

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610148415.9

[51] Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2007年5月23日

[11] 公开号 CN 1966525A

[51] Int. Cl. (续)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

[22] 申请日 2002.6.13

[21] 申请号 200610148415.9

分案原申请号 02815939.X

[30] 优先权

[32] 2001.6.13 [33] US [31] 60/298172

[71] 申请人 根马布股份公司

地址 丹麦哥本哈根

[72] 发明人 J·范德温克尔 M·A·范迪克

A·F·格里特森 E·哈尔克

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 刘玥

权利要求书4页 说明书74页 附图18页

[54] 发明名称

表皮生长因子受体(EGFR)的人单克隆抗体

[57] 摘要

公开了特异性与人 EGFR 结合的分离的人单克隆抗体及相关的基于抗体的组合物和分子。人抗体可以由能够通过进行 V-D-J 重组产生人单克隆抗体的多个同种型和通过进行 V-D-J 重组和同种型转换产生人单克隆抗体同种型的转基因小鼠产生。也公开了包含人抗体的药物组合物、产生人抗体的非人转基因动物和杂交瘤,以及使用人抗体的治疗和诊断方法。

1. 一种结合于人 EGFR 的分离的人单克隆抗体, 其中该抗体与另一种抗体结合 EGFR 上的相同表位, 所述另一种抗体包含具有 SEQ ID NO: 2 所示氨基酸序列的重链可变区和具有 SEQ ID NO: 4 所示氨基酸序列的轻链可变区。

2. 权利要求 1 的人抗体, 包含: 具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 2 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列的重链可变区, 以及具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 4 具有至少 90% 序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区。

3. 权利要求 1 或 2 的人抗体, 包含: 具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列的重链可变区, 以及具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

4. 权利要求 1 或 2 的人抗体, 包含: 具有图 15B 所示的 CDR3 氨基酸序列的重链 CDR3 区, 以及具有图 15A 所示的 CDR3 氨基酸序列的轻链 CDR3 区。

5. 前述权利要求之任一项的人抗体, 其中该抗体是 IgG1, IgA, IgE, IgM, IgG4 或 IgD 抗体。

6. 权利要求 5 的人抗体, 其中该抗体是 IgG1 抗体。

7. 权利要求 6 的人抗体, 其中该抗体是抗体 2F8。

8. 权利要求 1-6 之任一项的人抗体, 其中该抗体是 Fab 片段或单链抗体。

9. 前述权利要求之任一项的人抗体, 其中该抗体抑制 EGFR 配体结合人 EGFR。

10. 权利要求 9 的人抗体, 其中该抗体使 EGFR 配体与人 EGFR 的结合阻断至少约 50%。

11. 权利要求 9 或 10 的人抗体, 其中该 EGFR 配体是 EGF 或 TGF- α 。

12. 前述权利要求之任一项的人抗体, 其中该抗体以至少约 $10^8 M^{-1}$ 的平衡缔合常数 (K_A) 结合于人 EGFR。

13. 权利要求 12 的人抗体, 其中该抗体以至少约 $10^9 M^{-1}$ 的平衡缔合常数 (K_A) 结合于人 EGFR。

14. 前述权利要求之任一项的人抗体, 其中该抗体不激活补体。

15. 前述权利要求之任一项的人抗体，它抑制 EGF 或 TGF- α 诱导的 EGFR 自磷酸化。

16. 前述权利要求之任一项的人抗体，它结合于表达 EGFR 的细胞并且 (a) 抑制该细胞的生长，(b) 诱导人效应细胞存在下的细胞裂解 (ADCC) 或 (c) 不诱导补体介导的细胞裂解。

17. 权利要求 16 的人抗体，其中该表达 EGFR 的细胞是 (a) 选自膀胱细胞、乳腺细胞、结肠细胞、肾细胞、卵巢细胞、前列腺细胞、肾细胞、鳞状细胞和非小细胞肺细胞的肿瘤细胞，(b) 滑膜成纤维细胞或 (c) 角质形成细胞。

18. 前述权利要求之任一项的人抗体，其中该抗体由包含与永生化细胞融合的 B 细胞的杂交瘤产生，此 B 细胞由转基因非人动物获得，此转基因动物具有含有人重链转基因和人轻链转基因的基因组，或者该抗体由包含编码人重链和人轻链的核酸的转染瘤产生。

19. 一种杂交瘤，包含与永生化细胞融合的 B 细胞，此 B 细胞由转基因非人动物获得，此转基因动物具有含有人重链转基因和人轻链转基因的基因组，其中该杂交瘤产生可检测量的权利要求 1-18 之任一项的抗体或其抗原结合部分。

20. 一种转染瘤，包含编码人重链和人轻链的核酸，其中该转染瘤产生可检测量的权利要求 1-18 之任一项的抗体或其抗原结合部分。

21. 权利要求 20 的转染瘤，包含编码人重链可变区和人轻链可变区的核酸，所述的人重链可变区具有 SEQ ID NO : 1 所示的核苷酸序列，所述的人轻链可变区具有 SEQ ID NO : 3 所示的核苷酸序列。

22. 一种表达权利要求 1-18 之任一项的抗体的转基因非人动物，其中此转基因非人动物具有含有人重链转基因和人轻链转基因的基因组。

23. 一种制备权利要求 1-18 之任一项的抗体的方法，包括：将分离自转基因非人动物的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合，以形成永生化的分泌该抗体的杂交瘤细胞，其中所述转基因非人动物具有含有人重链转基因和人轻链转基因的基因组，并且用 EGFR 或表达 EGFR 的细胞免疫过，以便由该动物的 B 细胞产生抗体。

24. 一种双特异性分子，包含权利要求 1-18 之任一项的人抗体和对人抗原呈递细胞 (APC) 或对人 Fc 受体的结合特异性。

25. 权利要求 24 的双特异性分子, 其中该 Fc 受体是人 Fc γ RI 或人 Fc α 受体。

26. 权利要求 24 或 25 的双特异性分子, 它与 Fc 受体在该受体的免疫球蛋白结合位点以外的位点结合。

27. 一种组合物, 包含权利要求 1-18 之任一项的人抗体和可药用载体。

28. 一种组合物, 包含权利要求 1-18 之任一项的两种或更多种人抗体或其抗原结合部分的组合, 其中每种所述抗体或其抗原结合部分与 EGFR 的不同表位结合。

29. 一种组合物, 包含权利要求 1-18 之任一项的人抗体和一种化疗剂。

30. 一种免疫毒素, 包含连接于细胞毒性剂的权利要求 1-18 之任一项的人抗体。

31. 一种抑制表达 EGFR 的细胞生长的体外方法, 包括将细胞与有效量的权利要求 1-18 之任一项的抗体相接触, 使得表达 EGFR 的细胞的生长被抑制, 其中该抗体抑制 EGFR 配体结合人 EGFR。

32. 一种诱导表达 EGFR 的细胞的细胞裂解的体外方法, 包括在效应细胞存在下, 将表达 EGFR 的细胞与权利要求 1-18 之任一项的抗体相接触, 从而发生表达 EGFR 的细胞的细胞裂解。

33. 权利要求 31 或 32 的方法, 其中该细胞选自膀胱细胞、乳腺细胞、结肠细胞、肾细胞、卵巢细胞、前列腺细胞、肾细胞、鳞状细胞和非小细胞肺细胞、滑膜成纤维细胞和角质形成细胞。

34. 权利要求 1-18 之任一项的人抗体在制备用于治疗或预防由 EGFR 表达介导的疾病的药物中的用途。

35. 权利要求 34 的用途, 其中该疾病是癌症或自身免疫病。

36. 权利要求 35 的用途, 其中该癌症选自膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、肾癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌以及头和颈癌, 并且该自身免疫病涉及表皮过度增殖或是炎症性关节炎。

37. 权利要求 34-36 之任一项的用途, 其中该人抗体与针对 Fc 受体的结合特异性或与细胞毒素偶联。

38. 权利要求 34-37 之任一项的用途, 其中所述的治疗或预防进一步包括共同给予另一种治疗剂。

39. 权利要求 38 的用途, 其中该治疗剂选自阿霉素(阿得里亚霉素)、顺铂、硫酸博莱霉素、卡氮芥、苯丁酸氮芥和环磷酰胺羟基脲。

40. 含有权利要求 1-18 之任一项的人抗体和另一种治疗剂的产品, 该产品作为用于共同给药以治疗或预防由 EGFR 表达介导的疾病的联合制剂。

41. 检测样品中 EGFR 抗原或表达 EGFR 的细胞存在的方法, 包括: 在允许抗体或其部分与 EGFR 之间形成复合物的条件下, 将样品与权利要求 1-18 之任一项的抗体相接触; 以及检测复合物的形成。

42. 一种表达载体, 包含编码权利要求 1-18 之任一项的人抗体的轻链、重链或轻链和重链两者的可变区的核苷酸序列。

43. 权利要求 42 的表达载体, 进一步包含编码与 EGFR 结合的人抗体的轻链、重链或轻链和重链两者的恒定区的核苷酸序列。

44. 权利要求 42 或 43 的表达载体, 包含编码重链可变区和轻链可变区的核酸, 所述的重链可变区具有 SEQ ID NO : 1 所示的核苷酸序列, 所述的轻链可变区具有 SEQ ID NO : 3 所示的核苷酸序列。

45. 包含权利要求 42-44 之任一项的表达载体的转染瘤。

表皮生长因子受体 (EGFR) 的人单克隆抗体

本申请是申请日为2002年6月13日的中国专利申请02815939.X“表皮生长因子受体 (EGFR) 的人单克隆抗体”的分案申请。

相关申请

本申请要求2001年6月13日提交的美国临时申请60/298,172的优先权,在此全文引入作为参考。

技术领域

本发明涉及用于治疗 and 预防与EGFR的表达相关的疾病,特别是表达EGFR的肿瘤和自身免疫病的改进的抗体治疗。

背景技术

EGF受体(EGFR)是一种170 kDa的1型跨膜分子。已经发现它的表达在许多人类肿瘤,包括头和颈、乳腺、结肠、前列腺、肺和卵巢的癌中上调。过量表达的程度与不佳的临床预后相关(Baselga, et al. (1994) *Pharmac. Therapeut.* 64: 127-154; Modjtahedi, et al. (1994) *Int. J. Oncology* 4: 277-296)。此外,它的表达通常伴随者由表达EGFR的肿瘤细胞产生EGFR配体、TGF- α 和EGF等,这表示自分泌循环参与这些细胞的进展(Baselga, et al. (1994) *Pharmac. Therapeut.* 64: 127-154; Modjtahedi, et al. (1994) *Int. J. Oncology.* 4: 277-296)。因此,阻断这些EGFR配体和EGFR之间的相互作用可以抑制肿瘤生长和存活(Baselga, et al. (1994) *Pharmac. Therapeut.* 64: 127-154)。

EGFR的配体结合域的单克隆抗体(MAbs)可以阻断EGF和TGF- α 之间的相互作用以及因此同时阻断细胞内信号传递途径。产生了一些鼠单克隆抗体,这些抗体完成了这种体外阻断,并且评估了这些抗体影响小鼠异种移植物模型中的肿瘤生长的能力(Masui, et al. (1986) *Cancer Res.* 46: 5592-5598; Masui, et al. (1984) *Cancer Res.* 44: 1002-1007; Goldstein, et al. (1995) *Clin. Cancer Res.* 1:

1311-1318)。在移植了人肿瘤细胞后一天给药时,大多数抗 EGFR MAbs 可有效防止无胸腺小鼠中的肿瘤形成 (Baselga, et al. (1994) *Pharmac. Therapeut.* 64: 127-154)。然而,当注射至携带建立了人肿瘤异种移植物的 小鼠中时,这些鼠 MAbs (如 MAbs 225s 和 528) 仅仅导致部分肿瘤消退。完全消除肿瘤需要共同给予化疗剂 (Baselga, et al. (1994) *Pharmac. Therapeut.* 64: 127-154; Fan, et al. (1993) *Cancer Res.* 53: 4322-4328; Baselga, et al. (1993) *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1327-1333)。

因此,尽管目前获得的结果明确地确立了 EGFR 作为免疫治疗的靶,它们也表明,鼠抗体不构成理想的治疗剂。而且,用鼠抗体进行治疗一般在患者中引发严重的免疫反应。为了避免小鼠抗体的免疫原性,理想的治疗应该完全使用人抗体。作为达到这一目标的一个步骤,开发了 225 MAb (C225) 的嵌合形式,其中小鼠抗体的可变区与人恒定区连接。尽管 C225 在建立的异种移植肿瘤的体内治疗中表现出改进的抗肿瘤活性,这仅仅在高剂量下才能达到 (Goldstein, et al. (1995) *Clin. Cancer Res.* 1: 1311 - 1318)。目前正在临床试验中评估 C255 治疗各种类型的实体瘤的作用 (Baselga, J. (2000) *J. Clin. Oncol.* 18: 54S-59S; Baselga, J. (2000) *Ann. Oncol.* 11 Suppl 3: 187-190, 2000)。

因此,需要改进的抗 EGFR 的治疗性抗体,所述抗体在低剂量给药时有效治疗和/或预防与 EGFR 的过量表达相关的疾病,并且在患者中不激发免疫反应。如前所述,单克隆抗体 (MAb) 在疾病的许多诊断和治疗方法中起显著作用,并且随着开发完全的人抗体的技术的产生,成为更有吸引力的试剂。抗体和抗体衍生物构成了目前正在开发的生物药物的 25%,并且其中的许多正在被开发为癌症治疗剂。抗体组合了靶特异性和有效参与免疫系统的能力。这些特性和它们的长生物半衰期的组合向研究者们提示了抗体的治疗潜能。最近这方面已经达到了顶点,美国食品和药品管理局 (FDA) 批准了用于癌症治疗的一些抗体。

发明内容

本发明提供了用于治疗和预防与 EGFR 的表达相关的疾病,特别是表达 EGFR 的肿瘤和自身免疫病的改进的抗体治疗。抗体得到了改进,

因为它们是完全的人抗体（在此称作"HuMAbs™"）并且因此在患者中的免疫原性更低。与以前报道的其它抗EGFR抗体相比，这些抗体在较低的剂量下也是治疗有效的（如有效防止表达EGFR的细胞的生长和/或功能）。此外，在某些实施方案中，抗体具有额外的优点，即不激活补体（例如，不诱导补体介导的靶细胞裂解），这减少了治疗中的不良副作用。

因此，在一种实施方案中，本发明提供了特异性结合于人表皮生长因子受体(EGFR)的分离的人单克隆抗体，以及含有一种所述抗体或所述抗体的组合的组合物。人抗体抑制（如阻断）EGFR配体，如EGF和TGF- α 与EGFR结合。例如，EGFR配体与EGFR的结合可以被抑制至少约10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%，或100%，并且优选导致EGFR介导的细胞信号传递的阻止。

本发明的优选人抗体抑制表达在人效应细胞（如多形核细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞）存在下抑制表达EGFR的细胞生长和/或介导其杀灭（如裂解或吞噬），但是它们不激活补体介导的表达EGFR的细胞的裂解。因此，本发明的人单克隆抗体可以用作体内和体外的诊断和治疗剂。

在此处示例的一种实施方案中，本发明的人抗体是具有IgG1重链和 κ 轻链的IgG1（例如IgG1k）抗体。然而，本发明也包括其它抗体同种型，如IgG1，IgG2，IgG3，IgG4，IgM，IgA1，IgA2，IgAsec，IgD和IgE。这些抗体可以是完整抗体或抗体的抗原结合片段，包括Fab，F(ab')₂，Fv和链Fv片段。

在一种特定的实施方案中，人抗体是由在其可变区分别包含SEQ ID NO：1和SEQ ID NO：3所示的核苷酸序列及其保守序列修饰的人IgG重链和人 κ 轻链核酸编码。在另一种实施方案中，人抗体包括分别包含SEQ ID NO：2和SEQ ID NO：4所示的氨基酸序列及其保守序列修饰的IgG重链和 κ 轻链。

在另一种特定的实施方案中，人抗体相当于抗体2F8或与抗体2F8结合于相同表位（如与其竞争）或具有相同结合特征的抗体。

本发明的人抗体可以在宿主细胞，如含有编码抗体重链和轻链的核酸的转染瘤（如由永生化CHO细胞或淋巴细胞组成的转染瘤）中重组产生，或者直接从表达抗体的杂交瘤（例如，包含了一个从转基因非

人动物如转基因小鼠中获得的与永生化细胞融合的 B 细胞, 转基因小鼠有一个包含一个人重链转基因和一个轻链转基因的基因组) 直接获得。在一个特定的实施方案中, 抗体由此处称作 2F8 的杂交瘤或含有在其可变区分别包含 SEQ ID NO : 1 和 SEQ ID NO : 3 所示的核苷酸序列及其保守序列修饰的人重链和人轻链核酸的宿主细胞 (如 CHO 细胞) 转染瘤产生。

在另一种实施方案中, 本发明的人抗 EGFR 抗体的特征可以在于下列的一种或多种特性:

a) 对 EGFR 受体的特异性;

b) 对 EGFR 的亲合性, 平衡亲和常数 (K_A) 至少为约 $10^7 M^{-1}$, 优选为约 $10^8 M^{-1}$, $10^9 M^{-1}$, 更优选为约 $10^{10} M^{-1}$ 到 $10^{11} M^{-1}$ 或更高;

c) 从 EGFR 的解离常数 (K_D) 为约 $10^{-3} s^{-1}$, 优选为约 $10^{-4} s^{-1}$, 更优选为约 $10^{-5} s^{-1}$, 最优选为约 $10^{-6} s^{-1}$;

d) 调理表达 EGFR 的细胞的能力; 或

e) 在约 10ug/ml 或更低的浓度 (如体外) 下, 人效应细胞存在时具有抑制表达 EGFR 的细胞 (如肿瘤细胞) 生长和/或介导对该细胞的吞噬及杀灭的能力。

可以由本发明的人抗体导向的表达 EGFR 的肿瘤细胞的例子包括, 但不限于, 膀胱、乳腺、结肠、肾、卵巢、前列腺、肾细胞、鳞状细胞、肺 (非小细胞)、或头和颈肿瘤细胞。其它表达 EGFR 的细胞包括滑膜成纤维细胞和角质细胞, 它们分别可以在关节炎和牛皮癣的治疗中用作靶细胞。

在另一种实施方案中, 本发明的人抗体与 EGFR 抗原以至少约 $10^8 M^{-1}$, 更优选为至少约 $10^9 M^{-1}$ 或 $10^{10} M^{-1}$ 的亲合常数结合, 并且可以在 IC_{50} 为约 $1 \times 10^{-7} M$ 或更低时, 或在约 10ug/ml 或更低的浓度下体外抑制表达 EGFR 的细胞生长和/或介导人效应细胞如多形核细胞 (PMNs)、单核细胞和巨噬细胞对表达 EGFR 的细胞的吞噬和杀灭。

在另一种实施方案中, 本发明的人抗体抑制 EGFR 介导的细胞信号传递。例如, 抗体可以抑制 EGFR 配体 (如 EGF 或 TGF- α) 诱导的 EGFR 的自磷酸化。抗体也可以抑制自分泌 EGF 或 TGF- α 诱导的细胞激活或诱导人多形核细胞存在下的表达 EGFR 的细胞的裂解 (ADCC)。表达 EGFR 的细胞包括, 膀胱细胞、乳腺细胞、结肠细胞、肾细胞、卵巢细胞、

前列腺细胞、肾细胞、鳞状细胞、非小细胞肺细胞、滑膜成纤维细胞和角质细胞等。

另一方面，本发明提供了编码本发明的抗体或抗原结合部分的核酸分子。包括本发明的抗体编码核酸的重组表达载体和用这种载体转染的宿主细胞，以及通过培养这些宿主细胞产生抗体的方法也包含在本发明中的范围中，所述载体例如包含编码由杂交瘤产生的抗体 2F8 的重链和轻链可变区和恒定区的核苷酸序列的表达载体。

另一方面，本发明提供了从表达本发明的人抗 EGFR 抗体的非人动物如转基因小鼠中得到的分离 B 细胞。优选地，分离 B 细胞从用 EGFR 抗原的纯化或富集制剂和/或表达 EGFR 的细胞免疫过的转基因非人动物，如转基因小鼠中获得。优选地，转基因非人动物，如转基因小鼠，有一个包含编码本发明的抗体的全部或部分的人重链转基因和一个人轻链转基因的基因组。然后分离 B 细胞被永生化的，提供 EGFR 的人单克隆抗体来源（如杂交瘤）。

因此，本发明也提供了可以产生与 EGFR 特异性结合的人单克隆抗体的杂交瘤。在一种实施方案中，杂交瘤包含了一个从转基因非人动物如转基因小鼠中获得的与永生化的细胞融合的 B 细胞，转基因小鼠有一个包含编码本发明的抗体的全部或部分的一个重链转基因和一个轻链转基因的基因组。本发明的特定杂交瘤包括 2F8。

而另一方面，本发明提供了转基因非人动物，如转基因小鼠（这里也称作“HuMAb”），它表达与 EGFR 特异性结合的单克隆抗体。在一种特定的实施方案中，转基因非人动物是转基因小鼠，它有一个包含编码本发明的抗体的全部或部分的一个重链转基因和一个人轻链转基因的基因组。转基因非人动物可以用 EGFR 抗原的纯化或富集制剂和/或表达 EGFR 受体的细胞来免疫。优选地，转基因非人动物如转基因小鼠可以通过进行 V-D-J 重组和同种型转换产生多种 EGFR 受体的人单克隆抗体同种型（如 IgG, IgA 和/或 IgM）。同种型转换可以通过经典或非经典同种型转换完成。

另一方面，本发明提供了产生特异性与 EGFR 反应的人单克隆抗体的方法。在一种实施方案中，此方法包括用 EGFR 抗原和/或表达 EGFR 受体的细胞的纯化或富集制剂来免疫有一个包含编码本发明的抗体的全部或部分的一个重链转基因和一个人轻链转基因的基因组的转基因

因非人动物如转基因小鼠。然后获得动物的 B 细胞（如脾 B 细胞）并与骨髓瘤细胞融合形成无限增殖的，分泌抗 EGFR 的人单克隆抗体的杂交瘤。

另一方面，本发明的人抗 EGFR 抗体可以由另一种功能分子如另一种肽或蛋白（如 Fab' 片段）衍生，与其联接或共表达。例如，本发明的一种抗体或抗原结合部位可以与一种或多种其它分子实体如另一种抗体（如为产生双特异性或多特异性抗体）、细胞毒素、细胞配体或抗原进行功能性联接（如通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其它方式）。因此，本发明包括大量抗体偶联物、双特异性和多特异性分子，以及融合蛋白，它们都与表达 EGFR 的细胞结合，并且将其它分子导向于细胞，或结合于 EGFR 和其它分子或细胞。

在一种特定的实施方案中，本发明包括双特异性或多特异性分子；所述双特异性或多特异性分子包含至少一个对 EGFR（例如人抗 EGFR 抗体或其片段或模拟物）的第一结合特异性和对 Fc 受体，如人 Fc γ RI 或人 Fc α 受体，或抗原呈递细胞（APC）上的另一种抗原的第二结合特异性。典型地，本发明的双特异性和多特异性分子包含至少一个抗体或其片段（如 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv 或单链 Fv），优选人抗体或其部分，或“嵌合的”或“人源化”的抗体或其部分（例如有一个来源于非人抗体（如鼠）的可变区，或至少一个互补决定区（CDR），剩下的部分来源于人）。

因此，本发明包括与人 EGFR 和 Fc 受体如人 IgG 受体，如 Fc γ 受体（Fc γ R），如 Fc γ R I（CD64），Fc γ R II（CD32）和 Fc γ R III（CD16）结合的双和多特异性分子。其它 Fc 受体，如人 IgA 受体（如 Fc α RI）也可以作为靶。Fc 受体优选位于效应细胞如单核细胞、多形核细胞、巨噬细胞或激活的多形核细胞的表面。在一种优选实施方案中，双特异性和多特异性分子在受体的免疫球蛋白 Fc（如 IgG 或 IgA）结合点之外的位点与 Fc 受体结合。因此，双特异性和多特异性分子的结合不被生理水平的免疫球蛋白阻断。

另一方面，本发明提供了包含与治疗部分如细胞毒药物、酶活性毒素或其片段、放射性同位素或小分子抗癌药连接的本发明的人抗 EGFR 抗体或其片段的偶联物。

或者，本发明的人抗体可以与所述治疗剂和细胞毒性剂共同给药，

但不与它们连接。它们可以与所述试剂同时（如在单一组合物中或分开）或在给予所述试剂之前或之后共同给药。所述试剂可以包括化疗剂，如阿霉素（阿得里亚霉素）、顺铂硫酸博莱霉素、卡氮芥、苯丁酸氮芥和环磷酰胺羟基脲。本发明的人抗体也可以与放疗联合给予。

另一方面，本发明提供了组合物，如药物和诊断组合物/试剂盒，它包含可药用的载体和特异性与EGFR结合的本发明的至少一种人单克隆抗体或其抗原结合部分。在一种实施方案中，组合物包含人抗体或其抗原结合部分的组合，优选为每个抗体或抗原结合部分与独特的表位的组合。例如，包含介导在效应细胞存在时高效杀灭靶细胞的人单克隆抗体的药物组合物可以与另一种抑制表达EGFR细胞生长的人单克隆抗体组合。所以，此组合提供了适应提供最大治疗益处的多种治疗。包含至少一种本发明的人单克隆抗体或其抗原决定部位和至少一种本发明的双特异性或多特异性分子的组合的组合物，如药物组合物，也在本发明的范围内。

而另一方面，本发明提供了用上述的本发明的抗体或和相关组合物，抑制表达EGFR的细胞增殖和/或生长，和/或诱导表达EGFR的细胞的杀灭的方法。在一种实施方案中，此方法包括在人效应细胞存在下，在体内或体外将表达EGFR受体的细胞与本发明的一种人单克隆抗体或其组合接触。此方法可以在如体外或来自体内的培养物（如包含表达EGFR和效应细胞的培养物）中应用。例如，一种包含表达EGFR的细胞和效应细胞的样品可以在体外培养，并与本发明的抗体或其抗原结合部分（或本发明的双特异性或多特异性抗体）组合。另外，此方法也可以在受试者中使用，如作为体内（如治疗或预防）方案的一部分。

对于用于与EGFR表达（如过量表达）相关的疾病的体内治疗和预防，以治疗有效剂量（例如导致生长抑制、表达EGFR的肿瘤细胞的细胞吞噬和/杀灭的剂量），使用任何适当的给药途径，如注射和本领域公知的基于抗体的临床产品的其它给药途径给予本发明的人抗体。

可以使用本发明的人抗体治疗和/或预防的典型EGFR相关疾病包括，但不限于自身免疫病和癌症。例如，可以治疗和/或预防的癌症包括膀胱、乳腺、结肠、肾、卵巢、前列腺、肾细胞、鳞状细胞、肺（非小细胞）、头和颈的癌症。可以治疗的自身免疫病包括，例如，牛皮癣

和炎症性关节炎, 如, 类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮相关的关节炎和牛皮癣关节炎。

在一种实施方案中, 还使用化疗剂、放疗或调节, 例如增强或抑制 Fc 受体如 Fc α 受体或 Fc γ 受体的表达或活性的试剂。在治疗中给予的典型细胞因子包括粒细胞集落刺激因子 (G-CSF), 粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF), γ 干扰素 (IFN- γ) 和肿瘤坏死因子 (TNF)。典型的治疗剂包括抗肿瘤剂如阿霉素 (阿得里亚霉素)、顺铂硫酸博莱霉素、卡氮芥、苯丁酸氮芥和环磷酰胺羟基脲等。

为增加本发明的人抗 EGFR 抗体抗不高度表达 EGFR 的癌细胞的疗效, 可以与上调或影响 EGFR 表达的试剂, 如导致肿瘤细胞上的 EGFR 上调和更均一表达的淋巴因子共同给予抗体。适于给药的淋巴因子制剂包括 γ 干扰素、肿瘤坏死因子及其组合。这些可以静脉内给药。淋巴因子的适当剂量一般是 10,000 - 1,000,000 单位/患者。

而另一方面, 本发明为在体外或体内检测样品中的 EGFR 抗原的存在, 如诊断 EGFR 相关疾病提供了方法。在一种实施方案中, 它通过在允许抗体和 EGFR 之间形成复合物的条件下, 将待检验样品和对照样品与本发明的人单克隆抗体 (或其抗原结合部分) 接触而完成。然后检测 (如用 ELISA) 复合物的形成。当使用对照样品和试验样品时, 检测两种样品中的复合物, 样品之间复合物形成的统计学显著差异指示检验样品中 EGFR 抗原的存在。

