



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104093743 B

(45)授权公告日 2018.04.24

(21)申请号 201280067754.8

(22)申请日 2012.11.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104093743 A

(43)申请公布日 2014.10.08

(30)优先权数据
61/563,092 2011.11.23 US
61/656,670 2012.06.07 US
61/722,558 2012.11.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.07.22

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/066038 2012.11.20

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/078191 EN 2013.05.30

(73)专利权人 医学免疫有限责任公司
地址 美国马里兰州

(72)发明人 帕塔·S·乔杜里 D·泰斯 肖战
菲力浦·斯泰纳
克丽斯塔·齐纳尔
马龙·雷贝拉托

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 郑霞

(51)Int.Cl.
C07K 16/40(2006.01)

(56)对比文件
CN 1214695 A, 1999.04.21,
WO 2011044311 A2, 2011.04.14,
Sala等. An ErbB-3 antibody, MP-RM-1,
inhibits tumor growth by blocking ligand-
dependent and independent activation of
ErbB-3/Akt signaling.《Oncogene》.2011,第31
卷(第10期),1275-86.

Noriyuki Takai等. 2C4, a monoclonal
antibody against HER2, disrupts the HER
kinase signaling pathway and inhibits
ovarian carcinoma cell growth and
inhibits ovarian carcinoma cell growth.
《Cancer》.2005,第104卷(第12期),

审查员 高雅

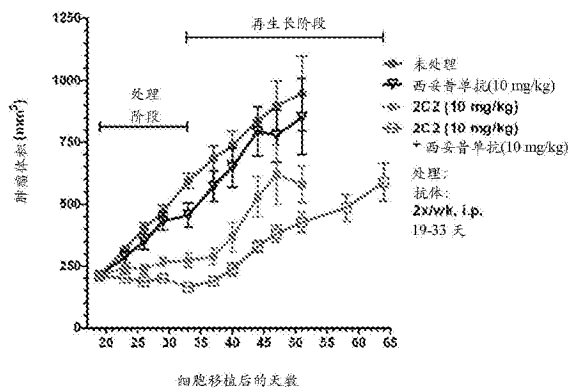
权利要求书2页 说明书74页
序列表20页 附图42页

(54)发明名称

特异于HER3的结合分子及其用途

(57)摘要

本发明涉及结合HER3受体胞外域并且通过配体依赖性和/或非配体依赖性机制抑制多种HER3受体相关功能的抗体及其抗原结合片段。还提供了半衰期增加的组合物。另外,本发明提供了用于诊断和治疗与HER3介导的信号转导有关的疾病的组合物和方法。



1. 一种特异性结合至HER3的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:3的抗体轻链可变区(VL)和SEQ ID NO:2的抗体重链可变区(VH),其中所述抗原结合片段为Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv或sc(Fv)₂。

2. 一种特异性结合至HER3的单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含VL和VH,其中所述VL包含以下氨基酸序列:

[FW₁]SGSLSNIGLNYS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDSPGGEA[FW₄]

其中,[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]和[FW₄]代表VL框架区,并且

其中所述VH包含以下氨基酸序列:

[FW₅]YYMQ[FW₆]YIGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGDAFDI[FW₈]

其中,[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]和[FW₈]代表VH框架区,并且其中,所述FW1为SEQ ID NO:40,FW2为SEQ ID NO:41,FW3为SEQ ID NO:42,FW4为SEQ ID NO:43,FW5为SEQ ID NO:36,FW6为SEQ ID NO:37,FW7为SEQ ID NO:38且FW8为SEQ ID NO:39,

其中所述抗原结合片段为Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv或sc(Fv)₂。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其包含重链恒定区。

4. 根据权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述重链恒定区是人IgG恒定区。

5. 根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述人IgG恒定区为IgG1恒定区。

6. 根据权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述人IgG恒定区相对于野生型人IgG恒定结构域在位置252、254和256包含氨基酸取代,其中编号是根据如Kabat中的EU索引进行的,并且其中

(a) 用酪氨酸(Y)取代位置252处的氨基酸,

(b) 用苏氨酸(T)取代位置254处的氨基酸,和

(c) 用谷氨酸(E)取代位置256处的氨基酸。

7. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其包含轻链恒定区,所述轻链恒定区选自人κ恒定区和人λ恒定区。

8. 根据权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其包含轻链恒定区,所述轻链恒定区选自人κ恒定区和人λ恒定区。

9. 根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其包含人λ恒定区。

10. 根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述人IgG恒定区相对于野生型人IgG恒定结构域在位置252、254和256包含氨基酸取代,其中所述编号是根据如Kabat中所述的EU索引进行的,并且其中

(a) 用酪氨酸(Y)取代位置252处的氨基酸,

(b) 用苏氨酸(T)取代位置254处的氨基酸,和

(c) 用谷氨酸(E)取代位置256处的氨基酸。

11. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中,所述抗体是人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、重组抗体、多重特异性抗体,或它们的抗原结合片段;或者其中所述抗体或其抗原结合片段结合至至少一种异源试剂。

12. 包含根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段和可药用载体的组合物。

13. 包含编码根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段的序列的核酸。
14. 包含根据权利要求13所述的核酸的载体。
15. 包含根据权利要求13所述的核酸序列的宿主细胞。
16. 一种制备抗体或其抗原结合片段的方法, 包括 (a) 培养根据权利要求15所述的细胞; 和 (b) 分离所述抗体或其抗原结合片段。
17. 治疗有效量的根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于抑制表达HER3的细胞增殖的药物中的用途。
18. 治疗有效量的根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗受试者中癌症的药物中的用途。
19. 根据权利要求18所述的用途, 其中, 所述癌症选自结肠癌、肺癌、胃癌、乳腺癌、头颈癌和黑素瘤。
20. 根据权利要求19所述的用途, 其中, 所述癌症包括包含KRAS突变的细胞。
21. 根据权利要求18所述的用途, 其中, 所述癌症的特征在于表达heregulin。
22. 治疗有效量的第一试剂与治疗有效量的第二试剂的组合在制备用于治疗受试者中癌症的药物中的用途, 其中所述第一试剂是权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段, 所述第二试剂是不同于所述第一试剂的抗癌剂。
23. 一种包含权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段的试剂盒。
24. 权利要求1或2所述的抗体或抗原结合片段在制备用于诊断患者中表达HER3的癌症的试剂中的用途, 其中所述试剂的使用包括以下步骤:
 - (a) 使来自所述患者的生物样品与权利要求1或2所述的抗体或抗原结合片段接触;
 - (b) 检测所述抗体或抗原结合片段与HER3的结合, 以确定所述来自患者的生物样品中的HER3蛋白水平; 以及
 - (c) 将所述HER3蛋白水平与标准HER3蛋白水平进行比较。
25. 权利要求1或2所述的抗体或抗原结合片段在制备用于在对患者中的表达HER3的癌症进行治疗的过程中监测HER3蛋白水平的试剂中的用途, 其中所述试剂的使用包括以下步骤:
 - (a) 向所述患者给予权利要求1或2所述的抗体或抗原结合片段;
 - (b) 使来自所述患者的生物样品与所述抗体或抗原结合片段接触;
 - (c) 检测所述抗体或抗原结合片段与HER3的结合, 以确定所述来自患者的生物样品中的HER3蛋白水平; 以及
 - (d) 将所述HER3蛋白水平与标准HER3蛋白水平进行比较。
26. 权利要求1或2所述的抗体或抗原结合片段在制备用于在对给予权利要求1或2所述的抗体或抗原结合片段的患者进行治疗的过程中监测HER3蛋白活性水平的试剂中的用途, 其中所述试剂的使用包括以下步骤:
 - (a) 使来自所述患者的生物样品特异性结合于磷酸化HER3的抗体或抗原结合片段接触;
 - (b) 检测所述抗体或抗原结合片段与磷酸化HER3的结合, 以确定所述来自患者的生物样品中的HER3蛋白活性水平; 以及
 - (c) 将所述HER3蛋白活性水平与标准HER3蛋白活性水平进行比较。

特异于HER3的结合分子及其用途

[0001] 对电子提交的序列表的引用

[0002] 本发明申请作为参考引入了作为标题为“Her3-100W01_SL”的文本文件与本发明申请一起提交的序列表,该文本文件于2012年11月12日生成并且大小为31.3千字节。

技术领域

[0003] 本发明提供了特异性结合至HER3的组合物和使用这些组合物治疗癌症的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 人表皮生长因子受体3 (HER3,也称为ErbB3) 是受体蛋白酪氨酸并且属于受体蛋白酪氨酸激酶 (RTK) 的表皮生长因子受体 (EGFR) EGFR/HER亚家族,所述亚家族由EGFR (HER1/ErbB1)、HER2/ErbB2、HER3/ErbB3和HER4/ErbB4组成。EGFR和HER2是公认的驱动多种类型的实体瘤的致癌作用的致癌RTK,所述实体瘤包括如乳腺癌、结肠直肠癌和肺癌的主要类别。已显示EGFR和HER2的酪氨酸激酶活性是它们致癌活性所必需的。

[0006] 像原型EGFR一样,跨膜受体HER3由胞外配体结合域 (ECD)、ECD内的二聚域、跨膜域和胞内蛋白酪氨酸激酶域 (TKD) 和C末端磷酸化域组成 (参见,例如, Kim等人, (1998), Biochem. J. 334, 189-195; Roepstorff等人, (2008) Histochem. Cell Biol. 129, 563-578)。

[0007] 配体调蛋白 (Heregulin) (HRG) 结合至HER3的胞外域并通过促进与其他EGFR家族成员 (例如,其他HER受体) 的二聚作用以及其胞内域的转磷酸作用激活受体介导的信号通路。已显示HER3缺少可检测的酪氨酸激酶活性,这可能是由于酪氨酸激酶域中的某些关键残基的非保守置换所造成的。因此,作为这种激酶缺乏的后果,HER3需要与其他RTK,特别是EGFR和HER2形成异二聚体以经历磷酸化作用并且需要在功能上是有活性的。

[0008] HER3在肿瘤发生中的主要作用是用作支架蛋白,从而使得能够最大程度地诱导PI3K/AKT途径。HER3已显示包含含有一簇6个C末端酪氨酸的基序,当磷酸化时,其模拟了共有PI3K/p85结合位点。因此,通过与HER3形成异二聚体,上游的肿瘤驱动子 (oncogenes)、EGFR、HER2、cMET和FGFR2能够最有效地结合至PI3K/AKT途径。因此,对HER3活性的损失能够阻断不同RTK驱动的多种系统中癌症发展的预期是合理的。研究已表明HER2增强的乳腺癌细胞中HER3 siRNA的抑制导致了与HER2 siRNA抑制类似的抗增殖作用,这进一步表明了癌症非常需要HER3。

[0009] 除了促进非应激条件下肿瘤的生长外,已发现HER3高度参与了赋予对多种靶标药物的治疗耐受性,所述药物包括EGFR酪氨酸激酶抑制剂,HER2单克隆抗体如曲妥珠单抗,和PI3K或AKT或MEK的小分子抑制剂。作为对于尽管开始有临床反应,但是一定会出现的原发瘤破坏以及对抗癌症耐受性问题的有希望的癌症靶标,这为HER3增加了另一层吸引力。

[0010] HER3具有两种不同的与其伴侣RTK二聚的方式:配体依赖性 (在存在HRG的情况下) 或非配体依赖性。就HER2-HER3二聚体而言,已知在低至中HER2表达的细胞中,HER3仅可以在配体结合后与HER2复合,相反在HER2扩增的细胞中 (HER2 IHC3+),它们与HRG形成自发的二聚体 (Junttila等人, (2009) Cancer Cell. 15 (5): 429-40)。在存在或不存在配体的情况下形成的二聚体在结构上是不同的,如早期研究所显示的,该研究显示曲妥珠单抗/

Herceptin® (Genentech/Roche批准用于HER2+乳腺癌的HER2单克隆抗体) 仅能够破坏非配体依赖性二聚体,但是不能破坏配体依赖性二聚体,而帕妥珠单抗\ **Omnitarg®** (rhuMAb2C4, Genentech/Roche的3期临床试验中的HER2单克隆抗体) 仅可以破坏配体依赖性二聚体。

[0011] HER家族成员之间二聚体的形成增强了HER3的信号电位,并且是不但能够用于信号多样化而且可以用于信号放大的方式。在多个细胞背景中,已显示HER3是磷酸化的。例如,在过表达HER3的人乳腺癌亚型中,HER3是酪氨酸残基组成型磷酸化的(参见,例如, Kraus等人, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2900-2904; Kim等人, (1998), *Biochem. J.* 334, 189-195; Schaefer等人, (2004) *Cancer Res.* 64, 3395-3405; Schaefer等人, (2006) *Neoplasia* 8, 612-622)。因此,有效干扰HER3磷酸化的疗法是所期望的。

[0012] 另外,已发现在几种类型的癌症中HER3是过表达和/或过度激活的,所述癌症如乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝癌、肾癌和膀胱癌、胰癌、脑癌、造血组织肿瘤、成视网膜细胞瘤、黑素瘤、结肠直肠癌、胃癌、头颈癌、肺癌等。(参见,例如, Sithanandam&Anderson (2008) *Cancer Gene Ther.* 15, 413-448)。一般地,HER3通常在EGFR、HER2、C-Met和FGFR1表达癌症中激活。

[0013] 已显示了HER2/HER3的表达和从非侵袭性向侵袭性阶段的发展之间的相关性 (Alimandi等人, *Oncogene* 10, 1813-1821; DeFazio等人, *Cancer* 87, 487-498; Naidu等人, *Br. J. Cancer* 78, 1385-1390)。因此,HER3可以用作提高的肿瘤侵袭性和存活率较差的诊断标志物。PI3K/AKT的持续HER3激活已反复显示导致了肿瘤对EGFR/HER2抑制剂的耐受性。

[0014] 尽管已研究了HER3在癌症的发展和进展中的作用(参见,例如, Horst等人, (2005) *Int. J. Cancer* 115, 519-527; Xue等人, (2006) *Cancer Res.* 66, 1418-1426),但是HER3作为临床干预的靶标仍很大程度上是未理解的。目前大部分免疫疗法主要集中在抑制HER2,具体地,HER2/HER3复合物的异二聚体的作用(参见,例如, Sliwkowski等人, (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 14661-14665)。因此,本发明的目标是提供有效抑制HER3介导的能够用于多种癌症的诊断、预后预测和治疗的细胞信号的改善的免疫治疗剂。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明公开内容提供了抗HER3结合分子,例如,其抗体或抗原结合片段,例如,在配体依赖性和非依赖性环境中能够抑制HER3活性的单克隆抗体。相反,本领域中其他抗HER3单克隆抗体(例如, Ab#6 (国际专利公开W0 2008/100624) 和U1-59 (国际专利公开W0 2007077028;在本文中也称为AMG) 仅能够抑制配体依赖性HER3活性。还公开了效力提高并且半衰期延长的亲合力成熟的抗HER3结合分子,并因此能够以延长的剂量间隔并且以较小的剂量体积不太频繁地施用所述结合分子。本发明公开还提供了治疗人受试者中疾病(如癌症)的方法,其包括施用抗HER3结合分子。在一些具体的方面中,使用了2C2-来源的YTE突变体人抗体。

[0017] 本发明公开提供了特异性结合至HER3胞外域内表位的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述结合分子特异性结合至与包含CL16或2C2的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)的抗体或其抗原结合片段相同的HER3表位。还提供了特异性结合至HER3并且通过包含CL16或2C2的VH和VL的抗体或其抗原结合片段竞争性抑制HER3结合的分离的结合分子或其抗原结合片段。

[0018] 本发明公开还提供了包含抗体VL的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VL包含以下氨基酸序列:

[0019] [FW₁]X₁GSX₂SNIGLNYVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃X₄X₅GE X₆[FW₄]

[0020] 其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]和[FW₄]代表VL框架区,并且其中

[0021] (a) X₁代表氨基酸残基精氨酸(R)或丝氨酸(S),

[0022] (b) X₂代表氨基酸残基丝氨酸(S)或亮氨酸(L),

[0023] (c) X₃代表氨基酸残基丝氨酸(S)或甘氨酸(G),

[0024] (d) X₄代表氨基酸残基亮氨酸(L)或脯氨酸(P),

[0025] (e) X₅代表氨基酸残基精氨酸(R)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)或丝氨酸(S),和

[0026] (f) X₆代表氨基酸残基缬氨酸(V)或丙氨酸(A)。

[0027] 此外,本发明公开提供了包含抗体VH的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VH包含以下氨基酸序列:

[0028] [FW₅]YYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGDAFDI[F W₈]

[0029] 其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]和[FW₈]代表VH框架区,并且其中X₇代表氨基酸残基酪氨酸(Y)、异亮氨酸(I)或缬氨酸(V)。

[0030] 本发明公开提供了包含抗体VL和抗体VH的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VL包含以下氨基酸序列:

[0031] [FW₁]X₁GSX₂SNIGLNYVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃X₄X₅GEX₆[FW₄]

[0032] 其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]和[FW₄]代表VL框架区,并且其中

[0033] (a) X₁代表氨基酸残基精氨酸(R)或丝氨酸(S),

[0034] (b) X₂代表氨基酸残基丝氨酸(S)或亮氨酸(L),

[0035] (c) X₃代表氨基酸残基丝氨酸(S)或甘氨酸(G),

[0036] (d) X₄代表氨基酸残基亮氨酸(L)或脯氨酸(P),

[0037] (e) X₅代表氨基酸残基精氨酸(R)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)或丝氨酸(S),和

[0038] (f) X₆代表氨基酸残基缬氨酸(V)或丙氨酸(A),和

[0039] 其中所述VH包含以下氨基酸序列:

[0040] [FW₅]YYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGDAFDI[F W₈]

[0041] 其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]和[FW₈]代表VH框架区,并且其中X₇代表氨基酸残基酪氨酸(Y)、异亮氨酸(I)或缬氨酸(V)。

[0042] 本发明公开还提供了包含抗体VL的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VL包含与SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20相同或者除了4个、3个、2个或1个氨基酸取代外与SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20相同的VL互补决定区-1(VL-CDR1)氨基酸序列。另外,本发明公开提供了包含抗体VL的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VL包含与SEQ ID NO:21相同或者除了4个、3个、2个或1个氨基酸取代外与SEQ ID NO:21相同的VL互补决定区-2(VL-CDR2)氨基酸序列。

[0043] 另外,本发明公开提供了包含抗体VL的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VL包含与:SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30相同或

者除了4个、3个、2个或1个氨基酸取代外与SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:30相同的互补决定区-3 (VL-CDR3) 氨基酸序列。另外,本发明公开提供了包含抗体VH的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VH包含与SEQ ID NO:31相同或者除了4个、3个、2个或1个氨基酸取代外与SEQ ID NO:31相同的互补决定区-1 (VH-CDR1) 氨基酸序列。

[0044] 此外,本发明公开提供了包含抗体VH的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VH包含与SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34相同或者除了4个、3个、2个或1个氨基酸取代外与SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:34相同的互补决定区-2 (VH-CDR2) 氨基酸序列。还提供了包含抗体VH的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VH包含与SEQ ID NO:35相同或者除了4个、3个、2个或3个氨基酸取代外与SEQ ID NO:35相同的互补决定区-3 (VH-CDR3) 氨基酸序列。

[0045] 本发明公开提供了包含抗体VL的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VL包含分别与以下氨基酸序列相同或者除了一种或多种VL-VDR中的4个、3个、2个或1个氨基酸取代外与之相同的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3氨基酸序列,所述氨基酸序列为:SEQ ID NO:18、21和22、SEQ ID NO:18、21和26、SEQ ID NO:18、21和27、SEQ ID NO:20、21和22、SEQ ID NO:19、21和22、SEQ ID NO:18、21和25、SEQ ID NO:18、21和28、SEQ ID NO:18、21和29、SEQ ID NO:18、21和30、SEQ ID NO:18、21和23、SEQ ID NO:19、21和23、SEQ ID NO:20、21和23、SEQ ID NO:18、21和24或者SEQ ID NO:18、21和25。本发明公开还提供了包含抗体VH的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VH包含分别与以下氨基酸序列相同或者除了一种或多种VH-VDR中的4个、3个、2个或1个氨基酸取代外与之相同的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3氨基酸序列,所述氨基酸序列为:SEQ ID NO:31、32和35、SEQ ID NO:31、33和35或SEQ ID NO:31、34和35。

[0046] 另外,本发明公开提供了包含VL和VH的特异性结合至HER3的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述VL和VH包含分别与以下氨基酸序列相同或者除了一种或多种VDR中的4个、3个、2个或1个氨基酸取代外与之相同的VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3氨基酸序列,所述氨基酸序列为:SEQ ID NO:18、21、22、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、26、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、27、31、32和35、SEQ ID NO:20、21、22、31、32和35、SEQ ID NO:19、21、22、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、25、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、28、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、29、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、30、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、23、31、32和35、SEQ ID NO:19、21、23、31、32和35、SEQ ID NO:20、21、23、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、24、31、32和35,或SEQ ID NO:18、21、25、31、32和35。还提供了包含抗体VL和抗体VH的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VL包含与参比氨基酸序列至少约90%至约100%相同的氨基酸序列,所述参比氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17。本发明公开还提供了包含抗体VL和抗体VH的特异性结合至HER3的分离的结合分子或其抗原结合片段,其中所述VH包含与参比氨基酸序列至少约90%至约100%相同的氨基酸序列,所述参比氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:12和SEQ ID

NO:13。此外,本发明公开提供了特异性结合至HER3的分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含VL,所述VL包含与参比氨基酸序列至少约90%至约100%相同的序列,所述参比氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,并且其中所述抗体或抗原结合片段包含VH,所述VH包含与参比氨基酸序列至少约90%至约100%相同的序列,所述参比氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0047] 本发明公开还提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其包括包含SEQ ID NO:49的VL和包含SEQ ID NO:50的VH。另外,本发明公开提供了分离的抗体或其抗原结合片段,其包括包含SEQ ID NO:3的VL和包含SEQ ID NO:2的VH。此外,本发明公开提供了特异性结合至HER3胞外域内的表位的分离的结合分子或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:3的抗体VL、SEQ ID NO:2的抗体VH和SEQ ID46的IgG1恒定区。还提供了特异性结合至HER3胞外域内的表位的分离的结合分子或其抗原结合片段,其由SEQ ID NO:3的抗体VL、SEQ ID NO:2的抗体VH和SEQ ID46的IgG1恒定区组成。

附图说明

[0048] 图1显示了KPL4细胞中克隆16抗HER3单克隆抗体的内化,其表现为表面荧光染色的缺失。顶部部分显示了时间=0时的内化。底部部分显示了2.5小时后的内化。

[0049] 图2A显示了对应于抗HER3单克隆抗体克隆16 (CL16;原始,亲本克隆)、克隆16 (GL;生殖系克隆)、5H6、8A3、4H6、6E.3、2B11、2D1、3A6和4C4的VL序列的多重序列比对。显示了CDR1、CDR2和CDR3的位置。将不同于CL16 (GL) 抗体的氨基酸残基加亮。

[0050] 图2B显示了对应于抗HER3单克隆抗体克隆16 (CL16;亲本克隆)以及克隆15D12.1 (也称为15D12.I)和15D12.2 (也称为15D12.V)的VH序列的多重序列比对。显示了CDR1、CDR2和CDR3的位置。将不同于CL16亲本抗体的氨基酸残基加亮。

[0051] 图2C显示了对应于抗HER3单克隆抗体CL16 (原始,亲本克隆)、CL16 (GL;生殖系克隆)、1A4、2C2、3E.1、2F10和2B11的VL序列的多重序列比对。显示了CDR1、CDR2和CDR3的位置。将不同于CL16 (GL) 抗体的氨基酸残基加亮。

[0052] 图3显示了配体驱动的MCF-7细胞中HER3磷酸化 (pHER3) 的抑制,其中HER3仅通过外源HRG (配体) 激活。测定了2C2抗HER3单克隆、公开的抗HER3单克隆抗体AMG和MM,以及R347对照抗体。提供了pHER3的最大抑制百分比和IC₅₀。

[0053] 图4显示了MDA-MB-175细胞中的生长抑制,它是已确立的HRG-自分泌环驱动模型,其中内源HRG驱动HER3活性和细胞生长。测定了2C2抗HER3单克隆、公开的抗HER3单克隆抗体AMG和MM,以及R347对照抗体。提供了最大生长抑制百分比和IC₅₀。

[0054] 图5显示了HMCB细胞中的生长抑制,它是已确立的HRG-自分泌环驱动模型,其中内源HRG驱动HER3活性和细胞生长。测定了2C2抗HER3单克隆、公开的抗HER3单克隆抗体AMG和MM,以及R347对照抗体。提供了IC₅₀。

[0055] 图6显示在该配体依赖性黑素瘤中2C2不但抑制HMCB细胞生长,而且还抑制HER3磷酸化 (pHER3) 和AKT磷酸化 (pAKT)。

[0056] 图7显示在配体依赖性A549NSCLC中2C2抑制HER3磷酸化 (pHER3) 和AKT磷酸化

(pAKT)。

[0057] 图8显示在肺癌、胃癌和乳腺癌的细胞模型中HER3磷酸化 (pHER3) 的抑制。部分A显示了HCC827细胞系 (具有EGFR/HER3信息交流 (cross-talk) 的突变体EGFR驱动的NSCLC模型) 中pHER3的抑制。部分B显示了通过用EGFR TKI长期处理所获得的EGFR-TKI-耐受性HCC827NSCLC模型中pHER3的抑制。部分C显示了MKN45细胞系 (具有cMET-HER3信息交流 (cross-talk) 的cMET扩增的胃癌模型) 中pHER3的抑制。部分D显示了Kato III细胞系 (具有FGFR2-HER3信息交流 (cross-talk) 的FGFR2扩增的胃癌模型) 中pHER3的抑制。部分E显示了BT-474细胞系 (HER2扩增的乳腺癌非配体依赖性模型 (即细胞缺少HRG表达)) 中pHER3的抑制。测定了2C2抗HER3单克隆、公开的抗HER3单克隆抗体AMG和MM, 以及R347对照抗体。提供了pHER3的最大抑制百分比和IC₅₀。

[0058] 图9显示在胃癌和乳腺癌的细胞模型中AKT磷酸化 (pAKT) 的抑制。部分A显示了MKN45细胞系中pAKT的抑制。部分B显示了Kato III细胞系中pAKT的抑制。部分C显示了BT-474细胞系 (HER2扩增的乳腺癌非配体依赖性模型 (即细胞缺少HRG表达)) 中pAKT的抑制。测定了2C2抗HER3单克隆、公开的抗HER3单克隆抗体AMG和MM, 以及R347对照抗体。提供了pAKT的最大抑制百分比和IC₅₀。

[0059] 图10显示2C2抑制MDA-MB-361细胞中的细胞信号和增殖。部分A显示在HER2扩增的MDA-MB-361细胞中2C2抑制HER3磷酸化 (pHER3)。部分B显示2C2以剂量依赖性方式抑制细胞生长。显示了6和14天处理时的百分比抑制率 (分别为上部分和下部分)。

[0060] 图11显示了在表达高水平HRG的HARA-B细胞中2C2抑制HER3磷酸化 (pHER3)。

[0061] 图12显示2C2和rhuMab2C4而不是EGFR拮抗剂西妥昔单抗或吉非替尼抑制HRG配体依赖性信号 (部分A和B的底部)。部分A和B的顶部部分为基底细胞, SW620 (部分A, 左侧)、SW480 (部分A, 中间)、Co1o205 (部分A, 右侧)、LOVO (部分B, 左侧)、HCT15 (部分B, 中间) 和Caco-2 (部分B, 右侧)。

[0062] 图13显示了测量克隆16、公开的AMG和MM抗HER3单克隆抗体、阳性对照配体阻断的抗HER3单克隆抗体和R347对照抗体直接阻断HRG结合至HER3的HRG-HER3ELISA结合测定。

[0063] 图14显示2C2阻断了HER2-HER3的二聚。部分A显示评价配体依赖性模型T-47D细胞中HER2-HER3复合物形成程度的HRG可诱导的HER2-HER3二聚测定, 其显示用2C2、CL16、AMG和MM抗HER3单克隆抗体预处理的清楚的HRG诱导的HER2-HER3结合。所有抗HER3抗体阻断这种配体诱导的HER2-HER3二聚作用。部分B显示了评价BT-474细胞中HER2-HER3复合物形成程度的非配体依赖性HER2-HER3二聚测定, 用2C2或CL16预处理阻断了这种非配体依赖性HER2-HER3二聚作用。

[0064] 图15显示了2C2诱导的HER3内化和降解。部分A显示了定量对两种不同2C2单克隆抗体浓度反应的时间过程和目标内化程度的基于FACS的内化测定。部分B显示了用抗HER3 2C2单克隆抗体或R347对照抗体预处理的模型结肠直肠癌细胞LoVo、HCT15和SW620中的HER3降解作用。

[0065] 图16显示了基于FACS的细胞周期分析, 其表明在SkBR3细胞中, HER2扩增的乳腺癌细胞类似于BT-474, Herceptin® (曲妥珠单抗) 和CL16单克隆抗体 (2C2单克隆抗体的亲本前导抗体 (parental lead)) 两者均导致在G1期的细胞周期停滞。还显示了对应于用R347对照抗体和用rhuMab2C4抗HER2单克隆抗体 (帕妥珠单抗/Omnitarg®) 处理的细胞的结果。

[0066] 图17显示了抗HER3抗体对HRG诱导的VEGF分泌的抑制。部分A显示了用抗HER3单克隆抗体CL16和Merrimack MM、抗HER2单克隆抗体Herceptin®(曲妥珠单抗),或R347对照抗体预处理的BT-474乳腺癌细胞中VEGF分泌的变化。部分B显示了用抗HER3单克隆抗体CL16和MerrimBck MM、抗HER2单克隆抗体Herceptin®(曲妥珠单抗),或R347对照抗体预处理的MCF-7模型乳腺癌细胞中VEGF分泌的变化。

[0067] 图18显示抗HER3单克隆抗体2C2结合至在Ad293细胞中异位表达的基于细胞表面的食蟹猴HER3(cyno HER3)并调节其活性。部分A显示了用对照载体(左侧)或表达食蟹猴HER3的载体(右侧)转染的Ad293细胞的免疫印迹分析。在具有或不具有HRG共刺激的情况下,用2C2或对照抗体(R347)处理细胞,并用抗HER3(中间印迹)、抗pHER3(顶部印迹)和抗GAPDH(底部印迹)抗体探查。部分B表示部分A的上方4个泳道中基于密度测定法的pHER3定量。

[0068] 图19显示在使用人FADU头颈异种移植模型时,施用2C2单克隆抗体后肿瘤体积的剂量依赖性减小。部分A显示在该模型中每周施用两次7mg/kg的2C2是最有效的,其dTGI(肿瘤生长抑制)为99%。部分B显示在使用人FADU头颈异种移植模型时,在混合施用2C2单克隆抗体和抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗后肿瘤体积显著减小。组合治疗在10个中产生了7个部分消退并且在10个中产生了2个完全消退。

[0069] 图20显示在向具有肿瘤的小鼠施用5mg/kg或30mg/kg的单次剂量和反复剂量后2C2的非线性药物动力学。数据表明小鼠HER3用作吸附物(sink)以结合施用于小鼠的2C2,并且作为单次剂量的30mg/kg足以使所述吸附物(sink)饱和。

[0070] 图21显示在使用人FADU头颈异种移植模型时10mg/kg负荷剂量的单克隆抗体2C2的抗肿瘤益处。施用2C2负荷剂量以饱和小鼠HER3吸附物使得3mg/kg的2C2能够显示出强烈的抗肿瘤活性,而无负荷剂量的3mg/kg的2C2仅具有适度的活性。

[0071] 图22显示用2C2-YTE处理降低了FADU异种移植肿瘤提取物中pHER3和pAKT的水平。在该实验中,pHER3和pAKT的水平分别降低了59.5%和51.7%。在该实验中,在总HER3水平中未观察到变化。

[0072] 图23显示在使用人Detroit562头颈异种移植模型时,施用2C2单克隆抗体后肿瘤体积的剂量依赖性减小。部分A显示每周施用2次10mg/kg的2C2是最有效的,其dTGI为72%。部分B显示在使用人Detroit562头颈异种移植模型时,在混合施用2C2单克隆抗体和抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗后肿瘤体积减小。组合治疗在10个中产生了9个部分消退,而单独的西妥昔单抗在10个中产生了5个部分消退。Detroit562异种移植模型含有PIK3CA突变。

[0073] 图24显示在使用人CAL27头颈异种移植模型时,在施用2C2-YTE单克隆抗体后肿瘤体积的剂量依赖性减小。

[0074] 图25显示在使用人A549NSCLC异种移植模型时,施用2C2单克隆抗体后肿瘤体积的剂量依赖性减小。部分A显示每周施用2次30mg/kg的2C2至处理期的最后一天(第33天;之后是再生长)是最有效的,其dTGI为91%。10mg/kg时的2C2-YTE和2C2具有相当的活性。部分B显示在使用人A549NSCLC异种移植模型时,在混合施用2C2单克隆抗体和抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗后肿瘤体积减小。在处理期期间,向2C2加入西妥昔单抗提高了2C2的活性,并且在肿瘤再生长期间延缓了肿瘤的再生长。A549异种移植模型含有KRAS突变和LKB-1缺失。

[0075] 图26显示在使用人HARA-B鳞状细胞癌异种移植模型时,在施用2C2-YTE单克隆抗

体后肿瘤体积减小。每周施用2次30mg/kg的2C2-YTE是最有效的,其dTGI为64.6%。10mg/kg的2C2-YTE具有相当的活性,而3mg/kg的2C2-YTE无活性。

[0076] 图27显示在使用人HT-29结肠直肠异种移植模型时,施用2C2单克隆抗体后肿瘤体积的剂量依赖性减小。每周施用2次30mg/kg的2C2至处理期的最后一天(第26天;之后是再生长)是最有效的,其dTGI为56%。30mg/kg时的2C2-YTE和2C2具有相当的活性。HT-29异种移植模型含有BRAF突变。

[0077] 图28显示在使用人HCT-116结肠直肠异种移植模型时,施用2C2单克隆抗体后肿瘤体积减小。每周施用2次30mg/kg的2C2是最有效的,其dTGI为43%。10mg/kg时的2C2-YTE和2C2具有相当的活性。HCT-116异种移植模型含有KRAS突变。

[0078] 图29显示在使用人LOVO结肠直肠异种移植模型时,施用2C2单克隆抗体后肿瘤体积减小。每周施用2次30mg/kg的2C2是最有效的,其dTGI为48%。10mg/kg时的2C2-YTE和2C2具有相当的活性。LOVO异种移植模型含有KRAS突变。

[0079] 图30显示在使用人DU145前列腺异种移植模型时,施用2C2单克隆抗体后肿瘤体积减小。每周施用2次30mg/kg的2C2是最有效的,其dTGI为77%。DU145异种移植模型含有LKB-1缺失。

[0080] 图31显示在使用人BT-474乳腺癌正位异种移植模型时,施用2C2单克隆抗体后肿瘤体积减小。部分A显示每周施用2次30mg/kg的2C2是最有效的,其dTGI为55%。部分B显示在使用人BT-474乳腺癌正位异种移植模型时,在混合施用2C2单克隆抗体和小分子药物拉帕替尼后肿瘤体积减小。在处理期期间,向拉帕替尼加入2C2提高了拉帕替尼的活性,并且在肿瘤再生长期间适当延缓了肿瘤的再生长。在处理期期间,作为单一效力治疗,30mg/kg时的2C2-YTE和2C2具有相当的活性。部分C显示在使用人BT-474乳腺癌正位异种移植模型时,在施用2C2单克隆抗体后肿瘤体积减小。在该模型中,单独的曲妥珠单抗是非常有活性的,并且在该模型中,通过2C2是加入观察到了轻微的提高。BT-474异种移植模型含有扩增的HER2(通过HercepTest为3+)。

[0081] 图32显示用克隆16(2C2前体)处理降低了BT-474异种移植肿瘤提取物中pHER3和pAKT的水平。在该实验中,pHER3和pAKT的水平分别降低了50%和46.1%。在该实验中,在总HER3水平中未观察到变化。

[0082] 图33显示在使用人MCF-7乳腺癌正位异种移植模型时,施用2C2单克隆抗体后肿瘤体积减小。部分A显示每周施用2次10mg/kg的2C2是最有效的,其dTGI为34%。10mg/kg时的2C2-YTE和2C2具有相当的活性。部分B显示在使用人MCF-7乳腺癌正位异种移植模型时,在混合施用2C2单克隆抗体和小分子药物紫杉醇后肿瘤体积减小。向紫杉醇中加入2C2提高了处理期期间紫杉醇的活性。MCF-7异种移植模型含有低水平的HER2(通过HercepTest为1+)。

[0083] 图34显示使用人MDA-MB-361乳腺癌正位异种移植模型(部分A-C)时,在2C2-YTE施用后肿瘤体积减小。在处理期期间,向单克隆抗体曲妥珠单抗加入2C2-YTE提高了曲妥珠单抗的活性,并且在肿瘤再生长期间延缓了肿瘤的再生长(部分A)。向单克隆抗体rhuMAb2C4加入2C2-YTE适当提高了rhuMAb2C4的活性,但是不会延缓肿瘤的再生长(部分B)。向小分子药物拉帕替尼中加入2C2-YTE提高了拉帕替尼的活性,但是不会延缓肿瘤的再生长(部分C)。

[0084] 图35显示在这些抗体60mg/kg的单次剂量后,与2C2和克隆16-GL相比,首次接受试

验的人FcRn SCID转基因小鼠的血清中单克隆抗体2C2-YTE的延长的暴露水平。

[0085] 图36显示HER3蛋白对用MEK抑制剂(MEKi) 司美替尼处理起反应的水平提高(星号表示)。在HT-29细胞(左侧)、LOVO(中间)和Co1o205(右侧)中,用MEKi结合2C2处理使HER3水平降低回到正常水平。还在HT-29和LOVO模型中检查了pHER3的水平并显示出类似的反应。

[0086] 图37显示在皮下癌症异种移植模型和A549(部分A,顶部)、HT-29(部分B,顶部)和LOVO(部分C,顶部)中,2C2-YTE和司美替尼的组合提高了任一种试剂单独的抗肿瘤效力。用所述组合处理的小鼠的肿瘤裂解液(A549、HT-29和LOVO异种移植模型)的免疫印迹分析显示磷酸HER3和磷酸ERK被完全抑制(部分A-C,底部)。

[0087] 发明详述

[0088] 本发明提供了结合至HER3的分子及其抗原结合片段。在一些方面,这些分子是特异性结合至HER3的抗体及其抗原结合片段。还提供了相关的多核苷酸、包含所述抗HER3抗体或其抗原结合片段的组合物和制备抗HER3抗体和抗原结合片段的方法。还提供了使用新型抗HER3抗体的方法,如治疗受试者中癌症的方法和诊断使用。

[0089] 为了使本发明可以更容易理解,首先定义了某些术语。这整详细说明中描述了其他定义。

[0090] I. 定义

[0091] 在详细描述本发明之前,应理解本发明不限于具体的组成或处理步骤,照此它是可以改变的。除非上下文中明确规定,否则如本说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式的“一个”和“所述”包括复数对象。在本文中,术语“一个”以及术语“一个或多个”和“至少一个”可以互换使用。

[0092] 此外,在本文中使用时,“和/或”将作为两种指定的特征或组成中的每一个与另一个或不与另一个一起的具体公开。因此,在本文中,如在短语如“A和/或B”中使用的,术语“和/或”旨在包括“A和B”、“A或B”、“A(单独的)”和“B(单独的)”。同样地,如在短语如“A、B和/或C”中所使用的,术语“和/或”旨在涵盖以下方面中的每一个:A、B和C;A、B或C;A或C;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独的);B(单独的);和C(单独的)。

[0093] 除非另外定义,否则本文中所使用的所有技术和科学术语的含义与本发明公开相关领域技术人员通常理解的含义相同。例如,“生物医学和分子生物学简明词典(the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology)”,Juo,Pei-Show,第二版,2002,CRC Press;“细胞和分子生物学词典(The Dictionary of Cell and Molecular Biology)”,第三版,1999,Academic Press;和“生物化学和分子生物学生津词典(the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology)”,修订版,2000,Oxford University Press,向技术人员提供了本发明中使用的多种术语的常规词典。

[0094] 单位、前缀和符号以它们在Système International de Unites(SI)中接受的形式表示。数值范围包括限定该范围的数值。除非另外说明,否则氨基酸序列以氨基至羧基的方向从左到右书写。本文提供的标题不是对多个方面的限制,它可以通过总体上参考本说明书得出。因此,通过全面参考本说明书对以下所定义的术语进行了更充分的定义。

[0095] 应理解在本文中用语言“包括”描述了无论哪些方面,还提供了用术语“由……组成”和/或“基本由……组成”描述的其他类似方面。

[0096] 在本文中,用一般已知的三字母符号或用IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的

单字母符号表示氨基酸。同样地,用一般接受的单字母编码表示核苷酸。

[0097] 术语“HER3”和“HER3受体”在本文中是可互换使用的并且表示ErbB3蛋白(在文献中也称为HER3,ErbB3受体)如在美国专利No.5480968和在Plowman等人,(1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87,4905-4909中所述;还参见,Kani等人,(2005) Biochemistry44,15842-15857和Cho&Leahy (2002) Science297,1330-1333。全长成熟HER3蛋白序列(无前导序列)对应于图4中所示的序列和美国专利No.5480968中的SEQ ID NO:4 减去从成熟蛋白上切割下的19个氨基酸的前导序列。

[0098] 术语“抑制”可互换使用并且表示生物活性的任何统计学显著降低,其包括活性的完全阻断。例如,“抑制”可以表示生物活性约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的降低。因此,当术语“抑制”用于描述,例如,对配体介导的HER3磷酸化的影响时,则该术语是指相对于未处理(对照)细胞中的磷酸化,抗体或其抗原结合片段统计学显著降低EGF样配体诱导的HER3磷酸化的能力。表达HER3的细胞可以是天然存在的细胞或细胞系(例如,癌细胞)或者可以通过将编码HER3的核酸引入至宿主细胞而重组产生的。在一个方面,抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段将配体介导的HER3磷酸化抑制了至少10%,或至少20%,或至少30%,或至少40%,或至少50%,或至少60%,或至少70%,或至少80%,或至少90%,或约100%,如通过(例如)免疫印迹然后用抗磷酸酪氨酸抗体探查或通过ELISA所确定的,如以下实施例中所述。

[0099] 如本文所使用的,术语表达HER3的细胞的“生长抑制”是指相对于在不存在抗HER3结合分子(例如,抗体或其抗原结合片段)的情况下的增殖,所述抗HER3结合分子(例如,抗体或其抗原结合片段)统计学显著地减少表达HER3的细胞的增殖的能力。在一个方面,当细胞与抗HER3结合分子(例如,本发明的抗体或其抗原结合片段)接触时,相对于在不存在所述抗HER3结合分子(例如,抗体或其抗原结合片段)时所测量的增殖(对照条件),表达HER3的细胞(例如,癌细胞)的增殖能够减少至少10%,或至少20%,或至少30%,或至少40%,或至少50%,或至少60%,或至少70%,或至少80%,或至少90%或约100%。可以使用本领域承认的技术通过测量细胞分裂率(细胞群体内经历细胞分裂的细胞部分)和/或由于终末分化或细胞死亡(例如,胸苷掺入)所造成的细胞群体中的细胞损失率来测定细胞增殖。

[0100] 在本文中,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是可互换使用的,其包括完整抗体及其任何抗原结合片段或单链。

[0101] 典型的抗体包含通过二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)。每条重链由重链可变区(在本文中缩写为VH)和重链恒定区组成。重链恒定区包括三个域,CH1、CH2和CH3。每条轻链由轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区组成。轻链恒定区包括一个域,CL。VH和VL区还可以再分为与更保守的区域(称为框架区(FW))相互交替的高变区(称为互补决定区(CDR))。每个VH和VL由3个CDR和4个FW组成,它们从氨基末端至羧基末端按以下顺序布置:FW₁、CDR1、FW₂、CDR2、FW₃、CDR3、FW₄。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区能够介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,其包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。本发明的示例性抗体包括克隆16(CL16)抗HER3抗体(原始和生殖系)、亲合力优化克隆,其包括(例如)抗HER32C2抗体,和血清半衰期优化抗HER3抗体,其包括(例如)抗HER32C2-YTE抗体。

[0102] 术语“生殖系”是指抗体中特定位置的氨基酸突变回到生殖系中的那些氨基酸。参

见,例如,CL16“生殖系”抗体是通过将三个点突变Y2S、E3V和M20I引入至VL区的FW₁中从原始CL16抗体所产生的。

[0103] 术语“抗体”是指通过免疫球蛋白分子可变区内的至少一个抗原识别位点识别并特异性结合至靶标(如蛋白质、多肽、肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或上述的组合)的免疫球蛋白分子。如本文所使用的,只要抗体显示出所需的生物活性,则术语“抗体”涵盖了完整多克隆抗体、完整单克隆抗体、抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段)、单链Fv(scFv)突变体、从至少两个完整抗体产生的多重特异性抗体(如双重特异性抗体)、嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、包含抗体的抗原决定部分的融合蛋白和包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子。抗体可以是五大类免疫球蛋白中的任一种:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,或者它们的亚类(同种型)(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2),根据它们重链恒定区的同一性,其分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同种类的免疫球蛋白具有不同的并且熟知的亚单位结构和立体构型。抗体可以是裸抗体或者可以结合至其他分子,如毒素、放射性同位素等。

[0104] “阻断”抗体或者“拮抗剂”抗体是抑制或降低它所结合的抗原(如HER3)的生物活性的抗体。在某些方面,阻断抗体或者拮抗剂抗体显著或完全抑制抗原的生物活性。期望地,所述生物活性降低了10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%或者甚至100%。

[0105] 术语“HER3抗体”或者“结合至HER3的抗体”或者“抗HER3”是指能够以足够的亲合力结合HER3从而使所述抗体在作为靶向HER3的治疗剂或诊断剂时有用的抗体。抗HER3抗体与不相关的非HER3蛋白结合的程度小于抗体与HER3结合的约10%,如通过(例如)放射免疫测定(RIA)、BIAcore™(使用重组HER3作为分析物并使用抗体作为配体,或反之),或本领域中已知的其他结合测定所测量的。在某些方面,结合至HER3的抗体的解离常数(K_D) $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{pM}$ 、 $\leq 1\text{pM}$ 或 $\leq 0.1\text{pM}$ 。

[0106] 术语“抗原结合片段”是指完整抗体的一部分并且是指完整抗体的抗原决定可变区。在本领域中,已知能够通过全长抗体的片段实施抗体的抗原结合功能。抗体片段的实例包括(但不限于)Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、线性抗体(linear antibody)、单链抗体和由抗体片段形成的多重特异性抗体。

[0107] “单克隆抗体”是指参与高特异性识别和单一抗原决定簇或表位的结合的同源性抗体群。这与通常包含针对不同抗原决定簇的不同抗体的多克隆抗体形成对比。术语“单克隆抗体”涵盖了完整和全长单克隆抗体以及抗体片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白和包含抗原识别位点的任何其他修饰的免疫球蛋白分子。此外,“单克隆抗体”是指以多种方式制备的这些抗体,所述方式包括(但不限于)通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物。

[0108] 术语“人源化抗体”是指来源于非人(例如,鼠)免疫球蛋白的抗体,其已通过工程设计包含了最少的非人(例如,鼠)序列。通常,人源化抗体是其中来自互补决定区(CDR)的残基被具有所需特异性、亲合力和能力的来自非人物种(例如,小鼠、大鼠、兔或仓鼠)的CDR的残基取代的人免疫球蛋白(Jones等人,1986,Nature,321:522-525;Riechmann等人,1988,Nature,332:323-327;Verhoeyen等人,1988,Science,239:1534-1536)。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FW)残基被具有所需特异性、亲合力和能力的非人物种的抗体中相应的残基取代。

[0109] 可以通过Fv框架区中和/或取代的非人残基内其他残基的取代来进一步修饰人源

化抗体以改善和优化抗体特异性、亲合力和/或能力。一般地,人源化抗体将包含基本全部的至少一个,并且通常两个或三个可变区,所述可变区包含全部或基本全部的对应于非人免疫球蛋白的CDR区,而全部或基本全部的FR区为人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至少一部分,所述恒定区或域通常为人免疫球蛋白的恒定区或结构域。用于产生人源化抗体的方法的实例在美国专利No.5225539或5639641中有所描述。

[0110] 抗体的“可变区”是指单独或组合的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区。重链和轻链可变区分别由通过三个也称为高变区的互补决定区(CDR)连接的四个框架区(FW)组成。每条链中的CDR通过FW区紧密结合在一起,并且与来自另一条链的CDR一起促进抗体的抗原结合位点的形成。用于确定CDR的技术至少有两种:(1)基于物种间序列差异性的方法(即Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(第5版,1991,National Institutes of Health,Bethesda Md.));和(2)基于抗原抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-lazikani等人,(1997)J.Molec.Biol.273:927-948)。另外,有时在本领域中使用了这两种方法的组合来确定CDR。

[0111] 当提及可变区中的残基(大致为轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,通常使用Kabat编号系统(例如,Kabat等人,Sequences of Immunological Interest,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。

[0112] 如Kabat中氨基酸的位置编号是指Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用该编号系统,真实的线性氨基酸序列可以含有对应于可变结构域的FW或CDR的缩短或插入的较少或其他氨基酸。例如,重链可变结构域可以在H2的残基52之后包含单个氨基酸插入(根据Kabat,残基52a)和在重链FW残基82之后包含插入的残基(例如,根据Kabat,残基82a、82b和82c等)。

[0113] 表1

环	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H38B	H26-H35B	H26-H32...34
[0114] (Kabat 编号)			
H1	H31-H38	H26-H38	H26-H32
(Chothia 编号)			
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0115] 可以通过用“标准”Kabat编号序列在抗体序列同源性区进行比对来确定给定抗体的Kabat残基编号。相反,Chothia是指结构环的位置(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。根据环的长度,Chothia CDR-H1环的末端在使用Kabat编号规则编号时在H32和H34之间改变(这是因为Kabat编号方案着眼于H35A和H35B处的插入;如果35A和35B均

不存在,则环在32处结束;如果仅35A存在,则环在33处结束;如果35A和35B均存在,则环在34处结束)。AbM高变区表示Kabat CDR和Chothia结构环之间的折中,并且通过牛津分子AbM抗体模型软件(Oxford Molecular's AbM antibody modeling software)使用。

[0116] IMGT(ImMunoGeneTics)也提供了免疫球蛋白可变区(包括CDR)的编号系统。参见,例如,Lefranc,M.P.等人,Dev.Comp.Immunol.27:55-77(2003),其作为参考并入本文。IMGT编号系统是基于高变环的超过5000条序列、结构数据和鉴定的比对的,并且使得能够容易地对所有物种进行可变区和CDR区的比较。根据IMGT编号方案,VH-CDR1在位置26-35,VH-CDR2在位置51-57,VH-CDR3在位置93-102,VL-CDR1在位置27-32,VL-CDR2在位置50-52,并且VL-CDR3在位置89-97。

[0117] 如在整个说明书中所使用的,所述VH CDR序列对应于经典Kabat编号位置,即Kabat VH-CDR1位于位置31-35,VH-CDR2位于位置50-65并且VH-CDR3位于位置95-102。VL-CDR2和VL-CDR3也对应于经典Kabat编号位置,即分别为位置50-56和89-97。如本文所使用的,术语“VL-CDR1”或“轻链CDR1”对应于VL中Kabat位置23-34处的序列(相反,根据Kabat编号方案,经典VL-CDR1位置对应于位置24-34)。

[0118] 如本文所使用的,Fc区包括含有除第一恒定区免疫球蛋白域之外的抗体恒定区的多肽。因此,Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白域,和IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白域,和这些域的柔性铰链N末端。对IgA和IgM来说,Fc可以包括J链。对于IgG来说,Fc包括免疫球蛋白域C γ 2和C γ 3以及C γ 1和C γ 2之间的铰链。尽管Fc区的边界可以是不同的,但是人IgG重链Fc区通常定义为包括其羧基末端的残基C226或P230,其中编号是根据EU索引进行的,如Kabat中所述(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。Fc可以表示分离的该区域,或表示在抗体、抗体片段或Fc融合蛋白的背景下的该区域。已在多个不同的Fc位置观察到了多态性,其包括(但不限于)如通过EU索引所编号的位置270、272、312、315、356和358,并因此所提供序列和现有技术中的序列之间可能存在轻微的差异。

[0119] 术语“人抗体”是指使用任何本领域中已知的技术通过人产生的抗体或者具有对应于通过人产生的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体的这种定义包括完整或全长抗体、它们的片段和/或包含至少一条人重链和/或轻链多肽的抗体,如,例如,包含鼠轻链和人重链多肽的抗体。

