



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103153339 B

(45) 授权公告日 2021.05.04

(21) 申请号 201180036931.1

A61P 35/00 (2006.01)

(22) 申请日 2011.05.27

C07K 16/32 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103153339 A

(43) 申请公布日 2013.06.12

(30) 优先权数据

PA201000468 2010.05.27 DK

61/349182 2010.05.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013.01.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2011/058772 2011.05.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/147982 EN 2011.12.01

(73) 专利权人 根马布股份公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 B.d.戈艾杰 E.N.v.d.布林克

S.海杰 T.里德尔 R.霍埃特

O.巴德斯加尔德 D.萨蒂恩

J.v.d.温克尔 P.帕伦

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘健 梁谋

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2005118635 A3,2005.12.15

WO 2006113643 A3,2006.10.26

WO 2006087637 A2,2006.08.24

ROCKBERG J ET AL.Discovery of epitopes for targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) with antibodies.《Molecular Oncology》.2009,第3卷(第3期),对比文件1的摘要以及图1-图7.

ROCKBERG J ET AL.Discovery of epitopes for targeting the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) with antibodies.《Molecular Oncology》.2009,第3卷(第3期),对比文件1的摘要以及图1-图7.

SIYI HU ET AL.Epitope mapping and structural analysis of an anti-ErbB2 antibody A21:Molecular basis for tumor inhibitory mechanism.《PROTEINS:STRUCTURE, FUNCTION, AND BIOINFORMATICS》.2008,第70卷(第3期),全文.

审查员 陈彦闯

权利要求书4页 说明书51页

序列表22页 附图9页

(54) 发明名称

针对HER2表位的单克隆抗体

(57) 摘要

本发明公开了结合人表皮生长因子受体2 (HER2) 的分离的单克隆抗体,以及基于相关抗体的组合物和分子。本发明还公开了包含该抗体的药物组合物和使用该抗体的治疗和诊断方法。

1. 单克隆抗体, 所述单克隆抗体结合表皮生长因子受体2 (HER2), 所述单克隆抗体包含选自如下的VH区和VL区:

a) 包含SEQ ID NO:2的CDR1序列、SEQ ID NO:3的CDR2序列和SEQ ID NO:4的CDR3序列的VH区; 以及包含SEQ ID NO:6的CDR1序列、GAS的CDR2序列和SEQ ID NO:7的CDR3序列的VL区;

b) 包含SEQ ID NO:9的CDR1序列、SEQ ID NO:10的CDR2序列和SEQ ID NO:11的CDR3序列的VH区; 以及包含SEQ ID NO:13的CDR1序列、DAS的CDR2序列和SEQ ID NO:14的CDR3序列的VL区;

c) 包含SEQ ID NO:16的CDR1序列、SEQ ID NO:17的CDR2序列和SEQ ID NO:18的CDR3序列的VH区; 以及包含SEQ ID NO:20的CDR1序列、GAS的CDR2序列和SEQ ID NO:21的CDR3序列的VL区;

d) 包含SEQ ID NO:23的CDR1序列、SEQ ID NO:24的CDR2序列和SEQ ID NO:25的CDR3序列的VH区; 以及包含SEQ ID NO:27的CDR1序列、GAS的CDR2序列和SEQ ID NO:28的CDR3序列的VL区;

e) 包含SEQ ID NO:30的CDR1序列、SEQ ID NO:31的CDR2序列和SEQ ID NO:32的CDR3序列的VH区; 以及包含SEQ ID NO:34的CDR1序列、GAS的CDR2序列和SEQ ID NO:35的CDR3序列的VL区; 和

f) 包含SEQ ID NO:37的CDR1序列、SEQ ID NO:38的CDR2序列和SEQ ID NO:39的CDR3序列的VH区; 以及包含SEQ ID NO:41的CDR1序列、GAS的CDR2序列和SEQ ID NO:42的CDR3序列的VL区。

2. 权利要求1的抗体, 所述抗体包含VH区和VL区, 所述VH区选自如下:

a) SEQ ID NO:1的VH区;

b) SEQ ID NO:8的VH区;

c) SEQ ID NO:15的VH区;

d) SEQ ID NO:22的VH区;

e) SEQ ID NO:29的VH区;

f) SEQ ID NO:36的VH区; 和

g) a)、d) 或e) 中任一者的变体, 其中所述变体具有1个、2个或3个氨基酸取代, 每个取代在图1A中的相应共有序列中通过“X”指示的位置处, 且所述取代是被在图1A中的比对的VH序列中的相同位置处存在的氨基酸取代。

3. 权利要求2的抗体, 所述抗体包含选自如下的VH区和VL区:

a) SEQ ID NO:1的VH区和SEQ ID NO:5的VL区;

b) SEQ ID NO:8的VH区和SEQ ID NO:12的VL区;

c) SEQ ID NO:15的VH区和SEQ ID NO:19的VL区;

d) SEQ ID NO:22的VH区和SEQ ID NO:26的VL区;

e) SEQ ID NO:29的VH区和SEQ ID NO:33的VL区;

f) SEQ ID NO:36的VH区和SEQ ID NO:40的VL区; 和

g) a)、d) 或e) 中任一者的变体, 其中所述变体具有1个、2个或3个氨基酸取代, 每个取代在图1A中的相应共有序列中通过“X”指示的位置处, 且所述取代是被在图1A中的比对的

VH序列或图2A中的比对的VL序列中的相同位置处存在的氨基酸取代。

4. 权利要求1-3中任一项的抗体,所述抗体对于结合表达HER2的细胞具有低于0.80 μ g/ml的EC₅₀值。

5. 权利要求4的抗体,所述抗体对于结合表达HER2的细胞具有低于0.50 μ g/ml的EC₅₀值。

6. 权利要求1-3中任一项的抗体,所述抗体特异性结合HER2阳性的猕猴上皮细胞。

7. 权利要求1-3中任一项的抗体,其中当所述抗体缀合至治疗部分如假单胞菌-外毒素A的截短形式时,所述抗体杀死至少60%的表达HER2的肿瘤细胞系。

8. 权利要求7的抗体,其中当所述抗体缀合至治疗部分如假单胞菌-外毒素A的截短形式时,所述抗体杀死至少70%的表达HER2的肿瘤细胞系。

9. 权利要求1-3中任一项的抗体,其中与曲妥珠单抗相比,更高量的所述抗体被表达HER2的肿瘤细胞系内化。

10. 权利要求1-3中任一项的抗体,其中所述抗体是二价抗体。

11. 权利要求1-3中任一项的抗体,其中所述抗体是抗原结合片段。

12. 权利要求1-3中任一项的抗体,其中所述抗体是全长抗体。

13. 权利要求12的抗体,其中所述抗体是IgG1抗体。

14. 权利要求12的抗体,其中所述抗体是IgG1, κ 抗体。

15. 权利要求1-3中任一项的抗体,其中所述抗体是效应物功能缺陷抗体。

16. 权利要求15的抗体,其中所述抗体是稳定化的人IgG4抗体,其中用赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸或亮氨酸取代人IgG4的重链恒定区409位的精氨酸,和/或其中铰链区包含Cys-Pro-Cys序列。

17. 权利要求16的抗体,其中用赖氨酸取代人IgG4的重链恒定区409位的精氨酸。

18. 权利要求1-3中任一项的抗体,其中所述抗体是单价抗体。

19. 权利要求18的抗体,其中所述单价抗体包含

(i) 权利要求1-17的抗体的可变区或所述区的抗原结合部分,和

(ii) 免疫球蛋白的C_H区或其包含C_{H2}和C_{H3}区的片段,其中所述C_H区或其片段已经修饰,使得对应于铰链区的区域,以及,如果所述免疫球蛋白不是IgG4亚型,C_H区的其它区域,不包含任何如下氨基酸残基:在多克隆人IgG存在的情况下,所述氨基酸残基能够与相同的C_H区形成二硫键或者与相同的C_H区形成其它共价的或稳定的非共价重链间键。

20. 权利要求19的抗体,其中所述C_H区的其它区域是C_{H3}区。

21. 权利要求20的抗体,其中步骤ii)中提到的免疫球蛋白是IgG4亚型的。

22. 权利要求21的抗体,其中所述重链已经修饰,使得整个铰链区已经缺失。

23. 权利要求1-3中任一项的抗体,其中所述抗体是双特异性抗体,其包含如权利要求1-3中任一项中所定义的抗体的第一抗原结合区,和具有不同结合特异性的第二抗原结合区。

24. 权利要求23的抗体,其中所述第二抗原结合区对人效应细胞、人Fc受体、B细胞受体或HER2的非阻断表位具有结合特异性。

25. 权利要求1-3中任一项的抗体,其中所述抗体与另一个部分相缀合。

26. 权利要求1-3中任一项的抗体,其中所述抗体与细胞毒性部分、放射性同位素、药物或细胞因子相缀合。

27. 权利要求26的抗体, 所述抗体

i) 与选自如下的细胞毒性部分缀合: 美登素I、卡里奇霉素、duocarmycin、雷查霉素或单甲基瑞奥西汀E;

ii) 与选自如下的细胞因子缀合: IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3配体、干细胞因子、安西司亭和TNF α ; 或

iii) 与放射性同位素缀合。

28. 核苷酸序列组, 其编码选自如下的VH和VL氨基酸序列: SEQ ID NO: 1和5; 8和12; 15和19; 22和26; 29和33; 36和40; 43和44; 45和46; 47和48; 49和50; 51和52; 53和54; 55和56。

29. 表达载体, 其包含根据权利要求28所述的核苷酸序列组, 其中所述载体进一步编码可操作连接的轻链恒定区和可操作连接的重链恒定区; 或编码根据权利要求28所述的核苷酸序列组的两个表达载体的组合, 其中所述两个载体之一编码权利要求28的VL氨基酸序列, 且进一步编码可操作连接的轻链恒定区, 并且所述两个载体中的第二载体编码权利要求28的VH氨基酸序列, 且进一步编码可操作连接的重链恒定区。

30. 重组的真核生物或原核生物宿主细胞, 其产生如权利要求1-25中任一项中所定义的抗体。

31. 药物组合物, 其包含如权利要求1-27中任一项中所定义的抗体和药学上可接受的载体。

32. 权利要求1-27中任一项的抗体, 其用作药物。

33. 权利要求1-27中任一项的抗体, 其用于癌症的治疗中。

34. 权利要求33的用于癌症的治疗中的抗体, 其中所述癌症选自: 乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、胃癌、结肠直肠癌、食道癌、头部和颈部的鳞状细胞癌、子宫颈癌、胰腺癌、睾丸癌、恶性黑色素瘤和软组织癌。

35. 权利要求33的用于癌症的治疗中的抗体, 其中所述抗体用于与一种或多种进一步的治疗剂组合以治疗癌症。

36. 权利要求35的用于癌症的治疗中的抗体, 其中所述进一步的治疗剂是化疗剂。

37. 权利要求1-27中任一项的抗体用于制备用于治疗癌症的药物的用途, 其中所述癌症选自: 乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、胃癌、结肠直肠癌、食道癌、头部和颈部的鳞状细胞癌、子宫颈癌、胰腺癌、睾丸癌、恶性黑色素瘤和软组织癌。

38. 权利要求37的用途, 其中所述抗体用于与一种或多种进一步的治疗剂组合以治疗癌症。

39. 权利要求1-27中任一项的抗体, 其用于治疗包含共表达HER2和EGFR和/或HER3的肿瘤细胞的受试者中的癌症。

40. 权利要求39的抗体, 其中所述癌症选自乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜/子宫颈癌、肺癌、恶性黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、睾丸癌、软组织肿瘤和膀胱癌。

41. 权利要求40的抗体, 其中所述软组织肿瘤是滑膜肉瘤。

42. 用于产生权利要求1-27中任一项的抗体的方法, 所述方法包括下列步骤

a) 培养权利要求30的宿主细胞, 以及

b) 从培养基纯化所述抗体。

43. 权利要求1-27中任一项的抗体在制备试剂中的用途, 所述试剂用于检测样品中HER2的存在的方法, 所述方法包括:

- 在允许抗体和HER2之间形成复合物的条件下, 将所述样品与权利要求1-27中任一项的抗体接触; 和

- 分析是否已经形成了复合物。

44. 用于检测样品中HER2的存在的试剂盒, 其包含

- 权利要求1-27中任一项的抗体; 以及
- 所述试剂盒的使用说明书。

针对HER2表位的单克隆抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及针对人表皮生长因子受体2 (HER2) 的单克隆抗体,和这 类抗体的用途,尤其是它们在治疗癌症中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] HER2是185-kDa的细胞表面受体酪氨酸激酶,是表皮生长因子受 体(EGFR)家族的成员,该家族包括四种不同的受体:EGFR/ErbB-1, HER2/ErbB-2,HER3/ErbB-3和HER4/ErbB-4。EGFR家族的四个成员形 成同源和异源二聚体,HER2是对于其他ErbB受体优选并且最有效的二 聚体伴侣(Graus-Porta等,Embo J1997;16:1647-1655;Tao等,J Cell Sci 2008;121:3207-3217)。可以通过过表达或者通过与可以被配体结合而 活化的其他ErbBs的异源二聚化而活化HER2(Riese和Stern,Bioessays 1998;20:41-48)。对于HER2,没有鉴别到任何配体。HER2活化导致受 体磷酸化,这通过多种信号通路如MAPK、磷酸肌醇3-激酶/AKT、JAK/STAT和PKC触发下游信号的级联,这最终导致多种细胞功能如生 长、生存和分化的调控(Huang等,Expert Opin Biol Ther2009;9:97-110)。

[0004] 对HER2在肿瘤中的很多注意力集中在其在乳腺癌中的作用,其中 报道了HER2在约20%的病例中过表达并且HER2过表达与预后较差相 关(Reese等,Stem Cells1997;15:1-8;Andrechek等,Proc Natl Acad Sci U S A2000;97:3444-3449;和Slamon等, Science1987;235:177-182)。除 了乳腺癌,HER2表达还与其他人肿瘤类型,包括前列腺癌,非小细胞 肺癌,膀胱癌,卵巢癌,胃癌,结肠癌,食管癌和头部和颈部的鳞状细 胞癌相关(Garcia de Palazzo等,Int J Biol Markers1993;8:233-239;Ross 等,Oncologist2003; 8:307-325;Osman等,J Urol2005;174:2174-2177; Kapitanovic等, Gastroenterology1997;112:1103-1113;Turken等, Neoplasma2003;50:257-261;和 Oshima 等,Int J Biol Markers2001; 16:250-254)。

[0005] 曲妥珠单抗(Herceptin[®])是重组的人源化的单克隆抗体,其针对 HER2蛋白的结构域IV,从而在高HER2过表达的细胞中阻断配体非依 赖性HER2同源二聚化,导致在更小的程度上HER2与其他家族成员的 异源二聚化(Cho等,Nature2003;421:756-760和Wehrman 等,Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:19063-19068)。在具有适度HER2表达水平的 细胞中,发现曲妥珠单抗(trastuzumab)抑制HER2/EGFR异源二聚体的形 成(Wehrman等, (2006),同上;Schmitz等.,Exp Cell Res2009; 315:659-670)。曲妥珠单抗介导抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)并防 止胞外结构域脱落,否则胞外结构域脱落可以导致HER2过 表达细胞中 截短的组成型活性的蛋白的形成。对于曲妥珠单抗也已经报道了表达高 水平的HER2的肿瘤细胞的体外和体内增殖的抑制(Nahta和Esteva的综 述,Oncogene2007;26: 3637-3643)。已经批准了Herceptin[®]用于HER2 过表达的转移性乳腺癌第一线和辅助治 疗,或与化疗相结合,或作为遵 循一个或多个化疗方案的单一药物。已经发现曲妥珠单抗 仅在20-50% 的HER2过表达的乳腺癌肿瘤患者中是有效的,许多初始应答者在几个 月后 表现复发(Dinh等,Clin Adv Hematol Oncol2007;5:707-717)。

[0006] 帕妥珠单抗(Omnitarg[™])是另一种针对HER2蛋白的结构域II的单 克隆抗体,导致

配体诱导的异源二聚化(即,HER2与配体已经结合的 ErbB家族的另一个成员的二聚化)的抑制;据报道不严格地要求高HER2 表达水平的机制(Franklin等.,Cancer Cell2004;5:317-328.)。尽管帕妥 珠单抗也介导ADCC,帕妥珠单抗的作用的主要机制依赖于其二聚化阻断(Hughes等,Mol Cancer Ther2009;8:1885-1892)。此外,发现帕妥珠 单抗增强EGFR内化并通过抑制EGFR/HER2异源二聚体的形成而增强 下调,否则使EGFR拴系(tether)于质膜(Hughes等,2009,同上)。这与 EGFR二聚体比EGFR/HER2二聚体更有效地内化这一观察结果相关(Pedersen等,Mol Cancer Res2009;7:275-284。据报道,当在以前的曲 妥珠单抗治疗期间进展的患者中组合时,帕妥珠单抗和曲妥珠单抗的作 用的互补机制导致增强的抗肿瘤效果和有效性(Baselga等,J Clin Oncol 2010;28:1138-1144),评价在以前未治疗的HER2阳性转移性乳腺癌中 这种抗体与多西他赛(Docetaxel)共同组合的III期试验正在进行中。

[0007] 改进靶向抗体治疗的另一种方法是通过将细胞毒性细胞或药物特 异性递送至表达抗原的癌细胞。例如,所谓的三功能性抗体是双特异性 抗体,具有一个靶向肿瘤细胞上的抗原的臂以及另一个靶向T细胞上的 抗原例如CD3的臂。结合后,形成结合Fc的T细胞、肿瘤细胞和效应 物细胞的复合物,导致杀死肿瘤细胞(Muller和Kontermann,BioDrugs 2010;24:89-98)。Ertumaxomab就是这种针对HER2的三功能性抗体, 其在低HER2表达的细胞系中诱导细胞毒性,在转移性乳腺癌的II期临 床开发中(Jones等,Lancet Oncol2009;10:1179-1187和Kiewe等,Clin Cancer Res2006;12:3085-3091)。

[0008] HER2抗体药物缀合物(ADC)目前在临床开发中。T-DM1由与真菌 毒素maytansine缀合的曲妥珠单抗组成。(Krop等,2011,J Clin Oncol 2010(在印刷前提前在线出版)和Lewis Phillips等,Cancer Res2008; 68:9280-9290)报道了在II期试验中,严重预处理患者组群(包括以前的曲 妥珠单抗和/或拉帕替尼(lapatinib)治疗)中的应答。III期试验正在进行 中,其中评价T-DM1比卡培他滨+拉帕替尼在以前接受曲妥珠单抗治疗 的HER2-阳性的局部晚期或转移性乳腺癌的患者中的疗效和安全性。

[0009] 尽管许多因素参与选择用于HER2靶向治疗的合适的抗体,如果 HER2-抗体复合物在抗体结合后有效地内化,这对于ADC方法通常是一 种优势。对于小鼠HER2抗体的研究显示,抗体的某些组合促进HER2 内吞作用(Ben-Kasus等,PNAS2009;106:3294-9)。已经报道人HER2抗 体F5和C1相对于它们自身迅速地内化并结合相同的表位(WO 99/55367 和WO 2006/116107)。然而,与EGFR相比,HER2的内化受损。事实 上,EGFR同源二聚体的内化效率远远高于HER2同源二聚体(Dinh等, Clin Adv Hematol Oncol2007;5:707-717)。EGFR,也 还有HER3,可以 分别通过形成EGFR/HER2和HER3/HER2异源二聚体而增加HER2的内 吞作用(Baulida等,J Biol Chem1996;271:5251-5257;Pedersen NM,等, Mol Cancer Res2009; 7:275-84)。

[0010] 调节HER2的功能的复杂机制需要进一步研究针对这种原癌基因的 新的并且优化的治疗策略。因此,对于治疗HER2相关的疾病如癌症, 仍然需要有效和安全的产品。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的一个目的是提供用于医疗用途的新的、高度特异的、有效的 单克隆HER2抗体。本发明的抗体显示与本领域中已有描述的抗体不同 的HER2结合特性。具体而言,本发明的抗体结合HER2的不同区段, 因为它们彼此阻断与HER2的结合,但不阻断曲妥珠单

抗、帕妥珠单抗 或F5/C1与HER2的结合。此外,与已知抗体相反,本发明的抗体可以在不促进细胞增殖的情况下有效地内化进表达HER2的细胞。

[0013] 在优选的实施方案中,本发明的抗体是完全人的,结合新的表位,和/或对于人患者中的治疗用途具有其他有利的特性。示例性的特性包括 但不限于,与以高或低水平表达人HER2的癌细胞的有利的结合特性,特异性结合表达HER2直接同源物的猕猴上皮细胞,结合HER2后有效 内化,当作为抗体药物缀合物(ADC)施用时代杀死表达高或低水平HER2 的癌细胞的高能力,对表达HER2的癌细胞的增殖没有显著的激动效果 并提供表达HER2的细胞的有效ADCC-介导的杀死,以及上述特性的 任何组合。

[0014] 下面进一步详细描述了本发明的这些和其他方面。

[0015] 附图简要说明

[0016] 图1:HuMab重链可变区(VH)序列与种系(参照)序列的比对(A-D)。在每个VH序列中,在特定位置与种系(参照)的那些氨基酸不同的氨基酸突出显示。显示共有VH序列,其中“X”表示可能有其他氨基酸(选自在指明位置比对的那些氨基酸)的位置。在每个VH序列中,CDR1、CDR2 和CDR3序列用下划线表示。在表4中进一步定义了共有CDR序列。

[0017] 图2:HuMab轻链可变区(VL)序列与种系(参照)序列的比对(A-B)。在每个VL序列中,在特定位置与种系(参照)的那些氨基酸不同的氨基酸突出显示。在图2A中,所有VL序列源自相同的V-区段(IgKV3-20-01),但抗体间最接近的J-区段不同。显示共有VL序列,其中“X”表示可能有其他氨基酸(选自在指明位置比对的那些氨基酸)的位置。在每个VL序列中,CDR1、CDR2和CDR3序列用下划线表示。在表4中进一步定义了共有CDR序列。

[0018] 图3:如实施例12中所述测定的,HER2抗体与(A)高(AU565)和(B)低(A431)表达HER2的细胞系的结合曲线。显示数据是每种细胞系的一次代表性实验的平均荧光强度(MFI)。 EC_{50} 值表示表观亲和力。

[0019] 图4:HER2抗体与上皮细胞上表达的HER2的结合。显示数据是 实施例13中所述的一次代表性实验的平均荧光强度(MFI)。

[0020] 图5:HER2抗体的铬-释放(ADCC)测定,显示在与HER2抗体孵育后 ^{51}Cr -标记的SK-BR-3细胞的PBMC-介导的裂解。显示的值是来自用SK-BR-3细胞的一次代表性的体外ADCC实验的平均最高百分比 ^{51}Cr -释放 \pm 标准偏差。详细信息见实施例15。

[0021] 图6:与未处理的细胞(设置为100%)相比,HER2抗体对AU565 细胞的增殖的影响。显示数据是在三次独立的实验中测定的与未处理的 细胞相比的AU565细胞的百分比增殖 \pm 标准偏差。详细信息见实施例16。

[0022] 图7:ADC测定,显示通过抗- κ -ETA'-缀合的HER2抗体的AU565 细胞(A)或A431细胞(B)的杀死。(A)显示数据是使用以未缀合的和抗- κ -ETA'-缀合的HER2抗体处理的AU565细胞的一次代表性实验的平均 荧光强度(MFI)。(B)显示数据是使用以未缀合的和抗- κ -ETA'-缀合的 HER2抗体处理的A431细胞的一次代表性实验的平均荧光强度(MFI)。详细信息见实施例17。

[0023] 图8:HER2的抗体诱导的下调。用10 μ g/mL mAb孵育3天后AU565 细胞裂解物中表达的HER2的相对百分比。用HER2特异性捕获ELISA 定量HER2的量并表示为相对于未处理的细胞的百分比。显示数据是三次实验的平均值 \pm 标准偏差。详细信息见实施例19。

[0024] 图9:HER2抗体(FITC)与溶酶体标记LAMP1(Cy5)的共定位分析,显示对于各种单

特异性HER2抗体的与Cy5重叠的FITC像素强度。对于每种抗体绘制三个不同的图像的LAMP1/Cy5阳性像素的FITC像素强度。抗体005表现出与抗体Herceptin和帕妥珠单抗相比LAMP1/Cy5阳性区域中更高的FITC像素强度。详细信息见实施例20。

[0025] 图10:借助流式细胞仪分析的HER2抗体与用不同的HER2ECD 构建体转染的CHO-S细胞的结合。Hu-HER2=完全人HER2, Hu-HER2-ch (I) CR1=具有鸡结构域I的hu-HER2, Hu-HER2-ch (II)=具有鸡结构域II的hu-HER2, hu-HER2-ch (III)=具有鸡结构域III的 hu-HER2和Hu-HER2-ch (IV)=具有鸡结构域IV的hu-HER2。显示数据 是一种代表性抗体106的平均荧光强度(MFI)。详细信息见实施例21。

[0026] 图11:在雌性CB.17重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠中NCI-N87人 胃癌异种移植模型中HER2-HuMab005的体内效果。显示数据是每组 (n=10只小鼠/组)的平均肿瘤大小±S.E.M. (A)和生存(B)。详细信息见实 施例22。

[0027] 发明的详细说明

[0028] 定义

[0029] 当本文中使用时,术语“HER2”(也被称为ErbB-2, NEU, HER-2和 CD340)是指人表皮生长因子受体2 (SwissProt P04626),包括细胞(包括肿 瘤细胞)天然表达的或用HER2基因转染的细胞上表达的HER2的任何变 体、同种型和物种同源物。物种同源物包括猕猴HER2 (猕猴;GenBank 登录号GI:109114897)。