本发明的其它特征和优点由下面的详述和权利要求显而易见。

附图说明

图 1 表示来自小鼠 20241 的杂交瘤上清液与鼠单克隆抗 EGFR MAbs 225, 528 和 AB5 的竞争性 ELISA。

图 2 表示来自小鼠 20242 和 20243 的人抗体上清液与鼠单克隆抗 EGFR MAbs 225, 528 和 AB5 的竞争性 ELISA。

图 3 表示纯化的人抗体与鼠单克隆抗 EGFR MAbs 225 和 528 的竞争性 ELISA。

图 4A, 4B, 4C 和 4D 表示 HuMAbs (A) 6B3, (B) 5F12, (C) 2F8, 和 (D) 2A2 的竞争性 ELISA。

图 5A 和 5B 表示通过抗 EGFR HuMAbs 和鼠 MAbs 对 EGF-生物素与

EGFR 的结合的抑制 (ELISA 形式)。

图 6 表示通过抗 EGFR HuMAbs 和鼠 MAbs 对 EGF-生物素与 A431 细胞上 EGFR 的结合的抑制。

图 7 表示 A431 细胞上抗 EGFR HuMAbs 的滴度。

图 8 表示 2F8 抑制 EGF 结合纯化和天然的 EGFR 的能力。2F8 (菱形)、鼠 225 (正方形)、EGF (三角形) 或人 IgG1 κ 同种型对照 (圆形) 的效果是基于 EGF-生物素与固定化 EGFR 的结合而测量的。如图 8 中所描述, 2F8 能够以 17nM 的 IC₅₀ 抑制 EGF-生物素结合, 该 IC₅₀ 显著低于 225 (IC₅₀ 为 30 nM)。

图 9 是表示抑制 EGF 和 TGF- α 结合 A431 细胞的能力。A431 细胞来源于卵巢表皮样癌并且在其细胞表面表达超过 1×10^6 个 EGFR 分子。使用流式细胞仪分析来测定对 2F8 结合 A431 细胞的抑制。在加入 2F8 前用 5 (空心柱) 或 50 μ g/ml (实心柱) 配体预孵育细胞。没有配体的抗体结合 (PBS 组) 设定为 100%。如图所示, 2F8 有效阻断 EGF 和 TGF- α 结合 A431 细胞。这些结果表明, 2F8 与配体在 EGFR 上的相同位点附近或在相同位点结合。

图 10A 和 10B 表示单克隆抗 EGFR 对 A431 细胞的自磷酸化的作用。如方法中指出, 用不同抗体 (10 μ g/ml) 处理无血清的亚汇合 A431 细胞, 用 EGF (A) 或 TGF- α (B) 刺激, 并提取。通过 SDS-PAGE 分析 EGFR 磷酸化并且用抗磷酸酪氨酸抗体进行免疫印迹。

图 11A, 11B 和 11C 表示通过抗 EGFR 人抗体抑制表达 EGFR 的肿瘤细胞系生长。用各种浓度的 HuMAb 2F8 (正方形), 5C5 (三角形), 6E9 (十字), 2A2 (菱形), 抗体阴性对照抗 CTLA4 (空心圆形)、抗体阳性对照 225 (实心圆形) 或仅用培养基 (对照) 孵育表达 EGFR 的肿瘤细胞系 A431 (A), HN5 (B) 和 MDA-MB-468 (C) 7 天。此后, 用固定细胞的结晶紫染色评估细胞生长。生长抑制百分比计算为与仅仅使用对照的培养基中存在的蛋白量相比, 孵育 7 天后剩余的蛋白量。数据表示三次重复测量, 并且代表在不同日进行的 3 次实验。

图 12 表示人 PMN 介导的抗体依赖性细胞毒性。按描述分离 PMN。将 ⁵¹Cr 标记的 A431 细胞铺于 96 孔平底板中。以效应细胞: 靶细胞 100: 1 加入 PMN, 以不同浓度加入抗体。孵育过夜后, 测量 ⁵¹Cr 释放。

图 13 表示在无胸腺鼠模型中用 HuMAb 2F8 预防肿瘤形成。在第 0

天用 200 μ l PBS 中的 3×10^6 个肿瘤细胞对每组 6 只的各组小鼠进行肋腹皮下注射。随后, 在第 1 天 (75 μ g/200 μ l), 第 3 天 (25 μ g/200 μ l), 和第 5 天 (25 μ g/200 μ l) (箭头) 用 HuMAb 2F8 (实心正方形) 腹膜内注射小鼠, 用腹膜内注射人 IgG1- κ MAb 作为对照 (空心圆形)。数据表示为平均肿瘤体积 + SEM, 并且表示产生相似结果的 3 次实验。

图 14 表示与鼠抗 EGFR MAb (m225) 相比, 用 HuMAb 2F8 清除建立的 A431 肿瘤异种移植物。在第 0 天用 200 μ l PBS 中的 3×10^6 个肿瘤细胞对小鼠进行肋腹皮下注射。在第 10 天, 将小鼠随机分配至治疗组, 并且在第 12 天 (75 μ g/200 μ l), 第 14 天 (25 μ g/200 μ l), 和第 16 天 (25 μ g/200 μ l) (箭头) 用 HuMAb 2F8 (实心正方形, 2F8 短期) 或鼠抗-EGFR MAb 225 (实心三角形, m225 短期) 进行治疗。此外, 包括第 12 天接受 75 μ g/200 μ l HuMAb 2F8 或 m225, 继续在第 14, 16, 19, 22, 26, 29, 33, 36 和 40 天接受 25 μ g/200 μ l HuMAb 2F8 或 m225 的各组 (空心正方形, 2F8 长期; 空心三角形, m225 长期)。数据表示为平均肿瘤体积 + SEM, 并且表示产生相似结果的 3 次实验。黑色箭头表示短期治疗的治疗天数, 空心箭头表示长期治疗的治疗天数。

图 15A 和 15B 表示具有指定 CDR 区的 2F8 的 V_H -和 V_L -区的序列。

具体实施方式

本发明为治疗和诊断以表皮生长因子受体抗原 (这里称作"EGFR") 的表达, 特别是过量表达为特征的疾病提供了新颖的基于抗体的治疗方法。本发明的治疗使用与存在于 EGFR 上的表位相结合的人 IgG 单克隆抗体或其抗原结合部分。本发明包括的其它分离的人单克隆抗体包括 IgA, IgG1-4, IgE, IgM 和 IgD 抗体。在一种实施方案中, 人抗体在非人转基因动物如转基因小鼠中产生, 可以通过进行 V-D-J 重组和同种型转换产生多种 EGFR 的人单克隆抗体同种型 (如 IgG, IgA 和/或 IgE)。因此, 本发明的各种方面包括抗体和抗体片段, 其药物组合物, 以及非人转基因动物, 和产生这些单克隆抗体的 B 细胞、宿主细胞转染瘤和杂交瘤。本发明也包括用本发明的抗体在体外或体内检测表达 EGFR 或相关交叉反应生长因子受体的细胞, 或抑制表达 EGFR

的细胞生长、分化和/或迁移的方法。

为更容易理解本发明，首先定义一些术语。其它定义在详述中逐渐阐明。

术语“表皮生长因子受体”，“EGFR”和“EGFR 抗原”在这里可以互换使用，包括人 EGFR 的变体、同种型和物种同源物。在一种优选实施方案中，本发明的抗体与 EGFR 抗原的结合通过抑制或阻断 EGFR 配体与 EGFR 的结合而抑制表达 EGFR 的细胞（如肿瘤细胞）生长。术语“EGFR 配体”包括 EGFR 的所有（如生理）配体，包括 EGF，TGF- α 、肝素结合 EGF（HB-EGF）、双调蛋白（AR）和 epiregulin（EPI）。在另一种优选实施方案中，本发明的抗体与 EGFR 抗原的结合介导效应细胞吞噬和/或杀灭表达 EGFR 的细胞。

这里用到的术语“抑制生长”（如指细胞）包括与不接触抗 EGFR 抗体的相同细胞的生长相比，当与抗 EGFR 抗体接触时细胞生长的任何可测量的减少，如使细胞生长抑制至少约 10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%，或 100%。

这里用到的术语“抑制结合”和“阻断结合”（例如指抑制/阻断 EGFR 配体与 EGFR 的结合）可以互换使用，并且包括部分和完全抑制/阻断。EGFR 配体与 EGFR 的抑制/阻断优选减少或改变当没有抑制或阻断时，EGFR 配体与 EGFR 结合时发生的细胞信号传递的水平或类型。抑制和阻断也包括与不接触抗 EGFR 抗体的相同细胞的生长相比，当与抗 EGFR 抗体接触时细胞生长的任何可测量的减少，如使细胞生长抑制至少约 10%，20%，30%，40%，50%，60%，70%，80%，90%，或 100%。

这里用到的术语“抗体”包括完整的抗体及其任何抗原结合片段（即“抗原结合部分”）或单链。“抗体”是指包括至少两条由二硫键内部连接的重（H）链和两条轻（L）链的糖蛋白。每条重链包括一个重链可变区（这里缩写为 VH）和一个重链恒定区。重链恒定区由三个结构域，CH1，CH2 和 CH3 组成。每条轻链由一个轻链可变区（这里缩写为 VL）和一个轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域，CL 组成。VH 和 VL 区可以被进一步分为称作互补决定区（CDR）的超变区，中间镶嵌更保守的区域，叫做构架区（FR）。每条 VH 和 VL 由三个 CDR 和四个 FR 组成，从氨基端到羧基端以下列顺序排列：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。重链和轻链的可变区包含一个与抗原相互作用的结

合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞（如效应细胞）和经典补体系统的第一成分（C1q）的结合。

这里用到的术语抗体的“抗原结合部分”（或简称为“抗体部分”）是指保持与抗原（如 EGFR）特异性结合能力的抗体的一个或更多片段。已经介绍过抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来完成。在术语抗体的“抗原结合部位”范围内的结合片段的例子包括 (i) Fab 片段，即由 VL, VH, CL 和 CH1 结构域组成的单价片段；(ii) F(ab')₂ 片段，即包含两个由铰链区的二硫桥连接的 Fab 片段的二价片段；(iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段；(iv) 由抗体一个单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段；(v) 由一个 VH 结构域组成的 dAb 片段 (Ward et al, (1989) *Nature* 341: 544-546)；以及 (vi) 分离的互补决定区 (CDR)。此外，尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由各自的基因编码，它们可以用重组方法通过合成的接头连接，合成接头使它们可以作为单蛋白链产生，其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子（称作单链 Fv (scFv)；见 Bird et al (1988) *Science* 242: 423-426；及 Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883)。这种单链抗体也意欲包括在术语抗体的“抗原结合部分”范围中。这些抗体片段用本领域技术人员公知的传统技术获得，为使用而进行的片段筛选与完整抗体的方法相同。

术语“表位”表示能够特异性结合于抗体的蛋白决定簇。表位通常由化学活性表面分子基团，如氨基酸或糖侧链组成，并且通常具有特异性三维结构特征，以及特异性电荷特征。构象性和非构象性表位的区别在于与前者的结合在变性溶剂存在下失去，而与后者的结合则不失去。

术语“双特异性分子”包括任何有两个不同的结合特异性的试剂，如蛋白、肽、或蛋白或肽复合物，它们可以与 (a) 细胞表面抗原和 (b) 效应细胞表面的 Fc 受体结合或反应。术语“多特异性分子”或“异特异性分子”包括任何有两个以上不同的结合特异性的试剂，如蛋白、肽、或蛋白或肽复合物。例如，所述分子可以与 (a) 细胞表面抗原和 (b) 效应细胞表面的 Fc 受体和 (c) 至少一个其它成分结合或反应。因此，本发明包括，但不局限于定向于细胞表面抗原如 EGFR 和其它靶，如效

应细胞表面 Fc 受体的双特异性、三特异性和其它多特异性分子。

术语“双特异性抗体”此外还包括双抗体 (diabodies)。双抗体是二价的、双特异性抗体，其中的 VH 和 VL 域在单肽链上表达，但使用的接头太短，不允许在同一条链上的两个结构域之间配对，因此迫使此结构域与另一条链上的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点（见，例如 Holliger, P. et al. (1993) *proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2: 1121-1123）。

这里用到的术语“异抗体 (heteroantibodies)”指两个或更多抗体、抗体结合片段（如 Fab），其衍生物，或连接在一起的抗原结合区，至少其中的两个有不同的特异性。这些不同的特异性包括对效应细胞上的 Fc 受体的结合特异性，以及靶细胞如肿瘤细胞上的抗原或表位的结合特异性。这里用到的术语“人抗体”，意欲包括有从人种系免疫球蛋白序列来源的可变和恒定区的抗体。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（如由体外随机或位点特异性诱变诱导的突变或体内的体细胞突变）。然而，这里用到的术语“人抗体”，并不包括 CDR 序列来源于另一种哺乳动物物种如小鼠的种系，被嫁接至人的构架序列中的抗体。

这里用到的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单分子组成的抗体分子制剂。单克隆抗体组合物表现出单结合特异性和对特定表位的亲和性。因此，术语“人单克隆抗体”是指具有来源于人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区并表现出单结合特异性的抗体。在一种实施方案中，人单克隆抗体由包含一个从转基因非人动物如转基因小鼠中获得的 B 细胞与永生化细胞融合产生的杂交瘤产生，转基因小鼠有一个包含一个人人类重链转基因和一个人人类轻链转基因的基因组。

这里用到的术语“重组人抗体”意欲包括所有用重组方法制备、表达、产生或分离的人抗体，如（a）从转基因人免疫球蛋白基因的动物（如小鼠）或由其制备的杂交瘤中分离的抗体（在下面的第一部分详述）；（b）从经转化而表达抗体的宿主细胞，如转染瘤分离的抗体，（c）由重组组合人抗体文库分离的抗体，和（d）用其它涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它 DNA 序列的方法制备、表达、产生或分

离的抗体。所述重组人抗体来源于人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。然而在某些实施方案中，这种重组人抗体经历了体外诱变（或，当使用转基因人 Ig 序列的动物时，体内体细胞诱变），因此重组抗体 VH 和 VL 区的氨基酸序列来源于人种系 VH 和 VL 序列并与其相关，可能在体内并不天然存在于人抗体种系的所有组成成分。

这里用到的“异源性抗体”是与产生这种抗体的转基因非人生物相联系而定义的。此术语是指这样一种抗体，它具有与存在于不构成转基因非人动物的生物中的氨基酸序列或编码核酸序列相对应，并一般是从转基因非人动物以外的物种获得的氨基酸序列或编码核酸序列。

这里用到的“异杂交 (heterohybrid) 抗体”指有不同生物来源的轻链和重链的抗体。例如，有一条人重链与一条鼠轻链缔合的抗体是异杂交抗体。异杂交抗体的例子包括前面讨论过的嵌合的和人源化抗体。

这里用到的“分离抗体”意指基本上没有其它具有不同抗原特异性抗体的抗体（如特异性与 EGFR 结合的分离抗体基本上没有与 EGFR 之外的抗原特异性结合的抗体）。然而特异性与人 EGFR 的表位、同种型或变体结合的分离抗体对其它相关的如来自于其它物种的抗原（如 EGFR 物种同源物）可能有交叉反应性。此外，分离抗体可以基本上没有其它细胞物质和/或化学物质。在本发明的一种实施方案中，有不同特异性的“分离”单克隆抗体的组合在一种明确的组合物中组合。

这里用到的“特异性结合”是指抗体与预定的抗原结合。一般，抗体以至少约 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 的亲合性结合，与预定抗原结合的亲合性至少比与预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原（如 BSA，酪蛋白）的亲合性大两倍。短语“识别抗原的抗体”和“抗原的特异性抗体”在这里可以与术语“特异性与抗原结合的抗体”互换使用。

这里用到的术语对 IgG 抗体的“高亲合性”是指至少约 $10^7 M^{-1}$ ，优选为至少约 $10^8 M^{-1}$ ，更优选为至少约 $10^9 M^{-1}$ ，更优选为至少约 $10^{10} M^{-1}$ ， $10^{11} M^{-1}$ ， $10^{12} M^{-1}$ 或更高，如直到 $10^{13} M^{-1}$ 或更高的结合亲合性。然而，“高亲合性”结合对其它抗体同种型可以改变。例如，对 IgM 同种型的“高亲合性”结合是指结合亲合性至少为约 $1 \times 10^7 M^{-1}$ 。

这里用到的术语“ K_A ”意指特定抗体-抗原相互作用的缔合常数。

这里用到的术语“ K_D ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离常数。

这里用到的术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类型（如 IgM 或 IgG1）。

这里用到的术语“同种型转换”是指抗体类型或同种型从一种 Ig 类型转换到另一种其它 Ig 类型的现象。

这里用到的术语“非转换同种型”是指在没有发生同种型转换的情况下产生的重链同种型类型；编码非转换同种型的 CH 基因一般是功能性重排的 VDJ 基因下游的第一个 CH 基因。同种型转换被分类为经典或非经典同种型转换。经典同种型转换是通过涉及转基因中至少一个转换序列区的重组事件而发生的。非经典同种型转换可以通过例如在人 σ_{μ} 和人 Σ_{μ} 之间的同源重组（伴 δ 缺失）而发生。其它非经典转换机制，如转基因间和/或染色体间重组及其它机制，可以发生并完成同种型转换。

这里用到的术语“转换序列”是指那些负责转换组合的 DNA 序列。

“转换供体”序列，一般是一个 μ 转换区，将处在转换重组过程中被去除的结构区的 5'（上游）。“转换受体”区将在将被去除的结构区和替代恒定区（如 γ , ϵ 等）之间。由于不存在重组经常发生的特定位点，从结构一般不能预测最终的基因序列。

这里用到的“糖基化模式”被定义为与蛋白，更具体地说是免疫球蛋白共价连接的糖单位模式。当本领域技术人员发现异源抗体的糖基化模式与转基因的 CH 基因所来源的物种相比，与非人转基因动物物种的糖基化模式更相似时，异源抗体糖基化模式的特征可以在于基本上与非人转基因动物物种产生的抗体的上天然存在的糖基化模式相似。

这里使用的应用于一种对象的术语“天然存在的”是指某种对象可以在自然中发现。例如，可以从天然来源中分离并没有通过人在实验室中进行有意的修饰的生物（包括病毒）中的多肽或多核苷酸序列就是天然存在的。

这里用到的术语“重排的”是指一条重链或轻链免疫球蛋白基因座的一种构型，其中的 V 段在分别编码基本上完整的 VH 或 VL 结构域的一种构象中紧邻 D-J 或 J 段。重排的免疫球蛋白基因座可以通过与种系 DNA 比较而识别；重排基因座将有至少一个重组的七聚体/九聚体同源元件。

这里用到的关于一个 V 段的术语“未重排的”或“种系构型”是指

V 段未重组因此不与 D 或 J 段紧邻的构型。

这里用到的术语“核酸分子”意欲包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链，但优选双链 DNA。

这里用到的关于编码与 EGFR 结合抗体或抗体部分（如 VH, VL, CDR3）的核酸的术语“分离的核酸分子”，意指其中编码抗体或抗体部分的核苷酸序列不含编码与 EGFR 以外的抗原结合的抗体或抗体部分的核苷酸序列的核酸分子，其它序列可以天然地侧翼于人基因组 DNA 中的核酸。在一种实施方案中，人抗 EGFR 抗体或其部分包括 2F8 的核苷酸或氨基酸序列，以及分别具有 SEQ ID NOs: 1 和 3 以及 2 和 4 所示序列的重链（VH）和轻链（VL）可变区。

如此处所公开和要求保护的，SEQ ID NOs: 1-4 所示的序列包括“保守序列修饰”，即不显著影响或改变由所述核苷酸序列编码的抗体或含有所述氨基酸序列的抗体的结合特征的核苷酸和氨基酸序列修饰。所述保守序列修饰包括核苷酸和氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域的标准技术，如定点诱变和 PCR 介导的诱变等将修饰导入 SEQ ID NOs: 1-4 中。保守氨基酸取代包括氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代。本领域中已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸（如赖氨酸、精氨酸、组氨酸），具有酸性侧链的氨基酸（如天冬氨酸、谷氨酸），具有不带电的极性侧链的氨基酸（如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸），具有非极性侧链的氨基酸（如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸），具有 β 分支侧链的氨基酸（如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）和具有芳香侧链的氨基酸（如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，优选用于来自于同一侧链家族的另一种氨基酸残基替代人抗 EGFR 抗体中的非必须氨基酸残基。

或者，在另一种实施方案中，例如可以通过饱和诱变沿抗 EGFR 抗体编码序列的全部或部分而随机引入突变，并且筛选得到的修饰的抗 EGFR 抗体的结合活性。

因此，由此处公开的（重链和轻链可变区）核苷酸序列编码的抗体和/或含有此处公开的氨基酸序列（即 SEQ ID NOs: 1-4）的抗体包括基本上由经保守修饰的相似序列编码的，或含有经保守修饰的相似序

列的抗体。下文提供了关于如何基于此处公开为 SEQ ID Nos: 1-4 的部分（即重链和轻链可变区）序列产生所述基本相似的抗体的进一步讨论。

对于核酸，术语“基本同源”指两个核酸或其指定序列，当最优比对和比较时，在有适当的核苷酸插入和缺失情况下，至少约 80% 的核苷酸，通常至少约 90 到 95%，更优选至少约 98% 到 99.5% 的核苷酸是相同的。另外，在选择性杂交条件下片段与其互补链进行杂交时也存在基本同源。

两个序列间的百分比同一性是一个关于序列间相同位置数量的函数（即同源% = 相同位置数/总位置数 × 100），考虑在最优比对两个序列时需要引入的空位数量和每个空位的长度。序列比较和判断两个序列的百分比同一性可以用数学算法来完成，在下面的非限制实施例中描述。

两个核苷酸序列的百分比同一性可以用 GCG 软件包（在 <http://www.gcg.com> 可以找到）中的 GAP 程序判断，使用 NWSgapdna.CMP 矩阵，以及 40, 50, 60, 70, 或 80 的空位权重和 1, 2, 3, 4, 5 或 6 的长度权重。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性也可以用引入 ALIGN 程序（2.0 版）中的 E. Meyers 和 W. Miller 算法判断（CABIOS, 4:11-17(1989)），使用 PAM120 权重残基表，空位长度罚分为 12，空位罚分为 4。此外，两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性也可以用引入 GCG 软件包（在 <http://www.gcg.com> 可以找到）中 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch 算法判断（J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)），使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵，以及 16, 14, 12, 10, 8, 6 或 4 的空位权重和 1, 2, 3, 4, 5 或 6 的长度权重。

本发明的核酸和蛋白质序列可以进一步用作“询问序列”来进行对公共数据库的检索，如鉴定相关序列。这种检索可以按 Altschul, 等在 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10 中所描述的，用 NBLAST 和 XBLAST 程序（2.0 版）执行。BLAST 核苷酸检索可以用 NBLAST 程序执行，分数=100，字长=12，从而获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白检索可以用 XBLAST 程序执行，分数=50，字长=3，从而获得与本发明的蛋白分子同源的氨基酸序列。为比较目的而获得

有空位的比对，有空位的 BLAST 可以按照 Altschul 等在 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25 (17): 3389 - 3402 中的描述来使用。当使用 BLAST 和有空位的 BLAST 程序时，可以使用各自程序（如 XBLAST 和 NBLAST）的缺省参数。见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

核酸可以在完整细胞、细胞裂解物或部分纯化或基本纯净形式中存在。当用包括碱/SDS 处理、CsCl 显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和其它本领域中公知的标准技术将核酸从其它细胞成分或其它污染物如其它细胞的核酸或蛋白中纯化出来时，核酸就是“分离的”或“表现为基本纯净”。见 F. Ausubel, et al. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

来自 cDNA，基因组或混合物的本发明的核酸组合物尽管通常是天然序列（除修饰的限制位点等），但可以依照标准技术进行突变而提供基因序列。对于编码序列，这些突变可以按照需要影响氨基酸序列。具体而言，本发明考虑了与天然 V, D, J, 恒定区，转换区和其它类似序列同源或由其衍生的 DNA 序列（“衍生”表示一个序列与另一个序列相同或由其修饰而来）。

当核酸与另一个核苷酸序列置于功能关系时，就被“可操作性连接”。例如，如果启动子或增强子影响一个编码序列的转录，那么它就被可操作性连接到该序列。对于转录调节序列，可操作性连接表示被连接的 DNA 序列是邻接的并且对连接读框中的两个邻接的蛋白编码区是必要的。对于转换序列，可操作性连接提示该序列可以影响转换重组。

这里用到的术语“载体”意指可以将核酸转运到与其连接序列的核酸分子。载体的一种类型是“质粒”，指可以将额外的 DNA 片段连接到其中的双链 DNA 环。另一种类型的载体是病毒载体，其中额外的 DNA 片段可以与病毒基因组连接。某些载体可以在其引入的宿主细胞（如有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体）中自主复制。其它载体（如非附加型哺乳动物载体）可以在导入宿主细胞时整合到宿主细胞的基因组中，与宿主基因组一起复制。此外，某些载体可以指导与其可操作性连接的基因的表达。这种载体在这里被称作“重组表达载体”（或简称为“表达载体”）。总的说来，应用在重组 DNA 技术

中的表达载体通常以质粒形式存在。在本详述中，“质粒”和“载体”可以互换使用，因为质粒是最常使用的载体。然而，本发明意欲包括有相同功能的载体的其它表达形式，如病毒载体（如复制缺陷逆转录病毒，腺病毒和腺伴随病毒）。

这里用到的术语“重组宿主细胞”（或简称为“宿主细胞”）意指重组表达载体引入的细胞。必须理解这些术语并不仅指特定受试细胞，也指这些细胞的后代。由于突变或环境影响可能在后代中出现某些修饰，这些后代实际上可能不会与母体细胞相同，但仍然包括在这里用到的术语“宿主细胞”的范围内。重组宿主细胞包括，例如 CHO 细胞和淋巴细胞。

本发明的各方面在下面的部分中有进一步详述。

I. 人 EGFR 抗体的产生

本发明的单克隆抗体 (MAbs) 可以用多种技术产生，包括传统单克隆抗体方法学如 Kohler 和 Milstein 标准体细胞杂交技术，*Nature* 256: 495 (1975)。尽管优选体细胞杂交技术，原则上也可以使用其它产生单克隆抗体的技术，如 B 淋巴细胞病毒或癌基因转化。

制备杂交瘤的优选动物系统为鼠系统。小鼠中的杂交瘤产生是一个完善的程序。分离用于融合的免疫脾细胞的方案和技术是本领域中公知的。融合配偶体（如免疫骨髓瘤细胞）及融合程序也是公知的。

在一种优选实施方案中，针对 EGFR 的人单克隆抗体可以用携带部分人免疫系统而不是小鼠系统的转基因小鼠产生。这些转基因小鼠，这里称作“HuMAb”，包含一个编码未重排人重链 (μ 和 γ) 和 κ 轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因微基因座，以及灭活内源性 γ 和 κ 链基因座的靶突变 (Lonberg, N. Et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859)。因此，此小鼠显示小鼠 IgM 或 κ 的表达减少，并且由于免疫应答，引入的人重链和轻链转基因经历了类型转换和体细胞突变而产生高亲和性人 IgG κ 单克隆抗体 (Lonberg, N et al. (1994), *supra*; 综述于 Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113: 49-101; Lonberg N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, 和 Harding, F. And Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764: 536-546)。HuMAb

小鼠的制备在下面的第II部分和以下文献中有详细描述, Taylor, L. Et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20: 6287-6295; Chen, J, et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90: 3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4: 117-123; Chen J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152: 2912-2920; Lonberg et al., (1994) *Nature* 368(6474) : 856-859; Lonberg, N. 9(1994) *Handbook of Experience Pharmacology* 113: 49-101; Taylor, L. Et al. (1994) *International Immunology* 6; 579-591; Lonberg, N. And Hszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci* 764: 536-546; Fishwild, D. Et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, 在此完整引入其全部内容作为参考。还可进一步参考都属于 Lonberg and kay, and GenPharm International 的美国专利 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 和 5,770,429; 属于 Surani et al. 的美国专利 No. 5,545,807; 公开于1998年6月11日的国际公开 W0 98/24884; 公开于1994年11月10日的 W094/25585; 公开于1993年6月24日的 W093/1227; 公开于1992年12月23日的 W092/22645; 公开于1992年3月19日的 W092/03918, 在此完整引入其公开内容作为参考。另外, 实施例2中描述的 HC012 转基因小鼠可以用来产生人抗 EGFR 抗体。

人抗体免疫

为产生完全的人 EGFR 单克隆抗体, HuMAb 小鼠可以用 EGFR 抗原的纯化或富集制剂和/或表达 EGFR 的细胞免疫, 如下面的文件中所描述, Lonberg N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 及 W098/24884。小鼠优选在首次融合时为 6-16 周龄。例如, EGFR 抗原的纯化或富集制剂 (5-20 μ g) 可以用来腹膜内免疫 HuMAb 小鼠。当用 EGFR 抗原的纯化或富集制剂免疫不产生抗体时, 也可以用表达 EGFR 的细胞如肿瘤细胞来免疫小鼠, 从而促进免疫应答。

用不同抗原积累的经验表明,当先用与完全弗氏佐剂混合的抗原进行腹膜内(IP)免疫,然后每隔一周(最多共6周)用与不完全弗氏佐剂混合的抗原进行腹膜内免疫,HuMAb转基因小鼠有最好的免疫应答。免疫应答可以用免疫方案中由眼眶后取血得到的血浆样品监测。血浆可以用ELISA(如下面所描述)法筛选,有足够抗EGFR人免疫球蛋白滴度的小鼠可以用来融合。可以在处死或取出脾脏之前对小鼠进行静脉内加强免疫。预计每种抗原需要进行2-3次融合。每种抗原需要免疫几只小鼠。例如,可以免疫总共12只HC07和HC012株的HuMAb小鼠。

