

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102295703 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 28

(21) 申请号 201110278830. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2003. 07. 11

C07K 16/28(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00(2006. 01)

60/396, 290 2002. 07. 15 US

60/480, 043 2003. 06. 20 US

(62) 分案原申请数据

03821625. 6 2003. 07. 11

(71) 申请人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

(72) 发明人 汉斯·科尔 伯吉特·博森梅尔

汉斯·乔基姆·米勒

马克·X. 斯利科夫斯基

斯蒂芬·M. 凯尔西

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴 张红春

权利要求书 1 页 说明书 62 页

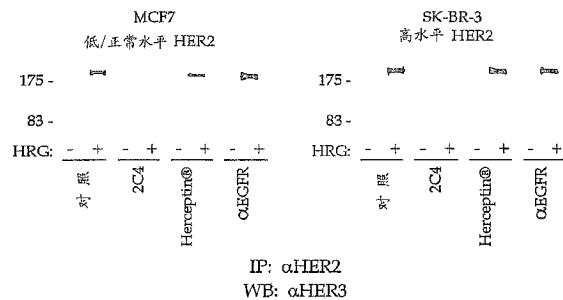
序列表 4 页 附图 3 页

(54) 发明名称

鉴定对用抗 ErbB2 抗体处理响应的肿瘤的方法

(57) 摘要

本发明涉及鉴定对用抗 ErbB2 抗体处理响应的肿瘤的方法。通过在肿瘤细胞样品中检测 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 蛋白质复合物或者 HER2 磷酸化的存在来鉴定对用抗 HER2 抗体处理响应的肿瘤。用抗 HER2 抗体, 例如 rhuMAb 2C4 治疗患有包含 HER/2/HER1 和 / 或 HER2/HER3 异二聚体和 / 或 HER2 磷酸化的肿瘤的患者。



1. 重组人源化单克隆抗体 2C4 (rhuMAb 2C4), 其是固定剂量 420mgrhuMAb 2C4 或载入剂量 840mg rhuMAb 2C4, 且其中所述 rhuMAb 2C4 包含分别为 SEQ ID NO :3 和 4 的轻链和重链可变区氨基酸序列, 及人轻链和重链 IgG1 (非 A 同种异型) 恒定区序列。

2. 依照权利要求 1 的 RhuMAb 2C4, 其是固定剂量 420mg。

3. 依照权利要求 1 的 RhuMAb 2C4, 其是载入剂量 840mg。

4. 依照权利要求 1 至 3 任一项的 RhuMAb 2C4, 其在容器中。

5. 依照权利要求 4 的 RhuMAb 2C4, 其中所述容器是瓶子、小管、或注射器。

6. 依照权利要求 4 的 RhuMAb 2C4, 其中所述容器是静脉溶液袋或具有可以被皮下注射针头穿过的塞子的小管。

7. 依照权利要求 4 至 6 任一项的 RhuMAb 2C4, 其中所述容器在进一步包括标签或包装插入物的制品中。

8. 依照前述权利要求任一项的 RhuMAb 2C4, 其存在于包含药学可接受载体的药物组合物中。

9. 在患者中治疗癌症的方法中使用的重组人源化单克隆抗体 2C4 (rhuMAb 2C4), 其中在所述方法中每 3 周以 420mg 固定剂量施用 rhuMAb 2C4, 且其中所述 rhuMAb 2C4 包含分别为 SEQ ID NO :3 和 4 的轻链和重链可变区氨基酸序列, 及人轻链和重链 IgG1 (非 A 同种异型) 恒定区序列。

10. 依照权利要求 9 使用的 RhuMAb 2C4, 其中在所述方法中所述 rhuMAb2C4 治疗以 840mg 载入剂量开始。

11. 在癌症患者中治疗卵巢癌、乳腺癌、肺癌或前列腺癌的方法中使用的重组人源化抗体 2C4 (rhuMAb 2C4), 其中所述 rhuMAb 2C4 包含分别为 SEQ ID NO :3 和 4 的轻链和重链可变区氨基酸序列, 及人轻链和重链 IgG1 (非 A 同种异型) 恒定区序列, 且其中在所述方法中每 3 周以 420mg 固定剂量施用 rhuMAb 2C4。

12. 依照权利要求 11 使用的重组人源化抗体, 其中所述 rhuMAb 2C4 是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞表达的。

13. 依照权利要求 11 或权利要求 12 使用的重组人源化抗体, 其中所述 rhuMAb 2C4 治疗以 840mg 载入剂量开始。

14. 重组人源化抗体 2C4 (rhuMAb 2C4) 在制备用于在癌症患者中治疗卵巢癌、乳腺癌、肺癌或前列腺癌的药物中的用途, 其中所述 rhuMAb 2C4 包含分别为 SEQ ID NO :3 和 4 的轻链和重链可变区氨基酸序列, 及人轻链和重链 IgG1 (非 A 同种异型) 恒定区序列, 且其中在所述治疗中每 3 周以 420mg 固定剂量施用 rhuMAb 2C4。

15. 依照权利要求 14 的用途, 其中所述 rhuMAb 2C4 是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞表达的。

16. 依照权利要求 15 的用途, 其中所述药物用于治疗癌症患者, 其中所述 rhuMAb 2C4 治疗以 840mg 载入剂量开始。

鉴定对用抗 ErbB2 抗体处理响应的肿瘤的方法

[0001] 本申请是申请日为 2003 年 07 月 11 日、申请号为 03821625.6 (国际申请号为 PCT/US2003/021590)、发明名称为“鉴定对用抗 ErbB2 抗体处理响应的肿瘤的方法”的发明申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及鉴定对用抗 HER2 抗体处理响应的肿瘤的方法,以及治疗患有这种肿瘤的患者方法。

背景技术

[0003] 受体酪氨酸激酶的 ErbB 家族是细胞生长、分化和存活的重要介导体。受体家族包括四个独特成员,包括表皮生长因子受体 (EGFR 或 ErbB1)、HER2 (ErbB2 或 p185^{neu})、HER3 (ErbB3) 和 HER4 (ErbB4 或 tyro2)。

[0004] 由 erbB1 基因编码的 EGFR 已被暗示与人的恶性肿瘤发生相关。特别地,已经在乳腺、膀胱、肺、头部、颈和胃癌以及恶性胶质瘤中观察到 EGFR 表达升高。在通过自分泌刺激性路径引起受体激活的同一肿瘤细胞中,EGFR 受体表达升高通常与 EGFR 配基——转化生长因子 α (TGF- α)——的生成增多相关。Baselga 和 Mendelsohn *Pharmac. Ther.*, **64**:127-154 (1994)。此外,表皮生长因子受体相关蛋白 (ERRP) 已经被描述,其中 1583bp 的 cDNA 片段克隆与小鼠 EGFR 和截短的大鼠 EGFR 具有 90-95% 的序列同源性 (美国专利号 6,399,743;和美国公开号 2003/0096373)。针对 EGFR 或其配基,TGF- α 和 EGF 的单克隆抗体已经被评价为在治疗这种恶性肿瘤中作为治疗剂。参见,例如 Baselga 和 Mendelsohn., 同上文;Masui et al., *Cancer Research*, **44**:1002-1007 (1984);和 Wu et al., *J Clin. Invest.*, **95**:1897-1905 (1995)。

[0005] ErbB 家族的第二个成员 p185neu 最早被鉴定为来自化学处理的大鼠的成神经细胞瘤的转化基因的产物。Neu 原癌基因的活化形式由所编码蛋白的跨膜区域中的点突变 (缬氨酸变为谷氨酸) 而产生。在乳腺和卵巢癌中观察到 neu 的人同系物 (HER2) 发生扩增,这与不理想的预后相关 (Slamon et al., *Science*, **235**:177-182 (1987);Slamon et al., *Science*, **244**:707-712 (1989);和美国专利号 4,968,603)。迄今,还没有报道在人的肿瘤中具有与 neu 原癌基因中的点突变类似的点突变。ErbB2 的过度表达 (常常,但不是一律由于基因扩增) 也在其他癌症中观察到,包括胃癌、子宫内膜癌、唾液腺癌、肺癌、肾癌、结肠癌、甲状腺癌、胰腺癌和膀胱癌。参见,以及其它文献,King et al., *Science*, **229**:974 (1985);Yokota et al., *Lancet*, **1**:765-767 (1986);Fukushigi et al., *Mol Cell Biol.*, **6**:955-958 (1986);Geurin et al., *Oncogene Res.*, **3**:21-31 (1988);Cohen et al., *Oncogene*, **4**:81-88 (1989);Yonemura et al., *Cancer Res.*, **51**:1034 (1991);Borst et al., *Gynecol. Oncol.*, **38**:364 (1990);Weiner et al., *Cancer Res.*, **50**:421-425 (1990);Kern et al., *Cancer Res.*, **50**:5184 (1990);Park et al., *Cancer Res.*, **49**:6605 (1989);Zhau et al., *Mol. Carcinog.*, **3**:354-357 (1990);Aasland et al., *Br. J. Cancer*, **57**:

358-363(1988);Williams et al., *Pathobiology*, 59:46-52(1991);和 McCann et al., *Cancer*, 65:88-92(1990)。ErbB2 可能在前列腺癌中过度表达 (Gu et al., *Cancer Lett.*, 99:185-9(1996);Ross et al., *Hum. Pathol.*, 28:827-33(1997);Ross et al., *Cancer*, 79:2162-70(1997);和 Sadasivan et al., *J. Urol.*, 150:126-31(1993))。ErbB2 的过度表达可能会通过不依赖于配基地激活 ErbB2 或 ErbB2 同型二聚体,引起肿瘤生长。

[0006] 针对大鼠 p185neu 和人 ErbB2 蛋白质产物的抗体已经被描述。Drebin 及其同事已经制备出抗大鼠 neu 基因产物 p185neu 的抗体。参见,例如 Drebin et al., *Cell*, 41:695-706(1985);Myers et al., *Meth. Enzym.*, 198:277-290(1991);和 W094/22478。Drebin et al., *Oncogene*, 2:273-277(1988) 报道,与 p185neu 的两个不同区域反应的抗体的混合物对被植入裸鼠的 neu 转化的 NIH-3T3 细胞产生协同的抗肿瘤作用。还参见 1998 年 10 月 20 日授权的美国专利 5,824,311。

[0007] Hudziak 等, *Mol. Cell. Biol.*, 93:1165-1172(1989) 描述了一系列抗 ErbB2 抗体的制备,采用人乳腺肿瘤细胞系 SK-BR-3 对其进行鉴定。通过在 72 小时后对单细胞层进行结晶紫染色,测定了 SK-BR-3 细胞在暴露于抗体后的相对细胞增殖。采用这种测定法,用称为 4D5 的抗体获得最大抑制作用,其抑制了 56% 的细胞增殖。在该测定中,该系列的其他抗体在较小程度降低细胞增殖。还进一步发现抗体 4D5 能够使过度表达 ErbB2 的乳腺肿瘤细胞系对 TNF- α 的细胞毒性作用变得敏感。还参见 1997 年 10 月 14 日授权的美国专利号 5,677,171。在 Hudziak et al 中被讨论的抗 ErbB2 抗体还在 Fendly et al., *Cancer Research*, 50:1550-1558(1990);Kotts et al., *In Vitro*, 26(3):59A(1990);Sarup et al., *Growth Regulation*, 1:72-82(1991);Shepard et al., *J Clin. Immunol.*, 11(3):117-127(1991);Kumar et al., *Mol. Cell Biol.*, 11(2):979-986(1991);Lewis et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 37:255-263(1993);Pietras et al., *Oncogene*, 9:1829-1838(1994);Vitetta et al., *Cancer Research*, 54:5301-5309(1994);Sliwowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665(1994);Scott et al., *J. Biol. Chem.*, 266:14300-5(1991);D' souza et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:7202-7206(1994);Lewis et al., *Cancer Research*, 56:1457-1465(1996);和 Schaefer et al., *Oncogene*, 15:1385-1394(1997) 中被进一步表征。

[0008] 重组的人源化鼠抗 ErbB2 抗体 4D5(huMAb4D5-8, rhuMAb HER2 或 HERCEPTIN[®];美国专利号 5,821,337) 在过度表达 ErbB2 的转移性乳腺癌的患者中具有临床活性,这些患者接受了广泛的预先抗癌治疗 (Baselga et al., *J Clin Oncol.*, 14:737-744(1996))。1998 年 9 月 25 日 HERCEPTIN[®] 获得美国食品和药品管理局的销售许可,用于治疗患有转移性乳腺癌的患者,其肿瘤过度表达 ErbB2 蛋白。但是,并不是所有的过度表达 ErbB2 的肿瘤都对 HERCEPTIN[®] 响应。(Brockhoff et al., *Cytometry*, 44:338-48(2001))。此外,临床前的数据暗示,HERCEPTIN[®] 对于治疗非小细胞肺癌 (NSCLC) 是治疗上有效的。HER2 蛋白在 20-66% 的被切除 NSCLC 肿瘤中过度表达,并且被证明在多个系列中预测不理想的患者结局 (Azzoli, C. G. et al., *Semin. Oncol.*, 29(Suppl14):59-65(2002))。

[0009] 其他具有各种性质的抗 ErbB2 的抗体已经被描述在 Tagliabue et al., *Int. J. Cancer*, 47:933-937(1991);McKenzie et al., *Oncogene*, 4:543-548(1989);Maier et al., *Cancer Res.*, 51:5361-5369(1991);Bacus et al., *Molecular Carcinogenesis*, 3:

350-362(1990); Stancovski et al., PNAS (USA), 88:8691-8695(1991); Bacus et al., Cancer Research, 52:2580-2589(1992); Xu et al., Int. J. Cancer, 53:401-408(1993); W094/00136; Kasprzyk et al., Cancer Research, 52:2771-2776(1992); Hancock et al., Cancer Res., 51:4575-4580(1991); Shawver et al., Cancer Res., 54:1367-1373(1994); Arteaga et al., Cancer Res., 54:3758-3765(1994); Harwerth et al., J. Biol. Chem., 267:15160-15167(1992); 美国专利号 5,783,186; 和 Klapper et al., Oncogene, 14:2099-2109(1997) 中。单克隆抗体 2C4 在 WO 01/00245 中描述, 在此引入作为参考。已经证明 2C4 破坏 HER2 与其他 ErbB 受体家族成员发生二聚化 (WO 01/00245)。

[0010] 同源性筛选已经鉴定了两种其他的 ErbB 受体家族成员; ErbB3(美国专利号 5,183,884 和 5,480,968, 以及 Kraus et al., PNAS(USA), 86:9193-9197(1989)) 和 ErbB4(欧洲专利申请号 599,274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750(1993); 和 Plowman et al., Nature, 366:473-475(1993))。这两种受体在至少某些乳腺癌细胞系中均表现为表达增加。

[0011] ErbB 受体通常以各种组合的形式存在于细胞内, 并且一般认为异二聚化增加细胞对各种 ErbB 配基反应的多样性 (Earp et al., Breast Cancer Research and Treatment, 35:115-132(1995))。然而, 这些受体聚集以及如何作用于信号传递的机制还未被充分了解 (Brennan, P. J. et al., Oncogene, 19:6093-6101(2000))。EGFR 被六个不同配基结合; 表皮生长因子 (EGF), 转化生长因子 α (TGF- α), 双调蛋白, 肝素结合表皮生长因子 (HB-EGF), β -动物纤维素 (betacellulin) 和上皮调节素 (epiregulin) (Groenen et al., Growth Factors, 11:235-257(1994))。由对单个基因的可变剪接得到的 heregulin 蛋白家族是 ErbB3 和 ErbB4 的配基。Heregulin 家族包括 α 、 β 和 γ heregulin (Holmes et al., Science, 256:1205-1210(1992), 美国专利号 5,641,869; 和 Schaefer et al., Oncogene, 15:1385-1394(1997)); neu 分化因子 (NDF), 神经胶质生长因子 (GGFs); 乙酰胆碱受体诱导活性 (acetylcholine receptor inducing activity) (ARIA); 以及感觉和运动神经元衍生因子 (sensory and motor neuron derived factor) (SMDF)。综述参见 Groenen et al., Growth Factors, 11:235-257(1994); Lemke, G., Molec. & Cell. Neurosci., 7:247-262(1996) 和 Lee et al., Pharm. Rev., 47:51-85(1995)。最近, 三种其他的 ErbB 配基被鉴定; 神经调节蛋白 -2 (neuregulin-2) (NRG-2), 其被报道能结合 ErbB3 或 ErbB4 (Chang et al., Nature, 387:509-512(1997); 和 Carraway et al., Nature, 387:512-516(1997)); 神经调节蛋白 -3 (neuregulin-3), 其结合 ErbB4 (Zhang et al., PNAS(USA), 94(18):9562-7(1997)); 和神经调节蛋白 -4 (neuregulin-4), 其结合 ErbB4 (Harari et al., Oncogene, 18:2681-89(1999)) HB-EGF、 β -动物纤维素和上皮调节素也结合 ErbB4。

[0012] 虽然 EGF 和 TGF α 不结合 ErbB2, 但是 EGF 刺激 EGFR 和 ErbB2 形成异二聚体, 该异二聚体激活 EGFR 并导致 ErbB2 在异二聚体中发生转磷酸作用。二聚化和 / 或转磷酸作用似乎能够激活 ErbB2 酪氨酸激酶。参见 Earp et al., 同上文。同样地, heregulin 不与 ErbB2 结合, 但是当 ErbB3 与 ErbB2 共表达时, 形成一种活性信号传递复合物 (Nagy et al., Cytometry, 32:120-31(1998))。针对 ErbB2 的抗体能够破坏这一复合物 (Sliwkowski et al., J. Biol. Chem., 269(20):14661-14665(1994))。ErbB3 是酪氨酸激酶缺陷的, 因此需要异二聚化, 优选与 ErbB2 异二聚化, 来具备信号转换能力。(Graus-Porta et al.,

EMBO J., 16:1647-55(1995))。此外,当与 ErbB2 共表达时, ErbB3 对 heregulin(HRG) 的亲合性增加至较高的亲合状态。还参见 Levi et al., Journal of Neuroscience, 15:1329-1340(1995); Morrissey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:1431-1435(1995) 和 Lewis et al., Cancer Res., 56:1457-1465(1996) 对于 ErbB2-ErbB3 蛋白质复合物的描述。实际上, ErbB2 是 EGFR 和 ErbB3 的优选异二聚化伴侣。(Graus-Porta et al., 同上文)。如同 ErbB3 一样, ErbB4 与 ErbB2 形成活性信号传递复合物 (Carraway 和 Cantley, Cell, 78:5-8(1994))。ErbB2 与 EGFR 或 ErbB3 的配基依赖的异二聚化可能促进表达 ErbB2 的肿瘤的生长。

[0013] 已经在来自原发性乳腺癌患者的肿瘤样本中和膀胱癌中研究了 ErbB 受体和 heregulin 的表达以及 HER2 的磷酸化状况 (Esteva et al., Pathol. Oncol. Res., 7:171-177(2001); Chow et al., Clin. Cancer Res., 7:1957-1962(2001))。Thor et al., J. Clin. Oncology, 18:3230-3239(2000), 和 DiGiovanna et al., Cancer Res., 62:6667-6673(2002) 已经报道了在乳腺癌中,通过 Her2/neu 的活跃信号传递与临床病理和患者结局之间的相关性。

[0014] 发明概述

[0015] 一个方面,本发明涉及鉴定对用抗 HER2 抗体处理有响应的肿瘤的方法。优选地,该抗 HER2 抗体阻断包含 HER2 的 ErbB 异二聚体的配基激活。在一个实施方案中,该抗体是单克隆抗体 2C4,更加优选为 rhuMAb 2C4。

[0016] 获得肿瘤样本,并检测该样本中是否存在 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物。当检测到这种复合物时,肿瘤被鉴定为对用抗 HER2 抗体的处理有响应。

[0017] 在一个实施方案中,通过用抗 HER2 抗体免疫沉淀任何含有 HER2 的蛋白质复合物来检测是否存在复合物。然后被免疫沉淀的复合物与选自由抗 HER3 抗体、抗 HER1 抗体和抗 HER4 抗体组成的组的抗体接触,确定任何结合。如果确定抗 HER3 和 / 或抗 HER1 和 / 或抗 HER4 的抗体结合到被免疫沉淀的复合物上,即检测到 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 复合物。

[0018] 在另一个实施方案中,通过将肿瘤样本与包含第一荧光团的抗 HER2 的抗体接触来检测是否存在 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物。然后将肿瘤样本与选自由抗 HER3 和 / 或抗 HER1 和 / 或抗 HER4 抗体组成的组的抗体接触,其中所述抗体包含第二荧光团。然后测定荧光共振能量转移来确定第一荧光团与第二荧光团是否十分接近。如果第一荧光团与第二荧光团被确定十分接近,则检测到存在 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物。

[0019] 在还有另一个实施方案中,通过将肿瘤样本与第一结合化合物接触来检测是否存在 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物。第一结合化合物包含特异地结合 HER2 的第一靶向结合部分。第一靶向结合部分优选是抗 HER2 抗体或抗体片段。第一结合化合物进一步包括通过可裂解接头连接到第一个结合结构域的可检测部分。

[0020] 将肿瘤样本与第二结合化合物接触。第二结合化合物优选包含特异地结合 HER3 或 HER1 或 HER4 和优选不结合 HER2 的第二靶向结合部分。在另一个实施方案中,第二结合化合物结合 HER3 或 HER1,并且不结合 HER2 或 HER4。在另一个实施方案中,第二靶向结合

部分包含抗 HER3 或抗 HER1 或抗 HER4 的抗体或抗体片段。第二结合化合物被激活时能够断裂第一结合化合物的可裂解接头,从而当第一结合化合物与第二结合化合物十分接近时产生游离的可检测部分。当鉴定到存在游离的可检测部分时,确定存在 HER2/HER3 或 HER2/HER1 或 HER2/HER4 蛋白质复合物。在一个实施方案中,通过毛细管电泳确定是否存在游离的可检测部分。

[0021] 在另一个实施方案中,第一结合化合物包含特异地结合 HER1 或 HER3 或 HER4 的第一靶向结合结构域,并且第二结合化合物包含特异地结合 HER2 的第二靶向结合结构域。

[0022] 在还有一个实施方案中,通过评价 ErbB 受体磷酸化,例如通过免疫沉淀 HER2 蛋白质,接着通过蛋白质印迹免疫检测磷酸酪氨酸,检测 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物,以及所引起的 HER2 活化。

[0023] 用于分析是否存在 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物的肿瘤样本优选从患有该肿瘤的患者中获得。该样本例如可以通过活组织检查获得。在另一个实施方案中,该样本通过纯化来自患者的循环的肿瘤细胞来获得。在还有另一个实施方案中,该样本在从患者身上摘除肿瘤的手术过程中获得。

[0024] 在另一个实施方案中,肿瘤样本是从哺乳动物而不是最先发生该肿瘤的患者之外的哺乳动物中获得。优选地,该样本得自小鼠或另一种啮齿类动物。更加优选地,该肿瘤是异种移植的肿瘤。该异种移植的肿瘤优选通过将人的肿瘤碎片移植到小鼠或另一种啮齿类动物来制备。

[0025] 在一个实施方案中,肿瘤是肺肿瘤,更加优选是非小细胞肺癌肿瘤。在另一个实施方案中,肿瘤是乳腺肿瘤。

[0026] 在另一个方面,本发明涉及检测对用抑制 HER2 与 ErbB 受体家族另一成员结合的抗体的处理有响应的肿瘤细胞的方法,包括步骤 (a) 提供包含 HER2 阳性肿瘤细胞的生物学样本;和 (b) 检测生物学样本中的 ErbB 受体的磷酸化,其中所述磷酸化表明肿瘤细胞对用抗体处理有响应。在一个实施方案中,检测 ErbB2 (HER2) 受体的磷酸化。

[0027] 如前所述,与 HER2 相关的其他成员是 HER3、HER1 和 / 或 HER4,例如 HER2 和 / 或 HER1。该方法还可以另外包含检测是否存在 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物的步骤,基本上如上所述。

[0028] 在另一个方面,本发明还涉及用于预测被诊断具有 HER2 阳性肿瘤的受检者对用抑制 HER2 与 ErbB 受体家族的另一个成员结合的抗体处理的反应的方法,通过检测在得自该受检者的包含 HER2 阳性肿瘤细胞的生物样本中 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物的形成和 / 或 ErbB 受体的磷酸化。存在这种蛋白质复合物和 / 或所述磷酸化表明个体可能对用抗体处理有响应。在一个实施方案中,检测到 ErbB2 (HER2) 受体的磷酸化表明受检者可能对用该抗体处理有响应。

[0029] 在还有另一个实施方案中,本发明涉及通过检测受检者的循环的肿瘤细胞中的 ErbB 受体的磷酸化,鉴定对用抗 HER2 抗体处理有响应的受检者。存在这种磷酸化表明受检者可能对用抗 HER2 抗体的处理有响应。在一个实施方案中,检测 ErbB2 (HER2) 磷酸化。在另一个实施方案中,受检者是人。在还有另一个实施方案中,该方法还包含用抗 HER2 抗体治疗受检者,优选使用 rhuMAb 2C4。

[0030] 在另一个方面,本发明提供一种制品,其包含含有结合 HER2 的抗体的容器和关于

将该抗体施用给患有肿瘤的患者中的说明书。优选地,该肿瘤已经被确定包含 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 异二聚体。

[0031] 在一个实施方案中,该容器含有阻断包含 HER2 的 ErbB 异二聚体的配基活化的抗体。在另一个实施方案中,该容器含有单克隆抗体 2C4,更加优选为 rhuMAb 2C4。

[0032] 在还有一个方面,本发明提供治疗患者的方法,包含给患者施用治疗有效量的结合 HER2 的抗体。优选地,该患者患有被确定包含 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 异二聚体的肿瘤。

[0033] 在一个实施方案中,抗体阻断包含 HER2 的 ErbB 异二聚体的配基活化。在另一个实施方案中,该抗体是单克隆抗体 2C4,更加优选为 rhuMAb 2C4。

[0034] 在另一个方面,本发明提供治疗患者的方法,包含给患者施用治疗有效量的结合 HER2 的抗体。优选地,该患者患有被确定具有被磷酸化的 ErbB 受体的肿瘤。

[0035] 在一个实施方案中,被磷酸化的 ErbB 受体是 HER2。在另一个实施方案中,抗体阻断包含 HER2 的 ErbB 异二聚体的配基活化。在另一个实施方案中,该抗体是单克隆抗体 2C3,更加优选为 rhuMAb 2C4。

[0036] 本发明还涉及:

[0037] 1. 鉴定对用抗 HER2 抗体处理响应的肿瘤的方法,包含:

[0038] a) 检测所述肿瘤的样本中 HER2/HER 3 和 / 或 HER2/HER1 蛋白质复合物的存在;

[0039] c) 当检测到复合物时,则将肿瘤鉴定为对用抗 HER2 抗体处理响应的肿瘤。

[0040] 2. 项 1 的方法,其中抗 HER2 抗体阻断包含 HER2 的 ErbB 异二聚体的配基活化。

[0041] 3. 项 1 的方法,其中抗 HER2 抗体是单克隆抗体 2C4。

[0042] 4. 项 1 的方法,其中抗 HER2 抗体是 rhuMAb 2C4。

[0043] 5. 项 1 的方法,其中 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 蛋白质复合物的存在通过如下步骤检测:

[0044] a) 用抗 HER2 抗体免疫沉淀任何包含 HER2 的蛋白质复合物;

[0045] b) 用选自抗 HER3 抗体和抗 HER1 抗体组成的组中的抗体与被免疫沉淀的复合物接触;和

[0046] c) 确定抗 HER3 和 / 或抗 HER1 抗体是否与被免疫沉淀的复合物结合,

[0047] 其中如果确定抗 HER3 和 / 或抗 HER1 抗体与被免疫沉淀的复合物结合,则检测到 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 复合物。

[0048] 6. 项 1 的方法,其中 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 蛋白质复合物的存在通过如下步骤检测:

[0049] a) 将肿瘤样本与包含荧光团的抗 HER2 抗体接触;

[0050] b) 将肿瘤样本与选自抗 HER3 和抗 HER1 抗体组成的组中的抗体接触,其中所述抗体包含第二荧光团;

[0051] c) 通过测量荧光共振能量转移确定第一荧光团和第二荧光团是否十分接近,

[0052] 其中如果第一和第二荧光团被确定十分接近,则检测到 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 蛋白质复合物的存在。

[0053] 7. 项 1 的方法,其中 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 蛋白质复合物的存在是通过如下步骤检测的:

[0054] a) 将肿瘤样本与第一结合化合物接触,其中所述第一结合化合物包含特异结合 HER2 的第一靶向结合部分,并且还进一步包含通过可裂解接头连接到第一靶向结合部分的可检测部分;

[0055] b) 将肿瘤样本与第二结合化合物接触,其中该第二结合化合物包含特异结合 HER3 或 HER1 的第二靶向结合部分和可活化的裂解剂;

[0056] c) 激活裂解剂,使得如果第一结合化合物和第二结合化合物十分接近,第二结合化合物断裂第一结合化合物中的可裂解接头来产生游离的可检测部分;和

[0057] d) 鉴定游离的可检测部分的存在,

[0058] 其中当鉴定到游离的可检测部分时,检测到 HER2/HER3 或 HER2/HER1 蛋白质复合物的存在。

[0059] 8. 项 7 的方法,其中第一靶向结合部分包含抗 HER2 抗体或者抗体片段。

[0060] 9. 项 7 的方法,其中第一靶向结合部分包含 HER2 受体的配体。

[0061] 10. 项 7 的方法,其中第二靶向结合部分包含抗 HER3 抗体或者抗体片段。

[0062] 11. 项 7 的方法,其中第二靶向结合部分包含 HER3 受体的配体。

[0063] 12. 项 7 的方法,其中第二靶向结合部分包含抗 HER1 抗体或者抗体片段。

[0064] 13. 项 7 的方法,其中第二靶向结合部分包含 HER1 受体的配体。

[0065] 14. 项 7 的方法,其中样本从患有该肿瘤的患者中获得。

[0066] 15. 项 14 的方法,其中样本通过肿瘤的活组织检查获得。

[0067] 16. 项 14 的方法,其中样本通过纯化来自患者血液的循环的肿瘤细胞来获得。

[0068] 17. 项 14 的方法,其中样本是在手术从患者中去除肿瘤的过程中获得。

[0069] 18. 项 1 的方法,其中肿瘤样本从小鼠中获得。

[0070] 19. 项 18 的方法,其中肿瘤是异种移植的肿瘤。

[0071] 20. 项 19 的方法,其中异种移植的肿瘤是通过将人肿瘤碎片移植到小鼠中来制备。

[0072] 21. 项 1 的方法,其中肿瘤是肺肿瘤。

[0073] 22. 项 1 的方法,其中肿瘤是乳腺肿瘤。

[0074] 23. 鉴定对用抑制 HER2 与 ErbB 受体家族的另一成员结合的抗体处理响应的肿瘤细胞的方法,包含:

