



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201106969 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：099112369

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 20 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/04/20 美國

61/171,008

2009/04/21 美國

61/171,318

2009/05/26 美國

61/181,195

(71)申請人：建南德克公司(美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

N S A B P 基金股份有限公司(美國) NSABP FOUNDATION, INC. (US)

美國

(72)發明人：范菲 葛威多利 FYFE, GWENDOLYN (US)；漢瑞克 艾瑞克 HEDRICK, ERIC

(US)；麥斯 羅伯特 D MASS, ROBERT D. (US)；威馬克 挪曼 WOLMARK,

NORMAN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：2 共 113 頁

(54)名稱

輔助癌症治療

ADJUVANT CANCER THERAPY

(57)摘要

本發明揭示用於輔助癌症治療之方法及包含抗 VEGF 抗體的組合物。

隊組A：

藥物	劑量	投藥	給藥間隔	計劃持續時間
奧沙利鉑	85 mg/m ²	用250 mL D5W之個別輸注袋及由Y線管(Y-line tubing)連接之個別管線靜脈內並行投與2小時	第1天 每14天1次	12個週期
甲醯四氫葉酸	400 mg/m ²			
5-FU	400 mg/m ²			
5-FU	2400 mg/m ² 歷經46小時	靜脈內連續輸注46小時	第1天及第2天 每14天1次	

隊組B：

藥物	劑量	投藥	給藥間隔	計劃持續時間
貝伐單抗	5 mg/kg	稀釋於100 mL 0.9% NaCl溶液中，歷經以下時期靜脈內給予： 90分鐘-第1劑 60分鐘-第2劑 30分鐘-所有後續劑量 沖洗輸注管線	第1天 每14天1次	12個月
奧沙利鉑	85 mg/m ²	用250 mL D5W之個別輸注袋及由Y線管連接之個別管線靜脈內並行給予2小時 靜脈內團式注射 2至4分鐘	第1天 每14天1次	12個週期 (6個月)
甲醯四氫葉酸	400 mg/m ²			
5-FU	400 mg/m ²			
5-FU	2400 mg/m ² 歷經46小時	靜脈內連續輸注46小時	第1天及 第2天 每14天1次	



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201106969 A1

(43)公開日：中華民國 100 (2011) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：099112369

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 04 月 20 日

(51)Int. Cl. : *A61K39/395 (2006.01)*

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2009/04/20 美國

61/171,008

2009/04/21 美國

61/171,318

2009/05/26 美國

61/181,195

(71)申請人：建南德克公司(美國) GENENTECH, INC. (US)

美國

N S A B P 基金股份有限公司(美國) NSABP FOUNDATION, INC. (US)

美國

(72)發明人：范菲 葛威多利 FYFE, GWENDOLYN (US)；漢瑞克 艾瑞克 HEDRICK, ERIC

(US)；麥斯 羅伯特 D MASS, ROBERT D. (US)；威馬克 挪曼 WOLMARK,

NORMAN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：34 項 圖式數：2 共 113 頁

(54)名稱

輔助癌症治療

ADJUVANT CANCER THERAPY

(57)摘要

本發明揭示用於輔助癌症治療之方法及包含抗 VEGF 抗體的組合物。

隊組A：

藥物	劑量	投藥	給藥間隔	計劃持續時間
奧沙利鉑	85 mg/m ²	用250 mL D5W之個別輸注袋及由Y線管(Y-line tubing)連接之個別管線靜脈內並行投與2小時	第1天 每14天1次	12個週期
甲醯四氫葉酸	400 mg/m ²			
5-FU	400 mg/m ²			
5-FU	2400 mg/m ² 歷經46小時	靜脈內連續輸注46小時	第1天及第2天 每14天1次	

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明大體而言係關於治療人類疾病及病理學病狀。更特定言之，本發明係關於抗血管生成劑在輔助癌症治療中之用途。

本申請案主張2009年4月20日申請之美國臨時申請案第61/171,008號；2009年4月21日申請之美國臨時申請案第61/171,318號；及2009年5月26日申請之美國臨時申請案第61/181,195號的優先權及權益，各案之內容係以引用的方式併入本文中。

【先前技術】

癌症為人類健康的最致命威脅之一。僅在美國，癌症每年影響將近130萬名新患者，且為繼心血管疾病之後第二大死亡原因，每4例死亡中佔約1例。實體腫瘤為造成大多數此類死亡之原因。儘管某些癌症之醫療方面存在顯著進展，但在以往20年中所有癌症之總體5年存活率僅已改良約10%。癌症或惡性腫瘤以不受控方式快速轉移及生長，使得極難及時偵測及治療。

大多數當前之癌症治療方法為相對非選擇性的且一般在癌症已進展至較惡性狀態之後靶向腫瘤。手術移除患病組織；放射線治療縮小實體腫瘤；且化學治療迅速殺死在分裂之細胞。化學治療尤其會導致眾多副作用，在一些情況下，其嚴重程度會限制可給予之劑量且因此排除使用潛在有效之藥物。此外，癌症經常對化學治療藥物產生抗性。

對於大多數新近診斷出患有可手術治療之癌症的患者，標準治療為確定性手術，接著化學治療。此治療旨在儘可能多地移除原發性及轉移性疾病以防止復發及改良存活。實務上，大多數此等患者在手術後不具有肉眼可見之殘餘腫瘤跡象。然而，其中許多患者以後將產生復發且可能最終死於其所患疾病。例如當少量活腫瘤細胞在手術之前發生轉移、避開手術且因當前偵測技術之限制而在手術後無法偵測到時，此情形可發生。

因此，術後輔助治療成為手術之重要輔助手段，以在此等殘餘的微小轉移性癌細胞再生且變得難治之前消除此等細胞。在過去數十年中，輔助治療之進展一般為漸增的(incremental)，集中於使用不同的化學治療劑。許多化學治療方案已在輔助治療患有早期重大癌症適應症(諸如肺癌、乳癌及結腸直腸癌)之患者時顯示臨床益處。Strauss 等人，*J Clin Oncol* 22:7019 (2004)；International Adjuvant Lung Cancer Trial Collaboration Group *N Engl J Med* 350:351-60 (2004)。Moertel 等人，*Ann Intern Med* 122:321-6 (1995)；IMPACT *Lancet* 345:939-44 (1995)；Citron 等人，*J Clin Oncol* 21:1431-9 (2003)。

儘管基於化學(chemo-based)之輔助治療存在確定益處，但與任何種類的化學治療皆相關之一個重大限制為顯著毒性。化學治療藥物一般不靶向腫瘤部位，且不能區分正常細胞與腫瘤細胞。在輔助背景下，因為治療持續很久且其對患者之生活品質造成持續影響，故毒性問題尤其具有挑

戰性。此外，輔助化學治療在具有較低復發風險之患者中之益處仍不清楚，使得可質疑該等患者是否值得承受化學治療之副作用。

血管生成係指一系列重要之細胞事件，其中血管內皮細胞經歷增殖、修剪及重組以自先前存在之血管網路形成新血管。有明顯跡象表明，血管聯結發育 (development of a vascular supply) 為正常及病理學增殖過程所必需。氧及營養素之傳遞，以及分解代謝產物之移除代表在多細胞生物體中發生的大多數生長過程中之限速步驟。

儘管誘導新血管被視為腫瘤血管生成之主要模式，但最近資料已表明，一些腫瘤可藉由佔有現存宿主血管而生長。所佔有之血管結構接著退化，使得腫瘤衰退，最終藉由腫瘤邊緣處低氧誘導之血管生成而逆轉。

正常血管生成與異常血管生成之關鍵陽性調節劑之一為血管內皮生長因子 (VEGF)-A。VEGF-A 為包括 VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F 及 PlGF 之基因家族之一部分。VEGF-A 主要結合於兩種高親和力受體酪胺酸激酶，即 VEGFR-1 (Flt-1) 及 VEGFR-2 (Flk-1/KDR)，後者為 VEGF-A 之血管內皮細胞有絲分裂信號之主要傳遞物。另外，已鑑別出神經纖毛蛋白-1 (neuropilin-1) 為結合肝素之 VEGF-A 同功異型物之受體，且可在血管發育中起作用。

VEGF 為多效性生長因子，除為血管生成因子之外，其亦在諸如內皮細胞存活及增殖、血管滲透性及血管擴張、單核細胞趨化性及鈣流入之其他生理學過程中顯示多種生

物效應。此外，其他研究已報導 VEGF 對諸如視網膜色素上皮細胞、胰管細胞及許旺細胞 (Schwann cell) 之數種非內皮細胞類型之有絲分裂效應。

由於 VEGF 被視為病理學病狀中血管生成之主要調節劑，已多次嘗試在涉及病理學血管生成之條件下阻斷 VEGF 活性。

在大部分惡性疾病中 VEGF 之表現上調，且 VEGF 過表現係與許多實體腫瘤之較晚期或較差預後有關。因此，已使用抑制 VEGF 信號傳導路徑之分子來治療已注意到病理學血管生成之相對較晚期實體腫瘤。