产生人EGFR单克隆抗体的杂交瘤的生成

小鼠脾细胞可以根据标准实验方案进行分离并用PEG与小鼠骨髓瘤细胞系融合。然后为产生抗原特异性抗体对产生的杂交瘤进行筛选。例如将从免疫小鼠得到的脾淋巴细胞单细胞悬液与P3X63-Ag8,653非分泌性小鼠骨髓瘤细胞(ATCC, CRL 1580)数量的1/6用50%的PEG进行融合。将大约 2×10^5 个细胞平铺在平底微量滴定板,然后在包含20%胎克隆血清,18%“653”条件培养基,5%origen(IGEN),4 mM L-谷氨酰胺,1mM L-谷氨酰胺,1 mM 丙酮酸钠,5mM HEPES,0.055mM 2-巯基乙醇,50单位/ml青霉素,50mg/ml链霉素,50mg/ml庆大霉素和1X HAT(Sigma;融合后24小时加入HAT)的选择性培养基中孵育。两周后,在HT替代HAT的培养基中培养细胞。然后对每个孔用ELISA法筛选人抗EGFR的单克隆IgM和IgG抗体。一旦杂交瘤广泛生长,通常在10-14天后观察培养基。重新平铺抗体分泌性杂交瘤,再次筛选,如果仍然为人IgG抗EGFR单克隆抗体阳性,可以通过有限稀释进行至少两次亚克隆。然后在体外培养稳定的亚克隆从而组织培养基中产生少量抗体从而进行鉴定。

产生人EGFR单克隆抗体的转染瘤的生成

也可以使用例如本领域公知的重组DNA技术和基因转染方法(Morrison, S. (1985) Science 229: 1202)的组合在宿主细胞转染瘤中产生本发明的人抗体。

例如,在一种实施方案中,可以将目的基因,如人抗体基因连接至

表达载体，例如真核细胞质粒中。然后可以将质粒引入宿主细胞，如细菌细胞（如大肠杆菌）中，然后使细胞生长。可以用溶菌酶选择和含有具有整合 DNA 的质粒的宿主细胞，以便除去细胞壁。可以将得到的原生质球与永生化细胞，如骨髓瘤细胞融合（称作“转染”）。融合后，可以鉴定和选择稳定的细胞（转染子）。这些细胞代表然后可以通过在腹水或组织培养物中生长而扩增，并且用于产生人抗体的转染瘤。

表达完整抗体的部分抗体序列的使用

抗体主要通过位于六个重链和轻链互补决定区 (CDRs) 的氨基酸残基与靶抗原相互作用。因此，CDRs 中的氨基酸序列在各个抗体之间比在 CDRs 外的序列更多样。因为 CDR 序列负责大多数抗体-抗原相互作用，可以通过构建包含来自于嫁接至来自于具有不同特性的不同抗体的构架序列上的特异性天然抗体的 CDR 序列的表达载体而表达模拟特异性天然抗体的特性的重组抗体（见，例如，Riechmann, L. et al., 1998, *Nature* 332: 323-327; Jones, P. et al., 1986, *Nature* 321: 522-525; 和 Queen, C. et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 10029-10033）。可以从包含种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库获得所述构架序列。这些种系序列与成熟抗体基因序列不同，因为它们不包括完全组装的可变区基因，所述基因是通过 B 细胞成熟过程中的 V (D) J 连接而形成的。种系基因序列也将不同于各个平均跨可变区的高亲和性第二全部组成成分抗体的序列。例如，体突变在构架区的氨基末端部分相对不常见。例如，体突变在构架区 1 的氨基末端部分和构架区 4 的羧基末端部分相对不常见。此外，许多体突变不显著改变抗体的结合特性。因此，为了重建具有相似于原始抗体的结合特性的完整重组抗体，并不必须获得特定抗体的完整 DNA 序列（见 1999 年 3 月 12 日提交的 PCT/US99/05535，在此引入作为参考）。跨 CDR 区的部分重链和轻链序列一般足够用于此目的。用部分序列确定哪一种种系可变区和连接基因片段贡献于重组抗体可变区基因。然后用种系序列填充可变区的缺少部分。重链和轻链前导序列在蛋白成熟中切割，并且不贡献于最终抗体的特性。为此，必须使用相应的种系前导序列而表达构建体。为了加入缺少的序列，可以通过连接或 PCR 扩

增将克隆的 cDNA 序列与合成的寡核苷酸结合。或者，可以将完整的可变区合成为一组短的、重叠的寡核苷酸并且通过 PCR 扩增结合，以产生完整的合成可变区克隆。这一过程具有某些优点，如去除或引入特定的限制位点，或优化特定的密码子。

用来自于杂交瘤的重链和轻链转录物的核苷酸序列设计一组重叠的合成寡核苷酸，以产生与天然序列具有相同氨基酸编码能力的合成 V 序列。合成重链和 κ 链可以以三种方式不同于天然序列：打断重复核苷酸碱基串以促进寡核苷酸合成和 PCR 扩增；根据 Kozak 规则掺入最优翻译起始位点 (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266L19867019870)，以及将 HindIII 位点工程化至翻译起始位点上游。

对于重链和轻链可变区，最优化的编码链和相应的非编码链序列在相应非编码寡核苷酸大约中点分解为大约 30 - 50 个核苷酸。因此，对于每条链，寡核苷酸可以组装为跨 150 - 400 个核苷酸的片段的重叠双链组。然后用合并物作为模板来产生 150 - 400 个核苷酸的 PCR 扩增产物。一般地，单可变区寡核苷酸组将分解为两个合并物，它们可以分别扩增以产生两个重叠的 PCV 产物。然后通过 PCT 扩增结合重叠产物，以形成完整的可变区。也可能需要在 PCR 扩增中引入重链或轻链恒定区的重叠片段 (包括 κ 轻链的 BbsI 位点或 γ 重链的 AgeI 位点)，从而产生可以容易克隆至表达载体构建体中的片段。

然后将重新构建的重链和轻链可变区与克隆的启动子、翻译起始位点、恒定区、3'非翻译区、聚腺苷酸化位点和转录终止位点序列结合，以形成表达载体构建体。重链和轻链表达构建体可以结合至共转染、系列转染、或分开转染至宿主细胞中的单一载体中，所述宿主细胞然后融合形成表达两条链的宿主细胞。

用于构建人 IgG κ 的表达载体的质粒如下文所述。对质粒进行构建，以使 PCR 扩增的 V 重链和 V κ 轻链 cDNA 序列可以用于重新构建完整的重链和轻链微基因。这些质粒可以用于表达完全的人或嵌合 IgG1 κ 或 IgG4 κ 抗体。可以构建相似的质粒用于表达其它重链同种型，或用于表达包含 λ 轻链的抗体。

因此，在本发明的另一方面，本发明的人抗 EGFR 抗体，如 2F8 的结构特征被用于产生保留本发明的抗体的至少一种功能特性，例如结合于 EGFR 的结构相关的人抗 EGFR 抗体。更具体地，2F8 的一个或多

个 CDR 区可以与已知的人构架区和 CDRs 重组结合，以产生额外的、重组工程化的本发明的人抗 EGFR 抗体。

因此，在另一种实施方案中，本发明提供了一种制备抗 EGFR 抗体的方法，包括：

制备包含以下成分的抗体：（1）人重链构架区和人重链 CDRs，其中至少人重链 CDRs 之一包含选自图 15 所示 CDRs 的氨基酸序列的氨基酸序列（或 SEQ ID NO: 2 中的相应氨基酸残基）；和（2）人轻链构架区和人轻链 CDRs，其中至少人轻链 CDRs 之一包含选自图 15 所示 CDRs 的氨基酸序列的氨基酸序列（或 SEQ ID NO: 4 中的相应氨基酸残基），其中抗体保留结合 EGFR 的能力。

可以使用标准结合测定确定抗体结合 EGFR 的能力，如实施例中所示（如 ELISA）。由于本领域中公知抗体重链和轻链 CDR3 结构域在抗体对抗原的结合特异性/亲和性中起特别重要的作用，按上述方法制备的本发明的重组抗体优选包含 2F8 的重链和轻链 CDR3s。所述抗体可以进一步包含 2F8 的 CDR2s。因此，本发明进一步提供了包含以下成分的抗 EGFR 抗体：（1）人重链构架区，人重链 CDR1 区，人重链 CDR2 区，和人重链 CDR3 区，其中人重链 CDR3 区是图 15 所示 2F8 的 CDR3（或 SEQ ID NO: 2 中的相应氨基酸残基）；和（2）人轻链构架区，人轻链 CDR1 区，人轻链 CDR2 区，人轻链 CDR3 区，其中人轻链 CDR3 区是图 15 所示 2F8 的 CDR3（或 SEQ ID NO: 4 中的相应氨基酸残基），其中该抗体结合 EGFR。抗体可以进一步包含 2F8 的重链 CDR2 和/或轻链 CDR2。抗体可以进一步包含 2F8 的重链 CDR1 和/或轻链 CDR1。

优选地，上述工程化抗体的 CDR1，2 和/或 3 包含此处公开的 2F8 的精确氨基酸序列。然而，本领域技术人员将理解，从 2F8 的精确 CDR 序列有一些偏离，而仍然保留抗体有效结合 EGFR 的能力（如保守取代）也是可能的。因此，在另一种实施方案中，工程化的抗体可以由例如与 2F8 的一个或多个 CDRs 具有例如 90%，95%，98%或 99.5%同一性的一个或多个 CDRs 组成。除了简单结合 EGFR，工程化抗体，可以选择如上文所述的工程化抗体对本发明抗体的其它功能特性的保留，如

- （1）与表达 EGFR 的活细胞结合；
- （2）与 EGFR 的高亲和性结合；
- （3）与 EGFR 上的唯一表位结合（排除以组合形式使用的有互

补活性的单克隆抗体将竞争与相同表位的结合的可能性);

- (4) 对表达 EGFR 细胞的调理作用。
- (5) 在人效应细胞存在时介导对表达 EGFR 细胞的生长抑制、吞噬和/或杀灭。

鉴定人单克隆抗体与 EGFR 的结合

为鉴定本发明的人单克隆 EGFR 抗体的结合, 可以用如 ELISA 法检验免疫小鼠血清。简单地说, 用 PBS 中 $0.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 的纯化 EGFR 包被微量滴定板, 然后用溶于 PBS 的 5% 牛血清白蛋白封闭。将 EGFR 免疫小鼠的血浆稀释液加入每个孔并在 37°C 孵育 1-2 小时。用 PBS/Tween 洗涤微量滴定板, 然后用碱性磷酸酶偶联的山羊抗人 IgG Fc 特异性多克隆试剂在 37°C 孵育 1 小时。在洗涤后, 将微量滴定板用 pNPP 底物 ($1\text{mg}/\text{ml}$) 显色, 在 405-650 的 OD 值下分析。优选使用显色最高滴度的小鼠进行融合。

上述 ELISA 分析也可用来筛选显示与 EGFR 免疫原有阳性反应的杂交瘤。以高亲和性与 EGFR 结合的杂交瘤将被亚克隆并进一步鉴定。保持亲代细胞反应性的每个杂交瘤的一个克隆(通过 ELISA)可以选作在 -140°C 储存的 5-10 小管细胞库, 用于抗体纯化。

为纯化人抗 EGFR 抗体, 选定的杂交瘤可以在 2 升的滚瓶中生长, 准备进行抗体纯化。在用蛋白 A-琼脂糖 (Pharmacia, Piscataway, NJ) 进行亲和层析之前过滤并浓缩上清液。可以用凝胶电泳检查洗脱的 IgG 并用高压液相层析保证纯度。缓冲液可以交换为 PBS, 浓度可以采用 1.43 的消光系数由 OD_{280} 判断。单克隆抗体可以被等分并在 -80°C 下储藏。

为判断选定的人抗 EGFR 单克隆抗体是否与唯一的表位结合, 可以用能够买到的试剂 (Pierce, Rockford, IL) 生物素化每种抗体。可以用上述 EGFR 包被的 ELISA 板进行未标记单克隆抗体和生物素化单克隆抗体竞争实验。生物素化 MAb 可以用链亲和素碱性磷酸酶探针检测。

为判断纯化抗体的同种型, 可以进行同种型 ELISA。用 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗人 Ig 包被微量滴定板的孔在 4°C 下过夜。用 5% BSA 封闭后, 将微量滴定板与 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的单克隆抗体或纯化同种型对照在室温下反应 2 小

时。然后将孔与人 IgG1 或人 IgM 特异性碱性磷酸酶结合探针反应。按前面描述的方法进行显影和分析。

为证明单克隆抗体与表达 EGFR 的活细胞结合，可以使用流式细胞仪。简言之，将表达 EGFR 的细胞系（在标准生长条件下生长）在包含 0.1% Tween80 和 20% 小鼠血清的 PBS 中与不同浓度的单克隆抗体混合，在 37℃ 下孵育 1 小时。经过洗涤，在与第一抗体染色相同的条件下将细胞与荧光素标记的抗人 IgG 抗体反应。FACSscan 仪可以利用光和散射属性来控制单个细胞从而分析样品。另一种使用荧光显微镜的测定可以（补充或替代）流式细胞仪测定。可以用前面描述的方法对细胞染色并用荧光显微镜检测。这种方法允许看到单个细胞，但根据抗体密度可能会有灵敏度降低。

可以通过蛋白印迹法进一步检验抗 EGFR 人 IgG 与 EGFR 抗原的反应性。简言之，可以制备表达 EGFR 的细胞的细胞提取物并进行十二烷基硫酸钠 (SDS) 聚丙烯酰胺凝胶电泳。在电泳之后，可以将分开的抗原转移到硝酸纤维素膜上，用 20% 的小鼠血清封闭，并用被检验单克隆抗体探测。可以用抗人 IgG 碱性磷酸酶及 BCIP/NBT 底物片 (Sigma chem. Co., St. Louis, MO) 显影检测人 IgG 结合。

人 EGFR 单克隆抗体的吞噬和细胞杀灭活性

除了与 EGFR 特异性结合，人单克隆 EGFR 抗体介导吞噬和杀灭表达 EGFR 的细胞的能力也可以被检验。体外单克隆抗体活性检验将提供检验体内模型前的初步筛选。简言之，从健康供体得到的多形核细胞 (PMN) 或其它效应细胞可以用 Ficoll Hypaque 密度离心纯化，然后进行污染红细胞裂解。洗涤过的 PMN 可以以不同的效应细胞和肿瘤细胞比例 (效应细胞: 肿瘤细胞) 悬浮在补加 10% 热灭活胎牛血清并与 ^{51}Cr 标记的表达 EGFR 的细胞混合的 RPMI 中。然后加入不同浓度的纯化人抗 EGFR IgG。不相关的人 IgG 可以作为阴性对照。检验可以在 37℃ 下进行 0-120 分钟。可以通过测量释放到培养物悬浮液中的 ^{51}Cr 来检验样品的细胞裂解。也可以将抗 EGFR 单克隆抗体互相组合测量，以便判断多种单克隆抗体是否可以加强细胞裂解。

也可以在体内模型中（如在小鼠中）检验与 EGFR 结合的人单克隆抗体，判断它们介导吞噬和杀灭表达 EGFR 的细胞如肿瘤细胞的效力。

例如，这些抗体可以按以下标准选择，这些标准并不是唯一的：

- (1) 表达 EGFR 的活细胞结合；
- (2) 与 EGFR 的高亲和性结合；
- (3) 与 EGFR 上的唯一表位结合（排除以组合形式使用的有互补活性的单克隆抗体将竞争与相同表位的结合的可能性）；
- (4) 对表达 EGFR 细胞的调理作用。
- (5) 人效应细胞存在时介导对表达 EGFR 细胞的生长抑制、吞噬和/或杀灭。

本发明的优选人单克隆抗体符合一个或更多，优选符合所有这些标准。在一种特定的实施方案中，人单克隆抗体以组合形式应用，如作为包括两个或更多抗 EGFR 单克隆抗体或其片段的药物组合物。例如，有不同但互补活性的人抗 EGFR 单克隆抗体可以在单个治疗方法中结合，从而达到需要的治疗或诊断效果。这种组合的一个例子是一种组合物，它包含介导在效应细胞存在时高效杀灭靶细胞的抗 EGFR 人单克隆抗体，并与另一种抑制表达 EGFR 的细胞生长的人抗 EGFR 单克隆抗体组合。

II. 产生人单克隆抗 EGFR 抗体的转基因非人动物的产生

而另一方面，本发明提供了转基因非人动物，如可以表达与 EGFR 特异性，优选以高亲和性结合的人单克隆抗体的转基因小鼠。在一种优选实施方案中，转基因非人动物，如转基因小鼠（HuMAb 小鼠），有一个包含一个人重链转基因和一个轻链转基因的基因组。在一种实施方案中，转基因非人动物如转基因小鼠用 EGFR 抗原的纯化或富集制剂和/或表达 EGFR 的细胞免疫。转基因非人动物如转基因小鼠优选可以通过进行 V-D-J 重组和同种型转换而产生人 EGFR 单克隆抗体的多种同种型（如 IgG，IgA 和/或 IgE）。同种型转换可以通过经典或非经典同种型转换而发生。

设计以异源抗体所有组成成分并应答外来抗原刺激的转基因非人动物要求包含在转基因动物中的异源免疫球蛋白转基因在 B 细胞发育途径中正确行使功能。在一种优选实施方案中，异源重链转基因的正

确功能包括同种型转换。因此，本发明的转基因是为产生同种型转换和下列内容的一项或多项而建立的：(1) 高水平和细胞类型特异性表达，(2) 功能基因重排，(3) 激活并应答等位基因排斥，(4) 表达足够的初级组成成分，(5) 信号转导，(6) 体细胞超变，和(7) 免疫应答中转基因抗体基因座的显性化。

并不是前面的标准都需要满足。例如，在那些转基因动物的内源性免疫球蛋白基因座被功能性破坏的实施方案中，转基因不需要激活等位基因排斥。此外，在转基因包含一个功能性重排的重链和/或轻链免疫球蛋白基因的实施方案中，不需要第二条标准的功能基因重排，至少对于已经重排的转基因时如此。分子免疫学的背景知识可以参考 *fundamental Immunology*, 2nd edition (1989), Paul William E., ed. Raven press, N.Y., 在此引入作为参考。

在某些实施方案中，用于产生本发明的人单克隆抗体的转基因非人动物包含重排、未重排或重排和未重排组合的转基因动物种系中的异源免疫球蛋白重链和轻链转基因。每个重链转基因包含至少一个 C_H 基因。另外，重链转基因可包含能够支持编码转基因动物 B 细胞中的多个 C_H 基因的异源性转基因的同种型转换功能的同种型转换序列。这些转换序列可以在作为转基因 C_H 基因来源的物种的种系免疫球蛋白基因座中天然存在，或者这些转换序列可以从得到转基因构建体的物种(转基因动物)中的序列衍生而来。例如，如果掺入与小鼠重链基因座中天然存在的序列相同的转换序列，用来产生转基因小鼠的人转基因构建体可以产生更高频率的同种型转换事件，正如假设的那样，小鼠转换序列经优化而与小鼠转换重组酶系统作用，而人转换序列则不是。转换序列可以用传统克隆方法分离和克隆，或可以按照已发表的免疫球蛋白转换区序列相关序列信息从重叠合成寡核苷酸从头合成 (Mills et al., Nucl. Acids Res. 15; 7305-7316 (1991); Sideras et al., Intl. Immunol. 1: 631-642 (1989), 在此引入作为参考)。对于前面的每种转基因动物，可以在转基因动物很大比例的 B 细胞(至少 10%) 中发现功能性重排的异源性重链和轻链免疫球蛋白转基因。

用于产生本发明的转基因动物的转基因包括一个含有编码至少一个可变基因片段、一个多样性基因片段、一个连接基因片段和至少一个恒定区基因片段的 DNA 的重链转基因。免疫球蛋白轻链转基因含有

编码至少一个可变基因片段、一个连接基因片段和至少一个恒定区基因片段的 DNA。编码轻链和重链基因片段的基因片段与衍生它们的转基因非人动物是同源性的，或者说它们与不包括转基因非人动物的物种中编码免疫球蛋白重链和轻链基因片段的 DNA 相对应。在本发明一个方面，转基因经构建使各个基因片段未重排，或不重排，以便编码一个功能性免疫球蛋白轻链或重链。这种未重排的转基因支持在暴露于 EGFR 抗原时 V, D 和 J 基因片段（功能性重排）重组并优选支持 D 区基因片段的全部或部分掺入转基因非人动物中得到的未重排免疫球蛋白重链。

在另一种实施方案中，转基因包含一个未重排“微基因座”。这样的转基因一般包含 C, D 和 J 片段的基本部分和 V 基因片段的亚型。在这种转基因构建体中，不同的调节序列，如启动子、增强子、类型转换区、RNA 加工的剪接供体和剪接受体、重组信号等，包含从异源性 DNA 衍生的相应序列。这些调节序列可以从掺入与本发明使用的非人动物相同或相关物种得到的转基因。例如，人免疫球蛋白基因片段可以在转基因中与啮齿类动物免疫球蛋白增强子序列结合用于转基因小鼠。另外，合成的调节序列可以掺入转基因，其中这种合成调节序列与已知的哺乳动物基因组中天然存在的功能性 DNA 序列不同源。合成调节序列是根据共有序列规则而设计的，例如那些指定剪接受体位点或启动子/增强子基序的允许序列的规则。例如，包含与天然存在的种系 Ig 基因座相比，具有非必需 DNA 部分（如间插序列；内含子或其部分）的至少一个内部（即不在该部分的末端）缺失的基因组免疫球蛋白基因座的一部分的微基因座。

在本发明的一种优选实施方案中，用于产生人 EGFR 抗体的包含至少一个，一般 2-10 个，有时 25-50 或更多拷贝的 W098/24884 实施例 12 所描述的转基因（如 pHC1 或 pHC2）的转基因动物与含有 W098/24884 实施例 5, 6, 8 或 14 所描述轻链转基因的一个拷贝的转基因动物杂交，其后代与 W098/24884 实施例 10 所描述的 J_H 缺失动物杂交，在此特意引入其内容作为参考。对于这三种性状的每一种，动物都杂交到纯合型。这些动物有如下基因型：单拷贝（每单套染色体）的人重链未重排微基因座（在 W098/24884 实施例 12 中有描述），单拷贝（每单套染色体）的重排人 K 轻链构建体（在 W098/24884 实施例 14

中有描述), 以及在每个内源性小鼠重链基因座去掉所有功能性 J_H 片段的一个缺失(在 W098/24884 实施例 10 中有描述)。这种动物与对于 J_H 片段缺失为纯合型的小鼠(W098/24884 实施例 10)杂交, 产生对 J_H 缺失为杂合子(W098/24884 实施例 10)且对人重链和轻链构建体为半合子的后代。给得到的动物注射抗原并用来产生抗这些抗原的人单克隆抗体。

从这种动物分离的 B 细胞对于人重链和轻链是单特异性的, 因为它们只包含每个基因的一个拷贝。此外, 它们对于人或小鼠重链将是单特异性的, 因为内源性小鼠重链基因拷贝由于 W098/24884 实施例 9 和 12 介绍的跨 J_H 缺失而都是非功能性的。此外, B 细胞的绝大部分对于人或鼠轻链是单特异性的, 因为单拷贝重排人 κ 轻链基因的表达将在绝大部分 B 细胞中等位和同种型排斥内源性小鼠 κ 和 λ 链基因的重排。

优选实施方案的转基因小鼠的很大组成部分将产生免疫球蛋白, 理想的是基本与天然小鼠相同。这样, 例如在内源性 Ig 基因被灭活的实施方案中, 总免疫球蛋白水平将为约 0.1 到 10mg/ml 血清, 优选 0.5 到 5mg/ml, 最理想至少为 1.0mg/ml 左右。当一个可以实现将 IgM 转换到 IgG 的转基因被引入转基因小鼠时, 成年小鼠血清 IgG 与 IgM 的比例优选为约 10:1。IgG 与 IgM 的比例在未成熟小鼠中将低得多。总的说来, 大于约 10%, 优选 40 - 80% 的脾和淋巴结 B 细胞专门表达人 IgG 蛋白。

全部组成理想近似于非转基因小鼠, 通常至少 10%, 优选 25% 到 50% 或更多。一般说来, 至少将产生约 1000 个不同的免疫球蛋白(理想为 IgG), 优选 10^4 到 10^6 或更多, 将主要由引入小鼠基因组不同 V, J 和 D 的区的数量决定。这些免疫球蛋白一般将识别约一半或更多高抗原性的蛋白, 如葡萄球菌蛋白 A。一般, 免疫球蛋白将显示对预选抗原至少约 $10^7 M^{-1}$, 优选至少约 $10^9 M^{-1}$, 更优至少 $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$, $10^{12} M^{-1}$ 或更高, 如最高到 $10^{13} M^{-1}$ 或更高的亲和性。

在一些实施方案中, 可能优选产生有预定所有组成成分的小鼠来限制在对存在于预定抗原类型的抗体应答中的 V 基因选择。有预定所有组成成分的重链转基因可以包含例如在人预定抗原类型的抗体应答中优选使用的人 V_H 基因。另外, 一些 V_H 可能由于各种原因从定义之所

有组成成分中被排除（如，不太可能编码对预定抗原的高亲和性 V 区；进行体细胞突变和亲和性锐减（affinity sharpening）的倾向性小；或对特定人群是免疫原性的）。这样，在包含各种重链或轻链基因片段的转基因重排之前，这些基因片段可以通过如杂交或 DNA 测序被轻易识别为是从转基因动物以外的生物中得到。

本发明的转基因小鼠可以按前面所描述的用 EGFR 抗原的富集或纯化制剂和/或表达 EGFR 的细胞免疫。此小鼠将产生通过转基因内转换重组（顺式转换）进行类型转换并表达与 EGFR 反应的免疫球蛋白的 B 细胞。这些免疫球蛋白可以是人序列抗体，其中重链和轻链多肽由可能包括体来源于细胞突变和 V 区重组连接的序列和种系编码序列的人转基因序列编码；尽管由于体细胞突变和不同 V-J 和 V-D-J 重组结合可能出现其它非种系序列，这些人序列免疫球蛋白可以称作与由人 V_L 或 V_H 基因片段和人 J_L 或 J_H 片段编码的多肽序列基本等同。对于这样的人序列抗体，每条链的可变区一般至少 80% 由人种系 V, L, 在重链中为 D 基因片段编码；通常至少 85% 的可变区由转基因中存在的人种系序列编码；经常 90% 或 95% 或更多的可变区由转基因中存在的人种系序列编码。然而，由于非种系序列由体细胞突变和 VJ 和 VDJ 连接而引入，人序列抗体将经常有一些不像在小鼠种系中的人转基因那样由人 V, D, 或 J 基因片段编码的可变区序列（恒定区序列少一些）。典型说来，这些非种系序列（或各个核苷酸位点）将在 CDR 或其附近，或在已知体细胞突变簇集的区域簇集。

与预定抗原结合的人序列抗体可以从同种型转换得到，这样就产生了包含一个人序列 γ 链（如 $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2B$, 或 $\gamma 3$ ）和一个人序列轻链（如 K）的人抗体。作为亲和突变和抗原选择 B 细胞的结果特别是作为第二（或在后）抗原攻击的结果，这种同种型转换的人序列抗体通常包含一个或多个体细胞突变，一般是在可变区存在并经常在 CDR 的约 10 个残基内。这些高亲和性人序列抗体可以有至少约 $1 \times 10^9 M^{-1}$ ，一般最少 $5 \times 10^9 M^{-1}$ ，优选高于 $1 \times 10^{10} M^{-1}$ ，并且有时 $5 \times 10^{10} M^{-1}$ 到 $1 \times 10^{11} M^{-1}$ 或更高的结合亲和性。

本发明的另一方面涉及从这些小鼠中得到的 B 细胞，它们可以用来产生表达以高亲和性（如大于 $2 \times 10^9 M^{-1}$ ）与 EGFR 结合的人单克隆抗体。这样，在本发明的另一种实施方案中，这些杂交瘤被用来产生包

含一个对结合 EGFR 的亲合常数 (K_A) 至少为 $2 \times 10^9 M^{-1}$ 的免疫球蛋白的组合物, 其中的上述免疫球蛋白包含:

一个由如下成分组成的人序列轻链: (1) 有一个与由人 V_L 基因片段和一个人 J_L 基因片段编码的多肽序列基本同一的多肽序列的轻链可变区, 及 (2) 有一个与由人 C_L 基因片段编码的多肽序列基本同一的多肽序列的轻链恒定区; 及

一个由如下成分组成的人序列重链 (1) 有一个与由人 V_H 基因片段, 任选 D 区和一个人 J_H 基因片段编码的多肽序列基本同一的多肽序列的重链可变区, 及 (2) 有一个与由人 C_H 基因片段编码的多肽序列基本同一的多肽序列的重链恒定区。

