



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102099376 A

(43) 申请公布日 2011. 06. 15

(21) 申请号 200880129763. 9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008. 12. 12

C07K 16/28 (2006. 01)

(30) 优先权数据

2008-155676 2008. 06. 13 JP

61/076352 2008. 06. 27 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 12. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SE2008/000694 2008. 12. 12

(87) PCT申请的公布数据

W02009/151356 EN 2009. 12. 17

(71) 申请人 阿特拉斯医疗有限公司

地址 瑞典斯德哥尔摩

(72) 发明人 M·乌莱恩 J·罗克伯格

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 姜建成

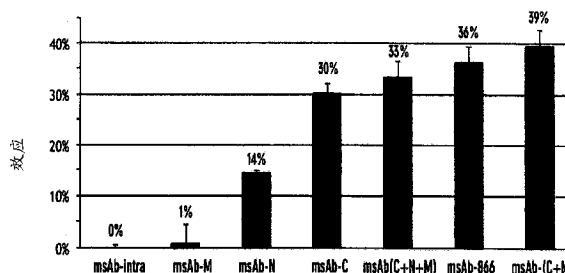
权利要求书 5 页 说明书 30 页 附图 8 页

(54) 发明名称

针对 HER2 的细胞外结构域 2 和 3 的抗体

(57) 摘要

本发明涉及一种亲和配体,该亲和配体能够选择性地与一种亚群相互作用,该亚群由来自 HER2 的细胞外结构域 2 和 3 的 37 个或更少的连续的氨基酸残基组成,其中该亚群包括氨基酸序列 LQVF 和 / 或 ESFDGD,并且本发明涉及由这类亚群组成的多肽。



1. 能够选择性地与一种亚群相互作用的亲和配体,该亚群由来自 HER2 的细胞外结构域 2 和 3 的 37 个或更少的连续的氨基酸残基 (SEQ ID NO :7) 组成,所述亚群包括氨基酸序列 LQVF (SEQ ID NO :8) 和 / 或 ESFDGD (SEQ ID NO :9)。

2. 根据权利要求 1 所述的亲和配体,其中所述亚群由 26 个或更少的氨基酸残基组成。

3. 根据权利要求 2 所述的亲和配体,其中所述亚群由选自下组的一个氨基酸序列组成,该组的组成为 :SEQ ID NO :11 以及 15-20。

4. 根据权利要求 2 或 3 所述的亲和配体,其中所述亚群由 21 个或更少的氨基酸残基组成。

5. 根据以上权利要求中任一项所述的亲和配体,其中所述亚群包括 LQVF (SEQ ID NO :8) 和 / 或 LPESFDGD (SEQ ID NO :11)。

6. 根据以上权利要求中任一项所述的亲和配体,其中所述亚群是 10 个或更多个氨基酸残基。

7. 根据权利要求 1 至 5 的任一项所述的亲和配体,其中所述亚群由 8 个或更少的氨基酸残基组成。

8. 根据权利要求 1 所述的亲和配体,其中所述亚群由 SEQ ID NO :6 的 1-37 位的氨基酸残基的序列组成。

9. 根据以上权利要求的任一项所述的亲和配体,它抑制在培养物中人类乳癌细胞的生长的 20% -100%。

10. 根据权利要求 9 所述的亲和配体,其中这些人类乳癌细胞是 BT474 乳癌细胞。

11. 根据权利要求 9 至 10 的任一项所述的亲和配体,它在 500ng/ml 的浓度下抑制生长。

12. 根据以上权利要求的任一项所述的亲和配体,它以低于 100nM 的一个 EC50 结合该亚群。

13. 根据以上权利要求的任一项所述的亲和配体作为一种药物的用途。

14. 根据以上权利要求的任一项所述的亲和配体,用于一个哺乳动物受试者的治疗,该哺乳动物受试者患有或怀疑患有以 HER2 过量表达为特征的失调。

15. 根据权利要求 14 所述的亲和配体,其中所述受试者已经用一种能够与 HER2 如 HER2 的细胞外结构域选择性地相互作用的治疗性抗体进行了治疗,该治疗性抗体不同于该亲和配体。

16. 根据权利要求 15 所述的亲和配体,其中所述以 HER2 过量表达为特征的失调是一种癌症,并且所述癌症已经发展了对该治疗性抗体的抗性。

17. 根据权利要求 14 所述的亲和配体,其中其特征为 HER2 过量表达的该失调是一种癌症。

18. 根据权利要求 16 或 17 所述的亲和配体,其中该癌症是选自下组,其组成为 :乳癌、鳞状细胞癌、肺癌例如小细胞肺癌或非小细胞肺癌、胰腺癌、恶性胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、外阴癌、肝癌、肝细胞瘤、结肠直肠癌如结肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、甲状腺癌、肾母细胞瘤、膀胱癌、子宫内膜癌、肾癌、头颈部癌、胃癌、食管癌、以及前列腺癌。

19. 根据权利要求 18 所述的亲和配体,其中该癌症是选自下组,其组成为 :乳癌、肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌以及肾母细胞瘤。

20. 根据权利要求 19 所述的亲和配体,其中该癌症是乳癌。

21. 根据权利要求 20 所述的亲和配体,其中该癌症是转移性乳癌。

22. 根据以上权利要求的任一项所述的亲和配体,它是其一种抗体或它的一种片段或衍生物,如一种单克隆抗体,如一种嵌合单克隆抗体或人源化单克隆抗体。

23. 权利要求 1 至 21 的任一项所述的亲和配体,它是一种衍生于选自下组的一种支架的蛋白配体,该组的组成为:葡萄球菌蛋白 A 和其域、脂质运载蛋白、锚蛋白重复域、纤维素结合域、 γ 晶型、绿色荧光蛋白、人细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4、蛋白酶抑制剂、PDZ 域、肽适体、葡萄球菌核酸酶、淀粉酶抑肽、纤连蛋白 III 型域以及锌指结构。

24. 根据权利要求 1 至 21 的任一项所述的亲和配体,它是一种寡核苷酸分子。

25. 一种组合物,该组合物包括一种根据以上权利要求的任一项所述的亲和配体以及一个第二亲和配体,该第二亲和配体能够选择性地与一个第二亚群相互作用,该第二亚群具有来自 HER2 (SEQ ID NO:7) 的细胞外结构域 2 和 3 的 73 个或更少的连续的氨基酸残基,所述第二亚群包括一个或多个选自下组的氨基酸序列,该组的组成为:SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13 以及 SEQ ID NO:14。

26. 根据权利要求 25 所述的组合物,其中该第二亚群由选自下组的一个氨基酸序列组成,该组的组成为:SEQ ID NO:21-34。

27. 根据权利要求 25 或 26 所述的组合物,其中该第二亚群由 45 个或更少的氨基酸残基组成。

28. 根据权利要求 27 所述的组合物,其中该第二亚群由 16 个或更少的氨基酸残基组成。

29. 根据权利要求 25 所述的组合物,其中该第二亚群由序列 SEQ ID NO:4 的 39-111 位氨基酸残基组成。

30. 根据权利要求 25 至 29 的任一项所述的组合物,它抑制在培养物中的人类乳癌细胞的生长的 20% -100%。

31. 根据权利要求 30 所述的组合物,其中这些人类乳癌细胞是 BT474 乳癌细胞。

32. 根据权利要求 30 至 31 的任一项所述的组合物,它在 500ng/ml 的浓度下抑制生长。

33. 根据权利要求 25 至 32 的任一项所述的组合物,其中该第二亲和配体以低于 100nM 的 EC50 结合该第二亚群。

34. 根据权利要求 25 至 33 的任一项所述的组合物,其中该第二亲和配体是一种抗体或一种它的片段或衍生物,如一种单克隆抗体,如一种嵌合单克隆抗体或人源化单克隆抗体。

35. 根据权利要求 25 至 33 的任一项所述的组合物,其中该第二亲和配体是一种衍生于选自下组的一种支架的蛋白配体,该组的组成为:葡萄球菌蛋白 A 和其域、脂质运载蛋白、锚蛋白重复域、纤维素结合域、 γ 晶型、绿色荧光蛋白、人细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4、蛋白酶抑制剂、PDZ 域、肽适体、葡萄球菌核酸酶、淀粉酶抑肽、纤连蛋白 III 型域以及锌指结构。

36. 根据权利要求 25 至 33 的任一项所述的组合物,其中该第二亲和配体是一种寡核苷酸分子。

37. 组合物,包括:根据权利要求 1 至 24 的任一项所述的一种亲和配体或根据权利要求 25 至 36 的任一项所述的一种组合物;以及一种针对 HER2 的酪氨酸激酶抑制剂。

38. 根据权利要求 25 至 37 的任一项所述的组合物作为一种药物的用途。
39. 根据权利要求 25 至 38 的任一项所述的组合物,用于一个哺乳动物受试者的治疗,该哺乳动物受试者患有或怀疑患有以 HER2 过量表达为特征的失调。
40. 根据权利要求 39 所述的组合物,其中对所述受试者已经用一种能够与 HER2 如与 HER2 的细胞外结构域选择性地相互作用的的治疗性抗体进行了治疗,其中治疗性抗体与该亲和配体和该第二亲和配体是不同的。
41. 根据权利要求 40 所述的组合物,其中所述以 HER2 过量表达为特征的失调是一种癌症,并且所述癌症已经发展了对该治疗性抗体的抗性。
42. 一种分离的多肽,该多肽由来自 HER2 的细胞外结构域 2 和 3 的 37 个或更少的连续的氨基酸残基 (SEQ ID NO :7) 组成,并且包括氨基酸序列 LQVF (SEQ ID NO :8) 和 / 或 ESFDGD (SEQ ID NO :9)。
43. 根据权利要求 42 所述的多肽,该多肽由 26 个或更少的氨基酸残基组成。
44. 根据权利要求 42 至 43 的任一项所述的多肽,该多肽由选自下组的一种氨基酸序列组成,该组的组成为 :SEQ ID NO :11 以及 15-20。
45. 根据权利要求 42 至 44 的任一项所述的多肽,该多肽由 21 个或更少的氨基酸残基组成。
46. 根据权利要求 42 至 45 的任一项所述的多肽,该多肽包括该氨基酸序列 LQVF (SEQ ID NO :8) 和 / 或 LPESFDGD (SEQ ID NO :11)。
47. 根据权利要求 42 至 46 的任一项所述的多肽,该多肽由 10 个或更多个氨基酸残基组成。
48. 根据权利要求 42 至 46 的任一项所述的多肽,该多肽由 8 个或更少的氨基酸残基组成。
49. 根据权利要求 42 至 48 的任一项所述的多肽,其中如果该多肽包括序列 LQVF,则具有两个或更少的氨基酸残基侧接在 LQVF 的 C 端侧。
50. 根据权利要求 42 所述的多肽,该多肽由序列 SEQ ID NO :6 的 1-37 位氨基酸残基组成。
51. 根据权利要求 42 至 50 的任一项所述的多肽作为一种抗原的用途。
52. 根据权利要求 42 至 51 的任一项所述的多肽作为一种抗原在免疫中的用途。
53. 根据权利要求 42 至 52 的任一项所述的多肽在治疗性抗体的制备中的用途。
54. 根据权利要求 42 至 53 的任一项所述的一种多肽作为一种抗原的用途。
55. 根据权利要求 42 至 53 的任一项所述的一种多肽用于免疫的用途。
56. 根据权利要求 55 所述的用途,其中该免疫是一种非人类哺乳动物的免疫。
57. 根据权利要求 42 至 53 的任一项所述的一种多肽在一种治疗性抗体的制备中的用途,该治疗性抗体如一种治疗性单克隆抗体,如一种治疗性嵌合单克隆抗体或人源化单克隆抗体。
58. 根据权利要求 42 至 53 的任一项所述的多肽在一种治疗性亲和配体的选择或纯化中的用途,该治疗性亲和配体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调。
59. 根据权利要求 42 至 53 的任一项所述的一种多肽作为一种治疗靶标的用途。
60. 根据权利要求 1 至 24 的任一项所述的一种亲和配体作为一种药物的用途

61. 根据权利要求 1 至 24 的任一项所述的一种亲和配体在一种药物的制造中的用途, 该药物用于一个哺乳动物受试者的治疗, 该哺乳动物受试者患有或怀疑患有一种以 HER2 过量表达为特征的失调。

62. 根据权利要求 61 所述的用途, 其中对所述受试者已经用一种能够与 HER2 如与 HER2 的细胞外结构域选择性地相互作用的的治疗性抗体进行了治疗, 其中治疗性抗体与该亲和配体是不同的。

63. 根据权利要求 61 或 62 所述的用途, 其中所述以 HER2 过量表达为特征的失调是一种癌症, 并且所述癌症已经发展了对该治疗性抗体的抗性。

64. 用于鉴定一种亲和配体的方法, 该亲和配体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调, 该方法包括以下步骤:

a) 使一种多肽与一种公认的亲和配体在使之能够结合的条件下接触, 该多肽包括根据权利要求 1 至 24 的任一项所述的一种亚群; 并且

b) 确定是否该公认的亲和配体结合至该亚群。

65. 根据权利要求 64 所述的方法, 其中步骤 a) 的该多肽是一种根据权利要求 35 至 45 的任一项所述的多肽; 并且步骤 b) 由确定是否该公认的亲和配体结合至该多肽组成。

66. 根据权利要求 64 至 65 的任一项所述的方法, 其中该失调是一种癌症, 该方法进一步包括以下步骤:

c) 确定是否该公认的亲和配体抑制了癌细胞如 BT474 乳腺癌细胞的生长或诱导了其凋亡。

67. 生产一种亲和配体的方法, 该方法包括: 使用根据权利要求 64 至 66 的任一项所述的方法鉴定一种亲和配体; 并且生产所述鉴定的亲和配体。

68. 用于生产一种克隆的方法, 该方法包括以下步骤:

a) 提供从一种哺乳动物获得的细胞, 该哺乳动物已经用一种抗原免疫, 该抗原包括根据权利要求 1 至 24 的任一项所述的亚群, 这些细胞包括编码能够与该亚群选择性地相互作用的一种抗体的 DNA; 并且

b) 使所述细胞与骨髓瘤细胞融合以获得至少一个克隆。

69. 根据权利要求 68 所述的方法, 该方法进一步包括以下步骤:

a') 用该抗原免疫该哺乳动物,

其中步骤 a') 先于步骤 a)。

70. 根据权利要求 68 至 69 的任一项所述的方法, 该方法进一步包括以下步骤:

c) 选择来自步骤 b) 的克隆, 该克隆表达能够与该亚群选择性地相互作用的抗体。

71. 根据权利要求 68 至 69 的任一项所述的方法, 其中步骤 a) 的抗原由根据权利要求 42 至 53 的任一项所述的一种多肽组成。

72. 根据权利要求 71 所述的方法, 该方法进一步包括以下步骤:

c) 选择来自步骤 b) 的克隆, 该克隆表达能够选择性地与该抗原相互作用的抗体。

73. 根据权利要求 68 至 72 的任一项所述的方法, 该方法进一步包括以下步骤:

d) 提供在步骤 b) 中获得的或在步骤 c) 中选择的一种克隆, 并且将来自该克隆的 DNA 与编码人类抗体的 DNA 合并, 其中来自该克隆的 DNA 编码了由该克隆表达的一种抗体的至少与该亚群选择性地相互作用的这个部分; 并且

e) 在将来自步骤 d) 合并的 DNA 结合进入细胞以获得用于表达一种治疗性抗体的一种克隆, 该治疗性抗体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调。

74. 生产一种亲和配体的方法, 该方法包括: 使用根据权利要求 68 至 73 的任一项所述的方法产生一种克隆; 并且从所述克隆获得所述亲和配体。

75. 一个哺乳动物受试者的治疗方法, 该哺乳动物受试者患有或怀疑患有一种以 HER2 过量表达为特征的失调, 该方法包括对该受试者给予一个有效量的根据权利要求 1 至 24 的任一项所述的一种亲和配体或根据权利要求 25 至 41 的任一项所述的一种组合物。

76. 根据权利要求 75 所述的方法, 进一步包括对该受试者给予一种针对 HER2 的酪氨酸激酶抑制剂。

77. 根据权利要求 75 至 76 的任一项所述的方法, 其中所述治疗是手术前的治疗。

78. 根据权利要求 75 至 76 的任一项所述的方法, 其中所述治疗是手术后的治疗。

79. 根据权利要求 75 至 78 的任一项所述的方法, 其中对所述受试者已经用一种能够与 HER2 如与 HER2 的细胞外结构域选择性地相互作用的的治疗性抗体进行了治疗, 其中治疗性抗体与该亲和配体是不同的。

80. 根据权利要求 79 所述的方法, 其中所述以 HER2 过量表达为特征的失调是一种癌症, 并且所述癌症已经发展了对该治疗性抗体的抗性。

81. 根据权利要求 75 至 80 的任一项所述的方法, 其中该以 HER2 过量表达为特征的失调是一种癌症。

82. 根据权利要求 81 所述的方法, 其中该癌症是选自下组, 其组成为: 乳癌、鳞状细胞癌、肺癌例如小细胞肺癌或非小细胞肺癌、胰腺癌、恶性胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、外阴癌、肝癌、肝细胞瘤、结肠直肠癌例如结肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、甲状腺癌、肾母细胞瘤、膀胱癌、子宫内膜癌、肾癌、头颈部癌、胃癌、食管癌、以及前列腺癌。

83. 根据权利要求 82 所述的方法, 其中该癌症是选自下组, 该组的组成为: 乳癌、肺癌、前列腺癌、结肠直肠癌以及肾母细胞瘤。

84. 根据权利要求 83 所述的方法, 其中该癌症是乳癌。

85. 根据权利要求 84 所述的方法, 其中该癌症是转移性乳癌。

86. 一种制造品, 该制造品包括一种容器、一种在该容器内的组合物, 该组合物包括根据权利要求 1 至 24 的任一项所述的一种亲和配体或根据权利要求 25 至 41 的任一项所述的一种组合物、以及一种在该容器上或与该容器相关的标签, 该标签表明所述组合物可以用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调。

针对 HER2 的细胞外结构域 2 和 3 的抗体

发明领域

[0001] 本发明总体上涉及 HER2 的细胞外结构域的氨基酸亚群、靶向这类亚群的抗体、以及相关的方法和用途,如治疗方法和用途。

[0002] 背景

[0003] HER2

[0004] 人表皮生长因子受体 2(HER2 或 erbB-2) 是一个跨膜受体酪氨酸激酶家族的表皮生长因子受体家族(EGFR、HER2、HER3、以及 HER4) 的一员。这些受体具有在 40% -50% 之间的总体序列一致性并且具有相似的结构域。它们都含有一种细胞外配体结合结构域、一个单一的跨膜结构域、以及细胞内酪氨酸激酶和调节结构域。

