



(43) 申请公布日 2015. 12. 30

7C2	WA	22-23	(31 RESIDUES)
7F8	DA	22-53	(31 RESIDUES)
2C4	NA	22-584	(562 RESIDUES)
7X9	AA	22-584	(662 RESIDUES)
3E8	AK	512-625	(113 RESIDUES)
4D5	AD	529-625	(96 RESIDUES)
2H11	AS	529-645	(116 RESIDUES)
3H2	BS	541-585	(45 RESIDUES)

1. 用于治疗铂耐受性癌症的方法,所述癌症选自卵巢癌、原发性腹膜癌和输卵管癌,所述方法包括各自以有效治疗癌症的量对患者施用比 Trastuzumab 更有效地抑制 HER 二聚化的 HER2 抗体及抗代谢物化疗剂。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述 HER2 抗体结合 HER2 结构域 II。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述 HER2 抗体是 Pertuzumab。

4. 任一前述权利要求的方法,其中所述抗代谢物化疗剂是吉西他滨。

5. 任一前述权利要求的方法,其中来自患者的肿瘤样品呈现出 HER 活化。

6. 权利要求 5 的方法,其中来自患者的肿瘤样品呈现出 HER2 活化。

7. 用于治疗铂耐受性癌症的方法,所述癌症选自卵巢癌、原发性腹膜癌和输卵管癌,所述方法包括各自以有效治疗癌症的量对患者施用结合 HER2 上异二聚体结合位点的 HER2 抗体及吉西他滨。

8. 权利要求 7 的方法,其中所述抗体阻断 HER2 与 EGFR 或 HER3 的异二聚化。

9. 用于治疗铂耐受性癌症的方法,所述癌症选自卵巢癌、原发性腹膜癌和输卵管癌,所述方法包括各自以有效治疗癌症的量对患者施用结合 HER2 结构域 II 的 HER2 抗体及吉西他滨。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述 HER2 抗体结合 HER2 的结构域 I、II 和 III 之间的连接处。

铂耐受性癌症的疗法

[0001] 本申请是申请日为2005年6月15日、中国申请号为200580027930.5、发明名称为“铂耐受性癌症的疗法”的发明申请的分案申请。

[0002] 相关申请

[0003] 本申请是根据37CFR 1.53(b)提交的非临时申请,根据35USC § 119(e)要求2004年6月16日提交的临时申请60/580,333的收益,并将其内容收入本文作为参考。

[0004] 生物材料的保藏

[0005] 以下生物材料已经保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA) (ATCC):

[0006] 保藏物 保藏日期 保藏编号

[0007] 鼠/鼠杂交瘤细胞系2C4 1999年04月08日 HB-12697

[0008] 以下生物材料已经保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA) (ATCC):

[0009]

保藏物	保藏日期	保藏编号
细胞#758, A-HER2, NB9644P28	1990年5月24日	CRL 10463
杂交瘤细胞#741 7C2.B9 NB 10151/65	1996年10月17日	HB-12215
杂交瘤细胞#456 7F3 NB 7865/5	1996年10月17日	HB-12216

发明领域

[0010] 本发明涉及联合有效抑制HER二聚化的HER2抗体及吉西他滨来治疗铂耐受性的卵巢癌、原发性腹膜癌或输卵管癌的方法。

[0011] 发明背景

[0012] HER抗体

[0013] 受体酪氨酸激酶的HER家族是细胞生长、分化和存活的重要介质。该受体家族包括4个独特的成员:表皮生长因子受体(EGFR、ErbB1或HER1)、HER2(ErbB2或p185^{neu})、HER3(ErbB3)和HER4(ErbB4或tyro2)。

[0014] 由erbB1基因编码的EGFR已被认为是人类恶性肿瘤的病因。具体而言,在乳房、膀胱、肺、头、颈和胃癌以及成胶质细胞瘤中已经观察到EGFR表达的升高。EGFR受体表达的升高常常与EGFR配体,转化生长因子 α (TGF- α)的产量增加有关,这样的肿瘤细胞通过自分泌刺激途径导致受体活化。Baselga and Mendelsohn, Pharmac. Ther. 64:127-154(1994)。针对EGFR或其配体TGF- α 或EGF的单克隆抗体已经作为治疗此类恶性肿瘤的治疗剂进行了评估。参见例如Baselga and Mendelsohn, 同上;Masui et al., Cancer Research 44:1002-1007(1984);及Wu et al., J. Clin. Invest. 95:1897-1905(1995)。

[0015] HER家族的第二个成员p185^{neu}最初被鉴定成转化基因的产物,来自经化学处理的大鼠的成神经细胞瘤。neu原癌基因的活化形式产生自所编码蛋白质跨膜区中的点突

变(缬氨酸变成谷氨酸)。在乳房和卵巢癌中观察到 neu 的人同系物的扩增,而且这与预后不良有关(Slamon et al., Science 235:177-182(1987); Slamon et al., Science 244:707-712(1989); 及美国专利 4,968,603)。迄今为止,就人类肿瘤而言尚无 neu 原癌基因中与之类似的点突变的报道。在其它癌症中也已观察到 HER2 的过表达(频繁但不均一,原因在于基因扩增),包括胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰和膀胱癌。参见 King et al., Science 229:974(1985); Yokota et al., Lancet 1:765-767(1986); Fukushige et al., Mol. Cell Biol. 6:955-958(1986); Guerin et al., Oncogene Res. 3:21-31(1988); Cohen et al., Oncogene 4:81-88(1989); Yonemura et al., Cancer Res. 51:1034(1991); Borst et al., Gynecol. Oncol. 38:364(1990); Weinere et al., Cancer Res. 50:421-425(1990); Kern et al., Cancer Res. 50:5184(1990); Park et al., Cancer Res. 49:6605(1989); Zhau et al., Mol. Carcinog. 3:254-257(1990); Aasland et al., Br. J. Cancer 57:358-363(1988); Williams et al., Pathobiology 59:46-52(1991); 及 McCann et al., Cancer 65:88-92(1990) 等。HER2 可在前列腺癌中过表达(Gu et al., Cancer Lett. 99:185-9(1996); Ross et al., Hum. Pathol. 28:827-33(1997); Ross et al., Cancer 79:2162-70(1997); 及 Sadasivan et al., J. Urol. 150:126-31(1993))。

[0016] 还描述了针对大鼠 p185^{neu} 和人 HER2 蛋白质产物的抗体。Drebin 及其同事制备了针对大鼠 neu 基因产物, p185^{neu} 的抗体。参见例如 Drebin et al., Cell 41:695-706(1985); Myers et al., Meth. Enzym. 198:277-290(1991); 及 W094/22478。Drebin et al., Oncogene 2:273-277(1988) 报道了与 p185^{neu} 的两个独特区域有反应性的抗体混合物对植入裸鼠的 neu 转化 NIH-3T3 细胞产生协同的抗肿瘤作用。还可参见 1998 年 10 月 20 日发布的美国专利 5,824,311。

[0017] Hudziak et al., Mol. Cell Biol. 9(3):1165-1172(1989) 描述了一组 HER2 抗体的生成,并利用人乳房肿瘤细胞系 SK-BR-3 鉴定。通过 72 小时后单层细胞的结晶紫染色测定了暴露于抗体后 SK-BR-3 细胞的相对细胞增殖。利用此测定法,用称作 4D5 的抗体获得了最大抑制,它抑制细胞增殖达 56%。该组其它抗体在此测定法中以较低程度降低细胞增殖。还发现抗体 4D5 使过表达 HER2 的乳房肿瘤细胞系对 TNF- α 的细胞毒性作用变得敏感。还可参见 1997 年 10 月 14 日发布的美国专利 5,677,171。Hudziak 等人的文章中论述的抗体还在以下文献中进行了鉴定:Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558(1990); Kotts et al., In Vitro 26(3):59A(1990); Sarup et al., Growth Regulation 1:72-82(1991); Shepard et al., J. Clin. Immunol. 11(3):117-127(1991); Kumar et al., Mol. Cell Biol. 11(2):979-986(1991); Lewis et al., Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263(1993); Pietras et al., Oncogene 9:1829-1838(1994); Vitetta et al., Cancer Research 54:5301-5309(1994); Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665(1994); Scott et al., J. Biol. Chem. 266:14300-5(1991); D'souza et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7202-7206(1994); Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465(1996); 及 Schaefer et al., Oncogene 15:1385-1394(1997)。

[0018] 鼠 HER2 抗体 4D5 的重组人源化型式(huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, Trastuzumab 或 HERCEPTIN[®]; 美国专利 5,821,337)在临床上对患有 HER2 过表达的转移

性乳癌并已接受广泛的早期抗癌疗法的患者起作用 (Baselga et al., J. Clin. Oncol. 14:737-744(1996))。1998 年 9 月 25 日 Trastuzumab 得到了食品和药品管理局的销售许可,可用于治疗所患肿瘤过表达 HER2 蛋白质的转移性乳癌患者。

[0019] 以下文献中描述了具有各种特性的其它 HER2 抗体:Tagliabue et al., Int. J. Cancer 47:933-937(1991); McKenzie et al., Oncogene 4:543-548(1989); Maier et al., Cancer Res. 51:5361-5369(1991); Bacus et al., Molecular Carcinogenesis 3:350-362(1990); Stancovski et al., PNAS(USA) 88:8691-8695(1991); Bacus et al., Cancer Research 52:2580-2589(1992); Xu et al., Int. J. Cancer 53:401-408(1993); W094/00136; Kasprzyk et al., Cancer Research 52:2771-2776(1992); Hancock et al., Cancer Res. 51:4575-4580(1991); Shawver et al., Cancer Res. 54:1367-1373(1994); Arteaga et al., Cancer Res. 54:3758-3765(1994); Harwerth et al., J. Biol. Chem. 267:15160-15167(1992); 美国专利 5,783,186; 及 Klapper et al., Oncogene 14:2099-2109(1997)。

[0020] 同源性筛选使得 HER 受体家族的两个其它成员得以鉴定:HER3(美国专利 5,183,884 和 5,480,968 以及 Kraus et al., PNAS(USA) 86:9193-9197(1989)) 和 HER4(欧洲专利申请 599,274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1746-1750(1993); 及 Plowman et al., Nature 366:473-475(1993))。这两种受体均在至少有些乳癌细胞系中显示出表达升高。

[0021] 通常发现 HER 受体在细胞中有多种组合,而且认为它的二聚化增加了细胞对各种 HER 配体的应答的多样性 (Earp et al., Breast Cancer Research and Treatment 35:115-132(1995))。EGFR 受到 6 种不同配体的结合:表皮生长因子 (EGF)、转化生长因子 α (TGF- α)、双调蛋白、肝素结合表皮生长因子 (HB-EGF)、betacellulin 和 epiregulin (Groenen et al., Growth Factors 11:235-257(1994))。由单一基因的可变剪接产生的一个调蛋白蛋白质家族是 HER3 和 HER4 的配体。调蛋白家族包括 α 、 β 和 γ 调蛋白 (Holmes et al., Science 256:1205-1210(1992); 美国专利 5,641,869; 及 Schaefer et al., Oncogene 15:1385-1394(1997)); neu 分化因子 (NDF); 神经胶质生长因子 (GGF); 乙酰胆碱受体诱导活性 (ARIA); 及感觉和运动神经元衍生因子 (SMDF)。有关综述参见 Groenen et al., Growth Factors 11:235-257(1994); Lemke, G., Molec. & Cell. Neurosci. 7:247-262(1996) 及 Lee et al., Pharm. Rev. 47:51-85(1995)。最近还鉴定了另外三种 HER 配体:神经调节蛋白 -2 (NRG-2), 据报道结合 HER3 或 HER4 (Chang et al., Nature 387:509-512(1997); 及 Carraway et al., Nature 387:512-516(1997)); 神经调节蛋白 -3, 结合 HER4 (Zhang et al., PNAS(USA) 94(18):9562-7(1997)); 及神经调节蛋白 -4, 结合 HER4 (Harari et al., Oncogene 18:2681-89(1999))。HB-EGF、betacellulin 和 epiregulin 也结合 HER4。

[0022] 尽管 EGF 和 TGF α 不结合 HER2, 但是 EGF 刺激 EGFR 和 HER2 形成异二聚体, 它活化 EGFR 并导致异二聚体中 HER2 的转磷酸作用。二聚化作用和 / 或转磷酸作用看来活化 HER2 酪氨酸激酶。参见 Earp et al., 同上。同样, 当 HER3 与 HER2 共表达时, 形成了有活性的信号复合物, 而针对 HER2 的抗体能破坏此复合物 (Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665(1994))。此外, 在与 HER2 共表达时, HER3 对调蛋白 (HRG) 的

亲和力提高到了较高的亲和力状态。还可参见有关 HER2-HER3 蛋白质复合物的文献 :Levi et al., Journal of Neuroscience 15:1329-1340(1995) ;Morrissey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1431-1435(1995) ;及 Lewis et al., Cancer Res. 56:1457-1465(1996)。HER4, 与 HER3 类似, 与 HER2 形成有活性的信号复合物 (Carraway and Cantley, Cell 78:5-8(1994))。

[0023] 卵巢癌

[0024] 卵巢癌是女性生殖道恶性肿瘤中最常见的死因。据估计在美国每年有大约 24,000 名新诊断的患者, 有大约 13,000 人死于该病。晚期卵巢癌患者常常用基于铂的化疗法治疗, 常常与紫杉烷 (taxane) 联合。在这些药剂失败后, 就很少有治疗选择了。患铂敏感性疾病的患者常常用铂复治, 但相当一部分患者在复治后只有短暂的响应持续时间。对于那些患铂耐受性疾病的患者, 结果就不太有利。托泊替康 (topotecan) 被食品和药品管理局 (FDA) 批准用于初始或后续化疗失败的患者 ;脂质体多柔比星 (liposomal doxorubicin) 只被批准用于以基于铂和紫杉醇 (paclitaxel) 的化疗方案二者均难以控制的卵巢癌患者。托泊替康和脂质体多柔比星已在铂耐受性疾病患者中分别显示 6% 和 12% 的部分响应率 (partial response rate), 同时有 14-18 周的中值无进展存活 (median progression-free survival)。最近, 报道了吉西他滨 (gemcitabine) 在铂耐受性卵巢癌中部分响应为 16% 的有希望结果, 导致越来越多的将此药剂用作第二梯队疗法。然而, 无疑仍需要新的改进的治疗选择用于现有疗法失败的晚期卵巢癌患者。

[0025] 卵巢癌的发病机理中涉及受体酪氨酸激酶的 ErbB 或人表皮生长因子受体 (BER) 家族。为了靶向 HER 信号途径, 将 pertuzumab (rhuMAb 2C4) 开发成抑制 HER2 与其它 HER 受体二聚化的人源化抗体, 从而抑制配体驱动的磷酸化作用和活化作用, 以及 RAS 和 AKT 途径的下游激活。

[0026] 吉西他滨已经用于多种肿瘤, 并且指明用于胰和肺癌。单独使用吉西他滨药剂的最常见毒性包括血细胞减少, 贫血和嗜中性白血球减少的发生率分别为 68% 和 63%。另一常见的毒性是恶心和呕吐, 联合发生率为 69%, 其中三级 13%, 四级 1%。腹泻的发生率稍低, 为 19%。皮疹的发生更常见, 为 30%, 只有 1% 是三级。已将吉西他滨与许多其它化疗剂联合, 诸如紫杉烷、蒽环类抗生素 (anthracyclines) 和铂, 没有任何显著的毒性增加或未预料到的毒性。

[0027] 在二期试验中, 在不同化疗剂的几种组合中将 trastuzumab 与吉西他滨联合, 而且耐受同样良好, 未观察到心脏毒性或未预料到的毒性。Safran et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 20:130a(2001) ;Miller et al., Oncology 15(2):38-40(2001)。有关 trastuzumab 和吉西他滨的联合还可参见 :Zinner et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 20:328a(2001) ;Nagourney et al., Breast Cancer Res. Treat. 57:116, Abstract 475(1999) ;Bun et al., Proc. Am. Assoc. Canc. Res. 41:719, Abstract#4571(2000) ;Konecny et al., Breast Cancer Res. Treat. 57:114, Abstract 467(1999) ;O' Shaughnessy et al., Sem. Oncol. 2(suppl 3):22-26(2004) ;Sledge et al., Sem. Oncol. 2(suppl 3):19-21(2003) ;Zinner et al., Lung Cancer 44(1):99-110(2004) ;Gatzemeier et al., Ann. of Oncol. 15:19-27(2004)。

[0028] 在 Omnitarg 作为单一药剂用于治疗实体瘤的一期试验中, 用 pertuzumab 治疗 3

名晚期卵巢癌患者。其中一人具有持久的部分响应,而另一名受试者在 15 周内病情稳定。Agus et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 22:192, Abstract771 (2003)。

[0029] 发明概述

[0030] 第一方面,本发明涉及用于治疗铂耐受性癌症的方法,所述癌症选自卵巢癌、原发性腹膜癌和输卵管癌,所述方法包括各自以有效治疗癌症的量对患者施用比 Trastuzumab 更有效地抑制 HER 二聚化的 HER2 抗体及抗代谢物化疗剂 (antimetabolite chemotherapeutic agent)。

[0031] 另一方面,本发明提供了用于治疗铂耐受性癌症的方法,所述癌症选自卵巢癌、原发性腹膜癌和输卵管癌,所述方法包括各自以有效治疗癌症的量对患者施用结合 HER2 上异二聚体结合位点的 HER2 抗体及吉西他滨。

[0032] 又一方面,本发明涉及用于治疗铂耐受性癌症的方法,所述癌症选自卵巢癌、原发性腹膜癌和输卵管癌,所述方法包括各自以有效治疗癌症的量对患者施用结合 HER2 结构域 II 的 HER2 抗体及吉西他滨。

[0033] 本发明涉及下述各项。

[0034] 1. 用于治疗铂耐受性癌症的方法,所述癌症选自卵巢癌、原发性腹膜癌和输卵管癌,所述方法包括各自以有效治疗癌症的量对患者施用比 Trastuzumab 更有效地抑制 HER 二聚化的 HER2 抗体及抗代谢物化疗剂。

[0035] 2. 项 1 的方法,其中所述 HER2 抗体结合 HER2 结构域 II。

[0036] 3. 项 1 的方法,其中所述 HER2 抗体是 Pertuzumab。

[0037] 4. 任一前述项的方法,其中所述抗代谢物化疗剂是吉西他滨。

[0038] 5. 任一前述项的方法,其中来自患者的肿瘤样品呈现出 HER 活化。

[0039] 6. 项 5 的方法,其中来自患者的肿瘤样品呈现出 HER2 活化。

[0040] 7. 任一前述项的方法,相对于只用抗代谢物化疗剂治疗的患者,它导致存活有所改善。

[0041] 8. 项 7 的方法,相对于只用抗代谢物化疗剂治疗的患者,它导致无进展存活有所改善。

[0042] 9. 项 7 的方法,相对于只用抗代谢物化疗剂治疗的患者,它导致整体存活有所改善。

[0043] 10. 任一前述项的方法,它导致客观响应。

[0044] 11. 项 10 的方法,它导致完全响应。

[0045] 12. 项 10 的方法,它导致部分响应。

[0046] 13. 任一前述项的方法,其中先以约 840mg 的加载剂量施用 HER2 抗体,后续大约每 3 周约 420mg。

[0047] 14. 项 1 至 12 任一项或多项的方法,其中以大约每 3 周施用约 1050mg 的剂量施用 HER2 抗体。

[0048] 15. 项 4 的方法,其中在 3 周循环的第 1 天和第 8 天以约 $600\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $1250\text{mg}/\text{m}^2$ 之间的剂量施用吉西他滨。

[0049] 16. 任一前述项的方法,其中在施用 HER2 抗体之前或之后施用抗代谢物化疗剂。

[0050] 17. 项 16 的方法,其中至少一次施用抗代谢物化疗剂和至少一次施用 HER2 抗体之

间的时间间隔是约 1 个月或更短。

[0051] 18. 项 17 的方法,其中至少一次施用抗代谢物化疗剂和至少一次施用 HER2 抗体之间的时间间隔是约 2 周或更短。

[0052] 19. 项 1 至 15 中任一项的方法,其中在单一配制剂或分开配制剂中同时对患者施用抗代谢物化疗剂和 HER2 抗体。

[0053] 20. 项 1 的方法,其中所述癌不过表达 HER2。

[0054] 21. 任一前述项的方法,还包括对患者施用第二种化疗剂。

[0055] 22. 项 21 的方法,其中所述第二种化疗剂选自紫杉烷、卡培他滨、基于铂的化疗剂、蒽环类抗生素、脂质体多柔比星、托泊替康、培美曲塞、长春花生物碱类和 TLK 286。

[0056] 23. 任一前述项的方法,其中联合抗代谢物化疗剂和 HER2 抗体的治疗对患者产生协同的、或者大于累加的治疗效益。

[0057] 24. 项 4 的方法,其中联合吉西他滨和 HER2 抗体的治疗对患者产生协同的、或者大于累加的治疗效益。

[0058] 25. 任一前述项的方法,其中所述 HER2 抗体是裸抗体。

[0059] 26. 任一前述项的方法,其中所述 HER2 抗体是完整的抗体。

[0060] 27. 项 1 至 25 任一项的方法,其中所述 HER2 抗体是包含抗原结合区的抗体片段。

[0061] 28. 任一前述项的方法,其中所述癌症是卵巢癌。

[0062] 29. 项 1 至 27 任一项的方法,其中所述癌症是原发性腹膜癌。

[0063] 30. 项 1 至 27 任一项的方法,其中所述癌症是输卵管癌。

[0064] 31. 用于治疗铂耐受性癌症的方法,所述癌症选自卵巢癌、原发性腹膜癌和输卵管癌,所述方法包括各自以有效治疗癌症的量对患者施用结合 HER2 上异二聚体结合位点的 HER2 抗体及吉西他滨。

[0065] 32. 项 31 的方法,其中所述抗体阻断 HER2 与 EGFR 或 HER3 的异二聚化。

[0066] 33. 用于治疗铂耐受性癌症的方法,所述癌症选自卵巢癌、原发性腹膜癌和输卵管癌,所述方法包括各自以有效治疗癌症的量对患者施用结合 HER2 结构域 II 的 HER2 抗体及吉西他滨。

[0067] 34. 项 33 的方法,其中所述 HER2 抗体结合 HER2 的结构域 I、II 和 III 之间的连接处。

[0068] 附图简述

[0069] 图 1A 和 1B 描述了 HER2 胞外域 (ECD) 内残基 22-645 的表位定位 (氨基酸序列, 包括信号序列, 如图 1A 所示; SEQ ID NO: 13), 是通过截短突变体分析和定点诱变测定的 (Nakamura et al., J. of Virology 61(10):6179-6191(1993); 及 Renz et al., J. Cell Biol. 125(6):1395-1406(1994))。使用聚合酶链式反应从 cDNA 制备各种 HER2-ECD 截短或点突变。将 HER2 突变体作为 gD 融合蛋白在哺乳动物表达质粒中表达。此表达质粒使用细胞巨化病毒启动子 / 增强子, SV40 终止及聚腺苷酸化信号位于所插入 cDNA 的下游。将质粒 DNA 转染到 293 细胞中。转染后那天, 在无甲硫氨酸和半胱氨酸、含 1% 透析胎牛血清和 ^{35}S 甲硫氨酸和 ^{35}S 半胱氨酸各 25 μCi 的低葡萄糖 DMEM 中通过新陈代谢将细胞标记过夜。收获上清液, 然后将 HER2 单克隆抗体或对照抗体加入上清液, 并在 4°C 温育 2-4 小时。将复合物沉淀, 加到 10-20% Tricine SDS 梯度凝胶上, 并用 100V 进行电泳。将凝胶电印迹至膜

上,并通过放射自显影进行分析。如图 1B 所示,HER2 抗体 7C2、7F3、2C4、7D3、3E8、4D5、2H11 和 3H4 结合各种 HER2ECD 表位。

[0070] 图 2A 和 2B 显示了 HER2 单克隆抗体 2C4 和 7F3 对 MCF7 细胞 rHRG β 1 活化的影响。图 2A 显示了 2C4 或 7F3 对 HRG 刺激酪氨酸磷酸化的抑制作用的剂量-应答曲线。图 2B 显示了 2C4 或 7F3 对 ^{125}I 标记 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 结合 MCF7 细胞的抑制作用的剂量-应答曲线。

[0071] 图 3 描绘了 HER2 单克隆抗体 2C4 或 7F3 对特异性 ^{125}I 标记 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 结合一组人肿瘤细胞系的抑制作用。单克隆抗体对照是不阻断 rHRG 结合的同种型匹配的鼠单克隆抗体。在存在 100nM rHRG β 1 的条件下进行平行温育,由此测定非特异性 ^{125}I 标记 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 结合。非特异性 ^{125}I 标记 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 结合的数值小于所有被测细胞系总值的 1%。

[0072] 图 4A 和 4B 显示了单克隆抗体 2C4 和 4D5 对 MDA-MB-175 (图 4A) 和 SK-BR-3 (图 4B) 细胞增殖的影响。将 MDA-MB-175 和 SK-BR-3 细胞接种于 96 孔板中并使其粘附 2 小时。实验在含 1% 血清的培养基中进行。加入 HER2 抗体或者只加入培养基,并将细胞在 37°C 温育 2 小时。随后加入 rHRG β 1 (1nM) 或者只加入培养基,并将细胞温育 4 天。对细胞单层进行清洗,并用 0.5% 结晶紫染色/固定。测量 540nm 处的吸光度以测定细胞增殖。

[0073] 图 5A 和 5B 显示了在表达低/正常水平 HER2 的 MCF7 细胞中 (图 5A) 和表达高水平 HER2 的 SK-BR-3 细胞中 (图 5B),单克隆抗体 2C4、Trastuzumab 抗体或抗 EGFR 抗体对 HER2 与 HER3 的调蛋白 (HRG) 依赖性结合的影响;参见下文实施例 2。

[0074] 图 6A 和 6B 比较了完整鼠单克隆抗体 2C4 (μ 2C4) 与嵌合 2C4Fab 片段的活性。图 6A 显示了嵌合 2C4Fab 或完整鼠单克隆抗体 2C4 对 ^{125}I -HRG 结合 MCF7 细胞的抑制作用。将 MCF7 细胞接种于 24 孔板中 (1×10^5 个细胞/孔) 并培养两天至大约 85% 汇合。结合实验如 Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465 (1996) 中所述进行。图 6B 描绘了对 MCF7 细胞中 rHRG β 1 激活 p180 酪氨酸磷酸化的抑制作用,如 Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465 (1996) 中所述进行。

[0075] 图 7A 和 7B 描述了鼠单克隆抗体 2C4 的轻链可变区 (V_L) (图 7A) 和重链可变区 (V_H) (图 7B) (分别是 SEQ ID NO:1 和 2);人源化 2C4 型式 574 的 V_L 和 V_H 结构域 (分别是 SEQ ID NO:3 和 4);及人 V_L 和 V_H 共有框架 (hum κ 1, 轻链 κ 亚组 I; hum III, 重链亚组 III) (分别是 SEQ ID NO:5 和 6) 的氨基酸序列对比。星号标示人源化 2C4 型式 574 和鼠单克隆抗体 2C4 之间或者人源化 2C4 型式 574 和人框架之间的差异。括弧内是互补决定区 (CDR)。

[0076] 图 8A 至 8C 显示了实施例 3 中通过 ELISA 测定的嵌合 Fab 2C4 (Fab. v1) 及几种人源化 2C4 变体与 HER2 胞外域 (ECD) 的结合。

[0077] 图 9 是单克隆抗体 2C4 的 V_L 和 V_H 结构域的带状图,标示了白色 CDR 主链 (L1、L2、L3、H1、H2、H3)。还显示了人源化过程中通过诱变评估的 V_H 侧链 (参见实施例 3, 表 2)。

[0078] 图 10 描绘了单克隆抗体 2C4 或 Trastuzumab 对 EGF、TGF- α 或 HRG 介导的活化促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的影响。

[0079] 图 11A 和 11B 分别显示了 Trastuzumab 轻链 (SEQ ID NO:14) 和 Trastuzumab 重链 (SEQ ID NO:15) 的氨基酸序列。

[0080] 图 12A 和 12B 分别显示了 Pertuzumab 轻链 (SEQ ID NO:16) 和 Pertuzumab 重链 (SEQ ID NO:17) 的氨基酸序列。

[0081] 图 13 以图描绘了 2C4 在 HER2 异二聚体结合位点处的结合,从而阻止与活化 EGFR 或 HER3 的异二聚化。

[0082] 图 14 描述了 HER2/HER3 与 MAPK 和 Akt 途径的偶联。

[0083] 图 15 比较了 Trastuzumab 和 Pertuzumab 的活性。

[0084] 图 16 以图描绘了 HER2 的各个结构域。

[0085] 优选实施方案的详述

[0086] I. 定义

[0087] “HER 受体”是属于 HER 受体家族的受体蛋白质酪氨酸激酶,包括 EGFR、HER2、HER3 和 HER4 受体及未来将鉴定的此家族其它成员。HER 受体通常将包含胞外结构域,它可结合 HER 配体;亲脂性跨膜结构域;保守的胞内酪氨酸激酶结构域;和含有几个可被磷酸化的酪氨酸残基的羧基末端信号结构域。HER 受体可以是“天然序列”HER 受体或其“氨基酸序列变体”。优选 HER 受体是天然序列人 HER 受体。

[0088] HER2 的胞外域包含 4 个结构域:结构域 I(大约第 1-195 位氨基酸残基)、结构域 II(大约第 196-320 位氨基酸残基)、结构域 III(大约第 321-488 位氨基酸残基)和结构域 IV(大约第 489-632 位氨基酸残基)(残基编号不包括信号肽)。参见 Garrett et al., Mol. Cell. 11:495-505(2003); Cho et al., Nature 421:756-760(2003); Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328(2004);或 Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1746-1750(1993) 以及本文图 16。

[0089] 术语“ErbB1”、“HER1”、“表皮生长因子受体”和“EGFR”在本文中可互换使用,指例如 Carpenter et al., Ann. Rev. Biochem. 56:881-914(1987) 中公开的 EGFR,包括其天然存在的突变体形式(例如删除突变体 EGFR,如 Humphrey et al., PNAS(USA) 87:4207-4211(1990))。erbB1 指编码 EGFR 蛋白质产物的基因。

