

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 94119914

※ 申請日期： 94.6.15

※IPC 分類：A61K 39/395

A61P 35/00

一、發明名稱：(中文/英文)

具有鉑抗性之癌症之治療

THERAPY OF PLATINUM-RESISTANT CANCER

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商建南德克公司

GENENTECH, INC

代表人：(中文/英文)

提摩西 R 史瓦茲

SCHWARTZ, TIMOTHY R.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州舊金山市 DNA 路 1 號

1 DNA WAY, SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 1 人)

姓 名：(中文/英文)

史蒂芬 M. 凱樂西

KELSEY, STEPHEN M.

國 籍：(中文/英文)

英國 U.K.

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2004 年 06 月 16 日；60/580,333

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種以會有效地抑制HER二聚合作用之HER2抗體以及真西塔賓之組合以治療鉑抗藥性之卵巢癌、原發性腹膜癌或輸卵管癌之方法。

【先前技術】

HER抗體

受體酪胺酸激酶之HER族群為細胞生長、分化及存活之重要介體。此受體族群包括四個不同成員，包括表皮生長因子受體(EGFR、ErbB1或HER1)、HER2(ErbB2或p185^{neu})、HER3(ErbB3)及HER4(ErbB4或tyro2)。

被erbB1基因編碼之EGFR已於病因上牽涉人類惡性病症。特定言之，增加表現之EGFR已被發現於乳房、膀胱、肺臟、頭部、頸部及胃癌，以及神經膠質母細胞瘤中。增加EGFR受體表現經常伴隨著增加EGFR配位體之生產，轉變生長因子 α (TGF- α)，藉由相同腫瘤細胞，造成受體經由自分泌刺激途徑之活化作用。Baselga與Mendelsohn, *Pharmac. Ther.* 64: 127-154 (1994)。單株抗體導引抵抗EGFR或其配位體，TGF- α 與EGF，已在此種惡性病症之治療上，被評估作為治療劑。參閱，例如Baselga與Mendelsohn., 同前文出處；Masui等人癌症研究(*Cancer Research*) 44: 1002-1007 (1984); 及Wu等人*J. Clin. Invest.* 95: 1897-1905 (1995)。

HER族群之第二個成員，p185^{neu}，原先係被確認為得自以化學方式處理大白鼠之神經胚細胞瘤之轉變基因產物。

neu 原致癌基因之活化形式係由於經編碼蛋白質之跨膜區域中之點突變(纈胺酸對麩胺酸)所造成。neu 之人類同系物之放大，係被發現於乳房與卵巢癌中，且與不良預後有關聯(Slamon 等人, *Science*, 235: 177-182 (1987); Slamon 等人, *Science*, 244: 707-712 (1989); 及美國專利 4,968,603)。迄今，未曾有類似 neu 原致癌基因中之點突變，針對人類腫瘤被報告過。HER2 之過度表現(經常但不均勻，由於基因放大作用所致)亦已被發現於其他癌瘤中，包括胃、子宮內膜、唾液腺、肺臟、腎臟、結腸、甲狀腺、胰臟及膀胱之癌瘤。其中尤其是參閱 King 等人, *Science*, 229: 974 (1985); Yokota 等人, *Lancet*: 1: 765-767 (1986); Fukushige 等人, *Mol Cell Biol.*, 6: 955-958 (1986); Guerin 等人, *Oncogene Res.*, 3: 21-31 (1988); Cohen 等人, *致癌基因*, 4: 81-88 (1989); Yonemura 等人, *Cancer Res.*, 51: 1034 (1991); Borst 等人, *Gynecol. Oncol.*, 38: 364 (1990); Weiner 等人, *Cancer Res.*, 50: 421-425 (1990); Kern 等人, *Cancer Res.*, 50: 5184 (1990); Park 等人, *Cancer Res.*, 49: 6605 (1989); Zhau 等人, *Mol. Carcinog.*, 3: 254-257 (1990); Aasland 等人 *Br. J. Cancer* 57: 358-363 (1988); Williams 等人 *Pathobiology* 59: 46-52 (1991); 及 McCann 等人, *Cancer*, 65: 88-92 (1990)。HER2 可被過度表現於前列腺癌中(Gu 等人 *Cancer Lett.* 99: 185-9 (1996); Ross 等人 *Hum. Pathol.* 28: 827-33 (1997); Ross 等人 *Cancer* 79: 2162-70 (1997); 及 Sadasivan 等人 *J. Urol.* 150: 126-31 (1993))。

抗體導引抵抗大白鼠 p185^{neu} 與人類 HER2 蛋白質產物已被描述。Drebin 與同事已培養抵抗大白鼠 neu 基因產物 p185^{neu}

之抗體。參閱，例如 Drebin 等人, *Cell* 41: 695-706 (1985); Myers 等人, *Meth. Enzym.* 198: 277-290 (1991); 及 WO 94/22478。Drebin 等人 *Oncogene* 2: 273-277 (1988) 報告，與 p185^{neu}之兩個不同區域具反應性之抗體混合物，對於被植入無毛老鼠中之 neu-轉變之 NIH-3T3 細胞，會造成增效抗腫瘤作用。亦參閱 1998 年 10 月 20 日頒予之美國專利 5,824,311。

Hudziak 等人, *Mol. Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172 (1989) 係描述 HER2 抗體試驗名單之產生，其係使用人類乳房腫瘤細胞系 SK-BR-3 作特徵鑒定。在曝露於抗體之後，SK-BR-3 細胞之相對細胞增生，係藉由單層之結晶紫染色，於 72 小時後測得。使用此項檢測，最高抑制係以稱為 4D5 之抗體獲得，其係抑制細胞增生達 56%。在試驗名單中之其他抗體，於此項檢測中係降低細胞增生，達較小程度。進一步發現抗體 4D5 會敏化 HER2 過度表現之乳房腫瘤細胞系，成為 TNF- α 之細胞毒性作用。亦參閱 1997 年 10 月 14 日頒予之美國專利 5,677,171。於 Hudziak 等人中討論之 HER2 抗體，係進一步在 Fendly 等人, *癌症研究 (Cancer Research)* 50: 1550-1558 (1990); Kotts 等人, *活體外* 26(3): 59A (1990); Sarup 等人, *生長調節* 1: 72-82 (1991); Shepard 等人 *J. Clin. Immunol.* 11(3): 117-127 (1991); Kumar 等人 *Mol. Cell. Biol.* 11(2): 979-986 (1991); Lewis 等人 *Cancer Immunol. Immunother.* 37: 255-263 (1993); Pietras 等人 *Oncogene* 9: 1829-1838 (1994); Vitetta 等人 *癌症研究 (Cancer Research)* 54: 5301-5309 (1994); Sliwkowski 等人 *J. Biol. Chem.* 269(20): 14661-14665 (1994); Scott 等人 *J. Biol. Chem.* 266: 14300-5 (1991); D'souza 等人 *Proc. Natl. Acad.*

Sci. 91 : 7202-7206 (1994) ; Lewis 等人 *癌症研究 (Cancer Research)* 56 : 1457-1465 (1996) ; 及 Schaefer 等人 *Oncogene* 15 : 1385-1394 (1997) 中經特徵鑒定。

老鼠 HER2 抗體 4D5 之重組人化變型 (huMAb4D5-8 、 rhuMAb HER2 、 搓史圖諸馬伯 (trastuzumab) 或 Herceptin® ; 美國專利 5,821,337) 在患有 HER2 過度表現轉移性乳癌而已接受廣泛先前抗癌療法之病患中，係為臨床上活性的 (Baselga 等人，*J. Clin. Oncol.* 14 : 737-744 (1996)) 。搓史圖諸馬伯 (trastuzumab) 係接受來自食品藥物管理局，1998 年 9 月 25 日，關於治療患有轉移性乳癌而其腫瘤係過度表現 HER2 蛋白質之病患之銷售許可。

具有不同性質之其他 HER2 抗體，已被描述於 Tagliabue 等人 *Int. J. Cancer* 47 : 933-937 (1991) ; McKenzie 等人 *Oncogene* 4 : 543-548 (1989) ; Maier 等人 *Cancer Res.* 51 : 5361-5369 (1991) ; Bacus 等人 *分子致癌作用* 3 : 350-362 (1990) ; Stancovski 等人 *PNAS (USA)* 88 : 8691-8695 (1991) ; Bacus 等人 *癌症研究 (Cancer Research)* 52 : 2580-2589 (1992) ; Xu 等人 *Int. J. Cancer* 53 : 401-408 (1993) ; WO 94/00136 ; Kasprzyk 等人 *癌症研究 (Cancer Research)* 52 : 2771-2776 (1992) ; Hancock 等人 *Cancer Res.* 51 : 4575-4580 (1991) ; Shawver 等人 *Cancer Res.* 54 : 1367-1373 (1994) ; Arteaga 等人 *Cancer Res.* 54 : 3758-3765 (1994) ; Harwerth 等人 *J. Biol. Chem.* 267 : 15160-15167 (1992) ; 美國專利 5,783,186 ; 及 Klapper 等人 *Oncogene* 14 : 2099-2109 (1997) 中。

類同性篩檢已造成確認兩種其他 HER 受體族群成員 ; HER3 (美國專利 5,183,884 與 5,480,968 ，以及 Kraus 等人 *PNAS*

(USA) 86 : 9193-9197 (1989)) , 與 HER4 (EP 專利申請案 599,274 ; Plowman 等人 , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 : 1746-1750 (1993) ; 及 Plowman 等人 , *Nature*, 366 : 473-475 (1993)) 。此兩種受體在至少一些乳癌細胞系上顯示增加之表現。

HER 受體一般係被發現於細胞之各種組合中 , 且異種二聚合作用係被認為會增加對多種 HER 配位體之細胞回應之多樣性 (Earp 等人 *乳癌研究與治療* 35 : 115-132 (1995)) 。 EGFR 係被六種不同配位體結合 ; 表皮生長因子 (EGF) 、 轉變生長因子 α (TGF- α) 、 兩性調節素 、 肝素結合之表皮生長因子 (HB-EGF) 、 β 細胞素及表調節素 (Groenen 等人 , *生長因子* 11 : 235-257 (1994)) 。由於單一基因之替代接合所造成之遺傳素蛋白質族群 , 係為 HER3 與 HER4 之配位體。遺傳素族群包括 α 、 β 及 γ 遺傳素 (Holmes 等人 , *Science*, 256 : 1205-1210 (1992) ; 美國專利 5,641,869 ; 及 Schaefer 等人 *Oncogene* 15 : 1385-1394 (1997)) ; neu 分化因子 (NDF) 、 神經膠質生長因子 (GGF) ; 乙醯膽鹼受體引致之活性 (ARIA) ; 及感覺與運動神經元衍生之因子 (SMDF) 。關於回顧 , 可參閱 Groenen 等人 , *生長因子* 11 : 235-257 (1994) ; Lemke, G. *Molec. & Cell. Neurosci.* 7 : 247-262 (1996) , 及 Lee 等人 *Pharm. Rev.* 47 : 51-85 (1995) 。最近已確認三種其他 HER 配位體 ; 神經調節素-2 (NRG-2) , 據報告其會結合無論是 HER3 或 HER4 (Chang 等人 , *Nature* 387 509-512 (1997) ; 與 Carraway 等人 , *Nature* 387 : 512-516 (1997)) ; 神經調節素-3 , 其會結合 HER4 (Zhang 等人 , *PNAS (USA)* 94(18) : 9562-7 (1997)) ; 及神經調節素-4 , 其會結合 HER4 (Harari 等人 , *Oncogene* 18 : 2681-89 (1999)) , HB-EGF 、

β 細胞素及表調節素亦會結合至 HER4。

雖然 EGF 與 TGF α 不會結合 HER2，但 EGF 會刺激 EGFR 與 HER2，以形成異種二聚體，其會活化 EGFR，且造成 HER2 在異種二聚體中之轉磷醯化作用。二聚合作用及 / 或轉磷醯化作用顯示會活化 HER2 酪胺酸激酶。參閱 Earp 等人, 同前文出處。同樣地，當 HER3 與 HER2 共表現時，係形成活性發出訊息複合物，且抗體導引抵抗 HER2 係能夠瓦解此複合物 (Sliwkowski 等人, *J. Biol. Chem.*, 269 (20): 14661-14665 (1994))。此外，HER3 對遺傳素 (HRG) 之親和力，當與 HER2 共表現時，係被增加至較高親和力狀態。亦參閱 Levi 等人, *神經科學期刊* 15: 1329-1340 (1995)；Morrissey 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1431-1435 (1995)；及 Lewis 等人, *Cancer Res.*, 56: 1457-1465 (1996)，關於 HER2-HER3 蛋白質複合物。HER4，就像 HER3 一樣，係與 HER2 形成活性發出訊息複合物 (Carraway 與 Cantley, *Cell* 78: 5-8 (1994))。

卵巢癌

卵巢癌為來自女性生殖道惡性病症之最常見死亡原因。在美國，估計每年有 24,000 個新診斷病例，其中大約 13,000 位因該疾病而死亡。患有已進展卵巢癌之病患，係經常以鉑為基礎之化學療法治療，經常併用紅豆杉烷。在此等藥劑已失敗後，有數種治療選擇。患有鉑敏感性疾病之病患經常以鉑再治療，但大量比例之病患，於再治療後，具有短回應期間。對於具有鉑抗藥性疾病結果者較沒有幫助。拓波提肯 (topotecan) 係被食品藥物管理局 (FDA) 許可，用於最

初或後續化學療法已失敗之病患；微脂粒多克索紅菌素僅被許可用於患有卵巢癌而對鉑-與培克里他索 (paclitaxel) 為基礎之化學治療服用法兩者反拗之病患。拓波提肯 (topotecan) 與微脂粒多克索紅菌素，在患有鉑抗藥性疾病之病患中，已証實部份回應率個別為 6% 與 12%，具有中間值無進展存活期為 14-18 週。又最近，關於真西塔賓 (gemcitabine) 之有希望結果已被報告，於鉑抗藥性卵巢癌中，具有部份回應在 16% 下，導致增加利用此藥劑，作為第 2 線療法。但是，對於患有已進展卵巢癌而現行療法對其已失敗之病患，對新穎且經改良之治療選擇，有明顯需求。

受體酪胺酸激酶之 ErbB 或人類表皮生長因子受體 (HER) 族群係牽涉卵巢癌之發病原理。為以 HER 發出訊息途徑為標的，柏圖祖馬伯 (pertuzumab) (rhuMAb2C4) 係被發展為人化抗體，其會抑制 HER2 與其他 HER 受體之二聚合作用，藉以抑制配位體驅動之磷醯化作用與活化作用，及 RAS 與 AKT 途徑之下游活化作用。

真西塔賓已被使用於多種腫瘤中，並顯示供使用於胰與肺癌。關於使用單一藥劑真西塔賓之最常見毒性，包括血細胞減少症，伴隨著貧血與嗜中性白血球減少症之發生率個別為 68% 與 63%。另一個常見毒性為惡心與嘔吐，具有合併發生率為 69%，其中 13% 等級 III 與 1% 等級 IV 發生率。腹瀉較不常發生，在 19% 下。皮疹較常發生，在 30% 下，僅具有 1% 等級 III 發生率。真西塔賓已被併用許多其他化學治療劑，譬如紅豆杉烷類、蔥環素及鉑，未具有任何顯著

增加或令人意外之毒性。

搓史圖諸馬伯已在不同化學療法之數種組合中，併用真西塔賓，在第II期試驗中，且亦良好地被容許，未具有經發現之心臟或令人意外之毒性。Safran等人 *Proc Am. Soc. Clin. Oncol.* 20: 130a (2001)，Miller等人 *腫瘤學* 15(2): 38-40 (2001)。亦參閱 Zinner 等人 *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 20 : 328a (2001) ，Nagourney 等人 *Breast Cancer Res. Treat.* 57 : 116, 摘要 475 (1999) ，Bun 等人 *Proc. Am. Assoc. Canc. Res.* 41 : 719, 摘要 #4571 (2000) ，Konecny 等人 *Breast Cancer Res Treat* 57 : 114, 摘要 467 (1999) ，O'Shaugnessy 等人 *Sem. Oncol* 2 (補充 : 22-26 (2004) ，Sledge 等人 *Sem. Oncol.* 2 (補充 : 19-21 (2003) ，Zinner 等人 *肺癌* 44(1): 99-110 (2004) ，Gatzemeier 等人 *Ann of Oncol.* 15: 19-27 (2004) ，關於搓史圖諸馬伯 (trastuzumab) 與真西塔賓 (gemcitabine) 之組合。

在歐尼塔革 (Omnitarg) 作為單一藥劑以治療固態腫瘤之第I期試驗中，3位具有已進展卵巢癌之病患係以柏圖祖馬伯 (pertuzumab) 治療。一位具有持久性部份回應，而另一位病患具有安定疾病，歷經15週。Agus 等人 *Proc Am Soc Clin Oncol* 22 : 192, 摘要 771 (2003) 。

【發明內容】

在第一方面，本發明係關於一種治療選自包括卵巢癌、原發性腹膜癌及輸卵管癌之鉑抗藥性癌症之方法，其包括對病患投予會抑制HER二聚合作用而比搓史圖諸馬伯 (trastuzumab) 更有效之HER2抗體，與一種抗代謝化學治療劑，各以有效治療該癌症之量。

於另一方面，本發明係提供一種治療選自包括卵巢癌、原發性腹膜癌及輸卵管癌之鉑抗藥性癌症之方法，其包括對病患投予會結合至HER2上之異種二聚體結合位置之HER2抗體，與真西塔賓(gemcitabine)，各以有效治療該癌症之量。

於又另一方面，本發明係關於一種治療選自包括卵巢癌、原發性腹膜癌及輸卵管癌之鉑抗藥性癌症之方法，其包括對病患投予會結合至HER2上之功能部位II之HER2抗體，與真西塔賓，各以有效治療該癌症之量。

較佳具體實施例之詳述

I. 定義

"HER受體"為受體蛋白酪胺酸激酶，歸屬於HER受體族群，且包括EGFR、HER2、HER3及HER4受體，及欲在未來被確認之此族群其他成員。HER受體一般係包含一個胞外功能部位，其可結合HER配位體；一個親脂性跨膜功能部位；一個保守胞內酪胺酸激酶功能部位；及一個潛伏數個可被磷醯基化之酪胺酸殘基之羧基末端發出訊息功能部位。HER受體可為"原本順序"HER受體，或其"胺基酸順序變種"。HER受體較佳為原本順序人類HER受體。

HER2之胞外功能部位包含四個功能部位，功能部位I(胺基酸殘基為約1-195)、功能部位II(胺基酸殘基為約196-320)、功能部位III(胺基酸殘基為約321-488)及功能部位IV(胺基酸殘基為約489-632)(殘基編號未具有訊息肽)。參閱Garrett等人 *Mol. Cell.* 11: 495-505 (2003)，Cho等人 *Nature* 421: 756-760

(2003)，Franklin 等人 *癌細胞* 5：317-328 (2004)，或 Plowman 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90：1746-1750 (1993)，及本文之圖 16。

術語 "ErbB1"、"HER1"、"表皮生長因子受體" 及 "EGFR" 可於本文中交換使用，且係指 EGFR，如在 Carpenter 等人 *Ann. Rev. Biochem.* 56：881-914 (1987) 中所揭示者，包括其天然生成之突變形式 (例如缺失突變型 EGFR，如在 Humphrey 等人 *PNAS (USA)* 87：4207-4211 (1990) 中者)。erbB1 係指使 EGFR 蛋白質產物編碼之基因。

措辭 "ErbB2" 與 "HER2" 可於本文中交換使用，且係指例如在 Semba 等人，*PNAS (USA)* 82：6497-6501 (1985) 與 Yamamoto 等人 *Nature* 319：230-234 (1986) 中所述之人類 HER2 蛋白質 (基因銀行收受號碼 X03363)。“erbB2”一詞係指使人類 ErbB2 編碼之基因，而 "neu" 係指使大白鼠 p185^{neu} 編碼之基因。較佳 HER2 為原本順序人類 HER2。

"ErbB3" 與 "HER3" 係指受體多肽，譬如在美國專利 5,183,884 與 5,480,968，以及 Kraus 等人 *PNAS (USA)* 86：9193-9197 (1989) 中所揭示者。

術語 "ErbB4" 與 "HER4" 於本文中係指受體多肽，譬如在 EP 專利申請案 599,274；Plowman 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90：1746-1750 (1993)；及 Plowman 等人，*Nature*, 366：473-475 (1993) 中所揭示者，包括其異構重組物，例如在 1999 年 4 月 22 日公告之 WO 99/19488 中所揭示者。

所謂 "HER 配位體" 係意謂多肽，其會結合及 / 或活化 HER 受體。於本文中特別令人感興趣之 HER 配位體為原本順序

人類 HER 配位體，譬如表皮生長因子 (EGF) (Savage 等人, *J. Biol. Chem.* 247 : 7612-7621 (1972))；轉變生長因子 α (TGF- α) (Marquardt 等人, *Science* 223 : 1079-1082 (1984))；兩性調節素亦被稱為史旺諾瑪 (schwanoma) 或角質細胞自分泌生長因子 (Shoyab 等人 *Science* 243 : 1074-1076 (1989)；Kimura 等人 *Nature* 348 : 257-260 (1990)；及 Cook 等人 *Mol. Cell. Biol.* 11 : 2547-2557 (1991))； β 細胞素 (Shing 等人, *Science* 259 : 1604-1607 (1993)；與 Sasada 等人 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190 : 1173 (1993))；肝素結合表皮生長因子 (HB-EGF) (Higashiyama 等人, *Science* 251 : 936-939 (1991))；表調節素 (Toyo 等人, *J. Biol. Chem.* 270 : 7495-7500 (1995)；及 Komurasaki 等人 *Oncogene* 15 : 2841-2848 (1997))；遺傳素 (參閱下文)；神經調節素 -2 (NRG-2) (Carraway 等人, *Nature* 387 : 512-516 (1997))；神經調節素 -3 (NRG-3) (Zhang 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94 : 9562-9567 (1997))；神經調節素 -4 (NRG-4) (Harari 等人 *Oncogene* 18 : 2681-89 (1999)) 或克利普脫 (cripto) (CR-1) (Kannan 等人 *J. Biol. Chem.* 272(6) : 3330-3335 (1997))。結合 EGFR 之 HER 配位體包括 EGF、TGF- α 、兩性調節素、 β 細胞素、HB-EGF 及表調節素。結合 HER3 之 HER 配位體包括遺傳素。能夠結合 HER4 之 HER 配位體包括 β 細胞素、表調節素、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4 及遺傳素。

當於本文中使用时，"遺傳素" (HRG) 係指被遺傳素基因產物編碼之多肽，如在美國專利 5,641,869 或 Marchionni 等人, *Nature*, 362 : 312-318 (1993) 中所揭示者。遺傳素之實例包括遺傳素- α 、遺傳素- β 1、遺傳素- β 2 及遺傳素- β 3 (Holmes 等人,

Science, 256 : 1205-1210 (1992) ; 及美國專利 5,641,869) ; neu 分化因子 (NDF)(Peles 等人 *Cell* 69 : 205-216 (1992)) ; 乙醯膽鹼受體引致之活性 (ARIA)(Fall 等人 *Cell* 72 : 801-815 (1993)) ; 神經膠質生長因子 (GGF)(Marchionni 等人, *Nature*, 362 : 312-318 (1993)) ; 感覺與運動神經元衍生因子 (SMDF)(Ho 等人 *J. Biol. Chem.* 270 : 14523-14532 (1995)) ; γ -遺傳素 (Schaefer 等人 *Oncogene* 15 : 1385-1394 (1997)) 。此術語包括原本順序 HRG 多肽之生物活性片段及 / 或胺基酸順序變種，譬如其似 EGF 功能部位片段 (例如 HRG $\beta_{177-244}$) 。

本文中之 "HER 二聚體" 係為以非共價鍵方式結合之二聚體，包含至少兩種不同 HER 受體。當表現兩種或多種 HER 受體之細胞被曝露於 HER 配位體時，此種複合物可形成，且可藉由免疫沉澱作用單離，並藉由 SDS-PAGE 分析，如在 Sliwkowski 等人, *J. Biol. Chem.*, 269 (20) : 14661-14665 (1994) 中所述者。此種 HER 二聚體之實例包括 EGFR-HER2、HER2-HER3 及 HER3-HER4 異種二聚體。再者，HER 二聚體可包含與不同 HER 受體譬如 HER3、HER4 或 EGFR 結合之兩種或多種 HER2 受體。其他蛋白質，譬如細胞活素受體亞單位 (例如 gp130) 可與二聚體締合。

於 HER2 上之 "異種二聚體結合位置" 係指 HER2 胞外功能部位之一個區域，在與其形成二聚體時，其係與 EGFR、HER3 或 HER4 胞外功能部位之一個區域接觸或形成界面。此區域係被發現於 HER2 之功能部位 II 中。Franklin 等人, *癌細胞* 5 : 317-328 (2004) 。

"HER 活化作用" 或 "HER2 活化作用" 係指任一種或多種 HER 受體或 HER2 受體之活化作用或磷醯化作用。一般而言，HER 活化作用會造成訊息轉導(例如，因 HER 受體之胞內激酶功能部位使 HER 受體或受質多肽之酪胺酸殘基磷醯基化所造成)。HER 活化作用可藉由結合至包含吾人感興趣 HER 受體之 HER 二聚體之 HER 配位體所媒介。結合至 HER 二聚體之 HER 配位體，可活化二聚體中之一或多個 HER 受體之激酶功能部位，且藉以造成一或多個 HER 受體中之酪胺酸殘基之磷醯化作用，及/或其他受質多肽譬如 Akt 或 MAPK 胞內激酶中之酪胺酸殘基之磷醯化作用。

"原本順序" 多肽為具有與衍生自天然之多肽(例如 HER 受體或 HER 配位體)相同胺基酸順序者。此種原本順序多肽可單離自天然，或可藉由重組或合成方式製成。因此，原本順序多肽可具有天然生成之人類多肽、老鼠多肽或得自任何其他哺乳動物物種多肽之胺基酸順序。

"胺基酸順序變種" 一詞係指具有胺基酸順序與原本順序多肽不同達某種程度之多肽。通常，胺基酸順序變種將與原本 HER 配位體之至少一種受體結合功能部位，或與原本 HER 受體之至少一種配位體結合功能部位，具有至少約 70% 類同性，且其較佳為至少約 80%，更佳為至少約 90%，與此種受體或配位體結合功能部位類同。胺基酸順序變種具有取代、缺失及/或插入，在原本胺基酸順序之胺基酸順序內之某些位置處。

"類同性" 係被定義為在將順序與引進間隙(若必要時)對

準以達成最高百分比類同性後，於胺基酸順序變種中相同之殘基百分比。關於對準之方法與電腦程式係為此項技藝中所習知。一種此類電腦程式為"對準(Align) 2"，由 Genentech 公司著作，其係於 1991 年 12 月 10 日，在美國版權局 (Washington, DC 20559)，以使用者憑証提出申請。

本文中之"抗體"一詞係以最寬廣意義使用，且明確地涵蓋完整單株抗體、多株抗體、多專一性抗體(例如雙專一性抗體)，由至少兩個完整抗體與抗體片段所形成，只要其顯示所要之生物學活性即可。

於本文中使用的"單株抗體"一詞，係指得自實質上均質抗體個體群之抗體，意即包含該個體群之個別抗體，係為相同及/或結合相同抗原決定部位，惟可在單株抗體生產期間發生之可能變種除外，此種變種一般係以少量存在。與多株抗體製劑對照，其典型上包含被導引針對不同決定子(抗原決定部位)之不同抗體，各單株抗體係被導引針對抗原上之單一決定子。單株抗體除了其專一性以外，有利之處在於其係未被其他免疫球蛋白污染。修飾用語"單株"係表示抗體之特性為得自抗體之實質上均質個體群，而非欲被解釋為需要藉任何特定方法製造抗體。例如，根據本發明欲被使用之單株抗體，可藉由雜種瘤方法製成，其係首先由 Kohler 等人, *Nature*, 256: 495 (1975) 所描述，或可藉由重組 DNA 方法製成(參閱，例如美國專利 4,816,567)。“單株抗體”亦可單離自噬菌體抗體庫，使用例如 Clackson 等人, *Nature*, 352: 624-628 (1991) 與 *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) 中所

述之技術。

本文中之單株抗體係特別包括"嵌合"抗體，其中一部份重及/或輕鏈係相同或類似於衍生自特定物種或歸屬於特定抗體種類或亞組之抗體中之相應順序，而該鏈之其餘部份係相同或類似於衍生自另一物種或歸屬於另一抗體種類或亞組之抗體中之相應順序，以及此種抗體之片段，只要其顯示所要之生物學活性即可(美國專利 4,816,567；與 Morrison 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984))。此處吾人感興趣之嵌合抗體包括"首次接觸抗原"之抗體，其包含衍生自非人類靈長動物(例如古老世界猴子、無尾猿等)之可變功能部位抗原結合順序，與人類恒定區域順序。

"抗體片段"包含完整抗體之一部份，較佳係包含其抗原結合或可變區域。抗體片段之實例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 及 Fv 片段；雙抗體；線性抗體；單鏈抗體分子；及由抗體片段形成之多專一性抗體。

"完整抗體"為包含抗原結合可變區域以及輕鏈恒定功能部位(C_L)與重鏈恒定功能部位 C_H1、C_H2 及 C_H3 者。恒定功能部位可為原本順序恒定功能部位(例如人類原本順序恒定功能部位)或其胺基酸順序變種。完整抗體較佳係具有一或多種效應子功能。

抗體"效應子功能"係指可歸因於抗體之 Fc 區域(原本順序 Fc 區域或胺基酸順序變種 Fc 區域)之生物學活性。抗體效應子功能之實例包括 C1q 結合；補體依賴性細胞毒性；Fc 受體結合；抗體依賴性細胞所媒介之細胞毒性(ADCC)；吞

噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體；BCR)之向下調節等。

依其重鏈恒定功能部位之胺基酸順序而定，完整抗體可歸屬於不同"種類"。完整抗體有五個主要種類：IgA, IgD, IgE, IgG及IgM，且其中數種可被進一步區分成"亞組"(同型物)，例如IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA及IgA2。相應於不同抗體種類之重鏈恒定功能部位，係個別被稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同免疫球蛋白種類之亞單位結構與三次元組態係為習知。

"抗體依賴性細胞所媒介之細胞毒性"與"ADCC"係指細胞所媒介之反應，其中會表現Fc受體(FcR)之非專一性細胞毒性細胞(例如天然殺傷(NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)會辨識標的細胞上之經結合抗體，及接著造成標的細胞之溶胞作用。用於媒介ADCC、NK細胞之初生細胞，僅會表現Fc γ RIII，然而單細胞會表現Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII。FcR於造血細胞上之表現，係摘錄於Ravetch與Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991)之第464頁上之表3中。為評估吾人感興趣分子之ADCC活性，可進行活體外ADCC檢測，譬如在美國專利5,500,362或5,821,337中所述者。可用於此種檢測之效應子細胞，包括末梢血液單核細胞(PBMC)與天然殺傷(NK)細胞。替代或另外，吾人感興趣分子之ADCC活性可於活體內評估，例如在動物模式中，譬如於Clynes等人*PNAS (USA)* 95: 652-656 (1998)中所揭示者。

"人類效應子細胞"為白血球，其會表現一或多種FcR，

且進行效應子功能。此等細胞較佳係表現至少Fc γ RIII，且進行ADCC效應子功能。會媒介ADCC之人類白血球之實例，包括末梢血液單核細胞(PBMC)、天然殺傷(NK)細胞、單細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球；其中PBMC與NK細胞為較佳。效應子細胞可單離自其原本來源，例如得自血液或如本文中所述之PBMC。

術語"Fc受體"或"FcR"係用以描述結合至抗體之Fc區域之受體。較佳FcR為原本順序人類FcR。再者，較佳FcR為會結合IgG抗體(γ 受體)者，且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII亞組之受體，包括此等受體之對偶質變種與替代疊接形式。

Fc γ RII受體包括Fc γ RIIA("活化受體")與Fc γ RIIB("抑制受體")，其具有類似胺基酸順序，主要差異在其細胞質功能部位上。活化受體Fc γ RIIA含有免疫受體酪胺酸為基礎之活化主體(ITAM)在其細胞質功能部位上。抑制受體Fc γ RIIB含有免疫受體酪胺酸為基礎之抑制主體(ITIM)在其細胞質功能部位上(參閱回顧M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997))

。FcR係被回顧於Ravetch與Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9: 457-92 (1991); Capel等人, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); 及de Haas等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995)中。其他FcR，包括欲在未來被確認者，係被本文之"FcR"一詞所涵蓋。此術語亦包括初生受體FcRn，其係負責母親IgG之轉移至胎兒(Guyer等人, *J. Immunol.* 117: 587 (1976)與Kim等人, *J. Immunol.* 24: 249 (1994))。

"補體依賴性細胞毒性"或"CDC"係指分子於補體存在下溶解標的之能力。補體活化途徑係藉由補體系統之第一種

成份(C1q)結合至與同源抗原複合之分子(例如抗體)而被引發。為評估補體活化作用，可進行CDC檢測，例如，按 Gazzano-Santoro 等人, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996) 中所述。

"原本抗體"經常為約150,000個道爾吞之雜四聚體糖蛋白，由兩個相同輕(L)鏈與兩個相同重(H)鏈所組成。各輕鏈係藉由一個共價二硫鍵連結至重鏈，而二硫化物鏈結之數目在不同免疫球蛋白同型物之重鏈中會改變。各重與輕鏈亦具有規則間隔之鏈內二硫化物橋基。各重鏈於一端具有可變功能部位(V_H)，接著為許多恒定功能部位。各輕鏈具有可變功能部位於一端(V_L)，及恒定功能部位在其另一端。輕鏈之恒定功能部位係與重鏈之第一個恒定功能部位對準，而輕鏈可變功能部位係與重鏈之可變功能部位對準。咸認特定胺基酸殘基係在輕鏈與重鏈可變功能部位之間形成界面。

