

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00811782.9

[51] Int. Cl.

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 39/44 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 4 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 100482281C

[22] 申请日 2000.6.23 [21] 申请号 00811782.9

[30] 优先权

[32] 1999.6.25 [33] US [31] 60/141,316

[32] 2000.3.16 [33] US [31] 60/189,844

[86] 国际申请 PCT/US2000/017229 2000.6.23

[87] 国际公布 WO2001/000244 英 2001.1.4

[85] 进入国家阶段日期 2002.2.19

[73] 专利权人 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·埃里克森 R·斯瓦尔

M·斯利夫科夫斯基 W·布拉特尔

[56] 参考文献

WO9817797A 1998.4.30

EP0425235A 1991.5.2

审查员 李 钢

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 张平元

权利要求书 2 页 说明书 46 页 附图 39 页

[54] 发明名称

抗 ErbB 抗体 - 类美坦素偶联物在制备药物中的应用

[57] 摘要

本发明涉及使用抗 ErbB 抗体 - 类美坦素偶联物的治疗方法, 以及此类方法中所用的制品。具体地说, 本发明涉及用抗 ErbB 受体的抗体与类美坦素的偶联物进行 ErbB 受体靶向癌症治疗的方法。

1. 抗 ErbB 抗体-类美坦素偶联物在制备用于治疗哺乳动物肿瘤的药物中的用途, 其中的肿瘤以过量表达 ErbB 受体为特征, 而且对抗 ErbB 抗体治疗无反应或反应差。
2. 根据权利要求 1 所述的用途, 所述的哺乳动物是人。
3. 根据权利要求 2 所述的用途, 所述 ErbB 受体选自 ErbB1(EGFR), ErbB2(HER2), ErbB3(HER3)或 ErbB4(HER4)。
4. 根据权利要求 3 所述的用途, 所述抗 ErbB 抗体是生长抑制性抗体。
5. 根据权利要求 3 所述的用途, 所述抗 ErbB 抗体诱导细胞死亡。
6. 根据权利要求 3 所述的用途, 所述抗 ErbB 抗体诱导细胞凋亡。
7. 根据权利要求 3 所述的用途, 所述抗体是抗 ErbB2 抗体。
8. 根据权利要求 7 所述的用途, 所述肿瘤是癌症。
9. 根据权利要求 8 所述的用途, 所述癌症选自乳房癌, 卵巢癌, 胃癌, 子宫内膜癌, 唾液腺癌, 肺癌, 肾癌, 结肠癌, 结肠直肠癌, 甲状腺癌, 胰腺癌, 前列腺癌或膀胱癌。
10. 根据权利要求 9 所述的用途, 所述癌症是乳房癌。
11. 根据权利要求 10 所述的用途, 所述乳房癌以 2+或以上水平过量表达 ErbB2。
12. 根据权利要求 11 所述的用途, 所述乳房癌以 3+水平过量表达 ErbB2。
13. 根据权利要求 12 所述的用途, 所述抗体具有 4D5 单克隆抗体(ATCC CRL 10463)的生物学特征。
14. 根据权利要求 13 所述的用途, 所述抗体与 4D5 单克隆抗体(ATCC CRL 10463)结合相同表位。
15. 根据权利要求 13 所述的用途, 所述抗体是单克隆抗体 4D5(ATCC CRL 10463)。
16. 根据权利要求 13 所述的用途, 所述抗体是人源化抗体。
17. 根据权利要求 16 所述的用途, 所述抗体选自以下人源化抗体: huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 或 huMAb4D5-8(HERCEPTIN®)。
18. 根据权利要求 17 所述的用途, 所述抗体是人源化抗体 huMAb4D5-8(HERCEPTIN®)。
19. 根据权利要求 3 所述的用途, 所述抗体是抗体片段。
20. 根据权利要求 19 所述的用途, 所述抗体片段是 Fab 片段。
21. 根据权利要求 3 所述的用途, 所述类美坦素是美坦素。

22. 根据权利要求3所述的用途,所述类美坦素是美坦醇。
23. 根据权利要求3所述的用途,所述类美坦素是美坦醇酯。
24. 根据权利要求23所述的用途,所述类美坦素是美坦醇 C-3 位的酯。
25. 根据权利要求24所述的用途,所述类美坦素是图1所示的DM1。
26. 根据权利要求3所述的用途,所述抗体与类美坦素通过双特异性化学接头偶联。
27. 根据权利要求26所述的用途,所述化学接头是 N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶硫)丙酸酯(SPDP)或 N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶硫)戊酸酯(SPP)。
28. 根据权利要求3所述的用途,将所述抗体与类美坦素偶联的接头选自二硫键,硫醚,酸不稳定、光不稳定、肽酶不稳定或酯酶不稳定的基团。
29. 根据权利要求28所述的用途,所述接头是二硫键基团或硫醚基团。
30. 根据权利要求29所述的用途,所述接头是二硫键基团。
31. 根据权利要求3所述的用途,所述偶联物的每个抗体分子连有 1-10 个类美坦素分子。
32. 根据权利要求31所述的用途,所述偶联物的每个抗体分子连有 3-5 个类美坦素分子。
33. 根据权利要求7所述的用途,其中所述药物是与第二抗体联用的药物,所述第二抗体结合 ErbB2 并阻抑 ErbB 受体被配体活化。
34. 根据权利要求33所述的用途,所述第二抗体包括单克隆抗体 2C4(ATCC HB-12697)或人源化的 2C4。
35. 根据权利要求33所述的用途,所述第二抗体与细胞毒试剂偶联。
36. 根据权利要求35所述的用途,所述细胞毒试剂是类美坦素。
37. 一种产品,包括容器和装于其中的组合物,该组合物含有抗 ErbB 抗体-类美坦素偶联物,该产品还包括包装内说明书或标签,上面指明所述组合物可用于治疗以过量表达 ErbB 受体为特征的癌症。
38. 根据权利要求37所述的产品,所述包装内说明书或标签指明所述组合物可用于治疗以过量表达 ErbB2 受体为特征的癌症。
39. 根据权利要求38所述的产品,所述癌症是乳房癌。
40. 根据权利要求38所述的产品,所述癌症的特征是以 2+或以上水平过量表达 ErbB2 受体。
41. 根据权利要求40所述的产品,所述癌症的特征是以 3+水平过量表达 ErbB2 受体。

抗 ErbB 抗体-类美坦素偶联物在制备药物中的应用

发明背景技术领域

本发明涉及用抗 ErbB 受体的抗体与类美坦素的偶联物进行 ErbB 受体靶向癌症治疗的方法，以及其中所用的制品。

相关技术说明1. 美坦素(Maytansine)和类美坦素(Maytansinoid)

最早，美坦素分离自非洲灌木 *Maytenus serrata*(美国专利 3,896,111)。后来发现，有些微生物也能产生类美坦素，例如美坦醇(maytansinol)和 C-3 美坦醇酯(C-3 maytansinol ester)(美国专利 4,151,042)。以下专利中描述了美坦醇及其类似物：美国专利 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 和 4,371,533。

美坦素和类美坦素具有强细胞毒性，但它们在癌症化疗中的应用受到极大限制，因为它们对肿瘤的选择性差会导致严重的副作用。美坦素的临床试验因其对中枢神经系统及胃肠道系统的严重副作用而中止(Issel 等, 癌症治疗回顾 5: 199—207(1978))。

2. ErbB 族受体酪氨酸激酶和抗 ErbB 抗体

ErbB 族受体酪氨酸激酶是细胞生长、分化和存活重要的介质。该受体家族包括 4 个不同成员：上皮生长因子受体(EGFR 或 ErbB1), HER2(ErbB2 或 p185^{neu}), HER3(ErbB3)和 HER4(ErbB4 或 tyro2)。

最早鉴定的 p185^{neu} 是化疗大鼠成神经细胞瘤转化基因的产物。*neu* 原癌基因的活化形式缘于其编码蛋白跨膜区内的一个点突变(缬氨酸变成谷氨酸)。在乳房癌和卵巢癌中可观察到人 *neu* 扩增，且与预后差相关(Slamon 等, *科学*,235:177-182(1987); Slamon 等, *科学*,244: 707-712(1989); 和美国专利 4,968,603)。迄今为止尚未发现人肿瘤发生类似 *neu* 原癌基因中的点突变。在胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌、甲状腺癌、胰腺癌和膀胱癌等其他癌症中也存

在 ErbB2 过量表达(通常但非一定是因为基因扩增)。见: King 等, *科学*, 229: 974(1985); Yokota 等, *柳叶刀*, 1: 765-767(1986); Fukushima 等, *分子细胞生物学*, 6: 955-958(1986); Geurin 等, *癌基因研究*, 3: 21-31(1988); Cohen 等, *癌基因*, 4: 81-88(1989); Yonemura 等, *癌症研究*, 51: 1034(1991); Borst 等, *妇科医学与肿瘤学*, 38: 363(1990); Weiner 等, *癌症研究*, 50: 421-425(1990); Ken 等, *癌症研究*, 50: 5184(1990); Park 等, *癌症研究*, 49: 6605(1989); Zhau 等, *分子癌症学*, 3: 354-357(1990); Aasland 等, *英国癌症杂志*, 57: 358-363(1988); Williams 等, *病理生物学* 59: 46-52(1991); 和 McCann 等, *癌症*, 65: 88-92(1990)。ErbB2 还可能在前列腺癌中过量表达(Gu 等, *癌症通讯*, 99: 185-9(1996); Ross 等, *人类病理学*, 28: 827-33(1997); Ross 等, *癌症*, 79: 2162-70(1997); 和 Sadasivan 等, *泌尿学杂志*, 150: 126-31(1993))。2000 年 4 月 13 日的 PCT 公开 WO00/20579 描述了一种 erbB2 癌基因的剪接形式, 该形式编码一种组成型酪氨酸磷酸化的 ErbB2 受体。由这种剪接变异体编码的 erbB2 蛋白框内缺失了 16 个氨基酸(CVDLDDKGCPAEQRAS), 其中 2 个是保守性半胱氨酸。

大鼠 p185^{neu} 和人 ErbB2 蛋白质产物的抗体已有所描述。Drebin 与其同事获得了抗大鼠 *neu* 基因产物 p185^{neu} 的抗体。见例如 Drebin 等, *细胞*, 41: 695-706(1985); Myers 等, *酶促方法*, 198: 277-290(1991); 和 WO94/22478。Drebin 等在 *癌基因*, 2: 273-277(1988)中称, 与 p185^{neu} 两个不同区域反应的抗体的混合物对植入裸鼠的 *neu* 转化的 NIH-3T3 细胞具有抗肿瘤协同作用。另可见例如 1998 年 10 月 20 日的美国专利 5,824,311。

以下文献中描述了其他不同特性的抗 ErbB2 抗体: Tagliabue 等, *世界癌症杂志*, 47: 933-937(1991); McKenzie 等, *癌基因*, 4: 543-548(1989); Maier 等, *癌症研究* 51: 5361-5369(1991); Bacus 等, *癌发生分子学*, 3: 350-362(1990); Stancovski 等, *PNAS(USA)* 88: 8691-8695(1991); Bacus 等, *癌症研究* 52: 2580-2589(1990); Xu 等, *世界癌症杂志* 53: 401-408(1993); WO94/00136; Kasprzyk 等, *癌症研究* 52: 2771-2776(1992); Hancock 等, *癌症研究* 51: 4575-4580(1991); Shawver 等, *癌症研究* 54: 1367-1373(1994); Arteaga 等, *癌症研究* 54: 3758-3765(1994); Harweuth 等, *生物化学杂志* 267: 15160-15167(1992); 美国专利 5,783,186; 和 Klapper 等, *癌基因* 14: 2099-2109(1997)。

Hudziak 等在 *分子细胞生物学* 9(3): 1165-1172(1989)中描述了一组抗 ErbB2 抗体的产生, 这种方法的特征在于使用人乳房癌细胞线 SK-BR-3。在 SK-BR-3 细胞与抗体接触 72 小时后, 通过细胞单层结晶紫染色测定了细胞的相对增殖率。

用该试验,最大抑制来自被称为 4D5 的抗体,该抗体可抑制 56%的细胞繁殖。该组中其他抗体在该试验中对细胞繁殖的抑制程度较低。还发现,抗体 4D5 可以使得 ErbB2 过量表达的乳房癌细胞对 TFN 细胞毒作用敏感。另可见例如 1997 年 10 月 14 日的美国专利 5,677,171。Hudziak 等所述的抗 ErbB2 抗体在以下文献中得到了进一步的鉴定: Fendly 等, *癌症研究* 50: 1550—1558(1990); Kotts 等, *体外* 26(3): 59(A)(1990); Sarup 等, *生长调节* 1: 72—82(1991); Shepard 等, *临床免疫学杂志* 11(3): 117—127(1991); Kumar 等, *分子细胞生物学* 11(2): 979—986(1991); Lewis 等, *癌症与免疫学与免疫治疗学* 37: 255—263(1993); Pietras 等, *癌基因* 9: 1829—1838(1994); Vitetta 等, *癌症研究* 54: 5301—5309(1994); Sliwkowski 等, *生物化学杂志* 269(20): 14661—14665(1994); scott 等, *生物化学杂志* 266: 14300—5(1991); D'souza 等, *美国科学院院报* 91: 7202—7206(1994); Lewis 等, *癌症研究* 56: 1457—1465(1996); 和 Schaefer 等, *癌基因* 15: 1385—1394(1997)。

小鼠单克隆抗 HER2 抗体可抑制过量表达 HER2 达 2+ 和 3+ 水平的乳房癌细胞的生长,但是对于低水平表达 HER2 的细胞则没有作用(Lewis 等, *癌症与免疫学与免疫治疗学*(1993))。根据这一发现,将 4D5 人源化(Carter 等, *美国科学院院报* 89: 4285—4289(1992))。在经传统化疗后仍过量表达 HER2 的乳房癌患者中对称为 HERCEPTIN®的这一人源化版本(huMAb4D5-8, rhuMAbHER2, 美国专利 5,821,337)进行了测试(Baselga 等, *临床肿瘤学杂志* 14:737-744(1996);Cobleigh 等, *临床肿瘤学杂志* 17: 2639—2648(1999))。该试验中的大多数患者有 3+ 水平的 HER 过量表达,但其中一部分是 2+ 肿瘤。值得注意的是,HERCEPTIN®在 15% 的患者中诱导产生了临床反应(4%为完全反应,11%为部分反应),反应持续时间的中值为 9.1 个月。1998 年 9 月 25 日,HERCEPTIN®经食品与药物管理委员会准许上市用于治疗过量表达 ErbB2 蛋白的恶性乳房癌患者。

同源性筛选发现了另外 2 个 ErbB 受体家族的成员:ErbB3(美国专利 5,183,884 和 5,480,968, 以及 Kraus 等, *PNAS(USA)*86:9193-9197(1989)和 ErbB4(欧洲专利申请 599,274; Plowman 等, *美国科学院院报* 90: 1746—1750(1993); 和 Plowman 等, *自然* 366: 473—475(1993))。这 2 种受体都在至少部分乳房癌细胞线中过量表达。

3. 类美坦素—抗体偶联物

为了提高治疗指数,目前将美坦素和类美坦素与特异性结合肿瘤细胞抗原的抗体偶联。含类美坦素的免疫偶联物可见例如美国专利 5,208,020; 5,416,064 和

欧洲专利 0 425 234 B1。Liu 等在美国科学院院报 93: 8618—8623(1996)中描述了含类美坦素 DM1 与抗人结肠直肠癌单克隆抗体 C242 相连的免疫偶联物。这种偶联物对培养的结肠癌细胞具有强细胞毒作用,并在体内肿瘤生长试验中表现出抗癌活性。Chari 等在癌症研究 52: 127—131(1992)中描述的免疫偶联物中,类美坦素通过二硫键与结合人结肠癌细胞线上抗原的小鼠抗体 A7 偶联,或与结合 HER2/*neu* 癌基因的小鼠单克隆抗体 TA.1 偶联。体外测定了 TA.1-类美坦素偶联物对人乳房癌细胞线 SK-BR-3 的细胞毒性,该细胞线每细胞表达 3×10^5 HER-2 表面抗原。该药物偶联物获得了与游离类美坦素药物相当的细胞毒性,这种毒性可以通过增加每个抗体上结合的类美坦素分子数量来提高。A7-类美坦素偶联物在小鼠中的全身性细胞毒性较低。

虽然 HERCEPTIN®是曾尝试过多种抗癌治疗的 ErbB2 过量表达型乳房癌治疗史的一次突破,但约 85%的受治者对 HERCEPTIN®疗法无反应或者只有弱反应,而且,在获准上市前的临床试验中,全部受治患者的发病前时间中值仅为 3.1 个月。所以,临床上亟需进一步开发 HER2-靶向的抗癌药物,以用于哪些对 HERCEPTIN®疗法无反应或者只有弱反应的 HER2 过量表达型肿瘤或其他 HER2 表达相关性疾病的患者。

本发明概述

本发明的基础是出人意料的实验发现: HERCEPTIN®-类美坦素偶联物治疗 HERCEPTIN®疗法无反应或弱反应型 HER2(ErbB2)过量表达型肿瘤治疗中非常有效。

本发明内容之一涉及治疗哺乳动物肿瘤的方法,所述肿瘤的特征在于过量表达 ErbB 受体,而且对单克隆抗 ErbB 抗体治疗无反应或弱反应,该方法包括给予所述哺乳动物治疗有效量的抗 ErbB 抗体与类美坦素的偶联物。

在优选实施方式之一中,所述患者是人。另一优选实施方式中,所述 ErbB 受体是(人)ErbB2(HER2)。所述方法不受所用抗 ErbB 抗体作用机制的限制。因此,所述抗 ErbB 抗体可具有,例如,生长抑制特性和/或诱导细胞死亡和/或凋亡。在一特定优选实施方式中,所述方法涉及对乳房癌、卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌、结肠直肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、前列腺癌和膀胱癌等癌症的治疗。较好的是,乳房癌,尤其是过量表达 ErbB2 达 2+水平或以上的乳房癌,达 3+水平更好。优选组的抗体具有 4D5 单克隆抗体的生物学特征,或与 4D5 单克隆抗体结合相同的表位,特别好的是鼠源单克隆抗体 4D5(ATCC

CRL 10463)的人源化形式。

本发明偶联物所用的类美坦素可以是美坦素,或者,美坦醇或美坦醇酯更好。所述抗体和类美坦素可通过例如 N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶硫)丙酸酯(SPDP)或 N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶硫)戊酸酯(SPP)等双特异性化学接头偶联。抗体与类美坦素之间的接头可以是例如二硫键,硫醚,酸不稳定性基团,光不稳定性基团,肽酶不稳定性基团,或酯酶不稳定性基团。

在一特定实施方式中,本发明治疗方法包括给予一种第二抗体,该第二抗体结合 ErbB2 并阻抑 ErbB 受体被配体激活。如果需要,可将该第二抗体与一种细胞毒试剂例如类美坦素偶联。

本发明的另一内容涉及一种制品,它包括一个容器和其中的组合物,该组合物包含抗 ErbB 抗体-类美坦素偶联物,还包含包装内说明或标签,上面说明了该组合物可用于治疗以 ErbB 受体过量表达(最好达 2+ 水平或以上)为特征的癌症。

附图说明

图 1 是类美坦素“DM1”的结构。

图 2 是 HERCEPTIN®-DM1 偶联物的结构。

图 3 是 HERCEPTIN®-DM1 偶联物在 Sephacryl S300 凝胶过滤柱上的洗脱曲线。

图 4 是 HER2 转基因质粒构建物的核苷酸序列(SEQ ID NO:1),该构建物指导天然人 HER2(ErbB2)在转基因小鼠乳腺中的表达。该图还包括 HER2(ErbB2)cDNA 插入片段的核苷酸序列(SEQ ID NO:2),以及 HER2(ErbB2)的推定氨基酸序列(SEQ ID NO:3),包括信号序列。在 SEQ ID NO:3 中,残基 22—645 是 HER2(ErbB2)的胞外区。

图 5 显示 HERCEPTIN®-DM1 对 HER2 转基因肿瘤的作用。将 2mm³ 大小的 MMTV HER2-转基因肿瘤切片移植到 FVB 小鼠的乳房脂肪层中。当肿瘤长到 250mm³ 时,连续 5 天给一组 8 个小鼠 i.v.注射 HERCEPTIN®-DM1 偶联物。另 2 组小鼠每周用 10mg/kg HERCEPTIN®或 RITUXAN®进行 IP 处理两次。

图 6 显示人源化抗 HER2 抗体 2C4 的重链可变区序列。

图 7 显示人源化抗 HER2 抗体 2C4 的轻链可变区序列。

本发明的详细描述

1. 定义

除非另作说明,本文中科技术语的意义与本领域的常规理解相同。Singleton 等,《微生物学和分子生物学辞典,第 2 版》,J. Wiley & Sons(New York, NY 1994)。本领域技术人员将会看出,还有许多与本文所述相似或等效的方法和材料可用于

本发明。实际上，本发明并不局限于后文所述的方法和材料。本发明中术语的含意如下：

“ErbB 受体”或“ErbB”指属于 ErbB 受体家族的酪氨酸激酶受体蛋白，包括 ErbB1(EGFR)，ErbB2，ErbB3 和 ErbB4 受体，以及将来可能鉴定到的该家族其他成员。该定义特别包括相应 *erbB* 癌基因剪接形式所编码的 ErbB 受体，这包括但不限于已公开 PCT 申请 WO00/20579(2000 年 4 月 13 日公开)中所述的 ErbB2 缺失变体。ErbB 受体一般包括一个结合 ErbB 配体的胞外区；亲脂性跨膜区；保守的胞内酪氨酸激酶区；和包含数个可磷酸化酪氨酸残基的羧基末端信号区。所述 ErbB 受体可以是“天然序列”的 ErbB 受体，或其功能性衍生物，例如“氨基酸序列变体”。优选的是天然序列人 ErbB 受体。

“ErbB1”，“表皮生长因子受体”和“EGFR”在本文中通用，都表示天然序列的 EGFR，例如 Carpenter 等，*生物化学年度回顾*，56：881-914(1987)所述，包括其天然突变体(例如 Humphrey 等，*PNAS(USA)*，87:4207-4211(1990)所述的缺失突变 EGFR，及其功能性衍生物，例如氨基酸序列变体。*erbB1* 表示编码 EGFR 蛋白质产物的基因。

“ErbB2”或“HER2”在本文中通用，都表示天然序列的人 HER2 蛋白，见例如 Semba 等，*PNAS(USA)*，82：6497-6501(1985)和 Yamamoto 等，*自然* 319：230-234(1986)(Genebank 登录号 X03363)，及其功能性衍生物，例如氨基酸序列变体。*erbB2* 指编码人 HER2 的基因，*neu* 表示编码大鼠 p185^{neu} 的基因。优选的 HER2 是天然序列的人 HER2。结合 HER2 的抗体的例子包括 MAbs4D5(ATCC CRL 10463)，2C4(ATCC HB-12697)，7F3(ATCC HB-12216)和 7C2(ATCC HB 12215)(见，美国专利 5,772,997，WO98/77797；和美国专利 5,840,525)。人源化抗 HER2 抗体包括美国专利 5,821,337 中表 3 中的 huMAb4D5，huMAb4D5-2，huMAb4D5-3，huMAb4D5-4，huMAb4D5-5，huMAb4D5-6，huMAb4D5-7 和 huMAb4D5-8(HERCEPTIN®)；人源化 520C9(WO93/21319)。有关人抗 HER-2 抗体可见 1998 年 6 月 30 日的美国专利 5,772,997 和 1997 年 1 月 3 日公开的 WO97/00271。

“ErbB3”和“HER3”指受体多肽(例如美国专利 5,183,884 和 5,480,968 以及 Kraus 等，*PNAS(USA)*86：9193-9197(1989)所述)，及其功能性变体，包括其氨基酸序列变体。结合 HER3 的抗体的例子包括美国专利 5,968,511(Akita 和 Sliwowski)所述，例如 8B8 抗体(ATCC HB12070)或其人源化变体。