[0090] 表述“ErbB2”和“HER2”在本文中可互换使用,指例如 Semba et al., PNAS(USA) 82:6497-6501(1985) 和 Yamamoto et al., Nature 319:230-234(1986) 中描述的人 HER2 蛋白(Genebank 编号 X03363)。术语“erbB2”指编码人 ErbB2 的基因,而“neu”指编码大鼠 p185^{neu}的基因。优选的 HER2 是天然序列人 HER2。

[0091] “ErbB3”和“HER3”指例如美国专利 5,183,884 和 5,480,968 及 Kraus et al., PNAS(USA) 86:9193-9197(1989) 中公开的受体多肽。

[0092] 术语“ErbB4”和“HER4”在本文中指例如欧洲专利申请 599,274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:1746-1750(1993); 及 Plowman et al., Nature 366:473-475(1993) 中公开的受体多肽,包括其同种型(isoform),例如 1999 年 4 月 22 日发布的 W099/19488 中所公开的。

[0093] “HER 配体”指结合和/或活化 HER 受体的多肽。本文中特别感兴趣的 HER 配体是天然序列人 HER 配体,诸如表皮生长因子(EGF)(Savage et al., J. Biol. Chem. 247:7612-7621(1972)); 转化生长因子 α (TGF- α)(Marquardt et al., Science 223:1079-1082(1984)); 双调蛋白,又称为施旺氏细胞瘤(schwannoma)或角质形成细胞自分泌生长因子(Shoyab et al., Science 243:1074-1076(1989); Kimura et al., Nature 348:257-260(1990); 及 Cook et al., Mol. Cell. Biol. 11:2547-2557(1991)); betacellulin(Shing et al., Science 259:1604-1607(1993); 及 Sasada et

al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 190:1173(1993)); 肝素结合表皮生长因子(HB-EGF)(Higashiyama et al., Science 251:936-939(1991)); epiregulin(Toyoda et al., J. Biol. Chem. 270:7495-7500(1995); 及 Komurasaki et al., Oncogene 15:2841-2848(1997)); α 调蛋白(见下文); 神经调节蛋白-2(NRG-2)(Carraway et al., Nature 387:512-516(1997)); 神经调节蛋白-3(NRG-3)(Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 94:9562-9567(1997)); 神经调节蛋白-4(NRG-4)(Harari et al., Oncogene 18:2681-89(1999)); 或 cripto(CR-1)(Kannan et al., J. Biol. Chem. 272(6):3330-3335(1997))。结合 EGFR 的 HER 配体包括 EGF、TGF- α 、双调蛋白、betacellulin、HB-EGF 和 epiregulin。结合 HER3 的 HER 配体包括调蛋白。能结合 HER4 的 HER 配体包括 betacellulin、epiregulin、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4 和调蛋白。

[0094] “调蛋白”(HRG)在用于本文时指由调蛋白基因编码的多肽,如美国专利 5,641,869 或 Marchionni et al., Nature 362:312-318(1993)中所公开的。调蛋白的例子包括调蛋白- α 、调蛋白- β 1、调蛋白- β 2 和调蛋白- β 3(Holmes et al., Science 256:1205-1210(1992); 及美国专利 5,641,869); neu 分化因子(NDF)(Peles et al., Cell 69:205-216(1992)); 乙酰胆碱受体诱导活性(ARIA)(Falls et al., Cell 72:801-815(1993)); 神经胶质生长因子(GGF)(Marchionni et al., Nature 362:312-318(1993)); 感觉和运动神经元衍生因子(SMDF)(Ho et al., J. Biol. Chem. 270:14523-14532(1995)); γ -调蛋白(Schaefer et al., Oncogene 15:1385-1394(1997))。此术语包括天然序列 HRG 多肽的生物学活性片段和/或氨基酸序列变体,诸如其 EGF 样结构域片段(例如 HRG β 1₁₇₇₋₂₄₄)。

[0095] “HER 二聚体”在本文中指包含至少两个不同 HER 受体的非共价结合二聚体。当表达两种或多种 HER 受体的细胞暴露于 HER 配体时可能形成此类复合物,可通过免疫沉淀进行分离并通过 SDS-PAGE 进行分析,如例如 Sliwkowski et al., J. Biol. Chem. 269(20):14661-14665(1994)中所述。此类 HER 二聚体的例子包括 EGFR-HER2、HER2-HER3 和 HER3-HER4 异二聚体。此外,HER 二聚体可包含与诸如 HER3、HER4 或 EGFR 等不同 HER 受体结合的两个或多个 HER2 受体。其它蛋白质,诸如细胞因子受体亚基(例如 gp130)可与所述二聚体结合。

[0096] HER2 上的“异二聚体结合位点”指 HER2 胞外域中在与 EGFR、HER3 或 HER4 形成二聚体时,接触 EGFR、HER3 或 HER4 胞外域中某区域或与 EGFR、HER3 或 HER4 胞外域中某区域形成介面的区域。已发现所述区域在 HER2 的结构域 II 中。Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328(2004)。

[0097] “HER 活化”或“HER2 活化”指任一种或多种 HER 受体或者 HER2 受体的活化或磷酸化作用。一般而言,HER 活化导致信号转导(例如由 HER 受体胞内激酶结构域引起的,磷酸化 HER 受体或底物多肽中的酪氨酸残基)。HER 活化可由结合包含目的 HER 受体的 HER 二聚体的 HER 配体介导。结合 HER 二聚体的 HER 配体可活化二聚体中一种或多种 HER 受体的激酶结构域,从而导致一种或多种 HER 受体中酪氨酸残基的磷酸化作用和/或其它底物多肽中酪氨酸残基的磷酸化作用,诸如 Akt 或 MAPK 胞内激酶。

[0098] “天然序列”多肽是与衍生自自然界的多肽(例如 HER 受体或 HER 配体)具有相同氨基酸序列的多肽。这样的天然序列多肽可从自然界中分离或者可通过重组或合成手段产

生。因此,天然序列多肽可具有天然存在的人多肽、鼠多肽或来自任何其它哺乳动物物种的多肽的氨基酸序列。

[0099] 术语“氨基酸序列变体”指具有某种程度上不同于天然序列多肽的氨基酸序列的多肽。通常,氨基酸序列变体与天然 HER 配体的至少一个受体结合结构域或者与天然 HER 受体的至少一个配体结合结构域将具有至少约 70% 的同源性,而且优选的是,它们与所述受体或配体结合结构域将至少约 80%,更优选至少约 90% 同源。氨基酸序列变体在天然氨基酸序列的氨基酸序列内的某些位置具有替代、删除和 / 或插入。

[0100] “同源性”定义为在必要时对比序列和引入缺口以获取最大百分比同一性后,氨基酸序列变体中相同残基的百分比。用于对比的方法和计算机程序在本领域是众所周知的。一种这样的计算机程序是“Align 2”,由 Genentech, Inc. 创作,已经在 1991 年 12 月 10 日与用户文档 (user documentation) 一起提交给美国版权局 (Washington, DC 20559)。

[0101] 术语“抗体”在本文中使用最广的含义,具体覆盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体 (如双特异性抗体)、及抗体片段,只要它们展示所需生物学活性。

[0102] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指由一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同和 / 或结合相同表位,除了生产单克隆抗体的过程中可能产生的变体外,此类变体通常以极少量存在。与典型的包含针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制品不同,每种单克隆抗体针对抗原上的同一决定簇。除了它们的特异性以外,单克隆抗体的优越性体现在它们未受到其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”指示由基本上同质的抗体群获得的抗体的特征,并不解释为需要通过任何特定方法来生产抗体。例如,依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由 Kohler et al., Nature 256:495 (1975) 描述的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组 DNA 方法来制备 (参见例如美国专利 4,816,567)。“单克隆抗体”还可使用例如 Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) 和 Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) 中描述的技术由噬菌体抗体库分离。

[0103] 单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体,其中重链和 / 或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展示所需生物学活性 (美国专利 4,816,567; 及 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。本文中感兴趣的嵌合抗体包括包含衍生自非人灵长类动物 (如旧大陆猴类 (Old World Monkey)、猿等) 的可变区抗原结合序列及人恒定区序列的“灵长类化 (primatized)”抗体。

[0104] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0105] “完整抗体”指包含抗原结合可变区以及轻链恒定区 (C_L) 和重链恒定区 C_H1、C_H2 和 C_H3 的抗体。恒定区可以是天然序列恒定区 (如人天然序列恒定区) 或其氨基酸序列变体。优选的是,完整抗体具有一项或多项效应物功能。

[0106] 抗体“效应物功能”指那些可归于抗体 Fc 区 (天然序列 Fc 区或氨基酸序列变体 Fc 区) 的生物学活性。抗体效应物功能的例子包括 C1q 结合;补体依赖性细胞毒性;Fc 受

体结合 ; 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) ; 吞噬作用 ; 细胞表面受体 (如 B 细胞受体 ; BCR) 的下调等。

[0107] 根据完整抗体的重链恒定区的氨基酸序列, 可将其归入不同的“类”(class)。完整抗体有五种主要的类别: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 其中有些可进一步分为“亚类”(subclass) (同种型), 如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。将与不同抗体类别对应的重链恒定区分别称作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是众所周知的。

[0108] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”指由细胞介导的反应, 其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒性细胞 (如天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞) 识别靶细胞上结合的抗体, 随后引起靶细胞溶解。介导 ADCC 的主要细胞, NK 细胞, 只表达 Fc γ RIII, 而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII。Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991) 中第 464 页表 3 总结了造血细胞上的 FcR 表达。为了评估目的分子的 ADCC 活性, 可进行体外 ADCC 测定法, 诸如美国专利 5,500,362 或 5,821,337 中所描述的。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。或者 / 另外, 可在体内评估目的分子的 ADCC 活性, 例如在动物模型中, 诸如 Clynes et al., *PNAS(USA)* 95:652-656(1998) 中所公开的。

[0109] “人效应细胞”指表达一种或多种 FcR 并行使效应物功能的白细胞。优选的是, 该细胞至少表达 Fc γ RIII 并执行 ADCC 效应物功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单核细胞 (PBMC)、天然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞, 优选 PBMC 和 NK 细胞。效应细胞可以从其天然来源中分离, 例如血液或 PBMC, 正如本文所述。

[0110] 术语“Fc 受体”和“FcR”用于描述与抗体 Fc 区结合的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。此外, 优选的 FcR 是与 IgG 抗体结合的 FcR (γ 受体), 包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体, 包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ RII 受体包括 Fc γ RIIA (“活化受体”) 和 Fc γ RIIB (“抑制受体”), 它们具有相似的氨基酸序列, 区别主要在于其胞质域。活化受体 Fc γ RIIA 在其胞质域中包含基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM)。抑制受体 Fc γ RIIB 在其胞质域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM) (参见综述 Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997))。FcR 的综述参见 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492(1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34(1994); 及 de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-341(1995))。术语“FcR”在本文中涵盖其它 FcR, 包括未来将会鉴定的 FcR。该术语还包括新生儿受体, FcRn, 它负责将母体的 IgG 转移给胎儿 (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587(1976) 和 Kim et al., *J. Immunol.* 24:249(1994))。

[0111] “补体依赖性细胞毒性”或“CDC”指在存在补体时分子溶解靶物的能力。补体激活途径是由补体系统第一组分 (C1q) 结合与关联抗原复合的分子 (如抗体) 起始的。为了评估补体激活, 可进行 CDC 测定法, 例如 Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163(1996) 中所描述的。

[0112] “天然抗体”通常是由两条相同的轻链 (L) 和两条相同的重链 (H) 构成的约 150,000 道尔顿的异四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接, 而二硫键的数目在具有不同免疫球蛋白同种型的重链中有所变化。每条重链和轻链还具有间隔规律的

链内二硫桥。每条重链在一端具有一个可变区 (V_H), 接着是多个恒定区。每条轻链在一端具有一个可变区 (V_L), 而另一端是一个恒定区。轻链的恒定区与重链的第一个恒定区排列在一起, 而轻链的可变区与重链的可变区排列在一起。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变区之间形成界面。

[0113] 术语“可变的”指可变区中的某些部分在抗体序列中差异广泛且用于每种特定抗体针对其特定抗原的结合和特异性的实情。然而, 变异性并非均匀分布于抗体的整个可变区。它集中于轻链和重链可变区中称作高变区的三个区段。可变区中更加高度保守的部分称作框架区 (FR)。天然重链和轻链的可变区各自包含四个 FR, 它们大多采取 β -折叠构象, 通过形成环状连接且在某些情况中形成 β -折叠结构一部分的三个高变区连接。每条链中的高变区通过 FR 非常接近的保持在一起, 并与另一条链的高变区一起促成抗体的抗原结合位点的形成 (参见 Kabat 等人, 《Sequences of Proteins of Immunological Interest》, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991)。恒定区不直接涉及抗体与抗原的结合, 但显示出多种效应物功能, 诸如抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC) 中抗体的参与。

[0114] 术语“高变区”在用于本文时指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基 (例如轻链可变区中的残基 24-34 (L1)、50-56 (L2) 和 89-97 (L3) 及重链可变区中的 31-35 (H1)、50-65 (H2) 和 95-102 (H3); Kabat 等人, 《Sequences of Proteins of Immunological Interest》, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) 和 / 或 那些来自“高变环”的残基 (例如轻链可变区中的残基 26-32 (L1)、50-52 (L2) 和 91-96 (L3) 及重链可变区中的 26-32 (H1)、53-55 (H2) 和 96-101 (H3); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。“框架”或“FR”残基指本文定义的高变区残基以外的可变区残基。

[0115] 用木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段, 称作“Fab”片段, 各自具有一个抗原结合位点, 和一个残余“Fc”片段, 其名称反映了它易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生一个 $F(ab')_2$ 片段, 它具有两个抗原结合位点, 并且仍能够交联抗原。

[0116] “Fv”是包含完整抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。该区域由紧密、非共价结合的一个重链可变区和一个轻链可变区的二聚体组成。正是在这种构造中, 各个可变区的三个高变区相互作用而在 V_H - V_L 二聚体表面确定了一个抗原结合位点。六个高变区共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而, 即使是单个可变区 (或只包含对抗原特异的三个高变区的半个 Fv) 也具有识别和结合抗原的能力, 尽管亲和力低于完整结合位点。

[0117] Fab 片段还包含轻链的恒定区和重链的第一恒定区 (CH1)。Fab' 片段因在重链 CH1 结构域的羧基末端增加了少数残基而与 Fab 片段有所不同, 包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 是本文中对其中恒定区的半胱氨酸残基携带至少一个游离硫醇基的 Fab' 的称谓。 $F(ab')_2$ 抗体片段最初是作为成对 Fab' 片段生成的, 在 Fab' 片段之间具有铰链半胱氨酸。还知道抗体片段的其它化学偶联。

[0118] 来自任何脊椎动物物种的抗体的“轻链”, 根据其恒定区的氨基酸序列, 可归入两种截然不同类型中的一种, 称作卡帕 (κ) 和拉姆达 (λ)。

[0119] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域, 其中这些结构域存在

于一条多肽链上。优选的是,该 Fv 多肽在 V_H 和 V_L 结构域之间还包含多肽接头,使得 scFv 形成抗原结合所需的结构。关于 scFv 的综述参见 Plückthun,在《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》中,第 113 卷,Rosenburg 和 Moore 编,Springer-Verlag, New York,269-315,1994。HER2 抗体 scFv 片段描述于 W093/16185 ;美国专利 5,571,894 ;和美国专利 5,587,458。

[0120] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段,该片段在同一条多肽链 (V_H - V_L) 中包含相连的重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对,迫使结构域与另一条链的互补结构域配对,并产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的描述于例如 EP 404,097 ;W0 93/11161 ;和 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)。

[0121] 非人(如啮齿类)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的高变区残基用具有所需特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常,人源化抗体将包含基本上不少于至少一个、通常两个如下可变区,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有的 FR 是人免疫球蛋白序列的 FR。任选的是,人源化抗体还将包含至少部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones et al., Nature 321:522-525 (1986) ;Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988) ;及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。

[0122] 人源化 HER2 抗体包括 huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7 和 huMAb4D5-8 或 Trastuzumab (HERCEPTIN®),如美国专利 5,821,337 的表 3 中所述,明确收入本文作为参考;人源化 520C9 (W093/21319) 和人源化 2C4 抗体,如本文所述。

[0123] 为了本文的目的,“Trastuzumab”、“HERCEPTIN®”和“huMAb4D5-8”指包含分别在 SEQ ID NO:14 和 15 中的轻链和重链氨基酸序列的抗体。

[0124] 在本文中,“Pertuzumab”和“OMNITARG™”指包含分别在 SEQ ID NO:16 和 17 中的轻链和重链氨基酸序列的抗体。

[0125] “裸的”抗体指未偶联异源分子,诸如细胞毒性模块或放射性标记物的抗体(如本文所定义的)。

[0126] “分离的”抗体指已经由其天然环境的一种成分鉴别和分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染成分指将会干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将抗体纯化至(1)根据 Lowry 法的测定,抗体重量超过 95%,最优选重量超过 99%,(2)足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个残基的 N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)通过使用考马斯蓝或优选银染的还原或非还原条件下的 SDS-PAGE 达到同质。既然抗体的天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而,分离的抗体通常将通过至少一个纯

化步骤来制备。

[0127] “比 Trastuzumab 更有效地抑制 HER 二聚化的”HER2 抗体指比 Trastuzumab 更有效（例如有效性至少增强约 2 倍）地减少或消除 HER 二聚体的抗体。优选的是，这样的抗体至少大约像选自下组的抗体那样有效地抑制 HER 二聚化：鼠单克隆抗体 2C4、鼠单克隆抗体 2C4 的 Fab 片段、Pertuzumab 和 Pertuzumab 的 Fab 片段。可以直接通过研究 HER 二聚体，或者通过评估由 HER 二聚化引起的 HER 活化或下游信号传导，和 / 或通过评估抗体-HER2 结合位点等来评估对 HER 二聚化的抑制。用于筛选有能力比 Trastuzumab 更有效地抑制 HER 二聚化的抗体的测定法见 Agus et al., Cancer Cell 2:127-137(2002) 和本文实施例 1-2 和 4。只是作为例示，可以通过评估例如下列各项来分析对 HER 二聚化的抑制：对 HER 二聚体形成的抑制（见例如 Agus et al., Cancer Cell 2:127-137(2002) 的附图 1A-B 和本文实施例 2）；降低表达 HER 二聚体的细胞中的 HER 配体活化（例如本文实施例 1 和 Agus et al., Cancer Cell 2:127-137(2002) 的附图 2A-B）；阻断 HER 配体结合表达 HER 二聚体的细胞（例如本文实施例 1 和 Agus et al., Cancer Cell 2:127-137(2002) 的附图 2E）；在存在（或缺乏）HER 配体时对表达 HER 二聚体的癌细胞（如 MCF7、MDA-MD-134、ZR-75-1、MD-MB-175、T-47D 细胞）的细胞生长的抑制（例如本文实施例 1 和 Agus et al., Cancer Cell 2:127-137(2002) 的附图 3A-D）；对下游信号传导的抑制（例如对 HRG 依赖性 AKT 磷酸化的抑制或对 HRG 或 TGF α 依赖性 MAPK 磷酸化的抑制）（见例如本文实施例 4 和 Agus et al., Cancer Cell 2:127-137(2002) 的附图 2C-D）。还可以通过研究抗体-HER2 结合位点来评估抗体是否抑制 HER 二聚化，例如通过评估与 HER2 结合的抗体的结构或模型，诸如晶体结构（见例如 Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328(2004)）。

[0128] HER2 抗体可比 Trastuzumab 更有效（例如至少 2 倍更有效）地“抑制 HRG 依赖性 AKT 磷酸化”和 / 或抑制“HRG 或 TGF α 依赖性 MAPK 磷酸化”（见例如 Agus et al., Cancer Cell 2:127-137(2002) 和本文实施例 4）。

[0129] HER2 抗体可以是“不抑制 HER2 胞外域切割”的抗体（Molina et al., Cancer Res. 61:4744-4749(2001)）。

[0130] “结合 HER2 的异二聚体结合位点的”HER2 抗体结合结构域 II 中的残基（且任选还结合 HER2 的胞外域以外的其它结构域，诸如结构域 I 和 III 中的残基），且至少在一定程度上能在空间上阻碍 HER2-EGFR、HER2-HER3 或 HER2-HER4 异二聚体的形成。Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328(2004) 表征了存放在 RCSB 蛋白质数据库（ID Code 1S78）的 HER2-Pertuzumab 晶体结构，举例说明了结合 HER2 的异二聚体结合位点的例示性抗体。

[0131] “结合 HER2 结构域 II 的”抗体结合结构域 II 中的残基和任选 HER2 的其它结构域，诸如结构域 I 和 III 中的残基。优选的是，结合结构域 II 的抗体结合 HER2 结构域 I、II 和 III 之间的连接处。

[0132] “卵巢”是女性体内位于子宫任一侧的两个小杏仁形器官之一。

[0133] “法罗皮氏管 (fallopian tube)”或“输卵管”是从雌性哺乳动物卵巢通入子宫的两条细管之一。

[0134] “腹膜”是诸如腹部等体腔的上皮层。

[0135] “卵巢癌 (Ovarian cancer)”是在一个或两个卵巢中发生的有可能威胁生命的恶性肿瘤。到卵巢癌的症状出现时，卵巢肿瘤可能已经长大到足以使癌细胞发散到整个腹部。

已经扩散到卵巢以外的卵巢癌细胞称为转移性卵巢癌。卵巢肿瘤趋向于扩散至膈、肠和 / 或网膜 (腹部覆盖和衬垫器官的脂肪层)。癌细胞还可通过淋巴管和血流扩散到其它器官。本文待治疗的卵巢癌包括三种主要类型的恶性卵巢肿瘤,即上皮肿瘤、生殖细胞肿瘤和基质肿瘤。

[0136] “原发性腹膜癌 (primary peritoneal carcinoma)”指在腹膜中发生的癌症。原发性腹膜癌在微观形态、症状、扩散模式和预后上可能与上皮卵巢癌非常相似。卵巢被切除的妇女仍然可能患上原发性腹膜癌。

[0137] “输卵管癌 (Fallopian tube carcinoma)”指输卵管和 / 或宽韧带的癌症。

[0138] “上皮肿瘤”发生于围绕在卵巢外周,称为生殖上皮的一层立方细胞中。上皮肿瘤占全部卵巢癌的可多达 90%。

[0139] “生殖细胞肿瘤”发现于卵巢的卵成熟细胞中。生殖细胞肿瘤占有卵巢癌的约 3%,多数发生于青少年和年轻女性中。

[0140] “基质肿瘤”由将卵巢维持在一起并产生雌性激素、雌激素和孕酮的结缔组织细胞发生。基质瘤占全部卵巢癌的 6%。

[0141] “肿瘤样品”在本文中是指衍生自患者肿瘤的样品或者包含来自患者肿瘤的肿瘤细胞的样品。肿瘤样品的例子在本文中包括但不限于肿瘤活组织切片检查、循环中肿瘤细胞、循环中血浆蛋白质、腹水、衍生自肿瘤或呈现肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系,以及保存的肿瘤样品,诸如福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤样品。

[0142] “生长抑制剂”在用于本文时指在体外或在体内抑制细胞,尤其是表达 HER 的癌细胞生长的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可以是显著降低 S 期的表达 HER 细胞百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进 (处于 S 期以外的位置) 的药剂,诸如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药剂。经典的 M 期阻断剂包括长春花生物碱类 (长春新碱和长春碱)、紫杉醇、和拓扑异构酶 II 抑制剂诸如多柔比星、表柔比星、柔红霉素、依托泊苷和博来霉素。那些阻滞 G1 的药剂也溢出进入 S 期停滞,例如 DNA 烷化剂诸如他莫昔芬、泼尼松、达卡巴嗪、双氯乙基甲胺、顺铂、甲氨喋呤、5- 氟尿嘧啶和 ara-C。其它信息可参见在《The Molecular Basis of Cancer》中, Mendelsohn 和 Israel 编,第 1 章,题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antiepioplastic drugs”, Murakami 等人, WB Saunders, Philadelphia, 1995, 尤其是第 13 页。

[0143] “生长抑制性”抗体的例子是那些结合 HER2 并抑制过表达 HER2 的癌细胞生长的抗体。优选的生长抑制性 HER2 抗体在约 0.5-30 μ g/ml 的抗体浓度对细胞培养中 SK-BR-3 乳房肿瘤细胞的生长抑制大于 20%, 优选大于 50% (例如从约 50% 至约 100%), 其中生长抑制是在 SK-BR-3 细胞暴露于抗体后 6 天测定的 (参见 1997 年 10 月 14 日发布的美国专利 5,677,171)。该专利及下文中更详细的描述了 SK-BR-3 细胞生长抑制测定法。优选的生长抑制性抗体是鼠单克隆抗体 4D5 的人源化变体,例如 Trastuzumab。

[0144] “诱导凋亡”的抗体指那些根据膜联蛋白 V 结合、DNA 断裂、细胞收缩、内质网膨胀、细胞破裂和 / 或膜囊形成 (称作凋亡小体) 的测定,诱导程序性细胞死亡的抗体。所述细胞通常是过表达 HER2 受体的细胞。优选所述细胞是肿瘤细胞,例如乳房、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰和膀胱细胞。在体外,所述细胞可以是 SK-BR-3、BT474、Calu3 细胞、MDA-MB-453、MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。有多种方法可用于评估与凋亡相关

的细胞事件。例如,可通过膜联蛋白结合来测量磷脂酰丝氨酸 (PS) 易位;可通过 DNA 梯化 (laddering) 来评估 DNA 断裂;而可通过亚二倍体细胞的任何增加来评估伴随着 DNA 断裂的核 / 染色质浓缩。优选的是,诱导凋亡的抗体是在利用 BT474 细胞的膜联蛋白结合测定法 (见下文) 中导致对膜联蛋白结合的诱导相对于未处理细胞提高约 2 至 50 倍,优选约 5 至 50 倍,最优选约 10 至 50 倍的抗体。诱导凋亡的 HER2 抗体的例子是 7C2 和 7F3。

[0145] “表位 2C4”指 HER2 胞外域中抗体 2C4 所结合的区域。为了筛选结合 2C4 表位的抗体,可进行常规的交叉封闭测定法,诸如《Antibodies, A Laboratory Manual》, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane, 1988 中所描述的。或者,可进行表位作图以评估抗体是否结合 HER2 的 2C4 表位 (例如 HER2 的大约第 22 位残基至大约第 584 位残基区域内的任何一个或多个残基,含;参见图 1A-1B)。表位 2C4 包含来自 HER2 胞外域中结构域 II 的残基。2C4 和 Pertuzumab 在结构域 I、II 和 III 的连接处结合 HER2 的胞外域。Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328 (2004)。

[0146] “表位 4D5”指 HER2 胞外域中抗体 4D5 (ATCC CRL 10463) 和 Trastuzumab 所结合的区域。此表位接近 HER2 的跨膜域,且在 HER2 的结构域 IV 之内。为了筛选结合 4D5 表位的抗体,可进行常规的交叉封闭测定法,诸如《Antibodies, A Laboratory Manual》, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane, 1988 中所描述的。或者,可进行表位作图以评估抗体是否结合 HER2 的 4D5 表位 (例如 HER2 的大约第 529 位残基至大约第 625 位残基区域内的任何一个或多个残基,含;参见图 1A-1B)。

[0147] “表位 7C2/7F3”指 HER2 胞外域的结构域 I 内 N 末端处 7C2 和 / 或 7F3 抗体 (各自保藏于 ATCC, 见下文) 所结合的区域。为了筛选结合 7C2/7F3 表位的抗体,可进行常规的交叉封闭测定法,诸如《Antibodies, A Laboratory Manual》, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane, 1988 中所描述的。或者,可进行表位作图以确定抗体是否结合 HER2 上的 7C2/7F3 表位 (例如 HER2 的大约第 22 位残基至大约第 53 位残基区域内的任何一个或多个残基;参见图 1A-1B)。

[0148] “治疗”指治疗性处理和预防性措施二者。需要治疗的受试者包括早就患有癌症的受试者以及要预防癌症的受试者。因此,本文中待治疗的患者可能已经诊断为患有癌症或者可能有患上癌症的倾向性或易感性。

[0149] 术语“有效量”指在患者中有效治疗癌症的药物量。药物的有效量可减少癌细胞的数目;缩小肿瘤的尺寸;抑制 (即减缓到一定程度和优选阻止) 癌细胞浸润到周围器官中;抑制 (即减缓到一定程度和优选阻止) 肿瘤转移;在某种程度上抑制肿瘤生长;和 / 或在一定程度上减轻一种或多种与癌症相关的症状。在药物可阻止生长和 / 或杀死现有癌细胞的程度上,它可以是抑制细胞的和 / 或细胞毒性的。有效量可延长无进展存活 (例如通过实体瘤的响应评估标准 (Response Evaluation Criteria for Solid Tumors, RECIST) 或 CA-125 变化来测量), 导致客观响应 (包括部分响应, PR 或完全响应, CR), 增加总体存活时间, 和 / 或改善癌症的一种或多种症状 (例如通过 FOSI 来评估)。

[0150] “总体存活 (Overall survival)”指确定的一段时间, 诸如例如从诊断或治疗开始 1 年、5 年等, 仍活着的患者。

[0151] “无进展存活 (progression free survival)”指仍活着且癌症未恶化的患者。

[0152] “客观响应 (objective response)”指可测量的响应, 包括完全响应 (complete

response, CR) 或部分响应 (partial response, PR)。

[0153] “完全响应”或“部分响应”意指响应治疗而发生癌症的所有体征消失。这并非总是意味着癌症已经治愈。

[0154] “部分响应”指响应治疗而发生一个或多个肿瘤或病变的尺寸缩小,或者体内癌症的范围缩小。

[0155] “表达 HER 的癌症”是包含在其细胞表面存在 HER 蛋白质的细胞的癌症。

[0156] “表达 HER2 的癌症”是在其细胞表面产生足够水平的 HER2 的癌症,使得 HER2 抗体可与之结合并具有对于所述癌症的治疗效果。

[0157] “过表达”HER 受体的癌症是与同一组织类型的非癌细胞相比,在其细胞表面具有显著更高水平的 HER 受体诸如 HER2 的癌症。这样的过表达可以是由基因扩增或者转录或翻译增加引起的。可在诊断或预后测定法中通过评估细胞表面上存在的 HER 蛋白质水平的增加(例如通过免疫组化测定法, IHC) 来确定 HER 受体的过表达。或者/另外,可测量细胞中 HER 编码核酸的水平,例如通过荧光原位杂交 (FISH; 参见 1998 年 10 月公布的 W098/45479)、DNA 印迹或聚合酶链式反应 (PCR) 技术,诸如实时定量 PCR (RT-PCR)。还可通过测量诸如血清等生物学流体中的脱落抗原(例如 HER 胞外域)来研究 HER 受体过表达(参见例如 1990 年 6 月 12 日发布的美国专利 4,933,294; 1991 年 4 月 18 日发布的 W091/05264; 1995 年 3 月 28 日发布的美国专利 5,401,638; 以及 Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990))。除了上述测定法之外,熟练技术人员还可利用多种体内测定法。例如,可将患者体内细胞暴露于任选用例如放射性同位素等可检测标记物标记的抗体,并且可评估抗体与患者体内细胞的结合,例如通过外部扫描放射性或通过分析取自事先已暴露于所述抗体的患者的活组织检查切片。

