



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101981056 B

(45) 授权公告日 2016.02.10

(21) 申请号 200980111007.8

(22) 申请日 2009.01.28

(30) 优先权数据

61/024,825 2008.01.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010.09.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/032220 2009.01.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/099829 EN 2009.08.13

(83) 生物保藏信息

ATCC HB-12215 1996.10.17

ATCC HB-12216 1996.10.17

ATCC CRL10463 1990.05.24

ATCC HB-12697 1999.04.08

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 里德·J·哈里斯

保罗·A·莫克尼克

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 张红春

(51) Int. Cl.

C07K 16/32(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101023100 A, 2007.08.22, 权利要求

1-23 及说明书第 7 页第 10 行至第 8 页第 25 行,说明书第 19 页第 22-30 行,说明书第 28 页第 3 行至第 66 页第 5 行,表 3A、3B,图 9A、9B.

CN 1299370 A, 2001.06.13, 全文.

WO 01061356 A1, 2001.08.23, 全文.

CN 101014366 A, 2007.08.08, 全文.

R. J. Harris et al. Identification of multiplesources of chargeheterogeneity in arecombinant antibody. 《Journal of Chromatography B》. 2001, 第 752 卷 233-245 页.

David B. Agus et al. Phase I Clinical Study of Pertuzumab, a Novel HER Dimerization Inhibitor, in Patients With Advanced Cancer. 《JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY》. 2005, 第 23 卷 (第 11 期), 2534-2543 页.

Melissa Perkins et al. Determination of the Origin of Charge Heterogeneity in a Murine Monoclonal Antibody. 《Pharmaceutical Research》. 2000, 第 17 卷 (第 9 期), 1110-1117 页.

审查员 彭海航

权利要求书2页 说明书41页
序列表17页 附图16页

(54) 发明名称

包含结合 HER2 结构域 II 的抗体及其酸性变体的组合物

(57) 摘要

描述了一种包含结合 HER2 结构域 II 的主要种类 HER2 抗体及其酸性变体的组合物。还公开了包含所述组合物的药物配制剂及所述组合物的治疗用途。

1. 一种包含结合 HER2 结构域 II 的主要种类 HER2 抗体及其酸性变体的组合物, 其中所述主要种类 HER2 抗体包含分别如 SEQ ID No. 15 和 16 所示的轻链和重链氨基酸序列, 且其中所述酸性变体为所述主要种类 HER2 抗体的糖化变体、脱酰胺变体、唾液酰化变体、二硫化物还原变体和不可还原变体, 其中二硫化物还原变体为有一个或多个形成二硫键的半胱氨酸被化学还原成游离硫醇形式的主要种类抗体变体, 且其中不可还原变体为不能通过还原剂处理被化学还原成重链和轻链的主要种类抗体变体。

2. 权利要求 1 的组合物, 其中所述酸性变体的量少于所述组合物的 25%。

3. 权利要求 1 或 2 的组合物, 其中所述主要种类 HER2 抗体和所述酸性变体都是完整抗体。

4. 权利要求 1-3 任一项的组合物, 其中所述组合物还包含所述主要种类 HER2 抗体的氨基末端前导延伸变体。

5. 权利要求 4 的组合物, 其中所述氨基末端前导延伸包含 VHS-。

6. 权利要求 5 的组合物, 其中所述氨基末端前导延伸由 VHS- 组成。

7. 权利要求 1-6 任一项的组合物, 其中所述组合物还包含所述主要种类 HER2 抗体的选自下组的氨基酸序列变体: 在其一条或两条重链上包含 C 末端赖氨酸残基的抗体, 和具有一个或多个氧化的甲硫氨酸残基的抗体。

8. 权利要求 1-7 任一项的组合物, 其进一步包含 Trastuzumab。

9. 权利要求 1-7 任一项的组合物在制备用于治疗患者中癌症的药物中的用途, 其中所述癌症为乳腺癌、胃癌、或卵巢癌。

10. 权利要求 9 的用途, 其中所述药物与 Trastuzumab 组合用于治疗癌症。

11. 一种药物配制剂, 其在药学可接受载体中包含权利要求 1-8 任一项的组合物。

12. 权利要求 11 的药物配制剂, 该药物配制剂是无菌的。

13. 一种包含主要种类 HER2 抗体及其酸性变体的组合物, 其中所述主要种类 HER2 抗体包含分别如 SEQ ID No. 15 和 16 所示的轻链和重链氨基酸序列, 且其中所述酸性变体为糖化变体、脱酰胺变体、二硫化物还原变体、唾液酰化变体和不可还原变体, 其中所述酸性变体的量少于所述组合物的 25%, 且其中所述酸性变体具有与所述主要种类 HER2 抗体基本上相同的药动学, 其中二硫化物还原变体为有一个或多个形成二硫键的半胱氨酸被化学还原成游离硫醇形式的主要种类抗体变体, 且其中不可还原变体为不能通过还原剂处理被化学还原成重链和轻链的主要种类抗体变体。

14. 一种药物配制剂, 其在药学可接受载体中包含权利要求 13 的组合物。

15. 一种药物组合物, 其包含:

(a) 主要种类 HER2 抗体, 其包含分别如 SEQ ID No. 15 和 16 所示的轻链和重链氨基酸序列;

(b) 所述主要种类 HER2 抗体的酸性变体, 其中所述酸性变体为糖化变体、脱酰胺变体、二硫化物还原变体、唾液酰化变体和不可还原变体, 其中所述酸性变体的量少于所述组合物的 25%, 且其中所述酸性变体具有与所述主要种类 HER2 抗体基本上相同的药动学; 和

(c) 药学可接受载体,

其中二硫化物还原变体为有一个或多个形成二硫键的半胱氨酸被化学还原成游离硫醇形式的主要种类抗体变体, 且其中不可还原变体为不能通过还原剂处理被化学还原成重

链和轻链的主要种类抗体变体。

包含结合 HER2 结构域 II 的抗体及其酸性变体的组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2008 年 1 月 30 日提交的美国临时专利申请 No. 61/024825 的权益, 通过述及其公开内容完整收入本文用于所有目的。

发明领域

[0003] 本发明关注包含结合 HER2 结构域 II 的主要种类 HER2 抗体及其酸性变体的组合物。本发明还涉及包含所述组合物的药物配制剂及所述组合物的治疗用途。

[0004] 发明背景

[0005] HER2 抗体

[0006] 受体酪氨酸激酶的 HER 家族是细胞生长、分化和存活的重要介质。该受体家族包括四个独特的成员: 表皮生长因子受体 (EGFR、ErbB1 或 HER1)、HER2 (ErbB2 或 p185^{neu})、HER3 (ErbB3) 和 HER4 (ErbB4 或 tyro2)。

[0007] 由 *erbB1* 基因编码的 EGFR 已被认为是人类恶性肿瘤的病因。具体而言, 在乳腺癌、膀胱癌、肺癌、头癌、颈癌和胃癌以及成胶质细胞瘤中已经观察到 EGFR 表达的升高。EGFR 受体表达的升高常常与 EGFR 配体, 转化生长因子 α (TGF- α) 的产量增加有关, 这样的肿瘤细胞通过自分泌刺激途径导致受体活化。Baselga and Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64:127-154(1994)。针对 EGFR 或其配体 TGF- α 或 EGF 的单克隆抗体已经作为治疗此类恶性肿瘤的治疗剂进行了评估。参见例如 Baselga and Mendelsohn, 见上文; Masui et al., *Cancer Research* 44:1002-1007(1984); 及 Wu et al., *J. Clin. Invest.* 95:1897-1905(1995)。

[0008] HER 家族的第二个成员 p185^{neu} 最初被鉴定成转化基因的产物, 来自经化学处理的大鼠的成神经细胞瘤。neu 原癌基因的活化形式产生自所编码蛋白质跨膜区中的点突变 (缬氨酸变成谷氨酸)。在乳腺癌和卵巢癌中观察到 neu 的人同系物的扩增, 而且这与预后不良有关 (Slamon et al, *Science* 235:177-182(1987); Slamon et al., *Science* 244:707-712(1989); 及美国专利 4,968,603)。迄今为止, 对于人类肿瘤尚无 neu 原癌基因中与之类似的点突变的报道。在其它癌瘤中也已观察到 HER2 的过表达 (频繁但不均一, 原因在于基因扩增), 包括胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰和膀胱的癌瘤。参见 King et al., *Science* 229:974(1985); Yokota et al., *Lancet* 1:765-767(1986); Fukushige et al., *Mol. Cell Biol.* 6:955-958(1986); Guerin et al., *Oncogene Res.* 3:21-31(1988); Cohen et al., *Oncogene* 4:81-88(1989); Yonemura et al., *Cancer Res.* 51:1034(1991); Borst et al., *Gynecol. Oncol.* 38:364(1990); Weinere et al., *Cancer Res.* 50:421-425(1990); Kern et al., *Cancer Res.* 50:5184(1990); Park et al., *Cancer Res.* 49:6605(1989); Zhau et al., *Mol. Carcinog.* 3:254-257(1990); Aasland et al., *Br. J. Cancer* 57:358-363(1988); Williams et al., *Pathobiology* 59:46-52(1991); 及 McCann et al., *Cancer* 65:88-92(1990) 等。HER2 可在前列腺癌中过表达 (Gu et al., *Cancer Lett.* 99:185-9(1996); Ross et al., *Hum. Pathol.* 28:827-33(1997); Ross et

al., *Cancer* 79 :2162-70(1997) ;及 Sadasivan et al., *J. Urol.* 150 :126-31(1993))。

[0009] 已经描述了针对大鼠 p185^{neu}和人 HER2 蛋白质产物的抗体。Drebin 及其同事制备了针对大鼠 neu 基因产物, p185^{neu}的抗体。参见例如 Drebin et al., *Cell* 41 :695-706(1985) ;Myers et al., *Meth. Enzym.* 198 :277-290(1991) ;及 W094/22478。Drebin et al., *Oncogene* 2 :273-277(1988) 报道了与 p185^{neu}的两个独特区域有反应性的抗体混合物对植入裸鼠的 neu 转化 NIH-3T3 细胞产生协同的抗肿瘤作用。还可参见 1998 年 10 月 20 日发布的美国专利 5,824,311。

[0010] Hudziak et al., *Mol. Cell. Biol.* 9(3) :1165-1172(1989) 描述了一组 HER2 抗体的生成,并利用人乳房肿瘤细胞系 SK-BR-3 鉴定。通过 72 小时后单层细胞的结晶紫染色测定了暴露于抗体后 SK-BR-3 细胞的相对细胞增殖。利用此测定法,用称作 4D5 的抗体获得了最大抑制,它抑制细胞增殖达 56%。该组其它抗体在此测定法中以较低程度降低细胞增殖。还发现抗体 4D5 使过表达 HER2 的乳房肿瘤细胞系对 TNF- α 的细胞毒性作用变得敏感。还可参见 1997 年 10 月 14 日发布的美国专利 5,677,171。Hudziak 等人的文章中讨论的抗体还在以下文献中进行了鉴定:Fendly et al., *Cancer Research* 50 :1550-1558(1990) ;Kotts et al., *In Vitro* 26(3) :59A(1990) ;Sarup et al., *Growth Regulation* 1 :72-82(1991) ;Shepard et al., *J. Clin. Immunol.* 11(3) :117-127(1991) ;Kumar et al., *Mol. Cell. Biol.* 11(2) :979-986(1991) ;Lewis et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 37 :255-263(1993) ;Pietras et al., *Oncogene* 9 :1829-1838(1994) ;Vitetta et al., *Cancer Research* 54 :5301-5309(1994) ;Sliwowski et al., *J. Biol. Chem.* 269(20) :14661-14665(1994) ;Scott et al., *J. Biol. Chem.* 266 :14300-5(1991) ;D' Souza et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91 :7202-7206(1994) ;Lewis et al., *Cancer Research* 56 :1457-1465(1996) ;及 Schaefer et al., *Oncogene* 15 :1385-1394(1997)。

[0011] 鼠 HER2 抗体 4D5 的重组人源化型式 (huMAb4D5-8、rhuMAb HER2、Trastuzumab 或 **HERCEPTIN[®]** ;美国专利 5,821,337) 在临床上对患有 HER2 过表达的转移性乳腺癌并已接受广泛的早期抗癌疗法的患者起作用 (Baselga et al., *J. Clin. Oncol.* 14 :737-744(1996))。Trastuzumab 在 1998 年 9 月 25 日得到了食品和药品管理局的销售许可,可用于治疗所患肿瘤过表达 HER2 蛋白质的转移性乳腺癌患者。

[0012] 以下文献中描述了具有各种特性的其它 HER2 抗体:Tagliabue et al., *Int. J. Cancer* 47 :933-937(1991) ;McKenzie et al., *Oncogene* 4 :543-548(1989) ;Maier et al., *Cancer Res.* 51 :5361-5369(1991) ;Bacus et al., *Molecular Carcinogenesis* 3 :350-362(1990) ;Stancovski et al., *PNAS(USA)* 88 :8691-8695(1991) ;Bacus et al., *Cancer Research* 52 :2580-2589(1992) ;Xu et al., *Int. J. Cancer* 53 :401-408(1993) ;W094/00136 ;Kasprzyk et al., *Cancer Research* 52 :2771-2776(1992) ;Hancock et al., *Cancer Res.* 51 :4575-4580(1991) ;Shawver et al., *Cancer Res.* 54 :1367-1373(1994) ;Arteaga et al., *Cancer Res.* 54 :3758-3765(1994) ;Harwerth et al., *J. Biol. Chem.* 267 :15160-15167(1992) ;美国专利 5,783,186 ;及 Klapper et al., *Oncogene* 14 :2099-2109(1997)。

[0013] 同源性筛选使得 HER 受体家族的两个其它成员得以鉴定:HER3(美国专利 5,183,884 和 5,480,968 以及 Kraus et al., *PNAS(USA)* 86 :9193-9197(1989)) 和 HER4(欧

洲专利申请 599,274 ;Plowman et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90 :1746-1750(1993) ;及 Plowman et al., Nature 366 :473-475(1993))。这两种受体均在至少有些乳癌细胞系中显示表达升高。

[0014] 通常发现 HER 受体在细胞中有多种组合,而且认为它的二聚化增加了对各种 HER 配体的细胞应答的多样性 (Earp et al., Breast Cancer Research and Treatment 35 :115-132(1995))。EGFR 受到 6 种不同配体的结合:表皮生长因子 (EGF)、转化生长因子 α (TGF- α)、双调蛋白、肝素结合表皮生长因子 (HB-EGF)、betacellulin 和 epiregulin(Groenen et al., Growth Factors 11 :235-257(1994))。由单一基因的可变剪接产生的一个调蛋白蛋白质家族是 HER3 和 HER4 的配体。调蛋白家族包括 α 、 β 和 γ 调蛋白 (Holmes et al., Science 256 :1205-1210(1992) ;美国专利 5,641,869 ;及 Schaefer et al., Oncogene 15 :1385-1394(1997)) ;neu 分化因子 (NDF) ;神经胶质生长因子 (GGF) ;乙酰胆碱受体诱导活性 (ARIA) ;及感觉和运动神经元衍生因子 (SMDF)。有关综述参见 Groenen et al., Growth Factors 11 :235-257(1994) ;Lemke,G, Molec. & Cell. Neurosci. 7 :247-262(1996) ;及 Lee et al., Pharm. Rev. 47 :51-85(1995)。最近还鉴定了另外三种 HER 配体:神经调节蛋白 -2(NRG-2),据报道它结合 HER3 或 HER4(Chang et al., Nature 387 :509-512(1997) ;及 Carraway et al., Nature 387 :512-516(1997)) ;神经调节蛋白 -3,它结合 HER4(Zhang et al., PNAS(USA)94(18) :9562-7(1997)) ;和神经调节蛋白 -4,它结合 HER4(Harari et al., Oncogene 18 :2681-89(1999))。HB-EGF、betacellulin 和 epiregulin 也结合 HER4。

[0015] 尽管 EGF 和 TGF α 不结合 HER2,但是 EGF 刺激 EGFR 和 HER2 形成异二聚体,它活化 EGFR 并导致异二聚体中 HER2 的转磷酸作用。二聚化作用和 / 或转磷酸作用看来活化 HER2 酪氨酸激酶。参见 Earp et al., 见上文。同样,当 HER3 与 HER2 共表达时,形成有活性的信号复合物,而针对 HER2 的抗体能破坏此复合物 (Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269(20) :14661-14665(1994))。此外,在与 HER2 共表达时,HER3 对调蛋白 (HRG) 的亲合力提高到了较高的亲合力状态。关于 HER2-HER3 蛋白质复合物还可参见 Levi et al., Journal of Neuroscience 15 :1329-1340(1995) ;Morrissey et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92 :1431-1435(1995) ;及 Lewis et al., Cancer Res. 56 :1457-1465(1996)。HER4,与 HER3 类似,与 HER2 形成有活性的信号复合物 (Carraway and Cantley, Cell 78 :5-8(1994))。

[0016] 为了靶向 HER 信号途径,将 rhuMab 2C4(Pertuzumab) 开发成抑制 HER2 与其它 HER 受体二聚化的人源化抗体,从而抑制配体驱动的磷酸化作用和活化作用,及 RAS 和 AKT 途径的下游激活。在 Pertuzumab 作为治疗实体瘤的单一药剂的 I 期试验中,用 Pertuzumab 治疗患有晚期卵巢癌的 3 名受试者。一人具有持久的部分响应,而另一名受试者疾病稳定了 15 周。Agus et al.Proc AmSoc Clin Oncol 22 :192, Abstract 771(2003)。

[0017] 抗体变体组合物

[0018] 美国专利 6,339,142 描述了包含抗 HER2 抗体及其一种或多种酸性变体的混合物的 HER2 抗体组合物,其中所述酸性变体的量少于约 25%。Trastuzumab 是例示性的 HER2 抗体。

[0019] Reid 等人在充分表征的生物技术药物会议 (Well Characterized Biotech Pharmaceuticals Conference) (2003 年 1 月) 上呈现的海报 “Effects of Cell Culture

Process Changes on Humanized Antibody Characteristics”描述了一种未命名的人源化 IgG1 抗体组合物,它由于其重链上 VHS 信号肽、N- 末端谷氨酰胺和焦谷氨酸的组合而具有 N- 末端异质性。

[0020] Harris 等人在 IBC 抗体生成会议 (IBC Antibody Production Conference) (2002 年 2 月) 上所做的讲话“The Ideal Chromatographic Antibody Characterization Method”报告了人源化抗 IgE 抗体 E25 的重链上的 VHS 延伸。

[0021] Rouse 等人在 WCBP (2004 年 1 月 6-9 日) 上所做的演讲“‘Top Down’ Glycoprotein Characterization by High Resolution Mass Spectrometry and Its Application to Biopharmaceutical Development”描述了一种单克隆抗体组合物,它由于其轻链上的 ³AHS 或 ²HS 信号肽残基而具有 N- 末端异质性。

[0022] Jill Porter 在 IBC 会议 (2000 年 9 月) 上呈现的海报“Strategic Use of Comparability Studies and Assays for Well Characterized Biologicals”讨论了 ZENAPAX™ 的晚期洗脱形式,它在其重链上具有三个额外的氨基酸残基。

[0023] US2006/0018899 记载了一种包含主要种类 Pertuzumab 抗体及 Pertuzumab 抗体的氨基末端前导延伸变体以及其它变体形式的组合物。

[0024] 发明概述

[0025] 依照第一个方面,本发明关注一种包含结合 HER2 结构域 II 的主要种类 HER2 抗体及其酸性变体的组合物,其中所述酸性变体包括糖化变体 (glycated variant)、二硫化物还原变体 (disulfide reduced variant)、或不可还原变体 (non-reducible variant)。优选的是,所述酸性变体包括糖化变体、脱酰胺变体 (deamidated variant)、二硫化物还原变体、唾液酰化变体 (sialylated variant)、和不可还原变体。期望的是,所述酸性变体的量少于约 25%。

[0026] 在另一个方面,本发明提供一种包含主要种类 HER2 抗体及该主要种类抗体的酸性变体的组合物,其中所述主要种类 HER2 抗体包含 SEQ ID No. 3 和 4 中的可变轻链和可变重链,且其中所述酸性变体包括糖化变体、脱酰胺变体、二硫化物还原变体、唾液酰化变体、和不可还原变体。

[0027] 本发明还关注在药学可接受载体中包含所述组合物的药物配制剂。

[0028] 另外,本发明涉及一种治疗患者中 HER2 阳性癌症的方法,包括以有效治疗所述癌症的量对所述患者施用所述药物配制剂。就此类方法而言,如本文实施例中证明的,优选的是,所述主要种类抗体和酸性变体具有本质上相同的药动学。

[0029] 在另一个方面,本发明关注一种制备药物组合物的方法,包括:(1) 制备包含结合 HER2 结构域 II 的主要种类 HER2 抗体及其酸性变体的组合物,所述酸性变体包括糖化变体、二硫化物还原变体、或不可还原变体,并(2) 评估所述组合物中的所述酸性变体,并确定其量少于约 25%。在一个实施方案中,通过选自下组的方法来评估所述酸性变体:离子交换层析(其中所述组合物用唾液酸酶处理);有十二烷基硫酸钠的还原性毛细管电泳(CE-SDS);非还原性 CE-SDS;硼酸盐层析;和肽作图。

[0030] 附图简述

[0031] 图 1 提供了 HER2 蛋白质结构的示意图,及其胞外域的结构域 I-IV 的氨基酸序列(分别是 SEQ ID No. 19-22)。

[0032] 图 2A 和 2B 描绘了鼠源单克隆抗体 2C4 的轻链可变区 (V_L) (图 2A) 和重链可变区 (V_H) (图 2B) (分别是 SEQ ID No. 1 和 2); 人源化 2C4 型式 574 的 V_L 和 V_H 结构域 (分别是 SEQ ID No. 3 和 4), 及人 V_L 和 V_H 共有框架 (hum κ 1, 轻链 κ 亚组 I; hum III, 重链亚组 III) (分别是 SEQ ID No. 5 和 6) 的氨基酸序列对比。星号标示人源化 2C4 型式 574 和鼠源单克隆抗体 2C4 之间或人源化 2C4 型式 574 和人框架之间的差异。互补决定区 (CDR) 在括号中。

[0033] 图 3A 和 3B 显示了 Pertuzumab 轻链 (SEQ ID No. 15) 和重链 (SEQ ID No. 16) 的氨基酸序列。CDR 以粗体显示。碳水化合物模块 (moiety) 附着于重链的 Asn299。

[0034] 图 4A 和 4B 显示了 Pertuzumab 轻链 (SEQ ID No. 17) 和重链 (SEQ ID No. 18) 的氨基酸序列, 各自包含完整的氨基末端信号肽序列。