[0030] 术语“免疫球蛋白”是指一类结构上相关的糖蛋白,由两对多肽链(一对轻(L)低分子量链和一对重(H)链)组成,所有四条链通过二硫键内部连 接。免疫球蛋白的结构已经得到充分表征。见例如 Fundamental Immunology第7章(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))。简而言之,每条重链典型地由重链可变区(本文缩写为V_H或VH)和重链恒定区组成。重链恒定区典型地由三个结构域(C_{H1}, C_{H2} 和C_{H3})组成。每条轻链典型地由轻链可变区(这里缩写为V_L或VL)和轻 链恒定区组成。轻链恒定区典型地由一个结构域C_L构成。V_H和V_L区可 以进一步再分成超可变性区(或超变区,其在结构限定环的序列和/或形式中具有高度可变性),也称作互补决定区(CDRs),它们之间散布着更 保守的、称作框架区(FRs)的区域。每个V_H和V_L典型地由3个CDR和 4个FR组成,从氨基末端向羧基末端以下列顺序排列:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4(另见Chothia和Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987))。除非上下文另外指明或与之矛盾,根据IMGT规则鉴别 本文的CDR序列(Brochet X., Nucl Acids Res. 2008;36:W503-508和 Lefranc MP., Nucleic Acids Research 1999;27:209-212;也参见因特网http 地址imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIg。然而, 也可以通过Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)中所述的方法进行抗体序列中氨基酸残基的编号(本文中短语如“如Kabat中可变结构域残基编号”, “Kabat位置”或“根据Kabat”是指这 种编号系统)。具体而言,对于恒定区中氨基酸的编号,可以使用根据同 上的Kabat等的EU索引编号系统。对于给定抗体,可以通过在该抗体 序列与“标准”Kabat编号序列的同源区的比对而确定残基的Kabat编号。

[0031] 在本发明的上下文中,术语“抗体”(Ab)是指免疫球蛋白分子,免疫 球蛋白分子的片段,或其二者中任一种的衍生物,其在典型的生理条件 下具有与抗原特异性结合的能

力,具有显著时间期间的半衰期,如至少 约30分钟,至少约45分钟,至少约1小时,至少约2小时,至少约4 小时,至少约8小时,至少约12小时,约24小时或者更长,约48小 时或者更长,约3、4、5、6、7或更多天等,或者任何其他相关的功能 上定义的期间(如足够诱发、促进、提高和/或调节和抗体与抗原的结合 关联的生理应答的时间,和/或足以供抗体招募效应物活性的时间)。免 疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体(Abs)的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和补体系统的组分,如补体活 化经典途径中的第一组分C1q。HER2抗体也可以是双特异性抗体、双 抗体(diabody)或类似分子(双抗体的描述见例如 PNAS USA90(14), 64448(1993))。事实上,本发明提供的双特异性抗体、双抗体等除了结合HER2的一部分以外,还可以结合任何合适的目标。如前所述,除非 上下文另外指明或与之明显矛盾,本文的术语抗体包括抗体的片段,该 抗体片段是抗原结合片段,即保持与抗原特异性结合能力。已经显示,可以由全长抗体的片段行使抗体的抗原结合功能。术语“抗体”中涵盖的 抗原结合片段的例子包括(i) Fab' 或Fab片段,由V_L,V_H,C_L和C_H1结构 域组成的单价片段,或者如W02007059782 (Genmab)中描述的单价抗体;(ii) F(ab')₂片段,包含通过在铰链区中的二硫桥连接的两个Fab片段的二 价片段;(iii)基本上由V_H和C_H1结构域组成的Fd片段;(iv)基本上由抗 体的单一臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段;(v) dAb片段(Ward等, Nature341,544-546(1989)),其基本上由V_H结构域组成,也称作结构域 抗体(Holt等; Trends Biotechnol.2003Nov;21(11):484-90);(vi) 骆驼抗 体(camelid)或纳米抗体(nanobodies)(Reverts等;Expert Opin Biol Ther.2005Jan;5(1):111-24),和(vii)分离的互补决定区(CDR)。而且,尽 管Fv片段的两个结构域V_L和V_H是由分别的基因编码,但是可以通过 合成的接头用重组方法将它们连接起来,该合成的接头能够使它们作为 单一蛋白链制造出来,其中V_L和V_H区配对形成单价分子(被称为单链 抗体或单链Fv(scFv),见例如 Bird等.,Science242,423-426(1988)和 Huston等.,PNAS USA85,5879-5883(1988))。除非上下文另外指出或明 显指明,这种单链抗体涵盖在术语抗体中。尽管这种片段通常包括在抗 体的意义内,它们共同地并且各自独立地是本发明的独特特征,显示不 同的生物学特性和效用。本文进一步讨论了在本发明的上下文中的这些 和其他有用的抗体片段以及这种片段的双特异性形式。还应当理解的 是,除非另外指出,术语抗体还包括通过任何已知的技术如酶切割 (enzymatic cleavage)、肽合成和重组技术提供的多克隆抗体、单克隆抗体(mAbs)、抗体样多肽,如嵌合抗体和人源化抗体,以及保留与抗原特 异性结合能力的抗体片段(抗原结合片段)。产生的抗体可以具有任何同 种型。

[0032] 如本文所使用的,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋 白类型(例如 IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgD,IgA,IgE,或IgM)。

[0033] 术语“单价抗体”在本发明的上下文中意味着抗体分子能够结合单 个抗原分子,因此不能够抗原交联。

[0034] “效应物功能缺陷的抗体”或“效应物功能缺陷抗体”是指如下抗体,其具有显著降低的活化一种或多种效应物机制(如补体活化或Fc受体结 合)的能力或者没有该能力。因此,效应物功能缺陷抗体具有显著降低的 介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖的细胞毒性 (CDC)的能力或者没有该能力。这种抗体的一个例子是IgG4。

[0035] “HER2抗体”或“抗-HER2抗体”是如上所述的抗体,其与抗原HER2 特异性结合。

[0036] 如本文所使用的,术语“人抗体”意图包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或定点诱变或 通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如本文所使用的,术语“人抗体”并不意图包括如下抗体,其中源自另一种哺乳动物物种(如小鼠)种系的CDR序列被接枝到人框架序列上。

[0037] 如本文所使用的,如果抗体是从使用人免疫球蛋白序列的系统获得的(例如通过免疫携带人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或者通过筛选人免疫球蛋白基因文库),并且其中选择的人抗体在氨基酸序列与由该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少90%,如至少95%,例如至少96%,如至少97%,例如至少98%,或者如至少99%相同,则人抗体“源自”特定的种系序列。典型地,除了重链CDR3,源自特定人种系序列的人抗体与由该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相比,显示不超过20个氨基酸的差异,例如不超过10个氨基酸的差异,例如不超过9、8、7、6或5个,例如不超过4、3、2或1个氨基酸的差异。

[0038] 在一个优选实施方案中,本发明的抗体是分离的。如本文所使用的,“分离的抗体”意图是指如下抗体,其基本上不含其他具有不同抗原特异性的抗体(例如,特异性结合HER2的分离抗体基本上不含特异性结合除HER2以外的抗原的抗体)。然而,特异性结合HER2的表位、同种型或变体的分离的抗体可以与其他相关抗原,例如来自其他物种的抗原(例如HER2种间同源物)具有交叉反应性。而且,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学剂。在本发明的一个实施方案中,两种或多种具有不同抗原结合特异性的“分离的”单克隆抗体被组合在良好定义的组合物中。

[0039] 当本文中在两种或更多种抗体的上下文中使用时,术语“与...竞争”或“与...交叉竞争”表明,两种或更多种抗体竞争结合HER2,例如在实施例14中所述的测定中竞争结合HER2。如果抗体竞争一种或多种其他抗体25%或更高时,抗体“阻断”或“交叉阻断”一种或多种其他抗体结合HER2,25%-74%代表“部分阻断”,75%-100%代表“完全阻断”,优选使用实施例14的测定来确定。对于一些抗体对,实施例的测定中的竞争或阻断只有在将一种抗体包被在平板上,而用另一种进行竞争时才能观察到,但反之则不行。除非上下文另外定义或否定,当在本文中使用时,术语“与...竞争”,“与...交叉竞争”,“阻断”或“交叉阻断”还意图涵盖这种抗体对。

[0040] 术语“表位”是指能够特异性结合抗体的蛋白决定簇。表位通常由分子的表面基团如氨基酸或糖侧链组成,通常具有特定的三维结构特征,以及特定的带电特征。构象表位和非构象表位的区别在于,在变性剂存在的情况下,与前者的结合消失,而与后者的结合不消失。表位可以包括直接参与结合的氨基酸残基(也称作表位的免疫显性组分(immunodominant component)),和其他不直接参与结合的氨基酸残基,如可以被特异性抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基(换言之,这些氨基酸残基位于特异抗原结合肽的足迹(footprint)内)。

[0041] 如本文所使用的,术语“单克隆抗体”是指具有单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示对特定表位的单一的结合特异性和亲和力。因此,术语“人单克隆抗体”是指显示单一结合特异性的抗体,其具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。人单克隆抗体可以通过杂交瘤产生,杂交瘤包括与永生化细胞融合的、从转基因或转染染色体非人类动物(例如转基因小鼠)获得的B细胞,该动物具有包含人重链转基因

和轻链转基因的基因组。

[0042] 如本文所使用的,在抗体与预定抗原的结合的上下文中,术语“结合”典型地是其以对应于约 10^{-7} M或者更小,如约 10^{-8} M或者更小,如约 10^{-9} M或者更小,约 10^{-10} M或者更小,或者约 10^{-11} M或者甚至更小的 K_D 的亲合力结合(当通过例如在BIAcore3000设备中用抗原作为配体、以抗体作为分析物通过表面等离子体共振(SPR)技术进行测定时),并且与除预定抗原或密切相关的抗原之外的非特异性抗原(例如BSA或酪蛋白)结合的其亲合力相比,其与预定抗原结合的亲合力对应的 K_D 低至少10倍,如至少低100倍,例如至少低1,000倍,如至少低10,000倍,例如至少低100,000倍。亲合力低出的量取决于抗体的 K_D ,因此当抗体的 K_D 非常低时(即抗体是高度特异性的),对抗原的亲合力低于对非特异性抗原的亲合力的量可以是至少10,000倍。

[0043] 如本文所使用的,术语“ k_d ”(sec $^{-1}$)是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值也称作 k_{off} 值。

[0044] 如本文所使用的,术语“ k_d ”(M $^{-1} \times$ sec $^{-1}$)是指特定抗体-抗原相互作用的结合速率常数。

[0045] 如本文所使用的,术语“ K_D ”(M)是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0046] 如本文所使用的,术语“ K_A ”(M $^{-1}$)是指特定抗体-抗原相互作用的结合平衡常数,并且通过 k_a 除以 k_d 获得。

[0047] 如本文所使用的,术语“抑制增殖”(例如涉及细胞,如肿瘤细胞)意图包括当与HER2抗体接触时,和与HER2抗体接触的不同细胞的增殖相比,细胞增殖的任何明显的降低,例如,抑制细胞培养物增殖至少约10%,至少约20%或至少约30%,或至少与参照抗体如曲妥珠单抗一样,例如,通过实施例中的测定所确定的。

[0048] 如本文所使用的,术语“促进增殖”(例如涉及细胞,如肿瘤细胞)意图包括当与HER2抗体接触时,和与HER2抗体接触的不同细胞的增殖相比,细胞增殖的任何明显的增加,例如,促进细胞培养物增殖至少约10%,至少约20%或至少约30%,或至少与参照抗体如F5一样,例如,通过实施例中的测定所确定的。

[0049] 如本文所使用的,当本文中在HER2抗体的上下文中使用时,“内化”包括其中所述抗体从细胞表面和/或从周围培养基内化进表达HER-2的细胞的任何机制,例如,通过内吞作用。可以使用测量内化抗体的量的直接测定(如,例如,实施例18中所述的fab-CypHer5E测定)或其中测定内化的抗体-毒素缀合物的作用的间接测定(如,例如,实施例17的抗- κ -ETA'测定)评价抗体的内化。

[0050] 本发明还提供了包括实施例抗体的 V_L 区、 V_H 区、或一个或多个CDR的功能变体的抗体。在HER2抗体的上下文中使用的 V_L 、 V_H 或CDR的功能变体仍然允许该抗体保留母体抗体(parent antibody)的亲合力(affinity)/亲合力(avidity)和/或特异性/选择性的至少相当部分(至少约50%,60%,70%,80%,90%,95%或更多),在一些情况下,与母体抗体相比,这种HER2抗体可以与更大的亲合力、选择性和/或特异性相关。

[0051] 这些功能变体典型地保留与母体抗体的显著的序列同一性。两条序列之间的百分比同一性是序列所共享的相同位置的数量的函数(即,%同源性=相同位置数/位置的总数 \times 100),同时考虑缺口的数量和每个缺口的长度,需要引入缺口是为了在两条序列间进行最佳比对。可以通过E. Meyers和W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17 (1988)的算

法(其已经 被引入到ALIGN程序(2.0版)中),使用PAM120加权残基表、12的缺口 长度罚分和4的缺口罚分确定两条核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同 一性。此外,可以使用Needleman和Wunsch,J.Mol.Biol.48,444-453 (1970)算法确定两个氨基酸序列之间的百分比同一性。

[0052] 示例性的变体包括在一个或多个“变体”氨基酸位置(在对应的共 有序列表示为“X”)与图1和2所示的母体抗体VH和/或VL序列不同的 那些。优选的变体是其中的新的氨基酸选自在图1或2中比对序列之一 的对应位置的那些氨基酸(关于CDR序列变体的详细信息,见表4)。另 外地或额外地,VH,VL或CDR变体的序列可以主要通过保守的取代而 与母体抗体序列的VH,VL或CDR序列不同;例如变体中的至少10个, 如至少9、8、7、6、5、4、3、2或1个取代是保守的氨基酸残基替换。

[0053] 在本发明的上下文中,可以通过下列表格中反映的氨基酸类型内的 取代定义保守取代。

[0054] 对于保守取代的氨基酸残基类型

[0055]	酸性残基	Asp (D)和 Glu (E)
	碱性残基	Lys (K)、 Arg (R) 和 His (H)
	亲水性不带电荷的残基	Ser (S)、 Thr (T)、 Asn (N) 和 Gln (Q)
	脂肪族不带电荷的残基	Gly (G)、 Ala (A)、 Val (V)、 Leu (L) 和 Ile (I)
	非极性不带电荷的残基	Cys (C)、 Met (M) 和 Pro (P)
	芳香族残基	Phe (F)、 Tyr (Y) 和 Trp (W)

[0056] 如本文所使用的,术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)意图 是指其中已经引入表达载体,例如编码本发明的抗体的表达载体的细 胞。重组宿主细胞包括例如转染瘤(transfectomas),如CHO细胞、HEK293 细胞、NS/0细胞和淋巴细胞。

[0057] 术语“转基因非人类动物”是指如下非人类动物,其基因组包括一个 或多个人重链和/或轻链转基因或转染色体(整合或者不整合进动物的天 然基因组DNA中),并且能够表达完全的人抗体。例如,转基因小鼠可 以具有人轻链转基因,以及人重链转基因或人重链转染色体,使得当用 HER2抗原和/或表达HER2的细胞进行免疫时,小鼠产生人HER2抗体。 可以将人重链转基因整合进小鼠的染色体DNA中,如同在转基因小鼠 (例如HuMAb小鼠如HCo7,HCo12或HCo17小鼠)中那样,或者人重 链转基因可以保持在染色体外部,如在W002/43478中描述的转染色体 KM小鼠中那样。具有更大的人Ab基因所有组成成分类似小鼠包 括 HCo7和HCo20(见例如W02009097006)。这些转基因和转染色体小鼠(本 文共同地称为“转基因小鼠”)能够通过经历V-D-J重组和同种型转换 (isotype switching)而产生针对 给定抗原的人单克隆抗体的多种同种型(如IgG,IgA,IgM,IgD和/或IgE)。还可以通过引入 编码这种特异性抗 体的基因,例如通过将基因与在动物乳汁中表达的基因可操作连接而 利 用转基因非人动物用于产生针对特定抗原的抗体。

[0058] “治疗”是指施用有效量的本发明的治疗活性化合物,用于缓解、减 轻、遏制或根除(治愈)症状或疾病状态的目的。

[0059] “有效量”是指在必要的剂量和时间期间,有效获得期望的治疗结果 的量。治疗有

效量的HER2抗体可以随着多种因素而改变,如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及HER2抗体在个体内引发期望的应答的能力。治疗有效量还是这样的量,其中抗体或抗体部分的治疗有益效果超过其任何毒性或有害效果。

[0060] “抗-独特型”抗体是如下抗体,其识别通常与抗体的抗原结合位点关联的独特决定簇。

[0061] 本发明的进一步的方面和实施方案

[0062] 如上所述,在第一个方面,本发明涉及结合HER2的单克隆抗体。

[0063] 可以例如通过Kohler等,Nature256,495(1975)首先描述的杂交瘤方法产生,或者可以通过重组DNA方法产生本发明的单克隆抗体。还可以使用例如Clackson等,Nature352,624-628(1991)和Marks等,J.Mol. Biol.222,581-597(1991)中描述的技术从噬菌体抗体文库分离单克隆抗体。可以从任何合适的来源获得单克隆抗体。因此,例如,可以从杂交瘤获得单克隆抗体,其中所述杂交瘤可以从用感兴趣的抗原免疫的小鼠获得的小鼠脾B细胞制备,该感兴趣的抗原的形式可以是例如在表面上表达抗原的细胞,或者是编码感兴趣的抗原的核酸。还可以从杂交瘤获得单克隆抗体,所述杂交瘤源自被免疫的人或非人哺乳动物(如大鼠、狗、灵长动物等)的表达抗体的细胞。

[0064] 在一个实施方案中,本发明的抗体是人抗体。可以使用携带部分人免疫系统而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生针对HER2的人单克隆抗体。这种转基因和转染色体小鼠包括在本文分别被称为HuMAb小鼠和KM小鼠的小鼠,并在本文共同地被称为“转基因小鼠”。

[0065] HuMAb小鼠包含编码未重排的人重链(μ 和 γ)和 κ 轻链免疫球蛋白序列,连同使内源 μ 和 κ 链基因座失活的靶向的突变的人免疫球蛋白基因迷你基因座(miniloci)(Lonberg,N.等,Nature368,856-859(1994))。因此,小鼠显示降低的小鼠IgM或 κ 的表达,并且对免疫应答中,引入的人重链和轻链转基因经历类型转换(class switching)和体细胞突变(somatic mutation)从而产生高亲和力人IgG, κ 单克隆抗体(Lonberg,N.等.(1994),同上;综述见Lonberg,N.Handbook of Experimental Pharmacology113,49-101(1994),Lonberg,N.和Huszar,D.,Intern.Rev. Immunol.Vol.1365-93(1995)以及Harding,F.和Lonberg,N.Ann.N.Y. Acad.Sci764536-546(1995))。Taylor,L.等,Nucleic Acids Research20,6287-6295(1992),Chen,J.等,International Immunology5,647-656(1993),Tuailon等,J.Immunol.152,2912-2920(1994),Taylor,L.等,International Immunology6,579-591(1994),Fishwild,D.等,Nature Biotechnology14,845-851(1996)中详细描述了HuMAb小鼠的制备。也参见US5,545,806,US5,569,825,US5,625,126,US5,633,425,US 5,789,650,US5,877,397,US5,661,016,US5,814,318,US5,874,299,US 5,770,429,US5,545,807,W098/24884,W094/25585,W093/1227,W0 92/22645,W092/03918和W001/09187。

[0066] HCo7,HCo12,HCo17和HCo20小鼠在它们的内源轻链(κ)基因中具有JKD破坏(JKD disruption)(如Chen等,EMBO J.12,821-830(1993)中所述),在它们的内源重链基因中具有CMD破坏(如W001/14424的实施例1中所述),并具有KCo5人 κ 轻链转基因(如Fishwild等,Nature Biotechnology14,845-851(1996)中所述)。此外,Hco7小鼠具有HCo7人重链转基因(如US5,770,429中所述),HCo12小鼠具有HCo12人重链转基因(如W001/14424的实施例2

中所述), HCo17小鼠具有HCo17人 重链转基因(如W001/09187的实施例2中所述)以及HCo20小鼠具有 HCo20人重链转基因。产生的小鼠在对于内源的小鼠重链和 κ 轻链基因 座的破坏纯合的背景中表达人免疫球蛋白重链和 κ 轻链转基因。

[0067] 在KM小鼠品系中,已经如Chen等,EMBO J.12,811-820(1993)中 所述将内源小鼠 κ 轻链基因纯合地破坏,并且已经如W001/09187的实 施例1所述将内源小鼠重链基因纯合地破坏。如Fishwild等,Nature Biotechnology14,845-851(1996)中所述,该小鼠品系携带人 κ 轻链转基 因KCo5。该小鼠品系还携带由如W002/43478中所述的染色体14片段 hCF(SC20)组成的人重链转染色体。可以如W0097006中所述通过将 HCo12与KCo5[J/K](Balb)交配而产生HCo12-Balb/C小鼠。可以根据公 知的技术使用来自这些转基因小鼠的脾细胞来产生分泌人单克隆抗体 的杂交瘤。

[0068] 进一步,可以使用本领域公知的技术通过展示型技术(包括但不限于,噬菌体展示、逆转录病毒展示、核糖体展示和其他技术)鉴别本发明 的人抗体或来自其他物种的本发明的抗体,产生的分子可以经受额外的 成熟过程,例如亲和力成熟,因为这些技术是本领域公知的(见例如 Hoogenboom等,J.Mol.Biol.227,381(1991)(噬菌体展示),Vaughan等,Nature Biotech14,309(1996)(噬菌体展示),Hanes和Plucthau,PNAS USA 94,4937-4942(1997)(核糖体展示),Parmley和Smith,Gene73, 305-318(1988)(噬菌体展示),Scott TIBS17,241-245(1992),Cwirla等, PNAS USA87,6378-6382(1990),Russel等,Nucl.Acids Research21, 1081-1085(1993),Hogenboom等,Immunol.Reviews130,43-68(1992),Chiswell和McCafferty TIBTECH10,80-84(1992),和US5,733,743)。如 果使用展示技术产生非人的抗体,则这些抗体可以进行人源化。

[0069] 在一个方面,本发明的HER2抗体结合人HER2的结构域III。本发 明的本发明人已经表明,抗体005,006,059,060,106和111显示出 增强的内化、溶酶体降解和抗- κ -ETA'模型系统中的毒性。因此,不受任 何理论所束缚,抗体与HER2的结构域III的结合可能对于抗体的内化 是重要的,因此,可用于抗体药物缀合物(ADC)。抗体005,006,059, 060,106和111识别位于HER2结构域III中的表位,所述表位在HER2 的异源二聚化中不具有已知的功能。而已经报道HER2结构域IV(被 Herceptin结合)参与HER2的配体非依赖性异源二聚化(Juntilla等, Cancer Cell2009;15:429-440),已经报道HER2结构域II(被帕妥珠单抗 结合)参与HER2的配体诱导的异源二聚化(Landgraf等,Breast Cancer Research2007;9: 202)。我们假设,HER2/ErbB异源二聚体的形成对于 获得HER2抗体/受体复合物的足够的内化和降解是至关重要的。因此,采用HER2异源二聚体驱动的内化和降解的HER2抗体对于未来的 HER2靶向的ADC治疗剂似乎是非常有吸引力的。具体而言,在没有以 极高水平过表达HER2的肿瘤细胞上,HER2/ErbB异源二聚体的形成可 以代表对于递送ADC的HER2抗体的有吸引力的方法。

[0070] 在本发明的HER2抗体的一个方面,当如实施例14中所述测定时, 抗体不阻断第二抗体与可溶性HER2的结合,所述第二抗体任选地以固 定化的形式,包含曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、F1和C5中任一种的VH 和VL序列。

[0071] 在本发明的抗体的一个额外或另外的方面,抗体阻断或交叉阻断本 文所述的新的人抗体中的一种或多种与可溶性HER2的结合。

[0072] 在一个实施方案中,抗体阻断任选地固定化的参照抗体与可溶性 HER2的结合,其

中所述参照抗体含有包含序列SEQ ID NO:1的VH区 和包含序列SEQ ID NO:5的VL区 (005), 优选地, 其中当如实施例14 中所述测定时, 抗体完全阻断。

[0073] 在一个实施方案中, 抗体阻断任选地固定化的参照抗体与可溶性 HER2的结合, 其中所述参照抗体含有包含序列SEQ ID NO:8的VH区 和包含序列SEQ ID NO:12的VL区 (006), 优选地, 其中当如实施例14 中所述测定时, 抗体完全阻断。

[0074] 在一个实施方案中, 抗体阻断任选地固定化的参照抗体与可溶性 HER2的结合, 其中所述参照抗体含有包含序列SEQ ID NO:15的VH区 和包含序列SEQ ID NO:19的VL区 (059), 优选地, 其中当如实施例14 中所述测定时, 抗体完全阻断。

[0075] 在一个实施方案中, 抗体阻断任选地固定化的参照抗体与可溶性 HER2的结合, 其中所述参照抗体含有包含序列SEQ ID NO:22的VH区 和包含序列SEQ ID NO:26的VL区 (060), 优选地, 其中当如实施例14 中所述测定时, 抗体完全阻断。

[0076] 在一个实施方案中, 抗体阻断任选地固定化的参照抗体与可溶性 HER2的结合, 其中所述参照抗体含有包含序列SEQ ID NO:29的VH区 和包含序列SEQ ID NO:33的VL区 (106), 优选地, 其中当如实施例14 中所述测定时, 抗体完全阻断。

[0077] 在一个实施方案中, 抗体阻断任选地固定化的参照抗体与可溶性 HER2的结合, 其中所述参照抗体含有包含序列SEQ ID NO:36的VH区 和包含序列SEQ ID NO:40的VL区 (111), 优选地, 其中当如实施例14 中所述测定时, 抗体完全阻断。

[0078] 在单独和特定的实施方案中, 抗体阻断前述实施方案中两种、三种、四种、五种或六种参照抗体的结合, 如, 例如, 抗体005和111, 抗体 005和006; 抗体059和106; 抗体006和059; 抗体059, 106, 005和 060; 抗体006, 59, 060和111; 或抗体059, 106, 005, 060, 111和006。

[0079] 在一个实施方案中, 当如实施例14中所述测定时, 抗体至少25%, 优选至少50%地竞争下列的所有与可溶性HER2的结合:

[0080] 参照抗体, 任选地固定化的, 包含序列SEQ ID NO:1的VH区和 包含序列SEQ ID NO:5的VL区 (005);

[0081] 参照抗体, 任选地固定化的, 包含序列SEQ ID NO:15的VH区和 包含序列SEQ ID NO:19的VL区 (059);

[0082] 参照抗体, 任选地固定化的, 包含序列SEQ ID NO:22的VH区和 包含序列SEQ ID NO:26的VL区 (060);

[0083] 参照抗体, 任选地固定化的, 包含序列SEQ ID NO:29的VH区和 包含序列SEQ ID NO:33的VL区 (106);

[0084] 参照抗体, 任选地固定化的, 包含序列SEQ ID NO:36的VH区和 包含序列SEQ ID NO:40的VL区 (111),

[0085] 在一个实施方案中, 抗体, 当固定化时, 阻断选自如下的至少一种 抗体与可溶性HER2的结合:

[0086] 含有包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO:5 的VL区 (005) 的抗体;