“ErbB4”和“HER4”指受体多肽(例如欧洲专利申请 599,274；Plowman 等，美国科学院院报 90：1746-1750(1993)；和 Plowman 等，*自然*，366:473-

475(1993), 及其功能性变体, 包括其氨基酸序列变体, 例如 WO99/19488 所述的 HER4 同种异型。

“天然”或“天然序列”EGFR, HER2, HER3 或 HER4 多肽可以分离自大自然, 也可以用重组 DNA 技术、化学合成法, 或以上及类似技术的联合制得。

“功能性衍生物”包括氨基酸序列变体, 以及天然多肽的共价衍生物, 条件是它们保留了与天然多肽相当的生物活性。氨基酸序列变体与天然氨基酸序列的差异一般在于天然氨基酸序列中一个或多肽氨基酸的取代、缺失和/或插入。缺失变体包括天然多肽的片段和 N 端和/或 C 端截短变体。通常, 氨基酸序列变体与天然多肽应具有至少 70%, 甚至至少 80%, 甚至至少 90% 的同源性。

“同源性”指氨基酸序列排列对比后(为了获得最大同源性百分比, 可以引入必要的空距)相同残基的百分比。用于序列排列对比的方法和计算机程序都是本领域所熟知的。此类程序之一是 Genetech Inc. 的“Align 2”, 已于 1991 年 12 月 10 日向美国版权局(Washington, DC 20559)登记。

“ErbB 配体”指能结合和/或激活 ErbB 受体的多肽。本发明中特别有意义的 ErbB 配体是天然序列人 ErbB 配体, 例如表皮生长因子(EGF)(Savage 等, *生物化学杂志* 247: 7612-7621(1972)); 转化生长因子 α (TGF- α)(Marquardt 等, *科学* 223: 1079-1082(1984)); 双调蛋白(又称施旺细胞或角质形成细胞自泌生长因子(Shoyab 等, *科学* 243: 1074-1076(1989), Kimura 等, *自然* 348: 257-260; 和 Cook 等, *分子细胞生物学* 11: 2547-2557(1991)); betacellulin(Shing 等, *科学* 259: 1604-1607(1993); 和 Sasada 等, *生物化学和生物物理学研究通讯* 190: 1173(1993)); 肝素结合性表皮生长因子(HB-EGF)(Higashiyama 等, *科学* 251: 936-939(1991)); 上皮调节蛋白(epiregulin)(Toyoda 等, *生物化学杂志* 270: 7495-7500(1995); 和 Komurasaki 等, *癌基因* 15: 2841-2848(1997)), heregulin(见后文); 神经调节蛋白-2(NRG-2)(Carraway 等, *自然* 387: 512-516(1997)); 神经调节蛋白-3(NRG-3)(Zhang 等, *美国科学院院报* 94: 9562-9567(1997)); 或 cripto(CR-1)(Kannan 等, *生物化学杂志* 272(6): 3330-3335(1997))。结合 ERFR 的 ErbB 配体包括 EGF, TGF- α , 双调蛋白, betacellulin, HB-EGF 和上皮调节蛋白。结合 HER3 的 ErbB 配体包括 heregulin。结合 HER4 的 ErbB 配体包括 betacellulin, HB-EGF, NRG-2, NRG-3 和 heregulin。

“heregulin(HRG)”指激活(即结合后诱导复合物中酪氨酸残基的磷酸化)ErbB2-ErbB3 和 ErbB2-ErbB4 蛋白质复合物的多肽。其所包括的各种 heregulin 多肽可见 Holmes 等, *科学* 256: 1205-1210(1992); WO92/20798; Wen 等, *Mol, Cell,*

Biol., 14(3):1909-1919(1994)和 Marchioni 等, 自然 362: 312-318(1993)所述。该术语包括天然 HRG 多肽的生物活性片段和/或变体, 例如其 EGF-样区域片段(例如 HRG $\beta_{177-244}$)。

“Erb 异寡聚物”是至少两种不同 ErbB 受体非共价偶联的寡聚物。当表达两种或两种以上 ErbB 受体的细胞接触 ErbB 配体时就会形成此类复合物, 它们可以按照例如 Sliwkowski 等, 生物化学杂志 269(20): 14661-14665(1994)所述通过免疫沉淀进行分离, 用 SDS-PAGE 进行分析。此类 ErbB 异寡聚物的例子包括 EGFR-HER2, HER2-HER3 和 HER3-HER4 复合物。而且, 所述 ErbB 异寡聚物还包括两个或两个以上 HER2 受体与 HER3、HER4 或 EGFR 等另外的 ErbB 受体的组合。所述异寡聚物也包括细胞因子受体亚基(例如 gp130)等其他蛋白质。

在有关 HER2 变体(例如 HER2 片段)的描述中, “具有天然人 HRE2 的生物学活性”表示当所述片段在本发明(转基因或非转基因)动物模型中过量表达时, 其诱导肿瘤生长的能力与天然 HER2 相当。

“肿瘤”指各种瘤细胞生长和增殖(不论其是恶性还是良性), 以及各种癌前和癌性细胞和组织。

“癌”和“癌性”表示哺乳动物中以细胞生长失控为特征的生理状况。癌的例子包括但不限于癌, 淋巴瘤, 乳房癌, 肉瘤, 和白血病或淋巴系统恶性肿瘤。更具体的例子包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌), 肺癌, 包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺部的腺癌和肺部的鳞状细胞癌, 腹膜癌, 肝细胞癌, 胃癌(包括胃肠癌), 胰腺癌, 恶性胶质瘤, 宫颈癌, 卵巢癌, 肝癌, 膀胱癌, 肝细胞瘤, 乳房癌, 结肠癌, 直肠癌, 结肠直肠癌, 子宫内膜癌或子宫癌, 唾液腺癌, 肾癌, 前列腺癌, 阴道癌, 甲状腺癌, 肝癌, 肛门癌, 阴茎癌, 以及头颈癌。

过量表达某种 ErbB 受体的癌指细胞表面 ErbB 受体(例如 HER2)水平明显高于同类组织非癌性细胞。这样的过量表达可能是因为基因扩增或转录和翻译的增强所致。ErbB 受体过量表达可以在诊断或预后试验中通过测定(例如通过免疫组织化学试验 IHC)细胞表面 ErbB 蛋白质水平升高来判断, 也可以通过测定细胞中 ErbB 编码核酸的水平(例如通过原位荧光杂交 FISH; 见 WO98/45479, 1998 年 10 月公开), Southern 印迹或聚合酶链反应(PCR)技术(例如实时定量 PCR(RT-PCR))。还可以通过检测血清等生物液中的脱落抗原(shed antigen)(例如 ErbB 胞外区)来研究 ErbB 受体过量表达(见, 例如美国专利 4,933,294, 1990 年 6 月 12 日授权; WO91/05264, 1991 年 4 月 18 日公开; 美国专利 5,401,638, 1995 年 3 月 28 日授权; 和 Sias 等, 免疫学方法杂志 132: 73-80(1990))。除此之外, 还可以采用各种

已知的体内试验。例如，可以让患者体内的细胞与抗体(可以带有放射性同位素等可检测标记)接触，然后通过体外放射性扫描或分析接触抗体前取自患者的活组织样品来测评抗体与细胞的结合。

可根据每个细胞表达的 HER2 分子拷贝数(这可以用生物化学方法测定)将过量表达 HER2 的肿瘤进行免疫组织化学评分并进行生物化学分级：0=0-10,000 拷贝/细胞，1+=至少约 200,000 拷贝/细胞，2+=至少约 500,000 拷贝/细胞，3+=至少约 2,000,000 拷贝/细胞。3+水平的 HER2 过量表达可引起酪氨酸激酶的非配体依赖性激活(Hudziak 等，美国科学院院报 84: 7159-7163(1987))，可见于约 30%的乳房癌，这些患者的无复发存活率和总存活率大大降低(Slamon 等，科学 244: 707-712(1989)；Slamon 等，科学 235: 177-182(1987))。

相反，“并非以 ErbB 受体过量表达为特征的”癌指，在诊断试验中，与同类组织的非癌细胞相比，其表达 ErbB 受体并不高于正常水平。

“非激素依赖性”癌指其增殖不依赖于存在结合癌细胞表面受体的激素。此类癌在临床给予降低肿瘤内或肿瘤周围激素浓度的药物或手术不能缓解。非激素依赖性癌的例子包括非雄激素依赖性前列腺癌，非雌激素依赖性乳房癌，子宫内膜癌和卵巢癌。此类癌可能始于激素依赖性肿瘤，在接受抗激素治疗后，由激素敏感期发展成为非激素控制性肿瘤。

“抗体”在此取其最广义的解释，具体包括完整单克隆抗体，多克隆抗体，由至少 2 个完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)，以及抗体片段，只要它们都具有所需的生物学活性。

“单克隆抗体”指该抗体来自一群基本均一抗体，即构成该集群的各抗体完全相同，除了可能存在的少量天然突变。单克隆抗体具有针对单一抗原性位点的高特异性。而且，与多克隆抗体制剂不同，多克隆抗体制剂包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体，每个单克隆抗体只对抗原的一个决定簇。除了特异性之外，单克隆抗体的优点还在于在合成时可以不受其他抗体的污染。修饰语“单克隆”表示该抗体的特征在于来自一个基本均一的抗体群，而不应理解成需由特殊方法制得。例如，本发明的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法获得(Kohler 等，自然 256: 495(1975))，或通过重组 DNA 方法制得(见美国专利 4,816,567)。“单克隆抗体”还可以如 Clackson 等，自然 352: 624-628(1991)和 Marks 等，分子生物学杂志 222: 581-597(1991)所述，从噬菌体抗体库中分离得到。

本发明中，单克隆抗体还特别包括“嵌合”抗体及其片段，即重链和/或轻链的一部分与某种、某类或某亚类抗体相同或同源，其余部分则与另一种、类或亚

类抗体相同或同源，只要它们具有所需的生物学活性(美国专利 4,816,567；和 Morrison 等，美国科学院院报 81：6851-6855(1984))。本发明的嵌合抗体包括灵长化(primatized)抗体，其中包含来自非人灵长类(例如古猴，猩猩等)的可变区抗原结合序列和人恒定区序列。

“抗体片段”包括抗体的一部分，最好是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；单链抗体分子；和由抗体片段形成的多特异性抗体。

“完整抗体”包含抗原结合可变区以及轻链恒定区(C_L)，重链恒定区(C_H1，C_H2 和 C_H3)。恒定区可以是天然序列(例如人天然恒定区序列)或其氨基酸序列变异体。较好的是具有一种或多种效应功能的完整抗体。

非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指包含最少量非人免疫球蛋白序列的嵌合抗体。大多数人源化抗体是人接受者免疫球蛋白的超变区残基被换成具有所需特异性、亲和力和功能的非人(例如小鼠、大鼠、兔子或非人灵长类)超变区残基(供者抗体)。有时，人免疫球蛋白的框架区(FR)残基也被置换以非人残基。而且，人源化抗体还可以包含受者抗体或供者抗体中没有的残基。这些修饰是为了进一步优化抗体的性能。通常，人源化抗体一般包含至少一个，通常是两个可变区，其中所有或几乎所有超变环与非人免疫球蛋白的相对应，而 FR 则完全或几乎完全是人免疫球蛋白的序列。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常是人免疫球蛋白 Fc)的至少一部分。有关细节见 Jones 等，自然 321：522-525(1986)；Riechmann 等，自然 332：323-329(1988)；和 Presta，当代结构生物学见解 2：593-596(1992)。

人源化抗 ErbB2 抗体包括美国专利 5,821,337 的表 3 中的 huMAb4D5-1，huMAb4D5-2，huMAb4D5-3，huMAb4D5-4，huMAb4D5-5，huMAb4D5-6，huMAb4D5-7 和 huMAb4D5-8(HERCEPTIN®)；和该专利图 6 中的人源化 2C4 抗体。

抗体的“效应功能”指抗体 Fc 区(Fc 区天然序列或其氨基酸序列变异体)产生的生物学活性，例如 C1q 结合性；补体依赖性细胞毒性；Fc 受体结合性；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(例如 B 细胞受体即 BCR)下调，等。

完整抗体可根据重链恒定区的氨基酸序列分为不同的“类”。主要的五类是 IgA，IgD，IgE，IgG 和 IgM，其中几类还可以分为不同的“亚类”(同种型)，例如 IgG1，IgG2，IgG3，IgG4；IgA1 和 IgA2。抗体不同类的重链恒定区分别称为

α , β , ϵ , γ 和 μ 。免疫球蛋白不同类的亚基结构和三维构型都是众所周知的。

“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)”指以下由细胞介导的反应：表达 Fc 受体(FcR)的非特异性细胞毒细胞(例如天然杀伤细胞(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, 然后引起靶细胞的裂解。介导 ADCC 的主要细胞即 NK 细胞只表达 Fc RI, 单核细胞则表达 Fc RI, Fc RII 和 Fc RIII。Ravetch 和 Kinet, *免疫学粘度回顾* 9: 457-92(1991)第 464 页的表 3 中总结了造血细胞上的 FcR 表达。可通过体外 ADCC 试验, 例如美国专利 5,500,362 或 5,821,337, 来评价某分子的 ADCC 活性。可用于此类试验的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤细胞(NK 细胞)。或者, 也可以通过动物模型体内试验来评价某分子的 ADCC 活性, 例如 Clynes 等, *PANS(USA)*95:652-656(1998)所述。

“人效应细胞”是表达一种或多种 FcR, 并具有效应功能的白细胞。较好的是, 此类细胞至少表达 Fc RIII, 并具有 ADCC 效应功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤细胞(NK 细胞), 单核细胞, 细胞毒 T 细胞和嗜中性粒细胞; 其中优选 PBMC 和 NK 细胞。效应细胞可以从其天然来源中分离, 例如自血液或 PBMC 中分离。

“Fc 受体”或“FcR”指结合抗体 Fc 区的受体。优选的 FcR 是天然序列的人 FcR。而且, 优选的 FcR 应能结合 IgG 抗体(γ 受体), 这包括 Fc RI、Fc RII 和 Fc RIII 亚类, 包括它们的等位变体和不同拼接形式。Fc RII 受体包括 Fc RIIA(“活化受体”)和 Fc RIIB(“抑制受体”), 它们的氨基酸序列相似, 主要区别在于胞质区。活化受体 Fc RIIA 的胞质区含有一个免疫受体基于酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体 Fc RIIB 的胞质区含有一个免疫受体基于酪氨酸的抑制基序(ITIM)(见 M.Daeron, *免疫学年度回顾* 15: 203-234(1997))。有关 FcR 可见 Ravetch 和 Kinet, *免疫学年度回顾* 9: 457-92(1991); Capel 等, *免疫学方法* 4: 25-34(1994); 和的 Hass 等, *实验室临床医学杂志* 126: 330-41(1995)。本发明的“FcR”还包括将来鉴定到的 FcR, 还包括新生儿受体即 FcRn, 它负责 IgG 的母婴传递(Guyer 等, *免疫学杂志* 117: 587(1976)和 Kim 等, *免疫学杂志* 24: 249(1994))。

“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指分子在补体存在下裂解白细胞的能力。补体活化路径从补体系统的第一组分(C1q)与某分子(例如抗体)与相应抗原的复合物结合开始。可通过 CDC 实验来评价补体的激活, 例如 Gazzano-Santoro 等, *免疫学方法杂志* 202: 163(1996)。

“天然抗体”通常为四聚糖蛋白, 分子量约 150,000 道尔顿(Da), 由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)构成。每条轻链通过一个二硫共价键与一条重

链相连，免疫球蛋白不同同种型重链间二硫键的数量是不同的。每一重链和轻链还具有规则间隔的链间二硫桥。每一重链的一端具有一个可变区(V_H)，后跟数个恒定区。每一轻链的一端为可变区(V_L)，另一端为恒定区。轻链的恒定区与重链的第一恒定区对齐，轻链的可变区与重链的可变区对齐。可以认为，特定的残基在轻链可变区和重链可变区之间形成了一个界面。

抗体描述中的“可变”指：抗体可变区的某些部分彼此之间差异很大，并被用于特定抗体与其特定抗原的结合和特异性。然而，抗体可变区的可变性分布是不均匀的。可变性主要集中于轻链和重链可变区内的超变区。可变区中保守性较高的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变区各有 4 个 FR，一般为 β 平面构型，彼此间通过 3 个成环超变区相连，有时，超变区构成 β 平面的一部分。各链中的超变区通过 FR 紧靠在一起，并与另一链中的超变区靠近，由此形成抗体的抗原结合位点(残基 Kabat 等, 免疫学上重要蛋白质的序列, 第 5 版, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但也具有各种不同的效应功能，例如参与抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)。

“超变区”指抗体中负责结合抗原的氨基酸残基序列。超变区主要包括轻链可变区中“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(轻链可变区内的残基 24-34(L1), 50-56(L2)和 89-97(L3)，和重链可变区内的残基 31-35(H1)，50-56(H2)和 95-102(H3)；Kabat 等, 免疫学上重要蛋白质的序列, 第 5 版, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD(1991))和/或“超变环”中的残基(例如轻链可变区内的残基 26-32(L1)，50-52(L2)和 91-96(L3)，和重链可变区内的残基 26-32(H1)，53-55(H2)和 96-101(H3)；Chothia 和 Lesk, 分子生物学杂志 196: 901-917(1987))。“框架区”或“FR”残基指可变区内上超变区残基之外的残基。

“分离的”抗体指从其自然环境中被鉴定，分离和/或回收的抗体。其天然环境中的杂质组分指那些会影响其诊断或治疗用途的物质，这些杂质包括酶、激素以及其他蛋白质或非蛋白质溶质。在优选实施方式中，抗体被纯化至(1)95wt.%(用 Lowry 法测定)，最好是 99wt.%(2)纯化至可用转杯测序仪测得至少 15 个 N 末端残基或内部氨基酸序列的程度；或(3)纯化至用还原或非还原 Coomassie 蓝或银染色(更好)的 SDS-PAGE 结果为均一。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体，因为此时至少有一种该抗体天然环境中的组分将不存在。然而，分离抗体的制备至少需经一个纯化步骤。

“结合”所研究抗原(例如 ErbB2 抗原)的抗体指与该抗原的结合亲和力足以适应以下用途的抗体:作为靶向表达该抗原的细胞的诊断试剂和/或靶向传送细胞毒性或其他化疗药物(例如类美坦素)的治疗药物。如果是结合 ErbB2 的抗体,它将优先结合 ErbB2 而非其他 ErbB 受体,也可以是与 EGFR、ErbB3 或 ErbB4 等其他蛋白质没有明显交叉反应的抗体。此类实施方式中,用荧光活化细胞分选(FACS)试验或放射性免疫沉淀(RIA)测定,该抗体与非 ErbB2 蛋白质的结合(例如细胞表面与内源性受体的结合)程度应低于 10%。有时,抗 ErbB2 抗体与大鼠 *neu* 蛋白没有明显的交叉反应,例如见 Schecter 等,自然 312: 513(1984)和 Drebin 等,自然 312: 545-548(1984)。

除非另作说明,“单克隆抗体 4D5”和“4D5 单克隆抗体”指含有来自鼠 4D5 抗体的抗原结合残基的抗体。例如,单克隆抗体 4D5 可以是具有鼠单克隆抗体 4D5 的抗原结合氨基酸残基的鼠单克隆抗体 4D5(ATCC CRL10463)或其变体,例如人源化抗体 4D5。人源化 4D5 抗体的例子包括 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 和 huMAb4D5-8(HERCEPTIN®), 见美国专利 5,821,337, 其中优选 huMAb4D5-8(HERCEPTIN®)。

具有某指定抗体(例如单克隆抗体 4D5)“生物学特征”的抗体指具有一个或多个该指定抗体区别于结合同一抗原(例如 ErbB2)的其他抗体的生物学特征的抗体。例如具有 4D5 生物学特征的抗体以依赖于 ErbB2 表达水平的方式抑制 ErbB 表达细胞的生长,和/或以相同于 4D5 的方式结合 ErbB2 胞外区内的同一表位(例如阻抑单克隆抗体 4D5 结合 ErbB2 的抗体)。

“生长抑制剂”指在体外或体内抑制细胞尤其是 ErbB 表达癌细胞生长的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可以是能显著降低 S 期 ErbB 表达细胞百分比的物质。生长抑制剂的例子包括(在 S 期以外)阻抑细胞周期发展的物质,例如引起 G1 停滞和 M 期停滞的物质。典型的 M 期阻抑剂包括长春花提取物(包括长春新碱和长春花碱), taxanes 和 topo II 抑制剂,例如阿霉素、表柔比星、柔红霉素、依托泊甙和博来霉素。阻滞 G1 的物质也参与 S 期阻滞,例如他莫昔芬、泼尼松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶和 Ara-C 等 DNA 烷基化剂。其他相关信息可见癌症的分子基础, Mendelsohn 和 Israel 编, Murakami 等的第一章“细胞周期的调节, 致癌基因和抗癌药物”(WB Saunders: Philadelphia, 1995), p.13。

“生长抑制”性抗体的例子是结合 ErbB2 并抑制过量表达 ErbB2 的癌细胞生

长的抗体。优选的生长抑制性抗 ErbB2 抗体以 0.5-30g/ml 左右的浓度与 SK-BR-3 乳房癌细胞接触 6 天后检测,抑制培养的 SK-BR-3 乳房癌细胞达 20%,更好的超过 50%(例如 50-100%)(1997 年 10 月 4 日的美国专利 5,677,171)。本发明后文将更详细的描述 SK-BR-3 细胞生长抑制试验。优选的生长抑制性抗体是单克隆抗体 4D5,例如人源化 4D5。

“诱导细胞死亡”的分子(例如抗体)指使得活细胞变成非活性细胞的分子。所述的细胞一般为表达 ErbB2 受体的细胞,尤其是过表达该受体的细胞。较好的是,所述细胞是癌细胞,例如乳房癌、卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、前列腺癌或膀胱癌的癌细胞。在体外,所述细胞可以是 SK-BR-3 细胞, BT474 细胞, Calu 3 细胞, MDA-MB-453 细胞, MDA-MB-361 细胞或 SKOV3 细胞。体外细胞死亡可在没有补体或免疫效应细胞存在的条件下测定,以区别于抗体依赖性细胞介导的细胞毒(ADCC)或补体依赖性细胞毒(CDC)所致的细胞死亡。因此,可采用热灭活血清(即没有补体),并在没有免疫效应细胞的条件下进行细胞死亡试验。要确定某分子是否能够诱导细胞死亡,可通过碘丙鎓(PI)、台盼蓝(Moore 等,细胞技术 17: 1-11(1995))或 7AAD 摄取来检测细胞膜完整性的损伤,并与未经处理的细胞相比较。优选的细胞死亡诱导性抗体是能在 BT474 细胞 PI 摄取试验中引起 PI 摄取的抗体。可诱导细胞死亡的抗体的例子包括抗 ErbB2 抗体 7C2 和 7F3(WO98/17797),包括其人源化和/或亲和力成熟变体。

“诱导凋亡”的分子(例如抗体)是根据膜联蛋白 V 结合、DNA 断裂、细胞收缩、内质网膨胀、细胞破坏和/或膜泡(又称凋亡体)测定,诱导细胞程序性死亡的分子。所述细胞一般是过量表达 ErbB2 受体的细胞。较好的是,所述细胞是肿瘤细胞,例如乳房癌、卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、前列腺癌或膀胱癌的癌细胞。在体外,所述细胞可以是 SK-BR-3 细胞, BT474 细胞, Calu 3 细胞, MDA-MB-453 细胞, MDA-MB-361 细胞或 SKOV3 细胞。有多种方法可用于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检测磷脂酰丝氨酸(PS)转移;通过 DNA 序列梯来配件 DNA 断裂;通过亚二倍体细胞的增多来评价与 DNA 断裂相伴的核/染色质收缩。较好的是,诱导凋亡的分子是在 BT474 细胞的膜联蛋白结合试验中,诱导的膜联蛋白结合是未处理细胞的 2-50 倍, 5-50 倍,甚至 10-50 倍的分子。有时,促凋亡分子会进一步抑制 ErbB 受体的 ErbB 配体活化作用。其他情形中,促凋亡分子并不显著抑制 ErbB 受体的 ErbB 配体活化作用。而且,所述分子可以诱导凋亡但并不