[0035] 图 5 以图描述了 2C4 在 HER2 的异二聚体结合位点处的结合, 由此阻止与活化的 EGFR 或 HER3 的异二聚化。

[0036] 图 6 描绘了 HER2/HER3 与 MAPK 和 Akt 途径的偶联。

[0037] 图 7 比较了 Trastuzumab 和 Pertuzumab 的活性。

[0038] 图 8A 和 8B 显示了 Trastuzumab 轻链 (SEQ ID No. 13) 和重链 (SEQ ID No. 14) 的氨基酸序列。

[0039] 图 9A 和 9B 描绘了变体 Pertuzumab 轻链序列 (SEQ ID No. 23) 和变体 Pertuzumab 重链序列 (SEQ ID No. 24)。

[0040] 图 10 显示了阳离子交换 MP (主峰) 和 AV (酸性变体) 的分离、细胞培养、回收、和 PK (药动学) 评估和分析测试的实验设计。新鲜的培养基 = 标准培养基; 用过的培养基 = 细胞培养 12 天后的标准培养基, 通过离心来除去细胞。不控制溶解氧、pH、和其它参数。

[0041] 图 11 显示了来自实施例 1 的典型 DIONEX PROPACJ 阳离子交换 (CEX) 层析图。

[0042] 图 12 显示了对 Pertuzumab 起始材料和 CEX 级分的分析。AV = 酸性变体; MP = 主峰; 而 BV = 碱性变体。

[0043] 图 13 揭示了掺入细胞培养物并温育 12 天的主峰 (MP) 的 CEX。

[0044] 图 14 描述了主峰温育条件。

[0045] 图 15 概述了用于表征酸性变体的方法。

[0046] 图 16 显示了实施例 1 中 PK 研究中的 Pertuzumab 浓度对时间的关系。

[0047] 图 17 提供了来自实施例 1 中 PK 研究的曲线下面积 (AUC) 和几何均值比。

[0048] 优选实施方案的详述

[0049] I. 定义

[0050] 术语“主要种类抗体”在本文中指组合物中这样的抗体氨基酸序列结构, 它是该组合物中在数量上占绝大多数的抗体分子。优选的是, 主要种类抗体是 HER2 抗体, 诸如结合 HER2 结构域 II 的抗体、比 Trastuzumab 更有效地抑制 HER 二聚化的抗体、和 / 或结合 HER2 的异二聚体结合位点的抗体。本文中主要种类抗体的优选实施方案是包含 SEQ ID No. 3 和 4 中的轻链和重链可变区氨基酸序列的抗体, 且最优选包含 SEQ ID No. 15 和 16 中的轻链和重链氨基酸序列 (Pertuzumab)。

[0051] “氨基酸序列变体”抗体在本文中指具有与主要种类抗体不同的氨基酸序列的抗体。通常, 氨基酸序列变体将与主要种类抗体具有至少约 70% 的同源性, 而且优选的是, 它

们将是与主要种类抗体至少约 80%，且更优选至少约 90% 同源。氨基酸序列变体在主要种类抗体氨基酸序列内部或邻近的某些位置具有替代、删除和 / 或添加。本文中氨基酸序列变体的例子包括酸性变体（如脱酰胺抗体变体）、碱性变体、在其一条或两条轻链上具有氨基末端前导延伸（如 VHS-）的抗体、在其一条或两条重链上具有 C- 末端赖氨酸残基的抗体、具有一个或多个氧化后甲硫氨酸残基的抗体等，且包括重链和 / 或轻链氨基酸序列变异的组合。

[0052] “酸性变体”指比主要种类抗体更加酸性的主要种类抗体的变体。相对于主要种类抗体，酸性变体已经获得了负电荷或损失了正电荷。此类酸性变体可以使用依照电荷将蛋白质分开的分离方法（诸如离子交换层析）来解析。在通过阳离子交换层析分离时，主要种类抗体的酸性变体比主峰先洗脱。

[0053] “二硫化物还原变体”有一个或多个形成二硫键的半胱氨酸被化学还原成游离硫醇形式。这种变体可以通过疏水相互作用层析或通过分筛方法（诸如有十二烷基硫酸钠的毛细管电泳（CE-SDS））来监测，例如如实施例 1 中所描述的。

[0054] 在本文中，“不可还原变体”指不能通过还原剂（诸如二硫苏糖醇）处理被化学还原成重链和轻链的主要种类抗体变体。此类变体可以通过用还原剂处理组合物并使用评估蛋白质大小的方法（诸如有十二烷基硫酸钠的毛细管电泳（CE-SDS））评估所得组合物来评估，例如使用下文实施例 1 中描述的技术。

[0055] “糖基化变体 (glycosylation variant)”抗体在本文中是指有一个或多个碳水化合物模块附着于它的抗体，所述碳水化合物与附着于主要种类抗体的一个或多个碳水化合物模块不同。本文中糖基化变体的例子包括有 G1 或 G2 寡糖结构代替 G0 寡糖结构附着于其 Fc 区的抗体、有一个或多个碳水化合物模块附着于其一条或两条轻链的抗体、没有碳水化合物模块附着于其一条或两条重链的抗体、唾液酸化的抗体等，以及这些糖基化改变的组合。

[0056] 若抗体具有 Fc 区，则本文中诸如图 14 所示的寡糖结构可附着于抗体的一条或两条重链，如位于残基 299。对于 Pertuzumab，G0 是最主要的寡糖结构，而在 Pertuzumab 组合物中发现其它寡糖结构，诸如 G0-F、G-1、Man5、Man6、G1-1、G1(1-6)、G1(1-3) 和 G2 的量较少。

[0057] 除非另有说明，“G1 寡糖结构”在本文中包括 G1(1-6) 和 G1(1-3) 结构。

[0058] 为本文目的，“唾液酰化变体”指如下的主要种类抗体变体，其包含附着至其一条或两条重链的一个或多个唾液酰化碳水化合物模块。唾液酰化变体可以通过在有或没有唾液酸酶处理的情况下评估组合物（例如通过离子交换层析）来鉴定，例如如实施例中所描述的。

[0059] “糖化变体”指共价附着有糖（诸如葡萄糖）的抗体。这种添加可以通过葡萄糖与蛋白质上的赖氨酸残基起反应（例如在细胞培养基）来发生。糖化变体可以通过对还原的抗体的质谱术分析（评估重链或轻链质量的增加）来鉴定。糖化变体还可以通过硼酸盐层析来定量，如下文实施例 1 中所解释的。糖化变体与糖基化变体不同。

[0060] “脱酰胺”抗体指其中一个或多个天冬酰胺残基衍生成例如天冬氨酸、琥珀酰亚胺或异天冬氨酸的抗体。脱酰胺抗体的一个例子是 Pertuzumab 变体，其中 Pertuzumab 的一条或两条重链上的 Asn-386 和 / 或 Asn-391 是脱酰胺的。

[0061] “氨基末端前导延伸变体”在本文中指在主要种类抗体的任何一条或多条重链或轻链的氨基末端处有一个或多个氨基酸残基的氨基末端前导序列的主要种类抗体。例示性的氨基末端前导延伸包含三个氨基酸残基、VHS 或由其组成,它们存在于抗体变体的一条或所有两条轻链上。

[0062] “同源性”定义为在必要时对比序列和引入缺口以获取最大百分比同一性后,氨基酸序列变体中相同残基的百分比。用于对比的方法和计算机程序在本领域是众所周知的。一种这样的计算机程序是“Align 2”,由 Genentech, Inc. 创作,已经在 1991 年 12 月 10 日与用户文档 (user documentation) 一起提交给美国版权局 (Washington, DC 20559)。

[0063] 为了本文的目的,“阳离子交换分析”指根据电荷差异利用阳离子交换剂将包含两种或多种化合物的组合物分开的任何方法。阳离子交换剂通常包含共价结合的,带负电荷的基团。优选的是,本文中的阳离子交换剂是弱阳离子交换剂和 / 或包含羧酸盐 / 酯官能团,诸如 Dionex 出售的 PROPAC WCX-10™阳离子交换柱。

[0064] “HER 受体”是属于 HER 受体家族的受体蛋白质酪氨酸激酶,包括 EGFR、HER2、HER3 和 HER4 受体及未来将鉴定的此家族其它成员。HER 受体通常将包含胞外结构域,它可结合 HER 配体;亲脂性跨膜结构域;保守的胞内酪氨酸激酶结构域;和含有几个可被磷酸化的酪氨酸残基的羧基末端信号结构域。优选的是,HER 受体是天然序列人 HER 受体。

[0065] HER2 的胞外域包含 4 个结构域:结构域 I(大约第 1-195 位氨基酸残基)、结构域 II(大约第 196-319 位氨基酸残基)、结构域 III(大约第 320-488 位氨基酸残基)和结构域 IV(大约第 489-630 位氨基酸残基)(残基编号不包括信号肽)。参见 Garrett et al., Mol. Cell. 11 :495-505(2003);Cho et al., Nature 421 :756-760(2003);Franklin et al., Cancer Cell 5 :317-328(2004);或 Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90 :1746-1750(1993)。还可参见本文图 1。

[0066] 术语“ErbB1”、“HER1”、“表皮生长因子受体”和“EGFR”在本文中可互换使用,指例如 Carpenter et al., Ann. Rev. Biochem. 56 :881-914(1987) 中公开的 EGFR,包括其天然存在的突变体形式(如 Humphrey et al., PNAS(USA) 87 :4207-4211(1990) 中的删除突变体 EGFR)。erbB1 指编码 EGFR 蛋白质产物的基因。

[0067] 表述“ErbB2”和“HER2”在本文中可互换使用,指例如 Semba et al., PNAS(USA) 82 :6497-6501(1985) 和 Yamamoto et al., Nature 319 :230-234(1986) 中描述的人 HER2 蛋白(Genebank 编号 X03363)。术语“erbB2”指编码人 ErbB2 的基因,而“neu”指编码大鼠 p185^{neu}的基因。优选的 HER2 是天然序列人 HER2。

[0068] “ErbB3”和“HER3”指例如美国专利 5,183,884 和 5,480,968 及 Kraus et al., PNAS(USA) 86 :9193-9197(1989) 中公开的受体多肽。

[0069] 术语“ErbB4”和“HER4”在本文中指例如欧洲专利申请 599,274;Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :1746-1750(1993);及 Plowman et al., Nature 366 :473-475(1993) 中公开的受体多肽,包括其同种型(isoform),例如 1999 年 4 月 22 日出版的 W099/19488 中所公开的。

[0070] “HER 配体”指结合和 / 或活化 HER 受体的多肽。本文中特别感兴趣的 HER 配体是天然序列人 HER 配体,诸如表皮生长因子(EGF)(Savage et al., J. Biol. Chem. 247 :7612-7621(1972));转化生长因子 α (TGF- α)(Marquardt et al., Science 223 :

1079-1082(1984)); 双调蛋白, 又称为施旺细胞瘤 (schwannoma) 或角质形成细胞自分泌生长因子 (Shoyab et al., Science 243:1074-1076(1989); Kimura et al., Nature 348:257-260(1990); 及 Cook et al., Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557(1991)); betacellulin (Shing et al., Science 259:1604-1607(1993); 及 Sasada et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173(1993)); 肝素结合表皮生长因子 (HB-EGF) (Higashiyama et al., Science 251:936-939(1991)); epiregulin (Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270:7495-7500(1995); 及 Komurasaki et al., Oncogene 15:2841-2848(1997)); α 调蛋白 (见下文); 神经调节蛋白-2 (NRG-2) (Carraway et al., Nature 387:512-516(1997)); 神经调节蛋白-3 (NRG-3) (Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567(1997)); 神经调节蛋白-4 (NRG-4) (Harari et al., Oncogene 18:2681-89(1999)); 或 cripto (CR-1) (Kannan et al., J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335(1997))。结合 EGFR 的 HER 配体包括 EGF、TGF- α 、双调蛋白、betacellulin、HB-EGF 和 epiregulin。结合 HER3 的 HER 配体包括调蛋白。能够结合 HER4 的 HER 配体包括 betacellulin、epiregulin、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4 和调蛋白。

[0071] “调蛋白” (HRG) 在用于本文时指由调蛋白基因编码的多肽, 如美国专利 5,641,869 或 Marchionni et al., Nature 362:312-318(1993) 中所公开的。调蛋白的例子包括调蛋白- α 、调蛋白- β 1、调蛋白- β 2 和调蛋白- β 3 (Holmes et al., Science 256:1205-1210(1992); 及美国专利 5,641,869); neu 分化因子 (NDF) (Peles et al., Cell 69:205-216(1992)); 乙酰胆碱受体诱导活性 (ARIA) (Falls et al., Cell 72:801-815(1993)); 神经胶质生长因子 (GGF) (Marchionni et al., Nature 362:312-318(1993)); 感觉和运动神经元衍生因子 (SMDF) (Ho et al., J. Biol. Chem. 270:14523-14532(1995)); γ -调蛋白 (Schaefer et al., Oncogene 15:1385-1394(1997))。此术语包括天然序列 HRG 多肽的生物学活性片段和 / 或氨基酸序列变体, 诸如其 EGF 样结构域片段 (如 HRG β 1177-244)。

[0072] “HER 二聚体”在本文中是指包含至少两个不同 HER 受体的非共价结合二聚体。当表达两种或多种 HER 受体的细胞暴露于 HER 配体时可能形成此类复合物, 可通过免疫沉淀进行分离并通过 SDS-PAGE 进行分析, 如例如 Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665(1994) 中所述。此类 HER 二聚体的例子包括 EGFR-HER2、HER2-HER3 和 HER3-HER4 异二聚体。此外, HER 二聚体可包含与诸如 HER3、HER4 或 EGFR 等不同 HER 受体组合的两个或多个 HER2 受体。其它蛋白质, 诸如细胞因子受体亚基 (如 gp130) 可与所述二聚体结合。

[0073] HER2 上的“异二聚体结合位点”指 HER2 胞外域中在与 EGFR、HER3 或 HER4 形成二聚体时, 接触 EGFR、HER3 或 HER4 胞外域中某区域或与 EGFR、HER3 或 HER4 胞外域中某区域形成介面的区域。已发现所述区域在 HER2 的结构域 II 中。Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328(2004)。

[0074] “HER 活化”或“HER2 活化”指任一种或多种 HER 受体或 HER2 受体的活化或磷酸化作用。一般而言, HER 活化导致信号转导 (例如由 HER 受体胞内激酶结构域引起的, 磷酸化 HER 受体或底物多肽中的酪氨酸残基)。HER 活化可由结合包含目的 HER 受体的 HER 二聚体的 HER 配体介导。结合 HER 二聚体的 HER 配体可活化二聚体中一种或多种 HER 受体的激酶

结构域,从而导致一种或多种 HER 受体中酪氨酸残基的磷酸化作用和 / 或其它底物多肽中酪氨酸残基的磷酸化作用,诸如 Akt 或 MAPK 胞内激酶。

[0075] 术语“抗体”在本文中用最广的含义,具体覆盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(如双特异性抗体)、及抗体片段,只要它们展现所需生物学活性。

[0076] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指由一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同和 / 或结合相同表位,除了生产单克隆抗体的过程中可能产生的可能变体外,诸如本文描述的那些抗体。与典型的包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品不同,每种单克隆抗体针对抗原上的同一决定簇。除了它们的特异性以外,单克隆抗体的优越性体现在它们未受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”指示由基本上同质的抗体群获得的抗体的特征,并不解释为需要通过任何特定方法来生产抗体。例如,依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由 Kohler et al., Nature 256:495(1975) 描述的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组 DNA 方法来制备(参见例如美国专利 4,816,567)。“单克隆抗体”还可使用例如 Clackson et al., Nature 352:624-628(1991) 和 Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597(1991) 中描述的技术从噬菌体抗体库分离。

[0077] 单克隆抗体在本文中具体包括“嵌合”抗体,其中重链和 / 或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现所需生物学活性(美国专利 4,816,567;及 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855(1984))。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类动物(如旧大陆猴类(Old World Monkey)、猿等)的可变区抗原结合序列和人恒定区序列的“灵长类化(primatized)”抗体。

[0078] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0079] “完整抗体”指包含抗原结合可变区以及轻链恒定区(C_L)和重链恒定区 C_H1、C_H2 和 C_H3 的抗体。恒定区可以是天然序列恒定区(如人天然序列恒定区)或其氨基酸序列变体。优选的是,完整抗体具有一项或多项效应物功能,且包含附着于其一条或两条重链的寡糖结构。

[0080] 抗体“效应物功能”指那些可归于抗体 Fc 区(天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区)的生物学活性。抗体效应物功能的例子包括 C1q 结合;补体依赖性细胞毒性;Fc 受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(如 B 细胞受体;BCR)的下调等。

[0081] 术语“Fc 区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 C-端区域,包括天然序列 Fc 区和变异 Fc 区。虽然免疫球蛋白重链 Fc 区的边界可以变化,但是人 IgG 重链 Fc 区通常定义为自其 Cys226 或 Pro230 位置的氨基酸残基至羧基末端的区段。Fc 区的 C-末端赖氨酸(残基 447,依照 EU 编号系统)可以消除,例如在生产或纯化抗体的过程中,或者通过对编码抗体重链的核酸进行重组工程改造。因而,完整抗体组合物可以包括所有 K447 残基都被消除的抗体群、无一 K447 残基被消除的抗体群、或者混合了有 K447 残基的抗体和没有 K447

残基的抗体的抗体群。

[0082] 除非本文另有说明,免疫球蛋白重链的残基编号方式是如 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) 中的 EU 索引的编号方式。“如 Kabat 中的 EU 索引”指人 IgG1 EU 抗体的残基编号方式。

[0083] 根据完整抗体的重链恒定区的氨基酸序列,可将其归入不同的“类”(class)。完整抗体有五种主要的类别:IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM,其中有些可进一步分为“亚类”(subclass)(同种型),如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。将与不同抗体类别对应的重链恒定区分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的。

[0084] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指由细胞介导的反应,其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒性细胞(如天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞) 识别靶细胞上结合的抗体,随后引起靶细胞溶解。介导 ADCC 的主要细胞, NK 细胞,只表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 :457-92 (1991) 中第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目的分子的 ADCC 活性,可进行体外 ADCC 测定法,诸如美国专利 5,500,362 或 5,821,337 中所描述的。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。或者/另外,可在体内评估目的分子的 ADCC 活性,例如在动物模型中,诸如 Clynes et al., PNAS (USA) 95 :652-656 (1998) 中所公开的。

[0085] “人效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并行使效应物功能的白细胞。优选的是,该细胞至少表达 Fc γ RIII 并执行 ADCC 效应物功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单核细胞 (PBMC)、天然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞,优选 PBMC 和 NK 细胞。效应细胞可以从其天然来源中分离,例如血液或 PBMC,正如本文所述。

[0086] 术语“Fc 受体”和“FcR”用于描述与抗体 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。此外,优选的 FcR 是与 IgG 抗体结合的 FcR (γ 受体),包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA (“活化受体”) 和 Fc γ RIIB (“抑制受体”),它们具有相似的氨基酸序列,区别主要在于其胞质域。活化受体 Fc γ RIIA 在其胞质域中包含免疫受体基于酪氨酸的活化基序 (ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其胞质域中包含免疫受体基于酪氨酸的抑制基序 (ITIM) (参见综述 Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15 :203-234 (1997))。FcR 的综述参见 Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9 :457-492 (1991); Capel et al., Immunomethods 4 :25-34 (1994); 及 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126 :330-341 (1995))。术语“FcR”在本文中涵盖其它 FcR,包括未来将会鉴定的 FcR。该术语还包括新生儿受体, FcRn, 它负责将母体的 IgG 转移给胎儿 (Guyer et al., J. Immunol. 117 :587 (1976) 和 Kim et al., J. Immunol. 24 :249 (1994))。

[0087] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指在存在补体时分子溶解靶物的能力。补体激活途径是由补体系统第一组分 (C1q) 结合与关联抗原复合的分子(如抗体)起始的。为了评估补体激活,可进行 CDC 测定法,例如 Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202 :163 (1996) 中所描述的。

[0088] “天然抗体”通常是由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成的约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链中有所变化。每条重链和轻链还具有间隔规律的链内二硫桥。每条重链在一端具有一个可变区(V_H),接着是多个恒定区。每条轻链在一端具有一个可变区(V_L),而另一端是一个恒定区。轻链的恒定区与重链的第一恒定区排列在一起,而轻链的可变区与重链的可变区排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。

[0089] 术语“可变的”指可变区中的某些部分在抗体序列中差异广泛且用于每种特定抗体针对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而,变异性并非均匀分布于抗体的整个可变区。它集中于轻链和重链可变区中称作高变区的三个区段。可变区中更加高度保守的部分称作框架区(FR)。天然重链和轻链的可变区各自包含四个FR,它们大多采取 β -折叠构象,通过形成环状连接且在有些情况中形成 β -折叠结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过FR非常接近的保持在一起,并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人,《Sequences of Proteins of Immunological Interest》,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991)。恒定区不直接涉及抗体与抗原的结合,但展现多种效应物功能,诸如抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)中抗体的参与。

[0090] 术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如轻链可变区中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)及重链可变区中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等人,《Sequences of Proteins of Immunological Interest》,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991)和/或那些来自“高变环”的残基(例如轻链可变区中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)及重链可变区中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917(1987))。“框架区”或“FR”残基指本文定义的高变区残基以外的可变区残基。

[0091] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段,称作“Fab”片段,各自具有一个抗原结合位点,和一个残余“Fc”片段,其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段,它具有两个抗原结合位点,并且仍能够交联抗原。

[0092] “Fv”是包含完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密、非共价结合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体组成。正是在这种构造中,各个可变区的三个高变区相互作用而在 V_H - V_L 二聚体表面确定了一个抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变区(或只包含对抗原特异的三个高变区的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力低于完整结合位点。

[0093] Fab片段还包含轻链的恒定区和重链的第一恒定区(CH1)。Fab'片段因在重链CH1结构域的羧基末端增加了少数残基而与Fab片段有所不同,包括来自抗体较链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对其中恒定区的半胱氨酸残基携带至少一个游离硫醇基的Fab'的称谓。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为成对Fab'片段生成的,在Fab'片段之间具有较链半胱氨酸。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0094] 来自任何脊椎动物物种的抗体的“轻链”,根据其恒定区的氨基酸序列,可归入两

种截然不同类型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

[0095] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域,其中这些结构域存在于一条多肽链上。优选的是,该 Fv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含多肽接头,使得 scFv 形成抗原结合所需的结构。关于 scFv 的综述参见 Plückthun,在《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》中,第 113 卷,Rosenburg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, 269-315, 1994。HER2 抗体 scFv 片段描述于 W093/16185 ;美国专利 5, 571, 894 ;和美国专利 5, 587, 458。