[0120] 术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列来源于两种或更多种物种的抗体。通常,轻链和重链两者的可变区均对应于来源于一种哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔等)的具有所需特异性、亲合力和能力的抗体可变区,同时所述恒定区与来源于另一物种(通常是人)的抗体中的序列同源以避免在该物种中引起免疫应答。

[0121] 术语“YTE”或“YTE突变体”是指IgG1Fc中的突变,其导致与人FcRn的结合提高并且改善了具有所述突变的抗体的血清半衰期。YTE突变体包括引入至IgG1重链的三个突变的组合:M252Y/S254T/T256E(EU编号,Kabat等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Public Health Service,National Institutes of Health,Washington,D.C.)。参见美国专利No.7658921,其作为参考并入本文。YTE突变体已显示与相同抗体的野生型相比,将抗体的血清半衰期提高了约4倍(Dall'Acqua等人,

J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006))。还参见美国专利No. 7083784, 该专利以其全部内容作为参考并入本文。

[0122] “结合亲和力”一般是指分子(例如, 抗体)的单一结合位点与其结合伴侣(例如, 抗原)之间非共价相互作用的总和的强度。除非另外说明, 否则如本文所使用的, “结合亲和力”是指反映结合对成员(例如, 抗体和抗原)之间1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其伴侣Y的亲和力一般可以通过解离常数(K_D)来表示。可以通过本领域中已知的常规方法来测量亲和力, 包括本文所述的那些方法。低亲和力抗体通常与抗原缓慢结合并且往往易于解离, 而高亲和力抗体通常与抗原更快速地结合并且往往保持结合更长时间。测量结合亲和力的多种方法在本领域中是已知的, 并且出于本发明的目的, 可以使用任何这些方法。

[0123] 除非另有说明, 否则“效力”通常表示为 IC_{50} 值(nM)。 IC_{50} 是抗体分子的中值抑制浓度。在功能性测定中, IC_{50} 是将生物反应降低了其最大值的50%的浓度。在配体结合研究中, IC_{50} 是将受体结合降低了最大特异性结合水平的50%的浓度。可以通过本领域中已知的多种方式来计算 IC_{50} 。可以通过测量(例如)抗亲本CL16(克隆16)单克隆抗体来确定效力的改善。

[0124] 与克隆16抗体相比, 本发明所述的抗体或多肽的效力的改善倍数可以为至少约2倍, 至少约4倍, 至少约6倍, 至少约8倍, 至少约10倍, 至少约20倍, 至少约30倍, 至少约40倍, 至少约50倍, 至少约60倍, 至少约70倍, 至少约80倍, 至少约90倍, 至少约100倍, 至少约110倍, 至少约120倍, 至少约130倍, 至少约140倍, 至少约150倍, 至少约160倍, 至少约170倍或至少约180倍或更多倍。

[0125] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或者“ADCC”是指一种细胞毒性形式, 其中分泌的Ig结合至在某些细胞毒性细胞(例如, 自然杀伤(NK)细胞、中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcR), 从而使得这些细胞毒性效应细胞与具有抗原的靶细胞特异性结合并随后通过细胞毒素杀死靶细胞。特异性高亲和力IgG抗体针对“武装”细胞毒性细胞的靶细胞表面并且它们绝对是这些杀死所需的。靶细胞的溶胞是胞外的, 需要直接细胞与细胞的接触, 并且不涉及补体。据考虑除抗体之外, 具有特异性结合具有抗原的靶细胞的能力的包含Fc区的其他蛋白质, 具体地Fc融合蛋白将能够使细胞介导的细胞毒性起效。为简单起见, 由Fc融合蛋白活性所产生的细胞介导的细胞毒性在本文中还称为ADCC活性。

[0126] “分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是处于在自然中未发现的形式多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物包括已纯化至不再是它们在自然中所存在的形式的程度的那些。在一些方面, 分离的抗体、多核苷酸、载体、细胞或组合物是基本纯的。

[0127] 术语“受试者”是指任何动物(例如, 哺乳动物), 其包括(但不限于)人、非人灵长类、啮齿类等, 它们将是特定治疗的接受者。通常, 术语“受试者”和“患者”在本文中可互换使用以表示人受试者。

[0128] 术语“药物组合物”是指处于使活性成分的生物活性有效的形式并且不包含对所述组合物将施用至的受试者具有不可接受的毒性的其他组分的制剂。这种组合物可以是无菌的。

[0129] 如本文所公开的, 抗体的“有效量”是足够进行具体说明的目的的量。相对于所说明的目的, 可以经验性地并以常规方式确定“有效量”。

[0130] 术语“治疗有效量”是指对“治疗”受试者或哺乳动物中的疾病或病症有效的抗体或其他药物的量。

[0131] 当在本文中使用时,单词“标记物”是指直接或间接结合至抗体以产生“标记的”抗体的可检测的化合物或组合物。所述标记物可以是自身可检测的(例如,放射性同位素标记物或荧光标记物),或者就酶促标记物来说,能够催化底物化合物或组合物的化学变化,这是可检测的。

[0132] 术语如“治疗”或“减轻”是指以下两方面:(1)使所诊断的病理情况或病症治愈、减缓、症状减轻和/或发展停止的治疗措施,和(2)预防和/或减缓目标病理情况或病症的发展的预防或防范措施。因此,需要治疗的那些包含已患病症的那些;有患病倾向的那些;和要预防病症的那些。在某些方面,如果患者显示出(例如)某种类型的癌症的全部、部分或短暂缓解,则根据本发明所述的方法,成功“治疗”了受试者的癌症。

[0133] 术语“癌症”、“肿瘤”、“癌性的”和“恶性的”是指或描述了哺乳动物中通常以不受控制的细胞生长为特征的生理条件。癌症的实例包括(但不限于)癌,包括腺癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、黑素瘤、肉瘤和白血病。这些癌更具体的实例包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠癌、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤、胰癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌如肝癌(hepatic carcinoma)和肝瘤(hepatoma)、膀胱癌、乳腺癌(包括激素介导的乳腺癌,参见,例如,Innes等人,(2006),Br.J.Cancer94:1057-1065)、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、骨髓瘤(如多发性骨髓瘤)、唾液腺癌、肾癌如肾细胞癌和韦尔姆斯氏瘤、基底细胞癌、黑素瘤、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、睾丸癌、食道癌、多种类型的头颈癌和粘液源性癌,如卵巢粘液性癌、肝胆管型肝癌(肝)和肾乳头状癌。

[0134] 如本文所使用的,术语“癌”是指上皮细胞癌,上皮细胞是覆盖身体表面、产生激素并构成腺体的细胞。癌的实例为皮肤、肺、结肠、胃、乳腺、前列腺和甲状腺癌。

[0135] 如本文所使用的,术语“KRAS突变”是指在某些癌症中在v-Ki-ras2Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因的人同源基因中发现的突变。人KRAS基因mRNA序列的非限制性实例包括Genbank登录号No.NM004985和NM033360。据报道在73%的胰腺肿瘤、35%的结肠直肠肿瘤、16%的卵巢肿瘤和17%的肺肿瘤中发现了KRAS突变。KRAS突变一般发生在人KRAS基因的密码子12或143中。

[0136] 如在本文中可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸聚合物并且包括DNA和RNA。所述核苷酸可以是脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、修饰的核苷酸或碱基和/或它们的类似物,或者可以通过DNA或RNA聚合酶引入到聚合物中的任何基质。多核苷酸可以包括修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸和它们的类似物。上述说明适用于本文所提及的全部多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0137] 术语“载体”表示能够在宿主细胞中递送,并且在一些方面,表达一种或多种所关心的基因或序列的构建体。载体的实例包括(但不限于)病毒载体、裸DNA或RNA表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与正离子型多肽缩合剂有关的DNA或RNA表达载体、包封在脂质体中的DNA或RNA表达载体,和某些真核细胞,如生产细胞。

[0138] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用以表示任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可以是直链或支链的,它可以包括修饰的氨基酸,并且它可以被非氨基酸中断。术语还涵盖了已被天然修饰或通过干预修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化作

用、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其他操作或修饰,如与标记成分结合。例如,含有一种或多种氨基酸类似物(包括,例如,非天然氨基酸等)以及本领域中已知的其他修饰的多肽也包含在定义内。应理解由于本发明的多肽是基于抗体的,因此在某些方面,所述多肽作为单链或结合链存在。

[0139] 在两种或更多种核酸或多肽的背景中,术语“相同”或百分比“同一性”是指当比较并比对(如有必要,引入空位)最大对应性时,相同或者具有指定百分比的相同的核苷酸或氨基酸残基的两种或更多种序列或子序列,但是不认为任何保守氨基酸取代是序列同一性的一部分。可以使用序列比对软件或算法或者通过目测检查测量百分比同一性。可以用于获得氨基酸或核苷酸序列比对的多种算法和软件在本领域中是已知的。

[0140] 序列对比算法的一种该非限制性实例是Karlin等人,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.,87:2264-2268所述的算法,如在Karlin等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.,90:5873-5877中所修改的,并且引入至NBLAST和XBLAST程序(Altschul等人,1991,Nucleic Acids Res.,25:3389-3402)。在某些方面,如Altschul等人,1997,Nucleic Acids Res.25:3389-3402中所述,可以使用空位BLAST。BLAST-2、WU-BLAST-2(Altschul等人,1996,Methods in Enzymology,266:460-480)、ALIGN、ALIGN-2(Genentech,South San Francisco,California)或Megalign(DNASTAR)是可以用于比对序列的其他公共可用的软件程序。在某些方面,使用GCG软件包中的GAP程序确定了两条核苷酸序列之间的百分比同一性(例如,使用NWSgapdna.CMP矩阵,空位权重为40、50、60、70或90,长度权重为1、2、3、4、5或6)。在某些替代方面,引入Needleman和Wunsch算法(J.Mol.Biol.(48):444-453(1970))的GCG软件包中的GAP程序可以用于确定两条氨基酸序列之间的百分比同一性(例如,使用BLOSUM62矩阵或PAM250矩阵,空位权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5)。作为另外一种选择,在某些方面,使用Myers和Miller的算法(CABIOS,4:11-17(1989))确定了核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性。例如,可以使用ALIGN程序(2.0版)和使用PAM120,以残基表、空位长度罚分为12并且空位罚分为4来确定百分比同一性。本领域技术人员能够通过特定比对软件确定用于最大比对的适当参数。在某些方面,使用了比对软件的缺省参数。

[0141] 在某些方面,将第一氨基酸序列对第二序列氨基酸的百分比同一性“X”计算为 $100 \times (Y/Z)$,其中Y是作为在第一和第二序列比对(如通过目测检查或特定序列对比程序所比对的)中相同匹配而得分的氨基酸残基的个数,而Z是第二序列中残基的总数。如果第一序列的长度比第二序列的长,则第一序列对第二序列的百分比同一性将高于第二序列对第一序列的百分比同一性。

[0142] “保守的氨基酸取代”是其中一个氨基酸残基被具有类似侧链的另一个氨基酸残基所取代的一种取代。已在本领域中定义了具有类似侧链的氨基酸残基的种类,其包括碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如,天门冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。例如,苯丙氨酸对酪氨酸的取代为保守取代。在某些方面,本发明所述的多肽和抗体的序列中的保守取代不会终止含有所述氨基酸序列的多肽或抗体对抗原(即,多肽或抗体所

结合的HER3)的结合。鉴别不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守取代的方法在本领域中是熟知的(参见,例如,Brummell等人,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等人,Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:.412-417(1997))。

[0143] 如本文所使用的,相对于轻链(VL)和重链(VH)可变区,术语“共有序列”是指基于有关VL或VH链内的氨基酸残基经受修饰但不损害抗原结合的信息所定义的复合或通用的VL或VH序列。因此,在VL或VH链的“共有序列”中,某些氨基酸位置被该位置处的多个可能的氨基酸残基之一所占据。例如,如果精氨酸(R)或丝氨酸(S)出现在特定的位置,那么共有序列内的特定位置可以是精氨酸或丝氨酸(R或S)。可以通过以下方法定义VH和VL链的共有序列,例如,通过体外亲和力成熟(例如,使用简并编码引物使某个CDR中的每个氨基酸位置随机化)、通过抗体CDR内氨基酸残基的扫描致突变(例如,丙氨酸扫描致突变),或本领域中已知的任何其他方法,然后评价突变体与抗原的结合以确定突变氨基酸位置是否影响抗原结合。在一些方面,在CDR区中引入突变。在其他方面,在框架区中引入突变。在一些其他方面,在CDR和框架区中引入突变。

[0144] II. 抗HER3结合分子

[0145] 本发明提供了HER3结合分子,例如,特异性结合HER3的抗体及其抗原结合片段。HER3的全长氨基酸(aa)和核苷酸(nt)序列在本领域中是已知的(参见,例如,对于人HER3,UniProt Acc.No.P2186,或者对于小鼠HER3,UniProt Acc.No.088458)。在一些方面,所述抗HER3结合分子为人抗体。在某些方面,所述HER3结合分子为抗体或其抗原结合片段。在一些方面,HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、单链Fv或scFv,二硫键连接的Fv、V-NAR域、IgNar、胞内抗体、IgGDCH2、微抗体、F(ab')₃、四链抗体、三链抗体、双链抗体、单域抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb²、(scFv)₂或scFv-Fc。在一些方面,抗体属于IgG1亚类并且包含三重突变YTE,如以上在定义部分中所公开的。

[0146] 在某些方面,与亲本克隆16(CL16)抗体相比,修饰了本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段。与CL16相比,所述修饰可以包括CDR区和/或FW区中的突变。在某些方面,本发明的抗HER3抗体包含对CL16的轻链的CDR1和/或CDR3的修饰,其包括(但不限于):

[0147] 1) 包含共有序列X1GSX₂SNIGLN_{YVS}的轻链CDR1,其中X1选自R或S,并且X2选自S或L;和

[0148] 2) 包含共有序列AAWDDX₃X₄X₅GEX₆的轻链CDR3,其中X3选自S或G,X4选自L或P,X5选自R、I、P或S,并且X6选自V或A。

[0149] 在某些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含对CL16的重链的CDR2的修饰,其包括(但不限于)包含共有序列X7IGSSGGVTNYADSVKG的重链CDR1,其中X7选自Y、I或V。

[0150] 在一个方面,抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL区,所述VL区包含共有氨基酸序列:

[0151] [FW₁]X₁GSX₂SNIGLN_{YVS}[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃X₄X₅GEX₆[FW₄]

[0152] 其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]和[FW₄]代表VL框架区1(SEQ ID NO:40或44)、VL框架区2(SEQ ID NO:41)、VL框架区3(SEQ ID NO:42)和VL框架区4(SEQ ID NO:43)的氨基酸残基,并且其中X₁代表氨基酸残基精氨酸(R)或者丝氨酸(S),X₂代表氨基酸残基丝氨酸(S)或者亮

氨酸(L), X₃代表氨基酸残基丝氨酸(S)或者谷氨酸(E), X₄代表氨基酸残基亮氨酸(L)或脯氨酸(P)、X₅代表氨基酸残基精氨酸(R)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)或丝氨酸(S),并且X₆代表氨基酸残基缬氨酸(V)或精氨酸(R)。

[0153] 在一个方面,抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH区,所述VH区包含共有氨基酸序列:

[0154] [FW₅]YYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGDAFDI[F W₈]

[0155] 其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]和[FW₈]代表VH框架区1(SEQ ID NO:36)、VH框架区2(SEQ ID NO:37)、VH框架区3(SEQ ID NO:38)和VH框架区4(SEQ ID NO:39)的氨基酸残基,并且其中X₇代表氨基酸残基酪氨酸(Y)、异亮氨酸(I)或缬氨酸(V)。

[0156] 在一个方面,抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL区,所述VL区包含共有氨基酸序列:

[0157] [FW₁]X₁GSX₂SNIGLNLYVS[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃X₄X₅GEX₆[FW₄]

[0158] 其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]和[FW₄]代表VL框架区1(SEQ ID NO:40或44)、VL框架区2(SEQ ID NO:41)、VL框架区3(SEQ ID NO:42)和VL框架区4(SEQ ID NO:43)的氨基酸残基,并且其中X₁代表氨基酸残基精氨酸(R)或者丝氨酸(S),X₂代表氨基酸残基丝氨酸(S)或者亮氨酸(L),X₃代表氨基酸残基丝氨酸(S)或者谷氨酸(E),X₄代表氨基酸残基亮氨酸(L)或脯氨酸(P)、X₅代表氨基酸残基精氨酸(R)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)或丝氨酸(S),并且X₆代表氨基酸残基缬氨酸(V)或精氨酸(R);并且其中所述抗HER3抗体或其抗原结合片段还包含VH区,所述VH区包含以下共有氨基酸序列:

[0159] [FW₅]YYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGDAFDI[F W₈]

[0160] 其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]和[FW₈]代表VH框架区1(SEQ ID NO:36)、VH框架区2(SEQ ID NO:37)、VH框架区3(SEQ ID NO:38)和VH框架区4(SEQ ID NO:39)的氨基酸残基,并且其中X₇代表氨基酸残基酪氨酸(Y)、异亮氨酸(I)或缬氨酸(V)。

[0161] 在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR1,所述VL-CDR1由选自SEQ ID NO:18、19和20的序列组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR1,所述VL-CDR1包含选自SEQ ID NO:18、19和20的序列。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR2,所述VL-CDR2由SEQ ID NO:21组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR2,所述VL-CDR2包含SEQ ID NO:21。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR3,所述VL-CDR3由选自SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29和30的序列组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR3,所述VL-CDR3包含选自SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29和30的序列。

[0162] 在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR1,所述VH-CDR1由SEQ ID NO:31组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR1,所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:31。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR2,所述VH-CDR2由选自SEQ ID NO:32、33和34的序列组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR2,所述VH-CDR2包含选自SEQ ID NO:32、33和34的序列。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR3,所述VH-CDR3由SEQ ID NO:35组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR3,所

述VH-CDR3包含SEQ ID NO:35。

[0163] 在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR1,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VL-CDR1由选自SEQ ID NO:18、19和20的序列组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR1,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VL-CDR1包含选自SEQ ID NO:18、19和20的序列。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR2,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VL-CDR2由SEQ ID NO:21组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR2,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VL-CDR2包含SEQ ID NO:21。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR3,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VL-CDR3由选自SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29和30的序列组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL-CDR3,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VL-CDR3包含选自SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29和30的序列。

[0164] 在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR1,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VH-CDR1由SEQ ID NO:31组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR1,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VH-CDR1包含SEQ ID NO:31。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR2,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VH-CDR2由选自SEQ ID NO:32、33和34的序列组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR2,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VH-CDR2包含选自SEQ ID NO:32、33和34的序列。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR3,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VH-CDR3由SEQ ID NO:35组成。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VH-CDR3,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,所述VH-CDR3包含SEQ ID NO:35。

[0165] 在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含由选自SEQ ID NO:18、19和20的序列组成的VL-CDR1;由SEQ ID NO:21组成的VL-CDR2;和由选自SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29和30的序列组成的VL-CDR3。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含含有选自SEQ ID NO:18、19和20的序列的VL-CDR1;含有SEQ ID NO:21的VL-CDR2;和含有选自SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29和30的序列的VL-CDR3。

[0166] 在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含由SEQ ID NO:31组成的VH-CDR1;由选自SEQ ID NO:32、33和34的序列组成的VH-CDR2;和由SEQ ID NO:35组成的VH-CDR3。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:31的VH-CDR1;含有选自SEQ ID NO:32、33和34的序列的VH-CDR2;和含有SEQ ID NO:35的VH-CDR3。

[0167] 在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,由选自SEQ ID NO:18、19和20的序列组成的VL-CDR1;除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,由SEQ ID NO:21组成的VL-CDR2;和除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,由选自SEQ ID NO:22、23、24、25、26、27、28、29和30的序列组成的VL-CDR3。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,含有选自SEQ ID NO:18、19和20的序列的VL-CDR1;除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,含有SEQ ID NO:21的VL-CDR2;和除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,含有选自SEQ ID NO:22、23、

24、25、26、27、28、29和30的序列的VL-CDR3。

[0168] 在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,由SEQ ID NO:31组成的VH-CDR1;除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,由选自SEQ ID NO:32、33和34的序列组成的VH-CDR2;和除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,由SEQ ID NO:35组成的VH-CDR3。在一些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,含有SEQ ID NO:31的VH-CDR1;除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,含有选自SEQ ID NO:32、33和34的序列的VH-CDR2;和除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,含有SEQ ID NO:35的VH-CDR3。

[0169] 在某些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含对重链和/或轻链的CDR1、CDR2和/或CDR3的修饰,并且还包含对重链和/或轻链的FW₁、FW₂、FW₃和/或FW₄的修饰。在一些方面,FW₁包含SEQ ID NO:40或44,FW₂包含SEQ ID NO:41,FW₃包含SEQ ID NO:42,FW₄包含SEQ ID NO:43,FW₅包含SEQ ID NO:36,FW₆包含SEQ ID NO:37,FW₇包含SEQ ID NO:38和FW₈包含SEQ ID NO:39。

[0170] 在一些方面,除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,FW₁包含SEQ ID NO:40或44;除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,FW₂包含SEQ ID NO:41;除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,FW₃包含SEQ ID NO:42;除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,FW₄包含SEQ ID NO:43;除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,FW₅包含SEQ ID NO:36;除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,FW₆包含SEQ ID NO:37;除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,FW₇包含SEQ ID NO:38;和除1个、2个、3个或4个氨基酸取代之外,FW₈包含SEQ ID NO:39。

[0171] 在某些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL和VH,所述VL和VH包含在一个或多个CDR中分别与以下氨基酸序列相同或除4个、3个、2个或1个氨基酸取代外与之相同的VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3,VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3氨基酸序列,所述氨基酸序列为:SEQ ID NO:18、21、22、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、26、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、27、31、32和35、SEQ ID NO:20、21、22、31、32和35、SEQ ID NO:19、21、22、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、25、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、28、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、29、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、30、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、23、31、32和35、SEQ ID NO:19、21、23、31、32和35、SEQ ID NO:20、21、23、31、32和35、SEQ ID NO:18、21、24、31、32和35,或SEQ ID NO:18、21、25、31、32和35。

[0172] 本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段的重链和轻链可变结构域包括表2中所列的序列。

[0173] 表2

[0174]

SEQ ID NO.	描述	序列
1	CL16VL (生殖系)	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEVFGGGT KLTVL
17	CL16VL (原始)	QYELTQPPSASGTPGQRTMSCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN NQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEVFGGGT TKLTVL
2	CL16 VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYYMQWVRQAPGKGLEWVSYI GSSGGVTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLG DAFDIWGQGTMVTSS
4	5H6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDGLPGEVFGGGT KLTVL
5	8A3 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLIGEVFGGGT KLTVL
6	4H6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCRGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEVFGGGT KLTVL
7	6E.3 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEVFGGGT KLTVL
8	2B11 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLPGEVFGGGT KLTVL
9	2D1 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGEAFGGGT KLTVL
10	3A6 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPSGEVFGGGT KLTVL

[0175]

11	4C4 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLRGEVFGGGT KLTVL
12	15D12.1 (15D12.I) VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYYMQWVRQAPGKGLEWVSII GSSGGVTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLG DAFDIWGQGTMVTSS
13	15D12.2 (15D12.V) VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYYMQWVRQAPGKGLEWVSI GSSGGVTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLG DAFDIWGQGTMVTSS
14	1A4 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPSGEAFGGGT KLTVL
3	2C2 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPSGEAFGGGT KLTVL
15	3E.1 VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCRGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPSGEAFGGGT KLTVL
16	2F10	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGLNYVSWYQQLPGTAPKLLISRNN QRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSPSGEAFGGGT KLTVL

[0176] 在某些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含抗体VL和抗体VH,其中VL包含与参比氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列,所述参比氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17。

[0177] 在其他方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含抗体VL和抗体VH,其中VH包含与参比氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的氨基酸序列,所述参比氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0178] 在其他方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含VL,所述VL包含与参比氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的序列,所述参比氨基酸序列选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:17,并且还包含VH,所述VH包含与参比氨基酸序列至少约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%相同的序列,所述参比氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13。

[0179] 在一些方面,抗HER3抗体或其抗原结合片段包含表2的VH和表2的VL。在整个说明书中,根据它们的VL链来表示抗体。在本说明书中公开的特定抗体的重链对应于CL16原始重链(SEQ ID NO:2)。因此,“CL16抗体”是包含两条原始CL16轻链(SEQ ID NO:17)和两条CL16原始重链(SEQ ID NO:2)的IgG1,而“2C2抗体”是包含两条2C2轻链(2C2VL)(SEQ ID NO:3)和两条CL16原始重链(SEQ ID NO:2)的IgG1。

[0180] 在一些方面,抗HER3抗体或其抗原结合片段包含重链恒定区或其片段。在一些具体的方面中,所述重链恒定区是IgG恒定区。IgG恒定区可以包含轻链恒定区,其选自 κ 恒定区和 λ 恒定区。

[0181] 在某些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段以与包含CL16原始重链(SEQ ID NO:2)和原始CL16轻链(SEQ ID NO:17)的CL16抗体基本相同或更好的亲合力结合HER3。在某些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段以与包含2C2轻链(2C2VL)(SEQ ID NO:3)和CL16原始重链(SEQ ID NO:2)的2C2抗体基本相同或更好的亲合力结合HER3。

[0182] 在本发明的一个方面,抗HER3抗体或其抗原结合片段特异地结合HER3及其抗原片段,其解离常数 k_d (K_{off}/K_{on}) 小于 $10^{-6}M$,或小于 $10^{-7}M$,或小于 $10^{-8}M$,或小于 $10^{-9}M$,或小于 $10^{-10}M$,或小于 $10^{-11}M$,或小于 $10^{-12}M$,或小于 $10^{-13}M$ 。在本发明具体的方面,抗HER3抗体或其抗原结合片段以 2×10^{-10} 至 $6 \times 10^{-10}M$ 之间的解离常数特异地结合HER3及其抗原片段。

[0183] 在另一个方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段以小于 $1 \times 10^{-3}s^{-1}$ 或小于 $2 \times 10^{-3}s^{-1}$ 的 K_{off} 结合至HER3和/或其抗原片段。在其他方面,抗HER3抗体或其抗原结合片段以小于 $10^{-3}s^{-1}$,小于 $5 \times 10^{-3}s^{-1}$,小于 $10^{-4}s^{-1}$,小于 $5 \times 10^{-4}s^{-1}$,小于 $10^{-5}s^{-1}$,小于 $5 \times 10^{-5}s^{-1}$,小于 $10^{-6}s^{-1}$,小于 $5 \times 10^{-6}s^{-1}$,小于 $5 \times 10^{-7}s^{-1}$,小于 $10^{-8}s^{-1}$,小于 $5 \times 10^{-8}s^{-1}$,小于 $10^{-9}s^{-1}$,小于 $5 \times 10^{-9}s^{-1}$ 或小于 $10^{-10}s^{-1}$ 的 K_{off} 结合至HER3及其抗原片段。在具体的方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段以 $0.5 \times 10^{-4}s^{-1}$ 至 $2.0 \times 10^{-4}s^{-1}$ 之间的 K_{off} 结合至HER3和/或其抗原片

段。

[0184] 在另一个方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段以至少 $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,至少 $5\times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,至少 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,至少 $5\times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,至少 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,至少 $5\times 10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,或至少 $10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,或至少 $10^9\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的结合速率常数或 K_{on} 速率结合至HER3和/或其抗原片段。在另一个方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段以 $1\times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 至 $6\times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 之间的结合速率常数或 K_{on} 速率结合至HER3和/或其抗原片段。

[0185] 表1中公开的VH和VL序列可以“混合并匹配”以产生其他本发明的抗HER3结合分子。在某些方面,15D12.I和15D12.V的VH序列混合并匹配。另外或者作为另外一种选择,5H6、8A3、4H6、6E.3、2B11、2D1、3A6、4C4、1A4、2C2、3E.1的VL序列可以混合并匹配。

[0186] 在某些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含改善与人FcRn的结合并且改善抗HER3抗体或其抗原结合片段的半衰期的突变。在一些方面,这些突变是引入至IgG1的恒定结构域的位置252中蛋氨酸(M)向酪氨酸(Y)的突变,位置254中丝氨酸(S)向苏氨酸(T)的突变,和位置256中苏氨酸(T)向谷氨酸(E)的突变,以上是根据Kabat中的EU索引编号的(Kabat等人,(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S.Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.))。参见美国专利No.7658921,该专利作为参考并入本文。已表明与相同抗体的野生型相比,称为“YTE突变体”的这类突变体IgG显示出半衰期增加约4倍(Dall'Acqua等人, J.Biol.Chem.281:23514-24 (2006))。在一些方面,包含IgG恒定结构域的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含位置251-257、285-290、308-314、385-389和428-436处氨基酸残基的一个或多个氨基酸取代,以上是根据Kabat中EU索引编号的,其中这些突变使抗HER3抗体或其抗原结合片段的血清半衰期增加。

[0187] 在一些方面,YTE突变体还包含IgG恒定结构域的位置434处的氨基酸取代,所述氨基酸选自色氨酸(W)、蛋氨酸(M)、酪氨酸(Y)和丝氨酸(S),以上是根据Kabat中的EU索引编号的。在其他方面,YTE突变体还包含IgG恒定结构域的位置434处的氨基酸取代,所述氨基酸选自色氨酸(W)、蛋氨酸(M)、酪氨酸(Y)和丝氨酸(S),以上是根据Kabat中的EU索引编号的,和IgG恒定结构域的位置428处的氨基酸取代,所述氨基酸选自苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、苯丙氨酸(F)和丝氨酸(S),以上是根据Kabat中的EU索引编号的。

[0188] 在其他方面,YTE突变体还包含IgG恒定结构域的位置434处的酪氨酸(Y)取代,以上是根据Kabat中的EU索引编号的,和IgG恒定结构域的位置257处的亮氨酸(L)取代,以上是根据Kabat中的EU索引编号的。在一些方面,YTE突变体还包含IgG恒定结构域的位置434处的丝氨酸(S)取代,以上是根据Kabat中的EU索引编号的,和IgG恒定结构域的位置428处的亮氨酸(L)取代,以上是根据Kabat中的EU索引编号的。

[0189] 在具体的方面,抗HER3抗体或其抗原结合片段包含2C2轻链可变区(2C2VL;SEQ ID NO:3)、原始CL16重链可变区(SEQ ID NO:2)和包含IgG1恒定结构域的位置252处蛋氨酸(M)向酪氨酸(Y)突变,位置254处丝氨酸(S)向苏氨酸(T)突变和位置256处苏氨酸(T)向谷氨酸(E)突变的IgG1恒定结构域,以上是根据Kabat中的EU索引编号的。

[0190] 在某些方面,本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段包含至少一种IgG恒定结构域氨基酸取代,其选自:

[0191] (a) 位置252处使用酪氨酸(Y)、苯丙氨酸(F)、色氨酸(W)或苏氨酸(T)的氨基酸取

代,

[0192] (b) 位置254处使用苏氨酸(T)的氨基酸取代,

[0193] (c) 位置256处,使用丝氨酸(S)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)或苏氨酸(T)的氨基酸取代,

[0194] (d) 位置257处使用亮氨酸(L)的氨基酸取代,

[0195] (e) 位置309处使用脯氨酸(P)的氨基酸取代,

[0196] (f) 位置311处使用丝氨酸(S)的氨基酸取代,

[0197] (g) 位置428处使用苏氨酸(T)、亮氨酸(L)、苯丙氨酸(F)或丝氨酸(S)的氨基酸取代,

[0198] (h) 位置433处使用精氨酸(R)、丝氨酸(S)、异亮氨酸(I)、脯氨酸(P)或谷氨酰胺(Q)的氨基酸取代,

[0199] (i) 位置434处使用色氨酸(W)、蛋氨酸(M)、丝氨酸(S)、组氨酸(H)、苯丙氨酸(F)或酪氨酸的氨基酸取代,和

[0200] (j) 两种或更多种所述取代的组合,

[0201] 其中所述位置是根据Kabat中的EU索引编号的,并且其中与具有野生型IgG恒定结构域的IgG血清半衰期相比,所述修饰的IgG具有增加的血清半衰期。

[0202] 在其他方面,VH和/或VL氨基酸序列可以与上述序列是85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相似的,并且包含1、2、3、4、5或更多个保守取代。可以通过编码SEQ ID NO:1-17的核酸分子的致突变(例如,定点突变或PCR介导的突变)并使用本文所述的功能性测定测试所编码的改变的抗体的保留的功能来获得具有VH和VL区的HER3抗体,所述VH和VL区分别对SEQ ID NO:2、12或13所表示的VH区和/或SEQ ID NO:1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、14、15、16或17所表示的VL区具有高(即80%或以上)相似性。

[0203] 可以使用任何适合的本领域中熟知的方法,例如,流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA)或动力学(例如,BIACORE™分析),通过实验确定抗体对抗原的亲合力(affinity)或亲和力(avidity)。可以容易地使用直接结合测定以及竞争性结合测定形式。(参见,例如,Berzofsky等人,“Antibody-Antigen Interactions”,Fundamental Immunology,Paul,W.E.主编,Raven Press:New York,N.Y.(1984);Kuby,Immunology,W.H.Freeman and Company:New York,N.Y.(1992);和本文所述的方法。如果在不同条件下测量(例如,盐浓度、pH、温度),则所测量的具体的抗体-抗原相互作用的亲合力可以是不同的。因此,使用如本领域中已知的抗体和抗原的标准溶液和标准化缓冲液,并且如本文所述的缓冲液进行亲合力及其他抗原结合参数(例如, K_D 或 K_d 、 K_{on} 、 K_{off})的测量。

[0204] 在本领域中还已知使用BIACORE™分析测量的亲合力可以根据要结合至芯片的反应物中的一种而改变。在这方面,可以使用其中靶标抗体(例如,2C2单克隆抗体)固定化在芯片(称为“IgG向下(IgG down)”形式)上的形式或者使用其中靶标蛋白(例如,HER3)固定化在芯片(例如,称为“HER3向下(HER3down)”形式)上的形式来测量亲合力。

[0205] III. 结合至与本发明的抗HER3抗体及其抗原结合片段相同的表位的结合分子

[0206] 在另一个方面,本发明包含结合至与本文所述的多种抗HER3抗体相同的表位的HER3结合分子。如本文所使用的术语“表位”是指能够结合至本发明的抗体的蛋白决定簇。表位通常由分子的化学活性表面基团组成,如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特异性立体

结构特性,和特异性电荷特性。构型和非构型表位的区别在于在存在变性溶剂时,与前者的结合丧失,但与后者的结合不会。可以根据在标准HER3结合测定中它们与抗体(如CL16抗体、2C2抗体或2C2-YTE突变体)交叉竞争的能力(例如,以统计学显著的方式竞争性抑制结合)来鉴别这些抗体。因此,在一个方面,本发明提供了与本发明的另一种抗HER3抗体或其抗原结合片段(如CL16抗体或2C2抗体)竞争与HER3的结合的抗HER3抗体及其抗原结合片段,例如,人单克隆抗体。测试抗体抑制(例如)CL16抗体或2C2抗体的结合的能力表明测试抗体可以与抗体竞争与HER3的结合;根据非限制性理论,这种抗体可以结合至HER3上与它所竞争的抗HER3抗体或其抗原结合片段相同或相关(例如,结构类似的或空间临近)的表位。在一个方面,结合至HER3上与(例如)CL16抗体或2C2抗体相同的表位的抗HER3抗体或其抗原结合片段是人单克隆抗体。

[0207] IV. 作用机理

[0208] 在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以抑制HER3磷酸化。在其他方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以抑制AKT磷酸化。在其他方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以抑制HER2-HER3二聚体形成。在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以抑制细胞生长。在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段缺少ADCC作用。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以通过非配体依赖性作用机理抑制HER3磷酸化、AKT磷酸化和/或肿瘤集落形成。

[0209] 在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在HRG驱动的乳腺癌MCF-7细胞中抑制HER3磷酸化,如通过ELISA所测量的,其IC₅₀低于约30ng/mL,低于约25ng/mL,低于约20ng/mL,低于约15ng/mL或低于约10ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在HRG驱动的乳腺癌MCF-7细胞中抑制HER3磷酸化,如通过ELISA所测量的,其IC₅₀低于约20ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在HRG驱动的乳腺癌MCF-7细胞中抑制HER3磷酸化,如通过ELISA所测量的,其IC₅₀低于约15ng/mL。在另一个具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在HRG驱动的乳腺癌MCF-7细胞中抑制HER3磷酸化,如通过ELISA所测量的,其IC₅₀低于约10ng/mL。

[0210] 在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在MDA-MB-175乳腺癌细胞中抑制细胞生长,其IC₅₀低于约0.90μg/mL,低于约0.80μg/mL,低于约0.70μg/mL,低于约0.60μg/mL,低于约0.50μg/mL,低于约0.40μg/mL,低于约0.30μg/mL或低于约0.20μg/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在MDA-MB-175乳腺癌细胞中抑制细胞生长,其IC₅₀低于约0.50μg/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在MDA-MB-175乳腺癌细胞中抑制细胞生长,其IC₅₀低于约0.40μg/mL。在另一个具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在MDA-MB-175乳腺癌细胞中抑制细胞生长,其IC₅₀低于约0.30μg/mL。在另一个具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在MDA-MB-175乳腺癌细胞中抑制细胞生长,其IC₅₀低于约0.20μg/mL。

[0211] 在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在HMCB黑素瘤细胞中抑制细胞生长,其IC₅₀低于约0.20μg/mL,低于约0.15μg/mL,低于约0.10μg/mL,低

于约0.05 μ g/mL,低于约0.04 μ g/mL或低于约0.03 μ g/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在HMCB黑素瘤细胞中抑制细胞生长,其IC₅₀低于约0.10 μ g/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在HMCB黑素瘤细胞中抑制细胞生长,其IC₅₀低于约0.05 μ g/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在HMCB黑素瘤细胞中抑制细胞生长,其IC₅₀低于约0.04 μ g/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在HMCB黑素瘤细胞中抑制细胞生长,其IC₅₀低于约0.03 μ g/mL。

[0212] 在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在EGFR驱动的HCC827肺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约20ng/mL,低于约15ng/mL,低于约10ng/mL,低于约8ng/mL,低于约6ng/mL,低于约4ng/mL或低于约2ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在EGFR驱动的HCC827肺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约10ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在EGFR驱动的HCC827肺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约8ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在EGFR驱动的HCC827肺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约6ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在EGFR驱动的HCC827肺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约4ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在EGFR驱动的HCC827肺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约2ng/mL。

[0213] 在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在耐受TKI的EGFR驱动的HCC827肺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约30ng/mL,低于约25ng/mL,低于约20ng/mL,低于约15ng/mL,低于约10ng/mL或低于约5ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在耐受TKI的EGFR驱动的HCC827肺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约20ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在耐受TKI的EGFR驱动的HCC827肺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约15ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在耐受TKI的EGFR驱动的HCC827肺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约10ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在耐受TKI的EGFR驱动的HCC827肺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约5ng/mL。

[0214] 在一些具体的方面中,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以用于治疗TKI耐受性癌症。

[0215] 在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在cMET驱动的MKN45人胃腺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约15ng/mL,低于约10ng/mL,低于约9ng/mL,低于约8ng/mL,低于约7ng/mL,低于约6ng/mL,低于约5ng/mL或低于约4ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在cMET驱动的MKN45人胃腺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约10ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在cMET驱动的MKN45人胃腺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约8ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在cMET驱动的MKN45人胃腺癌细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约6ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在cMET驱动的MKN45人胃腺癌

细胞中抑制HER3磷酸化,其IC₅₀低于约4ng/mL。

[0216] 在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在cMET驱动的MKN45细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约15ng/mL,低于约10ng/mL,低于约9ng/mL,低于约8ng/mL,低于约7ng/mL,低于约6ng/mL,低于约5ng/mL,低于约4ng/mL或低于约3ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在cMET驱动的MKN45细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约8ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在cMET驱动的MKN45细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约6ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在cMET驱动的MKN45细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约4ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在cMET驱动的MKN45细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约3ng/mL。

[0217] 在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在FGFR2驱动的Kato III人胃印戒细胞癌细胞中抑制pHER,其IC₅₀低于约9ng/mL,低于约8ng/mL,低于约7ng/mL,低于约6ng/mL,低于约5ng/mL,低于约4ng/mL,低于约3ng/mL,低于约2ng/mL或低于约1ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在FGFR2驱动的Kato III人胃印戒细胞癌细胞中抑制pHER,其IC₅₀低于约5ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在FGFR2驱动的Kato III人胃印戒细胞癌细胞中抑制pHER,其IC₅₀低于约4ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在FGFR2驱动的Kato III人胃印戒细胞癌细胞中抑制pHER,其IC₅₀低于约3ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在FGFR2驱动的Kato III人胃印戒细胞癌细胞中抑制pHER,其IC₅₀低于约2ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在FGFR2驱动的Kato III人胃印戒细胞癌细胞中抑制pHER,其IC₅₀低于约1ng/mL。

[0218] 在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在FGFR-2驱动的Kato III细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约6ng/mL,低于约5ng/mL,低于约4ng/mL,低于约3ng/mL,低于约2ng/mL或低于约1ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在FGFR-2驱动的Kato III细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约4ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在FGFR-2驱动的Kato III细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约3ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在FGFR-2驱动的Kato III细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约2ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在FGFR-2驱动的Kato III细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约1ng/mL。

[0219] 在一些方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在非配体依赖性BT-474乳腺癌细胞中抑制pHER,其IC₅₀低于约10ng/mL,低于约9ng/mL,低于约8ng/mL,低于约7ng/mL,低于约6ng/mL,低于约5ng/mL,低于约4ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在非配体依赖性BT-474乳腺癌细胞中抑制pHER,其IC₅₀低于约8ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在非配体依赖性BT-474乳腺癌细胞中抑制pHER,其IC₅₀低于约6ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在非配体依赖性BT-474乳腺癌细胞中抑制pHER,其IC₅₀低于约4ng/mL。

[0220] 在一些方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在非配体依赖性BT-474乳腺癌细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约10ng/mL,低于约9ng/mL,低于约8ng/mL,低于约7ng/mL,低于约6ng/mL,低于约5ng/mL,低于约4ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在非配体依赖性BT-474乳腺癌细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约8ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在非配体依赖性BT-474乳腺癌细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约6ng/mL。在具体的方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在非配体依赖性BT-474乳腺癌细胞中抑制pAKT,其IC₅₀低于约4ng/mL。在一些方面,HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在BT-474细胞(非配体依赖性乳腺癌模型)中抑制pHER3、pAKT和肿瘤集落形成。

[0221] 在一些方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以抑制HRG诱导的VEGF分泌。在具体的方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在非配体依赖性BT-474乳腺癌细胞和/或HRG驱动的乳腺癌MCF-7细胞中抑制HRG诱导的VEGF分泌。

[0222] 在一些方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以导致细胞周期阻滞。在具体的方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以在乳腺癌细胞中导致细胞周期阻滞,所述乳腺癌细胞包括(但不限于)SKBR3或BT474细胞。

[0223] V. 抗HER3抗体和抗原结合片段的制备

[0224] 可以使用杂交瘤法制备单克隆抗HER3抗体,如Kohler和Milstein(1975) Nature256:495中所述的那些。使用杂交瘤法,如上所述使小鼠、仓鼠或其他适合的宿主动物免疫以引起通过将特异性结合至免疫抗原的抗体的淋巴细胞进行生产。还可以体外免疫淋巴细胞。免疫后,分离淋巴细胞并使用(例如)聚乙二醇与适合的骨髓瘤细胞系融合以形成杂交瘤细胞,然后可以选择杂交瘤细胞从而与未融合的淋巴细胞和骨髓瘤细胞分离。然后,可以使用标准方法在体外培养中(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986)或者在动物中作为体内腹水肿瘤使产生如通过免疫沉淀、免疫印迹法或通过体外结合测定(例如,放射免疫测定(RIA);酶联免疫吸附测定(ELISA))所确定的特异性抗所选抗原的单克隆抗体的杂交瘤增殖。然后,如以上对多克隆抗体所述的,可以从培养基或腹水液中纯化单克隆抗体。

[0225] 作为另外一种选择,还可以使用如美国专利No. 4816567所述的重组DNA法制备抗HER3单克隆抗体。如通过使用特异性扩增编码所述抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸引物的RT-PCR,从成熟B细胞或杂交瘤细胞分离编码单克隆抗体的多核苷酸,并且使用常规程序确定它们的序列。然后,将分离的编码重链和轻链的多核苷酸克隆至适合的表达载体中,然后将所述表达载体转染到宿主细胞中,如大肠杆菌(E. coli)细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞,通过宿主细胞产生单克隆抗体。另外,如所述的,可以从表达所需物种的CDR的噬菌体展示文库分离所需物种的重组抗HER3单克隆抗体或其抗原结合片段(McCafferty等人, 1990, Nature, 348:552-554; Clarkson等人, 1991, Nature, 352:624-628; 和Marks等人, 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597)。

[0226] 还可以使用DNA重组技术以一些不同的方式修饰编码抗HER3抗体或其抗原结合片

段的多核苷酸以产生替代性抗体。在一些方面，(1) 对于产生嵌合抗体的人抗体的那些区域或者(2) 对于产生融合抗体的非免疫球蛋白多肽，可以置换(例如) 小鼠单克隆抗体的轻链和重链的恒定结构域。在一些方面，将恒定区截短或移动以产生所需的单克隆抗体的抗体片段。可变区的定点突变或高密度突变可以用于优化单克隆抗体的特异性、亲合力等。

[0227] 在某些方面，所述抗HER3抗体或其抗原结合片段是人抗体或其抗原结合片段。可以直接使用本领域中已知的多种技术制备人抗体。可以产生体外免疫的或从产生抗靶标抗原的抗体的免疫个体分离的永生化人B淋巴细胞(参见，例如，Cole等人，*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p.77 (1985); Boemer等人，1991, *J. Immunol.*, 147 (1):86-95; 和U.S. Patent 5750373)。

[0228] 另外，抗HER3人抗体或其抗原结合片段可以选自噬菌体文库，其中所述噬菌体文库表达人抗体，如，例如，Vaughan等人，1996, *Nat. Biotech.*, 14:309-314; Sheets等人，1998, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*, 95:6157-6162; Hoogenboom和Winter，1991, *J. Mol. Biol.*, 227:381; 和Marks等人，1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581中所述。用于抗体噬菌体文库的产生和使用的技术还在美国专利No. 5969108; 6172197; 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915; 6593081; 6300064; 6653068; 6706484; 和7264963; 和Rothe等人，2007, *J. Mol. Bio.*, doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018中有所描述(每篇文献以其全部内容作为参考并入)。

[0229] 在本领域中，亲合力成熟策略和链更替策略(Marks等人，1992, *Bio/Technology* 10:779-783, 该文献以其全部内容作为参考并入) 是已知的并且可以用于产生高亲合力人抗体或其抗原结合片段。

[0230] 在一些方面，抗HER3单克隆抗体可以是人源化抗体。还可以使用用于工程设计、人源化或表面重塑非人或人抗体的方法并且这些方法在本领域中是熟知的。人源化、表面重塑或类似工程设计的抗体可以具有来自非人来源的一个或多个氨基酸残基，例如，但不限于，小鼠、大鼠、兔、非人灵长类或其他哺乳动物。这些非人氨基酸残基被通常称为“输入”残基(“import” residues) 的残基取代，并且通常来自已知人序列的“输入”可变结构域、恒定结构域或其他域。这些输入序列可以用于降低免疫原性或者降低、提高或改变结合、亲合力、结合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期或任何其他适合的特性，如本领域中已知的。一般地，CDR残基直接并且最显著地参与影响HER3结合。因此，保持了部分或全部非人或人CDR序列，同时可变区和恒定区的非人序列被人或其他氨基酸取代。

[0231] 抗体还可以任选地是人源化抗体、表面重塑抗体、工程设计抗体或人抗体，所述抗体通过工程设计保留了对抗原HER3的高亲合力以及其他良好的生物学性质。为了实现该目标，可以任选地使用亲本、工程设计和人源化序列的立体模型通过亲本序列和多种概念化人源化和工程设计产物的分析过程来制备人源化(或人) 或者工程设计的抗HER3抗体和表面重塑抗体。立体免疫球蛋白模型是一般可用的并且是本领域技术人员所熟悉的。说明和显示所选候选免疫球蛋白序列的大致立体构型结构的计算机程序是可用的。对这些显示图案的检查使得能够分析所述残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能所起的作用，即对影响候选免疫球蛋白结合其抗原(如HER3) 的能力的残基的分析。以这种方式，可以从共有序列和输入序列选择框架(FW) 残基并合并，从而实现所需的抗体特性，如对靶标抗原提高的亲合力。

[0232] 可以使用任何已知的方法进行本发明的抗HER3抗体或其抗原结合片段的人源化、表面重塑或工程设计,例如但不限于以下文献中所述的那些,Jones等人,Nature321:522(1986);Riechmann等人,Nature332:323(1988);Verhoeyen等人,Science239:1534(1988);Sims等人,J.Immunol.151:2296(1993);Chothia and Lesk,J.Mol.Biol.196:901(1987);Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.89:4285(1992);Presta等人,J.Immunol.151:2623(1993);美国专利No.5639641;5723323;5976862;5824514;5817483;5814476;5763192;5723323;5766886;5714352;6204023;6180370;5693762;5530101;5585089;5225539;4816567;7557189;7538195;和7342110;国际专利申请No.PCT/US98/16280;PCT/US96/18978;PCT/US91/09630;PCT/US91/05939;PCT/US94/01234;PCT/GB89/01334;PCT/GB91/01134;PCT/GB92/01755;国际专利申请公开No.W090/14443;W090/14424;W090/14430;和欧洲专利公开No.EP 229246;以上文献中的每一篇包括其中所引用的参考文献在内全部作为参考并入本文。

[0233] 还可以在一旦免疫能够在不存在内源免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的全部功能的含有人免疫球蛋白位点的转基因小鼠中制备抗HER3人源化抗体及其抗原结合片段。该方法描述于美国专利No.5545807;5545806;5569825;5625126;5633425;和5661016。

[0234] 在某些方面,提供了抗HER3抗体片段。用于生产抗体片段的多种技术是已知的。通常,通过完整抗体的蛋白水解消化获得这些片段(例如,Morimoto等人,1993,Journal of Biochemical and Biophysical Methods24:107-117;Brennan等人,1985,Science,229:81)。在某些方面,通过重组产生抗HER3抗体片段。Fab、Fv和scFv抗体片段均可以在大肠杆菌(E.coli)或其他宿主细胞中表达并从它们中分泌,因此使得能够产生大量这些片段。这些抗HER3抗体片段还可以从以上所讨论的抗体噬菌体文库中分离。抗HER3抗体片段还可以是线性抗体,如美国专利No.5641870中所述。对于熟练的医师来说,用于产生抗体片段的其他技术将是显而易见的。

[0235] 根据本发明,技术可以适合于产生对HER3特异的单链抗体(参见,例如,美国专利No.4946778)。另外,方法可以适合于构建Fab表达文库(参见,例如,Huse等人,Science246:1275-1281(1989))以使得能够快速有效地鉴别对HER3或其衍生物、片段、类似物或同源基因具有所需特异性的单克隆Fab片段。可以通过本领域中的技术产生抗体片段,所述技术包括(但不限于):(a)通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生的F(ab')₂片段;(b)通过使F(ab')₂片段的二硫键还原产生的Fab片段;(c)通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体分子产生的Fab片段,和(d)Fv片段。

[0236] 特别是在抗体片段的情况下,修饰抗HER3抗体或其抗原结合片段以提高其血清半衰期还可以是所期望的。这可以通过以下方式实现,例如,通过在抗体或抗体片段中的适当区域中的突变向所述抗体或抗体片段引入补救受体结合表位或者通过将所述表位引入至肽标记并随后将所述肽标记在末端或中间融合至所述抗体或抗体片段(例如,通过DNA或肽合成),或者通过YTE突变。在本领域中,提高抗体或其抗原结合片段的血清半衰期的其他方法,例如,与异源分子(如PEG)的结合是已知的。

[0237] 异源偶联抗HER3抗体及其抗原结合片段也在本发明的范围内。异源偶联抗体由两个共价连接的抗体组成。例如,已提出这些抗体将免疫细胞靶向不希望的细胞(参见,例如,美国专利No.4676980)。考虑可以使用合成蛋白化学中已知的方法体外制备异源偶联抗

HER3抗体及其抗原结合片段,所述方法包括使用交联剂的那些。例如,可以使用二硫键交换反应或通过形成硫醚键来构建免疫毒素。出于此目的,适合试剂的实例包括亚胺硫醇(iminothiolate)和4-巯基丁亚氨酸甲酯。

[0238] 在某些方面,可以将本发明所述的HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段与其他治疗剂混合或结合至其他治疗剂或毒素以形成免疫结合物和/或融合蛋白。这些治疗剂和毒素的实例包括但不限于西妥昔单抗(Erbitux®)、帕尼单抗(Vectibix®)、拉帕替尼(Tykerb®/Tyverb®)和紫杉醇(Taxol®、Abraxane®)和衍生物(例如,多西他赛)。