引起 S 期的细胞大量减少(例如, 与对照相比, 细胞百分比仅下降约 0-10%)。诱导凋亡的抗体的例子包括抗 ErbB2 抗体 7C2 和 7F3(WO98/17797), 包括其人源化和/或亲和力成熟变体。

“抑制” ErbB 受体的配体活化作用的抗体是如前所述降低或阻止所述活化作用的抗体, 所述抗体能比单克隆抗体 4D5 更有效地抑制 ErbB 受体的配体活化作用, 例如该抗体可以与单克隆抗体 7F3 或 2C4 或它们的 Fab 片段等效, 更好的是与单克隆抗体 2C4 或其 Fab 片段等效。例如, 抑制 ErbB 受体配体活化作用的抗体可以是抑制 ErbB 异寡聚物形成的效率比 4D5 高约 50-100% 的抗体。阻抑 ErbB 受体的配体活化作用可通过多种方式, 例如干扰配体与 ErbB 受体结合, 干扰 ErbB 复合物形成, 干扰 ErbB 复合物中酪氨酸激酶活性和/或干扰 ErbB 受体内或其近旁酪氨酸激酶残基的磷酸化。抑制 ErbB 受体的配体活化作用的抗体的例子包括单克隆抗体 2C4 和 7F3(抑制 ErbB2/ErbB3 和 ErbB2/ErbB4 异寡聚物的 HRG 活化; 以及 EGF、TGF、双调蛋白、HB-EGF 和/或表调蛋白(epiregulin)对 EGFR/ErbB2 异寡聚物的活化); 和 L26、L96 和 L288 抗体(Klapper 等, 致癌基因 14: 2099-2109(1997)), 它们抑制 EGF 和 NDF 与 T47D 细胞的结合, 该细胞表达 EGFR、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4, 还包括上述抗体的人源化及亲和力成熟变体以及其他抗体。

“表位”指多种抗原的(单克隆或多克隆)抗体结合位点。

结合特定表位的抗体可过“表位图谱”来鉴定。有许多已知方法可用于蛋白质上表位位置的制图和特征分析, 包括抗体-抗原复合物晶体结构解构, 竞争试验, 基因片段表达试验和基于合成肽的试验, 见例如 Harlow 和 Lane, *抗体的使用, 实验室手册*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York 1999 中的第 11 章。竞争试验可见后文。根据基因片段表达试验, 随机或特定的基因构建使编码蛋白质的开放读码框断裂, 然后测定所表达的蛋白质片段与所研究的抗体的反应性。可以通过例如 PCR 生成基因片段, 然后体外转录, 并在放射性氨基酸存在下翻译成蛋白质。通过免疫沉淀和凝胶电泳来检测放射性标记的蛋白质片段与抗体的结合。有些表位也可以用大型噬菌体展示的随机肽序列库(噬菌体库)来鉴定。还可以在单纯结合试验中检测已知的重叠肽片段库是否与所测抗体结合。后一种方法适合鉴定约 5-15 个氨基酸的线性表位。

当两抗体识别相同或空间重合的表位时, “基本上结合同一表位”的抗体互为参比抗体。确定两表位是否相同或空间重合最常用且最快的方法是竞争试验, 该试验用标记的抗原或标记的抗体进行, 可采用多种模式。通常, 将抗原固定在

96 孔板上，用放射性或酶标记来检测非标记抗体抑制标记抗体结合的能力。

“表位 4D5”指 ErbB2 胞外区内抗体 4D5(ATCC CRL10463)所结合的区域。该表位靠近 ErbB2 的跨膜区，是图 4 SEQ ID NO:3 中 ErbB2 胞外区氨基酸序列内的残基 519-625，包含端值。可通过常规交叉抑制试验来筛选结合 4D5 表位的抗体，见例如 Harlow 和 Lane，同上。也可以通过制作表位图谱来确定抗体是否结合 ErbB2 的 4D5 表位(例如，SEQ ID NO:3 中残基 529-625 之间的任一或多个残基)。

“表位 3H4”指 ErbB2 胞外区内抗体 3H4 所结合的区域。该表位包括图 4 SEQ ID NO:3 中 ErbB2 胞外区氨基酸序列内的残基 541-599。

“表位 7C2/7F3”是位于 ErbB2 胞外区 N 末端 7C2 和/或 7F3 抗体(已在 ATCC 保藏，见后文)结合的区域。可通过常规交叉抑制试验来筛选结合表位 7C2/7F3 的抗体，见例如 Harlow 和 David Lane，*抗体，实验室手册*，Cold Spring Harbour Laboratory Press，Cold Spring Harbour，New York 1988。也可以通过制作表位图谱来确定抗体是否结合 ErbB2 上的 7C2/7F3 表位(例如，图 4 SEQ ID NO:3 中残基 22-53 之间的任一或多个残基)。

“对抗 ErbB 单克隆抗体治疗无反应或反应差”的肿瘤在公认动物模型或人体临床试验中，与无处理或安慰剂处理相比，抗 ErbB 抗体治疗没有引起统计学上显著的改善，或者，在抗 ErbB 抗体治疗初期有反应，但随着治疗的继续，肿瘤继续长大。特别适合测定抗 ErbB 抗体效果的动物模型是本发明实施例 3 所述的转基因动物模型。

“处理”或“治疗”都指以预防或减缓恶化(例如癌症的发展或扩散)为目的的治疗和预防手段。就本发明而言，理想的良好临床效果包括但不限于缓解症状，减轻病重程度，稳定疾病状态(即不恶化)，延迟或减缓疾病发展，减轻病症，和(部分或全面)恢复，不论可测知或不可测知。“治疗”也可以表示相对于不接受治疗的预期存活期相比，延长了存活期。需要治疗的包括已经患病和易于发病的，或需要预防的个体。

“疾病”指各种可因本发明治疗方法而缓解的病症，包括慢性和急性疾病，或使得哺乳动物易于患病的病理状态。有待治疗的疾病的例子包括但不限于良性和恶性肿瘤；白血病和淋巴系统恶性肿瘤，尤其是乳房癌、卵巢癌、胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌、甲状腺癌、胰腺癌、前列腺癌或膀胱癌。特别适合用本发明方法治疗的疾病是过量表达 ErbB 受体(例如 ErbB2 和/或 EGFR)，而且对于用所述过量表达的受体其抗体进行的治疗无反应或反应差的恶性肿瘤，例如乳房癌。特别适合的是对于 HERCEPTIN®治疗无反应或反应差的、

过量表达 ErbB2 受体的乳房癌。

“治疗有效量”指药物的用量可有效治疗哺乳动物的疾病。以癌症为例，药物的治疗有效量可减少癌细胞；缩小癌细胞；抑制癌细胞渗入周围器官(即一定程度的减缓，最好是停止)；抑制肿瘤扩散(即一定程度的减缓，最好是停止)；一定程度地抑制肿瘤生长；和/或一定程度地缓解一种或多种与癌症相关的症状。药物阻止已存在的癌细胞生长和/或将其杀死可以通过细胞静止作用或细胞毒性作用。就癌症治疗而言，可以通过测定疾病发展的时间(TTP)和/或反应速度(RR)来确定效果。

“细胞毒试剂”在此指可抑制细胞功能和/或造成细胞破坏的物质，包括放射性同位素(例如 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} 和 Lu 的放射性同位素)，化疗试剂，以及来自细菌、真菌、植物或动物的毒性，例如小分子毒素或酶活性毒素，包括它们的片段和/或变体。

“化疗试剂”指用于治疗癌症的化合物，包括烷基化剂，例如塞替派和环磷酰胺(CYTOXANTM)等；烷基硫酸酯，例如白消安，英丙舒凡和哌博舒凡；氮丙啶，例如苯佐替派、卡波醌、美妥替哌和乌瑞替哌；氮丙啶和 methylamelamines，包括六甲蜜胺、曲他安、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和 trimethylolomelamine；氮芥，例如苯丁酸氮芥、蔡氮芥、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、次氯酸氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑、novembicin、胆甾醇对苯乙酸氮芥、泼尼莫司汀、曲磷胺、乌拉莫司汀；亚硝基脲，例如卡莫司汀、chlorozotocin、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀；抗生素，例如阿克拉霉素、放线菌素、authramycin、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素 C、刺孢霉素、carabycin、洋红霉素、carzinophilin、色霉素、放线菌素 D、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸、阿霉素、表柔比星、依索比星、伊达比星、marcellomycin、丝裂霉素、麦考酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、potfiromycin、嘌罗霉素、quelamycin、罗多比星、绛色霉素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净他司丁、佐柔比星；抗代谢药，例如氨甲蝶呤和 5-氟尿嘧啶(5-FU)；叶酸类似物，例如 denopterin、氨甲蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙；嘌呤类似物，例如氟达拉滨、6-硫嘌呤、硫嘌呤、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU；雄激素，例如卡鲁睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯；抗肾激素类(anti-adrenals)，例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦；叶酸补充剂，例如叶酸；醋葡醛内酯；醛磷酰胺苷

(aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸; 安吡定; bestabucil; 比生群; edatraxate; 地磷酰胺; 地美可辛; 地吡醌; elfornithine; 依利醋铵; 依托革鲁; 硝酸镓; 羟基脲; 蘑菇多糖; 氯尼达明; 米托胍脲; 米托蒽醌; 莫派达醇; nitracrine; 喷司他丁; phenamet; 吡柔比星; 鬼臼酸; 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼; PSK; 雷佐生; 西佐喃; 锗螺胺; 细交链胞菌酮酸; 三亚胺醌; 2,2',2''-三氯三乙胺; 脲烷; 长春地辛; 达卡巴嗪; 甘露莫司汀; 二溴甘露醇; 二溴卫茅醇; 派泊溴烷; gacytosine; 阿拉伯糖苷(Ara-C); 环磷酰胺; 塞替派; taxanes, 例如 paclitaxel(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)和 doxetaxel(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥; gemcitabine; 6-硫鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 氮甲蝶呤; 铂同系物, 例如顺铂和卡铂; 长春碱; 铂; 依托泊甙(VP-16); 异环磷酰胺; 丝裂霉素 C; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞宾; navelbine; novantrone; 替尼泊苷; 道诺霉素; 氮蝶呤; xeloda; ibandronate; CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 视黄酸; 埃斯波素; capecitabine; 和以上所述化合物的药学上认可的盐、酸或衍生物。“化疗试剂”还包括调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素试剂, 例如抗雌激素药物: 他莫昔芬, 雷洛昔芬, 芳香酯抑制性 4(5)-咪唑, 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬; keoxifene; LY117018; onapristone 和托瑞米芬(Fareston)等; 和抗雄激素药物: 氟他胺, 尼鲁米特, bicalutamide, 亮丙瑞林和革舍瑞林; 以及它们的药学上认可的盐、酸或衍生物。

“前药”在此指药学活性物质的前体或衍生物形式, 与亲本药相比, 它们对肿瘤细胞的细胞毒性较低, 但能被酶激活或转化成活性较高的亲本药形式。见例如 Wilman, “癌症化疗中的前药”, 生物化学协会会刊 14, pp.375-382, Belfast 第 615 次会议(1986)和 Stella 等, “前药: 一种药物靶向传递的化学方法”, 定向药物传递, Borchardt 等编辑, pp.247-267, Humana Press(1985)。本发明的前药包括但不限于含磷酸酯前药, 含硫代磷酸酯前药, 含硫酸酯前药, 含肽前药, D 氨基酸改性前药, 糖基化前药, 含内酰胺前药, 含可取代苯氧基乙酰胺前药或含取代苯乙酰胺前药, 5-氟胞嘧啶和其他 5-氟尿嘧啶前药, 它们能转化为活性较高的细胞毒性游离药。可经衍生为细胞毒性药物的本发明前药形式的例子包括但不限于前述化疗试剂。

“核酸”指聚核苷酸, 例如脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA), 还包括由核苷酸类似物形成的 DNA 或 RNA 的等效物、类似物, 单链(有义链或反义链)和双链聚核苷酸。“分离的”核酸分子指经过鉴定, 并去除了至少一种其天然来源中通常与之结合的污染性核酸分子的核酸。分离的核酸其形式不同于其天然形

式。因此，分离的核酸分子不同于存在于天然细胞内的核酸分子。然而，分离的核酸分子包括存在于抗体表达细胞内的核酸分子，即(例如)，其染色体位置不同于其天然细胞的核酸分子。

“载体”在此指能够运载另一核酸的核酸分子。“表达载体”包括能够合成自身所带重组基因所编码的 HER2 蛋白的质粒、粘粒或噬菌体。优选载体能够自复制和自表达与之相连的核酸。本说明书中，“质粒”和“载体”混用，因为质粒是最常用的载体形式。

“转录调控元件”和“转录调控序列”在此混用，都指在特定宿主细胞内表达操作性连接的编码序列所需的核酸(例如 DNA)序列。例如，适用于原核细胞的调控序列包括启动子，可选的操纵子序列，和核糖体结合位点。已知，真核细胞使用的是启动子、增强子、剪接信号和聚腺苷酸信号。所谓调控序列包括促进或调节转录的各种元件，包括启动子、RNA 聚合物与转录因子间基本作用所需的核心元件，上游元件，增强子和应答元件(Lewin, “基因 V”, Oxford University Press, Oxford, pp.847-873)。本发明所称某基因或一类基因的转录调控元件包括该基因或该类基因的完整天然转录调控元件区域，也包括其修饰形式。所述的修饰形式包括元件重排，元件缺失或异源序列，异源序列的插入。转录调控元件具有模块性，有些调控元件(例如增强子)的功能没有位置依赖性，这使得所述修饰成为可能。已有许多技术可用于剖析基因的调控序列，从而确定它们的位置和功能。可根据需要用此类信息来指导调控元件的修饰。然而，较好的是使用完整的转录调控元件全区域。

“组织特异性启动子”指这样一段核苷酸序列：它可作为启动子调控与之操作性相连的选定 DNA 序列的表达，并能够使得该选定 DNA 序列在特定组织细胞内表达，例如在乳腺细胞内。在一说明性实施方式中，可用采用了乳腺特异性启动子的基因构建物来指导 HER2 蛋白或其片段在乳腺组织内的优势性表达。

将核酸“操作性连接”即使之处于与另一核酸序列具有功能关系的位置。例如，前导序列或分泌性前导肽的 DNA 与某多肽的 DNA 操作性连接，如果它们表达为参与所述多肽分泌的前体蛋白质；启动子或增强子与一段编码序列操作性连接，如果该启动子或增强子影响着所述序列的转录；或者，核糖体结合位点与一段编码序列操作性连接，如果其位置促进翻译。总的说来，“操作性连接”表示连接后的 DNA 序列连是连续的，如果是分泌性前导肽，则应连续而且在读码相内。然而，增强子的连接不必是连续的。所述连接可通过常规限制性位点的连接反应实现。如果没有这样的位点，可根据已知方法使用合成的寡核苷酸接头。

“转染”表示通过核酸介导的转移将核酸分子(例如表达载体)导入宿主细胞。

“转化”过程表示：细胞的基因型因摄取了异源 DNA 或 RNA 而被改变，例如，转化细胞将表达重组 HER2。

“转基因”在此指对于导入了基因的转基因动物或细胞而言部分或完全异源的核酸序列，或者，其序列与导入了基因的转基因动物或细胞的内源基因同源，但它插入动物的基因组后改变了该基因组(例如，该同源序列插入在不同于天然基因所在的位置，或其插入造成基因敲除)。可将转基因与一段或多段转录调控序列或选定核酸表达优化所需的其他核酸(例如内含子)操作性连接。

因此，“转基因构建物”指包含转基因并可包含其他核酸的核酸序列，所述其他核酸例如转录调控序列、聚腺苷酸化位点，复制起点，标记基因等，即对将转基因插入宿主基因组整体操作可能有用的序列。

“转基因的”在此表示某动物或构建物含有转基因。例如，“转基因生物”指其一个或多个细胞经人为导入(例如本领域公知的转基因技术)而含有异源核酸的动物，尤其是非人动物。通过精细的基因操作，例如微注射和重组病毒感染，将核酸直接导入细胞，或通过导入其前体而间接导入。“基因操作”不包括育种和体外受精，而是指导入重组 DNA 分子。该分子可能整合到染色体内，也可能成为染色体外复制的 DNA。在本文所述的典型转基因动物中，转基因使得细胞表达或过量表达重组形式的 HER2 蛋白。“建立者线”或“建立动物”表示这些动物是导入了转基因的胚胎的成熟产物，即，这些动物由插入了 DNA 并被植入一种或多种代孕宿主的胚胎长成。

“子代”和“转基因动物的子代”指原转化哺乳动物每一后代的任一或所有后代。“非人动物”指哺乳动物类中除人之外的所有成员。“哺乳动物”指包括人在内的所有哺乳类动物，包括圈养动物、放养动物、动物园内动物、参赛动物或宠物，例如小鼠、大鼠、兔子、猪、绵羊、山羊、牛和高级灵长类动物。

“细胞”，“细胞线”和“细胞培养物”在此混用，且都包括它们的后代。因此，“转化子”和“转化细胞”包括原代细胞和由它们得到的培养物，不论存在几次传递。还需要指出的是，所有子代的 DNA 内容不一定完全相同，因为存在着随机突变。本发明包括筛选得到的与原转化细胞具有相同功能或生物学活性的突变子代。根据后文所述，根据需要，它们可能具有不同的称谓。

“脂质体”是由各种脂类、磷脂和/或表面活性剂构成的小泡，用于向动物传递药物(例如本发明的抗 ErbB2 抗体，或化疗试剂)。脂质体的组成一般排列成双层，类似于生物膜的脂类排列。

“包装内说明”指治疗产品市售包装内的说明书，其中的信息包括适应症、使用方法、剂量、给药方式、禁忌症和/或使用注意事项。

“心保护剂”指预防或减轻患者与服药(例如抗 ErbB 抗体或其类美坦素偶联物)有关的心肌功能异常(即心肌病和/或充血性心衰)的化合物或组合物。例如，心保护剂能够预防和减弱自由基介导的心脏毒性作用和/或预防和减弱氧化性应激损伤。本发明心保护剂的例子包括离子螯合剂 dexrazoxane(ICRF-187)(Seifert 等, *药物治疗学年报* 28: 1063-1072(1994)); 降脂药和/或抗氧化剂，例如普罗布考(Signal 等, *分子细胞心脏病学杂志* 27:1055-1063(1995)); 氨磷汀(氨基硫醇 2-[(3-氨基丙基)氨基]乙硫醇二氢磷酸酯，又称 WR-2721，及其去磷酸细胞摄取形式，又称 WR-1065)和 S-3-(3-甲基氨基丙基氨基)丙基磷酸硫代酸(WR-151327)，见 Green 等, *癌症研究* 54: 738-741(1994); 地高辛(Bristow, M.R., Bristow MR. 编的 *药物引起的心脏病*, New York: Elsevier 191-215(1980)); β -抑制剂，例如美托洛尔(Hjalmarson 等, *药物* 47: 增刊 4: 31-9(1994)和 Shaddy 等, *美国心脏病杂志* 129: 197-9(1995)); 维生素 E; 抗坏血酸(维生素 C); 自由基清除剂，例如石竹酸，乌索酸和 N-乙酰半胱氨酸(NAC); 自旋捕集化合物，例如 α -苯基-叔丁基硝酮(PBN)(Paracchini 等, *抗癌研究* 13: 1607-1612(1993)); 硒基化合物，例如 P251(Elbesen); 等等。

2. 详细描述

本发明的基础是在一种新的鼠 HER2 转基因肿瘤模型中所获得的结果，该模型中，HERCEPTIN®或由其得到的鼠抗体 4D5 对于肿瘤生长几乎没有作用。用该模型检测 HERCEPTIN®和 HERCEPTIN®-类美坦素偶联物的效用，意外发现：于转基因小鼠中移植肿瘤虽然对 HERCEPTIN®治疗反应较差，但 HERCEPTIN®-类美坦素偶联物却非常有效。

因此，本发明的基础是用抗 ErbB 抗体-类美坦素偶联物来治疗对抗 ErbB 抗体和/或类美坦素反应不良的 ErbB 过量表达型肿瘤。

A. 抗 ErbB 抗体的生成

以下是本发明用来生成抗体的方法，只可视为举例。以下将就抗 ErbB2 抗体来描述抗体的生产，但本领域技术人员可以看出，显然可用类似方法生成和修饰 ErbB 受体家族其他成员的抗体。

用来生产抗体的 ErbB2 抗原可以是例如 ErbB2 蛋白的胞外区或其片段的可溶

形式,其中应包含所需的表位。或者,也可使用在细胞表面表达 ErbB2 的细胞(例如经转化而过量表达 ErbB2 的 NIH-3T3 细胞;或 SK-BR-3 等癌细胞;见 Stancovski 等, *PANS(USA)*88: 8691-8695(1991))来生产抗体。本领域技术人员可以看出,还可用其他形式的 ErbB2 来生产抗体。

(i)多克隆抗体

可通过给动物多次皮下注射(sc)或腹膜内注射(ip)相关抗原和佐剂来产生多克隆抗体。按需要,可用双官能剂或衍生剂将相关抗原与对待免疫动物具有免疫原性的蛋白质偶联,所述蛋白质例如匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂,所述双官能剂例如马来酰亚氨基苯甲酸基磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基偶联), N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基偶联), 戊二醛, 琥珀酸酐, SOCl_2 , 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, 其中的 R 和 R^1 是不同的烷基。

例如,将 100g(兔)或 5g(小鼠)蛋白质或偶联物与 3 倍体积弗氏完全佐剂混合,用此溶液多点皮下注射,如此以抗原、免疫原性偶联物或衍生物免疫动物。一个月后增强免疫,即用肽或偶联物原用量的 1/5 至 1/10 与弗氏完全佐剂混合后多点皮下注射。7-14 天后,放取动物的血,检测血清的抗体效价。继续对动物增强免疫,直至效价达到平台期。较好的是用同一抗原与不同蛋白质或通过不同的交联剂形成的偶联物增强免疫。也可以用重组细胞培养物生成的融合蛋白形式的偶联物。而且,可适当使用明矾等凝聚剂来增强免疫反应。

(ii)单克隆抗体

单克隆抗体是由一群基本均一的抗体获得的,即该群中的各抗体除可能极少量存在的天然突变之外完全相同。因此,修饰语“单克隆”是指抗体不是不同抗体的混合物这一特征。

例如,单克隆抗体可用杂交瘤方法制备,最早的相关报道是 Kohler 等, *自然* 256: 495(1975), 也可用重组 DNA 方法制备(美国专利 4,816,567)。

在杂交瘤方法中,如上所述地免疫小鼠或仓鼠等合适的宿主动物,为的是激发生产或能够生产特异性结合免疫所用蛋白质的抗体的淋巴细胞。或者也可以进行淋巴细胞体外免疫。然后用合适的融合剂(例如聚乙二醇)将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞(Goding, *单克隆抗体: 原理和实践*, pp.59-103(Academic Press, 1986))。

将所得的杂交瘤细胞接种并培养在合适的培养基中,培养基中含有一种或多

种可抑制非融合亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如，如果亲本骨髓瘤细胞没有次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT 或 HPRT)，则杂交瘤的培养基含有次黄嘌呤、氨甲蝶呤和胸苷(HAT 培养基)，这将阻止 HGPRT 缺陷型细胞的生长。