因為癌症仍為最致命疾病之一，故可能需要額外治療，諸如輔助治療。如在論述以下揭示內容之後將顯而易見，本發明解決此等及其他需要。

【發明內容】

VEGF 特異性拮抗劑與化學治療之組合使用已顯示在癌症 (例如轉移性結腸直腸癌、非小細胞肺癌、乳癌等) 患者中有利，但對在輔助治療中使用抗 VEGF 抗體所知甚少。本文中，本發明係關於在患有非轉移性結腸直腸癌之人類個體中輔助使用 AVASTIN[®] 之臨床研究中獲得之結果。

因此，本發明提供一種輔助治療方法，其包含投與癌症患者有效量之 VEGF 特異性拮抗劑 (例如抗 VEGF 抗體) 歷時一年以上。在一些實施例中，輔助治療方法延長患者之無病存活 (DFS) 或總存活 (OS)。在一些實施例中，在起始治療後約 2 至 5 年評估 (例如分析) DFS 或 OS。亦提供一種輔助

治療方法，其包含投與癌症患者有效量之VEGF特異性拮抗劑，其中在以VEGF特異性拮抗劑積極治療期間癌症進展經防止或延遲，且其中積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以VEGF特異性拮抗劑積極治療之後，癌症進展經防止或延遲約3個月或6個月。本發明進一步提供一種輔助治療方法，其包含投與癌症患者有效量之VEGF特異性拮抗劑，其中在以VEGF特異性拮抗劑積極治療期間癌症復發經防止或延遲，且其中使用VEGF特異性拮抗劑之積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以VEGF特異性拮抗劑積極治療之後，癌症復發經防止或延遲約3、4、5或6個月。在某些實施例中，在確定性手術後投與患者VEGF特異性拮抗劑。在某些實施例中，包含投與抗VEGF抗體之輔助治療在治療起始之後持續至少2年、至少3年、至少4年、至少5年、至少10年或10年以上。

本發明提供一種輔助治療方法，其包含投與已接受癌症確定性手術的患者有效量之VEGF特異性拮抗劑以延長患者之DFS或OS，其中投與VEGF特異性拮抗劑歷時一年以上。在一些實施例中，在起始治療後約2至5年評估DFS或OS。亦提供一種輔助治療方法，其包含投與已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術的患者有效量之VEGF特異性拮抗劑，其中在以VEGF特異性拮抗劑積極治療期間癌症進展經防止或延遲，且其中積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以VEGF特異性拮抗劑積極治療之後，

癌症進展經防止或延遲約3、4、5或6個月。本發明進一步提供一種輔助治療方法，其包含投與已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術的患者有效量之VEGF特異性拮抗劑，其中在以VEGF特異性拮抗劑積極治療期間癌症復發經防止或延遲，且其中使用VEGF特異性拮抗劑之積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以VEGF特異性拮抗劑積極治療之後，癌症復發經防止或延遲約3、4、5或6個月。在某些實施例中，包含投與抗VEGF抗體之輔助治療在治療起始之後持續至少2年、至少3年、至少4年、至少5年、至少10年或10年以上。

本發明進一步提供一種治療已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術的患者之方法，其包含投與該患者包含有效量之VEGF特異性拮抗劑的輔助治療以延長患者之DFS或OS，其中投與VEGF特異性拮抗劑歷時一年以上。在一些實施例中，在起始治療後約2至5年評估(例如分析)DFS或OS。亦提供一種治療已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術的患者之方法，其包含投與該患者包含有效量之VEGF特異性拮抗劑的輔助治療，其中在以VEGF特異性拮抗劑積極治療期間癌症進展經防止或延遲，且其中積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以VEGF特異性拮抗劑積極治療之後，癌症進展經防止或延遲約3、4、5或6個月。本發明進一步提供一種治療已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術的患者之方法，其包含投與該患者包含有效量之VEGF特異性拮抗劑的輔助治療，其中在以VEGF

特異性拮抗劑積極治療期間癌症復發經防止或延遲，且其中使用 VEGF 特異性拮抗劑之積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以 VEGF 特異性拮抗劑積極治療之後，癌症復發經防止或延遲約 3、4、5 或 6 個月。在某些實施例中，該方法包含投與抗 VEGF 抗體，在治療起始之後歷時至少 2 年、至少 3 年、至少 4 年、至少 5 年、至少 10 年或 10 年以上。

本發明亦提供一種防止或延遲患者癌症復發之方法，其包含投與該患者有效量之 VEGF 特異性拮抗劑(例如抗 VEGF 抗體)歷時一年以上，其中該投與 VEGF 特異性拮抗劑(例如抗 VEGF 抗體)會防止癌症復發。本發明進一步提供一種降低患者癌症復發之可能性的方法，其包含投與該患者有效量之 VEGF 特異性拮抗劑(例如抗 VEGF 抗體)歷時一年以上，其中該投與 VEGF 特異性拮抗劑(例如抗 VEGF 抗體)會降低癌症復發之可能性。

在任一種本發明方法之一些實施例中，該投與 VEGF 特異性拮抗劑會防止出現臨床上可偵測的腫瘤或其轉移，或降低出現臨床上可偵測的腫瘤或其轉移之可能性。

在本發明各方法中，在起始治療之後持續投與 VEGF 特異性拮抗劑(例如抗 VEGF 抗體)歷時至少 2 年、至少 3 年、至少 4 年、至少 5 年、至少 10 年或 10 年以上。在一些實施例中，持續投與 VEGF 特異性拮抗劑(例如抗 VEGF 抗體)直至死亡為止。

在本發明各方法中，抗 VEGF 抗體可經 VEGF 特異性拮抗

劑(例如，如下所述之VEGF受體分子或嵌合VEGF受體分子)替代。抗VEGF抗體可為單株抗體、嵌合抗體、完全人類抗體或人類化抗體。適用於本發明方法之例示性抗體包括貝伐單抗(bevacizumab)(AVASTIN®)、G6-31、B20-4.1及其片段。在一些實施例中，抗VEGF抗體含有包含以下胺基酸序列之重鏈可變區：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA
 PGKGLEWVGWINTYTGPEPT AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED
 TAVYYCAKYPHYYGSSHWF DVWGQGLVT VSS (SEQ ID NO: 1)

及包含以下胺基酸序列之輕鏈可變區：

DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF
 TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
 GTKVEIKR (SEQ ID NO: 2)。

在本發明方法之某些實施例中，抗VEGF抗體為貝伐單抗。

本發明各方法之實踐可能與包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病之癌症的治療相關。此等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌(hepatocellular cancer)、胃腸癌、胰腺癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝腫瘤(hepatoma)、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌(kidney cancer)、肝癌、前列腺癌、腎癌(renal cancer)、陰門癌、甲狀腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、胃癌、黑色素瘤及各種類型之頭頸部癌。在本發明方法之一些實施例中，個體患有非轉移性

結腸直腸癌。在本發明方法之一些實施例中，個體患有轉移性結腸直腸癌。在一些實施例中，個體患有可切除的II期或III期結腸癌。

在個體已接受確定性手術之實施例中，一般在個體已自手術恢復一段時間之後投與VEGF特異性拮抗劑(例如抗VEGF抗體)。此時段可包括創口癒合或手術切口癒合所需之時期、降低創口開裂的風險所需之時段，或個體恢復至基本上類似於或優於手術前健康程度之健康程度所需之時段。在完成確定性手術與首次投與抗VEGF抗體之間的時期亦可包括藥物假日(drug holiday)所需之時期，其中個體需要或要求各治療方案之間間隔一段時間。在完成確定性手術與開始抗VEGF抗體治療之間的時段一般可包括小於一週、1週、2週、3週、4週(28天)、5週、6週、7週、8週、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月、1年、2年、3年或3年以上。在一個實施例中，在確定性手術與投與抗VEGF抗體之間的時段大於2週且小於1年。在一個實施例中，在確定性手術與投與抗VEGF抗體之間的時段為至少28天。

上文各態樣可進一步包括監測個體之癌症復發。例如可藉由評估無病存活(DFS)或總存活(OS)來實現監測。在一個實施例中，在起始治療後約2至5年評估DFS或OS。在一個實施例中，個體在治療之後無病至少1至5年。