对 EGFR 高亲和性的人单克隆抗体的产生可以用一种在具有一个包含整合人免疫球蛋白转基因的基因组的转基因小鼠中扩增人可变区基因片段所有所有组成成分的方法来促进, 上述方法包括将一个包含在上述整合人免疫球蛋白转基因中不存在的 V 区基因片段的 V 基因转基因引入基因组。通常, V 区转基因是一个包含人 V_H 或 V_L (V_K) 基因片段阵列的一部分的酵母人工染色体, 可能在人基因组中天然存在或可能用重组方法分别剪接在一起, 可能包括无序或省略 V 基因片段。通常 YAC 包括至少 5 个或更多功能性 V 基因片段。在这种变异中, 可以产生用 V 所有组成成分扩增方法产生的转基因小鼠, 其中此小鼠表达包含一个由在 V 区转基因存在的 V 区基因片段编码的可变区序列和在 Ig 转基因上编码的 C 区的免疫球蛋白链。通过 V 所有组成成分扩增方法, 可以产生至少有 5 个不同 V 转基因小鼠; 可以产生包含至少 24 个或更多 V 基因的小鼠。一些 V 基因片段可以是非功能性的 (如伪基因等); 这些片段可以保留或如果需要, 可以由熟练的技术人员用重组方法去除。

当小鼠种系被工程化为含有一个具有扩增 V 片段所有组成成分, 基本上在包含 J 和 C 基因片段的人 Ig 转基因中不存在的功能性 YAC 时, 这种性状可以被增殖并杂交到其它遗传背景, 包括有一个扩增的 V 片段所有组成成分的功能性 YAC 杂交到有不同人 Ig 转基因的小鼠种系所在的背景。有一个扩增 V 片段所有组成成分的多功能性 YAC 可以杂交到一个种系而与一种人 Ig 转基因 (或多种人 Ig 转基因) 一起作用。尽管这里称作 YAC 转基因, 这些转基因在整合到基因组时可能基本缺

乏酵母序列，如酵母中自主复制必需的序列；这些序列可以在酵母中复制后而不再必要时（即在引入小鼠 ES 细胞或小鼠前受精卵）由基因工程选择性地去除（如限制性消化和脉冲电场凝胶电泳或其它适当方法）。增殖人序列免疫球蛋白表达特性的方法，包括杂交具有人 Ig 转基因，也可任选具有含有扩增 V 片段所有组成成分的功能性 YAC 的转基因小鼠。V_H 和 V_L 基因片段都可在 YAC 上存在。转基因小鼠可以杂交到实施者希望的任何背景，包括携带其它人转基因，包括人 Ig 转基因和/或编码其它人淋巴细胞蛋白的转基因的背景。本发明也提供了由具有扩增的 V 区所有组成成分的 YAC 转基因的转基因小鼠产生的高亲和性人序列免疫球蛋白。尽管前面描述了本发明转基因动物的优选实施方案，但本发明也考虑了其它实施方案，可以分为 4 类：

I. 包含一个未重排重链和重排轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；

II. 包含一个未重排重链和未重排轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；

III. 包含一个重排重链和未重排轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；

IV. 包含一个重排重链和重排轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；

在这些转基因动物分类中，优选的优先顺序为 II > I > III > IV，其中内源性轻链基因（或至少 K 基因）通过同源重组（或其它方法）被剔除，以及 I > II > III > IV，其中内源性轻链基因没有被剔除并且必需由等位排斥显性化。

III. 与 EGFR 结合的双/多特异性分子

而在本发明的另一种实施方案中，人 EGFR 单克隆抗体或其抗原结合部分可以被衍生或连接到另一个功能性分子如另一种肽或蛋白（如 Fab' 片段），产生与多个结合位点或靶表位结合的双特异性或多特异性分子。例如，本发明的抗体或抗原结合部分可以与一种或多种其它结合分子，如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物功能性连接（例如通过化学偶联，基因融合，非共价缔合或其它方式）。

因此，本发明包括含有至少一个对 EGFR 的第一结合特异性和一个

对第二个靶表位有第二结合特异性的双特异性和多特异性分子。在本发明的一种特定实施方案中，第二靶表位是 Fc 受体，如人 Fc δ R1 (CD64) 或 Fc α 受体 (CD89)。所以，本发明包括与表达 Fc γ R, Fc α R 或 Fc ϵ R 的效应细胞 (如单核细胞、巨噬细胞或多形核细胞 (PMNs)) 和表达 EGFR 的靶细胞都可以结合的双特异性和多特异性分子。这种双特异性和多特异性分子将表达 EGFR 的细胞导向到效应细胞，并且如同本发明的人单克隆抗体，激发 Fc 受体介导的效应细胞活性，如吞噬表达 EGFR 的细胞，抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)，细胞因子释放或产生超氧阴离子。

除了抗 Fc 结合特异性和抗 EGFR 结合特异性，本发明的双和多特异性分子可以进一步包括第三结合特异性。在一种实施方案中，第三结合特异性是抗体增强因子 (EF) 部分，如与参与细胞毒活性的表面蛋白相结合，并因此增加对靶细胞的免疫应答的分子。“抗增强因子部分”可以抗体 (包括 ScFv)，功能性抗体片段或与某种分子如抗原或受体结合的配体，结果是增强了 Fc 受体或靶细胞抗原的结合决定簇的作用。“抗增强因子部分”可以与 Fc 受体或靶细胞抗原结合。另外，抗增强因子部分结合的实体可以不同于第一和第二结合特异性所结合的实体。例如，抗增强因子部分可以与细胞毒 T 细胞 (如通过 CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 或其它对靶细胞产生增强的免疫应答的免疫细胞) 结合。

在一种实施方案中，本发明的双特异性和多特异性分子至少包含一个抗体，或一个其抗体片段，包括如 Fab, Fab', F(ab')₂Fv 或单链 Fv 的结合特异性。此抗体也可以是轻链或重链二聚体，或任何其微型片段如 Fv 或如 Ladner 等在 1990 年 8 月 7 日授权的美国专利 4,946,778 中描述的单链结构，特意引入其内容作为参考。

在一种实施方案中，本发明的双特异性和多特异性分子包含对效应细胞表面存在的 Fc γ R 或 Fc α R 的结合特异性的人单克隆抗体，以及对靶细胞抗原，如 EGFR 的第二结合特异性。

在一种实施方案中，对 Fc 受体的结合特异性是由人单克隆抗体提供的，其结合不由人免疫球蛋白 (IgG) 阻断。这里用到的术语“IgG 受体”是指染色体 1 上 8 个 γ 链基因的任何一个是。这些基因编码被分为三种 Fc γ 受体类型：Fc γ R I (CD64)、Fc γ R II (CD32) 和 Fc γ R III (CD16)

的总共 12 个跨膜或可溶受体同种型。在一种优选实施方案中，Fc γ 受体是一个高亲和性 Fc γ R I。人 Fc γ R I 是一个 72kD 的分子，它表现对单体 IgG 的高亲和性 ($10^8 - 10^9 M^{-1}$)。

这些优选单克隆抗体的产生和鉴定由 Fanger 等在 PCT 申请 W088/00052 和在美国专利 4,954,617 中有描述，其教导在这里引用作为参考。这些抗体在受体 Fc γ 结合位点以外的位点与 Fc γ R I、Fc γ R II 和 Fc γ R III 结合。这样，它们的结合基本不被生理水平的 IgG 阻断。本发明中有用的特异性抗 Fc γ R I 抗体为 MAb22, MAb32, MAb44, MAb62 和 MAb197。产生 MAb32 的杂交瘤可以从美国典型培养物保藏中心，ATCC，保藏号 HB9469 得到。抗 Fc γ R I MAb22, MAb22 的 F(ab')₂ 片段可以从米德列斯公司 (Annandale, N.J.) 获得。在其它实施方案中，抗 Fc γ 受体抗体是单克隆抗体 22 (H22) 的人源化形式。H22 抗体的产生和鉴定在 Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155(10):4996-5002 和 PCT/US93/10384 中有描述。产生 H22 抗体的细胞系于 1992 年 11 月 4 日，以 HA022CL1 的名称保藏于美国典型培养物保藏中心，保藏号为 CRL 11177。

在其它优选实施方案中，对 Fc 受体的结合特异性由与人 IgA 受体如 Fc α 受体 (Fc α R (CD89)) 结合的抗体提供，其结合优选不被人免疫球蛋白 A (IgA) 阻断。术语 "IgA" 意欲包括染色体 19 上一个 α 基因 (Fc α R I) 的基因产物。已知该基因编码一些 55 到 110Kda 的可变剪接的跨膜同种型。Fc α R I (CD89) 在单核细胞/巨噬细胞，嗜酸性粒细胞和中性粒细胞上进行组成型表达，但在非效应细胞群上表达。Fc α R I 对 IgA1 和 IgA2 都有中等的亲和性 ($\approx 5 \times 10^7 M^{-1}$)，当暴露于细胞因子如 G-CSF 或 GM-CSF 时会增加 (Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16:423-440)。对识别为 A3, A59, A62 和 A77，与 Fc α R I 在 IgA 配体结合域以外结合的四种 Fc α R I 已经有了描述 (Monteiro, R.C. et al., 1992, J. Immunol. 148:1764)。这里也描述了一个称作 14.1 的对抗 Fc α R I 的完全人单克隆抗体。

Fc α R I 和 Fc γ R I 是用于本发明的优选触发受体，因为它们 (1) 主要在免疫效应细胞，如单核细胞、PMNs、巨噬细胞和树突细胞上表达；(2) 以高水平 (如每细胞 5,000-100,000) 表达；(3) 细胞毒活性的介导体 (如 ADCC, 细胞吞噬)；(4) 介导增强的抗原呈递，包括导

向于它们的自身抗原。

在其它实施方案中，本发明的双特异性和多特异性分子进一步包含识别，例如，结合于靶细胞抗原，如 EGFR 的结合特异性。在一种优选实施方案中，通过本发明的人单克隆抗体提供结合特异性。

这里用到的“效应细胞特异性抗体”是指与效应细胞 Fc 受体结合的抗体或功能性片段。在本发明中使用的优选抗体与效应细胞 Fc 受体在内源性免疫球蛋白不结合的位点结合。

这里用到的术语“效应细胞”是指参与与免疫应答识别和激活阶段相对的免疫应答效应阶段的免疫细胞。可以作为范例的免疫细胞包括骨髓和淋巴来源的细胞，如淋巴细胞（如 B 细胞和包括细胞溶解 T 细胞（CTL）的 T 细胞），杀伤细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、多形核细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性粒细胞。一些效应细胞表达特异性 Fc 受体并执行特异性免疫功能。在一种优选实施方案中，效应细胞可以诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（ADCC），如可以诱导 ADCC 的中性粒细胞。例如，表达 FcR 的单核细胞和巨噬细胞参与靶细胞的特异性杀灭及向免疫系统的其它成分呈递抗原，或与抗原呈递细胞结合。在另一种实施方案中，效应细胞可以吞噬靶抗原、靶细胞或微生物。效应细胞上特定 FcR 的表达可以由体液因子如细胞因子调节。例如，Fc γ R I 的表达由 γ 干扰素（IFN- γ ）上调。这种增强的表达增加了携带 Fc γ R I 的细胞对靶的细胞杀灭活性。效应细胞可以吞噬或裂解靶抗原或靶细胞。

“靶细胞”应该表示可以被本发明的一种组合物（如人单克隆抗体，双特异性或多特异性分子）导向的受试者（如人或动物）不需要的任何细胞。在一种优选实施方案中，靶细胞为表达，优选过量表达 EGFR 的细胞。表达 EGFR 的细胞一般包括肿瘤细胞，如膀胱、乳腺、结肠、肾、卵巢、前列腺、肾细胞、鳞状细胞、肺（非小细胞）以及头和颈肿瘤细胞。其它表达 EGFR 的细胞包括分别可以在关节炎和牛皮癣的治疗中作为靶的滑膜成纤维细胞和角质形成细胞。

尽管优选人单克隆抗体，其它可以用于本发明的双特异性或多特异性分子的抗体为鼠科的、嵌合的和人源化单克隆抗体。

嵌合的小鼠-人单克隆抗体（即嵌合抗体）可以由本领域中已知的重组 DNA 技术产生。例如，用限制性酶消化编码鼠（或其它物种）单

克隆抗体分子 Fc 恒定区的基因，去掉编码鼠 Fc 的区域，用编码人 Fc 恒定区基因的相当部分替代。（见 Robinson et al, 国际专利公开 PCT/US86/02269; Akira, et al., 欧洲专利申请 184,187; Taniguchi, M., 欧洲专利申请 171,496; Morrison et al., 欧洲专利申请 173,494; Neuberger et al., 国际专利申请 WO 86/01533; Cabilly et al. 美国专利. 4,816,567; Cabilly et al. 欧洲专利申请 125,023; Better et al. (1988 Science 240: 1041-1043); Liu et al. (1987) PNAS 84: 3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) PNAS 84: 214-218; Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; 和 Shaw et al., 1988, J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559)。

可以通过用人 Fv 可变区的相当序列替代不直接参与抗原结合的 Fc 可变区序列使嵌合抗体进一步人源化。对人源化嵌合抗体的一般综述可以见 Morrison, S.L., 1985, Science 229:1202-1207 以及 Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214。这些方法包括从至少一条重链或轻链分离、操作和表达编码所有或部分免疫球蛋白 Fv 可变区的核酸序列。这种核酸的来源在本领域的技术人员中是众所周知的，例如，可以从产生抗 GP II_bIII_a 抗体 7E3 的杂交瘤获得。编码嵌合抗体或其片段的重组 DNA 然后可以被克隆到适当的表达载体。适当的人源化抗体也可以用 CDR 替代而产生，见美国专利 5,225,539; Jones et al. 1986 Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. 1988 Science 239:1534; 和 Beidler et al. 1988 J. Immunol. 141:4053-4060。

特定人抗体的所有 CDR 都可以用至少一部分非人 CDR 替代或只有一些 CDRs 可以用非人 CDR 替代。只需要替代将人源化抗体结合到 Fc 受体所需要数目的 CDRs。

可以用非人抗体来源的 CDR 替代至少一部分人抗体 CDR 的方法对抗体进行人源化。Winter 描述了一种用来制备本发明的人源化抗体的方法（英国专利申请 GB 2188638A, 1987 年 3 月 26 日提交），在此特意引入其内容作为参考。可以按题目为 Humanized Antibodies to Fc Receptors for Immunoglobulin G on Human Mononuclear Phagocytes 的国际申请 WO 94/10332 所描述的，通过寡核苷酸定向位

点诱变用非人 CDRs 替代人 CDR。

特定氨基酸被取代、去除或添加的嵌合人源化抗体也属于本发明的范围。特别是优选人源化抗体在构架区有氨基酸取代，因而改善与抗原的结合。例如，在有小鼠 CDRs 的人源化抗体中，人构架区的氨基酸序列可以被位于小鼠抗体相应位置的氨基酸取代。已知这种取代可以在某种场合改善人源化抗体与抗原的结合。有氨基酸序列添加、去除或取代的抗体在这里称作修饰的抗体或改变的抗体。

术语修饰的抗体意欲包括这些抗体，如通过如去除、增加或取代抗体的一些部分而修饰的单克隆抗体、嵌合抗体和人源化抗体。例如，抗体可以通过去除恒定区并用准备增加抗体半衰期如血清半衰期、稳定性或亲和性的恒定区替代来修饰。只要双特异性和多特异性分子有至少一个对 Fc γ R 特异的抗原结合区并触发至少一种效应功能，那么任何修饰都在本发明的范围内。

本发明的双特异性和多特异性分子可以用化学技术（如见 D. M. Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807），“polydoma” 技术（见 Reading 的美国专利 4,474,893）或重组 DNA 技术产生。

特别是，可以用这里提供的实施例所描述的本领域中公知的方法偶联作为组分的结合特异性，如抗 FcR 和抗 EGFR 结合特异性来制备本发明的双特异性和多特异性分子。例如，双特异性和多特异性分子的每种结合特异性可以分别产生然后彼此偶联。当结合特异性为蛋白或多肽时，可以用各种偶联或交联试剂进行共价偶联。交联试剂的例子包括蛋白 A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚氨基-S-乙酰-硫代乙酸酯（SATA）、5,5'-二硫代双（2-硝基苯甲酸）（DTNB）、o-phenylenedimaleimide（oPDM）、N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫)丙酸酯（SPDP），及磺基琥珀酰亚基 4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯（sulfo-SMCC）（见例如，Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648）。其它方法包括由 Paulus（Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132）；Brennan 等（science (1985) 229:81-83），和 Glennie 等（J. Immunol. (1987) 139:2367-2375）所描述的方法。优选的偶联试剂为 SATA 和 sulfo-SMCC，都可以从 Pierce 化学公司（Rockford，

IL) 获得。

当结合特异性为抗体(如两个人源化抗体)时,它们可以用两条重链 C 端铰链区的巯基键连接。在一种特定优选实施方案中,铰链区被修饰为在偶联前包含奇数个,优选为一个巯基。

另外,两种结合特异性都可以在同一载体中编码并在相同宿主中表达和装配。当双特异性和多特异性分子为 MAb × MAb, MAb × Fab, Fab × F(ab')₂ 或配体 × Fab 融合蛋白时,此方法特别有用。本发明的双特异性和多特异性分子,如双特异性分子,可以是单链分子,如单链双特异性抗体,包含一个单链抗体和一个结合决定簇的单链双特异性分子,或包含两个结合决定簇的单链双特异性分子。双特异性和多特异性分子也可以是单链分子或可以包含至少两个单链分子。制备双和多特异性分子的方法在以下文献中举例描述,美国专利 5,260,203; 美国专利 5,455,030; 美国专利 4,881,175; 美国专利 5,132,405; 美国专利 5,091,513; 美国专利 5,476,786; 美国专利 5,013,653; 美国专利 5,258,498; 美国专利 5,482,858。

双特异性和多特异性分子与它们的特异性靶相结合可以用酶联免疫吸附测定(ELISA),放射免疫测定(RIA),FACS 分析,生物测定(如生长抑制)或蛋白印迹测定来证实。每种测定方法一般都通过使用待测定复合物特异的标记试剂(如抗体)来检测待测定蛋白-抗体复合物的存在。例如,FcR-抗体复合物可以用如识别并特异性与抗体-FcR 复合物结合的酶连接的抗体或抗体片段来检测。另外,可以用其它免疫测定的中的任何一种来检测。例如,可以将抗体放射性标记并用于放射免疫测定(RIA)(例如,见 Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, 在此引入作为参考)。具有放射活性的同种型可以用如使用 γ 计数器或闪烁计数器或放射自显影的方法检测。

IV. 抗体偶联物/免疫毒素

另一方面,本发明的特征在于与治疗部分,如细胞毒素、药物或放射性同位素偶联的人抗 EGFR 单克隆抗体或其片段。当与细胞毒素偶联时,这些偶联抗体就叫做“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒试剂包括任

何对细胞有害(如杀灭细胞)的试剂,其例子包括紫杉醇、松胞菌素 B、短杆菌肽 D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、表鬼白毒吡喃葡萄糖苷、表鬼白毒噻吩葡萄糖苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、阿霉素、北豆根碱、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素 D、1-脱氢表雄酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、心得安、嘌呤霉素及其类似物或同源物。治疗试剂包括,但不局限于抗代谢物(如氨甲喋呤、6-巯基嘌呤、6-巯基鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟鸟嘧啶),烷化剂(如二氯甲基二乙胺、thioepa chlorambucil、美法伦、亚硝基脲氮芥(BSNU)和罗氮芥(CCNU)、cyclophosphamide、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素 C 和顺二氯二胺铂(II)((DDP)顺铂)、anthracycline(如道诺红霉素(以前称作道诺霉素)和亚德里亚霉素),抗生素(如放线菌素(以前称作放射霉素)、博来霉素、光神霉素和氨基霉素(AMC),以及抗有丝分裂剂(如长春新碱、长春花碱)。本发明的抗体可以与放射性同位素如放射性碘偶联,产生治疗 EGFR 相关疾病的细胞毒放射性药物。

本发明的抗体偶联物可以用来修饰某种生物反应,药物部分并不限于经典化疗剂的范围。例如,药物部分可以是一种具有所需要生物活性的蛋白或多肽。这种蛋白可以包含如酶活性毒素或其活性片段,如红豆因、蓖麻毒蛋白 A、假单胞菌素、或白喉毒素;蛋白如肿瘤坏死因子或 γ 干扰素;或生物反应调节剂如,淋巴因子、白介素-1("IL-1"),白介素-2("IL-2"),白介素-6("IL-6"),粒细胞巨噬细胞集落刺激因子("GM-CSF"),粒细胞集落刺激因子("G-CSF"),或其它生长因子。

将这种治疗部分与抗体结合的技术非常熟悉,见,如 Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", In Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985);

"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

V. 药物组合物

另一方面，本发明提供了一种组合物，如药物组合物，它包含一个或几个本发明的人单克隆抗体或其抗原结合部分的组合，与可药用的载体一起配制。在一种优选实施方案中，此组合物包括多个（如两个或以上）本发明的分离人抗体或其抗原结合部分的组合。优选地，组合物的每个抗体或其抗原结合部分与独特的、预选的 EGFR 表位相结合。

在一种实施方案中，有补体活性的人抗 EGFR 单克隆抗体被组合应用，如作为包含两个或更多人抗 EGFR 单克隆抗体的药物组合物。例如，介导效应细胞存在时高效杀灭靶细胞的人单克隆抗体可以与另一种抑制表达 EGFR 的细胞生长的人单克隆抗体组合。

在另一种实施方案中，此组合物包含一个或多个本发明的双特异性或多特异性分子的组合（例如，包含至少一个对 Fc 受体的结合特异性和至少一个对 EGFR 的结合特异性）。

本发明的药物组合物也可用于联合治疗，即与其它试剂结合联合。例如，联合治疗可以包括本发明的组合物和至少一种抗肿瘤试剂或其它传统治疗方法。

这里用到的“可药用载体”包括任何和所有生理相容的溶剂、分散剂、包衣、抗细菌和抗真菌试剂、等渗的和吸收延缓试剂等。优选地，这种载体适合静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮使用（如通过注射或滴注）。取决于给药途径，活性化合物，即抗体、双特异性和多特异性分子可以用一种物质包被，使化合物不受酸和其它可能灭活此混合物的自然条件的影响。

“可药用盐”是指保持母体化合物需要的生物活性并且不带来任何不需要的毒性作用的盐（见，例如 Berge, S.M., et al. (1977) J.

Pharm. Sci. 66:1-19)。这些盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括那些从如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、磷等无毒无机酸以及如脂肪酸单和二羧酸、苯取代烷酸、羟基烷酸、芳香酸、脂肪酸和芳香磺酸等无毒有机酸衍生的盐。碱加成盐包括从如钠、钾、镁、钙等碱金属和N,N'-联苯二亚胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等无毒有机胺衍生的盐。

本发明的组合物可以通过许多本领域中公知的方法给药。正如熟练的技术人员所鉴定的，给药途径和/或方式将由希望结果的不同而改变。活性化合物可以用保护化合物避免迅速释放的载体制备，如包括植入物、经皮贴剂、和微胶囊运送系统的控释配方。可以使用如乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、和聚乳酸等生物可降解的和生物相容的多聚体。制备这种制剂的许多方法被授予专利并且在本领域的技术人员中是公知的。见如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

为通过某种给药途径而给予本发明的化合物，必须将其包被于防止其被灭活的物质中或与这种物质共同给药。例如，这种化合物可以用适当的载体例如脂质体或稀释剂而给予受试者。可药用的稀释剂包括盐和水缓冲液包括水包油包水CGF乳状液以及传统脂质体(Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27)。

可药用载体包括为临时制备无菌注射液或分散剂所用的无菌水溶液或分散液和无菌粉末。这些针对药用活性物质的媒介和试剂的使用在本领域中是公知的。除了与活性化合物不相容的传统介质或试剂外，考虑了将其使用在本发明的药物组合物中。此组合物中也可掺入补充的活性化合物。

治疗组合物在生产和储存条件下一般必需是无菌和稳定的。此组合物可以配制为溶液、微乳状液、脂质体或其它适合高药物浓度的有序结构。载体可以是包括如水、乙醇、多羟基化合物(例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等)，及其适当的混合物的溶剂或分散介质。可以通过例如使用包膜如卵磷脂、在分散时保持要求的颗粒大小及使用表面活性剂来保持适当的液态。在许多情况下，优选在组合物中包括等渗剂如糖、多元醇如甘露醇、山梨醇或氯化钠。可以通过在组合物中

加入延缓吸收的试剂如一硬脂酸盐和明胶来延长注射组合物的吸收。

无菌注射液可以通过在适当溶剂中加入要求的剂量的活性化合物和上面列举的一种或几种成分的组合，并按要求进行灭菌微量过滤。一般说来，分散剂通过将活性化合物加入一种包含上面所列举的基本分散介质和要求的其它成分的无菌载体。对于制备无菌注射液的无菌粉末，优选制备方法为真空干燥和冷冻干燥（低压冻干），产生活性成分粉末，再加上从前面无菌过滤的溶液得到的其它需要成分。

调整剂量方案来提供最优的需要反应（如治疗反应）。例如，可以给予单个丸剂，可以随时间给予一些分开的剂量，或由治疗状况的紧急程度按比例减少或增加剂量。为给药方便和剂量统一，以剂量单位的形式配制肠胃外组合物非常有好处。这里用到的剂量单位形式是指作为受治疗受试者的单位剂量的生理区分的单位；每个单位包含预定量的活性化合物，经计算可以与要求的药物载体协同作用，产生需要的治疗效果。本发明剂量单位形式的规格由以下内容指定并直接依赖于(a)活性化合物的独特特征和需要达到的特定疗效及(b)本领域中固有的限制如治疗所用化合物个体敏感性的限制。

可药用抗氧化剂的例子包括：(1)水溶性抗氧化剂，如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、硫酸钠等；(2)脂溶性抗氧化剂，如棕榈酸抗坏血酸酯、丁基化羟基苯甲醚（BHA），丁基化羟基甲苯（BHT）、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α 生育酚等及(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。

对于治疗组合物，本发明包括适于口服、鼻腔、局部（包括颊和舌下）、直肠、阴道和/或肠胃外给药的配方。这些配方可以方便地以单位剂型存在，可以用制药领域公知的方法制备。可以与载体物质组合而产生单剂型的活性成分的量将根据被治疗者和特定给药方式而不同。可以与载体物质组合产生单剂型的活性成分的量将为产生疗效的组合物的量。一般说来，以百分数计算，该量将为活性成分的约0.01-99%，优选约0.1-70%左右，更优选约1-30%。

本发明适于阴道给药的制剂也包括含有本领域中公知的适当载体的阴道栓、填塞物、油膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。局部或经皮给予本发明的组合物的剂型包括粉末、喷雾、软膏、糊剂、油膏、洗液、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。活性化合物可以在无菌条件下与

可药用载体，以及可能要求的任何防腐剂、缓冲液或推进剂混和。

这里用到的短语“肠胃外给药”和“给药于肠胃外”表示肠道和局部给药以外的给药方式，通常是注射、并包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊髓内、硬膜外和胸骨内注射输注。

在本发明的药物组合物中使用的适合水或非水载体包括水、乙醇、多羟基化合物（例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等），及其适当的混合物、植物油，如橄榄油、及可注射有机酯，如亚油酸。可以通过例如使用包被物如卵磷脂、在分散时保持要求的颗粒大小及使用表面活性剂来保持适当的液态。

这些组合物也可以包含佐剂，如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。预防微生物的出现可以通过灭菌程序，以及通过引入各种抗细菌和抗真菌剂如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、酚山梨酸等。也可能在组合物中需要包括等渗试剂，如糖、氯化钠等。另外，可以通过在组合物中加入延缓吸收的试剂如一硬脂酸铝和明胶来延长可注射药物形式的吸收。

当本发明的化合物作为药物给予人和动物时，它们可以单独或作为含有与可药用载体组合的例如 0.01-99.5%（更优选 0.1-90%）的活性成分的药物组合物。

忽略选择的使用途径，可以以适当水合形式使用的本发明的化合物，和/或本发明的药物组合物，可以通过本领域中的公知传统方法被配方为可药用剂型。

本发明的药物组合物中的实际剂量水平可以改变，从而获得可以达到特定病人所需的治疗反应的活性成分的量、组合物和给药方式，而对病人无毒。选定的剂量水平将取决于各种药代动力学因素包括本发明使用的特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性，给药途径、给药时间、所使用的特定化合物的分泌速度、疗程、其它与所使用的特定组合物联合使用的药物、化合物和/或物质、年龄、性别、体重、状况、治疗病人的一般健康和过去史等医学领域中熟知的因素。

本领域中有常规技术的医生或兽医可以轻易判断并处方需要的药物组合物的量。例如，医生或兽医可以以低于获得需要的疗效要求剂

量的用于药物组合物中的本发明的化合物剂量开始，并逐渐增加剂量，直到达到需要的疗效。总之，本发明的组合物的适当剂量是有效产生疗效的最低剂量的化合物的量。这种有效剂量一般将取决于前面所描述的因素。优选给药方式为静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下，优选接近靶位点给药。如果需要，治疗组合物的有效日剂量可以选择作为 2、3、4、5、6 或更多亚剂量，在一天中的适当间隔，以单位剂型分别给药。尽管本发明的化合物可以单独给药，优选将化合物作为药物配方（组合物）使用。