[0239] 在一些方面,可以将本发明的HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段结合至靶向表皮生长因子受体(EGFR)的抗体或抗体片段。在其他方面,本发明的HER3结合分子可以结合至酪氨酸激酶抑制剂。在一些具体的方面中,本发明的HER3结合分子可以结合至与EGFR和/或HER2/neu有关的酪氨酸激酶活性的抑制剂。在一些方面,本发明的HER3结合分子可以结合至抗有丝分裂剂。在一些具体的方面中,本发明的HER3结合分子可以结合至稳定核纺锤体微管组装的试剂。

[0240] 出于本发明的目的,应理解修饰的抗HER3抗体或其抗原结合片段可以包含提供用于抗体或多肽与HER3结合的任何类型的可变区。在这点上,所述可变区可以包含或来源于可以诱导以发生体液免疫应答并产生抗所需肿瘤相关抗原的免疫球蛋白的任何类型哺乳动物。照此,修饰的抗HER3抗体或其抗原结合片段的可变区可以是(例如)人、鼠、非人灵长类(例如,食蟹猴、恒河猴等)或狼来源的。在一些方面,修饰的抗HER3抗体或其抗原结合片段的可变区和恒定区两者均是人的。在其他方面,可以将相容抗体的可变区(通常来源于非人来源)工程设计或具体改变以改善分子的结合性质或降低免疫原性。在该方面,在本发明中有用的可变区可以人源化或者另外通过输入氨基酸序列的引入进行改变。

[0241] 在某些方面,通过一种或多种CDR的至少部分取代,并且如有必要,通过部分框架区取代和序列改变来改变抗HER3抗体或其抗原结合片段的重链和轻链两者中的可变结构域。尽管CDR可以来源于与框架区所来源的抗体相同的类或甚至亚类的抗体,但是设想了CDR将来源于不同类的抗体并且在某些方面来源于来自不同物种的抗体。用来自供体可变区的完整CDR来取代所有CDR从而将一个可变结构域的抗原结合能力传递至另一个将是不必需的。然而,仅需要传递维持抗原结合位点活性所必需的那些残基。考虑到美国专利No. 5585089、5693761和5693762中所述的解释,通过进行常规实验或者通过尝试试验以获得免疫原性降低的功能性抗体将在本领域那些技术人员的能力之内。

[0242] 尽管对可变区进行了改变,但是本领域技术人员将理解本发明的修饰的抗HER3抗体或其抗原结合片段将包含抗体(例如,全长抗体或其免疫活性片段),其中一个或多个恒定区结构域的至少一部分已缺失或另外改变从而提供了所需的生物化学特性,如当与包含天然或未改变的恒定区的具有大致相同的免疫原性的抗体相比时,提高的肿瘤定位或降低的血清半衰期。在一些方面,修饰的抗体的恒定区将包含人恒定区。与本发明相容的恒定区的修饰包括一个或多个结构域中一个或多个氨基酸的添加、缺失或置换。也就是说,本文所公开的修饰抗体可以包括对三个重链恒定结构域(CH1、CH2或CH3)中的一个或多个和/或对轻链恒定结构域(CL)的改变或修饰。在一些方面,考虑了其中使一个或多个结构域部分或

完全缺失的修饰的恒定区。在一些方面,修饰的抗体将包括域缺失的构建体或变体,其中已去除了整个CH2结构域(Δ CH2构建体)。在一些方面,除去的恒定区结构域将被短氨基酸间隔物(例如,10个残基)取代,所述短氨基酸间隔物提供了一定程度的通常因不存在恒定区而赋予的分子柔性。

[0243] 除了它们的构型外,本领域还已知恒定区介导多种效应子功能。例如,与抗体互补的C1组分的结合激活补体系统。补体的激活在细胞病原体的调理作用和溶胞中具有重要意义。补体的激活还刺激炎症反应并且还可涉及自身免疫超敏反应。另外,抗体通过Fc区结合至细胞,其中抗体Fc区上的Fc受体位点结合至细胞上的Fc受体(FcR)。存在对不同类的抗体具有特异性的多种Fc受体,包括IgG(γ 受体)、IgE(η 受体)、IgA(α 受体)和IgM(μ 受体)。抗体与细胞表面上Fc受体的结合触发了多种重要而各异的生物学反应,包括抗体包被粒子的吞噬和毁坏、免疫复合物的清除、通过杀伤细胞使抗体包被的靶细胞溶胞(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或ADCC)、炎症介质的释放、胎盘转移以及免疫球蛋白产生的控制。

[0244] 在某些方面,抗HER3抗体或其抗原结合片段提供了改变的效应子功能,并且反过来,效应子功能影响所施用的抗体或其抗原结合片段的生物谱。例如,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其他方式)可以减少循环性修饰抗体的Fc受体结合,从而增强肿瘤定位。在其他情况下,可能的是根据本发明的恒定区修饰缓和了补体结合,并因而缩短了血清半衰期并减少了结合的细胞毒素的非特异性结合。但是恒定区的其他修饰可用于消除二硫键或寡糖部分,从而可因增强的抗原特异性或抗体柔性而实现增强的定位。相似地,可以使用完全在技术人员能力范围内的熟知的生物化学或分子学工程技术容易地实现根据本发明的恒定区的修饰。

[0245] 在某些方面,作为抗体或其抗原结合片段的HER3结合分子不具有一种或多种效应子功能。例如,在一些方面,所述抗体或其抗原结合片段不具有抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性和/或不具有补体依赖性细胞毒性(CDC)活性。在某些方面,所述抗HER3抗体或其抗原结合片段不结合至Fc受体和/或补体因子。在某些方面,所述抗体或其抗原结合片段没有效应子功能。

[0246] 将注意到在某些方面可以对抗HER3修饰的抗体或其抗原结合片段进行工程设计以将CH3结构域直接融合至相应修饰抗体或其片段的铰链区。在其他构建体中,可以期望在铰链区和修饰的CH2和/或CH3结构域之间提供肽间隔物。例如,可以表达其中CH2结构域缺失而剩余的CH3域(修饰或未修饰)通过5-20个氨基酸间隔物连接至铰链区的相容构建体。可以添加这样的间隔物,例如以确保恒定结构域的调控元件保持自由并可接近或者确保铰链区保持柔性。然而,应注意在一些情况下氨基酸间隔物可以显示出免疫原性并引起针对所述构建体的不希望免疫应答。因此,在某些方面,添加到所述构建体的任何间隔物将相对无免疫原性,或甚至完全没有免疫原性,以便维持修饰抗体所需的生物化学品质。

[0247] 除了整个恒定区结构域的缺失外,应理解可通过少数或甚至单个氨基酸的部分缺失或置换来提供本发明的抗HER3抗体及其抗原结合片段。例如,在CH2域的所选区域中的单个氨基酸突变可以足以显著降低Fc结合并借此提高肿瘤定位。相似地,可以期望的是仅使控制要调节的效应子功能(例如,补体C1q结合)的一个或多个恒定区结构域的一部分缺失。恒定区的这些部分缺失可以改善所述抗体或其抗原结合片段的所选特性(例如,血清半衰期),同时使与受试者恒定区结构域有关的其他所需功能保持完整。此外,如上所述,所公开

的抗HER3抗体及其抗原结合片段的恒定区可通过增强所得构建体的谱图的一个或多个氨基酸的突变或置换进行修饰。在这方面,有可能的是破坏由保守结合位点(例如,Fc结合)所提供的活性,同时基本上维持修饰的抗体或其抗原结合片段的构型和免疫谱。某些方面可以包括向恒定区添加一个或多个氨基酸以增强所需的特征,如减弱或增强效应子功能或提供更多的细胞毒素或碳水化合物附着。在这些方面中,可能期望插入或复制来源于所选恒定区结构域的特定序列。

[0248] 本发明还包括基本与本文所示的嵌合、人源化和人抗HER3抗体或其抗体结合片段同源的变体和等价物。这些可以包含(例如)保守置换突变,即一个或多个氨基酸被相似的氨基酸置换。例如,保守置换是指一个氨基酸被同一大类中的另一个氨基酸置换,如,例如,一个酸性氨基酸被另一个酸性氨基酸置换,一个碱性氨基酸被另一个碱性氨基酸置换,或者一个中性氨基酸被另一个中性氨基酸置换。保守氨基酸置换的目的在本领域中是熟知的。

[0249] 还可以修饰抗HER3抗体或其抗原结合片段以包含通常不是蛋白质一部分的其他化学部分。那些衍生化部分可以改善溶解性、生物半衰期或蛋白质吸收。所述部分还可以减少或消除蛋白质的任何不良副作用等。对那些部分的综述可见于Remington's Pharmaceutical Sciences,第20版,Mack Publishing Co.,Easton,PA(2000)。

[0250] VI. 编码HER3结合分子的多核苷酸

[0251] 在某些方面,本发明涵盖了多核苷酸,所述多核苷酸包含编码特异性结合HER3的多肽或其抗原结合片段的核酸序列。例如,本发明提供了多核苷酸,所述多核苷酸包含编码抗HER3抗体或编码该抗体的抗原结合片段的核酸序列。本发明所述的多核苷酸可以处于RNA的形式或处于DNA的形式。DNA包括cDNA、基因组DNA和合成的DNA;并且可以是双链或单链的,并且如果是单链的,则可以是编码链或非编码(反义)链。

[0252] 在某些方面,所述多核苷酸是分离的。在某些方面,所述多核苷酸是基本纯的。在某些方面,所述多核苷酸包括在相同阅读框中融合至辅助(例如)来自宿主细胞的多肽的表达和分泌的多核苷酸的成熟多肽的编码序列(例如,用作控制多肽从细胞中运输的分泌序列的前导序列)。具有前导序列的多肽为前蛋白,并可以具有由宿主细胞切割以形成成熟形式的多肽的前导序列。所述多核苷酸还可以编码作为成熟蛋白质外加5'氨基酸残基的HER3结合前蛋白。

[0253] 在某些方面,所述多核苷酸包括成熟HER3结合多肽(例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段)的编码序列,该编码序列在相同阅读框中融合至允许(例如)所编码的多肽纯化的标志物序列。例如,就细菌宿主而言,所述标志物序列可以由pQE-9载体提供的六聚组氨酸标签,以提供融合至所述标志物的成熟多肽的纯化;或者当使用哺乳动物宿主(例如,COS-7细胞)时,所述标志物序列可以是来源于流感病毒血凝素蛋白的血凝素(HA)标签。

[0254] 本发明还涉及所述编码(例如)本发明的HER3结合分子的HER3结合片段、类似物和衍生物的多核苷酸的变体。

[0255] 多核苷酸变体可以在编码区、非编码区或两者中包含改变。在一些方面,所述多核苷酸变体包含产生沉默置换、添加或缺失但不改变编码多肽的性质或活性的改变。在一些方面,核苷酸变体由于遗传密码的简并度而通过沉默置换产生。可以出于多种原因产生多核苷酸变体,例如,优化特定宿主的密码子表达(将人mRNA中的密码子变成对细菌宿主(如

大肠杆菌 (*E. coli*) 优选的那些密码子)。还提供了包含本文所述的多核苷酸的载体和细胞。

[0256] 在一些方面,可以使用寡核苷酸合成仪通过化学合成构建编码HER3结合分子(例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段)的DNA序列。这些寡核苷酸可以基于以下方面进行设计:所需多肽的氨基酸序列,以及选择在将要产生所关心的重组多肽的宿主细胞中有利的那些密码子。可以将标准方法用于合成编码所关心的分离多肽的分离多核苷酸序列。例如,可以将完整的氨基酸序列用于构建反向翻译的基因。另外,可以合成包含编码特定分离多肽的核苷酸序列的DNA寡聚物。例如,可以合成编码所需多肽的多个部分的多个小寡核苷酸,然后进行连接。各个寡核苷酸通常包含用于互补组装的5'或3'突出。

[0257] 一旦组装(通过合成、定点诱变或另一种方法),则将编码所关心的特定分离多肽的多核苷酸序列插入表达载体并可操作地连接至适合在所需宿主中表达所述蛋白质的表达控制序列。可以通过以下方法确认正确组装:核苷酸测序、限制性酶切谱图以及在适合的宿主中表达生物活性多肽。如本领域中熟知的,为了在宿主中获得转基因的高表达水平,必须将基因可操作地连接至在所选的表达宿主中具有功能性的转录和翻译表达控制序列。

[0258] 在某些方面,将重组表达载体用于扩增和表达编码抗HER3抗体或其抗原结合片段的DNA。重组表达载体是可复制的DNA构建体,其具有编码抗HER3抗体或其抗原结合片段的多肽链的合成或cDNA来源的DNA片段,该片段可操作地连接至来源于哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的适合的转录或翻译调控序列。转录单元通常包含以下部分的组件:(1)在基因表达中具有调控作用的遗传元件,例如,转录启动子或增强子;(2)转录成mRNA并翻译成蛋白质的结构或编码序列;和(3)合适的转录和翻译起始和终止序列,如将在下文中详细描述。这些调控元件可以包括控制转录的操纵子序列。另外,可以包含通常由复制起点赋予的在宿主中的复制能力以及有利于识别转化体的选择基因。当它们彼此功能相关时,DNA区域是可操作连接的。例如,如果信号肽的DNA作为参与所述多肽分泌的前体表达,则所述信号肽的DNA(分泌前导序列)可操作地连接至多肽的DNA;如果启动子控制所述序列的转录,则所述启动子可操作地连接至编码序列;或者如果核糖体结合位点的定位可使得允许翻译,则所述核糖体结合位点可操作地连接至编码序列。旨在用于酵母表达系统的结构元件包括使得能够通过宿主细胞在胞外分泌翻译蛋白质的前导序列。作为另外一种选择,当重组蛋白在没有前导序列或转运序列的情况下表达时,它可以包含N末端蛋氨酸残基。随后,该残基可以任选地从所表达的重组蛋白上切割以提供最终产物。

[0259] 表达控制序列和表达载体的选择将取决于宿主的选择。可以使用多种表达宿主/载体的组合。对于真核宿主有用的表达载体包括(例如)含有来自SV40、牛乳头瘤病毒、腺病毒和巨细胞病毒的表达控制序列的载体。对于细菌宿主有用的表达载体包括已知的细菌质粒,如得自大肠杆菌 (*E. coli*) 的质粒,其包括pCR 1、pBR322、pMB9及它们的衍生物;更宽宿主范围的质粒,如M13和丝状单链DNA噬菌体。

[0260] 适合表达HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段的宿主细胞包括受适合启动子控制的原核生物、酵母、昆虫或更高等的真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如,大肠杆菌 (*E. coli*) 或杆菌 (*bacilli*)。高等真核细胞包括如下所述的哺乳动物源的建立的细胞系。还可以使用无细胞的翻译系统。Pouwels等人(*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, N.Y., 1985) 描述了适合与细菌、真菌、酵母和哺

乳动物细胞宿主一起使用的克隆和表达载体,该文献的相关公开内容作为参考并入本文。有关蛋白质生产(包括抗体生产)方法的其他信息可见于(例如)美国专利公开No.2008/0187954、美国专利No.6413746和6660501以及国际专利公开No.WO 04009823,所述专利中的每一篇以其全部内容作为参考并入本文。

[0261] 多种哺乳动物或昆虫细胞培养系统还可以有利地用于表达重组HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段。可以在哺乳动物细胞中进行重组蛋白的表达,因为这些蛋白通常正确折叠、适当修饰并具有完全功能。适合的哺乳动物宿主细胞系的实例包括HEK-293和HEK-293T、Gluzman (Cell23:175,1981)所述的猴肾细胞的COS-7系,以及其他细胞系,包括,例如,L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、NSO、HeLa和BHK细胞系。哺乳动物表达载体可以包含非转录元件,如复制起点、连接至待表达的基因的适合的启动子和增强子,和其他5'或3'侧接非转录序列,以及5'或3'非翻译序列,如必要的核糖体结合位点、多腺苷酸化位点、剪接供体和受体位点以及转录终止序列。Luckow和Summers, BioTechnology6:47 (1988)综述了用于在昆虫细胞中产生异源蛋白的杆状病毒系统。

[0262] 可以根据任何适合的方法纯化通过转化宿主产生的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段。这些标准方法包括色谱法(例如,离子交换、亲和和分级柱色谱法)、离心、差异溶解度或通过用于蛋白质纯化的任何其他标准技术。可以将如六聚组氨酸、麦芽糖结合域、流感病毒外壳蛋白序列和谷胱甘肽-S-转移酶的亲和标签附接至蛋白质,以允许通过经过适合亲和柱而容易地纯化。分离的蛋白质还可以使用如蛋白质水解、核磁共振和X-射线晶体衍射的这些技术进行物理表征。

[0263] 例如,可以使用可商购的蛋白质浓缩过滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元首先对将重组蛋白分泌到培养基中的系统的上清液进行浓缩。在浓缩步骤后,可以将浓缩物应用于适合的纯化基质。作为另外一种选择,可以使用阴离子交换树脂,例如,具有二乙氨基乙基(DEAE)侧基的基质或基材。所述基质可以是丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、纤维素或在蛋白质纯化中常用的其他类型。作为另外一种选择,可以采用阳离子交换步骤。适合的阳离子交换剂包括含有磺丙基或羧甲基的多种不溶性基质。最后,可以使用利用疏水性RP-HPLC介质(例如,具有甲基或其他脂族侧基的硅胶)的一种或多种反相高效液相色谱(RP-HPLC)步骤来进一步纯化HER3结合分子。还可以按多种组合形式使用某些或全部上述纯化步骤以提供均一的重组蛋白。

[0264] 在细菌培养中产生的重组HER3结合蛋白,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以(例如)通过以下方法分离:首先从细胞颗粒中提取,然后进行一个或多个浓缩、盐析、水性离子交换或尺寸排阻色谱步骤。可以将高效液相色谱(HPLC)用于最终的纯化步骤。可以通过任何便利的方法破坏在重组蛋白表达中使用的微生物细胞,所述方法包括冻融循环、超声处理、机械破坏或使用细胞裂解剂。

[0265] 本领域已知用于纯化抗体和其他蛋白质的方法还包括(例如)在美国专利公开No.2008/0312425、2008/0177048和2009/0187005中所述的那些,所述专利公开中的每一篇均以其全部内容作为参考并入本文。

[0266] 在某些方面,HER3结合分子为非抗体的多肽。用于鉴定和产生以高亲和力结合至蛋白靶标的非抗体多肽的多种方法在本领域中是已知的。参见,例如,Skerra, Curr.Opin.Biotechnol.,18:295-304 (2007);Hosse等人,Protein Science,15:14-27

(2006);Gill等人,Curr.Opin.Biotechnol.,17:653-658(2006);Nygren,FEBS J.,275:2668-76(2008)和Skerra,FEBS J.,275:2677-83(2008),以上每篇文献以其全部内容作为参考并入本文。在某些方面,噬菌体展示技术可以用于鉴定/产生HER3结合多肽。在某些方面,多肽包括选自以下类型的蛋白质支架:蛋白A、脂质运载蛋白、纤连蛋白结构域、锚蛋白共有重复结构域和硫氧还蛋白。

[0267] VI. 使用治疗性抗HER3抗体的治疗方法

[0268] 本发明的方法涉及使用抗HER3结合分子,例如,抗体,包括其抗原结合片段、变体和衍生物来治疗患有与HER3表达或HER3表达细胞有关的疾病的患者。“HER3表达细胞”表示表达HER3的细胞。检测细胞中HER3表达的方法在本领域中是熟知的并且包括但不限于PCR技术、免疫组织化学、流式细胞术、免疫印迹、ELISA等。

[0269] 尽管以下讨论提及了使用本发明的HER3结合分子的多种疾病和病症的诊断方法和治疗,但是本文所述的方法还适用于抗HER3抗体和保留了本发明的抗HER3抗体的所需性质(例如,能够特异结合HER3并中和HER3活性)的这些抗HER3抗体的抗原结合片段、变体和衍生物。在一些方面,HER3结合分子为人或人源化抗体,所述抗体不介导ADCC,或者选自不介导ADCC的已知抗HER3抗体,或者是通过工程设计从而使它们不介导ADCC的抗HER3抗体。在一些方面,HER3结合分子是克隆16单克隆抗体。在其他方面,HER3结合分子是克隆16YTE突变体抗体。在一些方面,HER3结合分子是P2B11单克隆抗体。在一些方面,HER3结合分子是1A4单克隆抗体。在一些方面,HER3结合分子是2C2单克隆抗体。在一些方面,HER3结合分子是2F10单克隆抗体。在一些方面,HER3结合分子是3E1单克隆抗体。在一些方面,HER3结合分子是通过工程设计以延长血清半衰期的P2B11单克隆抗体。在一些方面,HER3结合分子是通过工程设计以延长血清半衰期的1A4单克隆抗体。在一些方面,HER3结合分子是通过工程设计以延长血清半衰期的2C2单克隆抗体。在一些方面,HER3结合分子是通过工程设计以延长血清半衰期的2F10单克隆抗体。在一些方面,HER3结合分子是通过工程设计以延长血清半衰期的3E1单克隆抗体。在其他方面,HER3结合分子是P2B11YTE突变体抗体。在其他方面,HER3结合分子是1A4YTE突变体抗体。在其他方面,HER3结合分子是2C2-YTE突变体抗体。在其他方面,HER3结合分子是2F10YTE突变体抗体。在其他方面,HER3结合分子是3E1YTE突变体抗体。

[0270] 在一个方面,治疗包括向受试者或患者应用或施用本发明的抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,或者向来自受试者或患者的分离的组织或细胞系应用或施用抗HER3结合分子,其中所述受试者或患者患有疾病、疾病的症状或者易患疾病。在另一个方面,治疗还旨在包括向受试者或患者应用或施用包含抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物组合物,或者将包含抗HER3结合分子的药物组合物应用或施用至来自患有疾病、疾病症状或易患疾病的受试者或患者的分离组织或细胞系。

[0271] 本发明的抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或其衍生物对于多种癌症的治疗是有用的。在一个方面,本发明涉及用作药物的抗HER结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或其衍生物,具体地在癌症的治疗或预防中使用。癌症的实例包括(但不限于)结肠癌、肺癌、胃癌、头颈鳞状细胞癌、黑素瘤、胰癌、前列腺癌和乳腺癌。

[0272] 根据本发明的方法,如在本文其他地方所定义的,至少一种抗HER3结合分子,例

如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物用于促进对癌症的积极治疗反应。术语对癌症治疗的“积极治疗反应”是指与这些抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或其衍生物的活性有关的疾病的改善和/或与所述疾病有关的症状的改善。因此,例如,疾病的改善可以表现出完全反应的特征。“完全反应”是指没有临床可检测的疾病,并且任何先前的测试结果恢复正常。作为另外一种选择,疾病的改善可以分为部分反应。“积极治疗反应”涵盖了癌症的发展和/或持续时间的减少或抑制,癌症严重性的降低或改善和/或由本发明的抗HER3结合分子的施用所产生的其一种或多种症状的改善。在具体的方面,这些术语是指在本发明的抗HER3结合分子的施用后的1种、2种或3种或者更多种结果:(1)癌细胞群体的稳定、减少或消除;(2)癌症生长的稳定或减少;(3)癌症形成的损害;(4)原发性、局部和/或转移性癌症的根除、除去或控制;(5)死亡减少;(6)无病、无复发、无发展和/或整体存活、持续时间或比率的提高;(7)反应速率、反应持久性或产生反应或处于缓解的患者数目的增加;(8)住院率降低;(9)住院时间减少;(10)癌症尺寸得到维持并且不提高或者提高小于10%,优选地小于5%,优选地小于4%,优选地小于2%,和(12)缓解患者数目的增加。

[0273] 可以使用筛选技术来评价临床反应,如磁共振成像(MRI)扫描、X射线照相成像、计算机断层(CT)扫描、流式细胞术或荧光激活细胞分选(FACS)分析、组织学、宏观病理学和血液化学,其包括(但不限于)通过ELISA、RIA、色谱法等可检测的变化。除这些积极治疗反应之外,经历了抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的疗法的受试者可以经受与疾病有关的症状的改善的有益作用。

[0274] 本发明的抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或其衍生物可以与任何已知的癌症疗法组合使用,所述疗法包括任何试剂或试剂组合,所述试剂对于癌症(例如,结肠癌、肺癌、胃癌、头颈鳞状细胞癌和乳腺癌)治疗是已知有用的或者是已经使用或目前正在使用的。第二试剂或药物组合制剂的试剂组合或剂量施用方案优选地对本发明的抗体或多肽具有补充活性,从而使它们不会彼此不利地影响。

[0275] 抗癌剂包括用于治疗恶性肿瘤,如癌性生长的药物。药物疗法可以单独使用,或者与其他治疗(如手术或放射疗法)组合使用。根据所涉及的器官的性质,可以在癌症治疗中使用几类药物。例如,一般通过雌激素刺激乳腺癌,并且可以用使性激素失活的药物进行治疗。类似地,可以用使雄激素(男性性激素)失活的药物治疗前列腺癌。在本发明的某些方法中使用的抗癌剂包括抗体(例如,结合IGF-1R的抗体、结合EGFR的抗体、结合HER2的抗体、结合HER3的抗体或结合cMET的抗体)、靶向IGF1R的小分子、靶向EGFR的小分子、靶向HER2的小分子、抗代谢物、烷化剂、局部异构酶抑制剂、微管靶标试剂、激酶抑制剂、蛋白质合成抑制剂、免疫治疗剂、激素疗法、糖皮质激素、芳香酶抑制剂、mTOR抑制剂、化疗剂、蛋白激酶B抑制剂、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂、RLr9、CD289、酶抑制剂、抗TRAIL、MEK抑制剂等。

[0276] 在具体的方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段可以与靶向表皮生长因子受体(EGFR)的抗体或抗体片段组合施用,例如,西妥昔单抗(Erbix®、Imclone)、帕尼单抗(Vectibix®, Amgen)、马妥珠单抗/EMD72000(Merck Serono)、MM-151寡克隆(Merrimack)、尼妥珠单抗(TheraCIM, InnGene Kalbiotechy)、GA201/RG7160(Roche)、Sym004(Symphogen)、MEHD-7945A(EGFR/HER3双重特异性, Genentech)。在其他具

体的方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段可以与靶向HER2的抗体或抗体片段组合施用,例如,帕妥珠单抗(rhuMAb 2C4/Omnitarg®, Genentech)、曲妥珠单抗(herceptin®, Genentech/Roche)、MM-111 (HER2/HER3双重特异性抗体, Merrimack, 例如, WO 2009/126920)。在其他具体方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段可以与还靶向HER3的抗体或抗体片段组合施用,例如,MEHD-7945A/RG7597 (EGFR/HER3双重特异性, Genentech, 例如, WO 2010108127)、MM-121 (Merrimack, 例如, WO 2008/100624)、MM-111 (HER2/HER3双重特异性抗体, Merrimack, 例如, WO 2009/126920)、AV-203 (Aveo, 例如, WO 2011/136911)、AMG888 (Amgen, WO 2007/077028)、HER3-8 (Immunogen, 例如, WO 2012/019024)。在其他具体的方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段可以与靶向HER4的抗体或抗体片段组合施用。在具体的方面,本发明的HER3结合分子可以与靶向EGFR或HER2 (例如,西妥昔单抗或曲妥珠单抗)的抗体组合施用。在其他具体的方面,本发明的HER3结合分子可以与靶向HER2的抗体药物结合物 (例如,曲妥珠单抗emtansine, Genentech/Roche) 组合施用。考虑了本发明的HER3结合分子通过抗体与共受体的结合所引起的共受体的内化和降解作用,并因此将提高靶向EGFR、HER2和/或HER4的抗体和/或抗体药物结合物的效力。

[0277] 在其他方面,本发明的HER3结合分子可以与酪氨酸激酶抑制剂组合施用。在一些其他的具体方面,本发明的HER3结合分子可以与EGFR和/或HER2/neu相关的酪氨酸激酶活性抑制剂 (例如,拉帕替尼) 组合施用。在具体的方面,本发明的HER3结合分子可以与表皮生长因子受体 (例如,EGFR、HER2、HER4) 的小分子抑制剂组合施用,所述小分子抑制剂例如,吉非替尼 (Iressa®, AstraZeneca); 卡奈替尼/CI-1033 (Pfizer); 拉帕替尼 (Tykerb®, GlaxoSmithKline)、厄洛替尼 (Tarceva®, OSI Pharma)、阿法替尼 (Tovok®/Tomtovok®, Boehringer Ingelheim)、来那替尼 (HKI-272, Pfizer)。

[0278] 在一些方面,本发明的HER3结合分子可以与抗有丝分裂剂组合施用。在一些具体的方面中,本发明的HER3结合分子可以与使核纺锤体微管组装稳定的试剂组合施用,例如,紫杉醇或多西他赛。

[0279] 在一些方面,本发明的HER3结合分子可以与MEK (有丝分裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 激酶,也称为MAPKK) 抑制剂,例如,司美替尼 (AZD6244, ARRY-142866, AstraZeneca)、WX-554 (Wilex)、曲美替尼 (GlaxoSmithKline)、refametinib (Ardea Biosciences)、E-6201 (Eisai)、MEK-162 (Novartis) 组合施用。在具体的方面,MEK抑制剂和本发明的HER3结合分子的组合比任一种单独的试剂更有效的。在具体的方面中,本发明的HER3结合分子与司美替尼组合施用。

[0280] 当组合疗法包括抗HER3结合分子的施用与另一种治疗剂的施用组合时,本发明所述的方法涵盖了使用单独制剂或单一药物制剂的共施用和以任一种顺序的连续施用。在一些方面,本文所述的抗HER3抗体与其他药物组合施用,其中所述抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物和治疗剂可以按任一种顺序序贯给药,或者同时给药 (即,同时或在相同时间框内)。

[0281] 组合疗法可以提供“协同作用”并且表现出“协同性”,即当活性成分一起使用时所

实现的作用大于所述化合物单独使用时所产生的作用之和。当活性成分在以下情况时,可以实现协同作用:(1)共配制并且以合并的单位剂量制剂同时施用或递送;(2)作为单独制剂交替或平行递送;或(3)通过一些其他方案。当以交替疗法递送时,当(例如)通过在单独注射器中的不同注射剂序贯给药或递送化合物时,可以实现协同作用。一般地,在交替疗法期间,序贯(即连续)给药每种活性成分的有效剂量,而在组合疗法中,一同施用两种或更多种活性成分的有效剂量。

[0282] 在一些方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以与表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂协同组合施用。在一些方面,EGFR抑制剂为抗体。在具体的方面,EGFR抑制剂抗体为**Erbitux®**(西妥昔单抗)或帕尼单抗(**Vectibix®**)。在具体的方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段可以与EGFR和/或HER2/neu相关的酪氨酸激酶活性抑制剂(例如,拉帕替尼)协同组合施用。在一些方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以与HER2抑制剂协同组合施用。在一些方面,HER2抑制剂为抗体。在具体的方面,HER2抑制剂抗体为帕妥珠单抗(rhuMAb **2C4/Omnitarg®**, Genentech)、曲妥珠单抗(**Herceptin®**, Genentech/Roche)或曲妥珠单抗emtansine (Genentech/Roche)。在具体的方面,本发明的HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段可以与HER2/neu相关的酪氨酸激酶活性抑制剂(例如,拉帕替尼)协同组合施用。在一些方面,本发明的HER3结合分子可以与抗有丝分裂剂协同组合施用。在一些具体的方面中,所述抗有丝分裂剂稳定了核纺锤体微管组装。在一些具体的方面中,所述抗有丝分裂剂为紫杉醇或多西他赛。在一些具体的实施方式中,2C2抗体可以与表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂协同组合施用。在一些具体的实施方式中,EGFR抑制剂为抗体。在具体的实施方式中,与2C2抗体协同施用的EGFR抑制剂抗体为**Erbitux®**(西妥昔单抗)。在具体的实施方式中,2C2抗体可以与EGFR和/或HER2/neu相关的酪氨酸激酶活性抑制剂(例如,拉帕替尼)协同组合施用。在一些实施方式中,2C2抗体可以与抗有丝分裂剂协同组合施用。在一些具体的实施方式中,与2C2抗体协同施用的抗有丝分裂剂稳定了核纺锤体微管组装。在一些具体的实施方式中,与2C2抗体协同施用的抗有丝分裂剂为紫杉醇。

[0283] 在一个方面,癌症包括KRAS突变。在具体的方面,KRAS突变位于人KRAS基因的密码子12处。如实施例部分中所显示的,无论是用作单一试剂(单一疗法)或与另一种治疗剂组合时,本文所公开的抗HER3抗体能够抑制包含KRAS突变的肿瘤细胞生长。

[0284] 其他方面为作为临床测试程序的一部分,抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或其衍生物在组织中蛋白水平的诊断监测中的使用,例如,来确定给定治疗方案的效力。例如,可以通过将抗体偶联至可检测的物质来辅助检测。可检测的物质的实例包括多种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。适合的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适合的辅基复合物的实例包括抗生蛋白链菌素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;适合的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括荧光素酶、萤光素和水母发光蛋白;和适合的放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0285] VII. 药物组合物和施用方法

[0286] 制备和向对其有需要的受试者施用本发明的抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的方法对于本领域技术人员是熟知的并且是容易确定的。抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的施用途径可以是(例如)口服、肠胃外、通过吸入或局部的。如本文所使用的术语肠胃外包括,例如,静脉内、动脉内、腹膜内、肌内、皮下、直肠或阴道施用。然而,在与本文所教导的内容相容的其他方法中,可以将本发明的抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物直接递送至不利的细胞群体位点,借此提高了患病组织对治疗剂的暴露。

[0287] 如本文所讨论的,可以以药物有效量施用本发明的抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物以用于HER3表达细胞介导的疾病(如某些类型的癌症)的体内治疗。

[0288] 在本发明中使用的药物组合物可以包括药物可用的载体,包括,例如,水、离子交换剂、蛋白质、缓冲物质和盐。还可以存在防腐剂及其他添加剂。所述载体可以是溶剂或分散媒介。在Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Publishing Co.),第16版(1980)中描述了在本文所公开的治疗方法中使用的适合的制剂。在一些方面,在冰箱(2-8℃)稳定的组合物中配制本发明的HER3结合分子。在具体的方面,冰箱稳定的组合物包含25mM组氨酸/组氨酸HCl、205mM蔗糖、0.02%聚山梨酯80,pH6.0。在另一个具体的方面,在冰箱稳定的组合物中配制25-100mg/ml的本发明的HER3结合分子。

[0289] 在任何情况下,可以通过在适当的溶剂中引入所需量的活性化合物(例如,单独的或与其他活性剂结合的抗HER3抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物),然后过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。此外,可以将制剂以试剂盒的形式包装并出售。这些制品可以具有标签或包装说明书,其显示了相关组合物对于治疗患有或易患疾病或病症的受试者是有用的。

[0290] 肠胃外制剂可以是单次推注剂量、输注剂量或负荷推注剂量,然后使用维持剂量。这些组合物可以以特定的固定间隔或可变间隔,例如,每天一次或基于“根据需要”的基础施用。

[0291] 所述组合物可以以单次剂量、多次剂量或在已确定的时间段以输注形式施用。还可以调整剂量施用方案以提供最佳期望反应(例如,治疗性或预防性反应)。

[0292] 用于治疗HER3表达细胞介导的疾病(如某些类型的癌症,其包括,例如,结肠癌、肺癌、胃癌、头颈鳞状细胞癌、黑素瘤、胰癌、前列腺癌和乳腺癌)的本发明的组合物的治疗有效剂量根据多种不同因素改变,其包括施用方式、靶标位点、患者的生理状态,患者是人还是动物、所施用的其他药物和治疗是预防性还是治疗性的。通常,患者为人,但是还可以治疗非人哺乳动物(包括转基因哺乳动物)。可以使用本领域技术人员已知的常规方法滴定治疗剂量以优化安全性和效力。

[0293] 考虑到本发明的公开内容,本领域的技术人员容易地确定了要施用的至少一种抗HER3结合分子,例如,抗体或其结合片段、变体或衍生物的量,而无需过度实验。影响至少一种抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的施用方式和各个量的因素包括(但不限于)疾病严重程度、病史、经受疗法的个体的年龄、身高、体重、健康性和身体状况。类似地,要施用的抗HER3结合分子,例如,抗体或其片段、变体或衍生物的量将取决于施用方式和受试者是否将经历单次剂量或多次剂量的这种试剂。

[0294] 本发明还提供了抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物在生产用于治疗癌症类型的药物中的使用,所述癌症包括,例如,结肠癌、肺癌、胃癌、头颈鳞状细胞癌、黑素瘤、胰癌、前列腺癌和乳腺癌。

[0295] 本发明还提供了抗HER3结合分子,例如,本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物在生产用于治疗受试者的癌症类型的药剂中的使用。在某些方面,所述药剂在已用至少一种其他疗法预先治疗的受试者中使用。“预先治疗”旨在表示受试者在接受包含抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物之前已接受了一种或多种其他疗法(例如,已用至少一种其他抗癌疗法治疗)。不必需受试者对使用先前疗法的预先治疗起反应。因此,接受包含抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物受试者对使用先前疗法的预先治疗或对其中预先治疗包含多次疗法的先前疗法中的一种或多种可以起反应或者可以不起反应。

[0296] 本发明还提供了抗HER3结合分子,例如,本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物和至少一种其他疗法的共施用。抗HER3抗体和至少一种其他疗法可以一起在单一组合物中共施用或者可以在单独的组合物中在相同的时间或重叠的时间一起共施用。

[0297] 本发明还提供了抗HER3结合分子,例如,本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物在生产用于治疗受试者的癌症的药剂中的使用,其中在已用至少一种其他疗法治疗受试者之前施用所述抗HER3结合分子。

[0298] VIII. 诊断

[0299] 本发明还提供了在HER3表达细胞介导的疾病,如某些类型的癌症,包括(例如)结肠癌、肺癌、胃癌、头颈鳞状细胞癌、黑素瘤、胰癌、前列腺癌和乳腺癌的诊断期间有用的诊断方法,所述方法包括测量HER3蛋白或转录本在来自个体的组织或其他细胞或体液中的表达水平,和将测量的表达水平与正常组织或体液中的标准HER3表达水平相比较,其中与标准相比表达水平的提高是病症的指征。

[0300] 本发明的抗HER3抗体及其抗原结合片段、变体和衍生物可用于使用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法(例如,参见,Jalkanen等人,J.Cell.Biol.101:976-985(1985);Jalkanen等人,J.Cell Biol.105:3087-3096(1987))测定生物样品中的HER3蛋白水平。用于检测HER3蛋白表达的其他基于抗体的方法包括免疫测定法,如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀或免疫印迹。在本文的其他地方更详细地描述了适合的测定。

[0301] “测定HER3多肽的表达水平”旨在直接(例如,通过确定或估计绝对蛋白水平)或相对(例如,通过和与第二生物样品中的多肽水平相关的疾病比较)定性或定量地测量或估计第一生物样品中HER3多肽的水平。可以测量或估计第一生物样品中HER3多肽的表达水平并将其与标准HER3多肽水平比较,所述标准采自从未患病症的个体获得的第二生物样品或通过平均来自未患病症的个体群体的水平来确定。如在本领域中理解的,一旦已知“标准”HER3多肽水平,则它可以作为标准反复用于比较。

[0302] 本发明还提供了在HER3表达细胞介导的疾病,如某些类型的癌症,包括(例如)结肠癌、肺癌、胃癌、头颈鳞状细胞癌、黑素瘤、胰癌、前列腺癌和乳腺癌的诊断期间有用的诊断方法,所述方法包括测量HER3蛋白在来自个体的组织或其他细胞或体液中的活性水平,和将测量的活性水平与正常组织或体液中的标准HER3活性水平相比较,其中与标准相比的活性水平的提高是病症的指征。

[0303] 本发明还提供了在HER3表达细胞介导的疾病,如某些类型的癌症,包括(例如)结肠癌、肺癌、胃癌、头颈鳞状细胞癌、黑素瘤、胰癌、前列腺癌和乳腺癌的处理期间有用的诊断方法,所述方法包括在HER3表达细胞介导的疾病的处理期间测量HER3蛋白在来自个体的组织或其他细胞或体液中的活性水平,和将测量的活性水平与正常组织或体液中的标准HER3活性水平相比较和/或将所测量的活性水平与治疗前得自个体的组织或体液中的标准HER3活性水平相比较,其中与标准相比活性水平的降低是HER3活性抑制的指征。

[0304] “测定HER3蛋白的活性水平”旨在直接(例如,通过确定或估计绝对活性水平)或相对(例如,通过与第二生物样品中的活性水平相比)定性或定量地测量或估计第一生物样品中HER3蛋白的活性。可以测量或估计第一生物样品中HER3蛋白的活性水平并将其与标准HER3蛋白活性比较,所述标准采自从未患病症的个体获得的第二生物样品或通过平均来自未患病症的个体群体或来自治疗前的个体的水平来确定。如在本领域中理解的,一旦已知“标准”HER3蛋白的活性水平,则它可以作为标准反复用于比较。在某些方面,测量或估计生物样品中HER3的活性水平或者通过检测生物样品中磷酸化HER3进行比较。在具体的方面,测量或估计生物样品中HER3的活性水平,或者通过检测皮肤活体组织检查中磷酸化HER3进行比较,其中在活组织检查之前或之后用HRG刺激皮肤。

[0305] “生物样品”旨在表示得自个体、细胞系、组织培养或可能表达HER3的细胞的其他来源的任何生物样品。用于从哺乳动物获得组织活组织检查和体液的方法在本领域中是公知的。

[0306] 在一些方面,可以使用离体测定检测施用于受试者的HER3抑制剂(例如,本发明的抗HER3抗体及其抗原结合片段、变体和衍生物)的生物活性。在具体的方面,离体测定包括检测皮肤活组织检查中磷酸化HER3的水平,其中在活组织检查之前或之后用HRG刺激皮肤。在具体的方面,匹配的的皮肤活组织检查采自己施用HER3抑制剂的受试者。在具体的方面,在施用HER3抑制剂的受试者的第一皮肤区域注射HRG而在第二皮肤区域注射对照缓冲剂,其中在所需时间量(例如,10-60分钟)之后,从所述第一皮肤区域和第二皮肤区域采集活组织检查。在替代的方面,用HRG处理第一皮肤活组织检查而用对照缓冲剂处理第二皮肤活组织检查,其中所述第一和第二活组织检查是从已施用HER3抑制剂的受试者中采集的相匹配的皮肤活组织检查。在另一个具体的方面,在皮肤活组织检查中检测磷酸化HER3的水平。在某些方面,确定了所述第一(HRG处理)和所述第二(对照缓冲剂处理)活组织检查之间的磷酸化HER3水平的差异。在某些方面,将皮肤活组织检查匀浆化并通过ELISA检测磷酸化HER3的水平。在其他方面,将来自施用HER3抑制剂的受试者的皮肤活组织检查中的磷酸化HER3的水平与来自未施用HER3抑制剂的对照受试者的皮肤活组织检查中的磷酸化HER3水平相比较,其中已施用HER3抑制剂的受试者的皮肤活组织检查中的磷酸化HER3的水平的降低是HER3抑制剂的生物活性的量度。在替代方面,将来自施用HER3抑制剂的受试者的皮肤活组织检查中的磷酸化HER3的水平与来自相同受试者但是在HER3抑制剂施用之前采集的皮肤活组织检查中的磷酸化HER3水平相比较,其中施用HER3抑制剂后,受试者的皮肤活组织检查中的磷酸化HER3的水平的降低是HER3抑制剂的生物活性的量度。在实施例5.15节中详细描述了所述方法的其他具体方面。

[0307] IX. 包含HER3结合分子的试剂盒

[0308] 本发明提供了包含本文所述的并且可以用于进行本文所述的方法的本发明的

HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段的试剂盒。在某些方面,试剂盒在一个或多个容器中包含至少一种纯化的抗HER3抗体或其抗原结合片段。在一些方面,所述试剂盒含有进行检测测定所必需和/或足够的所有组分,其包括所有对照、进行测定的说明和用于分析和解释结果的任何必需的软件。本领域技术人员将容易地认识到本发明所公开的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段可以容易地引入至本领域中公知的已确立的试剂盒形式中的一种之中。

[0309] X. 免疫测定

[0310] 可以通过本领域中已知的任何方法测定本发明的抗HER3结合分子,例如,抗体或其抗原结合片段、所述分子的变体或其衍生物的免疫特异性结合。可以使用的免疫测试方法包括(但不限于)使用多种技术的竞争性或非竞争性测试系统,所述技术如免疫印迹、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测试、免疫沉淀测试、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体结合测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、蛋白A免疫测定,以上列举了一些,在此就不一一列举了。这些测定对于本领域技术人员来说是常规并且熟知的(参见,例如,Ausubel等人主编,(1994)Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,Inc.,NY),第1卷,该文献以其全部内容作为参考并入本文)。

[0311] 本发明的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段、所述分子的变体或其衍生物可以在组织学上(如在免疫荧光、免疫电子显微术或非免疫学测定法中)用于HER3受体或其保守变体或肽片段的原位检测。可以通过从患者中取出组织学样品,对其应用标记的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段、变体或其衍生物,优选地通过将所标记的HER3结合分子(例如,抗体或片段)覆盖在生物样品上来进行应用以完成原位检测。通过使用该程序,有可能不仅能确定HER3或保守变体或肽片段的的存在性,而且还可以确定它们在所检查的组织中的分布。通过使用本发明,本领域技术人员将容易地理解到可以对多种组织学方法中的任一种(例如,染色程序)进行改变以获得这种原位检测。

[0312] 可以根据熟知的方法确定给定批的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段、变体或其衍生物的结合活性。通过使用常规实验,本领域技术人员将能够确定每次测定的可操作和最佳的测定条件。

[0313] 适合于确定分离的HER3结合分子,例如,抗HER3抗体或其抗原结合片段、变体或其改变/突变的衍生物的结合特征的方法和试剂在本领域中是已知和/或是可商购的。设计用于这些动力学分析的设备 and 软件是可商购的(例如,BIAcore,BIAevaluation软件,GE Healthcare;KinExa软件,Sapidyne Instruments)。

[0314] 除非另外指明,否则本发明的实践将使用在本领域的技术范围内的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规方法。在文献中充分说明了这些技术。参见,例如,Sambrook等人主编,(1989)Molecular Cloning A Laboratory Manual(第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press);Sambrook等人主编,(1992)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,(Cold Springs Harbor Laboratory, NY);D.N.Glover主编,(1985)DNA Cloning,第I和II卷;Gait主编,(1984)Oligonucleotide Synthesis;Mullis等人,美国专利No.4683195;Hames和Higgins主编,(1984)Nucleic Acid Hybridization;Hames和Higgins主编,(1984)Transcription And

Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller和Calos主编, (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu等人主编, Methods In Enzymology, 第154和155卷; Mayer和Walker主编, (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir和Blackwell主编, (1986) Handbook Of Experimental Immunology, 第I-IV卷; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); 和Ausubel等人, (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.)。

[0315] 抗体工程的一般原理可见于Borrebæck主编, (1995) Antibody Engineering (第2版; Oxford Univ. Press)。蛋白质工程的一般原理可见于Rickwood等人主编, (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.)。抗体和抗体-半抗原结合的一般原理可见于: Nisonoff (1984) Molecular Immunology (第2版; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); 和Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N.Y.)。另外, 本领域中已知的并且未具体说明的免疫学中的标准方法通常按照Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites等人主编, (1994) Basic and Clinical Immunology (第8版; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) 以及Mishell和Shiigi (主编) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY) 中进行。

[0316] 说明免疫学一般原理的标准参考书包括: Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett等人主编, (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); 在Burden等人主编的Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology中, Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" (Elsevier, Amsterdam); Goldsby等人主编, (2000) Kuby Immunology (第4版; H. Freeman & Co.); Roitt等人, (2001) Immunology (第6版; London: Mosby); Abbas等人, (2005) Cellular and Molecular Immunology (第5版; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann和Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook和Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach和Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press)。

[0317] 以上所引用的所有参考文献以及在本文中所引用的所有参考文献以其全部内容作为参考并入本文。

[0318] 下列实施例以举例且非限制性的方式提供。

实施例

[0319] 还可以参考以下非限制性实施例来定义本发明的方面,所述实施例详细描述了本发明的某些抗体的制备和使用本发明的抗体的方法。可以再不背离本发明的范围的情况下对材料和方法两者实施多种改变,这对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0320] 实施例1.分离/优化抗HER3单克隆抗体的方法

[0321] 1.1抗原和细胞系

[0322] 重组人Her1 (ECD) /Fc嵌合体、人HER2 (ECD) /Fc嵌合体、人HER3 (ECD) /Fc嵌合体和人Her4 (ECD) /Fc均购自R&D Systems (Minneapolis,MN),并且通过接头肽融合至C末端6X组氨酸标记。重组小鼠HER3 (ECD) /Fc嵌合体是在本实验室生产的。在补充有5%胎牛血清(FBS)的DMEM中培养人KPL-4乳腺癌细胞。

[0323] 1.2HER3结合剂的文库筛选-克隆16抗体的鉴别 (CL16)

[0324] 将未标记和生物素化的HER3 (ECD) /Fc用作从Dyax's Fab310人Fab噬菌体展示文库 (Dyax,Cambridge,MA) 选择HER3结合剂的靶标。进行了两组淘选 (panning):捕获淘选和溶液中的淘选。对于捕获淘选,首先将输入的噬菌体与通过固定化重组蛋白A/G捕获在免疫管 (immunotube) 上的多克隆人IgG一起孵育,然后用通过固定化重组蛋白A/G捕获在免疫管 (immunotube) 上的未标记的靶标进行选择。

[0325] 在溶液中的淘选中,将输入的噬菌体与多克隆人IgG、具有淬灭的生物素的抗生蛋白链菌素涂覆的磁珠孵育以用于排除选择,然后用生物素化的靶标进行选择,其中随后与抗生蛋白链菌素涂覆的磁珠一起孵育以捕获结合至靶标的噬菌体。在通过用大量TPBS (1×PBS/0.1%吐温-20) 清洗除去未结合的噬菌体后,用100mM TEA (三乙胺) 洗脱结合的噬菌体。随后,对来自溶液中的淘选的洗脱的噬菌体和保持在珠上的噬菌体进行扩增并进行下一轮选择。对每组选择进行三轮选择。

[0326] 阳性结合噬菌体的百分比在使用捕获淘选的小于1%至使用三轮溶液中的淘选的68%的范围内 (表3)。

[0327] 表3:HER3结合剂的筛选

[0328]

淘选	捕获淘选	在溶液中的淘选 中的第二轮	在溶液中的淘选 中的第三轮
所筛选的总克隆	380	285	475
阳性克隆	1	7	322
阳性率 (%)	<1	2	68

[0329] 1.3通过噬菌体ELISA筛选人和小鼠HER3结合剂

[0330] 通过噬菌体ELISA,针对人和小鼠HER3结合筛选从第二轮和第三轮选择所富集的噬菌体。在4℃,用在1×PBS (pH7.4) 中稀释的5mg/ml,50ml每孔的不同抗原涂覆96孔半面积板过夜。在室温下,用3% (w/v) 无脂奶在TPBS中的溶液阻断涂覆的板1小时,并用TPBS清洗两次。然后,将板与过夜的噬菌体上清液一起孵育1h。在用TPBS清洗10次后,将板与辣根过氧化物酶 (HRP) -结合的抗M13抗体一起孵育1小时,和清洗10次。用四甲基联苯胺 (TMB) 过氧化物酶底物溶液使板显影,用0.18M H₂SO₄终止反应并且将板在ELISA酶标仪上在450nm下读数。

[0331] 鉴别了与鼠HER3 (作为HER3-Fc融合体) 交叉反应的29个独特的阳性结合剂。所鉴别的结合剂无一显示出对HER2或Her4的交叉反应(数据未显示)。

[0332] 1.4将Fab重排为完整IgG抗体和表达

[0333] 通过PCR产生了来自阳性噬菌体克隆的免疫球蛋白可变轻链(VL) 和可变重链(VH), 并将其插入到含有 λ 轻链恒定区和CH1-铰链-CH2-CH3IgG1区的人IgG1表达载体中。为了表达IgG1抗体, 使用293fectin™试剂(Invitrogen, Carlsbad, CA) 用重排的IgG载体瞬时转染人胚肾293-F细胞。转染后10天收获条件培养基, 并将其混合和无菌过滤。使用蛋白A珠纯化IgG1。将最终洗脱的IgG1对PBS透析, 并通过蛋白定量测定确定IgG1浓度。

[0334] 将克隆16 (CL16; SEQ ID NO:1和2分别为VL和VH氨基酸序列) 重排为人IgG1。

[0335] 1.5通过免疫荧光确定克隆16抗体 (CL16) 的内化

[0336] 用克隆16抗体 (CL16) 标记人乳腺癌KPL-4细胞。用CL16孵育细胞导致HER3胞吞的增加, 这防止了受体与细胞表面上的HER2形成活性信号复合物。