[0158] 相反,“不过表达 HER2 受体”的癌症是与同一组织类型的非癌细胞相比,不表达高于正常水平的 HER2 受体的癌症。

[0159] “过表达”HER 配体的癌症是与同一组织类型的非癌细胞相比,产生显著更高水平的该配体的癌症。这样的过表达可以是由基因扩增或者转录或翻译增加引起的。可通过评估患者体内,例如肿瘤活组织检查切片中所述配体(或编码它的核酸)的水平,或者通过诸如 IHC、FISH、DNA 印迹、PCR 或上述体内测定法等各种诊断测定法从诊断上确定 HER 配体的过表达。

[0160] 术语“胞毒剂”在用于本文时指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意欲包括放射性同位素(如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²和 Lu 的放射性同位素)、化疗剂、和毒素诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素,包括其片段和/或变体。

[0161] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类,诸如噻替哌 (thiotepa) 和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 烷基磺酸酯类,诸如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (piposulfan); 氮丙啶类,诸如苯佐替哌 (benzodopa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替哌 (meturedopa) 和乌瑞替哌 (uredopa); 乙撑亚胺类 (ethylenimine) 和甲基蜜胺类 (methylamelamine), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate)

和三羟甲蜜胺 (trimethylolomelamine) ; 番荔枝内酯类 (acetogenin) (尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)) ; δ -9- 四氢大麻酚 (曲大麻酚 (dronabinol), **MARINOL®**) ; β - 拉帕醌 (lapachone) ; 拉帕醇 (lapachol) ; 秋水仙素类 (colchicine) ; 白桦脂酸 (betulinic acid) ; 喜树碱 (camptothecin) (包括合成类似物拓扑替康 (topotecan) (**HYCAMTIN®**), CPT-11 (伊立替康 (irinotecan), **CAMPTOSAR®**)、乙酰喜树碱、东莨菪素 (scopolectin) 和 9- 氨基喜树碱) ; 苔藓抑素 (bryostatin) ; callystatin ; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物) ; 鬼臼毒素 (podophyllotoxin) ; 鬼臼酸 (podophyllinic acid) ; 替尼泊苷 (teniposide) ; 隐藻素类 (cryptophycin) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8) ; 多拉司他丁 (dolastatin) ; duocarmycin (包括合成类似物 KW-2189 和 CB1-TM1) ; 艾榴塞洛素 (eleutherobin) ; pancratistatin ; sarcodictyin ; 海绵抑素 (spongistatin) ; 氮芥类, 诸如氯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌氮芥 (estramustine)、异磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、松龙苯芥 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard) ; 硝基脲类, 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine) ; 抗生素类, 诸如烯二炔类 (enediynes) 抗生素 (如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (见例如 Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994))) ; 蒽环类 (dynemicin) 抗生素, 包括 dynemicin A ; 二碳磷酸盐类 (bisphosphonate), 诸如氯膦酸盐 (clodronate) ; 埃斯波霉素 (esperamicin) ; 以及新抑癌菌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (authramycin)、氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6- 二氮 -5- 氧 -L- 正亮氨酸、**ADRIAMYCIN®** 多柔比星 (doxorubicin) (包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2- 吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、依达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素 (mitomycin) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺加霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培来霉素 (peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链脲霉素 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin) ; 抗代谢物类, 诸如甲氨喋呤和 5- 氟尿嘧啶 (5-FU) ; 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨喋呤、蝶酰三谷氨酸 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate) ; 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6- 巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤 ; 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、

6-氮尿苷、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、多西氟尿啉 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine); 雄激素类, 诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸羟甲雄酮 (dromostanolone propionate)、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、曼托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸; 醋葡内酯 (aceglatone); 醛磷酰胺糖苷 (aldophosphamide glycoside); 氨基酮戊酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 氨苯吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); defofamine; 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); 依洛尼塞 (elfornithine); 醋酸羟吡唑 (elliptinium acetate); epothilone; 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟脲; 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidamine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和美登醇 (maytansinol); 安丝菌素 (ansamitocin); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamol); 二胺硝吡啶 (nitracrine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西索菲兰 (sizofiran); 锗螺胺 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecene) (尤其是 T-2 毒素、verracurin A、杆孢菌素 A (roridin A) 和蛇形菌素 (anguidine)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine) (**ELDISINE®**、**FILDESIN®**); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露醇氮芥 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabioside) (“Ara-C”); 环磷酰胺; 噻替哌; 紫杉烷类 (taxane), 如 **TAXOL®** 紫杉醇 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、**ABRAXANE™** 紫杉醇的不含克列莫佛 (Cremophor)、清蛋白改造纳米颗粒剂型 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和 **TAXOTERE®** 多西他塞 (doxetaxel) (**Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France**); 苯丁酸氮芥 (chloranbucil); 吉西他滨 (gemcitabine) (**GEMZAR®**); 6-硫鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 甲氨嘌呤; 铂类似物, 诸如顺铂和卡铂; 长春碱 (vinblastine) (**VELBAN®**); 铂; 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine) (**ONCOVIN®**); 奥沙利铂 (oxaliplatin); 亚叶酸 (leucovorin); 长春瑞滨 (vinorelbine) (**NAVELBINE®**); 诺安托 (novantrone); 依达曲沙 (edatrexate); 柔红霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤; 希罗达 (xeloda); 伊拜膦酸盐 (ibandronate); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类维 A 酸, 诸如视黄酸; 卡培他滨 (capecitabine); 以及上述任何物质的制药学可接受的盐、酸或衍生物; 以及上述两种或多种的组合, 诸如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙联合疗法的缩写) 和 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATIN™) 联合 5-FU 和亚叶酸 (leucovorin) 的治疗方案的缩写)。

[0162] 该定义还包括作用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,诸如抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂 (SERM),包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬)、雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、keoxifene、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和 **FARESTON®** 托瑞米芬 (toremifene); 抑制调节肾上腺中雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂,诸如例如 4(5)-咪唑、氨鲁米特 (aminoglutethimide)、**MEGASE®** 醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、**AROMASIN®** 依西美坦 (exemestane)、福美司坦 (formestane)、法偈唑 (fadrozole)、**RIVISOR®** 伏罗唑 (vorozole)、**FEMARA®** 来曲唑 (letrozole) 和 **ARIMIDEX®** 阿纳托唑 (anastrozole); 及抗雄激素类,诸如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡米特 (bicalutamide)、亮丙瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin); 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸,特别是那些抑制涉及粘着性细胞增殖的信号途径中的基因表达的反义寡核苷酸,诸如例如 PKC- α 、Ralf、H-Ras 和表皮生长因子受体 (EGF-R); 疫苗,诸如基因疗法疫苗,例如 **ALLOVECTIN®** 疫苗、**LEUVECTIN®** 疫苗和 **VAXID®** 疫苗; **PROLEUKIN®** rIL-2; **LURTOTECAN®** 拓扑异构酶 1 抑制剂; **ABARELIX®** rmRH; 及上述任何物质的制药学可接受的盐、酸或衍生物。

[0163] “抗代谢物化疗剂”是结构类似于代谢物,但不以生产性方式被身体所利用的药剂。许多抗代谢物化疗剂干扰核酸, RNA 和 DNA 的生成。抗代谢物化疗剂的例子包括吉西他滨 (**GEMZAR®**)、5-氟尿嘧啶 (5-FU)、卡培他滨 (XELODA™)、6-巯基嘌呤、甲氨喋呤、6-巯鸟嘌呤、培美曲塞 (pemetrexed)、雷替曲塞 (raltitrexed)、阿糖胞苷 (arabino sylcytosine, ARA-C, cytarabine) (**CYTOSAR-U®**)、达卡巴嗪 (**DTIC-DOME®**)、azocytosine、脱氧胞嘧啶 (deoxycytosine)、pyridimene、氟达拉滨 (**FLUDARA®**)、克拉屈滨 (cladribine)、2-脱氧-D-葡萄糖等。优选的抗代谢物化疗剂是吉西他滨。

[0164] “吉西他滨”或“2'-脱氧-2',2'-二氟胞嘧啶单盐酸 (b-异构体)”是展示抗肿瘤活性的核苷类似物。盐酸吉西他滨的实验式是 C₉H₁₁F₂N₃O₄·HCl。盐酸吉西他滨由 Eli Lilly 以商标 **GEMZAR®** 销售。

[0165] “基于铂的化疗剂”包括含有铂作为分子的整体组成部分的有机化合物。基于铂的化疗剂的例子包括卡铂、顺铂和奥沙利铂 (oxaliplatinum)。

[0166] “基于铂的化疗”意指用一种或多种基于铂的化疗剂任选联合一种或多种其它化疗剂的治疗法。

[0167] “铂耐受性”癌症意指在接受基于铂的化疗时病情仍进展的癌症患者 (即患者是“铂难以控制的”), 或者在完成基于铂的化疗方案后 12 个月内 (例如 6 个月内) 病情有进展的患者。

[0168] 在用于本文时,术语“EGFR 靶向药物”指结合 EGFR 并任选抑制 EGFR 活化的治疗剂。此类药剂的例子包括结合 EGFR 的抗体和小分子。结合 EGFR 的抗体的例子包括 MAb 579 (ATCC CRL HB 8506)、MAb 455 (ATCC CRL HB 8507)、MAb 225 (ATCC CRL 8508)、MAb

528(ATCC CRL 8509)(参见 Mendelsohn 等人的美国专利 4,943,533 及其变体,诸如嵌合化 225(C225或Cetuximab; **ERBUTIX®**)和重构人 225(H225)(参见 Imclone Systems Inc. 的 WO 96/40210);结合 II 型突变体 EGFR 的抗体(美国专利 5,212,290);结合 EGFR 的人源化和嵌合抗体,如美国专利 5,891,996 中所述;及结合 EGFR 的人抗体,诸如 ABX-EGF(参见 Abgenix 的 WO 98/50433)。抗 EGFR 抗体可与胞毒剂偶联,由此产生免疫偶联物(参见例如 EP 659,439A2, Merck Patent GmbH)。结合 EGFR 的小分子的例子包括 ZD1839 或 Gefitinib(IRESSA™;AstraZeneca)、CP-358774 或 Erlotinib HCl(TARCEVA™;Genentech/OSI)和 AG1478、AG1571(SU 5271;Sugen)。

[0169] “酪氨酸激酶抑制剂”是在某种程度上抑制酪氨酸激酶诸如 HER 受体的酪氨酸激酶活性的分子。这样的抑制剂的例子包括上一段中提到的 EGFR 靶向药物,以及小分子 HER2 酪氨酸激酶抑制剂诸如可从 Takeda 购买的 TAK165、优先结合 EGFR 但抑制 HER2 和 EGFR 过表达细胞的双重 HER 抑制剂诸如 EKB-569 等(可从 Wyeth 购买)、GW572016(可从 Glaxo 购买)一种口服 HER2 和 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂、及 PKI-166(可从 Novartis 购买);泛 HER(pan-HER)抑制剂,诸如 canertinib(CI-1033;Pharmacia);Raf-1 抑制剂,诸如可从 ISIS Pharmaceuticals 购买的,抑制 Raf-1 信号传导的反义剂 ISIS-5132;非 HER 靶向 TK 抑制剂,诸如可从 Glaxo 购买的 Imatinib mesylate(Gleevec™);MAPK 胞外调控激酶 I 抑制剂 CI-1040(可从 Pharmacia 购买);喹唑啉类,诸如 PD 153035, 4-(3-氯苯胺基)喹唑啉;吡啶并嘧啶类;嘧啶并嘧啶类;吡咯并嘧啶类,诸如 CGP 59326、CGP 60261 和 CGP 62706;吡啶并嘧啶类,4-(苯氨基)-7H-吡咯[2,3-d]嘧啶;姜黄素(二阿魏酰甲烷,4,5-双(4-氟苯胺基)-酞亚胺);含硝基噻吩模块的 tyrphostines;PD-0183805(Warner-Lambert);反义分子(如那些结合 HER 编码核酸的反义分子);喹喔啉(美国专利 5,804,396);tryphostins(美国专利 5,804,396);ZD6474(Astra Zeneca);PTK-787(Novartis/Schering AG);泛 HER 抑制剂,诸如 CI-1033(Pfizer);Affinitac(ISIS 3521;Isis/Lilly);Imatinib mesylate(Gleevec;Novartis);PKI 166(Novartis);GW2016(Glaxo SmithKline);CI-1033(Pfizer);EKB-569(Wyeth);Semaxinib(Sugen);ZD6474(AstraZeneca);PTK-787(Novartis/Schering AG);INC-1C11(Imclone);或任何如下专利出版物中所记载的:美国专利 5,804,396;WO 99/09016(American Cyanimid);WO 98/43960(American Cyanamid);WO 97/38983(Warner Lambert);WO 99/06378(Warner Lambert);WO 99/06396(Warner Lambert);WO 96/30347(Pfizer, Inc.);WO 96/33978(Zeneca);WO 96/3397(Zeneca);及 WO 96/33980(Zeneca)。

[0170] “抗血管生成剂”指阻断或在某种程度上干扰血管发育的化合物。抗血管生成因子可以是例如结合涉及促进血管生成的生长因子或生长因子受体的小分子或抗体。在本文中优选的抗血管生成因子是结合血管内皮生长因子(VEGF)的抗体,诸如 Bevacizumab (**AVASTEN®**)。

[0171] 术语“细胞因子”指由一种细胞群释放的、作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子是淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子包括生长激素,诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素、和牛生长激素;甲状旁腺素;甲状旁腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素类,诸如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH);肝生长因子;成纤维细胞生长因子;促乳素;胎盘催乳激

素 ; 肿瘤坏死因子- α 和- β ; 穆勒氏 (Mullerian) 抑制性物质 ; 小鼠促性腺激素相关肽 ; 抑制素 ; 激活素 (activin) ; 血管内皮生长因子 ; 整联蛋白 ; 血小板生成素 (TPO) ; 神经生长因子, 诸如 NGF- β ; 血小板衍生生长因子 ; 转化生长因子 (TGF), 诸如 TGF- α 和 TGF- β ; 胰岛素样生长因子-I 和-II ; 促红细胞生成素 (EPO) ; 骨诱导因子 (osteoinductive factor) ; 干扰素, 诸如干扰素- α 、- β 和- γ ; 集落刺激因子 (CSF), 诸如巨噬细胞 CSF (M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞 CSF (GM-CSF) 和粒细胞 CSF (G-CSF) ; 白介素 (IL), 诸如 IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12 ; 肿瘤坏死因子, 诸如 TNF- α 或 TNF- β ; 及其它多肽因子, 包括 LIF 和 kit 配体 (KL)。在用于本文时, 术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列细胞因子的生物学活性等效物。

[0172] II. HER2 抗体的产生

[0173] 下文描述了用于生成依照本发明使用的抗体的例示性技术。用于生成抗体的 HER2 抗原可以是例如可溶形式的 HER2 胞外域或其含有所需表位的部分。或者, 在其细胞表面表达 HER2 的细胞 (例如经转化而过表达 HER2 的 NIH-3T3 细胞 ; 或癌细胞系, 诸如 SK-BR-3 细胞, 参见 Stancovski et al., PNAS (USA) 88:8691-8695 (1991)) 可用于生成抗体。可用于生成抗体的其它形式 HER2 对于本领域技术人员是显而易见的。

[0174] (i) 多克隆抗体

[0175] 多克隆抗体优选通过在动物中多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射相关抗原和佐剂来生成。使用双功能或衍生化试剂, 例如马来酰亚胺苯甲酰硫代琥珀酰亚胺酯 (通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, 其中 R 和 R¹ 是不同的烃基, 将相关抗原与在待免疫的物种中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的, 例如匙孔虫血蓝蛋白、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0176] 通过将例如 100 μg 或 5 μg 蛋白质或偶联物 (分别用于兔或小鼠) 与 3 倍体积的弗氏完全佐剂混和, 并将该溶液皮内注射于多个部位, 由此将动物针对抗原、免疫原性偶联物或衍生物进行免疫。一个月后, 通过多个部位的皮下注射, 用弗氏完全佐剂中肽或偶联物初始量的 1/5-1/10 对动物进行强化。7-14 天后, 采集动物的血液, 并测定血清的抗体滴度。对动物进行强化直到滴度达到稳定。优选的是, 将动物用相同抗原但与不同蛋白质和 / 或通过不同交联剂偶联得到的偶联物进行强化。偶联物还可在重组细胞培养物中作为蛋白质融合物来制备。同样, 适当使用凝聚剂诸如明矾来增强免疫应答。

[0177] (ii) 单克隆抗体

[0178] 单克隆抗体是由一群基本上同质的抗体获得的, 即构成群体的各个抗体相同, 除了可能以很少量存在的可能的天然存在突变外。因此, 修饰语“单克隆”表示抗体的特征, 即不是分立抗体的混合物。

[0179] 例如, 单克隆抗体可通过最初由 Kohler et al., Nature 256:495 (1975) 描述的杂交瘤方法来制备, 或者可通过重组 DNA 方法来制备 (美国专利 4,816,567)。

[0180] 在杂交瘤方法中, 如上所述免疫小鼠或其它合适的宿主动物, 诸如仓鼠, 以引发生成或能够生成如下抗体的淋巴细胞, 所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质。或者, 可以在体外免疫淋巴细胞。然后, 使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合, 以形成杂交瘤细胞 (Goding,《Monoclonal Antibodies:Principles and Practice》,

59-103, Academic Press, 1986)。

[0181] 将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养,所述培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常将含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷 (HAT 培养基),这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞生长。

[0182] 优选的骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持所选抗体生成细胞稳定的高水平生成抗体、并对诸如 HAT 培养基等培养基敏感的骨髓瘤细胞。在这些细胞中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠源骨髓瘤系,诸如那些可从 Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, California, USA) 获得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的衍生系,以及可从 American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA) 获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已有描述 (Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); 及 Brodeur 等人,《Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications》,51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

[0183] 可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养基测定针对抗原的单克隆抗体的生成。优选的是,通过免疫沉淀或通过体外结合测定法,诸如放射性免疫测定法 (RIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA),测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。

[0184] 单克隆抗体的结合亲和力可通过例如 Munson et al., Anal. Biochem. 107:220 (1980) 的 Scatchard 分析来测定。

[0185] 在鉴定得到生成具有所需特异性、亲和力和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后,所述克隆可通过有限稀释流程进行亚克隆,并使用标准方法进行培养 (Goding,《Monoclonal Antibodies: Principles and Practice》,59-103, Academic Press, 1986)。适于这一目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤进行体内培养。

[0186] 可通过常规抗体纯化流程,诸如例如蛋白 A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清适当分开。

[0187] 编码单克隆抗体的 DNA 易于通过常规流程分离并测序 (例如使用能够特异性结合编码鼠源抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。以杂交瘤细胞作为所述 DNA 的优选来源。一旦分离,可将 DNA 置于表达载体中,然后将该表达载体转染到宿主细胞中,诸如不另外产生抗体蛋白质的大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。关于编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述性论文包括 Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262 (1993) 和 Plückthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992)。

[0188] 在另一个实施方案中,可从使用 McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990) 所述技术构建的噬菌体抗体库中分离抗体或抗体片段。Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991) 和 Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991) 分别描述了使用噬菌体文库分离鼠源和人源抗体。后续出版物描述了通过链改组 (Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)), 以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略 (Waterhouse et al., Nuc. Acids Res. 21:2265-2266 (1993)), 生成高亲和力 (nM 范围) 的人源抗体。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的

可行替代方法。

[0189] 还可以修饰 DNA, 例如通过替代即用人重链和轻链恒定区的编码序列代替同源鼠源序列(美国专利 4,816,567; 及 Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851(1984)), 或通过共价接合免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列。

[0190] 通常, 用此类非免疫球蛋白多肽替代抗体的恒定区, 或者用它们替代抗体的一个抗原结合位点的可变区, 以产生嵌合二价抗体, 它包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合位点及对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

[0191] (iii) 人源化抗体

[0192] 本领域已经描述了用于将非人抗体人源化的方法。优选的是, 人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基, 它们通常取自“输入”可变区。人源化可基本上依照 Winter 及其同事的方法进行 (Jones et al., Nature 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536(1988)), 通过用高变区序列替代相应的人抗体序列。因此, 此类“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 4,816,567), 其中本质上少于整个人可变区用来自非人物种的相应序列替代。在实践中, 人源化抗体通常是其中一些高变区残基和可能的一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

[0193] 用于制备人源化抗体的人可变区的选择, 包括轻链和重链, 对于降低抗原性非常重要。根据所谓的“最适 (best-fit)”方法, 用啮齿类抗体可变区序列对已知的人可变区序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类最接近的人序列作为人源化抗体的人框架区 (FR) (Sims et al., J. Immunol. 151:2296(1993); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901(1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链可变区亚组的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架区。同一框架可用于数种不同的人源化抗体 (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285(1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623(1993))。

[0194] 更为重要的是, 抗体在人源化后保持对抗原的高亲和力及其它有利的生物学特性。为了实现这一目的, 依照一种优选的方法, 通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的, 且为本领域熟练技术人员所熟悉。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像能够分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用, 即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样, 可从受体和输入序列中选出 FR 残基并进行组合, 从而获得所需抗体特征, 诸如对靶抗原的亲和力提高。通常, 高变区残基直接且最实质的涉及对抗原结合的影响。

[0195] 下文实施例 3 描述了结合 HER2 并阻断 HER 受体的配基活化的例示性人源化 HER2 抗体的生成。本文中特别感兴趣的人源化抗体基本上像鼠单克隆抗体 2C4(或其 Fab 片段)一样有效的阻断 EGF、TGF- α 和 / 或 HRG 介导的 MAPK 激活, 和 / 或基本上像鼠单克隆抗体 2C4(或其 Fab 片段)一样有效的结合 HER2。本文中的人源化抗体可以例如包含掺入人重链可变区的非人高变区残基, 而且还可以在选自 69H、71H 和 73H 的位置包含框架区 (FR) 替代, 采用的是 Kabat 等人, 《Sequences of Proteins of Immunological Interest》, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中给出的

可变区编号系统。在一个实施方案中,人源化抗体在 69H、71H 和 73H 的两个或所有位置包含 FR 替代。

[0196] 本文中的例示性目的人源化抗体包含重链可变区互补决定残基 GFTFTDVTMX,其中 X 优选是 D 或 S (SEQ ID NO:7); DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO:8); 和 / 或 NLGPSFYFDY (SEQ ID NO:9), 任选包含这些 CDR 残基的氨基酸修饰, 例如其中修饰基本上保持或改善抗体的亲和力。例如, 目的抗体变体可在上述重链可变区 CDR 序列中具有约 1 个到约 7 个或者约 5 个氨基酸替代。这样的抗体变体可通过亲和力成熟来制备, 例如如下文所述。最优选的人源化抗体包含 SEQ ID NO:4 中的重链可变区氨基酸序列。

[0197] 例如, 除了前一段落中的那些重链可变区 CDR 残基之外, 人源化抗体还可包含轻链可变区互补决定残基 KASQDVSIGVA (SEQ ID NO:10); SASYX¹X²X³, 其中 X¹ 优选是 R 或 L, X² 优选是 Y 或 E, 而 X³ 优选是 T 或 S (SEQ ID NO:11); 和 / 或 QQYYIYPYT (SEQ ID NO:12)。这样的人源化抗体任选包含上述 CDR 残基的氨基酸修饰, 例如其中修饰基本上保持或改善抗体的亲和力。例如, 目的抗体变体可在上述轻链可变区 CDR 序列中具有约 1 个到约 7 个或者约 5 个氨基酸替代。这样的抗体变体可通过亲和力成熟来制备, 例如如下文所述。最优选的人源化抗体包含 SEQ ID NO:3 中的轻链可变区氨基酸序列。

[0198] 本申请还设想了一种亲和力成熟的抗体, 它结合 HER2 并阻断 HER 受体的配基活化。亲本抗体可以是人抗体或人源化抗体, 例如包含轻链和 / 或重链可变区序列分别为 SEQ ID NO:3 和 4 的抗体 (即变体 574)。亲和力成熟的抗体优选以高于鼠 2C4 或变体 574 的亲和力结合 HER2 受体 (例如根据采用 HER2 胞外域 (ECD) ELISA 的评价, 例如亲和力改善约 2 倍或约 4 倍到约 100 倍或约 1000 倍)。例示性的用于替代的重链可变区 CDR 残基包括 H28、H30、H34、H35、H64、H96、H99, 或者两个或多个的组合 (例如这些残基中的 2、3、4、5、6 或 7 个)。用于改变的轻链可变区 CDR 残基的例子包括 L28、L50、L53、L56、L91、L92、L93、L94、L96、L97, 或者两个或多个的组合 (例如这些残基中的 2 至 3、4、5 或直到约 10 个)。

[0199] 还设想了一种各种形式的人源化抗体或亲和力成熟的抗体。例如, 人源化抗体或亲和力成熟的抗体可以是抗体片段, 诸如 Fab, 它任选与一种或多种胞毒剂偶联以产生免疫偶联物。或者, 人源化抗体或亲和力成熟的抗体可以是完整抗体, 诸如完整的 IgG1 抗体。

[0200] (iv) 人抗体

[0201] 作为人源化的替代方法, 可生成人抗体。例如, 现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫后生成完整人抗体的转基因动物 (例如小鼠)。例如, 已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区 (J_H) 基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移大量人种系免疫球蛋白基因将导致在抗原攻击后生成人抗体。参见例如 Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993); 及美国专利 5,591,669、5,589,369 和 5,545,807。

[0202] 或者, 噬菌体展示技术 (McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)) 可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变 (V) 区基因全集生成人抗体和抗体片段。根据这种技术, 将抗体 V 区基因克隆到丝状噬菌体诸如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因的读码框中, 并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝, 以抗体的功能特性为基础进行选择也导致编码展示那些特

性的抗体的基因的选择。因此,噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以多种形式进行;有关综述参见例如 Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571(1993)。V 基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson et al., *Nature* 352:624-628(1991) 从衍生自经免疫小鼠脾的小型 V 基因随机组合文库分离得到大量不同的抗噁唑酮抗体。可本质上依照 Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597(1991) 或 Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734(1993) 所述技术,由未免疫人供体构建 V 基因全集,并分离针对大量不同抗原(包括自身抗原)的抗体。还可参见美国专利 5,565,332 和 5,573,905。

[0203] 还可通过体外激活 B 细胞(参见美国专利 5,567,610 和 5,229,275)来生成抗体。

[0204] 1998 年 6 月 30 日发布的美国专利 5,772,997 和 1997 年 1 月 3 日出版的 WO 97/00271 中描述了人 HER2 抗体。

[0205] (v) 抗体片段

[0206] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(参见例如 Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117(1992) 及 Brennan et al., *Science* 229:81(1985))。然而,现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。例如,可从上文讨论的噬菌体抗体库分离抗体片段。或者,可直接从大肠杆菌回收 Fab'-SH 片段,并通过化学方法偶联形成 F(ab')₂ 片段(Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167(1992))。依照另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养物分离 F(ab')₂ 片段。用于生成抗体片段的其它技术对熟练从业人员是显而易见的。在其它实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。参见 WO 93/16185;美国专利 5,571,894;和美国专利 5,587,458。抗体片段还可以是“线性抗体”,例如如美国专利 5,641,870 中所述。所述线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

[0207] (vi) 双特异性抗体

[0208] 双特异性抗体指对至少两种不同表位具有结合特异性的抗体。例示性的双特异性抗体可结合 HER2 蛋白质的两种不同表位。其它此类抗体可将 HER2 结合位点与 EGFR、HER3 和/或 HER4 的结合位点进行组合。或者,HER2 臂可与结合白细胞上触发分子诸如 T 细胞受体分子(例如 CD2 或 CD3)或 IgG 的 Fc 受体(Fc γ R),诸如 Fc γ RI(CD64)、Fc γ RII(CD32)和 Fc γ RIII(CD16)的臂组合,使得细胞防御机制聚焦于 HER2 表达细胞。双特异性抗体还可用于将胞毒剂定位于表达 HER2 的细胞。这些抗体拥有 HER2 结合臂及结合胞毒剂(例如肥皂草毒蛋白、抗干扰素- α 、长春花生物碱、蓖麻毒蛋白 A 链、甲氨蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。可将双特异性抗体制备成长抗体或抗体片段(例如 F(ab')₂ 双特异性抗体)。

[0209] WO 96/16673 描述了一种双特异性 HER2/Fc γ RIII 抗体,而美国专利 5,837,234 公开了一种双特异性 HER2/Fc γ RI 抗体 IDM1(Osidem)。WO98/02463 显示了一种双特异性 HER2/Fc α 抗体。美国专利 5,821,337 教导了一种双特异性 HER2/CD3 抗体。MDX-210 是一种双特异性 HER2-Fc γ RIII 抗体。

[0210] 用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。全长双特异性抗体的传统生成基于两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两种链具有不同的特异性(Millstein et al., *Nature* 305:537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤

(四源杂交瘤 (quadroma)) 生成 10 种不同抗体分子的潜在混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化相当麻烦,且产物产量低。WO 93/08829 及 Traunecker et al.,EMBO J. 10:3655-3659(1991) 中公开了类似的流程。

[0211] 根据一种不同的方法,将具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。融合优选使用包含至少部分铰链、CH2 和 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定区。优选的是,在至少一种融合物中具有包含轻链结合所必需的位点的第一重链恒定区(CH1)。将编码免疫球蛋白重链融合物以及,如果需要,免疫球蛋白轻链的 DNA 插入分开的表达载体,并共转染到合适的宿主生物体中。在用于构建的三种多肽链比例不等时提供最佳产量的实施方案中,这为调整三种多肽片段的相互比例提供了很大的灵活性。然而,在至少两种多肽链以相同比率表达导致高产量时或在该比率没有特别意义时,有可能将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一个载体。

