

[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 200710141111.4

[51] Int. Cl.

*C07K 16/32 (2006.01)*

*A61K 47/48 (2006.01)*

*A61P 35/00 (2006.01)*

[43] 公开日 2008 年 2 月 13 日

[11] 公开号 CN 101121750A

[22] 申请日 2000.6.23

[21] 申请号 200710141111.4

分案原申请号 00811898.1

[30] 优先权

[32] 1999.6.25 [33] US [31] 60/141,316

[71] 申请人 杰南技术公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 卡梅利亚·W·亚当斯

伦纳德·G·普雷斯塔

马克·斯利科斯基

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张红春

权利要求书 3 页 说明书 84 页 附图 14 页

[54] 发明名称

人源化抗 ErbB2 抗体及用抗 ErbB2 抗体进行  
的治疗

[57] 摘要

本申请描述了人源化抗 ErbB2 抗体, 以及用抗  
ErbB2 抗体, 如人源化抗 ErbB2 抗体治疗癌症的方法。

1. 一种与 ErbB2 结合并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的人源化抗体, 该人源化抗体包含重链可变区(V<sub>H</sub>), 且还包含在 69H、71H 和 / 或 73H 位点上的框架区(FR)取代, 其中所述的重链可变区包含已引入到人 V<sub>H</sub> 区中的非人类超变区的残基。

2. 权利要求 1 的人源化抗体, 其包含在 69H、71H 和 73H 位点上的框架区(FR)取代。

3. 权利要求 2 的人源化抗体, 其中所述 FR 取代是 IleH69Leu, ArgH71Val 和 AspH73Arg。

4. 权利要求 1-3 任一项的人源化抗体, 其包含 V<sub>H</sub> 互补决定区(CDR)残基 GFTFTDYTMX(SEQ ID NO: 7)、DVNPNSGGSIYNQRFKG(SEQ ID NO: 8)和 NLGPSFYFDY(SEQ ID NO: 9)。

5. 权利要求 1-4 任一项的人源化抗体, 其包含 SEQ ID NO: 4 中的 V<sub>H</sub> 区氨基酸序列。

6. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体, 其包含轻链可变区(V<sub>L</sub>)的互补决定区(CDR)残基 KASQDVSIGVA(SEQ ID NO: 10)、SASYXXX(SEQ ID NO: 11)和 QQYYIYPYT(SEQ ID NO: 12)。

7. 权利要求 1-6 任一项的人源化抗体, 其包含 SEQ ID NO: 3 中的 V<sub>L</sub> 区氨基酸序列。

8. 权利要求 1-7 任一项的人源化抗体, 其为完整的 IgG1 抗体。

9. 权利要求 1-7 任一项的人源化抗体, 其为抗体片段。

10. 权利要求 9 的人源化抗体, 其为 Fab 片段。

11. 权利要求 1-10 任一项的人源化抗体的亲和力成熟的变体。

12. 一种人源化抗体, 其包含 SEQ ID NO: 3 中轻链可变区(V<sub>L</sub>)的氨基酸序列和 SEQ ID NO: 4 中重链可变区(V<sub>H</sub>)的氨基酸序列。

13. 包含权利要求 12 中 V<sub>L</sub> 和 V<sub>H</sub> 的氨基酸序列的 IgG1 抗体。

14. 包含权利要求 1-13 任一项的抗体和可药用载体的组合物。

15. 一种免疫偶联物, 其包括与细胞毒药物偶联的权利要求 1-13 任一项所述的抗体。

16. 权利要求 1-13 任一项的抗体, 其与一种非蛋白性质的聚合物偶联。

17. 权利要求 16 的抗体, 其中所述非蛋白性质的聚合物为聚乙二醇。
18. 编码权利要求 1-13 任一项的抗体的分离的核酸。
19. 包含权利要求 18 的核酸的载体。
20. 包含权利要求 18 的核酸的宿主细胞。
21. 权利要求 20 的宿主细胞, 其为哺乳动物细胞。
22. 权利要求 21 的宿主细胞, 其为中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。
23. 一种制备人源化抗体的方法, 其包括培养权利要求 20 的宿主细胞, 从而使所述核酸表达。
24. 权利要求 23 的方法, 其进一步包括从所述宿主细胞培养中回收所述抗体。
25. 权利要求 24 的方法, 其中所述抗体是从宿主细胞培养基中回收。
26. 能结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体在制备用于治疗人类癌症的药物中的应用, 其中所述癌症的特征不是 ErbB2 受体的过度表达。
27. 权利要求 26 的应用, 其中所述癌症是乳腺癌。
28. 权利要求 26 的应用, 其中所述药物是用于与治疗有效量的第二治疗药物联合应用的药物, 所述第二药物选自与 ErbB2 结合的第二种不同抗体、化疗药物、靶向 EGFR 的药物、抗血管生成药物、抗激素化合物、心脏保护剂和细胞因子。
29. 权利要求 28 的应用, 其中所述第二治疗药物是化疗药物。
30. 权利要求 29 的应用, 其中所述化疗药物选自蒽环霉素类抗生素、环磷酰胺、紫杉烷、新霉酰胺、xeloda、丝裂霉素 C、奥沙利铂、吉西他滨和铂化合物。
31. 权利要求 28 的应用, 其中所述第二治疗药物是靶向 EGFR 的药物。
32. 权利要求 31 的应用, 其中所述靶向 EGFR 的药物是 ZD1839、CP-358774、AG1478、C225 或 H225。
33. 权利要求 28 的应用, 其中所述的第二治疗药物为 rhuMAb HER2(HERCEPTIN)。
34. 权利要求 28 的应用, 其中所述癌症是结肠癌、直肠癌或结肠直肠癌。
35. 权利要求 28 的应用, 其中所述癌症是卵巢癌。

---

36. 一种比单克隆抗体 7F3 (ATCC HB-12216) 更有效地与 ErbB2 结合并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的人源化抗体。

## 人源化抗 ErbB2 抗体及用抗 ErbB2 抗体进行治疗

此案是申请日为 2000 年 6 月 23 日、中国申请号为 00811898.1、发明名称为“人源化抗 ErbB2 抗体及用抗 ErbB2 抗体进行治疗”的发明申请的分案申请。

### 发明领域

本发明涉及人源化抗 ErbB2 抗体和用例如人源化抗 ErbB2 抗体等抗 ErbB2 抗体治疗癌症的方法。

### 发明背景

受体酪氨酸激酶的 ErbB 家族是细胞生长、分化和生存中重要的介体。该受体家族包括 4 个不同的成员，即表皮生长因子受体(EGFR 或 ErbB1)、HER2(ErbB2 或 p185<sup>neu</sup>)、HER3(ErbB3)和 HER4(ErbB4 或 tyro2)。

有证据表明由 erbB1 基因编码的 EGFR 与人类的恶性肿瘤有关。尤其是在乳腺癌、膀胱癌、肺癌、头部肿瘤、颈部肿瘤和胃癌以及胶质母细胞瘤等肿瘤中观察到 EGFR 的增高表达。EGFR 受体表达增加通常与同一癌细胞中 EGFR 配体，转化生长因子  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) 的产生增加相关，导致通过自分泌刺激途径活化受体。Baselga 和 Mendelsohn, Pharmac.Ther. 64: 127-154(1994)。针对 EGFR 或其配体、TGF- $\alpha$  和 EGF 的单克隆抗体已经在这些恶性肿瘤的治疗中作为治疗药物被评价。例如见 Baselga 和 Mendelsohn, 出处同上; Masui 等, 癌症研究 44: 1002-1007(1984); 和 Wu 等, J.Clin.Invest. 95: 1897-1905(1995)。

ErbB 家族的第二个成员 p185<sup>neu</sup> 最初确定为经化学处理的大鼠的神经母细胞瘤中转化基因的产物。neu 原癌基因的活化形式是由编码蛋白的跨膜结构域中点突变(缬氨酸突变为谷氨酸)引起。在乳腺癌和卵巢癌中检测到 neu 的人类同系物的扩增，并且与预后不良相关(Slamon 等, 科学, 235: 177-182(1987); Slamon 等, 科学, 244: 707-712(1989); 和美国专利 4968603)。到目前为止，在人类癌症中还没有报道与 neu 原癌基因点突变相类似的点突变。在其它癌症，包括胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰

腺和膀胱的癌症中,也观察到 ErbB2 的过度表达(常见原因(但并非一律)是由于基因扩增)。参见,如 King 等,科学, 229: 974(1985); Yokata 等,柳叶刀: 1: 765-767(1986); Fukushima 等,分子细胞生物学, 6: 955-958(1986); Geurin 等,癌基因研究, 3: 21-31(1988); Cohen 等,癌基因, 4: 81-88(1989); Yonemura 等,癌症研究, 51: 1034(1991); Borst 等, Gynecol.Oncol., 38: 364(1990); Weiner 等,癌症研究, 50: 421-425(1990); Kern 等,癌症研究, 50: 5184(1990); Park 等,癌症研究, 49: 6605(1989); Zhau 等, Mol.Carcinog., 3: 354-357(1990); Aasland 等,英格兰癌症杂志, 57: 358-363(1988); Williams 等, Pathobiology 59: 46-52(1991); 和 McCann 等,癌症, 65: 88-92(1990)。ErbB2 可在前列腺癌中过度表达(Gu 等, Cancer Lett. 99: 185-9(1996); Ross 等, Hum.Pathol.28: 827-33(1997); Ross 等,癌症 79: 2162-70(1997); 和 Sadasivan 等, J.Urol. 150: 126-31(1993))。

针对大鼠 p185<sup>neu</sup> 和人 ErbB2 蛋白产物的抗体已有报道。Drebin 及其同事已经制备了抗大鼠 neu 基因产物 p185<sup>neu</sup> 的抗体。例如见 Drebin 等,细胞, 41: 695-706(1985); Myers 等,酶学方法, 198: 277-290(1991); 和 WO94/22478。Drebin 等(癌基因 2: 273-277(1988))报道与 p185<sup>neu</sup> 的两种不同区域反应的抗体混合物对移植入裸鼠体内的 neu 转化型 NIH-3T3 细胞有协同抗癌作用。另见 1998 年 10 月 20 日发布的美国专利 5824311。

Hudziak 等(分子细胞生物学 9(3): 1165-1172(1989))报道了一组用人乳腺癌细胞系 SK-BR-3 鉴定的抗 ErbB2 抗体的制备。暴露于所述抗体 72 小时之后, SK-BR-3 细胞单层通过结晶紫染色确定相对细胞增殖。利用这种检测方法,用称为 4D5 的抗体得到了最大抑制率,该抗体抑制细胞增殖达 56%。在此检测中,该组其它抗体降低细胞增殖的程度较低。进一步发现抗体 4D5 使 ErbB2 过度表达的乳腺癌细胞系对 TNF- $\alpha$  的细胞毒作用敏感。另见 1997 年 10 月 14 日发布的美国专利 5677171。在文献中进一步描绘了 Hudziak 等所讨论的抗 ErbB2 抗体,所述文献为 Fendly 等,癌症研究 50: 1550-1558(1990); Kotts 等, In Vitro 26(3): 59A(1990); Sarup 等,生长调节 1: 7272-82(1991); Shepard 等,临床免疫学杂志 11(3): 117-127(1991); Kumar 等,分子细胞生物学 11(2): 979-986(1991); Lewis 等, Cancer Immunol.Immunother. 37: 255-263(1993); Pietras 等,癌基因 9: 1829-1838(1994); Vitetta 等,癌症研究 54: 5301-5309(1994); Sliwowski 等,生物化学杂志 269(20): 14661-14665(1994); Scott 等,生物化学杂志 266:

14300-5(1991); D'souza 等, 美国国家科学院院刊 91: 7202-7206(1994); Lewis 等, 癌症研究 56: 1457-1465(1996); 和 Schaefer 等, 癌基因 15: 1385-1394(1997)。

鼠抗 ErbB2 抗体 4D5 的重组人源化抗体(huMAb4D5-8, rhuMAbHER2 或 HERCEPTIN®; 美国专利号 5821337)对已经接受过广泛抗癌治疗的 ErbB2 过度表达的转移性乳腺癌患者可进行有效临床治疗(Baselga 等, J.Clin.Oncol. 14: 737-744(1996))。HERCEPTIN®在 1998 年 9 月 25 日获得了食品和药品管理局的市场准入批准, 用于治疗过度表达 ErbB2 蛋白的转移性乳腺癌的患者。

具有各种特点的其它抗 ErbB2 抗体在下述文献中叙述, Tagliabue 等, 国际癌症杂志 47: 933-937(1991); McKenzie 等, 癌基因 4: 543-548(1989); Maier 等, 癌症研究 51: 5361-5369(1991); Bacus 等, 分子致癌作用 3: 350-362(1990); Stancovski 等, PNAS(USA)88: 8691-8695(1991); Bacus 等, 癌症研究 52: 2580-2589(1992); Xu 等, 国际癌症研究 53: 401-408(1993); WO94/00136; Kasprzyk 等, 癌症研究 52: 2771-2776(1992); Hancock 等, 癌症研究 51: 4575-4580(1991); Shawver 等, 癌症研究 54: 1367-1373(1994); Arteaga 等, 癌症研究 54: 3758-3765(1994); Harwerth 等, 生物化学杂志 267: 15160-15167(1992); 美国专利号 5783186; 和 Klapper 等, 癌基因 14: 2099-2109(1997)。

同源性筛选导致了其它两个 ErbB 受体家族成员的鉴定: ErbB3(美国专利 5183884 和 5480968 以及 Kraus 等, PNAS(USA)86: 9193-9197(1989))和 ErbB4(欧洲专利申请 599274; Plowman 等, 美国国家科学院院刊, 90: 1746-1750(1993); 和 Plowman 等, 自然, 366: 473-475(1993))。所有这些受体在至少部分乳腺癌细胞系上表现为表达增加。

ErbB 受体通常以各种组合方式存在于细胞中, 而且认为异二聚体化增加了对各种 ErbB 配体的细胞应答的多样性(Earp 等, 乳腺癌研究和治疗 35: 115-132(1995))。EGFR 可被六种不同的配体结合: 表皮生长因子(EGF), 转化生长因子  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), 双调蛋白(amphiregulin), 肝素结合表皮生长因子(HB-EGF), betacellulin 和表皮调节素(epiregulin)(Groenen 等, 生长因子 11: 235-257(1994))。由单基因的选择性剪接产生的 heregulin 蛋白家族是 ErbB3 和 ErbB4 的配体。该 heregulin 家族包括  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ -heregulins(Holmes 等, 科学, 256: 1205-1210(1992); 美国专利 5641869; 和 Schaefer 等, 癌基因 15:

1385-1394(1997)); neu 分化因子(NDFs), 神经胶质生长因子(GGFs); 乙酰胆碱诱导活性(ARIA); 以及感觉和运动神经元衍生因子(SMDF)。关于其综述见 Groenen 等, 生长因子 11: 235-257(1994); Lemke, G. 分子和细胞神经学, 7: 247-262(1996)和 Lee 等, Pharm.Rev. 47: 51-85(1995)。最近鉴定了另外三个 ErbB 配体: neuregulin-2(NRG-2), 据报道其与 ErbB3 或 ErbB4 结合(Chang 等, 自然 387: 509-512(1997)和 Garraway 等, 自然 387: 512-516(1997)); 与 ErbB4 结合的 neuregulin-3(Zhang 等, PNAS(USA)94(18): 9562-7(1997)); 和与 ErbB4 结合的 neuregulin-4(Harari 等, 癌基因 18: 2681-89(1999))。HB-EGF、betacellulin 和表皮调节素也与 ErbB4 结合。

虽然 EGF 和 TGF  $\alpha$  不结合 ErbB2, 但 EGF 刺激 EGFR 和 ErbB2 形成异二聚体, 其活化 EGFR 并导致异二聚体中 ErbB2 的转磷酸化作用。二聚体化和/或转磷酸化作用可活化 ErbB2 酪氨酸激酶。见 Earp 等, 出处同上。同样, 当 ErbB3 与 ErbB2 共表达时, 形成活性信号传导复合物, 并且针对 ErbB2 的抗体能破坏这种复合物(Sliwkowski 等, 生物化学杂志, 269(20): 14661-14665(1994))。另外, 当与 ErbB2 共表达时, ErbB3 对 heregulin (HRG) 的亲合力增加到更高的亲合力状态。关于 ErbB2-ErbB3 蛋白复合物, 另见 Levi 等, 神经学杂志 15: 1329-1340(1995); Morrissey 等, 美国国家科学院院刊 92: 1431-1435(1995); 和 Lewis 等, 癌症研究, 56: 1457-1465(1996)。同 ErbB3 相似, ErbB4 可与 ErbB2 形成活性信号传导复合物(Garraway 和 Cantley, 细胞 78: 5-8(1994))。

### 发明概述

首先, 本发明提供了治疗人体肿瘤的方法, 包括向人体给药治疗有效量的与 ErbB2 结合的抗体, 其中所述肿瘤表达表皮生长因子受体(EGFR)。

本文涉及利用与 ErbB2 结合的抗体治疗所述癌症时与 EGFR-靶向药物相比的各种优点。尤其是在肝和皮肤中 EGFR 高度表达, 这给活性药物提供了与 EGFR 结合的广泛部位。另外, 对于其它靶向 EGFR 的药物如嵌合抗 EGFR 抗体 C225 以及与 EGFR 结合的小分子药物 ZD1839, 已经观察到皮肤毒性。预计结合 ErbB2 的抗体具有比这些药物更好的安全性。

当本文中用于治疗抗体能阻断 ErbB 受体的配体活化作用和/或具有单克隆抗体 2C4 的生物学特点时, 可实现更多的优点。例如靶向 EGFR 的

物仅干扰 EGFR，但本文中具体目的抗体(例如 2C4，包括其人源化变体和/或其亲和力成熟的变体)将干扰 EGFR/ErbB2、ErbB3/ ErbB4 和 ErbB2/ErbB3 异二聚体。另外，本文中结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体将与靶向 EGFR 的药物互补，而此时靶向 EGFR 的药物相互之间并不互补。

本发明进一步提供了治疗人体癌症的方法，其中所述癌症的特点不是 ErbB2 受体的过度表达，所述方法包括向人体给药治疗有效量的与 ErbB2 结合并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体。

另外，本发明提供了治疗人体中激素非依赖性癌症的方法，包括向人体给药治疗有效量的、结合 ErbB2 受体并阻断 ErbB 受体之配体活化作用的抗体。

本发明进一步提供了治疗人体癌症的方法，包括向人体给药治疗有效量的(a)结合 ErbB2 并抑制过度表达 ErbB2 的癌细胞生长的第一种抗体；和(b)结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的第二种抗体。

本发明还提供了治疗人体癌症的方法，其中所述癌症选自结肠、直肠和结肠直肠的癌症，包括给人体给药治疗有效量的结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体。

在另外的实施方案中，本发明提供了用于上述方法的产品(在其它物品之中)。例如，本发明提供了包括容器和其中所组合物的产品，其中所述组合物包括结合 ErbB2 的抗体，该产品进一步包括包装插页(a package insert)，其说明所述组合物能用来治疗表达表皮生长因子受体(EGFR)的癌症。

本发明另外还涉及包括容器和其中所含组合物的产品，其中所述组合物包括结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体，该产品进一步包括包装插页，其说明所述组合物能用来治疗癌症，其中所述癌症的特点不是 ErbB2 受体过度表达。

本发明还涉及包括容器和其中所含组合物的产品，其中所述组合物包括结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体，该产品进一步包括包装插页，其说明所述组合物能用来治疗激素非依赖性癌症。

在另一个实施方案中，提供的产品包括 (a)装有组合物的第一个容器，其中所述组合物包括结合 ErbB2 并抑制过度表达 ErbB2 的癌细胞生长的第一种抗体；和(b)装有组合物的第二个容器，其中所述组合物包括结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的第二种抗体。

本发明提供了包括容器和其中所含组合物的另一产品,其中所述组合物包括结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体,并且该产品进一步包括包装插页,其说明所述组合物能用来治疗选自结肠癌、直肠癌和结肠直肠癌的癌症。

本发明另外还提供了:结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的人源化抗体;包括该人源化抗体和可药用载体的组合物;包括与细胞毒药物偶联的人源化抗体的免疫偶联物。

而且,本发明提供了分离的编码该人源化抗体的核酸;包含该核酸的载体;包含所述核酸或载体的宿主细胞;以及制备所述人源化抗体的方法,包括培养含所述核酸的宿主细胞,使所述核酸表达,并任选进一步包括从所述宿主细胞培养物(例如所述宿主细胞的培养基)中回收该人源化抗体。

本发明进一步涉及含有与 ErbB2 结合的抗体的免疫偶联物,该抗体与一个或多个加利霉素分子偶联,还涉及在人体中利用所述偶联物治疗表达 ErbB2 的癌,例如 ErbB2 过度表达的癌。偶联物中的抗体优选单克隆抗体 4D5,例如人源化 4D5(并且优选 huMAb4D5-8(HERCEPTIN®));或者优选单克隆抗体 2C4,例如人源化 2C4。免疫偶联物中的抗体可以是完整的抗体(例如完整的 IgG1 抗体)或者是抗体片段(例如 Fab、F(ab)<sub>2</sub>、二价抗体(diabody)等)。

本发明涉及: 1. 在人体中治疗癌症的方法,其中所述癌症表达表皮生长因子受体(EGFR),所述方法包括向人体给药治疗有效量的与 ErbB2 结合的抗体; 2. 第 1 项的方法,其中所述抗体可阻断 ErbB 受体的配体活化作用; 3. 第 2 项的方法,其中所述抗体阻断单克隆抗体 2C4 与 ErbB2 的结合; 4. 第 1 项的方法,其中所述癌症的特点是 EGFR 过度活化; 5. 第 4 项的方法,其中所述癌症过度表达 ErbB 配体; 6. 第 5 项的方法,其中所述 ErbB 配体是转化生长因子 $\alpha$ (TGF- $\alpha$ ); 7. 第 1 项的方法,其中所述抗体阻断促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)的 TGF- $\alpha$ 活化作用; 8. 第 1 项的方法,其中所述癌症不以过度表达 ErbB2 受体为特征; 9. 第 1 项的方法,其中所述癌症选自结肠癌、直肠癌和结直肠癌; 10. 第 9 项的方法,其进一步包括向人体给药化疗药物; 11. 第 10 项的方法,其中所述化疗药物选自 5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲酰四氢叶酸(LV)、CPT-11 和左旋咪唑; 12. 第 1 项的方法,其中所述癌症是肺癌; 13. 第 12 项的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌; 14. 第 12 项的方法,其进一步包括向人体给药化疗药物; 15. 第 14 项的方法,其中所述化疗

药物选自紫杉烷、吉西他滨、新霉酰胺、顺铂、奥沙利铂和卡铂；16. 第1项的方法，其中所述抗体具有单克隆抗体2C4的生物学特点；17. 第16项的方法，其中所述抗体包含单克隆抗体2C4或人源化2C4；18. 第1项的方法，其中所述抗体是抗体片段；19. 第18项的方法，其中所述抗体片段是Fab片段；20. 第1项的方法，其中所述抗体不与细胞毒药物偶联；21. 第18项的方法，其中所述抗体片段不与细胞毒药物偶联；22. 第1项的方法，其中所述抗体与细胞毒药物偶联；23. 第1项的方法，进一步包括向人体给药治疗有效量的第二种治疗药物，该药物选自与ErbB2结合的第二种不同抗体、化疗药物、靶向EGFR的药物、抗血管生成药物、抗激素化合物、心脏保护剂和细胞因子；24. 第1项的方法，包括向人体给药至少一剂所述抗体，其量从约0.5mg/kg到约10mg/kg；25. 第24项的方法，包括约每周给药所述剂量；26. 第24项的方法，包括约每3周给药所述剂量；27. 在人体中治疗癌症的方法，其中所述癌症不以ErbB2受体的过度表达为特征，所述方法包括向人体给药治疗有效量的与ErbB2结合并阻断ErbB受体的配体活化作用的抗体；28. 第27项的方法，其中所述癌症是乳腺癌；29. 第28项的方法，其中所述癌症是转移性乳腺癌；30. 第28项的方法，进一步包括向人体给药化疗药物；31. 第30项的方法，其中所述化疗药物选自蒽环霉素类抗生素、环磷酰胺、紫杉烷、新霉酰胺、xeloda、丝裂霉素C、奥沙利铂、吉西他滨和铂化合物；32. 在人体中治疗癌症的方法，包括向人体给药治疗有效量的(a)结合ErbB2并抑制过度表达ErbB2的癌生长的第一种抗体；(b)结合ErbB2并阻断ErbB受体的配体活化作用的第二种抗体；33. 第32项的方法，其中所述第一种抗体包括单克隆抗体4D5或人源化4D5，而所述第二种抗体包括单克隆抗体2C4或人源化2C4；34. 在人体中治疗癌症的方法，其中所述癌症选自结肠癌、直肠癌和结肠直肠癌，所述方法包括向人体给药治疗有效量的能结合ErbB2并阻断ErbB受体的配体活化作用的抗体；35. 一种包括容器和其中组合物的产品，其中所述组合物包括结合ErbB2的抗体，该产品还包括包装插页，其说明所述组合物可用于治疗表达生长因子受体(EGFR)的癌症；36. 一种包括容器和其中组合物的产品，其中所述组合物包括与ErbB2结合并阻断ErbB受体的配体活化作用的抗体，该产品还包括包装插页，其说明所述组合物可用于治疗癌症，其中所述癌症的特点不是ErbB2受体的过度表达；37. 一种产品，其包括(a)第一个容器，其中含组合物，该组合物包括与ErbB2结合并抑制过度表达ErbB2的癌细胞生长的第一种抗体；

(b)第二个容器,其中包含组合物,该组合物包括能与 ErbB2 结合并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的第二种抗体; 38. 第 37 项的产品,进一步包括一种包装插页,其说明所述第一和第二种抗体组合物可用于治疗癌症; 39. 一种产品,其包括一种容器和其中所含组合物,其中所述组合物包括与 ErbB2 结合并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体,该产品还包括一种包装插页,其说明所述组合物可用于治疗选自结肠癌、直肠癌和结肠直肠癌的癌症; 40. 与 ErbB2 结合并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的人源化抗体; 41. 第 40 项的人源化抗体,其基本上以与鼠单克隆抗体 2C4 等效的能力结合 ErbB2; 42. 包括重链可变区( $V_H$ )的第 40 项所述人源化抗体,其中已将非人类超变区残基引入到人  $V_H$  区中,并且进一步包括在选自 69H、71H 和 73H 的位点上的框架区(FR)取代,这里利用 Kabat 提出的编号系统(1991); 43. 第 42 项所述人源化抗体,其在位点 69H、71H 和 73H 上包含 FR 取代; 44. 第 40 项所述人源化抗体,其包括  $V_H$  互补决定区(CDR)残基 GFTFTDYTMX(SEQ ID NO: 7)、DVNPNSGGSIYNQRFKG(SEQ ID NO: 8)和 NLGPSFYFDY(SEQ ID NO: 9); 45. 第 40 项所述人源化抗体,其包括 SEQ ID NO: 4 中的  $V_H$  区氨基酸序列; 46. 第 40 项所述人源化抗体,其包括轻链可变区( $V_L$ )的互补决定区(CDR)残基 KASQDVSIGVA(SEQ ID NO: 10)、SASYXXX(SEQ ID NO: 11)和 QQYYIYPYT(SEQ ID NO: 12); 47. 第 40 项所述人源化抗体,其包括 SEQ ID NO: 3 中的  $V_L$  区氨基酸序列; 48. 第 40 项所述人源化抗体,其为完整的 IgG1 抗体; 49. 第 40 项所述人源化抗体,其为抗体片段; 50. 第 49 项所述人源化抗体,其为 Fab 片段; 51. 一种亲和力成熟的抗体,其与 ErbB2 结合并阻断 ErbB 受体的配体活化作用; 52. 一种组合物,其包括第 40 项所述人源化抗体和一种可药用载体; 53. 一种免疫偶联物,其包括与细胞毒药物偶联的第 40 项所述人源化抗体; 54. 分离的编码第 40 项所述人源化抗体的核酸; 55. 包括第 54 项所述核酸的载体; 56. 包括第 55 项所述载体的宿主细胞; 57. 制备人源化抗体的方法,包括培养第 56 项所述宿主细胞,从而使所述核酸表达; 58. 第 57 项所述方法,其进一步包括从宿主细胞培养中回收所述人源化抗体; 59. 第 58 项的方法,其中所述人源化抗体是从宿主细胞培养基中回收; 60. 能结合 ErbB2 的抗体在制备用于治疗人类癌症的药物中的应用,其中所述癌症表达表皮生长因子受体(EGFR); 61. 第 60 项的应用,其中所述抗体阻断 ErbB 受体的配体活化作用; 62. 第 61 项的应用,其中所述抗体阻断单克隆抗体 2C4 与 ErbB2 的结合; 63. 第 60 项的应用,其中所

述癌症的特征是 EGFR 过度活化; 64. 第 63 项的应用, 其中所述癌症过度表达 ErbB 配体; 65. 第 64 项的应用, 其中所述 ErbB 配体是转化生长因子  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ); 66. 第 60 项的应用, 其中所述抗体阻断促分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的 TGF- $\alpha$  活化作用; 67. 第 60 项的应用, 其中所述癌症的特征不是 ErbB2 受体的过度表达; 68. 第 60 项的应用, 其中所述癌症选自结肠癌、直肠癌和结直肠癌; 69. 第 68 项的应用, 其中所述药物用于与化疗药物一起给药; 70. 第 69 项的应用, 其中所述化疗药物选自 5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲酰四氢叶酸(LV)、CPT-11、和左旋咪唑; 71. 第 60 项的应用, 其中所述癌症是肺癌; 72. 第 71 项的应用, 其中所述癌症是非小细胞肺癌; 73. 第 71 项的应用, 其中所述所述药物用于与化疗药物一起给药; 74. 第 73 项的应用, 其中所述化疗药物选自紫杉烷、吉西他滨、新霉酰胺、顺铂、奥沙利铂、和卡铂; 75. 第 60 项的应用, 其中所述抗体具有单克隆抗体 2C4 的生物学特征; 76. 第 75 项的应用, 其中所述包含单克隆抗体 2C4 或人源化抗体 2C4; 77. 第 60 项的应用, 其中所述抗体是抗体片段; 78. 第 77 项的应用, 其中所述抗体片段是 Fab 片段; 79. 第 60 项的应用, 其中所述抗体未与细胞毒药物偶联; 80. 第 77 项的应用, 其中所述抗体片段未与细胞毒药物偶联; 81. 第 60 项的应用, 其中所述抗体与细胞毒药物偶联; 82. 第 60 项的应用, 其中所述药物用于与治疗有效量的第二种治疗药物一起给药至人, 所述第二种药物选自与 ErbB2 结合的第二种不同抗体、化疗药物、靶向 EGFR 的药物、抗血管生成药物、抗激素化合物、心脏保护剂, 和细胞因子; 83. 第 60 项的应用, 其中所述药物用于将至少一剂所述抗体以约 0.5 mg/kg - 约 10 mg/kg 的量给药至人; 84. 第 83 项的应用, 其中所述药物用于约每周给药所述药剂; 85. 第 83 项的应用, 其中所述药物用于约每三周给药所述药剂; 86. 一种应用, 其为能结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体在制备用于治疗人类癌症的药物中的应用, 其中所述癌症的特征不是 ErbB2 受体的过度表达; 87. 第 86 项的应用, 其中所述癌症是乳腺癌; 88. 第 87 项的应用, 其中所述癌症是转移性乳腺癌; 89. 第 87 项的应用, 其中所述药物用于与化疗药物一起给药至人; 90. 第 89 项的应用, 其中所述化疗药物选自蒽环霉素类抗生素、环磷酰胺、紫杉烷、新霉酰胺、xeloda、丝裂霉素 C、奥沙利铂、吉西他滨和铂化合物; 91. 一种应用, 其为(a)与 ErbB2 结合并抑制过度表达 ErbB2 的癌细胞生长的第一种抗体; 和(b)与 ErbB2 结合并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体, 在制备用于治疗人类癌症的药物中的应用; 92. 第 91 项的应用,

其中所述第一种抗体包含单克隆抗体 4D5 或人源化 4D5, 而所述第二种抗体包含单克隆抗体 2C4 或人源化 2C4; 93. 一种应用, 其为能结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体在制备用于治疗人类癌症的药物中的应用, 其中所述癌症选自结肠癌、直肠癌和结直肠癌; 94. 第 56 项的宿主细胞, 其为一种哺乳动物细胞; 95. 第 94 项的宿主细胞, 其为中国仓鼠卵巢(CHO)细胞; 96. 第 56 项的宿主细胞, 其为原核生物的细胞; 97. 第 96 项的宿主细胞, 其为大肠杆菌的细胞; 98. 第 40-51 项中任一项的抗体, 其与一种非蛋白性质的聚合物偶联; 99. 第 98 项的抗体, 其所述非蛋白性质的聚合物为聚乙二醇; 100. 第 23 项的方法, 其中所述第二种治疗药物为靶向 EGFR 的药物; 101. 第 100 项的方法, 其中所述靶向 EGFR 的药物是 ZD1839, CP-358774 或 AG1478; 102. 第 100 项的方法, 其中所述靶向 EGFR 的药物是与 EGFR 结合的抗体; 103. 第 102 项的方法, 其中所述与 EGFR 结合的抗体是 C225 或 H225; 104. 第 82 项的应用, 其中所述第二种治疗药物是靶向 EGFR 的药物; 105. 第 104 项的应用, 其中所述靶向 EGFR 的药物是 ZD1839, CP-358774 或 AG1478; 106. 第 104 项的应用, 其中所述靶向 EGFR 的药物是与 EGFR 结合的抗体; 107. 第 106 项的应用, 其中所述与 EGFR 结合的抗体是 C225 或 H225。

#### 附图简述

图 1A 和 1B 描述了在 ErbB2 细胞外结构域(ECD)中残基 22-645(包括信号序列的氨基酸序列, 见图 1 和 SEQ ID NO: 13 所示)的表位作图, 它是通过截短突变分析和定点诱变的方法确定(Nakamura 等, 病毒学杂志(67(10): 6179-6191)(1993); 和 Renz 等, 细胞生物学杂志, 125(6): 1395-1406(1994))。各种 ErbB2-ECD 截短突变体或点突变体是利用聚合酶链式反应从 cDNA 产生。ErbB2 突变体在哺乳动物的表达质粒中表达为 gD 融合蛋白。这种表达质粒使用了巨细胞病毒启动子/增强子和 SV40 终止序列以及位于 cDNA 插入片段下游的聚腺苷酸信号。用质粒 DNA 转染 293 细胞。转染一天后, 将细胞在无甲硫氨酸和半胱氨酸的低糖 DMEM 培养基中通过代谢(metabolically)标记过夜, 所述 DMEM 培养基中含 1% 经透析的胎牛血清和 25  $\mu$  Ci  $^{35}$ S 甲硫氨酸以及 25  $\mu$  Ci  $^{35}$ S 半胱氨酸。收获上清, 并向上清中加入抗 ErbB2 单克隆抗体或对照抗体, 4℃培育 2-4 小时。沉淀复合物, 在 10-20

% Tricine SDS 梯度凝胶上用 100V 电压进行电泳。将该凝胶电印迹到膜上并通过放射自显影进行分析。如图 1B 所示, 抗 ErbB2 抗体 7C2、7F3、2C4、7D3、3E8、4D5、2H11 和 3H4 结合各种 ErbB2 ECD 表位。

图 2A 和 2B 表明抗 ErbB2 单克隆抗体 2C4 和 7F3 对 MCF7 细胞的 rHRG  $\beta$  1 活化作用的影响。图 2A 表明 2C4 或 7F3 抑制 HRG 刺激酪氨酸磷酸化的剂量-应答曲线。图 2B 表明 2C4 或 7F3 抑制  $^{125}\text{I}$  标记的 rHRG  $\beta$  1<sub>177-244</sub> 与 MCF7 细胞结合的剂量-应答曲线。

图 3 描述了抗 ErbB2 单克隆抗体 2C4 或 7F3 抑制  $^{125}\text{I}$  标记的特异性 rHRG  $\beta$  1<sub>177-244</sub> 与一组人肿瘤细胞系的结合。对照单克隆抗体是不阻断 rHRG 结合的同种型匹配的鼠单克隆抗体。在 100nM rHRG  $\beta$  1 存在的条件下通过平行温育确定  $^{125}\text{I}$  标记的非特异性 rHRG  $\beta$  1<sub>177-244</sub> 的结合。 $^{125}\text{I}$  标记的非特异性 rHRG  $\beta$  1<sub>177-244</sub> 的结合小于所有检测的细胞系的总结合的 1%。