視疾病類型及嚴重程度而定，抗VEGF抗體(例如貝伐單抗)之較佳劑量係描述於本文中且可介於約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至約50

mg/kg，最佳約5 mg/kg至約15 mg/kg之範圍內，包括(但不限於)5 mg/kg、7.5 mg/kg或10 mg/kg。投與頻率將視疾病類型及嚴重程度而變化。對於歷經數天或更久重複投與，視病狀而定，持續治療直至如藉由本文所述或此項技術中已知之方法所量測，已實現所需治療效應為止。在一個實例中，每週、每兩週或每三週一次投與本發明之抗VEGF抗體，劑量範圍為約5 mg/kg至約15 mg/kg，包括(但不限於)5 mg/kg、7.5 mg/kg或10 mg/kg。然而，其他給藥方案亦可能適用。藉由習知技術及檢驗容易地監測本發明治療之進展。

在上文各態樣之其他實施例中，局部或全身性(例如經口或靜脈內)投與VEGF特異性拮抗劑，例如抗VEGF抗體。在一些實施例中，延長使用抗VEGF抗體之治療，直至患者已無癌症並保持選自由以下組成之群的時段為止：1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年及12年。

在其他實施例中，使用VEGF特異性拮抗劑之治療為單一治療，或如臨床醫師所評估或本文所述，持續時間為VEGF特異性拮抗劑治療期之單一治療。

在其他實施例中，使用VEGF特異性拮抗劑之治療係與包括(但不限於)以下之額外抗癌治療組合：手術、放射治療、化學治療、分化治療(differentiating therapy)、生物治療、免疫治療、血管生成抑制劑及抗增殖化合物。使用VEGF特異性拮抗劑之治療亦可包括以上各類型的治療方

案之任何組合。另外，細胞毒性劑、抗血管生成劑及抗增殖劑可與 VEGF 特異性拮抗劑組合使用。在一個實施例中，抗癌治療為化學治療。舉例而言，化學治療劑係選自例如烷化劑、抗代謝物、葉酸類似物、嘧啶類似物、嘌呤類似物及相關抑制劑、長春花屬生物鹼、表鬼白毒素、抗生素、L-天門冬醯胺酶、拓撲異構酶抑制劑、干擾素、鉍配位錯合物、蔥二酮取代之尿素、甲基胍衍生物、腎上腺皮質抑制劑、腎上腺皮質類固醇、助孕素、雌激素、抗雌激素、雄激素、抗雄激素、性腺釋放素類似物等。在一些態樣中，並行 (concurrently) 投與化學治療劑與 VEGF 特異性拮抗劑。

在包括額外抗癌治療之實施例中，可在投與 VEGF 特異性拮抗劑之前、期間 (例如同時) 或之後進一步以額外抗癌治療治療個體。在一個實施例中，抗癌治療為包括投與奧沙利鉑 (oxaliplatin)、5-氟尿嘧啶、甲醯四氫葉酸或其組合之化學治療。在一個實施例中，無論單獨投與或與抗癌治療一起投與，VEGF 特異性拮抗劑可以維持治療之形式投與。

本發明方法亦宜防止腫瘤復發或腫瘤 (例如在移除原發腫瘤之後存留之休眠腫瘤) 再生長，或宜減少或防止微小轉移之出現或增殖。

在本發明之以上各態樣之其他實施例中，投與一定量的 VEGF 特異性拮抗劑或投與該拮抗劑歷時一定時間 (例如對於歷經一段時間之特定治療方案)，以提高或延長已接受

治療結腸直腸癌之確定性手術之個體的存活(例如達20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或100%以上)。在一個實例中，以個體之DFS或OS量度存活，其中在起始以VEGF特異性拮抗劑輔助治療後約2至5年評估DFS或OS。在一些其他實施例中，使用VEGF特異性拮抗劑來防止個體癌症復發或癌症進展或降低個體癌症復發或癌症進展之可能性。

本發明之其他特徵及優勢將自以下實施方式、圖式及申請專利範圍顯而易見。

【實施方式】

I. 定義

術語「VEGF」或「VEGF-A」用以指165個胺基酸之人類血管內皮細胞生長因子及相關的121、145、189及206個胺基酸之人類血管內皮細胞生長因子(如例如Leung等人，*Science*, 246:1306 (1989)及Houck等人，*Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991)所述)，以及其天然存在之對偶基因形式及經處理形式。VEGF-A為包括VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F及PlGF之基因家族之一部分。VEGF-A主要結合於兩種高親和力受體酪胺酸激酶，即VEGFR-1(Flt-1)及VEGFR-2(Flk-1/KDR)，後者為VEGF-A之血管內皮細胞有絲分裂信號之主要傳遞物。另外，已鑑別出神經纖毛蛋白-1為結合肝素之VEGF-A同功異型物之受體，且可在血管發育中起作用。術語「VEGF」或「VEGF-A」亦係指來自諸如小鼠、大鼠或靈長類動物之非人類物種之

VEGF。來自特定物種之VEGF有時由諸如針對人類VEGF之hVEGF或針對鼠類VEGF之mVEGF的術語指示。術語「VEGF」亦用以指包含165個胺基酸之人類血管內皮細胞生長因子之胺基酸8至109或1至109的多肽截短形式或片段。在本申請案中，對任何此等形式之VEGF之提及均可例如以「VEGF(8-109)」、「VEGF(1-109)」或「VEGF165」來鑑別。「截短」之天然VEGF之胺基酸位置係如天然VEGF序列中所示來編號。舉例而言，截短之天然VEGF中之胺基酸位置17(甲硫胺酸)亦為天然VEGF中之位置17(甲硫胺酸)。截短之天然VEGF對KDR及Flt-1受體之結合親和力與天然VEGF相當。

「抗VEGF抗體」為以足夠親和力及特異性結合於VEGF之抗體。所選抗體通常將對VEGF具有結合親和力，例如該抗體可以在100 nM-1 pM之間的Kd值結合hVEGF。舉例而言，可藉由基於表面電漿共振之檢驗(諸如BIAcore檢驗，如PCT申請公開案第WO 2005/012359號中所述)、酶聯免疫吸附檢驗(ELISA)及競爭檢驗(例如RIA之競爭檢驗)測定抗體親和力。在某些實施例中，本發明之抗VEGF抗體可在靶向及干擾涉及VEGF活性之疾病或病狀時用作治療劑。又，可對抗體進行其他生物活性檢驗，例如以評估其作為治療劑之效用。此等檢驗在此項技術中為已知的且視抗體之靶抗原及預定用途而定。實例包括HUVEC抑制檢驗；腫瘤細胞生長抑制檢驗(例如在WO 89/06692中所述)；抗體依賴性細胞毒性(ADCC)及補體介導之細胞毒性

(CDC)檢驗(美國專利 5,500,362)；及促效活性或血細胞生成檢驗(參看 WO 95/27062)。抗 VEGF 抗體通常將不結合於諸如 VEGF-B 或 VEGF-C 之其他 VEGF 同系物，亦不結合於諸如 PlGF、PDGF 或 bFGF 之其他生長因子。

「VEGF 拮抗劑」係指能夠中和、阻斷、抑制、消除、降低或干擾 VEGF 活性(包括其結合於一或多種 VEGF 受體)之分子。VEGF 拮抗劑包括抗 VEGF 抗體及其抗原結合片段、受體分子及特異性結合於 VEGF 藉此隔絕其結合於一或多種受體之衍生物、抗 VEGF 受體抗體及 VEGF 受體拮抗劑，諸如 VEGFR 酪胺酸激酶之小分子抑制劑。

「天然序列」多肽包含與源自自然界之多肽具有相同胺基酸序列之多肽。因此，天然序列多肽可具有來自任何哺乳動物之天然存在多肽的胺基酸序列。此類天然序列多肽可由自然界分離，或可由重組或合成方式製得。術語「天然序列」多肽特定涵蓋多肽之天然存在之截短或分泌形式(例如細胞外域序列)、多肽的天然存在之變異體形式(例如替代性剪接形式)及天然存在之對偶基因變異體。

多肽「變異體」意謂與天然序列多肽具有至少約 80% 胺基酸序列一致性之生物學活性多肽。此等變異體包括例如在多肽之 N 端或 C 端添加或缺失一或多個胺基酸殘基之多肽。通常，變異體與天然序列多肽將具有至少約 80% 胺基酸序列一致性、更佳至少約 90% 胺基酸序列一致性及甚至更佳至少約 95% 胺基酸序列一致性。

術語「抗體」係以最廣泛含義使用且包括單株抗體(包

括全長或完整單株抗體)、多株抗體、多價抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及抗體片段(參看下文),前提為其顯示所需生物活性。

在整個本說明書及申請專利範圍中,免疫球蛋白重鏈中殘基之編號為如Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)中之EU索引的編號,該文獻係以引用的方式明確併入本文中。