[0087] 含有包含序列SEQ ID NO:8的VH区和包含序列SEQ ID NO:12 的VL区 (006) 的抗体;

[0088] 含有包含序列SEQ ID NO:15的VH区和包含序列SEQ ID NO:19 的VL区 (059) 的抗

体;

[0089] 含有包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO:26 的VL区(060)的抗体;

[0090] 含有包含序列SEQ ID NO:29的VH区和包含序列SEQ ID NO:33 的VL区(106)的抗体;和

[0091] 含有包含序列SEQ ID NO:36的VH区和包含序列SEQ ID NO:40 的VL区(111)的抗体,

[0092] 优选地,当如实施例14中所述测定时,所述固定化抗体完全阻断。

[0093] 在一个实施方案中,其中当如实施例14中所述测定时,抗体,当 固定化时,25%或更高,优选50%或更高竞争前述实施方案中定义的所有抗体与可溶性HER2的结合。

[0094] 在本发明的抗体一个方面,抗体与本文所述的新的人抗体中的一种 或多种结合HER2上的相同表位。

[0095] 在一个实施方案中,抗体与含有包含序列SEQ ID NO:1的VH区和 包含序列SEQ ID NO:5的VL区的抗体(005)结合相同的表位。

[0096] 在一个实施方案中,抗体与含有包含序列SEQ ID NO:8的VH区和 包含序列SEQ ID NO:12的VL区的抗体(006)结合相同的表位。

[0097] 在一个实施方案中,抗体与含有序列包含SEQ ID NO:15的VH区 和包含序列SEQ ID NO:19的VL区的抗体(059)结合相同的表位。

[0098] 在一个实施方案中,抗体与含有包含序列SEQ ID NO:22的VH区 和包含序列SEQ ID NO:26的VL区的抗体(060)结合相同的表位。

[0099] 在一个实施方案中,抗体与含有包含序列SEQ ID NO:29的VH区 和包含序列SEQ ID NO:33的VL区的抗体(106)结合相同的表位。

[0100] 在一个实施方案中,抗体与含有包含序列SEQ ID NO:36的VH区 和包含序列SEQ ID NO:40的VL区的抗体(111)结合相同的表位。

[0101] 在一个实施方案中,抗体与至少一种选自如下抗体结合相同的表 位:

[0102] a) 含有包含序列SEQ ID NO:43的VH区和包含序列SEQ ID NO: 44的VL区的抗体(041);

[0103] b) 含有包含序列SEQ ID NO:45的VH区和包含序列SEQ ID NO: 46的VL区的抗体(150);和

[0104] c) 含有包含序列SEQ ID NO:47的VH区和包含序列SEQ ID NO: 48的VL区的抗体(067);

[0105] d) 含有包含序列SEQ ID NO:49的VH区和包含序列SEQ ID NO: 50的VL区的抗体(072);

[0106] e) 含有包含序列SEQ ID NO:51的VH区和包含序列SEQ ID NO: 52的VL区的抗体(163);

[0107] f) 含有包含序列SEQ ID NO:53的VH区和包含序列SEQ ID NO: 54的VL区的抗体(093);

[0108] g) 含有包含序列SEQ ID NO:55的VH区和包含序列SEQ ID NO: 56的VL区的抗体(044)。

[0109] 在本发明的抗体的另一个额外的或另外的方面,抗体结合HER2,包含与本文所述的新的抗体的序列相似或相同的VH CDR3,VH区和/或VL区序列。

[0110] 在一个实施方案中,抗体包含具有选自如下的氨基酸序列的 VH CDR3区:

[0111] SEQ ID NO:59,如SEQ ID No:4,25,32的序列(005,060,106),任选地,其中VH区源自IgHV5-51-1种系;

[0112] SEQ ID NO:62,如SEQ ID No:11的序列(006),任选地,其中VH区源自IgHV3-23-1种系序列;

[0113] SEQ ID NO:65,如SEQ ID No:18的序列(059),任选地,其中VH区源自IgHV1-18-1种系序列;或者

[0114] SEQ ID NO:67,如SEQ ID No:39的序列(111),任选地,其中VH区源自IgHV1-69-4种系序列。

[0115] 在一个实施方案中,抗体含有包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的 VH CDR3区,其中X1=Q,H,或L;X2=R,A,T,或K;X3=G;X4=D;X5=R或无;X6=G或无;X7=Y或F;X8=Y或D;X9=Y,F,或H;X10=Y,D,S,F,或N;X11=M或L;和X12=V或I;优选地,其中X1=Q,X2=R或A;X5=X6=无;X7=Y或F;X8=Y;X9=F;X10=Y;和X12=V。在一个特定实施方案中,抗体含有包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VH CDR3区,其中X1=Q,X2=R或A;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=Y或F;X8=Y;X9=F;X10=Y;和X12=V。在一个实施方案中,抗体含有包含SEQ ID NO:59的氨基酸序列的VH CDR3区,其中X1=Q,X2=K;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=F;X8=Y;X9=X10=F;X11=L;和X12=V;或其中X1=Q,X2=A;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=X8=Y;X9=Y;X10=N;X11=M;和X12=V;或其中X1=Q,X2=K;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=X8=Y;X9=H;X10=Y;X11=L;和X12=V;或其中X1=Q,X2=K;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=Y;X8=Y;X9=F;X10=N;X11=L;和X12=V;或其中X1=Q,X2=R;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=Y;X8=Y;X9=F;X10=N;X11=L;和X12=V;或其中X1=Q,X2=R;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=Y;X8=Y;X9=X10=F;X11=L;和X12=I;或其中X1=Q,X2=A;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=X8=Y;X9=Y;X10=N;X11=M;和X12=V。

[0116] 在一个实施方案中,抗体包含如图1中所示的抗体041,150,067,072,163,或093中一种的VH CDR3区,任选地,其中VH区源自IgHV5-51-1种系。

[0117] 在一个实施方案中,抗体包含选自如下的VH区

[0118] a) 包含SEQ ID NOs:57,58和59的CDR1,CDR2和CDR3序列的 VH区,如

[0119] a. 选自SEQ ID NOs:2,23,和30的CDR1序列;选自3,24,和31的CDR2序列;选自4,25,和32的CDR3序列(005,060,106),

[0120] b. 分别地,SEQ ID NOs:2,3和4的CDR1,CDR2,和CDR3序列(005),

[0121] c. 分别地,SEQ ID NOs:23,24和25的CDR1,CDR2,和CDR3序列(060),

[0122] d. 分别地,SEQ ID NOs:32,33和34的CDR1,CDR2,和CDR3序列(106),

[0123] 任选地,其中VH区源自IgHV5-51-1种系;

[0124] b) 包含分别地SEQ ID NOs:60,61和62的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOS:9,10和11的CDR1,CDR2和CDR3序列(006)的 VH区;任选地,其中VH区源自IGHV3-23-1种系;和

[0125] c) 包含SEQ ID NOs:63,64和65的CDR1,CDR2和CDR3序列如SEQ ID NOS:16,17和18的CDR1,CDR2和CDR3序列(059)的VH区;分别地,任选地,其中VH区源自IgHV1-18-1种系;

和

[0126] d) 包含SEQ ID NOs:66,38和67的CDR1,CDR2和CDR3序列如 SEQ ID NOS:37,38和39的CDR1,CDR2和CDR3序列(111)的VH区; 分别地,任选地,其中VH区源自IgHV1-69-4种系。

[0127] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区选自前述实施方案(a)、(c)或(d),所述VL区包含分别地SEQ ID NO:68,GAS 和SEQ ID No:69的CDR1,CDR2和CDR3序列,如选自SEQ ID Nos:6, 20,27,34和41的CDR1,是GAS的CDR2和选自7,21,28,35和42 的CDR3序列(005,059,060,106,111);分别地,任选地,其中VL区源自 IgKV3-20-01种系。

[0128] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区是前述 实施方案(b),所述VL区包含SEQ ID NO:13,DAS和SEQ ID NO:14 的CDR1,CDR2和CDR3序列(006),分别地,任选地,其中所述VL 区源自IgKV3-11-01。

[0129] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分 别地SEQ ID NOs:2,3和4的CDR1,CDR2和CDR3序列;所述VL区包 含分别地SEQ ID NOs:6,GAS,和SEQ ID NO:7的CDR1,CDR2和CDR3 序列(005)。

[0130] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分 别地SEQ ID NOs:9,10和11的CDR1,CDR2和CDR3序列;所述VL 区包含分别地SEQ ID NOs:13,DAS,和SEQ ID NO:14的CDR1,CDR2 和CDR3序列(006)。

[0131] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分 别地SEQ ID NOs:16,17和18的CDR1,CDR2和CDR3序列;所述VL 区包含分别地SEQ ID NOs:20,GAS,和SEQ ID NO:21的CDR1,CDR2 和CDR3序列(059)。

[0132] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分 别地SEQ ID NOs:23,24和25的CDR1,CDR2和CDR3序列;所述VL 区包含分别地SEQ ID NOs:27,GAS,和SEQ ID NO:28的CDR1,CDR2 和CDR3序列(060)。

[0133] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分 别地SEQ ID NOs:30,31和32的CDR1,CDR2和CDR3序列;所述VL 区包含分别地SEQ ID NOs:34,GAS,和SEQ ID NO:35的CDR1,CDR2 和CDR3序列(106)。

[0134] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含分 别地SEQ ID NOs:37,38和39的CDR1,CDR2和CDR3序列;所述VL 区包含分别地SEQ ID NOs:41,GAS,和SEQ ID NO:42的CDR1,CDR2 和CDR3序列(111)。

[0135] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含: SEQ ID NO:57的CDR1序列,其中X1=S;X2=T和X3=S;SEQ ID NO:58 的CDR2序列,其中X1=Y和X2=H以及SEQ ID NO:59的CDR3序列, 其中X1=Q,X2=K;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=F;X8=Y;X9=X10=F; X11=L;和X12=V;所述VL区包含;SEQ ID NO:68的CDR1序列,其 中X1=X2=S; CDR2序列GAS;以及SEQ ID NO:69的CDR3序列,其 中X1=Q,X2=S,X3=X4=无和X5=L (041)。

[0136] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含: SEQ ID NO:57的CDR1序列,其中X1=S;X2=T和X3=S;SEQ ID NO:58 的CDR2序列,其中X1=Y和X2=H以及SEQ ID NO:59的CDR3序列, 其中X1=Q,X2=A;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=X8=Y;X9=Y; X10=N; X11=M;和X12=V;所述VL区包含;SEQ ID NO:68的CDR1序列, 其中X1=X2=S; CDR2序列GAS;以及SEQ ID NO:69的CDR3序列, 其中X1=Q,X2=S,X3=X4=无和X5=L

(150)。

[0137] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含: SEQ ID NO:57的CDR1序列,其中X1=S;X2=T和X3=S;SEQ ID NO:58 的CDR2序列,其中X1=Y和X2=D以及SEQ ID NO:59的CDR3序列, 其中X1=Q,X2=K;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=X8=Y;X9=H;X10=Y; X11=L;和X12=V;所述VL区包含;SEQ ID NO:68的CDR1序列,其 中X1=X2=S; CDR2序列GAS;以及SEQ ID NO:69的CDR3序列,其 中X1=Q,X2=S,X3=P,X4=R和X5=L (067)。

[0138] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含: SEQ ID NO:57的CDR1序列,其中X1=S;X2=T和X3=S;SEQ ID NO:58 的CDR2序列,其中X1=Y和X2=D以及SEQ ID NO:59的CDR3序列, 其中X1=Q,X2=K;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=Y;X8=Y;X9=F;X10=N;X11=L;和X12=V;所述VL区包含;SEQ ID NO:68的CDR1 序列,其中X1=X2=S; CDR2序列GAS;以及SEQ ID NO:69的CDR3 序列,其中X1=Q,X2=S,X3=P,X4=R和X5=L (072)。

[0139] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含: SEQ ID NO:57的CDR1序列,其中X1=R;X2=I和X3=S;SEQ ID NO:58 的CDR2序列,其中X1=Y和X2=D以及SEQ ID NO:59的CDR3序列, 其中X1=Q,X2=R;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=Y;X8=Y;X9=F;X10=N;X11=L;和X12=V;所述VL区包含;SEQ ID NO:68的CDR1 序列,其中X1=X2=S; CDR2序列GAS;以及SEQ ID NO:69的CDR3 序列,其中X1=Q,X2=S,X3=X4=无和X5=L (163)。

[0140] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含: SEQ ID NO:57的CDR1序列,其中X1=S;X2=T和X3=S;SEQ ID NO:58 的CDR2序列,其中X1=Y和X2=D以及SEQ ID NO:59的CDR3序列, 其中X1=Q,X2=R;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=Y;X8=Y;X9= X10=F; X11=L;和X12=I;所述VL区包含;SEQ ID NO:68的CDR1序列,其 中X1=X2=S; CDR2序列GAS;以及SEQ ID NO:69的CDR3序列,其 中X1=Q,X2=S,X3=X4=无和X5=L (093)。

[0141] 在一个实施方案中,抗体包含VH区和VL区,所述VH区包含: SEQ ID NO:57的CDR1序列,其中X1=R;X2=S和X3=S;SEQ ID NO:58 的CDR2序列,其中X1=F和X2=D以及SEQ ID NO:59的CDR3序列, 其中X1=Q,X2=A;X3=G;X4=D,X5=X6=无;X7=X8=Y;X9=Y;X10=N; X11=M;和X12=V;所述VL区包含;SEQ ID NO:68的CDR1序列, 其中X1=X2=S; CDR2序列GAS;以及SEQ ID NO:69的CDR3序列, 其中X1=Q,X2=S,X3=X4=无和X5=L (044)。

[0142] 在单独的实施方案中,抗体包括:

[0143] a) 包含序列SEQ ID NO:1的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:5的VL区 (005)

[0144] b) 包含序列SEQ ID NO:8的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:11的VL区 (006)

[0145] c) 包含序列SEQ ID NO:15的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:19的VL区 (059)

[0146] d) 包含序列SEQ ID NO:22的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:26的VL区 (060)

[0147] e) 包含序列SEQ ID NO:29的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:33的VL区

(106)

[0148] f) 包含序列SEQ ID NO:36的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:40的VL区
(111)

[0149] g) 包含序列SEQ ID NO:43的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:44的VL区
(041)

[0150] h) 包含序列SEQ ID NO:45的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:46的VL区
(150)

[0151] i) 包含序列SEQ ID NO:47的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:48的VL区
(067)

[0152] j) 包含序列SEQ ID NO:49的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:50的VL区
(072)

[0153] k) 包含序列SEQ ID NO:51的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:52的VL区
(163)

[0154] l) 包含序列SEQ ID NO:53的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:54的VL区
(093),

[0155] m) 包含序列SEQ ID NO:55的VH区和,优选地,包含序列 SEQ ID NO:56的VL区
(044),

[0156] n) 所述抗体中任一种的变体,其中所述变体优选地具有最多1,2 或3个氨基酸修饰,更优选氨基酸取代,如保守的氨基酸取代,以及其中新的氨基酸是在图1或2中比对的序列的相同位置处,尤其是在对应的共有序列中通过“X”表示的位置处的氨基酸的取代。

[0157] 在本发明的抗体的另一个方面,抗体部分或完全阻断本文所述的一种或多种新的抗体与可溶性HER2的结合,优选地,当如实施例14中所述测定时;以及其进一步特征在于,如实施例12,13,15,16,17和18 中所述测定的一种或多种特性。

[0158] 在一个实施方案中,当如实施例12中所述测定时,HER2抗体在与 A431细胞结合中具有比曲妥珠单抗更低的EC₅₀值(半数最大有效浓度), 优选低于0.80μg/ml,0.50μg/ml,或0.30μg/ml的EC₅₀值,并且交叉阻断 至少一种选自如下的抗体:

[0159] a) 含有包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO: 5的VL区的抗体
(005);

[0160] b) 含有包含序列SEQ ID NO:8的VH区和包含序列SEQ ID NO: 11的VL区的抗体
(006);和

[0161] c) 含有包含序列SEQ ID NO:15的VH区和包含序列SEQ ID NO: 19的VL区的抗体
(059)。

[0162] 在单独的和特定的实施方案中,前述实施方案的抗体完全交叉阻断 抗体005, 006,059,或其组合,优选与之结合相同的表位。

[0163] 在一个额外或另外的实施方案中,当如实施例13中所述测定时, HER抗体特异性结合HER2阳性猕猴上皮细胞,并且交叉阻断至少一种 选自如下的抗体:

[0164] a) 含有包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO: 5的VL区的抗体
(005);

[0165] b) 含有包含序列SEQ ID NO:8的VH区和包含序列SEQ ID NO: 11的VL区的抗体

(006) ;

[0166] c) 含有包含序列SEQ ID NO:15的VH区和包含序列SEQ ID NO: 19的VL区的抗体(059) ;

[0167] d) 含有包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO: 26的VL区的抗体(060) ;

[0168] e) 含有包含序列SEQ ID NO:29的VH区和包含序列SEQ ID NO: 33的VL区的抗体(106) ;

[0169] f) 含有包含序列SEQ ID NO:36的VH区和包含序列SEQ ID NO: 40的VL区的抗体(111)。

[0170] 在单独的和特定的实施方案中,前述实施方案的抗体完全交叉阻断 抗体005, 006,059,060,106,111或其组合,优选与之结合相同的表位。

[0171] 在一个额外或另外的实施方案中,当如实施例16中所述测定时, HER2抗体特异性地结合表达HER2的AU565细胞但弱于F5地促进细 胞的配体非依赖性增殖,优选地少于30%促进增殖,更优选少于20%促 进增殖,并且交叉阻断至少一种选自如下的抗体:

[0172] a) 含有包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO: 5的VL区的抗体(005);和

[0173] b) 含有包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO: 26的VL区的抗体(060)。

[0174] 在单独的和特定的实施方案中,前述实施方案的抗体完全交叉阻断 抗体005,060或其组合,优选与之结合相同的表位。

[0175] 在一个额外或另外的实施方案中,当如实施例17中所述测定时, 当直接或间接缀合于治疗部分如假单胞菌外毒素A的截短形式时,抗体 在杀死AU565细胞,A431细胞,或AU565和A431细胞中比曲妥珠单 抗更有效。

[0176] 在一个实施方案中,当如实施例17中所述测定时,缀合的抗体杀 死至少60%,优选至少70%的AU565细胞或A431细胞,并且交叉阻 断至少一种选自如下的抗体:

[0177] a) 含有包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO: 5的VL区的抗体(005) ;

[0178] b) 含有包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO: 26的VL区的抗体(060) ;

[0179] c) 含有包含序列SEQ ID NO:15的VH区和包含序列SEQ ID NO: 19的VL区的抗体(059) ;和

[0180] d) 含有包含序列SEQ ID NO:36的VH区和包含序列SEQ ID NO: 40的VL区的抗体(111)。

[0181] 在单独和特定的实施方案中,前述实施方案的抗体完全交叉阻断抗 体005、060、059、111或其组合,优选与之结合相同的表位。

[0182] 在一个额外或另外的实施方案中,优选地当如实施例17中所述测 定时,抗体,当直接或间接缀合于治疗部分时,能够杀死比AU565细 胞更低平均量的HER2拷贝/细胞,如平均约500,000或更少,100,000 或更少,或30,000或更少拷贝的HER2/细胞(当,例如,如实施 例12中 所述测定时)的肿瘤细胞,其浓度使得非缀合的抗体不诱导细胞的杀死。

[0183] 在一个实施方案中,当如实施例17中所述测定时,前述实施方案的抗体杀死至少80%的A431细胞,并且交叉阻断至少一种选自如下的抗体

[0184] a) 含有包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO: 5的VL区的抗体(005);和

[0185] b) 含有包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO: 26的VL区的抗体(060)。

[0186] 在单独和特定的实施方案中,前述实施方案的抗体完全交叉阻断抗体005、060或其组合,优选与之结合相同的表位。

[0187] 在一个额外或另外的实施方案中,优选当根据实施例18测定时,抗体被表达HER2的肿瘤细胞如AU565细胞内化,其程度高于曲妥珠单抗,优选是内化的曲妥珠单抗的量的超过两倍或三倍,所述抗体交叉阻断至少一种选自如下的抗体:

[0188] a) 含有包含序列SEQ ID NO:1的VH区和包含序列SEQ ID NO: 5的VL区的抗体(005);

[0189] b) 含有包含序列SEQ ID NO:8的VH区和包含序列SEQ ID NO: 11的VL区的抗体(006);

[0190] c) 含有包含序列SEQ ID NO:15的VH区和包含序列SEQ ID NO: 19的VL区的抗体(059);

[0191] d) 含有包含序列SEQ ID NO:22的VH区和包含序列SEQ ID NO: 26的VL区的抗体(060);

[0192] e) 含有包含序列SEQ ID NO:29的VH区和包含序列SEQ ID NO: 33的VL区的抗体(106);

[0193] f) 含有包含序列SEQ ID NO:36的VH区和包含序列SEQ ID NO: 40的VL区的抗体(111)。

[0194] 在单独和特定的实施方案中,前述实施方案的抗体完全交叉阻断抗体005,006,059,060,106,111或其组合,优选与之结合相同的表位。

[0195] 在进一步的实施方案中,优选地当如实施例中所所述测定时,抗体弱于F5地促进表达HER2的肿瘤细胞的增殖,并且超过曲妥珠单抗地被内化进表达HER2的肿瘤细胞。

[0196] 抗体形式

[0197] 本发明提供了HER2抗体,所述HER2抗体有效结合并内化进表达HER2的肿瘤细胞,通常没有显著促进细胞的配体非依赖性增殖。根据用于特定用途的期望的功能特性,特定抗体可以选自本发明中提供的抗体组和/或可以如下面所述调整它们的形式以改变这些特性。

[0198] 本发明抗体可以是任何同种型。同种型的选择典型地遵从期望的效应物功能,例如ADCC诱导。示例性的同种型是IgG1,IgG2,IgG3,和IgG4。可以使用人轻链恒定区, κ 或 λ ,的任一个。如果期望,可以通过已知方法转换本发明的HER2抗体的类型。例如,可以将初始为IgM的本发明的抗体类型转换为本发明的IgG抗体。进一步地,可以使用类型转换技术将一种IgG亚类转化为另一种,例如从IgG1至IgG2。因此,可以通过同种型转换为例如IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgD,IgA,IgE,或IgM抗体而改变本发明的抗体的效应物功能而用于各种治疗用途。在一个实施方案中,本发明的抗体是IgG1抗体,例如IgG1, κ 。

[0199] 在进一步的实施方案中,将本发明的抗体糖工程化以减少岩藻糖并因此增强ADCC,例如,通过如US 2009317869中所述或如van Berkel等,(2010) Biotechnol.Bioeng.105:350中所述在抗体生产期间将化合物加入培养基,或者通过,例如,如Yamane-Ohnuki等(2004) Biotechnol.Bioeng87:614中所述使用FUT8敲除细胞。或者可以使用Umaña等.(1999) Nature Biotech17:176中所述的方法优化ADCC。

[0200] 在进一步的实施方案中,已经将本发明的抗体工程化以增强补体活化,例如,如Natsume等.(2009) Cancer Sci.100:2411中所述。

[0201] 在一个实施方案中,本发明的抗体是全长抗体,优选IgG1抗体,尤其是IgG1, κ 抗体。在另一个实施方案中,本发明的抗体是抗体片段或者单链抗体。

[0202] 可以例如用常规技术通过片段化获得抗体片段,以本文所述的完整抗体的相同的方式基于用途筛选片段。例如,可以通过用胃蛋白酶(pepsin)处理抗体产生F(ab')₂片段。可以用还原剂如二硫苏糖醇处理产生的F(ab')₂片段以还原二硫键而产生Fab'片段。可以通过用木瓜蛋白酶处理抗体而获得Fab片段。还可以通过硫醚键或二硫键结合Fab'片段来产生F(ab')₂片段。还可以通过在重组细胞中表达编码这种片段的核酸来产生抗体片段(见例如Evans等,J.Immunol.Meth.184,123-38(1995))。例如,编码F(ab')₂片段的一部分的嵌合基因可以包括:编码H链的C_H1结构域和铰链区的DNA序列,随后是用于产生这种截短的抗体片段分子的翻译终止密码子。

[0203] 如上所解释的,在一个实施方案中,本发明的HER2抗体是二价抗体。

[0204] 在另一个实施方案中,本发明的HER2抗体是单价抗体。

[0205] 在一个实施方案中,本发明的抗体是Fab片段或单臂的抗体,如US20080063641(Genentech)中所述的,或其他单价抗体,例如如W02007048037(Amgen)中所述的。

[0206] 在一个优选的实施方案中,单价抗体具有如W02007059782(Genmab)(通过引用并入本文)所述的具有铰链区缺失的结构。因此,在一个实施方案中,抗体是单价抗体,其中通过如下方法构建所述HER2抗体,该方法包括:

[0207] i) 提供编码所述单价抗体的轻链的核酸构建体,所述构建体包含编码选择的抗原特异性HER2抗体的VL区的核苷酸序列和编码Ig的恒定CL区的核苷酸序列,其中所述编码选择的抗原特异性抗体的VL区的核苷酸序列和所述编码Ig的CL区的核苷酸序列可操作地连接在一起,并且其中,在IgG1亚型的情况下,编码CL区的核苷酸序列已经修饰,使得CL区不包含任何如下氨基酸:在多克隆人IgG存在的情况下或者当施用于动物或人类时,所述氨基酸能够与包含相同的CL区的氨基酸序列的其他肽形成二硫键或共价键;

[0208] ii) 提供编码所述单价抗体的重链的核酸构建体,所述构建体包含编码选择的抗原特异性抗体的VH区的核苷酸序列和编码人Ig的恒定CH区的核苷酸序列,其中编码CH区的核苷酸序列已经修饰,使得对应于铰链区的区域,以及如Ig亚型所要求的,CH区的其他区域,如CH3区,不包含任何如下氨基酸残基:在多克隆人IgG存在的情况下或者当施用于动物或人类时,所述氨基酸残基参与和包含相同的人Ig的CH区的氨基酸序列的其他肽形成二硫键或者共价的或稳定的非共价的重链间键,其中所述编码选择的抗原特异性抗体的VH区的核苷酸序列和所述编码所述Ig的CH区的核苷酸序列可操作地连接在一起;

[0209] iii) 提供用于产生所述单价抗体的细胞表达系统;