"可變"一詞係指可變功能部位之某些部份在抗體中之順序上廣泛地不同之事實，且係被使用於各特定抗體對其特定抗原之結合與專一性上。但是，變異性並未均勻地分佈在整個抗體之可變功能部位中。其係集中在三個鏈段上，稱為高可變區域，在輕鏈與重鏈可變功能部位兩者中。可變功能部位之更高度地保守部份係被稱為骨架區域(FR)。原本重與輕鏈之可變功能部位，各包含四個FR，大部份採取 β -薄片型態，藉由三個高可變區域連接，其係形成圈環，連接 β -薄片結構，而在一些情況中形成該 β -薄片結構之一部份。於各鏈中之高可變區域係藉由FR保持緊密接近在一

起，而具有來自另一鏈之高可變區域，有助於形成抗體之抗原結合位置(參閱Kabat等人,具免疫學重要性之蛋白質順序,第5版,國家衛生研究所公共衛生服務,Bethesda,MD.(1991))。恒定功能部位未直接涉及使抗體結合至抗原，但顯示各種效應子功能，譬如參與抗體依賴性細胞毒性(ADCC)中之抗體。

當於本文中使用了"高可變區域"一詞時，係指抗體之胺基酸殘基，其係負責抗原結合。高可變區域一般係包含來自"互補性決定區域"或"CDR"之胺基酸殘基(例如，在輕鏈可變功能部位中之殘基24-34(L1)、50-56(L2)及89-97(L3)，與在重鏈可變功能部位中之31-35(H1)、50-65(H2)及95-102(H3);Kabat等人,具免疫學重要性之蛋白質順序,第5版,國家衛生研究所公共衛生服務,Bethesda,MD.(1991))，及/或來自"高可變圈環"之殘基(例如，在輕鏈可變功能部位中之殘基26-32(L1)、50-52(L2)及91-96(L3)，與在重鏈可變功能部位中之26-32(H1)、53-55(H2)及96-101(H3);Chothia與Lesk *J. Mol. Biol.* 196: 901-917(1987))。"骨架區域"或"FR"殘基係為如本文中定義之高可變區域殘基以外之可變功能部位殘基。

抗體之木瓜蛋白酶消化，會產生兩種相同抗原結合片段，稱為"Fab"片段，各具有單一抗原結合位置，及一種殘留"Fc"片段，其名稱係反映出其容易結晶之能力。胃蛋白酶處理會產生 $F(ab')_2$ 片段，其具有兩個抗原結合位置，且仍然能夠使抗原交聯。

"Fv"為最小抗體片段，其含有完整抗原辨識與抗原結合

位置。此區域包含一個重鏈與一個輕鏈可變功能部位呈緊密非共價締合之二聚體。在此組態中，各變數功能部位之三個高可變區域係交互作用，以界定一個抗原結合位置，在 V_H - V_L 二聚體之表面上。此六個高可變區域係集體地賦予對抗體之抗原結合專一性。但是，即使單一可變功能部位（或一半 F_v ，僅包含三個對抗原專一之高可變區域）具有辨識與結合抗原之能力，惟係在比整個結合位置較低之親和力下。

Fab 片段亦含有輕鏈之恒定功能部位，與重鏈之第一個恒定功能部位 (CH1)。Fab' 片段與 Fab 片段不同之處在於添加少數殘基在重鏈 CH1 功能部位之羧基末端，包括來自抗體鉸鏈區域之一或多個半胱胺酸。Fab'-SH 為在本文中對於其中恒定功能部位之半胱胺酸殘基帶有至少一個自由態硫醇基之 Fab' 之指稱。 $F(ab')_2$ 抗體片段最初係以成對 Fab' 片段產生，其具有鉸鏈半胱胺酸在彼等之間。抗體片段之其他化學偶合亦為已知。

來自任何脊椎動物物種之抗體之"輕鏈"，可歸屬於兩種顯然不同類型之一，稱為 κ 與 λ ，以其恒定功能部位之胺基酸順序為基礎。

"單鏈 F_v " 或 "sc F_v " 抗體片段包含抗體之 V_H 與 V_L 功能部位，其中此等功能部位係存在於單一多肽鏈中。 F_v 多肽較佳係進一步包含多肽鏈結，在 V_H 與 V_L 功能部位之間，其使得 sc F_v 能夠形成供抗原結合所要之結構。關於 sc F_v 之回顧，可參閱 Pluckthun, 單株抗體之藥理學, 第 113 卷, Rosenberg 與 Moore 編

著, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 頁 (1994)。HER2 抗體 scFv 片段係描述於 WO 93/16185; 美國專利 5,571,894; 及美國專利 5,587,458 中。

"雙抗體"一詞係指具有兩個抗原結合位置之小抗體片段, 此片段包含可變重功能部位(V_H), 經連接至相同多肽鏈(V_H - V_L)中之可變輕功能部位(V_L)。由於利用太短以致不允許相同鏈上之兩個功能部位之間配對之鏈結, 故功能部位係被強迫與另一個鏈之互補功能部位配對, 並產生兩個抗原結合位置。雙抗體係更完整地描述於例如 EP 404,097; WO 93/11161; 及 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) 中。

非人類(例如齧齒動物)抗體之"人化"形式, 係為含有衍生自非人類免疫球蛋白之最小順序之嵌合抗體。大部份而言, 人化抗體係為人類免疫球蛋白(接受者抗體), 其中來自接受者之高可變區域之殘基, 係被來自非人類物種(供體抗體)之高可變區域之殘基置換, 該物種譬如老鼠、大白鼠、兔子或非人類靈長類動物, 其具有所要之專一性、親和力及容量。於一些情況中, 人類免疫球蛋白之骨架區域(FR)殘基係被相應之非人類殘基置換。再者, 人化抗體可包含未在接受者抗體或供體抗體中發現之殘基。此等改質物係被製成, 以進一步精製抗體性能。一般而言, 人化抗體係包含實質上所有至少一種, 且典型上兩種可變功能部位, 其中所有或實質上所有高可變圈環係相應於非人類免疫球蛋白, 且所有或實質上所有FR係為具有人類免疫球蛋

白順序者。人化抗體視情況亦將包含至少一部份免疫球蛋白恒定區域(Fc)，典型上為人類免疫球蛋白。關於進一步細節，可參閱 Jones 等人, *Nature* 321: 522-525 (1986); Riechmann 等人, *Nature* 332: 323-329 (1988); 及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)。

人化 HER2 抗體包括 huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7 及 huMAb4D5-8 或搓史圖諸馬伯 (trastuzumab)(HERCEPTIN®)，如在美國專利 5,821,337 之表 3 中所述者，其係明確地併於本文供參考；人化 520C9 (WO 93/21319)，及人化 2C4 抗體，如本文中所述。

對本文之目的而言，"搓史圖諸馬伯 (trastuzumab)"、"HERCEPTIN®" 及 "huMAb4D5-8" 係指個別包含順序識別碼 14 與 15 中之輕與重鏈胺基酸順序之抗體。

此處，"柏圖祖馬伯 (Pertuzumab)" 與 "OMNITARG™" 係指個別包含順序識別碼 16 與 17 中之輕與重鏈胺基酸順序之抗體。

"裸露抗體" 係為未共軛至異種分子譬如細胞毒性部份物質或放射性標識之抗體(如本文中定義)。

"經單離" 抗體為已被確認且自其天然環境之成份分離及/或回收者。其天然環境之污染成份為會干擾對於抗體之診斷或治療用途之物質，且可包括酵素、激素及其他蛋白質性或非蛋白質性溶質。在較佳具體實施例中，抗體係被純化(1)至大於 95 重量% 抗體，當藉 Lowry 方法測定時，而最佳

係超過 99 重量%，(2)至足以獲得 N-末端或內部胺基酸順序之至少 15 個殘基之程度，利用旋轉杯定序儀，或(3)至藉由 SDS-PAGE 之均一性，在還原或非還原條件下，使用柯麥西 (Coomassie) 藍色或較佳為銀染色。經單離抗體包括當場在重組細胞內之抗體，因為抗體天然環境之至少一種成份將不存在。但是，一般情況，經單離抗體將藉由至少一個純化步驟製備。

"會比搓史圖諸馬伯 (trastuzumab) 更有效地抑制 HER 二聚合作用"之 HER2 抗體，係為會比搓史圖諸馬伯更有效地(例如更有效至少約 2-倍)減少或排除 HER 二聚體。此種抗體較佳係抑制 HER2 二聚合作用至少約如選自包括老鼠單株抗體 2C4、老鼠單株抗體 2C4 之 Fab 片段、柏圖祖馬伯 (Pertuzumab) 及柏圖祖馬伯之 Fab 片段之抗體一樣有效。吾人可評估 HER 二聚合抑制，其方式是直接地研究 HER 二聚體，或藉由評估 HER 活化作用或下游發出訊息作用，其係由於 HER 二聚合作用所造成，及/或藉由評估抗體-HER2 結合位置等。關於篩檢抗體具有比搓史圖諸馬伯 (trastuzumab) 更有效地抑制 HER 二聚合作用能力之檢測，係描述於 Agus 等人 *癌細胞* 2: 127-137 (2002) 及本文實例 1-2 與 4 中。僅舉例言之，吾人可檢測 HER 二聚合作用之抑制，其方式是評估例如 HER 二聚體形成之抑制(參閱，例如 Agus 等人 *癌細胞* 2: 127-137 (2002) 之圖 1A-B；及本文實例 2)；表現 HER 二聚體之細胞之 HER 配位體活化作用之降低(本文實例 1 與例如 Agus 等人 *癌細胞* 2: 127-137 (2002) 之圖 2A-B)；HER 配位體結合至會表現 HER 二聚

體之細胞之阻斷(本文實例1與例如Agus等人*癌細胞*2: 127-137 (2002)之圖2E);於HER配位體存在(或不存在)下會表現HER二聚體之癌細胞(例如MCF7、MDA-MD-134、ZR-75-1、MD-MB-175、T-47D細胞)之細胞生長抑制(本文實例1與例如Agus等人*癌細胞*2: 127-137 (2002)之圖3A-D);下游發出訊息作用之抑制(例如,HRG依賴性AKT磷醯化作用之抑制,或HRG-或TGF α -依賴性MAPK磷醯化作用之抑制)(參閱本文實例4與例如Agus等人*癌細胞*2: 127-137 (2002)之圖2C-D)。吾人亦可評估抗體是否會抑制HER二聚合作用,其方式是研究抗體-HER2結合位置,例如藉由評估結構或模式,譬如經結合至HER2之抗體之晶體結構(參閱,例如Franklin等人*癌細胞*5: 317-328 (2004))。

HER2抗體可比搓史圖諸馬伯更有效地(例如至少2-倍更有效地)"抑制HRG依賴性AKT磷醯化作用"及/或抑制"HRG-或TGF α -依賴性MAPK磷醯化作用"(參閱Agus等人*癌細胞*2: 127-137 (2002)與本文實例4,作為實例)。

HER2抗體可為"不會抑制HER2外功能部位分裂"者(Molina等人*Cancer Res.* 61: 4744-4749 (2001))。

"會結合至HER2之異種二聚體結合位置"之HER2抗體,會結合至功能部位II中之殘基(且視情況亦結合至HER2胞外功能部位之其他功能部位中之殘基,譬如功能部位I與III),且可於立體上阻礙HER2-EGFR、HER2-HER3或HER2-HER4異種二聚體之形成,至少達某種程度。Franklin等人*癌細胞*5: 317-328 (2004)係特徵鑒定HER2柏圖祖馬伯(pertuzumab)晶體結

構，寄存於RCSB蛋白質資料銀行(ID代碼IS78)，說明會結合至HER2之異種二聚體結合位置之舉例抗體。

"會結合至HER2之功能部位II"之抗體，會結合至功能部位II中之殘基，且視情況結合至HER2之其他功能部位譬如功能部位I與III中之殘基。會結合至功能部位II之抗體，較佳係結合至HER2之功能部位I、II及III間之接合處。

"卵巢"為兩個小扁桃形器官之一，位在女性中子宮之任一側上。

"法羅彪氏管"或"輸卵管"為兩個微細管件之一，自女性哺乳動物卵巢前導至子宮中。

"腹膜"為體腔譬如腹部之上皮內襯。

"卵巢癌"為潛在地威脅生命之惡性病徵，其係在一或兩個卵巢中發展。在出現卵巢癌病徵時，卵巢腫瘤可能已生長足夠大，而流出癌細胞於整個腹部。已擴散於卵巢外部之卵巢癌細胞係被稱為轉移性卵巢癌。卵巢腫瘤傾向於擴散至隔膜、腸及/或網膜(覆蓋且裝填腹部中之器官之脂肪層)。癌細胞亦可經過淋巴通道與血流擴散至其他器官。此處，欲被治療之卵巢癌包括三種原發性種類，惡性卵巢腫瘤，意即上皮腫瘤，生殖細胞腫瘤，及基質腫瘤。

"原發性腹膜癌"係指源自於腹膜中之癌症。以顯微外觀、病徵、擴散型式及預後為觀點，原發性腹膜癌可能極類似上皮卵巢癌。已將其卵巢移除之婦女仍可能獲得原發性腹膜癌。

"輸卵管癌"係指輸卵管及/或寬廣韌帶之癌症。

"上皮腫瘤"係在一層圍繞卵巢外側而被稱為胚胎上皮之立方細胞中發展。上皮腫瘤係構成高達90%之所有卵巢癌。

"生殖細胞腫瘤"已被發現於卵巢之卵成熟細胞中。生殖細胞腫瘤係構成所有卵巢癌之約3%，最常發生在少女與年輕女性中。

"基質腫瘤"係從結締組織細胞發展，該細胞係將卵巢保持在一起，並產生女性激素、雌激素及黃體酮。基質腫瘤係構成所有卵巢癌之6%。

本文中之"腫瘤試樣"係為衍生自病患之腫瘤，或包含來自病患腫瘤之腫瘤細胞之試樣。此處腫瘤試樣之實例包括但不限於腫瘤生物檢體、循環腫瘤細胞、循環血漿蛋白質、水腹液、初生細胞培養物或衍生自腫瘤或顯示似腫瘤性質之細胞系，以及經保存腫瘤試樣，譬如經福馬林固定、經石蠟包埋之腫瘤試樣。

當於本文中使用时，"生長抑制劑"係指抑制細胞尤其是HER表現癌細胞生長之化合物或組合物，無論是活體外或活體內。因此，生長抑制劑可為顯著地降低HER表現細胞在S期中之百分比者。生長抑制劑之實例包括會阻斷細胞循環進展(在S期以外之位置處)之藥劑，譬如會引致G1遏制與M-期遏制之劑。古典M-期阻斷劑包括長春花類(長春新鹼與長春花鹼)、紅豆杉烷類及topo II抑制劑，譬如多克索紅菌素、表紅菌素、道諾紅菌素、衣托糖苷(etoposide)及博來霉素。遏制G1之藥劑亦會溢出進入S-期遏制中，例如DNA

烷基化劑，譬如他摩西吩(tamoxifen)、潑尼松、氮烯咪胺、氮芥、順氯胺鉑、胺甲喋呤、5-氟尿嘧啶及ara-C。進一步資訊可參閱癌症之分子基礎, Mendelsohn 與 Israel 編著, 第1章, 其標題為"細胞循環調節、致癌基因及抗贅瘤藥物", Murakami 等人(WB Saunders: Philadelphia, 1995), 尤其是第13頁。

"生長抑制"抗體之實例為會結合至HER2且抑制過度表現HER2之癌細胞生長者。較佳生長抑制HER2抗體會抑制SK-BR-3乳房腫瘤細胞在細胞培養物中之生長，在抗體濃度為約0.5至30微克/毫升下，達大於20%，且較佳為大於50% (例如約50%至約100%)，其中生長抑制係在SK-BR-3細胞曝露至抗體後六天測定(參閱1997年10月14日頒予之美國專利5,677,171)。SK-BR-3細胞生長抑制檢測係更詳細地描述於該專利與下文中。較佳生長抑制抗體為老鼠單株抗體4D5之人化變種，例如搓史圖諸馬伯(trastuzumab)。

"會引致細胞凋零"之抗體係為當藉由附加素V之結合、DNA之斷裂、細胞收縮率、內質網之擴張、細胞斷裂及/或細胞膜泡囊之形成(稱為細胞凋零物體)測定時，會引致程式化細胞死亡者。此細胞經常為會過度表現HER2受體者。此細胞較佳為腫瘤細胞，例如乳房、卵巢、胃、子宮內膜、唾液腺、肺臟、腎臟、結腸、甲狀腺、胰或膀胱細胞。於活體外，該細胞可為SK-BR-3、BT474、Calu3細胞、MDA-MB-453、MDA-MB-361或SKOV3細胞。各種方法可用於評估與細胞凋零有關聯之細胞事件。例如，磷脂醯絲胺酸(PS)移位作用可藉由附加素結合進行度量；DNA斷裂可經過

DNA 架梯作用評估；及伴隨著 DNA 斷裂之核/染色質縮合，可藉由少於二倍體細胞上之任何增加進行評估。會引致細胞凋零之抗體，較佳為會造成約 2 至 50 倍，較佳為約 5 至 50 倍，而最佳為約 10 至 50 倍引致附加素結合者，相對於使用 BT474 細胞之附加素結合檢測中之未經處理細胞(參閱下文)。會引致細胞凋零之 HER2 抗體之實例為 7C2 與 7F3。

"抗原決定部位 2C4" 為在 HER2 之胞外功能部位中抗體 2C4 所結合之區域。為篩檢結合至 2C4 抗原決定部位之抗體，可進行例行之交叉阻斷檢測，譬如在抗體實驗室手冊, Cold Spring Harbor 實驗室, Harlow 與 David Lane 編著 (1988) 中所述者。或者，可進行抗原決定部位定圖譜，以評估抗體是否結合至 HER2 之 2C4 抗原決定部位(例如，在 HER2 之從大約殘基 22 至大約殘基 584(內含)之區域中之任一個或多個殘基；參閱圖 1A-B)。抗原決定部位 2C4 包含來自 HER2 胞外功能部位之功能部位 II 之殘基。2C4 與柏圖祖馬伯 (pertuzumab) 係結合至 HER2 之胞外功能部位，在功能部位 I、II 及 III 之接合處。Franklin 等人 癌細胞 5：317-328 (2004)。

"抗原決定部位 4D5" 為在 HER2 之胞外功能部位中抗體 4D5 (ATCC CRL 10463) 與搓史圖諸馬伯 (trastuzumab) 所結合之區域。此抗原決定部位係接近 HER2 之跨膜功能部位，且在 HER2 之功能部位 IV 內。為篩檢結合至 4D5 抗原決定部位之抗體，可進行例行之交叉阻斷檢測，譬如在抗體實驗室手冊, Cold Spring Harbor 實驗室, Harlow 與 David Lane 編著 (1988) 中所述者。或者，可進行抗原決定部位定圖譜，以評估抗體

是否結合至HER2之4D5抗原決定部位(例如，在從大約殘基529至大約殘基625(內含)之區域中之任一個或多個殘基；參閱圖1A-B)。

"抗原決定部位7C2/7F3"為在HER2之胞外功能部位之功能部位I內之N末端中7C2及/或7F3抗體(各寄存於ATCC中，參閱下文)所結合之區域。為篩檢結合至7C2/7F3抗原決定部位之抗體，可進行例行之交叉阻斷檢測，譬如在抗體實驗室手冊，Cold Spring Harbor實驗室，Harlow與David Lane編著(1988)中所述者。或者，可進行抗原決定部位定圖譜，以証實抗體是否結合至HER2上之7C2/7F3抗原決定部位(例如，在HER2之從大約殘基22至大約殘基53之區域中之任一個或多個殘基；參閱圖1A-B)。

"治療"係指治療處理及預防或防止措施。需要治療者包括已經具有癌症者，以及其中癌症欲被預防者。因此，此處待治療之病患可能已被診斷為具有癌症，或可能傾向於罹患或容易感染癌症。"有效量"一詞係指有效治療病患中癌症之藥物量。有效量之藥物可減少癌細胞數目；降低腫瘤大小；抑制(意即，減緩至某種程度，且較佳為停止)癌細胞浸潤至末梢器官中；抑制(意即，減緩至某種程度，且較佳為停止)腫瘤轉移；抑制腫瘤生長，達某種程度；及/或舒解一或多種與癌症有關聯之病徵，達某種程度。達藥物可預防生長及/或殺死現存癌細胞之程度，其可為細胞抑制及/或細胞毒性。此有效量可延長無進展存活期(例如當藉由關於固態腫瘤、RECIST或CA-125改變之回應評估標準

度量時)，造成目的回應(包括部份回應PR，或完全回應CR)，增加整體存活時間及/或改善癌症之一或多種病徵(例如，如藉由FOSI所評估者)。

"整體存活期"係指病患保持活著，歷經限定期間，譬如自診斷或治療時間起，1年、5年等。

"無進展存活期"係指病患保持活著，癌症未變得更壞。"目的回應"係指可度量回應，包括完全回應(CR)或部份回應(PR)。

所謂"完全回應"或"完全緩解"係意欲為在對治療回應時，所有癌症跡象之消失。這未必意謂癌症已被治癒。

"部份回應"係指在一或多個腫瘤或損害之大小上，或在身體中之癌症程度上降低，以回應治療。

"表現HER之癌症"為一種癌症，其包含具有HER蛋白質存在於其細胞表面上之細胞。

"表現HER2之癌症"為會產生足夠含量之HER2在其細胞表面上之癌症，以致HER2抗體可結合至其上，且針對該癌症具有治療作用。

"過度表現"HER受體之癌症，為具有顯著較高含量之HER受體，譬如HER2，在其細胞表面上之癌症，與相同組織類型之非癌性細胞比較。此種過度表現可因基因放大作用或因增加之轉錄或轉譯所造成。HER受體過度表現可在診斷或預後檢測中，藉由評估增加含量之存在於細胞表面上之HER蛋白質而測得(例如經由免疫組織化學檢測；IHC)。替代或另外，吾人可度量使HER編碼之核酸在細胞

中之含量，例如經由螢光原位雜化(FISH；參閱1998年10月公告之WO 98/45479)，Southern沾吸或聚合酶連鎖反應(PCR)技術，譬如即時定量PCR(RT-PCR)。吾人亦可藉由度量生物流體譬如血清中之流出抗原(例如HER胞外功能部位)，研究HER受體過度表現(參閱，例如1990年6月12日頒予之美國專利4,933,294；1991年4月18日公告之WO 91/05264；1995年3月28日頒予之美國專利5,401,638；及Sias等人*J. Immunol. Methods* 132：73-80(1990))。除了上述檢測之外，各種活體內檢測可被熟練執行者採用。例如，吾人可使病患身體內之細胞曝露至抗體，其係視情況以可偵測標識物標識，例如放射性同位素，且抗體對病患中細胞之結合可進行評估，例如藉由外部掃描放射活性，或藉由分析採取自先前曝露至抗體之病患之生物檢體。

反之，"不會過度表現HER2受體"之癌症，與相同組織類型之非癌性細胞比較，係為不會表現高於正常含量之HER2受體之癌症。

會"過度表現"HER配位體之癌症，與相同組織類型之非癌性細胞比較，為會產生顯著較高含量配位體之癌症。此種過度表現可因基因放大作用或因增加之轉錄或轉譯所造成。HER配位體之過度表現，可藉由評估配位體(或使其編碼之核酸)，在病患中，例如在腫瘤生物檢體中之含量，或藉由各種診斷檢測，譬如上述之IHC、FISH、Southern沾吸、PCR或活體內檢測，以診斷方式測得。

於本文中使用的"細胞毒劑"一詞，係指會抑制或預防細

胞功能及/或造成細胞摧毀之物質。此術語係意欲包括放射性同位素(例如 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} 及 Lu 之放射性同位素)、化學治療劑及毒素, 譬如細菌、真菌、植物或動物來源包括其片段及/或變種之小分子毒素或具酵素活性毒素。

"化學治療劑"為可用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括烷基化劑, 譬如噻替哌(thiotepa)與 CYTOXAN[®] 環磷醯胺; 烷基磺酸鹽, 譬如白血福恩(busulfan)、因普洛硫烷(improsulfan)及哌醯硫烷; 氮丙啶類, 譬如苯并多巴、卡巴醌(carboquone)、美圖瑞多巴(meturedopa)及脲多巴(uredopa); 一氮參圓與甲基三聚氰胺, 包括阿催塔胺(altretamine)、三乙烯三聚氰胺、三乙烯磷醯胺、三乙烯硫代磷醯胺及三羥甲基三聚氰胺; 聚乙醯(尤其是布拉塔辛(bullatacin)與布拉塔辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氫大麻油醇(卓那賓諾(dronabinol), MARINOL[®]); β -拉帕醌; 黃鐘花醌; 秋水仙素; 樺木醇酸; 喜樹鹼(包括合成類似物拓波提肯(topotecan)(HYCAMTIN[®])、CPT-11(伊利諾提肯(irinotecan), CAMPTOSAR[®])、乙醯基喜樹鹼、澳洲葎荖副素及9-胺基喜樹鹼); 布里歐制菌素; 可里制菌素; CC-1065(包括其阿多傑利辛(adozelesin)、卡皆列辛(carzelesin)及必皆列辛(bizelesin)合成類似物); 鬼臼素; 鬼臼素酸; 天尼昔(teniposide); 隱藻素(特別是隱藻素1與隱藻素8); 多拉制菌素; 都卡霉素(duocarmycin)(包括合成類似物, KW-2189與CB1-TM1); 約魯色洛賓(eleutherobin); 汎拉提制菌素(pancratistatin); 沙可迪克叮(sarcodictyin); 史豐吉制菌素

(spongistatin); 氮芥末類, 譬如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、荼氮芥、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、依發斯醯胺(ifosfamide)、氮芥、氮芥氧化物鹽酸鹽、苯丙胺酸氮芥、諾維必清(novembichin)、膽固醇苯乙酸氮芥、潑尼氮芥(prednimustine)、氯乙環磷醯胺、尿嘧啶芥; 亞硝基脲類, 譬如亞硝基脲氮芥、吡葡亞硝脲、弗提氮芥(fotemustine)、環己亞硝脲、尼氮芥(NIMUSTINE)及蘭尼氮芥(ranimustine); 抗生素, 譬如烯二炔抗生素(例如鈣血霉素(calicheamicin), 尤其是鈣血霉素 γ 與鈣血霉素 ω (參閱, 例如 Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994)); 代內霉素(Dynemicin), 包括代內霉素A; 雙膦酸鹽, 譬如可若宗酸鹽(clodronate); 伊斯伯拉霉素(esperamicin); 以及新制癌菌素發色團及相關色素蛋白烯二炔抗生素發色團), 阿可拉辛霉素(aclacinomysins)、放線菌素、歐昨霉素(authramycin)、氮絲胺酸、博來霉素、卡提諾霉素(cactinomycin)、卡拉必素(carabycin)、洋紅霉素、嗜癌素、色霉素、達克汀霉素、道諾紅菌素、迭托紅菌素(detorubicin)、6-重氮基-5-酮基-L-正亮胺酸, 正白胺酸、ADRIAMYCIN[®]多克索紅菌素(包括嗎福啉基-多克索紅菌素、氘基嗎福啉基-多克索紅菌素、2-二氫吡咯并-多克索紅菌素及脫氧多克索紅菌素)、表紅菌素、約索紅菌素(esorubicin)、依達紅菌素、馬些諾霉素(marcellomycin), 絲裂霉素, 譬如絲裂霉素C, 霉菌酚酸、諾加拉霉素、橄欖霉素、佩普羅霉素(peplomycin)、波非洛霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、奎拉霉素(quelamycin)、洛多紅菌素(rodorubicin)、鏈黑菌素、鏈霉亞硝基素、殺結核菌

素、由苳尼梅斯(ubenimex)、吉諾制菌素、唑紅菌素(zorubicin); 抗新陳代謝劑, 譬如胺甲喋呤與5-氟尿嘧啶(5-FU); 葉酸類似物, 譬如丹諾喋呤(denopterin)、胺甲喋呤、蝶醯喋呤、胺三甲喋呤(trimetrexate); 喋呤類似物, 譬如弗達拉賓(fludarabine)、6-巰基喋呤、噻米普林(thiamiprine)、硫基鳥喋呤; 嘧啶類似物, 譬如安西塔賓(ANCITABINE)、氮西替定(azacitidine)、6-氮脲嘧啶核苷、卡莫呋(carmofur)、阿糖胞苷、二去氧脲嘧啶核苷、多西弗利叮(doxifluridine)、恩諾西塔賓(enocitabine)、5-氟脫氧尿苷; 雄激素, 譬如二甲甾酮、卓莫史坦酮(Dromostanolone)丙酸鹽、表提歐史坦醇(epitiostanol)、美提歐史坦(mepitiostane)、甾丸內脂; 抗-腎上腺劑, 譬如胺基導眠能(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、三洛斯坦(trilostane); 葉酸補充物, 譬如弗若林(frolic)酸; 醋葡內酯; 醛磷醯胺糖苷; 胺基乙醯丙酸; 恩尼魯拉西(eniluracil); 阿姆薩素(amsacrine); 貝斯他布西(bestrabucil); 雙安催(bisantrene); 約達催薩(edatraxate); 迪發弗胺(defofamine); 秋水仙胺; 迪阿濟醯(diaziquone); 也佛尼辛(elfornithine); 耶律普寧(elliptinium)醋酸鹽; 艾波希酮(epothilone); 乙環氧啉; 硝酸鎂; 羥基脲; 香菇糖; 洛尼丹寧(lonidainine); 美坦習諾(maytansinoid), 譬如美坦生(maytansine)與安沙米托辛(ansamitocins); 絲裂胍脲(mitoguazone); 絲裂黃酮(mitoxantrone); 莫比坦莫(mopidanmol); 尼爪俄林(nitraerine); 戊托制菌素(pentostatin); 酚那美特(phenamet); 皮拉紅菌素(pirarubicin); 洛索山酮(losoxantrone); 2-乙基醯肼; 甲基苳肼; PSK[®]多醣複合物(JHS天然產物, Eugene, OR); 丙亞胺;

利坐素(rhizoxin); 西坐非蘭(sizofiran); 螺鎂; 細交鏈孢菌酮酸;
 三環偶氮醌(triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 單端孢素(尤其是 T-2 毒素、維拉苦林(verracurin) A、杆孢菌素 A 及安瓜定(anguidine)); 胺基甲酸酯; 長春花素(ELDISINE[®]、FILDESIN[®]);
 氮烯咪胺; 甘露醇氮芥; 米托布朗托(mitobronitol); 絲裂乳酸
 萘酚(mitolactol); 雙溴丙基哌啶; 加西托辛(gacytosine); 阿拉
 伯糖苷("Ara-C"); 環磷醯胺; 噻替哌(thiotepa); 紅豆杉烷類,
 例如 TAXOL[®] 培克里他索(paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb 腫瘤學,
 Princeton, N.J.), ABRAXANETM 不含克雷莫弗(Cremophor) 白蛋白
 經設計培克里他索毫微粒子配方(美國醫藥配對物,
 Schaumburg, Illinois) 及 TAXOTERE[®] 多謝他索(doxetaxel)(Rhone-
 Poulenc Rorer, Antony, France); 氯安布西(chloranbucil); 真西塔賓
 (gemcitabine)(GEMZAR[®]); 6-巯基鳥嘌呤; 巯基嘌呤; 胺甲喋呤;
 鉑類似物, 譬如順氯胺鉑與碳氯胺鉑; 長春花鹼(VELBAN[®]);
 鉑; 衣托糖苷(etoposide)(VP-16); 依發斯醯胺(ifosfamide); 絲裂
 黃酮(mitoxantrone); 長春新鹼(ONCOVIN[®]); 草酸鉑; 白威賓
 (leucovorin); 威諾賓(vinorelbine)(NAVELBINE[®]); 諾凡從(novantrone)
 ; 伊達催克沙特(edatrexate); 道諾霉素; 胺基喋呤; 愛西若
 達(xeloda); 愛邦宗酸鹽(ibandronate); 拓撲異構酶抑制劑
 RFS 2000; 二氟甲基鳥胺酸(DMFO); 類視色素, 譬如視黃酸;
 卡配西塔賓(capecitabine); 任何上述之藥學上可接受之鹽、酸
 或衍生物; 以及上述兩種或多種之組合, 譬如 CHOP, 關於
 環磷醯胺、多克索紅菌素、長春新鹼及氫化潑尼松之合併
 療法之縮寫, 與 FOLFOX, 關於與 5-FU 及白威賓(leucovorin)