[0212] 在该方法的一个优选实施方案中,双特异性抗体由一个臂上具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链,和另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。由于免疫球蛋白轻链仅在半双特异性分子中的存在提供了分离的便利途径,因此发现这种不对称结构便于将所需双特异性复合物与不想要的免疫球蛋白链组合分开。该方法公开于 WO 94/04690。关于生成双特异性抗体的其它细节参见例如 Suresh et al.,Methods in Enzymology 121:210(1986)。

[0213] 根据美国专利 5,731,168 中描述的另一种方法,可改造一对抗体分子之间的界面,将从重组细胞培养物中回收的异二聚体的百分比最大化。优选的界面包含至少部分 C_H3 抗体恒定区。在该方法中,将第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链用较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)替换。通过用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生针对大侧链的相同或相似大小的补偿性“空腔”。这提供了较之其它不想要的终产物诸如同二聚体提高异二聚体产量的机制。

[0214] 双特异性抗体包括交联或“异源偶联”抗体。例如,异源偶联物中的一种抗体可与亲合素偶联,另一种抗体与生物素偶联。例如,此类抗体建议用于将免疫系统细胞靶向不想要的细胞(美国专利 4,676,980),和用于治疗 HIV 感染(WO 91/00360、WO 92/200373 和 EP 03089)。可使用任何便利的交联方法来制备异源偶联抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的,并且连同许多交联技术一起公开于美国专利 4,676,980。

[0215] 文献中还描述了由抗体片段生成双特异性抗体的技术。例如,可使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan et al.,Science 229:81(1985) 描述了通过蛋白水解切割完整抗体以生成 F(ab')₂ 片段的方法。将这些片段在存在二硫醇络合剂亚砷酸钠的情况下还原,以稳定邻近的二硫醇并防止分子间二硫键的形成。然后将产生的 Fab' 片段转变为硫代硝基苯甲酸酯(TNB) 衍生物。然后将 Fab'-TNB 衍生物之一通过巯基乙胺的还原重新恢复成 Fab'-硫醇,并与等摩尔量的另一种 Fab'-TNB 衍生物混合,以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可用作酶的选择性固定化试剂。

[0216] 最近的进展使得从大肠杆菌中直接回收 Fab'-SH 片段变得更加容易,这些片段可化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby et al.,J. Exp. Med. 175:217-225(1992) 描述了生成完全人源化的双特异性抗体 F(ab')₂ 分子。每个 Fab' 片段由大肠杆菌分开分泌,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合过表达

HER2 受体的细胞和正常人 T 细胞,以及触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳房肿瘤靶的溶解活性。

[0217] 还描述了从重组细胞培养物直接制备和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已使用亮氨酸拉链生成双特异性抗体。Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553(1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。抗体同二聚体在铰链区还原而形成单体,然后重新氧化而形成抗体异二聚体。这种方法也可用于生成抗体同二聚体。由 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993) 描述的“双抗体”技术提供了制备双特异性抗体片段的替代机制。该片段包含通过接头相连的轻链可变区 (V_L) 和重链可变区 (V_H),所述接头太短使得同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此,迫使一个片段上的 V_H 和 V_L 结构域与另一个片段上的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。还报道了通过使用单链 Fv (sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见 Gruber et al., J. Immunol. 152:5368(1994)。

[0218] 设想了具有超过两个效价的抗体。例如,可制备三特异性抗体。Tutt et al., J. Immunol. 147:60(1991)。

[0219] (vii) 其它氨基酸序列修饰

[0220] 设想了本文所述 HER2 抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能希望改进抗体的结合亲和力和 / 或其它生物学特性。通过将适当的核苷酸改变引入 HER2 抗体核酸或者通过肽合成法来制备 HER2 抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如 HER2 抗体氨基酸序列中的残基删除和 / 或插入和 / 或替代。只要最终的构建物具有所需特性,可进行删除、插入和替代的任何组合以获得最终的构建物。氨基酸变化还可能改变 HER2 抗体的翻译后加工,诸如改变糖基化位点的数目或位置。

[0221] 可用于鉴定 HER2 抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域的一种方法称作“丙氨酸扫描突变”,如 Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085(1989) 所述。这里,鉴定了一个或一组靶残基(例如带电荷的残基,诸如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸),并用中性或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)替代,以影响氨基酸与 HER2 抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体,推敲那些对替代显示功能敏感性的氨基酸位置。因此,虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的,但是突变本身的性质不需要预先决定。例如,为了分析在指定位点处的突变的后果,在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描诱变或随机突变,并对所表达的 HER2 抗体变体筛选所需活性。

[0222] 氨基酸序列插入包括氨基 - 和 / 或羧基 - 末端的融合,长度范围从一个残基到包含上百或更多残基的多肽,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N- 末端甲硫氨酰残基的 HER2 抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。HER2 抗体分子的其它插入变体包括在 HER2 抗体的 N- 或 C- 末端融合酶(例如用于 ADEPT) 或提高抗体血清半衰期的多肽。

[0223] 另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在 HER2 抗体分子中有至少一个氨基酸残基用不同残基替换。最感兴趣进行替代诱变的位点包括高变区,但也考虑了 FR 改变。保守替代在表 1 中显示在标题“优选替代”下。如果此类替代导致生物学活性的改变,那么可以引入表 1 中称为“例示替代”的更实质性改变,或如下文中关于氨基酸种类的进一步描

述,并筛选产物。

[0224] 表 1

[0225]

原始残基	例示替代	优选替代
Ala(A)	Val ;Leu ;Ile	Val
Arg(R)	Lys ;Gln ;Asn	Lys
Asn(N)	Gln ;His ;Asp ;Lys ;Arg	Gln
Asp(D)	Glu ;Asn	Glu
Cys(C)	Ser ;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn ;Glu	Asn
Glu(E)	Asp ;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn ;Gln ;Lys ;Arg	Arg
Ile(I)	Leu ;Val ;Met ;Ala ;Phe ;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸 ;Ile ;Val ;Met ;Ala ;Phe	Ile
Lys(K)	Arg ;Gln ;Asn	Arg
Met(M)	Leu ;Phe ;Ile	Leu

[0226]

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

[0227] 对抗体生物学特性的实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的

替代来完成：(a) 替代区域的多肽主链的结构，例如作为折叠片或螺旋构象，(b) 靶位点处分子的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积。根据其侧链特性的相似性，可将氨基酸如下分组 (A. L. Lehninger, 在《Biochemistry》中，第 2 版，73-75, Worth Publishers, New York, 1975)：

[0228] (1) 非极性的：Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M)

[0229] (2) 不带电荷的、极性的：Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q)

[0230] (3) 酸性的：Asp(D)、Glu(E)

[0231] (4) 碱性的：Lys(K)、Arg(R)、His(H)

[0232] 或者，根据共同的侧链特性，可将天然存在残基如下分组：

[0233] (1) 疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0234] (2) 中性、亲水性的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0235] (3) 酸性的：Asp、Glu；

[0236] (4) 碱性的：His、Lys、Arg；

[0237] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0238] (6) 芳香族的：Trp、Tyr、Phe。

[0239] 非保守替代将需要用这些类别之一中的一个成员交换另一个类别的。

[0240] 任何不涉及保持 HER2 抗体正确构象的半胱氨酸残基也可替代，通常用丝氨酸，以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反，可向抗体中添加半胱氨酸键以改善其稳定性（特别是当抗体是抗体片段诸如 Fv 片段时）。

[0241] 特别优选的一类替代变体牵涉替代亲本抗体（例如人源化或人抗体）的一个或多个高变区残基。通常，选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改进的生物学特性。产生此类替代变体的一种便利方法牵涉使用噬菌体展示的亲力和成熟。简而言之，将数个高变区位点（例如 6-7 个位点）突变，在各个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上，作为与各个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性（例如结合亲和力）。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点，可进行丙氨酸扫描诱变来鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者 / 另外，分析抗原 - 抗体复合物的晶体结构，以鉴定抗体和人 HER2 之间的接触点可能是有益的。所述接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候选位点。一旦产生这样的变体，如本文所述对该组变体进行筛选，可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

[0242] 抗体的另一类氨基酸变体改变了抗体的原始糖基化样式。改变意味着删除在抗体中发现的一个或多个碳水化合物模块，和 / 或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

[0243] 抗体的糖基化通常或是 N- 连接的或是 O- 连接的。N- 连接指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸（其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸）是将碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。因此，多肽中这些三肽序列其中任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O- 连接的糖基化指将糖类 N- 乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸，最常见的是丝氨酸或苏氨

酸,但也可使用 5- 羟脯氨酸或 5- 羟赖氨酸。

[0244] 向抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上文描述的三肽序列而便利地完成(用于 N- 连接的糖基化位点)。所述改变还可通过向原始抗体的序列中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(用于 O- 连接的糖基化位点)。

[0245] 编码 HER2 抗体氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然存在氨基酸序列变体的情况中),或者通过对早期制备的变体或非变体型式的 HER2 抗体进行寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

[0246] 可能希望在效应物功能方面修饰本发明的抗体,例如增强抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可通过在抗体 Fc 区中引入一个或多个氨基酸替代来实现。或者/另外,可在 Fc 区中引入半胱氨酸残基,从而使得在该区中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可具有改善的内在化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)。参见 Caron et al., J. Exp. Med. 176:1191-1195(1992) 和 Shopes, B., J. Immunol. 148:2918-2922(1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如 Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565(1993) 中描述的异双功能交联剂来制备。或者,抗体可改造成具有双重 Fc 区,并由此可具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。参见 Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230(1989)。

[0247] 为了提高抗体的血清半衰期,可如例如美国专利 5,739,277 中所述将补救受体结合表位掺入抗体(尤其是抗体片段)。在用于本文时,术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子(例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃或 IgG₄)Fc 区中负责提高 IgG 分子体内血清半衰期的表位。

[0248] (viii) 筛选具有期望特性的抗体

[0249] 上文已经描述了用于生成抗体的技术。如果需要,还可以选择具有某些生物学特征的抗体。

[0250] 为了鉴定阻断 HER 受体的配体活化的抗体,可测定抗体阻断 HER 配体结合表达 HER 受体(例如偶联另一种 HER 受体,该 HER 受体与目的 HER 受体形成 HER 异寡聚体)的细胞的能力。例如,可将天然表达或者经转染而表达 HER 异寡聚体的 HER 受体的细胞与抗体一起温育,然后暴露于经标记的 HER 配体。然后可评估 HER2 抗体阻断配体结合 HER 异寡聚体中的 HER 受体的能力。

[0251] 例如,可以基本上如下文实施例 1 中所述,以 24 孔板的形式在冰上使用单层 MCF7 培养物进行 HER2 抗体对 HRG 结合 MCF7 乳房肿瘤细胞系的抑制。可将 HER2 单克隆抗体添加到各个孔中,并温育 30 分钟。然后可加入 ¹²⁵I 标记的 rHRG β 1₁₇₇₋₂₂₄(25pm),并可继续温育 4-16 小时。可绘制剂量-应答曲线,并可计算目的抗体的 IC₅₀值。在一个实施方案中,阻断 HER 受体的配体活化的抗体在此测定法中抑制 HRG 结合 MCF7 细胞的 IC₅₀为约 50nM 或更低,更优选 10nM 或更低。当抗体是抗体片段诸如 Fab 片段时,在此测定法中抑制 HRG 结合 MCF7 细胞的 IC₅₀可以是例如约 100nM 或更低,更优选 50nM 或更低。

[0252] 或者/另外,可评估 HER2 抗体阻断 HER 异寡聚体中存在的 HER 受体的 HER 配体刺激的酪氨酸磷酸化的能力。例如,可将内源表达或者经转染而表达 HER 受体的细胞与抗体一起温育,然后使用抗磷酸酪氨酸单克隆(任选偶联有可检测标记物)测定 HER 配体依

赖性酪氨酸磷酸化活性。美国专利 5,766,863 中描述的激酶受体活化测定法也可用于测定 HER 受体活化和抗体对该活性的阻断。

[0253] 在一个实施方案中,可以基本上如下文实施例 1 中所述,筛选在 MCF7 细胞中抑制 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化的抗体。例如,可将 MCF7 细胞铺到 24 孔板中,并将 HER2 的单克隆抗体加入每个孔中,于室温温育 30 分钟;然后可向每个孔中加入 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 至终浓度 0.2nM,并可继续温育 8 分钟。从每个孔中吸走培养基,通过加入 100 μ l SDS 样品缓冲液 (5% SDS, 25mM DTT, 25mM Tris-HCl, pH 6.8) 来终止反应。可在 4-12% 梯度凝胶 (Novex) 上对每一份样品 (25 μ l) 进行电泳,然后通过电泳转移到聚偏二氟乙烯膜上。可对抗磷酸酪氨酸 (以 1 μ g/ml) 免疫印迹显影,并通过反射密度法 (reflectance densitometry) 量化 Mr 约 180,000 的主要反应性条带的强度。在此测定法中,所选抗体优选将 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化显著抑制至对照的约 0-35%。可绘制通过反射密度法测定的对 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化的抑制作用的剂量-应答曲线,并可计算目的抗体的 IC₅₀。在一个实施方案中,阻断 HER 受体的配体活化的抗体在此测定法中抑制 p180 酪氨酸磷酸化的 HRG 刺激的 IC₅₀ 为约 50nM 或更低,更优选 10nM 或更低。当该抗体是抗体片段诸如 Fab 片段时,在此测定法中抑制 HRG 刺激 p180 酪氨酸磷酸化的 IC₅₀ 可以是例如约 100nM 或更低,更优选 50nM 或更低。

[0254] 还可评估抗体对 MDA-MB-175 细胞的生长抑制作用,例如基本上如 Schaefer et al., Oncogene 15:1385-1394 (1997) 中所述。依照此测定法,可将 MDA-MB-175 细胞用 HER2 单克隆抗体 (10 μ g/mL) 处理 4 天,并用结晶紫染色。与 HER2 抗体的温育对此细胞系显示的生长抑制作用可能与使用单克隆抗体 2C4 相似。在还有一个实施方案中,外源 HRG 不会显著逆转这种抑制作用。优选的是,无论是否存在外源 HRG,该抗体将能够以大于单克隆抗体 4D5 的程度 (并且任选以大于单克隆抗体 7F3 的程度) 抑制 MDA-MB-175 细胞的细胞增殖。

[0255] 在一个实施方案中,根据免疫共沉淀实验的测定,诸如实施例 2 中所述,目的 HER2 抗体可在 MCF7 和 SK-BR-3 细胞中阻断调蛋白依赖性的 HER2 与 HER3 结合,实质上比单克隆抗体 4D5 更有效,且优选实质上比单克隆抗体 7F3 更有效。

[0256] 为了鉴定生长抑制性 HER2 抗体,可筛选抑制过表达 HER2 的癌细胞生长的抗体。在一个实施方案中,在约 0.5-30 μ g/ml 的抗体浓度,所选生长抑制性抗体能够将细胞培养中的 SK-BR-3 细胞生长抑制约 20-100%,优选约 50-100%。为了鉴定这样的抗体,可进行美国专利 5,677,171 中描述的 SK-BR-3 测定法。依照此测定法,在添加了 10% 胎牛血清、谷氨酰胺和青霉素链霉素的, F12 和 DMEM 培养基的 1:1 混合液中培养 SK-BR-3 细胞。以 20,000 个细胞将 SK-BR-3 细胞铺入 35mm 细胞培养皿 (2ml/35mm 培养皿)。每个培养皿加入 0.5-30 μ g/ml HER2 抗体。6 天后,用电子 COULTER™ 细胞计数器对细胞数计数,与未处理细胞比较。可选择那些将 SK-BR-3 细胞生长抑制约 20-100% 或约 50-100% 的抗体作为生长抑制性抗体。关于用于筛选生长抑制性抗体,诸如 4D5 和 3E8 的测定法,参见美国专利 5,677,171。

[0257] 为了选择诱导凋亡的抗体,可利用使用 BT474 细胞的膜联蛋白结合测定法。如前一段落所讨论的,在培养皿中培养和接种 BT474 细胞。然后除去培养基,只用新鲜培养基或者含有 10 μ g/ml 单克隆抗体的培养基替换。在 3 天温育期后,用 PBS 洗涤细胞单层,通过

胰蛋白酶消化脱离。然后如上文关于细胞死亡测定法所讨论的,离心细胞,重悬于 Ca^{2+} 结合缓冲液中,并等分到试管中。然后往试管中加入经标记的膜联蛋白(如膜联蛋白 V-FTIC)($1\text{ }\mu\text{g/ml}$)。可用 FACSCAN™ 流式细胞计数仪和 FACSCONVERT™ CellQuest 软件(Becton Dickinson)来分析样品。选择那些相对于对照诱导统计学显著水平的膜联蛋白结合的抗体作为诱导凋亡的抗体。除了膜联蛋白结合测定法,还可利用使用 BT474 细胞的 DNA 染色测定法。为了进行此测定法,将已经如前面两段所述用目的抗体处理过的 BT474 细胞与 $9\text{ }\mu\text{g/ml}$ HOECHST 33342™ 于 37°C 温育 2 小时,然后用 MODFIT LT™ 软件(Verity Software House)在 EPICS ELITE™ 流式细胞计数仪(Coulter Corporation)上进行分析。可选择在此测定法中诱导的凋亡细胞百分比变化比未处理细胞高 2 倍或更高(优选 3 倍或更高)(直到 100% 凋亡细胞)的抗体作为促凋亡(pro-apoptotic)抗体。

[0258] 为了筛选结合 HER2 上目的抗体所结合的表位的抗体,可进行常规交叉阻断测定法,诸如《Antibodies, A Laboratory Manual》, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane, 1988 中所述,以评估所述抗体是否交叉阻断诸如 2C4 或 Pertuzumab 等抗体与 HER2 的结合。或者/另外,可通过本领域已知的方法进行表位作图(参见例如本文图 1A 和 1B),并且/或者可研究抗体-HER2 结构(Franklin et al., Cancer Cell 5:317-328(2004))以了解抗体结合 HER2 的哪个/哪些结构域。

[0259] (ix) 免疫偶联物

[0260] 本发明还涉及包含抗体偶联胞毒剂的免疫偶联物,所述胞毒剂诸如化疗剂、毒素(例如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素,包括其片段和/或变体)或放射性同位素(即放射偶联物)。

[0261] 上文已经描述了可用于生成此类免疫偶联物的化疗剂。本文还设想了抗体与一种或多种小分子毒素的偶联物,诸如加利车霉素、美登素(美国专利 5, 208, 020)、单端孢菌毒素和 CC1065。

[0262] 在本发明的一个实施方案中,将抗体与一个或多个美登素分子偶联(例如每个抗体分子偶联约 1 个至约 10 个美登素分子)。例如可将美登素转变为 May-SS-Me, 后者可还原为 May-SH3 并与经修饰抗体反应(Chari et al., Cancer Research 52:127-131(1992))以产生美登素生物碱-抗体免疫偶联物。

[0263] 另一种目的免疫偶联物包含偶联有一个或多个加利车霉素分子的 HER2 抗体。加利车霉素抗生素家族能够在亚皮摩尔浓度产生双链 DNA 断裂。可使用的加利车霉素的结构类似物包括但不限于 γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙酰基- γ_1^I 、PSAG 和 θ_1^I (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342(1993) 和 Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928(1998))。还参见美国专利 5, 714, 586 ; 5, 712, 374 ; 5, 264, 586 ; 和 5, 773, 001, 明确收入本文作为参考。

[0264] 可使用的酶活毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa))、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素(modeccin)A 链、 α -帚曲毒素(sarcin)、油桐(Aleurites fordii)毒蛋白、香石竹(dianthin)毒蛋白、美洲商陆(Phytolacca Americana)毒蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制物、麻疯树毒蛋白(curcin)、巴豆毒蛋白(crotonin)、肥皂草(saponaire officinalis)抑制物、白树毒素(gelonin)、丝林霉素

(mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (neomycin) 和单端孢菌毒素 (tricothecenes)。参见例如 1993 年 10 月 28 日出版的 WO 93/21232。

[0265] 本发明还设想了抗体与具有核酸水解活性的化合物 (例如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶诸如脱氧核糖核酸酶 ;DNA 酶) 之间形成的免疫偶联物。

[0266] 有多种放射性同位素可用于生成放射偶联 HER2 抗体。例子包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 和 Lu 的放射性同位素。

[0267] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和胞毒剂的偶联物, 诸如 3-(2-吡啶基二巯基) 丙酸 N-琥珀酰亚胺酯 (SPDP)、4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己胺-1-羧酸琥珀酰亚胺酯、亚氨基硫烷 (IT)、亚氨酸酯 (诸如盐酸己二酰亚胺二甲酯)、活性酯类 (诸如辛二酸二琥珀酰亚胺酯)、醛类 (诸如戊二醛)、双叠氮化合物 (诸如双 (对叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物 (诸如双 (对重氮苯甲酰基) 己二胺)、二异氰酸酯 (诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物 (诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯) 的双功能衍生物。例如, 可如 Vitetta et al., Science 238:1098(1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 WO 94/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒性药物的“可切割接头”。例如, 可使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、二甲基接头或含二硫化物接头 (Chari et al., Cancer Research 52:127-131(1992))。

[0268] 或者, 可例如通过重组技术或肽合成法来制备包含 HER2 抗体和胞毒剂的融合蛋白。

[0269] 在另一个实施方案中, 可以将抗体与“受体” (诸如链霉亲和素) 偶联, 用于肿瘤的预定位, 其中对患者施用抗体-受体偶联物, 随后使用清除剂从循环中除去未结合的偶联物, 然后施用与胞毒剂 (例如放射性核苷) 偶联的“配体” (例如亲和素)。

[0270] (x) 抗体依赖性酶介导的前体药物疗法 (ADEPT)

[0271] 通过将抗体与前体药物活化酶偶联, 本发明的抗体还可用于 ADEPT, 所述前体药物活化酶将前体药物 (例如肽基化剂, 参见 WO 81/01145) 转变为活性抗癌药。参见例如 WO 88/07378 和美国专利 4,975,278。

[0272] 可用于 ADEPT 的免疫偶联物的酶组分包括能够以这样一种方式作用于前体药物从而将其转变为更具活性的细胞毒性形式的任何酶。

[0273] 可用于本发明方法的酶包括但不限于可将含磷酸盐 / 酯的前体药物转变为游离药物的碱性磷酸酶; 可将含硫酸盐 / 酯的前体药物转变为游离药物的芳基硫酸酯酶; 可将无毒 5-氟胞嘧啶转变为抗癌药物 5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶; 可将含肽的前体药物转变为游离药物的蛋白酶, 诸如沙雷氏菌蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶 (诸如组织蛋白酶 B 和 L); 可转化含 D-氨基酸替代的前体药物的 D-丙氨酰羧肽酶; 可将糖基化前体药物转变为游离药物的碳水化合物切割酶类, 诸如 β -半乳糖苷酶和神经氨酸酶; 可将 β -内酰胺衍生的药物转变为游离药物的 β -内酰胺酶; 及可将在其氨基氮处分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生的药物转变成游离药物的青霉素酰胺酶, 诸如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者, 可使用具有酶活性的抗体, 本领域也称作“抗体酶”, 将本发明的前体药物转变为游离活性药物 (参见例如 Massey, Nature 328:457-458(1987))。可如本文所述制备抗体-抗体酶偶联物, 用于将抗体酶投递至肿瘤

细胞群。

[0274] 可通过本领域众所周知的技术将本发明的酶与 HER2 抗体共价结合, 诸如使用上文讨论的异双功能交联剂。或者, 可使用本领域众所周知的重组 DNA 技术构建包含与本发明酶的至少功能活性部分连接的本发明抗体的至少抗原结合区的融合蛋白(参见例如 Neuberger et al., Nature 312:604-608(1984))。

[0275] (xi) 其它抗体修饰

[0276] 本文还设想了抗体的其它修饰。例如, 可将抗体与多种非蛋白质性质聚合物中的一种连接, 例如聚乙二醇 (PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯、或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。还可将抗体包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、在胶状药物传递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》, 第 16 版, Osol, A. 编, 1980。

[0277] 本文公开的 HER2 抗体还可配制成脂质体。可通过本领域已知的方法来制备包含抗体的脂质体, 诸如 Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688(1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030(1980); 美国专利 4, 485, 045 和 4, 544, 545; 及 1997 年 10 月 23 日出版的 WO 97/38731 中所述。美国专利 5, 013, 556 中公开了循环时间延长的脂质体。

[0278] 特别有用的脂质体可用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂类组合物通过反相蒸发法生成。将脂质体挤过具有设定孔径的滤器, 以产生具有所需直径的脂质体。可如 Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288(1982) 中所述, 将本发明抗体的 Fab' 片段经二硫化物交换反应与脂质体偶联。任选在脂质体中包含化疗剂。参见 Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484(1989)。

[0279] III. 药用配制剂

[0280] 制备依照本发明使用的抗体的治疗用配制剂, 即将具有所需纯化程度的抗体与任选的制药学可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合(《Remington's Pharmaceutical Sciences》, 第 16 版, Osol, A. 编, 1980), 以冻干配制剂或水溶液的形式贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的, 还包括缓冲剂, 诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸; 抗氧化剂, 包括抗坏血酸和甲硫氨酸; 防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵; 氯化己烷双胺; 苯扎氯铵、苯索氯铵; 酚、丁醇或苯甲醇; 对羟基苯甲酸烷基酯, 诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯; 邻苯二酚; 间苯二酚; 环己醇; 3-戊醇; 和间甲酚); 低分子量(少于约 10 个残基)多肽; 蛋白质, 诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 诸如聚乙烯吡咯烷酮; 氨基酸, 诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸; 单糖、二糖和其它碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合剂, 诸如 EDTA; 糖类, 诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇; 成盐相反离子, 诸如钠; 金属复合物(如 Zn-蛋白质复合物); 和/或非离子表面活性剂, 诸如 TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇 (PEG)。WO 97/04801 中描述了优选的冻干 HER2 抗体配制剂, 明确收入本文作为参考。

[0281] 本文中的配制剂还可含有所治疗具体适应症所必需的超过一种活性化合物, 优选那些活性互补且彼此没有不利影响的化合物。例如, 可能还希望在配制剂中提供结合 EGFR、HER2(例如结合 HER2 上不同表位的抗体)、HER3、HER4 或血管内皮生长因子 (VEGF) 的抗体。

或者 / 另外, 配制剂中还可包含化疗剂、胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂、EGFR 靶向药物、抗血管生成剂和 / 或心脏保护剂。此类分子适于以有效用于所需目的的量而联合存在。

[0282] 活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中, 例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊、在胶状药物传递系统中(例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于例如《Remington's Pharmaceutical Sciences》, 第 16 版, Osol, A. 编, 1980。

[0283] 可制备持续释放配制剂。持续释放配制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质, 该基质以定型产品的形式存在, 如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(美国专利 3, 773, 919)、L-谷氨酸和 L-谷氨酸 γ -乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0284] 用于体内施用的配制剂必须是无菌的。这可容易的通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0285] IV. 筛选适于治疗的患者

[0286] 依照本发明的一个优选实施方案, 为治疗选择的患者具有呈现 HER(且优选 HER2)活化的肿瘤。在一个实施方案中, 癌细胞中 HER(或 HER2)活化的程度显著超过同一组织类型的非癌细胞中该受体的活化水平。这样的过度活化可能是由于癌细胞中 HER 受体过表达和 / 或可用于活化 HER 受体的 HER 配体高于正常水平造成的。这样的过度活化可能引起癌细胞的恶性状态和 / 或是由癌细胞的恶性状态引起的。在有些实施方案中, 将对癌症进行诊断或预后测定法以确定是否存在导致所述 HER 受体过度活化的 HER 受体扩增和 / 或过表达。或者 / 另外, 可对癌症进行诊断或预后测定法以确定癌中是否存在造成所述受体过度活化的 HER 配体扩增和 / 或过表达。在此类癌症的子集中, 所述受体的过度活化可能是由自分泌刺激途径造成的。下文将更为详细的描述用于测定 HER 活化的多种测定法。

[0287] (i) HER 二聚体

[0288] 可对肿瘤样品评估 HER 二聚体的存在, 如指示 HER 或 HER2 活化。可使用本领域已知的任何方法来探测肿瘤中的 HER2 二聚体, 诸如 EGFR-HER2、HER2-HER3。下文描述了数种优选方法。这些方法检测非共价蛋白质-蛋白质相互作用或者另外指示目的蛋白之间的接近性。

[0289] 可使用基于免疫亲和的方法, 诸如免疫沉淀或 ELISA 来检测 HER 二聚体。在一个实施方案中, 用 HER2 抗体免疫沉淀包含来自肿瘤细胞的 HER2 的复合物, 然后通过免疫印迹对所得免疫沉淀物探查 EGFR 或 HER3 的存在。在另一个实施方案中, 可将 EGFR 或 HER3 抗体用于免疫沉淀步骤, 然后用 HER2 抗体探查免疫沉淀物。在又一个实施方案中, 可用对 EGFR、HER3、EGFR/HER2 复合物或 HER2/HER3 复合物特异的 HER 配体来沉淀复合物, 然后探查 HER2 的存在。例如, 可将配体与亲合素偶联, 并用生物素柱纯化复合物。

[0290] 在其它实施方案中, 诸如 ELISA 或抗体“夹心(sandwich)”型测定法中, 将 HER2 的抗体固定在固相支持物上, 接触肿瘤细胞或肿瘤细胞裂解物, 洗涤, 然后暴露于针对 EGFR 或 HER3 的抗体。后一种抗体的结合, 可直接检测或者通过偶联有可检测标记物的二抗来检

测,指示异二聚体的存在。在某些实施方案中,固定 EGFR 或 HER3 抗体,将 HER2 抗体用于检测步骤。在其它实施方案中,可使用 HER 配体,取代或联合 HER 抗体。

[0291] 化学或紫外交联也可用于共价连接活细胞表面的二聚体。Hunter et al., *Biochem. J.* 320:847-53。化学交联剂的例子包括二硫代双(琥珀酰亚胺基)丙酸酯(DSP)和 3,3'-二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基)丙酸酯(DTSSP)。在一个实施方案中,通过 SDS-PAGE 分析来自化学交联肿瘤细胞的细胞提取物,并用 EGFR 和 / 或 HER3 的抗体进行免疫印迹。适当分子量的超位移带(supershifted band)最有可能代表 EGFR-HER2 或 HER2-HER3 二聚体,因为 HER2 是 EGFR 和 HER3 的优选二聚化配偶。此结果可通过后续使用 HER2 抗体的免疫印迹得以证实。