[0005] HER2 相关的失调

[0006] 已经发现表皮生长因子受体家族的成员在许多种癌症类型(如上皮细胞的恶性肿瘤)中促进了肿瘤细胞增殖。已经在许多种人类癌症中研究了 HER2,并且已经发现在许多肿瘤中被上调了,特别是在乳癌、肺癌、胰腺和结肠直肠癌、以及肾母细胞瘤中,而且在卵巢癌、膀胱癌、子宫内膜癌、肾癌、头部和颈部癌、胃癌、食管癌、以及前列腺癌中(Ménard et al(2001)Annals of Oncology 12(Suppl. 1)S15-S19)。

[0007] 癌症

[0008] 癌症是在西方世界中疾病和死亡的最普通的原因之一。通常,对于癌症的大多数形式,发病率随着年龄而增加。随着人类种群持续活得更长,由于一般健康状态的增进,癌症可能影响个体数量的增加。虽然在环境因素(饮食、吸烟、紫外线辐射等等)连同遗传因素(“癌基因”如 p53、APC、BRCA1、XP 等的种系突变)与癌症的发生风险之间提供一种联系的知识体有增加,最普通癌症的类型的病因大部分仍然是未知的。

[0009] 从一种细胞生物学观点看没有完全令人满意的癌症的定义,尽管事实上癌症基本上是一种细胞疾病并且被定义为具有净细胞生长以及抗群体行为的一种转化细胞群体。恶性转化代表基于不可逆的遗传改变以向一种恶性表型的转变。虽然这还没有正式证明,恶性转化是被认为是发生在一个细胞中,随后从该细胞发展出的肿瘤开始了(“癌症的克隆性”教义)。致癌作用是通过它产生癌症的过程并且通常被认为包括最后导致恶性肿瘤生长的多个事件。这种多级过程包括如果干限速步骤,如突变以及还可能的次生事件的加入,其导致在癌前期增殖阶段之后癌症的形成。这些分级改变涉及决定细胞分裂、不合群行为、以及细胞死亡的重要调节通路的错误(突变)的累积。与周围的细胞相比,每一种这些改变可以提供一种选择性达尔文生长优势,导致在肿瘤细胞群中的净生长。一种恶性肿瘤不仅必需由这些转化肿瘤细胞它们本身组成,而且周围正常细胞充当为一种支持性基质。这种募集的癌基质包括结缔组织、血管、以及各种其他的正常细胞例如炎症细胞,它们一致地起作用从而为这些转化肿瘤细胞提供持续肿瘤生长必需的信号。

[0010] 最常见的癌症的形式出现在体细胞中并且主要是上皮细胞起源的,例如前列腺、乳房、结肠、泌尿道以及皮肤;随后是从造血系起源的癌症例如白血病和淋巴瘤、从神经外胚层起源的癌症例如恶性胶质瘤、以及软组织肿瘤例如肉瘤。

[0011] 乳癌

[0012] 乳癌是全世界癌症的第二最常见的形式,并且到目前为止是女性最频繁发生的癌症。由 Parkin 等人提出的来自 GLOBOCAM2002 数据库的资料揭示在 2002 年有 115 万个新病例并且在相同期间有 41 万个死亡病例 (Parkin DM et al. (2005) CA Cancer J Clin 55, 74-108)。如果在一个早期检测出,则对于生活在一个发达国家中的患者预后是相对好的,与在一个发展中国家中的 57% 相比,具有 73% 的总体五年生存率。该发病率正在缓慢增加,并且在发达国家中大约每九个女性中有一个在她的一生中被认为患上乳癌。虽然与雌性类固醇激素相关的生活方式改变 (包括暴露于外源性激素) 影响发展乳癌的风险,这些因素仅仅组成了病因学的一小部分,并且预防操作的益处被认为是低的。死亡率的降低是由于通过乳房 X 线照相术筛选的早期检测以及现代辅助全身疗法的使用。

[0013] 癌症的治疗以及疗法

[0014] 癌症的治疗包括例如:外科手术、放射疗法、化学疗法、靶向治疗、免疫疗法、激素疗法、以及血管生成抑制剂。

[0015] 一种靶向治疗的实例是用治疗性抗体的治疗 (抗体疗法),它可以是一种有吸引力的途径,因为它靶向肿瘤细胞,与例如选择性雌激素受体调节剂 (SERM) 以及作为常规全身性治疗的化学疗法相反。

[0016] 乳癌的治疗

[0017] 自从在七十年代后期它的引进,保乳治疗 (结合乳房保留手术以及手术后放射治疗) 已经成为在女性中的第一位的治疗选择,其中肿瘤的根治性切除可以与一种好的美容结果相结合。乳房切除术在一些患者即具有小乳房、大肿瘤 (> 4cm) 或多病灶 / 多中心疾病的女性中仍然是优选的。

[0018] 腋窝切开主要是用于诊断目的而进行的,并且将至少 10 个淋巴结去除以给出一种具有 97% -98% 敏感性的好的分期指导 (Axelsson CK et al. (1992) Eur J Cancer 28A : 1415-8 ; Recht A and Houlihan MJ (1995) Cancer 6 (9) : 1491-1512)。然而,对于原发癌的治疗中的微创手术的下一步已经引进了具有腋窝淋巴结定位而不是腋窝淋巴结清扫 (它与高的并发症相关) 的前哨淋巴结活检技术。这种技术作为认识的结果而被引入,即认识到从乳房到腋窝的大多数淋巴引流最初通过一个 (或少数) 淋巴结 (前哨淋巴结),其支持这个淋巴结可能是腋窝淋巴结状况的一种充分指示的分析 (Veronesi U et al. (2003) New Engl J Med 349 (6) : 546-53)。

[0019] 乳癌作为一种全身性疾病的概念,即在诊断时播散性微转移的存在可以解释在区域治疗后的治疗失败,为在二十世纪七十年代辅助随机试验铺平了道路,包括内分泌疗法和化学疗法。辅助的综合化学疗法通常已经是对于激素受体阴性的 具有高复发风险的患者 (不管淋巴结状况) 的标准疗法。已经证明尤其是在绝经前期患者中对总生存率以及无复发生存率二者的有益效果 (EBCTCG (1998) Lancet 352 (9132) : 930-42)。对于具有激素应答疾病 (即雌激素受体 (ER) 和 / 或孕酮受体 (PR) 阳性疾病) 的患者,辅助的综合化学疗法已经与内分泌疗法相组合作为序贯化学内分泌疗法而给予。并且,辅助化学治疗通常引起闭经,引起除细胞毒性之外的二次内分泌效应 (Pagani O et al. (1998) Eur J Cancer 34 (5) : 632-40)。

[0020] 内分泌疗法被推荐用于具有激素受体阳性肿瘤的患者 (不管年龄、阶段以及绝经

状况)。

[0021] 在激素应答绝经前患者中,已经显示出通过手术或照射去除卵巢或通过 LHRH 激动剂抑制卵巢是有效的辅助治疗方式 (Emens LA and Davidson NA(2003)Clin Ca Res(1 Pt 2):468S-94S)。在绝经后患者中,卵巢去除没有位置,因为雌激素的原始来源不是从卵巢合成而是来自在包括乳房的外周组织中的雄甾烯二酮向雌酮和雌二醇的转变。

[0022] 它莫西芬是一种具有对 ER 有拮抗作用的选择性雌激素受体调节剂 (SERM),它促成了一种在绝经前以及绝经后女性二者中用于晚期乳癌的适当的治疗。在具有 ER 阳性 (ER+) 肿瘤的患者 (不考虑淋巴结状况) 中在初期手术后给予五年的它莫西芬作为辅助治疗明显地减少了乳癌的死亡率 (EBCTCG(1998)Lancet351(9114):1451-67)。虽然它莫西芬具有一种免于心血管疾病的保护效应,由于对在子宫内膜中的 ER 的激动效应,发展子宫内膜癌的风险增加了 (EBCTCG(2005)Lancet 365(9472):1687-717)。

[0023] 芳香酶抑制剂 (AIs) 通过抑制芳香酶而起作用,该酶将雄激素转换成雌激素。AIs 不适合用于绝经前女性的治疗,因为它通过下丘脑和垂体腺体刺激卵巢以增加雄激素的产生。AIs 可以作为辅助治疗单独地或继它莫西芬治疗之后给予绝经后女性,并且已经显示它们显著降低了死亡率,如果单独给予可能更好 (Howell A et al.(1995)Lancet 345(8941):29-30;Ellis MJ and Rigden CE(2006)Curr Med Res Opin22(12):2479-87;Coates AS et al.(2007)J Clin Oncol 25(5):486-92)。然而,这种疗法是相对新的并且长期副作用还没有完全认识 (Buzdar A et al.(2006)Lancet Oncol7(8):633-43),但最重要的是心血管并发症以及骨质疏松症。

[0024] 新近研制的完全阻滞 ER 的纯抗雌激素如氟维司群,目前仅仅用于晚期乳癌而不在该辅助方案中 (Rutqvist LE(2004)Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 18(1):81-95)。

[0025] 虽然一些研究表明一些 ER 阴性 (ER-),即 ER α 阴性 (ER α -) 肿瘤对它莫西芬治疗有应答,辅助内分泌疗法在激素受体阴性乳癌中没有位置 (EBCTCG(1998)Lancet 351:1451-1467)。

[0026] 在所有乳癌的约 20%并且在低分化乳癌中高达 70%过量表达 Her2 基因 (Berger MS 等人 (1988)Cancer Res 48(5):1238-43;Borg Å et al.(1990)Cancer Res50(14):4332-7)。主要通过免疫组织化学 (IHC) 可以常规地评估 HER2 状况,并且在具有中度表达的病例中可以通过荧光原位杂交 (FISH) 分析确定基因扩增状况。HER2 过量表达或基因扩增通常与一种预后不良相关。此外,已经呈现了支持 HER2 过量表达与对内分泌治疗的抗性之间的关系的实验资料 (Shou J et al.(2004)J Natl Cancer Inst 96(12):926-35)。然而,临床资料并不一致 (Borg Å et al.(1994)Cancer Lett 81(2):137-44, De Placido S et al.(2003)Clin Ca Res 9(3):1039-46, RydénL et al.(2005)J Clin Oncol 23(21):4695-704)。

[0027] 乳癌是一种真正的异质性疾病,并且尽管对其性质的了解在增加,可用的治疗选项仍然不是十分满意的。

[0028] 发明的披露

[0029] 本披露的一个方面的一个目的是提供来自 HER2 细胞外结构域的氨基酸残基的亚群。本披露其他方面的目的是提供能够与这些亚群相互作用的亲和配体以及包括这些亲和

配体的组合物。本披露的某些其他方面的进一步的目的是提供利用这些亚群作为靶标（例如用于治疗目的）的用途和方法。

[0030] 本发明由所附权利要求定义的。

[0031] 因此，作为本披露的第一方面，提供了一种能够选择性地与一种亚群相互作用的亲和配体，该亚群是来自 HER2 的细胞外结构域 2 和 3 的 37 个或更少的连续的氨基酸残基 (SEQ ID NO :7)，所述亚群包括氨基酸序列 LQVF (SEQ ID NO :8) 和 / 或 ESFDGD (SEQ ID NO :9)。

[0032] 在本披露的情况下，“HER2 的细胞外结构域 2 和 3”是指由 SEQ ID NO :7 的氨基酸残基组成的 HER2 序列的部分。

[0033] 此外，在本披露的情况下，“来自 HER2 的细胞外结构域 2 和 3 的连续的氨基酸残基”是指 SEQ ID NO :7 的氨基酸序列的一个连续的部分。

[0034] 此外，在本披露的情况下，“与一种氨基酸残基的亚群选择性地相互作用”是指与包含在该亚群中的氨基酸残基选择性地相互作用。例如，能够与一种氨基酸残基的亚群选择性地相互作用的一种亲和配体可以能够与由该亚群的氨基酸残基组成的一个片段选择性地相互作用，这个片段可以在溶液中游离存在或被固定例如结合至一种珠粒上。还有，这种片段可以结合至报告基因基序上用于相互作用的检测。作为另一个实例，“能够与一种氨基酸残基的亚群选择性地相互作用的亲和配体”可以是指该亚群被包括在一个长的多肽中的情况，它是在该亲和配体与该亚群的氨基酸残基相互作用并且不与周围的氨基酸残基相互作用的前提下建立的。

[0035] 在本披露的情况下，“特异的”或“选择性的”相互作用（例如一种亲和配体与其靶标或抗原的“特异的”或“选择性的”相互作用）表示：该相互作用是这样使得在特异的与非特异的相互作用之间或在选择性的与非选择性的相互作用之间的区别变得有意义。在两种蛋白质之间的相互作用有时是通过解离常数测量的。解离常数描述了在两个分子之间的结合强度（或亲和性）。典型地在一种抗体与其抗原之间的解离常数是从 10^{-7} 到 10^{-11} M。然而，高的特异性并不是必需要求高的亲和性。对于其对应物具有低亲和性的分子（在摩尔范围内）已经显示出与具有很高亲和性的分子一样的特异性。在本披露的情况下，一种特异性或选择性的相互作用是指：在给定条件下在一种自然产生的或处理过的生物学流体的组织样品或液体样品中其他蛋白质存在下，为了确定一种特异性蛋白、靶标蛋白或其一种片段的存在和 / 或量的一种特定的方法可使用的程度。换言之，特异性或选择性是用于相关蛋白之间区分的能力。在本说明书中特异性的与选择性的有时是可互换使用的。例如，一种抗体的特异性或选择性可以如以下实例部分 4 中而确定，其中分别使用了一种蛋白阵列装置、一种悬浮珠粒阵列、以及一种多路竞争测定 (multiplexed competition assay) 来进行分析。特异性与选择性测定还被描述于 Nilsson P et al. (2005) Proteomics 5 : 4327-4337。

[0036] 本发明的第一方面是基于但不限于：诸位发明人已经发现亲和配体结合至由 HER2 的细胞外结构域 2 和 3 之内的氨基酸序列组成的多肽，特别是包括序列 LQVF (SEQ ID NO :8) 和 / 或 ESFDGD (SEQ ID NO :9) 的多肽，这些多肽对人类乳癌细胞的生长具有抑制作用。

[0037] 已经发现一个具有 26 个氨基酸残基的多肽片段 (SEQ ID NO :16)，以及更短的片

段如一个具有 21 个氨基酸残基的片段 (SEQ ID NO :19)、一个具有 12 个氨基酸残基的片段 (SEQ ID NO :20)、两个具有 9 个氨基酸残基的片段 (SEQ ID NO :15 和 18)、以及两个具有 8 个氨基酸残基的片段 (SEQ ID NO :11 和 17) 与展示出一种生长抑制作用的抗体相互作用 (参见图 6)。

[0038] 因此,在该第一方面的实施方案中,该亚群可以由 30 个或更少的氨基酸残基如 26 个或更少的氨基酸残基组成。此外,该亚群可以例如由 21 个或更少的氨基酸残基,如 16 个或更少的氨基酸残基,如 12 个或更少的氨基酸残基,如 9 个或更少的氨基酸残基,如 8 个或更少的氨基酸残基组成。

[0039] 在一些情况下该亲和配体与该亚群之间一种充分的相互作用可能要求不同长度的氨基酸序列。因此,在该第一方面的实施方案中,该亚群可以由 6 个或更多个氨基酸残基,如由 8 个或更多个氨基酸残基,如由 10 个或更多个氨基酸残基组成。

[0040] 如以下实例中所示,一种出产具有生长抑制作用的抗体的免疫法是通过使用一种抗原 (SEQ ID NO :1) 来进行的,其中在 C 末端的最后四个氨基酸残基是 LQVF。因此,在该第一方面的实施方案中,如果该亚群包括该序列 LQVF,它可能在 LQVF 的 C 端侧上具有 2 个或更少的氨基酸残基,如在 LQVF 的 C 端侧没有氨基酸残基。即,在一些实施方案中,该亚群的 C 端可能由以下组成 :... LQVFET (在 LQVF 的 C 端侧上有两个氨基酸残基)、... LQVFE (在 LQVF 的 C 端侧上有一个氨基酸残基)、... LQVF (在 LQVF 的 C 端侧上没有氨基酸残基)。

[0041] 已经发现许多个片段 (SEQ ID NO :11 以及 15-20) 与展示了生长抑制作用的 抗体 (即 msAb-C, 见实例部分 3) 相互作用。因此,在该第一方面的实施方案中,所述亚群可以选自下组,其组成为 :SEQ ID NO :11 以及 15-20。

[0042] 在该第一方面的进一步的实施方案中,该亚群可以包括该序列 LQVF。在这类实施方案中,该亚群可以选自下组,其组成为 :SEQ ID NO :11 和 20。SEQ ID NO :16 和 20 分别包括 LQVF。

[0043] 在该第一方面的其他的实施方案中,该亚群可以包括该序列 ESFDGD。在这类实施方案中,该亚群可以选自下组,其组成为 :SEQ ID NO :11 以及 15-19。SEQ ID NO :11 以及 15-19 的每一个包括 ESFDGD。

[0044] 在该第一方面的实施方案中,该亚群可以包括该序列 PESFDGD (SEQ ID NO :10) 或 LPESFDGD (SEQ ID NO :11)。

[0045] 此外,在该第一方面的实施方案中,该亚群可以包括该序列 ESFDGDP, 如 PESFDGDP, 如 LPESFDGDP。

[0046] 在该第一方面的实施方案中,该亚群可以是具有 SEQ ID NO :6 的 1-37 位的氨基酸残基的序列。

[0047] 如在以下实例部分 5 中进一步说明的,诸位发明人已经发现本披露的亲和配体可以抑制乳癌细胞的生长。因此,在该第一方面的实施方案中,该亲和配体可以抑制人类乳癌细胞的生长,如在培养物中的人类乳癌细胞。例如,相对于不能够与 HER2 的细胞外结构域选择性地相互作用的一种亲和配体,该亲和配体 (如能够与 HER2 的细胞外结构域选择性地相互作用的一种抗体) 可以抑制在培养物中人类乳癌细胞生长的 20% -100% (如 30% -100%)。进行产生这样一种相对生长抑制值的测量并且使这类测量适合于一种特定的情况是在本领域的那些普通技术人员能力之内的。

[0048] 作为一个实例,相对抑制的测量的可以通过以下方式进行:将某一浓度的亲和配体加入到人类乳癌细胞的一个第一培养物(如BT474乳癌细胞),并且将同样浓度的能够与HER2的细胞外结构域选择性地相互作用的一种抗体(如HPA001383(Atlas Antibodies, Sweden))加入到同样类型的人类乳癌细胞的一个第二培养物。孵育一定的时间(如4天)后,对各培养物的细胞数进行计数。将在该第二培养物中的细胞数考虑作为参考,并且相对于该参考计算该亲和配体的生长抑制值。即,若该参考是100个细胞并且该第一培养物包含70个细胞,则该生长抑制是 $(100-70)/100 = 30\%$ 。参见以下实例部分5。