图 4A 和图 4B 表明单克隆抗体 2C4 和 4D5 对 MDA-MB-175(图 4A)和 SK-BR-3(图 4B)细胞的增殖的影响。将 MDA-MB-175 和 SK-BR-3 细胞接种至 96 孔培养板中, 并使其粘附 2 小时。在含 1% 血清的培养基中进行实验。加入抗 ErbB2 抗体或仅加入培养基, 将细胞在 37°C 中培养 2 小时。随后加入 rHRG  $\beta$  1(1nM)或仅加入培养基并培养细胞 4 天。洗涤单层细胞并用 0.5% 结晶紫染色/固定。在 540nm 处检测吸光度来确定细胞的增殖。

图 5A 和 5B 表明在以低/正常水平表达 ErbB2 的 MCF7 细胞(图 5A)和高水平表达 ErbB2 的 SK-BR-3 细胞(图 5B)中, 单克隆抗体 2C4, HERCEPTIN® 抗体或抗 EGFR 抗体对 ErbB2 与 ErbB3 的 heregulin (HRG)依赖性结合的影响, 见下述实施例 2。

图 6A 和图 6B 比较了完整的鼠单克隆抗体 2C4(mu 2C4)和嵌合型 2C4 Fab 片段的活性。图 6A 表明嵌合型 2C4 Fab 或完整的鼠单克隆抗体 2C4 对  $^{125}\text{I}$ -HRG 与 MCF7 细胞结合的抑制。将 MCF7 细胞接种在 24 孔培养板中( $1 \times 10^5$  细胞/孔)并培养 2 天致约 85% 细胞汇合。按 Lewis 等(癌症研究 56: 1457-1465(1996))所述方法进行实验。图 6B 描述了对 MCF7 细胞中对 rHRG  $\beta$  1 活化 p180 酪氨酸磷酸化的作用的抑制, 按 Lewis 等(癌症研究 56: 1457-1465(1996))所述方法进行。

图 7A 和图 7B 描述了对下述序列的排列对比(alignment), 即小鼠单克隆抗体 2C4 的轻链可变区( $V_L$ ) (图 7A)和重链可变区( $V_H$ ) (图 7B)氨基酸序列(分别见 SEQ ID NOs 1 和 2); 人源化 2C4 抗体 574 的  $V_L$  和  $V_H$  区(分别见 SEQ ID

Nos 3 和 4), 以及人  $V_L$  和  $V_H$  的共有框架(hum  $\kappa$  1, 轻链  $\kappa$  亚群 I; humIII, 重链亚群 III) (分别见 SEQ ID Nos 5 和 6)。星号表明人源化 2C4 抗体 574 和鼠单克隆抗体 2C4 之间或人源化 2C4 抗体 574 和人的框架之间的差异。互补决定区(CDR)用括号标出。

图 8A-C 表明按实施例 3 的 ELISA 法检测的嵌合型 Fab 2C4(Fab.v1)和几种人源化 2C4 变体与 ErbB2 细胞外结构域(ECD)的结合。

图 9 是单克隆抗体 2C4 的  $V_L$  和  $V_H$  的带状图, 其中对白色的 CDR 骨架作标记(L1、L2、L3、H1、H2、H3)。还给出了人源化期间用诱变法评估的  $V_H$  侧链(参见实施例 3, 表 2)。

图 10 描述了单克隆抗体 2C4 或 HERCEPTIN®对 EGF、TGF- $\alpha$  或 HRG 介导的促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)活化作用的影响。

图 11 是表明抗 ErbB2 抗体(单独或联合)对 Calu3 肺腺癌异种移植瘤(3+ErbB2 过度表达)的作用的条图。注: 治疗在第 24 天终止。

图 12 描述了重组人源化单克隆抗体 2C4(rhuMAb 2C4)或 HERCEPTIN®对 MDA-175 细胞生长的影响, 用 Alamar Blue 检测法测定。

图 13 表明 rhuMAb 2C4 抗 MCF7 异种移植物的效果。

## 优选实施方案详述

### I. 定义

“ErbB 受体”是受体蛋白酪氨酸激酶, 属于 ErbB 受体家族并且包括 EGFR、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 受体和在将来被鉴定的此家族其它成员。ErbB 受体通常包括可结合 ErbB 配体的细胞外结构域; 亲脂性跨膜结构域; 保守的细胞内酪氨酸激酶结构域; 和含几个可被磷酸化的酪氨酸残基的羧基末端信号结构域。ErbB 受体可以是“天然序列”ErbB 受体或其“氨基酸序列变体”。优选该 ErbB 受体是天然序列人 ErbB 受体。

术语“ErbB1”、“表皮生长因子受体”和“EGFR”在本文中可互换应用, 是指如 Carpenter 等(Ann.Rev.Biochem. 56: 881-914(1987))公开的 EGFR, 包括其天然突变型(例如 Humphrey 等(PNAS(USA)87: 4207-4211(1990))所述缺失突变型 EGFR)。erbB1 是指编码 EGFR 蛋白产物的基因。

词语“ErbB2”和“HER2”在本文中可互换应用, 是指如 Semba 等(PNAS(USA)82:6497-6501(1985))和 Yamamoto 等(自然 319: 230-234(1986))

所述的HER2蛋白(Genebank登记号 X03363)。术语“erbB2”是指编码人ErbB2的基因，而“neu”是指编码大鼠p185<sup>neu</sup>的基因。优选的ErbB2是具有天然序列的人ErbB2。

“ErbB3”和“HER3”是指如美国专利 5183884 和 5480968 以及 Kraus 等(PNAS(USA)86: 9193-9197(1989))公开的受体多肽。

本文中“ErbB4”和“HER4”是指在下述文献中公开的受体多肽，如欧洲专利申请 599274、Plowman 等，美国国家科学院院刊, 90: 1746-1750(1993)、和 Plowman 等，自然, 366: 473-475(1993)，包括其同种型，如在 1999 年 4 月 22 公开的 WO99/19488 中所述。

“ErbB 配体”是指结合和/或活化 ErbB 受体的多肽。本文中特定目的 ErbB 配体是天然序列的人 ErbB 配体，例如表皮生长因子(EGF) (Savage 等，生物学化学杂志 247: 7612-7621(1972)); 转化生长因子(TGF- $\alpha$ ) (Marquardt 等，科学 223: 1079-1082(1984)); 双调蛋白，也称为神经鞘瘤(Schwanoma)或角质细胞自分泌生长因子(Shoyab 等，科学 243: 1074-1076(1989); Kimura 等，自然 348: 257-260(1990); Cook 等，分子细胞生物学 11: 2547-2557 (1991)); betacellulin (Shing 等，科学 259: 1604-1607(1993); 和 Sasada 等，Biochem. Biophys. Res. Commun. 190: 1173(1993)); 肝素结合型表皮生长因子(HB-EGF) (Higashiyama 等，科学 251: 936-939(1991)); 表皮调节素(Toyoda 等，生物学化学杂志 270: 7495-7500(1995); 和 Komurasaki 等，癌基因 15: 2841-2848(1997)); heregulin (见下述); neuregulin-2(NRG-2) (Garraway 等，自然 387: 512-516(1997)); neuregulin-3(NRG-3) (Zhang 等，美国国家科学院院刊 94: 9562-9567(1997)); neuregulin-4(NRG-4) (Harari 等，癌基因 18: 2681-89 (1999))或 cripto(CR-1) (Kannan 等，生物学化学杂志 272(6): 3330-3335 (1997))。结合 EGFR 的 ErbB 配体包括 EGF, TGF- $\alpha$ , amphiregulin, betacellulin, HB-EGF 和表皮调节素。结合 ErbB 3 的 ErbB 配体包括 hereglin。能结合 ErbB 4 的 ErbB 配体包括 betacellulin、表皮调节素、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4 和 heregulin。

“Heregulin” (HRG)在本文中是指如美国专利 5641869 或 Marchionni 等(自然, 362: 312-318(1993))公开的 heregulin 基因编码的多肽。heregulin 的实例包括 heregulin- $\alpha$ 、heregulin- $\beta$  1、heregulin- $\beta$  2 和 heregulin- $\beta$  3(Holmes 等，科学 256: 1205-1210(1992); 和美国专利 5641869); neu 分化因子(NDF) (Peles 等，细胞 69: 205-216 (1992)); 乙酰胆碱受体诱导活性(ARIA) (Falls

等, 细胞 72: 801-815 (1993)); 神经胶质生长因子(GGF) (Marchionni 等, 自然, 362: 312-318 (1993)); 感觉和运动神经元衍生的因子(SMDF) (Ho 等, 生物学化学杂志 270: 14523-14532(1995));  $\gamma$ -heregulin (Schaefer 等, 癌基因 15: 1385-1394 (1997))。该术语包括天然序列 HRG 多肽的生物学活性片段和/或其氨基酸序列变体, 例如其 EGF 样结构域片段(如 HRG  $\beta$  1<sub>177-244</sub>)。

本文中“ErbB 异寡聚体”是指包括至少两种不同 ErbB 受体的非共价结合型寡聚体。当表达两种或多种 ErbB 受体的细胞暴露于 ErbB 配体时, 可形成这样的复合物, 其可通过免疫沉淀法分离并可通过 SDS-PAGE 进行分析, 例如 Sliwowski 等(生物学化学杂志 269(20): 14661-14665(1994))所述。这类 ErbB 异寡聚体的实例包括 EGFR- ErbB2、ErbB2- ErbB3 和 ErbB3- ErbB4 复合物。而且, 所述 ErbB 异寡聚体可包括两种或多种与不同 ErbB 受体(例如 ErbB3、ErbB4 或 EGFR)组合的 ErbB2 受体。在该异寡聚体中可包括其它蛋白如细胞因子受体亚单位(如 gp130)。

“ErbB 受体的配体活化作用”是指由与含目的 ErbB 受体的 ErbB 异寡聚体结合的 ErbB 配体所介导的信号传导(例如由 ErbB 受体的细胞内激酶结构域使 ErbB 受体或底物多肽中酪氨酸残基磷酸化所引起的信号传导)。这通常涉及 ErbB 配体与 ErbB 异寡聚体的结合, 该结合可活化异寡聚体中一个或多个 ErbB 受体的激酶结构域, 并且因此导致一个或多个 ErbB 受体中酪氨酸残基的磷酸化, 和/或其它底物多肽中酪氨酸残基的磷酸化。ErbB 受体活化可利用各种酪氨酸磷酸化试验定量。

“天然序列”多肽是指其氨基酸序列与天然来源多肽(例如 ErbB 受体或 ErbB 配体)相同的多肽。此天然序列多肽可从自然中分离, 或者可通过重组或合成方法制备。因此, 天然序列多肽可具有天然发生的人多肽、鼠多肽或其它哺乳动物物种来源多肽的氨基酸序列。

术语“氨基酸序列变体”是指其氨基酸序列与天然序列多肽有一定程度的差异的多肽。通常, 氨基酸序列变体与天然 ErbB 配体的至少一个受体结合结构域或与天然 ErbB 受体的至少一个配体结合结构域, 有至少约 70% 的同源性, 优选所述同源性至少约 80%, 更优选至少约 90%。所述氨基酸序列变体在天然氨基酸序列中某些位点上具有取代、缺失和/或插入。

“同源性”定义为在将序列排列对比并引入缺口(如果需要)而得到同源性的最大百分率之后, 氨基酸序列变体中相同残基的百分率。用于排列的方法和计算机程序在本领域众所周知。一种这样的计算机程序是由 Genentech,

Inc.享有主权的“Align 2”，它和用户文件于1991年12月10日提交至美国版权局(Washington, DC 20559)。

本文中术语“抗体”是指最广义上的抗体，具体包括完整的单克隆抗体，多克隆抗体，由至少两种完整抗体形成的多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段，只要其显示所需生物学活性。

本文中术语“单克隆抗体”是指来自基本上同质的抗体群的抗体，即除了可能少量存在的天然突变以外，该抗体群中的各个抗体均相同。单克隆抗体具有高度的特异性，针对单个抗原位点。而且，与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反，每种单克隆抗体是针对抗原上的单个表位。除了其特异性之外，单克隆抗体的优点在于它们可被合成并不受其它抗体的污染。修饰词“单克隆”表明该抗体的特点，即其来自基本上同质的抗体群，不解释为需通过任何特殊方法产生该抗体。例如，根据本发明应用的单克隆抗体可通过由 Kohler 等(自然, 256: 495(1975))首先描述的杂交瘤法进行制备, 或者可通过重组DNA法进行制备(例如见美国专利4816567)。

“单克隆抗体”还可利用例如 Clackson 等 (自然, 352: 624-628(1991))和 Marks 等(分子生物学杂志, 222: 581-597(1991))所述技术从噬菌体抗体文库中分离。

本文中单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体，其重链和/或轻链的一部分与源自特殊物种或属于特殊抗体种类或亚类的抗体的相应序列相同或同源，但所述链的剩余部分的序列与源自另一个物种或属于另一个抗体种类或亚类的抗体(以及此抗体的片段，只要它们显示所需的生物学活性)的相应序列相同或同源 (美国专利 4,816,567; 和 Morrison 等, 美国国家科学院院刊, 81: 6851-6855(1984))。本文中目的嵌合抗体包括“灵长类化”抗体，其包括源自非人类灵长类动物(如 Old World Monkey, Ape 等)的可变区抗原结合序列和人恒定区序列。

“抗体片段”包括完整抗体的一部分，优选包括其抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 和 Fv 片段；二价抗体；线性抗体；单链抗体分子；和由抗体片段形成的多特异性抗体。

“完整”抗体是包括抗原结合可变区以及轻链恒定区 (C<sub>L</sub>)和重链恒定区 C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub> 和 C<sub>H3</sub> 的抗体。所述恒定区可以是天然序列恒定区 (例如人天然序列恒定区)或其氨基酸序列变体。优选完整抗体具有一种或多种效应功能。

抗体的“效应功能”是指那些可归因于抗体 Fc 段(天然序列 Fc 段或氨基酸序列变体 Fc 段)的生物学活性。抗体效应功能的实例包括 C1q 结合;补体依赖性细胞毒作用; Fc 受体结合; 抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC); 吞噬作用; 细胞表面受体(如 B 细胞受体; BCR)等的下调。

根据其重链恒定区的氨基酸序列, 可将完整抗体分成不同的“类”。主要有 5 类完整抗体: IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM, 其中一些抗体可进一步分成“亚类”(同种型), 例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。对应于不同类抗体的重链恒定区分别称为  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和  $\mu$ 。免疫球蛋白不同类的亚单位结构和三维构象众所周知。

“抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用”和“ADCC”是指由细胞介导的反应, 其中表达 Fc 受体(FcR)的非特异性细胞毒细胞(例如自然杀伤(NK)细胞, 中性粒细胞和巨噬细胞)识别结合在靶细胞上的抗体, 随后引起该靶细胞裂解。介导 ADCC 作用的主要细胞 NK 细胞仅表达 Fc  $\gamma$  RIII, 而单核细胞则表达 Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RII 和 Fc  $\gamma$  RIII。关于造血细胞上 FcR 表达的总结见 Ravetch 和 Kinet, *Annu.Rev.Immunol* 9: 457-92(1991)的 464 页上的表三。为了评价目的分子的 ADCC 活性, 可进行体外 ADCC 检测, 例如美国专利 5500362 或 5821337 中所述。用于这类检测的有效效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。或者(或另外), 可在体内, 例如在 Clynes 等(PNAS(USA), 95: 652-656(1998))所述的动物模型中, 评估目的分子的 ADCC 活性。

“人类效应细胞”是表达一或多种 FcR 并执行效应功能的白细胞。优选所述细胞至少表达 Fc  $\gamma$  RIII 并执行 ADCC 效应功能。介导 ADCC 作用的人类白细胞的实例包括外周血单核细胞(PBMC), 自然杀伤(NK)细胞, 单核细胞, 细胞毒 T 细胞和中性粒细胞; 优选 PBMC 和 NK 细胞。所述效应细胞可从其天然来源中分离, 例如从本文所述血液或 PBMC 中分离。

术语“Fc 受体”或“FcR”用来描述与抗体 Fc 段结合的受体。优选的 FcR 是天然序列人 FcR。而且, 优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的受体( $\gamma$  受体), 包括 Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RII 和 Fc  $\gamma$  RIII 亚类(包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接型)。Fc  $\gamma$  RII 受体包括具有相似的氨基酸序列的 Fc  $\gamma$  RIIA(“活化受体”)和 Fc  $\gamma$  RIIB(“抑制受体”), 其主要区别在于其细胞浆结构域。活化受体 Fc  $\gamma$  RIIA 在其细胞浆结构域中含有免疫受体酪氨酸为基础的活化基序(ITAM)。抑制受体 Fc  $\gamma$  RIIB 在其胞浆结构域中含有免疫受体酪氨酸为基础

的抑制基序(ITIM)。(见综述 M. in Daeron, *Annu.Rev.Immunol.* 15: 203-234(1997))。FcR 的综述见 Ravetch 和 Kinet, *Annu.Rev.Immunol.* 9: 457-92(1991); Capel 等, *免疫学方法* 4: 25-34(1994); 和 de Haas 等, *J.Lab.Clin.Med.* 126: 330-41(1995)。本文中术语“FcR”涵盖其它 FcR, 包括那些在将来将被鉴定的 FcR。该术语还包括负责将母体 IgG 转移到胎儿的新生期受体 FcRn (Guyer 等, *免疫学杂志* 117: 587(1976)和 Kim 等, *免疫学杂志* 24: 249(1994))。

“补体依赖性细胞毒作用”或“CDC”是指在补体存在的条件下分子裂解靶的能力。补体系统的第一个组分(C1q)与结合相关(cognate)抗原的分子(例如抗体)的结合可起始补体激活途径。为了评价补体活化作用, 可进行 CDC 检测, 如 Gazzano-Santoro 等(*免疫学方法杂志* 202: 163(1996))所述。

“天然抗体”通常是约 150000 道尔顿的异四聚体糖蛋白, 由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每个轻链通过一个共价二硫键与重链连接, 而不同免疫球蛋白同种型的重链之间的二硫键数目并不相同。每个重链和轻链中还具有规则间隔的链内二硫键。每个重链在其一个末端有可变区(V<sub>H</sub>), 其后是多个恒定区。每个轻链在其一个末端有可变区(V<sub>L</sub>), 而另一端是恒定区。轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对应(align), 而轻链可变区与重链可变区相对应。特殊的氨基酸残基被认为在轻链和重链可变区之间形成界面。

术语“可变”是指可变区某些部分的序列在抗体之间有很大差异, 它们可在各个抗体对其特殊抗原的结合和特异性方面发挥作用。然而, 该变异性不是均匀的分布于整个抗体的可变区。它集中于轻链和重链可变区中三个称为超变区的节段中。可变区中保守性较高的区域称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变区各包括 4 个 FR, 主要采取  $\beta$  折叠构象, 被三个超变区相连接, 形成环状连接, 而在一些情况中形成  $\beta$  折叠结构的一部分。各个链的超变区通过 FR 紧密的靠近在一起, 并且与其它链的超变区一起形成抗体的抗原结合位点(见 Kabat 等, 具有免疫学意义的蛋白的序列, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合, 但是表现出各种效应功能, 例如在抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)中抗体的参与。

术语“超变区”在本文中是指抗体上负责结合抗原的氨基酸序列。所述超变区通常包括“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如轻链可变区

的残基 24-34(L1)、50-56(L2)和 89-97(L3)和重链可变区的残基 31-35(H1)、50-65(H2)和 95-102(H3); Kabat 等, 具有免疫学意义的蛋白的序列, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))和/或那些“超变环”的氨基酸残基(例如轻链可变区的残基 26-32(L1)、50-52(L2)和 91-96(L3)和重链可变区的残基 26-32(H1)、53-55(H2)和 96-101(H3); Chothia 和 Lesk, 分子生物学杂志 196: 901-917(1987))。“框架区”或“FR”残基是那些除了本文所定义的超变区残基以外的可变区残基。

木瓜蛋白酶消化抗体可产生两个相同的各带有单个抗原结合位点的抗原结合片段(称为“Fab”片段)和残余的“Fc”片段, Fc 段的名称反应了其易于结晶的能力。经胃蛋白酶处理可产生具有两个抗原结合位点并仍然能交联抗原的  $F(ab')_2$  片段。

“Fv”段是含有完整的抗原识别和抗原结合位点的最小抗体片段。此区由紧密地非共价连接的一个重链可变区与一个轻链可变区的二聚体组成。在这个构象中每个可变区的三个超变区相互作用, 在  $V_H$ - $V_L$  二聚体表面限定一个抗原结合位点。这六个超变区共同赋予抗体以抗原结合特异性。然而, 即使是单个可变区(或  $F_V$  上仅含有二个抗原特异性高变区的那一半)也具有识别和结合抗原的能力, 但与完整的结合位点相比其亲和力较低。

Fab 段还包括轻链恒定区和重链的第一个恒定区(CH1)。Fab' 与 Fab 的差别在于 Fab' 在重链 CH1 的羧基末端多出几个残基, 包括抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 在本文中是指恒定区半胱氨酸残基中至少有一个游离巯基的 Fab'。 $F(ab')_2$  抗体片段在最初产生为 Fab' 片段对, 在它们之间具有铰链区半胱氨酸。抗体片段的其它化学偶联是众所周知的。

脊椎动物任何物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可以是两种完全不同的型( $\kappa$  和  $\lambda$ )之一, 型别区分的依据是其恒定区氨基酸序列。

“单链 Fv”或“scFv”抗体片段包括抗体的  $V_H$  和  $V_L$  结构域, 这些结构域存在于单个多肽链上。优选 Fv 多肽在  $V_H$  和  $V_L$  结构域之间还包含一个多肽接头, 它能使 scFv 形成抗原结合所需的结构。关于 scFv 的综述见 Pluckthun 在《单克隆抗体的药理学》, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页(1994)。抗 ErbB2 抗体 scFv 片段见 WO93/16185、美国专利 5571894 和美国专利 5587458 中所述。

术语“二价抗体(diabodies)”是指具有两个抗原结合位点的小分子抗体片段, 这些片段在一条多肽链( $V_H$ - $V_L$ )上含有相连的一个重链可变区( $V_H$ )和一

个轻链可变区(V<sub>L</sub>)。利用一种非常短的接头,其使得同一条链上的两个结构域无法配对,不得不与另一条链上的互补结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。在EP 404,097; WO93/11161; 和 Hollinger 等,美国国家科学院院刊, 90: 6444-6448(1993)中有对二价抗体的更详细描述。

非人类(例如啮齿类动物)抗体的“人源化”型是嵌合抗体,其包括最小限度的源自非人类免疫球蛋白的序列。在很大程度上,人源化抗体是人类的免疫球蛋白(接受体抗体),其中接受体的超变区残基被具有所需特异性、亲和力和性能的小鼠、大鼠、家兔或非人类灵长类等非人类物种的(供体抗体)超变区残基所取代。在一些实例中,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基由相应的非人类残基所取代。而且,人源化抗体可包括在接受体抗体或供体抗体中不存在的残基。这些修饰旨在进一步改善抗体的性能。通常,人源化抗体基本上包括至少一个(通常包括两个)可变区的全部,其中超变环的全部或基本上全部对应于非人类免疫球蛋白的相应部分,而FR序列的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列。人源化抗体还任选包括免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。详见 Jones 等,自然, 321: 522-525 (1986); Riechmann 等,自然 332: 323-329 (1988); 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)。

人源化抗 ErbB2 抗体包括美国专利 5821337(引入作参考)的表 3 中所述的 huMAb4D5-1、huMAb4D5-2、huMAb4D5-3、huMAb4D5-4、huMAb4D5-5、huMAb4D5-6、huMAb4D5-7 和 huMAb4D5-8(HERCEPTIN®); 人源化 520C9 (WO93/21319)和如下所述的人源化 2C4 抗体。

“分离的”抗体是已从其天然环境的组成中鉴定、分离和/或回收的抗体。其天然环境的污染成分是干扰抗体的诊断或治疗应用的物质,可包括酶、激素和其它蛋白性或非蛋白性溶质。在优选的实施方案中,该抗体的纯度应达到:(1)经 Lowery 法确定的抗体重量的 95%以上,最优选所述重量的 99%以上,(2)足以获得用旋转杯状(spinning cup)序列分析仪所测至少 15 个残基的 N 端或内部氨基酸序列,(3)通过还原或非还原条件下的 SDS-PAGE 以及考马斯亮蓝染色、优选银染所证实的同质性。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为该抗体的自然环境中的至少一种组分已不存在。一般情况下分离的抗体可通过至少一个纯化步骤来制备。

“结合”目的抗原(例如 ErbB2 抗原)的抗体是能以足够的亲和力结合该抗原,而使该抗体在靶向表达该抗原的细胞中作为有效的治疗药物那些抗

体。在所述抗体为结合 ErbB2 的抗体时,与其它 ErbB 受体相比,它通常优选结合 ErbB2,并且它可以是与 EGFR、ErbB3 或 ErbB4 等其它蛋白没有显著的交叉相互作用的抗体。在这类实施方案中,当用荧光活化细胞分选术(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA)等方法进行检测时,该抗体与这些非 ErbB2 蛋白的结合(例如与内源性受体的细胞表面结合)程度将小于 10%。有时,抗 ErbB2 抗体与大鼠 neu 蛋白不发生显著的交叉相互作用,例如 Schecter 等,自然 312: 513(1984)和 Drebin 等,自然 312: 545-548(1984)中所述。

“阻断”ErbB 受体的配体活化作用的抗体是降低或防止上述这种活化作用的抗体,其中该抗体能以远比单克隆抗体 4D5 更为有效地(例如与单克隆抗体 7F3 或 2C4 或其 Fab 片段一样有效,优选与单克隆抗体 2C4 或其 Fab 片段一样有效)阻断 ErbB 受体的配体活化作用。例如,阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体可以是在阻断 ErbB 异寡聚体形成的方面比 4D5 的有效性约高 50-100%的抗体。对 ErbB 受体的配体活化作用的阻断可通过任何方式发生,例如通过干扰:配体与 ErbB 受体的结合、ErbB 复合物的形成、ErbB 复合物中 ErbB 受体的酪氨酸激酶活性和/或 ErbB 受体的酪氨酸激酶残基的磷酸化。阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体实例包括单克隆抗体 2C4 和 7F3(其阻断 ErbB2/ErbB3 和 ErbB2/ErbB4 异寡聚体的 HRG 活化作用;和 EGFR/ErbB2 异寡聚体的 EGF、TGF- $\alpha$ 、amphiregulin、HB-EGF 和/或表皮调节素的活化作用);和 L26、L96 和 L288 抗体(Klapper 等,癌基因 14: 2099-2109(1997)),其阻断 EGF 和 NDF 与表达 EGFR、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 的 T47D 细胞的结合。

具有所指抗体(例如称为 2C4 的单克隆抗体)的“生物学特性”的抗体,是指具有所指抗体的一种或多种生物学特性的抗体,这些特性使此抗体区别于结合相同抗原(例如 ErbB2)的其它抗体。例如,具有 2C4 的生物学特性的抗体可阻断含 ErbB2 和 ErbB3 或 ErbB4 的 ErbB 异寡聚体被 HRG 活化的作用;阻断 ErbB 受体(包括 EGFR 和 ErbB2)被 EGF、TGF- $\alpha$ 、HB-EGF、表皮调节素和/或 amphiregulin 活化的作用;阻断 MAPK 被 EGF、TGF- $\alpha$  和/或 HRG 介导活化的作用;和/或与 ErbB2 的胞外结构域中可被 2C4 结合的表位结合(例如其阻断单克隆抗体 2C4 与 ErbB2 的结合)。

除非另外指明,词语“单克隆抗体 2C4”是指具有下述实施例中鼠 2C4 抗体(或衍生自该 2C4 抗体)的抗原结合残基的抗体。例如,该单克隆抗体 2C4 可以是鼠单克隆抗体 2C4 或其具有鼠单克隆抗体 2C4 的抗原结合氨基酸残

基的变体,例如人源化抗体 2C4。人源化 2C4 抗体的实例见下述实施例 3。除非另外指明,在本文中词语“rhUMAb 2C4”是指含有分别示于 SEQ ID No. 3 和 4 的轻链可变区(V<sub>L</sub>)和重链可变区(V<sub>H</sub>)序列,并且这些序列已与任选由中国仓鼠卵(CHO)细胞表达的人的轻链和重链 IgG1(非 A 同种异型)恒定区融合的那些抗体。

除非另外指明,术语“单克隆抗体 4D5”指具有鼠 4D5 (ATCC CRL 10463) 抗体(或衍生自 4D5 抗体)的抗原结合残基的抗体。例如,该单克隆抗体 4D5 可以是鼠单克隆抗体 4D5 或其具有鼠单克隆抗体 4D5 的抗原结合氨基酸残基的变体,例如人源化抗体 4D5。4D5 抗体实例包括如美国专利 5,821,337 中所述的 huMAb 4D5-1、huMAb 4D5-2、huMAb 4D5-3、huMAb 4D5-4、huMAb 4D5-5、huMAb 4D5-6、huMAb 4D5-7 和 huMAb 4D5-8 (HERCEPTIN®),其中 huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®)是优选的人源化 4D5 抗体。

本文中“生长抑制剂”是指在体内或体外抑制细胞生长,尤其抑制表达 ErbB 的癌症细胞生长的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可以是显著降低 S 期 ErbB 表达细胞百分比的药物。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期(在除 S 期以外的某个阶段)进展的药物,例如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药物。经典的 M 期阻断剂包括长春花类(长春新碱和长春花碱),紫杉烷(taxane)和 topo II 抑制剂如阿霉素、表阿霉素、柔红霉素、依托泊甙(etoposide)和博来霉素等。那些使 G1 期停滞的药物还连带(spill over)使 S 期停滞,例如 DNA 烷化剂象他莫昔芬、强的松、达卡巴嗪、氮芥(mechlorethamine)、顺铂、氨甲蝶呤、5-氟尿嘧啶和阿糖胞苷等。详见《癌症的分子基础》Mendelsohn 和 Israel 编,第一章, Murakami 等的题为“细胞周期的调节、癌基因和抗肿瘤药”的文章(WB Saunders: Philadelphia, 1995),尤其见 13 页。

“生长抑制性”抗体实例是与 ErbB2 结合并抑制过度表达 ErbB2 的癌细胞的生长的那些抗体。优选的生长抑制性抗 ErbB2 抗体在约 0.5-30  $\mu$ l/ml 的浓度下可使细胞培养中 SK-BR-3 乳腺癌细胞的生长抑制 20% 以上,优选 50% 以上(例如从约 50% 到约 100%),其中的生长抑制是使 SK-BR-3 细胞暴露于所述抗体 6 天后检测的(见 1997 年 10 月 14 日公布的美国专利 5677171)。SK-BR-3 细胞生长抑制试验详见该专利以及下文。优选的生长抑制性抗体是单克隆抗体 4D5,例如人源化 4D5。

“诱导细胞死亡”的抗体是使活细胞失去活性的抗体。所述细胞通常是

表达 ErbB2 受体的细胞,尤其是过度表达 ErbB2 受体的细胞。优选所述细胞为癌细胞,例如乳腺、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰腺或膀胱的细胞。在体外,所述细胞可以是 SK-BR-3、BT474、Calu3、MDA-MB-453、MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。在体外的细胞死亡可在无补体和免疫效应细胞的条件下进行检测,以便与抗体依赖性细胞介导的细胞毒(ADCC)或补体依赖性细胞毒作用(CDC)诱导的细胞死亡进行区分。因此,可使用热灭活的血清(即无补体的条件下)并在无免疫效应细胞的条件下进行细胞死亡检测。为了检测抗体能否诱导细胞死亡,可通过评价相对于未处理细胞,对 propidium iodide (PI)、台盼蓝(见 Moore 等,细胞技术 17: 1-11 (1995))或 7AAD 的吸收来评估膜完整性的丧失。优选的细胞死亡诱导抗体是那些在 BT474 细胞的 PI 摄入试验中诱导 PI 摄入的抗体(见下述)。

“诱导凋亡”的抗体是指那些可诱导细胞程序性细胞死亡的抗体,所述凋亡可通过 annexin V 的结合, DNA 片段化, 细胞皱缩, 内织网膨胀, 细胞碎裂, 和/或膜泡(称为凋亡小体)的形成确定。所述细胞通常是过度表达 ErbB2 受体的细胞。优选所述细胞为癌细胞,例如乳腺、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、结肠、甲状腺、胰腺或膀胱的细胞。在体外,所述细胞可以是 SK-BR-3、BT474、Calu 3、MDA-MB-453、MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。可用各种方法检测与凋亡相关的细胞事件。例如, 磷脂酰丝氨酸(PS)易位可通过 annexin 结合来测定; DNA 片段化可通过 DNA 序列梯(laddering)来评估; 与 DNA 片段化相伴的核/染色体浓缩可通过亚二倍体细胞中的任何增加来评估。优选凋亡诱导抗体是在 BT474 细胞的 annexin 结合试验中, 导致对 annexin 的结合为未处理细胞的约 2-50 倍, 优选约 5-50 倍, 最优选约 10-50 倍的那些抗体(见下述)。有时前凋亡性(pro-apoptotic)抗体是进一步阻断 ErbB 受体的 ErbB 配体活化作用的抗体(例如 7F3 抗体), 即所述抗体与单克隆抗体 2C4 有共同的生物学特点。在其它情况中, 所述抗体是不明显阻断 ErbB 受体的 ErbB 配体活化作用的抗体(例如 7C2 抗体)。而且, 该抗体可以是与 7C2 相似的抗体, 其在诱导细胞凋亡时, 不引起 S 期细胞的百分比大幅下降(例如与对照相比仅引起这些细胞的百分比下降约 0-10% 的抗体)。

“表位 2C4”是 ErbB2 细胞外结构域中与抗体 2C4 结合的区域。为了筛选与 2C4 表位结合的抗体, 可进行常规的交叉阻断试验, 例如《抗体》, 实验室指南, 冷泉港实验室, Harlow 和 David Lane 编(1998)所述方法。或者, 可进行表位作图来评定抗体是否与 ErbB2 的 2C4 表位结合(例如 ErbB2 上从

约残基 22 到残基 584 的区域中的任何一个或多个残基, 包括这两个端点残基, 见图 1A-B)。

“表位 4D5”是 ErbB2 细胞外结构域中与抗体 4D5(ATCC CRL 10463) 结合的区域。该表位靠近 ErbB2 的跨膜结构域。为了筛选与 4D5 表位结合的抗体, 可进行常规的交叉阻断试验, 例如《抗体》, 实验室指南, 冷泉港实验室, Harlow 和 David Lane 编(1998)所述方法。或者, 可进行表位作图来评定抗体是否与 ErbB2 的 4D5 表位结合(例如 ErbB2 上从约残基 529 到残基 625 的区域中的任何一个或多个残基, 包括这两个端点残基, 见图 1A-B)。

“表位 3H4”是 ErbB2 细胞外结构域中与抗体 3H4 结合的区域。该表位包括 ErbB2 细胞外结构域的氨基酸序列中从约 541 到约 599(包括这两个端点残基)的残基, 见图 1A-B。

“表位 7C2/7F3”是与 7C2 和/或 7F3 抗体(均在 ATCC 保存, 见下述)结合的 ErbB2 细胞外结构域 N 末端区域。为了筛选与 7C2/7F3 表位结合的抗体, 可进行常规的交叉阻断试验, 例如《抗体》, 实验室指南, 冷泉港实验室, Harlow 和 David Lane 编(1998)所述方法。或者, 可进行表位作图来评定抗体是否与 ErbB2 的 7C2/7F3 表位结合(例如 ErbB2 上从约残基 22 到残基 53 的区域中的任何一个或多个残基, 见图 1A-B)。

“治疗”即指治疗性处理也指预防性措施。需要治疗者包括已患病者以及需要对疾病进行预防者。因此, 将要接受本文所述治疗哺乳动物可能被诊断为已患病或对所述疾病易感。

需要治疗的“哺乳动物”是指归为哺乳动物的任何动物, 包括人、家畜和农场动物, 以及动物园里的动物、参与运动项目的动物或宠物如狗、马、猫、牛等。优选所述哺乳动物为人类。

“疾病”是将从抗 BrbB2 抗体的治疗中受益的任何情况。这包括慢性和急性疾病, 包括哺乳动物易感的特定疾病的病理状况。在此将被治疗的疾病的非限定实例包括良性和恶性肿瘤; 白血病和淋巴样恶性肿瘤; 神经元、神经胶质细胞、星型细胞、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞、上皮细胞、间质和囊胚腔的疾病; 炎性、血管原性和免疫性疾病。

术语“治疗有效量”是指有效治疗哺乳动物疾病的药物的量。如果是治疗癌症, 则药物的治疗有效量可减少癌细胞的数量; 减少肿瘤的大小; 抑制(即减慢至一定程度, 优选终止)癌细胞浸润到外周器官中; 抑制(即减慢至一定程度, 优选终止)肿瘤转移; 在一定程度上, 抑制肿瘤生长; 和/或在一定