治疗组合物可以通过本领域中的公知医学设备给药。例如，在一种优选实施方案中，本发明的治疗组合物可以用无针皮下注射设备给药，如在美国专利 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824 或 4,596,556 中公开的设备。本发明中有用的公知植入物和组件的例子包括：美国专利 4,487,603，它公开了以控制速率分散药物的可植入微量滴注泵；美国专利 4,486,194，它公开了经皮用药的治疗设备；美国专利 4,447,233，它公开了以精确滴注速度运送药物的药物输注泵；美国专利 4,447,224，它公开了连续运送药物的可变流量可植入滴注泵；美国专利 4,439,196，它公开了一种有多室容器的渗透性药物运送系统；以及美国专利 4,475,196，它公开了一种渗透性药物运送系统。在此引入这些专利文献作为参考。许多其它的这种植入物、运送系统和组件在本领域中的技术人员中是公知的。

在某些实施方案中，本发明的人单克隆抗体可以为保证体内适当分布而配方。例如，血脑屏障（BBB）排除了许多高度亲水的化合物。为保证本发明的治疗化合物穿过 BBB（如果需要），它们可以在例如脂质体中配制。关于生产脂质体的方法，见，如美国专利 4,522,811；5,374,548 及 5,399,331。脂质体可以包括一个或多个选择性运送到特定细胞或器官内的部分，这样增强了导向性药物运送（见，如 V. V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685）。作为例子的导向部分包括叶酸或生物素（见，如 Low et al 的美国专利 5,416,016）；甘露糖苷（Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038）；抗体（P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140；M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180）；

表面活性蛋白 A 受体 (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134), 可以包含本发明的制剂和发明分子成分的不同种类; p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090); 也见 K. Keinanen; M. L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J. J. Killion; I. J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273。在本发明的一种实施方案中, 本发明的治疗化合物在脂质体中配制; 在一种更优的实施方案中, 脂质体包含导向部分。在一种最优实施方案中, 脂质体中的治疗化合物由浓集注射运送至肿瘤或感染附近的位点。组合物必须为液体, 必需在可以容易注射的范围内。必需在生产 and 储存条件下保持稳定, 并且必需防止微生物如细菌和真菌污染。

与未治疗者相比, “治疗有效剂量” 优选抑制至少约 20%, 更优选至少约 40%, 甚至更优选至少 60%, 还可更优选至少约 80% 的肿瘤生长。化合物抑制癌症生长的能力可以在可预测人肿瘤疗效的动物模型系统中评估。另外, 组合物的这种特征可以通过采用本领域从业者公知的测定方法检验化合物的抑制, 如体外抑制能力而评价。治疗有效剂量的治疗化合物可以减小肿瘤大小, 或减轻使用者的症状。本领域中的一种常规方法以如目标病灶大小、受试者症状的严重性和特定的组合物或选择的给药途径等因素为基础, 就可以判断这些用量。

组合物必需是无菌的, 并且是液态的, 处于组合物可以用注射运送的范围。除了水以外, 载体可以是等渗缓冲盐溶液, 乙醇, 多羟基化合物 (例如, 甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等), 及其适当的混合物。可以通过例如使用包被物如卵磷脂、在分散时保持要求的颗粒大小及使用表面活性剂来保持适当的液态。另外, 可以通过在组合物中加入延缓吸收的试剂如一硬脂酸铝和明胶使可注射组合物长期吸收。

当活性化合物受到适当保护时可以口服, 例如, 同情性稀释剂或同化的可食用载体一起口服。

VI. 本发明的用途和方法

本发明的组合物 (如人 EGFR 单克隆抗体及其衍生物/偶联物) 有体外和体内诊断和治疗用途。例如, 这些分子可以用于给予例如体外或来自体内的培养物中的细胞, 或例如体内用于受试者, 以治疗、预防或诊断多种疾病。这里用到的术语“受试者”意欲包括人和非人动物。

优选的人类动物包括以 EGFR 表达特别是错误表达（如过量表达）为特征的疾病的病人。例如，本发明的方法和组合物可以用于治疗有致肿瘤的疾病的病人，如以出现表达 EGFR 的肿瘤细胞，包括如膀胱、乳腺、结肠、肾、卵巢、前列腺、肾细胞、鳞状细胞、肺（非小细胞）、以及头和颈肿瘤细胞为特征的疾病的受试者。本发明的方法和组合物也可以用于治疗其它疾病，如自身免疫疾病，癌症，牛皮癣，或炎症性关节炎，如类风湿性关节炎，系统性红斑狼疮相关的关节炎，或牛皮癣关节炎。本发明的术语“非人动物”包括所有脊椎动物，如哺乳和非哺乳动物，如非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

本发明的组合物（如人抗体、多特异性和双特异性分子）首先可以在体外进行与治疗或诊断相关的结合活性的检验。例如，可以用下面实施例中描述的 ELISA 和流式细胞仪测定来检测本发明的组合物。另外，可以测定这些分子触发至少一种效应细胞介导的效应细胞活性，包括表达 EGFR 的细胞的裂解的活性。测定效应细胞介导的细胞裂解的方案在下面实施例中有所描述。

本发明的组合物（如人抗体、多特异性和双特异性分子）在治疗和诊断 EGFR 相关疾病中有额外作用。例如，可以使用人单克隆抗体、多特异性或双特异性分子，例如在体内或体外引发一种或多种下列生物活性：调理表达 EGFR 的细胞；介导人效应细胞存在下对表达 EGFR 细胞的吞噬或细胞裂解；抑制表达 EGFR 的细胞中 EGF 或 TGF- α 诱导的自磷酸化；抑制自分泌 EGF 或 TGF- α 诱导的表达 EGFR 的细胞的激活；或抑制表达 EGFR 的细胞生长，如以低剂量。

在另一种实施方案中，本发明的人单克隆抗体不能诱导补体介导的细胞裂解，因此，在触发补体激活的疾病，如痤疮方面具有更少的副作用。痤疮的主要原因是产生皮脂的滤泡中的角质化模式的改变。由于角质形成细胞表达 EGFR，皮肤中 EGFR 信号传递过程的干扰可以改变滤泡中角质形成细胞的生长和分化，从而导致痤疮形成。直接免疫荧光研究证明，在早期非炎性和非炎性痤疮病变中具有经典和替代的补体途径的激活。

在一种特定实施方案中，人抗体及其衍生物在体内应用于治疗、预防或诊断多种 EGFR 相关疾病。EGFR 相关疾病包括多种癌症，如膀胱、乳腺、结肠、肾、卵巢、前列腺、肾细胞、鳞状细胞、肺（非小细胞）

以及头和颈癌。其它 EGFR 相关疾病包括，自身免疫病、牛皮癣和炎症性关节炎。

本发明的组合物（如人抗体、多特异性和双特异性分子）的给药方法在本领域中是公知的。这种分子的适当剂量取决于受试者的年龄和体重以及使用的特定药物。这种分子可以与放射性核素如 ^{131}I ， ^{90}Y ， ^{105}Rh 偶联，见下面文献中的描述，Goldenberg, D. M. et al. (1981) *Cancer Res.* 41:4354-4360，及欧洲专利 0365 997。本发明的组合物（如人抗体、多特异性和双特异性分子）也可与抗感染剂偶联。

在另一种实施方案中，人抗 EGFR 抗体或其抗原结合片段可以与治疗剂，如化疗剂共同给药，或可以与其它已知治疗，如抗癌治疗，如放疗共同给予。所述治疗剂包括，抗肿瘤剂等，所述抗肿瘤剂如阿霉素（阿得里亚霉素）、顺铂硫酸博莱霉素、卡氮芥、苯丁酸氮芥和环磷酰胺羟基脲，这些抗肿瘤剂自身仅仅在对患者为毒性或亚毒性的水平才有效。顺铂以 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 剂量，每四周一次静脉内给药，阿霉素以 $60-75\text{mg}/\text{m}^2$ 剂量每 21 天一次静脉内给药。本发明的人抗 EGFR 抗体，或其抗原结合片段与化疗剂的共同给药提供了通过对人肿瘤细胞产生细胞毒性作用的不同机制而起作用的两种抗癌剂。所述共同给药可以解决由于发生药物抗性或肿瘤细胞抗原性的改变导致的问题，所述药物抗性或肿瘤细胞抗原性的改变使得它们不与抗体反应。

靶特异性效应细胞，如与本发明的组合物（如人抗体、多特异性和双特异性分子）连接的效应细胞也可作为治疗试剂。用于定向的效应细胞可以是人白细胞如巨噬细胞、中性粒细胞或单核细胞。其它细胞包括嗜酸性细胞和其它有 IgG 或 IgA 受体的细胞。如果需要，效应细胞可以从被治疗的受试者获得。靶特异性效应细胞，可以作为生理可接受的溶液中的细胞悬浮液而给予。给予的细胞数可以为 $10^8 - 10^9$ ，但将取决于治疗目的不同而改变。总之，用量将足够获得在靶细胞如表达 EGFR 的肿瘤细胞的定位，并足够通过如细胞吞噬完成细胞杀灭。给药途径也可变化。

用靶特异性效应细胞的治疗可以与其它去除靶细胞的方法结合进行。例如，用本发明的组合物（如人抗体、多特异性和双特异性分子）和/或配备这些组合物的效应细胞的抗肿瘤治疗可以与化疗联合使用。另外，联合免疫治疗可以用来指导两个不同细胞毒性效应细胞群

定位于肿瘤细胞排斥。例如，连接到抗 Fc γ R I 或抗 CD3 的抗 EGFR 抗体可以与 IgG 或 IgA 受体特异性结合剂结合使用。

本发明的双特异性和多特异性分子也可以用来调节效应细胞上的 Fc γ R 或 Fc α R 水平，如通过给细胞表面受体加帽或去除细胞表面受体。抗 Fc 受体混和物也可用于此目的。

有补体结合位点，如 IgG1, -2 或 -3，或 IgM 上的补体结合部分的本发明的组合物（如人抗体、多特异性和双特异性分子）也可在补体存在下使用。在一种实施方案中，对包含靶细胞及本发明的结合剂和适当效应细胞的细胞群的离体治疗可以通过加入补体或含有补体的血清而得到补充。对包被本发明的结合剂的靶细胞的吞噬可以通过与补体蛋白结合而改善。在另一种实施方案中，包被本发明的组合物（如人抗体、多特异性和双特异性分子）的靶细胞也可被补体裂解。在另一种实施方案中，本发明的组合物不激活补体。

本发明的组合物（如人抗体、多特异性和双特异性分子）也可与补体一起给药。因此，包含人抗体、多特异性或双特异性分子和血清或补体的组合物也在本发明的范围内。这些组合物的优势在于补体紧邻人抗体、多特异性或双特异性分子。另外，本发明的人抗体、多特异性或双特异性分子和血清或补体可以分开给药。

包含本发明的组合物（如人抗体、多特异性和双特异性分子）和使用说明书的试剂盒也在本发明的范围内。试剂盒还可包含至少一种额外的试剂，如补体，或一个或更多额外的本发明的人抗体（如，区别于第一个人抗体，与 EGFR 抗原的一个表位结合的具有补体活性的人抗体）。

在另一种实施方案中，可以额外给予受试者调节，如增强或抑制 Fc γ 或 Fc α 受体的表达活性的试剂，例如，用细胞因子治疗受试者。在用多特异性分子治疗中优选给予的细胞因子包括粒细胞集落刺激因子（G-CSF），粒细胞 - 巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）， γ 干扰素（INF- γ ）和肿瘤坏死因子（TNF）。

在另一种实施方案中，可以额外用淋巴因子制剂治疗受试者。可以用淋巴因子制剂诱导不高度表达 EGFR 的癌细胞高度表达 EGFR。淋巴因子制剂可以导致肿瘤细胞中更均质的 EGFR 表达，从而导致更有效的治疗。适于给药的淋巴因子制剂包括 γ 干扰素、肿瘤坏死因子及其组

合。这些可以静脉内给药。淋巴因子的适当剂量是 10,000 - 1,000,000 单位/患者。

本发明的组合物（如人抗体、多特异性和双特异性分子）也可用于表达 Fc γ R 或 EGFR 的靶细胞，例如标记这些细胞。为了这种应用，可以将结合剂连接到可以检测的分子。这样，本发明提供了定位来自体内或体外，表达 Fc 受体如 Fc γ R 或 EGFR 的细胞的方法。可检测的标记物可以是，如放射性同位素、荧光化合物和酶或酶辅因子。

在一种实施方案中，本发明提供了检测样品中 EGFR 的存在或测量 EGFR 抗原量的方法，包括在允许抗体或其部分和 EGFR 形成复合物的条件下，将样品和对照样品与特异性与 EGFR 结合的人单克隆抗体或其抗原结合部分相接触。然后检测复合物的形成，其中样品与对照样品间复合物形成的不同提示样品中存在 EGFR 抗原。

在另一种实施方案中，本发明提供了体内或体外检测表达 Fc 的细胞的存在或为其定量的方法。此方法包括 (i) 给予受试者偶联于可检测标记物的本发明的组合物（如多或双特异性分子）或其片段；(ii) 将受试者暴露于检测该可检测标记物的方法，以便识别包含表达 Fc 的细胞的区域。

通过下面的实施例对本发明做了进一步说明，但这些例子不应作为进一步的限制。在此特意引入本申请中引用的所有附图的内容和所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容作为参考。

实施例

材料和方法

抗原：用 A431 人表皮样癌细胞系 (CRL-1555, 批号 203945, ATCC Manassas, Virginia) 和获得自 Sigma Chemical Co (产品 E 3641 批号 109H4108 和 20K4079) 的可溶性表皮生长因子受体 (EGFR) 免疫转基因小鼠。在 -20°C - -80°C 储存可溶性 EGFR 直到使用。

培养基制剂：用 (A) 含有 10%FBS, 青霉素 - 链霉素 (Sigma P-7539) 和 2 - 巯基乙醇 (GibcoBRL 21985-023) 的高葡萄糖 DMEM (Mediatech Cellgro # 10013) 培养 A431 细胞和骨髓瘤细胞。向杂交瘤生长培养基中加入额外的培养基补充物，包括：Origin-杂交瘤克隆因子 (Igen 21001), OPI 补充物 (Sigma 0-5003), HAT 或 HT (Sigma H 0262, H

0137)。 (B) 仅仅含有 DMEM, 抗生素和 2-巯基乙醇的无血清培养基。
用于免疫的细胞: 用于免疫的细胞在 T-75 细胞培养烧瓶的 DMEM (见上文) 上生长至汇合, 用每烧瓶 5-10ml 的胰蛋白酶 EDTA (Cellgrow, Cat # 25-053-C1) 溶液收获。在 50ml 完全培养基中重悬从烧瓶回收的细胞, 然后通过 50ml 无菌 PBS 中进行三个循环的离心 (1000 G) 和重悬而洗涤。用悬浮于 0.5ml 无菌 PBS 中的 1×10^7 个细胞注射小鼠。
EGFR: 以 $25 \mu\text{g EGFR}/100 \mu\text{l}$ 的浓度将可溶性 EGFR 与溶于无菌 PBS 的 Ribi 佐剂 (Sigma, M 6536) 混合。用溶于无菌 PBS 的可溶性 EGFR 进行最终的尾静脉免疫。

转基因小鼠: 将小鼠饲养在过滤器笼中, 并且在融合日评估具有良好的身体状况。产生所选择的杂交瘤的小鼠是雄性 6-8 周龄的 (CMD)++; (HCo7) 11952 +; (JKD)++; (KCo5) 9272 + 基因型 (见表 1)。

表 1

基因型数据*						
小鼠	性别	出生日	基因型			
20241	雄性	9/21/99	CMD++	(HCo7) 11952+	(JKD) ++	(KCo5) 9272
20242	雄性	9/21/99	CMD++	(HCo7) 11952+	(JKD) ++	(KCo5) 9272
20243	雄性	9/21/99	CMD++	(HCo7) 11952+	(JKD) ++	(KCo5) 9272

* 括号中是各个转基因名称, 其后是随机整合的转基因的细胞系号。符号 ++ 和 + 表示纯合或半合子; 然而, 由于小鼠是使用基于 PCR 的测定进行常规筛选的, 所述测定不允许我们区分随机整合的人 Ig 转基因的杂合性和纯合性, + 符号可能给予实际上对这些元件为纯合的小鼠。

抗体: 体外和体内使用以下抗 EGFR MAbs: 2F8 (也称作 "Humax-EGFR"), 人 IgG1 抗-EGFR 抗体 (GenMab, Utrecht, The Netherlands); 产生 m225 的杂交瘤, 小鼠 IgG2a 抗-EGFR 抗体是从美国典型培养物保藏中心 (ATCC, Rockville, MD, HB-8508) 获得的; 用作不相关 IgG1 抗体的不相关的人 IgG 同种型对照 (GenMab); 用作间接免疫荧光的第二抗体 (Protos, San Francisco, CA) 的异硫氰酸荧光素 (FITC) 偶联的山羊抗小鼠 IgG (H+L) 的 $F(ab')_2$ 片段, FITC 偶联的 $F(ab')_2$ 兔- α -人 IgG (DAKO, Glostrup, Denmark)。

在补加了 10% 胎牛血清 (FBS) (Hyclone, Logan, Utah) 和 100 U/ml

青霉素和 100 U/ml 链霉素(都来自于 Gibco BRL)(pen/strep)的 DMEM (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland)中培养 2F8 杂交瘤。在补加了 15% FBS (Hyclone)和青霉素/链霉素(都来自于 Gibco BRL)的 RPMI 1640 (Gibco BRL)中培养 m225 杂交瘤。在 37 °C, 含有 5%二氧化碳的湿化气氛中保持所有细胞系。用蛋白 A 亲和层析随后通过在 HR200 柱(Pharmacia, New Jersey)上进行大小排阻而纯化人抗体。用蛋白 G 亲和层析随后通过在 HR200 柱上进行大小排阻而纯化小鼠抗体。通过十二烷基硫酸盐-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)测定的所有抗体纯度都>95%。通过胃蛋白酶或 β -巯基乙醇处理, 然后通过蛋白-A/G 纯化而制备 F(ab') 片段。通过 SDS-PAGE 测定的分离的 F(ab') 片段的纯度>95%。

细胞系: 从 ATCC(Rockville, MD, CRL-155)获得 A431, 即高度过量表达 EGFR 的表皮样癌。在补加 10%热灭活的 FBS(Hyclone), 50 μ g/ml 链霉素, 50 IU/ml 青霉素和 4 mM L-谷氨酰胺(都来自于 Gibco BRL)的 RPMI 1640 培养基(Gibco BRL)中培养细胞。细胞生长至附着时, 通过使用溶于 PBS(Life Technologies, Paisley, Scotland)的胰蛋白酶-EDTA 而使其脱离。在肿瘤模型中, 总是在对数期使用细胞。在每个实验之间对细胞检验稳定的 EGFR 表达和支原体污染。

融合程序: 从新安乐死的小鼠无菌获得脾, 并且置于培养板中的 20-30 ml 冷无血清培养基(SFM)中。去除附着的组织, 在 SFM 中洗涤脾两次。通过在组织研磨器中的 SFM 中均质化而轻轻收获脾细胞。

以 1000g 离心细胞 10 分钟, 通过将脾细胞沉淀重悬在 5ml 冰冷的 0.17 M NH_4Cl 中 2-5 分钟而裂解细胞沉淀中的红细胞。然后用 20ml SFM 稀释细胞混合物并且以 1000g 离心细胞 10 分钟。将骨髓瘤细胞收获于 50ml 的离心管中。然后通过以 1000g 离心并且重悬于 30-40 ml SFM 中共三个循环而洗涤脾细胞和骨髓瘤细胞。

细胞计数后, 以 1: 1-4: 1 的脾细胞/骨髓瘤细胞比混合脾细胞和骨髓瘤细胞。通过离心沉淀脾细胞/骨髓瘤细胞混合物, 通过吸取去除上清液。通过在 45 秒中向细胞沉淀中逐滴加入 1-2 ml PEG 溶液(Sigma # P-7181)并且轻轻使溶液混合 75 秒而进行融合。通过在 1 分钟内逐滴加入 2 ml SFM 而缓慢稀释 PEG 溶液。用另外的 2ml SFM 重复该过程, 然后使溶液静置 1 分钟。

然后在90秒中用额外的30 ml SFM缓慢稀释溶液。以1000g离心细胞10分钟并且重悬于30 Ml HAT培养基。在含有3% Origin杂交瘤克隆因子的HAT补充培养基中将融合混合物稀释至200-300 ml, 并且以 $> 200 \mu\text{l}/\text{孔}$ (约10-15板/脾)分散至96孔板中。在第7天, 通过用补加3% Origin的新鲜HT培养基替换每个孔中一半的培养基填充平板。其后用HT培养基每3-4天填充一次平板。

ELISA 试剂:

1. 磷酸盐缓冲的盐水(PBS), 无Ca和Mg的D-PBS, Hyclone D-PBS # SH30013.03, 或Sigma P 3813.
2. PBS-T (洗涤缓冲液), 含0.05% Tween 20的PBS, Sigma P-1379.
3. PBS-T加1% BSA (Sigma A 9647)。它作为封闭缓冲液和样品缓冲液。
4. ELISA板, Nunc Imuno板F96 Maxisorp 442404.
5. 抗人IgG γ 链特异性抗体, Jackson ImmunoResearch #109-006-098.
6. 碱性磷酸酶标记的山羊抗人 γ 链特异性IgG, Jackson Immuno Research #109-056-098。另一种选择是用碱性磷酸酶标记的抗人 κ , Sigma A 3813.
7. 碱性磷酸酶标记的抗人IgG1或IgG3, Southern Biotechnology # 9050-04 & 9210-04, 用于同种型特异性ELISA.
8. 对硝基苯基(pNPP), Sigma N2765, 或Sigma Fast tablet 试剂盒N-2770.
9. pNPP底物和缓冲液 - 两种选择:
 - A. 二乙醇胺缓冲液: 混合物 97 ml 二乙醇胺, Sigma D-2286, 加 0.1g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 800 ml Di水。将pH调节至9.8, 用Di水将终体积调节至1.0L。每20ml二乙醇胺缓冲液加入一片20mg的pNPP, Sigma N-2765.
 - B. 一组Sigma Fast pNPP片: 将1片缓冲剂片和1 pNPP片溶于20 ml H_2O 。
10. 使用405 nm过滤器的ELISA板读数器。
11. 表皮生长因子受体(EGFR), Sigma E 3641, 生物素标记的EGF (EGF-B), Molecular Probes E-3477.

12. 生物素标记的抗 EGFR MAbs 或人抗体。
13. 用于阴性对照的非特异性人抗体，或纯化的人 IgG1 κ ，Sigma I - I3889。
14. 自动化的 ELISA 板洗涤器：Titertek MAP C。

抗人 IgG, κ ELISA: 为筛选用于产生人 IgG, κ 的 MAbs, 用 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抗人 IgG γ 链特异性抗体, Jackson ImmunoResearch #109-006-098 在 4°C 下包被 ELISA 板过夜或更长时间。在板洗涤液中洗涤板, 并且加入 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ PBS-T 加 1%BSA。将板孵育至少 15 分钟, 并且向 ELISA 板孔中加入 $10-50 \mu\text{l}$ 细胞培养物上清液, 每个板中的一些孔中加入 IgG 作为阳性对照, 细胞培养基作为阴性对照。将板在室温下孵育 1-2 小时, 洗涤, 并且加入溶于 PBS-T 加 1%BSA 的 1: 5000 的人 κ 抗体 (Sigma A-3813)。将板在室温下孵育 1 小时, 在板洗涤液中洗涤 4 次, 加入 pNPP 底物。将板孵育 10-60 分钟, 在 ELISA 板读数器中 405 nm 下读出吸光度。

用于检测抗 EGFR 人抗体特异性的 ELISA 程序 - 抗体与 EGFR 包被的 ELISA 板的直接结合: 为证明抗 EGFR 抗体特异性结合于 EGFR, 用溶于 PBS 的浓度为 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 的 EGFR 4°C 下包被 Nunc Maxisorp 板过夜, 或室温下包被 2 小时。将板在 PBS-T 中洗涤 3 次, 加入 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ PBS-T 加 1%BSA 以封闭塑料表面的非特异性位点, 并且在加样前孵育至少 15 分钟。将待测样品的稀释液加入 PBS-T 加 1%BSA。以 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 加入样品和标准品, 在室温下孵育 1 小时, 在 PBS-T 中将板洗涤 3 次。加入 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 含 1: 3000 - 1: 5000 稀释的碱性磷酸酶标记的山羊抗人 γ 特异性抗体的 PBS-T 1% BSA。或者, 可使用碱性磷酸酶标记的抗人 γ 。将板在室温下孵育 1 小时, 洗涤 4 次, 并且加入 pNPP 底物。在 405nm 读出吸光度。

用于检测抗 EGFR 人抗体特异性的 ELISA 程序 - ELISA EGF/EGFR 阻断测定: 为了证明抗 EGFR 抗体结合于 EGFR 并且还阻断生物素标记的表皮生长因子与表皮生长因子受体 (EGFR) 的结合, 用溶于 PBS 的浓度为 $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ 的 EGFR 4°C 下包被 Nunc Maxisorp 板过夜, 或室温下包被 2 小时。将板在 PBS-T 中洗涤 3 次, 加入 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ PBS-T

加 1%BSA 以封闭塑料表面的非特异性位点，并且在加样前孵育至少 15 分钟。将待测样品的稀释液加入 PBS-T 加 1%BSA。将上清液在 PBS-T 1% BSA 中最少以 1: 3 稀释，用于加入 ELISA 板。以 100 μ l/孔加入样品和标准品，在室温下孵育 30 分钟，加入 20 μ l/孔浓度为 0.5 μ g/ml 的生物素标记的 EGF，将板孵育 1 小时（将其加入已经存在于板上的样品溶液）。或者，可以将样品孵育 1 小时，洗涤，加入 100 μ l/孔浓度为 0.1 μ g/ml 的 EGF-生物素，并且孵育 1 小时。将板洗涤 3 次，加入 100 μ l/孔含 1: 2000 稀释的链亲和素碱性磷酸酶的 PBS-T 1% BSA，并且孵育 1 小时。将板洗涤 4 次，并且加入 pNPP 底物。在 405nm 读出吸光度。

用于确定抗 EGFR 人抗体的表位特异性的竞争性 ELISA - 与商购鼠 MAbs 225, 528, AB5 和 29.1 的竞争：进行该测定以确定哪一种 MAbs 最类似于抗体 225, 528, AB5 和 29.1。MAbs 225, 528 和 AB5 阻断 EGF 与其受体结合，并且体内抑制 EGFR 的内源性酪氨酸激酶活性。MAb 29.1 是结合于 EGFR 的糖残基的非阻断性 MAb。用溶于 PBS 的浓度为 0.4 μ g/ml 的 EGFR 室温下包被板至少 2 小时，或 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜，并且用 100 μ l/孔 PBS-T 1%BSA 洗涤并封闭。倒去封闭溶液，将 100 μ l/孔 PBS-T- 1%BSA 加入板左侧的柱 1-6，同时将 1 μ g/ml (100 μ l/孔) 的未标记的小鼠 MAb 加入板右侧的柱 7-12。将板在室温下孵育 1 小时，将 25 μ l 细胞培养物上清液加入板每一半的相等位置，以便每一上清液加入一个具有 PBS-T-1% BSA 的孔和一个具有小鼠 MAb 的孔。将板孵育 1 小时，洗涤，并且加入碱性磷酸酶标记的抗人 IgG Fc 抗体。将板孵育 1 小时。洗涤板并且加入底物。在 405nm 读出吸光度。通过以下公式确定 MAb 的竞争百分比：(无竞争的 OD 上清液 - 有 MAb 竞争的 OD 上清液 / 无竞争的 OD 上清液) \times 100。

用于确定抗 EGFR 人抗体的表位特异性的竞争性 ELISA - 与生物素标记的人抗体的竞争性 ELISA：也进行竞争性 ELISA 测定以确定抗 EGFR 人抗体的特异性。用溶于 PBS 的浓度为 0.4 μ g/ml 的 EGFR 室温下包被板至少 2 小时，或 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜。用 100 μ l/孔 PBS-T 1%BSA 洗涤并封闭板。将 50 μ l (10 - 30 μ g/ml) 未标记的人抗体或小鼠 MAbs 加入

板柱顶层的孔，序贯转移 50 μ l，然后连续沿每个柱向下混合，以产生每种抗体的三倍稀释液。混合后从底层孔中弃去 50 μ l。将板孵育 1 小时，向整个板中加入 20 μ l/孔生物素化的抗 EGFR 人抗体或未标记的小鼠抗人 EGFR 抗体，以便竞争性抗体的终浓度为大约 0.1-0.2 μ g/ml。将板在室温下孵育 1 小时，洗涤，加入 100 μ l/孔链亲和素碱性磷酸酶（1:2000 在 PBS-T-BSA 中稀释）或碱性磷酸酶标记的山羊抗小鼠 IgG。将板孵育 1 小时，洗涤，并且加入底物。在 405nm 读出吸光度。