合併之草酸鉑 (ELOXATINTM) 之治療服用法之縮寫。

亦被包含於此定義中者為抗-激素劑，用以調節或抑制對於腫瘤之激素作用，譬如抗雌激素與選擇性雌激素受體調制劑 (SERM)，包括例如他摩西吩 (tamoxifen) (包括 NOLVADEX[®] 他摩西吩 (tamoxifen))、瑞洛西吩 (raloxifene)、卓洛西吩 (droloxifene)、4-羥基他摩西吩、三氧西吩 (trioxifene)、凱歐西吩 (keoxifene)、LY117018、翁那普利史東 (onapristone) 及 FARESTON[®] 托里米吩 (toremifene)；芳香酶抑制劑，其係抑制酵素芳香酶，其係調節雌激素在腎上腺中之生產，例如 4(5)-咪唑、胺基導眠能 (aminoglutethimide)、MEGASE[®] 甲地孕酮醋酸鹽、AROMASIN[®] 約克美斯烷 (exemestane)、弗美斯烷 (formestan)、發德羅唑 (fadrozole)、RIVISOR[®] 波羅唑 (vorozole)、FEMARA[®] 列特羅唑 (letrozole) 及 ARIMIDEX[®] 安那史唑 (anastrozole)；及抗雄性激素劑，譬如弗如醯胺 (flutamide)、尼如醯胺 (nilutamide)、二卡如醯胺 (bicalutamide)、留普內酯 (leuprolide) 及郭捨瑞林 (goserelin)；以及卓沙西塔賓 (troxacitabine) (1,3-二氧伍圓核苷胞嘧啶類似物)；反有意義寡核苷酸，特別是會抑制基因在與進行細胞增生有關聯之發出訊息途徑中之表現者，例如 PKC- α 、Raf、H-Ras 及表皮生長因子受體 (EGF-R)；疫苗，譬如基因療法疫苗，例如 ALLOVECTIN[®] 疫苗、LEUVECTIN[®] 疫苗及 VAXID[®] 疫苗；PROLEUKIN[®] rIL-2；LURTOTECAN[®] 拓樸異構酶 1 抑制劑；ABARELIX[®] rmRH；及任何上述之藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

"抗代謝物化學治療劑" 為結構上類似新陳代謝產物之藥

劑，但不能以生產性方式被身體利用。許多抗代謝物化學治療劑會干擾核酸RNA與DNA之生產。抗代謝物化學治療劑之實例包括真西塔賓(gemcitabine)(GEMZAR[®])、5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡配西塔賓(capecitabine)(XELODATM)、6-巰基嘌呤、胺甲喋呤、6-硫基鳥嘌呤、佩美催西得(pemetrexed)、瑞提崔斯得(raltitrexed)、阿拉伯糖基胞嘧啶ARA-C阿糖胞苷(CYTOSAR-U[®])、氮烯咪胺(DTIC-DOME[®])、偶氮基胞嘧啶、脫氧胞嘧啶、嘧啶、弗達拉賓(fludarabine)(FLUDARA[®])、可列拉賓(cladribine)、2-脫氧-D-葡萄糖等。較佳抗代謝物化學治療劑為真西塔賓(gemcitabine)。

"真西塔賓(Gemcitabine)"或"2'-脫氧-2',2'-二氟胞嘧啶核苷單鹽酸鹽(b-異構物)"為核苷類似物，其顯示抗腫瘤活性。關於真西塔賓HCl之實驗式為C₉H₁₁F₂N₃O₄•HCl。真西塔賓HCl係由Eli Lilly以商標GEMZAR[®]銷售。

"鉑為基礎之化學治療劑"包括含有鉑作為分子之一個完整部份之有機化合物。鉑為基礎之化學治療劑之實例包括碳氯胺鉑、順氯胺鉑及草酸鉑。

所謂"鉑為基礎之化學療法"係意欲為具有一或多種鉑為基礎之化學治療劑，視情況併用一或多種其他化學治療劑之療法。

所謂"鉑抗藥性"癌症係意謂癌症病患在接受鉑為基礎之化學療法之同時已發展(意即病患係為"鉑反拗")，或病患在完成鉑為基礎之化學治療服用法後，於12個月內(例如於6個月內)已發展。

於本文中使用的"EGFR-為標的之藥物"一詞，係指會結合至EGFR且視情況抑制EGFR活化作用之治療劑。此種藥物之實例包括會結合至EGFR之抗體與小分子。會結合至EGFR抗體之實例，包括MAb 579 (ATCC CRL HB 8506)、MAb 455 (ATCC CRL HB8507)、MAb 225 (ATCC CRL 8508)、MAb 528 (ATCC CRL 8509) (參閱美國專利4,943,533, Mendelsohn 等人)，及其變種，譬如經嵌合化之225 (C225 或些圖西馬伯 (Cetuximab)；ERBUTIX®) 與再成形人類225 (H225) (參閱WO 96/40210，Imclone系統公司)；會結合類型II突變型EGFR之抗體(美國專利5,212,290)；會結合EGFR之人化與嵌合抗體，如在美國專利5,891,996中所述者；及會結合EGFR之人類抗體，譬如ABX-EGF (參閱WO 98/50433，Abgenix)。抗-EGFR抗體可與細胞毒劑共軛，因此產生免疫共軛物(參閱，例如EP659,439A2, Merck專利 GmbH)。會結合至EGFR之小分子實例包括ZD1839或吉非汀尼伯(Gefitinib)(IRESSA™；Astra Zeneca)、CP-358774或姍羅提尼伯(Erlotinib) HCl (TARCEVA™；Genentech/OSI) 及AG1478、AG1571 (SU 5271；Sugen)。

"酪胺酸激酶抑制劑"為會抑制酪胺酸激酶譬如HER受體之酪胺酸激酶活性達某種程度之分子。此種抑制劑之實例包括前文段落中指出之EGFR-為標的之藥物，以及小分子HER2酪胺酸激酶抑制劑，譬如TAK 165，可得自Takeda，雙-HER抑制劑，譬如EKB-569 (可得自Wyeth)，其會優先地結合EGFR，但抑制HER2 & EGFR-過度表現細胞兩者，GW572016 (可得自Glaxo)，一種口服HER2與EGFR酪胺酸激酶抑制劑，及

PKI-166 (可得自 Novartis)；全-HER 抑制劑，譬如肯內提尼伯 (canertinib)(CI-1033；Pharmacia)；Raf-1 抑制劑，譬如反有意義劑，ISIS-5132，可得自 ISIS 醫藥，其會抑制 Raf-1 發出訊息；非 HER 為標的之 TK 抑制劑，譬如愛馬汀尼伯 (Imatinib) 甲烷磺酸鹽 (GleevacTM)，可得自 Glaxo；MAPK 胞外調節之激酶 I 抑制劑 CI-1040 (可得自 Pharmacia)；喹唑啉類，譬如 PD 153035，4-(3-氯基苯胺基)喹唑啉；吡啶并嘧啶類；嘧啶并嘧啶類；吡咯并嘧啶類，譬如 CGP 59326、CGP 60261 及 CGP 62706；吡唑并嘧啶類，4-(苯基胺基)-7H-吡咯并 [2,3-d]嘧啶類；薑黃色素 (二阿魏醯基甲烷, 4,5-雙(4-氯基苯胺基)鄰苯二甲醯亞胺)；色磷素 (tyrphostin)，含有硝基噻吩部份基團；PD-0183805 (Warner-Lamber)；反有意義分子 (例如會結合至使 HER 編碼之核酸者)；喹喏啉類 (美國專利 5,804,396)；色磷素類 (美國專利 5,804,396)；ZD6474 (Astra Zeneca)；PTK-787 (Novartis/Schering AG)；全-HER 抑制劑，譬如 CI-1033 (Pfizer)；Affinitac (ISIS 3521；Isis/Lilly)；愛馬汀尼伯 (Imatinib) 甲烷磺酸鹽 (Gleevac；Novartis)；PKI 166 (Novartis)；GW2016 (Glaxo SmithKline)；CI-1033 (Pfizer)；EKB-569 (Wyeth)；Semaxinib (Sugen)；ZD6474 (AstraZeneca)；PTK-787 (Novartis/Schering AG)；INC-1C11 (Imclone)；或如在任何下列專利公報中所述者：美國專利 5,804,396；WO 99/09016 (美國氰胺)；WO 98/43960 (美國氰胺)；WO 97/38983 (Warner Lambert)；WO 99/06378 (Warner Lambert)；WO 99/06396 (Warner Lambert)；WO 96/30347 (Pfizer 公司)；WO 96/33978 (Zeneca)；WO 96/3397 (Zeneca)；及 WO 96/33980 (Zeneca)。

"抗血管生成劑"係指會阻斷或干擾血管發展達某種程度之化合物。抗血管生成因子可為例如會結合至涉及促進血管生成之生長因子或生長因子受體之小分子或抗體。本文之較佳抗血管生成因子為會結合至血管內皮生長因子(VEGF)之抗體，譬如貝發西馬伯(Bevacizumab)(AVASTIN®)。

"細胞活素"一詞為被一個細胞群集體釋出之蛋白質之總稱術語，其係作用在另一種細胞上作為胞間介體。此種細胞活素之實例為淋巴細胞活素、單細胞活素及傳統多肽激素。被包含在細胞活素之中者為生長激素，譬如人類生長激素、N-甲硫丁胺鹽基人類生長激素及牛生長激素；甲狀旁腺激素；甲狀腺素；胰島素；胰島素原；弛緩素；弛緩素原；糖蛋白激素，譬如促卵泡成熟激素(FSH)、促甲狀腺激素(TSH)及促黃體生成激素(LH)；肝生長因子；成纖維細胞生長因子；催乳激素；胎盤催乳激素；腫瘤壞死因子- α 與- β ；目勒氏抑制物質；老鼠促性腺激素有關聯肽；抑制素；活性素；血管內皮生長因子；整合素；血栓造血素(TPO)；神經生長因子，譬如NGF- β ；血小板生長因子；轉變生長因子(TGF)，譬如TGF- α 與TGF- β ；似胰島素生長因子-I與-II；促紅血球生成素(EPO)；骨誘發因子；干擾素，譬如干擾素- α 、- β 及- γ ；菌落刺激因子(CSF)，譬如巨噬細胞-CSF(M-CSF)；粒性細胞-巨噬細胞-CSF(GM-CSF)；及粒性細胞-CSF(G-CSF)；間白血球活素(IL)，譬如IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12；腫瘤壞死因子，譬如TNF- α 或TNF- β ；及其他多肽因子，包括LIF與kit配位體(KL)。於本文中使

用之細胞活素一詞，包括來自天然來源或來自重組細胞培養物之蛋白質，及原本順序細胞活素之生物活性相當物。

II. HER2 抗體之產生

下文說明係關於製造被使用於根據本發明抗體之舉例技術。欲被用於製造抗體之HER2抗原，可為例如HER2之胞外功能部位或其一部份之可溶性形式，含有所要之抗原決定部位。或者，在其細胞表面處表現HER2之細胞（例如經轉變以過度表現HER2之NIH-3T3細胞；或癌細胞系，譬如SK-BR-3細胞，參閱Stancovski等人*PNAS (USA)*88: 8691-8695 (1991))可用以產生抗體。可用於產生抗體之其他HER2形式，將為熟諳此藝者所顯而易見。

(i) 多株抗體

多株抗體較佳係在動物中藉由有關聯抗原與佐劑之多重皮下(sc)或腹膜腔內(ip)注射而引起。其可用以使有關聯之抗原共軛至欲被免疫物種中為免疫原之蛋白質，例如鍵孔青貝血藍質、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑，使用雙官能性或衍化劑，例如順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基磺酸基琥珀醯亞胺酯（經過半胱胺酸殘基之共軛作用）、N-羥基琥珀醯亞胺（經過離胺酸殘基）、戊二醛、琥珀酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ ，其中R與 R^1 為不同烷基。

動物係針對該抗原、免疫原共軛物或衍生物經免疫，其方式是將例如100微克或5微克之蛋白質或共軛物（個別對兔子或老鼠）與3體積Freund氏完整佐劑合併，將此溶液以皮內方式注射在多重位置處。一個月後，動物係以1/5至1/10

最初量之肽或共軛物，在Freund氏完整佐劑中，在多重位置處藉由皮下注射而被加速。七至十四天後，將動物採血，並檢測血清之抗體滴定度。動物係被加速直到滴定度平穩為止。動物較佳係以相同抗原之共軛物加速，但係共軛至不同蛋白質及/或經過不同交聯作用試劑。共軛物亦可在重組細胞培養物中製成蛋白質融合物。聚集劑，譬如明礬，亦適合用以加強免疫回應。

(ii) 單株抗體

單株抗體係得自實質上均質抗體之個體群，意即包含該個體群之個別抗體係為相同，惟可以少量存在之可能天然生成之突變型除外。因此，修飾用語"單株"係表示抗體之特性為並非分立抗體之混合物。

例如，單株抗體可使用首先由Kohler等人, *Nature*, 256: 495 (1975)所描述之雜種瘤方法製成，或可藉由重組DNA方法(美國專利4,816,567)製成。

在雜種瘤方法中，老鼠或其他適當宿主動物，譬如大頰鼠，係如前文所述經免疫，以誘使淋巴細胞產生或能夠產生抗體，其將專一性地結合至用於免疫作用之蛋白質。或者，淋巴細胞可於活體外經免疫。然後，使用適當融合劑，譬如聚乙二醇，使淋巴細胞與骨髓細胞瘤細胞融合，以形成雜種瘤細胞(Goding, *單株抗體：原理與實務*, 第59-103頁(大學出版社, 1986)。

經如此製成之雜種瘤細胞係被接種並生長於適當培養基中，其較佳係含有一或多種會抑制未融合母體骨髓細胞瘤

細胞生長或存活之物質。例如，若母體骨髓細胞瘤細胞缺乏酵素次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(HGPRT或HPRT)，則供雜種瘤用之培養基，典型上將包含次黃嘌呤、胺基嘌呤及胸苷(HAT培養基)，此等物質會預防HGPRT-缺乏細胞之生長。

較佳骨髓細胞瘤細胞係為會有效地融合，支持藉由經選擇之產生抗體細胞之安定高含量產生抗體，及係對培養基譬如HAT培養基敏感者。其中，較佳骨髓細胞瘤細胞系為老鼠骨髓細胞瘤細胞系，譬如衍生自MOPC-21與MPC-11老鼠腫瘤者，可得自Salk研究所細胞分佈中心(San Diego, California USA)，及SP-2或X63-Ag8-653細胞，可得自美國培養物類型收集處(Rockville, Maryland USA)。人類骨髓細胞瘤與老鼠-人類雜骨髓細胞瘤細胞系亦已被描述用於產生人類單株抗體(Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); 與Brodeur等人, 單株抗體生產技術與應用, 第51-63頁(Marcel Dekker公司, New York, 1987))。

於其中正在生長雜種瘤細胞之培養基，係經檢測關於被導引抵抗該抗原之單株抗體之生產。藉由雜種瘤細胞產生之單株抗體之結合專一性，較佳係藉由免疫沉澱作用或藉由活體外結合檢測測定，譬如放射免疫檢測(RIA)或酵素連結之免疫吸收性檢測(ELISA)。

單株抗體之結合親和力可例如藉由Munson等人, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980)之Scatchard分析測定。

在雜種瘤細胞經確認會產生具有所要專一性、親和力及/或活性之抗體後，可將無性繁殖系藉由限制稀釋程序進行

次代無性繁殖，並藉由標準方法生長(Goding, 單株抗體：原理與實務, 第59-103頁(大學出版社1986))。供此項目的使用之適當培養基，包括例如D-MEM或RPMI-1640培養基。此外，雜種瘤細胞可於活體內，在動物中生長成為水腹腫瘤。

藉由次代無性繁殖系分泌之單株抗體，係適當地藉習用抗體純化程序，自培養基、水腹流體或血清分離，例如蛋白質A-瓊脂糖、羥基磷灰石層析、凝膠電泳、滲析或親和層析法。

使單株抗體編碼之DNA係容易地使用習用程序單離與定序(例如利用寡核苷酸探測物，其能夠專一性地結合至使老鼠抗體之重與輕鏈編碼之基因)。雜種瘤細胞係充作此種DNA之較佳來源。一旦經單離，DNA即可被置入表現載體中，然後使其轉染至宿主細胞中，譬如大腸桿菌細胞、猿猴COS細胞、中國大頰鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓細胞瘤細胞，其在其他情況下不會產生抗體蛋白質，以獲得單株抗體在重組宿主細胞中之合成。關於使抗體編碼之DNA在細菌中重組表現之回顧論文，係包括Skerra等人, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) 與 Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992)。

於進一步具體實施例中，單株抗體或抗體片段可自使用McCafferty等人, *Nature*, 348: 552-554 (1990)中所述之技術產生之抗體噬菌體庫單離。Clackson等人, *Nature*, 352: 624-628 (1991) 與 Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)描述老鼠與人類抗體個別使用噬菌體庫單離。隨後之刊物係描述藉由鏈滑移

產生高親和力(nM範圍)人類抗體(Marks等人, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), 以及結合感染與活體內重組, 作為建構極大噬菌體庫之策略(Waterhouse等人, *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993))。因此, 此等技術為對傳統單株抗體雜種瘤技術之可實行替代方式, 以單離單株抗體。

DNA亦可經改質, 例如替代同系老鼠順序, 經由以編碼順序取代人類重鏈與輕鏈恒定功能部位(美國專利4,816,567; 與Morrison等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), 或經由使非免疫球蛋白多肽之全部或部份編碼順序, 以共價方式接合至免疫球蛋白編碼順序。

典型上, 此種非免疫球蛋白多肽係用以取代抗體之恒定功能部位, 或其係用以取代抗體之一個抗原組合位置之可變功能部位, 以產生嵌合雙價抗體, 其包含一個對抗原具有專一性之抗原組合位置, 與另一個對不同抗原具有專一性之抗原組合位置。

(iii) 人化抗體

使非人類抗體人化之方法, 已被描述於此項技藝。人化抗體較佳係具有一或多個胺基酸殘基, 自非人類來源引進其中。此等非人類胺基酸殘基經常被稱為"輸入"殘基, 其典型上係取自"輸入"可變功能部位。人化作用基本上可按照Winter與共同研究者之方法進行(Jones等人, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen等人, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), 其方式是以高可變區域順序取代相應之人類抗體順序。因此, 此種"人化"

抗體係為嵌合抗體(美國專利4,816,567)，其中實質上小於完整人類可變功能部位已被來自非人類物種之相應順序取代。實際上，人化抗體典型上為人類抗體，其中一些高可變區域殘基與可能之一些FR殘基係被來自齧齒動物抗體中類似位置之殘基取代。

欲被用於製造人化抗體之人類輕與重可變功能部位兩者，其選擇極為重要，以降低抗原性。根據所謂"最良好吻合"方法，齧齒動物抗體之可變功能部位順序係針對已知人類可變功能部位順序之整個資料庫進行篩選。然後，接受最接近齧齒動物之人類順序，作為人化抗體用之人類骨架區域(FR)(Sims 等人, *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia 等人, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987))。另一種方法係使用衍生自輕或重鏈特定亞組之所有人類抗體之同感順序之特定骨架區域。相同骨架可用於數種不同人化抗體(Carter 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta 等人, *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993))。

更重要的是，抗體應被人化並保留對抗原之高親和力，及其他有利生物學性質。為達成此目的，根據較佳方法，人化抗體係藉由母體順序與各種概念人化產物之分析程序，使用母體與人化順序之三次元模型製成。三次元免疫球蛋白模型係為一般可取得，且為熟諳此藝者所熟悉。圖解與顯示所選擇候選免疫球蛋白順序之可能三次元構形結構之電腦程式可取得。此等顯示之檢查允許分析殘基在候選免疫球蛋白順序之功能上之可能角色，意即分析殘基影

響候選免疫球蛋白結合其抗原之能力。依此方式，FR殘基可自接受者與輸入順序進行選擇與合併，以致所要之抗體特性，譬如增加對標的抗原之親和力，係被達成。一般而言，高可變區域殘基係直接且最實質上涉及影響抗原結合。

下文實例3係說明舉例之人化HER2抗體之產生，其係結合HER2且阻斷HER受體之配位體活化作用。此處特別令人感興趣之人化抗體，會阻斷EGF、TGF- α 及/或HRG所媒介之MAPK活化作用，基本上如老鼠單株抗體2C4(或其Fab片段)一樣有效，及/或結合HER2，基本上如老鼠單株抗體2C4(或其Fab片段)一樣有效。此處之人化抗體可例如包含被併入人類可變重功能部位中之非人類高可變區域殘基，並可進一步包含骨架區域(FR)取代，在選自包括69H、71H及73H之位置，利用Kabat等人，具免疫學重要性之蛋白質順序，第5版，國家衛生研究所公共衛生服務，Bethesda, MD (1991)中所提出之可變功能部位編號系統。於一項具體實施例中，人化抗體包含FR取代，在位置69H、71H及73H中之兩個或全部處。

此處吾人感興趣之舉例人化抗體包含可變重功能部位互補性決定殘基GFTFTDYTMX，其中X較佳為D或S(順序識別碼：7)；DVNPNSGGSIYNQRFKG(順序識別碼：8)；及/或NLGPSFYFDY(順序識別碼：9)，視情況包含此等CDR殘基之胺基酸改質物，例如其中改質物基本上保持或改良抗體之親和力。例如，吾人感興趣之抗體變種可具有約一至約七或約五個胺基酸取代，在上述可變重CDR順序中。此種抗

體變種可藉由親和力成熟製成，例如下文所述者。最佳人化抗體包含順序識別碼：4中之可變重功能部位胺基酸順序。

人化抗體可包含可變輕功能部位互補性決定殘基 KASQDV SIGVA (順序識別碼：10)；SASYX¹X²X³，其中X¹較佳為R或L，X²較佳為Y或E，及X³較佳為T或S(順序識別碼：11)；及/或QQYYIYPYT(順序識別碼：12)，例如，除了此等可變重功能部位以外，於前文段落中之CDR殘基。此種人化抗體視情況包含上述CDR殘基之胺基酸改質物，例如其中改質物基本上保持或改良抗體之親和力。例如，吾人感興趣之抗體變種可具有約一至約七或約五個胺基酸取代，在上述可變輕CDR順序中。此種抗體變種可藉由親和力成熟製成，例如下文所述者。最佳人化抗體包含順序識別碼：3中之可變輕功能部位胺基酸順序。

本申請案亦意欲涵蓋親和力成熟抗體，其係結合HER2並阻斷HER受體之配位體活化作用。母抗體可為人類抗體或人化抗體，例如個別包含順序識別碼3與4之可變輕及/或重順序者(意即變種574)。親和力成熟抗體較佳係結合至HER2受體，具有親和力優於老鼠2C4或變種574(例如約二或約四倍，至約100倍或約1000倍經改良之親和力，例如當使用HER2胞外功能部位(ECD)ELISA評估時)。供取代之舉例可變重CDR殘基包括H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99，或兩種或多種之組合(例如二、三、四、五、六或七種此等殘基)。供改變之可變輕CDR殘基之實例包括L28, L50, L53, L56, L91,

L92, L93, L94, L96, L97，或兩種或多種之組合(例如二至三、四、五或至高達約十種此等殘基)。

人化抗體或親和力成熟抗體之各種形式係意欲被涵蓋在內。例如，人化抗體或親和力成熟抗體可為抗體片段，譬如 Fab，其係視情況與一或多種細胞毒劑共軛，以產生免疫共軛物。或者，人化抗體或親和力成熟抗體可為完整抗體，譬如完整 IgG1 抗體。

(iv) 人類抗體

作為人化作用之一種替代方式，可產生人類抗體。例如，目前能夠產生轉基因動物(例如老鼠)，其能夠在免疫作用時，於內源免疫球蛋白生產不存在下，產生人類抗體之全滿存庫。例如，已描述在嵌合與胚細胞系突變老鼠中之抗體重鏈接合區域(J_H)基因之同合子缺失，會造成內源抗體生產之完全抑制。人類胚細胞系免疫球蛋白基因陣列在此種胚細胞系突變老鼠中之轉移，將造成人類抗體在抗原激發時產生。參閱，例如 Jakobovits 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits 等人, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Bruggermann 等人, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); 以及美國專利案號 5,591,669, 5,589,369 及 5,545,807。

或者，噬菌體顯示技術(McCafferty 等人, *Nature* 348: 552-553 (1990))可從得自未經免疫供體之免疫球蛋白可變(V)功能部位基因存庫，用以產生活體外人類抗體與抗體片段。根據此項技術，抗體 V 功能部位基因係於架構內無性繁殖至絲狀噬菌體之無論是主要或較少病毒外殼蛋白基因中，譬如

M13 或 fd，並以功能性抗體片段顯示在噬菌體粒子之表面上。由於絲狀粒子含有噬菌體基因組之單股 DNA 複製，故以抗體功能性質為基礎之選擇亦會造成使顯示此等性質之抗體編碼之基因之選擇。因此，噬菌體係模擬 B-細胞之一些性質。噬菌體顯示可在多種格式中進行；關於其回顧，可參閱例如 Johnson, Kevin S. 與 Chiswell, David J., 於結構生物學上之現行見解 3: 564-571 (1993)。V-基因鏈段之數種來源可被使用於噬菌體顯示。Clackson 等人, *Nature*, 352: 624-628 (1991) 係從衍生自經免疫老鼠脾臟之 V 基因之小的隨機結合庫，單離多種陣列之抗-噁唑酮抗體。得自未經免疫人類供體之 V 基因存庫可被建構，而對各種不同陣列抗原(包括自體抗原)之抗體，基本上可按照由 Marks 等人, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991)，或 Griffith 等人, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993) 所述之技術單離。亦參閱美國專利案號 5,565,332 與 5,573,905。

正如上文所討論者，人類抗體亦可藉由活體外經活化 B 細胞產生(參閱美國專利 5,567,610 與 5,229,275)。

Huma HER2 抗體係被描述於 1998 年 6 月 30 日頒予之美國專利 5,772,997 與 1997 年 1 月 3 日公告之 WO 97/00271 中。

(v) 抗體片段

已發展各種技術，以製造抗體片段。傳統上，此等片段係經由完整抗體之蛋白分解消化而衍生(參閱，例如 Morimoto 等人, *生物化學與生物物理方法期刊* 24: 107-117 (1992)；與 Brennan 等人, *Science*, 229: 81 (1985))。但是，此等片段目前可直接藉由重組宿主細胞產生。例如，抗體片段可

單離自上文所討論之抗體噬菌體庫。或者，Fab'-SH 片段可直接回收自大腸桿菌，並以化學方式偶合，以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter 等人, Bio/Technology 10: 163-167 (1992))。根據另一種途徑，F(ab')₂ 片段可直接單離自重組宿主細胞培養物。用於產生抗體片段之其他技術將為熟練執行者所明瞭。在其他具體實施例中，所選擇之抗體為單鏈 Fv 片段 (scFv)。參閱 WO 93/16185；美國專利 5,571,894；及美國專利 5,587,458。抗體片段亦可為"線性抗體"，例如在美國專利 5,641,870 中所述者。此種線性抗體片段可為單專一性或雙專一性。

(vi) 雙專一性抗體

雙專一性抗體為對至少兩種不同抗原決定部位具有結合專一性之抗體。舉例之雙專一性抗體可結合至 HER2 蛋白質之兩個不同抗原決定部位。其他此種抗體可使 HER2 結合位置與 EGFR、HER3 及 / 或 HER4 之結合位置合併。或者，HER2 臂可與一個臂合併，後述臂係結合至白血球上之觸發分子，譬如 T-細胞受體分子 (例如 CD2 或 CD3)，或對 IgG 之 Fc 受體 (Fc γ R)，譬如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 及 Fc γ RIII (CD16)，以使細胞防禦機制聚焦至表現 HER2 之細胞。雙專一性抗體亦可用以使細胞毒劑定位至表現 HER2 之細胞。此等抗體具有 HER2 結合臂，及結合細胞毒劑 (例如沙孢素 (saporin)、抗-干擾素- α 、長春花生物鹼、蓖麻蛋白 A 鏈、胺甲喋呤或放射性同位素附著素) 之臂。雙專一性抗體可被製成全長抗體或抗體片段 (例如 F(ab')₂ 雙專一性抗體)。

WO 96/16673 係描述雙專一性 HER2/Fc γ RIII 抗體，而美國專

利 5,837,234 係揭示雙專一性 HER2/Fc γ RI 抗體 IDM1 (Osidem)。雙專一性 HER2/Fc α 抗體係被顯示於 WO 98/02463 中。美國專利 5,821,337 陳述雙專一性 HER2/CD3 抗體。MDX-210 為雙專一性 HER2-Fc γ RIII Ab。

製造雙專一性抗體之方法，係為此項技藝中已知。全長雙專一性抗體之傳統製造，係以兩種免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現為基礎，其中此兩鏈具有不同專一性 (Millstein 等人, *Nature*, 305: 537-539 (1983))。由於免疫球蛋白重與輕鏈之隨機揀選，故此等雜種瘤 (四重瘤) 係產生 10 種不同抗體分子之可能混合物，其中只有一種具有正確雙專一性結構。此正確分子之純化，其經常藉由親和層析步驟達成，是頗為麻煩的，且產物產率很低。類似程序係揭示於 WO 93/08829 中，及在 Traunecker 等人, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991) 中。

根據不同途徑，具有所要結合專一性之抗體可變功能部位 (抗體-抗原組合位置) 係融合至免疫球蛋白恒定功能部位順序。融合物較佳係具有免疫球蛋白重鏈恒定功能部位，包含至少部份鉸鏈、CH2 及 CH3 區域。較佳係具有第一個重鏈恒定區域 (CH1)，含有輕鏈結合所必須之位置，存在於至少一個融合物中。使免疫球蛋白重鏈融合物編碼之 DNA 及若需要時之免疫球蛋白輕鏈，係被插入個別表現載體中，且被共轉染至適當宿主生物體中。當於建構中使用不相等比例之三種多肽鏈提供最適宜產率時之具體實施例中，這在調整三個多肽片段之相互比例上提供大的靈活性。但是，當至少兩個呈相等比例之多肽鏈之表現造成高產率時，

或當此等比例未具有特別重要性時，可將對於兩個或全部三個多肽鏈之編碼順序插入一個表現載體中。

於此途徑之一項較佳具體實施例中，雙專一性抗體係由在一臂中具有第一個結合專一性之雜種免疫球蛋白重鏈，與在另一臂中之雜種免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二個結合專一性)所組成。已發現此不對稱結構有助於所要雙專一性化合物自不想要之免疫球蛋白鏈組合中分離，因免疫球蛋白輕鏈存在於只有一半之雙專一性分子中，係提供一種容易之分離方式。此途徑係揭示於WO 94/04690中。關於產生雙專一性抗體之進一步細節，可參閱例如 Suresh 等人，*酶學方法*, 121: 210 (1986)。

根據另一種經描述於美國專利 5,731,168 中之途徑，於一對抗體分子間之界面可經設計，以使異種二聚體之百分比達到最大程度，其係回收自重組細胞培養物。較佳界面包含抗體恒定功能部位 C_H3 區域之至少一部份。於此方法中，來自第一個抗體分子界面之一或多個小胺基酸側鏈，係被較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換。與該大側鏈相同或類似大小之補償"孔穴"係在第二個抗體分子界面產生，其方式是以較小側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈。這提供一種機制，以增加異種二聚體之產率，勝過其他不想要之最終產物，譬如同種二聚體。

雙專一性抗體包括交聯或"雜共軛"抗體。例如，雜共軛物中之抗體之一可偶合至抗生物素蛋白，另一個則偶合至生物素。此種抗體已被提出例如使免疫系統細胞成為不想

要細胞之標的(美國專利 4,676,980)，及用於治療 HIV 感染(WO 91/00360, WO 92/200373 及 EP 03089)。雜共軛抗體可使用任何合宜交聯方法製成。適當交聯劑係為此項技藝中所習知，且係揭示於美國專利 4,676,980 中，伴隨著許多交聯技術。

自抗體片段產生雙專一性抗體之技術，亦已被描述於文獻中。例如，雙專一性抗體可使用化學鏈結製備。Brennan 等人, *Science*, 229: 81 (1985) 描述一種程序，其中完整抗體係以蛋白分解方式分裂以產生 $F(ab')_2$ 片段。此等片段係於雙硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下被還原，以使毗雙硫醇安定化，並防止分子間二硫化物形成。然後，使所產生之 Fab' 片段轉化成硫基硝基苯甲酸鹽(TNB)衍生物。接著，使 Fab' -TNB 衍生物之一，經由以巰基乙胺還原，再轉化成 Fab' -硫醇，並與等莫耳量之另一種 Fab' -TNB 衍生物混合，以形成雙專一性抗體。所製成之雙專一性抗體可作為藥劑用於酵素之選擇性固定化作用。

最近發展已幫助 Fab' -SH 片段自大腸桿菌之直接回收，其可以化學方式偶合以形成雙專一性抗體。Shalaby 等人, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) 係描述完全人化雙專一性抗體 $F(ab')_2$ 分子之生產。各 Fab' 片段係個別分泌自大腸桿菌，並接受經導引之活體外化學偶合，以形成雙專一性抗體。如此形成之雙專一性抗體能夠結合至過度表現 HER2 受體之細胞與正常人類 T 細胞，以及觸發人類細胞毒性淋巴細胞抵抗人類乳房腫瘤標的之溶解活性。

直接自重組細胞培養物製造與單離雙專一性抗體片段之

各種技術，亦已被描述。例如，雙專一性抗體已使用白胺酸拉鍊對製成。Kostelny 等人, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553 (1992)。

得自 Fos 與 Jun 蛋白質之白胺酸拉鍊肽係藉由基因融合，連結至兩種不同抗體之 Fab' 部份。抗體同種二聚體係在鉸鏈區域被還原，以形成單體，然後再氧化以形成抗體異種二聚體。此方法亦可用於產生抗體同種二聚體。由 Hollinger 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993) 所述之 "雙抗體" 技術，已提供製造雙專一性抗體片段之替代機制。此等片段包含重鏈可變功能部位 (V_H)，藉由連結基，連接至輕鏈可變功能部位 (V_L)，該連結基太短，以致不允許在相同鏈上之兩個功能部位之間配對。因此，一個片段之 V_H 與 V_L 功能部位係被強迫與另一個片段之互補 V_L 與 V_H 功能部位成對，於是形成兩個抗原結合位置。利用單鏈 Fv (sFv) 二聚體製造雙專一性抗體片段之另一種策略，亦已被報告過。參閱 Gruber 等人, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994)。

具有超過兩個價鍵之抗體係意欲涵蓋在內。例如，可製備參專一性抗體。Tutt 等人, *J. Immunol.* 147: 60 (1991)。

(vii) 其他胺基酸順序改質

本文中所述之 HER2 抗體之胺基酸順序改質係意欲涵蓋在內。例如，一般可能期望改良抗體之結合親和力及/或其他生物學性質。HER2 抗體之胺基酸順序變種係藉由引進適當核苷酸改變至 HER2 抗體核酸中，或藉由肽合成製成。此種改質包括例如 HER2 抗體之胺基酸順序內殘基之刪除及/或插入及/或取代。刪除、插入及取代之任何組合係施行至

達成最後構造物，其條件是最後構造物具有所要之特性。胺基酸變化亦可改變HER2抗體之轉譯後過程，譬如改變糖基化作用位置之數目或定位。

一種確認HER2抗體之某些殘基或區域係為供致突變之較佳位置之有用方法，係稱為"丙胺酸掃描致突變"，譬如由Cunningham與Wells Science 244: 1081-1085 (1989)所述者。此處，一個殘基或一組標的殘基係被確認(例如帶有電荷之殘基，譬如arg、asp、his、lys及glu)且被中性或帶負電荷胺基酸(最佳為丙胺酸或聚丙胺酸)置換，以影響胺基酸與HER2抗原之交互作用。對於取代展現功能敏感性之胺基酸位置，係接著藉由引進進一步或其他變種在於或針對取代位置而被精製。因此，雖然引進胺基酸順序變種之位置係被預定，但突變型本身之性質並非必須是預定的。例如，為分析突變型在特定位置之性能，ala掃描或隨機致突變係在標的密碼子或區域處進行，並篩檢經表現HER2抗體變種之所要活性。

胺基酸順序插入包括胺基-及/或羧基末端融合，長度範圍從一個殘基至含有一百或更多個殘基之多肽，以及單一或多重胺基酸殘基之順序內插入。末端插入之實例包括具有N-末端甲硫丁胺鹽基殘基之HER2抗體或經融合至細胞毒性多肽之抗體。HER2抗體分子之其他插入變種包括HER2抗體之N-或C-末端融合至酵素(例如ADEPT)或多肽，其會增加抗體之血清半生期。

另一種變種類型為胺基酸取代變種。此等變種具有至少

一個胺基酸殘基在被不同殘基置換之HER2抗體分子中。關於取代致突變之最大重要性位置包括高可變區域，但FR變更亦意欲涵蓋在內。保守取代係示於表1中，於"較佳取代"之標題下。若此種取代會造成改變生物學活性，則更多實質改變，在表1中取名為"舉例之取代"，或如進一步於下文關於胺基酸種類所述者，可被引進並篩檢產物。

表1

原始殘基	舉例之取代	較佳取代
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 ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

於抗體生物學性質上之實質改質，係經由選擇取代而達

成，該取代在其對於保持以下情況之作用上係顯著地不同，(a)多肽主鏈於取代區域中之結構，例如作成薄片或螺旋形構像，(b)分子於標的位置處之電荷或疏水性，或(c)側鏈之整體。胺基酸可根據其側鏈性質之類似性分組(在 A. L. Lehninger, *Biochemistry*, 第二版，第 73-75 頁，Worth 出版社，New York(1975) 中)：

(1) 非極性：Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) 未帶電極性：Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) 酸性：Asp (D), Glu (E)

(4) 鹼性：Lys (K), Arg (R), His (H)

或者，天然生成之殘基可以共同側鏈性質為基礎，區分成數組：

(1) 疏水性：正白胺酸，Met, Ala, Val, Leu, Ile；

(2) 中性親水性：Cys, Ser, Thr, Asn, Gln；

(3) 酸性：Asp, Glu；

(4) 鹼性：His, Lys, Arg；

(5) 會影響鏈取向之殘基：Gly, Pro；

(6) 芳族：Trp, Tyr, Phe.