[0049] 因此,这些人类乳癌细胞例如可以是BT474乳癌细胞。并且此外,该生长抑制例如可以在500ng/ml的浓度下的生长抑制。

[0050] 如在以下实例部分4c和4e中进一步说明的,诸位发明人已经显示本披露的亲和配体可以在一种低浓度结合它们的靶标。因此,在该第一方面的实施方案中,该亲和配体可以在低于100nM的EC50结合该亚群,如低于50nM,如低于20nM,如低于10nM。EC50的测量例如可以根据以下实例部分4c和4e来进行。

[0051] 在该第一方面的实施方案中,该亲和配体可以是一种抗体或其片段或衍生物。这类抗体例如可以根据本披露的这些实例部分生成的。

[0052] 以下给出了根据该第一方面的亲和配体的进一步的实例(“亲和配体”)。

[0053] 作为该第一方面的一个第一构型,提供了根据该第一方面的一种亲和配体,该亲和配体用于作为一种药物。

[0054] 存在许多其特征为HER2过量表达的失调,并且结合HER2的细胞外结构域的亲和配体可以被用于作为一种药物,用于治疗或影响这类失调的进展。

[0055] 因此,作为该第一方面的一个第二构型,提供了一种根据该第一方面亲和配体,该亲和配体用于一种哺乳动物受试者的治疗,该哺乳动物受试者患有或怀疑患有以HER2过量表达为特征的失调。以下讨论了根据该第一方面的其特征为HER2过量表达的不同失调的实例(“HER2失调”)。

[0056] 在本披露的情况下,“患有一种乳癌的哺乳动物受试者”是指患有一种原发或继发乳房肿瘤的哺乳动物受试者或已经从乳房去除肿瘤的哺乳动物受试者,其中该肿瘤的去除是指通过任何类型的手术或治疗杀死或去除该肿瘤。“乳房肿瘤”包括导管原位癌(DCIS)。在本披露的方法和用途方面中,或在“用于使用的产品”(本披露的构型)中,“患有一种乳癌的哺乳动物受试者”还包括其中该哺乳动物受试者在进行该用途或方法的时候怀疑为患有一种乳癌并且随后确立乳癌诊断的情形。

[0057] 此外,在本披露的情况下,“怀疑患有乳癌的一个哺乳动物受试者”例如可以是一个受试者,该受试者呈现出典型的一种或多种乳癌症候群和/或指示为乳癌的高风险,如一种早期乳癌或遗传特征,例如在家族中的乳癌的历史。该风险还可以根据一种模型评估,例如Gail模型。

[0058] 已经报告在用一种抗HER2抗体治疗的癌患者中,该癌症经常发展出针对该抗HER2抗体的抗性。所以,一种靶向该抗HER2细胞外结构域(而不是该抗HER2抗体)的另外部分的“新的”亲和配体可以适合用于进一步治疗患有这类癌症的患者。

[0059] 因此,在该第一方面的第二构型的实施方案中,对该受试者可能已经用一种能够与HER2(如HER2的细胞外结构域)选择性地相互作用的治疗性抗体进行治疗,这种治疗性

抗体与该亲和配体是不同的。

[0060] 此外,在这类实施方案中,这种以 HER2 过量表达为特征的失调例如可以是一种癌症,如一种乳癌,例如一种转移性乳癌,该癌症已经发展了对治疗性抗体的抗性。

[0061] 例如,能够与 HER2 选择性地相互作用的治疗性抗体可以是曲妥珠单抗或帕妥珠单抗 (pertuzumab)。

[0062] 作为本发明的一个第二方面,提供了一种组合物,该组合物包括一种根据该第一方面的亲和配体,以及一个第二亲和配体,该第二亲和配体能够与具有来自 HER2 (SEQ ID NO :7) 的细胞外结构域 2 和 3 的具有 73 个或更少的连续的氨基酸残基的一个第二亚群选择性地相互作用,所述第二亚群包括 SEQ ID NO :12、SEQ ID NO :13 和 / 或 SEQ ID NO :14 的氨基酸序列。

[0063] 这个第二方面是基于但不限于:诸位发明人洞察到靶向 HER2 的细胞外结构域 2 和 3 的两个不同部分的抗体的组合可以导致比仅仅靶向这些部分之一的抗体更强的生长抑制作用。这在以下实例部分 5d-f 中进一步讨论了。

[0064] 以下给出了根据该第二方面的第二亲和配体的不同类型的实例 (“亲和配体”)。

[0065] 已经发现这些序列 SEQ ID NO :21-34 与 msAb-N 相互作用。

[0066] 因此,在该第二方面的实施方案中,该第二亚群可以是选自下组的氨基酸序列,该组的组成为 SEQ ID NO :21-34。

[0067] 此外,SEQ ID NO :21-34 分别是 26、44、27、45、19、39、23、31、70、22、22、23、38、以及 23 个氨基酸残基长度 (参见图 7)。此外,鉴定的表位 SEQ ID NO :12-14 分别是 8、10、以及 16 个氨基酸残基长度。

[0068] 因此,在该第二方面的实施方案中,该第二亚群可以是 70 个或更少的氨基酸残基、如 55 个或更少的氨基酸残基、如 45 个或更少的氨基酸残基、如 44 个或更少的氨基酸残基、如 39 个或更少的氨基酸残基、如 38 个或更少的氨基酸残基、如 31 个或更少的氨基酸残基、如 27 个或更少的氨基酸残基、如 26 个或更少的氨基酸残基、如 23 个或更少的氨基酸残基、如 22 个或更少的氨基酸残基、如 19 个或更少的氨基酸残基、如 16 个或更少的氨基酸残基、如 10 个或更少的氨基酸残基、如 8 个或更少的氨基酸残基。

[0069] 此外,该第二方面的这些实施方案的该第二亚群例如可以是 8 个或更多的氨基酸残基、如 10 个或更多的氨基酸残基。这在以上进一步讨论了。

[0070] 在该第二方面的实施方案中,该第二亚群可以由序列 SEQ ID NO :4 的 39-111 位的氨基酸残基组成的。

[0071] 如在以下实例部分 5d-f 中进一步说明的,诸位发明人已经发现本披露的抗体的组合可以抑制乳癌的生长。因此,在该第二方面的实施方案中,该组合物可以抑制人类乳癌细胞 (如在培养物中的人类乳癌细胞) 的生长。例如,相对于不能够与 HER2 的细胞外结构域选择性地相互作用的一种亲和配体,该组合物 (如能够与 HER2 的细胞外结构域选择性地相互作用的一种抗体) 可以抑制在培养物中人类乳癌细胞生长的 20% -100% (如 30% -100%)。进行产生这样一种相对生长抑制值的测量并且使这类测量适合于一种特定的情况是在本领域的普通技术人员能力之内的。这些人类乳癌细胞例如可以是 BT474 乳癌细胞。并且此外,该生长抑制例如可以是在 500ng/ml 的浓度下的生长抑制。以上描述了与该第一方面相关的生长抑制测量的一个实例。

[0072] 如在以下实例部分 4c 和 4e 中进一步说明的, 诸位发明人已经显示出本披露的抗体可以一个低浓度结合它们的靶标。因此, 在该第二方面的实施方案中, 该第二亲和配体可以在低于 100nM 的 EC50 结合该第二亚群, 如低于 50nM, 如低于 20nM, 如低于 10nM。这样的 EC50 测量例如可以是根据以下实例部分 4c 和 4e 进行的。

[0073] 在该第二方面的实施方案中, 该第二亲和配体可以是一种抗体或其片段或衍生物。这样一种抗体例如可以是根据本披露的这些实例部分生成的。以下讨论了适合于该第二方面的该第二亲和配体的亲和配体的其他类型 (“亲和配体”)。

[0074] 为了加强和 / 或延长一种根据该第一方面亲和配体或一种根据该第二方面的组合物的作用, 或为了抵消抗性的发展, 该亲和配体或组合物可以与一种靶向地针对 HER2 的酪氨酸激酶抑制剂相组合。因此, 作为该第二方面的一个变体, 提供了一种组合物, 该组合物包括: 一种根据该第一方面的亲和配体或一种根据该第二方面的组合物; 以及一种针对 HER2 的酪氨酸激酶抑制剂。该针对 HER2 的酪氨酸激酶抑制剂例如可以是拉帕替尼 (lapatinib)、吉非替尼 (gefitinib)、或厄洛替尼 (erlotinib)。

[0075] 作为该第二方面的一个第一构型, 提供了根据该第二方面的一种组合物, 该组合物用于作为一种药物。

[0076] 存在许多其特征为 HER2 过量表达的失调, 并且包括结合 HER2 的细胞外结构域的亲和配体的组合物可以用于作为一种药物, 用于治疗或影响这类失调的进展。

[0077] 因此, 作为该第二方面的一个第二构型, 其中提供了一种根据该第二方面的组合物, 该组合物用于一种哺乳动物受试者的治疗, 该哺乳动物受试者患有或怀疑患有一种以 HER2 过量表达为特征的失调。以下讨论了根据该第二方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例 (“HER2 失调”)。

[0078] 如以上所叙述, 已经报告在用一种抗 HER2 抗体治疗的癌症患者中, 该癌症可能发展针对该抗 HER2 抗体的抗性。因此, 一种包括靶向抗 HER2 的细胞外结构域的其他部分的抗体 (而不是抗 HER2 抗体) 的组合物可以适合用于进一步治疗患有这类癌症的患者。

[0079] 因此, 在该第二方面的第二构型的实施方案中, 对该受试者可能已经用一种能够与 HER2 (如 HER2 的细胞外结构域) 选择性地相互作用的治疗性抗体治疗, 该治疗性抗体与该亲和配体或该第二亲和配体是不同的。

[0080] 此外, 在这类实施方案中, 这种以 HER2 过量表达为特征的失调例如可以是一种癌症, 如一种乳癌, 例如一种转移性乳癌, 这些癌症已经发展了对该治疗性抗体的抗性。

[0081] 例如, 能够与 HER2 选择性地相互作用的治疗性抗体可以是曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

[0082] 作为本披露的一个第三方面, 提供了一种分离的多肽, 该多肽由来自 HER2 的细胞外结构域 2 和 3 的 37 个或更少的连续的氨基酸残基 (SEQ ID NO :7) 组成, 并且包括该氨基酸序列 LQVF (SEQ ID NO :8) 和 / 或 ESFDGD (SEQ ID NO :9)。

[0083] 本披露的这个第三方面是基于但不限于: 诸位发明人洞察到 HER2 的细胞外结构域的某些部分是特别令人感兴趣的, 例如作为一种治疗靶标, 并且可以利用包括或其组成为这类部分的那些片段进行治疗物的生产、选择、或纯化。

[0084] 已经发现具有 26 个氨基酸残基的一个多肽片段 (SEQ ID NO :16), 以及更短的片段如一个具有 21 个氨基酸残基的片段 (SEQ ID NO :19)、一个具有 12 个氨基酸残基的片段

(SEQ ID NO:20)、两个具有 9 个氨基酸残基的片段 (SEQ ID NO:15 和 18)、以及两个具有 8 个氨基酸残基的片段 (SEQ ID NO:11 和 17) 与展示出一种生长抑制作用的抗体相互作用。

[0085] 因此,在该第三方面的实施方案中,该多肽可以由 31 个或更少的氨基酸残基,如 26 个或更少的氨基酸残基,如 21 个或更少的氨基酸残基,如 16 个或更少的氨基酸残基,如 12 个或更少的氨基酸残基,如 9 个或更少的氨基酸残基,如 8 个或更少的氨基酸残基组成。

[0086] 在一种亲和配体(如该第一方面的一种亲和配体)与该多肽之间的一种充分的相互作用在一些情况下可能要求不同长度的氨基酸序列。因此,在该第三方面的实施方案中,该多肽可以由 6 个或更多个氨基酸残基,如 8 个或更多个氨基酸残基,如 10 个或更多个氨基酸残基组成。

[0087] 如以下实例部分 1 和 2 中所示,一种出产具有生长抑制作用的抗体的免疫法是通过使用一种抗原 (SEQ ID NO:1) 来进行的,其中在 C 末端的最后四个氨基酸残基是 LQVF。因此,在该第三方面的实施方案中,如果该多肽包括该序列 LQVF,则它在该 LQVF 的 C 端侧具有 2 个或更少的氨基酸残基,如在该 LQVF 的 C 端侧没有氨基酸残基。即,在一些实施方案中,该多肽的 C 端可能由以下组成:...LQVFET(在 LQVF 的 C 端侧上有两个氨基酸残基)、...LQVFE(在 LQVF 的 C 端侧上有一个氨基酸残基)、或...LQVF(在 LQVF 的 C 端侧上没有氨基酸残基)。

[0088] 已经发现许多片段 (SEQ ID NO:11 以及 15-20) 与展示了生长抑制作用的抗体(即 msAb-C,见实例部分 3) 相互作用。因此,在该第三方面的实施方案中,该多肽可以选自下组,其组成为:SEQ ID NO:11 以及 15-20。

[0089] 在该第三方面的进一步的实施方案中,该多肽可以包括该序列 LQVF (SEQ ID NO:8)。在这类实施方案中,该多肽例如可以选自下组,其组成为:SEQ ID NO:16 和 20。SEQ ID NO:16 和 20 包括 LQVF。

[0090] 此外,在该第三方面的实施方案中,该多肽可以包括该序列 ESFDGD (SEQ ID NO:9)。在这类实施方案中,该多肽例如可以选自下组,其组成为:SEQ ID NO:11 以及 15-19。

[0091] 更进一步地,在该第三方面的实施方案中,该多肽可以包括该序列 PESFDGD (SEQ ID NO:10) 或 LPESFDGD (SEQ ID NO:11)。

[0092] 在该第三方面的实施方案中,该多肽可以由 SEQ ID NO:6 的 1-37 位的氨基酸残基的序列组成。(即以 LQVF 结尾的 SEQ ID NO:6 的一个 37 个氨基酸残基长度的子序列。)

[0093] 作为该第三方面的一种构型,其中提供了根据该第三方面的一种多肽,用于作为一种抗原如一种用于例如非人类哺乳动物的免疫的抗原。

[0094] 作为它的一种相关构型,其中提供了根据该第三方面的一种多肽,用于在制备治疗性抗体(例如为用于治疗其特征为 HER2 的过量表达的失调的治疗性抗体)中使用。以下讨论了根据该第三方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例(“HER2 失调”)。

[0095] 作为本披露的一个第四方面,其中提供了根据该第三方面的一种多肽用于作为一种抗原如一种用于例如非人类哺乳动物的免疫的抗原的用途。

[0096] 以下进一步讨论了其中根据该第三方面的一种多肽用作一种抗原的用途和方法。

[0097] 作为该第四方面的一个第一构型,其中提供了根据该第三方面的一种多肽在一种治疗性抗体(如一种治疗性单克隆抗体,例如一种治疗性嵌合抗体或人源化单克隆抗体)的制备中的用途。

[0098] 作为一个实例,单克隆抗体可以通过融合来自已经用该多肽免疫的小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞而制备。此外,兔 B 细胞也可用于这一目的。

[0099] 然后可以稀释细胞的这种混合物,并且可以从单个母细胞生长出克隆。然后可以测试由这些不同的克隆分泌的抗体结合至该多肽的能力。随后,可以在培养基中生长一种稳定的和 / 或生产的克隆到一个高的量。

[0100] 例如,可以将编码来自该稳定克隆的单克隆鼠抗体的结合部分的 DNA 与编码人类抗体的 DNA 合并。然后可以用哺乳动物的细胞培养物表达基因工程 DNA 并且生产鼠-人抗体。论及嵌合抗体或人源化抗体,取决于该鼠抗体部分的大小。作为另一个实例,可以涉及基因工程鼠以产生更多的人源样抗体 (human-like antibody)。

[0101] 用于生产单克隆抗体和抗体的人源化的方法对技术人员是熟知的。

[0102] 将以上所描述的编码人类抗体的 DNA 或涉及基因工程鼠的合并的一个原因是避免人类免疫系统将这些抗体识别为外来的。

[0103] 然后可以将这些嵌合抗体或人源化抗体用作治疗性抗体,例如用于治疗其特征为 HER2 过量表达的失调。

[0104] 作为该第四方面的一个第二构型,其中提供了根据该第三方面的一种多肽的用途,用于选择或纯化一种治疗性亲和配体,该治疗性亲和配体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调。以下讨论了根据该第四方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例 (“HER2 失调”)。

[0105] 以下给出了根据该第四方面的治疗性亲和配体的实例 (“亲和配体”)。

[0106] 例如,这样的使用可以包括在一种固相支持物 (其上已经固定该多肽) 上的亲和纯化。例如可以将该固相支持物安排在一个柱中。此外,该使用可以包括使用一种固相支持物 (其上已经固定该多肽) 的亲和配体的选择,该亲和配体具有根据该第三方面的一种多肽的特异性。这样的固相支持物可以是 96 孔板、磁珠、琼脂糖珠粒或琼脂糖凝胶珠粒。此外,该使用可以包括在一种可溶基质 (例如使用一种葡聚糖基质) 上的亲和配体的分析,或在一种表面等离子共振仪 (如一种 Biacore™ 仪) 中的使用,其中该分析例如可以包括监测固定的多肽与许多潜在的亲和配体的亲合性。

[0107] 作为该第四方面的一个第三构型,其中提供了根据该第三方面的一种多肽作为一种治疗靶标的用途。

[0108] 作为一个第五方面,其中提供了根据该第一方面亲和配体的用途。

[0109] 作为该第五方面的一个第一构型,其中提供了根据该第一方面的一种亲和配体作为一种药物的用途。

[0110] 作为该第五方面的一个第二构型,其中提供了一种根据该第一方面的亲和配体的用途,用于制造用于治疗一种哺乳动物受试者的药物,该哺乳动物受试者患有或怀疑患有一种以 HER2 过量表达为特征的失调。以下讨论了根据该第五方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例 (“HER2 失调”)

[0111] 在该第五方面的该第二构型的实施方案中,对该受试者已经用一种能够与 HER2 (如 HER2 的细胞外结构域) 选择性地相互作用的治疗性抗体治疗,这种治疗性抗体与该亲和配体是不同的。

[0112] 此外,在该第五方面的该第二构型的实施方案中,这种以 HER2 过量表达为特征的

失调例如可以是一种癌症,如一种乳癌,例如一种转移性乳癌,该癌症已经发展了于该治疗性抗体的抗性。

[0113] 如以上进一步讨论了与该第一方面的第一和第二构型相关的该第五方面的第一和第二构型的细节。

[0114] 作为本披露的一个第六方面,其中提供了用于鉴定一种亲和配体的方法,该亲和配体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调,该方法包括以下步骤:

[0115] a) 使一种多肽与一种公认的亲和配体接触,该多肽包括根据该第一方面的亚群;以及

[0116] b) 确定是否该公认的亲和配体结合至该亚群。

[0117] 在该第六方面的实施方案中,步骤 a) 可以是:

[0118] 使根据该第三方面的一种多肽与一种公认的亲和配体在使之能够结合的条件下进行接触;并且步骤 b) 可以是:

