



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101674846 B

(45) 授权公告日 2014. 07. 02

(21) 申请号 200880009633. 1

A61P 35/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 02. 15

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

60/901, 904 2007. 02. 16 US

61/009, 796 2008. 01. 02 US

W0 2006017538 A2, 2006. 02. 16,

W0 2006020706 A2, 2006. 02. 23,

EP 1283053 A1, 2003. 02. 12,

W0 2006091209 A2, 2006. 08. 31,

W0 9735885 A1, 1997. 10. 02,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2009. 09. 24

审查员 田园

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/002119 2008. 02. 15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02008/100624 EN 2008. 08. 21

(73) 专利权人 梅里麦克制药股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 B · 舍贝尔 U · 尼尔森

M · 费尔德豪斯 A · 穆拉加南丹姆

D · 巴克勒

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书45页

序列表20页 附图44页

(54) 发明名称

ErbB3 抗体及其用途

(57) 摘要

本发明提供了一类新型的结合 ErbB3 受体并抑制各种不同 ErbB3 功能的单克隆抗体。例如, 此处所描述的抗体能够结合 ErbB3 并抑制 EGF 样配体介导的受体磷酸化。

1. 一种结合 ErbB3 的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 包含:
如 SEQ ID NO :7 所示的重链可变区 CDR1 ;
如 SEQ ID NO :8 所示的重链可变区 CDR2 ;
如 SEQ ID NO :9 所示的重链可变区 CDR3 ;
如 SEQ ID NO :10 所示的轻链可变区 CDR1 ;
如 SEQ ID NO :11 所示的轻链可变区 CDR2 ;和
如 SEQ ID NO :12 所示的轻链可变区 CDR3。
2. 一种结合 ErbB3 的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 包含如 SEQ ID NO :1 所示的重链可变区和如 SEQ ID NO :2 所示的轻链可变区。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合部分, 其中, 所述抗体选自人抗体、人源化抗体、双特异性抗体和嵌合抗体。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合部分, 其中, 所述抗体或其抗原结合部分选自 Fab、Fab'、2、ScFv、SMIP、亲和抗体、avimer、纳米抗体和域抗体。
5. 根据权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合部分, 其中, 抗体同种型选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD 和 IgE 抗体。
6. 根据权利要求 5 所述的抗体或其抗原结合部分, 其中所述抗体是 IgG2 同种型抗体。
7. 在药学上可接受的载体中包含前述任一项权利要求所述的抗体或抗原结合部分的组合物。
8. 根据权利要求 7 所述的组合物, 其中所述组合物是适合于注射或输注的灭菌水溶液或分散液, 或者所述组合物是用于即时制备适合于注射或输注的灭菌注射溶液或分散液的灭菌粉末。
9. 根据权利要求 7 所述的组合物, 进一步包含靶向 EGFR 的分子。
10. 一种制备权利要求 8 所述的灭菌水溶液的方法, 所述方法包括于药学上可接受的载体中包含所述抗体或抗原结合部分的水溶液的灭菌微过滤。
11. 一种编码权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合部分的可变区的分离的核酸, 包含重链可变区 SEQ ID NO :25 和轻链可变区 SEQ ID NO :26。
12. 一种包含权利要求 11 所述的核酸的表达载体。
13. 一种包含权利要求 12 所述的表达载体的宿主细胞。
14. 一种产生权利要求 1-6 中任一项所述的抗体或其抗原结合部分的宿主细胞。
15. 一种产生权利要求 1 或 2 所述的抗体或其抗原结合部分的宿主细胞, 其中, 所述抗体由 SEQ ID NO :25 所示的重链可变区核苷酸序列和 SEQ ID NO :26 所示的轻链可变区核苷酸序列编码。
16. 包含一种或多种权利要求 1-6 中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分, 并任选地包含用于治疗或诊断与 ErbB3 依赖性信号传导相关的疾病的说明的试剂盒。
17. 根据权利要求 16 所述的试剂盒, 其中, 所述疾病为癌症。
18. 权利要求 1-6 任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分在制备用于抑制人类受试者的 ErbB3 信号传导的药物中的用途。
19. 权利要求 1-6 任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分在制备用于治疗人类受试者的癌症的药物中的用途。

20. 根据权利要求 18 或 19 所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合部分包含如 SEQ ID NO:7 所示的重链可变区 CDR1;如 SEQ ID NO:8 所示的重链可变区 CDR2;如 SEQ ID NO:9 所示的重链可变区 CDR3;如 SEQ ID NO:10 所示的轻链可变区 CDR1;如 SEQ ID NO:11 所示的轻链可变区 CDR2;和如 SEQ ID NO:12 所示的轻链可变区 CDR3。

21. 根据权利要求 18 或 19 所述的用途,其中所述抗体或其抗原结合部分包含如 SEQ ID NO:1 所示的重链可变区和如 SEQ ID NO:2 所示的轻链可变区。

22. 根据权利要求 19 所述的用途,其中,所述癌症选自黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、胃肠 / 结肠癌、肺癌、透明细胞肉瘤和前列腺癌。

23. 根据权利要求 18 或 19 所述的用途,其中,所述抗体或其抗原结合部分是经静脉、肌肉或皮下给予受试者的。

24. 根据权利要求 19 所述的用途,其中,所述抗体或其抗原结合部分与第二治疗剂联合给药。

25. 根据权利要求 24 所述的用途,其中,所述第二治疗剂是第二抗体或其抗原结合部分。

26. 根据权利要求 24 所述的用途,其中,所述第二治疗剂是抗癌剂。

27. 根据权利要求 26 所述的用途,其中,所述抗癌剂选自抗体、小分子、抗代谢物、烷化剂、拓扑异构酶抑制剂、微管靶向药物、激酶抑制剂、蛋白质合成抑制剂、免疫治疗剂、激素或其类似物、生长抑素类似物、糖皮质激素、芳香化酶抑制剂和 mTOR 抑制剂。

28. 根据权利要求 27 所述的用途,其中,所述抗体为抗 IGF1R 抗体、抗 EGFR 抗体或抗 cMET 抗体。

29. 根据权利要求 27 所述的用途,其中,所述小分子靶向 IGF1R、EGFR 或 cMET。

30. 权利要求 1-6 中任一项所述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分在制备用于诊断人类受试者的与 ErbB3 相关的癌症的诊断试剂中的用途。

ErbB3 抗体及其用途

背景技术

[0001] 多肽生长因子受体的 ErbB/HER 亚族包括表皮生长因子 (EGF) 受体 (EGFR、ErbB1/HER1)、neu 致癌基因产物 (ErbB2/HER2) 及最近确认的 ErbB3/HER3 和 ErbB4/HER4 受体蛋白质 (参见, 例如 Hynes 等人 (1994) *Biochim. Biophys. Acta. Rev. Cancer* 1198, 165-184)。据推测, 这些受体中的各种都由细胞外配体结合结构域、跨膜结构域、胞质蛋白酪氨酸激酶 (PTK) 结构域和 C 末端磷酸化结构域组成 (参见, 例如 Kim 等人, (1998) *Biochem. J.* 334, 189-195)。

[0002] 体外实验表明, 与其它 ErbB/HER 家族成员相比, ErbB3 蛋白质的蛋白酪氨酸激酶活性显著降低, 且这种降低部分地由于在 ErbB3 的预计催化结构域中发生的非保守氨基酸置换 (参见, 例如 Guy 等人 (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91, 8132-8136; Sierke 等人 (1997) *Biochem. J.* 322, 757-763)。但是, ErbB3 蛋白质表现出在多种细胞环境中被磷酸化。例如, 在过量表达该蛋白质的人乳腺癌细胞系的亚群中, ErbB3 在酪氨酸残基上被组成型磷酸化 (参见, 例如 Kraus 等人 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 2900-2904; 和 Kim 等人, 同上; 还参见 Schaefer 等人 (2006) *Neoplasia* 8(7): 613-22 和 Schaefer 等人 *Cancer Res* (2004) 64(10): 3395-405)。

[0003] 尽管人们一直在研究 ErbB3 在癌症中的作用 (参见, 例如 Horst 等人 (2005) 115, 519-527; Xue 等人 (2006) *Cancer Res.* 66, 1418-1426), 但是在很大程度上 ErbB3 作为临床干预的靶点仍未受到重视。目前的免疫治疗主要集中于抑制 ErbB2 的作用, 且特别是 ErbB2/ErbB3 复合物的异二聚化 (参见, 例如 Sliwkowski 等人 (1994) *J. Biol. Chem.* 269(20): 14661-14665 (1994))。因此, 本发明的目的在于提供有效抑制 ErbB3 信号传导的改进的免疫治疗并可用于治疗和诊断多种癌症。

发明内容

[0004] 本发明提供了一类与 ErbB3 受体相结合并抑制各种 ErbB3 功能的新型单克隆抗体。例如, 此处所描述的抗体能够与 ErbB3 结合并抑制 EGF 样配体介导的受体磷酸化。如此处所描述的, EGF 样配体包括 EGF、TGF- α 、 β 细胞素 (betacellulin)、肝素结合性表皮生长因子、biregulin 和双调蛋白, 其与 EGFR 结合并诱导 EGFR 和 ErbB3 的二聚化。这种二聚化随之引起 ErbB3 的磷酸化, 并通过该受体激活信号传导。因此, 本发明的单克隆抗体可用于治疗和诊断与 ErbB3 介导的细胞信号传导相关的多种癌症。因此, 在一个实施方式中, 本发明提供了与 ErbB3 相结合并抑制 EGF 样配体介导的 ErbB3 磷酸化的单克隆抗体 (及其抗原结合部分)。

[0005] 在另一个实施方式中, 抗体进一步具有下述一种或多种特性: (i) 抑制 ErbB3 配体介导的信号传导, 包括通过 ErbB3 配体 (例如神经调节素、表皮调节素、epigen 和 BIR) 与 ErbB3 的结合介导的信号传导; (ii) 抑制表达 ErbB3 的细胞的增殖; (iii) 降低细胞表面上的 ErbB3 水平 (例如通过诱导 ErbB3 的内在化) 的能力; (iv) 抑制表达 ErbB3 的细胞的 VEGF 分泌; (v) 抑制表达 ErbB3 的细胞的迁移; (vi) 抑制表达 ErbB3 的细胞的球状体生长;

和 / 或 (vii) 与位于 ErbB3 结构域 I (残基 20-209) 上的表位相结合, 例如与包含或跨过 ErbB3 氨基酸序列的残基 20-202 的表位相结合。

[0006] 通过表面等离子共振分析或细胞结合分析进行测量, 本发明的特定的单克隆抗体及其抗原结合部分的 K_D 为 50nM 或更低。

[0007] 在进一步的实施方式中, 本发明的特定的单克隆抗体及其抗原结合部分包含重链可变区, 该重链可变区包含与 SEQ ID NO :1、SEQ ID NO :3、SEQ ID NO :5、SEQ ID NO :35 或 SEQ ID NO :37 所示的重链可变区氨基酸序列至少 80% (例如 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%) 相同的氨基酸序列。本发明其它特定的单克隆抗体及其抗原结合部分包含轻链可变区, 该轻链可变区包含与 SEQ ID NO :2、SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :6、SEQ ID NO :36 或 SEQ ID NO :38 所示的轻链可变区氨基酸序列至少 80% (例如 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%) 相同的氨基酸序列。抗体还可以包含上述重链和轻链可变区两者。

[0008] 抗体或其抗原结合部分的重链和轻链可变区通常包含一个或多个互补性决定区 (CDR)。它们包含一个或多个 CDR1、CDR2 和 CDR3 区域。因此, 本发明其它特定的抗体及其抗原结合部分包含一个或多个选自包含 SEQ ID NO :7 的重链可变区 CDR1、包含 SEQ ID NO :8 的重链可变区 CDR2、包含 SEQ ID NO :9 的重链可变区 CDR3、包含 SEQ ID NO :10 的轻链可变区 CDR1、包含 SEQ ID NO :11 的轻链可变区 CDR2、包含 SEQ ID NO :12 的轻链可变区 CDR3 及其组合的 CDR 序列。

[0009] 本发明再其它的特定抗体及其抗原结合部分包含一个或多个选自包含 SEQ ID NO :13 的重链可变区 CDR1、包含 SEQ ID NO :14 的重链可变区 CDR2、包含 SEQ ID NO :15 的重链可变区 CDR3、包含 SEQ ID NO :16 的轻链可变区 CDR1、包含 SEQ ID NO :17 的轻链可变区 CDR2、包含 SEQ ID NO :18 的轻链可变区 CDR3 及其组合的 CDR 序列。

[0010] 本发明再其它的特定抗体及其抗原结合部分包含一个或多个选自包含 SEQ ID NO :19 的重链可变区 CDR1、包含 SEQ ID NO :20 的重链可变区 CDR2、包含 SEQ ID NO :21 的重链可变区 CDR3、包含 SEQ ID NO :22 的轻链可变区 CDR1、包含 SEQ ID NO :23 的轻链可变区 CDR2、包含 SEQ ID NO :24 的轻链可变区 CDR3 及其组合的 CDR 序列。

[0011] 本发明再其它的特定抗体及其抗原结合部分包含一个或多个选自包含 SEQ ID NO :39 的重链可变区 CDR1、包含 SEQ ID NO :40 的重链可变区 CDR2、包含 SEQ ID NO :41 的重链可变区 CDR3、包含 SEQ ID NO :42 的轻链可变区 CDR1、包含 SEQ ID NO :43 的轻链可变区 CDR2、包含 SEQ ID NO :44 的轻链可变区 CDR3 及其组合的 CDR 序列。

[0012] 本发明再其它的特定抗体及其抗原结合部分包含一个或多个选自包含 SEQ ID NO :45 的重链可变区 CDR1、包含 SEQ ID NO :46 的重链可变区 CDR2、包含 SEQ ID NO :47 的重链可变区 CDR3、包含 SEQ ID NO :48 的轻链可变区 CDR1、包含 SEQ ID NO :49 的轻链可变区 CDR2、包含 SEQ ID NO :50 的轻链可变区 CDR3 及其组合的 CDR 序列。

[0013] 抗体及其抗原结合部分还可以包含一个或多个与上述任何 CDR 或 CDR 的组合至少 80% (例如 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%) 相同的 CDR。

[0014] 在一个实施方式中, 抗体及其抗体部分完全来自人体 (即包括人 CDR 和框架序列)。本发明的特定的人抗体包括具有源自人 VH3 种系基因的重链可变区和 / 或源自人 VL2 种系基因的轻链可变区的抗体。

[0015] 本发明还包括与此处所描述的任何抗体或其部分所结合的表位相同或重叠的表

位（例如位于 ErbB3 结构域 I 的表位，如包含或跨过 ErbB3 氨基酸序列的残基 20-202 的表位）结合的单克隆抗体及其部分。本发明还包括与此处所描述的抗体具有相同活性的抗体（例如具有与 Ab#6 相同的序列的抗体）。

[0016] 本发明的抗体包括抗体以及其它具有抗体样性质的蛋白质支架 (scaffold) 的所有已知形式。例如，抗体可以是人抗体、人源化抗体、双特异性抗体、嵌合抗体或具有抗体样性质的蛋白质支架，例如，纤连蛋白或锚蛋白重复序列。抗体还可以是 Fab、Fab'、2、ScFv、SMIP、亲和抗体 (affibody)、纳米抗体 (nanobody) 或域抗体 (domain antibody)。抗体还可以具有下述任何的同种型：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD 和 IgE。

[0017] 在又一个实施方式中，本发明还提供了包含此处所描述的抗体或抗原结合部分的组合、并与可接受的载体和 / 或辅料一起配制的组合物。在特定的实施方式中，组合物包含两种或更多种与 ErbB3 上不同的表位结合的抗体或与不结合 ErbB3 的抗癌抗体组合的此处所描述的抗体。

[0018] 在再另一个实施方式中，本发明提供了编码此处所描述的抗体及其抗原结合部分的分离的核酸。在特定的实施方式中，该核酸编码重链可变区，其包含与 SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :35 或 SEQ ID NO :37 至少 80%（例如 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%）相同或在高严格条件下与 SEQ ID NO :25、SEQ ID NO :27、SEQ ID NO :29、SEQ ID NO :35 或 SEQ ID NO :37 杂交的核苷酸序列；或编码轻链可变区，其包含与 SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :36 或 SEQ ID NO :38 至少 80%（例如 85%、90%、95%、96%、97%、98% 或 99%）相同或在高严格条件下与 SEQ ID NO :26、SEQ ID NO :28、SEQ ID NO :30、SEQ ID NO :36 或 SEQ ID NO :38 杂交的核苷酸序列；或这些重链和轻链可变区的组合。

[0019] 本发明进一步提供了表达和 / 或产生此处所描述的抗体及抗原结合部分的非人类转基因哺乳动物、杂交瘤和转基因植物。

[0020] 本发明还提供了包含一种或多种此处所描述的分离的单克隆抗体或其抗原结合部分及任选的用于治疗或诊断与 ErbB3 依赖性信号传导相关的疾病（例如癌症）的说明的试剂盒。

[0021] 本发明的抗体及其抗原结合部分可被用于广泛的治疗和诊断应用中，特别是用于癌症应用中。因此，本发明的另一方面提供了通过给予足以抑制 EGF 样介导的 ErbB3 磷酸化的量的一种或多种此处所描述的抗体或其抗原结合部分来抑制受试者中 EGF 样配体介导的 ErbB3 磷酸化的方法。本发明进一步提供了通过给予足以治疗癌症的量的一种或多种此处所描述的抗体或其抗原结合部分来治疗受试者中多种癌症的方法，癌症包括但不限于黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、胃肠癌 / 结肠癌、肺癌、透明细胞肉瘤和前列腺癌。抗体或其抗原结合部分可以单独给药，也可以与其它治疗剂（例如抗癌剂，比如其它抗体、化学治疗剂和 / 或辐射）联合给药。

[0022] 在其它实施方式中，本发明提供了用于诊断和预测 ErbB3 相关疾病（例如癌症）的方法。在一个实施方式中，这是通过将本发明的抗体或抗原结合部分与来自受试者的细胞相接触（例如体外或体内）、并测量与细胞上 ErbB3 结合的水平实现的，其中异常高的 ErbB3 结合水平显示受试者患有与 ErbB3 相关的癌症。

[0023] 本发明的其它特征和优势将会在下述的具体说明和权利要求书中体现出来。

[0024] 附图简述

[0025] 图 1A 和 1B 为柱状图,描述了使用山羊抗人 Alexa 647 第二抗体的各种抗 ErbB3 候选抗体 (Fab, 此处称为 Ab) 与 MALME-3M 黑素瘤细胞上表达的 ErbB3 的结合。

[0026] 图 2A-2D 为曲线图,描述了各种抗 ErbB3 候选抗体的 K_D 值。图 2A 和 2B 为曲线图,分别描述了使用表面等离子共振 (SPR) 技术测量得到的抗体 #6 (称为 Ab#6) 和抗体 #3 (称为 Ab#3) 的 K_D 值。图 2C 和 2D 为曲线图,分别描述了通过细胞结合分析使用 MALME-3M 黑素瘤细胞测量得到的 Ab#6 和 Ab#3 的 K_D 值。

[0027] 图 3 为曲线图,描述了使用 ELISA 得到的抗 ErbB3 抗体 (Ab#6) 与 ErbB3 的结合特异性。EGFR、BSA 和 TGF- α 用作对照。

[0028] 图 4 为曲线图,描述了使用 ELISA 测量得到的抗 ErbB3 抗体 (Ab#6) 在体外降低 MALME-3M 黑素瘤细胞中的总 ErbB3 水平的能力。

[0029] 图 5A 和 5B 为曲线图,描述了使用 FACS 分析测量得到的抗 ErbB3 抗体 (Ab#6) 下调 MALME-3M 细胞上的 ErbB3 受体的能力。图 5A 显示了使用抗体的 IgG1 同种型的结果。图 5B 显示了使用抗体的 IgG2 同种型的结果。

[0030] 图 6A-6D 为曲线图,描述了使用 FACS 分析测量得到的抗体介导的 ErbB3 下调 (Ab#6) 的时间过程。

[0031] 图 7 为柱状图,描述了各种抗 ErbB3 抗体在体内下调黑素瘤细胞中的 ErbB3 的能力。

[0032] 图 8 为柱状图,描述了抗 ErbB3 抗体 (Ab#6) 在体内下调 ADRr 异种移植物中的 ErbB3 的能力。

[0033] 图 9 为曲线图,描述了抗 ErbB3 抗体 (Ab#6) 在细胞效价发光分析 (Cell Titer GloW Assay) 中抑制 MALME-3M 细胞增殖的能力。

[0034] 图 10 为曲线图,描述了抗 ErbB3 抗体 (Ab#6) 抑制卵巢细胞系 ADRr 细胞增殖的能力。

[0035] 图 11 为曲线图,描述了抗 ErbB3 抗体 (Ab#6) 抑制 ACHN 细胞增殖的能力。

[0036] 图 12 为柱状图,描述了抗 ErbB3 抗体 (Ab#6) 在体内抑制 ADRr 异种移植物中 ErbB3 磷酸化的能力。

[0037] 图 13A-13C 为曲线图,描述了抗 ErbB3 抗体 (Ab#6) 抑制 ADRr 细胞中 β 细胞素和神经调节素介导的 ErbB3 磷酸化的能力。

[0038] 图 14A-14B 为曲线图,描述了抗 ErbB3 抗体 (Ab#6 IgG2 同种型) 抑制卵巢肿瘤细胞系 OVCAR 5 和 OVCAR 8 中 ErbB3 磷酸化的能力。

[0039] 图 15A-15C 为曲线图,描述了 β 细胞素 (BTC) 结合 ErbB1 的能力。如图所示, β 细胞素与 ErbB1 阴性 MALME-3M 细胞不结合 (图 17A), 而分别在 10nM (图 17B) 和 200nM (图 17B) 的浓度下与 ErbB1 阳性 ADRr 细胞结合。曲线图还描述了爱必妥 (Erbbitux) 对该结合的抑制。

[0040] 图 16A-16B 为曲线图,描述了抗 ErbB3 抗体 (Ab#6 IgG2 同种型) 抑制 MALME-3M 细胞中神经调节素介导的信号传导的能力。图 16A 描述了 Ab#6 抑制 MALME-3M 细胞中神经调节素介导的 ErbB3 磷酸化的能力,图 16B 描述了 Ab#6 抑制 MALME-3M 细胞中 AKT 磷酸化的能力。

[0041] 图 17A-D 为曲线图,描述了通过异种移植物的研究得到的抗 ErbB3 抗体 (Ab#6) 抑制 (A) 卵巢 (ADRR 细胞)、(B) 前列腺 (Du145 细胞)、(C) 卵巢 (OvCAR8 细胞) 和 (D) 胰腺 (Colo357 细胞) 肿瘤生长的能力。

[0042] 图 18A 和 18B 为曲线图,描述了使用 FACS 分析测量得到的 Ab#6 (图 18A) 和 Ab#3 的 Fab (图 18B) 抑制神经调节素与 MALME-3M 细胞上的 ErbB3 结合的能力。

[0043] 图 19A 和 19B 为曲线图,描述了 Ab#6 抑制表皮调节素与 ADRr 细胞上的 ErbB3 结合的能力。图 19A 描述了表皮调节素与 ADRr 细胞的结合,图 19B 描述了爱必妥和 Ab#6 两者抑制表皮调节素与 ADRr 细胞结合的能力。

[0044] 图 20A 和 20B 为曲线图,描述了肝素结合性表皮生长因子 (HB-EGF) 与 ADRr 细胞上的 ErbB 结合的能力 (图 20A) 以及抗 ErbB3 抗体 (Ab#6) 缺乏抑制该结合的能力 (图 20B)。

[0045] 图 21A-21C 显示了抗体 (Ab#6、Ab#3、Ab#14、Ab#17 和 Ab#19) 的重链和轻链可变区的氨基酸序列。

[0046] 图 22A-22B 显示了抗体 (Ab#6、Ab#3 和 Ab#14) 的重链和轻链可变区的核苷酸序列。

[0047] 图 23 显示了抗体 (Ab#6、Ab#17 和 Ab#19) 轻链可变区的氨基酸序列,其回复为相应的种系氨基酸序列。氨基酸残基的改变处添加了下划线。

[0048] 图 24A-24C 为曲线图,显示了 Ab#6 抑制肿瘤细胞 VEGF 分泌的能力。

[0049] 图 25 为曲线图,显示了 Ab#6 对细胞迁移的作用。

[0050] 图 26A-C 为曲线图,显示了 (A) AdrR 细胞中球状体生长的抑制、(B) AdrR 中 HRG 诱导的球状体生长的抑制,和 (C) Du145 细胞中 HRG 诱导的球状体生长的抑制。

[0051] 图 27A 和 B 为曲线图,显示了 Ab#6 对 (A)HRG 和 (B)BTC 与 AdrR 细胞的结合的作用。

[0052] 图 28 为曲线图,显示了 Ab#6 对 HGF 诱导的 ErbB3 磷酸化的作用。

[0053] 图 29A 和 B 显示了 Ab#6 对 (A)pErbB1 和 pErbB3 的磷酸化以及 (B)HRG 诱导的 ErbB2/3 复合体形成的作用。

[0054] 图 30 为曲线图,显示了 Ab#6 与 ErbB3 的氨基酸残基 20-202 结合。

具体实施方式

[0055] 为了使本发明更容易理解,首先对一些术语进行了定义。其他定义在通篇详细描述中给出。

[0056] I. 定义

[0057] 术语“ErbB3”、“HER3”、“ErbB3 受体”和“HER3 受体”在此处可互换使用,是指人 ErbB3 蛋白质,如美国专利 No. 5480968 和 Plowman 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:4905-4909(1990)中所述;还参见 Kani 等人,Biochemistry 44:15842-857(2005),Cho 和 Leahy,Science297:1330-1333(2002)。

[0058] 此处所使用的术语“EGF 样配体”是指表皮生长因子受体 (EGFR) 的配体,包括表皮生长因子 (EGF) 和密切相关的蛋白质,例如转化生长因子- α (TGF- α)、 β 细胞素 (BTC)、肝素结合性表皮生长因子 (HB-EGF)、biregulin(BIR) 和双调蛋白 (AR),它们与细胞表面的 EGRF 结合并刺激受体的内在蛋白质-酪氨酸激酶活性。具体而言,EGF 样配体诱导形成

EGFR(也称为 ErbB1)与 ErbB3 的蛋白质复合体(例如参见 Kim 等人, (1998) *Biochem J.*, 334:189-195), 因此导致复合体中酪氨酸残基的磷酸化。

[0059] 本发明的抗体及其抗原结合部分抑制 EGF 样配体介导的 ErbB3 磷酸化, 并在某些实施方式中, 显示出一种或多种下述附加性质: (i) 抑制神经调节素、表皮调节素、epigen 和 bregulin(BIR) 中的一种或多种介导的通过 ErbB3 的信号传导; (ii) 抑制表达 ErbB3 的细胞的增殖; (iii) 降低细胞表面 ErbB3 水平的能力; (iv) 抑制表达 ErbB3 的细胞的 VEGF 分泌; (v) 抑制表达 ErbB3 的细胞的迁移; (vi) 抑制表达 ErbB3 的细胞的球状体生长; 和/或 (vii) 与位于 ErbB3 结构域 I 上的表位结合, 例如与包含或跨过 ErbB3 氨基酸序列的残基 20-202 的表位结合。

[0060] 此处所使用的术语“抑制”是指生物活性的任何统计学显著的降低, 包括活性的完全阻断。例如, “抑制”可以指生物活性降低大约 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或 100%。

[0061] 因此, 此处所使用的短语“EGF 样配体介导的 ErbB3 磷酸化的抑制”是指相对于未处理(对照)细胞中的磷酸化而言, 抗体或抗原结合部分统计学显著地降低 EGF 样配体诱导的 ErbB3 磷酸化的能力。表达 ErbB3 的细胞可以为天然发生的细胞或细胞系, 或者可以通过向宿主细胞引入编码 ErbB3 的核苷酸进行重组制造。在一个实施方式中, 抗体或其抗原结合部分抑制 EGF 样配体介导的 ErbB3 磷酸化至少为 10%、或至少为 20%、或至少为 30%、或至少为 40%、或至少为 50%、或至少为 60%、或至少为 70%、或至少为 80%、或至少为 90% 或 100%, 这是通过例如 Kim 等人, (1998) *Biochem J.*, 334:189-195 以及下文的实施例中描述的蛋白质印迹法及随后使用抗磷酸酪氨酸抗体进行探测而确定的。

[0062] 此处所使用的短语“神经调节素、表皮调节素、epigen 和 bregulin 介导的通过 ErbB3 的信号传导的抑制”是指相对于不存在抗体(对照)的信号传导而言, 抗体或其抗原结合部分统计学显著地降低由 ErbB3 配体(例如神经调节素、表皮调节素、epigen 和 bregulin)介导的通过 ErbB3 的信号传导的能力。此处的 ErbB3-配体也称作“神经调节素样配体”。这意味着在抗体或其抗原结合部分存在的情况下, 相对于对照(没有抗体)而言, 在表达 ErbB3 的细胞中由神经调节素、表皮调节素、epigen 和 bregulin 中的一种或多种介导的信号统计学显著地降低。可以通过分析 ErbB3 底物和/或存在于涉及 ErbB3 的细胞级联(cascade)中的蛋白质的水平或活性来测量 ErbB3-配体介导的信号。在一个实施方式中, 相对于不存在抗体或其抗原结合部分时(对照)的水平或活性而言, 抗体或其抗原结合部分降低 ErbB3 底物和/或在涉及 ErbB3 的细胞级联中的蛋白质的水平或活性至少为 10%、或至少为 20%、或至少为 30%、或至少为 40%、或至少为 50%、或至少为 60%、或至少为 70%、或至少为 80%、或至少为 90% 或 100%。这样的 ErbB3-配体介导的信号传导可以使用本领域公认的技术进行测量, 这些技术使用用于这些蛋白质的激酶分析(参见, 例如 Horst 等人, 同上; Sudo 等人 (2000) *Methods Enzymol.*, 322:388-92; 和 Morgan 等人 (1990) *Eur. J. Biochem.*, 191:761-767) 测量 ErbB3 的底物(例如 SHC 或 PI3K)或在涉及 ErbB3 的细胞级联中的蛋白质(例如 AKT)的水平或活性。

[0063] 在特定的实施方式中, 抗体或其抗原结合部分通过抑制 ErbB3-配体(例如神经调节素、表皮调节素、epigen 或 bregulin 中的一种或多种)与 ErbB3 的结合抑制 ErbB3-配体(例如神经调节素、表皮调节素、epigen 或 bregulin)介导的通过 ErbB3 的信号传导。

一些配体（例如 bircalin 或 BIR）既作为 EGF 样配体（即与 EGFR/ErbB1 结合）也作为 ErbB3 样配体（即与 ErbB3 结合）起作用。

[0064] 此处所使用的短语“神经调节素、表皮调节素、epigen 和 bircalin 与 ErbB3 结合的抑制”是指相对于不存在抗体（对照）的结合而言，抗体或抗原结合部分统计学显著地降低 ErbB3 配体（例如神经调节素、表皮调节素、epigen 或 bircalin 中的一种或多种）与 ErbB3 结合的能力。这意味着在不存在抗体或其抗原结合部分的情况下，相对于对照（没有抗体）而言，与 ErbB3 结合的 ErbB3- 配体（例如神经调节素、表皮调节素、epigen 或 bircalin）的量统计学显著地降低。在存在本发明的抗体或其抗原结合部分的情况下，相对于不存在抗体或其抗原结合部分（对照）时的量而言，与 ErbB3 相结合的 ErbB3 配体的量可以降低至少 10%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90% 或 100%。ErbB3- 配体结合的降低可以使用本领域公认的技术进行测量，这些技术测量存在或不存在（对照）抗体或其抗原结合部分的情况下标记的 ErbB3- 配体（例如放射性标记的神经调节素、表皮调节素、epigen 或 bircalin）与表达 ErbB3 的细胞结合的水平。

[0065] 此处所使用的短语“抑制表达 ErbB3 的细胞的增殖”是指相对于不存在抗体时的增殖而言，抗体或其抗原结合部分统计学显著地降低表达 ErbB3 的细胞的增殖的能力。在一个实施方式中，相对于不存在抗体或其抗原结合部分时（对照）所测量到的增殖而言，当细胞与本发明的抗体或其抗原结合部分接触时，表达 ErbB3 的细胞（例如癌细胞）的增殖可以降低至少 10%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90% 或 100%。细胞增殖可以使用本领域公认的技术进行分析，这些技术测量细胞分裂的速率、细胞群体中发生细胞分裂的比例和 / 或在细胞群体中由于终末分化或细胞死亡而造成的细胞损失率（例如使用细胞效价发光分析或胸苷掺入法）。

[0066] 此处所使用的短语“降低细胞表面 ErbB3 水平的能力”是指相对于未处理（对照）细胞而言，抗体或其抗原结合部分统计学显著地降低在与抗体接触的细胞的表面上发现的 ErbB3 量的能力。例如，细胞表面 ErbB3 水平的降低有可能是由于 ErbB3 内在化的增加（或 ErbB3 内吞作用的提高）。在一个实施方式中，相对于不存在抗体或其抗原结合部分时（对照）的细胞表面表达或内在化而言，抗体或其抗原结合部分降低细胞表面 ErbB3 的表达至少 10%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90% 或 100%，和 / 或增加 ErbB3 受体的内在化至少 10%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90% 或 100%。在存在或不存在抗体或其抗原结合部分时细胞表面的 ErbB3 水平和 / 或 ErbB3 受体的内在化可以使用本领域公认的技术（例如 Horst 等人（同上）和此处的实施例中描述的技术）很容易地进行测量。

[0067] 此处所使用的短语“表达 ErbB3 的细胞的 VEGF 分泌的抑制”是指相对于不存在抗体时的 VEGF 分泌而言，抗体或其抗原结合部分统计学显著地降低表达 ErbB3 的细胞的 VEGF 分泌的能力。在一个实施方式中，相对于不存在抗体或其抗原结合部分时（对照）测量得到的 VEGF 分泌而言，当表达 ErbB3 的细胞（例如癌细胞）与本发明的抗体或其抗原结合部分接触时细胞的 VEGF 分泌可以降低至少 10%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、

或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90% 或 100%。VEGF 分泌可以使用本领域公认的技术（例如此处所描述的那些技术）进行分析。

[0068] 此处所使用的短语“表达 ErbB3 的细胞的迁移的抑制”是指相对于不存在抗体时的细胞迁移而言，抗体或其抗原结合部分统计学显著地降低表达 ErbB3 的细胞的迁移的能力。在一个实施方式中，相对于不存在抗体或其抗原结合部分时（对照）所测量得到的细胞迁移而言，当表达 ErbB3 的细胞（例如癌细胞）与本发明的抗体或其抗原结合部分接触时细胞的迁移可以降低至少 10%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90% 或 100%。细胞迁移可以使用本领域公认的技术（例如此处所描述的技术）进行分析。

[0069] 此处所使用的短语“表达 ErbB3 的细胞的球状体 (spheroid) 生长的抑制”是指相对于不存在抗体时的细胞迁移而言，抗体或其抗原结合部分统计学显著地降低表达 ErbB3 的细胞的迁移的能力。在一个实施方式中，相对于不存在抗体或其抗原结合部分时（对照）所测量得到的细胞迁移，当表达 ErbB3 的细胞（例如癌细胞）与本发明的抗体或其抗原结合部分相接触时细胞的迁移可以降低至少 10%、或至少 20%、或至少 30%、或至少 40%、或至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 80%、或至少 90% 或 100%。细胞迁移可以使用本领域公认的技术（例如此处所描述的技术）进行分析。此处可互换使用的术语“抗体”或“免疫球蛋白”包括完整的抗体及其任何抗原结合片段（即“抗原结合部分”）或单链。“抗体”包含由二硫键相互连接的至少两条重 (H) 链和两条轻 (L) 链。各重链由重链可变区（此处简称为 V_H ）和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域 CH1、CH2 和 CH3 组成。各轻链由轻链可变区（此处简称为 V_L ）和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。 V_H 和 V_L 区可以进一步细分为高变区（称为互补性决定区 (CDR)），夹杂着更加保守区域的区域（称为框架区 (FR)）。各 V_H 和 V_L 由三个 CDR 和四个 FR 构成，其从氨基端至羧基端的排列顺序为：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子（包括各种免疫系统细胞（例如，效应细胞）和经典补系统的第一成分 (C1q)）的结合。本发明的示例性的抗体包括抗体 #1、3 和 14 及其抗原结合部分。

[0070] 此处所使用的术语抗体的“抗原结合部分”（或简称为“抗体部分”）是指保持与抗原（例如 ErbB3）特异性结合的能力的一个或多个抗体片段。已经显示抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段完成。术语抗体的“抗原结合部分”涵盖的结合片段的例子包括 (i) Fab 片段，一种由 V_L 、 V_H 、CL 和 CH1 结构域构成的单价片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，一种包含在铰链区由二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段；(iii) 由 V_H 和 CH1 结构域构成的 Fd 片段；(iv) 由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域构成的 Fv 片段；(v) 包含 V_H 和 V_L 结构域的 dAb；(vi) 由 V_H 结构域构成的 dAb 片段 (Ward 等人 (1989) Nature 341, 544-546)；(vii) 由 V_H 或 V_L 结构域构成的 dAb；和 (viii) 分离的互补性决定区 (CDR) 或 (ix) 两个或更多个分离的 CDR 的组合，其任选地由合成的连接体接合。此外，尽管 Fv 片段的两个结构域 (V_L 和 V_H) 由独立的基因编码，它们可使用重组方法通过合成的连接体接合，该合成连接体使它们能够成为单个蛋白链，其中 V_L 和 V_H 区配对以形成单价分子（也被称为单链 Fv (scFv)；参见，例如 Bird 等人 (1988) Science 242, 423-426；和 Huston 等人 (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883。这样的单链抗体还意图包含在术语抗体的“抗原结合部分”之内。使用本技术

领域技术人员已知的常规方法来获得这些抗体片段,并且以筛选完整抗体的相同方式来对片段的效用进行筛选。可以通过重组 DNA 技术或完整免疫球蛋白的酶或化学切割来产生抗原结合部分。

[0071] 此处所使用的术语“单克隆抗体”是指从基本同源的抗体群获得的抗体,即组成该抗体群的各个抗体除了少量存在的可能的天然发生的突变以外都是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相反,各单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。可以使用任何本领域公认的技术和那些在此描述的技术(例如,如 Kohler 等人 (1975) *Nature*, 256:495 中描述的杂交瘤方法、如 Lonberg 等人 (1994) *Nature* 368(6474):856-859 中描述的转基因动物、重组 DNA 方法(参见,例如 U. S. Pat. No. 4,816,567) 制备单克隆抗体或者使用例如 Clackson 等人, *Nature*, 352:624-628(1991) 和 Marks 等人 *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991) 中描述的技术利用噬菌体抗体库制备单克隆抗体。单克隆抗体包括嵌合抗体、人抗体和人源化抗体,且可以是天然发生的或重组产生的。

