(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102580084 B
(45)授权公告日 2016.11.23

(21)申请号 201210006776.5

(22)申请日 2005.06.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102580084 A

(43)申请公布日 2012.07.18

(30)优先权数据
60/645,697 2005.01.21 US

(62)分案原申请数据
200580049191.X 2005.06.15

(83)生物保藏信息
ATCC CRL 10463 1990.05.24
ATCC HB-12215 1996.10.17
ATCC HB-12216 1996.10.17
ATCC HB-12697 1999.04.08

(73)专利权人 健泰科生物技术公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 戴维.E.艾利森 勒内.布鲁诺
卢建丰 奇.M.恩格

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 张红春

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
CN 1370082 A,2002.09.18,
CN 1370082 A,2002.09.18,
JP 特许第4229591 B2,2009.02.25,
WO 0166126 A1,2001.09.13,
WO 2004008099 A2,2004.01.22,
Mattew c.franklin,et al..insights into erbb signaling from the structure fo the erbb2-pertuzumab complex.《Cancer cell》.2004,第5卷第317-328页,尤其是第第317页摘要第1-4行、倒数第1段第3-4行.

审查员 方晓云

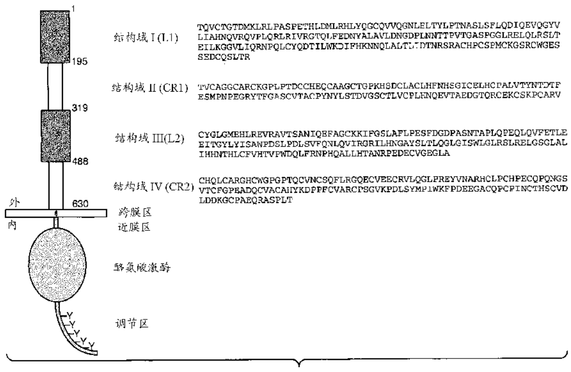
权利要求书2页 说明书62页
序列表16页 附图19页

(54)发明名称

HER抗体的固定剂量给药

(57)摘要

本发明涉及HER抗体的固定剂量给药。本发明涉及HER抗体,如pertuzumab的固定剂量给药。



1.HER2抗体在制备用于治疗癌症的包括含有固定剂量HER2抗体的管形瓶的制品中的用途,其中所述治疗包括以有效治疗所述癌症的量为病人施用一个或多个固定剂量的HER2抗体来进行,所述HER2抗体结合HER2胞外结构域的结构域II,其中所述固定剂量选自420mg、525mg、840mg和1050mg HER2抗体。

2.权利要求1的用途,其中所述HER2抗体结合HER2胞外结构域的结构域I、II和III之间的连接处。

3.权利要求1或2的用途,其中所述HER2抗体抑制HER2与EGFR或HER3的异源二聚化。

4.前述权利要求中任一项的用途,其中所述HER2抗体分别包含SEQ ID Nos.3和4中的可变轻链和可变重链氨基酸序列。

5.前述权利要求中任一项的用途,其中所述HER2抗体是pertuzumab。

6.前述权利要求中任一项的用途,其中所述固定剂量为420mg HER2抗体。

7.权利要求1-5中任一项的用途,其中所述固定剂量为1050mg HER2抗体。

8.前述权利要求中任一项的用途,其中所述治疗包括每周、每2周、每3周、或者每4周为病人施用固定剂量的HER2抗体。

9.权利要求8的用途,其中所述治疗包括每3周为病人施用固定剂量的HER2抗体。

10.前述权利要求中任一项的用途,其中所述HER2抗体为裸抗体。

11.前述权利要求中任一项的用途,其中所述HER2抗体为完整抗体。

12.权利要求1至10中任一项的用途,其中所述HER2抗体为包含抗原结合区的抗体片段。

13.前述权利要求中任一项的用途,其中所述癌症显示HER表达、扩增、或活化。

14.前述权利要求中任一项的用途,其中所述癌症为卵巢癌、腹膜癌、或输卵管癌。

15.权利要求1至13中任一项的用途,其中所述癌症是转移性乳腺癌(MBC)。

16.权利要求1至13中任一项的用途,其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。

17.权利要求1至13中任一项的用途,其中所述癌症是前列腺癌。

18.权利要求1至13中任一项的用途,其中所述癌症是结肠直肠癌。

19.前述权利要求中任一项的用途,其中所述治疗包括为病人施用第二治疗剂。

20.权利要求19的用途,其中所述第二治疗剂选自化疗剂、不同的HER抗体、抗不同肿瘤相关抗原的抗体、抗激素化合物、心脏保护剂、细胞因子、EGFR-靶向药物、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、COX抑制剂、非类固醇抗炎药、法呢基转移酶抑制剂、结合癌胚蛋白CA 125的抗体、HER2疫苗、另一种HER靶向治疗剂、Raf或ras抑制剂、盐酸多柔比星脂质体注射剂、托泊替康、紫杉烷、双重酪氨酸激酶抑制剂、TLK286、EMD-7200、治疗恶心的药剂、预防或治疗皮疹的药剂或标准的痤疮治疗剂、降低体温的药剂、和造血生长因子。

21.权利要求20的用途,其中所述第二治疗剂是化疗剂。

22.权利要求21的用途,其中所述化疗剂是抗代谢物化疗剂。

23.权利要求22的用途,其中所述抗代谢物化疗剂是吉西他滨。

24.权利要求20的用途,其中所述第二治疗剂是曲妥单抗、盐酸埃罗替尼、或贝伐单抗。

25.pertuzumab在制备用于治疗病人癌症的包括含有固定剂量pertuzumab的管形瓶的制品中的用途,其中所述治疗包括为所述病人施用至少一个固定剂量的pertuzumab,其中所述固定剂量选自420mg、525mg、840mg、和1050mg的pertuzumab。

26.权利要求25的用途，其中所述治疗包括每3周为病人施用固定剂量的pertuzumab。

27.权利要求25或权利要求26的用途，其中所述癌症选自卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、转移性乳腺癌(MBC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、前列腺癌、和结肠直肠癌。

28.包括含有固定剂量HER2抗体的管形瓶的制品，其中所述固定剂量HER2抗体选自420mg、525mg、840mg和1050mg的HER2抗体。

29.权利要求28的制品，其中所述HER2抗体是pertuzumab。

30.权利要求28或权利要求29的制品，其进一步包括指导用户为癌症病人施用所述固定剂量的包装插页。

31.权利要求30的制品，其中所述癌症选自卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、转移性乳腺癌(MBC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、前列腺癌、和结肠直肠癌。

32.权利要求30或权利要求31的制品，其中所述包装插页进一步指导用户为癌症病人施用所述固定剂量，所述癌症病人的癌症显示HER表达、扩增、或活化。

33.权利要求28至32中任一项的制品，其包括两个管形瓶，其中第一个管形瓶含有840mg固定剂量的pertuzumab，第二个管形瓶含有420mg固定剂量的pertuzumab。

34.权利要求28至32中任一项的制品，其包括两个管形瓶，其中第一个管形瓶含有1050mg固定剂量的pertuzumab，第二个管形瓶含有525mg固定剂量的pertuzumab。

HER抗体的固定剂量给药

[0001] 本申请是申请日为2005年6月15日、中国申请号为200580049191.X、发明名称为"HER抗体的固定剂量给药"的发明申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 此为依据37CFR 1.53(b)提交的非-临时申请,根据35USC§119(e)要求于2005年1月21日提交的临时申请60/645,697的权益,本文将其内容加入作为参考。

技术领域

[0004] 本发明涉及HER抗体,如pertuzumab的固定剂量给药。

背景技术

[0005] HER受体和抗HER受体的抗体

[0006] 受体酪氨酸激酶的HER家族是细胞生长、分化和存活的重要介导物。所述受体家族包括四个确定的成员,包括表皮生长因子受体(EGFR、ErbB1、或HER1)、HER2(ErbB2或$p185^{neu}$)、HER3(ErbB3)和HER4(ErbB4或tyro2)。

[0007] 在因果关系上,由erbB1基因编码的EGFR已经牵涉于人类恶性疾病中。特别地,已经观察到EGFR在乳腺癌、膀胱癌、肺癌、头部癌、颈癌和胃癌以及恶性胶质瘤中表达增加。EGFR受体表达的增强通常与相同肿瘤细胞生产EGFR配体、转化生长因子α(TGF-α)的增加有关,所述相同肿瘤细胞生产EGFR配体、转化生长因子α(TGF-α)的增加引起通过自分泌刺激途径的受体激活。Baselga and Mendelsohn,Pharmac.Ther.64:127-154(1994)。已经将抗EGFR或其配体TGF-α和EGF的单克隆抗体作为治疗这些恶性疾病的治疗剂进行了评估。参见,例如,Baselga and Mendelsohn,同上;Masui et al.Cancer Research 44:1002-1007(1984);和Wu et al.J.Clin.Invest.95:1897-1905(1995)。

[0008] HER家族的第二个成员$p185^{neu}$最初被鉴定为来自化学处理大鼠成神经细胞瘤的转化基因的产物。neu原癌基因的活化型源于所编码蛋白的跨膜区中的点突变(缬氨酸突变为谷氨酸)。在乳腺和卵巢癌中观察到neu的人同源物的扩增,其与不良预后有关(Slamon et al.,Science,235:177-182(1987);Slamon et al.,Science,244:707-712(1989);和美国专利4,968,603)。迄今为止,对于人类肿瘤还没有报导与neu原癌基因中的类似的点突变。还在其它癌症包括胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、肾脏癌、结肠癌、甲状腺癌、胰腺癌和膀胱癌中观察到HER2的过表达(通常但不完全归因于基因扩增)。其中参见King et al.,Science,229:974(1985);Yokota et al.,Lancet:1:765-767(1986);Fukushige et al.,Mol Cell Biol.,6:955-958(1986);Guerin et al.,Oncogene Res.,3:21-31(1988);Cohen et al.,Oncogene,4:81-88(1989);Yonemura et al.,Cancer Res.,51:1034(1991);Borst et al.,Gynecol.Oncol.,38:364(1990);Weiner et al.,Cancer Res.,50:421-425(1990);Kern et al.,CancerRes.,50:5184(1990);Park et al.,Cancer Res.,49:6605(1989);Zhau et al.,Mol.Carcinog.,3:254-257(1990);Aasland et al.Br.J.Cancer 57:358-363(1988);Williams et al.,Pathobiology 59:46-52(1991);

and McCann et al.,Cancer,65:88-92(1990)。HER2可能在前列腺癌中过表达(Gu et al.,Cancer Lett.99:185-9(1996);Ross et al.,Hum.Pathol.28:827-33(1997);Ross et al.,Cancer 79:2162-70(1997);和Sadasivan et al.,J.Urol.150:126-31(1993))。

[0009] 已经描述了抗大鼠p185^{neu}和人HER2蛋白产物的抗体。

[0010] Drebin及其同事已制备了抗大鼠neu基因产物,p185^{neu}的抗体,参见,例如,Drebin et al.,Cell 41:695-706(1985);Myers et al.,Meth.Enzym.198:277-290(1991);和WO94/22478。Drebin et al.Oncogene 2:273-277(1988)报导与p185^{neu}的两个确定区域反应的抗体的混合物对植入到裸鼠中的neu转化的NIH-3T3细胞产生协同性抗肿瘤效应。也可参见1998年10月20日授权的美国专利5,824,311。

[0011] Hudziak et al.,Mol.Cell.Biol.9(3):1165-1172(1989)描述了用人乳腺肿瘤细胞系SK-BR-3表征的一系列HER2抗体的生产。72小时后通过单层细胞的龙胆紫染色测定暴露于所述抗体之后SK-BR-3细胞的相对增殖。利用该测试方法,用称为4D5的抗体获得了最大抑制,4D5抑制细胞增殖的百分比为56%。在该测试中,该组中的其它抗体将细胞增殖减小到更低程度。进一 步发现抗体4D5使HER2-过表达乳腺肿瘤细胞系对TNF-α的细胞毒性效应敏感。也可参见1997年10月14日授权的美国专利5,677,171。Fendly et al.Cancer Research 50:1550-1558(1990);Kotts et al.In Vitro 26(3):59A(1990);Sarup et al.Growth Regulatton 1:72-82(1991);Shepard et al.J.Clin.Immumol.11(3):117-127(1991);Kumar et al.Mol.Cell.Biol.11(2):979-986(1991);Lewis et al.Cancer Immumol.Immumother.37:255-263(1993);Pietras et al.Oncogene 9:1829-1838(1994);Vitetra et al.Cancer Research 54:5301-5309(1994);Sliwkowski et al.J.Biol.Chem.269(20):14661-14665(1994);Scott et al.J.Biol.Chem.266:14300-5(1991);D'souza et al.Proc.Natl.Acad.Sci.91:7202-7206(1994);Lewis et al.Cancer Research 56:1457-1465(1996);和Schaefer et al.Oncogene15:1385-1394(1997)中进一步表征了Hudziak et al.中讨论的HER2抗体。

[0012] 鼠HER2抗体4D5的重组人源化型式(huMAb4D5-8、rhuMAb HER2、曲妥单抗(trastuzumab)或 HERCEPTIN®;美国专利5,821,337)在HER2-过表达转移性乳腺癌病人中是具有临床活性的,所述病人先前已接受了大量的抗癌治疗剂(Baselga et al.,J.Clin.Oncol.14:737-744(1996))。曲妥单抗(trastuzumab)于1998年9月25日自食品药品管理局获得了用于治疗转移性乳腺癌病人的市场准入,所述转移性乳腺癌的肿瘤过表达HER2蛋白。

[0013] 其它具有不同特性的HER2抗体已描述于Tagliabue et al.Int.J.Cancer47:933-937(1991);McKenzie et al.Oncogene 4:543-548(1989);Maier et al.Cancer Res.51:5361-5369(1991);Bacus et al.Molecular Carcinogenesis3:350-362(1990);Stancovski et al.PNAS(USA)88:8691-8695(1991);Bacus et al.Cancer Research 52:2580-2589(1992);Xu et al.Int.J.Cancer 53:401-408(1993);WO94/00136;Kasprzyk et al.Cancer Research 52:2771-2776(1992);Hancock etal.Cancer Res.51:4575-4580(1991);Shawver et al.Cancer Res.54:1367-1373(1994);Arteaga et al.Cancer Res.54:3758-3765(1994);Harwerthet al.J.Biol.Chem.267:15160-15167(1992);U.S.Patent No.5,783,186;和Klapper et al.Oncogene 14:2099-2109(1997)。

[0014] 同源性筛选已鉴定了两种其它HER受体家族成员:HER3(美国专利5,183,884和5,480,968以及Kraus et al.,PNAS(USA)86:9193-9197(1989))和HER4(EP专利申请599,274;Plowman et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA，90:1746-1750(1993);和Plowman et al.,Nature,366:473-475(1993))。这两种受体在至少一些乳腺癌细胞系上都显示增强的表达。

[0015] 通常发现HER受体在细胞中以不同组合存在,认为异源二聚化增加针对多种HER配体的细胞反应的多样性(Earp et al.Breast Cancer Research and Treatment 35:115-132(1995))。EGFR被六个不同的配体结合:表皮生长因子(EGF)、转化生长因子α(TGF-α)、双调蛋白(amphiregulin)、肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)、β细胞调节素(betacellulin)和上皮调节蛋白(epiregulin)(Groenen et al.Growth Factors 11:235-257(1994))。源于单个基因的交替拼接(alternative splicing)的调蛋白蛋白家族是HER3和HER4的配体。调蛋白家族包括α、β和γ调蛋白(Holmes et al.,Science,256:1205-1210(1992);美国专利5,641,869;和Schaefer et al.Oncogene 15:1385-1394(1997));neu分化因子(NDFs)、神经胶质生长因子(GGFs);乙酰胆碱受体活性诱导蛋白(acetylcholine receptor inducing activity,ARIA);和感觉与运动神经元衍生因子(SMDF)。综述参见Groenen et al.Growth Factors 11:235-257(1994);Lemke,G.Molec.& Cell.Neurosci.7:247-262(1996)和Lee et al.Pharm.Rev.47:51-85(1995)。最近鉴定了另外三个HER配体:神经调节蛋白-2(NRG-2),据报导其结合HER3或HER4(Chang et al.Nature 387 509-512(1997);和Carraway et alNature 387:512-516(1997));神经调节蛋白-3,其结合HER4(Zhang et al.PNAS(USA)94(18):9562-7(1997));和神经调节蛋白-4,其结合HER4(Harari et al.Oncogene 18:2681-89(1999))HB-EGF、β细胞素(betacellulin)和上皮调节蛋白(epiregulin)也结合HER4。

[0016] 虽然EGF和TGFα不结合HER2,但EGF刺激EGFR和HER2形成异二聚体,其激活EGFR并在所述异二聚体中引起HER2的转磷酸作用。二聚化和/或转磷酸作用看起来激活HER2酪氨酸激酶。参见Earp et al.,同上。同样,当HER3与HER2一起共表达时,形成活性信号复合体,抗HER2的抗体能够破坏该复合体(Sliwkowski et al.,J.Biol.Chem.,269(20):14661-14665(1994))。此外,当与HER2一起共表达时,HER3对调蛋白(HRG)的亲合力提升到更高的亲合力状态。关于HER2-HER3蛋白复合体也可参见,Levi et al.,Journal of Neuroscience 15:1329-1340(1995);Morrissey eta l.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:1431-1435(1995);和Lewis et al., Cancer Res.,56:1457-1465(1996)。HER4象HER3一样与HER2一起形成活性信号复合体(Carraway and Cantley,Cell 78:5-8(1994))。

[0017] 与HER抗体有关的专利文献包括:US 5,677,171,US 5,720,937,US5,720,954,US 5,725,856,US 5,770,195,US 5,772,997,US 6,165,464,US6,387,371,US 6,399,063,US2002/0192211A1,US 6,015,567,US 6,333,169,US4,968,603,US 5,821,337,US 6,054,297,US 6,407,213,US 6,719,971,US6,800,738,US2004/0236078A1,US 5,648,237,US 6,267,958,US 6,685,940,US 6,821,515,WO98/17797,US 6,127,526,US 6,333,398,US 6,797,814,US6,339,142,US 6,417,335,US 6,489,447,WO99/31140,US2003/0147884A1,US2003/0170234A1,US2005/0002928A1,US 6,573,043,US2003/0152987A1,WO99/48527,US2002/0141993A1,WO01/00245,US2003/0086924,US2004/0013667A1,WO00/69460,WO01/00238,WO01/15730,US6,627,196B1,US6,632,979B 1,WO01/00244,US2002/0090662A1,WO01/89566,US2002/0064785,US2003/0134344,WO 04/24866,US2004/0082047,US2003/

0175845A1,WO03/087131,US2003/0228663,WO2004/008099A2,US2004/0106161,WO2004/048525,US2004/0258685A1,US 5,985,553,US5,747,261,US 4,935,341,US 5,401,638,US 5,604,107,WO 87/07646,WO89/10412,WO 91/05264,EP 412,116B1,EP 494,135B1,US 5,824,311,EP444,181B1,EP 1,006,194A2,US 2002/0155527A1,WO 91/02062,US5,571,894,US 5,939,531,EP 502,812B1,WO 93/03741,EP 554,441B1,EP656,367A1,US 5,288,477,US 5,514,554,US 5,587,458,WO 93/12220,WO93/16185,US 5,877,305,WO 93/21319,WO 93/21232,US 5,856,089,WO94/22478,US 5,910,486,US 6,028,059,WO 96/07321,US 5,804,396,US5,846,749,EP 711,565,WO 96/16673,US 5,783,404,US 5,977,322,US6,512,097,WO 97/00271,US 6,270,765,US 6,395,272,US 5,837,243,WO96/40789,US 5,783,186,US 6,458,356,WO 97/20858,WO 97/38731,US6,214,388,US 5,925,519,WO 98/02463,US 5,922,845,WO 98/18489,WO98/33914,US 5,994,071,WO 98/45479,US 6,358,682B1,US 2003/0059790,WO 99/55367,WO 01/20033,US 2002/0076695A1,WO 00/78347,WO01/09187,WO 01/21192,WO 01/32155,WO 01/53354,WO 01/56604,WO01/76630,WO02/05791,WO 02/11677,US 6,582,919,US2002/0192652A1,US 2003/0211530A1,WO 02/44413,US 2002/0142328,US 6,602,670B2,WO02/45653,WO 02/055106,US 2003/0152572,US 2003/0165840,WO 02/087619,WO 03/006509,WO03/012072,WO 03/028638,US 2003/0068318,WO03/041736,EP 1,357,132,US 2003/0202973,US 2004/0138160,US 5,705,157,US 6,123,939,EP 616,812B1,US 2003/0103973,US 2003/0108545,US6,403,630B1,WO 00/61145,WO 00/61185,US 6,333,348B1,WO 01/05425,WO 01/64246,US 2003/0022918,US 2002/0051785A1,US 6,767,541,WO01/76586,US 2003/0144252,WO 01/87336,US 2002/0031515A1,WO01/87334,WO 02/05791,WO 02/09754,US 2003/0157097,US 2002/0076408,WO 02/055106,WO 02/070008,WO 02/089842和WO 03/86467。

[0018] 诊断学

[0019] 选择用HER2抗体曲妥单抗(trastuzumab)治疗过的病人用于基于HER2过表达/扩增的治疗。参见,例如,WO99/31140(Paton et al.),US2003/0170234A1(Hellmann,S.),和US2003/0147884(Paton et al.);以及WO01/89566,US2002/0064785,和US2003/0134344(Mass et al.)。也可参见,US2003/0152987,Cohen et al.,涉及检测HER2过表达和扩增的免疫组化(IHC)和荧光原位杂交(FISH)。

[0020] WO2004/053497(Bacus et al.)涉及测定或预测对 HERCEPTIN®治疗的应答。US2004/013297A1(Bacus et al.)涉及测定或预测对ABX0303EGFR抗体治疗的应答。WO2004/000094(Bacus et al.)涉及测定对GW572016、小分子、EGFR-HER2酪氨酸激酶抑制剂的应答。WO2004/063709,Amler et al.,涉及用于测定对EGFR抑制剂盐酸埃罗替尼的敏感性的生物标记物和方法。US2004/0209290,Cobleigh et al.,涉及乳腺癌预后的基因表达标记。可以选择用pertuzumab治疗过的病人用于基于HER激活或二聚化的治疗。涉及pertuzumab和用其选择用于治疗的病人的专利文献包括:WO01/00245(Adams et al.);US2003/0086924(Sliwkowski,M.);US2004/0013667A1(Sliwkowski,M.);以及WO2004/008099A2,和US2004/0106161(Bossenmaier et al.)。

[0021] Cronin et al.,Am.J.Path.164(1):35-42(2004)描述了石蜡包埋的组织中基因表达的测量。Ma et al.Cancer Cell5:607-616(2004)描述了利用来自肿瘤 组织切片的分

离的RNA通过基因寡核苷酸微阵列进行的基因测谱法(profiling),所述肿瘤组织切片取自保存的原始活检组织切片。

[0022] 抗癌药和HER抗体的给药方案

[0023] 讨论抗癌药的给药方案(dosing)的论文包括:Egorin,M.J Clin Oncol2003;21:182-3(2003);Baker et al.J Natl Cancer Inst 94:1883-8(2002);Felici et al.Eur J Cancer 38:1677-84(2002);Loos et al.Clin.Cancer Res.6:2685-9(2000);de Jongh et al.J.Clin Oncol.19:3733-9(2001);Mathijssen et al.J.Clin Oncol.20:81-7(2002);和de Jong et al.Clin Cancer Res10:4068-71(2004)。

[0024] 典型地,已经根据基于体重(mg/kg)或者基于体表面积(BSA)的给药方案施用了商业上可获得的人源化IgG单克隆抗体(即曲妥单抗(trastuzumab)、和贝伐单抗(Bevacizumab),Genentech Inc.,South San Francisco和gemtuzumab ozogomicin,Wyeth Pharmaceuticals,Philadelphia)和肿瘤学中的细胞毒性小分子药物。

[0025] Cetuximab (ERBITUX®)是结合EGF受体的抗体,被批准用于结肠直肠癌的治疗。在结肠直肠癌中,cetuximab 400mg/m^2通过2小时的静脉内输注作为负载剂量(loading dose)给予。之后每周一次在1小时期间给予250mg/m^2的维持剂量。参见cetuximab处方信息。

[0026] 曲妥单抗(trastuzumab) (HERCEPTIN®)以4mg/kg的负载剂量施用于转移性乳腺癌病人,之后每周2mg/kg的剂量。参见曲妥单抗(trastuzumab)处方信息。

[0027] 也可参见W099/31140;US2003/0147884A1;US2003/0170234A1;US2005/0002928A1;W000/69460;W001/15730和US 6,627,196B1,其涉及曲妥单抗给药方案。

[0028] Pertuzumab(也称为重组人单克隆抗体2C4;OMNITARG™,Genentech,Inc,South San Francisco)代表称为HER二聚化抑制剂(HDI)的一类新试剂中的第一种,其发挥作用抑制HER2与其它HER受体(如EGFR/HER1、HER3和HER4)形成活性异二聚体的能力,并且活性与HER2表达水平无关。参见,例如,Harari and Yarden Oncogene 19:6102-14(2000);Yarden and Sliwkowski.Nat Rev Mol Cell Biol 2:127-37(2001);Sliwkowski Nat Struct Biol 10:158-9(2003);Cho et al.Nature 421:756-60(2003);和Malik et al.Pro Am Soc Cancer Res 44:176-7(2003)。

[0029] 已经显示Pertuzumab在肿瘤细胞中阻断HER2-HER3异二聚体的形成抑制至关重要的细胞信号转导,所述细胞信号导致肿瘤增殖和存活减少(Agus et al.Cancer Cell 2:127-37(2002))。

[0030] Pertuzumab已经作为单一试剂在门诊中用Ia期试验和II期试验进行了测试,所述Ia期试验在晚期癌症(advanced cancer)病人中进行,II期试验在卵巢癌和乳腺癌以及肺和前列腺癌病人中进行。在I期研究中,用每3周静脉内给予的pertuzumab治疗病人,所述病人患有标准治疗期间或之后发展为不能治愈的(incurable)、局部晚期(locally advanced)、复发的或转移性实体瘤。Pertuzumab通常被很好地耐受。在可对应答进行评价的20个病人中的3个获得了肿瘤退化。两个病人已确认部分应答。在21个病人中的6个中观察到持续超过2.5个月的疾病稳定(Agus et al.Pro Am Soc Clin Oncol22:192(2003))。在2.0-15mg/kg的剂量pertuzumab的药代动力学是线性的,平均清除率从2.69到3.74mL/天/kg,平均终点消除半衰期(mean terminal elimination half-life)从15.3到27.6天。

没有检测到针对pertuzumab的抗体(Allison et al.Pro Am Soc Clin Oncol 22:197 (2003))。I期试验中基于体重(mg/kg)进行Pertuzumab给药。已经利用固定剂量启动II期试验。

[0031] 发明概述

[0032] 本发明提供固定剂量给药(fixed dosing)人源化IgG1单克隆抗体对药代动力学和目标药物浓度的影响和应用的首次重要评估。此HER抗体pertuzumab分析的首要目的是:1)评估pertuzumab在癌症病人中的群体药代动力学(population pharmacokinetic)和预测协变量(predictive covariante),和2)检测固定的、或基于体重、和基于体表面积(BSA)的给药方案之后的暴露以及稳态谷浓度(steady-state trough concentrations)的可变性(variability)。

[0033] 相应地,第一个方面,本发明提供治疗癌症的方法,包括以有效治疗所述癌症的量为病人施用一个或多个固定剂量的HER抗体。

[0034] 另一方面,本发明提供治疗病人癌症的方法,包括为所述病人施用至少一个固定剂量的pertuzumab,其中所述固定剂量选自大约420mg、大约525mg、大约840mg、和大约1050mg的pertuzumab。

[0035] 本发明还涉及包括含有固定剂量HER抗体的管形瓶的制品,其中所述固定剂量选自大约420mg、大约525mg、大约840mg和大约1050mg HER抗体。

[0036] 本发明涉及下述各项:

[0037] 1.治疗癌症的方法,包括以有效治疗所述癌症的量为病人施用一个或多个固定剂量的HER抗体。

[0038] 2.项1的方法,其中所述抗体结合选自下组的HER受体:EGFR、HER2、和HER3。

[0039] 3.项2的方法,其中所述抗体结合HER2。

[0040] 4.项3的方法,其中所述HER2抗体结合HER2胞外结构域的结构域II。

[0041] 5.前述项中任一项的方法,其中所述抗体结合HER2胞外结构域的结构域I、II和III之间的连接处。

[0042] 6.前述项中任一项的方法,其中所述HER抗体抑制HER2与EGFR或HER3的异源二聚化。

[0043] 7.前述项中任一项的方法,其中所述HER抗体分别包含SEQ ID Nos.3和4中的可变轻链和可变重链氨基酸序列。

[0044] 8.前述项中任一项的方法,其中所述HER抗体是pertuzumab。

[0045] 9.前述项中任一项的方法,其中所述固定剂量在大约20mg至大约2000毫克HER抗体范围内。

[0046] 10.前述项中任一项的方法,其中所述固定剂量选自大约420mg、大约525mg、大约840mg和大约1050mg HER抗体。

[0047] 11.项10的方法,其中所述固定剂量为大约420mg HER抗体。

[0048] 12.项10的方法,其中所述固定剂量为大约1050mg HER抗体。

[0049] 13.前述项中任一项的方法,其中大约每周、大约每2周、大约每3周、或者大约每4周为病人施用固定剂量的HER抗体。

[0050] 14.项13的方法,其中大约每3周为病人施用固定剂量的HER抗体。

[0051] 15.前述项中任一项的方法,其中所述HER抗体为裸抗体。

[0052] 16.前述项中任一项的方法,其中所述HER抗体为完整抗体。

[0053] 17.项1至15中任一项的方法,其中所述HER抗体为包含抗原结合区的抗体片段。

[0054] 18.前述项中任一项的方法,其中所述HER抗体为人源化的或人的IgG1 抗体。

[0055] 19.前述项中任一项的方法,其中所述癌症显示HER表达、扩增、或活化。

[0056] 20.前述项中任一项的方法,其中所述癌症为卵巢癌、腹膜癌、或输卵管癌。

[0057] 21.项1至19中任一项的方法,其中所述癌症是转移性乳腺癌(MBC)。

[0058] 22.项1至19中任一项的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0059] 23.项1至19中任一项的方法,其中所述癌症是前列腺癌。

[0060] 24.项1至19中任一项的方法,其中所述癌症是结肠直肠癌。

[0061] 25.前述项中任一项的方法,其包括为病人施用第二治疗剂。

[0062] 26.项25的方法,其中所述第二治疗剂选自化疗剂、不同的HER抗体、抗不同肿瘤相关抗原的抗体、抗激素化合物、心脏保护剂、细胞因子、EGFR-靶向药物、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、COX抑制剂、非类固醇抗炎药、法呢基转移酶抑制剂、结合癌胚蛋白CA 125的抗体、HER2疫苗、另一种HER靶向治疗剂、Raf或ras抑制剂、盐酸多柔比星脂质体注射剂、托泊替康、紫杉烷、双重酪氨酸激酶抑制剂、TLK286、EMD-7200、治疗恶心的药剂、预防或治疗皮疹的药剂或标准的痤疮治疗剂、降低体温的药剂、和造血生长因子。

[0063] 27.项26的方法,其中所述第二治疗剂是化疗剂。

[0064] 28.项27的方法,其中所述化疗剂是抗代谢物化疗剂。

[0065] 29.项28的方法,其中所述抗代谢物化疗剂是吉西他滨。

[0066] 30.项26的方法,其中所述第二治疗剂是曲妥单抗、盐酸埃罗替尼、或贝伐单抗。

[0067] 31.治疗病人癌症的方法,包括为所述病人施用至少一个固定剂量的pertuzumab,其中所述固定剂量选自大约420mg、大约525mg、大约840mg、和大约1050mg的pertuzumab。

[0068] 32.项31的方法,其中大约每3周为病人施用固定剂量的pertuzumab。

[0069] 33.项31或项32的方法,其中所述癌症选自卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、转移性乳腺癌(MBC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、前列腺癌、和结肠直肠癌。

[0070] 34.包括含有固定剂量HER抗体的管形瓶的制品,其中所述固定剂量选 自大约420mg、大约525mg、大约840mg和大约1050mg的HER抗体。

[0071] 35.项34的制品,其中所述HER抗体是pertuzumab。

[0072] 36.项34或项35的制品,其进一步包括指导用户为癌症病人施用所述固定剂量的包装插页。

[0073] 37.项36的制品,其中所述癌症选自卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、转移性乳腺癌(MBC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、前列腺癌、和结肠直肠癌。

[0074] 38.项36或项37的制品,其中所述包装插页进一步指导用户为癌症病人施用所述固定剂量,所述癌症病人的癌症显示HER表达、扩增、或活化。

[0075] 39.项34至38中任一项的制品,其包括两个管形瓶,其中第一个管形瓶含有大约840mg固定剂量的pertuzumab,第二个管形瓶含有大约420mg固定剂量的pertuzumab。

[0076] 40.项34至38中任一项的制品,其包括两个管形瓶,其中第一个管形瓶含有大约1050mg固定剂量的pertuzumab,第二个管形瓶含有大约525mg固定剂量的pertuzumab。

[0077] 附图简述

[0078] 图1提供HER2蛋白质结构示意图，及其胞外结构域的结构域1-IV的氨基酸序列(分别为SEQ ID Nos.19-22)。

[0079] 图2A和2B列出了鼠单克隆抗体2C4的轻链可变区(V_L)(图2A)和重链可变区(V_H)(图2B)的氨基酸序列(分别为SEQ ID Nos.1和2)的比对；人源化2C4574型的V_L和V_H结构域(分别为SEQ ID Nos.3和4)，以及人V_L和V_H共有框架(humκ1，轻链kappa亚组I；humIII，重链亚组III)(分别为SEQ ID Nos.5和6)。星号表明人源化2C4574型(humanized 2C4version 574)和鼠单克隆抗体2C4之间或者人源化2C4574型和人框架之间的不同。括号中为互补决定区(CDRs)。

[0080] 图3A和3B显示pertuzumab轻链和重链的氨基酸序列(分别为SEQ ID Nos.13和14)。CDRs以粗体表示。计算的轻链和重链分子量为23,526.22Da和49,216.56Da(半胱氨酸为还原形式)。碳水化合物部分附着于重链的Asn299。

[0081] 图4示意性地列出2C4于HER2的异源二聚体结合部位的结合，由此以活化的EGFR或HER3阻止异源二聚化。

[0082] 图5列出HER2/HER3与MAPK和Akt途径的偶联。

[0083] 图6比较曲妥单抗和pertuzumab的不同活性。

[0084] 图7A和7B分别显示曲妥单抗轻链(图7A；SEQ ID No.15)和重链(图7B；SEQ ID No.16)的氨基酸序列。

[0085] 图8A和8B分别列出变异的pertuzumab轻链序列(图8A；SEQ ID No.17)和变异的pertuzumab重链序列(图8B；SEQ ID No.18)。

