

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610008639.X

[51] Int. Cl.

A61J 1/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月23日

[11] 公开号 CN 1820734A

[22] 申请日 1998.12.10

[21] 申请号 200610008639.X

分案原申请号 98812097.6

[30] 优先权

[32] 1997.12.12 [33] US [31] 60/069,346

[71] 申请人 基因技术股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 S·谢克 V·E·佩顿

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 37 页 附图 1 页

[54] 发明名称

用抗 ErbB2 抗体治疗

[57] 摘要

本发明涉及治疗以 ErbB2 过度表达为特征的疾病的方法。更具体地说,本发明涉及用抗 ErbB2 抗体和化疗剂的组合而不是蒽环类抗生素(如阿霉素或表柔比星)来治疗易患或诊断患有过度表达 ErbB2 的癌症患者。

1. 一种生产的制品，它包含一个容器，容器内包含抗 ErbB2 抗体的组合物，以及包装插页，该包装插页上有避免使用蒽环类抗生素类化疗剂与所述组合物组合使用的说明。

2. 根据权利要求 1 所述的生产制品，它还包含容器上的标签或容器附带的标签，该标签表明了所述组合物可用来治疗以 ErbB2 受体过度表达为特征的疾病。

3. 根据权利要求 2 所述的生产制品，其中所述标签表明所述组合物可用来治疗乳房癌。

4. 根据权利要求 2 所述的生产制品，其中所述抗 ErbB2 抗体与受体的胞外结构域结合。

5. 根据权利要求 4 所述的生产制品，其中所述抗 ErbB2 抗体与 ErbB2 胞外结构域序列中的表位 4D5 结合。

6. 根据权利要求 5 所述的生产制品，其中所述抗体是人化 4D5 抗 ErbB2 抗体。

7. 一种治疗易患或经诊断患有以 ErbB2 受体过度表达为特征的疾病的人患者的方法，该方法包括在蒽环类抗生素衍生物不存在下，给予人患者有效量的抗 ErbB2 抗体与非蒽环类抗生素衍生物的化疗剂的组合。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述疾病是良性或恶性肿瘤。

9. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述疾病是癌。

10. 根据权利要求 9 所述的方法，其中所述癌症选自乳房癌、鳞状细胞癌、小细胞性肺癌、非小细胞性肺癌、肠胃癌、胰癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和各类头部和颈部癌。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中所述癌症是乳房癌。

12. 根据权利要求 11 所述的方法，其中所述癌症是转移性乳房癌。

13. 根据权利要求 7 所述的方法，其中所述抗体与 ErbB2 受体的胞外结构域结合。

14. 根据权利要求 13 所述的方法，其中所述抗体与 ErbB2 胞外结构域

序列中的表位 4D5 结合。

15. 根据权利要求 14 所述的方法,其中所述抗体是人化的 4D5 抗 ErbB2 抗体。

16. 根据权利要求 7 所述的方法,其中所述化疗剂是塔克索德。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述塔克索德是帕利他塞或多西他塞。

18. 根据权利要求 7 所述的方法,其中当以单剂形式给予个体时,所述组合的有效量低于所述抗 ErbB2 抗体与所述化疗剂的有效量之总和。

19. 根据权利要求 7 所述的方法,其中通过测定疾病进展时间或反应比例来测定效率。

用抗 ErbB2 抗体治疗

本发明申请是申请号为 988120976, 申请日为 1998 年 12 月 10 日, 发明名称为“用抗 ErbB2 抗体治疗”的申请的分案申请。

发明领域

本发明涉及治疗以 ErbB2 过度表达为特征的疾病的方法。更具体地说, 本发明涉及用抗 ErbB2 抗体和化疗剂的组合而不是蒽环类抗生素 (anthracycline 如阿霉素(toxorubicin)或表柔比星(epirubicin))来治疗易患或诊断患有过度表达 ErbB2 的癌症患者。

发明背景

已经确定编码生长因子和生长因子受体的原癌基因在各种人恶性肿瘤 (包括乳房癌)致病机理中起着重要作用。业已发现, 人 ErbB2 基因(*erbB2*, 也称为 *her2* 或 *c-erbB-2*), 在约 25-30% 的人乳房癌患者中是过度表达的, 该基因编码了与表皮生长因子受体(EGFR)相关的 185kd 的跨膜糖蛋白受体 (p185^{HER2})(Slamon 等, Science, 235: 177-182[1987]; Slamon 等, Science, 244: 707-712[1989])。

几条证据证实了 ErbB2 在 ErbB2 过度表达肿瘤的致病机理和临床侵袭性中起直接的作用。已表明, 将 ErbB2 引入非肿瘤细胞会引起它们发生恶性转化(Hudziak 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7159-7163[1987]; DiFiore 等人, Science 237: 78-82[1987])。发现表达 HER2 的转基因小鼠发育产生了乳房肿瘤(Guy 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10578-10582[1992])。

针对 *erbB2* 基因的大鼠等价物(*neu*)编码的人 *erbB2* 蛋白产物和蛋白质的抗体已有描述。Drebin 等人, Cell 41:695-706(1985)报道了针对大鼠 *neu* 基因产物的 IgG2a 单克隆抗体。该抗体称为 7.16.4, 它使 B104-101 细胞(经 *neu* 原癌基因转染的 NIH-3T3 细胞)上的细胞表面 p185 表达下调, 并抑制这些细胞形成集落。在 Drebin 等人, PNAS(USA)83:9129-9133(1986)中, 7.16.4 抗体显示出能抑制植入裸鼠体内的 *neu* 转化的 NIH-3T3 细胞以及大鼠成神经细胞瘤细胞(从该细胞中最先分离得到 *neu* 癌基因)的致瘤性生长。Drebin 等在 Oncogene 2: 387-394(1988)中讨论了抗大鼠 *neu* 基因产物的一组抗体的生产方法。发现所有这些抗体对悬浮在软琼脂中的 *neu* 转化细胞的生长均有

细胞静止作用。IgM, IgG2a 和 IgG2b 同种型抗体能在补体存在下明显介导 *neu* 转化细胞的体外裂解,但是没有一种抗体能介导 *neu* 转化细胞的高水平的依赖于抗体的细胞毒性(ADCC)。Drebin 等 *Oncogene* 2: 273-277(1988)报道了与 p185 分子上的两个不同区域起反应的抗体混合物,对植入裸鼠中的 *neu* 转化的 NIH-3T3 细胞有协同抗肿瘤作用。Myers 等在 *Meth. Enzym.* 198: 277-290(1991)中综述了抗 *neu* 抗体的生物效应。另可参见 WO94/22478, 1994 年 10 月 13 日公开。

Hudziak 等, *Mol. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172(1989)描述了一组抗 ErbB2 抗体的产生,该抗体用人乳房肿瘤细胞系 SKBR3 来作性质鉴定。SKBR3 细胞在接触抗体后的细胞相对增殖可通过 72 小时后细胞单层的结晶紫染色来测定。通过该试验,测得抗体 4D5 有最大的抑制效果,它可抑制 56% 的细胞增殖。该组中的其它抗体(包括 7C2 和 7F3)在该试验中降低细胞增殖的程度较低。Hudziak 等的结论是,4D5 抗体对 SKBR3 细胞的作用是细胞静止作用而非细胞毒性,因为在从培养基中除去抗体后 SKBR3 细胞恢复成接近正常的生长速度。另发现,抗体 4D5 使得 p185^{erbB2} 过度表达的乳房肿瘤细胞系对于 TNF- α 胞毒效应敏感。另见 WO89/06692, 1989 年 7 月 27 日公开。Hudziak 等的文献中所讨论的抗 ErbB2 抗体在以下各文献中也有所表述: Fendly 等, *Cancer Research* 50: 1550-1558(1990); Kotts 等, *In Vitro* 26(3): 59A(1990); Sarup 等, *Growth Regulation* 1: 72-82(1991); Shepard 等, *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127(1991); Kumar 等, *Mol. Cell. Biol.* 11(2): 979-986(1991); Lewis 等, *Cancer Immunol. Immunother.* 37: 255-263(1993); Pietras 等, *Oncogene* 9:1829-1838(1994); Vitetta 等, *Cancer Research* 54:5301-5309(1994); Sliwkowski 等, *J. Biol. Chem.* 269(20): 14661-14665(1994); Scott 等, *J. Biol. Chem.* 266: 14300-5(1991); 和 D'souza 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 7202-7206(1994)。

Tagliabue 等, *Int. J. Cancer* 47: 933-937(1991)描述了两种抗体,它们是根据对过度表达 ErbB2 的肺腺癌细胞系(Calu-3)的反应性选出的。发现其中一种抗体(称为 MGR3)可内化、诱导 ErbB2 的磷酸化并在体外抑制肿瘤细胞生长。

McKenzie 等 *Oncogene* 4: 543-548(1989)制得了一组有不同表位特异性的抗 ErbB2 抗体,其中包括命名为 TA1 的抗体。发现该 TA1 抗体能引起 ErbB2 胞吞作用的加速(参见 Maier 等, *Cancer Res.* 51:5361-5369(1991))。

Bacus等 *Molecular Carcinogenesis* 3: 350-362(1990)报道了TA1抗体诱导乳房癌细胞系 AU-565(过度表达 *erbB2* 基因的细胞系)和 MCF-7(不过度表达 *erbB2* 基因的细胞系)的成熟。发现这些细胞的生长和获得成熟表型受到抑制,与细胞表面 ErbB2 受体水平的减少和细胞质中受体水平暂时升高有关。

Stancovski等 *PNAS(USA)*88: 8691-8695(1991)获得了一组抗 ErbB2 的抗体,将这些抗体腹膜内注射入裸鼠中,评价了其对 *erbB2* 基因过度表达所转化的小鼠成纤维细胞肿瘤生长的作用。对于四种抗体检测到有不同的肿瘤抑制水平,但是一种抗体(N28)却持续地刺激肿瘤生长。单克隆抗体 N28 明显诱导 ErbB2 受体磷酸化,而其它四种抗体通常表现出低的或不表现出磷酸化诱导活性。对于抗 ErbB2 抗体对 SKBR3 细胞增殖的作用也作了评价。在该 SKBR3 细胞增殖试验中,与对照相比,有两种抗体(N12 和 N29)降低了细胞增殖。评价了各种抗体通过依赖于补体的细胞毒性(CDC)和依赖于抗体的细胞介导的细胞毒性(ADCC)体外诱导细胞裂解的能力,该论文的作者的结论是抗体的抑制功能显然并不是由 CDC 或 ADCC 所致。

Bacus等在 *Cancer Research* 52: 2580-2589(1992)中进一步对前文 Bacus 等(1990)和 Stancovski 等所述的抗体进行了性质鉴定。该鉴定延伸了 Stancovski 等的研究,评价了给携带有过度表达人 ErbB2 的小鼠成纤维细胞的裸鼠静脉注射这些抗体后的作用。在他们的早期研工作中发现, N28 加速了肿瘤生长,而 N12 和 N29 则明显抑制表达 ErbB2 的细胞的生长。发现 N24 抗体也有部分肿瘤抑制作用。Bacus 等还测试了这些抗体促进人乳房癌细胞系 AU565 和 MDA-MB453(过度表达 ErbB2)以及 MCF-7(含有低水平的此受体)中成熟表型的能力。Bacus 等发现,肿瘤的体内抑制与细胞分化相关;肿瘤刺激性抗体 N28 对分化没有作用; N12、N29 和 N24 抗体的肿瘤抑制作用与它们诱导的分化程度相关。

Xu等 *Int. J. Cancer* 53: 401-408(1993)评价了一组抗 ErbB2 抗体的表位结合特异性,及其抑制不依赖于贴壁和依赖于贴壁的 SKBR3 细胞生长(通过单个抗体和组合)、调节细胞表面 ErbB2、以及抑制配体刺激的不依赖于贴壁生长的能力。另见 WO94/00136, 1994 年 1 月 6 日公开,和 Kasprzyk 等, *Cancer Research* 52: 2771-2776(1992)关于抗 ErbB2 抗体的组合物。另外,在 Hancock 等 *Cancer Res.* 51: 4575-4580(1991); Shawver 等, *Cancer Res.* 54: 1367-1373(1994); Arteaga 等 *Cancer Res.* 54: 3758-3765(1994)和 Harwerth 等 *J.Biol.Chem.* 267: 15160-15167(1992)中讨论了其它抗 ErbB2 抗体。

一种重组的人化抗 ErbB2 单克隆抗体(鼠抗 ErbB2 抗体 4D5 的人化版本, 称为 rhuMAb HER2 或 HERCEPTIN®)在患 ErbB2 过度表达的转移性乳房癌、已经接受广泛的抗癌治疗的患者中表现出有临床活性(Baselga 等人, J. Clin. Oncol. 14: 737-744[1996])。

ErbB2 过度表达通常被认为是预后不良(尤其是在患有涉及腋淋巴结的原发性疾病的患者中)的预报(Slamon 等人, [1987]和[1989], 同上; Ravdin 和 Chamness, Gene 159:19-27[1995]; 以及 Hynes 和 Stern, Biochim Biophys Acta 1198:165-184[1994]), 并且与对激素治疗和化疗剂(包括 CMF(环磷酰胺、甲氨蝶呤和氟尿嘧啶)以及蒽环类抗生素)的敏感性和/或抗性有关(Baselga 等人, Oncology 11(3 Suppl 1): 43-48[1997])。然而, 尽管 ErbB2 过度表达与预后不良相关, HER2-阳性患者对 taxans 治疗有临床反应的可能性比 HER2-阴性患者好 3 倍(*Ibid*)。rhuMab HER2 表现出能增强帕利他塞(paclitaxel)(TAXOL®)和阿霉素抗裸鼠中乳房癌异体移植物的活性, 该裸鼠中注射了表达高水平 HER2 的人乳房腺癌细胞(Baselga 等人, Breast Cancer, Proceedings of ASCO, 13 卷, 摘要 53[1994])。

发明概述

本发明涉及治疗以 ErbB2 过度表达为特征的疾病, 其基于这样一个认识, 尽管用抗 ErbB2 抗体治疗能明显增强常用化疗剂的临床效果, 但是给予抗 ErbB2 抗体会加重已被视为是蒽环类抗生素衍生物副作用的心肌功能紊乱综合征。

因此, 本发明涉及一种治疗易患或经诊断患有特征为 ErbB2 受体过度表达的疾病患者的方法, 该方法包括在蒽环类抗生素衍生物不存在下, 给予患者治疗有效量的抗 ErbB2 抗体与化疗剂的组合物, 该化疗剂不是蒽环类抗生素衍生物(如阿霉素或表柔比星)。

所治疾病宜为以 ErbB2 受体过度表达为特征的良好性或恶性肿瘤, 例如癌症如乳房癌、鳞状细胞癌、小细胞性肺癌、非小细胞性肺癌、肠胃癌、胰癌、成胶质细胞癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝细胞癌和各类头部和颈部癌。化疗剂宜为塔克索德(taxoid), 如 TAXOL®(帕利他塞)或 TAXOL®衍生物。

尽管抗 ErbB2 抗体在较佳实施方案中的抗增生效应是足够的, 但是抗 ErbB2 抗体能诱导细胞死亡或凋亡。较佳的抗 ErbB2 抗体结合 ErbB2 受体

的胞外结构域,较佳的是结合 ErbB2 胞外结构域序列中的表位 4D5 或 3H4。更佳的,抗体是抗体 4D5,最佳的是人化形式。

本发明的方法特别适合治疗以 ErbB2 受体过度表达为特征的乳房或卵巢癌。

在另一方面,本发明涉及一种制品,它包含一个容器,容器中的成分包含抗 ErbB2 抗体,任选地容器上还有或附有说明该组合物可用于治疗 ErbB2 受体过度表达为特征的病症的标签,以及包装插页,该插页有避免采用蒺环类抗生素化疗剂与本组合物组合的说明。

附图简述

图 1 显示了 ErbB2 胞外结构域的表位图谱,它通过截短突变体分析和定点诱变(Nakamura 等, *J. of Virology* 67(10): 6179-6191(1993 年 10 月); Renz 等, *J. Cell. Biol.* 125(6): 1395-1406(1994 年 6 月))而测得。抗增殖的单克隆抗体 4D5 和 3H4 却结合于跨膜结构域附近。用聚合酶链反应技术从 cDNA 制得各种 ErbB2-ECD 截短物或点突变。ErbB2 突变体在哺乳动物表达质粒中被表达成 gD 融合蛋白。该表达质粒采用巨细胞病毒启动子/增强子以及位于插入 cDNA 下游的 SV40 终止子和聚腺苷酸化信号。将质粒 DNA 转染入 293S 细胞中。转染 1 天后,使细胞在不含甲硫氨酸和半胱氨酸、含有 1% 透析过的胎牛血清和各 25 μ Ci³⁵S 甲硫氨酸和 ³⁵S 半胱氨酸的低葡萄糖 DMEM 中通过新陈代谢进行标记过夜。收集上清,在上清液中加入 ErbB2 单克隆抗体或对照抗体,4 $^{\circ}$ C 培育 2-4 小时后收集上清液。使复合物沉淀,施加到 10-20% Tricine SDS 梯度凝胶上,在 100V 下电泳。将凝胶电泳印迹到膜上并通过放射自显影来分析。SEQ ID NO:8 和 9 分别显示了 3H4 和 4D5 表位。

图 2 示出了 ErbB2 结构域 1 的氨基酸序列(SEQ ID NO: 1)。粗体氨基酸表示经缺失作图测得的单抗 7C2 和 7F3 识别的表位位置,即“7C2/7F3 表位”(SEQ ID NO: 2)。

较佳实施方案详述

I. 定义

术语“HER2”、“ErbB2”、“c-Erb-B2”可互换使用。除非另有所述,本文所用的术语“ErbB2”、“c-Erb-B2”和“HER2”指人蛋白,“her2”、“erbB2”和“c-erb-B2”指人基因。人 *erbB2* 基因和 ErbB2 蛋白在例如 Semba 等 *PNAS(USA)*82:6497-6501(1985) 和 Yamamoto 等 *Nature*319:

230-234(1986)(Genbank 登录号 X03363)中有所描述。ErbB2 包含四个结构域(结构域 1-4)。

“表位 4D5”是 ErbB2 胞外结构域中与抗体 4D5(ATCC CRL 10463)结合的区域。该表位毗邻 ErbB2 的跨膜区。为筛选与 4D5 表位结合的抗体,可采用如《抗体:实验手册》, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane(1988)所述的常规的交叉阻断试验。或者,可作表位图(见图 1),以评价该抗体是否与 ErbB2 的 4D5 表位(即大约残基 529 左右,如残基 561 至 625 区域内的任何一个或多个残基)结合。

术语“表位 3H4”指 ErbB2 胞外结构域中与抗体 3H4 结合的区域。该表位显示在图 1 中,其包括 ErbB2 胞外结构域之氨基酸序列中约 541 至 599 的残基。

术语“表位 7C2/7F3”是 ErbB2 胞外结构域 N 端与 7C2 和/或 7F3 抗体(两者均保藏于 ATCC,见下文)结合的区域。为了筛选与 7C2/7F3 表位结合的抗体,可采用如《抗体:实验手册》, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane(1988)所述的常规的交叉阻断试验。或者,可用表位作图来确定该抗体是否与 ErbB2 上的 7C2/7F3 表位(即 ErbB2 中大约残基 22 至 53 区域(SEQ ID NO: 2)中的任何一个或多个残基)结合。

术语“诱导细胞死亡”或“能诱导细胞死亡”指抗体使活细胞变成不能存活之细胞的能力。这里的“细胞”是表达 ErbB2 受体的细胞,尤其是过度表达 ErbB2 受体的细胞。与同组织类型的非癌细胞相比,过度表达 ErbB2 的细胞具有明显高出正常的 ErbB2 水平。较佳的,该细胞是癌细胞,如乳房、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰或膀胱的癌细胞。在体外,细胞可以是 SKBR3、BT474、Calu3、MDA-MB-453、MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。细胞的体外死亡可在没有补体和免疫效应细胞存在下测知,以区别依赖于抗体的细胞毒性(ADCC)或依赖于补体的细胞毒性(CDC)所诱导的细胞死亡。这样,可用热灭活血清(即没有补体)和没有免疫效应细胞存在下,来测试细胞死亡。为了确定抗体是否能诱导细胞死亡,通过碘化丙锭(PI)、台盼蓝(参见, Moore 等, Cytotechnology 17:1-11(1995))或 7AAD 的吸收相对于未经处理细胞来评价膜完整性的丧失程度。较佳的诱导细胞死亡的抗体是在“BT474 细胞的 PI 吸收试验”中诱导 PI 吸收的那些抗体。

术语“诱导细胞凋亡”或“能诱导细胞凋亡”指抗体诱导编程性细胞死亡的能力,它通过与膜联蛋白 V 的结合、DNA 片段化、细胞皱缩、内质网膨

胀、细胞裂解和/或形成膜泡囊(称为凋亡小体(apoptotic body))来确定。细胞是过度表达 ErbB2 受体的细胞。“细胞”宜为肿瘤细胞,如乳房、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰或膀胱的癌细胞。在体外,细胞可以是 SKBR3、BT474、Calu3 细胞、MDA-MB-453、MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。可以用各种方法来评价与细胞凋亡相关的细胞活动。例如,可通过膜联蛋白结合来测定磷脂酰丝氨酸(PS)的转运;可通过 DNA 梯来评价 DNA 片段化,如本文实施例所述;可通过亚二倍体细胞的生长评价胞核/染色质凝聚以及 DNA 片段化。诱导细胞凋亡的抗体最好是,在“采用 BT474 细胞的膜联蛋白结合试验”(见下文)中,与未经处理细胞相比,能诱导出约 2 至 50 倍(较佳的为 5 至 50 倍,最佳的约 10-150 倍)的膜联蛋白结合的抗体。

有时,促细胞凋亡性抗体是阻断 HRG 结合/激活 ErbB2/ErbB3 复合物的抗体(如 7F3 抗体)。在其它场合,该抗体是不明显阻断 HRG 激活 ErbB2/ErbB3 受体复合物的抗体(如 7C2)。另外,抗体可以象 7C2 那样,在诱导凋亡的同时,不会大大减少 S 期细胞的百分数(如只使这些细胞百分数相对于对照减少约 0-10% 的抗体)。

感兴趣的抗体可以象 7C2 那样,与人 ErbB2 特异性结合,且不与其它蛋白(如 *erbB1*、*erbB3* 和/或 *erbB4* 基因编码的蛋白)发生显著的交叉反应。有时,此抗体可能不与大鼠 *neu* 蛋白(如 Schechter 等, *Nature* 312: 513(1984) 和 Drebin 等, *Nature* 312: 545-548(1984)中所述的)发生明显的交叉反应。在该种实施方案中,此抗体与这些蛋白结合(如细胞表面与内源性受体结合)的程度将低于 10% (经荧光素激活细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA)测得)。

本文所用的术语“遗传调节蛋白(heregulin, HRG)”指激活 ErbB2-ErbB3 和 ErbB2 - ErbB4 蛋白复合物(即在结合到其上时诱导复合物中酪氨酸残基磷酸化)的多肽。该术语中包括的各种遗传调节蛋白多肽公开在(例如)Holmes 等 *Science*, 256: 1205-1210(1992); WO 92/20798; Wen 等, *Mol. Cell. Biol.*, 14(3): 1990-1919(1994); 和 Marchionni 等, *Nature*, 362: 312-318(1993)中。该术语包括天然存在的 HRG 多肽的生物活性片段和/或变体,如其 EGF 样结构域片段(如 HRG $\beta_{177-244}$)。