「如Kabat中之EU索引」係指人類IgG1 EU抗體之殘基編號。

在一個實施例中,本發明之「Kd」或「Kd值」係藉由放射性標記之VEGF結合檢驗(RIA)量測,該檢驗用Fab型抗體及VEGF分子如以下檢驗所述來進行,該檢驗藉由在滴定系列之未標記VEGF存在下以最小濃度之(^{125}I)標記之VEGF(109)平衡Fab,接著以塗有抗Fab抗體之培養盤捕捉結合之VEGF來量測Fab對VEGF之溶液結合親和力(Chen等人, (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881)。為建立檢驗條件,以含5 $\mu\text{g/ml}$ 捕捉性抗Fab抗體(Cappel Labs)之50 mM碳酸鈉(pH 9.6)塗佈微量滴定盤(Dynex)隔夜,且隨後在室溫(約23°C)下以2%(w/v)牛血清白蛋白之PBS溶液阻斷2至5小時。在非吸附性培養盤(Nunc #269620)中,使100 pM或26 pM [^{125}I]VEGF(109)與相關Fab(例如Fab-12)之連續稀釋液混合(Presta等人, (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599)。接著培育相關Fab隔夜;然而,培育可持續65小時以確保達

到平衡。此後，將混合物轉移至捕捉培養盤中以在室溫下培育一小時。接著移除溶液且以0.1% Tween-20之PBS溶液洗滌培養盤八次。當培養盤已變乾時，每孔添加150微升閃爍體(MicroScint-20; Packard)，且在Topcount γ 計數儀(Packard)上對培養盤計數10分鐘。選擇得到小於或等於20%之最大結合的各Fab濃度用於競爭結合檢驗。根據另一實施例，藉由使用表面電漿共振檢驗，在25°C下使用BIAcore™-2000或BIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)，用固定hVEGF(8-109)CM5晶片在約10個反應單位(RU)下量測Kd或Kd值。簡言之，根據供應商說明書以N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基丁二醯亞胺(NHS)活化羧甲基化聚葡萄糖生物感測器晶片(CM5, BIAcore Inc.)。以10 mM乙酸鈉(pH 4.8)將人類VEGF稀釋為5 $\mu\text{g/ml}$ (約0.2 μM)，隨後以5微升/分鐘之流動速率注射以獲得約10個反應單位(RU)之偶合蛋白。在注射人類VEGF後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。為進行動力學量測，在25°C下以約25 $\mu\text{l/min}$ 之流動速率注射含0.05% Tween 20之PBS(PBST)中Fab之兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)。使用簡單的一對一朗繆爾結合模型(one-to-one Langmuir binding model)(BIAcore評估軟體3.2版)，藉由同時擬合締合與解離感測器圖譜來計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。以比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 計算平衡解離常數(Kd)。例如參看Chen, Y.等人，(1999) *J. Mol Biol* 293:865-881。若藉由上文表面電漿共振檢驗得知締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，

則可使用量測在 25°C 下 20 nM 抗 VEGF 抗體 (Fab 形式) 之 PBS (pH 7.2) 溶液的螢光發射強度 (激發 = 295 nm ; 發射 = 340 nm , 16 nm 帶通) 之增加或降低的螢光淬滅技術 (fluorescent quenching technique) , 在如在光譜儀 (諸如裝備停流 (stop-flow) 之分光光度計 (Aviv Instruments) 或具有經攪拌光析管之 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度計 (ThermoSpectronic)) 中所量測漸增濃度之人類 VEGF 短形式 (8-109) 或小鼠 VEGF 存在下測定締合速率。

「阻斷」抗體或抗體「拮抗劑」為抑制或降低所結合之抗原之生物活性的抗體。舉例而言, VEGF 特異性拮抗劑抗體結合 VEGF 且抑制 VEGF 誘導血管內皮細胞增殖或誘導血管滲透性之能力。較佳阻斷抗體或拮抗劑抗體完全抑制抗原之生物活性。

除非另有指示, 否則在整個本說明書中使用表述「多價抗體」表示包含三個或三個以上抗原結合位點之抗體。舉例而言, 多價抗體係經工程改造以具有三個或三個以上抗原結合位點且一般不為天然序列 IgM 或 IgA 抗體。

「抗體片段」僅包含完整抗體之一部分, 一般包括完整抗體之抗原結合位點且因此保留結合抗原之能力。本定義所涵蓋之抗體片段的實例包括: (i) 具有 VL、CL、VH 及 CH1 域之 Fab 片段; (ii) Fab' 片段, 其為在 CH1 域之 C 端具有一或多個半胱胺酸殘基之 Fab 片段; (iii) 具有 VH 及 CH1 域之 Fd 片段; (iv) 具有 VH 及 CH1 域及一或多個在 CH1 域 C 端之半胱胺酸殘基的 Fd' 片段; (v) 具有抗體單臂之 VL 及 VH 域的

Fv 片段；(vi)dAb 片段 (Ward 等人，*Nature* 341, 544-546 (1989))，其由 VH 域組成；(vii)分離之 CDR 區；(viii)F(ab')₂ 片段，即包括兩個 Fab' 片段藉由鉸鏈區之二硫橋連接的二價片段；(ix)單鏈抗體分子 (例如單鏈 Fv；scFv)(Bird 等人，*Science* 242:423-426 (1988)；及 Huston 等人，*PNAS (USA)* 85:5879-5883 (1988))；(x)具有兩個抗原結合位點之「雙功能抗體」，其包含重鏈可變域 (VH) 與同一多肽鏈中之輕鏈可變域 (VL) 連接 (例如參看 EP 404,097；WO 93/11161；及 Hollinger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993))；(xi)「線抗體」，其包含一對串聯 Fd 區段 (VH-CH1-VH-CH1)，該等區段連同互補輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區 (Zapata 等人，*Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 (1995)；及美國專利第 5,641,870 號)。

如本文中所用，術語「單株抗體」係指獲自實質上同源抗體群體之抗體，亦即構成該群體之個別抗體除可能存在少量可能天然存在之突變外為相同的。單株抗體針對單一抗原具有高度特異性。此外，與通常包括針對不同決定子 (抗原決定基) 之不同抗體的多株抗體製劑相反，各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。不應將修飾語「單株」視為需要藉由任何特定方法產生抗體。舉例而言，欲根據本發明使用之單株抗體可藉由 Kohler 等人，*Nature* 256:495 (1975) 首先描述之融合瘤方法製得，或可藉由重組 DNA 方法 (例如參看美國專利第 4,816,567 號) 製得。亦可使用例如在 Clackson 等人，*Nature* 352:624-628 (1991) 或 Marks 等

人，*J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)中所述之技術自噬菌體抗體文庫中分離「單株抗體」。

「Fv」片段為含有完整抗原識別及結合位點之抗體片段。該區域係由一個重鏈可變域與一個輕鏈可變域緊密締合之二聚體組成，該等可變域本質上可為共價的，例如在scFv中。在此組態中，各可變域之三個CDR相互作用以界定 V_H - V_L 二聚體表面上之抗原結合位點。六個CDR或其子集共同賦予抗體以抗原結合特異性。然而，甚至單一可變域(或僅包含三個抗原特異性CDR的一半Fv)亦具有識別及結合抗原之能力，但其親和力通常低於整個結合位點。

如本文中所用，「抗體可變域」係指抗體分子之輕鏈及重鏈中包括互補決定區(CDR；亦即CDR1、CDR2及CDR3)及構架區(FR)之胺基酸序列的部分。 V_H 係指重鏈之可變域。 V_L 係指輕鏈之可變域。根據本發明中所用之方法，指派給CDR及FR之胺基酸位置可根據Kabat(*Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987及1991))界定。抗體或抗原結合片段之胺基酸編號亦係根據Kabat之編號。

如本文中所用，術語「互補決定區」(CDR；亦即CDR1、CDR2及CDR3)係指抗體可變域中對於抗原結合而言必需存在之胺基酸殘基。各可變域通常具有三個經鑑別為CDR1、CDR2及CDR3之CDR區。各互補決定區可包含來自如由Kabat定義之「互補決定區」的胺基酸殘基(亦即，輕鏈可變域中之約殘基24-34(L1)、50-56(L2)及89-

97(L3)，及重鏈可變域中之31-35(H1)、50-65(H2)及95-102(H3)；Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版。Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))，及/或來自「高變環」之殘基(亦即，輕鏈可變域中之約殘基26-32(L1)、50-52(L2)及91-96(L3)，及重鏈可變域中之26-32(H1)、53-55(H2)及96-101(H3)；Chothia及Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。在一些情況下，互補決定區可包括來自根據Kabat定義之CDR區與來自高變環之胺基酸。舉例而言，抗體4D5之重鏈的CDRH1包括胺基酸26至35。