[0086] 图9A和9B为通过一个-(图9A)或二个-(图9B)区域模型(compartmental model)拟合的单个患者的PK数据的代表性图谱。开放的环显示观测到的浓度。实线和点线分别表示预测的群体和预测的个体浓度。

[0087] 图10A和10B表示模型诊断图。图10A显示观测到的pertuzumab浓度相对于预测的pertuzumab浓度。实线为连续的线。图10B显示加权残值(weighted residuals)相对于预测的pertuzumab浓度。虚线为数据的LOESS平滑(smooth)。

[0088] 图11A和11B显示基础模型(图11A)和最终模型(图11B)在以体表面积(BSA)计的中央区域(Vc)，以重量(WT)和体积计的清除率(CL)的随机效应(random effect)(η)。

[0089] 图12A-12F显示利用在后模型检查(posterior model check)进行的pertuzumab最终群体药代动力学模型的模型评估。检验统计的在后预测分布和观测值：图12A-2.5th；图12B-5th；图12C-50th，图12D-90th，图12E-95th，图12F-97.5th。每个直方图上的垂直线代表检验统计的观测值。

[0090] 图13图示1000个模拟患者在固定的、基于体重(WT)或BSA的剂量之后，依照最终模型的预测的pertuzumab稳态谷浓度(steady state trough concentration)(第84天)，其中所述患者是从初始药代动力学(PK)数据组随机抽样(bootstrapped)选出的。

[0091] 图14A和14B显示≤10th(50.4kg)(图14A)或≥90th(88.5kg)(图14B)WT值的病人群体在固定的、基于体重(WT)或BSA的剂量之后，预测的pertuzumab稳态谷浓度(第84天)。

[0092] 优选实施方案的详细描述

[0093] I.定义

[0094] 本文中治疗剂的“固定的(fixed)”或“单一的(flat)”剂量指在不考虑病人的 体重(WT)或体表面积(BSA)的情况下为所述病人施用的剂量。因此所述固定的或单一的剂量不是以mg/kg剂量或mg/m^2剂量提供的，而是以治疗剂的绝对量提供的。

[0095] 本文“负载(loading)”剂量通常包括施用于病人的治疗剂的初始剂量，以及之后它的一个或多个维持剂量。通常施用单个负载剂量，但本文也包括多个负载剂量。通常，所施用的负载剂量的量超过所施用的维持剂量的量和/或比维持剂量更频繁地施用负载剂量，以便比利用维持剂量更早地获得所需的治疗剂的稳态浓度。

[0096] 本文中“维持(maintenance)”剂量指在治疗期间施用于病人的一个或多个治疗剂剂量。通常在被隔开的治疗时间间隔施用所述维持剂量，如大约每周、大约每2周、大约每3周、或大约每4周。

[0097] “HER受体”指属于HER受体家族的受体蛋白酪氨酸激酶，包括EGFR、HER2、HER3和HER4受体。HER受体通常会包括胞外结构域，其可以结合HER配体和/或与另一种HER受体分子二聚化；亲脂性跨膜结构域；保守的胞内酪氨酸激酶结构域；和含有几个可以磷酸化的酪氨酸残基的羧基末端信号结构域。所述HER受体可以是“天然序列”HER受体或其“氨基酸序列变体”。优选所述HER受体为天然序列人HER受体。

[0098] 本文中术语“ErbB1”、“HER1”、“表皮生长因子受体”和“EGFR”可互换使用，并且如Carpenter et al.Ann.Rev.Biochem.56:881-914(1987)中所公开的，称为EGFR，包括其天然发生的突变形式(例如Humphrey et al.PNAS(USA)87:4207-4211(1990)中的缺失突变体EGFR)。erbB1指编码EGFR蛋白质产物的基因。

[0099] 本文中措辞“ErbB2”和“HER2”可互换使用，指例如Semba et al(1985)PNAS(USA)，82:6497-6501和Yamamoto et al(1986)Nature,319:230-234(Genbank登录号X03363)中描述的人HER2蛋白。术语“erbB2”指编码人ErbB2的基因，“neu”指编码大鼠$p185^{neu}$的基因。优选的HER2是天然序列人HER2。

[0100] HER2的胞外结构域包括四个结构域：“结构域I”(约1-195位氨基酸残基：SEQ ID NO:19)、“结构域II”(约196-319位氨基酸残基：SEQ ID NO:20)、“结构域III”(约320-488位氨基酸残基：SEQ ID NO:21)、和“结构域IV”(约489-630位氨基酸残基：SEQ ID NO:22)(残基编号不含信号肽)。参见Garrett et al.Mol.Cell..11:495-505(2003)，Cho et al.Nature 421:756-760(2003)，Franklin et al.Cancer Cell5:317-328(2004)，和Plowman et al.Proc.Natl.Acad.Sci.90:1746-1750(1993)，以及本文中的图1。

[0101] “ErbB3”和“HER3”指例如美国专利5,183,884和5,480,968以及Kraus et al.PNAS(USA)86:9193-9197(1989)中公开的受体多肽。

[0102] 本文中术语“ErbB4”和“HER4”指例如EP专利申请599,274；Plowman et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:1746-1750(1993)；和Plowman et al.，Nature,366:473-475(1993)中公开的受体多肽，包括其同种型，例如公开于1999年4月22日的WO99/19488中披露的。

[0103] “HER配体”指结合和/或激活HER受体的多肽。此处特别感兴趣的HER配体为天然序列人HER配体如表皮生长因子(EGF)(Savage et al.，J.Biol.Chem.247:7612-7621(1972))；转化生长因子α(TGF-α)(Marquardt et al.，Science223:1079-1082(1984))；双调蛋白，也称为神经鞘瘤(schwanoma)或角化细胞自分泌生长因子(Shoyab et al.Science

243:1074-1076(1989);Kimura et al.Nature 348:257-260(1990);和Cook et al.Mol.Cell.Biol.11:2547-2557(1991));β细胞调节素(betacellulin)(Shing et al.,Science 259:1604-1607(1993);和Sasada et al.Biochem.Biophys.Res.Commun.190:1173(1993));肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)(Higashiyama et al.,Science 251:936-939(1991));上皮调节蛋白(epiregulin)(Toyoda et al.,J.Biol.Chem.270:7495-7500(1995);和Komurasaki et al.Oncogene 15:2841-2848(1997));调蛋白(参见下文);神经调节蛋白-2(NRG-2)(Carraway et al.,Nature 387:512-516(1997));神经调节蛋白-3(NRG-3)(Zhang et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.94:9562-9567(1997));神经调节蛋白-4(NRG-4)(Harari et al.Oncogene18:2681-89(1999));和cripto(CR-1)(Kannan et al.J.Biol.Chem.272(6):3330-3335(1997))。结合EGFR的HER配体包括EGF、TGF-α、双调蛋白、β细胞调节素、HB-EGF和上皮调节蛋白(epiregulin)。结合HER3的HER配体包括调蛋白(heregulin)。能够结合HER4的HER配体包括β细胞调节素、上皮调节蛋白、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4、和调蛋白。

[0104] 本文使用"调蛋白(heregulin)"(HRG)时指由如公开于美国专利5,641,869、或Marchionni et al.,Nature,362:312-318(1993)中的调蛋白基因产物所编码的多肽。调蛋白的例子包括调蛋白-α、调蛋白-β1、调蛋白-β2和 调蛋白-β3(Holmes et al.,Science,256:1205-1210(1992);和美国专利5,641,869);neu分化因子(NDF)(Peles et al.Cell69:205-216(1992));乙酰胆碱受体活性诱导蛋白(ARIA)(Falls et al.Cell72:801-815(1993));神经胶质生长因子(GGFs)(Marchionni et al.,Nature,362:312-318(1993));感觉和运动神经元衍生因子(SMDF)(Ho et al.J.Biol.Chem.270:14523-14532(1995));γ-调蛋白(Schaefer et al.Oncogene15:1385-1394(1997))。

[0105] 本文中"HER二聚体"指包括至少两个HER受体的非共价联结的二聚体。当表达两种或多种HER受体的细胞暴露于HER配体时可以形成这些复合体,可以通过免疫沉淀和SDS-PAGE分析分离,例如Sliwkowski et al.,J.Biol.Chem.,269(20):14661-14665(1994)中所述。这种HER二聚体的例子包括EGFR-HER2、HER2-HER3和HER3-HER4异二聚体。另外,HER二聚体可以包含与不同HER受体如HER3、HER4或EGFR组合的两种或多种HER2受体。其它的蛋白,如细胞因子受体亚基(例如gp130)可以与所述二聚体联结。

[0106] "HER抑制剂"指干扰HER活化或功能的药剂。HER抑制剂的例子包括HER抗体(例如EGFR、HER2、HER3、或HER4抗体);EGFR-靶向药物;小分子HER拮抗剂;HER酪氨酸激酶抑制剂;HER2和EGFR双重酪氨酸激酶抑制剂如lapatinib/GW572016;反义分子(参见,例如,WO2004/87207);和/或结合或干扰下游信号分子如MAPK或Akt的功能的药剂(参见图5)。优选所述HER抑制剂是结合HER受体的抗体或小分子。

[0107] "HER抗体"指结合HER受体的抗体。任选所述HER抗体进一步干扰HER活化或功能。优选所述HER抗体结合HER2受体。本文中特别感兴趣的HER2抗体是pertuzumab。HER2抗体的另一个例子是曲妥单抗。EGFR抗体的例子包括cetuximab和ABX0303。

[0108] "HER活化"指任何一个或多个HER受体的活化、或磷酸化。通常,HER活化引起信号转导(例如由HER受体或底物多肽中的HER受体磷酸化酪氨酸残基的胞内激酶结构域所引发的)。HER活化可以由结合HER二聚体的HER配体所介导,所述HER二聚体包含感兴趣的HER受体。结合HER二聚体的HER配体可以激活二聚体中一个或多个HER受体的激酶结构域,由此引

起一个或多个HER受体中的酪氨酸残基的磷酸化和/或其它底物多肽如Akt或MAPK胞内激酶中的酪氨酸残基的磷酸化。例如，参见图5。

[0109] “磷酸化”指向蛋白质如HER受体、或其底物添加一个或多个磷酸基。

[0110] “抑制HER二聚化”的抗体是抑制、或干扰HER二聚体形成的抗体。优选这样的抗体在其异源二聚体结合部位结合HER2。本文中最优选的二聚化抑制性抗体是pertuzumab或MAb 2C4。2C4与HER2的异源二聚体结合部位的结合图示于图4。其它抑制HER二聚化的抗体的例子包括结合EGFR并抑制其与一个或多个其它HER受体二聚化的抗体(例如EGFR单克隆抗体806，MAb 806，其结合已激活或解除限制的(untethered)EGFR；参见Johns et al.，J.Biol.Chem.279(29)：30375-30384(2004))；结合HER3并抑制其与一个或多个其它HER受体二聚化的抗体；和结合HER4并抑制其与一个或多个其它HER受体二聚化的抗体。

[0111] “比曲妥单抗更有效地抑制HER二聚化”的抗体指比曲妥单抗更有效地减少或消除HER二聚体的抗体(例如有效性至少约2倍)。优选这种抗体抑制HER2二聚化至少与选自下组的抗体一样有效：鼠单克隆抗体2C4、鼠单克隆抗体2C4的Fab片段、pertuzumab、和pertuzumab的Fab片段。人们可以通过直接研究HER二聚体、或者通过评估HER活化、或来自HER二聚化的下游信号、和/或通过评估抗体-HER2结合部位等等来评估HER二聚化抑制。筛选具有比曲妥单抗更有效地抑制HER二聚化的能力的抗体的试验描述于Agus et al.Cancer Cell2:127-137(2002)和WO01/00245(Adams et al.)。仅仅是举例说明，人们可以通过评估，例如，HER二聚体形成的抑制(参见，例如，Agus et al.Cancer Cell2:127-137(2002)的图1A-B；和WO01/00245)；减弱表达HER二聚体的细胞的HER配体活化(例如，WO01/00245和Agus et al.Cancer Cell2:127-137(2002)的图2A-B)；阻断HER配体与表达HER二聚体的细胞的结合(例如，WO01/00245，和Agus et al.Cancer Cell2:127-137(2002)的图2E)；在HER配体存在(或不存在)时表达HER二聚体的癌细胞(例如MCF7，MDA-MD-134，ZR-75-1，MD-MB-175，T-47D细胞)的细胞生长抑制(例如，WO01/00245和Agus et al.Cancer Cell 2:127-137(2002)的图3A-D)；下游信号的抑制(例如，HRG-依赖的AKT磷酸化的抑制或者HRG-或TGFα-依赖的MAPK磷酸化的抑制)(例如，参见，WO01/00245，Agus et al.Cancer Cell 2:127-137(2002)的图2C-D)来测试HER二聚化的抑制。人们也可以通过研究抗体-HER2结合部位来评估所述抗体是否抑制HER二聚化，例如通过评估结合于HER2的抗体的结构或模型，如晶体结构来研究(参见， 例如，Franklin et al.Cancer Cell 5:317-328(2004))。

[0112] HER2上的“异源二聚体结合部位”指HER2的胞外结构域中的区域，一旦与其形成二聚体，该区域与EGFR、HER3或HER4的胞外结构域中的区域接触或接合(interface)。该区域发现于HER2的结构域II中。Franklin et al.Cancer Cell 5:317-328(2004)。

[0113] HER2抗体可以比曲妥单抗更有效地“抑制HRG-依赖的AKT磷酸化”和/或抑制“HRG-或TGFα-依赖的MAPK磷酸化”(例如至少2倍更有效)(参见，例如，Agus et al.Cancer Cell 2:127-137(2002)和WO01/00245)。

[0114] HER2抗体可以是确实“不抑制HER2膜外区(ectodomain)裂解”的抗体(Molina et al.Cancer Res.61:4744-4749(2001))。

[0115] 结合HER2的异源二聚体结合部位的HER2抗体结合于结构域II中的残基(也任选结合于HER2胞外结构域的其它结构域，如结构域I和III中的残基)，并且能够至少一定程度地

在空间上阻碍HER2-EGFR、HER2-HER3、或HER2-HER4异二聚体的形成。Franklin et al.Cancer Cell 5:317-328(2004)鉴定了HER2-pertuzumab晶体结构,保存于RCSB蛋白质数据库(ID号IS78),其显示结合HER2的异源二聚体结合部位的示例性抗体。

[0116] 结合HER2的结构域II的抗体结合结构域II中的和任选HER2的其它结构域,如结构域I和III中的残基。优选结合结构域II的抗体结合HER2的结构域I、II和III之间的连接点。

[0117] "天然序列"多肽指具有与源于自然界的多肽(例如,HER受体或HER配体)相同的氨基酸序列的多肽。这样的天然序列多肽可以从自然界分离,或者可以通过重组或合成手段生产。因此,天然序列多肽可以具有天然发生的人多肽、鼠多肽、或来自任何其它哺乳动物物种的多肽的氨基酸序列。

[0118] 此处术语"抗体"以其最广义使用,特别涵盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、至少由两种完整抗体所形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)、以及抗体片段,只要它们具有所需的生物学活性。

[0119] 此处所用术语"单克隆抗体"指由基本上同质的抗体群体获得的抗体,即所述群体包含的各个抗体是相同的和/或结合相同表位,除了可能在生产单克隆抗体期间发生的可能的变体之外,这种变体通常少量存在。这种单克隆抗体典型地包括包含结合目标的多肽序列的抗体,其中通过这样的方法获得目标结合多肽序列,所述方法包括从大量多肽序列选择单个目标结合多肽序 列。例如,所述选择方法可以是从大量克隆,例如从一组杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆选择独特的克隆。应当理解可以进一步改变所选择的目标结合序列,例如以改善对目标的亲合力、以人源化目标结合序列、以改善其在细胞培养中的生产、以减轻其体内免疫原性、以构建多特异性抗体等等,并且包含改变的目标结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品相反,单克隆抗体制品的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了其特异性之外,由于单克隆抗体制品典型地不被其它免疫球蛋白所污染,因而它们具有优势。所述修饰语"单克隆"指从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征,不能理解为需要以任何特定方法生产所述抗体。例如,按照本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术包括例如杂交瘤方法(e.g.,Kohler et al.,Nature,256:495(1975);Harlow et al.,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,2nd ed.1988);Hammerling et al.,in:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681,(Elsevier,N.Y.,1981))、重组DNA方法(参见,例如,美国专利4,816,567)、噬菌体展示技术(参见,例如,Clackson et al.,Nature,352:624-628(1991);Marks et al.,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991);Sidhu et al.,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee et al.,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Nat.Acad.Sci.USA101(34):12467-12472(2004);和Lee et al.J.Immunol.Methods284(1-2):119-132(2004)、和生产人或动物中的类人抗体的技术(其中所述动物具有部分或所有人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因)(参见,例如,WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 1991/10741;Jakobovits et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:2551(1993);Jakobovits et al.,Nature,362:255-258(1993);Bruggemann et al.,Year in Immuno.,7:33(1993);美国专利5,545,806;5,569,825;5,591,669(所有都是GenPharm的);美国专利5,545,807;WO 1997/17852;美国专利5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,

633,425;和5,661,016;Marks et al.,Bio/Technology,10:779-783(1992);Lonberg et al.,Nature,368:856-859(1994);Morrison,Nature,368:812-813(1994);Fishwild et al.,Nature Biotechnology,14:845-851(1996);Neuberger,Nature Biotechnology,14:826(1996);and Lonberg and Huszar,Intern.Rev.Immunol.,13:65-93(1995)。

[0120] 本文中单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体,以及这些抗体的片段,其中重链和/或轻链的一部分与源于特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中的相应序列等同或同源,而链的其余部分与源于其它物种或属于其它抗体类或亚类的抗体中的相应序列等同或同源,只要它们显示所需的生物学活性(美国专利4,816,567;和Morrison et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。此处感兴趣的嵌合抗体包括“灵长类化的”抗体,其包含源于非人灵长类(例如,旧世纪猴(Old World Monkey)、猿(Ape)等等)的可变区抗原结合序列和人恒定区序列。

[0121] ″抗体片段″包括完整抗体的一部分,优选包括其抗原结合区。抗体片段的例子包括Fab、Fab′、$F(ab')_2$、以及Fv片段;双功能抗体;线性抗体;单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0122] 此处“完整抗体”指包含两个抗原结合区、和Fc区的抗体。优选所述完整抗体具有一种或多种效应器功能。

[0123] 依据其重链恒定区的氨基酸序列,可以将完整抗体指定为不同的“类别”。有五种主要的完整抗体类别:IgA、IgD、IgE、IgG、和IgM,其中几种可以进一步分为“亚类”(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、以及IgA2。对应于不同抗体类别的重链恒定区分别称为α、δ、ε、γ、和μ。不同类别免疫球蛋白的亚单位结构和三维构象是熟知的。

[0124] 抗体“效应器功能”指可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物学活性。抗体效应器功能的例子包括C1q结合;补体依赖的细胞毒;Fc受体结合;抗体依赖的细胞介导的细胞毒(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等等。

[0125] ″抗体依赖的细胞介导的细胞毒″和″ADCC″指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcRs)的非特异性细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞、和巨噬细胞)识别靶细胞上结合的抗体,随后导致靶细胞裂解。介导ADCC的主要细胞,NK细胞,只表达FcγRIII,而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。造血细胞上FcR的表达概括于Ravetch and Kinet,Annu.Rev.Immunol 9:457-92(1991)第464页表3。为了评估感兴趣分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测试,如美国专利5,500,362或5,821,337中所描述的。用于此测试的可用的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。可选地,或者除此之外,可以体内评估感兴趣分子的ADCC 活性,例如在动物模型中,如Clynes et al.PNAS(USA)95:652-656(1998)中所公开的。

[0126] “人效应细胞”为表达一种或多种FcRs并执行效应器机能的白细胞。优选所述细胞至少表达FcγRIII并执行ADCC效应器功能。介导ADCC的人白细胞的例子包括外周血单个核细胞(PBMC)、天然杀伤(NK)细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞;PBMC和NK细胞是优选的。所述效应细胞可以从其天然来源分离,例如本文所述的从血液或PBMC分离。

[0127] 术语“Fc受体”或“FcR”用于描述结合于抗体Fc区的受体。优选的FcR为天然序列的人FcR。另外,优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ受体),包括FcγRI、FcγRII、和FcγRIII

亚类的受体,包括这些受体的等位变体和可变拼接形式。FcγRII受体包括FcγRIIA("活化受体")和FcγRIIB("抑制受体"),其具有类似的氨基酸序列,主要在其胞质结构域中有所不同。活化受体FcγRIIA在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体FcγRIIB在其胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见综述M. Daëron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。Ravetchand Kinet,Annu.Rev.Immunol 9:457-92(1991);Capel et al.,Immunomethods4:25-34(1994);和de Haas et al.,J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)中综述了FcRs。此处术语"FcR"包括其它的FcRs,包括将来要鉴定的那些。所述术语还包括新生儿受体FcRn,其负责母系IgG向胎儿的转移(Guyer et al.,J.Immunol.117:587(1976)和Kim et al.,J.Immunol.24:249(1994)),并调节免疫球蛋白的体内平衡。

[0128] "补体依赖的细胞毒"或"CDC"指分子在补体的存在下裂解目标的能力。补体激活途径由补体系统的第一个组件(C1q)结合于与同类抗原复合在一起的分子(例如抗体)所启动。为了评估补体活化,可以进行CDC测试,例如Gazzano-Santoro et al.,J.Immunol.Methods 202:163(1996)中所描述的。

[0129] "天然抗体"通常为约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成。每条轻链由一个共价二硫键连接于重链,然而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型重链中有变化。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫键。每条重链一端具有可变区(V_H),接下来是许多恒定区。每种轻链在一端具有可变区(V_L),在其另一端具有恒定区。轻链的恒定区与重链的第一个恒定区配对,轻链可变区与重链的可变区配对。据 信特定氨基酸残基形成轻链和重链可变区之间的接触面。

[0130] 术语"可变的"指抗体中可变区的某些部分在序列中差异非常大,用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性中。然而,可变性在所有抗体的可变区中不是均匀分布的。在轻链和重链可变区中,集中于三个称为高变区的片段。可变区较保守的部分称为框架区(FRs)。天然重链和轻链的可变区各包含四个FRs,大体采用β-片层构象,通过三个高变区相连,形成相连的环,并且在一些例子中形成β-片层结构的一部分。每条链中的高变区通过FRs非常紧密地结合在一起,并且通过来自另一条链的高变区为抗体的抗原结合部位的形成作出贡献(参见Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。恒定区不直接涉及抗体与抗原的结合,但显示多种效应器功能,例如抗体依赖的细胞毒(ADCC)中抗体的参与。

[0131] 此处使用术语"高变区"时指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。所述高变区通常包含来自"互补决定区"或"CDR"的氨基酸残基(例如,轻链可变区中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变区中的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))和/或来自"高变环"的那些残基(例如,轻链可变区中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变区中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia and Lesk J.Mol.Biol.,196:901-917(1987))。"框架区"或"FR"残基是除了此处定义的高变区残基之外的那些可变区残基。

[0132] 抗体的木瓜蛋白酶消化产生两条相同的抗原结合片段,称为"Fab"片段,每条都具

有单一的抗原结合部位，和残留的"Fc"片段，其名称反映了其易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生F(ab′)$_2$片段，其具有两个抗原结合部位，仍然能够交联抗原。

[0133] "Fv"是包含完全抗原识别和抗原结合部位的最小抗体片段。该区域由紧密的、非共价结合的一条重链和一条轻链可变区的二聚体组成。正是以这种每个可变区的三个高变区相互作用的构象确定了V_H-V_L二聚体表面上的抗原结合部位。六个高变区共同赋予抗体的抗原结合特异性。然而，即便是单一的可变区(或者是只包含三个抗原特异性高变区的Fv的一半)也具有识别并结合抗原的能力，虽然其亲合力低于完整的结合部位。

[0134] Fab片段也包含轻链的恒定区和重链的第一个恒定区(CH1)。Fab′片段与Fab片段不同，其在重链CH1区的羧基末端添加了几个残基，包括一个或多个来自抗体绞链区的半胱氨酸。此处将恒定区的半胱氨酸残基具有至少一个自由硫醇基的Fab′称为Fab′-SH。F(ab′)$_2$抗体片段起初以Fab′片段对的形式产生，所述Fab′片段对在Fab′片段之间具有铰链半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联物也是已知的。

[0135] 可以基于抗体的恒定区将来自任何脊椎动物物种的抗体的"轻链"指定为两种清楚确定的类型，称为kappa(κ)和lambda(λ)的其中一种。

[0136] "单链Fv"或"scFv"抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域，其中这些结构域存在于单一多肽链中。优选Fv多肽在V_H和V_L结构域之间进一步包含多肽连接序列，其使scFv能够形成所需的用于抗原结合的结构。综述参见Plückthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，vol.113，Rosenburg and Moore eds.，Springer-Verlag，New York，pp.269-315(1994)。HER2抗体scFv片段描述于WO93/16185；美国专利5,571,894；和美国专利5,587,458。

[0137] 术语"双功能抗体(diabody)"指具有两个抗原结合部位的小抗体片段，所述片段包括同一多肽链(V_H-V_L)中连接到轻链可变区(V_L)的重链可变区(V_H)。通过使用太短而不允许同一条链上的两个结构域配对的连接序列，迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对，产生两个抗原结合部位。例如EP404,097；WO 93/11161；以及Hollinger et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，90：6444-6448(1993)中更为充分地描述了双功能抗体。

[0138] "人源化"形式的非人(例如，啮齿类动物)抗体指包含源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在很大程度上，人源化抗体指其中来自受体高变区的残基被来自非人物种(供体抗体)高变区的残基所置换的人免疫球蛋白(受体抗体)，所述非人物种为例如具有所需特异性、亲合力、和能力的小鼠、大鼠、兔或非人灵长类。一些情况下，人免疫球蛋白的框架区(FR)残基由相应的非人残基所置换。另外，人源化抗体可以包含受体抗体或供体抗体中未发现的残基。构建了这些修饰以进一步改善抗体性能。总的来说，人源化抗体基本上会包含所有的或至少一个、和典型地两个可变区，其中所有的或者基本上所有的高变环相应于非人免疫球蛋白的那些高变环，并且所有的或者基本上所有的FRs均为人免疫球蛋白序列的FRs。人源化抗体任选还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)，典型地人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。详情参 见Jones et al.，Nature 321：522-525(1986)；Riechmann et al.，Nature332：323-329(1988)；和Presta，Curr.Op.Struct.Biol.2：593-596(1992)。

[0139] 人源化HER2抗体包括美国专利5821337(此处特别加入作为参考)的表3中描述的huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7和huMAb4D5-8或曲妥单抗(trastuzumab) (HERCEPTIN®)；人源化520C9(WO 93/

21319);和此处所述人源化2C4抗体。

[0140] 为了本文的目的,"曲妥单抗(trastuzumab)"、"HERCEPTIN®"和"huMAb4D5-8"指分别包含SEQ ID NOS.15和16中的轻链和重链氨基酸序列的抗体。

[0141] 本文中,"pertuzumab"和"OMNITARG™"指分别包含SEQ ID NOS.13和14中的轻链和重链氨基酸序列的抗体。

[0142] 曲妥单抗和pertuzumab之间的区别示于图6。

[0143] "裸抗体(naked antibody)"指未交联于异源分子如细胞毒性部分或放射性标记的抗体。

[0144] ″分离的″抗体指已经从其天然环境组分中鉴别和分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染物组分指会干扰抗体的诊断或治疗用途的材料,可能包括酶、激素、和其它的蛋白质或非蛋白质溶解物。在优选实施方案中,所述抗体将被纯化至(1)用Lowry法测定时以重量计大于抗体的95%,最优选以重量计超过99%,纯化至(2)使用旋杯(spinning cup)测序仪测定时达到足以获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或者纯化至(3)在还原性或非还原性条件下进行SDS-PAGE,用考马斯蓝或优选银染时达到均质(homogeneity)。由于抗体天然环境的至少一种组分不存在,因而分离的抗体包括重组细胞内原位存在的抗体。然而,通常分离的抗体将通过至少一个纯化步骤制备。

[0145] "亲合力成熟的"抗体指在其一个或多个高变区中有一个或多个改变,与不拥有那些改变的亲本抗体相比,所述改变引起抗体对抗原的亲合力的改善。优选的亲合力成熟抗体对目标抗原将有纳摩尔或者甚至皮摩尔亲合力。亲合力成熟抗体通过本领域已知的方法生产。Marks et al.Bio/Technology10:779-783(1992)描述了通过VH和VL结构域改组进行的亲合力成熟。Barbas et al.Proc Nat.Acad.Sci,USA 91:3809-3813(1994);Schier et al.Gene 169:147-155(1995);Yelton et al.J.Immunol.155:1994-2004(1995);Jackson et al.,J.Immunol.154(7):3310-9(1995);和Hawkins et al,J.Mol.Biol.226:889-896(1992)描述了CDR和/或框架残基随机诱变。

[0146] 本文中术语"主要种类抗体(main species antibody)"指组合物中的抗体结构,其在数量上是所述组合物中的主要抗体分子。在一个实施方案中,所述主要种类抗体是HER2抗体,例如结合HER2的结构域II的抗体、比曲妥单抗更有效地抑制HER二聚化的抗体、和/或结合HER2的异源二聚体结合部位的抗体。本文中所述主要种类抗体的优选实施方案是包含SEQ ID Nos.3和4中的可变轻链和可变重链氨基酸序列,最优选包含SEQ ID Nos.13和14中的轻链和重链氨基酸序列的抗体(pertuzumab)。

[0147] 本文中"氨基酸序列变体"抗体指具有不同于主要种类抗体的氨基酸序列的抗体。通常,氨基酸序列变体与所述主要种类抗体将拥有至少约70%同源性,并且优选它们将与所述主要种类抗体至少约80%、更优选至少约90%同源。所述氨基酸序列变体在所述主要种类抗体的氨基酸序列内或者邻近于所述主要种类抗体的氨基酸序列处的特定位点拥有取代、删除、和/或添加。本文中氨基酸序列变体的例子包括酸式变体(例如脱酰胺抗体变体)、碱式变体、在其一个或两个轻链上具有氨基末端前导序列延伸(例如VHS-)的抗体、在其一个或两个重链上具有C末端赖氨酸残基的抗体等等,并且包括重链和/或轻链氨基酸序列的变异的组合。本文中特别感兴趣的抗体变体是其一个或两个轻链上包含氨基末端前导序列延伸的抗体,任选进一步包含相对于主要种类抗体的其它的氨基酸序列和/或糖基化

差异。

[0148] 本文中“糖基化变体抗体”指具有附着于其上的一个或多个碳水化合物部分的抗体,其不同于附着于主要种类抗体上的一个或多个碳水化合物部分。本文中糖基化变体的例子包括具有附着于其Fc区的G1或G2寡糖结构,而不是G0寡糖结构的抗体,具有附着于其一个或两个轻链的一个或两个碳水化合物部分的抗体,没有附着于抗体的一个或两个重链的碳水化合物的抗体等等,以及糖基化改变的组合。

[0149] 抗体具有Fc区时,如本文图9所示的寡糖结构可以附着于抗体的一个或两个重链,例如在残基299处(298,残基的Eu编号)。对于pertuzumab,G0是主要的寡糖结构,同时发现在pertuzumab组成(composition)中有其它寡糖结构如G0-F、G-1、Man5、Man6、G1-1、G1(1-6)、G1(1-3)和G2以较 低量存在。

[0150] 除非另有指明,本文中“G1寡糖结构”包括G-1、G1-1、G1(1-6)和G1(1-3)结构。

[0151] 本文中“氨基末端前导序列延伸(amino-terminal leader extension)”指氨基末端前导序列的一个或多个氨基酸残基,所述氨基末端前导序列存在于抗体的任何一个或多个重链或轻链的氨基末端。示例性氨基末端前导序列延伸包含或由三个氨基酸残基VHS组成,其存在于抗体变体的一个或两个轻链上。

[0152] “脱酰胺(deamidated)”抗体指其中其一个或多个天冬酰胺残基已被衍生化,例如衍生为天冬氨酸、琥珀酰亚胺、或异天冬氨酸。

[0153] 术语″癌症″和″癌症的″指或者描述典型地以无限制的细胞生长为特征的哺乳动物生理学病症。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤(包括髓母细胞瘤和视网膜母细胞瘤)、肉瘤(包括脂肪肉瘤和和滑膜细胞肉瘤)、神经内分泌肿瘤(包括类癌肿瘤、胃泌素瘤、和胰岛细胞癌)、间皮瘤、雪旺氏细胞瘤(schwannoma)(包括听神经瘤)、脑膜瘤、腺癌、黑素瘤、白血病或淋巴恶性肿瘤。这些癌症的更具体的例子包括鳞状细胞癌(squamous cell cancer)(例如鳞状上皮细胞癌)、肺癌,包括小细胞肺癌(SCLC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺腺癌和肺鳞状细胞癌(squamous carcinoma of the lung)、腹膜癌、肝细胞癌(hepatocellular cancer)、胃(gastric)或胃部(stomach)癌症包括胃肠癌、胰腺癌、恶性胶质瘤(glioblatoma)、颈部癌症、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤(hepatoma)、乳腺癌(包括转移性乳腺癌)、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾腺癌、肾脏或肾癌(kidney and renal cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、肛门癌、阴茎癌、睾丸癌、食道癌、胆道肿瘤、以及头颈癌。

[0154] 本文中“病人”指人类病人。所述病人可以是“癌症病人”,即正在经历或处于患一种或多种癌症症状的风险中的病人,或者其它能够受益于用HER抗体治疗的病人。

[0155] “生物样品”一般指来自生物来源的细胞或组织样品。

[0156] “病人样品”指从病人如癌症病人获得的样品。

[0157] 本文中“肿瘤样品”指源于或包含来自病人肿瘤的肿瘤细胞的样品。本文中肿瘤样品的例子包括但不限于肿瘤活组织检查、循环的肿瘤细胞、循环的血浆蛋白、腹水、源于肿瘤或显示肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系、以及保存的肿瘤样品,如福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤样品或冷冻的肿瘤样品。

[0158] “固定的”肿瘤样品指已经利用固定剂组织学保存的样品。

[0159] “福尔马林固定的”肿瘤样品指已经用福尔马林作为固定剂保存的样品。

[0160] “包埋的”肿瘤样品指由坚固的以及通常坚硬的介质如石蜡、蜡、火棉(celloidin)、或树脂包裹的样品。包埋使切割薄片用于显微检查或者用于生产组织微阵列(TMAs)成为可能。

[0161] “石蜡包埋的”肿瘤样品指由源于石油(petroleum)的纯化的固体烃类混合物包裹的样品。

[0162] 本文中“冷冻的”肿瘤样品是指冷冻的或者是已经冷冻的肿瘤样品。

[0163] “显示HER表达、扩增、或活化”的癌症或生物样品指在诊断测试中表达(包括过表达)HER受体、已扩增了HER基因、和/或以其它方式显示HER受体的活化或磷酸化的样品。这种活化可以直接(例如通过测量HER磷酸化)或间接(例如通过基因表达制谱或通过检测HER异二聚体,如本文所述)测定。

[0164] “HER受体过表达或扩增”的癌症指与相同组织类型的非癌细胞相比具有明显更高水平的HER受体蛋白或基因的癌症。这种过表达可以由基因扩增或增强的转录或翻译所致。HER受体过表达或扩增可以在诊断或预后测试中通过评估存在于细胞表面上的提高的ErbB蛋白水平来测定(例如,通过免疫组化测试;IHC)。或者,或除此之外,可以通过例如荧光原位杂交(FISH;参见WO 98/45479,公开于1998年10月)、southern印迹、或聚合酶链式反应(PCR)技术如定量实时PCR(qRT-PCR)测定细胞中HER编码核酸的水平。也可以通过测量生物流体如血清中的脱落抗原(例如,HER胞外结构域)来研究HER受体过表达或扩增(参见,例如,公布于1990年6月12日的美国专利4,933,294;公开于1991年4月18日的WO91/05264;公布于1995年3月28日的美国专利5,401,638;以及Sias et al.J.Immunol.Methods 132:73-80(1990))。除了上述测试以外,熟练技术人员还可以采用不同的体内测试方法。例如,可以将病人体内的细胞暴露于抗体,所述抗体任选用可探测的标记,例如,放射性同位素标记,可以评估所述抗体与病人细胞的结合,例如,通过放射性外部扫描或者通过分析活检组织评估,该活检组织取自之前暴露于所述抗体的病人。

[0165] 反之,“不过表达或扩增HER受体”的癌症指与相同组织类型的非癌细胞相比,不具有高于正常HER受体蛋白或基因水平的癌症。抑制HER二聚化的抗体,如pertuzumab,可用于治疗不过表达或扩增HER2受体的癌症。

[0166] 本文中使用″生长抑制剂″时指在体外或体内抑制细胞尤其是HER表达癌细胞的生长的化合物或组合物。因此,所述生长抑制剂可以为显著减小S期HER表达细胞的百分数的生长抑制剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期运行(在非S期位置)的试剂,如诱导G1停滞和M-期停滞的试剂。经典M-期阻断剂包括长春药属(vincas)(长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine))、紫杉烷(taxane)、和topo II抑制剂如多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、依托泊苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。阻滞G1的那些药剂也溢出到S-期停滞中,例如,DNA烷化剂如他莫昔芬(tamoxifen)、强的松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、氮芥(mechlorethamine)、顺铂、甲氨蝶呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶、和ara-C。可以在The Molecular Basis of Cancer,Mendelsohn and Israel,编,第1章,Murakami et al.(WB Saunders:Philadelphia,1995)标题为″Cell cycle regulation,oncogenes,and antineoplastic drugs″,尤其是第13页中查找更多信息。

[0167] ″生长抑制性″抗体的例子指结合HER2并抑制过表达HER2的癌细胞生长的那些抗

体。优选的生长抑制性HER2抗体以约0.5至30μg/ml的抗体浓度抑制细胞培养物中大于20％、优选大于50％(例如自约50％到约100％)的SK-BR-3乳腺肿瘤细胞生长，其中所述生长抑制在将SK-BR-3细胞暴露于所述抗体六天后测定(参见公布于1997年10月14日的美国专利5,677,171)。在所述专利和下文中更详细地描述了SK-BR-3细胞生长抑制测试。优选的生长抑制性抗体是鼠单克隆抗体4D5的人源化变体，例如，曲妥单抗(trastuzumab)。

[0168] ″诱导细胞凋亡″的抗体指诱导程序性细胞死亡的抗体，所述程序性细胞死亡通过膜联蛋白V结合、DNA片段化、细胞皱缩、内质网膨胀、细胞破碎、和/或膜囊(称为凋亡体)形成测定。所述细胞通常为过表达HER2受体的细胞。优选所述细胞是肿瘤细胞，例如，乳腺、卵巢、胃、子宫内膜、唾腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰腺或膀胱细胞。在体外，所述细胞可以是SK-BR-3、BT474、Calu 3细胞、MDA-MB-453、MDA-MB-361或SKOV3细胞。可以 获得多种评估与凋亡有关的细胞事件的方法。例如，可以通过膜联蛋白结合测量磷脂酰丝氨酸(PS)易位；可以通过DNA梯度法(laddering)评估DNA片段化；可以通过亚二倍体(hypodiploid)细胞的任何增加评估伴随DNA片段化的核/染色质浓缩。优选诱导凋亡的抗体是在膜联蛋白结合测试中利用BT474细胞相对于未处理细胞引起约2至50倍、优选约5至50倍、最优选约10至50倍的膜联蛋白结合诱导的抗体(参见下文)。诱导凋亡的HER2抗体的例子为7C2和7F3。

[0169] ″表位2C4″指HER2的胞外结构域中抗体2C4所结合的区域。为了筛选结合2C4表位的抗体，可以实施常规交叉阻断测试，如Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow and David Lane(1988)中所述。优选所述抗体阻断约50％或更多的2C4与HER2的结合。或者，可以以表位做图法(epitope mapping)评估所述抗体是否结合于HER2的2C4表位。表位2C4包含来自HER2胞外结构域中的结构域II的残基。2C4和pertuzumab于结构域I、II和III的连接处(junction)结合于HER2的胞外结构域。Franklin et al.Cancer Cell5:317-328(2004)。

[0170] ″表位4D5″是HER2的胞外结构域中抗体4D5(ATCC CRL 10463)和曲妥单抗(trastuzumab)所结合的区域。该表位靠近HER2的跨膜结构域，位于HER2的结构域IV中。为了筛选结合4D5表位的抗体，可以实施常规交叉阻断测试，如Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow and David Lane(1988)中所述。或者，可以通过表位作图以评估所述抗体是否结合于HER2的4D5表位(例如大约自残基529到约残基625区域中的任何一个或多个残基，包括于HER2ECD内，残基编号包括信号肽)。

[0171] ″表位7C2/7F3″指处于结构域I中的HER2胞外结构域N末端的区域，所述7C2和/或7F3抗体(都保藏于ATCC，参见下文)结合于该区域。为了筛选结合7C2/7F3表位的抗体，可以实施常规交叉阻断测试，如Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow and David Lane(1988)中所述。或者，可以进行表位作图以确定所述抗体是否结合于HER2上的7C2/7F3表位(例如大约自HER2ECD的残基22到约残基53区域中的任何一个或多个残基，残基编号包括信号肽)。

[0172] ″治疗″既指治疗性治疗也指预防或阻止措施。需要治疗的包括那些已经患所述疾病的以及要预防所述疾病的那些。因此，本文中所要治疗的病人可 以已被诊断为患有所述疾病或者可能有患所述疾病的倾向或对所述疾病易感。

[0173] 术语“有效量”指有效治疗病人癌症的药物的量。药物的有效量可以减少癌细胞的数目；减小所述肿瘤大小；抑制(即，在一定程度上减缓且优选终止)癌细胞浸润到外周器官

中;抑制(即,在一定程度上减缓且优选终止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上减轻与癌症有关的一种或多种症状。达到药物能够阻止生长和/或杀死存在的癌细胞的程度时,其可能是细胞抑制和/或细胞毒性的。所述有效量可以延长无进展存活(Progression free survival)(例如通过实体瘤的应答评价标准(Response Evaluation Criteria,RECIST)或CA-125变化测量的)、引起目标应答(包括部分应答,PR,或完全应答,CR)、增加整体存活时间、和/或改善癌症的一种或多种症状(例如通过FOSI评估的)。

[0174] "整体存活(overall survival)"指病人在从诊断或治疗的时间开始保持存活的时间,如1年、5年等等。

[0175] "无进展存活率(Progression free survival)"指病人保持存活,而无癌症的进一步恶化。"目标应答(objective response)"指可测的应答,包括完全应答(CR)或部分应答(PR)。

[0176] "完全应答"或"完全缓解"意思是响应于治疗,所有癌症体征均消失。这不总意味着癌症已被治愈。

[0177] "部分应答"指响应于治疗,一种或多种肿瘤或病变的大小、或体内癌症的范围减小(减弱)。

[0178] 此处所用术语"细胞毒剂"指抑制或者阻止细胞机能和/或导致细胞破坏的物质。所述术语将包括放射性同位素(例如At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}和Lu的放射性同位素)、化疗剂、以及毒素如小分子毒素或者细菌、真菌、植物或动物来源的酶学活性毒素,包括其片段和/或其变体。

[0179] "化疗剂"是对癌症治疗有用的化合物。化疗剂的实例包括烷化剂,例如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide) CYTOXAN®;磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates),例如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类(aziridines),例如苯佐替派(benzodepa)、卡波醌(carboquone)、美妥替派(meturedepa)和乌瑞替派(uredepa);乙撑亚胺 类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(trietylene phosphoramide)、三乙撑硫代磷酰胺(triethiylenethiophosphoramide)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);TLK 286 (TELCYTA®);番荔枝内酯类(acetogenin)(特别是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));δ-9-四氢大麻酚(delta-9-tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol), MARINOL®);β-拉帕醌(beta-lapachone);拉帕醇(lapachol);秋水仙素类(colchicines);白桦脂酸(betulinic acid);喜树碱(camptothecin)(包括合成的类似物托泊替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(依立替康(irinotecan), CAMPTOSAR®)、乙酰喜树碱(acetylcamptothecin)、东莨菪亭(scopoletin)和9-氨基喜树碱(9-aminocamptothecin));苔藓抑素(bryostatin);callystatin;CC-1065(包括它的阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);鬼臼毒素(podophyllotoxin);鬼臼酸(podophyllinic acid);替尼泊苷(teniposide);隐藻素类(cryptophycins)(特别是隐藻素1和隐藻素8);多拉司他汀(dolastatin);duocarmycin(包括合成的类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);pancratistatin;sarcodictyin;海绵抑素(spongistatin);氮芥类(nitrogen mustards),

例如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlomaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝脲类(nitrosoureas),诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);二膦酸酯(盐)类(bisphosphonates),如氯膦酸盐(酯)(clodronate);抗生素,例如烯二炔类(enediyne)抗生素(例如加利车霉素(calicheamicin),特别是加利车霉素γ1I和加利车霉素ωI1(例如,参见Agnew,Chem Intl.Ed.Engl.,33:183-186(1994))和蒽环类抗生素(anthracyclines)如annamycin、AD 32、alcarubicin、柔红霉素(daunorubicin)、右雷佐生(dexrazoxane)、DX-52-1、表柔比星(epirubicin)、GPX-100、伊达比星(idarubicin)、KRN5500、美诺立尔(menogaril)、dynemicin,包括dynemicin A、埃斯波霉素(esperamicin)、新制癌素发色团(neocarzinostatin chromophore)和相关色素蛋白烯二炔类抗生素发色团、阿克拉霉素(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycins)、放线菌素C(cactinomycin)、carabicin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、放线菌素D(dactinomycin)、地托比星(detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(doxorubicin)(包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星、多柔比星脂质体(liposomal doxorubicin)和脱氧多柔比星)、依索比星(esorubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)如丝裂霉素C(mitomycin C)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、和佐柔比星(zorubicin);叶酸类似物如二甲叶酸(denopterin)、蝶酰三谷氨酸(pteropterin)、和三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)和硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他宾(enocitabine)和氟尿苷(floxuridine);雄激素如卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、表硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)和睾内酯(testolactone);抗肾上腺类如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、和曲洛司坦(trilostane);叶酸补偿物(folic acid replenisher)如亚叶酸(folinic acid)(亚叶酸(leucovorin));醋葡醛内酯(aceglatone);抗叶酸抗肿瘤剂(anti-folate anti-neoplastic agents)如 ALIMTA®、LY231514培美曲塞(pemetrexed)、二氢叶酸还原酶抑制剂如甲氨蝶呤(methotrexate)、抗代谢物如5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)(5-FU)及其前药如UFT、S-1和卡培他滨(capecitabine)、以及胸苷酸合成酶抑制剂和甘氨酰胺核糖核苷酸甲酰基转移酶抑制剂如雷替曲塞(raltitrexed)

(TOMUDEX[RM],TDX);二氢嘧啶脱氢酶抑制剂如恩尿嘧啶(eniluracil);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);安吖啶(amsacrine);bestrabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defosfamide);地美可辛(demecolcine);地吖醌(diaziquone);elfornithine;依利醋铵(elliptinium acetate);埃博霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓;羟脲(hydroxyurea);香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidamine);美登木素生物碱类(maytansinoids),例如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);米托胍腙(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);二胺硝吖啶(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);蛋氨氮芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);2-乙基酰肼(ethylhydrazide);丙卡巴肼(procarbazine);PSK®多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西索菲兰(sizofiran);螺旋锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2′,2″-三氯三乙胺;单端孢菌素类(trichothecenes)(尤其是T-2毒素、疣孢菌素(verrucarin)A、杆孢菌素(roridin)A和蛇行菌素(anguidin));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine)(ELDISINE®,FILDESIN®);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷(arabinoside)(“Ara-C”);环磷酰胺(cyclophosphamide);噻替派(thiotepa);类紫杉醇(taxoids)和紫杉烷类(taxanes),例如，TAXOL®紫杉醇(paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.),ABRAXANE[TM]不含克列莫佛(Cremophor)、清蛋白改造的纳米颗粒剂型紫杉醇(American Pharmaceutical Partners,Schaumberg,Illinois)、和TAXOTERE7多西他塞(docetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer,Antony,France);苯丁酸氮芥(chlorambucil);吉西他滨(gemcitabine)(GEMZAR7);6-硫鸟嘌呤(thioguanine);巯基嘌呤(mercaptopurine);铂;铂类似物或基于铂的类似物例如顺铂(cisplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂(carboplatin);长春碱(vinblastine)(VELBAN®);依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺(ifosfamide);米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱(vincristine)(ONCOVIN®);长春碱(vinca alkaloid);长春瑞滨(vinorelbine)(NAVELBINE®);能灭瘤(novantrone);依达曲沙(edatrexate);道诺霉素(daunomycin);氨基蝶呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊本膦酸盐(ibandronate);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类维A酸(retinoids),诸如维A酸(retinoic acid);上述所有物质的药学可接受盐、酸或衍生物;以及上述的两种或更多种的组合,例如CHOP和FOLFOX,CHOP是环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙(prednisolone)的组合治疗的缩写,FOLFOX是奥沙利铂(ELOXATIN[TM])联合5-FU和亚叶酸(leucovorin)进行治疗的缩写。

[0180] 该定义还包括担负调节或抑制作用于肿瘤的激素的抗激素试剂例如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERMs),包括例如他莫昔芬(tamoxifen)(包括NOLVADEX®他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羟泰米酚(4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬(trioxifene)、那洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮(onapristone)、和 FARESTON®托瑞米芬(toremifene);抑制芳香化酶的芳香化

酶抑制剂，其调节肾上腺中雌激素的生产，例如4(5)-咪唑、氨鲁米特(aminoglutethimide)、MEGASE®醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、福美司坦(formestanie)、法屈唑(fadrozole)、RIVISOR®伏罗唑(vorozole)、FEMARA®来曲唑(letrozole)、和ARIMIDEX®阿那曲唑(anastrozole)；以及抗雄激素例如氟他米特(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)、比卡米特(bicalutamide)、亮丙瑞林(leuprolide)、和戈舍瑞林(goserelin)；以及曲沙他滨(troxacitabine)(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物)；反义寡核苷酸，尤其是抑制与支持细胞增殖有关的信号途径中的基因表达的那些反义寡核苷酸，所述基因如PKC-α、Raf、H-Ras、和表皮生长因子受体(EGF-R)；疫苗如基因治疗疫苗，例如ALLOVECTIN(疫苗、LEUVECTIN®疫苗、和VAXID®疫苗；PROLEUKIN®rIL-2；LURTOTECAN®拓扑异构酶1抑制剂；ABARELIX®rmRH；以及上述任一项的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0181] "抗代谢物化疗剂"指在结构上类似于代谢物，但不能由机体以生产方式使用的药剂。许多抗代谢物化疗剂干扰核酸RNA和DNA的生产。抗代谢物化疗剂的例子包括吉西他滨(gemcitabine)(GEMZAR®)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、卡培他滨(capecitabine)(XELODA™)、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、6-硫代鸟嘌呤、培美曲塞(pemetrexed)、雷替曲塞(raltitrexed)、阿拉伯糖胞嘧啶ARA-C阿糖胞苷(CYTOSAR-U®)、达卡巴嗪(dacarbazine)(DTIC-DOME ®)、氮胞嘧啶(azocytosine)、脱氧胞嘧啶(deoxycytosine)、pyridmidene、氟达拉滨(fludarabine)(FLUDARA®)、cladrabine、2-脱氧-D-葡萄糖等等。优选的抗代谢物化疗剂是吉西他滨。

[0182] "吉西他滨"或"2′-脱氧-2′,2′-二氟胞苷一氢氯化物(2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine monohydrochloride)(b-异构体)"是显示抗癌活性的核苷类似物。吉西他滨HCl的经验式(empirical formula)是C9H11F2N3O4A HCl。盐酸吉西他滨由Eli Lilly出售，商标为GEMZAR®。

[0183] "基于铂的化疗剂"包括含有作为分子的完整部分的铂的有机化合物。基于铂的化疗剂的例子包括卡铂、顺铂、和奥沙利铂(oxaliplatinum)。

[0184] "基于铂的化疗"意思是用一种或多种基于铂的化疗剂治疗，任选与一种或多种其它化疗剂组合。

[0185] "铂抗性"癌症意思是虽然接受了基于铂的化疗但癌症还是进展了的病人(即所述病人是"铂不应性的(platinum refractory)")，或者所述病人在完成基于铂的化疗方案后，在12个月内(例如在6个月内)已经进展。

[0186] ″抗血管生成剂″指在某种程度上阻断、或干扰血管发育的化合物。抗血管生成因子可以为例如结合生长因子或生长因子受体的小分子或抗体，所述生长因子或生长因子受体涉及促进血管生成。本文中优选的抗血管生成因子为结合血管内皮生长因子(VEGF)的抗体，如贝伐单抗(Bevacizumab)

[0187] (AVASTIN®)。

[0188] 术语″细胞因子″是由一个细胞群体释放的作为细胞间介质而作用于另一细胞的蛋白质的通称。这种细胞因子的例子为淋巴因子、单核因子、和传统多肽激素。细胞因子包

括生长激素如人生长激素、N-甲硫氨酰基人生长激素、和牛生长激素；甲状旁腺激素；甲状腺素；胰岛素；胰岛素原；松弛素(relaxin)；松弛素原(prorelaxin)；糖蛋白激素如促卵泡素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)、和促黄体生成素(LH)；肝生长因子；成纤维细胞生长因子；催乳素；胎盘催乳素；肿瘤坏死因子-α和-β；苗勒(mullerian)-抑制物质；小鼠促性腺激素-相关肽；抑制素(inhibin)；活化素(activin)；血管内皮生长因子；整联蛋白；促血小板生成素(TPO)；神经生长因子如NGF-β；血小板-生长因子；转化生长因子(TGF)如TGF-α和TGF-β；胰岛素样生长因子-I和-II；促红细胞生成素(EPO)；成骨诱导因子；干扰素如干扰素-α、-β、和-γ；集落刺激因子(CSF)如巨噬细胞-CSF(M-CSF)；粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF)；和粒细胞-CSF(G-CSF)；白介素(IL)如IL-1、IL-1α、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12；肿瘤坏死因子如TNF-α或TNF-β；以及其它多肽因子包括LIF和kit配体(kit ligand)(KL)。本文所用 术语细胞因子包括天然来源的或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物学活性等价物。

[0189] 本文所用术语“EGFR-靶向药物”指结合EGFR并且任选抑制EGFR活化的治疗剂。这些药剂的例子包括结合EGFR的抗体和小分子。结合EGFR的抗体的例子包括MAb 579(ATCC CRL HB 8506)、MAb 455(ATCC CRLHB8507)、MAb 225(ATCC CRL 8508)、MAb 528(ATCC CRL 8509)(参见，美国专利4,943,533,Mendelsohn et al.)及其变体，如嵌合225(C225或Cetuximab；ERBUTIX®)和重整型(reshaped)人225(H225)(参见，WO96/40210,Imclone Systems Inc.)；结合II型突变EGFR的抗体(美国专利5,212,290)；美国专利5,891,996中所述的结合EGFR的人源化和嵌合抗体；和结合EGFR，如ABX-EGF的人抗体(参见WO98/50433，Abgenix)；EMD55900(Stragliotto et al.Eur.J.Cancer 32A:636-640(1996))；和mAb 806或人源化mAb 806(Johns et al.,J.Biol.Chem.279(29):30375-30384(2004))。抗EGFR抗体可以与细胞毒剂偶联，由此产生免疫偶联物(参见，例如，EP659,439A2,Merck Patent GmbH)。结合EGFR的小分子的例子包括ZD1839或Gefitinib(IRESSA™;Astra Zeneca)；CP-358774或盐酸埃罗替尼(Erlotinib HCL)(TARCEVA™;Genentech/OSI)；和AG1478、AG1571(SU 5271;Sugen)。

[0190] “酪氨酸激酶抑制剂”指抑制酪氨酸激酶如HER受体的酪氨酸激酶活性的分子。这些抑制剂的例子包括前段所指出的EGFR靶向药物；小分子HER2酪氨酸激酶抑制剂如TAK165，其可由Takeda获得；双重HER抑制剂如EKB-569(可由Wyeth获得)，其优先结合EGFR但同时抑制HER2和EGFR过表达细胞；GW572016(可由Glaxo获得)，其为口服HER2和EGFR酪氨酸激酶抑制剂；PKI-166(可由Novartis获得)；泛-HER抑制剂如canertinib(CI-1033；Pharmacia)；Raf-1抑制剂如反义药剂ISIS-5132，可由ISISPharmaceuticals获得，其抑制Raf-1信号；非-HER靶向TK抑制剂如甲磺酸伊马替尼(Imatinib mesylate)(Gleevac™)，可由Glaxo获得；MAPK胞外调节的激酶I抑制剂CI-1040(可由Pharmacia获得)；喹唑啉类，如PD 153035,4-(3-氯代苯胺)喹唑啉；吡啶并嘧啶；嘧啶并嘧啶(pyrimidopyrimidines)；吡咯并嘧啶(pyrrolopyrimidines)，如CGP 59326、CGP 60261和CGP 62706；吡唑并嘧啶(pyrazolopyrimidines)、4-(苯氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶；姜黄素(curcumin)(二阿魏酰甲烷、4,5-二(4-氟代苯胺)酞酰亚胺)；含硝基噻吩部分的 tyrphostines；PD-0183805(Warner-Lamber)；反义分子(例如结合HER编码核酸的那些反义分子)；喹噁啉(美国专利5,804,396)；tryphostins(美国专利5,804,396)；ZD6474(Astra Zeneca)；PTK-787

(Novartis/Schering AG);泛-HER抑制剂如CI-1033(Pfizer);Affinitac(ISIS 3521;Isis/Lilly);甲磺酸伊马替尼(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);或者如以下任一专利文献所述的:美国专利5,804,396;W099/09016(American Cyanimid);W098/43960(American Cyanamid);W097/38983(Warner Lambert);W099/06378(Warner Lambert);W099/06396(Warner Lambert);W096/30347(Pfizer,Inc);W096/33978(Zeneca);W096/3397(Zeneca);和W096/33980(Zeneca)。

[0191] “自身免疫病”在本文中指因个体自身组织引起的和针对个体自身组织的疾病或病症或其共分离(co-segregate)或表现或者由此产生的疾患。自身免疫性疾病或病症的例子包括但不限于关节炎(类风湿性关节炎诸如急性关节炎、慢性类风湿性关节炎、痛风性关节炎、急性痛风性关节炎、慢性炎性关节炎、退行性关节炎、感染性关节炎、莱姆(Lyme)关节炎、增生性关节炎、银屑病性关节炎、脊椎关节炎和幼发型类风湿性关节炎,骨关节炎,慢性进行性关节炎(arthritis chronica progrediente),变形性关节炎,慢性原发性多关节炎,反应性关节炎,和强直性脊柱炎),炎性过度增殖性皮肤病,银屑病诸如斑块状银屑病、滴状银屑病、脓疱性银屑病和指甲银屑病,特应性包括特应性疾病诸如干草热和乔布氏(Job)综合征,皮炎包括接触性皮炎、慢性接触性皮炎、变应性皮炎、变应性接触性皮炎、疱疹样皮炎和特应性皮炎,x连锁的高IgM综合征,荨麻疹诸如慢性变应性荨麻疹和慢性特发性荨麻疹包括慢性自身免疫性荨麻疹,多肌炎/皮肌炎,青少年型皮肌炎,中毒性表皮坏死松解症,硬皮病(包括系统性硬皮病),硬化诸如系统性硬化、多发性硬化(MS)诸如脊髓-眼(spino-optical)MS、原发性进行性MS(PPMS)和复发性消退性(relapsing remitting)MS(RRMS)、进行性系统性硬化、动脉粥样硬化、动脉硬化、播散性硬化(sclerosis disseminata)和共济失调性(ataxic)硬化,炎性肠病(IBD)(例如克罗恩氏(Crohn)病,自身免疫介导的胃肠病,结肠炎诸如溃疡性结肠炎(colitis ulcerosa)、微观(microscopic)结肠炎、胶原性结肠炎、 息肉状结肠炎、坏死性小肠结肠炎和透壁性结肠炎,和自身免疫性炎性肠病),坏疽性脓皮症,结节性红斑,原发性硬化性胆管炎,巩膜外层炎,呼吸窘迫综合征包括成人型或急性呼吸窘迫综合征(ARDS),脑膜炎,整个或部分葡萄膜的炎症,虹膜炎,脉络膜炎,自身免疫性血液学病症,类风湿性脊椎炎,突发性听觉丧失,IgE介导的疾病诸如过敏反应和变应性和特应性鼻炎,脑炎诸如拉斯默森氏(Rasmussen)脑炎和边缘系和/或脑干脑炎,葡萄膜炎诸如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽肿性葡萄膜炎、非肉芽肿性葡萄膜炎、晶状体抗原性葡萄膜炎、后葡萄膜炎或自身免疫性葡萄膜炎,具有和没有肾病综合征的肾小球肾炎(GN)诸如慢性或急性肾小球肾炎诸如原发性GN、免疫介导的GN、膜性GN(膜性肾病)、特发性膜性GN或特发性膜性肾病、膜增殖性或膜性增殖性GN(MPGN)包括I型和II型、和急进性GN,变应性疾患和应答,变应性反应,湿疹包括变应性或特应性湿疹,哮喘诸如支气管哮喘(asthma bronchiale)和自身免疫性哮喘,涉及T细胞浸润和慢性炎性应答的疾患,针对外来抗原诸如妊娠期间胎儿A-B-O血型的免疫反应,慢性肺部炎性疾病,自身免疫性心肌炎,白细胞粘附缺陷,系统性红斑狼疮(SLE)(systemic lupus erythematodes)诸如皮肤SLE、亚急性皮肤红斑狼疮、新生儿狼疮综合征(NLE)、播散性红斑狼疮、狼疮(包括狼疮肾炎、狼疮脑炎、儿科狼疮、非肾狼疮、肾外狼疮、盘状狼疮、狼疮脱发),幼发型(I型)糖尿病包

括儿科胰岛素依赖性糖尿病(IDDM)、成人期发作的糖尿病(II型糖尿病)、自身免疫性糖尿病、特发性尿崩症,与细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发型超敏感性有关的免疫应答,结核病,结节病,肉芽肿病包括淋巴瘤样肉芽肿病、韦格纳氏(Wegener)肉芽肿病,粒细胞缺乏,血管炎病包括血管炎(包括大血管血管炎(包括风湿性多肌痛和巨细胞(高安氏(Takayasu))动脉炎),中血管血管炎(包括川崎氏(Kawasaki)病和结节性多动脉炎/结节性动脉周围炎),微观(microscopic)多动脉炎,CNS血管炎,坏死性、皮肤性或超敏感性血管炎,系统性坏死性血管炎,和ANCA相关血管炎诸如丘-施二氏(Churg-Strauss)血管炎或综合征(CSS)),颞动脉炎,再生障碍性贫血,自身免疫性再生障碍性贫血,库姆斯(Coombs)阳性贫血,戴-布二氏(Diamond Blackfan)贫血,溶血性贫血或免疫性溶血性贫血包括自身免疫性溶血性贫血(AIHA),恶性贫血(anemia perniciosa),阿狄森氏(Addison)病,单纯红细胞性贫血或再生障碍(PRCA),因子VIII缺乏,血友病A,自 身免疫性嗜中性粒细胞减少症,全血细胞减少症,白细胞减少症,涉及白细胞渗出的疾病,CNS炎性病症,多器官损伤综合征诸如那些败血症、外伤或出血继发的,抗原-抗体复合物介导的疾病,抗肾小球基底膜病,抗磷脂抗体综合征,变应性神经炎,贝切特氏(Bechet或Behcet)病,卡斯尔曼氏(Castleman)综合征,古德帕斯丘氏(Goodpasture)综合征,雷诺氏(Reynaud)综合征,斯耶格伦氏(Sjogren)综合征,史-约二氏(Stevens-Johnson)综合征,类天疱疮诸如大疱性类天疱疮和皮肤类天疱疮,天疱疮(包括寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、粘膜类天疱疮型天疱疮和红斑性天疱疮),自身免疫性多内分泌病,莱特氏(Reiter)病或综合征,免疫复合物肾炎,抗体介导的肾炎,视神经脊髓炎,多神经病,慢性神经病诸如IgM多神经病或IgM介导的神经病,血小板减少症(例如心肌梗死患者发生的)包括血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、输血后紫癜(PTP)、肝素诱发的血小板减少症、和自身免疫或免疫介导的血小板减少症诸如特发性血小板减少性紫癜(ITP)包括慢性或急性ITP,睾丸和卵巢的自身免疫病包括自身免疫性睾丸炎和卵巢炎,原发性甲状腺功能减退症,甲状旁腺功能减退,自身免疫性内分泌病包括甲状腺炎诸如自身免疫性甲状腺炎、桥本氏(Hashimoto)病、慢性甲状腺炎(桥本氏(Hashimoto)甲状腺炎)或亚急性甲状腺炎,自身免疫性甲状腺病,特发性甲状腺功能减退症,格雷夫斯氏(Graves)病,多腺性综合征诸如自身免疫性多腺体综合征(或多腺性内分泌病综合征),瘤外综合征包括神经学瘤外综合征诸如兰伯特-伊顿(Lambert-Eaton)肌无力综合征或伊顿-兰伯特(Lambert-Eaton)综合征,僵体或僵人综合征,脑脊髓炎诸如变应性脑脊髓炎(encephalomyelitis allergica)和实验性变应性脑脊髓炎(EAE),重症肌无力诸如胸腺瘤相关重症肌无力,小脑变性,神经性肌强直,视性眼阵挛或视性眼阵挛肌阵挛综合征(OMS),和感觉神经病,多病灶运动神经病,席汉氏(Sheehan)综合征,自身免疫性肝炎、慢性肝炎、类狼疮肝炎、巨细胞性肝炎、慢性活动性肝炎或自身免疫性慢性活动性肝炎,淋巴样间质性肺炎(LIP),梗阻性细支气管炎(非移植)对NSIP,格-巴二氏(Guillain-Barré)综合征,贝格尔氏(Berger)病(IgA肾病),特发性IgA肾病,线性IgA皮肤病,原发性胆汁性肝硬化,肺硬变,自身免疫性肠病综合征,乳糜泻,腹部疾病,口炎性腹泻(麸质肠病),顽固性口炎性腹泻,特发性口炎性腹泻,冷球蛋白血症、肌萎缩侧索硬化(ALS)(卢格里克氏(Lou Gehrig)病),冠状动脉病,自身免疫 性耳病诸如自身免疫性内耳病(AIED)、自身免疫性听觉丧失,视性眼阵挛肌阵挛综合征(OMS),多软骨炎诸如顽固性或复发性多软骨炎,肺泡蛋白沉着症,淀粉样变,巩膜炎,非癌性淋巴细胞增多,原发性淋巴细胞增多包括单克隆B细胞淋巴细

胞增多(例如良性单克隆丙种球蛋白病和性质未确定的单克隆丙种球蛋白病(MGUS)),周围神经病,瘤外综合征,通道病诸如癫痫、偏头痛、心率失常、肌肉病症、失聪、失明、周期性瘫痪和CNS的通道病,孤独症,炎性肌病,局灶性节段性肾小球硬化(FSGS),内分泌性眼病,葡萄膜视网膜炎,脉络膜视网膜炎,自身免疫性肝脏病学病症,纤维肌痛,多发性内分泌衰竭,施密特氏(Schmidt)综合征,肾上腺炎,胃萎缩,早老性痴呆,脱髓鞘病诸如自身免疫性脱髓鞘病和慢性炎性脱髓鞘性多神经病,糖尿病肾病,德雷斯勒氏(Dressler)综合征,斑秃,CREST综合征(钙质沉着症、雷诺氏(Raynaud)现象、食道运动功能障碍、指端硬化和毛细管扩张),男性和女性自身免疫性不孕不育,混合性结缔组织病,恰加斯氏(Chagas)病,风湿热,习惯性流产,农民肺,多形红斑,心脏切开术后综合征,柯兴氏(Cushing)综合征,养鸟者肺,变应性肉芽肿性血管炎,良性淋巴细胞性血管炎,阿尔波特氏(Alport)综合征,肺泡炎诸如变应性肺泡炎和纤维化肺泡炎,间质性肺病,输血反应,麻风,疟疾,利什曼病,锥虫病(kypanosomiasis),血吸虫病,蛔虫病,曲霉病,Sampter氏综合征,卡普兰氏(Caplan)综合征,登革,心内膜炎,心内膜心肌纤维化,弥漫性肺间质纤维化,间质性肺纤维化,肺纤维化,特发性肺纤维化,囊性纤维化,眼内炎,持久隆起性红斑(erythema elevatum et diutinum),胎儿成红细胞增多症,嗜曙红细胞性筋膜炎(faciitis)、舒尔曼氏(Shulman)综合征,费尔提氏(Felty)综合征,flariasis,睫状体炎诸如慢性睫状体炎、异时性睫状体炎、虹膜睫状体炎(急性或慢性)或Fuch氏睫状体炎,亨诺-许兰二氏(Henoch-Schonlein)紫癜,人免疫缺陷病毒(HIV)感染,艾柯病毒感染,心肌病,阿尔茨海默氏(Alzheimer)病,细小病毒感染,风疹病毒感染,种痘后综合征,先天性风疹感染,爱泼斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒感染、腮腺炎,埃文斯(Evans)综合征,自身免疫性性腺衰竭,西登哈姆氏(Sydenham)舞蹈病,链球菌后肾炎,闭塞性血栓血管炎(thromboangitis ubiterans),甲状腺毒症,脊髓痨,脉络膜炎,巨细胞性多肌痛,内分泌性眼病,慢性超敏感性肺炎,干燥性角膜结膜炎,流行性角膜结膜炎,特发性肾炎综合征,微小病变肾病,良性家族性和缺血-再灌注损伤,视网膜自身免 疫,关节炎症,支气管炎,慢性阻塞性气道疾病,硅沉着病,口疮,口疮性口炎,动脉硬化性病症,无精子发生(aspermiogenese),自身免疫性溶血,伯克氏(Boeck)病,冷球蛋白血症,杜普伊特伦氏(Dupuytren)挛缩,晶体过敏性眼内炎(endophthalmia phacoanaphylactica),变应性小肠炎(enteritis allergica),麻风节结性红斑,特发性面瘫,慢性疲乏综合征,风湿热(febris rheumatica),哈-里二氏(Hamman-Rich)病,感觉神经性听觉丧失,阵发性血红蛋白尿(haemoglobinuria paroxysmatica),性腺功能减退,局限性回肠炎(ileitis regionalis),白细胞减少症,传染性单核细胞增多症,横贯性(traverse)脊髓炎,原发性特发性粘液水肿,肾病,交感性眼炎(ophthalmia symphatica),肉芽肿性睾丸炎(orchitis granulomatosa),胰腺炎,急性多神经根炎,坏疽性脓皮症,奎尔万氏(Quervain)甲状腺炎,获得性脾萎缩,由于抗精虫抗体的不育症,非恶性胸腺瘤,白癜风,SCID和爱泼斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒相关疾病,获得性免疫缺陷综合征(AIDS),寄生虫病诸如利什曼虫,中毒性休克综合征,食物中毒,涉及T细胞浸润的疾患,白细胞粘附缺陷,与细胞因子和T-淋巴细胞介导的急性和迟发性超敏感性有关的免疫应答,涉及白细胞渗出的疾病,多器官损伤综合征,抗原-抗体复合物介导的疾病,抗肾小球基底膜病,变应性神经炎,自身免疫性多内分泌病,卵巢炎,原发性粘液水肿,自身免疫性萎缩性胃炎,交感性眼炎,风湿病,混合性结缔组织病,肾病综合征,胰岛炎,多内分泌衰竭,周围神

经病，自身免疫性多腺性综合征I型，成人期发作的特发性甲状旁腺功能减退(AOIH)，全秃，扩张型心肌病，获得性大疱性表皮松解(epidermolisis bullosa acquisita,EBA)，血色素沉着，心肌炎，肾病综合征，原发性硬化性胆管炎，化脓性或非化脓性鼻窦炎，急性或慢性鼻窦炎，筛窦炎，额窦炎，上颌窦炎或蝶窦炎，嗜曙红细胞相关病症诸如嗜曙红细胞增多症、肺嗜曙红细胞增多性浸润、嗜曙红细胞增多-肌痛综合征、吕弗勒氏(Loffler)综合征、慢性嗜曙红细胞性肺炎、热带肺嗜曙红细胞增多、支气管肺曲霉病、曲霉肿、或含有嗜曙红细胞的肉芽肿，过敏反应，血清阴性脊椎关节炎病，多内分泌自身免疫病，硬化性胆管炎，巩膜、巩膜外层、慢性粘膜皮肤假丝酵母病，布鲁顿氏(Bruton)综合征，婴儿期一过性低丙种球蛋白血症，威斯科特-奥尔德里齐(Wiskott-Aldrich)综合征，共济失调性毛细管扩张，与以下各项有关的自身免疫性病症：胶原病、风湿病、神经病学疾病、淋巴结炎、缺血再灌注紊乱、血压应答降低(reduction in blood pressure response)、血管功能障碍、毛细管扩张(antgiectasis)、组织损伤、心血管缺血、痛觉过敏、脑缺血和伴随血管化的疾病，变应性超敏感性病症，肾小球肾炎病，再灌注损伤，心肌或其它组织的再灌注损伤，具有急性炎性成分的皮肤病，急性化脓性脑膜炎或其它中枢神经系统炎性病症，眼和眶炎性病症，粒细胞输血相关综合征，细胞因子诱发的中毒，嗜眠发作(narcolepsy)，急性重度炎症，慢性顽固性炎症，肾盂炎，肺硬变，糖尿病性视网膜病，糖尿病性大动脉病症，动脉内增生，消化性溃疡，心瓣炎，和子宫内膜异位症。

[0192] “良性过度增殖紊乱”意思是与细胞增殖有关并由医学团体成员识别为异常的病人的状况。异常状态以某特性的水平为特征，所述特性的水平在统计学上不同于未患所述紊乱的生物中观测到的水平。细胞增殖指通过细胞的倍增而生长或扩展，并且包括细胞分裂。细胞增殖的速率可以通过统计给定单位时间内产生的细胞数目来测量。良性过度增殖紊乱的例子包括银屑病和息肉(polyps)。

[0193] “呼吸道疾病”涉及呼吸系统，包括慢性支气管炎、哮喘包括急性哮喘和变应性哮喘、囊性纤维化、支气管扩张、过敏性或其它鼻炎或窦炎、α1-抗胰蛋白酶缺乏、咳嗽、肺气肿、肺纤维化或高反应性气管(hyper-reactive airway)疾病、慢性阻塞性肺病、和慢性阻塞性肺紊乱。

[0194] “银屑病”指以局限性、离散的和汇合的、微红、银屑斑丘疹的出疹为特征的病症。银屑病病变通常主要发生在肘、膝盖、头皮、和躯干上，显微镜下显示特征性角化不全(parakerotosis)和表皮突(rete ridges)的延长。所述术语包括多种形式的银屑病，包括所述疾病的红皮、脓疱、中度-严重和顽固形式。

[0195] “子宫内膜异位”指子宫内膜组织的异位发生，常常形成包含改变的血液的囊肿。

[0196] 本文中术语“血管疾病或紊乱”指影响血管系统包括心血管系统的多种疾病或紊乱。这些疾病的例子包括动脉硬化、血管再阻塞、动脉粥样硬化、术后血管狭窄、再狭窄、血管闭塞或颈动脉阻塞性疾病、冠状动脉病、心绞痛、小血管疾病、高胆固醇血症、高血压、和涉及血管上皮细胞异常增殖或功能的病症。

[0197] 术语"狭窄"指使体内孔道(例如，导管(duct)或管道(canal))狭窄或缢缩。

[0198] 术语"血管狭窄"指血管闭塞或狭窄。血管狭窄通常由脂肪沉积(如在动脉 粥样硬化的例子)或血管平滑肌细胞和内皮细胞的过度迁移和增殖引起。动脉对狭窄尤其敏感。本文所用术语“狭窄”特别包括初始狭窄和再狭窄。

[0199] 术语"再狭窄"指初始狭窄治疗有明显成功后狭窄的反复。例如,血管狭窄上下文中的"再狭窄"指其已被明显成功地治疗后血管狭窄的再发,例如通过以血管成形术(例如经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty)、定向冠状动脉经皮腔内斑块旋切术(direction coronary atherectomy)或支架(stent)等等去除脂肪沉积。再狭窄中其中一种起作用的因素是内膜增生。术语"内膜增生(intimal hyperplasia)",可与"新生内膜增生(neointimal hyperplasia)"和"新生内膜形成(neointima formation)"互换使用,指血管、内膜内部大部分层加厚,其为血管平滑肌细胞和内皮细胞过度增殖和迁移的结果。再狭窄期间发生的许多变化通常一起称为"血管壁改型(remodeling)"。

[0200] 术语"气囊血管成形术(balloon angioplasty)"和"经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty)"(PTCA)通常可互换使用,指非-外科手术的基于导管的治疗以从冠状动脉去除斑块(plaque)。狭窄或再狭窄通常导致高血压,其是血流阻力增加的结果。

[0201] 术语"高血压"指异常高的血压,即超过正常范围的上限值。

[0202] "息肉"指一团组织从正常表面水平向外或向上凸起或突出,由此从相对宽的基底或纤细的茎生长的肉眼可见为半球体、球形、或不规则隆起样(moundlike)结构。例子包括结肠、直肠和鼻息肉。

[0203] "纤维腺瘤"指源于腺上皮的良性瘤,其中有增殖性成纤维细胞和结缔组织成分的明显基质(conspicuous stroma)。这通常发生于乳腺组织。

[0204] "哮喘"指导致呼吸困难的病症。支气管哮喘指其中存在普遍性气管狭窄的肺部病症,其可能是由于平滑肌收缩(痉挛)、粘膜水肿、或支气管和细支气管管腔中的粘液而致。

[0205] "支气管炎"指支气管粘膜炎症。

[0206] 对于本文的目的,"管形瓶"指保存治疗剂的容器。管形瓶可以用能够用注射器穿透的塞子密封。通常,管形瓶由玻璃材料构成。管形瓶中的治疗剂可以处于多种状态包括液体、冻干的、冷冻的状态等等。

[0207] 术语"包装插页"指习惯上包括在治疗剂商业包装中的说明书,其包含有关适应症、用法、用量、给药方式、禁忌和/或涉及这些治疗产品使用的警 告的信息。

[0208] II.抗体的生产

[0209] 以下涉及生产根据本发明使用的HER抗体的示例性技术。用于生产抗体的HER抗原可以是例如可溶形式的HER胞外结构域或其包含所需表位的部分。或者,在其细胞表面表达HER的细胞(例如经转化过表达HER2的NIH-3T3细胞;或癌细胞系如SK-BR-3细胞,参见Stancovski et al.PNAS(USA)88:8691-8695(1991))可用于生产抗体。用于生产抗体的其它形式的HER受体对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0210] (i)多克隆抗体

[0211] 多克隆抗体优选在动物中通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂制备。将有关抗原偶联于对所要免疫的物种而言具有免疫原性的蛋白质,例如匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白、或大豆胰蛋白酶抑制剂上可能是有用的,所述交联使用双功能或衍生化试剂进行,例如,马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基交联)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、$SOCl_2$、或$R^1N=C=NR$,其中

R和R^1是不同的烷基。

[0212] 用抗原、免疫原性偶联物、或通过将例如100μg或5μg蛋白质或偶联物(分别用于兔子或小鼠)与3体积的弗氏完全佐剂组合得到衍生物并将所述溶液皮内注射于多个部位而免疫动物。一个月后以弗氏完全佐剂中原始量1/5至1/10的肽或偶联物在多个部位为所述动物皮下注射以加强免疫。7至14天后对动物放血,测定血清的抗体滴度。对动物加强免疫直至滴度稳定在高水平。优选用相同抗原的偶联物为动物加强免疫,但所述抗原偶联于不同的蛋白质和/或通过不同的交联剂交联。偶联物也可以在重组细胞培养物中作为蛋白质融合物制备。同样,凝集化试剂(aggregating agent)如明矾适合用于增强免疫应答。

[0213] (ii)单克隆抗体

[0214] 本领域可利用多种制备单克隆抗体的方法。例如,单克隆抗体可以用杂交瘤方法制备,杂交瘤方法由Kohler et al.,Nature 256:495(1975)首次描述,或者可以通过重组DNA方法(美国专利4,816,567)制备。

[0215] 在杂交瘤方法中,如本文以上所述免疫小鼠或其它适当的宿主动物如仓鼠,以激发产生或能够产生抗体的淋巴细胞,所述抗体将特异地结合用于免 疫的蛋白质。或者,可以体外免疫淋巴细胞。然后用适当的融合剂如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,pp.59-103(Academic Press,1986))。

[0216] 接种如此制备的杂交瘤细胞并将其培养于适当的培养基中,所述培养基优选包含一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),用于所述杂交瘤的培养基典型地将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤、和胸苷(HAT培养基),这些物质阻止HGPRT-缺陷细胞的生长。

[0217] 优选的骨髓瘤细胞是那些有效融合、支持所选择的抗体生产细胞稳定高水平地生产抗体、并对培养基如HAT培养基敏感的骨髓瘤细胞。其中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤细胞系,如源于MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的鼠骨髓瘤细胞系,其可由Salk Institute Cell Distribution Center,San Diego,California USA获得,以及SP-2或X63-Ag8-653细胞,其可由美国典型培养物保藏中心,Rockville,Maryland USA获得。也已描述了人骨髓瘤和小鼠-人杂交瘤细胞系用于人单克隆抗体的生产(Kozbor,J.Immunol.,133:3001(1984);和Brodeur et al.,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987))。

[0218] 测试其中培养有杂交瘤细胞的培养基,用于针对所述抗原的单克隆抗体的生产。优选通过免疫沉淀法或者通过体外结合测试如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测试(ELISA)测定由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性。

[0219] 例如可以通过Munson et al.,Anal.Biochem.,107:220(1980)的Scatchard分析测定单克隆抗体的结合亲合力。

[0220] 鉴定了生产具有所需特异性、亲合力、和/或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,可以通过有限稀释法亚克隆所述克隆,并以标准方法培养(Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice,pp.59-103(Academic Press,1986))。用于该目的的合适的培养基包括例如D-MEM或者RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以作为动物中的腹水肿瘤体内培养。

[0221] 由所述亚克隆分泌的单克隆抗体适于以传统抗体纯化程序，例如蛋白质A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析、或亲合层析从培养基、腹水流体、或血清分离。

[0222] 利用常规程序(例如，通过使用能够特异地结合编码鼠抗体重链和轻链的寡核苷酸探针)可以很容易地分离编码单克隆抗体的DNA并测序。杂交瘤细胞用作这种DNA的优选来源。一旦分离了DNA，可以将其置于表达载体中，然后将其转染到原本不生产抗体蛋白质的宿主细胞如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中华仓鼠卵巢(CHO)细胞、或骨髓瘤细胞中，以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。有关编码抗体的DNA在细菌中重组表达的综述文献包括Skerra et al.,Curr.Opinion in Immunol.,5:256-262(1993)和Plückthun,Immunol.Revs.,130:151-188(1992)。

[0223] 在另一实施方案中，可以从使用McCafferty et al.,Nature,348:552-554(1990)中描述的技术得到的抗体噬菌体文库中分离单克隆抗体或抗体片段。Clackson et al.,Nature,352:624-628(1991)和Marks et al.,J.Mol.Biol.,222:581-597(1991)分别描述了用噬菌体文库分离鼠和人抗体。后来的出版物描述了高亲合力(nM范围)人抗体的生产，其通过链改组(Marks et al.,Bio/Technology,10:779-783(1992))、以及作为构建极大噬菌体文库策略的组合感染和体内重组(Waterhouse et al.,Nuc.Acids.Res.,21:2265-2266(1993))进行。因此，这些技术是分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行性替代技术。

[0224] 也可以修饰DNA，例如通过用人重链和轻链恒定区取代同源鼠序列(美国专利4,816,567；和Morrison,et al.,Proc.Natl Acad.Sci.USA,81:6851(1984))，或者通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列全部或部分共价连接到免疫球蛋白编码序列来修饰。

[0225] 典型地，这样的非免疫球蛋白多肽被抗体的恒定区所取代，或者被抗体的一个抗原结合部位的可变区所取代，形成嵌合二价抗体，其包括具有抗原特异性的一个抗原结合部位和具有不同抗原特异性的另一个抗原结合部位。

[0226] (iii)人源化抗体

[0227] 本领域已经描述了人源化非人抗体的方法。优选人源化抗体具有从非人来源导入的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为"引入的"残基，其典型地从"引入的"可变区获取。人源化基本上可以按照Winter及其同事(Jones et al.,Nature,321:522-525(1986)；Riechmann et al.,Nature,332:323-327(1988)；Verhoeyen et al.,Science,239:1534-1536(1988))的方法实施，通过用高变区序列取代人抗体的相应序列而完成。因此，这样的"人源 化"抗体是嵌合抗体(美国专利4,816,567)，其中基本上小于完整的人可变区已经被来自非人物种的相应序列所取代。在实践中，人源化抗体典型地为人抗体，在该人抗体中，一些高变区残基可能还有一些FR残基被来自啮齿类动物抗体的类似位点所取代。

[0228] 选择用于制备人源化抗体的人轻链和重链可变区对于减少抗原性是非常重要的。按照所谓的"最佳适应(best-fit)"方法，针对已知的人可变区序列完整文库筛选啮齿类动物抗体的可变区序列。然后接受与啮齿类动物的序列最接近的人序列作为人源化抗体的人框架区(FR)(Sims et al.,J.Immunol.,151:2296(1993)；Chothia et al.,J.Mol.Biol.,196:901(1987))。另一种方法使用特定的框架区，所述框架区来源于特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列。相同框架可用于几种不同的人源化抗体(Carter etal., Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);Presta et al.,J.Immunol.,151:2623(1993))。

[0229] 人源化的抗体保持对抗原的高度亲合力以及其它的有利生物学特性是更为重要的。为了实现此目标,按照优选的方法,用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和多种概念性人源化产物,通过该分析方法制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型一般是可以得到的,并为本领域技术人员所熟知。说明并展示所选择的候选免疫球蛋白序列可能的三维构象结构的计算机程序是可以获得的。对此展示的观察允许分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以这种方法,可以从受者和引入的序列选择并组合FR残基以便获得所需的抗体特性,如增加对目标抗原的亲合力。通常,高变区残基直接地、最本质地影响抗原结合。

[0230] WO01/00245描述了结合HER2并阻断HER受体的配体活化的示例性人源化HER2抗体的生产。本文中特别感兴趣的人源化抗体基本上同鼠单克隆抗体2C4(或其Fab片段)一样有效地阻断EGF、TGF-α和/或HRG介导的MAPK活化和/或基本上如鼠单克隆抗体2C4(或其Fab片段)一样有效地结合HER2。本文中人源化抗体可以例如包含掺入到人可变重链结构域的非人高变区残基,并且可以进一步包含选自下组位点的框架区(FR)取代:运用Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)中提供的可变区编 号系统的69H、71H和73H。在一个实施方案中,人源化抗体在位点69H、71H和73H中的两个或所有位点包含FR取代。

[0231] 本文中感兴趣的示例性人源化抗体包含可变重链结构域互补决定残基GFTFTDYTMX,其中X优选为D或S(SEQ ID NO:7);DVNPNSGGSIYNQRFKG(SEQ ID NO:8);和/或NLGPSFYFDY(SEQ ID NO:9),任选包含那些CDR残基的氨基酸修饰,例如其中所述修饰基本上保持或改善抗体的亲合力。例如,感兴趣的抗体变体在上述可变重链CDR序列中可以具有约一个到约七个或约五个氨基酸取代。这些抗体变体可以通过亲合力成熟制备,例如如下所述的。最优选的人源化抗体包含SEQ ID NO:4中的可变重链结构域氨基酸序列。

[0232] 例如除了前段中的那些可变重链结构域CDR残基之外,人源化抗体还可以包含可变轻链结构域互补决定残基KASQDVSIGVA(SEQ ID NO:10);SASYX^{1}X^{2}X^3,其中X^{1}优选为R或L,X^{2}优选为Y或E,X^{3}优选为T或S(SEQ ID NO:11);和/或QQYYIYPYT(SEQ ID NO:12)。这些人源化抗体任选包含上述CDR残基的氨基酸修饰,例如其中所述修饰基本上保持或改善所述抗体的亲合力。例如,感兴趣的抗体变体在上述可变轻链CDR序列中可以具有约一个到约七个或约五个氨基酸取代。这些抗体变体可以通过亲合力成熟制备,例如如下所述的。最优选的人源化抗体包含SEQ ID NO:3中的可变轻链结构域氨基酸序列。

[0233] 本申请还预期结合HER2并阻断HER受体的配体活化的亲合力成熟的抗体。亲本抗体可以是人抗体或人源化抗体,例如分别包含SEQ ID Nos.3和4的可变轻链和/或重链序列的抗体(即变体574)。所述亲合力成熟抗体优选以高于鼠2C4或变体574的亲合力的亲合力结合HER2受体(例如利用HER2-胞外结构域(ECD)ELISA评估时从约二或约四倍到约100倍或约1000倍提高的亲合力)。用于取代的示例性可变区重链CDR残基包括H28、H30、H34、H35、H64、H96、H99、或它们中两个或多个(例如这些残基中的二个、三个、四个、五个、六个、或七个)的组合。用于改变的可变区轻链CDR残基的例子包括L28、L50、L53、L56、L91、L92、L93、 L94、L96、L97或它们中两个或多个(例如这些残基中的两个至三个、四个、五个或直至约十个)的组合。

[0234] 可以预期多种形式的人源化抗体或亲合力成熟抗体。例如，人源化抗体或亲合力成熟抗体可以是抗体片段如Fab，其任选与一种或多种细胞毒剂偶联以产生免疫偶联物。或者，所述人源化抗体或亲合力成熟抗体可以是完整抗体，如完整的IgG1抗体。优选的完整IgG1抗体包含SEQ ID NO:13中的轻链序列和SEQ ID NO:14中的重链序列。

[0235] (iv)人抗体

[0236] 作为人源化的替代方案，可以生产人抗体。例如，现在生产转基因动物(例如，小鼠)是可能的，在没有内源免疫球蛋白生产的情况下，所述转基因动物在免疫时能够生产全套人抗体。例如，已经描述了嵌合的生殖细胞系突变小鼠中纯合删除抗体重链连接区(J_H)基因导致内源抗体生产的完全抑制。在这种生殖细胞系突变小鼠中，一旦抗原攻击，人生殖细胞系免疫球蛋白基因阵列的转移将导致人抗体的生产。参见，例如，Jakobovits et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，90:2551(1993)；Jakobovits et al.，Nature，362:255-258(1993)；Bruggermann et al.，Year in Immuno.，7:33(1993)；和美国专利5，591，669、5，589，369和5，545，807。

[0237] 或者，噬菌体展示技术(McCafferty et al，Nature 348:552-553(1990))可用于从来自非免疫化供体的免疫球蛋白可变(V)区全套基因体外生产人抗体和抗体片段。依照该技术，将抗体V区基因读框内(in-frame)克隆到丝状噬菌体如M13或fd的主要或次要外壳蛋白基因中，在该噬菌体颗粒表面上将其作为功能性抗体片段展示。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝，所以基于抗体功能特性的选择也导致编码显示那些特性抗体的基因的选择。因此，噬菌体模拟B细胞的一些特性。可以以多种方式完成噬菌体展示；其综述参见，例如，Johnson，Kevin S.and Chiswell，David J.，Current Opinion in Structural Biology 3:564-571(1993)。V基因片段的几种来源可用于噬菌体展示。Clackson et al.，Nature，352:624-628(1991)从源于已免疫过的小鼠脾的小型随机组合文库中分离了多个批次的抗恶唑酮抗体。可以从未免疫化人供体构建全套V基因，可以基本上按照Marks et al.，J.Mol.Biol.222:581-597(1991)，或Griffith et al.，EMBO J.12:725-734(1993)所述技术分离针对多个抗原(包括自身抗原)批次的抗体。也可参见美国专利5，565，332和5，573，905。

[0238] 如以上所讨论的，也可以通过体外活化的B细胞生产人抗体(参见美国专利5，567，610和5，229，275)。

[0239] 人HER2抗体描述于公布于1998年6月30日的美国专利5，772，997和公开于1997年1月3日的WO 97/00271。

[0240] (v)抗体片段

[0241] 已经开发了多种生产包含一个或多个抗原结合区的抗体片段的技术。传统上，这些片段通过完整抗体的蛋白水解消化而衍生(参见，例如，Morimoto et al.，Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992)；和Brennan et al.，Science，229:81(1985))。然而，现在可以通过重组宿主细胞直接生产这些片段。例如，可以从以上讨论的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。或者，可以直接从大肠杆菌回收Fab′-SH片段并进行化学偶联以形成$F(ab')_2$片段(Carter et al.Bio/Technology 10:163-167

(1992))。根据另一种方法,可以直接从重组宿主细胞培养物中分离$F(ab')_2$片段。其它生产抗体片段的技术对于熟练技术人员来说将是显而易见的。在其它实施方案中,所选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185;美国专利5,571,894;以及美国专利5,587,458。例如,抗体片段也可以是"线性抗体",例如美国专利5,641,870中所述。这种线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0242] (vi)双特异性抗体

[0243] 双特异性抗体是具有针对至少两个不同表位的结合特异性的抗体。示例性双特异性抗体可以结合HER2蛋白的两个不同表位。其它的这种抗体可以将HER2结合部位与EGFR、HER3和/或HER4的结合部位组合。或者,HER2臂可以与结合白细胞上的激发分子如T细胞受体分子(例如CD2或CD3)、或IgG的Fc受体(FcγR)如FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)和FcγRIII(CD16)的臂组合,以使细胞的防御机制集中于HER2-表达细胞。双特异性抗体也可用于将细胞毒性试剂定位于HER2表达细胞。这些抗体拥有HER2-结合臂和结合细胞毒性剂(例如皂草素、抗干扰素-α、长春花生物碱、蓖麻毒素A链、氨甲蝶呤、或放射性同位素半抗原)的臂。可以将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段(例如$F(ab')_2$双特异性抗体)。

[0244] WO 96/16673描述了双特异性HER2/FcγRIII抗体,美国专利5,837,234披露了双特异性HER2/FcγRI抗体IDM1(Osidem)。双特异性HER2/Fcα抗体 如WO98/02463中所示。美国专利5,821,337教导了双特异性HER2/CD3抗体。MDX-210是双特异性HER2-FcγRIII Ab。

[0245] 制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生产基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中所述两条链具有不同的特异性(Millstein et al.,Nature,305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四重杂交瘤(quadromas))生产10种可能的不同抗体分子混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化通常通过亲合层析步骤进行,相当繁琐且产物产率低。WO 93/08829、和Traunecker et al.,EMBO J.,10:3655-3659(1991)中公开了类似的方法。

[0246] 依据不同方法将具有所需结合特异性的抗体可变区(抗体-抗原结合部位)融合于免疫球蛋白恒定区序列。所述融合优选与免疫球蛋白重链恒定区融合,所述免疫球蛋白重链恒定区至少包括部分铰链区、CH2区和CH3区部分。优选在至少一种融合物中具有第一个重链恒定区(CH1),其包含轻链结合必需的位点。将编码免疫球蛋白重链融合物和,如果需要的话,免疫球蛋白轻链的DNAs插入到单独的表达载体中,共转染到合适的宿主生物中。这在实施方案中为调整三种多肽片段的相互比例提供了很大的弹性,此时构建体中使用的三种多肽链的不同比率提供了最佳产率。然而,将两种或所有三种多肽链的编码序列插入到一种表达载体中也是可能的,此时至少两种多肽链以相同比率表达导致高的产率,或者此时所述比率没有特定意义。

[0247] 在此方法的优选实施方案中,所述双特异性抗体由具有一个臂中的第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。发现该不对称结构促进所需双特异性化合物从不需要的免疫球蛋白链组合中分离,这样只以双特异性分子的一半存在的免疫球蛋白轻链提供了很便利的分离方法。此方法公开于WO 94/04690。生产双特异性抗体的更多详情参见例如,Suresh et al.,Methods in Enzymology,121:210(1986)。

[0248] 依据美国专利5,731,168中描述的另一种方法,工程化一对抗体分子之间的接触

面(interface),以最大化从重组细胞培养物中回收的异源二聚体的百分比。优选的接触面至少包括抗体恒定区的一部分CH3区。在该方法中,来自第一抗体分子接触面的一个或多个小氨基酸侧链被更大的侧链(例如酪氨酸或色氨酸)所替换。通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换 大的氨基酸侧链,在第二抗体分子的接触面上形成了与大型侧链大小相同或相似的补偿"腔"。这提供了增加异二聚体产率的机制,所述产率超过其它不需要的终产物如同二聚体的产率。

[0249] 双特异性抗体包括交联的或"异源偶联的"抗体。例如,可以将异源偶联物中的抗体之一偶联于抗生物素蛋白,另一个偶联于生物素。已建议用这些抗体将免疫系统细胞引导到不需要的细胞(美国专利4,676,980),用于HIV感染的治疗(WO 91/00360、WO 92/200373、和EP 03089)。可以用任何适当的交联方法制备异源偶联抗体。合适的交联剂是本领域所熟知的,其公开于美国专利4,676,980,还有许多交联技术。

[0250] 文献中也已描述了从抗体片段生产双特异性抗体的技术。例如,可以用化学键制备双特异性抗体。Brennan et al.,Science,229:81(1985)描述了这样的方法,在该方法中通过完整抗体的蛋白水解生产$F(ab')_2$片段。在二巯基化物络合剂亚砷酸钠的存在下还原这些片段,以稳定附近的二巯基并防止分子间二硫化物的形成。然后将所得到的Fab'片段转变为三硝基苯磺酸(TNB)衍生物。然后通过巯基乙胺还原,将其中一种Fab'-TNB衍生物再转变为Fab'-硫醇,并与等摩尔量的另一种Fab'-TNB衍生物混合,形成双特异性抗体。所生产的双特异性抗体可用作酶选择性固定的试剂。

[0251] 最近的发展已经方便了Fab'-SH片段从大肠杆菌的回收,可以化学偶联所述片段以形成双特异性抗体。Shalaby et al.,J.Exp.Med.,175:217-225(1992)描述了完全人源化双特异性抗体$F(ab')_2$分子的生产。将从大肠杆菌分别分泌的每种Fab'片段在体外直接化学偶合,形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达HER2受体的细胞和正常人T细胞,还激发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳腺肿瘤目标的裂解活性。

[0252] 已经描述了多种直接从重组细胞培养物中制备分离双特异性抗体片段的技术。例如,已用亮氨酸拉链生产了双特异性抗体。Kostelny et al.,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992)。通过基因融合将来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽连接于两种不同抗体的Fab'部分。在绞链区还原抗体同二聚体以形成单体,然后再将其氧化,形成抗体异二聚体。该方法还可用于抗体同二聚体的生产。Hollinger et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)描述的"双功能抗体"技术提供了制备双特异性抗体片段的替代机制。所述片段包含通过连接序列连接到轻链可变区(V_L)的重链可变区(V_H),连接序列非 常短,不允许两个结构域在同一条链上配对。因此,迫使一个片段的V_H和V_L结构域与另一片段的互补V_L和V_H结构域配对,由此形成两个抗原结合部位。还报导了利用单链Fv(sFv)二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber et al.,J.Immunol.,152:5368(1994)。

[0253] 可以预期超过二价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tutt et al.J.Immunol.147:60(1991)。

[0254] (vii)其它氨基酸序列修饰

[0255] 可以预期本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能希望改善抗体的结合亲合力和/或其它生物学特性。通过向抗体核酸引入适当的核苷酸改变或通过肽合成制备抗体的氨基酸序列变体。这种修饰包括,例如,从所述抗体的氨基酸序列内删除残基、和/或往抗

体的氨基酸序列内插入残基和/或取代抗体氨基酸序列内的残基。实施删除、插入、和取代的任意组合以得到最终的构建体,以使所述最终构建体拥有所需的特征。氨基酸变化也可能改变抗体的翻译后进程,例如改变糖基化位点的编号或位置。

[0256] 用于鉴定抗体的特定残基或区域的方法称为"丙氨酸-扫描诱变",如Cunningham and Wells Science,244:1081-1085(1989)所述,其中所述的特定残基或区域为优选的诱变部位。此处,鉴定了残基或目标残基组(例如,带电荷的残基如arg、asp、his、lys、和glu)并用中性的或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)取代,以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在所述取代位点或者为所述取代位点引入更多的或其它的变体,而优化那些对取代显示出功能敏感性的氨基酸位置。这样,当用于引入氨基酸序列变异的位点预先确定时,突变本身的性质就不必预先确定了。例如,为了分析给定位点突变的性能,在目标密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机诱变,根据所需活性筛选所表达的抗体变体。

[0257] 氨基酸序列插入包括从一个残基到包含一百个或更多残基的多肽的氨基和/或羧基末端的融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N-末端蛋氨酰残基的抗体或融合于细胞毒性多肽的抗体。所述抗体分子的其它插入变体包括抗体的N-或C-末端融合于酶(例如对于ADEPT)或多肽,所述酶或多肽提高所述抗体的血清半衰期。

[0258] 另一种类型的变体是氨基酸取代变体。这些变体在抗体分子中至少有一个氨基酸残基被不同的残基所取代。最感兴趣的取代诱变部位包括高变区, 但也可预期FR改变。标题为"优选的取代"的表1中显示了保守性取代。如果这些取代导致生物学活性的改变,那么可以引入表1中命名为"示例性取代"或依照下述的关于氨基酸类别的更多实质性改变,并筛选产物。

[0259] 表1

[0260]

原来的残基	示例性取代	优选的取代
Ala(A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg(R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn(N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp(D)	Glu;Asn	Glu
Cys(C)	Ser;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn;Glu	Asn
Glu(E)	Asp;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile(I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys(K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met(M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe(F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala

Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val;Ser	Ser
Trp(W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val(V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸	Leu

[0261] 抗体生物学特性的实质性修饰通过选择取代来实现，所述选择取代对维持(a)取代区域中多肽骨架的结构，例如片层或螺旋构象，(b)分子目标部位 的电荷或疏水性，或(c)侧链的大小的影响方面差异显著。可以根据氨基酸的侧链特性的相似性对氨基酸分组(A.L.Lehninger,Biochemistry，第2版，pp.73-75,Worth Publishers,New York(1975)中)：

[0262] (1)非极性的：Ala(A)，Val(V)，Leu(L)，Ile(I)，Pro(P)，Phe(F)，Trp(W)，Met(M)

[0263] (2)不带电的极性的：Gly(G)，Ser(S)，Thr(T)，Cys(C)，Tyr(Y)，Asn(N)，Gln(Q)

[0264] (3)酸性的：Asp(D)，Glu(E)

[0265] (4)碱性的：Lys(K)，Arg(R)，His(H)

[0266] 或者，可以基于常见侧链特性将天然发生的残基分为以下的组：

[0267] (1)疏水性的：正亮氨酸，Met，Ala，Val，Leu，Ile；

[0268] (2)中性亲水性的：Cys，Ser，Thr，Asn，Gln；

[0269] (3)酸性的：Asp，Glu；

[0270] (4)碱性的：His，Lys，Arg；

[0271] (5)影响链方向的残基：Gly，Pro；

[0272] (6)芳香族的：Trp，Tyr，Phe。

[0273] 非保守性取代需要用这些类别中其中一类的成员交换另一类中的成员。

[0274] 通常也可以用丝氨酸取代不涉及维持抗体的正确构象的任何半胱氨酸残基，以改善分子的氧化稳定性并阻止异常交联。反之，可以将半胱氨酸键加至抗体以改善其稳定性(特别是抗体为抗体片段如Fv片段时)。

[0275] 特别优选的取代变体类型涉及取代亲本抗体(例如人源化的或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步开发的所得变体相对于生产所述变体的亲本抗体而言会具有改善的生物学特性。用于生产这些取代变体的适当路线涉及利用噬菌体展示的亲合力成熟。简单地说，突变几个高变区位点(例如6-7个位点)，在每个位点产生所有可能的氨基酸取代。如此产生的抗体变体作为融合物以单价形式从丝状噬菌体颗粒展示，所述融合物融合于包装在每个颗粒内部的M13的基因III产物。然后如本文所述筛选噬菌体展示变体的生物学活性(例如结合亲合力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点，可以进行丙氨酸扫描诱变，以鉴定明显促进抗原结合的高变区残基。或者，或除此之外，分析抗原抗体复合体的晶体结构以鉴定抗体与人HER2 之间的接触点可能是有益的。根据本文详细描述的技术，这些接触的残基和邻近的残基是用于取代的候选残基。一旦制备了这样的变体，则如本文所述筛选这一系列变体，可以选择在一种或多种相关测试中具有优越特性的抗体用于进一步的开发。

[0276] 抗体的另一类型的氨基酸变体改变抗体原来的糖基化样式。改变意思是删除抗体中发现的一个或多个碳水化合物部分，和/或添加一个或多个抗体中不存在的糖基化位点。

[0277] 抗体的糖基化典型地为N-连接的或O-连接的。N-连接指碳水化合物部分附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是碳水化合物部分向天冬酰胺侧链酶学附着的识别序列，其中X为除脯氨酸之外的任何氨基酸。因此，多肽中任何一个这种三肽序列的存在都形成潜在的糖基化位点。O-连接糖基化指N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、或木糖中的其中一种附着于羟基氨基酸，最常见的是丝氨酸或苏氨酸，尽管也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。

[0278] 通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述的三肽序列(对于N-连接糖基化位点)而方便地完成向抗体添加糖基化位点。也可以通过向原抗体的序列添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或者用一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基取代而获得所述改变(对于O-连接糖基化位点)。

[0279] 抗体包含Fc区时，可以改变附着于其上的碳水化合物。例如，美国专利申请US 2003/0157108A1，Presta，L.描述了具有成熟碳水化合物结构的抗体，所述碳水化合物结构缺乏附着于抗体Fc区的岩藻糖。也可参见US2004/0093621A1(Kyowa Hakko Kogyo Co.Ltd)。在附着于抗体Fc区的碳水化合物中具有二等分(bisecting)N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)的抗体参见WO03/011878，Jean-Mairet et al.和美国专利6,602,684，Umana et al。在附着于抗体Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体报导于WO97/30087，Patel et al。还可参见WO98/58964(Raju，S.)和WO99/22764(Raju，S.)，这些文献涉及具有附着于其Fc区的改变的碳水化合物的抗体。

[0280] 可能希望改变本发明所述抗体的效应器功能，例如以增强抗体的抗原依赖的细胞介导的细胞毒(ADCC)和/或补体依赖的细胞毒(CDC)。这可以通过在所述抗体的Fc区引入一个或多个氨基酸取代来实现。或者或除此之外，可以将半胱氨酸残基引入Fc区，从而允许在该区域形成链间二硫键。如此 制备的同二聚体抗体可能具有改善的内在化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖的细胞毒作用(ADCC)。参见Caron et al.，J.Exp Med.176:1191-1195(1992)和Shopes，B.J.Immunol.148:2918-2922(1992)。也可以如Wolff et al.Cancer Research 53:2560-2565(1993)所述用异双功能交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体。或者，可以工程化抗体使之具有双Fc区，并可能由此具有增强的补体裂解和ADCC能力。参见Stevenson et al.Anti-CancerDrugDesign 3:219-230(1989)。

[0281] WO00/42072(Presta，L.)描述了在人效应细胞存在下具有改善的ADCC功能的抗体，其中所述抗体在其Fc区包含氨基酸取代。优选具有改善的ADCC的抗体在Fc区的位点298、333、和/或334包含取代。优选改变的Fc区是人IgG1Fc区，其在一个、两个或三个这些位点包含取代，或由这些取代组成。

[0282] 具有改变的C1q结合和/或补体依赖的细胞毒(CDC)的抗体描述于WO99/51642、美国专利6,194,551B1、美国专利6,242,195B1、美国专利6,528,624B1和美国专利6,538,124(Idusogie et al.)。所述抗体在其Fc区位点270、322、326、327、329、313、333和/或334的一个或多个氨基酸位点包含氨基酸取代。

[0283] 为了增加抗体的血清半衰期，例如可以如美国专利5,739,277所述将补救受体结合表位掺入到抗体(尤其是抗体片段)中。此处所用术语"补救受体结合表位"指IgG分子(例如，IgG_1、IgG_2、IgG_3、或IgG_4)Fc区的表位，其负责增加IgG分子的体内血清半衰期。

[0284] 具有改善的对新生儿Fc受体(FcRn)的结合、和增加的半衰期的抗体描述于WO00/

42072(Presta,L.)。这些抗体包含在其中具有一个或多个取代的Fc区域,所述取代改善Fc区与FcRn的结合。例如Fc区在位点238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434的一个或多个处可以具有取代。优选的具有改善的FcRn结合的包含Fc区的抗体变体在其Fc区的位点307、380和434中的一个、两个或三个位点包含氨基酸取代。

[0285] 还预期具有三个或更多(优选四个)功能性抗原结合位点的工程化抗体(US申请US2002/0004587A1,Miller et al.)。

[0286] 编码抗体氨基酸序列变体的核酸分子通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然发生的氨基酸序列变体的情况下)或者通过寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变、以及早先制备的变体或抗体的非变异型式的盒式诱变。

[0287] (viii)筛选具有所需特性的抗体

[0288] 以上已经描述了生产抗体的技术。需要的话,可以进一步选择具有特定生物学特性的抗体。

[0289] 为了鉴定阻断HER受体的配体活化的抗体,可以测定抗体阻断HER配体结合表达HER受体的细胞的能力(例如与另一种HER受体连接,感兴趣的HER受体与所述另一种HER受体形成HER异源寡聚体)。例如,可以与所述抗体一起孵育天然表达、或经转染而表达HER异源寡聚体的HER受体的细胞并暴露于标记的HER配体。然后可以评估所述抗体阻断配体结合HER异源寡聚体中的HER受体的能力。

[0290] 例如,可以基本上如WO01/00245中所述,利用24-孔平板阵列中冰上单层细胞MCF7培养物实施HER2抗体对HRG结合MCF7乳腺肿瘤细胞系的抑制。HER2单克隆抗体可以添加到每个小孔并保温30分钟。然后可以添加^{125}I-标记的rHRGβ$1_{177-224}$(25pm),孵育可以持续4至16小时。可以制定剂量反应曲线,并且可以计算感兴趣抗体的IC_{50}值。在一个实施方案中,该测试中阻断HER受体的配体活化的抗体将有约50nM或更少,更优选10nM或更少的抑制HRG结合MCF7细胞的IC_{50}。所述抗体是抗体片段如Fab片段时,该测试中抑制HRG结合MCF7细胞的IC_{50}可以例如是约100nM或更少,更优选50nM或更少。

[0291] 或者,或除此之外,可以评估抗体阻断HER受体的HER配体刺激的酪氨酸磷酸化的能力,所述HER受体存在于HER异源寡聚体中。例如,内在地表达HER受体或者经转染而表达它们的细胞可以与所述抗体一起孵育,然后利用抗磷酸化酪氨酸单克隆(其任选与可探测的标记偶联)测试HER配体依赖的酪氨酸磷酸化活性。美国专利5,766,863中描述的激酶受体活化测试也可用于测定HER受体活化和抗体对所述活性的阻断。

[0292] 在一个实施方案中,可以基本上如WO01/00245中所述筛选MCF7细胞中抑制HRG刺激p180酪氨酸磷酸化的抗体。例如,MCF7细胞可以在24孔平板中划平板,可以将HER2的单克隆抗体添加到每个小孔并在室温保温 30分钟;可以将rHRGβ$1_{177-244}$添加到每个小孔至0.2nM终浓度,可以继续保温8分钟。培养基可以从每个小孔吸出,可以通过添加100μl SDS样品缓冲液(5%SDS、25mM DTT、和25mM Tris-HCl,pH 6.8)来终止反应。每个样品(25μl)可以在4-12%梯度凝胶(Novex)上电泳,然后电泳转移到聚偏氟乙烯膜。可以使抗磷酸化酪氨酸(于1μg/ml)免疫印迹显影,可以通过反射率光密度法定量M_r-180,000的主要反应条带的强度。优选在该测试中所选择的抗体会明显抑制HRG刺激p180酪氨酸磷酸化至对照的约0-35%。可以制定抑制HRG刺激p180酪氨酸磷酸化的剂量反应曲线,所述抑制通过反射率光密

度法测得，还可以计算感兴趣抗体的IC_{50}。在一个实施方案中，该测试中阻断HER受体的配体活化的抗体将有约50nM或更少、更优选10nM或更少的抑制HRG刺激p180酪氨酸磷酸化的IC_{50}。所述抗体是抗体片段如Fab片段时，该测试中抑制HRG刺激p180酪氨酸磷酸化的IC_{50}可以例如是约100nM或更少，更优选50nM或更少。

[0293] 也可以例如基本上如Schaefer et al.Oncogene 15:1385-1394(1997)中所述评估所述抗体对MDA-MB-175细胞的生长抑制性效应。根据该测试，MDA-MB-175细胞可以用HER2单克隆抗体(10μg/mL)处理4天并用龙胆紫染色。与HER2抗体一起孵育可能显示类似于由单克隆抗体2C4所获得的对该细胞系的生长抑制性效应。在另一实施方案中，外源的HRG不会明显逆转此抑制。优选存在和不存在外源HRG时所述抗体都将能够比单克隆抗体4D5更大程度地抑制MDA-MB-175细胞的细胞增殖(并任选比单克隆抗体7F3更大程度地抑制)。

[0294] 在一个实施方案中，在例如WO01/00245中所述的共免疫沉淀试验中测定时，感兴趣的HER2抗体可以基本上比单克隆抗体4D5更有效地阻断MCF7和SK-BR-3细胞中调蛋白依赖的HER2与HER3结合，优选基本上比单克隆抗体7F3更有效。

[0295] 为了鉴定生长抑制性HER2抗体，可以筛选抑制过表达HER2的癌细胞生长的抗体。在一个实施方案中，在约0.5至30μg/ml的抗体浓度，所选择的生长抑制性抗体能够抑制细胞培养物中约20-100％的SK-BR-3细胞生长，优选抑制约50-100％。为了鉴定这些抗体，可以实施美国专利5,677,171中所述的SK-BR-3测试。根据该测试，SK-BR-3细胞培养于F12和DMEM培养基的1:1混合物中，其中添加有10％胎牛血清、谷氨酰胺和青霉素链霉素。以20,000个细胞将SK-BR-3细胞在35mm细胞培养皿(2mls/35mm培养皿)中划平板。每个培养皿添加0.5至30μg/ml的HER2抗体。六天后，用电子COULTER™细胞计数器统计与未处理细胞相比较的细胞数目。约20-100％或约50-100％抑制细胞生长的那些抗体可以选择为生长抑制性抗体。参见美国专利5,677,171中有关筛选生长抑制性抗体如4D5和3E8的测试。

[0296] 为了选择诱导凋亡的抗体，可以使用利用BT474细胞的膜联蛋白结合测试。如前面段落讨论的那样，将BT474细胞培养并接种在培养皿中。然后去除培养基并单独用新鲜培养基或含10μg/ml所述单克隆抗体的培养基更换。三天的保温期之后，用PBS冲洗单层，并通过胰酶消化解离。然后离心细胞，重悬于Ca^{2+}结合缓冲液中，并等分到上述试管中用于细胞死亡测试。然后试管中加入标记的膜联蛋白(例如膜联蛋白V-FITC)(1μg/ml)。样品可以用FACSCAN™流式细胞仪和FACSCONVERT™ CellQuest软件(Becton Dickinson)分析。相对于对照而言，诱导统计学上显著的膜联蛋白结合水平的那些抗体选择为凋亡诱导抗体。除了膜联蛋白结合测试之外，也可以使用利用BT474细胞的DNA染色测试。为了实施该测试，将已经用前两段所述的感兴趣抗体处理过的BT474细胞与9μg/ml HOECHST 33342™一起37℃孵育2hr，然后利用MODFIT LT™软件(Verity Software House)在EPICS ELITE™流式细胞仪(Coulter Corporation)上分析。可以利用该测试将诱导凋亡细胞百分数变化的抗体选择为促凋亡(pro-apoptotic)抗体，所述百分数是未经处理的细胞的2倍或更大(优选3倍或更大)(直至100％凋亡细胞)。参见WO98/17797有关筛选诱导凋亡的抗体如7C2和7F3的测试。

[0297] 为了筛选结合HER2上的表位的抗体(其中所述HER2由感兴趣的抗体所结合)，可以实施如Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow and David Lane(1988)中所述的常规交叉阻断测试，以评估所述抗体是否交叉阻断抗体如2C4或pertuzumab与HER2的结合。或者，或除此之外，可以用本领域已知的方法进行表位制

图和/或可以研究抗体-HER2结构(Franklin et al.Cancer Cell 5:317-328(2004))看HER2的哪个(些)结构域被所述抗体结合。

[0298] (ix)Pertuzumab组合物

[0299] 在HER2抗体组合物的一个实施方案中，所述组合物包含主要类别pertuzumab抗体(main species pertuzumab antibody)与其一种或多种变体的混 合物。此处pertuzumab主要类别抗体的优选实施方案是包含SEQ ID Nos.3和4中的可变轻链和可变重链氨基酸序列的抗体，最优选包含选自SEQ ID No.13和17的轻链氨基酸序列，和选自SEQ ID No.14和18的重链氨基酸序列(包括那些序列的脱酰胺和/或氧化变体)。在一个实施方案中，所述组合物包含主要类别pertuzumab抗体及其包含氨基末端前导序列延伸(amino-terminal leader extension)的氨基酸序列变体的混合物。优选所述氨基末端前导序列延伸在抗体变体的轻链上(例如在所述抗体变体的一个或两个轻链上)。所述主要类别HER2抗体或抗体变体可以是全长抗体或抗体片段(例如Fab或$F(ab')_2$片段)，但优选两者都是全长抗体。本文中抗体变体在其任何一个或多个重链或轻链上可以包含氨基末端前导序列延伸。优选所述氨基末端前导序列延伸在所述抗体的一个或两个轻链上。优选所述氨基末端前导序列延伸包含或由VHS-组成。可以通过多种分析技术包括但不限于N-末端序列分析、电荷异质性测试(例如，阳离子交换层析或毛细管区带电泳)、质谱分析等等检测组合物中氨基末端前导序列延伸的存在。组合物中抗体变体的量通常从构成用于检测所述变体的任何测试方法(优选N-末端序列分析)的检测极限的量到少于主要类别抗体的量。通常，组合物中约20％或更少(例如从约1％至约15％，如从5％到约15％)的抗体分子包含氨基末端前导序列延伸。这种百分比量优选利用定量N-末端序列分析或阳离子交换分析(优选使用高分辨率的、弱阳离子交换柱，如PROPAC WCX-10™阳离子交换柱)测定。除了氨基末端前导序列延伸变体之外，可以预期更多的主要类别抗体和/或变体的氨基酸序列变化，包括但不限于在其一个或两个重链上包含C-末端赖氨酸残基的抗体、脱酰胺抗体变体等等。

[0300] 另外，所述主要类别抗体或变体可以进一步包含糖基化变异，其非限制性例子包括包含附着于其Fc区的G1或G2寡糖结构的抗体、包含附着于其轻链的碳水化合物部分的抗体(例如一个或两个碳水化合物部分，如葡萄糖或半乳糖，附着于所述抗体的一个或两个轻链，例如附着于一个或多个赖氨酸残基)、包含一个或两个非-糖基化重链的抗体、或者包含附着于其一个或两个重链的唾液酸化寡糖的抗体等等。

[0301] 所述组合物可以从遗传工程化细胞系，例如表达HER2抗体的中华仓鼠卵巢(CHO)细胞系回收，或者可以通过肽合成制备。

[0302] (x)免疫偶联物

[0303] 本发明还涉及包含偶联于细胞毒剂如化疗剂、毒素(例如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶学活性毒素，包括其片段和/或变体)、或放射性同位素(即放射性偶联物)的抗体的免疫偶联物。

[0304] 以上已经描述了用于生产这种免疫偶联物的化疗剂。本文还可以预期抗体与一种或多种小分子毒素，如加利车霉素(calicheamicin)、美登素(maytansine)(美国专利5,208,020)、单端孢霉烯(trichothecene)、和CC1065的偶联物。

[0305] 在本发明的一个优选实施方案中，抗体偶联于一个或多个美登素分子(例如每个抗体分子约1至约10个美登素分子)。例如可以将美登素转变为May-SS-Me，其可以还原为

May-SH3并与修饰的抗体反应(Chari et al.Cancer Research 52:127-131(1992))产生美登素类-抗体免疫偶联物。
[0306] 另一种感兴趣的免疫偶联物包含偶联于一个或多个加利车霉素分子的抗体。抗生素的加利车霉素家族能够在亚皮摩尔浓度产生双链DNA断裂物。可以使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于γ_1^I,α_2^I,α_3^I,N-乙酰-γ_1^I,PSAG和θ^I_1(Hinman et al.Cancer Research 53:3336-3342(1993)和Lode et al.Cancer Research 58:2925-2928(1998))。也可参见美国专利5,714,586;5,712,374;5,264,586;和5,773,001,这些特别加入本文作为参考。
[0307] 可以使用的酶学活性毒素及其片段包括白喉A链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素A链(来自铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa))、蓖麻毒素A链、相思豆毒素A链、蒴莲素(Modeccin)A链、α-sarcin、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹素蛋白(dianthin)、美国商陆(Phytolaca americana)蛋白(PAPI、PAPII、和PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、麻疯树毒素(curcin)、巴豆毒素(crotin)、sapaonaria officinalis抑制剂、凝胶素(gelonin)、mitogellin、局限曲菌素(restrictocin)、酚霉素(phenomycin)、伊诺霉素(enomycin)和单端孢菌素类(trichothecenes)。参见,例如,出版于1993年10月28日的WO93/21232。
[0308] 本发明还预期抗体与具有核酸酶活性的化合物(例如核糖核酸酶或DNA核酸内切酶如脱氧核糖核酸酶;DNase)之间形成的免疫偶联物。
[0309] 可获得多种放射性同位素用于放射性偶联抗体的生产。例子包括At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}和Lu的放射性同位素。
[0310] 可以用多种双功能蛋白偶联剂制备抗体和细胞毒性试剂的偶联物,所述偶联剂为例如N-琥珀酰亚胺-3-(2-吡啶二巯基)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基噻吩(iminothiolane,IT)、亚氨酸酯(imidoester)的双功能衍生物(如盐酸已二酰亚氨酸二甲酯(dimethyl adipimidate HCL))、活性酯(如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛(如戊二醛(glutareldehyde))、二叠氮化合物(如二(对叠氮苯甲酰)已二胺)、二重氮衍生物(如二-(对-重氮苯甲酰)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,可以如Vitetta et al.Science238:1098(1987)所述制备蓖麻毒素免疫毒素。碳14标记的1-异氰酸苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸偶联到抗体的示例性螯合剂。参见WO94/11026。连接子可以是促进细胞中细胞毒性药物释放的"可裂解连接序列"。例如,可以使用酸不稳定性连接子、肽酶敏感的连接子、二甲基连接子或含二硫化物的连接子(Chari et al.Cancer Research 52:127-131(1992))。
[0311] 或者,可以通过重组技术或肽合成制备包含抗体和细胞毒性试剂的融合蛋白。
[0312] 本文预期其它的免疫偶联物。例如,所述抗体可以连接到多种非蛋白质类多聚体的其中一种,例如,聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯、或聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物。例如,也可以通过凝聚技术或界面聚合将抗体包装于所制备的微胶囊中(例如分别为羟甲基纤维素或白明胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊),包装于胶状药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或者包装于常规乳液中。这些技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Oslo,A.编,(1980)。

[0313] 本文公开的抗体也可配制为免疫脂质体。通过本领域已知的方法制备含抗体的脂质体，例如Epstein et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688(1985);Hwang et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4030(1980);美国专利4,485,045和4,544,545;以及公开于1997年10月23日的W097/38731中所述。美国专利5,013,556公开了循环时间增加的脂质体。

[0314] 特别有用的脂质体可以用脂质组合物通过反相蒸发法生产，所述脂质组合物包含磷脂酰胆碱、胆固醇、和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)。通过孔径确定的滤器挤出脂质体，产生具有所需直径的脂质体。可以通过二硫 化物交换反应如Martin et al.J.Biol.Chem.257:286-288(1982)所述将本发明抗体的Fab′片段偶联于脂质体。任选脂质体内包含化疗剂。参见Gabizon et al.J.National Cancer Inst.81(19):1484(1989)。

[0315] III.选择用于治疗的病人

[0316] 本文中所述病人任选在治疗前已经过诊断测试。例如，所述诊断测试可以评估HER(例如HER2或EGFR)表达(包括过表达)、扩增、和/或活化(包括磷酸化或二聚化)。

[0317] 通常，如果进行诊断测试，则可以从需要治疗的病人获得样品。患者患有癌症时，所述样品通常为肿瘤样品。在优选的实施方案中，所述肿瘤样品来自卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、转移性乳腺癌(MBC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、前列腺癌、或结肠直肠癌肿瘤样品。

[0318] 然而应当指出本文中描述了多种HER抗体的其它非-恶性治疗学病症。要治疗病人的那些非-恶性病症时，合适的样品可以从所述病人获得并对其进行本文所述的诊断测试。

[0319] 本文中生物样品可以是固定的样品，例如福尔马林固定的、石蜡包埋的(FFPE)样品，或冷冻的样品。

[0320] 根据本文中本发明的一个实施方案，选择用于治疗的病人具有显示HER(并优选HER2)活化的肿瘤。在一个实施方案中，癌细胞中HER(或HER2)活化的程度明显超过相同组织类型的非-癌细胞中所述受体的活化水平。这种过度活化可能由HER受体的过表达和/或大于正常水平的可用于激活癌细胞中的HER受体的HER配体所引起。这种过度活化可能引发和/或起因于癌细胞的恶性状态。在一些实施方案中，将对所述癌症实施诊断或预后测试以确定HER受体的扩增和/或过表达是否正在发生，所述HER受体的扩增和/或过表达导致HER受体的这种过度活化。或者，或除此之外，可以对所述癌症实施诊断或预后测试以确定癌症中HER配体的扩增和/或过表达是否正在发生，所述癌症归因于所述受体的过度活化。在这种癌症亚组中，所述受体的过度活化可能由自分泌刺激途径所引起。以下将更为详细地描述用于测定HER活化的多种测试方法。

[0321] (i)HER二聚体

[0322] 可以评估肿瘤样品中HER二聚体的存在，其指示HER或HER2活化。本领域已知的任何方法均可用于检测肿瘤中的HER2二聚体，如 EGFR-HER2、HER2-HER3。几种优选的方法描述如下。这些方法检测非共价蛋白质-蛋白质相互作用或者反过来显示感兴趣的蛋白质之间的靠近(proximity)。

[0323] 基于免疫亲合的方法如免疫沉淀或ELISA可用于检测HER二聚体。在一个实施方案中，HER2抗体用于从肿瘤细胞免疫沉淀包含HER2的复合体，然后探测所得免疫沉淀以通过免疫印迹检测EGFR或HER3的存在。在另一个实施方案中，EGFR或HER3抗体能够用于免疫沉淀步骤，然后用HER2抗体检测所述免疫沉淀。在又一实施方案中，特异于EGFR、HER3、EGFR/HER2复合体或HER2/HER3复合体的HER配体可用于沉淀复合体，然后检测所述复合体以探测

HER2的存在。例如,可以将配体偶联于抗生物素蛋白(avidin)和在生物素柱上纯化复合体。

[0324] 在其它实施方案中,如ELISA或抗体“三明治”型测试,HER2的抗体被固定在固相支持物上,用肿瘤细胞或肿瘤细胞溶解产物接触,冲洗,然后暴露于抗EGFR或HER3的抗体。后一种抗体的结合显示异二聚体的存在,可以直接或通过偶联于可探测标记的二抗检测所述后一种抗体的结合。在特定实施方案中,EGFR或HER3抗体被固定,HER2抗体用于检测步骤。在其它实施方案中,HER配体可用于取代HER抗体,或者与HER抗体组合使用。

[0325] 化学或UV交联也可用于共价连接活细胞表面上的二聚体。Hunter et al.,Biochem.J.,320:847-53。化学交联剂的例子包括二硫双(琥珀酰亚胺)丙酸酯(盐)(dithiobis(succinimidyl)propionate)(DSP)和3,3二硫双(硫代琥珀酰亚胺)丙酸酯(盐)(3,3-dithiobis(sulphosuccinimidyl)propionate,DTSSP)。在一个实施方案中,通过SDS-PAGE和用EGFR和/或HER3的抗体进行免疫印迹来分析来自化学交联的肿瘤细胞的细胞提取物。合适分子量的超迁移(supershifted)条带最可能代表EGFR-HER2或HER2-HER3二聚体,因为HER2是EGFR和HER3的优选二聚化伴侣。随后可以通过用HER2抗体进行免疫印迹来确认该结果。

[0326] 荧光共振能量转移(resonance energy transfer,FRET)也可用于检测EGFR-HER2或HER2-HER3二聚体。FRET基于能量从供体荧光团(fluorophore)向受体荧光团的转移而检测体内和体外蛋白质构象变化和蛋白质-蛋白质相互作用。Selvin,Nat.Struct.Biol.7:730-34(2000)。能量转移只有当供体荧光团与受体荧光团足够靠近时才发生。在典型的FRET试验中,两 个蛋白质或单个蛋白质上的两个部位用不同的荧光探针标记。其中一个探针,供体探针,被特定波长的入射光激发至较高能态。然后供体探针将其能量传递到第二个探针,受体探针,导致供体的荧光强度减弱,受体的荧光辐射增强。为了测量能量转移的程度,将用供体和受体探针标记的样品中的供体强度与其只用供体探针标记的样品中的强度相比较。任选在供体/受体和只在受体样品中比较受体强度。合适的探针是本领域已知的,包括例如膜渗透性染料,如荧光素和罗丹明(rhodamine)、有机染料,如花菁类(Cyanine)染料、和镧族元素原子。Selvin,同上。检测和测量能量转移的方法和装置也是本领域已知的。Selvin,同上。

[0327] 适于在个体细胞中检测和测量蛋白质-蛋白质相互作用的基于FRET的技术也是本领域已知的。例如,供体光漂白荧光共振能量转移(donor photobleaching fluorescence resonance energy transfer,pbFRET)显微术和荧光寿命成像显微术(fluorescence lifetime imaging microscopy,FLIM)可用于检测细胞表面受体的二聚化。Selvin,同上;Gadella & Jovin,J.Cell Biol.,129:1543-58(1995)。在一个实施方案中,“在悬浮液中”或“原位”在细胞上使用pbFRET以检测和测量EGFR-HER2或HER2-HER3二聚体的形成,其描述于Nagy et al.,Cytometry,32:120-131(1998)。这些技术测量由于能量转移的供体荧光寿命的减小。在特定实施方案中,流式细胞计数Foerster-type FRET技术(FCET)可用于研究EGFR-HER2和HER2-HER3二聚化,其描述于Nagyet al.,同上,和Brockhoff et al.,Cytometry,44:338-48(2001)。

[0328] FRET优选与标准免疫组化标记技术一起使用。Kenworthy,Methods,24:289-96(2001)。例如,偶联于合适的荧光染料的抗体可用作探针以标记两种不同的蛋白质。如果蛋白质彼此靠近,那么荧光染料充当FRET的供体和受体。通过标准手段检测能量转移。可以通

过流式细胞计数手段或者通过数字显微系统，如共焦显微术(confocal microscopy)或偶联于电荷耦合器件(CCD)照相机的广域荧光显微术(wide-field fluorescence microscope)探测能量转移。
[0329] 在本发明的一个实施方案中，HER2抗体和EGFR或HER3抗体直接用两种不同的荧光团标记，例如Nagy等，同上所述。肿瘤细胞或肿瘤细胞溶解产物与差异标记抗体接触，所述差别标记抗体在EGFR-HER2或HER2-HER3二聚体存在下充当FRET的供体和受体。或者，HER2和EGFR 或HER3的未标记的抗体与用作供体和受体的差别标记的第二抗体一起使用。参见，例如，Brockhoff等，同上。探测能量转移并且如果发现标记非常靠近则确定二聚体的存在。
[0330] 在其它实施方案中，特异于HER2和HER1或HER3的HER受体配体是荧光标记的并且用于FRET研究。
[0331] 在本发明的其它实施方案中，利用标准直接或间接免疫荧光技术和共焦激光扫描显微术通过HER2与EGFR或HER3的共定位显示肿瘤细胞表面上二聚体的存在。或者，使用激光扫描成像(LSI)检测高通量阵列如微孔平板中的抗体结合和HER2与EGFR或HER3的共定位，如Zuck et al，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，96:11122-27(1999)中所述。
[0332] 在更多实施方案中，通过鉴定依赖于二聚体组件靠近的酶活性测定EGFR-HER2和/或HER2-HER3二聚体的存在。HER2抗体与一种酶偶联，EGFR或HER3抗体与第二酶偶联。添加第一酶的第一底物，反应产生第二酶的第二底物。这引发与另一种分子的反应，产生可探测的化合物如染料。另一种化学品的存在分解第二底物，这样，与第二酶的反应被阻止，除非第一和第二酶以及由此两种抗体非常靠近。在特定实施方案中，肿瘤细胞或细胞溶解产物与同葡萄糖氧化酶偶联的HER2抗体以及同辣根过氧化物酶偶联的HER3或HER1抗体接触。葡萄糖与染料前体如DAB、和催化酶一起加到反应中。当DAB染色时颜色的显现确定二聚体的存在。
[0333] 也可以用基于eTag™测试系统(Aclara Bio Sciences，Mountain View，CA)的方法检测二聚体，例如，公开于2001年12月6日的美国专利申请2001/0049105中所述，两者均特别整体加入作为参考。eTag™、或“电泳标签”包含可探测的报道分子部分，如荧光类的。它也可以包含“移动性修饰剂(mobility modifier)”，其基本上由具有独特电泳迁移率的部分组成。这些部分允许在确定的电泳条件如毛细管电泳(CE)条件下从复合混合物分离和检测eTag™。含有报道分子部分的eTag™的一部分以及任选所述移动性修饰剂通过可裂解的连接基团连接到第一目标结合部分，产生第一结合化合物。第一目标结合部分特异性地识别特定的第一目标，如核酸或蛋白质。第一目标结合部分没有任何方式的限制，可以是例如多核苷酸或多肽。优选第一目标结合部分是抗体或抗体片段。或者，第一目标结合部分可以是HER受体配体或其能结合的片段。
[0334] 所述连接基团优选包含可裂解部分，如酶底物，或者包含可以在限定的条件下被裂解的任何化学键。第一目标结合部分结合到其目标时，裂解剂被引入和/或激活，并且连接基团被裂解，因此释放含有报道分子部分和移动性修饰剂的eTag™的一部分。因此，“游离”eTag™的存在显示目标结合部分结合到其目标。
[0335] 优选第二结合化合物包含裂解剂和特异性识别第二目标的第二目标结合部分。第二目标结合部分也没有任何方式的限制，可以是例如抗体或抗体片段或者HER受体配体或能结合的配体片段(binding competent ligand fragment)。如果第一结合化合物和第二

结合化合物非常靠近，所述裂解剂则是只会裂解第一结合化合物中的连接基团的试剂。

[0336] 在本发明的实施方案中，第一结合化合物包含eTag™，其中HER2的抗体作为第一目标结合部分。第二结合化合物包含连接到能够裂解eTag™的连接基团的裂解剂的EGFR或HER3的抗体。为了能够裂解所述连接基团，优选所述裂解剂必须被激活。肿瘤细胞或肿瘤细胞溶解产物与结合HER2的eTag™接触，与结合细胞表面上的EGFR或HER3的修饰的EGFR或HER3抗体接触。优选去除未结合的结合化合物，如有必要，则激活裂解剂。如果存在EGFR-HER2或HER2-HER3二聚体，由于裂解剂与连接基团的靠近，所述裂解剂将裂解连接基团，释放eTag™。然后可以通过任何本领域已知的方法如毛细管电泳检测游离的eTag™。

[0337] 在一个实施方案中，所述裂解剂是作用于连接基团的可活化的化学品类别。例如，可以通过将样品暴露于光而活化所述裂解剂。

[0338] 在另一个实施方案中，将EGFR或HER3的抗体用作第一目标结合部分来构建eTag™，从HER2的抗体构建第二结合化合物。

[0339] 在又一实施方案中，利用与其对HER二聚体中的任何HER受体的结合相比，特异性或者优先结合所述二聚体的抗体或其它试剂检测HER二聚体。

[0340] (ii)HER2磷酸化

[0341] 在前述部分讨论的与EGFR、HER2、或HER3抗体免疫沉淀之后，可以任选进行二聚体的功能性测试，其为免疫印迹的替代方案或补充。在一个实施方案中，用HER3抗体免疫沉淀后是免疫沉淀中受体酪氨酸激酶活性测试。因为HER3没有固有的酪氨酸激酶活性，所以免疫沉淀中酪氨酸激酶活性的存在显示HER3最可能与HER2相结合。Graus-Porta et al.，EMBO J.，16:1647-55(1997);Klapper et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,96:4995-5000(1999)。可以通过用HER2抗体进行免疫印迹来确认该结果。在另一个实施方案中，用HER2抗体免疫沉淀之后进行EGFR受体酪氨酸激酶活性测试。在该测试中，将免疫沉淀与放射性ATP和肽底物接触，所述肽底物通过EGFR模拟HER2的转磷酸作用(transphosphorylation)的体内部位。肽的磷酸化显示共免疫沉淀以及由此产生的EGFR与HER2的二聚化。受体酪氨酸激酶活性测试是本领域熟知的，包括例如通过磷酸化酪氨酸抗体检测目标底物的磷酸化，和检测相关(cognate)信号转导途径如MAPK途径的活化的测试方法。

[0342] 可以通过一种或多种HER受体如HER2受体的免疫沉淀和Western印迹分析评估HER受体的磷酸化。例如，利用抗磷酸化酪氨酸抗体检测免疫沉淀的HER受体中的磷酸化酪氨酸残基，通过凝胶上磷酸HER2条带的存在确定阳性。抗磷酸化酪氨酸抗体商业上可由PanVera(Madison,WI)，Invitrogen,Chemicon International Inc.的子公司获得。(Temecula，CA)，或者Upstate Biotechnology(Lake Placid,NY)。通过条带的缺失确定阴性。

[0343] 在另一个实施方案中，利用磷酸特异性HER2抗体通过免疫组化评估HER2(HER2)受体的磷酸化(clone PN2A;Thor et al.,J.Clin.Oncol,18(18):3230-3239(2000))。

[0344] 其它检测HER受体磷酸化的方法包括但不限于KIRA ELISA(美国专利5,766,863;5,891,650;5,914,237;6,025,145;和6,287,784)、质谱分析(比较磷酸化和非-磷酸化HER2的大小)、和同时用HER(例如HER2)抗体和磷酸特异性或磷酸酪氨酸特异性抗体(例如，使用可由Aclara BioSciences(Mountain View,CA)获得的eTag™测试试剂盒))的e-tag接近性测试(proximity assay)。本文以上描述了eTag测试的详情。

[0345] 也可以使用细胞阵列中的磷酸特异性抗体检测信号转导蛋白细胞样品中的磷酸

化状态(US2003/0190689)。

[0346] (iii)基因表达谱

[0347] 在一个实施方案中,基因表达分析可以作为直接测量HER磷酸化或活化的替代方案。这在样品为固定样品(例如石蜡包埋的、福尔马林固定肿瘤样品)、HER磷酸化可能难以可靠地定量时尤其有用。依照该方法评估了样品中两种或多种HER受体和一种或多种HER配体的表达,其中两种或多种 HER受体和一种或多种HER配体的表达显示样品中阳性HER磷酸化或活化。在该方法的一个实施方案中,可以测量样品中β细胞调节素和/或双调蛋白的表达,其中β细胞调节素和/或双调蛋白表达显示样品中的阳性HER磷酸化或活化。

[0348] 依照该方法测试来自病人的样品的两种或多种HER受体(优选选自EGFR、HER2、和HER3)和一种或多种HER配体(优选选自β细胞调节素、双调蛋白、上皮调节蛋白(epiregulin)、和TGF-α,最优选β细胞调节素或双调蛋白)的表达。例如,所述两种或多种HER受体可以是EGFR和HER2、或HER2和HER3。优选测定HER2和EGFR或HER3,以及β细胞调节素或双调蛋白的表达。可以单独测试样品中β细胞调节素或双调蛋白的表达,或者与测试两种或多种HER受体的表达组合。所鉴定的基因的阳性表达显示所述病人是用HER抗体如pertuzumab治疗的候选者。另外,所述基因的阳性表达显示所述病人比不具有这种阳性表达的病人更可能对用HER抗体治疗有良好反应。

[0349] 测定mRNA或蛋白质表达的多种方法包括但不限于基因表达谱、聚合酶链式反应(PCR)包括定量实时PCR(qRT-PCR)、微阵列分析、基因表达系列分析(SAGE)、MassARRAY、通过大规模平行测序技术(massively parallel signature sequencing,MPSS)进行的基因表达分析、蛋白质组学(proteomics)、免疫组化(IHC)等等。优选定量mRNA。这种mRNA分析优选利用聚合酶链式反应(PCR)技术或者通过微阵列分析进行。使用PCR时,优选的PCR形式是定量实时PCR(qRT-PCR)。在一个实施方案中,例如如果与相同肿瘤类型样品相比一种或多种上述基因的表达在中值或以上则认为是阳性表达。所述中值表达水平基本上可以与测定基因表达同时测定,或者可以先前已经测定过。

[0350] 测定基因表达的多种示例性方法,将固定的、石蜡包埋的组织用作RNA来源用于制作基因表达谱的代表性方案的步骤,包括mRNA分离、纯化、引物延伸和扩增在许多公开的杂志论文中给出(例如:Godfrey et al.J.Molec.Diagnostics 2:84-91(2000);Specht et al.,Am.J.Pathol.158:419-29(2001))。简单地说,代表性方法从切割约10微克厚度切片的石蜡包埋的肿瘤组织样品开始。然后提取RNA,去除蛋白质和DNA。分析RNA浓度后,如有必要可以包括RNA修复和/或扩增步骤,并利用基因特异性启动子反向转录 RNA,之后进行PCR。最后,以所测试的肿瘤样品中鉴定的特征性基因表达样式为基础分析数据,以确定可用于所述病人的最好的治疗方案。

[0351] (iv)HER表达和扩增

[0352] 为了测定癌症中的HER表达或扩增,可以利用许多诊断/预后测试方法。在一个实施方案中,可以通过IHC分析HER过表达,例如使用 HERCEPTEST®(Dako)。可以对来自肿瘤活组织切片的石蜡包埋的组织切片进行IHC测试,给予如下的HER2蛋白质染色强度标准:

[0353] 分数0:没有观察到染色,或者在少于10%的肿瘤细胞中观察到膜染色。

[0354] 分数1+:在超过10%的肿瘤细胞中检测到模糊的/依稀可辨的膜染色。所述细胞只

有部分膜被染色。

[0355] 分数2+:在超过10%的肿瘤细胞中观察到微弱至中度的完全膜染色。

[0356] 分数3+:在超过10%的肿瘤细胞中观察到中度至强烈的完全膜染色。

[0357] HER2过表达评估分数为0或1+的那些肿瘤可以鉴定为未过表达HER2,而分数为2+或3+的那些肿瘤可以鉴定为过表达HER2。

[0358] 可以用对应于每个细胞表达的HER2分子的拷贝数的免疫组化分数为过表达HER2的肿瘤评定等级,并且可以用生物化学方法测定:

[0359] 0=0-10,000拷贝/细胞,

[0360] 1+=至少约200,000拷贝/细胞,

[0361] 2+=至少约500,000拷贝/细胞,

[0362] 3+=至少约2,000,000拷贝/细胞。

[0363] HER2以3+水平过表达导致酪氨酸激酶不依赖于配体的活化(Hudziak et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:7159-7163(1987)),发生在大约30%的乳腺癌中,并且在这些患者中,无复发存活期(relapse-free survival)和总体存活期(overall survival)减少(Slamon et al.,Science 244:707-712(1989);Slamon et al.,Science,235:177-182(1987))。

[0364] 或者,或除此之外,可以在福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤组织上进行FISH测试如INFORM™(由Ventana,Arizona出售)或PATHVISION™(Vysis,Illinois),以测定肿瘤中HER2扩增的程度(如果有的话)。

[0365] 在一个实施方案中,所述癌症将会是表达(并且可能为过表达)EGFR的癌症,就如上所述的评估HER2表达的方法而论,可以评估这种表达。

[0366] HER受体或HER配体过表达或扩增也可以利用体内诊断测试评估,例 如通过施用带有可探测标记(例如放射性同位素)的、结合要检测的分子的分子(如抗体),并从外部扫描患者以定位所述标记。

[0367] IV.药物制剂

[0368] 通过将具有所需纯度的抗体与可选的药学上可接受载体、赋形剂或稳定剂混合来制备所使用的根据本发明的抗体的治疗学制剂(Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版,Osol,A.编著(1980)),其为冻干制剂或水溶液形式。可接受的载体、赋形剂、或稳定剂在所用剂量和浓度对受者来说是无毒的,其包括缓冲液如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸缓冲液;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(如八癸二甲基苄基氯化铵;氯化六烃季铵;苯扎氯铵、氯化苄甲乙氧铵;苯酚、丁基或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯类如甲基或丙基对羟苯甲酸酯;邻苯二酚;间苯二酚;环已醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、白明胶、或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸;单糖、二糖、和其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;形成盐的反离子如钠;金属复合物(例如锌-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。WO 97/04801中描述了冻干的抗体制剂,此处特别加入作为参考。

[0369] 用于治疗用途的优选的pertuzumab制剂在20mM醋酸组氨酸、120mM蔗糖、0.02%聚

山梨酸酯20,pH 6.0中包含30mg/mL pertuzumab。可选的pertuzumab制剂包含25mg/mL pertuzumab、10mM组氨酸-HCl缓冲液、240mM蔗糖、0.02%聚山梨酸酯20,pH 6.0。

[0370] 本文的制剂也可以包含一种以上的对所治疗的特定病症来说必需的活性化合物,优选彼此具有互补活性而不具有不利影响的活性化合物。在以下治疗方法部分描述了许多可以与HER抗体组合的药物。这样的分子在组合药物中适于以对预定目标有效的量提供。

[0371] 例如,也可以通过团聚技术或界面聚合将活性成分包装于所制备的微胶囊中,例如分别包装于羟甲基纤维素或白明胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中,包装于胶状药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或者包装于常规乳液中。这些技术公开于Remington'sPharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)。

[0372] 可以制备缓释制品。适当的缓释制品的例子包括包含抗体的固态疏水性聚合物半透性基质,其中基质为成形产品形式的,例如薄膜、或微胶囊。缓释基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-丙烯酸甲酯)、或聚乙烯醇、聚交酯(美国专利3,773,919)、L-谷氨酸和γ乙基-L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如LUPRONDEPOT™(由乳酸-羟基乙酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射微球)、以及聚-D-(-)-3-羟丁酸。

[0373] 要用于体内施用的制剂必须是无菌的。这很容易通过除菌滤膜过滤而实现。

[0374] V.HER抗体的治疗和给药方案

[0375] 以上定义部分列举了许多可用固定剂量的HER抗体治疗的癌症的例子。优选的癌症病症包括卵巢癌;腹膜癌;输卵管癌;乳腺癌包括转移性乳腺癌(MBC);肺癌,包括非小细胞肺癌(NSCLC);前列腺癌;结肠直肠癌;和/或显示HER表达、扩增和/或活化的癌症。在一个实施方案中,所治疗的癌症为化疗抗性癌症或铂抗性癌症。施用固定剂量的抗体将导致癌症体征或症状的改善。

[0376] 除了癌症之外,本文中公开的固定剂量的HER抗体还可用于治疗许多非-恶性疾病或紊乱。这些非-恶性疾病或紊乱包括自身免疫疾病(例如银屑病;参见前述定义);子宫内膜异位;硬皮病;再狭窄;息肉如结肠息肉、鼻息肉或胃肠息肉;纤维腺瘤(fibroadenoma);呼吸道疾病(参见前述定义);胆囊炎;神经纤维瘤;多囊肾疾病;炎性疾病;皮肤紊乱,包括银屑病和皮炎;血管病(参见前述定义);涉及血管上皮细胞异常增殖的病症;胃肠溃疡;门内特里埃氏(Menetrier)病,分泌型腺瘤或蛋白质流失综合征(protein loss syndrome);肾紊乱;血管生成紊乱;眼睛疾病如年龄相关黄斑变性、、推测的眼组织胞浆菌病综合征(presumed ocular histoplasmosis syndrome)、来自增殖性糖尿病性视网膜病的视网膜新生血管化、视网膜血管化、糖尿病性视网膜病、或年龄相关的黄斑变性;骨相关病理如骨关节炎、软骨病和骨质疏松症;脑缺血反应事件之后的损伤;纤维化或水肿(edemia)疾病如肝硬化、肺纤维化、肉样瘤病(carcoidosis)、甲状腺炎(throiditis)、系统性超高粘度综合征(hyperviscosity syndrome systemic)、奥斯勒-韦伯-朗迪(Osler-Weber-Rendu)病、慢性闭塞性肺病、或烧伤后的水肿、外伤、辐射、中风、缺氧或局部缺 血;皮肤过敏性反应;糖尿病性视网膜病和糖尿病性肾病;格-巴二氏(Guillain-Barre)综合征;移植物抗宿主疾病或移植排斥;佩吉特氏(Paget)病;骨或关节炎症;光老化(例如人皮肤由紫外射线引发的);良性前列腺肥大;特定微生物感染包括选自腺病毒、汉坦病毒(hantaviruses)、布氏疏螺旋

体(Borrelia burgdorferi)、耶尔森氏菌属(Yersinia spp.)和百日咳博德特氏菌(Bordetella pertussis)的感染;血小板凝集引发的血栓;生殖性病症如子宫内膜异位、卵巢过度刺激综合征(ovarian hyperstimulation syndrome)、子痫前期(preeclampsia)、功能性月经失调、或月经过多;滑膜炎;动脉粥样化;急性和慢性肾病(包括增殖性肾小球肾炎和糖尿病诱导的肾病);湿疹;肥厚性瘢痕形成;内毒素性休克和真菌感染;家族性腺瘤息肉病(familial adenomatosis polyposis);神经退化性疾病(neurodedenerative diseases)(例如阿尔茨海默氏(Alzheimer)病、AIDS相关痴呆、帕金森氏(Parkinson)病、肌萎缩侧索硬化、视网膜色素变性、脊髓性肌萎缩和小脑变性);骨髓增生异常综合征;再生障碍性贫血;缺血性损伤;肺、肾脏或肝脏纤维化;T-细胞介导的超敏反应疾病;婴儿肥厚性幽门狭窄;尿阻塞性综合征;银屑病关节炎;和桥本氏(Hasimoto)甲状腺炎。本文中用于治疗的优选的非-恶性病症包括银屑病、子宫内膜异位、硬皮病、血管病(例如再狭窄、动脉粥样硬化(artherosclerosis)、冠状动脉病、或高血压)、结肠息肉、纤维腺瘤或呼吸道疾病(例如哮喘、慢性支气管炎、支气管扩张或囊肿性纤维化)。

[0377] 依照已知方法,例如静脉推注(bolus)施用或在一定时期连续输注、通过肌肉内、腹膜内、脑脊液内(intracerobrospinal)、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部、或吸入途径为病人施用HER抗体。优选静脉内施用所述抗体。

[0378] 为阻止或治疗疾病,HER抗体的固定剂量将取决于如上定义的要治疗的疾病的类型、疾病的严重程度和病程、施用所述分子是否用于预防或治疗目的、以前的治疗、患者的病史和对所述抗体的反应、以及主治医师的判断。所述固定剂量适于一次或者在一系列治疗中施用于患者。优选所述固定剂量为自大约20mg至大约2000毫克HER抗体。例如,所述固定剂量可以是大约420mg、大约525mg、大约840mg、或大约1050mg HER抗体。

[0379] 施用一系列固定剂量时,可以例如大约每周、大约每2周、大约每3周、或大约每4周施用,但优选大约每3周施用一次。所述固定剂量可以例如持 续施用直到疾病发展、不良后果出现,或者由医师确定的其它时间。例如,可以施用从大约两个、三个、或四个、直至大约17个或更多个固定剂量。

[0380] 在一个实施方案中,施用一个或多个负载剂量的抗体,之后施用一个或多个维持剂量的抗体。在另一个实施方案中,为病人施用大量相同的固定剂量。

[0381] 根据本发明的一个优选实施方案,施用大约840mg固定剂量的HER抗体(例如pertuzumab)(负载剂量),之后施用一个或多个大约420mg剂量(维持剂量)的抗体。所述维持剂量优选大约每3周施用一次,共计施用至少两个剂,直至17个或更多剂。

[0382] 根据本发明的另一个优选实施方案,例如每3周施用一个或多个大约1050mg固定剂量的HER抗体(例如pertzumab)。根据该实施方案,施用一个、两个或多个固定剂量,例如施用直至一年(17个循环),并且需要的话更长时间。

[0383] 在另一个实施方案中,大约1050mg固定剂量的HER2抗体(例如pertuzumab)作为负载剂量施用,之后施用一个或多个大约525mg维持剂量的抗体。根据该实施方案,可以每3周为病人施用大约一个、两个或多个维持剂量。

[0384] 因此,本发明提供治疗病人癌症的方法,包括为所述病人施用至少一个固定剂量的pertuzumab,其中所述固定剂量为大约420mg、大约525mg、大约840mg、或大约1050mg的pertuzumab。

[0385] 所述疾病为癌症时，优选用HER抗体和一种或多种化疗剂的组合治疗病人。优选至少其中一种化疗剂是抗代谢物化疗剂如吉西他滨。组合施用包括共同施用(coadministration)或并行施用(concurrent administration)，其利用分剂(separate formulation)或单个药物制剂(single pharmaceutical formulation)以任何顺序连续施用，其中优选有两种(或所有)活性试剂同时发挥其生物学活性的时期。因此，所述抗代谢物化疗剂可以在施用HER抗体之前、或之后施用。在该实施方案中，至少施用一次抗代谢物化疗剂和至少施用一次HER抗体之间的时间优选大约1个月或更短，最优选大约2周或更短。或者，抗代谢物化疗剂和HER抗体以单剂或分剂同时施用于病人。用化疗剂(例如抗代谢物化疗剂如吉西他滨)和HER抗体(例如pertuzumab)的组合治疗可以对病人产生协同性的、或者大于累加的治疗学益处。

[0386] 为此，如果施用抗代谢物化疗剂的话，通常以已知剂量施用，或者由于药物的联合作用或可归因于施用抗代谢物化疗剂的不良副作用而任选降低剂量。这种化疗剂的制剂和给药方案可以依照厂商的说明使用，或者依照熟练技术人员根据经验所确定的使用。所述抗代谢物化疗剂为吉西他滨时，优选以大约600mg/m^{2}至1250mg/m^2(例如大约1000mg/m^2)的剂量施用，例如在3-周循环的第1天和第8天施用。

[0387] 除了HER抗体和抗代谢物化疗剂之外，还可以与其它的治疗学方案组合。例如，可以施用第二种(第三种、第四种等)化疗剂，其中第二种化疗剂或者是另一种不同的抗代谢物化疗剂、或者是非抗代谢物化疗剂。例如，第二种化疗剂可以是紫杉烷(Taxane)(如紫杉醇(paclitaxel)或多西他塞(docetaxel)、卡培他滨(capecitabine)、或基于铂的化疗剂(如卡铂、顺铂、或奥沙利铂)、蒽环类抗生素(anthracycline)(如多柔比星(doxorubicin)，包括多柔比星脂质体)、托泊替康(topotecan)、培美曲塞、长春碱类(vinca alkaloid)(如长春瑞滨(vinorelbine))、和TLK 286。可以施用不同化疗剂的“鸡尾酒(Cocktails)”。

[0388] 其它可以与HER抗体组合的治疗剂选自以下的一种或多种：第二种不同的HER抗体(例如，生长抑制性HER2抗体如曲妥单抗(trastuzumab)、或诱导HER2-过表达细胞凋亡的HER2抗体，如7C2、7F3或其人源化变体)；抗不同肿瘤相关抗原如EGFR、HER3、HER4的抗体；抗激素化合物，例如，抗雌激素化合物如他莫昔芬、或芳香化酶抑制剂；心脏保护剂(阻止或减轻任何与所述治疗有关的心肌机能障碍)；细胞因子；EGFR靶向药物(如TARCEVA™、IRESSA®Cetuximab)；抗血管生成剂(尤其是Genentech出售的商标名为AVASTIN™的贝伐单抗(Bevacizumab))；酪氨酸激酶抑制剂；COX抑制剂(例如COX-1或COX-2抑制剂)；非类固醇抗炎药，塞来考昔(Celecoxib) (CELEBREX®)；法呢基转移酶抑制剂(例如，可自Johnson和Johnson获得的Tipifarnib/ ZARNESTRA®R115777或可自Schering-Plough获得的Lonafarnib SCH66336)；结合癌胚蛋白CA 125的抗体如Oregovomab(MoAb B43.13)；HER2疫苗(如来自Pharmexia的HER2AutoVac疫苗，或者从Dendreon的APC8024蛋白疫苗，或者来自GSK/Corixa的HER2肽疫苗)；另一种HER靶向治疗剂(例如曲妥单抗(trastuzumab)、cetuximab、gefitinib、埃罗替尼(erlotinib)、CI1033、GW2016等)；Raf和/或ras抑制剂(参 见，例如，WO 2003/86467)；盐酸阿霉素脂质体注射剂 (DOXIL®)；拓扑异构酶I抑制剂如托泊替康；紫杉烷；HER2和EGFR双酪氨酸激酶抑制剂如lapatinib/GW572016；TLK286 (TELCYTA®)；EMD-7200；治疗恶心的药剂如血清素拮抗剂、类固醇或苯并二氮卓类(benzodiazepine)；预防或治疗皮疹的药剂或痤疮疗法，包括局部或口服抗

生素;降体温药物,诸如醋氨酚(acetaminophen)、苯海拉明(diphenhydramine)或哌替啶(meperidine);造血生长因子,等等

[0389] 任何上述共同施用的试剂的合适剂量均为目前使用的那些剂量,并且,由于所述试剂与HER抗体的联合作用(协同作用),剂量可能降低。

[0390] 除了上述治疗方法,可以对患者实施外科手术以去除癌细胞,和/或实施放射治疗。

[0391] 优选所施用的抗体是裸抗体。然而所施用的抗体可以与细胞毒剂偶联。优选所述免疫偶联物和/或与其结合的抗原被细胞内在化,导致免疫偶联物杀伤与其结合的癌细胞的治疗学功效增强。在优选的实施方案中,所述细胞毒剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。这些细胞毒剂的例子包括美登木素生物碱类、加利车霉素、核糖核酸酶和DNA内切酶。

[0392] 除了为所述病人施用所述抗体蛋白质之外,本申请还预期基因疗法施用抗体或蛋白质抑制剂。参见,例如,公开于1996年3月14日的W096/07321涉及基因疗法用于生产胞内抗体的用途。

[0393] 主要有两种使核酸(任选包含于载体中)进入病人细胞的方法:体内(in vivo)和回体(ex vivo)。对于体内递送,直接将核酸注射到病人体内,通常在需要所述抗体的部位。对于回体治疗,取出病人的细胞,将核酸导入到这些分离的细胞中,直接将改造过的细胞施用于病人,或者例如密封到多孔膜内,将所述多孔膜植入到病人体内(参见,例如美国专利4,892,538和5,283,187)。有许多可用的技术用于将核酸导入到活细胞中。这些技术根据是将核酸转移到体外培养的细胞中,还是在体内将核酸转移到预定宿主的细胞中而有所不同。适合于将核酸体外转移到哺乳动物细胞的技术包括使用脂质体、电穿孔、微注射、细胞融合、DEAE-右旋糖酐、磷酸钙沉淀法等等。用于回体基因递送的常用载体是反转录病毒。

[0394] 当前优选的体内核酸转移技术包括用病毒载体(如腺病毒、单纯疱疹I病毒、或腺病毒相关病毒)转染和基于脂质的系统(例如,用于基因的脂质介 导转移的有用脂质为DOTMA、DOPE和DC-Chol)。在一些情况下,希望为核酸源提供导向靶细胞的试剂,如细胞表面膜蛋白或靶细胞特异性抗体、靶细胞上受体的配体等等。使用脂质体时,结合于胞吞作用相关细胞表面膜蛋白的蛋白质可用于靶向和/或促进吸收,例如衣壳蛋白或其片段对特定细胞类型的向性,循环中经历内在化的蛋白质的抗体、以及引导胞内定位和增强胞内半衰期的蛋白。例如,Wu et al.,J.Biol.Chem.262:4429-4432(1987);和Wagner et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:3410-3414(1990)描述了受体介导的胞吞作用技术。目前已知的基因标记和基因疗法方案的综述参见Anderson et al.,Science 256:808-813(1992)。也可参见WO 93/25673和其中引用的文献。

[0395] VI.制品

[0396] 在本发明的另一实施方案中,提供了包含材料的产品,所述材料用于治疗癌症或上述其它紊乱。所述制品包括其中含有固定剂量的HER抗体的管形瓶和任选包装插页。所述管形瓶可以由多种材料如玻璃或塑料构成,并且可以用可由注射器穿透的塞子密封。例如,所述管形瓶可以是formal vitrumI型玻璃管形瓶(例如对于420mg固定剂量为20cc管形瓶,或者对于1050mg固定剂量为50cc管形瓶),具有DAIKYO GREY™氟-层压树脂塞子和20mm倒转顶部铝帽。所述制品可以进一步包括从商业和用户的观点来看所需要的其它材料,包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针、和注射器等。

[0397] 在优选的实施方案中，所述制品包括含有固定剂量HER抗体(例如pertuzumab)的管形瓶，其中所述固定剂量为大约420mg、大约525mg、大约840mg、或者大约1050mg的HER抗体。

[0398] 所述制品优选进一步包括包装插页。所述包装插页可以提供为癌症病人施用固定剂量的说明，所述癌症病人包括但不限于卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、转移性乳腺癌(MBC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、前列腺癌、结肠直肠癌病人，和/或为显示HER表达、扩增和/或磷酸化的癌症病人施用固定的剂量。

[0399] 在一个实施方案中，所述制品包括两个管形瓶，其中第一个管形瓶含有大约840mg固定剂量的pertuzumab，第二个管形瓶含有大约420mg固定剂量的pertuzumab。

[0400] 在另一个实施方案中，所述制品包括两个管形瓶，其中第一个管形瓶含有大约1050mg固定剂量的pertuzumab，第二个管形瓶含有大约525mg固定剂量的pertuzumab。

[0401] VII.材料保藏

[0402] 下述杂交瘤细胞系已经保藏于美国典型培养物保藏中心，10801University Boulevard,Manassas,VA 20110-2209,USA(ATCC)：

[0403]

抗体名称	**分类命名**	**ATCC编号**	**保藏日期**
7C2	杂交瘤细胞#741 7C2.B9 NB 10151/65	ATCC HB-12215	1996年10月17日
7F3	杂交瘤细胞#456 7F3 NB 7865/5	ATCC HB-12216	1996年10月17日
4D5	细胞#758, A-HER2, NB9644P28	ATCC CRL 10463	1990年5月24日
2C4	鼠/鼠杂交瘤细胞系2C4	ATCC HB-12697	1999年4月8日

[0404] 以下的非限制性实施例阐述本发明的更多细节。本文特别加入说明书中所有引证文件的内容作为参考。

[0405] <u>实施例1</u>

[0406] 当前的实施例评估HER抗体pertuzumab的群体药代动力学(population pharmacokinetic,PK)和预测协变量(predictive covariate)，并检验固定的、基于体重的、或基于BSA的给药方案后稳态槽血清浓度的变异性(variability of steady-state trough serum concentration)。Pertuzumab或者作为基于体重的剂量(0.5-15mg/kg)或作为固定剂量(420mg或1050mg)通过IV输注(q3周)施用。汇集了来自包含153个病人和1458个浓度-时间点的一个Ia期和两个II期试验(卵巢和乳腺)的Pertuzumab血清浓度数据，利用使用一级条件评估(first-order conditional estimation)相互作用(FOCE相互作用)方法的NONMEM™将其用于该分析。线性2-隔室模型(linear 2-compartment model)很好地描述了所述数据。体重、血清白蛋白、和血清碱性磷酸酶是影响清除率(CL)的显著协变量

(significant covariate),体表面积(BSA)是影响中央室分布容积(distribution volume ar central compartment)(Vc)的显著变量。在最后的模型中,CL和Vc分别为0.214L/天和2.74L。体重只解释了CL病人体内变异性的8.3%。利用在后预测检查评估最终的群体PK模型显示了良好的性能。与固定剂量给药相比,在利用最终模型从原始数据组随机抽样(bootstrapped)的1000个模拟患者中,基于体重和BSA的给药方案只分别减少稳态谷浓度群体变异性的6.2%和5.8%,模拟还显示在固定的、基于体重或BSA的给药方案之后,具有低于20mcg/mL目标的预测稳态谷浓度的患者的百分数是近似的。据推断,虽然典型地人源化抗体按体重进行给药,该 实施例中的分析显示了施用HER抗体pertuzumab,利用固定剂量治疗癌症的需求。

[0407] 方法

[0408] 研究和病人

[0409] 用于该分析的所有三个研究均经参与中心(participating centers)的合适的伦理委员会批准。从所有病人获得了书面告知的许可。

[0410] 研究1是Ia期、开放标记的、多中心(multicenter)、剂量逐步增加的研究,用于评估作为单一药剂静脉内施用于患晚期(advanced)实体恶性肿瘤的患者的pertuzumab的安全性、耐受性、和药代动力学表现。这些病人接受了第一个循环每3周以90分钟IV输注,然后在后续循环中以30分钟输注的以IV途径施用的pertuzumab剂量。在3或6个患者的组中剂量逐步升高(0.5、2、5、10、和15mg/kg),直到确定了最大耐受量(MTD)或者达到了最高剂量水平。在治疗的第一个循环期间,用于测定pertuzumab浓度的血清样品在一系列时间点收集:给药前、IV输注结束时、于1.5、4、和9小时时、以及第2、5、8和15天时。在第二个治疗循环期间,用于测定pertuzumab浓度的血清样品在给药前、IV输注开始后29分钟、和第8天收集。

[0411] 研究2是II期、开放标记的、单一组(single arm)、多中心试验,用于评估晚期卵巢癌病人中有关pertuzumab功效的整体功效、安全性、耐受性和基于肿瘤的HER2活化效应,其中所述病人的疾病对先前的化疗不显疗效或者在先前的化疗之后已经复发。这些女性患者接受IV输注的pertuzumab,其以单一药剂在第一个治疗循环期间90分钟时间以840mg的固定剂量施用,之后以420mg的维持剂量,在后续的治疗循环每3周以30分钟输注递送。在第一和第二个治疗循环期间,用于测定pertuzumab浓度的血清样品在给药前、IV输注结束后15分钟、以及第8和第15天收集。后续治疗循环期间,其它用于测定pertuzumab浓度的血清样品在给药前和IV输注结束后15分钟时收集。

[0412] 研究3是II期、开放标记的、单一组(single-arm)、多中心(multicenter)随机化研究,用于评估低HER2表达的转移性乳腺癌病人中作为单一药剂施用的两个不同pertuzumab剂量的功效和安全性。在第一个剂量组中,病人接受第一个循环中作为840mg负载剂量在90分钟期间IV输注施用的 pertuzumab,接下来在后续治疗循环期间,每3周30分钟IV输注420mg的维持剂量。在第二个剂量组中,病人接受第一个循环中作为1050mg剂量在90分钟期间IV输注的pertuzumab,以及在后续治疗循环期间,每3周30分钟IV输注的1050mg剂量。在研究3中,用于测定pertuzumab浓度的血清样品在给药前、IV输注结束后15分钟、以及前两个治疗循环期间第8和第15天收集。后续治疗循环期间,其它用于测定pertuzumab浓度的血清样品在给药前和输注结束后15分钟时收集。

[0413] 药物测试

[0414] 通过确定的受体结合、酶联、免疫吸附测试(ELISA)测定Pertuzumab血清浓度。所述测试使用p185HER2胞外结构域从血清样品捕获pertuzumab。用小鼠抗人Fc-辣根过氧化酶(HRP)(Jackson ImmunoResearch Laboratories,Inc.)检测结合的pertuzumab,并将四甲基联苯胺(TMB)(KPL,Inc.)用作显色底物定量血清pertuzumab。所述测试对于人血清中的pertuzumab有0.25mcg/mL的最小可计量浓度。

[0415] 群体药代动力学分析

[0416] 利用NONMEM™(Boeckmann and Beal NONMEM™用户指南)实施群体非线性混合效应模型(population non-linear mixed-effect modeling)构建。旧金山:NONMEM™项目小组,加州大学,旧金山(1994))带有NM-TRAN和PREDPP和Compaq Visual Fortran compiler(6.5版)的软件(第V版,Level 1.0)。两个不同基础结构模型,利用IV输注的一-和二-区室线性PK模型匹配血清pertuzumab浓度时间数据。在整个模型构建过程中使用具有η-ε相互作用的一级条件评估(first-order conditional estimation)(FOCE)方法。

[0417] 用指数误差模型描述PK参数的个体间变异:

[0418] $$\mathrm{Pi} = \hat{\mathrm{P}}_{\mathrm{i}} \exp(\eta_{\mathrm{iP}}) \quad (1)$$

[0419] 乘法协变回归模型(mulitipliative covariate regression model)如下实施:

[0420] $$\hat{\mathrm{Pi}} = \theta_1 \left(\frac{\mathrm{X_i}}{\mathrm{med(X)}}\right)^{\theta x} (1+\theta_{\mathrm{D}}\mathrm{D}) \qquad (2)$$

[0421] 其中η_{ip}表示第i个病人个体的“真实”参数(Pi)与群体中典型值$(\hat{P_i})$之间的比例差异,所述典型值针对协变量值调整为等于该个体病人的数值。η_{ip}是随机效应,具有平均值零和变异ω^2。θ_X、和θ_D分别是连续(例如WT)或二歧(例如性别和种族)协变量所要估计的回归系数。连续变量以其中间(med(X))值为 中心,因此允许θ_1代表具有中值协变量的典型病人的清除率估计值。二歧协变量(dichotomous covariate)编号为0或1(例如,女性=0,男性=1;白种人(Caucasian)=0,其它种族=1)。剩余变异构建为比例附加误差模型(proportional-additive error model):

[0422] $C_{pij}=\hat{C}_{pij}(1+\varepsilon_{ij,prop})+\varepsilon_{ij,add}$,其中$C_{pij}$和 $\hat{C}_{pij}$分别为针对第i个个体测量的第j个和模型预测的浓度,$\varepsilon_{ij,prop}$和$\varepsilon_{ij,add}$表示成比例的和附加残余个体间随机误差,其以平均值0和变异$\sigma_{prop}{}^2$和$\sigma_{add}{}^2$分布。

[0423] 以图表表示研究了基于结构模型的PK参数的贝叶斯估计值与个体协变量之间的关系。基于初步探索性分析,测试了各协变量对PK参数的影响。最初测试了协变量对个体PK参数(即,清除率和中央室的体积)的影响。然后,通过将显著协变量加入到模型中构建个体PK参数的完全协变量模型。通过只保留模型中的显著协变量,使用退后消去(backward elimination)法测定每个个体PK参数的最终协变量模型。当高度相关的协变量具有相似的药理学意义时(如体重和BSA),只有最显著的因素保留在模型中。然后组合所获得的针对每个PK参数的该最终协变量模型,形成新的完整模型(full model),利用退后消去法(backward elimination process)详细描述所述最终群体PK模型。

[0424] 替代结构模型的对比和协变量模型的构建以典型拟合优度(goodness-of-fit)诊断图和似然比检验(likelihood ratio test)为基础。比较替代性分级模型时,目标函数值的差异大约是卡方分布的,自由度为n(n是完全和缩小模型之间数目或参数的差异)。已证

明该近似值对于FOCE-INTERACTION估计方法(Wahlby et al.J Pharmacokinet Pharmacodyn28:231-52(2001))来说是可靠的。为了区分两个分级(hierarchical)模型，使用大于7.9(1个自由度)的目标函数差异，其对应于$p<0.005$的显著性水平。

[0425] 对于给定的PK参数(例如，CL)，用回归模型中的协变量解释的个体间变异分数(%变异)计算如下：

[0426] $$\%\,\text{variance} = \left(\frac{\omega^2_{\text{CL,BASED}} - \omega^2_{\text{CL,FINAL}}}{\omega^2_{\text{CL,BASE}}}\right) \times 100 \qquad (3)$$

[0427] 其中$\omega^2_{\text{CL,BASED}}$和$\omega^2_{\text{CL,FINAL}}$分别代表基础和最终PK模型中清除率的个体间变异。

[0428] 群体药代动力学模型评估

[0429] 本研究中的模型评估使用随机抽样再抽样技术(bootstrap resampling technique)，以评估最终模型的稳定性并估计参数的置信区间。本模型评估技术首先利用软件包Wings for NONMEM™(N Holford，404版，2003年6月，奥克兰，新西兰)中的随机抽样选项构建数据组，然后获得每个复制数据组的参数估计值。从1000次成功运行获得了结果，测定了群体参数(population parameters)的平均数以及第2.5个和97.5个百分点(指95%置信区间)，并与原始数据的估计值相比较。

[0430] 此外，用在后预测模型检查评估最终模型描述观测数据的能力(Yano et al.J Pharmacokinet Pharmacodyn 28:171-92(2001)；Gelman and Meng，Model checking and model improvement.In:Gilks WR，Richardson S，Spiegelhalter DJ，eds.Markov Chain Monte Carlo in Practice.Boca Raton:Chapman & Hall/CRC，189-202(1996)；Gelman et al.Bayesian Data Analysis.Boca Raton:Chapman &Hall/CRC(2004).在这些分析中，计算了观测数据的第2.5个、第5个、第10个、第25个、第50个(中值)、第75个、第90个、和第95个百分点，并选择作为在后预测模型检查的检验统计量(test statistics)。包括最终固定和随机效应参数的最终群体PK模型用于模拟观测数据组的1000次重复，并从那些模拟数据组的每一个计算检验统计量。然后将来自模拟数据组的检验统计量的在后预测分布与观测的检验统计量相比较，可以根据下述等式估计p值(p^{PPC})，这通过计算其中来自模拟数据组的检验统计量超过观测检验统计量的变现值(realized value)的例子的比例进行(Gelman and Meng，(1996)同上).

[0431] $$p^{PPC} = \frac{1}{N}\sum_{i=1}^{1000} I(T(y_i^{rep},\theta) \geq T(y,\theta_i)) \qquad (1)$$

[0432] 其中I(.)为指示函数(indicater function)，当其自变量真实且不为0时其取值为1。T(y，θ)为观测检验统计量的“变现值(realized value)”，因为其由观测数据y实现。T(y_i^{rep}，θ)为从模拟数据组i(范围从1到1000)得到的检验统计量(Gelman and Meng，(1996)同上).

[0433] 此外，对于病人个体的每个时间点，计算了模拟数据的第2.5个、第5个、第95个、第97.5个分位数(quantitle)。测定了落入所汇集的模拟数据的 第2.5个分位数和第95.5个分位数(95%区间)、第5个分位数和第95个分位数(90%区间)边界的观测数据的数目。

[0434] 固定的、基于BSA、和体重的给药方案后的Pertuzumab暴露

[0435] 最终群体PK模型用于测定稳态谷浓度和固定的、基于BSA-、和体重的给药方案后的暴露。对于固定的、基于BSA的、或基于体重的给药方案，利用具有通过随机抽样(有放回

的)原始PK数据组获得的数据组的最终模型模拟了1000个患者的pertuzumab的血清浓度-时间谱和清除率。所有模拟的患者于第0天在90min内接受840mg、12.2mg/kg、或485mg/m^{2}iv输注,然后于第21、42和63天在30min内接受420mg、6.1mg/kg、或242.5mg/m^{2}iv输注。然后评估不同剂量给药方案后于第84天获得的稳态谷浓度(Css_{trough})。此外,计算了固定的、基于BSA的或基于体重的剂量后具有低于目标浓度(20mcg/ml)的稳态谷浓度的患者百分数。模拟的清除率值用于依照下述等式测定稳态平均暴露($AUCss_{0-\tau}$):

[0436] $$AUCss_{0-\tau}=\frac{Dose}{CL} \quad (4)$$

[0437] 结果

[0438] 图形数据包括于该PK分析中的病人的图形特征列于表2。

[0439] 表2.包括于所述分析的病人的图形特征

[0440]

	中值	范围
年龄(岁)	56.0	32.0-78.0
BSA*(m^2)	1.73	1.40-2.53
体重(kg)	69.0	45.0 – 150.6
白蛋白(g/L)	39.2	21.0 – 52.0
碱性磷酸酶(ALK)(IU/L)	107.0	39.0 – 367.0

	病人数	%
性别		
男性	8	5.2
女性	145	94.8
人种		
白种人	141	92.2
非洲美国人	3	2.0
西班牙人	4	2.6
亚洲人	3	2.0
土著印第安人	0	0
其他	2	1.3

[0441] *BSA,体表面积。

[0442] 在三个研究中,从153个病人收集了总共1458个pertuzumab血清浓度时间点的样

品。在所有病人中，18个来自Ia期试验，60个来自II期卵巢癌试验，75个来自II期乳腺癌试验。因此，该分析中大多数(94.8%)病人为女性，占1110个(76%)血清pertuzumab浓度数据。所有患者都具有经FISH(荧光原位杂交)分析确认的低HER2表达肿瘤，和通过0或1的ECOG(Eastern Cooperative Oncology Group)表现状况显示的良好的身体机能状况。具有丢失的协变量(missing covariate)的病人数极低(对于身高和BSA来说都是4.6%)，丢失的协变量转嫁于(impute)所述中值。在只具有记录的取样日期的384个 (20.8%)血清pertuzumab浓度样品中，取样时间归为中午12点。实施灵敏度分析以评估这些转嫁的时间(imputed times)对未显示显著影响的模型中群体参数估计值的影响。

[0443] 群体PK分析。二-区室模型(two-compartment model)描述了优于一-区室模型的数据，所述一-区室模型基于目标函数(δ=-736.2)和诊断图的变化。图9A-B中，代表性pertuzumab血清浓度-时间谱拟合到一-和二-区室模型。K12的个体间变异项(η)从二-区室模型中去除，因为该η项的去除不导致目标函数中统计学上的显著增加(δ<7.88)。因此，在最终基础模型中只保留η_{CL}、η_{Vc}和η_{k21}。

[0444] 接下来评估η_{CL}、η_{Vc}和η_{k21}当中存在协方差项的影响。η_{CL}、η_{Vc}和η_{k21}当中协方差项的加入改善了吻合度(fit)(δ=-23.2，df=3)。然而，发现协方差项的估计不充分(%CV>100)，具有微小的估计关联(r_{CL-Vc}=0.37；r_{CL-K21}=0.27；r_{Vc-K21}=0.42)，对参数估计值几乎没有影响(数据没有显示)。因此，对于协变量影响模型建立，没有保留协方差项。在利用最终基础模型的探索性分析中，没有鉴定出可能的协变量与η_{k21}之间的明显关系。因此，在具有协变量的最终模型的开发期间，没有检查协变量对η_{k21}的影响

[0445] 图10A-B显示对于具有协变量的最终模型，预测的相对于观测的pertuzumab血清浓度和加权残值(weighted residual)相对于预测血清浓度图。在所述最终模型中，血清白蛋白(ALB)、体重(BW)和血清碱性磷酸酶(ALKP)是解释pertuzumab清除率(CL)的个体间变异的最显著的协变量。BSA是解释pertuzumab中心区室体积分布(central compartment volume of distribution)(Vc)个体间变异的最显著协变量。η_{CL}、η_{Vc}和η_{k21}当中协方差项的加入改善了吻合度(δ=-14.0，df=3)。然而，所述估计关联不大(r_{CL-Vc}=0.45；r_{CL-K21}=0.28；r_{Vc-K21}=0.39)，所述参数估计值未受影响(数据没有显示)。因此，协方差项未包括于最终模型中。所述最终模型图示如下：

[0446] $$CL=\theta_{CL}\times\left(\frac{WT}{69}\right)^{\theta_{WT\_CL}}\times\left(\frac{ALB}{39.2}\right)^{\theta_{ALB\_CL}}\times\left(\frac{ALKP}{107}\right)^{\theta_{ALKP\_CL}} \qquad (4)$$

[0447] $$Vc=\theta_{Vc}\times\left(\frac{BSA}{1.72}\right)^{\theta_{BSA\_Vc}} \qquad (5)$$

[0448] 最终模型的参数估计值概括于表3。

[0449] 表3.最终群体药代动力学模型的参数估计值和利用随机抽样验证法(Bootstrap Validation Procedure)的参数的稳定性

[0450]

	原始数据组	1000个随机抽样重复
	估计值(%RSE)[a]	平均数(95% CI)
结构模型		
CL(L/天)	0.214(3.1)	0.214(0.201, 0.228)
Vc(L)	2.740(1.9)	2.739(2.640, 2.840)
K12(天$^{-1}$)	0.203(16.6)	0.220(0.159, 0.416)
K21(天$^{-1}$)	0.258(15.6)	0.275(0.203, 0.480)
个体间变异		
CL %CV	31.1(11.0)	30.6(27.0, 34.1)
Vc %CV	16.2(20.3)	16.0(12.7, 19.2)
K_{21} %CV	25.2(37.6)	24.1(11.4, 33.6)
协变量模型		
ALB对CL(θ_{ALB_CL})	-1.010(18.4)	-1.019(-1.420,-0.632)
WT对CL(θ_{WT_CL})	0.587(19.3)	0.589(0.372, 0.826)
ALKP对CL(θ_{ALKP_Vc})	0.169(29.5)	0.170(0.067, 0.258)
BSA对Vc(θ_{BSA_Vc})	1.160(12.2)	1.151(0.890, 1.451)
残余变异		
均衡误差(Proportional error)σ^2_{prop}	0.037(19.4)	0.037(0.030, 0.045)
相加误差(Additive error), σ_{prop},mcg/mL	2.265(77.8)	2.24(0.002, 4.160)

[0451]　a.%RSE:估计值的相对标准误百分数＝SE/参数估计值x100

[0452]　估计分析群体中血清pertuzumab的CL为0.214L/天，Vc为2.74L。K_{12}和K_{21}分别为0.203和0.258天$^{-1}$。最终模型中，CL和Vc的个体间变异，计算为个体间变异的平方根(ω^2)并表示为%CV，分别为31.1%和16.2%，对于不含协变量的基础模型(base model)来说为38.0%和20.8%。因此最终模型中ALB、WT、和ALKP的协变量影响解释了大约33%的CL个体间变异。然而，单独体重只解释了8.3%的CL病人间变异。在最终模型中，BSA的协变量影响解释了大约39%的Vc个体间变异。基础模型中CL对WT的依赖性以及Vc对BSA的依赖性说明了最终模型中的情况，如图11A-B所示。估计的$t_{1/2\alpha}$和$t_{1/2\beta}$分别为1.4和17.2天。

[0453] 模型评估:从原始数据组获得了1000个成功的随机抽样(bootstrap runs),并将其与原始观测数据相比较。从随机抽样程序获得的平均群体PK估计值类似于原始数据组的参数估计值(表3),显示所开发的模型是稳定的。固定影响参数的95%置信区间是狭窄的,其说明良好的精确度。

[0454] 在后预测模型检查用于评估最终模型描述观测数据的能力。包括最终固定和随机影响参数的最终群体药代动力学模型用于模拟1000个重复。然后计算了那1000个模拟数据组中每一个的检验统计量。图12A-F显示所选检验统计量的1000个模拟值的直方图,垂直线表示观测检验统计量的“变现值(realized value)”。在后预测分布接近观测值,对于每个检验统计量估计的p-值均大于0.05。此外,所收集的模拟数据的90%和95%百分位数范围内的观测pertuzumab浓度百分数分别为89.3%和94.7%。这些结果提示所述模型能够相当好地描述和预测数据。

[0455] 固定的、基于BSA、和基于体重的给药方案后的Pertuzumab暴露。

[0456] 估计了1000个模拟患者于第84天时的预测pertuzumab稳态谷血清浓度($C_{ss,trough}$),所述模拟患者依照方法部分概括的给药方案,利用固定的、基于体重的、或基于BSA的剂量从原始PK数据组和最终模型随机抽样(bootstrapped)。这些数据显示,当与固定剂量给药相比时,利用基于体重的和基于BSA的给药方案,$C_{ss,trough}$的群体变异分别减少6.17和5.76%(图13和表4)。

[0457] 表4

[0458] 1000个依照最终模型自原始PK数据组随机抽样的模拟患者在固定的、基于体重或BSA的剂量后,预测的Pertuzumab稳态谷浓度(第84天)

[0459]

	$C_{ss\ trough}$(mcg/ml) 固定剂量	$C_{ss\ trough}$(mcg/ml) 基于体重的剂量	$C_{ss\ trough}$(mcg/ml) 基于BSA的剂量
最小值	2.68	2.39	2.54
第五个百分点	16.56	16.32	16.86
中值	51.87	51.81	52.48
平均值	56.37	56.08	56.44
第95个百分点	115.38	110.46	112.14
最大值	209.67	179.06	192.00
%CV	54.05	52.62	52.40
变异	928.21	870.93	874.71
从固定剂量改变的%变异[a]	-	-6.17	-5.76
$C_{sstrough}$ < 20 mcg/ml的患者的百分数	8.3	8.7	8.3

[0460] [a]利用以下等式计算从固定剂量改变的变异(variance)百分数：

[0461]

$$\text{变异变化百分数 (percent variance change)} = \frac{\text{变异}_{\text{基于体重或BSA的剂量}} - \text{变异}_{\text{基于固定的剂量}}}{\text{变异}_{\text{基于固定的剂量}}} \times 100$$

[0462] $C_{ss,trough}$低于20mcg/ml的目标血清浓度的患者的百分率是相似的，固定的、基于体重的、或基于BSA的剂量给药的值分别为8.3％、8.7％、和8.3％(表4)。从1000个模拟患者的pertuzumab血清稳态$AUC_{ss0-\tau}$分析获得了类似的结果，与固定剂量给药相比，基于体重和BSA的剂量给药只分别减小了群体变异的2.2％和4.2％。在固定剂量、基于体重、和基于BSA的剂量后，用相同的模拟数据组测定具有极端体重(即，WT≤第10个和≥第90个百分点)的群体的$C_{ss,trough}$(图14A-B)。对于固定剂量、基于体重的、和基于BSA的 剂量，具有小于或等于第10个百分点的WT的群体的中值pertuzumab$C_{ss,trough}$分别为72.3(范围：8.7至166.5)、52.8(范围：6.8至125.7)和63.2(范围：7.8至150.1)mcg/ml。对于固定的、基于体重的、和基于BSA的给药方案，群体中具有低于20mcg/ml目标血清浓度的$C_{ss,trough}$的患者百分比分别为5.4％、12.6％、和9.0％。对于固定剂量、基于体重的、和基于BSA的剂量，具有大于或等于第90个百分点的WT的群体中值pertuzumab $C_{ss,trough}$分别为42.1(范围：7.0至119.8)、62.8(范围：14.4至167.3)和52.9(范围：10.2至133.3)mcg/ml。该群体中具有低于20mcg/ml目标血清浓度的$C_{ss,trough}$的患者的百分比是相似的，对于固定的、基于体重的、或基于BSA的给药方案其数值分别为7.4％、2.8％、和5.6％)。对来自1000个模拟患者的这些亚组进行pertuzumab血清稳态$AUC_{ss0-\tau}$分析，获得了类似结果。

[0463] 讨论

[0464] 典型地，已经在基于体重(mg/kg)或基于BSA的剂量的基础上施用了肿瘤学中的人源化IgG单克隆抗体和细胞毒性小分子药物。Pertuzumab已经在门诊中用Ia期试验和II期试验进行了测试，所述Ia期试验在晚期癌症病人中进行，II期试验在卵巢癌、乳腺癌、肺癌、和前列腺癌病人中进行。在I期试验中，以体重为基础(mg/kg)定量给予Pertuzumab，然后在II期试验中利用固定剂量启动。此处利用在这三个试验中收集的图形和血清pertuzumab浓度-时间数据，建立了具有pertuzumab PK的预测协变量的群体PK模型。然后在固定剂量给药、基于体重和BSA的给药方案之后，将该模型用于检查稳态浓度。

[0465] 由该分析获得的Pertuzumab PK与肿瘤学中使用的针对其它人源化单克隆IgG1药物所报告的那些非常相似(Harris et al.Proc Am Soc Clin Oncol21:488a(2002)；Leyland-Jones et al.J Clin Oncol 21:3965-71(2003)；和Lu et al.Clin Pharmacol Ther 75:91(2004))。

[0466] 线性2-区室线性PK模型很好地描述了所述数据，在所述最终模型中pertuzumab CL为0.214L/天。pertuzumab的典型Vc为2.74L或大约40ml/kg，其等于人血浆体积并且与所报告的其它单克隆IgG1药物的数值一致(Harris et al.(2002)，同上；和Lu et al.(2004)，同上)。Pertuzumab CL明显受体重以及白蛋白和碱性磷酸酶血清浓度的影响，而Vc明显受BSA的影响。由于包括 于所述分析中的少数男性患者(5.2％)，不能评估性别对pertuzumab PK的影响。由随机抽样程序和在后模型检查获得的结果表明所述最终模型是稳定的，能够相当好地描述和预测数据。

[0467] 体重对CL的影响和BSA对Vc的影响表明pertuzumab可以基于体重或者基于BSA给

药。然而，模型中仅仅体重和仅仅BSA的协变量影响只分别解释了大约8.3％和40％的CL和Vc的个体间影响。这表明虽然体重是CL的预测标志以及BSA是Vc的预测标志，但是体重和BSA对定量给药之后pertuzumab暴露的影响可能是可测量的，但贡献不是很大。

[0468] 因此，下一步利用模拟评估不同给药方案对pertuzumab暴露的影响。在1000个由原始数据组随机抽样的患者中，与固定剂量给药(fixed dosing)相比，发现基于体重或基于BSA的给药方案于第84天时，只分别降低模拟稳态谷血清浓度群体变异的6.2％和5.8％。此外，对于所有三种给药方案，具有低于所选目标20mcg/mL的预测稳态谷血清浓度的患者的百分比是相似的。在具有极端体重(即，WT≤第10个和≥第90个百分点)的群体中进行亚组分析获得了类似的结果。

[0469] 因此，推断pertuzumab PK与WT和BSA有关。然而，WT和BSA只解释了CL和Vc的个体间变异的很小的百分比，看起来基于WT和基于BSA的给药方案没有改善pertuzumab稳态暴露的可预测性。推荐在癌症病人中应用pertuzumab的固定剂量给药方案(fixed-dosing regimen)。

[0470] 相信本发明代表了癌症病人中人源化IgG1单克隆抗体基于体重或基于BSA的给药方案对稳态药物浓度的影响的关键评估的首次公开。实施单一-固定剂量给药(flat-fixed dosing)具有几个显著病人护理和经济意义：i}由于单一单位制剂(single unit dose)在制造、存储和运输中的更高效率而降低了成本，ii}在药厂和医院中高效地制备单一制剂(single dose)而无需病人个性化，iii)在医师开单一单位制剂的处方时效率更高，iv)降低由于剂量计算误差而使病人接受错误剂量的可能性。虽然人源化抗体典型地根据体重或BSA给药，但本文的分析显示了在癌症病人中利用固定剂量施用HER抗体pertuzumab的可行性。

序列表

<110> 健泰科生物技术公司(GENENTECH, INC.)
ALLISON, DAVID E.
BRUNO, RENE
LU, JIAN-FENG
NG, CHEE M.

<120> HER 抗体的固定剂量给药

<130> P2202R1

<141> 2005-06-15

<150> US 60/645,697
<151> 2005-01-21

<160> 22

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

<400> 1
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val
1 5 10 15

[0001] Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
20 25 30

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

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

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

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

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

Ile Lys

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

<400> 2
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr

20 25 30

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

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

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

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

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

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

<210> 3
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 3
[0002] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Ile Lys

<210> 4
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 4
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

[0003]
<210> 5
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 5
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Ile Lys

<210> 6
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 6

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

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

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

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
```

[0004]

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的.

<220>
<221> Xaa
<222> 10
<223> Xaa 优选为 D 或 S

<400> 7

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

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<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> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 9
Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr
5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 10
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala
[0005] 5 10

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

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

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

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

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

<210> 12

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

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

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

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 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

[0006] 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> 14
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 14
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe 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

[0007]

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

[0008]

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
380 385 390

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
395 400 405

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
410 415 420

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
425 430 435

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

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

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 15
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys 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

[0009] Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170 175 180

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

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

Arg Gly Glu Cys

<210> 16
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe 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

[0010]

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> 17
<211> 217
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

[0011] <400> 17
Val His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
1 5 10 15

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

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

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

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75

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

Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr
95 100 105

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

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

Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln

140 145 150

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

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
200 205 210

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 18
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 序列是合成的

<400> 18
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

[0012] 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

[0013]

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

<210> 19
<211> 195

<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 19
Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

[0014] Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg
125 130 135

Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile
140 145 150

Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn
155 160 165

Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser
170 175 180

Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg
185 190 195

<210> 20
<211> 124
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 20
Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro
1 5 10 15

Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro
20 25 30

Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His Phe Asn His Ser Gly
35 40 45

Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp

50 55 60

Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly
65 70 75

Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp
80 85 90

Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys Pro Leu His Asn Gln Glu Val
95 100 105

Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro
110 115 120

Cys Ala Arg Val

<210> 21
<211> 169
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 21
Cys Tyr Gly Leu Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val
1 5 10 15

Thr Ser Ala Asn Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe
20 25 30

[0015]
Gly Ser Leu Ala Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala
35 40 45

Ser Asn Thr Ala Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu
50 55 60

Thr Leu Glu Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro
65 70 75

Asp Ser Leu Pro Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile
80 85 90

Arg Gly Arg Ile Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln
95 100 105

Gly Leu Gly Ile Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu
110 115 120

Gly Ser Gly Leu Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe
125 130 135

Val His Thr Val Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln
140 145 150

Ala Leu Leu His Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly
155 160 165

Glu Gly Leu Ala

<210> 22
<211> 142
<212> PRT
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 22
Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro
1   5   10   15

Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys
                20   25   30

Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val
                35   40   45

Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln
                50   55   60

[0016]

Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val
                65   70   75

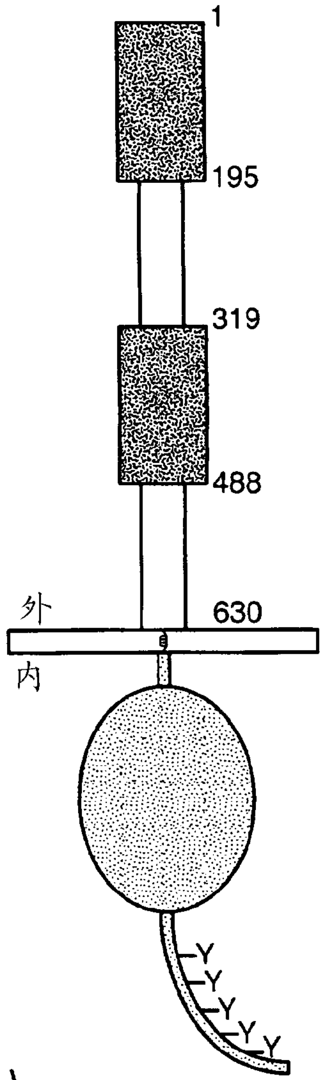
Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys
                80   85   90

Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys
                95   100   105

Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys
                110   115   120

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

Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
                140



结构域 I (L1)
TQVCTGTDMKLRLPASPETHLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYV
LIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGLRELQLRSLT
EILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGES
SEDCQSLTR

结构域 II (CR1)
TVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTF
ESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARV

结构域 III(L2)
CYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLE
EITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLRELGSGLAL
IHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRPEDECVGEGLA

结构域 IV (CR2)
CHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGS
VTCFGPEADQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINCTHSCVD
LDDKGCPAEQRASPLT

跨膜区

近膜区

酪氨酸激酶

调节区

图1

轻链可变区

```
                  10        20          30          40
2C4       DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC [KASQDVSIGVA] WYQQRP
           **    **** *      *                      *
574       DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [KASQDVSIGVA] WYQQKP
                                   *   ** ***
hum κI    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQSISNYLA] WYQQKP

                    50          60        70        80
2C4       GQSPKLLIY [SASYRYT] GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA
           **                    *  *         *    * *
574       GKAPKLLIY [SASYRYT] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
                     * *****
hum κI    GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP

                    90         100
2C4       EDLAVYYC [QQYYIYPYT] FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1)
            * *                  *   *
574       EDFATYYC [QQYYIYPYT] FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3)
                       *** *
hum κI    EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5)
```

图2A

重链可变区

```
                  10        20          30          40
2C4       EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS [GFTFTDYTMD] WVKQS
              **  **  *  * ***  *                  * *
574       EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFTDYTMD] WVRQA
                                         ** * *
hum III   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA

                    50  a      60          70        80
2C4       HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG] KASLTVDRSSRIVYM
          *  *   **                     *** *    **** *
574       PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG] RFTLSVDRSKNTLYL
                     ****** *** ****       * * *
hum III   PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNSKNTLYL

            abc      90         100ab         110
2C4       ELRSLTFEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)
          ***  **                             **
574       QMNSLRAEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:4)
                             ********
hum III   QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY] WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:6)
```

图2B

Pertuzumab轻链氨基酸序列

1 10 20 30 40 50 60
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC**KASQDVSIGVA**WYQQKPGKAPKLLIY**SASYRYT**GVPS

70 80 90 100 110 120
RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC**QQYYIYPYT**FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP

130 140 150 160 170 180
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT

190 200 210
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图3A

Pertuzumab重链氨基酸序列

1 10 20 30 40 50 60
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFTDYTMD**WVRQAPGKGLEWVA**DVNPNSGGSIY**

70 80 90 100 110 120
NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARN**LGPSFYFDY**WGQGTLVTVSSA

130 140 150 160 170 180
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

190 200 210 220 230 240
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

250 260 270 280 290 300 *
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS

310 320 330 340 350 360
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM

370 380 390 400 410 420
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ

430 440 448
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

图3B

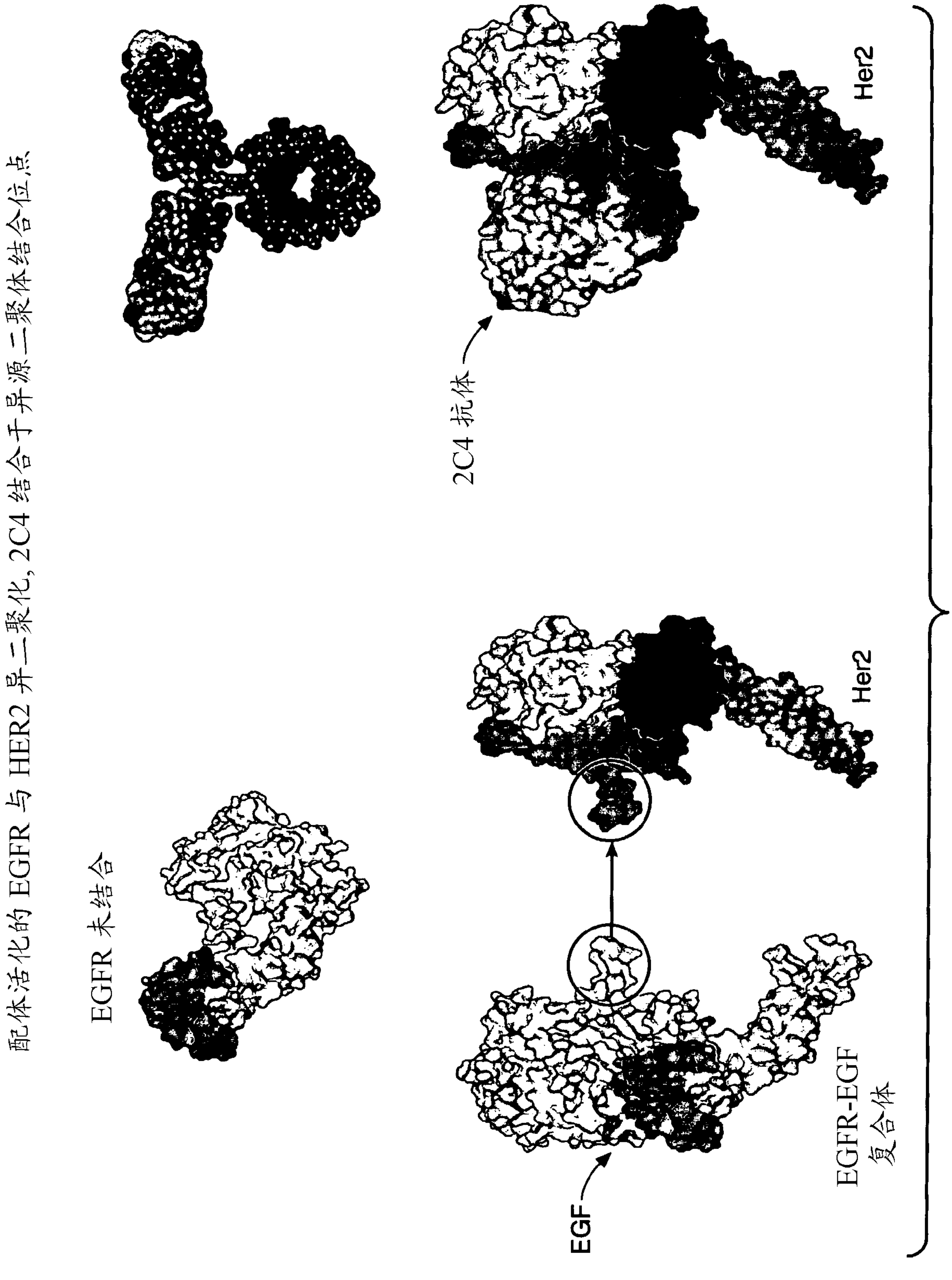

配体活化的EGFR与HER2异二聚化，2C4结合于异源二聚体结合位点
EGFR 未结合
2C4 抗体
Her2
Her2
EGF
EGFR-EGF
复合体

图4

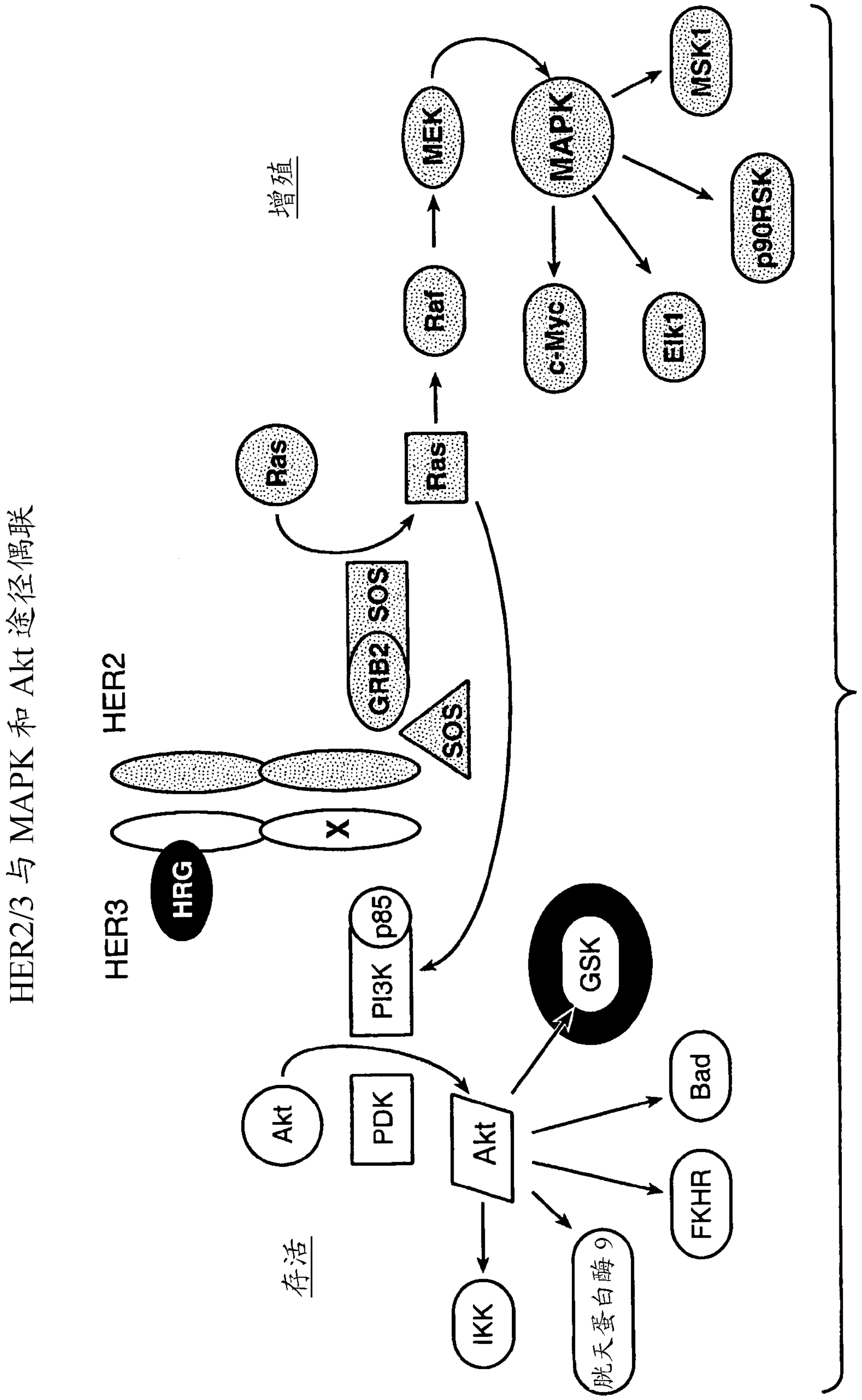

HER2/3与MAPK和Akt途径偶联
HER3
HER2
HRG
X
GRB2
SOS
SOS
Ras
Ras
Raf
MEK
MAPK
MSK1
p90RSK
Elk1
c-Myc
增殖
PI3K
p85
Akt
PDK
Akt
GSK
Bad
FKHR
胱天蛋白酶 9
IKK
存活

图5

曲妥单抗
Herceptin

Pertuzumab
Omnitarg

- 结合在近 JM 的 IV 中
- 保护受体免于脱落
- 中度影响受体下调
- 作为共同受体对 HER2 的作用有轻微影响

- 在二聚化界面处结合在 II 中
- 不阻止受体脱落
- 中度影响受体下调
- 作为共同受体对 HER2 的作用有较大影响

图6

轻链

1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPK	45	15: V, 30: N
46	LLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQ	90	60: S, 75: I
91	HYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL	135	105: E, 120: P
136	LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT	180	150: V, 165: E
181	LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	214	195: E, 210: N

图7A

重链

1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGL 45

46 EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED 90

91 TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS 135

136 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS 180

181 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 225

226 THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS 270

271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<u>N</u>STYRVVSVLTVLHQD 315

316 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 360

361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG 405

406 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG 449

图7B

1 V H S D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I G V A W Y Q Q K P G K 45

46 A P K L L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y 90

91 C Q Q Y Y I Y P Y T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V 135

136 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S 180

181 T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C 217

图8A

1 E V Q L V E S G G G L V Q P G(15) G S L R L S C A A S G F T F T(30) 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(60) N Q R F K G R F T L S V D R S(75) 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(105) F D Y W G Q G T L V T V S S A(120) 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(150) Y F P E P V T V S W N S G A L(165) 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(195) G T Q T Y I C N V N H K P S N(210) 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(240) S V F L F P P K P K D T L M I(255) S R T P E V T C V V V D V S H(270)

271 E D P E V K F N W Y V D G V E(285) V H N A K T K P R E E Q Y N S(300) 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(330) P A P I E K T I S K A K G Q P(345) 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(375) P S D I A V E W E S N G Q P E(390) 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(420) Q G N V F S C S V M H E A L H(435) N H Y T Q K S L S L S P G K(449)

图8B

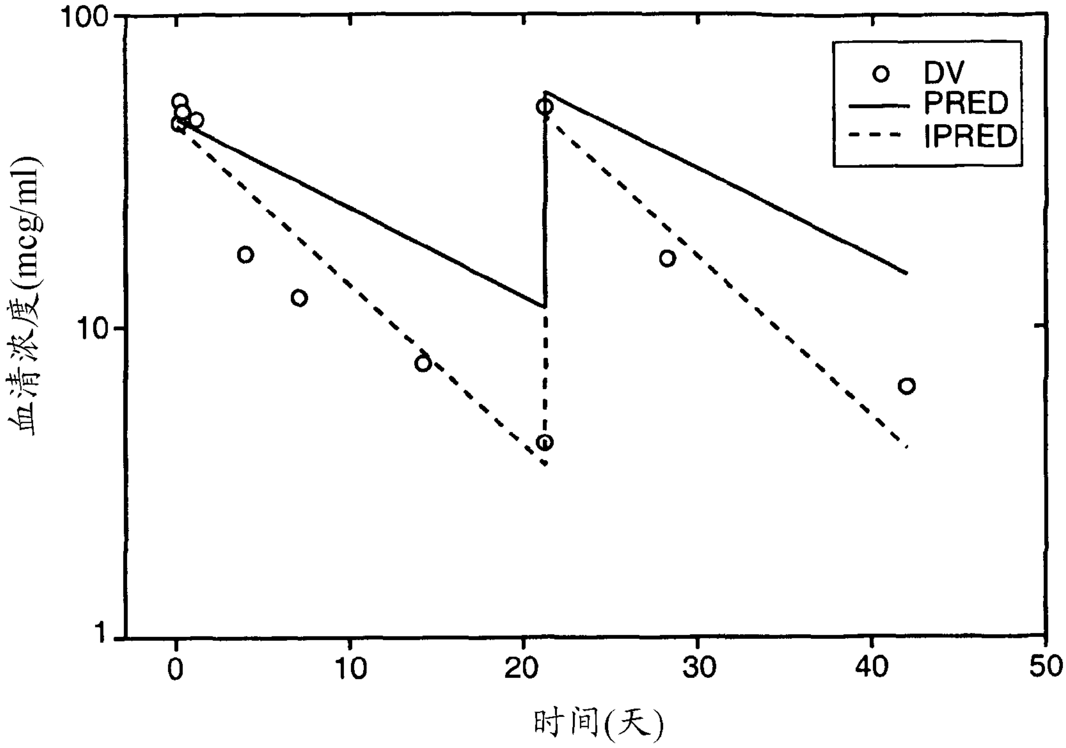

100
10
1
0
10
20
30
40
50
血清浓度(mcg/ml)
时间(天)
DV
PRED
IPRED

图9A

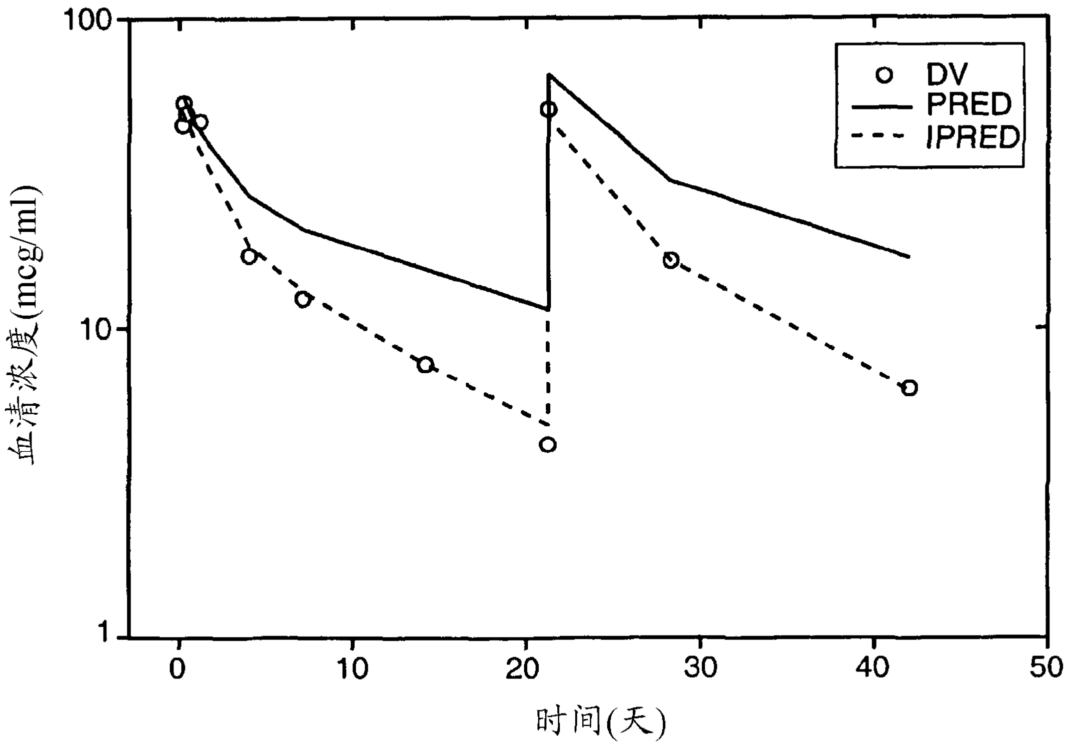

100
10
1
0
10
20
30
40
50
血清浓度(mcg/ml)
时间(天)
DV
PRED
IPRED

图9B

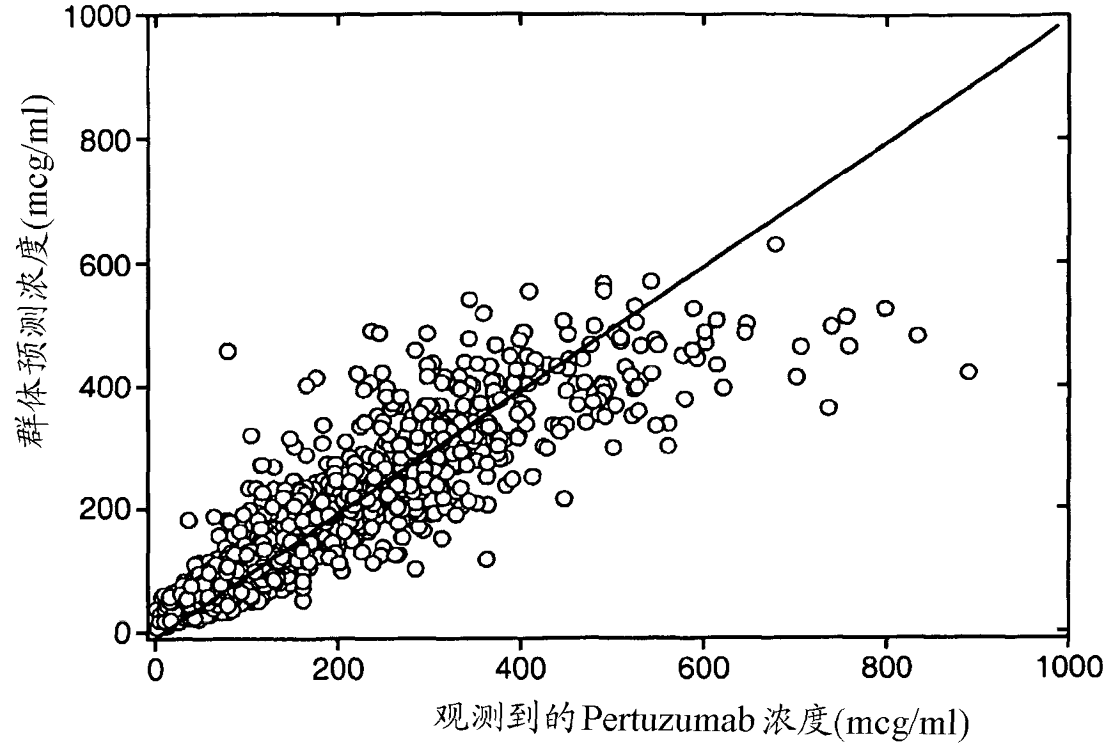

1000
800
600
400
200
0
0
200
400
600
800
1000
群体预测浓度(mcg/ml)
观测到的Pertuzumab浓度(mcg/ml)

图10A

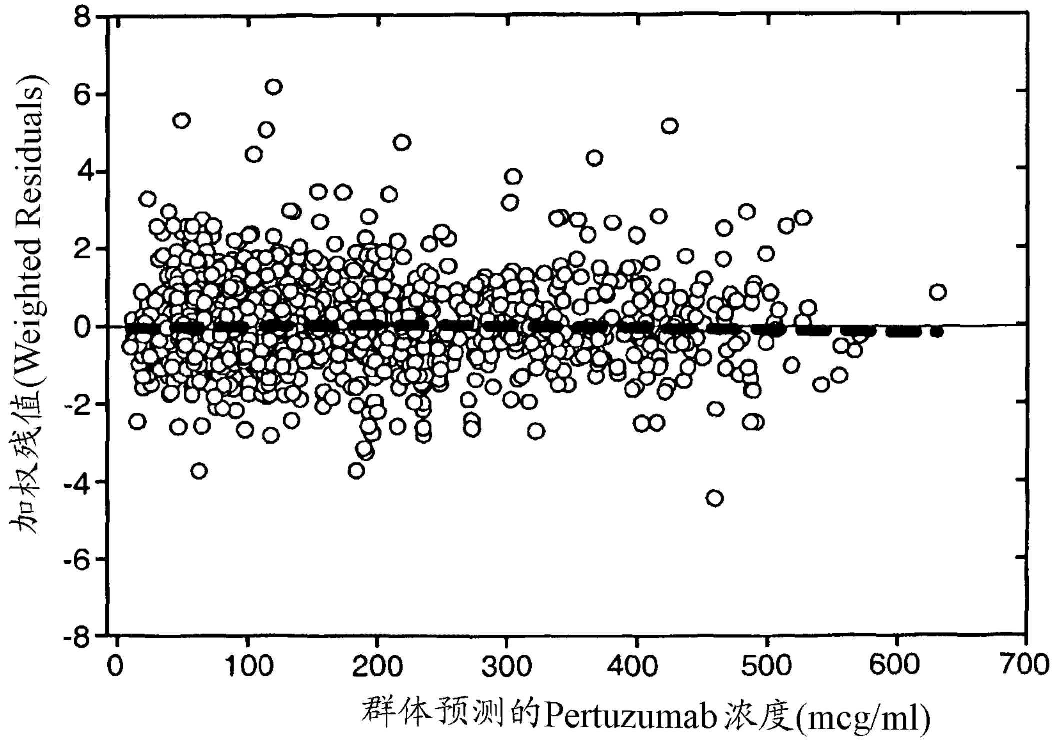

8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
0
100
200
300
400
500
600
700
加权残值(Weighted Residuals)
群体预测的Pertuzumab浓度(mcg/ml)

图10B

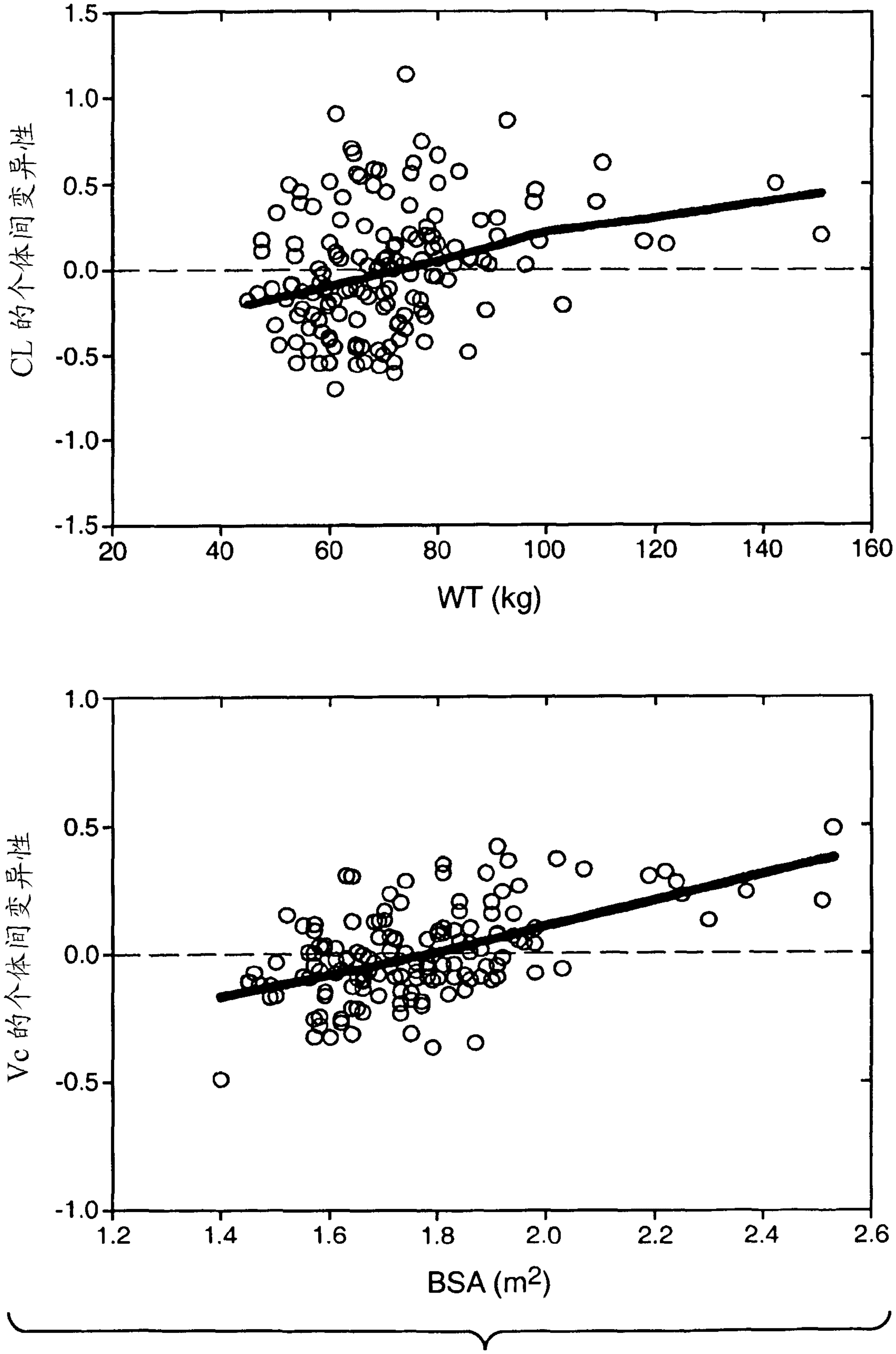

1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
CL 的个体间变异性
20
40
60
80
100
120
140
160
WT (kg)
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
Vc 的个体间变异性
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
BSA (m2)

图11A

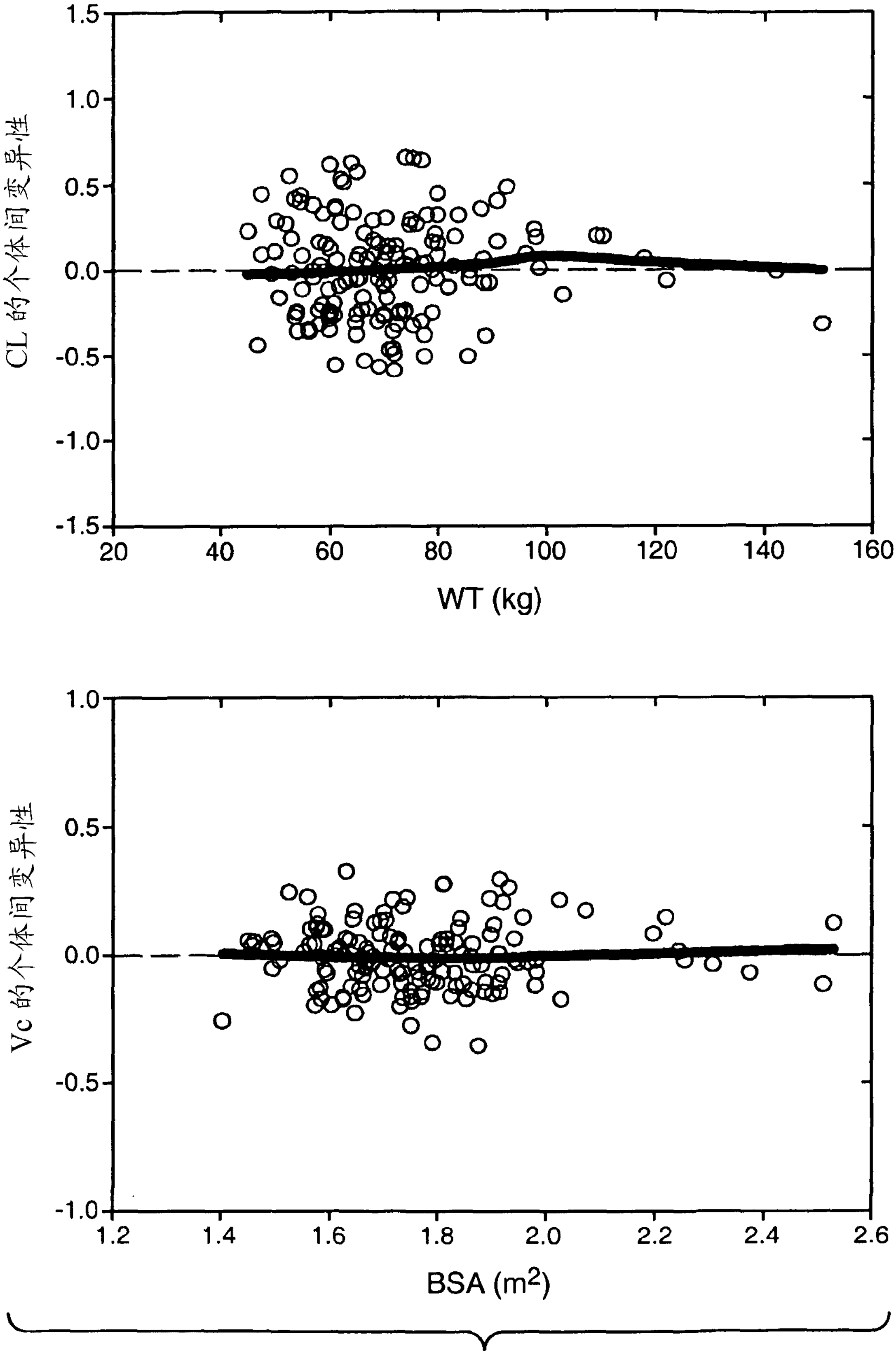

CL 的个体间变异性
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
20
40
60
80
100
120
140
160
WT (kg)
Vc 的个体间变异性
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
1.2
1.4
1.6
1.8
2.0
2.2
2.4
2.6
BSA (m2)

图11B

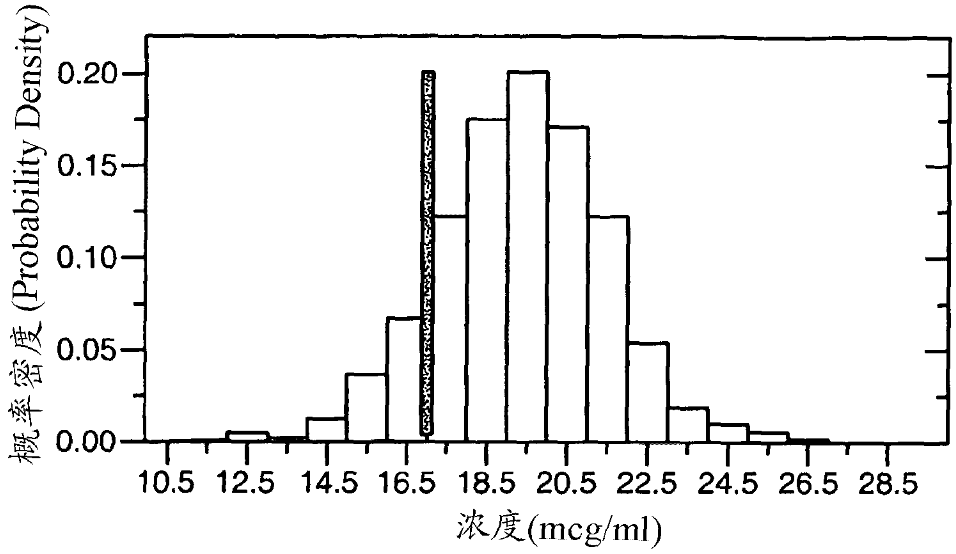

概率密度 (Probability Density)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
10.5 12.5 14.5 16.5 18.5 20.5 22.5 24.5 26.5 28.5
浓度(mcg/ml)

图12A

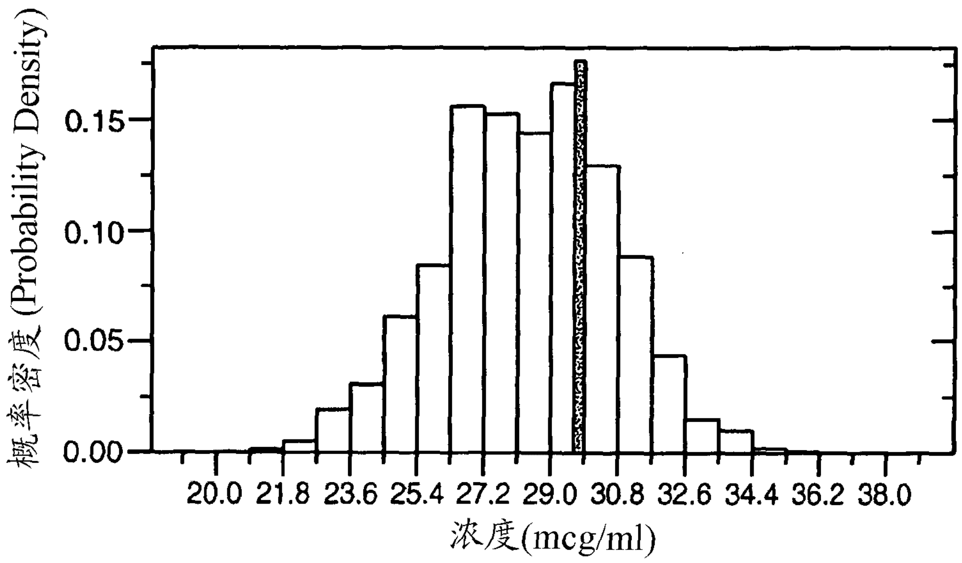

概率密度 (Probability Density)
0.15
0.10
0.05
0.00
20.0 21.8 23.6 25.4 27.2 29.0 30.8 32.6 34.4 36.2 38.0
浓度(mcg/ml)

图12B

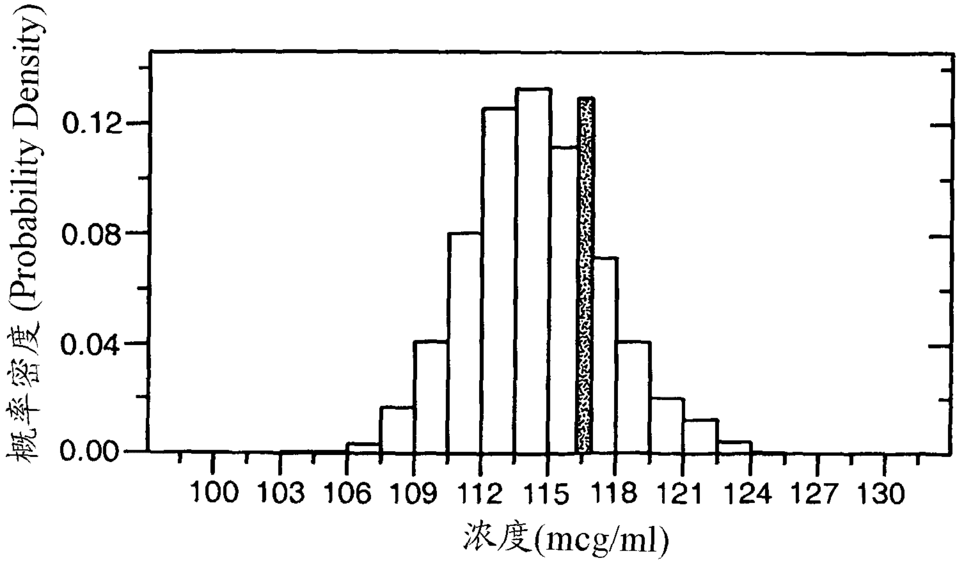

概率密度 (Probability Density)
0.12
0.08
0.04
0.00
100 103 106 109 112 115 118 121 124 127 130
浓度(mcg/ml)

图12C

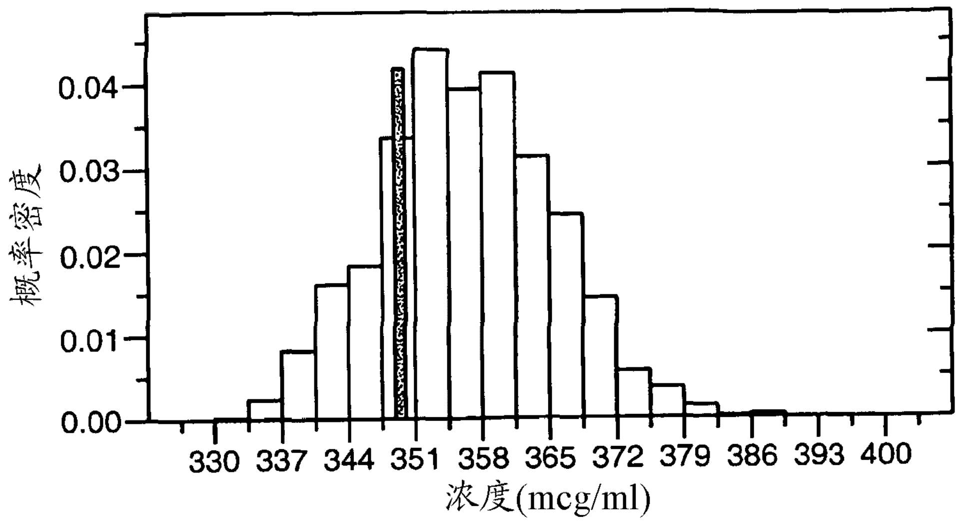

概率密度
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
330 337 344 351 358 365 372 379 386 393 400
浓度(mcg/ml)

图12D

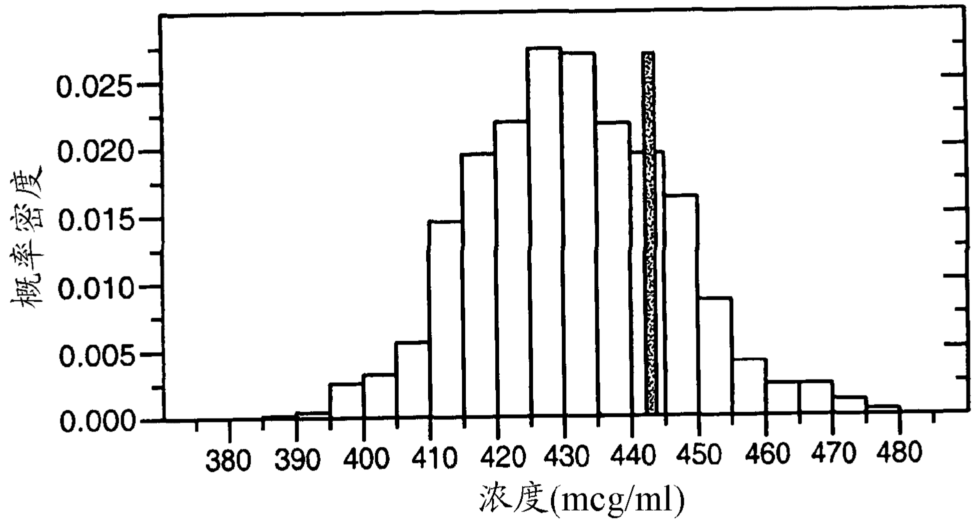

0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
概率密度
380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480
浓度(mcg/ml)

图12E

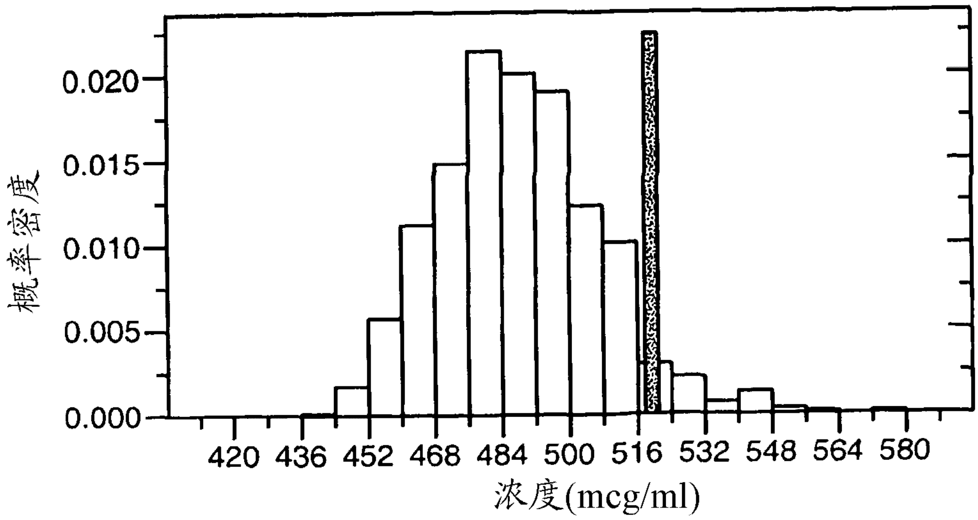

0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
概率密度
420 436 452 468 484 500 516 532 548 564 580
浓度(mcg/ml)

图12F

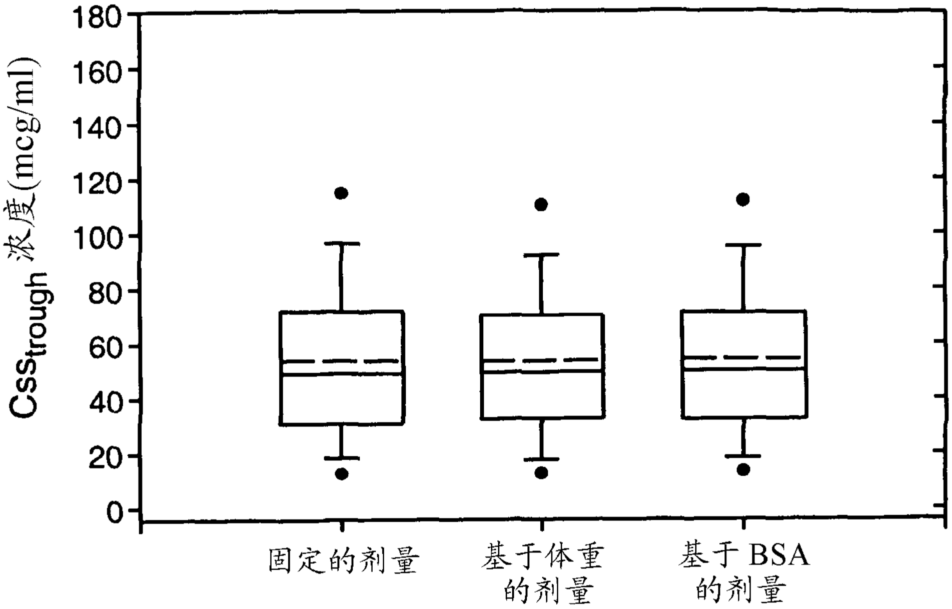

180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Css$_{trough}$ 浓度(mcg/ml)
固定的剂量
基于体重的剂量
基于BSA的剂量

图13

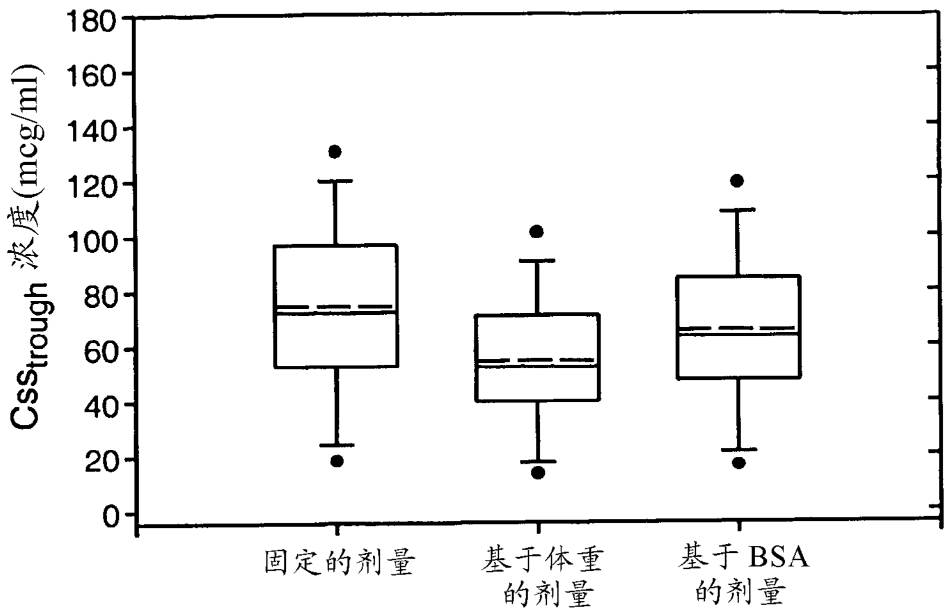

180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Css$_{trough}$ 浓度(mcg/ml)
固定的剂量
基于体重的剂量
基于BSA的剂量

图14A

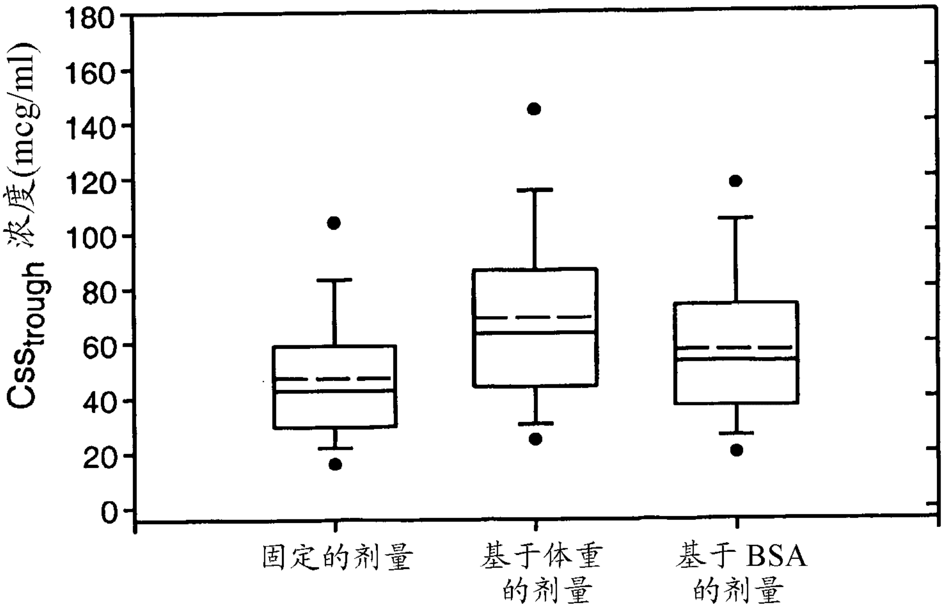

Css$_{trough}$ 浓度(mcg/ml)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
固定的剂量
基于体重的剂量
基于 BSA 的剂量

图14B