定程度上,缓解与癌症相关的一或多种症状。至于所述药物阻止生长和/或杀伤现存癌细胞的程度,可以是抑制细胞和/或具有细胞毒性。至于肿瘤治疗,可通过例如评估疾病进展时间 (TTP) 和/或确定应答率 (RR) 来测定其效力。

术语“癌症”和“癌性质的”是指或描述哺乳动物中以细胞生长失控为典型特点的病理状态。癌症的实例包括但不限于癌 (carcinoma), 淋巴瘤, 母细胞瘤, 肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。更具体而言, 这些癌包括鳞状细胞癌 (例如上皮鳞状细胞癌), 肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状上皮癌), 腹膜癌, 肝细胞癌 (hepatocellular cancer), 胃癌(包括胃肠癌), 胰腺癌, 胶质母细胞瘤, 宫颈癌, 卵巢癌, 肝癌 (liver cancer), 膀胱癌, 肝细胞瘤(hepatoma), 乳腺癌, 结肠癌, 直肠癌, 结直肠癌, 子宫内膜或子宫癌, 唾液腺癌, 肾癌, 前列腺癌, 外阴癌, 甲状腺癌, 肝癌(hepatic carcinoma), 肛门癌, 阴茎癌以及头颈癌。

“表达 ErbB 的癌”含有于细胞表面携带 ErbB 蛋白的细胞。“表达 ErbB 的癌”在其细胞表面产生足够水平的 ErbB2, 而使抗 ErbB2 抗体能与其结合并对所述癌症产生治疗作用。

“以 ErbB 受体过度活化为特点”的癌是这样的癌, 其中癌细胞中的 ErbB 受体活化程度显著高于相同组织类型的非癌性细胞中该受体的活化水平。此过度活化可起因于癌细胞中 ErbB 受体的过度表达和/或有效活化 ErbB 受体的 ErbB 配体高于正常水平。此过度活化可引起癌细胞的恶性状态, 和/或被癌细胞的恶性状态引起。在一些实施方案中, 可对所述癌症进行诊断性或预后性检测, 来确定导致此 ErbB 受体过度活化的 ErbB 受体扩增和/或过度表达是否存在。或者(或另外)对所述癌症进行诊断性或预后性检测, 来确定促使此受体过度活化的 ErbB 配体扩增和/或过度表达是否存在。在这些癌的一个亚群中, 所述受体的过度活化可由自分泌刺激途径引起。

在“自分泌”刺激途径中, 自我刺激的发生是因为所述癌症细胞即产生 ErbB 配体又产生其相关的 ErbB 受体。例如, 所述癌症可表达或过度表达 EGFR 而且还表达或过度表达 EGFR 配体(例如 EGF、TGF- $\alpha$ 、或 HB-EGF)。在另一个实施方案中, 所述癌症可表达或过度表达 ErbB2 而且还表达或过度表达 heregulin (如  $\gamma$ -HGR)。

“过度表达”ErbB 受体的癌是在其细胞表面上的 ErbB 受体(例如 ErbB2)水平显著高于相同组织类型的非癌性细胞的那些癌。此过度表达可由基因扩

增或增加的转录或翻译而引起。ErbB 受体的过度表达可在通过评估细胞表面 ErbB 蛋白水平的增加(例如通过免疫组化试验; IHC)而进行的诊断性或预后性检测中确定。或者(或另外), 细胞中 ErbB 核酸的水平可通过如原位荧光杂交(FISH; 见 1998 年 10 月公开的 WO98/45479), Southern 印迹或实时定量 PCR(RT-PCR)等聚合酶链式反应测定。也可通过检测血浆等生物体液中的脱落抗原(例如 ErbB 细胞外结构域)来研究 ErbB 受体过度表达(例如见 1990 年 6 月 12 日公布的美国专利 4933294; 1991 年 4 月 18 日公开的 WO91/05264; 1995 年 3 月 28 日公布的美国专利 5401638; 和 Sias 等, 免疫学方法杂志 132: 73-80(1990))。除了上述试验, 熟练的技术人员还可利用各种体内试验。例如, 可将患者体内的细胞暴露于已任选用可检测的标记物(例如放射性同位素)标记的抗体, 然后通过例如体表放射活性扫描, 或通过对在暴露于抗体之前从患者体内取的活体组织进行分析来评估患者细胞与抗体的结合。

相反, “不以 ErbB2 受体过度表达为特点”的癌在诊断性检测中, 与其相同组织类型的非癌性细胞相比, 表达的 ErbB2 受体水平不高于正常水平。

“过度表达”ErbB 配体的癌是产生的 ErbB 配体水平显著高于相同组织类型的非癌性细胞的那些癌。此过度表达可由基因扩增或增加的转录或翻译而引起。通过检测患者(例如肿瘤活体标本)中该配体(或其编码核酸)的水平, 或通过诊断性检测如 IHC、FISH、southern 印迹、PCR 或上述体内试验等, 可确诊 ErbB 配体过度表达。

“激素非依赖性”癌是其不依赖于与该癌症中细胞表达的受体结合的激素的存在而增殖的那些癌症。这些癌症不因实施能降低肿瘤内或其附近的激素浓度的药理学或手术方案而出现临床消退。激素非依赖性癌的实例包括雄激素非依赖性前列腺癌, 雌激素非依赖性乳腺癌、子宫内膜癌和卵巢癌。这些癌可能始于激素依赖性肿瘤, 然后在抗激素治疗后由激素敏感期而发展为激素耐受性肿瘤。

本文中术语“细胞毒药物”是指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。该术语意在包括放射性同位素(例如 At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>和 Lu 的放射性同位素), 化疗药物, 毒素如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素, 包括其片段和/或变体。

“化疗药物”是在肿瘤治疗中使用的化学化合物。化疗药物实例包括烷化剂, 如噻替哌(thiotepa); 环磷酰胺(cyclophosphamide)(CYTOXAN<sup>TM</sup>); 烷基磺酸酯如白消安(busulfan), 英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan); 氮

丙啉(aziridine)如苯并多巴(benadopa), 卡波醌(carboquone), 美妥替啉(meturedopa)和尿烷亚胺(uredopa); 氮丙啉和 methylamelamine 包括六甲蜜胺(altretamine), 三亚胺嗪(triethylenemelamine), 三亚乙基磷酰胺, 三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine); 氮芥(nitrogen mustards)如苯丁酸氮芥, 萘氮芥, 胆磷酰胺(cholophosphamide), 雌氮芥(estramustine), 异环磷酰胺(ifosfamide), 氮芥(mechlorethamine), 盐酸氧氮芥; 左旋苯丙氨酸氮芥(melphalan), 新氮芥(novembichin), 胆甾醇苯乙酸氮芥, 松龙苯芥(prednimustine), 曲磷胺(trofosfamide), 尿嘧啶氮芥; 亚硝基脲(nitrosureas)如亚硝基脲氮芥(carmustine), 氯脲菌素(chlorozotocin), 福莫司汀(fotemustine), 洛莫司汀(lomustine), 尼莫司汀(nimustine), 雷莫司汀(ranimustine); 抗生素如阿克拉霉素, 放线菌素, anthramycin, 重氮丝氨酸, 博来霉素, 放线菌素 C (cactinomycin), 加利车霉素(calicheamicin), carabycin, 洋红霉素(chromomycin), 嗜癌素(carzinophilin), 色霉素, 放线菌素 D, 柔红菌素(daunorubicin), 地托比星(detorubicin), 6-重氮-5-氧-L-正亮氨酸, 阿霉素(doxorubicin), 表阿霉素(epirubicin), 依索比星(esorubicin), 伊达比星(idarubicin), 发波霉素(marcellomycin), 丝裂霉素, 霉酚酸, 诺加霉素(nogalamycin), 橄榄霉素(olivomycin), 培洛霉素(peplomycin), potfiromycin, 嘌呤霉素, 三铁阿霉素(quelamycin), 罗多比星(rodorubicin), 链黑菌素; 链脲霉素(streptozocin), 杀结核菌素, 乌苯美司(ubenimex), 净司他丁(zinostatin), 佐柔比星(zorubicin); 抗代谢药如氨甲蝶呤, 5-氟尿嘧啶(5-FU); 叶酸类似物如二甲叶酸(denopterin), 氨甲蝶呤, 蝶罗呤, 三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤类似物氟达拉滨(fludarabine), 6-巯基嘌呤, 硫咪嘌呤, 硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物如安西他滨(ancitabine), 阿扎胞苷(azacitidine), 6-氮尿苷, 卡莫氟(carmofur), 阿糖胞苷, 双脱氧尿苷, 去氟氧尿苷(doxifluridine), 依诺他滨(enocitabine), 氟尿苷, 5-FU; 雄激素类如二甲睾酮(calusterone), 丙酸甲雄烷酮(dromostanol propionate), 环硫雄醇(epitiostanol), 美雄氨(mepitiostane), 睾内酯(testolactone); 抗肾上腺类如氨鲁米特(aminoglutethimide), 米托坦(mitotane), 曲洛司坦(trilostane); 叶酸补充剂如frolinic acid; 醋葡内酯; 醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside); 氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid); 安吡啉(amsacrine); bestabucil; 比生群(biasntrene); 依达曲沙(edatraxate); defofamine; 秋水仙胺; 地吡醌(diaziquone); elfornithine; 依利醋铵(elliptinium acetate); 依托格鲁(etoglucid); 硝酸镓; 羟

基脲; 香菇多糖(lentinan); 氯尼达明(lonidamine); 米托胍脲(mitoguazone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamol); 硝呋旦(nitracrine); 喷司他丁(pintostatin); phenamet; 吡柔比星(pirarubicin); 鬼臼树酸(podophyllinic acid); 2-乙基酰肼; 丙卡巴肼(procarbazine); PSK®; 雷佐生(razoxane); 西索菲兰(sizofiran); 锗螺胺(spirogermanium); 细交链孢菌酮酸; 三亚胺醌; 2,2',2''-三氯三乙胺(trichlorotriethylamine); 乌拉坦(urethan); 长春碱酰胺; 达卡巴嗪(dacarbazine); 甘露醇氮芥; 二溴甘露醇(mitobronitol); 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷(pipobroman); gacytosine; 阿拉伯糖苷(“Ara-C”); 环磷酰胺; 三胺硫磷(thiotepa); 紫杉烷(紫杉烷), 如紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)和 docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨(gemcitabine); 6-硫代鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 氨基蝶呤; 铂类似物如顺铂和卡铂; 长春花碱; 铂; 依托泊甙(etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺; 丝裂霉素 C; 米托蒽醌; 长春新碱; 长春瑞宾(vinorelbine); 新霉酰胺(navelbine); novantrone; 替尼泊甙(teniposide); 柔红霉素; 氨基蝶呤; xeloda; 伊拜膦酸盐(ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 维甲酸; esperamicins; capecitabine; 以及上述任何物质的可药用盐, 酸或衍生物。此定义还包括能调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素制剂, 如抗雌激素制剂包括他莫昔芬(tamoxifen), 雷洛昔芬(raloxifene), 芳香酶抑制剂 4(5)-咪唑, 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬(trioxifene), keoxifene, LY117018, onapristone, 和托瑞米芬(Fareston); 和抗雄激素制剂如氟他氨(flutamide), 尼鲁米特(nilutamide), bicalutamide, 亮丙瑞林(leuprolide)和戈舍瑞林(goserelin); 和上述任何物质的可药用盐, 酸或衍生物。

本文中术语“靶向 EGFR 的药物”是指与 EGFR 结合并任选抑制 EGFR 活化的治疗药物。这些药剂的实例包括与 EGFR 结合的抗体和小分子。与 EGFR 结合的抗体实例包括 Mab 579 (ATCC CRL HB8506)、Mab 455 (ATCC CRL HB 8507)、Mab 225 (ATCC CRL HB 8508)、Mab 528 (ATCC CRL HB 8509) (见美国专利 4943533, Mendelsohn 等)及其变体, 例如嵌合型 225(C225)和重塑型人 225(H225) (见 WO96/40210, Imclone Systems Inc.); 结合 EGFR II 型突变体的抗体(美国专利 5212290); 美国专利 5891996 中所述与 EGFR 结合的人源化抗体和嵌合抗体; 和与 EGFR 结合的人抗体(见 WO98/50433, Abgenix)。所述抗 EGFR 抗体可与细胞毒药剂偶联, 从而产生免疫偶联物(见

例如 EP 659,439A2, Merck Patent GmbH)。与 EGFR 结合的小分子的实例包括 ZD 1839 (Astra Zeneca)、CP-358774 (OSI/Pfizer)和 AG 1478。

“抗血管生成药剂”是指在一定程度上阻断或干扰血管发育的化合物。例如,抗血管生成因子可以是与参与促进血管生成的生长因子或生长因子受体结合的小分子或抗体。本文中优选的抗血管生成因子是与血管内皮生长因子(VEGF)结合的抗体。

术语“细胞因子”是一般性术语,指由一个细胞群释放的对另一个细胞群起细胞间介质作用的蛋白。这些细胞因子包括生长激素,如人生长激素, N-甲二磺酰人生长激素,和牛生长激素;甲状旁腺素;甲状腺素;胰岛素;前胰岛素;松弛素;前松弛素;糖蛋白激素如卵泡刺激素(FSH), 甲状腺刺激素(TSH), 促黄体(生成)激素(LH);肝细胞生长因子;成纤维细胞生长因子;催乳激素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和 $\beta$ ; mullerian-抑制物;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;苯丙酸诺龙;血管内皮细胞生长因子;整联蛋白;血小板生成素(TPO);神经生长因子如 NGF- $\beta$ ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF)如 TGF- $\alpha$ 和 TGF- $\beta$ ;胰岛素样生长因子-I 和-II;促红细胞生成素(EPO);骨诱导因子(osteoinductive factors);干扰素如干扰素- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ;集落刺激因子(CSF)如巨噬细胞-CSF(M-CSF);粒细胞-巨噬细胞-CSF(GM-CSF);粒细胞-CSF(G-CSF);白细胞介素(IL)如 IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12;肿瘤坏死因子如 TNF- $\alpha$ 或 TNF- $\beta$ ;和其它多肽因子包括 LIF 和 kit 配体(KL)。本文中术语细胞因子包括天然蛋白或来自重组细胞培养物的蛋白以及天然序列细胞因子的生物活性等效物。

本申请使用的术语“前体药物”是指药物活性物质的前体或衍生物形式,其相对于亲本药物对肿瘤细胞的细胞毒作用较小且可酶促活化或被转换成更具活性的亲本形式。例见 Wilman, “癌症化疗中的前体药物” Biochemical Society Transaction, 14, pp.375-382, 615<sup>th</sup> Meeting Belfast (1986)和 Stella 等,

“前体药物:一种药物定向运送的化学方法”定向药物运送, Borchardt 等(编), pp.247-267, Humana press(1985)。本发明的前体药物包括,但不限于含有磷酸盐的前体药物,含有硫代磷酸盐的前体药物,含有硫酸盐的前体药物,含有肽的前体药物, D-氨基酸修饰的前体药物,糖基化的前体药物,含有 $\beta$ -内酰胺的前体药物,任选含有取代的苯氧乙酰胺的前体药物或任选含有取代的苯基乙酰胺的前体药物, 5-氟胞嘧啶和可转化为更具细胞毒活性的游离

药物的其它 5-氟尿嘧啶前体药物。可衍生为本发明所用前体药物形式的细胞毒药物包括，但不限于上述化疗药物。

“脂质体”是由能向哺乳动物有效运送药物(如本文公开的抗 ErbB2 抗体，和，任选，一种化疗药物)的各类脂质、磷脂和/或表面活性剂组成的小分子囊泡。脂质体的组分通常排列为双层形式，与生物膜的脂质排列相似。

所用的术语“包装插页”是指通常包括在治疗产品的商业包装中，含有与这些治疗产品的使用有关的说明，用法，剂量，给药，禁忌和/或警示等的说明书。

“心脏保护剂”是能预防或减少与向患者给药(如蒽环霉素抗生素和/或抗 ErbB2 抗体)相关的心肌功能障碍(即心肌病和/或充血性心脏衰竭)的化合物或组合物。心脏保护剂可，例如阻断或减少自由基介导的心脏毒性作用和/或预防或减少氧化应激损伤。本定义包括的心脏保护剂的实例包括铁螯合剂右丙亚胺(dexrazoxane)(ICRF-187) (Seifert 等, *Annals of Pharmacotherapy* 28: 1063-1072 (1994)); 降脂药和/或抗氧化剂，如丙丁酚(probucol) (Singal 等, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 27: 1055-1063 (1995)); 氨磷汀(氨基硫醇 2-[(3-氨丙基)氨基]乙烷硫醇-二氢磷酸酯，也称为 WR-2721，其脱磷酸化的细胞吸收型称为 WR-1065)和 S-3-(3-甲基氨基丙基氨基)丙基硫代磷酸(WR-151327)，见 Green 等, *癌症研究* 54: 738-741(1994); 地高辛(Bristow, M.R.在 Bristow, M.R. 主编的《药物诱导的心脏病》中，纽约: Elsevier 191-215(1980));  $\beta$  阻断剂如美托洛尔(Hjalmarson 等, *药物* 47: 增刊 4: 31-9(1994); 和 Shaddy 等, *美国心脏杂志* 129: 197-9(1995)); 维生素 E; 抗坏血酸(维生素-C); 自由基清除剂，如齐墩果酸、乌苏酸和 N-乙酰半胱氨酸(NAC); spin trapping 化合物，如  $\alpha$ -苯基-叔丁基硝酮(PBN); (Paracchini 等, *抗癌研究* 13: 1607-1612(1993)); selenoorganic 化合物，如 P251(Elbesen)等等。

“分离的”核酸分子是从抗体核酸的天然来源中通常与其结合的至少一种杂质核酸分子中鉴定并分离的核酸分子。分离的核酸分子不同于其天然形式或组合(setting)。因此分离的核酸分子区别于其在天然细胞中的存在形式。然而，分离的核酸分子包括通常能表达该抗体的细胞中所含核酸分子，例如在此细胞中所述核酸分子的染色体定位与其在天然细胞中的定位不相同。

术语“调控序列”指在特定宿主生物中使可操作连接的编码序列表达所需的 DNA 序列。适于原核生物的调控序列可包括如启动子，任选操纵子序列，和核糖体结合位点。已知真核生物细胞利用启动子，聚腺苷酸化信号和

增强子。

当一种核酸与另一种核酸序列处于功能相关的位置时,该核酸与该另一种核酸“可操作相连”。例如如果一种多肽表达为参与该多肽的分泌的前体蛋白,则将前序列或分泌前导序列的 DNA 与该多肽的 DNA 可操作相连;启动子或增强子当能影响编码序列的转录时可与该编码序列可操作相连;或核糖体结合位点当其位置能促进翻译时可与编码序列可操作相连。通常“可操作相连”指被连接的 DNA 序列是相邻的,而且,如果是分泌前导序列,则相邻且为阅读状态。然而,增强子不必是相邻的。连接可通过在方便的限制性位点相连而实现。如果不存在这样的位点,可根据常规实践使用合成的寡核苷酸衔接子或接头。

本文中,词语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养”可互换应用,而且所有这些名称均包括子代。因此,单词“转化体”或“转化的细胞”包括原代主体细胞和从其衍生的培养物,不必考虑转移的次数。还应明白由于有意或无意的突变,所有子代的 DNA 含量可能不完全相同。具有与原始转化细胞中所筛选的功能或生物学活性相同的功能或生物学活性的突变子代也包括在内。名称不同之处,将在文中指明。

## II. 抗 ErbB2 抗体的制备

下面是关于本发明所用抗体的制备技术实例的叙述。用于制备抗体的 ErbB2 抗原可以是例如 ErbB2 的可溶型细胞外结构域或其含所需表位的一部分。或者,可用在其表面表达 ErbB2 的那些细胞(例如转化为过度表达 ErbB2 的 NIH-3T3 细胞;或 SK-BR-3 细胞等癌细胞系,见 Srancovski 等,PNAS(USA)88: 8691-8695(1991))来制备抗体。ErbB2 的可用于制备抗体的其它形式对于本领域技术人员是显而易见的。

### (i) 多克隆抗体

多克隆抗体优选通过多次给动物皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂而产生。将所述相关抗原与针对所免疫的物种具有免疫原性的蛋白(如匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin)、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂)用双功能试剂或衍生试剂,如马来酰亚胺苯甲酰基硫代琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基结合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 $\text{SOCl}_2$  或  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (R 和  $\text{R}^1$  是不同烷基,进行偶联是有效的。

用所述抗原、免疫原性偶联物或衍生物免疫动物,方法是,将  $100\text{ }\mu\text{g}$

或 5  $\mu$ g 蛋白或偶联物(分别针对兔或鼠)与 3 倍体积的弗氏完全佐剂混合, 在多位点皮内注射该溶液。1 个月后, 多位点皮内注射起始量的 1/5 - 1/10 的肽或与弗氏完全佐剂的偶联物来加强免疫。7-14 天后, 对动物采血, 测定血清中的抗体效价。对动物的加强免疫直到效价达到平台期为止。优选给动物加强注射相同抗原的偶联物, 但也可以是偶联至不同蛋白和/或通过不同的交联剂偶联的偶联物。偶联物还可以是重组细胞培养物产生的融合蛋白。此外, 可用明矾等聚集剂增强免疫应答。

## (ii) 单克隆抗体

单克隆抗体来自基本均一的抗体群, 即该群体中的每个抗体除了可能的很小量天然突变外都相同。因此, 修饰词“单克隆”指所述抗体的并非不同抗体混合物的特性。

例如, 单克隆抗体可用由 Kohler 等, 自然(1975)首次描述的杂交瘤技术制备, 或用重组 DNA 方法制备(美国专利 4,816,567)。

在杂交瘤方法中, 如上述免疫小鼠或其它适合的宿主动物如仓鼠, 以激发那些产生或能产生与用于免疫之蛋白特异性结合的抗体的淋巴细胞。另外, 可体外免疫淋巴细胞。然后用适当融合剂, 如聚乙二醇, 使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合, 形成杂交瘤细胞(Goding, 单克隆抗体: 原理及应用, pp.59-103(Academic Press, 1986))。

将如此制备的杂交瘤细胞接种至适当培养基中并培养, 优选该培养基含有一或多种能抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活物质。例如, 如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT 或 HPRT), 杂交瘤培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷(HAT 培养基), 这些物质阻止 HGPRT-缺陷型细胞的生长。

优选骨髓瘤细胞是那些能有效融合、支持所选抗体生成细胞以稳定的高水平产生抗体, 并对诸如 HAT 培养基等类似培养基敏感的细胞。其中, 优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系, 如由 Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA 提供的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤细胞和由美国典型培养物保藏中心, Rockville, Maryland USA 提供的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。也有报道称人骨髓瘤以及小鼠-人异质性骨髓瘤细胞系可用于产生人单克隆抗体(Kozbor, 免疫学杂志 133: 3001(1984); Brodeur 等, 单克隆抗体制备技术及应用, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))

可在含有生长的杂交瘤细胞培养基中分析直接针对所述抗原的单克隆

抗体的产生。杂交瘤细胞所产生的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀或通过体外结合试验,如放射免疫分析(RIA)或酶联免疫吸附试验(ELISA)来分析。

单克隆抗体的结合亲和力可通过如 Muson 等, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)所述 Scatchard 分析来测定。

一旦鉴定出能产生具有所需特异性、亲和力、和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,将这些克隆通过有限稀释法进一步克隆并用标准方法进行培养(Goding, 单克隆抗体: 原理及应用, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。适于此目的的培养基包括如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可作为腹水中肿瘤的形式在动物体内生长。

由亚克隆分泌的单克隆抗体可用常规免疫球蛋白纯化方法如蛋白-A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析从培养基、腹水或血清中分离。

编码单克隆抗体的 DNA 可用常规方法很容易的分离和测序(如利用能与编码小鼠抗体重链和轻链的基因特异结合的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞是这类 DNA 的优选来源。DNA 分离后,可将其插入表达载体中,然后用此表达载体转染宿主细胞,如大肠杆菌细胞、猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞,以便在重组宿主细胞中合成单克隆抗体。编码抗体的 DNA 在细菌中的重组表达的综述见 Skerra 等, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5: 256-262(1993)和 Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151-188 (1992)。

在另一实施方案中,可从用 McCafferty 等, *自然*, 348:552-554 (1990)所述技术产生的抗体噬菌体文库中分离抗体或抗体片段。Clackson 等, *自然*, 352:624-628(1991)和 Marks 等, *分子生物学杂志* 222: 581-597(1991)分别描述了用噬菌体文库分离鼠和人的抗体。后来的文献描述了通过链改组制备高亲和力(nM 范围)的人型抗体(Marks 等, *生物/技术* 10: 779-783(1992)),以及用于构建大规模噬菌体文库的组合感染和体内重组方法(Waterhouse 等, *核酸研究* 21: 2265-2266(1993))。因此,这些技术都可取代传统单克隆抗体杂交瘤技术来分离克隆抗体。

DNA 也可通过用人类重链和轻链的恒定区编码序列取代小鼠同源序列来修饰(美国专利 4,816,567; Morrison 等, *美国国家科学院学报* 81: 6851 (1984)),或通过将非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列与免疫球蛋白编

码序列共价结合来修饰。

通常用所述非免疫球蛋白多肽取代抗体恒定区，或取代抗体上一个抗原结合点的可变区，形成二价嵌合抗体，其中一个抗原结合位点特异于一种抗原而另一个抗原结合位点特异于另一种抗原。

### (iii) 人源化抗体

本领域已有关于人源化非人类抗体的制备方法的描述。优选人源化抗体中已导入一或多个源自非人类的氨基酸残基。这些非人类氨基酸残基常称为“引进的”残基，它们通常来自“引进的”可变区。人源化过程基本如 Winter 及其同事 (Jones 等，自然，321:522-525(1986); Riechmann 等，自然，332:323-327(1988); Verhoeyen 等，科学，239:1534-1536(1988)) 所述，用高变区序列取代人类抗体的相应序列来进行。因此，这样的“人源化”抗体是嵌合抗体(美国专利 4,816,567)，其中完整人类可变区的很少一部分被非人类物种的相应序列取代。实践中，人源化抗体通常是人的抗体，其中高变区残基且可能有部分 FR 残基被啮齿类抗体中类似位点的残基取代。

对用于制备人源化抗体的人类可变区(包括重链和轻链)的选择，对降低抗原性非常重要。根据所谓“最适应”方法，针对已知人类可变区序列的整个文库筛选啮齿类抗体可变区序列。将与啮齿类的序列最相似的人类序列作为人源化抗体的人框架区(FR)(Sims 等，免疫学杂志，151:2296(1993); Chothia 等，分子生物学杂志，196:901(1987))。另一种方法是用人类轻链或重链特定亚型的所有抗体的共有序列作为特定框架区。相同的框架可用于几种不同的人源化抗体(Carter 等，美国国家科学院学报，89: 4285(1992); Presta 等，免疫学杂志，151: 2623 (1993))。

更重要的是，将抗体人源化后保留了对抗原的高亲和力和其它有利的生物特性。为达到此目的，在一种优选方法中，通过用亲本序列和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物来制备人源化抗体。免疫球蛋白三维模型已有商品，是本领域技术人员所熟悉的。还有用于描述和展示所选免疫球蛋白序列可能的三维构象的计算机程序。通过观察这些展示结果可分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中可能发挥的作用，即分析能影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基，通过这种方法，可从受者和引进序列中选出 FR 残基并组合，从而得到所需抗体性质，如对靶抗原的亲合力增加。总之，高变区残基直接并且最主要涉及对抗原结合的影响。

下述的实施例 3 叙述了结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的

人源化抗 ErbB2 抗体实例的制备。本文中特定目的人源化抗体基本上与小鼠单克隆抗体 2C4(或其 Fab 片段)一样有效地阻断 MAPK 的由 EGF、TGF- $\alpha$  和/或 HRG 介导的活化作用,和/或与小鼠单克隆抗体 2C4(或其 Fab 片段)一样有效地结合 ErbB2。例如,此处的人源化抗体可包括引入人重链可变区的非人类超变区残基,并且可进一步包括在选自 69H、71H 和 73H(使用在 Kabat 等,具有免疫学意义的蛋白的序列,第 5 版. Public Health Service. National Institute of Health, Bethesda, MD(1991)中提出的编号系统)的位点上的框架区(FR)取代。在一个实施方案中,所述人源化抗体在 69H, 71H 和 73H 的两个或所有位置包含 FR 取代。

本文中目的人源化抗体的一个实例包括重链可变区的互补决定区残基 GFTFTDYTMX, 其中 X 优选 D 或 S(SEQ ID NO: 7); DVNPNSGGSIYNQRFKG(SEQ ID NO: 8); 和/或 NLGPSFYFDY(SEQ ID NO: 9), 任选包括这些 CDR 残基的氨基酸修饰, 例如所述修饰基本上维持或提高该抗体的亲和力。例如, 目的抗体变体在上述重链可变区 CDR 序列中可具有约 1-7 或 5 个氨基酸取代。通过如下所述亲和力成熟可制备这样的抗体变体。最优选的人源化抗体包括 SEQ ID NO: 4 中的重链可变区氨基酸序列。

除了例如在先段落的那些重链可变区 CDR 残基之外, 人源化抗体可包括轻链可变区的互补决定区残基 KASQDVSIGVA(SEQ ID NO: 10); SASYX<sup>1</sup>X<sup>2</sup>X<sup>3</sup>, 其中 X<sup>1</sup> 优选 R 或 L, X<sup>2</sup> 优选 Y 或 E, X<sup>3</sup> 优选 T 或 S(SEQ ID NO: 11); 和/或 QQYYIYPYT(SEQ ID NO: 12)。这样的人源化抗体任选包括上述 CDR 残基的氨基酸修饰, 例如所述修饰基本上维持或提高该抗体的亲和力。例如, 目的抗体的变体在上述轻链可变区 CDR 序列中可具有约 1-7 或 5 个氨基酸取代。通过如下所述亲和力成熟可制备这样的抗体变体。最优选的人源化抗体包括 SEQ ID NO: 3 中的轻链可变区氨基酸序列。

本申请还考虑了亲和力成熟的结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体。亲本抗体可以是人抗体或人源化抗体, 例如包括轻链可变区和/或重链可变区序列(分别见 SEQ ID NO 3 和 4)的抗体(即变体 574)。所述亲和力成熟的抗体优选以高于鼠 2C4 或变体 574 的亲和力与 ErbB2 受体结合(例如用 ErbB2-细胞外结构域(ECD)ELISA 法检测时, 亲和力提高约 2 或 4 倍到约 100-1000 倍)。用于取代的重链可变区 CDR 残基实例包括 H28、H30、H34、H35、H64、H96 和 H99, 或者这些残基的两个或多个(例如 2、3、4、5、6 或者 7 个残基)的组合。可被改变的轻链可变区 CDR 残基包括 L28、L50、

L53、L56、L91、L92、L93、L94、L96、L97 或这些残基的两个或多个(例如 2 到 3、4、5 直到 10 个残基)的组合。

本申请还考虑了人源化抗体或亲和力成熟的抗体的各种形式。例如,所述人源化抗体或亲和力成熟的抗体可以是抗体片段,如 Fab,其可任选与一个或多个细胞毒药物偶联以制备免疫偶联物。或者,所述人源化抗体或亲和力成熟的抗体可以是完整的抗体,例如完整的 IgG1 抗体。

#### (iv) 人类抗体

除了进行人源化以外还可制备人类抗体。例如现在已能产生如下转基因动物(如小鼠),它们通过免疫能产生人类抗体的所有成分而不产生内源免疫球蛋白。例如,有报道称,嵌合及种系(germ-line)突变小鼠中抗体重链连接区(J<sub>H</sub>)基因的纯合缺失导致内源抗体的产生被完全抑制。将人类种系免疫球蛋白基因阵列转移到这类种系突变小鼠中将导致因抗原攻击而诱导人类的抗体产生。见 Jakobovits 等,美国国家科学院学报,90: 2551(1993); Jakobovits 等,自然,362: 255-258(1993); Bruggermann 等,Year in Immuno.7: 33(1993); 和美国专利 5591669, 5589369 和 5545807。

或者,可用噬菌体展示技术(McCafferty 等,自然 348: 552-553(1990))从未免疫供者的免疫球蛋白可变(V)区基因的所有组成而体外产生人类抗体和抗体片段。依据此技术,将抗体 V 区基因克隆在与丝状噬菌体(如 M13 或 fd)主要或次要衣壳蛋白基因相同的框架内,并在噬菌体颗粒的表面展示为功能性抗体片段。因为丝状颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,根据抗体的功能特点进行的选择也导致对显示这些性质的抗体的编码基因进行选择。因此,噬菌体模仿了 B 细胞的部分特点。噬菌体展示可以以多种形式进行;这些综述见 Johnson, Kevin S.和 Chiswell, David J., 结构生物学的最新观点(Current Opinion in Structural Biology) 3: 564-571(1993)。可使用 V 基因片段的多个来源进行噬菌体展示。Clackson 等,自然,352:624-628 (1991)从免疫小鼠脾脏来源的 V 基因的随机组合小文库中分离了抗-恶唑酮抗体的一个多样性阵列。可基本如 Marks 等,分子生物学杂志 222: 581-597 (1991),或 Griffith 等,EMBO J.12: 725-734(1993)所述构建未经免疫的人类供者 V 基因的所有组成,并分离针对抗原多样性阵列(包括自身抗原)的抗体。亦参见美国专利 5565332 和 5573905。

人类抗体也可通过体外活化的 B 细胞而产生(见美国专利 5,567,610 和 5,229,275)。

人类抗 ErbB2 抗体在 1998 年 6 月 30 日公布的美国专利 5772997 和 1997 年 1 月 3 日公开的 WO97/00271 中叙述。

(v) 抗体片段

已开发了生成抗体片段的多种技术。传统上, 这些片段通过对完整抗体的蛋白水解性消化获得(见 Morimoto 等, 生物化学和生物物理学方法杂志 (Journal of Biochemical and Biophysical Methods) 24: 107-117(1992)) 和 Brennan 等, 科学, 229: 81(1985))。但现在可直接通过重组宿主细胞产生这些片段。例如, 可从上述抗体噬菌体库分离抗体片段。另外, 可从大肠杆菌直接回收 Fab'-SH 片段, 并经化学连接形成 F(ab')<sub>2</sub> 片段(Carter 等, 生物/技术 10: 163-167(1992))。依据另一种方法, 可直接从重组宿主细胞培养中分离 F(ab')<sub>2</sub> 片段。其它产生抗体片段的技术对本领域技术人员是显而易见的。在其它实施方案中, 所选抗体是单链 Fv 片段(scFv)。见 WO 93/ 16185; 美国专利 5,571,894; 和美国专利 5,587,458。抗体片段也可以是“线性化抗体”, 如美国专利 5,641,870 所述。这类线性化抗体片段可以是单特异性或双特异性的。

(vi) 双特异性抗体

双特异性抗体是具有针对至少两种不同表位的结合特异性的抗体。如双特异性抗体可以与 ErbB2 蛋白的两种不同表位结合。其它这种抗体可将 ErbB2 结合位点与针对 EGFR、ErbB3 和/或 ErbB4 的结合位点组合。或者, 可将抗 ErbB2 臂与结合白细胞上引发分子的臂结合, 从而集中针对 ErbB2 表达细胞的细胞防御机制, 所述引发分子如 T 细胞受体分子(CD2 或 CD3), 或 IgG Fc 受体(Fc  $\gamma$  R)如 Fc  $\gamma$  R I (CD64)、Fc  $\gamma$  R II (CD32)和 Fc  $\gamma$  R III (CD16)。双特异性抗体还可用于将细胞毒制剂定位至表达 ErbB2 的细胞。这些抗体具有 ErbB2 结合臂和结合细胞毒制剂(例如皂草素, 抗 INF- $\alpha$ , 长春花生物碱, 蓖麻毒蛋白 A 链, 氮甲蝶呤或放射性同位素半抗原)的臂。双特异性抗体可制备成全长抗体或抗体片段(如 F(ab')<sub>2</sub> 双特异性抗体)。

WO 96/16673 叙述了双特异性抗 ErbB2/抗 Fc  $\gamma$  RIII 抗体, 而在美国专利 5837234 中公开了双特异性抗 ErbB2/抗 Fc  $\gamma$  RI 抗体。双特异性抗 ErbB2/Fc  $\alpha$  抗体见 WO98/02463。美国专利 5821337 中叙述了双特异性抗 ErbB2/抗 CD3 抗体。

制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。完整双特异性抗体的传统制备方法是基于两种免疫球蛋白重链-轻链对的共表达, 其中这两条链具有不