[0337] 通过将细胞在生长条件下孵育0 (非内化) 或2.5小时 (内化) 使得细胞表面连接的CL16抗体能够内化。然后, 用3.7%多聚甲醛固定全部细胞, 在PBS中清洗, 用0.5% Triton X-100在PBS中的溶液透性化, 并在加入抗荧光淬灭封片液和荧光显微检查前用1mg/ml的AlexaFluor®488山羊抗人IgG (Invitrogen) 染色。发现CL16抗体在KPL-4细胞中内化。在0时间, KPL-4细胞显示出强烈的细胞表面染色 (图1, 0小时, 上图), 而在生长条件下孵育2.5小时后, 细胞表面染色减弱并被指示内化的胞内间断性染色取代 (图1, 2.5小时, 下图)。

[0338] 1.6构建表达克隆16Fab的噬菌体载体

[0339] 将编码抗体克隆16的抗原结合片段 (Fab) 的DNA克隆至Dall' Acqua等人先前所述的修饰的M13基噬菌体表达载体中 (Dall' Acqua等人, 2005, Methods. 36:43-60)。在该修饰的载体中, 将人 λ 恒定区DNA工程设计以取代人 κ 轻链。Fab片段的表达受LacZ启动子的控制, 并且通过融合至Fab片段的VH和VL链中任一条的N-末端的噬菌体P3信号序列使得能够分泌Fab片段。通过杂交突变进行克隆, 如Kunkel (Kunkel, T. A., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 82:488-492) 和Wu (Wu, H., 2003, Methods Mol. Biol. 207:197-212) 所描述的。

[0340] 简言之, 通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增克隆16IgG的可变区。通过杂交和随后的DNA聚合反应, 分别将克隆16可变轻链区整合到具有人 λ 恒定区的框中, 并且将可变重链区克隆到具有人重链恒定区1 (CH1) 的框中。然后, 将含有克隆16Fab片段的噬菌体载体在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) CJ236株中生长以产生含有尿嘧啶核苷 (U) 的单链DNA (ssDNA), 如Wu和An所述 (Wu, H. 和An, LL., 2003, Methods Mol. Biol. 207:213-33)。将含有尿嘧啶核苷的ssDNA用作模板以引入所设计的突变, 从而用于改善对HER3的结合亲和力。

[0341] 1.7克隆16 (CL16) 生殖系

[0342] 序列分析显示克隆16 (CL16) 的VH框架与VH生殖系基因3-23具有100%的序列同一性, 而VL框与其最近的生殖系基因47*01在6个位置处是不同的。进行定点突变以改变每个和全部不同于生殖系基因47*01的氨基酸。具体地, 如下所示在轻链可变区中引入了6个点突变: Y2S、E3V、S18R、M21I、H38Q和S50Y, 其中第一个字母代表原始克隆16的单字母氨基酸代码, 数字代表框架残基编号 (根据Kabat), 而第二个字母代表生殖系序列的单字母氨基酸代码。参见图2A和图2C中的序列, 其分别对应于原始VL CL16和生殖系 (GL) VL CL16。所得变

体表示为Fab,并且通过ELISA确定它们与重组HER3蛋白的结合。

[0343] 结合结果显示如通过ELISA所测量的,与亲本克隆16相比框2中的H38Q氨基酸突变改善了结合。相反,相同框中的S49Y突变对结合具有负影响。其他点突变显示对HER3结合无影响。具有全部6个非生殖系氨基酸突变的完全生殖系突变体显示了与S50Y点突变类似的结合降低程度,这表明氨基酸S50参与结合。与亲本克隆16相比,对具有除S50Y之外的全部生殖系点突变的克隆的进一步测试保留和/或提高了对HER3的结合。将该部分生殖系克隆,克隆16(GL)(在本发明中还称为“GL-P6”)用作进一步亲合力优化的模板。

[0344] 1.8克隆16(CL16)的亲合力优化

[0345] 使用杂交突变法将生殖系克隆GL-P6的所有6个互补决定区(DCR)的每个氨基酸单个突变为其他20种氨基酸(Kunkel,1985)。两组DNA引物(其中一个含有编码8个氨基酸的NSS密码子,而另一个含有编码12个不同氨基酸的NWS密码子)用于将突变引入至每个靶标CDR位置。在杂交突变反应中使用了单个简并引物。简言之,每个简并引物是磷酸化的,然后与尿苷酸化的GL-16Fab ssDNA以10:1的比值使用。将混合物加热至95℃,然后在1小时内冷却至55℃。此后,加入T4连接酶和T7DNA聚合酶,并将混合物在37℃孵育1.5小时。分别混合VH和VL CDR的合成产物;然而,NSS和NWS文库保持独立并且单独筛选。通常,将1μL的混合文库DNA电穿孔至XL1-Blue以用于在XL1-Blue菌苔上形成空斑或者用于产生Fab片段(Wu和An,2003)。

[0346] 1.9Fab文库的初筛选

[0347] 初筛选由单点ELISA(SPE)测定组成,所述单点ELISA是使用在96孔板(深孔)中生长并用单个重组M13克隆感染的细菌的培养上清液进行的,如在其他处所描述的(Wu和An,2003)。简言之,该捕获ELISA包括在4℃用约50ng绵羊抗人Fd抗体(Biodesign International,ME)在碳酸盐缓冲液(pH8.5)中的溶液涂覆96孔Maxisorp Immunoplate的各个孔过夜。第二天,在室温下用3%BSA在PBS缓冲液中的溶液阻断所述板1小时。然后,将Fab上清液加入到所述板中并在室温下孵育1小时。清洗后,将0.1μg生物素化的HER3蛋白加入至所述孔中并将混合物在室温下孵育1.5小时。然后,在室温下与中性抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶(HRP)结合物(Pierce,IL)一起孵育约40分钟。用四甲基联苯胺(TMB)底物检测HRP活性,并用0.2M H₂SO₄使反应终止。在450nm读板。

[0348] 挑出在450nm显示出比亲本克隆GL-P6Fab更大的光密度(OD)信号的克隆并再生长(15mL)(Wu和,2003)并通过ELISA(如上所述)重复测定两次以确认阳性结果。对重复显示出大于GL-P6Fab的信号克隆的克隆测序。然后,通过定量Fab ELISA确定具有CDR变化的每个克隆的Fab蛋白浓度,其中将已知浓度的Fab用作参考。通过将ELISA信号与参考Fab所产生的信号相比较,确定了Fab浓度。在归一化Fab浓度下,对所有阳性变体再次重复结合测定以确定突变体Fab和亲本GL-P6Fab的相对结合亲合力。

[0349] 结合ELISA显示在CDR2中分别含有Y50I或Y50V点突变的表示为克隆14C7和克隆15D12的两个VH变体在HER3结合中显示出与亲本生殖系克隆GL-P6相比的5倍改善。在VL突变系列中,鉴别了显示出改善的结合的在CDR1中的几种单个突变,例如,克隆4H6(包含S24R点突变)、克隆6E3(包含S27L点突变),或者在CDR3中的几种单个突变,例如,克隆5H6(包含S94G点突变)、克隆8A3(包含S96aI点突变)、克隆4C4(包含S96aR点突变)、克隆2B11(包含S96aP点突变)和克隆2D1(包含V97A突变)。

[0350] 最值得注意地,VL-CDR3的氨基酸S96a被异亮氨酸(I)、精氨酸(R)或脯氨酸(P)的置换分别导致了3.5倍、8.6倍和32倍的结合改善。

[0351] 1.10Fab文库的组合筛选

[0352] 将确定对结合至HER3有益的VH和VL中的点突变进一步结合以获得额外的结合协同作用。将组合突变体表示为Fab并使用HER3结合ELISA进行筛选。尽管将Fab片段的VH链中的Y50I或Y50V点突变中的任一个与VL突变相结合似乎无益处而且还降低了对HER3的结合,但是结合几种VL突变进一步改善了结合。这些VL突变的组合包括克隆1A4(包含L96P、S97P和V100A点突变)、克隆2C2(包含S26L、L96P、S97P和V100A点突变)、克隆2F10(包含S97P和V100A突变)和克隆3E1(包含S23R、L96P、S97P和V100A点突变)中的组合。

[0353] 1.11亲和力优化的Fab变体向IgG形式的转化和抗体表达

[0354] 将显示出改善的结合的单个突变和组合突变变体转化为IgG形式以用于进一步表征。使用编码限制性酶切位点的引物通过PCR扩增每个变体的可变区以有利于向IgG哺乳动物表达载体的克隆以用于使用HEK293F细胞进行表达。根据生产商的说明,直接在1mL HiTrap蛋白A柱(GE Healthcare,NJ)上从条件培养基中纯化分泌的可溶性人IgG1蛋白。将纯化的人IgG1样品(通常>95%的均一性,如通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳所判断的)对PBS进行透析,快速冷冻并在-70℃储存。

[0355] 使用HER3结合ELISA检验纯化的IgG的结合。组合突变体IgG显示出改善的结合,如通过总结合信号所确定的,其中2C2显示出相对于亲本克隆16及其他组合突变变体的最显著的结合改善。还通过ELISA测试了IgG对鼠和食蟹猴HER3的结合。结果显示了组合突变体对这些旁系同源HER3种的改善的结合。

[0356] 图2A和图2B分别显示了轻链和重链可变区的氨基酸序列对每个所鉴别的单个突变的比对。表4提供了每个克隆的SEQ ID NO。图2C中提供了每个组合克隆的轻链可变区的比对。

[0357] 表4

[0358]

SEQ ID	描述	SEQ ID	描述
17	克隆 16 V _L aa	21	克隆 4H6 V _L CDR2 aa
1	克隆 16-生殖系 V _L aa	22	克隆 4H6 V _L CDR3 aa
2	克隆 16 V _H aa	7	克隆 6E.3 V _L aa
18	克隆 16 V _L CDR1 aa	19	克隆 6E.3 V _L CDR1 aa
21	克隆 16 V _L CDR2 aa	21	克隆 6E.3 V _L CDR2 aa
22	克隆 16 V _L CDR3 aa	22	克隆 6E.3 V _L CDR3 aa
31	克隆 16 V _H CDR1 aa	9	克隆 2D1 V _L aa
32	克隆 16 V _H CDR2 aa	18	克隆 2D1 V _L CDR1 aa
35	克隆 16 V _H CDR3 aa	21	克隆 2D1 V _L CDR2 aa
8	克隆 2B11 V _L aa	28	克隆 2D1 V _L CDR3 aa
18	克隆 2B11 V _L CDR1 aa	10	克隆 3A6 V _L aa
21	克隆 2B11 V _L CDR2 aa	18	克隆 3A6 V _L CDR1 aa
25	克隆 2B11 V _L CDR3 aa	21	克隆 3A6 V _L CDR2 aa
14	克隆 1A4 V _L aa	29	克隆 3A6 V _L CDR3 aa
18	克隆 1A4 V _L CDR1 aa	11	克隆 4C4 V _L aa
21	克隆 1A4 V _L CDR2 aa	18	克隆 4C4 V _L CDR1 aa
22	克隆 1A4 V _L CDR3 aa	21	克隆 4C4 V _L CDR2 aa
3	克隆 2C2 V _L aa	30	克隆 4C4 V _L CDR3 aa
19	克隆 2C2 V _L CDR1 aa	12	克隆 15D12.1 V _H aa
21	克隆 2C2 V _L CDR2 aa	31	克隆 15D12.1 V _H CDR1 aa
23	克隆 2C2 V _L CDR3 aa	33	克隆 15D12.1 V _H CDR2 aa

[0359]

16	克隆 2F10 V _L aa	35	克隆 15D12.1 V _H CDR3 aa
18	克隆 2F10 V _L CDR1 aa	13	克隆 15D12.2 V _H aa
21	克隆 2F10 V _L CDR2 aa	31	克隆 15D12.2 V _H CDR1 aa
24	克隆 2F10 V _L CDR3 aa	34	克隆 15D12.2 V _H CDR2 aa
15	克隆 3E.1 V _L aa	35	克隆 15D12.2 V _H CDR3 aa
20	克隆 3E.1 V _L CDR1 aa	36	V _H FW ₁ aa
21	克隆 3E.1 V _L CDR2 aa	37	V _H FW ₂ aa
23	克隆 3E.1 V _L CDR3 aa	38	V _H FW ₃ aa
4	克隆 5H6 V _L aa	39	V _H FW ₄ aa
18	克隆 5H6 V _L CDR1 aa	40	V _L FW ₁ 生殖系 aa
21	克隆 5H6 V _L CDR2 aa	41	V _L FW ₂ aa
26	克隆 5H6 V _L CDR3 aa	42	V _L FW ₃ aa
5	克隆 8A3 V _L aa	43	V _L FW ₄ aa
18	克隆 8A3 V _L CDR1 aa	44	V _L FW ₁ 原始 aa
21	克隆 8A3 V _L CDR2 aa	45	IgG1 恒定区*
27	克隆 8A3 V _L CDR3 aa	46	IgG1 恒定区*-YTE
6	克隆 4H6 V _L aa	47	克隆 16 V _L nt
20	克隆 4H6 V _L CDR1 aa	48	克隆 16 V _H nt

*提供了同种异型差异

V_L aa 共有序列:[FW₁]X₁GXS₂SNIGLNYSV[FW₂]RNNQRPS[FW₃]AAWDDX₃X₄X₅GEX₆[FW₄]其中[FW₁]、[FW₂]、[FW₃]和[FW₄]代表 VL 框架区,

其中

(a) X₁ 代表氨基酸残基精氨酸 (R) 或丝氨酸 (S),(b) X₂ 代表氨基酸残基丝氨酸 (S) 或亮氨酸 (L),(c) X₃ 代表氨基酸残基丝氨酸 (S) 或甘氨酸 (G),(d) X₄ 代表氨基酸残基亮氨酸 (L) 或脯氨酸 (P),(e) X₅ 代表氨基酸残基精氨酸 (R)、异亮氨酸 (I)、脯氨酸 (P) 或丝氨酸 (S),
和(f) X₆ 代表氨基酸残基缬氨酸 (V) 或丙氨酸 (A)。V_H aa 共有序列:[FW₅]YYYMQ[FW₆]X₇IGSSGGVTNYADSVKG[FW₇]VGLGDAFDI[FW₈]其中[FW₅]、[FW₆]、[FW₇]和[FW₈]代表 VH 框架区,其中 X₇ 代表氨基酸残基酪氨酸 (Y)、异亮氨酸 (I) 或缬氨酸 (V)

[0360] 1.12抗HER3单克隆抗体的结合研究

[0361] 使用BIAcore™表面等离子共振技术通过测量人HER3胞外域(hu HER3(ECD))与捕获在传感器芯片表面上的IgG的结合确定了抗HER3IgG与人HER3蛋白的胞外域结合的动力学速率(K_{on} , K_{off})和平衡解离常数(K_D)。然后,使用通过厂家所得到的BIAevaluation软件,根据所得的结合曲线计算单个结合(K_{on})和解离(K_{off})速率常数。用1:1结合模型拟合数据,

其包括修正传质限制结合的项,如果对它进行了检测的话。根据这些速率常数,然后从 K_{off}/K_{on} 的商计算了IgG与人HER3胞外域蛋白的相互作用的表观解离结合常数(K_D)。

[0362] 根据高分辨率BIAcore图,亲本IgG(克隆16)与人HER3胞外域的结合的和解离速率常数分别为 $5.29 \times 10^5/\text{Ms}$ 和 $73.0 \times 10^{-4}/\text{s}$,从而得到了14nM的表观 K_D 。相比较,亲合力改善的IgG变体与人HER3胞外域的结合的解离速率常数与对亲本IgG所测量的那些类似,其范围在 3.41×10^5 至 $4.32 \times 10^5/\text{Ms}$ 。这些相同的图还用于确定克隆16变体相应的解离速率常数,其范围在 1.60×10^{-4} 至 $6.21 \times 10^{-4}/\text{s}$ 。如上所述计算了克隆16变体的表观 K_D ,并且其范围在0.429nM(2C2克隆变体)至1.44nM。(P2B11克隆变体)。 K_{on} 和 K_{off} 的个体误差较小($\leq$ 计算参数的约2%),并且整体拟合至动力学数据,表明1:1相互作用模型的使用是适合的。另外,评价未表明结合是传质限制的。

[0363] 表5总结了图2C中所提供的组合单克隆克隆的生物物理学性质,其包括 K_{on} 、 K_{off} 和 K_D 值,以及表达水平和得率。

[0364] 包含2C2VL(SEQ ID NO:3)和原始C16VH(SEQ ID NO:2)的2C2单克隆抗体是亲合力改善最大的前导抗体,其 K_D 为0.4nM,表示比亲本克隆16单克隆抗体改善了32倍。 K_D 的改善很大程度上是解离速率降低的结果。还评价了表达水平和产物得率。在5天的瞬时转染研究中,所有单克隆抗体克隆很好地表达,其中在该研究中2C2单克隆抗体显示出最高的表达水平。所有亲合力优化的前导抗体显示出不同程度的亲合力改善,除了1A4抗体由于低表达效力而退出。

[0365] 表5:与亲本CL16(克隆16)抗体相比较的多种亲合力优化的前导抗体的生物物理学性质总结。

[0366]

克隆名称	计算的pI	K_{on} (1/Ms) (xE+5)	K_{off} (1/s) (xE-4)	Biacore KD (nM, IgG down)	Biacore KD (nM, Her3 down)	第5天的表达 水平 (暂态)	产率 (mg/体积, ml)
P2B11	8.21	4.32	6.21	1.53 (9x)	0.74 (2.4x)	159 ug/ml	70/500
1A4	8.2	3.41	2.86	0.838 (17x)	0.493 (3.6x)	60 ug/ml	53/1200
2C2	8.2	3.73	1.60	0.434 (32x)	0.093 (19x)	148 ug/ml	71/600
2F10	8.2	3.54	2.90	0.818 (17x)	0.326 (5x)	130 ug/ml	66/600
3E 1	8.32	3.43	1.78	0.52 (26x)	0.286 (6.2x)	125 ug/ml	59/600
克隆 16	7.83	5.29	73.0	14	1.77	ND	ND

[0367] 注:每个亲合力优化的前导抗体包含克隆名称VL链和原始C16VH

[0368] 进行了多种基于细胞的测定以评价多种亲合力优化的前导抗体相对于克隆16对非配体依赖性(人乳腺癌细胞系BT-474, ATCC No. HTB-20™)以及配体依赖性(人乳腺癌细胞系T-47D, ATCC No. HTB-133)模型(两个细胞系均得自ATCC)的功能改善,其包括HER3信号通路的抑制(pHER3和pAKT)、细胞生长的抑制(短期的6天生长测定和长期的克隆源性测定)和

T-47D细胞(T-47分化的上皮细胞次代株)中HRG-诱导的pHER3的终止。

[0369] 如下进行了克隆源性测定。以1000个细胞/孔的密度将BT-474细胞铺板至6孔板中。在过夜附着后,按照浓度剂量曲线用同型对照IgG或所指示的HER3单克隆抗体处理细胞。每周用具有适合剂量的单克隆抗体的培养基更新一次,更新三周。在21天结束时,处理细胞以进行Cell-titer-Glo (CTG) 测定以评价多种单克隆抗体对集落形成的抑制(使用对照IgG作为基线)。从Prizm分析获得IC₅₀值。

[0370] 基本如对图4所使用的,进行了BT-4746天生长测定(参见下文实施例2中的部分2.2)。基本如对图10所使用的,进行了BT-474pAKT测定(参见下文实施例2中的部分2.6.1)。基本如对图3所使用的(参见下文实施例2中的部分2.1),进行了T-47D HRG可诱导的pHER3测定,并且使用对图16A所使用的相同规程(参见下文实施例3中的部分3.3.1)进行了T-47D FACS结合和内化测定。

[0371] 出于比较的目的,将IC₅₀值和最大抑制水平汇集。如表6所示,亲合力改善的前导抗体在大部分测定中显示出一致的提高2-3倍的效力。如下所述,还在一些体外和体内测定中表征了亲本克隆16和/或代表性优化克隆,例如,克隆2C2抗体(还简称为2C2或2C2单克隆抗体)。

[0372] 另外,将突变引入至优化克隆2C2的Fc区以延长半衰期。具体地,根据Kabat中的EU索引对M252Y、S254T、T256E编号。这种半衰期优化的分子被称为2C2-YTE。将理解可以引入其他突变来代替这三种突变,或者与这三种突变结合引入其他突变,参见,例如,美国专利No.7083784;国际专利申请公开No.WO2009058492;Dall'Acqua等人,2002J. Immunol.169:5171-80;Zalevsky等人,2010,Nature Biotech.28:157-9)。2C2-YTE显示抑制BT-474细胞增殖和集落生长的程度与2C2相同(数据未显示)。

[0373] 通过在pH6.0的25mM的组氨酸/组氨酸HCl、205mM蔗糖、0.02%聚山梨酯80中配制抗体(例如,50mg/ml)来获得冰箱(2-8℃)稳定的组合物。

[0374] 表6:与亲本CL16单克隆抗体相比较的亲合力优化的前导抗体的生物学性质的总结。

[0375]

克隆名称	BT474 克隆源性测定		BT474 6天生长		BT474 pAKT 测定		T47D HRG 可 诱导的 pHer3		T47D FACS 结合	
	IC ₅₀ (pM)	最大抑制%	拐点 (pM)	最大抑制%	拐点 (pM)	最大抑制%	IC ₅₀ (pM)	最大抑制%	Kd (pM)	最大 GMFI
P2B11	26.9	87.1	98	47.5	23.6	62	79.8	85	199	1441
1A4	30.7	81.3	133.3	54.5	28.5	62	133	84	281	1577
2C2	31.9	87.2	62.7	48.3	42.6	61	130.3	85	316	1583
2F10	31.2	80.4	66.7	49	46.4	62	127.2	86	306	1527
3E 1	20.8	79.2	85.3	48.1	26.2	66	59.2	86	447	1644
克隆 16- PA	64.5	79.8	280	46	73.1	64	104.4	75	112	1055

[0376] 实施例2.抗HER3单克隆抗体的表征

[0377] 2.1MCF-7细胞中HRG诱导的HER3磷酸化(pHER3)测定

[0378] MCF-7 (ATCC No. HTB-22) 是具有HER3表达但没有内源HRG表达的人乳腺癌细胞系。将MCF-7细胞以30000个细胞/孔的密度在96孔板中铺板并允许其附着过夜。然后,在处理前使细胞血清饥饿24小时。在血清饥饿后,除去培养基并更换为含有测试和对照抗体的不含血清的培养基,并且将细胞在37℃孵育1小时。在本实施例和在以下所提供的其他实施例中使用的测试抗体包括本文所提供的抗HER3抗体,如克隆16、2C2、2C2-YTE;和本领域中已知的抗HER3抗体,具体地,在本文中分别表示为AMG和MM的U1-59 (国际专利公开W0 2007077028) 和Ab#6 (专利公开W0 2008/100624)。同时,以 $4 \times (80\text{ng/ml})$ 在不含血清的生长培养基中制备heregulin (HRGb1, R&D Systems, Minneapolis, MN) 储液。在1小时孵育期结束时,将HRGb1加入孔中 (20ng/ml 最终浓度) 并在37℃孵育20分钟。在处理结束时,除去培养基并用PBS清洗细胞。将细胞在80ml具有蛋白酶和磷酸酶抑制剂 (Calbiochem, La Jolla, CA) 的Triton X溶胞缓冲液 (Boston Bioproducts, Ashland, MA) 中溶解并在-20℃储存直至分析。然后,按照生产商的规程 (R&D Systems, DYC1769), 使用半体积96孔Corning® Costar® 3690ELISA板 (Corning Life Science, Lowell, MA) 和每孔50μl细胞裂解液进行pHER3ELISA。

[0379] 通过使用HRGb1的细胞处理刺激通过HER3磷酸化 (缩写为pHER3) 所反映的HER3激活。在pHER3ELISA测定中,使用抗HER32C2mAb的预处理导致pHER3信号的剂量依赖性抑制 (图3, 顶部)。在该测定中,所公开的抗HER3单克隆抗体MM和AMG也是有活性的,然而,2C2的效力提高了约5倍,如通过 IC_{50} 测量所确定的 (图3, 底部)。对2C2-YTE观察到了类似的结果 (数据未显示)。

[0380] 2.2MDA-MB-175乳腺癌细胞的生长抑制

[0381] MDA-MB-175 (ATCC No. HTB-25) 是已建立的HRG表达 (γ -同种型) 乳腺癌细胞系,其依赖于HRG-HER3信号通路来生长和存活。将细胞以2000个细胞/孔的密度在96孔白壁板 (white-walled plate) 中铺板并允许其附着过夜。第二天,除去培养基并更换为100ml/孔含有测试和对照抗体的新鲜完全生长培养基。将板总计孵育6天。为了计算相对细胞数,根据生产商的规程使用CellTiter-Glo™ (Promega, Madison, WI)。在CellTiter-Glo™加入后,将板在室温下孵育10分钟并使用酶标仪测量发光性。

[0382] 用2C2、MM或AMG抗HER3单克隆抗体进行生长测定。如图4所示,所有三种抗体实现了不同程度的抗增殖作用,其中2C2显示出更高的效力 ($\text{IC}_{50}=0.14\mu\text{g/ml}$) (图4, 上图) 和较高的生长抑制 (72%) (图4, 下图)。

[0383] 2.3HMCB黑素瘤细胞的生长抑制

[0384] HMCB (ATCC No. CRL-9607™) 是已建立的由HRG诱导的HER2-HER3异二聚化作用驱动的HRG表达 (1β-同种型) 黑素瘤模型。将HMCB细胞在96孔板 (Costar®) 中以750个每孔的密度在100μl含有10%热失活FBS的完全培养基中铺板。第二天,在完全培养基中制备抗体处理。所有抗HER3单克隆抗体和对照IgG的起始浓度为10mg/ml,并且在完全培养基中制备连续稀释。除去铺板培养基并且以100μl每孔加入处理,重复三次。

[0385] 然后,将板在37℃在5%CO₂中孵育6天。将相等体积的CellTiter-Glo™试剂加入到每个孔中。将板在室温下在板震荡器上摇晃10分钟以确保完全细胞溶解。使用2104 EnVision® Multilabel酶标仪 (PerkinElmer, Waltham, MA) 测量发光性。

[0386] 如图5所示,2C2仍比现有抗体更有效。在抑制HMCB黑素瘤细胞系的细胞生长中,2C2比公开的抗HER3单克隆抗体AMG和MM的效力高8-30倍。

[0387] 2.4HMCB黑素瘤细胞和A549NSCLC细胞中HER3和AKT活性测定

[0388] 在HRG-自分泌HMCB(ATCC No.CRL-9607™)和A549(ATCC No.CCL-185)模型中评价了HER3前导抗体抑制HER3信号通路的能力。将HMCB细胞在24孔板中并且在含有10%热失活FBS的培养基中以 10^5 每孔铺板,并且在抗体处理前使其达到80%或以上的汇合。除去铺板培养基并将细胞与抗体一起孵育。在完全培养基中制备抗HER3单克隆抗体和对照IgG。所有抗HER3抗体的起始浓度为10mg/ml并且进行了连续稀释。仅以10 μ g/ml的浓度使用对照IgG。在除去铺板培养基之后,应用处理。在37℃,在5%CO₂中孵育6小时(HMCB细胞)或72小时(A549细胞)后,用冰冷的PBS清洗细胞一次,然后通过加入Laemmli还原缓冲液(Boston BioProducts,Ashland,MA)进行细胞溶解。

[0389] 在短暂孵育后,收集细胞溶胞液,将相等的量加载到Bis NuPAGE® Novex® Bis-Tris凝胶(Invitrogen,Carlsbad,CA)上并将蛋白质转移到PVDF膜(Invitrogen,Carlsbad,CA)上。用5%脱脂奶粉和0.1%吐温20(Sigma,St.Louis,MO)在TBS(pH7.4)中的溶液封闭膜并且在4℃与抗HER3抗体(sc-285抗体,Cell Signaling Technology,Beverly,MA)、抗pHER3抗体(4791抗体,Cell Signaling Technology,Beverly,MA)、抗AKT抗体(9272抗体,Cell Signaling Technology,Beverly,MA)、抗pAKT抗体(4060抗体,Cell Signaling Technology,Beverly,MA)、抗神经调节蛋白-1(neuregulin-1)/HRG(NRG1/HRG)抗体(sc-348,Santa Cruz)和抗GAPDH抗体(G8795抗体,Sigma,St.Louis,MO)孵育过夜。

[0390] 在0.1%吐温20在TBS中的溶液清洗膜,然后在辣根过氧化物酶-结合的抗生蛋白链菌素第二抗体(GE Healthcare)中孵育1小时。清洗后,通过使用SuperSignal® West Femto化学发光底物和SuperSignal® West Pico化学发光底物(Pierce/Thermo Scientific,Rockford,IL)在X射线胶片上检测蛋白质条带。

[0391] 如图6和7所示,在HMCB和A549细胞中2C2抗体均终止了HER3信号通路。在HMCB细胞中,2C2以剂量依赖性方式有效地抑制了pHER3及其下游效应分子pAKT,并且比公开的抗HER3单克隆抗体AMG或MM中的任一个更有效。在A549细胞中,2C2抗体还抑制pHER3及其下游效应分子pAKT。

[0392] 2.5肺癌、胃癌和乳腺癌的细胞模型中HER3磷酸化(pHER3)的测定

[0393] 2.5.1pHER3细胞测定

[0394] 以30000个细胞/孔的密度将细胞(HCC827NSCLC细胞、吉非替尼耐受性HCC827NSCLC细胞、MKN45胃癌细胞、Kato III胃癌细胞或BT-474HER2扩增的乳腺癌细胞)在96孔板中铺板并允许其附着过夜。然后,在37℃,以所指示的剂量曲线用测试或对照抗体处理细胞4小时。在处理结束时,除去培养基并用PBS清洗细胞。将细胞在80ml具有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Calbiochem,La Jolla,CA)的Triton X溶胞缓冲液(Boston Bioproducts,Ashland,MA)中溶解并在-20℃储存直至分析。然后,根据生产商的规程(R&D Systems,DYC1769,Minneapolis,MN)使用半体积96孔ELISA板(Costar3690)和每孔50 μ l细胞溶胞液进行pHER3ELISA。

[0395] 2.5.2HCC827细胞中pHER3活性的抑制

[0396] 用如以上实施例部分2.5.1中所述的测试或对照抗体处理作为突变体EGFR-驱动的非小细胞肺癌 (NSCLC) 模型的HCC827细胞 (ATCC CRL-2868™) (参见上文)。如图8A所示, 2C2抗体能够部分抑制pHER3信号, 而公开的抗HER3单克隆抗体AMG和MM不太有效并且效力比2C2低10倍。

[0397] 2.5.3吉非替尼耐受性HCC827细胞中pHER3活性的抑制

[0398] HCC827具有并且由突变体EGFR驱动, 这使其对EGFR酪氨酸激酶抑制剂 (TKI), 如吉非替尼具有高敏感性。将亲本HCC827细胞暴露于恒定中毒剂量的吉非替尼并且分离出显示具有扩增的cMET (癌症逃避TKI疗法的已知机制) 的耐受性克隆。用如以上实施例部分2.5.1中所述的抗HER3单克隆抗体处理TKI耐受性HCC827细胞 (参见上文)。如图8B所示, 在使其对吉非替尼耐受的突变体HCC827中抗HER3单克隆抗体2C2抑制HER3活性。与对亲本细胞系所观察到的结果类似, 在TKI耐受性HCC827细胞系中, 2C2显示出比AMG和MM抗体更高的效力 (约10倍更高的效力)。

[0399] 2.5.4MKN45细胞中pHER3活性的抑制

[0400] 尽管cMET不是Her家族成员, 但是已表明它能够与HER3形成二聚体。将MKN45cMET扩增的胃癌模型细胞系用于评价抗HER3抗体是否可以对抗cMET-驱动的HER3激活。用如以上实施例部分2.5.1中所述的抗HER3单克隆抗体处理MKN45细胞。如图8C所示, 所有三种抗HER3单克隆抗体 (2C2、AMG和MM) 能够抑制MKN45细胞中的pHER3, 但是2C2显示出比AMG和MM抗体更高的效力 (约5-7倍更高的效力)。

[0401] 2.5.5Kato III细胞中pHER3活性的抑制

[0402] 除了与EGFR、HER2和cMET偶联外, HER3与FGFR2二聚化以有利于其转化可能。将作为FGFR2扩增的胃癌模型的Kato III (ATCC No. HTB-103™) 细胞系用于评价抗HER3抗体是否可以抑制FGFR2驱动的HER3激活。用如以上实施例部分2.5.1中所述的抗HER3单克隆抗体处理Kato III细胞 (参见上文)。在该模型中, 所有三种抗HER3单克隆抗体 (2C2、AMG和MM) 实现了类似的最大pHER3抑制程度 (约60%), 但是如通过IC₅₀所测量的, 2C2的效力分别比AMG和MM抗体高15-20倍 (图8D)。

[0403] 2.5.6BT-474细胞中pHER3活性的抑制

[0404] 已表明HER2-HER3二聚体是癌症中转化最多的致癌实体之一。因此, 我们研究了BT-474细胞系 (ATCC NO. HTB-20™) 中的抗HER3单克隆抗体, 所述细胞系是良好建立的不表达配体并且预期由非配体依赖性HER2-HER3二聚作用驱动的HER2扩增的乳腺癌模型。用如以上实施例部分2.5.1中所述的三种抗HER3单克隆抗体以及2C2-YTE处理BT-474细胞。与其中所测试的全部三种抗HER3单克隆抗体均有活性的模型 (如HCC827细胞、吉非替尼耐受性HCC827细胞、MKN45细胞和Kato III细胞) 不同, 2C2 (亲本2C2和2C2-YTE突变体) 是所测试的抗HER3单克隆抗体中唯一一个显示出显著pHER3抑制活性的模型。这些结果显示2C2 (亲本2C2形式和2C2-YTE突变体) 在非配体依赖性模型中是功能性的并且显示了在配体依赖性和非配体依赖性背景中2C2的双官能度。

[0405] 2.6胃癌和乳腺癌细胞模型中AKT磷酸化 (pAKT) 的测定

[0406] 2.6.1pAKT细胞测定

[0407] 以30000个细胞/孔的密度将细胞 (MKN45胃癌细胞、Kato III胃癌细胞或BT-474HER2扩增的乳腺癌细胞) 在96孔板中铺板并允许其附着过夜。然后, 在37℃, 以所指示的

剂量曲线用测试或对照抗体处理细胞4小时。在处理结束时,除去培养基并用PBS清洗细胞。将细胞在80ml具有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Calbiochem,La Jolla,CA)的Triton X溶胞缓冲液(Boston Bioproducts,Ashland,MA)中溶解并在-20℃储存直至分析。根据包含在Phospho(Ser473)/Total AKT全细胞溶胞液试剂盒(产品目录号No.K15100D,Meso-Scale Discovery,Gaithersburg,MD)中的生产商的规程分析AKT/pAKT以确定pAKT含量。

[0408] 2.6.2MKN45细胞中pAKT活性的抑制

[0409] 为了确定2C2是否可以抑制除pHER3之外的HER3下游信号通路,我们还在扩增的cMET-驱动的胃癌模型MKN45中评价了其抑制AKT磷酸化的能力。用如以上实施例部分2.6.1中所述的抗HER3单克隆抗体处理MKN45细胞。在该模型系统中,2C2单克隆抗体实现了部分pAKT抑制,其效力比AMG和MM抗HER3单克隆抗体更高(高约5-7倍)(图9A)。这表明2C2不但抑制HER3活性,而且还抑制HER3的下游效应分子,如pAKT。

[0410] 2.6.3Kato III细胞中pAKT活性的抑制

[0411] 为了研究这种活性是否被转化为更好的pAKT(HER3的效应子)抑制效力,我们在该细胞系中使用了如以上实施例部分2.6.1中所述的Meso-Scale Discovery测定通过多种抗HER3单克隆抗体分析pAKT抑制。如图9B所示,与pHER3数据一致,2C2在扩增的FGFR2-驱动的胃癌模型Kato III细胞中抑制pAKT。2C2在pAKT抑制中再次实现了比AMG和MM抗体更高的效力(如通过IC₅₀所测量的)和最大反应。

[0412] 2.6.4BT-474细胞中pAKT活性的抑制

[0413] 已表明HER2-HER3二聚体是癌症中转化最多的致癌实体之一。因此,我们在BT-474细胞系中研究了抗HER3单克隆抗体的活性。用如以上实施例部分2.6.1所述的抗HER3单克隆抗体以及用2C2的YTE突变体形式处理BT-474细胞。与其中所测试的全部三种抗HER3单克隆抗体(2C2、AMG和MM)均有活性的模型(如MKN45和KatoIII细胞)不同,2C2(亲本2C2形式和2C2-YTE突变体)是所测试的抗HER3单克隆抗体中唯一一个显示出显著pAKT抑制活性的模型。这些结果显示2C2(亲本2C2形式和2C2-YTE突变体)在非配体依赖性模型中是功能性的,并且显示了在配体依赖性和非配体依赖性背景中2C2(亲本2C2形式和2C2-YTE突变体)的双官能度。

[0414] 2.7MDA-MB-361细胞中HER3信号和细胞增殖的抑制

[0415] 为了表征对曲妥珠单抗非高度反应性的HER2扩增的乳腺癌细胞中2C2-YTE的活性,我们将注意力集中在MDA-MB-361(ATCC No.HTB-27)上,它是在PIK3CA中具有激活突变(E545K)的乳腺癌模型,并且由于PI3K途径的内在激活而使其可以有助于对曲妥珠单抗的耐受性(Junttila等人,2009,Cancer Cell.15:429-40)。我们确定了在该模型中2C2对HER3信号和细胞增殖的作用。

[0416] 为了评价信号,将人乳腺细胞系MDA-MB-361以每孔150000个细胞在24孔板中在补充有10%热失活的胎牛血清(FBS)(Invitrogen)的RPMI(Invitrogen)中铺板。第二天,除去铺板培养基并且将细胞在完全培养基中与30μg/mL最终浓度的抗HER3抗体2C2或对照抗体一起孵育。在37℃,在5%CO₂中孵育6小时后,用冰冷的PBS清洗细胞一次,然后通过加入Laemmli还原缓冲液(Boston BioProducts,Ashland,MA)溶胞。在短暂孵育后,收集细胞溶胞液,将相等的量加载到Bis NuPAGE® Novex® Bis-Tris凝胶(Invitrogen, Carlsbad,CA)上并将蛋白质转移到PVDF膜(Invitrogen, Carlsbad,CA)上。用5%脱脂奶粉

和0.1%吐温20 (Sigma, St. Louis, MO) 在TBS (pH7.4) 中的溶液封闭膜, 并将膜在4℃与抗HER3抗体 (sc-285抗体, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) 和抗pHER3抗体 (4791抗体, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) 一起孵育过夜。在0.1%吐温20在TBS中的溶液清洗膜, 然后在辣根过氧化物酶-结合的抗生蛋白链菌素第二抗体 (GE Healthcare) 中孵育1小时。清洗后, 通过使用SuperSignal® West Femto化学发光底物和SuperSignal® West Pico化学发光底物 (Pierce/Thermo Scientific, Rockford, IL) 在X射线胶片上检测蛋白质条带。

[0417] 为了评价细胞增殖, 将MDA-MB-361细胞以2000个细胞的密度接种在100μL含有10%热失活的FBS的培养基中; 使用了Costar白色聚苯乙烯组织培养物处理的96孔平底板 (Corning)。第二天, 除去铺板培养基并将抗体加入到完全培养基中至100μL每孔的最终体积。然后, 将板在5%CO₂, 在37℃孵育6或14天。对于14天测定, 在第7天应用新鲜抗体。在每个时间点结束时, 将相等体积的CellTiter-GloR试剂 (Promega) 加入到每个孔中。将板在室温下在板震荡器上摇晃10分钟以确保完全细胞溶解。使用EnVision2104Multilabel酶标仪 (PerkinElmer) 测量发光性。

[0418] 2C2降低了该细胞系的pHER3水平 (图10A) 并且抑制了细胞生长 (图10B), 这表明2C2-YTE不仅在HER2扩增的曲妥珠单抗敏感性癌症中是有活性的, 而且在由于PIK3CA上的突变所造成的对曲妥珠单抗不太敏感的HER2扩增的癌症中也是有活性的。

[0419] 2.8新型HRG依赖性癌症类型的鉴别

[0420] 为了鉴别其他新型HRG-依赖性癌症类型, 根据HER3信号活性和HRG表达筛选了多种肺鳞状细胞癌 (SCC) 细胞系。HARA-B (JCRB No. JCRB1080.1) 和KNS-62 (JCRB No. IF050358) 细胞系表达了显著水平的HER3、HRG以及pHER3 (数据未显示)。因此, 我们在HARA-B和KNS-62细胞系中研究了2C2的活性。基本如以上实施例部分2.4所述, 用抗HER3单克隆抗体处理细胞, 2C2能够降低HARA-B细胞系 (图11) 和KNS-62细胞系中的pHER3水平 (数据未显示)。如下所示 (实施例部分5.4), 2C2-YTE在人鳞状HARA-B NSCLC异种移植模型中显示出剂量依赖性抗肿瘤效力。因此, 这些标准 (即, HER3、HRG以及pHER3的表达) 可以是有用的筛选工具以鉴别对抗HER3抗体起反应的其他癌症类型, 其包括 (例如) 如本文所述的2C2、AMG、MM和本领域中已知的其他抗体 (参见, 例如, 国际专利公开W02011/136911、W02012/019024、W02010/022814)。

[0421] 2.9在某些HRG-依赖性癌症类型中HER2是主要的驱动剂。

[0422] 在存在HER3配体heregulin (HRG) 的情况下, HER3与EGFR或HER2异二聚化, 这导致HER3的磷酸化和致癌信号通过磷酸肌醇3激酶 (PI3K) 和也称为AKT的蛋白激酶B (PKB) 的传导。对一系列CRC模型进行表征以确定哪个受体酪氨酸激酶, EGFR或HER2, 是通过HER3的信号的主要驱动剂。具体地, 单独用HER2或EGFR的拮抗剂或者与HER3拮抗剂2C2结合来处理六种不同的CRC肿瘤细胞系, SW620 (ATCC No. CCL-227)、SW480 (ATCC No. CCL-228)、CoLo205 (ATCC No. CCL-222)、LOVO (ATCC No. CCL-229)、HCT15 (ATCC No. CCL-225) 和Caco-2 (ATCC No. HTB-37)。简言之, 将细胞以 1.5×10^5 个细胞每孔的密度接种到24孔板中。第二天, 用10μg/mL的下列抗体处理2个相同组的细胞: 2C2抗HER3抗体、R347对照IgG抗体、抗HER2抗体2C4 (例如, 专利公开W02001/00245)、抗EGFR抗体西妥昔单抗或者5μM的EGFR酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼。在37℃孵育5-6小时后, 将50ng/mL的HRG在37℃加入到一组细胞中15分钟。然后,

用冷PBS清洗所有细胞,并通过加入60 μ L的2 $\times$ SDS(十二烷基硫酸钠)样品缓冲液(Invitrogen)溶胞。将溶胞液转移到1.5mL管中并煮沸5分钟,然后在冰上冷冻2分钟。在转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Invitrogen)之前,将相等体积(20 μ L)的蛋白质样品在NuPAGE Novex Bis-Tris凝胶(Invitrogen)中分辨。将膜在含有0.1%吐温20(Sigma)的Tris-缓冲盐水(KPL)中清洗,并在4 $^{\circ}$ C与抗HER3抗体(Santa Cruz Biotechnology)、pHER3-Tyr1289(Cell Signaling Technology)、磷酸化AKT(蛋白激酶B(pAKT))(Cell Signaling Technology)、磷酸化ERK(有丝分裂原激活的蛋白激酶/胞外信号调节的激酶(pERK))(Cell Signaling Technology)和3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)(Sigma)孵育过夜。在含有0.1%吐温20(Sigma)的Tris-缓冲盐水(KPL)中清洗膜,然后在辣根过氧化物酶-结合的第二抗体(GE HealthCare)中孵育1小时。清洗后,通过使用SuperSignal West Pico化学发光底物(Pierce/Thermo Scientific)在X射线底片上检测蛋白质条带。

[0423] 如图12所示,抗HER3和抗HER2抗体降低了配体刺激的细胞中HER3、pHER3和pAKT的水平,而EGFR拮抗剂(如西妥昔单抗和吉非替尼)处理对这些信号分子无作用。这些数据表明在所测试的所有癌症模型中HER2是HRG诱导的HER3信号的主要驱动剂。

[0424] 实施例3.抗HER3单克隆抗体的作用机理研究

[0425] 3.1克隆16部分阻断配体结合至HER3

[0426] 抗HER3单克隆抗体阻断配体诱导的HER3活性的效力可能是由它们直接阻止配体结合的能力所造成的。为了研究该情况,我们通过用heregulin(HRG)涂板并将标记的重组HER3蛋白与之结合建立了体外HRG-HER3结合测定。

[0427] 3.1.1HRG-HER3结合测定

[0428] 在4 $^{\circ}$ C,用10ng/ml heregulin(HRGb1,产品目录No.377-HB,R&D Systems,Minneapolis,MN)涂覆微孔板过夜。第二天,用PBST(PBS+0.05%吐温20)将板清洗4次,并在室温下在PBS+1mg/ml BSA中封闭1小时。在封闭期间,在单独的板中在PBSTB(PBS+0.05%吐温20+0.1%BSA)中制备测试抗体(克隆16、AMG、MM和阳性对照抗HER3配体阻断的单克隆抗体)的连续稀释并在室温下将其与5mg/ml的重组HER3(产品目录号No.348-RB,R&D Systems,Minneapolis,MN)混合30分钟。然后,在加入抗体-HER3混合物前,将ELISA板用PBST清洗4次。将板在室温下孵育1小时,随后用PBST清洗4次。在室温下,加入抗His HRP(产品目录号No.34460,Qiagen,Valencia,CA)1小时。用PBST将板清洗4次,然后用TMB检测。使用酶标仪在450nm读板。图13中显示了代表性结果。

[0429] 3.1.2结果

[0430] 测试了几种单克隆抗体(克隆16、AMG、MM和阳性对照抗HER3配体阻断的单克隆抗体)干扰HRG与HER3结合的能力。阳性对照HER3配体阻断的单克隆抗体有效并且完全抑制HER3结合至HRG。相反,克隆16(2C2的亲本前导抗体,参见以上实施例部分1.6“亲和力优化”)在破坏这种结合中仅是部分有效的(约30%最大抑制)。AMG和MM单克隆抗体显示出类似的不完全阻断作用(图13)。这些发现表明克隆16不可能起到直接配体阻断单克隆抗体的作用。

[0431] 3.22C2破坏HER2-HER3二聚作用

[0432] 由于其激酶缺乏的性质,HER3单体不是活性的并且它需要与其他RTK形成异二聚体从而是活性的。HER2:HER3二聚体已表明是配体依赖性和非依赖性环境中最致癌的信号

物质(Junttila等人,2009,Cancer Cell.15:429-40)。使用HRG诱导的HER2-HER3二聚体形成测定在T-47D细胞(显示HRG诱导的HER3-HER2二聚体形成的配体依赖性乳腺癌模型)中和在非配体依赖性BT-474细胞中评价了2C2对HER2-HER3二聚作用的破坏。所述测定是基于HER3-HER2的免疫共沉淀的。

[0433] 3.2.1配体诱导的HER2-HER3二聚作用测定

[0434] 以 1×10^6 个/孔将T-47D细胞(ATCC Cat.No.HTB-133TM) 在6孔板中接种过夜。第二天早晨,在37℃用浓度为5μg/ml的在完全血清中的2C2、CL16、AMG和MM单克隆抗体处理细胞2小时。对照包括无抗体处理或用对照R347IgG1处理。在处理之后,用50ng/ml HRG在37℃处理10分钟(包括未用HRG处理的对照)。用冷PBS清洗细胞3次,然后加入500μl包括蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Sigma,St.Louis,MO)的细胞溶解缓冲液。细胞在冰上溶解至少30分钟。用细胞刮刀收获溶胞产物。将50μl含有与1μg抗HER3mAb结合的25μl蛋白A珠的蛋白A珠溶液(产品目录号No.MAB3481,R&D Systems,Minneapolis,MN)加入到500μl细胞溶胞产物中并转移至免疫沉淀(IP)柱。将IP柱在4℃旋转过夜。随后,将IP柱旋转沉淀以除去溶胞产物,并用冷的细胞溶胞缓冲液清洗所述珠。将50μl含有50mM DTT的2×SDS样品缓冲液加入到每个IP柱中,并将所述柱煮沸4分钟。除去每个柱的底部端,并将柱旋转沉淀以收集洗脱液。使用SDS-PAGE分离20μl洗脱液。对HER2和HER3进行免疫印迹(用抗HER2抗体,产品目录号No.OP15L,CalBiochem,La Jolla,CA;和抗HER3抗体,产品目录号No.SC-285,Santa Cruz Biotechnology,Inc.,Santa Cruz,CA)。

[0435] 3.2.2非配体依赖性HER2-HER3二聚化测定

[0436] 将BT-474细胞(ATCC Cat.No.HTB-20TM)以每孔 1×10^6 个细胞的密度在6孔板中具有10%热失活的FBS的完全RPMI1640细胞培养基中铺板。第二天,除去铺板培养基并用含有饱和剂量的测试抗体的新鲜的完全RPMI1640替换。在该实验中,以5μg/mL的浓度测试了CL16(2C2的前体低亲和力形式)、2C2和R347(对照IgG)。将细胞与抗体在37℃一起孵育2小时。然后,除去培养基并用冷PBS清洗细胞1次。将交联剂3,3'-二硫代双[磺酸琥珀酰亚氨基丙酸酯](DTSSP)以2mM的浓度加入到1mL冷PBS中。将细胞在冰上孵育至少1小时。然后,用冷PBS清洗细胞3次。加入含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的细胞溶解缓冲液(500μL),并将细胞放置在冰上至少30分钟以使其溶胞,然后用细胞刮刀收获。从细胞溶胞产物中免疫沉淀出HER2和HER3。将细胞溶胞产物(500μL)与预结合至1μg HER3MAb(MAB3481,R&D Systems)的50μL蛋白A琼脂糖珠(50%浆液;Invitrogen)在SigmaPrep离心柱(Sigma)中混合。将混合物在4℃孵育过夜。第二天,通过离心将珠与细胞溶胞产物分离。用含有蛋白酶(Sigma)和磷酸酶抑制剂(EMD Millipore)的冷细胞溶胞缓冲液(Cell Signaling Technologies)清洗柱中的珠4次。在清洗程序后,将50μL含有50mM二硫苏糖醇(DTT;EMD Chemicals)的2×SDS(十二烷基硫酸钠)样品缓冲液加入到离心柱中。然后,将柱煮沸4分钟。通过离心将蛋白质洗脱,并马上用于免疫印迹法(如部分2.4中进行)。

[0437] 3.2.3结果

[0438] 将用HRG处理或未处理的T-47D细胞溶胞。将HER3与抗HER3单克隆抗体一起沉淀,然后将沉淀颗粒中的蛋白质在SDS-PAGE上分离并对作为HER2-HER3相互作用的指示的HER2的存在性进行印迹。模型是配体可诱导的,这是因为二聚体仅在配体刺激后发生。用2C2预处理有效预防了二聚体的形成,这表明了它阻止配体诱导的HER2-HER3二聚体形成的能力。

还发现包括MM、AMG和亲本克隆16的其他抗HER3单克隆抗体是有效的(图14A)。当交联剂DTSSP用于生物化学稳定蛋白质络合物时,在不存在HRG的情况下在BT-474细胞中捕获了组成型HER2:HER3异二聚体,这表明了非配体依赖性异二聚体的形成。用2C2或CL16预处理细胞将有效地破坏该异二聚体的形成(图14B)。

[0439] 3.3.2C2诱导的HER3内化和降解

[0440] 靶标内化和降解是单克隆抗体抑制它们的靶标功能的两种常见机制。首先,我们评价了BT-474乳腺癌细胞中2C2介导的HER3内化。然后,我们确定在该快速2C2诱导的HER3内化之后是否可以有靶标降解。

[0441] 3.3.1HER3内化测定

[0442] 使用荧光激活细胞分选(FACS)测定来确定HER3内化。用Accutase酶使BT-474细胞分离并将细胞悬浮在含有1%BSA的PBS中(FACS缓冲液)至细胞密度为 10×10^6 个细胞/毫升。将50 μ l细胞加入到U型底96孔板的每个室内。将50 μ l抗HER3单克隆抗体加同位素对照(20mg/ml)加入到每个孔中以达到10mg/ml的最终浓度。将板在37℃分别孵育0.5小时、2小时和4.5小时。用冷FACS缓冲液清洗细胞2次(通过以1500rpm离心2分钟使细胞成颗粒)。用含有1 μ g/ml或10 μ g/ml小鼠抗人HER3单克隆抗体(产品目录号No.MAB3481,R&D Systems, Minneapolis,MN)的冷FACS缓冲液使细胞再悬浮。