[0119] 确定是否该公认的亲和配体结合至该多肽。

[0120] 以下给出了根据该第六方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例(“HER2 失调”)。

[0121] 此外,以下给出了根据该第六方面的亲和配体的实例(“亲和配体”)。

[0122] 这个第六方面是基于但不限于:诸位发明人洞察到与鉴定的 HER2 的细胞外结构域的靶序列对应的蛋白片段可能对于鉴定或选择治疗性亲和配体是有用的。

[0123] 在该第六方面的实施方案中,其中该失调是一种癌症,如一种乳癌,该方法可以进一步包括以下步骤:

[0124] c) 确定是否该公认的亲和配体抑制了癌细胞的生长或诱导了癌细胞的凋亡,如乳腺癌细胞,例如 BT474 乳腺癌细胞。

[0125] 例如,与一种靶向 HER2 胞内部分的抗体相比,步骤 c) 的标准可以是该公认的亲和配体抑制生长的 20% 或更高、如 30% 或更高。例如,该公认的亲和配体在一个 250ng/ml 或 500ng/ml 的浓度下可以抑制生长。

[0126] 这样的测定例如可以如以下实例部分 5 进行。

[0127] 作为该第六方面的一个第一构型,其中提供了用于鉴定一种或多种亲和配体的方法,这些亲和配体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调,该方法包括以下这些步骤:

[0128] a) 使根据该第三方面的一种多肽与一种或多种公认的亲和配体接触;并且

[0129] b) 鉴定结合至该多肽的亲和配体。

[0130] 作为该第六方面的一个第二构型,其中提供了一种方法,该方法用于生产一种克隆,例如表达一种治疗性抗体的克隆,该治疗性抗体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调,该方法包括:

[0131] a) 提供从一种哺乳动物获得的细胞,该哺乳动物已经用一种抗原免疫,该抗原包括一种根据该第一方面的亚群,这些细胞包括编码能够与该亚群选择性地相互作用的一种抗体的 DNA;并且

[0132] b) 将所述细胞与骨髓瘤细胞融合以获得至少一个克隆。

[0133] 在本披露的情况下,“一个克隆”是指一群相同的细胞,这些细胞共享一个共同祖

先 (common ancestry), 即衍生自同一个母细胞。

[0134] 例如, 步骤 b) 可以包括培养。

[0135] 在该第六方面的第二构型的实施方案中, 该方法进一步包括以下步骤:

[0136] a') 用该抗原免疫该哺乳动物, 其中步骤 a') 先于步骤 a)。

[0137] 例如, 步骤 a) 的哺乳动物可以是一个非人类哺乳动物。

[0138] 此外, 在步骤 a) 中提供的这些细胞例如可以是脾细胞。并且, 步骤 a) 的哺乳动物例如可以是一种鼠。因此, 在步骤 a) 中提供的这些细胞例如可以是来自一种鼠的脾细胞。

[0139] 可替代地, 在步骤 a) 中提供的这些细胞例如可以是 B 细胞。此外, 步骤 a) 的哺乳动物例如可以是一种兔。因此, 在步骤 a) 中提供的这些细胞例如可以是兔的 B 细胞。

[0140] 在该第六方面的第二构型的实施方案中, 该方法可以进一步包括以下步骤:

[0141] c) 选择来自步骤 b) 的一种克隆, 该克隆分泌能够与该亚群选择性地相互作用的抗体。

[0142] 此外, 在该第六方面的该第二构型的实施方案中, 该抗原可以由根据该第三方面的一种多肽组成。在这类实施方案中, 如果该方法包括步骤 c), 则选择一种分泌能够与该抗原选择性地相互作用的抗体的克隆。

[0143] 还有, 在该第六方面的第二构型的实施方案中, 该方法可以进一步包括以下步骤:

[0144] d) 提供在步骤 b) 中获得的或在步骤 c) 中选择的一种克隆, 并且将来自该克隆的 DNA (其中来自该克隆的 DNA 编码由该克隆表达的一种抗体的至少与该亚群选择性地相互作用的这个部分) 与编码人类抗体的 DNA 合并; 并且

[0145] e) 将来自步骤 d) 合并的 DNA 结合进细胞以获得用于表达一种治疗性抗体的一种克隆, 该治疗性抗体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调。

[0146] 例如, 步骤 e) 可以包括培养。

[0147] 步骤 e) 的克隆例如可以是一种哺乳动物细胞系。由步骤 e) 的这个克隆表达的治疗性抗体例如可以是嵌合抗体或人源化抗体。

[0148] 作为该第六方面的一个第三构型, 其中提供了一种生产亲和配体 (如一种抗体, 例如一种治疗性抗体) 的方法, 该方法包括: 使用根据该第六方面的方法鉴定一种亲和配体; 并且生产所述的鉴定的亲和配体。特别地, 如果通过本披露的传授内容的指导来生产这样的鉴定的亲和配体是在技术人员的能力范围之内的。

[0149] 作为该第六方面的一个第四构型, 其中提供了一种生产亲和配体 (如一种抗体, 例如一种治疗性抗体) 的方法, 该方法包括: 使用根据该第六方面的该第二构型的方法生产一种克隆; 并且从所述克隆获得所述亲和配体。特别地, 如果通过本披露传授的内容指导来生产来自该克隆的亲和配体是在技术人员的能力范围之内的。例如, 从该克隆获得所述亲和配体可以包括启动该亲和配体 (例如一种抗体) 的表达, 并且收获该随后分泌的亲和配体 (例如抗体)。

[0150] 作为本披露的一个第七方面, 其中提供了一种治疗一个哺乳动物受试者的方法, 该哺乳动物受试者患有或怀疑患有以 HER2 过量表达为特征的失调, 该方法包括对该受试者给予一个有效量的根据该第一方面的一种亲和配体或根据该第二方面的一种组合物。

[0151] 以下讨论了根据该第七方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例 (“HER2 失调”)。

[0152] 在该第七方面的实施方案中,该方法可以进一步包括对该受试者给予一种针对 HER2 的酪氨酸激酶抑制剂。

[0153] 此外,在该第七方面的实施方案中,该治疗可以是一种手术前的治疗。因此,例如可以根据该第七方面治疗怀疑患有乳癌或具有乳癌复发的高风险的一个受试者或具有预定的乳癌外科手术的受试者。

[0154] 可替代地,在该第七方面的实施方案中,该治疗可以是一种手术后的治疗。

[0155] 此外,该治疗可以是手术前和手术后的治疗,例如,可以在外科手术去除一个乳癌肿瘤之前对该受试者给予该亲和配体或组合物的一种第一有效量,并且在外科手术去除该乳癌肿瘤之后对该受试者给予该亲和配体或组合物的一种第二有效量。

[0156] 在该第七方面的实施方案中,对该受试者可能已经用一种能够与 HER2 (如 HER2 的细胞外结构域) 选择性地相互作用的治疗性抗体治疗,该治疗性抗体与该亲和配体是不同的。这样的治疗性抗体例如可以是曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

[0157] 在该第七方面的这类实施方案中,这种以 HER2 过量表达为特征的失调可以是一种癌症 (如一种乳癌),该乳癌已经发展了对该治疗性抗体的抗性。

[0158] 作为本发明的一个第八方面,其中提供了一种制造品,包括:一种容器;在该容器内的一种组合物,该组合物包括一种根据该第一方面的亲和配体或根据该第二方面的一种组合物;以及在该容器上或与该容器相关的一种标签,该标签表明所述组合物可以用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调。

[0159] 例如,该容器可以是一个瓶子、小瓶、或注射器。该容器可以从许多种材料 (如玻璃或塑料) 形成的。该容器容纳一种用于治疗该失调有效的亲和配体或组合物,并且可以具有一个无菌入口。例如,该容器可以是一种静脉输液袋或一种小瓶 (具有一个可通过皮下注射针刺穿的塞子)。例如,该制造品可以进一步包括一个第二容器,该第二容器包括一种药学上可接受的缓冲剂,如磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液、或葡萄糖溶液。并且,该制造品可以进一步包含来自一种商业的以及使用者立场的其他的所期望的材料,包括其他的缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头、以及注射器。例如,该制造品可以另外包括一种具有使用说明书的包装插件。例如这可以是用于外科手术前和 / 或外科手术后使用的说明书和 / 或用于对一个受试者给药的说明书,该受试者患有一种癌,该癌症已经发展了针对治疗性抗 HER2 抗体的抗性。

[0160] 以下讨论了根据该第八方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例 (“HER2 失调”)。

[0161] 作为本披露的一个第九方面,其中提供了一种亲和配体,该亲和配体是该第二方面的第二亲和配体。

[0162] 作为该第九方面的一个第一构型,其中提供了根据该第九方面的一种亲和配体,该亲和配体用于作为一种药物。

[0163] 存在多种其特征为 HER2 过量表达的失调,并且结合 HER2 的细胞外结构域的亲和配体可以用于作为一种药物,用于治疗或影响这类失调的进展。

[0164] 因此,作为该第九方面的一个第二构型,其中提供了根据该第九方面的亲和配体,

该亲和配体用于治疗其特征为 HER2 过量表达的失调。以下讨论了根据该第九方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例（“HER2 失调”）

[0165] 如以上所叙述,已经报告在用一种抗 HER2 抗体治疗的癌患者中,该癌症经常发展出针对该抗 HER2 抗体的抗性。因此,一种靶向 HER2 的细胞外结构域的其他部分的“新的”亲和配体（而不是抗 HER2 抗体）可以适合用于进一步治疗患有这类癌症的患者。

[0166] 因此,在该第九方面的第二构型的实施方案中,对该受试者可能已经用一种能够与 HER2（如 HER2 的细胞外结构域）选择性地相互作用的治疗性抗体治疗,该治疗性抗体与根据该第九方面的亲和配体是不同的。

[0167] 此外,在这类实施方案中,这种以 HER2 过量表达为特征的失调例如可以是一种癌症（如一种乳癌,例如一种转移性乳癌）,这些癌已经发展了对于该治疗性抗体的抗性。

[0168] 例如,能够选择性地与 HER2 相互作用的治疗性抗体可以是曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

[0169] 作为本披露的一个第十方面,其中提供了一种分离的多肽,该分离的多肽由来自 HER2 的细胞外结构域 2 和 3 的 73 个或更少的连续的氨基酸残基（SEQ ID NO:7）组成,并且包括 LQVF（SEQ ID NO:12）、SEQ ID NO:13 和 / 或 SEQ ID NO:14 的氨基酸序列。

[0170] 本披露的这个第十方面是基于但不限于:诸位发明人洞察到 HER2 的细胞外结构域的某些部分是特别令人感兴趣的,例如作为一种治疗靶标,并且可以利用包括或其组成这类部分的那些片段用于治疗物的生产、选择、或纯化。

[0171] 在该第十方面的实施方案中,该多肽可以由选自下组的一个氨基酸序列组成,该组的组成为:SEQ ID NO:21-34。

[0172] 这些多肽 SEQ ID NO:21-34（已经发现它们与 msAb-N 相互作用）分别具有 26、44、27、45、19、39、23、31、70、22、22、23、38 以及 23 个氨基酸残基的长度（参见图 7）。并且,这些鉴定的表位 SEQ ID NO:12-14 分别具有 8、10 以及 16 个氨基酸残基的长度。

[0173] 因此,在该第十方面的实施方案中,该多肽可以是由 70 个或更少的氨基酸残基组成、如 55 个或更少的氨基酸残基、如 45 个或更少的氨基酸残基、如 44 个或更少的氨基酸残基、如 39 个或更少的氨基酸残基、如 38 个或更少的氨基酸残基、如 31 个或更少的氨基酸残基、如 27 个或更少的氨基酸残基、如 26 个或更少的氨基酸残基、如 23 个或更少的氨基酸残基、如 22 个或更少的氨基酸残基、如 19 个或更少的氨基酸残基、如 16 个或更少的氨基酸残基、如 10 个或更少的氨基酸残基、如 8 个或更少的氨基酸残基。

[0174] 如以上叙述,在一种亲和配体（如该第九方面的一种亲和配体）与该多肽之间的一种充分的相互作用在一些情况下可能要求不同长度的氨基酸序列。因此,在该第十方面的实施方案中,该多肽可以由 6 个或更多个氨基酸残基,如 8 个或更多个氨基酸残基,如 10 个或更多个氨基酸残基组成。

[0175] 在该第十方面的进一步的实施方案中,该多肽可以包括序列 SEQ ID NO:12。在这类实施方案中,该多肽例如可以由包括 SEQ ID NO:12 的序列 SEQ ID NO:21-34 的任一个组成。

[0176] 在该第十方面的进一步的实施方案中,该多肽可以包括序列 SEQ ID NO:13。在这类实施方案中,该多肽例如可以由包括 SEQ ID NO:13 的序列 SEQ ID NO:21-34 的任一个组成。

[0177] 在该第十方面的此外的实施方案中,该多肽可以包括序列 SEQ ID NO:14。在这类实施方案中,该多肽例如可以由包括 SEQ ID NO:14 的序列 SEQ ID NO:21-34 的任一个组成。

[0178] 在该第十方面的实施方案中,该多肽可以是由序列 SEQ ID NO:4 的 39-111 位的氨基酸残基组成。

[0179] 作为该第十方面的一种构型,其中提供了根据该第十方面的一种多肽用于作为一种抗原使用,如一种用于(例如非人类哺乳动物的)免疫法的抗原。

[0180] 作为其一种相关的构型,其中提供了根据该第十方面的一种多肽用于制备治疗性抗体(例如用于治疗其特征为 HER2 的过量表达的失调的治疗性抗体)。以下讨论了根据该第十方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例(“HER2 失调”)

[0181] 作为本披露的一个第十一方面,其中提供了根据该第十一方面的一种多肽作为一种抗原如一种用于免疫(例如一种非人类哺乳动物的免疫)的抗原的用途。

[0182] 以下进一步讨论了其中根据该第十方面的一种多肽用作一种抗原的用途和方法。

[0183] 作为该第十一方面的一个第一构型,其中提供了根据该第十方面的一种多肽在一种治疗性抗体(如一种治疗性单克隆抗体,例如一种治疗性嵌合单克隆抗体或人源化单克隆抗体)的制备中的用途。结合该第四方面的第一构型在以上进一步论述了这种情况。

[0184] 作为该第十一方面的一个第二构型,其中提供了根据该第十方面的一种多肽用于选择或纯化一种治疗性亲和配体,该治疗性亲和配体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调。以下讨论了根据该第十一方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例(“HER2 失调”)

[0185] 例如,这样的用途可以包括在一种固相支持物(其上已经固定该多肽)上的亲和纯化。例如可以将该固相支持物安排在一个柱中。此外,该用途可以包括选择对根据该第十方面的一种多肽具有特异性的亲和配体,通过使用一种固相支持物(其上已经固定该多肽)。这样的固相支持物可以是 96 孔板、磁珠、琼脂糖珠粒或琼脂糖凝胶珠粒。此外,该使用可以包括在一种可溶基质(例如使用一种葡聚糖基质)上的亲和配体的分析,或在一种表面等离子共振仪(如一种 Biacore™ 仪)中的使用,其中该分析例如可以包括监测固定的多肽与许多潜在的亲和配体的亲合性。

[0186] 以下给出了根据该第十一方面的治疗性亲和配体的实例(“亲和配体”)。

[0187] 作为该第十一方面的一个第三构型,其中提供了根据该第十方面的一种多肽作为一种治疗靶标的用途。

[0188] 作为一个第十二方面,其中提供了根据该第九方面的亲和配体的用途。

[0189] 作为该第十二方面的一个第一构型,其中提供了根据该第九方面的一种亲和配体作为一种药物的用途。

[0190] 作为该第十二方面的一个第二构型,其中提供了一种根据该第九方面的亲和配体的用途,用于制造用于治疗一种哺乳动物受试者的药物,该哺乳动物受试者患有或怀疑患有以 HER2 过量表达为特征的失调。以下讨论了根据该第十二方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例(“HER2 失调”)

[0191] 在该第十二方面的该第二构型的实施方案中,对该受试者可能已经用一种能够与 HER2(如 HER2 的细胞外结构域)选择性地相互作用的治疗性抗体治疗,这种治疗性抗体与

该亲和配体是不同的。

[0192] 并且,在该第十二方面的该第二构型的实施方案中,这种以 HER2 过量表达为特征的失调可以是一种癌症,如一种乳癌,例如一种转移性乳癌,该癌症已经发展了对该治疗性抗体的抗性。

[0193] 以上进一步讨论了与该第九方面的第一和第二构型相关的该第十二方面的第一和第二构型的主题。

[0194] 作为本披露的一个第十三方面,其中提供了用于鉴定一种亲和配体的方法,该亲和配体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调,该方法包括以下这些步骤:

[0195] a) 使一种多肽与一种公认的亲和配体接触,该多肽包括根据该第二方面的一个第二亚群;并且

[0196] b) 确定是否该公认的亲和配体结合至该第二亚群。

[0197] 在该第十三方面的实施方案中,步骤 a) 可以是:

[0198] 使根据该第十方面的一种多肽与一种公认的亲和配体在使之能够结合的条件下接触;并且步骤 b) 可以是:

[0199] 确定是否该公认的亲和配体结合至该多肽。

[0200] 以下给出了根据该第十三方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例(“HER2 失调”)。

[0201] 此外,以下给出了根据该第十三方面的亲和配体的实例(“亲和配体”)。

[0202] 这个第十三方面是基于但不限于:诸位发明人洞察到与 HER2 的细胞外结构域的鉴定的靶序列对应的蛋白片段可能对于鉴定或选择治疗性亲和配体是有用的。

[0203] 在该第十三方面的实施方案中,其中该失调是一种癌症如一种乳癌,该方法可以进一步包括以下步骤:

[0204] c) 确定是否该公认的亲和配体抑制了癌细胞的生长或诱导了癌细胞的凋亡,如乳腺癌细胞,例如 BT474 乳腺癌细胞。

[0205] 例如,步骤 c) 的标准可以是:该公认的亲和配体比一种靶向 HER2 胞内部分的抗体更能抑制生长。例如,该公认的亲和配体在 250ng/ml 或 500ng/ml 的浓度下可以抑制生长。

[0206] 这样的测定例如可以如以下实例部分 5 而进行。

[0207] 作为该第十三方面的一个第一构型,其中提供了用于鉴定一种或多种亲和配体的方法,这些亲和配体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调,该方法包括以下步骤:

[0208] a) 使根据该第十方面的一种多肽与一种或多种公认的亲和配体接触;并且

[0209] b) 鉴定结合至该多肽的亲和配体。

[0210] 作为该第十三方面的一个第二构型,其中提供了一种生产一种克隆的方法,例如表达一种治疗性抗体的克隆,该治疗性抗体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调,该方法包括:

[0211] a) 提供从一种哺乳动物获得的细胞,该哺乳动物已经用一种抗原免疫,该抗原包括根据该第二方面的第二亚群,这些细胞包括编码能够与该亚群选择性地相互作用的一种抗体的 DNA;并且