[0096] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段,该片段在同一条多肽链 (V_H - V_L) 中包含相连的重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对,迫使结构域与另一条链的互补结构域配对,并产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的描述于例如 EP 404, 097 ;W0 93/11161 ;和 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448(1993)。

[0097] 非人(如啮齿类)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的高变区残基用具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常,人源化抗体将包含基本上不少于至少一个、通常两个如下可变区,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有的 FR 是人免疫球蛋白序列的 FR。任选的是,人源化抗体还将包含至少部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones et al., Nature 321 :522-525(1986) ;Riechmann et al., Nature 332 :323-329(1988) ;及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2 :593-596(1992)。

[0098] 人源化 HER2 抗体包括 huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7 和 huMAb4D5-8 或 Trastuzumab (**HERCEPTIN®**), 如美国专利 5, 821, 337 的表 3 中所述,明确收入本文作为参考;人源化 520C9(W093/21319) 和人源化 2C4 抗体,如本文所述。

[0099] 为了本文的目的,“Trastuzumab”、“**HERCEPTIN®**”和“huMAb4D5-8”指包含分别在 SEQ ID No. 13 和 14 中的轻链和重链氨基酸序列的抗体。

[0100] 在本文中,“Pertuzumab”和“rhuMAb 2C4”指包含分别在 SEQ ID No. 3 和 4 中的轻链和重链可变区氨基酸序列的抗体。若 Pertuzumab 是完整抗体,则它优选包含分别在 SEQ ID No. 15 和 16 中的轻链和重链氨基酸序列。

[0101] “裸抗体”指未偶联异源分子,诸如细胞毒性模块或放射性标记物的抗体(如本文所定义的)。

[0102] “分离的”抗体指已经由其天然环境的成分鉴别和分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染成分指将会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至(1)根据 Lowry 法的测定,抗体重量超过 95%,最优选重量超过 99%,(2)足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)通过使用考马斯蓝或优选银染的还原或

非还原条件下的 SDS-PAGE 达到同质。既然抗体的天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0103] “比 Trastuzumab 更有效的抑制 HER 二聚化的”HER2 抗体指比 Trastuzumab 更有效(例如有效性提高至少约 2 倍)的减少或消除 HER 二聚体的抗体。优选的是,这样的抗体至少大约像选自下组的抗体那样有效的抑制 HER 二聚化:鼠单克隆抗体 2C4、鼠单克隆抗体 2C4 的 Fab 片段、完整的 Pertuzumab、和 Pertuzumab 的 Fab 片段。可直接通过研究 HER 二聚体,或者通过评估由 HER 二聚化引起的 HER 活化或下游信号传导,和/或通过评估抗体-HER2 结合位点等来评估对 HER 二聚化的抑制。用于筛选有能力比 Trastuzumab 更有效的抑制 HER 二聚化的抗体的测定法见 Agus et al., *Cancer Cell* 2:127-137(2002) 和 W001/00245(Adams et al.)。只是作为例示,可通过评估例如下列各项来分析对 HER 二聚化的抑制:对 HER 二聚体形成的抑制(参见例如 Agus et al., *Cancer Cell* 2:127-137(2002) 的附图 1A-B 和 W001/00245);表达 HER 二聚体的细胞中 HER 配体活化的降低(例如 W001/00245 和 Agus et al., *Cancer Cell* 2:127-137(2002) 的附图 2A-B);对 HER 配体结合表达 HER 二聚体的细胞的阻断(例如 W001/00245 和 Agus et al., *Cancer Cell* 2:127-137(2002) 的附图 2E);在存在(或缺乏)HER 配体时对表达 HER 二聚体的癌细胞(如 MCF7、MDA-MD-134、ZR-75-1、MD-MB-175、T-47D 细胞)的细胞生长的抑制(例如 W001/00245 和 Agus et al., *Cancer Cell* 2:127-137(2002) 的附图 3A-D);对下游信号传导的抑制(例如对 HRG 依赖性 AKT 磷酸化的抑制或对 HRG 或 TGF α 依赖性 MAPK 磷酸化的抑制)(参见例如 W001/00245 和 Agus et al., *Cancer Cell* 2:127-137(2002) 的附图 2C-D)。还可通过研究抗体-HER2 结合位点来评估抗体是否抑制 HER 二聚化,例如通过评估与 HER2 结合的抗体的结构或模型,诸如晶体结构(参见例如 Franklin et al., *Cancer Cell* 5:317-328(2004))。

[0104] HER2 抗体可比 Trastuzumab 更有效(例如有效性提高至少 2 倍)的“抑制 HRG 依赖性 AKT 磷酸化”和/或抑制“HRG 或 TGF α 依赖性 MAPK 磷酸化”(参见例如 Agus et al., *Cancer Cell* 2:127-137(2002) 和 W001/00245)。

[0105] HER2 抗体可以是“不抑制 HER2 胞外域切割”的抗体(Molina et al., *Cancer Res.* 61:4744-4749(2001))。

[0106] “结合 HER2 的异二聚体结合位点的”HER2 抗体结合结构域 II 中的残基(且任选还结合 HER2 的胞外域以外的其它结构域,诸如结构域 I 和 III 中的残基),且至少在一定程度上能在空间上阻碍 HER2-EGFR、HER2-HER3 或 HER2-HER4 异二聚体的形成。Franklin et al., *Cancer Cell* 5:317-328(2004) 表征了存放在 RCSB 蛋白质数据库(ID Code 1S78)的 HER2-Pertuzumab 晶体结构,举例说明了结合 HER2 的异二聚体结合位点的例示性抗体。

[0107] “结合 HER2 结构域 II 的”抗体结合结构域 II 中的残基和任选 HER2 的其它结构域,诸如结构域 I 和 III 中的残基。

[0108] “生长抑制剂”在用于本文时指在体外或在体内抑制细胞,尤其是表达 HER 的癌细胞生长的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可以是显著降低 S 期的表达 HER 细胞百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进(处于 S 期以外的位置)的药剂,诸如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药剂。经典的 M 期阻断剂包括长春花生物碱类(长春新碱和长春碱)、紫杉醇、和拓扑异构酶 II 抑制剂诸如多柔比星、表柔比星、柔红霉素、依托泊苷和博

来霉素。那些阻滞 G1 的药剂也溢出进入 S 期停滞,例如 DNA 烷化剂诸如他莫昔芬、泼尼松、达卡巴嗪、双氯乙基甲胺、顺铂、甲氨喋呤、5- 氟尿嘧啶和 ara-C。其它信息可参见在《The Molecular Basis of Cancer》中, Mendelsohn 和 Israel 编,第 1 章,题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antieoplastic drugs”, Murakaini 等人, WB Saunders, Philadelphia, 1995, 尤其是第 13 页。

[0109] “生长抑制性”抗体的例子是那些结合 HER2 并抑制过表达 HER2 的癌细胞生长的抗体。优选的生长抑制性 HER2 抗体在约 0.5-30 $\mu\text{g/ml}$ 的抗体浓度对细胞培养中 SK-BR-3 乳房肿瘤细胞的生长抑制大于 20%, 优选大于 50% (例如从约 50% 至约 100%), 其中生长抑制是在 SK-BR-3 细胞暴露于抗体后 6 天测定的 (参见 1997 年 10 月 14 日发布的美国专利 5,677,171)。该专利及下文中更详细的描述了 SK-BR-3 细胞生长抑制测定法。优选的生长抑制性抗体是鼠单克隆抗体 4D5 的人源化变体, 例如 Trastuzumab。

[0110] “诱导凋亡”的抗体指那些根据膜联蛋白 V 结合、DNA 断裂、细胞收缩、内质网膨胀、细胞破裂和 / 或膜囊形成 (称作凋亡小体) 的测定, 诱导程序性细胞死亡的抗体。所述细胞通常是过表达 HER2 受体的细胞。优选的是, 所述细胞是肿瘤细胞, 例如乳房、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰或膀胱细胞。在体外, 所述细胞可以是 SK-BR-3、BT474、Calu3 细胞、MDA-MB-453、MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。有多种方法可用于评估与凋亡有关的细胞事件。例如, 可通过膜联蛋白结合来测量磷脂酰丝氨酸 (PS) 易位; 可通过 DNA 梯化 (laddering) 来评估 DNA 断裂; 而可通过亚二倍体细胞的任何增加来评估伴随着 DNA 断裂的核 / 染色质浓缩。优选的是, 诱导凋亡的抗体是在使用 BT474 细胞的膜联蛋白结合测定法 (见下文) 中导致对膜联蛋白结合的诱导相对于未处理细胞提高约 2 至 50 倍, 优选约 5 至 50 倍, 最优选约 10 至 50 倍的抗体。诱导凋亡的 HER2 抗体的例子是 7C2 和 7F3。

[0111] “表位 2C4”指 HER2 胞外域中抗体 2C4 所结合的区域。为了筛选结合 2C4 表位的抗体, 可进行常规的交叉阻断测定法, 诸如《Antibodies, A Laboratory Manual》, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane, 1988 中所描述的。或者, 可使用本领域知道的方法进行表位作图以评估抗体是否结合 HER2 的 2C4 表位, 和 / 或可研究抗体 -HER2 结构 (Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328 (2004)) 以了解抗体结合 HER2 的哪个 / 些结构域。表位 2C4 包含来自 HER2 胞外域中结构域 II 的残基。2C4 和 Pertuzumab 在结构域 I、II 和 III 的连接处结合 HER2 的胞外域。Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328 (2004)。

[0112] “表位 4D5”指 HER2 胞外域中抗体 4D5 (ATCC CRL 10463) 和 Trastuzumab 所结合的区域。此表位接近 HER2 的跨膜域, 且在 HER2 的结构域 IV 之内。为了筛选结合 4D5 表位的抗体, 可进行常规的交叉阻断测定法, 诸如《Antibodies, A Laboratory Manual》, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane, 1988 中所描述的。或者, 可进行表位作图以评估抗体是否结合 HER2 的 4D5 表位 (例如大约第 529 位残基至大约第 625 位残基区域内的任何一个或多个残基, 含; 见图 1)。

[0113] “表位 7C2/7F3”指 HER2 胞外域的结构域 I 内 N 末端处 7C2 和 / 或 7F3 抗体 (各自保藏于 ATCC, 见下文) 所结合的区域。为了筛选结合 7C2/7F3 表位的抗体, 可进行常规的交叉阻断测定法, 诸如《Antibodies, A Laboratory Manual》, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane, 1988 中所描述的。或者, 可进行表位作图以确定抗体是否结合 HER2 上的 7C2/7F3 表位 (例如图 1 中 HER2 的大约第 22 位残基至大约第 53 位残基区域内

的任何一个或多个残基)。

[0114] “治疗”指治疗性处理和预防性措施二者。需要治疗的受试者包括早就患有疾病的受试者以及要预防疾病的受试者。因此,本文中待治疗的患者可能已经诊断为患有疾病或者可能有患上疾病的倾向性或易感性。

[0115] 术语“癌症”和“癌的”指的是或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调节的生理状况。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤(包括髓母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)、肉瘤(包括脂肪肉瘤和滑膜细胞肉瘤)、神经内分泌肿瘤(包括类癌瘤、胃泌素瘤和胰岛细胞癌)、间皮瘤、施旺细胞瘤(包括听神经瘤)、脑膜瘤、腺癌、黑素瘤、和白血病或淋巴样恶性肿瘤。这些癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌(如上皮鳞状细胞癌)、肺癌包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞癌、腹膜的癌症、肝细胞癌症、胃癌包括胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝瘤(hepatoma)、乳癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝的癌、肛门癌、阴茎癌、睾丸癌、食道癌、胆管肿瘤、及头和颈癌。

[0116] 术语“有效量”指在患者中有效治疗疾病的药物量。若疾病是癌症,则药物的有效量可减少癌细胞的数目;缩小肿瘤的尺寸;抑制(即减缓到一定程度和优选阻止)癌细胞浸润到周围器官中;抑制(即减缓到一定程度和优选阻止)肿瘤转移;在某种程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上减轻一种或多种与癌症有关的症状。在药物可阻止生长和/或杀死现有癌细胞的程度上,它可以是抑制细胞的和/或细胞毒性的。有效量可延长无进展存活,导致客观响应(包括部分响应,PR或完全响应,CR),增加总体存活时间,和/或改善癌症的一种或多种症状。

[0117] “HER2 阳性癌症”是包含在其细胞表面存在 HER2 蛋白质的细胞的癌症。

[0118] “过表达”HER 受体的癌症是与同一组织类型的非癌细胞相比,在其细胞表面具有显著更高水平的 HER 受体诸如 HER2 的癌症。这样的过表达可以由基因扩增或者转录或翻译增加引起的。可在诊断或预后测定法中通过评估细胞表面上存在的 HER 蛋白质水平的增加(例如通过免疫组化测定法, IHC)来确定 HER 受体的过表达。或者/另外,可测量细胞中编码 HER 的核酸的水平,例如通过荧光原位杂交(FISH;参见 1998 年 10 月公布的 W098/45479)、Southern 印迹或聚合酶链式反应(PCR)技术,诸如实时定量 PCR(RT-PCR)。还可通过测量生物学流体诸如血清中的脱落抗原(例如 HER 胞外域)来研究 HER 受体过表达(参见例如 1990 年 6 月 12 日发布的美国专利 4,933,294;1991 年 4 月 18 日发布的 W091/05264;1995 年 3 月 28 日发布的美国专利 5,401,638;及 Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80(1990))。除了上述测定法之外,熟练技术人员还可利用多种体内测定法。例如,可将患者体内细胞暴露于任选用可检测标记物例如放射性同位素标记的抗体,并且可评估抗体与患者体内细胞的结合,例如通过外部扫描放射性或通过分析取自事先已暴露于所述抗体的患者的活组织检查切片。

[0119] 相反,“不过表达 HER2 受体”的癌症是与同一组织类型的非癌细胞相比,不表达高于正常水平的 HER2 受体的癌症。

[0120] “过表达”HER 配体的癌症是与同一组织类型的非癌细胞相比,产生显著更高水平的该配体的癌症。这样的过表达可以由基因扩增或者转录或翻译增加引起的。可通过评估患者体内,例如肿瘤活组织检查切片中所述配体(或编码它的核酸)的水平,或者通过各

种诊断测定法诸如 IHC、FISH、Southern 印迹、PCR 或上文所述体内测定法在诊断上确定 HER 配体的过表达。

[0121] 术语“胞毒剂”在用于本文时指抑制或阻止细胞功能和 / 或引起细胞破坏的物质。该术语意欲包括放射性同位素 (如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、p³²和 Lu 的放射性同位素)、化疗剂、和毒素诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素, 包括其片段和 / 或变体。

[0122] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类, 诸如噻替哌 (thiotepa) 和环磷酰胺 (cyclophosphamide) (**CYTOXAN®**); 烷基磺酸酯类, 诸如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan); 氮丙啶类, 诸如苯佐替哌 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替哌 (meturedopa) 和乌瑞替哌 (uredopa); 乙撑亚胺类 (ethylenimine) 和甲基蜜胺类 (methylamelamine), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylolomelamine); 番荔枝内酯类 (acetogenin) (尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚 (曲大麻酚 (dronabinol), **MARINOL®**); β -拉帕醌 (lapachone); 拉帕醇 (lapachol); 秋水仙素类 (colchicine); 白桦脂酸 (betulinic acid); 喜树碱 (camptothecin) (包括合成类似物拓扑替康 (topotecan) (**HYCAMTIN®**), CPT-11 (伊立替康 (irinotecan), **CAMPTOSAR®**), 乙酰喜树碱、东莨菪素 (scopolectin) 和 9-氨基喜树碱); 苔藓抑素 (bryostatins); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 鬼臼毒素 (podophyllotoxin); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 替尼泊苷 (teniposide); 隐藻素类 (cryptophycin) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8); 多拉司他丁 (dolastatin); duocarmycin (包括合成类似物 KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥类, 诸如氯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌氮芥 (estramustine)、异磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、松龙苯芥 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard); 硝基脲类, 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine); 抗生素类, 诸如烯二炔类 (enediyne) 抗生素 (如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (参见例如 Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994))); 蒽环类 (dynemicin) 抗生素, 包括 dynemicin A; 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新抑癌菌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨基霉素 (authramycin)、氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-二

氮-5-氧-L-正亮氨酸、多柔比星 (doxorubicin) (包括 **ADRIAMYCIN®**、吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星、盐酸多柔比星脂质体注射剂 (**DOXIL®**)、脂质体多柔比星 TLC D-99 (**MYOCET®**)、PEG 化脂质体多柔比星 (**CAELYX®**) 和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、依达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素 (mitomycin) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺加霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培来霉素 (peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链脲霉素 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin); 抗代谢物类, 诸如甲氨喋呤、吉西他滨 (gemcitabine) (**GEMZAR®**)、替加氟 (tegafur) (**UFTORAL®**)、卡培他滨 (capecitabine) (**XELODA®**)、epothilone 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨喋呤、蝶酰三谷氨酸 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、多西氟尿啶 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine); 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、曼托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸; 醋葡内酯 (aceglatone); 醛磷酸胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基酮戊酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 氨苯吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); defofamine; 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); 依洛尼塞 (elfornithine); 醋酸羟吡唑 (elliptinium acetate); 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟脲; 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidamine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和美登醇 (maytansinol); 安丝菌素 (ansamitocin); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamol); 二胺硝吡啶 (nitracrine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西索菲兰 (sizofiran); 锆螺胺 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecene) (尤其是 T-2 毒素、verracurin A、杆孢菌素 A (roridin A) 和蛇形菌素 (anguidine)); 乌拉坦 (urethan); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露醇氮芥 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) (“Ara-C”); 噻替哌; 类紫杉醇 (taxoid), 例如紫杉醇 (paclitaxel) (**TAXOL®**)、紫杉醇的清蛋白改造纳米颗粒剂型 (ABRAXANE™) 和多西他塞 (doxetaxel) (**TAXOTERE®**); 苯丁酸氮芥 (chloranbucil); 6-巯鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 甲氨喋呤; 铂剂, 诸如顺铂、奥沙利铂 (oxaliplatin) 和卡铂; 阻止微管蛋白聚合形成微管的长春花生物碱类 (vincas), 包括长

春碱 (vinblastine) (**VELBAN®**)、长春新碱 (vincristine) (**ONCOVIN®**)、长春地辛 (vindesine) (**ELDISINE®**, **FILDESIN®**)和长春瑞宾 (vinorelbine) (**NAVELBINE®**);依托泊苷 (etoposide) (VP-16);异磷酰胺 (ifosfamide);米托蒽醌 (mitoxantrone);亚叶酸 (leucovorin);诺安托 (novantrone);依达曲沙 (edatrexate);柔红霉素 (daunomycin);氨基蝶呤;伊拜膦酸盐 (ibandronate);拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸 (DMFO);类维 A 酸, 诸如视黄酸, 包括贝沙罗汀 (bexarotene) (**TARGRETIN®**);二碳酸盐类 (bisphosphonate), 诸如氯膦酸盐 (clodronate) (例如**BONEFOS®**或**OSTAC®**)、etidronate (**DIDROCAL®**)、NE-58095、唑来膦酸 (zoledronic acid)/唑来膦酸盐/酯 (zoledronate) (**ZOMETA®**)、阿仑膦酸盐/酯 (alendronate) (**FOSAMAX®**)、pamidronate (**ARELIA®**)、替鲁膦酸盐/酯 (tiludronate) (**SKELID®**)或利塞膦酸盐/酯 (risedronate) (**ACTONEL®**);曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸, 特别是那些抑制涉及粘着性细胞增殖的信号途径中的基因表达的反义寡核苷酸, 诸如例如 PKC- α 、Ralf、H-Ras 和表皮生长因子受体 (EGF-R);疫苗, 诸如**THERATOPE®**疫苗和基因疗法疫苗, 例如**ALLOVECTIN®**疫苗、**LEUVECTIN®**疫苗和**VAXID®**疫苗;拓扑异构酶 1 抑制剂 (如**LURTOTECAN®**);rmRH (**ABARELIX®**);BAY439006 (sorafenib;Bayer);SU-11248 (Pfizer);哌立福辛 (perifosine), COX-2 抑制剂 (如塞来考昔 (celecoxib) 或艾托考昔 (etoricoxib)), 蛋白体抑制剂 (如 PS341);bortezomib (**VELCADE®**);CCI-779;tipifamib (R11577);orafenib, ABT510;Bcl-2 抑制剂, 诸如 oblimersen sodium (**GENASENSE®**);pixantrone;EGFR 抑制剂 (见下文定义);酪氨酸激酶抑制剂 (见下文定义);及上述任何物质的药学可接受的盐、酸或衍生物;以及上述两种或多种的组合, 诸如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写) 和 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATIN™) 联合 5-FU 和亚叶酸 (leucovorin) 的治疗方案的缩写)。

[0123] 该定义还包括作用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂, 诸如具有混合的激动剂/拮抗剂特性 (profile) 的抗雌激素类, 包括他莫昔芬 (tamoxifen) (**NOLVADEX®**)、4-羟基他莫昔芬、托瑞米芬 (toremifene) (**FARESTON®**)、艾多昔芬 (idoxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、雷洛昔芬 (raloxifene) (**EVISTA®**)、曲沃昔芬 (trioxifene)、keoxifene, 及选择性雌激素受体调节剂 (SERM), 诸如 SERM3;没有激动剂特性的纯粹的抗雌激素, 诸如氟维司群 (fulvestrant) (**FASLODEX®**) 和 EM800 (此类药剂可阻断雌激素受体 (ER) 二聚化, 抑制 DNA 结合, 提高 ER 周转, 和 / 或遏制 ER 水平);芳香酶抑制剂, 包括类固醇芳香酶抑制剂, 诸如福美坦 (formestane) 和依西美坦 (exemestane) (**AROMASIN®**), 及非类固醇芳香酶抑制剂, 诸如阿那曲唑 (anastrozole) (**ARIMIDEX®**)、来曲唑 (letrozole) (**FEMARA®**) 和氨基鲁米特 (aminoglutethimide), 及其它芳香酶抑制剂, 包括伏罗唑 (vorozole) (**RIVISOR®**)、醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate) (**MEGASE®**)、法倔唑 (fadrozole)、咪唑 (imidazole);lutenizing hormone 释放激素激动剂, 包括亮丙瑞林 (leuprolide) (**LUPRON®**和**ELIGARD®**)、戈舍瑞

林 (goserelin)、布舍瑞林 (buserelin) 和曲普瑞林 (triptorelin); 性类固醇类, 包括孕激素, 诸如醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate) 和醋酸甲羟孕酮 (medroxyprogesterone acetate), 雌激素, 诸如乙烯雌酚 (diethylstilbestrol) 和倍美力 (premarin), 及雄激素 / 类维 A 酸, 诸如氟甲睾酮 (fluoxymesterone)、所有反式维 A 酸 (transretinoic acid) 和芬维 A 胺 (fenretinide); 奥那司酮 (onapristone); 抗孕酮类; 雌激素受体下调调节剂 (ERD); 抗雄激素类, 诸如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide) 和比卡米特 (bicalutamide); 睾内酯 (testolactone); 及上述任何物质的药学可接受的盐、酸或衍生物; 以及两种或多种上述物质的组合。