[0210] iv) 通过在(iii)的细胞表达系统的细胞中共表达(i)和(ii)的核酸构建体而产

生所述单价抗体。

[0211] 类似地,在一个实施方案中,HER2抗体是单价抗体,其包含

[0212] (i) 如本文所述的本发明的抗体的可变区或所述区的抗原结合部分, 和

[0213] (ii) 免疫球蛋白的C_H区或其包含C_{H2}和C_{H3}区的片段,其中所述 C_H区或其片段已经修饰,使得对应于铰链区的区域,以及,如果免疫球蛋白不是IgG4亚型,C_H区的其他区域,如C_{H3}区,不包含任何如下氨基酸残基:在多克隆人IgG存在的情况下,所述氨基酸残基能够与相同的C_H区形成二硫键或者与相同的C_H区形成其他共价的或稳定的非共价重链间键。

[0214] 在其进一步的实施方案中,单价HER2抗体的重链已经修饰,使得整个铰链缺失。

[0215] 在另一个进一步的实施方案中,所述单价抗体是IgG4亚型的,但 C_{H3}区已经修饰,使得产生下列氨基酸取代中的一种或多种:

[0216] CH3突变的编号

	KABAT*	EU 索引 G4*	突变
	E378	E357	E357A 或 E357T 或 E357V 或 E357I
	S387	S364	S364R 或 S364K
	T389	T366	T366A 或 T366R 或 T366K 或 T366N L368A 或 L368V 或 L368E 或 L368G 或 L368S 或 L368T
[0217]	L391	L368	
	D427	D399	D399A 或 D399T 或 D399S F405A 或 F405L 或 F405T 或 F405D 或 F405R 或 F405Q 或 F405K 或 F405Y
	F436	F405	
	Y438	Y407	Y407A 或 Y407E 或 Y407Q 或 Y407K 或 Y407F
	F436 和 Y438	F405 和 Y407	(F405T 和 Y407E)或(F405D 和 Y407E) (D399S 和 Y407Q)或(D399S 和 Y407K)或 D427 和 Y438 D399 和 Y407 (D399S 和 Y407E)

[0218] *KABAT表示根据Kabat的氨基酸编号 (Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes ofHealth, Bethesda,MD. (1991) 。EU索引表示根据如Kabat (同上) 所述的EU索引的氨基酸编号。

[0219] 在另一个进一步的实施方案中,所述单价抗体的序列已经修饰,使得它不包含任何用于N-连接的糖基化的受体位点。

[0220] 本发明的HER2抗体还包括单链抗体。单链抗体是其中重链和轻链 Fv区被连接的肽。在一个实施方案中,本发明提供了单链Fv(scFv),其中在单肽链中用柔性肽接头(典型地约10、12、15或更多个氨基酸残基) 将本发明的HER2抗体的Fv中的重链和轻链连接起来。下列文献中描述了生产这种抗体的方法:例如,US4,946,778,Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,vol.113,Rosenburg和Moore eds.Springer-Verlag,New York,pp.269-315 (1994),Bird等,Science242, 423-426 (1988),Huston等,

PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) 和 McCafferty 等, Nature 348, 552-554 (1990)。单链抗体可以是单价的, 如果仅使用单一的 V_H 和 V_L , 可以是二价的, 如果使用两个 V_H 和 V_L , 或者是多价的, 如果使用多于两个 V_H 和 V_L 。

[0221] 在一个实施方案中, 本发明HER2抗体是效应物功能缺陷抗体。在一个实施方案中, 效应物功能缺陷的HER2抗体是稳定化的IgG4抗体, 其已经修饰以防止Fab-臂交换 (van der Neut Kolfshoten等. (2007) Science 317 (5844): 1554-7)。合适的稳定化的IgG4抗体的例子是如下抗体, 其中用赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸或亮氨酸, 优选赖氨酸 (如W02006033386 (Kirin) 中所述) 取代人IgG4重链恒定区409位的精氨酸 (如Kabat等在EU索引中表示), 和/或其中铰链区已经修饰以包含 Cys-Pro-Pro-Cys序列。

[0222] 在一个实施方案中, 稳定化的IgG4HER2抗体是包含重链和轻链的 IgG4抗体, 其中所述重链包含人IgG4恒定区, 所述恒定区在对应于409 的位置处具有选自Lys, Ala, Thr, Met和Leu的残基, 和/或在对应于 405的位置处具有选自Ala, Val, Gly, Ile和Leu的残基, 并且其中所述抗体任选地包含一个或多个进一步的取代、缺失和/或插入, 但在铰链区不包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。优选地, 所述抗体在对应于409的位置 处包含Lys或Ala残基, 或者抗体的CH3区已经被人IgG1、人IgG2或 人IgG3的CH3区所替代。还可参见W02008145142 (Genmab)。

[0223] 在甚至进一步的实施方案中, 稳定化的IgG4HER2抗体是包含重链 和轻链的IgG4抗体, 其中所述重链包含人IgG4恒定区, 所述人IgG4 恒定区在对应于409的位置处具有选自Lys, Ala, Thr, Met和Leu的 残基, 和/或在对应于405的位置处具有选自Ala, Val, Gly, Ile和Leu 的残基, 并且其中所述抗体任选地包含一个或多个进一步的取代、缺失 和/或插入, 并且其中所述抗体在铰链区包含Cys-Pro-Pro-Cys序列。优 选地, 所述抗体在对应于409的位置处包含Lys或Ala残基, 或者抗体 的CH3区已经被人IgG1、人IgG2或人IgG3的CH3区所替代。

[0224] 在进一步的实施方案中, 效应物功能缺陷的HER2抗体是非IgG4 型例如IgG1, IgG2或IgG3的抗体, 其已经突变, 使得介导效应物功能 如ADCC的能力已经降低或者甚至去除。例如Dall'Acqua WF等, J Immunol. 177 (2): 1129-1138 (2006) 和Hezareh M, J Virol.; 75 (24): 12161-12168 (2001) 中已经描述了这种突变。

[0225] 缀合物

[0226] 在进一步的实施方案中, 本发明提供了与治疗部分如细胞毒素、化 疗药物、细胞因子、免疫抑制剂或放射性同位素缀合的HER2抗体。这 种缀合物在本文被称作“免疫缀合物”。包括一种或多种细胞毒素的免疫 缀合物称作免疫毒素 (immunotoxins)。

[0227] 细胞毒素或细胞毒剂包括任何对细胞有害 (例如杀死细胞) 的试剂。用于形成本发明免疫缀合物的合适治疗剂包括紫杉醇 (taxol)、细胞松弛素B (cytochalasin B)、短杆菌肽D (gramicidin D)、溴化乙锭 (ethidium bromide)、依米丁 (emetine)、丝裂霉素 (mitomycin)、依托泊苷 (etoposide)、鬼臼噻吩苷 (tenoposide)、长春新碱 (vincristine)、长春花碱 (vinblastine)、秋水仙碱 (colchicin)、多柔比星 (doxorubicin)、柔红霉素 (daunorubicin)、二羟蒽醌二酮 (dihydroxy anthracin dione)、美登素 I (maytansine) 或其类似物或衍生物、米托蒽醌 (mitoxantrone)、光神霉素 (mithramycin)、放线菌素D (actinomycin D)、1-去氢睾酮 (1-dehydrotestosterone)、糖

皮质激素 (glucocorticoids)、普鲁卡因 (procaine)、丁卡因 (tetracaine)、利多卡因 (lidocaine)、普萘洛尔 (propranolol) 和嘌呤霉素 (puromycin); 卡里奇霉素 (calicheamicin) 或其类似物或衍生物; 抗代谢物 (如氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪 (decarbazine)、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨、克拉屈滨), 烷化剂 (如氮芥、thioepa、苯丁酸氮芥、美法仑、卡氮芥 (BSNU)、洛莫司汀 (CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪 (DTIC)、丙卡巴肼、丝裂霉素 C、顺铂和其他铂衍生物, 如卡铂; 以及 duocarmycin A、duocarmycin SA、CC-1065 (又名雷查霉素 (rachelymycin)), 或 CC-1065 的类似物或衍生物)、抗生素 (如放线菌素 D (以前称作放线菌素)、博来霉素、柔红霉素 (以前称作道诺霉素)、阿霉素、伊达比星、光神霉素 (mithramycin)、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素、安曲霉素 (AMC))、抗有丝分裂剂 (例如, 微管蛋白抑制剂) 如 monomethyl auristatin E、monomethyl auristatin F 或多拉司他汀 10 的其他类似物或衍生物; 白喉毒素和相关分子 (如白喉 A 链及其活性片段和杂合分子); 蓖麻毒蛋白毒素 (例如蓖麻毒蛋白 A 或脱糖基化蓖麻毒蛋白 A 链毒素)、霍乱毒素、志贺样毒素 (SLT-I, SLT-II, SLT-IIIV)、LT 毒素、C3 毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆 Bowman-Birk 蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、alorin、皂苷、蒴莲素、gelanin、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲素 A 链、 α -帚曲霉素、油桐 (*Aleurites fordii*) 蛋白、石竹素 (dianthin) 蛋白、美洲商陆 (*Phytolacca Americana*) 蛋白 (PAPI, PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制剂、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草 (*sapaonaria officinalis*) 抑制剂、白树毒素 (gelonin)、mitogellin、局限曲霉素 (restrictocin)、酚霉素和依诺霉素毒素。其他合适的缀合分子包括抗菌 / 裂解肽, 如 CLIP、蛙皮素 2、蜂毒肽、天蚕抗菌肽和 P18; 核糖核酸酶 (RNase)、DNase I、葡萄球菌内毒素-A、美洲商陆抗病毒蛋白、白喉毒素和假单胞菌内毒素。见例如 Pastan 等, *Cell* 47, 641 (1986) 和 Goldenberg, *Calif. A Cancer Journal for Clinicians* 44, 43 (1994)。可以与如本文其他部分所述的本发明的 HER2 抗体组合施用的治疗剂, 如抗癌细胞因子或趋化因子, 也是可用于与本发明的抗体缀合的治疗部分的候选。

[0228] 在一个实施方案中, 本发明的 HER2 抗体包括缀合的核酸或核酸相关分子。在一个这种实施方案中, 缀合的核酸是细胞毒性核糖核酸酶、反义核酸、抑制性 RNA 分子 (例如, siRNA 分子) 或免疫刺激性核酸 (例如, 免疫刺激性的包含 CpG 基序的 DNA 分子)。在另一个实施方案中, 本发明的 HER2 抗体缀合于适配子或核酶。

[0229] 在一个实施方案中, 提供了包含一个或多个放射性标记的氨基酸的 HER2 抗体。放射性标记的 HER2 抗体可以用于诊断和治疗目的 (与放射性标记的分子缀合是另一种可能的特征)。用于多肽的标记的非限制性例子包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{213}Bs 、 ^{225}Ac 和 ^{227}Th 。

[0230] 在一个实施方案中, 抗体与放射性同位素或包含放射性同位素螯合物缀合。例如, 抗体可以与螯合剂接头, 例如 DOTA, DTPA 或 tiuxetan 缀合, 这允许抗体与放射性同位素形成复合物。抗体也可以或另外包含或缀合于一个或多个放射性标记的氨基酸, 或其他放射性标记的分子。放射性标记的 CD74 抗体可以用于诊断和治疗目的。放射性同位素的非限制性例子包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{111}In 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{213}Bs 、 ^{225}Ac 和 ^{227}Th 。

[0231] 还可以通过与聚合物共价缀合而化学修饰 HER2 抗体, 以便例如增加它们的循环半衰期。在例如 US4,766,106、US4,179,337、US4,495,285 和 US4,609,546 中例举了示例性

聚合物和将它们与肽连接的方法。其他 聚合物包括聚氧乙烯化多元醇和聚乙二醇 (PEG) (例如分子量为约1,000- 约40,000如约2,000-约20,000的PEG)。

[0232] 可以使用任何本领域已知的用于将HER2抗体与缀合的分子如上文 所述的那些相缀合的方法,包括在下列文献中描述的方法:Hunter等, Nature144,945 (1962),David等, Biochemistry 13,1014 (1974),Pain等,J. Immunol.Meth. 40,219 (1981) 和Nygren, J.Histochem.and Cytochem.30, 407 (1982)。可以通过将其他部分与HER2抗体或其片段 (例如HER2抗 体H或L链)的N-末端侧或C-末端侧化学地缀合而产生这种抗体 (见例 如如 Osamu Kanemitsu编辑的Antibody Engineering Handbook,由 Chijin Shokan出版 (1994))。还可以通过在合适的内部残基或糖处缀合而 产生这种缀合的抗体衍生物。

[0233] 可以直接或间接地将该试剂与本发明的HER2抗体偶联。第二种试 剂的间接偶联的一个例子是通过间隔部分与抗体中的半胱氨酸或赖氨 酸残基偶联。在一个实施方案中, 将HER2抗体与前药分子缀合,所述 前药分子在体内可以通过间隔子或接头被活化为治疗 性药物。施用后, 通过肿瘤细胞相关的酶或其他肿瘤特异性的条件裂解间隔子或接头,由 此形成活性药物。Syntarga BV等在W002083180,W02004043493, W02007018431, W02007089149,和W02009017394中描述了这种前药 技术和接头的例子。美国专利号6,989, 452 (Medarex) 中也可以发现合适 的抗体-前药技术和duocarmycin类似物。

[0234] 在一个实施方案中,将本发明的HER2抗体与螯合剂接头 (例如 tiuxetan) 连接,这 允许将抗体缀合于放射性同位素。

[0235] 双特异性抗体

[0236] 在进一步的方面,本发明涉及双特异性分子,所述双特异性分子包 含来自本文上 面所述的本发明的HER2抗体的第一抗原结合位点和具有 不同的结合特异性 (如对于人效 应物细胞、人Fc受体、T细胞受体、B 细胞受体的结合特异性,或者对于HER2的非重叠表位的 结合特异性) 的第二抗原结合位点,即其中例如当如实施例14中所述测试时,所述 第一和 第二抗原结合位点对于和HER2的结合不彼此交叉阻断的双特异 性抗体。

[0237] 本发明的示例性的双特异性抗体分子包括 (i) 缀合在一起的两种抗 体,一种具有 对HER2的特异性,另一种具有对第二种目标的特异性, (ii) 单一抗体,其具有对HER2特异 性的一条链或臂以及对第二种分子特 异性的第二条链或臂, (iii) 单链抗体,其具有对 HER2和第二种分子的 特异性,例如,经由通过一个额外的肽接头串联连接的两个scFv; (iv) 双可变结构域抗体 (DVD-Ig),其中每条轻链和重链包含通过短肽连接串 联的两个可 变结构域 (Wu等,Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule,In:Antibody Engineering,Springer Berlin Heidelberg (2010)); (v) 化学连接的双特异性 (Fab')₂片段; (vi) Tandab,这是两种单链双 抗体的融合体,其产生四价 的双特异性抗体,其具有两个针对每一种目标抗原的结合位 点; (vii) flexibody,这是scFv与双抗体的组合,产生多价分子; (viii) 基于蛋 白激酶A中 “二聚化和锚结构域”的所谓的“锚和锁 (dock and lock)”分子,当应用于Fabs时,其可以 产生由两个相同的Fab片段和与之连接的不同 的Fab片段组成的三价双特异性结合蛋白; (ix) 所谓的蝎子分子 (Scorpion molecule),其包含,例如,融合于人Fc区的两个末端的两个 scFv;和 (x) 双抗体。在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是双抗 体。

[0238] 在一个实施方案中,第二种分子是癌抗原/肿瘤相关抗原,如癌胚抗 原 (CEA)、前

列腺特异性抗原 (PSA)、RAGE (肾抗原)、 α -甲胎蛋白、CAMEL (黑色素瘤上的CTL-识别的抗原)、CT抗原 (如MAGE-B5, -B6, -C2, -C3, 和D; Mage12; CT10; NY-ES01, SSX2, GAGE, BAGE, MAGE, 和SAGE)、粘蛋白抗原 (例如MUC1, 粘蛋白-CA125等)、神经节苷脂抗原、酪氨酸酶、gp75、c-Met、C-myc、Mart1、MelanA、MUM-1、MUM-2、MUM-3、HLA-B7、Ep-CAM或癌症相关的整合素如 $\alpha 5 \beta 3$ 整合素。在另一个实施方案中,第二种分子是T细胞和/或NK细胞抗原,如CD3或CD16。在另一个实施方案中,第二种分子是血管生成因子或其他癌症相关生长因子,如血管内皮生长因子、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子受体、血管生成素或这些中任一种的受体,尤其地,与癌症进展相关的受体 (例如HER受体中的另一种;HER1、HER3或HER4)。在一个实施方案中,第二抗原结合位点结合HER2上与本发明的抗体结合的位点不同的,优选非阻断的位点。例如,第二种分子可以源自,或交叉阻断曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、F5或C1的HER2结合。

[0239] 核酸序列、载体和宿主细胞

[0240] 在进一步的方面,本发明涉及编码本发明的抗体的重链和轻链的核酸序列如DNA序列。

[0241] 在一个实施方案中,核酸序列编码选自如下的氨基酸序列:SEQ ID NO:1,5,8,12,15,19,22,26,29,33,36,40,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,和56。

[0242] 在另一个特定实施方案中,核酸序列编码选自如下的VH氨基酸序列:SEQ ID NO:1,8,15,22,29,36,43,45,47,49,51,53,和55。

[0243] 在另一个特定实施方案中,核酸序列编码选自如下的VL氨基酸序列:SEQ ID NO:5,12,19,26,33,40,44,46,48,50,52,54,和56。

[0244] 在甚至进一步的方面,本发明涉及编码本发明的抗体的表达载体,或一组表达载体。抗体的重链和轻链可以由相同载体或由不同载体编码。

[0245] 这种表达载体可用于重组产生本发明的抗体。

[0246] 在一个实施方案中,本发明的表达载体包含编码选自如下的氨基酸序列中的一种或多种的核苷酸序列:SEQ ID NO:1,5,8,12,15,19,22,26,29,33,36,40,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,和56。

[0247] 在另一个特定实施方案中,本发明的表达载体包含编码选自如下的VH氨基酸序列中的一种或多种的核苷酸序列:SEQ ID NO:SEQ ID NO:1,8,15,22,29,36,43,45,47,49,51,53,和55。

[0248] 在另一个特定实施方案中,本发明的表达载体包含编码选自如下的VL氨基酸序列中的一种或多种的核苷酸序列:SEQ ID NO:SEQ ID NO:5,12,19,26,33,40,44,46,48,50,52,54,和56。

[0249] 在进一步的实施方案中,表达载体进一步包含编码抗体,例如人抗体的轻链恒定区、重链恒定区、或轻链和重链恒定区二者的核苷酸序列。

[0250] 本发明上下文中的表达载体可以是任何合适的载体,包括染色体、非染色体、合成的核酸载体 (包含一组合适的表达控制元件的核酸序列)。这种载体的例子包括SV40的衍生物、细菌质粒、噬菌体DNA、杆状病毒、酵母质粒、源自质粒和噬菌体DNA组合的载体和病毒核酸 (RNA或DNA) 载体。在一个实施方案中,编码HER2抗体的核酸被包含在裸DNA或RNA载体内,包括例如线性表达元件 (例如在Sykes和Johnston, Nat Biotech17,35559

(1997)中所述的),紧凑的核酸载体(例如在 US6,077,835和/或W000/70087中所述的),质粒载体如pBR322、pUC19/18或pUC118/119,“侏儒(midge)”尺寸最小化核酸载体(例如在Schakowski等,Mol Ther3,793-800(2001)中所述的),或者作为沉淀的(precipitated)核酸载体构建体,例如CaP04-沉淀构建体(如在例如W0 00/46147,Benvenisty和Reshef,PNAS USA 83,9551-55(1986),Wigler等,Cell114,725(1978),以及Coraro和Pearson,Somatic Cell Genetics7,603 (1981)中所述的)。这种核酸载体及其使用是本领域公知的(见例如US5,589,466和US5,973,972)。

[0251] 实施例2和3中也描述了本发明的抗体的示例性的表达载体。

[0252] 在一个实施方案中,载体适合用于在细菌细胞中表达HER2抗体。这种载体的例子包括表达载体,如BlueScript(Stratagene),pIN载体(Van Heeke&Schuster,J Biol Chem264,5503-5509(1989),pET载体(Novagen,Madison WI)等)。

[0253] 表达载体还可以是,或者可选择地是适合用于在酵母系统中表达的载体。可以采用任何适合用于在酵母系统中表达的载体。适合的载体包括,例如,包含组成型或诱导型启动子如 α 因子、醇氧化酶和PGH的载体(综述见:F.Ausubel等,ed.Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York(1987),和Grant等,Methods in Enzymol1153,516-544(1987))。

[0254] 表达载体还可以是,或者可选择地是适合用于在哺乳动物细胞中表达的载体,例如包含作为可选择标记的谷氨酰胺合成酶的载体,如Bebbington(1992)Biotechnology (NY) 10:169-175中所述的载体。

[0255] 核酸和/或载体还可以包含编码分泌/定位序列的核酸序列,其可以将多肽,如新生的多肽链,靶向至周质空间(periplasmic space)或者细胞培养基内。这种序列是本领域中已知的,并包括分泌前导或信号肽。

[0256] 在本发明的表达载体中,编码HER2抗体的核酸可以包含任何合适的启动子、增强子和其他促进表达的元件或者与任何合适的启动子、增强子和其他促进表达的元件相关。这种元件的例子包括强表达启动子(例如人CMV IE启动子/增强子以及RSV,SV40,SL33,MMTV,和HIV LTR启动子),有效的聚(A)终止序列,大肠杆菌中质粒产物的复制起点,作为选择标记的抗生素抗性基因,和/或便利的克隆位点(例如多接头)。核酸也可以包含诱导型启动子而不是组成型启动子,如CMV IE。

[0257] 在一个实施方案中,编码HER2抗体的表达载体可以通过病毒载体置于或者递送至宿主细胞或宿主动物中。

[0258] 在甚至进一步的方面,本发明涉及重组的真核或原核宿主细胞,例如转染瘤,其产生如本文所定义的本发明的抗体。宿主细胞的例子包括酵母、细菌和哺乳动物细胞,如CHO或HEK细胞。例如,在一个实施方案中,本发明提供了包含核酸的细胞,所述核酸稳定整合到细胞基因组内并且包含用于表达本发明的HER2抗体的编码序列。在另一个实施方案中,本发明提供了细胞,所述细胞包含非整合的核酸,如质粒、粘粒、噬菌粒或线性表达元件,所述非整合的核酸包含用于表达本发明的HER2抗体的编码序列。

[0259] 在进一步的方面,本发明涉及产生如本文所定义的本发明的抗体的杂交瘤。在甚至进一步的方面,本发明涉及转基因非人动物或植物,其包括编码人重链和人轻链的核酸,其中所述动物或植物产生本发明的抗体。

[0260] 在进一步的方面,本发明涉及用于产生本发明的HER2抗体的方法,所述方法包括如下步骤:

[0261] a) 培养如本文上面所述的本发明的杂交瘤或宿主细胞,和

[0262] b) 从培养基纯化本发明的抗体。

[0263] 组合物

[0264] 在进一步的主要方面,本发明涉及药物组合物,其包含:

[0265] -如本文所定义的HER2抗体,和

[0266] -药学上可接受的载体。

[0267] 本发明的药物组合物可以包含本发明的抗体或者本发明的不同抗体的组合。

[0268] 可以根据常规技术如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,19th Edition,Gennaro,Ed.,Mack Publishing Co.,Easton,PA,1995中公开的那些配制药物组合物。本发明的药物组合物可以,例如,包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、去垢剂(例如非离子去垢剂,如吐温-20或吐温-80)、稳定剂(例如糖类或无蛋白氨基酸)、防腐剂、组织固定剂、增溶剂、和/或适合用于包含在药物组合物中的其他材料。

[0269] 药学上可接受的载体包括任何和全部合适的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌和抗真菌剂、等渗剂、抗氧化剂和吸收延迟剂,以及与本发明的化合物生理上相容的类似物。本发明的药物组合物中可以采用的合适的水性和非水性载体的例子包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、乙醇、右旋糖、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、及其合适的混合物、植物油、羧甲基纤维素胶体溶液、黄蓍胶和可注射的有机酯,如油酸乙酯,和/或各种缓冲剂。药学上可接受的载体包括用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌水溶液或分散体和无菌粉末。可以通过使用包衣材料,如卵磷脂,在分散体情况下通过保持所需的颗粒大小,以及通过使用表面活性剂而保持合适的流动性。

[0270] 本发明的药物组合物还可以包括药学上可接受的抗氧化剂,例如(1)水溶性抗氧化剂,如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2)油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚、丁羟甲苯、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和(3)金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0271] 本发明的药物组合物在组合物中还可以包括等渗剂,如糖,多元醇,如甘露醇、山梨醇、甘油或氯化钠。

[0272] 本发明的药物组合物还可以包含一种或多种适合用于选择的给药途径的佐剂,如防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、防腐剂或缓冲剂,其可以提高药物组合物的保存期限或有效性。可以用保护化合物免于快速释放的载体制备本发明的化合物,所述载体如控释剂型,包括植入体、经皮贴片和微胶囊化的递送系统。这种载体可以包括明胶、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、生物可降解的、生物相容性聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸,单独地或者与蜡一起,或者其他本领域公知的材料。用于制备这种制剂的方法是本领域技术人员通常已知的。

[0273] 可以通过将所需量的活性化合物与根据需要的组分(例如,如上面所列举的)的一种或组合并入适合的溶剂中,随后通过无菌微量过滤而制备无菌可注射溶液。通常,通过将活性化合物并入含有基础分散介质和所需的其它成分(例如来自上面列举的那些)的无菌媒介中而制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法的

例子是真 空干燥和冷冻干燥(冻干),所述方法从先前无菌过滤的其溶液产生活性 成分加上任何额外的期望组分的粉末。

[0274] 药物组合物中活性组分的实际剂量水平可以变化,以获得在对患者 没有毒性的情况下对于特定患者、组合物或施用模式有效地实现期望的 治疗应答的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药代动力学因 素,包括采用的本发明的特定组合物或其酰胺的活性,施用途径,施用 时间,采用的特定化合物的排泄速度,治疗的持续时间,与采用的特定 组合物联合使用的其他药物、化合物和/或材料,治疗的患者的年龄、性 别、体重、状况、总体健康状况和以前的医疗史,以及医学领域公知的 类似因素。

[0275] 可以通过任何合适的途径和模式施用药物组合物。在一个实施方案 中,肠胃外施用本发明的药物组合物。如本文所使用的,术语“肠胃外 施用”是指除肠内和局部施用以外的施用模式,通常通过注射,包括表 皮、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、皮 内、腹膜 内、腱内、经气管、皮下、表皮下(subcuticular)、关节内、囊下、蛛网膜 下、椎管内、颅内、胸内、硬脑膜外和胸骨内注射和输注。