「構架區」(下文中為FR)為非CDR殘基之可變域殘基。各可變域通常具有四個經鑑別為FR1、FR2、FR3及FR4之FR。若CDR係根據Kabat定義，則輕鏈FR殘基位於約殘基1-23(LCFR1)、35-49(LCFR2)、57-88(LCFR3)及98-107(LCFR4)處，且重鏈FR殘基位於重鏈殘基中之約殘基1-30(HCFR1)、36-49(HCFR2)、66-94(HCFR3)及103-113(HCFR4)處。若CDR包含來自高變環之胺基酸殘基，則輕鏈FR殘基位於輕鏈中之約殘基1-25(LCFR1)、33-49(LCFR2)、53-90(LCFR3)及97-107(LCFR4)處，且重鏈FR殘基位於重鏈殘基中之約殘基1-25(HCFR1)、33-52(HCFR2)、56-95(HCFR3)及102-113(HCFR4)處。在一些情況下，當CDR包含來自如Kabat定義之CDR之胺基酸與高變環之胺基酸時，FR殘基將相應地經調節。舉例而言，當CDRH1包括胺基酸H26-H35時，重鏈FR1殘基係在位置1-

25且FR2殘基係在位置36-49。

「Fab」片段含有輕鏈之可變域及恆定域，及重鏈之可變域及第一恆定域(CH1)。F(ab')₂抗體片段包含一對Fab片段，此對片段一般藉由其間之鉸鏈半胱胺酸在接近其羧基端處共價連接。此項技術中亦已知抗體片段之其他化學偶合。

「單鏈Fv」或「scFv」抗體片段包含抗體之V_H及V_L域，其中此等域存在於單一多肽鏈中。Fv多肽一般進一步包含在V_H域與V_L域之間的多肽連接子，其使scFv能夠形成供抗原結合之所需結構。關於scFv之回顧，參看Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*，第113卷，Rosenburg及Moore編。Springer-Verlag, New York，第269-315頁(1994)。

術語「雙功能抗體」係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含重鏈可變域(V_H)與同一多肽鏈(V_H及V_L)中之輕鏈可變域(V_L)連接。藉由使用過短而無法使同一鏈上兩個域之間配對的连接子，迫使該等域與另一鏈之互補域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體係較充分地描述於例如EP 404,097；WO 93/11161；及Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)中。

表述「線抗體」係指Zapata等人，*Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995)中所述之抗體。簡言之，此等抗體包含一對串聯Fd區段(V_H-C_H1-V_H-C_H1)，該等區段連同互補輕

鏈多肽一起形成一對抗原結合區。線抗體可為雙特異性或單特異性的。

本文中，單株抗體特定包括「嵌合」抗體(免疫球蛋白)，其中重鏈及/或輕鏈之一部分係與源自特定物種或屬於特定抗體種類或子類之抗體中的相應序列一致或同源，而該鏈之其餘部分係與源自另一物種或屬於另一抗體種類或子類之抗體中的相應序列一致或同源，以及此等抗體之片段，前提為其顯示所需生物活性(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。

非人類(例如鼠類)抗體之「人類化」形式為含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。人類化抗體一般為人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體高變區之殘基係經來自諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物之非人類物種(供體抗體)之高變區的具有所需特異性、親和力及能力之殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架區(FR)殘基係經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含受體抗體或供體抗體中未見之殘基。進行此等修飾以進一步改進抗體效能。人類化抗體一般將包含至少一個且通常兩個可變域之實質上全部，其中所有或實質上所有高變環均對應於非人類免疫球蛋白之高變環，且所有或實質上所有FR區均為人免疫球蛋白序列之FR區。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常包含人類免疫球蛋白恆定區之至少一部分。有關

進一步細節，參看 Jones 等人，*Nature* 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人，*Nature* 332:323-329 (1988)；及 Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)。

「人類抗體」為具有對應於人類產生之抗體之胺基酸序列的胺基酸序列及/或已使用任何如本文所揭示之製造人類抗體之技術製得的抗體。人類抗體之此定義尤其排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。人類抗體可使用此項技術中已知之各種技術製得。在一個實施例中，人類抗體係選自噬菌體文庫，其中該噬菌體文庫表現人類抗體 (Vaughan 等人，*Nature Biotechnology* 14:309-314 (1996)；Sheets 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6157-6162 (1998)；Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991)；Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991))。人類抗體亦可藉由將人類免疫球蛋白基因座引入內源性免疫球蛋白基因已部分或完全失活之轉殖基因動物(例如小鼠)中而製得。攻毒後，觀察人類抗體產生，其在所有方面均密切地類似於人類中所見，包括基因重排、組裝及抗體譜。此方法係描述於例如美國專利第 5,545,807 號；第 5,545,806 號；第 5,569,825 號；第 5,625,126 號；第 5,633,425 號；第 5,661,016 號，及以下科學出版物中：Marks 等人，*Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)；Lonberg 等人，*Nature* 368: 856-859 (1994)；Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994)；Fishwild 等人，*Nature Biotechnology* 14: 845-51 (1996)；Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996)；

Lonberg及Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)。

或者，可經由永生化人類B淋巴細胞，使得產生針對靶抗原之抗體來製備人類抗體(此等B淋巴細胞可自個體回收，或可能已經活體外免疫)。例如參看Cole等人，*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss，第77頁(1985)；Boerner等人，*J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991)；及美國專利第5,750,373號。

「親和力成熟」抗體為與不具有改變之親本抗體相比，在一或多個CDR中具有一或多種改變，使得抗體對抗原之親和力存在改良的抗體。較佳之親和力成熟抗體將對靶抗原具有奈莫耳或甚至皮莫耳級之親和力。親和力成熟抗體係藉由此項技術中已知之程序製造。Marks等人，*Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述藉由VH及VL域改組實現親和力成熟。以下文獻描述CDR及/或構架殘基之隨機突變誘發：Barbas等人，*Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier等人，*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton等人，*J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人，*J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)；及Hawkins等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

抗體之「功能性抗原結合位點」為能夠結合靶抗原之位點。抗原結合位點之抗原結合親和力未必與引出該抗原結合位點之親本抗體一樣強，但結合抗原之能力必須能使用已知用於評估抗體結合於抗原之多種方法中的任一者來量測。此外，本文中之多價抗體之各抗原結合位點的抗原結

合親和力不需相同定量。對於本文中之多聚抗體，功能性抗原結合位點之數目可使用超速離心分析來評估，如美國專利申請公開案第20050186208號之實例2中所述。根據此分析方法，合併不同比率之靶抗原與多聚抗體，且假設功能性結合位點之數目不同來計算複合物之平均分子量。將此等理論值與所得實際實驗值相比較，以評估功能性結合位點之數目。

具有指定抗體之「生物學特徵」之抗體為具有該抗體之一或多種生物學特徵的抗體，該等生物學特徵使其與結合於相同抗原之其他抗體相區分。

為篩選結合於相關抗體所結合之抗原上之抗原決定基的抗體，可進行常規交叉阻斷檢驗(cross-blocking assay)，諸如 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow及David Lane編 (1988)中描述之檢驗。

「物種依賴性抗體」為對來自第一哺乳動物物種之抗原的結合親和力強於其對來自第二哺乳動物物種之該抗原的同系物之結合親和力的抗體。通常，物種依賴性抗體「特异性結合於」人類抗原(亦即，具有不大於約 1×10^{-7} M、較佳不大於約 1×10^{-8} M且最佳不大於約 1×10^{-9} M之結合親和力(K_d)值)，但對來自第二非人類哺乳動物物種之該抗原之同系物的結合親和力為其對該人類抗原之結合親和力之1/(至少約50)，或1/(至少約500)，或1/(至少約1000)。物種依賴性抗體可為如上文所定義之各種類型抗體中之任一者，但通常為人類化或人類抗體。

如本文中所示，「抗體突變體」或「抗體變異體」係指物種依賴性抗體之胺基酸序列變異體，其中物種依賴性抗體之一或多個胺基酸殘基已經修飾。此等突變體與物種依賴性抗體必定具有小於100%之序列一致性或相似性。在一個實施例中，抗體突變體之胺基酸序列將與物種依賴性抗體之重鏈可變域或輕鏈可變域之胺基酸序列具有至少75%、更佳至少80%、更佳至少85%、更佳至少90%且最佳至少95%之胺基酸序列一致性或相似性。相對於此序列之一致性或相似性在本文中係定義為在比對序列且必要時引入間隙以達成最大序列一致性百分比之後，候選序列中與物種依賴性抗體殘基一致(亦即，相同殘基)或相似(亦即，來自基於共同側鏈特性的同一組之胺基酸殘基，參看下文)之胺基酸殘基的百分比。可變域外部抗體序列中之N端、C端或內部延伸、缺失或插入均不應解釋為影響序列一致性或相似性。