同特异性(Millstein 等, 自然, 305: 537-539(1983))。由于免疫球蛋白重链轻链随机分配, 这些杂交瘤(细胞杂交瘤(quadroma))可能产生 10 种不同抗体分子的混合物, 其中只有一种具有正确的双特异性结构。对所述正确分子的纯化(通常通过亲和层析步骤来进行)非常复杂, 且产量很低。类似的方法见 WO93/08829 和 Traunecker 等, EMBO J, 10: 3655-3659(1991)。

依据另一种方法, 可将具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变区与免疫球蛋白恒定区序列融合。该融合优选与包含铰链区的至少一部分、CH2 及 CH3 区的免疫球蛋白重链恒定区融合。优选使含有轻链结合所需位点的第一重链恒定区(CH1)出现在至少在一种融合中。可将编码免疫球蛋白重链融合体, 以及必要时, 编码免疫球蛋白轻链的 DNA 插入不同表达载体, 共转染至适当宿主生物。这使得在使用非等比的三种多肽链进行构建的实施方案中, 能较灵活地调整三种多肽片段的相互比例, 以获得最佳产量。但也可在至少两种多肽链以等比例表达而获得高产时或所述比例无特别意义时, 将两种或所有三种多肽链的编码序列插入同一表达载体。

在该方法的一个优选实施方案中, 所述双特异性抗体由一条臂上的带有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条臂上的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)构成。已发现这种不对称结构有利于从非必要免疫球蛋白链的混合中分离出所需双特异性化合物, 因为只有该双特异性分子的一半上存在免疫球蛋白轻链, 这使得分离更加容易。此方法公开于 WO94/04690 中。制备双特异性抗体的进一步细节, 见 Suresh 等, 酶学方法, 121: 210(1986)。

根据美国专利 5,731,168 所述的另一种方法, 可改造一对抗体分子之间的界面, 使得从重组细胞培养中获得的异源二聚体的百分比最大。优选的界面包括抗体恒定区 CH3 结构域的至少一部分。在该方法中, 源于第一抗体分子界面上的一条或多条氨基酸小侧链被较大侧链(如酪氨酸或色氨酸)取代。与所述大侧链大小相同或相近的互补“沟”可通过将氨基酸大侧链用小侧链(如丙氨酸或苏氨酸)取代而在第二抗体分子的界面上形成。这使得异二聚体的产量比不想要的终产物如同型二聚体的高。

双特异性抗体包括交联抗体或“异源偶联的”抗体。例如, 可使异源偶联物中的抗体之一与抗生物素蛋白偶联, 使另一抗体与生物素偶联。有观点认为, 这类抗体可用于将免疫细胞导向不想要的细胞(美国专利 4676980); 也可用于治疗 HIV 感染(WO91/00360, WO92/200373, EP03089)。异源偶联

抗体可通过任何适当的交联方法制备。适当的交联制剂和多种交联技术为本领域已知，可在美国专利 4676980 号中获得。

从抗体片段制备双特异性抗体的技术已有文献。例如，双特异性抗体可利用化学连接制备。Brennan 等，科学 229: 81(1985)中描述了将完整抗体经蛋白水解制备  $F(ab')_2$  片段的方法。这些片段在二巯基复合剂亚砷酸钠存在时被还原，从而稳定相邻的巯基，并阻止分子间二硫键的形成。生成的  $Fab'$  片段被转化为硫硝基苯甲酸盐(TNB)衍生物。其中一种  $Fab'$  - TNB 衍生物经巯基乙胺还原成  $Fab'$  - 硫醇，再与等分子量的其它  $Fab'$  - TNB 衍生物混合形成双特异性抗体。如此产生的双特异性抗体可作为酶的选择性固相化中所用的试剂。

近期的进展促进了  $Fab'$  - SH 片段从大肠杆菌的直接回收，该片段可经化学偶联形成双特异性抗体。Shalaby 等，实验医学杂志，175:217-225(1992)中描述了完全人源化双特异性抗体  $F(ab')_2$  分子的产生。每一  $Fab'$  片段分别从大肠杆菌中分泌出来，体外直接化学偶联形成双特异性抗体。如此制备的双特异性抗体能与过度表达 ErbB2 受体的细胞和正常人 T 细胞结合，还能引发人类细胞毒淋巴细胞对人乳腺肿瘤细胞的裂解活性。

直接从重组细胞培养中制备并分离双特异性抗体片段的多种技术也已有描述。例如，可用亮氨酸拉链制备双特异性抗体。Kostelny 等，免疫学杂志，148(5):1547-1553(1992)。将来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的  $Fab'$  部分通过基因融合而连接。使抗体的同型二聚体在铰链区被还原成单体，然后被再氧化形成抗体的异二聚体。该方法也可用于制备抗体同型二聚体。由 Hollinger 等，美国国家科学院学报，90:6444-6448 (1993)) 描述的“二价抗体”技术提供了另一种制备双特异性抗体片段的方法。所述片段中含有重链可变区 ( $V_H$ )，其通过接头与轻链可变区( $V_L$ )相连，该接头非常短，使得同一链的两个结构域之间无法配对。因此，同一片段上的  $V_H$  和  $V_L$  结构域被迫与另一片段上的互补  $V_L$  和  $V_H$  结构域配对，从而形成两个抗原结合位点。此外还报道了另一种用单链  $Fv(sFv)$ 二聚体来制备双特异性抗体的策略。见 Gruber 等，免疫学杂志，152: 5368(1994)。

还考虑了二价以上的抗体。如可制备三特异性抗体。Tutt 等，免疫学杂志，147: 60(1991)。

#### (vii) 其它氨基酸序列修饰

本申请考虑了本文所述抗 ErbB2 抗体的氨基酸序列修饰。例如，可能需

要改进抗体的结合亲和力和/或其它生物学特点。抗 ErbB2 抗体的氨基酸序列变体可通过在抗 ErbB2 抗体核酸中引入适当的核苷酸变化或通过肽合成制备。这类修饰包括例如抗 ErbB2 抗体的氨基酸序列内残基的缺失、和/或插入和/或取代。可进行缺失、插入和取代的任何组合以获得最终的构建体，只要最终的构建体具有所需的特性。所述氨基酸变化还可改变抗 ErbB2 抗体的翻译后加工过程，例如改变糖基化位点的数目或位置。

一种鉴别抗 ErbB2 抗体中处于诱变优选位置的特定残基或区域的有效方法是 Cunningham 和 Wells, 科学 244:1081-1085 (1989)所述的“丙氨酸扫描诱变”。这里，鉴定一个残基或一组靶残基(例如，带电的残基如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸)并用中性或带负电的氨基酸取代(最优选丙氨酸或多聚丙氨酸)取代，以便影响氨基酸与 ErbB2 抗原的相互作用。那些证实对取代具有功能敏感性的氨基酸位置通过在取代点引入进一步的或其他的变体而改进。故，尽管引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的，但突变本身不必是预定的。例如，为分析在指定位点处突变的作用，在所述靶密码子或区域实行丙氨酸扫描或随机诱变，并筛选所表达的具有预期活性的抗 ErbB2 抗体变体。

氨基酸序列插入包括氨基-和/或羧基-端的融合(其长度从一个残基至包括 100 个或更多残基的多肽)，以及序列内单个或多个氨基酸残基的插入。末端插入的例子包括带有 N-末端甲硫氨酰残基的抗 ErbB2 抗体或与细胞毒性多肽融合的该抗体。抗 ErbB2 抗体分子的其它插入变体包括使抗 ErbB2 抗体的 N-或 C-末端与能增加该抗体的血清半衰期的酶或多肽融合。

另一类变体是氨基酸取代变体。这些变体使抗 ErbB2 抗体分子中至少一个氨基酸残基被不同残基取代。最有趣进行取代诱变的位点包括高变区，也可以考虑 FR 的改变。保守取代见表 1 的“优选取代”栏。如果这些取代引起生物学活性的改变，则可引入表 1 中“取代举例”栏的更实质性改变，或进一步在下文的氨基酸分类中所述的更实质性改变，并筛选产物。

表 1

| 原始残基   | 取代举例                    | 优先取代 |
|--------|-------------------------|------|
| Ala(A) | val; leu; ile           | val  |
| Arg(R) | lys; gln; asn           | lys  |
| Asn(N) | gln; his; asp; lys; arg | gln  |
| Asp(D) | glu; asn                | glu  |

|        |                               |     |
|--------|-------------------------------|-----|
| Cys(C) | ser; ala                      | ser |
| Gln(Q) | asn; glu                      | asn |
| Glu(E) | asp; gln                      | asp |
| Gly(G) | ala                           | ala |
| His(H) | Asn; gln; lys; arg            | arg |
| Ile(I) | Leu; val; met; ala; phe; 正亮氨酸 | leu |
| Leu(L) | 正亮氨酸; ile; val; met; ala; phe | ile |
| Lys(K) | arg; gln; asn                 | arg |
| Met(M) | leu; phe; ile                 | leu |
| Phe(F) | leu; val; ile; ala; tyr       | tyr |
| Pro(P) | ala                           | ala |
| Ser(S) | thr                           | thr |
| Thr(T) | ser                           | ser |
| Trp(W) | tyr; phe                      | tyr |
| Tyr(Y) | trp; phe; thr; ser            | phe |
| Val(V) | ile; leu; met; phe ala; 正亮氨酸  | leu |

对所述抗体的生物学特性的实质性修改可通过选择性取代来完成,所述取代的效应在维持(a)取代区多肽骨架的结构,例如片层结构或螺旋构象,(b)该分子靶位点的电荷或疏水性,(c)侧链的大小这几方面有显著差异。天然残基根据共有的侧链特性可分为:

- (1)疏水性: 正亮氨酸, 蛋氨酸, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸 异亮氨酸
- (2)中性亲水: 半胱氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸
- (3)酸性: 天冬氨酸, 谷氨酸
- (4)碱性: 天冬酰胺, 谷氨酰胺, 组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸
- (5)影响侧链定向的残基: 甘氨酸, 脯氨酸
- (6)芳香族: 色氨酸, 酪氨酸, 苯丙氨酸。

非保守取代将限定上述某一类的成员被另一类取代。

不参与维持抗 ErbB2 抗体的正确构象的任何半胱氨酸残基也可被取代,通常被丝氨酸取代,以提高该分子的氧化稳定性,并阻止异常交联。相反,可在该抗体中添加半胱氨酸连接以提高其稳定性(特别当该抗体为抗体片段如 FV 片段时)。

取代变体的特别优选类型包括取代亲本抗体高变区的一或多个残基。通

常, 所选用于进一步开发的变体相对于其亲本抗体应具有改进的生物学活性。产生这种取代变体的一个方便方法是利用了噬菌体展示的亲和力成熟。简单地说, 使高变区的几个位点(如 6-7 个位点)突变以便在每一位点产生所有可能的氨基酸取代。这样产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上, 其为与每个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合体。然后筛选噬菌体展示的变体是否具有本文所述生物学活性(如结合亲和力)。为了鉴定备选的高变区修饰位点, 可通过丙氨酸扫描诱变来鉴定对抗原结合作出主要贡献的高变区残基。此外, 分析抗原-抗体复合物的晶体结构以确定抗原与抗体之间的接触点也较有利。这些接触残基及其邻近残基是根据本文所述技术进行取代的候选位点。一旦产生这样的变体, 如本文所述对它们全部进行筛选, 选出在一或多个相关实验中具有优势特性的抗体以便进一步开发。

所述抗体的另一种氨基酸变体改变了该抗体原来的糖基化模式。所谓改变就是去掉该抗体中的一或多个碳水化合物部分, 和/或添加一或多个原本不存在于该抗体中的糖基化位点。

抗体的糖基化通常为 N-连接或 O-连接。N-连接指将碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链相连。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中 X 是除脯氨酸以外的任何氨基酸)是使碳水化合物部分与天冬酰胺侧链酶促相连的识别序列。因此, 多肽中存在上述任一种三肽序列都可产生潜在的糖基化位点。O-连接糖基化指将 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖、或木糖附着于羟基氨基酸, 主要是丝氨酸、苏氨酸, 但也可用 5-羟脯氨酸和 5-羟赖氨酸。

在抗体中添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列, 使其包含一或多个上述三肽序列而实现(在添加 N-连接糖基化位点的情况下)。这种改变也可通过在原始抗体的序列中添加或取代一或多个丝氨酸或苏氨酸残基来实现(在添加 O-连接的情况下)。

编码抗 ErbB2 抗体的氨基酸序列变体的核酸分子由本领域已知的各种方法制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离(在天然氨基酸序列变体的情况下), 或通过对抗 ErbB2 抗体之早期制备的变体或非变体形式进行寡核苷酸介导的(或定点)诱变, PCR 诱变和盒式诱变来制备。

也可预期修饰该抗体的效应物功能, 例如使该抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和/或补体依赖的细胞毒作用(CDC)增强。这可以通过在抗体 F<sub>C</sub> 区引入一或多个氨基酸取代而获得。此外, 可在 F<sub>C</sub> 区引入半胱

氨酸残基,使得在此区形成链间二硫键。由此产生的同型二聚体抗体可提高内在化能力和/或增强补体介导的细胞杀伤作用和 ADCC。见 Caron 等,实验医学杂志 176:1191-1195(1992)和 Shopes, B. 免疫学杂志 148: 2918-2922 (1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚体抗体也可用 Wolffe 等,癌症研究 53:2560-2565 (1993)所述异源双功能交联剂制备。或者,可通过工程改造产生具有双 F<sub>C</sub> 区并因此具有增强的补体裂解效应及 ADCC 能力的抗体。见 Stevenson 等,抗癌药物的设计(Anti-Cancer drug design) 3:219-230 (1989)。

为了延长该抗体的血清半衰期,可在该抗体(尤其抗体片段)中掺入一个补救受体结合表位,如美国专利 5,739,277 所述。本文中术语“补救受体结合表位”是指 IgG 分子(例如 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub>, 或 IgG<sub>4</sub>)Fc 区中负责延长该 IgG 分子的体内血清半衰期的表位。

(viii) 筛选具有所需特性的抗体

制备抗体的技术如上述。可根据需要进一步筛选具有特定生物学特性的抗体。

为了确定阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体,可测定该抗体阻断 ErbB 配体与表达 ErbB 受体(例如与另一 ErbB 受体结合,该受体与目的 ErbB 受体形成 ErbB 异寡聚体)的细胞结合的能力。可将天然表达或通过转染而表达 ErbB 异寡聚体中 ErbB 受体的细胞与所述抗体进行温育,然后将其暴露于标记的 ErbB 配体。之后可估测抗 ErbB2 抗体阻断 ErbB 异寡聚体中 ErbB 受体的配体结合的能力。

例如,抗 ErbB2 抗体抑制 HRG 与 MCF7 乳腺癌细胞系的结合的作用可基本上按实施例 1 所述方法,利用冰浴 24 孔培养板中的单层 MCF7 培养物来进行。向每孔中加入抗 ErbB2 单克隆抗体,并温育 30 分钟。然后加入 <sup>125</sup>I 标记的 rHRG β 1<sub>177-224</sub>(25pm),并继续温育 4-16 小时。可绘制剂量应答曲线并计算目的抗体的 IC<sub>50</sub> 值。在一个实施方案中,阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体在此检测中抑制 HRG 与 MCF 细胞的结合的 IC<sub>50</sub> 值约为 50nM 或更低,优选 10nM 或更低。当所述抗体为抗体片段如 Fab 段时,该检测中抑制 HRG 与 MCF7 细胞的结合的 IC<sub>50</sub> 值可为例如约 100nM 或更低,更优选 50nM 或更低。

或者(或另外),可检测抗 ErbB2 抗体阻断 ErbB 异寡聚体中 ErbB 受体的 ErbB 配体活化型酪氨酸磷酸化作用的能力。例如,可将内源性表达 ErbB 受体或通过转染表达它们的细胞与所述抗体温育,然后利用抗磷酸酪氨酸单克

隆抗体(其任选与可检测的标记物偶联),检测 ErbB 配体依赖性酪氨酸磷酸化活性。美国专利 5766863 中所述的激酶受体活化试验也可用于测定 ErbB 受体活化作用,并可用抗体阻断该活化作用。

在一个实施方案中,可基本如实施例 1 所述筛选能抑制 MCF7 细胞中 p180 酪氨酸磷酸化之 HRG 刺激作用的抗体。例如,将 MCF7 细胞铺于 24 孔培养板中,每孔加入 ErbB2 的单克隆抗体,室温温育 30 分钟;然后每孔加入 rHRG  $\beta$  1<sub>177-224</sub> 致终浓度 0.2nM,继续温育 8 分钟。从各个孔中吸出培养基,加入 100  $\mu$ l SDS 样品缓冲液(5% SDS, 25mM DTT 和 25Mm Tris-HCl, pH6.8)终止反应。将每份样品(25  $\mu$ l)在 4-12% 梯度凝胶(Novex)上进行电泳,然后电转到聚偏二氟乙烯膜上。使抗磷酸酪氨酸免疫印迹膜显色,通过反射比密度测定法(reflectance densitometry)定量处于  $M_r$  -180000 位置的主要反应带的密度。所选抗体优选能将 p180 酪氨酸磷酸化的 HRG 刺激作用在此试验中显著抑制为对照的约 0-35%。可根据反射密度测定法确定的对 p180 酪氨酸磷酸化之 HRG 刺激的抑制作用绘制剂量应答曲线,并计算目的抗体的  $IC_{50}$  值。在一个实施方案中,阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体在此检测中抑制 p180 酪氨酸磷酸化之 HRG 刺激的  $IC_{50}$  值约为 50nM 或更低,优选 10nM 或更低。在所述抗体为抗体片段如 Fab 段时,在此检测中抑制 p180 酪氨酸磷酸化之 HRG 刺激的  $IC_{50}$  值可为例如约 100nM 或更低,更优选 50nM 或更低。

也可估测所述抗体对 MDA-MB-175 细胞的生长抑制作用,例如基本上按 Schaefer 等,癌基因 15: 1385-1394(1997)中所述。根据该项试验,MDA-MB-175 细胞可用抗 ErbB2 单克隆抗体(10  $\mu$ l/ml)处理 4 天,再用结晶紫染色。与抗 ErbB2 抗体一起温育对此细胞系显示出类似于单克隆抗体 2C4 的生长抑制作用。在另一个实施方案中,外源性 HRG 不能显著逆转此抑制作用。优选所述抗体在外源性 HRG 存在和不存在的条件下,均能以高于单克隆抗体 4D5(并任选高于单克隆抗体 7F3)的水平抑制 MDA-MB-175 细胞的增殖。

在一个实施方案中,抗 ErbB2 目的抗体在 MCF7 和 SK-BR-3 细胞中均可阻断 ErbB2 与 ErbB3 的 heregulin 依赖性结合,如实施例 2 中所述免疫共沉淀实验所测,其效力远高于单克隆抗体 4D5,优选远高于单克隆抗体 7F3。

为了鉴定生长抑制性抗 ErbB2 抗体,可筛选能抑制过度表达 ErbB2 的癌细胞生长的抗体。在一个实施方案中,所选生长抑制性抗体在约 0.5-30  $\mu$ g/ml 的抗体浓度下能使细胞培养中 SK-BR-3 细胞的生长被抑制约 20-100%,

优选被抑制 50-100%。为了鉴定这样的抗体,可实施美国专利 5677171 中所述的 SK-BR-3 试验。根据该项试验,将 SK-BR-3 细胞培养在 F12 与 DMEM(添加了 10% 胎牛血清、谷氨酰胺和青霉素、链霉素)以 1:1 混合的培养基中。将 20000 个 SK-BR-3 细胞置于 35mm 培养皿中(2mls/35mm 培养皿)。每皿加入 0.5-30  $\mu\text{g/ml}$  抗 ErbB2 抗体。6 天之后,利用电子 COULTER™ 细胞计数仪计数细胞数目,并与未经处理的细胞进行比较。那些能将 SK-BR-3 细胞的生长抑制约 20-100% 或 50-100% 的抗体被选为生长抑制性抗体。

为了筛选诱导细胞死亡的抗体,可评价相对于对照的膜完整性丧失,其可由例如 PI、台盼蓝或 7AAD 摄入来指示。优选的试验是利用 BT474 细胞进行的 PI 摄入试验。根据该试验,将 BT474 细胞(可从美国典型培养物保藏中心(Rockville, MD)获得)培养在含 10% 热灭活的 FBS(Hyclone)和 2mM L-谷氨酰胺的 Dulbecco's 改良型 Eagle 培养基(D-MEM):Ham's F-12(50:50)中。(因此,该检测是在无补体和免疫效应细胞的条件下进行)。将 BT474 细胞以  $3 \times 10^6$ /皿的浓度接种至 100 × 20mm 的培养皿中,并使其粘附过夜。然后弃去培养基,仅用新鲜培养基或用含 10  $\mu\text{g/ml}$  适当单克隆抗体的培养基取代。细胞以 3 天为一周期进行培养。每次处理后,单层细胞用 PBS 洗涤,并用胰酶消化使其脱附。然后将细胞在 4℃ 以 1200 rpm 离心 5 分钟,将沉淀重悬于 3ml 冰冷的  $\text{Ca}^{2+}$  结合缓冲液(10mM Hepes, pH7.4, 140mM NaCl, 2.5mM  $\text{CaCl}_2$ )中,再分装到 35mm 滤器封盖的 12 × 75 试管中(每管 1ml, 每处理组 3 管)以去除细胞团块。然后向试管中加入 PI(10  $\mu\text{g/ml}$ )。样品利用 FACSCAN™ 流式细胞仪和 FACSCONVERT™ CellQuest 软件(Becton Dickinson)分析。可将那些诱导统计显著水平的细胞死亡(如 PI 摄入法所测)的抗体选为诱导细胞死亡的抗体。

为了筛选凋亡诱导抗体,可利用 BT474 细胞进行 annexin 结合试验。将 BT474 细胞按上段所述接种并培养。然后弃去培养基,仅用新鲜培养基或用含 10  $\mu\text{g/ml}$  单克隆抗体的培养基取代。细胞以 3 天为一周期进行培养后,将单层用 PBS 洗涤,并用胰酶消化使其脱附。然后如上文细胞死亡试验所述将细胞离心,重悬于  $\text{Ca}^{2+}$  结合缓冲液中,并分装到试管中。向试管中加入标记的 annexin (例如 annexin V-FTIC) (1  $\mu\text{g/ml}$ )。利用 FACSCAN™ 流式细胞仪和 FACSCONVERT™ CellQuest 软件(Becton Dickinson)分析样品。在用 PI 摄入法检测时,可将那些诱导统计显著水平的 annexin 结合(如 PI 摄入法所测)的抗体选为凋亡诱导抗体。

除了 annexin 结合试验,可利用 BT474 细胞进行 DNA 染色试验。为此,将已如前两段所述用目的抗体处理过的 BT474 细胞与  $9\mu\text{g/ml}$  HOECHST 33342<sup>TM</sup> 于  $37^{\circ}\text{C}$  温育 2 小时,然后在 EPICS ELITE<sup>TM</sup> 流式细胞仪(Coulter Corporation)上用 MODFITLT<sup>TM</sup> 软件(Verity Software House)进行分析。引起凋亡细胞百分率改变(比未处理细胞高两倍或更多(优选高 3 倍或更多)(直到 100% 的凋亡细胞))的抗体可用此试验筛选为前凋亡抗体。

为了筛选能与结合目的抗体之 ErbB2 上某一表位结合的抗体,可如《抗体,实验室指南》,冷泉港实验室,Ed Harlow 和 David Lane(1998)所述进行常规交叉阻断试验。或者(或另外),可通过本领域已知技术进行表位作图(见,例如本文中图 1A 和 1B)。

#### (ix) 免疫偶联物

本发明还涉及免疫偶联物,其中含有与细胞毒药物偶联的抗体,所述细胞毒药物如化疗药物、毒素(例如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体)或放射性同位素等。

可有效用于制备这类免疫偶联物的化疗药物如上述。本文还涉及抗体与一或多种小分子毒素,如加利车霉素,美登素(美国专利 5,208,020),单端孢霉烯(trichothene),CC1065 的偶联物。

在本发明的一个优选实施方案中,使抗体与一或多个美登素分子偶联(如每个抗体分子与约 1-10 个美登素分子偶联)。美登素可转化成 May-SS-Me,然后还原成 May-SH3,并与修饰过的抗体反应(Chari 等,癌症研究 52: 127-131(1992))产生美登素生物碱-抗体偶联物。

另外,抗体可以与一或多个加利车霉素分子结合。加利车霉素家族的抗生素能在亚  $\text{pM}$  浓度水平产生双链 DNA 断裂。可使用的加利车霉素结构类似物包括,但不限于  $\gamma_1^1$ 、 $\alpha_2^1$ 、 $\alpha_3^1$ 、N-乙酰基- $\gamma_1^1$ 、PSAG 以及  $\theta_1^1$  (Hinmam 等,癌症研究 53: 3336-3342(1993)和 Lode 等,癌症研究 58: 2925-2928 (1998))。

可以应用的酶活性毒素及其片段包括:白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌)、蓖麻毒蛋白 A 链、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 $\alpha$ -帚曲毒素、油桐(*Aleutites fordii*)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆(*Phytolacca Americana*)蛋白(PAPI, PAPII, PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制因子、麻疯树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂,白树毒素,米托菌素(mitogellin)、局限曲菌素、酚霉素、依诺霉素和单端孢菌毒素(tricothecenes)。例见 1993 年 10 月 28 日

公开的 WO93/21232。

本发明还涉及一种免疫偶联物，其由抗体与具有核裂解活性的化合物(如核糖核酸酶或 DNA 内切核酸酶如脱氧核糖核酸酶；DNase)偶联。

多种放射性同位素可用于制备放射性偶联的抗体，实例包括  $\text{At}^{211}$ 、 $\text{I}^{131}$ 、 $\text{I}^{125}$ 、 $\text{Y}^{90}$ 、 $\text{Re}^{186}$ 、 $\text{Re}^{188}$ 、 $\text{Sm}^{153}$ 、 $\text{Bi}^{212}$ 、 $\text{P}^{32}$  以及 Lu 的放射性同位素。

抗体与细胞毒制剂的偶联物可通过多种双功能蛋白偶联剂来连接，所述双功能蛋白偶联剂如：N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二巯基)丙酸酯(SPDP)，琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯，iminothiolane (IT)，亚氨酸酯的双功能衍生物(如亚氨基己二酸二甲酯盐酸盐)，活性酯类(如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯)，醛类(如戊二醛(glutarealdehyde))，双-叠氮化合物(如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)，双-重氮衍生物(如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)，二异氰酸酯(如亚甲代苯基 2,6-二异氰酸酯)，和双-活性氟化合物(如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如，蓖麻毒蛋白免疫毒素可如 Vitetta 等，科学 238: 1098(1987)所述制备。 $\text{C}^{14}$  标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三氨五乙酸酯(MX-DTPA)是将放射性核苷酸偶联至抗体的偶联剂之一。见 WO94/11026。这种接头可能是有利于细胞毒药物在细胞内释放的“可断开的接头”。例如，可使用酸不稳定型接头，肽酶敏感型接头，二甲基接头或含二硫键的接头(Chari 等，癌症研究 52: 127-131(1992))。

或者，可通过重组技术或肽合成来获得抗体与细胞毒制剂的融合蛋白。

在另一实施方案中，抗体可与肿瘤预靶向中应用的“受体”(如链霉抗生物素蛋白)偶联，将该抗体-受体偶联物给予患者，之后用清除剂除去循环中未结合的偶联物，再给予已偶联了细胞毒制剂(如放射性核苷酸)的“配体”(如抗生物素蛋白)。

#### (x) 抗体依赖性酶介导的前体药物治疗(ADEPT)

本发明的抗体还可与前体药物活化酶相结合，然后用于 ADEPT，所述活化酶可以将前体药物(如肽基化疗剂，见 WO81/01145)转化为活性抗癌药物。见 WO88/07378 和美国专利 4,975,278。

这些用于 ADEPT 的偶联物中的酶组分包括能作用于前体药物使其转化为活性更强的细胞毒形式的任何酶。

本发明的方法中用到的酶包括，但不限于，能将含磷酸基的前体药物转化为游离药物的碱性磷酸酶；可将含硫酸基的前体药物转化为游离药物的芳香基硫酸酯酶；将无毒的 5-氟胞嘧啶转化为抗癌药物，如 5-氟尿嘧啶的胞嘧

啖脱氨酶；能将含肽的前体药物转化为游离药物的蛋白酶，如沙雷氏菌属蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、羧肽酶和组织蛋白酶(如组织蛋白酶 B 和 L)等；可转化含 D-氨基酸取代基的前体药物的 D-丙氨酰羧肽酶；能将糖基化前体药物转化为游离药物的碳水化合物裂解酶类如  $\beta$ -半乳糖苷酶和神经氨酸酶；能将  $\beta$ -内酰胺衍生的药物转化为游离药物的  $\beta$ -内酰胺酶；能在药物中的氨基氮处分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基转化而使药物游离的青霉素酰胺酶如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶。或者，可用本领域称为“抗体酶”的具有酶活性的抗体，将本发明的前体药物转化为游离的活性药物(见 Massey, 自然 328: 457-458 (1987))。可如本文所述制备抗体-抗体酶偶联物以便将抗体酶运送至肿瘤细胞群。

本发明的酶可通过本领域已知的技术，如上述异源双功能交联试剂的使用而与抗体共价结合。或者，可以通过本领域已知的 DNA 重组技术(如 Neuberger 等, 自然, 312: 604-608 (1984))构建含至少本发明抗体的抗原结合区的融合蛋白，所述抗体与本发明酶的至少一个功能活性部分连接。

#### (xi) 其它抗体修饰

本文还涉及对抗体的其它修饰。例如，可以使抗体与一种非蛋白多聚物，如聚乙二醇、聚丙二醇、聚氧化烯(polyoxyalkylene)、或聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物交联。还可将抗体包被于微囊(可通过凝聚技术或界面聚合作用制备，如分别制成羟甲基纤维素或明胶微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯(methylmethacrylate)))、胶体药物传递系统(如脂质体、白蛋白小球体、微乳胶、纳米颗粒和纳米胶囊)或巨乳胶(macroemulsions)。这些技术见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16 版, Oslo, A., Ed.(1980)。

本文公开的抗-ErbB2 抗体还可配成免疫脂质体。含抗体的脂质体可通过本领域已知方法制备，如 Epstein 等, 美国国家科学院学报 82: 3688 (1985); Hwang 等, 美国国家科学院学报 77: 4030 (1980); 美国专利 4,485,045 和 4,544,545 及 1997 年 10 月 23 日公开的 WO97/38731。在美国专利 5,013,566 中公开了循环时间已增加了的脂质体。

特别有效的脂质体可利用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物经反相蒸发法产生。脂质体通过一定孔径大小的滤膜挤压可获得具有所需直径的脂质体。本发明抗体的 Fab' 片段可如 Martin 等, 生物学化学杂志, 257: 286-288 (1982)所述，经二硫化物交换反应与脂质体偶联。可任选在所述脂质体中包含一种化疗药物。见 Gabizon 等，

J. National Cancer Inst, 81 (19)1484 (1989)。

### III. 载体、宿主细胞和重组方法

本发明还提供了分离的编码人源化抗 ErbB2 抗体的核酸、含所述核酸的载体和宿主细胞、制备所述抗体的重组技术。

为了对抗体进行重组制备,分离其编码核酸并插入到可复制载体中,来进一步克隆(DNA 扩增)或表达。利用传统方法(例如利用能与编码单克隆抗体重链或轻链的基因特异性结合的探针),可容易的分离并测序编码所述抗体的 DNA。许多载体可应用。载体组分通常包括但不限于一个或多个下述组分:信号序列,复制起始点,一个或多个标记基因,增强子元件,启动子和转录终止序列。

#### (i) 信号序列组分

本发明的抗 ErbB2 抗体不仅可直接重组制备,而且还可制备成与异源多肽的融合多肽,优选所述异源多肽为信号序列或在成熟蛋白或多肽的 N 末端上具有特异性裂解位点的其它多肽。优选的异源信号序列是被宿主细胞识别并加工(即通过信号肽酶裂解)的信号序列。对于不能识别并加工天然抗 ErbB2 抗体信号序列的原核宿主细胞,用选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp 或热稳定肠毒素 II 前导区的原核信号序列取代所述天然信号序列。对于酵母分泌,可用例如酵母转化酶前导区、 $\alpha$  因子前导区(包括糖酵母属和克鲁维酵母属的  $\alpha$  因子前导区)、酸性磷酸酶前导区、白色念珠菌葡萄糖淀粉酶前导区或 WO90/13646 中所述信号序列等取代上述天然信号序列。在哺乳动物细胞表达时,可使用哺乳动物信号序列以及如单纯疱疹 gD 信号序列等病毒分泌前导区。

将这些前导区 DNA 在阅读框架内与编码抗 ErbB2 抗体的 DNA 连接。

#### (ii) 复制起始点组分

表达载体和克隆载体中均含有能使载体在一或多种所选宿主细胞中进行复制的核酸序列。通常,在克隆载体中,此序列是能使载体独立于宿主染色体 DNA 而进行复制的序列,它包括复制起始点或自主复制序列。在多种细菌、酵母和病毒中,这样的序列众所周知。来自质粒 pBR322 的复制起始点适合于大多数革兰氏阴性细菌,2  $\mu$  质粒起始点适合于酵母,而各种病毒(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV)复制起始点可用于哺乳动物细胞中的克隆载体。通常,哺乳动物表达载体不需要复制组分的复制起始点(只有 SV40 起始点常用,因为它含有早期启动子)。

### (iii) 筛选基因组分

表达载体和克隆载体可包含筛选基因(也称为可筛选标记)。典型的筛选基因编码蛋白,该蛋白(a)提供对抗生素或其它毒素,如氨苄青霉素、新霉素、氨基嘌呤或四环素等的抗性,(b)弥补营养缺陷,或(c)提供从复合培养基中不能得到的关键营养物质,例如编码芽孢杆菌属 D-丙氨酸消旋酶的基因。

筛选方案的一个实例是利用药物阻滞宿主细胞的生长。那些被异源基因成功转化的细胞产生能赋予药物抗性的蛋白,从而在筛选过程中存活。这样的显性筛选实例使用新霉素、霉酚酸和潮霉素。

另一种适于哺乳动物细胞的可筛选标记实例是那些能对可吸收抗 ErbB2 抗体核酸的感受态细胞进行鉴定的标记,例如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白 I 和 II(优选灵长类金属硫蛋白基因)、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等等。

例如,首先通过在含氨基嘌呤(Mtx) (DHFR 的竞争性拮抗剂)的培养基中培养所有转化体,鉴定被 DHFR 筛选基因转染的细胞。当使用野生型 DHFR 时,适当的宿主细胞是 DHFR 活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系。

或者,通过在含针对可筛选标记的氨基糖苷抗生素(例如卡那霉素、新霉素或 G418)等筛选药物的培养基中培养细胞,可筛选用编码抗 ErbB2 抗体、野生型 DHFR 蛋白和另一个可筛选标记(如氨基糖苷 3'-磷酸转移酶(APH))的 DNA 序列转化或共转化的宿主细胞。见美国专利 4965199。

适用于酵母的适当筛选基因是存在于酵母质粒 YRp7 中的 *trp1* 基因(Stinchcomb 等,自然,282: 39(1979))。*trp1* 基因为不能在色氨酸中生长的酵母突变株(例如 ATCC 44076 或 PEP4-1)提供了筛选标记。Jones, Genetics, 85: 12(1977)。酵母宿主细胞基因组中 *trp* 损伤的存在,为通过无色氨酸的条件下的培养对转化进行检测提供了有效的环境。同样,Leu2 缺陷的酵母株(ATCC 20622 或 38626)被含有 Leu2 基因的已知质粒弥补。

另外,可将源自 1.6  $\mu$ m 环状质粒 pKD1 的载体用于转化克鲁维酵母属的酵母。另有关于用乳酸克鲁维酵母大规模制备重组牛凝乳酶的表达系统的报道。Van den Berg. Bio/Technology, 8: 135(1990)。用于通过克鲁维酵母工业菌株分泌成熟的重组人血清白蛋白的稳定型多拷贝表达载体也被发现。Fleer 等, Bio/Technology 9: 968-975(1991)。

### (iv) 启动子组分

表达载体和克隆载体通常含有可被宿主生物识别并与抗 ErbB2 抗体核

酸可操作相连的启动子。适合于在原核宿主中应用的启动子包括 *phoA* 启动子,  $\beta$ -内酰胺酶和乳糖启动子系统, 碱性磷酸酶, 色氨酸(*trp*)启动子系统和杂合启动子如 *tac* 启动子。然而, 其它已知的细菌启动子也是适合的。用于细菌系统的启动子还含有 Shine-Dalgarno(S.D.)序列, 它与编码抗 ErbB2 抗体的 DNA 可操作连接。