用于检测抗 EGFR 人抗体的 FACS 程序 - EGF/EGFR 阻断: 用该测定证明抗 EGFR 抗体结合于细胞表面的 EGFR，并且通过该作用阻断生物素标记的表皮生长因子 (EGF-B) 与表皮生长因子受体 (EGFR) 的结合。该基于 FACS 的方法使用表达约 10^6 EGFR 分子/细胞的人表皮癌细胞系 A431。

用于 EGFR FACS 测定的材料:

1. 在一个或多个 T-175 烧瓶中汇合的 A431 细胞 (ATCC CRL 1555)。在 DMEM 加 10 % FCS 中培养 A431 细胞。
2. 胰蛋白酶 - EDTA 溶液, Sigma T-3924。
3. 生物素标记的 EGF。制备约 5 μ g/ml 的储液, 使用 10 μ l/孔。
4. 圆底 96 孔板。
5. 无菌 OBS。
6. PBS 加 1% BSA 加 0.02 % 叠氮化钠 (FACS 缓冲液)。
7. PE 标记的链亲和素, Sigma S 3402。在 FACS 缓冲液中 1: 20 稀释。
8. PE 标记的或 FITC 标记的 FC γ 特异性抗人 IgG, Pharmingen 34164X, 34165X。
9. 用摆动桶和 96 孔板的适配器 (Beckman) 进行低速离心。
10. FACS
11. BD FACS 管。

程序: 通过胰蛋白酶 EDTA 处理收获 A431 细胞。去除组织培养烧瓶中的培养基, 用 10-20 ml 无菌 PBS 或 HBSS 短暂冲洗烧瓶。当细胞开始

从塑料表面脱离时,用 10ml 的移液管轻轻从塑料表面吸出细胞,并且产生没有太多细胞团块的单细胞悬浮液。将细胞转移至含有 20-30ml 细胞培养基(含 FBS)的 50ml 试管中,以 1000g 离心 10 分钟,通过离心并且在冷 FACS 缓冲液中重悬细胞而洗涤两次。通过尼龙网过滤细胞溶液以去除细胞团块(BD FACS 管的顶部具有用于此目的装置)。对细胞进行计数,调整体积,以便每 ml 具有 $1-5 \times 10^6$ 个细胞。以 200,000 细胞/孔将细胞分配至圆底 96 孔板中,并且以 1000g 离心约 1 分钟,然后倒去液体(细胞应该保留在孔底)。将板在冰上或 4℃ 下保持。在分开的 96 孔板中,通过从 10 μ g/ml 起始并且降低至 4.5ng/ml 而制备抗体的三倍稀释系列,从而制备 FACS 缓冲液中的抗体样品稀释液。将 10 μ l 每种抗体稀释液、同种型对照和缓冲液对照加入圆底板中。将抗体样品和对照与细胞混合,并且在冰上孵育 30 分钟。将 10 μ l 生物素标记的 EGF 加入抗体细胞溶液并且再孵育 30 分钟。通过离心并且重悬于 FACS 缓冲液中而洗涤细胞三次。加入 50 μ l/孔链亲和素 PE,混合,并且再冰上孵育 30 分钟。将细胞洗涤三次并且重悬于 50 μ l FACS 缓冲液中。将每孔的内容物转移到含有 300-400 μ l FACS 缓冲液的试管。通过 FACS 在 FL-2 通道中分析 5000-10000 个细胞。用 MCF 对抗体浓度作图。

人或动物来源的材料: A431 人表皮样癌细胞系(CRL-1555, 批号 203945, ATCC Manassas, Virginia)。胰蛋白酶 EDTA(Cellgrow Cat # 25-053-CI)。P3 X63 ag8.653 骨髓瘤细胞系: ATCC CRL 1580, 批号 F-15183。Origin-杂交瘤克隆因子(Igen 21001)。OPI 补充物(Sigma 0-5003)。胎牛血清(SH30071 批号 #s ALE10321, 和 AGH6843)来自于 Hyclone, Logan, Utah。Origen 冷冻培养基(Igen, # 210002)。

ELISA: 为了测定人抗体与 EGFR 的结合,使用了 ELISA, 其中将 EGFR (Sigma, St Louis, M) 在 96 孔微量滴定板(Greiner, Frickenhausen, Germany)上的 PBS 中以 1 μ g/ml 的浓度包被过夜。用浓度为 100 μ l/孔的 ELISA 缓冲液(PBS/. 05% Tween 20 和 1% 鸡血清(Gibco BRL)) 封闭板后,加入在 ELISA 缓冲液中稀释的单克隆抗体,并且在 37℃ 下孵育 1 小时。随后将板洗涤 3 次,并且用过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG

Fc 特异性抗体 (Jackson, West Grace, P) 37℃ 下孵育 1 小时。用 ABTS (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 对该测定显影 30 分钟。在 415nm 下用微量滴定板读数器 (Biotek, Winooski, Canada) 测量吸光度。至于阻断研究, 将板用 ELISA 缓冲液中的 50 μl 封闭试剂预孵育 10 分钟, 然后加入 50 μl 完全的人抗体。对于测定小鼠血清中的人 IgG, 在 96 孔微量滴定板 (Greiner) 中的 PBS 中用兔抗人 κ, 轻链 (DAKO) 将 ELISA 板包被过夜。用 100 μl/孔 ELISA 缓冲液 (PBS/. 05% Tween20 和 1% 鸡血清) 封闭板后, 加入在 ELISA 缓冲液中稀释的小鼠血清, 并且在 37℃ 下孵育 1 小时。随后将板洗涤 3 次, 并且用过氧化物酶标记的兔 F(ab')₂ 片段抗人 IgG (DAKO) 37℃ 下孵育 1 小时。用 ABTS (Roche) 对该测定显影 30 分钟。在 415nm 下用微量滴定板读数器 (Biotek, Winooski, Canada) 测量吸光度。

流式细胞术: 用 MAb 在 4℃ 下将过量表达 EGFR 的肿瘤细胞孵育 30 分钟。在补加了 1% 牛血清白蛋白 (Roche) 和 0, 01 % 叠氮化物的磷酸盐缓冲的盐水中洗涤 3 次。用山羊抗小鼠抗体的 FITC-偶联的 F(ab')₂ 片段或兔抗人 IgG 抗体的 FITC-偶联的 F(ab')₂ 片段进行计数 - 染色。对于抑制实验, 用 EGF 或 TGF-α 将细胞 4℃ 下预孵育 10 分钟。在 FACScan 流式细胞仪 (Becton-Dickinson, San Jose, CA) 上分析样品。

磷酸化研究: 用低血清条件 (0.5%) 处理 24 孔板 (NUNC, Kamstrup, Denmark) 中 A431 细胞的亚汇合培养物。向孔中加入不同的抗体稀释液并且在 37℃ 下和 5% 二氧化碳中孵育 30 分钟。用或不用 5 ng/ml EGF (Prepotech, Rocky Hill, NJ) 在 37℃ 下和 5% 二氧化碳中刺激细胞 5 分钟。按 Tomic et al. (Tomic et al, 1995) 所述, 用每孔 100 μl 裂解缓冲液制备细胞提取物。通过钠 SDS-PAGE 和抗磷酸酪氨酸抗体 (PY20, Transduction Laboratories, Kentucky)、山羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体 (Transduction Laboratories) 免疫印迹, 和 ECL 检测分析 50 μl A431 细胞提取物。为用 TGF-α (Prepotech, Rocky Hill, NJ) 进行刺激, 用低血清培养基 (0.5%) 处理 24 孔板 (Nunc) 中 A431 细胞的亚汇合培养物过夜。以 10 或 0 μg/ml 的固定剂量加入抗体, 并且

按上述进行孵育。用递增量的 TGF- α 刺激细胞。按上述内容处理细胞。

体外细胞生长抑制：用非放射性抑制测定评估完全的人抗体的细胞生长抑制特征。简言之，将 $100 \mu\text{l}$ $2 \times 10^4/\text{ml}$ 的 A431 细胞加入平底组织培养板中并且置于细胞培养孵育器中。2 小时后加入 $100 \mu\text{l}$ 抗体稀释液并且放回细胞培养孵育器中。将细胞孵育 6-7 天，倒去上清液，向每个孔中加入溶于 PBS 的 $100 \mu\text{l}$ 0.25% 戊二醛。室温下孵育 45 分钟后，用脱矿质水将孔洗涤两次。加入 $50 \mu\text{l}$ 溶于脱矿质水的 1% 结晶紫，并且室温下孵育 15 分钟。用脱矿质水将板洗涤两次后，在板振荡器上用 100% 甲醇使板显影 30 分钟。使用带有 650nm 参考过滤器的 550nm 过滤器，采用微量滴定板读数器测量吸光度。重复三次测量抑制。用三份特定抗体浓度的平均吸光度除以没有加入抗体的孔的平均吸光度，然后乘 100，从而确定相对细胞增殖百分比。

效应细胞分离：通过对 Repp, et al. (1991) Blood 78: 885-889 中所述进行略微修改的方法分离外周血白细胞。简言之，将用肝素抗凝的血液层叠在 ficoll 梯度上。离心后，从中间相收获效应细胞，并且通过低渗裂解去除剩余的红细胞。用 Cytospin 制剂评估高于 95 % 的分离细胞纯度。通过台盼蓝排斥确定的细胞存活率超过 95%。

ADCC 测定：在 ^{51}Cr 释放测定 (Valerius, et al. (1993) Blood, 82 : 931-939) 中评估完全的人抗体裂解肿瘤细胞的能力。分离的人白细胞用作效应细胞源。简言之，用 $100 \mu\text{Ci}$ ^{51}Cr 孵育肿瘤靶 2 小时。用培养基洗涤 3 次后，将 5×10^3 个靶细胞加入含有 $50 \mu\text{l}$ 分离的效应细胞和不同浓度敏化 MAbs 的圆底组织培养板，并且在培养基中稀释。终体积为 $200 \mu\text{l}$ ，效应细胞与靶细胞的比例 (E:T) 为 80:1。将该测定在 37°C 下孵育过夜，并且通过离心终止。在上清液中以三份测量铬释放。细胞毒性百分比用以下公式计算：

$$\% \text{特异性裂解} = \frac{\text{实验 cpm} - \text{自发 cpm}}{\text{最大 cpm} - \text{自发 cpm}} \times 100$$

通过向靶细胞中加入 ZAP-oglobin® (10 % 终浓度) 而测定最大 ^{51}Cr 释放, 并且在缺乏敏化抗体和效应细胞的条件下测量基础释放。在这些测定条件下仅仅观察到非常低水平的抗体介导的非细胞毒性 (无效应细胞) (<5% 特异性裂解)。

使用 SPR 技术进行亲和性测量: 使用 BIAcore 300 (Biacore, Upsala, Sweden) 测定抗 EGFR 抗体的结合亲和性。根据制造商的说明, 将从 Sigma 购买的由 A431 细胞纯化的 EGFR 固定在 CM5 芯片上。用不同浓度的抗体 F (ab') 片段进行测量。用 BIAevaluation 软件 (3.1 版) 测定缔合常数和解离常数。

小鼠和肿瘤模型: 从 Harlan (Horst, The Netherlands) 购买 Balb/c 裸鼠 (NuNu)。用 8 - 12 周龄的雌性小鼠进行所有描述的实验。将小鼠饲养在中心实验室动物设施 (Utrecht, The Netherlands) 中的转基因小鼠设施中, 并且通过 Utrecht 大学动物伦理委员会批准该实验。当参与实验时, 每周两次检查小鼠的毒性症状和包括活动水平、皮肤异常、腹泻和一般表现的不适。使用了充分确立的皮下 (s. c.) 肿瘤模型。简言之, 将高水平表达 EGFR 的 A431 细胞接种在小鼠右侧, 剂量为 3×10^6 个细胞。肿瘤生长至均匀, 并且可以容易通过游标卡尺测量。肿瘤体积报道为长 \times 宽 \times 高 (以 mm^3 表示。根据研究方案腹膜内注射 (i. p.) 单克隆抗体。通过流式细胞术和免疫组化在体内传代后测量肿瘤细胞的稳定 EGFR 表达。为了确定药代动力学, 用 2F8 抗体对有和无肿瘤的小鼠进行腹膜内注射。注射前和注射后 6 周每周通过尾静脉取出血样。通过人 IgG ELISA 分析样品。

统计学分析: 成组数据报道为平均值 \pm 平均值的标准误 (SEM)。组间差异通过未配对 (或适当时配对) 斯氏 t 检验进行分析。表示出显著性水平。显著性采用 $p < 0.05$ 的水平。

实施例 1 用于产生抗 EGFR 人抗体, 也称作 “HuMAbs” 的 Cmu 靶小鼠的产生

CMD 导向载体的建立

质粒 pICEmu 包含一个跨 mu 基因, 从 Balb/C 基因组 λ 噬菌体文库中获得的鼠 Ig 重链基因座的 EcoRI/XhoI 片段(Marcu et al. Cell 22: 187, 1980)。此基因组片段被亚克隆到质粒 pICEM19H 的 XhoI/EcoRI 位点(Marsh et al; Gene 32, 481-485, 1984)。包含在 pICEmu 的重链序列从 mu 内含子增强子 3' 的 EcoRI 位点向下游延伸到 mu 基因最后一个跨膜外显子下游约 1kb 的 XhoI 位点; 然而, 通过在大肠杆菌中传代, 许多 mu 转换重复区域被去除。导向载体按如下方法建立。将一个 1.3kb 的 HindIII/SmaI 片段从 pICEmu 切除并亚克隆到 HindIII/SmaI 消化的 pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA)。此 pICEmu 片段从位于 Cmu1 5' 端约 1kb 的 HindIII 位点延伸到 Cmu1 内部的 SmaI 位点。产生的质粒用 SmaI/SpeI 消化, 然后插入一个约 4kb 的从 pICEmu 得到的, 从 Cmu1 3' 的 SmaI 位点延伸到最后一个 Cmu 外显子下游的 XbaI 位点的 SmaI/XbaI 片段。产生的质粒 pTAR1 在 SmaI 位点被线性化, 插入一个 neo 表达盒。该盒包含一个在小鼠磷酸甘油激酶 (pkg) 启动子 (XbaI/TaqI 片段; Adra et al. (1987) Gene 60: 65-74) 转录控制下并包含 pkg 聚腺苷酸化位点 (PvuII/HindIII 片段; Boer et al. (1990) Biochemical Genetics 28: 299-308) 的 neo 基因。该盒从质粒 pKJ1 (Tybulewicz et al. (1991) Cell 65: 1153-1163 有描述) 得到, neo 盒作为 EcoRI/HindIII 片段被切除并亚克隆到 EcoRI/HindIII 消化的 pGEM-7Zf(+) 而产生 pGEM-7(KJ1)。Neo 盒从 pGEM-7(KJ1) 通过 EcoRI/SalI 消化被切除, 为平端, 并被亚克隆到质粒 pTAR1 的 SmaI 位点, 与基因组 Cmu 序列方向相反。产生的质粒被 Not I 线性化, 插入一个单纯疱疹病毒胸腺嘧啶激酶 (tk) 盒, 这样可以允许有同源重组的 ES 克隆富集, 如 Mansour et al. (1988) Nature 336: 348-352 的描述。该盒包含了其两端为小鼠 pgk 启动子和聚腺苷酸化位点的 tk 基因编码序列, 如 Tybulewicz et al. (1991) Cell 65: 1153-1163 的描述。产生的 CMD 导向载体包含与重链基因座总共约 5.3kb 的同源性, 并设计产生在第一个 Cmu 外显子的唯一 SmaI 位点插入 neo 表达盒的突变 mu 基因。导向载体在电穿孔到 ES 细胞之前, 用在质粒序列内部切割的 PvuI 线性化。

靶 ES 细胞的产生和分析

AB-1 ES 细胞 (McMahon, A. P. and Bradley, A., (1990) Cell 62:1073-1085) 在有丝分裂不活跃的 SNL76/7 细胞饲养层 (ibid.) 上生长, 基本如 (Robertson, E. J. (1987), Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 71-112) 所描述。线性化的 CMD 导向载体通过 Hasty 等描述的方法 (Hasty, P. R. Et al. (1991) Nature 350: 243-246) 被电穿孔到 AB-1 细胞中。被电穿孔的细胞以 $1-2 \times 10^6$ 个细胞/平皿的密度被平铺到 100mm 的平皿。24 小时后, 将 G418 (200mg/ml 活性成分) 和 FIAU ($5 \times 10^{-7}M$) 加入培养基, 抗药克隆允许培养 8-9 天。挑选克隆, 用胰蛋白酶消化, 分为两部分, 并进一步扩展。然后从每个克隆得到的细胞的一半被冷冻, 另一半为进行载体和靶序列之间的同源重组而进行分析。

DNA 分析通过 DNA 印迹杂交执行。按 Laird 等描述的方法 (Laird, P. W. et al., (1991) Nucleic Acids Res. 19: 4293) 将 DNA 从克隆中分离。分离的基因组 DNA 用 SpeI 消化并用一个与 mu 内含子增强子和 mu 转换区之间的序列杂交的 915bp 的 SacI 片段即探针 A 探测。探针 A 检测野生型基因座的一个 9.9kb 的 SacI 片段和 mu 基因座的一个与 CMD 导向载体同源重组 (neo 表达盒包含一个 SpeI 位点) 的 7.6kb 的鉴别带。在 DNA 印迹分析筛选的 1132 个抗 G418 和 FIAU 克隆中, 3 个显示出了提示 mu 基因座同源重组的 7.6kb 的 Spe I 带。用酶 BglII, BstXI 和 EcoRI 进一步消化这 3 个克隆, 证明载体被同源性整合到 mu 基因中。当与探针 A 杂交后, 用 BglII, BstXI 或 EcoRI 消化的野生型 DNA 的印记分别产生 15.7, 7.3 和 12.5kb 的片段, 而靶 mu 等位基因的存在分别由 7.7, 6.6, 和 14.3kb 的片段提示。由 SpeI 消化检测的所有 3 个阳性克隆表现出预期的鉴别 neo 盒插入 Cmu1 外显子的 BglII, BstXI 和 EcoRI 限制片段。

具有突变 mu 基因的小鼠的产生

将这三个编号为 264, 272 和 408 的靶 ES 克隆融化并按 Bradley 在 Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: a Practical Approach (E. J. Robertson, ed.) Oxford: IRL Press, p. 113-151)

中描述的方法注射入 C57BL/6J 胚胎。将被注入的胚胎转移到假孕雌性小鼠中产生表现从引入 ES 细胞和宿主胚胎细胞衍生的细胞混合的嵌合小鼠。ES 细胞对嵌合体的贡献可以由黑色 C57BL/BJ 背景上的从 ES 细胞系衍生的灰色皮毛颜色数量用肉眼估计。克隆 272 和 408 只产生低百分比的嵌合体（即低百分比灰色色素），但克隆 264 产生高百分比的雄性嵌合体。这些嵌合体与 C57BL/J6 雌鼠杂交并产生灰色后代，提示 ES 细胞基因组的种系转移。对靶 mu 基因的筛选是通过对尾部解剖得到的 DNA 用 BglI 消化进行 DNA 印迹分析而执行的（如前面所描述的 ES 细胞 DNA 分析）。约 50% 的灰色后代除了野生型的 15.7kb 带，也表现出 7.7kb 的杂交 BglI 带，证明了靶 mu 基因的种系转移。

mu 基因功能性灭活的转基因小鼠的分析

为判断 neo 盒插入到 Cm μ 1 是否灭活了 Ig 重链基因，将一只克隆 264 的嵌合体与一只 JHD 突变纯合小鼠杂交，JHD 突变由于去除 JH 基因段而导致重链表达失活（Chen et al, (1993) Immunol. 5:647-656）。产生四只灰色后代。从 1 月龄的这些动物中得到血清并用 ELISA 测定鼠 IgM 的存在。四只后代中的两只完全缺失 IgM（见表 2）。从尾部解剖得到的 DNA 用 BglI 消化并与探针 A 杂交，以及通过用 StuI 消化并与一个 475bp 的 EcoRI/StuI 片段（ibid）杂交，DNA 印迹分析测定的四只动物的基因型证明，不能表达血清 IgM 的动物重链基因座中的一个等位基因有 JHD 突变，另一个有 Cm μ 1 突变。JHD 突变的杂合小鼠显示野生型水平的血清 Ig。这些资料证明 Cm μ 1 突变灭活 mu 基因的表达。

表 2

小鼠	血清IgM (mg/ml)	IgH链基因型
42	<0.002	CMD/JHD
43	196	+/JHD
44	<0.002	CMD/JHD
45	174	+/JHD
129 x BL6 F1	153	+/+
JHD	<0.002	JHD/JHD

表 2 表示由 ELISA 检测的, 有 CMD 和 JHD 突变 (CMD/JHD) 的小鼠, JHD 突变杂合子小鼠 (+/JHD), 野生型 (129SV × C57BL/6J) F1 小鼠 (+/+) 及 B 细胞缺陷 JHD 突变纯合小鼠 (JHD/JHD) 的血清 IgM 水平。

实施例 2 HC012 转基因小鼠的产生

HC012 人重链转基因

HC012 转基因通过共同注射 80kb 的 pHC2 插入片段 (Taylor et al., 1994, Int. Immunol., 6: 579-591) 和 25kb 的 pVx6 插入片段产生。质粒 pVx6 按如下方法建立。

一个包含种系人 VH1-18 (DP-14) 基因以及约 2.5kb 的 5' 侧翼和 5kb 的 3' 侧翼基因组序列的 8.5kb 的 HindIII/SalI DNA 片段被亚克隆到质粒载体 pSP72 (Promega, Madison, WI) 产生质粒 p343.7.16。一个包含种系人 VH5-51 (DP-73) 基因以及约 5kb 的 5' 侧翼和 1kb 的 3' 侧翼基因组序列的 7kb 的 BamHI/HindIII DNA 片段被克隆到基于 pBR322 的质粒克隆载体 pGP1f (Taylor et al. 1992, Nucleic Acids Res. 20: 6287-6295) 产生质粒 p251f。从 pGP1f 衍生的一个新克隆载体 pGP1k (SEQ ID NO: 13) 被 EcoRV/BamHI 消化并与一个包含种系人 VH3-23 (DP-47) 基因以及约 4kb 的 5' 侧翼和 5kb 的 3' 侧翼基因组序列的 10kb 的 EcoRV/BamHI DNA 片段连接。产生的质粒 p112.2RR.7 被 BamHI/SalI 消化并与 p251f 的 7kb 的纯化 BamHI/SalI 插入片段连接。产生的质粒 pVx4 用 XhoI 消化并与 p343.7.16 的 8.5kb 的 XhoI/SalI 插入片段连接。

获得了一个 VH1-18 基因与另外两个 V 基因方向相同的克隆。然后这个称为 pV × 6 的克隆被 NotI 消化, 按 Hogan 等的描述 (B. Hogan et al., *Manipulating the Mouse embryo, A Laboratory Manual*, 2nd edition, 1994, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY), 纯化的 26kb 插入片段与纯化的 pHC2 的 80kb NotI 插入片段以 1:1 的摩尔比共同注射到半天的 (C57BL/6J × DBA/2J) F2 胚胎原核中。从注入的胚胎发育的小鼠建立了三个包含从 Vx6 和 HC2 得到的序列的独立转基因小鼠系。这些系被指定为 (HC012) 14881, (HC012) 15083, (HC012) 15087。然后将这三个系的每一个与包含例 1 中描述的 CMD 突变、JKD 突变 (Chen et al. 1993, *EMBO J.* 12: 811-820) 和 (Kco5) 9272 转基因 (Fishwild et al. 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845-851) 的小鼠杂交。产生的小鼠在破坏内源性小鼠重链和κ轻链基因座为纯合的背景下表达人重链和κ轻链转基因。

实施例 3 抗 EGFR 的人单克隆抗体的产生

用两株不同的小鼠产生 EGFR 反应性人单克隆抗体。株 (CMD) ++; (JKD) ++; (HCo7) 11952+/++; (KCo5) 9272+/++ (此处也称作“HC07 小鼠”) 和株 (CMD) ++; (JKD) ++; (HCo12) 15087+/++; (KCo5) 9272+/++ (此处也称作“HC012 小鼠”)。这些株的每一个对于内源性重链 (CMD) 和 κ 轻链 (JKD) 基因座的破坏都是纯合的。两株也都含有人 κ 轻链转基因 (HCo7), 各个动物对插入 #11952 是半合子或纯合的。两株的区别在于所使用的人重链转基因。小鼠对 HC07 或 HC012 转基因是半合子或纯合的。CMD 突变在上述实施例 1 中描述。(HCo12) 15087 小鼠的产生描述于实施例 2。JKD 突变 (Chen et al. 1993, *EMBO J.* 12: 811-820) 和 (KCo5) 9272 (Fishwild et al. 1996, *Nature Biotechnology* 14: 845-851) 以及 (HCo7) 11952 小鼠描述于美国专利 Nos: 5, 770, 429 和 5, 545, 806 (Lonberg & Kay, 6/23/98)。

所使用的免疫方案列于下表 3。用 A431 细胞免疫小鼠两次, 然后用 Ribi 佐剂中的可溶性抗原免疫小鼠。第三次免疫后通过 ELISA 测定 EGFR 特异性血清滴度。融合前, 进行三次不同的免疫, 完成最终的加强。包括用 10 μg 溶于 50 μl PBS 的抗原通过尾静脉进行两次或三次序贯静脉内 (iv) 加强, 或用 25 μg 溶于 Ribi 佐剂的 EGFR 进行两次

序贯腹腔内 (i. p.) 加强 (见表 3)。在融合中所使用的三只小鼠是包括 HCo7 和 HCo 12 基因型的更大的小鼠队列的一部分。

免疫方案：表 3

免疫方案								
			ELISA	EGFR	ELISA		EGFR	
	A431 细胞	A431 细胞	滴度	溶于 Ribi ip	滴度	融合	溶于 Ribi ip	融合
小鼠	第 1 天	第 20 天	第 30 天	第 33 天	第 43 天	第 46 天	第 50 天	第 53 天
20241	2×10^6	1×10^7	0	25 μ g	4050		25 μ g	Ribi 2 \times 25 μ g***
20242	2×10^6	1×10^7	0	25 μ g	4050		25 μ g	2iv \times 25 μ g*
20243	2×10^6	1×10^7	450	25 μ g	12150	3iv \times 10 μ g*		
*第 4, 3 和 2 天 iv 注射溶于 PBS 的 EGFR (10 μ g)								
**第 4 和 3 天 iv 注射溶于 PBS 的 EGFR (10 μ g)								
***第 4 天 ip 注射溶于 Ribi 的 EGFR (10 μ g)								

用于前两次注射的免疫策略，即 $2 - 10 \times 10^6$ 个活 A431 细胞 i. p.，得到不佳的抗 EGFR 滴度 (见表 2)。然而，当用溶于 Ribi 佐剂的 25 μ g/小鼠可溶性 EGFR 免疫这些小鼠三次时，血清滴度增加 30 倍以上。这些结果明确证明，在细胞表面表达大量 EGFR 的细胞在激发初次免疫应答方面非常有效，该初次免疫应答用仅仅一剂溶于佐剂的纯化抗原就显著增强。

用 10 μ g 溶于 PBS 的可溶性 EGFR 在第 4, 3 和 2 天对小鼠 20243 进行 iv 尾静脉加强，从而完成融合前的最终加强。可溶性 EGFR 中的 Triton X-100 导致对小鼠尾的刺激。因此，为减少刺激的可能性，小

鼠 20242 仅仅在第 4 和 3 天接受可溶性 EGFR 的两次 i. v. 静脉加强，并且小鼠 20241 在第 4 和 3 天接受溶于 Ribi 佐剂中的 25 μ g EGFR 的两次 i. p. 免疫。这三次融合得到 46 种人 γ , κ 抗原阳性杂交瘤（见表 4）。接受佐剂 i. p. 加强的小鼠 20241 产生 35 种抗原特异性人 γ κ 抗体。

表 4

小鼠	γ κ +	γ κ +	γ 1 κ +	γ 3 κ +
		EGFR+	EGFR+	EGFR+
20243	120	14	13	1
20242	35	2	2	0
20241	*	30	28	2

实施例 4 杂交瘤制备

将 P3 X63 ag8.653 骨髓瘤细胞系 (ATCC CRL 1580, 批号 F-15183) 用于融合。将原始的 ATCC 管瓶解冻并且铺展在培养物中。从该铺展物中制备冷冻管瓶的储液。融合前 1-2 周将一个新管瓶中的细胞解冻。