[0443] 将细胞和抗人HER3在冰上孵育1小时。然后,用冷FACS缓冲液清洗细胞2次。随后,用含有Alexa Fluor® 488-标记的二抗(Invitrogen) (1:200v/v)的冷FACS缓冲液使细胞再悬浮,并在冰上孵育30-45分钟。然后,用冷FACS缓冲液清洗细胞2次,并用100ml冷FACS缓冲液再悬浮。此时,进行FACS。通过用仅包含第二抗体的对照减去GMFI获得荧光强度的绝对几何平均数(GMFI)。通过与使用IgG对照单克隆抗体获得的结果相比较来计算相对HER3表面清除率。图15A中显示了代表性结果。

[0444] 3.3.2HER3蛋白降解测定

[0445] 将Lovo、HCT15和SW620结肠直肠模型癌细胞(分别为ATCC No.CCL-229、CCL-225和CCL-227)以 1.5×10^5 /孔接种在24孔板中。过夜附着后,用2C2和对照单克隆抗体处理细胞3-4小时。用冷PBS清洗细胞1次,用50-60 μ l 2X SDS样品缓冲液直接溶胞并在100℃煮沸10分钟。将20 μ l样品加载到SDS-PAGE凝胶上,电泳分离并用抗HER3抗体(Santa Cruz Biotech)免疫印迹以定量总HER3蛋白水平。抗GAPDH抗体(Sigma)还作为常规蛋白加载对照用于定量GAPDH水平。

[0446] 3.3.3结果

[0447] 如图15A所示,两个剂量的2C2具有非常类似的影响。30分钟的处理导致表面HER3群体39%的损失(剩余61%),而2小时处理导致62%损失(剩余38%),这表明了通过2C2的快速靶标内化。另外,当三种不同的结肠直肠癌模型与2C2一起孵育时,在SW620细胞中观察到了完全HER3降解,而在其他两种细胞系中观察到了几乎完全的降解(图15B),这表明2C2能够具有强烈的靶标降解能力。

[0448] 3.4效应子功能:抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)

[0449] ADCC是通过其单克隆抗体可以赋予其体内抗肿瘤效力的一种公认方法。为了评价克隆16的ADCC活性,我们在两种HER2扩增的乳腺癌模型:BT-474和SkBR3中使用了体外PBMC

实现的ADCC测定。将赫赛汀/曲妥珠单抗用作阳性对照,这是因为它在这些类型的癌症中已显示赋予了ADCC作用。在两种模型中,我们从赫塞汀观察到了显著的肿瘤杀死作用,但是所测试的其他单克隆抗体,克隆16、AMG和MM,基本上是无活性的,这表明它们缺乏明显的ADCC作用(数据未出示)。使用人血清作为补体来源在CDC测定中测试了2C2-YTE。另外,作为对照包括了抗HER2抗体曲妥珠单抗和抗CD20抗体利妥昔单抗。包括2C2-YTE的这些抗体在任何浓度均未显示出任何可检测的CDC活性(数据未出示)。SkBR3细胞不表达CD20。作为阳性对照,利妥昔单抗在类似的CDC测定中对表达CD20的Daudi细胞显示出显著的细胞杀死活性(数据未出示)。

[0450] 3.5细胞周期阻滞

[0451] 3.5.1SkBR3乳腺癌细胞中的细胞周期阻滞测定

[0452] 将BioSantecells(ATCC No.HTB-30)以150000个细胞/孔的密度在6孔板中铺板并允许其附着过夜。第二天,除去培养基并更换为含有测试和对照抗体的新鲜生长培养基。然后,在37℃孵育细胞48小时。在处理结束时,将细胞胰蛋白酶化,混合至15ml锥形管,并以1500rpm离心5分钟。然后,用PBS清洗细胞一次并在冰冷的70%乙醇中在-20℃固定过夜。

[0453] 固定后,如上所述离心细胞,在PBS中清洗1次,并在染色溶液(PBS+0.1%Triton X-100、0.2mg/ml不含DNA酶的RNA酶A和20mg/ml碘化丙啶)中再悬浮。在室温下将细胞在黑暗中染色30分钟,并使用LSRII流式细胞仪系统(BD Biosciences)分析。使用得克萨斯红信号通道(Texas Red channel)检测碘化丙啶;使用FlowJo流式细胞术分析软件包(Tree Star, Inc., OR),使用Dean/Jett/Fox模型分析数据。

[0454] 3.5.2结果

[0455] 基于FACS的细胞周期分析显示在SkBR3细胞(与BT-474类似的HER2扩增的乳腺癌细胞系)中,赫塞汀和克隆16(2C2的亲本前导)在G1期导致细胞周期阻滞(通过减少S/G2群体,提高G1群体,如图16所示)。

[0456] 3.6通过阻断HRG诱导的VEGF分泌的抗血管原作用

[0457] HRG已显示在多种癌症模型中驱使VEGF(主要的促血管生成细胞因子)的分泌。因此,我们在两种乳腺癌模型:MCF-7和BT-474中评价了2C2在抑制HRG诱导的VEGF分泌中的抑制作用。

[0458] 3.6.1HRG诱导的VEGF分泌测定

[0459] 将MCF-7细胞和BT-474细胞以100000个细胞/孔的密度在24孔板中铺板,并允许其休止2天。除去培养基,并用500μl含有2%FBS以及对照和测试抗体的新鲜生长培养基替换。孵育24小时后,收集细胞培养基并使用VEGF ELISA试剂盒(R&D Systems DY293B)确定VEGF水平。通过向细胞中加入新鲜培养基和Cell Titer Glo(Promega, 1:1比值)并在室温下将板孵育10分钟来确定每个孔中的相对细胞数目。使用酶标仪读取发光性,并将这些值用于数据的归一化。

[0460] 3.6.2结果

[0461] HRG处理在BT-474(图17A)和MCF-7(图17B)中引起了显著的VEGF分泌提高,这两种乳腺癌模型细胞系的范围在6.5倍至8倍之间。CL16(克隆16)和MM单克隆抗体能够抑制大部分提高,这表明这些抗HER3单克隆抗体可以赋予额外的血管调节作用。

[0462] 实施例4.与食蟹猴和小鼠HER3的交叉反应性

[0463] 4.12C2以与人HER3相似的亲合力结合至食蟹猴和小鼠HER3

[0464] 基本如上所述进行了Biacore测定以比较2C2对人、食蟹猴(cyno)和小鼠HER3的亲合力以使得能够进行相关毒性物质选择(表7的顶部部分)。使用高分辨率Biacore仪、替代性Fc捕获试剂和对背景结合进行修正的改善的注射规程,对2C2-YTE进行其他Biacore测定。简言之,使用仪器生产商所列出的标准胺规程,将蛋白A捕获试剂固定在相同CM5传感器芯片上顺序连接的两个相邻的流通池上。将这些蛋白A表面中的一个用作该实验的参考表面,而另一个用作活性表面以用于记录IgG捕获和后续的HER3(ECD)结合。参考和活性流通池表面上最终的蛋白A密度分别记录为1986RU_s和1979RU_s。如所配置的,建立方法从而使2C2-YTE IgG首先仅捕获在活性蛋白A表面上,然后对活性和参考流通池表面注射HER3蛋白溶液。在这种情况下,该策略针对HER3分析物对蛋白A捕获表面的任何非特异性结合修正了结合曲线。对于IgG捕获步骤,在HBS-EP+仪器缓冲液(0.01M HEPES, pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA和0.05%P20)中制备了10nM的2C2-YTE IgG,然后以10μL/min的流速在活性蛋白A流通池表面上注射30秒。然后,开始在仪器缓冲液中制备500nM的人、食蟹猴和鼠HER3蛋白的储液,然后对每种制备2倍连续稀释的系列以提供0.39nM的最终浓度。然后,以75μL/min的流速在活性和参考池蛋白A表面上注射HER3蛋白120秒。收集15分钟的解离数据,然后在注射之间用10mM甘氨酸缓冲液(pH1.7)的两次60秒脉冲使流通池再生回到蛋白A捕获表面。在整个注射系列中,还交替进行了几次缓冲液注射。随后,使用选择缓冲液注射以及参比池数据以针对注射假象和/或非特异性结合相互作用修正原始数据组,这是通常称为“双参考”的技术(Myszka, 1999)。然后,如果检测了的话,将完全修正的结合数据全局拟合至包括针对传质限制结合进行修正的项的1:1结合模型(BIAevaluation4.1软件)。该分析确定了动力学速率(K_{on} , K_{off})常数,然后作为 K_{off}/K_{on} 从中计算了表观 K_D (表7底部)。两组实验之间的 K_{on} 和 K_{off} 值的变化可能是由如上详细说明了两个规程之间的差异造成的,并且一般在测量这些动力学参数的可接受的两倍误差范围内。如表7所示,2C2和2C2-YTE对食蟹猴HER3的亲合力实际上与对人HER3的亲合力相等。对小鼠HER3的亲合力在对人HER3的亲合力的3倍之内。

[0465] 表7:显示2C2对人、食蟹猴和小鼠HER3的亲合力的Biacore结合测定

	IgG 捕获	2C2 (exp34c, 34d,43b)	2C2 (exp43d)	2C2 (exp43f)
	受体	huHER3 (ECD)-His	muHER3-His	Cyno HER3-His
	形式	IgG (Fc)捕获	IgG (Fc)捕获	IgG (Fc)捕获
[0466]	K_{on} (1/Ms) ($\times 10^5$)	4.27 (+/- 0.45)	3.26	4.66
	K_{off} (1/s) ($\times 10^{-4}$)	1.71 (+/- 0.18)	3.78	1.81
	K_D (nM)	0.402 (+/- 0.029)	1.16	0.389
	IgG 捕获	2C2-YTE	2C2-YTE	2C2-YTE
	受体	huHER3 (ECD)-His	muHER3-His	Cyno HER3-His
	形式	IgG (Fc)捕获	IgG (Fc)捕获	IgG (Fc)捕获
[0467]	K_{on} (1/Ms) ($\times 10^5$)	1.61	1.11	1.52
	K_{off} (1/s) ($\times 10^{-4}$)	0.743	1.91	0.734
	K_D (nM)	0.461	1.721	0.483

[0468] 4.2HRG诱导的食蟹猴HER3磷酸化的测定

[0469] 按照与Lipofectamine2000试剂(Invitrogen)一起提供的规程,用全长食蟹猴HER3表达载体瞬时转染Ad293细胞(Stratagene No.240085)。处理前,允许细胞在37℃孵育

48小时。将10 μ g/ml的抗体加入到完全生长培养基中1小时,然后在37 $^{\circ}$ C用20ng/ml HRGb1 (R&D Systems) 刺激10分钟。在处理结束时,除去培养基并用PBS清洗细胞1次。用2 $\times$ Novex Tris-甘氨酸样品缓冲液 (Invitrogen) 将细胞溶胞并且通过免疫印迹法确定pHER3和总HER3的水平(分别为Cell Signaling antibody#4791和Santa Cruz antibody#285)。使用ImageJ软件(NIH, imagej.nih.gov/ij/) 完成了条带的密度测定。

[0470] 4.3结果

[0471] 为了充分建立2C2对食蟹猴HER3的结合和交叉调节,建立了异位表达全长食蟹猴HER3的稳定的Ad293细胞系,如通过免疫印迹所表明的(图18A)。当用HRG处理时,食蟹猴HER3经历了稳健的激活,如通过pHER3信号的诱导所表明的(图18B)。当用2C2共处理细胞,但同时又不在用R347对照抗体处理它们时,pHER3诱导完全终止,这表明2C2不仅能在细胞表面上结合至食蟹猴HER3,而且还能有效消除它的激活(图18B)。与显示2C2对食蟹猴HER3显示出与对人HER3相同的亲合力的上述Biacore亲合力测量数据相结合,这些结果证实对于2C2试验,食蟹猴HER3是相关毒性物质。

[0472] 抗HER3单克隆抗体的体内试验

[0473] 4.4皮下人FADU头颈异种移植模型研究

[0474] 4.4.1方法

[0475] 在37 $^{\circ}$ C,人FADU头颈细胞(ATCC No.HTB-43) 维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的RPMI1640培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射5 $\times$ 10⁶个细胞/只小鼠(悬浮在50%matrigel中)建立了异种移植。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至200mm³。腹膜内施用2C2、2C2-YTE、西妥昔单抗、对照IgG1或2C2与西妥昔单抗单克隆抗体的组合。对于剂量依赖性研究,以3、5、7和10mg/千克体重(mg/kg)施用2C2,以10mg/kg施用对照。对于组合研究,以3mg/kg施用2C2,以30mg/kg施用西妥昔单抗并且以6mg/kg施用对照抗体。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0476] 肿瘤体积= $\pi \div 6$ (长 $\times$ 宽 $\times$ 宽)

[0477] 抗肿瘤作用表示为百分比 δ 肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0478] 百分比 δ TGI= $1 - (dT \div dC) \times 100$,

[0479] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0480] 在使用2C2的效力研究结束时,在所指示的最终时间用2C2处理小鼠以确定药物动力学值。进行心脏穿刺,将血液采集到Microtainer血清分离管中(SST)中。将具有血液的管轻轻涡旋10秒,并在室温下保持20分钟以允许血清凝块。将样品以1000 $\times$ g离心10分钟,并小心地将血清样品转移到新管中并在-80 $^{\circ}$ C储存。

[0481] 将间接酶联免疫吸附测定(ELISA)形式用于小鼠血清中2C2的定量测定。将标准品、质量对照和小鼠血清样品与固定在96孔微量滴定板上的山羊抗人IgG抗体一起孵育。孵育后,通过清洗步骤除去未结合的材料,并使用山羊抗人IgG与辣根过氧化物酶的结合物检测2C2。加入酸性终止液,并通过测量450nm处的吸光度确定底物的酶促周转程度。所测量的吸光度与小鼠血清中存在的2C2浓度直接成正比。将所述测定的2C2标准曲线用于内插血清样品的浓度。

[0482] 4.4.2结果。

[0483] 使用在雌性裸鼠中皮下生长的人FADU头颈异种移植模型,2C2显示了剂量依赖性抗肿瘤效力。在研究期间,对每周施用两次7mg/kg观察到了99%肿瘤生长抑制(dTGI)的最大效力(图19A)。

[0484] 在处理期期间(7-18天),在FADU异种移植模型中每周施用两次3mg/kg的2C2与30mg/kg的西妥昔单抗的组合施用显示出清楚的协同抗肿瘤效力(图19B)。该作用是长效的并且肿瘤仅在第40天在再生长期结束时开始生长回去。组合治疗在10个中产生了7个部分消退并且在10个中产生了2个完全消退。

[0485] 2C2与小鼠HER3交叉反应并且已很好地确立HER3在多种非患病小鼠组织中表达。因此,在到达肿瘤组织前,宿主HER3可以用作吸附2C2单克隆抗体的吸附物。使用具有肿瘤的雌性裸鼠,以5mg/kg向这些小鼠施用1次或3次2C2,并且随时间跟踪2C2的暴露程度。2C2仅在上次5mg/kg 2C2剂量后1天是可检测的,并且在上次处理后3天变的不可检测(图36)。另一方面,使用与5mg/kg相同的时间表,施用30mg/kg 2C2剂量导致产生了更长的时窗,其中可以测量小鼠血清中的2C2。这些发现表明在向具有肿瘤的小鼠施用5mg/kg或30mg/kg的单次剂量和反复剂量后2C2的非线性药物动力学。数据表明小鼠HER3可以用作吸附物以结合施用于小鼠的2C2,并且作为单次剂量的30mg/kg足以使所述吸附物饱和。

[0486] 通过在具有FADU异种移植肿瘤的小鼠中施用高负荷剂量的2C2,然后施用低维持剂量,在功能上确认了小鼠中对于2C2的HER3吸附物的存在性。在FADU肿瘤模型中显示了10mg/kg负荷剂量和3mg/kg维持剂量的2C2的抗肿瘤效力。作为单次剂量,10mg/kg的2C2仅具有短暂的抗肿瘤效力。以3mg/kg每周施用两次2C2具有适度但连续的效力。与任一种单独的处理安排相比,10mg/kg负荷剂量与3mg/kg维持剂量的2C2的组合在阻止肿瘤生长中更有效(图21)。

[0487] 在FADU异种移植肿瘤提取物中测试了2C2调节药效动力学标志物pHER3和pAKT的能力。以30mg/kg在48小时内向具有人FADU异种移植肿瘤的小鼠施用2C2两次,并且在24小时后分析提取物。简言之,向无胸腺裸鼠皮下植入FADU头颈癌细胞。在48小时内,向动物施用两次30mg/kg的2C2。24小时后制备提取物以用于pHER3、pAKT和总HER3的分析(图22,分别为顶部、中间和底部部分)。将R347用作对照IgG1抗体。每个处理组6只动物。数据表示为平均值±标准偏差。本发明中,与来自对照IgG1处理的小鼠的肿瘤相比,2C2分别将HER3和AKT的磷酸化抑制了59.5%和51.7%(图22,上图和中间图)。通过2C2未观察到总HER3的调节(图22,下图)。

[0488] 4.5皮下人Detroit562头颈异种移植模型研究

[0489] 4.5.1方法。

[0490] 在37℃,人Detroit562头颈细胞(ATCC No.CCL-138)维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的RPMI1640培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射5×10⁶个细胞/只小鼠建立了异种移植。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至200mm³。腹膜内施用2C2、2C2-YTE、西妥昔单抗、对照IgG1或2C2与西妥昔单抗单克隆抗体的组合。对于剂量依赖性研究,以1、3、10和30mg/千克体重(mg/kg)施用2C2。对于组合研究,以3mg/kg施用2C2,以30mg/kg施用西妥昔单抗并且以10mg/kg施用对照抗体。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0491] 肿瘤体积 = $\pi \div 6$ (长 × 宽 × 宽)

[0492] 抗肿瘤作用表示为百分比 δ 肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0493] 百分比 δ TGI = $1 - (dT \div dC) \times 100$,

[0494] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0495] 在使用2C2的效力研究结束时,在所指示的最终时间用2C2处理小鼠以确定药物动力学值。进行心脏穿刺,将血液采集到SST microtainer管中。将具有血液的管轻轻涡旋10秒,并在室温下保持20分钟以允许血清凝块。将样品以 $1000 \times g$ 离心10分钟,并小心地将血清样品转移到新管中并在 -80°C 储存。

[0496] 将间接酶联免疫吸附测定(ELISA)形式用于小鼠血清中2C2的定量测定。将标准品、质量对照和小鼠血清样品与固定在96孔微量滴定板上的山羊抗人IgG抗体一起孵育。孵育后,通过清洗步骤除去未结合的材料,并使用山羊抗人IgG与辣根过氧化物酶的结合物检测2C2。加入酸性终止液,并通过测量450nm处的吸光度确定底物的酶促周转程度。所测量的吸光度与小鼠血清中存在的2C2浓度直接成正比。将所述测定的2C2标准曲线用于内插血清样品的浓度。

[0497] 4.5.2结果

[0498] 在雌性裸鼠中皮下生长的人Detroit562头颈异种移植模型中,2C2显示出抗肿瘤效力。每周施用2次10mg/kg的2C2是最有效的,其dTGI为72%(图23A)。Detroit562模型含有PIK3CA突变。

[0499] Detroit562肿瘤模型对抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗敏感,这导致每周施用两次10mg/kg时产生肿瘤生长抑制。3mg/kg 2C2与10mg/kg西妥昔单抗的组合提高了西妥昔单抗的抗肿瘤效力,并且导致在10个中产生了9个部分消退,而单独的西妥昔单抗产生了5/10的部分消退(图23B)。

[0500] 4.6皮下人CAL27头颈异种移植模型研究

[0501] 4.6.1方法。

[0502] 在 37°C ,人CAL27头颈细胞(ATCC No. CRL-2095)维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的RPMI 1640培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射 5×10^6 个细胞/只小鼠建立了异种移植。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至 200mm^3 。腹膜内施用2C2-YTE、西妥昔单抗或对照IgG1。对于剂量依赖性研究,以3、10和30mg/千克体重(mg/kg)施用2C2-YTE。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0503] 肿瘤体积 = $\pi \div 6$ (长 × 宽 × 宽)

[0504] 抗肿瘤作用表示为百分比 δ 肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0505] 百分比 δ TGI = $1 - (dT \div dC) \times 100$,

[0506] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0507] 4.6.2结果。

[0508] 使用2C2-YTE,在第三头颈肿瘤模型CAL27中确认了2C2-YTE的剂量依赖性活性。与对照IgG1处理的动物相比,每周施用2次3、10或30mg/kg的2C2-YTE显示了分别为26.4%、

55.2%或68.8%的TGI (图24)。

[0509] CAL27肿瘤模型对抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗敏感,这导致每周施用2次30mg/kg时产生了TGI为75.0%的肿瘤生长抑制(图24)。

[0510] 4.7皮下人KRAS突变的A549NSCLC异种移植模型研究

[0511] 4.7.1方法

[0512] 在37℃,将含有KRAS基因密码子12突变的人A549NSCLC细胞(ATCC No.CCL-185)维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的汉姆氏F12K培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射5×10⁶个细胞/只小鼠(悬浮在50%matrigel中)建立了异种移植。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至200mm³。腹膜内施用2C2、2C2-YTE、西妥昔单抗、对照IgG1或2C2与西妥昔单抗单克隆抗体的组合。对于剂量依赖性研究,以3、10和30mg/千克体重(mg/kg)施用2C2,并且以10mg/kg施用2C2-YTE。对于组合研究,以10mg/kg分别施用2C2和西妥昔单抗。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0513] 肿瘤体积=π÷6((长×宽×宽))

[0514] 抗肿瘤作用表示为百分比δ肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0515] 百分比δTGI=1-(dT÷dC)×100,

[0516] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0517] 4.7.2结果。

[0518] 在雌性裸鼠中皮下生长的人A549NSCLC异种移植模型中,2C2显示出剂量依赖性抗肿瘤效力。通过每周施用2次30mg/kg的2C2直至第33天,实现了91%δTGI的最大效力(图25A)。在该A549肿瘤模型中,以10mg/kg施用的2C2和2C2-YTE显示出类似的抗肿瘤效力。一旦处理停止,肿瘤开始以与在对照处理的小鼠中相同的速率生长。A549异种移植模型含有KRAS突变和LKB-1缺失。

[0519] 在该A549肿瘤模型中,单独的10mg/kg的西妥昔单抗是无效的。然而,在处理期间,与单独的2C2相比,向仍为10mg/kg的2C2中加入10mg/kg的西妥昔单抗导致了额外的抗肿瘤效力。另外,在停止处理后,组合处理组显示出较缓慢的肿瘤再生长速率(图25B)。

[0520] 4.8皮下人HARA-B鳞状NSCLC异种移植模型研究

[0521] 4.8.1方法

[0522] 在37℃,将表达野生型RAS基因、HRG和pHER3的人鳞状HARA-B NSCLC细胞维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L D-葡萄糖、2.383g/L HEPES缓冲液、L-谷氨酰胺、1.5g/L碳酸氢钠、110mg/L丙酮酸钠和10%胎牛血清的RPMI1640培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射5×10⁶个细胞/只小鼠(悬浮在50%matrigel中)建立了异种移植。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至227mm³。以3、10和30mg/千克体重(mg/kg)腹膜内施用2C2-YTE,以30mg/kg施用对照。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0523] 肿瘤体积=π÷6(长×宽×宽)

[0524] 抗肿瘤作用表示为百分比δ肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0525] 百分比δTGI=1-((dT÷dC)×100,

[0526] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0527] 4.8.2结果。

[0528] 在雌性裸鼠中皮下生长的人鳞状HARA-B NSCLC异种移植模型中,2C2-YTE显示出剂量依赖性抗肿瘤效力。通过每周施用2次30mg/kg的2C2-YTE直至第29天,实现了64.6% dTGI的最大效力(图26)。以10mg/kg施用的2C2-YTE显示出与30mg/kg类似的抗肿瘤效力;然而,在该HARA-B肿瘤模型中,3mg/kg的2C2-YTE是无效的。HARA-B异种移植模型含有野生型RAS等位基因。

[0529] 4.9皮下人HT-29CRC异种移植模型研究

[0530] 4.9.1方法

[0531] 在37℃,将人HT-29结肠直肠癌细胞(ATCC No.HTB-38)维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的RPMI1640培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射5×10⁶个细胞/只小鼠建立了异种移植。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至200mm³。腹膜内施用2C2、2C2-YTE和对照IgG1单克隆抗体。以2、10和30mg/千克体重(mg/kg)施用2C2,而以30mg/kg施用2C2-YTE。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0532] 肿瘤体积=π÷6(长×宽×宽)

[0533] 抗肿瘤作用表示为百分比δ肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0534] 百分比δTGI=1-(dT÷dC)×100,

[0535] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0536] 4.9.2结果。

[0537] 使用皮下注射到雌性裸鼠中的人HT-29结肠直肠异种移植模型,2C2显示出剂量依赖性抗肿瘤效力。在处理期期间,每周施用2次30mg/kg的2C2是最有效的,其dTGI为56%(图27)。两者均以30mg/kg施用时,2C2-YTE显示出与2C2相同的效力。一旦处理停止,肿瘤以和对照肿瘤相同的速率生长。HT-29异种移植模型含有BRAF突变。在该模型中,单独的10mg/kg的西妥昔单抗无可测量的抗肿瘤活性。在处理期结束时,30mg/kg的2C2与10mg/kg的西妥昔单抗结合的活性与单独的30mg/kg 2C2的活性是难以区分的(数据未显示)。这表明通过向西妥昔单抗加入2C2-YTE进一步抑制了对2C2反应良好的这种EGFR表达CRC肿瘤模型。

[0538] 4.10皮下人HCT-116CRC异种移植模型研究

[0539] 4.10.1方法

[0540] 在37℃,将人HCT-116结肠直肠癌细胞维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的RPMI1640培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射5×10⁶个细胞/只小鼠建立了异种移植。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至200mm³。腹膜内施用2C2、2C2-YTE、西妥昔单抗和对照IgG1单克隆抗体。以3、10和30mg/千克体重(mg/kg)施用2C2,而以30mg/kg施用2C2-YTE。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0541] 肿瘤体积=π÷6(长×宽×宽)

[0542] 抗肿瘤作用表示为百分比δ肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0543] 百分比 $\delta TGI = 1 - (dT \div dC) \times 100$,

[0544] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0545] 4.10.2结果。

[0546] 在皮下注射至雌性裸鼠中的人HCT-116结肠直肠异种移植模型中,每周施用2次几种不同浓度的2C2和10mg/kg的2C2-YTE显示出适度的抗肿瘤效力(图28)。对于10mg/kg的2C2,注意到最大效力为43% δTGI 。10mg/kg抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗是无效的。HCT-116异种移植模型含有KRAS突变。

[0547] 4.11皮下人LOVO CRC异种移植模型研究

[0548] 4.11.1方法。

[0549] 在37℃,将人LOVO结肠直肠癌细胞(ATCC No.CCL-229)维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的汉姆氏F12K培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射 5×10^6 个细胞/只小鼠建立了异种移植。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至200mm³。腹膜内施用2C2、2C2-YTE、西妥昔单抗和对照IgG1单克隆抗体。以10或10mg/千克体重(mg/kg)施用2C2,以10mg/kg施用2C2-YTE和西妥昔单抗,并且以30mg/kg施用对照。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0550] 肿瘤体积= $\pi \div 6$ (长 $\times$ 宽 $\times$ 宽)

[0551] 抗肿瘤作用表示为百分比 δ 肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0552] 百分比 $\delta TGI = 1 - (dT \div dC) \times 100$,

[0553] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0554] 4.11.2结果

[0555] 在雌性裸鼠中皮下生长的人LOVO结肠直肠异种移植模型中,每周施用2次30mg/kg的2C2实现了48% δTGI 的抗肿瘤效力(图29)。均为10mg/kg的2C2、2C2-YTE和西妥昔单抗具有相当的效力。LOVO异种移植模型含有KRAS突变。

[0556] 4.12皮下人DU145前列腺癌异种移植模型研究

[0557] 4.12.1方法。

[0558] 在37℃,将人DU145前列腺癌细胞(ATCC No.HTB-81)维持在5%CO₂孵育箱中含有伊格尔氏盐、L-谷氨酰胺和10%胎牛血清的MEM培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射 5×10^6 个细胞/只小鼠(悬浮在50%matrigel中)建立了异种移植。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至200mm³。以30mg/千克体重腹膜内施用2C2、MM和AMG单克隆抗体。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0559] 肿瘤体积= $\pi \div 6$ (长 $\times$ 宽 $\times$ 宽)

[0560] 抗肿瘤作用表示为百分比 δ 肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0561] 百分比 $\delta TGI = 1 - (dT \div dC) \times 100$,

[0562] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0563] 4.12.2结果

[0564] 使用在雄性裸鼠中皮下生长的人DU145前列腺癌异种移植模型,每周施用2次30mg/kg的2C2在该肿瘤模型中显示出77% dTGI的抗肿瘤效力(图30)。DU145异种移植模型含有LKB-1缺失。以30mg/kg使用的抗HER3单克隆抗体AMG和MM显示出抗肿瘤效力,但是与30mg/kg相同剂量的2C2相比,它们的效果较差。

[0565] 4.13正位人BT-474乳腺癌异种移植模型研究

[0566] 4.13.1方法。

[0567] 在37℃,将人BT-474乳腺癌细胞维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的RPMI1640培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧的乳房脂肪垫注射 1×10^7 个细胞/只小鼠(悬浮在50%matrigel中)建立了正位异种移植。细胞注射前,将雌激素粒(0.36mg)置于左侧皮肤下方。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至200mm³。以30mg/千克体重腹腔内施用2C2、2C2-YTE和/或本领域中已知的抗HER2抗体:MM、AMG和曲妥珠单抗(商品名赫塞汀[®];例如,美国专利No.5821337)。通过口服饲喂施用100mg/千克体重的拉帕替尼。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0568] 肿瘤体积= $\pi \div 6$ (长×宽×宽)

[0569] 抗肿瘤作用表示为百分比 δ 肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0570] 百分比 δ TGI= $1 - (dT \div dC) \times 100$,

[0571] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0572] 4.13.2结果

[0573] 使用正位注射到雌性裸鼠的乳房脂肪垫中的HER2驱动的人乳腺癌模型BT-474,在BT-474异种移植中,通过每周注射2次的30mg/kg 2C2的施用导致了55%的dTGI(图31A)。BT-474表达了通过HercepTest鉴定为3+的极高水平的HER2。在该HER2驱动模型中,均以30mg/kg施用的AMG和MM未显示出抗肿瘤效力。

[0574] 拉帕替尼是抑制EGFR和HER2的小分子药物。由于BT-474肿瘤是由HER2驱动的,因此在该模型中测试了拉帕替尼并且发现它在BT-474肿瘤模型中导致肿瘤郁滞。30mg/kg 2C2与100mg/kg拉帕替尼的组合处理导致单独的拉帕替尼的抗肿瘤效力的改善,这在没有额外处理的情况下在肿瘤再生长的延迟中清晰可见(图31B)。2C2-YTE的抗肿瘤活性与2C2类似。在该模型中还测试了抗HER2抗体曲妥珠单抗,并且它在该HER2驱动的异种移植模型中显示是非常有活性的,其dTGI为111.6%。通过加入30mg/kg的2C2,30mg/kg的曲妥珠单抗的活性进一步提高较少,其显示dTGI为118.5%(图31C)。

[0575] 在BT-474异种移植肿瘤提取物中,测试了克隆16(2C2所来源的亲本克隆)调节药效动力学标志物pHER3和pAKT的能力。简言之,将雌性无胸腺裸鼠正位植入到高HER2表达的BT-474乳腺癌细胞中。在48小时内,向动物施用两次30mg/kg的克隆16。24小时后,制备提取物以用于分析pHER3、pAKT和总HER3(tHER3)。对PBS处理的对照动物,将结果归一化。每个处理组有3只动物。如图32所示,与来自PBS处理的小鼠的肿瘤相比,克隆16分别将HER3和AKT的磷酸化抑制了50.0%和46.1%,并且未观察到克隆16对总HER3的调节。

[0576] 4.14正位人MCF-7乳腺癌异种移植模型研究

[0577] 4.14.1方法。

[0578] 在37℃,将人MCF-7乳腺癌细胞维持在5%CO₂孵育箱中含有glutamax、2.4/L碳酸氢钠、Hepes和5%胎牛血清的Optimem培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧的乳房脂肪垫注射5×10⁶个细胞/只小鼠(悬浮在50%matrigel中)建立了正位异种移植。细胞注射前,将雌激素粒(0.36mg)置于左侧皮肤下方。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至200mm³。腹膜内施用2C2、2C2-YTE和曲妥珠单抗单克隆抗体。以10或30mg/千克体重(mg/kg)施用2C2,以10mg/kg施用2C2-YTE和曲妥珠单抗。以10mg/千克体重静脉内施用紫杉醇。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0579] 肿瘤体积=π÷6(长×宽×宽)

[0580] 抗肿瘤作用表示为百分比δ肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0581] 百分比δTGI=1-(dT÷dC)×100,

[0582] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0583] 4.14.2结果

[0584] 在正位注射到雌性裸鼠的乳房脂肪垫中的人MCF-7乳腺癌异种移植模型中,10mg/kg或30mg/kg的2C2显示出适度的抗肿瘤效力,其dTGI为34%。10mg/kg的2C2-YTE与相同浓度的2C2具有类似的效力(图33A)。在该HER2表达模型中,曲妥珠单抗未显示出效力,这表明HER2不足以驱动肿瘤生长。MCF-7肿瘤表达低水平的HER2(1+),如通过HercepTest所测量的。

[0585] 当以10mg/kg的剂量每隔一天施用10天时,紫杉醇在MCF-7正位乳腺癌模型中显示出清楚的抗肿瘤效力。在处理期结束时,向紫杉醇处理中加入10mg/kg的2C2提高了单独的紫杉醇的抗肿瘤效力(图33B)。在处理停止后,肿瘤以和紫杉醇处理的肿瘤相同的速率再生长。

[0586] 4.15正位人MDA-MB-361乳腺癌异种移植模型研究

[0587] 4.15.1方法

[0588] 在37℃,将人MDA-MB-361乳腺癌细胞维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的RPMI1640培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧的乳房脂肪垫注射5×10⁶个细胞/只小鼠(悬浮在50%matrigel中)建立了正位异种移植。细胞注射前,将雌激素粒(0.36mg)置于左侧皮肤下方。在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至230mm³。2C2-YTE和/或本领域中已知的抗HER2抗体,具体地,曲妥珠单抗(商品名赫塞汀®;例如,美国专利No.5821337)和RhuMAb2C4(例如,专利公开W02001/00245),其在本文中分别表示为曲妥珠单抗和2C4。以30mg/千克体重(2C2-YTE)或以10mg/千克体重(曲妥珠单抗和2C4)腹膜内施用曲妥珠单抗和2C4单克隆抗体。通过口服饲喂施用100mg/千克体重的拉帕替尼。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0589] 肿瘤体积=π÷6(长×宽×宽)

[0590] 抗肿瘤作用表示为百分比δ肿瘤生长抑制(TGI),其如下所示进行计算:

[0591] 百分比δTGI=1-(dT÷dC)×100,

[0592] 其中dT=与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC=与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0593] 4.15.2结果

[0594] 使用正位注射到雌性裸鼠的乳房脂肪垫中的HER2驱动的人乳腺癌模型MDA-MB-361 (Hercept测试+2),在MDA-MB-361异种移植中,每周注射2次30mg/kg 2C2-YTE的施用导致了70.1%的dTGI (图34A-C)。MDA-MB-361以HerceptTest鉴定为2+的中等水平表达HER2,并且其通过FISH分析(荧光原位杂交分析)的得分为正。在MDA-MB-361肿瘤模型中,均以10mg/kg施用的曲妥珠单抗和rhuMAb2C4和以100mg/kg每天施用2次的拉帕替尼也显示出抗肿瘤效力。

[0595] 由于MDA-MB-361肿瘤是由HER2驱动的,因此将2C2-YTE与靶向HER2的药物结合,如曲妥珠单抗、rhuMAb2C4或拉帕替尼。与单独的曲妥珠单抗相比,30mg/kg 2C2-YTE与10mg/kg曲妥珠单抗的组合处理导致了额外的抗肿瘤效力。在没有额外处理的情况下,加合作用在肿瘤再生长的延迟中也是明显的(图34A)。在该模型中,与2C2-YTE与rhuMAb2C4(图34B)或拉帕替尼(图34C)的组合相比,2C2-YTE与曲妥珠单抗的组合更好。

[0596] 4.16表达人FcRn受体的转基因小鼠以研究具有YTE修饰的抗体的暴露。

[0597] 4.16.1方法。

[0598] 通过静脉内途径向表达人FcRn受体的转基因雌性SCID小鼠施用单次剂量的60mg/kg的克隆16-GL、2C2或2C2-YTE。在剂量施用后,通过心脏刺穿在几个时间点从这些小鼠收集血清,并将血液收集到SST microtainer管中。将管轻轻涡旋10秒,并在室温下保持20分钟以允许血清凝块。以1000×g将样品离心10分钟,并且将血清样品小心地转移到新的管中并在-80℃储存。将间接酶联免疫吸附测定(ELISA)形式用于小鼠血清中2C2的定量测定。将标准品、质量对照和小鼠血清样品与固定在96孔微量滴定板上的山羊抗人IgG抗体一起孵育。孵育后,通过清洗步骤除去未结合的材料,并使用山羊抗人IgG与辣根过氧化物酶的结合物检测2C2。加入酸性终止液,并通过测量450nm处的吸光度确定底物的酶促周转程度。所测量的吸光度与小鼠血清中存在的2C2或2C2-YTE的浓度直接成正比。将所述测定的2C2或2C2-YTE标准曲线用于内插血清样品的浓度。

[0599] 4.16.2结果。

[0600] 与2C2或克隆16-GL相比,在2C2主链上含有YTE突变的2C2-YTE随时间显示出更高的暴露水平(图35)。在向这些小鼠施用单次剂量抗体后14天,2C2-YTE的血清暴露水平高于100µg/ml,而2C2和克隆16-GL低于1µg/ml。与其亲本抗体2C2相比,该发现表明YTE可以延长2C2-YTE的半衰期。

[0601] 4.17MEK抑制剂诱导HER3表达并且与抗HER3抗体结合显示出额外的抗肿瘤效力。

[0602] KRAS (V-Ki-ras2Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因) 和BRAF (v-raf鼠肉瘤病毒癌基因B1) 突变导致通过致癌Ras/Raf/Mek/Erk途径的EGFR信号的组成型激活。Kras突变是多种实体瘤,具体地结肠直肠癌(CRC,30-40%) 和肺癌(LC,20-25%) 中最常发生的突变事件。在CRC中,Braf突变还以相对高的频率发生(约15%)。由于它们组成型激活ERK途径的能力,突变体Kras和Braf已显示出赋予肿瘤对RTK疗法的耐受性,特别是对EGFR mAb,如西妥昔单抗和帕尼单抗。使用单独的MEK抑制剂司美替尼(AstraZeneca,参见,例如,W003/077914和W02007/076245) 或与2C2(或2C2-YTE) 结合检验了CRC和LC模型中抑制有丝分裂原激活蛋白激酶(MEK) 对HER3途径的影响。检查了一些CRC和LC模型,其包括具有mut-Kras(例如,A549、LOVO) 或mut-Braf(例如,HT-29、Colo205) 的那些或野生型RAS(例如,HARA-B、KNS-62)。

[0603] 4.17.1方法。

[0604] 细胞培养研究:将细胞在24孔板中并且在含有10%热失活FBS的培养基中以 10^5 每孔铺板,并且在处理前使其达到80%或以上的汇合。在完全培养基中制备了2C2 (10 μ g/mL) 或对照抗体、MEK抑制剂司美替尼 (1或10 μ M) 或2C2 (10 μ g/mL) 和司美替尼 (10 μ M) 的组合。在除去铺板培养基之后,应用处理。在37 $^{\circ}$ C,在5%CO₂中孵育24小时后,用冰冷的PBS清洗细胞一次,然后通过加入60 μ L 2 $\times$ 十二烷基硫酸钠 (SDS) 样品缓冲液 (Invitrogen) 进行细胞溶解。将样品加热5分钟,然后在冰上冷却2分钟。通过基本如上所述的免疫印迹分析样品 (参见实施例部分2.4)。

[0605] 异种移植研究:在37 $^{\circ}$ C,将含有KRAS基因密码子12突变的人A549NSCLC细胞 (ATCC No. CCL-185) 维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的汉姆氏F12K培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射 5×10^6 个细胞/只小鼠 (悬浮在50%matrigel中) 建立了异种移植。在37 $^{\circ}$ C,将人HT-29结肠直肠癌细胞 (ATCC No. HTB-38) 维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的RPMI1640培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射 5×10^6 个细胞/只小鼠建立了异种移植。在37 $^{\circ}$ C,将人LOV0结肠直肠癌细胞 (ATCC No. CCL-229) 维持在5%CO₂孵育箱中含有4.5g/L葡萄糖、L-谷氨酰胺、丙酮酸钠和10%胎牛血清的汉姆氏F12K培养基中。通过向4至6周大的无胸腺nu/nu小鼠右侧皮下注射 5×10^6 个细胞/只小鼠建立了异种移植。对于所有三种肿瘤模型,在随机分配进行效力研究之前,允许肿瘤生长至200mm³。腹膜内施用2C2-YTE或对照IgG1。口服施用司美替尼。对于组合研究,分别以30mg/kg或75mg/kg施用2C2-YTE和司美替尼。对于小鼠中生长的肿瘤,使用下式,将卡尺测量用于计算肿瘤体积:

[0606] 肿瘤体积 = $\pi \div 6$ (长 $\times$ 宽 $\times$ 宽)

[0607] 抗肿瘤作用表示为百分比 δ 肿瘤生长抑制 (TGI),其如下所示进行计算:

[0608] 百分比 δ TGI = $1 - (dT \div dC) \times 100$,

[0609] 其中dT = 与分期时的值相比,处理组中平均肿瘤体积的变化,而dC = 与分期时的值相比,对照组中平均肿瘤体积的变化。

[0610] 从冷冻肿瘤制备溶胞产物:根据我们的体内规程通过CO₂窒息人道地使小鼠安乐死,并且将肿瘤切下并转移到Lysing Matrix A管中。加入含有蛋白酶抑制剂混合物和磷酸酶抑制剂混合物组I和II的RIPA溶胞缓冲液 (500 μ L),然后使用Fast Prep设备使样品均质化。将样品在冰上冷却30分钟,并通过在4 $^{\circ}$ C以14000rpm离心10分钟澄清之前进行另一个均质化循环。将澄清的溶胞产物转移到新的1.5mL管中,并测量蛋白质含量。然后,将溶胞产物在-80 $^{\circ}$ C储存直至分析。通过基本如上所述的免疫印迹分析样品 (参见实施例部分2.4)。

[0611] 4.17.2结果。

[0612] 如图36所示,在表达突变体BRAF的培养中生长的HT-29结肠直肠癌细胞中和在表达突变体KRAS的LOV0细胞 (图36,分别为左侧和中间印迹) 中用MEK抑制剂司美替尼处理后,总蛋白水平和pHER3蛋白水平两者提高。在司美替尼处理后,还在表达mut-BRAF的Colo205细胞中和表达突变体KRAS的DLD-1和HCT细胞中观察到了HER3的提高 (图36,右侧印迹,并且数据未显示)。在1 μ M和10 μ M剂量司美替尼时均发生了提高。通过在1 μ M和10 μ M剂量时所有细胞系中pERK的减少确认了司美替尼的活性。MEK的抑制导致ERK磷酸化的抑制。抗HER3抗体

2C2抑制HT-29和LOVO细胞中总的和pHER3两者。2C2还降低了Colo205和DLD-1细胞中的HER3。另外,2C2与司美替尼的共处理阻断了HT-29、LOVO和DLD-1细胞中司美替尼对总HER3和pHER3的诱导(图36,并且数据未显示)。在表达突变体KRAS的SW480结肠直肠癌细胞中,在未处理或司美替尼处理的细胞中未观察到可检测的HER3或pHER3。

[0613] 如图37A所示,与单独的司美替尼相比,30mg/kg的2C2-YTE与75mg/kg的司美替尼的组合处理在A549NSCLC异种移植中导致了额外的抗肿瘤效力。在没有额外处理的情况下,加合作用在肿瘤再生长的延迟中也是明显的(顶部部分)。在4天的一段时间内,来自用30mg/kg的2C2-YTE与75mg/kg的司美替尼的组合处理的小鼠的肿瘤溶胞产物的免疫印迹分析显示磷酸HER3和磷酸ERK完全被抑制。两种标志物用作2C2-YTE和司美替尼作用的药效动力学读出。用CRC异种移植模型HT-29(图37B,上部和下部部分)和LoVo(图37C,上部和下部部分)作出了类似的发现。另外,发现与单一处理相比,在用30mg/kg的2C2-YTE与75mg/kg的司美替尼的组合处理的HT-29肿瘤溶胞产物中磷酸AKT减少(图37B,下部分)。用75mg/kg司美替尼单独处理导致LoVo肿瘤提取物中磷酸HER3的增加,而这在用2C2-YTE和司美替尼的组合处理的肿瘤中被阻止(图37C,下部分)。在HARA-B中观察到了类似的结果(数据未显示)。

[0614] 在细胞培养中,在大部分所检查的模型中,观察到HER3蛋白水平对MEK抑制剂反应而增加,这表明HER3途径可能在MEK抑制剂的耐受性中起作用。在一些正位CRC和LC异种移植模型研究中,观察到2C2-YTE和司美替尼的组合提高了任一种试剂单独的抗肿瘤效力。这些数据支持2C2与MEK抑制剂(如司美替尼)结合的使用提高了抗肿瘤活性并且防止了耐受性。

[0615] 4.18食蟹猴中的毒理学研究

[0616] 4.18.1方法

[0617] 将20只雄性食蟹猴(*Macaca fascicularis*)分成4组(每组5只动物)并且施用总计5次剂量的载体对照或者10、30或120mg/kg的2C2-YTE。通过5分钟IV输注,以5mL/kg的剂量每周向动物剂量施用一次。在第32天(在剂量施用期的第29天的最终剂量施用后3天)每组尸体解剖3只动物,并且在恢复期的第43天每组尸体解剖2只动物(在剂量施用期的第29天的最终剂量施用后45天)。毒性的评价是基于一些因素的,其包括死亡率、临床观察、体重、剂量位点刺激得分、临床和解剖病理评价。

[0618] 分离食蟹猴血浆样品并使用抗HER3夹心形式通过用于定量游离sHER3的电化学发光(ECL)检测系统分析可溶性HER3(sHER3)水平。在2°C至8°C,用0.5µg/mL的2C2-YTE涂覆Meso Scale Discovery (MSD) 裸露96孔板(MSD,产品目录号L15XA-6/L11XA-6)过夜,随后用MSD阻断剂A(MSD,产品目录号R93BA-1)阻断。在室温下,将参比标准品和质量对照(QC),以及食蟹猴血浆未稀释的测试样品加入到阻断的板中1小时。当进行电化学刺激时,加入Sulfo-TAG(MSD,产品目录号R32AD-1)后,生物素化抗hErbB3/HER3抗体(R&D Systems,产品目录号BAM348)导致发光。捕获ECL信号并记录在MSD Sector成像仪2400上。所产生的光的量与食蟹猴血浆样品中sHER3的量直接相关。将原始数据(ECL计数)输出到SOFTmax® PRO中。使用5参数拟合程序拟合重组人HER3标准品的标准曲线。使用SOFTmax PRO的统计函数,根据标准曲线计算食蟹猴血浆HER3浓度。

[0619] 另外,采集皮肤活组织检查样品用于生物分析。简言之,在动物皮肤上画出相匹配

的10mm环,并且将约100 μ L 0.1mg/mL的PBS或HRG皮内注射到每个环的中心。约20分钟后,从每个注射位点采集皮肤样品并快速冷冻。作为另外一种选择,从每个位点采集相匹配的活组织检查样品(先前未进行皮内注射)并在室温下在有或者没有100 μ g/mL HRG的培养基中孵育约30分钟,然后用冰冷的PBS清洗两次。然后,将清洗的样品快速冷冻。然后,使用Fast Prep仪器(MP Biomedicals)在含有RIPA溶胞缓冲液和蛋白酶抑制剂混合物(Sigma-Aldrich)和磷酸酶抑制剂混合物组I和II(EMD-Millipore)的Lysing Matrix A管(MP Biomedicals)中将组织均质化。然后,在4 $^{\circ}$ C通过14000rpm离心5分钟进行澄清前,对样品进行冻融循环和另一个均质化循环。将澄清的溶胞产物转移到新的1.5mL管中,并测量蛋白质含量。使用夹心ELISA测定确定总HER3和pHER3水平。

[0620] 4.18.2结果

[0621] 在食蟹猴中进行了具有6周恢复期的2C2-YTE的非GLP,1个月重复剂量毒性研究以评价2C2-YTE的毒性和活性(当通过IV输注向食蟹猴每周施用1次,施用至少1个月(5次总剂量)时)并且在6周恢复期后评价任何作用的可逆性、持续性或延迟发生。在雄性食蟹猴中,在每周IV施用(5分钟输注)一次多至120mg/kg/剂量2C2-YTE,施用5周(5次总剂量)后,未观察到副作用。

[0622] 在食蟹猴的皮肤中,通过体内和离体评价确认了2C2-YTE阻断HRG诱导的pHER3的能力。在接受静脉内2C2-YTE的所有动物中观察到了循环可溶性HER3的完全抑制。用HRG离体刺激皮肤活组织检查导致pHER3:tHER3比值升高,这表明可以通过作为主要HER3配体的HRG激活食蟹猴皮肤中存在的HER3。在剂量施用期结束时,在所有2C2-YTE处理组中实现了HRG诱导的pHER3的完全抑制(数据未显示)。因此,在食蟹猴皮肤活组织检查样品中2C2-YTE体内和离体阻断了HRG诱导的HER3磷酸化。

[0623] 作为参考并入

[0624] 在本文中所提及的所有出版物和专利如具体并且单独指明每个单独的出版物或专利作为参考并入的一样以它们的全部内容作为参考并入本文。另外,出于全部目的,2011年11月23日提交的美国临时专利申请No.61/563092;2012年6月7日提交的美国临时专利申请No.61/656670和2012年11月5日提交的美国临时专利申请No.61/722558以它们的全部内容作为参考并入。

[0625] 具体方面的上述说明充分显示了本发明的一般性质,从而通过应用本领域技术范围内的知识,其他人无需过度实验就可以在不背离本发明的一般概念的情况下容易地改变和/或修改用于这些具体方面的多种应用。因此,基于本文所提供的教导和指导,这些修改和改变旨在处于所公开方面的等价形式的含义和范围内。应理解本文中的表达方式或术语是出于说明而不是限制的目的,从而根据教导内容和指导,技术人员将理解本发明说明书的术语或表达方式。

SEQUENCE LISTING

<110> 医学免疫有限责任公司
 <120> 特异于HER3的结合分子及其用途
 <130> 486406-146077/081408833-E
 <140> PCT/US2012/066038
 <141> 2012-11-20
 <150> US 61/563,092
 <151> 2011-11-23
 <150> US 61/656,670
 <151> 2012-6-7
 <150> US 61/722,558
 <151> 2012-11-5
 <160> 48
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列
 <400> 1

[0001]

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

<210> 2
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>

<223> 合成序列

<400> 2

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

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

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

Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

[0002]

<210> 3

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 3

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro
85 90 95

Pro Gly Glu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 4
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列
<400> 4

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

[0003]

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Gly Leu
85 90 95

Pro Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 5
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列
<400> 5

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ile Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 6
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 6

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

[0004]

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 7
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 7

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 8
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 8

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

[0005]

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Pro Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 9
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 9

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Glu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 10

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

[0006]

<220>

<223> 合成序列

<400> 10

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro
85 90 95

Ser Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 11
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 11

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
 20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

[0007]

Arg Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 12
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 12

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

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

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

Ser Ile Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 13

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

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

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

[0008]

Ser Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Gly Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 14
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 14

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

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

<210> 15
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 15

[0009]

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

<210> 16
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 16

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
 20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro
 85 90 95

Ser Gly Glu Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

[0010]

<210> 17

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 17

Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Met Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn
 20 25 30

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

Ile Ser Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 18

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 19

Ser Gly Ser Leu Ser Asn Ile Gly Leu Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

[0011]

<220>
<223> 合成序列

<400> 20

Arg Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Leu Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 21

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 22
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 22