用于真核生物的启动子序列是已知的。几乎所有的真核基因在转录起始位点上游约 25-30 个碱基处具有一个富含 AT 的区域。在许多基因的转录起始点上游 70-80 个碱基处发现的另一个序列是 CNCAAT 区, 其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的 3'末端是 AATAAA 序列, 它是用于在编码序列 3'末端添加 poly A 尾的信号。所有这些序列均被适当地插入到真核表达载体。

适于在酵母宿主中应用的启动序列实例包括 3-磷酸甘油酸激酶或其它糖酵解酶的启动子, 例如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶。

其它的酵母启动子, 即那些能通过生长条件控制转录的诱导型启动子, 是下述基因的启动子区, 即乙醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶。在 EP73657 中进一步叙述了用于酵母表达系统的适当载体和启动子。酵母增强子与酵母启动子一起使用更有利。

在哺乳动物宿主细胞中, 由载体转录抗 ErbB2 抗体可受下述启动子调控, 所述启动子来自病毒基因组(如多瘤病毒、鸡痘病毒、腺病毒(如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙型肝炎病毒, 最优选猴病毒 40(SV40))启动子, 或来自肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子等异源哺乳动物启动子, 或来自热休克启动子, 只要这些启动子与宿主细胞系统相容。

SV40 病毒的早期和晚期启动子可方便地以 SV40 限制性片段的形式获得, 它还包括 SV40 病毒的复制起始点。人巨细胞病毒的即早期启动子方便地以 Hind III E 限制性片段的形式获得。在美国专利 4419446 中公开了在哺乳动物宿主中用牛乳头瘤病毒作为载体的表达系统。在美国专利 4601978 中叙述了对这个系统改进。另见 Reyes 等, 自然 297: 598-601(1982)中关于在单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子控制下在小鼠细胞中表达人  $\beta$  干扰素 cDNA。

或者, 劳氏肉瘤病毒长末端重复序列可作为启动子使用。

(v) 增强子元件组分

在载体中插入增强子序列通常可增加编码本发明抗 ErbB2 抗体的 DNA 在高等真核生物中的转录。已经知道很多哺乳动物基因(珠蛋白, 弹性蛋白酶、白蛋白、 $\alpha$  胎蛋白和胰岛素)的增强子序列。然而人们通常使用真核细胞病毒的增强子。实例包括在其复制起始点晚期侧的 SV40 增强子(bp100-270), 巨细胞病毒早期启动子增强子, 在其复制起始点晚期侧的多瘤增强子, 和腺病毒增强子。另见 Yaniv, 自然 297: 17-18(1982)中所述的用于活化真核启动子的增强元件。所述增强子可以剪接入抗 ErbB2 抗体编码序列的 5' 或 3' 端, 但优选位于启动子的 5' 端。

(vi) 转录终止组分

用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其它多细胞生物的有核细胞)的表达载体, 还包括对转录终止和稳定 mRNA 结构所必须的序列。这些序列通常来自真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5' (偶尔为 3') 非翻译区。这些区域包含核苷酸片段, 其转录为编码抗 ErbB2 抗体的 mRNA 的非翻译区中的聚腺苷酸化片段。一种有效的转录终止组分是牛生长激素聚腺苷酸区。见 WO94/11026 及其所公开的表达载体。

(vii) 宿主细胞的筛选和转化

用于克隆或表达本发明载体中 DNA 的合适的宿主细胞是上述原核细胞、酵母或高等真核细胞。用于此目的的适合的原核细胞包括革兰氏阴性或革兰氏阳性细菌等真细菌, 如肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 的埃希菌属(例如大肠杆菌)、肠杆菌属、欧文菌属、克雷白菌属、变形菌杆属、沙门菌属(例如鼠伤寒沙门菌)、沙雷菌属(粘质沙雷菌)和志贺菌属等, 以及芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌(例如 1989 年 4 月 12 日出版的 DD266710 中所述地衣芽孢杆菌 41P)等, 假单胞菌属的铜绿菌假单胞菌, 及链霉菌。优选大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294 (ATCC31446), 份声明大肠杆菌 B、大肠杆菌 X177 (ATCC31537) 和大肠杆菌 W3110 (ATCC27325) 等其它菌株也适合。这些实例是用于说明而不是限制于此。

除了原核生物, 丝状真菌或酵母等真核微生物也是适于使编码抗 ErbB2 抗体的载体克隆或表达的宿主。酿酒酵母, 或常用的面包酵母, 在低等真核宿主微生物中最为常用。然而, 多种其它属、种和株也是可公开得到的并可用于本发明, 例如粟酒裂殖酵母; 克鲁维酵母属, 例如乳酸克鲁维酵母

(*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*)(ATCC 12424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*)(ATCC16045)、威克曼氏克鲁维酵母(*K.wickerhamii*) (ATCC 24178)、*K.waltii* (ATCC 56500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilarum*)(ATCC 36906)、耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*)和马克斯克鲁维酵母(*K.marxianus*)等; *yarrowia* (EP402226); 巴斯德毕赤酵母(*pichia pastoris*)(EP 183070); 念珠菌属; *Trichoderma reesia*(EP244234); 粗糙链孢霉; 许旺氏酵母属(*schwanniomyces*)如西方许旺氏酵母(*schwanniomyces occidentalis*)等; 和丝状真菌, 例如链孢霉属、青霉属、*Tolypocladium* 以及曲霉属如构巢曲霉和黑曲霉等。

用于表达糖基化抗体的适合宿主细胞来自多细胞生物。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已经从下述宿主中鉴定了大量的杆状病毒株和变体以及相应的容许型昆虫宿主细胞, 所述宿主包括草地夜蛾(毛虫)、埃及伊蚊(蚊子)、白纹伊蚊(蚊子)、*Drosophila melanogaster*(果蝇)和家蚕蛾等。用于转染的各种病毒株可以公开地获得, 例如加利福尼亚 Y 级夜蛾(*autographa californica*)NPV 的 L-1 变体和家蚕蛾 NPV 的 Bm-5 株, 并且这些病毒可以在此用作为根据本发明的病毒, 尤其是用于草地夜蛾细胞的转化。

棉花、玉米、土豆、大豆、牵牛花、西红柿和烟草的植物细胞培养物也可以用作宿主。

然而, 关注最多的是脊椎动物细胞, 而且在培养(组织培养)中繁殖脊椎动物细胞已经成为常规方法。有效哺乳动物宿主细胞的实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系(COS-7, ATCC CRL 1651); 人胚肾细胞系(293 细胞或亚克隆培养成悬浮培养液的 293 细胞, Graham 等, 普通病毒新杂志(J. Gen Virol.) 36: 59(1977)); 幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10); 中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub 等, 美国国家科学院院刊 77:4216 (1980)); 小鼠足细胞(TM4, Mather, Biol.Reprod. 23: 243-251 (1980)); 猴肾细胞(CV1 ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2); 犬肾细胞(MDCK ATCC CCL 34); 布法罗(buffalo)大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞(W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 细胞(Mather 等, 纽约科学院年鉴(Annals N.Y.Acad.Sci.) 383: 44-68 (1982)); MRC 5 细胞; FS4 细胞; 和人肝细胞癌细胞系(Hep G2)。

宿主细胞用上述用于抗 ErbB2 抗体制备的表达或克隆载体转化, 并在改

进型传统营养培养基上培养,所述培养基经改进已适于诱导启动子、筛选转化体或扩增编码所需序列的基因。

#### (viii) 培养宿主细胞

用于制备本发明的抗 ErbB2 抗体的宿主细胞可在各种培养基中培养。市售培养基如 Ham's F10 (Sigma)、最小基本培养基((MEM)(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)和 Dulbecco 氏改良型 Eagle 氏培养基((DMEM), Sigma)均适合于培养所述宿主细胞。另外,在 Ham 等,酶学方法 58: 44 (1979); Barnes 等,生物化学年鉴 102: 255(1980);美国专利 4767704、4657866、4927762、4560655 或 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国专利 Re.30985 中所述任何培养基可作为所述宿主细胞的培养基。任何所述培养基可在需要时补充激素和/或其它生长因子(例如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠,钙,镁,和磷酸)、缓冲液(例如 HEPES),核苷酸(例如腺苷和胸苷嘧啶)、抗生素(例如遗传霉素(GENTAMYCIN<sup>TM</sup>))、痕量元素(定义为通常以微摩尔级终浓度出现的无机化合物)、葡萄糖或一种等价能源。还包括任何其它必须补充物,其相应浓度为本领域已知。培养条件如温度、pH 等是现有技术中应用于表达型宿主细胞的那些,本领域技术人员对此很熟悉。

#### (ix) 抗 ErbB2 抗体的纯化

当使用重组技术时,抗体可以在细胞内胞质空间中产生,或直接分泌到培养基中。如果所述抗体在细胞内产生,第一步通过离心或超滤除去颗粒状碎片,即宿主细胞或其裂解片段。Carter 等,生物/技术 10: 163-167(1992)中叙述了用于分离分泌到大肠杆菌周质空间中的抗体的方法。简言之,在醋酸钠(pH3.5)、EDTA 和苯甲基磺酰氟(PMSF)存在的条件下融解细胞团超过 30 分钟。通过离心可以将细胞碎片除去。在抗体分泌到培养基的情况中,通常首先用市售的蛋白浓缩滤膜(例如 Amicon 或 Millipore Pellicon 超滤单位)浓缩此类表达系统的上清。在任何上述步骤中可以包括抑制蛋白裂解的 PMSF 等蛋白酶抑制剂,并且可以包括抑制外来污染物生长的抗生素。

从所述细胞中制备的抗体组合物可利用例如羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析等方法纯化,优选亲和层析。蛋白 A 作为亲和配体的适合性取决于该抗体上任何免疫球蛋白 Fc 区的种类和同种型。蛋白 A 可用于纯化基于人  $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$  或  $\gamma 4$  重链的抗体(Lindmark 等,免疫学方法杂志, 62: 1-13(1983))。蛋白 G 被建议用于所有的小鼠同种型和人  $\gamma 3$ (Guss 等, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。与亲和配体结合的基质最常用琼脂糖,但也可利用

其它基质。具有机械稳定性的基质如控制孔径的玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯等,比琼脂糖允许更快的流速且耗时更短。在所述抗体包括 CH3 结构域的情况中,Bakerbond ABX<sup>TM</sup>树脂(J.T.Baker, PhilliPBSurg, NJ)有利于纯化。根据待回收的抗体,还可以应用其它蛋白纯化技术,例如在离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反向 HPLC、硅层析、在阳离子或阴离子交换树脂层析(例如聚天冬氨酸柱)上进行的肝素 SEPHAROSE<sup>TM</sup> 层析、聚焦层析、SDS-PAGE 和硫酸铵沉淀。

在任何最初纯化步骤之后,利用 pH 约 2.5-4.5 的洗脱缓冲液,可以对包括所述目的抗体和污染物的混合物进行低 pH 疏水相互作用层析,优选在低盐浓度条件下进行(例如大约 0-0.25M 盐浓度)。

#### IV. 药物制剂形式

根据本发明使用的抗体的药用制剂通过将具有所需纯度的抗体与任选的药用载体、赋形剂或稳定剂(雷氏药学(Remington's Pharmaceutical Sciences)第 16 版, Osol, A.编(1980))混合而制备,然后以冻干剂或含水剂的形式保存。可药用载体、赋形剂、稳定剂在所用剂量及浓度下对受者无毒性,并包括缓冲剂例如磷酸盐,柠檬酸盐及其它有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化己烷双胺;氯化苄烷铵(benzalkonium chloride),苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;间甲酚);低分子量多肽(少于 10 个残基);蛋白质如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸,谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖及其它碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂如 EDTA;糖类如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子如钠;金属复合物(例如锌-蛋白复合物);和/或非离子表面活性剂如吐温<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> 或聚乙二醇(PEG)。WO97/04801 叙述了优选的冻干型抗 ErbB2 抗体剂型,在此引入本文作为参考。

所述制剂还可根据所治疗的具体情况而包含一种以上活性成分,优选具有互补活性但相互无负面影响的那些。例如,可能需要在一种制剂中进一步提供与 EGFR、ErbB2(例如结合 ErbB2 上不同表位的抗体)、ErbB3、ErbB4 或血管内皮生长因子(VEGF)结合的抗体。或者(或另外),所述组合物可进一步包括化疗药、细胞毒性药、细胞因子、生长抑制剂、抗激素药、EGFR-靶向药、抗血管生成药、和/或心脏保护剂。这些分子以对所需目的有效的总量

在组合中适当地存在。

活性成分也可容纳在通过凝聚技术或界面聚合作用制备的微胶囊中，如分别在胶体性质的药物运送系统(如脂质体，白蛋白小球体，微乳剂，纳米颗粒及纳米胶囊)或大乳剂(macroemulsions)的羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(异丁烯酸甲酯)微胶囊。这些技术见雷氏药学，第16版 Osol, A.编(1980)。

也可制备控释制剂。控释制剂的适当实例包括含有抗体的固态疏水聚合物的半通透性基质，所述基质为具有一定形状的制品，如膜或微胶囊。控释制剂实例包括聚酯、水凝胶(如聚(2-羟基乙基-异丁烯酸酯)或聚(乙烯醇)，聚交酯(美国专利 3,773,919)，L-谷氨酸与 $\gamma$ 乙基-L-谷氨酸酯的共聚物，不可降解的乙烯乙酸乙酯，可降解的乳酸-羟基乙酸共聚物如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-羟基乙酸共聚物和亮氨酸脯氨酸(leuprolide)乙酸酯组成的可注射的微球体)，以及聚 D-(-)-3-羟丁酸。

用于体内给药的制剂必须是无菌的。这可以通过除菌滤膜过滤而轻易实现。

#### V. 用抗 ErbB2 抗体进行治疗

根据本发明，可将抗 ErbB2 抗体用于治疗各种疾病。疾病实例包括良性或恶性肿瘤；白血病和淋巴的恶性疾病；其它疾病，如神经细胞、神经胶质细胞、星形胶质细胞、下丘脑、腺体、巨噬细胞、上皮、基质、囊胚腔、炎症性、血管生成性和免疫性的疾病。

通常，所治疾病是癌症。在此所治癌症的实例包括但不限于癌(carcinoma)，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤和白血病或淋巴的恶性病。这些癌的更具体实例包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)，肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌)，腹膜癌，肝细胞癌，胃癌(包括胃肠癌)，胰腺癌，成胶质细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌(liver cancer)，膀胱癌，肝细胞瘤，乳腺癌，结肠癌，结直肠癌，直肠癌，子宫内膜或子宫癌，唾液腺癌，肾癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝癌(hepatic carcinoma)，肛门癌，阴茎癌以及头颈癌。

所述癌症通常含有 ErbB2 表达细胞，从而使本文所述抗 ErbB2 抗体能与癌结合。虽然所述癌症的特点是 ErbB2 受体过度表达，但本申请进一步提供了对不被认为是 ErbB2 过度表达的癌的治疗方法。为了测定癌中的 ErbB2 表达，可应用各种诊断性/预后性检测。在一个实施方案中，ErbB2 过度表达可通过 IHC(例如利用 HERCEPTEST®(Dako))进行检测。可对肿瘤活检的石

蜡包埋组织切片进行 IHC 检测, ErbB 蛋白染色强度的标准如下:

分值 0

没有观察到染色, 或在少于 10% 的肿瘤细胞中观察到膜染色。

分值 1+

在多于 10% 的肿瘤细胞中检测到微弱/勉强看得见的膜染色。所述细胞仅有膜的一部分被染色。

分值 2+

在多于 10% 的肿瘤细胞中观察到从弱到中等强度的完全膜染色。

分值 3+

在多于 10% 的肿瘤细胞中观察到从中度到很强的完全膜染色。

可将 ErbB2 过度表达评估分值为 0 或 1+的那些肿瘤鉴定为并未过度表达 ErbB2, 而将分值为 2+或 3+的那些肿瘤鉴定为过度表达 ErbB2。

或者(或另外), 可在甲醛固定且石蜡包埋的肿瘤组织上进行例如 INFORM<sup>TM</sup>(购自 Ventana, Arizona)或 PATHVISION<sup>TM</sup>(Vysis, Illinois)等 FISH 检测, 确定肿瘤中 ErbB2 过度表达的程度(如果有)。

在一个实施方案中, 所述癌症是表达(并且可能过度表达)EGFR 的癌。可表达/过度表达 EGFR 的癌实例包括鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌), 肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌), 腹膜癌, 肝细胞癌, 胃癌(包括胃肠癌), 胰腺癌, 成胶质细胞瘤, 宫颈癌, 卵巢癌, 肝癌(liver cancer), 膀胱癌, 肝细胞瘤, 乳腺癌, 结肠癌, 结直肠癌, 直肠癌, 子宫内膜或子宫癌, 唾液腺癌, 肾癌, 前列腺癌, 外阴癌, 甲状腺癌, 肝癌(hepatic carcinoma), 肛门癌, 阴茎癌以及头颈癌。

在此所治疗的癌可以是以 ErbB 受体(例如 EGFR)的过度活化为特点的癌。此过度活化的原因可能是 ErbB 受体或 ErbB 配体的过度表达或产量增加。在本发明的一个实施方案中, 进行诊断性或预后性检测, 以确定患者的癌是否是以 ErbB 受体过度活化为特点。例如, 可检测所述癌症中 ErbB 基因的扩增和/或 ErbB 受体的过度表达。可测定这种扩增/过度表达的各种试验为本领域现有, 包括 IHC、FISH 和上述脱落抗原试验。或者(或另外), 可根据已知方法检测肿瘤中的或与肿瘤相关的 TGF- $\alpha$  等 ErbB 配体的水平。这些试验可检测待检样品中的蛋白或其编码核酸。在一个实施方案中, 利用免疫组化法(IHC)可检测肿瘤中 ErbB 配体的水平; 见例如 Scher 等, 临床癌症研究 1: 545-550(1995)。或者(或另外), 可通过例如 FISH、southern 印迹或 PCR 技术,

等评估待检样品中编码 ErbB 配体的核酸的水平。

而且, ErbB 受体或 ErbB 配体的过度表达或扩增可利用体内诊断试验评估, 如给药能与待检分子结合并带有可检测标记(如放射性同位素)的分子, 并从外部对患者进行扫描以定位该标记。

在所治疗癌症是激素非依赖性癌的情况下, 可利用上述各种试验评估肿瘤中激素(如雄激素)和/或其同源受体的表达。或者(或另外), 可以因为患者对抗激素治疗不再产生应答而将其诊断为患有激素非依赖性癌。

在某些实施方案中, 将包括与细胞毒药物偶联的抗 ErbB2 抗体的免疫偶联物给药至患者。优选所述免疫偶联物和/或与它结合的 ErbB2 蛋白被细胞摄入(internalize), 导致在杀伤与它结合的癌细胞时增加免疫偶联物的治疗效果。在优选的实施方案中, 细胞毒药物在癌细胞中靶向或干扰核酸。此细胞毒药物的实例包括美登素、加利车霉素、核糖核酸酶和 DNA 内切核酸酶。

抗 ErbB2 抗体或免疫偶联物可用已知方法向人类患者给药, 如静脉给药(例如作为大丸剂给药或通过持续输注一段时间而给药)等, 通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径给药。优选将抗体静脉内或皮下给药。

其它治疗方案也可与抗 ErbB2 抗体的给药联合进行。这种联合给药包括用分别不同的制剂或单个药物制剂共同给药, 以及以任何次序连续给药, 其中优选有一段时间为两种(或所有)活性药物同时发挥其生物学活性。

在一个优选的实施方案中, 用两种不同的抗 ErbB2 抗体对所述患者进行治疗。例如, 可用阻断 ErbB 受体的配体活化作用的第一种抗 ErbB2 抗体或具有单克隆抗体 2C4 的生物学特点的抗体, 以及能抑制生长的第二种抗 ErbB2 抗体(例如 HERCEPTIN<sup>®</sup>)或能诱导 ErbB2 过度表达细胞凋亡的抗 ErbB2 抗体(例如 7C2、7F3 或其人源化变体), 对患者进行治疗。优选这种联合治疗引起协同治疗效果。例如, 可用 HERCEPTIN<sup>®</sup>治疗患者, 之后, 例如当该患者对 HERCEPTIN<sup>®</sup>治疗没有应答的情况下, 用 rhuMAb 2C4 进行治疗。在另一个实施方案中, 患者首先用 rhuMAb 2C4 治疗, 之后接受 HERCEPTIN<sup>®</sup>治疗。在另外的实施方案中, 同时用 rhuMAb 2C4 和 HERCEPTIN<sup>®</sup>对患者进行治疗。

可能还需要将抗 ErbB2 抗体(或多种抗 ErbB2 抗体)的给药与针对另一种肿瘤相关抗原的抗体的给药联合。在这种情况下, 所述另一种抗体可与例如 EGFR、ErbB3、ErbB4 或血管内皮生长因子(VEGF)等结合。

在一个实施方案中,本发明的治疗涉及将抗 ErbB2 抗体(或多种抗 ErbB2 抗体)与一或多种化疗药或生长抑制药联合给药,包括组合不同的化疗药共同给药。优选的化疗药包括紫杉烷(如紫杉醇(paclitaxel)和紫杉萜(docetaxel))和/或蒽环类抗生素。这些化疗药的制剂和给药方案可根据厂商的说明进行,或根据熟练医生的经验确定。这类化疗的制剂和给药方案亦参见 Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams 和 Wilkins, Baltimore, MD(1992)。

可将抗激素化合物(例如他莫昔芬等抗雌激素化合物; 奥那司酮(onapristone)等抗黄体酮药物(EP 616812); 或氟他胺等抗雄激素)以这些分子的已知剂量与所述抗体组合给药。当所治疗的癌是激素非依赖性癌时,所述患者可先接受抗激素治疗,在所述癌症变为激素非依赖性癌之后,可向该患者给药抗 ErbB2 抗体(和任选的本文所述其它药物)。

有时,向患者同时给药心脏保护剂(以阻止或减少与该治疗相关的心肌功能障碍)或一个或多种细胞因子,可能也是有益的。还可同时给药靶向 EGFR 的药物或抗血管生成剂。除了上述治疗方案外,可对患者进行切除癌的手术和/或放疗。

本文所述抗 ErbB2 抗体还可与如上文定义部分所述的那些 EGFR 靶向药物联合,产生互补而强效的协同治疗效果。

如上述共给药的任何药物的适当剂量是目前应用的剂量,而且由于所述药物和抗 ErbB2 抗体的联合作用(协同作用)可降低使用剂量。

进行疾病的预防或治疗时,抗体的适当剂量依赖于所治疾病的类型(如上所述),疾病的严重程度和进程,抗体给药的目的是预防还是治疗,先前的治疗,患者的临床病史和对抗体的应答,以及主治医生的判断。抗体可一次或分多次向患者给药。无论是例如一次或多次分别给药,还是连续输注给药,向患者给药的起始候选剂量是约  $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ - $15\text{mg/kg}$ (例如  $0.1\text{-}20\text{mg/kg}$ )抗体,其取决于疾病的类型或严重程度。典型的每日给药剂量范围是从  $1\text{ }\mu\text{g/kg}$  到  $100\text{mg/kg}$  或更多,取决于上述因素。重复给药数天或更长时间时,视具体情况而将治疗持续至出现对疾病症状的所需抑制为止。抗体的优选剂量范围是约  $0.05\text{mg/kg}$ - $10\text{mg/kg}$ 。因而,可以以约  $0.5\text{mg/kg}$ 、 $2.0\text{ mg/kg}$ 、 $4.0\text{ mg/kg}$  或  $10\text{ mg/kg}$ (或其任何组合)向患者给药一或多剂。所述剂量可间歇给与,如每周一次或每三周一次,(例如使患者接受约 2-20 剂(如 6 剂)抗 ErbB2 抗体)。可以以较大剂量起始给药,然后以较小剂量给药一或多剂。剂量方案的实例

包括给药剂量约 4mg/kg 的抗 ErbB2 抗体起始,之后给药约 2mg/kg 的每周持续剂量。但其它剂量方案也有效。此治疗的进展可通过传统的技术和检测容易地监控。

除了向患者给药抗体蛋白,本申请考虑了通过基因治疗而给药抗体。编码抗体的核酸的这种给药方式包含在术语“给药治疗有效量的抗体”中。见例如 1996 年 3 月 14 日公布的 WO96/07321,其中涉及利用基因治疗来产生细胞内抗体。

有两种主要途径使所述核酸(任选包括在载体中)进入患者的细胞中:体内和回体(*ex vivo*)。在体内运输中,直接向患者注射所述核酸,通常在需要所述抗体的部位注射。在回体治疗中,取出患者的细胞,将核酸导入这些离体的细胞中,然后将改良的细胞直接回输给患者或将其包被在多孔膜中移植至患者体内(见例如美国专利 4892538 和 5283187)。有许多技术可用于将核酸引入活细胞中。根据所述核酸是在体外转移入培养细胞中,还是在体内转移入目的宿主细胞中,所应用的技术不同。适于在体外将核酸转移入哺乳动物细胞中的技术包括脂质体的使用,电穿孔,显微注射,细胞融合,DEAE-葡聚糖,磷酸钙沉淀法等。基因的回体传递常用的载体是逆转录病毒。

目前优选的体内核酸转移技术包括用病毒载体(例如腺病毒、单纯疱疹病毒 I 型或腺伴随病毒)和基于脂质的系统(用于脂质介导的基因转移的有效脂质体是例如 DOTMA、DOPE 和 DC-Chol)进行转染。在一些情况中,需要提供核酸来源,及靶向靶细胞的药剂,例如对细胞表面膜蛋白或靶细胞具有特异性的抗体、靶细胞上受体的配体等等。在使用脂质体的情况中,与内吞作用相关型表面膜蛋白结合的蛋白可用于靶向和/或促进摄取,例如对特殊细胞类型具有向性的衣壳蛋白或其片段,在循环中内在化的蛋白的抗体,靶向细胞内部位并延长细胞内半衰期的蛋白。受体介导的胞饮作用的技术参见 Wu 等,生物学化学杂志 262: 4429-4432(1987); Wagner 等,美国国家科学院院刊 87: 3410-3414(1990)。关于目前已知的基因标记和基因治疗方案的综述见 Anderson 等,科学 256: 808-813(1992)。另见 WO93/25673,在此引入本文作为参考。

## VI. 产品

在本发明的另一个实施方案中,提供了含用于治疗上述疾病的物质的产品。所述产品包括一个容器和位于该容器表面的或与该容器相关的标签或包装插页。适当的容器有瓶子,小瓶,注射器等。容器可由各种材料如玻璃或

塑料制成。该容器可内含一种能有效治疗目标疾病或紊乱的组合物，并具有无菌存取口(例如该容器可以是静脉注射袋或带有能通过皮下注射针穿刺的塞子的小瓶)。组合物中至少一种活性药剂是抗 ErbB2 抗体。所述标签或包装插页说明，所述组合物可用于治疗指定的疾病(例如癌)。在一个实施方案中，所述标签和包装插页说明，内含与 ErbB2 结合的抗体的所述组合物可用于治疗能表达选自表皮生长因子(EGFR)、ErbB3 和 ErbB4(优选表达 EGFR)的 ErbB 受体的癌症。另外，标签或包装插页可说明，所要治疗的患者是患有以 ErbB 受体(选自 EGFR、ErbB3 或 ErbB4)过度活化为特点的癌的患者。例如，所述癌症可以是过度表达一种这类受体或过度表达 ErbB 配体(例如 TGF- $\alpha$ )的癌。所述标签和包装插页还可说明，所述组合物可用于治疗不以 ErbB 受体过度表达为特征的癌症。例如，当 HERCEPTIN®的包装插页说明该抗体可用于治疗转移性乳腺癌患者(其肿瘤过度表达 ErbB2 蛋白)时，本发明的包装插页可能说明，上述抗体或组合物可用于治疗癌症而不必考虑 ErbB2 抗体过度表达的程度。在其它实施方案中，所述包装插页可能说明，所述抗体或组合物可用于治疗乳腺癌(例如转移性乳腺癌)；激素非依赖性癌；前列腺癌(例如雄激素非依赖性前列腺癌)；肺癌(例如小细胞肺癌)；结肠、直肠或结直肠癌；或本文所述的任何疾病。而且，所述产品可包括(a)其中装有组合物的第一个容器，所述组合物含有能结合 ErbB2 并抑制过度表达 ErbB2 的癌生长的第一抗体；和(b)其中装有组合物的第二个容器，所述组合物含有能结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的第二抗体。本发明的此实施方案中的产品可进一步包括包装插页，其说明第一和第二抗体组合物可用于治疗癌症。而且，该包装插页可指导所述组合物(包括结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配体活化作用的抗体)的使用者将用抗体进行的治疗与前面段落中所述的任何辅助治疗(例如，化疗药，EGFR 靶向药，抗血管生成药，抗激素化合物，心脏保护剂和/或细胞因子)进行组合。或者(或另外)，所述产品可进一步包括第二个(或第三个)容器，其中含可药用的缓冲液，例如用于注射的抑细菌水(BWFI)，磷酸盐缓冲液，Ringer's 溶液和葡萄糖溶液。还可包括具有商业需要以及符合用户需要的其它材料，如其它缓冲液、稀释剂，过滤器，针头和注射器。

## VII. 抗 ErbB2 抗体的非治疗性应用

本发明的抗体(例如人源化抗 ErbB2 抗体)具有进一步的非治疗性应用。

例如，所述抗体可用作亲和纯化试剂。在这个过程中，可利用本领域已

知技术将抗体固定在 Sephadex 树脂或滤纸等固相上。使固相化抗体与要纯化的含 ErbB 蛋白(或其片段)的样品接触,之后用适当溶剂洗涤支持相,使得基本除去样品中除了与固相化抗体结合的 ErbB2 蛋白外的所有其它物质。最后,用另一种适当溶液(例如甘氨酸缓冲液, pH 5.0)洗涤支持相,使 ErbB2 蛋白从抗体中释放。

抗 ErbB2 抗体可用于 ErbB2 蛋白的诊断检测,例如检测其在特异性细胞、组织或血清中的表达。

对于诊断性应用,通常用可检测的组分标记抗体。多种标记物可用,它们总体上分为下述几类:

(a) 放射性同位素,例如  $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$  和  $^{131}\text{I}$ 。利用例如在免疫学最新方案(Current Protocols in Immunology),卷 1 和 2, Coligen 等编, Wiley-interscience, 纽约, New York Pubs.(1991)中所述方法,用放射性同位素对所述抗体进行标记,并且可以利用闪烁计数器检测放射活性。

(b) 可以应用荧光标记,例如稀土元素螯合物(钕螯合物)或荧光素及其衍生物,例如罗丹明及其衍生物、丹磺酰、丽丝胺、藻红蛋白和得克萨斯红。可以利用例如在免疫学最新方案,出处同上,中所述技术,将所述荧光标记物与所述抗体连接。利用荧光计定量荧光。

(c) 可以应用各种酶-底物标记,在美国专利号 4275149 中提供了对其中一些的综述。所述酶通常催化发色底物的化学变化,可以利用各种技术测定这些变化。例如,所述酶可以催化底物的颜色变化,其可以被分光光度计所检测。或者,所述酶可以改变底物的荧光或化学发光。用于定量荧光改变的技术见上面的叙述。化学发光底物通过化学反应激发电子,然后发出可以被检测(例如,用化学发光仪)或给荧光受体提供能量的光。酶标记的实例包括萤光素酶(例如萤火虫萤光素酶或细菌萤光素酶,美国专利号 4737456)、萤光素、2,3-二氢二氮杂萘二酮、苹果酸酯脱氢酶、脲酶、辣根过氧化物酶(HRPO)等过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$  半乳糖苷酶、葡萄糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(例如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。在 O'Sullivan 等,制备酶免疫分析所用酶-抗体偶联物的方法,酶学方法,(J.Langone 和 H.Van Vunakis 编), Academic press, 纽约, 73: 147-166(1981)中叙述了将酶与抗体偶联的技术。

酶-底物组合的实例包括:

(i)辣根过氧化物酶(HRPO), 氢过氧化物酶为底物, 由氢过氧化物酶氧化染料前体(例如邻苯二胺(OPD)或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺氢氯化物(TMB));

(ii)碱性磷酸酶(AP), 以对硝基苯磷酸盐为发色底物; 和

(iii)  $\beta$ -D-半乳糖苷酶( $\beta$ -D-Gal), 有发色底物(例如对硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖苷酶)或发荧光底物 4-甲基伞形基(umbelliferyl)- $\beta$ -D-半乳糖苷酶。

本领域技术人员可以应用其它多种酶-底物组合。其综述见美国专利号 4275149 和 4318980。

有时, 标记物与抗体间接连接。技术人员知道用于此的各种技术。例如, 可使多肽与生物素偶联, 并使上述三类标记物之任一与抗生物素蛋白结合, 反之亦然。生物素与抗生物素蛋白选择性结合, 使标记物能以这种方式间接与抗体偶联。或者, 为使标记物与抗体间接连接, 将抗体与小分子半抗原(例如地高辛)偶联, 并将上述不同类型标记物之一与抗半抗原抗体(例如抗地高辛抗体)偶联。如此可实现标记物与抗体的间接偶联。

在本发明另一实施方案中, 抗体不需要标记, 其存在可利用与该抗体结合的标记抗体检测。

本发明抗体可用于任何已知的试验方法, 如竞争结合试验、直接和间接夹心试验, 及免疫沉淀试验。Zola, 单克隆抗体: 技术指南, 147-158 页(CRC Press, Inc. 1987)。

在免疫组化方法中, 肿瘤样品可以是新鲜或冰冻样品, 或可包埋于石蜡中并用福尔马林等防腐剂固定。

所述抗体还可以用于体内诊断试验。通常用放射性核素(例如  $^{111}\text{In}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$  或  $^{35}\text{S}$ )标记所述抗体, 以便该抗原或其表达细胞可利用免疫闪烁成像术定位。为方便起见, 本发明的抗体可以以试剂盒(即装有预计量的试剂组合物和进行诊断性检测的说明)的形式提供。在用酶对所述抗体进行标记的情况中, 该试剂盒包括酶所需要的底物和辅助因子(例如提供可检测的发色团或荧光团的底物前体)。另外, 其它的附加物包括例如稳定剂、缓冲液(例如封闭缓冲液或裂解缓冲液)等等。各种试剂的相对量可广泛变化, 以提供使检测的敏感性基本上最佳的试剂浓度。所述试剂尤其可以以干粉(通常为冻干剂)的形式提供, 其包含赋形剂, 使得其溶解后可提供具有适当浓度的试剂溶液。

#### VIII. 材料的保藏

下述杂交瘤细胞已保藏在美国典型培养物保藏中心, 10801 University

Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, 美国(ATCC):

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

本发明的进一步细节通过下述非限定性实施例举例说明。所有引文在此引入本文作为参考。

### 实施例 1

#### 单克隆抗体 2C4 的制备和鉴定

按 Fendly 等, 癌症研究 50: 1550-1558(1990)中所述方法, 制备与 ErbB2 的细胞外结构域特异性结合的鼠单克隆抗体 2C4、7F3 和 4D5。简言之, 用含 25mM EDTA 的磷酸盐缓冲液(PBS)收获按 Hudziak 等(美国国家科学院院刊 84: 7158-7163(1987))所述方法制备的 NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> 细胞(约表达  $1 \times 10^5$  ErbB2 分子/细胞), 并用其免疫 BALB/c 小鼠。在第 0、2、5 和 7 周给小鼠腹腔注射  $10^7$  个细胞(于 0.5ml PBS 中)。在第 9 和 13 周给带有特定抗血清(其可与  $^{32}\text{P}$ -标记的 ErbB2 免疫共沉淀)的小鼠腹腔注射麦胚凝集素-Sepharose(WGA)纯化的 ErbB2 膜提取物。之后静脉注射 0.1ml ErbB2 制剂, 并将脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞系 X63-Ag8.653 融合。

通过 ELISA 和放射性免疫沉淀法, 筛选杂交瘤细胞上清液的 ErbB2 结合。

用竞争性结合检测(Fendly 等, 癌症研究 50: 1550-1558(1990)), 确定与单克隆抗体 4D5、7F3 和 2C4 结合的 ErbB2 表位。通过利用 PANDEX<sup>TM</sup> 扫描仪定量完整细胞上的直接荧光, 对抗体进行交叉阻断研究。用已建立的方法(Wosfsy 等, 细胞免疫学中的筛选方法, 287 页, Mishel 和 Schiigi(编)San Francisco; W.J. Freeman Co.(1980)), 将每种单克隆抗体与异硫氰酸荧光素(FITC)偶联。用胰蛋白酶消化汇合的单层 NIH 3T3/HER2-3<sub>400</sub> 细胞, 并洗涤一次, 然后重悬于含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)和 0.1% NaN<sub>3</sub> 的冷 PBS 中, 浓度为  $1.75 \times 10^6$  细胞/ml。加入终浓度为 1% 的乳胶颗粒(IDC, Portland, OR), 以降低 PANDEX<sup>TM</sup> 平板膜的阻塞。向 PANDEX<sup>TM</sup> 平板孔中加入 20  $\mu\text{l}$  细胞悬液和 20  $\mu\text{l}$  纯化的单克隆抗体(100  $\mu\text{g/ml}$ -0.1  $\mu\text{g/ml}$ ), 在冰上孵育 30 分钟。向每孔中加入 20  $\mu\text{l}$  预先稀释的 FITC-标记的单克隆抗体, 在冰上孵育 30 分