[0075] a) 提供包含 HER2 阳性的肿瘤细胞的生物学样本;和

[0076] b) 检测在所述生物学样本中的 ErbB 受体的磷酸化,其中所述磷酸化指示所述肿瘤细胞对用所述抗体处理响应。

[0077] 24. 项 23 的方法,其中 ErbB2 (HER2) 受体磷酸化被检测。

[0078] 25. 项 23 的方法,其中其他成员选自由 HER3、HER1 和 HER4 组成的组。

[0079] 26. 项 23 的方法,其中抗体结合 HER2。

[0080] 27. 项 26 的方法,其中抗 HER2 抗体阻断包含 HER2 的 ErbB 异二聚体的配基活化。

[0081] 28. 项 27 的方法,其中抗体是 rhuMAb 2C4。

[0082] 29. 项 25 的方法,其中抗体结合 HER3。

[0083] 30. 项 25 的方法,其中抗体结合 HER1。

[0084] 31. 项 25 的方法,其中抗体结合 HER4。

[0085] 32. 项 23 的方法,另外还包含检测样本中至少一种选自自由 HER2/HER3、HER2/HER1 和 HER2/HER4 组成的组中的蛋白质复合物的存在。

[0086] 33. 项 32 的方法,其中通过如下来检测所述蛋白质复合物或多个蛋白质复合物的存在:

[0087] a) 用抗 HER2 抗体免疫沉淀任何包含 HER2 的蛋白质复合物;

[0088] b) 将被免疫沉淀的复合物与选自自由抗 HER3、抗 HER1 和抗 HER4 抗体组成的组中的至少一种抗体接触;和

[0089] c) 确定所述抗 HER3 和 / 或抗 HER1 和 / 或抗 HER4 抗体是否与被免疫沉淀的复合物结合,

[0090] 其中如果确定抗 HER3 和 / 或抗 HER1 和 / 或抗 HER4 抗体与被免疫沉淀的复合物结合,则检测到 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 复合物。

[0091] 34. 项 32 的方法,其中通过如下检测所述蛋白质复合物或多个蛋白质复合物的存在:

[0092] a) 将肿瘤样本与包含荧光团的抗 HER2 抗体接触;

[0093] b) 将肿瘤样本与选自自由抗 HER3、抗 HER1 和抗 HER4 抗体组成的组中的抗体接触,其中所述抗体包含第二荧光团;

[0094] c) 通过测量荧光共振能量转移确定第一荧光团与第二荧光团是否十分接近,

[0095] 其中如果第一与第二荧光团被确定十分接近,则检测到存在 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物。

[0096] 35. 项 32 的方法,其中通过如下检测所述蛋白质复合物或多个蛋白质复合物的存在:

[0097] a) 将肿瘤样本与第一结合化合物接触,其中所述第一结合化合物包含特异结合 HER2 的第一靶向结合部分,还进一步包含通过可裂解接头被连接到第一靶向结合部分的可检测部分;

[0098] b) 将肿瘤样本与第二结合化合物接触,其中第二结合化合物包含特异结合 HER3 或 HER1 或 HER4 的第二靶向结合部分和可活化的裂解剂;

[0099] c) 激活裂解剂,使得如果第一结合化合物和第二结合化合物十分接近,则第二结合化合物断裂第一结合化合物的可裂解接头来产生游离的可检测部分;和

[0100] d) 鉴定游离的可检测部分的存在,

[0101] 其中当游离的可检测部分被鉴定时,检测到 HER2/HER3 或 HER2/HER1 或 HER2/HER4 蛋白质复合物的存在。

[0102] 36. 项 35 的方法,其中第一靶向结合部分包含抗 HER2 抗体或抗体片段,或 HER2 受体的配体。

[0103] 37. 项 35 的方法,其中第二靶向结合部分包含抗 HER3 抗体或抗体片段,或 HER3 受体的配体。

[0104] 38. 项 35 的方法,其中第二靶向结合部分包含抗 HER1 抗体或抗体片段,或 HER1 受体的配体。

[0105] 39. 项 35 的方法,其中第二靶向结合部分包含抗 HER4 抗体或抗体片段,或 HER4 受体的配体。

- [0106] 40. 项 23 的方法,其中生物学样本是从肿瘤活组织检查中获得的组织。
- [0107] 41. 项 23 的方法,其中生物学样本是包含循环的肿瘤细胞和 / 或循环的血浆蛋白的生物学液体。
- [0108] 42. 项 23 的方法,其中该肿瘤选自自由乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠直肠癌和卵巢癌组成的组。
- [0109] 43. 项 23 的方法,其中 ErbB 受体磷酸化通过 ErbB 受体的免疫沉淀和蛋白质印迹分析来确定。
- [0110] 44. 项 43 的方法,其中 ErbB 受体磷酸化通过凝胶上的磷酸 ErbB 受体条带的存在来指示。
- [0111] 45. 项 43 的方法,还进一步包含用磷酸特异的抗 ErbB 受体抗体通过免疫组织化学来证实 ErbB 受体磷酸化的步骤。
- [0112] 46. 项 23 的方法,其中通过免疫组织化学确定 ErbB 受体磷酸化。
- [0113] 47. 用于预测个体对用抑制 HER2 与 ErbB 受体家族的另一成员联合的抗体处理的反应的方法,所述个体被诊断患有 HER2 阳性肿瘤,该方法包含:
- [0114] a) 提供从所述个体获得的生物学样本,包含 HER2 阳性肿瘤细胞;和
- [0115] b) 检测所述生物学样本中的 ErbB 受体的磷酸化,
- [0116] 其中所述磷酸化指示所述患者可能对用所述抗体处理有反应。
- [0117] 48. 项 47 的方法,其中所述 ErbB 受体是 ErbB2 (HER2)。
- [0118] 49. 项 47 的方法,其中其他成员选自自由 HER3、HER1 和 HER4 组成的组。
- [0119] 50. 项 47 的方法,其中抗体结合 HER2。
- [0120] 51. 项 50 的方法,其中抗 HER2 抗体阻断包含 HER2 的 ErbB 异二聚体的配基活化。
- [0121] 52. 项 51 的方法,其中抗体是 rhuMAb 2C4。
- [0122] 53. 项 49 的方法,其中抗体结合 HER3。
- [0123] 54. 项 49 的方法,其中抗体结合 HER1。
- [0124] 55. 项 49 的方法,其中抗体结合 HER4。
- [0125] 56. 项 47 的方法,另外还包含检测在样本中至少一种选自自由 HER2/HER3、HER2/HER1 和 HER2/HER4 组成的组中的蛋白质复合物的存在。
- [0126] 57. 项 56 的方法,其中通过如下检测所述蛋白质复合物的存在:
- [0127] a) 用抗 HER2 抗体免疫沉淀任何包含 HER2 的蛋白质复合物;
- [0128] b) 将被免疫沉淀的复合物与选自由抗 HER3、抗 HER1 和抗 HER4 抗体组成的组中的抗体接触;和
- [0129] c) 确定抗 HER3 和 / 或抗 HER1 和 / 或抗 HER4 抗体是否与被免疫沉淀的复合物结合,
- [0130] 其中如果确定抗 HER3 和 / 或抗 HER1 和 / 或抗 HER4 抗体与被免疫沉淀的复合物结合,则检测到 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 复合物。
- [0131] 58. 项 56 的方法,其中通过如下检测 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物的存在:
- [0132] a) 将肿瘤样本与包含荧光团的抗 HER2 抗体接触;
- [0133] b) 将肿瘤样本与选自由抗 HER3、抗 HER1 和抗 HER4 抗体组成的组中的抗体接触,

其中所述抗体包含第二荧光团；

[0134] c) 通过测量荧光共振能量转移确定第一荧光团与第二荧光团是否十分接近，

[0135] 其中如果第一荧光团和第二荧光团被确定十分接近，则检测到 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物的存在。

[0136] 59. 项 56 的方法，其通过如下检测 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 蛋白质复合物的存在：

[0137] a) 将肿瘤样本与第一结合化合物接触，其中所述第一结合化合物包含特异结合 HER2 的第一靶向结合部分，还进一步包含通过可裂解接头连接到第一靶向结合部分的可检测部分；

[0138] b) 将肿瘤样本与第二结合化合物接触，其中第二结合化合物包含特异结合 HER3、HER1 或 HER4 的第二靶向结合部分和可活化的裂解剂；

[0139] c) 激活裂解剂使得如果第一结合化合物与第二结合化合物十分接近，第二结合化合物断裂第一结合化合物中的可裂解接头来产生游离的可检测部分；和

[0140] d) 鉴定游离的可检测部分的存在，

[0141] 其中当鉴定到游离的可检测部分时，则检测到 HER2/HER3 或 HER2/HER1 或 HER2/HER4 蛋白质复合物的存在。

[0142] 60. 项 59 的方法，其中第一靶向结合部分包含抗 HER2 抗体或抗体片段，或 HER2 受体的配体。

[0143] 61. 项 59 的方法，其中第二靶向结合部分包含抗 HER3 抗体或抗体片段，或 HER3 受体的配体。

[0144] 62. 项 59 的方法，其中第二靶向结合部分包含抗 HER1 抗体或抗体片段，或 HER1 受体的配体。

[0145] 63. 项 59 的方法，其中第二靶向结合部分包含抗 HER4 抗体或抗体片段，或 HER4 受体的配体。

[0146] 64. 项 47 的方法，其中生物学样本是从肿瘤活组织检查中获得的组织。

[0147] 65. 项 47 的方法，其中生物学样本是包含循环的肿瘤细胞和 / 或循环的血浆蛋白的生物学液体。

[0148] 66. 项 47 的方法，其中肿瘤选自乳腺癌、前列腺癌、肺癌、结肠直肠癌和卵巢癌组成的组。

[0149] 67. 项 47 的方法，其中 ErbB 受体磷酸化通过 ErbB 受体的免疫沉淀和蛋白质印迹分析来确定。

[0150] 68. 项 67 的方法，其中 ErbB 受体磷酸化通过凝胶上存在磷酸 ErbB 受体条带来指示。

[0151] 69. 项 67 的方法，还进一步包含采用磷酸特异性抗 ErbB 受体抗体通过免疫组织化学来证实 ErbB 受体磷酸化的步骤。

[0152] 70. 项 47 的方法，其中 ErbB 受体磷酸化通过免疫组织化学确定。

[0153] 71. 用于鉴定对用抗 HER2 抗体处理响应的个体的方法，包含：

[0154] a) 检测所述个体的循环的肿瘤细胞中的 ErbB 受体磷酸化，和

[0155] b) 如果检测到所述磷酸化，则确定所述个体可能对用抗 HER2 抗体处理有反应。

- [0156] 72. 项 71 的方法,其中 ErbB2 (HER2) 磷酸化被检测。
- [0157] 73. 项 72,其中所述个体是人。
- [0158] 74. 项 73 的方法,还进一步包含用抗 HER2 抗体处理所述个体。
- [0159] 75. 项 74 的方法,其中所述抗 HER2 抗体是 rhuMAb 2C4。
- [0160] 76. 一种治疗患者的方法,包含给患者施用治疗有效量的结合 HER2 的抗体,其中该患者患有已被确定包含 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 异二聚体的肿瘤。
- [0161] 77. 项 76 的方法,其中抗体阻断包含 HER2 的 ErbB 异二聚体的配基活化。
- [0162] 78. 项 77 的方法,其中抗体是单克隆抗体 2C4。
- [0163] 79. 项 77 的方法,其中抗体是 rhuMAb 2C4。
- [0164] 80. 一种制品,包含含有结合 HER2 的抗体的容器和用于施用抗体给患有肿瘤的患者说明书,其中肿瘤已被确定包含 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 异二聚体。
- [0165] 81. 项 80 的制品,其中抗体阻断包含 HER2 的 ErbB 异二聚体的配基活化。
- [0166] 82. 项 81 的制品,其中容器包含单克隆抗体 2C4。
- [0167] 83. 项 81 的制品,其中容器包含 rhuMAb 2C4。
- [0168] 84. 治疗患者的方法,包含给患者施用治疗有效量的结合 HER2 的抗体,其中患者患有已被确定具有磷酸化 ErbB 受体的肿瘤。
- [0169] 85. 项 84 的方法,其中 ErbB 受体是 HER2。
- [0170] 86. 项 84 的方法,其中抗体阻断包含 HER2 的 ErbB 异二聚体的配基活化。
- [0171] 87. 项 84 方法,其中抗体是单克隆抗体 2C4。
- [0172] 88. 项 87 的方法,其中抗体是 rhuMAb 2C4。

附图简介

[0173] 附图 1A 和 1B 描述鼠单克隆抗体 2C4 的轻链可变区 (VL) (附图 1A) 和重链可变区 (VH) (附图 1B) 结构域的氨基酸序列比对 (分别为 SEQ ID No. 1 和 2), 2C4 的人源化形式 574 的 VL 和 VH 结构域 (分别为 SEQ ID No. 3 和 4) 以及人 VL 和 VH 的共有片段 (hum κ 1, 轻链 κ 亚群 I; hum III, 重链亚群 III) (分别为 SEQ ID No. 5 和 6)。星号表示在 2C4 的人源化形式 574 和鼠单克隆抗体 2C4 之间或者在 2C4 的人源化形式 574 和人框架之间的差异。互补决定区 (CDR) 在括号内。

[0174] 附图 2A 和 2B 表示在表达低水平 / 正常水平 ErbB2 的 MCF7 细胞 (附图 2A) 和表达高水平的 ErbB2 的 SK-BR-3 细胞 (附图 2B) 中, 单克隆抗体 2C4、HERCEPTIN® 抗体或抗 EGFR 抗体对 heregulin (HRG) 依赖的 ErbB2 与 ErbB3 结合的影响; 参见下面的实施例 2。

[0175] 附图 3 是表明在来自非小细胞肺癌异种移植外植体的蛋白质提取物中存在 HER1/HER2 和 HER2/HER3 异二聚体的免疫印迹。

[0176] 附图 4 是表明在来自非小细胞肺癌 (NSCLC) 异种移植外植体的蛋白质提取物中存在 HER2 磷酸化的免疫印迹。

[0177] 优选实施方案的详述

[0178] 本发明部分地基于对抗 HER2 抗体 rhuMAb 2C4 的响应与肿瘤细胞中存在 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和或 HER2/HER4 异二聚体、和 / 或 ErbB 受体磷酸化相关的试验发现。

因此,基于存在 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 异二聚体、和 / 或 ErbB 受体磷酸化,肿瘤可以被鉴定为对用抗 HER2 抗体的处理有响应,特别是具有抗 HER2 抗体 2C4 的一种或多种生物学活性的抗 HER2 抗体。HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 异二聚体,和 / 或 ErbB 受体磷酸化可以通过本领域已知的任何方法来鉴定。通过鉴定对用抗 HER2 的抗体处理响应的特定肿瘤和肿瘤类型,可以鉴定将可能会从这种处理中最获益的患者。此外,还可以鉴定可能无法从使用单克隆抗体 2C4 的治疗中获益的患者。

[0179] 定义

[0180] “ErbB 受体”是受体蛋白酪氨酸激酶,其属于 ErbB 受体家族,包括 EGFR(ErbB1)、ERRP、ErbB2、ErbB3 和 ErbB4 受体以及将来将被鉴定的该家族的其他成员。ErbB 受体通常包含可能结合 ErbB 配基的细胞外结构域;亲脂性跨膜结构域;保守的细胞内酪氨酸激酶结构域;和具有多个可以被磷酸化的酪氨酸残基的羧基端信号传导结构域。ErbB 受体可以是“天然序列”的 ErbB 受体或其“氨基酸序列变体”。优选地,ErbB 受体是天然序列的人 ErbB 受体。因此,“ErbB 受体家族成员”是 EGFR(ErbB1)、ErbB2、ErbB3、ErbB4 或任何其他目前已知或者将来将被鉴定的 ErbB 受体。优选地,该成员是 EGFR(ErbB1)、ErbB2、ErbB3、或 ErbB4。

[0181] 术语“ErbB1”、“表皮生长因子受体”、“EGFR”和“HER1”在此被互换使用,是指被公开在如 Carpenter et al., Ann. Rev. Biochem., 56:881-914(1987) 中的 EGFR,包括其天然存在的突变形式(例如 Humphrey et al., PNAS(USA), 87:4207-4211(1990) 中的缺失突变 EGFR)。erbB1 是指编码 EGFR 蛋白产物的基因。抗 HER1 的抗体被描述在例如 Murthy et al., Arch. Biochem. Biophys., 252:549-560(1987) 和 WO 95/25167 中。

[0182] 术语“ERRP”、“EGF 受体相关蛋白”、“EGFR 相关蛋白”和“表皮生长因子受体相关蛋白”在此被互换使用,是指公开在例如美国专利号 6,399,743 和美国公开号 2003/0096373 中的 ERRP。

[0183] 表达法“ErbB2”和“HER2”在此被互换使用,是指在例如 Semba et al., PNAS(USA), 82:6497-6501(1985) 和 Yamamoto et al., Nature, 319:230-234(1986) (Genebank 登录号 X03363) 中被描述的人 HER2 蛋白。术语“erbB2”是指编码人 ErbB2 的基因,而“neu”是指编码大鼠 p185neu 的基因。优选的 ErbB2 是天然序列的人 ErbB2。

[0184] “ErbB3”和“HER3”是指如在美国专利号 5,183,884 和 5,480,968 以及 Kraus et al., PNAS(USA), 86:9193-9197(1989) 中公开的受体多肽。抗 ErbB3 的抗体在本领域是已知的,被描述在例如美国专利号 5,183,884、5,480,968 和 W097/35885 中。

[0185] 术语“ErbB4”和“HER4”在此是指在如欧洲专利申请号 599,274; Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750(1993) 和 Plowman et al., Nature, 366:473-475(1993) 中所描述的受体多肽,包括其同种型,例如被公开在 1999 年 4 月 22 日公开的 WO 99/19488 中。抗 HER4 的抗体被描述在例如 WO 02/18444 中。

[0186] ErbB 受体的抗体可以从许多地方购买得到,包括例如 Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, USA 有限公司。

[0187] 所用“ErbB 配基”是指结合和 / 或激活 ErbB 受体的多肽。ErbB 配基是天然序列的人 ErbB 配基,例如表皮生长因子(EGF)(Savage et al., J. Biol. Chem., 247:7612-7621(1972)); 转化生长因子 α (TGF- α)(Marquardt et al., Science, 223:1079-1082(1984)); 双调蛋白也称作雪旺氏瘤(schwannoma)或角质细胞自分泌生

长因子 (keratinocyte autocrine growth factor) (Shoyab et al., *Science*, 243: 1074-1076(1989); Kimura et al., *Nature*, 348:257-260(1990); 和 Cook et al., *Mol. Cell. Biol.*, 11:2547-2557(1991)); β -动物纤维素 (Shing et al., *Science*, 259: 1604-1607(1993); 和 Sasada et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190:1173(1993)); 肝素结合表皮生长因子 (HB-EGF) (Higashiyama et al., *Science*, 251:936-939(1991)); 上皮调节素 (Toyoda et al., *J. Biol. Chem.*, 270:7495-7500(1995); 和 Komurasaki et al., *Oncogene*, 15:2841-2848(1997)); heregulin(参见下面); 神经调节蛋白-2(NRG-2) (Carraway et al., *Nature*, 387:512-516(1997)); 神经调节蛋白-3(NRG-3) (Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:9562-9567(1997)); 神经调节蛋白-4(NRG-4) (Harari et al., *Oncogene*, 18:2681-89(1999)) 或 cripto(CR-1) (Kannan et al., *J. Biol. Chem.*, 272(6):3330-3335(1997))。结合 EGFR 的 ErbB 配基包括 EGF、TGF- α 、双调蛋白、 β -动物纤维素、HB-EGF 和上皮调节素。结合 ErbB3 的 ErbB 配基包括 heregulin。能够结合 ErbB4 的 ErbB 配基包括 β -动物纤维素、上皮调节素、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4 和 heregulin。ErbB 配基还可以是合成的 ErbB 配基。合成的配基可以特异于特定的 ErbB 受体, 或者能够识别特定的 ErbB 受体复合物。合成配基的一个例子是合成的 heregulin/egf 嵌合双调素 (biregulin) (参见, 例如 Jones et al., *FEBS Letters*, 447:227-231(1999), 在此引入作为参考)。

[0188] 在此所用的“Heregulin”(HRG) 是指由在美国专利号 5,641,869 或 Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318(1993) 中公开的 heregulin 基因产物所编码的多肽。Heregulin 的例子包括 heregulin- α 、heregulin- β 1、heregulin- β 2 和 heregulin- β 3 (Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210(1992); 和美国专利号 5,641,869); neu 分化因子 (NDF) (Peles et al., *Cell*, 69:205-216(1992)); 乙酰胆碱受体诱导活性 (ARIA) (Falls et al., *Cell*, 72:801-815(1993)); 神经胶质生长因子 (GGF) (Marchionni et al., *Nature*, 362:312-318(1993)); 感觉和运动神经元衍生因子 (SMDF) (Ho et al., *J. Biol. Chem.*, 270:14523-14532(1995)); γ -heregulin (Schaefer et al., *Oncogene*, 15:1385-1394(1997))。该术语包括天然序列的 HRG 多肽的生物学活性片段和 / 或氨基酸序列变体, 例如其 EGF 样结构域片段 (例如, HRG β 1177-244)。

[0189] “ErbB 异低聚物”在此是包含至少两种不同 ErbB 受体的非共价结合的低聚体。“ErbB 二聚体”是包含两种不同 ErbB 受体的非共价结合的低聚体。当表达两种或更多种 ErbB 受体的细胞被暴露于 ErbB 配基时, 形成这种复合物。ErbB 低聚体, 例如 ErbB 二聚体, 可以通过免疫沉淀来分离并通过例如在 Sliwkowski et al., *J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665(1994) 中描述的 SDS-PAGE 来分析。这种 ErbB 异低聚体的例子包括 EGFR-ErbB2 (也称作为 HER1/HER2), ErbB2-ErbB3 (HER2/HER3) 和 ErbB3-ErbB4 (HER3/HER4) 复合物。此外, ErbB 异低聚体可以包含两个或更多个与不同 ErbB 受体例如 ErbB3、ErbB4 或 EGFR (ErbB1) 结合的 ErbB2 受体。其他蛋白质, 例如细胞因子受体亚单位 (例如 gp130) 可以被包括在异低聚体中。

[0190] “ErbB 受体的配基活化”是指受结合到包含目的 ErbB 受体的 ErbB 异低聚体上的 ErbB 配基调节的信号转导 (例如由 ErbB 受体的细胞内激酶结构域磷酸化 ErbB 受体或底物多肽中的酪氨酸残基所引起的)。一般地, 这涉及 ErbB 配基结合到 ErbB 异低聚体上, 激活

异低聚体中的一个或多个 ErbB 受体的激酶结构域,从而导致一个或多个 ErbB 受体的酪氨酸残基发生磷酸化和 / 或在额外的底物多肽中的酪氨酸残基发生磷酸化。可以采用各种酪氨酸磷酸化分析来量化 ErbB 受体活化。

[0191] “天然序列”多肽是具有与来自自然界的多肽(例如 ErbB 受体或 ErbB 配基)相同的氨基酸序列的多肽。这种天然序列多肽可以从自然界中分离或者可以通过重组或合成方法制备。因此,天然序列的多肽具有天然发生的人多肽、鼠多肽或来自任何其他哺乳动物物种的多肽的氨基酸序列。

[0192] 术语“氨基酸序列变体”是指具有在一定程度上与天然序列多肽有区别的氨基酸序列的多肽。通常,氨基酸序列变体将与天然 ErbB 配基的至少一个受体结合结构域或者与天然 ErbB 受体的至少一个配基结合结构域具有至少约 70% 同源性,和优选地至少约 80%,更加优选地,与这种受体或配基结合结构域至少约 90% 同源。氨基酸序列变体在天然氨基酸序列的氨基酸序列中的某些位点上具有取代、缺失和 / 或插入。

[0193] “同源性”被定义为在必要时进行序列比对和引入缺口以获取最大的百分比同一性后氨基酸序列变体中的相同残基的百分比。用于比对的方法和计算机程序在本领域是已熟知的。一种这种计算机程序是“Align 2”,由 Genentech, Inc. 创作,已经在 1991 年 12 月 10 日在华盛顿, DC 20559, 美国版权局与用户文档 (user documentation) 一起提交。

[0194] 术语“抗体”在此以最广泛的意义上使用,特别地涵盖完整的单克隆抗体、多克隆抗体、由至少两种完整抗体形成的多重特异性抗体(例如双特异性抗体),和抗体片段,只要其具有期望的生物学活性。

[0195] 如在此所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同型的抗体的群体中获得的抗体,即包含群体的各个抗体除了以少量存在的可能天然发生的突变外,是相同的。单克隆抗体是高度特异的,针对单一的抗原位点。此外,与包含针对不同抗原决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂形成对比的是,各个单克隆抗体针对抗原上的单一抗原决定簇。除了其特异性外,单克隆抗体的优点在于可以不受其他抗体污染地被合成。修饰语“单克隆”表示从基本上同型的抗体群体中获得的抗体的特征,而不被解释为需要通过任何特定方法来生产抗体。例如,根据本发明将被使用的单克隆抗体可以通过最早由 Kohler et al., *Nature*, 256:495(1975) 所描述的杂交瘤方法来制备,或者通过重组 DNA 方法(参见例如美国专利号 4,816,567) 来制备。还可以采用在例如 Clackson et al., *Nature*, 352:624-628(1991) 和 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991) 中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离“单克隆抗体”。

[0196] 单克隆抗体在此特别地包括“嵌合”抗体,其中重链和 / 或轻链的一部分与来自特定物种或者属于特定的抗体种类或亚类的抗体的相应序列相同或同源,而该链的剩余部分与来自另一物种或者属于另一抗体种类或亚类的抗体的相应序列相同或相似,以及这种抗体的片段,只要这些片段展示出期望的生物学活性(美国专利号 4,816,567;和 Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855(1984))。在此的目的嵌合抗体包括含有衍生自非人灵长类(例如旧大陆猴 (Old World Monkey), 猿等) 的可变结构域抗原结合序列和人的恒定区序列的“灵长类化”抗体。

[0197] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括 Fab、Fab'、F(ab')₂、和 Fv 片段;微型双功能抗体 (diabodies);线性抗体;

单链抗体分子 ;和由抗体片段形成的多重特异性抗体。

[0198] “完整的”抗体是包含抗原结合可变区以及轻链恒定结构域 (CL) 和重链恒定结构域 CH1, CH2 和 CH3 的抗体。恒定结构域可以是天然序列的恒定结构域 (例如人天然序列的恒定结构域) 或其氨基酸序列变体。优选地,完整的抗体具有一种或多种效应子功能。

[0199] 抗体的“效应子功能”是指那些可归结于抗体的 Fc 区域 (天然序列的 Fc 区域或氨基酸序列变体的 Fc 区域) 的生物学活性。抗体效应子功能的例子包括 C1q 结合 ;补体依赖的细胞毒性 ;Fc 受体结合 ;抗体依赖的细胞介导的细胞毒性 (ADCC) ;吞噬作用 ;细胞表面受体 (例如 B 细胞受体 ;BCR) 的下调等。

[0200] 根据重链的恒定结构域的氨基酸序列,完整抗体抗原被分成不同“种类”。有五个主要的完整抗体的种类 :IgA、IgD、IgE、IgG、和 IgM,并且这些中的部分还抗原进一步分成“亚类”(同种型),例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、和 IgA2。对应于不同抗体种类的重链恒定结构域分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是已熟知的。

[0201] “抗体依赖的细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指一种细胞介导的反应,其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性的细胞毒性细胞 (例如天然杀伤 (NK) 细胞,嗜中性粒细胞和巨噬细胞) 识别靶细胞上结合的抗体,并随后引起靶细胞的溶解。用于介导 ADCC 的初级细胞 NK 细胞仅表达 Fc γ RIII,而单核细胞表达 Fc γ RI, Fc γ R II 和 Fc γ RIII。造血细胞上的 FcR 表达被总结在 Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, **9**:457-92 (1991) 的第 464 页的表 3 中。为了评价目的分子的 ADCC 活性,进行例如在美国专利号 5,500,362 或 5,821,337 中描述的体外 ADCC 分析。可用于这种分析的有用的效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。可选择地或者另外地,可以在体内评价目的分子的 ADCC 活性,例如在如 Clynes et al., *PNAS (USA)*, **95**:652-656 (1998) 中披露的动物模型中。

[0202] “人的效应细胞”是白细胞,其表达一种或多种 FcR 并且行使效应子功能。优选地,该细胞至少表达 Fc γ RIII 并且行使 ADCC 效应子功能。介导 ADCC 的人白细胞的例子包括外周血单核细胞 (PBMC)、天然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、细胞毒性 T 细胞和嗜中性粒细胞 ;而 PBMC 和 NK 细胞是优选的。效应子细胞可以从其天然来源中分离,例如如在此描述地来自血液或 PBMC。

[0203] 术语“Fc 受体”或“FcR”用于描述一种结合到抗体的 Fc 区域的受体。优选的 FcR 是人 FcR 的天然序列。此外优选的 FcR 是结合 IgG 抗体的 FcR (γ 受体),包括 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和可变剪接形式。Fc γ R II 受体包括 Fc γ R II A (“活化受体”) 和 Fc γ R II B (“抑制受体”),具有相似的氨基酸序列,主要区别在于其胞质结构域。活化受体 Fc γ R II A 在其胞质结构域中含有一个以免疫受体酪氨酸为基础的活化基序 (an immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (ITAM)。抑制受体 Fc γ R II B 在其胞质结构域中含有一个免疫受体酪氨酸为基础的抑制基序 (an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) (ITIM)。(参见综述, M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, **15**:203-234 (1997))。FcR 在 Ravetch 和 Kinet, *Anne. Rev. Immunol.*, **9**:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, **4**:25-34 (1994); 和 de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, **126**:330-41 (1995) 中被评述。其他的 FcR,包括将来将被鉴定的那些,都被包含在此处的术语“FcR”中。该术语还包括新生儿的受体, FcRn,其负责将母体

的IgG转运到胎儿 (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587(1976) 和 Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249(1994))。

[0204] “补体依赖的细胞毒性”或者“CDC”是指存在补体时,分子溶解靶点的能力。补体活化路径由补体系统的第一组分(C1q)结合到与关联抗原复合的分子(例如,一种抗体)上起始。为了评价补体活化,可进行如在 Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163(1996)中描述的CDC分析。

[0205] “天然抗体”通常是约150,000道尔顿的由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成的异四聚糖蛋白。每条轻链通过共价二硫键连接到重链上,而且二硫键的数量随着不同免疫球蛋白同种型的重链而变化。每条重链和轻链还具有规则的间隔的链内二硫键。每条重链在其一端具有可变结构域(VH),随后是大量的恒定结构域。每条轻链在其一端具有可变结构域(VL),并在另一端具有恒定结构域。轻链的恒定结构域对准(aligned)重链的第一个恒定结构域,而轻链的可变结构域对准重链的可变结构域。一般认为,特定的氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成一个界面。

[0206] 术语“可变的”是指可变结构域的某些部分在抗体的序列中广泛地变化,被用于每一特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。但是,可变性不是均匀地分布在抗体的可变结构域中。其集中在轻链和重链可变结构域上的称为高变区(hypervariable region)的三个片段上。可变结构域的更加高度保守部分称作骨架区(framework region)(FR)。天然重链和轻链的可变结构域每个都包含四个FR,大部分采用 β 片层构型,由三个高变区连接,形成环状连接,有时形成 β 片层结构的一部分。各条链中的高变区通过FR被紧密地固定在一起,并与其他链的高变区一起导致抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat et al.,具有免疫学意义的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of immunological Interest),第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。恒定结构域不直接参与将抗体与抗原的结合,但是具有各种效应子功能,例如参与抗体在抗体依赖的细胞毒性(ADCC)中的作用。

[0207] 当用于本文时,术语“高变区”是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区通常包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如,轻链可变结构域中的残基24-34(L1),50-56(L2)和89-97(L3),以及重链可变结构域中的31-35(H1),50-65(H2)和95-102(H3);Kabat et al.,具有免疫学意义的蛋白质的序列,第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))和/或来自“高变区环”(“hypervariable loop”)的那些残基(例如轻链可变结构域中的残基26-32(L1),50-52(L2),91-96(L3)和重链可变结构域中的26-32(H1),53-55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk,*J. Mol. Biol.*,196:901-917(1987))。“骨架区”或“FR”残基是那些如在此所定义的高变区残基之外的可变结构域残基。

[0208] 木瓜蛋白酶消化抗体生成两种相同的抗原结合片段,称作“Fab”片段,每个片段具有一个单一的抗原结合位点和残余的“Fc”片段,其名称反映其很容易结晶的能力。胃蛋白酶处理生成具有两抗原结合位点的F(ab')₂片段,并且仍能够与抗原交联。

[0209] “Fv”是最小的抗体片段,其含有完整的抗原识别和抗原结合位点。该区域由以紧密和非共价连接的由一条重链和一个轻链可变结构域组成的二聚体组成。是在这一构型中,各个可变结构域的三个高变区相互作用来确定VH-VL二聚体表面上的抗原结合位点。

总的来说,六个超变区将抗原结合特异性赋予给抗体。但是,即使是单个可变结构域(或者仅包含三个特异于抗原的高变区的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,虽然其亲合性低于完整结合位点。

[0210] Fab片段还含有轻链的恒定结构域以及重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的相同之处在于在重链CH1结构域的羧基端增加少数残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH在此是指恒定结构域中的半胱氨酸残基带有至少一个游离巯基的Fab'。F(ab')₂抗体片段最初以一对之间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段生成。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0211] 根据恒定结构域的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的抗体的“轻链”被划归入两种明显区别的种类之一,称作kappa(κ)和lambda(λ)。

[0212] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域在单一的多肽链中存在。优选地,Fv多肽还包含VH和VL结构域之间的多肽接头,使scFv形成期望的抗原结合结构。对scFv的综述,参见Plückthun在The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113中的文章, Rosenberg和Moore编辑, Springer-Verlag, New York, 269-315(1994)。抗ErbB2抗体的scFv片段被描述在WO 93/16185;美国专利号5,571,894;和美国专利号5,587,458中。

[0213] 术语“微型双功能抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,该片段包含在同一多肽链(VH-VL)上连接到可变轻链结构域(VL)的可变重链结构域(VH)。通过使用接头,该接头非常之短,以致于无法使同一链上的两个结构域配对,结构域被迫与另一条链的互补结构域配对,产生两个抗原结合位点。微型双功能抗体在例如EP404,097;WO 93/11161;和Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448(1993)中被更充分地描述。

[0214] 非人(例如啮齿类动物)抗体的“人源化”形式是含有来自非人类的免疫球蛋白的最短序列的嵌合抗体。人源化抗原的大部分是人的免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的高变区的残基被来自具有期望特异性、亲合性和能力的非人类物种的高变区(供体抗体)的残基替代,非人类物种例如小鼠、大鼠、兔或非人类的灵长类。在某些情况下,人免疫球蛋白的骨架区(FR)残基被相应的非人类的残基替代。此外,人源化抗体可能包含不存在于受体抗体或供体抗体中的残基。进行这些修饰来进一步改善抗体性能。一般地,人源化抗体将包含至少一个,和典型地两个可变结构域的基本上全部,其中对应于非人类的免疫球蛋白的高变区环的全部或基本上全部和FR的全部或基本上全部是人的免疫球蛋白序列的那些部分。人源化抗体可选择地还包含至少免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区的一部分。更加详细的描述,参见Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329(1988);和Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992)。

[0215] 人源化的抗ErbB2的抗体包括在美国专利号5,821,337的表3中描述的huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7和huMAb4D5-8(HERCEPTIN[®]),在此明确引入作为参考;在下面描述的人源化520C9(WO 93/21319)和人源化2C4抗体。

[0216] “分离的”抗体是从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。其天然

环境的污染物组分是妨碍该抗体的诊断或治疗用途的物质,可能包括酶、激素和其他蛋白的或非蛋白溶解物。在优选实施方案中,抗体被纯化(1)如通过 Lowry 方法所测定的,至超过 95% 的抗体重量,最优选重量超过 99%,(2)以达到足以通过使用转杯式测序仪获得至少 15 个 N-末端残基或内在氨基酸序列的程度,或(3)以在还原或非还原条件下采用考马斯兰或者优选银染通过 SDS-PAGE 测定达到均一性。被分离的抗体包括在重组细胞中的原位抗体,这是由于抗体天然环境中的至少一个组分将不存在。但是,一般地,被分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0217] “结合”目的抗原例如 ErbB2 抗原的抗体,是能够以足够的亲合性结合该抗原使得该抗体可用于靶向表达该抗原的细胞的抗体。如果抗体是结合 ErbB2 的抗体,该抗体通常将优先地结合 ErbB2 而不是其他 ErbB 受体,并且是不会显著地与其他蛋白例如 EGFR, ErbB3 或 ErbB4 交叉反应的抗体。在这样的实施方案中,通过荧光激活细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA),抗体与这些非 ErbB2 蛋白质的结合程度(例如与内源受体的细胞表面结合)将小于 10%。有时,抗 ErbB2 的抗体不会显著地与大鼠 neu 蛋白发生交叉反应,例如在 Schecter et al., *Nature*, 312:513(1984) 和 Drebin et al., *Nature*, 312:545-548(1984) 中所描述。

[0218] 阻断 ErbB 受体的配基活化的抗体是降低或阻止上文定义的这种活化的抗体,其中该抗体实质上能够比单克隆抗体 4D5 更加有效地阻断 ErbB 受体的配基活化,例如,与单克隆抗体 7F3 或 2C4 或其 Fab 片段大约一样有效,和优选地与单克隆抗体 2C4 或其 Fab 片段大约一样有效。例如,阻断 ErbB 受体的配基活化的抗体是在阻断 ErbB 异低聚体形成上比 4D5 有效约 50-100% 的抗体。阻断 ErbB 受体的配基活化可以通过任何手段发生,例如,通过干扰:配基结合 ErbB 受体、ErbB 复合物形成、ErbB 复合物中 ErbB 受体的酪氨酸激酶活性和/或 ErbB 中或者通过 ErbB 受体的酪氨酸激酶残基的磷酸化。阻断 ErbB 受体的配基活化的抗体的例子包括单克隆抗体 2C4 和 7F3(其阻断 ErbB2/ErbB3 和 ErbB2/ErbB4 异低聚体的 HRG 活化;和 EGFR/ErbB2 异低聚体的 EGF, TGF- α , 双调蛋白, HB-EGF 和/或上皮调节素活化);和 L26, L96 和 L288 抗体(Klapper et al., *Oncogene*, 14:2099-2109(1997)), 其阻断 EGF 和 NDF 结合到表达 EGFR, ErbB2, ErbB3 和 ErbB4 的 T47D 细胞上。

[0219] 具有指定抗体例如称作 2C4 的单克隆抗体的“生物学特征”的抗体,是具有一种或多种使其区别于结合到相同抗原(例如 ErbB2)上的其它抗体的生物学特征的抗体。例如具有 2C4 的生物学特征的抗体,可能阻断包含 ErbB2 和 ErbB3, ErbB1 或 ErbB4 的 ErbB 异低聚体的 HRG 活化;阻断包含 EGFR 和 ErbB2 的 ErbB 受体的 EGF, TGF- α , HB-EGF, 上皮调节素和/或双调蛋白的活化;阻断 MAPK 的 EGF, TGF- α 和/或 HRG 介导的活化;和/或结合到 ErbB2 的细胞外结构域的被 2C4 结合的共同表位上,(例如阻断单克隆抗体 2C4 结合到 ErbB2 上的抗体)。

[0220] 除非另外指出,用语“单克隆抗体 2C4”是指具有下面的实施例的鼠 2C4 抗体的抗原结合残基的或衍生自该鼠 2C4 抗体的抗体。例如,单克隆抗体 2C4 可以是鼠单克隆抗体 2C4 或其变体,例如人源化抗体 2C4,具有鼠单克隆抗体 2C4 的抗原结合氨基酸残基。人源化 2C4 抗体的例子在本文和 WO 01/00245 中提供,WO 01/00245 在此全文引入作为参考。除非另外指出,在此所用的用语“rhuMAb 2C4”是指包含被融合到任选由中国仓鼠卵巢(CHO)细胞表达的人轻链和重链 IgG1(非 A 同种异型)恒定区序列的,分别为 SEQ ID No. 3 和 4

的可变轻链 (VL) 和可变重链 (VH) 序列的抗体。

[0221] 除非另外指出,术语“单克隆抗体 4D5”是指具有鼠 4D5 抗体 (ATCC CRL10463) 的抗原结合残基的或者衍生自该抗体的抗体。例如,单克隆抗体 4D5 可以是鼠单克隆抗体 4D5 或其变体,例如具有鼠单克隆抗体 4D5 的抗原结合残基的人源化 4D5。示例性的人源化 4D5 抗体包括在美国专利号 5,821,337 中的 huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 和 huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®]), huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®])是优选的人源化 4D5 抗体。

[0222] “生长抑制剂”用于此是指在体外或体内抑制细胞,特别是表达 ErbB 的癌细胞的生长的化合物或组合物。因此,生长抑制剂是在 S 期显著降低表达 ErbB 的细胞的比例的试剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进(在 S 期之外的地方)的试剂,例如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的试剂。经典 M 期阻断剂包括长春花碱(vincas)(长春新碱和长春碱),紫杉烷二萜(taxane),和 II 型拓扑抑制剂,例如阿霉素,表柔比星(epirubicin),柔红霉素,依托泊苷(etoposide)和博来霉素。那些阻滞 G1 期的试剂还延伸到 S 期阻滞,例如 DNA 烷基化试剂例如三苯氧胺,强的松,氮烯米胺(dacarbazine),双氯乙基甲胺,顺铂,氨甲蝶呤,5-氟尿嘧啶和阿糖胞苷。更加详细的信息可见“癌症的分子基础”,Mendelsohn 和 Israel 编辑,第 1 章,由 Murakami 等编写的标题为“细胞周期调控,癌基因和抗肿瘤药”,(WB Saunders: Philadelphia,1995),特别是第 13 页。

[0223] “生长抑制”的抗体的例子是那些结合到 ErbB2 并且抑制过度表达 ErbB2 的癌细胞生长的抗体。优选的生长抑制抗 ErbB2 的抗体以大约 0.5-30 μ g/ml 的抗体浓度抑制细胞培养物中 20% 以上的 SK-BR-3 乳腺癌细胞的生长,优选超过 50% (例如从约 50% 到约 100%),其中生长抑制作用是在将 SK-BR-3 细胞暴露于抗体 6 天后测定的(参见 1997 年 10 月 14 日授权的美国专利号 5,677,171)。SK-BR-3 细胞生长抑制分析在该专利和下面中被更加详细地描述。优选的生长抑制抗体是单克隆抗体 4D5,例如人源化的 4D5。

[0224] “诱导细胞死亡”的抗体是使活细胞不能存活的抗体。细胞通常是表达 ErbB2 受体的细胞,特别地该细胞过度表达 ErbB2 受体。优选地,该细胞是癌细胞,例如乳腺、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、大肠、甲状腺、胰腺或膀胱细胞。在体外,细胞可以是 SK-BR-3, BT474, Calu 3 细胞, MDA-MB-453, MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。可以通过在缺乏补体和免疫效应细胞的情况下测定体外细胞死亡,来区分由抗体依赖的细胞介导的细胞毒性(ADCC)或由补体依赖的细胞毒性(CDC)引起的细胞死亡。因此,可以采用加热灭活血清(即缺乏补体)和缺乏免疫效应细胞时进行细胞死亡的分析。为了确定抗体是否能够诱导细胞死亡,可以相对于未被处理的细胞评价膜完整性的缺失,通过碘化丙锭(PI)、台盼兰(参见 Moore et al., Cytotechnology, 17:1-11(1995))或 7AAD 的摄取来评价膜完整性的丧失。优选的诱导细胞死亡的抗体是那些在 BT474 细胞中在 PI 摄取分析试验中诱导 PI 摄取的抗体(参见下文)。

[0225] “诱导凋亡”的抗体是那些诱导细胞程序性死亡的抗体,由膜联蛋白 V 结合、DNA 断裂、细胞收缩、内质网扩张、细胞破裂和 / 或膜泡形成(称作凋亡小体)确定细胞程序性死亡。细胞通常是过度表达 ErbB2 受体的细胞。优选地,细胞是肿瘤细胞,例如乳腺、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、大肠、甲状腺、胰腺或膀胱细胞。在体外,细胞可以是 SK-BR-3, BT474, Calu3 细胞, MDA-MB-453, MDA-MB-361 或 SKOV3 细胞。有多种方法可用于评价与凋

亡相关的细胞事件。例如,通过膜联蛋白结合检测磷脂酰丝氨酸(PS)的转移;通过DNA梯(laddering)评价DNA断裂;并且核/染色质浓缩以及DNA断裂可通过亚二倍体细胞中的任何增加来评价。优选地,诱导凋亡的抗体是在BT474细胞的膜联蛋白结合分析中,引起相对于未处理细胞约2-50倍,优选约5-50倍,和最优选约10-50倍的膜联蛋白结合的诱导(见下文)。有时,前凋亡抗体(pro-apoptotic antibody)是还会进一步阻断ErbB受体的ErbB配基活化的抗体(例如7F3抗体);即与单克隆抗体2C4具有共同生物学特征的抗体。在其他情形下,抗体是不会显著地阻断ErbB受体的ErbB配基活化的抗体(例如7C2)。此外,抗体是如7C2的抗体,其在诱导凋亡时,不诱导在S期的细胞百分率的大量减少(例如相对于对照,仅诱导这些细胞的百分率的0-10%的减少)。

[0226] “表位2C4”是抗体2C4结合的ErbB2的细胞外结构域中的区域。为了筛选结合2C4表位的抗体,可以进行常规的交叉阻断分析,例如在“抗体,实验室手册,Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow和David Lane(1988)”中描述的分析。此外,可进行表位作图来评价抗体是否结合到ErbB2的2C4表位上(例如,ErbB2的从约残基22到约残基584中的任何一个或多个残基,包括残基22和残基584;参见附图1A-B)。

[0227] “表位4D5”是抗体4D5(ATCC CRL 10463)结合的ErbB2的细胞外结构域中的区域。该表位邻近ErbB2的跨膜结构域。为了筛选结合4D5表位的抗体,可以进行常规的交叉阻断分析,例如在“抗体,实验室手册,ColdSpring Harbor Laboratory,Ed Harlow和David Lane(1988)”中描述的分析。此外,可进行表位作图来评价抗体是否结合到ErbB2的4D5表位上(例如,从约残基529到约残基625中的任何一个或多个残基,包括残基529和残基625;参见附图1A-B)。

[0228] “表位3H4”是抗体3H4结合的ErbB2的细胞外结构域中的区域。该表位包括在ErbB2的细胞外结构域中的氨基酸序列中的从约541到约599的残基,包括残基541和残基599,参见附图1A-B。

[0229] “表位7C2/7F3”是在ErbB2的细胞外结构域的N末端的区域,被7C2和/或7F3抗体(都保藏在ATCC中,见下文)结合。为了筛选结合到7C2/7F3表位的抗体,可以进行常规的交叉阻断分析,例如在“抗体,实验室手册,Cold Spring Harbor Laboratory,Ed Harlow和David Lane(1988)”中描述的分析。此外,可以进行表位作图来确定该抗体是否结合到ErbB2上的7C2/7F3表位上(例如,在ErbB2的约残基22到约残基53的区域上的任何一个或多个残基;参见附图1A-B)。

[0230] 用于处理目的的“哺乳动物”是指被分类为哺乳动物的任何动物,包括人,家养动物和役使动物,和动物园、比赛、或宠物动物,例如狗、马、猫、奶牛等。优选,该哺乳动物是人。

[0231] “对处理有响应”的肿瘤在公认的动物模型或人临床试验中,表现出对抗ErbB的抗体处理的响应相对于与未处理或用安慰剂处理具有统计学上意义的显著改善,或者对抗ErbB的抗体的最初处理有响应,但是继续处理时仍然生长。

[0232] 术语“处理”(treat)或“处理”(treatment)是指治疗性处理和预防性(prophylactic)或预防性(preventative)措施,其中目的在于防止或减缓(减轻)不期望的生理变化或紊乱,例如癌症发生或扩散。对于本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括,但是不限于,无论是可检测的或不可检测的,症状缓和,疾病程度降低,疾病状态稳

定（即，未恶化），延迟或减缓疾病进展，改善或减轻疾病状态，和消除（无论部分地或完全地）。“处理”还指相对于未接受处理的预期存活时间，延长存活。那些需要处理的包括那些已经患有病症或者紊乱的以及那些倾向于患有病症或者紊乱的或者那些其中这些病症或紊乱将被预防的。

[0233] “紊乱”是将从本发明的处理中获益的任何病症。这包括慢性和急性的病症或疾病，包括那些使哺乳动物倾向于所述紊乱的病理症状。在此将被处理的紊乱的非限制性例子包括良性和恶性肿瘤；白血病和淋巴恶性肿瘤，特别是乳腺、卵巢、胃、子宫内膜、唾液腺、肺、肾、大肠、甲状腺、胰腺、前列腺或膀胱癌；神经元的、神经胶质的、星形胶质的、下丘脑的和其他腺体、巨噬细胞的、上皮的、基质的和囊胚的紊乱；和炎症性的、血管生成的和免疫学的紊乱。按照本发明的将被处理的优选紊乱是恶性肿瘤。

[0234] 术语“治疗有效量”是指足以有效治疗哺乳动物中的疾病或紊乱的药物含量。在癌症的情况下，药物的治疗有效量可能减少癌细胞的数量；降低肿瘤的大小；抑制（即减缓到一定程度和优选阻止）癌细胞浸润到周围器官中；抑制（即减缓到一定程度和优选阻止）肿瘤转移；在某种程度上抑制肿瘤生长；和/或在一定程度上减轻一种或多种与癌症相关的症状。在药物可能阻止生长和/或杀死存在的癌症细胞的程度上，它可以是抑制细胞性的和/或细胞毒性的。对于癌症治疗，例如可以通过估计疾病进展时间（TTP）和/或测定反应率（RR）来测量效率。

[0235] 术语“癌症”和“癌症的”是指或者描述哺乳动物中的一种生理状态，其典型特征在于不受调控的细胞生长。“肿瘤”包含一种或多种癌细胞。癌症的例子包括，但是不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴恶性肿瘤。这种癌症的更加特别的例子包括鳞状细胞癌（例如上皮鳞状细胞癌），肺癌包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌（“NSCLC”），肺腺癌和肺鳞状细胞癌，腹膜癌，肝细胞癌，胃的或胃癌包括胃肠癌，胰腺癌，恶性胶质瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，肝细胞瘤，乳腺癌，结肠癌，直肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌或子宫癌，唾液腺癌，肾脏或肾的癌，前列腺癌，阴门癌，甲状腺癌，肝癌，肛门癌，阴茎癌，以及头部和颈部癌。

[0236] “表达 ErbB 的癌症”是包含细胞表面存在 ErbB 蛋白的细胞的癌症。“表达 ErbB2 的癌症”是在其细胞表面生成足够水平 ErbB2 的癌症，使得抗 ErbB2 的抗体可以结合到那里并对该癌症具有治疗作用。

[0237] “特征在于过度活化”ErbB 受体的癌症是在癌症细胞中 ErbB 受体活化的程度显著超过该受体在相同组织类型的非癌症细胞中的活化水平的癌症。这种过度活化可能由 ErbB 受体的过度表达、和/或在癌症细胞中可用于激活 ErbB 受体的 ErbB 配基高于正常水平所导致的。这种过度活化可能引起癌细胞的恶性状况和/或由癌细胞的恶性状态引起。在一些实施方案中，对癌症进行诊断或预测分析来确定是否发生会导致 ErbB 受体的这种过度活化的 ErbB 受体的增殖和/或过度表达。可选择地，或另外地，对癌症进行诊断或预测分析来确定癌症中是否发生会导致受体过度活化的 ErbB 配基的扩增和/或过度表达。在这种癌症的亚群中，受体的过度活化可能源自自分泌刺激路径。

[0238] 在“自分泌”刺激路径中，通过既生成 ErbB 配基也生成其关联 ErbB 受体的癌症细胞发生自我刺激。例如，癌症可能表达或过度表达 EGFR，以及还表达或过度表达 EGFR 配基（例如，EGF，TGF- α 或 HB-EGF）。在另一个实施方案中，癌症可能表达或过度表达 ErbB2，以

及表达或过度表达 heregulin(例如 γ -HRG)。

[0239] “过度表达”ErbB 受体的癌症是相对于相同组织类型的非癌症细胞,在该细胞表面上具有显著较高水平的 ErbB 受体,例如 ErbB2。这种过度表达可能通过基因扩增或通过转录或翻译增强而引起。ErbB 受体过度表达可以通过评价存在于细胞表面的 ErbB 蛋白质水平的升高在诊断或预测分析中被确定(例如通过免疫组织化学分析;IHC)。可选择地或另外地,可以测量细胞中编码 ErbB 的核酸的水平,例如通过荧光原位杂交(FISH;参见1998年10月公开的WO 98/45479),DNA印迹,或聚合酶链式反应(PCR)技术,例如实时定量PCR(RT-PCR)。可以通过评价患者中,例如肿瘤活组织检查中的配基水平(或者编码其的核酸),或通过各种诊断分析例如 IHC, FISH, DNA 印迹, PCR 或上述的体内分析来诊断性地确定 ErbB 配基的过度表达。还可以检测生物学液体例如血清中的脱落抗原(shed antigen)(例如 ErbB 的细胞外结构域)来研究 ErbB 受体的过度表达(参见例如1990年6月12日授权的美国专利号4,933,294;1991年4月18日公开的WO 91/05264;1995年3月28日授权的美国专利号5,401,638;和 Sias et al., J. Immunol. Methods, 132:73-80(1990))。除了上述分析,各种其他的体内分析对熟练技术人员来说是可获得的。例如,可以将患者体内的细胞暴露于抗体,该抗体可选择地用可检测标记,例如放射性同位素标记,并可以评价抗体与患者体内细胞的结合,例如通过外部扫描放射性或者通过分析从预先暴露于抗体的患者中获得的活组织检查。

[0240] 过度表达 HER2 的肿瘤可以通过对应于每个细胞表达的 HER2 分子的拷贝数的免疫组织化学分值来估计,可以从生物化学上测定:0 = 0-10,000 拷贝/细胞,1+ = 至少约200,000 拷贝/细胞,2+ = 至少约500,000 拷贝/细胞,3+ = 至少约2,000,000 拷贝/细胞。水平为3+的HER2的过度表达会引起酪氨酸激酶发生不依赖于配基的活化(Hudziak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7159-7163[1987]),在大约30%的乳腺癌中发生,并且在这些患者中,不复发存活和总存活下降(Slamon et al., Science, 244:707-712[1989]; Slamon et al., Science, 235:177-182[1987])。

[0241] 相反,“不具有 ErbB2 受体过度表达特征”的癌症是在诊断性分析中与相同组织类型的非癌症细胞相比不表达高于正常 ErbB2 受体水平的 ErbB2 受体的癌症。

[0242] “不依赖于激素”的癌症是其增殖不依赖于与由癌症中细胞表达的受体结合的激素存在与否。在施用降低肿瘤中或附近的激素浓度的药物或手术方案时,这种癌症不会发生临床退化。不依赖于激素的癌症的例子包括不依赖于雄激素的前列腺癌,不依赖于雌激素的乳腺癌,子宫内膜癌和卵巢癌。这种癌症可能开始于激素依赖的肿瘤,并在抗激素治疗后由激素敏感阶段发展到激素难治的肿瘤。

[0243] 如在此所用的术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞破坏的一种物质。该术语想要包括放射性同位素(例如 At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 和 Lu 的放射性同位素),化学治疗剂,和毒素例如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体。

[0244] “化学治疗剂”是在癌症治疗中有用的化学化合物。化学治疗剂的例子包括烷基化剂例如三胺磷和环磷酰胺(CYTOXAN™);烷基磺酸盐例如白消安,二丙胺磺酯和哌泊舒凡;氮丙啶例如苄替哌(benzodopa),卡巴醌(carboquone),四甲尿烷亚胺(meturedopa),和乌瑞替哌(uredopa);氮丙啶 methylamelamine 和包括六甲噻胺(altretamine),曲他胺

(triethylenemelamine), 三亚乙基磷酰胺, 塞替哌 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylolomelamine); 氮芥例如苯丁酸氮芥, 萘氮芥 (chlomaphazine), cholophosphamide, 雌莫司汀 (estramustine), 异环磷酰胺 (ifosfamide), 双氯乙基甲胺 (mechlorethamine), 盐酸甲氧氮芥, 苯丙氨酸氮芥, 新氮芥, 苯芥胆固醇, 松龙苯芥 (prednimustine), 三芥环磷酰胺, 尿嘧啶芥; 亚硝基脲 (nitrosourea) 例如亚硝基脲氮芥, 氯脲霉素, 福泰氮芥 (fotemustine), 罗莫司丁 (lomustine), 尼莫司啉 (nimustine), 雷尼司啉 (ranimustine); 抗生素例如阿克拉霉素, 放射菌素, anthramycin, 重氮丝氨酸, 博来霉素, cactinomycin, 加利车霉素, carabycin, 洋红霉素, 嗜癌菌素 (carzinophilin), 色霉素, 放线菌素 D, 柔红霉素, 二乙氧醋酐阿霉素, 6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸, 阿霉素, 表柔比星, 去羟阿霉素, 伊达比星, 麻西罗霉素, 丝裂菌素, 霉酚酸, 诺加拉霉素, 橄榄霉素, 培来霉素, potfiromycin, 嘌呤霉素, quelamycin, rodorubicin, 链黑菌素, 链脲霉素, 杀结核菌素, 百士欣, 新制癌素, 佐柔比星; 抗代谢物例如氨甲蝶呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 叶酸类似物例如二甲叶酸, 氨甲蝶呤, 蝶酰三谷氨酸, 曲美沙特; 嘌呤类似物例如氟达拉滨 (fludarabine), 6-巯基嘌呤, 硫唑鸟嘌呤, 硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物例如环胞苷 (ancitabine), 氮杂胞苷 (azacitidine), 6-氮杂尿苷, 卡莫氟, 阿糖胞苷 (cytarabine), 双脱氧尿苷, 去氧氟尿苷, 依诺他滨 (enocitabine), 氟尿嘧啶脱氧核苷 (floxuridine), 5-FU; 雄性激素例如卡鲁睾酮, 羟甲雄酮丙酸酯, 环硫雄醇 (epitiostanol), 甲环硫甾烷, 睾内脂 (testolactone); 抗肾上腺素例如氨基苯乙哌啶酮, 米托坦 (mitotane), 曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充物例如 frolinic acid; 醋葡内酯; aldophosphamide glycoside; 氨基乙酰丙酸; 胺苯吡啶 (amsacrine); bestrabucil; 比山群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); defofamine; 脱羧秋水仙碱 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; 醋酸羟吡啶唑; 环氧甘醚; 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明 (lonidamine); 丙米胍 (mitoguanone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫匹达谋 (mopidamol); 二胺硝吡啶; 喷司他丁; 苯来美特 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 足叶草胍; 2-足叶草胍; 甲基苄胍; PSK[®]; 丙亚胺 (razoxane); 西作非兰; 螺旋锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸; 三亚胺脒; 2,2',2''-三氯乙胺; 氨基甲酸乙酯 (urethan); 长春地辛 (vindesine); 氮烯米胺; 甘露醇氮芥 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 ("Ara-C"); 环磷酰胺; 三胺硫磷; 紫杉烷二萜 (taxane), 例如泰素 (paclitaxel) (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) 和多西他赛 (docetaxel) (TAXOTERE[®], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥; 吉西他滨; 6-巯鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 氨甲蝶呤; 铂类似物例如顺铂和卡铂 (carboplatin); 长春碱; 铂; 依托泊甙 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺; 丝裂菌素 C; 米托蒽醌; 长春新碱; 失碳长春碱 (vinorelbine); 异长春花碱 (navelbine); 盐酸米托蒽醌; 替尼泊甙 (teniposide); 柔红霉素; 氨基蝶呤; 希罗达 (xeloda); 伊本膦酸钠 (ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 视黄酸; 埃斯波霉素; 卡培他滨 (capecitabine); 以及任何上述的药学上可接受的盐、酸或衍生物。在该定义中还包括的是作为调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素试剂, 例如抗雌激素, 包括例如三苯氧胺, 雷洛昔芬 (raloxifene), 芳香酶 (aromatase)

抑制性 4(5)-咪唑,4-羟基三苯氧胺,曲奥昔芬(trioxifene),keoxifene,LY117018,奥那斯酮(onapristone),和托瑞米芬(toremifene)(Fareston);和抗雄性激素的例如氟他胺(flutamide),尼鲁米特(nilutamide),比卡鲁胺(bicalutamide),利普安(leuprolide)和性瑞林(goserelin)及其任何上述的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0245] 如在此所用,术语“靶向 EGFR 的药物”是指结合到 EGFR 和任选地抑制 EGFR 活化的治疗剂。这种试剂的例子包括结合 EGFR 的抗体和小分子。结合到 EGFR 的抗体的例子包括 MA b 579(ATCC CRL HB 8506),MA b455(ATCC CRL HB8507),MA b 225(ATCC CRL 8508),MA b 528(ATCC CRL8509)(参见美国专利 4,943,533,Mendelsohn 等)及其变体,例如嵌合的 225(C225 或 Cetuximab ;ERBUTIX[®])和改造的人 225(H225)(参见 WO 96/40210,Imclone Systems Inc.);结合 II 型突变 EGFR 的抗体(美国专利 5,212,290);结合 EGFR 的人源化的和嵌合的抗体被描述在美国专利 5,891,996;以及结合 EGFR 的人抗体,例如 ABX-EGF(参见 WO 98/50433,Abgenix)。抗 EGFR 的抗体可以与细胞毒性剂偶联,从而产生一种免疫偶联物(参见,例如 EP659,439A2,Merck Patent GmbH)。结合 EGFR 的小分子的例子包括 ZD1839 或 Gefitinib(IRESSA[™];Astra Zeneca),CP-358774(TARCEVA[™];Genentech/OSI)和 AG1478,AG1571(SU 5271;Sugen)。

[0246] “酪氨酸激酶抑制剂”是在一定程度上抑制酪氨酸激酶例如 ErbB 受体的酪氨酸激酶活性的分子。这种抑制剂的例子包括在前面的段落中指出的靶向 EGFR 的药物以及喹唑啉,例如 PD153035,4-(3-氯苯胺基)喹唑啉,吡啶并嘧啶(pyridopyrimidines),嘧啶并嘧啶(pyrimidopyrimidines),吡咯并嘧啶(pyrrolopyrimidines),例如 CGP 59326,CGP 60261 和 CGP 62706,和吡唑啉酮嘧啶(pyrazolopyrimidines),4-(苯胺)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶,姜黄素(二阿魏酰甲烷,4,5-二(4-氟苯胺基)苯邻二甲酰亚胺),含有硝基噻吩成分的 tyrphostines;PD-0183805(Warner-Lambert);反义分子(例如,那些结合到编码 ErbB 的核酸上的分子);喹啉啉(美国专利 5,804,396);tryphostins(美国专利 5,804,396);ZD6474(Astra Zeneca);PTK-787(Novartis/Schering AG);泛-ErbB 抑制剂例如 CI-1033(Pfizer);Affinitac(ISIS 3521;Isis/Lilly);Imatinib mesylate(Gleevac;Novartis);PKI 166(Novartis);GW2016(Glaxo SmithKline);CI-1033(Pfizer);EKB-569(Wyeth);Semaxanib(Sugen);ZD6474(AstraZeneca);PTK-787(Novartis/Schering AG);INC-1C11(Imclone);或在任何下列专利申请中描述的:美国专利 5,804,396;WO 99/09016(American Cyanimid);WO98/43960(American Cyanimid);WO 97/38983(Warner Lambert);WO 99/06378(Warner Lambert);WO 99/06396(Warner Lambert);WO 96/30347(Pfizer, Inc);WO 96/33978(Zeneca);WO 96/3397(Zeneca);和 WO 96/33980(Zeneca)。

[0247] “抗血管生成剂”是指阻断或在一定程度上干扰血管发育的化合物。抗血管生成的因子例如可以是结合到参与促进血管生成的生长因子或生长因子受体上的小分子或抗体。优选的抗血管生成的因子在此是一种结合到血管内皮生长因子(VEGF)上的抗体。

[0248] 术语“细胞因子”是由一个细胞群体释放并作为细胞间的介体作用于另一种细胞的蛋白质的通称。这种细胞因子的例子为淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。在细胞因子中所包括的有生长激素例如人生长激素,N-甲硫氨酰人生长激素,和牛生长激素;甲状旁腺素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松弛素;松弛素原;糖蛋白激素例如促滤泡激

素 (FSH), 促甲状腺素 (TSH), 和 黄体生成素 (LH); 肝生长因子; 成纤维细胞生长因子; 促乳素; 胎盘催乳激素; 肿瘤坏死因子- α 和 - β ; 米勒管抑制物质; 小鼠促性腺激素相关肽; 抑制素; 活化素; 血管内皮生长因子; 整联蛋白; 血小板生成素 (TPO); 神经生长因子例如 NGF- β ; 血小板生长因子; 转化生长因子 (TGF) 例如 TGF- α 和 TGF- β ; 胰岛素样生长因子-I 和 -II; 促红细胞生成素 (EPO); 骨诱导因子 (osteoinductive factor); 干扰素例如干扰素- α , - β 和 - γ ; 集落刺激因子 (CSF) 例如巨噬细胞-CSF (M-CSF); 粒细胞-巨噬细胞-CSF (GM-CSF); 和粒细胞-CSF (G-CSF); 白介素 (IL) 例如 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; 肿瘤坏死因子例如 TNF- α 或 TNF- β ; 和其他的多肽因子包括 LIF 和 试剂盒配基 (kit ligand) (KL)。如在此所用, 术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质和天然序列的细胞因子的生物活性等价物。

[0249] 用在本申请中的术语“前体药物”是指药理学活性物质的前体或衍生物形式, 其相对于亲本药物 (parent drug) 对肿瘤细胞的细胞毒性较小, 能够被酶催化激活或者被转化为更有活性的亲本药物形式。参见, 例如 Wilman, “癌症化学治疗中的前体药物” *Biochemical Society Transactions*, 14, 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) 和 Stella 等, “前体药物: 用于靶向药物递送的化学方法”, *Directed Drug Delivery*, Borchardt 等编辑, 247-267, Humana Press (1985)。本发明的前体药物包括, 但是不限于可以被转化为更有活性的无细胞毒性的药物的, 含有磷酸盐的前体药物, 含有硫代磷酸盐的前体药物, 含有硫酸盐的前体药物, 含有肽的前体药物, D-氨基酸修饰的前体药物, 糖基化的前体药物, 含有 β -内酰胺的前体药物, 含有任选被取代的苯氧基乙酰胺的前体药物或者含有可选择地被取代的苯基乙酰胺的前体药物, 5-氟胞嘧啶以及其他的 5-氟尿嘧啶药物前体。可以被衍生为前体药物形式用于本发明的细胞毒性药物的例子包括, 但是不限于那些上面描述的化学治疗剂。

[0250] “脂质体”是由各种类型脂质、磷脂和 / 或表面活性剂组成的小泡, 其可被用于将药物 (例如在此公开的抗 ErbB2 的抗体和, 任选地化学治疗剂) 递送给哺乳动物。脂质体的组分通常以双分子层的结构排列, 类似于生物膜的脂排列。

[0251] 术语“包装插入物 (package insert)”是用于指通常包括在治疗性产品的商业包装中的说明书, 其包含关于适应症、用法、剂量、施用方法、禁忌征候的信息和 / 或关于使用该治疗性产品的警告。

[0252] “心脏防护剂”是一种防止或减少与给患者施用药物相关的心肌功能障碍 (即心肌病和 / 或充血性心力衰竭) 的化合物或组合物, 这些药物例如蒽环霉素抗生素和 / 或抗 ErbB2 的抗体。心脏防护剂可能例如阻断或降低自由基介导的心脏毒性作用和 / 或防止或减少氧化应激损伤。包括在本定义中的心脏防护剂的例子包括铁离子螯合剂右丙亚胺 (ICRF-187) (Seifert et al., *The Annals of Pharmacotherapy*, 28:1063-1072 (1994)); 降脂剂 (lipid-lowering agent) 和 / 或抗氧化剂例如丙丁酚 (Singal et al., *J. Mol. Cell Cardiol.*, 27:1055-1063 (1995)); 阿米斯丁 (氨基硫羟基 2-[(3-氨基丙基)氨基]乙硫醇-二氢磷酸酯, 也称作 WR-2721, 及其脱磷酸化的细胞摄取形式称作 WR-1065) 和 S-3-(3-甲氨基丙氨基)丙基硫代磷酸 (WR-151327), 参见 Green et al., *Cancer Research*, 54:738-741 (1994); 地高辛 (Bristow, M. R. 在: Bristow MR, 编辑. 药物诱导的

心脏病. 纽约:Elsevier 191-215(1980)); β -阻断剂例如美托洛尔(Hjalmarson et al., Drugs47:Suppl 4-:31-9(1994));和Shaddy et al., Am. Heart J., 129:197-9(1995));维生素 E;抗坏血酸(维生素 C);自由基清除剂例如石竹素,乌索酸和 N-乙酰半胱氨酸(NAC);自旋捕获化合物例如 α -苯基-叔-丁基硝酮(PBN);(Paracchini et al., Anticancer Res., 13:1607-1612(1993));硒代有机化合物例如 P251(Elbesen);等。

[0253] “被分离的”核酸分子是从至少一种污染物核酸分子中鉴定和分离出的核酸分子,在该抗体核酸分子的天然来源中,该分子通常与污染物核酸分子结合在一起。被分离的核酸分子不再是其在自然界中存在的形式或状态。因此,被分离的核酸分子区别于存在于天然细胞中的核酸分子。但是,被分离的核酸分子包括被包含在通常表达抗体的细胞中的核酸分子,在这样的细胞中,例如,核酸分子位于与天然细胞的染色体位置不同的染色体位置上。

[0254] 用语“控制序列”是指在特定宿主生物体中表达被可操作地连接的编码序列所必需的 DNA 序列。适合于原核生物的调控序列,例如包括启动子,任选地操纵子序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子,聚腺苷酸化信号和增强子。

[0255] 当核酸与另一种核酸序列处于一种功能性关系中时,被“可操纵地连接”。例如,如果用作前序列或分泌前导序列的 DNA 作为参与多肽分泌的蛋白前体被表达,则被可操纵地连接到表达多肽的 DNA 上;如果启动子或增强子影响序列的转录,则被可操作地连接到编码序列上;或者如果核糖体结合位点被放置在促进翻译的位置上,则其被可操作地连接到编码序列上。一般地,“被可操作地连接”是指被连接的 DNA 序列是连续的,并且在为分泌前导序列的情况下,是连续的并且处于阅读状态。但是,增强子不一定非得是连续的。结合是在便利的限制性位点上通过连接实现。如果不存在这种位点,按照常规操作,使用合成的寡核苷酸连接物或接头。

[0256] 如在此所用,用语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”互换使用,所有这种命名都包括后代。因此,用语“转化体”和“被转化的细胞”包括原代主体(subject)细胞以及由此产生的不论传递多少次的培养物。还应当理解,由于有意的或无意的突变,所有的后代在 DNA 含量上并不是完全相同的。还包括在最初转化细胞中被筛选的具有相同功能或生物学活性的突变后代。当使用不同的命名时,其包括哪些内容可以很清楚地从上下文中获知。

[0257] 鉴定对用抗 HER2 的抗体处理有响应的肿瘤的方法

[0258] 肿瘤和肿瘤细胞的来源

[0259] 肿瘤可以被表征为对用 2C4 或者功能性等价的抗体治疗响应,功能性等价的抗体具有抗体 2C4 的一种或多种生物学特征,例如,基于作为活化的度量,在细胞表面上存在 EGFR-ErbB2 和 / 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体。通过本领域知晓的任何方法分析肿瘤样本中是否存在异二聚体。优选地,通过下文描述的一种或多种方法来确定是否存在异二聚体。

[0260] 由于 HER2 活化是受体异二聚化和磷酸化的结果,一种特别重要的用于鉴定对用 2C4 或功能性等价抗体治疗响应的肿瘤的方法是检测 ErbB 受体磷酸化,例如 ErbB2(HER2)受体磷酸化,如下文所述。

[0261] 可被分析的肿瘤细胞的来源包括,但是不限于,肿瘤活组织检查,循环的肿瘤细胞,循环的血浆蛋白,腹水,异种移植肿瘤以及其他肿瘤模型,原代细胞培养物或者从肿瘤衍生的或者展示肿瘤样特性的细胞系,以及被保存的肿瘤样本,例如福尔马林固定、石蜡包

埋的肿瘤样本。本发明计划筛选 EGFR-ErbB2 和 / 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体和 / 或 ErbB 受体磷酸化的大量不同的肿瘤细胞类型。对于与被检测为异二聚体和 / 或 ErbB 受体如 ErbB2 (HER2) 受体磷酸化阳性的肿瘤细胞相同类型的肿瘤细胞可用 2C4 治疗。下面描述的肿瘤模型作为实施例被提供, 而不应该被解释为限制本发明。

[0262] 在一个实施方案中, 来源于正患有肿瘤的患者肿瘤细胞被分析是否对用 2C4 治疗响应。如果基于存在 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 异二聚体或者通过证实 ErbB 受体发生了磷酸化, 确定该细胞是有响应的, 那么随后可以用具有 2C4 的一种或多种生物学特征的抗体处理该患者。优选地, 用 rhuMAb 2C4 处理该患者。

[0263] 在另一个实施方案中, 分析来自特定类型的肿瘤的肿瘤细胞或被认为具有特定类型肿瘤的特征的细胞中是否存在 EGFR-ErbB2 和 / 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体, 或者 ErbB 受体是否磷酸化, 优选 ErbB2 (HER2) 受体。如果检测到 EGFR-ErbB2 和 / 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体和 / 或 ErbB 受体磷酸化, 一般认为该类型的肿瘤是用具有 2C4 的一种或多种生物学特征的抗 ErbB2 的抗体处理的优良的候选。然后可用这种抗体处理患有这种肿瘤的患者。

[0264] 细胞系异种移植

[0265] 可以通过将细胞直接植入到目的位点上来将体外繁殖的肿瘤细胞, 例如在培养物中生长的肿瘤细胞和肿瘤细胞系, 异种移植到小鼠中。这种方法是本领域技术人员熟知的。分析细胞, 以鉴定是否存在 EGFR-ErbB2 和 / 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体, 或者 ErbB 受体磷酸化, 例如 ErbB2 (HER2) 受体磷酸化。

[0266] 在一个实施方案中, 将肿瘤细胞皮下植入到小鼠中, 优选无胸腺的裸鼠。在另一个实施方案中, 肿瘤细胞被植入到生理相关的位置上来建立一个适当的原位肿瘤模型。例如, 来自乳腺癌细胞系的细胞以不同的浓度被植入到无胸腺的裸鼠的乳腺脂肪垫中来更加精确地模拟乳腺癌的生物学。可以在移植之前或之后, 分析肿瘤细胞是否存在 EGFR-ErbB2 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体, 或 ErbB 受体磷酸化。优选地, 在被植入的细胞已经发育为具有预期大小的肿瘤后再分析肿瘤细胞。还用 2C4 或功能性等价抗体来治疗小鼠, 用未被处理的小鼠作为对照。

[0267] 还可以给任何类型的肿瘤建立类似的模型, 已经从这些肿瘤中获得了被培养细胞或细胞系。肿瘤类型包括, 但不限于, 膀胱, 脑, 乳腺, 大肠, 食道, 肾, 白血病, 肝, 肺, 黑色素瘤, 卵巢, 胰腺, 前列腺, 肉瘤, 胃, 睾丸和子宫。在一个实施方案中, 过度表达 ErbB2 的肿瘤细胞或细胞系被用于移植, 而在另一个实施方案, 表达正常或低于正常含量的 ErbB2 的肿瘤细胞或细胞系被用于移植。在还有另一个实施方案中, 不对 HERCEPTIN[®] 响应的肿瘤细胞或细胞系被用于移植。

[0268] 在一个特定实施方案中, 大约 2 千万个 MDA-175 乳腺肿瘤细胞被植入小鼠的生殖腺的脂肪垫中。例如通过下述的方法之一, 在异种移植的细胞的表面上检测 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER3 二聚体的表达。还可用 0, 3mg/kg, 10mg/kg, 30mg/kg 或 100mg/kg 的 2C4 处理被这样移植的小鼠。其他剂量方案可以由本领域的普通技术人员来确定。

[0269] 虽然本发明适合于任何表达 HER2 的肿瘤的类型, 固体瘤例如乳腺癌, 卵巢癌, 肺癌, 前列腺癌和结直肠癌尤其适合遵循本发明来分析和处理。

[0270] 肿瘤异种移植

[0271] 可以获取哺乳动物肿瘤样本, 优选人肿瘤样本并植入到小鼠中, 优选无胸腺的裸

鼠。可以通过任何本领域已知的方法来获得肿瘤样本。在一个实施方案中,手术切除肿瘤样本,例如在活组织检查中或者在外科手术中,以从哺乳动物摘下肿瘤。在另一个实施方案中,通过从哺乳动物血液中纯化循环的肿瘤细胞来获得肿瘤样本。

[0272] 在一个特定的实施方案中,将直径为大约 $5 \times 5 \times 0.5-1\text{mm}$ 的人固体肿瘤切片植入无胸腺的裸鼠的肋部中,通常为每只小鼠四个切片。当被植入的肿瘤达到 10-15mm 的中值直径时,通常通过使用较小的肿瘤碎片进行连续传代。用于生成和研究人肿瘤异种移植的方法被描述在如下参考文献中,在此全文引入作为参考: Fiebig 等,“人肿瘤异种移植:新抗癌试剂的可预测性、表征和发现”,投稿于:“肿瘤学:用于抗癌药物开发的肿瘤模型相关性”, Fiebig 和 Burger 编辑 (Basel, Karger 1999), vol 54, 29-50 ; Berger 等,“人肿瘤异种移植在胸腺发育不全的裸鼠中的建立和表征”,在“肿瘤学中的免疫缺陷小鼠”中, Fiebig 和 Berger 编辑 (Basel, Karger 1992), 23-46 ; Fiebig 和 Burger,“人肿瘤异种移植和外植体”,在“癌症研究模型”中, Teicher 编辑 (Humana Press 2002) 113-137。

[0273] 当异种移植以固体瘤生长,分化,并发展出基质、脉管系统和中央坏死时,人异种移植被认为对供体患者体内的肿瘤行为具有高度预见性。在大多数情况下,异种移植物保留刚自患者获得的肿瘤的大部分分子的、组织学的和病理生理学特征。来自含有最初或者连续传代的肿瘤的小鼠的肿瘤细胞被分析是否存在 EGFR-ErbB2 和 / 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体,或 ErbB 受体是否发生磷酸化。还用 2C4 或者功能性等价抗体来治疗小鼠。

[0274] 在一个实施方案中,对一组新创建或建立的人肿瘤异种移植进行筛选,筛选是否存在 EGFR-ErbB2 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体,或者 ErbB 受体是否磷酸化。Fiebig 和 Burger, 同上文,描述了从多种常规癌症类型中建立的一组 300 个以上的人肿瘤异种移植,常规癌症类型例如膀胱,脑,乳腺,结肠,食道,肾,白血病,肝,肺,黑素,卵巢,胰腺,前列腺,肉瘤,胃,睾丸和子宫。在一个实施方案中,全组被筛选是否具有异二聚体,或 ErbB 受体例如 ErbB2 (HER2) 受体是否磷酸化。还可以筛选该组的亚群是否具有异二聚体,或 ErbB 受体是否磷酸化,其中该亚群是基于例如组织类型,过度、低或正常表达 ErbB2,或者不对 HERCEPTIN[®] 响应。以这种方式,基于是否存在异二聚体,或者通过证实 ErbB 受体例如 ErbB2 (HER2) 受体发生磷酸化,肿瘤可被分类为用 2C4 治疗的候选肿瘤。同样地,具有如此分类的肿瘤的患者可被更迅速地认为适合用 2C4 或功能性等价抗体治疗。

[0275] 在移植之前或之后,可分析肿瘤样本中是否存在 EGFR-ErbB2 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体,或 ErbB 受体是否磷酸化。在一个实施方案中,大约 1g 来自最初和 / 或被连续传代的异种移植的肿瘤被从分子学上进一步表征异二聚体,或者在液氮中迅速冷冻并存储在 -80°C 下,用于以后进行表征。进一步分析异种移植肿瘤还可以采用双层软琼脂分析,也称作克隆发生分析,如例如在 Fiebig 和 Burger 中,同上文中所描述。人固体肿瘤异种移植通过机械的方式和蛋白水解的方式分解为单细胞悬浮液,该细胞悬浮液被铺板到如所述铺了软琼脂的多孔平板中。肿瘤细胞体外生长导致集落形成,可以进一步分析该集落的分子特征,例如异二聚体,或 ErbB 受体磷酸化,或其他的组织化学的和形态学的特征。

[0276] B. 检测 EGFR-ErbB2 和 ErbB2-ErbB3 异二聚体

[0277] 本领域已知的任何方法可以被用于检测肿瘤中的 EGFR-ErbB2 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体。几个优选的方法在下面进行了描述。这些方法检测非共价的蛋白-蛋白的相互作用或者另外表明目的蛋白之间的接近性。下面描述的方法作为实施例被提供,而不应当被

解释为限制本发明。

[0278] 共免疫沉淀和免疫印迹

[0279] 以免疫亲合为基础的方法,例如免疫沉淀或 ELISA,可以被用于检测 EGFR-ErbB2 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体。在一个实施方案中,抗 ErbB2 的抗体被用于免疫沉淀包含来自肿瘤细胞的 ErbB2 的复合物,然后通过免疫印迹检测生成的免疫沉淀物中是否存在 EGFR 或 ErbB3。在另一个实施方案中,EGFR 或 ErbB3 抗体可被用于免疫沉淀步骤,然后用 ErbB2 抗体检测免疫沉淀物。在另一个实施方案中,特异于 HER1, HER3, HER2/HER1 复合物或 HER2/HER3 复合物的 ErbB 配基被用于沉淀复合物,然后检测复合物中是否存在 HER2。例如,配基被用于与抗生物素蛋白偶联,并在生物素柱上纯化复合物。

[0280] 在另一个实施方案中,例如 ELISA 或抗体“三明治”型分析中,针对 ErbB2 抗体被固定在固体支持物上,与肿瘤细胞或肿瘤细胞裂解物接触,洗涤,然后暴露于抗 EGFR 或 ErbB3 的抗体中。后一种抗体的结合,该结合可以直接地或者通过偶联到可检测标记上的第二种抗体来检测,表明存在异二聚体。在某些实施方案中,EGFR 或 ErbB3 的抗体被固定,而 ErbB2 抗体被用于检测步骤。在另一个实施方案中,ErbB 受体的配体被用于替代或者组合抗 ErbB 受体的抗体。

[0281] 用 EGFR, ErbB2, 或 ErbB3 抗体进行免疫沉淀后,可随后进行异二聚体的功能性分析,作为免疫印迹的替代或补充。在一个实施方案中,用 ErbB3 抗体进行免疫沉淀后,分析免疫沉淀物中的受体酪氨酸激酶活性。由于 ErbB3 不具有内在酪氨酸激酶活性,免疫沉淀物中存在酪氨酸激酶活性表明 ErbB3 最有可能与 ErbB2 结合。Graus-Porta et al., *EMBO J.*, 16:1647-55(1997); Klapper et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:4995-5000(1999)。该结果可通过使用 ErbB2 抗体的免疫印迹来证实。在另一个实施方案中,用 ErbB2 抗体进行免疫沉淀后,分析 EGFR 受体酪氨酸激酶活性。在该分析中,免疫沉淀与放射性 ATP 以及模拟 ErbB2 被 EGFR 转磷酸化的体内位点的肽底物接触。肽发生磷酸化表示共免疫沉淀,从而 EGFR 与 ErbB2 发生异二聚化。受体酪氨酸激酶活性分析在本领域是熟知的,包括检测靶点底物的磷酸化的分析,例如,通过磷酸酪氨酸抗体和活化关联的信号传导路径,例如 MAPK 路径。

[0282] 对上述方法和分析进行的改变对于本领域普通技术人员来说是显而易见和常规的。

[0283] 化学的或 UV 交联可以被用于共价连接活细胞表面的异二聚体。Hunter et al., *Biochem. J.*, 320:847-53。化学交联剂的例子包括二硫代双(琥珀酰亚胺基)丙酸(DSP)和 3,3' 二硫代双(磺基琥珀酰亚胺基)丙酸(DTSSP)。在一个实施方案中,来自化学交联的肿瘤细胞的细胞提取物通过 SDS-PAGE 分析并用 EGFR 和 / 或 ErbB3 的抗体进行免疫印迹。由于 ErbB2 是 EGFR 和 ErbB3 的优选异二聚化伴侣,合适分子量的超位移条带最有可能代表 EGFR-ErbB2 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体。该结果可通过随后用 ErbB2 抗体进行免疫印迹来证实。

[0284] FRET 和以荧光为基础的方法

[0285] 荧光共振能量转移(FRET)也被用于检测 EGFR-ErbB2 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体。FRET 根据能量从供体荧光团转移到受体荧光团,在体内和体外检测蛋白质构型变化和蛋白质-蛋白质相互作用。Selvin, *Nat. Struct. Biol.*, 7:730-34(2000)。能量转移仅在供体荧

光团与受体荧光团足够相近时发生。在典型的 FRET 实验中,两种蛋白或者单一蛋白上的两个位点用不同的荧光探针标记。探针中的一个,供体探针,用特定波长的入射光激发到较高的能量状态。然后供体探针将其能量转移到第二个探针上,即受体探针,导致供体荧光强度下降和受体荧光发射增强。为了测定能量转移的程度,供体在用供体和受体探针标记的样本中的强度与其在仅用供体探针标记的样本中的强度比较。任选地,比较在供体 / 受体的样本中和在仅含受体的样本中的受体强度。合适的探针在本领域是已知的,并包括例如可透过膜的染料,例如荧光素和罗丹明,有机染料,例如花青染料,和镧系原子。Selvin,同上文。用于检测和测量能量转移的方法和仪器在本领域也是已知的。Selvin,同上文。

[0286] 适合于检测和测量单个细胞中的蛋白质 - 蛋白质相互作用的以 FRET 为基础的技术在本领域也是已知的。例如,供体光漂白荧光共振能量转移 (pbFRET) 显微镜和荧光寿命成像显微镜 (FLIM) 可以被用于检测细胞表面受体的二聚化。Selvin,同上文;Gadella 和 Jovin, *J. Cell Biol.*, 129:1543-58 (1995)。在一个实施方案中, pbFRET 被在“悬浮液”中或“原位”用在细胞上来检测和测量 EGFR-ErbB2 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体的形成,如被描述在 Nagy et al., *Cytometry*, 32:120-131 (1998) 中。这些技术测量由于能量转移造成的供体荧光寿命的缩短。在一个特别的实施方案中,流式细胞计数 Foerster 型 FRET 技术 (FCET) 可被用于研究 EGFR-ErbB2 和 ErbB2-ErbB3 异二聚化,如在 Nagy et al.,同上文,和 Brockhoff et al., *Cytometry*, 44:338-48 (2001) 中所描述。

[0287] FRET 优选与标准的免疫组织化学标记技术联合使用。Kenworthy, *Methods*, 24:289-96 (2001)。例如,与合适的荧光染料偶联的抗体可以被用作标记两种不同蛋白质的探针。如果蛋白质与另一蛋白质接近,该荧光染料作为 FRET 的供体和受体。通过标准手段来检测能量转移。可以通过流式细胞计数手段或者通过数码显微镜系统检测能量转移,例如共焦显微镜或连接到电荷偶联装置 (charge-coupled device) (CCD) 照相机的宽视野荧光显微镜。

[0288] 在本发明的一个实施方案中,ErbB2 抗体或者 EGFR 或 ErbB3 抗体直接用两种不同荧光团标记,例如如在 Nagy et al.,同上文中所描述。肿瘤细胞或肿瘤细胞裂解物与进行区别标记的抗体接触,这些抗体在检测是否存在 EGFR-ErbB2 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体的 FRET 中作为供体和受体。此外,未被标记的抗 ErbB2 的和或者抗 EGFR 或者抗 ErbB3 的抗体与被区别标记来作为供体和受体的第二抗体一起使用。参见,例如 Brockhoff et al.,同上文。如果发现标记非常接近,那么检测到能量转移,并确定存在异二聚体。

[0289] 在另一个实施方案中,特异于 HER2 和或者特异于 HER1 或者特异于 HER3 的 ErbB 受体的配体被荧光标记,并用于 FRET 研究。

[0290] 在本发明的还有其他实施方案中,采用标准的直接或间接免疫荧光技术和共焦激光扫描显微镜,通过共定位 (co-localization) ErbB2 与或者 EGFR 或者 ErbB3 来证明在肿瘤细胞的表面上存在异二聚体。此外,激光扫描成像 (LSI) 被用于在高通量格式 (high-throughput format) 例如微孔平板中,检测抗体结合以及 ErbB2 与或者 EGFR 或者 ErbB3 共定位,如被描述在 Zuck et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:11122-27 (1999)。

[0291] 在还有一个实施方案中,通过鉴定依赖于异二聚体组分的相近性的酶活性来确定存在 EGFR-ErbB2 和 / 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体。ErbB2 抗体与一种酶偶联,而 EGFR 或 ErbB3 抗体与第二种酶偶联。加入用于第一种酶的第一种底物,该反应产生用于第二种酶的第二

种底物。这导致与另一种分子的反应来生成可检测的化合物,例如染料。另一个化学药品的存在分解了第二种底物,使得与第二种酶的反应被阻断,除非第一种和第二种酶,因此也就是两种抗体,十分接近。在一个特别的实施方案中,将肿瘤细胞或细胞裂解物与用葡萄糖氧化酶偶联的 ErbB2 抗体,以及用辣根过氧化酶偶联的 ErbB3 或 ErbB1 抗体接触。将葡萄糖以及染料前体,例如 DAB,和过氧化氢酶加入到反应中。产生对 DAB 染色的颜色确定存在异二聚体。

[0292] eTag™ 分析系统

[0293] 可以采用基于 eTag™ 分析系统 (Aclara Bio Sciences, Mountain View, CA) 的方法检测异二聚体,如被描述在例如 WO 83502 和 2001 年 12 月 6 日公开的美国专利申请 2001/0049105 中,两者都清楚地全文引入作为参考。eTag™ 或“电泳标记”包含可检测的报道分子部分,例如荧光团。其还可以包含“迁移率调节物”,迁移率调节物基本上由具有独特的电泳迁移率的部分组成。这些部分使得可以在限定的电泳条件下,例如毛细管电泳 (CE),从复杂的混合物中分离和检测 eTag™。包含报道分子部分以及,任选的,迁移率调节物的 eTag™ 的部分通过可裂解连接基团被连接到第一个靶向结合部分上,生成第一种结合化合物。第一个靶向结合部分特异地识别特定的第一个靶点,例如核酸或蛋白质。第一个靶向结合部分无论如何是不被限制的,并且可以是例如多核苷酸或多肽。优选地,第一个靶向结合部分是一种抗体或抗体片段。另外,第一个靶向结合部分可以是 ErbB 受体的配体或其具有结合能力的片段。

[0294] 连接基团优选包含可裂解部分,例如一种酶底物或在限定条件下可以被裂解的任何化学键。当第一个靶向结合部分结合到其靶点时,裂解剂被导入和 / 或激活,而连接基团被断裂,从而释放包含报道分子部分和迁移率调节物的 eTag™ 的部分。因此,存在“游离”的 eTag™ 表示靶向结合部分结合到其靶点上。

[0295] 优选地,第二种结合化合物包含裂解剂和特异地识别第二个靶点的第二个靶向结合部分。第二个靶向结合部分也是无论如何不是被限制的,并且可以是例如一种抗体或抗体片段或 ErbB 受体的配体或具有结合能力的配基片段。如果第一种结合化合物和第二种结合化合物十分接近,那么裂解剂将仅断裂第一种结合化合物中的连接基团。

[0296] 在本发明的一个实施方案中,第一种结合化合物包含 eTag™,在 eTag™ 中 ErbB2 抗体作为第一个靶向结合部分。第二种结合化合物包含连接到能够断裂 eTag™ 的连接基团的裂解剂上的 EGFR 或 ErbB3 的抗体。优选地,裂解剂必须被激活以能够断裂连接基团。肿瘤细胞或肿瘤细胞裂解物与结合到 ErbB2 上的 eTag™ 接触,和与结合到细胞表面上的 EGFR 或 ErbB3 的被修饰的 EGFR 或 ErbB3 抗体接触。优选去除未被结合的结合复合物,并在需要时激活裂解剂。如果存在 EGFR-ErbB2 或 ErbB2-ErbB3 异二聚体,由于裂解剂和连接基团相邻近,裂解剂将会断裂连接基团,并释放 eTag™。然后通过本领域已知的任何方法,例如毛细管电泳,检测游离的 eTag™。

[0297] 在一个实施方案中,裂解剂是可激活的作用于连接基团的化学药品种类。例如,可以通过将样本暴露于光照下来激活裂解剂。

[0298] 在另一个实施方案中,采用 EGFR 或 ErbB3 的抗体作为第一个靶向结合部分来构建 eTag™,而用 ErbB2 抗体构建第二种结合化合物。

[0299] 检测 ErbB 受体的磷酸化

[0300] 存在 ErbB 受体磷酸化可被用来证明 HER2 活化。

[0301] 在一个实施方案中,通过免疫沉淀一种或多种 ErbB 受体例如 ErbB2 (HER2) 受体,以及蛋白质印迹分析来评价 ErbB 受体磷酸化。例如,采用抗磷酸酪氨酸抗体来检测被免疫沉淀的 ErbB 受体中的被磷酸化的酪氨酸残基,在凝胶上存在磷酸 -HER2 条带确定为阳性。抗磷酸酪氨酸的抗体可以从 PanVera (Madison, WI) 或 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) 购买得到, PanVera (Madison, WI) 是 Invitrogen, Chemicon International Inc. (Temecula, CA) 的子公司。缺乏该条带确定为阴性。

[0302] 在另一个实施方案中,采用磷酸特异性抗 HER2 的抗体(克隆 PN2A; Thor et al., J. Clin. Oncol., 18(18):3230-3239 (2000)),通过免疫组织化学评价 ErbB2 (HER2) 受体磷酸化。用于检测 ErbB 受体磷酸化的其他方法包括,但是不限于, KIRA ELISA (美国专利号 5,766,863; 5,891,650; 5,914,237; 6,025,145; 和 6,287,784), 质谱法(比较磷酸化的和未磷酸化的 HER2 的大小),和采用抗 HER2 的抗体进行 e-tag 邻近性分析(例如采用购自 Aclara BioSciences (Mountain View, CA) 的 eTag™ 分析试剂盒)。对于 eTag™ 分析的详细内容在上文中描述。

[0303] 抗体制备

[0304] 下面的说明是关于制备按照本发明所用的治疗性和诊断性抗体的示例性技术。虽然该说明总体上针对抗 ErbB2 的抗体的制备,本领域的技术人员能够很容易地修改本公开来制备针对任何 ErbB 受体的抗体。

[0305] 用于制备抗体的 ErbB2 抗原可以是,例如含有所需表位的 ErbB2 的细胞外结构域或其部分的可溶形式。或者,在细胞表面表达 ErbB2 的细胞(例如被转化来过度表达 ErbB2 的 NIH-3T3 细胞;或癌细胞系例如 SK-BR-3 细胞,参见 Stancovski et al., PNAS (USA), 88:8691-8695 (1991)) 可以被用于生产抗体。可用于生产抗体的其他形式的 ErbB2 对于本领域技术人员来说是显然的。

[0306] 多克隆抗体

[0307] 优选地通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射相关抗原和佐剂在动物中产生多克隆抗体。采用双功能或衍生化剂,例如马来酰亚胺苯甲酰硫代琥珀酰亚胺酯(maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester)(通过半胱氨酸残基偶联), N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基偶联), 戊二醛, 琥珀酐, SOCl₂, 或 R₁N = C = NR, 其中 R 和 R₁ 是不同的烷基基团,将相关抗原偶联到在将被免疫的物种中具有免疫原性的蛋白质上是有用的,这些蛋白例如匙孔血蓝蛋白,血清白蛋白,牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0308] 通过组合例如 100 μg 或 5 μg 蛋白质或偶联物(分别用于兔或小鼠)与 3 倍体积的弗氏完全佐剂,并在多个部位皮内注射该溶液以针对抗原,免疫原性交联物或衍生物来免疫动物,一个月后,用 1/5-1/10 的最初量的溶解在弗氏完全佐剂中的肽或偶联物在多个部位上进行皮下注射来加强免疫动物。7-14 天后,给动物放血,分析血清中的抗体滴度。加强免疫动物直到该滴度达到稳定状态。优选地,用相同抗原但是偶联到不同蛋白质上和/或通过不同交联剂偶联的交联物来加强免疫动物。还可以蛋白质融合的形式在重组细胞培养物中制备偶联物。此外,凝集剂例如明矾适合被用于增强免疫反应。

[0309] 单克隆抗体

[0310] 单克隆抗体是从实质上均一的抗体的群体中获得,即包含群体的各个抗体除了可

能以最小量存在的可能天然发生的突变外,是相同的。因此,修饰语“单克隆”表示抗体的特征,即不是无联系的抗体的混合物。

[0311] 例如,单克隆抗体可以通过最早在Kohler et al.,*Nature*,256:495(1975)中描述的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组DNA方法(如美国专利号4,816,567)来制备。

[0312] 在杂交瘤方法中,小鼠或其他合适的宿主动物,例如仓鼠如上文所描述进行免疫来引发生产或能够生产抗体的淋巴细胞的产生,该抗体将特异地结合用于免疫接种的蛋白质。或者,在体外免疫淋巴细胞。然后,采用合适的融合试剂,例如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,形成杂交瘤细胞(Goding,“单克隆抗体:原理和实践”,59-103(Academic Press,1986))。

[0313] 如此制备的杂交瘤细胞被接种并生长在合适的培养基中,培养基中优选包含一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或存活物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),用于杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),这些物质阻止HGPRT缺陷细胞的生长。

[0314] 优选的骨髓瘤细胞是那些有效融合,通过所选择的生产抗体的细胞支持稳定高水平地生产抗体,并且对培养基例如HAT培养基敏感的细胞。其中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤系,例如那些来源于从Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的骨髓瘤系,和得自美国典型培养物保藏中心Rockville, Maryland USA的SP-2或X63-Ag8-653细胞。人骨髓瘤和小鼠人异骨髓瘤细胞系也被描述用于制备人单克隆抗体(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001(1984);和Brodeur et al.,“单克隆抗体制备技术及应用”,51-63(Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1987))。

[0315] 分析其中生长了杂交瘤细胞的培养基中针对抗原的单克隆抗体的生产。优选地,通过免疫沉淀或通过体外结合分析,例如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA),确定杂交瘤细胞制备的单克隆抗体的结合特异性。

[0316] 例如,可通过Munson et al.,*Anal. Biochem.*,107:220(1980)的斯卡查德分析来确定单克隆抗体的结合亲和力。

[0317] 在杂交瘤细胞被鉴定出生产具有所需特异性、亲合力和/或活性的抗体后,通过有限稀释操作亚克隆该克隆,并通过标准方法来生长(Goding,“单克隆抗体:原理和实践”,59-103(Academic Press,1986))。用于该目的合适培养基包括,例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外,杂交瘤细胞可以作为腹水肿瘤在动物中体内生长。

[0318] 亚克隆分泌的单克隆抗体采用传统的抗体纯化操作例如蛋白质A-琼脂糖、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析,从培养基、腹水液或血清中适当分离。

[0319] 采用常规操作(例如通过采用能够特异性地结合编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易分离和测序编码单克隆抗体的DNA。杂交瘤细胞作为这种DNA的优选来源。一旦被分离,DNA可被加入到表达载体中,然后将表达载体转染到宿主细胞中,例如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或者不另外生产抗体蛋白的骨髓瘤细胞,以获得单克隆抗体在重组的宿主细胞中的合成。关于在细菌中重组表达编码抗体的DNA的综述文章包括Skerra et al.,*Curr. Opinion in Immunol.*,5:256-262(1993)和Plückthun,*Immunol. Revs.*,130:151-188(1992)。

[0320] 在另一个实施方案中,可以采用在 McCafferty et al., *Nature*, 348:552-554(1990) 中描述的技术从所生成的抗体噬菌体文库中分离单克隆抗体或抗体片段。Clackson et al., *Nature*, 352:624-628(1991) 和 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597(1991) 分别描述了采用噬菌体文库分离鼠和人的抗体。随后的出版物中描述了通过链改组来制备高亲合性(nM 范围)的人抗体(Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783(1992)),以及组合感染和体内重组作为构建非常大噬菌体文库的策略(Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266(1993))。因此,对于用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术来说,这些技术是可行的替代。

[0321] DNA 还可以被修饰,例如通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列来替代同源的鼠序列(美国专利号 4,816,567;和 Morrison, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851(1984)),或者通过将全部或部分的非免疫球蛋白多肽的编码序列共价地连接到免疫球蛋白编码序列上。

[0322] 典型地,用这种非免疫球蛋白多肽来替代抗体的恒定结构域,或者用它们来替代抗体的抗原结合位点的可变结构域,以建立包含对一个抗原具有特异性的抗原结合位点以及对一个不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点的嵌合双价抗体。

[0323] 人源化抗体

[0324] 用于人源化非人类的抗体的方法已经在本领域被描述。

[0325] 优选地,人源化的抗体具有从非人来源被导入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人类的氨基酸残基通常被称作为“输入”残基,其通常来自“输入”的可变结构域。人源化基本上可以按照 Winter 及其同事的方法进行(Jones et al., *Nature*, 321:522-525(1986);Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327(1988);Verhoeyen et al., *Science*, 239:1534-1536(1988)),通过用高变区序列取代人抗体的相应序列。因此,这种“人源化”的抗体是嵌合抗体(美国专利号 4,816,567),其中比完整的人可变结构域小得多的部分被来自非人类物种的相应序列取代。实际上,人源化的抗体典型地是人的抗体,其中有些高变区残基以及可能有些 FR 残基被来自啮齿类动物抗体的类似位点上的残基取代。

[0326] 选择人的轻链和重链的可变结构域,以用于制备人源化的抗体对于降低抗原性是非常重要的。按照所谓的“最佳适配(best-fit)”的方法,用已知的人的可变结构域序列的整个文库筛选啮齿类动物抗体的可变结构域的序列。然后与啮齿类动物最接近的人序列被接受作为人源化抗体的人的骨架区(FR)(Sims et al., *J. Immunol.*, 151:2296(1993);Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。另一种方法采用来自特定的轻链或重链亚群的所有人抗体的共有序列的特定骨架区。相同的骨架可以被用于几种不同的人源化抗体(Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285(1992);Presta et al., *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

[0327] 被人源化的抗体保留对抗原的高亲合力以及其他有利的生物学特性也是重要的。为了达到这个目的,按照优选的方法,通过采用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种构想的人源化产物的过程来制备人源化的抗体。三维的免疫球蛋白模型是一般可获得的,并且是本领域技术人员熟悉的。计算机程序是可获得的,其阐明和显示被选择的候选免疫球蛋白序列的很可能的三维构象结构。对这些显示的探查可以分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残

基。通过这种方式,可以从受体和输入序列中选择和组合 FR 残基,来获得期望的抗体特性,例如增强对目标抗原的亲合力。总之,高变区的残基直接地和最实质性地参与影响抗原结合。

[0328] 结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配基活化的示例性人源化抗 ErbB2 的抗体被描述在 WO 01/0245,其在此引入作为参考。在此特别感兴趣的人源化抗体基本上与鼠单克隆抗体 2C4(或其 Fab 片段)一样有效地阻断 EGF,TGF- α 和 / 或 HRG 介导的 MAPK 的活化,和 / 或基本上与鼠单克隆抗体 2C4(或其 Fab 片段)一样有效地结合 ErbB2。人源化抗体在此可以例如,包含被结合到人可变重链结构域的非人的高变区残基,并且可能在选自 69H,71H 和 73H 组成的组中的一个位置上包含骨架区 (FR) 取代,采用的是在 Kabat et al.,“具有免疫学意义的蛋白质的序列”,第 5 版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991) 中给出的可变结构域编号系统。在一个实施方案中,人源化的抗体在 69H,71H 和 73H 的两个或所有位点包含 FR 取代。

[0329] 示例性的目的的人源化抗体在此包含可变的重链结构域互补决定残基 GFTFTDYTMX,其中 X 优选是 D 或 S(SEQ ID NO:7);DVNPNSGGSIYNQRFKG(SEQ ID NO:8);和 / 或 NLGPSFYFDY(SEQ ID NO:9),任选地包含这些 CDR 残基的氨基酸修饰,例如,其中修饰基本上保持或改善抗体的亲合力。例如,目的抗体变体可在上述的可变重链 CDR 序列中具有从约 1 个到约 7 个或者约 5 个氨基酸取代。这种抗体变体可以通过亲和力成熟 (affinity maturation) 来制备,例如如下文所述。最优选的人源化抗体包含 SEQ ID NO:4 中的可变的重链结构域氨基酸序列 (附图 1B)。

[0330] 例如,除了在前述段落中的那些可变重链结构域 CDR 残基之外,人源化抗体还可以包含可变的轻链结构域互补决定残基 KASQDVSIGVA(SEQ ID NO:10);SASYX1X2X3,其中 X1 优选为 R 或 L,X2 优选为 Y 或 E,和 X3 优选为 T 或 S(SEQ ID NO:11);和 / 或 QQYYIYPYT(SEQ ID NO:12),这种人源化抗体任选地包含上述 CDR 残基的氨基酸修饰,例如,其中修饰基本上保持或改善抗体的亲合力。例如,目的抗体变体可能在上述的可变轻链 CDR 序列中具有从约 1 个到约 7 个或者约 5 个氨基酸取代。这种抗体变体可以通过亲和力成熟来制备,例如如下文所述。最优选的人源化抗体包含 SEQ IDNO:3 中的可变的轻链结构域氨基酸序列 (附图 1A)。

[0331] 本申请还考虑亲合力成熟的抗体,其结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配基活化。亲本抗体可以是人抗体或人源化抗体,例如包含分别为 SEQ ID No3 和 4 的可变轻链和 / 或重链序列 (即变体 574;附图 1A 和 B)。亲合力成熟的抗体优选以高于鼠 2C4 或变体 574 的亲合力结合到 ErbB2 受体上 (如采用 ErbB2 细胞外结构域 (ECD)ELISA 评价,例如亲合力改善从约 2 倍或约 4 倍到约 100 倍或约 1000 倍)。示例性的用于取代的可变重链 CDR 残基包括 H28, H30, H34, H35, H64, H96, H99,或者两个或多个的组合 (如这些残基中的 2,3,4,5,6 或 7 个)。用于改变的可变轻链 CDR 残基的例子包括 L28, L50, L53, L56, L91, L92, L93, L94, L96, L97 或两个或多个的组合 (如这些残基中的 2 至 3、4、5 或直到约 10 个)。

[0332] 还考虑了各种形式的人源化抗体或亲合力成熟的抗体。例如,人源化抗体或亲合力成熟的抗体可以是抗体片段,例如 Fab,其任选地与一个或多个细胞毒性剂偶联来产生一种免疫偶联物。或者,人源化抗体或亲合力成熟的抗体可以是完整抗体,例如完整的 IgG1 抗体。

[0333] 人抗体

[0334] 作为人源化的替代,可以制备人抗体。例如现在能够制备转基因动物(例如小鼠),当缺乏内源性免疫球蛋白产物时,该转基因动物能够在免疫后产生人抗体的所有组分。例如,已经描述,在嵌合和种系突变小鼠中纯合缺失抗体重链连接区(heavy-chain joining region)(JH)基因导致内源抗体生产的完全抑制。将人种系免疫球蛋白基因阵列转移到这种种系突变小鼠,将会导致在抗原激发时产生人抗体。参见,如 Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551(1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258(1993); Bruggemann et al., Year in Immuno., 7:33(1993); 和美国专利号 5,591,669; 5,589,369 和 5,545,807。

[0335] 或者,噬菌体展示技术(McCafferty et al., Nature, 348:552-553(1990))可以被用于体外从来自未被免疫的供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因所有组成中生产人抗体和抗体片段。按照这种技术,抗体V结构域基因按照读框被克隆到丝状噬菌体例如M13或fd的主要或次要外壳蛋白基因中,并以功能性抗体片段展示在噬菌体颗粒的表面上。由于丝状颗粒含有噬菌体基因组的单链DNA拷贝,基于抗体的功能性特性的选择还会导致对编码展示那些特性的抗体的基因的选择。因此,噬菌体模拟了B细胞的一些特性。噬菌体展示可以以各种形式实现;对于此的综述,参见如 Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology, 3:564-571(1993)。一些V-基因区段的来源可以被用于噬菌体展示。Clackson et al., Nature, 352:624-628(1991) 从来源于被免疫小鼠的脾脏的一个小的随机组合V基因文库中分离到一系列不同的抗唑酮抗体。基本上按照 Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597(1991), 或 Griffith et al., EMBO J., 12:725-734(1993) 中描述的技术可以构建来自未被免疫的人供体的V基因的所有组成成分,并且可以分离抗一系列不同抗原(包括自体抗原)的抗体。还可以参见美国专利号 5,565,332 和 5,573,905。

[0336] 如上所讨论的,还可以通过体外激活的B细胞来产生人抗体(参见美国专利 5,567,610 和 5,229,275)。

[0337] 人抗 ErbB2 的抗体被描述在 1998 年 6 月 30 日授权的美国专利号 5,772,997 和 1997 年 1 月 3 日公开的 WO 97/00271 中。

[0338] 抗体片段

[0339] 各种技术已经被开发来生产抗体片段。

[0340] 传统上,这些片段通过蛋白质水解消化完整的抗体来获得(参见,如 Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117(1992); 和 Brennan et al., Science, 229:81(1985))。但是,现在可以通过重组宿主细胞直接地制备这些片段。例如,可以从上面讨论的抗体噬菌体文库中分离抗体片段。或者,可以从大肠杆菌中直接回收 Fab'-SH 片段,并化学偶联,来形成 F(ab')₂ 片段(Carter et al., Bio/Technology, 10:163-167(1992))。按照另一种方法,可以从重组宿主细胞培养物中直接分离 F(ab')₂ 片段。用于生产抗体片段的其他技术对于本领域技术人员来说是显然的。在其他实施方案中,所选择的抗体是单链 Fv 片段(scFv)。参见 W093/16185; 美国专利号 5,571,894; 和美国专利号 5,587,458。抗体片段还可以是线性抗体,如,在美国专利 5,641,870 中所描述的。这种线性抗体片段可以是单一特异性的或双特异性的。

[0341] 双特异性抗体

[0342] 双特异性抗体是对至少两个不同表位具有结合特异性的抗体。示例性的双特异性抗体可能结合到 ErbB2 蛋白的两个不同的表位上。其他的这种抗体可能组合 ErbB2 结合位点与 EGFR, ErbB3 和 / 或 ErbB4 的结合位点。或者, 抗 ErbB2 的臂可能与结合白细胞上的触发分子例如 T 细胞受体分子 (如 CD2 或 CD3), 或者 IgG 的 Fc 受体 (Fc γ R), 例如 Fc γ RI (CD64)、Fc γ R II (CD32) 和 Fc γ R III (CD16) 的臂组合, 来将细胞防御机制集中在表达 ErbB2 的细胞上。双特异性抗体还可以被用于将细胞毒性剂定位在表达 ErbB2 的细胞上。这些抗体具有 ErbB2 结合臂, 以及结合细胞毒性剂 (如皂草素, 抗干扰素 - α , 长春花生物碱, 蓖麻毒蛋白 A 链, 氨甲蝶呤或放射性同位素半抗原) 的臂。双特异性抗体可以作为全长抗体或抗体片段 (例如 F(ab')₂ 双特异性抗体) 被制备。

[0343] WO 96/16673 中描述了一种双特异性抗 ErbB2/ 抗 Fc γ R III 抗体, 而美国专利号 5, 837, 234 公开了一种双特异性的抗 ErbB2/ 抗 Fc γ RI 抗体。双特异性的抗 ErbB2/Fc α 抗体被示于 WO 98/02463 中。美国专利号 5, 821, 337 教导了一种双特异性的抗 ErbB2/ 抗 CD3 抗体。

[0344] 用于制备双特异性的抗体的方法在本领域是已知的。全长双特异性抗体的传统制备是基于共表达两种免疫球蛋白重链 - 轻链对, 其中这两条链具有不同的特异性 (Millstein et al., *Nature*, **305**:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链随机分类, 这些杂交瘤 (“四链瘤” quadromas) 生成了 10 种不同抗体分子的可能混合物, 其中只有一种抗体分子具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤来纯化正确的分子, 是非常繁琐的, 并且产量很低。类似的操作被公开在 WO 93/08829, 和 Traunecker et al., *EMBO J.*, **10**:3655-3659 (1991) 中。

[0345] 按照不同方法, 具有所需结合特异性的抗体可变结构域 (抗体 - 抗原结合位点) 被融合到免疫球蛋白的恒定结构域序列上。优选与包含铰链区、CH2、和 CH3 区域的至少一部分的免疫球蛋白重链恒定结构域融合。优选具有在至少一个融合体中出现的含有轻链结合必需位点的第一重链恒定区 (CH1)。编码免疫球蛋白重链融合体以及, 如果需要, 免疫球蛋白轻链的 DNA 被插入到各自独立的表达载体中, 并被共转染到合适的宿主生物体中。当构建中所用的三种多肽链的不相等比例产生最佳产量时, 这给调整实施方案中三种多肽片段相互比例提供很大的灵活性。但是, 当至少两种多肽链以相等比例表达获得了高产量时或者当该比例不是特别重要时, 有可能在一个表达载体中插入两种或全部三种多肽链的编码序列。

[0346] 在这种方法的优选实施方案中, 双特异性抗体由一个臂中的具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链, 以及另一个臂上的杂合免疫球蛋白重链 - 轻链对 (提供第二结合特异性) 组成。已经发现, 由于仅在双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链提供了一种便捷的分离途径, 这种不对称结构便于从不期望的免疫球蛋白链组合中分离期望的双特异性化合物。这种方法被公开在 WO 94/04690 中。生产双特异性抗体的更加详细内容参见, 例如 Sureshet al., *Methods in Enzymology*, **121**:210 (1986)。

[0347] 按照在美国专利号 5, 731, 168 中描述的另一方法, 可以工程化改造一对抗体分子之间的界面来使异二聚体的百分比最大化, 该异二聚体从重组细胞培养物中回收。优选的界面包含抗体恒定结构域的 CH3 结构域的至少一部分。在这种方法中, 来自第一抗体分子

界面的一条或多条小氨基酸侧链用较大的侧链（如酪氨酸或色氨酸）替代。通过用较小的侧链（如丙氨酸或苏氨酸）替换大氨基酸侧链在第二抗体分子的界面上产生与大侧链相同或类似大小的补偿“空穴”。这提供一种机制来提高异二聚体相对于其他不需要的终产物，例如同型二聚体的产量。

[0348] 双特异性抗体包括交联的或“异偶联物”抗体。例如，异偶联物中的抗体之一可以被偶联到抗生物素蛋白上，另一个则偶联到生物素上。这种抗体被建议用于例如将免疫系统细胞靶向不需要的细胞（美国专利号 4,676,980），以及用于治疗 HIV 感染（WO 91/00360, WO 92/200373, 和 EP 03089）。异偶联物抗体可以采用任何方便的交联方法来制备。合适的交联剂以及大量交联技术是本领域熟知的，被公开在美国专利号 4,676,980 中。

[0349] 用于从抗体片段生产双特异性抗体的技术也在文献中被描述。例如，双特异性抗体可以采用化学连接制备。Brennan et al., *Science*, **229**:81(1985) 描述了一种操作，其中完整抗体被蛋白质水解裂解产生 F(ab')₂ 片段。这些片段在二硫酚络合剂亚砷酸钠的存在下被还原以稳定邻近的二硫酚，并防止分子间二硫化物的形成。生成的 Fab' 片段然后被转化为硫代硝基苯甲酸盐 (TNB) 衍生物。然后通过用巯基乙胺还原，Fab' -TNB 衍生物之一被再转化为 Fab' -硫羟，与等克分子数的其他 Fab' -TNB 衍生物混合来形成双特异性抗体。生成的双特异性抗体可以被用作选择性固定酶的试剂。

[0350] 最近的进展使得从大肠杆菌中直接回收 Fab' -SH 片段变得更加容易，这些片段可以被化学偶联来形成双特异性抗体。Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, **175**:217-225(1992) 中描述了生产完全人源化的双特异性抗体 F(ab')₂ 分子。每个 Fab' 片段分别从 *E. coli* 中分泌，并在体外定向化学偶联来形成双特异性抗体。如此形成的双特异性抗体能够结合到过度表达 ErbB2 受体的细胞和正常的人 T 细胞上，并且触发人细胞毒性淋巴细胞针对人乳腺肿瘤靶点的裂解活性。

[0351] 各种用于直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的技术也已经被描述。例如已经采用亮氨酸拉链制备了双特异性抗体。Kostelny et al., *J. Immunol.*, **148**(5):1547-1553(1992)。通过基因融合，来自 Fos 和 Jun 蛋白的亮氨酸拉链肽被连接到两种不同抗体的 Fab' 部分上。抗体同型二聚体的铰链区被还原来形成单体，然后再次被氧化形成抗体异二聚体。这种方法还可以被用于生产抗体同型二聚体。被描述在 Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**:6444-6448(1993) 中的“微型双功能”技术给制备双特异性抗体片段提供可供选择的机制。该片段包含通过接头被连接到轻链可变结构域 (VL) 上的重链可变结构域 (VH)，该接头太短，以至同一条链上的两个结构域之间不能配对。因此，一个片段上的 VH 和 VL 结构域被迫与另一条片段上的互补 VL 和 VH 结构域配对，从而形成两个抗原结合位点。通过采用单链 Fv (sFv) 二聚体来制备双特异性抗体片段的另一策略也已经被报道。参见 Gruber et al., *J. Immunol.*, **152**:5368(1994)。

[0352] 还考虑到具有二价以上的抗体。例如，可制备三特异性抗体。Tutt et al., *J. Immunol.*, **147**:60(1991)。

[0353] 其他的氨基酸序列修饰

[0354] 还考虑到抗 ErbB2 的抗体的氨基酸序列修饰。例如，有可能期望改善抗体的结合亲和力 / 或其他的生物学特性。通过将适当的核苷酸改变引入抗 ErbB2 的抗体的核酸中，或者通过肽合成来制备抗 ErbB2 的抗体的氨基酸序列变体。这种修饰包括，例如，缺失

和 / 或插入和 / 或取代抗 ErbB2 的抗体的氨基酸序列中的残基。进行缺失、插入和取代的任何组合来获得最终的构建体,只要最终的构建体具有所需的特征。氨基酸改变也可改变抗 ErbB2 抗体的翻译后加工,例如改变糖基化位点的数量或位置。

[0355] 用于鉴定作为诱变优选位置的抗 ErbB2 抗体的某些残基或区域的有用方法称之为“丙氨酸扫描诱变”,被描述在 Cunningham 和 Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989) 中。在此,鉴定残基或目标残基组(如带电荷的残基,例如精氨酸,天冬氨酸,组氨酸,赖氨酸,和谷氨酸),并且用中性或带负电荷的氨基酸(最优选为丙氨酸或多聚丙氨酸)替换,来影响该氨基酸与 ErbB2 抗原的相互作用。那些表明对取代具有功能性灵敏性的氨基酸位置通过在或对取代位点引入更多或其他变化来改善。因此,虽然用于导入氨基酸序列变化的位点被预先确定,但是不必预先确定突变本身的性质。例如,为了分析在特定位点上突变的进行,在目标密码子或区域上进行丙氨酸扫描或随机诱变,用所需活性筛选被表达的抗 ErbB2 抗体变体。

[0356] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基到含有上百或更多残基的多肽的氨基和 / 或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N 末端甲硫氨酰残基的抗 ErbB2 抗体或者融合到细胞毒性多肽上的抗体。抗 ErbB2 抗体分子的其他插入变体包括抗 ErbB2 抗体的 N- 或 C- 末端融合到报道分子,酶(例如 ADEPT) 或者延长抗体的血清半衰期的多肽上。

[0357] 另一种类型的变体是氨基酸取代变体。这些变体在抗 ErbB2 抗体中具有至少一个氨基酸残基被不同残基取代。对取代诱变来说最感兴趣的位点包括高变区,但 FR 改变也被考虑在内。保守性取代显示在表 1 的“优选取代”的标题下。如果这种取代导致生物学活性的变化,那么导入在表 1 中称作“示范性取代”或者如下文关于氨基酸分类中进一步描述的更实质性改变,并筛选产物。

[0358] 表 1

[0359]

原始残基	示例性取代	优选取代
丙氨酸(A)	缬氨酸; 亮氨酸; 异亮氨酸	缬氨酸
精氨酸(R)	赖氨酸; 谷氨酰胺; 天冬酰胺	赖氨酸
天冬酰胺(N)	谷氨酰胺; 组氨酸; 天冬氨酸; 赖氨酸; 精氨酸	谷氨酰胺
天冬氨酸(D)	谷氨酸; 天冬酰胺	谷氨酸
半胱氨酸(C)	丝氨酸; 丙氨酸	丝氨酸
谷氨酰胺(Q)	天冬酰胺; 谷氨酸	天冬酰胺
谷氨酸(E)	天冬氨酸; 谷氨酰胺	天冬氨酸
甘氨酸(G)	丙氨酸	丙氨酸
组氨酸(H)	天冬酰胺; 谷氨酰胺; 赖氨酸; 精氨酸	精氨酸
异亮氨酸(I)	亮氨酸; 缬氨酸; 甲硫氨酸; 丙氨酸; 苯丙氨酸; 正亮氨酸	亮氨酸
亮氨酸(L)	正亮氨酸; 异亮氨酸; 缬氨酸; 甲硫氨酸; 丙氨酸; 苯丙氨酸	异亮氨酸
赖氨酸(K)	精氨酸; 谷氨酰胺; 天冬酰胺	精氨酸
甲硫氨酸(M)	亮氨酸; 苯丙氨酸; 异亮氨酸	亮氨酸
苯丙氨酸(F)	亮氨酸; 缬氨酸; 异亮氨酸; 丙氨酸; 酪氨酸	酪氨酸
脯氨酸(P)	丙氨酸	丙氨酸
丝氨酸(S)	苏氨酸	苏氨酸
苏氨酸(T)	丝氨酸	丝氨酸
色氨酸(W)	酪氨酸; 苯丙氨酸	酪氨酸
酪氨酸(Y)	色氨酸; 苯丙氨酸; 苏氨酸; 丝氨酸	苯丙氨酸
缬氨酸(V)	异亮氨酸; 亮氨酸; 甲硫氨酸; 苯丙氨酸; 丙氨酸; 正亮氨酸	亮氨酸

[0360] 抗体生物学特性的实质性改变是通过选择取代来实现, 这些取代在其保持如下方面的效果上具有显著区别: (a) 取代区域的多肽主链结构, 例如折叠或螺旋构型, (b) 靶位点的分子的电荷或疏水性, 或 (c) 侧链体积。基于共同的侧链特性, 天然存在的残基被分成几组:

[0361] (1) 疏水的: 正亮氨酸, 甲硫氨酸, 丙氨酸, 缬氨酸, 亮氨酸, 异亮氨酸;

[0362] (2) 中性亲水的: 半胱氨酸; 丝氨酸; 苏氨酸;

[0363] (3) 酸性的: 天冬氨酸, 谷氨酸;

[0364] (4) 碱性的 :天冬酰胺, 谷氨酰胺, 组氨酸, 赖氨酸, 精氨酸 ;

[0365] (5) 影响侧链定向的残基 :甘氨酸, 脯氨酸 ;和

[0366] (6) 芳香族 :色氨酸, 酪氨酸, 苯丙氨酸。

[0367] 非保守取代将要求将这些种类之一的一个成员换成另一个种类的。

[0368] 任何不参与维持抗 ErbB2 的抗体的正确构象的半胱氨酸残基也可被取代, 通常用丝氨酸取代, 来改善该分子的氧化稳定性, 并防止异常的交联。相反, 可以在抗体中加入半胱氨酸键来改善其稳定性 (特别是当抗体为抗体片段例如 Fv 片段时)。

[0369] 特别优选的一类取代变体涉及取代亲本抗体的一个或多个高变区残基 (例如人源化的或人抗体)。一般地, 被选择用于进一步开发的生成抗体相对于产生其的亲本抗体, 将具有改善了的生物学特性。用于生产这种取代变体的便捷方法涉及采用噬菌体展示的亲合力成熟。简而言之, 几个高变区位点 (如 6-7 个位点) 被突变来在每一位点上产生所有可能的氨基酸取代。如此生产的抗体变体显示为从作为融合体的丝状噬菌体颗粒到被包装在每一颗粒中的 M13 的基因 III 产物的单价形式。然后如在此所公开, 筛选噬菌体展示的变体的生物学活性 (如结合亲合力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点, 可以进行丙氨酸扫描诱变来鉴定对抗原结合作出显著贡献的高变区残基。可选择地或者额外地, 分析抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体和人 ErbB2 的接触点是有益的。这种接触残基和邻近残基是用于按照在此详述的技术进行的取代的候选。一旦生成这种变体, 对变体群体进行如在此所述的筛选, 而一个或多个相关分析中具有优良特性的抗体可被选择用于进一步开发。

[0370] 另一种类型的氨基酸变异改变抗体的原始糖基化模式。所谓改变是指删除一个或多个存在于抗体中的糖类部分, 和 / 或增加一个或多个不存在于抗体中的糖基化位点。

[0371] 抗体的糖基化典型的是 N- 联或 O- 联的。N- 联是指糖部分附着到天冬氨酸残基的侧链上。三肽序列天冬氨酸 -X- 丝氨酸和天冬氨酸 -X- 苏氨酸, 其中 X 是除了脯氨酸外的任何氨基酸, 是糖部分酶催化附着到天冬氨酸侧链上的识别序列。因此, 在多肽中这些三肽序列中任何一种的存在产生了潜在的糖基化位点。O- 联糖基化是指糖 N- 乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着到羟基氨基酸上, 最通常为丝氨酸或苏氨酸, 虽然也可以采用 5- 羟脯氨酸或 5- 羟赖氨酸。

[0372] 将糖基化位点添加到抗体上方便地是通过改变氨基酸序列使其含有一个或多个上述的三肽序列 (用作 N- 联糖基化位点) 来实现。这种改变还可以通过增加或替换一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基到原始抗体的序列上 (作为 O- 联糖基化位点)。

[0373] 编码抗 ErbB2 抗体的氨基酸序列变体的核酸分子通过本领域知晓的各种方法来制备。这些方法包括, 但是不限于, 从天然来源中分离 (在为天然存在的氨基酸序列变体的情况下) 或者通过早先制备的变体或非变体形式的抗 ErbB2 抗体的寡核苷酸介导 (或定点) 诱变, PCR 诱变和表达盒诱变来制备。

[0374] 有可能期望在效应子功能方面改变本发明的抗体, 例如来增强抗体的抗原依赖的细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和 / 或补体依赖的细胞毒性 (CDC)。这可以通过在抗体的 Fc 区导入一个或多个氨基酸取代来实现。作为选择或者另外地, 半胱氨酸残基可以被导入 Fc 区, 从而在该区域形成链间二硫键。如此生成的同型二聚抗体可能具有改进的内在化能力和 / 或提高补体介导的细胞杀伤和抗体依赖的细胞性细胞毒性 (ADCC)。参

见 Caron et al., *J. Exp. Med.*, **176**:1191-1195(1992) 和 Shopes, B., *J. Immunol.*, **148**:2918-2922(1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同型二聚体抗体还可以采用如在 Wolff et al., *Cancer Research*, **53**:2560-2565(1993) 中描述的异型双功能交联剂来制备。或者,可以改造抗体,使之具有双 Fc 区,从而具有增强的补体溶解和 ADCC 能力。参见 Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, **3**:219-230(1989)。

[0375] 为了延长抗体的血清半衰期,可以如在美国专利 5,739,277 中所描述在抗体(特别是抗体片段)中掺入补救受体结合表位。如在此所用,术语“补救受体结合表位”是指 IgG 分子(如 IgG1, IgG2, IgG3, 或 IgG4)的 Fc 区的表位,该表位负责延长 IgG 分子的体内血清半衰期。

[0376] 筛选具有期望特性的抗体

[0377] 用于生产抗体的技术已经在上面被描述。如果需要,还可以进一步选择具有某种生物学特性的抗体。

[0378] 为了鉴定阻断 ErbB 受体的配基活化的抗体,可测定抗体阻断 ErbB 配基结合到表达 ErbB 受体(例如偶联到另一种 ErbB 受体上,该 ErbB 受体与目的 ErbB 受体形成 ErbB 异寡聚物)的细胞的能力。例如,天然地表达或者被转染来表达 ErbB 异寡聚物的 ErbB 受体的细胞可以与抗体一起孵育,然后暴露给被标记的 ErbB 配基。然后可评价抗 ErbB2 的抗体阻断配基结合到 ErbB 异寡聚物中的 ErbB 受体上的能力。

[0379] 例如,通过抗 ErbB2 抗体抑制 HRG 结合到 MCF7 乳腺肿瘤细胞系上,可以基本上如 WO 01/00245 中所述,使用以在冰上以 24 孔平板的形式的单层 MCF7 培养物进行。将抗 ErbB2 的单克隆抗体添加到各个孔中,并孵育 30 分钟。然后可加入 ^{125}I -标记的 rHRG β 1177-224(25pm),继续孵育 4-16 小时。绘制剂量反应曲线,计算目的抗体的 IC₅₀ 值。在一个实施方案中,阻断 ErbB 受体的配基活化的抗体在本分析中抑制 HRG 结合到 MCF7 细胞的 IC₅₀ 为约 50nM 或更低,更加优选为 10nM 或更低。当抗体是抗体片段,例如 Fab 片段时,在本分析中抑制 HRG 结合到 MCF7 细胞的 IC₅₀ 可以是,例如约 100nM 或更低,更优选为 50nM 或更低。

[0380] 可选择地或另外地,可评定抗 ErbB2 抗体阻断存在于 ErbB 异寡聚物中的 ErbB 受体的 ErbB 配基刺激的酪氨酸磷酸化的能力。例如,内源性地表达或被转染来表达 ErbB 受体的细胞可以与抗体一起孵育,然后使用抗磷酸酪氨酸单克隆(其任选地与可检测的标记偶联)来分析 ErbB 配基依赖的酪氨酸磷酸化活性。在美国专利 5,766,863 中所描述的激酶受体活化分析也可以用于测定 ErbB 受体活化和通过抗体对该活性的阻断。

[0381] 在一个实施方案中,可以基本上如下面实施例 1 中所描述筛选抑制 HRG 刺激 MCF7 细胞中的 p180 酪氨酸磷酸化的抗体。例如,将 MCF7 细胞铺到 24 孔平板上,并将 ErbB2 的单克隆抗体加入每个孔中,在室温下孵育 30 分钟;然后可在每个孔中加入 rHRG β 1177-244 到 0.2nM 的最终浓度,继续孵育 8 分钟。从每个孔中吸走培养基,通过加入 100 μ l SDS 样本缓冲液(5% SDS, 25mM DTT 和 25mM Tris-HCl, pH 6.8)来终止反应。可在 4-12% 梯度凝胶(Novex)中对每一样本(25 μ l)进行电泳,然后通过电泳转移到聚偏二氟乙烯膜上。可进行抗磷酸酪氨酸(以 1 μ g/ml)免疫印迹,通过反射度光密度分析法量化 Mr180,000 的主要反应条带的强度。在本分析中,被选择的抗体优选显著地抑制 p180 酪氨酸磷酸化的 HRG 刺激至对照的约 0-35%。可绘制由反射度光密度分析法确定的 p180 酪氨酸磷酸化的 HRG

刺激的剂量反应曲线,并可计算目的抗体的 IC₅₀。在一个实施方案中,阻断 ErbB 受体的配基活化的抗体在本分析中抑制 p180 酪氨酸磷酸化的 HRG 刺激的 IC₅₀ 为约 50nM 或更低,更优选为 10nM 或更低。当该抗体为抗体片段例如 Fab 片段时,在本分析中抑制 p180 酪氨酸磷酸化的 HRG 刺激的 IC₅₀ 为,例如约 100nM 或更低,更加优选为 50nM 或更低。

[0382] 还可以评价抗体对 MDA-MB-175 细胞的生长抑制作用,如基本上如 Schaefer et al., *Oncogene*, 15:1385-1394(1997) 中所述。按照本分析方法,用抗 ErbB2 单克隆抗体 (10 μg/mL) 处理 MDA-MB-175 细胞 4 天,并用龙胆紫染色。用抗 ErbB2 的抗体孵育在这一细胞系上显示出与使用单克隆抗体 2C4 类似的生长抑制作用。在还有一个实施方案中,外源的 HRG 对这种抑制没有显著的逆转作用。优选地,无论是否存在外源 HRG,该抗体抑制 MDA-MB-175 细胞的细胞增殖的程度超过了单克隆抗体 4D5 (并且任选地超过了单克隆抗体 7F3)。

[0383] 在一个实施方案中,目的抗 ErbB2 的抗体可阻断 MCF7 和 SK-BR-3 细胞中的 heregulin 依赖的 ErbB2 与 ErbB3 结合,实质上比单克隆抗体 4D5 更有效,和优选地实质上比单克隆抗体 7F3 更有效,这通过例如在实施例 1 中所描述的共免疫沉淀实验中确定。

[0384] 为了鉴定生长抑制性抗 ErbB2 的抗体,可以筛选抑制过度表达 ErbB2 的癌症细胞生长的抗体。在一个实施方案中,在约 0.5-30 μg/ml 的抗体浓度下,所选择的生长抑制抗体能够抑制细胞培养物中约 20-100%,优选约 50-100% 的 SK-BR-3 细胞的生长。为了鉴定这种抗体,可以实施在美国专利号 5,677,171 中描述的 SK-BR-3 分析。按照这种分析,SK-BR-3 细胞在 F12 和添加了 10% 胎牛血清、谷氨酰胺和青霉素链霉素的 DMEM 培养基的 1:1 混合物中生长。将 20,000 个 SK-BR-3 细胞铺入 35mm 细胞培养皿中 (2ml/35mm 培养皿)。每个培养皿中加入 0.5-30 μg/ml 抗 ErbB2 抗体。6 天后,用电子 COULTER™ 细胞计数器计数细胞数量,与未被处理的细胞比较。那些抑制约 20-100% 或约 50-100% 的 SK-BR-3 细胞生长的抗体被选择作为生长抑制抗体。

[0385] 为了选择诱导细胞死亡的抗体,相对于对照可评价由例如 PI,台盼兰或 7AAD 摄取指示的膜完整性的丧失。优选分析是采用 BT474 细胞的 PI 摄取的分析。按照该分析,BT474 细胞 (可从美国典型培养物保藏中心 (Rockville,MD) 获得) 被培养在 Duibecco' s Modified Eagle Medium (D-MEM); 添加了 10% 热灭活的 FBS (Hyclone) 和 2mM L-谷氨酰胺的 Ham' s F-12 (50:50) 中。(因此,该分析在缺乏补体和免疫效应细胞下进行)。BT474 细胞以 3x10⁶/皿的浓度被接种到 100x20mm 培养皿中,附着过夜。然后去除培养基,只用新鲜培养基或者用含有 10 μg/ml 合适的单克隆抗体的培养液替换。孵育细胞 3 天。在每一处理后,用 PBS 洗涤单细胞层,用胰蛋白酶消化分离。然后在 40°C 下以 1200rpm 离心 5min,将沉淀重悬在 3ml 冰冷的 Ca²⁺ 结合缓冲液 (10mM Hepes, pH7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl₂) 中,并等分试样到 35mm 的加盖滤网的 12x75 试管中 (1ml/管, 3管/处理组) 来去除细胞块。然后在管中加入 PI (10 μg/ml)。用 FACSCAN™ 流式细胞计数仪和 FACSCONVERT™ CellQuest 软件 (Becton Dickinson) 来分析样本。通过 PI 摄取确定的那些引起统计学上显著水平的细胞死亡的抗体可被选择作为诱导细胞死亡的抗体。

[0386] 为了选择诱导凋亡的抗体,可采用使用 BT474 细胞的膜联蛋白结合分析。如前面的段落所讨论培养 BT474 细胞并植入培养皿中。然后去除培养基,只用新鲜培养基或者含有 10 μg/ml 单克隆抗体的培养基替换。在 3 天的孵育期后,用 PBS 洗涤单细胞层,用胰蛋白

酶消化分离。然后如上讨论离心细胞,重悬在 Ca^{2+} 结合缓冲液中,并等分试样到试管中用于细胞死亡分析。然后往试管中加入被标记的膜联蛋白(如膜联蛋白 V-FTIC) ($1 \mu\text{g/ml}$)。可用 FACSCAN™ 流式细胞计数仪和 FACSCONVERT™ CellQuest 软件 (Becton Dickinson) 来分析样本。那些相对于对照引起统计学上显著水平的膜联蛋白结合的抗体被选择作为诱导凋亡的抗体。

[0387] 除了膜联蛋白结合分析,还可以采用 BT474 细胞进行 DNA 染色分析。为了进行该分析,已经如前面两段所述用目的抗体处理的 BT474 细胞与 $9 \mu\text{g/ml}$ HOECHST 33342™ 在 37°C 下孵育 2 小时,然后用 MODFIT LT™ 软件 (Verity Software House) 在 EPICS ELITE™ 流式细胞计数仪 (Coulter Corporation) 中进行分析。通过该分析,诱导比未处理细胞高 2 倍或更高(优选 3 倍或更高)的凋亡细胞百分比变化(达到 100% 凋亡细胞)的抗体被选作前凋亡 (pro-apoptotic) 抗体。

[0388] 为了筛选结合到被目的抗体结合的 ErbB2 的一个表位上的抗体,可进行常规的交叉-阻断分析,例如被描述在“抗体,实验室手册, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow 和 David Lane (1988)” 中的分析。可选择地或另外地,可以通过本领域已知的方法进行表位作图(参见,如本文的附图 1A 和 1B)。

[0389] 免疫偶联物 (immunoconjugate)

[0390] 本发明还涉及包含被偶联到细胞毒性剂的抗体的免疫偶联物,细胞毒性剂例如化学治疗剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或经酶催化后有活性的毒素,包括其片段和/或变体)或放射性同位素(即放射偶联物)。

[0391] 在生产这种免疫偶联物中有用的化学治疗剂已经在上文被描述。本文还考虑了抗体和一种或多种小分子毒素,例如加利车霉素,美登素 (maytansine) (美国专利号 5, 208, 020), trichothene, 和 CC1065 的偶联物。

[0392] 在本发明的一个优选实施方案中,抗体被偶联到一个或多个美登素分子上(例如每个抗体约 1- 约 10 个美坦纳生分子)。美登素可以,例如被转化为 May-SS-Me, 其被还原为 May-SH3, 并与被修饰的抗体反应 (Chari et al., Cancer Research, 52:127-131 (1992)) 来生成美登木素生物碱抗体免疫偶联物。

[0393] 另一种目的免疫偶联物包含被偶联到一个或多个加利车霉素分子上的抗 ErbB2 抗体。抗生素的加利车霉素家族能够在亚皮摩尔浓度产生双链 DNA 断裂。可以被使用的加利车霉素的结构类似物包括,但是不限于 γ 1I、 α 2I、 α 3I、N-乙酰- γ 1I、PSAG 和 θ 1I (Hinman et al., Cancer Research, 53:3336-3342 (1993) 和 Lode et al., Cancer Research, 58:2925-2928 (1998))。还参见美国专利号 5, 714, 586 ; 5, 712, 374 ; 5, 264, 586 ; 和 5, 773, 001, 在此特别地引入作为参考。

[0394] 可以被使用的经酶催化有活性的毒素及其片段包括白喉 A 链, 白喉毒素的非结合活性片段, 外毒素 A 链(来自铜绿假单胞菌), 蓖麻蛋白 A 链, 相思豆毒蛋白 A 链, 莫迪素 (modeccin) A 链, α -八叠球菌, 油桐蛋白, dianthin 蛋白, 垂序商陆 (Phytolacca americana) 蛋白 (PAP I, PAP II, 和 PAP-S), 苦瓜抑制剂, 泻果素, 巴豆毒素, sapaonaria officinalis 抑制剂, gelonin, mitogellin, restrictocin, 酚霉素, 依诺霉素和 tricothecene。参见, 例如 1993 年 10 月 28 日公开的 WO 93/21232。

[0395] 本发明还进一步考虑在抗体和具有溶核活性的化合物(例如核糖核酸酶或 DNA 核

酸内切酶例如脱氧核糖核酸酶 (DNase) 之间形成的免疫偶联物。

[0396] 各种放射性同位素可以用于制备放射偶联的抗 ErbB2 抗体。例子包括 At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 和 Lu 的放射性同位素。

[0397] 可以采用各种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体与细胞毒性剂的偶联物, 这些偶联剂如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫酚)丙酸盐 (SPDP), 琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸盐, 亚氨基硫杂环戊烷 (iminothiolane) (IT), 亚氨酸酯的双功能衍生物 (例如 dimethyl adipimidate HCL, 活性酯 (例如二琥珀酰亚胺基辛二酸盐), 醛 (例如戊二醛), 二-叠氮化合物 (例如二(p-叠氮苯甲酰)己二胺), 二-重氮衍生物 (例如二-(p-重氮盐苯甲酰)-乙二胺, 二异氰酸盐 (例如亚苄基 2,6-二异氰酸盐), 和二-活性氟化合物 (例如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如, 蓖麻蛋白免疫毒素可以如 Vitetta 等, *Science*, 238:1098(1987) 中所述进行制备。14 碳标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二乙烯基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸偶联到抗体上的示例性螯合剂。参见 WO 94/11026。该接头可以是便于细胞毒性药物在细胞中释放的可裂解的接头。例如, 可以采用酸不稳定接头, 肽酶敏感的接头, 二甲基接头或含有二硫化物的接头 (Chari et al., *Cancer Research*, 52:127-131(1992))。

[0398] 或者, 包含抗 ErbB2 抗体和细胞毒性剂的融合蛋白可以通过如重组技术或肽合成为来制备。

[0399] 在还有另一个实施方案中, 抗体被偶联到一个在肿瘤预靶向中使用的“受体”(例如链霉抗生物素)上, 其中抗体-受体偶联物被施用给患者, 接着使用清除剂从循环中去除未被结合的偶联物, 然后施用偶联到细胞毒性剂 (例如放射性核苷酸) 上的“配基”(如抗生物素蛋白)。

[0400] 抗体依赖的酶介导的前体药物治疗 (ADEPT)

[0401] 本发明的抗体还可以被用于 ADEPT 之中, 通过将抗体偶联到激活前体药物的酶上, 该酶将前体药物 (如肽基化疗剂, 参见 WO 81/01145) 转化为活性抗癌药物。参见, 例如 WO 88/07378 和美国专利号 4,975,278。

[0402] 可用于 ADEPT 的免疫偶联物的酶组分包括任何能够以将前体药物转化为其更有活性、细胞毒性的形式的作用于前体药物的酶。

[0403] 可用于本发明的方法的酶包括, 但是不限于, 用于将含有磷酸的前体药物转化为游离药物的碱性磷酸酶; 用于将含有硫酸盐的前体药物转化为游离药物的芳基硫酸酯酶; 用于将无毒性的 5-氟胞嘧啶转化为抗癌药物 5-氟尿嘧啶的胞嘧啶脱氨酶; 蛋白酶, 例如沙雷氏菌属蛋白酶, 嗜热菌蛋白酶, 枯草杆菌蛋白酶, 羧肽酶和组织蛋白酶 (例如组织蛋白酶 B 和 L), 可以用于将含肽前体药物转化为游离药物; D-丙氨酰羧肽酶, 用于转化含有 D-氨基酸取代的前体药物; 糖裂解酶例如用于将糖基化的前体药物转化为游离药物的 β -半乳糖苷酶和神经氨酸苷酶; 用于将用 β -内酰胺衍生化的药物转化为游离药物的 β -内酰胺酶; 和青霉素酰胺酶, 例如青霉素 V 酰胺酶或青霉素 G 酰胺酶, 用于将在氨基氮分别用苯氧乙酰基或苯乙酰基衍生化的药物转化为游离药物。或者, 具有催化活性的抗体, 在本领域也被称作“抗体酶”(abzyme), 也可以被用于将本发明的前体药物转化为游离的活性药物 (参见, 例如 Massey, *Nature*, 328:457-458(1987))。抗体-抗体酶偶联物可以如在此所描述被制备来将抗体酶递送到肿瘤细胞群体中。

[0404] 本发明的酶可以通过本领域熟知的技术被共价结合到抗 ErbB2 抗体上,例如使用上面讨论的异双功能交联剂。或者,可以采用本领域熟知的重组 DNA 技术来构建包含被连接到本发明的酶的至少一个功能性活性部分的至少本发明的抗体的抗原结合区的融合蛋白(参见,如 Neuberger 等, *Nature*, 312:604-608(1984))。

[0405] 其他抗体修饰

[0406] 本文还考虑抗体的其他修饰。例如抗体可以被连接到各种各样非蛋白聚合物之一上,如聚乙二醇,聚丙二醇,聚氧化烯或者聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物。抗体还可以或者可选择地被连接到一个和多个各种各样的不同部分上,例如荧光标记,具有已知电泳迁移率的部分或者能够裂解特殊接头分子的部分。

[0407] 抗体还可以被诱捕到所制备的微囊体中,例如通过凝聚技术或者通过界面聚合(例如,分别为羟甲基纤维素或者明胶微囊体和 poly-(methylmethacrylate) 微囊体),在胶质药物递送系统中(例如脂质体,白蛋白微球体,微乳状液,纳米颗粒和纳米胶囊),或者在大分子乳液。这种技术被公开在雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),第 16 版,Oslo, A., 编辑,(1980) 中。

[0408] 在此公开的抗 ErbB2 抗体还可以被配制成免疫脂质体。含有抗体的脂质体通过本领域已知的方法来制备,例如被描述在 Epstein 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688(1985); Hwang 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030(1980); 美国专利 4,485,045 和 4,544,545; 和 1997 年 10 月 23 日公开的 WO 97/38731 中。循环时间延长的脂质体被描述在美国专利 5,013,556 中。

[0409] 特别有用的脂质体可以采用包含卵磷脂、胆固醇和 PEG-衍生磷脂酰乙醇胺(PEG-PE) 的脂质组合物通过反相蒸发方法生成。可以通过特定孔径的滤器挤压来获得具有期望直径的脂质体。本发明的抗体的 Fab' 片段可以如 Martin 等, *J. Biol. Chem.*, 257:286-288(1982) 所描述通过二硫化物交换反应被偶联到脂质体上。化学治疗剂任选被包含在脂质体中。参见 Gabizon 等, *J. National Cancer Inst.*, 81(19):1484(1989)。

[0410] 载体,宿主细胞和重组方法

[0411] 本发明还提供编码抗体包括人源化的抗 ErbB2 抗体的分离核酸,包含核酸的载体和宿主细胞,和用于生产抗体的重组技术。

[0412] 对于重组生产抗体,编码抗体的核酸被分离和插入到可复制的载体中,用于进一步克隆(DNA 扩增)或用于表达。采用常规方法(如通过采用能够特异性地结合到编码抗体的重链和轻链的基因上的寡核苷酸探针)可以很容易分离和测序编码单克隆抗体的 DNA。许多抗体是可以获得的。载体组分通常包括,但是不限于,下面的一种或多种:信号序列,复制起点,一种或多种标记基因,增强子元件,启动子和转录终止序列。

[0413] 信号序列组分

[0414] 不仅可以直接地,而且还可以用具有异源多肽的融合多肽形式重组生产抗 ErbB2 抗体,异源多肽优选为信号序列或在成熟蛋白或多肽的 N 末端具有特定可裂解位点的其他多肽。所选择的异源信号序列优选是被宿主细胞识别和加工(即被信号肽酶断裂)的序列。对于不识别和加工天然的抗 ErbB2 抗体的原核宿主细胞,信号序列被选自碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp 或热稳定肠毒素 II 前导序列的组的原核信号序列取代。对于酵母分泌物,天然信号序列可以被如酵母转化酶前导序列、 α 因子前导序列(包括酵母和克鲁维氏酵母

菌属 α 因子前导序列), 或者酸性磷酸酶前导序列, 白色假丝酵母葡糖淀粉酶前导序列, 或者 WO 90/13646 中描述的信号序列取代。在哺乳动物细胞表达中, 可以获得哺乳动物信号序列以及病毒性分泌前导序列, 例如疱疹单纯 gD 信号序列。

[0415] 这种前体区域的 DNA 可以读框的形式被连接到编码抗 ErbB2 抗体的 DNA 上。

[0416] 复制起点组分

[0417] 表达和克隆载体都含有核酸序列, 该核酸序列使得载体在一种或多种所选择的宿主细胞中是可复制的。一般地, 在克隆载体中, 这种序列是使载体能够独立于宿主染色体 DNA 复制的序列, 包括复制起点或者自动复制序列。这种序列在各种细菌、酵母和病毒中是已知的。质粒 pBR322 的复制起点适合于大多数革兰氏阴性细菌, 2 μ 质粒起点适合于酵母, 而各种病毒起点 (SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV) 对于哺乳动物细胞中的克隆载体是有用的。一般地, 复制起点的起点对于哺乳动物表达载体来说不是必需的 (SV40 起点仅仅是因为其含有早期启动子而通常被使用)。

[0418] 选择基因组分

[0419] 表达和克隆载体可能含有选择基因, 也称作选择标记。典型的选择基因编码蛋白, 该蛋白 (a) 赋予抗生素或其他毒性, 例如氨基青霉素, 新霉素, 氨基蝶呤或四环素, (b) 补体营养缺陷, 或者 (c) 提供不能从复合培养基中获得的关键营养成分, 例如为芽胞杆菌编码 D 丙氨酸消旋酶的基因。

[0420] 选择方案的一个例子采用药物来阻滞宿主细胞生长。那些成功地用异源基因转化的细胞生产赋予药物抗性的蛋白, 从而在选择方案中存活。这种显性选择的例子采用药物新霉素, 霉酚酸和潮霉素。

[0421] 适合用于哺乳动物细胞的选择标记的另一个例子是那些能鉴定细胞的选择标记, 这些细胞具有摄取抗 ErbB2 抗体核酸, 例如 DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白 -I 和 -II, 优选为灵长类金属硫蛋白基因、腺苷脱氨酶, 鸟氨酸脱羧酶等的的能力。

[0422] 例如, 用 DHFR 选择基因转化的细胞最初通过在含有氨基蝶呤 (Mtx)、DHFR 的竞争性拮抗剂的培养基中培养所有转化体来鉴定。当采用野生型 DHFR 时, 合适的宿主细胞是缺乏 DHFR 活性的中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞系。

[0423] 此外, 用编码抗 ErbB2 的抗体的 DNA 序列转化或共转化的宿主细胞 (特别是含有内源 DHFR 的野生型宿主), 野生型 DHFR 蛋白和其他可选择标记, 例如氨基糖苷 3' - 磷酸转移酶 (APH), 可以通过在含有选择试剂的培养基中的细胞生长来选择可选择标记, 例如氨基糖苷抗生素, 例如卡那霉素、新霉素或 G418。参见美国专利 4,965,199。

[0424] 用于酵母中的合适选择基因是存在于酵母质粒 YRp7 中的 trp 1 基因 (Stinchcomb 等, Nature, 282:39 (1979))。trp1 基因提供一种选择缺乏在色氨酸中生长的能力的酵母突变菌株的选择标记, 例如, ATCC No. 44076 或 PEP4-1。Jones, Genetics, 85:12 (1977)。在酵母宿主细胞基因组中存在 trp1 损伤, 提供用于通过在缺乏色氨酸时的生长来检测转化的有效环境。类似地, Leu2 缺陷的酵母菌株 (ATCC 20,622 或 38,626) 用携带 Leu2 基因的已知质粒互补。

[0425] 此外, 衍生自 1.6 μ m 环状质粒 pKD1 的载体可以被用于克鲁维氏酵母的转化。可选择地, 用于大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统被报道用于乳克鲁维氏酵母 (K. lactis)。Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)。用于通过工业用克鲁维氏酵

母菌株分泌成熟重组人血清白蛋白的稳定的多拷贝表达载体也已经被公开。Fleer 等, *Bio/Technology*, **9**:968-975 (1991)。

[0426] 启动子组分

[0427] 表达和克隆载体通常含有被宿主生物体识别的启动子, 并且启动子被可操作地连接到抗 ErbB2 抗体核酸上。适合用于原核宿主的启动子包括 *phoA* 启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色氨酸 (*trp*) 启动子特性和杂合启动子, 例如 *tac* 启动子。但是, 其他已知细菌启动子也是合适的。用于细菌系统的启动子也将含有被可操作地连接到编码抗 ErbB2 抗体的 DNA 上核糖体结合序列 (SD 序列)。

[0428] 真核细胞的启动子序列是已知的。实际上所有真核基因具有富含 AT 的区域, 位于转录起始位点上游约 25-30 个碱基处。另一种存在于许多基因的转录起始上游的 70-80 个碱基处的序列是 CNCAAT 区, 其中 N 可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的 3' 端为 AATAAA 序列, 其可作为将聚腺苷酸尾加到编码序列的 3' 端的信号。所有这些序列被合适地插入到真核表达载体中。

[0429] 用于酵母宿主的合适起始序列的例子包括 3-磷酸甘油酸激酶或其他糖分解酶的启动子, 例如烯醇酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸异构酶、磷酸葡糖异构酶和葡糖激酶。

[0430] 其他酵母启动子, 其是具有受生长条件控制的额外转录优势的可诱导启动子, 是醇脱氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关的降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。用于酵母表达的合适载体和启动子进一步被描述在 EP 73, 657 中。酵母增强子还有利地与酵母启动子一起使用。

[0431] 抗 ErbB2 抗体从哺乳动物宿主细胞的载体加以转录是受例如获自病毒基因组的启动子控制, 这些病毒例如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒 (例如腺病毒 2)、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒和最优选的猿猴病毒 40 (SV40), 来自异源哺乳动物的启动子控制, 例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子, 来自热休克启动子的控制, 只要该启动子与宿主细胞系统相容。

[0432] SV40 病毒的早期和晚期启动子方便地作为 SV40 的限制性片段获得, 该片段还含有 SV40 病毒的复制起点。人巨细胞病毒的即刻早期启动子便利地作为 HindIII E 限制性片段获得。采用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达 DNA 的系统被公开在美国专利 4, 419, 446 中。该系统的改进在美国专利 4, 601, 978 中被描述。还可以参见 Reyes 等, *Nature*, **297**:598-601 (1982) 关于在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子控制下表达 β -干扰素 cDNA 的描述。可选择地, 劳斯肉瘤病毒长末端重复序列可以被用作启动子。

[0433] 增强子元件组分

[0434] 经常通过将增强子序列插入载体来提高通过高等真核细胞转录编码本发明的抗 ErbB2 抗体的 DNA。目前已经知晓许多来自哺乳动物基因的增强子序列 (球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、甲胎蛋白和胰岛素)。然而, 典型地可以使用来自真核细胞病毒的增强子。该例子包括位于复制起点的晚期侧 (bp 100-270) 的 SV40 增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起点晚期侧的多瘤病毒增强子, 和腺病毒增强子。还可以参见 Yaniv, *Nature*,

297:17-18(1982) 关于激活真核启动子的增强元件的描述。增强子还可以被剪接到载体的抗 ErbB2 抗体编码序列的 5' 或 3' 位置上,但是优选位于启动子的 5' 位置上。

[0435] 转录终止组分

[0436] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其他多细胞生物体的有核细胞)中的表达载体也含有转录终止和稳定 mRNA 所需的序列。这种序列通常从真核或病毒 DNA 或 cDNA 的 5' 端和,偶尔从 3' 端,非翻译区获得。这些区域含有在编码抗 ErbB2 抗体的 mRNA 的非翻译部分作为多聚腺苷酸片段被转录的核苷酸片段。一种有用的转录终止组分是牛生长激素多聚腺苷酸区域。参见 W094/11026 以及其中描述的表达载体。

[0437] 宿主细胞的选择和转化

[0438] 用于在载体中克隆或表达 DNA 的合适宿主细胞在此是上文描述的原核细胞、酵母或高等真核细胞。用于该目的合适原核生物包括真细菌,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠细菌属(Enterobacteriaceae),例如埃希氏菌属,如大肠杆菌,肠杆菌属(Enterobacter),欧文氏杆菌属(Erwinia),克雷白氏杆菌属(Klebsiella),变形杆菌属(Proteus),沙门氏菌属(Salmonella),例如,鼠伤寒沙门氏杆菌(Salmonella typhimurium),沙雷氏菌属(Serratia),例如粘质沙雷氏菌(Serratia marcescans),和志贺菌属(Shigella),以及芽胞杆菌(Bacilli)例如枯草芽孢杆菌(B. Subtilis)和地衣芽孢杆菌(B. Licheniformis)(例如 1989 年 4 月 12 日公开在 DD 266,710 中的地衣芽孢杆菌 41P),假单胞菌(Pseudomonas)例如铜绿假单胞菌(P. aeruginosa),和链霉菌(Streptomyces)。虽然其他菌株例如大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌 W3110(ATCC 27,325)是合适的,优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌 294(ATCC31,446)。这些例子是说明性的,而不是限制性的。

[0439] 除了原核微生物,真核的微生物例如丝状真菌或者酵母是抗 ErbB2 抗体编码载体的合适克隆或表达宿主。酿酒酵母或者通常的面包(baker)酵母最普遍地被用于低等真核宿主微生物中。但是,大量其他属、种和菌株也是通常获得并在此有用的,例如粟酒裂殖糖酵母(Schizosaccharomyces pombe);克鲁维氏酵母(Kluyveromyces)宿主例如乳克鲁维氏酵母、脆壁克鲁维氏酵母(ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维氏酵母(ATCC 16,045)、威克曼氏克鲁维氏酵母(ATCC24,178)、K. waltii(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维氏酵母(ATCC 36,906)、耐热克鲁维氏酵母 K. thermotolerans 和马克斯克鲁维氏酵母;yarrowia(EP 402,226);巴斯德毕赤氏酵母(Pichia pastoris)(EP183,070);假丝酵母属(Candida);Trichoderma reesia(EP 244,234);粗糙链胞霉(Neurospora crassa);许旺氏酵母例如西方许旺氏酵母;和丝状真菌例如脉胞菌(Neurospora),青霉菌(Penicillium),Tolypocladium,和曲霉菌(Aspergillus)宿主例如构巢曲霉和黑曲霉(A. niger)。

[0440] 用于表达糖基化的抗 ErbB2 抗体的合适宿主来自多细胞生物体。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。许多来自例如草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)(毛虫)、埃及伊蚊(蚊子)、白纹伊蚊(蚊子)、黑腹果蝇(果蝇)和家蚕(Bombyx mori)的杆状病毒菌株和突变体以及相应允许昆虫宿主细胞已经被确定。各种用于转染的病毒株是公众可以获得的,例如苜蓿银斜纹夜蛾(Autographa californica)NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 株,而且这些病毒可以被用作按照本发明的病毒,特别地用于草地夜蛾细胞的转染。

[0441] 棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛花、西红柿和烟草的植物细胞培养物也可以被用

作宿主。

[0442] 但是,脊椎动物细胞是最令人感兴趣的,在培养物中繁殖脊椎动物细胞(组织培养)已经是常规操作。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子是用SV40转化的猴肾CV1系(COS-7, ATCC CRL 1651);人胚胎肾系(293或在悬浮培养物中生长的亚克隆293细胞, Graham等, *J. Gen. Virol.*, **36**:59(1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR(CHO, Urlaub等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**:4216(1980));小鼠滋养细胞(TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, **23**:243-251(1980));猴肾细胞(CV1ATCC CCL 70);非洲绿猴肾细胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);人宫颈癌细胞(HELA, ATCC CCL 2);犬肾细胞(MDCK, ATCC CCL 34);buffalo大鼠肝细胞(BRL 3A, ATCC CRL1442);人肺细胞(W138, ATCC CCL 75);人肝细胞(Hep G2, HB 8065);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562, ATCC CCL51);TRI细胞(Mather等, *Annals N. Y. Acad. Sci.*, **383**:44-68(1982));MRC 5细胞;ES4细胞;和人肝细胞瘤系(Hep G2)。

[0443] 宿主细胞用上面描述的用于抗ErbB2抗体生产的表达或克隆载体转化,并且培养在常规的营养培养基中,该培养基被改进以适合诱导启动子、选择转化体或者扩增编码期望序列的基因。

[0444] 培养宿主细胞

[0445] 用于生产本发明的抗ErbB2抗体的宿主细胞可以在各种培养基中培养。商业上可以购买得到的培养液例如Ham's F10(Sigma)、Minimal Essential Medium((MEM), (Sigma)、RPMI-1640(Sigma)和Dulbecco's Modified Eagle's Medium((DMEM), Sigma)都适合用于培养宿主细胞。此外,任何在Ham等, *Meth. Enz.*, **58**:44(1979), Barnes等, *Anal. Biochem.*, **102**:255(1980), 美国专利4,767,704;4,657,866;4,927,762;4,560,655;或5,122,469;WO 90/03430;WO 87/00195;或美国专利Re. 30,985中描述的培养基可以被用作宿主细胞的培养基。任何这些培养基可以必要地添加激素和/或其他生长因子(例如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子)、盐(例如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲液(例如HEPES)、核苷酸(例如腺苷和胸苷)、抗生素(例如GENTAMYCIN[®]药物)、微量元素(定义为通常以微摩尔范围的最终浓度存在的无机化合物),和葡萄糖或相当的能量来源。还可以包括本领域技术人员知晓的合适浓度的任何其他需要的添加剂。培养条件,例如温度、pH等是先前用于被选择来表达的宿主的那些条件,并且对本领域技术人员来说是显然的。

[0446] 抗ErbB2抗体的纯化

[0447] 当采用重组技术时,抗体在细胞内、周质间隙中生成,或者直接分泌到培养基中。如果在细胞内生成抗体,作为第一步,例如,通过离心或者超滤去除颗粒碎片,宿主细胞或者裂解碎片。Carter等, *Bio/Technology*, **10**:163-167(1992)描述用于分离抗体的操作,抗体被分泌到大肠杆菌的周质间隙。简而言之,在存在醋酸钠(pH3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)时,解冻细胞糊超过约30分钟。可以通过离心去除细胞碎片。当抗体被分泌到培养基中时,通常首先采用商业上可购买得到的蛋白质浓缩滤器,例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元,浓缩得自该表达系统的上清液。在任何先前的步骤中可以包括蛋白酶抑制剂例如PMSF来抑制蛋白质水解,也可以包括抗生素来防止外来的污染物的生长。

[0448] 制备自细胞的抗体组合物可以被纯化,采用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析,亲和层析是优选的纯化技术。蛋白A作为亲和配基的合适程度取决于抗体中存

在任何免疫球蛋白 Fc 结构域的种类和同种型。蛋白 A 可以被用于纯化基于人 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重链的抗体 (Lindmark 等, J. Immunol. Meth., 62:1-13(1983))。蛋白 G 被推荐用于所有小鼠的同种型和人 $\gamma 3$ (Guss 等, EMBO J, 5:15671575(1986))。亲合配基附着的基质最普遍为琼脂糖,但是也可以使用其他基质。机械上稳定的基质例如控制孔的玻璃或者多聚(苯乙烯二乙烯)苯,具有比琼脂糖所能达到的更高的流速和更短的处理时间。当抗体包含 CH3 结构域时, Bakerbond ABX™ 树脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) 被用于纯化。根据回收的抗体,还可以采用其他用于蛋白质纯化的技术,例如在离子交换柱上进行分馏、乙醇沉淀、反相 HPLC、在硅石上进行层析,在肝素琼脂糖上层析,在阴离子或阳离子交换树脂(例如多聚天冬氨酸柱)上层析,色谱聚焦, SDS-PAGE, 以及硫酸胺沉淀。

[0449] 在初步纯化步骤之后,包含目标抗体和污染物的混合物进行低 pH 的疏水相互作用层析,采用 pH 为约 2.5-4.5 之间的洗脱缓冲液,优选在低盐浓度下进行(例如从约 0-0.25M 盐)。

[0450] 药物制剂

[0451] 用于根据本发明的抗体的治疗制剂通过将具有期望纯度的抗体与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合被制备来用于以冻干制剂形式或者水溶液形式进行存储。(雷明顿药物科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences) 第 16 版, Osol, A. 编辑 (1980)), 可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用的剂量和浓度下对于受者来说是无毒的,并且包括缓冲液,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(例如十八烷基二甲基苯基氯化铵;氯化己烷双胺;苯扎氯胺;苄乙胺;苯酚,丁基或苯甲醇;烷基对羟基苯甲酸酯例如甲基或丙基对羟基苯甲酸酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间-甲苯酚);小分子量(少于约 10 个残基)多肽;蛋白质,例如血清白蛋白,明胶或者免疫球蛋白;亲水聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其他碳水化合物包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂例如 EDTA;糖例如蔗糖,甘露糖醇,海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子 (salt-forming counter-ions) 例如钠;金属复合物(例如 Zn 蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂例如 TWFEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。优选的冻干抗 ErbB2 抗体制剂被描述在 WO 97/04801 中,特别地在此引入作为参考。

[0452] 本文的制剂还可以含有受处理的特定适应症所需的一种以上活性化合物,优选是那些具有不会相互产生不利影响的互补活性的化合物。例如,期望在一个制剂中还进一步提供结合 EGFR, ErbB2(例如结合到 ErbB2 的不同表位上的抗体)、ErbB3、ErbB4 或血管上皮因子 (VEGF) 的抗体。可选择地或另外地,该组合物还进一步可以包含化学治疗剂、细胞毒性剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂、EGFR 靶向药物、抗血管生成剂,和/或心脏保护剂。这种分子适合以有效用于所需目的的含量而结合存在。

[0453] 在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊)或者在大分子乳剂中,活性成分还可以被包裹在例如通过凝聚技术或者通过界面聚合制备的微囊中,例如分别为羟甲基纤维素或者明胶微囊和 poly-(methylmethacrylate) 微囊。这种技术被描述在雷明顿药物科学第 16 版, Osol, A. 编辑, (1980) 中。

[0454] 可以制备缓释制备物。缓释制备物的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半通透性基质,这种基质是成形物品的形式,例如,膜或者微囊。缓释基质的例子包括

聚酯、水凝胶（例如多聚（2-羟基乙基异丁烯酸）或者多聚（乙烯醇））、聚交酯（美国专利 3,773,919）、L-谷氨酸和 γ -乙基 L-谷氨酰胺的共聚物、不可降解的乙烯乙基乙酸、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物例如 LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和 leuprolide acetate 组成的可注射微球），和多聚 D-(-)-3-羟基丁酸。

[0455] 用于体内施用的制剂必须被灭菌。这很容易地通过灭菌滤膜过滤来实现。

[0456] 用抗 ErbB2 的抗体治疗

[0457] 可以预期，按照本发明，抗 ErbB2 抗体可以被用于治疗各种疾病或紊乱。示例性的症状或紊乱包括良性的或恶性的肿瘤；白血病和淋巴恶性肿瘤；其他的紊乱例如神经元的、神经胶质的、星形胶质细胞的、下丘脑的、腺的、巨噬细胞的、上皮的、基质的、囊胚的、炎症性的、血管生成的和免疫学的紊乱。优选地，抗 ErbB2 的抗体被用于治疗被鉴定为对用这种抗体通过本文公开的方法治疗响应的肿瘤。

[0458] 一般地，将被治疗的疾病或紊乱是癌症。在此将被治疗的癌症的例子包括，但是不限于，癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或者淋巴恶性肿瘤。这种癌症的更加特别的例子包括鳞状细胞癌（例如上皮鳞状细胞癌），肺癌包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌，腹膜癌，肝细胞癌，胃的或者胃癌包括胃肠癌，胰腺癌，成胶质细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，肝细胞瘤，乳腺癌，结肠癌，直肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜或子宫癌，唾液腺癌，肾脏或肾癌，前列腺癌，阴门癌，甲状腺癌，肝癌，肛门癌，阴茎癌，以及头部和颈部癌。优选地，被治疗的癌症被鉴定为对用抗 ErbB2 的抗体处理响应，该响应是基于肿瘤样本中对 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 异二聚体的鉴定或者 ErbB 受体的磷酸化。其中 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 异二聚体形成和 / 或 ErbB 受体磷酸化期望被检测的特定的一组癌症包括，但是不限于肺乳腺癌、肺癌、卵巢癌，包括进展的、难治的或者周期性发生的卵巢癌、前列腺癌，结肠直肠癌和胰腺癌。

[0459] 癌通常包含表达 ErbB2 的细胞，使得此处的抗 ErbB2 抗体能够结合到癌上。虽然癌可以被表征为过度表达 ErbB2 受体，本申请进一步提供一种用于治疗不被认为是过度表达 ErbB2 的癌症的方法。为了确定癌中的 ErbB2 表达，可以采用各种诊断的 / 预后的分析。在一个实施方案中，可以通过 IHC 分析 ErbB2 过度表达，例如采用 HERCEPTEST® (Dako)。来自肿瘤活组织检查的石蜡包埋的组织切片可以被用于 IHC 分析，并给予如下的 ErbB2 蛋白质染色强度标准：

[0460] 分值 0

[0461] 没有观察到染色或者在少于 10% 的肿瘤细胞中观察到膜染色。

[0462] 分值 1+

[0463] 在超过 10% 肿瘤细胞中检测到浅的 / 刚刚可察觉的膜染色。该细胞仅部分膜被染色。

[0464] 分值 2+

[0465] 在超过 10% 的肿瘤细胞中观察到微弱到中度的完整膜染色。

[0466] 分值 3+

[0467] 在超过 10% 的肿瘤细胞中观察到中度到强烈的完整膜染色。

[0468] 那些在 ErbB2 过度表达评价中具有 0 或 1+ 分值的肿瘤可被表征为不过度表达 ErbB2，而那些具有 2+ 或 3+ 分值的肿瘤可被表征为过度表达 ErbB2。

[0469] 可选择地或者另外地, FISH 分析例如 INFORM™(Ventana, Arizona 销售) 或 PATHVISION™(Vysis, Illinois) 可以在福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织上进行来确定肿瘤中 ErbB2 的过度表达(如果有)的程度。

[0470] 在一个实施方案中, 该癌症可以是表达(可能, 但是不是必需, 过度表达)EGFR 的癌症。表达/过度表达 EGFR 的癌症的例子包括鳞状细胞癌症(例如上皮鳞状细胞癌症), 肺癌包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC), 肺腺癌和肺鳞状细胞癌, 腹膜癌, 肝细胞癌, 胃的或胃癌包括胃肠癌, 胰腺癌, 成胶质细胞瘤, 宫颈癌, 卵巢癌, 肝癌, 膀胱癌, 肝细胞瘤, 乳腺癌, 结肠癌, 直肠癌, 结肠直肠癌, 子宫内膜或子宫癌, 唾液腺癌, 肾或者肾的癌, 前列腺癌, 阴门癌, 甲状腺癌, 肝癌, 肛门癌, 阴茎癌以及头部和颈部癌症。

[0471] 本发明特别适合用于鉴定乳腺癌、前列腺癌, 例如阉割抗性前列腺癌(CRPC), 以及卵巢癌患者, 这些患者可能对用抗 HER2 抗体治疗产生良好的应答, 抗 HER2 抗体阻断包含 HER2 的 ErbB 异二聚体的配基活化, 例如单克隆抗体 2C4 或 rhuMAb 2C4。

[0472] 在此治疗的癌症可以是特征为 ErbB 受体例如 EGFR 过度活化的癌症。这种过度活化可能是由于 ErbB 受体或 ErbB 配基过度表达或者产量升高。在本发明的一个实施方案中, 可以进行诊断的或者预后的分析来确定患者的癌症其特征是否为 ErbB 受体过度活化。例如, 可以确定癌中 ErbB 基因扩增和/或 ErbB 受体过度表达。用于确定这种扩增/过度表达的各种分析在本领域是可以获得的, 并且包括上面描述的 IHC、FISH 和脱落抗原(shed antigen)分析。可选择地或者另外地, 肿瘤中或与肿瘤相关的 ErbB 配基的含量, 例如 TGF- α , 可以按照已知的操作来确定。这种分析可以检测被检测的样本中的蛋白质和/或编码蛋白质的核酸。在一个实施方案中, 可以采用免疫组织化学(IHC)确定肿瘤中的 ErbB 配基水平; 参见例如, Scher 等, Clin. Cancer Research, 1:545-550(1995)。可选择的或者另外地, 可以例如通过 FISH、DNA 印迹或 PCR 技术评价被检测的样本中的 ErbB 配基编码核酸的水平。

[0473] 此外 ErbB 受体或 ErbB 配基过度表达或者扩增可以采用体内诊断分析来评价, 例如通过施用结合到将被检测的分子上并且用可检测标记(例如放射性同位素)标引的分子(例如抗体), 并从外部扫描患者来对标记定位。

[0474] 当被治疗的癌症是不依赖于激素的癌症时, 肿瘤中激素(例如雄性激素)和/或其相关受体的表达可以采用各种可以获得的分析方法中的任何方法来评价, 例如上面所描述的方法。可选择地或者另外地, 患者可能被诊断为患有不依赖激素的癌症, 其中这些癌症不再对抗雄性激素的治疗有反应。

[0475] 在一些实施方案中, 包含被偶联到细胞毒性剂上的抗 ErbB2 抗体的免疫偶联物被施用给患者。优选地, 免疫偶联物和/或其所结合的 ErbB2 蛋白被细胞内化, 导致免疫偶联物杀死其所结合的癌细胞的治疗功效被提高。在优选实施方案中, 细胞毒性剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。这种细胞毒性剂的例子包括美登木素生物碱、加利车霉素、核糖核酸酶和 DNA 核酸内切酶。

[0476] 在特定实施方案中, 被施用的抗体是 rhuMAb 2C4, 或其功能性等价物。RhuMAb 2C4 是基于人 IgG1 骨架序列的人源化的单克隆抗体, 由两条重链(449 个残基)和两条轻链(214 个残基)组成。RhuMAb 2C4 在轻链和重链的表位结合区域上显著地区别于另一抗 HER2 抗体 HERCEPTIN®(Trastuzumab)。结果, rhuMAb 2C4 结合到 HER2 上的完全不同的表位

上。本发明提供用于检测对用 rhuMAb 2C4 或其功能性等价物处理响应的癌症的灵敏的方法。应当指出,这种对 rhuMAb 2C4 处理响应的癌症不要求是过度表达 HER2。

[0477] 按照已知的方法,例如静脉内给药,例如大药丸或者在一段时间内通过连续灌注,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内 (intracerebrospinal)、皮下、关节内、滑液内、壳膜内、口服、局部或者吸入路径将抗 ErbB2 抗体或免疫偶联物施用给人类患者。静脉内或皮下施用抗体是优选的。

[0478] 其他的治疗方案可以与施用抗 ErbB2 抗体组合。组合施用包括共施用,采用分离的制剂或者单一的药物制剂,以及以任何顺序的连续施用,其中优选存在一段两种 (或全部) 的活性试剂同时产生其生物学活性的时期。

[0479] 在一个特定实施方案中,患者用两种不同的抗 ErbB2 抗体治疗。例如,患者可以用阻断 ErbB 受体的配基活化的第一抗 ErbB2 抗体或者具有单克隆抗体 2C4 的生物学特征的抗体,以及抑制生长的第二抗 ErbB2 抗体 (例如 HERCEPTIN[®]) 或诱导过度表达 ErbB2 的细胞凋亡的抗 ErbB2 抗体 (例如,7C2,7F3 或其人源化变体) 处理。优选地,这种组合治疗方法导致协同的治疗作用。例如,可以用 HERCEPTIN[®] 治疗患者,然后用 rhuMAb 2C4 治疗,例如当患者对 HERCEPTIN[®] 治疗没有反应时。在另一个实施方案中,患者首先用 rhuMAb 2C4 治疗,然后接受 HERCEPTIN[®] 治疗。在还有另一个实施方案中,患者可以同时用 rhuMAb 2C4 和 HERCEPTIN[®] 治疗。

[0480] 还期望将施用抗 ErbB2 抗体或多个抗体,与施用针对另一种肿瘤相关抗原的抗体组合。在这种情况下,其他抗体可以例如结合 EGFR、ErbB3、ErbB4 或血管内皮生长因子 (VEGF)。

[0481] 在一个实施方案,本发明的处理包括组合施用抗 ErbB2 抗体 (或者多个抗体) 以及一种或多种化疗剂或者生长抑制剂,包括共施用不同化学治疗剂的混合物,优选的化疗剂包括优选的化疗剂包括紫杉烷二萜 (taxane) (例如泰素和多西他赛) 和 / 或蒽环霉素抗生素。这种化疗剂的制备和剂量方案可以按照生产商推荐或者如通过熟练技术人员经验性确定来使用。用于这种化疗剂的制备和剂量方案也被描述在 Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD(1992) 中。

[0482] 抗体可以以这种抗激素化合物的已知剂量与抗激素化合物组合;例如抗雌激素化合物如他莫西芬;抗孕酮如奥那斯酮 (参见 EP 616812);或抗雄性激素例如氟他胺。当被治疗的癌症是不依赖于激素的癌症时,患者可以先进行抗激素治疗,在癌症变为激素不依赖后,给患者施用抗 ErbB2 抗体 (以及任选地在此所描述的其他试剂)。

[0483] 有时,给患者共施用心脏保护剂 (来防止或者降低与治疗相关的心肌功能障碍) 或者一种或多种细胞因子是有益的。还可以共施用 EGFR 靶向药物或者抗血管生成剂。除了上述治疗方案外,可以对患者手术去除癌细胞和 / 或放射治疗。

[0484] 在此抗 ErbB2 抗体还可以与 EGFR 靶向的药物组合,这些药物如在定义部分中讨论的会产生互补的、和潜在的协同治疗作用的那些药物。

[0485] 可以与抗体组合的其他药物的例子包括化疗剂,例如卡铂、紫杉烷二萜 (taxane) (例如泰素或多西他赛)、吉西他滨、失碳长春碱、顺铂、奥沙利铂,或任何这些药物的组合例如卡铂 / 多西他赛;其他的抗 HER2 抗体 (例如生长抑制性抗 HER2 抗体,例如 HERCEPTIN[®],或诱导凋亡的抗 HER2 抗体,例如 7C2 或 7F3,包括其人源化的或亲合成熟

的变体);法呢基转移酶抑制剂;抗血管生成剂(例如,抗 VEGF 抗体);EGFR 靶向药物(例如,C225 或 ZD1839);细胞因子(例如,IL-2、IL-12、G-CSF 或 GM-CSF);或上面这些的组合。

[0486] 任何上述的共施用的试剂的适合剂量是目前使用的那些,并且由于试剂和抗 ErbB2 抗体的组合作用(协同作用),可以被降低。

[0487] 对于疾病的预防或治疗,适合的抗体剂量将取决于如上所定义的被治疗的疾病的类型,无论抗体被施用以用于预防或治疗目的的疾病的严重程度和进程,先前的治疗、患者的病史和对抗体的反应,以及主治医师的判断。抗体被一次或者经过一系列治疗被合理地施用给患者。根据疾病的类型和严重性,约 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 到 $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如 $0.1\text{--}20\text{mg}/\text{kg}$) 抗体是施用给患者的起始候选剂量,无论是,例如,通过一次或多次分开施用,或者通过连续灌注。典型的日剂量可以在 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 到 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更高的范围内,取决于上面提及的因素。对于在数天或更长时间内重复施用,根据症状,持续进行治疗直到产生期望的对疾病的抑制。优选的抗体剂量将在约 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 到约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 范围内。因此,可以给患者施用一个或多个约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 或 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量(或者它们的任意组合)。这种剂量可以被间断地施用,例如每周或每三周(例如,使得患者接受约 2 个到约 20 个,例如约 6 个剂量的抗 ErbB2 抗体)。施用起始的较高的载入剂量,接着施用一个或多个较小的剂量。示例性的剂量方案包括施用约 $4\text{mg}/\text{kg}$ 的起始载入剂量,接着约 $2\text{mg}/\text{kg}$ 抗 ErbB2 抗体的每周维持剂量。但是,其他剂量方案也是有用的。这种治疗的进展很容易通过常规技术和分析方法来监控。

[0488] 在特定实施方案中,rhuMAb 2C4 以 420mg 的固定剂量(相当于 70kg 体重的个体 $6\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量)被每三周施用。治疗以较高的载入剂量开始(例如 840mg ,相当于 $12\text{mg}/\text{kg}$ 体重)以更加迅速地达到稳定状态的血清浓度。特定的剂量方案也被提供在下面的实施例中。

[0489] 除了将抗体蛋白施用给患者,本申请还考虑了通过基因治疗来施用抗体。这种施用编码抗体的核酸包括在“施用治疗有效量的抗体”的表述中。参见,例如 1996 年 3 月 14 日公开的 WO 96/07321,其涉及使用基因治疗来产生细胞内抗体。

[0490] 有两种主要方法来将核酸(优选被含在载体中)体内和回体(ex vivo)地导入患者细胞中;对于体内递送,核酸被直接注射给患者,通常在需要抗体的部位。对于回体治疗,患者细胞被取出,将核酸导入到这些被分离的细胞中,被修饰的细胞被直接地或者例如被包囊在被植入患者中的多孔膜中,施用给患者,(参见例如,美国专利 4,892,538 和 5,283,187)。有各种技术可以用于将核酸导入活细胞中。根据核酸被体外转化到培养细胞或者体内转化到预期宿主的体内细胞中,这些技术是不同的。适合用于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞的技术包括使用脂质体、电穿孔、微注射、细胞融合、DEAE-葡聚糖、磷酸钙沉淀方法等。用于基因回体递送的常用载体是逆转录病毒。

[0491] 普遍优选的体内核酸转移技术包括用病毒载体(例如腺病毒,单纯疱疹 I 病毒或者腺伴随病毒)转染和以脂质为基础的系统(用于基因的脂质介导的转移的有用脂质是,例如 DOTMA、DOPE 和 DC-Chol)。在某些情况下,期望用靶向目标细胞的试剂提供核酸来源,例如特异于细胞表面膜蛋白或者目标细胞的抗体,目标细胞的受体的配基等。当采用脂质体时,结合到与细胞内吞作用相关的细胞表面膜蛋白的蛋白可以被用于靶向和/或方便摄取,例如趋向(tropic)特定细胞类型的衣壳蛋白或其片段,在循环中进行内在化的蛋白质

的抗体,和靶向细胞内定位和增强细胞内半衰期的蛋白质。受体介导的内吞作用的技术被描述,例如在 Wu 等, J. Biol. Chem., 262:4429-4432(1987);和 Wagner 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:3410-3414(1990) 中。对目前已知的基因制备和基因治疗方案的评论参见 Anderson 等, Science, 256:808-813(1992)。还可以参见 WO 93/25673 和其中引用的参考文献。

[0492] 制品

[0493] 在本发明的另一个实施方案中,提供了含有用于治疗上面描述的紊乱的材料的制品。

[0494] 制品包含一个容器和在容器上或者与容器关联的标签或包装插入物。合适的容器包括,例如瓶子、小管、注射器等。容器可以由各种材料形成,例如玻璃或塑料。容器中装有有效治疗症状的组合物,可能具有无菌的存取口 (access port) (例如该容器是静脉溶液袋或者具有可以被皮下注射针头穿过的塞子的小管)。组合物中至少一种活性试剂是抗 ErbB2 抗体。标签或包装插入物指明该组合物是用于治疗特定的症状,例如癌症。在一个实施方案中,标签或包装插入物指明包含结合 ErbB2 的抗体的组合物可以被用于治疗患有肿瘤的患者,该肿瘤中已经鉴定了存在 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER4 复合物,和 / 或已经检测到 ErbB 受体的磷酸化。而且,制品可以包含 (a) 其中含有组合物的第一容器,其中该组合物包含结合 ErbB2 并抑制 ErbB2 过度表达的癌细胞生长的第一抗体;和 (b) 其中含有组合物的第二容器,其中该组合物包含结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配基活化的第二抗体。在本发明的这个实施方案中,制品可进一步包含指明第一和第二抗体组合物可以被用于治疗癌症的包装插入物,该癌症的特征在于存在 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER4 异二聚体,和 / 或 ErbB 受体磷酸化。而且包装插入物可能教导组合物 (包含结合 ErbB2 并阻断 ErbB 受体的配基活化的抗体) 的使用者将用抗体治疗以及任何在前面部分描述的辅助治疗 (例如化疗剂,EGFR 靶向药物,抗血管生成剂,抗激素化合物,心脏保护剂和 / 或细胞因子) 组合。可选择地或者另外地,制品可进一步包含第二个 (第三个) 容器,其包含药学上可接受的缓冲液,例如用于注射的抑菌水 (BWF1)、磷酸缓冲盐水、林格液和葡萄糖液。还可以进一步包括商业或用户角度期望的其他物质,包括其他的缓冲液、稀释剂、滤器、针头和注射器。

[0495] 抗体还可以被用于诊断分析。一般地,抗体如上面的方法所描述被标记。为了方便,本发明的抗体可以在试剂盒中提供,即试剂以预定的含量与实施诊断分析的说明书一起包装组合。当抗体用酶标记时,该试剂盒将包括底物和酶所需的辅助因子 (例如提供可检测的生色团或荧光团的底物前体)。此外,可以包括其他添加剂,例如稳定剂、缓冲液 (例如阻断缓冲液或溶解缓冲液) 等。各种试剂的相对含量可以广泛地变化来在试剂液提供一定浓度,该浓度充分地优化分析的灵敏度。特别地,试剂可以以通常是冻干的粉末形式提供,包括溶解后提供具有合适浓度的试剂液的赋形剂。

[0496] 材料保藏

[0497] 如下的杂交瘤细胞系已经被保藏在美国典型培养物保藏中心,10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, 美国 (ATCC):

[0498]

抗体名称	ATCC 号	保藏日期
7C2	ATCC HB-12215	1996 年 10 月 17 日
7F3	ATCC HB-12216	1996 年 10 月 17 日
4D5	ATCC CRL 10463	1990 年 5 月 24 日
2C4	ATCC HB-12697	1999 年 4 月 8 日

[0499] 前面所撰写的说明书足以使本领域技术人员实施本发明。由于保藏的实施用于说明仅仅是发明的某些方面,并且任何功能相当的构建体属于本发明的保护范围,本发明将不被限制在被保藏的构建体的范围内。此处的材料保藏并不是承认本文包含的所撰写的说明书不足以实现本发明的任何方面,包括其最佳实施方式,也不被解释为限制权利要求的范围。实际上,根据前面的描述,除了本文给出和描述的那些外,本发明的各种改进对本领域技术人员来说是显而易见的,并且落入附随的权利要求书的范围内。

[0500] 应当理解,按照本文包含的教导,将本发明的教导应用于特定问题或情形属于本领域技术人员能力范围内的事。

[0501] 本发明的更加详细内容将通过如下的非限制性实施例来阐明。所有在说明书中引用的文献的公开在此特别地被引入作为参考。

[0502] 实施例 1

[0503] HRG 依赖的 ErbB2 与 ErbB3 的结合被单克隆抗体 2C4 阻断

[0504] WO 01/89566 中描述了特异性地结合 ErbB2 的细胞外结构域的鼠单克隆抗体 2C4,该文献公开的内容在此特别地全文引入作为参考。

[0505] 在共免疫沉淀实验中检测 ErbB3 与 ErbB2 的联合能力。1.0×10⁶MCF7 或 SK-BR-3 细胞被植入含有 10% 胎牛血清 (FBS) 和 10mM HEPES, pH 7.2 的 50 : 50DMEM/Ham' s F12 培养基 (生长培养基) 的 6 孔组织培养平板中,并使其附着过夜。在开始实验前,细胞在无血清的生长培养基中饥饿 2 小时。用磷酸缓冲盐水 (PBS) 简单地洗涤细胞,然后与稀释在 0.2% w/v 牛血清白蛋白 (BSA)、具有 10mM HEPES, pH7.2 的 RPMI 培养基 (结合缓冲液) 中 100nM 指定抗体,或者仅与结合缓冲液 (对照) 一起孵育。在室温下 1h 后,HRG 以 5nM 终浓度加到半数孔中 (+)。将类似体积的结合缓冲液加到其他孔中 (-)。继续孵育约 10 分钟。

[0506] 吸取以去除上清液,在含有 0.2mM PMSF、10 μg/ml 亮抑酶肽和 10TU/ml 抑酶肽的 RPMI, 10mM HEPES, pH 7.2, 1.0% v/v TRITON X-100TM, 1.0% w/v CHAPS (裂解缓冲液) 中裂解细胞。通过离心来去除裂解液中的不溶物质。

[0507] 用共价偶联到亲和凝胶 (Affi-Prep 10, Bio-Rad) 上的单克隆抗体免疫沉淀 ErbB2。这一抗体 (Ab-3, Oncogene Sciences, USA) 识别胞质结构域表位。通过往每一裂解物中加入 10 μl 的含有约 8.5 μg 固定抗体的凝胶浆液来进行免疫沉淀,样本在室温下混合 2h。然后通过离心来收集凝胶。用裂解缓冲液批量洗涤凝胶三次来去除未被结合的物质。然后加入 SDS 样本缓冲液,在沸腾的水浴中简单地加热样本。

[0508] 在 4-12% 聚丙烯酰胺凝胶对上清液进行电泳,电印迹到硝化纤维膜上。通过用抗 ErbB3 的胞质结构域表位的多克隆抗体 (c-17, Santa Cruz Biotech) 探查印迹来评价是否存在 ErbB3。用化学发光底物 (ECL, Amersham) 来观察印迹。

[0509] 如在分别对应于 MCF7 和 SK-BR-3 细胞的附图 2A 和 2B 的对照泳道所示, ErbB3 存

在于仅当细胞用 HRG 刺激的细胞时的 ErbB2 沉淀物中。如果细胞首先用单克隆抗体 2C4 温育, ErbB3 信号在 MCF7 细胞中消失(附图 5A, 泳道 2C4+) 或在 SK-BR-3 细胞中实质性地降低(附图 5B, 泳道 2C4+)。如在附图 2A-B 中所示, 在 MCF7 和 SK-BR-3 细胞中, 单克隆抗体 2C4 阻断 heregulin 依赖的 ErbB3 与 ErbB2 的结合显著地比 HERCEPTIN[®] 有效。用 HERCEPTIN[®] 预孵育降低 MCF7 裂解产物中的 ErbB3 信号, 但是对从 SK-BR-3 裂解产物中共沉淀的 ErbB3 的量的作用很小, 或者不起作用。在任一细胞系中, 用抗 EGF 受体的抗体 (Ab-1, Oncogene Sciences, USA) 预孵育对 ErbB3 共免疫沉淀 ErbB2 的能力没有影响。

[0510] 实施例 2

[0511] 细胞系和人肿瘤异种移植模型对 2C4 的反应性

[0512] 大约检测了 40 个肿瘤模型对 2C4 的反应性。这些模型代表了主要的癌症, 例如乳腺、肺、前列腺和大肠。50-60% 的模型对 2C4 处理产生反应。下面的表 1 列举所选择的被检测对 2C4 反应性的肿瘤模型。简而言之, 将约 3mm 大小的人肿瘤异种移植碎片移植到无胸腺裸鼠的皮肤下。或者, 从培养皿中分离体外生长的人肿瘤细胞, 重悬在磷酸盐缓冲盐水中, 并皮下注射到无免疫应答的小鼠的胁部。采用电测径器 (electric caliper) 每 2-3 天监控肿瘤的生长。

[0513] 当肿瘤达到大约 30-100mm 大小时, 动物随机地分成不同的处理和对照组。每周一次通过腹膜内注射施用 2C4。对照动物按照与处理组相同的方案接受相同体积不含抗体的载体溶液。在约 3-6 周后, 当对照组的肿瘤达到约 1000-1500mm³ 的大小时, 结束研究。对处理有反应被定义为肿瘤体积减小 $\geq 50\%$ 。

[0514] 表 1: 异种移植模型

[0515]

模型 #	肿瘤模型	对 2C4 的反应性	参考文献
1	LXFA289	无	(Fiebig 等, 1999)
2	LXFA297	有	
3	LXFA 526	无	(Fiebig 等, 1999)
4	LXFA629	有	(Fiebig 和 Burger, 2002)
5	LXFA 1041	无	
6	LXFE 211	无	(Fiebig 等, 1999)
7	LXFE 397	无	(Fiebig 等, 1999)
8	LXFL 529	无	(Burger 等, 2001)
9	LXFL 1072	有	(Fiebig 等, 1999)
10	Calu-3	有	(Stein 等, 2001)

11	NCI-H522	有	(Yamori 等,1997)
12	NCI-H322	无	(Zou 等,2001)
13	NCI-H441 (KAM)	有	(Gridley 等,1996)
14	MAXF MX1	无	
15	MAXF 401	无	(Fiebig 等,1999)
16	MAXF 449	有	(Burger 等,2001)
17	MAXF 713	无	(Berger 等,1992)
18	MAXF 857	无	(Fiebig 等,1999)

[0516] 该模型代表两种主要肿瘤模型,即非小细胞肺癌 (NSCLC ;模型 #1-13) 和乳腺癌 (模型 #14-18)。NSCLC 模型中的 9 种 (#1-9) 和所有的乳腺癌模型是通过在免疫缺陷小鼠中连续体内传代人肿瘤碎片得到。剩下的 NSCLC 模型 (#10-13) 是以细胞为基础的模型,其中体内肿瘤生长是通过将体外繁殖的细胞移植到无免疫应答小鼠中来诱导。

[0517] Berger, D. P., Winterhalter, B. R., 和 Fiebig, H. H. (1992). 在胸腺发育不全裸鼠中人肿瘤异体移植的建立和表征 *Immunodeficient Mice in Oncology*, H. H. Fiebig 和 D. P. Berger, 编辑 (Basel :Karger), 23-46.

[0518] Burger, A. M., Hartung, G., Stehle, G., Sinn, H., 和 Fiebig, H. H. (2001). 氨甲喋呤 - 白蛋白偶联物 (MTX-HSA) 在人肿瘤体内异体移植中的临床前评价 *Int. J. Cancer*, 92 : 718-24.

[0519] Fiebig, H. H., 和 Burger, A. M. (2002). 人肿瘤异体移植和外植体. In *Tumor Models in Cancer Research*, B. A. Teicher, 编辑 (Totowa, New Jersey :Humana Press), 113-137.

[0520] Fiebig, H. H., Dengler, W. A., 和 Roth, T. (1999). 人肿瘤异体移植 :新抗癌剂的可预测性、表征和发现。投稿于 *Oncology :Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development*, H. H. Fiebig 和 A. M. Burger, 编辑 . (Basel :Karger), 29-50.

[0521] Gridley, D. S., Andres, M. L., Garner, C., Mao, X. W., 和 Slater, J. M. (1996). TNF- α 对人肺腺癌模型中放射性效率影响的评价. *OncolRes.*, 8 :485-95.

[0522] Stein, R., Govindan, S. V., Chen, S., Reed, L., Spiegelman, H., Griffiths, G. L., Hansen, H. J., 和 Goldenberg, D. M. (2001). 使用微量放射性碘标记的 MabRS7 成功治疗人肺癌异体移植 *Crit. Rev. Oncol. Hemato.*, 39 :173-80.

[0523] Yamori, T., Sato, S., Chikazawa, H., 和 Kadota, T. (1997). Paclitaxel 针对人肺癌异种移植的抗肿瘤有效性 *Jpn. J Cancer Res.*, 88 :1205-10.

[0524] Zou, Y., Wu, Q. P., Tansey, W., Chow, D., Hung, M. C., Charnsangavej, C., Wallace, S., 和 Li, C. (2001). 在裸乳中水溶性聚 (L- 谷氨酸) - 喜树碱偶联物针对难治性人肺癌异种移植的有效性 *Int. J Oncol.*, 18 :331-6.

[0525] 实施例 3

[0526] 通过免疫沉淀检测 2C4 响应的肿瘤中的异二聚体

[0527] 对 2C4 反应和不反应的肿瘤进行抗 ErbB2 抗体免疫沉淀来分析是否存在 ErbB2-ErbB3 和 EGFR-ErbB2 异二聚体。除非另外说明,该方法按照“Maniatis T. 等,分子克隆:实验室手册,冷泉港,纽约,美国,冷泉港出版社,1982”来实施。

[0528] 选择不发生交叉反应的抗 HER2、抗 HER3 和抗 HER1 的抗体。为了确定抗体是否发生交叉反应,在人胚胎肾 (HEK) 293 细胞中表达 HER1、HER2、HER3 和 HER4 受体。用含有 HEPES 缓冲液 (pH 7.5) 的 Triton™ X100 (1% w/v) 裂解细胞。大约 20 μg 来自对照细胞和表达 HER1, HER2, HER3 和 HER4 的细胞的细胞总蛋白在 SDS 凝胶上分离,并通过半干印迹操作被转移到硝化纤维膜上。用明胶阻断后,检测各种抗 HER1、抗 HER2 和抗 HER3 的抗体针对其他 ErbB 受体的交叉反应性。被选择用于下面描述的实验的抗体不表现出任何显著的交叉反应性。

[0529] 在冰上机械碾碎新鲜的肿瘤样本,并在含有 50mM HEPES pH 7.5、150mM NaCl、1.5mM MgCl₂、1mM EDTA、10% (w/v) 甘油、1% (w/v) Triton™ X-100、1mM PMSF、10 μg/ml 抑酶肽和 0.4mM 原钒酸盐的缓冲液中裂解。离心完全裂解的肿瘤数次,直到上清液完全清澈。通过在 1.5ml Eppendorf 反应管中,结合澄清的肿瘤裂解物 (5-7mg 蛋白 / 裂解物)、5 μg 抗 ErbB2 抗体 (ab-3, 小鼠单克隆; 目录号 OP15, Oncogene Inc., USA) 和 50 μl 蛋白 G 偶联的琼脂糖来进行免疫沉淀。在加入 1-2 倍体积的含有 0.1% (w/v) Triton™ X-100 的 50mM HEPES 缓冲液, pH 7.5 后,在 4℃ 下转动试管 3-4 小时,接着进行离心。用 500 μl 的含有 0.1% (w/v) Triton™ X-100 的 50mM HEPES 缓冲液 pH7.5 洗涤沉淀 2-3 次。将等量体积的 2x Lammi 样本缓冲液加入到被洗涤的免疫沉淀物中,在 95℃ 下加热样本 5 分钟。通过 SDS-PAGE 分离样本,并转移到硝化纤维膜上。通过用抗 EGFR 抗体 (抗 EGFR 的兔多克隆抗体, Upstate Inc., USA; 目录号 06-847) 和抗 ErbB3 的抗体 (抗 ErbB3 的多克隆抗体; Santa Cruz Inc., USA; 目录号 SC-285) 探测印迹来评价是否存在 EGFR-ErbB2 和 ErbB2-ErbB3 异二聚体。过氧化物酶 (POD) 标记的抗兔 Fc 抗体 (BioRad Laboratories Inc. USA) 被用作第二抗体。采用化学发光底物 (ECLplus, Amersham) 观察印迹。

[0530] 附图 3 显示这些实验的结果。可以看出存在 ErbB2-ErbB3 和 / 或 EGFR-ErbB2 异二聚体。观察到如表 1 所示的 2C4 反应性与存在 ErbB2-ErbB3 和 / 或 EGFR-ErbB2 异二聚体之间的关联。

[0531] 实施例 4

[0532] 对 rhuMAb 2C4 的反应性与 HER2 磷酸化之间的关联

[0533] 已经在 14 个被植入小鼠中的人肿瘤 (9 个肺癌和 5 个乳腺癌) 中研究了 rhuMAb 2C4 对肿瘤生长的作用。如实施例 2 所描述进行肿瘤外植和处理。如在实施例 3 中所描述检测 HER2 异二聚体。

[0534] 通过免疫沉淀 HER2 和蛋白质印迹分析来评价 HER2 磷酸化。凝胶上存在磷酸 HER2 条带确定为阳性。不存在该条带确定为阴性。采用磷酸特异性抗 HER2 抗体 (克隆 PN2A, Thor 等, J. Clin. Oncol., 18:3230-9 (2000)) 通过免疫组织化学证实 HER2 磷酸化。

[0535] 在被检测的肿瘤的 5 种 (3 种肺癌和 2 种乳腺癌) 中,观察到肿瘤生长被显著地抑制,这与存在可检测的 HER2 与 HER1 或 HER3 的异二聚体,以及所有情况下强烈的 HER2 磷酸化相关。观察到 9 种肿瘤中没有对 rhuMAb2C4 处理的显著反应,没有检测到异二聚体,并

且不存在 HER2 磷酸化。在非临床模型中,存在 HER2 异二聚体化或者显著的 HER2 磷酸化有力地指示对 rhuMAb 2C4 处理有反应。在由肿瘤细胞系产生的异种移植中也获得相似的结果。

[0536] 实施例 5

[0537] 在对 2C4 响应的肿瘤中检测 HER2 的磷酸化

[0538] 在 9 个已经建立的非小细胞肺癌 (NSCLC) 异种移植的肿瘤模型 (LXFE211, LXFA 289, LXFA 297, LXFE 397, LXFA 526, LXFL 529, LXFA 629, LXFA1041, LXFL 1071, Oncotest GmbH, Freiburg, Germany) 中评价 rhuMAb 2C4 的功效。由于患者的肿瘤以固体瘤生长,产生基质、维管结构、中央坏死并且表现为圆顶分化,人肿瘤异种移植被认为是作为抗癌药物开发的最相关模型。此外,异种移植的肿瘤模型在组织学和化学敏感性上与原始肿瘤非常接近。

[0539] 如实施例 2 中所描述评价生长抑制。显著的生长抑制活性被定义为相对于对照组,抑制处理组的 > 50% 的生长。在 NSCLC 模型中的三个中 (LXFA 297, LXFA 629, 和 LXFL 1072), 观察到显著的对 rhuMAb 2C4 处理的生长抑制反应。在蛋白质水平上还研究了配基活化 HER2 的多个特征。如附图 4 中所示,可以从 9 个 NSCLC 肿瘤中的 8 个的肿瘤提取物中免疫沉淀 HER2。为了确定 HER2 的活化状态,然后用抗磷酸酪氨酸 (抗 PY) 抗体探测这些印迹。如在附图 4 的下面组中所示,三个响应肿瘤 (LXFA 297, LXFA 629 和 1072) 显示强烈的 HER2 活化。

[0540] 实施例 6

[0541] 通过检测 HER2 异二聚体来鉴定用 rhuMAb 2C4 治疗的肺癌患者的临床研究

[0542] 如果来自患者的肿瘤被发现包含 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 复合物,该患者被鉴定为患有对用 rhuMAb 2C4 治疗响应的非小细胞肺癌 (NSCLC)。

[0543] 通过活组织检查或者在手术切除肿瘤的过程中获得肿瘤样本。然后分析该样本是否存在 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER4 异二聚体。

[0544] 肿瘤细胞或细胞裂解物与特异结合 HER2 的 eTag™ 接触。该 eTag™ 包含可检测部分和特异于 HER2 的第一结合部分。可检测部分以可裂解接头被连接到第一结合部分上。在足够的结合时间后,去除多余的 eTag™。

[0545] 肿瘤细胞或细胞裂解物与特异结合 HER1 或 HER3 或 HER4 的第二结合化合物接触。通过洗涤来去除未被结合的化合物。然后激活第二结合化合物。如果第一结合化合物和第二结合化合物十分接近,被激活的第二结合化合物断裂 eTag™ 中的可裂解接头来产生游离的可检测部分。鉴定样本中的游离部分指示该肿瘤包含 HER2/HER1 或 HER2/HER3 或 HER2/HER4 异二聚体。

[0546] 在确定患者患有包含 HER2/HER1 和 / 或 HER2/HER3 和 / 或 HER2/HER4 异二聚体的肿瘤时,每周或者每 3 周分别静脉内 (IV) 施用 2 或 4mg/kg rhuMAb 2C4,直到疾病进展。抗体以多剂量液体制剂形式 (以 20mg/mL 或更高浓度装满 20mL) 被提供。主要的功效终点包括反应率和安全性。次要功效终点包括:总存活率、疾病进展时间、生活质量和 / 或反应持续时间。

[0547] 实施例 7

[0548] 鉴定用 rhuMAb 2C4 治疗的癌症患者的临床研究

[0549] 包含癌细胞的生物样本从用于治疗的考生中获得,例如通过肿瘤组织的活细胞检查,从腹水中抽吸肿瘤细胞或者临床实践中知晓的任何其他方法。通过上面描述的任何技术分析生物样本中的HER2磷酸化例如通过免疫沉淀和蛋白质印迹分析,和/或是否存在HER2/HER3、HER2/HER1和/或HER2/HER4异二聚体。生物样本中HER2磷酸化阳性和/或存在HER2/HER3、HER2/HER1和/或HER2/HER4异二聚体的个体对用rhuMAb 2C4处理可能比肿瘤样本中不显示HER2磷酸化或没有检测到异二聚体的患者有更好的反应。

[0550] 例如,被诊断具有卵巢癌的个体将进行肿瘤组织的活组织检查,或者从腹水液中抽吸肿瘤细胞。通过免疫沉淀和蛋白质印迹分析来分析组织中HER2的磷酸化。这需要最少约250mg肿瘤组织。

[0551] 一旦确定患者患有为HER2磷酸化阳性的肿瘤(例如,阉割抗性的前列腺癌CRPC或卵巢癌),在循环1(第一个21天的治疗阶段)的第一天,该患者将接受840mg载入剂量的rhuMAb 2C4,接着在每个后续的21天循环的第一天以持续的静脉灌注的形式接受420mg对于不表现疾病进展迹象的患者,通过每3周的静脉灌注继续治疗,直到1年(17个循环)。根据医生的判断,治疗可以在任何较早时期由于缺乏反应、副作用或者其他原因被停止。

[0552] 在本公开中引用的全部参考文献,以及其中引用的参考文献在此特别地引入作为参考。

[0553] 虽然本发明以某些实施方案被描述,本发明不是如此被限定。本领域技术人员将认识到,各种改进是可能的,而不从实质上改变本发明。不需要过度的实验而进行的所有这些改进被包含在本发明的保护范围内。

[0001]

序列表

- <110> 健泰科生物技术公司 (Genentech, Inc.)
(F. HOFFMANN - LA ROCHE AG)
Koll, Hans
Bossenmaier, Birgit
Muller, Hans-Joachim
Sliwkowski, Mark
Kelsey, Stephen
- <120> 鉴定对用抗 ErbB2 抗体处理响应的肿瘤的方法
- <130> 39766-0114PC
- <150> US 60/396,290
<151> 2002-07-15
- <150> US 60/480,043
<151> 2003-06-20
- <160> 6
- <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- <210> 1
<211> 107
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)
- <400> 1
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Ile Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ile Gly
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ile Tyr Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
- <210> 2
<211> 119
<212> PRT
<213> 人 (Homo sapiens)

[0002]

<400> 2
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Thr Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asp Val Asn Pro Asn Ser Gly Gly Ser Ile Tyr Asn Gln Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Ser Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Arg Ile Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Leu Gly Pro Ser Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

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

<210> 4
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

[0003]

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

<210> 5
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

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

<210> 6
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)

<400> 6
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

[0004]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Arg Val Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQRP	
	** *****	*	*	
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDVSIGVA]	WYQQKP	
		* * * * * *		
hum xI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQISNYLA]	WYQQKP	
	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	**	* *	* *	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
		* * * * * *		
hum xI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYYIYPYT]	FGGGTKLEIK	(SEQ ID NO: 1)	
	* *	* *		
574	EDFATYYC [QQYYIYPYT]	FGQGTKVEIK	(SEQ ID NO: 3)	
		* * * *		
hum xI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIK	(SEQ ID NO: 5)	

轻链可变区

图 1A

	10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYTMD]	WVKQS	
	** * * * * * * * *	*	* *	
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYTMD]	WVRQA	
		* * * *		
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA	
	50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * **	* * * *	* * * * *	*
574	PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
	* * * * * * * * * * * * * *			
hum III	PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL		
	abc	90	100ab	110
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTLTVSS	(SEQ ID NO: 2)
	* * * **		* *	
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGLTVTVSS	(SEQ ID NO: 4)
		* * * * * * * * *		
hum xI	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGLTVTVSS	(SEQ ID NO: 6)

重链可变区

图 1B

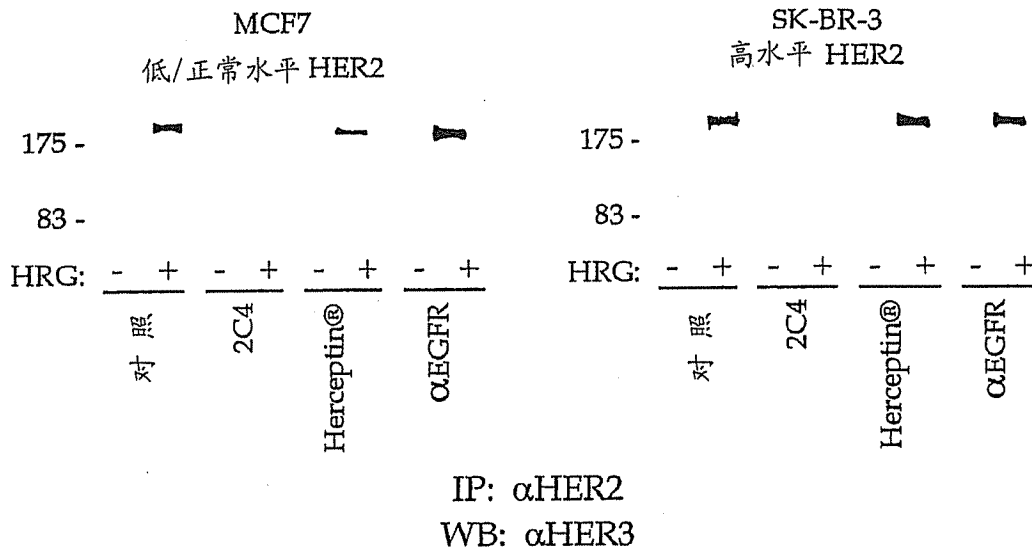
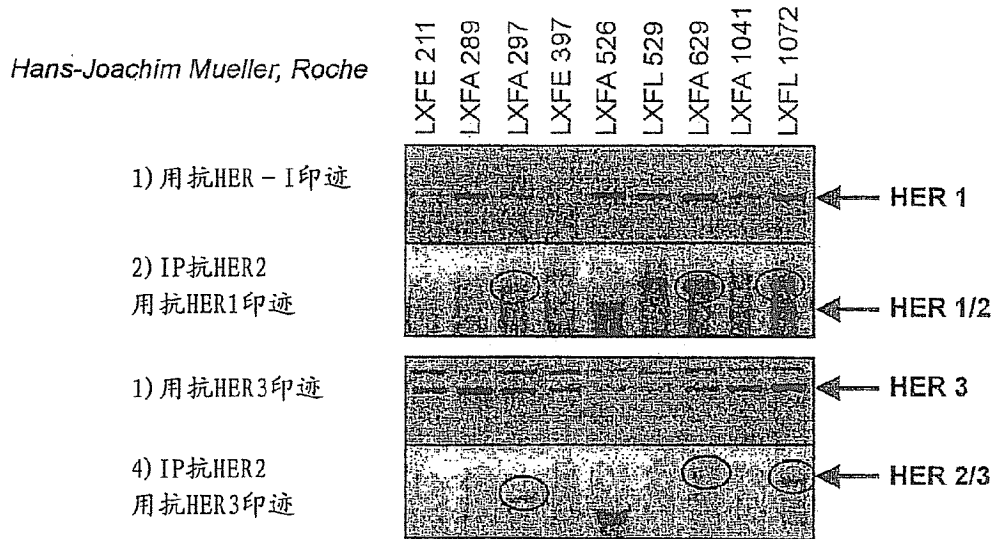


图 2A

图 2B

来自肿瘤检查 (oncotest) NSCLC 异种移植外植体的蛋白质提取物中的含有HER2的二聚体



HER2/HER1二聚体和HER2/HER3二聚体在rhuMAb2C4响应性NSCLC异种移植中相对于rhuMAb2C4非响应性NSCLC异种移植中升高

图 3

来自肿瘤检查NSCLC异种移植外植体的蛋白质提取物中的HER2表达/激活

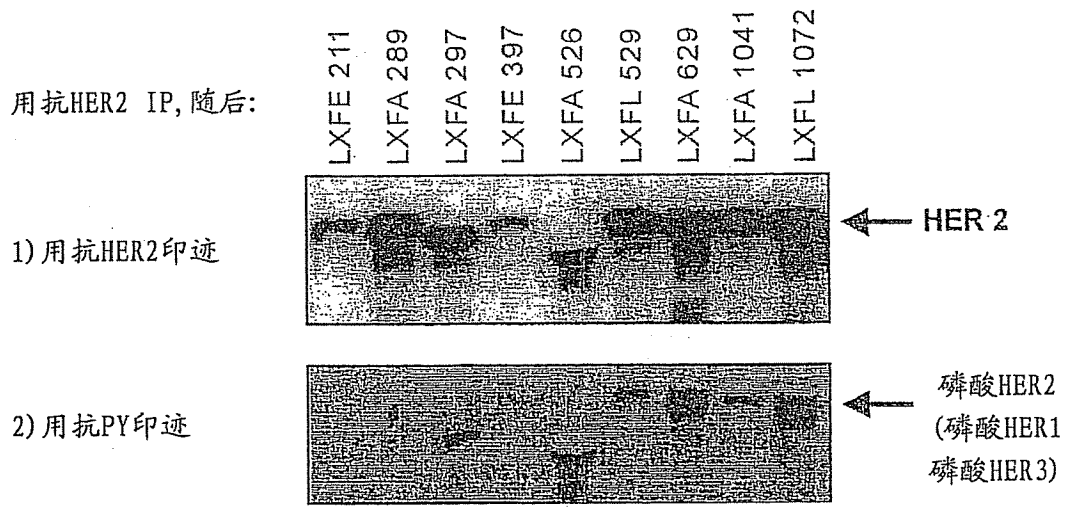


图 4