[0212] b) 使所述细胞与骨髓瘤细胞融合以获得至少一个克隆。

[0213] 例如,步骤 b) 可以包括培养。

[0214] 在该第十三方面的第二构型的实施方案中,该方法进一步包括以下步骤:

[0215] a') 用该抗原免疫该哺乳动物,

[0216] 其中步骤 a') 先于步骤 a)。

[0217] 例如,步骤 a) 的该哺乳动物可以是一种非人类哺乳动物。

[0218] 此外,在步骤 a) 中提供的这些细胞例如可以是脾细胞。并且,步骤 a) 的哺乳动物例如可以是一种鼠。因此,在步骤 a) 中提供的这些细胞例如可以是来自一个小鼠的脾细胞。

[0219] 可替代地,在步骤 a) 中提供的这些细胞例如可以是 B 细胞。此外,步骤 a) 的哺乳动物例如可以是一种兔。因此,例如可以由兔 B 细胞提供步骤 a) 中的这些细胞。

[0220] 在该第十三方面的第二构型的实施方案中,该方法可以进一步包括以下步骤:

[0221] c) 选择来自步骤 b) 的一种克隆,该克隆分泌能够与该亚群选择性地相互作用的抗体。

[0222] 此外,在该第十三方面的该第二构型的实施方案中,该抗原可以由根据该第十方面的一种多肽组成。在这类实施方案中,如果该方法包括步骤 c),则选择一种分泌能够与该抗原选择性地相互作用的抗体的克隆。

[0223] 并且,在该第十三方面的第二构型的实施方案中,该方法可以进一步包括以下步骤:

[0224] d) 提供在步骤 b) 中获得的或在步骤 c) 中选择的一种克隆,并且将来自该克隆的 DNA (其中来自该克隆的 DNA 编码了由该克隆表达的一种抗体的至少与该亚群选择性地相互作用的这个部分) 与编码人类抗体的 DNA 合并;并且

[0225] f) 将来自步骤 d) 合并的 DNA 结合进细胞以获得用于表达一种治疗性抗体的克隆,该治疗性抗体用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调。

[0226] 例如,步骤 e) 可以包括培养。

[0227] 步骤 e) 的该克隆例如可以是一种哺乳动物细胞系。由步骤 e) 的该克隆表达的这些治疗性抗体例如可以是嵌合抗体或人源化抗体。

[0228] 作为该第十三方面的一个第三构型,其中提供了一种生产亲和配体(如一种抗体,例如一种治疗性抗体)的方法,该方法包括:使用根据该第十三方面的方法鉴定一种亲和配体;并且生产所述鉴定的亲和配体。特别地,如果通过本披露的传授内容的指导来生产这样的鉴定的亲和配体是在技术人员的能力范围之内的。

[0229] 作为该第六方面的一个第四构型,其中提供了一种生产亲和配体(如一种抗体,例如一种治疗性抗体)的方法,该方法包括:使用根据该第十三方面的该第二构型的方法生产一种克隆;并且从所述克隆获得所述亲和配体。特别地,如果通过本披露的传授内容的指导从该克隆获得该亲和配体是在技术人员的能力范围之内的。例如,从该克隆获得所述亲和配体可以包括启动该亲和配体(例如一种抗体)的表达,并且收获该随后分泌的亲和配体(例如抗体)。

[0230] 作为本披露的一个第十四方面,其中提供了一种治疗哺乳动物受试者的方法,该哺乳动物受试者患有或怀疑患有以 HER2 过量表达为特征的失调,该方法包括对该受试者给予一个有效量的一种根据该第九方面的亲和配体。

[0231] 以下讨论了根据该第十四方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例 (“HER2 失调”)。

[0232] 在该第十四方面的实施方案中,该方法可以进一步包括对该受试者给予一种针对 HER2 的酪氨酸激酶抑制剂。

[0233] 此外,在该第十四方面的实施方案中,该治疗可以是一种手术前的治疗。因此,例如可以根据该第十四方面治疗怀疑患有一种乳癌或具有乳癌复发的高风险的一个受试者或具有预定的一种乳癌外科手术的受试者。

[0234] 可替代地,在该第十四方面的实施方案中,该治疗可以是一种手术后的治疗。

[0235] 此外,该治疗可以是手术前和手术后的治疗,例如,可以在外科手术去除一个乳癌肿瘤之前对该受试者给予该亲和配体的一个第一有效量,并且在外科手术去除该乳癌肿瘤之后对该受试者给予该亲和配体的一个第二有效量。

[0236] 在该第十四方面的实施方案中,对该受试者可能已经一种能够与 HER2 (如 HER2 的细胞外结构域) 选择性地相互作用的治疗性抗体治疗,该治疗性抗体与该亲和配体是不同的。这样的治疗性抗体例如可以是曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

[0237] 在该第十四方面的这类实施方案中,这种以 HER2 过量表达为特征的失调可以是一种癌症,如一种乳癌,该癌症已经发展了对该治疗性抗体的抗性。

[0238] 作为本发明的一个第十五方面,其中提供了一种制造品,包括:一种容器;在该容器内的一种组合物,该组合物包括一种根据该第九方面的亲和配体;以及在该容器上或与该容器相关的一种标签,该标签表明所述组合物可以用于治疗一种以 HER2 过量表达为特征的失调。

[0239] 以下讨论了根据该第十五方面的其特征为 HER2 过量表达的不同失调的实例 (“HER2 失调”)

[0240] 亲和配体

[0241] 根据本披露的以上方面的不同实施方案的亲和配体,如该第一方面的亲和配体以及该第二方面的第二亲和配体,可以独立地是任何类型的亲和配体。

[0242] 尽管如此,以下给出在本披露的情况下可以证明有用的这类亲和配体的实例。

[0243] 因此,在以上方面的实施方案中,这些亲和配体可以是独立地选自下组,其组成为:抗体、其片段以及其衍生物,即基于一种免疫球蛋白支架的亲和配体。例如,这些抗体可以是分离的和/或单特异性的。抗体包括任何起源的单克隆和多克隆抗体,包括鼠、兔、人以及其他抗体,连同包括来自不同物种的序列的嵌合抗体,如部分人源化抗体或人源化抗体,如部分人源化鼠抗体或人源化鼠抗体。最初,通过用选择的抗原免疫动物而制造抗体;然后从血液/血清中纯化多克隆抗体,而可以使用由 Köhler 和 Milstein 研制的杂交瘤技术生产限定特异性的单克隆抗体 (Köhler G 和 Milstein C (1976) Eur. J. Immunol. 6 : 511-519)。抗体片段以及衍生物包括:Fab 片段,这些 Fab 片段包括一个完整的免疫球蛋白的重链的第一恒定域 (CH1)、轻链的恒定域 (CL)、重链的可变域 (VH)、以及轻链的可变域 (VL);Fv 片段,这些 Fv 片段包括这两个可变抗体结构域 VH 和 VL (Skerra A and Plückthun A (1988) Science 240 :1038-1041);单链 Fv 片段 (scFv),这些单链 Fv 片段包括由一种柔性连接肽连接在一起的两个 VH 和 VL 结构域 (Bird RE and Walker BW (1991) Trends Biotechnol. 9 :132-137);Bence Jones 二聚体 (Stevens FJ et al. (1991)

Biochemistry 30 :6803-6805) ; 骆驼科动物重链二聚体 (Hamers-Casterman C et al. (1993) Nature 363 :446-448) 以及单链可变域 (Cai X and Garen A (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93 :6280-6285 ; Masat L et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91 :893-896), 以及单域支架, 像例如来自护士鲨 (nurse shark) 的新抗原受体 (New Antigen Receptor, NAR) (Dooley H et al. (2003) Mol. Immunol. 40 :25-33) 以及基于一种可变重链结构域的微型抗体 (minibodies) (Skerra A and Plückthun A (1988) Science 240 :1038-1041)。

[0244] 抗体连同它们的片段和衍生物代表了在治疗应用中亲和配体的传统选择。然而, 在本领域中的那些普通技术人员认识到例如由于选择性结合配体的高流通量生产以及低成本生产系统的要求的增加, 已经在最近十年期间研发了新的生物分子多样性技术。这已经能够使免疫球蛋白连同非免疫球蛋白 (作为结合配体例如在治疗应用中有用, 并且可以代替或与免疫球蛋白一起使用) 二者起源的新类型的亲和配体的产生。

[0245] 需要用于亲和配体选择的生物分子多样性可以通过多种可能的支架分子之一的组合工程而产生, 并且然后使用一种适当的选择平台来选择特异性和 / 或选择性亲和配体。该支架分子可以是免疫球蛋白起源的 (Bradbury AR 和 Marks JD (2004) J. Immunol. Meths. 290 :29-49), 非免疫球蛋白起源的 (Nygren PÅ 和 Skerra A (2004) J. Immunol. Meths. 290 :3-28), 或一种寡核苷酸起源的 (Gold L et al. (1995) Annu. Rev. Biochem. 64 :763-797)。

[0246] 在新颖的结合蛋白的研制中已经将许多非免疫球蛋白蛋白支架用作支持结构。对于生成针对有关 HER2 亚群的亲和配体有用的这类结构的非限制性实例是: 葡萄球菌蛋白 A 和其结构域以及这些结构域的衍生物, 比如蛋白 Z (Nord K et al. (1997) Nat. Biotechnol. 15 :772-777); 脂质运载蛋白 (Beste G et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 :1898-1903); 锚蛋白重复结构域 (Binz HK et al. (2003) J. Mol. Biol. 332 :489-503); 纤维素结合结构域 (CBD) (Smith GP et al. (1998) J. Mol. Biol. 277 :317-332; Lehtiö J et al. (2000) Proteins 41 :316-322); γ 晶型 (Fiedler U and Rudolph R, W001/04144); 绿色荧光蛋白 (GFP) (Peelle B et al. (2001) Chem. Biol. 8 :521-534); 绿色荧光蛋白、人细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4 (CTLA-4) (Hufton SE et al. (2000) FEBS Lett. 475 :225-231; Irving RA et al. (2001) J. Immunol. Meth. 248 :31-45); 蛋白酶抑制剂, 如 Knottin 蛋白 (Wentzel A et al. (2001) J. Bacteriol. 183 :7273-7284; Baggio R et al. (2002) J. Mol. Recognit. 15 :126-134) 以及 Kunitz 结构域 (Roberts BL et al. (1992) Gene 121 :9-15; Dennis MS and Lazarus RA (1994) J. Biol. Chem. 269 :22137-22144); PDZ 结构域 (Schneider S et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17 :170-175); 肽适体, 如硫氧还蛋白 (Lu Z et al. (1995) Biotechnology 13 :366-372; Klevenz B et al. (2002) Cell. Mol. Life Sci. 59 :1993-1998); 葡萄球菌核酸酶 (Norman TC et al. (1999) Science 285 :591-595); 淀粉酶抑肽 (McConnell SJ and Hoess RH (1995) J. Mol. Biol. 250 :460-479; Li R et al. (2003) Protein Eng. 16 :65-72); 基于纤连蛋白 III 型结构域的三连接素 (trinectin) (Koide A et al. (1998) J. Mol. Biol. 284 :1141-1151; Xu L et al. (2002) Chem. Biol. 9 :933-942); 以及锌指结构 (Bianchi E et al. (1995) J. Mol. Biol. 247 :154-160; Klug A (1999) J. Mol. Biol. 293 :215-218; Segal DJ et al. (2003) Biochemistry

42 :2137-2148)。

[0247] 以上提到的非免疫球蛋白支架的实例包括：呈现有助于新颖的结合特异性的产生的一种单随机化环 (single randomized loop) 的支架蛋白；具有一种刚性次级结构的蛋白支架，其中从该蛋白表面突出的侧链被随机化以用于新颖的结合特异性的产生；以及展示有助于新颖的结合特异性的产生的一种非邻接高可变环区域 (non-contiguous hyper-variable loop region) 的支架。

[0248] 除非免疫球蛋白之外，寡核苷酸也可以用作亲和配体。单链核酸被称为适体或假目标 (decoys)，折叠成轮廓分明的三维结构并且以高亲和性和特异性结合至它们的靶标。(Ellington AD 和 Szostak JW(1990)Nature 346 :818-822; Brody EN 和 Gold L(2000)J. Biotechnol. 74 :5-13; Mayer G 和 Jenne A(2004)BioDrugs18 :351-359)。这些寡聚核苷酸配体可以是 RNA 或 DNA，并且可以结合至宽范围的靶分子类别。

[0249] 为了从任何上述支架结构的变体的集合体 (pool) 选择所希望的亲和配体，许多选择平台可用于分离一种特异的新颖的配体（针对选择的一种靶蛋白）。选择平台包括但不限于：噬菌体展示 (Smith GP(1985)Science 228 :1315-1317)、核糖体展示 (Hanes J and Plückthun A(1997)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 :4937-4942)、酵母双杂交系统 (Fields S and Song O(1989)Nature 340 :245-246)、酵母展示 (Gai SA and Wittrup KD(2007)Curr Opin Struct Biol 17 :467-473)、mRNA 展示 (Roberts RW and Szostak JW(1997)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94 :12297-12302)、细菌展示 (Daugherty PS(2007)Curr Opin Struct Biol 17 :474-480、Kronqvist N et al. (2008)Protein Eng Des Sel 1-9、Harvey BR et al. (2004)PNAS101(25) :913-9198)、微珠粒展示 (Nord O et al. (2003)J Biotechnol 106 :1-13、W001/05808)、SELEX(System Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) (Tuerk C and Gold L(1990)Science 249 :505-510)、以及蛋白质片段互补测定 (PCA) (Remy I and Michnick SW(1999)Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 :5394-5399)。

[0250] 因此，在以上方面的实施方案中，这些亲和配体各自可以独立地是源自任何以上列出的这些蛋白支架或一种寡核苷酸分子的一种非免疫球蛋白亲和配体。

[0251] HER2 失调

[0252] 在以上方面（一至十五方面）的实施方案中，这种以 HER2 过量表达为特征的失调可以是一种癌症。

[0253] 更进一步地，在以上方面的实施方案中，该癌症可以是选自下组，其组成为：乳癌、鳞状细胞癌、肺癌如小细胞肺癌或非小细胞肺癌、胰腺癌、恶性胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、外阴癌、肝癌、肝细胞瘤、结肠直肠癌如结肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾癌、甲状腺癌、肾母细胞瘤、膀胱癌、子宫内膜癌、肾癌、头颈部癌、胃癌、食管癌、以及前列腺癌。

[0254] 例如，该癌症可以是选自下组，该组的组成为：乳癌、肺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、以及肾母细胞瘤。

[0255] 已经报告 HER2 蛋白在大约全部乳癌的 20% 并且在高达 70% 的低分化乳癌中过量表达。并且，已经很好地研究了抗 HER2 治疗对乳癌受试者（例如患有转移性乳癌的受试者）的有效性。

[0256] 因此，在以上方面的实施方案中，这种以 HER2 过量表达为特征的失调可以是一种

乳癌。例如,该乳癌可以是一种转移性乳癌。

[0257] 附图简要说明

[0258] 图 1 显示了亲和纯化和特异性分析。

[0259] 1a 显示了用于连续的选择性亲和纯化的方案的示意图。将针对该全长抗原增高的多克隆抗体(在此表示 866(SEQ ID NO:1))分成四个特异性群:一种抗 C 端部分(Ab-C);一种抗 M(中间)部分(Ab-M);抗 N 端部分(Ab-N);并且最后将一种全长抗原柱连接以收集可能的结合结构表位的抗体(Ab-S)。

[0260] 1b 显示了用于增高的针对该全长抗原(在此是指 Ab-866)的多克隆抗体的结合特异性的分析,并且使用一种 Luminex 珠粒阵列系统将所获得的这些抗体分成四个特异性群:Ab-C, Ab-M, Ab-N 以及 Ab-S。对于所有纯化的部分揭示了一种高特异性。黑色=结合,白色=未结合。

[0261] 1c 显示了一种 Luminex 珠粒阵列竞争测定用于估计这些纯化的单特异性抗体的相对亲和性。使用一种渐增浓度的可溶全长抗原(即 866(SEQ ID NO:1))作为竞争蛋白片段检测单特异性抗体与固定在该珠粒表面的全长抗原(即 866(SEQ ID NO:1))之间的相互作用。

[0262] 图 2 显示了 BT474 细胞的荧光激活细胞分选(FACS)的结果。分别评估了未标记的细胞(2a)以及用 Ab-Intra(一种靶向 HER2 胞内部分的多克隆抗体(HPA001383))标记的细胞、以及用作阴性对照的(2b)、Ab-866(2c)、Ab-N(2d)、Ab-M(2e)、Ab-C(2f)、曲妥珠单抗(2g)、以及 Ab-S(2h)的 FACS。对于曲妥珠单抗、msAb-866、msAb-N、以及 msAb-C 表明的细胞结合,观察了具有比未标记的细胞更高的荧光的富集的群,然而,对于 msAb-intra 或 msAb-M 没有发现有显著的荧光富集。

[0263] 图 3 显示了一种剂量响应研究,其中用一种渐增量的 msAb-866 处理 BT474 细胞。

[0264] 图 4 显示了一种分别使用 500ng/ml 的 msAb-Intra、msAb-M、msAb-N、msAb-C、msAb-CNM、msAb-866、以及 msAb-NC 对 BT474 细胞的生长抑制研究。所呈现的“效应”(“effect”)值是相对于用 msAb-Intra 处理的培养物。msAb-N、msAb-C、msAb-CNM、msAb-866 以及 msAb-NC 显示出在 14%与 39%之间的细胞生长抑制作用。

[0265] 图 5 显示了一种分别使用 500ng/ml 的 msAb-M、msAb-Intra、msAb-N、曲妥珠单抗、msAb-C、以及 msAb-866 对 BT474 细胞的生长抑制研究。所呈现的“效应”值是相对于用 msAb-Intra 处理的培养物。

[0266] 图 6 显示了一种选择的 HER2 片段(SEQ ID NO:11 以及 15-20)的氨基酸比对,各自包括通过表位作图鉴定的一个或多个 C 表位(SEQ ID NO:8-11)。这些序列的一些在该图的上半部开始并且延续到下半部。

[0267] 图 7 显示了一种选择的 HER2 片段(SEQ ID NO:21-34)的氨基酸比对,各自包括通过表位作图鉴定的一个或多个 N 表位(SEQ ID NO:12-14)。这些序列的一些在该图的上半部开始并且延续到下半部。

[0268] 针对 HER2 的单特异性抗体的产生以及它们与不同 HER 片段的相互作用以及对癌性细胞影响的研究

[0269] 1. 抗原的产生

[0270] a) 材料和方法

[0271] 用人基因组序列作为模板使用生物信息学工具选择了由 EnsEMBL 基因 ID ENSG 00000141736 编码的靶蛋白的一种适当的片段 (Lindskog M et al. (2005) *Biotechniques* 38 :723-727, EnsEMBL, www.ensembl.org)。该片段被用作模板用于生产与 HER2 蛋白 (SEQ ID NO :2 ;EnsEMBL 登陆号 ENSP00000269571) 的 274-400 位的氨基酸残基 (SEQ ID NO :1) 对应的具有 127 个氨基酸长度的片段。将该蛋白片段设计成由一种单一序列 (该单一序列具有与其他的人类蛋白低的序列相似性) 组成, 以使产生的亲合试剂的不想要的交叉反应性最小化, 并且仍具有一种适当的大小以允许构象性表位的形成并且允许在细菌系统中有效表达。