[0072] 术语“重组抗体”是指通过重组方式制备、表达、创建或分离的抗体,例如 (a) 从免疫球蛋白基因(例如人免疫球蛋白基因)的转基因或转染色体的动物(例如小鼠)中或从由该动物制备的杂交瘤中分离的抗体、(b) 从进行转化以表达所述抗体的宿主细胞(例如从转染瘤)分离的抗体、(c) 使用噬菌体展示从重组、组合抗体库(例如包含人抗体序列)分离的抗体,和 (d) 使用涉及将免疫球蛋白基因序列(例如人免疫球蛋白基因)与其它 DNA 序列进行剪接的任何其它方式制备、表达、创建或分离的抗体。这样的重组抗体可以具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。但是,在特定实施方式中,可以对这样的重组人抗体进行体外诱变,并因此重组抗体的 V_H 和 V_L 区的氨基酸序列是可能并非天然存在于体内的人抗体种系集合(repertoire)中的序列,尽管它们源自人种系 V_H 和 V_L 序列并与其相关。

[0073] 术语“嵌合免疫球蛋白”或抗体是指其可变区源自第一物种而其恒定区源自第二物种的免疫球蛋白或抗体。可以例如通过基因工程由属于不同物种的免疫球蛋白基因片段构建嵌合免疫球蛋白或抗体。

[0074] 此处所使用的术语“人抗体”意图包括具有可变区的抗体,其中框架和 CDR 区均源自人种系的免疫球蛋白序列,例如如 Kabat 等人(参见 Kabat 等人 (1991) *Sequences of proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U. S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) 所描述的。此外,如果抗体包含恒定区,该恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。人抗体可以包含非由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。但是,此处所使用的术语“人抗体”并不意图包括其中源自另一哺乳动物物种(例如小鼠)的 CDR 序列嫁接到人框架序列上的抗体。

[0075] 人抗体可以包含至少一个或多个由氨基酸残基(例如非由人种系免疫球蛋白序列编码的活性增强氨基酸残基)置换的氨基酸。通常,人抗体可以包含最多达 20 个由不属于人种系免疫球蛋白序列的部分的氨基酸残基置换的位置。在特定的实施方式中,这些置换在 CDR 区域中,如下面所详细描述。

[0076] 术语“人源化免疫球蛋白”或“人源化抗体”是指包含至少一个人源化免疫球蛋白

或抗体链（即至少一条人源化轻链或重链）的免疫球蛋白或抗体。术语“人源化免疫球蛋白链”或“人源化抗体链”（即“人源化免疫球蛋白轻链”或“人源化免疫球蛋白重链”）是指具有包含基本上来自人免疫球蛋白或抗体的可变框架区和基本上源自非人免疫球蛋白或抗体的互补性决定区（CDR）（例如，至少一个 CDR、优选两个 CDR，更优选三个 CDR）和进一步包含恒定区（例如在轻链的情况下，包含至少一个恒定区或其部分，和在重链的情况下，优选包含三个恒定区）的可变区的免疫球蛋白或抗体链（即，分别为轻或重链）。术语“人源化可变区”（例如，“人源化轻链可变区”或“人源化重链可变区”）是指包括基本源自人免疫球蛋白或抗体的可变框架区和基本源自非人免疫球蛋白或抗体的互补性决定区（CDR）的可变区。

[0077] “双特异性”或“双功能性抗体”是具有两种不同的重 / 轻链对和两种不同的结合位点的人工杂交抗体。可以通过多种方法（包括杂交瘤的融合或 Fab' 片段的连接）来制备双特异性抗体。参见，例如 Songsivilai & Lachmann, (1990) Clin. Exp. Immunol. 79, 315-321 ; Kostelny 等人 (1992) J. Immunol. 148, 1547-1553。在特定的实施方式中，本发明的双特异性抗体包含 ErbB3 和 IGF1-R（即胰岛素样生长因子 1-受体）的结合位点。在另一个实施方式中，本发明的双特异性抗体包含 ErbB3 和 C-MET 的结合位点。在其它实施方式中，双特异性抗体包含 ErbB3 的结合位点及 ErbB2、ERbB3、ErbB4、EGFR、Lewis Y、MUC-1、EpCAM、CA125、前列腺特异性膜抗原、PDGFR- α 、PDGFR- β 、C-KIT 或任何 FGF 受体的结合位点。

[0078] 此处所使用的“异种抗体”相对于产生这种抗体的转基因非人生物体或植物进行定义。

[0079] 此处所使用的“分离的抗体”是指基本上不含具有不同的抗原特异性的其它抗体的抗体（例如，特异性地与 ErbB3 相结合的分离的抗体基本上不含与 ErbB3 以外的其它抗原特异性地结合的抗体）。此外，分离的抗体通常基本上不含其它的细胞物质和 / 或化学物质。在本发明的一个实施方式中，具有不同的 ErbB3 结合特异性的“分离的”单克隆抗体的组合是在良好定义的组合物中进行组合。

[0080] 此处所使用的“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类（例如 IgM 或 IgG1）。在一个实施方式中，抗体或其抗原结合部分是选自 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgAsec、IgD 或 IgE 抗体同种型的同种型。在某些实施方式中，本发明的单克隆抗体为 IgG1 同种型。在其它实施方式中，本发明的单克隆抗体为 IgG2 同种型。

[0081] 此处所使用的“同种型转换”是指抗体的类型或同种型从一个 Ig 类变为其它 Ig 类中的一个的现象。

[0082] 此处所使用的“非转换同种型”是指当未发生同种型转换时产生的重链同种型类型；编码非转换同种型的 CH 基因通常为紧挨着功能性重排的 VDJ 基因下游的第一个 CH 基因。同种型转换被分为典型的或非典型的同种型转换。典型的同种型转换通过编码抗体的基因中涉及至少一个转换序列区的重组事件而发生。非典型的同种型转换可以通过例如人 σ_{μ} 和人 Σ_{μ} 同源重组（ δ -相关缺失）发生。替代的非典型转换机制（例如，特别是转基因间的和 / 或染色体间的重组）可以发生并完成同种型转换。

[0083] 此处所使用的术语“转换序列”是指负责转换重组的那些 DNA 序列。“转换供体”序列（典型地为 μ 转换区）为在转换重组过程中被删除的构建体（construct）区的 5' 端（即上游）。“转换受体”区是在将删除的构建区和置换恒定区（例如， γ 、 ϵ 等）之间。由

于没有总是发生重组的特定位点,因此最终的基因序列通常不能从构建体进行预测。

[0084] “抗原”为抗体或其抗原结合部分结合的实体(例如,蛋白质的实体或肽)。在本发明的各种不同的实施方式中,抗原为 ErbB3 或 ErbB3 样分子。在本发明的特定的实施方式中,抗原为人 ErbB3。

[0085] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的位点。表位可以由相邻氨基酸形成或通过蛋白质的三级折叠而并置的不相邻氨基酸形成。由相邻的氨基酸形成的表位在接触变性溶剂时通常仍会保留,而由三级折叠形成的表位通常在经变性溶剂处理时会丧失。表位通常包括处于独特的空间构型的至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个氨基酸。确定表位空间构型的方法包括本领域的技术和此处所描述的技术,例如,X 射线晶体学和二维核磁共振。参见,例如 Epitopes Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)。

[0086] 本发明还包括结合与本发明的抗体相同或重叠的表位的抗体(即竞争结合 ErbB3 的抗体)或结合与此处所描述的抗体所结合的表位重叠的表位(即位于 ErbB3 结构域 I 上的表位)的抗体。可以使用常规技术(例如免疫分析,比如表明一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力,即竞争结合分析)来确认识别相同的表位的抗体。竞争结合在其中所测试的免疫球蛋白抑制基准抗体对共同抗原(例如 ErbB3)的特异性结合的分析中确定。已知存在许多种竞争结合分析,例如固相直接或间接放射免疫分析(RIA)、固相直接或间接酶免疫分析(EIA)、夹心竞争分析(参见 Stahli 等人, (1983) Methods in Enzymology 9:242)、固相直接生物素-抗生物素蛋白 EIA(参见 Kirkland 等人 (1986) J. Immunol. 137:3614)、固相直接标记分析、固相直接标记夹心分析(参见 Harlow 和 Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press)、使用 I-125 标记物的固相直接标记 RIA(参见 Morel 等人 (1988) Mol. Immunol. 25(1):7)、固相直接生物素-抗生物素蛋白 EIA(Cheung 等人 (1990) Virology 176:546) 和直接标记 RIA(Moldenhauer 等人, (1990) Scand. J. Immunol. 32:77)。通常,这样的分析涉及使用与携带未标记的测试免疫球蛋白和标记的基准免疫球蛋白中的任一种的固相表面或细胞相结合的纯化抗原(例如 ErbB3)。通过确定在存在测试免疫球蛋白的情况下与固相表面或细胞相结合的标记物的量来测量竞争抑制。通常测试免疫球蛋白过量存在。通常,当竞争抗体过量存在时,其会抑制基准抗体与共同抗原的特异性结合至少 50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75% 或更多。

[0087] 此处所使用的术语“特异性的结合”、“特异性结合”、“选择性的结合”和“选择性结合”是指抗体或其抗原结合部分对特定的抗原或表位表现出可感知的亲和力,且通常不表现出与其它抗原或表位的显著的交叉反应性。“可感知的”或优选的结合包括亲和力为至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9M^{-1} 或 10^{10}M^{-1} 的结合。大于 10^7M^{-1} 、优选为 10^8M^{-1} 的亲和力为更优选的。本发明的范围还包括此处所列的这些值之间的值,优选的结合亲和力可以表示为亲和力的范围,例如 10^6 至 10^{10}M^{-1} 、优选为 10^7 至 10^{10}M^{-1} 、更优选为 10^8 至 10^{10}M^{-1} 。“不表现出显著的交叉反应性”的抗体为不会与不希望的实体(例如不希望的蛋白质实体)可感知地结合的抗体。例如,在一个实施方式中,与 ErbB3 特异性结合的抗体或其抗原结合部分可感知地与该 ErbB3 分子相结合,而不会显著地与其它 ErbB 分子及非 ErbB 蛋白质或肽反应。可根据任何本领域公认确定特异性或选择性结合的方式来确定这样的结合,包括,例如根据斯卡查

德分析和 / 或竞争结合分析确定特异性或选择性结合。

[0088] 此处所使用的术语“ K_D ”是指特定的抗体-抗原相互作用的解离平衡常数或抗体对于抗原的亲和力。在一个实施方式中,使用表面等离子共振分析或细胞结合分析所测量到的本发明的抗体或其抗原结合部分与抗原(例如 ErbB3)相结合的亲和力(K_D)为 50nM 或更好(即,更小)(例如 40nM 或 30nM 或 20nM 或 10nM 或更小)。在特定的实施方式中,使用表面等离子共振分析或细胞结合分析所测量到的本发明的抗体或其抗原结合部分与 ErbB3 相结合的亲和力(K_D)为 8nM 或更好(例如 7nM、6nM、5nM、4nM、2nM、1.5nM、1.4nM、1.3nM、1nM 或更小)。在其它实施方式中,当使用表面等离子共振 (SPR) 技术在 BIACORE 3000 仪中使用重组 ErbB3 作为分析物以及使用抗体作为配体进行测定时,抗体或其抗原结合部分与抗原(例如 ErbB3)相结合的亲和力(K_D)大约小于 $10^{-7}M$,例如大约小于 $10^{-8}M$, $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$ 或甚至更小;并且,抗体或其抗原结合部分以至少为与非特异性的抗原(例如 BSA、酪蛋白)(预先确定的抗原或其密切相关的抗原以外的抗原)结合的亲和力的两倍的亲和力与预先确定的抗原相结合。

[0089] 此处所使用的术语“ K_{off} ”是指抗体从抗体 / 抗原复合物解离的解离速率常数。

[0090] 此处所使用的术语“EC50”是指在体外或体内分析中,诱导出最大响应的 50% 响应(即最大响应与基线的中间值)的抗体或其抗原结合部分的浓度。

[0091] 如此处所使用的,“糖基化模式”定义为与蛋白质(更具体地,与免疫球蛋白蛋白质)共价结合的糖单元模式。

[0092] 此处所使用的用于某一物体的术语“天然发生的”是指某一物体可以在自然界中发现的事实。例如,存在于可以从自然界的来源中分离出来且没有在实验室中经过人类进行有意改变的生物体(包括病毒)中的多肽或多核苷酸序列为天然发生的。

[0093] 此处所使用的术语“重排的”是指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型,其中,在实质上编码完整的 V_H 或 V_L 结构域的构型中, V 片段分别紧挨着 D-J 或 J 片段。重排的免疫球蛋白基因座可以通过与种系 DNA 相比较进行识别;重排的基因座将具有至少一个重组的七聚体 / 九聚体同源元件。

[0094] 此处所使用的涉及 V 片段的术语“未重排的”或“种系构型”是指其中 V 片段未经重组以至于紧挨着 D 或 J 片段的构型。

[0095] 此处所使用的术语“核酸分子”意图包括 DNA 分子和 RNA 分子。核酸分子可以是单链或双链的,但是优选为双链 DNA。

[0096] 此处所使用的涉及编码与 ErbB3 相结合的抗体或抗体部分(例如 V_H 、 V_L 、CDR3)的核酸的术语“分离的核酸分子”是指其中编码抗体或抗体部分的核苷酸序列不含编码与 ErbB3 之外的抗原相结合的抗体的其它核苷酸序列的核酸分子,该其它序列在人基因组 DNA 中可能天然侧邻该核酸。

[0097] 此处所使用的术语“修饰的”或“修饰”是指在抗体或其抗原结合部分中改变一个或更多个氨基酸。改变可以通过在一个或多个位点添加、置换或删除氨基酸实现。可以通过已知的技术来实现改变,例如 PCR 诱变。例如,在一些实施方式中,使用本发明的方法识别的抗体或其抗原结合部分可以进行修饰,从而改变抗体或其抗原结合部分对 ErbB3 的结合亲和力。

[0098] 本发明在本发明的抗体序列中还包含“保守氨基酸置换”,即不会损害该核苷酸序

列编码的抗体或包含该氨基酸序列的抗体对抗原（即 ErbB3）的结合的核苷酸和氨基酸序列修饰。保守氨基酸置换包括一个类型的氨基酸被相同类型的氨基酸置换，其中所述类型由共同的氨基酸侧链物理化学性质以及自然界中发现的同源蛋白质中的高置换频率确定，例如通过标准 Dayhoff 频率交换矩阵（frequency exchange matrix）或 BLOSUM 矩阵确定的。氨基酸侧链被分为六大类，并包括 I 类（Cys）；II 类（Ser, Thr, Pro, Ala, Gly）；III 类（Asn, Asp, Gln, Glu）；IV 类（His, Arg, Lys）；V 类（Ile, Leu, Val, Met）和 VI 类（Phe, Tyr, Trp）。例如，Asp 置换另一 III 类的残基（例如 Asn、Gln 或 Glu）为保守置换。因此，在抗 ErbB3 抗体中预计的非关键氨基酸残基优选使用同一类中的另一氨基酸残基进行取代。识别不消除抗原结合的核苷酸和氨基酸保守置换的方法是本领域公知的（参见，例如 Brummell 等人 Biochem. 32:1180-1187(1993)；Kobayashi 等人 Protein Eng. 12(10):879-884(1999)；和 Burks 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417(1997)）。

[0099] 术语“非保守氨基酸置换”是指一类的氨基酸被另一类的氨基酸置换；例如，使用 III 类的残基（例如 Asp、Asn、Glu 或 Gln）来置换 II 类的残基 Ala。

[0100] 或者，在另一个实施方式中，可以沿着整个或部分抗 -ErbB3 抗体编码序列随机引入突变（保守或非保守），例如通过饱和诱变，且得到的修饰的抗 -ErbB3 抗体可以针对其结合活性进行筛选。

[0101] “共有序列”为相关序列的族中最常见的氨基酸（或核苷酸）形成的序列（参见，例如 Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987)。在蛋白质家族中，共有序列中的各位置都由家族中在该位置中最常见的氨基酸占据。如果两个氨基酸出现的频率相同，在该共有序列中可以包含其中的任一个。免疫球蛋白的“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。

[0102] 同样地，CDR 的共有序列可以通过本发明的 ErbB3 抗体的 CDR 氨基酸序列的最优比对得到。

[0103] 对于核酸而言，术语“基本同源性”是指当进行优化比对或对比时，两个核酸或其指定序列有至少大约 80% 的核苷酸是相同的，通常至少大约 90% 至 95%、更优选为至少大约 98% 至 99.5% 的核苷酸是相同的，其具有适当的核苷酸插入或缺失。或者，片断在选择性杂交条件下与互补链杂交时存在基本同源性。

[0104] 两个核苷酸序列之间的百分同一性是该序列共有的相同位置数的函数（即，% 同源性 = 相同的位置数 / 总位置数 × 100），同时考虑在对两个序列进行最优比对时需要引入的空位（gap）的数目和各空位的长度。序列的对比和两个序列间百分同一性的确定可以使用下述非限定性的实施例所描述的数学算法来完成。

[0105] 可以采用 GCG 软件的 GAP 程序，使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和 40、50、60、70 或 80 的空位权重和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重，确定两个核苷酸序列间的百分同一性。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分同一性也可以使用已经引入 ALIGN 程序（版本 2.0）中的 E. Meyers 和 W. Miller 的算法（CABIOS, 4:11-17(1989)）、使用 PAM120 残基权重表（weight residue table）、12 的空位长度罚分和 4 的空位罚分来确定。此外，两个氨基酸序列之间的百分同一性可以使用已经引入到 GCG 软件包的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch 算法（J. Mol. Biol. (48):444-453(1970)）、使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵及 16、14、12、10、8、6 或 4 的空位权重和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来确定。

[0106] 本发明的核酸和蛋白质序列还可以进一步用作“探询序列”对公众数据库进行检索,例如来识别相关序列。这样的检索可以使用 Altschul 等人 (1990) J. Mol. Biol. 215 : 403-10 的 NBLAST 和 XBLAST 程序 (版本 2.0) 进行。BLAST 核苷酸检索可以使用 NBLAST 程序进行 (分数 = 100, 字长 = 12) 以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白质检索可以使用 XBLAST 程序进行 (分数 = 50, 字长 = 3) 以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以使用如 Altschul 等人 (1997) Nucleic Acids Res. 25(17) :3389-3402 中描述的空位 BLAST。当使用 BLAST 和空位 BLAST 程序时,可以使用各程序 (例如 XBLAST 和 NBLAST) 的默认参数。

[0107] 核酸可以存在于完整细胞中、细胞溶解产物中或以部分纯化或完全纯化的形式存在。当使用标准技术 (包括碱 /SDS 处理、CsCl 显带、柱色谱法、琼脂糖凝胶电泳和其它本领域公知的技术) 从其它细胞组分或其它污染物 (例如其它细胞核酸或蛋白质) 中纯化出来时,核酸为“分离的”或“基本上纯的”。参见, F. Ausubel 等人, ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)。

[0108] 尽管本发明的核酸组合物通常为天然序列 (除了修饰的限制性位点等),但来自 cDNA、基因组或其混合物的本发明的核酸组合物可以按照标准技术进行突变来提供基因序列。对于编码序列,这些突变可以按照需要来影响氨基酸序列。特别地,可以设想与天然的 V、D、J、恒定序列、转换序列和其它此处所描述的这类序列同源的或源自它们的 DNA 序列 (其中“源自”表示一个序列与另一序列相同或由另一序列修饰得到)。

[0109] 术语“可操作地连接的”是指核酸序列与另一核酸序列具有功能性的关系。例如,如果前序列或分泌性前导体的 DNA 表达为参与多肽分泌的前蛋白,则该前序列或分泌性前导体的 DNA 可操作地与该多肽的 DNA 相连接;如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则该启动子或增强子可操作地与该编码序列相连接;或者如果核糖体结合位点的位置促进翻译,则该核糖体结合位点可操作地与编码序列相连接。通常,“可操作地连接”是指相连的 DNA 序列为相邻的,且在分泌性前导体的情况中,相连的 DNA 序列是相邻的并处于阅读相 (reading phase) 中。但是,增强子并非一定是相邻的。通过在方便的限制性位点的接合完成连接。如果不存在这样的位点的话,可根据常规操作使用合成的寡核苷酸接头或连接体。当核酸和另一核酸序列具有功能性的关系时,该核酸是“可操作地连接的”。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,该启动子或增强子可操作地与该编码序列连接。当涉及转录调控序列时,可操作地连接是指连接的 DNA 序列是相邻的,且在需要合并两个蛋白质编码区时,连接的 DNA 序列是相邻的并处于阅读框中。对于转换序列而言,可操作地连接是指该序列能够实现转换重组。

[0110] 此处所使用的术语“载体”是指能够转运与其连接的另一个核酸的核酸分子。载体的一种类型为“质粒”,其是指附加的 DNA 片断可接合到其中的环形双链 DNA 环。另一种载体类型是病毒载体,其中附加的 DNA 片断可以接合到病毒基因组中。特定的载体能够在其进入的宿主细胞内进行自主复制 (例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离型 (episomal) 哺乳动物载体)。其它的载体 (例如,非游离型哺乳动物载体) 可以在引入宿主细胞时整合到宿主细胞的基因组中,从而可以与宿主基因组一起进行复制。此外,特定的载体能够引导与它们可操作地连接的基因的表达。这样的载体被此处称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般而言,在重组 DNA 技术中应用的表达载体通常是质粒的形式。术语“质

粒”和“载体”可互换使用。但是，本发明意图包括这类其它形式的表达载体，例如病毒载体（例如，复制缺陷型反转录病毒、腺病毒和腺相关病毒），它们都具有等同的功能。

[0111] 此处所使用的术语“重组宿主细胞”（或简称“宿主细胞”）是指引入重组表达载体的细胞。需要明白的是，这些术语并不仅指特定的所述细胞，还指这些细胞的后代。由于突变或环境影响导致在后代中可能会出现某些改变，因而事实上，这些后代可能与母细胞不相同，但是它们仍然包括在此处所使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0112] 此处所使用的术语“治疗 (treat)”、“治疗 (treating)”和“治疗 (treatment)”是指此处所描述的治疗性或预防性措施。“治疗”方法包括对受试者（例如，患有与 ErbB3 依赖性信号传导相关的疾病或障碍或倾向患有这样的疾病或障碍的受试者）给予本发明的抗体或其抗原结合部分，从而预防、治疗、延迟该疾病或障碍或该疾病或障碍的复发、或降低其严重性，或减轻该疾病或障碍或该疾病或障碍的一种或多种症状，或者从而延长受试者的存活时间超过不接受这种治疗时预期的时间。

[0113] 此处所使用的术语“与 ErbB3 依赖性信号传导相关的疾病”或“与 ErbB3 依赖性信号传导相关的障碍”包括如下疾病状态和 / 或与疾病状态相关的症状，其中发现 ErbB3 水平升高和 / 或涉及 ErbB3 的细胞级联的激活。已经知道当发现 ErbB3 水平升高时，ErbB3 与其它 ErbB 蛋白质（例如 EGFR 和 ErbB2）形成异二聚体。因此，术语“与 ErbB3 依赖性信号传导相关的疾病”还包括其中发现 EGFR/ErbB3 和 / 或 ErbB2/ErbB3 异二聚体的水平升高的疾病状态和 / 或与疾病状态相关的症状。一般而言，“与 ErbB3 依赖性信号传导相关的疾病”是指任何需要 ErbB3 参与的障碍、发作、发展或症状的持续。示例性的 ErbB3 介导的障碍包括，但不局限于例如癌症。

[0114] 术语“癌症”和“癌性”指的是或描述的是通常以失控的细胞生长为特征的哺乳动物的生理状况。癌症的例子包括，但不局限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。这样的癌症的更特定的例子包括扁平细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃癌、胰腺癌、胶质细胞肿瘤（例如成胶质细胞瘤和神经纤维瘤）、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、黑素瘤、结肠直肠癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肾脏癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和各种类型的头部和颈部癌症。在特定的实施方式中，使用本发明的方法治疗或诊断的癌症选自黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、胃肠 / 结肠癌、肺癌和前列腺癌。

[0115] 此处所使用的术语“有效的量”是指当给予受试者时，如此处所描述的结合 ErbB3 的抗体或其抗原结合部分足以发挥治疗、预后或诊断与 ErbB3 依赖性信号传导相关的疾病的作用的量。治疗有效量根据接受治疗的受试者和疾病、受试者的体重和年龄、疾病状态的严重性、给药方式等的不同而变化，本领域的普通技术人员可以很容易确定治疗有效量。根据本发明，给药剂量的范围可以为大约 1ng 至大约 10000mg、大约 5ng 至大约 9500mg、大约 10ng 至大约 9000mg、大约 20ng 至大约 8500mg、大约 30ng 至大约 7500mg、大约 40ng 至大约 7000mg、大约 50ng 至大约 6500mg、大约 100ng 至大约 6000mg、大约 200ng 至大约 5500mg、大约 300ng 至大约 5000mg、大约 400ng 至大约 4500mg、大约 500ng 至大约 4000mg、大约 1 μ g 至大约 3500mg、大约 5 μ g 至大约 3000mg、大约 10 μ g 至大约 2600mg、大约 20 μ g 至大约 2575mg、大约 30 μ g 至大约 2550mg、大约 40 μ g 至大约 2500mg、大约 50 μ g 至大约 2475mg、大约 100 μ g 至大约 2,450mg、大约 200 μ g 至大约 2425mg、大约 300 μ g 至大约 2000mg、大约 400 μ g 至大约 1175mg、大约 500 μ g 至大约 1,150mg、大约 0.5mg 至大约 1125mg、大约 1mg

至大约 1100mg、大约 1.25mg 至大约 1075mg、大约 1.5mg 至大约 1050mg、大约 2.0mg 至大约 1025mg、大约 2.5mg 至大约 1000mg、大约 3.0mg 至大约 975mg、大约 3.5mg 至大约 950mg、大约 4.0mg 至大约 925mg、大约 4.5mg 至大约 900mg、大约 5mg 至大约 875mg、大约 10mg 至大约 850mg、大约 20mg 至大约 825mg、大约 30mg 至大约 800mg、大约 40mg 至大约 775mg、大约 50mg 至大约 750mg、大约 100mg 至大约 725mg、大约 200mg 至大约 700mg、大约 300mg 至大约 675mg、大约 400mg 至大约 650mg、大约 500mg 或大约 525mg 至大约 625mg 的抗体或其抗原结合部分。可以调整给药方案以提供最佳治疗反应。有效量也是抗体或其抗原结合部分的任何毒性或有害效应（即副作用）最小和 / 或被有益效果远远超过的量。

[0116] 术语“患者”包括接受预防或治疗处理的人和其它哺乳动物受试者。

[0117] 此处所使用的术语“受试者”包括任何人或非人类动物。例如，本发明的方法和组合物可用于治疗患有癌症的受试者。在特定的实施方式中，受试者是人。术语“非人类动物”包括所有脊椎动物，例如哺乳动物或非哺乳动物，例如非人类灵长类、羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0118] 术语“样品”是指来自患者或受试者的组织、体液或细胞。通常组织或细胞会从患者身上取出，但是也可能进行体内诊断。在实体肿瘤的情况下，组织样品可以从通过手术取出的肿瘤取得并通过常规技术制备以进行测试。在淋巴瘤和白血病的情况下，可以获得淋巴细胞、白血病细胞或淋巴组织并适当地制备。其它的患者样品（包括尿、眼泪、血清、脑脊髓液、粪便、痰、细胞提取液等）也可用于特定的肿瘤。

[0119] 术语“抗癌剂”和“抗肿瘤剂”是指用于治疗恶性肿瘤（例如癌生长）的药物。药物治疗可以单独使用，也可以与其它治疗（例如手术或放射治疗）联合使用。取决于所涉及的器官的性质，可以在癌症治疗中使用几类药物。例如，乳腺癌通常受到雌激素的刺激，因此可以使用灭活性激素的药物来治疗。同样地，前列腺癌可以使用灭活雄激素（雄性的性激素）的药物治疗。本发明的抗癌剂特别包括下述物质：

[0120]

抗癌剂	注释	例子
抗体	与 IGF-1R (胰岛素样生长因子 I 型受体) 结合的抗体, 其在大多数癌细胞表面上表达	A12 (完全人源化 mAb) 19D12 (完全人源化 mAb) CP751-871 (完全人源化 mAb) H7C10 (人源化 mAb)
抗体以外的其它抗体; 和		α IR3 (小鼠) scFV/FC (小鼠/人嵌合体) EM/164 (小鼠)
(b) 与不同表位结合的抗 ErbB3 抗体	结合 EGFR (表皮生长因子受体) 的受体; 影响 EGFR 表达或活性的突变可能导致癌症	马妥珠单抗 (Matuzumab) (EMD72000) 爱必妥®/西妥昔单抗 (Cetuximab) (Imclone) Vectibix®/帕尼单抗 (Panitumumab) (Amgen) mAb 806 尼妥珠单抗 (Nimotuzumab) (TheraCIM)
	结合 cMET (间充质上皮转化因子) 的抗体; 受体酪氨酸激酶 MET 家族的成员	AVEO (AV299) (AVEO) AMG102 (Amgen) 5D5 (OA-5D5) (Genentech)
靶向 IGF1R 的小分子	与不同表位结合的抗 ErbB3 抗体 IGF-1R (胰岛素样生长因子 1 型受体), 其在大多数癌细胞表皮上表达	此处描述的 Ab #14 (MM 121-14) Herceptin® (曲妥珠单抗) (Trastuzumab); Genentech) 1B4C3; 2D1D12 (U3 Pharma AG) NVP-AEW541-A BMS-536,924(1H-苯并咪唑-2-基)-1H-吡啶-2-酮)

		BMS-554,417
		环木脂体(Cycloligan)
		TAE226
		PQ401
靶向 EGFR 的	EGFR (表皮生长因子受体); 影响	Iressa®/吉非替尼(AstraZeneca)
小分子	EGFR 表达或活性的突变可能导致	CI-1033 (PD 183805) (Pfizer)
	癌症	拉帕替尼 (GW-572016)
		(GlaxoSmithKline)
		Tykerb®/ 二甲苯磺酸拉帕替尼
		(SmithKline Beecham)
		Tarceva®/埃罗替尼(Erlotinib) HCl
		(OSI-774) (OSI Pharma)
		PKI-166 (Novartis)
		PD-158780
		EKB-569
		酪氨酸磷酸化抑制剂(Tyrphostin)
		AG 1478 (4-(3-氯苯胺基)-6,7-二甲
		氧基喹啉)
靶向 cMET 的	cMET (间充质上皮转化因子); 受	PHA665752
小分子	体酪氨酸激酶 MET 家族成员	ARQ 197
抗代谢物	抗代谢物为与正常生化反应所需的	氟尿嘧啶(5-FU)
	物质 (代谢物) 具有相似的结构、	卡培他滨/XELODA® (HLR Roche)
	但其不同足以干扰细胞的正常功能	5-三氟甲基-2'-脱氧尿苷
	(包括细胞分裂) 的化合物	甲氧蝶呤钠(Trexall) (Barr)
		雷替曲塞 / Tomudex®
		(AstraZeneca)
		培美曲塞 (Pemetrexed)/Alimta®
		(Lilly)
		替加氟

[0121]

烷化剂

烷化抗肿瘤剂为将烷基连接到 DNA 上的烷化剂。由于通常癌细胞与正常细胞相比更加没有限制地增殖，癌细胞对 DNA 损伤更加敏感，因而烷化剂在临床上用于治疗多种肿瘤。

阿糖胞苷(阿糖胞苷,
Ara-C)/Thioguanine®
(GlaxoSmithKline)
5-氮杂胞苷
6-巯嘌呤(巯嘌呤, 6-MP)
咪唑硫嘌呤 /Azasan®
(AAIPHARMA LLC)
6-硫鸟嘌呤 (6-TG)/Purinethol®
(TEVA)
喷司他丁 (Pentostatin)/Nipent®
(Hospira Inc.)
磷酸氟达拉滨 /Fludara® (Bayer
Health Care)
克拉曲滨 (2-CdA, 2-氯脱氧腺
苷)/Leustatin® (Ortho Biotech)
核糖核苷酸还原酶抑制剂(RNR)
环磷酰胺/Cytosan (BMS) Neosar
(TEVA)
异环磷酰胺 /Mitoxana® (ASTA
Medica)
塞替派(Bedford, Abraxis, Teva)
BCNU→ 1,3 -双(2-氯乙基)-1-亚硝
基脲
CCNU→ 1, -(2-氯乙基)-3-环己基-1-
亚硝基脲(甲基 CCNU)
六甲三聚氰胺(六甲蜜胺, HMM)
/Hexalen® (MGI Pharma Inc.)
白消安/马利兰(GlaxoSmithKline)
盐酸甲基苄胍 /Matulane (Sigma

[0122]

		Tau Pharmaceuticals, Inc.)
		达卡巴嗪 (DTIC)
		苯丁酸氮芥 /Leukaran® (SmithKline Beecham)
		马法兰 /Alkeran® (GlaxoSmithKline)
		顺铂 (Cisplatinum, CDDP)/顺氯氨铂 (Bristol Myers)
		卡铂/伯尔定 (Paraplatin) (BMS)
		奥沙利铂 /Eloxitan® (Sanofi-Aventis US)
拓扑异构酶抑制剂	拓扑异构酶抑制剂为设计用于干扰拓扑异构酶 (异构酶 I 和 II) 活性的化学治疗剂, 拓扑异构酶是在正常的细胞周期中通过催化 DNA 链的磷酸二酯骨架的断裂和重新连接控制 DNA 结构的变化的酶。	盐酸多柔比星/ Doxil® (Alza) 柠檬酸柔红霉素 /Daunoxome® (Gilead) 盐酸米托蒽醌/Novantrone (EMD Serono) 放线菌素 D 依托泊甙 /Vepesid® (BMS)/Etopophos® (Hospira, Bedford, Teva Parenteral 等) 盐酸拓扑替康 /Hycamtin® (GlaxoSmithKline) 替尼泊甙 (VM-26)/Vumon® (BMS) 盐酸伊立替康 (CPT-11)/Camptosar® (Pharmacia & Upjohn)
微管靶向剂	微管是细胞骨架组分中的一种。在神经细胞轴突中它们的直径为 ~ 24 nm, 长度为几微米至可能几毫米。	长春碱/ Oncovin® (Lilly) 长春碱硫酸盐 /Velban® (停止) (Lilly)

[0123]

	微管作为细胞内的结构性组分，并参与许多细胞过程，包括有丝分裂、胞质分裂和囊泡运输。	酒石酸长春瑞滨 /Navelbine® (PierreFabre) 硫酸长春地辛/ Eldisine® (Lilly) 紫杉醇/ Taxol® (BMS) 多西他赛 /Taxotere® (Sanofi Aventis US) 纳米颗粒紫杉醇 (ABI-007)/Abraxane® (Abraxis BioScience, Inc.) 伊沙匹隆 (Ixabepilone)/IXEMPRA™ (BMS)
激酶抑制剂	酪氨酸激酶为在细胞内将磷酸基团连接到氨基酸酪氨酸上的酶。通过阻断蛋白质酪氨酸激酶的功能，这些化合物提供了一种控制癌细胞生长的工具。	甲磺酸伊马替尼 / Gleevec (Novartis) 苹果酸舒尼替尼/Sutent® (Pfizer) 甲苯磺酸索拉非尼/Nexavar® (Bayer) 盐酸尼洛替尼一水合物/Tasigna® (Novartis)
蛋白合成抑制剂	诱导细胞凋亡	L-天冬酰胺酶/Elspar® (Merck & Co.)
免疫治疗剂	诱导癌症患者发挥免疫响应力	α 干扰素 血管发生抑制剂 /Avastin® (Genentech) IL-2→ 白细胞介素 2 (Aldesleukin)/Proleukin® (Chiron) IL-12-> 白细胞介素 12
激素	与绝经和老化相关的激素治疗试图提高身体中特定激素的量来补偿年龄或疾病相关的激素降低。作为癌	柠檬酸托瑞米芬/Fareston® (GTX, Inc.) 氟维斯群/Faslodex® (AstraZeneca)

[0124]

症治疗的激素疗法或者降低了特定 激素的水平，或者改变了癌细胞利 用这些激素来生长和扩散的能力。		盐酸雷洛昔芬/Evista® (Lilly) 阿那曲唑 (Anastrozole)/Arimidex® (AstraZeneca)
		来曲唑/ Femara® (Novartis)
		法偭唑(Fadrozole) (CGS16949A)
		依西美坦/Aromasin® (Pharmacia & Upjohn)
		醋酸亮丙瑞林 /Eligard® (QTL USA) Lupron® (TAP Pharm.)
		醋酸戈舍瑞林 /Zoladex® (AstraZeneca)
		双羟奈酸曲普瑞林 /Trelstar® (Watson Labs)
		布舍瑞林 (Buserelin)/Suprefact® (Sanofi Aventis)
		那法瑞林
		西曲瑞克 (Cetrorelix)/Cetrotide® (EMD Serono)
		比卡鲁胺/Casodex® (AstraZeneca)
		尼鲁米特 /Nilandron® (Aventis Pharm.)
		醋酸甲地孕酮/ Megace® (BMS)
		生长抑素类似物(醋酸奥曲肽 /Sandostatin® (Novartis))
糖皮质激素	用于降低引起癌症疼痛的肿胀的抗 炎药物	泼尼松龙 地塞米松/Decadron® (Wyeth)
芳香化酶 (aromatase) 抑	包括咪唑	酮康唑
制剂		
[0125]		

mTOR 抑制剂 mTOR 信号传导途径在免疫抑制剂 西罗莫司(雷帕霉素)/Rapamune®
雷帕霉素的研究中最早发现。该高 (Wyeth)
度保守的途径调节细胞增殖以及响 西罗莫司脂化物(Temsirolimus)
应于环境因素的代谢,从而通过磷 (CCI-779)/Torisel® (Wyeth)
酸肌醇-3-激酶(PI-3K)将细胞生 Deforolimus (AP23573) (Ariad
长因子受体信号传导与细胞生长、 Pharm.)
增殖和血管发生联系起来。 依 维 莫 司 (Everolimus)

化学治疗剂

(RAD001)/Certican® (Novartis)
阿霉素、5-氟尿嘧啶、细胞毒素、
博来霉素、丝裂菌素 C、道诺霉素、
洋红霉素、氨喋呤、放线菌素 D、
丝裂菌素、埃斯培拉霉素

[0126] 一种或多种抗癌剂可以同时施用,或者在施用本发明的抗体或其抗原结合部分之前或之后施用。

[0127] 本发明的各个不同的方面将会在下述部分中进行更详细的阐述。

[0128] II. 制备本发明抗体的方法

[0129] (i) 单克隆抗体

[0130] 本发明的单克隆抗体可以通过多种已知技术进行制备,例如 Kohler 和 Milstein(1975)Nature 256:495 中描述的标准体细胞杂交技术、B 淋巴细胞的病毒或致瘤性转化或使用人抗体基因库的噬菌体展示技术。在特定的实施方式中,抗体为完全的人单克隆抗体。

[0131] 因此,在一个实施方式中,杂交瘤方法用于制备与 ErbB3 相结合的抗体。在这个方法中,小鼠或其它适当的宿主动物可以使用合适的抗原进行免疫,以诱导产生或能够产生与用于免疫的抗原特异性结合的抗体的淋巴细胞。或者,淋巴细胞可以在体外进行免疫。然后使用合适的融合剂(例如聚乙二醇),淋巴细胞可以与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。分析杂交瘤细胞在其中生长的培养基以检测针对抗原的单克隆抗体的生成。在确认杂交瘤细胞产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体之后,克隆可以通过有限稀释过程进行亚克隆化,并使用标准方法进行生长(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986))。用于此目的的合适的培养基包括,例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,杂交瘤细胞可以在动物体内作为腹水肿瘤生长。亚克隆分泌的单克隆抗体可以从培养基、腹水液或血清中通过常规免疫球蛋白纯化过程(例如,举例来说,蛋白 A-琼脂糖、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法)分离出来。

[0132] 在另一个实施方式中,与 ErbB3 相结合的抗体和抗体部分可以从抗体噬菌体

库中分离出来,该噬菌体库是使用例如 McCafferty 等人, Nature, 348 :552-554(1990), Clackson 等人, Nature, 352 :624-628(1991), Marks 等人, J. Mol. Biol., 222 :581-597(1991) 和 Hoet 等人 (2005) Nature Biotechnology 23, 344-348 ;Ladner 等人的美国专利 No. 5, 223, 409 ;5, 403, 484 ;和 5, 571, 698 ;Dower 等人的美国专利 No. 5, 427, 908 和 5, 580, 717 ;U. S. McCafferty 等人的美国专利 No. 5, 969, 108 和 6, 172, 197 ;及 Griffiths 等人的美国专利 No. 5, 885, 793 ;6, 521, 404 ;6, 544, 731 ;6, 555, 313 ;6, 582, 915 和 6, 593, 081 中描述的技术产生的。此外,还可以使用通过链改组 (Marks 等人, Bio/Technology, 10 :779-783(1992)) 以及作为用于构建非常大的噬菌体库的策略的组合感染和体内重组 (Waterhouse 等人, Nuc. Acids. Res., 21 :2265-2266(1993)) 产生高亲和力 (nM 范围) 人抗体。

[0133] 在特定的实施方式中,使用 Hoet 等人(同上)描述的噬菌体展示技术制备与 ErbB3 相结合的抗体或其抗原结合部分。这项技术涉及产生具有从人类供体分离出来的免疫球蛋白序列的独特组合并在重链 CDR 中具有合成多样性的人 Fab 库。这个库然后用于筛选与 ErbB3 相结合的 Fab。

[0134] 在再另一个实施方式中,可以使用携带部分人免疫系统而不是小鼠免疫系统的转基因或转染色体小鼠产生针对 ErbB3 的人单克隆抗体(参见,例如 Lonberg 等人 (1994) Nature 368(6474) :856-859 ;Lonberg, N. 等人 (1994), 同上 ;reviewed in Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113 :49-101 ;Lonberg, N. 和 Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13 :65-93, 及 Harding, F. 和 Lonberg, N. (1995) Ann. NY. Acad. Sci. 764 :536-546。进一步参见 Lonberg 和 Kay 的美国专利 No. 5, 545, 806 ;5, 569, 825 ;5, 625, 126 ;5, 633, 425 ;5, 789, 650 ;5, 877, 397 ;5, 661, 016 ;5, 814, 318 ;5, 874, 299 和 5, 770, 429 ;Surani 等人的美国专利 No. 5, 545, 807 ;Lonberg 和 Kay 的 PCT 公布 No. WO 92/03918, WO 93/12227, WO94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 和 WO 99/45962 ;及 Korman 等人的 PCT 公布 No. WO 01/14424)。

[0135] 在另一个实施方式中,可以使用在转基因或转染色体上携带人免疫球蛋白序列的小鼠(例如携带人重链转基因和人轻链转染色体的小鼠)产生本发明的人抗体(参见,例如 Ishida 等人的 PCT 公布 WO 02/43478)。

[0136] 再进一步,表达人免疫球蛋白基因的可选的转基因动物系统是本领域可获得的,并可用于产生本发明的抗 ErbB3 抗体。例如,可以使用称作 Xenomouse (Abgenix, Inc.) 的可选转基因系统;这样的小鼠在例如 Kucherlapati 等人的美国专利 No. 5, 939, 598 ;6, 075, 181 ;6, 114, 598 ;6, 150, 584 和 6, 162, 963 中有所描述。

[0137] 此外,表达人免疫球蛋白基因的可选的转染色体动物系统是本领域可获得的,并可用于产生本发明的抗 ErbB3 抗体。例如,可以使用携带人重链转染色体和人轻链转染色体的小鼠;如 Tomizuka 等人 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 :722-727 中所述。此外,携带人重链和轻链转染色体的牛在本领域中也有所描述 (Kuroiwa 等人 (2002) Nature Biotechnology 20 :889-894),并可用于产生本发明的抗 ErbB3 抗体。

[0138] 在再另一个实施方式中,可以使用产生这样的抗体的转基因植物和/或培养的植物细胞(例如,举例来说,烟草、玉米和浮萍)来制备本发明的抗体。例如,表达抗体或其抗原结合部分的转基因烟草叶可通过例如使用诱导型启动子(参见,例如 Cramer 等

人, Curr. Top. Microbol. Immunol. 240 :95118(1999)) 被用于制备这样的抗体。同样, 转基因玉米也可被用于表达这样的抗体及其抗原结合部分(参见, 例如 Hood 等人, Adv. Exp. Med. Biol. 464 :127-147(1999))。还可以从包括抗体部分(例如单链抗体(scFv's)的转基因植物种子, 例如使用烟草种子或马铃薯茎, 大量制备抗体(参见, 例如 Conrad 等人, Plant Mol. Biol. 38 :101-109(1998))。在植物中制备抗体或抗原结合部分的方法可以参见例如 Fischer 等人, Biotechnol. Appl. Biochem. 30 :99108(1999), Ma 等人, Trends Biotechnol. 13 :522-7(1995); Ma 等人, Plant Physiol. 109 :341-6(1995); Whitelam 等人, Biochem. Soc. Trans. 22 :940-944(1994) 和美国专利 No. 6, 040, 498 和 6, 815, 184。

[0139] 可以通过免疫沉淀或体外结合分析(例如辐射免疫分析(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))确定使用任何技术(包括此处所述的技术)制备的与 ErbB3 相结合的单克隆抗体或其部分的结合特异性。还可以通过 Munson 等人, Anal. Biochem., 107 :220(1980) 的斯卡查德分析来确定单克隆抗体或其部分的结合亲和力。

[0140] 在特定实施方式中, 使用上述任何方法制备的 ErbB3 抗体或其部分可以通过本领域公认的技术(例如那些此处所描述的技术)进一步进行改造或优化, 以获得所需的结合特异性和/或亲和力。

[0141] 在一个实施方式中, 源自 ErbB3 抗体的部分抗体序列可用于制备结构上和功能上相关的抗体。例如, 抗体主要通过位于六个重链和轻链互补性决定区(CDR)中的氨基酸残基与靶抗原相互作用。由于这个原因, 在抗体个体之间 CDR 中的氨基酸序列比 CDR 外的序列更多样化。由于 CDR 序列负责大部分的抗体-抗原相互作用, 通过构建包括嫁接到来自具有不同性质的不同载体的框架序列上的来自特定的天然发生抗体的 CDR 序列的表达载体(参见, 例如, Riechmann, L. 等人, 1998, Nature 332 :323-327; Jones, P. 等人, 1986, Nature 321 :522-525; 和 Queen, C. 等人, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86 :10029-10033), 表达模拟特定的天然发生抗体的性质的重组抗体是可能的。这样的框架序列可以从包括种系抗体基因序列的公开的 DNA 数据库中获得。

[0142] 因此, 本发明的抗 ErbB3 抗体的一种或多种结构特征(例如 CDR)可用于创建维持本发明抗体的至少一种功能性质(例如抑制 EGF 样配体介导的 ErbB3 磷酸化; 抑制一种或多种神经调节素、表皮调节素、epigen 或 bregulin 介导的通过 ErbB3 的信号传导; 抑制表达 ErbB3 的细胞的增殖; 和/或降低细胞表面的 ErbB3 水平)的结构相关的抗 ErbB3 抗体。

[0143] 在特定的实施方式中, 一种或多种选自 SEQ ID NO :7-12、SEQ ID NO :13-18、SEQ ID NO :19-24、SEQ ID NO :39-44 和 SEQ ID NO :45-50 的 CDR 区与已知的人框架区和 CDR 重组结合, 以产生本发明的附加的、重组工程化的抗 ErbB3 抗体。重链和轻链可变框架区可以源自相同或不同的抗体序列。

[0144] 本领域已知, 抗体重链和轻链 CDR3 结构域对抗体与抗原的结合特异性/亲和力具有特别重要的作用(参见 Hall 等人, J. Immunol., 149 :1605-1612(1992); Polymenis 等人, J. Immunol., 152 :5318-5329(1994); Jahn 等人, Immunobiol., 193 :400-419(1995); Klimka 等人, Brit. J. Cancer, 83 :252-260(2000); Beiboer 等人, J. Mol Biol., 296 :833-849(2000); Rader 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 :8910-8915(1998); Barbas 等人, J. Am. Chem. Soc., 116 :2161-2162(1994); Ditzel 等人, J. Immunol., 157 :739-749(1996))。因此, 在某些

实施方式中,产生的抗体包含此处所述的特定抗体的重链和 / 或轻链 CDR3(例如 SEQ ID NO:9,15,21,41,47 和 / 或 SEQ ID NO:12,18,24,44,50)。抗体还可能进一步包含本发明抗体的重链和 / 或轻链 CDR1 和 / 或 CDR2(例如 SEQ ID NO:7-8 和 / 或 SEQ ID NO:10-11;SEQ ID NO:13-14 和 / 或 SEQ ID NO:16-17;SEQ ID NO:20-21 和 / 或 SEQ ID NO:22-23;SEQ ID NO:39-40 和 / 或 SEQ ID NO:42-43;或 SEQ ID NO:45-46 和 / 或 SEQ ID NO:48-49)。

[0145] 上述工程化抗体的 CDR1、2 和 / 或 3 区可以包含此处所公开的确切的氨基酸序列(例如 Ab#6、Ab#3、Ab#14、Ab#17 或 Ab#19 的 CDR,分别在 SEQ ID NO:7-12,13-18,19-24,39-44 和 45-50 中给出)。但是,普通技术人员知道,与确切的 CDR 序列有一些偏差而同时保持抗体与 ErbB3 有效结合的能力是可能的(例如保守氨基酸置换)。因此,在另一个实施方式中,工程化抗体可以由例如,与 Ab#6、Ab#3 或 Ab#14 的一个或多个 CDR 90%、95%、98%、99% 或 99.5% 相同的一个或多个 CDR 构成。

[0146] 在另一个实施方式中,可以改变 CDR 的一个或多个残基来改变结合,从而实现更有利的结合速率。使用这一策略,可以获得具有超高结合亲和力(例如 10^{10}M^{-1} 或更高)的抗体。本领域公知的和那些在此描述的亲和力成熟技术可用于改变 CDR 区域,然后再筛选所得到的结合分子以发现所需的结合改变。因此,随着 CDR 改变,可以监测结合亲和力及免疫原性的变化并评分,从而获得优化出具有最优结合力和低免疫原性组合的抗体。

[0147] 除了 CDR 的修饰之外或者代替 CDR 的修饰,还可以在抗体的重链和 / 或轻链可变区的一个或多个框架区 FR1、FR2、FR3 和 FR4 内进行修饰,只要这些修饰不消除抗体的结合亲和力即可。

[0148] 在另一个实施方式中,抗体针对效应功能进行进一步修饰,从而例如提高抗体在癌症治疗中的效力。例如,可以将半胱氨酸残基引入 Fc 区域,从而使得该区内形成链间二硫键。因此,如此产生的同型二聚抗体可以具有改进的内在化能力和 / 或增强的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)。参见 Caron 等人, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992) 和 Shopes, B. J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992)。还可以使用 Wolff 等人 Cancer Research 53: 2560-2565 (1993) 中描述的异型双功能交联剂制备具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚抗体。或者,可以对具有双 Fc 区的抗体进行工程化,并可能由此具有提高的补体溶解和 ADCC 能力。参见 Stevenson 等人 Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989)。

[0149] 本发明还包括下述的双特异性抗体和免疫偶联物。

[0150] (ii) 双特异性抗体

[0151] 本发明的双特异性抗体包括至少一种 ErbB3 的结合特异性和至少一种另一抗原(例如致癌基因的产物)的结合特异性。双特异性抗体可被制备成长抗体或抗体片段(例如 F(ab')_2 双特异性抗体)。

[0152] 制备双特异性抗体的方法是本领域公知的(参见,例如 W005117973 和 W006091209)。例如,制备全长双特异性抗体可以基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中,两条链具有不同的特异性(参见,例如 Millstein 等人, Nature, 305: 537-539 (1983))。产生双特异性抗体的进一步细节可以参见例如 Suresh 等人, Methods in Enzymology, 121: 210 (1986) 和 Brennan 等人, Science, 229: 81 (1985), 其描述了用于制备双特异性抗体的化学键合过程。用于制备和从重组细胞培养物中直接分离双特异性

抗体片段的各种不同方法也已经有所描述。例如,已经使用亮氨酸拉链制备了双特异性抗体(参见,例如 Kostelny 等人, J. Immunol, 148(5):1547-1553(1992))。还报导了使用单链 Fv(sFv) 二聚体来制备双特异性抗体片段的另一种策略(参见,例如 Gruber 等人, J. Immunol, 152:5368(1994))。

[0153] 在特定的实施方式中,双特异性抗体包含与 ErbB3 相结合的第一抗体或其结合部分以及与其与 ErbB2、ERbB3、ErbB4、EGFR、IGF1-R、C-MET、Lewis Y、MUC-1、EpCAM、CA125、前列腺特异性膜抗原、PDGFR- α 、PDGFR- β 、C-KIT 或任何 FGF 受体相结合的第二抗体或其结合部分。

[0154] (iii) 免疫偶联物

[0155] 可以通过将此处所描述的抗体或其抗原结合部分与另一种治疗剂结合而形成本发明的免疫偶联物。合适的药剂包括,例如细胞毒性剂(例如化学治疗剂)、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素或其片段)和/或放射性同位素(例如放射性偶联物)。用于产生这样的免疫偶联物的化学剂已经在上面有所描述。可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉 A 链、白喉毒素的非结合性活性片段、外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素 A 链、相思豆毒素 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -帚曲霉毒、油桐(*Aleurites fordii*) 蛋白、香石竹毒蛋白(dianthin protein)、美洲商路蛋白(PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*) 抑制剂、麻风树毒素、巴豆毒素、石碱花(*Saponaire officinalis*) 抑制剂、多花白树毒素、mitogellin、局限曲菌素、酚霉素、伊诺霉素和单端孢霉烯族化合物(tricothecenes)。多种放射性核素可用于制备放射性偶联的抗 ErbB3 抗体。例子包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0156] 本发明的免疫偶联物可以使用多种双功能性蛋白偶联剂进行制备,例如, N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、亚氨基硫烷(ITS)、酰亚胺酯的双功能性衍生物(例如二亚胺代己二酸二甲酯盐酸盐)、活性酯(例如辛酸二琥珀酰亚胺酯)、醛(例如戊二醛)、双叠氮基化合物(例如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(例如双-(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(例如甲代亚苯基 2,6-二异氰酸酯)和双-活性氟化合物(例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,蓖麻毒素免疫毒素可以按照 Vitetta 等人, Science 238:1098(1987) 中的描述进行制备。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸为用于结合放射性核苷酸和抗体的示例性螯合剂(参见,例如 W094/11026)。

[0157] III. 筛选本发明抗体的方法

[0158] 在制备与 ErbB3 相结合的抗体或抗原结合部分之后,这类抗体或其部分可以使用本领域公知的多种分析方法对其各种不同性质(例如此处所描述的性质)进行筛选。

[0159] 在一个实施方式中,对抗体或其抗原结合部分抑制 EGF 样配体介导的 ErbB3 磷酸化的能力进行筛选。这可以通过在存在或不存在抗体或其抗原结合部分的情况下,用 EGF 样配体处理表达 ErbB3 的细胞来完成。然后可以溶解细胞,离心粗溶解产物以去除不溶物质。可以通过例如蛋白质印迹法、然后再使用抗磷酸酪氨酸抗体进行探测来测量 ErbB3 磷酸化,如 Kim 等人(同上)和下述实施例中所描述的。

[0160] 在其它实施方式中,进一步筛选抗体或其抗原结合部分的一种或多种下述性质:
(1) 抑制 ErbB3-配体(例如神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin)介导的通过

ErbB3 的信号传导 ; (2) 抑制表达 ErbB3 的细胞的增殖 ; (3) 降低细胞表面上的 ErbB3 水平的能力 (例如通过诱导 ErbB3 的内在化) ; (4) 抑制表达 ErbB3 的细胞的 VEGF 分泌 ; (5) 抑制表达 ErbB3 的细胞的迁移 ; (6) 抑制表达 ErbB3 的细胞的球状体生长 ; 和 / 或 (7) 与位于 ErbB3 的结构域 I 上的表位结合, 上述性质的每一种都可以使用本领域公认的技术或此处所讨论的技术方便地进行测量。

[0161] 可以使用常规分析方法 (例如 Horst 等人, 同上所描述的) 容易地测量神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin 中的一种或多种介导的通过 ErbB3 的信号传导的抑制。例如, 抗体或其抗原结合部分抑制神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin 介导的通过 ErbB3 信号传导的能力可以在神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin 中的一种或多种刺激之后, 如 Horst 等人, 同上, Sudo 等人, (2000) *Methods Enzymol*, 322 : 388-92 ; 和 Morgan 等人 (1990) *Eur. J. Biochem.*, 191 : 761-767 中所描述的通过 ErbB3 的已知底物 (例如 SHC 和 PI3K) 的激酶分析来测量。因此, 可以使用神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin 的一种或多种刺激表达 ErbB3 的细胞, 并与候选抗体或其抗原结合部分一起孵育。随后由这些细胞得到的细胞溶解产物可与 ErbB3 底物 (或涉及 ErbB3 的细胞途径中的蛋白质) 的抗体 (例如, 举例来说, 抗 JNK-1 抗体) 一起免疫沉淀, 并通过本领域公认的技术分析其激酶活性 (例如 JNK 激酶活性或 PI3- 激酶活性)。相对于不存在抗体或其抗原结合部分时的水平或活性而言, 存在抗体或其抗原结合部分时 ErbB3 底物或涉及 ErbB3 的途径中的蛋白质的水平或活性 (例如激酶活性) 的降低或完全消失是抑制神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin 中的一种或多种介导的信号传导的抗体或其抗原结合部分的指征。

[0162] 在特定实施方式中, 抗体或其抗原结合部分通过降低神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin 中的一种或多种与 ErbB3 的结合来抑制 ErbB3- 配体 (例如神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin) 介导的信号传导。

[0163] 为了选择抑制神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin 中的一种或多种与 ErbB3 结合的抗体或其抗原结合部分, 表达 ErbB3 的细胞 (例如 MALME-3M 细胞, 如下文实施例中描述的) 可以在不存在 (对照) 或存在抗 ErbB3 抗体或其抗原结合部分的情况下与标记的 ErbB3- 配体 (例如放射性标记的神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin) 接触。如果抗体或其抗原结合部分抑制神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin 与 ErbB3 的结合, 则相对于不存在抗体或其抗原结合部分时的量, 将观察到回收的标记物 (例如放射性标记的神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin) 的量统计学显著地降低。

[0164] 抗体或其抗原结合部分可以通过任何机理来抑制 ErbB3- 配体 (例如神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin) 的结合。例如, 抗体或其抗原结合部分可通过结合 ErbB3 上与 ErbB3 配体所结合的位点相同或重叠的位点来抑制 ErbB3 配体 (例如神经调节素、表皮调节素、epigen 或 biregulin 中的一种或多种) 与 ErbB3 的结合。或者, 抗体或其抗原结合部分可以通过改变或扭曲 ErbB3 的构型, 以使其不能与 ErbB3 配体相结合, 从而抑制 ErbB3 配体的结合。

[0165] 降低细胞表面 ErbB3 水平的抗体及其抗原结合部分可以通过其下调肿瘤细胞上的 ErbB3 的能力来进行识别。在特定实施方式中, 抗体或其抗原结合部分通过诱导 ErbB3 的内在化 (或提高内吞作用) 来降低 ErbB3 的细胞表面表达。为了对此进行测试, ErbB3 可

以被生物素化,且很容易确定细胞表面上 ErbB3 分子的数量,例如在存在或不存在抗体或其抗原结合部分的情况下测量培养物中细胞单层上的生物素量(例如,如 Waterman 等人, J. Biol. Chem. (1998), 273 :13819-27 中所描述的),然后再免疫沉淀 ErbB3 和使用抗生蛋白链菌素来进行探测。在存在抗体或其抗原结合部分的情况下检测到生物素化 ErbB3 随着时间逐渐降低意味着抗体降低了细胞表面上 ErbB3 的水平。

[0166] 还可以使用本领域公认的技术(例如下述实施例中描述的细胞效价发光分析)测试本发明的抗体或其抗原结合部分抑制表达 ErbB3 的细胞的增殖的能力(还参见,例如 Macallan 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (1998) 20 ;95 (2) :708-13 ;Perez 等人 (1995) Cancer Research 55, 392-398)。

[0167] 在另一个实施方式中,筛选抗体或其抗原结合部分抑制表达 ErbB3 的细胞的 VEGF 分泌的能力。这可以通过使用公知的分析方法(例如可以从 R&D Systems (Minneapolis, MN, Cat. #DY293B) 获得的 VEGF ELISA 试剂盒)进行。类似地,可以使用此处所描述的 trans-well 分析 (Millipore Corp., Billerica, MA, Cat#ECM552) 筛选抗体或部分抑制表达 ErbB3 的细胞(例如 MCF-7 细胞)的迁移的能力。

[0168] 在另一个实施方式中,筛选抗体或其抗原结合部分抑制表达 ErbB3 的细胞的球状体生长的能力。这可以使用此处所描述的接近促进肿瘤生长的条件的分析来完成(参见,例如 Herman 等人 (2007) Journal of Biomolecular Screening Electronic publication)。

[0169] 还可以使用本领域已知的和此处所描述的标准技术来识别结合到与本发明的一种或多种抗体相同的或重叠的表位上的抗体或其抗原结合部分。例如,为了筛选与感兴趣的抗体所结合的 ErbB3 上的相同或重叠表位相结合的抗体,可以进行交叉阻断分析,例如如 Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988) 中所描述的。

[0170] IV. 药物组合物

[0171] 在另一个方面,本发明提供了包含与药学上可接受的载体一起配制的本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分中的一种或其组合的组合物(例如药物组合物)。在一个实施方式中,该组合物包含本发明的多种(例如两种或更多种)与 ErbB3 上不同的表位结合的分离的抗体的组合。

[0172] 此处所使用的“药学上可接受的载体”包括任何和所有生理相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。优选地,载体适于静脉、肌肉、皮下、非消化道、脊髓或表皮给药(例如通过注射或输注)。取决于不同的给药途径,可以将活性化合物(即抗体、双特异性和多特异性分子)包被在某种材料中,以保护该活性化合物免受酸作用和其它可能灭活该化合物的自然条件的影响。

[0173] “药学上可接受的盐”是指保留母体化合物所需的生理活性、且不会引起任何不希望的毒性效应的盐(参见,例如 Berge, S. M. 等人 1977) J. Pharm. Sci. 66 :1-19)。这样的盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括衍生自非毒性的无机酸(例如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等)和衍生自非毒性有机酸(如,脂族单羧酸和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳香酸、脂族和芳香磺酸等)的盐。碱加成盐包括衍生自碱土金属(例如钠、钾、锰、钙等)的盐以及衍生自非毒性的有机胺(如, N, N' - 二苄基乙二胺、N- 甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因等)的盐。

[0174] 本发明的药物组合物可以单独给药或联合给药（即与其它药剂结合）。例如，联合治疗包括本发明的组合物以及至少一种或多种附加的治疗剂（例如下文描述的抗癌剂）。本发明的组合物还可以与放射治疗和 / 或手术联合施用。

[0175] 本发明的组合物可以通过本领域已知的许多方法给药。本领域的技术人员知道给药的途径和 / 或模式根据所希望的结果而改变。活性化合物可与保护化合物以防止其快速释放的载体一起制备，例如控释制剂（包括植入物、透皮贴片和微囊递送系统）。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合体，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。许多用于制备这类制剂的方法已经获得了专利或是本领域技术人员普遍知道的。参见，例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0176] 为通过特定给药途径来施用本发明的化合物，可能需要用某种材料包裹该化合物或与某种材料共同施用以防止其失活。例如，可以将该化合物在适当的载体（例如脂质体）或稀释剂中给予受试者。药学上可接受的稀释剂包括盐水和水性缓冲液。脂质体包括水包油包水 CGF 乳液以及普通的脂质体 (Strejan 等人 (1984) J. Neuroimmunol. 7 :27)。

[0177] 药学上可接受的载体包括灭菌水溶液或分散液以及用于即时制备灭菌注射溶液或分散液的灭菌粉末。这样的介质和试剂用于药学活性物质是本领域已知的。除了任何与活性化合物不相容的常规介质或试剂外，其它常规介质或试剂都可用于本发明的药物组合物中。辅助活性物质也可以引入组合物中。

[0178] 治疗组合物通常必须是灭菌的，并且在生产和储存条件下稳定。组合物可被配制成为溶液、微乳液、脂质体或适用于高药物浓度的其它有序的结构。载体可以是包含例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等）的溶剂或分散介质及其合适的混合物。可以例如通过使用涂层（例如卵磷脂），在分散剂的情况中维持需要的颗粒大小和通过使用表面活性剂维持适当的流动性。在许多情况下，组合物中优选包含等渗剂，例如糖、多元醇（例如甘露醇）、山梨醇或氯化钠。可以通过向组合物中引入延缓吸收的试剂（例如单硬脂酸盐和明胶）来延长可注射的组合物的吸收。

[0179] 灭菌的注射溶液的制备过程是将所需量的活性化合物和根据需要的上述所列成分的一种或组合加入到适当的溶剂中，然后再进行灭菌微过滤。一般而言，分散液是通过将活性化合物添加到包含基本分散介质和选自上述列举的成分的其它所需成分的灭菌载体中制备的。对于用于制备灭菌注射溶液的灭菌粉末的情况，优选的制备方法为真空干燥和冷冻干燥（冻干），其产生活性成分加上来自之前灭菌过滤溶液的任何需要的附加成分的粉末。

[0180] 调节给药方案以提供所需的最佳反应（例如治疗反应）。例如，可以单次给予大丸剂，可以分几次剂量在不同的时间进行给药，或者给药剂量可以根据治疗状况的紧急程度成比例地降低或增加。例如，本发明的人抗体可以经皮下注射每周给药一次或两次，或者经皮下注射每月给药一次或两次。

[0181] 将非肠道给药组合物配制成单位剂量形式以便于给药和剂量的均匀性是非常有利的。此处所使用的单位剂量形式是指适于作为单一剂量给予治疗的受试者的物理上分散的单元；每个单元包含经计算与所需药物载体结合能够产生所需的治疗效果的预定量的活性化合物。本发明的单位剂量形式的规格由 (a) 活性化合物的独特性质和需要达到的特定

治疗效果,和 (b) 配制这种活性化合物用于个体中的灵敏治疗的技术领域中国有的局限规定,或直接取决于这些因素。

[0182] 药学上可接受的抗氧化剂的例子包括:(1) 水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、偏亚硫酸钠、亚硫酸钠等;(2) 油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、丙基没食子酸酯、 α -生育酚等;和(3) 金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0183] 对于治疗性组合物而言,本发明的制剂包括那些适于口服、经鼻、局部(包括口腔和舌下)、直肠、阴道和/或非消化道给药的制剂。制剂可以方便以单位剂量形式存在,且可以通过药学领域已知的方法进行制备。可以与载体材料组合以制成单一剂量形式的活性成分的量将会根据治疗的受试者和特定的给药模式而变化。可以与载体材料组合以制备单一剂量形式的活性成分的量通常为产生治疗效果的组合物的量。一般而言,该量为大约0.001百分比至大约90百分比的活性成分,优选为大约0.005百分比至大约70百分比,最优选为大约0.01百分比至大约30百分比。

[0184] 适于阴道给药的本发明的制剂还包括包含本领域已知为合适的载体的阴道栓剂、止血塞、乳剂、凝胶剂、糊剂、泡沫或喷雾制剂。用于局部或经皮给药的本发明的组合物的剂型包括粉末、喷雾、药膏、糊剂、乳剂、乳液、凝胶、溶液、贴片和吸入剂。活性化合物可以在灭菌条件下与药学上可接受的载体、与可能需要的任何防腐剂、缓冲液或推进剂混合。

[0185] 此处所使用的术语“非肠道给药”和“肠道外给药”是指肠内和局部给药方式之外的其它给药方式,通常是经注射给药,包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼窝内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0186] 本发明的药物组合物中可以使用的合适的水性和非水性载体的例子包括水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)及其合适的混合物、植物油(例如橄榄油)和可注射有机酯(例如乙基油酸酯)。可以例如通过使用包衣材料(例如卵磷脂)、在分散剂的情况中通过维持所需的颗粒大小以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。

[0187] 这些组合物还可以包含辅剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。本领域公知的辅剂的特定例子包括例如无机辅剂(例如铝盐,例如磷酸铝和氢氧化铝)、有机辅剂(例如角鲨烯)、油基辅剂、病毒颗粒(例如包含源自流感病毒的膜结合性血凝素(heagglutinin)和神经氨酸酶的病毒颗粒)。

[0188] 可以通过上面的灭菌过程和加入不同的抗菌剂和抗病毒剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等)来防止微生物的出现。还可能希望在组合物中包含等渗剂,例如糖、氯化钠等。此外,可以通过包含延缓吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)来延长可注射的药物形式的吸收。

[0189] 当本发明的化合物作为药品给予人和动物时,它们可以单独给予,或者作为包含例如与药学上可接受的载体结合的0.001至90%(更优选0.005至70%,例如0.01至30%)的活性成分的药物组合物联合给予。

[0190] 与选择的给药途径无关,本发明的化合物(其可以合适的水合形式使用)和/或本发明的药物组合物可以使用本领域技术人员已知的常规方法配制成为药学上可接受的剂型。

[0191] 本发明的药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以改变以获得对于特定的患者、组合物和给药模式有效地实现希望的治疗反应而不会对患者产生毒性效应的活性成分的量。所选的剂量水平取决于多种药代动力学因素,包括本发明采用的特定的组合物或其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、给药时间、所使用的特定化合物的排泄率、治疗持续时间、与使用的特定组合物联合使用的其它的药物、化合物和 / 或材料、接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状态、总体健康水平和之前的病史等医学领域已知的类似因素。具有本领域普通技能的医生或兽医能够很容易地确定和指定所需的药物组合物的有效量。例如,医生或兽医可以以低于达到希望的治疗效果所需的水平开始药物组合物中使用的本发明的化合物的剂量,然后再逐渐增加剂量直到实现希望的效果为止。一般而言,本发明的组合物的合适日剂量为有效地产生治疗效果的最低剂量的化合物量。这样的有效剂量一般取决于上述因素。优选的给药方式为静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下给药,优选为接近目标位置给药。如果需要的话,治疗性组合物的有效的日剂量可以在整日时间内以适当的间隔以两个、三个、四个、五个、六个或更多个亚剂量独立地给药,任选地以单位剂量形式给药。尽管本发明的化合物单独给药是可能的,但是优选作为药物制剂(组合物)来给予该化合物。

[0192] 可以使用本领域已知的医学装置来给予治疗性组合物。例如,在优选实施方式中,本发明的治疗性组合物可以使用无针的皮下注射装置进行给药,例如美国专利 No. 5, 399, 163, 5, 383, 851, 5, 312, 335, 5, 064, 413, 4, 941, 880, 4, 790, 824 或 4, 596, 556 中公开的装置。可用于本发明的公知植入物和模块的例子包括:美国专利 No. 4, 487, 603, 其公开了用于以可控的速率的分配药物的可植入性微输注泵;美国专利 No. 4, , 486, 194, 其公开了用于经皮给药的治疗装置;美国专利 No. 4, 447, 233, 其公开了以精确的输注速率递送药物的药物输注泵;美国专利 No. 4, 447, 224, 其公开了用于连续药物输送的可变流量的可植入输注装置;美国专利 No. 4, 439, 196, 其公开了具有多腔隔室的渗透的药物递送系统;和美国专利 No. 4, 475, 196, 其公开了渗透的药物递送系统。许多其它的这样的植入物、递送系统和模块是本领域技术人员已知的。

[0193] 在某些实施方式中,本发明的单克隆抗体可被配制用于确保适当的体内分布。例如,血脑屏障(BBB)排除了许多高亲水性化合物。为了确保本发明的治疗化合物能够通过BBB(如果需要的话),它们必须被配制例如到脂质体中。制备脂质体的方法可以参见,例如美国专利 4, 522, 811 ;5, 374, 548 和 5, 399, 331。脂质体可以包含一个或多个被选择性地转运至特定的细胞或器官中的部分,因此能够提高靶向药物的转运(参见,例如 V. V. Ranade(1989) J. Clin. Pharmacol. 29 :685)。示例性的靶向部分包括叶酸或生物素(参见,例如 Low 等人的美国专利 5, 416, 016);甘露糖苷(Umezawa 等人, (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153 :1038);抗体(P. G. Bloeman 等(1995) FEBS Lett. 357 : 140 ;M. Owais 等人(1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39 :180);表面活性蛋白 A 受体(Briscoe 等(1995) Am. J. Physiol. 1233 :134),其不同种类可以包含于本发明的制剂中,以及本发明分子的成分;p120(Schreier 等人(1994) J. Biol. Chem. 269 :9090);还参见 K. Keinänen ;M. L. Laukkanen(1994) FEBS Lett. 346 :123 ;J. J. Killion ;I. J. Fidler(1994) Immunomethods 4 :273。

[0194] V. 使用本发明的抗体的方法

[0195] 本发明还提供了在多种体外和体内诊断和治疗应用中使用与 ErbB3 相结合的抗

体及其抗原结合部分的方法。例如，本发明的抗体可用于治疗与 ErbB3 依赖性信号传导相关的疾病，包括多种癌症。

[0196] 在一个实施方式中，本发明提供了通过给予受试者有效治疗疾病的量的本发明的抗体或其抗原结合部分来治疗与 ErbB3 依赖性信号传导相关的疾病。适当的疾病包括例如多种癌症，包括但不限于黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、胃肠癌、结肠癌、肺癌和前列腺癌。

[0197] 抗体可以单独给药或与另一种与该抗体结合或协同发挥作用的治疗剂一起治疗 ErbB3 介导的信号传导相关的疾病。这样的治疗剂包括例如下文描述的抗癌剂（例如细胞毒素、化学治疗剂、小分子和放射治疗）。

[0198] 在另一个实施方式中，本发明提供了通过将本发明的抗体或其抗原结合部分与来自受试者的细胞相接触（例如体外或体内）并测量结合细胞上的 ErbB3 的水平，来诊断受试者中与 ErbB3 上调相关的疾病（例如癌症）的方法。异常高的 ErbB3 结合水平意味着受试者患有与 ErbB3 上调相关的疾病。

[0199] 本发明的范围内还包括包含本发明的抗体及其抗原结合部分的试剂盒，其任选地包含用于治疗或诊断与 ErbB3 上调和 / 或 ErbB3 依赖性信号传导相关的疾病的说明书。该试剂盒可以包含显示试剂盒的内容物的预期用途的标签。术语标签包括任何试剂盒上或随试剂盒提供的文字、销售材料或记录材料，或其它随试剂盒的材料。

[0200] 本发明其它实施方式在下述实施例中描述。

[0201] 下述实施例将会进一步阐明本发明，但是不应该理解为限定本发明。序列表、附图和所有本申请所引用的参考文献、专利和专利申请公开的内容在此清楚地引入作为参考。

[0202] 实施例

[0203] 材料和方法

[0204] 在整个实施例部分中，除非特别说明，使用下述材料和方法。

[0205] 一般而言，除非特别说明，本发明的实施使用化学、分子生物学、重组 DNA 技术、免疫学（特别是例如抗体技术）的常规技术和多肽制备的标准技术。参见，例如 Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) ; Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996) ; Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996) ; Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow 等人, C. S. H. L. Press, Pub. (1999) ; 和 Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel 等人, John Wiley & Sons (1992)。用于分析 HCV 生物学特征的体外和体内模型系统描述于例如 Cell culture models and animal models of viral hepatitis. Part II: hepatitis C, Lab. Anim. (NY). ; 34(2) : 39-47 (2005) 和 The chimpanzee model of hepatitis C virus infections, ILAR J. ; 42(2) : 117-26 (2001) 中。

[0206] 细胞系

[0207] 下述实验中所使用的所有细胞系均自国家癌症研究所 (National Cancer Institute) 获得，或者如所说明的由研究者提供。

[0208] 细胞系

[0209] MCF7-ATCC cat. No. HTB-22

[0210] T47D-ATCC cat.No. HTB-133

[0211] Colo357- 这些细胞得自学术研究者,并描述于 Kolb 等人 (2006) Int. J. Cancer, 120 :514-523 中。

[0212] Du145-ATCC cat.No. HTB-81

[0213] OVCAR8- 来源已经在临时申请中描述

[0214] H1975 ATCC cat.No. CRL-5908

[0215] 肿瘤细胞的粉碎

[0216] 冷冻粉碎机 (Covaris Inc) 被用于粉碎肿瘤。肿瘤被储存在特殊的袋子中 (在添加肿瘤之前预先称重),在对它们进行操作时置于液氮中。对于小的肿瘤,向容纳肿瘤的袋子中先加入 200uL 裂解缓冲液,在液氮中冷冻,然后再粉碎以提高袋中肿瘤的回收率。粉碎的肿瘤被转移至 2mL 的微量离心管中,并置于液氮中,直至准备进行进一步的加工。

[0217] 肿瘤细胞裂解

[0218] 肿瘤细胞在补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液中进行裂解。裂解缓冲液被添加至肿瘤的等分试样中,最终浓度为大约 62.5mg/mL。肿瘤样品通过涡旋匀浆 30 秒,并在冰上孵育大约 30 分钟。裂解产物在 Qiagen Qias shredder 柱上旋转大约 10 分钟,以进一步对样品进行均质处理。澄清的裂解产物在干净管中被分为等分试样以用于下一步处理。

[0219] BCA 分析

[0220] 按照厂商的方案对所有的肿瘤样品进行 BCA 分析 (Pierce)。各肿瘤样品的总蛋白浓度 (以 mg/mL 计) 随后用于 ELISA 结果的标准化。

[0221] ELISA 分析

[0222] 所有的用于总的和磷酸 -ErbB3 的 ELISA 的 ELISA 试剂均作为 DuoSet 试剂盒购自于 R&D Systems。使用 50 μ L 抗体包被 96 孔 NuncMaxisorb 板,在室温下孵育过夜。第二日早上,在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤 (1000 μ L/孔) 板三次。然后在室温下使用 PBS 中的 2% BSA 封闭板大约一个小时。在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤 (1000 μ L/孔) 板三次。然后使用 50 μ L 细胞裂解产物和稀释于 50% 的裂解缓冲液和 1% BSA 中的标准品 (一式三份) 用于进一步处理。样品在 4°C 下在板振动器上孵育 2 个小时,在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 (1000 μ L/孔) 三次。加入大约 50 μ L 在 2% BSA 中稀释的检测抗体,加入 PBST,在室温下孵育大约 1 小时。对于磷酸 -ErbB3,检测抗体与辣根过氧化物酶 (HRP) 直接偶联,并在室温下孵育 2 小时。在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 (1000 μ L/孔) 三次。加入大约 50 μ L 抗生蛋白链菌素 -HRP,并在室温下孵育 30 分钟 (除了 pErbB3 以外)。在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 (1000 μ L/孔) 三次。加入大约 50 μ L Supersignal Pico ELISA 底物,使用 Fusion 板阅读器读板。使用 EXCEL 分析数据。重复样品取平均值,且误差条用于代表两次重复试验的标准偏差。

[0223] 实施例 1:使用噬菌体展示制备抗体

[0224] 为了获得本文中称作 Ab#6、Ab#3、Ab#14、Ab#17 和 Ab#19 的人抗 ErbB3 抗体,对包含来自人供体的免疫球蛋白序列的独特组合的人 Fab 噬菌体库 (Hoet 等人,同上,其全部内容通过引用方式结合于本文中) 进行 ErbB3 结合物的初步筛选。

[0225] 使用纯化的 ErbB3 和表达细胞表面 ErbB3 的中国仓鼠卵巢细胞系,从库中识别到

73 种独特的 Fab 序列。然后将这 73 种克隆重排 (reformat) 为仅无噬菌体的 Fab。使用高通量方法, 这些 Fab 被小规模地表达, 并使用 ELISA 和 Flexchip 方法 (是一种高通量表面等离子共振 (SPR) 技术) 测试其结合。将无噬菌体的 73 种 Fab 点样在芯片表面上, 并测量结合动力学以及对 ErbB3-his 融合靶蛋白质或 ErbB3-Fc 蛋白质 (R&D Systems) 的表位封闭。从所得数据计算平衡结合常数以及 Fab 的结合 / 解离速率。

[0226] 使用大约 500nM Fab 和 1 : 750 稀释的山羊抗人 Alexa 647 第二抗体稀释液来研究各种不同 Fab 对 MALME-3M 细胞的结合。如图 1A 和 1B 所示, 几种候选 Fab 显示出明显的 MALME-3M 细胞染色。

[0227] 实施例 2 : 抗 ErbB3 Fab 的优化

[0228] 在识别出阻断 ErbB3 配体 (神经调节素) 与 ErbB3 的结合的 Fab 之后, 下面对 Fab 的 VH 和 VL 序列进行密码子优化。

[0229] 具体而言, 使用表达为 IgG1 或 IgG2 同种型的表达构建体来重排 VH 和 VL 区域。该构建体包括具有用于替换适当的重链和轻链序列的表达盒的 Selexis 骨架。Selexis 载体包含 CMV 启动子和匹配的 poly-A 信号。

[0230] 密码子优化的 Ab#6 的 VH 和 VL 核酸序列分别显示于 SEQ ID NO : 25 和 26, Ab#3 的这些序列分别显示于 SEQ ID NO : 27 和 28, 如图 22 所示。

[0231] 实施例 3 : ErbB3 的结合亲和力

[0232] 使用两项独立技术 (即表面等离子共振分析和利用 MALME-3M 细胞的细胞结合分析) 测量抗 ErbB3 抗体的解离常数。

[0233] 表面等离子共振分析

[0234] 按照 Wassaf 等人 (2006) Analytical Biochem., 351 : 241-253 中的描述进行表面等离子共振分析 (也被称为 Flexchip 分析)。基于公式 $K_D = K_d / K_a$ 来计算 K_D 值。

[0235] 使用表面等离子共振分析测得的 Ab#6 和 Ab#3 的 K_D 值分别示于图 2A 和 2B 中。Ab#6 的 K_D 值大约为 4nM, Ab#3 的 K_D 值大约为 8nM, 分别如图 2A 和 2B 中所示。

[0236] 细胞结合分析

[0237] 进行细胞结合分析确定 Ab#6 和 Ab#3 的 K_D 值, 如下所示。

[0238] 使用 2ml 胰蛋白酶 -EDTA+2ml RPMI+5mM EDTA 在室温下使 MALME-3M 细胞脱壁 5 分钟。立即向胰蛋白酶化的细胞中加入完全 RPMI (10ml), 温和地重悬, 并使用 Beckman 台式离心机在 1100rpm 下旋转 5 分钟。细胞重悬于 BD 染色缓冲液 (PBS+2% 胎牛血清 +0.1% 叠氮化钠, Becton Dickinson) 中, 浓度为每毫升 2×10^6 细胞, 将 50 μ l (1×10^5 细胞) 等分试样接种到 96 孔滴定板中。

[0239] 在微量离心管中制备溶于 BD 染色缓冲液的 150 μ l 200nM 抗 ErbB3 抗体 (Ab#6 或 Ab#3) 的溶液, 并连续 2 倍稀释至 75 μ l BD 染色缓冲液中。稀释的抗体的浓度范围为 200nM 至 0.4nM。向 50 μ l 细胞悬浮液中直接加入 50 μ l 等分的不同蛋白质稀释液, 达到最终浓度 100nM、50nM、25nM、12nM、6nM、3nM、1.5nM、0.8nM、0.4nM 和 0.2nM 的抗体。

[0240] 在室温下, 96 孔板中的等分细胞在平板振动器上与蛋白质稀释液一起孵育 30 分钟, 并使用 300 μ l BD 染色缓冲液洗涤 3 次。在冷室中, 细胞在平板振动器上与 BD 染色缓冲液中的 100 μ l Alexa 647- 标记的山羊抗人 IgG 的 1 : 750 稀释液一起孵育 45 分钟。最后, 洗涤细胞两次, 沉淀并重悬于 250 μ l BD 染色缓冲液 +0.5 μ g/ml 碘化丙锭中。10000

个细胞的分析是在 FACScalibur 流式细胞仪中使用 FL4 通道完成的。MFI 值以及对应的抗 ErbB3 抗体的浓度分别绘在 y 轴和 x 轴上。通过 GraphPad Prism 使用非线性回归曲线的单位点结合模型来确定分子的 K_D 值。

[0241] 基于公式 $Y = B_{max} * X / K_D + X$ (B_{max} = 饱和时的荧光值, X = 抗体浓度, Y = 结合度) 来计算 K_D 值。如图 2C 和 2D 所示, 在使用 MALME-3M 细胞的细胞结合分析中, 得到的 Ab#6 和 Ab#3 的 K_D 值分别为大约 4nM 和 1.3nM。

[0242] 实施例 4: 对于 ErbB3 的结合特异性 / 表位结合

[0243] 如下所述, 使用 ELISA 对 Ab#6 的 IgG2 同种型与 ErbB3 的结合特异性进行分析。并分析 Ab#6 所结合的表位的识别。

[0244] 具体而言, 使用 50 μ l 的 5 μ g/ml 蛋白质 (重组人 ErbB3、重组人 EGFR 或不相关的蛋白质 (BSA)) 包被 96 孔 Nunc Maxisorb 板, 并在室温下孵育过夜。第二日早上, 在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 (1000 μ l/孔) 三次。然后在室温下使用 PBS 中的 2% BSA 封闭孔大约一个小时。在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 (1000 μ l/孔) 三次。在 2% BSA, PBST 中以不同的稀释比例 (1 μ M, 2 倍系列稀释) 加入大约 50 μ l Ab#6。所有的样品重复试验两次, 在 4°C 下平板振荡器上孵育 2 小时。在 BioTek 板洗涤器中, 使用 1000 μ l/孔的 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 3 次。加入 50 μ l 人 IgG 检测抗体 (HRP 偶联的 (Bethyl Inc; 1 : 75000 稀释于 2% BSA, PBST 中)), 且板在室温下孵育 1 小时。在 BioTek 板洗涤器中, 使用 1000 μ l/孔的 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 3 次。加入 50 μ l Supersignal PicoELISA 底物, 并在 Fusion 板阅读器上读板。数据使用 EXCEL 程序进行分析。重复样品取平均值, 误差条用于代表两次重复试验的标准偏差。

[0245] 如图 3 所示, 在 ELISA 中 Ab#6 结合重组 ErbB3, 但没有显示出与 EGFR、BSA 或 TGF- α 的明显结合。

[0246] 将对应于 ErbB3 的氨基酸残基 20-202 的片段 (截断突变体) 克隆到酵母展示载体 pYD2 (pYD1 (Invitrogen) 的改良版本, 具有经工程化置于 His 标记之前的终止密码子) 中 Nhe 和 BsiWI 限制性位点之间。将质粒转化到酵母菌株 EBY100 (Invitrogen) 中, 包含质粒的克隆在 Trp- 选择性培养基中进行选择。克隆在含葡萄糖的培养基中于 30°C 生长过夜, 并通过将其转移至含半乳糖的培养基中 18°C 生长 2 天以诱导 ErbB3 截断突变体的表达。使用 50nM Ab#6 对显示 ErbB3 截断突变体的酵母进行染色, 然后再使用 Alexa 染料 -647 标记的山羊抗人抗体进行染色。使用山羊抗人抗体对单独的样品进行染色仅仅用于显示不存在第二抗体对酵母的非特异性结合。在 FACS Calibur 细胞分选仪 (BD Biosciences) 上使用流式细胞仪进行分析。

[0247] 如图 30 所示, Ab#6 结合截断突变体, 即结合 ErbB3 的氨基酸残基 20-202。

[0248] 实施例 5: 肿瘤细胞上总 ErbB3 的下调

[0249] 测试 Ab#6 在体外和体内下调肿瘤细胞中 ErbB3 表达的能力, 如下所述。

[0250] 将 MALME-3M 细胞接种于 96 孔组织培养板上, 并在 37°C 的补充有抗生素、2mM L-谷氨酰胺和 10% 胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养基和 5% 二氧化碳中生长 24 小时。然后培养基更换为含抗生素、2mM L-谷氨酰胺和有或没有 1 μ M、250nM、63nM、16nM、4.0nM、1.0nM、240pM、61pM 和 15pM 浓度的抗体的 RPMI-1640 培养基。细胞于 37°C、5% 二氧化碳中生长 24 小时, 用冷的 PBS 洗涤, 然后使用包含 150mM NaCl、5mM 焦磷酸钠、10 μ M bpV (phen)、50 μ M 苯

肿 (phenylarsine)、1mM 原钒酸钠和蛋白酶抑制剂混合物 (cocktail) (Sigma, P714) 的哺乳动物蛋白提取物 (MPER) 裂解 (Pierce, 78505) 缓冲液收获细胞。使用含 0.1% tween-20 的磷酸缓冲盐水中的 4% 牛血清白蛋白将细胞裂解产物稀释两倍, 然后通过 ELISA 使用小鼠抗人 ErbB3 捕获抗体和生物素化小鼠抗人 ErbB3 第二检测抗体进行分析。抗生蛋白链菌素与可与化学发光底物 (Pierce, 37070) 反应的辣根过氧化物酶偶联, 从而产生了信号。使用光度计来可视化 ELISAs。

[0251] 如图 4 所示, 通过体外 ELISA 测量显示, Ab#6 在体外降低了 MALME-3M 细胞的总 ErbB3 水平大约 46.9%。不含血清和抗体的培养基作为对照。

[0252] 在进一步的实验中, 通过 FACS 分析来研究使用 Ab#6 的 IgG1 和 IgG2 同种型对 MALME-3M 细胞上 ErbB3 受体的下调。MALME-3M 细胞在 15cm 皿中进行胰蛋白酶化, 并使用 RPMI+10% 胎牛血清洗涤一次。重悬细胞沉淀, 使其密度为每毫升 1×10^6 个细胞。两等分的 2×10^5 细胞被加入到 12 孔组织培养板中, 并重悬于最终体积为 800 μ l 的 RPMI+10% 胎牛血清中。向一个孔中加入 Ab#6 IgG1 或 Ab#6 IgG2 同种型, 最终浓度为 100nM (处理的样品), 向其它孔中加入等体积的 PBS (未处理的样品)。

[0253] 第二日, 处理的和未处理的细胞被胰蛋白酶化、洗涤, 并在冰上与 BD 染色缓冲液中的 100mM Ab#6 孵育 30 分钟。使用 1ml BD 染色缓冲液洗涤两次, 并在冰上与 100 μ l 1 : 500 稀释的 Alexa 647 标记的山羊抗人 Alexa 647 稀释液一起孵育 45 分钟。然后再洗涤细胞, 重悬浮于 300 μ l BD 染色缓冲液 +0.5 μ g/ml 碘化丙锭中。10000 个细胞的分析是在 FACScalibur 流式细胞仪中使用 FL4 通道完成的。

[0254] 如图 5A 和 5B 所示, Ab#6 的 IgG1 和 IgG2 同种型分别下调 MALME-3M 细胞上的 ErbB3 大约 62% 和大约 66%。

[0255] 为了确定这种降低是否是由于 MALME-3M 细胞表面上的 ErbB3 受体的内在化, 测量在存在抗体的情况下 ErbB3 随时间的表达。具体而言, MALME-3M 细胞在 15cm 皿上进行胰蛋白酶化, 并使用 RPMI+10% 胎牛血清洗涤一次。重悬细胞沉淀, 使其密度为每毫升 1×10^6 个细胞。两等分的 2×10^5 细胞被加入到 12 孔组织培养板中, 并重悬于最终体积为 800 μ l 的 RPMI+10% 胎牛血清。向一个孔中加入抗 ErbB3 抗体, 最终浓度为 100nM (处理的样品), 向其它孔中加入等体积的 PBS (未处理的样品)。第二日, 处理的和未处理的细胞被胰蛋白酶化、洗涤, 并在冰上与 BD 染色缓冲液中的 100mM 抗 ErbB3 抗体一起孵育 30 分钟。使用 1ml BD 染色缓冲液洗涤细胞两次, 并在冰上与 100 μ l 1 : 500 稀释的 Alexa 647 标记的山羊抗人 Alexa 647 稀释液一起孵育 45 分钟。然后再洗涤细胞, 并重悬于 300 μ l BD 染色缓冲液 +0.5 μ g/ml 碘化丙锭中。10000 个细胞的分析是在 FACScalibur 流式细胞仪中使用 FL4 通道完成的。

[0256] 如图 6 所示, 分别在 0 小时 (图 6A)、0.5 小时 (图 6B)、2 小时 (图 6C) 和 24 小时 (图 6D) 测量了在 Ab#6 存在下 ErbB3 的下调。如图 6A-6D 所示, 在大约 30 分钟之后, 大约 50% 的细胞表面 ErbB3 受体被下调, 且在大约 24 小时时, 大约 93% 的细胞表面受体被下调。

[0257] 如下所述, 还对 Ab#6 在体内引起黑素瘤细胞中 ErbB3 下调的能力进行了研究。

[0258] 简而言之, T 细胞缺陷型 nu/nu 小鼠 (源自 NIH 的 3-4 周大的雌性小鼠; 远系杂交; 白化背景) 购自 Charles River 实验室 (Wilmington, MA)。用于植入的 MALME-3M 细胞在收获之前在培养基 (RPMI 培养基, 10% FBS, L-谷氨酰胺和抗生素, 37°C, 5% CO₂) 中生长达

到大约 80% 汇合 (confluency)。细胞在植入之前一直维持在冰上。在小鼠右侧腹皮下注射植入 100 μ l MALME-3M 细胞, 并使其恢复, 同时监控初始肿瘤生长。

[0259] 使用数字测径器测量肿瘤 (长度 $\times$ 宽度), 小鼠静脉注射 IgG2a (Sigma, M7769-5MG)。每隔一天对小鼠腹膜内给予 15 μ g 或 100 μ g 6 号抗体, 每周对肿瘤进行三次测量, 记录在微软 EXCEL 电子表格中。

[0260] 记录最终的肿瘤测量数据 (L $\times$ W), 使用 CO₂ 窒息法对小鼠进行安乐死, 切除肿瘤, 在液氮中速冻, 并储存于 -80°C (用于生化分析)。分析最终肿瘤测量数据, 并根据例如 Burtrum 等人, (2003) Cancer Res., 63 :8912-8921 中所描述的绘制肿瘤面积和肿瘤体积的曲线图。还可以通过“标准化”和“非标准化”的方式来分析肿瘤体积和肿瘤面积的数据。对于各测量时间点的数据的“标准化”, 各组中的各个肿瘤除以由测径器确定的初始肿瘤大小。

[0261] 如图 7 所示, 在该分析中测试的各种不同的抗体之中, 在用 Ab#6 的 IgG1 或 IgG2 同种型 24 小时处理的肿瘤中, Ab#6 在注射后 24 小时导致了总 ErbB3 的下调。使用 PBS 作为对照。

[0262] 在进一步的试验中, 研究了 Ab#6 在 ADRr 异种移植物中体内下调 ErbB3 的能力。

[0263] 简而言之, 样品在冷冻粉碎机 (Covaris Inc) 中粉碎。肿瘤被储存在特殊的袋子中 (在加入肿瘤之前预称重), 并在操作过程中置于液氮中。对于小的肿瘤, 首先向容纳肿瘤的袋子中加入 200 μ L 裂解缓冲液, 在液氮中冷冻, 然后再粉碎以提高袋中肿瘤的回收率。粉碎的肿瘤被转移至 2mL 的微量离心管中, 并置于液氮中, 直到进行裂解。肿瘤在补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液中进行溶解。裂解缓冲液被添加至肿瘤的等分试样中, 最终浓度为大约 62.5mg/mL。肿瘤样品被涡旋 30 秒使其均质化, 然后在冰上静置大约 30 分钟。细胞裂解产物在 Qiagen Qiashredder 柱上旋转大约 30 分钟, 以进一步使样品均质化。澄清的细胞裂解产物在干净管中被分为等分试样。

[0264] 根据上述材料和方法部分的内容进行 BCA 分析。

[0265] ErbB3 的总水平通过 ELISA 确定。ELISA 试剂作为 Duoset 试剂盒购自 R&D Systems。使用 50 μ L 各捕获抗体包被 96 孔 Nunc Maxisorb 板, 并在室温下孵育过夜。第二日早上, 在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 (1000 μ l/孔) 三次, 然后在室温下使用 PBS 中的 2% BSA 封闭板一个小时。随后在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 (1000 μ l/孔) 三次。然后将细胞裂解产物 (50 μ L) 和标准样稀释于 50% 的裂解缓冲液和 1% BSA 中; 所有的样品重复进行两次。板在 4°C 下在板振动器上孵育 2 个小时, 然后在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 (1000 μ l/孔) 三次。加入 50 μ l 用 2% BSA, PBST 稀释的检测抗体, 且板在室温下孵育 1 小时。在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 (1000 μ l/孔) 三次。加入 50 μ l 抗生蛋白链菌素-HRP, 且板在室温下孵育 30 分钟。再在 BioTek 板洗涤器中使用 PBST (0.05% Tween-20) 洗涤板 (1000 μ l/孔) 三次。加入 50 μ L Supersignal Pico ELISA 底物, 使用 Fusion 板阅读器进行读数。使用 EXCEL 分析数据。重复试验样品取平均值, 误差条用于代表两次重复试验的标准偏差。

[0266] 试验的结果示于图 8 中。如图 8 所示, 在 ADRr 异种移植物中 Ab#6 在体内下调 ErbB3。

[0267] 实施例 6 :肿瘤细胞增殖的抑制

[0268] 如下所示,研究了 Ab#6 抑制表达 ErbB3 的细胞(例如癌症细胞)的细胞增殖的能力。

[0269] 将 MALME3M、ACHN 和 NCI/ADRr 细胞接种于 96 孔组织培养板中,并在 37℃、5%二氧化碳中于补充有抗生素、2mM L-谷氨酰胺和 10%胎牛血清(FBS)的 RPMI-1640 培养基中生长 24 小时。然后培养基更换为包含抗生素、2mM L-谷氨酰胺和有或没有 1 μM、250nM、63nM、16nM、4.0nM、1.0nM、240pM、61pM 和 15pM 抗体的 RPMI-1640 培养基。细胞于 37℃、5%二氧化碳中生长 96 小时,然后使用 CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, G7573) 收获细胞,并在光度计上进行分析。不含血清和抗体的培养基作为对照。

[0270] 如图 9、10 和 11 所示, Ab#6 抑制了表达 ErbB3 的 MALME-3M 细胞(图 9)、ADRr 卵巢癌细胞(图 10)和 ACHN 细胞(图 11)的增殖。具体而言,使用细胞效价发光分析测量得到, Ab#6 抑制 MALME-3M 细胞大约 19.6%的增殖,抑制 ADRr 卵巢癌细胞大约 30.5%的增殖。同时,如图 11 所示, Ab#6 抑制了 ACHN 细胞大约 25.4%的增殖。

[0271] 实施例 7 :肿瘤细胞中 ErbB3 磷酸化的抑制

[0272] 如下所述,研究了 Ab#6 在体内抑制 ErbB3 磷酸化的能力。

[0273] 参照图 8,使用上述实施例 5 中描述的技术粉碎样品。如上述材料和方法部分所述进行 BCA 分析,并参照图 8 根据上述实施例 5 中的描述进行 ELISA 分析。

[0274] 这个试验的结果示于图 12 中。如图 12 所示,如按照以 ng/mg 总蛋白质计的磷酸化 ErbB3 (pErbB3) 的量测量的, Ab#6 在体内显著地抑制卵巢异种移植物中的 ErbB3 磷酸化。

[0275] 如下所述,还研究了 Ab#6 抑制 β 细胞素 (BTC) 或神经调节素 (HRG) 诱导的 ErbB3 磷酸化的能力。

[0276] 在用 50mM BTC、10mM HRG 或 333nM TGF-α 刺激之前,卵巢 ADRr 细胞与 Ab#6 一起预孵育 30 分钟。预孵育之后,去除培养基,且细胞在 37℃、5% CO₂ 下使用 50nM BTC 或 333nM TGF-α (对于 PE498) 刺激 5 分钟。还使用 HRG 对照 (5 分钟, 5nM)、10%血清和 0%血清对照。使用 1X 冷 PBS 洗涤细胞,并通过在冰上孵育 30 分钟在 30 μl 冷裂解缓冲液 (M-PER 缓冲液加钒酸钠 (NaVO₄, Sigma)、2-甘油磷酸、氧化苯胍、BpV 和蛋白酶抑制剂) 中进行裂解。细胞裂解产物置于 -80℃ 下储存过夜。

[0277] 如图 13A-13C 所示, Ab#6 能够显著抑制 β 细胞素和神经调节素介导的 ErbB3 的磷酸化。

[0278] 如下所述,在进一步的试验中,研究了 Ab#6 抑制卵巢肿瘤细胞系 OVCAR 5 和 OVCAR 8 中的 ErbB3 磷酸化的能力。

[0279] OVCAR 5 和 OVCAR 8 细胞系得自国家癌症研究所的癌症治疗和诊断部门 (“DCTD”)。按照上述材料和方法部分所述的内容进行 ELISA。

[0280] 该试验的结果描述于图 14A 和 14B 中。如图 14A 和 14B 所示, Ab#6 抑制 OVCAR 5 和 OVCAR 8 卵巢癌细胞系中的 ErbB3 磷酸化。

[0281] 如上所述, Ab#6 抑制 β 细胞素介导的 ErbB3 磷酸化。为了研究 β 细胞素介导的 ErbB3 磷酸化是通过 ErbB1 还是通过 ErbB3 发生,进行了下述试验。

[0282] ADRr 细胞或 MALME-3M 细胞 (1x10⁵) 在冰上与 25 μM 抗 ErbB3 Ab#6 或 25 μM 爱必妥

(作为对照)在 50 μ l BD 染色缓冲液中预孵育 30 分钟。30 分钟以后,向细胞中加入 50 μ l 400mM 生物素化的 BTC,并在冰上再孵育 30 分钟。最终的浓度为 12.5 μ M 抗体和 200nM BTC。然后使用 500 μ l BD 染色缓冲液洗涤细胞两次,并与 100 μ l 抗生蛋白链菌素 -PE (PE = 藻红蛋白) (Invitrogen) 在 BD 染色缓冲液中的 1 : 200 稀释液一起孵育 45 分钟。最后,洗涤细胞两次,重悬于 300 μ l BD 染色缓冲液中,并在 FACScalibur 流式细胞仪中进行分析。作为阳性对照,1x10⁵ADRR 或 MALME-3M 细胞在冰上与 200nM BTC 一起孵育 30 分钟,洗涤两次并与 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素 -PE 一起孵育 45 分钟。为了评估来自抗生蛋白链菌素 -PE 偶联物的背景染色,细胞与单独的 100 μ l 的 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素 -PE 孵育 45 分钟。

[0283] 试验的结果示于图 15A-15C 中。如图 15A 所示, β 细胞素 (BTC) 不显示任何明显的与 ErbB1 阴性 MALME-3M 细胞的结合。但是,如图 15B 和 15C 所示,BTC 确实显示出与 ErbB1 阳性 ADRr 细胞的结合。

[0284] 同样,如图 15B 和 15C 所示,该结合受到爱必妥的阻断,爱必妥是特异性地与 EGFR 结合的抗 EGFR 抗体,并作为对照以证明 EGF 样配体与 EGFR 结合,且其在例如 Adams 等人 (2005),Nature Biotechnology 23,1147-1157 中有所描述。

[0285] 实施例 8 :肿瘤细胞中神经调节素介导的信号传导的抑制

[0286] 如下所述,研究了 Ab#6 抑制神经调节素介导的肿瘤细胞信号传导的能力。

[0287] MALME-3M 细胞接种于 96 孔组织培养板中,并在 37°C、5%二氧化碳中于补充有抗生素、2mM L-谷氨酰胺和 10%胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培养基中生长 24 小时。细胞在 37°C、5%二氧化碳中于含抗生素、2mM L-谷氨酰胺的 RPMI-1640 培养基中血清饥饿 24 小时。细胞用或不用浓度为 1 μ M、250nM、63nM、16nM、4.0nM、1.0nM、240pM 和 61pM 的抗 ErbB3 抗体 (Ab#6 的 IgG2 同种型) 预处理 30 分钟,然后在 37°C 和 5%二氧化碳下使用 HRG1- β 1-ECD 刺激 10 分钟。使用冷 PBS 洗涤细胞,然后使用包含 150mM NaCl、5mM 焦磷酸钠、10 μ M bpV(phen)、50 μ M 苯胂 (phenylarsine)、1mM 原钒酸钠和蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma, P714) 的哺乳动物蛋白提取物 (MPER) 裂解 (Pierce, 78505) 缓冲液收获细胞。使用含 0.1% tween-20 的磷酸缓冲盐溶液中的 4%牛血清白蛋白将细胞裂解产物稀释两倍,然后使用 ELISA 分析 AKT (ErbB3 的下游效应子) 和 ErbB3 磷酸化。

[0288] 为了测试 AKT 磷酸化,细胞裂解产物使用 AKT 特异性捕获抗体和对 AKT 的丝氨酸 473 上的磷酸化位点特异性的生物素化检测抗体在 ELISA 板上进行试验。用与化学发光底物 (Pierce, 37070) 反应的辣根过氧化物酶偶联的抗生蛋白链菌素产生信号。为了分析 ErbB3 的磷酸化,细胞裂解产物用 ErbB3 特异性的捕获抗体和与辣根过氧化物酶偶联的抗磷酸酪氨酸检测抗体在 ELISA 板上进行试验。其然后再与化学发光底物 (Pierce, 37070) 反应。ELISA 使用分光计可视化。

[0289] 如图 16A 和 16B 所示,根据降低的 ErbB3 (图 16A) 和 AKT (图 16B) 磷酸化确定,Ab#6 是 MALME-3M 中神经调节素介导的信号传导的强力抑制剂。值得注意的是,Ab#6 抑制几乎 100%的 AKT 磷酸化。

[0290] 实施例 9 :卵巢、前列腺和胰腺肿瘤生长的抑制

[0291] 为了评估 Ab#6 的体内效力,在裸鼠中建立了几种人癌症的异种移植物模型,且在多剂量下评估其对肿瘤生长的抑制。例如, T 细胞缺陷型 nu/nu 小鼠 (源自 NIH 的 3-4 周

龄雌性小鼠；远系杂交；白化背景）购自 Charles River 实验室（Wilmington, MA）以用于异种移植物研究。在收获之前，用于植入的 ADRr 细胞在培养（RPMI 培养基，10% FBS，L-谷氨酰胺和抗生素，37℃，5% CO₂）中生长至大约 85% 汇合。细胞在植入之前在冰上维持。在小鼠右侧腹皮下注射植入 100 μl ADRr 细胞，并使其恢复，同时监控初始肿瘤生长。

[0292] 使用数字测径器测量肿瘤（长度 × 宽度），且小鼠静脉注射给予 IgG2a (Sigma, M7769-5MG)。每三天对小鼠腹膜内给药 30 μg 或 300 μg 抗体 #6，每周对肿瘤进行三次测量并记录在微软 EXCEL 电子表格中。

[0293] 记录最终的肿瘤测量值（L × W），使用 CO₂ 窒息法对小鼠进行安乐死，切除肿瘤，在液氮中速冻，并储存于 -80℃（用于生化分析）。分析的最终肿瘤测量值，如上述 Burtrum 等人描述的绘制肿瘤的表面积和肿瘤的体积曲线图。还通过“标准化”和“非标准化”的方式来分析肿瘤体积和肿瘤面积的数据。对于在测量的各时间点的数据的“标准化”，各组中的各肿瘤除以由测径器测定的初始肿瘤大小。

[0294] 源自人肿瘤细胞系，ADRr（卵巢）、Du145（前列腺）和 OvCAR8（卵巢）的三种不同模型的数据显示于图 17A-C 中，且 Colo357 异种移植物研究显示于图 17D 中。来自这些研究的数据显示，每三天（Q3d）300 μg 剂量的 Ab#6 显著地抑制肿瘤的生长（在研究过程中多时间点 $p < 0.05$ ）。此外，当在 Du145 前列腺癌模型以及肾脏和胰腺癌异种移植物模型（ACHN 和 COLO357）中剂量增加为 600 μg（Q3d）时，Ab#6 的这一抑制效应进一步提高。但是，将剂量进一步增加至 1500 μg Q3d 并不能提高效率（OvCAR8-图 17；COLO357），说明 600 μg 相对于肿瘤生长抑制为饱和剂量。从这些研究中动物血清的药代动力学（PK）分析显示 Ab#6 的血清保留有剂量依赖性的提高。同样，来自这些不同研究中的 Ab#6 的肿瘤内水平的生化分析显示 0 至 ~6pg MM121/μg 总肿瘤裂解产物（数据未显示）的剂量依赖性范围。

[0295] 实施例 10：ErbB3 配体与肿瘤细胞上的 ErbB3 相结合的抑制

[0296] 在进一步的试验中，如下所述研究了本发明的抗体抑制 ErbB3 配体与 ErbB3 的结合、而不是 EGF 样配体与 EGFR 的结合的特异性。

[0297] 在一个试验中，研究了 Ab#6 和 Ab#3 的 Fab 形式（Ab/Fab#3）抑制 ErbB3 配体（例如神经调节素和表皮调节素）与 ErbB3 结合的特异性。

[0298] 为了研究 Ab#6 和 Ab/Fab#3 抑制神经调节素与 ErbB3 结合的能力，进行了下述试验。

[0299] ADRr 细胞（ 1×10^5 ）在冰上与 10 μM 抗 ErbB3 抗体（例如 Ab#6 或 Ab/Fab#3）在 50 μl BD 染色缓冲液中孵育 30 分钟。30 分钟之后，向细胞中加入 50 μl 40nM 的生物素化神经调节素 EGF，再在冰上孵育 10 分钟。最终浓度为 5 μM 抗体和 20nM 神经调节素 EGF。然后使用 500 μl BD 染色缓冲液洗涤细胞两次，并与 100 μl 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素 -PE（PE = 藻红蛋白）（Invitrogen）在 BD 染色缓冲液中孵育 45 分钟。最后，洗涤细胞两次，重悬于 300 μl BD 染色缓冲液中，并使用 FACScalibur 流式细胞仪进行分析。作为阳性对照， 1×10^5 ADRr 细胞在冰上与 20nM 神经调节素 EGF 一起孵育 10 分钟，洗涤两次并与 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素 -PE 一起孵育 45 分钟。为了评估来自抗生蛋白链菌素 -PE 偶联物的背景染色，细胞与单独的 100 μl 的 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素 -PE 一起孵育 45 分钟。

[0300] 这一试验的结果显示于图 18A 和 18B 中。如图 18A 和 18B 所示，Ab#6 和 Ab/Fab#3 都能够抑制神经调节素与 ErbB3 的结合。

[0301] 同样,如下所示还研究了 Ab#6 抑制另一 ErbB3 配体(表皮调节素)与 ErbB3 结合的能力。

[0302] ADRr 细胞 (1×10^5) 在冰上与 $25 \mu\text{M}$ Ab#6 或 $25 \mu\text{M}$ 爱必妥(作为对照)在 $50 \mu\text{l}$ BD 染色缓冲液中预孵育 30 分钟。30 分钟后,向细胞中加入 $50 \mu\text{l}$ $2 \mu\text{M}$ 生物素化的 Epi,并在冰上再孵育 30 分钟。最终的浓度为 $12.5 \mu\text{M}$ 抗体和 $1 \mu\text{M}$ Epi。然后使用 $500 \mu\text{l}$ BD 染色缓冲液洗涤细胞两次,并与 $100 \mu\text{l}$ 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素-PE (PE = 藻红蛋白) (Invitrogen) 在 BD 染色缓冲液中孵育 45 分钟。最后,洗涤细胞两次,重悬于 $300 \mu\text{l}$ BD 染色缓冲液中,并使用 FACScalibur 流式细胞仪进行分析。作为阳性对照, 1×10^5 ADRr 细胞在冰上与 $1 \mu\text{M}$ Epi 一起孵育 30 分钟,洗涤两次并与 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素-PE 一起孵育 45 分钟。为了评估来自抗生蛋白链菌素-PE 偶联物的背景染色,细胞与单独的 $100 \mu\text{l}$ 的 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素-PE 一起孵育 45 分钟。

[0303] 该试验的结果示于图 19A 和 19B 中。如图 19A 所示,表皮调节素与 ErbB3 阳性 ADRr 细胞结合。此外,如图 19B 所示,这一结合受到爱必妥和 Ab#6 两者的抑制,说明表皮调节素可能与 EGFR 和 ErbB3 两者都结合。

[0304] 还进行了进一步的试验来研究 Ab#6 是否能够抑制 EGF 样配体(例如 HB-EGF)与肿瘤细胞的结合。

[0305] ADRr 细胞 (1×10^5) 在冰上与 $25 \mu\text{M}$ Ab#6 或 $25 \mu\text{M}$ 爱必妥(作为对照)在 $50 \mu\text{l}$ BD 染色缓冲液中预孵育 30 分钟。30 分钟之后,向细胞中加入 $50 \mu\text{l}$ 400nM 生物素化的 HB-EGF,并在冰上再孵育 30 分钟。最终的浓度为 $12.5 \mu\text{M}$ 抗体和 200nM HB-EGF。然后使用 $500 \mu\text{l}$ BD 染色缓冲液洗涤细胞两次,并与 $100 \mu\text{l}$ 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素-PE (PE = 藻红蛋白) (Invitrogen) 在 BD 染色缓冲液中孵育 45 分钟。最后,洗涤细胞两次,重悬于 $300 \mu\text{l}$ BD 染色缓冲液中,并使用 FACScalibur 流式细胞仪进行分析。作为阳性对照, 1×10^5 ADRr 细胞与 200nM HB-EGF 在冰上孵育 30 分钟,洗涤两次并与 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素-PE 孵育 45 分钟。为了评估来自抗生蛋白链菌素-PE 偶联物的背景染色,细胞与单独的 $100 \mu\text{l}$ 的 1 : 200 稀释的抗生蛋白链菌素-PE 孵育 45 分钟。

[0306] 如图 20A 和 20B 所示,HB-EGF 与 ADRr 细胞上的 ErbB 结合,Ab#6 并不抑制这种结合,证明了 Ab#6 对抑制 ErbB3 配体(例如神经调节素和表皮调节素)与 ErbB3 的结合是特异性的。

[0307] 实施例 11:肿瘤细胞中 VEGF 分泌的抑制

[0308] 使用 VEGF 分泌分析试验(VEGF ELISA 试剂盒由 R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat. #DY293B 提供)研究了 Ab#6 抑制表达 ErbB3 的细胞(例如癌细胞)的 VEGF 分泌的能力。首先,分析了 Ab#6 抑制未处理的和 HRG- β 1 处理的 MCF-7、T47D 和 COLO-357 细胞中 VEGF 分泌的能力。这些研究显示 COLO-357 向培养基中分泌最高量的 VEGF。由于这些细胞还具有非常高的 HRG 水平(数据未显示),向培养基中添加 HRG 不能够进一步诱导 VEGF 分泌(图 24A)。相反,HRG 能够诱导 MCF-7 和 T47D 细胞中的 VEGF 分泌。

[0309] 在所有三种细胞系中,Ab#6 均显示出在高水平下的强力抑制效果,最强的抑制是在 COLO-357(图 24A)中。在三种不同的异种移植物中,Ab#6 也显示类似的体内抑制 VEGF 分泌的效果,最强的抑制是在 COLO-357 异种移植物(图 24B)中。VEGF 的抑制与 ErbB3 磷酸化的抑制相关(图 24C)。VEGF 分泌的抑制还与肿瘤细胞血管发生的抑制相关。特别地,

已确认骨髓瘤细胞分泌因子（例如 VEGF 和 bFGF）引发血管发生（参见，例如 Leung 等人 (1989) Science 246(4935) :1306-9 ;Yen 等人 (2000) Oncogene 19(31) :3460-9）。

[0310] 实施例 12 :细胞迁移的抑制

[0311] 使用 trans-well 分析 (Millipore Corp., Billerica, MA, Cat#ECM552) 研究了 Ab#6 抑制表达 ErbB3 的细胞（例如 MCF-7 细胞）的迁移的能力。首先，使 MCF-7 细胞血清饥饿过夜，然后在存在或不存在 Ab#6（最终浓度为 8 μ M）的情况下在室温下孵育 15 分钟。然后将细胞转移至通过 I 型胶原涂覆的膜与下室分隔的上室中，细胞可通过所述 I 型胶原涂覆的膜迁移。在 Ab#6 的存在或不存在的条件下，向下室中的培养基中加入作为化学引诱物的 10% FBS。所述室在 37°C 孵育 16 小时，然后使用脱壁缓冲液去除通过所述膜迁移的细胞，并与细胞结合荧光染料一起孵育。使用荧光读板器来定量荧光。平均荧光 $\pm$ SEM (n = 2) 显示于图 25 中。

[0312] 如图 25 中所示，与未处理的对照（1 道）相比，10% FBS 刺激细胞迁移（3 道），且 8 μ M Ab#6 抑制 FBS 诱导的细胞迁移（4 道）。

[0313] 实施例 13 :球状体生长的抑制

[0314] 使用接近于进行肿瘤生长的条件的分析 (Herman 等人 (2007) Journal of Biomolecular Screening Electronic publication) 研究了 Ab#6 抑制表达 ErbB3 的细胞的球状体生长的能力。使用悬滴法 (Herrman 等人, 2008)，以 96 孔板每孔一个球状体的频率启动 ADR 和 DU145 球状体。然后如所述的那样使用 Ab#6（最终浓度 8 μ M）、神经调节素- β 1 EGF 域 (R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat#396-HB, 最终浓度 3.4 nM) 或两者的组合处理单个的球状体。使用光学显微镜检查 (10X 物镜) 在第 1 天和第 13 天测量球状体的直径。

[0315] Ab#6 抑制 ADR 细胞中的球状体生长（图 26A）。此外，3.4 nM HRG 刺激球状体的生长，且 Ab#6 抑制了 HRG 效应（图 26B）。在 13 天试验过程中，源自 DU145 的球状体大小没有增加；但是，HRG1- β 1 显著地刺激了其生长。在这些细胞中，8 μ M Ab#6 抑制了 HRG 诱导的球状体生长（图 26C）。

[0316] 实施例 14 :信号传导的抑制

[0317] 研究了 Ab#6 抑制由不同配体诱导的信号传导的能力。例如，测试了 Ab#6 对 HRG 和 BTC 与表达 ErbB3 受体的 ADR 细胞结合的效果。如图 27A 和 B 所示，使用 FACS 分析，Ab#6 与 HRG 而不是 BTC 竞争结合 ADR 细胞。因此，Ab#6 阻断 HRG 与 ErbB3 的结合将会阻止 HRG 诱导的信号传导。

[0318] 此外，测试了各种不同的配体对 ErbB3 磷酸化的诱导。三种配体 HRG、BTC 和 HGF 能够刺激 ADR 细胞中 ErbB3 诱导的磷酸化，而 EGF 不能。如图 28 所示，Ab#6 抑制了 ADR 细胞中 HGF 诱导的 pErbB3 磷酸化（图 28）。此外，如本领域已知的（参见，例如 Wallenius 等人 (2000) Am J Pathol. 156(3) :821-910702398），在各种不同的上皮肿瘤或非上皮肿瘤中发现了增强的 HGF 信号传导。

[0319] ErbB3/cMET 相互作用以及 Ab#6 在调控这种相互作用中的作用

[0320] 已经证明携带表皮生长因子受体 (EGFR) 的活化突变的非小细胞肺癌通过募集 MET 和 HER3 并因此激活 PI3K-AKT 细胞存活途径而产生对酪氨酸激酶抑制剂的抗性 (Engelmann 等人 (2007) Science 316 :1039-1043 ;Gou (2007) PNAS :105(2) :692-697)。通

过共免疫沉淀已经很好地确认了携带活化 EGFR 突变的细胞系中 EGFR 和 c-MET 之间的关联 (Engelmann 等人 2007 ;Gou 2007)。Guo 等人最近使用共免疫沉淀证明, c-MET 和 ErbB3 也存在于已知依赖于扩增的 c-MET 的胃细胞系 MKN45 中的复合物中。

[0321] 这种 c-MET-erbB3 相互作用还发生在携带野生型 EGFR 的 ADR 细胞中, 且不依赖于扩增的 c-MET。HGF (肝细胞生长因子) 在 ADR 细胞中以剂量依赖性的方式诱导 ErbB3 的磷酸化, 如图 28 所示。此外, Ab#6 抑制 HGF 诱导的 erbB3 磷酸化。

[0322] 还研究了 HRG 和 BTC 对于 ErbB1 和 ErbB3 磷酸化的作用, 发现 HRG 和 BTC 诱导 ErbB1 和 ErbB3 两者的磷酸化。发现 HRG 是 ErbB3 磷酸化的更加强力的诱导剂, 而 BTC 是 ErbB1 磷酸化的强力诱导剂 (图 29)。这一磷酸化很可能是由 ErbB1 和 ErbB3 的复合体驱动的。简而言之, HRG 结合 ErbB3 诱导了 ErbB1 和 ErbB3 之间复合体的形成, 导致了两种受体的激活。相同的现象也很可能出现在 BTC 上, 其中, BTC 结合 ErbB1 刺激了 ErbB1 和 ErbB3 之间复合体的形成, 导致了 ErbB1 和 ErbB3 两者的磷酸化。

[0323] 配体 (HRG、BTC、EGF 和 HGF) 刺激的 ErbB3 磷酸化的抗体抑制

[0324] 基于下述方法研究了 Ab#6 抑制配体 (HRG、BTC、EGF 和 HGF) 诱导的 ErbB3 磷酸化的能力:

[0325] 1. 将 ADR 细胞接种在 96 孔板上, 密度为 30000 细胞/孔/100 μ L, 培养基为含 10% FBS 的 RPMI 培养基, 使细胞生长过夜;

[0326] 2. 第二日, 通过改变培养基为不含 FBS 的培养基对细胞进行血清饥饿, 并使其生长过夜;

[0327] 3. 使用不同浓度 (0.01nM 至 100mM) 的 Ab#6 或缓冲液 (对照) 预处理细胞两小时;

[0328] 4. 然后使用 10nM HRG 和 HGF 刺激细胞 10 分钟, 或用 10mM BTC 和 EGF 刺激细胞 5 分钟;

[0329] 5. 通过去除培养基并使用冰冷 PBS 洗涤细胞一次来终止反应;

[0330] 6. 然后使用含 1X 蛋白酶抑制剂和 1X 磷酸酶抑制剂的 25mM Tris, pH7.5、150mM NaCl、1mM EDTA、1.0% Triton X-100、1.0% CHAPS、10% v/v 甘油来裂解细胞; 以及

[0331] 7. 根据厂商的说明, 使用 Human Phospho-ErbB3 ELISA 试剂盒 (R&D Systems, Minneapolis, MN, Cat. No. DYC1769) 来测量细胞裂解产物中的 ErbB3 磷酸化。

[0332] ErbB2-ErbB3 蛋白复合物形成的抗体抑制

[0333] ADR 细胞与缓冲液 (对照) 或 250nM Ab#6 在室温下预孵育 60 分钟, 然后再用 10nM HRG 或 10nM BTC 或对照缓冲液处理 10 分钟。细胞在含 0.2mM PMSF、50mTU/mL 抑肽酶和 100 μ M 亮氨酸酶素 (leupeptin) 的 25mM Tris, pH7.5、150mM NaCl、1mM EDTA、1.0% Triton X-100、1.0% CHAPS、10% v/v 甘油中裂解, 且裂解粗产物短暂离心以去除不溶物质。将上清液转移至新的微量离心管中, 以 1 : 500 稀释度加入抗 ErbB3 抗体 (Santa Cruz sc-285)。上清液在 4 $^{\circ}$ C 下温和摇动孵育过夜。首先使用 1X PBS 洗涤 60 μ L Immobilized Protein A/G 琼脂糖珠子 (Pierce, Rockford, IL, Cat# 20421)。将细胞裂解产物 - 抗体混合物加入到 PBS 洗涤的珠子中, 在 4 $^{\circ}$ C 下温和摇动孵育 2 小时。然后使用冰冷裂解缓冲液洗涤免疫沉淀物三次, 重悬于 30 μ L 2XSDS 样品缓冲液中, 在 95 $^{\circ}$ C 热变性 7 分钟, 在 4-12% Bis-Tris Gels SDS-PAGE 上电泳, 并在含 10% MeOH 的 Tri-甘氨酸缓冲液中电转移到 PVDF 膜上。膜在 10ml

封闭缓冲液中 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, Cat# 927-40000) 封闭 1 小时, 然后与 1 : 1000 的抗 ErbB2 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, Cat#29D8) 在 10ml 封闭缓冲液 (Li-Cor Biosciences, Cat#927-40000) 中孵育。使用 1 : 5000 的山羊抗 - 兔 IRDye800 (2 μ l) 在 10ml 封闭缓冲液 (Li-Cor Biosciences, Cat#927-40000) 中检测信号。

[0334] Ab#6 也显示完全抑制 HRG 刺激的 ErbB2/3 复合物形成 (图 29B)。

[0335] 等同方式

[0336] 本领域的技术人员将认识到或仅使用常规试验就能够确定此处所描述的本发明特定实施方式的多种等同方式。这样的等同方式也意图包含在下述的权利要求中。从属权利要求中公开的实施方式的任意组合都包含在本发明的范围之内。

[0337] 参考文献的引入

[0338] 此处所涉及的所有出版物、专利以及待决的专利申请都通过引用方式全文引入本文中。

- [0001] 序列表
- [0002] <110>MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC.
- [0003] <120>ERBB3 抗体及其用途
- [0004] <130>MMJ-001PC
- [0005] <140>PCT/US2008/002119
- [0006] <141>2008-02-15
- [0007] <150>60/901, 904
- [0008] <151>2007-02-16
- [0009] <150>61/009, 796
- [0010] <151>2008-01-02
- [0011] <160>53
- [0012] <170>PatentIn Ver. 3.3
- [0013] <210>1
- [0014] <211>119
- [0015] <212>PRT
- [0016] <213>人工序列
- [0017] <220>
- [0018] <223>/ 注 = " 人工序列的描述 :
- [0019] 合成多肽 "
- [0020] <400>1
- [0021] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [0022] 1 5 10 15
- [0023] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
- [0024] 20 25 30
- [0025] Val Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
- [0026] 35 40 45
- [0027] Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
- [0028] 50 55 60
- [0029] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
- [0030] 65 70 75 80
- [0031] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0032] 85 90 95
- [0033] Thr Arg Gly Leu Lys Met Ala Thr Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
- [0034] 100 105 110
- [0035] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
- [0036] 115
- [0037] <210>2
- [0038] <211>111

[0039] <212>PRT
 [0040] <213> 人工序列
 [0041] <220>
 [0042] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
 [0043] 合成多肽"
 [0044] <400>2
 [0045] Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 [0046] 1 5 10 15
 [0047] Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 [0048] 20 25 30
 [0049] Asn Val Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 [0050] 35 40 45
 [0051] Ile Ile Tyr Glu Val Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 [0052] 50 55 60
 [0053] Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 [0054] 65 70 75 80
 [0055] Gln Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
 [0056] 85 90 95
 [0057] Ser Ile Phe Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 [0058] 100 105 110
 [0059] <210>3
 [0060] <211>118
 [0061] <212>PRT
 [0062] <213> 人工序列
 [0063] <220>
 [0064] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
 [0065] 合成多肽"
 [0066] <400>3
 [0067] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0068] 1 5 10 15
 [0069] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
 [0070] 20 25 30
 [0071] Asn Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0072] 35 40 45
 [0073] Ser Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 [0074] 50 55 60
 [0075] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0076] 65 70 75 80
 [0077] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0078]	85	90	95
[0079]	Ala Arg Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr		
[0080]	100	105	110
[0081]	Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0082]	115		
[0083]	<210>4		
[0084]	<211>110		
[0085]	<212>PRT		
[0086]	<213> 人工序列		
[0087]	<220>		
[0088]	<223>/ 注 = " 人工序列的描述 :		
[0089]	合成多肽 "		
[0090]	<400>4		
[0091]	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln		
[0092]	1 5 10 15		
[0093]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Arg Asn		
[0094]	20 25 30		
[0095]	Tyr Ile Tyr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu		
[0096]	35 40 45		
[0097]	Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Ile Ser		
[0098]	50 55 60		
[0099]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg		
[0100]	65 70 75 80		
[0101]	Ser Glu Asp Glu Ala Glu Tyr His Cys Gly Thr Trp Asp Asp Ser Leu		
[0102]	85 90 95		
[0103]	Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
[0104]	100 105 110		
[0105]	<210>5		
[0106]	<211>122		
[0107]	<212>PRT		
[0108]	<213> 人工序列		
[0109]	<220>		
[0110]	<223>/ 注 = " 人工序列的描述 :		
[0111]	合成多肽 "		
[0112]	<400>5		
[0113]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0114]	1 5 10 15		
[0115]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr		
[0116]	20 25 30		

[0117]	Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0118]	35 40 45
[0119]	Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly His Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
[0120]	50 55 60
[0121]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0122]	65 70 75 80
[0123]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0124]	85 90 95
[0125]	Ala Lys Val Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Ile Trp
[0126]	100 105 110
[0127]	Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
[0128]	115 120
[0129]	<210>6
[0130]	<211>106
[0131]	<212>PRT
[0132]	<213> 人工序列
[0133]	<220>
[0134]	<223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0135]	合成多肽"
[0136]	<400>6
[0137]	Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Tyr Pro Gly Gln
[0138]	1 5 10 15
[0139]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Gly Ser Lys Phe Val
[0140]	20 25 30
[0141]	Ser Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr
[0142]	35 40 45
[0143]	Lys Asp Lys Arg Arg Pro Ser Glu Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[0144]	50 55 60
[0145]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Ile
[0146]	65 70 75 80
[0147]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val
[0148]	85 90 95
[0149]	Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
[0150]	100 105
[0151]	<210>7
[0152]	<211>5
[0153]	<212>PRT
[0154]	<213> 人工序列
[0155]	<220>

[0156] <223>/ 注 = " 人工序列的描述 :
[0157] 合成肽 "
[0158] <400>7
[0159] His Tyr Val Met Ala
[0160] 1 5
[0161] <210>8
[0162] <211>17
[0163] <212>PRT
[0164] <213> 人工序列
[0165] <220>
[0166] <223>/ 注 = " 人工序列的描述 :
[0167] 合成肽 "
[0168] <400>8
[0169] Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Trp Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[0170] 1 5 10 15
[0171] Gly
[0172] <210>9
[0173] <211>10
[0174] <212>PRT
[0175] <213> 人工序列
[0176] <220>
[0177] <223>/ 注 = " 人工序列的描述 :
[0178] 合成肽 "
[0179] <400>9
[0180] Gly Leu Lys Met Ala Thr Ile Phe Asp Tyr
[0181] 1 5 10
[0182] <210>10
[0183] <211>14
[0184] <212>PRT
[0185] <213> 人工序列
[0186] <220>
[0187] <223>/ 注 = " 人工序列的描述 :
[0188] 合成肽 "
[0189] <400>10
[0190] Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Val Val Ser
[0191] 1 5 10
[0192] <210>11
[0193] <211>7
[0194] <212>PRT

[0195] <213> 人工序列
 [0196] <220>
 [0197] <223>/ 注 = " 人工序列的描述：
 [0198] 合成肽"
 [0199] <400>11
 [0200] Glu Val Ser Gln Arg Pro Ser
 [0201] 1 5
 [0202] <210>12
 [0203] <211>11
 [0204] <212>PRT
 [0205] <213> 人工序列
 [0206] <220>
 [0207] <223>/ 注 = " 人工序列的描述：
 [0208] 合成肽"
 [0209] <400>12
 [0210] Cys Ser Tyr Ala Gly Ser Ser Ile Phe Val Ile
 [0211] 1 5 10
 [0212] <210>13
 [0213] <211>5
 [0214] <212>PRT
 [0215] <213> 人工序列
 [0216] <220>
 [0217] <223>/ 注 = " 人工序列的描述：
 [0218] 合成肽"
 [0219] <400>13
 [0220] Ala Tyr Asn Met Arg
 [0221] 1 5
 [0222] <210>14
 [0223] <211>17
 [0224] <212>PRT
 [0225] <213> 人工序列
 [0226] <220>
 [0227] <223>/ 注 = " 人工序列的描述：
 [0228] 合成肽"
 [0229] <400>14
 [0230] Val Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ala Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 [0231] 1 5 10 15
 [0232] Gly
 [0233] <210>15

- [0234] <211>9
[0235] <212>PRT
[0236] <213> 人工序列
[0237] <220>
[0238] <223>/ 注 = " 人工序列的描述：
[0239] 合成肽"
[0240] <400>15
[0241] Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
[0242] 1 5
[0243] <210>16
[0244] <211>13
[0245] <212>PRT
[0246] <213> 人工序列
[0247] <220>
[0248] <223>/ 注 = " 人工序列的描述：
[0249] 合成肽"
[0250] <400>16
[0251] Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Arg Asn Tyr Ile Tyr
[0252] 1 5 10
[0253] <210>17
[0254] <211>7
[0255] <212>PRT
[0256] <213> 人工序列
[0257] <220>
[0258] <223>/ 注 = " 人工序列的描述：
[0259] 合成肽"
[0260] <400>17
[0261] Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
[0262] 1 5
[0263] <210>18
[0264] <211>11
[0265] <212>PRT
[0266] <213> 人工序列
[0267] <220>
[0268] <223>/ 注 = " 人工序列的描述：
[0269] 合成肽"
[0270] <400>18
[0271] Gly Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
[0272] 1 5 10

[0273]	<210>19
[0274]	<211>5
[0275]	<212>PRT
[0276]	<213> 人工序列
[0277]	<220>
[0278]	<223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0279]	合成肽"
[0280]	<400>19
[0281]	Ala Tyr Gly Met Gly
[0282]	1 5
[0283]	<210>20
[0284]	<211>17
[0285]	<212>PRT
[0286]	<213> 人工序列
[0287]	<220>
[0288]	<223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0289]	合成肽"
[0290]	<400>20
[0291]	Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly His Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[0292]	1 5 10 15
[0293]	Gly
[0294]	<210>21
[0295]	<211>13
[0296]	<212>PRT
[0297]	<213> 人工序列
[0298]	<220>
[0299]	<223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0300]	合成肽"
[0301]	<400>21
[0302]	Val Leu Glu Thr Gly Leu Leu Val Asp Ala Phe Asp Ile
[0303]	1 5 10
[0304]	<210>22
[0305]	<211>11
[0306]	<212>PRT
[0307]	<213> 人工序列
[0308]	<220>
[0309]	<223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0310]	合成肽"
[0311]	<400>22

[0312]	Ser Gly Asp Gln Leu Gly Ser Lys Phe Val Ser
[0313]	1 5 10
[0314]	<210>23
[0315]	<211>8
[0316]	<212>PRT
[0317]	<213> 人工序列
[0318]	<220>
[0319]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :
[0320]	合成肽"
[0321]	<400>23
[0322]	Tyr Lys Asp Lys Arg Arg Pro Ser
[0323]	1 5
[0324]	<210>24
[0325]	<211>9
[0326]	<212>PRT
[0327]	<213> 人工序列
[0328]	<220>
[0329]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :
[0330]	合成肽"
[0331]	<400>24
[0332]	Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Tyr Val
[0333]	1 5
[0334]	<210>25
[0335]	<211>357
[0336]	<212>DNA
[0337]	<213> 人工序列
[0338]	<220>
[0339]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :
[0340]	合成多核苷酸"
[0341]	<400>25
[0342]	gaggtgcagc tgctggagag cggcggaggg ctggtccagc caggcggcag cctgaggctg 60
[0343]	tcctgcgccg ccagcggctt caccttcagc cactacgtga tggcctgggt gcggcaggcc 120
[0344]	ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtccagc atcagcagca gcggcggctg gaccctgtac 180
[0345]	gccgacagcg tgaagggcag gtccaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac 240
[0346]	ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcac caggggcctg 300
[0347]	aagatggcca ccatcttcga ctactggggc cagggcaccc tggtgaccgt gagcagc 357
[0348]	<210>26
[0349]	<211>333
[0350]	<212>DNA

[0351]	<213> 人工序列	
[0352]	<220>	
[0353]	<223>/ 注 = " 人工序列的描述 :	
[0354]	合成多核苷酸"	
[0355]	<400>26	
[0356]	cagtcgcgcc tgaccagccc cgccagcgtg agcggcagcc caggccagag catcaccatc	60
[0357]	agctgcaccg gcaccagcag cgacgtgggc agctacaacg tgggtgtcctg gtatcagcag	120
[0358]	caccccgcca agggccccaa gctgatcacc tacgaggtgt ccagaggcc cagcggcgtg	180
[0359]	agcaacaggt tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgaccat cagcggcctg	240
[0360]	cagaccgagg acgaggccga ctactactgc tgcagctacg ccggcagcag catcttcgtg	300
[0361]	atcttcggcg gagggaccaa ggtgaccgtc cta	333
[0362]	<210>27	
[0363]	<211>354	
[0364]	<212>DNA	
[0365]	<213> 人工序列	
[0366]	<220>	
[0367]	<223>/ 注 = " 人工序列的描述 :	
[0368]	合成多核苷酸"	
[0369]	<400>27	
[0370]	gaggtgcagc tgctggaaag cggcggaggc ctggtgcagc caggcggcag cctgaggctg	60
[0371]	tcctgcgcgc ccagcggcctt caccttcagc gcctacaaca tgagatgggt gcggcaggcc	120
[0372]	ccaggcaagg gcctggaatg ggtgtccgtg atctacccca gcggcggagc caccagatac	180
[0373]	gccgacagcg tgaagggcag gttcaccatc agcagggaca acagcaagaa caccctgtac	240
[0374]	ctgcagatga acagcctgag ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc caggggctac	300
[0375]	tactactacg gcatggacgt gtggggccag ggcaccctgg tgaccgtgag cagc	354
[0376]	<210>28	
[0377]	<211>330	
[0378]	<212>DNA	
[0379]	<213> 人工序列	
[0380]	<220>	
[0381]	<223>/ 注 = " 人工序列的描述 :	
[0382]	合成多核苷酸"	
[0383]	<400>28	
[0384]	cagagcgtgc tgaccagccc cccaagcgc agcggcaccc caggccagag ggtgaccatc	60
[0385]	agctgcagcg gcagcgacag caacatcggc aggaactaca tctactggta tcagcagttc	120
[0386]	cccgcaccg cccccaagct gctgatctac aggaacaacc agaggccag cggcgtgccc	180
[0387]	gacaggatca gcggcagcaa gageggcacc agcggcagcc tggccatcag cggcctgaga	240
[0388]	agcgaggacg agggcgagta ccaactgcgc acctgggacg acagcctgag cgggccagt	300
[0389]	ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta	330

[0390]	<210>29	
[0391]	<211>366	
[0392]	<212>DNA	
[0393]	<213> 人工序列	
[0394]	<220>	
[0395]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :	
[0396]	合成多核苷酸"	
[0397]	<400>29	
[0398]	gaagttcaat tgtttagagtc tgggtggcgggt cttgttcagc ctgggtgggttc ttacgtctt	60
[0399]	tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct gcttacggta tgggttgggt tcgccaagct	120
[0400]	cctggtaaag gtttggagtg gggtttcttat atctctcctt ctgggtggcca tactaagtat	180
[0401]	gctgactccg ttaaaggctcgt cttcactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
[0402]	ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagtactg	300
[0403]	gaaactggct tattggttga tgcttttgat atctggggcc aagggacaat ggtcaccgtc	360
[0404]	tcaage	366
[0405]	<210>30	
[0406]	<211>318	
[0407]	<212>DNA	
[0408]	<213> 人工序列	
[0409]	<220>	
[0410]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :	
[0411]	合成多核苷酸"	
[0412]	<400>30	
[0413]	cagtacgaat tgactcagcc accctcagtg tccgtgtacc caggacagac agccagcatc	60
[0414]	acctgctctg gagatcaatt ggggagtaaa tttgtttcct ggtatcagca gaggccaggc	120
[0415]	cagtcccctg tgtttggtcat gtataaagat aaaaggcggc cgtcagagat ccctgagcga	180
[0416]	ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctata	240
[0417]	gatgaggctg actattattg tcaggcgtgg gacagcagca cttatgtctt cggcactggg	300
[0418]	accaaggtca ccgtccta	318
[0419]	<210>31	
[0420]	<211>357	
[0421]	<212>DNA	
[0422]	<213> 人工序列	
[0423]	<220>	
[0424]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :	
[0425]	合成多核苷酸"	
[0426]	<400>31	
[0427]	gaagttcaat tgtttagagtc tgggtggcgggt cttgttcagc ctgggtgggttc ttacgtctt	60
[0428]	tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct cattacgtta tggcttgggt tcgccaagct	120

[0429]	cctggtaaag gtttggagtg ggtttcttct atctcttctt ctgggtggctg gactctttat	180
[0430]	gctgactccg ttaaaggteg cticactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
[0431]	ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acagccgtgt attactgtac tagaggctctc	300
[0432]	aagatggcta caatttttga ctactggggc cagggcaccc tggtcaccgt ctcaage	357
[0433]	<210>32	
[0434]	<211>333	
[0435]	<212>DNA	
[0436]	<213> 人工序列	
[0437]	<220>	
[0438]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :	
[0439]	合成多核苷酸"	
[0440]	<400>32	
[0441]	cagagcgctt tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc gatcaccatc	60
[0442]	tcctgcactg gaaccagcag tgatgttggg agttataatg ttgtctcctg gtaccaacaa	120
[0443]	caccagggca aagcccccaa actcatcatt tatgaggtea gtcagcggcc ctcaggggtt	180
[0444]	tctaategct tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgacaat ctctgggctc	240
[0445]	cagactgagg acgaggctga ttattactgc tgctcatatg caggtagtag tattttcgtg	300
[0446]	atatcgggcg gagggaccaa ggtgaccgtc cta	333
[0447]	<210>33	
[0448]	<211>354	
[0449]	<212>DNA	
[0450]	<213> 人工序列	
[0451]	<220>	
[0452]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :	
[0453]	合成多核苷酸"	
[0454]	<400>33	
[0455]	gaagttcaat tgttagagtc tgggtggcggc cttgttcagc ctgggtgggtc tttacgtctt	60
[0456]	tcttgcgctg ctcccgatt cactttctct gcttacaata tgcgttgggt tcgccaagct	120
[0457]	cctggtaaag gtttggagtg ggtttctgtt atctatcctt ctgggtggcgc tactcgttat	180
[0458]	gctgactccg ttaaaggteg cticactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac	240
[0459]	ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggtac	300
[0460]	tactactacg gtatggacgt ctggggccaa ggcaccctgg tcaccgtctc aage	354
[0461]	<210>34	
[0462]	<211>330	
[0463]	<212>DNA	
[0464]	<213> 人工序列	
[0465]	<220>	
[0466]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :	
[0467]	合成多核苷酸"	

[0468]	<400>34	
[0469]	cagagcgtct tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
[0470]	tcgtgttctg gaagegactc caacatcgga agaaattata tatattggta ccagcaattc	120
[0471]	ccaggaacgg cccccaagct cctcatctat aggaataatc agcggccctc aggggtccct	180
[0472]	gaccgaatct ctggtccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg	240
[0473]	tccgaggatg aggctgagta tcaactgtgga acatgggatg acagcctgag tgggtccgta	300
[0474]	ttcggcggag ggactaagct gaccgtccta	330
[0475]	<210>35	
[0476]	<211>118	
[0477]	<212>PRT	
[0478]	<213> 人工序列	
[0479]	<220>	
[0480]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :	
[0481]	合成多肽"	
[0482]	<400>35	
[0483]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[0484]	1 5 10 15	
[0485]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr	
[0486]	20 25 30	
[0487]	Gly Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
[0488]	35 40 45	
[0489]	Ser Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val	
[0490]	50 55 60	
[0491]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[0492]	65 70 75 80	
[0493]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0494]	85 90 95	
[0495]	Ala Arg Leu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr	
[0496]	100 105 110	
[0497]	Thr Val Thr Val Ser Ser	
[0498]	115	
[0499]	<210>36	
[0500]	<211>108	
[0501]	<212>PRT	
[0502]	<213> 人工序列	
[0503]	<220>	
[0504]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :	
[0505]	合成多肽"	
[0506]	<400>36	

[0507]	Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
[0508]	1 5 10 15
[0509]	Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp
[0510]	20 25 30
[0511]	Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu
[0512]	35 40 45
[0513]	Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser
[0514]	50 55 60
[0515]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Phe Arg Ser Leu Gln
[0516]	65 70 75 80
[0517]	Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro
[0518]	85 90 95
[0519]	Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
[0520]	100 105
[0521]	<210>37
[0522]	<211>119
[0523]	<212>PRT
[0524]	<213> 人工序列
[0525]	<220>
[0526]	<223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0527]	合成多肽"
[0528]	<400>37
[0529]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0530]	1 5 10 15
[0531]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
[0532]	20 25 30
[0533]	Gly Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0534]	35 40 45
[0535]	Ser Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val
[0536]	50 55 60
[0537]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0538]	65 70 75 80
[0539]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0540]	85 90 95
[0541]	Ala Gly Gly Arg Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly
[0542]	100 105 110
[0543]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0544]	115
[0545]	<210>38

[0546] <211>110
 [0547] <212>PRT
 [0548] <213> 人工序列
 [0549] <220>
 [0550] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
 [0551] 合成多肽"
 [0552] <400>38
 [0553] Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 [0554] 1 5 10 15
 [0555] Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp
 [0556] 20 25 30
 [0557] Asn Ile Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 [0558] 35 40 45
 [0559] Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 [0560] 50 55 60
 [0561] Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 [0562] 65 70 75 80
 [0563] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
 [0564] 85 90 95
 [0565] Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 [0566] 100 105 110
 [0567] <210>39
 [0568] <211>5
 [0569] <212>PRT
 [0570] <213> 人工序列
 [0571] <220>
 [0572] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
 [0573] 合成肽"
 [0574] <400>39
 [0575] Trp Tyr Gly Met Gly
 [0576] 1 5
 [0577] <210>40
 [0578] <211>17
 [0579] <212>PRT
 [0580] <213> 人工序列
 [0581] <220>
 [0582] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
 [0583] 合成肽"
 [0584] <400>40

[0585] Tyr Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[0586] 1 5 10 15
[0587] Gly
[0588] <210>41
[0589] <211>9
[0590] <212>PRT
[0591] <213> 人工序列
[0592] <220>
[0593] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0594] 合成肽"
[0595] <400>41
[0596] Leu Asn Tyr Tyr Tyr Gly Leu Asp Val
[0597] 1 5
[0598] <210>42
[0599] <211>11
[0600] <212>PRT
[0601] <213> 人工序列
[0602] <220>
[0603] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0604] 合成肽"
[0605] <400>42
[0606] Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp Ser Leu Asn
[0607] 1 5 10
[0608] <210>43
[0609] <211>7
[0610] <212>PRT
[0611] <213> 人工序列
[0612] <220>
[0613] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0614] 合成肽"
[0615] <400>43
[0616] Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr
[0617] 1 5
[0618] <210>44
[0619] <211>9
[0620] <212>PRT
[0621] <213> 人工序列
[0622] <220>
[0623] <223>/ 注=" 人工序列的描述：

[0624] 合成肽"
[0625] <400>44
[0626] Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro Phe Thr
[0627] 1 5
[0628] <210>45
[0629] <211>5
[0630] <212>PRT
[0631] <213> 人工序列
[0632] <220>
[0633] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0634] 合成肽"
[0635] <400>45
[0636] Arg Tyr Gly Met Trp
[0637] 1 5
[0638] <210>46
[0639] <211>17
[0640] <212>PRT
[0641] <213> 人工序列
[0642] <220>
[0643] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0644] 合成肽"
[0645] <400>46
[0646] Tyr Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
[0647] 1 5 10 15
[0648] Gly
[0649] <210>47
[0650] <211>10
[0651] <212>PRT
[0652] <213> 人工序列
[0653] <220>
[0654] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
[0655] 合成肽"
[0656] <400>47
[0657] Gly Arg Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe Asp Ser
[0658] 1 5 10
[0659] <210>48
[0660] <211>14
[0661] <212>PRT
[0662] <213> 人工序列

[0663] <220>
 [0664] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
 [0665] 合成肽"
 [0666] <400>48
 [0667] Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp Asn Ile Val Ser
 [0668] 1 5 10
 [0669] <210>49
 [0670] <211>7
 [0671] <212>PRT
 [0672] <213> 人工序列
 [0673] <220>
 [0674] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
 [0675] 合成肽"
 [0676] <400>49
 [0677] Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser
 [0678] 1 5
 [0679] <210>50
 [0680] <211>10
 [0681] <212>PRT
 [0682] <213> 人工序列
 [0683] <220>
 [0684] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
 [0685] 合成肽"
 [0686] <400>50
 [0687] Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Trp Val
 [0688] 1 5 10
 [0689] <210>51
 [0690] <211>111
 [0691] <212>PRT
 [0692] <213> 人工序列
 [0693] <220>
 [0694] <223>/ 注=" 人工序列的描述：
 [0695] 合成多肽"
 [0696] <400>51
 [0697] Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 [0698] 1 5 10 15
 [0699] Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
 [0700] 20 25 30
 [0701] Asn Val Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

[0702]	35	40	45
[0703]	Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe		
[0704]	50	55	60
[0705]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu		
[0706]	65	70	75
[0707]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser		
[0708]	85	90	95
[0709]	Ser Ile Phe Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
[0710]	100	105	110
[0711]	<210>52		
[0712]	<211>108		
[0713]	<212>PRT		
[0714]	<213> 人工序列		
[0715]	<220>		
[0716]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :		
[0717]	合成多肽"		
[0718]	<400>52		
[0719]	Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val		
[0720]	1	5	10
[0721]	Gly Asp Arg Ile Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asp		
[0722]	20	25	30
[0723]	Ser Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu		
[0724]	35	40	45
[0725]	Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Pro Arg Phe Ser		
[0726]	50	55	60
[0727]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Phe Arg Ser Leu Gln		
[0728]	65	70	75
[0729]	Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Ala Asn Ala Pro		
[0730]	85	90	95
[0731]	Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Arg		
[0732]	100	105	
[0733]	<210>53		
[0734]	<211>110		
[0735]	<212>PRT		
[0736]	<213> 人工序列		
[0737]	<220>		
[0738]	<223>/ 注=" 人工序列的描述 :		
[0739]	合成多肽"		
[0740]	<400>53		

[0741]	Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
[0742]	1 5 10 15
[0743]	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Arg Trp
[0744]	20 25 30
[0745]	Asn Ile Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
[0746]	35 40 45
[0747]	Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
[0748]	50 55 60
[0749]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
[0750]	65 70 75 80
[0751]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
[0752]	85 90 95
[0753]	Ser Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0754]	100 105 110

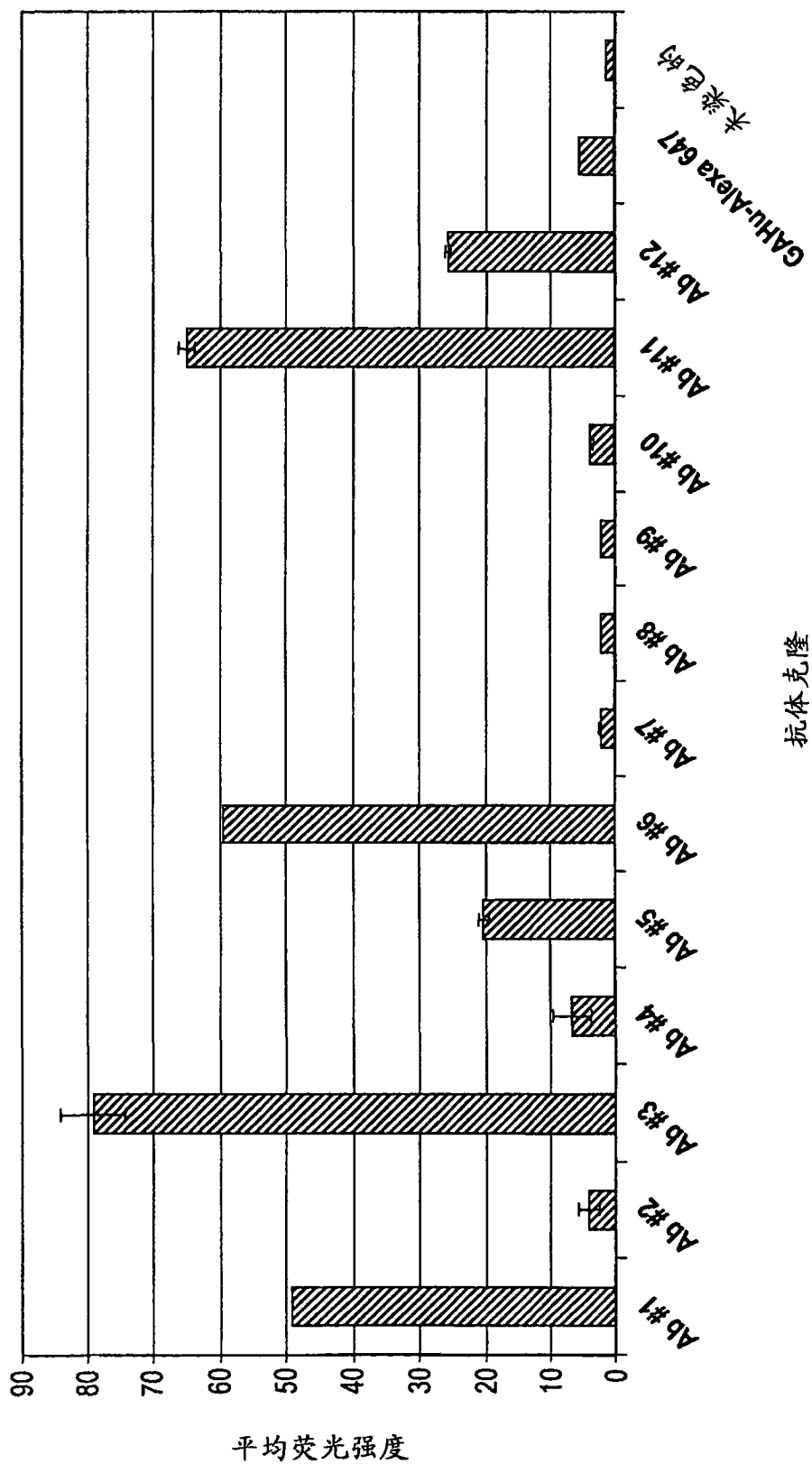


图 1A

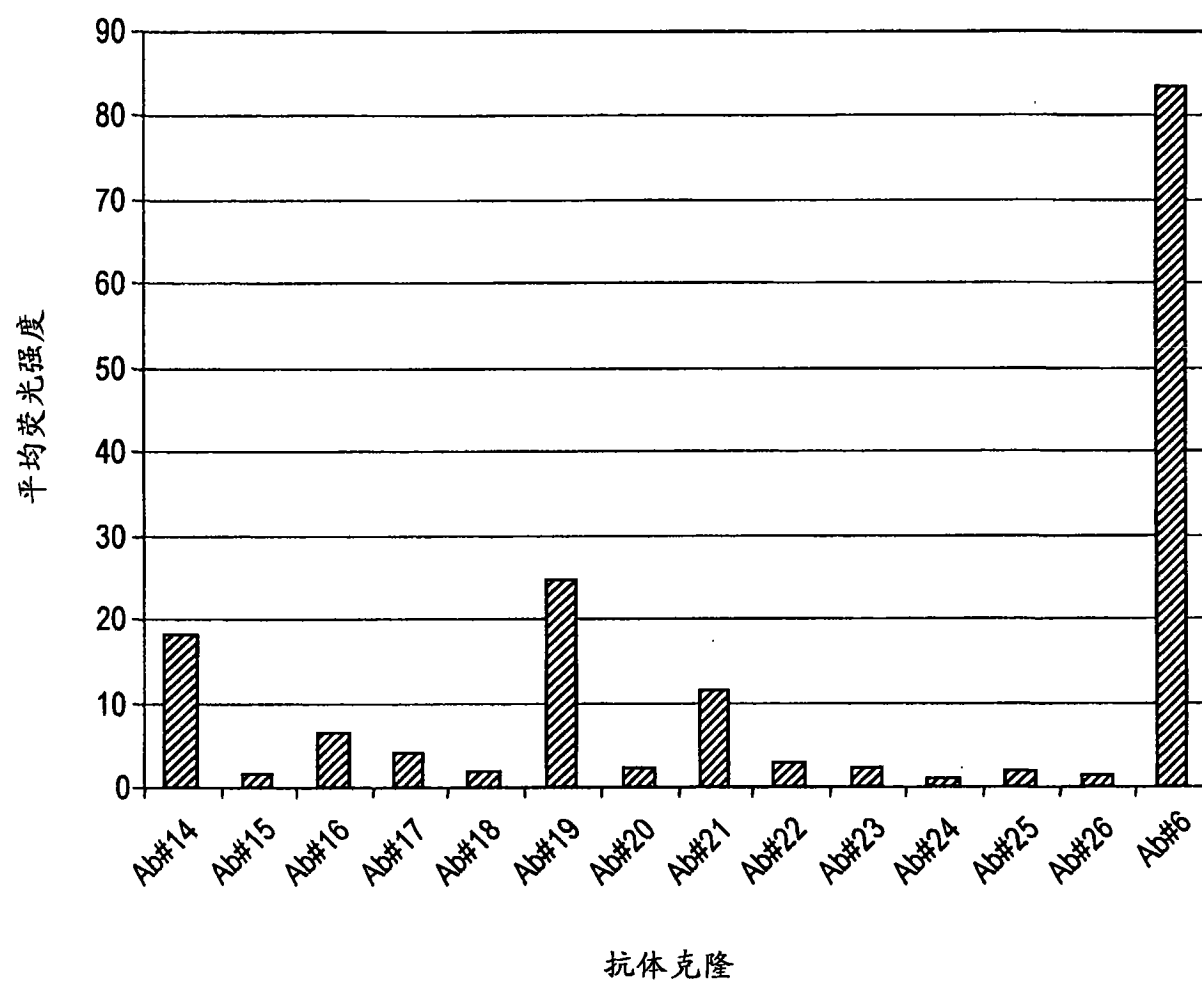


图 1B

通过 SPR 测量的抗体与 ErbB3 的结合

$$K_D = k_d/k_a$$

亲和力

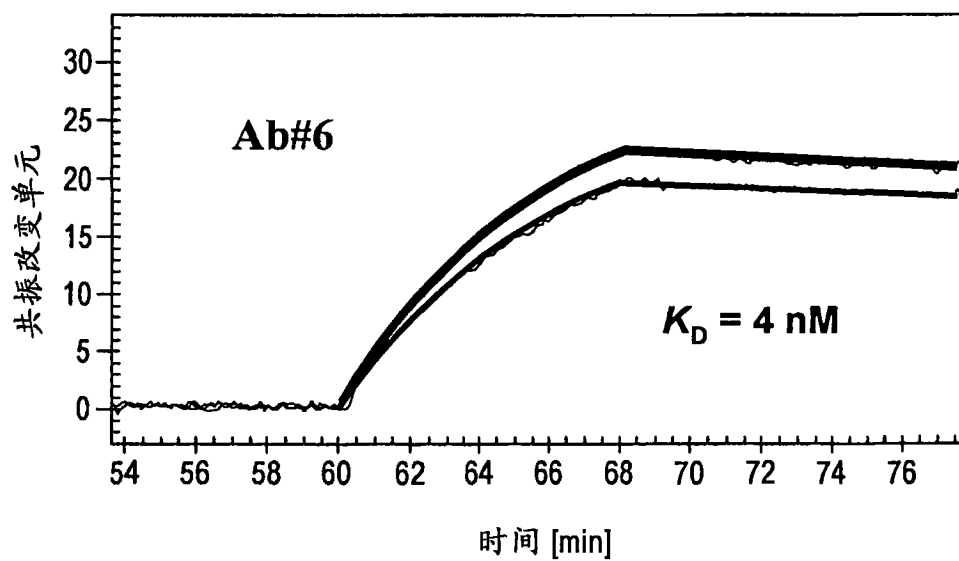


图 2A

亲和力

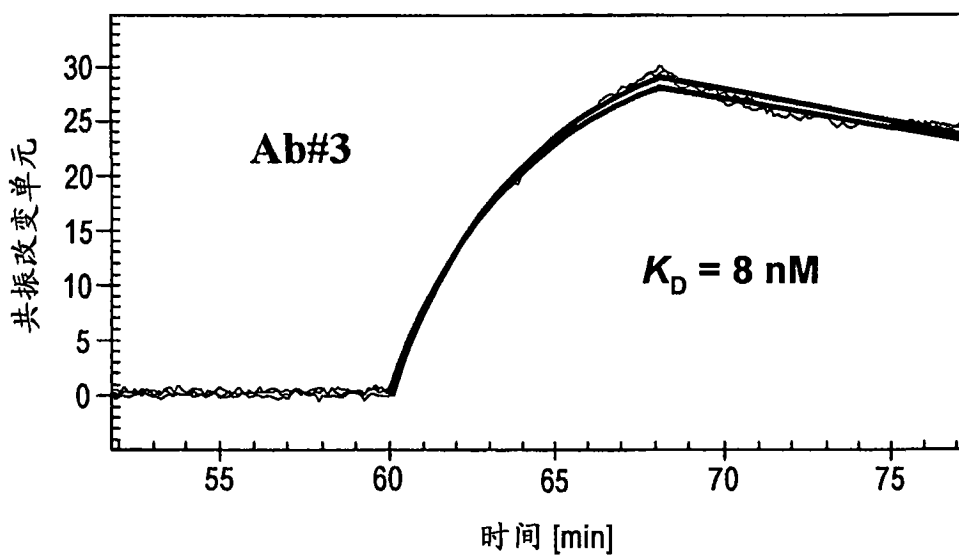


图 2B

抗体与 MALME-3M 细胞的细胞结合分析

$$Y=B_{\max} * X / K_D + X$$

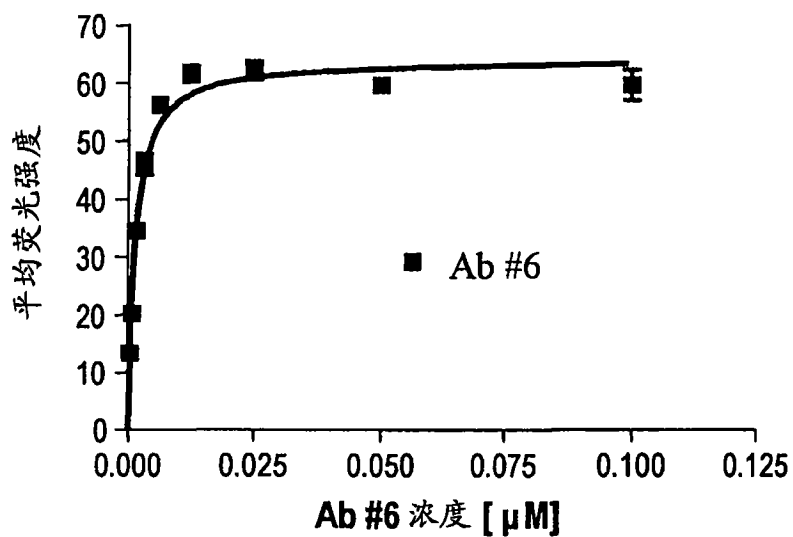


图 2C

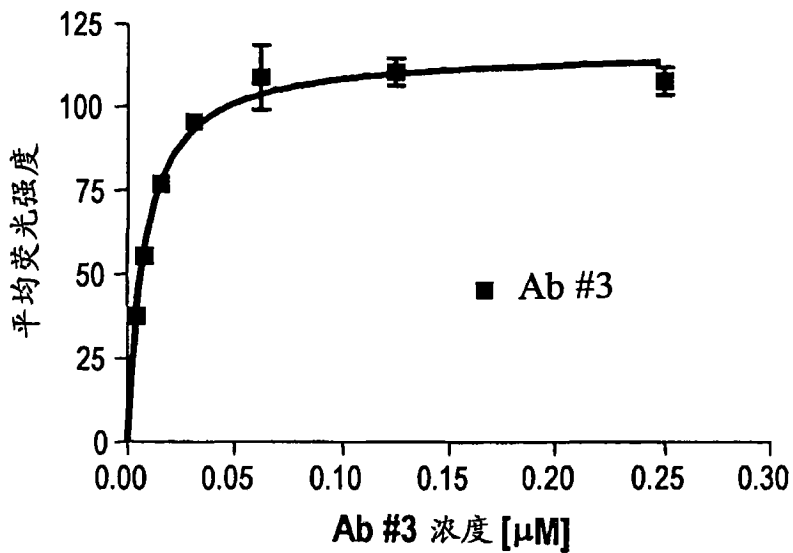


图 2D

AB #6 IgG2 特异性地与 ErbB3 结合

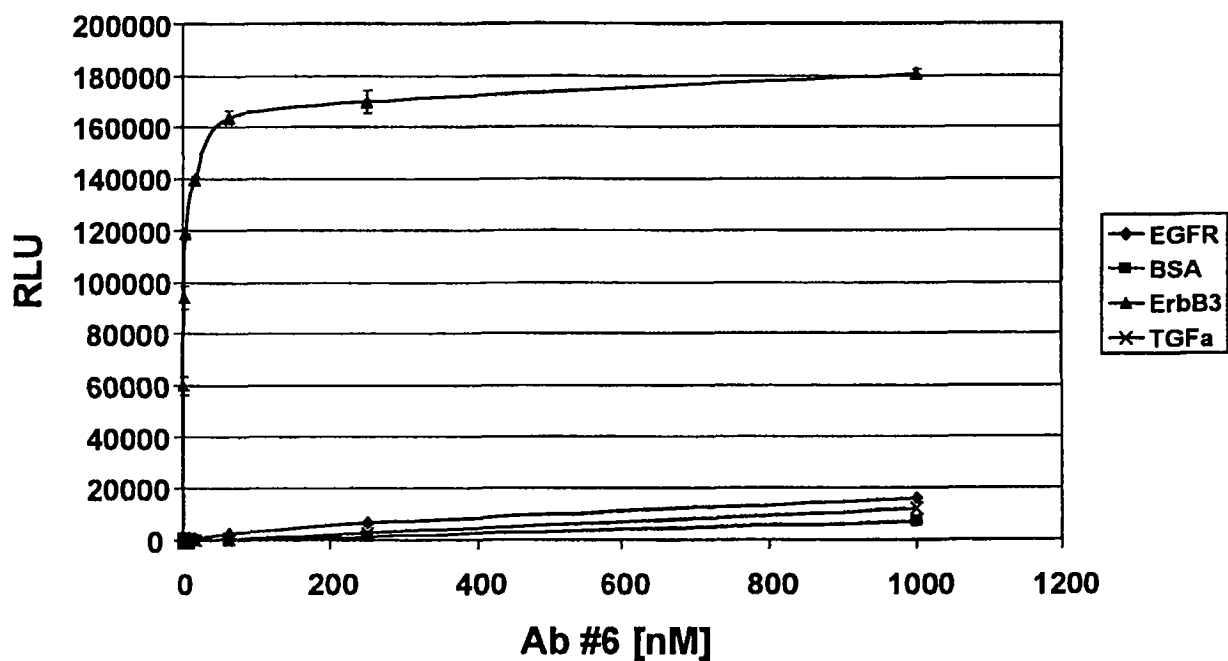


图 3

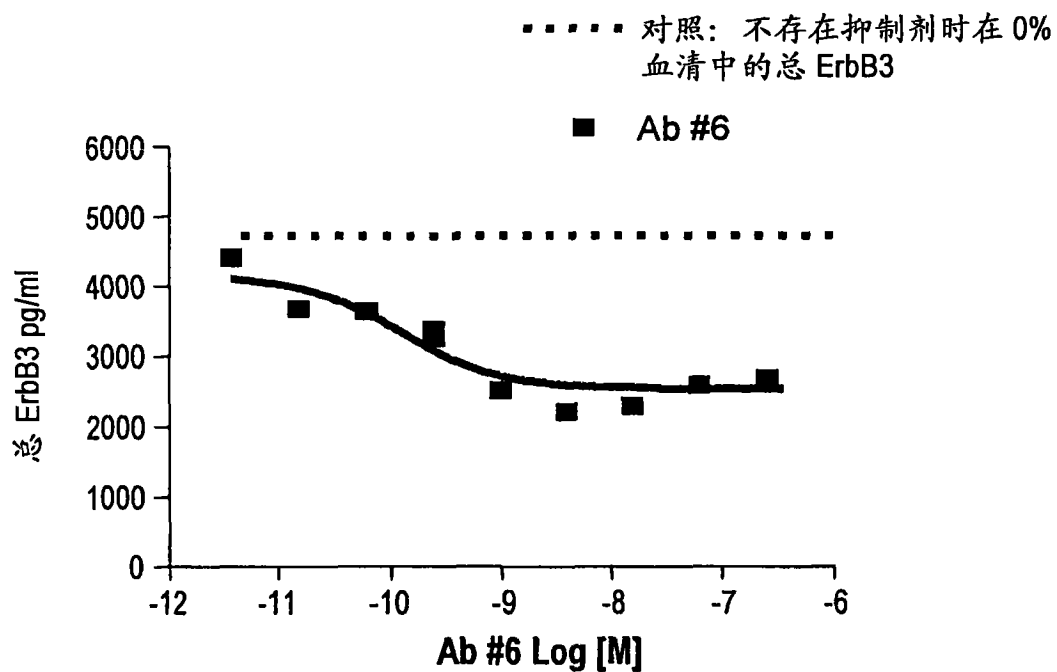
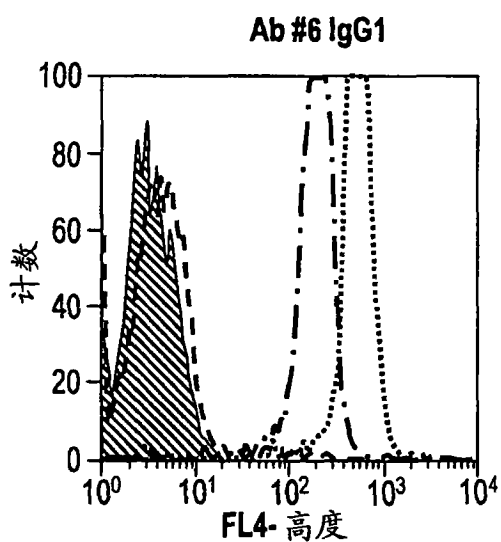
通过 ELISA 测量的抗体 #6 体外引起 MALME
3M 黑素瘤细胞中 ErbB3 水平的下降

图 4

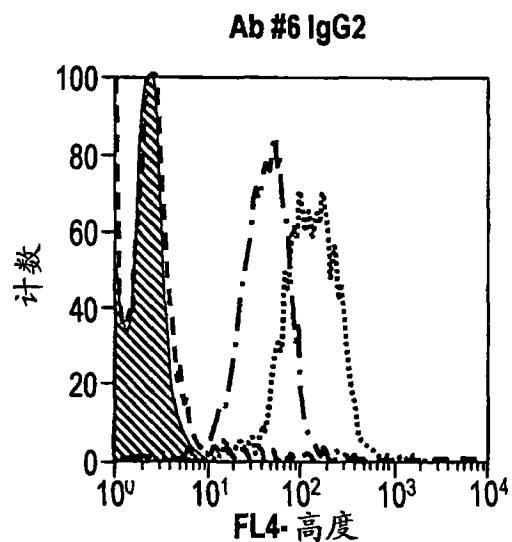
通过 FACS 测量得到的
Ab #6 IgG1 和 IgG2 下调
MALME-3M (黑素瘤)
细胞上的 ErbB3 受体