為增加含有本發明之胺基酸序列之抗體或多肽的半衰期，例如美國專利5,739,277中所述，可使救助受體結合抗原決定基(salvage receptor binding epitope)連接至抗體(尤其為抗體片段)。舉例而言，編碼救助受體結合抗原決定基之核酸分子可以同框方式(in frame)連接於編碼本發明之多肽序列的核酸，以致由經工程改造之核酸分子表現的融合蛋白包含救助受體結合抗原決定基及本發明之多肽序列。如本文中所示，術語「救助受體結合抗原決定基」係指IgG分子(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄)之Fc區中負責增

加IgG分子之活體內血清半衰期的抗原決定基(例如 Ghetie 等人, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000), 表1)。Fc區中具有取代且血清半衰期增加之抗體亦描述於WO 00/42072、WO 02/060919; Shields等人, *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Hinton, *J. Biol. Chem.* 279: 6213-6216 (2004)中。在另一實施例中, 亦可例如藉由連接其他多肽序列來增加血清半衰期。舉例而言, 可使適用於本發明方法之抗體或其他多肽連接於結合於FcRn受體或血清白蛋白結合肽之血清白蛋白或血清白蛋白之一部分, 以致血清白蛋白結合於該抗體或多肽, 例如此等多肽序列係揭示於WO 01/45746中。在一個實施例中, 欲連接之血清白蛋白肽包含DICLPRWGCLW之胺基酸序列。在另一實施例中, 藉由此等方法增加Fab之半衰期。關於血清白蛋白結合肽序列, 亦參看Dennis等人, *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002)。

「嵌合VEGF受體蛋白」為具有源自至少兩種不同蛋白質之胺基酸序列的VEGF受體分子, 該至少兩種不同蛋白質中至少一者為VEGF受體蛋白。在某些實施例中, 嵌合VEGF受體蛋白能夠結合於VEGF且抑制VEGF之生物活性。

「分離之」抗體為已經鑑別且自天然環境之組分分離及/或回收之抗體。其天然環境之污染物組分為會干擾抗體之診斷或治療用途的物質, 且可包括酶、激素及其他蛋白質性或非蛋白質性溶質。在某些實施例中, 抗體將純化

(1)至如勞立法(Lowry method)所測定大於95重量%之抗體，且最佳大於99重量%之抗體，(2)至足以藉由使用旋杯式序列分析儀獲得N端或內部胺基酸序列之至少15個殘基的程度，或(3)至均質，如藉由SDS-PAGE，在還原或非還原條件下，使用考馬斯藍(Coomassie blue)或銀染色(silver stain)達成。由於抗體之天然環境之至少一種組分將不會存在，分離之抗體包括原位處於重組細胞內之抗體。然而，分離之抗體通常將藉由至少一個純化步驟來製備。

「片段」意謂多肽或核酸分子之一部分，其較佳含有該參考核酸分子或多肽之整個長度的至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或95%以上。片段可含有10、20、30、40、50、60、70、80、90或100、200、300、400、500、600或600個以上核苷酸，或10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、190、200或200個以上胺基酸。

「抗血管生成劑」或「血管生成抑制劑」係指直接或間接抑制血管生成、血小管生成或不合需要之血管滲透性的小分子量物質、聚核苷酸、多肽、分離之蛋白質、重組蛋白、抗體，或其結合物或融合蛋白。應瞭解，抗血管生成劑包括結合血管生成因子或其受體且阻斷其血管生成活性的藥劑。舉例而言，抗血管生成劑為如上文所定義之血管生成劑之抗體或其他拮抗劑，例如VEGF-A或VEGF-A受體(例如KDR受體或Flt-1受體)之抗體、抗PDGFR抑制劑，諸如GleevecTM(甲磺酸伊馬替尼(Imatinib Mesylate))。抗血

管生成劑亦包括天然血管生成抑制劑，例如血管抑制素、內皮抑制素等。例如參看Klagsbrun及D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991)；Streit及Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003)(例如表3列出惡性黑色素瘤之抗血管生成治療)；Ferrara及Alitalo, *Nature Medicine* 5:1359-1364 (1999)；Tonini等人, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003)(例如表2列出已知抗血管生成因子)；及Sato. *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)(例如表1列出用於臨床試驗中之抗血管生成劑)。

本文中，「速效劑量(loading dose)」一般包含投與患者之治療劑的初始劑量，且繼之以其一或多個維持劑量。一般投與單次速效劑量，但本文中涵蓋多次速效劑量。通常，所投與之速效劑量的量超過所投與之維持劑量的量，及/或速效劑量之投與比維持劑量頻繁，以使達成治療劑之所需穩態濃度早於維持劑量所能達成。

本文中，「維持」劑量係指歷經治療期或在治療期之後投與患者之一或多劑治療劑。維持劑量通常以隔開之治療時間間隔，諸如約每週、約每2週、約每3週或約每4週投與。

「可手術治療之」癌症係指限於原發器官且適於手術之癌症。

「存活」係指患者保持活著，且包括無病存活(DFS)及總存活(OS)。存活可藉由卡普蘭-邁耶法(Kaplan-Meier method)評估，且使用分層對數等級測試(stratified log

rank test)來計算任何存活差異。

「無病存活(DFS)」係指患者在癌症未復發之情況下保持活著一定時段，諸如自治療起始或自初始診斷起約1年、約2年、約3年、約4年、約5年、約10年等。在本發明之一個態樣中，根據治療意向原則(intent-to-treat principle)分析DFS，亦即基於患者之指定治療來評估患者。DFS分析中所用之事件可包括癌症之局部、區域及遠端復發、出現繼發性癌症，及無先前事件(例如結腸直腸癌復發或第二種原發癌)之患者死亡原因。

「總存活」係指患者保持活著一定時段，諸如自治療起始或自初始診斷起約1年、約2年、約3年、約4年、約5年、約10年等。在本發明之研究中，用於存活分析之事件為死亡原因。

「延長存活」或「提高存活可能性」意謂相對於未經治療之患者(亦即相對於未以例如抗VEGF抗體之VEGF特異性拮抗劑治療之患者)，或相對於對照治療方案(諸如僅用化學治療劑，諸如結腸直腸癌標準護理中所用者，例如甲醯四氫葉酸、5-氟尿嘧啶、奧沙利鉑、伊立替康(irinotecan)或其組合治療)，經治療之患者提高DFS及/或OS或提高在一定時間點保持活著及/或無病之機率。在起始治療後或在初始診斷後，監測存活至少約兩個月、四個月、六個月、九個月，或至少約1年，或至少約2年，或至少約3年，或至少約4年，或至少約5年，或至少約10年等。

存活分析中之「危險比率」為兩條存活曲線之間差異的概要，其表示追蹤期間治療組較對照組死亡風險降低。危險比率為事件比率之統計學定義。為本發明之目的，危險比率係以表示在任何特定時間點實驗組中事件之機率除以對照組中事件之機率所定義。

術語「並行」在本文中用以指投與兩種或兩種以上治療劑，其中至少一部分投與在時間上重疊。因此，並行投與包括在中止投與一或多種其他藥劑之後繼續投與一或多種藥劑之給藥方案。

「單一治療」意謂包括在治療期過程期間僅單一治療劑用於治療癌症或腫瘤之治療方案。使用 VEGF 特異性拮抗劑之單一治療意謂在治療期期間，在無其他抗癌治療存在下投與 VEGF 特異性拮抗劑。

本文中，「輔助治療」係指在確定性手術之後給予之治療，其後無法偵測到殘餘疾病之跡象，以便降低疾病局部或轉移性復發之風險。輔助治療之目標在於防止或延遲癌症復發，且因此降低癌症相關死亡之可能性。

「維持治療」意謂為降低初始治療介入之有利結果後疾病復發或進展之可能性而給予的治療方案。可提供維持治療歷時任何時間長度，包括延長時段至個體之壽命。可在初始治療之後或與初始治療或額外治療聯合提供維持治療。用於維持治療之劑量可變化且可包括與其他類型治療所用之劑量相比減小之劑量。

本文中，「標準護理」化學治療係指常規用以治療特定

癌症之化學治療劑。

「確定性手術」之使用如同該術語在醫學社區 (medical community) 中所用，且通常係指結果為可能治癒之手術。確定性手術包括例如使得腫瘤經移除或切除之外科程序或其他程序，包括使得所有粗略可見之腫瘤均經移除或切除之程序。確定性手術包括例如完全或治癒性切除或完全整體切除腫瘤。確定性手術包括在一或多個階段中發生之程序，且包括例如多階段外科程序，其中一或多個外科程序或其他程序係在腫瘤切除之前進行。確定性手術包括移除或切除腫瘤 (包括累及之器官、器官之部分及組織，以及周圍器官，諸如淋巴結、器官之部分或組織) 之程序。