[0124] 在用于本文时, 术语“EGFR 靶向药物”指结合 EGFR 并任选抑制 EGFR 活化的治疗剂。此类药剂的例子包括结合 EGFR 的抗体和小分子。结合 EGFR 的抗体的例子包括 MAb 579(ATCC CRL HB 8506)、MAb 455(ATCC CRL HB8507)、MAb 225(ATCC CRL 8508)、MAb 528(ATCC CRL 8509) (参见 Mendelsohn 等人的美国专利 4, 943, 533 及其变体, 诸如嵌合化 225(C225 或 Cetuximab ; **ERBUTIX®**) 和重构人 225(H225) (参见 Imclone Systems Inc. 的 WO 96/40210); IMC-11F8, 完全人的 EGFR 靶向抗体 (Imclone); 结合 II 型突变体 EGFR 的抗体 (美国专利 5, 212, 290); 结合 EGFR 的人源化和嵌合抗体, 如美国专利 5, 891, 996 中所述; 及结合 EGFR 的人抗体, 诸如 ABX-EGF 或 Panitumumab (参见 Abgenix/Amgen 的 WO 98/50433); EMD 55900 (Stragliotto et al., Eur. J. Cancer 32A :636-640(1996)); EMD7200(matuzumab), 针对 EGFR 且与 EGF 和 TGF- α 竞争 EGFR 结合的人源化 EGFR 抗体 (EMD/Merck); 人 EGFR 抗体, HuMax-EGFR(GenMab); 称为 E1. 1、E2. 4、E2. 5、E6. 2、E6. 4、E2. 11、E6. 3 和 E7. 6. 3 和 US 6, 235, 883 中描述的完全人的抗体; MDX-447 (Medarex Inc.); 及 mAb 806 或 人 源 化 mAb 806 (Jones et al., J. Biol. Chem. 279(29) : 30375-30384(2004))。抗 EGFR 抗体可与胞毒剂偶联, 由此产生免疫偶联物 (参见例如 EP 659, 439 A2, Merck Patent GmbH)。EGFR 拮抗剂包括小分子, 诸如美国专利 5, 616, 582、5, 457, 105、5, 475, 001、5, 654, 307、5, 679, 683、6, 084, 095、6, 265, 410、6, 455, 534、6, 521, 620、6, 596, 726、6, 713, 484、5, 770, 599、6, 140, 332、5, 866, 572、6, 399, 602、6, 344, 459、6, 602, 863、6, 391, 874、6, 344, 455、5, 760, 041、6, 002, 008 和 5, 747, 498 以及 PCT 出版物 W098/14451、W098/50038、W099/09016 和 W099/24037 中描述的化合物。具体的小分子 EGFR 拮抗剂包括 OSI-774(CP-358774, erlotinib, **TARCEVA®**, Genentech/OSI Pharmaceuticals); PD 183805(CI 1033, 2-propenamide, N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[3-(4-吗啉基)丙氧基]-6-喹唑啉基]-, 二盐酸化物, Pfizer Inc.); ZD 1839, gefitinib(IRESSA™, 4-(3'-氯-4'-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉代丙氧基)喹唑啉, AstraZeneca); ZM 105180((6-氨基-4-(3-甲基苯基)-氨基)-喹唑啉, Zeneca); BIBX-1382(N8-(3-氯-4-氟-苯基)-N2-(1-甲基-哌啶-4-基)-嘧啶并[5, 4-d]嘧啶-2,8-二胺, Boehringer Ingelheim); PKI-166((R)-4-[4-[(1-苯基乙基)氨基]-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-酚); (R)-6-(4-羟基苯基)-4-[(1-苯基乙基)氨基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶); CL-387785(N-[4-[(3-溴苯基)氨基]-6-喹唑啉基]-2-丁炔酰胺 (butynamide)); EKB-569(N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-3-氰基-7-乙氧基-6-喹唑啉基]-4-(二甲基氨基)-2-丁炔酰胺 (butenamide), Wyeth); AG1478(Sugen); AG1571(SU 5271; Sugen); 双重 EGFR/HER2 酪氨酸激酶抑制剂, 诸如 lapatinib(GW 572016

或 N-[3-氯-4-[(3-氟苯基)甲氧基]苯基]6[[[2-甲基磺酰基]乙基]氨基]甲基]-2-咪唑基]-4-喹唑啉胺 (quinazolinamine); Glaxo-SmithKline) 或氰基胍喹唑啉 (cyanoguanidinequinazoline) 和氰基脒喹唑啉胺 (cyanoamidine quinazolamine) 衍生物。

[0125] “酪氨酸激酶抑制剂”指抑制酪氨酸激酶诸如 HER 受体的酪氨酸激酶活性的分子。这样的抑制剂的例子包括上一段中提到的 EGFR 靶向药物; 小分子 HER2 酪氨酸激酶抑制剂, 诸如可从 Takeda 购买的 TAK165; CP-724, 714, 一种口服 ErbB2 受体酪氨酸激酶选择性抑制剂 (Pfizer and OSI); 优先结合 EGFR 但抑制 HER2 和 EGFR 过表达细胞的双重 HER 抑制剂, 诸如 EKB-569 (可从 Wyeth 购买); lapatinib (GW572016; 可从 Glaxo-SmithKline 购买), 一种口服 HER2 和 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂; PKI-166 (可从 Novartis 购买); 泛 HER (pan-HER) 抑制剂, 诸如 canertinib (CI-1033; Pharmacia); Raf-1 抑制剂, 诸如可从 ISIS Pharmaceuticals 购买的, 抑制 Raf-1 信号传导的反义剂 ISIS-5132; 非 HER 靶向 TK 抑制剂, 诸如可从 Glaxo 购买的 Imatinib mesylate (GLEEVEC™); MAPK 胞外调控激酶 I 抑制剂 CI-1040 (可从 Pharmacia 购买); 喹唑啉类, 诸如 PD 153035, 4-(3-氯苯胺基) 喹唑啉; 吡啶并嘧啶类; 嘧啶并嘧啶类; 吡咯并嘧啶类, 诸如 CGP 59326、CGP 60261 和 CGP 62706; 吡唑并嘧啶类, 4-(苯氨基)-7H-吡咯 [2,3-d] 嘧啶; 姜黄素 (二阿魏酰甲烷, 4,5-双(4-氟苯胺基)-酞亚胺); 含硝基噻吩模块的 tyrphostins; PD-0183805 (Warner-Lambert); 反义分子 (例如那些结合 HER 编码核酸的反义分子); 喹啉类 (美国专利 5,804,396); tryphostins (美国专利 5,804,396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); 泛 HER 抑制剂, 诸如 CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); Imatinib mesylate (Gleevec; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C 11 (Imclone); 氰基胍喹唑啉和氰基脒喹唑啉胺衍生物; 或任何如下专利出版物中所记载的: 美国专利 5,804,396; W099/09016 (American Cyanamid); W0 98/43960 (American Cyanamid); W097/38983 (Warner Lambert); W0 99/06378 (Warner Lambert); W0 99/06396 (Warner Lambert); W0 96/30347 (Pfizer, Inc.); W0 96/33978 (Zeneca); W0 96/3397 (Zeneca); W0 96/33980 (Zeneca); 及 US 2005/0101617。

[0126] “抗血管生成剂”指阻断或在某种程度上干扰血管发育的化合物。抗血管生成因子可以是例如结合涉及促进血管生成的生长因子或生长因子受体的小分子或抗体。在本文中优选的抗血管生成因子是结合血管内皮生长因子 (VEGF) 的抗体, 诸如 Bevacizumab (AVASTIN®)。

[0127] 术语“细胞因子”指由一种细胞群释放的、作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。这样的细胞因子的例子是淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子包括生长激素, 诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素、和牛生长激素; 甲状旁腺素; 甲状腺素; 胰岛素; 胰岛素原; 松弛素; 松弛素原; 糖蛋白激素类, 诸如促卵泡激素 (FSH)、促甲状腺激素 (TSH) 和促黄体激素 (LH); 肝生长因子; 成纤维细胞生长因子; 促乳素; 胎盘催乳激素; 肿瘤坏死因子- α 和- β ; 穆勒氏 (Mullerian) 抑制性物质; 小鼠促性腺激素相关肽; 抑制素; 激活素 (activin); 血管内皮生长因子; 整联蛋白; 血小板生成素 (TPO); 神经生长因子, 诸如 NGF- β ; 血小板衍生生长因子; 转化生长因子 (TGF), 诸如 TGF- α 和 TGF- β ; 胰岛

素样生长因子 -I 和 -II ;促红细胞生成素 (EPO) ;骨诱导因子 (osteoinductive factor) ;干扰素,诸如干扰素 - α 、- β 和 - γ ;集落刺激因子 (CSF),诸如巨噬细胞 CSF (M-CSF)、粒细胞 - 巨噬细胞 CSF (GM-CSF) 和粒细胞 CSF (G-CSF) ;白介素 (IL),诸如 IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12 ;肿瘤坏死因子,诸如 TNF- α 或 TNF- β ;及其它多肽因子,包括 LIF 和 kit 配体 (KL)。在用于本文时,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物学活性等效物。

[0128] II. HER2 抗体变体组合物

[0129] 本发明至少部分关注某些 HER2 抗体组合物。优选的是,所述 HER2 抗体 (主要种类 HER2 抗体及其抗体变体其中任一或二者) 是结合 HER2 结构域 II,比 Trastuzumab 更有效的抑制 HER 二聚化,和 / 或结合 HER2 的异二聚体结合位点的抗体。本文中主要种类抗体的优选实施方案是包含 SEQ ID No. 3 和 4 中的轻链和重链可变区氨基酸序列,且最优选包含 SEQ ID No. 15 和 16 中的轻链和重链氨基酸序列 (Pertuzumab) 的抗体。

[0130] 本文中的组合物包含结合 HER2 结构域 II 的主要种类 HER2 抗体及其酸性变体,其中所述酸性变体包括糖化变体、二硫化物还原变体、和不可还原变体中的一项、两项、或三项。所述组合物中的酸性变体可以包括糖化变体、脱酰胺变体、二硫化物还原变体、唾液酰化变体、和不可还原变体中的一项、两项、三项、四项、或五项。优选的是,所述组合物中所有酸性变体的总量少于约 25%。在一个实施方案中,糖化变体、脱酰胺变体、二硫化物还原变体、唾液酰化变体、和不可还原变体构成所述组合物中酸性变体的至少约 75-80%。

[0131] 本发明还关注包含主要种类 HER2 抗体及主要种类抗体的酸性变体的组合物,其中所述主要种类 HER2 抗体包含 SEQ ID No. 3 和 4 中的可变轻链和可变重链序列,且其中所述酸性变体包括糖化变体、脱酰胺变体、二硫化物还原变体、唾液酰化变体、和不可还原变体中的一项、两项、三项、四项、或五项。

[0132] 本发明提供一种制备药物组合物的方法,包括:(1) 制备包含结合 HER2 结构域 II 的主要种类 HER2 抗体及其酸性变体的组合物,所述酸性变体包括糖化变体、二硫化物还原变体、或不可还原变体,并(2) 评估所述组合物中的酸性变体,并确定其量少于约 25%。所述方法涵盖将步骤(2) 之前、期间、或之后的组合物与药学可接受载体组合。在一个实施方案中,在步骤(2) 中评估的组合物在药学可接受载体中。

[0133] 在一个实施方案中,至少约 75-80% 的酸性变体 (构成组合物的少于约 25%) 选自:糖化变体、脱酰胺变体、二硫化物还原变体、唾液酰化变体、和不可还原变体。

[0134] 酸性变体可以通过多种方法来评估,但是优选的是所述方法包括下述一项、两项、三项、四项、或五项:离子交换层析 (IEC),其中在 IEC 之前、之后、和 / 或期间用唾液酸酶处理组合物 (例如用于评估唾液酰化变体);还原性 CE-SDS (例如用于评估二硫化物还原变体);非还原性 CE-SDS (例如用于评估不可还原变体);硼酸盐层析 (例如用于评估糖化变体);和肽作图 (例如用于评估脱酰胺变体)。

[0135] 在一个实施方案中,通过离子交换层析来分析总的酸性变体,例如使用弱阳离子交换剂和 / 或具有羧酸根官能团的阳离子交换剂 (例如使用 DIONEXPROPACJ WCX-10 层析柱)。在此类层析的一个实施方案中,层析条件涉及:缓冲液 A 为 20mM BisTris, pH 6.0;缓冲液 B 为 20mM BisTris, 200mM NaCl, pH6.0;和 1.0mL/min 的 0.5% 缓冲液 B 梯度。

[0136] 所述组合物任选包含氨基末端前导延伸变体。优选的是,所述氨基末端前导延伸

位于抗体变体的轻链上（例如位于抗体变体的一条或两条轻链上）。所述主要种类 HER2 抗体或抗体变体可以是完整抗体或抗体片段（如 Fab 或 F(ab')₂ 片段），但优选二者都是完整抗体。本文中的抗体变体可以在其任何一条或多条重链或轻链上包含氨基末端前导延伸。优选的是，所述氨基末端前导延伸位于抗体的一条或两条轻链上。所述氨基末端前导延伸优选包含 VHS- 或由其组成。组合物中氨基末端前导延伸的存在可通过多种分析技术来检测，包括但不限于 N- 末端序列分析、电荷异质性的测定法（例如阳离子交换层析或毛细管区带电泳）、质谱等。组合物中抗体变体的量通常在如下范围内，即从构成用于检测变体的任何测定法（优选阳离子交换分析）的检测下限的量到少于主要种类抗体量的量的范围。通常，组合物中约 20% 或更少（例如从约 1% 至约 15%，例如从 5% 至约 15%，且优选从约 8% 至约 12%）的抗体分子包含氨基末端前导延伸。这样的百分比量优选通过阳离子交换分析来测定。

[0137] 涵盖主要种类抗体和 / 或变体的其它氨基酸序列改变，包括但不限于在其一条或所有两条重链上包含 C- 末端赖氨酸残基的抗体（这样的抗体变体可以以约 1% 至约 20% 的量存在）、具有一个或多个氧化后甲硫氨酸残基的抗体（例如包含氧化后 met-254 的 Pertuzumab）等。

[0138] 此外，在上文讨论的唾液酰化变体之外，主要种类抗体或变体可包含别的糖基化变异，其非限制性例子包括包含附着于其 Fc 区的 G1 或 G2 寡糖结构的抗体、包含附着于其轻链的碳水化合物模块的抗体（例如一个或多个碳水化合物模块，诸如葡萄糖或半乳糖附着于抗体的一条或两条轻链，例如附着于一个或多个赖氨酸残基）、包含一条或两条非糖基化重链的抗体等。

[0139] 任选的是，包含一条或两条轻链的抗体，其中两条轻链其中任一或二者包含 SEQ ID No. 23 中的氨基酸序列（包括其变体，诸如本文中公开的那些）。所述抗体还包含一条或两条重链，其中两条重链其中任一或二者包含 SEQ ID No. 16 或 SEQ ID No. 24 中的氨基酸序列（包括其变体，诸如本文中公开的那些）。

[0140] 组合物可从表达 HER2 抗体的基因工程细胞系回收，从例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系回收，或者可通过肽合成来制备。

[0141] III. HER2 抗体的生成

[0142] 下文描述了用于生成依照本发明使用的抗体的例示性技术。用于生成抗体的 HER2 抗原可以是例如可溶形式的 HER2 胞外域或其含有所需表位的部分。或者，在其细胞表面表达 HER2 的细胞（例如经转化而过表达 HER2 的 NIH-3T3 细胞；或癌细胞系，诸如 SK-BR-3 细胞，参见 Stancovski et al., PNAS (USA) 88 :8691-8695 (1991)）可用于生成抗体。可用于生成抗体的其它形式 HER2 对于本领域技术人员是显而易见的。

[0143] (i) 单克隆抗体

[0144] 单克隆抗体是从一群基本上同质的抗体获得的，即构成群体的各个抗体相同和 / 或结合相同表位，除了单克隆抗体生产过程中可能产生的可能突变外，诸如本文所述那些变体。因此，修饰语“单克隆”表示抗体的特征，即不是分立抗体的混合物。

[0145] 例如，单克隆抗体可通过最初由 Kohler et al., Nature 256 :495 (1975) 描述的杂交瘤方法来制备，或者可通过重组 DNA 方法来制备（美国专利 4, 816, 567）。

[0146] 在杂交瘤方法中，如上所述免疫小鼠或其它合适的宿主动物，诸如仓鼠，以引发生

成或能够生成如下抗体的淋巴细胞,所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。然后,使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding,《Monoclonal Antibodies:Principles and Practice》,59-103,Academic Press,1986)。

[0147] 将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养,所述培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常将含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷(HAT培养基),这些物质阻止HGPRT缺陷细胞生长。

[0148] 优选的骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持所选抗体生成细胞稳定的高水平生成抗体、并对诸如HAT培养基等培养基敏感的骨髓瘤细胞。在这些细胞中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠源骨髓瘤系,诸如那些可从Salk Institute Cell Distribution Center(San Diego, California, USA)获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的衍生系,及可从American Type Culture Collection(Rockville, Maryland, USA)获得的SP-2或X63-Ag8-653细胞。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已有描述(Kozbor, J. Immunol. 133:3001(1984); 及 Brodeur 等人,《Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications》,51-63,Marcel Dekker, Inc., New York,1987)。

[0149] 可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养基测定针对抗原的单克隆抗体的生成。优选的是,通过免疫沉淀或通过体外结合测定法,诸如放射性免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA),测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。

[0150] 单克隆抗体的结合亲和力可通过例如Munson et al., Anal. Biochem. 107:220(1980)的Scatchard分析来测定。

[0151] 在鉴定得到生成具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,所述克隆可通过有限稀释流程进行亚克隆,并通过标准方法进行培养(Goding,《Monoclonal Antibodies:Principles and Practice》,59-103,Academic Press,1986)。适于这一目的的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤进行体内培养。

[0152] 可通过常规抗体纯化流程,诸如例如蛋白A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清适当分开。

[0153] 编码单克隆抗体的DNA易于通过常规流程分离并测序(例如使用能够特异性结合编码鼠源抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。以杂交瘤细胞作为所述DNA的优选来源。一旦分离,可将DNA置于表达载体中,然后将该表达载体转染到宿主细胞中,诸如不另外产生抗体蛋白质的大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于编码抗体的DNA在细菌中的重组表达的综述性论文包括Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262(1993)和Plückthun, Immunol. Revs. 130:151-188(1992)。

[0154] 在另一个实施方案中,可从使用McCafferty et al., Nature 348:552-554(1990)所述技术构建的噬菌体抗体库中分离单克隆抗体或抗体片段。Clackson et al., Nature 352:624-628(1991)和Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597(1991)分别描述了使用噬菌体文库分离鼠源和人源抗体。后续出版物描述了通过链改组(Marks et al., Bio/

Technology 10 :779-783(1992)),以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略 (Waterhouse et al., Nuc. Acids Res. 21 :2265-2266(1993)),生成高亲和力 (nM 范围) 的人源抗体。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方法。

[0155] 还可以修饰 DNA,例如通过替代即用人重链和轻链恒定区的编码序列代替同源鼠源序列 (美国专利 4,816,567;及 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6851(1984)),或通过共价接合免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列。

[0156] 通常,用此类非免疫球蛋白多肽替代抗体的恒定区,或者用它们替代抗体的一个抗原结合位点的可变区,以产生嵌合二价抗体,它包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合位点及对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

[0157] (ii) 人源化抗体

[0158] 本领域已经描述了用于将非人抗体人源化的方法。优选的是,人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基,它们通常取自“输入”可变区。人源化可基本上依照 Winter 及其同事的方法进行 (Jones et al., Nature 321 :522-525(1986);Riechmann et al., Nature 332 :323-327(1988);Verhoeyen et al., Science 239 :1534-1536(1988)),通过用高变区序列替代相应的人抗体序列。因此,此类“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利 4,816,567),其中本质上少于整个人可变区用来自非人物种的相应序列替代。在实践中,人源化抗体通常是其中一些高变区残基和可能的一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

[0159] 用于制备人源化抗体的人可变区的选择,包括轻链和重链,对于降低抗原性非常重要。依照所谓的“最适 (best-fit)”方法,用啮齿类抗体可变区序列对已知的人可变区序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架区 (FR) (Sims et al., J. Immunol. 151 :2296(1993);Chothia et al., J. Mol. Biol. 196 :901(1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同一框架可用于数种不同的人源化抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :4285(1992);Presta et al., J. Immunol. 151 :2623(1993))。

[0160] 更为重要的是,抗体在人源化后保持对抗原的高亲和力及其它有利的生物学特性。为了实现这一目的,依照一种优选的方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的,且为本领域熟练技术人员所熟悉。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像能够分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样,可从受体和输入序列中选出 FR 残基并进行组合,从而获得所需抗体特征,诸如对靶抗原的亲合力提高。通常,高变区残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

[0161] 美国专利第 6,949,245 号描述了结合 HER2 并阻断 HER 受体的配体活化的例示性人源化 HER2 抗体的生成。本文中特别感兴趣的人源化抗体基本上像完整鼠单克隆抗体 2C4 (或其 Fab 片段) 一样有效的阻断 EGF、TGF- α 和 / 或 HRG 介导的 MAPK 激活,和 / 或基本上像完整鼠单克隆抗体 2C4 (或其 Fab 片段) 一样有效的结合 HER2。本文中的人源化抗体

可例如包含掺入人重链可变区的非人高变区残基,而且还可在选自 69H、71H 和 73H 的位置包含框架区 (FR) 替代,采用的是 Kabat 等人,《Sequences of Proteins of Immunological Interest》,第 5 版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中给出的可变区编号系统。在一个实施方案中,人源化抗体在 69H、71H 和 73H 的两个或所有位置包含 FR 替代。

[0162] 本文中的例示性目的人源化抗体包含重链可变区互补决定残基 GFTFTDYTMX,其中 X 优选是 D 或 S (SEQ ID NO :7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO :8); 和 / 或 NLGPSFYFDY (SEQ ID NO :9), 任选包含那些 CDR 残基的氨基酸修饰,例如其中修饰基本上保持或改善抗体的亲和力。例如,目的抗体变体可在上述重链可变区 CDR 序列中具有约 1 个至约 7 个或者约 5 个氨基酸替代。这样的抗体变体可通过亲和力成熟来制备,例如如下文所述。最优选的人源化抗体包含 SEQ ID NO :4 中的重链可变区氨基酸序列。