钟, 洗涤后, 用 PANDEX™ 定量荧光。与无关单克隆抗体对照相比, 如果每个抗体阻断 50% 或更多的另一抗体的结合, 那么这些单克隆抗体被认为共享一个表位。在本实验中, 单克隆抗体 4D5、7F3 和 2C4 分别带有表位 I、G/F 和 F。

用乳腺癌细胞系 SK-BR-3 (见 Hudziak 等, 分子细胞生物学 9(3): 1165-1172(1989)) 可评估单克隆抗体 4D5、7F3 和 2C4 的生长抑制特性。简言之, 用 0.25% (体积比) 胰蛋白酶消化使 SK-BR-3 细胞脱附, 并重悬于完全培养基, 浓度为  $4 \times 10^5$  细胞每毫升。将 100  $\mu$ l ( $4 \times 10^4$  细胞) 等份试样的细胞悬液接种于 96 孔微稀释板中, 使细胞粘附, 然后只加入 100  $\mu$ l 培养基或加入含单克隆抗体(终浓度: 5  $\mu$ g/ml) 的培养基。72 小时之后, 用 PBS(pH 7.5) 洗涤平板两次, 用结晶紫(溶于甲醇, 浓度为 0.5%) 染色, 然后按 Sugarman 等, 科学 230: 943-945(1985) 中所述方法分析相对细胞增殖。相比于单克隆抗体 4D5 的约 56% 的抑制率, 单克隆抗体 2C4 和 7F3 分别抑制 SK-BR-3 的相对细胞增殖约 20% 和 38%。

估测单克隆抗体 2C4、4D5 和 7F3 对 MCF7 的全细胞裂解物中 Mr180000 范围内的蛋白的 HRG 活化酪氨酸磷酸化进行抑制的能力(Lewis 等, 癌症研究 56: 1457-1465(1996))。已经报道 MCF7 表达所有已知的 ErbB 受体, 但其表达水平较低。因为 ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 具有几乎相同的分子大小, 所以当用 Western 杂交法估测全细胞裂解物时, 鉴别哪种蛋白发生酪氨酸磷酸化是不可能的。

然而这些细胞是酪氨酸磷酸化检测的理想细胞, 因为在所使用的检测条件下, 在无外源性 HRG 加入时, 在 Mr180000 范围内, 它们呈现低水平到不可检测水平的酪氨酸磷酸化蛋白。

将 MCF7 细胞接种于 24 孔平板中, 向每孔中加入抗 ErbB2 单克隆抗体, 在室温下孵育 30 分钟; 然后向每孔加入 rHRG  $\beta$  1<sub>177-244</sub>, 终浓度为 0.2 nM, 然后持续孵育 8 分钟。从各个孔中小心地吸出培养基, 加入 100  $\mu$ l SDS 样品缓冲液(5% SDS, 25mM DTT, 和 25mM Tris-HCl, pH 6.8) 终止反应。将每份样品在 4-12% 梯度胶(Vovex) 上进行电泳, 然后电转到聚偏二氟乙烯膜上。使抗磷酸酪氨酸(4G10, 来源于 UBI, 浓度为 1  $\mu$ g/ml) 免疫杂交显色, 并按先前报道的反射密度测定法(Holmes 等, 科学 256: 1205-1210(1992); Sliwkowski 等, 生物学化学杂志 269: 14661-14665), 定量 Mr-180000 位置处主要反应带的强度。

单克隆抗体 2C4、7F3 和 4D5 显著地抑制 Mr180000 的蛋白的 HRG 诱导型酪氨酸磷酸化信号的产生。在无 HGR 的条件下, 这些抗体不能激活 Mr180000 范围内的蛋白的酪氨酸磷酸化。另外, 这些抗体不与 EGFR(Fendly 等, 癌症研究 50: 1550-1558(1990))、ErbB3 或 ErbB4 发生交叉反应。抗体 2C4 和 7F3 显著地抑制对 p180 酪氨酸磷酸化的 HRG 活化作用, 使其小于对照的 25%。单克隆抗体 4D5 能阻断 50% 酪氨酸磷酸化的 HRG 活化。图 2A 表明用反射密度测定法测定的 2C4 或 7F3 抑制 p180 酪氨酸磷酸化的 HRG 活化的剂量应答曲线。用 4 参数吻合法(fit)估测这些抑制曲线, 得 2C4 和 7F3 的  $IC_{50}$  值分别为  $2.8 \pm 0.7nM$  和  $29.0 \pm 4.1nM$ 。

用冰上 24 孔板中的单层培养细胞实施抗 ErbB2 抗体对 HRG 与 MCF7 乳腺癌细胞结合的抑制(Lewis 等, 癌症研究 56: 1457-1465(1996))。向每孔中加入 ErbB2 单克隆抗体, 并孵育 30 分钟。加入  $^{125}I$  标记的 rHRG  $\beta$  1<sub>177-244</sub>(25pm), 继续孵育 4-16 小时。图 2B 给出了 2C4 或 7F3 抑制 HRG 与 MCF7 细胞结合的剂量应答曲线。在  $^{125}I$  标记的 rHRG  $\beta$  1<sub>177-244</sub> 存在的条件下, 将不同浓度的 2C4 或 7F3 与 MCF7 细胞进行孵育, 抑制曲线见图 2B。分析这些资料, 得到 2C4 和 7F3 的  $IC_{50}$  值分别为  $2.4 \pm 0.3nM$  和  $19.0 \pm 7.3nM$ 。2C4 和 7F3 的最大抑制率为约 74%, 其与酪氨酸磷酸化的数据相符。

为了确定在 MCF7 细胞上观察到的抗 ErbB2 抗体的效应是否是普遍现象, 将人肿瘤细胞系与 2C4 或 7F3 共同孵育, 并检测  $^{125}I$  标记的 rHRG  $\beta$  1<sub>177-244</sub> 特异性结合的程度(Lewis 等, 癌症研究 56: 1457-1465(1996))。研究结果见图 3。除了已经报道的少量表达或不表达 ErbB2 的乳腺癌细胞系 MDA-MB-468 之外,  $^{125}I$  标记型 rHRG  $\beta$  1<sub>177-244</sub> 的结合在所有细胞系中均可被 2C4 或 7F3 显著抑制。报道表明其余的细胞系均表达 ErbB2, 在这些细胞系中 ErbB2 表达水平差别很大。实际上, 在所检测的细胞系中 ErbB2 表达程度的差异超过 2 个数量级。例如, BT-20、MCF7 和 Caov3 表达约  $10^4$  ErbB2 受体/细胞, 而 BT-474 和 SK-BR-3 表达约  $10^6$  ErbB2 受体/细胞。由这些细胞中 ErbB2 表达程度的较大差异及上述资料, 推断 ErbB2 和 ErbB3 或 ErbB4 之间的相互作用本身是高亲和力的相互作用, 其发生在胞浆膜的表面。

在外源 rHRG  $\beta$  1 存在或不存在的条件下, 估测了单克隆抗体 2C4 和 4D5 对 MDA-MB-175 和 SK-BR-3 细胞的生长抑制作用(Achaefer 等, 癌基因 15: 1385-1394(1997))。MDA-MB-175 细胞中 ErbB2 水平比正常乳腺上皮细胞中的水平高 4-6 倍, 并且 ErbB2-ErbB4 受体在 MDA-MB-175 细胞中被组成性

磷酸化。用抗 ErbB2 单克隆抗体 2C4 和 4D5(10  $\mu$ g/ml)处理 MDA-MB-175 细胞 4 天。在结晶紫染色检测中,与 2C4 保温表现出很强的对此细胞系的生长抑制作用(图 4A)。外源性 HRG 不能显著地逆转此抑制。在另一方面,2C4 显示对 ErbB2 过度表达的细胞系 SK-BR-3 没有抑制作用(图 4B)。在外源性 HRG 存在或不存在的条件下,单克隆抗体 2C4 能抑制 MDA-MB-175 细胞的增殖,其程度大于单克隆抗体 4D5 的抑制程度。4D5 对细胞增殖的抑制依赖于 ErbB2 的表达水平(Lewis 等, Cancer Immunol.Immunother. 37: 255-263(1993))。在 SK-BR-3 细胞中检测到的最大抑制率为 66%(图 4B)。但是此作用可被外源 HRG 克服。

## 实施例 2

### 单克隆抗体 2C4 阻断 ErbB2 与 ErbB3 的 HRG 依赖性结合

用免疫共沉淀实验检测 ErbB3 与 ErbB2 结合的能力。将  $1.0 \times 10^6$  MCF7 或 SK-BR-3 细胞接种在 6 孔组织培养板中并使其粘附过夜,培养基为含 10% 胎牛血清(FBS)和 10 mM HEPES(pH 7.2)的 50: 50DMEM/Ham's F12 培养基(生长培养基)。在实验开始前,将所述细胞在无血清的生长培养基中饥饿培养 2 小时。

用 PBS 简单地洗涤所述细胞,然后用 100nM 所指抗体(在含 10mM HEPES 的 0.2% w/v 牛血清白蛋白(BSA)RPMI 培养基(pH 7.2)(结合缓冲液)中稀释)或只用结合缓冲液(对照)孵育所述细胞。室温下 1 小时之后,向一半的孔中加入 HRG,终浓度为 5nM(+). 向其它孔中加入相似体积的结合缓冲液(-)。持续孵育近 10 分钟。

吸出上清,在含 0.2mM PMSF、10  $\mu$ g/ml 亮抑酶肽和 10TU/ml 抑酶肽的 RPMI、10mM HEPES、pH7.2、1.0% v/vTRITON X-100<sup>TM</sup>、1.0% w/vCHAPS(裂解缓冲液)中裂解细胞。离心去除裂解物中不溶性物质。

用与亲和凝胶(Affi-Prep10, Bio-Rad)共价偶联的单克隆抗体使 ErbB2 免疫沉淀。该抗体(Ab-3, Oncogene Sciences)识别胞浆区表位。向每份裂解物中加入含约 8.5  $\mu$ g 固定抗体的 10  $\mu$ l 凝胶混悬液,进行免疫沉淀,使样品在室温下混合 2 小时。然后通过离心收集凝胶。用裂解缓冲液逐批洗涤凝胶 3 次,去除未结合物质。然后加入 SDS 样品缓冲液,并将样品在沸水浴中简单加热。

将上清在 4-12% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,并电转到硝酸纤维素膜上。通过用针对 ErbB3 的胞浆区表位的多克隆抗体(c-17, Santa Cruz Biotech)

检测这些印迹膜，估测 ErbB3 的存在。用化学发光底物(ECL, Amersham)使这些印迹膜显色。

如图 5A 和图 5B(分别为 MCF 和 SK-BR-3 细胞)中对照泳道结果所示，只有当用 HRG 活化细胞时，ErbB2 免疫沉淀中才存在 ErbB3。如果首先用单克隆抗体 2C4 孵育细胞，那么 ErbB3 信号在 MCF7 细胞中消失(图 5A 泳道 2C4+)，或在 SK-BR-3 细胞中明显下降(图 5B 泳道 2C4+)。如图 5A-B 所示，在 MCF7 和 SK-BR-3 细胞中，单克隆抗体 2C4 基本上比 HERCEPTIN<sup>®</sup> 更有效地阻断 ErbB3 与 ErbB2 的 heregulin 依赖性结合。用 HERCETIN<sup>®</sup> 预温育可降低 MCF7 裂解物中的 ErbB3 信号，但对 SK-BR-3 裂解物中 ErbB3 共沉淀的量几乎没有或完全没有影响。用针对 EGF 受体(Ab-1, Oncogene Sciences)的抗体预温育，对 ErbB3 在这两种细胞中与 ErbB2 免疫共沉淀的能力没有影响。

### 实施例 3

#### 人源化 2C4 抗体

首先将鼠单克隆抗体 2C4 的可变区克隆到允许产生小鼠/人嵌合 Fab 片段的载体中。用 Stratagene RNA 提取试剂盒，按照产品说明书，从杂交瘤细胞中分离总 RNA。用 RT-PCR 法扩增可变区，凝胶纯化，插入到含人  $\kappa$  恒定区和 CH1 区的 pUC119 衍生质粒中，如先前所述(Carter 等, PNAS(USA)89: 4285(1992); 美国专利 5821337)。用得到的质粒转化大肠杆菌 16C9，用于表达 Fab 片段。按先前所述方法(Werther 等, 免疫学杂志 157: 4986-4995(1996); Presta 等, 癌症研究 57: 4593-4599(1997))，进行培养、诱导蛋白表达和纯化 Fab 片段。

对纯化的嵌合 2C4 Fab 段和鼠亲本抗体 2C4 抑制 <sup>125</sup>I-HRG 与 MCF7 细胞结合的能力及其在 MCF7 细胞中抑制 p180 酪氨酸磷酸化的 rHRG 活化的能力进行比较。如图 6A 中所示，在破坏人乳腺癌细胞系 MCF7 上高亲和力 ErbB2-ErbB3 结合位点的形成时，该嵌合 2C4 Fab 段非常有效。完整鼠抗体 2C4 的 IC<sub>50</sub> 值为  $4.0 \pm 0.4$  nM，而 Fab 段的 IC<sub>50</sub> 值为  $7.7 \pm 1.1$  nM。如图 6B 所示，单价嵌合抗体 2C4 Fab 段在破坏 HRG 依赖性 ErbB2-ErbB3 活化作用中非常有效。完整鼠单克隆抗体 2C4 的 IC<sub>50</sub> 值为  $6.0 \pm 2$  nM，而 Fab 段的 IC<sub>50</sub> 值为  $15.0 \pm 2$  nM。

嵌合克隆的 DNA 测序使得可鉴定 CDR 残基(Kabat 等, 免疫相关蛋白的序列, 5<sup>th</sup> Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda,

MD(1991)) (图 7A 和 B)。按先前所述方法(Presta 等, 癌症研究 57: 4593-4599(1997)), 利用寡核苷酸定点诱变, 将所有 6 个 CDR 区域引入质粒 VX4 上的完整人框架(VL  $\kappa$  亚基 I 和 VH 亚基 III)中。按上述方法表达并纯化“CDR-交换(swap)”后的蛋白。进行结合研究来比较所述两种蛋白。简言之, 用溶于 50mM 碳酸缓冲液(pH 9.6)中的 1 微克每毫升的 ErbB2 细胞外结构域(ECD; 按 WO90/14357 中所述方法制备)包被 NUNC MAXISORP™ 平板, 4℃ 过夜, 然后用 ELISA 稀释剂(0.5% BSA, 0.05 聚山梨酸酯(polysorbate)20, PBS)在室温下封闭 1 小时。将溶于 ELISA 稀释剂中的一系列样品稀释液在平板上温育 2 小时。洗涤之后, 用生物素化鼠抗人  $\kappa$  抗体(ICN634771), 随后用链亲和素偶联的辣根过氧化物酶(Sigma)检测结合的 Fab 片段, 以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(Kirkegaard 和 Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)作为底物。测定 450nm 处吸收值。如图 8A 所示, 在 CDR-交换的人 Fab 片段的构建体上, 所有的结合均缺失。

为了恢复人源化 Fab 段的结合, 利用源自 CDR-交换的 DNA 作为模板构建突变体。利用计算机产生的模型(图 9), 设计这些突变, 使改变后可能影响 CDR 构象或抗体-抗原界面的人框架区残基改变为它们的鼠源对应物。突变体见表 2。

表 2  
人源化 2C4 FR 突变的设计

| 突变体编号 | 框架区(FR)取代                                  |
|-------|--------------------------------------------|
| 560   | ArgH71Val                                  |
| 561   | AspH73Arg                                  |
| 562   | ArgH71Val, AspH73Arg                       |
| 568   | ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly            |
| 569   | ArgH71Val, AspH73Arg, PheH67Ala            |
| 570   | ArgH71Val, AspH73Arg, AsnH76Arg            |
| 571   | ArgH71Val, AspH73Arg, LeuH78Val            |
| 574   | ArgH71Val, AspH73Arg, IleH69Leu            |
| 56869 | ArgH71Val, AspH73Arg, AlaH49Gly, PheH67Ala |

各种突变体的结合曲线见图 8A-C。人源化 Fab 段 574(带有 ArgH71Val、AspH73Arg 和 IleH69Leu 的改变)表明恢复了原始嵌合 2C4 Fab 段的结合。为

了进一步精炼或增加人源化抗体的结合,可修饰其它的 FR 和/或 CDR 残基(如 L2、L54、L55、L56、H35 和/或 H48)(例如如下取代: IleL2Thr; ArgL54Leu; TyrL55Glu; ThrL56Ser; AspH35Ser; 和 ValH48Ile)。或者(或另外),为了改善或精炼所述人源化抗体的亲和力和/或其它生物学活性,可对其进行亲和力成熟(见上述)。

利用噬菌体展示方法,进行人源化 2C4 抗体 574 的亲和力成熟。简言之,将人源化 2C4.574 Fab 克隆到噬菌体展示载体中,作为 geneIII 融合蛋白。当通过与 M13KO7 辅助噬菌体感染而诱导噬菌体颗粒时,该融合蛋白允许 Fab 在噬菌体尾纤维蛋白 geneIII 的 N 末端上展示(Baca 等,生物学化学杂志 272: 10678(1997))。

对上面鉴定的 6 个 CDR 中的每个 CDR,单独构建文库。在这些文库中,利用含“NNS”的寡核苷酸(oligo)作为密码子,使 CDR 中用计算机模型确定为在与 ErbB2 结合中可能具有重要作用的氨基酸随机化。然后针对包被在 NUNC MAXISORP™板上的 ErbB2 ECD(用溶于含 0.2% 吐温 20® (MPBST) 的 PBS 中的 3% 干牛奶代替所有的封闭液)筛选文库。为了筛选亲和力高于 2C4.574 的噬菌体,在第 3、4 和 5 轮筛选中,在洗涤期间加入可溶性 ErbB2 ECD 或可溶性 Fab 2C4.574 作为竞争剂。洗涤时间延长到室温 1 小时。

5 轮筛选之后,用噬菌体-ELISA 法再一次分析单个克隆。在 Costar 96-孔 U 形底组织培养板中培养单个克隆,通过加入辅助噬菌体诱导该噬菌体。过夜培养之后,将大肠杆菌聚集成团,并将含噬菌体的上清转入 96 孔板而使所述噬菌体用 MPBST 在室温下封闭 1 小时。按上述方法将 ErbB2 ECD 包被的 NUNC MAXISORP™板也用 MPBST 封闭。将封闭的噬菌体在平板上温育 2 小时。洗涤之后,用在 MPBST 中 1: 5000 稀释的辣根过氧化物酶偶联型抗 M13 单克隆抗体(Amersham Pharmacia Biotech, Inc. 27-9421-01)检测结合的噬菌体。以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺作为底物。测定 450nm 处吸收值。

对每个文库中给出最强信号的 48 个克隆进行 DNA 测序。将序列出现频率最高的那些克隆亚克隆到上述允许表达可溶性 Fab 的载体中。对这些 Fabs 进行诱导、蛋白纯化,用上述的 ELISA 法分析纯化的 Fab 的结合,并将该结合与起始的人源化 2C4.574 抗体的结合进行比较。

在确定了单个 CDR 中目的突变之后,构建另外的突变,其为这些突变的各种组合,并按上述方法进行检测。相对于 574 改善了结合力的突变体见表 3。

表 3  
来源于 2C4.574 亲和力成熟的突变体的命名

| 突变体名称         | 相对于 574 的改变                                           | 突变体/574* |
|---------------|-------------------------------------------------------|----------|
| H3.A1         | serH99trp, metH34leu                                  | 0.380    |
| L2.F5         | serL50trp, tyrL53gly, metH34leu                       | 0.087    |
| H1.3.B3       | thrH28gln, thrH30ser, metH34leu                       | 0.572    |
| L3.G6         | tyrL92pro, ileL93lys, metH34leu                       | 0.569    |
| L3.G11        | tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, metH34leu            | 0.561    |
| L3.29         | tyrL92phe, tyrL96asn, metH34leu                       | 0.552    |
| L3.36         | tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro, metH34leu            | 0.215    |
| 654           | serL50trp, metH34leu                                  | 0.176    |
| 655           | metH34ser                                             | 0.542    |
| 659           | serL50trp, metH34ser                                  | 0.076    |
| L2.F5.H3.A1   | serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, serH99trp            | 0.175    |
| L3.G6.H3.A1   | tyrL92pro, ileL93lys, metH34leu, serH99trp            | 0.218    |
| H1.3.B3.H3.A1 | thrH28gln, thrH30ser, metH34leu, serH99trp            | 0.306    |
| L3.G11.H3.A1  | tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly, metH34leu, serH99trp | 0.248    |
| 654.H3.A1     | serL50trp, metH34leu, serH99trp                       | 0.133    |
| 654.L3.G6     | serL50trp, metH34leu, tyrL92pro, ileL93lys            | 0.213    |
| 654.L3.29     | serL50trp, metH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn            | 0.236    |
| 654.L3.36     | serL50trp, metH34leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro | 0.141    |

\* 在 ErbB2-ECD ELISA 中, 给出标准曲线的中间 OD 值所需要的突变体总量与给出标准曲线的中间 OD 值所需要的 574 的总量之间的比率。数字小于 1.0 表明突变体比 574 更好地结合 ErbB2。

已构建了下述突变体, 并且目前进行评估:

|                |                                                                  |
|----------------|------------------------------------------------------------------|
| 659.L3.G6      | serL50trp, metH34ser, tyrL92pro, ileL93lys                       |
| 659.L3.G11     | serL50trp, metH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly            |
| 659.L3.29      | serL50trp, metH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn                       |
| 659.L3.36      | serL50trp, metH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro            |
| L2F5.L3G6      | serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92pro, ileL93lys            |
| L2F5.L3G11     | serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly |
| L2F5.L29       | serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92phe, tyrL96asn            |
| L2F5.L36       | serL50trp, tyrL53gly, metH34leu, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro |
| L2F5.L3G6.655  | serL50trp, tyrL53gly, metH35ser, tyrL92pro, ileL93lys            |
| L2F5.L3G11.655 | serL50trp, tyrL53gly, metH34ser, tyrL92ser, ileL93arg, tyrL94gly |
| L2F5.L29.655   | serL50trp, tyrL53gly, metH34ser, tyrL92phe, tyrL96asn            |
| L2F5.L36.655   | serL50trp, tyrL53gly, metH34ser, tyrL92phe, tyrL94leu, tyrL96pro |

下述突变体(由同源性扫描提示得到)目前正在被构建

|     |           |
|-----|-----------|
| 678 | thrH30ala |
| 679 | thrH30ser |
| 680 | lysH64arg |
| 681 | leuH96val |
| 682 | thrL97ala |
| 683 | thrL97ser |
| 684 | tyrL96phe |
| 685 | tyrL96ala |
| 686 | tyrL91phe |
| 687 | thrL56ala |
| 688 | glnL28ala |
| 689 | glnL28glu |

在 H34 上优选的氨基酸是甲硫氨酸。如果发现在此位置被氧化,可变为亮氨酸。

发现 AsnH52 和 asnH53 对于结合是强烈优选的氨基酸。将这些残基变为丙氨酸或天冬氨酸可显著降低结合。

已制备包括人源化抗体 574 的轻链可变区和重链可变区和人 IgG1 重链恒定区的完整抗体(见美国专利 5821337)。用中国仓鼠卵巢细胞(CHO)制备所述完整抗体。该分子在本文中被称为 rhuMAb 2C4。

#### 实施例 4

##### 单克隆抗体 2C4 阻断 EGF、TGF- $\alpha$ 或 HRG 介导的 MAPK 活化作用

许多生长因子受体通过促分裂原介导的蛋白激酶(MAPK)途径传递信号。这些双特异性激酶是信号传导途径中最终触发肿瘤细胞分裂的关键终点之一。按下述方法估测单克隆抗体 2C4 或 HERCEPTIN<sup>®</sup>抑制 MAPK 的 EGF、TGF- $\alpha$  或 HRG 活化作用的能力。

将 MCF 细胞( $10^5$  细胞/孔)置于 12 孔细胞培养板中的含血清培养基中。第二天,去除细胞培养基,并向各个孔中加入含 0.1% 血清的新鲜培养基。在下一天重复此过程,并在检测之前,用无血清的结合缓冲液取代所述培养基(Jones 等,生物学化学杂志 273: 11667-74(1998); Schaefer 等,生物学化学杂志 274: 859-66(1999))。使细胞在室温下平衡,然后用 0.5ml 200nM HERCEPTIN<sup>®</sup>或单克隆抗体 2C4 温育 30 分钟。之后将细胞用 1nM EGF、1nM TGF- $\alpha$  或 0.2 nM HRG 处理 15 分钟。吸出细胞培养基,终止反应,然后加入 0.2ml 含 1% DTT 的 SDS-PAGE 样品缓冲液。按先前所述方法(Jones 等,

生物学化学杂志 273: 11667-74(1998)), 利用抗活性 MAPK 抗体(Promega)通过 Western 杂交估测 MAPK 活性。

如图 10 所示, 单克隆抗体 2C4 显著地阻断 MAPK 的 EGF、TGF- $\alpha$  或 HRG 介导型活化作用, 其程度大于 HERCEPTIN<sup>®</sup>。这些数据表明单克隆抗体 2C4 与 ErbB2 上用于结合 EGFR 或 ErbB3 的表面结合, 因而阻止了信号传递受体复合物的形成。

单克隆抗体 2C4 还表明抑制 heregulin (HGR)依赖性 Akt 活化作用。PI3 激酶信号传导途径的活化对于细胞存活是重要的(Carraway 等, 生物学化学杂志 270: 7111-6(1995))。在肿瘤细胞中, PI3 激酶活化在浸润表型中发挥作用(Tan 等, 癌症研究 59: 1620-1625(1999))。存活途径主要由丝氨酸/苏氨酸激酶 AKT 介导(Bos 等, Trends Biochem Sci. 20: 441-442(1995))。ErbB2 和 ErbB3 或 EGFR 之间形成的复合物能分别应答 heregulin 或 EGF 而起始这些途径(Olayioye 等, 分子和细胞生物学 18: 5042-51(1998); Karunagaran 等, EMBO 杂志 15: 254-264(1996); Krymskaya 等, 美国生理学杂志 276: L 246-55(1999))。用 2C4 温育 MCF7 乳腺癌细胞可抑制 heregulin 介导的 AKT 活化作用。而且, 加入 2C4 可进一步降低在无 heregulin 加入的条件下存在的 AKT 活化的基本水平。这些数据表明 2C4 可抑制 PI3 激酶的 ErbB 配体活化, 并且此抑制可导致细胞凋亡。肿瘤细胞对化疗药物毒性作用的更高的敏感性, 可证实对细胞凋亡的敏感性增加。

因而, 单克隆抗体 2C4 通过两个主要信号传递途径-MAP 激酶(主要增殖途径)和 PI3 激酶(主要存活/抗凋亡途径), 抑制配体起始的 ErbB 信号传导。

#### 实施例 5

##### 单克隆抗体 2C4 和 HERCEPTIN<sup>®</sup>在体内的组合

将用肺腺癌细胞系 Calu-3 建立的异体移植模型, 用于估测抗 HER2 单克隆抗体(单独或联合)抑制肿瘤生长的效果。将 0.1ml  $2.0 \times 10^6$  细胞接种于雌性 NCR 裸鼠皮下。每周测量肿瘤两次, 并且在肿瘤结节体积达到 100mm<sup>3</sup> 时, 将动物随机分为 7 个治疗组。所述治疗组是:

- (a)对照单克隆抗体, MAb 1766;
- (b)HERCEPTIN<sup>®</sup>, 10mg/kg;
- (c)单克隆抗体 7C2, 10mg/kg;
- (d)单克隆抗体 2C4, 10mg/kg;
- (e)HERCEPTIN<sup>®</sup>和 7C2, 各 10mg/kg;

(f)HERCEPTIN<sup>®</sup>和 2C4, 各 10mg/kg;

(g)单克隆抗体 2C4 和 7C4, 各 10mg/kg。

每周对动物处理两次, 直到第 24 天。每周测量肿瘤体积两次, 直到第 38 天。

如图 11 中条图所示, 用 2C4 或 HERCEPTIN<sup>®</sup>治疗 Calu-3 荷瘤小鼠, 可显著抑制肿瘤的生长。HERCEPTIN<sup>®</sup>和 2C4 或 HERCEPTIN<sup>®</sup>和 7C2 组合治疗效果好于单独给药任一单克隆抗体。

### 实施例 6

#### 用单克隆抗体 2C4 治疗结直肠癌

按 Sheng 等, J.Clin.Invest. 99: 2254-2259(1997)中所述方法, 将人结肠癌细胞系 HCA-7、LS174T 或 CaCo-2 等皮下接种于无胸腺裸鼠。一旦肿瘤体积达到约 100 mm<sup>3</sup>, 用 10-50mg/kg 单克隆抗体 2C4 通过腹腔注射给药各组动物, 每周两次。单克隆抗体 2C4 在体内抑制结直肠异体移植物的生长。

### 实施例 7

#### 用人源化抗体 2C4 治疗乳腺癌

用一项 3 日 Alamar Blue 检测, 估测了 rhuMAb 或 HERCEPTIN<sup>®</sup>对 ErbB2 不过度表达的人乳腺癌细胞的作用(Ahmed, S.A. 免疫学方法杂志 170: 211-224(1994); 和 Page 等, 国际肿瘤学杂志 3: 473-476(1996))。用于此检测的细胞是 ErbB2 表达水平为 1+的 MDA-175 人乳腺癌细胞。如图 12 所示, 与 HERCEPTIN<sup>®</sup>治疗相比, 加入 rhuMAb 2C4 以剂量依赖性方式显著抑制乳腺癌细胞系 MDA-175 的生长。

估测了 rhuMAb 2C4 抗 MCF7 异体移植物的效果, 所述 MCF7 异体移植物为雌激素受体阳性(ER+)并表达低水平 ErbB2。使用了补充雌激素的雌性小鼠。rhuMAb 2C4 以 30mg/kg/周的剂量给药。如图 13 所示, rhuMAb 2C4 可有效地抑制乳腺癌的体内生长, 其中该乳腺癌的特点不是过度表达 ErbB2。

### 实施例 8

#### 2C4 的药代动力学、代谢和毒理学

rhuMAb 2C4 在人血清中是稳定的。在生物物质中没有观察到复合物形成的迹象或聚集。在小鼠中 rhuMAb 2C4 的清除比 HERCEPTIN<sup>®</sup>快。药代动力学研究表明每周给药约 2-6 mg/kg rhuMAb 将导致其血清浓度与按目前剂量给药的 HERCEPTIN<sup>®</sup>相似。所得血清与 2C4 接触将大大提高体外测定的

IC<sub>50</sub> 值。

在恒河猴(cynomolgus)中(每组中 2 雄性和 2 雌性)进行毒理学研究。静脉给药 0、10、50 或 100mg/kg 的 rhuMAb 2C4, 每周两次, 给药 4 周。毒理学研究中检测体重(-2、-1 周及其后每周); 食物消耗(定量, 每日); 体检并评估血压、心电图(ECG)和体温(-2、-1 周及第 2 和 4 周, 该周第二次给药后 4 小时(4 hours post-dose following that weeks second dose))等; 心脏超声检测(第一周第一次给药后, 及研究的末期, 第四周); 临床病理学(基线水平和第 2 周及第 4 周末); 尿液分析(基线和第 2 周及第 4 周末); 抗体分析采样(基线和第 2 周及第 4 周末); 以及尸检和组织病理学分析。

所有组的全部动物均存活到研究结束。没有观察到明显的临床症状或各组间的差异。尸检结果表明任何动物的器官中没有显著的大体(gross)异常。在任何动物的组织中没有观察到显著的镜下异常。从本研究的开始到结束, 没有观察到显著的 ECG 变化。另外, 在各组之间没有见到差异。

#### 实施例 9

##### 剂量逐级提高(Escalation)

向肿瘤患者给药 5 个剂量水平(0.05、0.5、2.0、4.0 或 10mg/kg; 每个剂量水平 6 个受试者)之一的首剂量的 rhuMAb 2C4, 随后 4 周停药(wash-out)。第 5 周, 向患者给药相同剂量, 一周 4 次, 随后 4 周停药。具有完全应答、部分应答或稳定疾病的患者适合于进一步研究。

#### 实施例 10

##### 复发性或不応性转移型前列腺癌的治疗

rhuMAb 2C4 是针对 ErbB2 的全长人源化单克隆抗体(由 CHO 细胞产生)。rhuMAb 2C4 阻断 ErbB2 与其它 ErbB 家族成员的结合, 因而抑制细胞内 ErbB 途径的信号传导。与 HERCEPTIN<sup>®</sup>相反, rhuMAb 2C4 不但抑制 ErbB2 过度表达型肿瘤的生长, 还阻断需要 ErbB 配体依赖性信号传导的肿瘤的生长。

rhuMAb 2C4 可作为治疗激素不应性(雄激素非依赖性)前列腺癌患者的单一药物。效力的主要终点包括相对于提供最佳护理(米托蒽醌/泼尼松)(作为单一药物)的总存活率和安全性。效力的次要终点包括: 疾病进展时间, 应答率, 生命质量、疼痛和/或应答持续时间。rhuMAb 2C4 每周或每三周静脉内(IV)给药, 剂量分别为 2 或 4 mg/kg, 直到疾病进展(progression)。所述抗体以多剂液体剂型提供(20ml 装, 浓度为 20mg/ml 或更高)。

rhuMAb 2C4 还可与化疗联合用于治疗激素不应性(雄激素非依赖性)前列腺癌患者。效力的主要终点包括相对于化疗的总存活率和安全性。效力的次要终点包括: 疾病进展时间, 应答率, 生命质量、疼痛和/或应答持续时间。rhuMAb 2C4 每周或每三周静脉内(IV)给药, 剂量分别为 2 或 4 mg/kg, 直到疾病进展。所述抗体以多剂液体剂型提供(20ml 装, 浓度为 20mg/ml 或更高)。

可与抗 ErbB2 抗体(其阻断 ErbB2 受体的配体活化作用)联合治疗前列腺癌(例如雄激素非依赖性前列腺癌)的药物实例包括法呢基转移酶抑制剂; 抗血管生成药(例如抗 VEGF 抗体); EGFR 靶向药物(例如 C225 或 ZD1839); 另一抗 ErbB2 抗体(生长抑制性抗 ErbB2 抗体如 HERCEPTIN<sup>®</sup>等, 或诱导凋亡的抗 ErbB2 抗体如 7C2 或 7F3 等, 包括其人源化变体和/或亲和力成熟变体); 细胞因子(例如 IL-2、IL-12、G-CSF 或 GM-CSF); 抗雄激素(如氟他胺或环丙孕酮乙酸酯); 亮丙瑞林; 苏拉明; 化疗药如长春新碱、雌莫司汀、米托蒽醌、liarozole(视黄酸代谢阻断药)、环磷酰胺、阿霉素等蒽环霉素类抗生素、紫杉烷(例如紫杉醇或紫杉萜)或氨甲蝶呤, 或者上述药物的任何组合, 例如长春新碱/雌莫司汀或环磷酰胺/阿霉素/氨甲蝶呤; 泼尼松; 氢化可的松; 或其组合。可给药这些药物的标准剂量, 例如 40mg/m<sup>2</sup>/wk 紫杉萜(TAXOTERE<sup>®</sup>); 6(AUC)卡铂; 和 200mg/m<sup>2</sup> 紫杉醇(TAXOL<sup>®</sup>)。

### 实施例 11

#### 转移乳腺癌的治疗

rhuMAb 2C4 可作为治疗转移型乳腺癌患者(其肿瘤并不过度表达 ErbB2)的单一药物。效力的主要终点包括应答率和安全性。效力的次要终点包括: 总存活率, 疾病进展时间, 生命质量、和/或应答持续时间。rhuMAb 2C4 每周或每三周静脉内(IV)给药, 剂量分别为 2 或 4 mg/kg, 直到疾病进展。所述抗体以多剂液体剂型提供(20ml 装, 浓度为 20mg/ml 或更高)。

rhuMAb 2C4 还可与化疗联合用于治疗转移型乳腺癌患者(其肿瘤并不过度表达 ErbB2)。效力的主要终点包括相对于单独使用化疗的总存活率和安全性。效力的次要终点包括: 疾病进展时间, 应答率, 生命质量、和/或应答持续时间。rhuMAb 2C4 每周或每三周静脉内(IV)给药, 剂量分别为 2 或 4 mg/kg, 直到疾病进展。所述抗体以多剂液体剂型提供(20ml 装, 浓度为 20mg/ml 或更高)。