优选的骨髓瘤细胞应能有效融合，支持抗体生产细胞稳定而高水平地生产抗体，并对培养基(例如 HAT 培养基)敏感。优选的骨髓瘤细胞线是鼠骨髓瘤细胞线，例如 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤衍生的细胞线(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA)和 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞(美国典型培养物保藏中心, Rockville, Maryland USA)。曾有人用人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞线来生产人单克隆抗体(Kozbor, J., Immunol, 133:3001(1984); 和 Brodeur 等, *单克隆抗体生产技术和应用*, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

对杂交瘤生长的培养基进行抗抗原单克隆抗体生产检测。较好的是，杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性用免疫沉淀或体外结合试验来测定，例如放射性免疫试验(RIA)或酶联免疫吸附试验(ELISA)。

单克隆抗体的结合亲和力可用 Munson 等, 生物化学年报 107: 220(1980)所述的 Scatchard 试验来测定。

鉴定到所生产抗体具有所需特异性、亲和力和活性的杂交瘤细胞后，将该克隆用有限稀释法进行亚克隆，用标准方法培养(Goding, *单克隆抗体：原理和实践* pp.59-103(Academic Press, 1986)。合适的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640。此外，也可以在动物体内培养杂交瘤细胞，例如腹水瘤。

用常规抗体纯化方法从培养基，复水或血清中分离出亚克隆分泌的单克隆抗体，纯化方法例如蛋白 A-琼脂糖、羟基磷灰石层析、凝胶电泳，透析或亲和层析。

用常规技术不难分离得到编码单克隆抗体的 DNA 并测序(例如，用特异性结合鼠抗体重链和轻链编码基因的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞是此类 DNA 的优选来源。分离后，将 DNA 插入表达载体，然后转染原本不生产抗体蛋白的宿主细胞，例如大肠杆菌细胞，猴 COS 细胞，中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞，由此在重组宿主细胞内实现单克隆抗体的合成。有关抗体编码 DNA 在细菌内的重组表达可见 Skerra 等, *当代免疫学观点* 5: 256-262(1993)和 Pluckthum, *免疫学回顾*, 130: 151-188(1992)。

另一种实施方式中，可从用 McCafferty 等, *自然* 348: 552-554(1990)所述方法建立的抗体噬菌体库中分离单克隆抗体或抗体片段。Clackson 等, *自然* 352: 624-628(1991)和 Marks 等, *分子生物学杂志* 222: 581-597(1991)描述了用噬菌体库分离获得小鼠和人抗体。以后的文献中曾用链改组(Marks 等, *生物学/技术*,

10: 779-783(1992)), 联用感染和体内重组构建极大型噬菌体库(Waterhouse 等, *核酸研究* 21: 2265-2266(1993))来生产高亲和力的人抗体。因此, 这些技术都可作为传统单克隆抗体杂交瘤技术的备选用于分离单克隆抗体。

还可以对 DNA 进行修饰, 例如用人重链和轻链恒定区编码序列取代同源性鼠序列(美国专利 4,816,567; 和 Morrison 等, *美国科学院院报* 81: 6851(1984)), 或将某种非免疫球蛋白多肽的完整或部分编码序列与该免疫球蛋白编码序列共价连接。

通常, 所述用非免疫球蛋白多肽取代抗体的恒区, 或者取代抗体的抗原结合位点之一的可变区, 从而形成嵌合二价抗体, 即包含某一抗原特异性的一个抗原结合位点, 和另一抗原特异性的另一个抗原结合位点。

(iii)人源化抗体

非人抗体人源化的技术是已知的。较好的是, 人源化抗体内导入了来自其非人来源的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为取自“输入”可变区的“输入”残基。人源化可基本上按照以下方法即 Winter 及其同事(Jones 等, *自然* 321: 522-525(1986); Riechmann 等, *自然* 332: 323-327(1988); Verhoeyen 等, *科学* 239: 1534-1536(1988)), 用超变区取代人抗体内的相应序列。因此, 此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 4,816,567), 不到一个完整的人可变区被相应的非人序列所取代。实践中, 人源化抗体一般是人抗体, 但其中部分超变区残基, 还可能包括部分 FR 残基被鼠抗体相应位置的残基所取代。

挑选用来制造人源化抗体的轻链和重链可变区对于降低抗原性来说十分重要。按照“最佳拟合”法, 在整个已知人可变区序列库中筛选鼠抗体的可变区序列。然后, 将与鼠序列最近似的人序列作为人源化抗体的人框架区(FR)(Sims 等, *免疫学杂志*, 151: 2296(1993); Chothia 等, *分子生物学杂志* 196: 901(1987))。另一种方法使用所有人抗体特定亚类轻链或重链衍生的共有序列作为特定的框架区。该相同框架区可用于数种不同的人源化抗体(Carter 等, *美国科学院院报* 89: 4285(1992); Presta 等, *免疫学杂志* 151: 2623(1993))。

更重要的是, 人源化抗体应保留对抗原的高亲和力及其他优良生物学特性。为此, 一种优选方法制备人源化抗体的过程为: 用亲本序列和人源化序列的三维模型来分析亲本序列和各种理论人源化产物。三维免疫球蛋白模型是已有的, 并为本领域技术人员所熟知。可用计算机程序证明并展示特定候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构。对上述展示的研究可分析出个各残基在候选免疫球蛋白序

列的功能中可能的作用，即分析出影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的残基。用该方法可选出 FR 残基，并将受者序列与输入序列结合，从而获得所需的抗体特性，例如提高对靶抗原的亲合力。通常，超变区残基直接影响抗原结合，或影响最大。

后文实施例 1 以人源化抗 ErbB2 抗体为例描述了制备方法。本发明的人源化抗体在人重链可变区内掺入非人超变区残基，并可包含选自 69H, 71H 和 73H 位置(采用 Kabat 的具有免疫学意义的蛋白质的序列(第 5 版), Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD(1991)所述的可变区编号体系)的框架区 (FR)取代。实施方式之一中，人源化抗体含有 2 个和全部 69H, 71H 和 73H 位置的框架区(FR)取代。

考虑了各种不同形式的人源化抗体，例如，人源化抗体可以 Fab 等抗体片段，或者，人源化抗体可以是完整抗体，例如完整的 IgG₁ 抗体。

(iv)人抗体

作为人源化的备选方案，可生产人抗体。例如，现在已经能够生成经免疫后能生成完整人抗体库而没有内源性免疫球蛋白产生的转基因动物(例如小鼠)。例如，据称，嵌合和种系突变小鼠内抗体重链铰链区(J_H)纯合缺失造成内源性抗体生产的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因转移到此类种系突变小鼠中，在收到抗原攻击后即可生成人抗体。见，例如 Jakpbovits 等，*美国科学院院报* 90: 2551(1993); Jakobovits 等，*自然* 362:255-258(1993); Bruggermann 等，*免疫学年报* 7: 33(1993); 和美国专利 5,591,669, 5,589,369 和 5,545,807。

或者，可用噬菌体展示技术(McCafferty 等，*自然* 348: 552-553(1990))，从非免疫供体的免疫球蛋白可变(V)区基因库中体外制备人抗体或抗体片段。根据这一技术，将抗体 V 区基因框内克隆到丝状噬菌体(例如 M13 或 fd)的主衣壳蛋白或次衣壳蛋白基因中，在噬菌体颗粒表面展示为功能性抗体片段。因为丝状噬菌体颗粒含有单链的噬菌体 DNA 拷贝，根据抗体功能的选择同时选出了有此功能抗体的编码基因。这样，噬菌体模拟了 B 细胞的某些特性。噬菌体展示可用多种方式进行，见例如 Johnson, Kevin S.和 Chiswell, David J., *现代结构生物学杂志* 3: 564-571(1993)。有多种 V 基因序列来源可用于噬菌体展示。Clackson 等(*自然* 352: 624-628(1991))从免疫小鼠脾脏 V 基因的随机小组库中分离到抗噁唑酮抗体的多样性列阵。按照 Marks 等的方法(*分子生物学杂志* 222: 581-597(1991))或 Griffith 等(*欧洲生物学杂志* 12: 725-734(1993))以及美国专利 5,565,332 和 5,573,905 所述

的方法,可构建出非免疫人供体的 V 基因库,并分离到针对一抗原多样性列阵的抗体。

如前所述,人抗体也可以通过体外激活 B 细胞来制备(见美国专利 5,567,610 和 5,229,275)。

有关人抗 ErbB2 抗体可见 1998 年 6 月 30 日的美国专利 5,772,997 和 1997 年 1 月 3 日的 WO97/00271。

(v)抗体片段

已有多种技术可用于生成抗体片段。通常,这些片段通过完整抗体的酶消化衍生而得(Morimoto 等, *生物化学和生物物理学方法杂志* 24: 107-117(1992)和 Brennan 等, *科学* 229: 81(1985))。然而,现在,这些片段也可以直接由重组宿主细胞生成。例如,可用上述噬菌体库中分离得到抗体片段。或者,可从大肠杆菌中直接回收 Fab'-SH 片段,然后化学偶联成 F(ab')₂ 片段(Carter 等, *生物/技术* 10: 163-167(1982))。另一种方法直接从重组宿主细胞培养物中分离 F(ab')₂ 片段。其他生成抗体片段的方法对本领域技术人员来说显而易见。另一实施方式中,所选抗体是单链 Fv 片段(scFv)。见 WO93/16185; 美国专利 5,571,894 和美国专利 5,587,458。这种抗体片段又称“线性抗体”,见美国专利 5,641,870。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

(vi)双特异性抗体

双特异性抗体即对至少两种不同表位具有特异性的抗体,例如能结合 ErbB2 蛋白质上两个不同表位的抗体。其他此类抗体可将 ErbB2 结合位点与 EGFR、ErbB3 和/或 ErbB4 的结合位点相组合。或者,可将抗 ErbB2 臂与另一臂结合,后者与白细胞上的触发分子结合,使得细胞的防御机制集中针对表达 ErbB2 的细胞,所述触发分子例如 T 细胞受体分子(例如 CD2 或 CD3),或 IgG 的 Fc 受体(Fc R)Fc RI(CD64)、Fc RII(CD32)和 Fc RIII(CD16)。也可用双特异性抗体将细胞毒试剂导向表达 ErbB2 的细胞。WO96/16673 描述一种抗 ErbB2/抗 Fc RIII 双特异性抗体,美国专利 5,837,234 描述了一种抗 ErbB2/抗 Fc RI 双特异性抗体,WO98/02463 描述了一种抗 ErbB2/Fc 双特异性抗体,美国专利 5,821,337 描述了一种抗 ErbB2/抗 CD3 双特异性抗体。

制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。制备全长双特异性抗体的传统方法以两对免疫球蛋白重链-轻链的共表达为基础,其中两对链具有不同的特异性

(Millstein 等, 自然 305: 537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链与轻链的随机配对, 这些杂交瘤(四交瘤)可产生 10 种不同抗体分子的混合物, 其中只有一种是正确的双特异性结构。正确分子的纯化一般通过亲和层析进行, 该过程相当烦琐, 而且得率不高。WO93/08829 和 Traunecker 等, 欧洲生物学杂志 10: 3655-3659(1991)描述了类似的方法。另一种方法将具有所需结合特异性的抗体可变区(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定区序列融合, 最好与包含至少部分铰链区、CH2 和 CH3 的免疫球蛋白重链恒定区融合。最好在至少一种融合体中含有轻链结合所必需位点的重链第一恒定区(CH1)。根据需要, 可将编码免疫球蛋白重链融合体的 DNA 和编码免疫球蛋白轻链的 DNA 分别插入不同的表达载体, 然后共转染合适的宿主。当构建过程使用不等量的三种片段可获得最佳得率时, 这为调节三段多肽片段相互比例提供了很大的灵活性。然而, 当至少两段片段等量时可获得高得率, 或者多肽之比无关紧要时, 也可以将编码两段或三段多肽片段的聚核苷酸插入同一表达载体。

在该方法的优选实施方式中, 双特异性抗体的一臂包含具有第一结合特异性的杂交免疫球蛋白重链, 另一臂包含杂交的免疫球蛋白重链-轻链对(具有第二结合特异性)。已发现, 这种不对称结构有利于所需双特异性化合物的分离, 因为仅双特异性分子的一半含有免疫球蛋白轻链易于分离。该方法可见 WO94/04690。有关制备双特异性抗体更详细的内容可见 Suresh 等, 酶学方法, 121: 210(1986)。

根据美国专利 5,731,168 描述的另一种方法, 可对抗体分子对之间的界面进行基因工程改造, 从而尽可能提高从重组细胞培养物中回收得到异二聚体的百分比。优选界面至少包含抗体恒定区 CH3 的一部分。该方法中, 第一抗体分子界面上的一段或多段小氨基酸侧链用大氨基酸侧链(例如酪氨酸或色氨酸)置换。然后在第二抗体分子界面上通过用小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)置换大氨基酸侧链形成大小与大侧链相同或近似的补偿性“穴”。这样可使得异二聚体的得率高于均二聚体等其他不需要的终产物。

文献中还记载了由抗体片段制备双特异性抗体的技术。例如, 可通过化学连接来制备双特异性抗体。Brennan 等, 科学 229: 81(1985)描述的过程中, 完整抗体经蛋白酶剪切生成 $F(ab')_2$ 片段。二硫酚复合剂亚砷酸钠存在下还原这些片段, 稳定相邻的二硫酚, 避免形成分子内二硫键。然后将产生的 Fab'片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后用巯基乙胺将 Fab'-TNB 衍生物之一还原成 Fab'-硫醇, 与等量的另一种 Fab'-TNB 衍生物混合, 形成双特异性抗体。由此生成的双特异性抗体可用于酶的选择性固定化。

最近已可以直接从大肠杆菌中回收 Fab'-SH 片段，然后可通过化学偶联形成双特异性抗体。Shalaby 等，*实验医学杂志* 175: 217-225(1992)描述了一种全人源化双特异性抗体 F(ab')₂ 分子的产生。由大肠杆菌分别分泌各 Fab'片段，然后直接体外化学偶联成双特异性抗体。这样形成的双特异性抗体能够结合过量表达 ErbB2 受体的细胞和正常人 T 细胞，并触发人细胞毒性淋巴细胞对人乳房癌肿瘤的裂解活性。

已有多种从重组细胞培养物中直接制造和分离双特异性抗体片段的技术。例如，可用亮氨酸拉链来制造双特异性抗体。Kostelny 等，*免疫学杂志* 148(5): 1547-1553(1992)。通过基因融合将 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的 Fab'片段连接。在铰链区还原抗体均二聚体，形成单体，然后再氧化成抗体异二聚体。该方法也可以用来制造抗体均二聚体。Hollinger 等，*美国科学院院报* 90: 6444-6448(1993)描述的“二抗体”技术提供了另一种制造双特异性抗体片段的方法。其中的片段中，一段重链可变区(VH)通过一段连接肽与一段轻链可变区(VL)连接，这段连接肽很短以致不可能发生同一链内两区之间的配对。因此，一片段的 VH 和 VL 被迫与另一片段的互补 VL 和 VH 配对，于是形成两个抗原结合位点。还有另一种用单链 Fv(sFv)二聚体来制造双特异性抗体片段的方法，见 Gruber 等，*免疫学杂志* 152: 5368(1994)。

也可以制造二价以上的抗体，例如三特异性抗体。Tutt 等，*免疫学杂志* 147: 60(1991)。

(vii)其他氨基酸序列修饰

可以对本发明中的抗 ErbB2 抗体进行氨基酸序列修饰。例如，可能需要改进抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。制备抗 ErbB2 抗体的氨基酸序列变体可以通过在抗 ErbB2 抗体核酸内引入合适的核苷酸改变，或者通过肽合成。所述的修饰包括例如抗 ErbB2 抗体氨基酸序列内的缺失和/或插入和/或取代。只要最终结构具有所需的特征，可以联合运用缺失、插入和取代来形成最终结构。氨基酸改变还可以改变抗 ErbB2 抗体的翻译后加工，例如改变糖基化位点的数量或位置。

一种鉴定抗 ErbB2 抗体内作为突变优选位置的残基或区域的方法称为“丙氨酸扫描诱变”，见 Cunningham 和 Wells，*科学* 244: 1081-1085(1989)。其中，确定一个残基或一组残基(例如 arg、asp、his、lys 和 glu 等带电残基)，置换以中性或负电氨基酸(最好是丙氨酸或苯丙氨酸)，从而影响氨基酸与 ErbB2 抗原之间的相互作用。然后，在取代位置导入更多或其他变异，从而进一步分析对取代表现

出功能性敏感的氨基酸残基。因此，虽然导入氨基酸序列变异的位点是预定的，但是该位置上突变的性质不要求预定。例如，为例分析某给定位点上突变的性能，在目标密码子或区域进行 Ala 扫描和随机诱变，然后在表达出的抗 ErbB2 抗体变体中筛选所需的活性。

氨基酸序列插入包括氨基-和/或羧基末端融合，长度可以从一个残基到包含百多个残基的多肽，还包括单个或多个氨基酸残基的链内插入。末端插入的例子包括具有 N-末端甲硫氨酰基残基的抗 ErbB2 抗体或该抗体与一段细胞毒性多肽的融合体。抗 ErbB2 抗体的其他插入变体包括其 N 或 C 末端与酶(例如 ADEPT)或可延长抗体血清半寿期的多肽的融合体。

另一种变体是氨基酸取代变体。这些变体中，抗 ErbB2 抗体内的至少一个氨基酸残基被其他残基取代。最有意义的取代突变位点包括超变区，但也要考虑改变 FR。表 1 中“优选取代”列举了保守性的取代。如果此类取代改变了生物学活性，则可引入更具实质性的取代即表 1 中所谓“取代范例”或后文就氨基酸种类所述的取代，并对产物进行筛选。

表 1

原残基	取代范例	优选取代
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)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro(P)	Ala	ala
Ser(S)	Thr	thr
Thr(T)	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

对抗体生物学特性的实质性改变是通过挑选对于维持以下特性的影响显著不同的取代：(a)取代区域内多肽主链的结构，例如平面或双螺旋构象，(b)目标位

点的电荷或疏水性, 或(c)侧链体积。根据侧链特征, 可将天然残基分为:

(1)疏水性: met, ala, val, leu, ile;

(2)中性亲水性: cys, ser, thr;

(3)酸性: asp, glu;

(4)碱性: asn, gln, his, lys, arg;

(5)影响链取向的残基: gly, pro; 和

(6)芳香性: trp, tyr, phe

非保守性取代可能将一类的成员改变成另一类的。

也可以取代不参与维持抗 ErbB2 抗体正确构象的半胱氨酸残基, 通常用丝氨酸, 这可以提高分子的氧化稳定性, 避免误交联。另一方面, 也可以在抗体内增加半胱氨酸键以提高稳定性(尤其当抗体是 Fv 片段等抗体片段时)。

特别优选的取代变体中, 亲本抗体(人源化抗体或人抗体)超变区内的一个或多个残基被取代。通常, 选来进一步研究的变异抗体应具有优于其亲本的生物特性。产生此类取代变体的一个简便方法涉及采用噬菌体展示的亲亲和成熟。简而言之, 对多个超变区位点(例如 6—7 个位点)进行突变, 形成各位置上所有可能的取代。由丝状噬菌粒以单价形式展示这些抗体, 且是与包装在各噬菌粒内的 M13 基因 III 的产物形成的融合体。然后如本文所述对噬菌体展示的变体进行生物学活性(例如结合亲和力)筛选。为了确定进行修饰的候选超变区位点, 可通过丙氨酸扫描诱变来鉴定对抗原结合性贡献显著的超变区残基。也可以或还可以进行抗原-抗体复合物的晶体结构分析, 确定抗体和人 ErbB2 的接触点。这样的接触残基及其附近残基就是本文所述取代的候选位点。待此类变体产生后, 就可根据本文所述对变体组进行筛选, 在一个或多个相关试验中挑选具有优良特性的抗体继续研究。

可以就效应功能对本发明抗体进行修饰, 例如增强抗体的抗原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)。这可以通过在抗体 Fc 区引入一个或多个氨基酸取代。也可以或还可以在 Fc 区引入半胱氨酸残基, 从而在该区域形成链间二硫键。由此形成的均二聚体抗体提高了内化能力并/或提高了补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。见 Caron 等, *实验医学杂志* 176: 1191-1195(1992)和 Shopes, B., *免疫学杂志* 148: 2918-2922(1992)。也可以用异双官能交联剂制备具有增强抗肿瘤活性的均二聚抗体, 见 Wolff 等, *癌症研究* 53: 2560-2565(1993)。也可以将抗体改造成具有 2 个 Fc 区, 从而增强补体裂解和 ADCC 能力。见 Stevenson 等, *抗癌药物设计* 3: 219-230(1989)。

为了延长抗体的血清半寿期,可以在抗体(特别是抗体片段)内加入一个补救受体结合表位,见美国专利 5,739,277。本文中的“补救受体结合表位”指 IgG 分子(例如 IgG₁, IgG₂, IgG₃ 或 IgG₄)Fc 区内能够延长 IgG 分子体内血清半寿期的表位。

(viii)糖基化变体

抗体在其恒定区内的保守性位点被糖基化(Jefferis 和 Lund, 化学免疫学 65: 111-128(1997); Wright 和 Morrison, TibTECH 15: 26-32(1997))。免疫球蛋白的寡糖侧链会影响蛋白质的功能(Boyd 等, 分子免疫学 32: 1311-1318(1996); Wittwe 和 Howard, 生物化学 29: 4175-4180(1990))和糖蛋白分子内区域间的相互作用,这可能影响糖蛋白的构象和三维表面(Hefferis 和 Lund, 同上; Wyss 和 Wagner, 当代生物技术 7: 409-416(1996))。寡糖还可能基于特殊的识别结构将某糖蛋白靶向特定的分子。例如,据报道,在半乳糖基化的 IgG 中,寡糖部分“弹”出在 CH2 内空间,末端的 N-乙酰基葡萄糖胺残基因而能够与甘露糖结合蛋白结合(Malhotra 等, 自然医学 1: 237-243(1995))。用糖肽酶从中国仓鼠卵巢(CHO)细胞产生的 CAMPATH-1H(一种重组人源化鼠单克隆 IgG1 抗体,能够识别人淋巴细胞的 CDw52 抗原)中的去除部寡糖,导致补体介导的裂解作用(CMCL)完全丧失(Boyd 等, 分子免疫学 32: 1311-1318(1996)),但是用神经酰胺酶选择性地去除唾液酸残基则对 DMCL 没有影响。另据报道,抗体糖基化还会影响抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。例如,据报道,抗体的糖基化会影响抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。具体地说,具有四环素调节的 $\beta(1,4)$ -N-乙酰基葡萄糖胺转移酶 III(Gn III)(一种催化等分 GlcNAc 形成的糖基转移酶)表达的 CHO 细胞具有增强的 DCC 活性(Umana 等, 成熟生物技术 17: 176-180(1999))。

抗体的糖基化一般是 N 连接或 O 连接的。N 连接指糖基连接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-苏氨酸是糖基与天冬酰胺侧链酶促结合的识别序列,其中的 X 是脯氨酸之外的任一氨基酸。因此,多肽内存在以上三肽序列之一则形成一个潜在的糖基化位点。O 连接糖基化指 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一与羟基氨基酸(一般为丝氨酸或苏氨酸,但也可以使用 5-羟基脯氨酸或 5-羟基赖氨酸)连接。

抗体的糖基化变体即抗体的糖基化方式被改变的变体。所谓“改变”即删除一个或多个抗体内的原糖基,增加一个或多个糖基,改变糖基化的组成(糖基化方式)和糖基化程度等。

给抗体增加糖基化位点可通过改变含有一个或多个上述三肽序列的氨基酸序列(如果是 N 连接糖基化位点)。改变还可以通过增加或取代原抗体的一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基(如果是 O 连接糖基化位点)。同理, 去除糖基化位点也可以通过改变抗体天然糖基化位点内的氨基酸。

改变氨基酸序列常可以通过改变其核酸序列。编码抗 ErbB2 抗体氨基酸序列变体的核酸分子可用多种本领域已知方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源中分离(如果存在天然氨基酸序列变体), 或通过对抗 ErbB2 抗体的预制变体或非变体进行寡核苷酸介导(定点)诱变、PCR 诱变和盒诱变。

还可以改变抗体糖基化(包括糖基化方式)而不改变氨基酸序列或其核苷酸序列。糖基化主要依赖于表达该抗体的宿主细胞。因为用来表达作为潜在治疗剂的重组糖蛋白(例如抗体)的细胞一般都不是原天然细胞, 所以可以期望抗体糖基化方式的显著变异(见, 例如 Hse 等, 生物化学杂志 272: 9062-9070(1997))。除选择宿主细胞之外, 在重组生产抗体过程中影响糖基化的因素还包括生长模式、培养基配方、培养物密度、给氧条件、pH、纯化方法等。已有多种方法可用来在特定宿主内改变糖基化方式, 包括引入或过量表达参与寡糖生产的酶(美国专利 5,047,335; 5,510,261 和 5,278,299)。可以用酶例如内切糖苷酶 H(Endo H)消除糖蛋白的糖基化或某种类型的糖基化。此外, 可以通过基因工程使得重组宿主细胞产生缺陷, 不能加工某种类型的多糖。以上技术或类似技术都是本领域已知的。

抗体的糖基化结构可以通过常规糖分析技术来分析, 包括凝集素层析, NMB 质谱, HPLC, GPC, 单糖组成分析, 顺序酶促消化和 HPAEC-PAD(通过高 pH 离子交换层析根据电荷来分离寡糖)。为分析目的解离寡糖的技术也是已知的, 包括但不限于酶促处理(一般用肽-N-糖苷酶 F/内腔- β -半乳糖苷酶), 用强碱性条件主要解离 O 连接结构, 和用无水肼释放 N 和 O 连接寡糖的化学方法。

(ix) 筛选具有所需特性的抗体

以上描述了制备抗体的技术。根据需要, 然后可以挑选具有某些生物学特征的抗体。

例如, 要鉴定生长抑制性抗 ErbB2 抗体, 可以通过筛选抑制过量表达 ErbB2 的癌细胞生长的抗体。实施方式之一中, 所选的生长抑制性抗体在约 0.5-30g/ml 浓度对细胞培养物中 SK-BR-3 细胞生长的抑制可达 20-100%, 较好的是约 50-100%。为了鉴定这样的抗体, 可进行美国专利 5,677,171 所述的 SK-BR-3 试验。根据该试验, 将 SK-BR-3 细胞培养在 1:1 的 F12 和 DMEM 培养基中, 其中补充

了 10%胎牛血清，谷氨酰胺和青霉素、链霉素。在一个 35mm 细胞培养皿上接种 20,000 个 SK-BR-3 细胞(2ml/35mm 培养皿)。每培养皿内加 0.5-30g/ml 抗 ErbB2 抗体。6 天后，用电子 COULTER 细胞计数器清点细胞数，并与未处理细胞比较。挑选抑制 SK-BR-3 细胞生长达 20-100%或 50-100%的抗体作为生长抑制性抗体。

要挑选诱导细胞死亡的抗体，可以通过与对照相比评价由 PI、台盼蓝或 7AAD 摄取反映的细胞膜破损。优选试验是 BT474 细胞 PI 摄取试验。根据该试验，将 BT474 细胞(获自美国典型培养物保藏中心，Rockville, MD)培养在 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(D-MEM):Ham's F-12(50:50)中，其中补充了 10%热灭活的 FBS(Hyclone)和 2mM L-谷氨酰胺。(因此，该试验在无补体和免疫效应细胞的条件下进行)。以 3×10^6 /培养皿的密度将 BT474 细胞接种到 100×20mm 培养皿上，过夜附着。然后去除培养基，换以纯新鲜培养基或含 10g/ml 相应单克隆抗体的培养基。细胞培养 3 天。每次处理后用 PBS 洗涤细胞单层，并通过胰蛋白酶消化解离。然后在 4℃以 1200rpm 离心细胞 5 分钟，将沉淀重悬于 3ml 冰冷的 Ca^{2+} 结合缓冲液(10mM Hepes, pH7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl_2)，并等分后转移到 35mm 滤网盖 12×75 试管(1ml/管，每一处理组 3 管)内，消除细胞块。然后在试管内加入 PI(10g/ml)。可用 FACSCAN 流式细胞计数仪和 FACSCONVERT CellQuest 软件(Becton Dickinson)分析样品。根据 PI 吸收测定，诱导细胞死亡达统计学上显著水平的抗体可选作细胞死亡诱导性抗体。

为了挑选诱导凋亡的抗体，可用 BT474 细胞进行膜联蛋白结合试验。如前所述培养 BT474 细胞，并接种到培养皿中。然后去除培养基，换以纯新鲜培养基和含有 10g/ml 单克隆抗体的培养基。培养 3 天后，用 PBS 洗涤细胞单层，用胰蛋白酶消化解离。然后离心细胞，重悬于 Ca^{2+} 结合缓冲液中，如前所述等分到试管中进行细胞死亡试验。然后在试管内加入带标记的膜联蛋白(例如膜联蛋白 V-FTIC)(1g/ml)。可用 FACSCAN 流式细胞计数仪和 FACSCONVERT CellQuest 软件(Becton Dickinson)分析样品。可挑选与对照相比诱导膜联蛋白结合达统计学显著水平的抗体作为凋亡诱导性细胞。

除了膜联蛋白结合试验之外，还可以采用 BT474 细胞 DNA 染色试验。为例进行该该试验，将经以上两段所研究抗体处理的 BT474 细胞与 9g/ml HOECHST 33342 在 37℃共培养 2 小时，然后在 EPICS ELITE 流式细胞计数仪(Coulter Corporation)上用 MODFIT LT 软件(Verity Software House)进行分析。挑选诱导的凋亡细胞百分比比未处理细胞(至多 100%凋亡细胞)高 2 倍(3 倍或以上更好)的抗体作为促凋亡抗体。

为了鉴定阻抑 ErbB 受体被配体活化的抗体,可测定抗体阻抑 ErbB 配体与表达 ErbB 受体的细胞结合的能力(例如所研究的 ErbB 受体与另一 ErbB 受体偶联成 ErbB 异寡聚体)。例如,可将天然表达或转染后表达 ErbB 异寡聚体内各 ErbB 受体的细胞与抗体共培养,然后接触带标记的 ErbB 配体。然后,评价抗 ErbB2 抗体阻抑配体与 ErbB 异寡聚体内 ErbB 受体结合的能力。

例如,可如后文实施例 1 所述,在 24 孔板内,在冰上,用 MCF7 培养物单层进行抗 ErbB2 抗体抑制 HRG 与 MCF7 乳房癌细胞线结合的试验。可在各孔内加入抗 ErbB2 单克隆抗体,培养 30 分钟。然后加入 ^{125}I -标记的 rHRG 1₁₇₇₋₂₂₄(25pm),继续培养 4-16 小时。制作量效曲线,已酸所研究抗体的 IC₅₀。实施方式之一中,在该试验中,阻抑 ErbB 受体被配体活化的抗体抑制 HRG 与 MCF7 细胞结合的 IC₅₀ 约 50nM 或以下,约 10nM 或以下更好。如果所述抗体是抗体片段,例如 Fab 片段,该试验中抑制 HRG 结合 MCF7 细胞的 IC₅₀ 约 100nM 或以下,约 50nM 或以下更好。

也可以或还可以评价抗 ErbB2 抗体阻抑 ErbB 配体激发 ErbB 异寡聚物内 ErbB 受体的酪氨酸磷酸化的能力。例如,可将内源性表达或转染表达 ErbB 受体的细胞与抗体共培养,然后用抗磷酸酪氨酸单克隆抗体(可以与可测标记偶联)分析 ErbB 配体依赖性酪氨酸磷酸化活性。也可采用美国专利 5,766,863 所述的激酶受体活化试验来测定 ErbB 受体活化,和抗体对此活性的阻抑能力。

实施方式之一中,可筛选抑制 HRG 激发 MCF7 细胞内 p180 酪氨酸磷酸化的抗体。例如,可将 MCF7 细胞培养在 24 孔板中,在各孔中加入抗 ErbB2 单克隆抗体,室温培养 30 分钟;然后在各孔中加入 rHRG 1₁₇₇₋₂₂₄(0.2nM),继续培养 8 分钟。抽干各孔中的培养基,加入 100 μl SDS 样品缓冲液(5%SDS, 25mM DTT 和 25mM Tris-HCl, pH6.8)终止反应。各种样品(25 μl)在 4-12%梯度凝胶(Novex)上电泳,然后电泳转移到聚二氟乙烯膜上。进行抗磷酸酪氨酸(1g/ml)免疫印迹,用反射密度法定量测定 M_r180,000 处主要反应性带的强度。所选抗体应能显著抑制 HRG 激发的 p180 酪氨酸磷酸化,即在该试验中仅为对照的 0-35%。根据反射密度法测定,绘制抑制 HRG 激发 p180 酪氨酸磷酸化的量效曲线,并计算所研究抗体的 IC₅₀。实施方式之一中,阻抑配体活化 ErbB 受体的抗体抑制 HRG 激发 p180 酪氨酸磷酸化的 IC₅₀ 约为 50nM 或以下,10nM 或以下更好。如果所述抗体是 Fab 等抗体片段,其在该试验中抑制 HRG 激发 p180 酪氨酸磷酸化的 IC₅₀ 约为 100nM 或以下,50nM 或以下更好。

也可以按照 Schaefer 等, *致癌基因* 15: 1385-1394(1997)所述,评价抗体对

MDA-MB-175 细胞的生长抑制作用。根据该试验, MDA-MB-175 细胞可用抗 ErbB2 单克隆抗体(10g/ml)处理 4 天, 然后用结晶紫染色。抗 ErbB2 抗体共培养对该细胞线造成的生长抑制与单克隆抗体 2C4 相似。另一实施方式中, 外源性 HRG 不能显著逆转这种抑制作用。较好的是, 不论是否存在外源性 HRG, 所述抗体都能够比单克隆抗体 4D5 更强(或者比单克隆抗体 7F3 更强)地抑制 MDA-MB-175 细胞的增殖。

实施方式之一中, 根据共免疫沉淀实验测定, 所研究的抗 ErbB2 抗体可阻抑 ErbB2 与 MCF7 和 SK-BR-3 细胞内 ErbB3 的 heregulin 依赖性结合, 且比单克隆抗体 4D5 更有效, 更好的是比单克隆抗体 7F3 更有效。

为了筛选能与某研究抗体所结合的 ErbB2 上的表位结合的抗体, 可进行常规交叉阻抑实验, 例如抗体, 实验室手册, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow 和 David Lane 编辑(1988)所述。也可以或还可以用已知方法制作表位图谱(见图 1A 和 1B)。

然后, 可根据以上细胞试验的结果进行动物(例如鼠、模型、人临床试验)试验。例如, 用后文实施例所述的转基因小鼠模型可证明某种抗体不能或能有限地治疗 ErbB2 过量表达型肿瘤。

B. 抗 ErbB 抗体-类美坦素偶联物(免疫偶联物)

制备抗 ErbB 抗体-类美坦素偶联物可通过将抗 ErbB 抗体与类美坦素分子化学连接, 但不可显著削弱抗体和类美坦素分子各自的生物学活性。类美坦素是本领域所熟知的, 它可用已知方法合成, 也可以从天然原料中分离。合适的类美坦素见美国专利 5,208,020 等专利和非专利出版物。优选的类美坦素是美坦醇和在芳环或其他位置上被修饰的美坦醇类似物, 例如各种美坦醇酯。

本领域内已知许多接头可用于制作抗体-类美坦素偶联物, 例如美国专利 5,208,020 或欧洲专利 0425235B1 和 Chari 等, 癌症研究 52: 127-131(1992)所述。此类接头包括以上专利中所述的二硫基, 硫醚基, 酸不稳定性基团, 光不稳定基团, 肽酶不稳定基团, 或酯酶不稳定基团, 其中优选二硫基和硫醚基。

抗体与类美坦素的偶联物可用多种双官能蛋白质偶联剂来制备, 例如 N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP), 琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯, iminothiolane(IT), 亚氨酸酯的双官能衍生物(例如盐酸己二酰亚胺二甲酯), 活性酯(例如辛二酸二琥珀酰亚胺酯), 醛(例如戊二醛), 二重氮化合物(例如二(对重氮苯甲酰基)己二胺), 二重氮衍生物(例如二(对重氮苯甲酰基)-乙二胺),

二异氰酸酯(例如 2,6-二异氰酸甲苯酯), 和双活性氟化合物(例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。优选的偶联剂包括可形成二硫键的 N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二硫代)丙酸酯(SPDP)(Carlsson 等, *生物化学杂志* 173: 723-737(1978))和 N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶硫)戊酸酯(SPP)。

可将接头连接于类美坦素分子的各个位置, 这取决于连接的类型。例如, 可用常规偶联技术在具有羟基的 C3 位, 羟甲基修饰的 C14 位, 羟基修饰的 C15 位, 和具有羟基的 C20 位形成酯键。优选实施方式之一中, 连键形成于类美坦素或美坦醇类似物的 C3 位。

抗 ErbB 抗体-类美坦素偶联物的每个抗体分子一般连有约 1-10 个类美坦素分子, 以约 3-5 个为佳。

C. 药物制剂

将具有所需纯度的抗体与可选的药学上认可的载体、赋形剂或稳定剂(*雷明顿药物科学*, 第 16 版, Osol, A.编(1980))混合, 制备成冻干剂或水溶液形式的本发明抗体-类美坦素偶联物治疗性制剂。认可的载体、赋形剂或稳定剂在使用剂量和浓度对受主无毒, 包括: 缓冲液, 例如磷酸盐缓冲液, 柠檬酸盐缓冲液, 和其他有机酸缓冲液; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂, 例如氯化十八烷基二甲基苄基铵, 氯化己烷双胺, 亚苄基二氯, 苯索氯铵, 苯酚或苄醇, 例如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯的对羟基苯甲酸烷酯, 儿茶酚, 间苯二酚, 环己醇, 3-戊醇和间苯甲酚; 低分子量(少于 10 个残基)多肽; 蛋白质, 例如血清白蛋白, 明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 例如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 例如甘氨酸, 谷氨酰胺, 天冬酰胺, 组氨酸, 精氨酸或赖氨酸; 单糖, 二糖和其他糖类, 包括葡萄糖, 甘露糖或糊精; 螯合剂, 例如 EDTA; 糖, 例如蔗糖, 甘露醇, 海藻糖, 山梨醇; 成盐反离子, 例如钠; 精神复合物, 例如 Zn-蛋白质复合物; 和/或非离子性表面活性剂, 例如 TWEEN, PLURONICS 或聚乙二醇(PEG)。优选的冷冻干燥抗 ErbB2 抗体制剂可见 WO97/04810。

本发明的制剂也可以包含一种以上针对特定适应症的活性化合物, 较好的是, 彼此的活性相互补充而不相互消减。例如, 同一制剂中可另含结合 EGFR、ErbB2(例如结合 ErbB2 上其他表位)、ErbB3、ErbB4 或血管内皮生长因子(VEGF)的抗体或抗体-类美坦素偶联物。组合物也可以或还可以含有化疗试剂、细胞毒性试剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂和/或心保护剂。这些分子以适宜的有效含量存在。

可以将活性成分包在微胶囊中。例如, 可采用凝聚技术或界面聚合技术分别

包入羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊内,包于胶体药物传递系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中或包于粗乳液中。此类技术可参考雷明顿药物科学第16版, Osol, A.编(1980)。

可以制备成缓释制剂。缓释制剂的合适例子包括内含抗体的固体疏水性聚合物半透性有形(例如膜或微胶囊)基质。缓释基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟基乙基甲基丙烯酸酯)、或聚(乙烯醇)、聚交酯(美国专利 3,773,919), L-谷氨酸和 L-谷氨酸乙酯的共聚物, 非可降解的乙烯-乙酸乙酯共聚物, 可降解的乳酸-乙二酸共聚物, 例如 LUPRON DEOPT(由乳酸-乙二酸共聚物和乙酸 leuprolide 构成的注射微球)和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

体内使用的制剂必须无菌。这可以通过除菌滤膜过滤做到。

D. 使用抗 ErbB2 抗体-类美坦素偶联物的治疗方法

本发明认为, 可用抗 ErbB2 抗体-类美坦素偶联物治疗多种疾病, 例如良性或恶性肿瘤; 白血病和淋巴瘤; 还包括例如神经、胶质细胞、星形细胞、下丘脑、腺体、巨噬细胞、上皮、基底细胞、囊胚腔、炎症、血管生成和免疫疾病。

所治的疾病主要是癌症。本发明可治的癌症例如但不限于恶性肿瘤、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤、白血病或淋巴瘤。更具体的是: 鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌), 肺癌(包括小细胞肺癌, 非小细胞肺癌, 肺腺癌和肺鳞状细胞癌), 腹膜癌, 肝细胞癌, 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, 肝细胞瘤, 乳房癌, 结肠癌, 直肠癌, 直肠结肠癌, 子宫内膜癌或子宫癌, 唾液腺癌, 肾癌, 前列腺癌, 外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌, 阴茎癌, 以及头颈癌。

所治的癌应包含 ErbB 表达细胞, 这样, 本发明的抗 ErbB 抗体就能与以过量表达 ErbB 受体为特征的癌结合。在优选实施方式之一中, 所述的癌包含 ErbB2 表达细胞, 更好的是以过量表达 ErbB2 受体为特征的细胞。可用多种已知的诊断/预后试验来测定癌中 ErbB 例如 ErbB2 的表达。实施方式之一中, 可通过 IHC, 用 HERCEPTEST®(Dako)来分析 ErbB2 过量表达。可用肿瘤活检样品的石蜡包埋组织切片进行 IHC 试验, ErbB2 蛋白染色强度定级如下:

0 级

没有观察到染色, 或者, 仅 10%以下肿瘤细胞的细胞膜被染色;

1+级

10%以上肿瘤细胞膜有弱染色/或难以察觉的染色。细胞仅部分细胞膜被染色。

2+级

10%以上肿瘤细胞的全细胞膜被弱-中度染色。

3+级

10%以上肿瘤细胞的全细胞膜被中度-强染色。

ErbB2 过量表达呈 0 至 1+级的肿瘤可认为不具有过量表达 ErbB2 的特征, 2+至 3+的肿瘤则认为以过量表达 ErbB2 为特征。

测定肿瘤中 ErbB2 过量表达的程度, 也可以或还可以对福尔马林固定或石蜡包埋的肿瘤组织进行 FISH 试验, 例如 INFORM(Ventana, Arizona 出售)或 PATHVISION(Vysis, Illinois)。

实施方式之一中, 癌症表达(或过量表达)EGFR。过量表达 EGFR 的癌症例如鳞状细胞癌(如上皮鳞状细胞癌), 肺癌(如小细胞肺癌, 非小细胞肺癌, 肺腺癌和肺鳞状细胞癌), 腹膜癌, 肝细胞癌, 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, 肝细胞瘤, 乳房癌, 结肠癌, 直肠癌, 直肠结肠癌, 子宫内膜癌或子宫癌, 唾液腺癌, 肾癌, 前列腺癌, 外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌, 阴茎癌, 以及头颈癌。

较好的是, 本发明的免疫偶联物和/或与之结合的 ErbB(例如 ErbB2)或 EGFR 蛋白由细胞内化, 这样可提高免疫偶联物杀死其所结合癌细胞的疗效。优选实施方式之一中, 细胞毒试剂(类美坦素)靶向或干扰癌细胞内的核酸。

本发明的治疗针对的是对非偶联抗 ErbB 抗体无反应或反应差的 ErbB 过量表达肿瘤。这些患者可能曾经接受过无类美坦素偶联抗 ErbB 抗体治疗, 但没有获得显著改善, 或者只得到暂时改善。然而, 患者曾接受非偶联抗 ErbB 抗体治疗并不是其作为本发明治疗候选者的条件。本领域一般技术人员根据患者公开的临床信息和记录, 不难判断其是否适合本发明的免疫偶联物治疗。对不曾接受(非偶联)抗 ErbB 抗体治疗的哺乳动物—尤其是人—进行治疗也在本发明范围内。

可采用已知方法将抗 ErbB 抗体-类美坦素偶联物给予哺乳动物尤其是人, 例如静脉内(例如推注或连续滴注)、肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、动脉内、滑膜腔内、鞘内、口服、局部、吸入途径。优选通过静脉内或皮下给予抗体。

可将其他治疗与抗 ErbB 抗体-类美坦素偶联物治疗相联合。联合给药包括用单独制剂或单一制剂联合给药, 和按一定顺序给药, 最好存在着多种活性成分同时发挥各自生物学活性的时候。

优选实施方式之一中, 患者接受两种或两种以上不同抗 ErbB 抗体治疗, 至少其中之一的形式是与类美坦素的偶联物。例如, 患者接受第一抗 ErbB2 抗体-

类美坦素偶联物治疗, 其中的抗体是生长抑制剂(例如 HERCEPTIN®), 并接受第二抗 ErbB2 抗体或抗体-免疫偶联物治疗, 所述第二免疫偶联物例如抗体-类美坦素偶联物, 可阻抑 ErbB 受体被配体活化(例如 2C4 或其人源化和/或亲和成熟变体)或诱导 ErbB2 过量表达细胞凋亡(例如 7C2, 7F3 或它们的人源化变体)。另一实施方式中, 治疗包括给予特异性结合两种或两种以上不同 ErbB 受体(例如 ErbB2 和 EGFR 受体)的抗体, 其中至少一种抗 ErbB 抗体以类美坦素偶联物形式给予。较好的是, 以上联合治疗可获得协同效应。

也可将抗 ErbB 抗体-类美坦素偶联物与针对其他非 ErbB 受体族肿瘤相关抗原的抗体联合给予。此处的其他抗体可(例如)结合血管内皮生长因子(VEGF), 其形式可以是与类美坦素的偶联物, 或其他免疫偶联物。

实施方式之一中, 本发明的治疗包联合给予抗 ErbB2 抗体-类美坦素偶联物与一种或多种化疗制剂或生长抑制剂, 包括联合给予不同化疗制剂的混合物。优选的化疗制剂包括 taxanes(例如 paclitaxel 和 doxorubicin)和/或 anthracycline 抗生素。此类化疗制剂的准备和使用剂量可以按照制造商的说明书或根据经验决定。此类化疗的准备和使用剂量也可参考化疗服务, M.C.Perry 编, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992)。

可将抗体-类美坦素偶联物与抗激素化合物联用, 后者例如抗雌激素化合物, 如他莫昔芬; 抗孕酮化合物, 例如 onapristone(EP616812); 或抗雄激素化合物, 例如氟他胺, 它们的剂量是已知的。当待治疗的癌症非激素依赖性时, 患者可能已接收过抗激素治疗, 当癌症变为非激素依赖性后, 可给予患者抗 ErbB2 抗体(和上述他药物)。

有时, 还可能优选给患者联用心保护剂(为了预防或减轻与治疗相关的心肌功能不良)或一种或多种细胞因子。除以上治疗方法之外, 还可以对患者进行手术切除癌细胞和/或放射治疗。

以上联用制剂的剂量可以是目前所用的, 也可以略低, 因为这些制剂可能与抗 ErbB2 抗体产生叠加(协同)效应。

就预防或治疗疾病而言, 抗体-类美坦素偶联物的合适剂量取决于所治疾病的种类、程度和病程, 抗体是用于预防还是用于治疗, 先前的治疗, 患者的临床记录和对抗体的反应, 以及主治医生的考虑。抗体-类美坦素偶联物可以一次性给予患者, 或分多次给予。根据疾病的种类、程度, 不论是一次性给予或多次给予或连续输注, 抗体-类美坦素偶联物的初始候选剂量约为 1g/kg 至 15mg/kg(例如 0.1-20mg/kg)。根据以上因素, 典型的日用剂量约为 1g/kg 至 100mg/kg 或以上。

如果是数日或更长时间的重复给药,根据病情,治疗应持续至症状抑制达到要求。一种优选给药方案包括:抗 ErbB2 抗体-类美坦素偶联物初始剂量约 4mg/kg,然后每周的维持剂量约 2mg/kg。然而,也可以采用其他给药方案。可用常规技术和试验来监测本发明治疗的进展。

E. 产品

本发明另一实施方式提供一种含有治疗前述疾病所需材料的产品。该产品包括:容器和容器上或与之在一起的标签或包装内说明。合适的容器包括例如瓶,管形瓶或注射管等。容器可以用玻璃或塑料等多种材料制成。容器内装用于治疗疾病的组合物,并具有无菌接口(例如,容器可以是一个静脉输液袋或带塞管形瓶,塞子可让针头穿透)。至少组合物中有效成分之一是抗 ErbB2 抗体-类美坦素偶联物。标签或包装内说明指明,该组合物用于治疗选定的疾病,例如癌症。另一实施方式中,标签或包装内说明指明,含结合 ErbB2 的抗体的组合物可用于治疗表达 ErbB 受体的癌症,所述受体选自表皮生长因子受体(EGFR)、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4,最好是 EGFR。此外,标签和包装内说明还指明,接受治疗的患者所患应是以 ErbB 受体(选择 EGFR, ErbB2, ErbB3 或 ErbB4)活化过度为特征的癌症。例如,所述癌症可以是过量表达上述受体之一和/或过量表达某种 ErbB 配体(例如 TGF-)的癌症。标签和包装内说明还可以指明,组合物也可以用来治疗非以过量表达 ErbB2 受体为特征的癌症。例如,虽然 HERCEPTIN®的包装内说明书指明该抗体用于治疗其肿瘤过量表达 ErbB2 蛋白的乳房癌转移患者,它还说明该抗体或组合物可用于治疗对 HERCETPIN®无反应或反应差的癌症。另一种实施方式中,包装内说明可以指明,该抗体-类美坦素偶联物或组合物还可用于治疗非激素依赖性癌症,例如前列腺癌、结肠癌或结肠直肠癌。而且,本发明产品还可以包括(a)第一容器,其中的组合物含第一抗体与类美坦素的偶联物,该抗体结合 ErbB2 并抑制过量表达 ErbB2 的癌细胞生长;和(b)第二容器,其中的组合物含第二抗体或其与类美坦素的偶联物,该抗体结合 ErbB2 并阻抑 ErbB 受体被配体活化。本发明此实施方式的产品还包括说明该第一和第二抗体可治疗癌症的包装内说明书。本发明的产品也可以或还可以包括内含药学上认可的缓冲液(例如注射用无菌水(BWFI),磷酸盐缓冲液, Ringer 溶液和葡萄糖溶液)的第二(或第三)容器。该产品还可以根据销售和使用需要包括其他物质,例如其他缓冲液,稀释剂,过滤器,针头和注射管等。

以下非限定性实施例将进一步详细描述本发明。

实施例 1

抗 ErbB2 单克隆抗体 4D5 的产生, 鉴定和人源化

按照 Fendly 等, *癌症研究* 50:1550-1558(1990)所述制备特异性结合 ErbB2 胞外区的鼠单克隆抗体 4D5。简而言之, 按 Hudziak 等, *美国科学院院报* 84: 7158-7163(1987)所述培养 NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ 细胞(每细胞表达约 1×10^5 个 ErbB2 分子), 用含 25mM EDTA 的磷酸盐缓冲液(PBS)收获, 用于免疫 BALB/小鼠。在第 0、2、5、7 周, 给小鼠腹膜内(i.p.)注射含 10^7 个细胞的 0.5ml PBS。给予抗血清可免疫沉淀 ^{32}P 标记的 ErbB2 的小鼠在第 9 周和第 13 周 i.p.注射麦胚凝集素琼脂糖(WGA)纯化的 ErbB2 膜提取物。这以后, 静脉内(i.v.)注射 0.1ml ErbB2 制剂, 将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞线 X63-Ag8.653 融合。通过 ELISA 和放射性免疫沉淀筛选 ErbB2 结合性杂交瘤上清液。

表位图谱和鉴定

用竞争结合试验(Fendly 等, *癌症研究* 50: 1550-1558(1990))测定单克隆抗体 4D5 所结合的 ErbB2 表位。进行交叉阻抑试验, 即用 PANDEX™ 筛选仪定量测定完整细胞上的直接荧光。用标准方法(Wofsy 等, *细胞免疫学中的选择方法*, p.287, Mishel 和 Schiigi(编), San Francisco: W.J.Freeman Co.(1980))将单克隆抗体与异硫氰酯荧光素酯(FITC)偶联。用胰蛋白酶解离下铺满的 NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ 细胞单层, 洗涤一次, 重悬于含 0.5%胎牛血清白蛋白(BSA)和 0.1%NaN₃ 的冷 PBS, 浓度为 1.75×10^6 细胞/ml。加入胶乳粒子(IDC, Portland, OR)至 1%, 用以减少 PANDEX™ 板膜的堵塞。在 PANDEX™ 板的孔内加入 20l 细胞悬浮液和 20l 纯化单克隆抗体(100g/ml 至 0.1g/ml), 冰上培养 30 分钟, 各孔加入预定稀释度的 FITC 标记的单抗 201, 培养 30 分钟, 洗涤, 用 PANDEX™ 定量测定荧光。如果单克隆抗体抑制彼此的结合比抑制无关对照抗体高出 50%或以上, 则可认为它们针对相同的表位。该试验中, 设定单克隆抗体 4D5 针对表位 1(ErbB2 胞外区内氨基酸残基 529-625, 包括端值, 见 SEQ ID NO:3)。

用乳房癌细胞线 SK-BR-3 评价单克隆抗体 4D5 的生长抑制特征(见 Hudziak 等, *分子细胞生物学* 9(3):1165-1172(1989))。简而言之, 用胰蛋白酶(0.25v/v%)解离下 SK-BR-3 细胞, 悬浮于完全培养基, 4×10^5 细胞/ml。将 100μl(4×10^4 个细胞)的等份加入 96 孔微稀释板孔中, 待细胞附着后加入 100μl 纯培养基或含单克隆抗体(最终浓度为 5g/ml)的培养基。72 小时后, 用 PBS(pH7.5)洗板 2 次, 用

结晶紫(甲醇中的 0.5%溶液)染色,按 Sugarnan 等,科学 230: 943-945(1985)所述分析相对细胞增殖。单克隆抗体 4D5 抑制 SK-BR-3 细胞相对细胞繁殖达 56%。

还评价了单克隆抗体 4D5 抑制 HRG 刺激 MCF7 全细胞裂解液中 M_r 180,000 蛋白质酪氨酸磷酸化的能力(Lewis 等,癌症研究 56: 1457-1465(1996))。据报道,MCF7 细胞表达所有已知 ErbB 受体,但表达水平较低。由于 ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 的分子大小几乎相同,因此,用 Western 印迹分析法评价全细胞裂解液不可能分辨出是哪一蛋白被酪氨酸磷酸化。然而,这些细胞是 HRG 酪氨酸磷酸化试验理想的材料,因为在试验条件下,在没有外源 HRG 加入的条件下,它们产生 M_r 180,000 范围内蛋白的酪氨酸磷酸化水平为零或不可能测得。

将 MCF7 细胞培养在 24 孔板内,在各孔内加入抗 ErbB2 抗体,室温下培养 30 分钟;然后在各孔内加入 rHRG $1_{177-244}$ 至 0.2nM 最终浓度,继续培养 8 分钟。小心地抽干各孔内的培养液,加入 100 μ l SDS 样品缓冲液(5%SDS, 25mM DTT, 25mM Tris-HCl, pH6.8)终止反应。各样品(25l)在 4-12%梯度凝胶(Novex)上电泳,然后电泳转移到聚二氟乙烯膜上。进行抗磷酸酪氨酸(4G10, 获自 UBI, 用量为 1g/ml)免疫印迹,按已知方法(Holmes 等,科学 256: 1205-1210(1992)和 Sliwowski 等,生物化学杂志 269: 14661-14665(1994)),用反射密度法定量测定 M_r 180,000 主反应带的强度。

单克隆抗体 4D5 显著抑制 M_r 180,000 处 HRG 诱导的酪氨酸磷酸化信号产生,但在没有 HRG 存在时,不能激发 M_r 180,000 范围内蛋白质的酪氨酸磷酸化。而且,该抗体与 EGFR(Fendly 等,癌症研究 50:1550-1558(1990))、ErbB2、ErbB3 或 ErbB4 无交叉反应。单克隆抗体 4D5 阻抑 HRG 激发的酪氨酸磷酸化可达 50%。

还评价了在有或没有外源性 rHRG1 存在下,单克隆抗体 4D5 对 MDA-MB-175 和 SK-BR-3 细胞的生长抑制作用(Schaefer 等,致癌基因 15:1385-1394(1997))。MDA-MB-175 细胞内的 ErbB2 水平比正常乳房上皮细胞高 4-6 倍,该细胞内的 ErbB2-ErbB4 受体组成型地被酪氨酸磷酸化。不论有无外源 HRG,单克隆抗体 4D5 都能抑制 MDA-MB-175 细胞的增殖。4D5 对细胞增殖的抑制作用依赖于 ErbB2 表达水平(Lweis 等,癌症与免疫学与免疫治疗学 37: 255-263(1993))。SK-BR-3 细胞内测得的最大抑制为 66%。然而,外源性 HRG 可抵消这一作用。

人源化

将鼠单克隆抗体 4D5 人源化,采用新的“基因转变诱变”法,见美国专利 5,821,337。以下实施例所用的人源化单克隆抗体 4D5 称为 huMAb4D5-8。该抗体

为 IgG1 同种型。

实施例 2

HERCEPTIN®-DM1 偶联物

1. HERCEPTIN®的纯化

将 HERCEPTIN®(huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, 美国专利 5,821,337)(每管含 440mg 抗体)溶于 50ml MES 缓冲液(25mM MES, 50mM NaCl, pH5.6)。将样品上到阳离子交换柱(Sepharose S, 15cm×1.7cm)上, 该柱预先用同种缓冲液平衡。然后用该缓冲液洗柱(5 倍柱体积)。将缓冲液内 NaCl 浓度提高至 200mM 来洗脱 HERCEPTIN®。合并含抗体的流出组分, 稀释至 10mg/ml, 在含 50mM 磷酸钾, 50mM NaCl, 2mM EDTA, pH6.5 的缓冲液中透析。

2. 用 SPP 修饰 HERCEPTIN®

用 N-琥珀酰亚胺-4-(2-吡啶硫)戊酸酯(SPP)修饰纯化后的 HERCEPTIN®, 以引进二硫吡啶基团。用 SPP(用 2.3ml 乙醇赔偿 5.3 摩尔当量)处理 44.7ml 含抗体(376mg, 8mg/ml)的 50mM 磷酸钾缓冲液(pH6.5, NaCl(50mM), EDTA(1mM))。氩气氛下环境温度下培养 90 分钟后, 用 Sephadex G25 柱凝胶过滤反应混合物, 该柱先用 35mM 柠檬酸钠, 154mM NaCl 和 2mM EDTA 平衡。合并含抗体的流出组分, 并分析。如前所述测定抗体的修饰度。修饰抗体(HERCEPTIN®-SPP-Py)的回收率为 337mg(89.7%), 每个抗体有 4.5 个可释放的 2-硫吡啶基。

3. HERCEPTIN®-SPP-Py 与 DM1 的偶联

用前述 35mM 柠檬酸钠缓冲液(pH6.5)稀释修饰抗体(337.0mg, 9.5μmol 可释放 2-硫吡啶基)成 2.5mg/ml 最终浓度。然后在该抗体稀释液中加入 DM1(结构见图 1)(1.7 当量, 16.1μmol)以 3.0mM 二甲基乙酰胺(DMA, 在最终反应混合物中的浓度为 3%(v/v))配制的溶液。反应在氩气氛下、环境温度下进行 20 小时。HERCEPTIN®-DM1 偶联物的结构见图 2。

将反应液上样到 Sephacryl S300 凝胶过滤柱(5.0cm×90.0cm, 1.77L)上, 该柱预先用 35mM 柠檬酸钠, 154mM NaCl(pH6.5)平衡。流量为 5.0ml/min, 收集 65 份组分(每份 20.0ml)。主峰位于第 47 组分附近(图 3)。主峰含单体 HERCEPTIN®-DM1。合并第 44-51 组分并分析。通过测定 252nm 和 280nm 处的吸光度来测定每抗体分子所连接的 DM1 药物个数, 发现每个抗体分子连接 3.7 个药物分子。

实施例 3

转基因动物

为了提高 HERCEPTIN® 的临床活性, 制作了一种转基因 HER2 小鼠模型, 可用于进行新的 HER2 定向疗法的临床前试验。表达 *neu* 突变活化形式(即大鼠 HER2 的类似物)的转基因小鼠很容易形成肿瘤, 但是乳房癌过量表达的 HER2 没有发生突变, 而且, 在过量表达非突变 HER2 的转基因小鼠内, 肿瘤的形成也缓和得多(Webster 等, *癌症生物学学报* 5: 69-76(1994))。为了增强非突变 HER2 肿瘤的形成, 进一步增强了转基因小鼠内非突变 HER2 的过量表达。

在小鼠乳腺上皮细胞内促进 HER2 表达的任意启动子均可用于本发明构建物中。许多乳蛋白基因是由只在乳腺中具有活性的启动子/增强子元件转录的。乳蛋白基因包括编码酪蛋白(α -S₁ 和 β)、 β -乳球蛋白、 α -乳白蛋白和乳清酸性蛋白的基因。绵羊 β -乳球蛋白启动子在本领域内了解较充分, 且已广泛使用(Whitelaw 等, *生物化学杂志* 286: 31-39(1992))。然而, 类似的其他启动子 DNA 片段也适用。优选启动子是小鼠乳房肿瘤病毒(MMTV)长末端重复序列(LTR)衍生的启动子。本发明的一种 HER2 转基因构建物就采用了 MMTV LTR 启动子。

为了增强非突变 HER2 肿瘤的形成, 我们用上游 ATG 缺失的 HER2 cDNA 质粒来制造转基因小鼠, 该缺失是为了防止上游 ATG 密码子启动翻译, 该密码子启动翻译会降低 HER2 下游真起始密码子启动翻译的频率(见 Child 等, *生物化学杂志* 274: 24335-24341(1999))。此外, 可在 5'端增加一个嵌合内含子, 这也将提高表达水平(见 Neuberger 和 Williams, *核酸研究* 16: 6713(1988), Buchman 和 Berg, *分子细胞生物学* 8: 4395(1988); Brinster 等, *美国科学院院报* 85: 836(1988))。这一嵌合内含子衍生自 Promega 的载体, 即 pCI-neo 哺乳动物表达载体(bp890-1022)。cDNA 的 3'端侧接人生长素外显子 4 和 5, 以及聚腺苷酸化序列。而且, 选用 FVB 小鼠, 因为该品系更容易形成肿瘤。采用 MMTV-LTR 启动子来确保 HER2 在乳腺内的组织特异性表达。为了使得动物更容易形成肿瘤, 饲以 AIN 76A 饮食(Rao 等, *乳房癌研究和治疗* 45:149-158(1997))。该转基因质粒构建物的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)见图 4。

适合转基因实验的动物可从标准商业来源获得, 例如 Taconic(Germantown, N.Y.)。许多品系都适合, 但优选的是 FVB 雌鼠, 因为它们更容易形成肿瘤。用 FVB 雄鼠进行交配, 并用切除了输精管的 CD.1 种鼠激发假孕。切除了输精管的小鼠可从各供应商处获得。用假孕鼠与 FVB 小鼠或 129/BL6×FVB 的 p53 杂合小鼠交配。用 p53 等位基因杂合的小鼠来增强肿瘤形成, 但这被证明并非必需。所以, 有些 F1 肿瘤是混合品系的。建立了肿瘤的小鼠都是 FVB 品系的。获得了 6

个建立鼠，具有某些发展中的肿瘤，不生育后代。

实施例 4

以 HER2 转基因小鼠作为肿瘤模型评价 HER2-定向治疗

实施例 3 制造的转基因建立小鼠在 2 月龄左右，其乳腺组织活检根据免疫组织化学染色显示为 3+级 HER2 表达。经测定，脱落进入血清的 HER2 胞外区约为 1.2ng/ml(Huang 等, 同上)。该小鼠在在产下 4 窝仔后，约 5 月龄时发生乳房瘤。在无菌条件下手术切除该肿瘤，切取 2mm³ 的小片，植入野生型 FVB 雌小鼠的乳房脂肪层中。31 个接受移植的小鼠中 22 个发生肿瘤，潜伏期为 5 周。随着继续传代，肿瘤形成的潜伏期越来越短，生长越来越快，接受移植者中的肿瘤发病率提高至 95%以上。根据免疫组织化学染色监测，在原代肿瘤中，HER2 表达为 3+级，但不一致，在第一代之后，则变成了一致的 3+。

用 HERCEPTIN®或 4D5(获得人源化 HERCEPTIN®的原鼠抗体)治疗患肿瘤小鼠，对于肿瘤生长仅有中等抑制作用(图 5)。HERCEPTIN®或 4D5 治疗期间生长的肿瘤的 HER2 表达为 3+，这说明没有 HER2 阴性肿瘤选择性。而且，将 cy3-HERCEPTIN®注射入患肿瘤小鼠后，检测到其对肿瘤细胞的修饰，这说明无效并非因为抗体没有与肿瘤接触。

因为该肿瘤模型的持续性表达 HER2，且对 HERCEPTIN®无反应，如实施例 3 所述，用 HERCEPTIN®-类美坦素 DM1 偶联物试验了一种新的方法。图 5 显示，在该模型中，HERCEPTIN®-类美坦素 DM1 偶联物具有显著的抗肿瘤活性。RITUXAN®是一种无关的抗 CD20 单克隆抗体，在以上研究中用作阴性对照。与对照抗体 RITUXAN®比较，对 HERCEPTIN®几乎没有反应，但 HERCEPTIN®的类美坦素偶联物却具有显著的抗肿瘤活性。如图 5 所示，所有接受 HERCEPTIN®-类美坦素偶联物治疗的小鼠的肿瘤都显著缩小，虽然都没有消失。约 4 周后，肿瘤开始恢复生长。此时，杀死 5 个小鼠，发现，它们的肿瘤表达 HER2 水平为 3+。可见，对 HER2 阴性肿瘤没有选择性。根据这一发现，在其后的 5 天内用 HERCEPTIN®-类美坦素偶联物对其余 3 只小鼠进行治疗，肿瘤因而再次减退。

生物材料的保藏

以下杂交瘤细胞线已在美国典型培养物保藏中心(ATCC)(10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA)保藏:

抗体	ATCC 号	保藏日
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

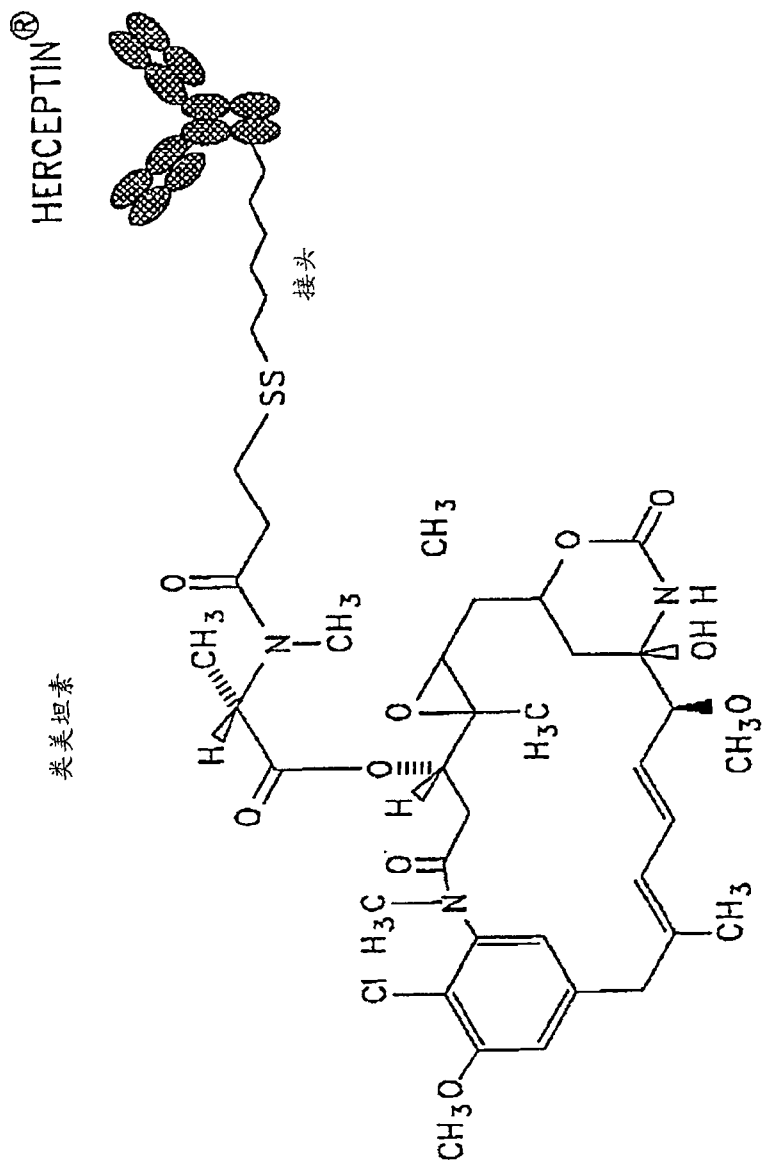
保藏根据有关用于专利程序的微生物保藏的国际认可的布达佩斯条约进行(布达佩斯条约)。以上保藏确保培养物自保藏日起30年内保持存活。ATCC根据布达佩斯相关条约,以及 Genetech, Inc.与 ATCC 之间的协议获得以上微生物,并保证自相关美国专利授权或在任一美国或国外专利申请最先公开后,培养物的后代永久地、无限制地对公众开放,并保证对美国专利商标局根据 35 USC §122 和委员会的相关规定(包括 37 CFR §1.12, 尤其是 886 OG 638)认可的主体开放。

以上保藏如正在申请欧洲专利,则在欧洲专利公知将被授权,或授权被撤回或视为撤回之日之前,保藏微生物的样品将只发放给需要样品者授权的专业人士。(EPC 规则 28(4))。

本申请的受让人同意,如果保藏物在适当的培养条件下死亡或灭失或破坏,将在收到通知后立即更换以同种培养物的活样品。不应将可以获得保藏物理解为获得许可实施本发明,这样的理解将违反各国政府根据各自专利法所授予的权利。

以上说明书已足以使本领域技术人员能够实施本发明。本发明的范围不应仅限于保藏的构建物,因为保藏的实施方式只是为了说明本发明某些方面的内容,任何与之等效的构建物都应属于本发明范围内。本发明对生物材料进行保藏并不意味着以上描述不能满足实施本发明包括最佳实施方式在内的各项内容所需,也不应将其理解成将权利要求的范围局限于具体描述所代表的内容。实际上,根据以上描述,本领域技术人员不难发现除本文所示和所述之外的修改,这些都应归入权利要求的范围内。

需要指出的是,根据本文所述,本领域一般技术人员都能够将本发明的技术运用于具体的问题或场合。本发明产品的实施例及其代表性的分离方法、用途和制造方法都不应理解为是对本发明的限定。