[0163] 例如,除了前一段落中的那些重链可变区 CDR 残基之外,人源化抗体还可包含轻链可变区互补决定残基 KASQDVSIGVA (SEQ ID NO :10); SASYX¹X²X³, 其中 X¹ 优选是 R 或 L, X² 优选是 Y 或 E, 而 X³ 优选是 T 或 S (SEQ ID NO :11); 和 / 或 QQYYIYPYT (SEQ ID NO :12)。这样的人源化抗体任选包含上述 CDR 残基的氨基酸修饰,例如其中修饰基本上保持或改善抗体的亲和力。例如,目的抗体变体可在上述轻链可变区 CDR 序列中具有约 1 个至约 7 个或者约 5 个氨基酸替代。这样的抗体变体可通过亲和力成熟来制备,例如如下文所述。最优选的人源化抗体包含 SEQ ID NO :3 中的轻链可变区氨基酸序列。

[0164] 本申请还设想了亲和力成熟的抗体,它结合 HER2 并阻断 HER 受体的配体活化。亲本抗体可以是人抗体或人源化抗体,例如包含轻链和 / 或重链可变区序列分别为 SEQ ID NO :3 和 4 的抗体 (即变体 574)。亲和力成熟的抗体优选以高于完整鼠 2C4 或完整变体 574 的亲和力结合 HER2 受体 (例如根据采用 HER2 胞外域 (ECD) ELISA 的评估,例如亲和力提高约 2 倍或约 4 倍至约 100 倍或约 1000 倍)。例示性的用于替代的重链可变区 CDR 残基包括 H28、H30、H34、H35、H64、H96、H99, 或者两个或多个的组合 (例如这些残基中的 2、3、4、5、6 或 7 个)。用于改变的轻链可变区 CDR 残基的例子包括 L28、L50、L53、L56、L91、L92、L93、L94、L96、L97, 或者两个或多个的组合 (例如这些残基中的 2 至 3、4、5 或直到约 10 个)。

[0165] 还设想了各种形式的人源化抗体或亲和力成熟的抗体。例如,人源化抗体或亲和力成熟的抗体可以是抗体片段,诸如 Fab, 它任选与一种或多种胞毒剂偶联以产生免疫偶联物。或者,人源化抗体或亲和力成熟的抗体可以是完整抗体,诸如完整的 IgG1 抗体。

[0166] (iii) 人抗体

[0167] 作为人源化的替代方法,可生成人抗体。例如,现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成人抗体完整全集的转基因动物 (如小鼠)。例如,已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区 (JH) 基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移大量人种系免疫球蛋白基因将导致在抗原攻击后生成人抗体。参见例如 Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362 : 255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno. 7 : 33 (1993); 及美国专利 5,591,669、5,89,369 和 5,545,807。

[0168] 或者,噬菌体展示技术 (McCafferty et al., Nature 348 : 552-553 (1990)) 可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变 (V) 区基因全集生成人抗体和抗体片段。依照

这种技术,将抗体 V 区基因克隆到丝状噬菌体诸如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因的读码框中,并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,以抗体的功能特性为基础进行的选择也导致编码展示那些特性的抗体的基因的选择。因此,噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行;有关综述参见例如 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)。V 基因区段的数千种来源可用于噬菌体展示。Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) 从衍生自经免疫小鼠脾的小型 V 基因随机组合文库分离得到大量不同的抗噁唑酮抗体。可本质上依照 Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991) 或 Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993) 所述技术,由未免疫人供体构建 V 基因全集,并分离针对大量不同抗原(包括自身抗原)的抗体。还可参见美国专利 5,565,332 和 5,573,905。

[0169] 还可通过体外激活 B 细胞(参见美国专利 5,567,610 和 5,229,275)来生成成人抗体。

[0170] 1998 年 6 月 30 日发布的美国专利 5,772,997 和 1997 年 1 月 3 日出版的 W097/00271 中描述了人 HER2 抗体。

[0171] (iv) 抗体片段

[0172] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见例如 Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) 及 Brennan et al., *Science* 229:81 (1985))。然而,现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。例如,可从上文讨论的噬菌体抗体库分离抗体片段。或者,可直接从大肠杆菌回收 Fab' -SH 片段,并通过化学方法偶联形成 F(ab')₂ 片段(Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。依照另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养物分离 F(ab')₂ 片段。用于生成抗体片段的其它技术对熟练从业人员是显而易见的。在其它实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。参见 W0 93/16185;美国专利 5,571,894;和美国专利 5,587,458。抗体片段还可以是“线性抗体”,例如如美国专利 5,641,870 中所述。所述线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0173] (v) 双特异性抗体

[0174] 双特异性抗体指对至少两种不同表位具有结合特异性的抗体。例示性的双特异性抗体可结合 HER2 蛋白质的两种不同表位。其它此类抗体可将 HER2 结合位点与 EGFR、HER3 和 / 或 HER4 的结合位点进行组合。或者,HER2 臂可与结合白细胞上触发分子诸如 T 细胞受体分子(如 CD2 或 CD3)或 IgG 的 Fc 受体(Fc γ R),诸如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ R II (CD32) 和 Fc γ R III (CD16) 的臂组合,使得细胞防御机制聚焦于 HER2 表达细胞。双特异性抗体还可用于将胞毒剂定位于表达 HER2 的细胞。这些抗体拥有 HER2 结合臂及结合胞毒剂(如肥皂草毒蛋白、抗干扰素- α 、长春花生物碱、蓖麻毒蛋白 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。可将双特异性抗体制备成全长抗体或抗体片段(如 F(ab')₂ 双特异性抗体)。

[0175] W0 96/16673 描述了一种双特异性 HER2/Fc γ R III 抗体,而美国专利 5,837,234 公开了一种双特异性 HER2/Fc γ RI 抗体 ID1M1 (Osidem)。W098/02463 显示了一种双特异性 HER2/Fc α 抗体。美国专利 5,821,337 教导了一种双特异性 HER2/CD3 抗体。MDX-210 是一种双特异性 HER2-Fc γ R III 抗体。

[0176] 用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生成基于两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两种链具有不同的特异性(Millstein et al., Nature 305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四源杂交瘤(quadroma))生成10种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦,且产物产量低。WO 93/08829及Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659(1991)中公开了类似的流程。

[0177] 依照一种不同的方法,将具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。融合优选使用包含至少部分较链、CH2和CH3区的免疫球蛋白重链恒定区。优选的是,在至少一种融合物中具有包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物以及,如果需要,免疫球蛋白轻链的DNA插入分开的表达载体,并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中,这为调整三种多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。然而,在至少两种多肽链以相同比率表达导致高产量时或在该比率没有特别意义时,有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一个载体。

[0178] 在该方法的一个优选实施方案中,双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了分离的便利途径,因此发现这种不对称结构便于将所需双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法公开于W094/04690。关于生成双特异性抗体的其它细节参见例如Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210(1986)。

[0179] 依照美国专利5,731,168中描述的另一种方法,可改造一对抗体分子之间的界面,将从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包含至少部分C_H3抗体恒定区。在该方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链(如酪氨酸或色氨酸)替换。通过用较小氨基酸侧链(如丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生针对大侧链的相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

[0180] 双特异性抗体包括交联或“异源偶联”抗体。例如,异源偶联物中的一种抗体可与亲合素偶联,另一种抗体与生物素偶联。例如,此类抗体建议用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利4,676,980),和用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373和EP 03089)。可使用任何便利的交联方法来制备异源偶联抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的,并且连同许多交联技术一起公开于美国专利4,676,980。

[0181] 文献中还描述了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan et al., Science 229:81(1985)描述了通过蛋白水解切割完整抗体以生成F(ab')₂片段的方法。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的Fab'片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后将Fab'-TNB衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成Fab'-硫醇,并与等摩尔量的另一种Fab'-TNB衍生物混合,以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

[0182] 最近的进展使得从大肠杆菌中直接回收Fab'-SH片段变得更加容易,这些片段

可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby et al., J. Exp. Med. 175 :217-225 (1992) 描述了生成完全人源化的双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子。每个 Fab' 片段由大肠杆菌分开分泌,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达 HER2 受体的细胞和正常人 T 细胞,以及触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳房肿瘤靶的溶解活性。

[0183] 还描述了从重组细胞培养物直接制备和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny et al., J. Immunol. 148(5) : 1547-1553(1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原而形成单体,然后重新氧化而形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。由 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448(1993) 描述的“双抗体”技术提供了制备双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的轻链可变区 (V_L) 和重链可变区 (V_H),所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此,迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber et al., J. Immunol. 152 :5368(1994)。

[0184] 设想了具有超过两个效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。Tutt et al., J. Immunol. 147 :60(1991)。

[0185] (vi) 其它氨基酸序列修饰

[0186] 设想了本文所述 HER2 抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能希望改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。通过将适当的核苷酸改变引入 HER2 抗体核酸或者通过肽合成来制备 HER2 抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如 HER2 抗体氨基酸序列中的残基删除和/或插入和/或替代。只要最终的构建物具有所需特性,可进行删除、插入和替代的任何组合以获得最终的构建物。氨基酸变化还可改变 HER2 抗体的翻译后加工,诸如改变糖基化位点的数目或位置。

[0187] 可用于鉴定 HER2 抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域的一种方法称作“丙氨酸扫描突变”,如 Cunningham and Wells, Science 244 :1081-1085(1989) 所述。这里,鉴定了一个或一组靶残基(例如带电荷的残基,诸如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸),并用中性或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)替代,以影响氨基酸与 HER2 抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体,推敲那些对替代显示功能敏感性的氨基酸位置。因此,虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的,但是突变本身的性质不需要预先决定。例如,为了分析在指定位点处的突变的后果,在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描诱变或随机突变,并对所表达的 HER2 抗体变体筛选所需活性。

[0188] 氨基酸序列插入包括氨基-和/或羧基-末端的融合,长度范围从一个残基至包含上百或更多残基的多肽,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N-末端甲硫氨酰残基的 HER2 抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。HER2 抗体分子的其他插入变体包括在 HER2 抗体的 N-或 C-末端融合酶(例如用于 ADEPT)或提高抗体血清半衰期的多肽。

[0189] 另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在 HER2 抗体分子中有至少一个氨基酸

残基用不同残基替换。最感兴趣进行替代诱变的位点包括高变区或 CDR,但也考虑了 FR 或 Fc 区改变。保守替代在表 1 中显示在标题“优选替代”下。如果此类替代导致生物学活性的改变,那么可以引入表 1 中称为“例示替代”的更实质性改变,或如下文中关于氨基酸种类的进一步描述,并筛选产物。

[0190] 表 1

[0191]

原始残基	例示替代	优选替代
Ala(A)	Val ;Leu ;Ile	Val
Arg(R)	Lys ;Gln ;Asn	Lys
Asn(N)	Gln ;His ;Asp ;Lys ;Arg	Gln
Asp(D)	Glu ;Asn	Glu
Cys(C)	Ser ;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn ;Glu	Asn
Glu(E)	Asp ;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn ;Gln ;Lys ;Arg	Arg
Ile(I)	Leu ;Val ;Met ;Ala ;Phe ;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸 ;Ile ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Ile
Lys(K)	Arg ;Gln ;Asn	Arg
Met(M)	Leu ;Phe ;Ile	Leu
Phe(F)	Trp ;Leu ;Val ;Ile ;Ala ;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val ;Ser	Ser
Trp(W)	Tyr ;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp ;Phe ;Thr ;Ser	Phe

Val (V)	Ile ;Leu ;Met ;Phe ;Ala ;正亮氨酸	Leu
---------	-------------------------------	-----

[0192] 对抗体生物学特性的实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来完成：(a) 替代区域的多肽主链的结构，例如作为折叠片或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积。根据其侧链特性的相似性，可将氨基酸如下分组 (A. L. Lehninger, 在《Biochemistry》中, 第 2 版, 73-75, Worth Publishers, New York, 1975)：(1) 非极性的：Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

[0193] (2) 不带电荷的、极性的：Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

[0194] (3) 酸性的：Asp (D)、Glu (E)

[0195] (4) 碱性的：Lys (K)、Arg (R)、His (H)

[0196] 或者，根据共同的侧链特性，可将天然存在残基如下分组：

[0197] (1) 疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0198] (2) 中性、亲水性的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0199] (3) 酸性的：Asp、Glu；

[0200] (4) 碱性的：His、Lys、Arg；

[0201] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0202] (6) 芳香族的：Trp、Tyr、Phe。

[0203] 非保守替代将需要用这些类别之一中的一个成员交换另一个类别的。

[0204] 任何不涉及保持 HER2 抗体正确构象的半胱氨酸残基也可替代，通常用丝氨酸，以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反，可向抗体中添加半胱氨酸键以改善其稳定性（特别是当抗体是抗体片段诸如 Fv 片段时）。

[0205] 特别优选的一类替代变体牵涉替代亲本抗体（如人源化或人抗体）的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改进的生物学特性。产生此类替代变体的一种便利方法牵涉使用噬菌体展示的亲合力成熟。简而言之，将数个高变区位点（例如 e6-7 个位点）突变，在各个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上，作为与各个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性（例如结合亲和力）。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点，可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者 / 另外，分析抗原 - 抗体复合物的晶体结构，以鉴定抗体和人 HER2 之间的接触点可能是有益的。所述接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候选位点。一旦产生这样的变体，如本文所述对该组变体进行筛选，可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

[0206] 抗体的另一类氨基酸变体改变了抗体的原始糖基化样式。改变意味着删除在抗体中发现的一个或多个碳水化合物模块，和 / 或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

[0207] 抗体的糖基化通常或是 N- 连接的或是 O- 连接的。N- 连接指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸（其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸）是将碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。

因此,多肽中这些三肽序列其中任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指将糖类 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸。

[0208] 向抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列而便利地完成(用于 N-连接的糖基化位点)。所述改变还可通过向原始抗体的序列中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(用于 O-连接的糖基化位点)。

[0209] 若抗体包含 Fc 区,则可改变附着其上的任何寡糖结构。例如,美国专利申请 US 2003/0157108 A1(Presta, L.) 中描述了有缺乏岩藻糖的成熟碳水化合物结构附着于抗体 Fc 区的抗体。还可参见 US 2004/0093621 A1(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)。WO 03/011878(Jean-Mairet 等人)和美国专利 6,602,684(Umana 等人)中提到了在附着于抗体 Fc 区的寡糖结构中有等分 N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)的抗体。WO 97/30087(Patel 等人)中报告了在附着于抗体 Fc 区的寡糖结构中有至少一个半乳糖残基的抗体。关于有更改碳水化合物附着于其 Fc 区的抗体还可参见 WO 98/58964(Raju, S.) 和 WO 99/22764(Raju, S.)。本文还设想了包含有此类碳水化合物结构附着于 Fc 区一条或两条重链上的主要种类抗体的抗体组合物

[0210] 编码 HER2 抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在氨基酸序列变体的情况中),或者通过对早期制备的变体或非变体型式的 HER2 抗体进行寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

[0211] (vii) 筛选具有期望特性的抗体

[0212] 上文已经描述了用于生成抗体的技术。如果需要,还可以选择具有某些生物学特征的抗体。

[0213] 为了鉴定阻断 HER 受体的配体活化的抗体,可测定抗体阻断 HER 配体结合表达 HER 受体(例如偶联另一种 HER 受体,该 HER 受体与目的 HER 受体形成 HER 异寡聚体)的细胞的能力。例如,可将天然表达或者经转染而表达 HER 异寡聚体的 HER 受体的细胞与抗体一起温育,然后暴露于经标记的 HER 配体。然后可评估 HER2 抗体阻断配体结合 HER 异寡聚体中的 HER 受体的能力。

[0214] 例如,可以基本上如 W001/00245 中所述,以 24 孔板的形式在冰上使用单层 MCF7 培养物进行 HER2 抗体对 HRG 结合 MCF7 乳房肿瘤细胞系的抑制。可将 HER2 单克隆抗体添加到各个孔中并温育 30 分钟。然后可加入 ^{125}I 标记的 rHRG $\beta_{1177-224}$ (25pm),并可继续温育 4-16 小时。可绘制剂量-应答曲线,并可计算目的抗体的 IC_{50} 值。在一个实施方案中,阻断 HER 受体的配体活化的抗体在此测定法中抑制 HRG 结合 MCF7 细胞的 IC_{50} 为约 50nM 或更低,更优选 10nM 或更低。当抗体是抗体片段诸如 Fab 片段时,在此测定法中抑制 HRG 结合 MCF7 细胞的 IC_{50} 可以是例如约 100nM 或更低,更优选 50nM 或更低。

[0215] 或者/另外,可评估 HER2 抗体阻断 HER 异寡聚体中存在的 HER 受体的 HER 配体刺激的酪氨酸磷酸化的能力。例如,可将内源表达或者经转染而表达 HER 受体的细胞与抗体一起温育,然后使用抗磷酸酪氨酸单克隆(任选偶联有可检测标记物)测定 HER 配体依赖性酪氨酸磷酸化活性。美国专利 5,766,863 中描述的激酶受体活化测定法也可用于测定 HER 受体活化和抗体对该活性的阻断。

[0216] 在一个实施方案中,可以基本上如 W001/00245 中所述,筛选在 MCF7 细胞中抑制 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化的抗体。例如,可将 MCF7 细胞铺到 24 孔板中,并将 HER2 的单克隆抗体加入每个孔中,于室温温育 30 分钟;然后可向每个孔中加入 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 至终浓度 0.2nM,并可继续温育 8 分钟。从每个孔中吸走培养基,通过加入 100 μ l SDS 样品缓冲液 (5% SDS, 25mM DTT, 25mM Tris-HCl, pH 6.8) 来终止反应。可在 4-12% 梯度凝胶 (Novex) 上对每一份样品 (25 μ l) 进行电泳,然后通过电泳转移到聚偏二氟乙烯膜上。可对抗磷酸酪氨酸 (以 1 μ g/ml) 免疫印迹显影,并通过反射密度法 (reflectance densitometry) 量化 Mr 约 180,000 的主要反应性条带的强度。在此测定法中,所选抗体优选将 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化显著抑制至对照的约 0-35%。可绘制通过反射密度法测定的对 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化的抑制作用的剂量-应答曲线,并可计算目的抗体的 IC₅₀。在一个实施方案中,阻断 HER 受体的配体活化的抗体在此测定法中抑制 p180 酪氨酸磷酸化的 HRG 刺激的 IC₅₀ 为约 50nM 或更低,更优选 10nM 或更低。当抗体是抗体片段诸如 Fab 片段时,在此测定法中抑制 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化的 IC₅₀ 可以是例如约 100nM 或更低,更优选 50nM 或更低。

[0217] 还可评估抗体对 MDA-MB-175 细胞的生长抑制作用,例如基本上如 Schaefer et al., Oncogene 15 :1385-1394 (1997) 中所述。依照此测定法,可将 MDA-MB-175 细胞用 HER2 单克隆抗体 (10 μ g/ml) 处理 4 天,并用结晶紫染色。与 HER2 抗体的温育对此细胞系显示的生长抑制作用可能与使用单克隆抗体 2C4 相似。在还有一个实施方案中,外源 HRG 不会显著逆转这种抑制作用。优选的是,无论是否存在外源 HRG,该抗体将能够以大于单克隆抗体 4D5 的程度 (并且任选以大于单克隆抗体 7F3 的程度) 抑制 MDA-MB-175 细胞的细胞增殖。

[0218] 在一个实施方案中,根据免疫共沉淀实验的测定,诸如 W001/00245 中所述,目的 HER2 抗体可在 MCF7 和 SK-BR-3 细胞中阻断调蛋白依赖性的 HER2 与 HER3 结合,实质上比单克隆抗体 4D5 更有效,且优选实质上比单克隆抗体 7F3 更有效。

[0219] 为了鉴定生长抑制性 HER2 抗体,可筛选抑制过表达 HER2 的癌细胞生长的抗体。在一个实施方案中,在约 0.5-30 μ g/ml 的抗体浓度,所选生长抑制性抗体能够将细胞培养中的 SK-BR-3 细胞生长抑制约 20-100%,优选约 50-100%。为了鉴定这样的抗体,可进行美国专利 5,677,171 中描述的 SK-BR-3 测定法。依照此测定法,在添加了 10% 胎牛血清、谷氨酰胺和青霉素链霉素的, F12 和 DMEM 培养基的 1 : 1 混合液中培养 SK-BR-3 细胞。以 20,000 个细胞将 SK-BR-3 细胞铺入 35mm 细胞培养皿 (2ml/35mm 培养皿)。每个培养皿加入 0.5-30 μ g/ml HER2 抗体。6 天后,使用电子 COULTER™ 细胞计数器对细胞数计数,与未处理细胞比较。可选择那些将 SK-BR-3 细胞生长抑制约 20-100% 或约 50-100% 的抗体作为生长抑制性抗体。关于用于筛选生长抑制性抗体,诸如 4D5 和 3E8 的测定法,参见美国专利 5,677,171。

[0220] 为了选择诱导凋亡的抗体,可利用使用 BT474 细胞的膜联蛋白结合测定法。如前一段落所讨论的,在培养皿中培养和接种 BT474 细胞。然后除去培养基,只用新鲜培养基或者含有 10 μ g/ml 单克隆抗体的培养基替换。在 3 天温育期后,用 PBS 洗涤细胞单层,通过胰蛋白酶消化脱离。然后如上文关于细胞死亡测定法所讨论的,离心细胞,重悬于 Ca²⁺ 结合缓冲液中,并等分到试管中。然后往试管中加入经标记的膜联蛋白 (如膜联蛋白 V-FTIC)

(1 μ g/ml)。可使用 FACSCAN™流式细胞计数仪和 FACSCONVERT™ CellQuest 软件 (Becton Dickinson) 来分析样品。选择那些相对于对照诱导统计学显著水平的膜联蛋白结合的抗体作为诱导凋亡的抗体。除了膜联蛋白结合测定法,还可利用使用 BT474 细胞的 DNA 染色测定法。为了进行此测定法,将已经如前面两段所述用目的抗体处理过的 BT474 细胞与 9 μ g/ml HOECHST 33342™于 37°C 温育 2 小时,然后使用 MODFIT LT™软件 (Verity Software House) 在 EPICS ELITE™流式细胞计数仪 (Coulter Corporation) 上进行分析。可选择在此测定法中诱导的凋亡细胞百分比变化比未处理细胞高 2 倍或更高 (优选 3 倍或更高) (直到 100% 凋亡细胞) 的抗体作为促凋亡 (pro-apoptotic) 抗体。用于筛选诱导凋亡抗体诸如 7C2 和 7F3 的测定法参见 W098/17797。

[0221] 为了筛选结合 HER2 上目的抗体所结合的表位的抗体,可进行常规交叉阻断测定法,诸如《Antibodies, A Laboratory Manual》, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane, 1988 中所述,以评估所述抗体是否交叉阻断诸如 2C4 或 Pertuzumab 等抗体与 HER2 的结合。或者 / 另外,可通过本领域已知的方法进行表位作图,且 / 或可研究抗体 -HER2 结构 (Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328 (2004)) 以了解抗体结合 HER2 的哪个 / 哪些结构域。

[0222] (viii) 免疫偶联物

[0223] 本发明还涉及包含偶联有胞毒剂的抗体的免疫偶联物,所述胞毒剂诸如化疗剂、毒素 (如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素,包括其片段和 / 或变体) 或放射性同位素 (即放射偶联物)。

[0224] 上文已经描述了可用于生成此类免疫偶联物的化疗剂。本文还设想了抗体与一种或多种小分子毒素的偶联物,诸如加利车霉素、美登素 (美国专利 5, 208, 020)、单端孢菌毒素和 CC1065。

[0225] 在本发明的一个优选实施方案中,将抗体与一个或多个美登素分子偶联 (例如每个抗体分子偶联约 1 个至约 10 个美登素分子)。例如可将美登素转变为 May-SS-Me, 后者可还原为 May-SH3 并与经修饰抗体反应 (Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992)) 以产生美登素生物碱 - 抗体免疫偶联物。

[0226] 另一种目的免疫偶联物包含偶联有一个或多个加利车霉素分子的 HER2 抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度产生双链 DNA 断裂。可使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰基 - γ_1^I 、PSAG 和 θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993) 和 Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998))。还可参见美国专利 5, 714, 586 ; 5, 712, 374 ; 5, 264, 586 ; 和 5, 773, 001, 明确收入本文作为参考。

[0227] 可使用的酶活毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 (Pseudomonas aeruginosa))、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 (modeccin) A 链、 α -帚曲毒素 (sarcin)、油桐 (Aleurites fordii) 毒蛋白、香石竹 (dianthin) 毒蛋白、美洲商陆 (Phytolacca Americana) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (momordica charantia) 抑制物、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (crotonin)、肥皂草 (sapaonaria officinalis) 抑制物、白树毒素 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin)

和单端孢菌毒素 (tricothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日出版的 WO 93/21232。

[0228] 本发明还设想了抗体与具有核酸水解活性的化合物(如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶诸如脱氧核糖核酸酶;DNA 酶)之间形成的免疫偶联物。

[0229] 有多种放射性同位素可用于生成放射偶联 HER2 抗体。例子包括 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和 Lu 的放射性同位素。

[0230] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和胞毒剂的偶联物,诸如 3-(2-吡啶基二巯基)丙酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP)、4-(N-马来酰亚胺甲基)环己胺-1-羧酸琥珀酰亚胺酯、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯(诸如盐酸己二酰亚胺二甲酯)、活性酯类(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类(诸如戊二醛)、双叠氮化合物(诸如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(诸如双(对重氮苯甲酰基)己二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)的双功能衍生物。例如,可如 Vitetta et al., Science 238 :1098(1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 WO 94/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒性药物的“可切割接头”。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、二甲基接头或含二硫化物接头 (Chari et al., Cancer Research 52 :127-131(1992))。

[0231] 或者,可例如通过重组技术或肽合成来制备包含 HER2 抗体和胞毒剂的融合蛋白。

[0232] 在另一个实施方案中,可将抗体与“受体”(诸如链霉亲和素)偶联,用于肿瘤的预定位,其中对患者施用抗体-受体偶联物,随后使用清除剂从循环中除去未结合的偶联物,然后施用与胞毒剂(如放射性核苷酸)偶联的“配体”(例如亲和素)。

[0233] (ix) 其它抗体修饰

[0234] 本文还设想了抗体的其它修饰。例如,可将抗体与多种非蛋白质性质聚合物中的一种连接,例如聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯、或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。还可将抗体包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶状药物传递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第 16 版,Osol, A. 编,1980。

[0235] 可能希望在效应物功能方面修饰本发明的抗体,例如增强抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。这可通过在抗体 Fc 区中引入一个或多个氨基酸替代来实现。或者/另外,可在 Fc 区中引入半胱氨酸残基,从而使得在该区中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可具有改善的内在化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。参见 Caron et al., J. Exp. Med. 176 : 1191-1195(1992) 和 Shopes, B., J. Immunol. 148 :2918-2922(1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如 Wolff et al., Cancer Research 53 :2560-2565(1993) 中描述的异双功能交联剂来制备。或者,抗体可改造成具有双重 Fc 区,由此可具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。参见 Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3 :219-230(1989)。

[0236] WO 00/42072 (Presta, L.) 描述了在存在人效应细胞时具有改进的 ADCC 功能的抗体,其中所述抗体在其 Fc 区中包含氨基酸替代。优选的是,具有改进的 ADCC 的抗体在 Fc 区的位置 298、333 和/或 334 包含替代。优选的是,改变的 Fc 区是在一个、两个或三个这

些位置处包含替代或由其组成的人 IgG1Fc 区。

[0237] WO 99/51642、美国专利 6,194,551 B1、美国专利 6,242,195 B1、美国专利 6,528,624 B1 和美国专利 6,538,124 (Idusogie 等人) 中描述了具有改变的 C1q 结合和 / 和补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的抗体。这些抗体在其 Fc 区的氨基酸位置 270、322、326、327、329、313、333 和 / 或 334 其中一个或多个处包含氨基酸替代。

[0238] 为了提高抗体的血清半衰期,可如例如美国专利 5,739,277 中所述将补救受体结合表位掺入抗体 (尤其是抗体片段)。在用于本文时,术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子 (如 IgG₁、IgG₂、IgG₃或 IgG₄)Fc 区中负责提高 IgG 分子体内血清半衰期的表位。W000/42072 (Presta, L.) 中还描述了在其 Fc 区中具有替代且血清半衰期延长的抗体。

[0239] 还设想具有三个或更多 (优选四个) 功能性抗原结合位点的改造抗体 (美国专利申请 US 2002/0004587 A1, Miller 等人)。

[0240] 本文公开的 HER2 抗体还可配制成脂质体。可通过本领域已知的方法来制备包含抗体的脂质体,诸如 Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); 美国专利 4,485,045 和 4,544,545; 及 1997 年 10 月 23 日出版的 WO 97/38731 中所述。美国专利 5,013,556 中公开了循环时间延长的脂质体。

[0241] 特别有用的脂质体可用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂质组合物通过反相蒸发法生成。将脂质体挤过具有设定孔径的滤器,以产生具有所需直径的脂质体。可如 Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) 中所述,将本发明抗体的 Fab' 片段经二硫化物交换反应与脂质体偶联。任选在脂质体中包含化疗剂。参见 Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)。

[0242] IV. 药物配制剂

[0243] 制备本发明组合物的治疗用配制剂,即将组合物与任选的药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合 (《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第 16 版,Osol, A. 编,1980),以冻干配制剂或水溶液的形式贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,还包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂 (诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量 (少于约 10 个残基) 多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如 EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐相反离子,诸如钠;金属复合物 (如 Zn-蛋白质复合物);和 / 或非离子表面活性剂,诸如 TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇 (PEG)。WO 97/04801 中描述了冻干 HER2 抗体配制剂。US20006/088523 中记载了对于本发明组合物而言特别优选的配制剂。

[0244] 本文中的配制剂还可含有所治疗具体适应症所必需的超过一种活性化合物,优选那些活性互补且彼此没有不利影响的化合物。例如,可能还希望在配制剂中提供结合 EGFR、HER2 (例如结合 HER2 上不同表位的抗体)、HER3、HER4 或血管内皮生长因子 (VEGF) 的抗体。或者 / 另外,配制剂中还可包含化疗剂、胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂、EGFR 靶

向药物、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂和 / 或心脏保护剂。此类分子适于以有效用于所需目的的量而联合存在。

[0245] 活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中,例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊、在胶状药物传递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于《Remington's Pharmaceutical Sciences》,第16版,Osol, A. 编,1980。

[0246] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质以定型产品的形式存在,如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利3,773,919)、L-谷氨酸和L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0247] 用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0248] V. 使用 HER2 抗体的治疗

[0249] 依照本发明,HER2 抗体可用于治疗癌症。所述癌症通常是 HER2 阳性的,使得本文的 HER2 抗体能够结合所述癌细胞。在一个实施方案中,所述癌症表达低 HER3(例如卵巢癌)或具有升高的 HER2 : HER3 比(例如卵巢癌)。上文定义部分列出了可用本发明组合物治疗的癌症。

[0250] 本文中要治疗的优选的癌症包括:乳腺癌,包括 HER2 阳性乳腺癌,任选与 trastuzumab 和类紫杉烷诸如多西他赛组合,而且包括乳腺癌的新辅助疗法;卵巢癌(包括铂耐受性和铂敏感性卵巢癌)(参见例如 US2006/0013819);肺癌(包括非小细胞肺癌, NSCLC),任选与 EGFR 抑制剂组合(参见例如 US2007/0020261);结肠直肠癌等。

[0251] 本文中 HER2 抗体可用于治疗各种非恶性疾病或病症,诸如自身免疫性疾病(如银屑病);子宫内膜异位;硬皮病;再狭窄;息肉,诸如结肠息肉、鼻息肉或胃肠息肉;纤维腺瘤;呼吸疾病;胆囊炎;神经纤维瘤病;多囊性肾病;炎性疾病;皮肤病症,包括银屑病和皮炎;脉管疾病;牵涉脉管上皮细胞异常增殖的状况;胃溃疡;门内特里埃氏(Menetrier)病,分泌型腺瘤或蛋白质流失综合征(protein loss syndrome);肾病症;血管生成性病症;眼病,诸如年龄相关黄斑变性、假定的眼组织胞浆菌病综合征(presumed ocular histoplasmosis syndrome)、来自增殖性糖尿病性视网膜病、视网膜血管形成、糖尿病性视网膜病或年龄相关的黄斑变性的视网膜新血管形成;骨相关病理学,诸如骨关节炎、佝偻病和骨质疏松;脑缺血事件后的损伤;纤维变性或水肿(edema)疾病,诸如肝硬化、肺纤维化、carcoidosis、throiditis、系统性高粘滞综合症、奥斯勒-韦伯-朗迪(Osler-Weber-Rendu)病、慢性阻塞性肺病,或者烧伤、外伤、辐射、中风、组织缺氧或缺血后的水肿;皮肤的超敏反应;糖尿病性视网膜病变和糖尿病性肾病;格-巴二氏(Guillain-Barre)综合征;移植物抗宿主病或移植排斥;佩吉特氏(Paget)病;骨或关节发炎;光老化(例如由UV照射人皮肤引起的);良性前列腺肥大;某些微生物感染,包括选自腺病毒、汉坦病毒(hantaviruses)、布氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、耶尔森氏菌属(Yersinia spp.)和百日咳博德特氏菌(Bordetella pertussis)的微生物病原体;由血

小板聚集引起的血栓；生殖疾患，诸如子宫内膜异位、卵巢过刺激综合征、先兆子痫、功能障碍性子宫出血或月经频多；滑膜炎；粥样斑；急性和慢性肾病（包括增生性肾小球肾炎和糖尿病诱发的肾病）；湿疹；肥厚性瘢痕形成；内毒素性休克和真菌感染；家族性腺瘤息肉病；神经变性疾病（如阿尔茨海默氏（Alzheimer）病、AIDS 相关痴呆、帕金森氏（Parkinson）病、肌萎缩侧索硬化、视网膜色素变性、脊髓性肌萎缩和小脑变性）；骨髓发育异常综合症（myelodysplastic syndrome）；再生障碍性贫血；缺血性损伤；肺、肾或肝的纤维化；T 细胞介导的超敏性疾病；婴儿肥厚性幽门狭窄；泌尿阻塞综合症；银屑病关节炎；和桥本氏（Hasimoto）甲状腺炎。本文疗法优选的非恶性适应症包括银屑病、子宫内膜异位、硬皮病、脉管疾病（如再狭窄、动脉粥样硬化、冠状动脉病或高血压）、结肠息肉、纤维腺瘤或呼吸疾病（如哮喘、慢性支气管炎、支气管扩张或囊性纤维化）。

[0252] 使用 HER2 抗体的治疗将导致疾病的体征或症状改善。例如，若所治疗疾病是癌症，则此类疗法可导致存活（总体存活和 / 或无进展存活）有所提高和 / 或可导致客观临床响应（部分的或完全的）。

[0253] 优选的是，所施用组合物中的 HER2 抗体是裸抗体。然而，所施用的 HER2 抗体可偶联胞毒剂。优选的是，免疫偶联物和 / 或其所结合的 HER2 蛋白质受到细胞的内在化，导致免疫偶联物杀伤其所结合的癌细胞的治疗功效提高。在一个优选的实施方案中，胞毒剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。此类胞毒剂的例子包括美登木素生物碱、加利车霉素、核糖核酸酶和 DNA 内切核酸酶。

[0254] 依照已知方法对人类患者施用 HER2 抗体，诸如静脉内施用，例如推注或一段时间的连续输注，通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入路径。优选静脉内施用抗体组合物。

[0255] 对于疾病的预防或治疗，HER2 抗体的适当剂量将取决于如上定义的待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和进程、施用 HER2 抗体是为了预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床史和对 HER2 抗体的响应、及主治医师的判断。适当的在某一时间或者通过一系列治疗对患者施用 HER2 抗体。根据疾病的类型和严重程度，对患者施用的初始候选剂量是约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $50\text{mg}/\text{kg}$ （如 $0.1\text{--}20\text{mg}/\text{kg}$ ）HER2 抗体，无论是通过例如一次或多次分开的施用，或者通过连续输注。在一个实施方案中，HER2 抗体的初始输注时间可长于后续输注时间，例如初始输注为约 90 分钟，而后续输注为约 30 分钟（如果初始输注耐受良好的话）。优选的 HER2 抗体剂量将在约 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内。因此，可对患者施用约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 或 $10\text{mg}/\text{kg}$ （或其任意组合）的一剂或多剂。这样的剂量可间歇施用，例如每周或每三周（例如使得患者接受约 2 剂至约 20 剂，例如约 6 剂 HER2 抗体）。可首先施用较高的加载剂量，后续较低的一剂或多剂。在一个实施方案中，首先以约 840mg 的加载剂量施用 HER2 抗体，然后大约每三周施用约 420mg 。在另一个实施方案中，首先以约 1050mg 的加载剂量施用 HER2 抗体，然后大约每三周施用约 525mg 。

[0256] 其它治疗剂可与 HER2 抗体联合。这样的联合施用包括使用分开的配制剂或单一的药用配制剂的共施用或同时施用，以及任一次序的连续施用，其中优选有一段时间所有两种（或多种）活性剂同时发挥其生物学活性。因此，可在施用 HER2 抗体之前或之后施用其它治疗剂。在此实施方案中，至少一次其它治疗剂的施用和至少一次 HER2 抗体的施用之间的计时优选为约 1 个月或更短，且最优选约 2 周或更短。或者，以单一的配制剂或分开的

配制剂同时对患者施用其它治疗剂和 HER2 抗体。

[0257] 可与 HER2 抗体联合的其它治疗剂的例子包括以下任一种或多种：化疗剂，诸如抗代谢物，如吉西他滨；第二种不同的 HER2 抗体（例如生长抑制性 HER2 抗体诸如 Trastuzumab 或诱导 HER2 过表达细胞凋亡的 HER2 抗体诸如 7C2、7F3 或其人源化变体）；靶向另一种肿瘤相关抗原诸如 EGFR、HER3、HER4 的第二种抗体；抗激素化合物，例如抗雌激素化合物诸如他莫昔芬，或芳香酶抑制剂；心脏保护剂（以预防或减轻与治疗有关的任何心肌功能障碍）；细胞因子；EGFR 靶向药物（诸如 Erlotinib、Gefitinib、或 Cetuximab）；抗血管生成剂（尤其是 Genentech 销售的 Bevacizumab，商标为 AVASTIN™）；酪氨酸激酶抑制剂；COX 抑制剂（例如 COX-1 或 COX-2 抑制剂）；非类固醇抗炎药，Celecoxib（**CELEBREX®**）；法呢基转移酶抑制剂（例如可从 Johnson and Johnson 购买的 Tipifarnib/ZARNESTRA® R 115777 或可从 Schering-Plough 购买的 Lonafamib SCH66336）；结合癌胚蛋白 CA 125 的抗体，诸如 Oregovomab (MoAb B43.13)；HER2 疫苗（诸如 Pharmexia 的 HER2 Auto Vac 疫苗，或 Dendreon 的 APC8024 蛋白质疫苗，或 GSK/Corixa 的 HER2 肽疫苗）；其它 HER 靶向疗法（如 trastuzumab、cetuximab、gefitinib、erlotinib、CI1033、GW2016 等）；Raf 和 / 或 ras 抑制剂（参见例如 WO 2003/86467）；Doxil；托泊替康 (Topotecan)；紫杉烷；GW572016；TLK286；EMD-7200；治疗恶心的药物，诸如血清素拮抗剂、类固醇或苯并二氮卓类 (benzodiazepien)；预防或治疗皮疹的药物或标准痤疮疗法，包括局部或口服抗生素；降体温药物，诸如醋氨酚 (acetaminophen)、苯海拉明 (diphenhydramine) 或哌替啶 (meperidine)；造血生长因子，等等。

[0258] 任何上述共施用药剂的合适剂量就是那些目前所使用的剂量，并且可由于该药剂与 HER2 抗体的联合作用（协同作用）而降低。联合 HER2 抗体组合物和其它治疗剂的治疗可对患者产生协同的、或者大于累加的治疗效益。

[0259] 如果施用化疗剂，通常以对此已知的剂量施用，或者任选由于所述药物的联合作用或可归于施用化疗剂的不良副作用而降低。所述化疗剂的制备和给药方案可依照制造商的说明书进行或由熟练从业人员根据经验确定。所述化疗的制备和给药方案还可参阅《Chemotherapy Service》，Ed.，M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)。

[0260] 除了上述治疗方案，还可对患者进行手术去除癌细胞和 / 或放疗。

[0261] VII. 材料保藏

[0262] 以下杂交瘤细胞系已保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA)：

[0263]

抗体名称	ATCC 编号	保藏日期
7C2	ATCC HB-12215	1996 年 10 月 17 日
7F3	ATCC HB-12216	1996 年 10 月 17 日
4D5	ATCC CRL 10463	1990 年 5 月 24 日

2C4	ATCC HB-12697	1999年4月8日
-----	---------------	-----------

[0264] 下面的非限制性实施例例示了本发明的更多细节。说明书中所有引用文献的内容均明确收入本文作为参考。

[0265] 实施例 1

[0266] 此实施例描述一种包含结合 HER2 结构域 II 的主要种类 HER2 抗体 (Pertuzumab) 及其酸性变体的组合物的表征。

[0267] Pertuzumab 是在人 IgG1 (κ) 框架基础上产生的重组人源化单克隆抗体。它包含两条重链 (448 个残基) 和两条轻链 (214 个残基)。两条重链由两个链间二硫键连接, 且各轻链通过一个链间二硫键附着于重链。在 Pertuzumab 的 Fc 区中在两条重链的 Asn-299 处有一个 N-连接糖基化位点。Pertuzumab 与 HERCEPTIN[®] (Trastuzumab) 的不同在于轻链 (12 个氨基酸差异) 和重链 (30 个氨基酸差异) 的表位结合区。由于这些差异, Pertuzumab 结合 HER2 受体上完全不同的表位。Pertuzumab 与人上皮细胞上 HER2 受体的结合阻止了它与 HER 受体家族的其它成员形成复合物 (Agus et al., Cancer Cell 2:127-137(2002))。通过阻断复合物的形成, Pertuzumab 阻止了所述复合物的配体 (例如 EGF 和 heregulin) 的生长刺激作用。体外实验证明了 Pertuzumab 和 Pertuzumab-Fab 都抑制 heregulin (HRG) 与 MCF7 细胞的结合, 并且 HRG 刺激的 HER2-HER3 复合物的磷酸化作用可被 Pertuzumab 和 Pertuzumab-Fab 二者所抑制 (Agus et al., Cancer Cell 2:127-137(2002))。此外, 发现 Pertuzumab 和 Pertuzumab 的聚乙二醇衍生化 Fab 在体内对肿瘤生长的抑制作用在鼠前列腺癌异种移植模型中是相当的 (Agus et al., Cancer Cell 2:127-137(2002))。这些资料表明所述抗体的 Fc 区不是抑制肿瘤生长所必需的, 而且二价性和 Fc 介导的效应物功能也不是体内或体外生物学活性所必需的。

[0268] 在此实施例中, 自阳离子交换柱收集 Pertuzumab 的主峰, 并在细胞培养基中温育或使用标准抗体纯化操作来加工。在主峰与细胞培养基成分一起温育时形成酸性变体。单克隆抗体的酸性变体是想要的产物的修饰形式, 它们在通过阳离子交换层析分开时比主峰早洗脱。在工艺变化之前和之后常常观察到酸性变体的量和 / 或分布的微小差异, 而且对证明产物可比性提出挑战。纯化操作对酸性变体形成的影响较小。在酸性变体级分中鉴定出的变体包括糖化变体、脱酰胺变体, 二硫化物还原变体、唾液酰化变体、和不可还原变体。总之, 酸性变体是完全有效力的。

[0269] 此项研究的目的是: 更好地了解细胞培养和回收工艺对 Pertuzumab 酸性变体形成的影响, 表征 Pertuzumab 的主要酸性变体, 及评估酸性变体对药动学 (PK) 的影响, 等。

[0270] 大鼠药动学研究显示酸性变体级分和主峰级分的曲线下面积等同于 Pertuzumab 起始材料 (几何均值比分别为 0.96 和 0.95)。这些结果证明虽然酸性变体在化学上与主峰不同, 但是它们具有等同的药动学。

[0271] 方法和结果

[0272] 图 10 描绘了阳离子交换 MP (主峰) 和 AV (酸性变体) 的分离、细胞培养、回收、和 PK (药动学) 评估和分析测试的实验设计。新鲜的培养基 = 标准培养基; 用过的培养基 = 细胞培养 12 天后的标准培养基, 通过离心来除去细胞。不控制溶解氧、pH、和其它参数。

[0273] A. 主峰和酸性变体的分离

[0274] 在 4.0x250mm DIONEX PROPAC WCX-10J 阳离子交换 (CEX) 柱上使用下述条件将 Pertuzumab 的电荷变体分开：

[0275] 缓冲液 A :20mM BisTris, pH 6.0

[0276] 缓冲液 B :20mM BisTris, 200mM NaCl, pH 6.0

[0277] 梯度 :0.5% B/min, 以 1.0mL/min 运行

[0278] 柱温度 :35℃

[0279] 检测 :280nm

[0280] 图 11 显示了一幅典型的层析图。收集了 AV(酸性变体)和 MP(主峰)级分。

[0281] 效力和单体含量在 pertuzumab 起始材料、主峰、和酸性变体间是相似的(图 12)。根据通过 CEX 测得的 90%纯度标准,主峰和酸性变体 CEX 级分的纯度是药动学研究可接受的(图 12)。

[0282] B. 主峰掺入实验

[0283] 将通过 CEX 分离的 Pertuzumab 主峰掺入新鲜的或用过的细胞培养基(没有细胞),并于 37℃温育 12 天,如图 10 所概述的。各个时间点的样品直接地或在通过蛋白 A 分离后通过 CEX 来分析。还将主峰掺入培养基 +/- 各种培养基成分,诸如葡萄糖和蛋白胨。另外,经由标准回收操作诸如蛋白 A 层析(ProA)、低 pH 处理、和 SP Sepharose Fast Flow (SPFF)加工主峰数个循环并通过 CEX 来分析。

[0284] 在新鲜的或用过的培养基中温育 12 天的主峰的 CEX 图谱是相似的(图 13 和图 14)。主峰在新鲜的培养基中温育后比在用过的培养基中缩小得更多。消除各种培养基成分不影响主峰的缩小。温育样品中的百分比主峰在有和没有蛋白 A 分离的情况中是相同的。在单独的培养基缓冲液中温育引起主峰损失。

[0285] 自培养基蛋白 A 分离主峰不影响 CEX 图,证明了温育期间的更改不影响蛋白 A 结合或洗脱。回收操作对百分比 CEX 主峰有较小的影响或没有影响。

[0286] C. 酸性变体的表征

[0287] 通过 CEX 自在细胞培养基中温育的主峰或 Pertuzumab 起始材料分离 Pertuzumab 酸性变体。通过图 15 中列举的方法来分析分离的酸性变体。酸性变体占总峰面积的 21%,因此鉴定了约 80% (21%中的 17%) 的酸性变体。脱酰胺形式不能被定量。

[0288] 在通过将主峰与培养基一起温育生成的酸性变体中鉴定的形式与在 Pertuzumab 起始材料中鉴定的那些相同。检测到下述形式:唾液酰化变体、二硫化物还原变体、糖化变体、不可还原变体、和脱酰胺变体。还原和 PNGase 处理后通过电喷雾电离质谱术 (ESI-MS) 鉴定出高级糖化形式。

[0289] D. 药动学 (PK) 研究

[0290] 单剂静脉内 (IV) 10mg/kg, 每组 12 只大鼠, 3 组 (酸性变体、主峰、Pertuzumab 起始材料)。广泛的 PK 采样进行 35 天。酸性变体、主峰、和 Pertuzumab 起始材料间 AUC (第 0-14 天) 的几何均值比。几何均值比 = GM 样品 / GM IgG1 起始材料。Pertuzumab 起始材料、酸性变体、和主峰的 Pertuzumab 浓度对时间曲线是相似的(图 16 和图 17)。在酸性变体、主峰、和 Pertuzumab 起始材料之间没有观察到暴露的显著差异。GMR 为约 1.0, 90% CI 介于 0.80 至 1.25 之间。

[0291] 结论

[0292] 多项细胞培养因素有助于酸性变体形成,但是回收没有显示出影响酸性变体形成。在酸性级分中鉴定出二硫化物还原变体、不可还原变体、唾液酰化变体、糖化变体、和脱酰胺变体。自 Pertuzumab 起始材料分离的酸性级分和通过温育 CEX 主峰生成的那些含有相同的形式。酸性变体、主峰、和 Pertuzumab 起始材料具有相同的药动学。

[0293] DocCode=SCORE

[0294] IFW 内容的 SCORE 占位页

[0295] 申请号 :PCT/US09/32220 文件日期 :01/28/2009

[0296] 此表格在 IFW 记录中的存在指明了在上文鉴定的日期以电子格式接收了下列文件类型。此内容保存在 SCORE 数据库中。

[0297] • 设计图

[0298] 既然这是电子提交的,那么就没有物理人工文件夹,在 PALM 中没有记录人工文件夹,而且不存在纸文件或物理媒体。IFW 记录中的 TIFF 图像是自保存在 SCORE 中的原始文件创建的。

[0299] 为了获取 SCORE 数据库中的文件,见 SIRA 制定的说明。

[0300] 在文件入口时(如上所述):

[0301] • 审查员可以经 eDAN 界面获取 SCORE 内容。

[0302] • 其它 USPTO 雇员能登记(bookmark)当前 SCORE URL(<http://es/ScoreAccessWeb/>)。

[0303] • 外部用户可以经公众和私人 PAIR(Public and Private PAIR) 界面获取 SCORE 内容。

[0304] 表格修正日期 :2006 年 2 月 8 日

[0001]

序列表

<110> 健泰科生物技术公司 (GENENTECH, INC.)
 HARRIS, REED J.
 MOTCHNIK, PAUL A.

<120> 包含结合 HER2 结构域 II 的抗体及其酸性变体的组合物

<130> P4169R1 WO

<140> PCT/US2009/032220
 <141> 2009-01-28

<150> US 61/024, 825
 <151> 2008-01-30

<160> 24

<210> 1
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 1
 Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 95 100 105
 Ile Lys

<210> 2
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 2
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu
 35 40 45
 Glu Trp Ile Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60

[0002]

Asn Gln Arg Phe Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser
65 70 75

Ser Arg Ile Val Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
95 100 105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
20 25 30

Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
20 25 30

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr

[0003]

	50		55		60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser					
	65		70		75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp					
	80		85		90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr					
	95		100		105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser					
	110		115		

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val					
1	5		10		15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser					
	20		25		30

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys					
	35		40		45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser					
	50		55		60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile					
	65		70		75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln					
	80		85		90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu					
	95		100		105

Ile Lys

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 6

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly					
1	5		10		15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser					
	20		25		30

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu					
	35		40		45

[0004]

<223> 序列是合成的.

<400> 10
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<220>
<221> 未确定
<222> 5
<223> Xaa 优选为 R 或 L

<220>
<221> 未确定
<222> 6
<223> Xaa 优选为 Y 或 E

<220>
<221> 未确定
<222> 7
<223> Xaa 优选为 T 或 S

<400> 11
Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa
5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的.

<400> 12
Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
5

<210> 13
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的.

<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
20 25 30
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

[0006]

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195

Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210

Arg Gly Glu Cys

<210> 14

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 14

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr
95 100 105

Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0007]

	110	115	120
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe		Pro Leu Ala Pro Ser Ser	
	125	130	135
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala		Leu Gly Cys Leu Val Lys	
	140	145	150
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val		Ser Trp Asn Ser Gly Ala	
	155	160	165
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		Ala Val Leu Gln Ser Ser	
	170	175	180
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		Thr Val Pro Ser Ser Ser	
	185	190	195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		Val Asn His Lys Pro Ser	
	200	205	210
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu		Pro Lys Ser Cys Asp Lys	
	215	220	225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		Pro Glu Leu Leu Gly Gly	
	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		Pro Lys Asp Thr Leu Met	
	245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		Val Val Val Asp Val Ser	
	260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		Trp Tyr Val Asp Gly Val	
	275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	
	290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu		Thr Val Leu His Gln Asp	
	305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys		Lys Val Ser Asn Lys Ala	
	320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		Ser Lys Ala Lys Gly Gln	
	335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		Pro Pro Ser Arg Glu Glu	
	350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		Cys Leu Val Lys Gly Phe	
	365	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		Glu Ser Asn Gly Gln Pro	
	380	385	390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		Val Leu Asp Ser Asp Gly	
	395	400	405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr		Val Asp Lys Ser Arg Trp	
	410	415	420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		Val Met His Glu Ala Leu	
	425	430	435

[0008]

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 15
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的.

<400> 15

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
20 25 30
Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90
Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110 115 120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125 130 135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140 145 150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155 160 165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185 190 195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200 205 210

Arg Gly Glu Cys

<210> 16
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的.

[0009]

```

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1                5                10                15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
                20                25                30

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
                35                40                45

Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
                50                55                60

Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
                65                70                75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
                80                85                90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
                95                100               105

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
                110               115               120

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
                125               130               135

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
                140               145               150

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
                155               160               165

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
                170               175               180

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
                185               190               195

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
                200               205               210

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
                215               220               225

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
                230               235               240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245               250               255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
                260               265               270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
                275               280               285

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
                290               295               300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                305               310               315

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

```

[0010]

	320		325		330
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser		Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
	335		340		345
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		Pro Ser Arg Glu Glu Met			
	350		355		360
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
	365		370		375
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
	380		385		390
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		Leu Asp Ser Asp Gly Ser			
	395		400		405
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		Asp Lys Ser Arg Trp Gln			
	410		415		420
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		Met His Glu Ala Leu His			
	425		430		435
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		Leu Ser Pro Gly			
	440		445		
<210> 17					
<211> 233					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 序列是合成的.					
<400> 17					
Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe		Leu Val Ala Thr Ala Thr			
1	5	10			15
Gly Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr		Gln Ser Pro Ser Ser Leu			
	20	25			30
Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr		Ile Thr Cys Lys Ala Ser			
	35	40			45
Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala Trp		Tyr Gln Gln Lys Pro Gly			
	50	55			60
Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser		Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr			
	65	70			75
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser		Gly Ser Gly Thr Asp Phe			
	80	85			90
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		Glu Asp Phe Ala Thr Tyr			
	95	100			105
Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro		Tyr Thr Phe Gly Gln Gly			
	110	115			120
Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val		Ala Ala Pro Ser Val Phe			
	125	130			135
Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu		Lys Ser Gly Thr Ala Ser			
	140	145			150

[0011]

Val Val Cys Leu	Leu Asn Asn Phe Tyr	Pro Arg Glu Ala Lys Val	155	160	165
Gln Trp Lys Val	Asp Asn Ala Leu Gln	Ser Gly Asn Ser Gln Glu	170	175	180
Ser Val Thr Glu	Gln Asp Ser Lys Asp	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser	185	190	195
Ser Thr Leu Thr	Leu Ser Lys Ala Asp	Tyr Glu Lys His Lys Val	200	205	210
Tyr Ala Cys Glu	Val Thr His Gln Gly	Leu Ser Ser Pro Val Thr	215	220	225
Lys Ser Phe Asn	Arg Gly Glu Cys		230		
<210>	18				
<211>	467				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	序列是合成的.				
<400>	18				
Met Gly Trp Ser	Cys Ile Ile Leu Phe	Leu Val Ala Thr Ala Thr	1	5	10
Gly Val His Ser	Glu Val Gln Leu Val	Glu Ser Gly Gly Gly Leu	20	25	30
Val Gln Pro Gly	Gly Ser Leu Arg Leu	Ser Cys Ala Ala Ser Gly	35	40	45
Phe Thr Phe Thr	Asp Tyr Thr Met Asp	Trp Val Arg Gln Ala Pro	50	55	60
Gly Lys Gly Leu	Glu Trp Val Ala Asp	Val Asn Pro Asn Ser Gly	65	70	75
Gly Ser Ile Tyr	Asn Gln Arg Phe Lys	Gly Arg Phe Thr Leu Ser	80	85	90
Val Asp Arg Ser	Lys Asn Thr Leu Tyr	Leu Gln Met Asn Ser Leu	95	100	105
Arg Ala Glu Asp	Thr Ala Val Tyr Tyr	Cys Ala Arg Asn Leu Gly	110	115	120
Pro Ser Phe Tyr	Phe Asp Tyr Trp Gly	Gln Gly Thr Leu Val Thr	125	130	135
Val Ser Ser Ala	Ser Thr Lys Gly Pro	Ser Val Phe Pro Leu Ala	140	145	150
Pro Ser Ser Lys	Ser Thr Ser Gly Gly	Thr Ala Ala Leu Gly Cys	155	160	165
Leu Val Lys Asp	Tyr Phe Pro Glu Pro	Val Thr Val Ser Trp Asn	170	175	180
Ser Gly Ala Leu	Thr Ser Gly Val His	Thr Phe Pro Ala Val Leu	185	190	195

[0012]

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 200 205 210
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 215 220 225
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 230 235 240
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 245 250 255
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 260 265 270
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 275 280 285
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 320 325 330
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 335 340 345
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 350 355 360
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 365 370 375
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 380 385 390
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 395 400 405
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 410 415 420
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 425 430 435
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 440 445 450
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 455 460 465
 Pro Gly
 <210> 19
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 19
 Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala

[0013]

1	5	10	15
Ser Pro Glu Thr	His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly		
	20	25	30
Cys Gln Val Val	Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr		
	35	40	45
Asn Ala Ser Leu Ser	Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly		
	50	55	60
Tyr Val Leu Ile Ala	His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln		
	65	70	75
Arg Leu Arg Ile Val	Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr		
	80	85	90
Ala Leu Ala Val Leu	Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr		
	95	100	105
Pro Val Thr Gly Ala	Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu		
	110	115	120
Arg Ser Leu Thr Glu	Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg		
	125	130	135
Asn Pro Gln Leu Cys	Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile		
	140	145	150
Phe His Lys Asn Asn	Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn		
	155	160	165
Arg Ser Arg Ala Cys	His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser		
	170	175	180
Arg Cys Trp Gly Glu	Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg		
	185	190	195
<210> 20			
<211> 124			
<212> PRT			
<213> 人(Homo sapiens)			
<400> 20			
Thr Val Cys Ala Gly	Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro		
1	5	10	15
Thr Asp Cys Cys His	Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro		
	20	25	30
Lys His Ser Asp Cys	Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly		
	35	40	45
Ile Cys Glu Leu His	Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp		
	50	55	60
Thr Phe Glu Ser Met	Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly		
	65	70	75
Ala Ser Cys Val Thr	Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp		
	80	85	90
Val Gly Ser Cys Thr	Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val		
	95	100	105

[0014]

Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro
 110 115 120
 Cys Ala Arg Val
 <210> 21
 <211> 169
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 21
 Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe
 20 25 30
 Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala
 35 40 45
 Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu
 50 55 60
 Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
 65 70 75
 Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile
 80 85 90
 Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
 95 100 105
 Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu
 110 115 120
 Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe
 125 130 135
 Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln
 140 145 150
 Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly
 155 160 165
 Glu Gly Leu Ala
 <210> 22
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 22
 Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro
 1 5 10 15
 Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys
 20 25 30
 Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
 35 40 45
 Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
 50 55 60

[0015]

Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val
 65 70 75
 Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys
 80 85 90
 Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys
 95 100 105
 Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
 110 115 120
 Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu
 125 130 135
 Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
 140
 <210> 23
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 序列是合成的。
 <400> 23
 Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln
 20 25 30
 Asp Val Ser Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
 35 40 45
 Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly
 50 55 60
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 80 85 90
 Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 95 100 105
 Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile
 110 115 120
 Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 125 130 135
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln
 140 145 150
 Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser
 155 160 165
 Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 170 175 180
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr

[0016]

	185	190	195
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys			
	200	205	210
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	215		
<210> 24			
<211> 449			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 序列是合成的.			
<400> 24			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
1	5	10	15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr			
	20	25	30
Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
	35	40	45
Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr			
	50	55	60
Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser			
	65	70	75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
	80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr			
	95	100	105
Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala			
	110	115	120
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
	125	130	135
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
	140	145	150
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu			
	155	160	165
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly			
	170	175	180
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
	185	190	195
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn			
	200	205	210
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
	215	220	225
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
	230	235	240

[0017]

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp	305	310	315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	320	325	330
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	335	340	345
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met	350	355	360
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	365	370	375
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu	380	385	390
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	395	400	405
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln	410	415	420
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	425	430	435
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	440	445	

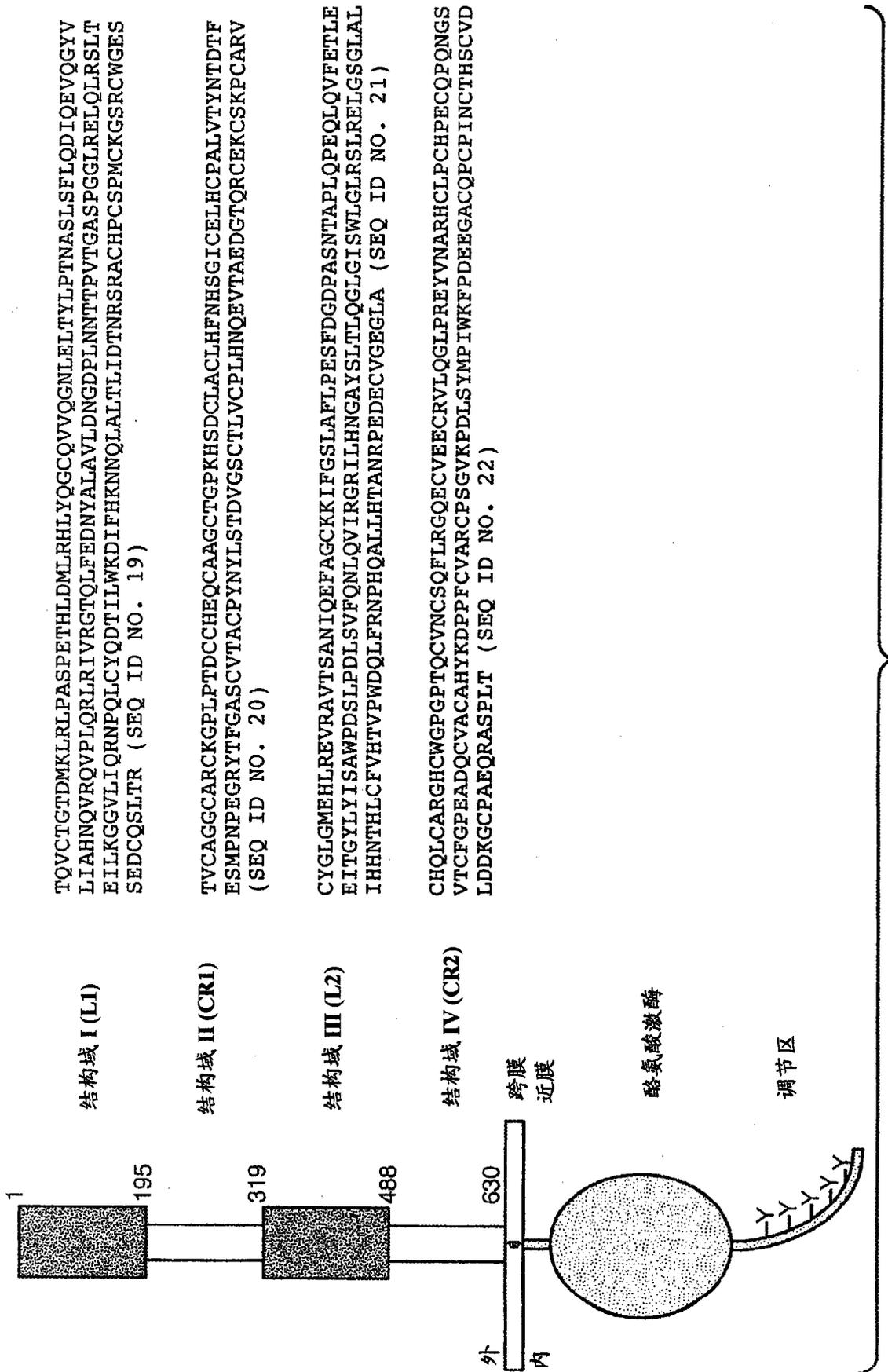


图 1

Pertuzumab 轻链的氨基酸序列

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSIGVAWYQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPVPS
      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
RFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSSSTLT
      190     200     210
      |      |      |
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