[0276] 在一个实施方案中,通过静脉内或皮下注射或输注施用药物组合 物。

[0277] 用途

[0278] 在进一步的主要方面,本发明涉及本发明的HER2抗体,其用作药 物。

[0279] 本发明的HER2抗体可以用于多种目的。具体而言,本发明的抗体 可用于治疗各种形式的癌症,包括转移性癌症和难治性癌症。

[0280] 在一个实施方案中,本发明的HER2抗体用于治疗乳腺癌,包括原 发性、转移性和难治性乳腺癌。

[0281] 在一个实施方案中,本发明的HER2抗体用于治疗选自如下的癌症 形式,前列腺癌,非小细胞肺癌,膀胱癌,卵巢癌,胃癌,结肠直肠癌, 食道癌,头部和颈部的鳞状细胞癌,子宫颈癌,胰腺癌,睾丸癌,恶性 黑色素瘤和软组织癌(如滑膜肉瘤)。

[0282] 在一个实施方案中,本发明涉及用于抑制一种或多种表达HER2的 肿瘤细胞的生长和/或增殖的方法,包括将本发明的抗体施用于需要其的 个体。

[0283] 在一个实施方案中,抗体缀合于另一个部分。

[0284] 在一个实施方案中,一种或多种肿瘤细胞共表达HER2和EGFR和/或HER3。

[0285] 本发明还涉及用于治疗癌症的方法,包括

[0286] a) 选择患有包括共表达HER2和EGFR和/或HER3的肿瘤细胞的癌 症的受试者,和

[0287] b) 将权利要求1-35中任一项的抗体施用于所述受试者。

[0288] 在一个实施方案中,癌症选自乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜/子宫 颈癌、肺癌、恶性黑色素瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、睾丸癌、软 组织肿瘤如滑膜肉瘤和膀胱癌。

[0289] 类似地,本发明涉及用于杀死表达HER2的肿瘤细胞的方法,包括 将有效量的本发明的抗体如抗体药物缀合物(ADC)施用于需要其的个 体。

[0290] 在一个实施方案中,所述肿瘤细胞参与如下的癌症形式:乳腺癌, 前列腺癌,非小细胞肺癌,膀胱癌,卵巢癌,胃癌,结肠直肠癌,食道 癌,头部和颈部的鳞状细胞癌,子宫颈癌,胰腺癌,睾丸癌,恶性黑色 素瘤和软组织癌(例如滑膜肉瘤)。

[0291] 在一个实施方案中,所述肿瘤细胞是共表达HER2和至少一个EGFR 家族的其他成员,优选EGFR、HER3、或EGFR和HER3两者的肿瘤细 胞,是参与乳腺癌,结肠直肠癌,子宫内

膜/子宫颈癌,肺癌,恶性黑色素瘤,卵巢癌,胰腺癌,前列腺癌,睾丸癌,软组织肿瘤(例如,滑膜肉瘤)或膀胱癌的肿瘤细胞。

[0292] 在一个方面,本发明涉及用于在受试者中治疗癌症的方法,包括选择患有包含共表达HER2和EGFR和/或HER3的肿瘤细胞的癌症的受试者,以及将任选地以缀合细胞毒性剂或药物的抗体的形式的本发明的抗体施用于受试者。在一个实施方案中,受试者患有选自如下的癌症:乳腺癌,结肠直肠癌,子宫内膜/子宫颈癌,肺癌,恶性黑色素瘤,卵巢癌,胰腺癌,前列腺癌,睾丸癌,软组织肿瘤(例如,滑膜肉瘤)或膀胱癌。

[0293] 而且,本发明涉及结合人HER2的单克隆抗体在制备用于治疗癌症(如上面提到的特定癌症适应症中的一种)的药物中的用途。

[0294] 本发明进一步涉及单克隆抗体,其用于治疗癌症,如上面提到的癌症适应症中的一种。

[0295] 在本发明的治疗方法的进一步的实施方案中,通过确定肿瘤负担或相关肿瘤细胞上的HER2表达水平而在治疗期间,例如,在预定的时间点监测治疗的效力。

[0296] 对上述治疗方法和用途中的剂量方案进行调节,以提供最佳的期望的应答(例如治疗性应答)。例如,可以施用单次大剂量(bolus),可以随时间施用若干分开的剂量,或者可以根据治疗情形的迫切情况如指示成比例地减少或增加剂量。胃肠外组合物可以配制为单位剂量形式,以便于施用并保持剂量均匀性。

[0297] HER2抗体的有效剂量和给药方案取决于待治疗的疾病或状况,并可以由本领域技术人员确定。本发明的化合物的治疗有效量的示例性的非限制性范围是约0.1-100mg/kg,如约0.1-50mg/kg,例如约0.1-20 mg/kg,如约0.1-10mg/kg,例如约0.5,约0.3,约1,约3,约5,或约8mg/kg。

[0298] 具有本领域普通技术的医师或兽医可以容易地确定并处方有效量的所需药物组合物。例如,医师或兽医可以从低于实现期望的治疗效果所需水平的水平开始药物组合物中采用的HER2抗体的剂量,并逐渐增加剂量,直到实现期望的效果。通常,本发明组合物的合适的每日剂量是化合物有效产生治疗效果的最低剂量的量。施用可以,例如,是肠胃外的,如静脉内的、肌内的或皮下的。在一个实施方案中,可以通过以10-500mg/m²,如200-400mg/m²的每周剂量输注而施用HER2抗体。这种施用可以重复进行,例如1-8次,如3-5次。可以通过在2-24小时,如2-12小时的期间连续输注而进行施用。在一个实施方案中,可以通过在长时间期间,如超过24小时,缓慢连续输注而施用HER2抗体以降低毒副作用。

[0299] 在一个实施方案中,可以以250mg-2000mg,如300mg,500mg,700mg,1000mg,1500mg或2000mg的每周剂量施用HER2抗体,最多达8次,如4-6次。必要时,这种方案可以,例如在6个月或12个月后,重复1次或多次。可以通过例如取出生物样品测定施用后血液中本发明的化合物的量并使用针对本发明的HER2抗体的抗原结合区的抗-独特型抗体来确定或调整剂量。

[0300] 在一个实施方案中,可以通过维持疗法施用HER2抗体,例如在6个月或更长的期间每周1次。

[0301] 还可以预防性地施用HER2抗体,以降低发生癌症的风险、延迟癌症进程中事件发生的开始和/或在癌症减轻过程中降低复发的风险。

[0302] 还可以在组合疗法中施用HER2抗体,即与其他与待治疗疾病或状况相关的治疗

剂组合。因此,在一个实施方案中,包含抗体的药物用于和一种或多种进一步的治疗剂如细胞毒性剂、化疗剂或抗血管生成剂组合。

[0303] 这种组合的施用可以同时、分别或顺次进行。对于同时施用,可以合适地作为一种组合物或者作为分开的组合物施用药物。因此,本发明还提供了用于治疗上述涉及表达HER2的细胞的病症的方法,该方法包括施用与一种或多种如下所述的额外治疗剂组合的本发明的HER2抗体。

[0304] 在一个实施方案中,本发明提供了用于在受试者中治疗涉及表达HER2的细胞的病症的方法,该方法包括将治疗有效量的本发明的HER2抗体和至少一种额外的治疗剂施用于需要其的受试者。

[0305] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括将治疗有效量的本发明HER2抗体和至少一种额外的化疗剂施用于需要其的受试者。

[0306] 在一个实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自抗代谢物,例如氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、decarbazine、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨或克拉屈滨。

[0307] 在另一个实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自烷基化试剂,如氮芥、塞替派(thioepa)、苯丁酸氮芥、美法仑、卡氯芥(BSNU)、环己亚硝脲(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链唑霉素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴肼、丝裂霉素C、顺铂和其他铂衍生物,如卡铂。

[0308] 在另一个实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自抗有丝分裂剂,如紫杉烷类(taxanes),例如多西紫杉醇(docetaxel)和紫杉醇,和长春花生物碱,例如长春地辛、长春新碱、长春花碱和长春瑞滨。

[0309] 在另一个实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自拓扑异构酶抑制剂,如托泊替康或伊立替康,或抑制细胞生长的药物,如依托泊苷和替尼泊苷。

[0310] 在另一实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自生长因子抑制剂,如ErbB1(EGFR)的抑制剂(如EGFR抗体,例如zalutumumab,西妥昔单抗、帕尼单抗或尼妥珠单抗,或其他EGFR抑制剂,如吉非替尼或埃罗替尼),另一种ErbB2的抑制剂(HER2/neu)(如HER2抗体,例如曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-DM1或帕妥珠单抗)或EGFR和HER2两者的抑制剂,如拉帕替尼)。

[0311] 在另一个实施方案中,这种额外的治疗剂可以选自酪氨酸激酶抑制剂,如伊马替尼(Glivec, Gleevec STI571)或拉帕替尼,PTK787/ZK222584。

[0312] 在另一个实施方案中,本发明提供了用于在受试者中治疗涉及表达HER2的细胞的病症的方法,该方法包括将治疗有效量的本发明的HER2抗体和至少一种血管生成、新血管化和/或其他血管化的抑制剂施用于需要其的受试者。

[0313] 这种血管生成抑制剂的例子是尿激酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂(如马立马司他、新伐司他、BAY129566、AG3340、BMS275291和类似药物)、内皮细胞迁移和增殖的抑制剂(如TNP470、角鲨胺、2-甲氧雌二醇、考布他汀类(combretastatins)、内皮他丁、血管抑素、青霉胺、SCH66336(Schering-Plough Corp, Madison, NJ)、R115777(Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ)和类似药物)、血管生成生长因子的拮抗剂(如ZD6474、SU6668、针对血管生成剂和/或它们的受体(如VEGF(例如贝伐单抗), bFGF, 和血管

生成素1)的抗体、沙利度胺、沙利度胺类似物(如CC5013)、Sugen5416、SU5402、抗血管生成核酶(如angiozyme)、干扰素 α (如干扰素 α 2a)、苏拉明和类似药物)、VEGF-R激酶抑制剂和其他抗血管生成酪氨酸激酶抑制剂(如SU011248)、内皮特异性整合素/生存信号传递抑制剂(如vitaxin和类似药物)、铜拮抗剂/螯合剂(如四硫钼酸盐、卡托普利和类似药物)、羧胺三唑(carboxyamido-triazole,CAI)、ABT627、CM101、白介素12(IL-12)、IM862、PNU145156E以及抑制血管生成的核苷酸分子(如反义-VEGF-cDNA、编码血管抑素的cDNA、编码p53的cDNA和编码缺陷型VEGF受体2的cDNA)。

[0314] 这种血管生成、新血管化和/或其他血管化的抑制剂的其他例子是抗血管生成肝素衍生物(如肝素酶III(heparinase III))、替莫唑胺、NK4、巨噬细胞迁移抑制因子、环氧合酶-2抑制剂、缺氧诱导因子1的抑制剂、抗血管生成的大豆异黄酮、奥替普拉、烟曲霉素及其类似物、生长抑素类似物、戊聚糖多硫酸酯、替可加兰钠、达肝素、肿瘤抑素(tumstatin)、血小板反应蛋白(thrombospondin)、NM-3、combrestatin、血管能抑素(canstatin)、阿伐他汀(avastatin)、针对其他相关目标的抗体,如抗 α -v/ β -3整合素和抗-kininostatin抗体。

[0315] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是抗癌免疫原,如癌抗原/肿瘤相关抗原(例如上皮细胞粘附分子(EpCAM/TACSTD1)、粘蛋白1(MUC1)、癌胚抗原(CEA)、肿瘤相关的糖蛋白72(TAG72)、gp100、Melan-A、MART1、KDR、RCAS1、MDA7、癌症相关的病毒疫苗(例如人乳头瘤病毒疫苗)、或肿瘤来源的热休克蛋白。

[0316] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是抗癌细胞因子、趋化因子或其组合。合适的细胞因子和生长因子的例子包括IFN γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α (例如,IFN α 2b)、IFN β 、GM-CSF、CD40L、Flt3配体、干细胞因子、安西司亭和TNF α 。合适的趋化因子可以包括Glu-Leu-Arg(ELR)-阴性趋化因子,如来自人CXC和C-C趋化因子家族的IP10、MCP3、MIG和SDF-1 α 。合适的细胞因子包括细胞因子衍生物、细胞因子变体、细胞因子片段和细胞因子融合蛋白。

[0317] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是细胞周期控制/细胞凋亡调节子(或“调节剂”)。细胞周期控制/细胞凋亡调节子可以包括针对并调节细胞周期控制/凋亡调节子的分子,例如(i)cdc-25(如NSC663284),(ii)过度刺激细胞周期的细胞周期蛋白依赖的激酶(如夫拉平度(flavopiridol)(L868275,HMR1275),7-羟基星孢素(7-hydroxystaurosporine)(UCN-01,KW2401)和roscovitine(R-roscovitine,CYC202)),和(iii)端粒酶调节子(如BIBR1532,SOT-095,GRN163和在例如US6,440,735和US6,713,055中所述的组合物)。干扰细胞凋亡途径的分子的非限制性例子包括TNF相关的细胞凋亡诱导配体(TRAIL)/细胞凋亡-2配体(Apo-2L)、激活TRAIL受体的抗体、IFN和反义Bcl-2(anti-sense Bcl-2)。

[0318] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是激素调节剂,如用于抗雄激素和抗雌激素疗法的药物。这种激素调节剂的例子是他莫昔芬、碘昔芬、氟维司群、屈洛昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、己烯雌酚、乙炔雌二醇/炔雌醇、抗雄激素(antiandrogene)(如氟他米特(flutaminde)/氟他胺(eulexin))、孕酮(如己酸羟孕酮、甲羟孕酮/普维拉、甲地孕酮醋酸酯/梅格施)、肾上腺皮质类固醇(如氢化可的松、泼尼

松)、黄体化激素释放激素(及其类似物或其他 LHRH激动剂如布舍瑞林和戈舍瑞林)、芳香酶抑制剂(如阿那曲唑/瑞宁得、氨鲁米特/cytraden、依西美坦)或激素抑制剂(例如奥曲肽/善得定)。

[0319] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是抗无反应性剂(anti-anergic agent),这种ascompounds是阻断 CTLA-4活性的分子,例如 ipilimumab。

[0320] 在一个实施方案中,用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂可以是抗癌核酸或抗癌抑制性RNA分子。

[0321] 作为用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂相关的其他抗癌剂的例子是分化诱导剂、视黄酸类似物(如全反式视黄酸、13-顺视黄酸和类似药物)、维生素D类似物(如西奥骨化醇和类似药物)、如下物质的抑制剂:ErbB3、ErbB4、IGF-1R、胰岛素受体、PDGFR α 、PDGFR β 、Flk2、Flt4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、TRKA、TRKC、RON(如抗-RON抗体)、Sea、Tie、Tie2、Eph、Ret、Ros、Alk、LTK、PTK7和类似药物。

[0322] 作为用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂相关的其他抗癌剂的例子是雌莫司汀和表柔比星。

[0323] 作为用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂相关的其他抗癌剂的例子是HSP90抑制剂,如17-烯丙基氨基格尔德霉素,针对肿瘤抗原如PSA、CA125、KSA、整合素如整合素 β 1的抗体或VCAM抑制剂。

[0324] 作为用于和HER2抗体组合用于治疗上述病症的治疗剂相关的其他抗癌剂的例子是钙调磷酸酶(calcineurin)抑制剂(如伐司朴达、PSC833和其他MDR-1或p-糖蛋白抑制剂)、TOR抑制剂(如西罗莫司、依维莫司和雷帕霉素),和“淋巴细胞归巢(lymphocyte homing)”机制的抑制剂(如FTY720),和对细胞信号传递具有影响的试剂如粘附分子抑制剂(如抗-LFA)。

[0325] 在一个实施方案中,本发明的HER2抗体用于和一种或多种其他的治疗性抗体组合使用,如ofatumumab、zanolimumab、daratumumab、兰尼单抗、Zenapax、Simulect、Remicade、Humira、Tysabri、Xolair、Raptiva和/或利妥昔单抗。

[0326] 在另一个实施方案中,组合使用两种或更多种不同的本文所述的本发明的抗体用于治疗疾病。特别感兴趣的组合包括两种或更多种非阻断性抗体。这种组合疗法可以导致结合增加数量的抗体分子/每个细胞,这可以提供增加的效力,例如通过激活补体介导的裂解。

[0327] 除上以外,本发明的组合疗法的其他实施方案包括如下:

[0328] 对于乳腺癌的治疗,HER2抗体或其治疗性缀合物,与氨甲喋呤、紫杉醇、阿霉素、卡铂、环磷酰胺、柔红霉素、表阿霉素、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、伊沙匹隆、密吐霉素、米托蒽醌、长春瑞滨、多西他赛、噻替派、长春新碱、卡培他滨、EGFR抗体(例如,zalutumumab、西妥昔单抗、帕尼单抗或尼妥珠单抗)或其他EGFR抑制剂(如吉非替尼或埃罗替尼)、另一种HER2抗体或缀合物(如,例如,曲妥珠单抗,曲妥珠单抗-DM1或帕妥珠单抗)、EGFR和HER2两者的抑制剂(如拉帕替尼)组合,和/或与HER3抑制剂组合。

[0329] 对于非小细胞肺癌的治疗,HER2抗体与EGFR抑制剂,如EGFR抗体,例如 zalutumumab、西妥昔单抗、帕尼单抗或尼妥珠单抗或其他EGFR抑制剂(如吉非替尼或埃罗

替尼)组合,或与另一种HER2药物(如 HER2抗体,例如曲妥珠单抗、曲妥珠单抗-DM1或帕妥珠单抗)组合或 与EGFR和HER2两者的抑制剂如拉帕替尼组合,或与HER3抑制剂组合。

[0330] 对于结肠直肠癌的治疗,HER2抗体与选自如下的一种或多种化合物组合:吉西他滨、贝伐单抗、FOLFOLX、FOLFIRI、XELOX、IFL、奥沙利铂、伊立替康、5-FU/LV、卡培他滨、UFT、EGFR靶向剂如西妥昔单抗、帕尼单抗、扎鲁木单抗(zalutimumab);VEGF抑制剂、或酪氨酸激酶抑制剂如舒尼替尼。

[0331] 对于前列腺癌的治疗,HER2抗体与选自如下的一种或多种化合物组合:激素/抗激素治疗剂;如抗雄激素、黄体化激素释放激素(LHRH)激动剂,和化疗剂如紫杉烷类、米托蒽醌、雌莫司汀、5FU、长春花碱 和伊沙匹隆。

[0332] 放射疗法-手术

[0333] 在一个实施方案中,本发明提供了用于在受试者中治疗涉及表达 HER2的细胞的病症的方法,该方法包括将治疗有效量的HER2抗体如 本发明的HER2抗体和放射疗法施用于需要其的受试者。

[0334] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括将治疗有效量的HER2抗体如本发明的HER2抗体和放射疗法 施用于需要其的受试者。

[0335] 在一个实施方案中,本发明提供了HER2抗体,如本发明的HER2 抗体在制备用于和放射疗法组合施用以治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0336] 放射疗法可以包括放射或者提供了将放疗药物施用于患者的相关 施用方法。放射源可以在待治疗患者的体外或者体内(放射治疗可以例如 是外部射束放射疗法(EBRT)或近程放射治疗(BT)的形式)。可用于实施 这些方法的放射活性元素包括例如镭、铯-137、铈-192、镅-241、金-198、钴-57、铜-67、镓-67、碘-123、碘-131和铟-111。

[0337] 在进一步的实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括与手术组合将治疗有效量的HER2抗体,如本发明的 HER2抗体施用于需要其的受试者。

[0338] 诊断用途

[0339] 本发明的HER2抗体还可以用于诊断目的。因此,在进一步的方面, 本发明涉及包含如本文定义的HER2抗体的诊断组合物。

[0340] 在一个实施方案中,本发明的HER2抗体可以用于通过检测HER2 的水平或在细胞膜表面上包含HER2的细胞的水平而在体内或体外诊断 疾病,在该疾病中激活的表达HER2的细胞在疾病发生中发挥活跃作用。可以通过例如在允许抗体和HER2之间形成复合物的条件下将待测样品,任选地与对照样品一起,与HER2抗体接触而实现这一点。

[0341] 因此,在进一步的方面,本发明涉及用于检测样品中HER2抗原或 表达HER2的细胞的存在的方法,包括:

[0342] -在允许抗体与HER2之间形成复合物的条件下,将样品与本发明的 HER2抗体接触;和

[0343] -分析是否形成了复合物。

[0344] 在一个实施方案中,该方法在体外实施。

[0345] 更具体地,本发明提供了用于鉴别、诊断侵袭性细胞和组织,以及 本发明的HER2抗体针对的其他细胞的方法,以及用于监测治疗性处理 的进展、治疗后状态、发生癌症的风险、癌症进程等的方法。

[0346] 用于这种技术中使用的HER2抗体和/或二级抗体的合适的标记是 本领域中公知的。

[0347] 在进一步的方面,本发明涉及用于检测样品中HER2抗原或表达 HER2的细胞的存在试剂盒,包括

[0348] -本发明的HER2抗体或本发明的双特异性分子;和

[0349] -试剂盒的使用说明书。

[0350] 在一个实施方案中,本发明提供了用于诊断癌症的试剂盒,包括容器,所述容器包含HER2抗体和一种或多种用于检测HER2抗体与HER2 结合的试剂。试剂可以包括例如荧光标签、酶标签、或其他可检测的标 签。试剂还可以包括用于酶反应的二级或三级抗体或试剂,其中酶反应 产生可以被可视化的产物。

[0351] 抗-独特型抗体

[0352] 在进一步的方面,本发明涉及抗-独特型抗体,其与如本文所述的本 发明的HER2抗体结合。

[0353] 抗-独特型(Id)抗体是如下抗体,其识别一般与抗体的抗原结合位点 相关的独特决定簇。可以通过用要制备抗-Id的mAb免疫动物而制备Id 抗体,其中所述动物的物种和遗传类型与HER2mAb的来源的物种和遗传类型相同。被免疫的动物通常可以识别免疫的抗体的独特型决定簇, 并且通过产生针对这些独特型决定簇的抗体(抗-Id抗体)而对其应答。

[0354] 还可以使用抗-Id抗体作为“免疫原”而在另一个动物内诱导免疫应 答,产生所谓的抗-抗-Id抗体。抗-抗-Id可能和诱导抗-Id的最初mAb 在表位上相同。因此,通过使用针对mAb的独特型决定簇的抗体,可 能鉴别出表达具有相同特异性的抗体的其他克隆。

[0355] 本发明进一步通过如下实施例进行举例说明,但它们不应视为对本 发明范围的进一步限制。

实施例

[0356] 实施例1-HER2和HER2变体的表达构建体

[0357] 产生用于表达全长HER2 (1255aa,Swissprot P04626)、HER2的胞外 结构域(ECD)(Her2-ECDHis,具有C-末端的His6标签的aa1-653)、天然 存在的HER2剪接变体(Her2-delex16,产生外显子16缺失并缺乏aa 633-648)和HER2受体的截短形式(HER2-粗短的(Her2-stumpy),aa 648-1256)的完全密码子优化的构建体。该构建体包含用于克隆的合适的 限制性位点和最优的Kozak序列(Kozak,M.,Gene1999; 234(2):187-208.)。将构建体克隆进哺乳动物表达载体pEE13.4(Lonza Biologics;Bebbington,C.R.,等,Biotechnology (N Y) 1992;10(2):169-75) 中,并完全测序以验证构建体的正确性。

[0358] 实施例2-帕妥珠单抗C1和F5的表达构建体

[0359] 产生了用于在HEK细胞中表达IgG1抗体帕妥珠单抗、C1和F5的 重链(HC)和轻链(LC)的完全密码子优化构建体。这些构建体编码的可变 区与在美国专利号6,949,245对于帕妥珠单抗重链和轻链以及美国专利 号7,244,826对于C1和F5重链和轻链描述的那些是相同的。对于C1 和F5,使用分别包含人IgG1重链(同种异型f)、人κ轻链或人λ轻链的 完全密码子优化的恒定区的哺乳动物表达载体p33G1f和p33K或p33L (pcDNA3.3 (Invitrogen))。对于帕妥珠单抗,使用分别包含人IgG1重链(同 种异型f)和人κ轻链的完

全密码子优化的恒定区的哺乳动物表达载体 pGlf (pEE12.4 (Lonza Biologics) 和 pKappa (pEE6.4 (Lonza Biologics))。

[0360] 使用,例如,美国专利号7,632,924中所述的重链和轻链序列,可以以相同的方式产生曲妥珠单抗(Herceptin[®])。

[0361] 实施例3-在HEK-293或CHO细胞中瞬时表达

[0362] 从Invitrogen获得Freestyle[™]293-F(一种适应悬浮生长和化学确定的Freestyle培养基的HEK-293亚克隆,(HEK-293F))细胞,并根据制造商的说明书使用293fectin(Invitrogen)以适当的质粒DNA进行转染。在抗体表达的情况下,共表达适当的重链和轻链表达载体。

[0363] 使用Freestyle MAX转染试剂(Invitrogen)将pEE13.4Her2、pEE13.4Her2-delex16和pEE13.4Her2-stumpy瞬时转染进Freestyle[™] CHO-S(Invitrogen)细胞系。通过如下文所述的FACS分析,检测HER2 和Her2-delex16的表达。

[0364] 实施例4-NS0中稳定的多克隆合并物的表达

[0365] 通过核转染(nucleofection, Amaxa)将pEE13.4Her2、pEE13.4Her2-delex16和pEE13.4Her2-stumpy稳定转染进NS0细胞。基于整合的谷氨酰胺合成酶筛选标记在谷氨酰胺依赖性生长选择后,建立稳定转染的细胞的合并物(Barnes, L.M., 等., Cytotechnology 2000; 32 (2): 109-123)。

[0366] 实施例5-His标签的HER2的纯化

[0367] 在HEK-293F细胞中表达Her2ECDHis。Her2ECDHis中的His-标签帮助固定化金属亲和色谱的纯化,因为His-标签的蛋白与树脂珠粒强烈结合,而培养上清液中存在的其他蛋白则不会强烈结合。

[0368] 在该过程中,使固定在色谱树脂上的螯合剂带上Co²⁺阳离子。将包含Her2ECDHis的上清液与树脂以分批模式(即溶液)孵育。孵育之后,从上清液中回收珠粒,并填充进柱子中。清洗柱子以除去弱结合的蛋白。然后用包含咪唑的缓冲液洗脱强结合的Her2ECDHis蛋白,其中咪唑与His竞争结合Co²⁺。通过在脱盐柱上进行缓冲液交换而从蛋白中除去洗脱液。