可与抗 ErbB2 抗体(其阻断 ErbB2 受体的配体活化作用)联合用于治疗乳腺癌(例如不以 ErbB2 过度表达为特征的转移型乳腺癌)的药物实例包括化疗

药, 如蒽环霉素类抗生素(例如阿霉素)、环磷酰胺、紫杉烷(例如紫杉醇或紫杉萜)、新霉酰胺、xeloda、丝裂霉素 C、铂化合物、奥沙利铂、吉西他滨, 或这些药物中两种或更多种的组合, 如阿霉素/环磷酰胺; 另一抗 ErbB2 抗体(生长抑制性抗 ErbB2 抗体如 HERCEPTIN<sup>®</sup>等, 或诱导凋亡的抗 ErbB2 抗体如 7C2 或 7F3 等, 包括它们的人源化变体和/或亲和力成熟变体); 抗雌激素(例如他莫昔芬); 法呢基转移酶抑制剂; 抗血管生成药(例如抗 VEGF 抗体); EGFR 靶向药物(例如 C225 或 ZD1839); 细胞因子(例如 IL-2、IL-12、G-CSF 或 GM-CSF); 或上述药物的组合。可用这些附加药物的标准剂量。

另外, rhuMAb 2C4 还可与 HERCEPTIN<sup>®</sup>联合用于治疗转移型乳腺癌患者(其肿瘤并不过度表达 ErbB2)。效力的主要终点包括应答率和安全性。效力的次要终点包括: 疾病进展时间, 相对于单独使用 HERCEPTIN<sup>®</sup>的总存活率, 生命质量、和/或应答持续时间。rhuMAb 2C4 每周或每三周静脉内(IV)给药, 剂量分别为 2 或 4 mg/kg, 直到疾病进展。所述抗体以多剂液体剂型提供(20ml 装, 浓度为 20mg/ml 或更高)。HERCEPTIN<sup>®</sup>可静脉内给药, 第一剂为 4mg/kg, 其后每周维持剂量为 2mg/kg。HERCEPTIN<sup>®</sup>以冻干粉形式提供。每瓶 HERCEPTIN<sup>®</sup>含 440mg HERCEPTIN<sup>®</sup>、9.9mg 盐酸 L-组氨酸、6.4mg L-组氨酸、400mg  $\alpha$ - $\alpha$ -海藻糖二水合物、1.8mg 聚山梨酸酯 20。用 20ml 含 1.1% 苯甲醇(作为防腐剂)的注射用无菌水(BWFI)重建, 产生含 21mg/ml HERCEPTIN<sup>®</sup>的 21ml 多剂量溶液(pH 为约 6.0)。

## 实施例 12

### 肺癌的治疗

rhuMAb 2C4 可作为治疗 IIIb 或 IV 期非小细胞肺癌的单一药物。效力的主要终点包括应答率和安全性。效力的次要终点包括: 总存活率, 疾病进展时间, 生命质量、和/或应答持续时间。rhuMAb 2C4 每周或每三周静脉内(IV)给药, 剂量分别为 2 或 4 mg/kg, 直到疾病进展。所述抗体以多剂液体剂型提供(20ml 装, 浓度为 20mg/ml 或更高)。

rhuMAb 2C4 还可与化疗联合用于治疗转移型非小细胞肺癌。效力的主要终点包括相对于常规治疗的总存活率和安全性。效力的次要终点包括: 疾病进展时间, 应答率, 生命质量和/或应答持续时间。rhuMAb 2C4 每周或每三周静脉内(IV)给药, 剂量分别为 2 或 4 mg/kg, 直到疾病进展。所述抗体以多剂液体剂型提供(20ml 装, 浓度为 20mg/ml 或更高)。

可与抗 ErbB2 抗体(其阻断 ErbB 受体的配体活化作用)联合治疗肺癌的

药物实例包括化疗药，如卡铂、紫杉烷(例如紫杉醇或紫杉萜)、吉西他滨、新霉酰胺、顺铂、奥沙利铂，或这些药物的任何组合，例如卡铂/紫杉萜；另一抗 ErbB2 抗体(生长抑制性抗 ErbB2 抗体如 HERCEPTIN<sup>®</sup>等，或诱导凋亡的抗 ErbB2 抗体如 7C2 或 7F3 等，包括它们的人源化变体和/或亲和力成熟变体)；法呢基转移酶抑制剂；抗血管生成药(例如抗 VEGF 抗体)；EGFR 靶向药物(例如 C225 或 ZD1839)；细胞因子(例如 IL-2、IL-12、G-CSF 或 GM-CSF)；或上述药物的组合。

### 实施例 13

#### 结直肠癌的治疗

rhuMAb 2C4 可作为治疗转移型结直肠癌的单体药物。效力的主要终点包括应答率和安全性。效力的次要终点包括：总存活率，疾病进展时间，生命质量、和/或应答持续时间。rhuMAb 2C4 每周或每三周静脉内(IV)给药，剂量分别为 2 或 4 mg/kg，直到疾病进展。所述抗体以多剂液体剂型提供(20ml 装，浓度为 20mg/ml 或更高)。

rhuMAb 2C4 还可与化疗联合用于治疗转移型结直肠癌患者。效力的主要终点包括相对于常规治疗的总存活率和安全性。效力的次要终点包括：疾病进展时间，应答率，生命质量和/或应答持续时间。rhuMAb 2C4 每周或每三周静脉内(IV)给药，剂量分别为 2 或 4 mg/kg，直到疾病进展。所述抗体以多剂液体剂型提供(20ml 装，浓度为 20mg/ml 或更高)。

可与抗 ErbB2 抗体(其阻断 ErbB 受体的配体活化作用)联合用于治疗结直肠癌的化疗药物实例包括 5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲酰四氢叶酸(LV)、CPT-11、左旋咪唑，或这些药物中两种或多种的组合如 5-FU/LV/CPT-11。可给药这些化疗药的标准剂量。可与抗 ErbB2 抗体联合用于治疗结直肠癌的其它药物包括法呢基转移酶抑制剂；抗血管生成药(例如抗 VEGF 抗体)；EGFR 靶向药物(例如 C225 或 ZD1839)；细胞因子(例如 IL-2、IL-12、G-CSF 或 GM-CSF)；另一抗 ErbB2 抗体(生长抑制性抗 ErbB2 抗体如 HERCEPTIN<sup>®</sup>等，或诱导凋亡的抗 ErbB2 抗体如 7C2 或 7F3 等，包括它们的人源化变体和/或亲和力成熟变体)；或上述药物的组合。

## 序列表

<110> 杰南技术公司 (Genentech, Inc.)

<120> 人源化抗 ErbB2 抗体及用抗 ErbB2 抗体进行治疗

<130> P1467R2PCT. 1

<140> PCT/US00/17366

<141> 2000-06-23

<150> US 60/141, 316

<151> 1999-06-25

<160> 13

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus Musculus)

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Thr | Val | Met | Thr | Gln | Ser | His | Lys | Ile | Met | Ser | Thr | Ser | Val |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Asp | Arg | Val | Ser | Ile | Thr | Cys | Lys | Ala | Ser | Gln | Asp | Val | Ser |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ile | Gly | Val | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln | Ser | Pro | Lys |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Leu | Leu | Ile | Tyr | Ser | Ala | Ser | Tyr | Arg | Tyr | Thr | Gly | Val | Pro | Asp |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Phe | Thr | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Phe | Thr | Ile |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Ser | Val | Gln | Ala | Glu | Asp | Leu | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Gln | Gln |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Tyr | Ile | Tyr | Pro | Tyr | Thr | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Glu |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |

Ile Lys

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 鼠 (Mus Musculus)

<400> 2

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Ser | Val | Lys | Ile | Ser | Cys | Lys | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr | Phe | Thr |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |

Asp Tyr Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu

---

|                                                             |     |     |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
|                                                             | 35  | 40  | 45  |
| Glu Trp Ile Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr |     |     |     |
|                                                             | 50  | 55  | 60  |
| Asn Gln Arg Phe Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser |     |     |     |
|                                                             | 65  | 70  | 75  |
| Ser Arg Ile Val Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp |     |     |     |
|                                                             | 80  | 85  | 90  |
| Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr |     |     |     |
|                                                             | 95  | 100 | 105 |
| Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser     |     |     |     |
|                                                             | 110 | 115 |     |

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

<220>  
 <223> 人源化 VL 序列

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

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

<220>  
 <223> 人源化 VH 序列

<400> 4

---

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

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

<220>  
 <223> 轻链共有序列

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

<210> 6  
 <211> 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重链共有序列

&lt;400&gt; 6

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

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

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Tyr | Ala | Met | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly | Leu |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Trp | Val | Ala | Val | Ile | Ser | Gly | Asp | Gly | Gly | Ser | Thr | Tyr | Tyr |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Asn | Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Arg | Val | Gly | Tyr | Ser | Leu |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tyr | Asp | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 鼠(Mus Musculus)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 不确定

&lt;222&gt; 10

&lt;223&gt; 未知氨基酸

&lt;400&gt; 7

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gly | Phe | Thr | Phe | Thr | Asp | Tyr | Thr | Met | Xaa |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 鼠(Mus Musculus)

&lt;400&gt; 8

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Val | Asn | Pro | Asn | Ser | Gly | Gly | Ser | Ile | Tyr | Asn | Gln | Arg | Phe |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |

Lys Gly

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 10

<212> PRT  
 <213> 鼠 (Mus Musculus)  
  
 <400> 9  
 Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr  
 1 5 10  
  
 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 鼠 (Mus Musculus)  
  
 <400> 10  
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly Val Ala  
 1 5 10  
  
 <210> 11  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 鼠 (Mus Musculus)  
  
 <220>  
 <221> 不确定  
 <222> 5-7  
 <223> 未知氨基酸  
  
 <400> 11  
 Ser Ala Ser Tyr Xaa Xaa Xaa  
 1 5  
  
 <210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 鼠 (Mus Musculus)  
  
 <400> 12  
 Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr Thr  
 1 5  
  
 <210> 13  
 <211> 645  
 <212> PRT  
 <213> 人 (Homo sapiens)  
  
 <400> 13  
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu  
 1 5 10 15  
  
 Leu Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp  
 20 25 30  
  
 Met Lys Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met  
 35 40 45  
  
 Leu Arg His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu  
 50 55 60  
  
 Glu Leu Thr Tyr Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln  
 65 70 75

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Asp | Ile | Gln | Glu | Val | Gln | Gly | Tyr | Val | Leu | Ile | Ala | His | Asn | Gln |  |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |  |
| Val | Arg | Gln | Val | Pro | Leu | Gln | Arg | Leu | Arg | Ile | Val | Arg | Gly | Thr |  |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |  |
| Gln | Leu | Phe | Glu | Asp | Asn | Tyr | Ala | Leu | Ala | Val | Leu | Asp | Asn | Gly |  |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |  |
| Asp | Pro | Leu | Asn | Asn | Thr | Thr | Pro | Val | Thr | Gly | Ala | Ser | Pro | Gly |  |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |  |
| Gly | Leu | Arg | Glu | Leu | Gln | Leu | Arg | Ser | Leu | Thr | Glu | Ile | Leu | Lys |  |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |  |
| Gly | Gly | Val | Leu | Ile | Gln | Arg | Asn | Pro | Gln | Leu | Cys | Tyr | Gln | Asp |  |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |  |
| Thr | Ile | Leu | Trp | Lys | Asp | Ile | Phe | His | Lys | Asn | Asn | Gln | Leu | Ala |  |
|     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |     |     | 180 |  |
| Leu | Thr | Leu | Ile | Asp | Thr | Asn | Arg | Ser | Arg | Ala | Cys | His | Pro | Cys |  |
|     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |     |     | 195 |  |
| Ser | Pro | Met | Cys | Lys | Gly | Ser | Arg | Cys | Trp | Gly | Glu | Ser | Ser | Glu |  |
|     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     | 210 |  |
| Asp | Cys | Gln | Ser | Leu | Thr | Arg | Thr | Val | Cys | Ala | Gly | Gly | Cys | Ala |  |
|     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     | 225 |  |
| Arg | Cys | Lys | Gly | Pro | Leu | Pro | Thr | Asp | Cys | Cys | His | Glu | Gln | Cys |  |
|     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |  |
| Ala | Ala | Gly | Cys | Thr | Gly | Pro | Lys | His | Ser | Asp | Cys | Leu | Ala | Cys |  |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |  |
| Leu | His | Phe | Asn | His | Ser | Gly | Ile | Cys | Glu | Leu | His | Cys | Pro | Ala |  |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |  |
| Leu | Val | Thr | Tyr | Asn | Thr | Asp | Thr | Phe | Glu | Ser | Met | Pro | Asn | Pro |  |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |  |
| Glu | Gly | Arg | Tyr | Thr | Phe | Gly | Ala | Ser | Cys | Val | Thr | Ala | Cys | Pro |  |
|     |     |     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |  |
| Tyr | Asn | Tyr | Leu | Ser | Thr | Asp | Val | Gly | Ser | Cys | Thr | Leu | Val | Cys |  |
|     |     |     |     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |  |
| Pro | Leu | His | Asn | Gln | Glu | Val | Thr | Ala | Glu | Asp | Gly | Thr | Gln | Arg |  |
|     |     |     |     | 320 |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |  |
| Cys | Glu | Lys | Cys | Ser | Lys | Pro | Cys | Ala | Arg | Val | Cys | Tyr | Gly | Leu |  |
|     |     |     |     | 335 |     |     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |  |
| Gly | Met | Glu | His | Leu | Arg | Glu | Val | Arg | Ala | Val | Thr | Ser | Ala | Asn |  |
|     |     |     |     | 350 |     |     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |  |
| Ile | Gln | Glu | Phe | Ala | Gly | Cys | Lys | Lys | Ile | Phe | Gly | Ser | Leu | Ala |  |

|                                                             |     |  |     |  |     |
|-------------------------------------------------------------|-----|--|-----|--|-----|
|                                                             | 365 |  | 370 |  | 375 |
| Phe Leu Pro Glu Ser Phe Asp Gly Asp Pro Ala Ser Asn Thr Ala |     |  |     |  |     |
|                                                             | 380 |  | 385 |  | 390 |
| Pro Leu Gln Pro Glu Gln Leu Gln Val Phe Glu Thr Leu Glu Glu |     |  |     |  |     |
|                                                             | 395 |  | 400 |  | 405 |
| Ile Thr Gly Tyr Leu Tyr Ile Ser Ala Trp Pro Asp Ser Leu Pro |     |  |     |  |     |
|                                                             | 410 |  | 415 |  | 420 |
| Asp Leu Ser Val Phe Gln Asn Leu Gln Val Ile Arg Gly Arg Ile |     |  |     |  |     |
|                                                             | 425 |  | 430 |  | 435 |
| Leu His Asn Gly Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu Gly Ile |     |  |     |  |     |
|                                                             | 440 |  | 445 |  | 450 |
| Ser Trp Leu Gly Leu Arg Ser Leu Arg Glu Leu Gly Ser Gly Leu |     |  |     |  |     |
|                                                             | 455 |  | 460 |  | 465 |
| Ala Leu Ile His His Asn Thr His Leu Cys Phe Val His Thr Val |     |  |     |  |     |
|                                                             | 470 |  | 475 |  | 480 |
| Pro Trp Asp Gln Leu Phe Arg Asn Pro His Gln Ala Leu Leu His |     |  |     |  |     |
|                                                             | 485 |  | 490 |  | 495 |
| Thr Ala Asn Arg Pro Glu Asp Glu Cys Val Gly Glu Gly Leu Ala |     |  |     |  |     |
|                                                             | 500 |  | 505 |  | 510 |
| Cys His Gln Leu Cys Ala Arg Gly His Cys Trp Gly Pro Gly Pro |     |  |     |  |     |
|                                                             | 515 |  | 520 |  | 525 |
| Thr Gln Cys Val Asn Cys Ser Gln Phe Leu Arg Gly Gln Glu Cys |     |  |     |  |     |
|                                                             | 530 |  | 535 |  | 540 |
| Val Glu Glu Cys Arg Val Leu Gln Gly Leu Pro Arg Glu Tyr Val |     |  |     |  |     |
|                                                             | 545 |  | 550 |  | 555 |
| Asn Ala Arg His Cys Leu Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln |     |  |     |  |     |
|                                                             | 560 |  | 565 |  | 570 |
| Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val |     |  |     |  |     |
|                                                             | 575 |  | 580 |  | 585 |
| Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys |     |  |     |  |     |
|                                                             | 590 |  | 595 |  | 600 |
| Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser Tyr Met Pro Ile Trp Lys |     |  |     |  |     |
|                                                             | 605 |  | 610 |  | 615 |
| Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys |     |  |     |  |     |
|                                                             | 620 |  | 625 |  | 630 |
| Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu |     |  |     |  |     |
|                                                             | 635 |  | 640 |  | 645 |

1 MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE THLDMLRHLY QGCQVQGNL ELTYLPTNAS LSFLODQIEV QGYVLIAHQ VRQVPLQRLR  
101 IVRGTQLFED NYALAVLDNG DPLNNTTPVT GASPGGLREL QLRSLTEILK GGVLIQRNPQ LCYQDTILWK DIFHKNNOLA LTLIDTNRSR ACHPCSPMCK  
201 GSRCWGESSE DCQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCCHEQC AAGCTGPKHS DCLACLHENH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNPEGRYT FGASCVTACP  
301 YNYLSTDVGS CTLVCPLHNQ EVTAEDGTQR CEKCSKPCAR VCYGLGMEHL REVRVTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGDPASNTA PLQPEQLQVF  
401 ETLEETGYL YISAWPDSLP DLSVFQNLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI SWLGURSLRE LGSGLALIIH NTHLCFVHTV PWDQLFRNPH QALLHTANRP  
501 EDECVGEGELA CHQLCARGHC WPGPTQCYN CSQFLRGQEC VEECRVIQGL PREYVNARHC LPCHPECQPQ NGSVTCGPE ADQCACAHY KDRPFCVARC  
601 PSGVKPDL SY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK GCPAE (SEQ ID NO: 13)

图 1A

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

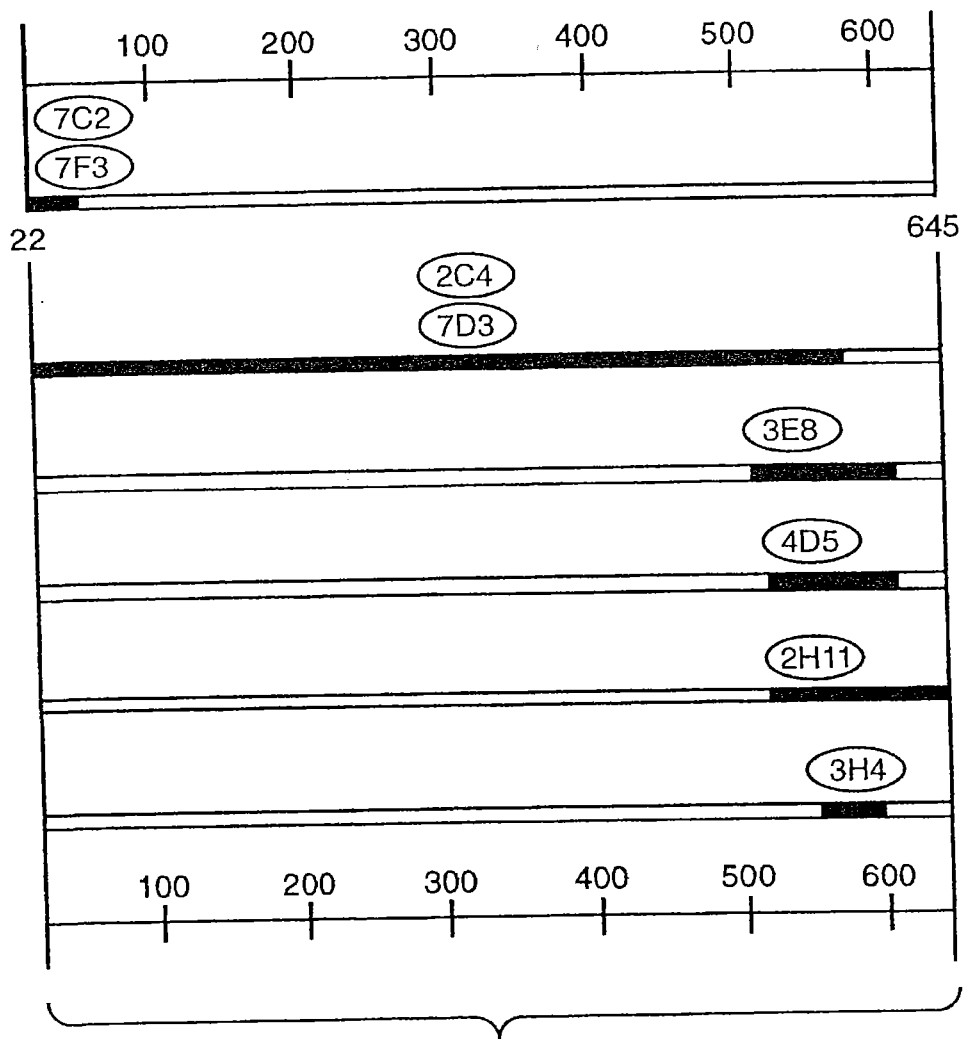


图 1B

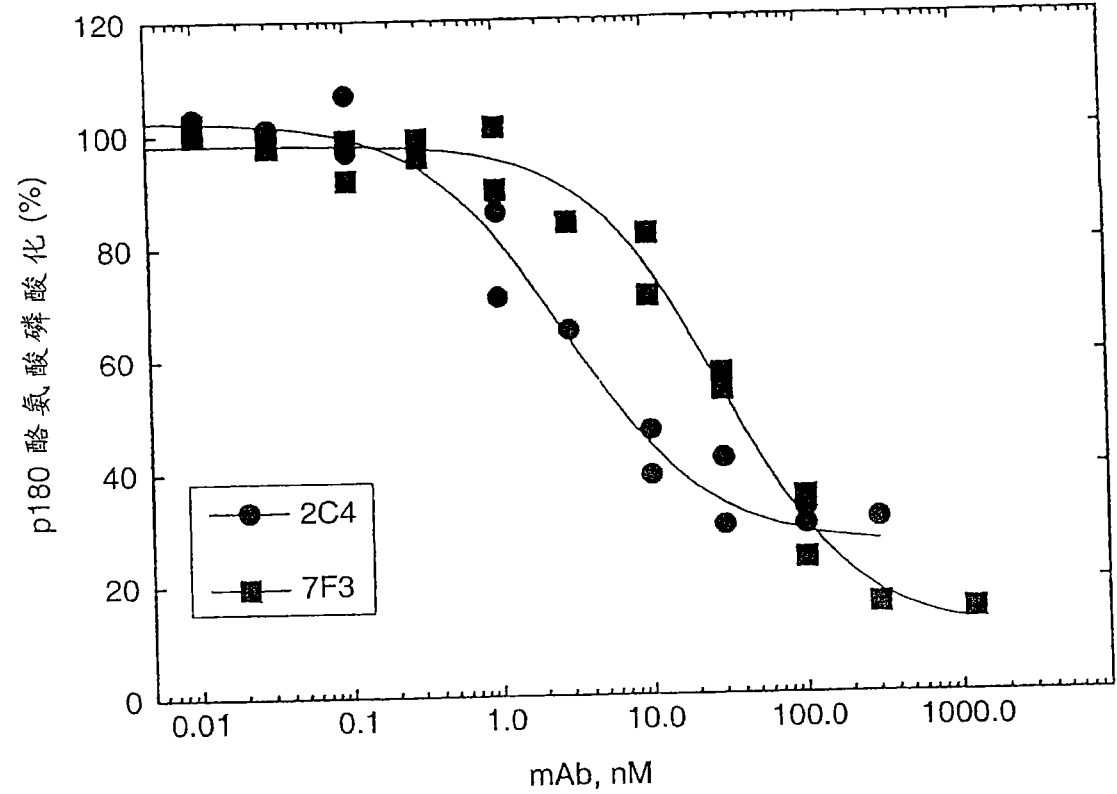


图 2A

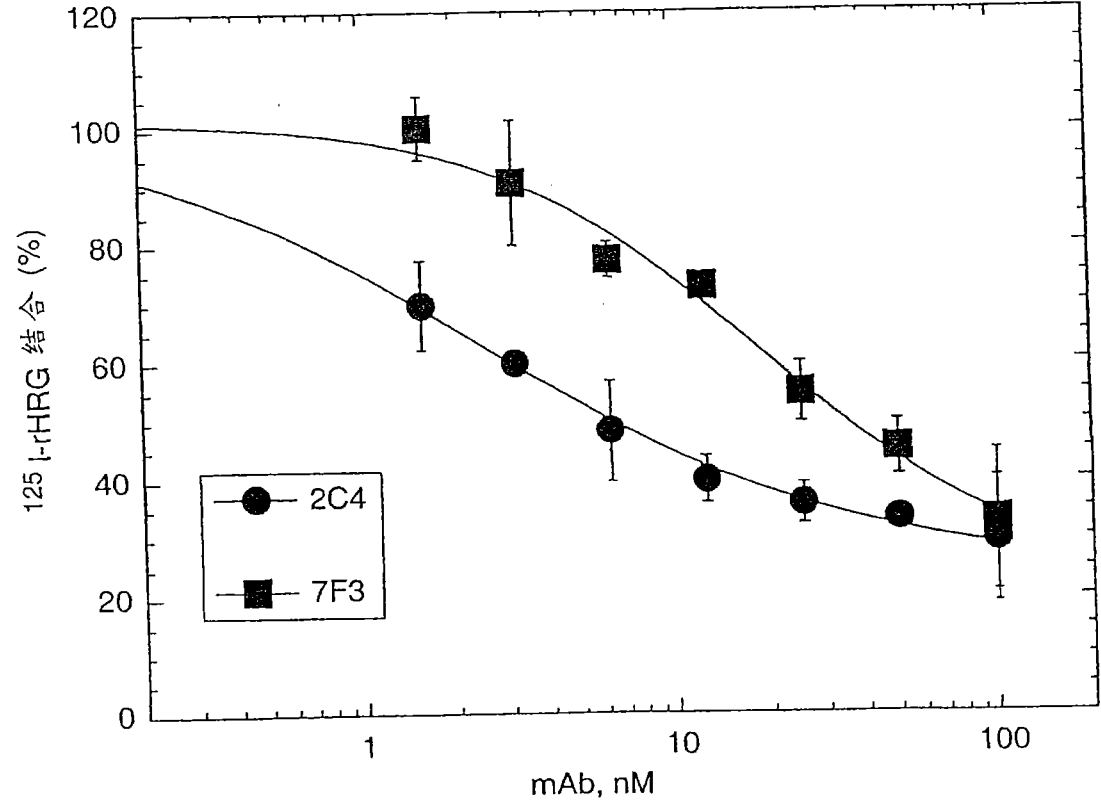


图 2B

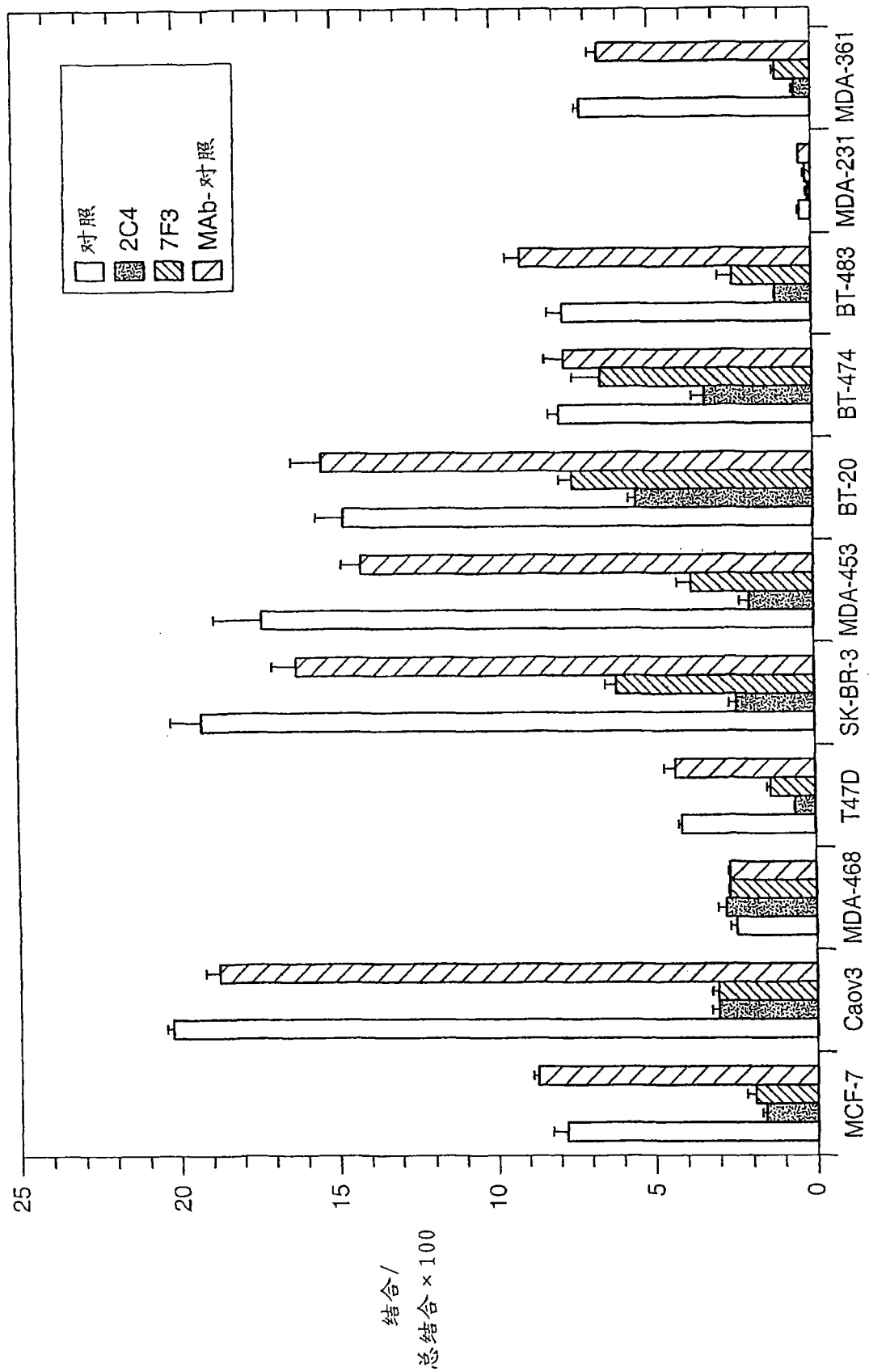


图 3

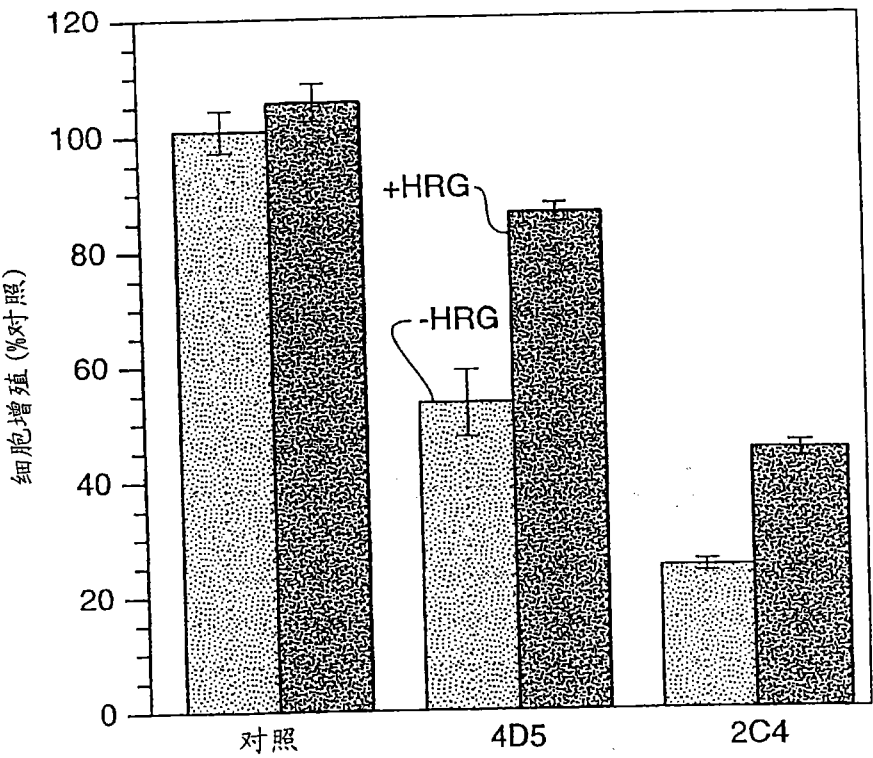


图 4A

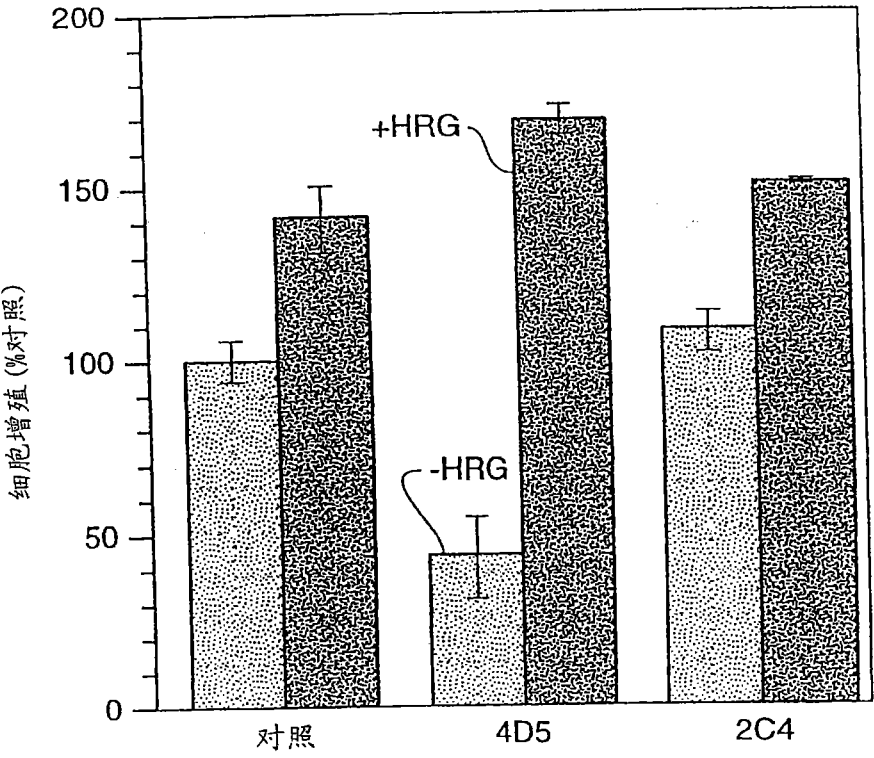
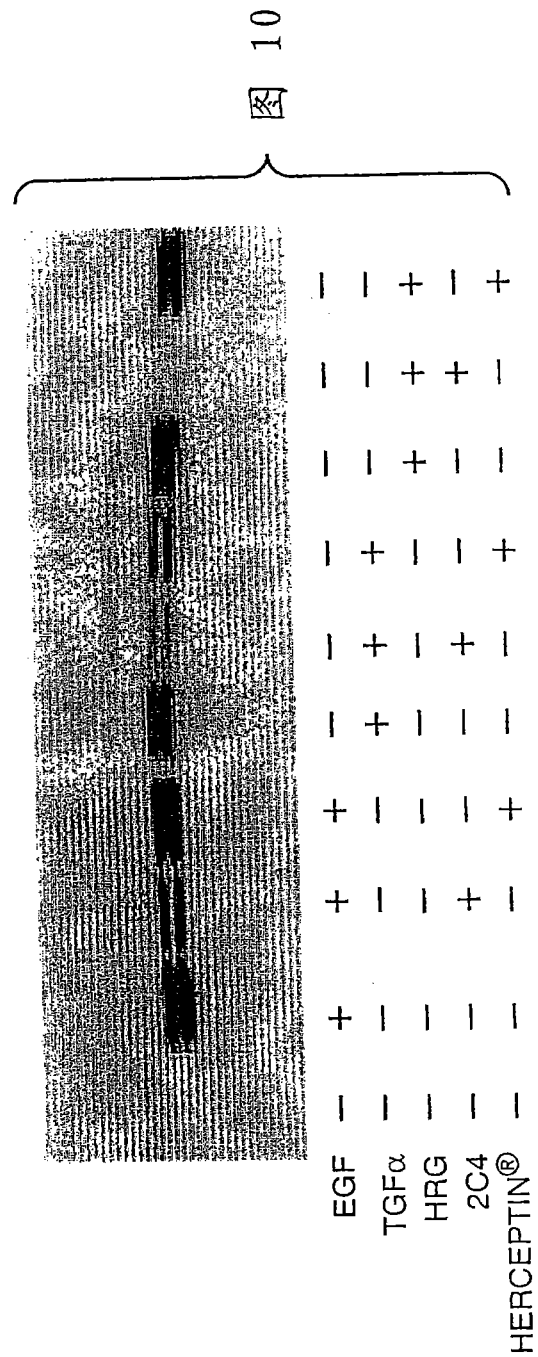
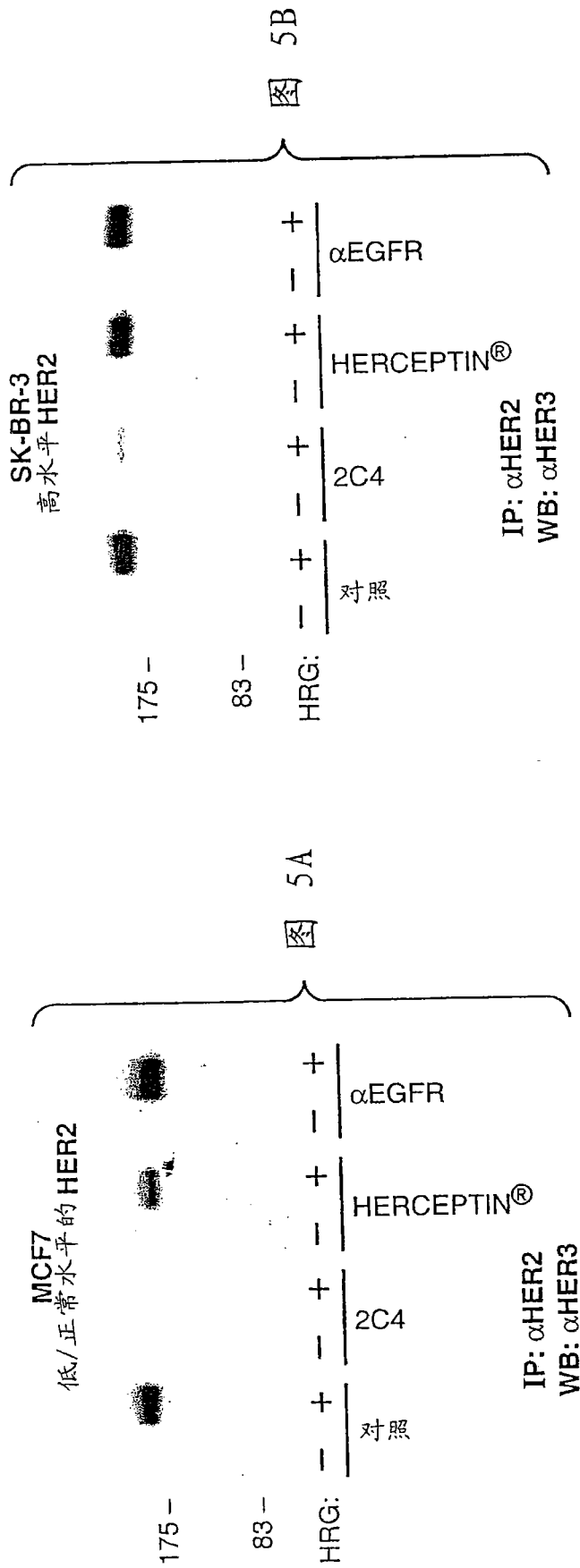