▨ 对照
..... 20nM_Ab #6_IgG2
- - - 二级 Ab
- . . 20nM_Ab #6_IgG2

图 5A

通过 FACS 测量得到的
Ab #6 IgG1 和 IgG2 下调
MALME-3M (黑素瘤)
细胞上的 ErbB3 受体



▨ 对照
..... 20nM_Ab #6_IgG2
- - - 二级 Ab
- . . 20nM_Ab #6_IgG2

图 5B

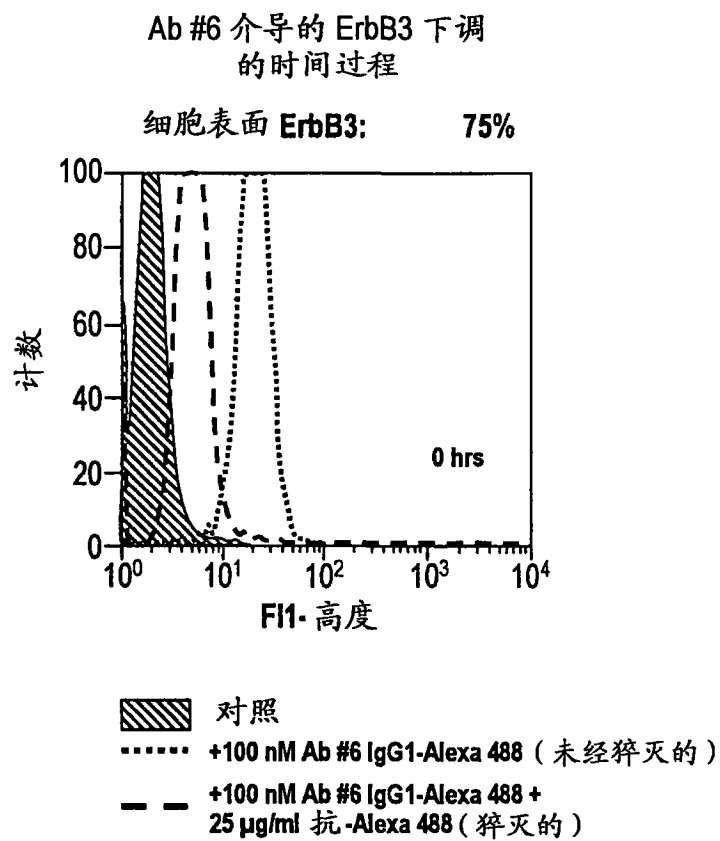


图 6A

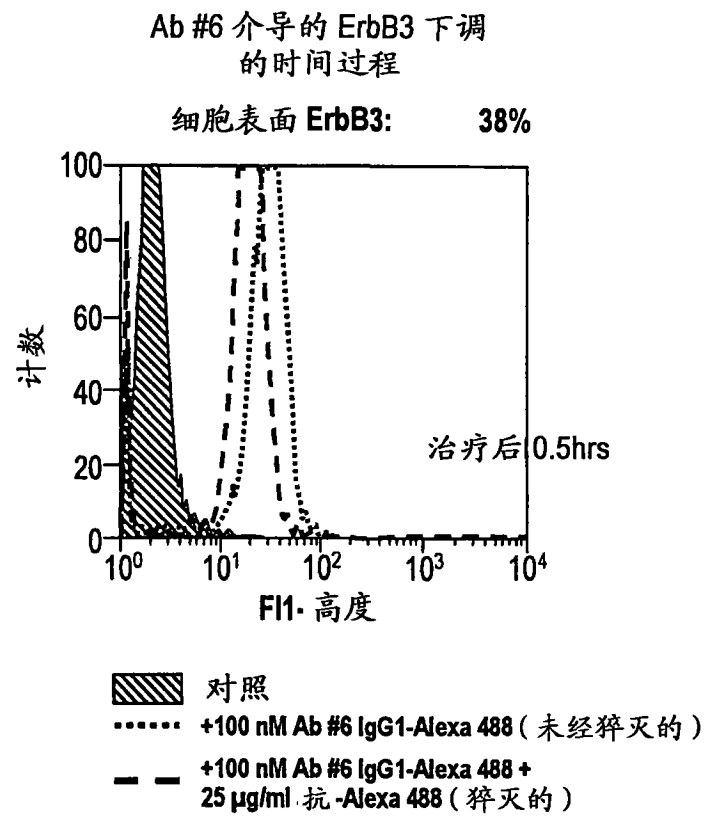


图 6B

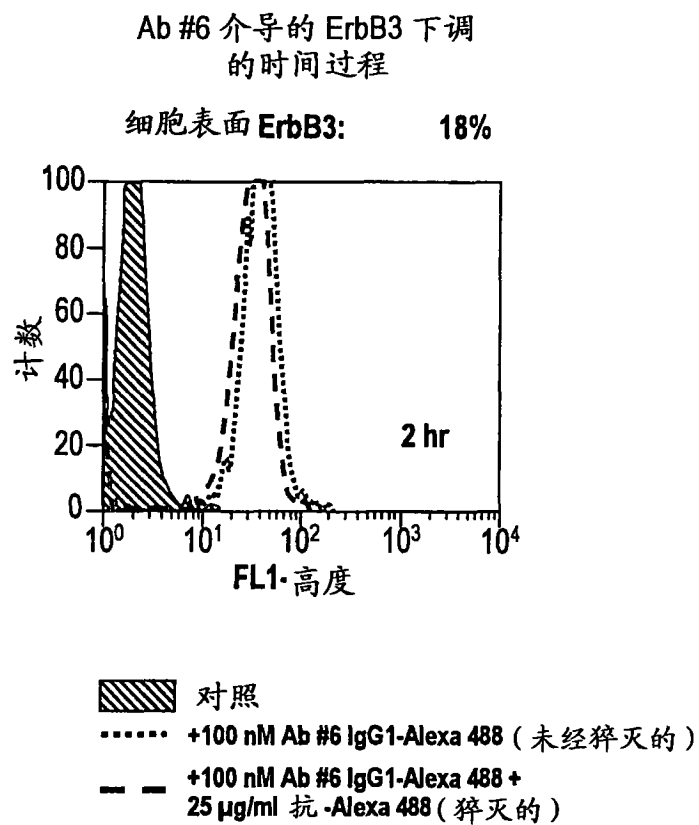


图 6C

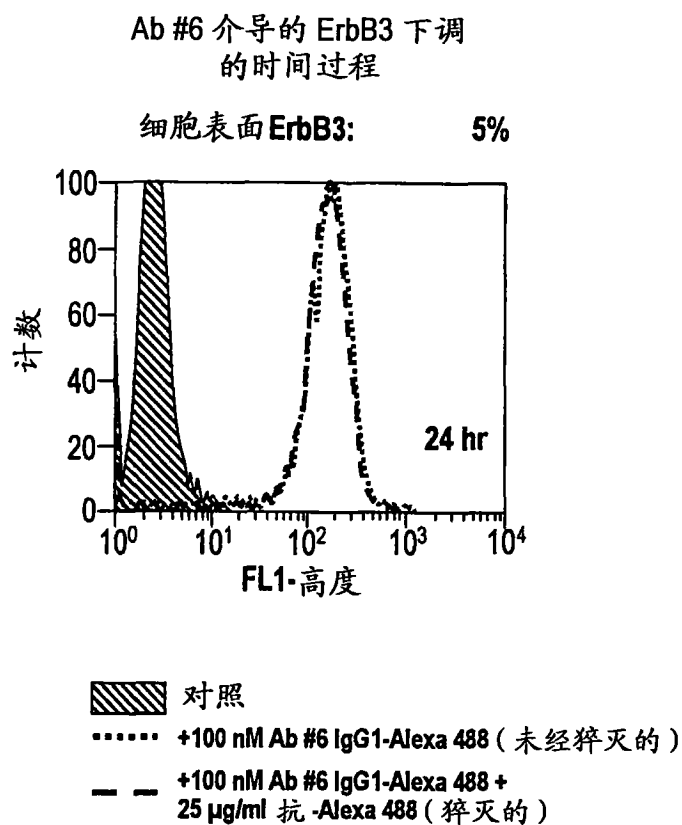


图 6D

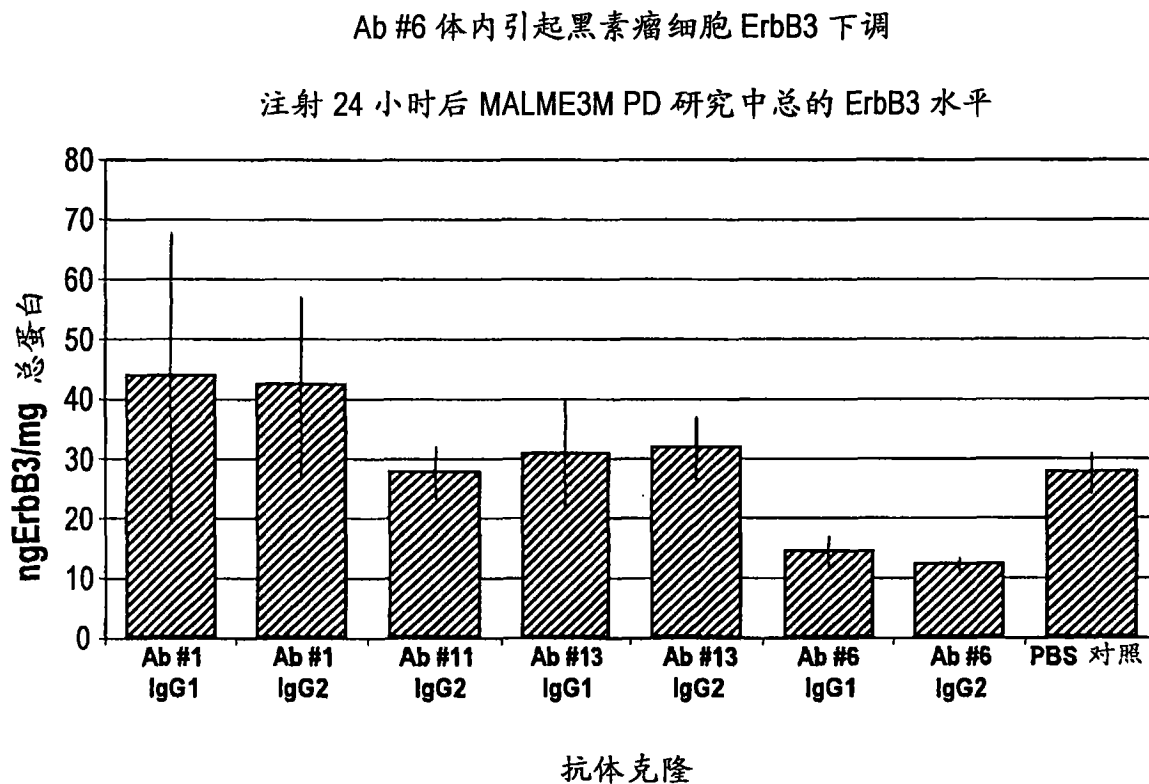


图 7

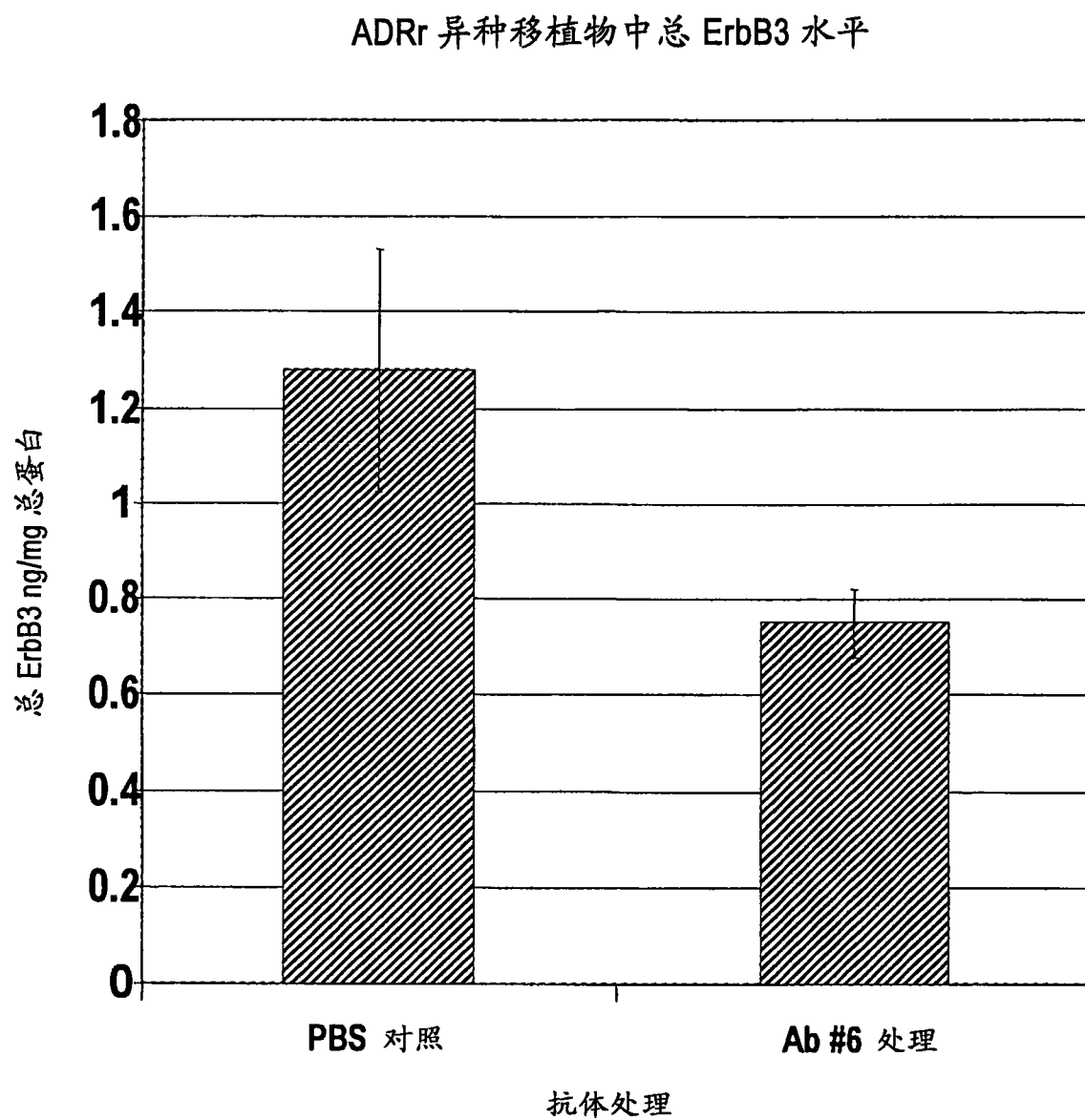


图 8

通过细胞效价发光分析测量得到：
Ab #6 抑制 MALME 3M 黑素瘤细胞的增殖

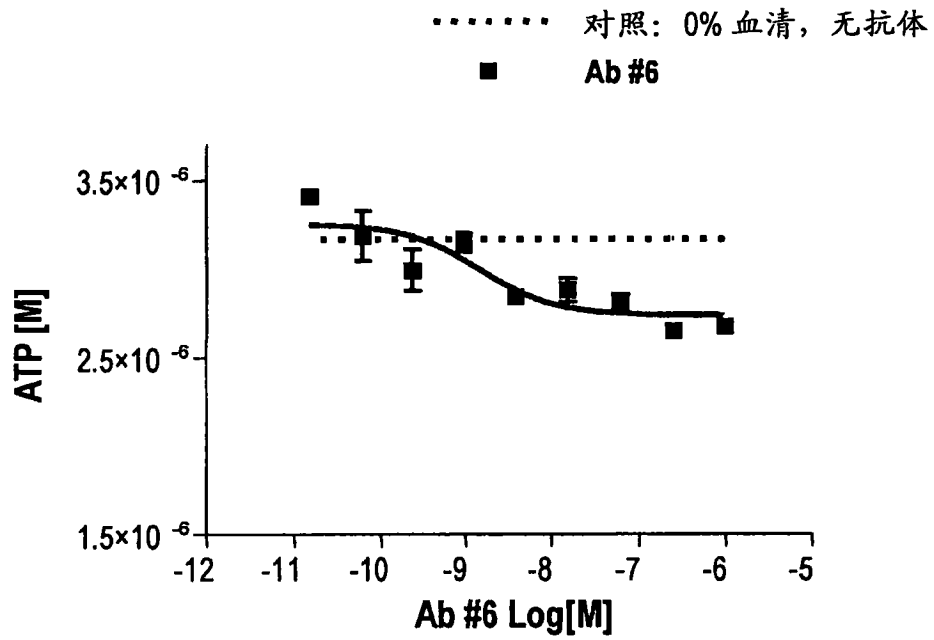


图 9

Ab #6 抑制 ADRr (卵巢) 细胞系细胞增殖

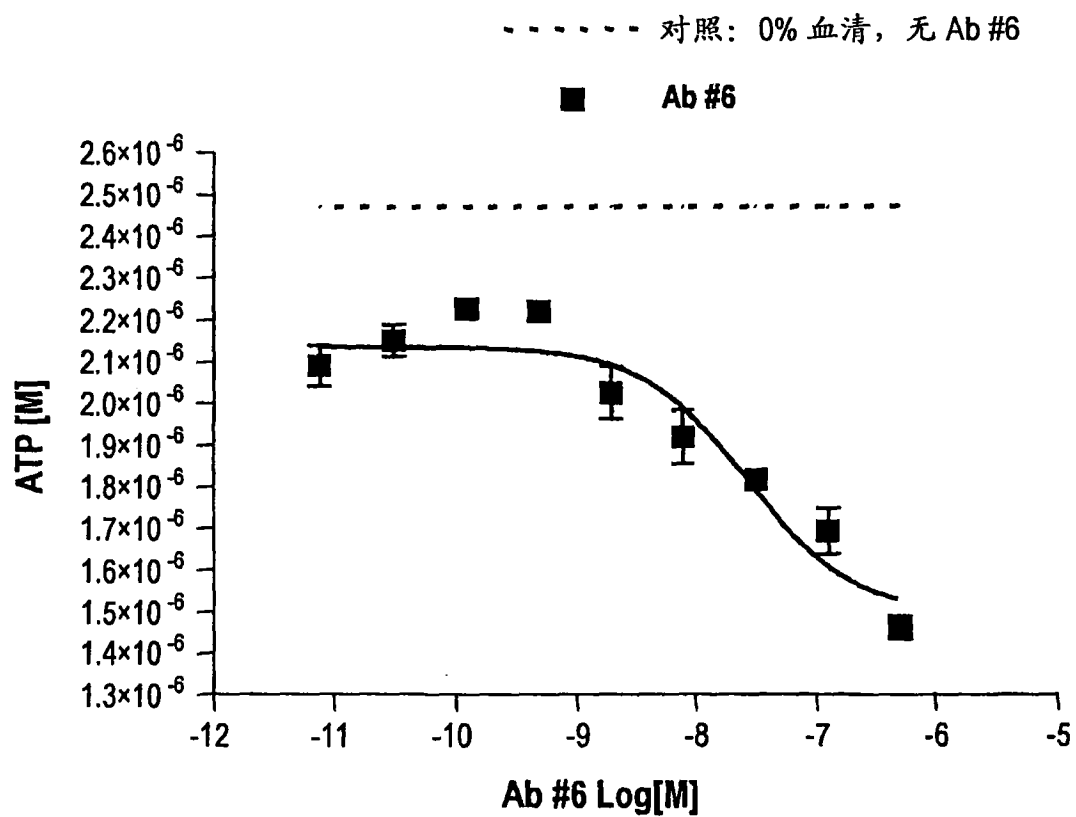


图 10

Ab #6 抑制 ACHN 细胞系细胞增殖

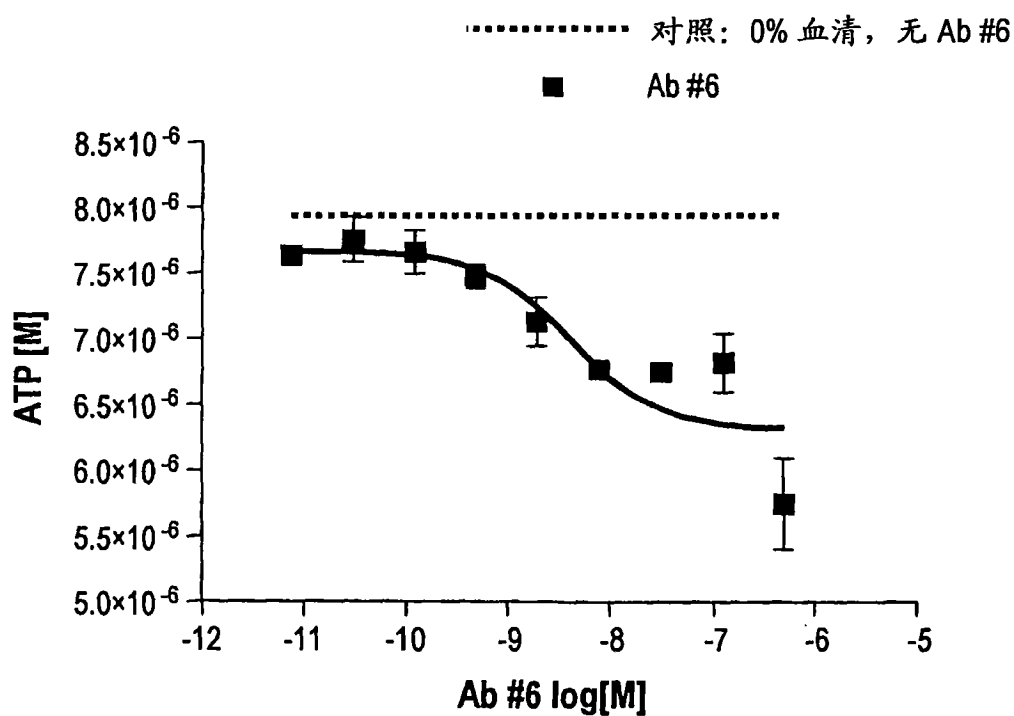


图 11

Ab #6 体内抑制 ADRr 异种移植物 ErbB3 磷酸化

ADRr 异种移植物 pErbB3 水平

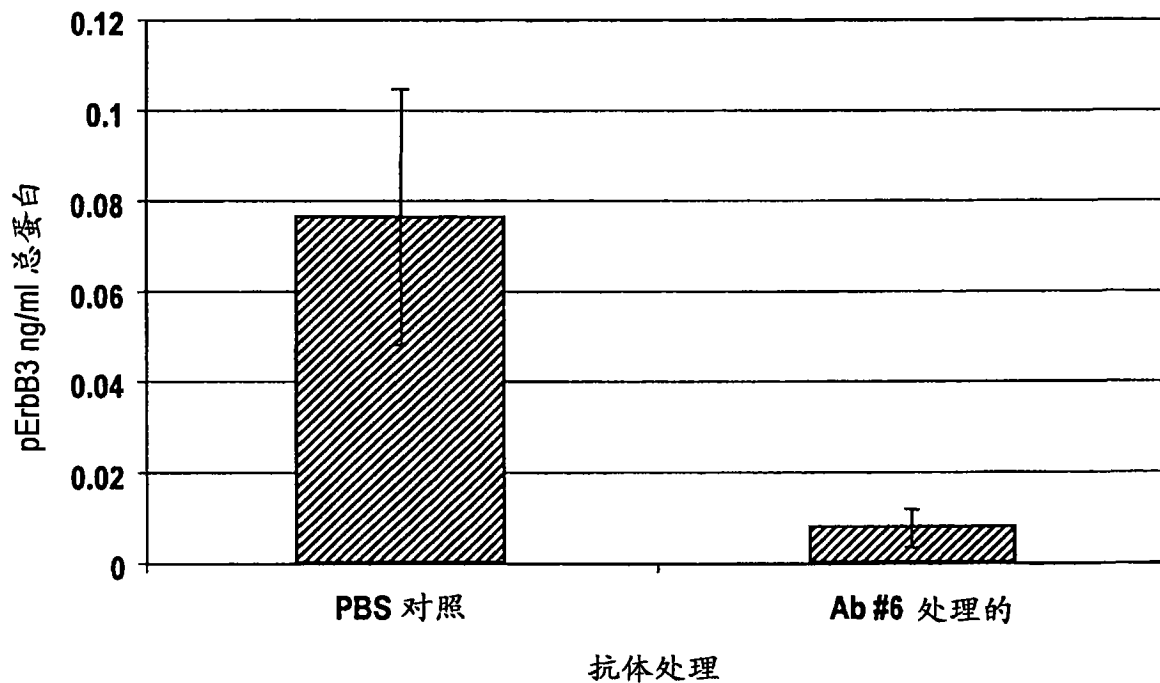


图 12

Ab #6 IgG2/BTC

IC50	8.37e-10 M
95% CI	5.32e-10 至 1.32e-9

NCI-ADRr 细胞中的 Ab #6 IC50-0% 血清

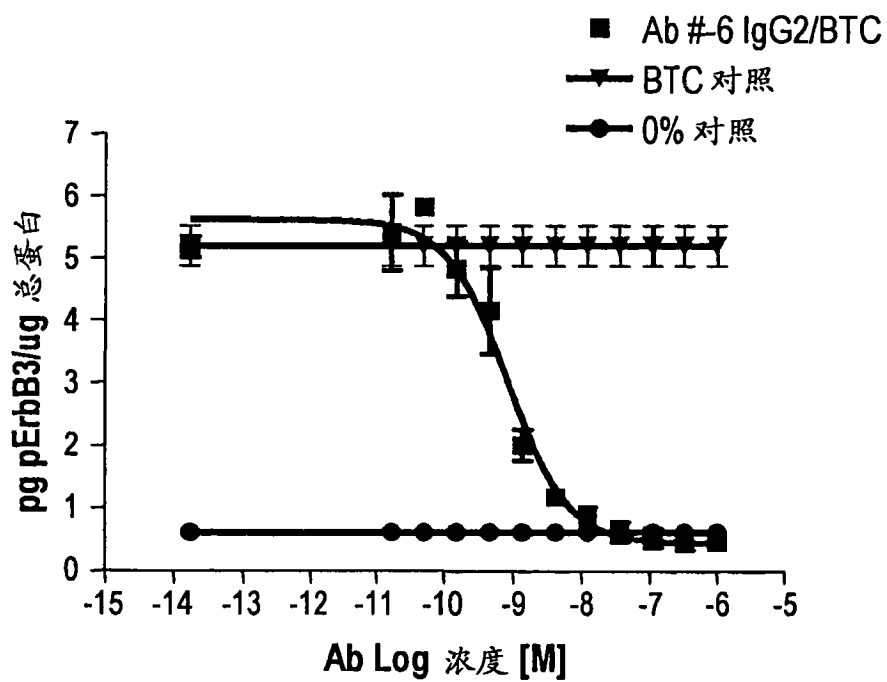


图 13A

Ab #6 IgG2/BTC	
IC50	2.488e-009
95% CI	1.051e-009 至 5.889e-009

NCI-ADRr 细胞中的 Ab #6 IgG2-0% 血清

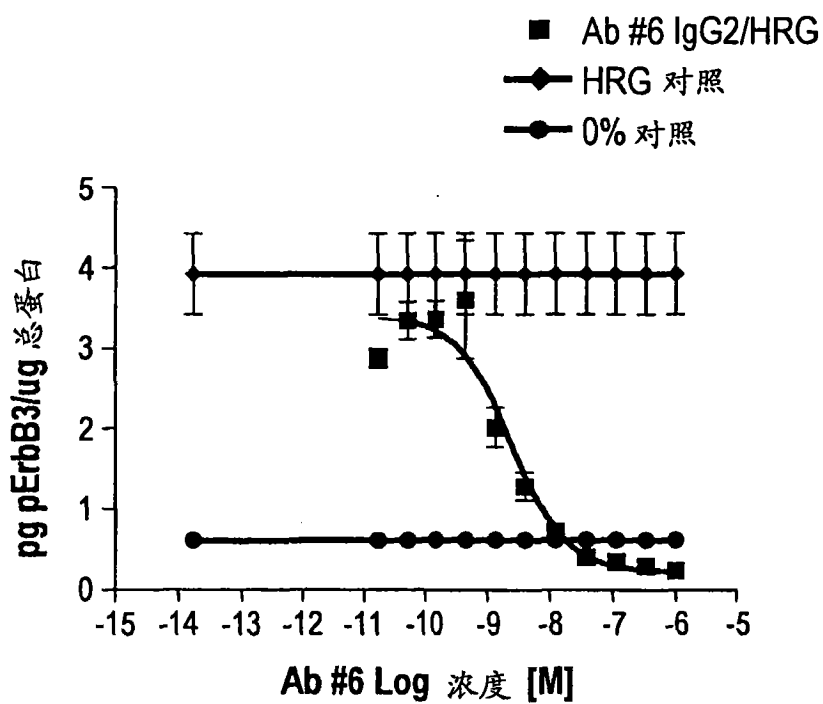


图 13B

Ab #6 IgG2/TGFa

IC50	4.901e-009
95% CI	1.965e-009 至 1.222e-008

NCI-ADRr 细胞中的 Ab #6 IgG2 IC50-0% 血清

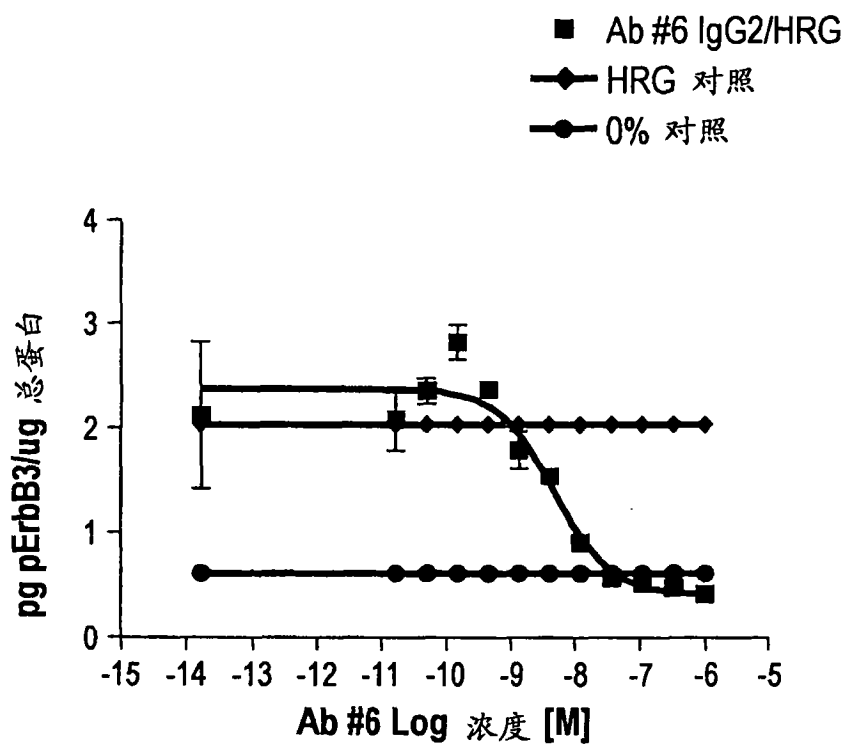


图 13C

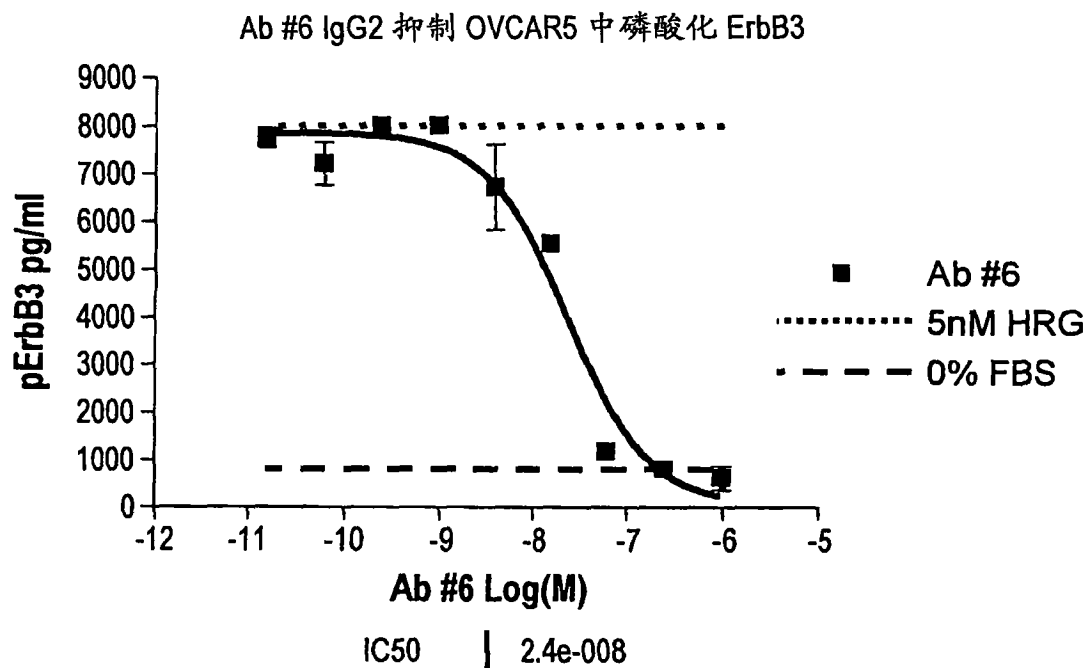


图 14A

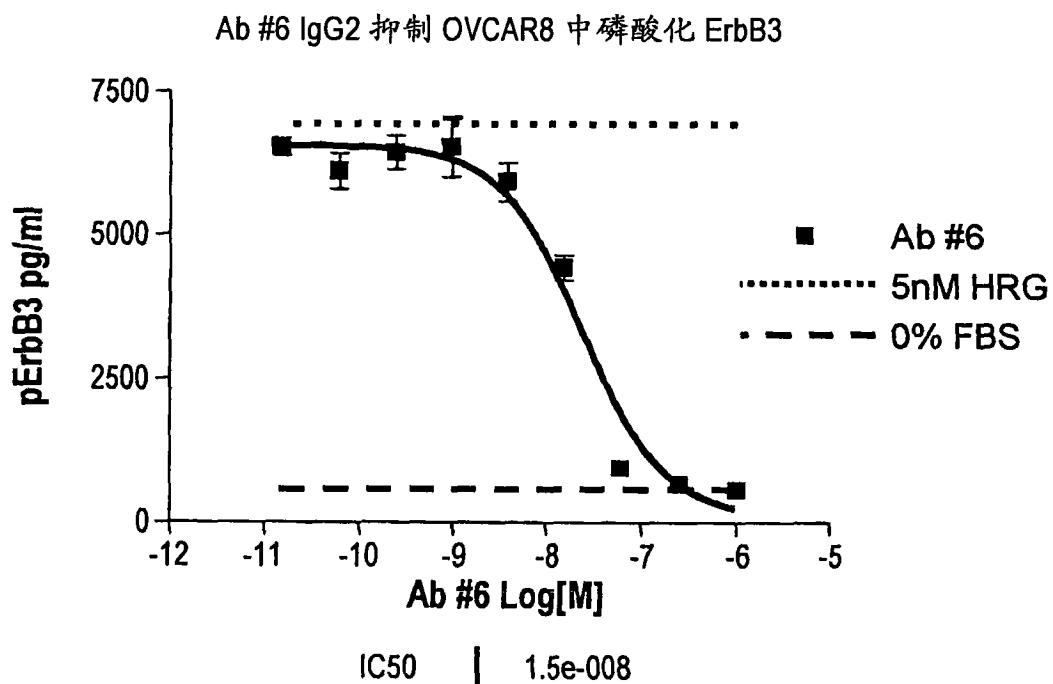


图 14B

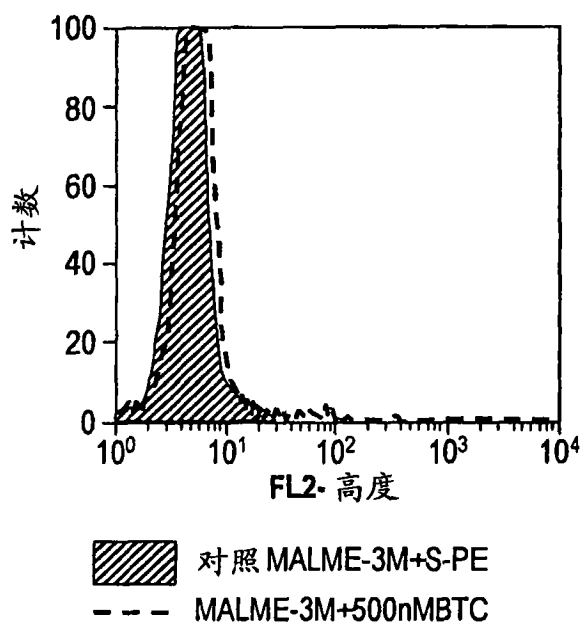


图 15A

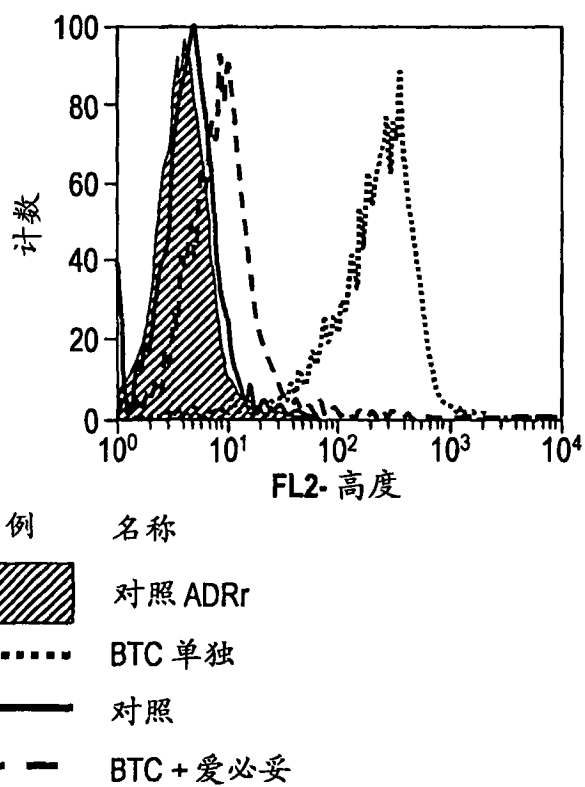


图 15B

爱必妥阻断 BTC 结合, 单 Ab #6 不能

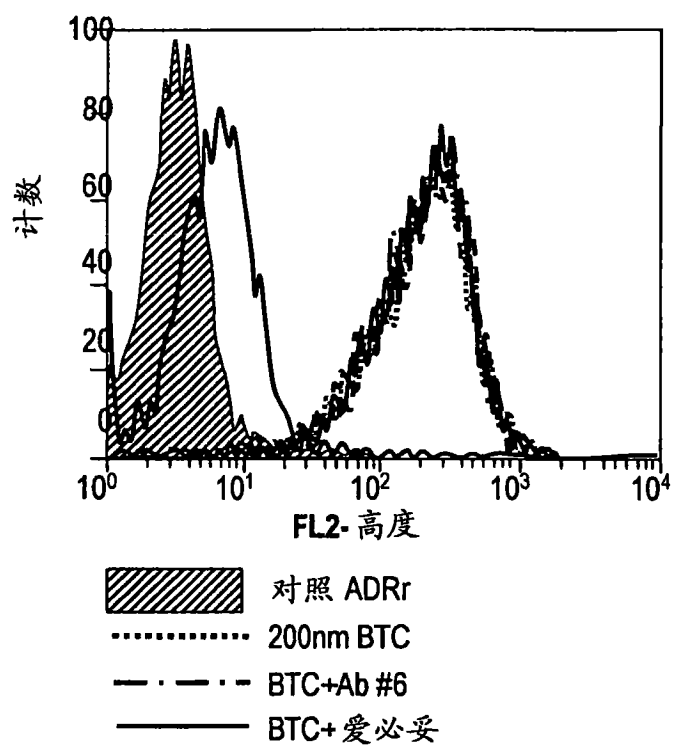


图 15C

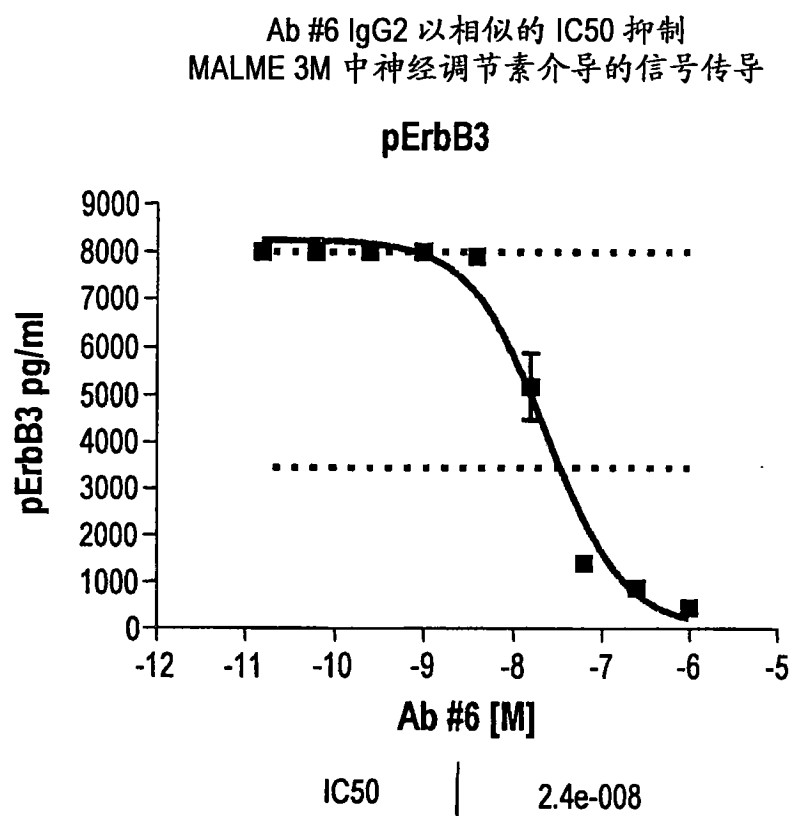


图 16A

Ab #6 IgG2 以相似的 IC₅₀ 抑制
MALME 3M 中神经调节素介导的信号传导

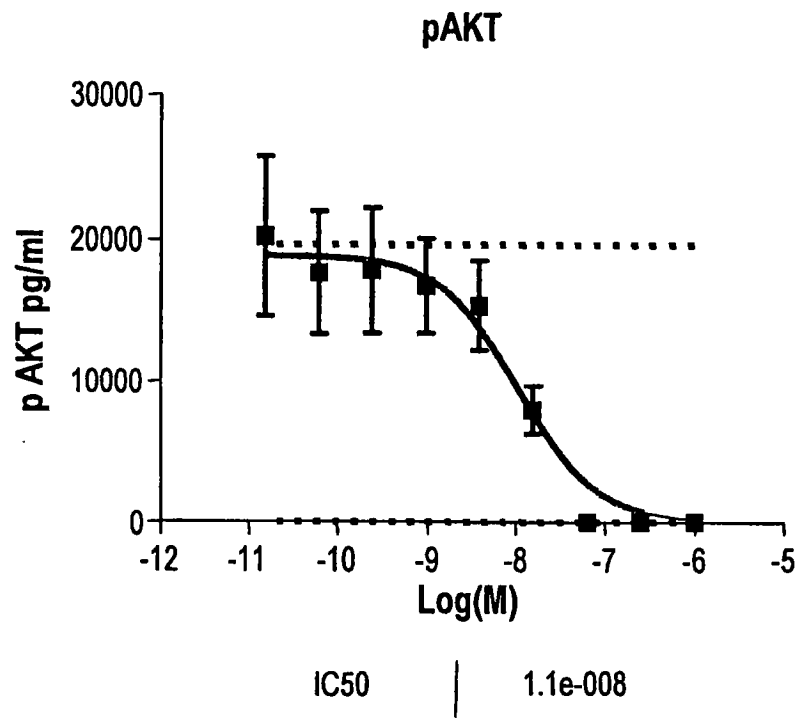


图 16B

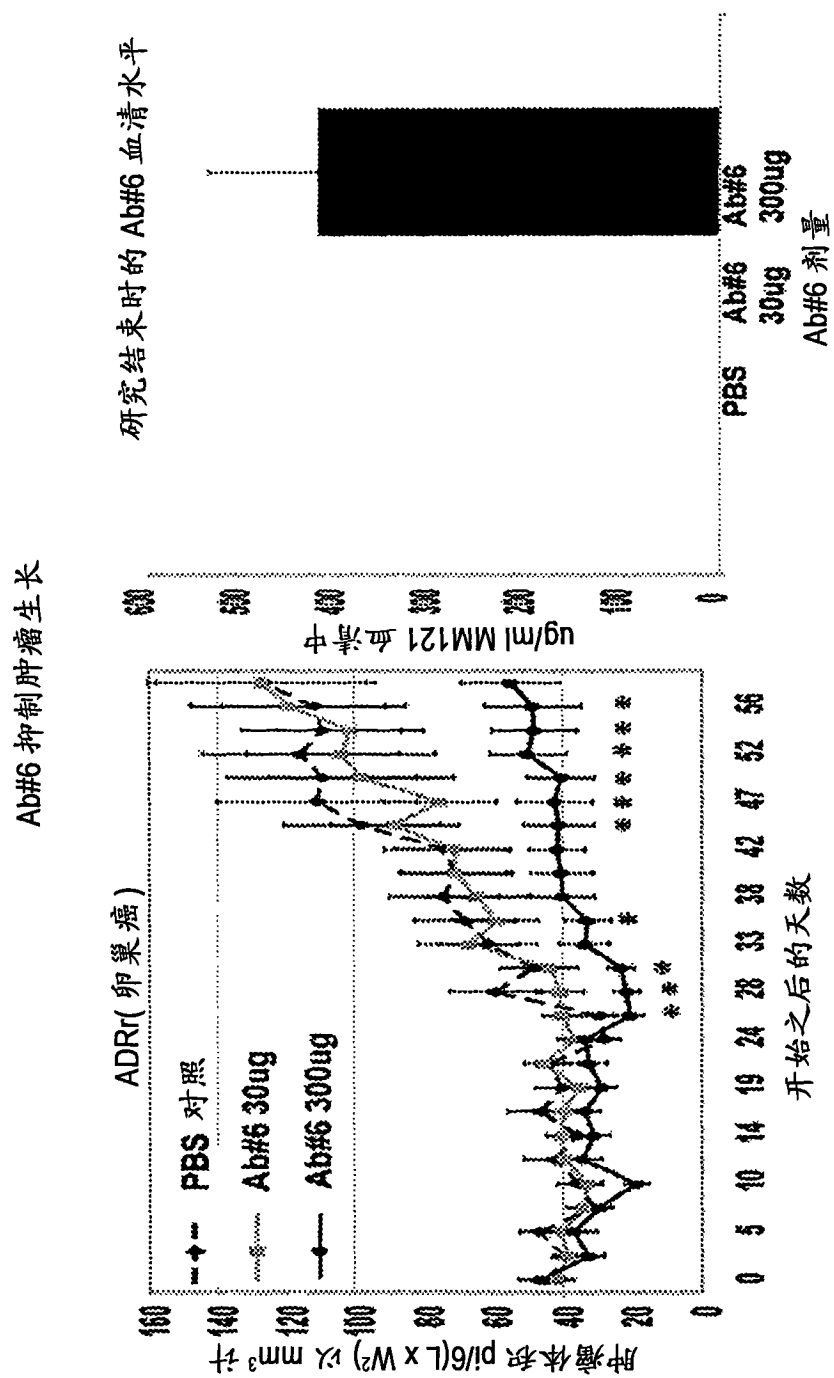
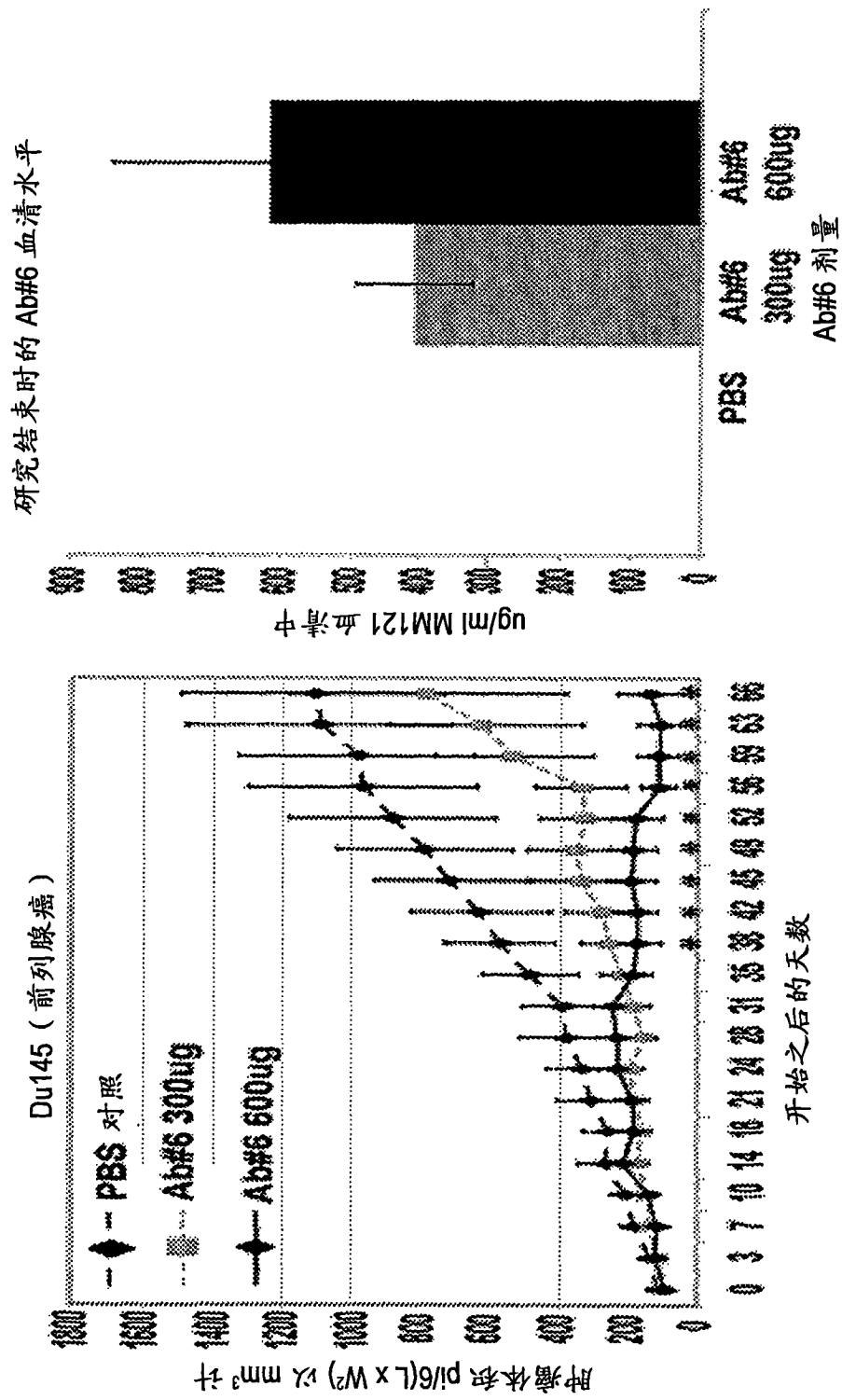


图 17A

Ab#6 抑制肿瘤生长



*P<0.05

图 17B

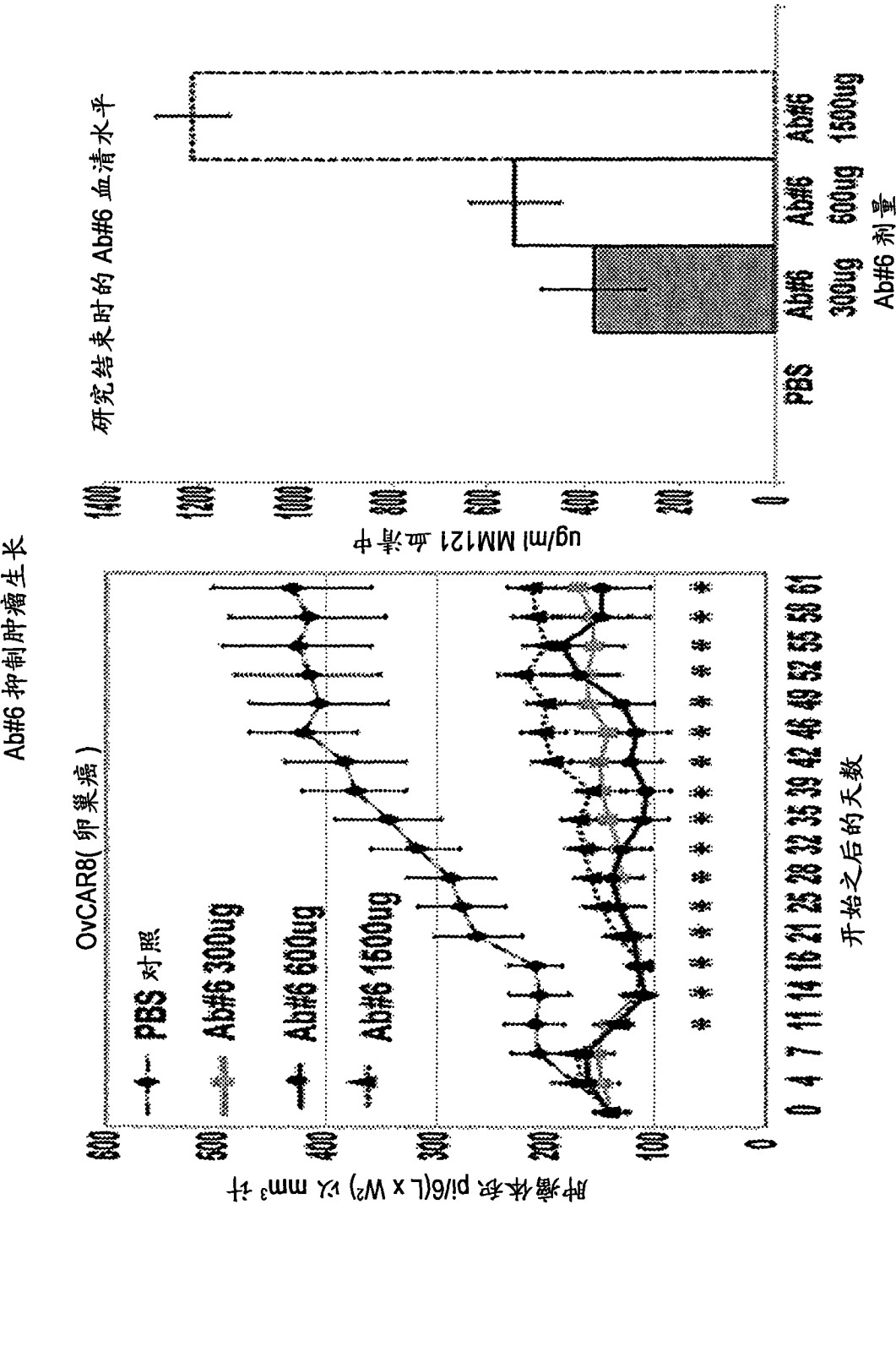


图 17C

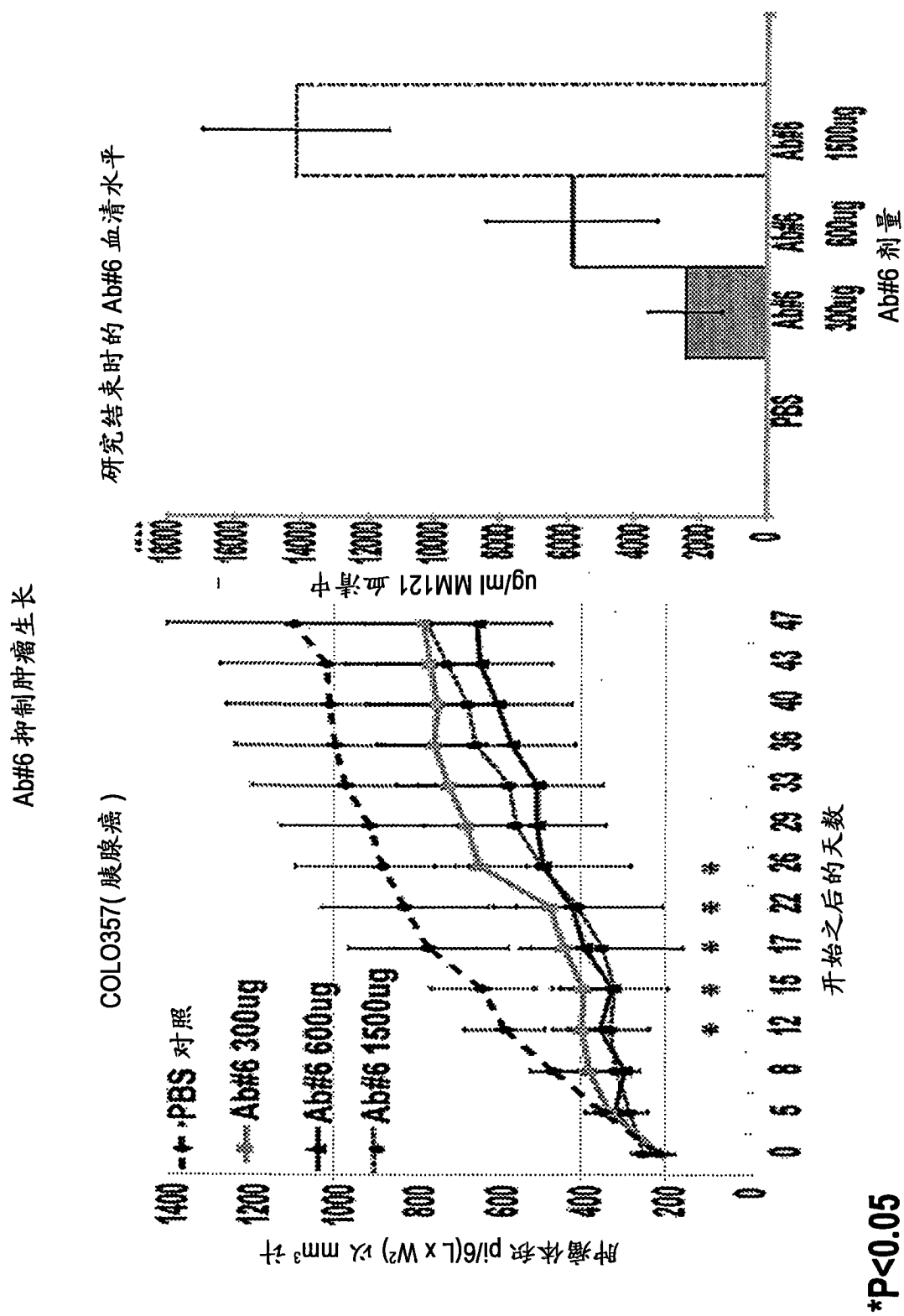


图 17D

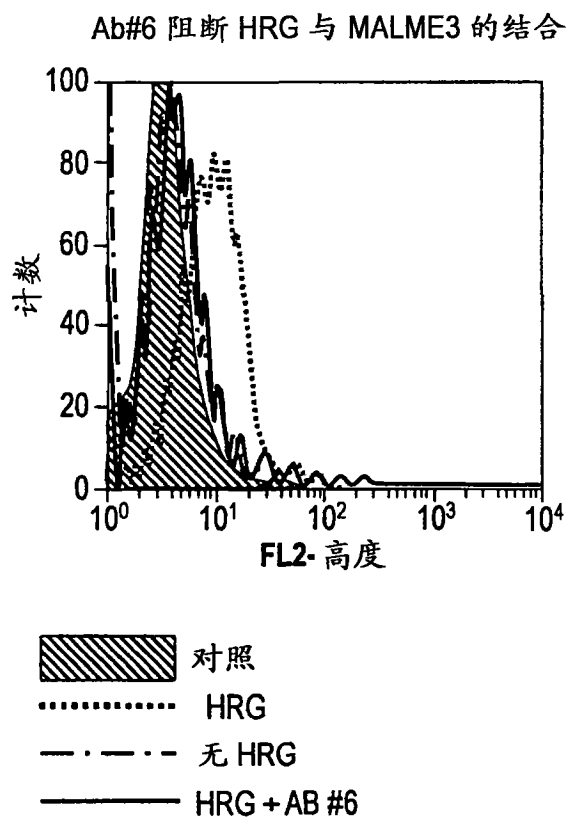


图 18A

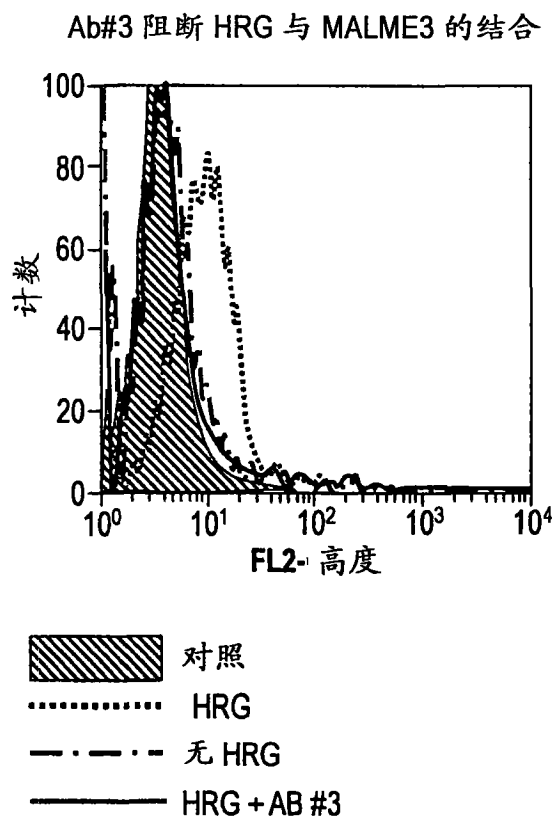


图 18B

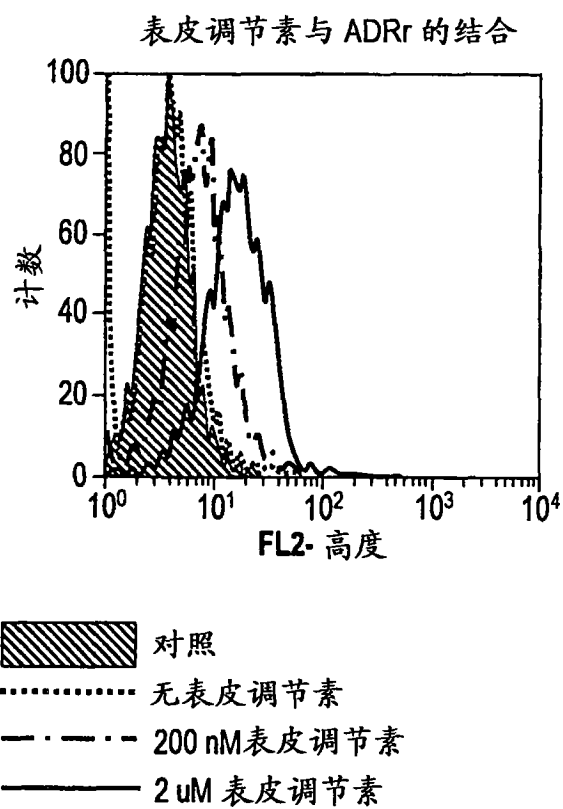
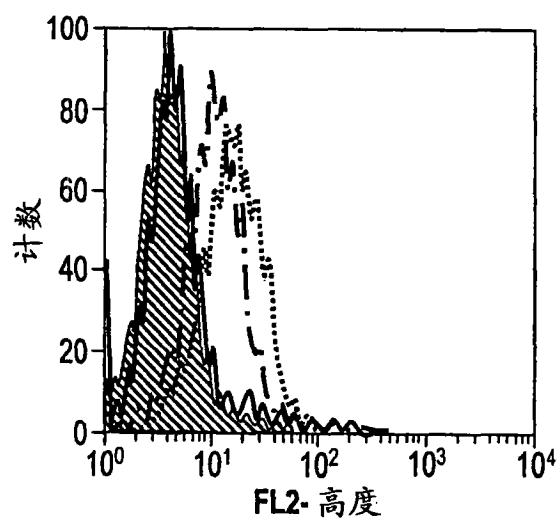