[0369] 实施例6-转基因小鼠的免疫操作

[0370] 从下列免疫步骤获得抗体005,006,041,044,059,060,067,072,093,106和111:通过以腹膜内(IP)的Her2ECD瞬时转染的5x10⁶NS0细胞和在尾部皮下(SC)的偶联半抗原钥孔戚血蓝蛋白(KLH)的20μg Her2ECDHis蛋白交替进行而每隔两周免疫两只雌性HCo12小鼠,一只雌性和一只雄性HCo12-Balb/C小鼠,一只雄性小鼠和一只雄性HCo17小鼠以及两只雄性HCo20小鼠(Medarex, San José, CA, USA)。每只小鼠最多进行八次免疫(四次IP和四次SC免疫)。在完全弗氏佐剂(CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)中进行使用细胞的第一次免疫。对于所有其他免疫,IP注射PBS中的细胞,而用不完全弗氏佐剂(IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) SC注射KLH偶联的Her2ECD。

[0371] 从下列免疫获得抗体150,通过以IP Her2delex16瞬时转染的5x10⁶ NS0细胞和在尾部SC20μg偶联于半抗原钥孔戚血蓝蛋白(KLH)的Her2ECDHis蛋白交替进行(间隔14天)而免疫一只雌性HCo17小鼠(Medarex)。最多进行八次免疫(四次IP和四次SC免疫)。在完全弗氏佐剂(CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)中完成使用细胞的第一次免疫。

对于所有其他免疫, IP注射PBS中的细胞, 而用不完全弗氏佐剂(IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) SC注射KLH偶联的 Her2ECD。

[0372] 从下列免疫获得抗体163, 通过以20 μ g偶联于半抗原钥孔戚血蓝蛋白(KLH)的 Her2ECDHis蛋白IP和在尾部SC交替进行(间隔14天)而免疫一只雌性HCo20小鼠(Medarex)。最多进行八次免疫(四次IP和四次SC免疫)。在完全弗氏佐剂(CFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)中IP完成第一次免疫。使用不完全弗氏佐剂(IFA; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)注射其他免疫。

[0373] 在抗原特异性FMAT筛选测定(如实施例7中所述)中具有针对 TC1014-Her2、TC1014-Her2delex16或TC1014-Her2stumpy的至少两个连续的滴度的小鼠被认为是阳性的并且融合。

[0374] 实施例7-同种抗原特异性筛选测定

[0375] 使用荧光微体积测定技术(Fluorometric Micro volume Assay Technology, FMAT; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)通过同种抗原特异性筛选测定(四分式)测定免疫的小鼠的血清或HuMab(人单克隆抗体)杂交瘤或转染瘤培养物上清液中HER2抗体的存在。为此, 使用4个基于细胞的测定的组合。测定与TC1014-Her2(瞬时表达HER2受体的HEK-293F细胞;如上所述产生)、TC1014-Her2delex16(瞬时表达 Her2-delex的胞外结构域(HER2受体的16个氨基酸缺失的突变体;如上所述产生)的HEK-293F细胞和TC1014-Her2stumpy(瞬时表达HER2受体的胞外粗短结构域的HEK-293F细胞;如上所述产生)以及HEK293野生型细胞(不表达HER2的阴性对照细胞)的结合。将样品添加至细胞以允许与HER2结合。随后, 用荧光缀合物(山羊抗-人IgG-Cy5; Jackson ImmunoResearch)检测HuMab的结合。使用TH1014-帕妥珠单抗(在HEK-293F细胞中产生的)作为阳性对照, 使用HuMab-小鼠合并的血清和HuMab-KLH作为阴性对照。使用Applied Biosystems8200细胞检测系统(8200CDS)扫描样品, 并使用‘计数 \times 荧光(counts \times fluorescence)’作为读出。当计数高于50并且计数 \times 荧光比阴性对照至少3倍更高时, 样品被规定为阳性的。

[0376] 实施例8-HuMab杂交瘤产生

[0377] 处死具有足够抗原特异性滴度产生(如上定义)的HuMab小鼠, 收集脾脏和腹主动脉和腔静脉侧翼的淋巴结。基本上根据制造商的说明书使用CEEF50电融合系统(Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, USA)通过电融合进行脾细胞和淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤细胞系的融合。接下来, 使用ClonePix系统(Genetix, Hampshire, UK)对初始孔进行亚克隆。为此, 将特定的初始孔杂交瘤接种于由40% CloneMedia(Genetix, Hampshire, UK)和60% HyQ2 \times 完全培养基(Hyclone, Waltham, USA)制备的半固体培养基中。如实施例7中所述在抗原特异性结合测定中重新测试亚克隆, 使用Octet(Fortebio, Menlo Park, USA)测定IgG水平以选择每个初始孔最特异并且最佳的生产克隆用于进一步的扩增。基于标准方案进行产生的HuMab杂交瘤的进一步扩增和培养(例如, 如在Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M.和Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, Inc., 2006中所述)。将通过这个过程产生的克隆命名为PC1014。

[0378] 实施例9-纯化的抗体的质谱

[0379] 使用包含蛋白G树脂的PhyTip柱(PhyNexus Inc., San Jose, USA)在Sciclone ALH3000工作站(Caliper Lifesciences, Hopkinton, USA)上纯化来自6孔或Hyperflask阶

段的0.8mL包含抗体的上清液的小份。根据制造商的说明书使用PhyTip柱,尽管用结合缓冲液PBS (B.Braun, Medical B.V., Oss, Netherlands) 和洗脱缓冲液0.1M甘氨酸-HCl pH2.7 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Germany) 替代缓冲液。纯化后,用2M Tris-HCl pH9.0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Netherlands) 中和样品。或者,在一些情况下,使用MabSelect SuRe纯化更大体积的培养上清液。

[0380] 纯化后,将样品置于384-孔板 (Waters, 100μl方孔板, part# 186002631) 中。用N-糖苷酶F (Roche目录号11365177001在37℃将样品去糖基化过夜。加入DTT (15mg/mL) (1μL/孔) 并在37℃孵育1h。样品 (5 或6μL) 在Acquity UPLC™ (Waters, Milford, USA) 上用BEH300C18, 1.7μm, 2.1×50mm柱在60℃进行脱盐。使用都包含0.1%甲酸 (Fluka, 目录号56302, Buchs, Germany) 的MQ水和LC-MS级乙腈 (Biosolve, 目录号01204101, Valkenswaard, The Netherlands) 分别作为洗脱液A和B。在以阳离子模式操作的micrOTOF™质谱仪 (Bruker, Bremen, Germany) 上在线记录飞行时间电喷雾离子化质谱。分析之前,用ES调节混合物 (ES tuning mix) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) 校准 900-3000m/z刻度。使用搜索5-80kDa之间的分子量的最大熵值算法 (Maximal Entropy algorithm), 以DataAnalysis™软件v.3.4 (Bruker) 对质谱去卷积。

[0381] 去卷积之后,将获得的全部样品的重链和轻链质量进行比较,以发现重复的抗体。这有时是由于额外轻链的存在,但是在重链的比较中,也考虑可能存在C-末端赖氨酸变体。这导致了一系列独特的抗体,即,特定重链和轻链的独特组合。在发现重复抗体的情况下,基于来自其他测试的结果选择独特的抗体。

[0382] 实施例10-HER2抗体可变结构域的序列分析并克隆于表达载体中

[0383] 从 5×10^6 个杂交瘤细胞制备HER2HuMabs的总RNA,根据制造商的说明书使用SMART RACE cDNA扩增试剂盒 (Clontech) 从100ng总RNA制备5'-RACE-互补DNA (cDNA)。通过PCR扩增VH和VL编码区并通过不依赖于连接的克隆 (Aslanidis, C. 和 P.J. de Jong, Nucleic Acids Res 1990; 18 (20): 6069-74) 将所述VH和VL编码区直接同框地 (in frame) 克隆进pGlf和pKappa表达载体。将通过这个过程产生的克隆命名为 TH1014。对于每种抗体,对16个VL克隆和8个VH克隆进行测序。选择预测的重链和轻链质量与相同抗体的杂交瘤来源的材料的质量 (如通过质谱法所测定的) 一致的克隆用于进一步研究和表达。

[0384] 获得的序列如图1和2以及序列表中所示。下文也更详细地描述了选择的序列。根据IMGT定义CDR序列 (Lefranc MP. 等, Nucleic Acids Research, 27, 209-212, 1999 和 Brochet X. Nucl. Acids Res. 36, W503-508 (2008))。表1、表2和表3给出了抗体序列信息或种系序列的概述,而表4显示了共有序列。

[0385] 表1: HuMabs005, 006, 059, 060, 106, 和111的重链可变区 (VH)、轻链可变区 (VL) 和 CDR序列。

[0386]

SEQ ID No: 1	VH 005	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKASGYSFHFYWIGW VRQMPGKGLEWMGSIYPGDS DTRYRPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWTS LKASDTAIYYCARQRGDYYYFYGM DVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 2	VH 005, CDR1	GYSFHFYW
SEQ ID No: 3	VH 005, CDR2	IYPGDS DT
SEQ ID No: 4	VH 005, CDR3	ARQRGDYYYFYGMDV
SEQ ID No: 5	VL 005	EIVLTQSPGTL SLSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWY QQKPGQVPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-LTFGGG TKVEIK
SEQ ID No: 6	VL 005, CDR1	QSVSSSY
	VL 005, CDR2	GAS
SEQ ID No: 7	VL 005, CDR3	QQYGSSLT
SEQ ID No: 8	VH 006	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYALI WV RQAPGKGLEWVSIIRGGAGSTYYADSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWG PLFDYW GQGT LVTVSS
SEQ ID No: 9	VH 006, CDR1	GFTFSNYA
SEQ ID No: 10	VH 006, CDR2	IRGGAGST
SEQ ID No: 11	VH 006, CDR3	AKARIWG PLFDY
SEQ ID No: 12	VL 006	EIVLTQSPATL SLSPGERATL SCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRL LIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQQR SNWPPLTFGGG TKVEIK

[0387]

SEQ ID No: 13	VL 006, CDR1	QSVSSY
	VL 006, CDR2	DAS
SEQ ID No: 14	VL 006, CDR3	QQRSNWPPLT
SEQ ID No: 15	VH 059	QVQLVQSGAEVKKPGASVRVPCKASGYTFTRYGISW VRQAPGQGLEWMGWISAYNGKTYAQKLQGRVTMT TDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELY FDYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 16	VH 059, CDR1	GYTFTRYG
SEQ ID No: 17	VH 059, CDR2	ISAYNGKT
SEQ ID No: 18	VH 059, CDR3	ARSPLLWFEELYFDY
SEQ ID No: 19	VL 059	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGTSLFTFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 20	VL 059, CDR1	QSVSSY
	VL 059, CDR2	GAS
SEQ ID No: 21	VL 059, CDR3	QQYGTSLFT
SEQ ID No: 22	VH 060	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFTSYWIGW VRQMPGKGLEWMGSIYPGDSYTRNSPSFQGQVTISA DKSIATAYLQWNSLKASDTAMYYCARHAGDFYFDG LDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 23	VH 060, CDR1	GYRFTTSYW
SEQ ID No: 24	VH 060, CDR2	IYPGDSYT
SEQ ID No: 25	VH 060, CDR3	ARHAGDFYFDGLDV
SEQ ID No: 26	VL 060	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPPITFGQGTREIK
SEQ ID No: 27	VL 060, CDR1	QSVSSY
	VL 060, CDR2	GAS
SEQ ID No: 28	VL 060, CDR3	QQYGSSPPIT
SEQ ID No: 29	VH 106	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTRYWIGW VRQMPGKGLEWMGIIYPGDSYTRYSPSFQGQVTISA DKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARLTGDRGFDYY SGMDVWGQGTTVTVSS
SEQ ID No: 30	VH 106, CDR1	GYSFTRYW
SEQ ID No: 31	VH 106, CDR2	IYPGDSYT
SEQ ID No: 32	VH 106, CDR3	ARLTGDRGFDYSGMDV
SEQ ID No: 33	VL 106	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQQYGSS-FTFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 34	VL 106, CDR1	QSVSSY
	VL 106, CDR2	GAS
SEQ ID No: 35	VL 106, CDR3	QQYGSSFT

[0388]

SEQ ID No: 36	VH 111	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYGISW VRQAPGPGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITAD KSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDQEYSSNWYYW GQGTLLTVSS
SEQ ID No: 37	VH 111, CDR1	GGTFSSYG
SEQ ID No: 38	VH 111, CDR2	IIPILGIA
SEQ ID No: 39	VH 111, CDR3	ARDQEYSSNWYY
SEQ ID No: 40	VL 111	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTL TISRLEPEDFAVYYCQLYGSSPTFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 41	VL 111, CDR1	QSVRSSY
	VL 111, CDR2	GAS
SEQ ID No: 42	VL 111, CDR3	QLYGSSPT

[0389] 表2:HuMabs005,006,059,060,106,和111的小鼠来源和重链和 轻链序列同源物

[0390]

HuMab:	小鼠:	品系:	种系 VH:	种系 VL:
005	350611	HCo12- BalbC	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
006	350611	HCo12- BalbC	IgHV3-23-1	IgKV3-11-01
059	350654	HCo17	IgHV1-18-1	IgKV3-20-01
060	350654	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
106	350660	HCo17	IgHV5-51-1	IgKV3-20-01
111	350660	HCo17	IgHV1-69-4	IgKV3-20-01

[0391] 表3:HuMabs041,150,067,072,163,093,和044的重链可变区 (VH),轻链可变区 (VL) 序列.对于VH和VL序列,各自的CDRs分别 对应于图1和2中下划线表示的那些序列。

[0392]

SEQ ID No: 43	VH 041	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARQKGDFYFFGLDVWGQGTAITVSS
SEQ ID No: 44	VL 041	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGKVEIK
SEQ ID No: 45	VH 150	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGSIYPGDSHTRYRPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARQAGDYYYNMGMDVWGQGTITVTVSS

[0393]

SEQ ID No: 46	VL 150	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLTWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 47	VH 067	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISVDKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQKGDYYYHYGLDVWGQGTTTVTVSS
SEQ ID No: 48	VL 067	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSPRLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 49	VH 072	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQKGDYYYFNGLDVWGQGTTTVTVSS
SEQ ID No: 50	VL 072	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSPRLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 51	VH 163	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFISYWIGWVRQMPGKGL EWMGRIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISVDKSISTAYLQWSSLKASD TAMYYCARQRGDYYYFNGLDVWGQGTTTVTVSS
SEQ ID No: 52	VL 163	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 53	VH 093	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGL EWMGRIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISADKSITTAYLQWSSLRASDT AMYYCARQRGDYYYFFGLDIWGQGTTTVTVSL
SEQ ID No: 54	VL 093	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 55	VH 044	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYRFSSYWIGWVRQMPGKGL EWMGSIFPGDS DTRYSPSFQGGVTISADKSITTAYLQWSSLKASDT AMYYCARQAGDYYYNGMDVWGQGTTTVTVSS
SEQ ID No: 56	VL 044	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYG SSLTFGGGTKVEIK

[0394] 表4:基于图1和2中所示的序列比对的共有CDRs。

[0395]

SEQ ID No: 57 005-060-106-041- 150-067-072-163- 093-044	IgHV5- 51-1	VH CDR1	GYX1FX2X3YW	其中 X1=S 或 R; X2=S、 T、H,或 I; 和 X3=S、 R,或 F; 优选地, 其中 X2=H 或 T
SEQ ID No: 58 005-060-106-041- 150-067-072-163- 093-044	IgHV5- 51-1	VH CDR2	IX1PGDSX2T	其中 X1=Y或F; X2=D、 Y、或H 优选地, 其中 X2=D或Y

[0396]

SEQ ID No: 59 005-060-106-041- 150-067-072-163- 093-044	IgHV5- 51-1	VH CDR3	ARX1X2X3X4X5X 6X7X8YX9X10GX 11DX12	其中X1=Q、H、或L； X2= R、A、T、或K； X3=G；X4=D；X5=R或 无；X6=G或无；X7=Y 或F；X8=Y或D；X9=Y、 F、或H；X10=Y、D、S、 F、或N；X11=M或L； 和X12=V或I； 优选地，其中X1=Q、 X2= R或A；X5=X6=无； X7=Y 或 F ； X8=Y ； X9=F ； X10=Y ； 和 X12=V
SEQ ID No: 60 006	IgHV3- 23-1	VH CDR1	GFTFSXYA	其中X=N或S，优选 N
SEQ ID No: 61 006	IgHV3- 23-1	VH CDR2	IX1GX2X3GST	其中X1=R或S；X2=G 或S；和X3=A或G，优 选地其中X1=R；X2=G； 和X3=A
SEQ ID No: 62 006	IgHV3- 23-1	VH CDR3	AKRIWGPXFDY	其中X=L或Y，优选 L
SEQ ID No: 63 059	IgHV1- 18-1	VH CDR1	GYTFTXYG	其中X=R或S，优选 R
SEQ ID No: 64 059	IgHV1- 18-1	VH CDR2	ISAYNGXT	其中X=K或N，优选 K
SEQ ID No: 65 059	IgHV1- 18-1	VH CDR3	ARSPLLWFEELYF DY	
SEQ ID No: 66 111	IgHV1- 69-4	VH CDR1	GGTFSSYX	其中X=G或A，优选地G
SEQ ID No: 38 111	IgHV1- 69-4	VH CDR2	IIPILGIA	
SEQ ID No: 67 111	IgHV1- 69-4	VH CDR3	ARDQEYSSX1X2 X3	其中X1=N或Y；X2=W 或F；和X3=Y或D，优 选地其中X1=N； X2=W；和X3=Y

[0397]

SEQ ID No: 68 005-059-060-106- 111-041-150-067- 072-163-093-044	IgKV3- 20-01	VL CDR1	QSVX1SX2Y	其中X1=S或R 和X2=S 或T
005-059-060-106- 111-041-150-067- 072-163-093-044	IgKV3- 20-01	VL CDR2	GAS	
SEQ ID No: 69 005-059-060-106- 111-041-150-067- 072-163-093-044	IgKV3- 20-01	VL CDR3	QX1YGX2SX3X4 X5T	其中X1=Q或L; X2=S 或T; X3=P或无; X4=P、 L、R、或无; 和X5=L、 F、I、或无; 优选地, 其中X4=P、L、 或无
SEQ ID No: 13 006	IgKV3- 11-01	VL CDR1	QSVSSY	
006	IgKV3- 11-01	VL CDR2	DAS	
SEQ ID No: 14 006	IgKV3- 11-01	VL CDR3	QQRSNWPPLT	

[0398] 实施例11-抗体的纯化

[0399] 将培养上清液通过0.2 μ m盲端过滤器(dead-end filter)过滤,上样至 5ml MabSelect SuRe柱(GE Health Care)上,用0.1M柠檬酸钠-NaOH, pH3洗脱。立即用2M Tris-HCl, pH9中和洗脱物,并过夜透析至12.6mM NaH₂PO₄, 140mM NaCl, pH7.4 (B. Braun)。或者,纯化之后,将洗脱物 上样至HiPrep脱盐柱,将抗体交换进12.6mM NaH₂PO₄, 140mM NaCl, pH7.4 (B. Braun) 缓冲液中。缓冲液透析或交换之后,样品通过0.2 μ m盲 端过滤器无菌过滤。通过SDS-PAGE确定纯度,并通过比浊法和280nm 吸光度测量浓度。将纯化的抗体保存在4℃。进行质谱法来鉴别由如实施例9所述杂交瘤表达的抗体重链和轻链的分子量。

[0400] 实施例12-通过FACS分析测定HER2克隆与表达膜结合的 HER2的肿瘤细胞的结合

[0401] 使用流式细胞仪(FACS Canto II, BD Biosciences)测试HER2抗体与 AU565细胞(购于ATCC, CRL-2351)和A431细胞(购于ATCC, CRL-1555) 的结合。Qifi分析(Dako, Glostrup, Denmark)表明, AU565细胞表达平均 1,000,000拷贝的HER2蛋白/细胞,而A431细胞表达平均15,000拷贝/ 细胞。使用藻红蛋白(PE)缀合的山羊-抗-人IgG抗体(Jackson)检测HER2 抗体的结合。使用临床级Herceptin[®] (Roche)作为阳性对照,使用同种型 对照抗体作为阴性对照。使用GraphPad Prism V4.03软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)通过非线性回归(具有可变 斜率的S型剂量-应答)测定EC₅₀值。

[0402] 如图3中所示,所有测试的HER2抗体都以剂量依赖的方式结合 AU565和A431细胞两者上表达的HER2。结合的EC₅₀值对于AU565 细胞在0.304-2.678 μ g/mL之间变化,对于A431细胞在0.106-1.982 μ g/ mL之间变化。尤其在A431细胞上,在测试的抗体之间观察到EC₅₀值的较大差异。在不同抗体之间也观察到最大结合水平的一些差异。具体 而言,与其他HER2

抗体相比,抗体005和006表现出更高的在A431 上的最大结合水平。

[0403] 实施例13-通过FACS分析测定HER2抗体与猕猴上皮细胞上表达的膜结合的HER2的结合

[0404] 为了测定与猕猴HER2的交叉反应性,使用流式细胞仪(FACS Canto II,BD Biosciences)测试HER2抗体与HER2-阳性猕猴上皮细胞(4MBr-5; 购于ATCC)的结合。使用藻红蛋白缀合的山羊-抗-人IgG抗体(Jackson) 作为二级缀合物。使用同种型对照抗体作为阴性对照抗体。

[0405] 如图4中所示,所有测试的HER2抗体都与猕猴HER2交叉反应。在两个测试的浓度(1 μ g/mL和10 μ g/mL),HER2抗体都能够特异性结合 猕猴HER2。没有观察到与同种型对照抗体的任何结合。

[0406] 实施例14-在夹心-ELISA中测定HER2抗体竞争与可溶性 Her2ECDHis的结合

[0407] 以下列方式确定测试的HER2抗体的最佳包被浓度和最佳 Her2ECDHis浓度:以在PBS中系列稀释的HER2HuMabs (2倍稀释中 0.125–8 μ g/mL) 在4 $^{\circ}$ C将ELISA孔包被过夜。接下来,用PBST(补充 0.05%吐温-20[Sigma-Aldrich,Zwijndrecht,The Netherlands]的PBS)洗涤 ELISA孔,用PBSTC(补充2% [v/v] 鸡血清[Gibco,Paisley,Scotland]的PBS) 在室温(RT) 封闭1小时。然后用PBST洗涤ELISA孔,并用PBSTC中 系列稀释的Her2ECDHis (2倍稀释中0.25–2 μ g/mL) 在RT孵育1小时。用PBST洗去未结合的Her2ECDHis,用0.25 μ g/mL生物素化的兔-抗 -6xhis-biot (Abcam,Cambridge,UK) 在RT下孵育结合的Her2ECDHis1小 时。其后,用PBST洗涤该板,用PBST中稀释的0.1 μ g/mL链霉亲和素 -聚-HRP (Sanquin,Amsterdam,The Netherlands) 孵育1小时。洗涤后,通 过避光在RT(室温) 与2,2'-连氮基-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸(ABTS:在 50ml ABTS缓冲液中稀释的ABTS片剂(Roche Diagnostics,Almere, The Netherlands)) 孵育15分钟而使反应可视化。通过加入等体积的草酸 (Sigma-Aldrich,Zwijndrecht,The Netherlands) 终止显色。在微量滴定板读 数器(Biotek Instruments,Winooski,USA) 上测定405nm处的荧光。测定 导致每种抗体的次最佳结合的抗体浓度并用于以下的交叉阻断实验。

[0408] 以如上所述测定的次最佳剂量将每种HER2抗体包被至ELISA孔。ELISA孔封闭后,在过量的第二(竞争剂)HER2抗体存在或不存在的情况 下,以预定浓度的1 μ g/mL生物素化的Her2ECDHis孵育孔。然后如上 所述进行ELISA。将Her2ECDHis与包被的抗体的残余结合表示为相对 于不存在竞争剂抗体的情况下观察的结合的百分比。然后,每个抗体结 合的百分比竞争确定为100减去抑制百分比。75%竞争代表完全的阻断, 25–74%竞争代表部分阻断,0–24%竞争没有阻断。

[0409] 如表5中所示,所有HER2抗体都竞争,至少部分地,它们自身与 Her2ECDHis的结合。曲妥珠单抗(临床级Herceptin[®]) 和帕妥珠单抗 (TH1014-pert,HEK-293细胞中瞬时产生的) 只能竞争它们自身,而不能 竞争任何其他列出的HER2抗体。C1和F5(都是在HEK-293细胞中瞬时 产生的) 彼此竞争与Her2ECDHis的结合,但是不与其他HER2抗体竞争。

[0410] 抗体005,006,059,060,106和111都彼此竞争与Her2ECDHis 的结合,但不交叉阻断曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、C1或F5。当006是 竞争抗体时,克隆005,059,060和106仅阻断006。在006被固定化 的反向反应中,没有发现阻断005,059,060或106。这可能是由于克 隆006相比于005,059,060,106和111的更高的表观亲和力(图3A 和3B中所示) 的结果。可以通

过亲合力效应和包含两种非阻断抗体的抗体-Her2ECDHis复合物的形成解释高于100%的值。

[0411] 表5:HER2抗体对于与Her2ECDHis的结合的竞争和阻断

固定化的mAb ↓	竞争性mAb: →									
	帕妥珠单抗	Pert	C1	F5	106	111	005	006	059	060
帕妥珠单抗	6	100	103	99	114	166	137	110	120	119
TH1014-pert	104	9	106	125	115	145	151	125	132	118
TH1014-C1	89	85	65	58	84	86	98	99	89	93
TH1014-F5	197	178	70	21	129	183	178	192	165	185
PC1014-106	323	275	471	495	26	21	25	25	25	23
PC1014-111	110	102	122	119	75	14	51	10	65	36
PC1014-005	126	115	157	227	54	32	18	15	22	12
PC1014-006	163	136	136	153	127	47	148	20	129	125
PC1014-059	117	107	78	128	23	12	13	11	12	11
PC1014-060	106	99	108	126	37	35	30	6	14	19
交叉阻断组	1	2	3	3	4	4	4	4	4	4

75 - 100% 竞争

25 - 74% 竞争

0 - 24% 竞争

[0413] 显示的值是两次独立的实验中相对于在竞争抗体不存在的情况下观察到的结合的平均百分比抑制。进行一次用HEK生产的C1和F5 (TH1014-C1和TH1014-F5) 的竞争实验。还检测了两次曲妥珠单抗 (临床级Herceptin[®]) 和HEK产生的帕妥珠单抗 (TH1014-pert)。