非保守取代將需要此等種類之一個成員與另一個種類交換。

未涉及保持 HER2 抗體固有構形之任何半胱胺酸殘基，亦可一般性地以絲胺酸取代，以改良分子之氧化安定性，並

防止進行交聯作用。反之，半胱胺酸鍵結可被添加至抗體，以改良其安定性(特別是在抗體為抗體片段譬如Fv片段之情況下)。

取代變種之特佳類型係涉及取代母抗體(例如人化或人類抗體)之一或多個高可變區域殘基。一般而言，經選擇供進一步發展之所形成變種，相對於用以產生彼等之母抗體，將具有經改良之生物學性質。用於產生此種取代變種之一種合宜方式，係涉及使用噬菌體顯示之親和力成熟。簡言之，係使數個高可變區域位置(例如6-7個位置)突變，以在各位置產生所有可能之胺基取代。因此產生之抗體變種係以單價型式，自絲狀噬菌體粒子顯示為對被包裝在各粒子內之M13之基因III產物之融合物。然後，將噬菌體顯示之變種篩檢其生物學活性(例如結合親和力)，如本文所揭示。為確認供改質之候選高可變區域位置，可進行丙胺酸掃描致突變以確認顯著地有助於抗原結合之高可變區域殘基。替代或另外，可有利地分析抗原-抗體複合物之晶體結構，以確認抗體與huma HER2間之接觸點。此種接觸殘基與相鄰殘基，根據本文詳盡地說明之技術，係為取代之候選者。一旦產生此種變種，立即使變種之試驗名單接受如本文中所述之篩檢，而在一或多種有關聯檢測中具有優越性質之抗體，可被選擇供進一步發展。

此抗體之另一種類型之胺基酸變種，係變更抗體之最初糖基化作用型式。所謂變更係意指刪除一或多個在抗體中發現之碳水化合物部份基團，及/或添加一或多個未存在於

抗體中之糖基化作用位置。

抗體之糖基化作用典型上為無論是N-連結或O-連結。N-連結係指碳水化合物部份基團連接至天冬素殘基之側鏈。三肽順序天冬素-X-絲胺酸與天冬素-X-蘇胺酸，其中X為任何胺基酸，惟脯胺酸除外，其係為碳水化合物部份基團之酵素連接至天冬素側鏈之辨識順序。因此，任一種此等三肽順序存在於多肽中，均會產生潛在糖基化作用位置。O-連結之糖基化作用係指糖類N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖之一連接至羥基胺基酸，最常為絲胺酸或蘇胺酸，惟5-羥脯胺酸或5-羥離胺酸亦可使用。

添加糖基化作用位置至抗體，係可合宜地藉由變更胺基酸順序，以致使其含有一或多個上述三肽順序(對N-連結之糖基化作用位置而言)而達成。變更亦可藉由添加或取代一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基至最初抗體之順序中而施行(對O-連結之糖基化作用位置而言)。

使HER2抗體之胺基酸順序變種編碼之核酸分子，係藉由此項技藝中已知之多種方法製成。此等方法包括但不限於自天然來源單離(在天然生成之胺基酸順序變種之情況中)，或藉由HER2抗體之較早期製成之變種或非變種類型之寡核苷酸所媒介(或位置引導)之致突變、PCR致突變及卡式致突變製備。

一般可能期望修改本發明之抗體關於效應子功能，例如以致能夠提高抗體之抗原依賴性細胞所媒介之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。這可藉由引進一

或多個胺基酸取代在抗體之Fc區域中而達成。替代或另外，半胱胺酸殘基可被引進於Fc區域中，於是允許鏈間二硫鍵在此區域中形成。因此產生之同種二聚體抗體可具有經改良之內部化作用能力及/或增加之補體所媒介之細胞殺死與抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。參閱 Caron 等人, *J. Exp Med.* 176 : 1191-1195 (1992) 與 Shopes, *B. J. Immunol.* 148 : 2918-2922 (1992)。具有經加強抗腫瘤活性之同種二聚體抗體，亦可使用異雙官能性交聯劑製成，如在 Wolff 等人, *癌症研究 (Cancer Research)* 53 : 2560-2565 (1993) 中所述者。或者，抗體可經設計而具有雙Fc區域，並可藉以具有加強之補體溶解與ADCC能力。參閱 Stevenson 等人, *抗癌藥物設計* 3 : 219-230 (1989)。

為增加抗體之血清半生期，吾人可併入補救受體結合抗原決定部位至抗體(尤其是抗體片段)中，如在美國專利 5,739,277 中所述者。於本文中使用之"補救受體結合抗原決定部位"一詞，係指IgG分子之Fc區域之抗原決定部位(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄)，其係負責增加IgG分子之活體內血清半生期。

(viii) 篩檢具有所要性質之抗體

關於產生抗體之技術已被描述於上文。吾人可進一步選擇具有某些生物學特徵之抗體，按需要而定。

為確認會阻斷HER受體之配位體活化作用之抗體，可測定抗體阻斷HER配位體結合至會表現HER受體之細胞之能力(例如，與另一種HER受體之共軛作用，吾人感興趣之HER

受體係與該受體形成HER異寡聚物)。例如，天然地表現或經轉染以表現HER異寡聚物之HER受體之細胞，可與抗體一起培養，然後曝露至經標識之HER配位體。可接著評估HER2抗體阻斷配位體結合至HER異寡聚物之HER受體之能力。

例如，藉由HER2抗體抑制HRG結合至MCF7乳房腫瘤細胞系，可使用單層MCF7培養物，在冰上，於24-井板格式中，基本上如下文實例1中所述進行。可將HER2單株抗體添加至各井，並培養30分鐘。然後，可添加 ^{125}I -標識之rHRG $\beta\text{l}_{177-224}$ (25 pm)，且培養可持續4至16小時。可製成劑量回應曲線，且可對吾人感興趣之抗體計算 IC_{50} 值。於一項具體實施例中，會阻斷HER受體之配位體活化作用之抗體，在此項檢測中，將具有抑制HRG結合至MCF7細胞之 IC_{50} 為約50 nM或較低，更佳為10 nM或較低。在抗體為抗體片段譬如Fab片段之情況中，在此項檢測中抑制HRG結合至MCF7細胞之 IC_{50} ，可為例如下約100 nM或較低，更佳為50 nM或低於。

替代或另外，可評估HER2抗體阻斷存在於HER異寡聚物中之HER受體之HER配位體刺激之酪胺酸磷醯化作用之能力。例如，以內源方式表現HER受體或經轉染以表現彼等之細胞，可與抗體一起培養，然後使用抗-磷酸酪胺酸單株(其係視情況與可偵測標識物共軛)，檢測HER配位體依賴性酪胺酸磷醯化作用活性。在美國專利5,766,863中所述之激酶受體活化作用檢測，亦可採用於測定HER受體活化作用及該活性被抗體之阻斷作用。

於一項具體實施例中，吾人可篩檢會在MCF7細胞中抑制p180酪胺酸磷醯化作用之HRG刺激之抗體，基本上按下文實例1中所述。例如，可將MCF7細胞覆蓋於24-井板中，並可將對HER2之單株抗體添加至各井中，且在室溫下培養30分鐘；然後，可將rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄添加至各井，達最後濃度為0.2 nM，且培養可持續8分鐘。可將培養基吸出各井，並可藉由添加100微升SDS試樣緩衝劑(5% SDS, 25 mM DTT及25 mM Tris-HCl, pH 6.8)，使反應停止。各試樣(25微升)可於4-12%梯度凝膠(Novex)上電泳，然後以電泳方式轉移至聚二氟化亞乙烯薄膜。可展開抗磷酸酪胺酸(在1微克/毫升下)免疫沾吸，並可將 M_r ~180,000下之主要反應性譜帶之強度，藉由反射度光密度分析法定量。經選擇之抗體在此項檢測中較佳係顯著地抑制p180酪胺酸磷醯化作用之HRG刺激至對照組之約0-35%。可製備當藉反射度光密度分析法測定時，關於抑制p180酪胺酸磷醯化作用之HRG刺激之劑量回應曲線，並可計算吾人感興趣抗體之 IC_{50} 。於一項具體實施例中，會阻斷HER受體之配位體活化作用之抗體，在此項檢測中，將具有抑制p180酪胺酸磷醯化作用之HRG刺激之 IC_{50} 為約50 nM或較低，更佳為10 nM或較低。在抗體為抗體片段譬如Fab片段之情況下，在此項檢測中抑制p180酪胺酸磷醯化作用之HRG刺激之 IC_{50} ，可為例如約100 nM或較低，更佳為50 nM或較低。

吾人亦可評估抗體對於MDA-MB-175細胞之生長抑制作用，例如基本上按Schaefer等人, *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997)

中所述。根據此項檢測，可將MDA-MB-175細胞以HER2單株抗體(10微克/毫升)處理4天，並以結晶紫染色。與HER2抗體一起培養可顯示對於此細胞系之生長抑制作用，類似藉由單株抗體2C4所顯示者。於進一步具體實施例中，外源HRG將不會顯著地逆轉此抑制。此抗體較佳係能夠抑制MDA-MB-175細胞之細胞增生，比單株抗體4D5達較大程度(且視情況比單株抗體7F3達較大程度)，於外源HRG存在與不存在下。

於一項具體實施例中，吾人感興趣之HER2抗體可在MCF7與SK-BR-3兩種細胞中，阻斷HER2與HER3之遺傳素依賴性締合作用，如在共免疫沉澱作用實驗中所測得者，譬如實例2中所述，其實質上比單株抗體4D5更有效，且較佳係實質上比單株抗體7F3更有效。

為確認HER2抗體之生長抑制，吾人可篩檢會抑制過度表現HER2之癌細胞生長之抗體。於一項具體實施例中，所選擇之生長抑制抗體係能夠抑制SK-BR-3細胞在細胞培養物中之生長，在約0.5至30微克/毫升之抗體濃度下，達約20-100%，且較佳係達約50-100%。為確認此種抗體，可進行美國專利5,677,171中所述之SK-BR-3檢測。根據此項檢測，係使SK-BR-3細胞在F12與DMEM培養基之1:1混合物中生長，該培養基係補充10%牛胎兒血清、麩醯胺及青霉素鏈霉素。SK-BR-3細胞係於20,000個細胞下，被覆蓋於35毫米細胞培養皿中(2毫升/35毫米培養皿)。每培養皿添加0.5至30微克/毫升HER2抗體。於六天後，使用電子COULTER™細胞計數

器，計數細胞之數目，與未經處理之細胞比較。會抑制 SK-BR-3 細胞生長達約 20-100% 或約 50-100% 之抗體，可被選擇作為生長抑制抗體。參閱美國專利 5,677,171，關於篩檢生長抑制抗體譬如 4D5 與 3E8 之檢測。

為選擇會引致細胞凋零之抗體，使用 BT474 細胞之附加素結合檢測係可採用。將 BT474 細胞培養與接種在培養皿中，如在前文段落中所討論者。然後，移除培養基，並以新培養基置換，單獨或含有 10 微克/毫升單株抗體之培養基。在三天培養期之後，將單層以 PBS 洗滌，並藉由胰蛋白酶化作用脫離。然後，使細胞離心，再懸浮於 Ca^{2+} 結合緩衝劑中，並分成數液份至管件中，如上文關於細胞死亡檢測所討論者。接著，使管件接受經標識之附加素(例如，附加素 V-FTIC)(1 微克/毫升)。試樣可使用 FACSCANTM 流動細胞計數器與 FACSCONVERTTM CellQuest 軟體 (Becton Dickinson) 分析。相對於對照組，會引致統計學上顯著含量之附加素結合之抗體，係被選擇為引致細胞凋零之抗體。除了附加素結合檢測以外，使用 BT474 細胞之 DNA 染色檢測可以採用。為進行此項檢測，係將已經以吾人感興趣之抗體按緊接於前之兩段落中所述處理之 BT474 細胞，與 9 微克/毫升 HOECHST 33342TM 在 37°C 下培養 2 小時，然後於 EPICS ELITETM 流動細胞計數器 (Coulter 公司) 上，使用 MODFIT LTTM 軟體 (Verity 軟體屋) 分析。會引致凋零細胞百分比改變，而比未經處理細胞係為 2 倍或較大(且較佳為 3 倍或較大)(至高達 100% 凋零細胞)之抗體，可使用此項檢測被選擇為前細胞凋零抗體。參閱

WO 98/17797，關於篩檢會引致細胞凋零之抗體譬如 7C2 與 7F3 之檢測。

為篩檢會結合至被吾人感興趣之抗體所結合之 HER2 上之抗原決定部位之抗體，可進行例行交叉阻斷檢測，譬如在抗體實驗室手冊，Cold Spring Harbor 實驗室，Harlow 與 David Lane 編著 (1988) 中所述者，以評估抗體是否會交叉阻斷抗體譬如 2C4 或柏圖祖馬伯 (pertuzumab) 對 HER2 之結合。替代或另外，可藉此項技藝中已知之方法，進行抗原決定部位定圖譜 (參閱，例如本文圖 1A 與 1B) 及 / 或吾人可研究抗體-HER2 結構 (Franklin 等人，*癌細胞* 5: 317-328 (2004)) 以明瞭 HER2 之何種功能部位被抗體結合。

(ix) 免疫共軛物

本發明亦關於免疫共軛物，其包含抗體，經共軛至細胞毒劑，譬如化學治療劑、毒素 (例如小分子毒素，或細菌、真菌、植物或動物來源之具酵素活性毒素，包括其片段及 / 或變種) 或放射性同位素 (意即放射共軛物)。

可用於產生此種免疫共軛物之化學治療劑已被描述於上文。抗體與一或多種小分子毒素譬如鈣血霉素 (calicheamicin)、美坦生 (maytansine) (美國專利 5,208,020)、單端孢素及 CC1065 之共軛物，亦意欲涵蓋於本文中。

在本發明之一項較佳具體實施例中，抗體係被共軛至一或多個美坦生 (maytansine) 分子 (例如每一抗體分子約 1 至約 10 個美坦生分子)。美坦生可例如被轉化成 May-SS-Me，其可被還原成 May-SH3，並與經變性之抗體反應 (Chari 等人，*癌*

症研究 (*Cancer Research*) 52: 127-131 (1992))，以產生美坦習諾 (maytansinoid)-抗體免疫共軛物。

另一種吾人感興趣之免疫共軛物包含經共軛至一或多個鈣血霉素 (calicheamicin) 分子之 HER2 抗體。抗生素之鈣血霉素族群係能夠在亞微微莫耳濃度下產生雙股 DNA 斷裂。可使用之鈣血霉素之結構類似物，包括但不限於 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙醯基- γ_1^I 、PSAG 及 θ_1^I (Hinman 等人, *癌症研究* 53: 3336-3342 (1993) 與 Lode 等人, *癌症研究* 58: 2925-2928 (1998))。亦參閱美國專利案號 5,714,586；5,712,374；5,264,586；及 5,773,001，明確地併於本文供參考。

可使用之具酵素活性之毒素及其片段，包括白喉 A 鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素 A 鏈 (得自綠膿桿菌)、蓖麻蛋白 A 鏈、相思子毒素 A 鏈、莫地毒素 (modeccin) A 鏈、 α -帚曲菌素、油桐蛋白質、二噁新 (dianthin) 蛋白質、十蕊商陸蛋白質 (PAPI、PAPII 及 PAP-S)、苦瓜抑制劑、瀉果樹素、巴豆毒蛋白、肥皂草抑制劑、地百合素、絲裂吉林 (mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、恩諾霉素 (enomycin) 及單端孢素。參閱，例如 1993 年 10 月 28 日公告之 WO 93/21232。

本發明進一步意欲涵蓋在抗體與具有核分解活性之化合物 (例如核糖核酸酶或 DNA 核酸內切酶，譬如脫氧核糖核酸酶；DNase) 之間形成之免疫共軛物。

多種放射性同位素可用於製造經放射共軛之 HER2 抗體。實例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 以及 Lu 之放射性同位素。

抗體與細胞毒劑之共軛物可使用多種雙官能性蛋白質偶合劑製成，譬如丙酸N-琥珀醯亞胺醯基-3-(2-吡啶基二硫伍園)酯(SPDP)、環己烷-1-羧酸琥珀醯亞胺醯基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)酯、亞胺基硫伍園(IT)、醯亞胺基酯類之雙官能性衍生物(譬如二甲基己二醯亞胺酸酯HCl)、活性酯類(譬如辛二酸二琥珀醯亞胺醯酯)、醛類(譬如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(譬如雙(對-疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮衍生物(譬如雙-(對-重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(譬如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氮化合物(譬如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如，蓖麻蛋白免疫毒素可按 Vitetta 等人, *Science* 238: 1098 (1987) 中所述製成。碳-14-標識之1-異硫氰基苄基-3-甲基二乙三胺五醋酸(MX-DTPA)係為舉例之螯合劑，供放射核苷酸共軛至抗體。參閱 WO 94/11026。連結劑可為在細胞中有助於釋出細胞毒性藥物之"可分裂連結劑"。例如，可使用酸不安定連結劑、肽酶敏感性連結劑、二甲基連結劑或含二硫化物連結劑 (Chari 等人, *癌症研究 (Cancer Research)* 52: 127-131 (1992))。

或者，可製成包含HER2抗體與細胞毒劑之融合蛋白質，例如藉由重組技術或肽合成。

於又另一項具體實施例中，抗體可被共軛至"受體"(譬如鏈霉胺基酸)，供利用於腫瘤預成為標的上，其中係將抗體-受體共軛物投予病患，接著自循環使用清除劑移除未結合之共軛物，然後是經共軛至細胞毒劑(例如放射核苷酸)之"配位體"(例如抗生物素蛋白)之投藥。

(x) 抗體依賴性酵素所媒介之前體藥物療法(ADEPT)

本發明之抗體亦可用於ADEPT，其方式是使抗體共軛至前體藥物活化酵素，其係使前體藥物(例如肽基化學治療劑，參閱WO 81/01145)轉化成活性抗癌藥物。參閱，例如WO 88/07378與美國專利4,975,278。

可用於ADEPT之免疫共軛物之酵素成份，包括能夠作用於前體藥物之任何酵素，其方式係致使其轉化成其較具活性細胞毒性形式。

可用於本發明方法之酵素，包括但不限於鹼性磷酸酶，其可用於使含磷酸鹽之前體藥物轉化成自由態藥物；芳基硫酸酯酶，其可用於使含硫酸鹽之前體藥物轉化成自由態藥物；胞嘧啶脫胺基酶，其可用於使無毒性5-氟基胞嘧啶轉化成抗癌藥物5-氟尿嘧啶；蛋白酶，譬如沙雷氏菌蛋白酶、嗜熱菌蛋白酶、枯草桿菌蛋白酶、羧基肽酶及組織蛋白酶(譬如組織蛋白酶B及L)，其可用於使含肽前體藥物轉化成自由態藥物；D-丙胺鹽基羧基肽酶，其可用於轉化含有D-胺基酸取代基之前體藥物；碳水化合物-分裂酵素，譬如 β -半乳糖苷酶與神經胺糖酸苷酶，其可用於使糖基化前體藥物轉化成自由態藥物； β -內鹽胺酶，其可用於使以 β -內鹽胺衍化之藥物轉化成自由態藥物；及青霉素鹽胺酶，譬如青霉素V鹽胺酶或青霉素G鹽胺酶，其可用於使在其胺氮處個別以苯氧基乙鹽基或苯乙鹽基衍化之藥物轉化成自由態藥物。或者，具有酵素活性之抗體，於此項技藝中亦稱為"抗體酶(abzyme)"，可用以使本發明之前體藥物轉化成

自由態活性藥物(參閱,例如 Massey, *Nature* 328: 457-458 (1987))。抗體-抗體酶共軛物可按本文中所述製備,以傳輸抗體酶至腫瘤細胞個體群。

本發明酵素可藉此項技藝中所習知之技術,共價結合至 HER2 抗體,譬如利用上文所討論之異雙官能性交聯試劑。或者,包含本發明抗體之至少抗原結合區域,經連結至本發明酵素之至少功能性上活性部份之融合蛋白質,可使用此項技藝中所習知之重組 DNA 技術建構(參閱,例如 Neuberger 等人, *Nature*, 312: 604-608 (1984))。

(xi) 其他抗體改質物

抗體之其他改質物係意欲涵蓋在本文中。例如,抗體可被連結至多種非蛋白質性聚合體之一,例如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯,或聚乙二醇與聚丙二醇之共聚物。抗體亦可被捕獲在例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合作用所製成之微膠囊(例如,個別為羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)中,在膠態藥物傳輸系統(例如微脂粒、白蛋白微球體、微乳化液、毫微粒子及毫微膠囊)中,或在巨乳化液中。此種技術係揭示於 *Remington 氏醫藥科學*,第 16 版,Oslo, A. 編著(1980)中。

於本文中所揭示之 HER2 抗體,亦可被調配成免疫微脂粒。含有抗體之微脂粒係藉此項技藝中已知之方法製備,譬如在 Epstein 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); 美國專利 4,485,045 與 4,544,545; 及 1997 年 10 月 23 日公告之 WO 97/38731 中

所述者。具有加強循環時間之微脂粒係揭示於美國專利 5,013,556 中。

特別有用之微脂粒可藉由逆相蒸發方法，使用包含磷脂 醯膽鹼、膽固醇及 PEG-衍化磷脂醯乙醇胺 (PEG-PE) 之脂質組合物產生。微脂粒係經過限定孔隙大小之濾器壓出，而產生具有所要直徑之微脂粒。本發明抗體之 Fab' 片段可共軛至微脂粒，按 Martin 等人, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982) 中所述，經由二硫化物交換反應。化學治療劑係視情況被包含在微脂粒中。參閱 Gabizon 等人, *J. National Cancer Inst.* 81 (19) 1484 (1989)。

III. 醫藥配方

根據本發明使用之抗體之治療配方係經製備以供儲存，其方式是將具有所要純度之抗體與選用之藥學上可接受之載劑、賦形劑或安定劑混合 (*Remington 氏醫藥科學*, 第 16 版, Osol, A. 編著 (1980))，呈經凍乾配方或水溶液形式。可接受之載劑、賦形劑或安定劑係在所採用之劑量與濃度下對接受者為無毒性，且包括緩衝劑，譬如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸類；抗氧化劑，包括抗壞血酸與甲硫胺酸；防腐劑 (譬如氯化十八基二甲基苄基銨；氯化六甲雙銨；氯化苄氧銨、氯化苄乙氧銨；酚、丁基或苄醇；對羥基苯甲酸烷酯類，譬如對羥基苯甲酸甲酯或丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間-甲酚)；低分子量 (低於約 10 個殘基) 多肽；蛋白質，譬如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合體，譬如聚乙烷基四氫吡咯酮；胺基酸，譬如

甘胺酸、麩醯胺、天冬素、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、雙糖及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，譬如 EDTA；糖類，譬如蔗糖、甘露醇、海藻糖或花楸醇；可形成鹽之抗衡離子，譬如鈉；金屬錯合物（例如 Zn-蛋白質複合物）；及 / 或非離子性界面活性劑，譬如 TWEENTM、PLURONICSTM 或聚乙二醇 (PEG)。較佳經凍乾 HER2 抗體配方係被描述於 WO 97/04801 中，明確地併於本文供參考。

本文之配方亦可含有超過一種活性化合物，按被治療之特定適應徵之需要而定，較佳為具有不會不利地影響彼此之互補活性者。例如，一般可能期望進一步在一種配方中提供會結合至 EGFR、HER2（例如結合 HER2 上之不同抗原決定部位之抗體）、HER3、HER4 或血管內皮因子 (VEGF) 之抗體。替代或另外，此組合物可進一步包含化學治療劑、細胞毒劑、細胞活素、生長抑制劑、抗-激素劑、EGFR-為標的之藥物、抗血管生成劑及 / 或心臟保護劑。此種分子係適當地以對於所意欲目的有效之量存在於組合中。

活性成份亦可被捕獲於微膠囊中，其係例如藉由凝聚技術或藉由界面聚合作用製成，例如個別為羥甲基纖維素或明膠微膠囊與聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊，在膠態藥物傳輸系統（例如微脂粒、白蛋白微球體、微乳化液、毫微粒子及毫微膠囊）中，或在巨乳化液中。此種技術係揭示於 Remington 氏醫藥科學，第 16 版，Osol, A. 編著 (1980) 中。

可製備持續釋出製劑。持續釋出製劑之適當實例包括含

有抗體之固體疏水性聚合體之半透性基質，此基質係呈成形物件形式，例如薄膜或微膠囊。持續釋出基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如，聚(甲基丙烯酸2-羥乙酯)或聚(乙醇醇))、聚內交酯(美國專利3,773,919)、L-麩胺酸與 γ L-麩胺酸乙酯之共聚物、不可降解乙烯-醋酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物，譬如LUPRON DEPOTTM(可注射微球體，由乳酸-乙醇酸共聚物與留普內酯(leuprolide)醋酸鹽所組成)及聚-D-(-)-3-羥丁酸。

欲被用於活體內投藥之配方必須是無菌的。這容易藉由經過無菌過濾薄膜過濾而達成。

IV. 篩檢供治療之病患

根據此處本發明之一項較佳具體實施例，經選擇供治療之病患係具有顯示HER(且較佳為HER2)活化作用之腫瘤。於一項具體實施例中，癌細胞中HER(或HER2)活化作用之程度，係顯著地超過該受體在相同組織類型之非癌細胞中之活化作用程度。此種過度活化作用可由於HER受體之過度表現及/或大於正常含量之HER配位體可用於活化癌細胞中之HER受體所造成。此種過度活化作用可造成癌細胞之惡性狀態及/或因該狀態所造成。在一些具體實施例中，該癌症將接受診斷或預後檢測，以測定HER受體之放大及/或過度表現是否正在發生，其會造成HER受體之此種過度活化作用。替代或另外，該癌症可接受診斷或預後檢測，以測定HER配位體之放大及/或過度表現是否正發生於癌症中，其係歸因於受體之過度活化作用。在此種癌症之一

個子集中，受體之過度活化作用可由於自分泌刺激途徑所造成。用於測定HER活化作用之各種檢測，係更詳細地描述於下文。

(i) *HER 二聚體*

可評估腫瘤試樣關於HER二聚體之存在，當顯示HER或HER2活化作用時。此項技藝中已知之任何方法可用以偵測腫瘤中之HER2二聚體，譬如EGFR-HER2、HER2-HER3。數種較佳方法係描述於下文。此等方法係偵測非共價蛋白質-蛋白質交互作用，或者以其他方式顯示吾人感興趣蛋白質間之親近。

免疫親和力為基礎之方法，譬如免疫沉澱作用或ELISA，可用以偵測HER二聚體。於一項具體實施例中，係使用HER2抗體，以使包含HER2之複合物自腫瘤細胞免疫沉澱，然後藉由免疫沾吸探測所形成之免疫沉澱物，關於EGFR或HER3之存在。於另一項具體實施例中，EGFR或HER3抗體可用於免疫沉澱步驟，然後以HER2抗體探測免疫沉澱物。於進一步具體實施例中，對EGFR、HER3、EGFR/HER2複合物或HER2/HER3複合物專一之HER配位體，可用以使複合物沉澱，然後探測其關於HER2之存在。例如，可使配位體共軛至抗生物素蛋白，並使複合物於生物素管柱上純化。

在其他具體實施例中，譬如ELISA或抗體"夾層"型檢測，係使對HER2之抗體固定於固態擔體上，與腫瘤細胞或腫瘤細胞溶胞產物接觸，洗滌，然後曝露至抵抗EGFR或HER3之抗體。後述抗體之結合，其可直接或藉由共軛至可偵測

標識物之次生抗體偵測，顯示異種二聚體存在。在某些具體實施例中，EGFR或HER3抗體係經固定，且HER2抗體係用於偵測步驟。在其他具體實施例中，可使用HER配位體，取代或併用HER抗體。

亦可使用化學或UV交聯作用，以共價方式接合活細胞表面上之二聚體。Hunter等人, *Biochem. J.*, 320: 847-53。化學交聯劑之實例包括丙酸二硫基雙(琥珀醯亞胺醯基)酯(DSP)與丙酸3,3'-二硫基雙(磺酸基琥珀醯亞胺醯基)酯(DTSSP)。於一項具體實施例中，以化學方式交聯之腫瘤細胞之細胞萃取物，係藉由SDS-PAGE與免疫沾吸，使用對EGFR及/或HER3之抗體進行分析。適當分子量之超移位譜帶最可能表示EGFR-HER2或HER2-HER3二聚體，因HER2係為EGFR與HER3之較佳二聚合作用配對物。此結果可藉由後續免疫沾吸，使用HER2抗體確認。

亦可使用螢光共振能轉移(FRET)以偵測EGFR-HER2或HER2-HER3二聚體。FRET係偵測活體內與活體外蛋白質構形變化與蛋白質-蛋白質交互作用，以從供體螢光團至受體螢光團之能量轉移為基礎。Selvin *Nat. Struct. Biol.*, 7: 730-34 (2000)。能量轉移只有在供體螢光團足夠接近受體螢光團時才會發生。在一項典型FRET實驗中，係將兩種蛋白質或單一蛋白質上之兩個位置以不同螢光探測物標識。探測物之一，意即供體探測物，係藉由特定波長之入射光，被激發至較高能態。於是，供體探測物會傳送其能量至第二種探測物，意即受體探測物，而造成降低供體螢光強度，並增

加受體螢光發射。為度量能量轉移之程度，係將以供體與受體探測物標識之試樣上之供體強度，與其在僅以供體探測物標識之試樣中之強度比較。視情況，在供體/受體與只有受體之試樣中比較受體強度。適當探測物係為此項技藝中已知，且包括例如可透過細胞膜之染料，譬如螢光素與羅達胺，有機染料，譬如花青染料，及銅系元素之原子。Selvin，同前文出處。關於偵測與度量能量轉移之方法與儀器配置，亦為此項技藝中已知。Selvin，同前文出處。