图 19A

Ab#6 和爱必妥阻断表皮调节素与 ADRr 的结合



对照
无表皮调节素
2 uM 表皮调节素 + AB #6
2 uM 表皮调节素 + 爱必妥

图 19B

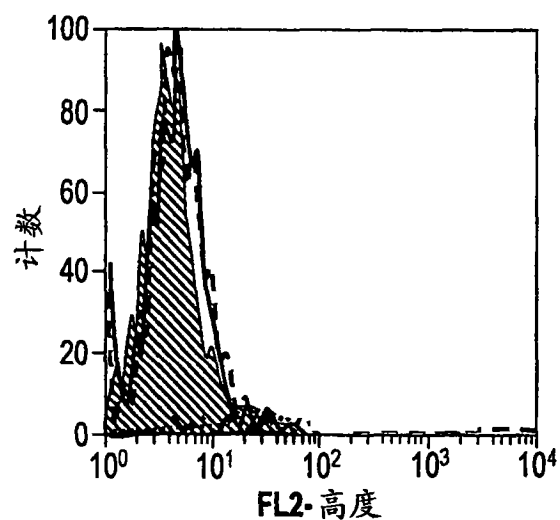
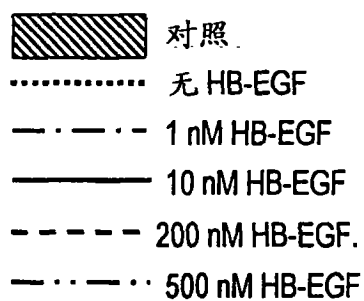
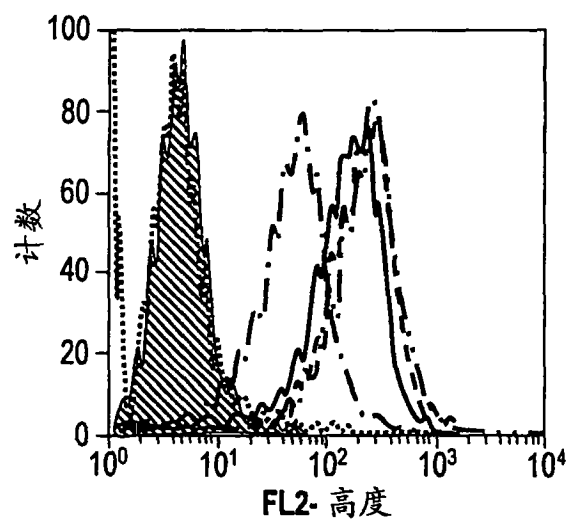


图 20B

图 20A

Ab # 6 VH 氨基酸序列 (SEQ ID NO:1)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMAWVRQAPGKGLEWVSSISS
GGWTLYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRGLKMATIFD
YWGQGT LTVSS

Ab # 6 VL 氨基酸序列 (SEQ ID NO:2)

QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVS WYQQHPGKAPKLIIEVSQR
PSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQTEDEADYYCCSYAGSSIFVIFGGGTKLTVL

Ab # 3 VH 氨基酸序列 (SEQ ID NO:3)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYNMRWVRQAPGKGLEWVSVIYPS
GGATRYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYYYGMDV
WGQGT LTVSS

Ab # 3 VL 氨基酸序列 (SEQ ID NO:4)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSDSNIGRNYIY WYQQFPGTAPKLLIYRNNQRP
SGVPDRISGSKSGTSASLAISGLRSEDEAEYHCGTWDDSLSGPVFGGGTKLTVL

Ab # 14 VH 氨基酸序列 (SEQ ID NO:5)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPS
GGHTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVLETGLLVD
AFDIWGQGTMTVSS

Ab # 14 VL 氨基酸序列 (SEQ ID NO:6)

QYELTQPPSVSVYPGQTASITCSGDQLGSKFVSWYQQRP GQSPVLVMYKDKRRP
SEIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAIDEADYYCQAWDSSTYVFGTGKTVL

Ab # 17 VH 氨基酸序列 (SEQ ID NO:35)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYGMGWVRQAPGKGLEWVSYISPS
GGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLNYYYGLDV
WGQGTTTVSS

Ab # 17 VL 氨基酸序列 (SEQ ID NO:36)

QDIQMTQSPSSLSASVGDRITITCQASQDIGDSL N WYQQKPGKAPRLIYDASNLE
TGVPFRFSGSGSGTDFTFTFRSLQPEDIATYFCQQSANAPFTFGPGTKVDIK

Ab # 19 VH 氨基酸序列 (SEQ ID NO:37)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYGMWWVRQAPGKGLEWVSYIGSS
GGPTYYYVDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGRGTPYYFDS
WGQGT LTVSS

Ab # 19 VL 氨基酸序列 (SEQ ID NO:38)

QYELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGRWNIVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRF
SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSSTWWFGGGTKLTVL

图 21A

Ab # 6 VH CDR1 (SEQ ID NO:7)
HYVMA

Ab # 6 VH CDR2 (SEQ ID NO:8)
SISSSGGWTLYADSVKG

Ab # 6 VH CDR3 (SEQ ID NO:9)
GLKMATIFDY

Ab # 6 VL CDR1 (SEQ ID NO:10)
TGTSSDVGSYNVVS

Ab # 6 VL CDR2 (SEQ ID NO:11)
EVSQRPS

Ab # 6 VL CDR3 (SEQ ID NO:12)
CSYAGSSIFVI

Ab # 3 VH CDR1 (SEQ ID NO:13)
AYNMR

Ab # 3 VH CDR2 (SEQ ID NO:14)
VIYPSGGATRYADSVKG

Ab # 3 VH CDR3 (SEQ ID NO:15)
GYYYYGMDV

Ab # 3 VL CDR1 (SEQ ID NO:16)
SGSDSNIGRNYTY

Ab # 3 VL CDR2 (SEQ ID NO:17)
RNNQRPS

Ab # 3 VL CDR3 (SEQ ID NO:18)
GTWDDSLSGPV

图 21B

<u>Ab # 14 VH CDR1 (SEQ ID NO:19)</u> AYGMG	<u>Ab # 19 VH CDR1 (SEQ ID NO:45)</u> RYGMW
<u>Ab # 14 VH CDR2 (SEQ ID NO:20)</u> YISPSGGHTKYADSVKG	<u>Ab # 19 VH CDR2 (SEQ ID NO:46)</u> YIGSSGGPTYVDSVKG
<u>Ab # 14 VH CDR3 (SEQ ID NO:21)</u> VLETGLLVDAFDI	<u>Ab # 19 VH CDR3 (SEQ ID NO:47)</u> GRGTPYYFDS
<u>Ab # 14 VL CDR1 (SEQ ID NO:22)</u> SGDQLGSKFVS	<u>Ab # 19 VL CDR1 (SEQ ID NO:48)</u> TGTSSDIGRWNIVS
<u>Ab # 14 VL CDR2 (SEQ ID NO:23)</u> YKDKRRPS	<u>Ab # 19 VL CDR2 (SEQ ID NO:49)</u> DVSNRPS
<u>Ab # 14 VL CDR3 (SEQ ID NO:24)</u> QAWDSSTYV	<u>Ab # 19 VL CDR3 (SEQ ID NO:50)</u> SSYTSSSTWV
<u>Ab # 17 VH CDR1 (SEQ ID NO:39)</u> WYGMG	
<u>Ab # 17 VH CDR2 (SEQ ID NO:40)</u> YISPSGGITVYADSVKG	
<u>Ab # 17 VH CDR3 (SEQ ID NO:41)</u> LNYYYGLDV	
<u>Ab # 17 VL CDR1 (SEQ ID NO:42)</u> QASQDIGDSL N	
<u>Ab # 17 VL CDR2 (SEQ ID NO:43)</u> DASNLET	
<u>Ab # 17 VL CDR3 (SEQ ID NO:44)</u> QQSANAPFT	

图 21C

Ab # 6 VH 密码子优化的核酸序列 (SEQ ID NO:25)

gaggtgcagctgctggagagcggcgggagggctggtccagccaggcggcagcctgaggctgtcctgcgccgcccagcggccttcac
cttcagccactacgtgatggcctgggtgcggcaggccccaggcaagggcctggaatgggtgtccagcatcagcagcggcgg
ctggaccctgtacgccgacagcgtgaagggcaggttcacatcagcagggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaac
agcctgagggccgaggacaccgccgtgtactactgcaccaggggcctgaagatggccaccatcttcgactactggggccagggc
accctggtgaccgtgagcagc

Ab # 6 VL 密码子优化的核酸序列 (SEQ ID NO:26)

cagtcgccctgacccagcccgcagcgtgagcggcagcccaggccagagcatcacatcagctgcaccggcaccagcagcga
cgtgggcagctacaacgtgggtgtcctgtatcagcagcaccggcaggcccaagctgatcatctacaggtgtcccagagg
cccagcggcgtgagcaacaggttcagcggcagcaagagcggcaacaccgccagcctgaccatcagcggcctgcagaccgagg
acgaggccgactactactgtctgcagctacgccggcagcagcatcttcgtgatcttcggcggagggaaccaaggtgaccgtccta

Ab # 3 VH 密码子优化的核酸序列 (SEQ ID NO:27)

gaggtgcagctgctggaaagcggcgggagggctggtgcagccaggcggcagcctgaggctgtcctgcgccgcccagcggccttcac
cttcagcgcctacaacatgagatgggtgcggcaggccccaggcaagggcctggaatgggtgtccgtgatctacccagcggcgg
agccaccagatacgccgacagcgtgaagggcaggttcacatcagcagggacaacagcaagaacaccctgtacctgcagatgaa
cagcctgagggccgaggacaccgccgtgtactactgcgccaggggctactactactacggcatggacgtgtggggccaggggcac
cctggtgaccgtgagcagc

Ab # 3 VL 密码子优化的核酸序列 (SEQ ID NO:28)

cagagcgtgctgacccagcccccaagcggcagcggcaccggcaggccagagggtgaccatcagctgcagcggcagcgacagca
acatcggcaggaactacatctactgttatcagcagttccccggcaccgcccccaagctgctgatctacaggaacaaccagaggccc
agcggcgtgcccagagatcagcggcagcaagagcggcaccagcggcagcctggccatcagcggcctgagaagcgaggac
gaggccgagtaccactgcggcacctgggacgacagcctgagcggccagtggttcggcggagggaaccaagctgaccgtccta

图 22A

Ab # 14 VH 核酸序列 (SEQ ID NO:29)

gaagttcaattgtagagtctggtggcggtctgttcagcctggtggttcttacgtctttctgcgctgctccggattcactttctct
gcttacggtatgggttgggttcgccaagctcctggtaaagggttggagtgggttcttatctctcttctggtggccatactaag
tatgctgactccgttaaaggctcgttcactatctctagagacaactctaagaatactctctacttgcatgaacagcttaagggc
tgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagtactggaaactggcttattggttgatgctttgatatctggggccaagggaca
atggtcaccgtctcaagc

Ab # 14 VL 核酸序列 (SEQ ID NO:30)

cagtacgaattgactcagccaccctcagtgctcgtgtaccaggacagacagccagcatcacctgctctggagatcaattggg
gagtaaattgttctggtatcagcagaggccaggccagtcctgtgttggtcatgtataaagataaaaggcgccgtcaga
gatccctgagcgaattctctggctccaactctgggaacacagccactctgaccatcagcgggacccaggctatagatgaggct
gactattattgtcaggcgtgggacagcagcactatgtcttcggcactgggaccaagggtaccgtccta

Ab # 6 VH 优化之前的核酸序列 (SEQ ID NO:31)

gaagttcaattgtagagtctggtggcggtctgttcagcctggtggttcttacgtctttctgcgctgctccggattcactttctct
cattacgttatggcttgggttcgccaagctcctggtaaagggttggagtgggttcttatctctcttctggtggctggactcttat
gctgactccgttaaaggctcgttcactatctctagagacaactctaagaatactctctacttgcatgaacagcttaagggctg
aggacacagccgtgtattactgtactagaggtctcaagatggctacaattttgactactggggccagggcacacctggtcaccg
tctcaagc

Ab # 6 VL 优化之前的核酸序列 (SEQ ID NO:32)

cagagcgcttgactcagccctgcctccgtgtctgggtctctggacagtcgatcaccatctcctgcactggaaccagcagtgat
gttgggaggtataatgttctctcctggtagcaacaacacccaggcaaaagccccaactcatctttagggtcagtcagcgg
ccctcaggggttctaatcgcttctctggctccaagtctggcaacacggcctccctgacaatctctgggtccagactgaggac
gaggctgattattactgtgctcatatgcaggtagtagtattttctgatattcggcggagggaaccaagggtaccgtccta

Ab # 3 VH 优化之前的核酸序列 (SEQ ID NO:33)

gaagttcaattgtagagtctggtggcggtctgttcagcctggtggttcttacgtctttctgcgctgctccggattcactttctct
gcttacaatatgcgttgggttcgccaagctcctggtaaagggttggagtgggttctgttatctatccttctggtggcgctactcgtt
atgctgactccgttaaaggctcgttcactatctctagagacaactctaagaatactctctacttgcatgaacagcttaagggct
gaggacacggccgtgtattactgtgcgagagggtactactactacggtatggacgtctggggccaaggcacacctggtcaccg
tctcaagc

Ab # 3 VL 优化之前的核酸序列 (SEQ ID NO:34)

cagagcgcttgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctcgtgttctggaagcgactcca
acatcggaagaaattatattatgttaccagcaattcccagggaacggccccaagctcctcatctataggaataatcagcggc
cctcaggggtccctgaccgaatctctggctccaagtctggcacctcagcctccctggccatcagtggtcctccgtccgaggat
gaggctgagtatcactgtggaacatgggatgacagcctgagtggtccggtattcggcggagggaactaagctgaccgtccta

图 22B

- **Ab #6 VLb:**
- QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYNVVSQYQQHPGKAPK
LMIYEVSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCCSYA
GSSIFVIFGGGTKVTVL (SEQ ID NO:51)
- **Ab #17 VK1b:**
- QDIQMTQSPSSLSASVGDRITITCQASQDIGDSLNWYQQKPGKAPRL
IYDASNLETGVPPRFSGSGSGTDFTFTFRSLQPEDIATYFCQQSANAP
FTFGPGTKVDIR (SEQ ID NO:52)
- **Ab #19 VL2b:**
- QYELTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGRWNIVSWYQQHPGKAPK
LMIYDVSNRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTS
SSTVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:53)

图 23

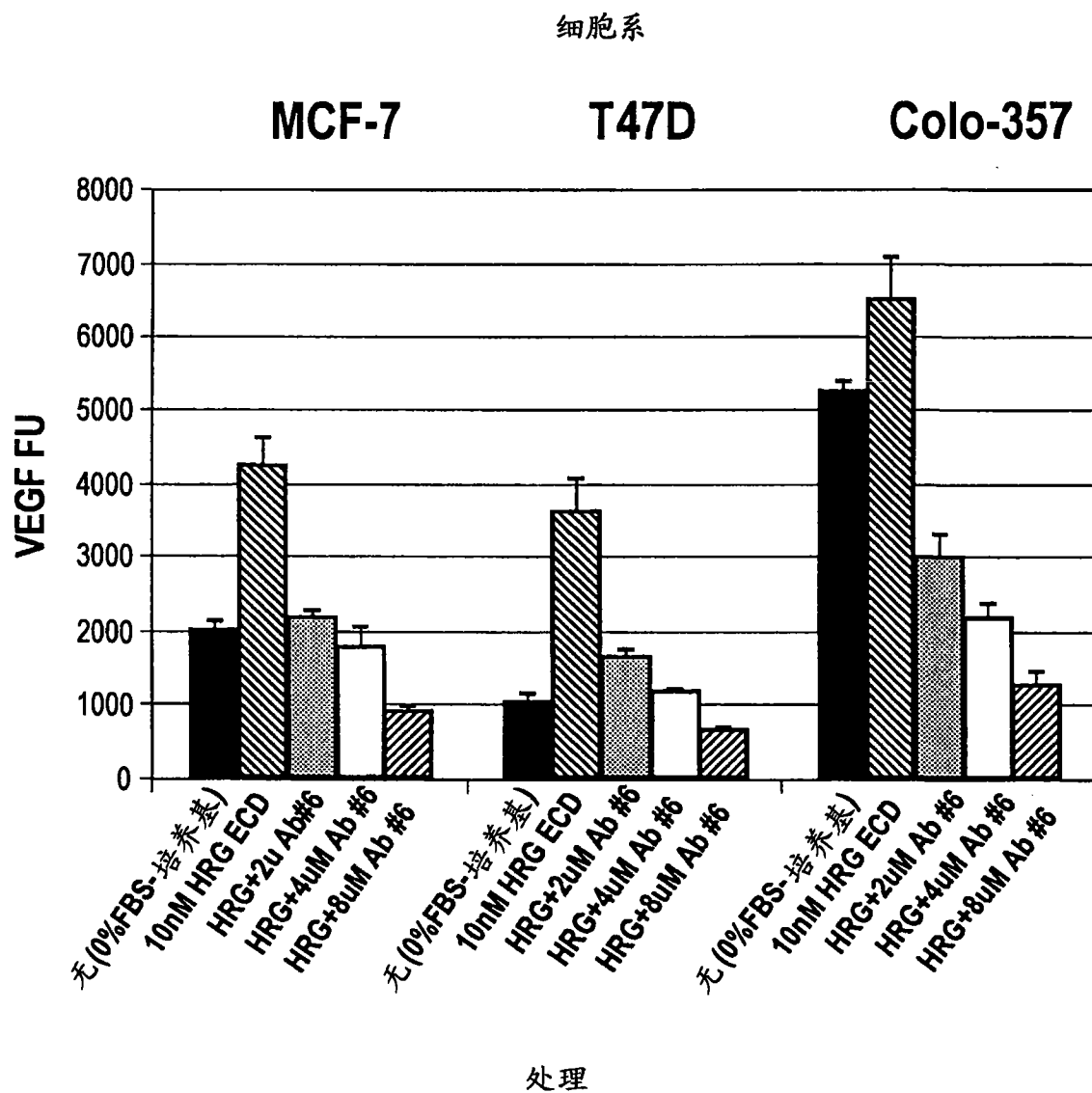


图 24A

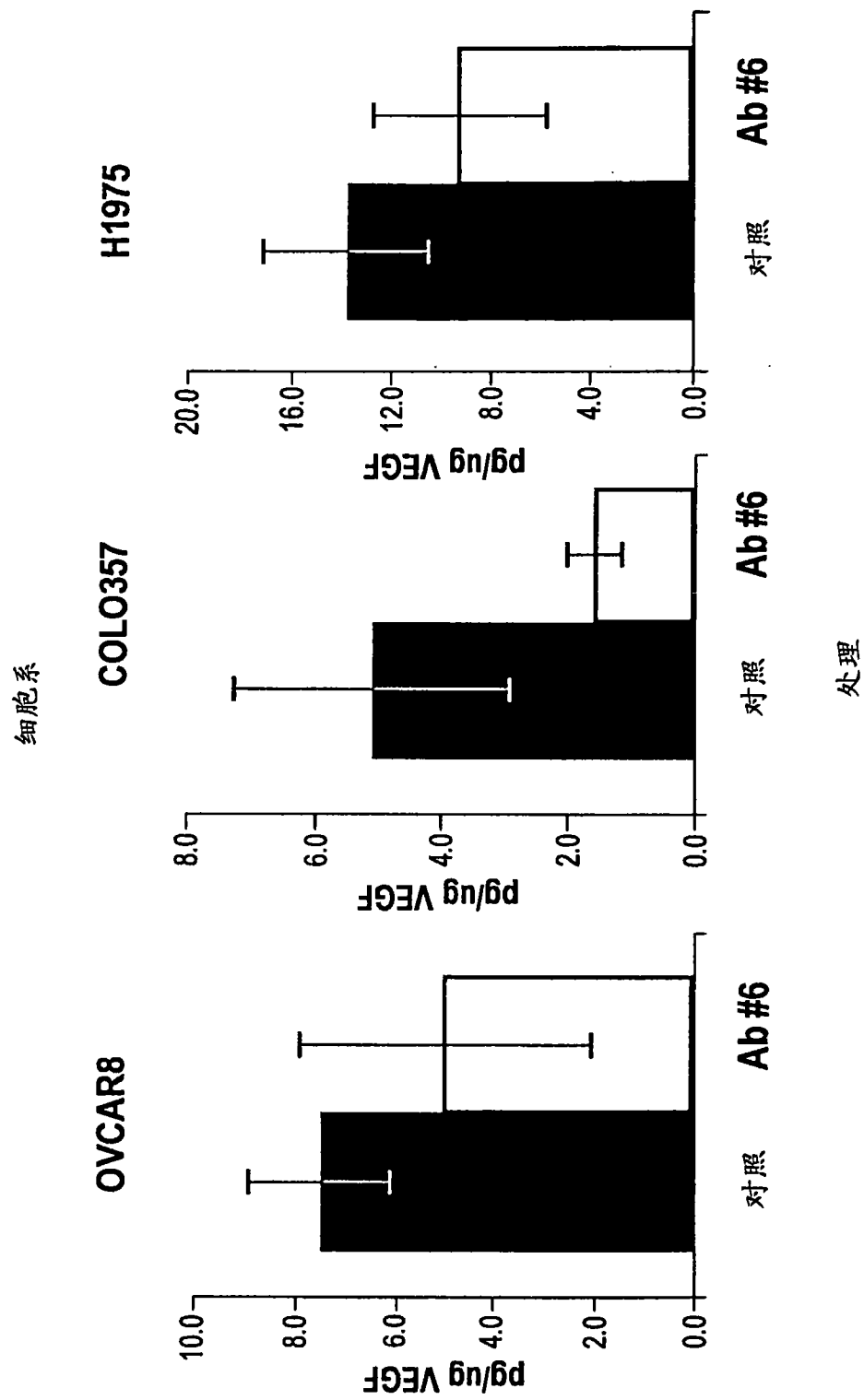


图 24B

磷酸化 ErbB3 抑制与 VEGF 分泌抑制的相关性

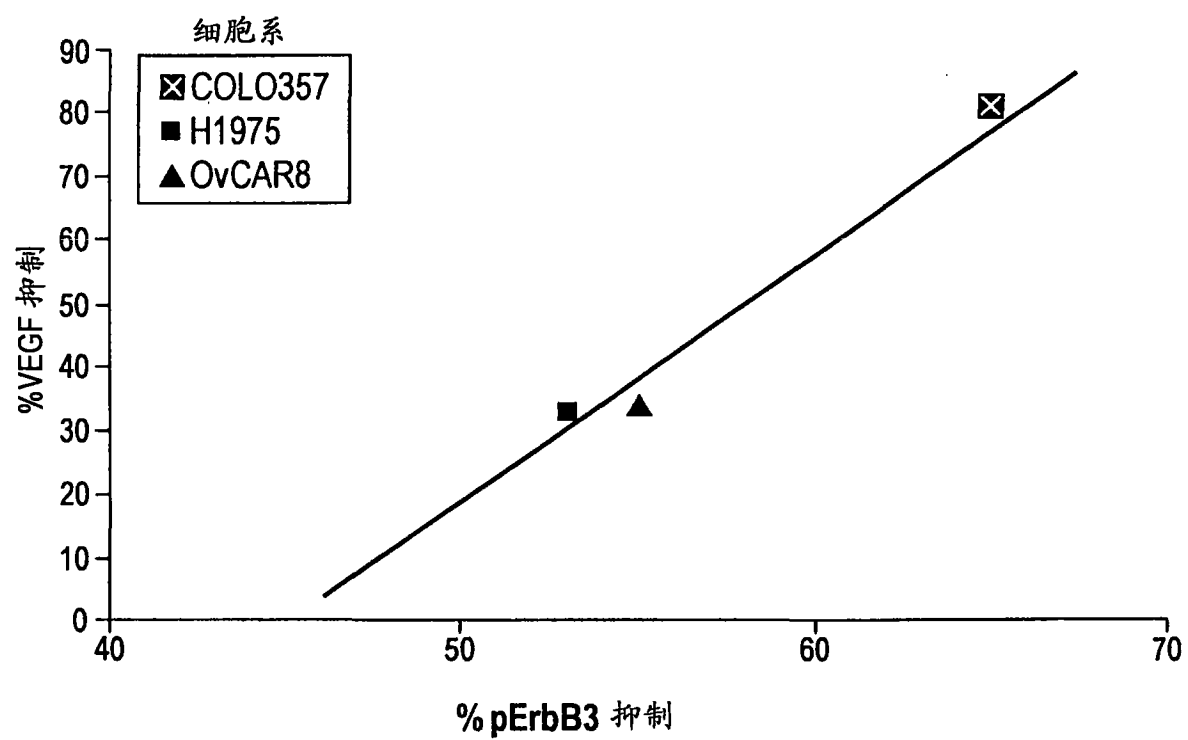


图 24C

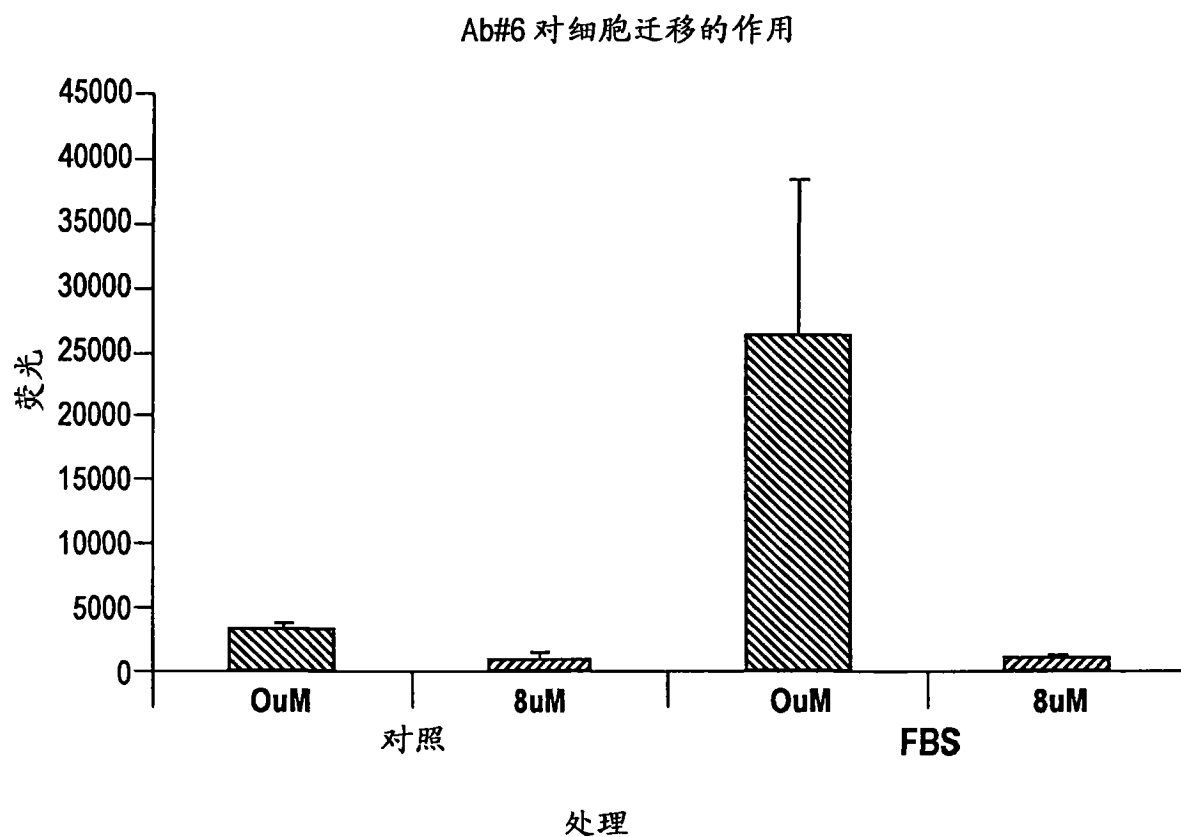


图 25

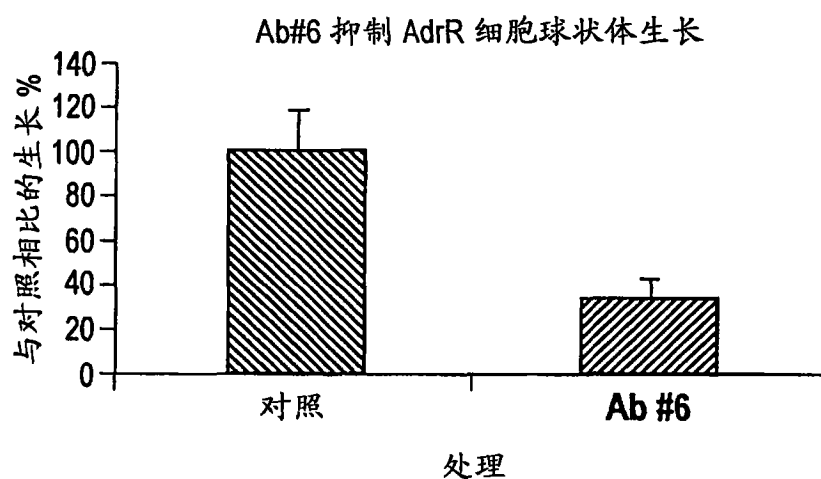


图 26A

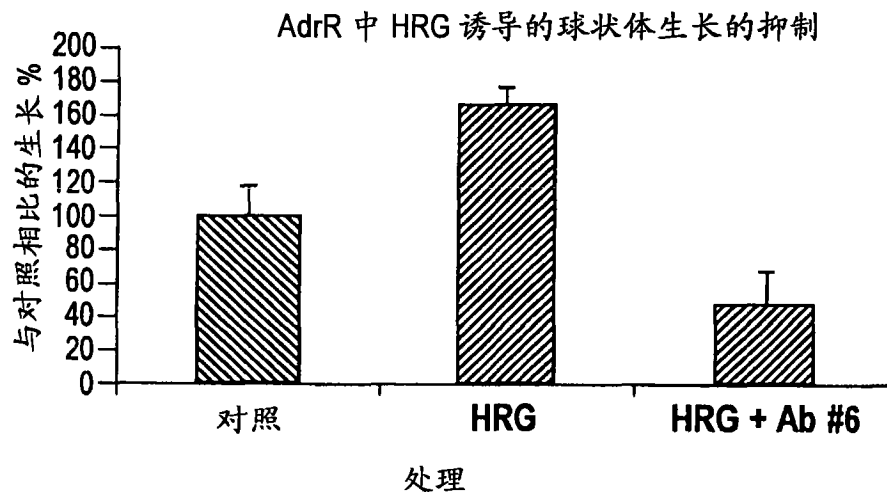


图 26B

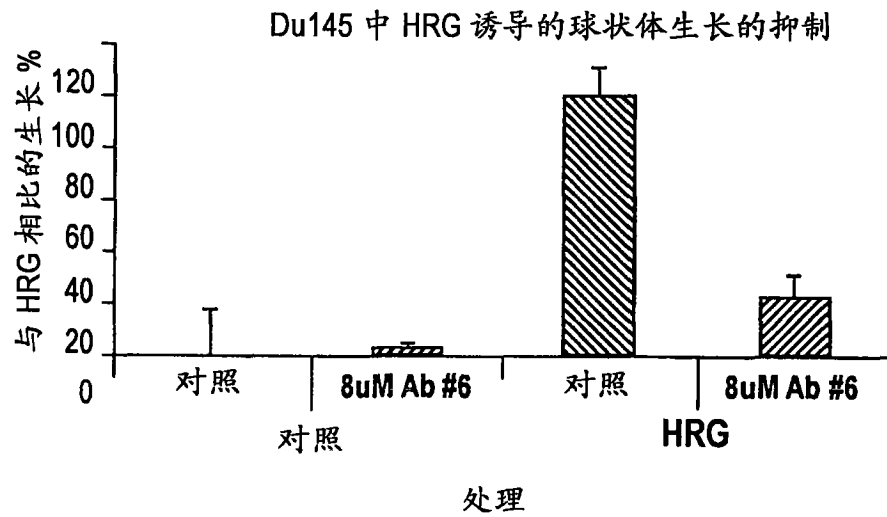


图 26C

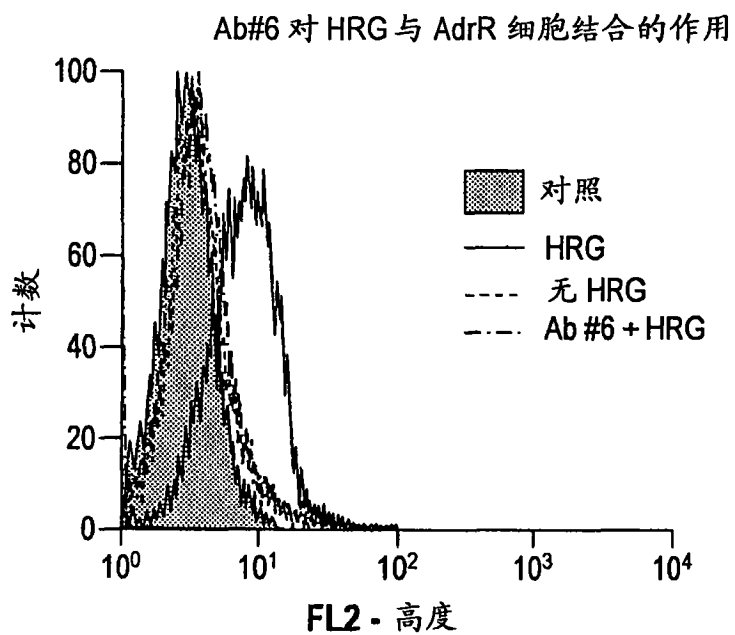


图 27A

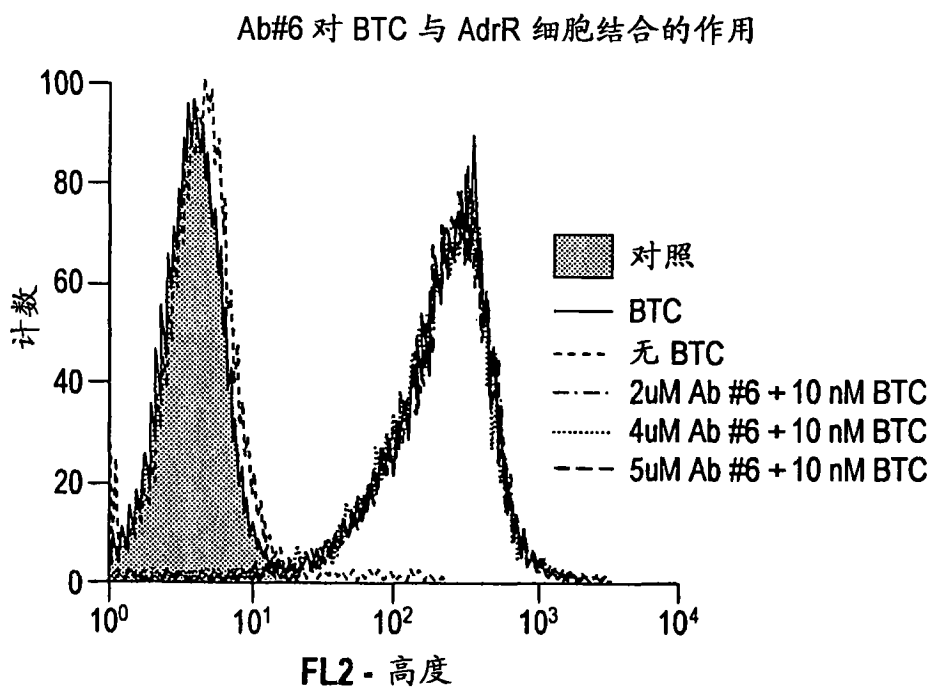


图 27B

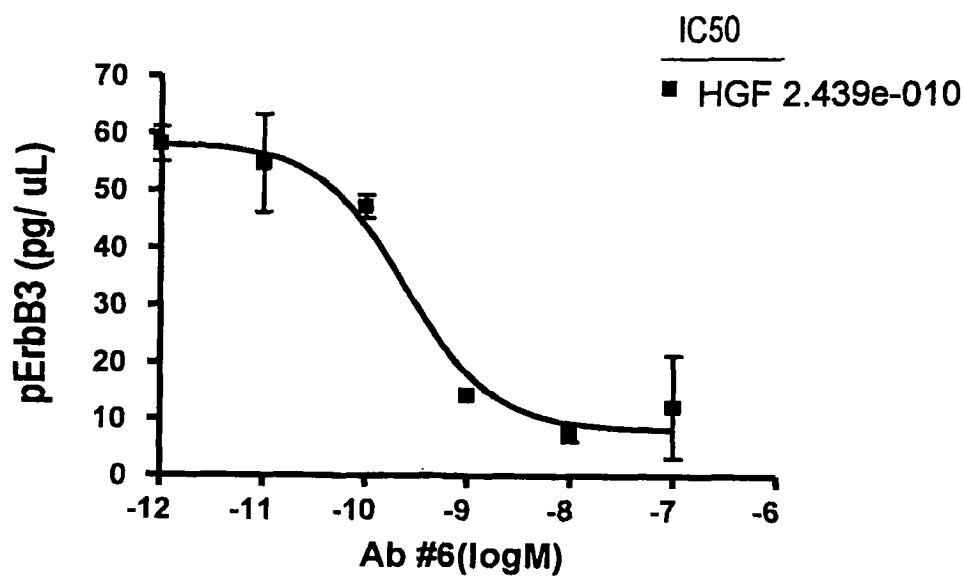


图 28



图 29A

图 29B

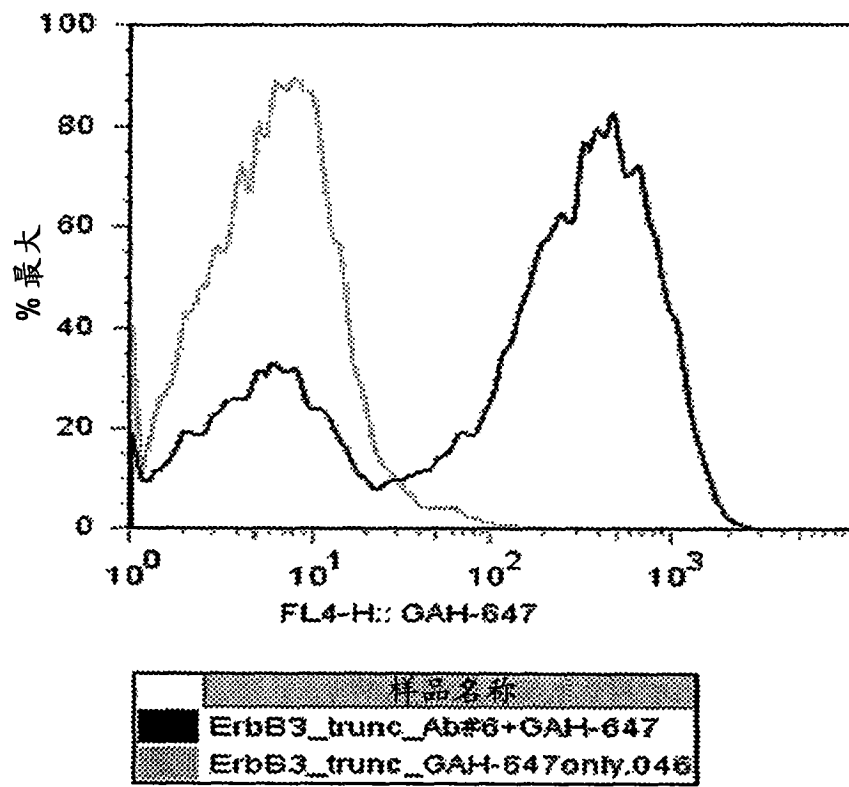


图 30