[0414] 实施例15-抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC)

[0415] 收获SK-BR-3细胞 (购于ATCC HTB-30) (5×10^6 细胞), 洗涤 (在PBS 中洗涤2次, 1500rpm, 5min), 并收集在补充10%加强型小牛血清 (CCS) (HyClone, Logan, UT, USA) 的1ml RPMI1640培养基中, 其中添加 $200 \mu\text{Ci}^{51}\text{Cr}$ (铬-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, The Netherlands)。将混合物在振荡水浴中37℃孵育1.5小时。洗涤细胞 (PBS中洗涤2次, 1500rpm, 5min) 后, 将细胞重悬于补充10%CCS的 RPMI1640培养基中, 通过台盼蓝排斥计数并稀释至 1×10^5 细胞/mL 的浓度。

[0416] 同时, 根据制造商的说明书使用标准Ficoll密度离心 (淋巴细胞分离介质; Lonza, Verviers, France) 从新鲜棕黄层 (buffy coat) (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) 分离外周血单核细胞 (PBMCs)。将细胞重悬在补充10%CCS的RPMI1640培养基中后, 通过台盼蓝排斥计数细胞, 并浓缩至 1×10^7 细胞/mL。

[0417] 对于ADCC实验, $50 \mu\text{L}^{51}\text{Cr}$ -标记的SK-BR-3细胞 (5,000细胞) 与 $15 \mu\text{g/mL}$ HER2抗体 (IgG1, κ) 在96-孔微量滴定板中补充10%CCS的100 μL RPMI培养基的总体积中预先孵育。在RT15min后, 加入50 μL PBMCs (500,000细胞), 产生100:1的效应物与目标的比例。通过将50 $\mu\text{L}^{51}\text{Cr}$ -标记的SK-BR-3细胞 (5,000细胞) 与100 μL 5% Triton-X100孵育而测定细胞裂解的最大数量。通过没有任何抗体或效应物细胞的情况下在150 μL 培养基中孵育

5.000⁵¹Cr-标记的SK-BR-3细胞而测定自发裂解 的量。通过在没有抗体的情况下将5.000SK-BR-3细胞与500.000PBMCs 孵育而测定抗体非依赖性细胞裂解的水平。随后,在37℃,5%CO₂孵 育细胞4hr。为了确定细胞裂解的量,将细胞离心(1200rpm,3min)并将 75μL上清液转移至细微管(micronic tubes),其后用γ计数器计数释放的⁵¹Cr。如下使用测得的每分钟计数(cpm)来计算抗体介导的裂解的百分比:

[0418] $(\text{cpm样品}-\text{cpm抗体非依赖性裂解})/(\text{cpm最大裂解}-\text{cpm自发裂解})\times 100\%$

[0419] 如图5中所示,所有的HER2抗体通过ADCC诱导SK-BR-3细胞的有效裂解。不同抗体的平均百分比裂解在15%和28%之间变化,除了 曲妥珠单抗(Herceptin[®]),其显示平均41%的裂解。不被理论所束缚,曲妥珠单抗的更高的百分比裂解的原因可能是,与其他HEK-产生的 HER2抗体上~4%非核心岩藻糖基化相比,由其CHO生产导致的增加 的非核心岩藻糖基化级别(12.4%),或者是通过识别诱导HER2受体-抗 体复合物的更少的内化的表位。

[0420] 实施例16-AU565细胞的配体非依赖性增殖的抑制

[0421] 测试HER2抗体体外抑制AU565细胞的增殖的能力。由于AU565 细胞上的高HER2表达水平(如实施例12中所述的~1.000.000拷贝/细 胞),HER2在这些细胞中具有组成型活性,因此不依赖于配体诱导的异 源二聚化。

[0422] 在96孔组织培养板(Greiner bio-one,Frickenhausen,Germany)中,在 10μg/mL HER2抗体存在的情况下在无血清的细胞培养基中每孔接种 9.000AU565细胞。作为对照,在没有抗体的情况下在无血清的培养基 中接种细胞。3天后,根据制造商的说明书以阿尔玛蓝(BioSource International, San Francisco, US)定量活细胞的量。以标准的阿尔玛蓝设置使用EnVision2101Multilabel reader (PerkinElmer, Turku, Finland)监 测荧光。将抗体处理的细胞的阿尔玛蓝信号绘制为相对于未处理的细胞 的百分比。应用Dunnett`s检验用于统计学分析。

[0423] 结果如图6中所示,表示HER2抗体处理后的AU565细胞相比于未 处理的细胞(设置为100%)的百分比增殖。Herceptin显然抑制AU565细 胞增殖,但这种影响没有统计学显著性。TH1014-F5显著增强AU565 细胞的增殖,表明这是激动性抗体,而其他测试的抗体(005, 060和帕 妥珠单抗)对AU565增殖都没有显著影响。对于曲妥珠单抗(Herceptin[®])和帕妥珠单抗,这与Juntilla等(Cancer Cell 2009;15(5):353-355)所述的 结果相一致。

[0424] 表6:HER2抗体处理后的AU565细胞相比于未处理的细胞(设置为 100%)的平均百分比增殖。

[0425]

抗体	%增殖
PC1014-005	103
PC1014-060	104
TH1014-F5	180
TH1014-pert	101
Herceptin	83
同种型对照	101

[0426] 实施例17-抗-κ-ETA' 测定

[0427] 为了研究HER2抗体对于抗体-药物缀合物方法的适用性,开发了使用 κ -定向的假单胞菌-外毒素A(抗- κ -ETA')的通用体外基于细胞的杀死测定法。该测定使用高亲和力的缀合于假单胞菌-外毒素A的截短形式的抗- κ 结构域抗体。内化后,抗- κ -ETA'结构域抗体经历蛋白水解和二硫键还原,使催化结构域与结合结构域分离。催化结构域经由KDEL保留基序从高尔基体运送至内质网,随后转位至胞质溶胶,其中它抑制了蛋白合成并诱导细胞凋亡(Kreitman RJ,BioDrugs2009;23(1):1-13)。在该测定中,为了鉴别能够内化并且通过毒素杀死的HER2受体,在与HER2-阳性细胞孵育之前将HER2抗体与抗- κ -ETA'预先缀合。如上所述,AU565细胞表达大量的Her2分子/细胞($\sim 10^6$ 分子/细胞),而A431细胞表达少量的Her2分子/细胞($\sim 30,000$ 分子/细胞)。

[0428] 首先,对于每种细胞系测定抗- κ -ETA'的最佳浓度,即,不会导致诱导非特异性的细胞死亡的最大耐受剂量。在96孔组织培养板(Greiner bio-one)中正常细胞培养基中接种AU565细胞(7500细胞/孔)和A431细胞(2500细胞/孔)并允许粘附至少4小时。接下来,细胞与正常的细胞培养基中100,10,1,0.1,0.01,0.001和0 μ g/mL抗- κ -ETA'稀释液孵育。3天后,根据制造商的说明书以阿尔玛蓝(BioSource International,San Francisco,US)定量活细胞的量。以标准的阿尔玛蓝设置使用EnVision 2101Multilabel reader(PerkinElmer,Turku,Finland)监测荧光。使用不能自身杀死细胞的最高浓度的抗- κ -ETA'用于下列实验(对于AU565为0.5 μ g/mL,对于A431为1 μ g/mL)。

[0429] 接下来,对于不同的HER2抗体测试抗体介导的内化和通过毒素的杀死。如上所述接种细胞。将系列稀释的HER2抗体与预定浓度的抗- κ -ETA'预先孵育30分钟,然后将它们加入细胞。孵育3天后,如上所述定量活细胞的量。将抗- κ -ETA'缀合的抗体处理的细胞的阿尔玛蓝信号绘制为相比于仅用抗体处理的细胞的百分比。使用23.4 μ g/mL星形孢菌素作为细胞杀死的阳性对照。使用同种型对照抗体作为阴性对照。

[0430] 如图7A和图7中所示,所有抗- κ -ETA'缀合的HER2抗体能够以剂量依赖的方式杀死AU565细胞。抗- κ -ETA'-缀合的Herceptin仅杀死32%的AU565细胞,而所有其他缀合的抗体诱导50-72%细胞杀死。此外,抗体005和111表现出与曲妥珠单抗(78.49ng/mL)相比3倍以上改进的EC₅₀值(分别为15.13和24.20ng/mL)。除了曲妥珠单抗,非缀合的HER2抗体在测试的浓度没有诱导AU565细胞的杀死。

[0431] 表7:抗- κ -ETA'-缀合的HER2抗体对AU565细胞的杀死。显示的数据是一次代表性实验中测定的以抗- κ -ETA'缀合的HER2抗体处理的AU565细胞的EC₅₀值和最大百分比细胞杀死。将星形孢菌素诱导的细胞杀死设置为100%,将未处理的细胞的MFI设置为0%。“Ndet”意味着未检测到。

[0432]

抗体	%杀死的细胞	EC ₅₀ ng/mL
PC1014-111	72.0	24.2
PC1014-005	69.7	15.13
PC1014-059	67.0	67.65
PC1014-060	64.3	79.38
PC1014-106	59.1	107.9
PC1014-006	50.4	45.14
曲妥珠单抗	31.9	78.49

同种型对照	Ndet	Ndet
-------	------	------

[0433] 如图7B和表8中所示,当缀合于抗- κ -ETA'时,抗体005和060能够诱导A431细胞的有效杀死($\geq 85\%$),而抗- κ -ETA'-缀合的Herceptin和同种型对照抗体没有诱导A431细胞的杀死。此外,抗体005和111已在低抗体浓度(10ng/mL)表现出杀死A431细胞,EC₅₀值为 ~ 10 ng/mL。用未缀合的HER2抗体没有观察到任何细胞杀死。

[0434] 表8:抗- κ -ETA'-缀合的HER2抗体对A431细胞的杀死。显示的数据是一次代表性实验中测定的以抗- κ -ETA'-缀合的HER2抗体处理的A431细胞的EC₅₀值和最大百分比细胞杀死。将星形孢菌素诱导的细胞杀死设置为100%,将未处理的细胞的MFI设置为0%。

抗体	%杀死的细胞	EC ₅₀ ng/mL
PC1014-005	88.5	~ 10.07
PC1014-060	85.0	~ 10.03
曲妥珠单抗	NDet	NDet
同种型对照	NDet	NDet

[0436] 实施例18-用基于FMAT的fab-CypHer5E分析测定HER2抗体的内化

[0437] 为了研究前面实施例中所述的 κ -毒素-ETA'测定中观察的AU565细胞的增强的杀死是否与HER2抗体的增强的内化相关,进行基于fab-CypHer5E的内化测定。CypHer5E是pH敏感性染料,在碱性pH(包外:培养基)无荧光,在酸性pH值(细胞内:溶酶体)有荧光,酸解离常数(pKa)为7.3。

[0438] 在384-孔组织培养板(Greiner bio-one)中在补充240ng/mL fab-CypHer5E(根据制造商的说明书进行山羊-fab-抗-人IgG[Jackson]与CypHer5E[GE Healthcare, Eindhoven, The Netherlands]的内部制备的偶联)的正常的细胞培养基中以3000细胞/孔的密度接种AU565细胞。

[0439] 接下来,在正常的细胞培养基中系列稀释HER2抗体,加入细胞,并置于室温9小时。使用8200FMAT(Applied Biosystems, Nieuwerkerk A/D IJssel, The Netherlands)测定胞内CypHer5E的平均荧光强度(MFI),并使用'计数x荧光'作为读出。使用同种型对照抗体作为阴性对照抗体。使用GraphPad Prism V4.03软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)通过非线性回归(具有可变斜率的S型剂量-应答)测定EC₅₀值和最大MFI。

[0440] 结果显示于表9中,描述了在用AU565细胞的CypHer5E内化测定中对于所有测试的HER2抗体的EC₅₀值和最高的MFI。最高的MFI值反映多少HER2抗体在结合后内化。与曲妥珠单抗(35.000)和TH1014-pert(35.323)相比,所有人HER2抗体显示更高的最高的MFI值(130.529--57.428),表明这些抗体诱导了增强的受体内化。TH1014-F5的增强的内化可能是由于其激动活性以及HER2-HER2二聚化的诱导而导致的(见实施例16)。

[0441] 表9:HER2抗体的基于Cypher-5的内化的测定。显示的数据是使用以fab-CypHer5E-标记的HER2抗体处理的AU565细胞的两次实验中一次代表性实验的MFI和EC₅₀值。

[0442]

Cypher 5		
抗体	EC ₅₀ ng/ mL	最高的MFI
PC1014-006	23.08	130829
PC1014-005	21.37	95117
PC1014-111	35.22	81680
PC1014-059	14.77	77123

[0443]

PC1014-060	36.16	68184
PC1014-106	68.60	57428
TH1014-F5	22.65	113116
TH1014-pert	~1041	35323
曲妥珠单抗	21.70	35000

[0444] 实施例19-HER2下调

[0445] 为了研究本发明的抗体诱导的增强的HER2内化是否也导致增加的受体下调,选择005作为代表性抗体并测试其诱导HER2的下调的能力。为此,AU565细胞与HER2抗体孵育3天,并分析HER2的存在。将AU565细胞接种于24孔组织培养板(100,000细胞/孔)中的正常细胞培养基中,并在10 μ g/mL HER2抗体存在的情况下在37 $^{\circ}$ C培养3天。用PBS洗涤后,通过在室温下用25 μ L Surefire裂解缓冲液(Perkin Elmer,Turku, Finland)孵育30min而裂解细胞。根据制造商的方案使用二喹啉甲酸(BCA)蛋白测定试剂(Pierce)定量总蛋白水平。使用HER2特异性夹心ELISA分析裂解物中的HER2蛋白水平。使用兔-抗-人HER2胞内结构域抗体(Cell Signaling)来捕获HER2,使用生物素化的山羊-抗-人HER2多克隆抗体(R&D)以及随后的链霉亲和素-聚-HRP来检测结合的HER2。使用2,2'-连氮基-双3-乙基苯并噻唑-6-磺酸(ABTS;在50ml ABTS缓冲液中稀释ABTS片剂[Roche Diagnostics,Almere,The Netherlands])使反应可视化并用草酸(Sigma-Aldrich,Zwijndrecht,The Netherlands)终止。在微量滴定板读数器(Biotek Instruments,Winooski,USA)上测定405nm处的荧光,HER2的量表示为相对于未处理的细胞的百分比。

[0446] 结果如下面的图8和表10中所示,其显示了表示为与未处理的细胞相比的百分比的HER2的量。图8和表10中的结果表明,抗体005诱导约30%的HER2下调,而Herceptin诱导约20%的HER2下调。这与抗体005观察到的增强的内化相一致。

[0447] 表10:表示为与未处理的细胞相比的百分比HER2的抗体诱导的HER2的下调。

[0448]

抗体	与未处理的细胞相比的HER2的%
Herceptin	80
IgG1-1014-005	70
同种型对照	108

[0449] 实施例20-通过共聚焦显微镜分析HER2抗体与溶酶体标记LAMP1的共定位

[0450] 实施例19中所述的HER2下调和基于CypHer-5E的内化测定表明,本发明的HER2抗体更有效地内化并靶向至溶酶体。为了验证这些发现,应用共聚焦显微镜技术。使AU565细胞在玻璃盖玻片(厚度为1.5微米,Thermo Fisher Scientific,Braunschweig,Germany)上的标准组织培养基中在37 $^{\circ}$ C生长3天。将细胞与50 μ g/mL亮抑酶肽(Sigma)预先孵育1小

时以阻断溶酶体活性,其后加入10 μ g/mL HER2抗体。将细胞在37 $^{\circ}$ C孵育额外的3或18小时。此后用PBS洗涤它们,用4%甲醛(Klinipath)在RT(室温)孵育30分钟。用封闭缓冲液(补充0.1%皂苷[Roche]和2%BSA[Roche]的PBS)洗涤载玻片,用包含20mM NH₄Cl的封闭缓冲液孵育20分钟以淬灭甲醛。用封闭缓冲液再次洗涤载玻片,与小鼠-抗-人CD107a(LAMP1)(BD Pharmingen)在RT孵育45分钟以鉴别溶酶体。用封闭缓冲液洗涤之后,用二级抗体;山羊-抗-小鼠IgG-Cy5(Jackson)和山羊-抗-人IgG-FITC(Jackson)的鸡尾酒在RT孵育玻片30分钟。用封闭缓冲液再次洗涤玻片,用20 μ L封固介质(将6克甘油[Sigma]和2.4克Mowiol4-88[Omnilabo]溶解于6mL蒸馏水中,其中加入12mL0.2M Tris[Sigma]pH8.5,随后在50-60 $^{\circ}$ C孵育10分钟。将封固介质等分并存储在-20 $^{\circ}$ C)在显微镜玻片上封固。用配备63x1.32-0.6浸油物镜和LAS-AF软件的Leica SPE-II激光共聚焦显微镜(Leica Microsystems)对玻片成像。为了允许定量重叠的像素强度,调整激光强度、增益和偏移量以便在没有像素饱和的情况下使抗体可视化。对于所有共聚焦玻片使这些设置保持相同。

[0451] 使用MetaMorph[®]软件(版本Meta Series6.1,Molecular Devices Inc,Sunnyvale California,USA)对12位灰度TIFF图像分析共定位。将FITC和Cy5图像作为堆栈(stacks)导入,减去背景。对于所有FITC图像和所有Cy5图像使用相同的阈值设置(手动设定)。共定位表示为在重叠区域(ROI)中的FITC像素强度,其中ROI由所有Cy5阳性区域构成。为了比较用数种HER2抗体染色的不同的玻片,用Cy5的像素强度对图像进行归一化。使用山羊-抗-小鼠IgG-Cy5来染色溶酶体标记LAMP1(CD107a)。测试的各种HER2抗体间的LAMP1的像素强度不应该不同。

[0452] 对于FITC和Cy5的共定位的均一化的值=

[0453]
$$\frac{(\text{总的像素强度FITC} \times \text{百分比 FITC-Cy5 共定位}/100)}{\text{总的像素强度Cy5}}$$

[0454] 结果如下面的图9和表11中所示,其显示了对于各种HER2抗体的与Cy5重叠的FITC像素强度。对于每种抗体,从一个玻片分析三个不同的包含~1、3或>5个细胞的图像。在每个玻片内的不同图像之间观察到显著的差异。仍然,很明显,当与Herceptin和帕妥珠单抗相比时,抗体005表明与溶酶体标记LAMP1的增强的共定位。这些结果表明,一旦内化,HER2抗体005有效地向溶酶体区室分选,使得它对于抗体药物缀合物方法尤其有趣。

[0455] 表11:描述为任意单位的与Cy5重叠的平均FITC像素强度

[0456] 抗体	溶酶体中的FITC像素强度[任意单位]
TH1014-005	0.619
TH1014-pert	0.214
Herceptin	0.236

[0457] 实施例21-HER2胞外结构域改组,人至鸡

[0458] 为了进一步定义本发明的抗体识别的HER2结合区域,进行HER2胞外结构域改组实验(extracellular domain shuffle experiment)。为此,产生具有5个构建体的小基因合成文库,将人HER2的胞外结构域的结构域I、II、III或IV的序列交换至鸡HER2的对应序列(原鸡属原鸡同种型 B NCBI:NP_001038126.1):1)完整的人HER2(Uniprot P04626),以下命名为hu-HER2,2)具有鸡结构域I的hu-HER2(用对应的鸡Her2区域替换人Her2的氨基

酸(aa) 1-203), 以下命名为hu-HER2-ch (I), 3) 具有鸡结构域II的hu-HER2 (用对应的鸡Her2区域替换人Her2的氨基酸(aa) 204-330), 以下命名为hu-HER2-ch (II), 4) 具有鸡结构域III的hu-HER2 (用对应的鸡Her2区域替换人Her2的aa331-507), 以下命名为 hu-HER2-ch (III), 5) 具有鸡结构域IV的hu-HER2 (用对应的鸡Her2区域替换人Her2的aa508-651), 以下命名为hu-HER2-ch (IV)。人和鸡HER2 直向同源物(orthologs) 显示它们的胞外结构域中67%同源性, 其中结构域I中62%同源性, 结构域II中72%同源性, 结构域III中63%同源性 以及结构域IV中68%同源性。根据制造商的说明书, 使用Freestyle MAX 转染试剂 (Invitrogen) 将构建体瞬时转染进Freestyle™ CHO-S (Invitrogen) 细胞系, 培养转染的细胞20小时。通过流式细胞仪分析HER2抗体与 转染的细胞的结合: 收获转染的CHO-S细胞, 用FACS缓冲液洗涤, 并用10μg/mL HER2抗体孵育(在冰上30分钟)。使用藻红蛋白(PE)-缀合的山羊-抗-人IgG抗体(Jackson) 检测HER2抗体的结合。为了检查不同批次之间的表达是否相同, 固定细胞并根据制造商的说明书用 Cytofix/Cytoperm溶液(BD) 通透, 使用与兔-抗-人胞内HER2抗体(DAKO) 组合的二级的PE-缀合的山羊-抗-兔抗体(Jackson) 染色。使用同种型对照 抗体作为阴性对照。在FACSCanto-II (BD) 上测定荧光, 使用GraphPad Prism V4.03软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 通过非线性回归(具有可变斜率的S型剂量-应答) 制作结合曲线。使用结合的损失作为 读出, 以鉴别不同的抗体识别哪些HER2结构域。

[0459] 抗体106的示例性结合曲线如图10中所示。所有的结合结果如表 12中所示。Herceptin显示与Hu-HER2-ch (IV) 的结合的损失, 但没有显示与具有剩余的改组的结构域之一的蛋白的结合的损失, 验证了 Herceptin的表位位于HER2结构域IV中。帕妥珠单抗仅显示与 Hu-HER2-ch (II) 的结合的损失, 验证了其表位位于HER2结构域II中。抗体005, 006, 059, 060和111显示取代HER2结构域III之后结合的 损失, 其表明该表位位于HER2结构域III中。有趣的是, 抗体059和 106表明与hu-HER2-ch (III) 和hu-HER2-ch (I) 两者的结合的损失, 表明抗 体059和106识别这两个结构域中的构象表位。

[0460] 表12: HER2抗体与不同的HER2ECD受体构建体的结合的总结。FL; hu-HER2, I; hu-HER2-ch (I), II; hu-HER2-ch (II), III; hu-HER2-ch (III), IV; hu-HER2-ch (IV) .+++表示正常结合, +表示与hu-HER2观察的结合 相比降低的结合, -表示没有结合。

抗体	改组的HER2-结构域				
	FL	I	II	III	IV
Herceptin	+++	+++	+++	+++	-
帕妥珠单抗	+++	+++	+	+++	+++
005	+++	+++	+++	-	+++
006	+++	+++	+++	-	+++
059	+++	-	+++	-	+++
060	+++	+++	+++	-	+++
106	+++	-	+++	-	+++
111	+++	+++	+++	-	+++

[0462] 实施例22-在SCID小鼠中的NCI-N87人胃癌异种移植物中 HER2HuMabs005的体内效力

[0463] 测定HER2-HuMabs005对雌性CB.17严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠中的NCI-N87人胃癌异种移植物模型中肿瘤生长和生存的体内作用。将在50%基质胶中的 10×10^6 NCI-N87肿瘤细胞s.c注射进雌性SCID小鼠,每组10只小鼠。肿瘤接种后8天,开始用HER2-HuMabs005或对照抗体HuMab-HepC的静脉内处理。在图11中,这表示为第1天,即处理开始的当天。首次剂量为40mg/kg,随后在处理开始后4、8、11、15、18、22和25天为10mg/kg。

[0464] 每周至少2次测定肿瘤体积。从卡尺(PLEXX)测量值计算体积(mm^3): $(\text{宽度}^2 \times \text{长度}) / 2$ 。每周两次用卡尺测量肿瘤,当每只动物的肿瘤达到预定终点体积(800mm^3)时使动物安乐死。

[0465] 如图11A和11B中显示,与接受阴性对照抗体HuMab-HEPC的小鼠相比,HuMab005施用的小鼠分别地显示更慢的肿瘤生长(A)和更好的生存(B)。

CPCH1263583P.txt

序列表

<110> Genmab A/S

<120> 针对HER2表位的单克隆抗体

<130> P/63.W0

<160> 69

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 122

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe His Phe Tyr
20 25 30

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

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Arg Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Thr Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Gly Tyr Ser Phe His Phe Tyr Trp
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
1 5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

[0001]

CPCH1263583P.txt

<213> 智人

<400> 4

Ala Arg Gln Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

[0002]

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

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

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr
1 5

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

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

CPCI1263583P.txt

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Arg Ile Trp Gly Pro Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

[0003]

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Ile Arg Gly Gly Ala Gly Ser Thr
1 5

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Ala Lys Ala Arg Ile Trp Gly Pro Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

CPCH1263583P.txt

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 85 90 95

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

<210> 13
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 13

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

[0004]

<400> 14

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr
 1 5 10

<210> 15
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15

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

Ser Val Arg Val Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Leu
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Pro Leu Leu Trp Phe Glu Glu Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

CPCI1263583P.txt

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 16

Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Gly
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Lys Thr
1 5

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Ala Arg Ser Pro Leu Leu Trp Phe Glu Glu Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

[0005]

<210> 19
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Leu
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 20
<211> 7
<212> PRT

CPCH1263583P.txt

<213> 智人

<400> 20

Gln Ser Val Ser Ser Thr Tyr
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Leu Phe Thr
1 5

<210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

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

[0006]

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Arg Asn Ser Pro Ser Phe
50 55 60Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ala Thr Ala Tyr
65 70 75 80Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95Ala Arg His Ala Gly Asp Phe Tyr Tyr Phe Asp Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

Gly Tyr Arg Phe Thr Thr Ser Tyr Trp
1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 24

CPCI1263583P.txt

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr
1 5

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Ala Arg His Ala Gly Asp Phe Tyr Tyr Phe Asp Gly Leu Asp Val
1 5 10 15

<210> 26
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

[0007]

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 29
<211> 124
<212> PRT
<213> 智人

CPCI1263583P.txt

<400> 29

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Thr Gly Asp Arg Gly Phe Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0008]

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 30

Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Trp
1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 31

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
1 5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 32

Ala Arg Leu Thr Gly Asp Arg Gly Phe Asp Tyr Tyr Ser Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 33

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

CPCI1263583P.txt

<400> 33

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

[0009]

<400> 34

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Phe Thr
1 5

<210> 36

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 36

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

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

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Pro Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

CPCI1263583P.txt

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Asp Gln Glu Tyr Ser Ser Asn Trp Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 38

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala
1 5

[0010]