適用於偵測與度量個別細胞中之蛋白質-蛋白質交互作用之FRET為基礎之技術，亦為此項技藝中已知。例如，供體光漂白螢光共振能轉移(pbFRET)顯微鏡術與螢光壽命照影顯微鏡術(FLIM)可用以偵測細胞表面受體之二聚合作用。Selvin，同前文出處；Gadella & Jovin *J. Cell Biol.*, 129: 1543-58 (1995)。於一項具體實施例中，pbFRET係被使用於無論是"呈懸浮"或"在原位"之細胞上，以偵測與度量EGFR-HER2或HER2-HER3二聚體之形成，如在Nagy等人, *細胞計數法*, 32: 120-131 (1998)中所述者。此等技術係度量供體螢光壽命上由於能量轉移所致之降低。在一項特定具體實施例中，可使用流動細胞計數Foerster型FRET技術(FCET)，以研究EGFR-HER2與HER2-HER3二聚合作用，如在Nagy等人，同前文出處，與Brockhoff等人, *細胞計數法*, 44: 338-48 (2001)中所述者。

FRET較佳係搭配標準免疫組織化學標識技術一起使用。Kenworthy, *Methods*, 24: 289-96 (2001)。例如，經共軛至適當螢光染料之抗體可作為用於標識兩種不同蛋白質之探測物使

用。若蛋白質係在彼此之附近，則螢光染料係充作FRET之供體與受體。能量轉移係藉標準方式偵測。能量轉移可藉由流動細胞計數裝置或藉由數值顯微鏡術系統偵測，譬如同焦顯微鏡術或廣視野螢光顯微鏡術，經聯結至電荷偶合裝置(CCD)攝影機。

在本發明之一項具體實施例中，HER2抗體與無論是EGFR或HER3抗體係直接以兩種不同螢光團標識，例如按Nagy等人，同前文出處中所述。腫瘤細胞或腫瘤細胞溶胞產物係與差別標識之抗體接觸，其係於EGFR-HER2或HER2-HER3二聚體存在下，充作FRET之供體與受體。或者，抵抗HER2與無論是EGFR或HER3之未標識抗體，係伴隨著充作供體與受體之差別標識次生抗體一起使用。參閱，例如Brockhoff等人，同前文出處。偵測能量轉移，而若發現標識物係緊密接近，則測得二聚體存在。

在其他具體實施例中，對HER2與無論是HER1或HER3專一之HER受體配位體，係經螢光標識，且用於FRET研究。

於本發明之又其他具體實施例中，二聚體存在於腫瘤細胞之表面上，係使用標準直接或間接免疫螢光技術與同焦雷射掃描電子顯微鏡術，藉由HER2與無論是EGFR或HER3之共定位証實。或者，使用雷射掃描照影(LSI)，在高通過量格式中，譬如微井板，偵測HER2與無論是EGFR或HER3之抗體結合與共定位，按Zuck等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 11122-27(1999)中所述。

在進一步具體實施例中，EGFR-HER2及/或HER2-HER3二聚

體之存在係藉由確認酵素活性而測得，該活性係依賴二聚體成份之親近。HER2抗體係與一種酵素共軛，而EGFR或HER3抗體係與第二種酵素共軛。添加供第一種酵素用之第一種受質，而反應係產生供第二種酵素用之第二種受質。這會導致與另一種分子反應，以產生可偵測之化合物，譬如染料。另一種化學物質之存在會使第二種受質分解，以致與第二種酵素之反應係被防止，除非第一種與第二種酵素，且因此是兩種抗體係緊密接近。在一項特定具體實施例中，腫瘤細胞或細胞溶胞產物係與HER2抗體接觸，該抗體係與葡萄糖氧化酶共軛，及與HER3或HER1抗體接觸，該抗體係與辣根過氧化酶共軛。將葡萄糖添加至反應物中，伴隨著染料先質，譬如DAB，及過氧化氫。二聚體之存在係經由在使DAB染色時，顏色之展開而測得。

二聚體亦可使用以eTagTM檢測系統(Aclara Bio Sciences, Mountain View, CA)為基礎之方法偵測，按例如在2001年12月6日公告之美國專利申請案2001/0049105中所述，此兩者係特別以其全文併於本文供參考。eTagTM或"電泳標記"係包含可偵測之報告子部份基團，譬如螢光基團。其亦可包含"移動性改質劑"，其基本上包含具有獨特電泳遷移率之部份基團。此等部份基團允許在限定之電泳條件下，譬如毛細電泳法(CE)，分離與偵測來自複雜混合物之eTagTM。含有報告子部份基團與視情況選用之移動性改質劑之eTagTM部份，係藉由可分裂連結基團連結至第一種標的結合部份基團，以產生第一種結合化合物。第一種標的結合部份基團

會專一性地辨識第一種標的，譬如核酸或蛋白質。第一種標的結合部份基團並未以任何方式限制，且可為例如多核苷酸或多肽。第一種標的結合部份基團較佳為抗體或抗體片段。或者，第一種標的結合部份基團可為HER受體配位體或其勝任結合片段。

連結基團較佳係包含可分裂部份基團，譬如酵素受質，或可在限定條件下分裂之任何化學鍵。當第一種標的結合部份基團結合至其標的時，係將分裂劑引進及/或活化，並使連結基團分裂，因此釋出含有報告子部份基團與移動性改質劑之eTagTM部份。因此，"自由態"eTagTM之存在，係表示標的結合部份基團之結合至其標的。

第二種結合化合物較佳係包含分裂劑，與第二種標的結合部份基團，其會專一性地辨識第二種標的。第二種標的結合部份基團亦不以任何方式受限，且可為例如抗體或抗體片段或HER受體配位體或勝任結合配位體片段。若第一種結合化合物與第二種結合化合物係緊密接近，則分裂劑係致使其將僅分裂第一種結合化合物中之連結基團。

在本發明之一項具體實施例中，第一種結合化合物係包含eTagTM，其中對HER2之抗體係充作第一種標的結合部份基團。第二種結合化合物包含對EGFR或HER3之抗體，經接合至能夠分裂eTagTM之連結基團之分裂劑。較佳情況是，分裂劑必須被活化，才能夠分裂連結基團。腫瘤細胞或腫瘤細胞溶胞產物係與eTagTM接觸，後者係結合至HER2，及與經改質之EGFR或HER3抗體接觸，該抗體係結合至細胞表

面上之 EGFR 或 HER3。未被結合之結合化合物較佳係被移除，且若必要則分裂劑係被活化。若 EGFR-HER2 或 HER2-HER3 二聚體存在，則分裂劑將分裂連結基團，並釋出 eTagTM，此係由於分裂劑接近連結基團所致。然後可藉此項技藝中已知之任何方法偵測自由態 eTagTM，譬如毛細電泳法。

於一項具體實施例中，分裂劑係為可活化化學物種，其係作用於連結基團上。例如，分裂劑可經由使試樣曝露至光線而被活化。

於另一項具體實施例中，eTagTM係使用對 EGFR 或 HER3 之抗體作為第一種標的結合部份基團而被建構，而第二種結合化合物係從對 HER2 之抗體建構。

於又另一項具體實施例中，HER 二聚體係使用會專一性地或優先地結合至二聚體抗體或其他試劑偵測，當與其結合至二聚體中之任一個 HER 受體比較時。

(ii) HER2 磷酸化作用

如前述段落中所討論者，以 EGFR、HER2 或 HER3 抗體之免疫沉澱作用，可視情況接著為二聚體之功能性檢測，作為對免疫沾吸之一種替代方式或補充。於一項具體實施例中，以 HER3 抗體之免疫沉澱作用，係接著為關於受體酪胺酸激酶活性在免疫沉澱劑中之檢測。由於 HER3 未具有內在酪胺酸激酶活性，故酪胺酸激酶活性存在於免疫沉澱劑中，係表示 HER3 最可能與 HER2 締合。Graus-Porta 等人, *EMBO J.*, 16: 1647-55 (1997); Klapper 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 4995-5000 (1999)。此結果可經由以 HER2 抗體之免疫沾吸確認。於

另一項具體實施例中，以HER2抗體之免疫沉澱作用係接著為EGFR受體酪胺酸激酶活性之檢測。在此項檢測中，免疫沉澱劑係與放射性ATP及肽受質接觸，該受質係模擬HER2被EGFR轉磷醯化作用之活體內位置。該肽之磷醯化作用表示共免疫沉澱作用，且因此是EGFR與HER2之二聚合作用。受體酪胺酸激酶活性檢測係為此項技藝中所習知，且包括偵測標的受質被例如磷酸酪胺酸抗體之磷醯化作用之檢測，及同源訊息轉導途徑譬如MAPK途徑之活化作用。

HER受體之磷醯化作用可藉由一或多種HER受體譬如HER2 (HER2) 受體之免疫沉澱作用，與Western氏沾吸分析，進行評估。例如，確定性係藉由磷醯基-HER2譜帶存在於凝膠上而測得，使用抗-磷酸酪胺酸抗體以偵測免疫沉澱HER受體中之磷醯基化酪胺酸殘基。抗-磷酸酪胺酸抗體可市購得自PanVera (Madison, WI)，為Invitrogen Chemicon國際公司 (Temecula, CA) 之子公司，或Upstate生物技術 (Lake Placid, NY)。否定性係藉由譜帶不存在測得。

於另一項具體實施例中，HER2 (HER2) 受體之磷醯化作用，係藉由免疫組織化學，使用磷醯基專一HER2抗體(無性繁殖系PN2A；Thor等人, *J. Clin. Oncol.*, 18 (18): 3230-3239 (2000)) 評估。

其他用於偵測HER受體磷醯化作用之方法，包括但不限於KIRA ELISA (美國專利案號5,766,863；5,891,650；5,914,237；6,025,145；及6,287,784)、質量光譜法(比較經磷醯基化與未經磷醯基化HER2之大小)及e-Tag親近檢測，使用HER(例如

HER2) 抗體與磷醯基專一或磷醯基酪胺酸專一抗體(例如使用 eTagTM 檢測套件, 可得自 Aclara Bioscience (Mountain View, CA) 。 eTag 檢測之細節係描述於上文。

吾人亦可於細胞陣列中使用磷醯基專一抗體, 以偵測訊息轉導蛋白質之細胞試樣中之磷醯化作用狀態 (US 2003/0190689) 。

(iii) HER2 配位體

HER 配位體譬如 TGF- α 在腫瘤中或與其締合之含量, 可根據已知程序測定。此種檢測可在欲被測試之試樣中偵測蛋白質及/或使其編碼之核酸。於一項具體實施例中, 在腫瘤中之 HER 配位體含量可使用免疫組織化學 (IHC) 測定; 參閱, 例如 Scher 等人, *Clin. Cancer Research* 1: 545-550 (1995)。替代或另外, 吾人可評估使 HER 配位體編碼之核酸在欲被測試試樣中之含量; 例如, 經由 FISH、Southern 沾吸或 PCR 技術。

(iv) 非 HER2 過度表現癌症

雖然癌症可藉由 HER2 受體之過度表現作特徵鑒定, 但本申請案進一步提供一種治療癌症之方法, 其並不被認為是 HER2 過度表現。

為測定 HER2 在癌症中之表現, 可採用各種診斷/預後檢測。於一項具體實施例中, HER2 過度表現可藉由 IHC 分析, 例如使用 HERCEPT[®] (Dako)。可使得自腫瘤生物檢體之石蠟包埋之組織切片接受 IHC 檢測, 且給予 HER2 蛋白質染色強度標準如下:

評分 0 未發現染色, 或在低於 10% 腫瘤細胞中發現細胞膜

染色。

評分 1+ 在超過 10% 腫瘤細胞中偵測出微弱 / 幾乎不能認出之細胞膜染色。細胞僅在一部份其細胞膜中被染色。

評分 2+ 在超過 10% 腫瘤細胞中發現弱至中等完全細胞膜染色。

評分 3+ 在超過 10% 腫瘤細胞中發現中等至強完全細胞膜染色。

關於 HER2 過度表現評估，具有 0 或 1+ 評分之腫瘤，可被特徵鑒定為未過度表現 HER2，然而具有 2+ 或 3+ 評分之腫瘤可被特徵鑒定為過度表現 HER2。

過度表現 HER2 之腫瘤可藉由免疫組織化學評分作分級，其係相應於每細胞所表現之 HER2 分子之複製物數目，且可以生物化學方式測定：

0 = 0-10,000 個複製物 / 細胞，

1+ = 至少約 200,000 個複製物 / 細胞，

2+ = 至少約 500,000 個複製物 / 細胞，

3+ = 至少約 2,000,000 個複製物 / 細胞。

在 3+ 程度下之 HER2 過度表現，其會導致酪胺酸激酶之配位體獨立活化作用 (Hudziak 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84 : 7159-7163 (1987))，其係發生在大約 30% 乳癌中，且在此等病患中，不再復發存活率與整體存活率係被減縮 (Slamon 等人, *Science*, 244 : 707-712 (1989) ; Slamon 等人, *Science*, 235 : 177-182 (1987))。替代或另外，FISH 檢測，譬如 INFORMTM (由 Ventana 銷售, Arizona) 或 PATHVISIONTM (Vysis, Illinois)，可在福馬林固

定、石蠟包埋之腫瘤組織中進行，以測定HER2在腫瘤中過度表現之程度(若含有時)。

於一項具體實施例中，癌症係為會表現(且可能過度表現)EGFR者，此種表現可如同關於如上述評估HER2表現之方法進行評估。

HER受體或HER配位體過度表現或放大，亦可使用活體內診斷檢測評估，例如藉由投予一種分子(譬如抗體)，其會結合欲被偵測之分子且係以可偵測標識物(例如放射性同位素)標記，及外部掃描該病患，關於該標識物之定位。

V. 以HER2抗體之治療

根據本發明，意欲涵蓋的是，HER2抗體可用以治療化學療法抗藥性之癌症或鉑抗藥性癌症，譬如鉑抗藥性癌症。該癌症通常係包含表現HER2之細胞，以致本文之HER2抗體能夠結合至該癌細胞。

病患係以HER2抗體，較佳為柏圖祖馬伯(pertuzumab)，與抗代謝物化學治療劑，較佳為真西塔賓(gemcitabine)之組合治療。合併之投藥係包括共同投藥或並存投藥，使用個別配方或單一醫藥配方，及連續投藥，以任一順序，其中較佳係有一個時期，而兩種(或全部)活性劑係同時施加其生物學活性。因此，抗代謝物化學治療劑可在HER2抗體投藥之前或之後投予。在此項具體實施例中，於抗代謝物化學治療劑之至少一次投藥與HER2抗體之至少一次投藥間之計時，較佳為大約1個月或較少，而最佳為大約2週或較少。或者，抗代謝物化學治療劑與HER2抗體係對病患並存

地投藥，在單一配方或個別配方中。

以此組合治療，將會造成癌症之徵候或病徵上之改善。例如，此種療法，相對於僅以抗代謝物化學治療劑治療之病患，可造成改善存活期(整體存活期及/或無進展存活期)，及/或可造成目的臨床回應(部份或完全)。再者，以抗代謝物化學治療劑(例如真西塔賓(gemcitabine))與HER2抗體(例如柏圖祖馬伯(pertuzumab))組合之治療，可對病患造成增效或大於相加之治療利益。

所投予之HER2抗體，較佳為裸露抗體。但是，所投予之HER2抗體可與細胞毒劑共軛。免疫共軛物及/或其所結合之HER2蛋白質，較佳係被細胞內部化，而造成免疫共軛物在殺死其所結合之癌細胞上增加之治療功效。於一項較佳具體實施例中，細胞毒劑係以癌細胞中之核酸作為標的或干擾之。此種細胞毒劑之實例包括美坦習諾(maytansinoid)、鈣血霉素(calicheamicin)、核糖核酸酶及DNA核酸內切酶。

HER2抗體(或HER2抗體免疫共軛物)與抗代謝物化學治療劑，係根據已知方法投予人類病患，譬如靜脈內投藥，例如以大丸劑，或藉由連續灌注歷經一段時間，藉由肌內、腹膜腔內、腦脊髓內、皮下、關節內、滑膜內、鞘內、口腔、局部或吸入途徑。HER2抗體與抗代謝物化學治療劑可以但未必藉由相同投藥途徑投藥。抗體與抗代謝物化學治療劑兩者之靜脈內投藥為較佳。

關於疾病之預防或治療，HER2抗體之適當劑量係依如上文定義之欲被治療疾病之類型，疾病之嚴重性與期間，是

否投予HER2抗體以提供預防或治療目的，先前療法，病患之臨床病歷與對HER2抗體之回應，以及負責醫師之判斷而定。HER2抗體係適當地以一次或歷經一系列治療投予病患。依疾病之類型與嚴重性而定，約1微克/公斤至50毫克/公斤(例如0.1-20毫克/公斤)之HER2抗體，係為投予病患之最初候選劑量，無論是例如藉由一或多次個別投藥，或藉由連續灌注。於一項具體實施例中，關於HER2抗體之最初灌注時間可能比後續灌注時間較長，例如對最初灌注大約90分鐘，而對後續灌注大約30分鐘(若最初灌注係被良好地容許)。HER2抗體之較佳劑量係在約0.05毫克/公斤至約10毫克/公斤之範圍內。因此，可將約0.5毫克/公斤，2.0毫克/公斤，4.0毫克/公斤或10毫克/公斤(或其任何組合)之一或多次劑量投予病患。此種劑量可間歇性地投予，例如每週或每三週(例如，致使病患接受約二至約二十，例如約六次劑量之HER2抗體)。可投予一份最初較高負載劑量，接著為一或多份較低劑量。於一項具體實施例中，HER2抗體係以大約840毫克之負載劑量投藥，接著為大約420毫克，大約每3週。於另一項具體實施例中，HER2抗體係以大約1050毫克之劑量投藥，大約每3週投予。

抗代謝物化學治療劑通常係在已知供其使用之劑量下投藥，或視情況降低，此係由於藥物之聯合作用，或可歸因於抗代謝物化學治療劑投藥之負面副作用所致。關於此種化學治療劑之製劑與服藥時間表，可根據製造者說明書或由熟練執業醫師以經驗方式決定而使用。關於此種化學療

法之製劑與服藥時間表，亦描述於化學療法服務，M.C. Perry, Williams & Wilkins 編著，Baltimore, MD (1992) 中。在抗代謝物化學治療劑為真西塔賓 (gemcitabine) 之情況下，其較佳係在約 600 毫克/平方米至 1250 毫克/平方米間之劑量下投藥 (例如大約 1000 毫克/平方米)，例如在 3-週循環之第 1 與 8 天。

除了 HER2 抗體與抗代謝物化學治療劑之外，其他治療服用法可與其合併。例如，可投予第二 (第三、第四等) 種化學治療劑，其中第二種化學治療劑係為無論是另一種不同抗代謝物化學治療劑，或不為抗代謝物之化學治療劑。例如，第二種化學治療劑可為紅豆杉烷 (譬如培克里他索 (paclitaxel) 或多謝他索 (docetaxel))、卡配西塔賓 (capecitabine) 或鉑為基礎之化學治療劑 (譬如碳氯胺鉑、順氯胺鉑或草酸鉑)、蔥環素 (譬如多克索紅菌素，包括微脂粒多克索紅菌素)、拓波提肯 (topotecan)、佩美催西得 (pemetrexed)、長春花生物鹼 (譬如威諾賓 (vinorelbine)) 及 TLK286。可投予不同化學治療劑之 "雞尾酒藥液"。

可與 HER2 抗體及抗代謝物化學治療劑併用之其他治療劑，包括下列之任一種或多種：第二種不同 HER2 抗體 (例如，生長抑制 HER2 抗體，譬如搓史圖諸馬伯 (trastuzumab)，或會引致過度表現 HER2 細胞之細胞凋零之 HER2 抗體，譬如 7C2、7F3 或其人化變種)；第二種抗體，被導引抵抗另一種腫瘤有關聯抗原，譬如 EGFR、HER3、HER4；抗激素化合物，例如抗雌激素化合物，譬如他摩西吩 (tamoxifen) 或芳香酶抑制劑；心臟保護劑 (以預防或減少任何與療法有關聯之心肌

機能障礙)；細胞活素；EGFR-為標的之藥物(譬如TARCEVA[®]、IRESSA[®]或些圖西馬伯(Cetuximab))；抗血管生成劑(尤其是貝發西馬伯(Bevacizumab)，由Genentech以商標AVASTINTM銷售)；酪胺酸激酶抑制劑；COX抑制劑(例如COX-1或COX-2抑制劑)；非類固醇消炎藥物，塞拉庫西比(Celecoxib)(CELEBREX[®])；法呢基轉移酶抑制劑(例如替皮法尼伯(Tipifarnib)/ZARNESTRA[®]R115777，可得自Johnson & Johnson，或Lonafarnib SCH66336，可得自Schering-Plough)；會結合腫瘤胎兒蛋白質CA 125之抗體，譬如歐瑞加馬伯(Oregovomab)(MoAb B43.13)；HER2疫苗(譬如HER2 Auto Vac疫苗，得自Pharmexia，或APC8024蛋白質疫苗，得自Dendreon，或HER2肽疫苗，得自GSK/Corixa)；另一種HER為標的之療法(例如搓史圖諸馬伯(trastuzumab)、些圖西馬伯(cetuximab)、吉非汀尼伯(gefitinib)、炯羅提尼伯(erlotinib)、CI1033、GW2016等)；Raf及/或ras抑制劑(參閱，例如WO 2003/86467)；多克西爾(Doxil)；托佩提肯(Topotecan)；紅豆杉烷；GW572016；TLK286；EMD-7200；治療惡心之藥劑，譬如血清素拮抗劑、類固醇或苯并二氮七園；預防或治療皮疹之藥劑，或標準座瘡療法，包括局部或口服抗生素；降體溫藥劑，譬如乙醯胺吩(acetaminophen)、苯海拉明(diphenhydramine)或麥啉；造血生長因子等。

關於任何上述共同投予藥劑之適當劑量，係為目前使用者，且可由於藥劑與HER2抗體之聯合作用(增效作用)而被降低。

除了上述治療服用法以外，可使病患接受癌細胞之手術移除及/或放射療法。

除了抗體蛋白質對病患投藥之外，本申請案係意欲涵蓋抗體藉由基因療法之投藥。此種使抗體編碼之核酸之投藥，係被措辭"投予抗體"所涵蓋。參閱，例如1996年3月14日公告之WO 96/07321，關於利用基因療法以產生胞內抗體。

有兩種主要途徑以在病患之細胞中獲得核酸(視情況被包含在載體中)；活體內與活體外。關於活體內傳輸，係將核酸直接注射至病患中，通常在其中需要抗體之位置。關於活體外治療，係移除病患之細胞，將核酸引進此等經分離細胞中，並將經改質之細胞投予病患，無論是直接或例如被包覆在多孔性薄膜中，其係被植入病患中(參閱，例如美國專利4,892,538與5,283,187)。有多種技術可用於引進核酸至存活細胞中。此等技術係依核酸是被轉移至活體外培養細胞中，或所意欲宿主之活體內細胞中而改變。適合轉移核酸至活體外哺乳動物細胞中之技術，包括利用微脂粒、電擊穿孔、顯微注射、細胞融合、DEAE-葡聚糖、磷酸鈣沉澱方法等。供活體外傳輸基因之常用載體為反轉錄酶病毒。

目前較佳活體內核酸轉移技術，包括以病毒載體轉移感染(譬如腺病毒、單純疱疹I病毒或與腺有關聯之病毒)與脂質為基礎之系統(供脂質所媒介之基因轉移之可使用脂質，係為例如DOTMA、DOPE及DC-Chol)。在一些狀況中，一般期望提供具有以標的細胞作為標的之藥劑之核酸來源，譬如對細胞表面膜蛋白質或標的細胞專一之抗體，對標的細

胞上受體之配位體等。在採用微脂粒之情況下，可使用會結合至與細胞攝粒作用有關聯之細胞表面膜蛋白質之蛋白質，以瞄靶以及/或幫助吸收，例如對特定細胞類型具向性之衣殼蛋白質或其片段，對於在循環中接受內部化作用之蛋白質之抗體，及以胞內定位為標的且提高胞內半生期之蛋白質。受體所媒介細胞攝粒作用之技術，係例如由Wu等人, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987)；與Wagner等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3410-3414 (1990)所描述。關於目前已知基因印記與基因療法擬案之回顧，可參閱Anderson等人, *Science* 256: 808-813 (1992)。亦參閱WO 93/25673及其中引述之參考資料。

VI. 物質之寄存

下列雜種瘤細胞系已被寄存於美國培養物類型收集處，10801 Boulevard 大學, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC)：

抗體名稱	ATCC 編號	寄存日期
7C2	ATCC HB-12215	1996 年 10 月 17 日
7F3	ATCC HB-12216	1996 年 10 月 17 日
4D5	ATCC CRL 10463	1990 年 5 月 24 日
2C4	ATCC HB-12697	1999 年 4 月 8 日

本發明之進一步細節係藉下述非限制性實例說明。在本專利說明書中所有引文之揭示內容，係明確地併於本文供參考。

【實施方式】

實例 1

單株抗體 2C4 之產生與特徵鑒定

會專一性地結合 HER2 胞外功能部位之老鼠單株抗體 2C4、7F3 及 4D5 係按 Fendly 等人, *癌症研究 (Cancer Research)* 50 : 1550-1558 (1990) 中所述製成。簡言之, 係將按 Hudziak 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84 : 7159-7163 (1987) 中所述製成之 NIH3T3/HER2-3₄₀₀ 細胞 (表現大約 1×10^5 HER2 個分子/細胞), 以含有 25 mM EDTA 之磷酸鹽緩衝之鹽水 (PBS) 採集, 並用以使 BALB/c 老鼠免疫。於第 0, 2, 5 及 7 週, 對老鼠進行腹膜腔內注射 0.5 毫升 PBS 中之 10^7 個細胞。於第 9 與 13 週, 對於具有免疫沉澱 ^{32}P -標識之 HER2 抗血清之老鼠, 以腹膜腔內給予麥牙凝集素-瓊脂糖 (WGA) 純化 HER2 細胞膜萃取物之注射。接著靜脈內注射 0.1 毫升 HER2 製劑, 並使脾細胞與老鼠骨髓細胞瘤細胞系 X63-Ag8.653 融合。

藉由 ELISA 與放射免疫沉澱作用, 篩檢雜種瘤上層清液之 HER2 結合。

藉由單株抗體 4D5、7F3 及 2C4 結合之 HER2 抗原決定部位, 係藉由競爭性結合分析測定 (Fendly 等人 *癌症研究 (Cancer Research)* 50 : 1550-1558 (1990))。交叉阻斷研究係於抗體上, 藉由直接螢光, 在完整細胞上, 使用 PANDEXTM 篩檢機器進行, 以定量螢光。各單株抗體係與螢光素異硫氰酸酯 (FITC) 共軛, 使用已建立之程序 (Wofsy 等人, 於細胞免疫學上之經選擇方法, 第 287 頁, Mishel 與 Schiigi (編著) San Francisco :

W.J. Freeman 公司 (1980))。使 NIH3T3/HER2-3₄₀₀ 細胞之匯合單層胰蛋白酶化，洗滌一次，並在 1.75×10^6 個細胞/毫升下，再懸浮於含有 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 與 0.1% NaN_3 之冷 PBS 中。添加最後濃度為 1% 之乳膠粒子 (IDC, Portland, OR)，以減少 PANDEXTM 板細胞膜結塊。將呈懸浮之 20 微升細胞與 20 微升經純化單株抗體 (100 微克/毫升至 0.1 微克/毫升) 添加至 PANDEXTM 板井中，並於冰上培養 30 分鐘。FITC-標識之單株抗體在 20 微升中之預定稀釋液添加至各井中，培養 30 分鐘，洗滌，及藉由 PANDEXTM 定量螢光。若在與無關聯單株抗體對照組比較下，另一種之各經阻斷結合達 50% 或較大，則單株抗體係被認為是共有抗原決定部位。在此實驗中，單株抗體 4D5、7F3 及 2C4 係個別被指定抗原決定部位 I、G/F 及 F。

單株抗體 2C4、7F3 及 4D5 之生長抑制特徵係使用乳房腫瘤細胞系 SK-BR-3 評估 (參閱 Hudziak 等人, *Molec. Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172 (1989))。簡言之，係利用 0.25% (體積/體積) 胰蛋白酶，使 SK-BR-3 細胞脫離，並在每毫升 4×10^5 個細胞之密度下，懸浮於完全培養基中。將 100 微升 (4×10^4 個細胞) 之液份覆蓋至 96-井微稀釋板中，允許細胞黏附，並然後添加 100 微升培養基，單獨或含有單株抗體之培養基 (最後濃度 5 微克/毫升)。72 小時後，將板以 PBS (pH 7.5) 洗滌兩次，以結晶紫 (0.5%，在甲醇中) 染色，並按 Sugarman 等人 *Science* 230: 943-945 (1985) 中所述，分析相對細胞增生。單株抗體 2C4 與 7F3 會抑制 SK-BR-3 相對細胞增生個別達約 20% 與約 38%，與

使用單株抗體 4D5 達成之約 56% 抑制比較。

評估單株抗體 2C4、4D5 及 7F3 關於其抑制來自 MCF7 細胞之全細胞溶胞產物，在 M_r 180,000 範圍內之蛋白質之 HRG-刺激酪胺酸磷醯化作用之能力 (Lewis 等人 *癌症研究 (Cancer Research)* 56: 1457-1465 (1996))。據報告 MCF7 細胞會表現所有已知 HER 受體，但在相對較低程度下。由於 HER2、HER3 及 HER4 具有幾乎相同分子大小，故當全細胞溶胞產物藉由 Western 氏沾吸分析評估時，不可能辨別何種蛋白質正在變成酪胺酸磷醯基化。

但是，此等細胞對於 HRG 酪胺酸磷醯化作用檢測係為理想的，因為在所使用之檢測條件下，於外源方式添加之 HRG 不存在下，其係顯示低至不可測得含量之酪胺酸磷醯化作用蛋白質，在 M_r 180,000 範圍內。

將 MCF7 細胞覆蓋在 24-井板中，並將對 HER2 之單株抗體添加至各井中，且在室溫下培養 30 分鐘；然後，將 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 添加至各井，達最後濃度為 0.2 nM，並持續培養 8 分鐘。自各井小心地吸出培養基，並藉由添加 100 微升 SDS 試樣緩衝劑 (5% SDS, 25 mM DTT 及 25 mM Tris-HCl, pH 6.8)，使反應停止。使各試樣 (25 微升) 在 4-12% 梯度凝膠 (Novex) 上電泳，然後以電泳方式轉移至聚二氟化亞乙烯薄膜。展開抗磷酸酪胺酸 (4G10，得自 UBI，於 1 微克/毫升下使用) 免疫沾吸，並藉由反射光密度分析法，定量 M_r ~180,000 下之主要反應性譜帶之強度，按以前所述 (Holmes 等人 *Science* 256: 1205-1210 (1992); Sliwkowski 等人 *J. Biol. Chem.* 269: 14661-14665 (1994))。

單株抗體 2C4、7F3 及 4D5 係顯著地抑制 HRG-所引致之酪胺酸磷醯化作用信號在 M_r 180,000 下產生。於 HRG 不存在下，此等抗體均未能夠刺激 M_r 180,000 範圍內之蛋白質之酪胺酸磷醯化作用。此等抗體亦不會與 EGFR (Fendly 等人癌症研究 (*Cancer Research*) 50: 1550-1558 (1990))、HER3 或 HER4 交叉反應。抗體 2C4 與 7F3 係顯著地抑制 p180 酪胺酸磷醯化作用之 HRG 刺激，達對照組之 <25%。單株抗體 4D5 能夠阻斷酪胺酸磷醯化作用之 HRG 刺激達 ~50%。圖 2A 顯示 2C4 或 7F3 抑制 p180 酪胺酸磷醯化作用之 HRG 刺激之劑量-回應曲線，當藉由反射光密度分析法測定時。此等抑制作用曲線，使用 4-參數吻合之評估，係對 2C4 與 7F3 個別產生 2.8 ± 0.7 nM 與 29.0 ± 4.1 nM 之 IC_{50} 。

藉由 HER2 抗體抑制 HRG 結合至 MCF7 乳房腫瘤細胞系，係在冰上，於 24-井板格式中，以單層培養物進行 (Lewis 等人癌症研究 (*Cancer Research*) 56: 1457-1465 (1996))。將 HER2 單株抗體添加至各井中，並培養 30 分鐘。添加 ^{125}I -標識之 rHRG $\beta 1_{177-224}$ (25 pm)，並持續培養 4 至 16 小時。圖 2B 係提供 2C4 或 7F3 抑制 HRG 結合至 MCF7 細胞之劑量-回應曲線。將不同濃度之 2C4 或 7F3 與 MCF7 細胞，於 ^{125}I -標識之 rHRG $\beta 1$ 存在下，一起培養，而抑制作用曲線係示於圖 2B 中。此等數據之分析係對 2C4 與 7F3 個別產生 2.4 ± 0.3 nM 與 19.0 ± 7.3 nM 之 IC_{50} 。對 2C4 與 7F3 之最高抑制 ~74%，係與酪胺酸磷醯化作用數據吻合。

為測定 MCF7 細胞上所發現之 HER2 抗體作用是否為一般

現象，故將人類腫瘤細胞系與 2C4 或 7F3 一起培養，並測定專一 ^{125}I -標識之 rHRG $\beta 1$ 結合之程度 (Lewis 等人癌症研究 (*Cancer Research*) 56: 1457-1465 (1996))。得自此項研究之結果係示於圖 3 中。 ^{125}I -標識之 rHRG $\beta 1$ 之結合，可顯著地在所有細胞系中被無論是 2C4 或 7F3 抑制，惟乳癌細胞系 MDA-MB-468 除外，其已被報告極少或不會表現 HER2。其餘細胞系均被報告會表現 HER2，其中 HER2 表現之程度在此等細胞系中係廣泛地改變。事實上，HER2 在所測試細胞系中表現之範圍，會改變超過 2 數量級。例如 BT-20、MCF7 及 Caov3 會表現 $\sim 10^4$ 個 HER2 受體/細胞，然而 BT-474 與 SK-BR-3 係表現 $\sim 10^6$ 個 HER2 受體/細胞。在給予 HER2 在此等細胞中之廣範圍表現與上述數據下，結論是 HER2 與 HER3 或 HER4 間之交互作用，本身為高親和力交互作用，發生在漿膜之表面上。

於外源 rHRG $\beta 1$ 存在或不存在下，單株抗體 2C4 與 4D5 在 MDA-MB-175 與 SK-BR-3 細胞上之生長抑制作用，係經評估 (Schaefer 等人, *Oncogene* 15: 1385-1394 (1997))。於 MDA-MB-175 細胞上之 HER2 含量，係為 4-6 倍高於正常乳房上皮細胞中所發現之含量，且 HER2-HER4 受體係於構成上在 MDA-MB-175 細胞中經酪胺酸磷醯基化。將 MDA-MB-175 細胞以 HER2 單株抗體 2C4 與 4D5 (10 微克/毫升) 處理 4 天。在結晶紫染色檢測中，與 2C4 培養係顯示對於此細胞系之強生長抑制作用 (圖 4A)。外源 HRG 不會顯著地逆轉此抑制。另一方面，2C4 對於 HER2 過度表現細胞系 SK-BR-3，係顯現出無抑制作用 (圖 4B)。單株抗體 2C4 能夠抑制 MDA-MB-175 細胞之細胞增生，比單株抗

體 4D5 達較大程度，於外源 HRG 存在與不存在下。藉由 4D5 抑制細胞增生，係依賴 HER2 表現程度 (Lewis 等人 *Cancer Immunol. Immunother.* 37: 255-263 (1993))。在 SK-BR-3 細胞中可偵測出最高抑制為 66% (圖 4B)。但是，此作用可被外源 HRG 克服。

實例 2

HER2 與 HER3 之 HRG 依賴性締合作用係被

單株抗體 2C4 阻斷

HER3 與 HER2 締合之能力係在共免疫沉澱作用實驗中測試。將 1.0×10^6 個 MCF7 或 SK-BR-3 細胞接種於六井組織培養板中，在含有 10% 牛胎兒血清 (FBS) 與 10 mM HEPES pH 7.2 之 50:50 DMEM/Ham 氏 F12 培養基 (生長培養基) 中，並允許黏附過夜。於開始實驗之前，使細胞在未具有血清之生長培養基中飢餓兩小時。

將細胞短暫地以磷酸鹽緩衝之鹽水 (PBS) 洗滌，然後與無論是 100 nM 所指示之抗體，經稀釋於 0.2% w/v 牛血清白蛋白 (BSA), RPMI 培養基中，具有 10 mM HEPES, pH 7.2 (結合緩衝劑)，或與單獨之結合緩衝劑 (對照組) 一起培養。在室溫下一小時後，將 HRG 添加至一半井 (+) 中，至最後濃度為 5 nM。將類似體積之結合緩衝劑添加至其他井 (-) 中。持續培養大約 10 分鐘。

藉由吸出移除上層清液，並使細胞溶解於含有 0.2 mM PMSF, 10 微克 / 毫升亮胺素及 10 TU / 毫升抑肽酶之 RPMI, 10 mM HEPES, pH 7.2, 1.0% v/v Triton X-100TM, 1.0% w/v CHAPS (溶

胞緩衝劑)中。藉由離心分離使溶胞產物去除不溶性物質。

將HER2使用以共價方式偶合至親和力凝膠(Affi-Prep 10, Bio-Rad)之單株抗體進行免疫沉澱。此抗體(Ab-3, 致癌基因科學)會辨識細胞質功能部位抗原決定部位。進行免疫沉澱作用, 其方式是將含有大約8.5微克固定化抗體之10微升凝膠漿液添加至各溶胞產物中, 並使試樣在室溫下混合兩小時。然後, 藉離心收集凝膠。將凝膠以溶胞緩衝劑分批洗滌三次, 以移除未結合之物質。接著, 添加SDS試樣緩衝劑, 並將試樣在沸水浴中短暫地加熱。

將上層清液在4-12%聚丙烯醯胺凝膠上操作, 並於硝基纖維素薄膜中電沾吸。HER3之存在係經由以抵抗其細胞質功能部位抗原決定部位之多株抗體(c-17, Santa Cruz Biotech)探測該沾吸而進行評估。沾吸係使用化學發光受質(ECL, Amersham)而呈現。

如圖5A與5B個別關於MCF7與SK-BR-3細胞之對照通道所示, HER3係只有在將細胞以HRG刺激時, 才存在於HER2免疫沉澱物中。若細胞首先以單株抗體2C4培養, 則HER3信號係在MCF7細胞中被廢除(圖5A, 通道2C4+)或在SK-BR-3細胞中實質上被降低(圖5B, 通道2C4+)。如圖5A-B中所示, 單株抗體2C4會阻斷HER3與HER2在MCF7與SK-BR-3兩種細胞中之遺傳素依賴性締合作用, 其實質上比搓史圖諸馬伯(trastuzumab)更有效。以搓史圖諸馬伯之預培養, 會降低HER3在MCF7溶胞產物中之信號, 但對於自SK-BR-3溶胞產物共沉澱之HER3量, 具有極少或無作用。以抵抗EGF受體之抗體

(Ab-1, 致癌基因科學) 預培養，對於 HER3 與 HER2 在任一種細胞系中共免疫沉澱之能力無作用。

實例 3

人化 2C4 抗體

老鼠單株抗體 2C4 之可變功能部位係首先被無性繁殖至載體中，其允許產生老鼠/人類嵌合 Fab 片段。全部 RNA 係使用 Stratagene RNA 萃取套件，按照製造者擬案，單離自雜種瘤細胞。可變功能部位係藉由 RT-PCR 放大，經凝膠純化，並插入含有人類 κ 恒定功能部位與人類 C_H1 功能部位之 pUC119-為基礎之質粒衍生物，如以前所述 (Carter 等人 *PNAS (USA)* 89: 4285 (1992); 與美國專利 5,821,337)。所形成之質粒係被轉變至大腸桿菌菌種 16C9 中，供表現 Fab 片段。培養物之生長，蛋白質表現之誘發，及 Fab 片段之純化，均如以前所述 (Werther 等人 *J. Immunol.* 157: 4986-4995 (1996); Presta 等人 *癌症研究 (Cancer Research)* 57: 4593-4599 (1997))。

將已純化之嵌合 2C4 Fab 片段與老鼠母抗體 2C4 比較，關於其抑制 ^{125}I -HRG 結合至 MCF7 細胞，及抑制 MCF7 細胞中 p180 酪胺酸磷醯化作用之 rHRG 活化作用之能力。如圖 6A 中所示，嵌合 2C4 Fab 片段在瓦解人類乳癌細胞系 MCF7 上之高親和力 HER2-HER3 結合位置形成上係極有效。對於完整老鼠 2C4 計算之相對 IC_{50} 值，係為 $4.0 \pm 0.4 \text{ nM}$ ，然而對 Fab 片段之數值為 $7.7 \pm 1.1 \text{ nM}$ 。如圖 6B 中所示，單價嵌合 2C4 Fab 片段在瓦解 HRG 依賴性 HER2-HER3 活化作用上係極有效。對於完整老鼠單株抗體 2C4 計算之 IC_{50} 值為 $6.0 \pm 2 \text{ nM}$ ，然而對 Fab 片段

之數值為 15.0 ± 2 nM。

嵌合無性繁殖系之DNA定序，允許確認CDR殘基(Kabat等人,具免疫學重要性之蛋白質順序,第5版,國家衛生研究所公共衛生服務, Bethesda, MD (1991))(圖7A與B)。使用寡核苷酸位置引導致突變，全部六個此等CDR區域，均被引進被包含在如以前所述(Presta等人,癌症研究(*Cancer Research*) 57: 4593-4599 (1997))之質粒VX4上之完整人類骨架($V_L \kappa$ 亞組I與 V_H 亞組III)中。來自所形成之"CDR-交換"之蛋白質係按上述表現與純化。進行結合研究，以比較兩種變型。簡言之，係將NUNC MAXISORP™板以50 mM碳酸鹽緩衝劑pH 9.6中之每毫升1微克HER2胞外功能部位(ECD;按WO 90/14357中所述製成)塗覆，於4°C下過夜，然後以ELISA稀釋劑(0.5% BSA, 0.05% 聚花楸酸酯 20, PBS)在室溫下阻斷1小時。將試樣在ELISA稀釋劑中之連續稀釋液，於板上培養2小時。於洗滌後，經結合之Fab片段係以生物素化老鼠抗人類 κ 抗體(ICN 634771)，接著以鏈黴胺基酸共軛之辣根過氧化酶(Sigma)偵測，並使用3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(Kirkegaard & Perry實驗室, Gaithersburg, MD)作為受質。吸光率係在450毫微米下讀取。如圖8A中所示，在建構CDR-交換人類Fab片段時，所有結合均喪失。

為恢復人化Fab之結合，突變型係使用得自CDR-交換之DNA作為模板而建構。使用電腦產生之模型(圖9)，此等突變型係經設計，以改變人類骨架區域殘基成為其老鼠相對物，在其中改變可能影響CDR構形或抗體-抗原界面之位置

處。突變型係示於表 2 中。

表 2

人化 2C4 FR 突變型之名稱

突變型編號	骨架區域 (FR) 取代
560	ArgH71Val
561	AspH73Arg
562	ArgH71Val, AspH73Arg
568	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly
569	ArgH71Val, AspH73Arg, PheH67Ala
570	ArgH71Val, AspH73Arg, AsnH76Arg
571	ArgH71Val, AspH73Arg, LeuH78Val
574	ArgH71Val, AspH73Arg, IleH69Leu
56869	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly, PheH67Ala

關於各種突變型之結合曲線係示於圖 8A-C 中。人化 Fab 變型 574，具有 ArgH71Val、AspH73Arg 及 IleH69Leu 之改變，顯示具有恢復至最初嵌合 2C4 Fab 片段之結合。其他 FR 及 / 或 CDR 殘基，譬如 L2, L54, L55, L56, H35 及 / 或 H48，可經改質 (例如經取代，如下列 - IleL2Thr；ArgL54Leu；TyrL55Glu；ThrL56Ser；AspH35Ser；及 ValH48Ile)，以進一步精製或加強人化抗體之結合。替代或另外，人化抗體可經親和力成熟 (參閱上文)，以進一步改良或精製其親和力及 / 或其他生物學活性。

人化 2C4 變型 574 係使用噬菌體顯示方法進行親和力成熟。簡言之，係使人化 2C4.574 Fab 無性繁殖至噬菌體顯示載

體中，成為基因 III 融合物。當噬菌體粒子經由以 M13KO7 輔助噬菌體感染而被誘發時，此融合物允許 Fab 被顯示於噬菌體尾纖維蛋白質基因 III 之 N-末端上 (Baca 等人 *J Biol Chem.* 272: 10678 (1997))。

對上文確認之 6 種 CDR 之每一種建構個別基因庫。於此等基因庫中，在使用電腦產生之模型 (圖 9) 確認為可能顯著結合至 HER2 之 CDR 中之胺基酸，係利用含有 "NNS" 作為其密碼子之寡聚物隨機化。然後，將基因庫針對被塗覆於 NUNC MAXISORPTM 板上之 HER2 ECD 進行盤塗覆，使用 3% 乳粉，在具有 0.2% TWEEN 20[®] (MPBST) 之 PBS 中，用於取代所有阻斷溶液。為選擇具有親和力高於 2C4.574 之噬菌體，在第 3、4 及 5 輪盤塗覆時，於洗滌步驟期間添加可溶性 HER2 ECD 或可溶性 Fab 2C4.574，作為競爭者。洗滌時間係被延長至 1 小時，在室溫下。

於 5 輪盤塗覆後，再一次藉由噬菌體-ELISA 分析個別無性繁殖系。使個別無性繁殖系於 Costar 96-井 U-型底組織培養板中生長，並藉由添加輔助噬菌體誘發噬菌體。於過夜生長後，使大腸桿菌細胞形成粒狀，並將含噬菌體之上層清液轉移至 96-井板，於其中以 MPBST 阻斷噬菌體，在室溫下 1 小時。以 HER2 ECD 塗覆之 NUNC MAXISORPTM 板，亦以如上述之 MPBST 阻斷。將已阻斷之噬菌體於板上培養 2 小時。於洗滌後，偵測經結合之噬菌體，使用辣根-過氧化酶-共軛抗-M13 單株抗體 (Amersham Pharmacia Biotech 公司, 27-9421-01)，以 1: 5000 稀釋於 MPBST 中，接著是作為受質之 3,3',5,5'-四甲基

聯苯胺。吸光率係在450毫微米下讀取。

將得自各基因庫而獲得最高信號之48種無性繁殖系經DNA定序。將其順序最頻繁地發生之無性繁殖系，次代無性繁殖至上述允許表現可溶性Fab之載體上。誘發此等Fab，經蛋白質純化，並藉由如上述之ELISA分析經純化Fab之結合，及將此結合與起始人化2C4.574變型比較。

在個別CDR中令人感興趣之突變型經確認後，將其他突變型，其為此等之不同組合，按上述建構與測試。相對於574，獲得經改良結合之突變型係描述於表3中。

表3

衍生自2C4.574親和力成熟之突變型名稱

<u>突變型名稱</u>	<u>自574之改變</u>	<u>突變型/574*</u>
H3.A1	serH99trp, methH34leu	0.380
L2.F5	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu	0.087
H1.3.B3	thrH28gln, thrH30ser, methH34leu	0.572
L3.G6	tyrL92pro, ileL93lys, methH34leu	0.569
L3.G11	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, methH34leu	0.561
L3.29	tyrL92phe, tyrL96asn, methH34leu	0.552
L3.36	tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro, methH34leu	0.215
654	serL50trp, methH34leu	0.176
655	methH34ser	0.542
659	serL50trp, methH34ser	0.076
L2.F5.H3.A1	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, serH99trp	0.175
L3G6.H3.A1	tyrL92pro, ileL93lys, methH34leu, serH99trp	0.218
H1.3.B3.H3.A1	thrH28gln, thrH30ser, methH34leu, serH99trp	0.306
L3.G11.H3.A1	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, methH34leu, serH99trp	0.248
654.H3.A1	serL50trp, methH34leu, serH99trp	0.133
654.L3.G6	serL50trp, methH34leu, tyrL92pro, ileL93lys	0.213
654.L3.29	serL50trp, methH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn	0.236
654.L3.36	serL50trp, methH35leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro	0.141

* 在 Erb2-ECD ELISA 中，為獲得標準曲線 mid-OD 所需要突變型之量，對為獲得標準曲線 mid-OD 所需要 574 量之比例。低於 1.0 之數目表示突變型結合 Erb2 比 574 結合更良好。

下列突變型亦已被建構，並目前在評估中：

659.L3.G6	serL50trp, methH34ser, tyrL92pro, ileL93lys
659.L3.G11	serL50trp, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
659.L3.29	serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
659.L3.36	serL50trp, methH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro
L2F5.L3G6	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92pro, ileL93lys
L2F5.L3G11	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
L2F5.L29	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn
L2F5.L36	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro
L2F5.L3G6.655	serL50trp, tyrL53gly, methH35ser, tyrL92pro, ileL93lys
L2F5.L3G11.655	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
L2F5.L29.655	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
L2F5.L36.655	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro

下列藉由類同性掃描所指出之突變型，目前正被建構中：

678	thrH30ala
679	thrH30ser
680	lysH64arg
681	leuH96val
682	thrL97ala
683	thrL97ser
684	tyrL96phe
685	tyrL96ala
686	tyrL91phe
687	thrL56ala
688	glnL28ala
689	glnL28glu

於 H34 下之較佳胺基酸為甲硫胺酸。若在此位置有發現氧化作用，則可能施行改變成白胺酸。已發現 AsnH52 與 AsnH53

係強烈地較佳供結合。改變此等殘基成為丙胺酸或天門冬胺酸，會急驟地降低結合。包含人化變型 574 之可變輕與重功能部位且具有人類 IgG1 重鏈恒定區域之完整抗體，已被製成(參閱美國專利 5,821,337)。該完整抗體係藉由中國大頰鼠卵巢(CHO)細胞製成。該分子於本文係被稱為柏圖祖馬伯(pertuzumab)。

實例 4

單株抗體 2C4 阻斷 EGF、TGF- α 或 HRG 所媒介之

MAPK 與 Akt 激酶活化作用

許多生長因子受體係經過有絲分裂原活化之蛋白質激酶(MAPK)途徑發出訊息。此等雙重專一性激酶為在訊息轉導途徑中關鍵終點之一，其最後會觸發癌細胞分裂。單株抗體 2C4 或搓史圖諸馬伯(trastuzumab)抑制 MAPK 之 EGF、TGF- α 或 HRG 活化作用之能力，係以下述方式評估。

將 MCF7 細胞 (10^5 個細胞 / 井) 覆蓋在含有血清之培養基中，於 12-井細胞培養板中。隔天，移除細胞培養基，並將含有 0.1% 血清之新培養基添加至各井中。然後，於第二天重複此程序，並在檢測之前，以不含血清之結合緩衝劑置換培養基 (Jones 等人 *J. Biol. Chem.* 273: 11667-74 (1998); 與 Schaefer 等人 *J. Biol. Chem.* 274: 859-66 (1999))。使細胞平衡至室溫，然後與 0.5 毫升 200 nM 搓史圖諸馬伯(trastuzumab)或單株抗體 2C4 一起培養 30 分鐘。接著，將細胞以 1 nM EGF、1 nM TGF- α 或 0.2 nM HRG 處理 15 分鐘。經由吸出細胞培養基，使反應停止，然後添加含有 1% DTT 之 0.2 毫升 SDS-PAGE 試樣緩衝劑。

MAPK 活化作用係藉由 Western 氏沾吸，使用抗-活性 MAPK 抗體 (Promega)，按以前所述 (Jones 等人 *J. Biol. Chem.* 273: 11667-74 (1998)) 評估。

如圖 10 中所示，單株抗體 2C4 係顯著地阻斷 MAPK 之 EGF、TGF- α 及 HRG 所媒介之活化作用，比搓史圖諸馬伯達較大程度。此等數據指出單株抗體 2C4 係結合至 HER2 之表面，其係用於其與無論是 EGFR 或 HER3 之締合，且因此阻止發出訊息受體複合物之形成。

單株抗體 2C4 亦顯示會抑制遺傳素 (HRG)-依賴性 Akt 活化作用。PI3 激酶訊息轉導途徑之活化作用，對於細胞存活率係為重要的 (Carraway 等人 *J. Biol. Chem.* 270: 7111-6 (1995))。在腫瘤細胞中，PI3 激酶活化作用在侵入性表現型中可扮演一項角色 (Tan 等人 *Cancer Research*. 59: 1620-1625, (1999))。存活途徑主要是藉由絲胺酸 / 蘇胺酸激酶 AKT 所媒介 (Bos 等人 *Trends Biochem Sci.* 20: 441-442 (1995))。於 HER2 與無論是 HER3 或 EGFR 之間形成之複合物，可引發此等途徑，以個別回應遺傳素或 EGF (Olayioye 等人 *Mol. & Cell. Biol.* 18: 5042-51 (1998)；Karunakaran 等人, *EMBO 期刊*. 15: 254-264 (1996)；及 Krymskaya 等人 *Am. J. Physiol.* 276: L246-55 (1999))。MCF7 乳癌細胞與 2C4 之培養，會抑制遺傳素所媒介之 Akt 活化作用。Agus 等人, *癌細胞* 2: 127-137 (2002)。再者，於遺傳素添加不存在下，所存在之 Akt 活化作用之基底含量，係進一步藉由添加 2C4 而被降低。

實例 5

鉑抗藥性癌症之療法

此實例係說明柏圖祖馬伯 (pertuzumab) 併用真西塔賓 (gemcitabine) 在患有鉑抗藥性卵巢癌、原發性腹膜癌或輸卵管癌之病患中之安全性、耐藥性及功效。柏圖祖馬伯與真西塔賓對於無進展存活期之作用，係在所有病患中，及在其腫瘤含有顯示 HER2 活化作用之標記物之病患子集中評估。

已進展而同時接受鉑為基礎之化學療法或在接受該療法之6個月內之病患，係合格用於此項研究。病患係隨機接受無論是真西塔賓 (gemcitabine) 且併用柏圖祖馬伯 (pertuzumab) 或真西塔賓且併用安慰劑。於此處經治療之病患包括在研究登錄之前未曾接受關於鉑抗藥性疾病之先前補救服用治療藥劑者，及已經服用一次關於鉑抗藥性疾病之先前服用法者。

真西塔賓係在1000毫克/平方米下，於各21天循環之第1與8天投藥。真西塔賓係首先灌注歷經30分鐘。關於毒性，將允許劑量降低。安慰劑或柏圖祖馬伯係於21天循環之第1天投藥。隨機接受柏圖祖馬伯之病患係被投予最初負載劑量840毫克(循環1)，接著在循環2及其後，係為420毫克。隨機接受安慰劑之病患係以如對於循環1、循環2及其後使用柏圖祖馬伯分組所投予之相同體積，投予安慰劑。未發展疾病之病患可接受治療至高達17次循環或1年。由於血細胞減少症之結果，病患將具有標準真西塔賓劑量降低及

停止服藥。柏圖祖馬伯亦將因任何停止之第1天真西塔賓服藥而被停止。後續劑量將在降低之劑量下，且將不會被增加。若劑量降低或停止劑量係為超過4種場合所需要，或若劑量被停止超過3週，則將中斷真西塔賓，且在治療醫師與醫療監視器准許下，盲檢藥物可持續，直到疾病進展為止。若第8天真西塔賓劑量係被停止，則第8天劑量將被省略，且後續治療將以下一循環開始(先前循環之第22天)。

真西塔賓將被停止與劑量降低係按下表建議：

絕對粒性細胞計數 ($\times 10^6$ /升)		血小板計數($\times 10^6$ /升)	%全量
>1000	與	>100,000	100
500-999	或	50,000-99,000	75
<500	或	<50,000	停止

對於任何需要劑量降低之病患之後續劑量，係在降低之劑量下。若由於血細胞減少症之結果，使劑量停止超過3週，則病患將被假定為具有無法令人接受之毒性，且將中斷真西塔賓。若沒有其他額外等級III或IV毒性，則盲檢藥物之持續，將在醫師與醫療監視器之判斷下。真西塔賓之血液學毒性係與劑量投藥之速率有關聯。將給予真西塔賓歷經30分鐘，而不管總劑量為何。用於NCI-CTC等級2血細胞減少症之菌落刺激劑，可在治療醫師判斷下使用。

關於交換至單一藥劑柏圖祖馬伯(pertuzumab)之選擇，將被提出。840毫克之負載劑量將在下一循環投予，到期時伴隨著連續420毫克，且後續循環為每21天。含有該癌症之代

表性腫瘤之石蠟包埋腫瘤試樣或未染色石蠟載玻片，可以獲得，且評估HER2磷醯化作用狀態。大約20-40%卵巢癌病患可具有可偵測之HER2磷醯化作用。

回應將在循環2, 4, 6, 8, 12及17結束時評估。可度量之疾病係使用固態腫瘤之回應評估標準(RECIST)，藉由臨床評估與CT掃描或等效物評估。關於具有可評估疾病之病患之回應，將根據對CA-125之改變，及疾病之臨床與放射學証據評估。此等回應應在回應之最初考証後4-8週確認。可評估病患將包括已具有至少一次回應評估，及在其腫瘤試樣中具有HER2磷醯化作用狀態測定之病患。

下述結果度量將被評估。

初期功效終點

無進展存活期，在所有病患於各分組中所指定研究治療起始之後，當使用RECIST或CA-125改變，由研究人員評估測定時。

無進展存活期，在所指定研究治療起始之後，於各分組中，在下列亞組中，當使用RECIST或CA-125改變，由研究人員評估測定時：

具有HER2活化作用之可偵測標記物之病患。

未具有HER2活化作用之可偵測標記物之病患。

後期功效終點

目的回應(PR或CR)

回應期間

存活時間

於4個月時無進展

此等終點將在所有病患中，於各分組中與在下列亞組中評估：

具有HER2活化作用之可偵測標記物之病患。

未具有HER2活化作用之可偵測標記物之病患。

為預防或治療可能之惡心與嘔吐，病患可以血清素拮抗劑、類固醇及/或苯并二氮七園類預先經藥物治療。為預防或治療可能之皮疹，可使用標準痤瘡療法，包括局部及/或口服抗生素。其他可能共存藥療法係為任何處方藥物或非處方製劑，由病患使用於間隔中，在第1天之前7天開始，並持續經過追蹤期之最後一天。歷經灌注有關聯之溫度升高至 $>38.5^{\circ}\text{C}$ ，或其他灌注有關聯病徵之病患，可於徵候上以乙醯胺吩(acetaminophen)、苯海拉明(diphenhydramine)或嘜啉治療。非實驗之造血生長因子可針對NCI-CTC等級2血細胞減少症投予。

按前述治療之病患，將在卵巢癌、原發性腹膜癌或輸卵管癌之徵候或病徵上顯示改善，如藉由任一個或多個初期或後期功效終點所評估者。再者，按前述使用柏圖祖馬伯與真西塔賓之組合所治療之鉑抗藥性病患，在癌症之任何徵候或病徵上，與僅使用真西塔賓治療之鉑抗藥性病患比較，將顯示較大改善。

【圖式簡單說明】

圖1A與1B係描繪當藉由截頭突變型分析與位置引導致突變測定時(Nakamura等人, *J. of Virology* 67(10): 6179-6191 (1993)；

與 Renz 等人, *J. Cell Biol.* 125(6): 1395-1406 (1994)) , HER2 胞外功能部位 (ECD) 內之殘基 22-645 之抗原決定部位定圖譜 (胺基酸順序, 包括訊息順序, 示於圖 1A 中; 順序識別碼: 13) 。各種 HER2-ECD 截頭或點突變型係製自 cDNA, 使用聚合酶連鎖反應技術。HER2 突變型係以 gD 融合蛋白質表現於哺乳動物表現質粒中。此表現質粒係使用巨細胞病毒啟動子/增強子, 具有 SV40 末端化與聚腺苷酸化作用訊息, 位於經插入 cDNA 之下游。質粒 DNA 係被轉染至 293 細胞中。在轉移感染之後一天, 細胞係在含有 1% 經滲析牛胎兒血清與 25 μ Ci 各 35 S 甲硫胺酸與 35 S 半胱胺酸之不含甲硫胺酸與半胱胺酸之低葡萄糖 DMEM 中, 以代謝方式經標識過夜。採集上層清液, 並將無論是 HER2 單株抗體或對照抗體添加至上層清液中, 且於 4°C 下培養 2-4 小時。使複合物沉澱, 施加至 10-20% 麥黃酮 SDS 梯度凝膠, 並在 100 V 下電泳。使此凝膠電沾吸於薄膜上, 並藉由放射自顯術分析。如圖 1b 中所示, HER2 抗體 7C2, 7F3, 2C4, 7D3, 3E8, 4D5, 2H11 及 3H4 係結合各種 HER2-ECD 抗原決定部位。

圖 2A 與 2B 顯示 HER2 單株抗體 2C4 與 7F3 對於 MCF7 細胞之 rHRG β 1 活化之作用。圖 2A 顯示關於 2C4 或 7F3 抑制酪胺酸磷酸化作用之 HRG 刺激之劑量-回應曲線。圖 2B 顯示關於藉由 2C4 或 7F3 抑制 125 I-標識之 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 結合至 MCF7 細胞之劑量-回應曲線。

圖 3 描繪藉由 HER2 單株抗體 2C4 或 7F3 抑制專一 125 I-標識之 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 結合至人類腫瘤細胞系之試驗名單。單株

抗體對照組為不會阻斷 rHRG 結合之同型物匹配老鼠單株抗體。非專一性 ^{125}I -標識之 rHRG $\beta_{177-244}$ 結合，係測定自 100 nM rHRG β_1 存在下進行之平行培養。非專一性 ^{125}I -標識之 rHRG $\beta_{177-244}$ 結合之數值，係低於經測試所有細胞系總計之 1%。

圖 4A 與 4B 顯示單株抗體 2C4 與 4D5 對於 MDA-MB-175 (圖 4A) 與 SK-BR-3 (圖 4B) 細胞增生之作用。將 MDA-MB-175 與 SK-BR-3 細胞接種於 96 井板中，並使其黏附 2 小時。實驗係在含有 1% 血清之培養基中進行。添加 HER2 抗體或單獨之培養基，並將細胞在 37°C 下培養 2 小時。接著，添加 rHRG β_1 (1 nM) 或單獨之培養基，並將細胞培養 4 天。將單層洗滌，並以 0.5% 結晶紫染色/固定。為測定細胞增生，故在 540 毫微米下度量吸光率。

圖 5A 與 5B 顯示單株抗體 2C4、搓史圖諸馬伯 (trastuzumab) 抗體或抗-EGFR 抗體，對於 HER2 與 HER3 在表現低/正常含量 HER2 之 MCF7 細胞中 (圖 5A) 與表現高含量 HER2 之 SK-BR-3 細胞中之遺傳素 (HRG) 依賴性締合之作用 (圖 5B)；參閱上文實例 2。

圖 6A 與 6B 係比較完整老鼠單株抗體 2C4 (μ 2C4) 與嵌合 2C4 Fab 片段之活性。圖 6A 顯示藉由嵌合 2C4 Fab 或完整老鼠單株抗體 2C4 抑制 ^{125}I -HRG 結合至 MCF7 細胞。使 MCF7 細胞接種於 24-井板 (1×10^5 個細胞/井) 中，且生長至約 85% 匯合，歷經兩天。結合實驗係按 Lewis 等人癌症研究 (Cancer Research) 56: 1457-1465 (1996) 中所述進行。圖 6B 係描繪在 MCF7 細胞中

抑制 p180 酪胺酸磷醯化作用之 rHRG β 1 活化作用，按 Lewis 等人癌症研究 (*Cancer Research*) 56: 1457-1465 (1996) 中所述進行。

圖 7A 與 7B 係描繪老鼠單株抗體 2C4 之可變輕 (V_L) (圖 7A) 與可變重 (V_H) (圖 7B) 功能部位 (個別為順序識別碼 1 與 2)；人化 2C4 變型 574 之 V_L 與 V_H 功能部位 (個別為順序識別碼 3 與 4)，及人類 V_L 與 V_H 同感骨架 (hum κ 1, 輕 κ 亞組 I；hum III, 重亞組 III) (個別為順序識別碼 5 與 6) 之胺基酸順序之對準。星號係確認人化 2C4 變型 574 與老鼠單株抗體 2C4 間之差異，或人化 2C4 變型 574 與人類骨架間之差異。互補性決定區域 (CDR) 係在括弧中。

圖 8A 至 C 顯示嵌合 Fab 2C4 (Fab.v1) 與數種人化 2C4 變種之結合至 HER2 胞外功能部位 (ECD)，當在實例 3 中藉 ELISA 測定時。

圖 9 為單株抗體 2C4 之 V_L 與 V_H 功能部位之絲帶圖，具有經標識之白色 CDR 主鏈 (L1, L2, L3, H1, H2, H3)。亦顯示人化作用期間藉由致突變評估之 V_H 側鏈 (參閱實例 3, 表 2)。

圖 10 描繪單株抗體 2C4 或搓史圖諸馬伯對於 EGF、TGF- α 或 HRG 所媒介有絲分裂原活化蛋白質激酶 (MAPK) 活化之作用。

圖 11A 與 11B 個別顯示搓史圖諸馬伯輕鏈 (順序識別碼：14) 與搓史圖諸馬伯重鏈 (順序識別碼：15) 之胺基酸順序。

圖 12A 與 12B 個別顯示柏圖祖馬伯輕鏈 (順序識別碼：16) 與柏圖祖馬伯重鏈 (順序識別碼：17) 之胺基酸順序。

圖 13 係概要地描繪 2C4 在 HER2 之異種二聚體結合位置處

之結合，藉以預防與經活化之 EGFR 或 HER3 之異種二聚合作用。

圖 14 描繪 HER2/HER3 偶合至 MAPK 與 Akt 途徑。

圖 15 係比較搓史圖諸馬伯與柏圖祖馬伯之活性。

圖 16 係概要地描繪 HER2 之各種功能部位。

序列表

<110> KELSEY, STEPHEN M.

<120> 鉑抗藥性癌症之治療

<130> P2146R1

<140> 094119914

<141> 2005-06-15

<150> US 60/580, 333

<151> 2004-06-16

<160> 17

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Asp	Thr	Val	Met	Thr	Gln	Ser	His	Lys	Ile	Met	Ser	Thr	Ser	Val
1				5					10					15

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

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

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

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

Ser	Ser	Val	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln
				80					85					90

Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu
				95					100					105

Ile Lys

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

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

Thr	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Thr
				20					25					30

Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Lys	Gln	Ser	His	Gly	Lys	Ser	Leu
				35					40					45

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工順序

<220>

<223> 順序係被合成

<400> 3

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

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

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

Leu	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Thr	Gly	Val	Pro	Ser
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

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

Ile Lys

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工順序

<220>

<223> 順序係被合成

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工順序

<220>
 <223> 順序係被合成

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

Ile Lys

<210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工順序

<220>
 <223> 順序係被合成

<400> 6
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工順序

<220>

<223> 順序係被合成

<220>

<221> Xaa

<222> 10

<223> Xaa較佳為D或S

<400> 7

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
 1 5 10

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工順序

<220>

<223> 順序係被合成

<400> 8

Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 1 5 10 15

Lys Gly

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工順序

<220>

<223> 順序係被合成

<400> 9

Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr	Phe	Asp	Tyr
1				5					10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工順序

<220>

<223> 順序係被合成

<400> 10

Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Ile	Gly	Val	Ala
1				5					10	

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工順序

<220>

<223> 順序係被合成

<220>

<221> Xaa

<222> 5

<223> Xaa較佳為R或L

<220>

<221> Xaa

<222> 6

<223> Xaa較佳為Y或E

<220>

<221> Xaa

<222> 7

<223> Xaa較佳為T或S

<400> 11

Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工順序

<220>

<223> 順序係被合成

<400> 12

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 645

<212> PRT

<213> 人類

<400> 13

Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu

1 5 10 15

Leu Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp

20 25 30

Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met

35 40 45

Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu

50 55 60

Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln

65 70 75

Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln

80 85 90

Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr

95 100 105

Gln Leu Phe Glu	Asp Asn Tyr Ala Leu	Ala Val Leu Asp Asn Gly
110	115	120
Asp Pro Leu Asn	Asn Thr Thr Pro Val	Thr Gly Ala Ser Pro Gly
125	130	135
Gly Leu Arg Glu	Leu Gln Leu Arg Ser	Leu Thr Glu Ile Leu Lys
140	145	150
Gly Gly Val Leu	Ile Gln Arg Asn Pro	Gln Leu Cys Tyr Gln Asp
155	160	165
Thr Ile Leu Trp	Lys Asp Ile Phe His	Lys Asn Asn Gln Leu Ala
170	175	180
Leu Thr Leu Ile	Asp Thr Asn Arg Ser	Arg Ala Cys His Pro Cys
185	190	195
Ser Pro Met Cys	Lys Gly Ser Arg Cys	Trp Gly Glu Ser Ser Glu
200	205	210
Asp Cys Gln Ser	Leu Thr Arg Thr Val	Cys Ala Gly Gly Cys Ala
215	220	225
Arg Cys Lys Gly	Pro Leu Pro Thr Asp	Cys Cys His Glu Gln Cys
230	235	240
Ala Ala Gly Cys	Thr Gly Pro Lys His	Ser Asp Cys Leu Ala Cys
245	250	255
Leu His Phe Asn	His Ser Gly Ile Cys	Glu Leu His Cys Pro Ala
260	265	270
Leu Val Thr Tyr	Asn Thr Asp Thr Phe	Glu Ser Met Pro Asn Pro
275	280	285
Glu Gly Arg Tyr	Thr Phe Gly Ala Ser	Cys Val Thr Ala Cys Pro
290	295	300
Tyr Asn Tyr Leu	Ser Thr Asp Val Gly	Ser Cys Thr Leu Val Cys
305	310	315
Pro Leu His Asn	Gln Glu Val Thr Ala	Glu Asp Gly Thr Gln Arg
320	325	330
Cys Glu Lys Cys	Ser Lys Pro Cys Ala	Arg Val Cys Tyr Gly Leu
335	340	345

Gly Met Glu His	Leu Arg Glu Val Arg	Ala Val Thr Ser Ala Asn	350	355	360
Ile Gln Glu Phe	Ala Gly Cys Lys Lys	Ile Phe Gly Ser Leu Ala	365	370	375
Phe Leu Pro Glu	Ser Phe Asp Gly Asp	Pro Ala Ser Asn Thr Ala	380	385	390
Pro Leu Gln Pro	Glu Gln Leu Gln Val	Phe Glu Thr Leu Glu Glu	395	400	405
Ile Thr Gly Tyr	Leu Tyr Ile Ser Ala	Trp Pro Asp Ser Leu Pro	410	415	420
Asp Leu Ser Val	Phe Gln Asn Leu Gln	Val Ile Arg Gly Arg Ile	425	430	435
Leu His Asn Gly	Ala Tyr Ser Leu Thr	Leu Gln Gly Leu Gly Ile	440	445	450
Ser Trp Leu Gly	Leu Arg Ser Leu Arg	Glu Leu Gly Ser Gly Leu	455	460	465
Ala Leu Ile His	His Asn Thr His Leu	Cys Phe Val His Thr Val	470	475	480
Pro Trp Asp Gln	Leu Phe Arg Asn Pro	His Gln Ala Leu Leu His	485	490	495
Thr Ala Asn Arg	Pro Glu Asp Glu Cys	Val Gly Glu Gly Leu Ala	500	505	510
Cys His Gln Leu	Cys Ala Arg Gly His	Cys Trp Gly Pro Gly Pro	515	520	525
Thr Gln Cys Val	Asn Cys Ser Gln Phe	Leu Arg Gly Gln Glu Cys	530	535	540
Val Glu Glu Cys	Arg Val Leu Gln Gly	Leu Pro Arg Glu Tyr Val	545	550	555
Asn Ala Arg His	Cys Leu Pro Cys His	Pro Glu Cys Gln Pro Gln	560	565	570
Asn Gly Ser Val	Thr Cys Phe Gly Pro	Glu Ala Asp Gln Cys Val			

	575		580		585
Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys	590		595		600
Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys	605		610		615
Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys	620		625		630
Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu	635		640		645

<210> 14
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工順序

<220>
 <223> 順序係被合成

<400> 14

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val	1	5	10	15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn	20	25	30	
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys	35	40	45	
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser	50	55	60	
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	65	70	75	
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln	80	85	90	
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu	95	100	105	
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro	110	115	120	

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

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

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

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

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

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

Arg Gly Glu Cys

<210> 15

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工順序

<220>

<223> 順序係被合成

<400> 15

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

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

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

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

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

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

Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr		95	100	105
Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser		110	115	120
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser		125	130	135
Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys		140	145	150
Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala		155	160	165
Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser		170	175	180
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser		185	190	195
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser		200	205	210
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys		215	220	225
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly		230	235	240
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met		245	250	255
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		260	265	270
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val		275	280	285
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn		290	295	300
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp		305	310	315
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala				

	320		325		330
Leu Pro Ala Pro	Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln		
	335		340		345
Pro Arg Glu Pro	Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Ser	Arg Glu Glu		
	350		355		360
Met Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu	Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe		
	365		370		375
Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu	Trp Glu Ser Asn	Gly Gln Pro		
	380		385		390
Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr Thr Pro	Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly		
	395		400		405
Ser Phe Phe Leu	Tyr Ser Lys Leu	Thr Val Asp Lys	Ser Arg Trp		
	410		415		420
Gln Gln Gly Asn	Val Phe Ser Cys	Ser Val Met His	Glu Ala Leu		
	425		430		435
His Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser	Leu Ser Leu Ser	Pro Gly		
	440		445		

<210> 16

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工順序

<220>

<223> 順序係被合成

<400> 16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Gly Glu Cys

<210> 17

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工順序

<220>

<223> 順序係被合成

<400> 17

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

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

Asp	Tyr	Thr	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	35	40	45
Glu	Trp	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Tyr	50	55	60
Asn	Gln	Arg	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Leu	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	65	70	75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	80	85	90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Asn	Leu	Gly	Pro	Ser	Phe	Tyr	95	100	105
Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	110	115	120
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	125	130	135
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	140	145	150
Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	155	160	165
Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	170	175	180
Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	185	190	195
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	200	205	210
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	215	220	225
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	245	250	255
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His			

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

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種以會有效地抑制HER二聚合作用之HER2抗體以及真西塔賓(gemcitabine)之組合以治療鉑抗藥性之卵巢癌、原發性腹膜癌或輸卵管癌之方法。

六、英文發明摘要：

十一、圖式：

1 MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRHLY QGCQVVOGNL LSFLODIQEV QGYVLIHNO VRQVPLQLRLR
 101 IVRGTOQLFED NYALAVLDNG DPLNNTTPVT GASPGGLREL QLRSLTEILK GGVLIQRNPQ LCYQDTILWK DIFHKNNQLA LTLIDYNNRSR ACHPCSPMCK
 201 GSRCWGESSE DCQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCCHEQC AAGCTGPKHS DCLACLHFNH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNPEGRYT FGASCVTACP
 301 YNYLSTDVGS CTLVCPLHNQ EVTAEDGTQR CEKCSKPCAR VCYGLGMEHL REVRAVTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFIPES FDGDPASNTA PLQPEQLQVF
 401 ETLEEITGYL YISAWPDSLP DLSVFONLQV-IRGRILHNGA YSLTLQGLGI SWLGLRSLRE LGSGLALIIH NTHLCFVHTV PWDQLFRNPH QALLHTANRP
 501 EDECVGEGIA CHQLCARGHC WPGPTQCVN CSQFLRGQEC VEECRVLQGL PREYVNARHC LPCHPECQPO NGSVTCFGPE ADQCACAHY KDPFFCVARC
 601 PSGVKPDLSY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAE (順序識別碼: 13)

圖 1A

7C2	aa	22-53	(31 殘基)
7F3	aa	22-53	(31 殘基)
2C4	aa	22-584	(562 殘基)
7D3	aa	22-584	(562 殘基)
3E8	aa	512-625	(113 殘基)
4D5	aa	529-625	(96 殘基)
2H11	aa	529-645	(116 殘基)
3H4	aa	541-599	(58 殘基)

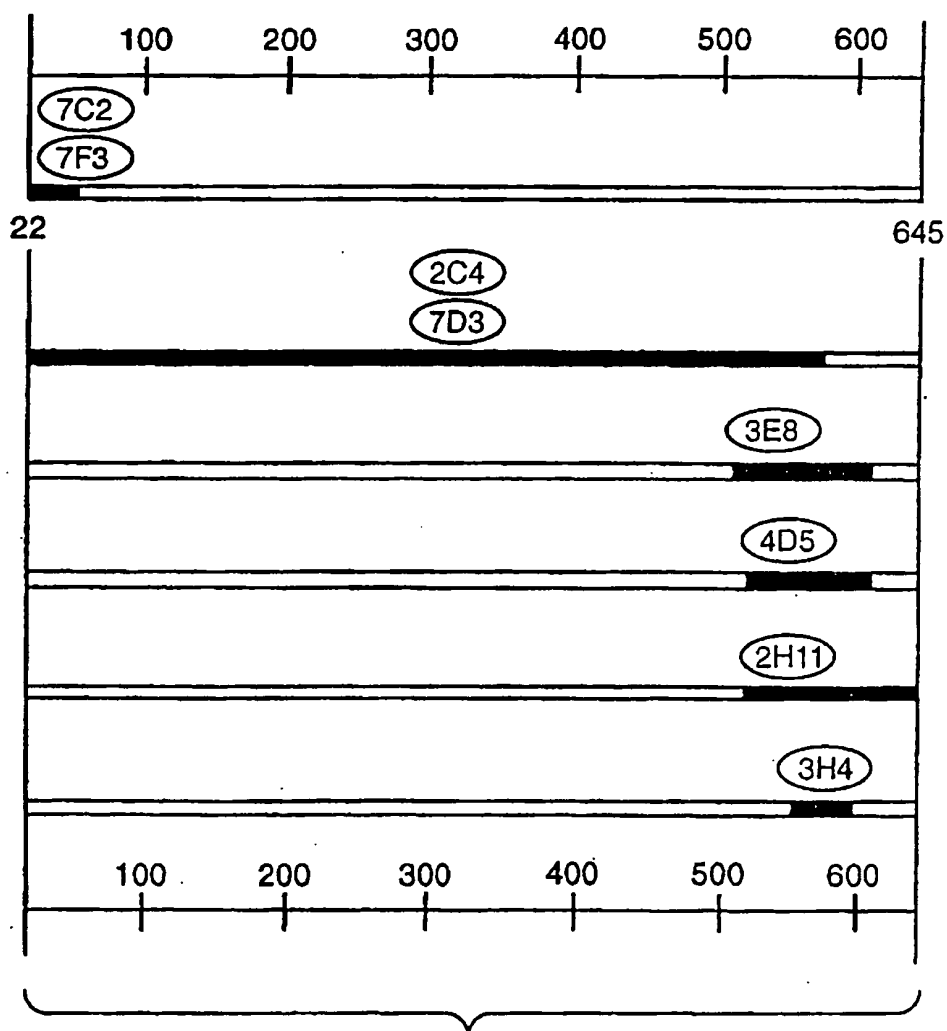


圖 1B

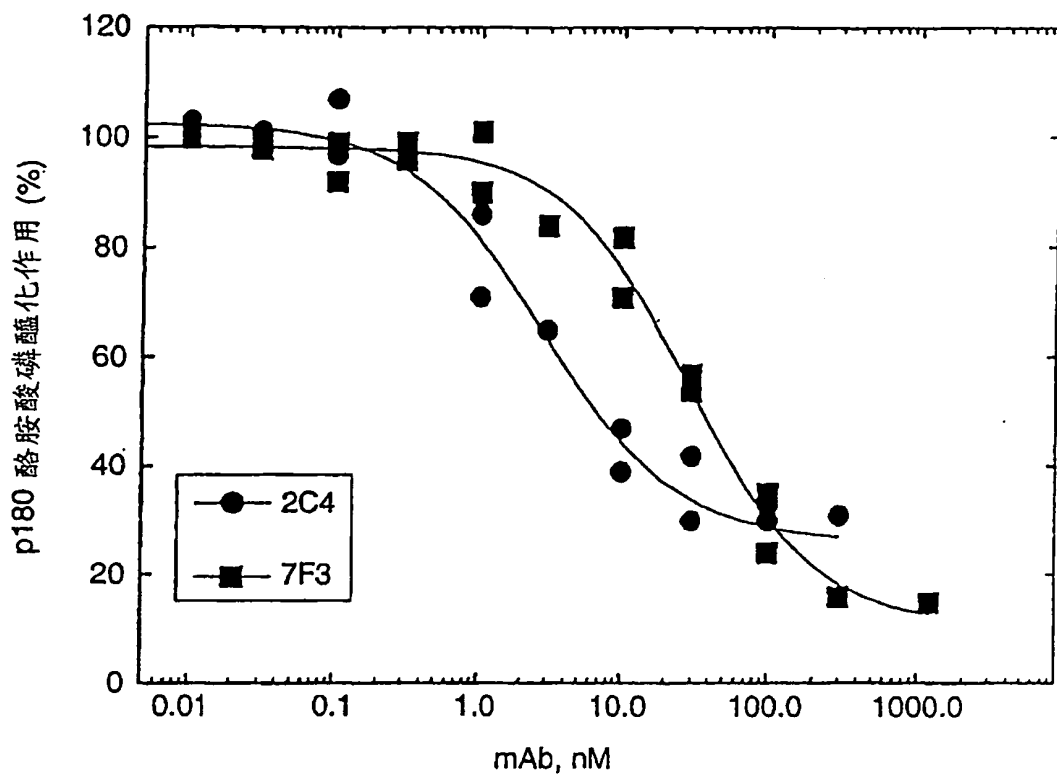


圖 2A

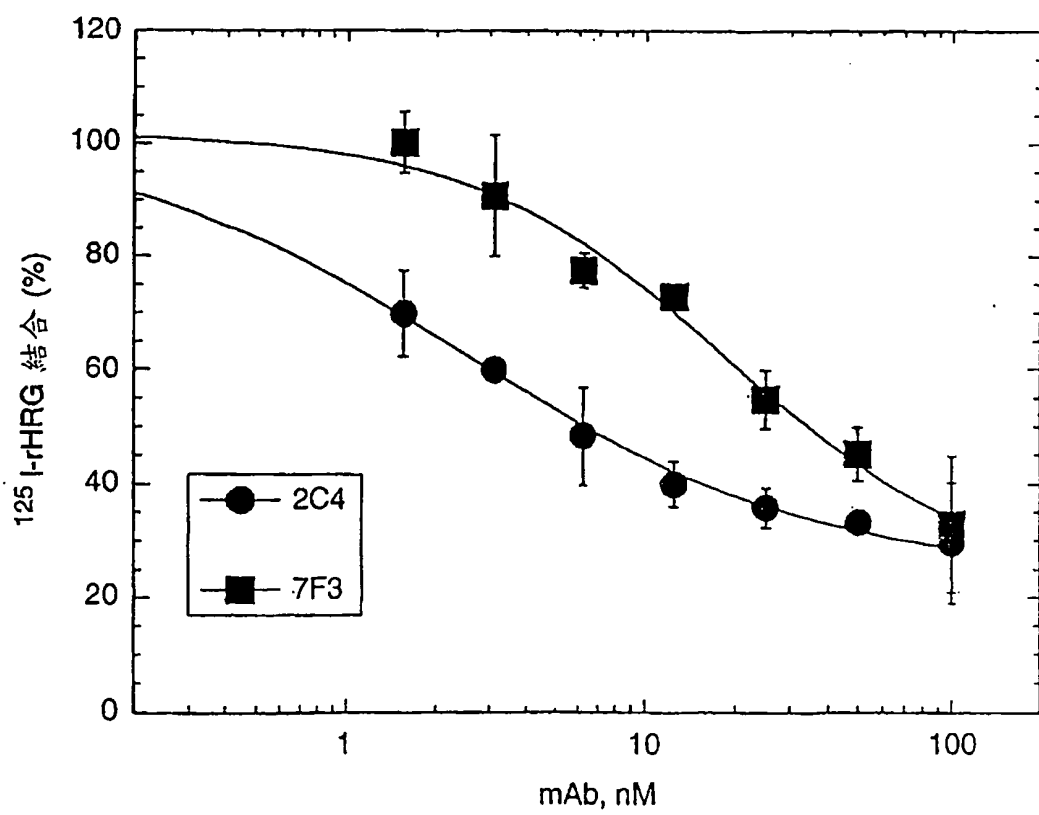


圖 2B

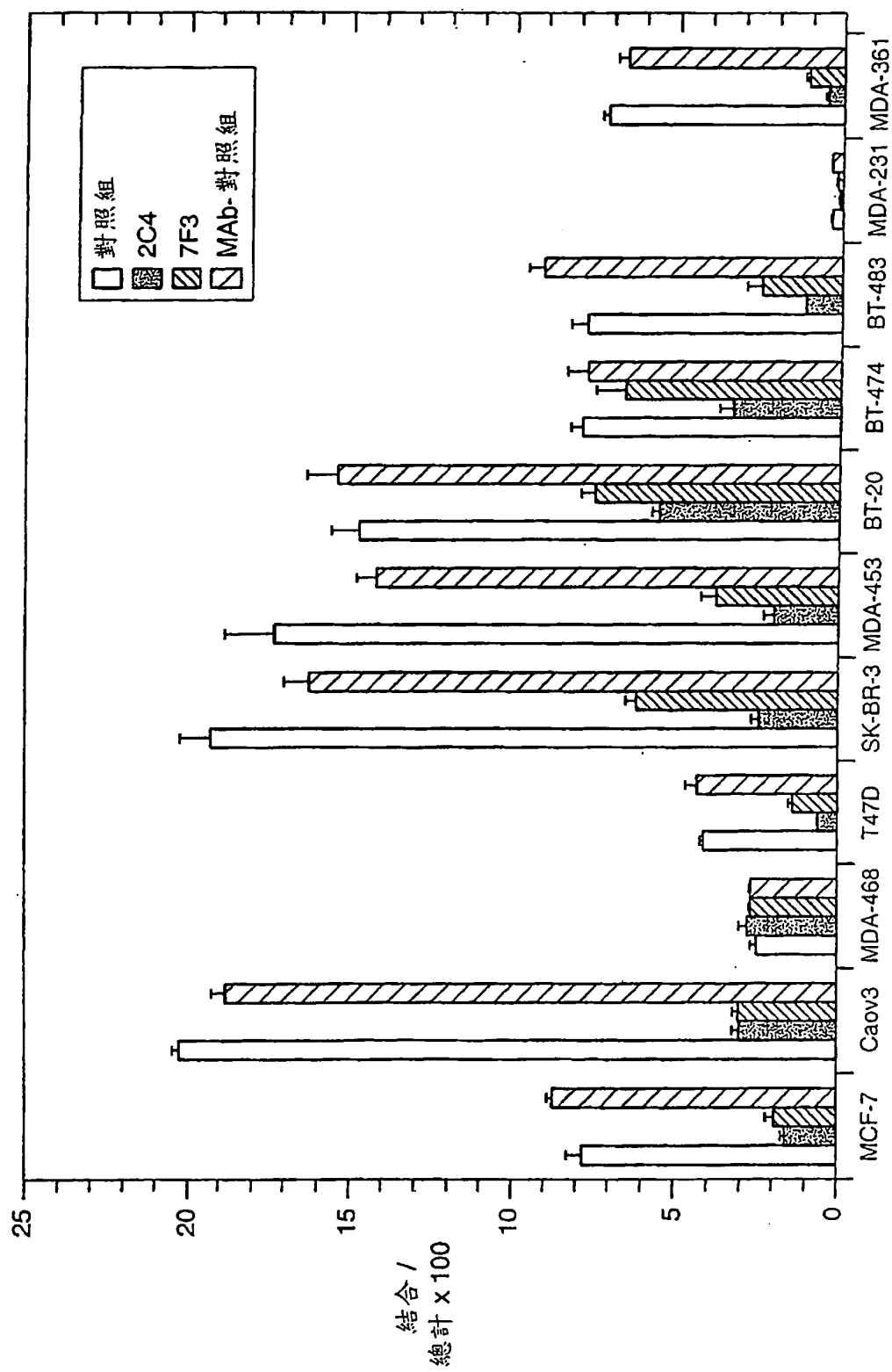


圖3

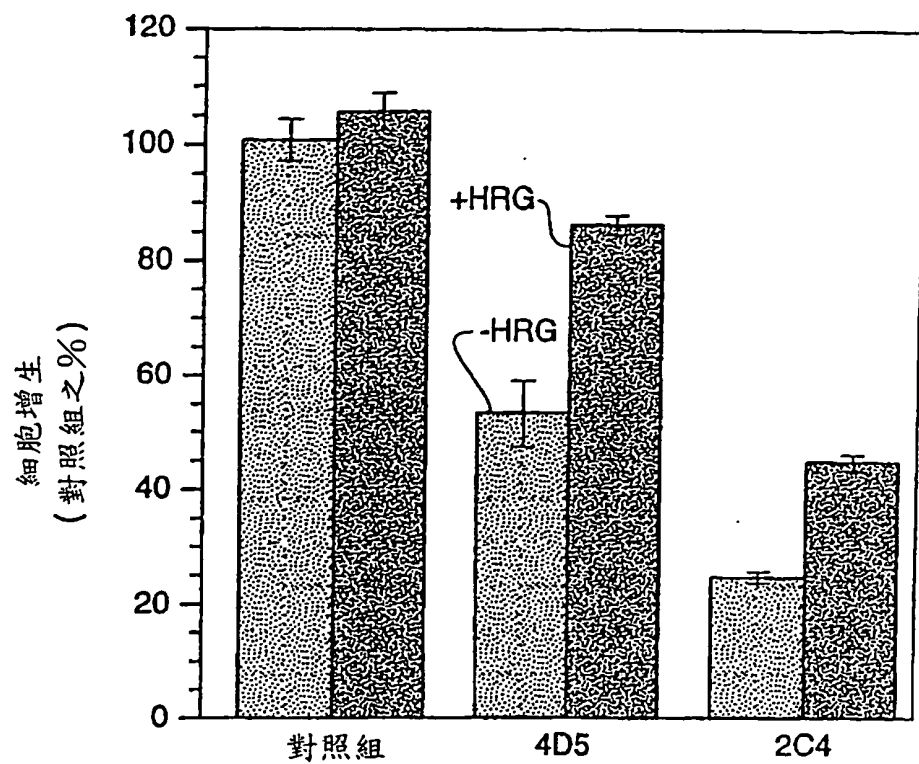


圖4A

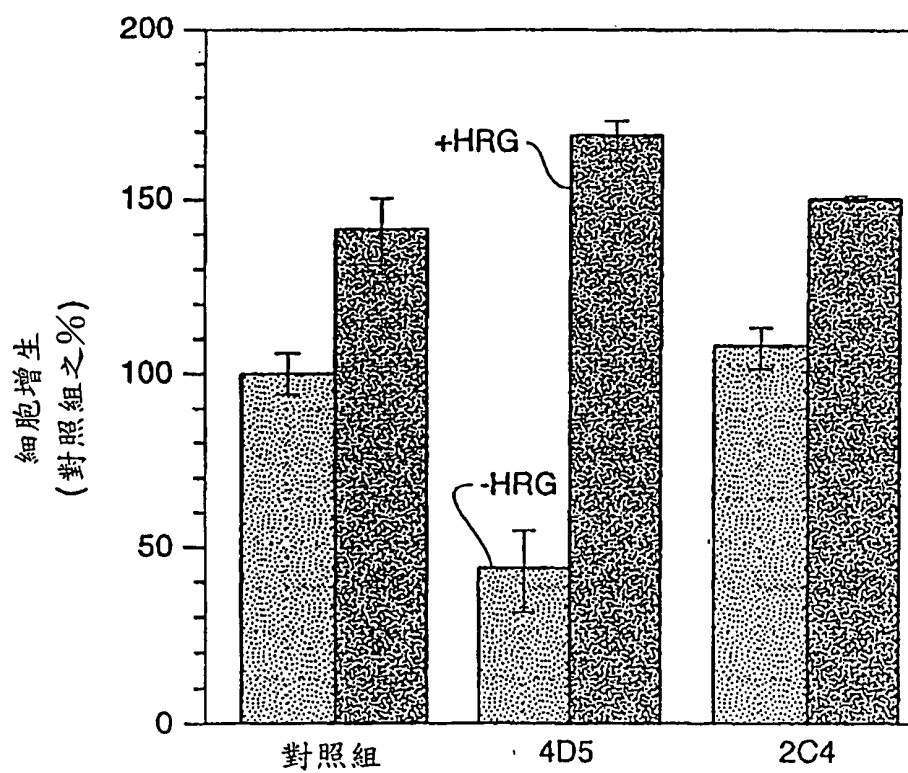
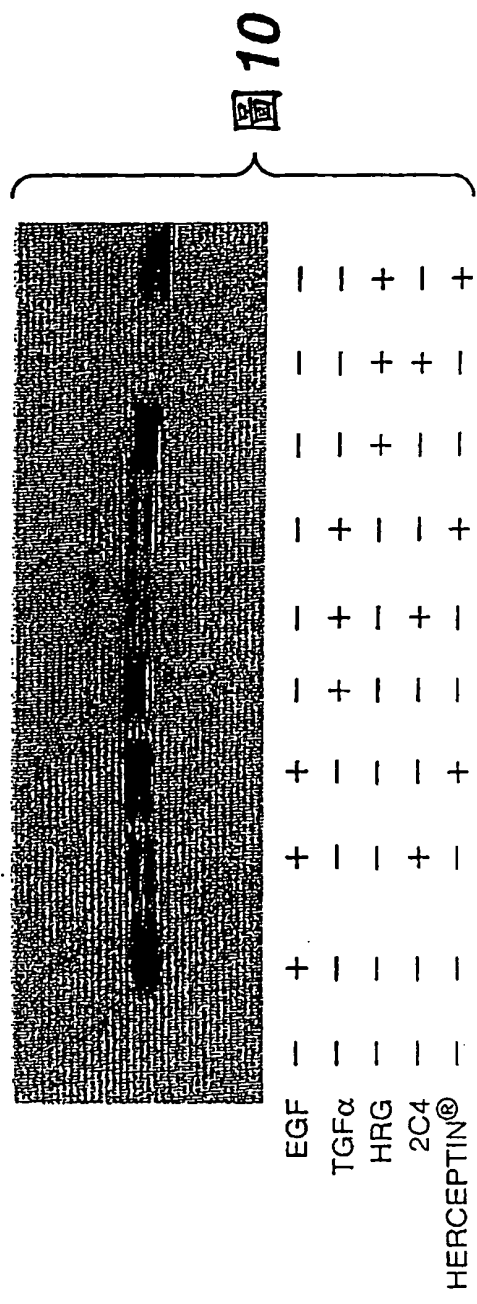
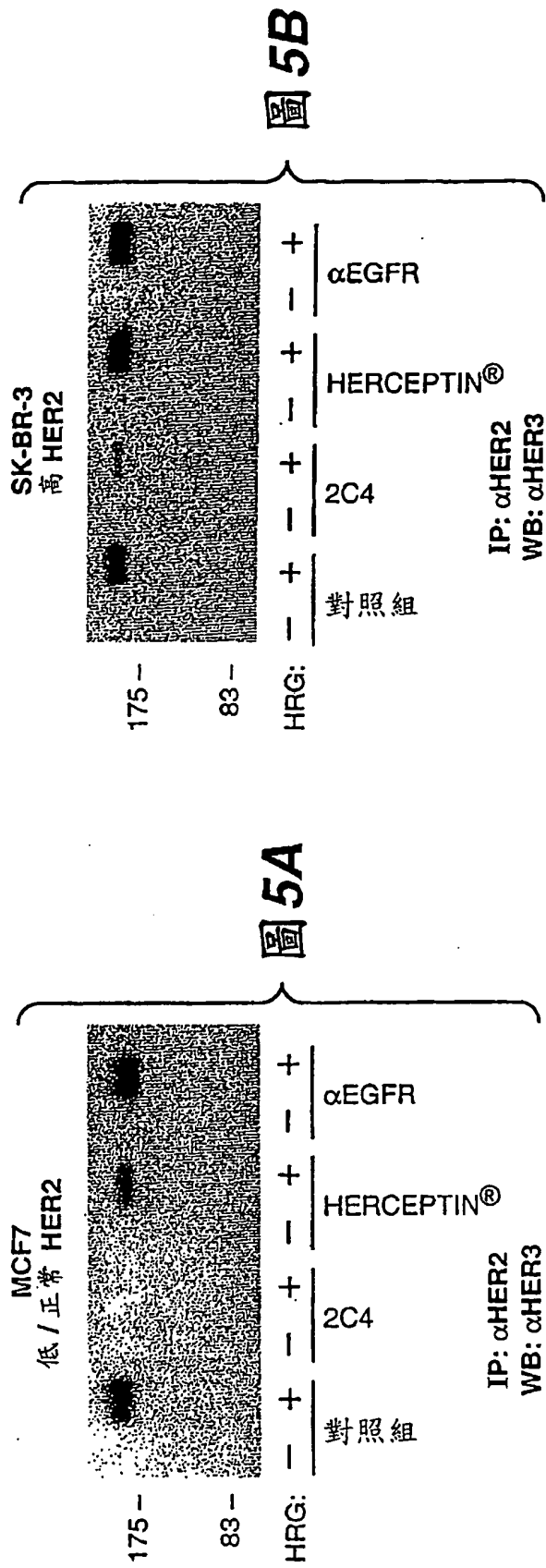


圖4B



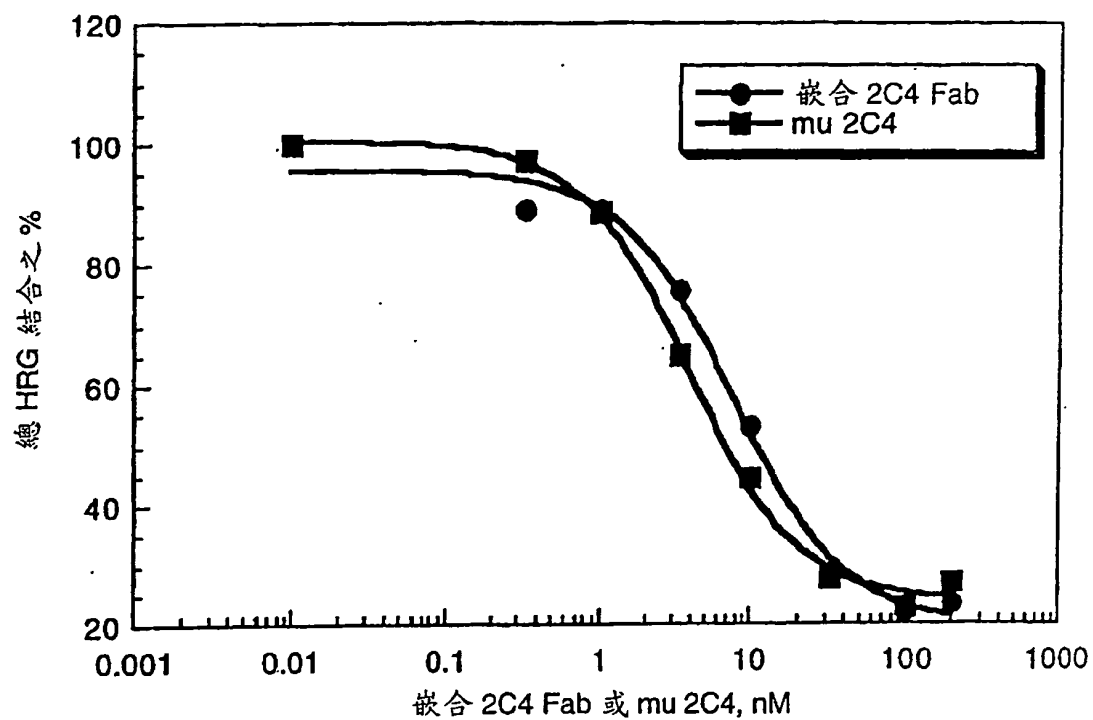


圖 6A

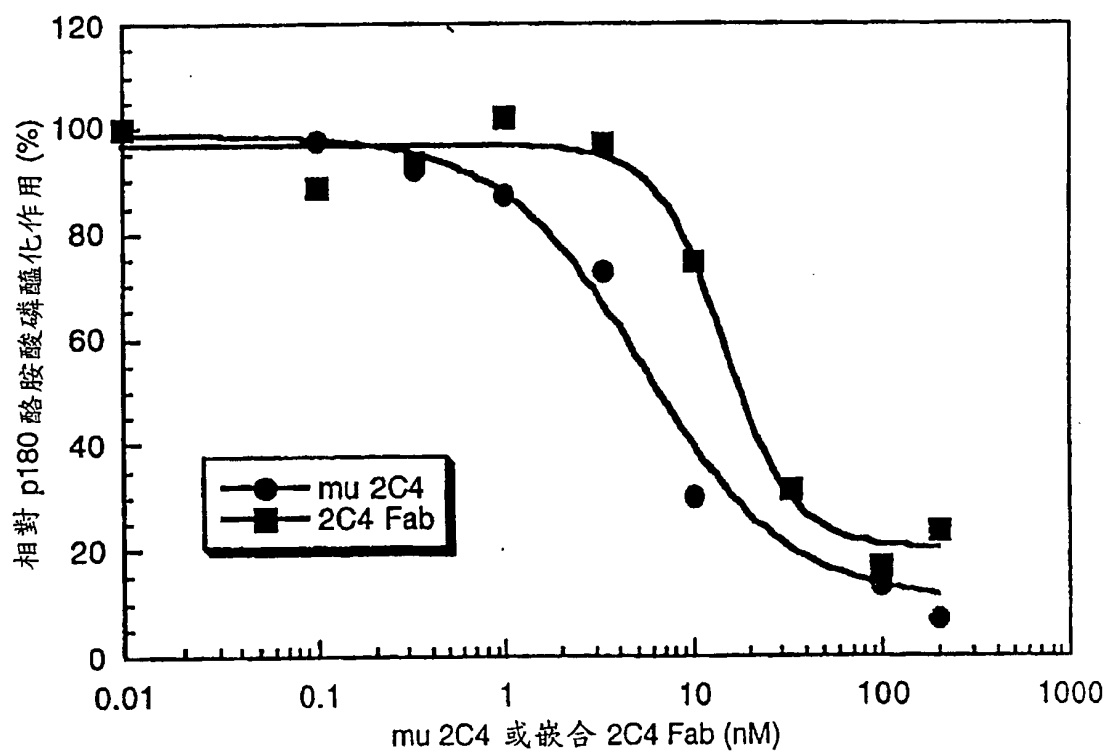


圖 6B

可變輕

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQR	P
	** *****	*		*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQK	P
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQK	P
	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTLT	ISSVQA	
	** *	*	*	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLT	ISSLQP	
		* *****		
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLT	ISSLQP	
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYIYPYT]	EGGGTKLEIK	(順序識別碼:1)	
	* *	*	*	
574	EDFATYYC [QQYIYPYT]	FGQGTKVEIK	(順序識別碼:3)	
		*** *		
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK	(順序識別碼:5)	