[0292] 荧光共振能量转移(FRET)也可用于检测 EGFR-HER2 或 HER2-HER3 二聚体。根据能量从供体荧光团向受体荧光团的转移,FRET 检测体内和体外的蛋白质构象改变和蛋白质-蛋白质相互作用。Selvin, *Nat. Struct. Biol.* 7:730-34(2000)。只有在供体荧光团足够接近受体荧光团时才发生能量转移。在典型的 FRET 实验中,用不同荧光探针标记两个蛋白质或单一蛋白质上的两个位点。用指定波长的入射光将探针之一,供体探针激发至较高的能量状态。然后供体探针将其能量传递给第二种探针,受体探针,导致供体的荧光强度下降,而受体的荧光发射增加。为了测量能量转移的程度,将用供体和受体探针标记的样品中的供体强度与只用供体探针标记的样品中它的强度进行比较。任选的是,比较供体 / 受体以及只有受体的样品中受体的强度。合适的探针是本领域已知的,包括例如膜渗入染料,诸如荧光素和罗丹明;有机染料,诸如花青染料;以及镧系元素原子。Selvin, 同上。检测和测量能量转移的方法和仪器也是本领域已知的。Selvin, 同上。

[0293] 适于检测和测量个体细胞中蛋白质-蛋白质相互作用的基于 FRET 的技术也是本领域已知的。例如,可使用供体光漂白荧光共振能力转移(pbFRET)显微术和荧光寿命成像显微术(FSIM)来检测细胞表面受体的二聚化。Selvin, 同上;Gadella&Jovin, *J. Cell Biol.* 129:1543-58(1995)。在一个实施方案中,将 pbFRET 用于“悬浮液中”或“原位”细胞以检测和测量 EGFR-HER2 或 HER2-HER3 二聚体的形成,如 Nagy et al., *Cytometry* 32:120-131(1998)中所述。这些技术测量由于能量转移而造成的供体荧光寿命的缩短。在一个具体的实施方案中,可使用流式细胞术 Foerster 型 FRET 技术(FCET)来研究 EGFR-HER2 和 HER2-HER3 二聚化,如 Nagy et al., 同上;及 Brockhoff et al., *Cytometry* 44:338-48(2001)中所述。

[0294] 优选将 FRET 与标准免疫组化标记技术联合使用。Kenworthy, *Methods* 24:289-96(2001)。例如,可将偶联有合适荧光染料的抗体作为探针用于标记两种不同的蛋白质。如果蛋白质彼此接近,则所述荧光染料起到 FRET 的供体和受体的作用。通过标准方法检测能量转移。可通过流式细胞术手段或者通过数字显微镜系统诸如与电荷耦合器件(CCD)相机偶联的共聚焦显微镜或宽视野荧光显微镜来检测能量转移。

[0295] 在本发明的一个实施方案中,用两种不同荧光团直接标记 HER2 抗体以及或是 EGFR 或是 HER3 抗体,例如如 Nagy et al., 同上中所述。使肿瘤细胞或肿瘤细胞裂解物接触差异标记的抗体,它们在存在 EGFR-HER2 或 HER2-HER3 二聚体时起到 FRET 的供体和受体的作用。或者,将未标记的针对 HER2 以及或是 EGFR 或是 HER3 的抗体连同用作供体和受体的差异标记的二抗一起使用。参见例如 Brockhoff et al., 同上。检测能量转移并确定二

聚体的存在,如果在极接近处发现标记物的话。

[0296] 在其它实施方案中,荧光标记对 HER2 以及或是 HER1 或是 HER3 特异的 HER 受体配体并用于 FRET 研究。

[0297] 在本发明的其它实施方案中,通过使用标准的直接或间接的免疫荧光技术和共聚焦激光扫描显微术得出的 HER2 与或是 EGFR 或是 HER3 的共定位,证明了肿瘤细胞表面上二聚体的存在。或者,用激光扫描成像 (LSI) 以高通量的形式诸如微孔板检测抗体结合以及 HER2 与或是 EGFR 或是 HER3 的共定位,如 Zuck et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:11122-27 (1999) 中所述。

[0298] 在其它实施方案中,通过鉴定依赖于二聚体组分接近的酶活性来确定 EGFR-HER2 和 / 或 HER2-HER3 二聚体的存在。将 HER2 抗体与一种酶偶联,而将 EGFR 或 HER3 抗体与第二种酶偶联。加入第一种酶的第一种底物,且该反应产生第二种酶的第二种底物。这导致与另一种分子的反应,从而产生可检测的化合物,诸如染料。另一种化学药品的存在破坏第二种底物,从而阻止与第二种酶的反应,除非第一种和第二种酶以及因此两种抗体极其接近。在一个具体的实施方案中,使肿瘤细胞或细胞裂解物接触偶联有葡萄糖氧化酶的 HER2 抗体以及偶联有辣根过氧化物酶的 HER3 或 HER1 抗体。向反应中加入葡萄糖以及染料前体,诸如 DAB,以及过氧化氢酶。通过 DAB 染色后的显色来确定二聚体的存在。

[0299] 还可使用基于 eTagTM测定体系 (Aclara Bio Sciences, Mountain View, CA) 的方法来检测二聚体,如例如 2001 年 12 月 6 日发布的美国专利申请 2001/0049105 中所述,将其全文明确收入本文作为参考。eTagTM或“电泳标签”包含可检测报导物模块,诸如荧光基团。它还可包含“迁移率修饰物”,基本上由具有独特电泳迁移率的模块组成。这些模块容许在规定的电泳条件诸如毛细管电泳 (CE) 下从复杂混合物中分离并检测 eTagTM。将 eTagTM 中含有报导物模块和任选的迁移率修饰物的部分通过可切割连接基团与第一靶结合模块连接以产生第一结合化合物。第一靶结合模块特异性识别特定的第一靶物,诸如核酸或蛋白质。第一靶结合模块不受任何形式的限制,它可以是例如多核苷酸或多肽。优选的是,第一靶结合模块是抗体或抗体片段。或者,第一靶结合模块可以是 HER 受体配体或其有结合能力的片段。

[0300] 连接基团优选包含可切割模块,诸如酶底物,或者可在规定条件下断裂的任何化学键。当第一靶结合模块与其靶物结合时,引入和 / 或活化裂解剂,连接基团遭到切断,由此释放 eTagTM中含有报导物模块和迁移率修饰物的部分。因此,“游离”eTagTM的出现指示靶结合模块与其靶物的结合。

[0301] 优选的是,第二结合化合物包含裂解剂和特异性识别第二靶物的第二靶结合模块。第二靶结合模块也不受任何方式的限制,它可以是例如抗体或抗体片段或 HER 受体配体或有结合能力的配体片段。裂解剂是这样的,它在第一结合化合物和第二结合化合物极其接近的情况下将只切割连接基团。

[0302] 在本发明的一个实施方案中,第一结合化合物包含 eTagTM,其中 HER2 的抗体担当第一靶结合模块。第二结合化合物包含与能切割 eTagTM连接基团的裂解剂连接的 EGFR 或 HER3 抗体。优选的是,所述裂解剂必须活化才能切割连接基团。使肿瘤细胞或肿瘤细胞裂解物接触结合 HER2 的 eTagTM以及结合细胞表面上的 EGFR 或 HER3 的经修饰 EGFR 或 HER3 抗体。如果需要,优选除去未结合的结合化合物并活化裂解剂。如果出现 EGFR-HER2 或

HER2-HER3 二聚体,由于裂解剂接近连接基团,裂解剂将切割连接基团并释放 eTagTM。然后可通过本领域已知的任何方法来检测游离 eTagTM,诸如毛细管电泳。

[0303] 在一个实施方案中,所述裂解剂是作用于连接基团的可活化化学药品。例如,所述裂解剂可以通过使样品暴露于光照而活化。

[0304] 在另一个实施方案中,使用 EGFR 或 HER3 抗体作为第一靶结合模块来构建 eTagTM,而第二结合化合物则由 HER2 抗体来构建。

[0305] 在又一个实施方案中,使用与其对二聚体中任一 HER 受体的结合相比,特异或优先结合二聚体的抗体或其它试剂来检测 HER 二聚体。

[0306] (ii)HER2 磷酸化

[0307] 如前一节所论述的,用 EGFR、HER2 或 HER3 抗体免疫沉淀后,可任选进行二聚体的功能性测定法,作为免疫印迹的替代或补充。在一个实施方案中,用 HER3 抗体免疫沉淀后测定免疫沉淀物中的受体酪氨酸激酶活性。因为 HER3 不具有内在的酪氨酸激酶活性,所以免疫沉淀物中存在酪氨酸激酶活性指示 HER3 最有可能与 HER2 相结合。Graus-Porta et al.,EMBO J. 16:1647-55(1997);Klapper et al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4995-5000(1999)。此结果可通过用 HER2 抗体进行免疫印迹得到证实。在另一个实施方案中,用 HER2 抗体免疫沉淀后测定 EGFR 受体酪氨酸激酶活性。在此测定法中,使免疫沉淀物接触放射性 ATP 和模拟 EGFR 对 HER2 的转磷酸作用的体内位点的肽底物。所述肽的磷酸化指示共沉淀及由此 EGFR 与 HER2 的二聚化。受体酪氨酸激酶活性测定法是本领域众所周知的,包括检测靶底物磷酸化的测定法,例如用磷酸酪氨酸抗体,以及检测相关信号转导途径,诸如 MAPK 途径激活的测定法。

[0308] 可通过一种或多种 HER 受体诸如 HER (HER2) 受体的免疫沉淀和蛋白质印迹分析来评估 HER 受体的磷酸化。例如,使用抗磷酸酪氨酸抗体来检测免疫沉淀的 HER 受体中磷酸化酪氨酸残基,通过凝胶上存在出现磷酸-HER2 带确定为阳性。抗磷酸酪氨酸抗体可购自 Pan Vera (Madison, WI), Invitrogen 的子公司、Chemicon International Inc. (Temecula, CA) 或 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)。通过缺乏该条带而确定为阴性。

[0309] 在另一个实施方案中,使用磷酸特异性 HER2 抗体 (克隆 PN2A;Thor et al.,J. Clin. Oncol. 18(18):3230-3239(2000)) 通过免疫组化来评估 HER (HER2) 受体的磷酸化。

[0310] 用于检测 HER 受体磷酸化的其它方法包括但不限于 KIRA、ELISA (美国专利 5,766,863;5,891,650;5,914,237;6,025,145;和 6,287,784)、质谱 (比较磷酸化和未磷酸化 HER2 的大小)、以及使用 HER (例如 HER2) 抗体和磷酸特异性或磷酸酪氨酸特异性抗体二者的 e- 标签接近性测定法 (例如使用购自 Aclara BioSciences (Mountain View, CA) 的 eTagTM测定试剂盒)。有关 eTag 测定法的细节见上文。

[0311] 还可在细胞阵列中使用磷酸特异性抗体来检测细胞样品中信号转导蛋白的磷酸化状态 (US 2003/0190689)。

[0312] (iii)HER2 配体

[0313] 可依照已知流程来测定肿瘤中或与肿瘤相关的 HER 配体诸如 TGF- α 的水平。这样的测定法可检测待测样品中的蛋白质和 / 或编码它的核酸。在一个实施方案中,可使用免疫组化 (IHC) 来测定肿瘤中的 HER 配体水平;参阅例如 Scher et al.,Clin. Cancer Research 1:545-550(1995)。或者 / 另外,可评估待测样品中 HER 配体编码核酸的水平;例

如通过 FISH、DNA 印迹或 PCR 技术。

[0314] (iv) 非 HER2 过表达癌症

[0315] 尽管癌症的特征可以是 HER2 受体的过表达,但本申请还提供了用于治疗不认为是 HER2 过表达的癌症的方法。

[0316] 为了测定癌症中的 HER2 表达,可以利用多种诊断/预后测定法。在一个实施方案中,可通过 IHC 来分析 HER2 过表达,例如使用 HERCEPTEST® (Dako)。可将来自肿瘤活组织检查的石蜡包埋组织切片进行 IHC 测定并遵循如下 HER2 蛋白质染色强度标准:

[0317] 得分 0:在少于 10%的肿瘤细胞中未观察到染色或者观察到膜染色。

[0318] 得分 1+:在超过 10%的肿瘤细胞中检测到微弱的/刚刚可察觉的膜染色。所述细胞只在其部分膜上有染色。

[0319] 得分 2+:在超过 10%的肿瘤细胞中观察到微弱至中等的完全膜染色。

[0320] 得分 3+:在超过 10%的肿瘤细胞中观察到中等至强烈的完全膜染色。

[0321] 那些 HER2 过表达评估得分 0 或 1+ 的肿瘤可鉴定为未过表达 HER2,而那些得分 2+ 或 3+ 的肿瘤可鉴定为过表达 HER2。

[0322] 过表达 HER2 的肿瘤可根据对应于每个细胞表达的 HER2 分子拷贝数的免疫组化得分进行定级,并且可通过生化方法测定:

[0323] 0 = 0-10,000 个拷贝/细胞,

[0324] 1+ = 至少约 200,000 个拷贝/细胞,

[0325] 2+ = 至少约 500,000 个拷贝/细胞,

[0326] 3+ = 至少约 2,000,000 个拷贝/细胞。

[0327] 导致酪氨酸激酶的配体依赖性活化的 3+ 水平的 HER2 过表达 (Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7159-7163(1987)) 发生于约 30%的乳癌中,而且在这些患者中,无复发存活和总体存活减少 (Slamon et al., Science 244:707-712(1989); Slamon et al., Science 235:177-182(1987))。

[0328] 或者/另外,可对福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织进行 FISH 测定法诸如 INFORM™(由 Ventana, Arizona 销售)或 PATHVISION™(Vysis, Illinois)以测定肿瘤中 HER2 过表达的程度(如果有的话)。

[0329] 在一个实施方案中,所述癌症将是表达(且可以是过表达)EGFR 的癌症,可对所述过表达进行评估,作为用于评估如上所述 HER2 表达的方法。

[0330] 还可利用体内诊断测定法来评估 HER 受体或 HER 配体过表达或扩增,例如通过施用结合待检测分子且标记有可检测标记物(例如放射性同位素)的分子(诸如抗体),然后对患者进行外部扫描以定位所述标记物。

[0331] V. 使用 HER2 抗体的治疗

[0332] 依照本发明,设想了 HER2 抗体可用于治疗化疗耐受性癌症或铂耐受性癌症,诸如铂耐受性癌症。所述癌症通常将包含 HER2 表达细胞,使得本文的 HER2 抗体能结合所述癌细胞。

[0333] 用 HER2 抗体,优选 Pertuzumab 和抗代谢物化疗剂,优选吉西他滨联合治疗患者。联合施用包括使用分开的配制剂或单一的药用配制剂的共施用或同时施用,以及任一次序的连续施用,其中优选有一段时间所有两种(或多种)活性剂同时发挥其生物学活性。因

此,可在施用 HER2 抗体之前或之后施用抗代谢物化疗剂。在此实施方案中,至少一次抗代谢物制剂的施用和至少一次 HER2 抗体的施用之间的计时优选为约 1 个月或更短,且最优选约 2 周或更短。或者,以单一的配制剂或分开的配制剂同时对患者施用抗代谢物化疗剂和 HER2 抗体。

[0334] 联合疗法将导致癌症的体征或症状改善。例如,这样的治疗可导致相对于只用抗代谢物化疗剂进行治疗的患者,存活有所提高(总体存活和/或无进展存活),并且/或者可导致客观临床响应(部分的或完全的)。此外,抗代谢物化疗剂(例如吉西他滨)和 HER2 抗体(例如 Pertuzumab)的联合治疗可对患者产生协同的、或者大于累加的治疗效益。

[0335] 优选的,所施用的 HER2 抗体是裸抗体。然而,所施用的 HER2 抗体可偶联胞毒剂。优选的是,免疫偶联物和/或其所结合的 HER2 蛋白质受到细胞的内在化,导致免疫偶联物杀伤其所结合的癌细胞的治疗功效提高。在一个优选的实施方案中,胞毒剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。此类胞毒剂的例子包括美登木素生物碱、加利车霉素、核糖核酸酶和 DNA 内切核酸酶。

[0336] 依照已知方法对人类患者施用 HER2 抗体(或 HER2 抗体免疫偶联物)和抗代谢物化疗剂,诸如静脉内施用,例如推注或一段时间的连续输注,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内(intracerebrospinal)、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入路径。HER2 抗体和抗代谢物化疗剂可以但不是必须通过相同的施用路径施用。优选静脉内施用抗体和抗代谢物化疗剂二者。

[0337] 对于疾病的预防或治疗,HER2 抗体的适当剂量将取决于如上定义的待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和进程、施用 HER2 抗体是为了预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床史和对 HER2 抗体的响应,以及主治医师的判断。适当的在某一时间或者通过一系列治疗对患者施用 HER2 抗体。根据疾病的类型和严重程度,对患者施用的初始候选剂量是约 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 至 50mg/kg (例如 $0.1\text{--}20\text{mg/kg}$)HER2 抗体,无论是通过例如一次或多次分开的施用,或者通过连续输注。在一个实施方案中,HER2 抗体的初始输注时间可以长于后续输注时间,例如初始输注为约 90 分钟,而后续输注为约 30 分钟(如果初始输注耐受良好的话)。优选的 HER2 抗体剂量将在约 0.05mg/kg 至约 10mg/kg 的范围内。因此,可对患者施用约 0.5mg/kg 、 2.0mg/kg 、 4.0mg/kg 或 10mg/kg (或其任意组合)的一剂或多剂。这样的剂量可间歇施用,例如,每周或每三周(例如使得患者接受约 2 剂至约 20 剂,例如约 6 剂 HER2 抗体)。可以首先施用较高的加载剂量,后续较低的一剂或多剂。在一个实施方案中,首先以约 840mg 的加载剂量施用 HER2 抗体,然后大约每三周施用约 420mg 。在另一个实施方案中,大约每 3 周以 1050mg 的一剂施用 HER2 抗体。

[0338] 抗代谢物化疗剂通常以其已知剂量施用,或者任选由于药物的联合作用或者由于施用抗代谢物化疗剂造成的不良副作用而降低剂量。可依照制造商的说明书使用此类化疗剂的制备和服药时间表,或者凭熟练技术人员的经验确定。此类化疗剂的制备和服药时间表还可参见 Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams&Wilkins, Baltimore, MD(1992)。其中抗代谢物化疗剂是吉西他滨,优选的是,例如在三周循环的第 1 天和第 8 天施用约 600mg/m^2 至 1250mg/m^2 之间(例如约 1000mg/m^2)的一剂。

[0339] 除了 HER2 抗体和抗代谢物化疗剂之外,还可联合其它治疗方案。例如,可施用第二(第三、第四、等等)化疗剂,其中第二种化疗剂或是另一种不同的抗代谢物化疗剂,或是

非抗代谢物的化疗剂。例如,第二种化疗剂可以是紫杉烷(诸如Paclitaxel或Docetaxel)、卡培他滨或基于铂的化疗剂(诸如卡铂、顺铂和奥沙利铂)、蒽环类抗生素(诸如多柔比星,包括脂质体多柔比星)、托泊替康、培美曲塞、长春花生物碱(诸如长春瑞滨)和 TLK 286。可以施用不同化疗剂的“鸡尾酒”。

[0340] 可与 HER2 抗体和抗代谢物化疗剂联合的其它治疗剂包括以下任一种或多种:第二种不同的 HER2 抗体(例如生长抑制性 HER2 抗体诸如 Trastuzumab 等或诱导 HER2 过表达细胞凋亡的 HER2 抗体诸如 7C2、7F3 或其人源化变体);靶向另一种肿瘤相关抗原诸如 EGFR、HER3、HER4 的第二种抗体;抗激素化合物,例如抗雌激素化合物诸如他莫昔芬,或芳香酶抑制剂;心脏保护剂(以预防或减轻与治疗有关的任何心肌功能障碍);细胞因子;EGFR 靶向药物(诸如 **TARCEVA®**、**IRESSA®** 或 Cetuximab);抗血管生成剂(尤其是 Genentech 销售的 Bevacizumab, 商标为 AVASTIN™);酪氨酸激酶抑制剂;COX 抑制剂(例如 COX-1 或 COX-2 抑制剂);非类固醇抗炎药, Celecoxib (**CELEBREX®**);法呢基转移酶抑制剂(例如可从 Johnson and Johnson 购买的 Tipifarnib/ **ZARNESTRA®** R115777 或可从 Schering-Plough 购买的 Lonafarnib SCH66336);结合癌胚蛋白 CA 125 的抗体,诸如 Oregovomab(MoAb B43.13);HER2 疫苗(诸如 Pharmexia 的 HER2Auto Vac 疫苗,或 Dendreon 的 APC8024 蛋白质疫苗,或 GSK/Corixa 的 HER2 肽疫苗);其它 HER 靶向疗法(例如 trastuzumab、cetuximab、gefitinib、erlotinib、CI1033、GW2016 等);Raf 和 / 或 ras 抑制剂(参见例如 WO 2003/86467);Doxil;托泊替康(Topotecan);紫杉烷;GW572016;TLK286;EMD-7200;治疗恶心的药物,诸如血清素拮抗剂、类固醇或苯并二氮卓类(benzodiazepien);预防或治疗皮疹的药物或标准痤疮疗法,包括局部或口服抗生素;降体温药物,诸如醋氨酚(acetaminophen)、苯海拉明(diphenhydramine)或哌替啶(meperidine);造血生长因子,等等。

[0341] 任何上述共施用药剂的合适剂量就是那些目前所使用的剂量,并且可由于该药剂与 HER2 抗体的联合作用(协同作用)而降低。

[0342] 除了上述治疗方案,还可对患者进行手术去除癌细胞和 / 或放疗。

[0343] 除了对患者施用抗体,本申请设想了通过基因疗法来施用抗体。表述“施用抗体”涵盖编码抗体的核酸的此类施用。参见例如 1996 年 3 月 14 日出版的 WO 96/07321,它关注通过基因疗法来生成胞内抗体。

[0344] 有两种主要方法使核酸(任选包含在载体中)进入患者的细胞,即体内和回体(ex vivo)。对于体内投递,通常在需要抗体的部位将核酸直接注射到患者体内。对于回体治疗,采集患者的细胞,将核酸导入这些分离的细胞,并将经过修饰的细胞或是直接施用于患者,或是例如装入多孔膜内并植入患者体内(参见例如美国专利 4,892,538 和 5,283,187)。有多种技术可用于将核酸导入活细胞。这些技术根据是将核酸转移至目的宿主的体外培养细胞还是体内细胞而有所变化。适于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-右旋糖苷、磷酸钙沉淀法等。常用于回体投递基因的载体是逆转录病毒。

[0345] 目前优选的体内核酸转移技术包括用病毒载体(诸如腺病毒、I 型单纯疱疹病毒或腺伴随病毒)和基于脂质的系统(可用于脂质介导的基因转移的脂质有例如 DOTMA、DOPE

和 DC-Chol) 进行的转染。在有些情况中,希望与靶向靶细胞的试剂一起提供核酸源,诸如对细胞表面膜蛋白或靶细胞特异的抗体、靶细胞上受体的配体等。在采用脂质体时,与胞吞作用相关细胞表面膜蛋白结合的蛋白质可用于靶向和 / 或促进摄入,例如对特定细胞类型具有向性的衣壳蛋白或其片段、在循环中进行内在化的蛋白质的抗体、和靶向细胞内定位和增加细胞内半衰期的蛋白质。例如 Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432(1987); 及 Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414(1990) 中描述了受体介导的胞吞技术。关于目前已知的基因标记和基因治疗方案的综述参见 Anderson et al., Science 256:808-813(1992)。还可参见 W093/25673 及其引用的参考文献。

[0346] VI. 材料的保藏

[0347] 以下杂交瘤细胞系已保藏于美国典型培养物保存中心 (American Type Culture Collection, ATCC) (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA) :

[0348]

抗体名称	ATCC 编号	保藏日期
7C2	ATCC HB-12215	1996 年 10 月 17 日
7F3	ATCC HB-12216	1996 年 10 月 17 日
4D5	ATCC CRL 10463	1990 年 5 月 24 日
2C4	ATCC HB-12697	1999 年 4 月 8 日

[0349] 下面的非限制性实施例例示了本发明的更多细节。说明书中所有引用文献的内容均明确收入本文作为参考。

实施例

[0350] 实施例 1 : 单克隆抗体 2C4 的生成和鉴定

[0351] 如 Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558(1990) 所述生成特异结合 HER2 胞外域的鼠单克隆抗体 2C4、7F3 和 4D5。简而言之,用含 25mM EDTA 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 收获如 Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:7159-7163(1987) 中所述生成的 NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ 细胞 (表达约 1×10^5 个 HER2 分子 / 细胞), 并用于免疫 BALB/c 小鼠。在第 0、2、5 和 7 周给小鼠腹膜内注射悬浮于 0.5ml PBS 中的 10^7 个细胞。在第 9 和 13 周给具有免疫沉淀 ³²P 标记 HER2 的抗血清的小鼠腹膜内注射小麦胚芽凝集素 -Sepharose (WGA) 纯化的 HER2 膜提取物。随后静脉内注射 0.1ml HER2 制备物, 并将脾细胞与小鼠骨髓瘤系 X63-Ag8.653 融合。

[0352] 通过 ELISA 和放射免疫沉淀对杂交瘤上清液筛选 HER2 结合。

[0353] 通过竞争性结合分析确定单克隆抗体 4D5、7F3 和 2C4 所结合的 HER2 表位 (Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558(1990))。使用 PANDEX™ Screen Machine 来量化荧光, 在完整细胞上通过直接荧光来进行抗体的交叉封闭研究。使用已建立的方法, 将各单克隆抗体与异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联 (Wofsy et al., Selected Methods in Cellular Immunology p. 287, Mishel and Schiigi (eds.) San Francisco: W. J. Freeman Co., 1980)。

将 NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ 细胞的汇合单层胰酶消化,洗涤一次,并以 1.75×10^6 个细胞/ml 重悬于含 0.5% 牛血清清蛋白 (BSA) 和 0.1% NaN₃ 的冷 PBS 中。加入终浓度 1% 的胶乳颗粒 (IDC, Portland, OR) 以减少 PANDEX™ 平板膜的堵塞。将 20 μ l 细胞悬浮液和 20 μ l 纯化的单克隆抗体 (100 μ g/ml 至 0.1 μ g/ml) 加入 PANDEX™ 平板孔中并在冰上温育 30 分钟。将 20 μ l 预定稀释度的 FITC 标记的单克隆抗体加入各孔中,温育 30 分钟,洗涤,并用 PANDEX™ 量化荧光。如果与无关单克隆抗体对照相比,各种单克隆抗体相互阻断结合达 50% 或更多,则认为这些单克隆抗体共享某一表位。在此实验中,单克隆抗体 4D5、7F3 和 2C4 分别指派表位 I、G/F 和 F。

[0354] 用乳房肿瘤细胞系 SK-BR-3 评估单克隆抗体 2C4、7F3 和 4D5 的生长抑制特征 (参见 Hudziak et al., *Molec. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172(1989))。简而言之,用 0.25% (vol/vol) 胰蛋白酶使 SK-BR-3 细胞脱离,并以 4×10^5 个细胞/ml 的密度悬浮于完全培养基。将 100 μ l (4×10^4 个细胞) 等分试样铺入 96 孔微量稀释板,使细胞粘附,然后加入 100 μ l 单纯的培养基或含单克隆抗体 (终浓度 5 μ g/ml) 的培养基。72 小时后,用 PBS (pH 7.5) 洗涤平板两次,用结晶紫 (0.5%, 溶于甲醇) 染色,并分析相对细胞增殖,如 Sugarman et al., *Science* 230:943-945(1985) 中所述。单克隆抗体 2C4 和 7F3 抑制 SK-BR-3 相对细胞增殖分别达约 20% 和约 38%, 比较而言用单克隆抗体 4D5 则达到约 56% 的抑制。

[0355] 对单克隆抗体 2C4、4D5 和 7F3 评估它们抑制来自 MCF7 细胞全细胞裂解物、Mr 180,000 范围内的蛋白质的 HRG 刺激的酪氨酸磷酸化的能力 (Lewis et al., *Cancer Research* 56:1457-1465(1996))。据报道, MCF7 细胞表达所有已知的 HER 受体,但水平相对较低。由于 HER2、HER3 和 HER4 具有近乎相同的分子量大小,因此在通过蛋白质印迹分析评估全细胞裂解物时不可能辨别哪种蛋白质的酪氨酸磷酸化了。

[0356] 然而,这些细胞是 HRG 酪氨酸磷酸化测定法的理想材料,因为在所用测定条件下,在缺乏外源添加的 HRG 时,它们在分子量 Mr 180,000 范围内呈现出低至不可检测水平的酪氨酸磷酸化蛋白质。

[0357] 将 MCF7 细胞铺入 24 孔板并将 HER2 的单克隆抗体加入各孔中,于室温温育 30 分钟,然后向各孔中加入 rHRG β 1₁₇₇₋₂₄₄ 至终浓度 0.2nM,继续温育 8 分钟。小心从各孔中吸出培养基,并加入 100 μ l SDS 样品缓冲液 (5% SDS, 25mM DTT 和 25mM Tris-HCl, pH 6.8) 终止反应。将各样品 (25 μ l) 在 4-12% 梯度凝胶 (Novex) 上进行电泳,然后电泳转移至聚偏二氟乙烯膜上。对抗磷酸酪氨酸 (4G10, 来自 UBI, 以 1 μ g/ml 使用) 免疫印迹显影,并如前文所述,通过反射密度法对分子量约 180,000 处的主要反应性条带强度进行定量 (Holmes et al., *Science* 256:1205-1210(1992); Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.* 269:14661-14665(1994))。

[0358] 单克隆抗体 2C4、7F3 和 4D5 显著抑制分子量 180,000 处的 HRG 诱导的酪氨酸磷酸化信号的产生。在缺乏 HRG 时,这些抗体都不能刺激分子量 180,000 范围内的蛋白质的酪氨酸磷酸化。同样,这些抗体不与 EGFR (Fendly et al., *Cancer Research* 50:1550-1558(1990))、HER3 或 HER4 发生交叉反应。抗体 2C4 和 7F3 显著抑制 HRG 刺激的 p180 酪氨酸磷酸化,达到小于对照的 25%。单克隆抗体 4D5 能阻断 HRG 刺激的酪氨酸磷酸化,达约 50%。图 2A 显示了通过反射密度法测定的 2C4 或 7F3 抑制 HRG 刺激的 p180 酪氨酸磷酸化的剂量-应答曲线。使用 4 参数拟合评估这些抑制曲线,得到 2C4 和 7F3 的 IC₅₀