術語「癌症」及「癌性的」係指或描述哺乳動物中通常特徵在於不受調節之細胞生長的生理學病狀。此定義包括良性及惡性癌症以及休眠腫瘤或微小轉移。癌症之實例包括 (但不限於) 癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病。此等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌、肺癌 (包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及肺鱗狀癌)、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌 (包括胃腸癌)、胰腺癌、神經膠母細胞瘤、子宮頸癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜癌或子宮癌、唾液腺癌、腎癌、肝癌、前列腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、肝癌及各種類型之頭頸部癌，以及B細胞淋巴瘤 (包括低級/濾泡性非霍奇金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma/NHL)；小淋巴細胞 (SL)NHL；中級/濾泡性NHL；中級彌漫性NHL；高級

免疫母細胞NHL；高級淋巴母細胞NHL；高級小無裂細胞NHL(high grade small non-cleaved cell NHL)；巨大腫瘤(bulky disease)NHL；套細胞淋巴瘤；AIDS相關淋巴瘤；及瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia))；慢性淋巴細胞白血病(CLL)；急性淋巴母細胞白血病(ALL)；毛細胞白血病；慢性骨髓母細胞白血病；及移植後淋巴增生性病變(PTLD)，以及與母斑細胞病、水腫(諸如與腦腫瘤相關之水腫)及梅格斯氏症候群(Meigs' syndrome)相關之異常血管增生。

「轉移」意謂癌症自其原發部位擴散至體內其他位置。癌細胞可離開原發腫瘤，滲入淋巴管及血管中，循環通過血流，且在體內其他各處正常組織內之遠端中心生長(轉移)。轉移可為局部或遠端的。癌症轉移為連續過程，視腫瘤細胞離開原發腫瘤、穿過血流且停在遠端部位而定。細胞在新部位建立血液供應且可生長以形成威脅生命之塊狀物。腫瘤細胞內之刺激與抑制分子路徑均調節此行為，且腫瘤細胞與遠端部位宿主細胞之間的相互作用亦為顯著的。

「微小轉移」意謂少量細胞已自原發腫瘤擴散至身體其他部分。篩選或診斷測試中可能偵測到或可能偵測不到微小轉移。

本文中，「癌症復發」係指在治療之後癌症復發，且包括癌症在原發器官中復發，以及癌症在原發器官外部復發之遠端復發。

處於「高癌症復發風險」下之個體為經歷癌症復發之可能性較大的個體。例如相對較年輕個體(例如小於約50歲)，有陽性淋巴結，尤其4個或4個以上累及淋巴結(包括4-9個累及淋巴結，及10個或10個以上累及淋巴結)之個體，及腫瘤直徑大於2 cm(例如在乳癌患者中)之個體。個體之風險程度可由熟練醫師測定。一般而言，此等高風險個體將具有淋巴結累及(例如有4個或4個以上累及淋巴結)；然而，無淋巴結累及之個體例如在腫瘤大於或等於2 cm時亦具高風險。

「癌症復發風險降低」意謂相對於未經治療之患者(亦即相對於未以例如抗VEGF抗體之VEGF特異性拮抗劑治療之患者)，或相對於對照治療方案(諸如僅用化學治療劑治療，該化學治療劑諸如為結腸直腸癌標準護理中所用者，例如甲醯四氫葉酸、5-氟尿嘧啶、奧沙利鉑、伊立替康或其組合)，降低經歷癌症復發之可能性。在起始治療後或在初始診斷後，監測癌症復發歷時至少約兩個月、四個月、六個月、九個月或至少約1年，或至少約2年，或至少約3年，或至少約4年，或至少約5年，或至少約10年等。

「起始治療」係指在手術移除腫瘤之後開始治療方案。在一個實施例中，此可指在手術後投與一或多種化學治療劑。或者，此可指初始投與VEGF特異性拮抗劑(例如抗VEGF抗體)及一或多種化學治療劑。

本文中，「治癒」癌症意謂視癌症類型而定，在開始輔助治療後約2、3、4或約5年無癌症復發。

如本文中所示，「腫瘤」係指所有惡性或良性贅生性細胞生長及增殖，及所有癌前及癌性細胞及組織。

「腫瘤休眠」意謂長久靜態，其中腫瘤細胞存在，但腫瘤進展在臨床上不明顯。篩選或診斷測試中可能偵測到或可能偵測不到休眠腫瘤。

「個體」意謂哺乳動物，包括(但不限於)人類或非人類哺乳動物，諸如牛、馬、犬、綿羊或貓科動物。個體較佳為人類。患者在本文中亦為個體。

個體之「群體(population)」係指諸如在臨床試驗中或如由腫瘤學家按照特定適應症之核准(例如FDA核准)(諸如癌症輔助治療)所見患有癌症的個體之組。

術語「抗癌治療」係指適用於治療癌症之治療。抗癌治療劑之實例包括(但不限於)例如手術、化學治療劑、生長抑制劑、細胞毒性劑、放射治療中所用之藥劑、抗血管生成劑、細胞凋亡劑、抗微管蛋白劑，及其他治療癌症之藥劑，諸如抗HER-2抗體、抗CD20抗體、表皮生長因子受體(EGFR)拮抗劑(例如酪胺酸激酶抑制劑)、HER1/EGFR抑制劑(例如埃羅替尼(erlotinib)(Tarceva[®]))、血小板衍生生長因子抑制劑(例如Gleevec[™](甲磺酸伊馬替尼))、COX-2抑制劑(例如塞內昔布(celecoxib))、干擾素、細胞激素、結合於一或多種以下靶ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR- β 、BlyS、APRIL、BCMA或VEGF受體、TRAIL/Apo2之拮抗劑(例如中和抗體)，及其他生物活性劑及有機化學劑等。本發明亦包括此等藥劑中兩者或兩者以上之組合。

如本文中所用，術語「細胞毒性劑」係指抑制或防止細胞功能及/或使細胞受到破壞之物質。該術語意欲包括放射性同位素(例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²，及Lu之放射性同位素)、化學治療劑，及毒素，諸如細菌、真菌、植物或動物來源之小分子毒素或酶促活性毒素，包括其片段及/或變異體。

「化學治療劑」為適用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括適用於治療癌症之化合物。化學治療劑之實例包括烷化劑，諸如噻替派(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺；烷基磺酸酯，諸如硫酸布他卡因(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡波醯(carboquone)、米特多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；伸乙基亞胺及甲基三聚氰胺，包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基蜜胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基蜜胺；多聚乙醯(acetogenin)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓朴替康(topotecan))；苔蘚蟲素(bryostatin)；卡利斯達汀(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；自念珠藻環肽(cryptophycin)(尤其自念珠藻環肽1及自念珠藻環肽8)；海兔毒素(dolastatin)；多卡米辛(duocarmycin)(包括合成類似物 KW-2189 及 CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；盤克斯達汀(pancratistatin)；沙考的汀

(sarcodictyin)；海綿素(spongistatin)；氮芥(nitrogen mustard)，諸如苯丁酸氮芥、荼氮芥(chlornaphazine)、氯磷醯胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺、二氯甲二乙胺(mechlorethamine)、鹽酸二氯甲二乙胺氧化物(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法侖(melphalan)、新恩比興(novembichin)、膽固醇對苯乙酸氮芥(phenesterine)、松龍苯芥(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥(uracil mustard)；亞硝基脲，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素，諸如烯二炔抗生素(例如刺孢黴素(calicheamicin)，尤其刺孢黴素 γ II及刺孢黴素 ω II(例如參看 Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))；達米辛(dynemicin)，包括達米辛A；雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)；斯培拉黴素(esperamicin)；以及新抑癌素發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomysin)、放線菌素(actinomycin)、蔥黴素(authramycin)、偶氮絲胺酸(azaserine)、博萊黴素(bleomycins)、放線菌素C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycinis)、更生黴素(dactinomycin)、道諾黴素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-側氧基-L-正白胺酸、ADRIAMYCIN®小紅莓(doxorubicin)(包括

(N-嗎啉基)-小紅莓、氫基(N-嗎啉基)-小紅莓、2-(N-吡咯啉基)-小紅莓(2-pyrrolino-doxorubicin)及去氧小紅莓)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(mitomycin)(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾加黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、潑非黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎那黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑菌素(streptonigrin)、鏈脲黴素(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin); 抗代謝物, 諸如甲胺喋呤(methotrexate)及5-氟尿嘧啶(5-FU); 葉酸類似物, 諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、喋羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate); 嘌呤類似物, 諸如氟達拉濱(fludarabine)、6-巰基嘌呤(6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine); 嘧啶類似物, 諸如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮雜尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙去氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine); 雄激素, 諸如卡普甾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酯(testolactone); 抗腎上腺劑, 諸如