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39

Ala Arg Asp Gln Glu Tyr Ser Ser Asn Trp Tyr Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 40

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

CPCH1263583P.txt

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Leu Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41

Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr
1 5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Gln Leu Tyr Gly Ser Ser Pro Thr
1 5

<210> 43
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

[0011]

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser His Thr Arg Tyr Arg Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Lys Gly Asp Phe Tyr Tyr Phe Phe Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ala Ile Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

CPCH1263583P.txt

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

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

<210> 45
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Ser His Thr Arg Tyr Arg Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Ala Gly Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

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

[0012]

CPCI1263583P.txt

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

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

<210> 47
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47

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

[0013]

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Lys Gly Asp Tyr Tyr Tyr His Tyr Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 48
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

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

CPCH1263583P.txt

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

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

<210> 49
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Lys Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Asn Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 109
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

[0014]

CPCI263583P.txt

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

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

<210> 51
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Gln Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Ile Ser Tyr
20 25 30

[0015]

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Arg Gly Asp Tyr Tyr Tyr Phe Asn Gly Leu Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

CPCH1263583P.txt

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

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

<210> 53
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

[0016]

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Arg Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Leu
115 120

<210> 54
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

CPCI1263583P.txt

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

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

<210> 55
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Arg Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

[0017]

Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gln Ala Gly Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Asn Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

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

CPCH1263583P.txt

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
85 90 95

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

<210> 57
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3).. (3)
<223> Xaa是Ser或Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> Xaa是Ser, Thr, His或Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6).. (6)
<223> Xaa是Ser, Arg或Phe

[0018] <400> 57

Gly Tyr Xaa Phe Xaa Xaa Tyr Trp
1 5

<210> 58
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2).. (2)
<223> Xaa是Tyr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> Xaa是Asp, Tyr或His

<400> 58

Ile Xaa Pro Gly Asp Ser Xaa Thr
1 5

<210> 59
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3).. (3)
<223> Xaa是Gln, His或Leu

CPCH1263583P.txt

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (4)
<223> Xaa是Arg, Ala, Thr或Lys

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> Xaa是Gly

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6).. (6)
<223> Xaa是Asp

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> Xaa是Arg或无

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8).. (8)
<223> Xaa是Gly或无

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9).. (9)
<223> Xaa是Tyr或Phe

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10).. (10)
<223> Xaa是Tyr或Asp

[0019] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (12).. (12)
<223> Xaa是Tyr, Phe或His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13).. (13)
<223> Xaa是Tyr, Asp, Ser, Phe或Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (15).. (15)
<223> Xaa是Met或Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17).. (17)
<223> Xaa是Val或Ile

<400> 59
Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Gly Xaa Asp
1 5 10 15

Xaa

<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6).. (6)
<223> Xaa是Asn或Ser

CPCI1263583P.txt

<400> 60

Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr Ala
1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2).. (2)

<223> Xaa是Arg或Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4).. (4)

<223> Xaa是Gly或Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Xaa是Ala或Gly

<400> 61

Ile Xaa Gly Xaa Xaa Gly Ser Thr
1 5

<210> 62

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

[0020]

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8).. (8)

<223> Xaa是Leu或Tyr

<400> 62

Ala Lys Arg Ile Trp Gly Pro Xaa Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (6).. (6)

<223> Xaa是Arg或Ser

<400> 63

Gly Tyr Thr Phe Thr Xaa Tyr Gly
1 5

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7).. (7)

CPCI1263583P. txt

<223> Xaa是Lys或Asn

<400> 64

Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Xaa Thr
1 5

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 65

Ala Arg Ser Pro Leu Leu Trp Phe Glu Glu Leu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 66

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa是Gly或Ala

<400> 66

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Xaa
1 5

[0021]

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa是Asn或Tyr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa是Trp或Phe

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa是Tyr或Asp

<400> 67

Ala Arg Asp Gln Glu Tyr Ser Ser Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa是Ser或Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

CPCH1263583P. txt

<222> (6).. (6)
<223> Xaa是Ser或Thr

<400> 68

Gln Ser Val Xaa Ser Xaa Tyr
1 5

<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2).. (2)
<223> Xaa是Gln或Leu

[0022]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5).. (5)
<223> Xaa是Ser或Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7).. (7)
<223> Xaa是Pro或无

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8).. (8)
<223> Xaa是Pro, Leu, Arg或无

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9).. (9)
<223> Xaa是Leu, Phe, Ile或无

<400> 69

Gln Xaa Tyr Gly Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Thr
1 5 10

IgHV5-51-1 / IGHJ6-02 - VH 比对

IgHV5-51-1 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
TH1014-005 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
TH1014-060 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
TH1014-106 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
 VH1014-041 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
 VH1014-150 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
 VH1014-067 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
 VH1014-072 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
 VH1014-163 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
 VH1014-093 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
 VH1014-044 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
 共有 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQ
 IgHV5-51-1 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----GMDVWGQGTITVTVSS
TH1014-005 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQAGD--YYFYGM DVWGQGTITVTVSS
TH1014-060 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARHAGD--FYYFDGL DVWGQGTITVTVSS
TH1014-106 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARLTGDRGFDYYSGMDVWGQGTITVTVSS
 VH1014-041 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--FYYFGL DVWGQGTITVTVSS
 VH1014-150 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQAGD--YYFYGM DVWGQGTITVTVSS
 VH1014-067 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--FYYFGL DVWGQGTITVTVSS
 VH1014-072 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--FYYFGL DVWGQGTITVTVSS
 VH1014-163 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--FYYFGL DVWGQGTITVTVSS
 VH1014-093 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQKGD--FYYFGL DVWGQGTITVTVSS
 VH1014-044 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQAGD--YYFYGM DVWGQGTITVTVSS
 共有 GQVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARXXXXXXXXXXGDXDWGQGTITVTVSS

图1A

IgHV3-23-1 / IGHJ4-02 - VH 比对

IgHV3-23-1 EVQLLES GGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKG
TH1014-006 EVQLLES GGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYALWVRQAPGKGLEWVSIIRGGAGSTYYADSVKG
 共有 EVQLLES GGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYALWVRQAPGKGLEWVSIIRGGAGSTYYADSVKG
 IgHV3-23-1 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK-----YFDYWGQGTITVTVSS
TH1014-006 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWGPFYFDYWGQGTITVTVSS
 共有 RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKARIWGPFYFDYWGQGTITVTVSS

图1B

IgHV1-18-1 / IGHJ4-02 – VH 比对

IgHV1-18-1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAQKLQG
TH1014-059 QVQLVQSGAEVKKPGASV**EV**CKASGYTFT**RY**GISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG**KT**YAQKLQG
共有 QVQLVQSGAEVKKPGASV**V**CKASGYTFT**XY**GISWVRQAPGQGLEWMGWISAYNG**IT**YAQKLQG

IgHV1-18-1 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR-----YFDYWGQGLTVTVSS
TH1014-059 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELYFDYWGQGLTVTVSS
共有 RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARSPLLWFEELYFDYWGQGLTVTVSS

图1C

IgHV1-69-4 / IGHJ4-02 – VH 比对

IgHV1-69-4 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG
TH1014-111 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSY**S**ISWVRQAPG**EG**GLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG
共有 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSY**X**ISWVRQAPG**EG**GLEWMGRIIPILGIANYAQKFQG

IgHV1-69-4 RVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAR-----YFDYWGQGLTVTVSS
TH1014-111 RVTITADKST**IT**AYMELSSLRSED TAVYYCARDQEYSS**NT**YWGQGLTVTVSS
共有 RVTITADKST**IT**AYMELSSLRSED TAVYYCARDQEYSS**XXX**YWGQGLTVTVSS

图1D

IgKV3-20-01 / IGKJ4-01 - VL 比对

IgKV3-20-01 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-005 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-059 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-060 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-106 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
VL1014-111 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
 VL1014-041 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
 VL1014-150 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
 VL1014-067 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
 VL1014-072 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
 VL1014-163 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
 VL1014-093 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
 VL1014-044 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS
 共有 EIVLTQSPGTL~~SL~~SPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGS

 IgKV3-20-01 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
VL1014-005 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
VL1014-059 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
VL1014-060 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
VL1014-106 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
VL1014-111 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
 VL1014-041 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
 VL1014-150 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
 VL1014-067 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
 VL1014-072 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
 VL1014-163 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
 VL1014-093 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
 VL1014-044 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK
 共有 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP-LTFGGGTKVEIK

图2A

IgKV3-11-01 / IGKJ4-01 - VL 比对

IgKV3-11-01 EIVLTQSPATLSLSPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
VL1014-006 EIVLTQSPATLSLSPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS
 共有 EIVLTQSPATLSLSPGERATL~~SC~~RASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGS

 IgKV3-11-01 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPP-LTFGGGTKVEIK
VL1014-006 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPP-LTFGGGTKVEIK
 共有 GSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPP-LTFGGGTKVEIK

图2B

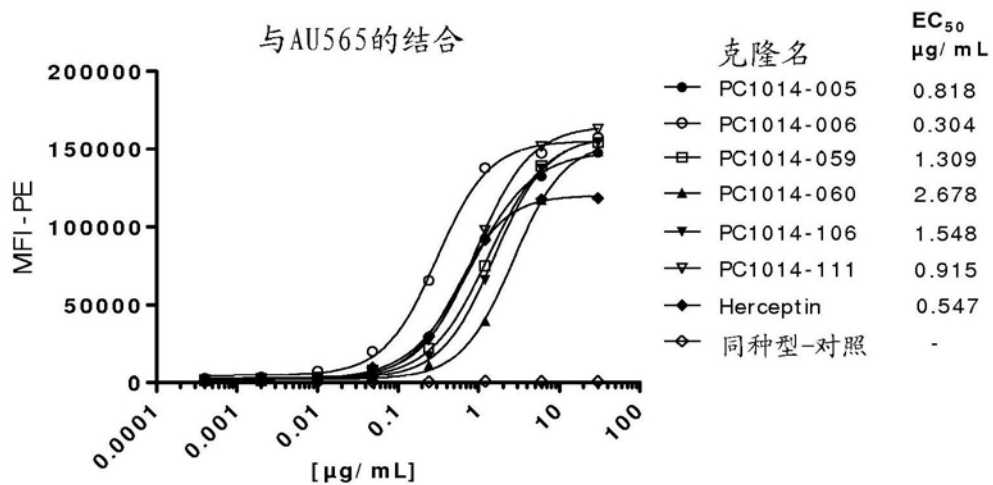


图3A

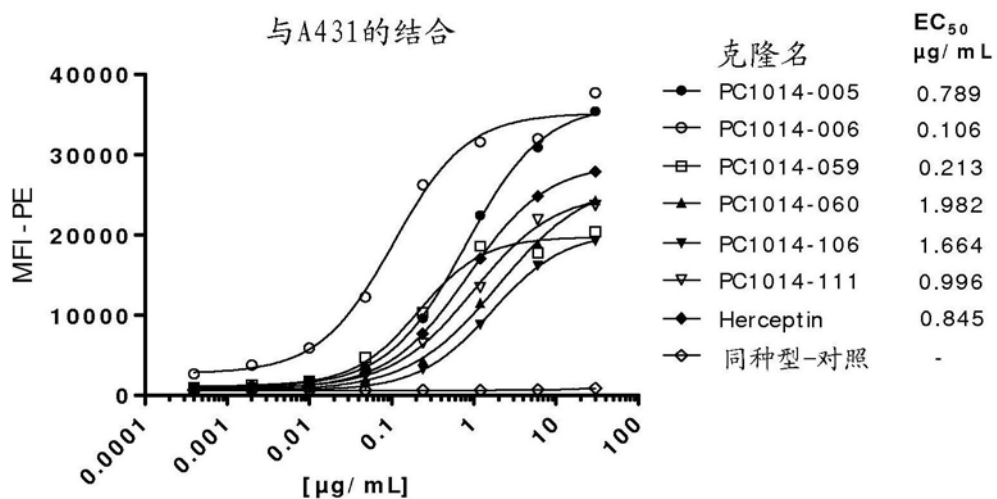


图3B

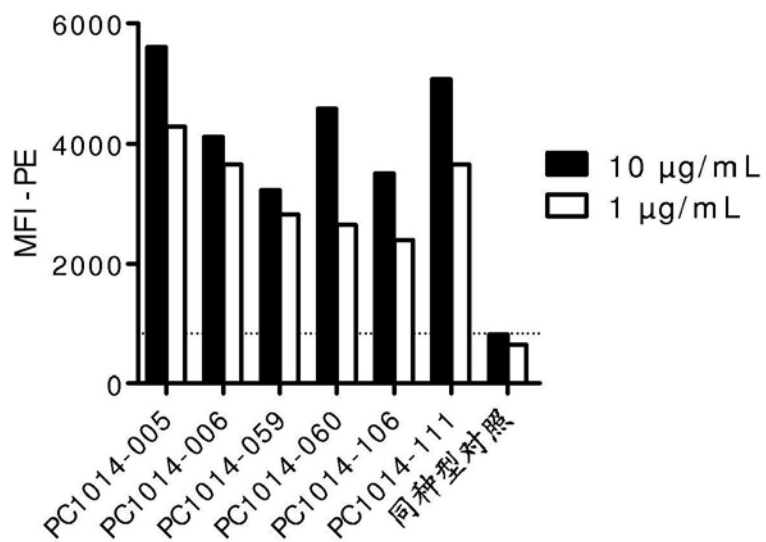


图4

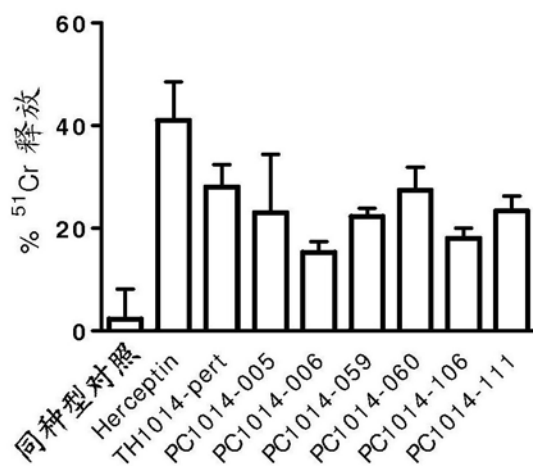


图5

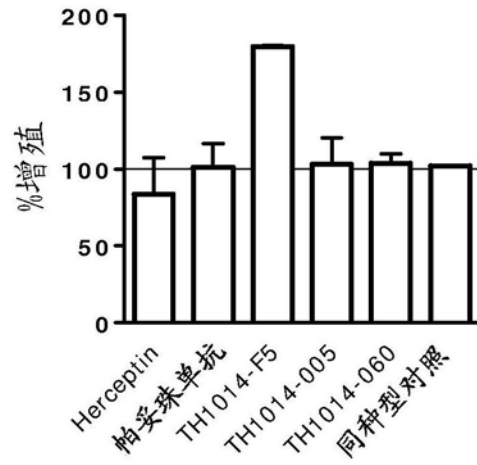


图6

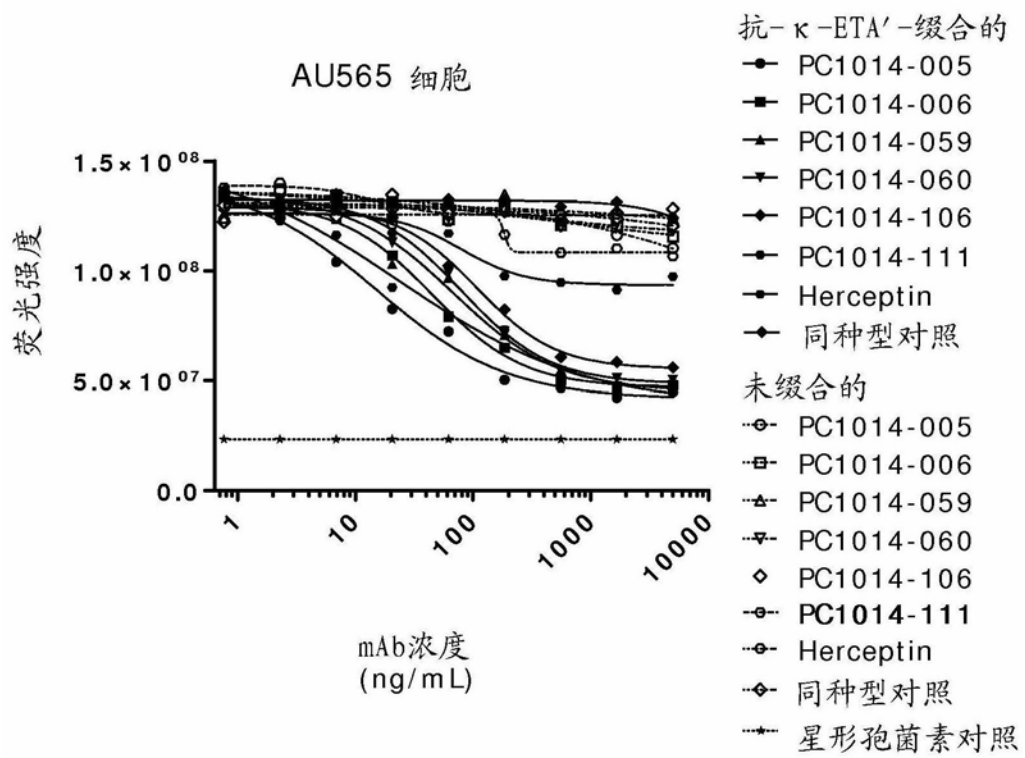


图7A

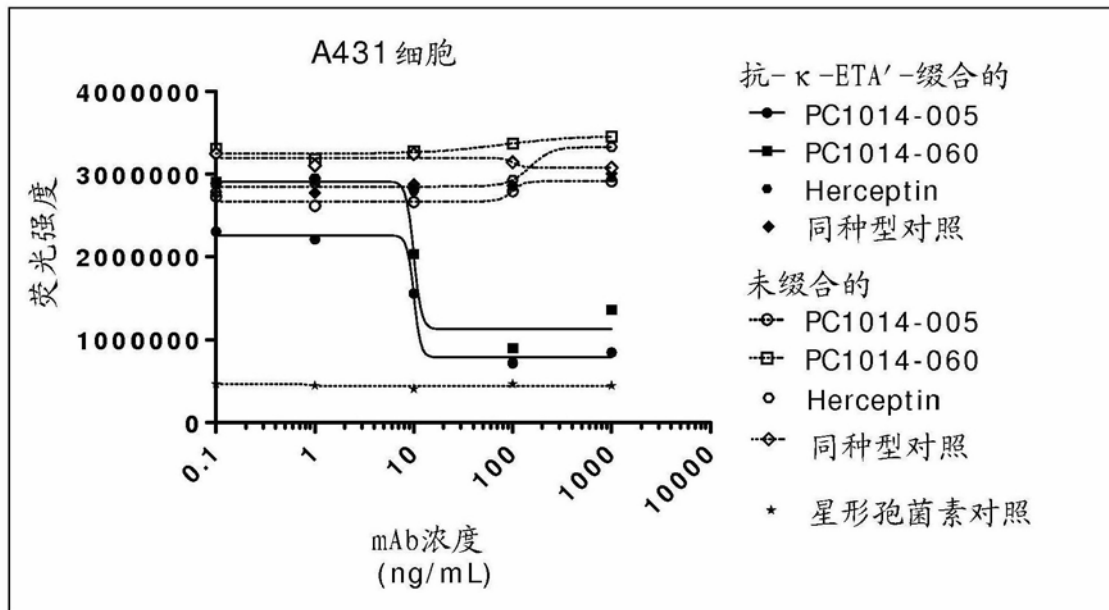


图7B

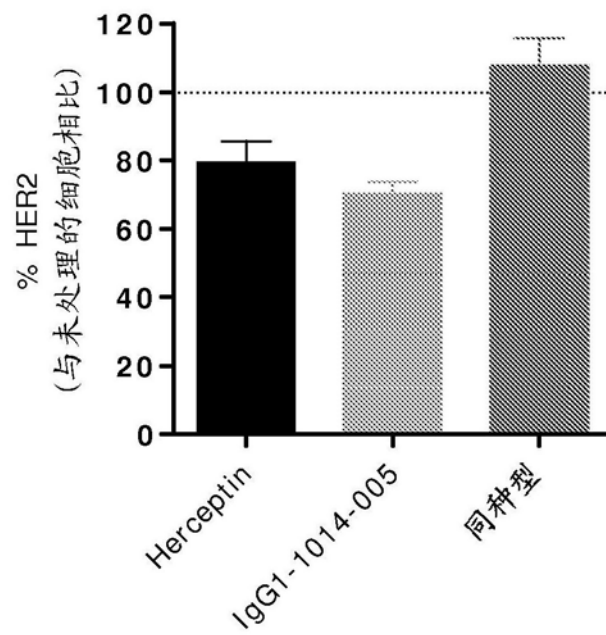


图8

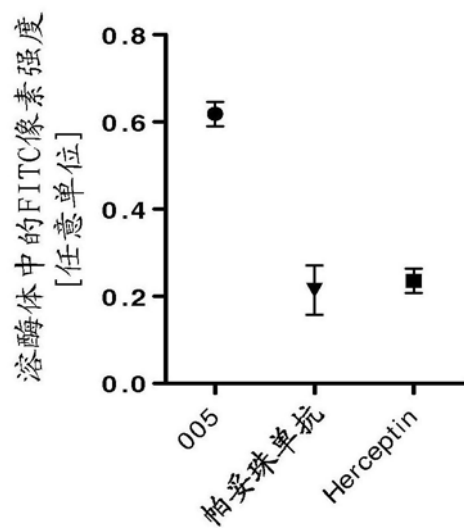


图9

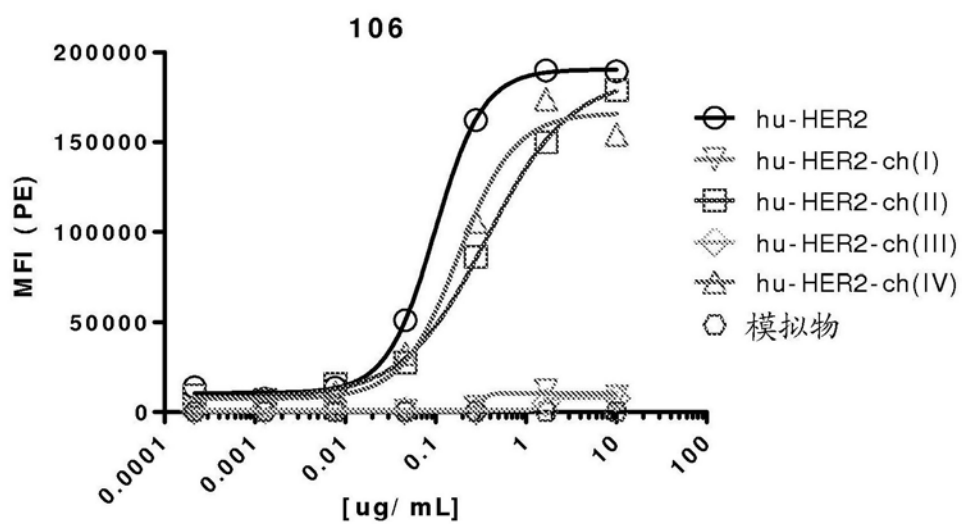


图10

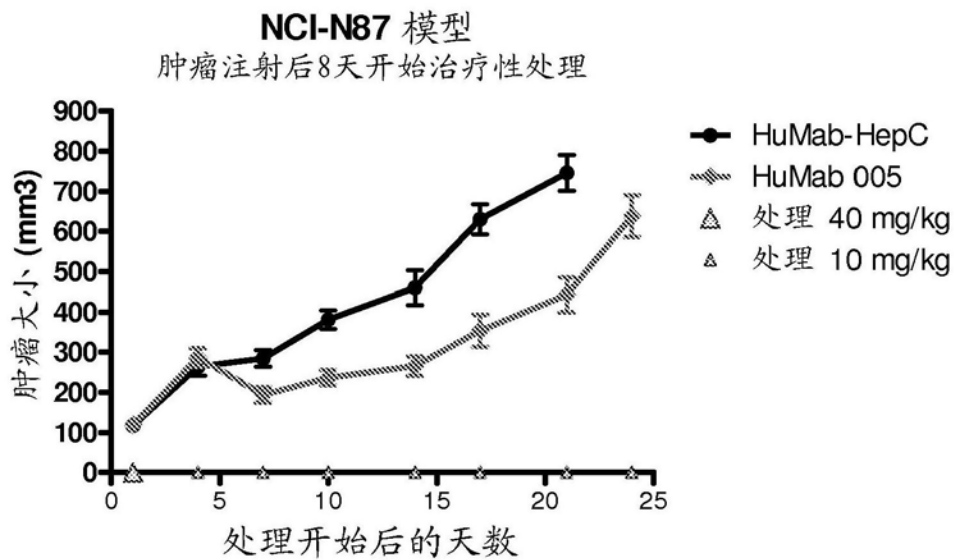


图11A

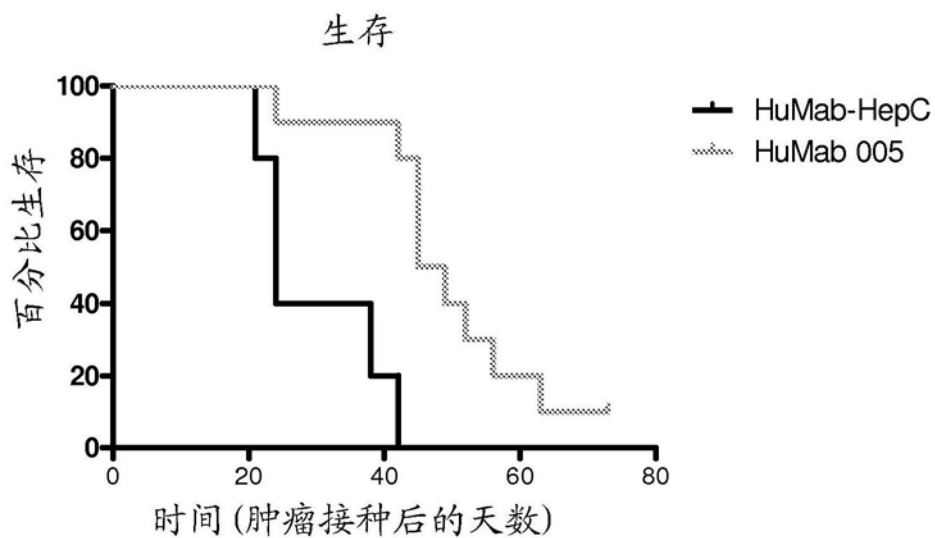


图11B