用含有 10% FBS, 青霉素-链霉素 (Sigma, P-7539) 和 5.5×10^{-5} M 2-巯基乙醇 (GibcoBRL, 21985-023) 的高葡萄糖 DMEM (Mediatech, Cellgro # 10013) 培养 A431 细胞和骨髓瘤细胞。向杂交瘤生长培养基中加入额外的培养基补充物, 包括: 3% Origin-杂交瘤克隆因子 (Igen, 21001), OPI 补充物 (Sigma, O-5003), 1.1×10^{-3} M 草酰乙酸, 4.5×10^{-4} M 丙酮酸钠, 和 24 国际单位/L 牛胰岛素, HAT (Sigma, H 0262) 1.0×10^{-4} M 次黄嘌呤, 4.0×10^{-7} M 氨基喋呤, 1.6×10^{-5} M 胸苷, 或 HT (Sigma, H0137) 1.0×10^{-4} M 次黄嘌呤, 1.6×10^{-5} M 胸苷。

从 Hyclone, Logan, Utah 获得表征的胎牛血清 (SH30071 批号 #s AJE10321 和 AGH6843)。无血清培养基仅仅含有 DMEM, 抗生素和 2-巯基乙醇。

来自于所有三只小鼠的脾大小正常, 并且产生约 $2 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ 个脾细胞。融合脾细胞。

融合后 7-10 天进行人 IgG κ 抗体的起始 ELISA 筛选。在可溶性

EGFR 包被的 ELISA 板上筛选人 IgG, κ 阳性孔。将抗原阳性杂交瘤转移到 24 孔板上并且最终转移至组织培养烧瓶中。通过有限稀释亚克隆 EGFR 特异性杂交瘤以确定单克隆性。通过将细胞冷冻于 DMEM 10% FBS 加 10% DMSO (Sigma, D2650) 或 Origen 冷冻培养基 (Igen, # 210002) 中保存几个发育阶段的抗原阳性杂交瘤。在 -80°C 或在 LN_2 中储存细胞。

随后评估最初的 EGFR 特异性杂交瘤的表位特异性及它们阻断 EGF 结合于 EGFR 受体的能力。以前已经证明了小鼠单克隆抗 EGFR 抗体 225 和 528 结合于 EGFR, 阻断 EGF 与 EGFR 的结合, 并且在动物和人研究中是抗癌免疫治疗剂。因此, 以竞争性 ELISA 形式使用这些抗体和非阻断性抗体, 从而鉴定具有免疫治疗特征的人抗体。

实施例 5 结合测定

用 Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Sweden) 测定对杂交瘤 2F8 的结合亲和性。按照制造商的说明, 将购自 Sigma 的从 A431 细胞纯化的 EGFR 固定在 CM5 芯片上。抗体 2F8 的平衡常数 (K_A) 为 $5.47 (\pm 0.52) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 。

实施例 6 竞争性 ELISA 测定

在 24 孔板中建立抗原阳性杂交瘤之后立即将竞争性 ELISA 测定用作起始的定量测定。概言之, 强竞争 (80-100%) 表示抗体结合于相同表位或紧邻于竞争性抗体的抗原区。小于 50% 的较弱竞争表明抗体及其竞争剂结合于不紧邻的抗原区。用来自于未克隆杂交瘤的上清液进行起始测定, 其中的许多含有一种以上杂交瘤/孔。用最初的孔的亚克隆进行随后的测定。图 1 和图 2 表示 (图 1 和图 2 中的数据是基于与 MA b 225 的竞争程度而排列的), 即使使用粗细胞培养物上清液, 可以鉴定抗体与 225 和 528 抗体结合于相似或相同的表位。从该实验中可以看出, 来自于小鼠 20241 或来自于小鼠 20242 和 20243 的抗体的竞争性结合模式中的不同分布。例如, 来自于 #20241 小鼠的前 7 种抗体 (图 1) 与 MA b 225 和 528 强烈竞争。来自于 20241 的其余抗体与 225 和 528 抗体中度或微弱竞争。来自于 20242 和 20243 小鼠的 5 种抗体 (1H6, 2F8, 1A8, 5C5, 和 8E1) 表现出与抗体 225 的强竞争, 与 MA b 528 无竞

争或微弱竞争(图2)。来自于小鼠20242和20243的抗体2F6, 8A12, 5F12, 6B3和6D9与MAb 225和528竞争, 但与225抗体的竞争更强。来自于这些小鼠的其它抗体不与商购MAbs竞争或微弱竞争。

用亚克隆的细胞产生的纯化抗体证实了这些起始的竞争性ELISA结果。图3和4表示, 抗体5F12和6B3与MAb 225和528强烈竞争, 并且证明彼此互相竞争。该数据表明, 这些抗体结合于相同表位或225或528结合位点紧邻的EGFR区。抗体2F8与MAb 225中度竞争, 并且不与抗体528显著竞争(图3和4)。然而, 抗体2F8, 6B3和5F12表现出强交叉竞争。该数据表明, 抗体2F8与225和528抗体结合于不同的表位, 并且结合于HuMAbs 6B3和5F12所结合的表位附近或重叠的EGFR受体区。抗体2A2和6E9不与任一种MAb竞争, 并且结合于与225和528抗体MAbs的结合位点无关的EGFR表位(图3和4)。

实施例7 EGF/EGFR 阻断测定

在EGF/EGFR阻断测定中进一步评估抗原阳性亚克隆。这些测定包括与MAb 225和/或528强烈竞争的抗体亚克隆, 以及与225或528微弱竞争或无竞争的抗体亚克隆。将一些抗体铺展在培养基中, 并且通过蛋白A层析纯化。图5和6表示抗体2F8, 5F12和6B3在ELISA中是225抗体的中度至强竞争剂, 是EGF与EGFR结合的强阻断剂。这在以ELISA形式进行的测定中是很明显的或通过人A431表皮样癌细胞上的FACS而很明显。在两种测定中, 人抗体与MAb 22效果相同或更佳。抗体2F8, 5F12, 6B3和6E9在A431细胞表面上也具有相似的结合特征(图7)。

体外EGF/EGFR阻断和ELISA竞争研究证明, 2F8, 5F12和6B3抗体与已经证明是免疫治疗剂的其它的抗EGFR鼠和人抗体具有相似特性(Sato, et al. (1983) Mol. Biol. Med. 511-529; Gill, et al. (1984) J. of Biol. Chem. 259 (12): 7755-7760)。2F8抗体在各种评估中总体上相当于6B3和5F12, 或比其更佳。

实施例8 用EGF受体的人单克隆抗体抑制EGF/TGF- α 结合于EGF受体

用流式细胞术, ELISA, 和配体诱导的自磷酸化的抑制而进行抑制研究。鼠MAbs 225或525用作阳性对照。将一种不相关的人IgG同种

型对照用作同种型对照。选择一种单一的人抗体 2F8 用于所有的其它研究。该抗体在此处也称作 "Humax-EGFR™"。图 8 表示 EGF 以浓度依赖性方式阻断 2F8 的能力。2F8 和 m225 阻断至相同程度，而 EGF 的阻断能力较低。

图 9 进一步表明 2F8 的阻断能力，它有效抑制 EGF 和 TGF- α 结合于 A431 细胞（来源于卵巢表皮样癌，并且在其表面表达 1×10^6 以上 EGFR 分子的细胞）。使用流式细胞仪分析来测定对 2F8 结合 A431 细胞的抑制。在加入 2F8 前用 5（空心柱）或 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ （实心柱）配体预孵育细胞。没有配体的抗体结合（PBS 组）设定为 100%。这些结果表明，2F8 与配体在 EGFR 上的相同位点附近或在相同位点结合。

实施例 9 用 EGF 受体的人单克隆抗体抑制肿瘤细胞激活

为评估 2F8 抑制肿瘤细胞激活的能力，检验了 2F8 对 EGF 触发的细胞应答，如内在酪氨酸激酶活性和伴随的细胞增殖的激活。EGF 或 TGF- α 结合于 EGFR 之后的最先发生的事件之一是诱导受体的自磷酸化。与 A431 细胞一起孵育 EGF 导致 EGFR (M: 170,000) 的酪氨酸磷酸化（图 10A）。尽管 2F8 本身不激活受体激酶活性，该抗体以剂量依赖性方式阻断 EGF 触发的 EGFR 酪氨酸磷酸化，在 16.6 nM 的浓度下具有完全抑制（抗体：EGF 摩尔比，20: 1，图 10A）。用抗体和 TGF- α 处理细胞，表明 2F8 在 66 nM 的浓度下完全阻断酪氨酸磷酸化（抗体：TGF- α 摩尔比，7, 3: 1，图 10B）。

EGF/TGF- α 与受体的结合导致细胞激活，反映于细胞增殖。因此，评估了 2F8 对肿瘤细胞（A431, MDA-MD-468 和 HN5 细胞）生长的抑制作用。在没有外源性 EGF 存在下进行这些实验。小鼠抗体用作对照。Humax-EGFR 以浓度依赖性方式抑制 A431 细胞生长，最大抑制 50%，该水平相似于小鼠抗体 225 所获得的水平（图 14）。对照抗体对细胞增殖无作用（图 14）。用两种其它细胞系以相似水平也获得了生长抑制（HN5 和 MDA-MB468, B 和 C）。由于没有向培养物中加入外源性 EGF，这些结果表明 2F8 阻断自分泌刺激，并因此抑制自分泌 EGF/TGF- α 诱导的肿瘤细胞激活的能力。

实施例 10 EGF 受体的人单克隆抗体诱导 ADCC

ADCC 是由抗体识别肿瘤细胞所触发的强效免疫效应机制。为了评估人 PMN 细胞在 2F8 存在下杀灭 A431 细胞, 用 ^{51}Cr 加载细胞, 随后用抗体和效应细胞 (PMN) 孵育过夜。孵育后, 测量铬释放。如图 14 所示, 2F8 能够使用人 PMN 诱导抗 A431 细胞的 ADCC。2F8 能够介导 PMN 诱导的 45% 的 A431 靶细胞的裂解, 该比例高于用 MAb425 所观察到的结果 (图 14)。

重要的是, 尽管能够募集免疫效应细胞和诱导 ADCC, 2F8 不能诱导补体介导的肿瘤细胞裂解。

实施例 11 EGF 受体的人单克隆抗体防止肿瘤形成

为表明 HuMAb 2F8 防止无胸腺鼠模型中肿瘤形成的能力, 在第 0 天用 $200\ \mu\text{l}$ PBS 中的 3×10^6 个肿瘤细胞对每组 6 只的各组小鼠进行肋腹皮下注射。随后, 在第 1 天 ($75\ \mu\text{g}/200\ \mu\text{l}$), 第 3 天 ($25\ \mu\text{g}/200\ \mu\text{l}$), 和第 5 天 ($25\ \mu\text{g}/200\ \mu\text{l}$) (箭头) 用 HuMAb 2F8 (实心正方形) 腹膜内注射小鼠, 用腹膜内注射人 IgG1- κ MAb 作为对照 (空心圆形)。数据表示为平均肿瘤体积 + SEM, 并且表示产生相似结果的 3 次实验。

图 14 表示与鼠抗 EGFR MAb (m225) 相比, 用 HuMAb 2F8 清除建立的 A431 肿瘤异种移植物。在第 0 天用 $200\ \mu\text{l}$ PBS 中的 3×10^6 个肿瘤细胞对小鼠进行肋腹皮下注射。在第 10 天, 将小鼠随机分配至治疗组, 并且在第 12 天 ($75\ \mu\text{g}/200\ \mu\text{l}$), 第 14 天 ($25\ \mu\text{g}/200\ \mu\text{l}$), 和第 16 天 ($25\ \mu\text{g}/200\ \mu\text{l}$) (箭头) 用 HuMAb 2F8 (实心正方形, 2F8 短期) 或鼠抗-EGFR MAb 225 (实心三角形, m225 短期) 进行治疗。此外, 包括第 12 天接受 $75\ \mu\text{g}/200\ \mu\text{l}$ HuMAb 2F8 或 m225, 继续在第 14, 16, 19, 22, 26, 29, 33, 36 和 40 天接受 $25\ \mu\text{g}/200\ \mu\text{l}$ HuMAb 2F8 或 m225 的各组 (空心正方形, 2F8 长期; 空心三角形, m225 长期)。数据表示为平均肿瘤体积 + SEM, 并且表示产生相似结果的 3 次实验。黑色箭头表示短期治疗的治疗天数, 空心箭头表示长期治疗的治疗天数。

等同方案

本领域的技术人员将认识到, 或可以用常规实验确定这里描述的本

发明的特定实施方案的许多等同方案。这些等同方案将包含在下列权利要求的范围内。

引入参考

在此引用的所有专利，未授权的专利申请和其它文献在此全文引入作为参考。

序列表

<110> Genmab, Inc. et al.

<120> 表皮生长因子受体(EGFR)的人单克隆抗体

<130> GMI-020PC

<150> US 60/298,172

<151> 2001-06-13

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 375

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

```
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tctctgtcag cgtctggatt caccttcagt acctatggca tgcaactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatgggatg atggaagtta taaatactat 180
ggagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatggt 300
attactatgg ttcggggagt tatgaaggac tactttgact actggggcca gggaaccctg 360
gtcaccgtct cctca 375
```