术语“ErbB2 - ErbB3 蛋白复合物”和“ErbB2-ErbB4 蛋白复合物”是 ErbB2 受体分别与 ErbB3 受体或 ErbB4 受体非共价关联的寡聚物。当表达这两种受体的细胞接触 HRG 时形成了该复合物,它可通过免疫沉淀来分离

获得，可用 SDS-PAGE(如 Sliwowski 等，J. Biol Chem., 269(20): 14661-14665(1994)所述)来分析。

“抗体(Ab)”和“免疫球蛋白(Ig)”是有相同结构特征的糖蛋白。抗体对特异抗原表现出结合特异性，而免疫球蛋白包括抗体和其它缺少抗原特异性的抗体样分子。例如，淋巴系统可产生低水平的后一类多肽，而骨髓瘤可产生水平提高的该类多肽。

“天然抗体”和“天然免疫球蛋白”是约 150000 道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与一条重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也具有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有一个可变区(V_H)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端有一个可变区(V_L)，另一端有一个恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。据信特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，应用于各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在抗体的整个可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区，它们大致上呈 β -折叠构型，由三个 CDR 相连，这些 CDR 形成环来连接 β 折叠结构，在某些情况下可形成 β 折叠结构的一部分。每条链中的 CDR 通过 FR 区紧密地靠在一起并与另一链的 CDR 一起形成了抗体的抗原结合部位(参见 Kabat 等，NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, 647-669 页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如抗体在依赖于抗体的细胞毒性中的参与作用。

木瓜蛋白酶消化抗体产生了两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段，每个片段有一个抗原结合位点)以及一个残余的“Fc”片段(该名称反映了其容易结晶的能力)。用胃蛋白酶处理产生了一个 $F(ab')_2$ 片段，该片段有两个抗原结合位点，并仍能交联抗原。

“Fv”是最小抗体片段，它含有完整的抗原识别和结合位点。该区域由一个重链和一个轻链可变区紧密非共价关联的二聚物组成。在该构型中，各可变区中的三个 CDR 相互作用，在 V_H - V_L 二聚体表面上确定了抗原结合

位点。6个 CDR 共同地赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变区(或 Fv 的一半,只包含对抗原有特异性的三个 CDR)也能识别并结合抗原,虽然其亲和力比整个结合位点低。

Fab 片段还含有轻链恒定区和重链的第一个恒定区(CH1)。Fab'片段与 Fab 片段不同,其重链 CH1 区的羧基端加入了几个残基,其中包括来自铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 在这里被命名为 Fab',其中恒定区的半胱氨酸残基带有一个游离的巯基。F(ab')₂ 抗体片段最初是以 Fab'片段对的形式产生的,在其间有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联方式也是已知的。

脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定区的氨基酸序列归为明显不同的两类(称为 κ 和 λ)中的一类。

根据重链恒定区的氨基酸序列,免疫球蛋白可以分为不同的种类。主要有 5 类免疫球蛋白: IgA, IgD, IgE, IgG 和 IgM,其中一些还可进一步分成亚类(同种型),如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 和 IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是众所周知的。

术语“抗体”具有最广泛的含义,其具体包括完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两个完整抗体形成的多特异性抗体(如双特异性抗体),以及具有所需生物活性的抗体片段。

“抗体片段”包括完整抗体的一部分,较佳的是完整抗体的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;二抗体(diabody);线性抗体(Zapata 等, Protein Eng. 8(10): 1057-1062(1995));单链抗体分子;和抗体片段形成的多特异性抗体。

本文所用的术语“单克隆抗体”指从一类基本均一抗体获得的抗体,即该群体中包含的单个抗体是相同的,除少数可能存在天然发生的突变外。单克隆抗体是高特异性的,针对单个抗原位点。而且,与常规(多克隆)抗体制剂(通常是包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体)不同,各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性外,单克隆抗体的优点还在于它们是通过杂交瘤培养来合成的,不会被其它免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”表示了抗体的特性,是从基本均一的抗体群中获得的,这不应被解释成需要用任何特殊方法来生产抗体。例如,用于本发明的单克隆抗体可用杂交瘤方法(由 Kohler 等, Nature, 256: 495(1975)首先提出)制得,或可用

重组 DNA 方法(例如参见美国专利 No. 4, 816, 567)制得。“单克隆抗体”也可用例如 Clackson 等, *Nature*, 352: 624-628(1991)和 Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597(1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离获得。

本文的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白)(其中重链和/或轻链的一部分与衍生自该特定种类或属于特定的抗体类或亚类的抗体序列相同或同源, 而链的其余部分与衍生自另一种类或属于另一抗体类或亚类的抗体对应序列同源)以及该抗体的片段, 只要该片段显示有所需的生物活性即可(美国专利 No. 4, 816, 567; Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855(1984))。

“人化”形式的非人(如小鼠)抗体是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 或抗体的其它抗原结合序列), 它们含有非人免疫球蛋白的最小序列。对于大多数情况, 人化抗体是人免疫球蛋白(受者抗体)中的受者互补决定区(CDR)残基被非人源(供者抗体)(例如有所需特异性、亲和力和活性的小鼠、大鼠或家兔)抗体的 CDR 残基代替。在一些情况下, 人免疫球蛋白的 Fv 构架区(FR)被对应的非人残基代替。另外, 人化的抗体可包括既不存在于受者抗体、又不存在于导入的 CDR 或构架序列中的残基。作这些修饰能进一步提高和最大化抗体的性能。通常, 人化抗体包含了基本上(至少一个、通常两个)的所有的可变区, 其中所有或基本上所有的 CDR 区对应于非人免疫球蛋白的 CDR 区, 所有或基本上所有的 FR 区是人免疫球蛋白序列的 FR 区。人化抗体最好还包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分, 通常是人免疫球蛋白的 Fc 部分。更详细的情况可参见 Jones 等, *Nature*, 321: 522-525(1986); Reichmann 等, *Nature*, 332: 323-329(1988); 和 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596(1992)。人化抗体包括 PRIMATIZED™ 抗体, 其中抗体的抗原结合区可从通过用感兴趣抗原免疫接种猕猴制得的抗体衍生获得。

“单链 Fv”或“sFv”抗体片段包括抗体的 V_H 和 V_L 区, 其中这些区存在于一条多肽链中。较佳的, Fv 多肽还包括 V_H 和 V_L 区间的多肽接头, 该接头可使 sFv 形成结合抗原所需的结构。关于 sFv 综述可见 Pluckthun, 《单克隆抗体的药理学》, 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编辑, Springer-Verlag, New York, 269-315 页(1994)。

术语“二抗体”指有两个抗原结合位点的小抗体片段, 该片段包括的一个重链可变区(V_H)与一个轻链可变区(V_L)相连于同一条多肽链(V_H-V_L)中。采

用一个短得无法使同一链上两个区之间产生配对的接头，迫使该区域与另一链中的互补区配对，而形成两个抗原结合位点。二抗体在例如 EP404, 096; WO93/11161; 和 Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448(1993) 中有更详细的描述。

“分离”的抗体是已被鉴定并从其天然环境成分中分离和/或回收获得的抗体。其天然环境中的污染成分是会干扰该抗体诊断或治疗应用的物质，它可能包括酶、激素和其它蛋白类或非蛋白类溶解物。在较佳的实施方案中，抗体将被纯化至：(1)含有超过 95%(重量)的抗体(经 Lowery 方法测得)，最佳的为大于 99%(重量)；(2)足以获得 N 端或内部氨基酸序列的至少 15 个残基(用转杯式测序仪测得)；或(3)在还原或非还原的条件下、经 SDS-PAGE 以考马斯亮蓝或更佳的银染法测定是均一的。分离的抗体包括重组细胞中的原位抗体，因为该抗体天然环境中的至少一种成分不存在。然而，分离的抗体通常可用至少一种纯化步骤制得。

本文所用的术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子(如 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 或 IgG₄)Fc 区的一个表位，它负责提高 IgG 分子的体内血清半衰期。

“治疗”指治疗和预防措施。那些需要治疗的对象是那些已经患有疾病以及有待预防疾病的对象。

需要治疗的“哺乳动物”指分类为哺乳动物的任何动物，包括人、家养和农场、动物园、运动场动物，或宠物，如狗、马、猫、奶牛等。较佳的哺乳动物是人。

“疾病”是受益于抗 ErbB2 抗体治疗的任何疾病。这包括慢性和急性疾病或失调，包括使哺乳动物易患所述疾病的那些病理性状态。本文待治疗的非限制性疾病例子包括良性和恶性肿瘤；白血病和淋巴恶性肿瘤；神经、胶质、星形胶质、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞性、上皮性、基质和囊胚腔疾病；和炎症、血管生成性和免疫性疾病。

本文所用的术语“治疗有效量”指具有抗增殖效果的任何用量。较佳的，该治疗有效量具有凋亡活性，或能诱导细胞死亡，该细胞宜为良性或恶性肿瘤细胞，具体是癌细胞。效果可用常规方式检测，这取决于待治疗的疾病。对于癌症治疗，例如可通过评价疾病进展的时间或测定反应速率(RR)(见下文实施例)来测定效果。

术语“癌”和“癌的”指哺乳动物中通常以细胞生长无调控为特征的生理性状态。癌的例子包括(但不局限于)癌瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血

病。这些癌的更具体的例子包括鳞状细胞癌、小细胞性肺癌、非小细胞性肺癌、肠胃癌、胰癌、成胶质细胞瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳房癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌瘤和各类头部和颈部癌。

本文所用的术语“细胞毒性试剂”指能抑制或阻止细胞功能和/或破坏细胞的物质。该术语包括放射性同位素(如 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 和 Re^{186})、化疗剂和毒素,如细菌、真菌、植物或动物的酶活性毒素或其片段。

“化疗剂”是用于治疗癌症的化学物质。化疗剂的例子包括阿霉素(adriamycin)(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)(5-FU)、阿糖胞苷(cytosine arabinoside)(Ara-C)、环磷酰胺(cyclophosphamide)(CYTOXANTM)、硫替哌(thiotepa)、白清安(busulfan)、塔克索德(taxoids)(例如,帕利他塞(paclitaxel)(TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)和多西他塞(doxetaxel)(Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France))、氨甲碟呤(methotrexate)、顺铂(cisplatin)、长春碱(vinblastine)、博来霉素(bleomycin)、表鬼白毒素吡喃葡萄糖苷(etoposide)、异环磷酰胺(ifosfamide)、丝裂霉素 C(mitomycin C)、盐酸米托蒽醌(Mitoxantrone)、长春花新碱(vincristine)、维诺瑞宾(Vinorelbine)、卡铂(Carboplatin)、表鬼白毒素噻吩糖苷(teniposide)、道诺霉素(daunomycin)、洋红霉素(carminomycin)、氨基碟呤(aminopterin)、更生霉素(dactinomycin)、丝裂霉素(mitomycins)、埃斯波霉素(esperamicins)(见美国专利 No. 4, 675, 187)、苯丙氨酸氮芥(melphalan)和其它相关的氮芥子类。本定义中还包括作用为调节或抑制作用于肿瘤的激素的激素制剂,如他莫昔芬(tamoxifen)和奥那普斯通(onapristone)。

化疗剂的其它例子包括磺酸烷酯,如英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶(aziridines),如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);氮杂环丙烷和甲蜜胺类,包括六甲蜜胺(altretamine)、三亚乙基蜜胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、triethylenethiophosphoramidate 和三甲基蜜胺(trimethylolomelamine);氮芥如,苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯代磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、二氯甲二乙胺(mechlorethamine)、氧氮芥盐酸盐(mechlorethamine oxide hydrochloride)、诺凡比星(novembichin)、胆甾醇对苯乙酸氮芥(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);

亚硝基脲(nitrosureas), 如亚硝基脲氮芥(carmustine)、氯唑星(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)、雷莫司汀(ranimustine); 抗生素, 如阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、胺茴霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、放线菌素 C(cactinomycin)、刺孢霉素(calicheamicin)、卡拉星(carabycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycins)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸(6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、道诺霉素(daunorubicin)、菌酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、泼非洛霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司它丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin)、庆大霉素(gentamicin); 叶酸类似物, 如德诺蝶呤(denopterin)、碟罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤类似物, 如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(6-mercaptapurine)、噻密普啉(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine); 嘧啶类似物, 如环胞苷(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、多西氟啉(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)和氟尿苷(floxuridine); 雄激素, 如二甲睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酮酸(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone); 抗肾上腺, 如氨基格鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂, 如 frolinic acid; 醋葡醛内酯(aceglatone)、磷酸胺醛糖苷(aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 安吡啶(amsacrine); 贝斯布西(bestrabucil); 比生群(bisantrene); 艾德塞(edatraxate); 地磷酸胺(defofamine); 地美可辛(demecolcine); 地吡醌(diaziquone); 福尼星(elfornithine); 依利醋铵(elliptinium acetate); 依托格鲁(etoglucid)、硝酸镓(gallium nitrate)、羟基脲(hydroxyurea)、香菇多糖(lentinan); 氯尼达明(lonidamine); 米托胍脲(mitoguazone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamol); 硝基胺(nitracrine); 喷司它丁(pentostatin); 苯纳米特(phenamet); 吡柔比星(pirarubicin); 鬼臼酸(podophyllinic acid); 2-乙基酰肼(2-ethylhydrazide); 甲苯胍(procarbazine); PSK®; 雷佐生(razoxane); 西唑喃(sizofiran); 锗螺胺(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid); 三亚胺醌(triaziquone); 2,2',2'-三氯三乙胺(2,2',2'-trichlorotriethylamine); 氨基甲酸乙酯(urethan); 长春地辛(vindesine); 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); 加西托星(gacytosine); 苯丁酸氮芥(chlorambucil); 加西它宾(gemcitabine); 6-硫代鸟嘌呤(6-thioguanine); 巯基嘌呤(mercaptapurine); 铂(platinum); 新霉酰胺(navelbine); 诺维通(novantrone); 噻洛达(xeloda); 依邦洛内(ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶(topoisomerase) 抑制剂 RFS2000 ; 二氟甲基鸟氨酸(difluoromethylornithine)(DMFO); 视黄酸(retinoic acid); 卡普它宾(capecitabine)、以及上述物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

调节或抑制作用于肿瘤的激素的激素试剂的其它例子包括其它抗雌激素类, 如雷洛昔吩(raloxifene)(Evista)、芳族酶抑制性 4(5)-咪唑(aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles)、4-羟基三苯氧胺(4-hydroxytamoxifen)、曲沃西芬(trioxifene)、凯西酚(keoxifene)以及 LY117018; 以及抗雄激素类, 如氟他胺(flutamide)和尼鲁米特(nilutamide); 以及上述物质药学上可接受的盐、酸或衍生物。

本文所用的术语“生长抑制剂”指在体外或体内抑制细胞(尤其是过度表达 ErbB2 的癌细胞)生长的化合物或组合物。因此该生长抑制剂可明显减少 S 期中过度表达 ErbB2 的细胞百分数。生长抑制剂例子包括阻断细胞周期进展(S 期以外处)的试剂, 如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的试剂。典型的 M 期阻断剂包括长春花碱类(长春花新碱(vincristine)和长春花碱(vinblastine))、TAXOL®、和拓扑 II 型抑制剂如阿霉素(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、道诺红霉素(daunorubicin)、表鬼白毒素吡喃葡萄糖苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。使 G1 停滞的那些试剂也将溢出(spill over)到 S 期停滞, 例如 DNA 烷基化试剂如三苯氧胺(tamoxifen)、强的松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、氮芥(mechlorethamine)、顺铂(cisplatin)、氨甲碟呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)和阿糖胞苷(ara-C)。进一步的信息可在《癌分子基础》, Mendelsohn 和 Israel 编辑, Chapter 1, 名称为“细胞周期调节、癌基因和抗肿瘤药物”, Murakami 等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995), 尤其是第 13 页。4D5 抗体(及其功能等价物)也可用于此目的。

“阿霉素”是一种蒽环类抗生素。阿霉素的化学全名为(8S-顺式)-10-[(3-氨基-2, 3, 6-三脱氧- α -L-来苏糖-己糖吡喃糖基)氧]-7, 8, 9, 10-四氢-6, 8, 11-三羟基-8-(羟乙酰基)-1-甲氧基-5,12-萘二酮。

术语“细胞因子”是由一类细胞释放的、作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的遗传术语。这些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, 如人生长激素、N-甲硫酰基人生

长激素和牛生长激素；甲状旁腺激素；甲状腺素；胰岛素；胰岛素原；松弛素；松弛素原；糖蛋白激素(如促卵泡激素(FSH)；促甲状腺素(TSH)和促黄体素(LH))；肝细胞生长因子；成纤维细胞生长因子；促乳素；胎盘催乳素；肿瘤坏死因子 α 和 β ；米勒抑制物；小鼠促性腺激素相关肽；抑制素；活化素；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(如NGF- β)；血小板生长因子；转化生长因子(TGF)(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(如干扰素 α ； β 和 γ)；集落刺激因子(CSF)(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))；白细胞介素(IL)(如IL-1；IL-1 α ；IL-2；IL-3；IL-4；IL-5；IL-6；IL-7；IL-8；IL-9；IL-11；IL-12)；肿瘤坏死因子如TNF- α 或TNF- β ；以及其它多肽因子(包括LIF和盒配体(KL, kit ligand))。本文所用的术语细胞因子包括来自天然的或重组细胞培养的蛋白以及天然序列细胞因子的生物活性等价物。

本申请所用的术语“前体药物”指药理学活性物质的前体或衍生物形式，它对肿瘤细胞的毒性比亲代药物低，并能受酶激活成为或转变为更具活性的亲代形式。例如参见，Wilman，“癌症化疗中的前体药物”*biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast(1987)和Stella等，“前体药物：一种定向输送药物的化学方法”，*Directed Drug Delivery*, Borchardt等，(编辑)，pp.247-267, Humana Press(1985)。本发明的前体药物包括(但不局限于)含磷酸酯的前体药物、含硫代磷酸酯的前体药物、含硫酸酯的前体药物、含肽的前体药物、D-氨基酸修饰的前体药物、糖基化的前体药物、含 β -内酰胺的前体药物、含有任选取代的苯氧乙酰胺的前体药物或含有任选取代的苯基乙酰胺的前体药物、能转变成更具细胞毒性游离药物的5-氟胞嘧啶和其它5-氟尿嘧啶前体药物。可衍生成前体药物形式用于本发明的细胞毒性药物例子包括(但不局限于)上述那些化疗剂。

“固相”指本发明抗体可以粘附的非水性基质。本文中固相例子包括部分或全部由玻璃(如孔径控制的玻璃)、多糖(如琼脂糖)、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯、聚乙烯醇和硅氧烷制成的那些固相。在某些例子中，根据上下文，固相可包括测试板的孔；在其它的例子中，它可以是纯化柱(如亲和层析柱)。该术语也包括如美国专利No. 4, 275, 149中公开的分散颗粒的不连续固相。

“脂质体”是由各类脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的用来将药物(如本文公开的抗ErbB2抗体，以及任选的化疗剂)传递给哺乳动物的小囊泡。脂

质体的组分通常以双层形式排列，这与生物膜的脂类排列方式类似。

术语“包装插页”用来指按照惯例包括在治疗产品市售包装内的说明书，它含有的信息是关于适应症、用途、剂量、给药方式、禁忌症和/或关于使用这些治疗产品的警告。

II. 抗 ErbB2 抗体的产生

下面将描述用来生产本发明抗体的典型技术方案。用来生产抗体的 ErbB2 抗原可以是，例如，可溶形式的 ErbB2 胞外结构域或含有所需表位的其一部分。或者，可用在细胞表面表达 ErbB2 的细胞(如被转化能过度表达 ErbB2 的 NIH-3T3 细胞；或癌细胞系，如 SKBR3 细胞，见 Stancovski 等，PNAS(USA)88: 8691-8695(1991))来生产抗体。用来生产抗体的其它形式的 ErbB2 是本领域技术人员明显可知的。

(i) 多克隆抗体

最好是通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关的抗原和佐剂，在动物体内产生多克隆抗体。利用双功能或衍生化试剂(例如磺基琥珀酰亚胺马来酰亚胺苯甲氧酯(通过半胱氨酸残基来偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 、或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中 R 和 R^1 是不同的烷基))，可以将相关的抗原与在待免疫接种动物中有免疫原性的蛋白(如匙孔蛾血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、或大豆胰蛋白酶抑制剂)偶联起来。

用抗原、免疫原性偶联物或衍生物对动物免疫接种，方法是混合例如 100 μg 或 5 μg 蛋白或偶联物(分别针对兔或小鼠)和 3 体积的 Freund 完全佐剂，将此溶液注射入皮内多处部位。1 个月后，以 Freund 完全佐剂中的肽或偶联物原先量的 1/5 至 1/10 加强注射入皮下多处部位。7 至 14 天后，对动物取血，测定血清的抗体滴度。继续加强接种动物直至滴度升高至平台。动物最好是用同一抗原、但与不同蛋白和/或通过不同交联剂偶联的偶联物来加强接种。偶联物也可在重组细胞培养中制成融合蛋白。另外，凝聚剂(如明矾)也适用于增强免疫应答。

(ii) 单克隆抗体

单克隆抗体可从一类基本均一的抗体获得，即群体中包含的各个抗体是相同的。除了可能存在的极少量天然发生的突变外。因此，修饰语“单克隆”表示了抗体的特征，它不是无联系抗体的混合物。

例如，单克隆抗体可用杂交瘤方法(由 Kohler 等，Nature, 256: 495(1975))

首先提出)制得, 或用重组 DNA 方法(美国专利 No. 4, 816, 567)制得。

在杂交瘤方法中, 如上所述免疫接种小鼠或其它合适的宿主动物(如仓鼠), 以诱导淋巴细胞, 而淋巴细胞产生或能产生特异性结合免疫接种用蛋白的抗体。或者, 淋巴细胞可在体外受免疫。然后用合适的融合剂(如聚乙二醇)来融合淋巴细胞和骨髓瘤细胞, 形成杂交瘤细胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103(Academic Press, 1986))。

将这样制得的杂交瘤细胞接种到合适的培养基中, 使其生长, 该培养基中最好含有一种或多种抑制未融合亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如, 如果亲代骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT), 则杂交瘤培养基中通常加入次黄嘌呤、氨基碟呤和胸苷(HAT 培养基), 这些物质抑制了 HGPRT 缺陷型细胞的生长。

较佳的骨髓瘤细胞是能有效融合、能支持所选择的抗体生成细胞稳定而高水平产生抗体、且对诸如 HAT 培养基之类的培养基敏感的那些细胞。其中较佳的骨髓瘤细胞系是小鼠骨髓瘤细胞系, 如从 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤(购自 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA)衍生的细胞系和 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞(购自 American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA)。另外, 用来生产人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系也已有所描述(Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001(1984); Brodeur 等, *Monoclonal antibody Production Techniques and Applications*, pp51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

测定杂交瘤生长的培养液中有无针对抗原的单克隆抗体产生。杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性宜通过免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫试验(RIA)或酶联免疫吸附试验(ELISA))来测定。

单克隆抗体的结合亲和力例如可用 Munson 等, *Anal. Biochem.*, 107: 220(1980)的 Scatchard 分析来测定。

在鉴定了能产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后, 通过有限稀释步骤来亚克隆该克隆, 并用标准方法(Goding, 《单克隆抗体: 理论和实践》, 59-103 页(Academic Press, 1986))使该亚克隆生长。用于该目的的合适的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外, 杂交瘤细胞还可以腹水瘤形式在动物体内生长。

用常规的免疫球蛋白纯化步骤(如蛋白 A-Sepharose, 羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析), 将亚克隆细胞分泌的单克隆抗体适当地从培

养液、腹水或血清中分离出来。

很容易分离获得编码单克隆抗体的 DNA 并用常规步骤对其测序(例如,用能与编码小鼠抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞是此类 DNA 的较佳来源。一旦分离出后,可将 DNA 置入表达载体中,然后将该载体转染到宿主细胞(如大肠杆菌细胞、猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞)中,在重组宿主细胞中合成获得单克隆抗体。关于编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述文献包括 Skerra 等, *Curr. Opin. in Immunol.*, 5: 256-262(1993)和 Pluckthum, *Immunol. Res.*, 130:151-188(1992)。

在另一个实施方案中,可以从采用 McCafferty 等, *Nature*, 348: 552-554(1990)所述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离获得抗体或抗体片段。Clackson 等, *Nature*, 352: 624-628(1991)和 Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597(1991)分别描述了用噬菌体文库来分离鼠和人抗体。以后的出版物描述了通过链改组(Marks 等, *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 等, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266(1993)),来产生高亲和力(nM 范围)的人抗体。因此,这些方法是传统单克隆抗体杂交瘤技术分离单克隆抗体的可行的变化方案。

也可对 DNA 进行修饰,例如通过用人重链和轻链恒定区的编码序列来代替同源的小鼠序列(美国专利 No. 4, 816, 567; Morrison 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851(1984)),或使非免疫球蛋白多肽的编码序列的部分或全部与免疫球蛋白编码序列共价连接。

通常,用这些非免疫球蛋白多肽取代抗体的恒定区,或者用它们取代抗体中一个抗原结合位点的可变区,产生了一个嵌合的二价抗体,该抗体包含了对一个抗原有特异性的抗原结合位点和对不同抗原有特异性的另一个抗原结合位点。

(iii)人化抗体以及人抗体

人化非人抗体的方法是本领域中熟知的。人化的抗体中宜导入一个或多个非人源氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为“导入”残基,它们通常取自“导入”可变区。人化可基本上依据 Winter 及其合作者(Jones 等, *Nature*, 321: 522-525(1986)); Riechmann 等, *Nature*, 332: 323-327(1988); Verhoeyen 等, *Science*, 239: 1534-1536(1988)所述的方法进行,用啮齿类 CDR

或 CDR 序列来取代人抗体的对应序列。因此, 这些“人化”抗体是嵌合抗体(美国专利 No. 4, 816, 567), 其中基本上不到一个完整的人可变区被非人动物的对应序列取代。在实践中, 人化抗体通常是人抗体中一些 CDR 残基以及可能还有一些 FR 残基被啮齿类抗体中类似部位的残基取代。

选择人轻链和重链可变区来制备人化抗体对于降低抗原性来说是非常重要的。根据所谓的“最佳配合”方法, 用已知人可变区序列的整个文库来筛选啮齿类抗体的可变区序列。然后, 采用最接近啮齿类序列的人序列作为人化抗体的人构架区(FR)(Sims 等, *J. Immunol.*, 151: 2296(1993); Chothia 等, *J. Mol. Biol.*, 196: 901(1987))。另一种方法采用得自所有人抗体轻链或重链特定亚组共有序列的特定构架区。同一构架区可用于几个不同的人化抗体(Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285(1992); Presta 等, *J. Immunol.*, 151: 2623(1993))。

更重要的是, 抗体的人化应保留对抗原的高亲和力以及其它有利的生物性能。为达到这一目的, 制备人化抗体的一个较佳的方法是, 利用亲代序列和人化序列的三维模型分析亲代序列和各种概念上(conceptual)的人化抗体。免疫球蛋白的三维模型是本领域技术人员通常能获得的和熟知的。可得到能描述和显示所候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。观察这些显示结果, 就能分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能起到的作用, 即, 分析影响候选免疫球蛋白与其抗原结合能力的残基。这样, 就能从供者抗体和导入序列中选出 FR 残基并将其组合, 从而获得所需的抗体特性(如对靶抗原的亲和力提高)。通常, CDR 残基直接影响和最实质上影响抗原结合。

或者, 现在可以制备转基因动物(如小鼠), 它能经免疫接种在没有内源性免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的全部组成成份。例如, 已经描述了嵌合种系突变型小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合缺失会完全抑制内源性抗体产生。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到这些种系突变型小鼠中能使其在抗原攻击时产生人抗体。例如参见, Jakobovits 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551(1993); Jakobovits 等, *Nature*, 362: 255-258(1993); Bruggermann 等, *Year in Immunol.*, 7: 33(1993)。人抗体也可从噬菌体展示文库中获得(Hoogenboom 等, *J. Mol. Biol.*, 227: 381(1991); Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597(1991))。

(iv) 抗体片段

制备抗体片段的各种技术已经发展起来。在传统上, 这些片段是通过完整抗体的蛋白消化来获得的(例如参见, Morimoto 等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117(1992)和 Brennan 等, *Science*, 229: 81(1985))。然而, 现在这些片段可用重组宿主细胞来直接生产。例如, 如上所述, 抗体片段可从抗体噬菌体文库中分离获得。或者, 可从大肠杆菌中直接回收得到 Fab'-SH 片段, 并使其化学交联形成 F(ab')₂ 片段(Carter 等, *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。根据另一种方法, F(ab')₂ 片段可直接从重组宿主细胞培养中分离获得。制备抗体片段的其它方法对于本领域技术人员来说是显而易见的。在其它实施方案中, 选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。见 WO93/16185。

(v)双特异性抗体

双特异性抗体是对至少两个不同表位有结合特异性的抗体。典型的双特异性抗体可以与 ErbB2 蛋白的两个不同的表位结合。例如, 一个臂可以与 ErbB2 结构域 1 中的表位(如 7C2/7F3 表位)结合, 另一个可以与不同的 ErbB2 表位(如 4D5 表位)结合。其它此类抗体可以将 ErbB2 结合位点与 EGFR、ErbB3 和/或 ErbB4 结合位点组合起来。或者, 抗 ErbB2 臂可以与结合白细胞上触发分子(如 T 细胞受体分子 CD2 或 CD3)或 IgG 的 Fc 受体(FcγR)(如 FcγRI(CD64)、FcγRII(CD 32)和 FcγRIII(CD16)的臂组合, 以使细胞防御机制聚集于表达 ErbB2 的细胞上。双特异性抗体也可用来使细胞毒性制剂定位于表达 ErbB2 的细胞。这些抗体具有 ErbB2 结合臂和细胞毒性制剂(如皂素、抗干扰素 α、长春花生物碱、蓖麻蛋白 A 链、氨甲碟呤或放射活性同位素半抗原)结合臂。双特异性抗体可制成全长抗体或抗体片段(如 F(ab')₂ 双特异性抗体)。

制备双特异性抗体的方法是该领域中已知的。制备全长双特异性抗体的传统方法是以两个具有不同特异性的免疫球蛋白重链-轻链对共同表达为基础(Millstein 等, *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(四杂交物)可能产生有 10 种不同抗体分子的混合物, 其中只有一种有正确的双特异性结构。要纯化该正确分子(通常采用亲和层析方法)是相当费力的, 且产量低。WO93/08829 以及 Traunecker 等, *EMBO J.* 10: 3655-3659(1991)公开了类似的方法。

根据不同的方法, 使具有所需结合特异性(抗体-抗体结合位点)的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。最好与免疫球蛋白重链恒定区融合,

至少包括部分铰链区、CH2 和 CH3 区。最好是至少在一个融合物中有含轻链结合所必需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免疫球蛋白轻链(如果需要)的 DNA 插入分离的表达载体中, 并且共同转染入合适的宿主生物体中。在构建时采用不相等比例的三种多肽链来提供最优得率的实施方案中, 这为调节三个多肽片段相互比例提供了更大的灵活性。然而, 当至少两个多肽链以相等比率表达导致高产率, 或比例无关紧要时, 可以将两个或所有三个多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

在该方法的一个较佳实施方案中, 双特异性抗体由一个臂中具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链和另一臂中的杂交免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。已发现这种不对称的结构有利于将所需的双特异性抗体从不需要的免疫球蛋白链组合物中分离出来, 因为免疫球蛋白轻链只存在于双特异性分子的一半中, 因此很容易分离。该方法公开在 WO94/04690 中。制备双特异性抗体的更详细的情况例如可参见 Suresh 等, *Methods in Enzymology*, 121: 210(1986)。根据 WO96/27011 中描述的另一种方法, 一对抗体分子间的界面可被工程改造成使得从重组细胞培养中回收获得的异二聚物达到最大的百分数。较佳的界面至少包含抗体恒定区 C_H3 结构域的一部分。在该方法中, 第一抗体分子界面上的一个或多个氨基酸小侧链被较大的侧链(如酪氨酸或色氨酸)代替。通过用较小的侧链(如丙氨酸或苏氨酸)来代替大的氨基酸侧链, 在第二抗体分子的界面上形成与(第一抗体中的)大侧链大小相同或相似的补偿性“空穴”。这就提供了一种机制使得异二聚物的产量高于其它不需要的最终产物(如均二聚物)。

双特异性抗体包括交联的或“异偶联”的抗体。例如, 异偶联物中的一个抗体可以与亲和素偶联, 另一个可以与生物素偶联。例如, 已有建议用这种抗体来使免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利 No. 4, 676, 980)以及用来治疗 HIV 感染(WO91/00360、WO92/200373 和 EP03089)。异偶联抗体可用任何方便的交联方法来制得。合适的交联剂是本领域中已知的, 美国专利 No. 4, 676, 980 中公开了这些交联剂以及许多交联技术。

从抗体片段来制备双特异性抗体的方法在文献中也已有所描述。例如, 可通过化学键来制备双特异性抗体。Brennan 等, *Science*, 229: 81(1985)描述了这样一种方法, 该方法是将完整的抗体蛋白水解断裂成 F(ab')₂ 片段。在二巯基复合试剂亚砷酸钠存在下还原这些片段, 使连位二巯基稳定, 从而防止分子间形成二硫键。然后将产生的 Fab' 片段转变成硫代硝基苯甲酸酯

(TNB)衍生物。然后,通过巯基乙胺还原将一个 Fab'-TNB 衍生物重新转变成 Fab'-巯基。再与等摩尔量的另一个 Fab'-TNB 衍生物混合形成双特异性抗体。制得的双特异性抗体可用作选择性固定酶的试剂。

最近的进展实现了从大肠杆菌中直接回收获得可化学交联形成双特异性抗体的 Fab'-SH 片段。Shalaby 等, *J. Exp. Med.*, 175:217-225(1992)描述了全人化双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的制备过程。使各 Fab'片段分别从大肠杆菌中分泌出来,然后在体外进行定向化学交联,形成双特异性抗体。这样形成的双特异性抗体能结合过度表达 ErbB2 受体的细胞和正常的人 T 细胞,并触发人细胞毒性淋巴细胞对人乳房肿瘤靶的裂解活性。

关于直接从重组细胞培养制备和分离双特异性抗体片段的各种方法已有描述。例如,利用亮氨酸拉链可制得双特异性抗体。Kostelny 等, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553(1992)。通过基因融合,使 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽与两个不同抗体的 Fab'部分连接。还原抗体均二聚物的铰链区,形成单体,然后重新氧化形成抗体异二聚物。该方法也可用来制备抗体均二聚物。Hollinger 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448(1993)中描述的“二抗体”技术为制备双特异性抗体片段提供了另一种机理。这些片段包括了通过一个接头将重链可变区(V_H)连接到轻链可变区(V_L),该接头非常短,使得同一链上的两个功能域之间不能发生配对。因此,一个片段上的 V_H 和 V_L 功能域被迫与另一片段上的互补 V_L 和 V_H 功能域配对,从而形成了两个抗原结合位点。采用单链 Fv(scFv)二聚物来制备双特异性抗体片段的另一种策略也已有报道。见 Grubber 等, *J. Immunol.*, 152: 5368(1994)。

也可考虑采用有超过两价的抗体。例如,可制得三特异性抗体。Tutt 等, *J. Immunol.* 147: 60(1991)。

(vi) 筛选所需性能的抗体

上面描述了制备抗体的方法。现在挑选具有本文所述性能的那些抗体。

为了选择能诱导细胞死亡的抗体,例如相对于对照通过 PI、台盼蓝或 7AAD 吸收的评价来表明膜完整性的丧失。较佳的测试方法是“采用 BT474 细胞的 PI 吸收试验”。根据该试验,将 BT474 细胞(可从美国典型培养物保藏中心(Rochville, MD)获得)培育在 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(D-MEM): Ham's F-12(50:50)中(添加了 10% 热灭活 FBS(Hyclone)和 2mM L 谷氨酰胺)。(这样,该试验在没有补体和免疫效应细胞存在下进行)。将 BT474 细胞以每碟 3×10^6 个的密度接种到 100×20mm 碟中,使其粘附过夜。然后除去培养基,

代之以单独的新鲜培养基或含有 10 μ g/ml 合适单克隆抗体的培养基。培育细胞 3 天。在每次处理后,用 PBS 洗涤单层并用胰蛋白酶消化脱粘附。然后,4 $^{\circ}$ C、1200rpm 离心细胞 5 分钟,将沉淀物重悬在 3ml 冰冷 Ca²⁺结合缓冲液(10mM HEPES, pH7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂)中,等分装入 35mm 盖有滤网的 12 \times 75 试管中(每管 1ml, 3 管为一处理组)以去除细胞凝聚块。然后在试管中加入 PI(10 μ g/ml)。用 FACSCANTM 流式细胞计数仪和 FACSCONVERTTM CellQuest 软件(Becton Dickinson)分析样品。选择能诱导有统计意义水平的细胞死亡(经 PI 吸收确定)的那些抗体。

为了选择能诱导细胞凋亡的抗体,可采用“利用 BT474 细胞的膜联蛋白结合试验”。如前段中所述的那样,培养 BT474 细胞并接种到碟中。然后除去培养基,代之以单独的新鲜培养基或含 10 μ g/ml 单克隆抗体的培养基。培育 3 天后,用 PBS 洗涤单层并用胰蛋白酶消化脱粘附。然后离心细胞,重悬于 Ca²⁺结合缓冲液中,并如上所述等分装入试管中进行细胞死亡试验。然后在试管中加入经标记的膜联蛋白(如膜联蛋白 V-FTIC)(1 μ g/ml)。用 FACSCANTM 流式细胞计数仪和 FACSCONVERTTM CellQuest 软件(Becton Dickinson)分析样品。选择能诱导出膜联蛋白结合有统计意义水平(与对照相比)的那些抗体作为诱导细胞凋亡的抗体。

除了膜联蛋白结合试验外,还可用“利用 BT474 细胞的 DNA 染色试验”。为了进行该试验,将前两段中所述经感兴趣抗体处理的 BT474 细胞在 9 μ g/ml HOECHST 33342TM 中 37 $^{\circ}$ C 培养 2 小时,然后用 MODFIT LTTM 软件(Verity Software House)在 EPICS ELITETM 流式细胞计数仪(Coulter Corporation)上分析。诱导凋亡细胞百分数变化(比未处理细胞(高达 100% 细胞凋亡)高 2 倍或更高(较佳的为 3 倍或更高))的抗体可被选作采用该试验的促细胞凋亡性抗体。

为了筛选与感兴趣抗体结合的 ErbB2 表位结合的抗体,可采用如《抗体实验手册》, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane(1988)所述的常规的交叉阻断试验。或者,可用本领域已知的方法进行表位作图。

为了鉴定在细胞培养中能抑制 50-100% SKBR3 细胞生长的抗 ErbB2 抗体,进行 WO89/06692 中所述的 SKBR3 试验。根据该试验,使 SKBR3 细胞在 F12 和 DMEM 培养基混合物(1:1)(其中添加了 10% 胎牛血清、谷氨酰胺和青霉素链霉素)中生长。在 35mm 细胞培养碟中接种 20,000 个 SKBR3 细胞(2ml/35mm 碟)。每个碟中加入了 2.5 μ g/ml 抗 ErbB2 抗体。6 天后,用

COULTER™ 电子细胞计数器计数细胞数目与未处理细胞比较。选择抑制 50-100% SKBR3 细胞生长的那些抗体，并按需与细胞凋亡性抗体组合使用。

(vii) 效应器功能的工程改造

在效应器功能方面可能希望改进本发明的抗体，以增强抗体在治疗(例如)癌时的效果。例如，可在 Fc 区域中引入半胱氨酸残基，从而在该区域中形成链间二硫键。这样制得的均二聚抗体可能有改进的内化能力和/或提高的补体介导细胞杀伤能力和依赖于抗体的细胞毒性(ADCC)。参见 Caron 等, J. Exp Med. 176: 1191-1195(1992) 和 Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922(1992)。也可如 Wolff 等 Cancer Research 53: 2560-2565(1993)描述的那样，用异二功能性交联剂来制备抗肿瘤活性增强的均二聚抗体。或者，可将抗体工程改造成具有双 Fc 区，从而可能增强补体裂解和 ADCC 能力。见 Stevenson 等, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230(1989)。

(viii) 免疫偶联物

本发明还涉及包含与细胞毒性制剂偶联的本文所述抗体的免疫偶联物，该细胞毒性制剂例如有化疗剂、毒素(如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素，或其片段)、或放射活性同位素(即放射偶联物)。

用来制备此类免疫偶联物的化疗剂在上文已有描述。可用的酶活性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(来自绿浓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa*)、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、 α -八叠球菌、*Aleurites fordii* 蛋白、代辛(diathin)蛋白、美洲商陆蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻枫树毒素、巴豆毒素、皂苷草抑制剂、芥洛尼(gelonin)、分裂素源(mitogellin)、局限曲霉素、酚霉素、伊诺霉素和三科西星(tricothecenes)。各种放射性核素可用来制备放射性偶联的抗 ErbB2 抗体。例子包括 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

抗体与细胞毒性制剂的偶联物可用各种双功能蛋白偶联剂制得，偶联剂例如有 N-琥珀酰亚胺 3-(2-吡啶二硫代)-丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(iminothiolane, IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如己二酸二甲酯 HCL)、活性酯(如辛二酸琥珀酰亚胺酯)、醛(如戊二醛)、二叠氮化合物(如二(对-叠氮苯甲酰基)己二胺)、二重氮衍生物(如二(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯 2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如，可根据 Vitetta 等 Science 238: 1098(1987)所述制备蓖麻毒蛋白的免疫毒素。 C^{14} 标记的 1-异硫氰酸苯基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用

来偶联放射性核苷酸与抗体的典型的螯合剂。见 WO94/11026。

在另一个实施方案中，抗体可以与“受体”(如链霉亲和素)偶联，以用来预先靶向肿瘤，其中将抗体-受体偶联物给予患者，然后用清除剂从循环中除去未结合的偶联物，再给予与细胞毒性制剂(如放射性核苷酸)偶联的“配体”(如亲和素)。

(ix)免疫脂质体

本文公开的抗 ErbB2 抗体也可制成免疫脂质体。含有该抗体的脂质体的制备方法是本领域中已知的，如 Epstein 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688(1985); Hwang 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030(1980); 和美国专利 No. 4, 485, 045 和 4, 544, 545 中有所描述。美国专利 No. 5, 013, 556 中公开了循环时间增加的脂质体。

特别有用的脂质体可通过反向蒸发方法从包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂类组合物制得。将脂质体挤压通过限定孔径的滤膜，获得所需直径的脂质体。本发明的抗体 Fab' 片段可如 Martin 等，J. Biol. Chem. 257:286-288(1982)中所述的那样通过二硫键互换反应与脂质体偶联。脂质体中可以任选地含有化疗剂。见 Gabizon 等，J. National Cancer Inst. 81(19)1484(1989)。

(x)依赖于抗体的酶介导的前体药物治疗(ADEPT)

通过将抗体与激活前体药物的酶(能将前体药物(如肽基化疗剂，见 WO81/01145)转变成有活性的抗癌药)偶联，本发明的抗体还可用于 ADEPT。例如参见 WO88/07378 和美国专利 No. 4, 975, 278。

用于 ADEPT 的免疫偶联物的酶成分包括可作用于前体药物将其转变成更具活性和细胞毒性形式的任何酶。

用于本发明方法的酶包括(但不局限于): 用于将含磷酸酯的前体药物转变成游离药物的碱性磷酸酶; 用于将含硫酸酯的前体药物转变成游离药物的芳基硫酸酯酶; 用于将无毒性 5-氟胞嘧啶转变成抗癌药物(5-氟尿嘧啶)的胞嘧啶脱酰胺酶; 用于将含肽前体药物转变成游离药物的蛋白酶，如锯齿(serratia)蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶 B 和 L); 用于转变含 D-氨基酸取代基的前体药物的 D-丙氨酰羧肽酶; 用于将糖基化前体药物转变成游离药物的糖类断裂酶，如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶; 用于将 β -内酰胺衍生的药物转变成游离药物的 β -内酰胺酶; 以及用于将经苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的胺基氮分别转变成游离药物的

青霉素酰胺酶，如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者，可用具有酶活性的抗体(也称为抗体酶(abzyme))将本发明的前体药物转变成游离的、有活性的药物(例如参见，Massey, Nature 328: 457-458(1987))。抗体-抗体酶偶联物可如本文所述的那样来制备，以将抗体酶递送至肿瘤细胞群。

利用本领域已知的技术(如用上述的异双功能交联剂)使本发明的酶与抗 ErbB2 抗体共价结合。或者，利用本领域中熟知的重组 DNA 技术(例如参见 Neuberger 等，Nature, 312: 604-608(1984))，可以构建出融合蛋白，它包含本发明抗体的至少抗原结合区和与之相连的本发明酶的至少一个功能活性部分。

(xi) 抗体补救性受体结合表位的融合

在本发明的某些实施方案中，希望采用抗体片段而不是完整的抗体，例如来提高肿瘤穿透性。在这种情况下，希望对抗体片段进行修饰，以提高其血清半衰期。例如，这可通过在抗体片段中掺入补救受体结合表位(例如，通过抗体片段中合适区域内的突变，或在肽尾端中掺入表位，然后通过 DNA 或肽合成融合入抗体片段末端或中部)来实现。

制备体内半衰期提高的这种抗体变体的系统性方法包括以下几步。首先是鉴定 IgG 分子 Fc 区的补救受体结合表位的序列和构型。一旦确定了该表位，就可修饰感兴趣抗体的序列，使其包括经鉴定的结合表位的序列及构型。在该序列发生突变后，测试抗体变体，看其体内半衰期是否比原来的抗体长。如果在测试时抗体变体没有较长的体内半衰期，则再一次将其序列改变使其包括经鉴定结合表位的序列和构型。测试变化后的抗体是否有较长的体内半衰期，继续该过程直至获得表现出较长体内半衰期的分子。

这样被掺入到感兴趣抗体中的补救受体结合表位是上述任何合适的表位，其特征取决于(例如)被修饰的抗体类型。该转移应使感兴趣的抗体仍然具有本文所述的生物活性。

较佳的，该表位构成一个区域，该区域中来自 Fc 区的一个或两个环的任何一个或多个氨基酸残基被转移到抗体片段的类似位置上。更佳的是，Fc 区中一个或两个环的三个或多个残基被转移。还要佳的是，该表位取自(例如 IgG 的)Fc 区中 CH₂ 区，并被转移到抗体 CH₁、CH₃ 或 V_H 区、或一个以上的此类区域中。或者，该表位取自 Fc 区的 CH₂ 区，并被转移到抗体片段的 C_L 区或 V_L 区或这两者中。

在一个最佳的实施方案中，补救受体结合表位包含序列(5'到 3'):

PKNSSMISNTP(SEQ ID NO: 3), 还任选地包括选自 HQSLGTQ(SEQ ID NO: 4)、HQNLSDGK(SEQ ID NO: 5)、HQNISDGK(SEQ ID NO: 6)或 VISSHLGQ(SEQ ID NO: 7)的序列, 尤其当抗体片段是 Fab 或(Fab')₂时。在另一个最佳实施方案中, 补救受体结合表位是含有下述序列(5'到 3')的多肽: HQNLSDGK(SEQ ID NO: 5)、HQNISDGK(SEQ ID NO: 6)或 VISSHLGQ(SEQ ID NO: 7)和序列 PKNSSMISNTP(SEQ ID NO: 8)。

(xii)抗 ErbB2 抗体的纯化

当采用重组技术时, 抗体可产生在细胞内(周质间隙内)或被直接分泌到培养基中。如果抗体产生在细胞内, 则第一步是(例如)通过离心或超离心来除去宿主细胞或裂解片段的颗粒碎片。Carter 等, *Bio/Technology* 10: 163-167(1992)描述了分泌入大肠杆菌周质间隙的抗体的一种分离方法。简言之, 在乙酸钠(pH3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟(PMSF)存在下融化细胞浆状物约 30 分钟。离心除去细胞碎片。若抗体被分泌到培养基中, 则最好首先用商业上购得的蛋白浓缩滤膜(例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 的超滤装置)浓缩该表达系统的上清液。在所述任何步骤中均可加入抑制蛋白水解的蛋白酶抑制剂(如 PMSF), 还可加入抗生素以防止外来污染物的生长。

例如, 可用羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析来纯化从细胞中制得的抗体组合物, 其中亲和层析是较佳的纯化方法。蛋白 A 作为亲和配体的合适程度取决于抗体中任何免疫球蛋白 Fc 区的动物种类和同种型。蛋白 A 可用来纯化以人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链为基础的抗体(Lindmark 等, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13(1983))。对于所有小鼠同种型和人 $\gamma 3$, 建议采用蛋白 G(Guss 等, *EMBO J.* 5: 1567-1575(1986))。用作亲和配体附着的基质通常是琼脂糖, 但是也可采用其它基质。机械上稳定的基质(如孔径控制的玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)能达到比琼脂糖更快的流速, 操作时间更短。当抗体包含 C_H3 区时, 可用 Bakerbond ABXTM 树脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)进行纯化。根据待回收抗体的不同, 还可采用其它蛋白纯化方法, 如在离子交换柱上分级、乙醇沉淀、反向 HPLC、硅胶层析、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上的肝素 SEPHAROSETM 层析、聚焦层析、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀。

在任何初步纯化后, 可对包含感兴趣抗体和污染物的混合物进行低 pH 疏水作用层析, 采用 pH 约 2.5-4.5 的洗脱缓冲液, 最好是在低盐浓度(如约 0-0.24M 盐)下进行。

C. 药物制剂

将有所需纯度的抗体与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合，制成冻干制剂或水性溶液形式的用于本发明的抗体治疗剂并保藏 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 版, Osol, A. 编辑(1980))。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下应对受者没有毒性，它们包括：缓冲液，如磷酸、柠檬酸和其它有机酸缓冲液；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六甲季胺、苯扎氯胺、苄索氯胺、苯酚、丁基或苄基醇；对羟苯甲酸烷酯如对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯；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，如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它糖类，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，如 EDTA；糖如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成盐平衡离子，如钠；金属配合物(如 Zn-蛋白配合物)；和/或非离子表面活性剂，如 TWEENTM、PLURONICSTM 或聚乙二醇(PEG)。

本文的制剂还可含有待治疗的具体适应征所需的一种或多种活性化合物，尤其是具有互补活性且相互间没有不利影响的那些化合物。例如，在一个制剂中，还希望提供与 EGFR、ErbB2(如与 ErbB2 上不同表位结合的抗体)、ErbB3、ErbB4 或血管内皮生长因子(VEGF)结合的抗体。或者，另外此组合物还可包含细胞毒性剂、细胞因子或生长抑制剂，只要该细胞毒性剂不是蒽环类抗生素衍生物(例如阿霉素或表柔比星)。这些分子应以实现目的的有效剂量组合。

活性组分还可包裹在(例如)通过团聚技术或界面聚合法制得的微胶囊中，例如分别在羟甲基纤维素或明胶微囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊中，在胶态药物递送系统(例如，脂质体、白蛋白微珠、微乳剂(microemulsion)、纳米级颗粒和纳米级胶囊)或巨乳剂(macroemulsion)中。这些技术公开在 Remington's Pharmaceutical Sciences 16 版，编者 Osol, A. (1980)中。

用于体内给药的制剂必须无菌。这很容易通过无菌滤膜过滤来实现。

可以制得缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水聚合物半渗透基质，其中该基质是成形制品形式，如薄膜或微胶囊。缓释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 No. 3, 773, 919)、L-谷氨酸和 γ 乙基-L-谷氨酸酯的共

聚物、不能降解的乙烯-乙酸乙烯酯、可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-羟基乙酸共聚物和 leuprolide 乙酸酯组成的可注射的微珠)、和聚-D(-)-3-羟基丁酸。尽管诸如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-羟基乙酸的聚合物能持续释放分子 100 天以上,但是某些水凝胶释放蛋白的时间却较短。当胶囊化的抗体长时间停留在体内时,它们会由于暴露在 37°C 水分下而变性或凝聚,从而导致生物活性丧失,且免疫原性可能会改变。可以根据涉及的机理来设计稳定化的合理策略。例如,如果发现凝聚的机理是通过硫代-二硫键互换而形成了分子间 S-S 键,则可通过修饰巯基残基、自酸性溶液中冻干、控制湿度程度、采用合适的添加剂和开发特殊的聚合物基质组合物来达到稳定化。

IV. 抗 ErbB2 抗体的治疗

本发明认为抗 ErbB2 抗体可用于治疗各种以 ErbB2 受体过度表达和/或激活为特征的各种病症。典型的病情或疾病的例子包括良性或恶性肿瘤(如肾、肝、肾、膀胱、乳房、胃、卵巢、结直肠、前列腺、胰、肺、外阴、甲状腺、肝细胞癌;肉瘤;成胶质细胞瘤和各种头部和颈部肿瘤);白血病和淋巴恶性肿瘤;其它疾病,如神经、胶质、星形胶质、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞性、上皮性、基质和囊胚腔疾病;以及炎症、血管生成和免疫疾病。

可根据已知的方法将本发明的抗体给予人患者,这些方法例如有作为药团的静脉内给药、或通过肌肉、腹腔内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜腔内、鞘内、口服、局部或吸入途径持续灌输一定时间。静脉给予抗体的方式是较佳的。

本发明的治疗方法涉及抗 ErbB2 抗体与非蒽环类抗生素衍生物的化疗剂的联合给药。联合给药包括共同给药,采用分开的制剂或一种药物制剂,以及以任何次序的连续给药,其中较佳的是在两种(或所有)活性剂同时发挥其生物活性时有一段时间。这些化疗剂的制剂和剂量方案可根据生产商的说明书来使用,或可根据专业医师的实践经验来确定。这些化学治疗的制剂和剂量方案还公开在 Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)中。化疗剂可在给予抗体前后或同时给予。抗体可以与抗雌激素化合物(如三苯氧胺)或抗黄体酮化合物(如 onapristone)(见 EP616812)组合,这些分子的剂量是本领域中已知的。

还希望给予抗其它肿瘤相关抗原的抗体,如与 EGFR、ErbB3、ErbB4、

或血管内皮生长因子(VEGF)结合的抗体。或者另外,可以将两种或多种抗 ErbB2 抗体给予患者。有时,还可将一种或多种细胞因子给予患者也许有好处。在一个较佳的实施方案中,抗 ErbB2 抗体与生长抑制剂一同给药。例如,可以首先给予生长抑制剂,然后再给予 ErbB2 抗体。然而,也可考虑同时给药,或首先给予 ErbB2 抗体。生长抑制剂的合适剂量是目前采用的那些剂量,而且由于生长抑制剂与抗 ErbB2 抗体的组合作用(协同作用),该剂量还可降低。

为预防或治疗疾病,抗体的合适剂量将取决于上述待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和病程(无论给予抗体是用来预防还是治疗目的)、以前的治疗、患者病史以及对抗体的反应、主治医师的判断。抗体可以适当地一次性或在一系列治疗中给予患者。

根据疾病严重程度和类型,给予患者的最初候选抗体剂量约为 1 μ g/kg 至 15mg/kg(如 0.1-20mg/kg),无论是通过一次或多次给药还是连续灌输。根据上述因素,典型的每日剂量大约为 1 μ g/kg 至 100mg/kg 或更高。对于反复给药几天或更长时间,须取决于病征,治疗持续直至病征受到所希望的抑制。然而,也可采用其它剂量方案。这种治疗的进展情况很容易通过常规技术和试验来监测。

关于合适剂量的进一步信息提供在下文实施例中。

G. 产品的生产

在本发明另一个实施方案中,提供了一种含有用于治疗上述疾病的物质的产品。该产品包括一个容器、一个标签和一张包装插页。合适的容器包括,例如,瓶、小瓶、注射器等。容器可用诸如玻璃或塑料之类的各种物质制成。容器中盛放了可有效治疗病征的组合物,还可以有一个无菌入口(例如,容器可以是盛静脉用溶液的袋或有可用皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。组合物中的至少一种活性剂是抗 ErbB2 抗体。容器上的或附带的标签说明了该组合物可用来治疗所列出的病征。产品还可包含第二个容器,该容器中含有药学上可接受的缓冲液,如磷酸缓冲盐溶液、Ringer's 溶液和葡萄糖溶液。它还可包括商业和应用上所需的其它物质,包括其它缓冲液、稀释剂、过滤器、针头和注射器。另外,产品包含一张有使用说明的包装插页,插页包括了该组合物不能和蒽环类抗生素化疗剂(如阿霉素或表柔比星)组合使用的警告。

H. 材料的保藏

下列杂交瘤细胞系已经保藏在美国典型培养物保藏中心(12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA(ATCC))中:

抗体命名	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 CRL10463	1990年5月24日

下文的非限制性实施例进一步描述了本发明的细节。

实施例

材料和方法

抗 ErbB2 单克隆抗体。按 Fendly 等 Cancer Res. 50: 1550-1558(1990)和 WO89/06692 所述,产生了对 ErbB2 胞外结构域有特异性的抗 ErbB2 的 IgG₁κ 鼠单克隆抗体 4D5。简而言之,如 Hudziak 等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)84: 7159(1987)所述产生 NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ 细胞(每个细胞表达约 1×10⁵ErbB2 个分子),用含 25mM EDTA 的磷酸盐缓冲液(PBS)收获细胞,用于免疫接种 BALB/c 小鼠。在第 0、2、5、7 周给小鼠腹膜内注射含 10⁷ 细胞的 0.5 毫升 PBS。在第 9 周和第 13 周,对抗血清能免疫沉淀 ³²P 标记的 ErbB2 的小鼠腹膜内注射经麦芽凝集素-Sepharose(WGA)纯化的 ErbB2 膜提取物。然后,静脉内注射一次 0.1ml 的 ErbB2 制剂,取脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系 X63-Ag8.653 融合。通过 ELISA 和放射性免疫沉淀法筛选杂交瘤上清液的 ErbB2 结合能力。MOPC-21(IgG1)(Cappell, Durham, NC),被用作同种异型匹配对照。

治疗用鼠 4D5 抗体的人化版本(HERCEPTIN®)进行。对该人化抗体进行工程改造,将鼠 4D5 抗体的互补决定区插入人免疫球蛋白 IgG₁ 共有序列的构架区(IgG₁)中(Carter 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289[1992])。所得人化抗 ErbB2 单克隆抗体对 p185^{HER2} 有很高的亲和力(Dissociation 常数[K_d]=0.1nmol/L),在体外和人异体移植物中明显抑制了含有高水平 p185^{HER2} 的乳房癌细胞的生长,诱导出依赖于抗体的细胞毒性(ADCC)作用,而且发现作为单一治疗剂,对接受过广泛先期治疗的 ErbB2 过度表达转移性乳房癌患者有临床活性。HERCEPTIN®由经基因工程改造的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系产生,该细胞系大规模生长,并将抗体分泌到培养基中。用标准的层析和过滤方法从 CHO 培养基中纯化获得该抗体。对用于本研究的每批抗体进行检验,以确认它的性质、纯度和效力,并符合“食

品药物管理局”对无菌性和安全性的要求。

合格标准 患者必须符合下列研究许可的合格标准:

-转移性乳房癌

-ErbB2(HER2)癌基因有过度表达(经免疫组织化学或荧光原位杂交(FISH)测定为2+至3+).[ErbB2的肿瘤表达可如以前所述(Slamon等人,[1987]和[1989])的那样,通过免疫组织化学分析从石蜡保存的患者肿瘤块制得的一系列薄片来测定。所用的第一检测抗体是4D5单克隆抗体,它具有和用于治疗的人化抗体相同的CDR。如果至少25%的肿瘤细胞表现出特征性的p185^{HER2}膜染色,则认为肿瘤过度表达ErbB2].

-通过放射照相手段、物理检查或照片表现出二维可测定的疾病(包括溶解性骨病损)

可测定的疾病定义为,在两个垂直直径中可通过物理检查、X-射线(平片)、计算机化的X线断层摄影术(CT)、磁共振显影(MRI)、超声或照片可重复测出的块物。

成骨细胞性转移灶、胸膜腔积液或腹水不认为是可测定的。可测定的病损最大尺寸至少为1厘米。转移性疾病的可评价部位的叙述以及可评价部位(如肺)中的病损数目必须记录在合适的病例报告表格(CRF)中。如果有大量肺或肝病损,则跟踪每个部位最大的6个病损。

-能理解并愿意签署书面表示同意的表格

-妇女应满18周岁

-通过对血液、肾、肝和代谢功能的筛选性实验室评价证明,候选人适合接受伴随的细胞毒化学治疗。

排除的标准 具有下列任一情况的患者应被排除在研究之外:

-以前接受过转移性乳房癌的细胞毒化学治疗

患者可能在以前曾接受过转移性疾病的激素治疗(如三苯氧胺)或佐剂环境中的细胞毒性治疗。

-伴有恶性肿瘤未被有效治愈

-Karnofsky评分上性能状况低于60%

-怀孕的或正受护理的妇女;有可能分娩的妇女,除非经研究者确定已有效避孕

-两侧有乳房癌(原发性肿瘤必须有2+到3+的HER2过度表达,或转移部位必须有2+到3+的HER2过度表达)

-在研究前 30 天内使用了调查性或未经许可的制剂

-临床上不稳定的或有不能治疗的转移到脑部的转移灶(例如需要放射治疗)

根据上述标准,选择 469 位患者参加本研究。随机地使半数患者(通过化学治疗分层)另外接受 HERCEPTIN®抗体(见下文)。

给药和剂量

抗 ErbB2 抗体

在第 0 天,在 90 分钟期间静脉内给予 4 毫克/千克人化抗 ErbB2 抗体(HERCEPTIN®, H)。从第 7 天起,患者每周在 90 分钟期间静脉内接受 2 毫克/千克抗体。

化学治疗

患者接受过下列两种化学治疗方案之一最少 6 个周期,只要患者的疾病没有进展: a)环磷酰胺和阿霉素或表柔比星(AC),如果患者没有在佐剂背景中接受过蒽环类抗生素治疗,或 b)帕利他塞(T, TAXOL®),如果患者在佐剂背景中接受过蒽环类抗生素治疗。HERCEPTIN®抗体的最初给药在任一化疗方案第一个周期前 24 小时。随后在化疗给药马上开始前给予抗体,如果抗体的最初给药被很好地耐受的话。如果抗体的第一次给予未被很好地耐受的话,则在化疗给药前 24 小时继续随后的灌输。使患者继续接受化疗超过 6 个周期,如果在治疗医师看来患者继续治疗有利的话。

环磷酰胺(600 毫克/平方米)的给予可以在最短 3 分钟期间静脉内推入或在最长 2 小时内灌输输入。

阿霉素(60 毫克/平方米)或表柔比星(75 毫克/平方米)可根据制度规定的程序在最短 3-5 分钟期间静脉内缓慢推入或在最长 2 小时内灌输输入。

帕利他塞(TAXOL®)给予的剂量是在 3 小时内静脉内给予 175 毫克/平方厘米。接受帕利他塞的所有患者预先在给予帕利他塞之前 12 至 6 小时口服地塞米松(或其等价物)20 毫克×2 剂;在帕利他塞之前 30 分钟静脉内给予 50 毫克苯海拉明(或其等价物),和在帕利他塞之前 30 分钟给予二甲茛啉(dimetidine)(或另一 H₂ 阻断剂)。

反应标准

进展性疾病:任何可测定的病损有 25%或更多增加的客观证据。进展性疾病反应还包括出现新病损的那些情况。对于骨病损,进展定义为平片、CT、MRI 客观测得增加 25%;并非由骨折引起的有症状的新损伤;或需要

缓和的放射治疗。

完全反应：所有放射照片和/或肉眼能看到的肿瘤在最短 4 周内消失。皮肤和胸壁完全反应必须通过活检来确认。

部分反应：所有可测定的病损的垂直直径总和在最短 4 周内减少至少 50%。没有出现新的病损，所有病损的大小也没有进展。

最小反应：所有可测定的病损的垂直直径总和减少 25% 至 49%。没有出现新的病损，所有病损的大小也没有进展。

稳定的疾病：可测定的病损的大小变化不超过 25%。没有出现病损。

从治疗开始到进展计算至肿瘤进展的时间(TTP)。用针对单一部分的确切方法计算反应速度的置信限。(Fleiss, JL, Statistical Methods for Rates and Proportions(第 2 版), New York, NY, Wiley, 1981, 13-17 页)。

结果

在 10.5 个月的中期随访中，疾病进展时间(TTP, 月为单位)以及反应比例(RR)的评价结果表明，HERCEPTIN®明显增加了化疗剂的结果，且整体的严重副作用(AE)没有增加：

	参与者	TTP(月)	RR(%)	AE(%)
CRx	234	5.5	36.2	66
CRx+H	235	8.6*	62.00**	69
AC	145	6.5	42.1	71
AC+H	146	9.0	64.9	68
T	89	4.2	25.0	59
T+H	89	7.1	57.3	70

*对数秩次检验的 $p < 0.001$ ；** X^2 检验 $p < 0.01$ ；CRx: 化疗；AC: 蒽环类抗生素/环磷酰胺治疗；H: HERCEPTIN®；T: TAXOL®

据报道, AC+H(18% 级 3/4)的组合治疗比单用 AC(3%)、T(0%)或 T+H(2%)更经常会出现类似于用蒽环类抗生素时所观察到的心肌功能紊乱综合征。

这些数据表明抗 ErbB2 抗体的治疗与化疗剂联合能增加临床效果(从反应比例和疾病进展的评价结果而确定)。但是，由于阿霉素或表柔比星增加了心肌副作用，因此蒽环类抗生素与抗 ErbB2 抗体治疗的组合使用是禁忌的。从风险和效益考虑，该结果表明 HERCEPTIN®和帕利他塞(TAXOL®)的组合治疗是有利的。

说明书中的所有引用文献均表述性地纳入本文作为参考。

序列表

<110> 基因技术股份有限公司 (Genentech, Inc.)

<120> 用抗 ErbB2 抗体治疗

<130> P1256R2PCT

<150> US 60/069, 346

<151> 1997-12-12

<160> 9

<210> 1

<211> 166

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu
1 5 10 15

Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val
20 25 30

Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser
35 40 45

Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu
50 55 60

Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg
65 70 75

Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala
80 85 90

Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr
95 100 105

Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu
110 115 120

Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
125 130 135

Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys
140 145 150

Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg
155 160 165

Ala

<210> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2
 Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro
 1 5 10 15

Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu Tyr Gln
 20 25 30

Gly Cys

<210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3
 Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro
 1 5 10

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4
 His Gln Ser Leu Gly Thr Gln
 1 5

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5
 His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys
 1 5

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6
 His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys
 1 5

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7
 Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln
 1 5

<210> 8
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 8

Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
 1 5 10 15

Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
 20 25 30

Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val
 35 40 45

Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg
 50 55

<210> 9

<211> 65

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr
 1 5 10 15

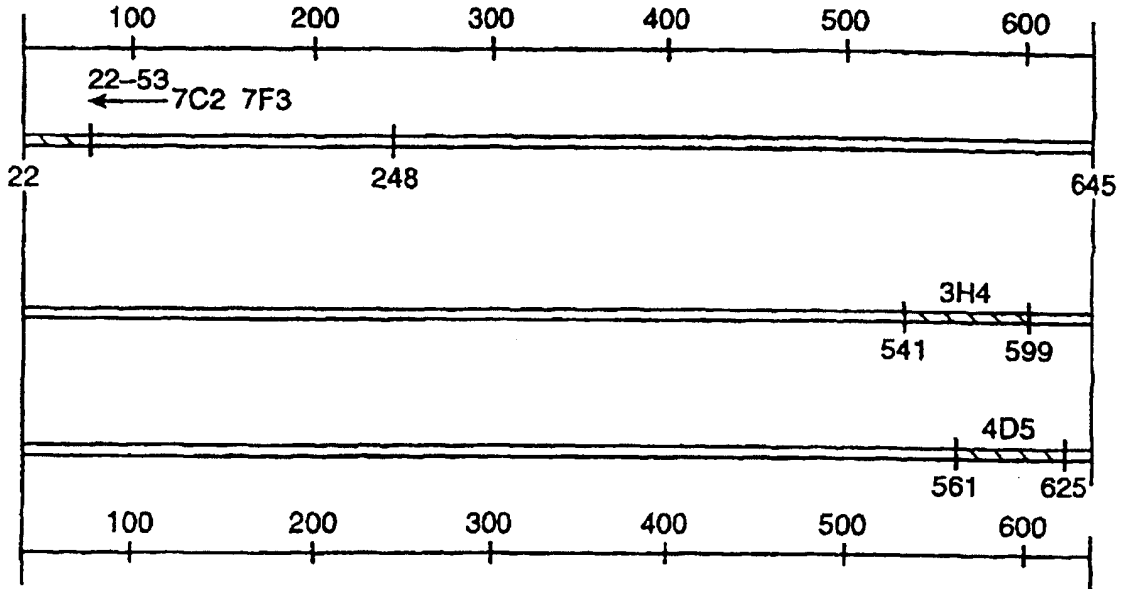
Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr
 20 25 30

Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys
 35 40 45

Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu
 50 55 60

Gly Ala Cys Gln Pro
 65

3H4 aa 541-599
 4D5 aa 529-625
 7C2 aa 22-53
 7F3 aa 22-53



3H4 表位 (SEQ ID NO:8)

VEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCVAR
 |
 541 | 599

4D5 表位 (SEQ ID NO:9)

LPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCVACAHYKDPFFCVARCPGKFDLSYMPIWKFPDEEGACQP
 |
 561 | 625

图 1

1 MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLEPA
 38 SPETHLDMLRHLIYQCCQVVOGNLELTYLPTNASLSFL
 75 QDIQEVQGYVLIHNOVROVPLQRLRIVRGTOFLFEDN
 112 YALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQRLSLTEI
 149 LKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLID
 186 TNRSRA

图 2