图 4B



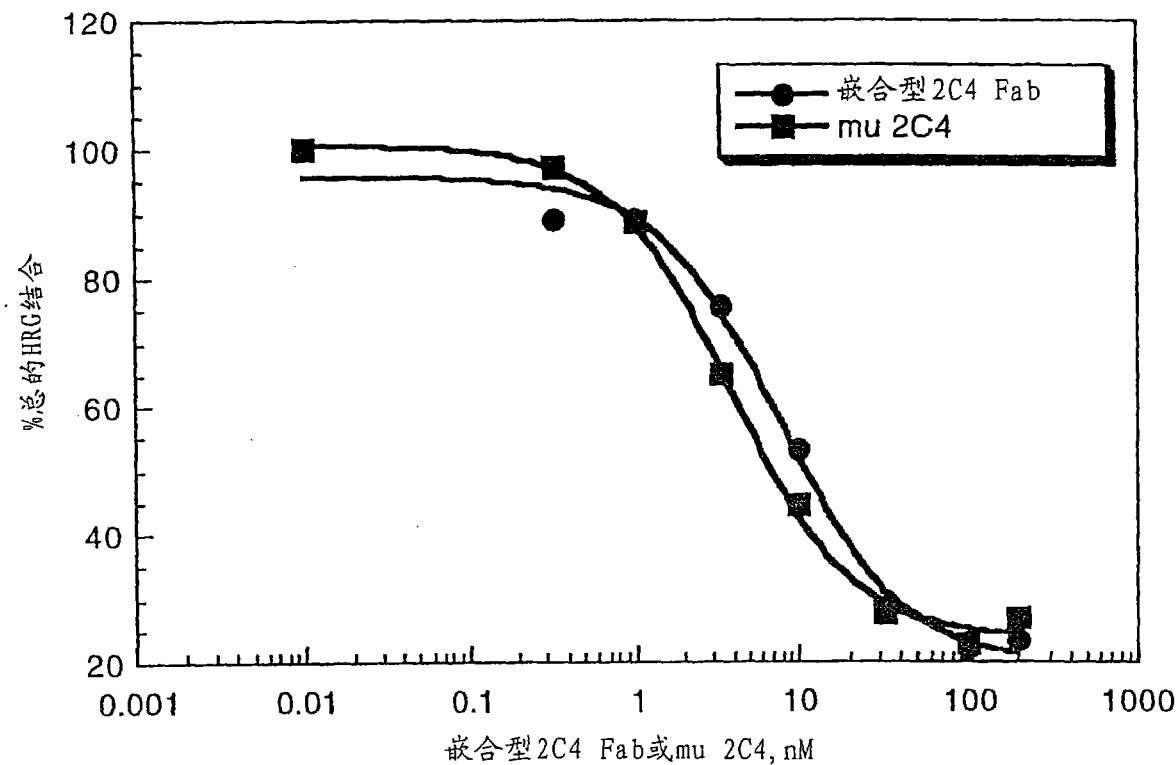


图 6A

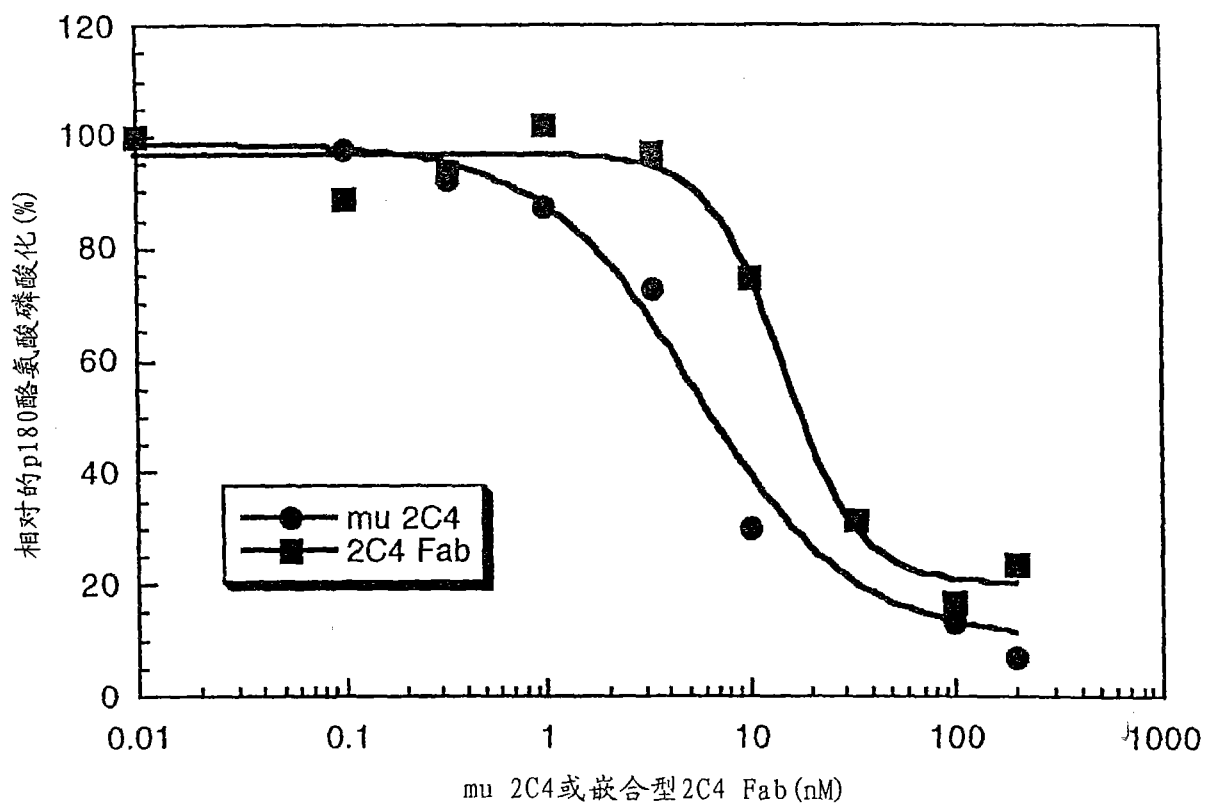


图 6B

## 轻链可变区

|        |                                               |       |       |       |
|--------|-----------------------------------------------|-------|-------|-------|
|        | 10                                            | 20    | 30    | 40    |
| 2C4    | DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC [KASQDV SIGVA] WYQQR  |       |       |       |
|        | **                                            | ***** | *     | *     |
| 574    | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [KASQDV SIGVA] WYQQR  |       |       |       |
|        |                                               |       | *     | ** ** |
| hum κI | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQSI SNYLA] WYQQR  |       |       |       |
|        | 50                                            | 60    | 70    | 80    |
| 2C4    | GQSPKLLIY [SASYRYT] GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA  |       |       |       |
|        | **                                            | *     | *     | ** ** |
| 574    | GKAPKLLIY [SASYRYT] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ    |       |       |       |
|        |                                               | *     | ***** |       |
| hum κI | GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ    |       |       |       |
|        | 90                                            | 100   |       |       |
| 2C4    | EDLAVYYC [QQYIYPYT] FGGGTKLEIK (SEQ ID NO:1)  |       |       |       |
|        | * *                                           | *     | *     |       |
| 574    | EDFATYYC [QQYIYPYT] FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:3)  |       |       |       |
|        |                                               | *** * |       |       |
| hum κI | EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:5) |       |       |       |

图 7A

## 重链可变区

|         |                                                            |       |       |       |
|---------|------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|
|         | 10                                                         | 20    | 30    | 40    |
| 2C4     | EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS [GFTFTDYTMD] WVKQS               |       |       |       |
|         | **                                                         | ** *  | *     | **    |
| 574     | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFTDYTMD] WVRQA               |       |       |       |
|         |                                                            |       | ** *  | *     |
| hum III | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA               |       |       |       |
|         | 50 a                                                       | 60    | 70    | 80    |
| 2C4     | HGKSLEWIG [DVNPNSGGS IYNQRFGK] KASLTVD RSSRIVYM            |       |       |       |
|         | * *                                                        | **    | *** * | ***** |
| 574     | PGKGLEWVA [DVNPNSGGS IYNQRFGK] RFTLSVDRSKNTLYL             |       |       |       |
|         |                                                            | ***** | ***   | *     |
| hum III | PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG] RFTISRDN SKNTLYL             |       |       |       |
|         | abc                                                        | 90    | 100ab | 110   |
| 2C4     | ELRSLTFEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:2)   |       |       |       |
|         | ***                                                        | **    |       | **    |
| 574     | QMNSLRAEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:4) |       |       |       |
|         |                                                            | ***** |       |       |
| hum III | QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY] WGQGT LTVTVSS (SEQ ID NO:6) |       |       |       |

图 7B

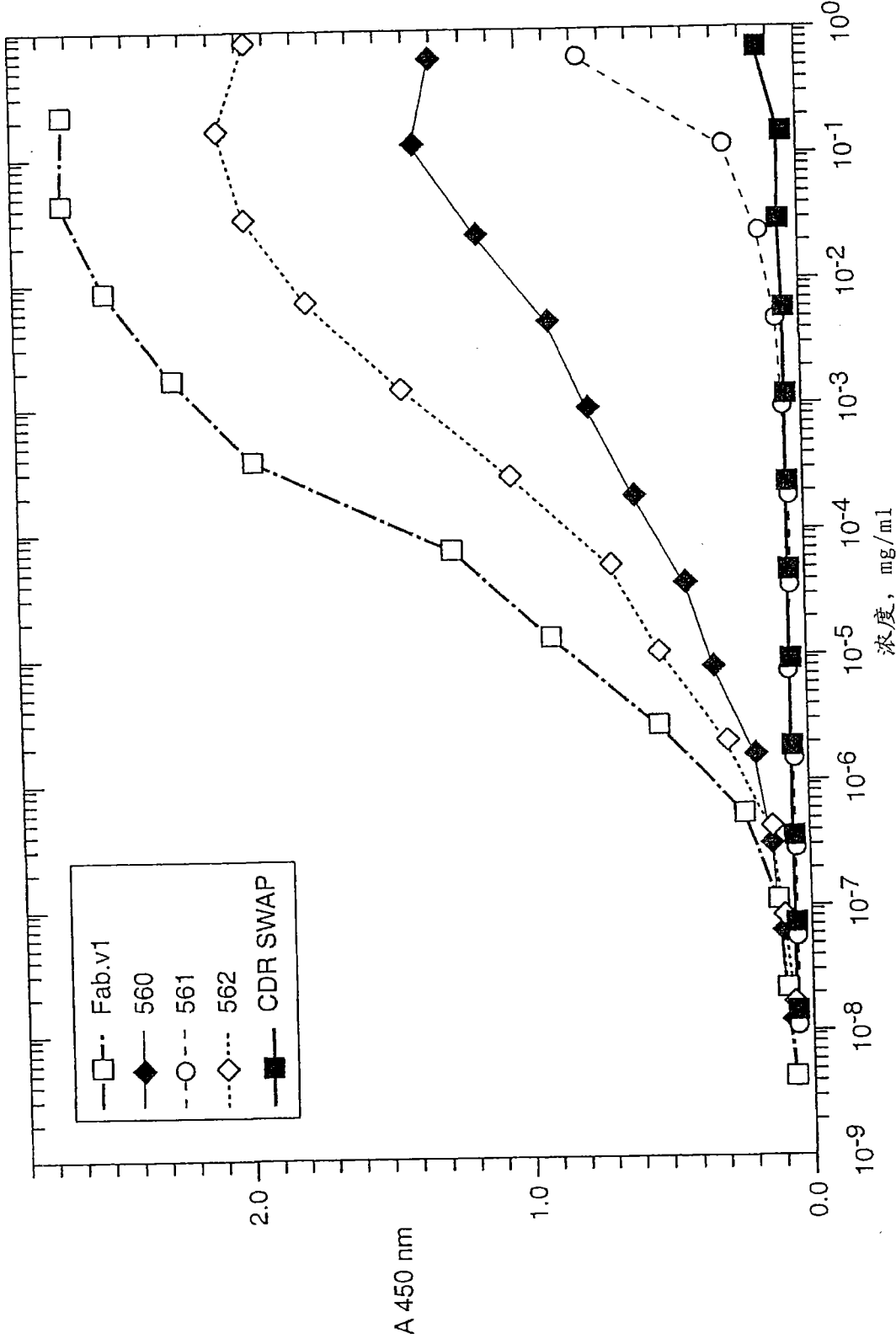


图 8A

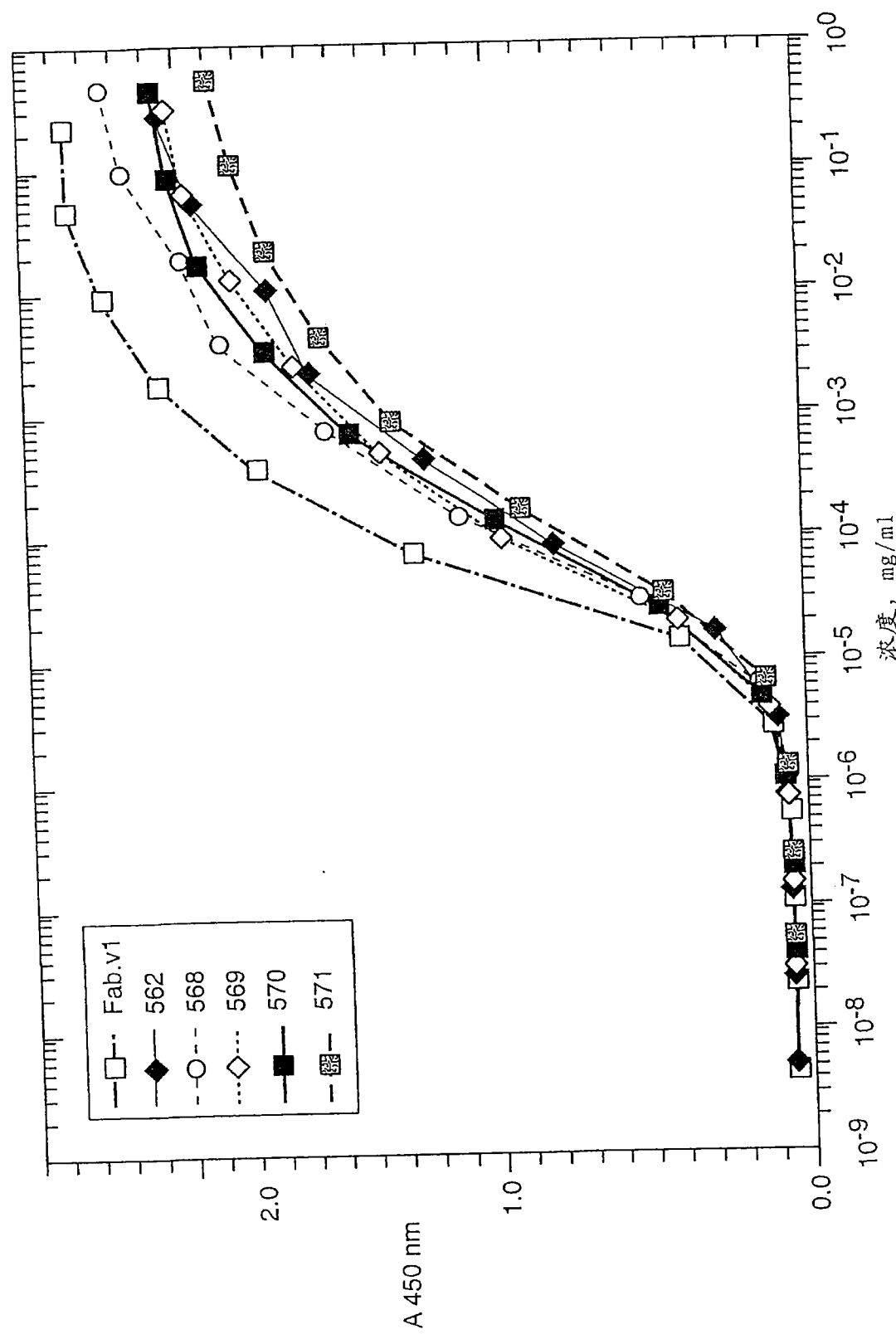


图 8B

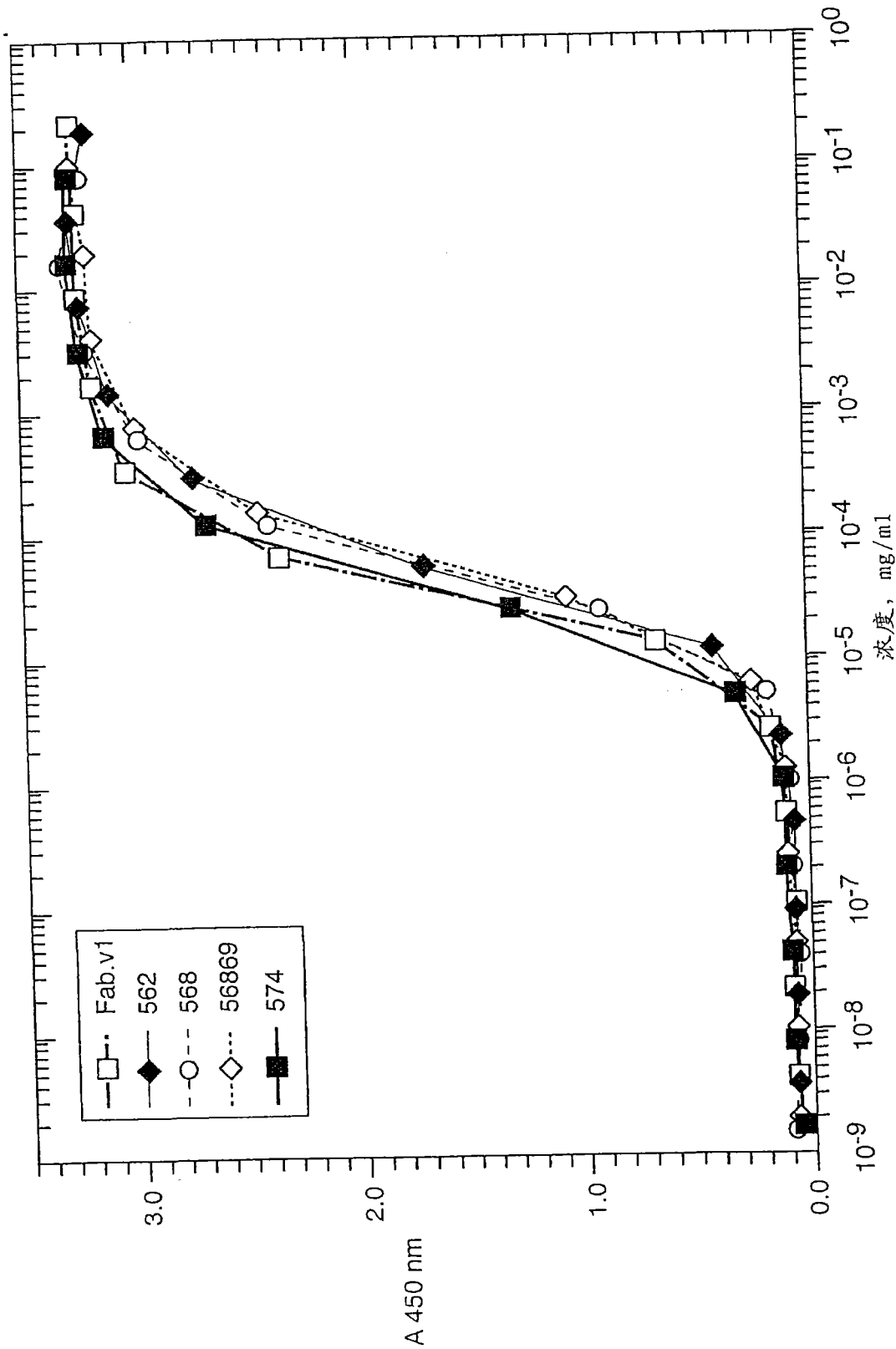


图 8C

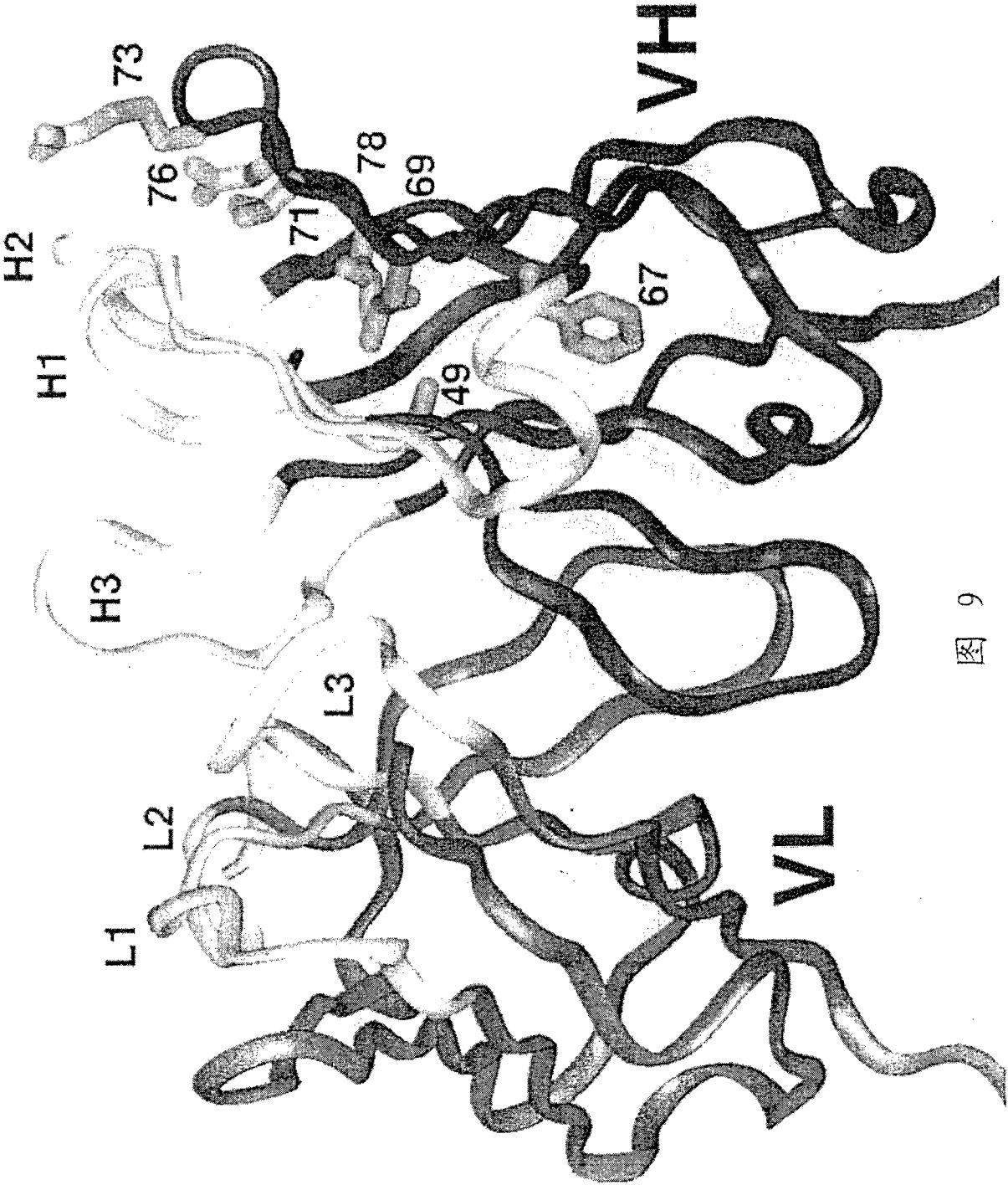


图 9

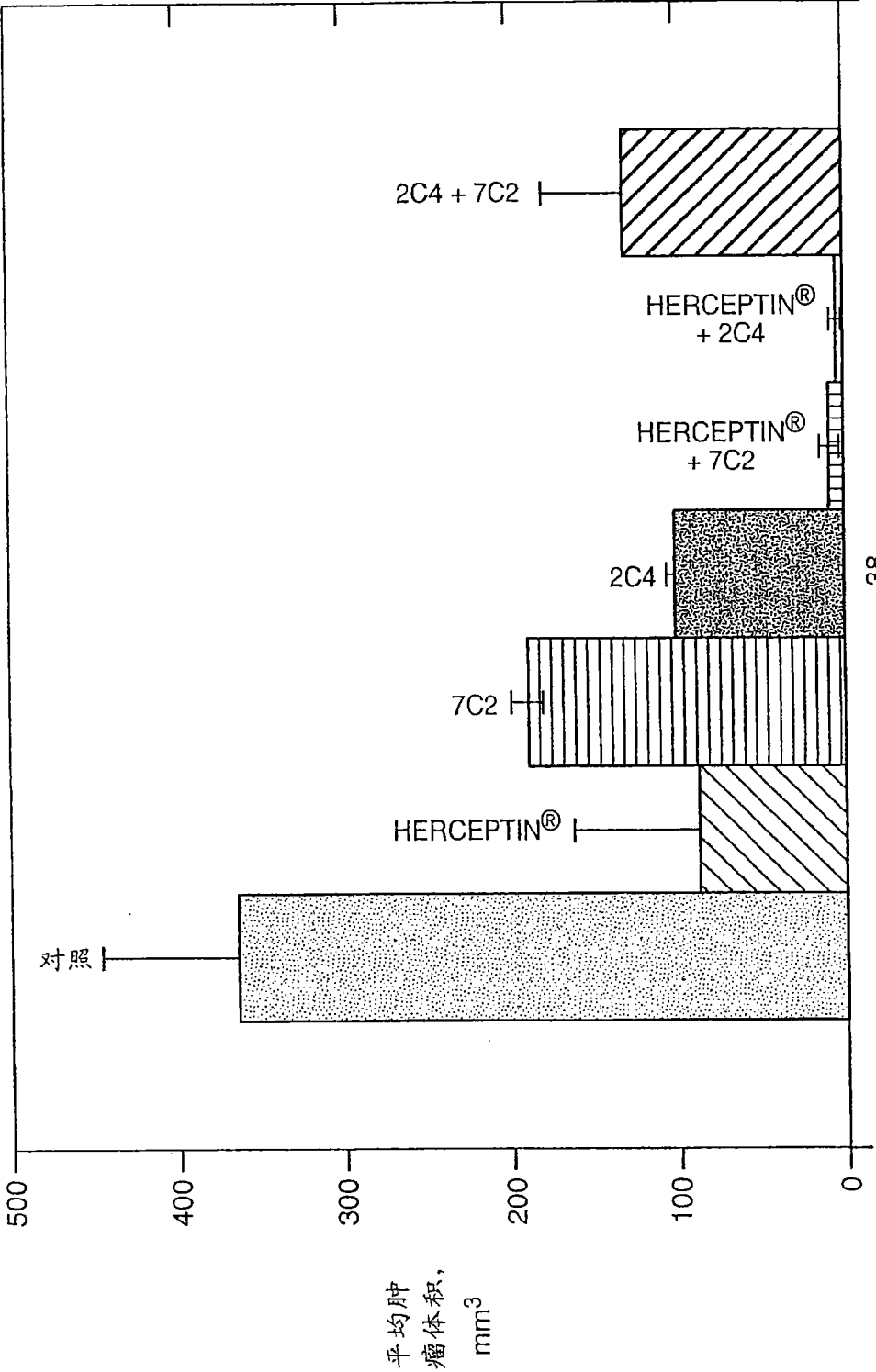


图 11

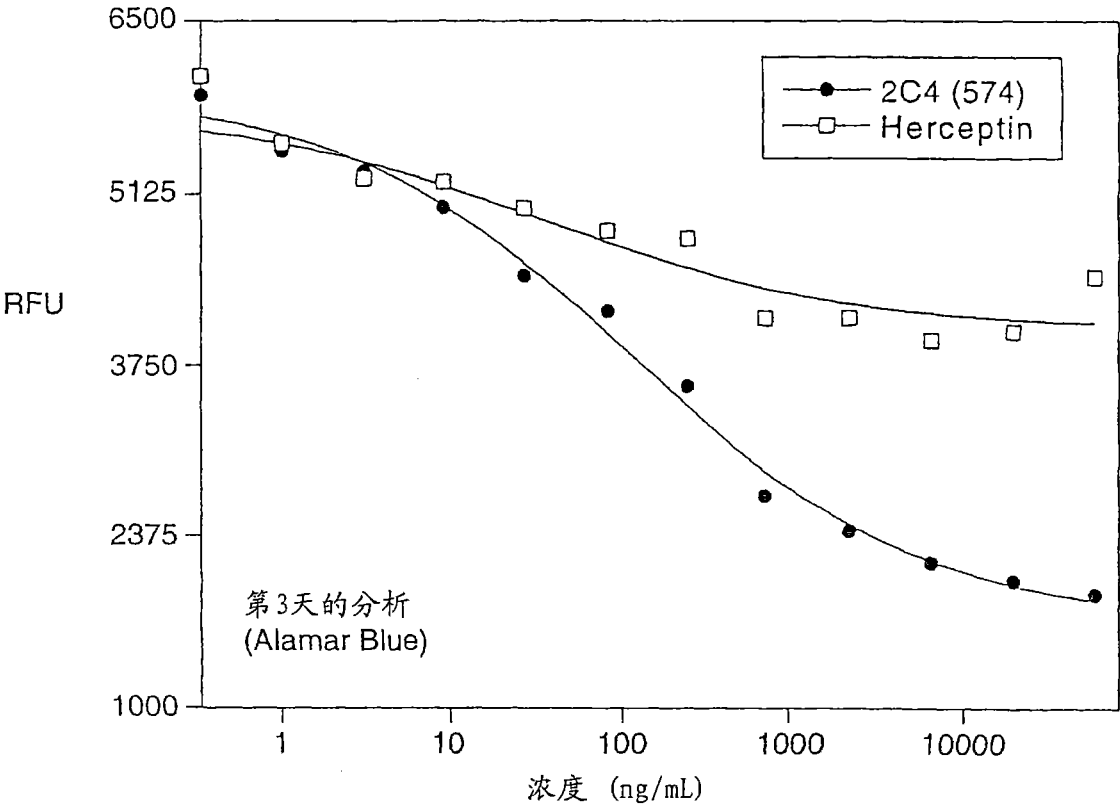


图 12

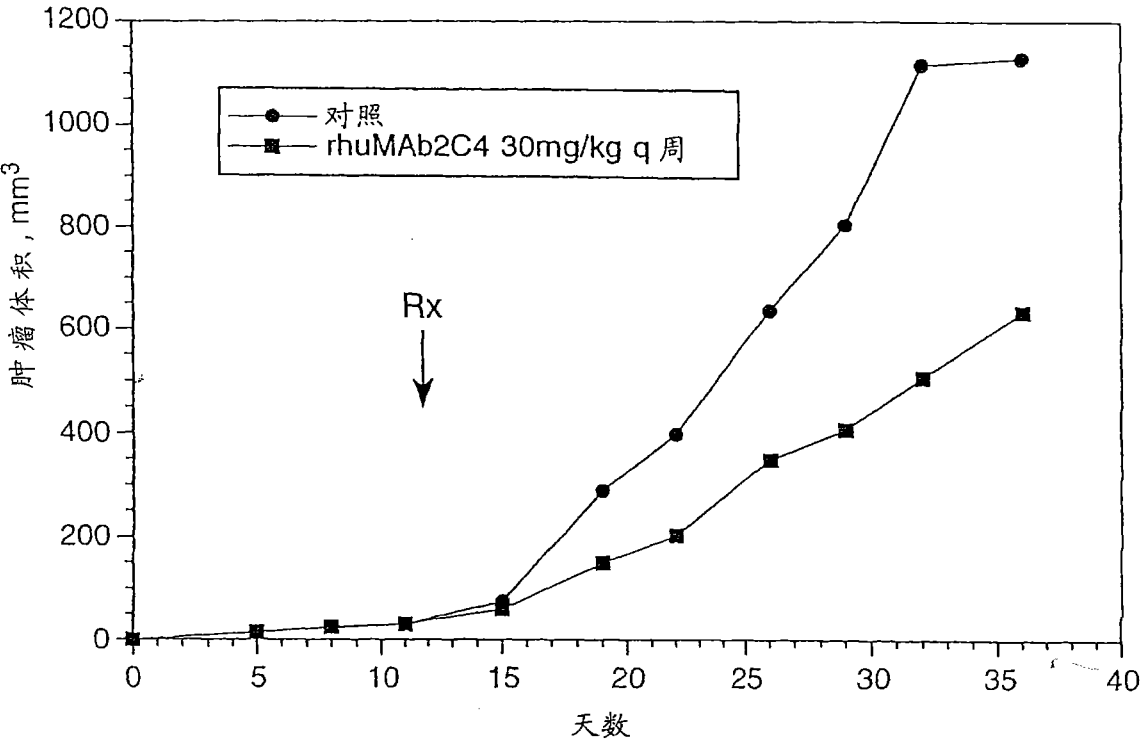


图 13