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Glu Val
1 5 10

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 23

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro Pro Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 24

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro Ser Gly Glu Ala
1 5 10

[0012]

<210> 25
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 25

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Pro Gly Glu Val
1 5 10

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 26

Ala Ala Trp Asp Asp Gly Leu Pro Gly Glu Val
1 5 10

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 27

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ile Gly Glu Val
1 5 10

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 28

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 29

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Pro Ser Gly Glu Val
1 5 10

[0013]

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 30

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Arg Gly Glu Val
1 5 10

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 31

Tyr Tyr Tyr Met Gln
1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 32

Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 33

Ile Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 34

Val Ile Gly Ser Ser Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 35

Val Gly Leu Gly Asp Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 36

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0014]

<223> 合成序列

<400> 36

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

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

<210> 37

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 37

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 38

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

[0015]

<400> 38

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 39

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 40

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 40

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys
20

<210> 41
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 41

Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Ser
1 5 10 15

<210> 42
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 42

[0016] Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser
1 5 10 15

Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 43

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
1 5 10

<210> 44
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 44

Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Met Ser Cys
20

<210> 45
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

[0017]

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

95

[0019]

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 47
<211> 648
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 47
cagtacgaat tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag tgtcaccatg 60
tcttgttctg ggagcagctc caatatcgga cttaattatg tatectggta ccagcacctc 120
ccaggaacgg cccccaact cctcatctct aggaataatc agcgccctc aggggtcct 180

[0020]

gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg	240
tccgaagatg aggcctgatta ttattgtgca gcatgggatg acagcctgag tggtagagga	300
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtcctc ggctagccca aggcctgccc ctcggtcact	360
ctgttccccgc cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg ccacactggt gtgtctcata	420
agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag	480
gcgggagtg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc	540
tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg	600
catgaagggg gcaccgtgga gaagacagtg gccctgcag aatgctct	648

<210> 48
 <211> 356
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 48	
gaagttcaat tgtagagtc tgggtggcgg cttgttcagc ctggtggttc ttacgtctt	60
tcttgcgctg cttccggatt cactttctct tattactata tgcagtgggt tcgccaagct	120
cctggtaaag gtttgagtg ggtttcttat atcggttctt ctggtggcgt tactaattat	180
gctgactccg ttaaaggctc cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagtaggt	300
cttgggggatg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc aagcgc	356

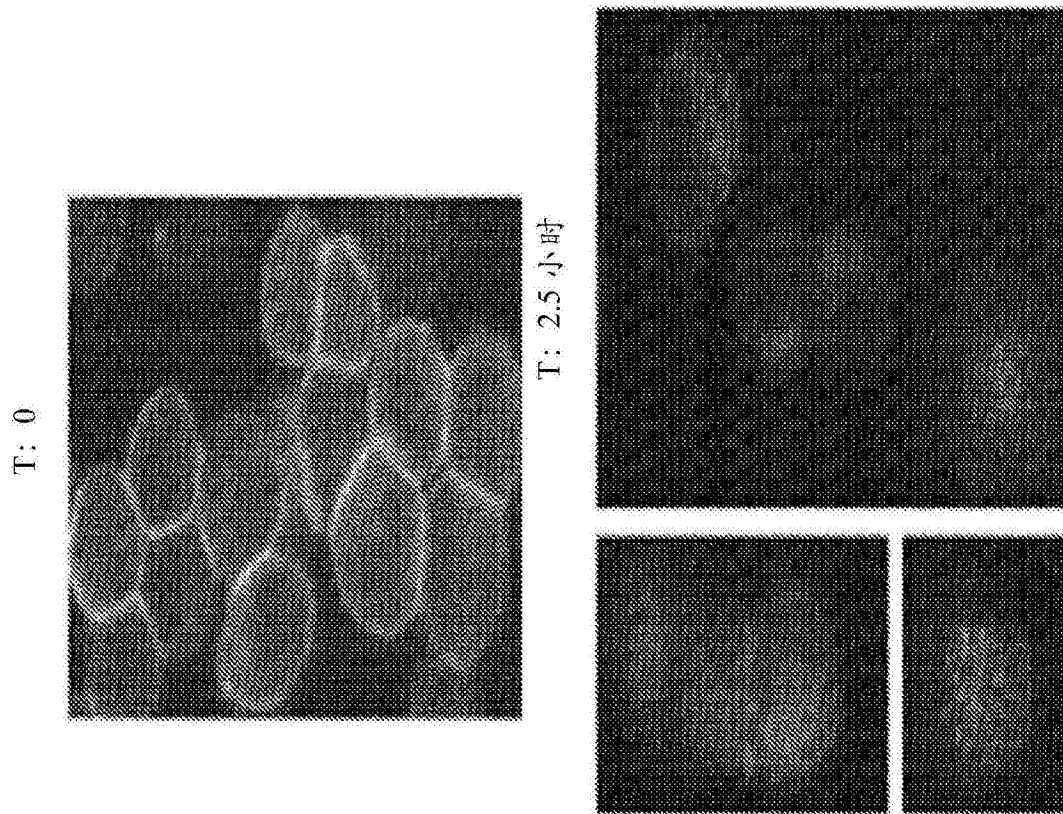


图1

Kabat #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	28	
CL16 (原始)	Q	T	E	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	S	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	S	N	I
CL16 (GL)	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	S	N	I
5H6	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	S	N	I
8A3	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	S	N	I
4H6	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	R	G	S	S	S	S	N	I
6E3	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	L	S	N	I	
2B11	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	S	N	I
2D1	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	S	N	I
3A6	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	S	N	I
4C4	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	S	N	I
CDR1																															

Kabat #	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
CL16 (原始)	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V	
CL16 (GL)	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V	
5H6	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V	
8A3	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V	
4H6	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V	
6E.3	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V	
2B11	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V	
2D1	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V	
3A6	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V	
4C4	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S	G	V	
CDR2																														

图2A部分I

Kabat#	8861886288638864886588668867886888698870887188728873887488758876887788788879888088818882888388848885888688878888
CL16 (原始)	PDRFSGSKSGTSA ⁸⁸⁶¹ SLAISGLRSEDEADYYC
CL16 (GL)	PDRFSGSKSGTSA ⁸⁸⁶¹ SLAISGLRSEDEADYYC
5H6	PDRFSGSKSGTSA ⁸⁸⁶¹ SLAISGLRSEDEADYYC
8A3	PDRFSGSKSGTSA ⁸⁸⁶¹ SLAISGLRSEDEADYYC
4H6	PDRFSGSKSGTSA ⁸⁸⁶¹ SLAISGLRSEDEADYYC
6E3	PDRFSGSKSGTSA ⁸⁸⁶¹ SLAISGLRSEDEADYYC
2B11	PDRFSGSKSGTSA ⁸⁸⁶¹ SLAISGLRSEDEADYYC
2D1	PDRFSGSKSGTSA ⁸⁸⁶¹ SLAISGLRSEDEADYYC
3A6	PDRFSGSKSGTSA ⁸⁸⁶¹ SLAISGLRSEDEADYYC
4C4	PDRFSGSKSGTSA ⁸⁸⁶¹ SLAISGLRSEDEADYYC

Kabat#	88918892889388948895889688978898889989008901890289038904890589068907
CL16 (原始)	AAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
CL16 (GL)	AAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
5H6	AAWDD ⁸⁸⁹⁵ GLPGEVFGGGTKLTVL
8A3	AAWDDSL ⁸⁸⁹⁶ IGEVFGGGTKLTVL
4H6	AAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
6E3	AAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
2B11	AAWDDSL ⁸⁸⁹⁶ IGEVFGGGTKLTVL
2D1	AAWDDSLSGE ⁸⁸⁹⁹ AFGGGTKLTVL
3A6	AAWDDSPSGEVFGGGTKLTVL
4C4	AAWDDSL ⁸⁸⁹⁵ RGEVFGGGTKLTVL

CDR3

图2A部分II

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
CL16 VH	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	T	T	P	S
15D12.1 VH	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	T	T	P	S
15D12.2 VH	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	T	T	P	S

Kabat#	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52 ^a	53	54	55	56	57	58	59
CL16 VH	Y	Y	Y	M	Q	W	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	T	S	Y	I	G	S	S	G	G	V	T	N	Y
15D12.1 VH	Y	Y	Y	M	Q	W	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	T	S	Y	I	G	S	S	G	G	V	T	N	Y
15D12.2 VH	Y	Y	Y	M	Q	W	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	T	S	Y	I	G	S	S	G	G	V	T	N	Y

CDR1CDR2

图2B部分I

Kabat#	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82 ^a	82 ^b	82 ^c	83	84	85
CL16 VH	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	L	R	A	E
15D12.1 VH	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	L	R	A	E
15D12.2 VH	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	L	R	A	E

Kabat#	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100 ^a	100 ^b	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
CL16 VH	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	V	G	L	G	D	A	F	D	I	N	G	Q	G	T	M	Y	T	T	S	S
15D12.1 VH	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	V	G	L	G	D	A	F	D	I	N	G	Q	G	T	M	Y	T	T	S	S
15D12.2 VH	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	V	G	L	G	D	A	F	D	I	N	G	Q	G	T	M	Y	T	T	S	S

CDR3

图2B部分II

Kabat #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b		
CL16 (原始)	Q	E	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	E	V	T	N	S	C	S	G	S	S	S	N			
CL16 (GL)	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	N		
1A4	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	N		
2C2	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	N		
3E.1	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	R	G	S	S	S	N		
2F10	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	N		
2B11	Q	S	V	L	T	Q	P	P	S	-	A	S	G	T	P	G	Q	R	V	T	I	S	C	S	G	S	S	S	N		
																												CDR1			

Kabat #	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
CL16 (原始)	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	E	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S
CL16 (GL)	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S
1A4	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S
2C2	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S
3E.1	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S
2F10	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S
2B11	I	G	L	N	Y	V	S	W	Y	Q	Q	L	P	G	T	A	P	K	L	L	I	S	R	N	N	Q	R	P	S
																												CDR2	

图2C部分I

Kabat #	5758596061626364656667686970717273747576777879808182838485
CL16 (原始)	GVPDRFSGSGKSGTSAASLAISGLRSEDEAD
CL16 (GL)	GVPDRFSGSGKSGTSAASLAISGLRSEDEAD
1A4	GVPDRFSGSGKSGTSAASLAISGLRSEDEAD
2C2	GVPDRFSGSGKSGTSAASLAISGLRSEDEAD
3E.1	GVPDRFSGSGKSGTSAASLAISGLRSEDEAD
2F10	GVPDRFSGSGKSGTSAASLAISGLRSEDEAD
2B11	GVPDRFSGSGKSGTSAASLAISGLRSEDEAD

Kabat #	8878888990919293949596979899100101102103104105106107
CL16 (原始)	YYCAAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
CL16 (GL)	YYCAAWDDSLSGEVFGGGTKLTVL
1A4	YYCAAWDDSPPGEAFFGGGTKLTVL
2C2	YYCAAWDDSPPGEAFFGGGTKLTVL
3E.1	YYCAAWDDSPPGEAFFGGGTKLTVL
2F10	YYCAAWDDSPSGEAFFGGGTKLTVL
2B11	YYCAAWDDSLPGEVFGGGTKLTVL
<u>CDR3</u>	

图2C部分II

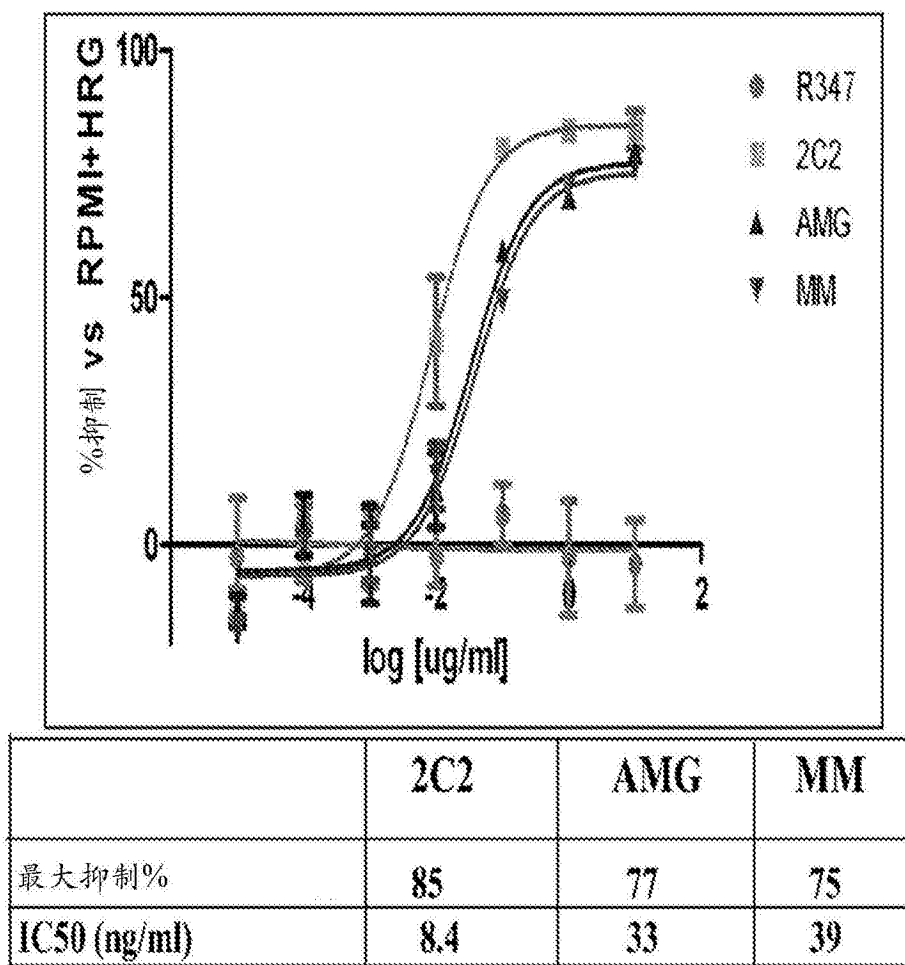
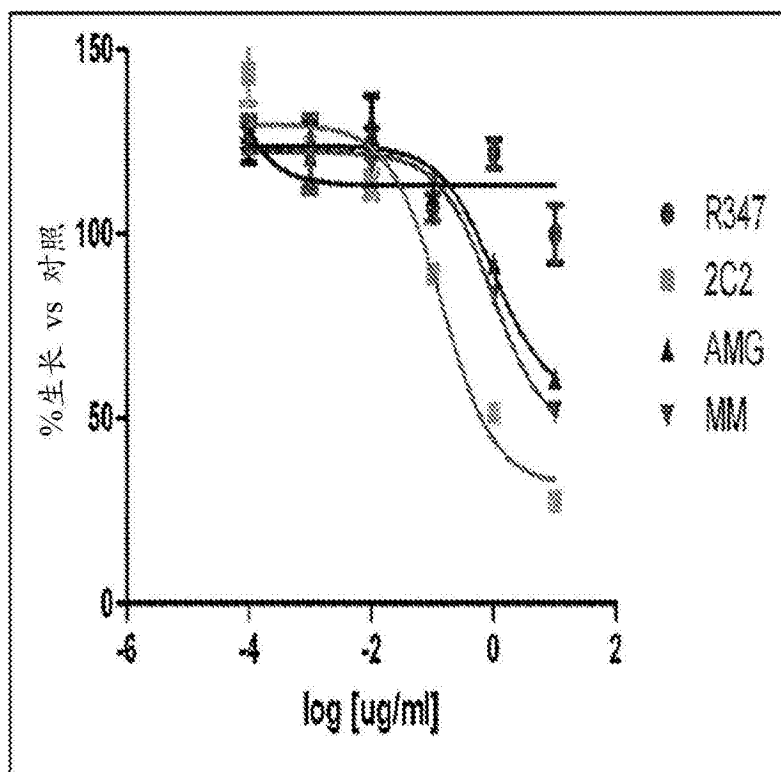
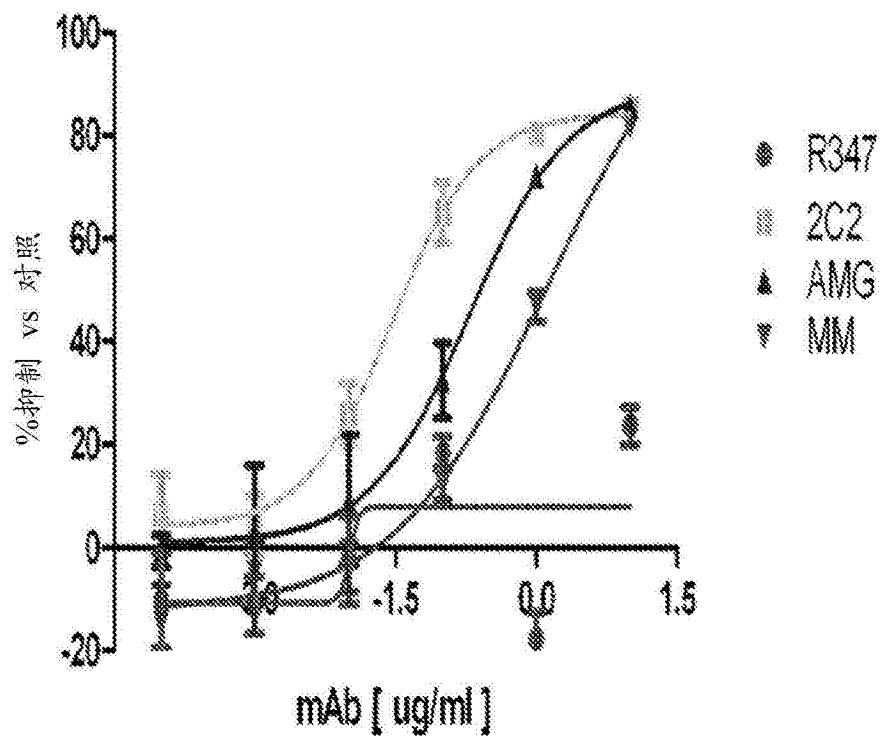


图3



	2C2	AMG	MM
最大抑制%	72	39	49
IC50 (ug/ml)	0.14	0.99	0.95

图4



	2C2	AMG	MM
IC50 (ug/ml)	0.027 ug/ml	1.729 ug/ml	0.209 ug/ml

图5

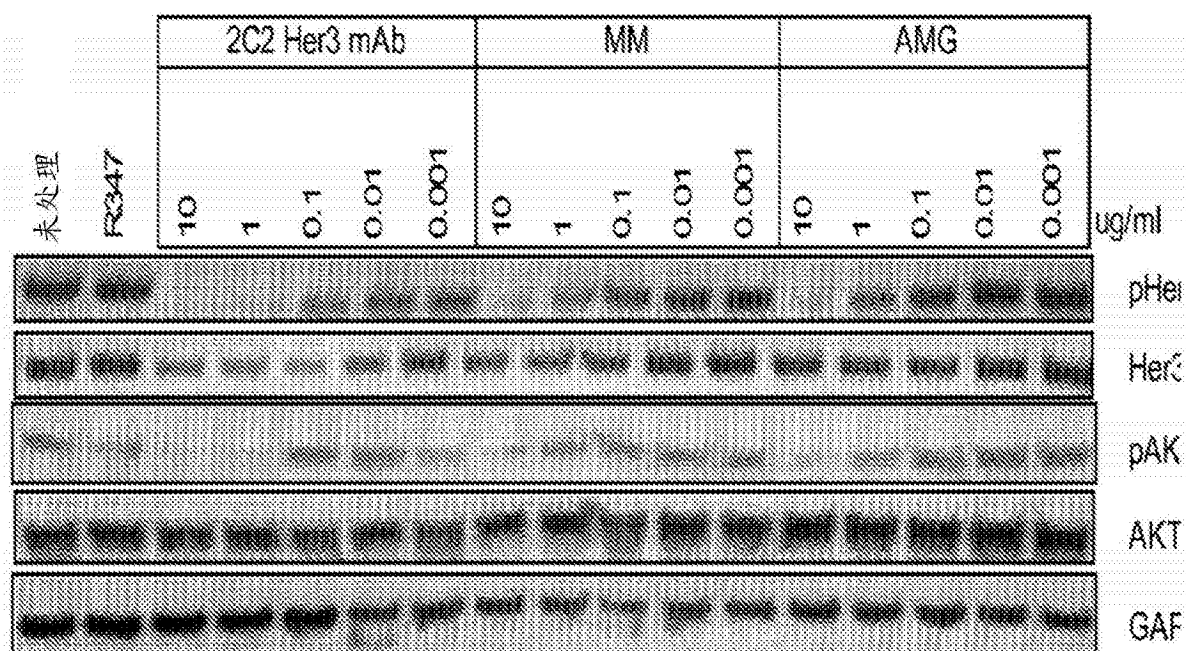


图6

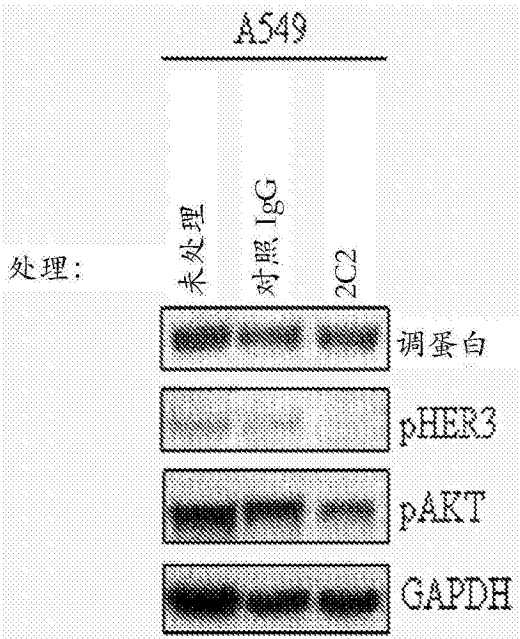
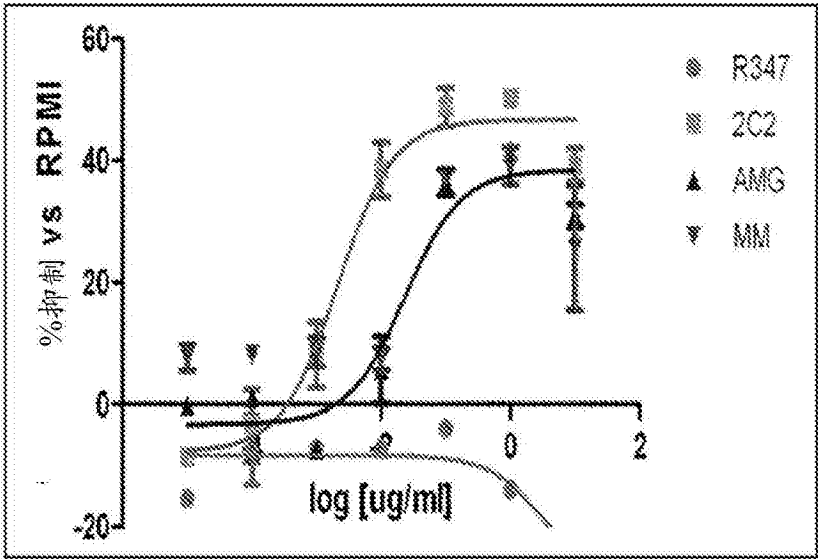
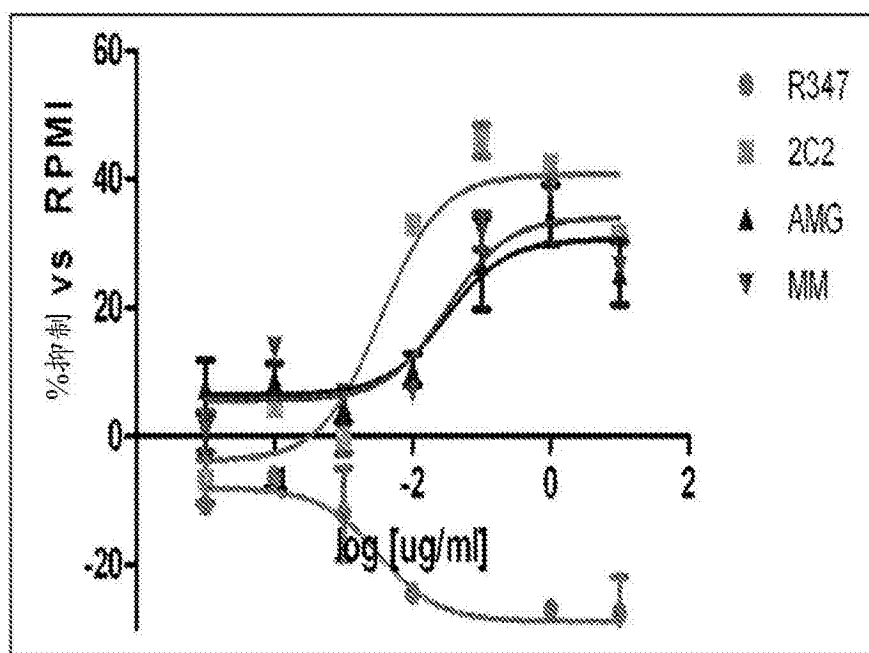


图7



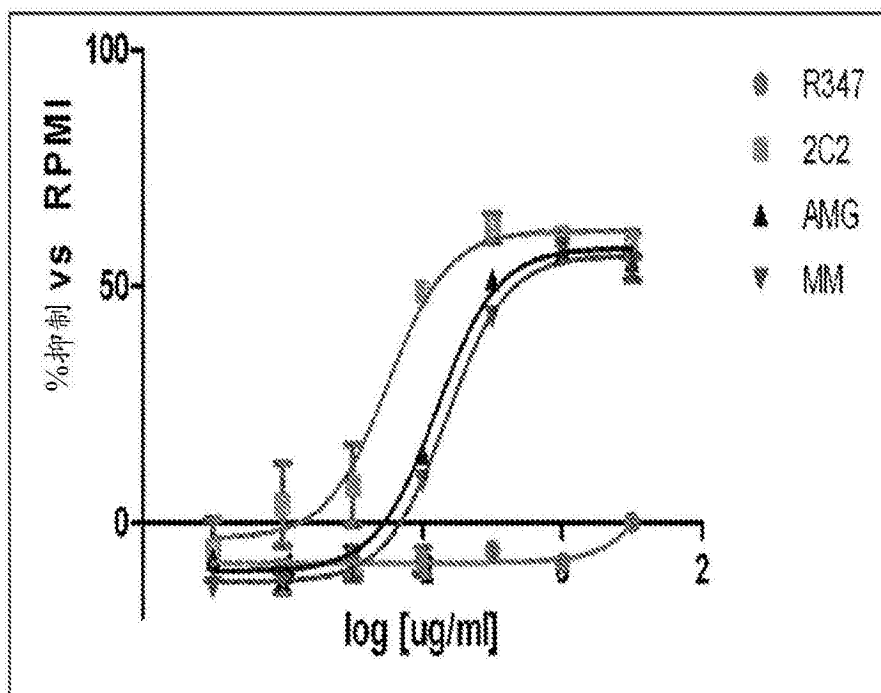
	2C2	AMG	MM
最大抑制%	54	41	
IC50 (ng/ml)	2	23	

图8A



	2C2	AMG	MM
最大抑制%	45	24	28
IC50 (ng/ml)	3.5	31	32

图8B



	2C2	AMG	MM
最大抑制%	62	58	57
IC50 (ng/ml)	3.2	16.1	22.1

图8C

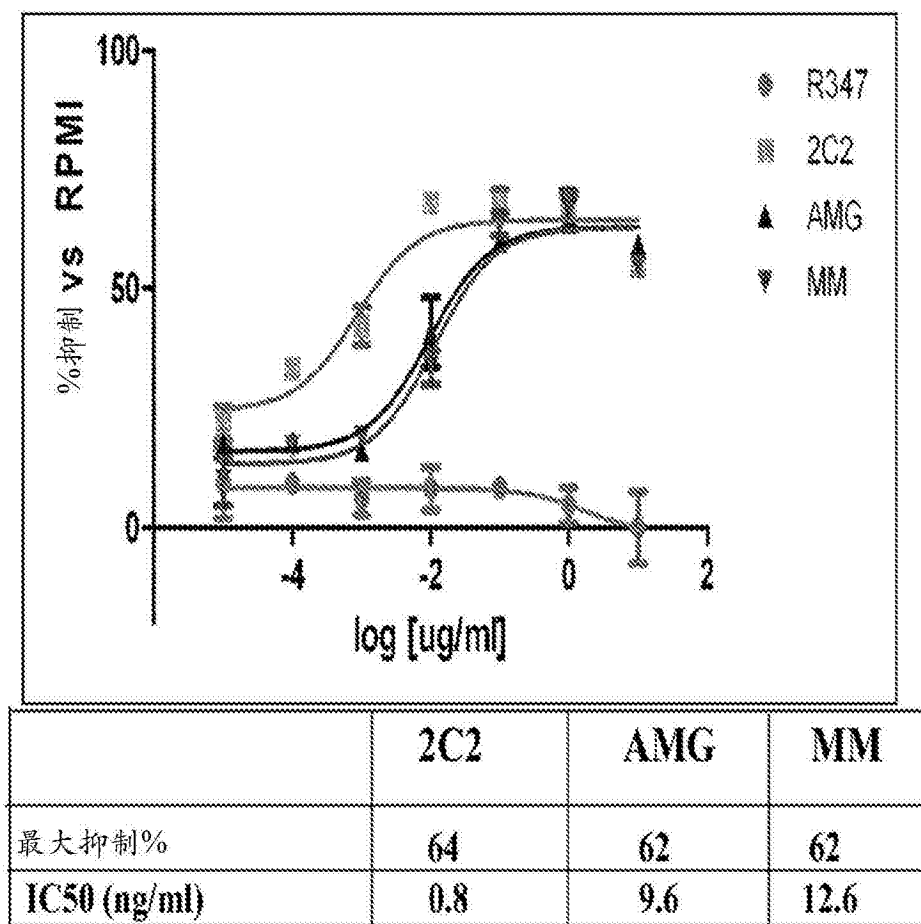
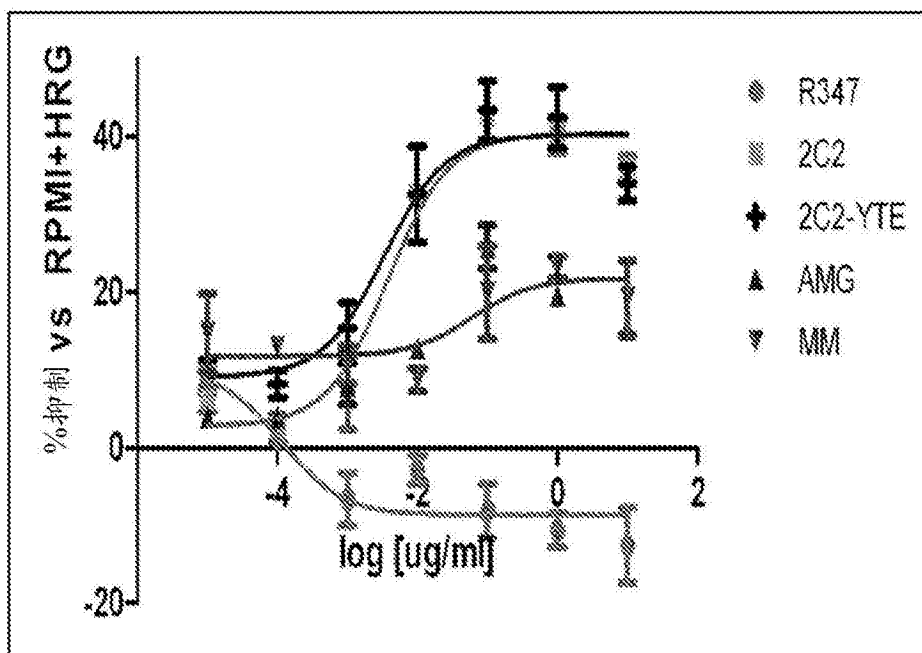
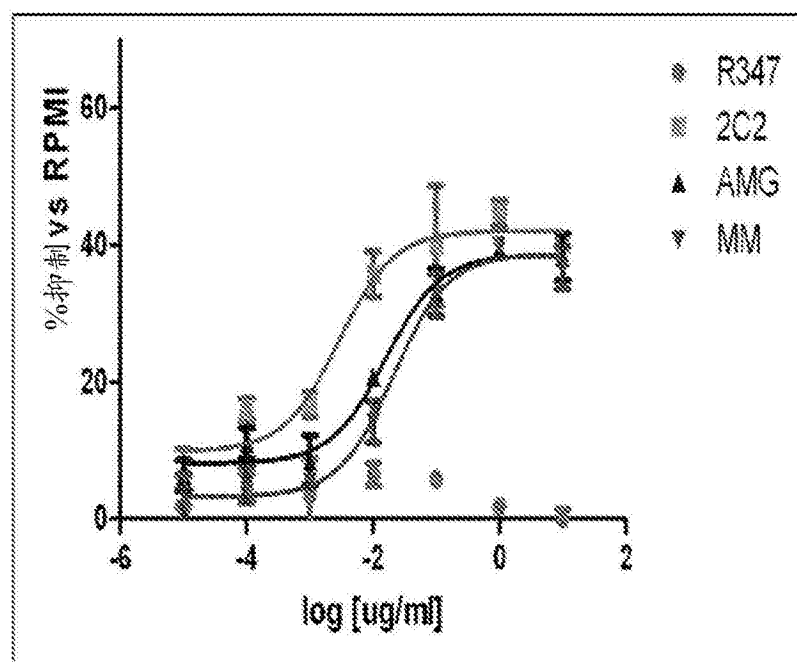


图8D



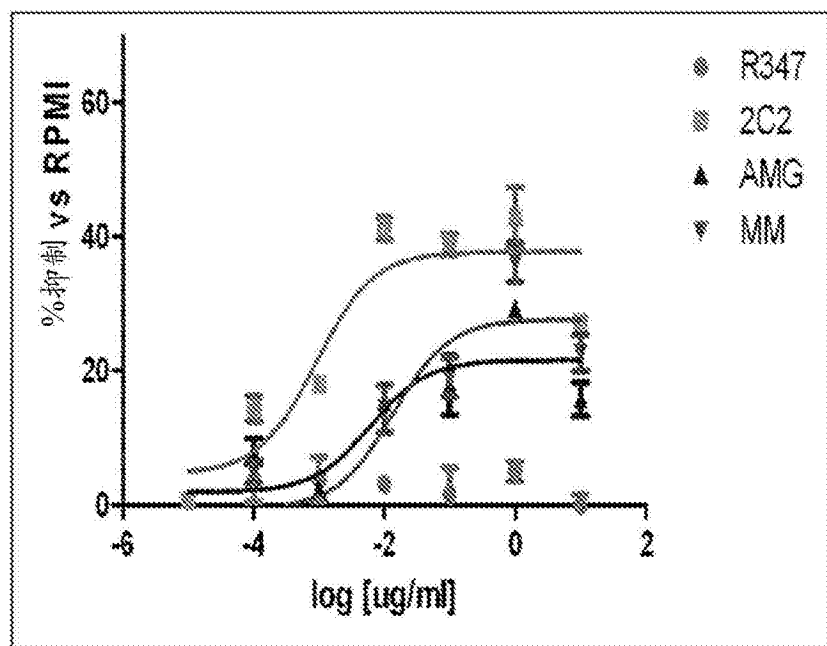
	2C2	AMG	MM
IC50 (ug/ml)	0.004	>10	>10
最大抑制%	41		

图8E



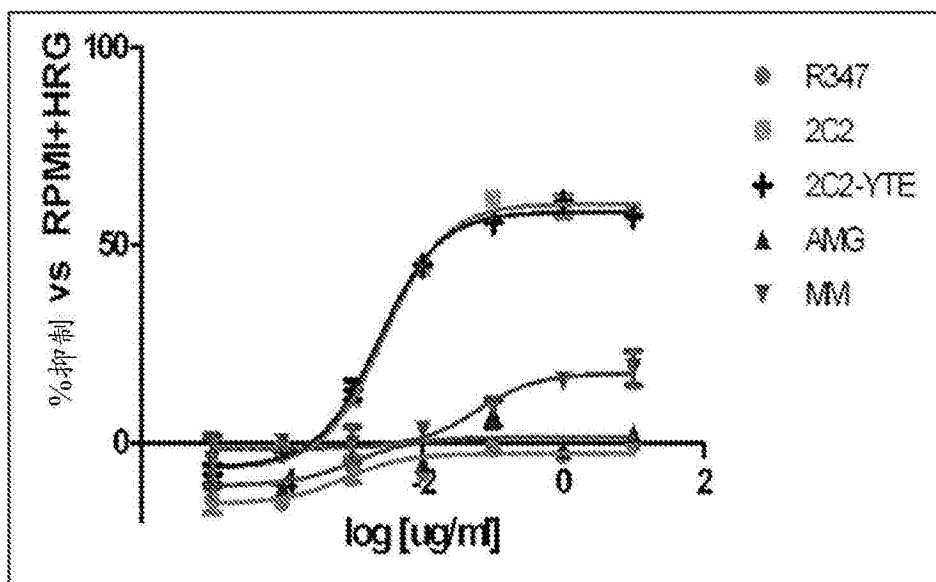
	2C2	AMG	MM
最大抑制%	42	38	38
IC50 (ng/ml)	2.9	15.8	21.2

图9A



	2C2	AMG	MM
最大抑制%	38	22	28
IC50 (ng/ml)	0.9	6.2	13.6

图9B



	2C2	AMG	MM
IC50 (ug/ml)	0.003	>10	>10
最大抑制%	60	1	17

图9C

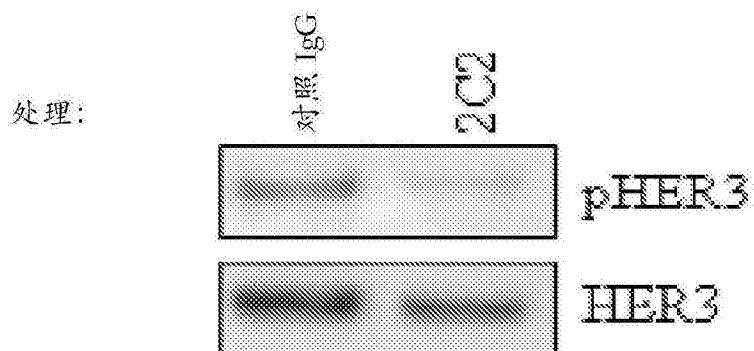


图10A

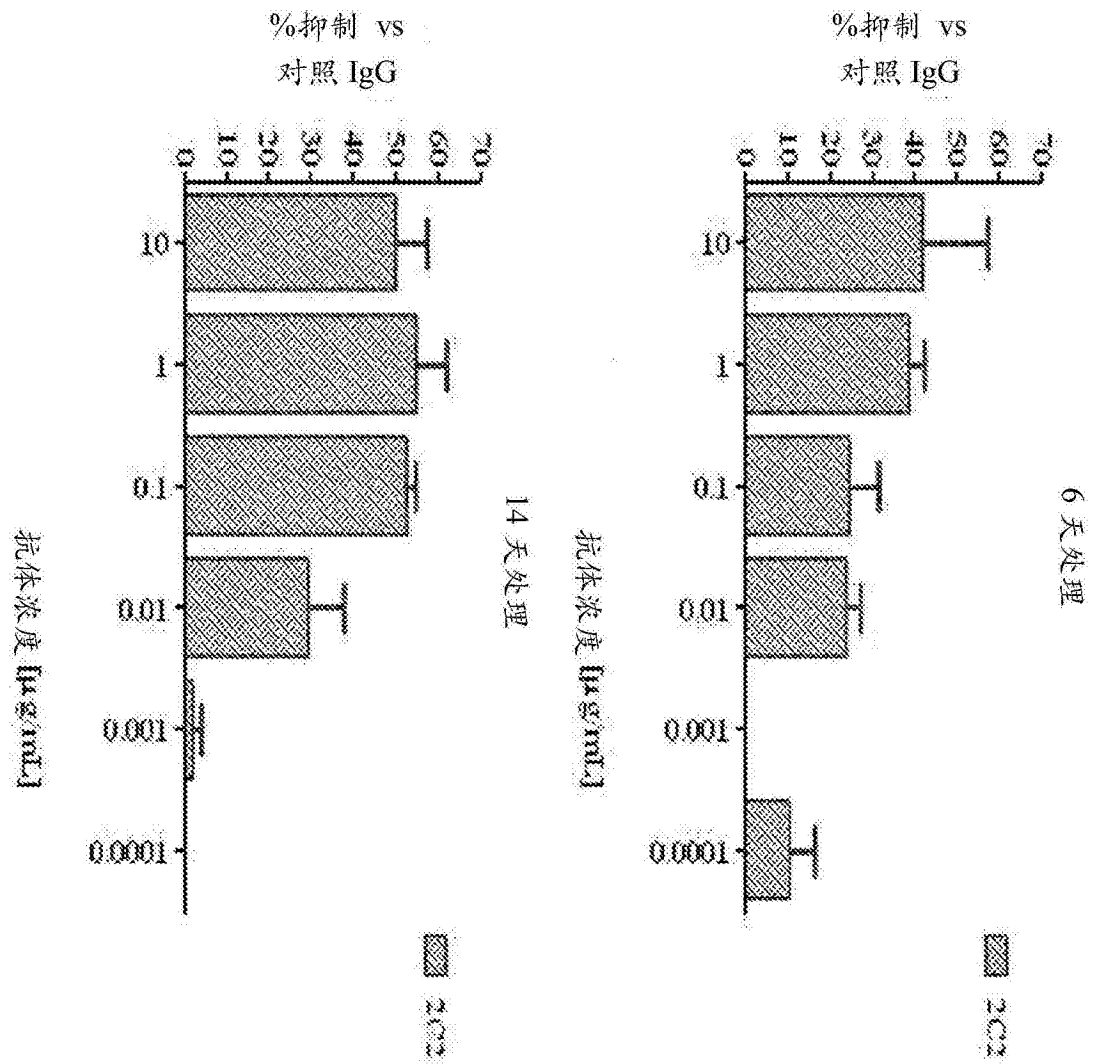


图10B

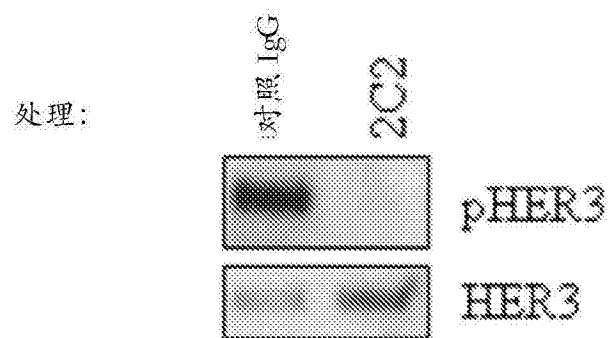


图11

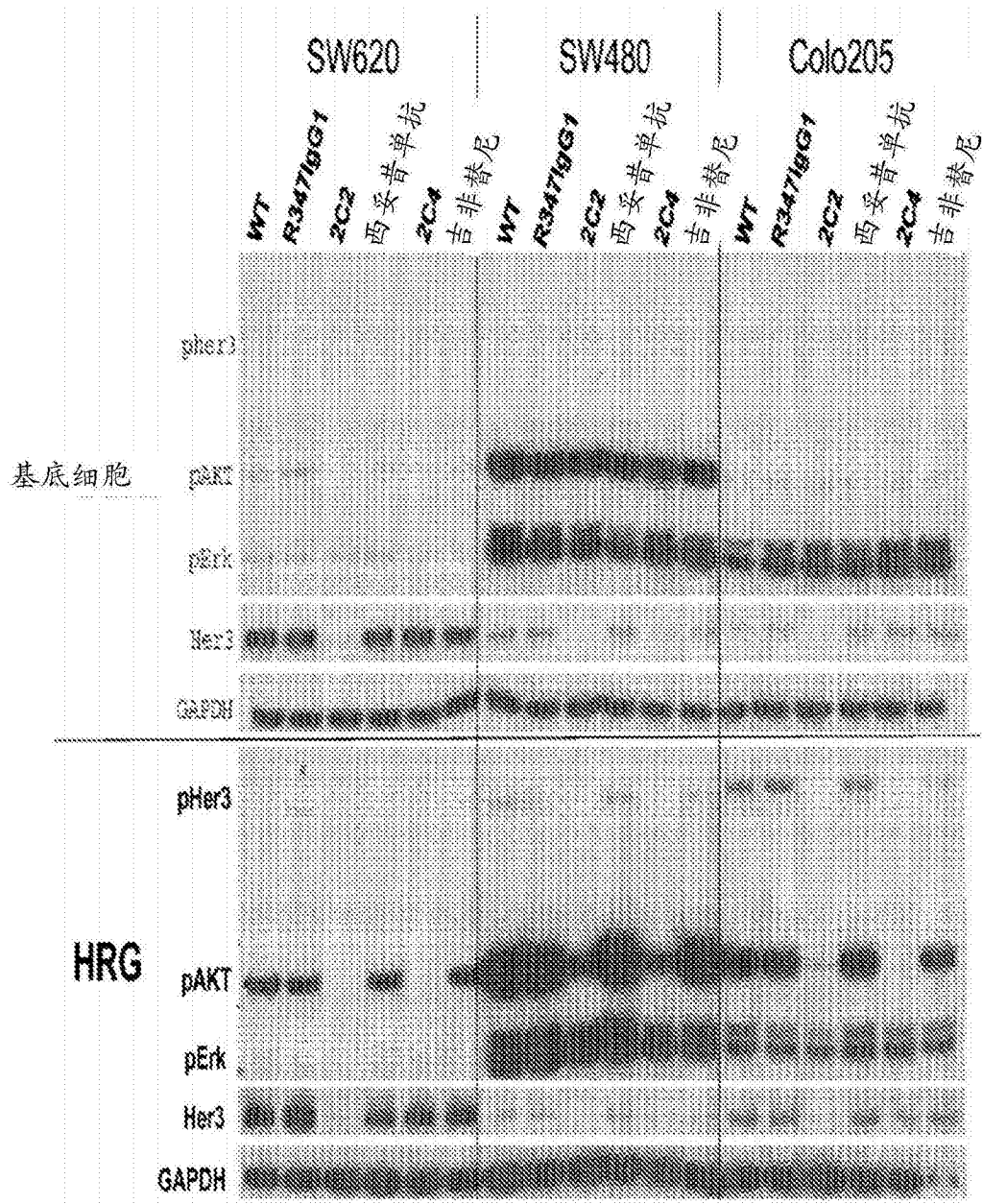


图12A

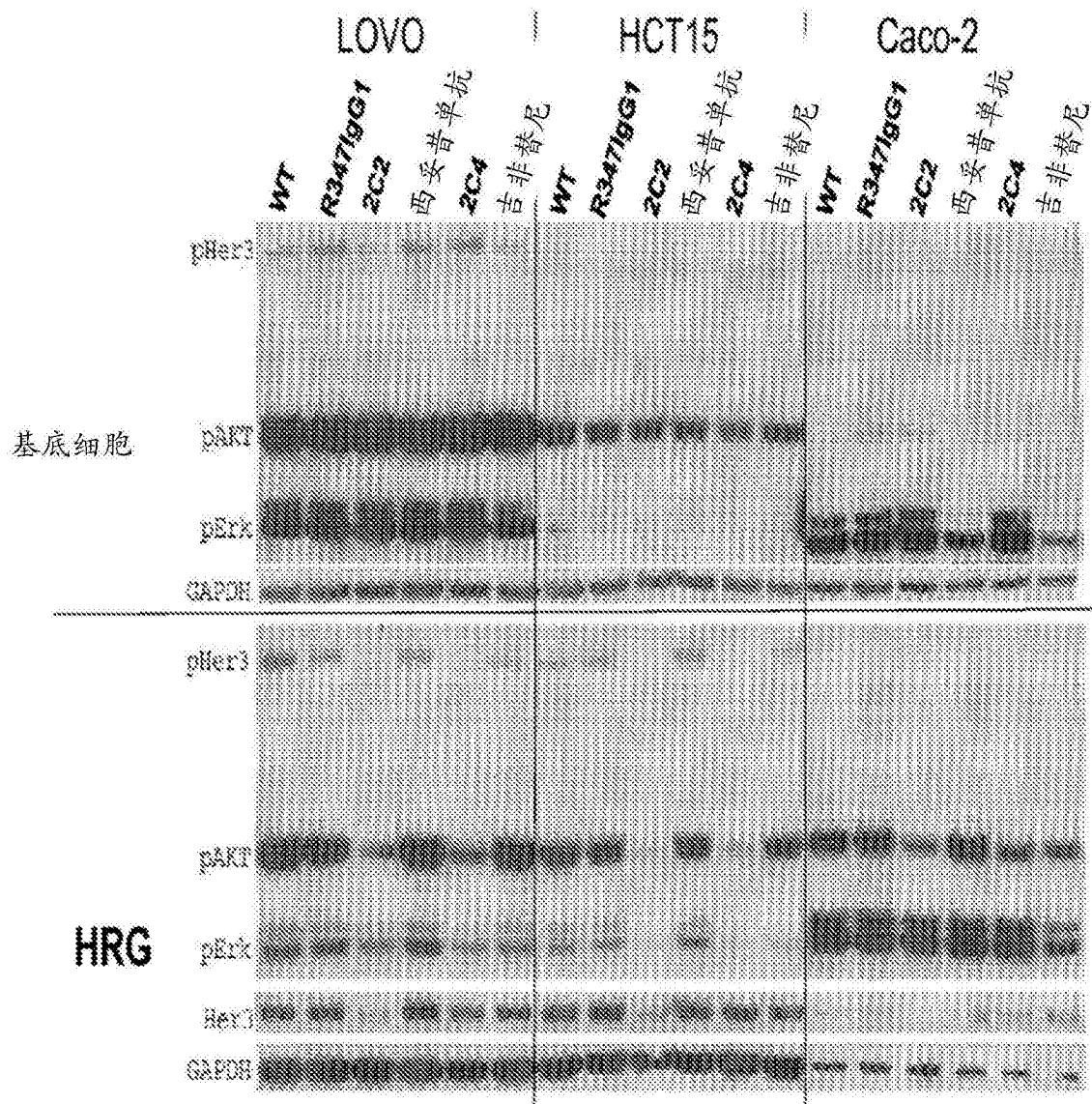


图12B

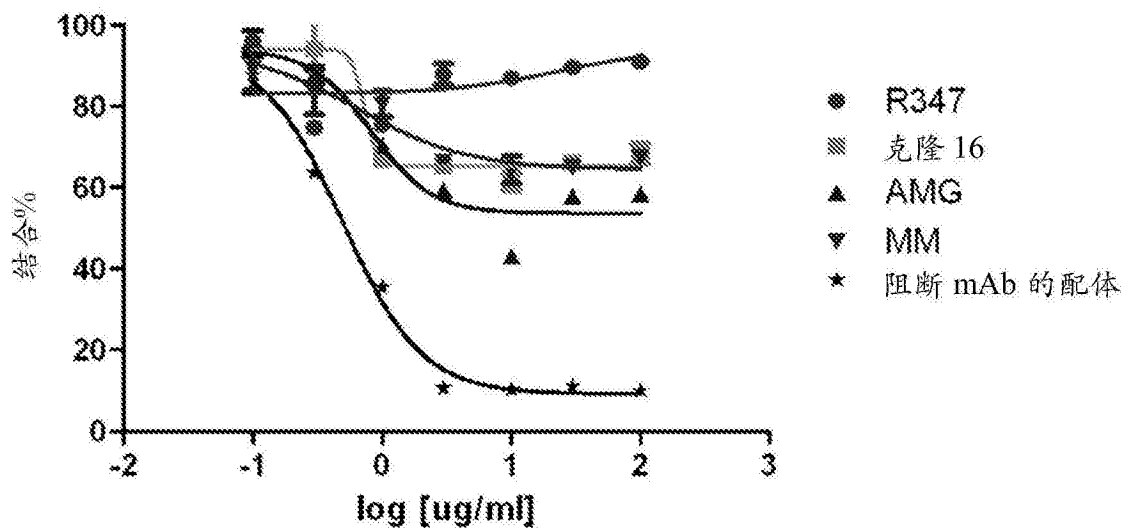


图13

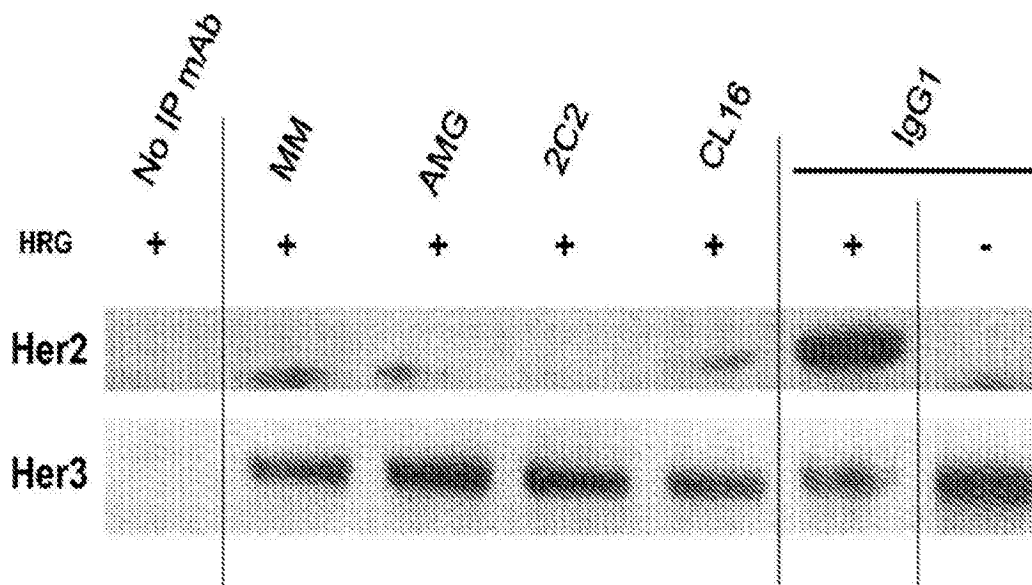


图14A

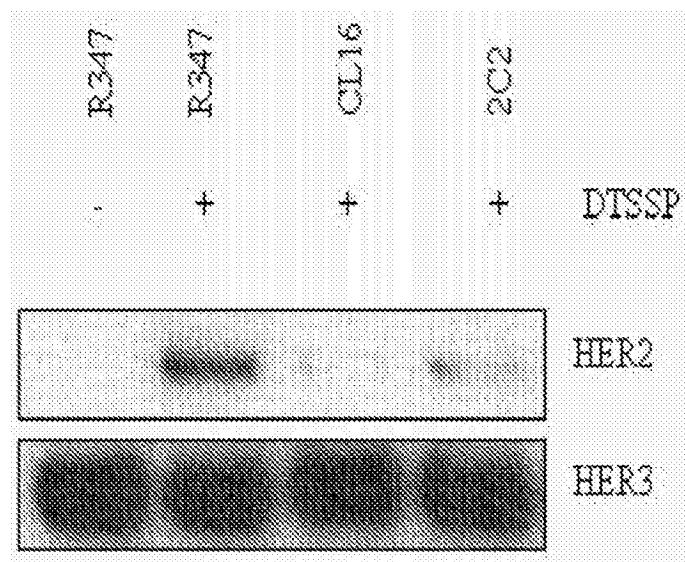


图14B

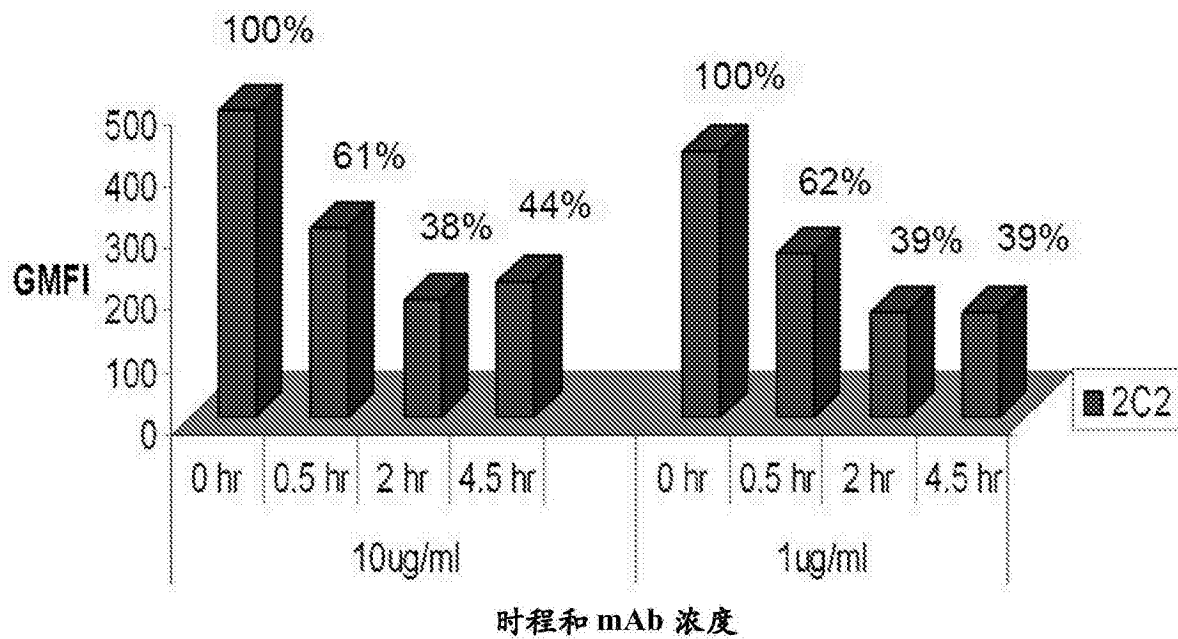


图15A

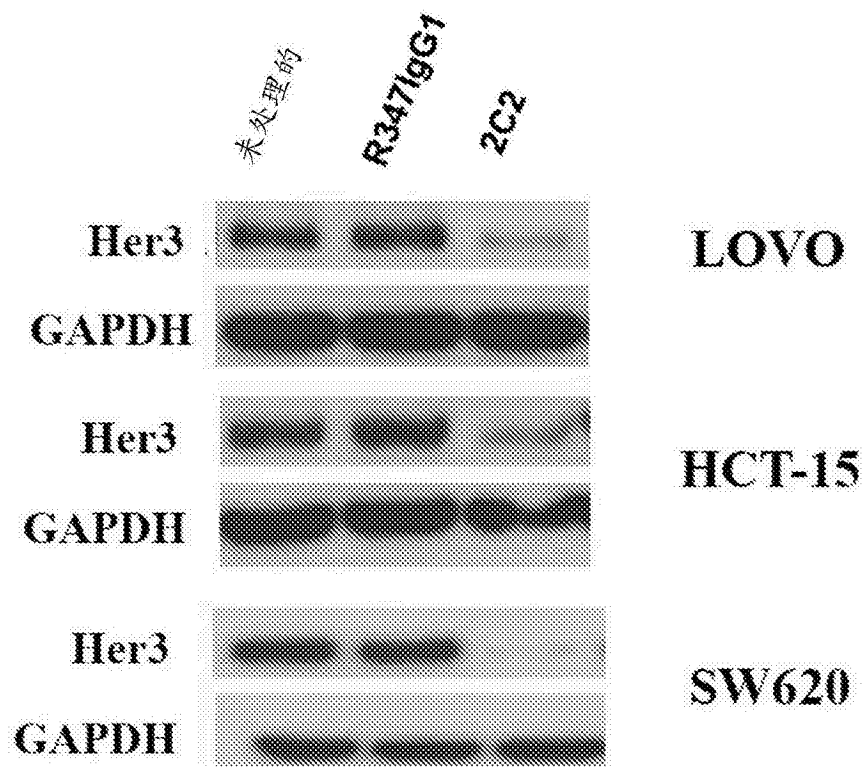


图15B

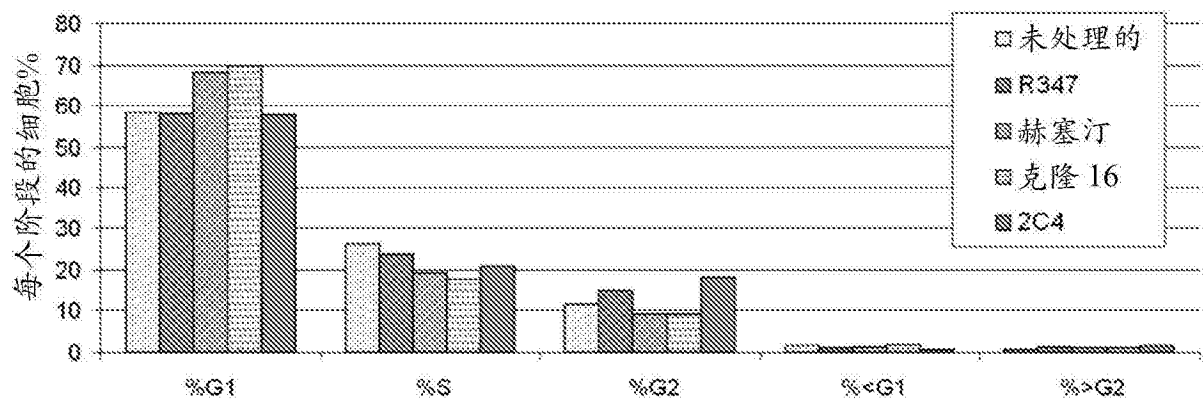


图16

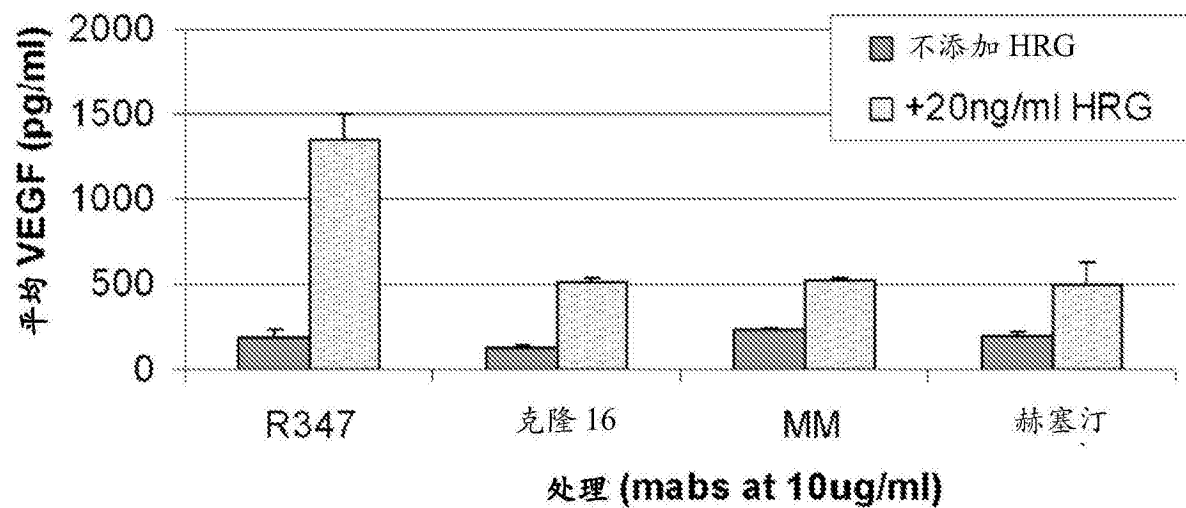


图17A

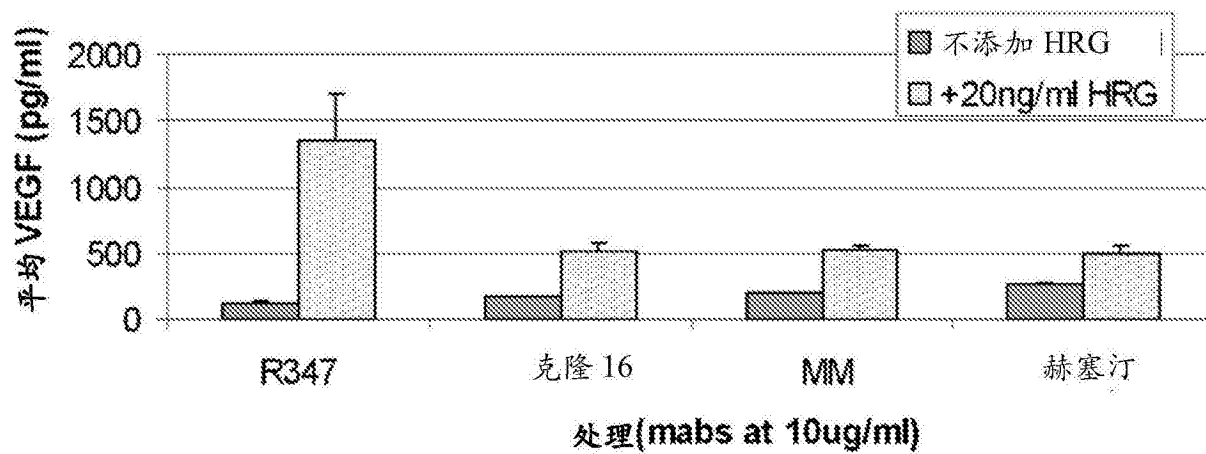


图17B

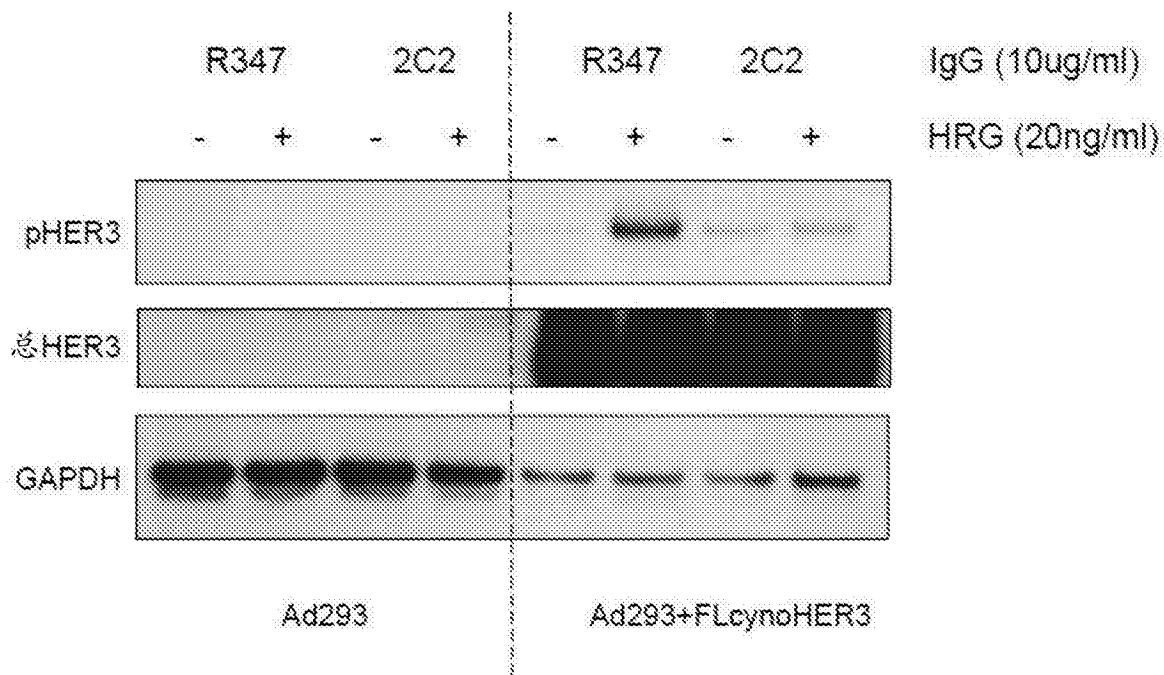


图18A

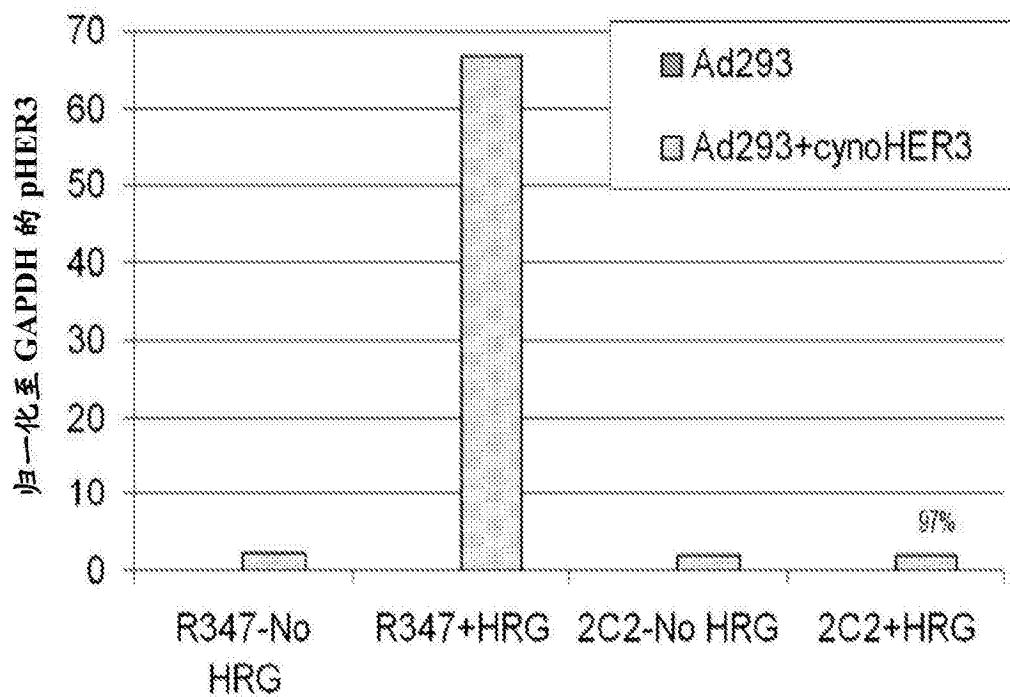


图18B

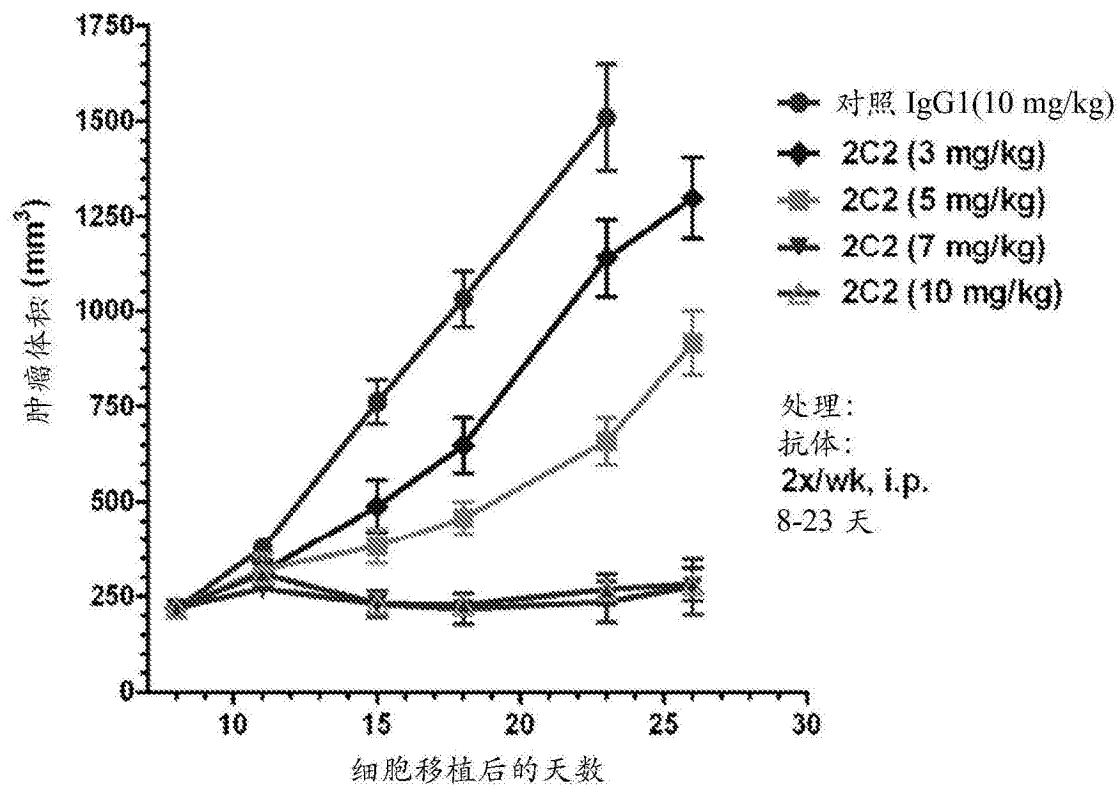


图19A

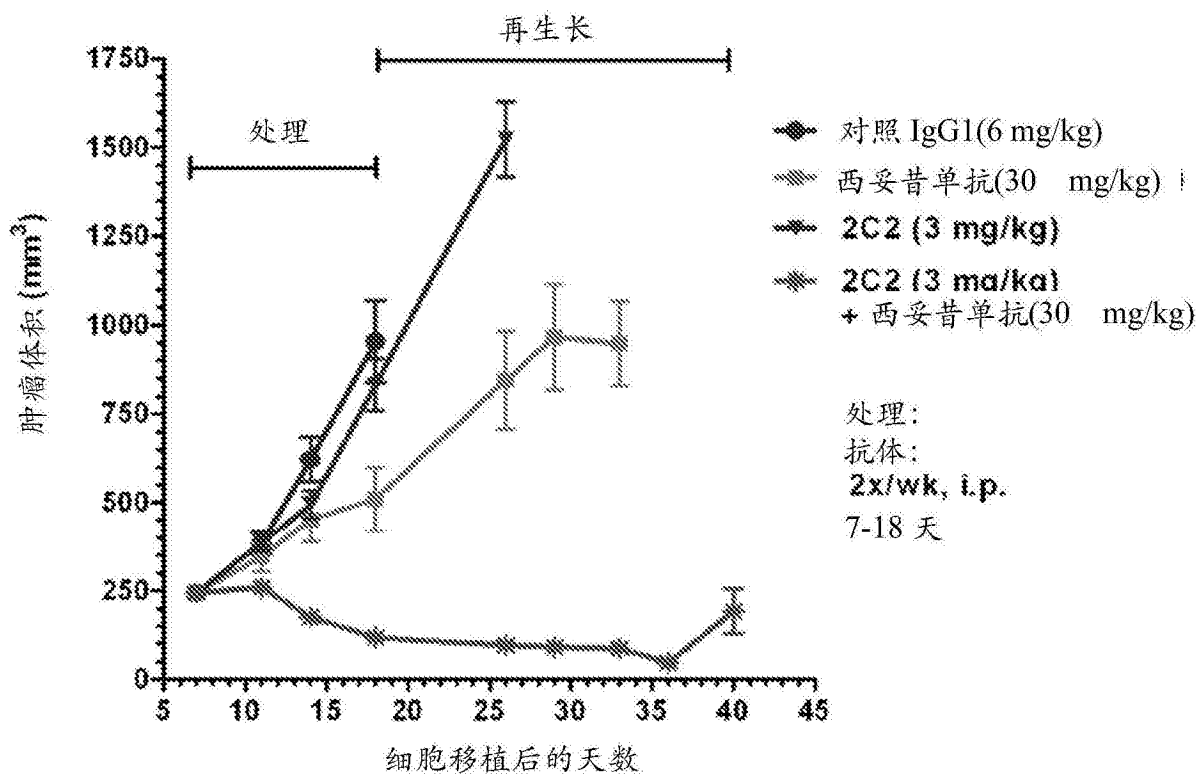


图19B

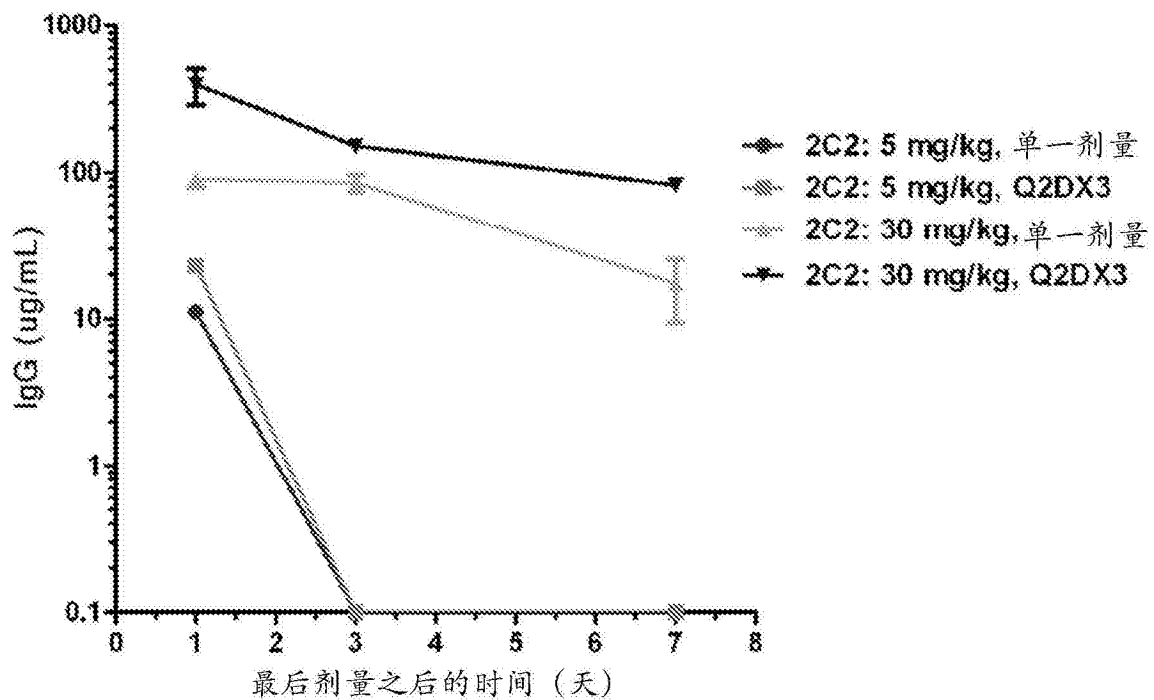


图20

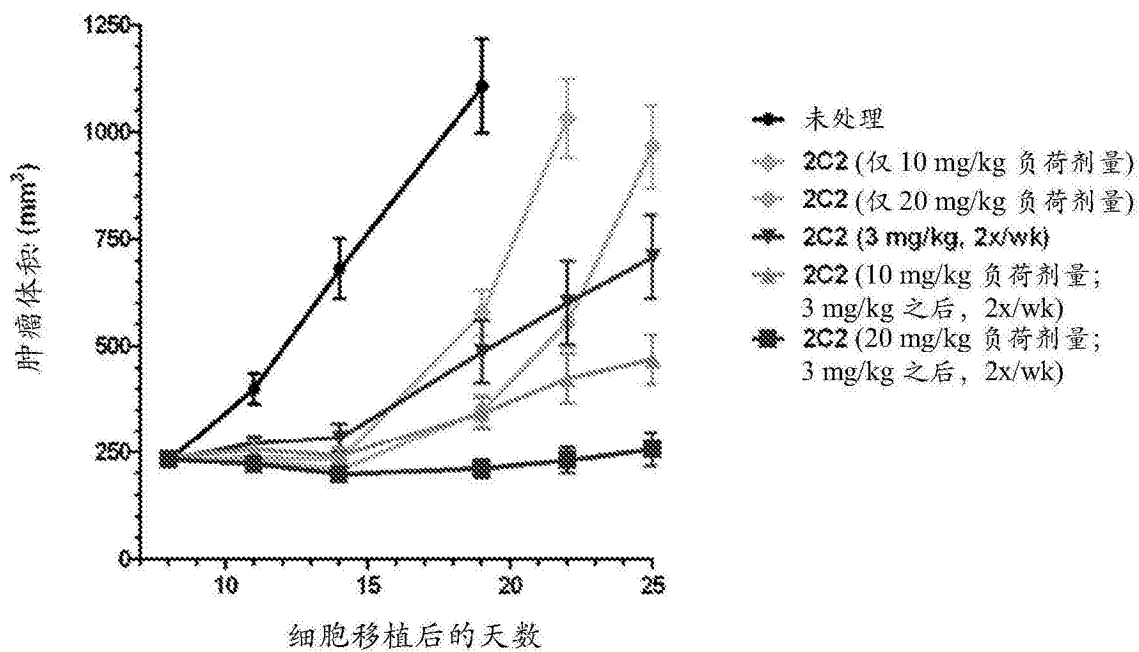


图21

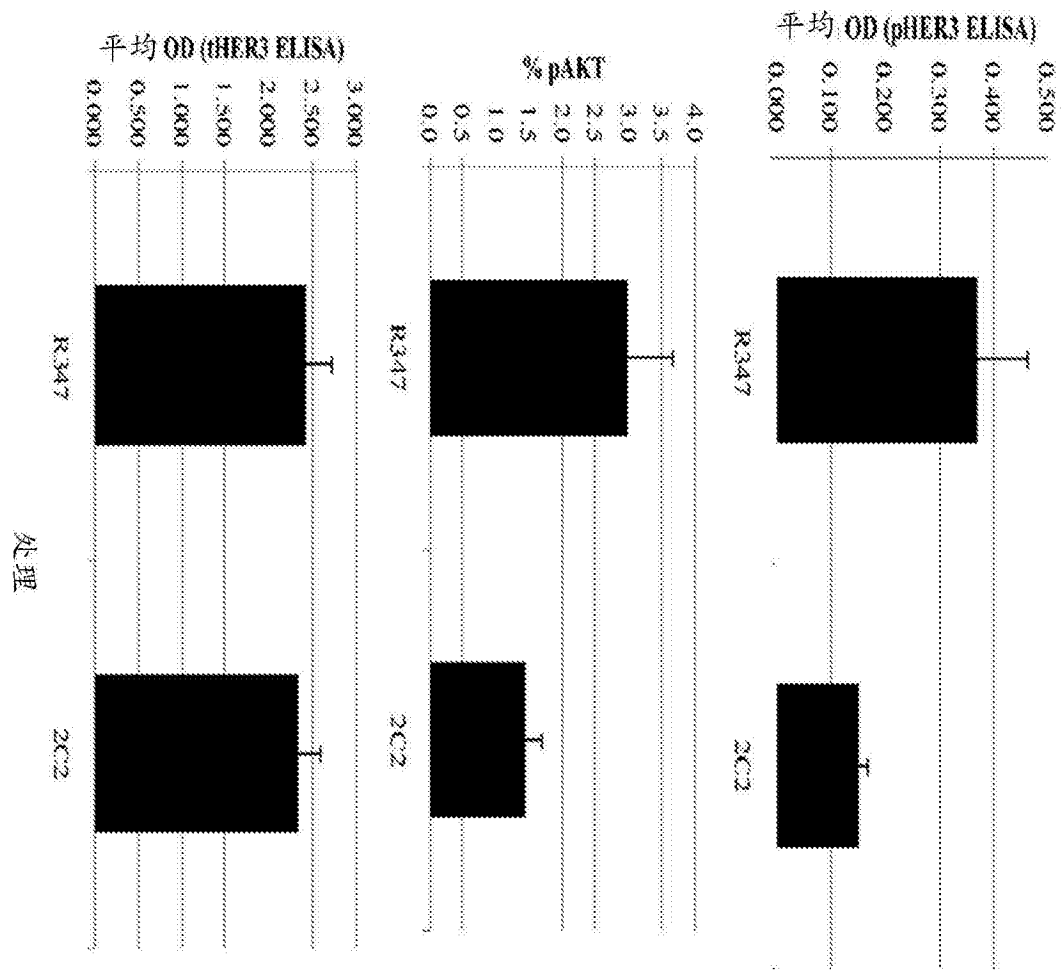


图22

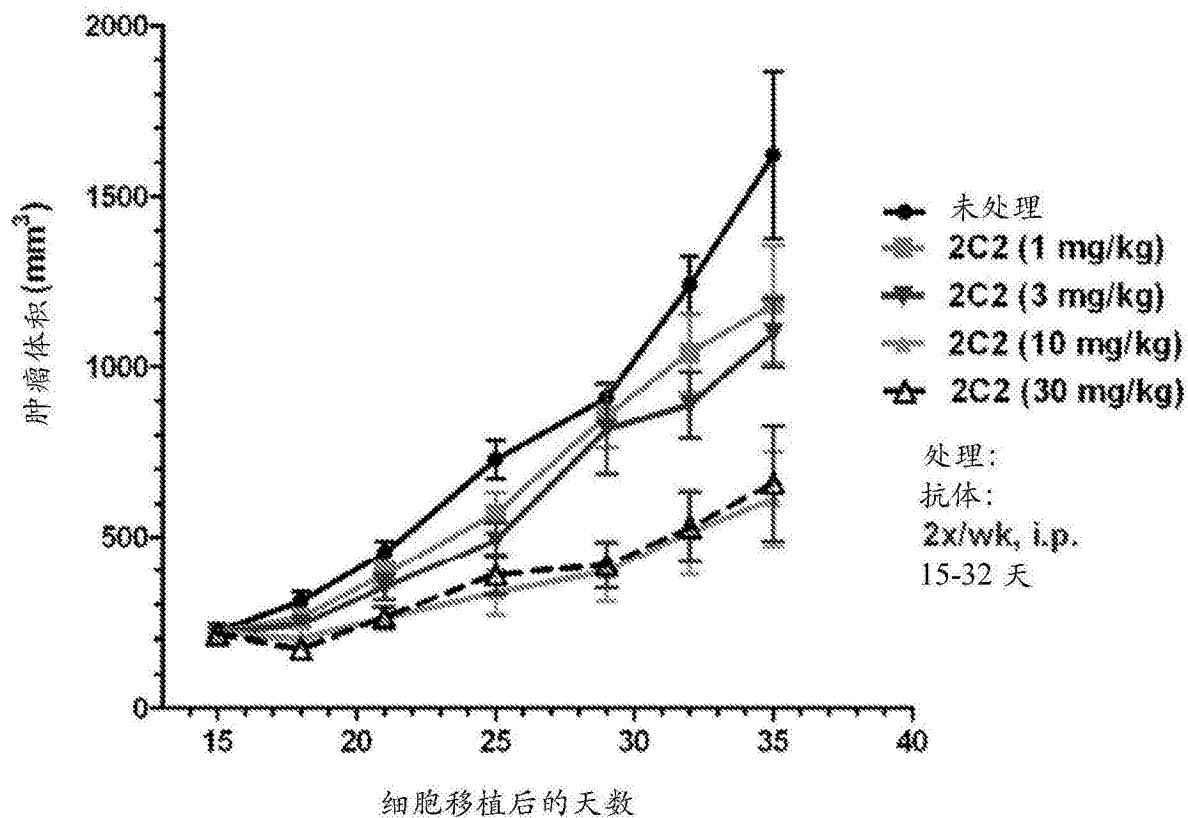


图23A

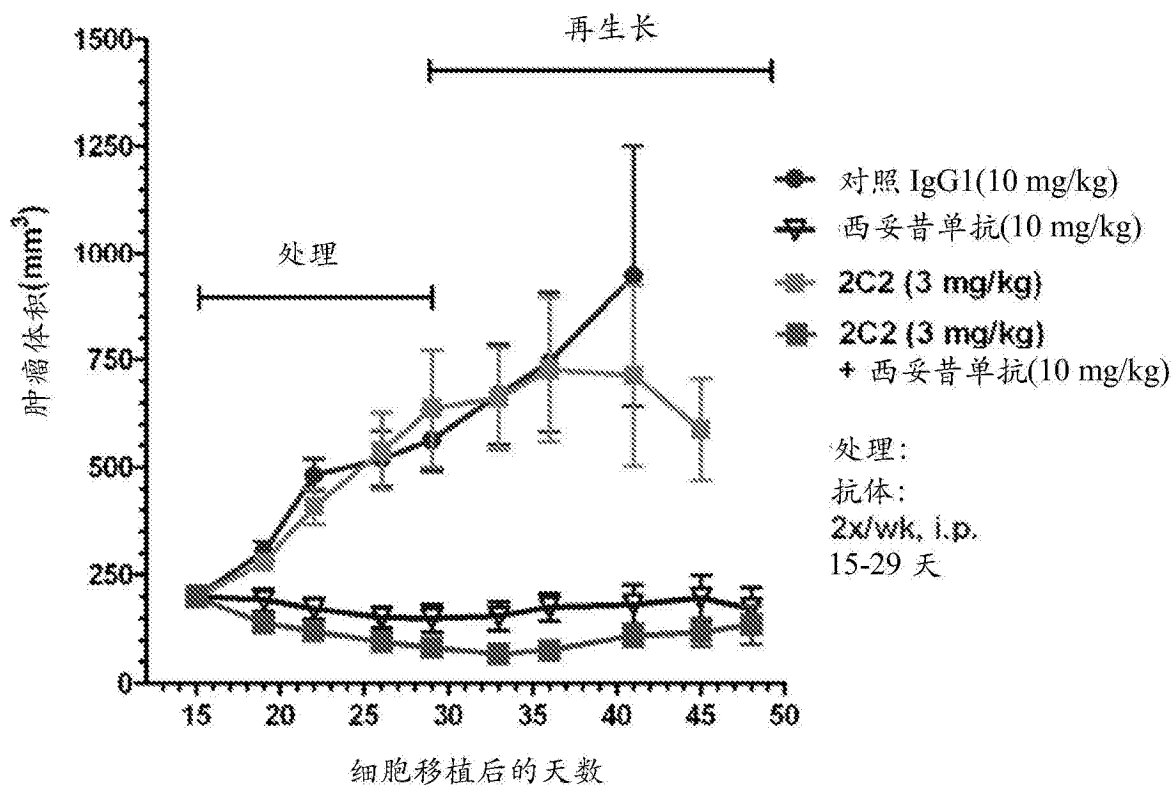


图23B