分别为 $2.8 \pm 0.7 \text{ nM}$ 和 $29.0 \pm 4.1 \text{ nM}$ 。

[0359] 以 24 孔板的形式在冰上用单层培养物进行 HER2 抗体对 HRG 结合 MCF7 乳房肿瘤细胞系的抑制 (Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465(1996))。将 HER2 单克隆抗体加入各孔中并温育 30 分钟。加入 ^{125}I 标记的 rHRG $\beta 1_{177-224}$ (25pm), 继续温育 4 至 16 小时。图 2B 提供了 2C4 或 7F3 抑制 HRG 结合 MCF7 细胞的剂量 - 应答曲线。在存在 ^{125}I 标记 rHRG $\beta 1$ 的情况下, 将不同浓度的 2C4 或 7F3 与 MCF7 细胞一起温育, 抑制曲线如图 2B 所示。分析这些数据得到 2C4 和 7F3 的 IC_{50} 分别为 $2.4 \pm 0.3 \text{ nM}$ 和 $19.0 \pm 7.3 \text{ nM}$ 。2C4 和 7F3 的最大抑制约 74% 是与酪氨酸磷酸化数据一致的。

[0360] 为了确定在 MCF7 细胞上观察到的 HER2 抗体的效果是否是普遍现象, 将人肿瘤细胞系与 2C4 或 7F3 一起温育并测定特异性 ^{125}I 标记的 rHRG $\beta 1$ 结合的程度 (Lewis et al., Cancer Research 56:1457-1465(1996))。此项研究的结果如图 3 所示。在所有细胞系中 ^{125}I 标记 rHRG $\beta 1$ 的结合可受到或是 2C4 或是 7F3 的抑制, 只有乳腺癌细胞系 MDA-MB-468 例外, 据报导该细胞系表达很少的 HER2 或者不表达 HER2。据报导其余细胞系都表达 HER2, 但 HER2 的表达水平在这些细胞系中变化较大。事实上, 所测细胞系中 HER2 表达的变化范围超过 2 个数量级。例如, BT-20、MCF7 和 Caov3 表达约 10^4 个 HER2 受体 / 细胞, 而 BT-474 和 SK-BR-3 表达约 10^6 个 HER2 受体 / 细胞。根据这些细胞中 HER2 表达的宽范围和以上数据得出结论, HER2 与 HER3 或 HER4 之间的相互作用自身是发生于质膜表面上的高亲和力相互作用。

[0361] 在存在或缺乏外源 rHRG $\beta 1$ 的条件下评估单克隆抗体 2C4 和 4D5 对 MDA-MB-175 和 SK-BR-3 细胞的生长抑制效果 (Schaefer et al., Oncogene 15:1385-1394(1997))。MDA-MB-175 细胞中的 HER2 水平比正常乳房上皮细胞中发现的水平高 4-6 倍, 而且在 MDA-MB-175 细胞中 HER2-HER4 受体组成性的酪氨酸磷酸化。用 HER2 单克隆抗体 2C4 和 4D5 ($10 \mu\text{g/mL}$) 处理 MDA-MB-175 细胞 4 天。在结晶紫染色测定法中, 与 2C4 一起温育显示出对此细胞系的强烈生长抑制效果 (图 4A)。外源 HRG 不显著逆转此抑制作用。另一方面, 2C4 对 HER2 过表达细胞系 SK-BR-3 没有显示出抑制效果 (图 4B)。在存在和缺乏外源 HRG 的两种情况下, 单克隆抗体 2C4 都能比单克隆抗体 4D5 更大程度的抑制 MDA-MB-175 细胞的细胞增殖。4D5 对细胞增殖的抑制作用依赖于 HER2 表达水平 (Lewis et al., Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263(1993))。可检测到 SK-BR-3 细胞中的最大抑制达 66% (图 4B)。然而, 此效果可被外源 HRG 克服。

[0362] 实施例 2: HER2 与 HER3 的 HRG 依赖性结合受到单克隆抗体 2C4 阻断

[0363] 在免疫共沉淀实验中测试 HER3 与 HER2 结合的能力。将 1.0×10^6 个 MCF7 或 SK-BR-3 细胞接种于 6 孔组织培养板中含 10% 胎牛血清 (FBS) 和 10mM HEPES, pH 7.2 的 50:50DMEM/Ham 氏 F12 培养基 (生长培养基) 中, 使其粘附过夜。在开始实验之前将细胞在无血清的生长培养基中饥饿两小时。

[0364] 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 简单洗涤细胞, 然后与在含 0.2% w/v 胎牛血清清蛋白 (BSA) 的 RPMI 培养基, 10mM HEPES, pH 7.2 (结合缓冲液) 中稀释的 100nM 指定抗体或者单纯的结合缓冲液 (对照) 一起保温。室温一小时后, 在半数孔中 (+) 加入终浓度 5nM 的 HRG。其它孔中 (-) 加入相似体积的结合缓冲液。继续温育约 10 分钟。

[0365] 吸出上清液并将细胞在含 0.2mM PMSF, $10 \mu\text{g/mL}$ 亮抑酶肽和 10TU/mL 抑酶肽的

RPMI, 10mM HEPES, pH 7.2, 1.0% v/v TRITON X-100™, 1.0% w/v CHAPS (裂解缓冲液) 中溶解。通过离心清除裂解物中的不溶物质。

[0366] 用共价偶联有亲和凝胶的单克隆抗体 (Affi-Prep 10, Bio-Rad) 免疫沉淀 HER2。此抗体 (Ab-3, Oncogene Sciences) 识别胞质域表位。如下进行免疫沉淀, 向各裂解物中添加含有约 8.5 μ g 固定化抗体的 10 μ l 凝胶浆体, 并使样品于室温混合两小时。然后通过离心收集凝胶。用裂解缓冲液分批洗涤凝胶三次以去除未结合物质。然后加入 SDS 样品缓冲液, 并在沸水浴中短暂加热样品。

[0367] 将上清液进行 4-12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳并电印迹至硝酸纤维素膜上。用针对其胞外域表位的多克隆抗体 (c-17, Santa Cruz Biotech) 通过探查印迹来评估 HER3 的存在。用化学发光底物 (ECL, Amersham) 使印迹显现。

[0368] 如图 5A 和 5B 中分别为 MCF7 和 SK-BR-3 细胞的对照道所示, 只有在用 HRG 刺激细胞时 HER2 免疫沉淀中才出现 HER3。如果首先将细胞与单克隆抗体 2C4 一起温育, 则 HER3 信号在 MCF7 细胞中消失 (图 5A, 道 2C4+), 或者在 SK-BR-3 细胞中实质性降低 (图 5B, 道 2C4+)。如图 5A-5B 所示, 单克隆抗体 2C4 比 Trastuzumab 实质性更有效的阻断 MCF7 和 SK-BR-3 两种细胞中 HER3 与 HER2 的调蛋白依赖性结合。与 Trastuzumab 预温育降低 MCF7 溶解物中的 HER3 信号, 但对从 SK-BR-3 溶解物共沉淀的 HER3 的量具有很小影响或者没有影响。与针对 EGF 受体的抗体 (Ab-1, Oncogene Sciences) 预温育对这两种细胞系中 HER3 与 HER2 共沉淀的能力没有影响。

[0369] 实施例 3: 人源化 2C4 抗体

[0370] 首先将鼠单克隆抗体 2C4 的可变区克隆到允许生成小鼠 / 人嵌合 Fab 片段的载体中。使用 Stratagene RNA 提取试剂盒依照制造商的方案从杂交瘤细胞分离总 RNA。如先前所述 (Carter et al., PNAS(USA) 89:4285(1992); 及美国专利 5,821,337), 将可变区通过 RT-PCR 扩增, 凝胶纯化, 并插入含有人 κ 恒定区和人 C_H1 结构域的基于 pUC119 的质粒的衍生物中。将所得质粒转化到大肠杆菌菌株 16C9 中以表达 Fab 片段。培养物的生长、蛋白质表达的诱导和 Fab 片段的纯化均如先前所述 (Werther et al., J. Immunol. 157:4986-4995(1996); Presta et al., Cancer Research 57:4593-4599(1997))。

[0371] 将纯化的嵌合 2C4Fab 片段与鼠亲本抗体 2C4 在它们抑制 ¹²⁵I-HRG 结合 MCF7 细胞的能力以及抑制 MCF7 细胞中 rHRG 激活 p180 酪氨酸磷酸化的能力方面进行比较。如图 6A 所示, 嵌合 2C4Fab 片段非常有效的破坏人乳腺癌细胞系 MCF7 上高亲和力 HER2-HER3 结合位点的形成。计算得出完整鼠 2C4 的相对 IC₅₀ 是 4.0 $\pm$ 0.4 nM, 而 Fab 片段的此值是 7.7 $\pm$ 1.1 nM。如图 6B 所示, 单价嵌合 2C4Fab 片段非常有效的破坏 HRU 依赖性 HER2-HER3 活化。计算得出完整鼠单克隆抗体 2C4 的 IC₅₀ 值是 6.0 $\pm$ 2 nM, 而 Fab 片段的此值是 15.0 $\pm$ 2 nM。

[0372] 嵌合克隆的 DNA 测序容许鉴定 CDR 残基 (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)) (图 7A 和 7B)。如先前所述 (Presta et al., Cancer Research 57:4593-4599(1997)), 利用寡核苷酸定点诱变, 将所有 6 个这些 CDR 区引入质粒 VX4 上所包含的完整人框架 (V_L κ 亚型 I 和 V_H 亚型 III) 中。如上表达并纯化来自所得“CDR 交换”的蛋白质。进行结合研究以比较两种型式。简而言之, 将 NUNC MAXISORP™ 板用 50mM 碳酸盐

缓冲液 pH 9.6 中的 1 μ g/ml HER2 胞外域 (ECD ;如 WO 90/14357 中所述产生) 在 4℃ 包被过夜,然后用 ELISA 稀释液 (0.5% BSA, 0.05% 聚山梨醇酯 20, PBS) 在室温封闭 1 小时。将样品在 ELISA 稀释液中的连续稀释液在板上温育 2 小时。洗涤后,用生物素化鼠抗人 κ 抗体 (ICN 634771) 以及后续的链霉亲和素偶联的辣根过氧化物酶 (Sigma) 检测结合的 Fab 片段,使用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (Kirkegaard&Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) 作为底物。读取 450nm 处的吸光度。如图 8A 所示,在构建 CDR 交换的人 Fab 片段后,所有结合都丧失了。

[0373] 为了恢复人源化 Fab 的结合,使用来自 CDR 交换的 DNA 作为模板来构建突变体。利用计算机产生的模型 (图 9),将这些突变设计成在改变可能影响 CDR 构象或抗体-抗原界面的位置将人框架区残基改变成它们的鼠对应物。突变体如表 2 所示。

[0374] 表 2 :人源化 2C4FR 突变的名称

[0375]

突变体编号	框架区 (FR) 替代
560	ArgH71Val

[0376]

561	AspH73Arg
562	ArgH71Val, AspH73Arg
568	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly
569	ArgH71Val, AspH73Arg, PheH67Ala
570	ArgH71Val, AspH73Arg, AsnH76Arg
571	ArgH71Val, AspH73Arg, LeuH78Val
574	ArgH71Val, AspH73Arg, IleH69Leu
56869	ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly, PheH67Ala

[0377] 各种突变体的结合曲线如图 8A-8C 所示。人源化 Fab 型式 574,具有改变 ArgH71Val、AspH73Arg 和 IleH69Leu,表现出结合恢复至原始嵌合 2C4Fab 片段的水平。可修饰另外的 FR 和 / 或 CDR 残基,诸如 L2、L54、L55、L56、H35 和 / 或 H48 (例如如下替代: IleL2Thr ;ArgL54Leu ;TyrL55Glu ;ThrL56Ser ;AspH35Ser ;和 ValH48Ile) 以进一步改善或增强人源化抗体的结合。或者 / 另外,可对人源化抗体进行亲和力成熟 (见上文) 以进一步提高或改善其亲和力和 / 或其它生物学活性。

[0378] 使用噬菌体展示方法对人源化 2C4 型式 574 进行亲和力成熟。简而言之,将人源化 2C4. 574Fab 克隆到噬菌体展示载体中成为基因 III 融合物。在通过 M13K07 辅助噬菌体感染来诱导噬菌体颗粒时,此融合物使得 Fab 展示在噬菌体尾丝蛋白质基因 III 的 N-末端 (Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678 (1997))。

[0379] 对于上文鉴定的 6 个 CDR, 对每一个构建单独的文库。在这些文库中, 对于 CDR 中利用计算机产生的模型 (图 9) 鉴定为对与 HER2 的结合可能重要的氨基酸, 使用包含“NNS”作为其密码子的寡核苷酸进行随机化。然后将文库针对包被到 NUNC MAXISORP™板上的 HER2ECD 进行淘选, 使用溶于含 0.2% TWEEN 20® (MPBST) 的 PBS 的 3% 奶粉代替所有封闭液。为了选择亲和力高于 2C4.574 的噬菌体, 在第 3、4 和 5 轮淘选中, 在洗涤步骤中加入可溶性 HER2ECD 或可溶性 Fab 2C4.574 作为竞争剂。洗涤时间延长至室温 1 小时。

[0380] 经 5 轮淘选后, 通过噬菌体 -ELISA 再次分析个别克隆。在 Costar 96 孔 U 底组织培养板中培养个别克隆, 通过添加辅助噬菌体来诱导噬菌体。培养过夜后, 沉淀大肠杆菌细胞, 将含噬菌体的上清液转移至 96 孔板中, 其中噬菌体用 MPBST 在室温封闭 1 小时。包被了 HER2ECD 的 NUNC MAXISORP™板也如上用 MPBST 进行封闭。将经过封闭的噬菌体在平板上温育 2 小时。洗涤后, 用在 MPBST 中 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶偶联的抗 M13 单克隆抗体 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc. 27-9421-01) 检测结合的噬菌体, 随后以 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺作为底物。读取 450nm 处的吸光度。

[0381] 对来自各文库产生最高信号的 48 个克隆进行 DNA 测序。将那些其序列最频繁出现的克隆亚克隆到上文所述允许表达可溶性 Fab 的载体。如上所述诱导这些 Fab, 纯化蛋白质, 并通过 ELISA 分析纯化的 Fab 的结合, 并将结合情况与起始人源化 2C4.574 型式进行比较。

[0382] 在鉴定了各个 CDR 中的有趣突变后, 构建这些突变的各种组合的其它突变体并如上进行测试。相对于 574 产生结合提高的突变体见表 3。

[0383] 表 3 : 由 2C4.574 的亲和力成熟衍生的突变体的名称

[0384]

突变体名称	相对于 574 的改变	突变体 /574*
H3. A1	serH99trp, meth34leu	0.380
L2. F5	serL50trp, tyrL53gly, meth34leu	0.087
H1. 3. B3	thrH28gln, thrH30ser, meth34leu	0.572
L3. G6	tyrL92pro, ileL93lys, meth34leu	0.569
L3. G11	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, meth34leu	0.561
L3. 29	tyrL92phe, tyrL96asn, meth34leu	0.552
L3. 36	tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro, meth34leu	0.215
654	serL50trp, meth34leu	0.176
655	meth34ser	0.542
659	serL50trp, meth34ser	0.076

L2. F5. H3. A1	serL50trp, tyrL53gly, methH34leu, serH99trp	0. 175
L3G6. H3. A1	tyrL92pro, ileL93lys, methH34leu, serH99trp	0. 218
H1. 3. B3. H3. A1	thrH28gln, thrH30ser, methH34leu, serH99trp	0. 306
L3. G11. H3. A1	tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, methH34leu, serH99trp	0. 248
654. H3. A1	serL50trp, methH34leu, serH99trp	0. 133
654. L3. G6	serL50trp, methH34leu, tyrL92pro, ileL93lys	0. 213
654. L3. 29	serL50trp, methH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn	0. 236
654. L3. 36	serL50trp, methH35leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro	0. 141

[0385] * 在 HER2-ECD ELISA 中产生标准曲线 OD 中值所需的突变体的量与产生标准曲线 OD 中值所需的 574 的量的比率。数值小于 1.0 表明突变体比 574 更好的结合 Erb2。

[0386] 还构建了下列突变体,并且目前正在评估:

[0387]

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

[0388]

L2F5. L3G6. 655	serL50trp, tyrL53gly, methH35ser, tyrL92pro, ileL93lys
L2F5. L3G11. 655	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly
L2F5. L29. 655	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn
L2F5. L36. 655	serL50trp, tyrL53gly, methH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro

[0389] 根据同源性扫描所提出的下列突变体目前正在构建中：

[0390]

678	thrH30ala
679	thrH30ser
680	lysh64arg
681	leuH96val
682	thrL97ala
683	thrL97ser
684	tyrL96phe
685	tyrL96ala
686	tyrL91phe
687	thrL56ala
688	glnL28ala
689	glnL28glu

[0391] H34 处优选的氨基酸是甲硫氨酸。如果在此位置发现氧化，则可改变成亮氨酸。

[0392] 发现 asnH52 和 asnH53 是结合所强烈优选的。将这些残基改变成丙氨酸或天冬氨酸显著降低结合。已经制备了包含人源化型式 574 的轻链和重链可变区及人 IgG1 重链恒定区的完整抗体（参见美国专利 5,821,337）。此完整抗体是用中国仓鼠卵巢（CHO）细胞生成的。该分子在本文中称为 Pertuzumab。

[0393] 实施例 4：单克隆抗体 2C4 阻断 EGF、TGF- α 或 HRG 介导的 MAPK 和 Akt 激酶活化

[0394] 许多生长因子受体通过促分裂原活化蛋白激酶（MAPK）途径发信号。这些双重特异性激酶是最终触发癌细胞分裂的信号转导途径中的关键终点之一。以如下方式评估单克隆抗体 2C4 或 Trastuzumab 抑制 EGF、TGF- α 或 HRG 激活 MAPK 的能力。

[0395] 将 MCF7 细胞（ 10^5 个细胞 / 孔）铺入 12 孔细胞培养板中含血清的培养基中。第二天，除去细胞培养基并向各孔中加入含 0.1% 血清的新鲜培养基。然后在次日重复此步骤并在测定前用无血清结合缓冲液置换培养基（Jones et al., J. Biol. Chem. 273:11667-74(1998)；及 Schaefer et al., J. Biol. Chem. 274:859-66(1999)）。将细胞平衡至室温，然后与 0.5mL 200nM Trastuzumab 或单克隆抗体 2C4 一起温育 30 分钟。然后将细胞用 1nM EGF、1nM TGF- α 或 0.2nM HRG 处理 15 分钟。通过吸出细胞培养基并随后加入 0.2mL 含 1% DTT 的 SDS-PAGE 样品缓冲液来终止反应。如先前所述用抗活性 MAPK 抗体（Promega）通过蛋白质印迹评估 MAPK 激活（Jones et al., J. Biol. Chem. 273:11667-74(1998)）。

[0396] 如图 10 所示,单克隆抗体 2C4 比 Trastuzumab 更大程度的显著阻断 EGF、TGF- α 和 HRG 介导的 MAPK 激活。这些资料说明,单克隆抗体 2C4 结合 HER2 上用于其结合 EGFR 或 HER3 的表面,从而阻止了信号受体复合物的形成。

[0397] 单克隆抗体 2C4 还显示出抑制调蛋白 (HRG) 依赖性 Akt 激活。PI3 激酶信号转导途径的激活对于细胞存活是重要的 (Carraway et al., J. Biol. Chem. 270:7111-6(1995))。在肿瘤细胞中,PI3 激酶活化可能在侵袭性表型中起作用 (Tan et al., Cancer Research 59:1620-1625(1999))。存活途径主要由丝氨酸/苏氨酸激酶 AKT 介导 (Bos et al., Trends Biochem. Sci. 20:441-442(1995))。HER2 与 HER3 或 EGFR 之间形成的复合物可分别响应调蛋白或 EGF 而起动这些途径 (Olayioye et al., Mol. & Cell. Biol. 18:5042-51(1998); Karunagaran et al., EMBO Journal 15:254-264(1996); 及 Krymskaya et al., Am. J. Physiol. 276:L246-55(1999))。MCF7 乳癌细胞与 2C4 的温育抑制调蛋白介导的 Akt 激活。Agus et al., Cancer Cell 2:127-137(2002)。此外,通过加入 2C4 进一步降低了在缺乏调蛋白时存在的 Akt 激活的基础水平。

[0398] 实施例 5:铂耐受性癌症的疗法

[0399] 此实施例证明了 pertuzumab 与吉西他滨联合治疗患铂耐受性卵巢癌、原发性腹膜癌或输卵管癌的患者时的安全性、耐受性和功效。在所有患者中以及其肿瘤含有指示 HER2 活化的标记物的患者子集评估 pertuzumab 和吉西他滨对无进展存活的效果。

[0400] 正在接受基于铂的化疗方案或者在接受此方案 6 个月内病情有进展的患者将符合此项研究的条件。患者将随机接受或是吉西他滨与 pertuzumab 的组合或是吉西他滨与安慰剂的组合。在此治疗的患者包括那些在加入研究前未接受过铂耐受性疾病的先前补救方案治疗 (previous salvage regimen treatment) 的患者,以及那些已接受过铂耐受性疾病的先前方案的患者。

[0401] 在每个 21 天循环的第 1 和 8 天以 1000mg/m²施用吉西他滨。首先输注吉西他滨 30 分钟。由于毒性问题允许降低剂量。在 21 天循环的第 1 天施用安慰剂或 pertuzumab。随机接受 pertuzumab 的受试者将施用 840mg 的起始加载剂量 (initial loading dose) (循环 1),随后在循环 2 和后续循环中施用 420mg。随机接受安慰剂的受试者将在循环 1、循环 2 及后续循环中施用与 pertuzumab 组相同体积的安慰剂。无疾病进展的受试者可接受治疗长达 17 个循环或 1 年。

[0402] 由于血细胞减少,患者将降低标准吉西他滨剂量和施用维持剂量 (held doses)。针对任何第 1 天吉西他滨的维持剂量,Pertuzumab 也将维持。后续剂量将是降低的剂量并且不再增加。如果超过 4 次 (4occasions) 需要剂量降低或维持剂量,或者如果维持剂量超过 3 周,那么将停用吉西他滨,并且经主治医师和医疗监控者同意可继续施用盲试药物直至病情进展。如果第 8 天吉西他滨剂量是维持的,那么该第 8 天的剂量可省略,后续处理将从下一个循环开始 (前一循环的第 22 天)。

[0403] 如下表推荐维持和降低吉西他滨的剂量:

[0404]

绝对粒细胞计数 ($\times 10^6/L$)		血小板计数 ($\times 10^6/L$)	%全剂量
>1000	和	>100,000	100
500-999	或	50,000-99,000	75
<500	或	<50,000	保持

[0405] 需要降低剂量的任何患者的后续剂量将是降低的剂量。如果由于血细胞减少,维持剂量超过 3 周,将假设患者具有无法接受的毒性并将停用吉西他滨。如果没有其它附加的 III 级或 IV 级毒性,根据医师和医疗监控者的判断将继续施用盲试药物。吉西他滨的血液学毒性与施药速率有关。不管总剂量如何,吉西他滨的给药都应超过 30 分钟。根据主治医师的判断可对 NCI-CTC2 级血小板减少使用集落刺激剂。

[0406] 还将提供与单一药剂 pertuzumab 交换 (crossover) 的选择。还将在预期的下一个循环时施用 840mg 的加载剂量,后续每 21 天的后续循环的 420mg。获取石蜡包埋的肿瘤样本或含癌的代表性肿瘤的未染色石蜡切片,并评估 HER2 磷酸化状态。约 20-40% 的卵巢癌患者可能具有可检测的 HER2 磷酸化。

[0407] 在第 2、4、6、8、12 和 17 个循环结束时评估响应。通过临床评估和 CT 扫描或等效手段,用实体瘤响应评估标准 (Response Evaluation Criteria for Solid Tumors, RECIST) 来评估可测量的疾病。根据 CA-125 变化以及疾病的临床和放射学证据,评估患可评估疾病的患者的响应。应当在最初记录响应后 4-8 周确认响应。可评估的受试者将包括已具有至少一次响应评估且在其肿瘤样本中确定了 HER2 磷酸化状态的受试者。

[0408] 将评估下列结果测量值。

[0409] 主要功效终点 (Primary Efficacy Endpoint)

[0410] 无进展存活 (Progression free survival), 根据调查人员使用 RECIST 或 CA-125 变化进行的评估确定, 在各组所有受试者中开始指定的试验治疗后进行。

[0411] 无进展存活, 根据调查人员使用 RECIST 或 CA-125 变化进行的评估确定, 在各组以下亚组中开始指定的试验治疗后进行:

[0412] 有 HER2 活化的可检测标志的受试者。

[0413] 无 HER2 活化的可检测标志的受试者。

[0414] 次要功效终点 (Secondary Efficacy Endpoints)

[0415] 客观响应 (PR 或 CR)

[0416] 响应持续时间

[0417] 存活时间

[0418] 4 个月没有进展

[0419] 将在各组以及下列亚组的所有受试者中评估这些终点:

[0420] 有 HER2 活化的可检测标志的受试者。

[0421] 无 HER2 活化的可检测标志的受试者。

[0422] 为了预防或治疗可能的恶心和呕吐, 可对患者前驱用药血清素 (serotonin) 拮抗剂、类固醇和 / 或苯并二氮卓类 (benzodiazepines)。为了预防或治疗可能的皮疹, 可使用标准痤疮疗法, 包括局部和 / 或口服抗生素。其它可能的伴随药疗有任何处方药物或非处方药制剂, 由受试者在间隔中使用, 在第 1 天之前 7 天开始并持续至随访期 (follow up

period) 的最后一天。由于输注导致温度升高至 $>38.5^{\circ}\text{C}$ 或其它与输注有关症状的受试者可用醋氨酚 (acetaminophen)、苯海拉明 (diphenhydramine) 或哌替啶 (meperidine) 进行对症处理。可对 NCI-CTC 2 级血细胞减少施用非实验性造血生长因子。

[0423] 根据任何一项或多项主要或次要功效终点的评估,如上所述治疗的患者将显示出卵巢癌、原发性腹膜癌或输卵管癌的体征或症状的改善。此外,与只用吉西他滨治疗的铂耐受性患者相比,如上所述用 Pertuzumab 和吉西他滨联合治疗的铂耐受性患者将显示出癌症任何一种体征或症状的较大改善。

[0001]

序列表

<110> 健泰科生物技术公司 (Genentech Inc.)
斯蒂芬·M·凯尔西

<120> 铂耐受性癌症的疗法

<130> P2146R1

<141> 2005-06-15

<150> US 60/580,333

<151> 2004-06-16

<160> 17

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 1

```

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

```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

```

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

```

[0002]

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

<220>
 <223> 此序列是合成的

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20 25 30
 Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105
 Ile Lys

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

<220>
 <223> 此序列是合成的

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr
 20 25 30
 Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr
 50 55 60
 Asn Gln Arg Phe Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Val Asp Arg Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr
 95 100 105
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

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

<220>
 <223> 此序列是合成的

[0003]

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

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

<220>
 <223> 此序列是合成的

<400> 6
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 20 25 30
 Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
 50 55 60
 Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu
 95 100 105
 Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 此序列是合成的

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

<400> 7
 Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Thr Met Xaa
 5 10

[0004]

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 8
Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

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

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

<220>
<223> 此序列是合成的

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

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

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

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

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

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

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 12

[0005]

```

Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr
      5

<210> 13
<211> 645
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 13
Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu
  1              5              10              15

Leu Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp
      20              25              30

Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met
      35              40              45

Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu
      50              55              60

Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln
      65              70              75

Asp Ile Gln Glu Val Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln
      80              85              90

Val Arg Gln Val Pro Leu Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr
      95              100             105

Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly
      110             115             120

Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly
      125             130             135

Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu Thr Glu Ile Leu Lys
      140             145             150

Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu Cys Tyr Gln Asp
      155             160             165

Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn Gln Leu Ala
      170             175             180

Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His Pro Cys
      185             190             195

Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser Glu
      200             205             210

Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala
      215             220             225

Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys
      230             235             240

Ala Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys
      245             250             255

Leu His Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala
      260             265             270

Leu Val Thr Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro
      275             280             285

Glu Gly Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro
      290             295             300

Tyr Asn Tyr Leu Ser Thr Asp Val Gly Ser Cys Thr Leu Val Cys
      305             310             315

Pro Leu His Asn Gln Glu Val Thr Ala Glu Asp Gly Thr Gln Arg
      320             325             330

```

[0006]

Cys Glu Lys Cys Ser Lys Pro Cys Ala Arg Val Cys Tyr Gly Leu	335	340	345
Gly Met Glu His Leu Arg Glu Val Arg Ala Val Thr Ser Ala Asn	350	355	360
Ile Gln Glu Phe Ala Gly Cys Lys Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala	365	370	375
Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala	380	385	390
Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu	395	400	405
Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro	410	415	420
Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile	425	430	435
Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile	440	445	450
Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu	455	460	465
Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val	470	475	480
Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His	485	490	495
Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala	500	505	510
Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro	515	520	525
Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys	530	535	540
Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val	545	550	555
Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln	560	565	570
Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val	575	580	585
Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys	590	595	600
Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys	605	610	615
Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys	620	625	630
Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu	635	640	645
<210> 14			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 此序列是合成的			
<400> 14			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val	1	5	10 15

[0007]

```

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn
    20                      25                      30
Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
    35                      40                      45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser
    50                      55                      60
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
    65                      70                      75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
    80                      85                      90
His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
    95                      100                     105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
   110                      115                     120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
   125                      130                     135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
   140                      145                     150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
   155                      160                     165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
   170                      175                     180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
   185                      190                     195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
   200                      205                     210
Arg Gly Glu Cys

```

<210> 15

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此序列是合成的

<400> 15

```

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

```

[0008]