[0272] 使用一种 Superscript™ 一步 RT-PCR 扩增试剂盒 (具有 Platinum® 标签 (Invitrogen)) 以及一种人类总 RNA 池组 (human total RNA Panel IV, BD Biosciences Clontech) 作为模板分离了包含 EnsEMBL 登录号 ENST00000269571 (SEQ ID NO :3) 的核苷酸 1058-1438 的 HER2 基因转录物的一种片段。通过 PCR 扩增引物将侧翼限制酶切位点 NotI 和 AscI 引入该片段以允许框内克隆进入表达载体 (正向引物 :TACAACACAGACACGTTTGAG, 生物素酰化的反向引物 :AAACACTTGGAGCTGCTCTG)。将该生成的生物素酰化的 PCR 产品固定在 Dynabeads M280 链霉亲和素上 (DynaL Biotech) (Larsson M et al. (2000) *J. Biotechnol.* 80 :143-157), 并且经过 NotI-AscI 消化在该固相支持物上经受 Not-AscI 消化 (New England Biolabs), 连接进入框内 pAff8c 载体 (Larsson M et al, supra), 该载体具有一种 N 端双亲和标签, 其组成为用于固定化金属离子层析 (IMAC) 纯化的六组氨酸标签以及来自链球菌 G 蛋白的一种免疫增强白蛋白结合蛋白 (immunopotentiating albumin binding protein, ABP) (**Sjölander** A et al. (1997) *J. Immunol. Methods* 201 :115-123 ; **Ståhl** S et al. (1999) *Encyclopedia of Bioprocess Technology :Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation* (Fleckinger MC 和 Drew SW, eds) John Wiley and Sons Inc., New York, pp 49-63), 并且转化进入大肠杆菌 BL21 (DE3) 细胞 (Novagen)。根据制造商的建议, 使用 TempliPhiDNA 测序扩增 试剂盒 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), 通过质粒 DNA 扩增的染料终止循环测序验证这些克隆的序列。

[0273] 通过添加在相同培养基中的 1ml 的一种过夜培养物, 将包含有该表达载体的 BL21 (DE3) 细胞接种在 100ml 的 30g/l 大豆胰蛋白酶肉汤中, 该大豆胰蛋白酶肉汤补充有 5g/l 的酵母提取物 (Merck KGaA) 以及 50mg/l 的卡那霉素 (Sigma-Aldrich)。在 37℃ 以及 150rpm 下将该细胞培养物在 1 公升摇瓶中孵育直到在 600nm 下的光密度达到 0.5-1.5。然后通过添加异丙基-β-D-硫代半乳糖吡喃糖苷 (Apollo Scientific) 至一个 1mM 的终浓度诱导蛋白表达, 并且在 25℃ 和 150rpm 继续孵育过夜。通过在 2400g 离心收获细胞, 并且将片状沉淀物再悬浮在 5ml 溶解缓冲液中 (7M 盐酸胍、47mM Na₂HPO₄、2.65mM NaH₂PO₄、10mM Tris-HCl、100mM NaCl、20mM β-巯基乙醇 ;pH = 8.0), 并且在 37℃ 和 150rpm 下孵育 2 小时。在 35300g 下离心以后, 收集包含变性并且溶解的蛋白的上清液。

[0274] 使用一个自动化蛋白纯化步骤 (Steen J et al. (2006) *Protein Expr. Purif.* 46 : 173-178) 在一种 ASPEC XL4™ (Gilson) 上, 通过在具有 1ml Talon® 金属 (Co²⁺) 亲合树脂的柱子 (BD Biosciences Clontech) 上进行固定化金属离子亲和层析 (IMAC) 纯化 His₆ 标签的融合蛋白。用 20ml 变性洗涤缓冲液 (6M 盐酸胍、46.6mM Na₂HPO₄、3.4mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、pH 8.0-8.2) 将该树脂平衡。然后, 将澄清的细胞溶解产物加至该柱子。其后, 将该树

脂在 2.5ml 洗脱缓冲液 (6M 脲、50mM NaH_2PO_4 、100mM NaCl 、30mM 乙酸、70mM 乙酸 Na, pH 5.0) 洗涤之前用不少于 31.5ml 的洗涤缓冲液洗涤。将洗脱的材料在 500、700、以及 1300 μl 的三个池中分离。将含有抗原的 700 μl 部分、以及汇集的 500 μl 以及 1300 μl 的部分储存以用于进一步的使用。

[0275] 将该抗原部分用磷酸盐缓冲盐水 (PBS; 1.9mM NaH_2PO_4 、8.1mM Na_2HPO_4 、154mM NaCl) 稀释到 1M 脲的终浓度, 随后使用具有 7500Da 截留分子量的 Vivapore10/20ml 浓缩器的一个浓缩步骤以增加该蛋白质的浓度 (Vivascience AG)。根据制造商的推荐使用一种具有牛血清白蛋白标准品的一种双金鸡宁酸 (BCA) 微测定科学试验计划 (Pierce) 测定该蛋白质的浓度。使用蛋白 50 或 200 测定法 (Agilent Technologies) 在 Bioanalyzer 仪器上分析该蛋白质的质量。

[0276] b) 结果

[0277] 通过使用对于该蛋白片段特异的引物, 通过 RT-PCR 从一个人 RNA 池成功分离了一种对应于该 HER2 基因的长转录物 (SEQ ID NO:3) 的核苷酸 1058 至 1438 并且编码一种肽 (SEQ ID NO:1) 的基因片段, 该肽由该靶蛋白 HER2 (SEQ ID NO:2) 的 274 至 400 位氨基酸组成。

[0278] 将编码该正确的氨基酸序列的一个克隆进行鉴定, 并且在大肠杆菌中表达产生这种正确大小的一种单一蛋白质, 并且随后使用固定化金属离子层析进行纯化。将该洗脱的样品稀释到 1M 脲的终浓度并且浓缩该样品到 1ml 以后, 测定该蛋白片段的浓度为 8.6mg/ml 以及 99.5% 纯度 (根据纯度分析)。

[0279] 2. 抗体的产生

[0280] a) 材料和方法

[0281] 根据国家指南 (瑞典许可号 A84-02) 将如以上获得的纯化的 HER2 片段用作抗原以免疫一种兔。用在弗氏完全佐剂中的 200 μg 的抗原肌肉注射免疫该兔作为初次免疫, 并且用在弗氏不完全佐剂中的 100 μg 的抗原以四星期的间隔加强三次。

[0282] 通过一个三步骤的基于免疫亲和性的科学试验计划将来自该免疫的动物的抗血清进行纯化 (Agaon C et al. (2004) J. Chromatogr. A 1043:33-40; Nilsson P et al. (2005) Proteomics 5:4327-4337)。在第一步骤中, 将 7ml 的总的抗血清用 10x PBS 缓冲到 1x PBS 的终浓度 (1.9mM NaH_2PO_4 、8.1mM Na_2HPO_4 、154mM NaCl), 使用一种 0.45 μm 孔径大小的过滤器过滤 (Acrodisc®, Life Science) 并且施加到一个亲和柱上, 该亲和柱含有 5ml 的 N-羟基琥珀酰亚胺活化的 Sepharose™4FastFlow (GE Healthcare), 其结合至表达自 pAff8c 载体的并且以如上描述的与用于该抗原蛋白片段同样的方式纯化的双亲和标签蛋白 His₆-ABP (一种六组氨酸标签以及一种白蛋白结合蛋白标签)。在第二步骤中, 以一个 0.5ml/min 的流率将流经消耗该双亲和标签 His₆-ABP 的抗体荷载到 1ml Hi-Trap NHS 活化的 HP 柱子 (GE Healthcare) 上, 该柱子与用作抗原用于免疫的 HER2 蛋白 (SEQ ID NO:1) 结合。如制造商的推荐将该 His₆-ABP 蛋白以及该蛋白片段抗原结合至该 NHS 活化的基质。用 1x PBST (1x PBS、0.1% Tween 20、pH 7.25) 将未结合的材料洗去, 并且使用一种低 pH 甘氨酸缓冲液 (0.2M glycine、1mM EGTA, pH 2.5) 洗脱俘获的抗体。自动收集该洗脱的抗体部分, 洗脱后立即汇集相关的部分, 并且使用 1M Tris-HCl 和 10xPBS 将 pH 调节至 7.25。该汇集的部分表示为 msAb-866。

[0283] b) 结果

[0284] 见以下部分 3b。

[0285] 3. 区域特异性抗体的产生

[0286] a) 材料和方法

[0287] 收集由 EnsEMBL 基因 ID ENSG00000141736 (EnsEMBL, www.ensembl.org) 编码的靶蛋白的三个片段, 以与用于免疫的蛋白片段 (SEQ ID NO :1) 的适当的重叠。以类似于如以上所描述的用于免疫的蛋白片段 (SEQ ID NO :1) 的方式生产了与该 HER2 蛋白 (SEQ ID NO :2 ; EnsEMBL 登录号 ENSP00000269571) 的氨基酸残基 236-363 (SEQ ID NO :4)、347-492 (SEQ ID NO :5)、以及 (364-530 (SEQ ID NO :6) 对应的这三个蛋白片段。

[0288] 使 10ml 来自如在 2a) 中所描述的同免疫的粗制血清在 PBS 中缓冲, 消毒过滤并且使用如上描述的相同的科学试验计划使之从 Tag 特异的 His6-ABP 抗体排除 (Larsson et al., 2006)。使用一种 Äkta Explorer (GE Health Care AB) 系统 (具有四个串联的亲和性 1ml HiTrap 柱) 按以下次序亲和纯化流经消耗的抗体 : C-端 (SEQ ID NO :6)、中间 (SEQ ID NO :5)、N-端 (SEQ ID NO :4)、以及全长抗原柱 (SEQ ID NO :1) (图 1a)。使抗体以 0.5ml/分钟的速度荷载到这些柱上, 并且用 20 倍柱体积的洗涤缓冲液将未结合的材料洗去。在低 pH 下分离洗脱后, 将结合的抗体分成 250ul 的部分 (Larsson et al., 2006)。洗脱后立即汇集相关的部分, 并且使用 1M Tris-HCl 和 10xPBS 将 pH 调节至 7.25。为了不干扰随后的研究, 不加入甘油或 NaN₃。分别将来自各柱的这些汇集的部分表示为 : 从 C 端柱 (SEQ ID NO :6) 洗脱的抗体表示为 msAb-C, 从中间柱 (SEQ ID NO :5) 洗脱的抗体表示为 msAb-M, 从 N 端 (SEQ ID NO :4) 洗脱的抗体表示为 msAb-N, 并且从全长抗原柱 (SEQ ID NO :1) 洗脱的抗体表示为 msAb-S。

[0289] b) 结果

[0290] 简言之, 分别将具有与用于免疫的该蛋白片段的 C 端、中间、以及 N 端部分连同该全长抗原片段 (SEQ ID NO :1) 对应的特异性蛋白序列的四个亲和柱串联以使能够进行选择性的亲和层析。该方法使得能够将这些抗原特异性抗体分离以便成分成四个不同的抗体群 : msAb-N (该群的 18%)、msAb-M (该群的 35%)、msAb-C (该群的 39%)、msAb-S (该群的 8%) (图 1a)。

[0291] 4. 亲和纯化的证实

[0292] a) 蛋白阵列

[0293] 在一种蛋白阵列装置中, 通过针对该抗原本身的结合分析, 分析了该亲和纯化抗体部分的特异性和选择性, 包括用于免疫的该蛋白片段 (SEQ ID NO :1) 和与它重叠的一些蛋白片段 (SEQ ID NO :4-6)、以及针对 92 个其他的人蛋白片段的结合分析 (Nilsson P et al. (2005) Proteomics 5 : 4327-4337)。在 0.1M 脲和 1x PBS (pH 7.4) 中将这些蛋白片段稀释到 40 µg/ml, 并且将 50 µl 的各片段转移到一种 96 孔点滴板的孔中。使用一种针和环状阵列 (pin-and-ring arrayer) (Affymetrix 427) 将这些蛋白片段一式两份点样并且固定在环氧树脂载玻片上 (SuperEpoxy, TeleChem)。将该载玻片在 1x PBS 中洗涤 (5 分钟) 并且然后将表面封闭 (SuperBlock[®], Pierce) 30 分钟。在加入这些单特异性抗体 (在 1x PBST 中按 1 : 5000 稀释到大致 50ng/ml) 之前将一种粘性 16 孔硅酮掩模 (Schleicher&Schuell) 施加到该玻片上, 并且在一种振荡器上孵育 60 分钟。将亲和标签特异性 IgY 抗体与这些单

特异性抗体共孵育以量化在各点中的蛋白的量。将该载玻片用 1x PBST 和 1x PBS 洗涤两次,每次 10 分钟。将第二抗体(与 Alexa647 结合的羊抗兔抗体和与 Alexa555 结合的羊抗鸡抗体,分子探针)在 1x PBST 中按 1 : 60000 稀释到 30ng/ml 并且孵育 60 分钟。关于该第一次孵育,在相同的洗涤步骤之后,将该载玻片旋转干燥并且扫描(G2565BA 阵列扫描仪,Agilent),其后使用图像分析软件将影像量化(GenePix 5.1,Axon Instruments)。

[0294] b) 悬浮珠粒阵列

[0295] 另外,使用一种 Luminex 悬浮珠粒阵列系统分析了特异性、选择性、以及相对亲和性。如先前的描述进行结合特异性的多路分析(Schwenk et al.,2007)。简而言之,在 PBST 中制备抗体稀释物以及与 98 个蛋白片段对应的 100 珠粒 ID 的一种珠粒混合物,该珠粒混合物包括用于免疫的抗原(SEQ ID NO:1)以及用于亚纯化(sub-purification)抗原的三个片段(SEQ ID NO:4-6)、一种 HisABP 片段以及一种抗兔 IgG 抗体。将 45 μ l 的 msAb 稀释物加至 5 μ l 的珠粒,并且在一种 96 孔板(Corning)中在不断混合下孵育 60 分钟。随后,加入 25 μ l 的 R-藻红蛋白标记的抗兔 IgG 抗体(0.5 μ g/ml,Jackson ImmunoResearch)或加入以用于 60 分钟的最终孵育。

[0296] c) 多路竞争测定(Multiplexed competition assay)

[0297] 在 PBST 中制备竞争蛋白片段的连续稀释物并且按 1 : 1 的比率与 msAb-866、msAb-N、msAb-M 以及 msAb-C 的溶液混合。在恒定混合下在 50 μ l 的总体积中进行孵育 60 分钟。随后,将该 msAb-PrEST 溶液转移到一个第二板上,该第二板每孔含有 5 μ l 的珠粒混合物。60 分钟后,加入 25 μ l 的 R-藻红蛋白标记的抗兔 IgG 抗体(0.5 μ g/ml,Jackson ImmunoResearch)并且另外孵育 60 分钟。进行三个独立的重复并且将其平均值用于资料分析。选择一种四个参数的逻辑函数用于拟合竞争曲线以计算 EC50 值并且比较相对结合质量。作为对于竞争的一种度量,对于所生成的曲线就它们的形状以及它们的估算的 EC50 值(这些值必须是大于标准差的一个数值)进行了观察。

[0298] d) 悬浮阵列读出和资料分析

[0299] 使用具有 Luminex IS 2.3 软件的 Luminex LX200 仪器装备进行测量。对于个实验,计数每珠粒 ID 的 100 个事件并且选择该荧光强度中位值来展示相互作用。用 R(一种用于统计计算和制图的语言和环境)进行资料分析和图示(Ihaka and Gentleman,1996)。

[0300] e) 结果

[0301] 为了在亲和纯化后确认抗体特异性以及选择性,使用平面阵列和 Luminex 悬浮珠粒阵列技术二者进行了一种蛋白微阵列分析。该分析确认了一种定向针对 His6 标签和 ABP 标签的成功的抗体耗尽(结果未显示)并且确保了高特异性抗体具有与固定的其他蛋白片段低潜力的非特异性相互作用(图 1b)。

[0302] 为了对在该蛋白阵列的各点中的蛋白的量进行定量,使用了一种与第一以及第二抗体的一种组合的双色染料标记系统。用标记有 Alexa 555 荧光染料的一个第二羊抗母鸡抗体检测了在母鸡中产生的标签特异性 IgY 抗体。用一种荧光 Alexa647 标记的羊抗兔抗体检测了该兔 msAb 对它的在该阵列上的抗原的特异性结合。一式两份点样各蛋白片段。使用平面阵列以及悬浮珠粒阵列的蛋白阵列分析显示出针对 HER2 的该亲和纯化的单特异性抗体(msAb-866、msAb-N、msAb-M、msAb-C、msAb-S)对正确的蛋白片段是高度选择性的,并且对于在该阵列上分析的所有其他的蛋白片段具有一种非常低的背景。另外,使用一种竞争

测定来确定相对亲和性,其中使用了一种浓度渐增的可溶全长抗原 (SEQ ID NO:1) 竞争蛋白片段竞争了 (challenged) 在单特异性抗体与固定在珠粒上的全长抗原 (SEQ ID NO:1) 蛋白片段之间的相互作用 (图 1c, 表 1)。确定了在低纳摩尔范围的抗体 msAb-866 (1.9nM)、msAb-N (4.5nM)、msAb-M (0.7nM)、以及 msAb-C (1.2nM) 的一种明显的亲和性,当用可溶蛋白片段 (SEQ ID NO:1) 竞争了它们与偶联到在免疫中使用的蛋白片段上的珠粒的相互作用时。

[0303]

表 1: 相对亲和性	
蛋白片段	EC50
Ab-866	1.9 nM
Ab-C	1.2 nM
Ab-M	0.7 nM
Ab-N	4.5 nM

[0304] 5. 细胞研究

[0305] a) 细胞培养

[0306] BT474 乳腺癌细胞购自美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA) 并且在补充有 10% FCS 和 1% 牛胰岛素的 RPMI 中维持,并且在 37°C 下 5% CO₂ 增湿气氛中保持。