圖7A

可變重

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** ** *	*	*	*
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		** *	*	*
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50	a	60	70
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVD	RSSRIVYM	
	* *	*	*	*
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDR	SKNTLYL	
		*****	*	*
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDN	SKNTLYL	
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(順序識別碼:2)
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(順序識別碼:4)

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS	(順序識別碼:6)

圖7B

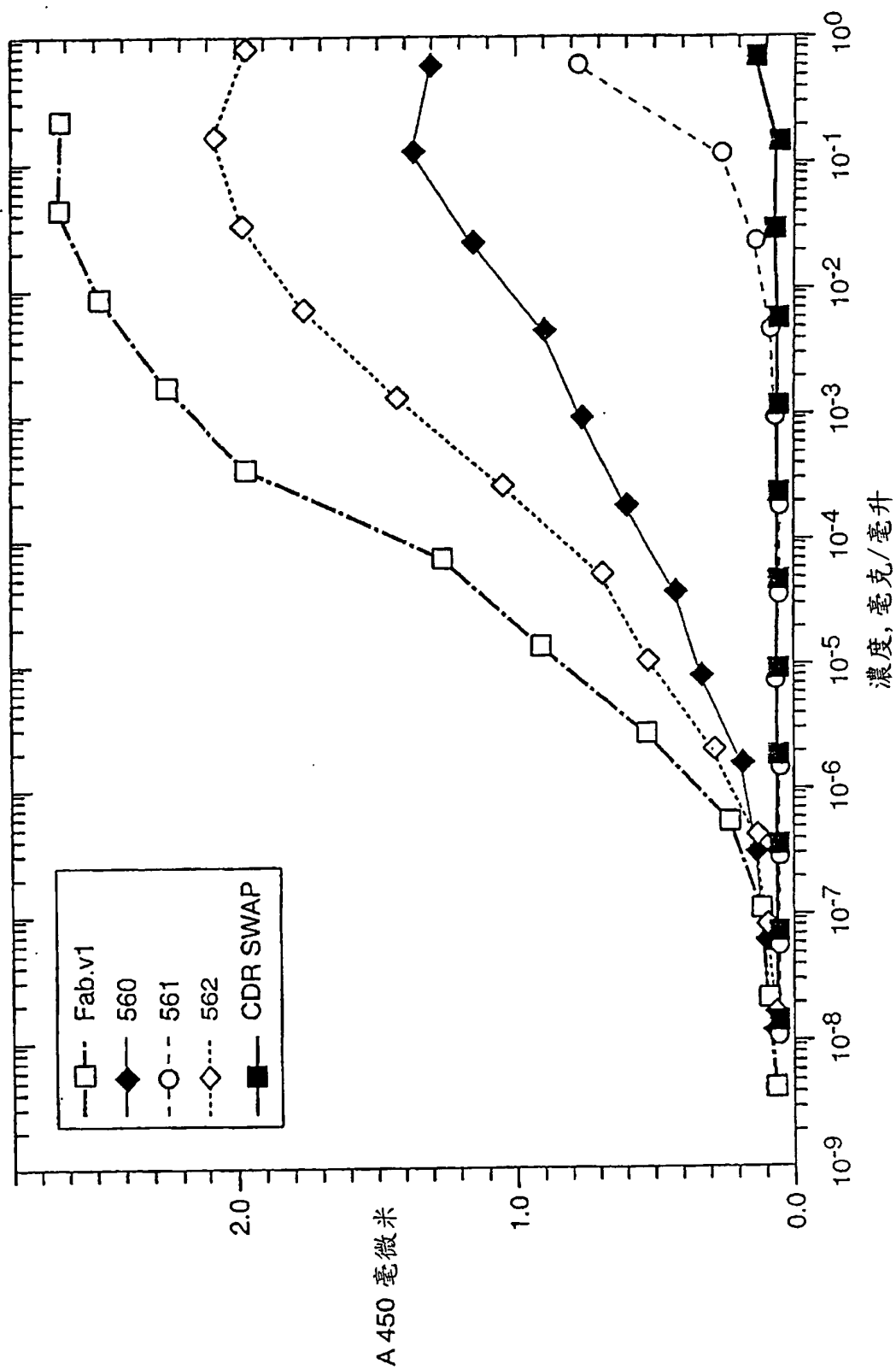


圖8A

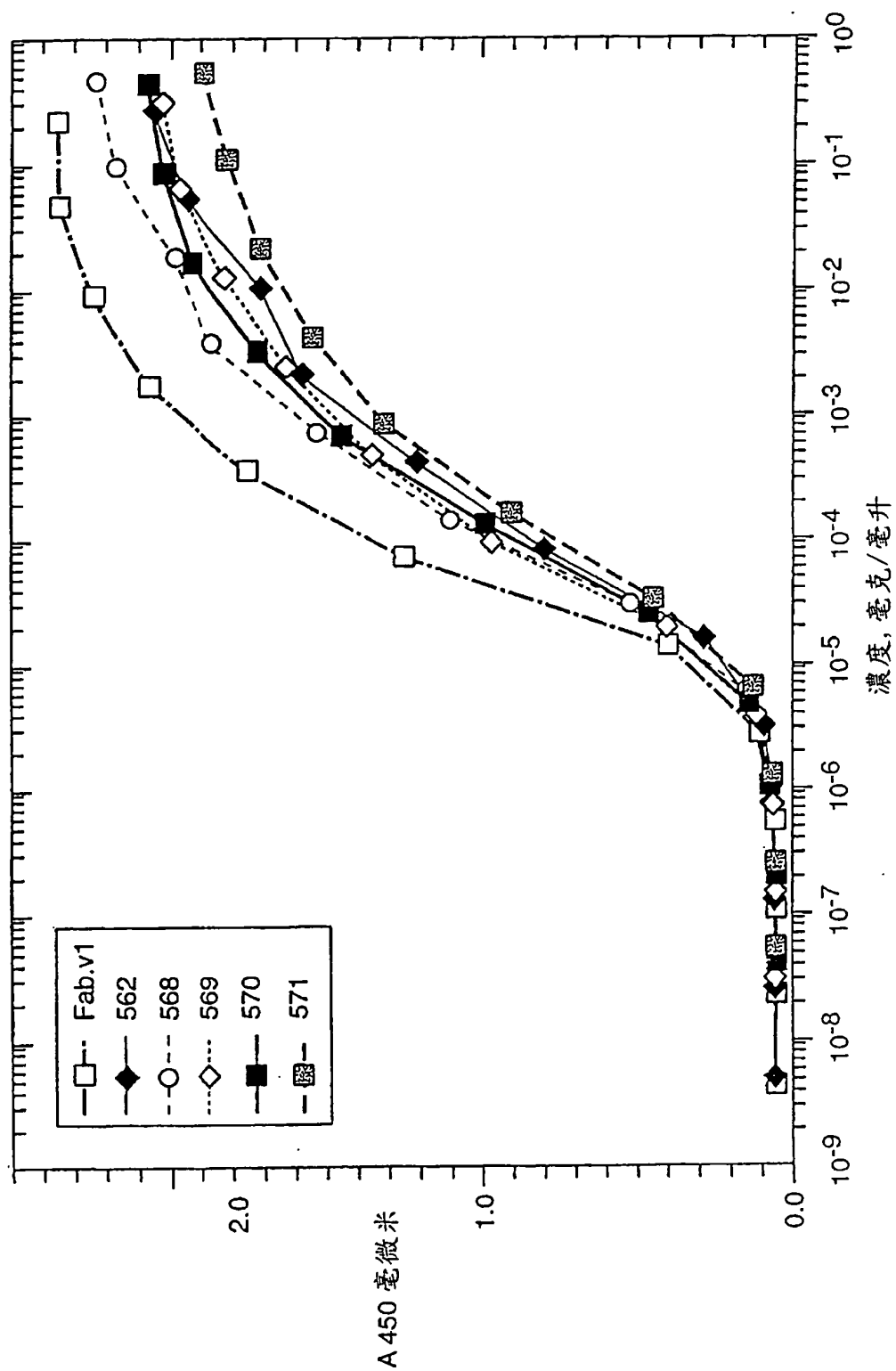


圖8B

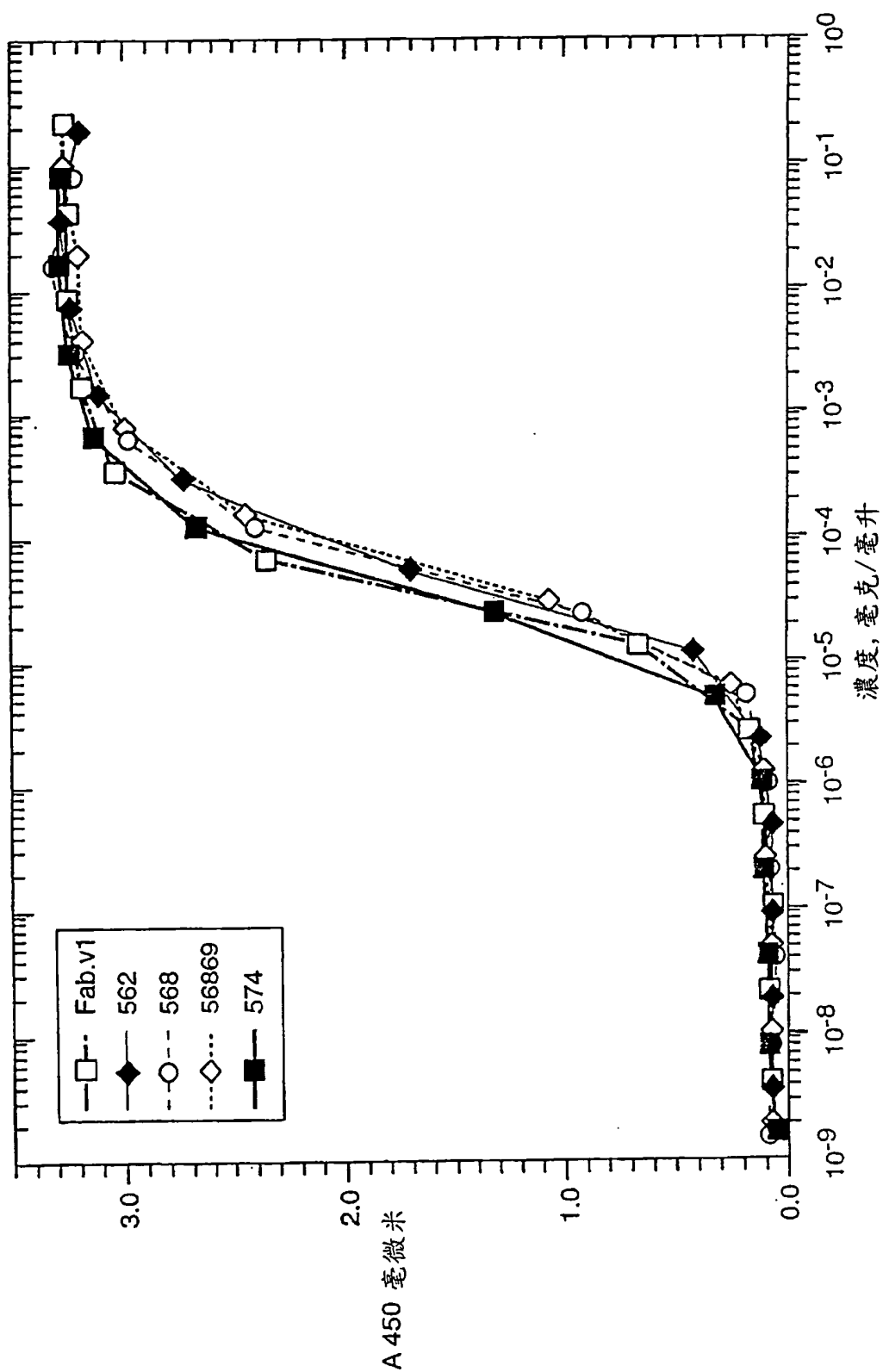


圖8C

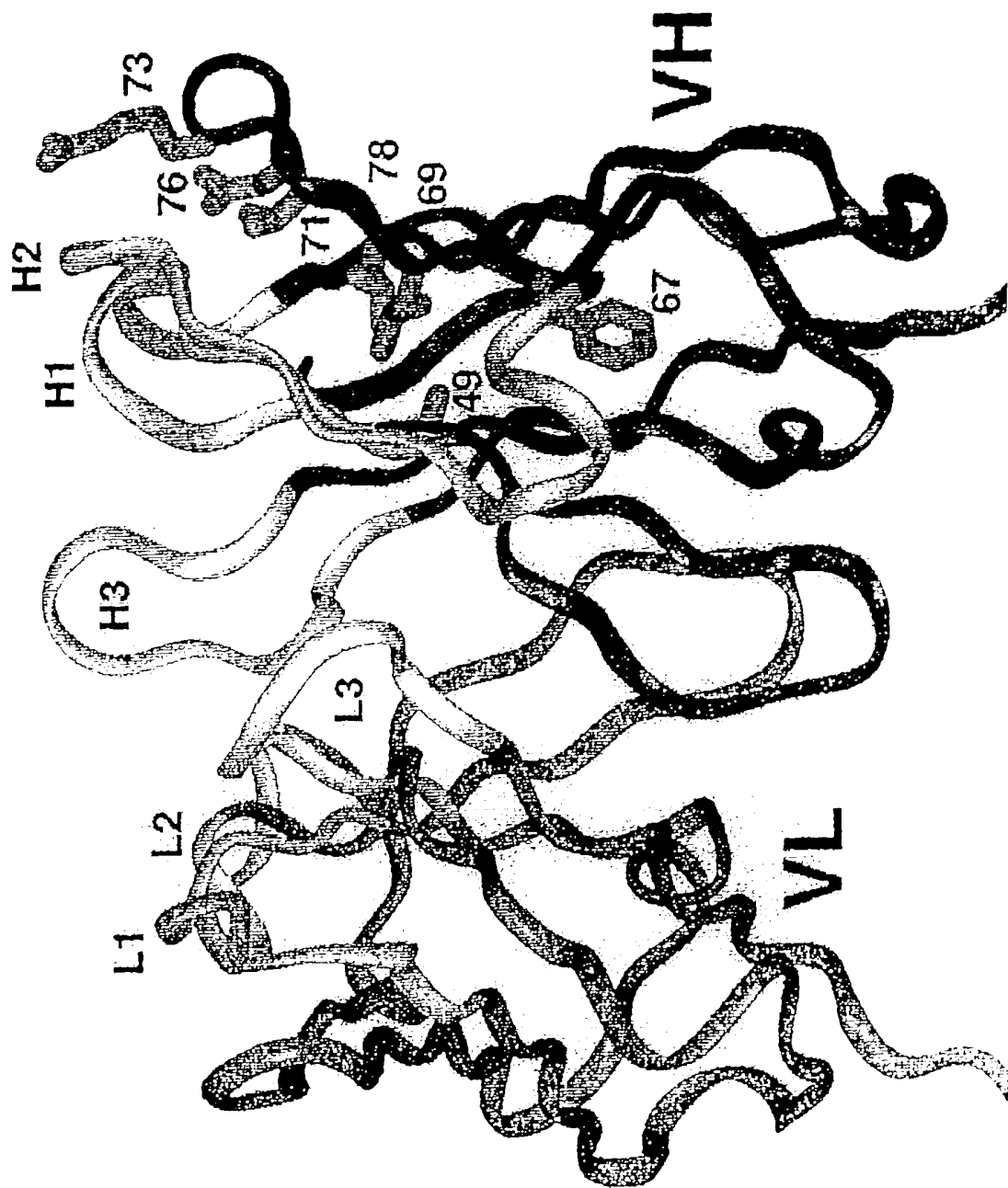


圖9

輕鏈

1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	D	V	N	T	A	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	45	
													15														30																			
46	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	R	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	90
													60														75																			
91	H	Y	T	P	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	135	
													105														120																			
136	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	180
													150														165																			
181	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C												
													195														210																			

圖11A

重鍵

1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL	30	45
46	EWARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED	75	90
91	TAVYYCSRWG G D G F Y A M D Y W G G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S	120	135
136	KSTSGGTAALGCLVKDYFPPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPPAVLQSS	165	180
181	GLYSLSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK	210	225
226	THTCPPCPAPELLGGPSPVFLFPKPKD T L M I S R T P E V T C V V D V S	255	270
271	HEDPEVKFNWYVDGV E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D	300	315
316	WLN G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E	345	360
361	M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G	390	405
406	S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G	435	449

圖11B

輕鍵

1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	A	S	Q	D	V	S	I	G	V	A	W	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	45
46	L	L	I	Y	S	A	S	Y	R	Y	T	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	90
91	Y	Y	I	Y	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	135
136	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	180
181	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C										214		

(順序識別碼:16)

圖12A

重鏈

1 E V Q L V E S G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F T D Y T M D W V R Q A P G K G L 45
 46 E W V A D V N P N S G G S I Y N Q R F K G R F T L S V D R S K N T L Y L Q M N S L R A E D 90
 91 T A V Y Y C A R N L G P S F Y F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K 135
 136 S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G 180
 181 L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T 225
 226 H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H 270
 271 E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W 315
 316 L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M 360
 361 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S 405
 406 F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (順序識別碼:17) 449

圖12B

配位體活化之EGFR與HER2異種二聚體
2C4係結合在異種二聚體結合位置

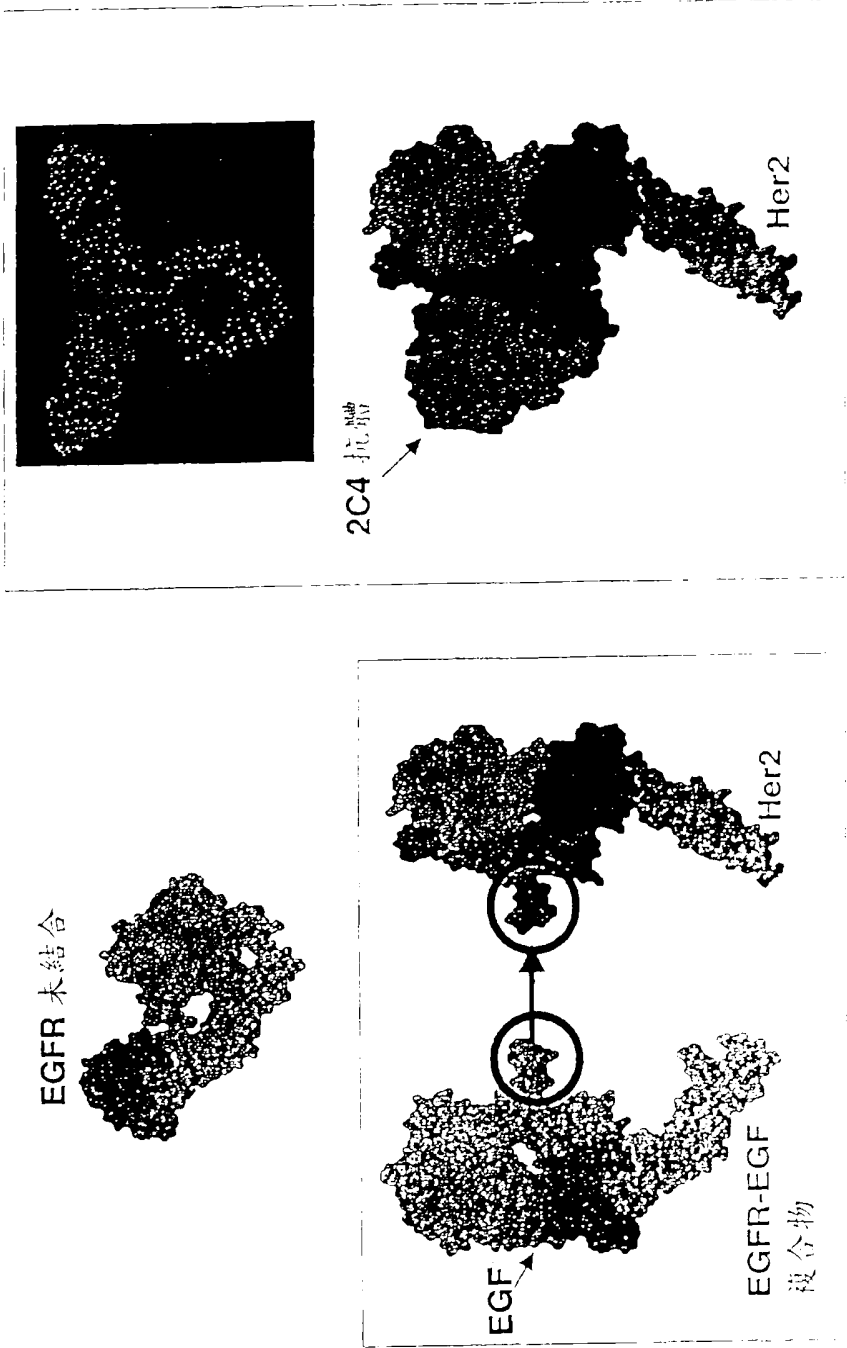


圖13

HER2/3偶合至MAPK與Akt途徑

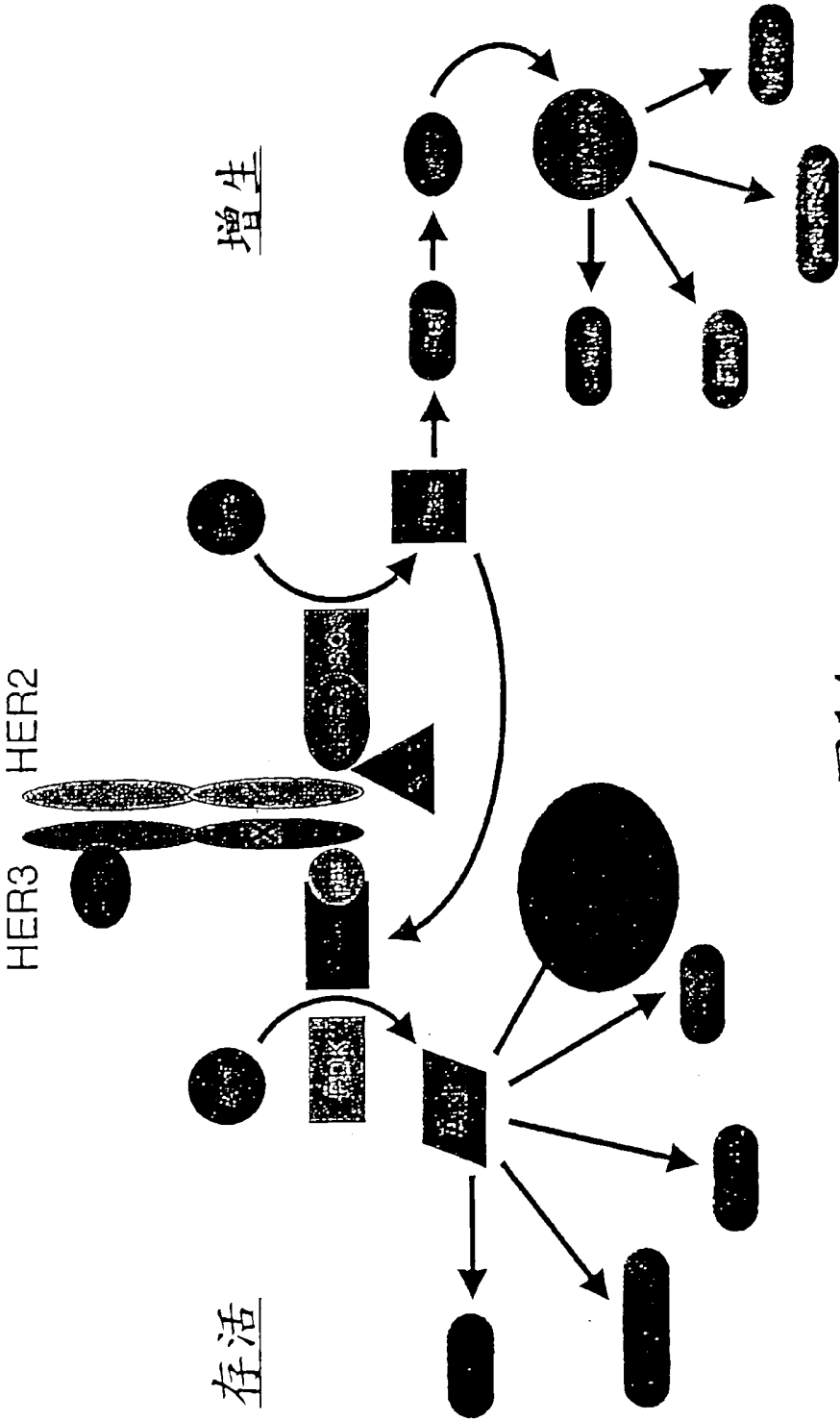
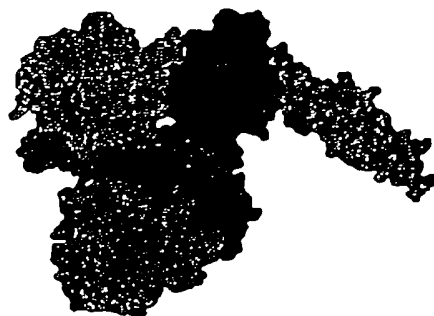


圖14

搓史圖諸馬伯(Trastuzumab)
賀西伯亭(Herceptin)

柏圖祖馬伯(Pertuzumab)
歐米塔革(Omnitarg)



- 結合在IV接近JM
- 保護以防止受體流出
- 中等影響受體向下調制
- 對於HER2作為共受體之角色輕微作用
- 結合在II中於二聚合作用界面處
- 不會防止受體流出
- 中等影響受體向下調制
- 對於HER2作為共受體之角色主要作用

圖15

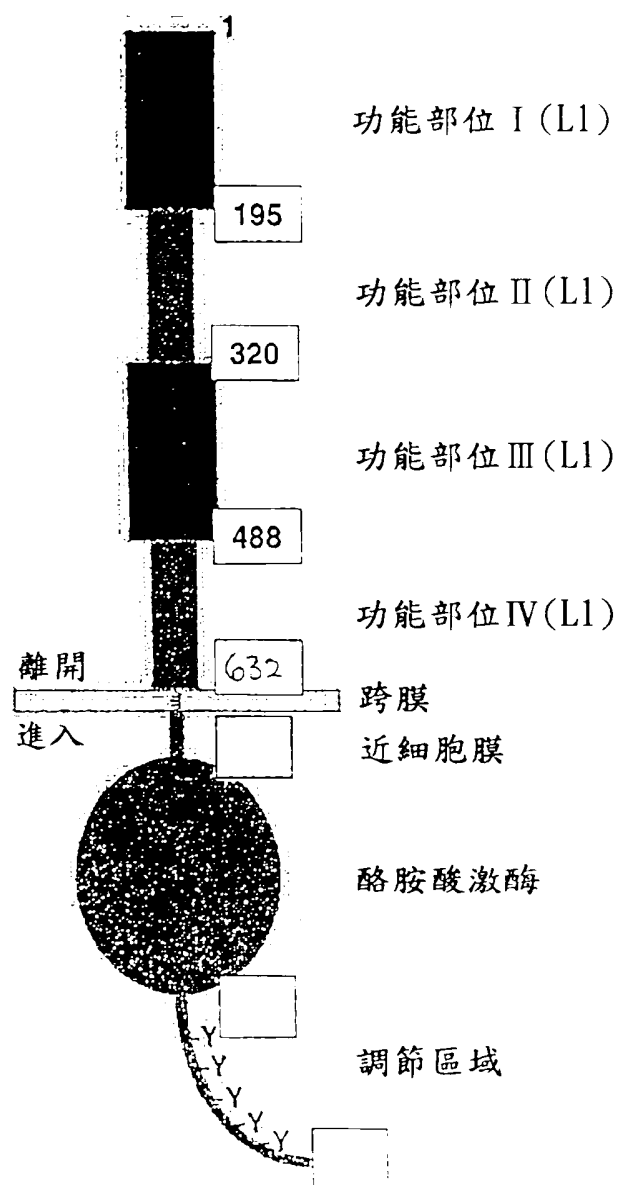


圖16

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

十、申請專利範圍：

1. 一種柏圖祖馬伯 (pertuzumab) 與真西塔賓 (gemcitabine) 之用途，其係用於製備治療鉑抗藥性癌症之藥物，該癌症係選自包括卵巢癌、原發性腹膜癌及輸卵管癌。
2. 如請求項1之用途，其中得自病患之腫瘤試樣顯示HER活化作用。
3. 如請求項2之用途，其中得自病患之腫瘤試樣顯示HER2活化作用。
4. 如請求項1之用途，其中相對於僅以真西塔賓治療之病患，以該藥物治療會造成存活期上之改善。
5. 如請求項4之用途，其中相對於僅以真西塔賓治療之病患，以該藥物治療會造成無進展存活期上之改善。
6. 如請求項4之用途，其中相對於僅以真西塔賓治療之病患，以該藥物治療會造成整體存活期上之改善。
7. 如請求項1之用途，其中以該藥物治療會造成目的回應。
8. 如請求項7之用途，其中以該藥物治療會造成完全回應。
9. 如請求項7之用途，其中以該藥物治療會造成部份回應。
10. 如請求項1之用途，其中柏圖祖馬伯係以大約840毫克之負載劑量投藥，接著為大約420毫克，約每3週。
11. 如請求項1之用途，其中柏圖祖馬伯係以大約1050毫克間之劑量投藥，約每3週投予。
12. 如請求項1之用途，其中真西塔賓係以約600毫克/平方米至1250毫克/平方米間之劑量，於3-週循環之第1與8天投藥。

13. 如請求項1之用途，其中真西塔賓係在柏圖祖馬伯投藥之前或之後投藥。
14. 如請求項13之用途，其中在真西塔賓之至少一次投藥與柏圖祖馬伯之至少一次投藥間之計時，係為大約1個月或較少。
15. 如請求項14之用途，其中在真西塔賓之至少一次投藥與柏圖祖馬伯之至少一次投藥間之計時，係為大約2週或較少。
16. 如請求項1之用途，其中真西塔賓與柏圖祖馬伯係在單一配方或個別配方中，共同地投予病患。
17. 如請求項1之用途，其中癌症不會過度表現HER2。
18. 如請求項1至17中任一項之用途，其中該藥物進一步包含第二種化學治療劑。
19. 如請求項18之用途，其中第二種化學治療劑係選自包括紅豆杉烷、卡配西塔賓(capecitabine)、鉑為基礎之化學治療劑、蔥環素、微脂粒多克索紅菌素、拓波提肯(topotecan)、佩美催西得(pemetrexed)、長春花生物鹼及TLK 286。
20. 如請求項1至17中任一項之用途，其中以真西塔賓與柏圖祖馬伯之組合之治療，會對病患造成增效或大於相加之治療利益。
21. 如請求項1至17中任一項之用途，其中癌症為卵巢癌。
22. 如請求項1至17中任一項之用途，其中癌症為原發性腹膜癌。
23. 如請求項1至17中任一項之用途，其中癌症為輸卵管癌。