<210> 2

<211> 125

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

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

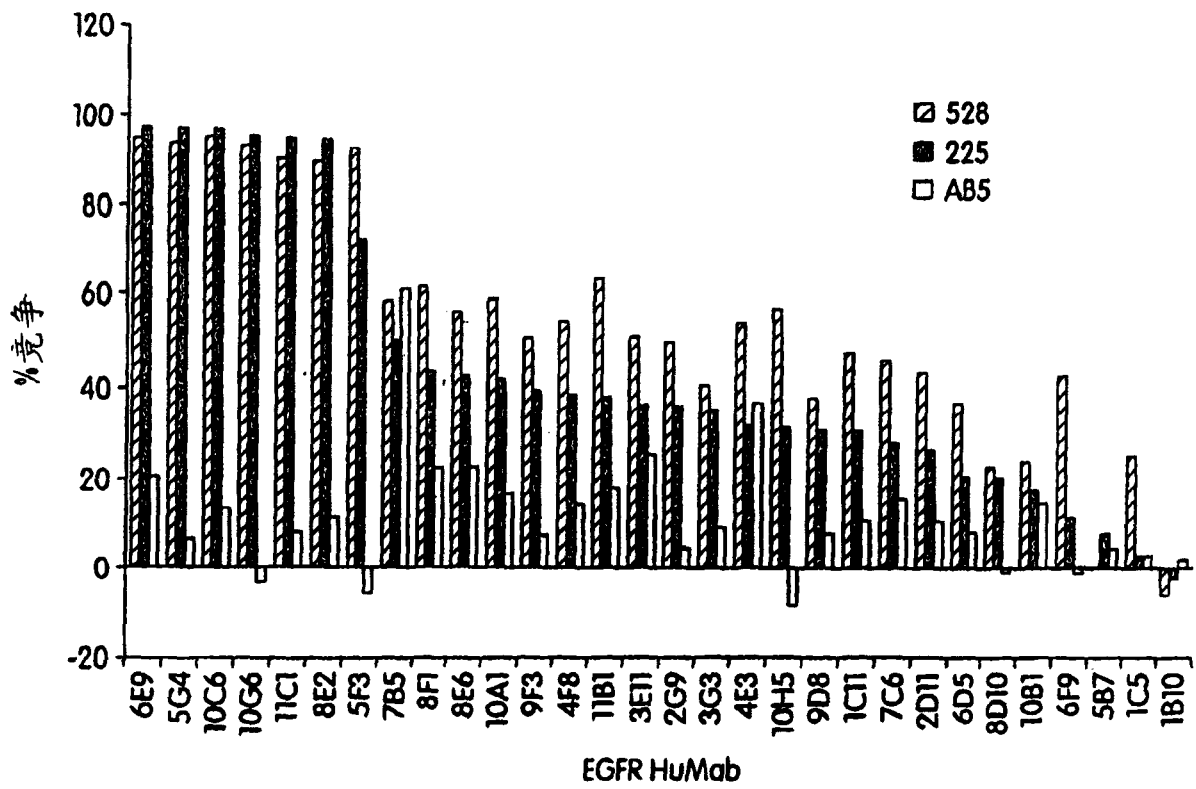



图 1

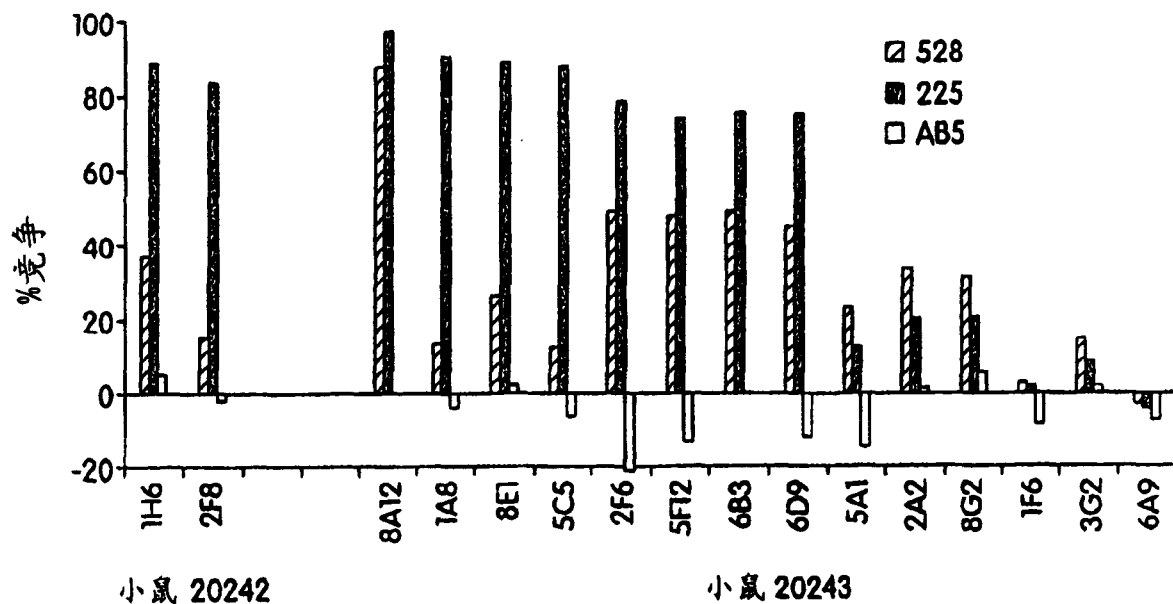


图 2

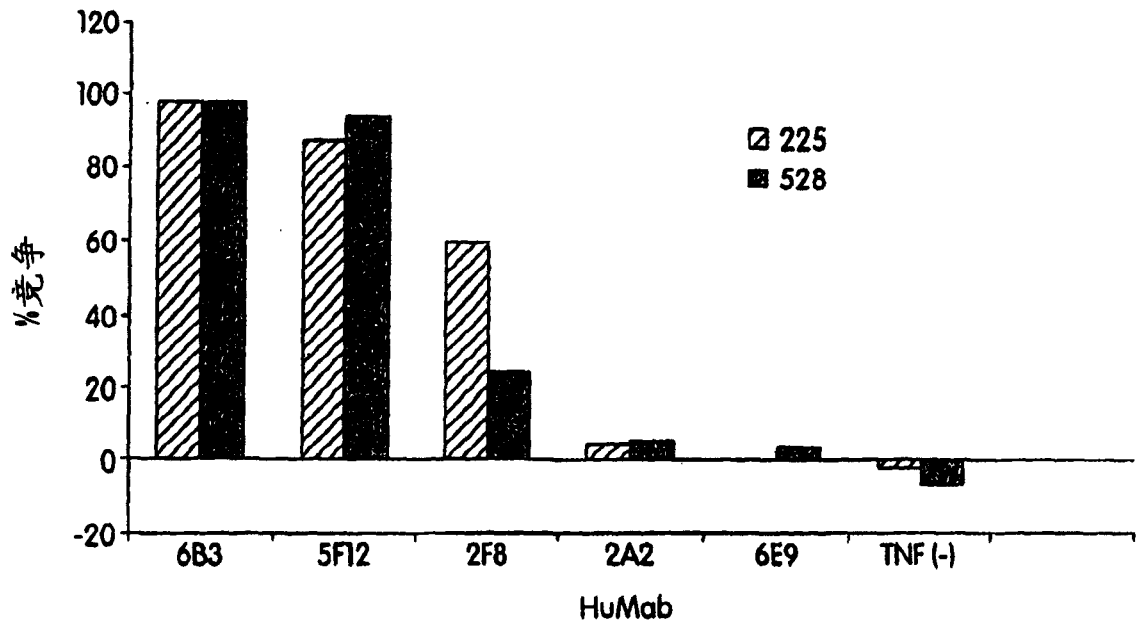


图 3

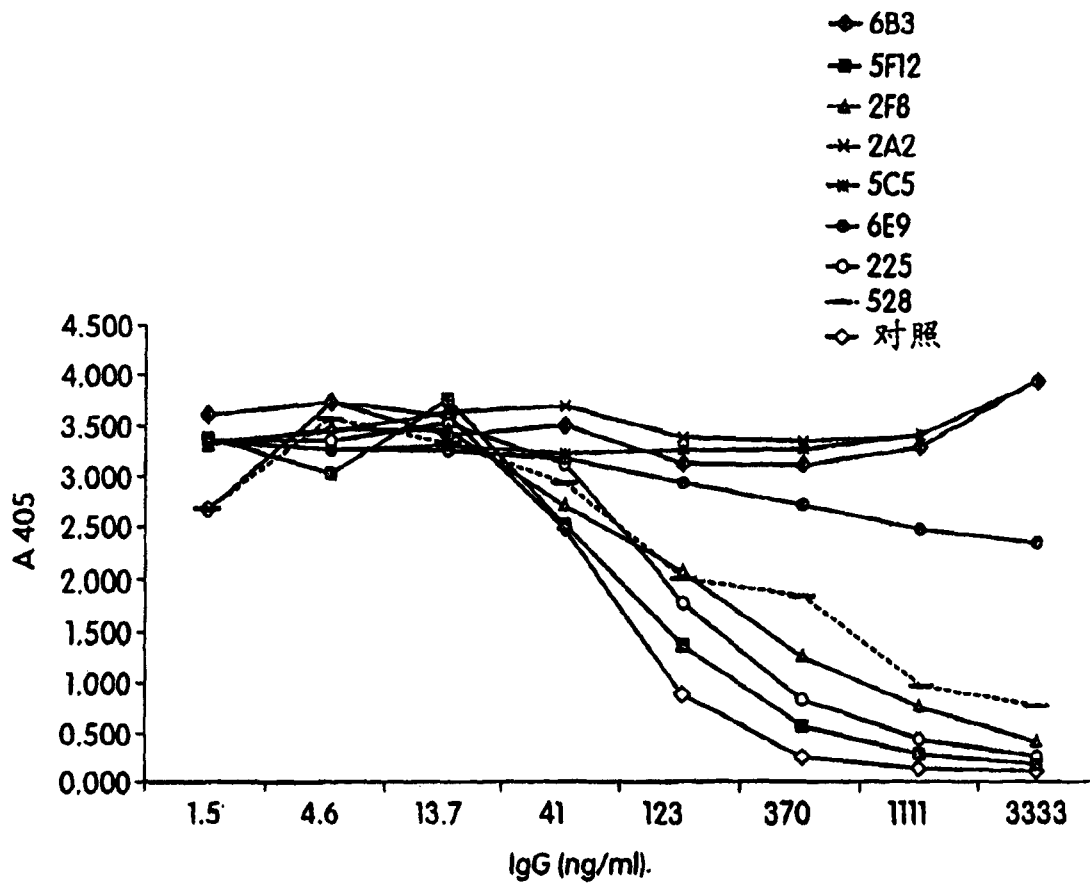


图 4A

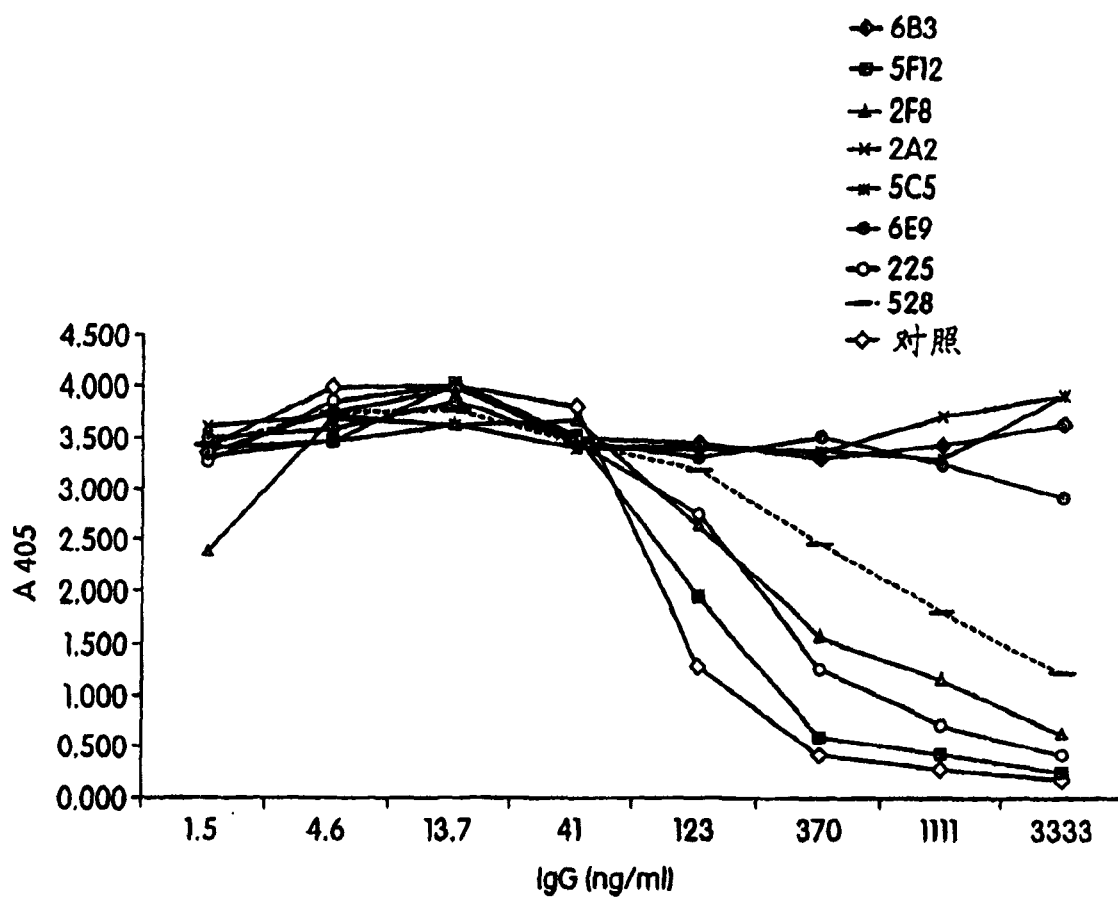


图 4B

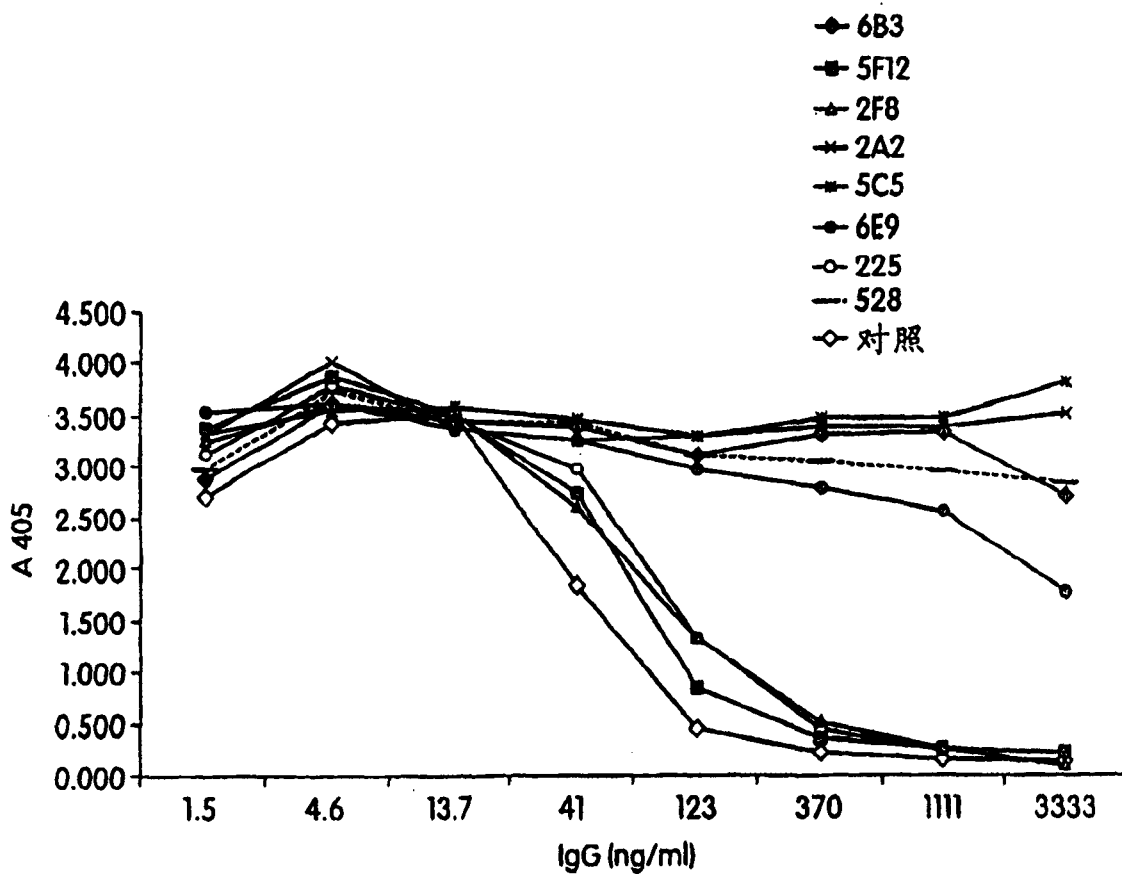


图 4C

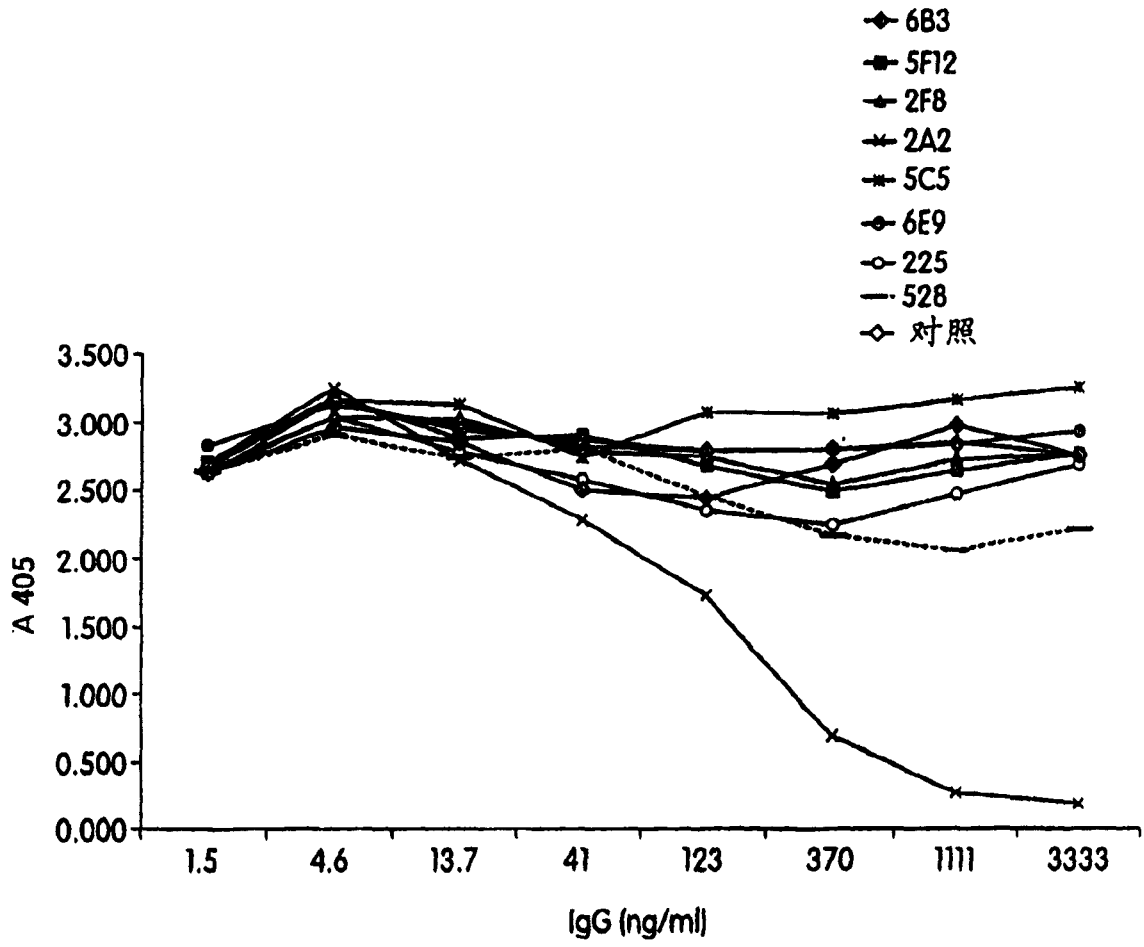


图 4D

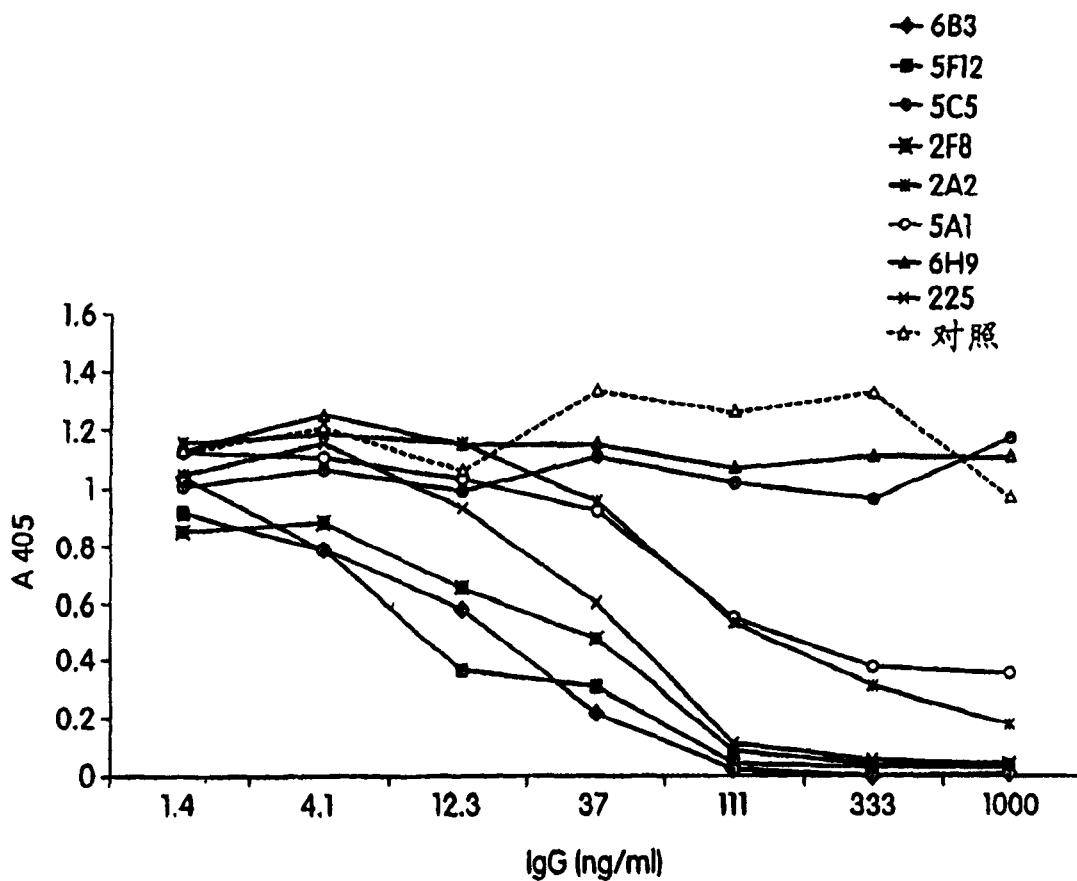


图 5A

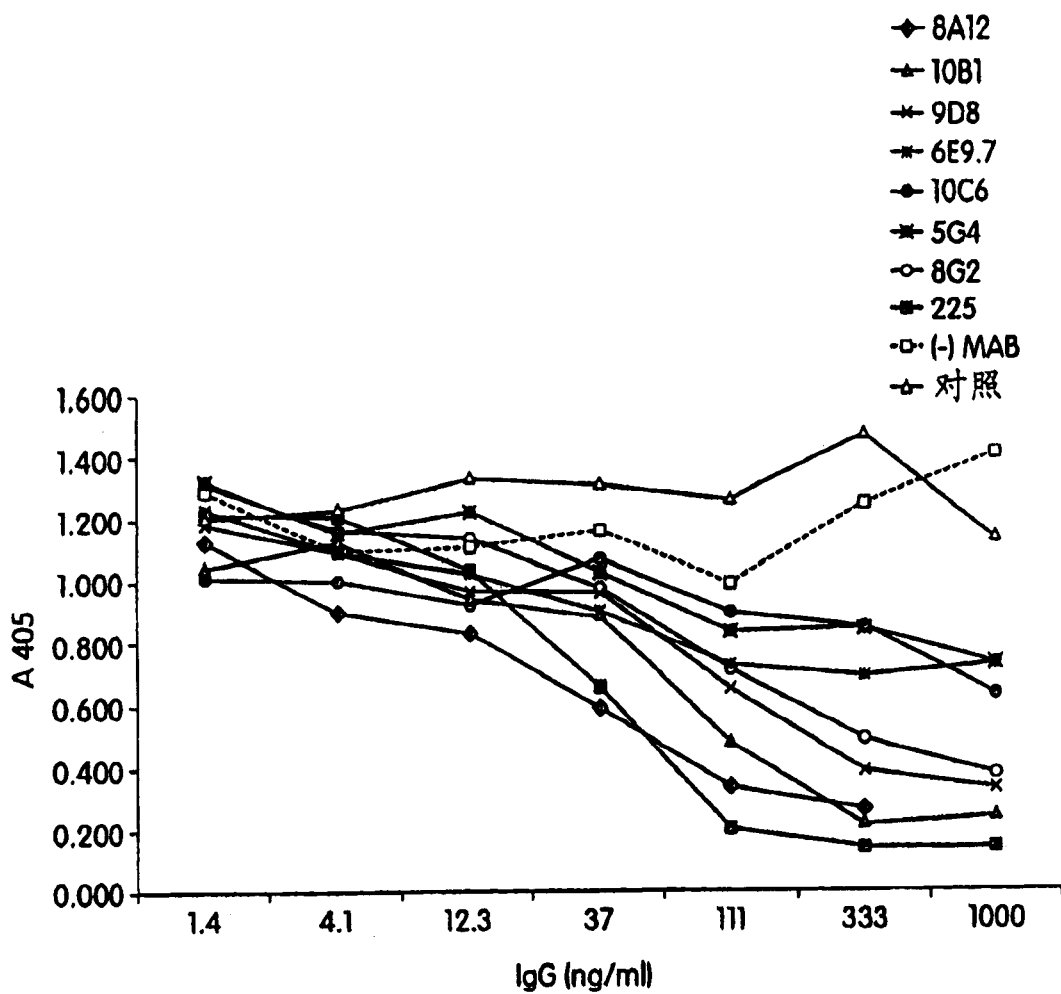


图 5B

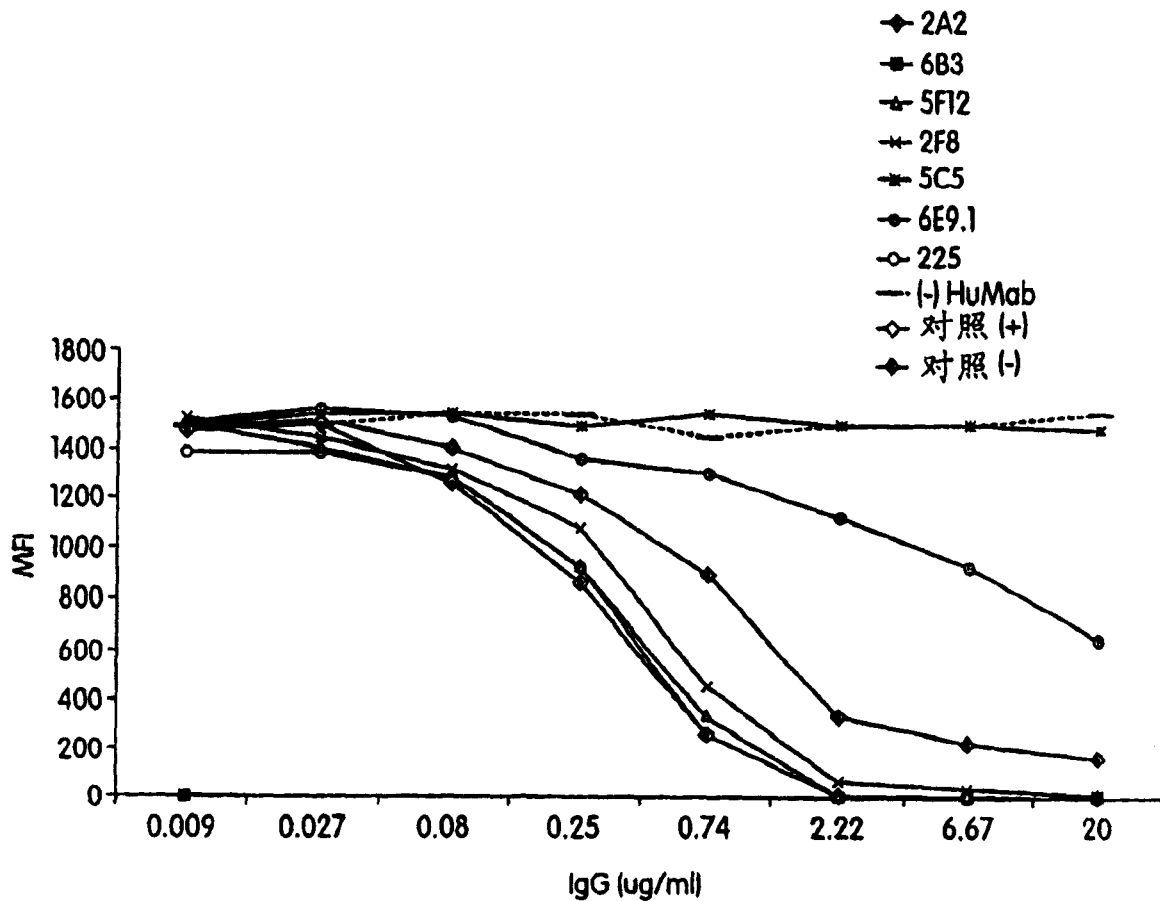


图 6

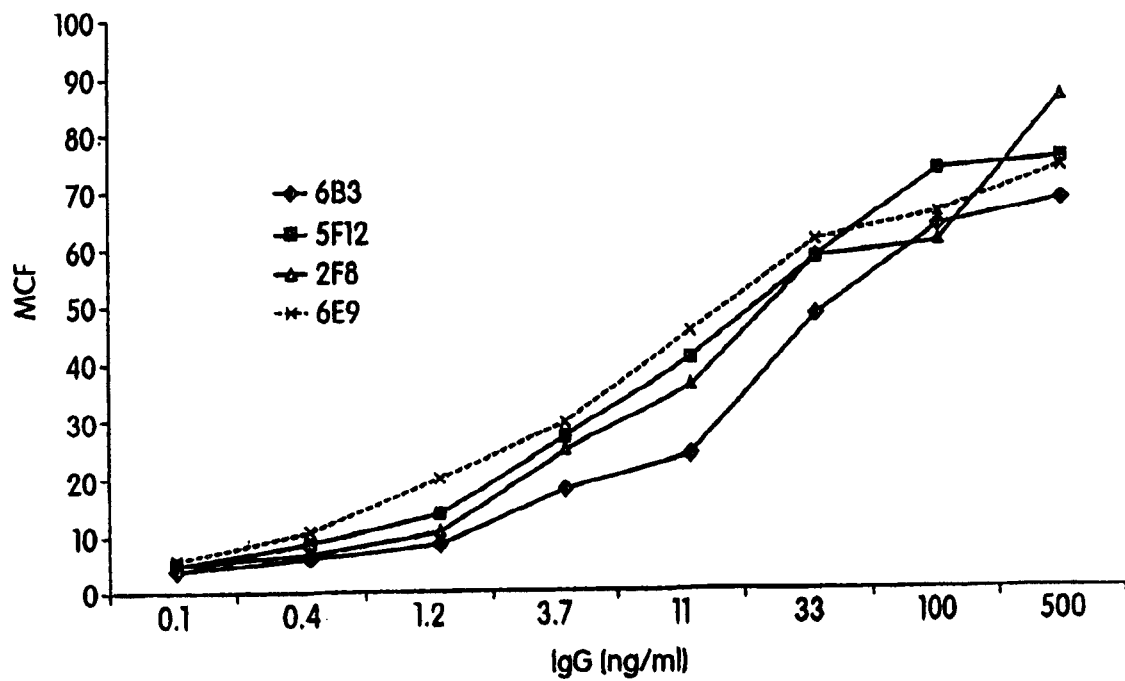


图 7

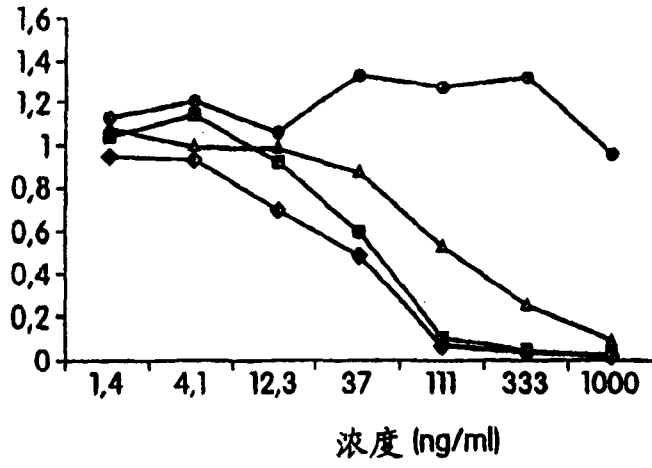


图 8

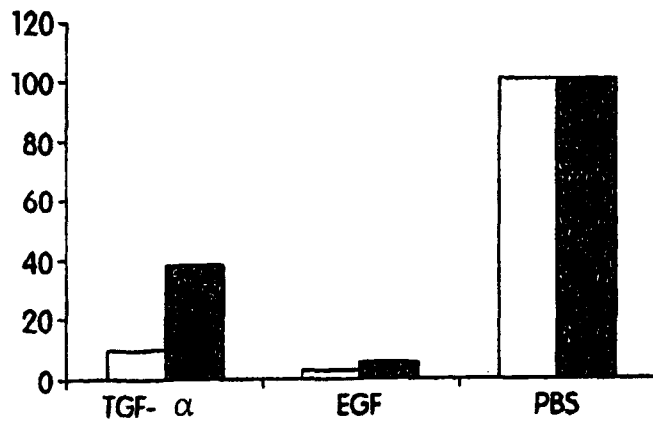


图 9

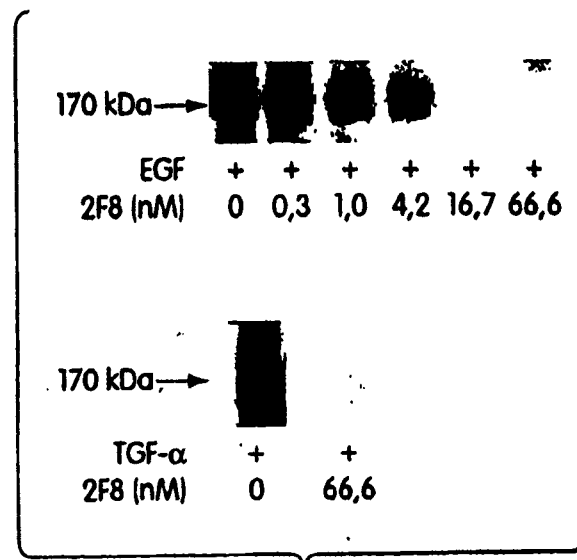


图 10

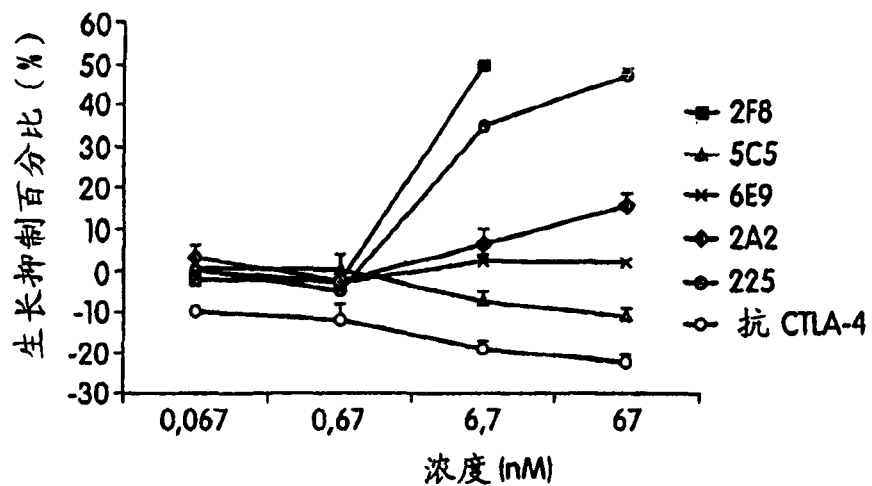


图 11A

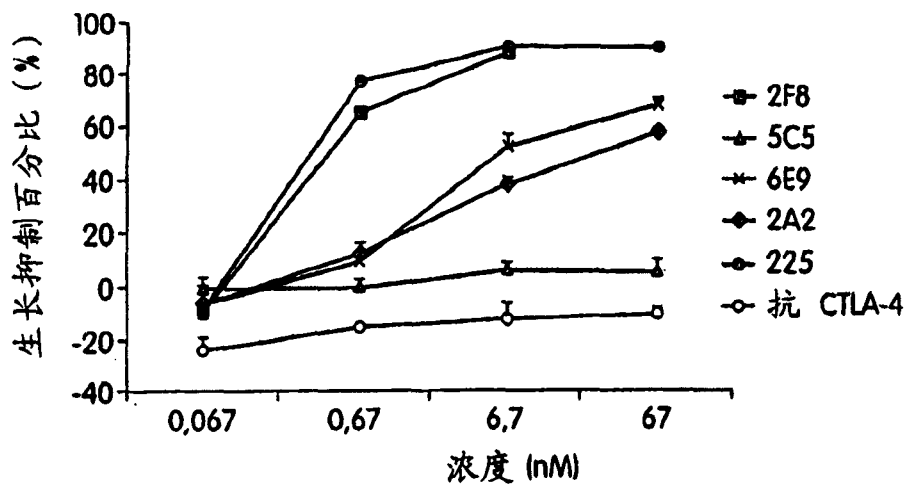


图 11B

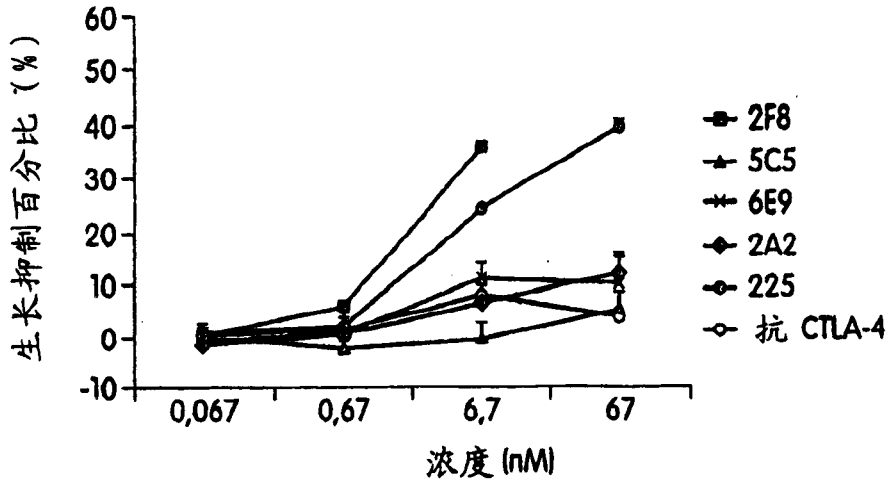


图 11C

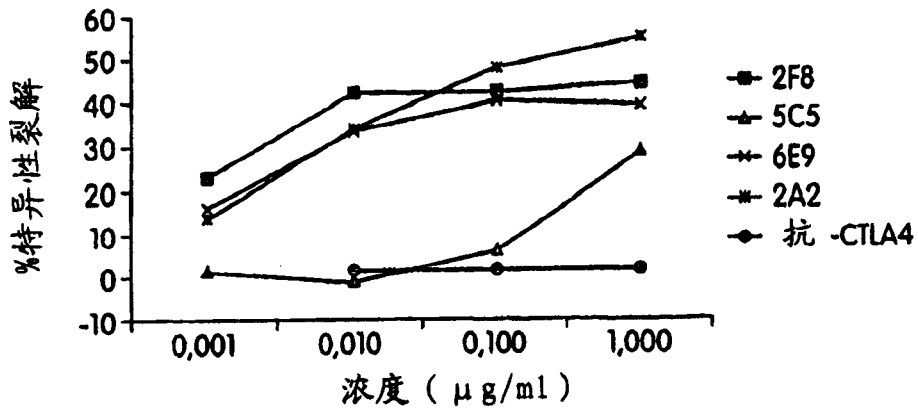


图 12

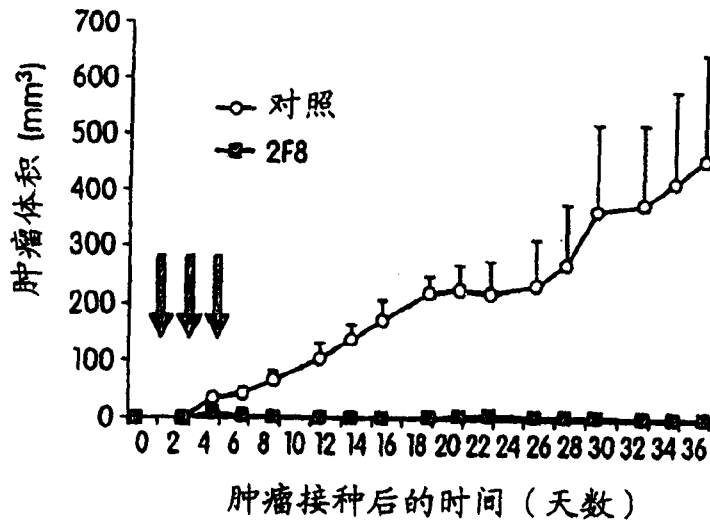


图 13

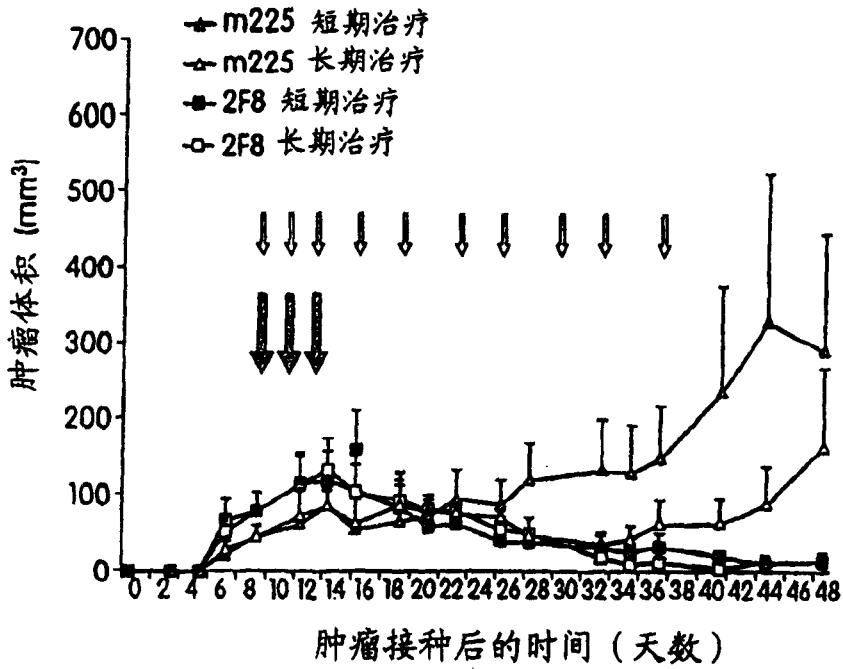


图 14

抗-EGFR 2F8 VL
 V-片段: L18
 J-片段: JK4

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
 GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA

CDR1

55 V T I T C R A S Q D I S S A L V W Y
 GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GAC ATT AGC AGT GCT TTA GTC TGG TAT

CDR2

109 Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
 CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

CDR2

163 E S G V P S R F S G S E S G T D F T
 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GAA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR3

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

CDR3

271 F N S Y P L T F G G G T K V E I K
 TTT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

图 15A

抗-EGFR 2F8 VH

V-片段: VH3-33
D片段: D3-10
J片段: JH4b

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L
CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG

CDR1

55 R L S C A A S G F T F S T Y G M H W
AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT ACC TAT GGC ATG CAC TGG

CDR2

109 V R Q A P G K G L E W V A V I W D D
GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG GAT GAT

CDR2

163 G S Y K Y Y G D S V K G R F T I S R
GGA AGT TAT AAA TAC TAT GGA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC

CDR3

271 T A V Y Y C A R D G I T M V R G V M
ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAT GGT ATT ACT ATG GTT CGG GGA GTT ATG

CDR3

325 K D Y F D Y W G Q G T L V T V S S
AAG GAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA