



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101970486 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 09

(21) 申请号 200880122649. 3

梅纳赫姆·泽维

(22) 申请日 2008. 10. 26

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

(30) 优先权数据

责任公司 11240

60/982, 438 2007. 10. 25 US

代理人 李丙林 张英

(85) PCT申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2010. 06. 24

C07K 16/22 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

A61K 39/395 (2006. 01)

PCT/IL2008/001410 2008. 10. 26

G01N 33/53 (2006. 01)

(87) PCT申请的公布数据

W02009/053987 EN 2009. 04. 30

(83) 生物保藏信息

ECACC 08101403 2008. 10. 14

ECACC 08101402 2008. 10. 14

ECACC 08101401 2008. 10. 14

(71) 申请人 布里斯托尔大学

地址 英国布里斯托尔

申请人 菲洛金有限公司

(72) 发明人 戴维·O·贝茨 史蒂文·J·哈珀

米丽亚姆·Y·曼戈卢斯

权利要求书 2 页 说明书 29 页 序列表 3 页

附图 10 页

(54) 发明名称

特异于血管内皮生长因子 (VEGF) 的促血管发生同工型的抗体

(57) 摘要

本发明提供了针对 VEGF 的激动剂促血管发生、促通透性、血管舒张同工型的抗体、以及至少具有抗体的抗原结合部分的分子。所披露的抗体和抗体片段的特征在于能够结合于并中和 VEGF 的促血管发生形式而不影响抗血管发生的 VEGF 同工型。本发明还提供了这样的抗体和抗体片段的制备方法和它们在治疗和诊断中的应用。

1. 一种特异于 VEGF 的抗体或至少包含其抗原结合部分的片段,其能够与促血管发生 VEGF 同工型结合而不能与抗血管发生 VEGF 同工型结合。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中,所述抗体识别包含表位 CDKPRR(SEQ ID NO:1) 的抗原决定基。

3. 根据权利要求 2 所述的抗体,其中,所述识别选自 CDKPRR(SEQ ID NO:1)、RCDKPRR(SEQ ID NO:3)、CRCDKPRR(SEQ ID NO:4)、和 TCRCDKPRR(SEQ ID NO:5) 组成的组中的抗原决定基。

4. 根据权利要求 2 所述的抗体,其中,所述抗原决定基不包括 DRARQEK(SEQ ID NO:7)。

5. 根据权利要求 2 所述的抗体,其不能中和包含表位 SLTRKD(SEQ ID NO:2) 的 VEGF 同工型。

6. 根据权利要求 5 所述的抗体,其中,所述 VEGF 同工型选自 VEGF₁₆₅b 和 VEGF₁₂₁b 组成的组。

7. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中,所述抗体是单克隆抗体。

8. 根据权利要求 7 所述的抗体,其是由选自以下组成的组中的杂交瘤细胞系制备的:保藏在欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)的 MR93A26 克隆 13-8-8,保藏号为 08101401;MR93A26 克隆 13-8-10,保藏号为 08101402;MR93A26 克隆 13-8-3,保藏号为 08101403。

9. 一种单克隆抗体,其是由选自以下组成的组中的杂交瘤细胞系制备的:保藏在欧洲细胞培养物保藏中心(ECACC)的 MR93A26 克隆 13-8-8,保藏号为 08101401;MR93A26 克隆 13-8-10,保藏号为 08101402;MR93A26 克隆 13-8-3,保藏号为 08101403。

10. 根据权利要求 7 所述的抗体,其中,所述抗体是人源化抗体。

11. 根据权利要求 7 所述的抗体,其中,所述抗体是人抗体。

12. 根据权利要求 7 所述的抗体,其中,所述抗体是嵌合抗体。

13. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中,所述抗体是多克隆抗体。

14. 根据权利要求 1 所述的抗体片段,其选自 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fd'、Fv、dAb、分离的 CDR 区和单链抗体组成的组。

15. 一种编码根据权利要求 1 所述的抗体或其抗体片段的分离的多核苷酸。

16. 一种药物组合物,包含作为活性成分的特异于 VEGF 的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段,其中所述抗体识别包含表位 CDKPRR(SEQ ID NO:1) 的抗原决定基;以及药用载体。

17. 一种对患有与 VEGF 的过表达相关的疾病或病症的受治疗者进行治疗的方法,包含向有需要的受治疗者给予特异于 VEGF 的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段,其中所述抗体识别包含表位 CDKPRR(SEQ ID NO:1) 的抗原决定基,从而对患有与 VEGF 的过表达相关的疾病或病症的受治疗者进行治疗。

18. 根据权利要求 17 所述的方法,其中,所述疾病或病症选自细胞增殖疾病或病症、通透性过高疾病或病症以及与血管发生有关的疾病或病症组成的组。

19. 根据权利要求 17 所述的方法,其中,所述疾病或病症选自血管发生、肾病综合征、急性呼吸窘迫综合征、癌症、增生性眼病、视网膜病、类风湿性关节炎、和牛皮癣组成的组。

20. 一种对有需要的受治疗者进行治疗的方法,包含与 VEGF 的抗血管发生同工型一起

给予根据权利要求 1 所述的抗体。

21. 根据权利要求 20 所述方法,其中,所述 VEGF 的抗血管发生同工型是 VEGF₁₆₅b。

22. 根据权利要求 20 所述方法,其中,所述 VEGF 的抗血管发生同工型选自 VEGF₁₂₁b、VEGF₁₄₅b、VEGF₁₈₉b、和 VEGF₂₀₆b 组成的组。

23. 特异于 VEGF 的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段用于制备治疗与 VEGF 相关的疾病或病症的药物的应用,其中,所述抗体识别包含表位 CDKPRR (SEQ ID NO :1) 的抗原决定基。

24. 特异于 VEGF 的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段用于治疗与 VEGF 相关的疾病或病症的应用,其中,所述抗体识别包含表位 CDKPRR (SEQ ID NO :1) 的抗原决定基。

25. 特异于 VEGF 的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段用于测量 VEGF 的促血管发生形式和抗血管发生形式之比的应用,其中,所述抗体识别包含表位 CDKPRR (SEQ ID NO :1) 的抗原决定基。

26. 一种用于检测或定量表示样品中存在促血管发生 VEGF 同工型的方法,包含利用特异于 VEGF 的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段,其中,所述抗体识别包含表位 CDKPRR (SEQ ID NO :1) 的抗原决定基。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,包含以下步骤:

i. 将特异于 VEGF 的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段与样品一起孵育,其中,所述抗体识别包含表位 CDKPRR (SEQ ID NO :1) 的抗原决定基;

ii. 利用可检测的探针来检测结合的激动剂 VEGF;

iii. 将 (ii) 的量与由含有已知量的促血管发生 VEGF 同工型的对照样品获得的标准曲线进行比较;以及

iv. 由所述标准曲线计算体液样品中的促血管发生抗体的量。

28. 用于诊断与促血管发生 VEGF 同工型相关的疾病或病症的方法,包含利用特异于 VEGF 的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段,其中,所述抗体识别包含表位 CDKPRR (SEQ ID NO :1) 的抗原决定基。

29. 根据权利要求 28 所述的方法,包含以下步骤:

i. 将生物学样品与特异于 VEGF 的激动性剂同工型的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段一起孵育;

ii. 利用可检测的探针来检测结合的激动剂 VEGF;

iii. 将 (ii) 的量与由含有已知量的促血管发生 VEGF 的对照样品获得的标准曲线进行比较;

iv. 由所述标准曲线计算体液样品中的促血管发生抗体的量;以及

v. 将 (iv) 的量与促血管发生 VEGF 的正常量进行比较。

30. 一种用于治疗肾病的方法,包含向有需要的受治疗者给予 VEGF 的抗血管发生同工型。

31. 根据权利要求 30 所述的方法,其中,所述 VEGF 的抗血管发生同工型是 VEGF₁₆₅b。

32. 根据权利要求 30 所述的方法,其中,所述 VEGF 的抗血管发生同工型选自 VEGF₁₂₁b、VEGF₁₄₅b、VEGF₁₈₉b、和 VEGF₂₀₆b 组成的组。

特异于血管内皮生长因子 (VEGF) 的促血管发生同工型的 抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗与血管发生有关的疾病的治疗或诊断抗体,该与血管发生有关的疾病包括肿瘤和视网膜病症。本发明尤其提供了特异于 VEGF 的促血管发生同工型的抗体。

背景技术

[0002] 血管发生

[0003] 血管发生是一种重要的细胞事件,其中脉管内皮细胞增殖、剪切并重组从而由先前存在的脉管网络形成新的血管。有明显证据证明脉管供给的发展对于正常增生和病理学增生过程都是很重要的 (Folkman and Klagsbrun 1987, Science 235,442-447)。氧和营养物质的递送,以及代谢产物的去除代表在多细胞生物体中发生的大多数生长过程中的限速步骤。因此,脉管区室 (compartment) 不仅是用于胚胎形成过程中的器官发育和分化所必需的,而且也是成体体内的伤口愈合和生殖功能所必需的。

[0004] 血管发生还与多种疾病的发病机理有关,这样的疾病包括但不限于,肿瘤、增生性视网膜病变、与年龄相关的黄斑退行性改变、类风湿性关节炎、和牛皮癣。血管发生对于大多数原发性肿瘤及其随后的转移灶的生长都是很重要的。肿瘤仅通过扩散至 1-2mm 的大小就能够吸收足够的营养物质和氧,它们在该处的进一步生长需要由脉管提供的精巧支持 (elaboration)。这一过程被认为是与募集邻近的宿主成熟脉管系统以开始萌发新的毛细血管有关,这些毛细血管朝向肿瘤体生长并随后浸润到该肿瘤体中。此外,肿瘤血管发生与从骨髓中募集循环内皮前体细胞来促进新生血管形成有关 (Kerbel 2000, Carcinogenesis, 21,505-515 ;Lynden et al., 2001, Nat. Med. 7,1194-1201)。

[0005] 考虑到血管发生的引人注目的生理学和病理学重要性,人们已经投入了大量精力进行研究以阐明能够调节这种过程的因素。研究表明,血管发生过程受到促血管发生分子和抗血管发生分子之间的平衡的调控,而在许多疾病 (尤其是癌症) 中这种平衡会发生偏移 (Carmeliet and Jain 2000, Nature 407,249-257)。

[0006] 血管内皮生长因子 (VEGF)

[0007] 血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的最普遍形式是 VEGF-A 或血管通透性因子 (VPF),已经报道了其作为正常和异常血管发生的关键调控因子 (Ferrara 和 Davis-Smyth, 1997, Endocrine Rev. 18,4-25)。与有助于脉管形成过程的其他生长因子相比,VEGF 是唯一对脉管系统中的内皮细胞具有高特异性的。VEGF 对于胚胎血管发生和血管发生都是很重要的 (Carmeliet et al., 1996, Nature 380,435-439 ;Ferrara et al., 1996, Nature 380, 439-442)。而且,女性生殖通道 (reproductive tract) 中的循环血管增殖以及骨头生长和软骨形成都需要 VEGF (Ferrara et al. 1998, Nature Med. 4,336-340 ;Gerber et al., 1999, Nature Med. ,5,623-628)。人 VEGF 是 32-42kDa 的二聚体糖蛋白,其介导血管舒张、使脉管通透性和内皮细胞有丝分裂增加。

[0008] 重要的证据还包括 VEGF 对与病理学血管发生有关的疾病或病症的发展所起到的重要作用。VEGF mRNA 被大多数诊查出的人肿瘤过表达。由于其对于促进肿瘤生长的核心作用, VEGF 提供了对于治疗介入的有吸引力的目标。事实上, 为了治疗肿瘤性疾病, 目前已经开发了多种旨在阻断 VEGF 或其受体信号系统的治疗策略。迄今为止, 通过单克隆抗体实施的 VEGF/VEGF 受体阻断和通过酪氨酸激酶抑制剂实施的受体信号抑制得到了最好的研究并且是可以在临床上使用的治疗方法。还研究了 VEGFR-1 核酶、VEGF 毒性结合物、和可溶性 VEGF 受体。

[0009] 抑制 VEGF 信号转导的一些其他策略被用于治疗应用或正在研发过程中, 它们包括人源化中和单克隆抗体 (humanized neutralizing monoclonal antibody)、可溶性受体、拮抗性 VEGF 突变体和肽、以及 VEGF 受体功能抑制剂。VEGF 抑制作用的综述最近已被 Moreira 等人公开 (Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry 2007, 7, 223-245)。

[0010] VEGF 基因的差异化外显子剪切导致产生了两个同工型家族: 第一个家族被称为刺激性的 (stimulatory)、激动剂或促血管发生家族, 而第二个家族已知为抑制性的、拮抗剂或抗血管发生家族。这两个家族在结构上非常相似但功能不同。存在三种主要的 mRNA 物质, 它们编码由被称为 VEGF₂₀₆、VEGF₁₈₉、VEGF₁₆₅、VEGF₁₄₅ 和 VEGF₁₂₁ 的同工型分泌的五种激动剂。因此, 由于选择性的剪切, 该促血管发生 VEGF 家族具有 121、145、165、189 和 206 个氨基酸的五种不同形式。VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅ 和 VEGF₁₆₅ 是可溶性的并且能够促进血管发生, 而 VEGF₁₈₉ 和 VEGF₂₀₆ 在细胞表面上与含有蛋白聚糖的肝素结合。已经描述了许多小的剪切变异体, 但它们的重要性仍然是不确定的。每一种同工型具有不同的特性和表达方式。WO 03/012105 中披露了形成 VEGF 的各种分子形式并且它们共有共同的由外显子 1 至 5 的 110 个氨基酸构成的氨基末端结构域, 但在羧基末端部分的长度不同 (参见图 1)。

[0011] 抗血管发生 VEGF 同工型

[0012] VEGF 剪切变异体家族 (在本文中也称为 VEGF_{xxx}b) 是 VEGF 的抗血管发生同工型, 其包括但不限于, VEGF₁₆₅b、VEGF₁₄₅b、VEGF₁₈₉b、VEGF₂₀₆b (如 WO 03/012105 中所披露的) 以及 VEGF₁₂₁b, 它们由 Bates 和 Harper 所定义。这些变异体被差异化剪切为缺少外显子 6 和外显子 8a (以前被称为外显子 8) 并且包含以前未知的编码氨基酸序列 Ser-Leu-Thr-Arg-Lys-Asp (SLTRKD, SEQ ID NO: 2) 的外显子 8b (以前被称为外显子 9)。VEGF₁₆₅b、和其他激动剂 VEGF 物质 (在本文中也称为 VEGF_{xxx}b) 是传统 VEGF 多肽的拮抗剂, 并且 Bate 和 Harper 已经证明了它们具有抗血管发生、抗血管舒张、抗通透性和抗增殖活性 (Woolard 等人, Cancer Research 2002, 62, 4123-4131, 以及 Cancer Research 2004, 64, 7822-7835)。在 Harper 和 Bates 最近发表的文章中 (Varey 等人, British J. Cancer 2008, 1-14), 作者得出结论认为 VEGF₁₆₅b 能够抑制结肠直肠肿瘤生长。此外, VEGF₁₆₅b 减少了贝伐单抗 (**AVASTIN®**) 对肿瘤生长的影响。

[0013] Soker 等人 (J. Biol. Chem. 1997, 272, 50, 31582-31588) 描述了对应于 VEGF₁₆₅ 的外显子 7 编码区域的肽, 其中 VEGF₁₆₅ 能够抑制 VEGF- 诱导的内皮细胞增殖。

[0014] WO 98/16551 总体上涉及能够结合于 VEGF 受体并占用 VEGF 受体而不会诱导天然 VEGF 应答的 VEGF 拮抗剂。VEGF 变异体具有影响 VEGF 单体单元 (monomeric unit) 成为适合的二聚体的能力的氨基酸变体。该具体披露的变异体具有至少一个经修饰的半胱氨酸残基, 该经修饰的半胱氨酸残基抑制该变异体通过形成二硫键而成为二聚体的能力。

[0015] WO 01/53345 涉及一种用于治疗或预防疾病的方法,该方法包含形成 VEGF 异源二聚体,并且涉及能够形成这样的异源二聚体的新型的 VEGF 同工型。

[0016] WO 01/12809 披露了一种 VEGF 拮抗剂,其是一种由 VEGF 衍生得到的分子,该分子在其环 I 样序列中具有突变,这种突变使得其能够在野生型二聚体存在时显著降低 VEGF 受体的活性。

[0017] WO 2005/000900 披露了治疗癌症的方法,该方法包含对患者与含化疗剂的抗癌剂组合物一起给予有效量的抗-VEGF 抗体。

[0018] US 2006/166878 披露了 VEGF₁₆₅ 的第七种外显子的一部分,并声称该部分起到了所有 VEGF 同工型的拮抗剂的作用。US2006/166878 中披露的抗体能够与 VEGF 的激动剂和拮抗剂同工型结合。

[0019] 抗 VEGF 抗体

[0020] 抗 VEGF 抗体“贝伐单抗 (BV)”也被称为“rhUMAb VEGF”或“**AVASTIN®**”,其是一种根据 Presta 等人,1997, Cancer Res., 57, 4593-4599 产生的重组体人源化抗-VEGF 单克隆抗体。**AVASTIN®**已被批准用于治疗应用并且对其进行用于治疗各种癌症的进一步临床研究。

[0021] **Avastin®**直接针对外显子 3/ 外显子 4 结合序列,该序列在所有的 VEGF 同工型中都是高度保守的,不论该 VEGF 同工型是激动性的还是拮抗性的。

[0022] WO 98/45331 披露了抗 VEGF 抗体以及它们的诊断和治疗应用,而 WO 98/45332 披露了人 VEGF 抗体及其生产和应用方法。

[0023] WO 2001/036972 披露了利用直接针对 VEGF 的不同表位的单克隆抗体来检测 VEGF 的 ELISA 方法。所描述的该方法能够在一次试验中同时检测 VEGF 的所有同工型。

[0024] WO 2005/054273 披露了针对血管内皮生长因子 (VEGF) 来设计和选择人源化抗体或全人抗体的方法。尤其是,提供了人源化或人抗-VEGF 单克隆抗体,其能够与具有高亲和性的人 VEGF 结合、在体外抑制 VEGF 诱导的内皮细胞增殖并在体内抑制 VEGF 诱导的血管发生。这些抗体和它们的衍生物能够广泛用于各种应用,例如诊断、预防、和治疗疾病,例如癌症、AMD、糖尿病性视网膜病、和由病理性血管发生引起的其他疾病。

[0025] WO 2005/007198 描述了用于制造和筛查特异于诊断和治疗与蛋白同工型有关的疾病的抗体的方法。其中披露的内容教导了制造并筛查能够识别特异于与疾病状态有关的各种多肽的同工型(尤其是 VEGF 同工型)的外显子的剪切接合处(剪接处, splice junction)的氨基酸的抗体。披露了所提到的能够识别 VEGF₁₂₁ 或 VEGF₁₆₅ 同工型的抗 VEGF 抗体,其中针对外显子 5 和外显子 8 之间的接合处的肽序列 (SEQ ID NO :6) 提出了抗 VEGF₁₂₁ 特异性抗体并且针对抗外显子 5 和外显子 7 之间的接合处的肽结构域提出了抗 VEGF₁₆₅ 特异性抗体。

[0026] 能够识别由促血管发生形式的 VEGF 共有的氨基酸序列的已知抗体均不能区分这种生长因子的促血管发生形式和抗血管发生形式。因此,对于提供能够诊断性地区分促血管发生同工型和抗血管发生同工型并治疗性地用于仅抑制促血管发生 VEGF 同工型的抗 VEGF 的抗体存在未满足的需求。

发明内容

[0027] 本发明是基于目前可用的针对 VEGF 的抗体不仅中和激动形式的 VEGF 而且还中和拮抗剂（抗血管发生）形式的 VEGF 并且由此起到具有临床反应的混合的拮抗剂 - 激动性的作用，其中该临床反应取决于组织中存在的 VEGF 同工型的平衡。因此，本发明首次提供了特异于促血管发生 VEGF 的抗体，其能够区分出促血管发生变异体和抗血管发生变异体并且仅中和前一种同工型。本发明还提供了用于获得这样的抗体的方法、这些抗体的制造方法、以及它们的治疗和诊断应用。

[0028] VEGF 的特异性肽序列，例如由包括序列 CDKPRR (SEQ ID NO :1) 的外显子 8a 编码的序列，存在于大多数促血管发生 VEGF 变异体中，但却不存在于含有由外显子 8b 编码的序列 SLTRKD (SEQ ID NO :2) 的 VEGF 拮抗剂变异体中。本发明提供了本发明的直接针对包含由外显子 8a 编码的序列的抗原决定基的抗体，其能够将 VEGF 的促血管发生形式和抗血管发生形式区分开。

[0029] 根据一个方面，本发明提供了抗 VEGF 的激动性同工型的抗体（在本文中也被称为抗 -VEGF_{xxx} 抗体），其能够与促血管发生 VEGF 同工型结合，而不能与抗血管发生 VEGF 形式结合。

[0030] 根据一种实施方式，抗体是特异于 VEGF 的抗体或其包含至少一个抗原结合部分的抗体片段，其中所述抗体识别包含表位 CDKPRR (SEQ ID NO :1) 的抗原决定基。

[0031] 根据具体的实施方式，该抗体识别选自由 ACDKPRR (SEQ ID NO :1)、RCDKPRR (SEQ ID NO :3)、CRCDKPRR (SEQ ID NO :4)、和 TCRCDKPRR (SEQ ID NO :5) 组成的组中的抗原决定基。

[0032] 根据另一种实施方式，该抗体不能与包含序列 SLTRKD (SEQ ID NO :2) 的 VEGF 同工型相结合。根据具体的实施方式，包含序列 SLTRKD 的 VEGF 同工型是 VEGF₁₆₅b 和 VEGF₁₂₁b、VEGF₁₄₅b、VEGF₁₈₉b、VEGF₂₀₆b。

[0033] 根据另一种实施方式，该抗体能够与包含序列 CDKPRR (SEQ ID NO :1) 的 VEGF 同工型相结合，其中所述抗体的抗原决定基不包括 DRARQEK (SEQ ID NO :7)。

[0034] 根据本发明的一种实施方式，抗体是单克隆抗体。根据一种具体实施方式，该单克隆抗体选自由人源化抗体、人抗体、嵌合抗体和至少包含抗体的抗原结合部分的抗体片段组成的组。根据一种具体的实施方式，该抗体片段选自由 Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fd'、Fv、dAb、分离的 CDR 区域、单链抗体、“双特异性抗体”、和“线性抗体”组成的组。

[0035] 根据一种具体实施方式，该单克隆抗体是由选自由保藏在欧洲细胞培养物保藏中心 (ECACC) 的 MR93 A26 克隆 13-8-8，保藏号为 08101401；MR93A26 克隆 13-8-10，保藏号为 08101402；MR93A26 克隆 13-8-3，保藏号为 08101403 组成的组中的杂交瘤细胞系制造的。

[0036] 根据另一种实施方式，该抗体是多克隆抗体。

[0037] 编码根据本发明的抗体的核酸分子也包括在本发明的范围内，其与激动性 VEGF 同工型具有亲和性并且特异于该激动性 VEGF 同工型。

[0038] 根据这个方面，披露了一种编码抗体或该抗体的片段的分离的多核苷酸。根据一种具体实施方式，特异于 VEGF 激动性同工型的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段识别包含表位 CDKPRR (SEQ ID NO :1) 的抗原决定基。

[0039] 本发明的另一方面涉及用于预防、缓解或治疗与 VEGF 相关的疾病或病症的药物组合物。本发明的药物组合物包含治疗有效量的能够与促血管发生 VEGF 形式相结合而不能与抗血管发生 VEGF 形式相结合的抗体；以及药用载体。

[0040] 根据一种实施方式,该药物组合物包含治疗有效量的特异于激动性 VEGF 的抗体或至少包含抗原结合部分的抗体片段。根据具体的实施方式,该特异于激动性 VEGF 的抗体或至少包含抗原结合部分的抗体片段能够识别包含表位 CDKPRR(SEQ ID NO:1) 的抗原决定基。

[0041] 根据具体的实施方式,该药物组合物包含治疗有效量的特异于激动性 VEGF 的抗体或其抗体片段,它们能够识别选自 CDKPRR(SEQ ID NO:1)、RCDKPRR(SEQ ID NO:3)、CRC DKPRR(SEQ ID NO:4)、和 TCRC DKPRR(SEQ ID NO:5) 组成的组中的抗原决定基。

[0042] 根据某些实施方式,该与激动性 VEGF 相关的疾病或病症是细胞增殖、通透性过高或血管发生相关的疾病或病症(包括但不限于肾病综合征和急性呼吸窘迫综合征,ARDS)。根据其他的实施方式,细胞增殖性疾病或病症选自包括但不限于癌症、眼部细胞增殖性疾病(眼病)、视网膜病症、类风湿性关节炎和牛皮癣组成的组。

[0043] 视网膜病包括例如脉络膜新生血管膜(Choroidal Neovascular Membrane(CNVM))、糖尿病性视网膜病、黄斑水肿、血管闭塞、与年龄相关的黄斑退行性改变(AMD)、和早产儿视网膜病(ROP)。

[0044] 本发明的另一方面涉及一种预防、缓解或治疗与血管发生或脉管内皮细胞增殖相关的疾病或病症的方法,包含对有需要的受治疗者给予包含治疗有效量的特异于 VEGF 的激动性同工型的抗体可药用载体的药物组合物。

[0045] 根据一些实施方式,该与激动性 VEGF 的过表达相关的疾病或病症是血管发生或细胞增殖疾病或病症。

[0046] 根据本发明的药物组合物可以作为单独治疗给药或者另外与任何 VEGF 拮抗剂一起给药进行治疗,该 VEGF 拮抗剂包括但不限于抗血管发生 VEGF 同工型。根据一种具体的实施方式,对有需要的受治疗者给予根据本发明的抗体作为与至少一种抗血管发生同工型相结合的部分治疗方案。根据具体的实施方式,VEGF 拮抗性同工型选自 VEGF₁₆₅b、VEGF₁₂₁b、VEGF₁₄₅b、VEGF₁₈₉b 或 VEGF₂₀₆b,组成的组以及它们的任意组合。本发明的药物组合物可以与 VEGF 拮抗剂一起给药或单独给药。

[0047] 本发明的药物组合物可以与抗肿瘤组合物一起给药。根据一种具体的实施方式,该抗肿瘤组合物包含至少一种化疗剂。能够与本发明的抗体一起给予的化疗剂可以包含本领域中已知表现出抗癌活性的任何药剂,包括但不限于:米托蒽醌,拓扑异构酶抑制剂,纺锤体抑制剂长春胺类(spindle poison vincas):长春碱、长春新碱、长春瑞滨(taxol)、紫杉醇、多西他赛;烷基化剂:双氯乙基甲胺、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、美法仑、异环磷酰胺;甲氨蝶呤;6-巯基嘌呤;5-氟尿嘧啶、阿糖胞苷、吉西他滨;鬼臼毒素:依托泊苷、伊立替康、托泊替康、达卡巴嗪;抗生素:多柔比星(阿霉素)、博来霉素、丝裂霉素;亚硝基脲:卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀、表柔比星、伊达比星、柔红霉素、无机离子:顺铂、卡铂;干扰素、门冬酰胺酶;激素类:他莫昔芬、亮脯利特(leuprolide)、氟他胺、和醋酸甲地孕酮。

[0048] 根据一种具体实施方式,化疗剂选自以下物质组成的组:烷聚化剂、抗代谢物、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物和相关抑制剂、长春碱类、表鬼臼毒素(epipodophyllotoxin)、嘌呤类、L-门冬酰胺酶、拓扑异构酶抑制剂、干扰素类、铂类配合物(platinum coordination complexes)、蒽二酮取代的脲(anthracenedione substituted urea)、甲基胍衍生物、肾上腺皮质素抑制剂、肾上腺皮质类固醇、黄体酮、雌激素类、抗雌激

素药、雄激素类、抗雄激素物质和绒促性素相关的激素类似物。根据另一种实施方式,该化疗剂选自自由 5- 氟尿嘧啶 (5-FU)、亚叶酸 (LV)、伊立替康、奥沙利铂、卡培他滨、紫杉醇和多烯紫杉醇 (doxetaxel) 组成的组。可以将两种或多种化疗剂组合使用并与抗 VEGF 抗体给药组合给药。一种优选的组合化疗方法是基于氟尿嘧啶的化疗方法,包含 5-FU 和一种或多种其他化疗剂。

[0049] 根据一种具体的实施方式,本发明提供了一种治疗受治疗者的癌症的方法,包含对该受治疗者给予有效量的抗激动性 VEGF 抗体以及抗癌组合物。

[0050] 可通过本发明的治疗得到缓解的癌症包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、淋巴瘤、淋巴瘤、和白血病或淋巴恶性肿瘤。这样的癌症的更特定的实例包括鳞状细胞癌、肺癌 (包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、和肺的鳞状细胞癌)、腹膜的癌症、肝细胞癌、胃癌 (包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌和各种类型的头颈癌、以及 B- 细胞淋巴瘤 (包括低级别 / 滤泡非何杰金 (氏) 淋巴瘤 (NHL); 小淋巴细胞 (SL) NHL; 中间级 / 滤泡 NHL; 中间级弥漫性 NHL; 高级别免疫细胞性 NHL; 高级别淋巴细胞性 NHL; 高级小无核裂细胞 NHL; 巨大肿块 (bulky disease) NHL; 外套膜细胞淋巴瘤; AIDS- 相关的淋巴瘤; 和华氏巨球蛋白血症); 慢性淋巴细胞白血病 (CLL); 急性淋巴细胞白血病 (ALL); 毛发细胞白血病; 慢性骨髓细胞性白血病; 和移植后淋巴组织增生的病症 (PTLD)、以及与癥瘕病相关的异常脉管增殖、水肿 (例如与脑部肿瘤相关的水肿)、和麦格综合征 (Meigs' syndrome)。优选地,癌症选自自由乳癌、结肠直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、非何杰金 (氏) 淋巴瘤 (NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波氏肉瘤、类癌 (carcinoid carcinoma)、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和多发性骨髓瘤组成的组。更具体地,癌症是结肠直肠癌。可由本发明的治疗得到缓解的癌性病症包括迁移性癌。本发明的方法尤其适用于血管化肿瘤的治疗。

[0051] 另一方面,本发明提供了一种提高癌症患者存活期的方法,包含向受治疗者给予有效量的包含特异于 VEGF 的激动性同工型的抗体的组合物和抗癌组合物,其中所述抗癌组合物包含至少一种化疗剂,由此抗 VEGF 抗体与抗癌组合物的组合给药有效增加了存活期。

[0052] 在另一种实施方式中,本发明提供了一种用于提高癌症患者的无进展生存期的方法,包含向受治疗者给予有效量的包含特异于 VEGF 激动性同工型的抗体的组合物和抗癌组合物,其中所述抗癌组合物包含至少一种化疗剂,由此同时给予特异于 VEGF 激动性同工型的抗体和抗癌组合物以有效增加无进展生存期。

[0053] 此外,本发明提供了一种用于治疗癌症患者的方法,包含向受治疗者给予有效量的包含特异于 VEGF 激动性同工型的抗体的组合物和抗癌组合物,由此同时给予特异于 VEGF 激动性同工型的抗体和抗癌组合物以有效提高受治疗者组中的反应发生率 (response incidence)。

[0054] 另一方面,本发明提供了一种用于增加癌症患者的反应期 (duration of response) 的方法,包含给予有效量的包含特异于 VEGF 激动性同工型的抗体的组合物和抗癌组合物,其中所述抗癌组合物包含至少一种化疗剂,由此同时给予特异于 VEGF 激动性同工型的抗体和抗癌组合物以有效增加反应时间。

[0055] 本发明的另一方面涉及特异于 VEGF 激动剂同工型的抗体或其抗体片段用于制造治疗与细胞增殖或血管发生有关的疾病或病症的治疗组合物的应用。

[0056] 根据一种实施方式,本发明提供了特异于 VEGF 的抗体或至少包含抗原结合部分的抗体片段用于制备用于治疗与 VEGF 的促血管发生形式的过表达相关的疾病或病症(包括但不限于与血管发生相关的疾病或病症)的药物的应用,其中所述抗体识别包含表位 CDKPRR(SEQ ID NO:1)的抗原决定基。

[0057] 根据本发明的另一方面,提供了特异于 VEGF 的抗体或至少包含抗原结合部分的抗体片段用于治疗与 VEGF 的促血管发生形式相关的疾病或病症的应用,其中所述抗体识别包含表位 CDKPRR(SEQ ID NO:1)的抗原决定基。根据一种实施方式,该疾病或病症是血管发生或细胞增殖疾病或病症。

[0058] 在本文中被称为 VEGF_{xxx} 的促血管发生 VEGF 是足细胞存活因子、促血管发生的并且增加肾脏中的肾小球的通透性,产生渗漏肾小球。

[0059] 在本文中被称为 VEGF_{xxx}b 的 VEGF 的抗血管发生形式(例如 VEGF_{165b})是足细胞存活因子,其是抗血管发生的并且减小肾脏中的肾小球的通透性。

[0060] 诸如 **AVASTIN®** 的 VEGF 清除剂和诸如 **SUTENT®** 的 VEGFR 阻断剂(酪氨酸激酶抑制剂, TKI) 会诱发发生蛋白尿和肾脏损伤。

[0061] 应该理解,根据本发明的原则,可以通过用仅特异于促血管发生 VEGF_{xxx} 的抗体进行治疗来避免或改善由 TKI(例如 **SUTENT®** 或诸如 **AVASTIN®** 的抗体)诱发的肾炎损伤和/或肾小球损伤。

[0062] 应该理解,根据本发明的原则,可以通过用 VEGF_{165b} 进行治疗来缓解由 TKI(例如 **SUTENT®** 或诸如 **AVASTIN®** 的抗体)诱发的肾炎损伤和/或肾小球损伤。因此,根据本发明的另一方面,VEGF_{165b} 能够缓解由已知的 VEGF 清除剂和 VEGFR 阻断剂诱导的损伤。

[0063] 根据另一方面,本发明提供了一种对有需要的受治疗者进行治疗的方法,包含与 VEGF 的抗血管发生同工型一起给予特异于根据本发明的促血管发生 VEGF 形式的抗体。

[0064] 根据一种具体的实施方式,VEGF_{165b}。根据其他的实施方式,VEGF 的抗血管发生同工型选自由 VEGF_{121b}、VEGF_{145b}、VEGF_{189b}、和 VEGF_{206b} 组成的组。

[0065] 根据另一种实施方式,本发明提供了一种治疗肾病的方法,包含向有需要的受治疗者给予 VEGF 的抗血管发生同工型。

[0066] 根据一种具体的实施方式,该 VEGF 的抗血管发生同工型是 VEGF_{165b}。根据其他的实施方式,该 VEGF 的抗血管发生同工型选自由 VEGF_{121b}、VEGF_{145b}、VEGF_{189b}、和 VEGF_{206b} 组成的组。

[0067] 根据本发明的另一种实施方式,提供了一种用于检测或定量表示促血管发生 VEGF 形式的存在的方法。因此,本发明还提供了一种利用抗激动性 VEGF 同工型的抗体来诊断与激动性 VEGF 同工型相关的病症水平升高的方法。根据本发明的诊断方法可以根据体内或体外的具体实施方式来实施。根据本发明的抗体也可以用于筛选法。例如,可以构成 ELISA 测定以通过本领域已知的方法利用单克隆和多克隆抗体来测量分泌的或细胞相关水平的多肽。

[0068] 根据一种实施方式,本发明提供了一种用于检测或定量表示促血管发生 VEGF 形式的存在的方法,包含以下步骤:

- [0069] i. 将特异于 VEGF 的激动剂同工型的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段与样品一起孵育；
- [0070] ii. 利用可检测的探针来检测结合的激动剂 VEGF；
- [0071] iii. 将 (ii) 的量与由含有已知量的促血管发生 VEGF 的对照样品获得的标准曲线进行比较；以及
- [0072] iv. 由该标准曲线计算体液样品中的促血管发生抗体的量。
- [0073] 根据另一种实施方式，提供了一种用于诊断与促血管发生 VEGF 形式相关的疾病或病症的方法，包含以下步骤：
- [0074] i. 将生物学样品与特异于 VEGF 的激动剂同工型的抗体或至少包含抗原结合部分的抗体片段一起孵育；
- [0075] ii. 利用可检测的探针来检测结合的激动剂 VEGF；
- [0076] iii. 将 (ii) 的量与由含有已知量的促血管发生 VEGF 的对照样品获得的标准曲线进行比较；
- [0077] iv. 由该标准曲线计算体液样品中的促血管发生抗体的量；以及
- [0078] v. 将 (iv) 的量与促血管发生 VEGF 的正常量进行比较。
- [0079] 本发明的抗体还可以用于评价患者体内的促血管发生 / 抗血管发生之比的筛选试验中并用于预测用抗 VEGF 治疗的治疗效果（例如用 **AVASTIN®** 进行治疗的实施例）。用本发明的抗体进行的筛选试验可用来确定 VEGF 的促血管发生形式和抗血管发生形式之间的比率，并由此预测治疗效果并设计适合的治疗方案。如用特异性抗体测量的 VEGF 的促血管发生形式和抗血管发生形式之间的比率能够被用作估计患者由 **AVASTIN®** 或其他抗 - 泛 VEGF 治疗（例如 VEGF- 阱 (VEGF-trap)）的有益工具。
- [0080] 本领域中对于 VEGF 抗血管发生 / 拮抗剂的基本上所有的已知应用或猜想都与本发明的抗体有关。这些应用包括，诊断、预防和治疗技术。本发明的其他实施方式和适用的全部范围将由下文中给出的具体描述而变得显而易见。

附图说明

- [0081] 图 1 是 A) 人类 VEGF 基因的外显子图谱，和 B) 导致不同的 VEGF 同工型的外显子剪接模式的示意图。
- [0082] 图 2 代表利用亲和纯化、特异于外显子 8a、或外显子 8b 的单特异性多克隆抗体重组来实施的 VEGF₁₆₅ 和 VEGF_{165b} 的蛋白质印记分析。
- [0083] 图 3 描述了通过增加抗外显子 8a 的单特异性多克隆抗体的浓度来抑制 VEGF₁₆₅ 介导的 HUVEC 迁移。
- [0084] 图 4A 和图 4B 描述了在 VEGF_{165b}、抗外显子 8a 的单特异性多克隆抗体或它们的组合存在的情况下测量的 HUVEC 的迁移。
- [0085] 图 5 描述了在 VEGF_{165b}、抗外显子 8a 的单特异性多克隆抗体或 Lucentis（雷珠单抗）或抗外显子 8a 的单特异性多克隆抗体与 VEGF_{165b} 的组合存在的情况下测量的 HUVEC 的迁移。
- [0086] 图 6 示出了抗 VEGF 的外显子 8a 的单克隆抗体响应于用 VEGF₁₆₅ 的刺激而抑制 ECV304 内皮细胞的迁移。

[0087] 图 7 描述了测试了抗激动性 VEGF 同工型 VEGF₁₆₅ 的单克隆抗体和多克隆抗体的内皮细胞迁移测定的结果。

[0088] 图 8 示出了 VEGF_{165b} 是一种不含血清的人类足细胞的存活因子。

[0089] 图 9 描述了在接受了系统给予 100 μ g 的 VEGF_{165b} 之后,在肾小球足细胞中过表达 VEGF_{165b} 的转基因小鼠中的脲肌酸酐 / 蛋白质之比。

[0090] 图 10 示出了 VEGF_{165b} 使慢性肾小球通透性减小。

[0091] 将人类有条件的永生化小球内皮细胞在无血清条件下培养 2 小时,然后在培养的单细胞层中响应于 1nM VEGF₁₆₅、1nM VEGF_{165b} 或 1nM VEGF₁₆₅ 与 1nM VEGF_{165b} 结合或为空 (对照) 来测量肾小球经上皮的电阻。结果显示,相对于对照 (即时间点为 0 分钟,SEM) 成倍增加。 $n = 5$,用分光光谱 (prism) 进行数据分析: $p \pm < 0.0001$,单向 ANOVA,用事后邦弗朗尼测试 (Bonferroni post test) 进行重复测量。对照与 VEGF_{165p} $p < 0.001$,对照与 VEGF_{165b} $p < 0.01$,对照与二者 $p > 0.05$,VEGF₁₆₅ 与 VEGF_{165b} 与二者 $p < 0.001$,VEGF_{165b} 与二者 $p < 0.01$ 。利用 SSPS 进行数据分析,所有的 p 值 > 0.0005 ,单向 ANOVA,重复测量,事后邦弗朗尼测试 (Post hoc Bonferroni) 对照与 VEGF 0.001,对其他 NSVEGF 对其他三组所有的显著 165 对二者 0.037。

[0092] 图 11 描述了在去氧肾上腺素 VEGF_{165b} 过表达的转基因小鼠中的体外完整肾小球的 LpA/Vi。

具体实施方式

[0093] 本发明首次提供了特异于 VEGF 的有害形式但不能中和该蛋白的有价值的拮抗形式的第一代抗体。由于抗血管发生 / 拮抗形式以及促血管内发生 / 激动形式的 VEGF 之间的结构差异使这称为可能。例如,天然 VEGF 抗血管发生 / 拮抗性 VEGF_{165b} 缺少存在于大多数促血管发生形式的 VEGF 中的由外显子 8a 编码的序列。

[0094] 针对外显子 8a 产生的抗体已经表现出与促血管发生同工型 VEGF₁₆₅ 结合并抑制促血管发生同工型 VEGF₁₆₅,而不结合并抑制抗血管发生形式 VEGF_{165b}。这些抗体还以剂量依赖的方式抑制介导 HUVEC 迁移的 VEGF₁₆₅。

[0095] 已知 VEGF 作为一种多效因子。其不仅调控血管发生,而且还作为体内许多细胞和组织 (例如,神经元、视网膜色素细胞、肾脏中的足细胞以及正常和成熟的血管) 的存活因子。VEGF 的完全缺失 (例如通过不区分 VEGF 和 VEGFR 阻断剂的促血管发生形式和抗血管发生形式的抗体而实现的情况) 会使患者暴露于视网膜损伤、出血和蛋白尿以及肾脏损伤和其他严重有害事件的风险中。

[0096] 期望靶向于促血管发生型 VEGF 的抗体是更加安全且更有效的,这是因为它们清除了促血管发生型 VEGF,使抗血管发生型 VEGF 与 VEGFR1 和 VEGFR2 相结合并起到抗血管发生和细胞保护作用。

[0097] **AVASTIN®** 是一种目前在治疗中使用的抗 VEGF 抗体,其无差别地以相同的亲和性与两种形式的 VEGF (促血管发生型 VEGF 和抗血管发生型 VEGF) 结合。这解释了其边缘效应 (marginal efficacy) 和较低的安全性。用 **AVASTIN®** 对表现出明显 VEGF_{165b} 水平的肿瘤患者进行治疗的效果并不明显,这是因为 VEGF_{165b} 会抑制该抗 VEGF 抗体的效果。通过本发明的特异性抗体测量得到的促血管发生型 VEGF 和抗血管发生型 VEGF 之间的比能

够被用作一种预测性工具,来预测哪些患者会从**AVASTIN®**受益或其他抗泛 VEGF 治疗 (anti-pan VEGF treatment) (例如 VEGF 拮) 中受益。

[0098] 定义

[0099] 术语“VEGF”是指(单不仅仅是指)121、145、165、189、和 206 个氨基酸的血管内皮生长因子,正如 Leung et al. Science, 1989, 246, 1306, 和 Houck et al. Mol. Endocrin., 1991, 5, 1806 所描述的,及其天然存在的等位形式和进行(processed)形式。术语“VEGF”是指所有形式的 VEGF-A,例如包含 165 个氨基酸的人脉管内皮细胞生长因子多肽的氨基酸 8 至 109 或 1 至 109 的截短形式、VEGF 家族和抗血管发生型 VEGF₁₆₅b、VEGF₁₂₁b 以及全部 VEGF_{xxx}b 系列。

[0100] 术语“VEGF 激动剂”、“激动性 VEGF”或“VEGF 的激动剂”是指 VEGF 的促血管发生活性,即是指能够促进或加速血管发生和/或通透性的 VEGF 形式。激动性 VEGF 形式的实例是那些含有由外显子 8a 编码的序列 CDKPRR 的 VEGF。

[0101] 术语“VEGF 拮抗剂”或“拮抗性 VEGF”是指作为抗血管发生分子并且不能促进血管发生的 VEGF 形式。拮抗性 VEGF 形式的实例是那些含有由外显子 8b 编码的序列 SLTRKD 代替由外显子 8a 编码的序列 CDKPRR 的 VEGF。

[0102] 激动性和拮抗性形式的 VEGF 通常是通过具有由外显子 8a 编码的序列(激动剂 VEGF)或缺少外显子 8a 且具有外显子 8b 表达的序列来加以区分的,然而,也可以存在其他形式的激动性和拮抗性 VEGF 而且也可以包括本发明范围内的区分这些激动性形式和拮抗性形式的抗体。抗“VEGF 抗体”是一种与具有足够的亲和性和特异性的 VEGF 结合的抗体。优选地,本发明的抗 VEGF 抗体能够用作靶向于或干扰与 VEGF 活性有关的疾病或病症的治疗剂。抗 VEGF 抗体通常不与其他 VEGF 同源物(例如,VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 或 VEGF-E 或其他生长因子,如 PlGF、PDGF 或 bFGF)结合。抗 VEGF 抗体可以是重组体人源化抗 VEGF 单克隆抗体。

[0103] “抗原”是一种能够引起抗体形成并与抗体结合的分子或分子的一部分。抗原可以具有一个或多个的表位。上文中指出的特异性反应意指抗原会以高选择性的方式与相应的抗体相结合,而不会与由其他抗原引发的大量其他抗体结合。本发明的抗原是一种激动性 VEGF 或其片段。

[0104] 本发明的术语“抗原决定基”或“表位”是指与特定抗体特异性反应的抗原分子的区域。

[0105] 抗体,或免疫球蛋白,包含通过二硫键结合在一起的两条重链以及两条轻链,每一条轻链都通过二硫键以“Y”形构型分别与重链相连。抗体的蛋白水解消化产生 Fv(可变片段)和 Fc(片段结晶)结构域。抗原结合结构域 Fab 多肽序列可发生变化的区域。术语 F(ab')₂ 代表通过二硫键相连的两个 Fab' 臂。抗体的中心轴被称为 Fc 片段。每一条重链的一端在数个恒定结构域(C_H)之后都具有一个可变结构域(V_H)。每一条轻链的另一端在数个恒定结构域(C_L)之后都具有一个可变结构域(V_L),并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐,且轻链恒定结构域与重链的第一恒定结构域(CH1)对齐。轻链和重链的每一对可变结构域都形成抗原结合位点。轻链和重链上的结构域具有相同的大致结构并且每个结构域都包含通过三个被称为互补决定区(CDR1-CDR3)的高度可变的结构域相连的四个框架区,该框架区的序列是相对保守的。这些结构域为抗原结合位点赋予了特异性和亲和

性。重链的同种型 (isotype) (λ 、 α 、 γ 、 ξ 或 μ) 决定了免疫球蛋白种类 (分别为 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM)。在所有的抗体类型中发现轻链有两种同种型 (κ 或 λ)。

[0106] 术语“抗体”以其最广泛的含义被使用并且包括单克隆抗体 (包括全长或完整的单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体 (例如双特异性抗体)、以及抗体片段, 只要它们表现出所需的生物学活性即可。

[0107] 本发明的抗体是一种至少包含抗体的抗原结合部位的分子。本发明的一种或多种抗体包括完整抗体, 例如多克隆抗体或单克隆抗体 (mAbs), 以及它们的蛋白水解片段, 例如 Fab 或 $F(ab')_2$ 片段。本发明的范围进一步包括嵌合抗体、人类抗体和人源化抗体; 重组抗体和工程抗体、以及它们的片段。此外, 可将编码该抗体的可变区的 DNA 插入到编码其他抗体的 DNA 中, 以产生嵌合抗体。单链抗体也包括在本发明的范围内。

[0108] “抗体片段”仅包含完整抗体的一部分, 通常包括该完整抗体的抗原结合部位并由此保留了与抗原结合的能力。由这种定义限定的抗体片段的实例包括: (i) Fab 片段, 具有 VL、CL、VH 和 CH1 结构域; (ii) Fab' 片段, 其是在 CH1 结构域的 C 端具有一个或多个半胱氨酸残基的 Fab 片段; (iii) Fd 片段, 其具有 VH 和 CH1 结构域; (iv) Fd' 片段, 其具有 VH 和 CH1 结构域并且在 CH1 结构域的 C 端具有一个或多个半胱氨酸残基; (v) Fv 片段, 其具有抗体单臂的 VL 和 VH 结构域; (vi) dAb 片段 (Ward et al., Nature 1989, 341, 544-546), 其由 VH 结构域组成; (vii) 分离的 CDR 区; (viii) $F(ab')_2$ 片段, 其是包括在铰链区通过二硫键相连的两个 Fab' 片段的二价抗体; (ix) 单链抗体分子 (例如单链 Fv; scFv) (Bird et al., Science 1988, 242, 423-426; 和 Huston et al., PNAS(USA) 1988, 85, 5879-5883); (x) “双特异抗体 (diabody)” 具有两个抗原结合部位, 其包含连接于相同的多肽链中的轻链可变区 (VL) 的重链可变区 (VH) (参加, 例如 EP 404, 097; WO 93/11161; 和 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6444-6448); (xi) “线性抗体”包含一对串联的 Fd 片段 (VH-CH1-VH-CH1), 其与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合部位 (Zapata et al. Protein Eng., 1995, 8, 1057-1062; 和美国专利第 5, 641, 870 号)。

[0109] 单链抗体可以是具有抗原结合能力的单链复合多肽并包含免疫球蛋白轻链和重链可变区 (即, 相连的 V_H - V_L 或单链 Fv (scFv)) 的氨基酸序列同源物或类似物。

[0110] 本文中所使用的“中和抗体”是指具有与特异性受体或能够较少或抑制 (阻断) 活性或通过受体进行的信号传导的配体靶标结合的抗原结合部位的分子, 如说明书所述的由体内或体外试验所确定的。

[0111] 本文中所使用的术语“单克隆抗体”是指由一族基本上同源的抗体获得的抗体, 即, 除了可能以较少的量存在的天然存在的突变之外, 包含该族的单个抗体是相同的。单克隆抗体对单个抗原是高度特异性的。此外, 相比于通常包括针对不同决定基 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体, 每个单克隆抗体都直接针对抗原上的单个决定基。修饰语“单克隆”不应解释为需要通过任何特定的方法来产生抗体。mAbs 可以通过本领域技术人员已知的方法来获得。例如, 根据本发明使用的单克隆抗体可以通过首先由 Kohler et al., Nature 1975, 256, 495 描述的杂交瘤方法来制备, 或可以通过重组 DNA 方法来制备 (参见例如美国专利第 4, 816, 567 号)。“单克隆抗体”也可以与利用如 Clackson et al., Nature 1991, 352, 624-628, 或 Marks et al., J. Mol. Biol., 1991, 222 :581-597 描述的技术的噬菌体抗体文库分离。

[0112] 本发明的 mAb 可以是任何免疫球蛋白类,包括 IgG、IgM、IgE、IgA 和它们的亚类。产生 mAb 的杂交瘤可以在体外或体内培养。在体内产生能够获得高效价的 mAb,其中将来自个体杂交瘤的细胞腹膜内注射到降植烷致敏的 (pristine-primed) Balb/c 小鼠体内,以产生含有高浓度所需 mAb 的腹水。同种型 IgM 或 IgG 的 mAb 可以利用本领域技术人员公知的柱层析方法从这样的腹水,或从培养液的上清纯化得到。

[0113] 本文中的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体,其中的一部分与来自于特定种或属于特定抗体类或亚类的抗体以及这样的抗体的片段中的相应序列完全相同或同源,并且重链和 / 或轻链的其他部分与来自于另一个种或属于另一个抗体类或亚类的抗体以及这样的抗体的片段中的相应序列完全相同或同源,只要它们表现出所需的生物学活性即可 (美国专利第 4,816,567 号;以及 Morrison 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855(1984))。另外,互补决定区 (CDR) 移植 (grafting) 可以通过改变抗体分子的某些特性 (包括亲和性或特异性) 来完成。美国专利第 5,225,539 号披露了 CDR 嫁接的一个非限制性实例。

[0114] 嵌合抗体是分子,它们的不同部分来自于不同的动物物种,例如那些具有来自于鼠 mAb 的可变区和人免疫球蛋白恒定区的物种。具有基本上来自人类抗体 (称为受体抗体) 的可变区框架残基和基本上来自小鼠抗体 (称为供体抗体) 互补决定区的抗体也被称为人源化抗体。嵌合抗体在应用中主要用于减少免疫原性并在生产者增加产量,例如,其中鼠 mAb 从杂交瘤具有较高的产量但在人类中具有较高的免疫原性,从而使用人 / 鼠嵌合。嵌合抗体和它们的制备方法是本领域中公知的 (例如 PCT 专利申请 WO 86/01533、WO97/02671、WO 90/07861、WO 92/22653 和美国专利 5,693,762、5,693,761、5,585,089、5,530,101 和 5,225,539)。

[0115] 非人抗体 (例如鼠抗体) 的“人源化”形式是含有最少的来自于非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。人源化抗体的大部分序列,是人免疫球蛋白 (受体抗体),其中来自受体的高可变区的残基被来自非人物种 (供体抗体) 的高可变区的残基替代,该非人物种例如是具有所需特异性、亲和性、和能力 (capacity) 的小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物。在一些例子中,人免疫球蛋白的框架区 (FR) 残基被向人的非人残基替代。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体或者供体抗体中未发现的残基。进行这些改变以进一步提高抗体的性能。一般而言,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个,通常为两个可变结构域,其中所有或基本上所有的高可变环都对应于非人免疫球蛋白并且所有或基本上所有的 FR 都是人免疫球蛋白序列。人源化抗体可选地还包含至少一部分的免疫球蛋白恒定区 (Fc),通常为人免疫球蛋白的恒定区。细节请参见 Jones et al., Nature 1986,321,522-525; Riechmann et al., Nature 1988,332,323-329; 和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992,593-596。

[0116] “人类抗体”是具有对应于由人产生的抗体和 / 或已经利用本文中描述的制造人类抗体的任何技术制造的抗体的氨基酸序列的抗体。人类抗体的这种定义具体排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人类抗体可以利用本领域中已知的各种技术来制造。在一种实施方式中,人类抗体选自噬菌体文库,该噬菌体文库表达人类抗体 (Vaughan et al. Nature Biotechnology 1996,14,309-314; Sheets et al. PNAS(USA), 1998,95,6157-6162); Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol., 1991,227,381; Marks et al., J. Mol. Biol., 1991,222,581)。也可以通过将人免疫球蛋白基因座引入到其中已经

使其内源性免疫球蛋白基因部分或全部失活的转基因动物（例如，小鼠）体内来制造人类抗体。在激发之后，观察到产生了人类抗体，其在各方面都非常接近在人体中所观察到的，包括基因重排、组装、和全套抗体。这种方法描述于例如美国专利第 5,545,807 号；第 5,545,806 号；第 5,569,825 号；第 5,625,126 号；第 5,633,425 号；第 5,661,016 号，以及以下的科学出版物：Marks et al., *Bio/Technology* 10:779-783(1992)；Lonberg et al., *Nature* 368:856-859(1994)；Morrison, *Nature* 368:812-13(1994)；Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14:845-51(1996)；Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826(1996)；Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995) 中。可替代地，人类抗体可以经由针对靶标抗原产生抗体的人 B 淋巴细胞（这样的 B 淋巴细胞可以从个体回收 (recover) 或可以已经在体外被免疫）的永生化来制备。参见例如 Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77(1985)；Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95(1991)；和美国专利第 5,750,373 号。

[0117] 术语“单链可变片段 (scFv)”意指以短（通常为丝氨酸、甘氨酸）连接子相连的免疫球蛋白的重链和轻链可变区的融合。单链抗体可以是具有抗原结合能力并包含与免疫球蛋白轻链和重链可变区（连接 V_H - V_L 或单链 Fv(scFv)）同源或异源的氨基酸序列的单链复合多肽。 V_H 和 V_L 可以复制天然单克隆抗体序列或包含美国专利第 5,091,513 中描述的 R-FR 结构的一条或两条链，其全部内容结合于本文作为参考。分离多肽类似物与轻链和重链可变区通过多肽连接子连接在一起。产生这样的单链抗体，尤其是编码已知的 V_H 和 V_L 链的多肽结构的 DNA 的方法可与例如美国专利第 4,946,778 号、第 5,091,513 号和第 5,096,815 号中所描述的方法相结合，它们的全部内容结合于本文作为参考。

[0118] 本文中使用的“具有抗体的抗原结合部位的分子”意指包括但不限于任意同种型的且通过任意动物细胞系或微生物生产的完整免疫球蛋白分子，而且还包括其抗原结合反应部分，包括但不限于 Fab 片段、Fab' 片段、 $F(ab')_2$ 片段、其重链和 / 或轻链的可变区、Fab 小抗体（参见 WO 93/15210、美国专利申请第 08/256,790 号、WO 96/13583、美国专利申请第 08/817,788 号、WO 96/37621、美国专利申请第 08/999,554 号，它们的全部内容结合于本文作为参考）、二聚体双特异性小抗体（参见 Muller et al., 1998）和与这样的反应部分相结合的嵌合抗体和单链抗体，以及其中物理性插入了这样的抗体反应部分的任何其他类型的分子或细胞，例如嵌合 T- 细胞受体或具有这样的受体的 T- 细胞，或以含有这样的反应部分的分子的部分的方式发展为递送治疗等分的分子。这样的分子可以通过任何已知的技术来提供，包括但不限于酶裂解、肽合成或重组技术。

[0119] 本发明的抗体能够通过利用常规给药方案向动物（优选为非人类）给予激动性 VEGF、或具有表位的片段、类似物、或细胞表达来获得。对于单克隆抗体的制备，可以使用本领域中提供了通过连续细胞系培养物来产生抗体的任何已知技术。实例包括各种技术，例如 Kohler, G. 和 Milstein, C., *Nature* 256:495-497(1975)；Kozbor et al., *Immunology Today* 4:72(1983)；Cole et al., *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc. (1985) 第 77-96 页。

[0120] 除了在体内产生抗体的常规方法之外，还可以利用噬菌体展示技术在体外产生抗体。与常规的抗体制备相比，这样的重组抗体的制备更快并且能够针对大量的抗原产生抗体。此外，当利用常规方法时，许多抗原是非免疫原性的或毒性极大，因此不能在动物体内

用于产生抗体。而且,重组抗体的亲和性成熟(即,增加亲和性和特异性)非常简单并且相对较快。最后,能够在一个选择程序中产生针对抗原的大量不同抗体。为了产生重组单克隆抗体,人们能够利用全部都基于展示文库的各种方法来产生具有不同抗原识别位点的大量抗体池。这样的文库能够以多种方式来产生。人们能够通过重链种系基因的池中克隆合成 CDR3 区来产生合成的全套抗体并由此产生大抗体的全套抗体,从该全套抗体中能够选择出具有不同特异性的重组抗体片段。人们能够利用人类淋巴细胞池作为构建抗体文库的起始材料。可以构建人类 IgM 抗体的纯的(native)全套抗体并由此产生较大差异性的人类文库。这种方法已经被成功地广泛用于针对不同抗原选择大量的抗体。在公知的参考文献中提供了用于噬菌体文库构建和重组抗体选择的试验方案,Current Protocols in Immunology, Colligan et al(Eds.), John Wiley & Sons, Inc. (1992-2000), 第 17 章, 第 17.1 段。

[0121] 非人类抗体可以通过本领域的任何已知方法人源化的抗体。在一种方法中,将非人互补决定区(CDR)插入到人类抗体或保守抗体框架序列中。其他的改变则能够引入到抗体框架中以调节亲和性和免疫原性。

[0122] 例如, Queen 等人的美国专利第 5,585,089 号披露了一种人源化免疫球蛋白及其制备方法,其中该人源化免疫球蛋白包含来自供体免疫球蛋白的互补决定区(CDR)以及来自人类受体免疫球蛋白的重链和轻链的重链和轻链,其中少数人源化免疫球蛋白包含来自 Kabat 和 Chothia CDR 之外的供体免疫球蛋白框架的氨基酸,其中该供体氨基酸代替了受体免疫球蛋白重链或轻链框架中的相应氨基酸。

[0123] Winter 的美国专利第 5,225,539 号还披露了一种经过改变的抗体或其抗原结合片段以及它们的制备方法,其中该抗体或其抗原结合片段的可变结构与具有第一免疫球蛋白重链或轻链可变结构域的框架区以及第二免疫球蛋白重链或轻链可变结构域的互补决定区,其中少数第二免疫球蛋白重链或轻链可变结构域的抗原结合特异性、物种(species)、类(class)或亚类(subclass)与实施第一免疫球蛋白重链或轻链可变结构域不同。

[0124] 还包括与本发明的抗体具有特异性免疫反应的抗个体基因型抗体。

[0125] 用于产生单链抗体的技术(美国专利第 4,946,778 号)能够适用于将单链抗体制造本发明的多肽或多核苷酸。而且,转基因小鼠、或其他有机体(例如其他哺乳动物)能够用于表达免疫特异于本发明的多肽或多核苷酸的人源化抗体。

[0126] 可替代地,可以利用噬菌体展示技术来选择与本发明的多肽具有结合活性的抗体基因,或由筛选自人类的具有抗 VEGF 的淋巴细胞的 PCR 扩增的 ν -基因的全套抗体(repertoire)或从文库来选择(McCafferty, et al., (1990), Nature 348,552-554; Marks, et al., (1992) Biotechnology 10,779-783)。这些抗体的亲和性也能够通过例如链改组(chain shuffling)(Clackson et al., (1991) Nature 352:628)而得到改善。能够利用上述抗体来分离或鉴别表达多肽的克隆,从而通过例如亲和层析来纯化多肽。

[0127] 本发明还提供了本发明的抗体分子的保守氨基酸变异体。本发明的变异体也可以被制成保持编码的蛋白的全部分子结构。当给定包含所披露的蛋白质产物的个别氨基酸的特性时,技术人员就能够识别出一些有利的置换。氨基酸置换,即“保守置换”可以通过例如基于所涉及残基的类似极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性、和/或两亲性。

[0128] “病症”是能够受益于利用抗体的治理的任何疾病。包括慢性和急性病症或疾病，包括使哺乳动物易患所讨论病症的病理学疾病。待治疗病症的非限制性实例包括良性和恶性肿瘤；白血病和淋巴系统恶性肿瘤；神经性的、神经胶质的、星形胶质细胞的、下丘脑的和其他腺体的、巨噬细胞的、上皮细胞的、间质的和囊胚腔的病症；以及炎性的、血管原性的、免疫学病症或通透性过高的状态。

[0129] 已知 VEGF 促进脉管内皮细胞增殖和血管发生，其是各种病理学的重要组成部分，因此，本发明的抗体可以用于抵抗的病症包括肿瘤生长和转移、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化和动脉硬化、新内膜超常增生 (neointimal hyperplasia)、糖尿病性视网膜病和糖尿病的其他并发症、晶状体后纤维组织增生症、新生血管性青光眼、与年龄相关的黄斑退行性改变、沙眼性结膜炎、移植的角膜装置的免疫排斥、与眼外伤或感染有关的角膜血管发生、牛皮癣、龈炎和与血管发生和 / 或慢性感染有关的其他病症。术语“治疗有效量”是指药物对于治疗哺乳动物体内的疾病或病症有效的量。在癌症的情况下，治疗有效量的药物可以使癌细胞的数目下降；使肿瘤的体积下降；抑制（即，减慢至某种程度且优选终止）癌细胞浸润到周围器官中；抑制（即，减慢至某种程度且优选终止）肿瘤转移；以某种程度抑制肿瘤生长；和 / 或以某种程度减轻与该病症有关的一种或多种症状。该药物可以以某种程度防止已存在的癌细胞生长和 / 或杀死已存在的癌细胞，该药物可以是细胞增殖抑制药和 / 或细胞毒性剂。对于癌症治疗，在活体中的效能例如能够通过评价存活期、疾病进行的时间 (TTP)、应答率 (RR)、应答期间、和 / 或生活质量来测量。

[0130] “治疗”是指治疗性的治疗和预防或预防性的措施。需要治疗的受治疗者包括那些以极高风险患有疾病的受治疗者以及那些预防患病的受治疗者。

[0131] 术语“癌症”或“癌症的”是指或描述了通常特征在于哺乳动物体内的不受调控的细胞增殖的生理学状态。癌症的实例包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、和白血病。这样的癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌、肺癌（包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、和肺的鳞状细胞癌）、腹膜的癌症、肝细胞癌、胃癌（包括胃肠癌）、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌和各种类型的头颈癌、以及 B- 细胞淋巴瘤（包括低级别 / 滤泡非何杰金（氏）淋巴瘤 (NHL)；小淋巴细胞 (SL) NHL；中间级 / 滤泡 NHL；中间级弥漫性 NHL；高级别免疫细胞性 NHL；高级别淋巴细胞性 NHL；高级小无核裂细胞 NHL；巨大肿块 (bulky disease) NHL；外套膜细胞淋巴瘤；AIDS- 相关的淋巴瘤；和华氏巨球蛋白血症）；慢性淋巴细胞白血病 (CLL)；急性淋巴细胞白血病 (ALL)；毛发细胞白血病；慢性骨髓细胞性白血病；和移植后淋巴组织增生的病症 (PTLD)、以及与瘰疬病相关的异常脉管增殖、水肿（例如与脑部肿瘤相关的水肿）、和麦格综合征 (Meigs' syndrome)。

[0132] 术语“抗肿瘤组合物”是指用于治疗癌症的组合物，包含至少一种能够抑制或阻止肿瘤生长或机能，和 / 或引起肿瘤细胞破坏的活性治疗剂。适合用于治疗癌症的抗肿瘤组合物中的治疗剂包括但不限于化疗剂、放射性同位素、毒素、细胞因子如干扰素类、和靶向于细胞因子的拮抗剂、细胞因子受体或与肿瘤细胞有关的抗原。例如，本发明中使用的治疗剂可以是抗体，例如抗 -HER2 抗体和抗 -CD20 抗体，或小分子酪氨酸激酶抑制剂，例如 VEGF 受体抑制剂和 EGF 受体抑制剂。优选地，该治疗剂是化疗剂。

[0133] “化疗剂”是用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的实例包括烷化剂,例如塞替派和 CYTOXANTM 环磷酰胺;烷基磺酸盐,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶类,例如苯佐替派、卡波醌、美乌替派、和乌瑞替派;环乙亚胺和甲基蜜胺类 (methyamelamines),包括六甲蜜胺、三乙烯胺三嗪、三亚乙基磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲基蜜胺 (trimethylolomelamine);多聚乙酰 (尤其是布拉它辛 (bullatacin) 和布拉它辛酮 (bullatacinone));喜树碱 (包括合成类似物托泊替康);苔藓抑素;海绵多聚乙酰 (callystatin);CC-1065 (包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);自念珠藻环肽 (尤其是自念珠藻环肽 1 和自念珠藻环肽 8);多拉司他汀;倍癌霉素 (包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1);软珊瑚醇;水鬼蕉碱 (pancratistatin);匍枝珊瑚醇 (sarcodictyin);spongistatin;氮芥,例如苯丁酸氮芥、蔡氮芥、氯代磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺 (mechlorethamine)、盐酸甲氧氮芥、新氮芥、苯乙酸氮芥胆甾醇酯、泼尼莫司汀、曲磷胺、尿嘧啶芥;亚硝基脲,例如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、和雷莫司汀;抗生素,例如烯二炔类抗生素 (例如, 加里刹霉素, 尤其是加里刹霉素 γ II 和加里刹霉素 ω II (参见例如 Agnew, Chem Intl. Ed. Engl. 33 :183-186 (1994)));蒽环类抗生素,包括达内霉素 A;二膦酸盐,例如氯膦酸盐;埃斯培拉霉素;以及新制癌菌素生色团和相关的色蛋白烯二炔类抗生素生色团)、阿克拉霉素、放线菌素、安曲霉素、偶氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素 C、卡米诺霉素、去甲柔红霉素、嗜癌霉素、色霉素、更生霉素、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、ADRIAMYCINTM 多柔比星 (包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星和去氧多柔比星)、表柔比星、索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素类例如丝裂霉素 C、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌罗霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链佐星、块菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗代谢剂,例如甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、hiamiprine、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;氟尿苷,例如卡普唑酮、屈他雄酮丙酸盐、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素类,例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,例如亚叶酸 (frolinic acid);醋葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吡啶;bestrabucil;比生群;依达曲沙;defofamine;秋水仙胺;地吡酮;依氟鸟氨酸;依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲、蘑菇多糖;氯尼达明 (lonidainine)、美登醇类,例如美登素和安丝菌素;米托胍脲;米托蒽醌;莫派达醇;nitraerine;喷司他丁;蛋氨酸;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙胍;丙卡巴胍、PSKTM 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.);雷佐生;根霉素;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯乙胺;单端孢霉烯族毒素类 (尤其是 T-2 毒素、黏液霉素 A (verracurin A)、杆孢菌素 A 和蛇形菌素 (anguidine));乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿糖胞苷 (“Ara-C”);环磷酰胺;塞替派;紫杉烷,例如 TAXOLTM 紫杉醇 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、不含克列莫佛的 ABRAXANTM、紫杉醇的工程白蛋白毫微粒配方 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)、以及 TAXOTERTM 多烯紫杉醇 (Rhone-Poulenc Rorer,

Antony, 法国); 苯丁酸氮芥; GEMZAR™ 吉西他滨; 6- 硫鸟嘌呤; 巯嘌呤、甲氨蝶呤; 铂配位络合物, 例如顺铂、奥沙利铂和卡铂; 长春碱; 铂; 依托泊苷 (VP-16); 异环磷酰胺; 米托蒽醌; 长春新碱; NAVELBINER™ 长春瑞滨; 诺安托; 替尼泊苷; 依达曲沙; 柔红霉素; 氨基蝶呤; 希罗达; 伊班膦酸盐; 伊立替康 (例如 CPT-11); 拓补异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基腈 (DMFO); , 例如维甲酸; 卡培他滨; 和以上任一种的药用盐、药用酸或衍生物。

[0134] 这个定义中还包括起作用于肿瘤的调节或抑制激素的抗激素剂, 例如抗雌激素类和选择性雌激素受体调节剂 (SERM), 包括例如屈洛昔芬 (包括 NOLVADEX™ 他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4- 羟泰米芬、曲沃昔芬、盐酸雷洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮、和 FARESTON 托瑞米芬; 抑制芳香酶类的芳香酶抑制剂, 其调节肾上腺中的雌激素产量, 例如 4(5)- 咪唑、氨鲁米特、MEGASE™ 甲地孕酮乙酸盐、AROMASIN™ 依西美坦、福美坦、法倔唑、RIVISOR™ 伏氯唑、FEMARA™ 来曲唑、和 ARIMIDEX™ 阿那曲唑; 和抗雄激素类, 例如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮脯利特、和戈舍瑞林; 以及曲沙他滨 (1,3- 二氧戊烷核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 尤其是那些抑制与阻粘 (abherent) 细胞增殖有关的信号通路中的基因表达的反义寡核苷酸, 例如 PKC- α 、Raf 和 H-Ras; 核酶, 例如 VEGF 表达抑制剂 (例如 ANGIOZYME™ 核酶) 和 HER2 表达抑制剂; 疫苗, 例如基因治疗疫苗、例如, ALLOVECTIN™ 疫苗、LEUVECTIN™ 疫苗、和 VAXID™ 疫苗; PROLEUKIN™ rIL-2; LURTOTECAN™ 拓扑异构酶 1 抑制剂; ABARELIX™ rmRH; 以及上述任一种的药用盐、酸或衍生物。

[0135] 药理学

[0136] 本发明还涉及人类药物应用的药物配方, 其包含作为活性剂的至少一种特异于 VEGF 拮抗剂同工型的抗体, 用于制造该治疗组合物, 该治疗组合物用于治疗或预防本文中所描述的各种病症。

[0137] 在这样的药物和药剂配方中, 活性剂优选与一种或多种药用载体以及可选地任意其他治疗成分一起使用。该载体必须是药用的意味着其与配方中的其他成分是相容的, 而不会不当地对其受药者产生有害影响。如上文所述, 该活性剂的量为达到所希望的治疗效果所需的量, 其用量适合于达到所需的日剂量。

[0138] 通常, 可将包含抗体的抗原结合部位或包含包括类肽 (peptidemimetic) 另一种多肽的本发明的分子悬浮于用于治疗应用的无菌盐水溶液中。可替代地, 该药物组合物能够被配置成活性成分 (包含抗体的抗原结合部位的分子) 的控释剂型或延长其在患者体内的存在时间。大量适合的药物递送体系是已知的并且包括例如可植入的药物释放体系、水凝胶、羟甲基纤维素、微囊、脂质体、微乳、微球等。受控释放制剂能够通过使用聚合物到复合物或者吸附本发明的分子来制备。例如, 生物相容性聚合物包括聚 (乙烯 - 共 - 醋酸乙烯酯) 基质和硬脂酸二聚体与癸二酸的聚酸酐共聚物基质。本发明的分子的释放速率, 即抗体或抗体片段从这样的基质的释放速率, 取决于分子的分子量、基质中的分子的量、和分散颗粒的大小。

[0139] 本发明的药物组合物可以通过任意适合的方式给予, 例如口服、局部地、鼻内地、皮下地、肌内、静脉内、动脉内、关节内、损伤内或肠胃外给药。通常, 优选静脉内 (i. v.)、关节内、局部地或肠胃外给药。

[0140] 对于本领域普通技术人员而言, 除了给药方案之外, 治疗有效量的本发明的分子将取决于所给予的分子的单位剂量、该分子是否与其他治疗及一起给予、免疫状态和患者

的健康程度、所给予的分子的治疗活性和治疗医生的判断。正如本文中所使用的,“治疗有效量”是指在一段时间内使与待治疗病症有关的一种或多种症状减轻所需的分子的量。

[0141] 尽管本发明的分子的适合剂量根据给药途径、分子类型(多肽、多核苷酸、有机分子等)、年龄、体重、性别、或患者的病况而有所不同并且应该最终由医生来确定,但在口服给药的情况下,日剂量通常为约0.01mg/kg体重至约500mg/kg体重之间,优选为约0.01mg/kg体重至约50mg/kg体重之间,更优选为约0.1mg/kg体重至约10mg/kg体重之间。在肠胃外给药的情况下,日剂量通常为约0.001mg/kg体重至约100mg/kg体重之间,优选为约0.001mg/kg体重至约10mg/kg体重之间,更优选为约0.01mg/kg体重至约1mg/kg体重之间。该日剂量可以例如以通常每日1-4次单独给药的给药方案来给予。其他优选的给药方法包括约0.01mg/kg体重至约100mg/kg体重的关节内给药。描述了在达到有效量时应考虑的因素,例如Goodman和Gilman的著作: *The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 第8版, Pergamon Press, 1990; 以及 Remington 的 *Pharmaceutical Sciences*, 第17版, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990。

[0142] 组合化疗的适合剂量方案是本领域中已知的并且描述于例如 Saltz et al. *Proc ASCO* 1999, 18, 233a 和 Douillard et al., *Lancet* 2000, 355, 1041-7 中。

[0143] 作为活性成分的本发明的分子是可溶性的、分散的或可与赋形剂混合的,该赋形剂公知是药用的并且与活性成分相容。适合的赋形剂例如是水、盐水、磷酸盐缓冲液(PBS)、葡萄糖、甘油、乙醇等以及它们的组合。其他适合的载体是本领域普通技术人员公知的。此外,如果需要的话,该组合物可含有少量的辅助性物质,例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂。

[0144] 以下的实施例意在举例说明如何制造并利用本发明的化合物和方法,而不是意在进行限制。尽管已经结合其具体实施方式描述了本发明,但对于本领域技术人员来说可以具有许多修改和变化是显而易见的。因此,所有这样的修改和变化都落在本发明所附权利要求的精神和宽范围内。

[0145] 实施例

[0146] 用于制备和表征抗体的方法是本领域中公知的。以下是对于根据本发明的生产抗-VEGFxxx抗体的示例性技术的描述。用于制造抗体的 VEGF 抗原以 VEGF 的激动形式存在而不是以 VEGF 的拮抗形式的 VEGFxxx 的任意肽序列。

[0147] 实施例 1: 多克隆抗体

[0148] 优选通过相关抗原和佐剂的多重皮下(sc)或腹膜内(ip)注射在动物体内产生多克隆抗体。利用双官能团或衍生试剂的使相关抗原与对待免疫的物种中产生免疫性的蛋白相结合是有益的,所述蛋白例如是钥孔戚血蓝素(KLH)、血清蛋白、牛甲状腺球蛋白、或大豆胰蛋白酶抑制剂,所述双官能团或衍生试剂例如是马来酰亚胺基苯甲酸琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基结合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基结合)、戊二醛、琥珀酐、 SOCl_2 、或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, 其中 R 和 R^1 是不同的烷基。

[0149] 针对抗原、产生免疫性的结合物、或组合的衍生物来免疫动物,例如,(分别用于兔子或小鼠)100 μg 或 5 μg 的蛋白或结合物与 3 倍体积的弗氏完全佐剂并在多处皮内注射该溶液。一个月后,通过多处皮内注射对动物追加 1/5 到 1/10 的弗氏完全佐剂中的原始肽量或结合物。7 到 14 天后,杀死动物并分析血清的抗体效价。对动物追加剂量直到效价稳定。优选地,用相同抗原的结合物对动物追加剂量,但是与不同的蛋白结合和/或通过不

同的交联剂结合。结合物也能够随着蛋白质融合在重组细胞培养物中制备。同样,例如明矾的凝聚试剂 (aggregating agent) 适合用于增强免疫反应。

[0150] 实施例 2:特异于 VEGF₁₆₅ 的多克隆抗体的制备

[0151] 设计多克隆抗体以结合和抑制 VEGF₁₆₅ 的促血管发生同工型而不是 VEGF₁₆₅b 的抗血管发生形式。通过氨基己酸间隔区使含有七个 C 端氨基酸残基的 VEGF₁₆₅ 的 RCDKPRR 肽与 KLH 结合,并用于免疫兔子。从免疫的兔子中收集含有多克隆抗体的血清。

[0152] 用于免疫的肽-KLH 结合物的制备

[0153] 在与 KLH 或树脂结合之前检查肽硫醇基 (peptide thiol group), 因为肽硫醇基在合成后有消失的趋势。

[0154] 1. 在 0.1M NaPi pH 7.2 中制备 5mM Ellman 氏试剂 (二硫 - 双 -2- 硝基苯甲酸) 的溶液

[0155] 2. 在去皮试管中称量大约 1mg 的肽。

[0156] 3. 加入 0.5ml 试剂。溶液变为亮黄色。

[0157] 4. 在缓冲液中将混合物稀释到 1/50。在相同浓度下在 412nm 处读取针对试剂的吸收。

[0158] 5. 使用 14,000 的摩尔消光系数基于硫醇基计算肽的表观分子量。将结果与肽的期望分子量进行比较。数值应该与三个因子中的一个一致,表观分子量通常更高。如果硫醇浓度异常的低,即,表观分子量非常高,则肽可能发生了错误 - 总之可能没有结合好。然后应该再通过用过量 DTT 并上 P2 柱来减少肽从而使硫醇基再生。

[0159] 将肽与 KLH 结合 (两只兔子,每注射只五次)

[0160] 1. 将 100mg 钥孔戚血蓝素 (KLH) 溶解于 2ml 水中,经声处理和涡流处理,放在 4℃ 的旋转体中大约 4 小时。

[0161] 2. 在 2 升 0.1M 的磷酸钠 pH 7.8 中将溶液透析过夜。这将去除任何污染硫醇或氨基化合物。

[0162] 3. 在离心机中将溶液全速旋转 10 分钟以去除聚集体。

[0163] 4. 将 KLH 溶液等分成用于 -SH 和 -NH₂ 结合的两个等分试样。

[0164] 5. 对于 -NH₂ 结合,向一个等分试样中加入 25mg 肽,随后加入戊二醛最终达到 0.1%。加入固体的肽或储存在 DMSO 中的浓度为 100mg/ml 的肽。加入戊二醛之后,用 pH 试纸检测 pH 值,用氢氧化钠将 pH 调节到 7.8。溶液在 4℃ 孵育 8-12 小时,轻轻地旋转溶液。

[0165] 6. 加入一小片 NaBH₄ 以除去剩余的戊二醛 (因为其在大的试管中倾向于放出气体 (fizz up)), 溶液在 4℃ 孵育 8-12 小时。

[0166] 7. 对于 -SH 结合,将 KLH 的另一个等分试样加热到室温。加入 DMSO 中的浓度为 100mg/ml 的 1/9 体积的碘乙酸 N- 羟基琥珀酰亚胺酯 (碘乙酰胺试剂应避光保存)。也可以从 Sigma 处购买 IAA-NHS 酯。

[0167] 8. 室温下 10 分钟之后,KLH 开始有少许浑浊。将其装载到 P-10 柱内用 0.1M 磷酸钠 pH 7.8 来平衡 (所述柱为至少十倍于样品的体积)。通过颜色来合并包含 KLH 的部分 (有些灰绿的颜色)。如上述第 5 步所述加入 5mg 的肽。将溶液在 4℃ 孵育至少 8 小时,轻轻地旋转溶液。

[0168] 9. 合并来自于两个步骤的结合肽,用 0.15M 的 NaCl 稀释到 5ml,并通过剧烈的声

处理将其破碎。将免疫原等分成 1ml 的等分试样（每一等分试样用于免疫两只兔子）并将其冷冻。

[0169] 按如下操作来进行免疫：

[0170]

操作	时间
免疫前测试血液 & 免疫 #1	0
免疫 #2	7 天
测试血液 #1	14 天
免疫 #3	21 天
测试血液 #2	28 天
免疫 #4	35 天
测试血液 #3	42 天
免疫 #5	63 天
收获血液	70 天

[0171] 合并的血清在按下列方法制备的肽-KLH 柱中进行亲和纯化，以进行单特异性的多克隆抗体制备：

[0172] 将肽-KLH 与 NHS-活化的树脂结合

[0173] 1. NHS-活化的 **Sepharose® 4Fast Flow** 是一种预活化的琼脂糖基质。NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)与含有伯氨基的配体结合形成化学稳定的酰胺键。NHS-活化的 **Sepharose® 4Fast Flow** 提供间隔臂并因此特别适于固定小的蛋白质和肽配体。高度的稳定性和间隔臂以及树脂的高流动性的和稳定性特性使其对于制药应用而言具有吸引力。

[0174] 2. 结合的凝胶能够用于制备能够隔离包括结合 KLH 的肽抗原在内的具体物质的亲和吸附剂，从而在一个步骤中就达到很高的纯度。

[0175] 3. 结合反应是快速和自发的，并且提供作为悬浮液 of NHS-活化的 **Sepharose® 4Fast Flow**。使配体与活化的基质结合包括结合后的清洗凝胶。

[0176] 4. 用于结合的缓冲液是：结合缓冲液：0.2M NaHCO₃、0.5M NaCl、pH 8.3，酸性溶液：1mM HCl（保持冷却），阻断缓冲液：0.5M 乙醇胺、0.5M NaCl，pH 8.3，水缓冲液：0.1M 醋酸酯、0.5M NaCl，pH 4.0，存储缓冲液：20% 乙醇 / PBS，平衡缓冲液：PBS。

[0177] 最后，使用 Vivaspin 仪对亲和纯化血清实施超滤。

[0178] 通过孵育含有 VEGF₁₆₅ 和 VEGF_{165b} 的抗体纯化部分的蛋白质印记分析来确定抗体的特异性。

[0179] 蛋白质印迹分析：

- [0180] 在 10%脱脂乳 /PBS/0.05%吐温中阻断过夜；
- [0181] 一抗 - 兔全血清在 2.5%阻断溶液中以 1 : 50 进行稀释 2 小时；
- [0182] 二抗 - 羊抗兔在 2.5%阻断溶液中以 1 : 8000 进行稀释；并在 x 光下曝光 20 秒。
- [0183] 如图 2 中所示,亲和纯化的多克隆抗体部分(相对外显子 8a 的 RCDKPRR 的表位产生)检测到 VEGF₁₆₅ 但没有检测到 VEGF_{165b}(左侧板),而特异于 VEGF_{165b} 的抗体(相对外显子 8b 的 SLTRKD 的表位产生)识别出 VEGF_{165b} 而没有识别出 VEGF₁₆₅(右侧板)。
- [0184] 利用以下分析对经纯化的抗体进行进一步评价：
- [0185] ELISA(Perrin et al., diabetologia 2005,48,2422;Varey et al., British J. Cancer 2008,1)；
- [0186] 迁移分析(如在 Bates et al., Cancer Research 2002,62,4123 中描述的)；
- [0187] 眼部血管生成(如在 Konopatskaya et al., Molecular Vision 2006,26,626 中描述的)；
- [0188] 体内肿瘤研究(如在 Rennel et al., Eur. J. Cancer 2008,44,1883 中描述的)；
- [0189] 免疫 - 组织化学(如在 Pritchard-Jones et al., B r. J. Cancer 2007, BrJ Cancer,97,223 中描述的)。
- [0190] 实施例 3 :抗 VEGF₁₆₅ 的多克隆抗体对内皮细胞迁移的抑制
- [0191] 在 Bates et al., Cancer Research 2002,62,4123-4131 中描述了迁移抑制的测试。该分析在含有胶原涂层的聚碳酸酯过滤插入物(8m 孔 ;微孔过滤器)的改进的 24- 孔勃顿小室(Boyden chamber)内完成。插入物位于包含 0.5mlVEGF 同工型 / 孔且含有或不含有 4-80ng/ml 纯净抗体部分的 24- 孔板中。将人脐静脉内皮细胞(HUVEC)悬浮于无血清的培养基中,在每一个孔的上部腔中加入 25,000 个细胞。将板孵育 6 小时以使得发生迁移,去除培养基,两个腔均用 PBS 清洗两遍。然后向腔中加入培养基中的 0.2mg/ml 噻唑蓝(MTT),并在 37℃孵育 3 小时。去除培养基,用 PBS 清洗腔两遍。用棉签去除上部腔中的未迁移细胞晶体(褪色蓝),将其置于 1ml DMSO 中以溶解 MTT 产物。迁移细胞晶体(在插入物的下侧)同样溶解于 MTT 中。将样品静置过夜以使产物完全溶解。使用分光光度计在 570nm 处确定可溶性 MTT 的吸光度。然后,可以从下部孔的强度占两个孔的整体强度的百分比来计算迁移的百分比。
- [0192] 如图 3 所示,多克隆抗体的剂量增加导致 VEGF₁₆₅ 介导的 HUVEC 迁移的剂量依赖性抑制。
- [0193] 相对于外显子 8a 的抗体在 HUVEC 迁移上的效果同样与 VEGF_{165b} 或 Lucentis™(**AVASTIN®**的 Fab 抗体片段)结合进行测试。如图 4A、图 4B 和图 5 所示,VEGF_{165b} 和 Lucentis™均使相对于外显子 8a 的多克隆抗体的抑制效应增加。此外,与 VEGF_{165b} 结合的相对于外显子 8a 的多克隆抗体的抑制效果比与 VEGF_{165b} 结合的 **AVASTIN®** / 雷珠单抗(lucentis)的抑制效果要强。
- [0194] 实施例 4 :单克隆抗体
- [0195] 可以例如使用 Kohler et al., Nature, 1975, 256 :495 首次描述的杂交瘤方法或可以通过重组 DNA 方法(美国专利第 4,816,567 号)来制备单克隆抗体。
- [0196] 在杂交瘤方法中,小鼠或其他适当的宿主动物(例如仓鼠或短尾猿)如上文描述的被免疫以产生淋巴细胞,该淋巴细胞产生或能够产生特异性结合于用于免疫的抗原的抗

体。可替代地,淋巴细胞可以在体外被免疫。然后使用合适的融合试剂(例如聚乙二醇)使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,从而形成杂交瘤细胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第 59-103 页 (Academic Press, 1986))。

[0197] 将这样制备的杂交瘤细胞接种到适合的培养基中并在其中生长,该适合的培养基优选含有一种或多种抑制未融合的、亲代骨髓瘤细胞生长或存活物质。优选的骨髓瘤细胞是那些有效融合的,通过所选择的产生抗体的细胞而支持稳定高水平地生产抗体,以及对培养基(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,例如那些来自 MOPC-21 和 MPC-11 的可从 Salk Institute Cell Distribution Center, 圣地亚哥, CA, USA 得到的小鼠肿瘤,和可从美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), Rockville, MD, USA 得到的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。也描述了人骨髓瘤和人鼠种间骨髓瘤细胞系用于人类单克隆抗体的生产 (Kozbor, *J. Immunol.*, 133 :3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第 51-63 页 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0198] 分析了杂交瘤细胞生长的培养基用于直接针对抗原的单克隆抗体生产。优选地,通过杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性通过免疫沉淀反应或体外结合分析来确定,例如放射性免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附分析 (ELISA)。

[0199] 在确定了产生所需特异性、亲和性、和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,可以通过有限的稀释步骤对克隆体实施亚克隆并通过标准方法生长 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第 59-103 页 (Academic Press, 1986))。用于此目的的适合的培养基包括,例如, D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。此外,杂交瘤细胞可以作为动物体内的腹水瘤在体内生长。

[0200] 可将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水液体分离、或与通过常规免疫球蛋白纯化步骤(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)得到的血清分离。

[0201] 编码单克隆抗体的 DNA 容易分离并使用常规方法(例如,通过使用能特异性结合于编码单克隆抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)进行测序。杂交瘤细胞是这样的 DNA 的优选来源。将 DNA 分离后,可将其置于表达载体中,然后将载体转染到宿主细胞(例如,不产生免疫球蛋白的大肠杆菌细胞、猿 COS 细胞、中华仓鼠卵巢细胞,或骨髓瘤细胞)中,从而在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。下文中将更详细地描述抗体的重组生产。

[0202] 在另一种实施方式中,能够从利用 McCafferty et al., *Nature*, 348 : 552-554 (1990) 中描述的技术产生的抗体噬菌体文库分离抗体或抗体片段。Clackson et al., *Nature*, 352 :624-628 (1991) 和 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222 :581-597 (1991) 分别描述了使用噬菌体文库进行的鼠抗体和人抗体的分离。随后的出版物通过链改组描述了高亲和性 (nM 范围) 人类抗体的生产 (Marks et al., *Bio/Technology*, 10 :779-783 (1992)), 以及在作为一种用于构建非常大的噬菌体文库的策略的组合感染和体内重组 (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21 :2265-2266 (1993))。因此,这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代选择。

[0203] 也可以对 DNA 进行修饰,例如,用人重链和轻链恒定结构域的编码序列替代同源

的鼠序列(美国专利第 4,816,567 号;Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)),或通过将全部或部分非免疫球蛋白多肽共价结合于免疫球蛋白编码序列。

[0204] 典型的这种非免疫球蛋白多肽被抗体的恒定结构域替代,或者它们被抗体的一个抗原结合位点的可变结构域替代,以产生包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合位点和对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点的嵌合二价抗体。

[0205] 实施例 5:特异于 VEGF_{xxx} 同工型的单克隆抗体的制备

[0206] VEGF₁₆₅ 的具有 6 个和 9 个氨基酸 C-末端序列的合成肽片段(CDKPRR SEQ ID NO: 1, TCRCDKPRR SEQ ID NO: 5)与作为载体分子的钥孔戚血蓝素(KLH)(英国布里斯托尔大学(University of Bristol)生物化学系)结合,并且然后用于免疫 6-8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠。

[0207] 根据一种试验方案,动物在第 1、21 和 42 天被皮下注射弗氏完全佐剂(FCA)中的 100 μg 肽-KLH 结合物,并在第 63、64 和 65 天分别追加剂量进行腹腔注射。第二天人道地处死小鼠并收集脾脏。

[0208] 其他的免疫试验方案按如下完成:安排 10 只雌性 Balb/C 小鼠(6-8 周龄)并在笼舍中饲养一周直到实施免疫时。使用与 KLH 结合的以上两种 VEGF₁₆₅ 肽(TCRCDKPRR SEQ ID NO: 5 和 CDKPRR SEQ ID NO: 1)。

[0209] 第一次注射(时间为 0)-对十只小鼠(每种肽五只)皮下注射完全弗氏佐剂(CFA)中的 100 μl (100 μg) 肽-KHL 结合物。

[0210] 第二次注射(约 3 周后)-用不完全弗氏佐剂(IFA)中的 100 μl (100 μg) 肽-KHL 结合物进行腹腔(IP)内注射来免疫小鼠。

[0211] 第三次注射(约 3 周后)-用 PBS 中的 100 μl (100 μg) 肽-KHL 结合物进行腹腔内注射来免疫小鼠。

[0212] 第四次注射(1 天后)-用 PBS 中的 100 μl (100 μg) 肽-KHL 结合物进行跨腹腔内注射来免疫小鼠。

[0213] 最后一次注射(1 天后)-用 PBS 中的 100 μl (100 μg) 肽-KHL 结合物进行跨腹腔内注射来免疫小鼠。

[0214] 收集(最后一次注射的一天后)-将经免疫的小鼠处死并转移到国家血液协会(National Blood Service, NBS)的 Southmead 医院以实施融合。

[0215] 将脾细胞与聚乙二醇融合于 NS0 小鼠骨髓瘤细胞系。在 96 孔板中将融合的细胞培养 2 周。由 ELISA 筛选确定的来自阳性孔的细胞在 96 孔板中连续稀释并在 10% DMEM 和杂交瘤克隆增强因子中培养。重复同样的步骤直到每个板连续 3 次达到 100% 阳性。在涂有羊抗人 VEGF 抗体(PBS 中浓度为 0.8 μg/ml, R&D)的 Immulon IIHB 平孔 96 孔板中完成筛选(Thermo Life Sciences Ltd.)。用 PBS/T 清洗之后,向孔中加入 100 μl 的 2ng/ml VEGF₁₆₅ 或重组细胞 VEGF₁₆₅b(R&D 系统)并在 37°C 振荡孵育 15 分钟。清洗之后,加入来自杂交瘤的 100 μl 条件培养基,并在 37°C 时震动着孵育 15 分钟。清洗之后,加入 100 μl 结合了 HRP 的羊抗鼠免疫球蛋白(1:1000 在 1% BSA/PBS 中, DACO)并在 37°C 振荡孵育 15 分钟。最后一次清洗后,加入邻苯二胺二氢氯化物(OPD)物质(Sigma Chemical Co., USA)并且在 492nm 处使用读板器(plate reader)测量吸光度。选择对 VEGF₁₆₅ 呈阳性,但对 VEGF₁₆₅b 呈阴性的样品。纯化并浓缩单克隆抗体,在含有 10% 牛 IgG- 缺乏 FCS(Hyclone, USA) 和 100 单位青

霉素、100 μ g 链霉素和 2mM 左旋谷氨酰胺的 DMEM(Sigma Chemical Co., USA) 中培养所选择的杂交瘤细胞的克隆体。在 G 蛋白 Sepharose 4Fast Flow 柱 (Amersham Biosciences, USA) 中纯化单克隆抗体。用 vivaspin 20(Vivascience AG, Hannover, 德国) 浓缩抗体并最终溶解在 PBS 中。

[0216] 使用如下的试验方案利用 ELISA 分析来测试每一种单克隆抗体克隆体：

[0217] 涂有 6 个氨基酸肽和 9 个氨基酸的肽的抗原：

[0218] 1. 无 VEGF₁₆₅ 的肽：10mg/ml (储存浓度)，工作浓度 10 μ g/ml。

[0219] 2. VEGF₁₆₅-BSA 肽：5mg/ml (储存浓度)，工作浓度 10 μ g/ml。

[0220] 3. VEGF₁₆₅b (阴性对照)：BSA+ 肽，存储浓度 1mg/ml；工作浓度为在碳酸盐涂覆溶液中 1 μ g/ml (1 : 1,000)。

[0221] 4. 6 个氨基酸的 VEGF₁₆₅b-BSA，存储浓度 2.5mg/ml；工作浓度，1 μ g/ml (1 : 2,500 稀释)。

[0222] 5. 肽-myc (髓细胞瘤病毒致癌基因同系物)：(阴性对照) myc-BSA，存储浓度，1.4mg/ml；工作浓度为在碳酸盐涂覆溶液中的 1 μ g/ml (1 : 1,400)。

[0223] 加入 75 μ l / 孔并在 37°C 振荡 15 分钟或 1 小时。

[0224] 用 PBS/吐温清洗孔三次。

[0225] 加入细胞上清 (推定样品包括单克隆抗体)：

[0226] 向 PBS/吐温中加入 75 μ l (来自 24 孔板)，或 75 μ l 稀释样品 (来自 96 孔板) (因为肽是经纯化的，无需 BSA 阻断)。

[0227] 孔在 37°C 时振荡孵育 15 分钟。

[0228] 加入二抗：

[0229] 1 : 2,500 稀释的结合了 HRP 的羊抗鼠免疫球蛋白 (Sigma A0412) 用于较少背景的肽检测。在 37°C 时振荡孵育 15 分钟。

[0230] 用 PBS/Tween 清洗三次。

[0231] 加入物质：

[0232] 枸缘酸盐-磷酸盐缓冲液，pH 5.0 加热到室温。

[0233] 将 30mg OPD (Sigma, No. -8412) 溶解于 30ml 枸缘酸盐-磷酸盐缓冲液中，在使用前加入 15 μ l 的 H₂O₂ 并在室温时孵育 15 分钟。

[0234] 终止：

[0235] 终止溶液：加入 100 μ l / 孔的 1M HCl (向含有 424ml 的 dH₂O 的瓶加入 40ml 的浓 HCl)。

[0236] 分析：

[0237] 在 492nm 处使用读板器测量吸光度。

[0238] 实施例 6：确定特异于激动剂 VEGF 的单克隆抗体潜能的迁移分析

[0239] 为了确定针对 VEGF、促血管发生形式的单克隆抗体的潜能，使用 ECV304 内皮细胞来进行迁移抑制分析。该分析确定了抗体抑制 ECV304 内皮细胞响应于 VEGF₁₆₅ 和 / 或 VEGF₁₆₅b 刺激而发生迁移的能力并按如下步骤完成：

[0240] 在无血清培养基中孵育 ECV304 内皮细胞 15 到 16 小时。

[0241] 用 200 μ l 附着因子 (attachment factor) 涂覆 8 μ m 插入物并在 4°C 时放置过夜

或在 37℃放置超过 1 小时。除去溶液并留下插入物在细胞培养罩中放置风干。

[0242] 在 PBS 中清洗细胞两次并用胰酶消化 5 分钟（通过朝手心内侧小心地敲打烧瓶而确保所有细胞分离）。

[0243] 将细胞慢慢旋转并且再悬浮于少量的已知培养基 +0.1% FCS 中。

[0244] 统计细胞并在 500 μ l 中稀释至 100,000 个细胞 (200,000 细胞 /ml)。

[0245] 制备趋化溶液 (500 μ l / 孔)。

[0246] 条件 (1nM 是 40ng/ml VEGF₁₆₅) :

[0247] 1. 阳性对照 (5% FCS, 即, 常规完全培养基)

[0248] 2. 阴性对照 (0.1% FCS, 即为低血清)

[0249] 3. 0nM 抗体 +1nM VEGF₁₆₅

[0250] 4. 10nM 抗体 +1nM VEGF₁₆₅

[0251] 5. 20nM 抗体 +1nM VEGF₁₆₅

[0252] 6. 40nM 抗体 +1nM VEGF₁₆₅

[0253] 7. 60nM 抗体 +1nM VEGF₁₆₅

[0254] 8. 80nM 抗体 +1nM VEGF₁₆₅

[0255] 溶液应该是经过灭菌的或经过过滤灭菌的。

[0256] 使用 24 孔板 (悬浮 Greiner 的板, 用于悬浮生长 662102 且没有组织可塑性 (tissue plastic)), 向孔的底部加入 500 μ l 趋化溶液 (附着因子级联生物制剂, s-006-100)。

[0257] 将插入物 (Millicell-PCF, PI8P01250) 风干并向孔中加入 500 μ l 细胞悬浮液。小心地将插入物放置在孔中, 不能在插入物下形成气泡。

[0258] 在培养箱中孵育板 6 小时以使得发生迁移。

[0259] 从两个层中去除培养基并且上层和下层均用 PBS 清洗两次。

[0260] 向每个孔中加入 300UL 4% 仲甲醛 /PBS, 并将孔放置 15 分钟。

[0261] 排净培养基并用 PBS 清洗孔三次。

[0262] 向每个孔中加入 200UL Hoechst 染料 (5UG/ml, 在 PBS/T 中 1 : 20 稀释储存) 并将孔在黑暗中放置 30-45 分钟。

[0263] 用 0.5% PBS/ 氟核清洗孔三次并用 PBS 清洗两次, 并用棉签去除未迁移细胞。

[0264] 使用解剖刀小心切开膜并使用 Vectashield 液体封固剂 (liquid mount) (Vectashield Vector, H-1000) 在将膜安装在载片上, 并使用清漆密封。

[0265] 在 10 个随机视野中使用 40 倍放大对迁移的细胞进行计数, 其中至少两个观察视野远离插入物边缘说明插入物边缘周围的任何未迁移和 / 或未去除细胞的累积。

[0266] 对于基底 / 对照, 每个视野中有 15-30 个细胞, 对于 40ng/ml VEGF₁₆₅, 有 80-150 个细胞 (与对照相比为 4-5 倍)。40ng/ml VEGF₁₆₅b 本身增加了 1.5-2 倍并且 VEGF₁₆₅+VEGF₁₆₅b 的迁移减少了约 3 倍。

[0267] 微孔插入物的迁移百分比这样计算 :

[0268] $[(\text{每个插入物中的细胞数} / 0.0028637) / 1 \times 10^5] \times 100$

[0269] 0.0028637 = 直径为 5mm 微孔插入物的观察视野所占的插入物面积, 对于 Falcon, 这个值是 0.00477。

[0270] 如图 6 所示,相对于 VEGF₁₆₅ 的外显子 8a 产生的单克隆抗体抑制了以剂量依赖方式进行的迁移。图 7 描述了测试相对于激动性 VEGF 同工型 VEGF₁₆₅ 的单克隆和多克隆抗体的内皮细胞迁移分析的结果。

[0271] 实施例 7 :抗 -VEGF_{xxx} 安全性药理学分布的特征

[0272] 对相对于促血管发生 VEGF 同工型 (VEGF_{xxx}) 的抗体进行单独测试并与 VEGF_{165b} 进行结合测试。期望动物和人体的 VEGF_{xxx} 特异性抗体的安全性优于用 VEGF 清除剂和 VEGFR 阻断剂所观察到的安全性。

[0273] 已知 VEGF 可作为多效因子。其不仅控制血管发生,而且还作为体内许多细胞和组织 (例如神经元、视网膜色素细胞、肾中正常的足细胞和成熟血管) 的存活因子。VEGF 的完全耗尽是例如通过不能区分 VEGF 的促血管发生形式和抗血管发生形式的抗体和 VEGFR 阻断剂会使患者视网膜损伤、出血和蛋白尿症和肾损伤和其他严重的不利事件而达到的。

[0274] 期望特异性靶向于促血管发生形式的 VEGF 的抗体更安全且更有效,因为它们清除了促血管发生形式的 VEGF 却没有清除 (spare) 抗血管发生形式的 VEGF。这使得抗血管发生形式的 VEGF 与 VEGFR1 和 VEGFR2 结合并起到了抗血管发生和细胞保护作用。特异于 VEGF 促血管发生同工型的抗体的安全性曲线在以下几个分析中表征:

[0275] 心血管安全性曲线

[0276] 针对促血管发生形式的 VEGF 的抗体的心血管安全性曲线是通过测量用抗 -VEGF_{xxx} 或 VEGF_{165b} 或 VEGF₁₆₅ 或 VEGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 治疗的动物的血压来表征的。而目前可利用的治疗方法使血压增加,期待特异于 VEGF 促血管发生同工型的抗体在动物和人体中具有更好的心血管安全性。

[0277] VEGF 抑制剂的严重副作用包括明显的蛋白尿症。已经表明 VEGF_{165b} 不会诱导蛋白尿症,因此特异于促血管发生形式的 VEGF 的抗体的肾脏安全性要优于用上述药物的肾脏安全性。通过肾小球内皮细胞在体外和体内的通透性试验来检查特异于 VEGF 促血管发生同工型的抗体的效果。特异于促血管发生形式的 VEGF 的抗体抑制由肾小球内皮细胞中的 VEGF₁₆₅ 引起的通透性。

[0278] 与抗 -VEGF 抗体和 VEGFR TKI 相比较来实施血压测量。而目前可利用的治疗方法会使血压增加,期望特异于 VEGF 促血管发生同工型的抗体具有更好的心血管安全性。

[0279] 对内皮细胞的细胞毒性分析

[0280] 已知 VEGF 抑制剂能够引起毛细管退化和内皮细胞死亡。VEGF_{165b} 没有细胞毒性,而是相反地对培养中的内皮细胞起保护作用同时 VEGF_{165b} 抗体会使细胞毒性增加。特异于促血管发生形式的 VEGF 的抗体对细胞存活的影响是通过与 VEGF_{165b}、VEGF₁₆₅、VEGF 清除剂和 VEGFR 阻断剂相比较来表征的。

[0281] 视网膜色素上皮细胞的细胞毒性分析

[0282] 作为细胞保护因子的 VEGF_{165b} 是一种可能的视网膜眼部治疗方法。为了确定 VEGF_{165b} 是否具有毒性或对视网膜色素上皮细胞具有保护性作用, RPE 细胞是血清饥饿的并用 VEGF_{165b} 或 VEGF_{165b} 的抗体处理并通过 LDH 分析来测量细胞毒性。结果清晰地表明 VEGF_{165b} 是 RPE 细胞的存活因子。测试了特异于促血管发生形式的 VEGF 的抗体对由血清耗尽引起的视网膜色素上皮细胞死亡的抑制作用。

[0283] 在体外进行的神经元细胞毒性分析

[0284] VEGF₁₆₅b 对其他细胞类型也具有细胞保护作用。之前就已知通过 VEGF₁₆₅ 用谷氨酸盐（或酯）使新生大鼠的海马神经元在兴奋性中毒过程中从细胞死亡得到恢复。用 VEGF₁₆₅b 对 CA1 或 CA3 神经元进行处理减少了由谷氨酸盐（或酯）引起的细胞毒性。为了确定是否存在 VEGF₁₆₅b 的再生效应，在培养中解离并测量轴突长度之后，使背根神经节形式的成年大鼠经受 VEGF₁₆₅b 处理。这表明能够使轴突长度增加的 VEGF₁₆₅b 处理表明，VEGF₁₆₅b 在体外具有细胞保护和神经元再生特性。

[0285] 为了表征对细胞保护作用的影响，与用 VEGF 清除剂和 VEGFR TKI 相比，在适当模型中测试了用相对于促血管发生 VEGF 同工型的抗体处理，并且与 VEGF₁₆₅b 一起处理和与 VEGF₁₆₅b 一起处理的细胞保护作用效果。

[0286] 实施例 8：人源化抗体和人类抗体

[0287] 人源化抗体，典型地具有嫁接有非人 CDR 的人类框架。因此，人源化抗体具有一个或多个从非人来源引入的氨基酸序列。这些非人氨基酸残基通常被称为“输入（import）”残基，它典型地来自“输入”可变结构域。人源化基本上可以在按 Winter 及其合作者的方法（Jones et al., Nature, 321:522-525(1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327(1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536(1988)) 之后，通过用啮齿动物 CDR 或 CDR 序列取代人类抗体的相应序列来完成。因此，这种“人源化的”抗体是嵌合抗体（美国专利第 4,816,567 号），其中实质上并不是所有的完整人可变结构域都被来自非人物种的相应序列所取代。实际上，人源化抗体通常是其中的一些 CDR 残基和可能的一些 FR 残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基所取代的人类抗体。

[0288] 用于制备人源化抗体的人可变结构域（包括轻链和重链）的选择对于减少抗原性是很重要的。根据所谓的“最适合”方法，对已知的人可变结构域序列的整个文库进行筛选，以得到啮齿动物抗体的可变结构域的序列。然后，将最接近啮齿动物序列的人类序列作为人源化抗体的人类框架（FR）（Sims et al., J. Immunol., 151:2296(1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901(1987)）。另一种方法使用来源于轻链或重链的特定亚基的所有人类抗体的保守序列的特定框架。同样的框架可以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)）。

[0289] 更重要的是抗体的人源化应保持对抗原的高亲和力和其他好的生物学特性。为了达到这个目标，根据一种优选的方法，人源化的抗体是使用亲代序列和人源化序列的三维模型通过对亲代序列和各种概念上的人源化产物的分析过程来制备的。三维免疫球蛋白模型通常是可利用的而且是本领域技术人员熟悉的。可利用说明和展示所选择的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。这些展示的检测使得能够对这些残基在候选免疫球蛋白序列功能化过程中所起的作用进行分析，即，对影响候选免疫球蛋白与抗原结合能力的残基进行的分析。利用这种方法，可从接受体和输入序列选择并结合 FR 残基，因此达到希望的抗体性质，例如目标抗原的亲和力增加。通常，CDR 残基直接并且大部分本质上与抗原结合有关。

[0290] 可替代地，现在已经能够制造转基因动物（例如小鼠），其在免疫后能够在缺乏内源性免疫球蛋白生产的情况下产生人类抗体的全长全套抗体谱。例如，已经描述了嵌合基因以及种系变异小鼠体内的抗体重链连接区（JH）基因的同合型缺失

(homozygous deletion) 会导致完全抑制内源性抗体产生。人类种系免疫球蛋白基因阵列在这样种系变异小鼠中的转移使得在抗原激发后产生人类抗体。参见,例如, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551(1993); Jakobovits et al., Nature, 362 :255-258(1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7 :33(1993); and Duchosal et al. Nature 355 :258(1992)。人类抗体也可以来自于噬菌体展示文库 (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227 :381(1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222 :581-597(1991); Vaughan et al. Nature Biotech 14 :309(1996))。

[0291] 实施例 9 :抗体片段

[0292] 已经发展了用于生产抗体片段的各种技术。通常,这些片段经由完整抗体的蛋白水解消化而得到(参见,例如 Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24 :107-117(1992) 和 Brennan et al., Science, 229 :81(1985))。然而,现在能够直接通过重组宿主细胞来生产这些片段。例如,可以从上文讨论过的抗体噬菌体文库分离抗体片段。可替代地, Fab' -SH 片段能够直接从大肠杆菌得到恢复并化学连接以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter et al., Bio/Technology 10 :163-167(1992))。根据另一种方法,能够直接从重组宿主细胞培养物中分离 F(ab')₂ 片段。用于抗体片段生产的其他技术对于普通医务人员而言是显而易见的。在其他的实施方式中,所选择的抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。

[0293] 实施例 10 :肾脏安全性

[0294] 本发明提供了特异于 VEGF 促血管发生同工型的抗体而放过了 (spare) VEGF 抗血管发生形式。严重的蛋白尿症与 VEGF 清除剂和 VEGFR 阻断剂的治疗相关。

[0295] 根据各种报导,超过 30% 用 AVASTIN 治疗的患者会患上蛋白尿症,在临床前期和人类临床试验中也观察到了这样的情况。Kabbinavar F et al. J Clin Oncol 2003; 21 :60-65; NEJM 2004 350 :2335-2342; Sugimoto H et al J Biol Chem 2003; 278(15) :12605。这种现象可能是因为 VEGF, 并且其作为内皮存活因子,是一种足细胞的自分泌存活因子。抗 -VEGF 抗体使细胞死亡增加,而 VEGF₁₆₅ 置换 (replacement) 使细胞死亡减少。如图 8 所示,披露了发现 VEGF_{165b} 是血清饥饿的人足细胞的存活因子。

[0296] 由于本文所披露的内容现在已经表明 VEGF_{165b} 不会引起蛋白尿症,并且有利的是特异于 VEGF 促血管发生形式的抗体将比已知药物具有更好地肾脏安全性,因为它们限制了抗血管发生形式。

[0297] 肾脏功能通过在收集到的试验动物的尿中测量的尿中肌氨酸酐 / 蛋白质之比来表征。所测试的动物包括经过系统给予 100ug VEGF_{165b} 治疗过的具有人类肿瘤的小鼠;和在血管小球的足细胞中表达 VEGF_{165b} 的转基因小鼠 (图 9);和在高血压测量后注射 1mg VEGF_{165b} 的大鼠。在所有的模型中,发现由尿中肌氨酸酐 / 蛋白质之比表征的肾脏功能都是正常的。

[0298] 对体外肾小球内皮细胞通透性的影响

[0299] 已知 VEGF₁₆₅ 使血管通透性增加并且它是通过 VEGF₁₆₅ 表达的这种机制而被认为是保持肾脏对水的高通透性,而且增加在其他组织中的通透性。当采用经上皮电阻分析时, VEGF_{165b} 在肾小球内皮细胞中表现出抑制由 VEGF₁₆₅ 引起的通透性 (图 10)。将人类有条件地永生化肾小球内皮细胞在无血清条件下培养 2 小时,然后在培养的单细胞层中响应于

1nM VEGF 165、1nM VEGF165b 或 1nMVEGF165 与 1nM VEGF165b 结合或为空（对照）来测量肾小球经上皮的电阻。结果是相对于对照（即时间点为 0 分钟，SEM）来说，平均倍数增加。 $n = 5$ ，利用分光光谱进行数据分析： $p \pm < 0.0001$ ，单向 ANOVA，用事后邦弗朗尼测试 (Post hoc Bonferroni) 进行重复测量。对照与 VEGF165 $p < 0.001$ ，对照与 VEGF165b $p < 0.01$ ，对照与两者 $p > 0.05$ ，VEGF165 与 VEGF165b 且 $p < 0.001$ 和 VEGF_{165b} 与两者 $p < 0.01$ 。使用 SSPS 进行数据分析，总体 p 值 > 0.0005 单相 ANOVA，重复测量，事后邦弗朗尼测试对照与 VEGF 0.001，对其他的 NSVEGF 相对其他三组所有显著 165 对二者 0.037。有利的是，特异于 VEGF 的促血管发生形式的抗体也会在肾小球内皮细胞中抑制由 VEGF₁₆₅ 引起的通透性。

[0300] 对体内肾小球通透性的影响

[0301] 已经示出了 VEGF₁₆₅ 能诱导蛋白尿症并使体内肾小球通透性增加。VEGF 拮抗剂也会使蛋白尿症和体内肾小球通透性增加。然而，在特异于足细胞的去氧肾上腺素启动子的控制下，在小鼠体内表达 VEGF165b 18 个月之后，肾小球对水的通透性显著下降（水利传导率）（图 11）。为了确定在体内肾小球中的特异于 VEGF 促血管发生形式的抗体的连续治疗的效果，测量从表达 VEGF_{165b} 18 个月的转基因小鼠分离的肾小球的通透性。从 18 个月大的野生型、杂合型、或纯合型 pod-VEGF 165b 小鼠中分离肾小球，并测量每单位面积，每单位体积 (LpA/Vi) 的水利电导率。与杂合型小鼠相比，纯合型小鼠的通透性减小，这表明了基因剂量效果。为了表征对肾脏安全性的影响与与其他 VEGF 清除剂和 VEGFR TKI 的测试进行比较，用特异于 VEGF 的促血管发生形式的抗体进行治疗的效果是相似的。

[0302] 前文所述的具体实施方式完全披露了本发明的一般性质，以致于其他人能通过应用目前的知识，容易地修改和 / 或适于各种应用，这样的具体实施方式没有不适当地试验而且没有偏离通用的概念，因此，这样的适应和修改应该并倾向于包括在所披露的实施方式的等同替代的含义和范围内。应该理解，本文中所使用的措辞或术语仅仅是用于描述并不是为了限制的目的。这表明，在不背离本发明的情况下，可以采用各种可替代形式的方式、材料、和步骤来实施所披露的各种功能。

P32926BAY 序列表

序列表

<110> 布里斯托尔大学
菲洛金有限公司

<120> 特异于血管内皮生长因子 (VEGF) 的促血管发生同工型的抗体

<130>P32926BAY

<140>PCT/IL2008/001410

<141>2008-10-26

<150>US 60/982,438

<151>2007-10-25

<160>7

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>6

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

Cys Asp Lys Pro Arg Arg

1

5

<210>2

<211>6

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>2

Ser Leu Thr Arg Lys Asp

1

5

<210>3

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>3

Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg

1 5

<210>4

<211>8

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>4

Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg

1 5

<210>5

<211>9

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>5

Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg

1 5

<210>6

<211>12

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>6

Asp Arg Ala Arg Gln Glu Cys Asp Lys Pro Arg Arg

1 5 10

<210>7

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>7

Asp Arg Ala Arg Gln Glu Lys

1

5

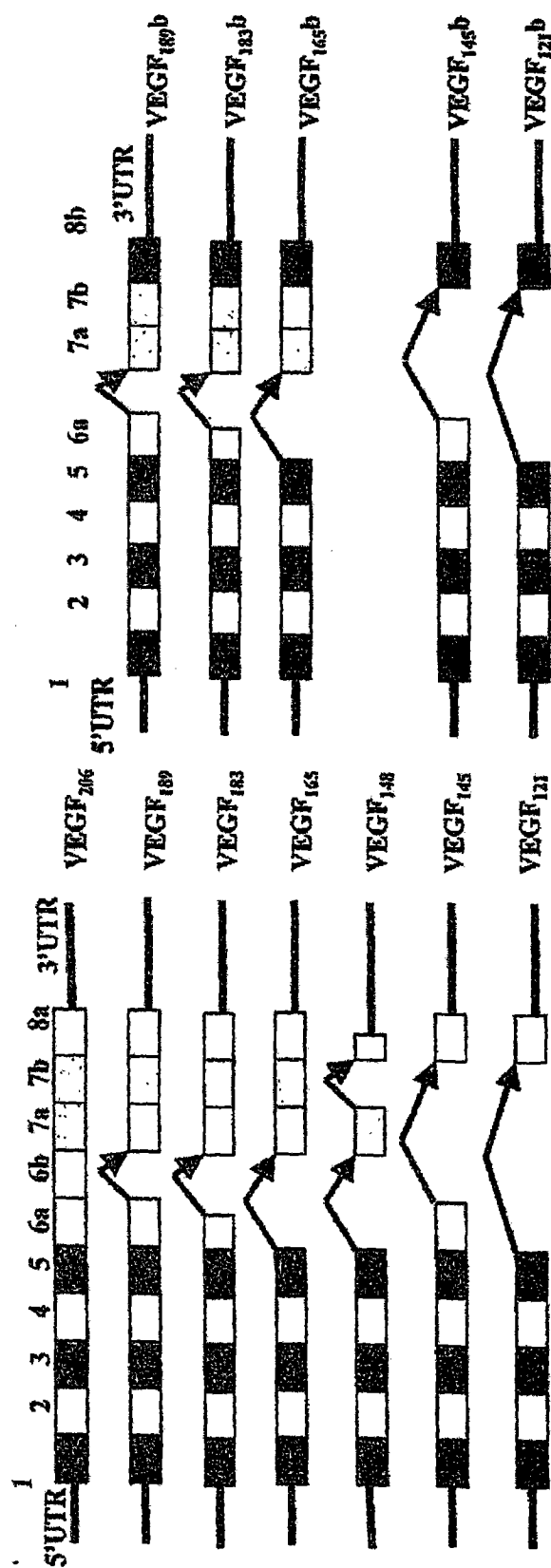


图 1

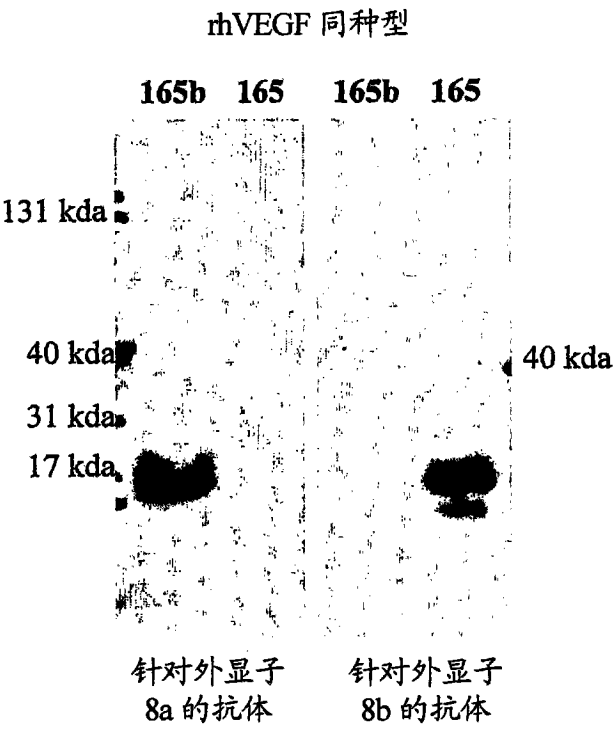


图 2

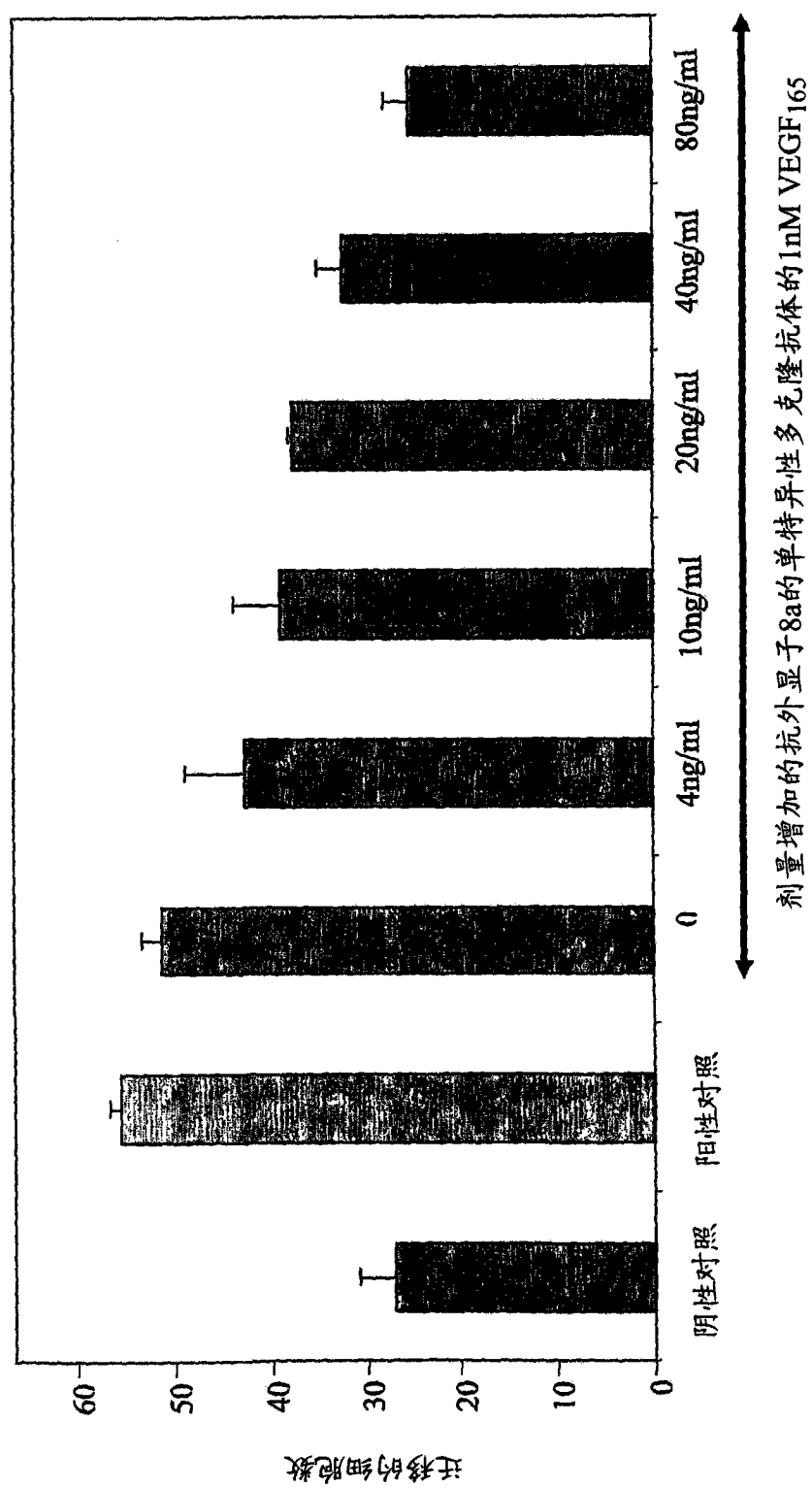


图 3

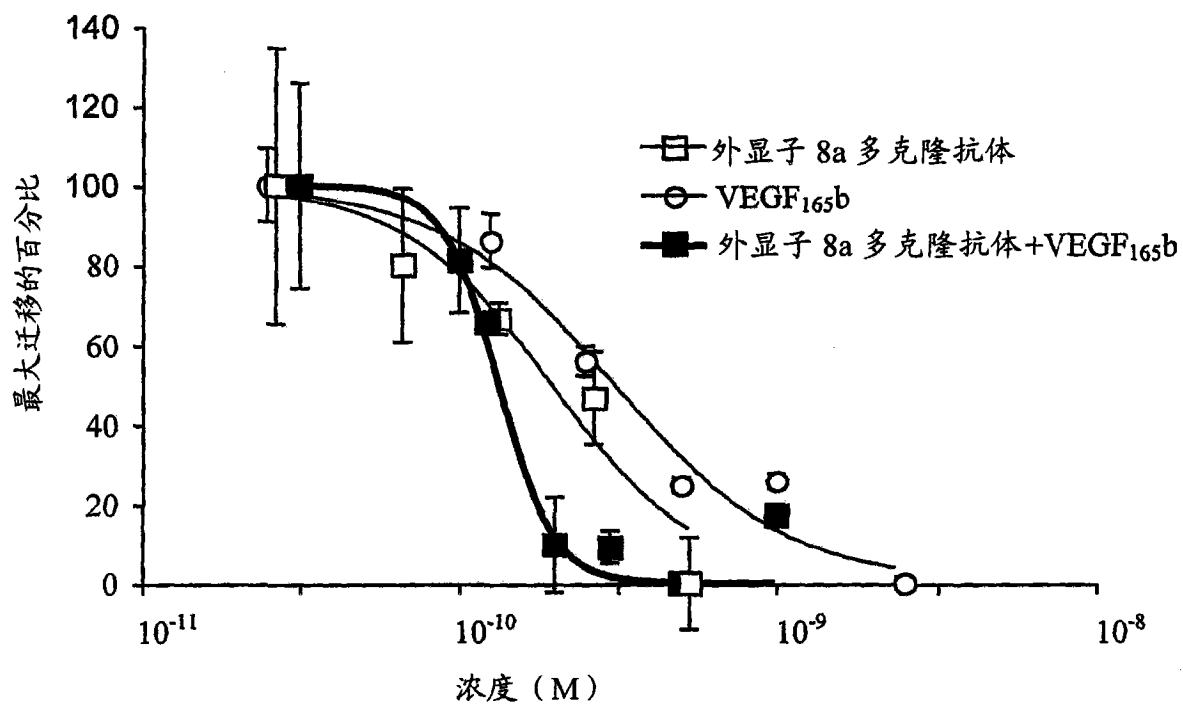


图 4A

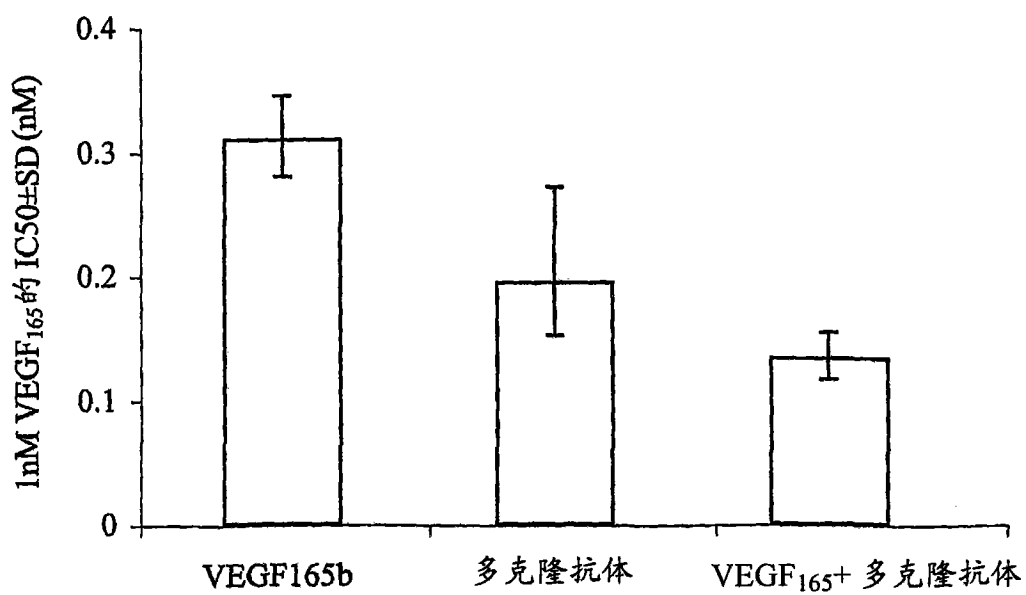


图 4B

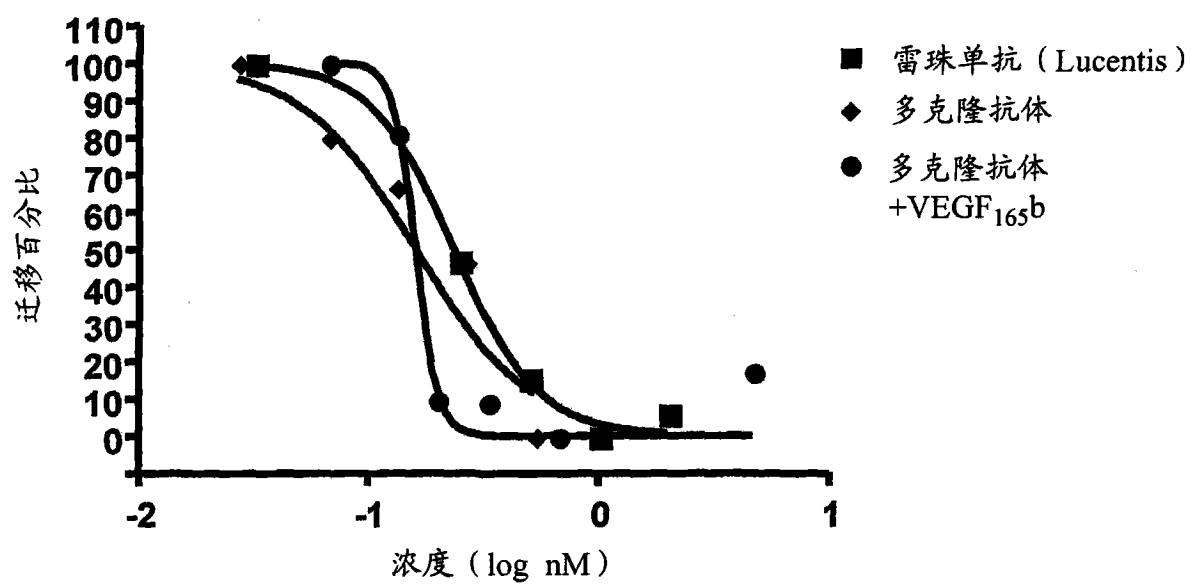


图 5

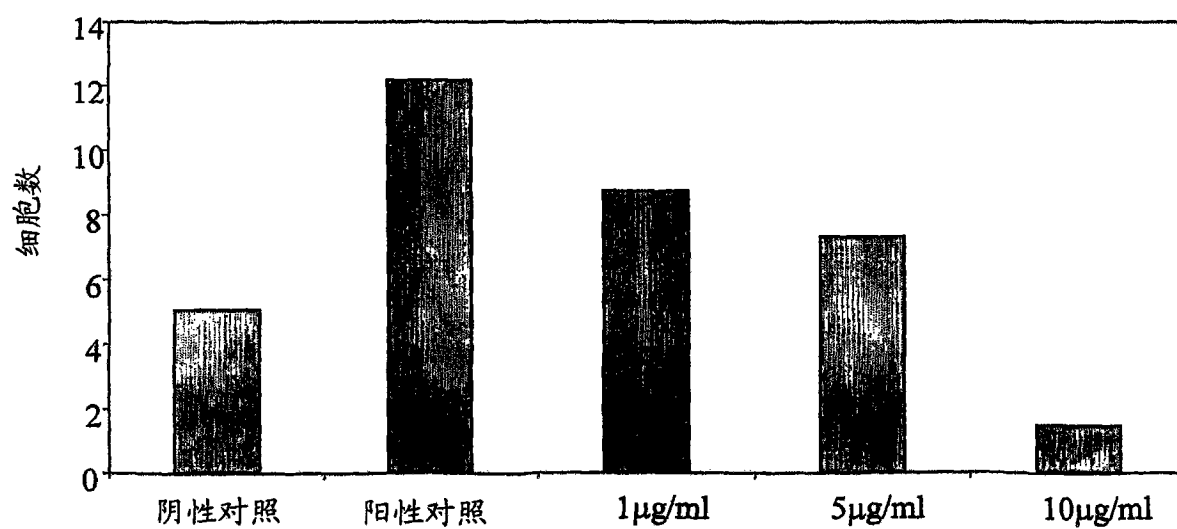


图 6

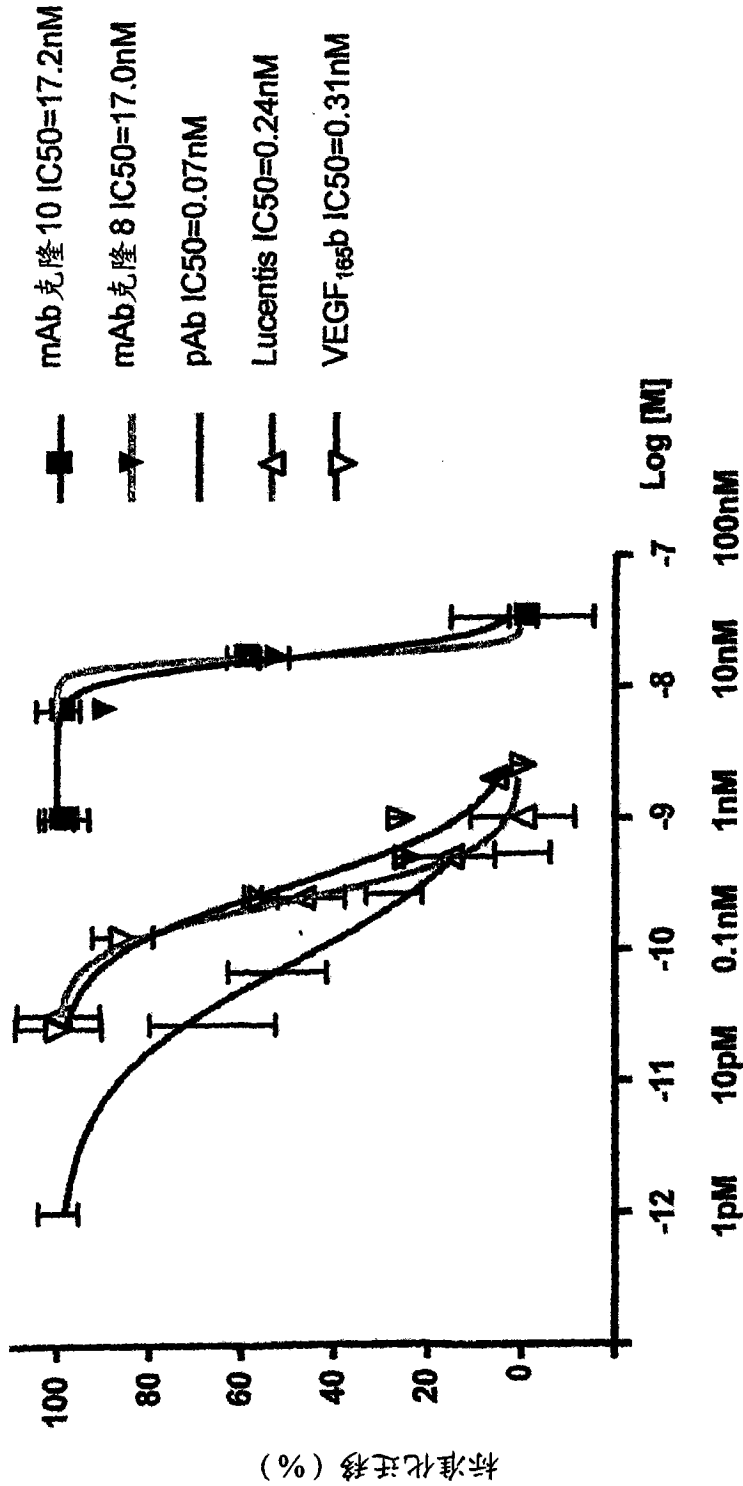


图 7

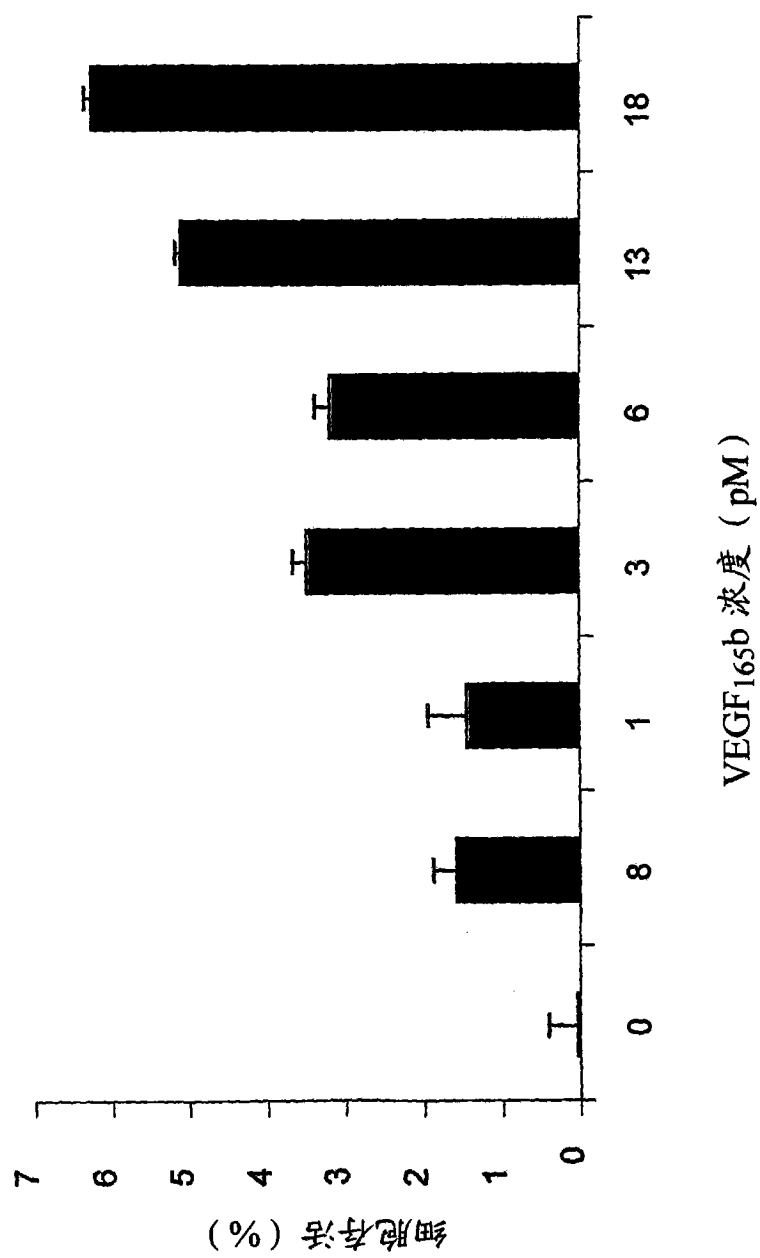


图 8

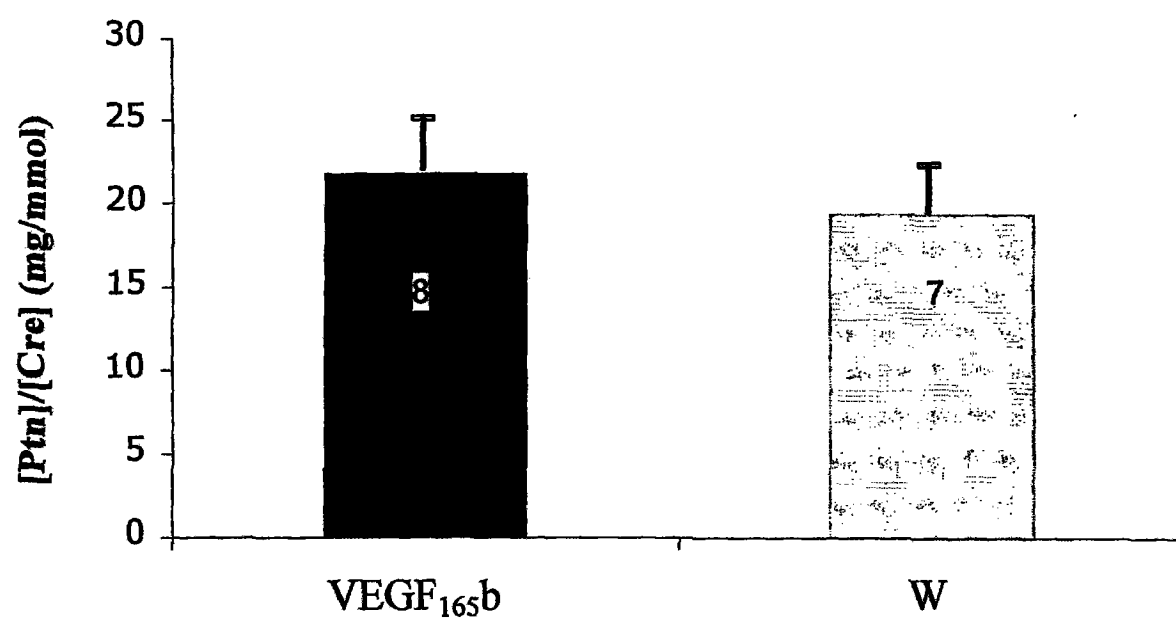


图 9

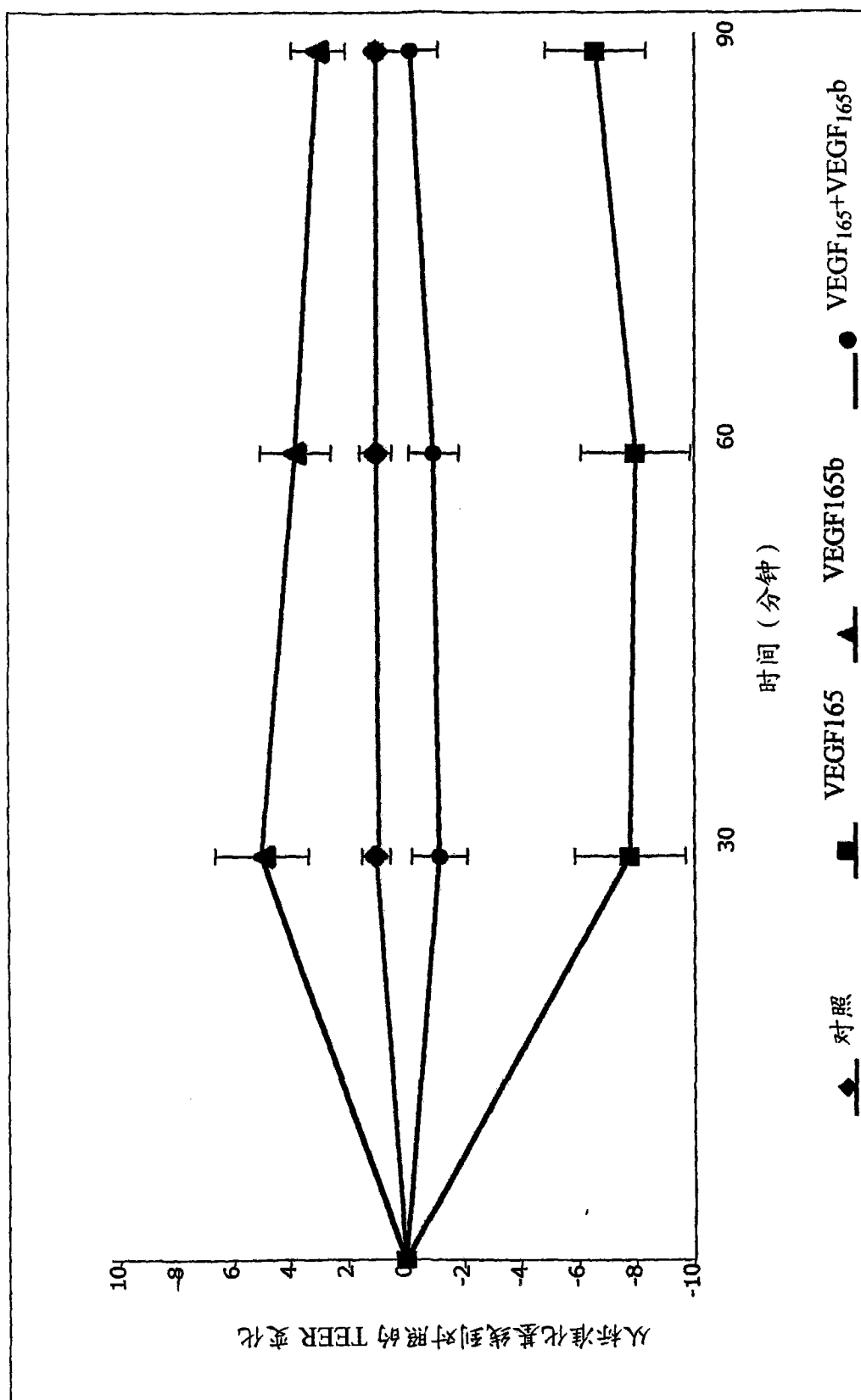


图 10

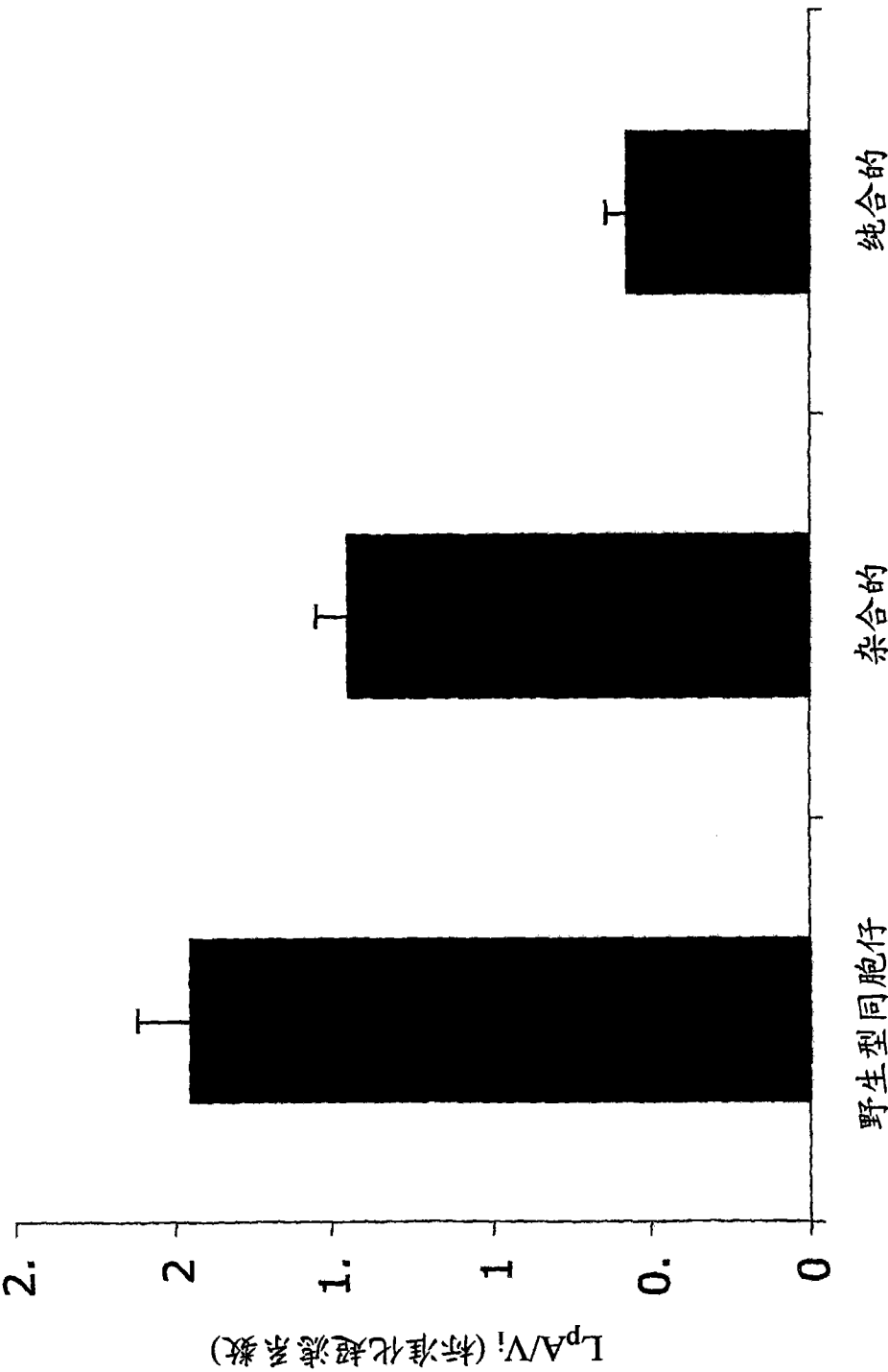


图 11