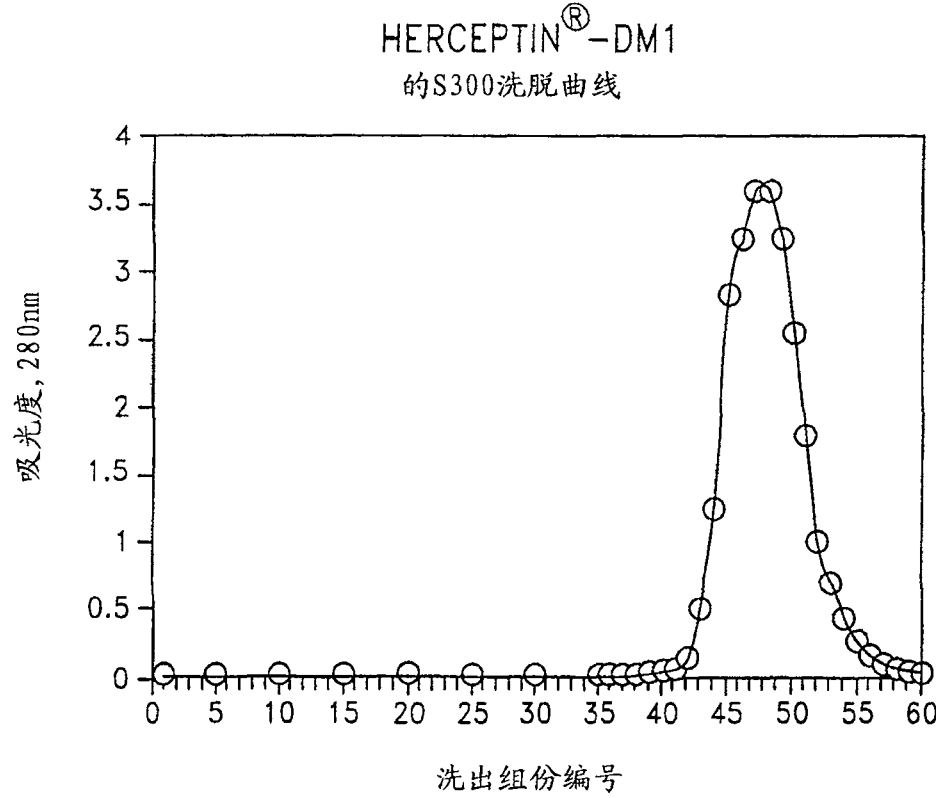


图 3

```

    hgiAI/aspHI      sau3AI      rmaI
    sau3AI            mboI/ndeII  maeI
    mboI/ndeII      dpnII      nheI
    dpnII bsp1286   dpnI cac8I tseI      fnu4HI/bsoFI
    pvuI/bspCI      mseI      nlaIII      sphI      fnu4HI/bsoFI
    mcrI      bsiHKAI      tsp509I      fnuDII/mvnI      cac8I      scfI
    bsiEI      bmyI      aseI/asnI/vspI      bstUI      bfaI      aluI      nspI      pstI
    taqI      apaLI/snoI      rcaI      bsh1236I      fnu4HI/bsoFI      cac8I
    aluI      dpnI      alw44I/snoI      bspHI      nruI      aluI      bbvI      cac8I      bsgI
    1  AAGCTCGATC GGTGCACATT AATTCAATGAT CGCGAGCTAG CAGCTTGCAAT GCCTGCAGCA GAAATGGTGT AACTCCCGAG AGTGTCTCTAC ACCTAGGGGA
    TTCGAGCTAG CCACGTGTAA TTAAGTACTA GCGCTCGATC GTCGAACGTA CGGACGTCGT CTTTACCAAC TTGAGGGCTC TCACAGGATG TGGATCCCTT
    ~ 接头1的起点
    ~ 接头1的终点
    ~ MMTV启动子的起点
    hgiJII
    bsp1286
    bmyI
    banII
    mwoI
    tseI
    fnu4HI/bsoFI
    bbvI
    101 GAAGCAGQCA AGGGGTGTGT TCCCACCAAG GACGACCCGT CTGGGCACAA ACGGATGAGC CCATCAGACA AAGACATATT CATTCTCTGC TGCAAACTTG
    CTTCGTCTGGT TCCCCAACAA AGGTGTGTTT CTGCTGGGCA GACCGGTGTT TGCCCTACTCG GGTAGTCTGT TTCTGTATAA GTAAGAGACG ACGTTTGAAC
    mwoI
    cac8I      hgiJII
    hgiAI/aspHI
    bsp1286      bmyI
    bsiHKAI      bmyI      banII      hphI      pleI      tru9I      sapi      mamI
    mwoI      aciI      mwoI      bmyI      banII      hphI      hinfi      msei      aluI      bsaBI
    aluI
    201 GCATAGCTCT GCTTTGCTGG GGCATTGGGG GAAGTTGCGG TTCTGTCTCG CAGGGCTCTC ACCCTTGACT CTTTAAATAG CTCTTCTGTG CAAGATTACA
    CGTATCGAGA CGAAACGACC CCGTAACCCC CTTCAACGCC CTTCCGAGAG GTCCCGAGAG TGGGAACCTGA GAAATATTATC GAGAAGACAC GTTCTTAATGT
```

54

```

      rmaI      styI      nlaIII      rmaI      nlaIII
      maeI      bsaJI      rsaI      maeI      rsaI
      bfaI      mnlI      csp6I      bfaI      csp6I
      aluI      mnlI      nlaIII      bsmI      bsmI
801 AAAGACTCGC CAGAGCTAGA CCTCCTTGCT GTATGTTGTC TCAAGAAGAA AAAGACGACA TGAAACAACA GGTACATGAT TATATTTATC TAGGAACAGG
      TTTCTGAGCG GTCTCGATCT GGAGGAACCA CATAACAACAG AGTTCTTCTT TTTCTGCTGT ACTTTGTTGT CCATGTACTA ATATAAATAG ATCCTTGTCC

      tspRI
      styI      alwNI
      bslI      bsmFI
      bslI bsaJI mnlI alw26I/bsmAI
901 AATGCACTTT TGGGAAAGA TTTTCCATAC CAAGGAGGGG ACAGTGGCTG GACTAATAGA ACATTATTCT GCAAAAACCTT ATGGCATGAG TTATTATGAA
      TTACGTGAAA ACCCCTTTCT AAAAGGTATG GTTCCTCCCC TGTCACCCGAC CTGATTATCT TGTAATAAGA CGTTTTTGAA TACCGTACTC AATAATACTT
      nlaIII

      tru9I      foki
      sau96I      styI      mseI      bstF5I
      haeIII/palI nlaIV      smlI      tru9I      mnlI      bsmAI
      asuI      aciI bsaJI aflII/bfrI maeIII mnlI      bsmAI
1001 TAGCCTTTAT TGGCCCAACC TTGCGGTTCC CAAGGCTTAA GTACGTTTTT GGTTACAAC TGTTCTTAAA ACGAGGATGT GAGACAAGTG CTTTGGTGAC
      ATCGGAAATA ACCGGGTGG AACGCCAAGG GTTCGGAATT CATTCAAAAA CCAATGTTTG ACAAGAATTT TGCTCCTACA CTCTGTTCAC CAAAGGACTG

      sstI
      sacI
      hgiJII
      hgiAI/aspHI
      ecl136II
      bsp1286
      bsiHKA1
      bmyI
      ddeI
      sau3AI
      mboI/ndeII
      dpnII aluI
      dpnI banII ddeI
      tsp509I
      apoI
1101 TTGCTTTGGT ATCAAAGGTT CTGATCTGAG CTCTGAGTGT TCTATTTTCC TATGTTCTTT TGAATTTAT CCAATCTTA TGTAAATGCT TATGTAACCC
      AACCAAAACCA TAGTTTCCAA GACTAGACTC GAGACTCACA AGATAAAAGG ATACAAGAAA ACCTTAAATA GGTTTAGAAT ACATTACGA ATACATTGG

```

[illegible]

[illegible]


```

                bstEII
scrFI
mvaI
ecorII
dsav
                tseI
fnu4HI/bsoFI
                tsrI sfanI
                aluI tspRI bslI bsaJI maeIII
                apyI tsp45I
                bbsKI hphI
                bstNI
                bsaJI hpaII
                mspI
                sau96I bst1107I
                bst217I
2501 CTTCAACCAC AGTGGCATCT GTGAGCTGCA CTGCCAGCC CTGGTCACCT ACAACACAGA CAGCTTTGAG TCCATGCCCA ATCCCGAGGG CCGGTATACA
GAAGTTGGTG TCACCGTAGA CACTCGACCT GACGGGTCGG GACCACTGGA TGTGTGTCT GTGCAAACTC AGGTACGGGT TAGGGCTCCC GGCATATGT
258 F N H S G I C E L H C P A L V T Y N T D T F E S M P N P E G R Y T

                cac8I
hinPI
hhaI/cfoI
nlaIV
nari
kasi
hinII/acyI
hgiCI
haeII aluI ahdI/eam1105I
ehel pvuII tsp45I
bani mspAII/nspBII
ahaII/bsaHI maeIII bsmFI
2601 TTCGGCGCA GCTGTGTGAC TGCCTGTCCC TACAACCTACC TTTCTACGGA CTTGGGATCC TGCACCCCTCG TCTGCCCCCT GCACAACCAA GAGGTGACAG
AAGCCGGGGT CGACACACTG ACGACACAGG ATGTTGATGG AAAGATGCCT GCACCTAGG ACGTGGGAGC AGACGGGGA CGTGTGGTT CTCCACTCTC
291 F G A S C V T A C P Y N Y L S T D V G S C T L V C P L H N Q E V T A

                hgiAI/aspHI
bspi286
bsiHKAII
bmyI
                hphI
                mnlI mnlI maeIII
                bsrI
2701 CAGAGGATGG AACACAGCGG TGTGAGAAGT GCAGCAAGCC CTGTGCCCGA GTGTGCTATG GTCTGGGCAT GGAGCACTTG CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC
GTCTCCTACC TTGTGTGCGC ACACTCTTCA CGTCGTTCGG GACACGGGCT CACACGATAC CAGACCGGTA CCTCGTGAAC GCTCTCCACT CCCGTCAATG
325 E D G T Q R C E K C S K P C A R V C Y G L G M E H L R E V R A V T

```

```

2801 CAGTGGCAAT ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAGATC TTTGGAGCC TGGCATTCT TGGGAGAGC TTTGATGGG ACCGAGCCTC CAACACTGCC
GTCACGGTTA TAGTCTCTCA AACGACCGAC GTTCTTCTAG AAACCTCTCG ACCGTAAGA CGGCTCTCG AAACCTAGCC TGGTCCGAG GTTGTGACGG
358 S A N I Q E F A G C K K I F G S L A F L P E S F D G D P A S N T A

tspRI      xcmI      sau3AI      scrFI      sau96I
bsrBI      scrFI      mboI/ndelI  mvaI      nlaIV
aciI      mvaI      dpnII      mvaI      avaII
ccgctccagg cagagcagct ccaagtgttt gagactctgg aagagatcac aggttaccta tacatctcag catggcggga cagcctgcct gacctcagcg
ggcgaggctg gtctcgctga ggttcacaaa ctctgagacc ttctctagtg tccaatggat atgtagagtc gtaccggcct gtcggacgga ctggagtcgc
391 ? L Q P E Q L Q V F E T L E E I T G Y L Y I S A W P D S L P D L S V

bpmI/qsuI      aluI      mspI      hpaII      haeIII/palI      ddeI      bpuAI
tseI      fnu4HI/bsaFI      pleI      hinFI      mboII      dpnI      maeIII      ddeI      nlaIII      cac8I      drdI      hgaI
fnu4HI/bsaFI      bsmAI      earI/ksp632I      bstEII      TACATCTCAG CATGGCAGG CAGCCTGCCT GACCTCAGCG
mwoI      bbvI      bsmAI      earI/ksp632I      bstEII      TACATCTCAG CATGGCAGG CAGCCTGCCT GACCTCAGCG
GGCGAGGCTG GTCTCGTCTGA GGTTCACAAA CTCTGAGACC TTCTCTAGTG TCCAATGGAT ATGTAGAGTC GTACCGGCT GTCCGACGGA CTGGAGTCGC
391 ? L Q P E Q L Q V F E T L E E I T G Y L Y I S A W P D S L P D L S V

alwNI      alw26I/bsaMI      hinPI      hhaI/cfoI      nlaIV      nari      kasi      hinII/acyI      hgiCI      haeII      dsp509I      ecoRI      apoI      ahaII/bsaHI      mwoI      bsII      mspAII/bspMI      fnu4HI/bsaFI      bbvI      tspRI
mboII      bspMI      TCTTCCAGAA CCTGCAAGTA ATCCGGGGGAC GAATTCGTGA CAATGGGCC TACTCGCTGA CCCTGCAAGG GCTGGGCATC AGCTGGCTGG GGCTGCGCTC
AGAAGGTCTT GGACGTTTCAT TAGGCCCCCTG CTTAAGACGT GTTACCGCGG ATGAGCGACT GGACGTTCC CGACCGTAG TCGACCGACC CCGACGCGAG
425 F Q N L Q V I R G R I L H N G A Y S L T L Q G L G I S W L G L R S

```

[illegible]

[illegible]

```

sciFI      mval      ecorII      dsav      bstNI      bssKI      apyI
sau96I      avaII      foki      asuI      bstF5I      mslI
3601 AGCCTTGCCC CATCAACTGC ACCACTCCT GTGTGGACCT GGATGACAAG GGCTGCCCCG CCGAGCAGAG AGCAGGCCCT CTGACGTCCA TCGTCTCTGC
TCGGACGGG GTAGTTGACG TGGGTGAGGA CACACCTGGA CCTACTGTTC CCGACGGGC GGCTCGTCTC TCGTCTGGA GACTGCAAGT AGCAGAGAG
625 P C P I N C T H S C V D L D D K G C P A E Q R A S P L T S I V S A

tail      maelI      esp3I
hinII/acyI bsmAI
ahaiI/bsaHI
cac8I mnlI aatII bsmBI acII
3701 GGTGGTTGGC ATTCTGCTGG TCGTGGTCTT GGGGGTGGTC TTGGGATCC TCATCAAGG ACCGCAGCAG AGATCCCGA AGTACACGAT CCGGAGACTG
CCACCAACCG TAAGACGACC AGCACAGAA CCCCACAGAA AACCCTAGG AGTAGTTCCG TGGCGTCGTC TTCTAGGCCT TCATGTGCTA CGCCTCTGAC
658 V V G I L L V V V L G V V F G I L I K R R Q Q K I R K Y T M R R L

mspi      mroI      bspMI      bspEI      bsaWI      sau3AI      mboI/ndeII      dpnII      dpnI      alwI
mnlI      sau3AI      mboI/ndeII      mamI      dpnII      dpnI      bsaBI      alwI      nlaIV      bstYI/xhoII      bamHI      alwI
tseI      fnu4HI/bsoFI      hpaII      rsal      mwoI      bbvI      mboII      accII      csp6I      sfaNI      bsmAI      bbvI
3701 GGTGGTTGGC ATTCTGCTGG TCGTGGTCTT GGGGGTGGTC TTGGGATCC TCATCAAGG ACCGCAGCAG AGATCCCGA AGTACACGAT CCGGAGACTG
CCACCAACCG TAAGACGACC AGCACAGAA CCCCACAGAA AACCCTAGG AGTAGTTCCG TGGCGTCGTC TTCTAGGCCT TCATGTGCTA CGCCTCTGAC
658 V V G I L L V V V L G V V F G I L I K R R Q Q K I R K Y T M R R L

```

```

sau3AI          hinPI          sau3AI          mboI/ndelI
mboI/ndelI      hhaI/cfoI      dpnII
scrFI           mvaI           bstYI/xhoII
nlaIV           bsmHI
ecoRII          dsav          acII
bstNI           sfaNI dpnI      esp3I      mnlI
bssKI           mamI alwI      bsmBI      ddelI
apyI           bsaBI alwI      bsmAI      aluI      hphI
sfaNI          CAACCATGCC GAGCGATGCC CAACCATGCC TCGTGAAGA GACGGAGCTG AGGAAGGTGA
3801 CTGCAGGAAA CGGAGCTGGT GGAGCCGCTG ACACCTAGCG GAGCGATGCC CAACCATGCC TCGTGAAGA GACGGAGCTG AGGAAGGTGA
GACGTCCTTT GCCTCGACCA CCTCGGCGAC TGTGGATGCC CTCGCTACGG GTTGTCCGC GTCTACGCT AGGACTTCT CTGCTCGAC TCCTTCCACT
691 L Q E T E L V E P L T P S G A M P N Q A Q M R I L K E T E L R K V R

          bslI
          sau3AI
          mboI/ndelI
          dpnII
          dpnI
          alwI
          nlaIV
          bstYI/xhoII
          bamHI
          sfaNI alwI
          accI
          alwI haeII
          sau3AI mwoI
          mboI/ndelI
          dpnII hinPI
          dpnI hhaI/cfoI
          bstYI/xhoII
          alwI haeII
          accI
          3901 AGGTGCTGG ATCTGGCGCT TTGGCACAG TCTACAGGG CATCTGGATC CCTGATGGGG AGAATGTGAA AATCCAGTG GCCATCAAAG TGTTGAGGGA
          TCCACGAACC TAGACCGCGA AAACCGTGTC AGATGTTCCC GTAGACCTAG GGACTACCCC TCITACACTT TTAAGGTCAC CGGTAGTTTC ACAACTCCCT
          725 V L G S G A F G T V Y K G I W I P D G E N V K I P V A I K V L R E

          nlaIV          mwoI
          hgiII
          bsp1286
          bmyI
          banII ndelI bsmAI bglI      sfaNI
          tail          maeII
          bsaAI
          ddelI
          4001 AAACACATCC CCCAAGCCA ACAAGAAAT CTTAGACGAA GCATACGTA TGGCTGGTGT GGGCTCCCCA TAGTCTCCC GCCTTCTGG CATCTGCCCTG
          TTTGTGTAGG GGGTTTCGGT TGTCTCTTTA GAATCTGCTT CGTATGCACT ACCGACCACA CCCAGGGGT ATACAGAGGG CGGAAGACCC GTAGACGGAC
          758 N T S P K A N K E I L D E A Y V M A G V G S P Y V S R L L G I C L

```

[illegible]

mspI	haeIII/palI
hpaII	sau96I
naeI/ngoMI	asuI
cfr10I/bsrFI	bslI
cac8I	bslI
pleI	bslI
hinFI	bslI
bpmI/gsuI	bslI
aciI	bslI
aciI hphI	bslI
mslI	bslI
4401 CTGGAGTCCA TTCTCGGCGG GCGGTTCCACC CACCAGAGTG ATGTGTGGAG TTATGGTGTG ACTGTGTGGG AGCTGATGAC TTTTGGGGCC AAACCTTACG	bslI
GACCTCAGGT AAGAGGCGG CGCCAAAGTGG GTGGTCTCAC TACACACCTC AATACCACAC TGACACACCC TCGACTACTG AAAACCCCGG TTTGGAATGC	bslI
891 L E S I L R R R R F T H Q S D V W S Y G V T V W E L M T F G A K P Y D	bslI
scrFI	bslI
nciI	bslI
mspI	bslI
hpaII	bslI
dsav	bslI
cauII	bslI
bssKI	bslI
xmaI/pspAI	bslI
bslI smaI	bslI
sau3AI scrFI	bslI
mboI/ndeII	bslI
dpnII	bslI
nciI	bslI
dsav	bslI
sau3AI	bslI
dpnI	bslI
cauII	bslI
mboI/ndeII	bslI
alaIV	bslI
bssKI	bslI
dpnII	bslI
bstYI/xhoII	bslI
dpnI	bslI
bamHI	bslI
bsaUI	bslI
alwI	bslI
avaI	bslI
bstYI/xhoII	bslI
4501 ATGGGATCCC AGCCCCGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA GGGGGAGCGG CTGCCCCCAGC CCCCCTCGCC GACGGGGTGC GTGGTACTA CAGATGACT AGTACCACTT	bslI
TACCCCTAGGG TCGGGGCCCTC TAGGACTGCG ACACCTTTT CCCCCTCGCC GACGGGGTGC GTGGTACTA CAGATGACT AGTACCACTT	bslI
925 G I P A R E I P D L L E K G E R L P Q P P I C T I D V Y M I M V K	bslI

```

sau96I
sauDI
scrFI
mvaI nlaIV
ecorII
dsav avall
bstNi
bssKI
bsaJI
apyI asuI
haeIII/palI
mscI/balI
haeI ppuMI hhaI/cfoI hinPI
haeI nlaIV haeII bslI
tsp509I eaeI nlaIII eeo0109I/draII foki
ecorI apoI acil cfri bsmFI afeI/eco47III bstF5I
CTGAATTCTC CCGCATGGCC AGGGACCCCC AGCGCTTTGT GGTCAATCCAG
460: ATGTTGGATG ATTGACTCTG AATGTCGGCC AAGATTCCGG GAGTTGGTGT CTGAATTCTC
TACAACCTAC TAACTGAGAC TTACAGCCGG TTCTAAGGCC CTCARCCACA GACTTAAGAG GCGTACCGG TCCCTGGGG TCGCGAAACA CCAGTAGGTC
958 C W M I D S E C R P R F R E L V S E F S R M A R D P Q R F V I Q

haeIII/palI
eaeI tfilI
cfri hinfi
AAGATTCCGG GAGTTGGTGT CTGAATTCTC CCGCATGGCC AGGGACCCCC AGCGCTTTGT GGTCAATCCAG
460: ATGTTGGATG ATTGACTCTG AATGTCGGCC AAGATTCCGG GAGTTGGTGT CTGAATTCTC
TACAACCTAC TAACTGAGAC TTACAGCCGG TTCTAAGGCC CTCARCCACA GACTTAAGAG GCGTACCGG TCCCTGGGG TCGCGAAACA CCAGTAGGTC
958 C W M I D S E C R P R F R E L V S E F S R M A R D P Q R F V I Q

sau96I
haeIII/palI
asuI
sau96I
pspOMI/bsp120I
nlaIV
hgiJII
bsp1286
bmyI
banII
asuI bsmFI
bstXI styI
apaI bsri bsaJI
mnli
mnli AATGAGGACT TGGGCCGAGC CAGTCCCTTG GACAGCACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGGACCT GGTGGATGCT GAGGAGTATC
TTACTCCTGA ACCCGGGTGG GTCAGGGAAC CTGTCGTGGA AGATGGCGAG TGACGACCTC CTGCTACTGT ACCCCCTGGA CCACCTACGA CTCCTCATAG
99: N E D L G P A S P L D S T F Y R S L L E D D M G D L V D A E E Y L

scrFI
mvaI
ecorII
dsav
bstNI
bssKI
apyI
sexAI
sau96I
avall
ppuMI
nlaIV sfaNIU
eco0109I/draII mnli
bsmFI foki ddel
bstF5I bseRI
nlaIII asuI
GGTGGGACCT GGTGGATGCT GAGGAGTATC
470: AATGAGGACT TGGGCCGAGC CAGTCCCTTG GACAGCACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGGACCT GGTGGATGCT GAGGAGTATC
TTACTCCTGA ACCCGGGTGG GTCAGGGAAC CTGTCGTGGA AGATGGCGAG TGACGACCTC CTGCTACTGT ACCCCCTGGA CCACCTACGA CTCCTCATAG
99: N E D L G P A S P L D S T F Y R S L L E D D M G D L V D A E E Y L