图 3A

Pertuzumab 重链的氨基酸序列

```

1      10      20      30      40      50      60
|      |      |      |      |      |      |
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYMMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIIY
      70      80      90      100     110     120
      |      |      |      |      |      |
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSA
      130     140     150     160     170     180
      |      |      |      |      |      |
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
      190     200     210     220     230     240
      |      |      |      |      |      |
LYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP
      250     260     270     280     290     300
      |      |      |      |      |      |
SVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
      310     320     330     340     350     360
      |      |      |      |      |      |
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
      370     380     390     400     410     420
      |      |      |      |      |      |
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
      430     440     448
      |      |      |
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

图 3B

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S D I Q M T Q S S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S 45
 46 Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F 90
 91 T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F 135
 136 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E 180
 181 S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T 225
 226 K S F N R G E C (SEQ ID NO. 17) 233

图 4A

1 M G W S C I I L F L V A T A T G V H S E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G 45
 46 F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S 90
 91 V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V 135
 136 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N 180
 181 S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H 225
 226 K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D 270
 271 T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E 315
 316 Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A 360
 361 K G Q P R E P Q V Y T L P P S R R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N 405
 406 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R R W Q Q G N V F S C S V M H 450
 451 E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (SEQ ID NO. 18)

图 4B

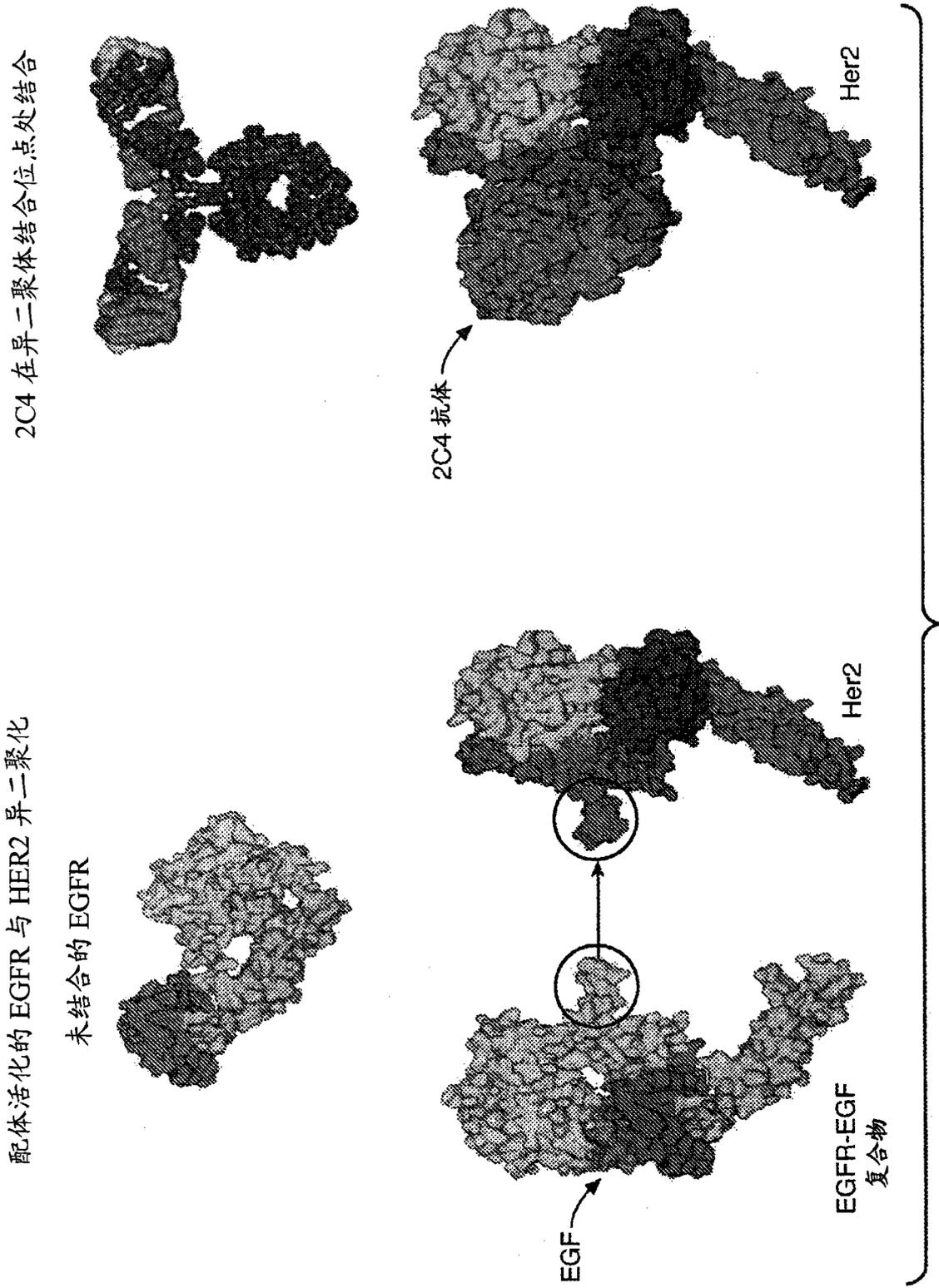


图 5

HER2/3 至 MAPK 和 Akt 途径的偶联

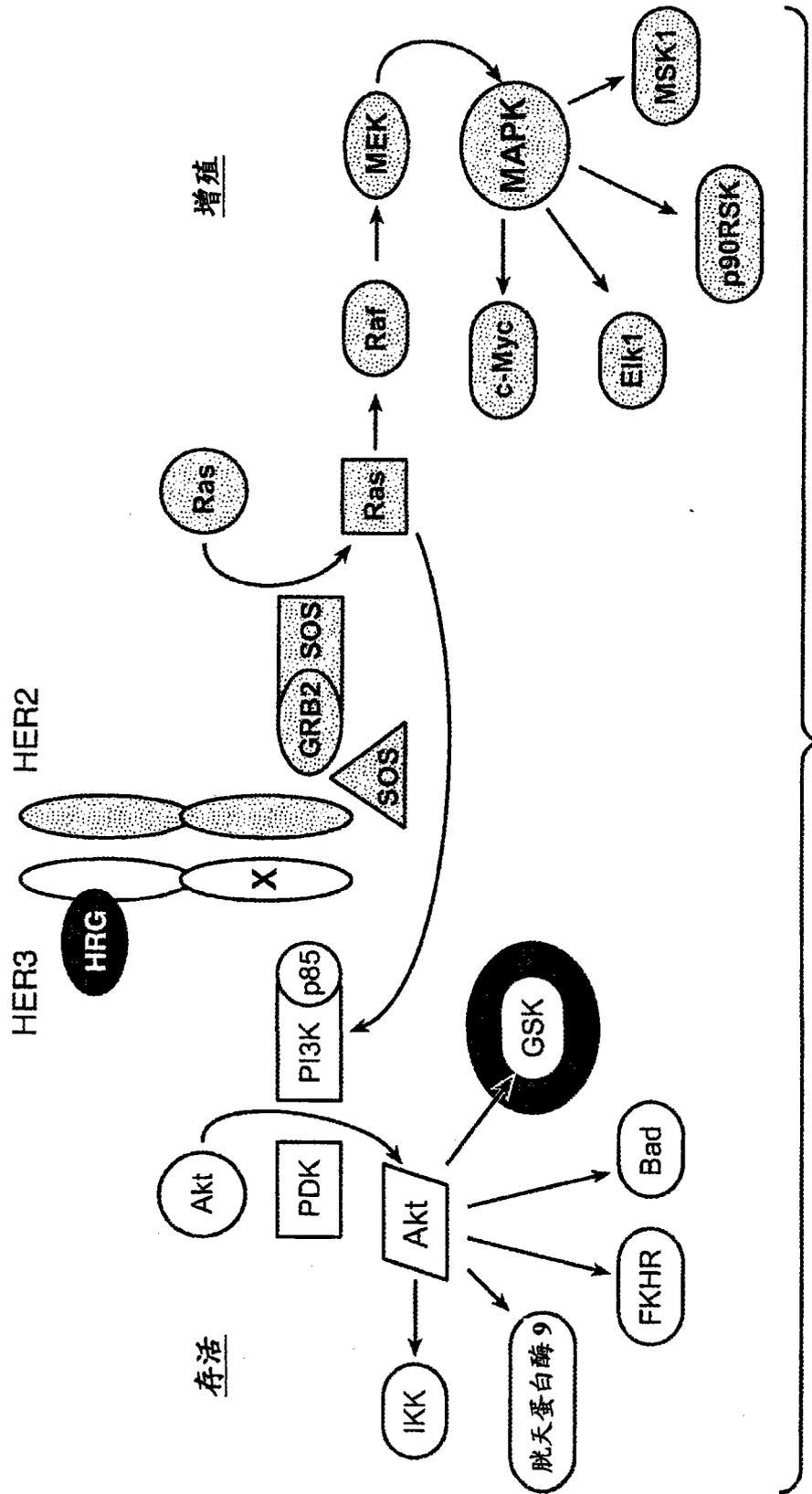


图 6

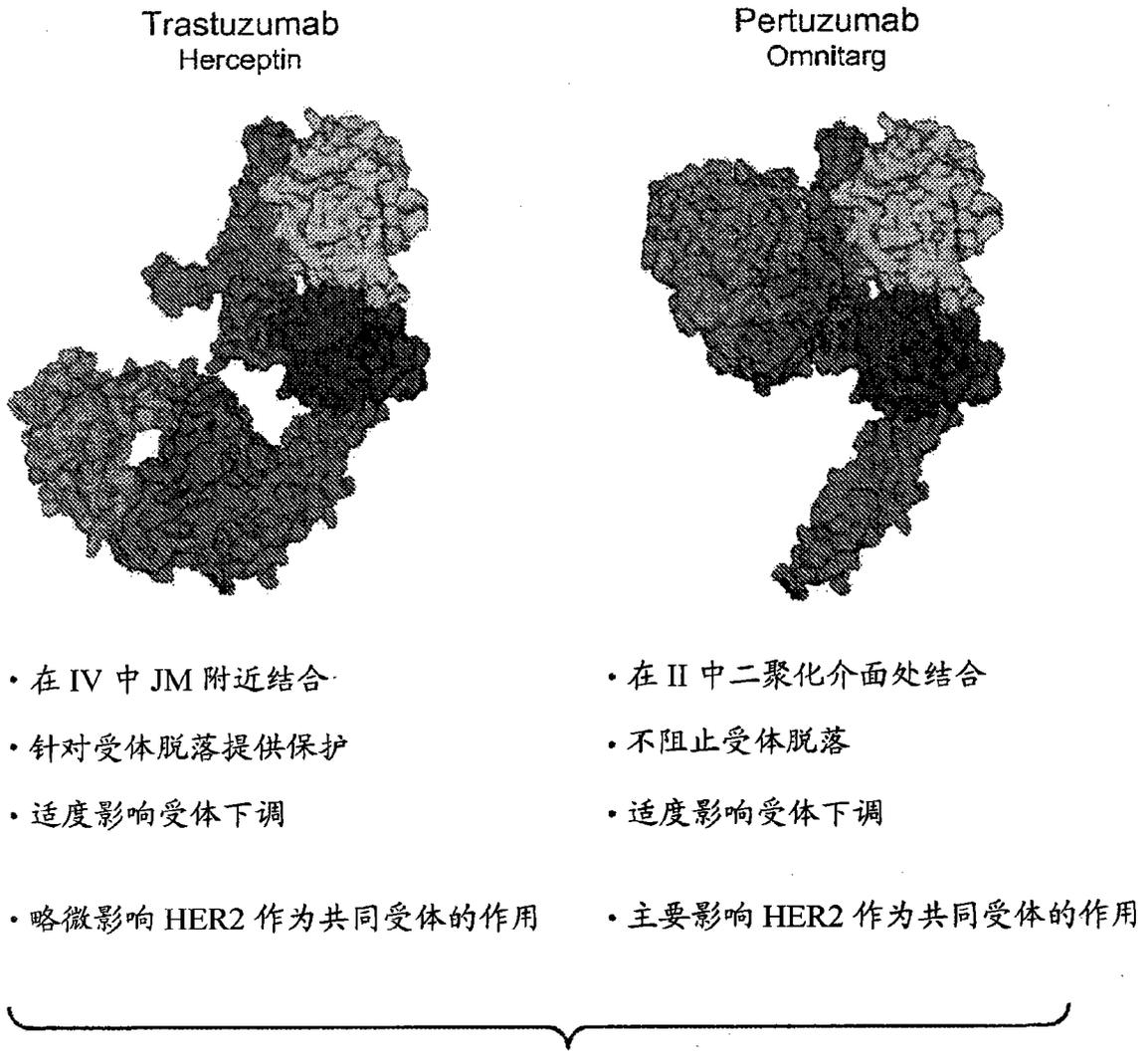


图 7

重链

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNIKDTYIHWVVRQAPGKGL 30 45
 46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AED 75 90
 91 TAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSS 120 135
 136 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH TFFAVLQSS 165 180
 181 GLYSSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 210 225
 226 THTCPPCPAPELLGGPSSVFLFPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVS 255 270
 271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKKPREEQYNS T YRVS V L T V L H Q D 300 315
 316 WLN GK EYKCKVSNKALPAPIEK T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E 345 360
 361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK T T P P V L D S D G 390 405
 406 SFFLYSKLTVDKSRWQQQGNV F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G 435 449

图 8B

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K 45
 46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y 90
 91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V 135
 136 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S 180
 181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (SEQ ID NO. 23) 217

图 9A

1 EVQLVESGGGLVQPGGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDDWVRRQAPGKGL 45
 46 EWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLR AED 90
 91 TAVYYCARN L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K 135
 136 S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G 180
 181 L Y S L S S V V T V P S S L G T Q T Y I C N V N N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T 225
 226 H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R R T P E V T C V V D V S H 270
 271 E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W 315
 316 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M 360
 361 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S 405
 406 F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K 449

(SEQ ID NO. 24)

图 9B

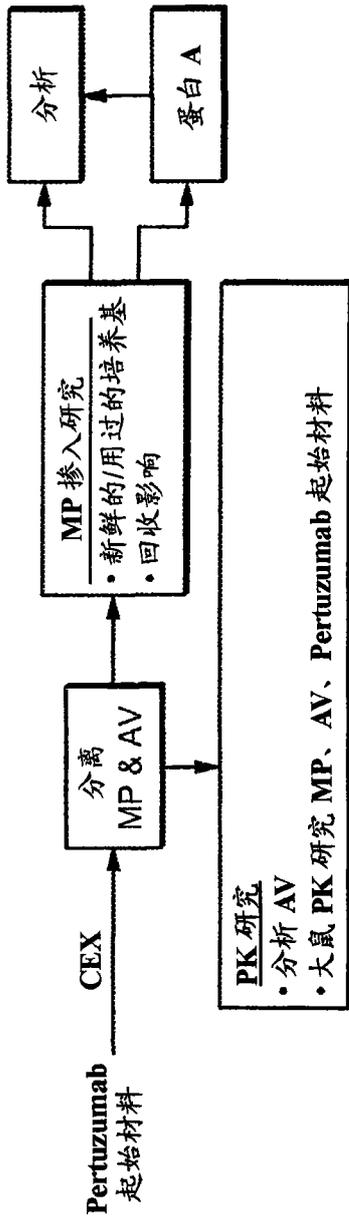


图 10

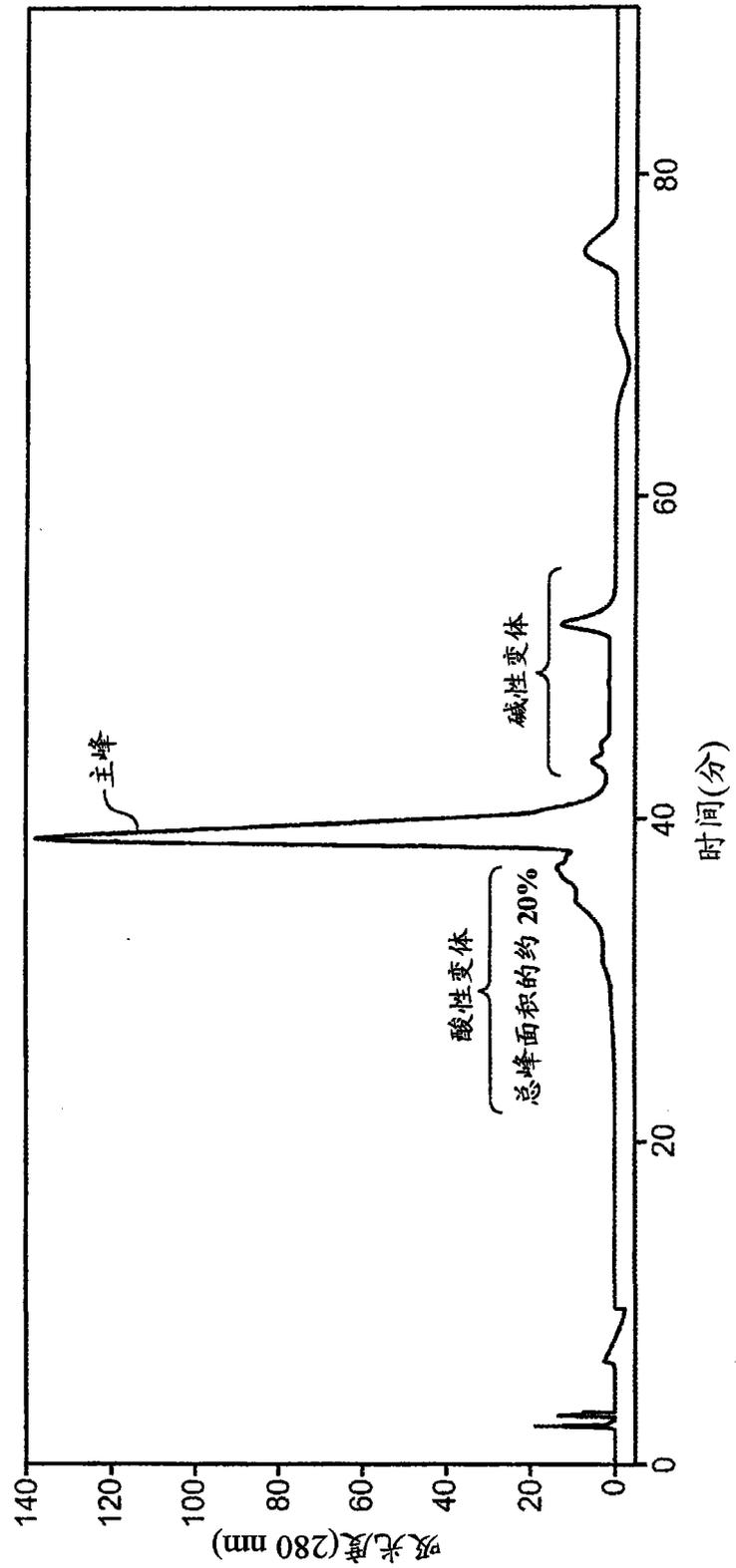


图 11

对 Pertuzumab 起始材料和 CEX 级分的分析			
分析	起始材料	主峰	酸性变体
CEX (%AV, %MP, %BV)	21, 68, 12	5, 93, 2	95, 4, 2
效力	94 (Ave. n=2)	109	92
SEC (%单体)	99.9	99.9	100

图 12

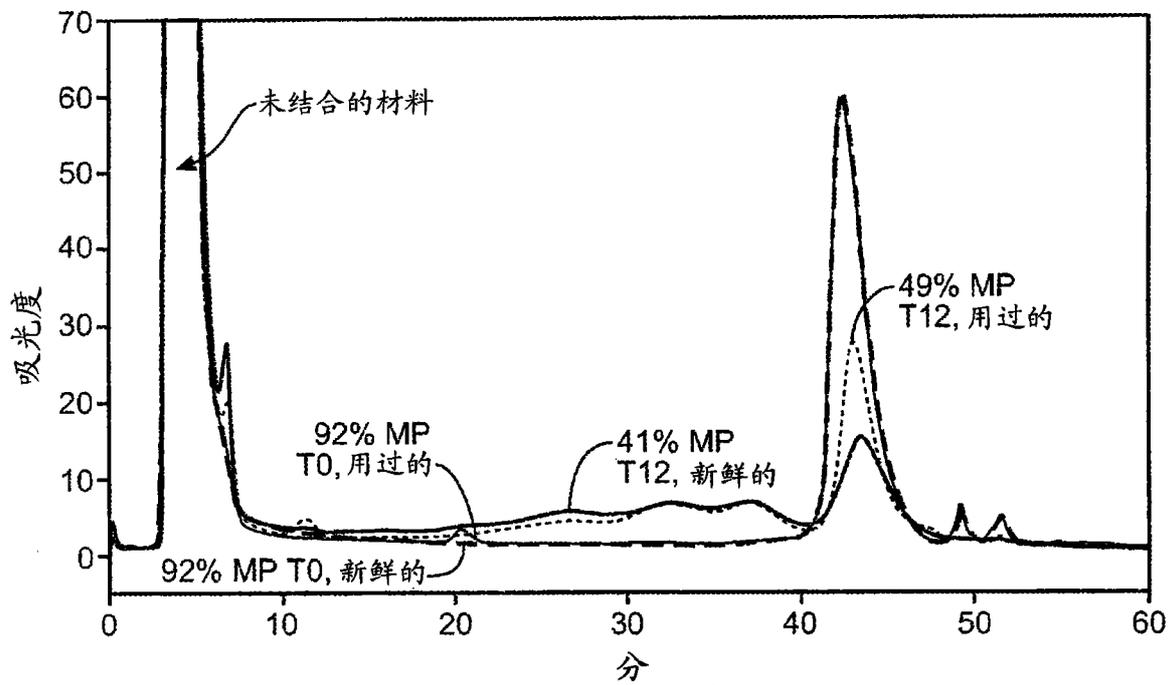


图 13

主峰温育条件	
12 天温育样品条件	%CEX 主峰
时间零点	90-92
新鲜的培养基	41%
用过的培养基	49%
-葡萄糖	43%
-葡萄糖、-蛋白胨、-Pluronic	41%
新鲜的培养基+ProA 分离	37%
培养基缓冲液	56%

图 14

用于表征酸性变体的方法	
方法	检测到的变体*
CEX +/- 唾液酸酶处理	6%唾液酰化的
还原性 CE-SDS	1.5%不完全还原的
非还原性 CE-SDS	6%还原的二硫化物
硼酸盐层析	3.5%糖化的(高级)
肽图	脱酰胺

*总 CEX 峰面积的百分比。

图 15

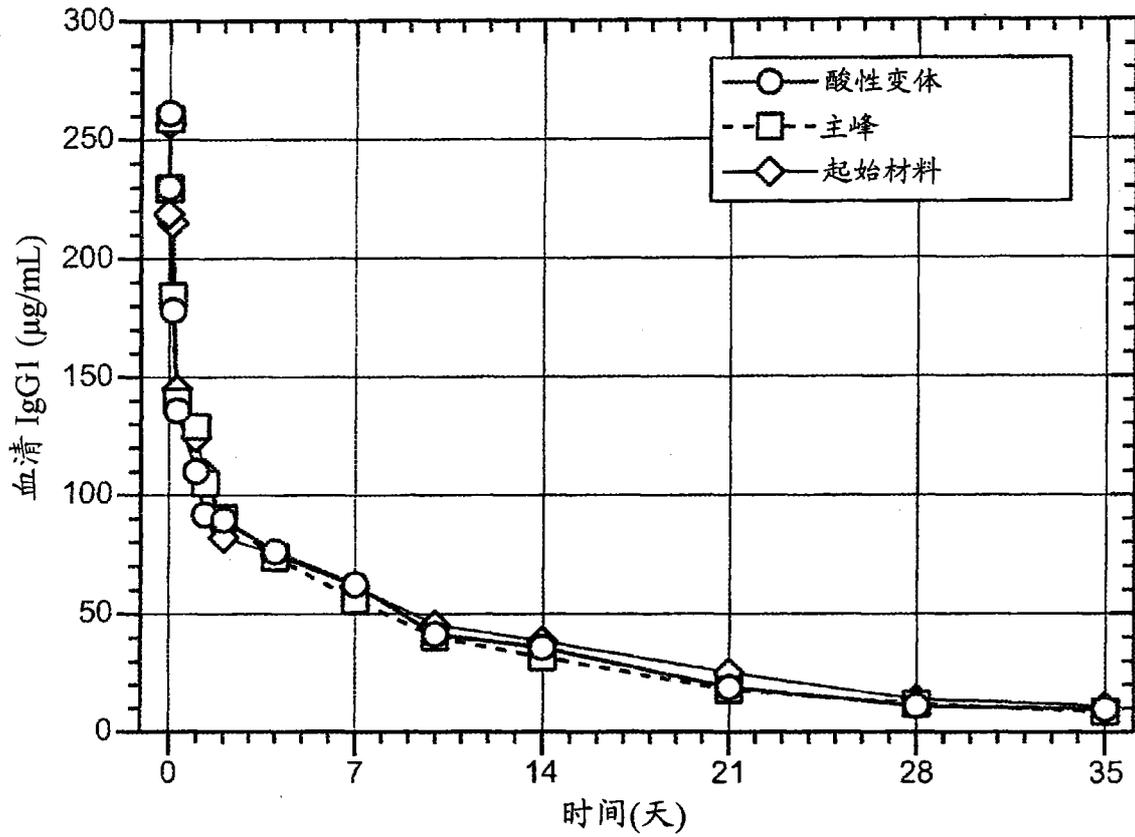


图 16

来自 PK 研究的 AUC 和几何均值比			
测试材料 (每组 n=12)	AUC ₀₋₁₄ (天·µg/mL)		几何均值比(CI)
	均值±SD	几何均值	
酸性变体	910 ± 73.1	907	0.963 (0.905, 1.03)
主峰	895 ± 85.5	891	0.946 (0.884, 1.01)
Pertuzumab 起始材料	946 ± 94.6	942	NA

图 17