[0307] b) 细胞结合测定

[0308] 通过胰蛋白酶消化使细胞从培养皿释放,离心并且重悬在 PBS:HAS (PBS, pH 7.2, 补充有 1% 的人血清白蛋白) 中并且计数。将 150000 个细胞在室温下在 96 孔板的 75 微升的反应体积中用 0.35 微克抗体 (msAb-N、msAb-M、msAb-C、以及 msAb-866) 标记 45 分钟。使用 2x100 微升 PBS:HAS 作为洗涤缓冲剂将未结合的抗体洗去。随后在室温下在 75 微升的反应体积中使抗体 (使用 0.35 微克第二羊抗兔单克隆抗体 (Invitrogen) 标记) 结合到 Alexa 488, 持续 45 分钟。在 PBS:HSA 2x100 微升中洗涤细胞,并且在一个样品管中重悬至 150ul 的终体积。使用一种 BD FACS Vantage SE 流式细胞仪 (BD Biosciences) 通过荧光激活细胞分选测量在 FL-1 的荧光发射 (在 488nm 激发) 以评估抗体结合至 BT474 细胞的能力。靶向 HER2 的胞内部分的等摩尔量的兔单特异性抗体 (msAb-intra) (HPA001383, Atlas 抗体 AB, 瑞典) 连同仅用第二抗体标记的细胞用作阴性对照。曲妥珠单抗 (赫赛汀, Roche) 用作阴性细胞标记对照 (使用 Alexa 488 羊抗人单克隆抗体 (Invitrogen) 作为第二试剂)。

[0309] c) 剂量响应研究

[0310] 在 24 孔皿中,将 BT474 细胞按 5×10^4 /孔接种。24 小时后,在一式三份的浓度范围从 1ng/ml 至 1000ng/ml 的 msAb-866 的稀释物中处理细胞。将用 PBS pH 7.2 处理的细胞用作对照。5 天后,将细胞用胰蛋白酶消化并且各计数三次。将细胞与未处理的培养物相比较的百分数计算为生长抑制。

[0311] d) 第一生长抑制研究

[0312] 在第 0 天将 BT474 细胞按 5×10^4 /孔接种在 24 孔皿中。使用在 3b) 中获得的部分比率制成抗体的两个重建混合物:将 msAb-N 与 msAb-C 按 18 : 39 的比率混合,表示为 msAb-NC;并且将 msAb-N、msAb-M、以及 msAb-C 按 18 : 35 : 39 的比率混合,表示为 msAb-NMC。24 小时后,在一式三份的 msAb-866、msAb-N、msAb-M、msAb-C、msAb-NC 以及

msAb-NMC 的稀释物（使用一个 500ng/ml 的最终抗体浓度）中处理细胞。将 msAb-intra 和 PBS pH 7.2 用作对照。5 天后，将细胞用胰蛋白酶消化并且各计数三次。将细胞与用该对照抗体 msAb-intra 处理的培养物相比较的百分数计算为生长抑制。

[0313] e) 第二生长抑制研究

[0314] 在第 1 天，将 BT474 细胞按 5×10^4 细胞 / 孔与 msAb-866、msAb-C、以及曲妥珠单抗的稀释物（使用一个 500ng/ml 的最终抗体浓度）一起一式三份地接种。将 msAb-intra 和 PBS pH 7.2 用作对照。4 天后，将细胞用胰蛋白酶消化并且各计数三次。将细胞与用该对照抗体 msAb-intra 处理的培养物相比较的百分数计算为生长抑制。

[0315] f) 结果

[0316] 用 msAb-866、msAb-N、以及 msAb-C 标记的 BT474 细胞的荧光激活细胞分选显示出具有一种比未标记细胞更高荧光的富集的群，这表明细胞结合，而对于 msAb-intra 或 msAb-M 没有发现有显著的荧光富集（图 2）。

[0317] 在用 msAb-866 处理的 BT474 细胞的剂量响应研究中，在第 5 天看到了一个显著影响细胞生长的 250-500ng/ml 的临界抗体浓度（图 3）。

[0318] 在使用 500ng/ml 的各自的抗体的 BT474 细胞的第一生长抑制研究中，msAb-M 显示了 1% 的生长抑制作用，msAb-N 显示了 14% 的生长抑制作用、msAb-C 显示了 30% 的生长抑制作用，msAb-NMC 显示了 33% 的生长抑制作用，msAb-866 显示了 36% 的生长抑制作用，msAb-NC 显示了 39% 的生长抑制作用（图 4）。

[0319] 因此，Ab-N 以及 Ab-C 二者都单独显示了一种实质性作用。包括 Ab-N 以及 Ab-C 的组合也显示了一种实质性作用。此外，诸位发明人已经注意到显示出高的作用的（ $\geq 30\%$ ）所有抗体样品都包含 Ab-C。

[0320] 并且，包含 Ab-C 和 Ab-N 二者的这些样品与单独采用 Ab-C 或 Ab-N 相比，总体上显示出一种较高的作用。

[0321] 从包含 Ab-C 和 Ab-N 的样品观察到了最高的作用。

[0322] 在第 4 天，在使用 500ng/ml 的各自的抗体的 BT474 细胞的第二生长抑制研究中，相对于 msAb-intra，Ab-866 显示了大约 41%、Ab-C 大约 26%、曲妥珠单抗大约 18%、以及 Ab-N 大约 5% 的生长抑制作用（图 5）。

[0323] 此外，诸位发明人已经注意到在这个装置中 Ab-C 和 Ab-866 显示出比曲妥珠单抗（赫赛汀）更高的作用，曲妥珠单抗是一种被批准的靶向 HER2 的细胞外结构域的治疗性抗体。这表明一种靶向 SEQ ID NO:6 的 1-37 位的氨基酸残基的 HER2 亚群的抗体或一种包括分别靶向 SEQ ID NO:6 的 1-37 位的氨基酸残基的 HER2 亚群以及 SEQ ID NO:4 的 39-111 位的氨基酸残基的 HER2 亚群的抗体的组合物可以用于治疗其特征为 HER2 过量表达的失调。

[0324] 对于含有 Ab-C 和 Ab-N 二者的 Ab-866 观察到了最高的作用。

[0325] 6. 使用细菌展示进行表位作图

[0326] a) 将文库亚克隆进入葡萄球菌展示载体

[0327] 将大肠杆菌株 RR1 Δ M15 (Rüther, U. pUR 250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its inserts. Nucleic Acids Res. 10, 5765-5772 (1982)) 用作宿主株用于质粒构建。通过将一种含有一个新的限制酶切位点 (PmeI) 的基因片段连接到先

前描述的葡萄球菌载体 pSCXm 而创建一种新的葡萄球菌载体 pSCEM1 (Wernérus, H. & Ståhl, S. Vector engineering to improve a staphylococcal surface display system. FEMS Microbiol Lett 212, 47-54 (2002)), 用 BamHI 和 SalI (New England Biolabs, Beverly, MA) 将其消化。获得具有 N 端 FLAG 序列的用于 HER2-ECD 扩增的模板。通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增该基因片段 (9.6ml, 合并的) 并且在冰上的 50ml Falcon 管中使用一种微尖 (microtip) 进行超声处理 60 分钟 (21% 幅值, 恒地超声处理) 以便产生随机片段。此后, 使用 Centricon Plus20 柱 (CO 10kDa; Millipore, Billerica, MA) 通过超滤浓缩样品。根据供应商的推荐, 通过加入 T4DNA 聚合酶以及 T4 多核苷酸激酶 (New England Biolabs) 使浓缩的片段末端钝化并且磷酸化。此后, 使用 T4 DNA 连接酶 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 使这些末端钝化的片段连接进入该葡萄球菌展示载体 pSCEM1, 用 PmeI 消化 (New England Biolabs)。将该文库转化到电转化感受态 *S. carnosus* TM300 (Götz, F. Staphylococcus carnosus: a new host organism for gene cloning and protein production. Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser. 19, 49S-53S (1990)), 如先前的描述 (Löfblom, J., Kronqvist, N., Uhlén, M., Ståhl, S. & Wernérus, H. Optimization of electroporation-mediated transformation: Staphylococcus carnosus as model organism. J Appl Microbiol 102, 736-747 (2007)), 并且在 15% 甘油中于 -80℃ 下储存。

[0328] b) 细胞标记以及荧光激活细胞分选 (FACS)

[0329] 将等分部分的 Sc:HER2-lib 或 Sc:Ephrin-B3-lib (至少十倍于该文库大小) 接种到具有 20 µg/ml 氯霉素的 100ml TSB+Y (大豆胰蛋白酶肉汤 + 酵母提取物) 并且在 37℃ 以及 150rpm 下生长过夜。16 小时后, 用具有 0.1% Pluronic® F108 NF 表面活性剂 (PBSP; BASF Corporation, Mount Olive, NJ) 的 1ml 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS, pH 7.4) 洗涤 10^7 个细胞。通过离心作用 (3500xg, 4℃, 6 分钟) 使这些细胞球粒化, 并且重悬于含有抗体 (即用于表位作图的抗体, 典型地在浓度 100nM 左右) 的 100 µl PBSP 中, 并且在室温下孵育并轻柔混合 1 小时以达到平衡结合。此后, 用 1ml 的冰冷 PBSP 洗涤细胞, 随后在黑暗中的冰上在 1ml PBSP (含有 4 µg/ml 的 Alexa Fluor® 488 羊抗兔 IgG 或 4 µg/ml 的 Alexa Fluor® 488 羊抗鼠 IgG (Invitrogen) 以及 225nM 的 Alexa Fluor® 647HSA) 中孵育结合 1 小时。在 1ml 冰冷 PBSP 中的最终洗涤步骤之后, 在分选之前将这些细胞重悬在 300 µl 冰冷的 PBSP 中。使用 FACSVantage SE (BD Biosciences, San Jose, CA) 流式细胞仪将这些细胞分选。将这些细胞直接分选进入 0.5ml B2 培养基 (Löfblom, J., Kronqvist, N., Uhlén, M., Ståhl, S. & Wernérus, H. Optimization of electroporation-mediated transformation: Staphylococcus carnosus as model organism. J Appl Microbiol 102, 736-747 (2007)) 并且涂布在含有 10 µg/ml 的氯霉素的血琼脂 基质 (Merck) 板上, 并且在 37℃ 下孵育 24 小时。在最后一轮中, 将细胞分选进入在 96 孔板的单独的孔 (含有半固体培养基) 中以形成集落。

[0330] c) DNA 测序和 BLAST 比对

[0331] 将每一集落的部分转移到在 96 孔板中的两个分离的孔用于 PCR。使用两个不同的引物对通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增该葡萄球菌展示载体的插入片段区域, 产生两种分别在正向端和在反向端含有一种生物素分子的 PCR 产物。根据制造商的说明使用一种 PSQ™ 96HS 仪器 (Biotage AB, Uppsala, Sweden) 在每一插入片段两端进行 10 个循环焦磷酸测

序。使用BLAST(Altschul et al,Basic local alignment search tool,J.Mol.Biol.147:195-197,(1990))使表位序列映射至该抗原序列。

[0332] d) 结果

[0333] 使用载体 pAY593 作为模板通过 PCR 扩增 HER2 的细胞外结构域 (ENSP00000269571 的氨基酸 27-653 或 ENST00000269571 的碱基对 317-2196) 的 DNA。通过超声处理将该扩增的 DNA 分段成不同的长度 (大约 50-350bp), 随后通过连接作用进入该葡萄球菌展示载体 (pSCEM1) 并且转化进入 *S. Carnosus* 出产约 30000 个转化体。在该葡萄球菌表面上将框内 DNA 片段展示为肽。在与抗体和荧光标记的第二反应物孵育之后, 使用流式细胞术分别分选阳性以及阴性细胞以便分离出表位递呈细胞与非表位递呈细胞。通过焦磷酸测序对这些分离的细胞测序并且最后将这些序列与用于鉴定表位的 HER2 抗原进行比对。

[0334] 使用了一种具有表面表达量水平的实时监测的双标记策略 (Löfblom, J., Wernérus, H. & Ståhl, S. Fine affinity discrimination by normalized fluorescence activated cell sorting in staphylococcal surface display. FEMS Microbiol Lett 248, 189-198 (2005))。它允许结合信号与表达水平的归一化, 提供了低的细胞间差异 (cell-to-cell variation) 并且使不同表位群的鉴别成为可能。此外, 它还允许一种平行测定以确定展示在该表面上的非结合肽。

[0335] 确认了对于 msAb-866 特异的四个表位 (SEQ ID NO:8 以及 SEQ ID NO:12-14)。对于揭示一个另外的表位 (SEQ ID NO:11) 的 msAb-C 进行了第二轮的表位作图。表位 SEQ ID NO:8 以及 SEQ ID NO:11 (包括后面的 SEQ ID NO:9-10 的变体) 位于 C 片段上, 而表位 SEQ ID NO:12-14 位于 N 片段上。

[0336] 在表位 SEQ ID NO:8 和 SEQ ID NO:11 (包括其变体 SEQ ID NO:9-10) 的建立中, 利用了例如片段 SEQ ID NO:11 与 SEQ ID NO:15-20 的相互作用 (图 6)。

[0337] 此外, 在表位 SEQ ID NO:12-14 的建立中, 利用了例如片段 SEQ ID NO:21-34 的相互作用 (图 7)。

[0338] 将在本申请中涉及的所有引证材料 (包括但不限于公开文件、DNA 或蛋白数据录入、以及专利) 通过引用结合在此。

[0339] 因此很显然本发明的描述可以在许多方面做出同样的改变。此类改变将不被视为是偏离了本发明的精神以及范围, 并且对本领域的普通技术人员而言将是显而易见的所有此类变更旨在包含在以下权利要求的范围内。

[0340] 7. 单克隆抗体的产生

[0341] 基于由 Köhler 和 Milstein 研制的杂交瘤技术可以生产单克隆抗体 (Köhler, G 和 Milstein, C, 1973, Nature 256, 495-497)。诸位发明人在此给出根据本披露如何研制针对 HER2 表位的单克隆抗体的简要说明。该单克隆抗体应当能够与氨基酸序列 LQVF (SEQ ID NO:8) 或 ESFDGD (SEQ ID NO:9) 选择性地相互作用。SEQ ID NO:1 可以用作抗原并且在实例部分 1 中说明了其生产。一种替代方法是合成一种包括本发明的表位的肽, 例如由氨基酸序列 CAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFET 组成的一种肽, 并且使用这种肽作为抗原。

[0342] 以三周间隔将抗原皮下注射进入 BALB/c 小鼠 (4-6 周龄, 雌性)。在免疫前, 将该抗原与弗氏完全佐剂混合用于第一次注射, 并且与弗氏不完全佐剂混合用于随后的注射。在融合之前三天, 静脉内用抗原最后激发 (challenged) 该小鼠。通过来自该免疫的小鼠的

脾细胞与一种 Sp2/0 骨髓瘤细胞系的融合产生杂交瘤。然后,使用 ELISA 筛选若干杂交瘤细胞系,并且鉴定和选择分泌对于包括 LQVF (SEQ ID NO :8) 和 / 或 ESDGD (SEQ ID NO :9) 的一个或多个片段特异的抗体的细胞系用于进一步的表征。

[0343] 作为本披露的一些方面涉及 HER2 抗体作为一种治疗剂的用途,进一步表征涉及如在实例部分 5b 中提出的细胞结合测定测试来自选择的杂交瘤细胞系的上清液中的抗体。选择具有结合至在 BT474 细胞表面上表达的 HER2 受体的抗体的细胞系用于亚克隆化和扩增。

[0344] 进一步表征可以包括与在实例部分 5d-5e 中提出的结果一致的生长抑制研究,以证实这些单克隆抗体展现出治疗上感兴趣的生长抑制作用。最后,可以做出在实例部分 6a-d 中提出的表位作图,以证实来自选择的细胞系的单克隆抗体与预期的一种或多种表位相互作用。

[0345] 在将该单克隆抗体作为一种治疗剂引入之前,可以降低其免疫原性。可以将鼠单克隆抗体工程化以成为嵌合抗体或人源化抗体,由此去除至少部分的它们的免疫原性成分并且增加它们的免疫学效能。可替代地,可以使用转基因鼠或噬菌体展示文库生产完全人源性单克隆抗体。