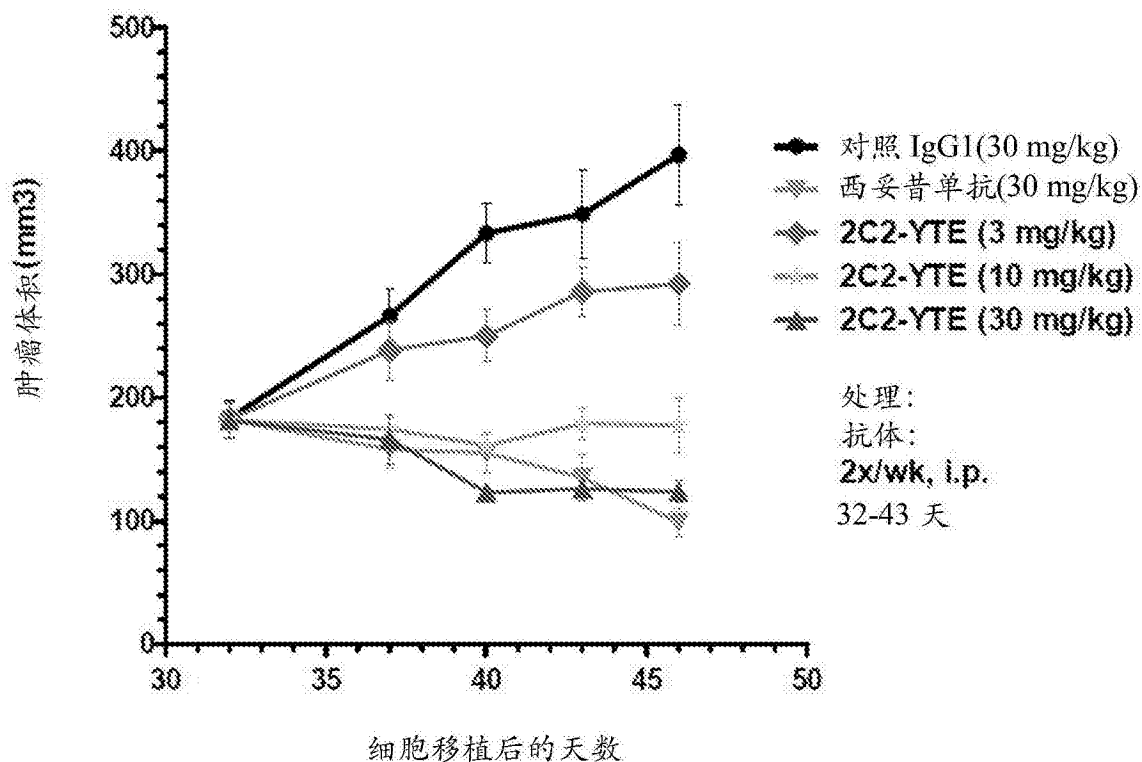


图24

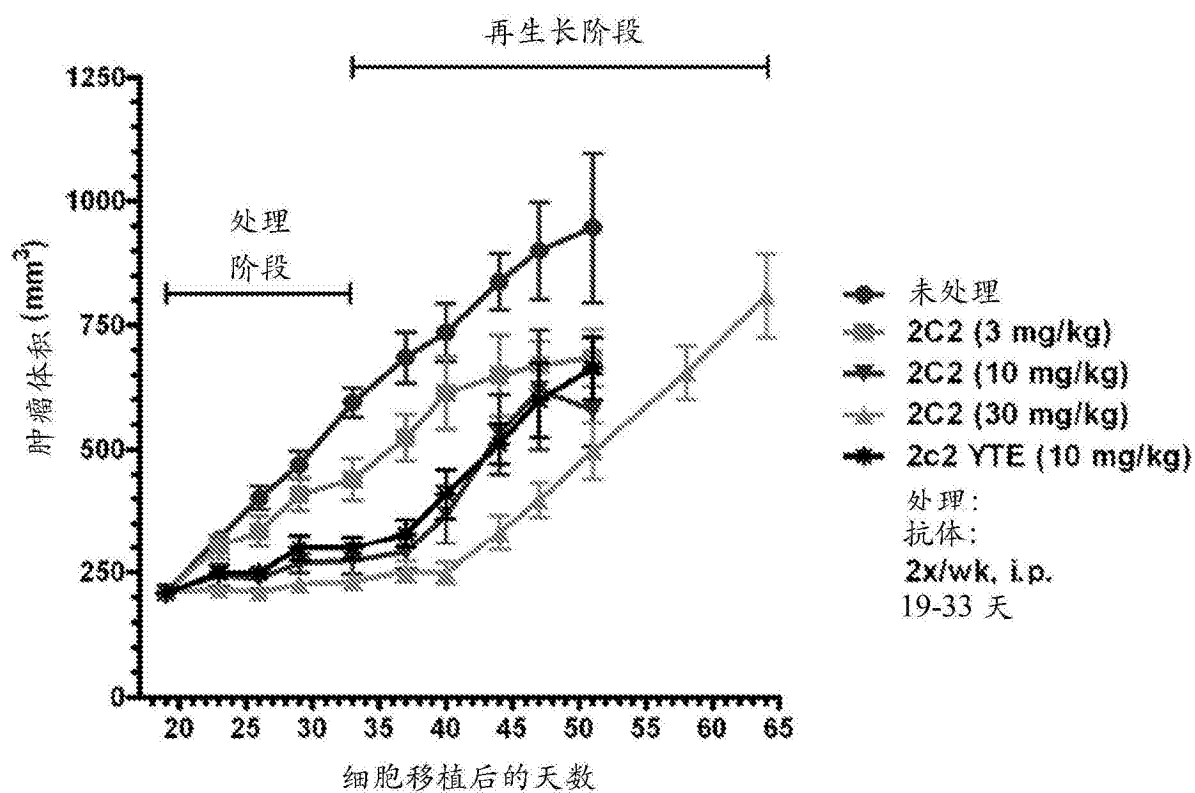


图25A

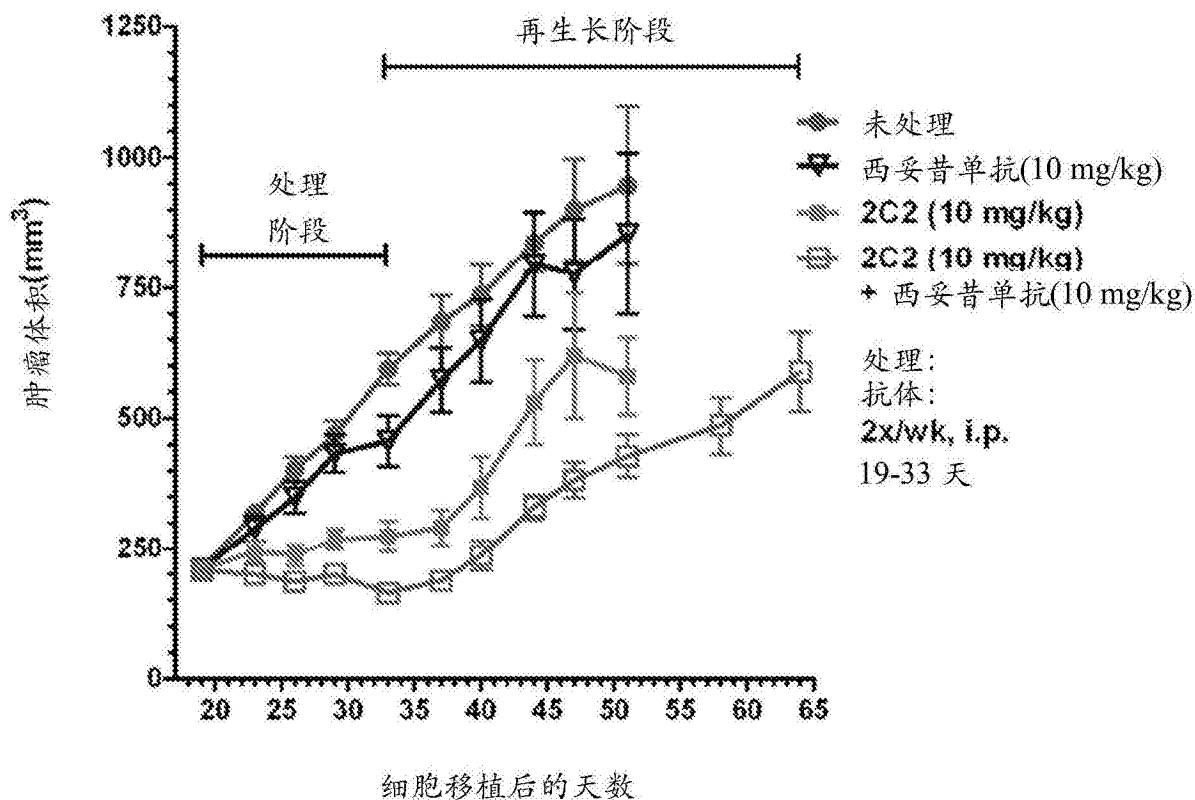


图25B

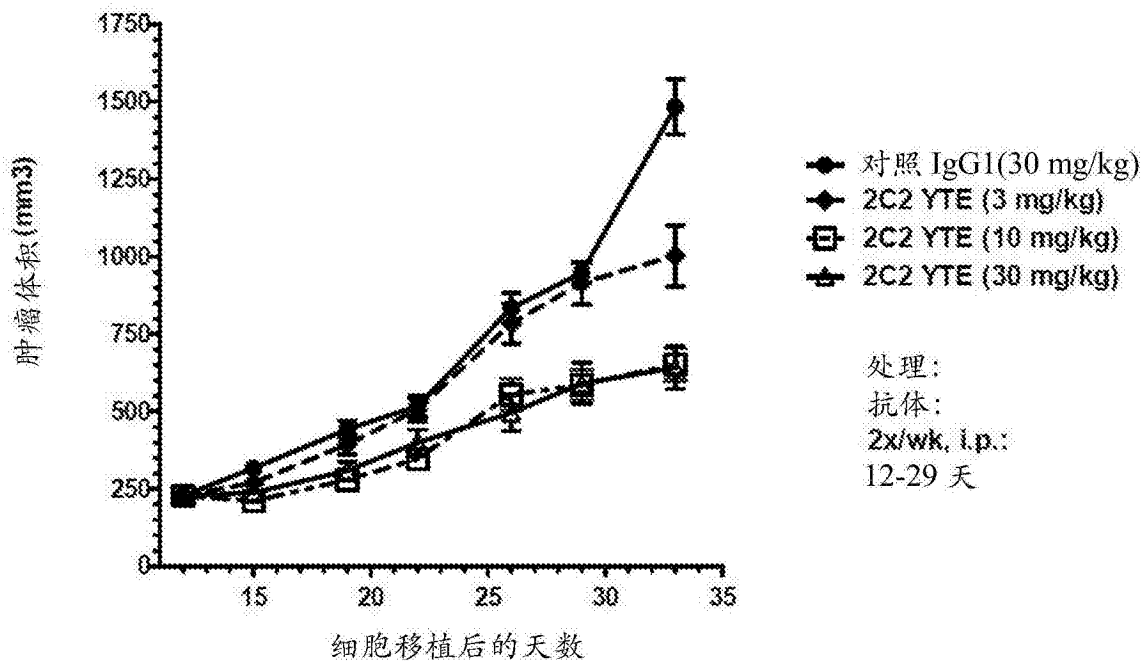


图26

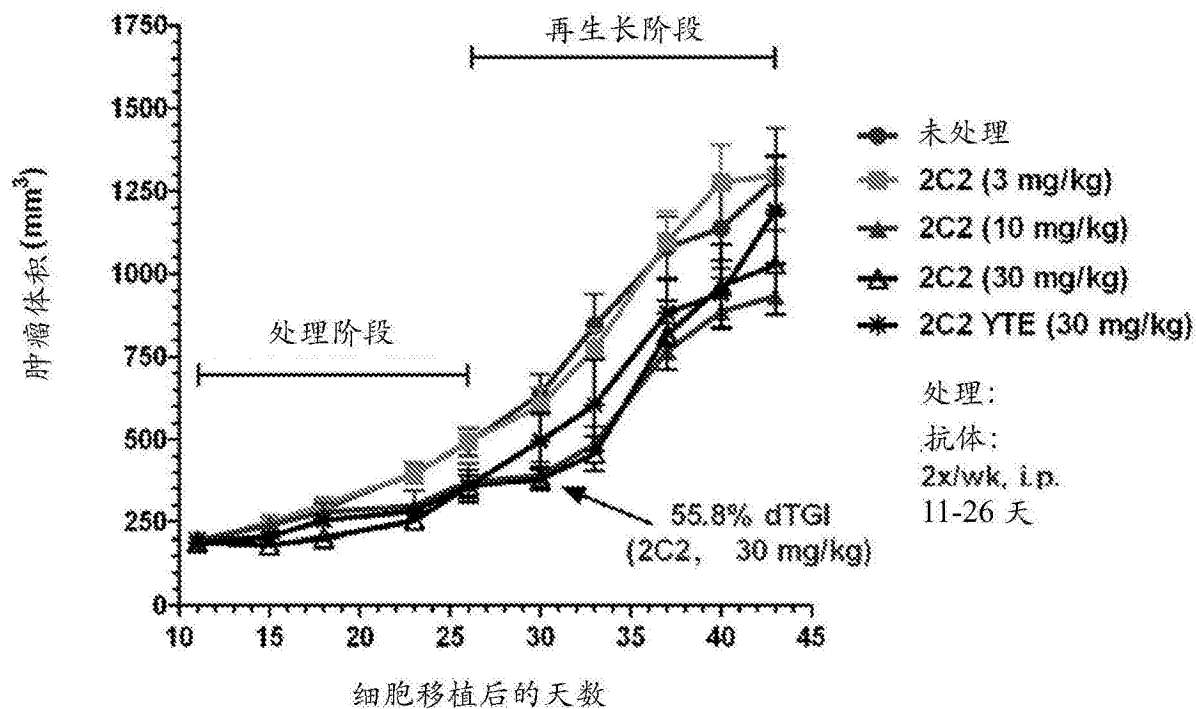


图27

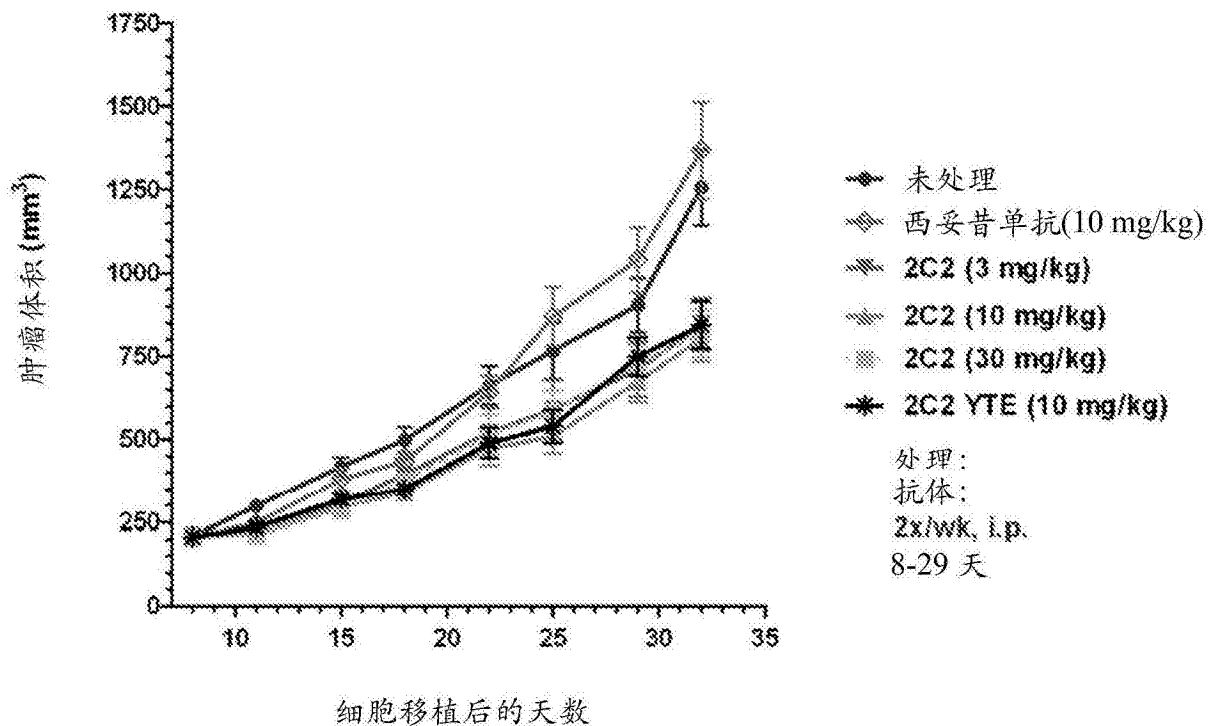


图28

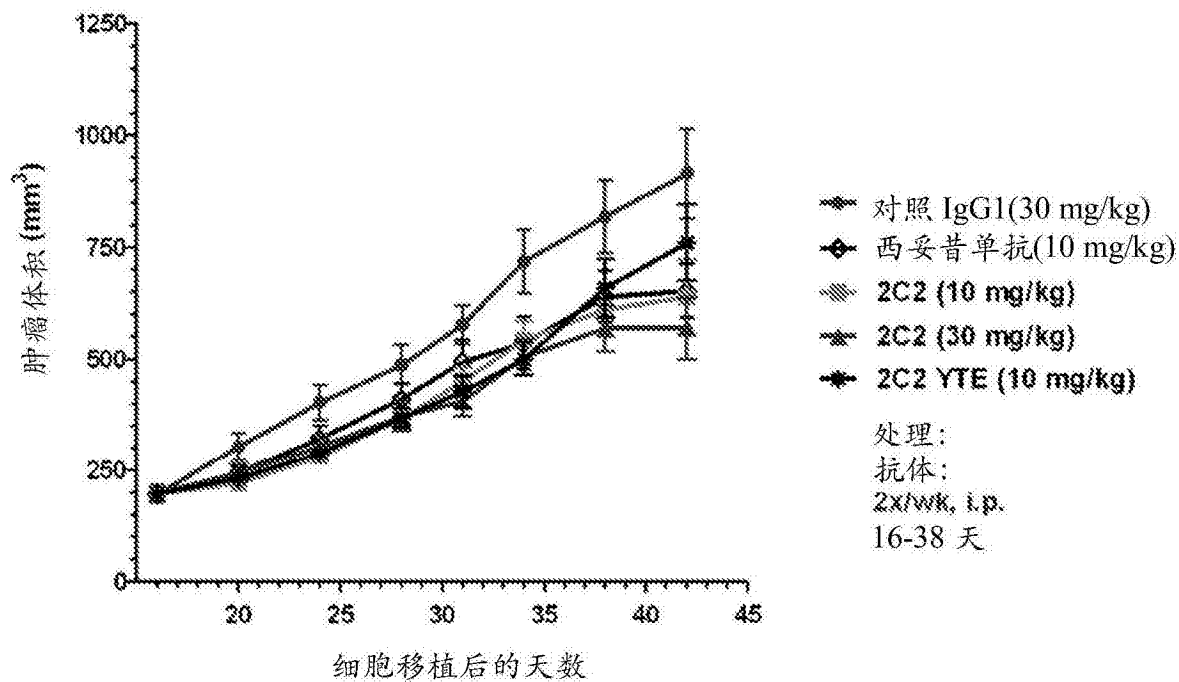


图29

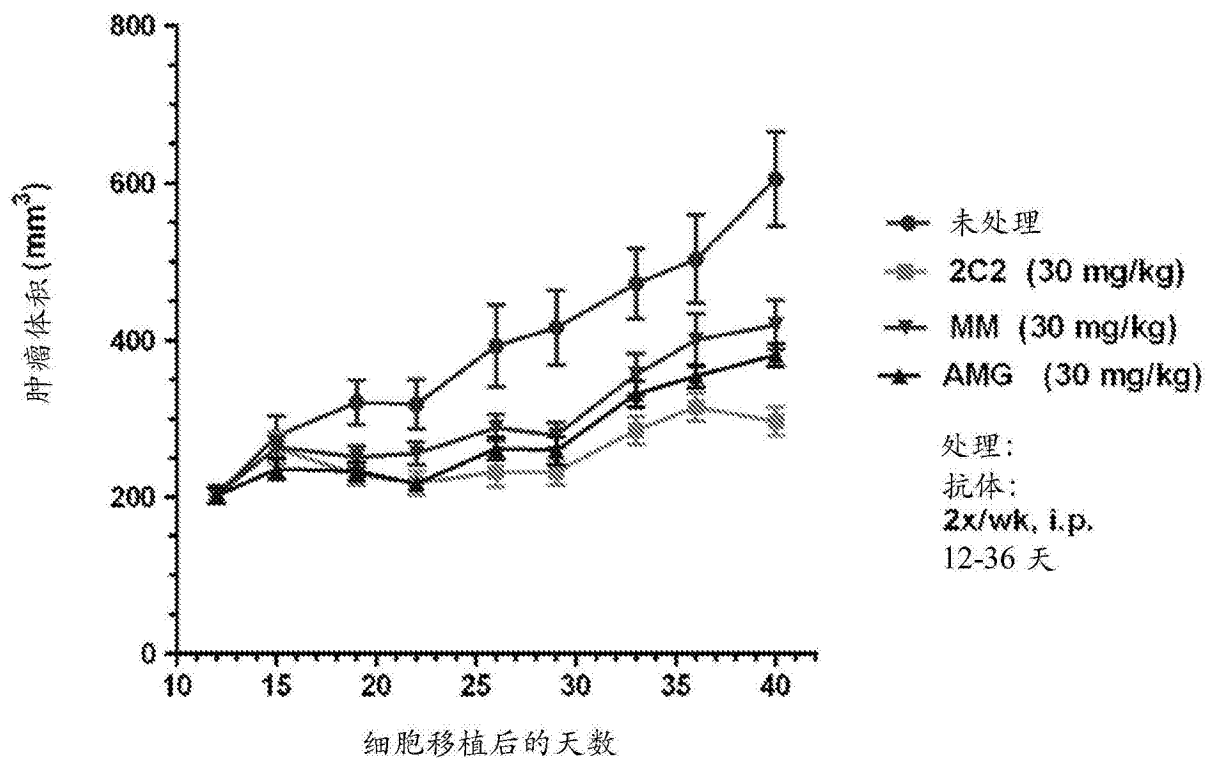


图30

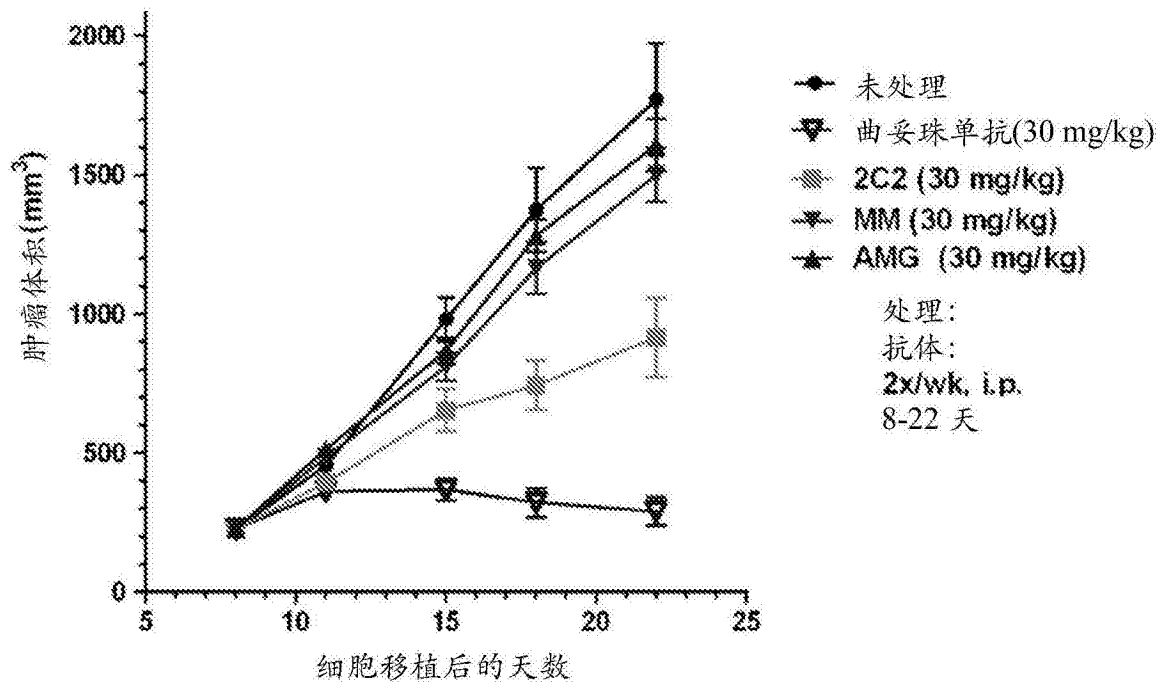


图31A

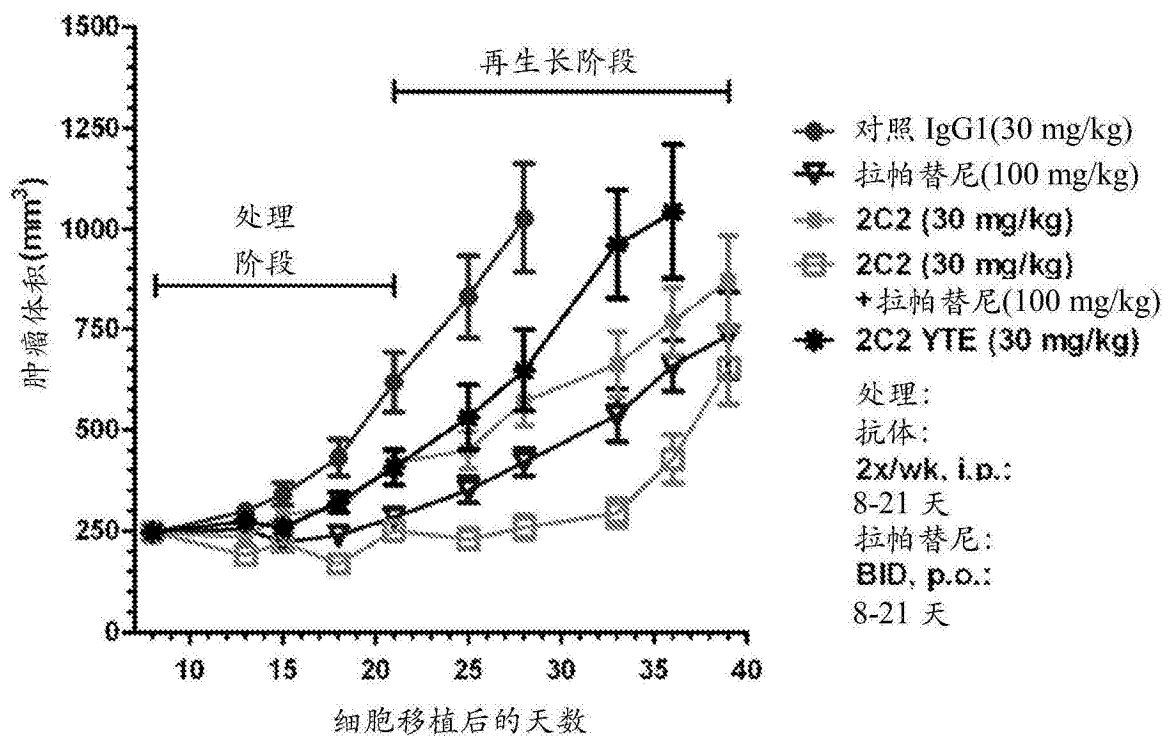


图31B

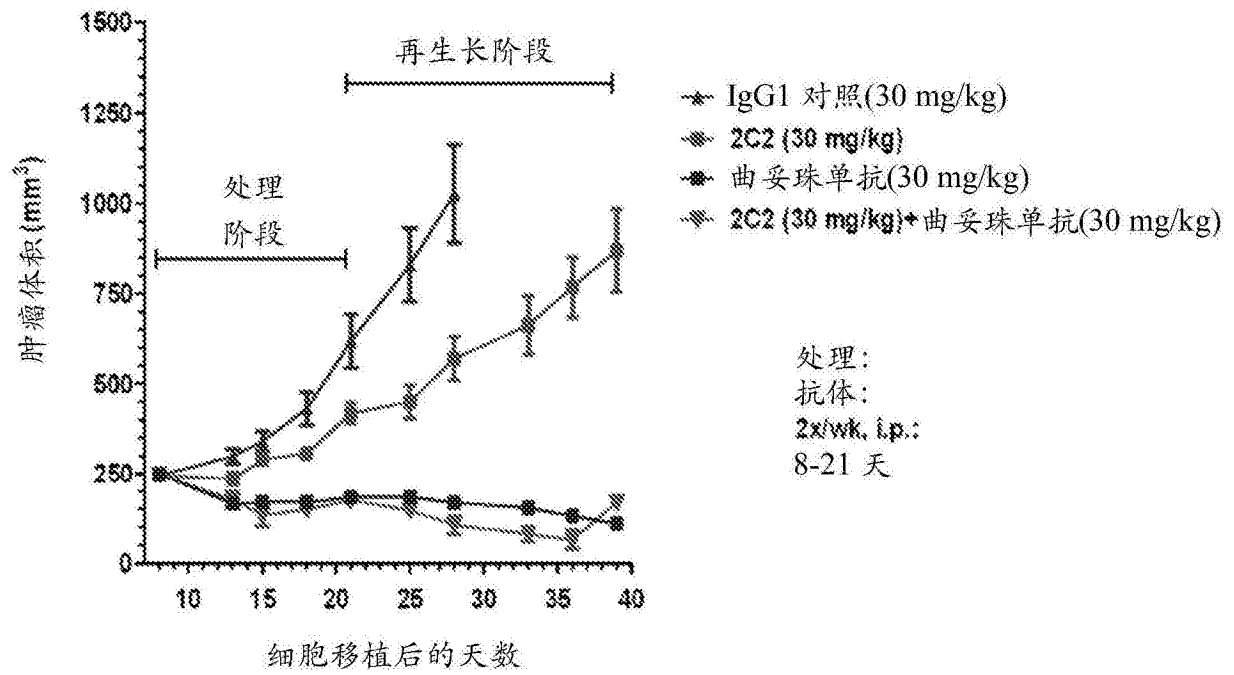


图31C

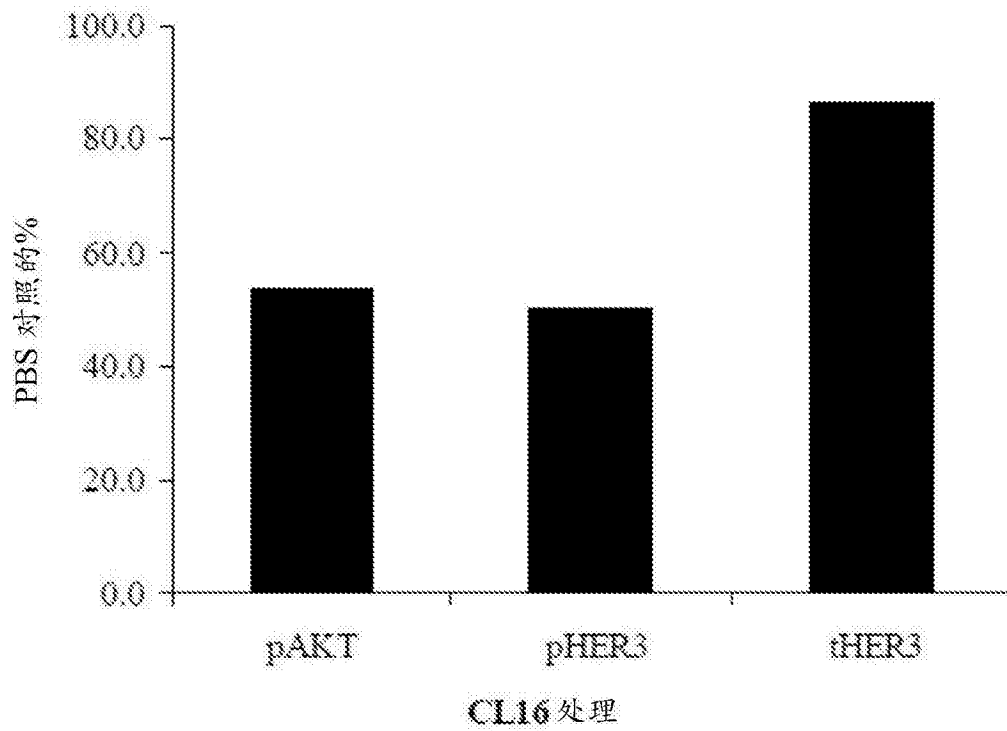


图32

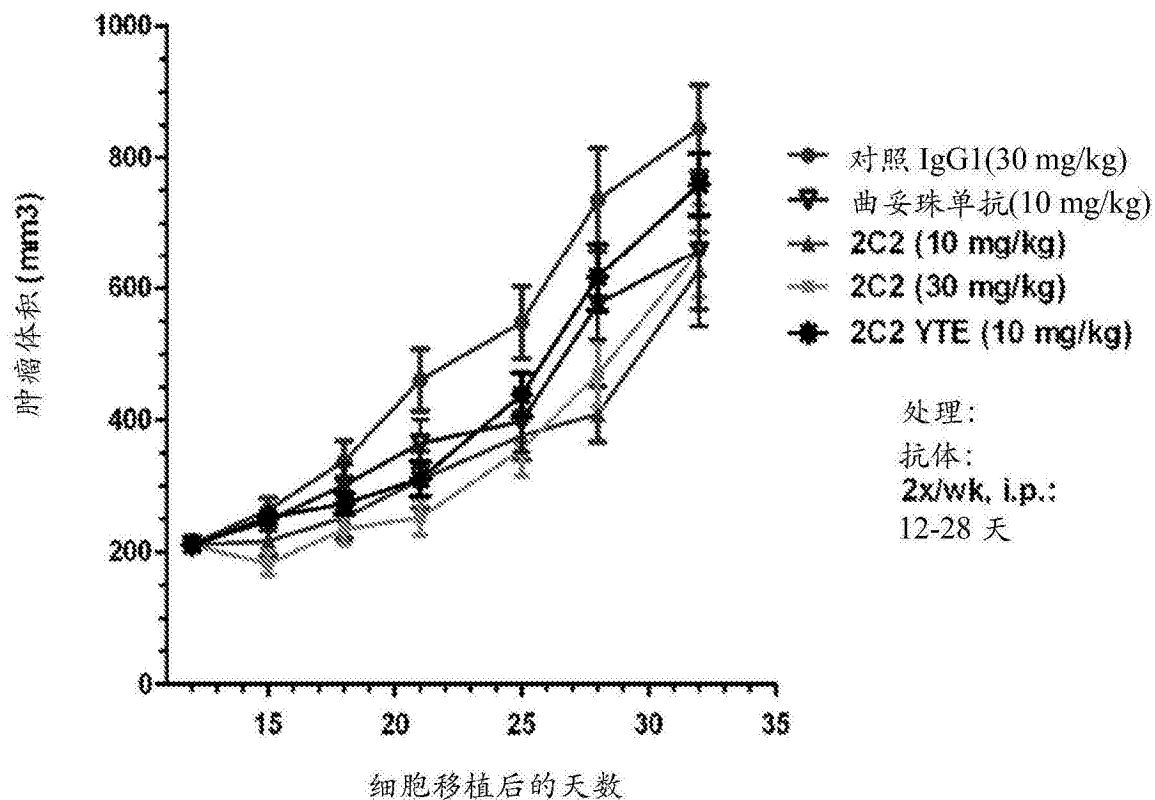


图33A

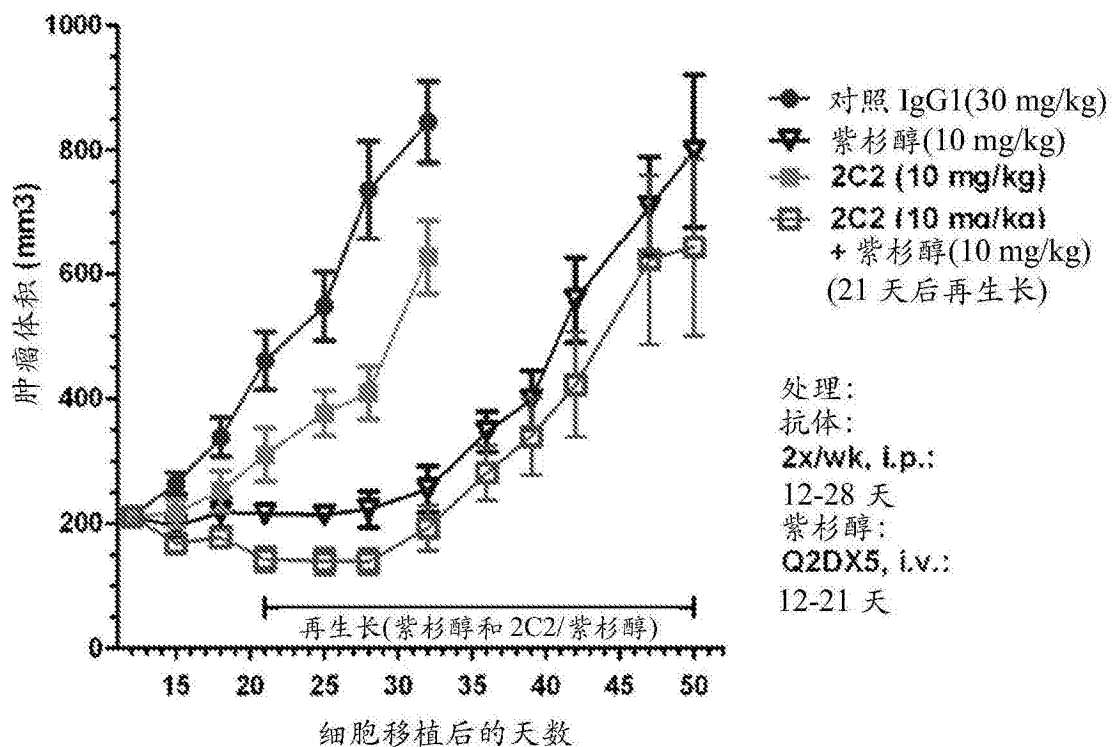


图33B

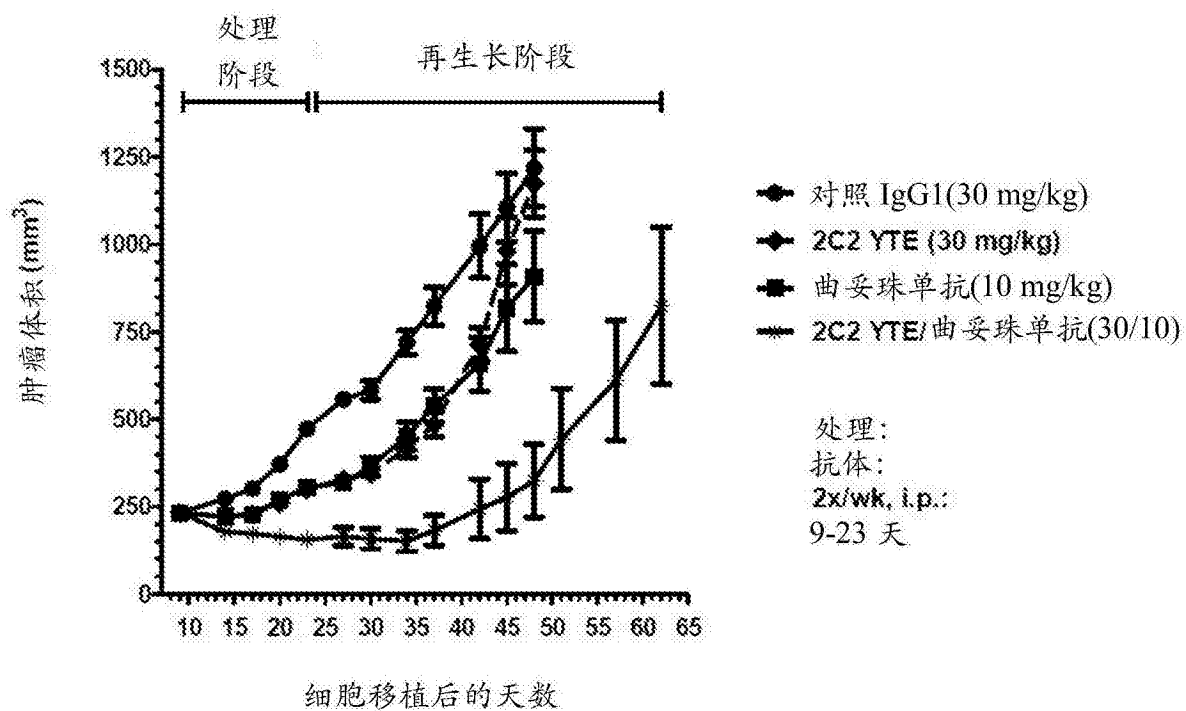


图34A

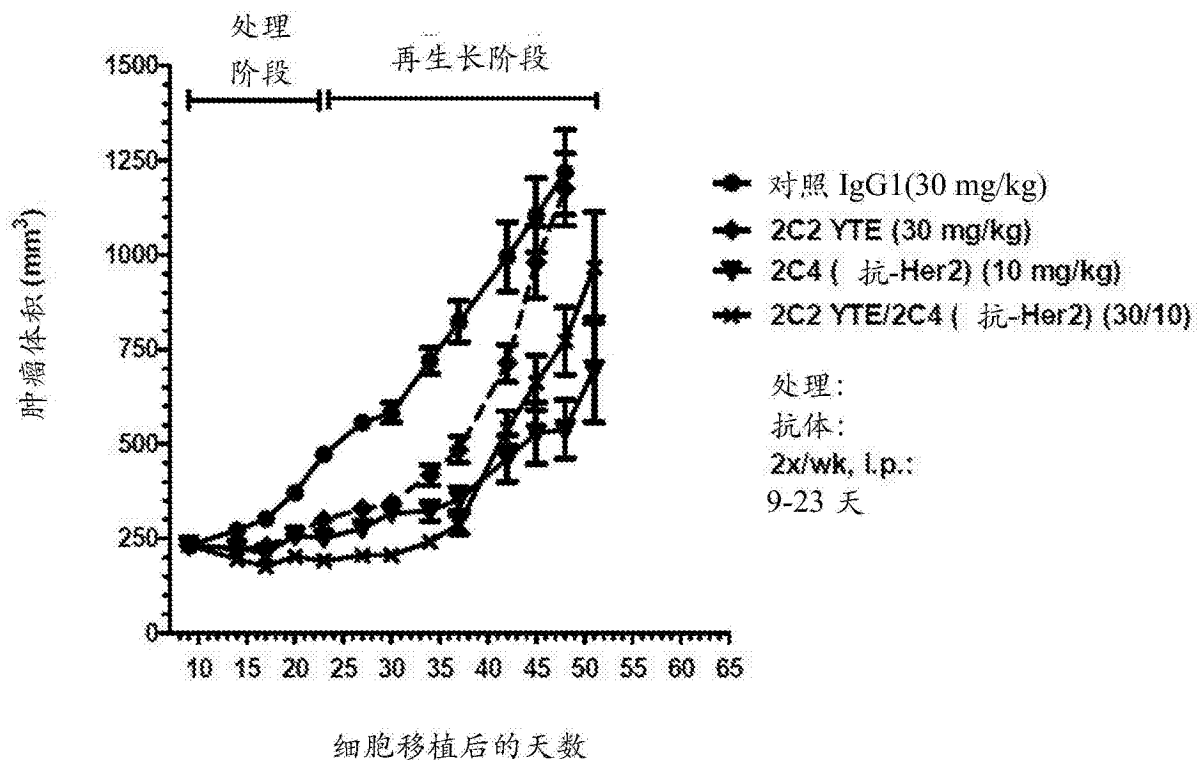


图34B

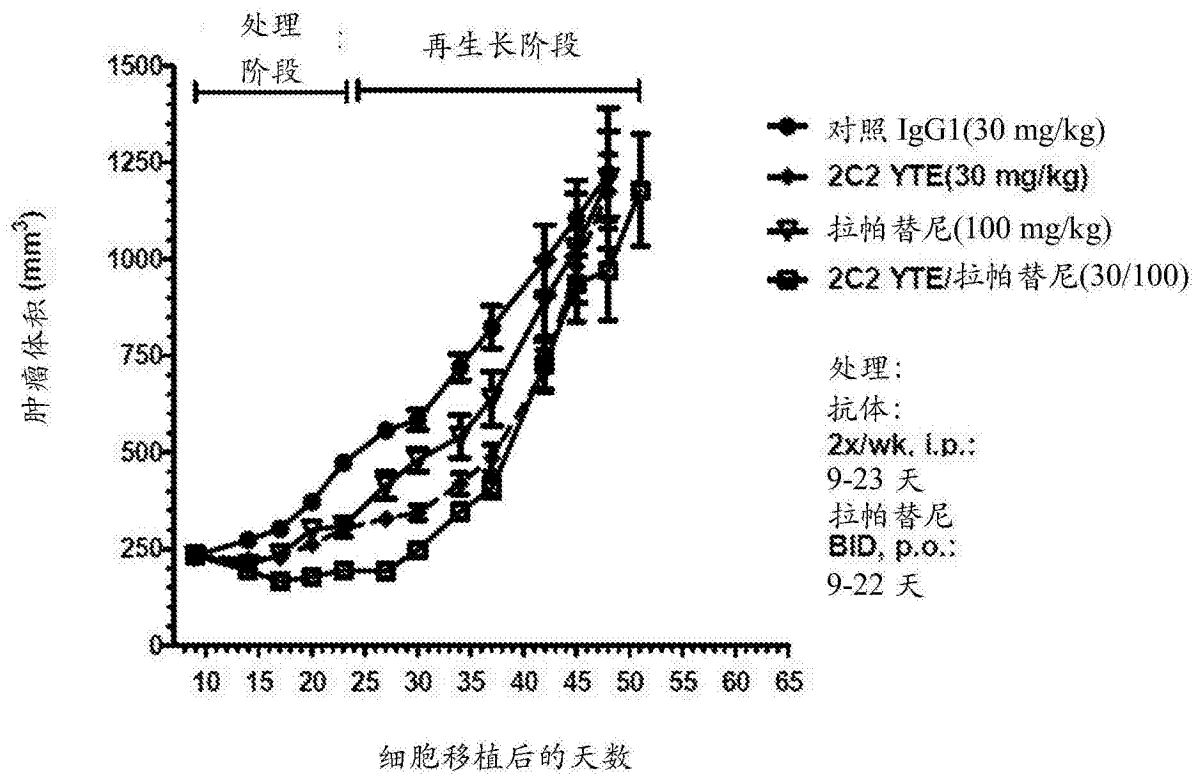


图34C

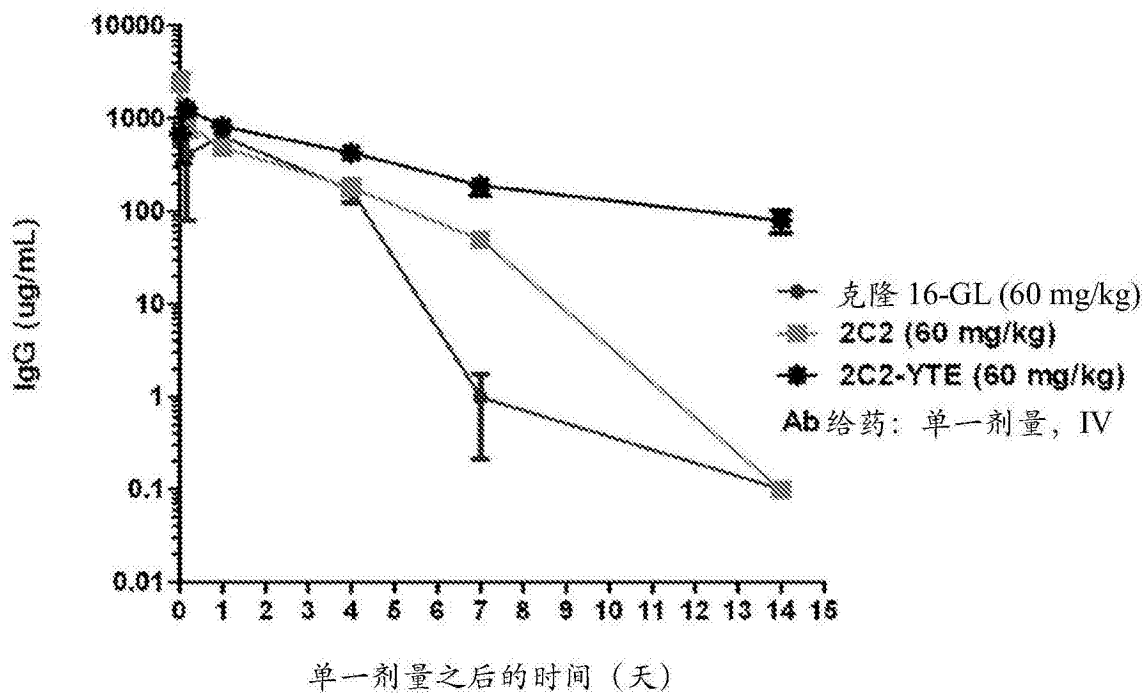


图35

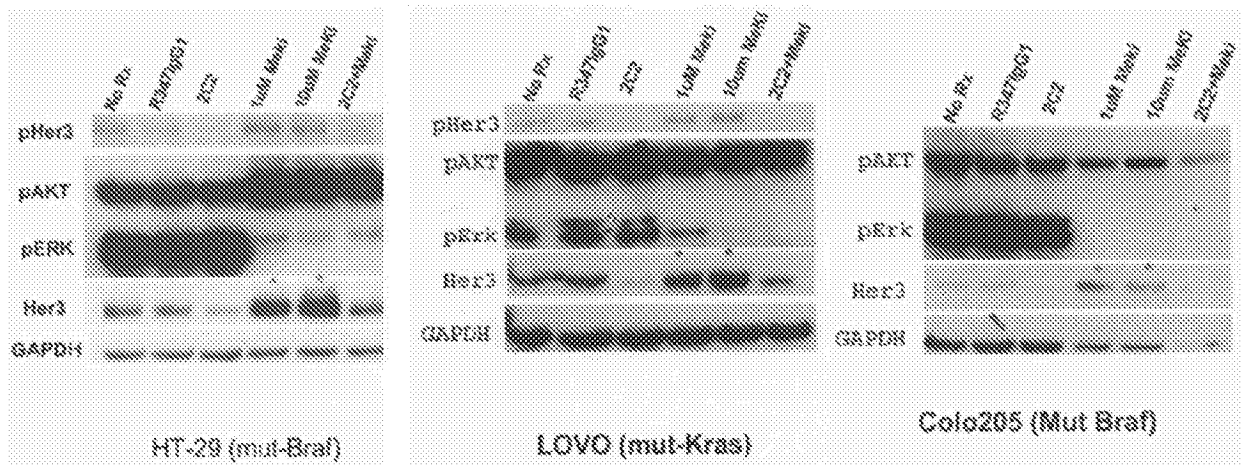


图36

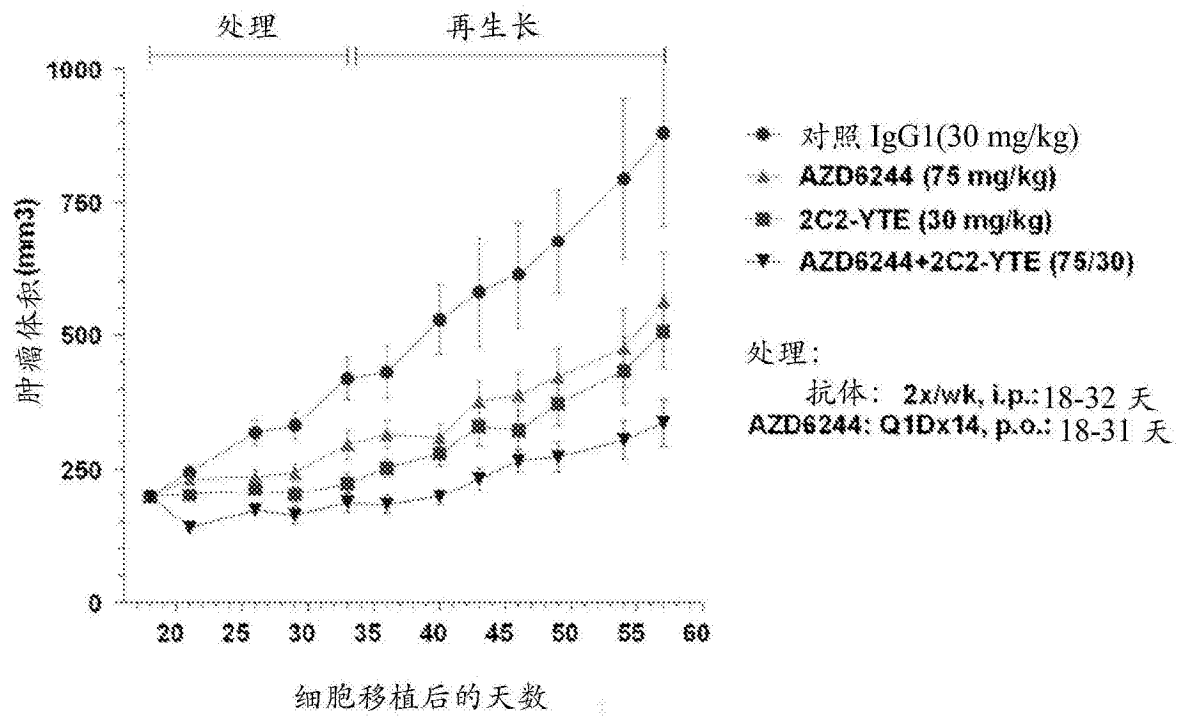


图37A部分I

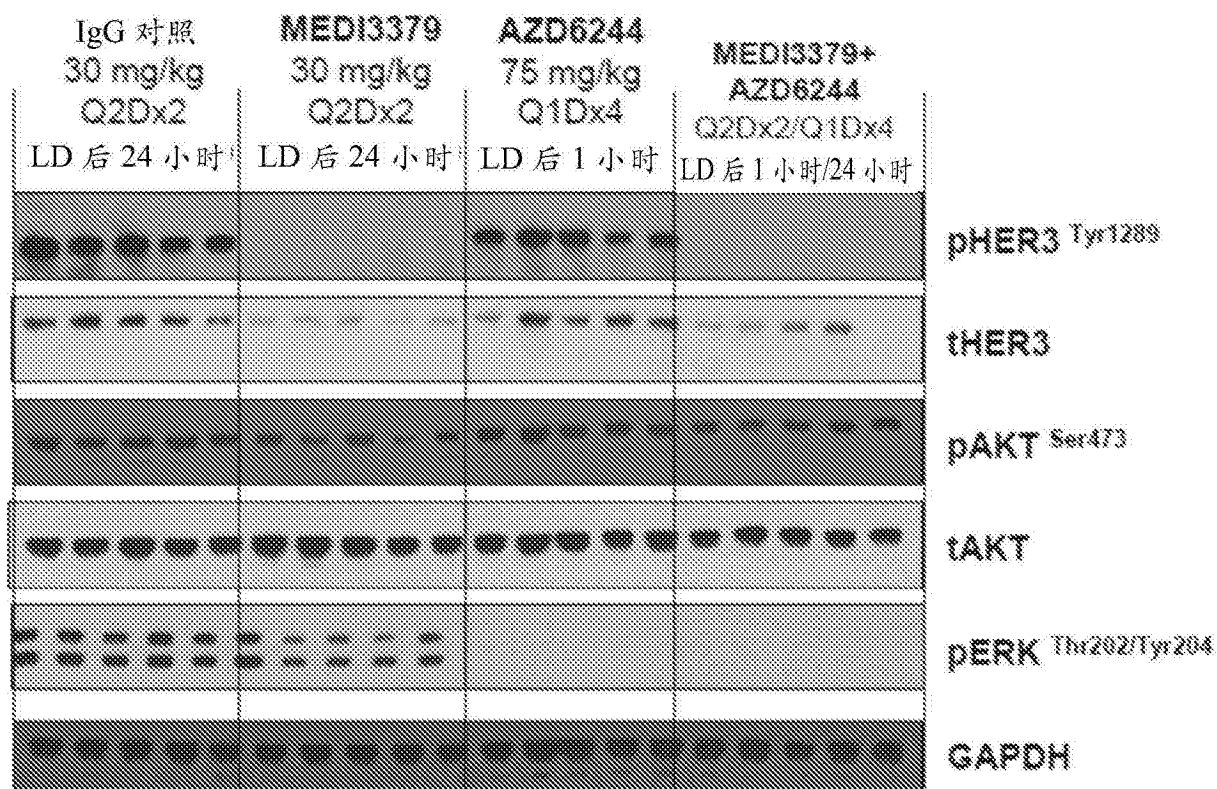


图37A部分II

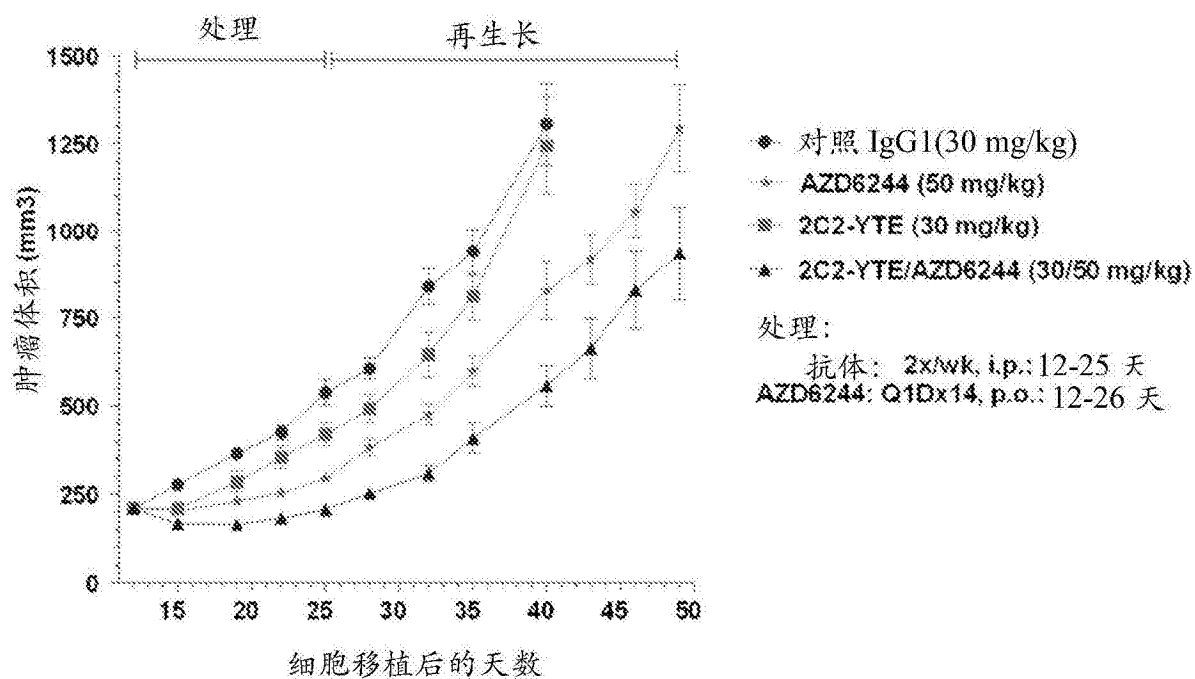


图37B部分I

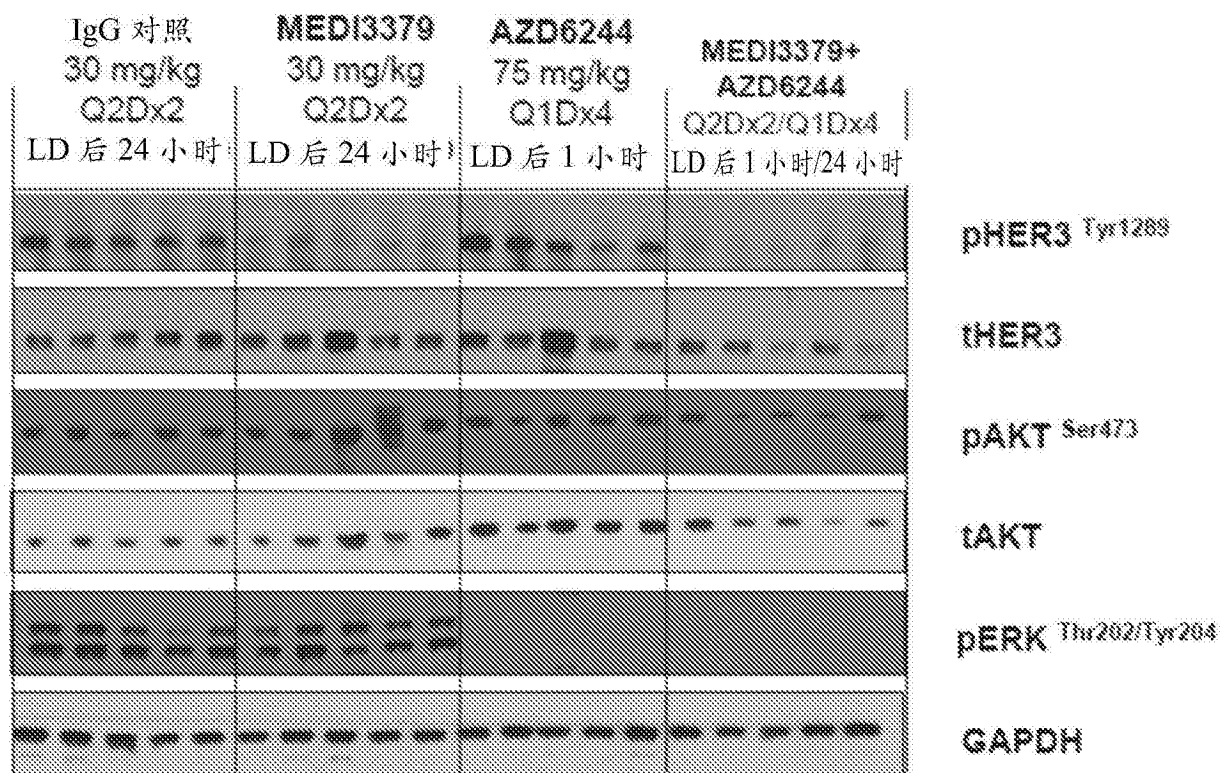


图37B部分II

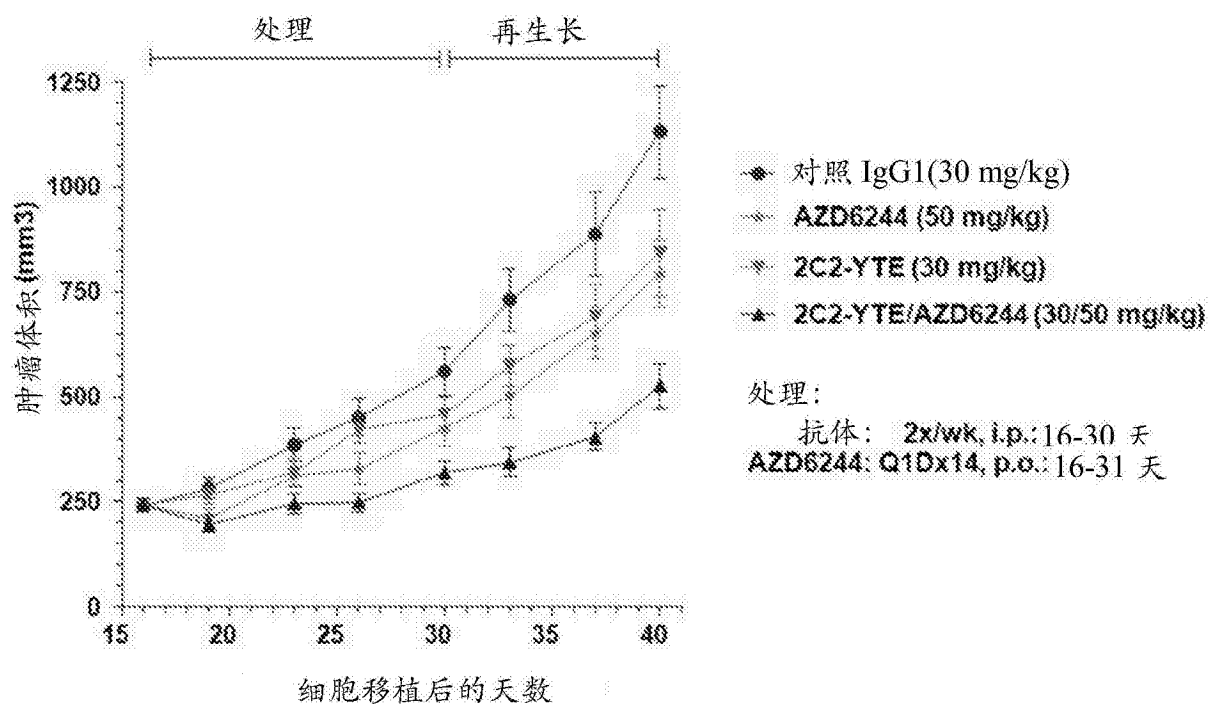


图37C部分I

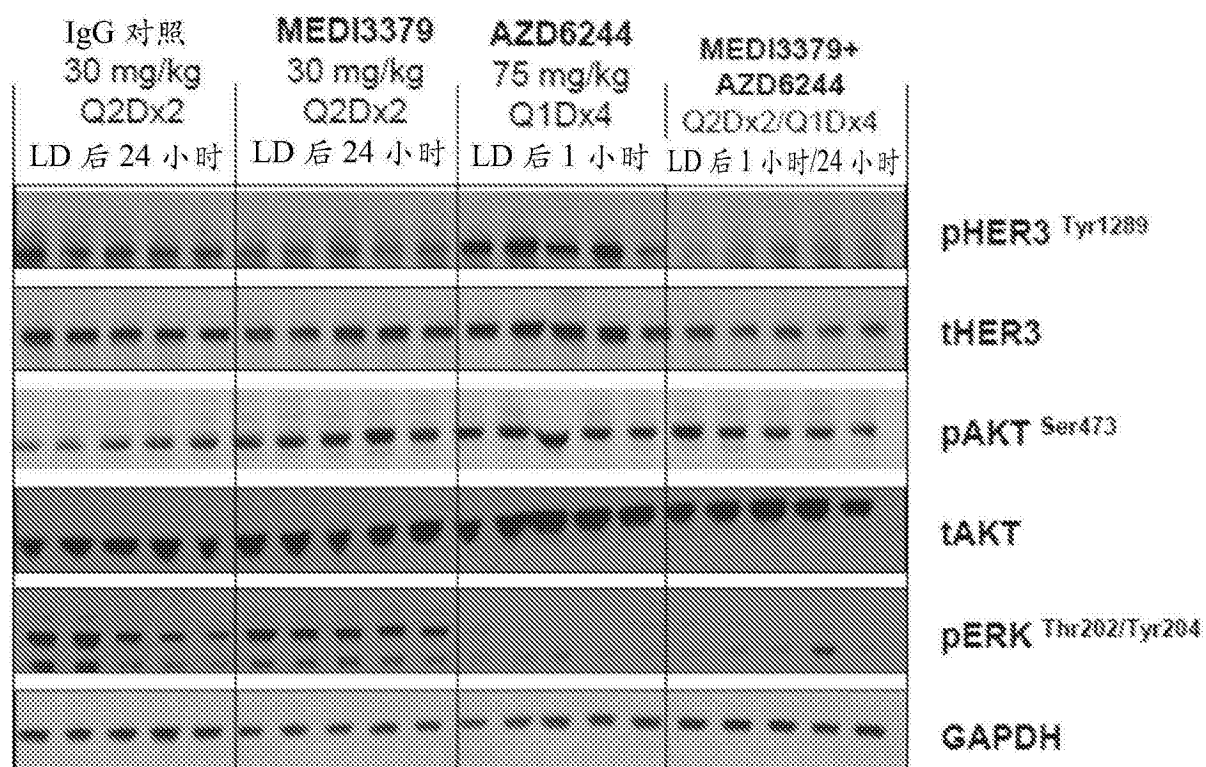


图37C部分II