Ala Ser Thr Lys Gly	Pro Ser Val Phe	Pro Leu Ala Pro Ser Ser
125		130 135
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala	Leu Gly Cys Leu Val Lys	
140	145	150
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val	Ser Trp Asn Ser Gly Ala	
155	160	165
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro	Ala Val Leu Gln Ser Ser	
170	175	180
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val	Thr Val Pro Ser Ser Ser	
185	190	195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn	Val Asn His Lys Pro Ser	
200	205	210
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu	Pro Lys Ser Cys Asp Lys	
215	220	225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	Pro Glu Leu Leu Gly Gly	
230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys	Pro Lys Asp Thr Leu Met	
245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	Val Val Val Asp Val Ser	
260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn	Trp Tyr Val Asp Gly Val	
275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn	
290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu	Thr Val Leu His Gln Asp	
305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser Asn Lys Ala	
320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile	Ser Lys Ala Lys Gly Gln	
335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg Glu Glu	
350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr	Cys Leu Val Lys Gly Phe	
365	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln Pro	
380	385	390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp Ser Asp Gly	
395	400	405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	Val Asp Lys Ser Arg Trp	
410	415	420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala Leu	
425	430	435
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly	
440	445	

<210> 16
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 此序列是合成的
 <400> 16

[0009]

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1              5              10              15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser
 20            25            30
Ile Gly Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35            40            45
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser
 50            55            60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65            70            75
Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80            85            90
Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95           100           105
Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
110           115           120
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
125           130           135
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
140           145           150
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu
155           160           165
Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
170           175           180
Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Gln Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu
185           190           195
Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn
200           205           210
Arg Gly Glu Cys

```

<210> 17

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 此序列是合成的

<400> 17

```

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

```

[0010]

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala	110	115	120
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys	125	130	135
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp	140	145	150
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu	155	160	165
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly	170	175	180
Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu	185	190	195
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn	200	205	210
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	215	220	225
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro	230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	260	265	270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu	275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser	290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp	305	310	315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu	320	325	330
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	335	340	345
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met	350	355	360
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	365	370	375
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu	380	385	390
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	395	400	405
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln	410	415	420
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His	425	430	435
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	440	445	

1 MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRHLV QGCQVVGNL ELTYLPTNAS LSFLODIQEV QGYVLIHNO VRQVPLQRLR
101 IVRGTOLEFED NYALAVLDNG DPLMNTTPVT GASPGGLREL QLRSLTEILK GGVLIQRNPQ LCYQDTILMK DIFHKNNOLA LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK
201 GSRGWGESSE DCQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCCHEQC AAGCTGPKHS DCLACLHFNH SGICELHCPA IVTYNTDTFE SMPNPEGRYT FGASCVTACP
301 YNYLSTDVGS CTLVCPLHNQ EVTAEDGTQR CEKCSKPCAR VCYGLGMEHL REVRVTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA PLQPEQLQVF
401 ETLEEITGYL YISAWPDSL PDLVFNQLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI SWGLRSLRE LGSGLALHH NTHLCFVHTV PWDQLFRNPH QALLHTANRP
501 EDECVGEGLA CHQLCARGHC WGPQTQCVN CSQFLRGQEC VEECRVLQGL PREYVNRHC LPCHPEQCPQ NGSVTCFGPE ADQCVACAHY KDPPFCVARC
601 PSGVKPDLSY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAE (SEQ ID NO: 13)

图 1A

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

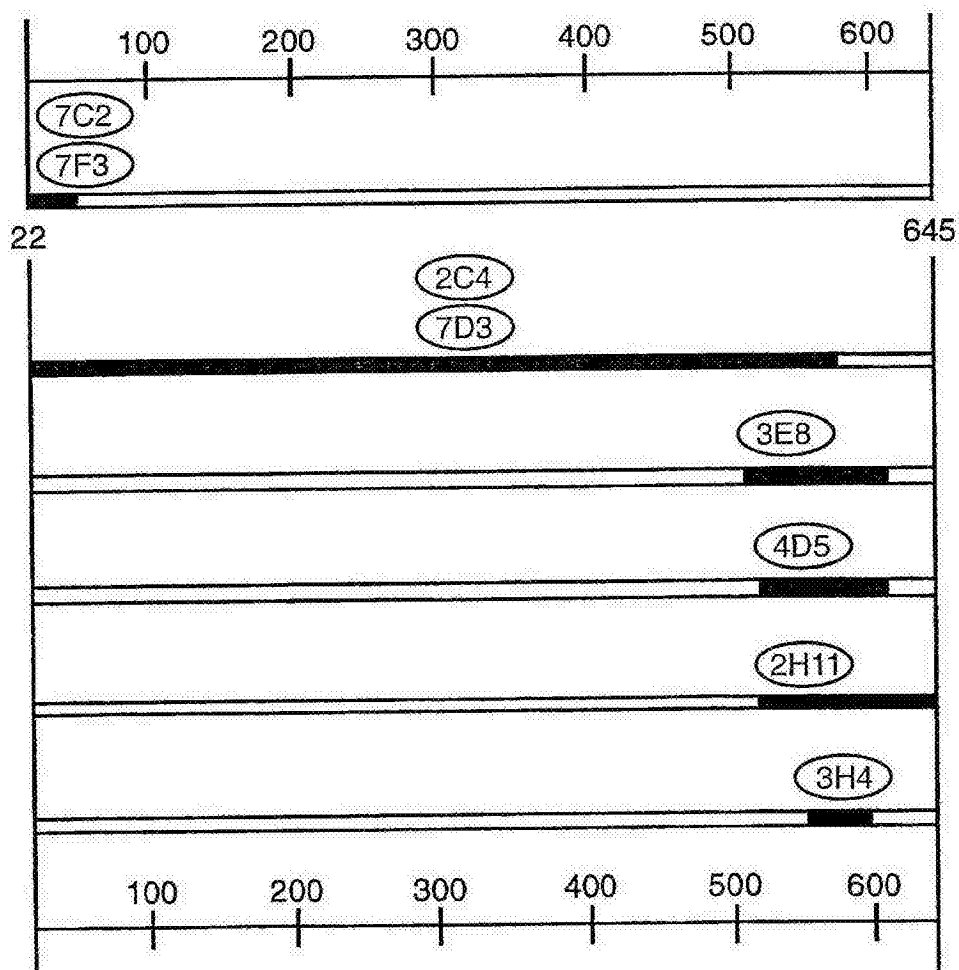


图 1B

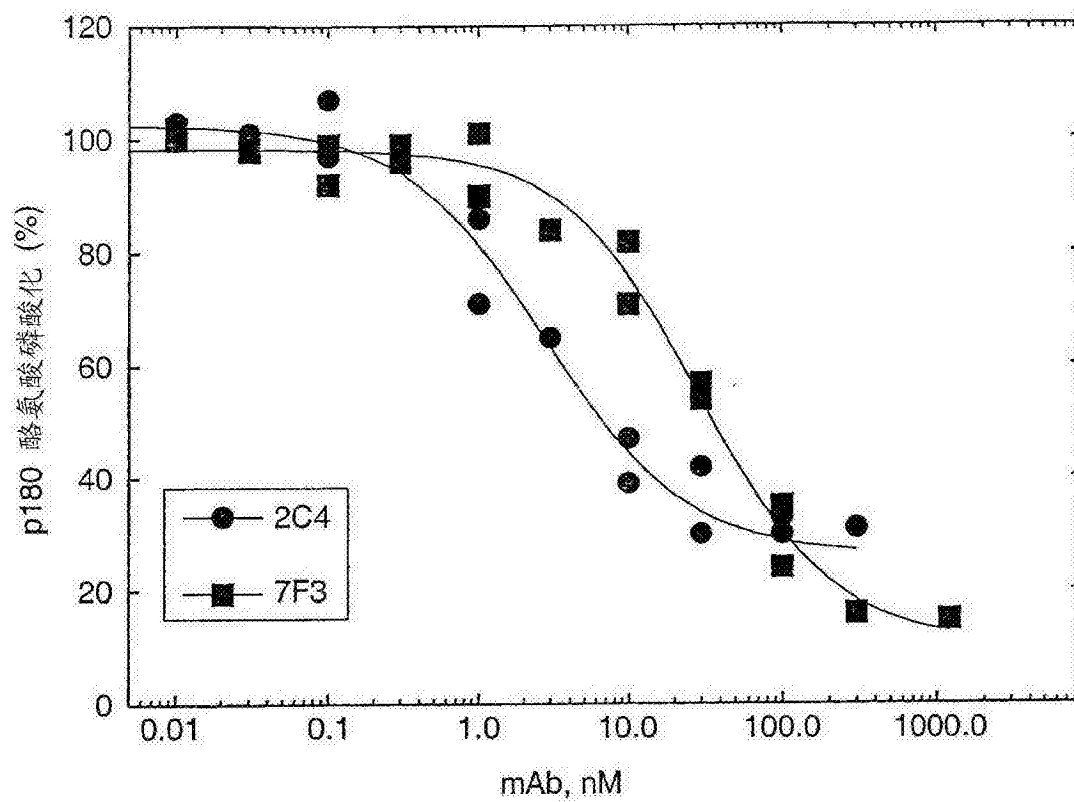


图 2A

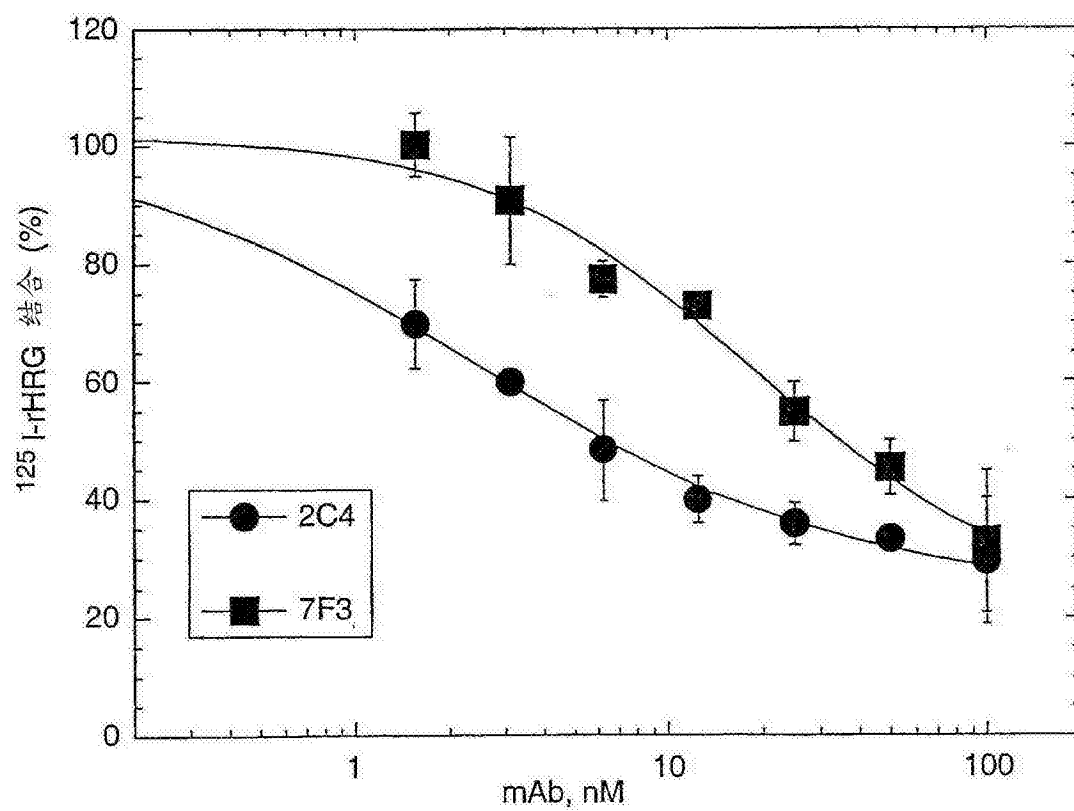


图 2B

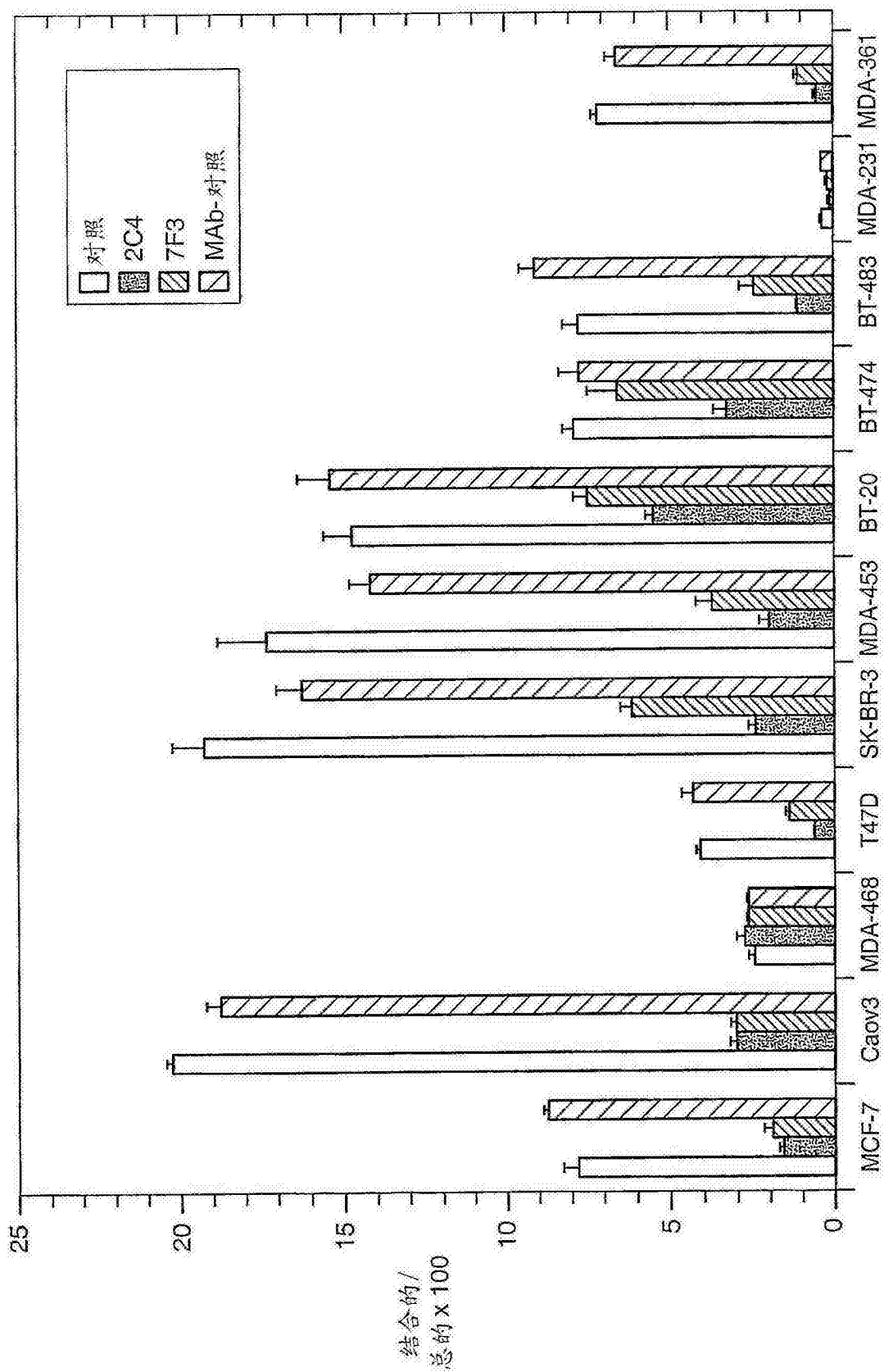


图 3

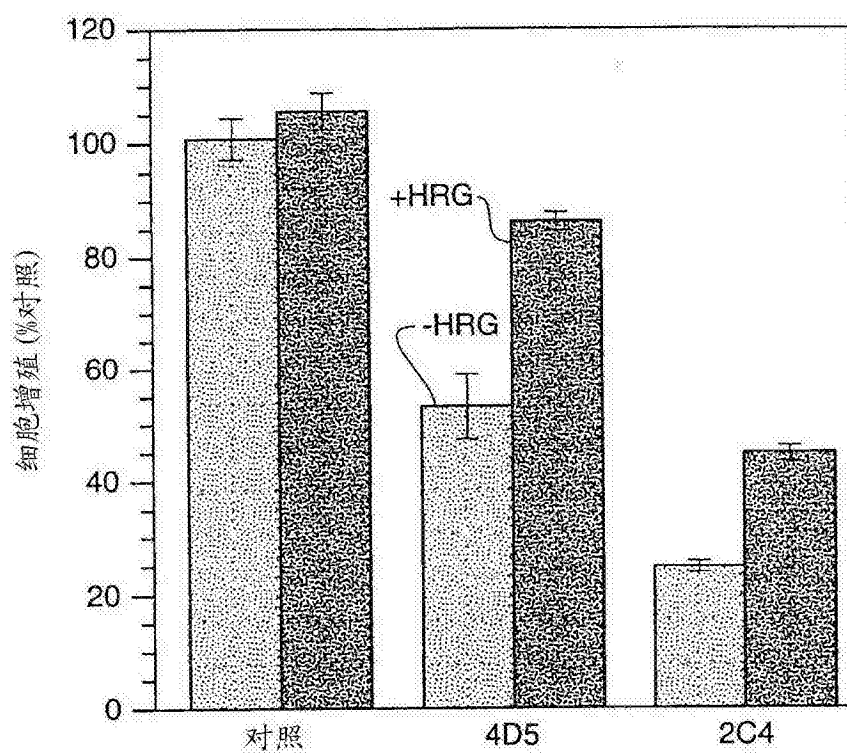


图 4A

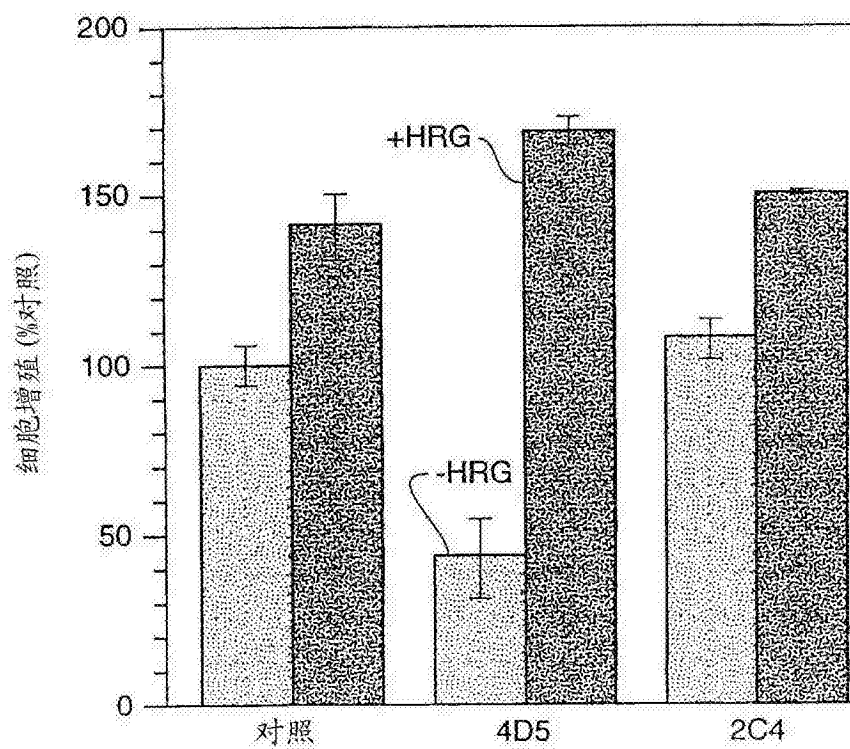


图 4B

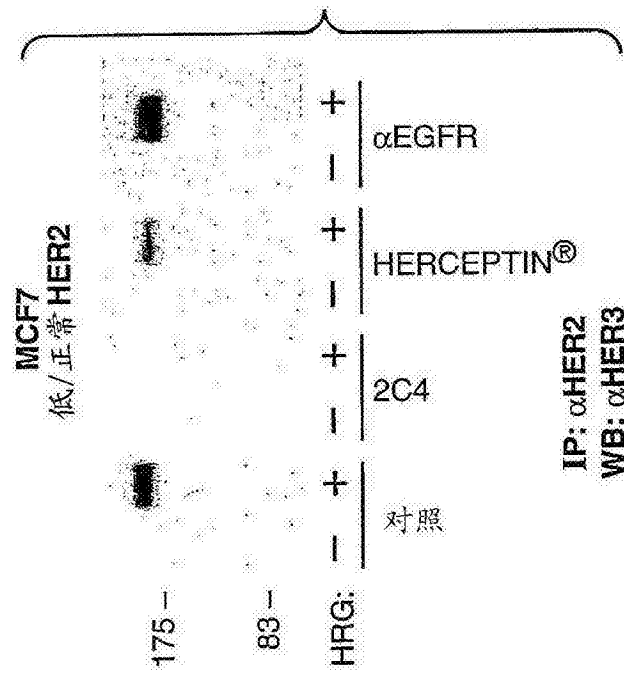


图 5A

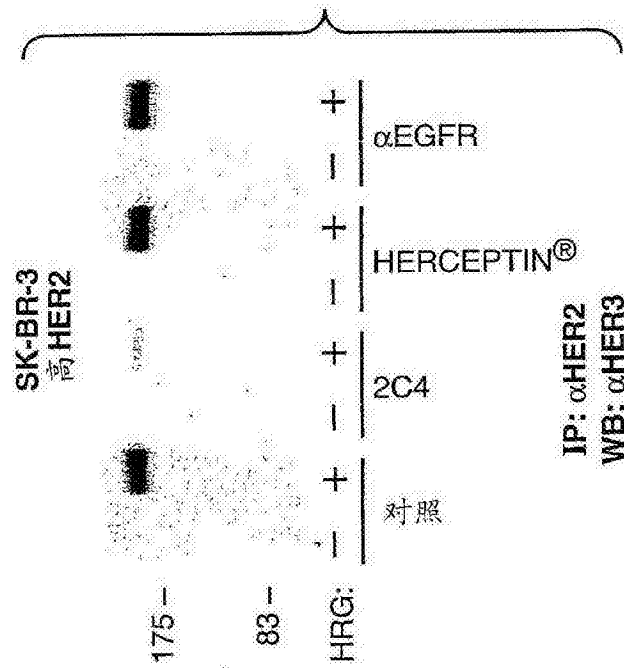


图 5B

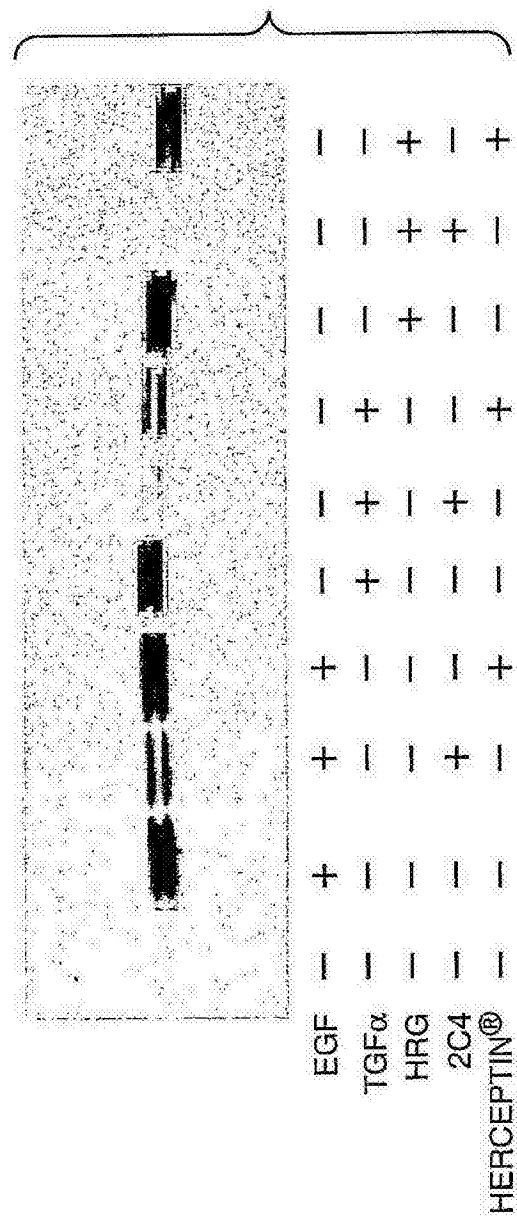


图 10

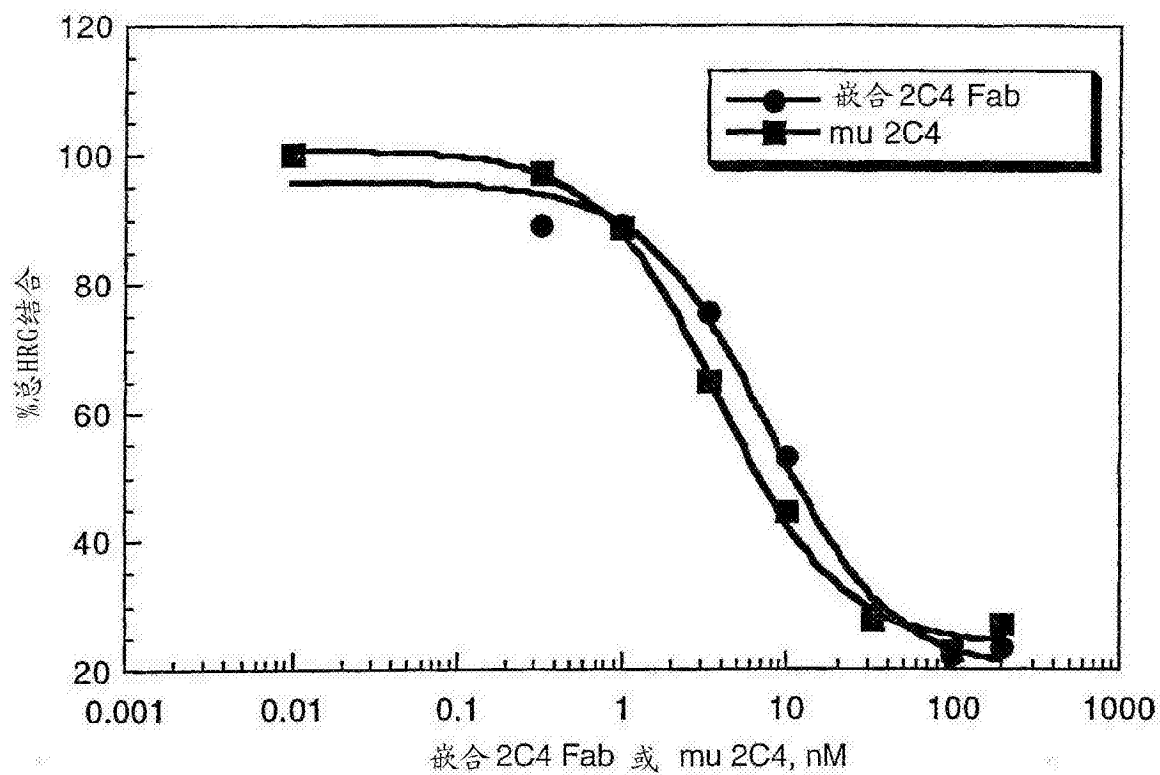


图 6A

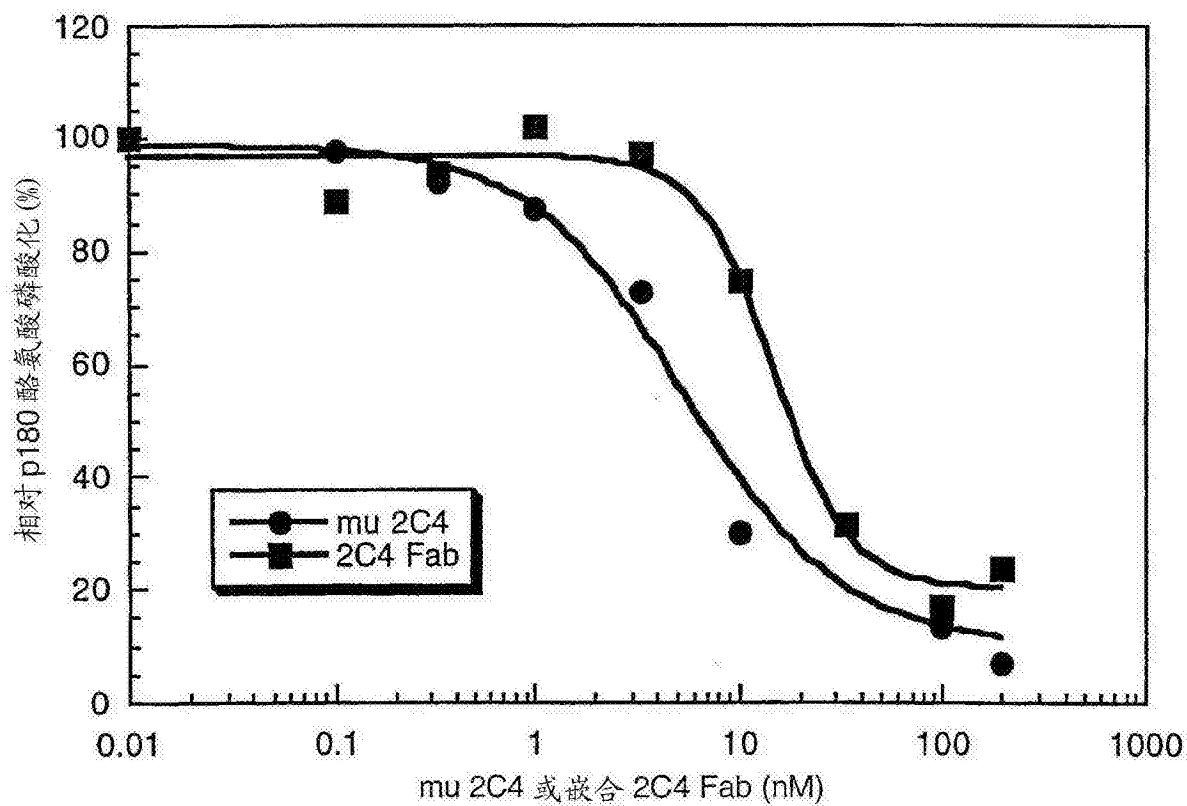


图 6B

轻链可变区

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQR	P
	** *****	*		*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQK	P
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQK	P

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

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

图 7A

重链可变区

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

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

	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)	
	*** **		**	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:4)	

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:6)	

图 7B

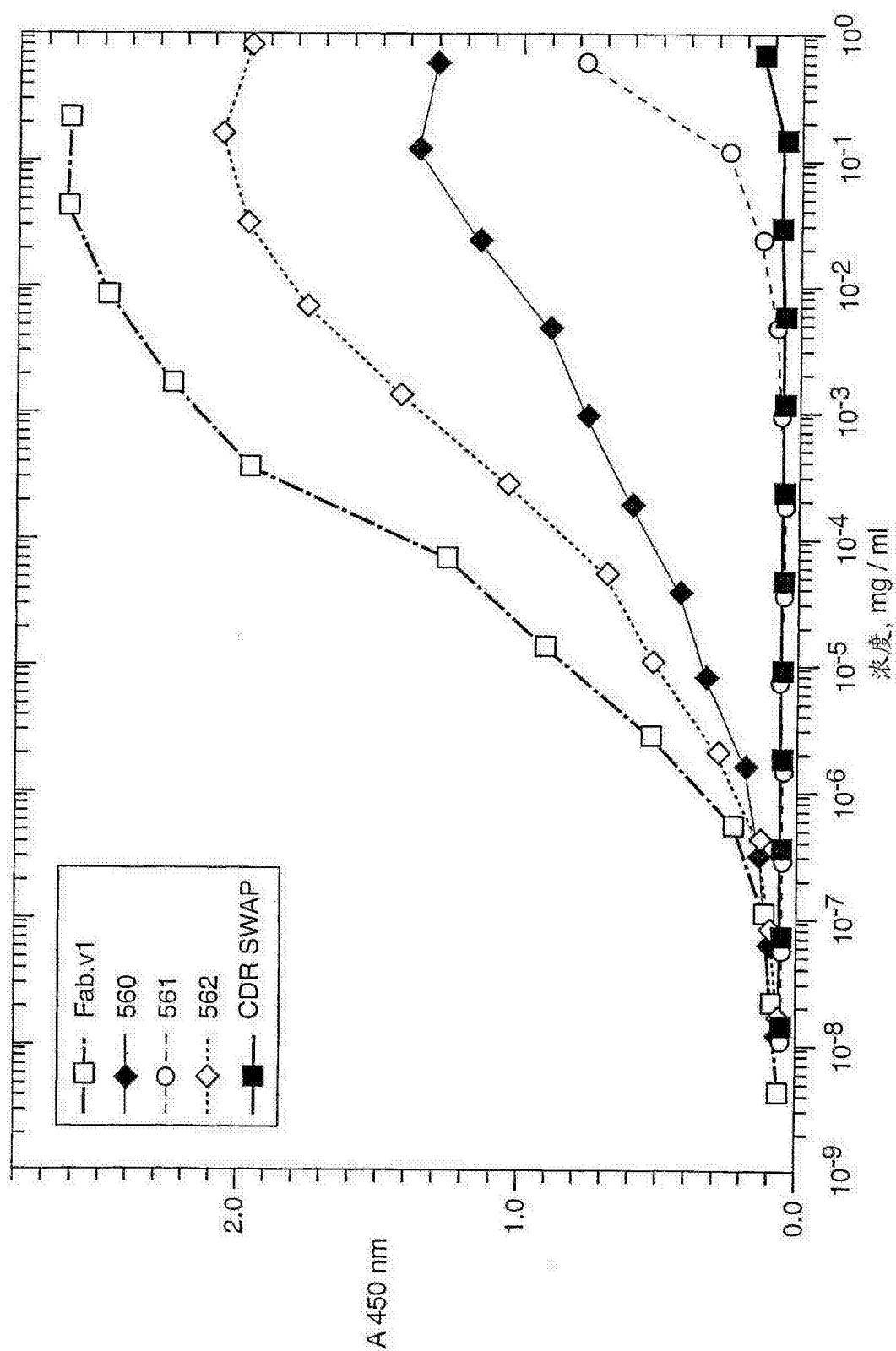


图 8A

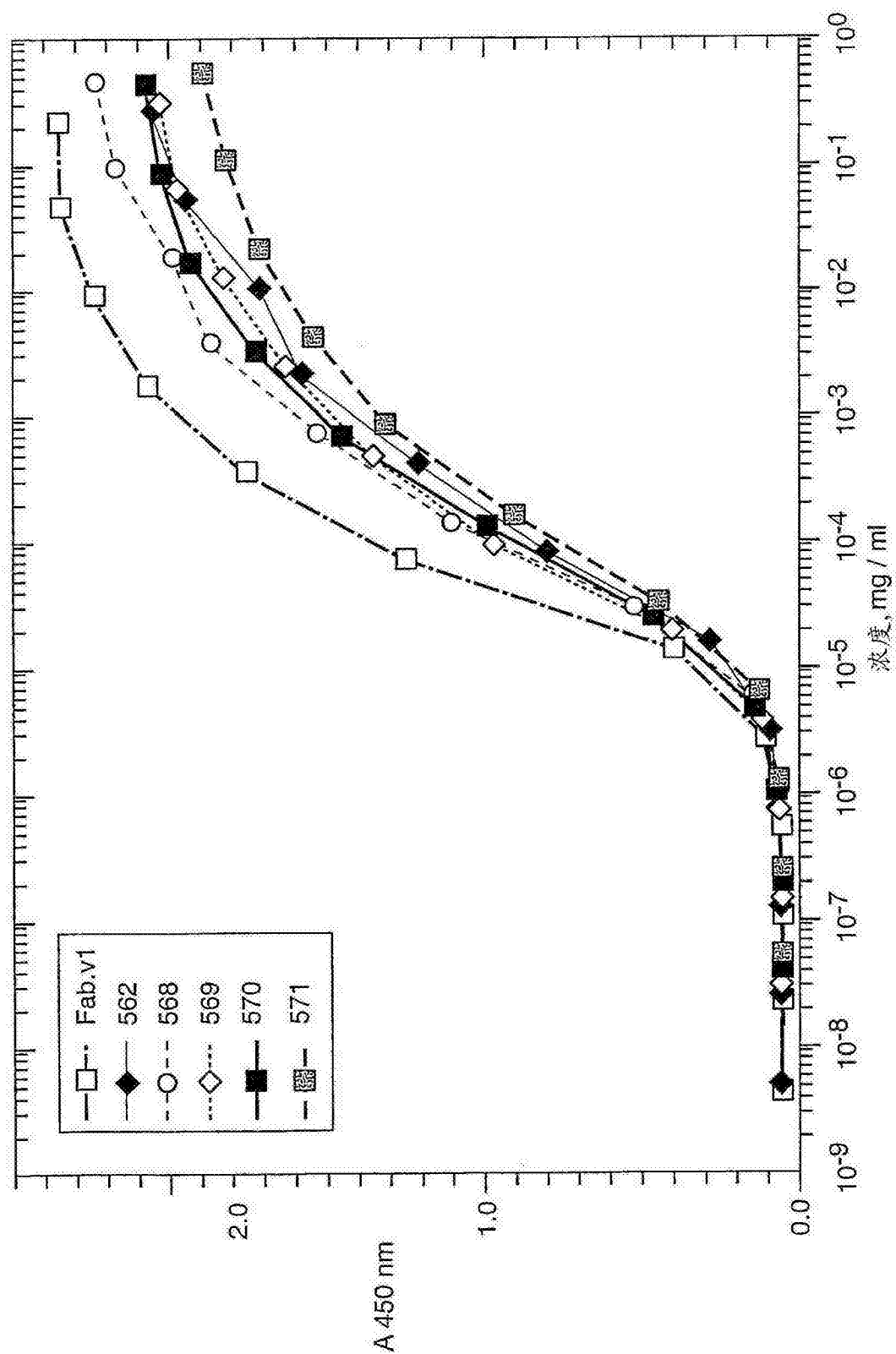


图 8B

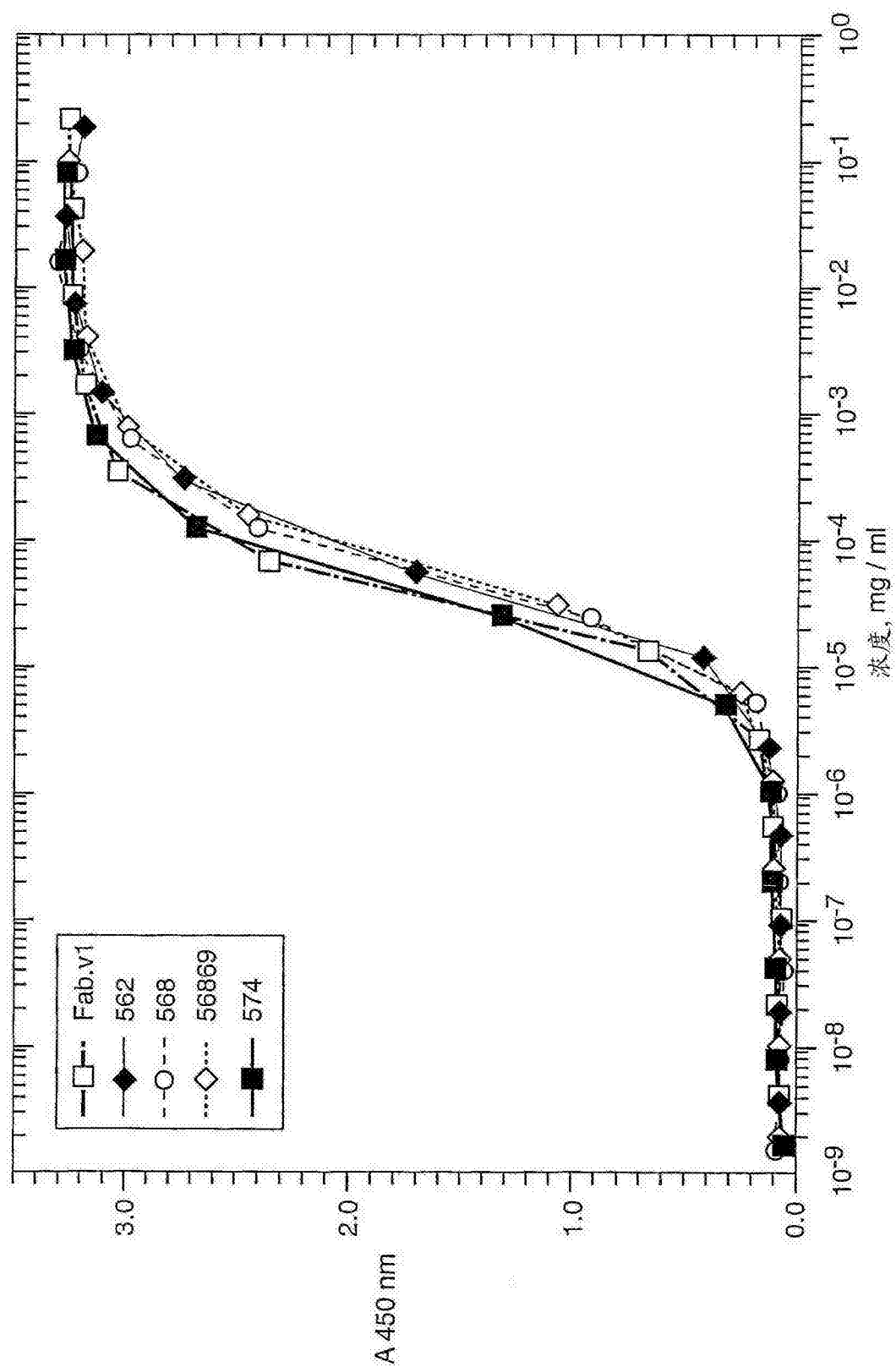


图 8C

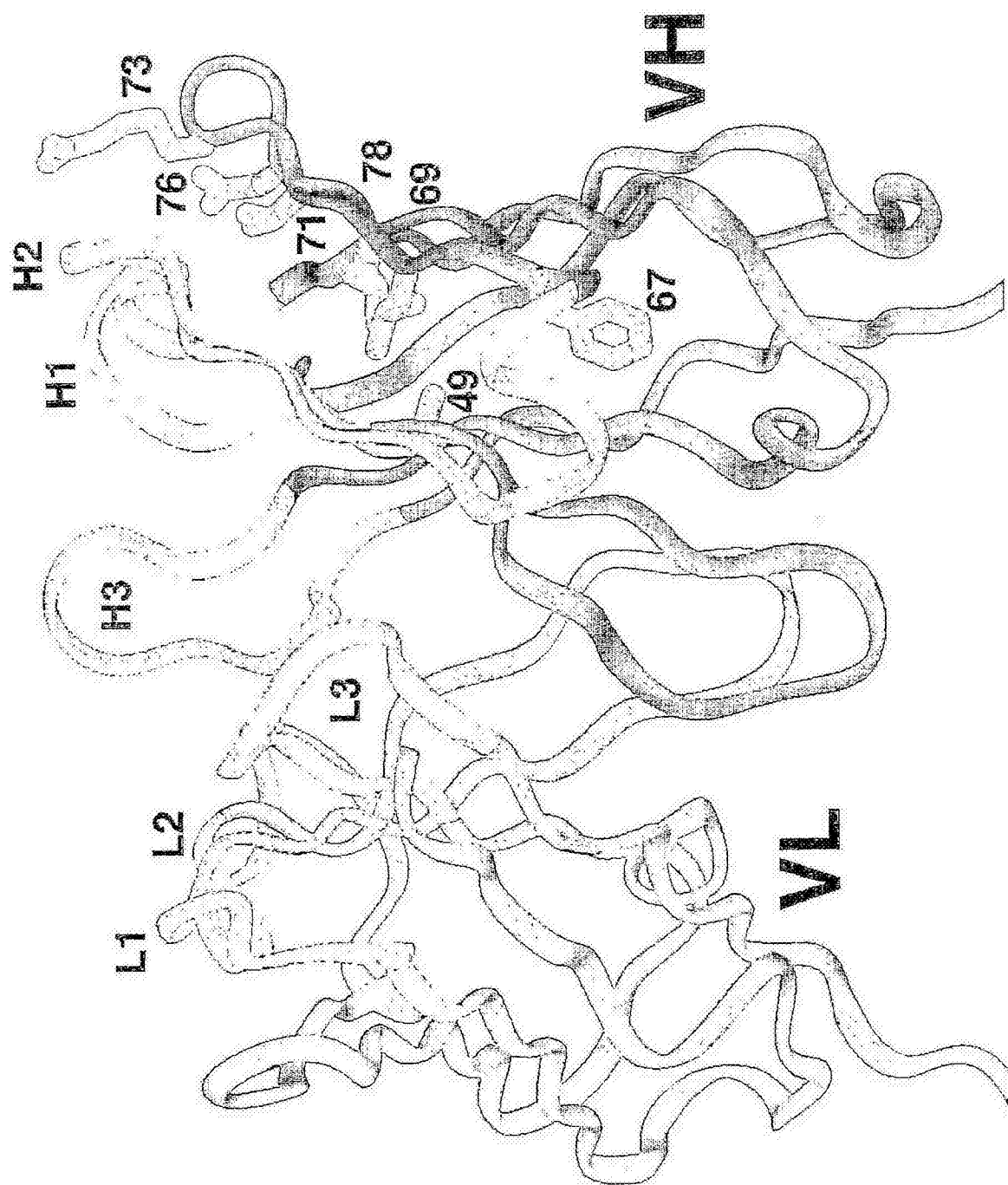


图 9

轻链

```

1   15   30   45
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K
46   60   75   90
L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A F Y Y C Q Q
91  105  120  135
H Y T T P P T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
136  150  165  180
L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
181  195  210  214
L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

```

图 11A

重链

```

1   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDITYIHWRQAPGKGL 45
    15
46  EWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AED 90
    60
91  TAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS 135
    105
136 KSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHFFPAVLQSS 180
    150
181 GLYSSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK 225
    195
226 THTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPETCVVDVS 270
    240
271 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD 315
    285
316 WLNKGKEYCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREE 360
    330
361 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNNYKTTTPVLDSDG 405
    375
406 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNH YTQKSLSLSPG 449
    420

```

图 11B

轻链

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

(SEQ ID NO: 16)

图 12A

重链

```

1   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVVRQAAPGKGL45
46  EWVADVNPNSSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLR90
91  TAVYCARNLGPPSFYFDYWGGQGLVTVSSASTKGPSTVFP135
136 STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSSGVHTFP180
181 LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKKVDKKVEPK225
226 HTPCPCPAPEL240LGGPSVFLFPKPKD255TLMI270SRTP270EV270TC270V270V270DS270H270
271 EDPEVKFNWYVDGV285EHVHN300AKTKPR300EEQ300YN300ST300Y300RV300SV300LV300TH300Q300DW300
316 L316NGKE316Y316K316CK316VS316N316K316AL316PA316PI316E316K316TI316SK316AK316G316Q316PR316EP316Q316V316Y316TL316PP316SR316EM316
361 TK361N361Q361V361SL361TC361LV361K361GF361Y361PS361DI361AV361EW361ES361NG361Q361PE361NN361Y361KT361TP361PL361DS361GS361
406 FF406LY406SK406LT406VD406KS406R406W406QQ406QG406N406VF406SC406SV406M406HE406AL406HN406HY406T406Q406KS406LS406LS406PG406K406

```

(SEQ ID NO: 17)

图 12B

配体活化的EGFR与HER2的异二聚化 2C4在异二聚体结合位点处结合

EGFR 未结合的

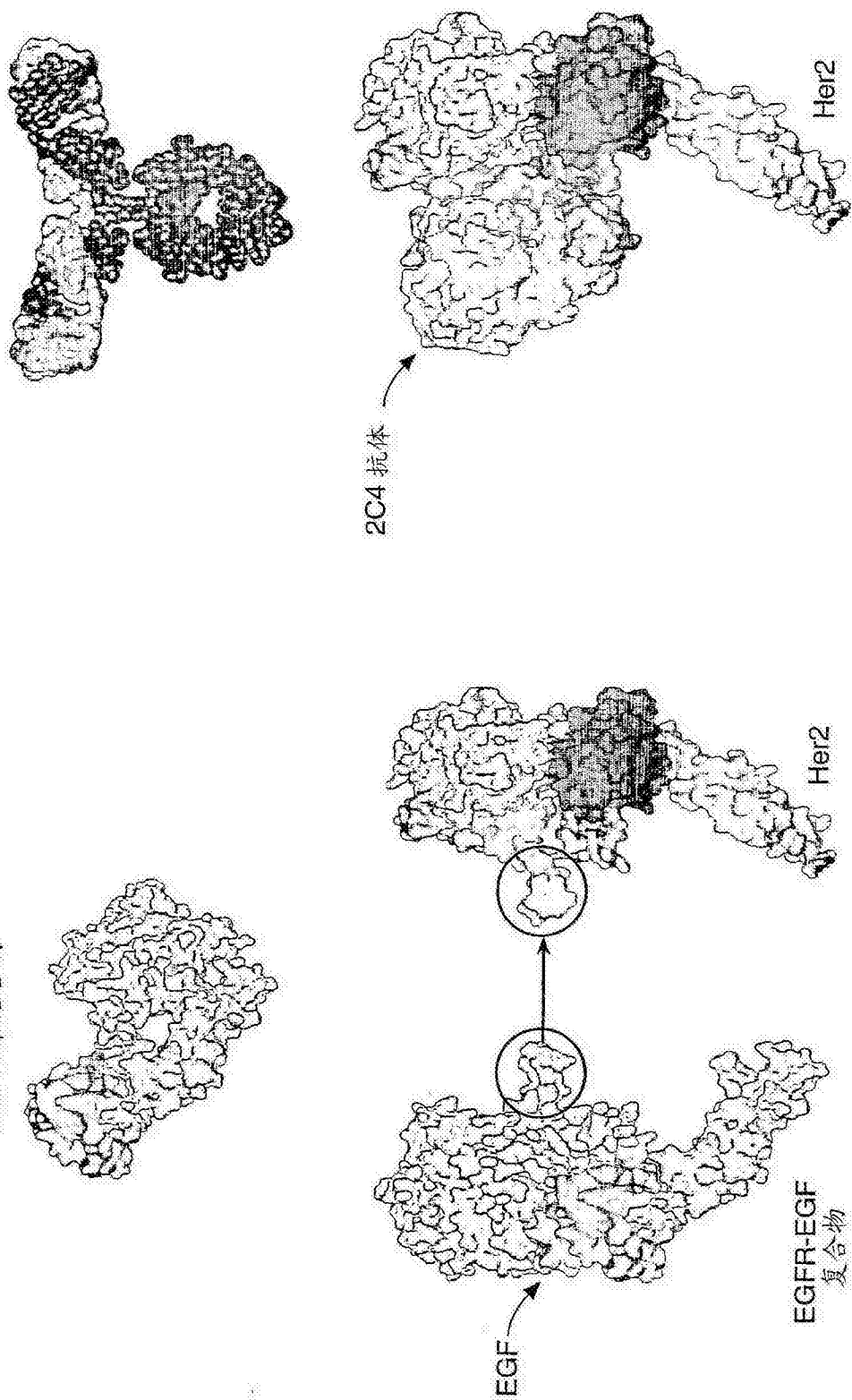


图 13

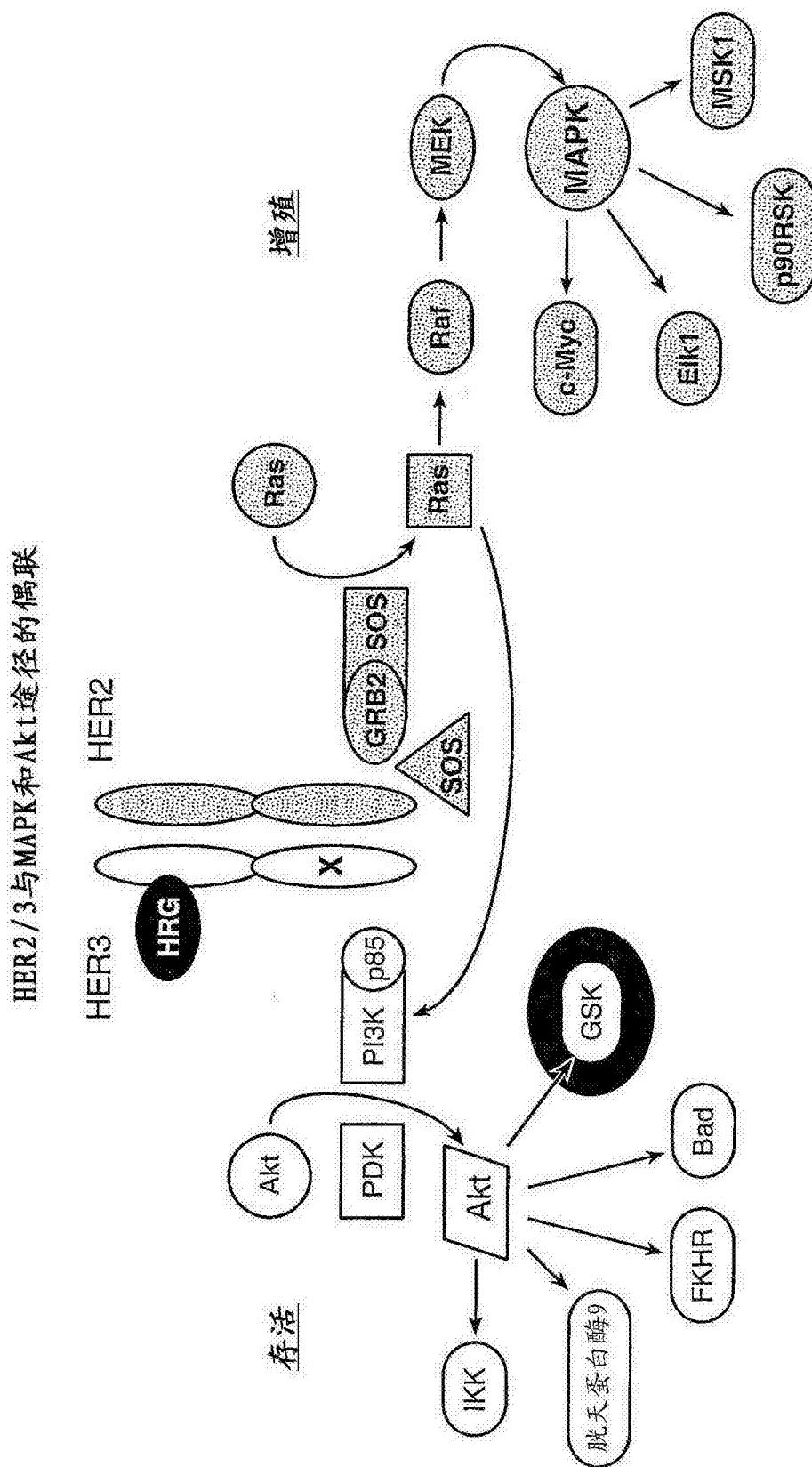


图 14

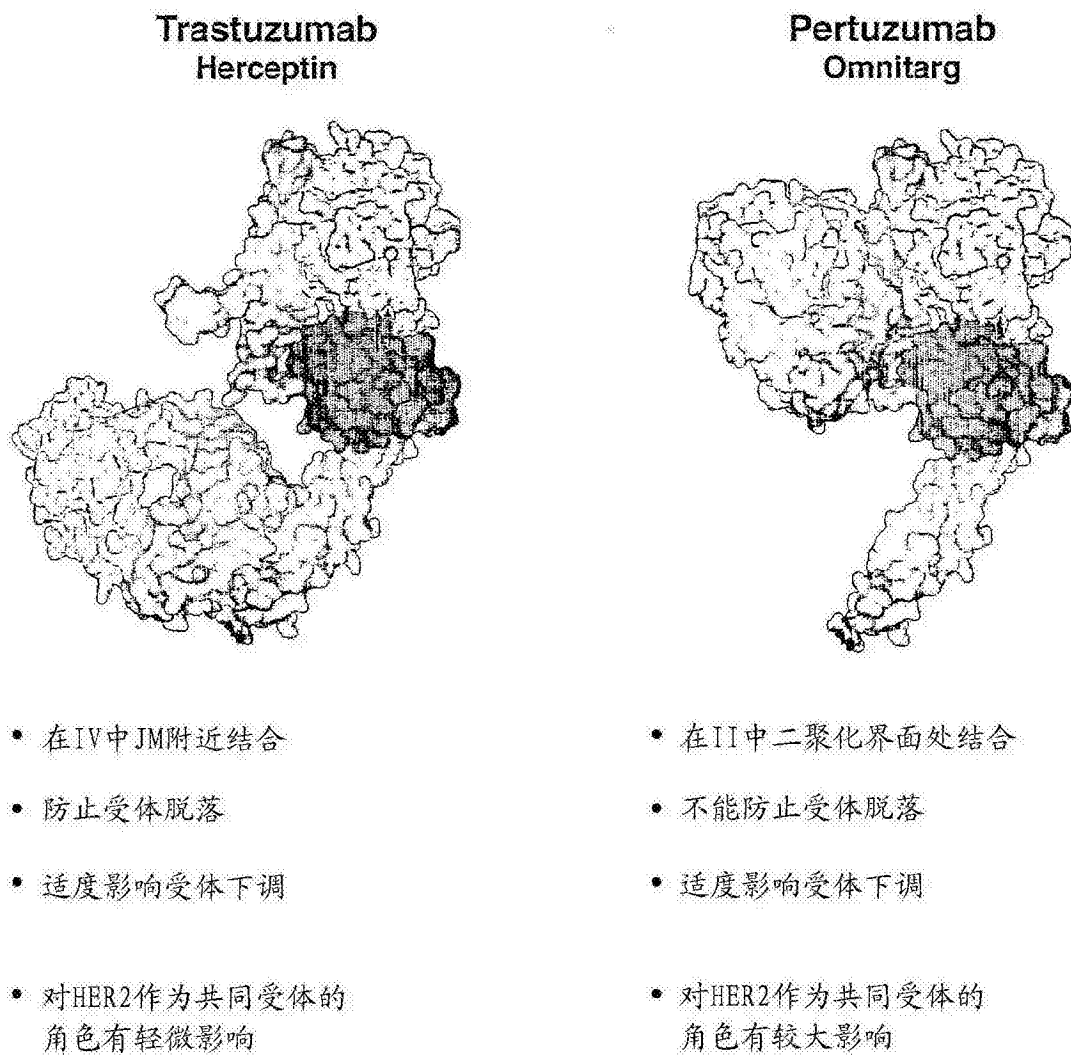


图 15

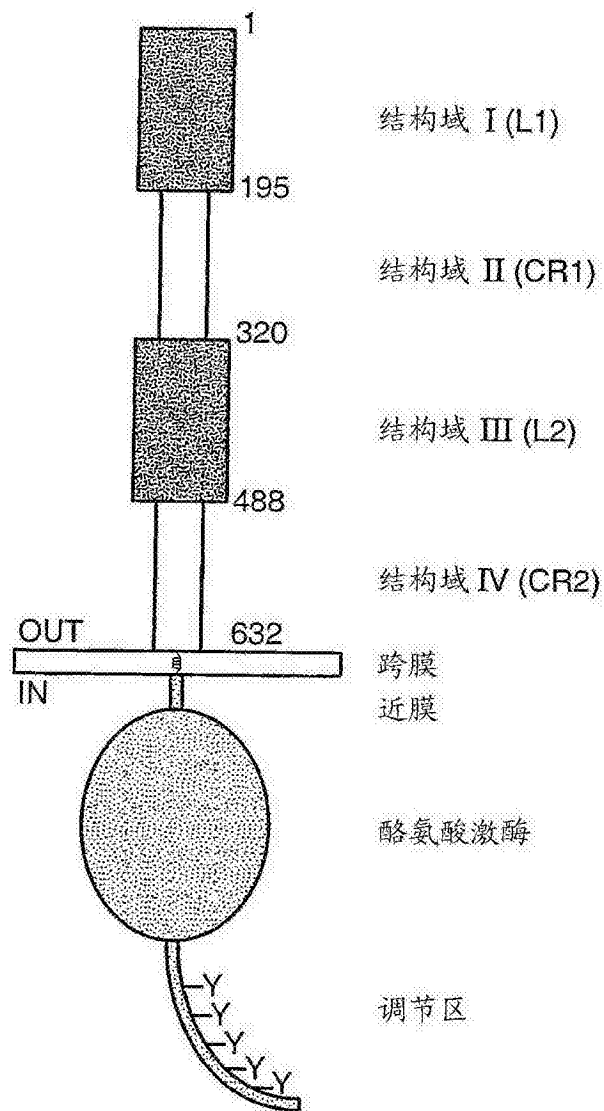


图 16