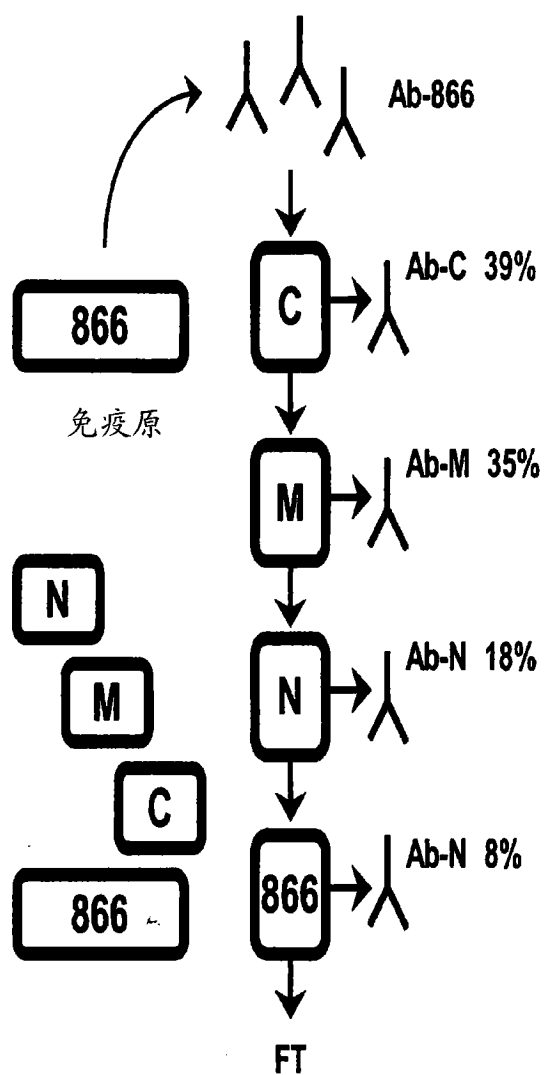


图 1A

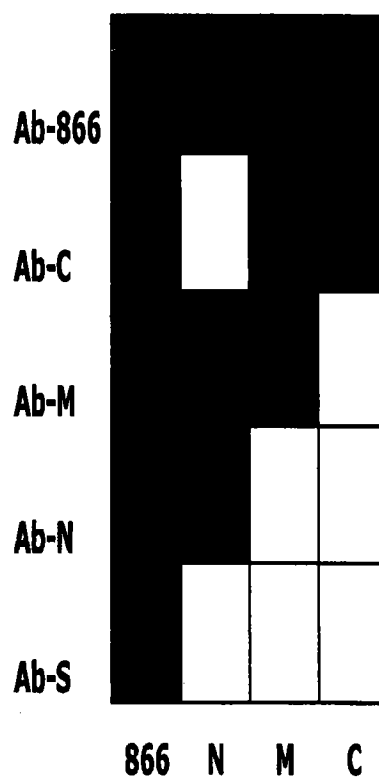


图 1B

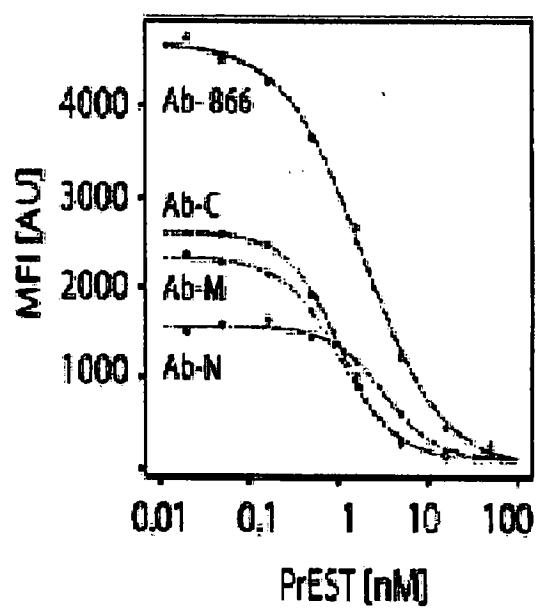


图 1C

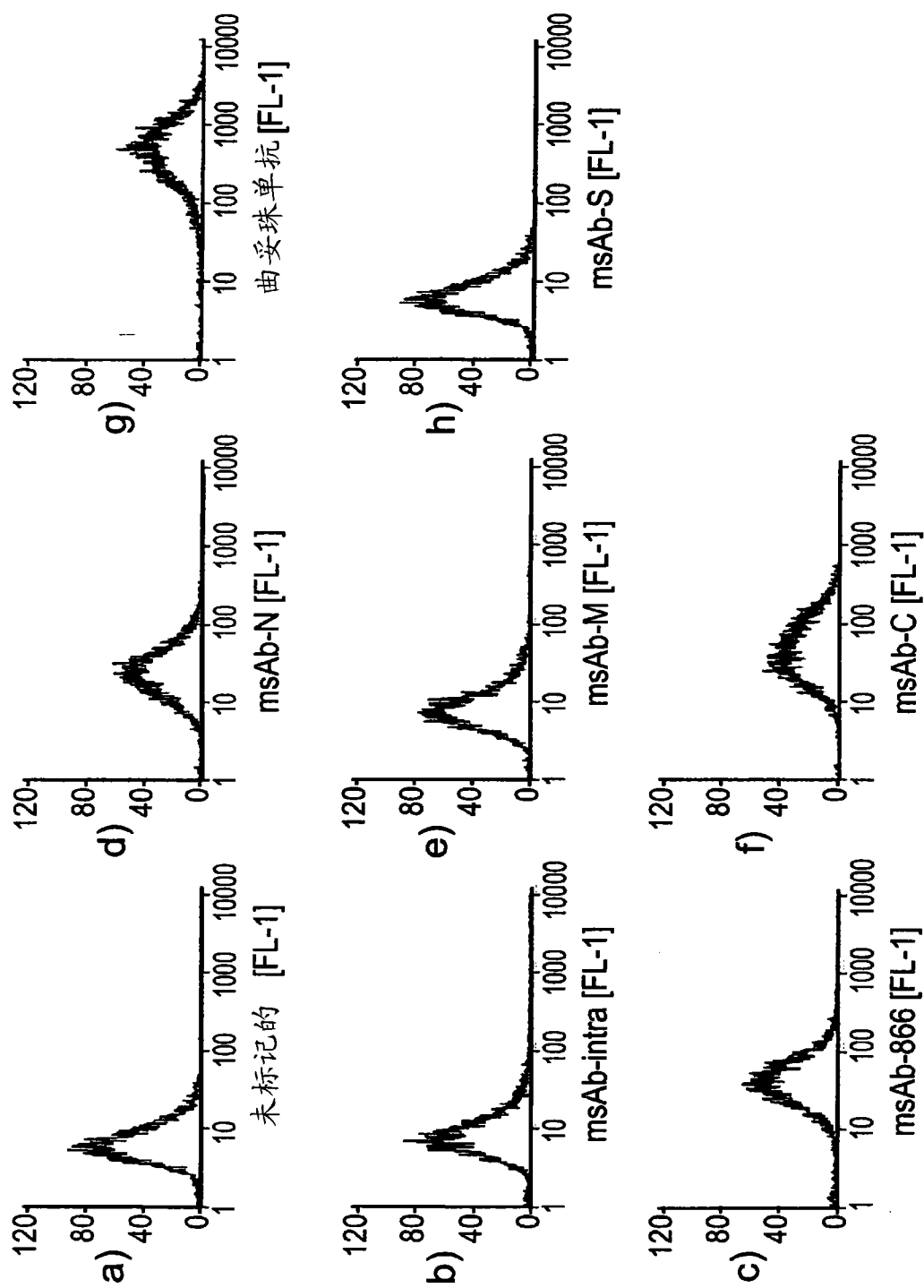


图 2

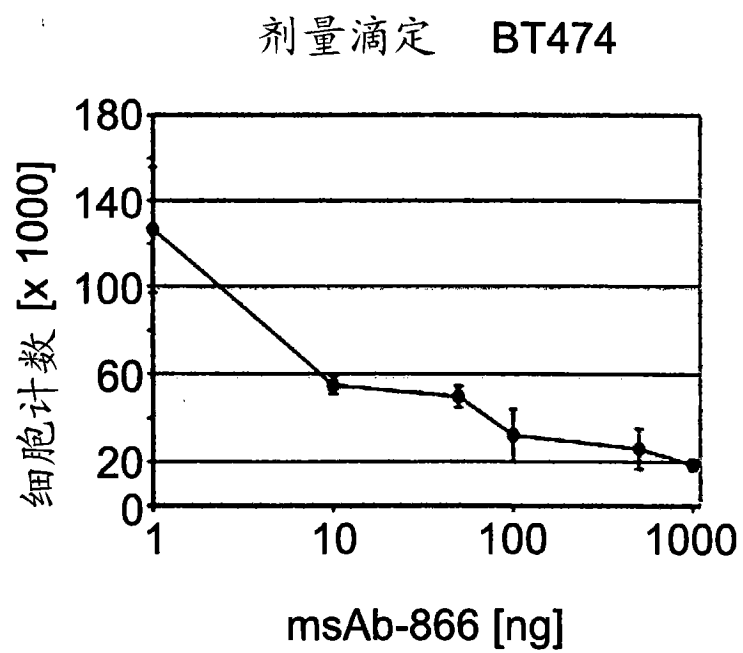


图 3

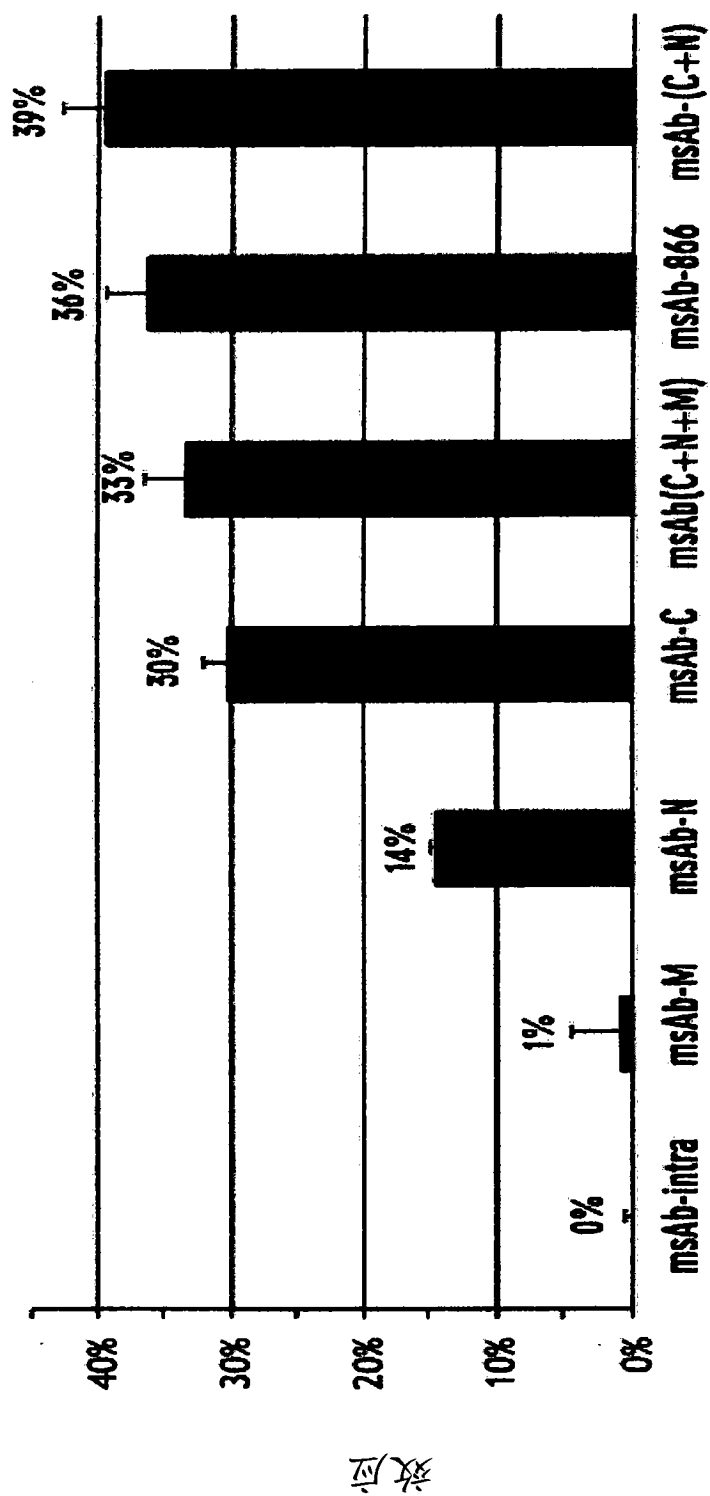


图 4

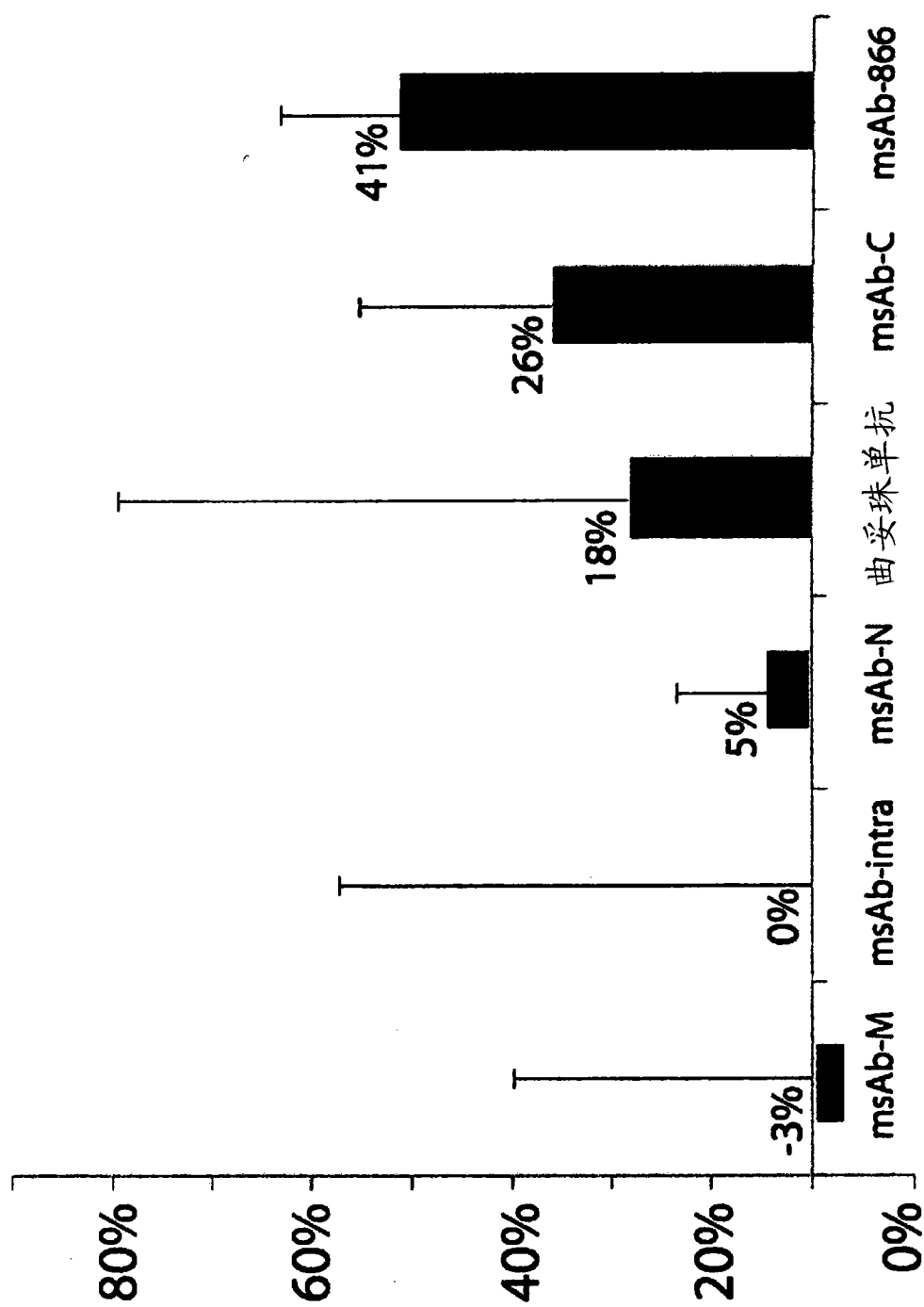


图 5

SEQ ID NO 7	RTVCGGCGKCKPLPTDCHEQCAAGCTQKHSDCLACLHFNWSGTCELHOPALVTNTDTFESNPDEGRYTFGASCTACPNVYSTDVGSCTLVCPHNDQVTAEDGTQRCCKSPCARVCYGLQMEHLREVRAVTSANTQEFACCKKIFGS
SEQ ID NO 1	-----NTDITFESNPDEGRYTFGASCTACPNVYSTDVGSCTLVCPHNDQVTAEDGTQRCCKSPCARVCYGLQMEHLREVRAVTSANTQEFACCKKIFGS
SEQ ID NO 4	-----CHEQCAAGCTQKHSDCLACLHFNWSGTCELHOPALVTNTDTFESNPDEGRYTFGASCTACPNVYSTDVGSCTLVCPHNDQVTAEDGTQRCCKSPCARVCYGLQMEHLREVRAVTSANTQEFACCKKIFGS
SEQ ID NO 5	-----MEHLREVRAVTSANTQEFACCKKIFGS
SEQ ID NO 6	-----FACCKKIFGS
SEQ ID NO 11	-----
SEQ ID NO 15	-----
SEQ ID NO 16	-----
SEQ ID NO 17	-----
SEQ ID NO 18	-----
SEQ ID NO 19	-----
SEQ ID NO 20	-----
SEQ ID NO 8	-----
SEQ ID NO 9	-----
SEQ ID NO 10	-----

SEQ ID NO 7	LAFIPESFDQASPATAPLQPEQLQVFETLEETGILYTSAMPDLPDL SVFQNLQVTRGRILLNGAYSLLTQGLGTSNGLRSRELCSGLALIHNTHL CFVHTVPHDQL FNPHQALLHTANPDECVGEGLAGLCH
SEQ ID NO 1	-----LAFIPESFDQASPATAPLQPEQLQVF
SEQ ID NO 4	-----
SEQ ID NO 5	LAFIPESFDQASPATAPLQPEQLQVFETLEETGILYTSAMPDLPDL SVFQNLQVTRGRILLNGAYSLLTQGLGTSNGLRSRELCSGLALIHNTHL CFVHTVPHDQL FNPHQALLHTANPDECVGEGLAGLCH
SEQ ID NO 6	LAFIPESFDQASPATAPLQPEQLQVFETLEETGILYTSAMPDLPDL SVFQNLQVTRGRILLNGAYSLLTQGLGTSNGLRSRELCSGLALIHNTHL CFVHTVPHDQL FNPHQALLHTANPDECVGEGLAGLCH
SEQ ID NO 11	-----LIPESFDQ
SEQ ID NO 15	-----PESFDQPA
SEQ ID NO 16	-----LIPESFDQASPATAPLQPEQLQVFET
SEQ ID NO 17	-----PESFDQ
SEQ ID NO 18	-----LIPESFDQ
SEQ ID NO 19	-----ESTQDQASPATAPLQPEQLQVF
SEQ ID NO 20	-----LQVFETLEETG
SEQ ID NO 8	-----LQVF
SEQ ID NO 9	-----ESTQDQ
SEQ ID NO 10	-----PESFDQ

图 6

SEQ ID NO 7	RTVCAGGACGKPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 1	-----YNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 4	-----CHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 5	-----YNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 6	-----YNTDTEES
SEQ ID NO 12	-----YNTDTEES
SEQ ID NO 13	-----NPEGRYTFGA
SEQ ID NO 14	-----VGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTOR
SEQ ID NO 21	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 22	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 23	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 24	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 25	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 26	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 27	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 28	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 29	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 30	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 31	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 32	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 33	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 34	-----FNSGICELHCPALVTYNTDTEESMPNPEGRYTFGASCTACPMNYLSTDVGSCTLVCPLNHVEVTAEDGTORCEKSPCARVCYGLGMEHLREVAVTSANTIOEF
SEQ ID NO 7	AGCKKTFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLPPEQLQVFETILEETGYLYSAMPDLSPLSVFQNLQVTRGRLLHNGAYSILTLOGLSMLGLRSRELGSGLALHMHNTILCFVHTVPMDOQLFRNPQALLHTANRPEDECVGEGLACH
SEQ ID NO 1	AGCKKTFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLPPEQLQVF
SEQ ID NO 4	AGCKKTFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLPPEQLQVFETILEETGYLYSAMPDLSPLSVFQNLQVTRGRLLHNGAYSILTLOGLSMLGLRSRELGSGLALHMHNTILCFVHTVPMDOQLFRNPQALLHTANRPEDECVGEGLACH
SEQ ID NO 5	AGCKKTFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLPPEQLQVFETILEETGYLYSAMPDLSPLSVFQNLQVTRGRLLHNGAYSILTLOGLSMLGLRSRELGSGLALHMHNTILCFVHTVPMDOQLFRNPQALLHTANRPEDECVGEGLACH
SEQ ID NO 6	AGCKKTFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLPPEQLQVFETILEETGYLYSAMPDLSPLSVFQNLQVTRGRLLHNGAYSILTLOGLSMLGLRSRELGSGLALHMHNTILCFVHTVPMDOQLFRNPQALLHTANRPEDECVGEGLACH
SEQ ID NO 12	-----
SEQ ID NO 13	-----
SEQ ID NO 14	-----
SEQ ID NO 21	-----
SEQ ID NO 22	-----
SEQ ID NO 23	-----
SEQ ID NO 24	-----
SEQ ID NO 25	-----
SEQ ID NO 26	-----
SEQ ID NO 27	-----
SEQ ID NO 28	-----
SEQ ID NO 29	-----
SEQ ID NO 30	-----
SEQ ID NO 31	-----
SEQ ID NO 32	-----
SEQ ID NO 33	-----
SEQ ID NO 34	-----

图 7