```

70

sau96I
 nlaIV
 avall
 asuI
 rsaI
 csp6I
 mnlI
 rsaI
 csp6I
 scfI acII
 tspRI ppuMI
 mnlI mspall/nspBII
 eco0109I/draII
 ddel
 mnlI bsaMI
 6001 GGAATGGGG CAGCCAAAGG GCTGCCAAGC CTCCCAACAC ATGACCCACAG
 CCTCTACAG CGGTACAGT AGACCCAC AGTACCCCTG CCTCTGAGA
 CCTTACCCC GTCGGTCCC CGAGTTTCG GAGGGGTG TACTGGGTC
 GGGAGATGTC GCCATGTCAC TCCTGGGTG TCATGGGAC GAGAGACTCT
 1091 G M G A A K G L Q S L P T H D P S P L Q R Y S E D P T V P L P S E T
 sau96I
 haeIII/palI
 asuI
 sau96I
 pspOMI/bsp120I
 nlaIV
 hgiII
 eco0109I/draII
 bsp1286
 bmyI
 banII
 asuI
 apaI
 sau96I
 nlaIV
 haeIII/palI
 asuI mwoI
 avall
 bslI mnlI
 5101 CTGATGGCTA CGTTGCCCC CTGACCTGCA GCCCCCRGCC TGBATATGT AACACGCCAG ATGTTGGCC CCAGCCCCCT TCGCCCCGAG AGGGCCCTCT
 GACTACCGAT GCAACGGGG GACTGGACGT CGGGGTGCG ACTATACAC TTGTGCGTGC TACAAGCCGG GTCTGGGGA AGCGGGGCTC TCCGGGAGA
 1125 D G Y V A P L T C S P Q P E Y V N Q P D V R P Q P P S P R E G P L
 scrFI
 mvaI
 ecoRII
 dsav
 bstNI
 bssKI
 bsaJI
 apyI
 bsaJI mboII
 haeIII/palI
 sau96I pleI
 asuI hinfI
 5201 cac8I mwoI bspMI banI
 GCCTGCTGCC CGACCTGCTG GTGCCACTCT GGAAGGSCC AGACTCTCT CCCACGGGA GAATGGGTC GTCAAGACG TTTTGGCTT TGGGGGTGCC
 CGGACGACGG GCTGGACGAC CACGGTGAGA CCTTCCCGG TTCTGAGAGA GGGGTCCCTT CTACCCCGAG CAGTTTCTGC AAAACGGAA ACCCCACGG
 1158 P A A R P A G A T L E R A K T L S P G K N G V V K D V F A F G G A
 dsal
 bsaJI
 nlaIV
 hgiCI
 banI
 5201
 1158

scrFI
 mvaI
 ecoRII
 dsav
 bstNI
 bssKI
 bsaJI
 rsal
 csp6I
 avaI scaI
 5301 GTGGAGAACC CCGAGTACTT GACACCCCAG GGAGGAGCTG CCCCTCAGCC CCACTCTCCT CTGCTCTTCA GCCCAGCCTT CGACAACCTC TATTACTGGG
 CACCTCTTGG GGCTCATGAA CTGTGGGGTC CTCCTCTCGAC GGGGAGTCGG GGTGGGAGGA GGACGGAGT CGGGTCGGAA GCTGTTGGAG ATAATGACCC
 1191 V E N P E Y L T P Q G G A A P Q P H P P P A F S P A F D N L Y Y W D
 sau96I
 nlaIV
 avaII
 asuI
 ppmI
 eco0109I/draII
 scrFI
 mvaI
 ecoRII
 dsav
 bstNI
 bssKI
 apyI
 bsrBI
 bslI acII
 5401 ACCAGGACCC ACCAGAGCGG GGGGTCCAC CCAGCACCTT CAAGGGACA CTTACGGCAG AGAACCAGA GTACCTGGT CTGCACGTC CAGTGTGAAC
 TGGTCTGGG TGGTCTGGC CCCCAGAGT GGTGCTGAA GTTTCCTGT TCTTGGTCT CATGGACCA GACCTGCAG GTCACACTG
 1225 Q D P P E R G A P P S T F K G T P T A E N P E Y L G L D V P V O
 sau96I
 avaII
 asuI
 nlaIV
 bsmFI
 rsal
 csp6I
 5401 ACCAGGACCC ACCAGAGCGG GGGGTCCAC CCAGCACCTT CAAGGGACA CTTACGGCAG AGAACCAGA GTACCTGGT CTGCACGTC CAGTGTGAAC
 TGGTCTGGG TGGTCTGGC CCCCAGAGT GGTGCTGAA GTTTCCTGT TCTTGGTCT CATGGACCA GACCTGCAG GTCACACTG
 1225 Q D P P E R G A P P S T F K G T P T A E N P E Y L G L D V P V O

rmaI
 maeI
 styI
 bsaJI
 blnI
 avrII
 haeIII/pal
 stuI
 haeI
 mnlI bfaI
 mnlI bfaI
 TTTGGAGGCC
 AAACCTCCGG

mnlI aluI
 haeIII/pali
 mnlI
 fnu4HI/bsOFI
 acII ddeI
 GCGGCCCTCT GAGCTATATCC AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC
 CCATCATCAC TCCTCCGAAA

sau96I
 sau96I
 pspOMI/bsp120I
 nlaIV
 hgiJII
 thai haeIII/pali
 fnuDII/mvnl
 sacII/sstII
 mspAII/nspBII
 kspI bsp1286
 dsaI bmyI
 bsaJI asuI
 fnu4HI/bsOFI
 haeIII/pali
 mcrI banII
 eagi/smaII/ecIXI
 eaeI cac8I
 cfrI acII
 bsiEI asuI
 notI bstUI
 fnu4HI/bsOFI
 acII bsh1236I
 mnlI drdI maeI bslI
 CCTCTGACAG CAACGTCTAT GACCTCCTAA
 GGAGACTGTC GTTGAGATA CTGGAGGATT
 ^ hgh外显子4 (cal/nar) 的起点

xhoI
 smlI
 pleI
 taqI taqI
 salI paeR7I
 clai/bsp106 hinfI rsaI maeI notI bstUI
 aluI bspDI hincII/hindII csp6I bfaI acII bsh1236I
 hindIII taqI accI auaI scaI xbaI bsrBI acII apaI
 TAGGCTTTTG CAAAAGCTT ATCGATACCG TCGACTGCGAG AGTACTTCTA GAGCGGCCGC GGGCCCCATCG CCTCTGACAG CAACGTCTAT GACCTCCTAA
 ATCCGAAAAC GTTTTCGAA TAGCTATGGC AGCTGAGTGC TCATGAAGAT CTGCGCGGCG CCCGGGTGAGC GGAGACTGTC GTTGAGATA CTGGAGGATT
 ^ HER2 xba-hindIII的BS插入片段的起点
 ^ xhoI处来自BS的人HER2插入片段的终点
 ^TG PCR 5'引物

mspI
hpaII
scrFI
ncII
dsav
cauII
bssKI
bsII
tseI
bsII
fnu4HI/bsoFI
mnlI
mboII
bsaJI
bsrI
bglII
scfI
taqI

rmal
maeI
bfal
sau96I
avaII
asuI
ppuMI
eco0109I/draII
sfaNI
TCC

5701
AGGACCTAGA
GGAAGGCATC
CAAACGCTGA
TGGGGAGGCT
GGAGATGGC
AGCCCCCGGA
CTGGGCAGAT
CTTCAAGCAG
ACCTACAGCA
AGTTCGACAC

5801
AAACTCACAC
AACGATGACG
CACTACTCAA
GTGCTCTACT
GCTTCAGGAA
GGACATGGAC
AAGGTCGAGA
CATTCTGCG
CATCGTGCAG

TTGAGTGTG
TTGCTACTGC
GTGATGAGTT
CTTGATGCCC
GACGAGATGA
CGAAGTCCTT
CCTGTACCTG
TTCCAGCTCT
GTAAGGACGC
GTAGCACGTC

mboII
sau3AI
mboI/ndeII
dpnII
dpnI
bstYI/xhoII
bsgII
scfI
taqI

^外显子4的终点/外显子5的起点

bslI
sau96I
haeIII/palI
asuI
sau96I
pspOMI/bsp120I
nlaIV
hgiJII
bsp1286
bmyI
banII
asuI
cac8I
haeIII/palI
sau96I
eco0109I/draII
nlaIV
eco0109/draII bpuAI
eco0109/draII bbsI
GGGCCCCAAG TTGGGAAGAC AACCTGTAGG GCCTGCGGG scfI asuI acII
CCCCGGGTTCC AACCCCTTCTG TTGGACATCC CGGACGCCCC AGATAAGCCC TTGGTTCGAC CTCACGTCAC CGTGTAGAA CCGAGTGACG TTAGAGGCGG

bslI
mboII
bpuAI
bbsI
scfI
asuI
acII
tspRI
mwoI
bslI
acII
GGCTCACTGC AATCTCCGCC
CGAGTGACG TTAGAGGCGG

sphI
nspHI
nspI
scrFI
mval
ecoRII
dsav
nlaIII
celII/espI
bstNI
ppul0I
bstNI
bssKI
nsII/avaII
blpI/bpul102I
tfII
apyI
nlaIII
bssKI
aluI
cac8I
apyI
ddeI
tsp509I
bsmBI
bsmAI
TGGTAGAGAC
AACACAAAAA
ACCATCTCTG

scrFI
mval
ecoRII
dsav
bstNI
bssKI
bsaJI
apyI
tcctGGGTTCC AAGCGATTCT CCTGCCTCAG CCTCCCCGAGT TGTGGGATT TGTGGGATC ATGACCGATC TCAGCTAATT TTTGTTTTTT TGGTAGAGAC
AGGACCCCAAG TTCGCTAAGA GGACGGAGTC GGAGGGCTCA ACAACCCCTAA GGTCCGCTACG TACTGTGTCG AGTCGATTAA AAACAAAAA
ACCATCTCTG

scrFI
 mvaI
 ecoRII
 ecoRII
 dsav
 bstNI
 bssKI
 apyI
 haeIII/pali
 msci/bali
 haeI
 eaeI
 cfrI
 hphI
 ggggtttcac
 ccatattggcc
 agcttggtt
 ccaactccta
 atctcaggtg
 atctaccac
 cttggcctcc
 caaatgctg
 ggattacagg
 cgtgaaccac
 ccccaaaagt
 gtataacgg
 tccgaccaga
 ggttgaggat
 tagagtccac
 tagatgggtg
 gaaccggagg
 gtttaacgac
 cctaattgtc
 gcaactgttg
 tsprI
 mspI
 cfr10I/bsrFI
 bsaWI
 styI sau96I hpaII
 ncoI haeIII/pali
 dsal asuI ageI
 bsaJI pflMI
 bspMI nlaIII bslI
 bsmFI
 hgiAI/aspHI
 sau3AI
 mboI/ndeII
 tru9I
 dpnII bspI286
 dpnI bsiHKAI
 tsp509I
 pvuI/bspCI
 msel nlaIII
 mcrI bmyI aseI/asnI/vspI
 bsiEI apaII/snoI
 rcal apoI
 tsp509I
 alw44I/snoI
 bspHI
 tsp509I
 gaattacgat
 cgggtgcacat
 taattcatga
 aattcgtaat
 ctttaattgcta
 gccacgtgta
 attaagtact
 ttaagcatga
 ^接头2的起
 ^接头2的终
 6301
 6401
 6501

[illegible]

80

```

truuI      nlaIV
tsp509I    hgiCI
truuI      mnlI
msei       tsuRI bani ddel
ahaIII/draI  msei tsuRI bani ddel
7701 CTTTAAAT AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG
GAAATTTAA TTTTACTTC AAAATTTAGT TAGATTTTCAT ATATATCTCAT TTGAACCCAGA CTGTCAATGG TTACGAATTA GTCACTCCGT GGATAGAGTC

sau3AI     bsrI tseI
mboI/ndeII sau96I fnu4HI/bsoFI
dpmI       nlaIV bbvI
dpmI       haeIII/palI
7801 CGATCTGTCT ATTTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACTACGA TAGCGGAGGG CTTACCATCT GCCCCAGTG CTGCAATGAT
GCTAGACAGA TAAAGCAAGT AGGTATCAAC GGACTGAGGG GCAGCACATC TATTGATGCT ATGCCCTCCC GAATGGTAGA CCGGGGTCAC GACGTTACTA

bsmAI
bsai
thai
fnuDI/mbnI mspi bpmI/gsuI mspi
bstOI       hpaiI haeIII/palI sau96I foki
bsh1236I    cfr10I/bsrFI bgli sau96I hinPI avaiI mnlI
aciI        hphi nlaIV cac8I hpaiI asuI hhai/cfoI asuI aciI bstF5I
7901 ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACAGC CAGCCGGAAG GCGCGAGGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC
TGGCGCTCTG GGTGGGAGTG GCCGAGGTCT AATAGTCTGT TATTGGTGG GTCCGCTTC CCGGCTCGCG TCTTACCAG GACGTTGAAA TAGCGGGAGG

scrFI
ncil
mspi
hpaiI
tsp509I    dsav rmai tsel mslI
truuI      caulI maelI fnu4HI/bsoFI
msei       bssKI bfaI bsrI mwoI bbvI bsrDI cac8I tsu45I
bsrI       asel/asnI/vspI aluI avilI/fspi mwoI bbvI sfaNI maelII
8001 ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTG CGCACGTTG TTGCCATTGC TGCTGGCATC GTGGTGTAC
TAGGTACAGAT AATAACACAC GGCCCTTCGA TCTCATTCAT CAAGCGGTCA ATTATCAAC GCGTTGCAAC AACGGTAACG ACGACCGTAG CACCACAGTG

```

sau3AI
 mboI/ndeII
 dpnII
 dpnI
 sau96I
 avaiI
 asuI
 8101 GCTCGTCGTT TGGTATGGCT TCATTTCAGT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG
 CGAGCAGCAA ACCATACCGA AGTAAGTCGA GGCCAAGGGT TGCTAGTTCC GCTCAATGTA CTAGGGGTA CAACACGTTT TTTCGCCAAT CGAGGAAGCC
 sau3AI
 mboI/ndeII
 dpnII
 dpnI
 sau96I
 avaiI
 asuI
 8201 TCCTCCGATC GTTGTGAGAA GTAGTTGGC CGCAGTGTGA TCACGTATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC
 AGGAGGCTAG CAACAGTCTT CATTCAACCG CGGTCACAAT AGTAGTACC AATACCGTCG TGACGTATTA AGAGATGAC AGTACGGTAG GCATTCTACG
 sau3AI
 mboI/ndeII
 dpnII
 dpnI
 sau96I
 avaiI
 asuI
 8301 TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGGGACCG AGTTGCTCTT GCCGGGGTTC ATCAGGGGAT AATACCGGCG
 AAAAGACACT GACCACACTCAT GAGTTGGTTC AGTAAGACTC TTATCACATA CGCGGCTGGC TCAACAGAA CGGGCGCGCAG TAGTGCCCTA TTATGGGCGG
 sau3AI
 mboI/ndeII
 dpnII
 dpnI
 sau96I
 avaiI
 asuI
 8401 CACATAGCAG AACTTTAAAG GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC
 GTGTATCGTC TTGAAATTTT CACGAGTAGT AACCTTTTGC AAGAAGCCCC GCTTTTGTAGA GTTCTAGAA TGGCGACAAC TCTAGGTCAA GCTACATTGG

hgiAI/aspHI
 bsp1286
 bsiHKA1
 bmyI
 apaLI/snoI
 alw44I/snoI
 bssSI
 8501 CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTACAGCATC TTTTACTTTT ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAA GGAATAAGG
 GTGACACCGT GGGTTGACTA GAAGTCGTAG AAAATGAAAG TGGTCGAAA GACCCACTCG TTTTGTGCTT TCCGTTTTAC GCGGTTTTT CCGTTATTC
 acil
 fnu4HI/bscFI
 nlaIII
 rcaI bciVI
 bspHI acil
 bsmAI bsrBI
 8601 GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTAT CAGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA
 CGCTGTGCCT TTACAACCTA TGAGTATGAG AAGGAAAAG TTATAATAAC TTGGTAATA GTCCCAATAA CAGAGTACTC GCCTATGTAT AACTTACAT
 mslI
 mboII
 earI/ksp632I sspI
 hinPI
 thal
 fnuDII/mvni
 bstUI
 bsh1236I
 acil
 nnaIV hhaI/cfoI
 8701 TTTAGAAA TAAACAATA GGGTTCCGC GCACATTCC CCGAAAAGTG CCACCTGAGC TCTAAGAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAA
 AAATCTTTT ATTTGTTTAT CCCCAGGCG CGGTAAAGG GGCTTTTCAC GGTCGACTGC AGATTCTTTG GTAATAATAG TACTGTAAAT GGATATTTT
 tail
 maeII
 hinII/acyI
 ahaII/bsaHI
 aatII ddeI
 nlaIII
 rcaI tru9I
 bspHI mseI
 8801 TAGCGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTTTTCA AGAATACTGC CTGCGCGGTT TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
 ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGACG GAGCGCGGCA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACGTCGAGGG CCTCTGCCAG
 mspI
 scrFI
 nciI esp3I
 dsav bsmBI
 tseI cauII
 fnu4HI/bscFI
 nlaIII bssKI
 nspHI aluI hpaII
 nspI bbvI bslI bsmAI maeIII
 8801 TAGCGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTTTTCA AGAATACTGC CTGCGCGGTT TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
 ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGACG GAGCGCGGCA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACGTCGAGGG CCTCTGCCAG
 sau96I mboII
 haeIII/palI
 eco0109I/draII
 mnlI bpuAI
 bssSI asuI bbsI
 mnlI hhaI/cfoI hphI
 thal
 fnuDII/mvni
 bsh1236I
 hinPI
 thal
 fnuDII/mvni
 bstUI
 bsh1236I
 mnlI hhaI/cfoI hphI
 hphI mnlI
 nspI bbvI bslI bsmAI maeIII
 8801 TAGCGGTATC ACGAGGCCCT TTGCTTTTCA AGAATACTGC CTGCGCGGTT TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
 ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGACG GAGCGCGGCA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACGTCGAGGG CCTCTGCCAG

```

scrFI
nciI
mspi
hpaII
dsav
    sfaNI
fokI cauII
bstF5I
    aluI
        aciI bssKI ddrI
            hhaI/cfoI
                hinPI mspAII/nspBII
                    bsh1236I
                        bstUI aciI
                            fnuDII/mvnI
                                thaI
                                    hgaI
8901 ACAGCTTGTC TGTAAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTGAGGGCGC GTTGGCGGGT GTCGGGGCGC AGCCATGACC CAGTCACGTA
TGTGGAACAG ACATTGCCT ACGGCCCTCG TCTGTTCTGG CAGTCCCGCG CAGTCCCGCA CAACCGCCCA CAGCCCCGCG TCGGTACTGG GTCAGTGCCAT

    mwol
        bstAPI
            hgiAI/aspHI
                bsp1286
                    bsiHKAI
                        bmyI ndeI
                            ddeI
                                rsaI
                                    fnu4HI/bsoFI
                                        tru9I
                                            mwol
                                                aciI
                                                    mseI
                                                        actATGGCTTA ACTATGGCGC ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA
9001 GCCATAGCGG AGTTGGCTTA ACTATGGCGC ATCAGAGCAG ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA
CGCTATCGCC TCAACCGAAT TGATACGCCG TAGTCTCGTC TAACATGACT CTCACGTGGT ATACGCCACA CTTATGGCG TGTCTACGCA TTCCTCTTTT

    mwol
        hinPI
            hhaI/cfoI
                nlaIV
                    narI
                        kasI
                            hinII/acyI
                                hgiCI
                                    haeII
                                        sfaNI
                                            mwol
                                                bglI
                                                    aciI
                                                        ahaII/bsaHI
                                                            taccGCATCA GCGCCATTG GCCATTGAG CGGTAAGTCC GATGCGTTGA CAACCCCTTC CGCTAGCCAC GCGCGGAGAA GCGATAATGC GGTGACCGC TTCCCCCCTA
9101 TACCGCATCA GCGCCATTG GCCATTGAG CGGTAAGTCC GATGCGTTGA CAACCCCTTC CGCTAGCCAC GCGCGGAGAA GCGATAATGC GGTGACCGC TTCCCCCCTA
ATGGCGTAGT CCGCGGTAAG CGGTAAGTCC GATGCGTTGA CAACCCCTTC CGCTAGCCAC GCGCGGAGAA GCGATAATGC GGTGACCGC TTCCCCCCTA

```

```
scrFI      tspRI
mvaI       bsrI
ecorII     haeIII/palI
dsav       eaeI
bstNI      cfrI
bssKI      tail
bsaJI      tsp45I
apyI       maeIII
           bsrI      maeII
           maeIII
           bsrI      maeII
           CAGGTTTTC CAGTCACGA CGTTGTAAAA CGACGGCCAG TGCC
           GTGCTGCAAG GCGATTAAAGT TGGGTAAACG CAGGTTTTC CAGTCACGA CGTTGTAAAA CGACGGCCAG TGCC
           CACGACGTTT CGCTAATTCA ACCATTGCT GTCCCAAAG GGTCAAGTGT GCAACATTTT GCTGCCGGTC ACGG
```

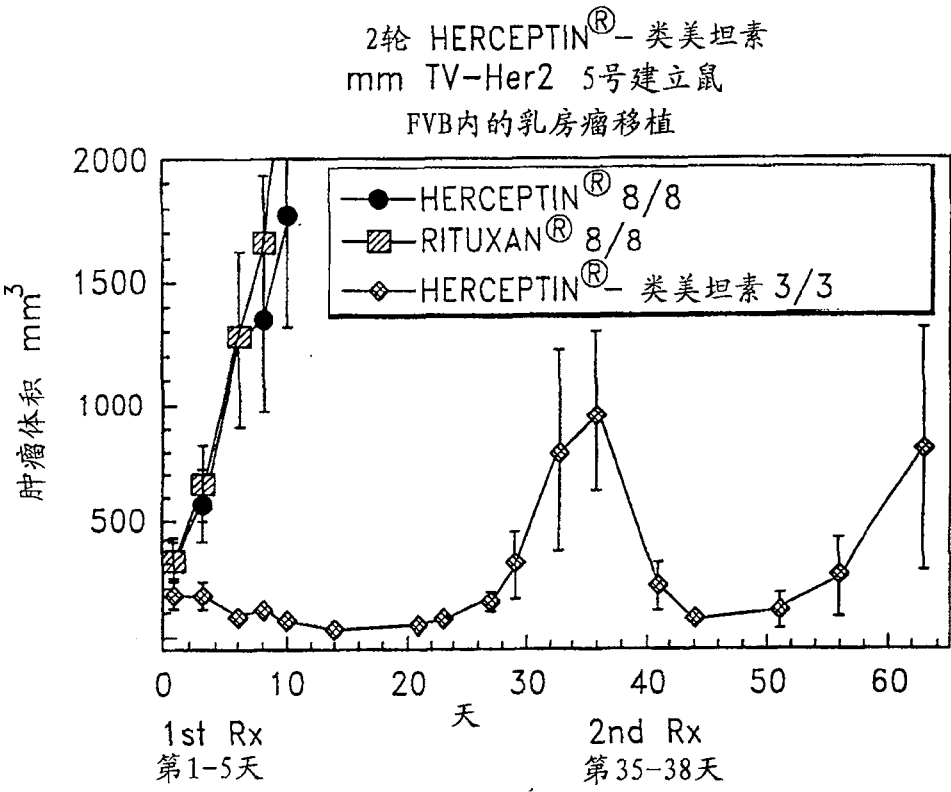


图 5

重链可变区

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** ** *	* ** *		* *
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		** *	*	
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG	[DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM	
	* * **		*** *	*****
574	PGKGLEWVA	[DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL	
	*****	*** **	*	*
hum III	PGKGLEWVA	[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL	
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTTLTVSS	
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS	

图 6

轻链可变区

		10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRP		
	** **** *	*			*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	[KASQDVSIGVA]	WYQQKP		
		* ** ***			
hum KI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	[KASQDVSIGVA]	WYQQKP		
		50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY	[SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTTTISVQA		
	** *		* *		* *
574	GKAPKLLIY	[SASYRYT]	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQP		
		* *****			
hum KI	GKAPKLLIY	[AASSLES]	GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQP		
		90	100		
2C4	EDLAVYYC	[QQYYIYPYT]	FGGGTKLEIKRT		
	* *		* *		
574	EDFATYYC	[QQYYIYPYT]	FGQGTKVEIKRT		
		*** *			
hum KI	EDFATYYC	[QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKRT		

图 7