胺魯米特(aminogluthimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑，諸如夫羅林酸(frolic acid)；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；恩尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；倍思塔布(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；艾達曲克(edatraxate)；得弗伐胺(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醯(diaziquone)；依氟鳥胺酸(elfornithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；艾普塞隆(epothilone)；乙環氧啶(etoglucid)；硝酸鎂；羥基脲；香菇多糖(lentinan)；羅尼達寧(lonidainine)；美登素類(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及安絲菌素(ansamitocin)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醯(mitoxantrone)；莫派達醇(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴司他丁(pentostatin)；苯來美特(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醯(losoxantrone)；足葉草酸(podophyllinic acid)；2-乙基醯肼(2-ethylhydrazide)；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐糖(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醯(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢徽烯毒素(trichothecene)(尤其T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、桿孢菌素A(roridin A)及蛇形菌毒素(anguidine))；胺

基甲酸酯 (urethan) ; 長春地辛 (vindesine) ; 達卡巴嗪 (dacarbazine) ; 甘露莫司汀 (mannomustine) ; 二溴甘露醇 (mitobronitol) ; 二溴衛矛醇 (mitolactol) ; 哌泊溴烷 (pipobroman) ; 甲托辛 (gacytosine) ; 阿拉伯糖 (arabinoside)(「Ara-C」) ; 環磷醯胺 ; 噻替哌 ; 紫杉烷類 (taxoid) , 例如 TAXOL® 太平洋紫杉醇 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE® 無十六醇聚氧乙烯醚 (Cremophor) 的白蛋白工程改造之太平洋紫杉醇奈米粒子調配物 (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois) , 及 TAXOTERE® 多西他賽 (doxetaxel)(Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France) ; 苯丁酸氮芥 (chloranbucil) ; GEMZAR® 吉西他濱 (gemcitabine) ; 6-硫鳥嘌呤 ; 巯基嘌呤 ; 甲胺喋呤 ; 鉑類似物 , 諸如順鉑 (cisplatin) 、奧沙利鉑及卡鉑 (carboplatin) ; 長春鹼 (vinblastine) ; 鉑 ; 依託泊苷 (etoposide)(VP-16) ; 異環磷醯胺 ; 米托蒽醌 ; 長春新鹼 (vincristine) ; NAVELBINE® 長春瑞賓 (vinorelbine) ; 諾凡特龍 (novantrone) ; 替尼泊甙 (teniposide) ; 依達曲沙 (edatrexate) ; 道諾黴素 ; 胺基蝶呤 (aminopterin) ; 希羅達 (xeloda) ; 伊班膦酸鹽 (ibandronate) ; 伊立替康 (Camptosar, CPT-11)(包括伊立替康與 5-FU 及甲醯四氫葉酸之治療方案) ; 拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000 ; 二氟甲基鳥胺酸 (DMFO) ; 類視黃素 , 諸如視黃酸 ; 卡培他濱 (capecitabine) ; 康柏斯達汀 (combretastatin) ; 甲醯四氫葉酸 (LV) ; 奧沙利鉑 , 包括奧

沙利鉑治療方案 (FOLFOX)；PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR(例如埃羅替尼 (Tarceva[®]))及 VEGF-A 之抑制劑，其減少細胞增殖；及任一上述物質之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

此定義亦包括抗激素劑，其用以調節或抑制對腫瘤之激素作用，諸如抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑 (SERM)，包括例如他莫昔芬 (包括 NOLVADEX[®] 他莫昔芬)、雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、克沃昔芬 (keoxifene)、LY117018、奧那司酮 (onapristone) 及 FARESTON·托瑞米芬 (FARESTON·toremifene)；芳香酶抑制劑，其抑制調節腎上腺中雌激素產生之酶芳香酶，諸如 4(5)-咪唑、胺魯米特 (aminoglutethimide)、MEGASE[®] 乙酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、AROMASIN[®] 依西美坦 (exemestane)、福美絲坦 (formestane)、法屈唑 (fadrozole)、RIVISOR[®] 伏羅唑 (vorozole)、FEMARA[®] 來曲唑 (letrozole) 及 ARIMIDEX[®] 阿那曲唑 (anastrozole)；及抗雄激素，諸如氟他胺 (flutamide)、尼魯米特 (nilutamide)、比卡魯胺 (bicalutamide)、亮丙立德 (leuprolide) 及戈舍瑞林 (goserelin)；以及曲沙他濱 (troxacitabine) (1,3-二氧戊環核苷胞嘧啶類似物)；反義寡核苷酸，尤其抑制涉及異常細胞增殖之信號傳導路徑中之基因表現者，諸如 PKC- α 、Raf 及 H-Ras；核糖核酸酶，諸如 VEGF 表現抑制劑 (例如 ANGIOZYME[®] 核糖核酸酶) 及 HER2 表現抑制劑；疫苗，諸

如基因治療疫苗，例如 ALLOVECTIN® 疫苗、LEUVECTIN® 疫苗及 VAXID® 疫苗；PROLEUKIN® rIL-2；LURTOTECAN® 拓撲異構酶 1 抑制劑；ABARELIX® rmRH；及上述任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

術語「細胞激素」為由一個細胞群體釋放之作為細胞間介體作用於另一細胞的蛋白質之通用術語。此等細胞激素之實例為淋巴介質、單核球激素及傳統多肽激素。細胞激素中包括生長激素，諸如人類生長激素、N-甲硫胺醯基人類生長激素及牛生長激素；副甲狀腺激素；甲狀腺素；胰島素；胰島素原；鬆弛素；鬆弛素原；醣蛋白激素，諸如促濾泡素(FSH)、促甲狀腺素(TSH)及促黃體素(LH)；表皮生長因子；肝生長因子；纖維母細胞生長因子；促乳素；胎盤生乳素；腫瘤壞死因子- α 及腫瘤壞死因子- β ；苗勒抑制物質(mullerian-inhibiting substance)；小鼠促性腺激素相關肽；抑制素(inhibin)；活化素；血管內皮生長因子；整合素；血小板生成素(TPO)；神經生長因子，諸如NGF- α ；血小板生長因子；轉化生長因子(TGF)，諸如TGF- α 及TGF- β ；類胰島素生長因子-I及類胰島素生長因子-II；紅血球生成素(EPO)；骨生成誘導因子；干擾素，諸如干擾素- α 、干擾素- β 及干擾素- γ ；群落刺激因子(CSF)，諸如巨噬細胞-CSF(M-CSF)；粒細胞-巨噬細胞-CSF(GM-CSF)；及粒細胞-CSF(G-CSF)；介白素(IL)，諸如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；腫瘤壞死因子，諸如TNF- α 或TNF- β ；及其他多肽因子，包括LIF及kit配位體(KL)。如本文中所用，術語細胞激素包括來自天然來源或來自重組細胞培養物之蛋白質，及天然序列細胞激素之生物學活性等效物。

「生長抑制劑」在用於本文中時係指抑制活體外及/或活體內細胞生長之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著降低S期細胞百分比者。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進程(在除S期以外之位置)之藥劑，諸如誘導G1停滯及M期停滯之藥劑。經典M期阻斷劑包括長春花屬(vincas)(長春新鹼及長春鹼)、TAXOL[®]，及拓撲異構酶II(topo II)抑制劑，諸如小紅莓、表柔比星、道諾黴素、依託泊苷及博萊黴素(bleomycin)。使G1停滯之藥劑亦過剩而引起S期停滯，例如DNA烷化劑，諸如他莫西芬、潑尼松(prednisone)、達卡巴嗪、二氯甲二乙胺、順鉑、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶及ara-C。其他資訊可見於The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及Israel編，第1章，標題為「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」，Murakami等人(WB Saunders: Philadelphia, 1995)，尤其第13頁。

如本申請案中所用，術語「前藥」係指醫藥學活性物質之前驅體或衍生形式，其與母體藥物相比對腫瘤細胞之細胞毒性較小，且能夠酶促活化或轉化為更具活性之母體形式。例如參看Wilman，「Prodrugs in Cancer Chemotherapy」*Biochemical Society Transactions*, 14，第375-382頁，第

615屆會議，貝爾法斯特(615th Meeting Belfast)(1986)及 Stella等人，「Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery,」*Directed Drug Delivery*, Borchardt等人(編)，第247-267頁，Humana Press (1985)。本發明之前藥包括(但不限於)含磷酸酯基之前藥、含硫代磷酸酯基之前藥、含硫酸酯基之前藥、含肽前藥、經D-胺基酸修飾之前藥、糖基化前藥、含 β -內醯胺之前藥、含有視情況經取代之苯氧基乙醯胺的前藥或含有視情況經取代之苯基乙醯胺的前藥、5-氟胞嘧啶及其他5-氟尿苷前藥，其可轉化為更具活性之細胞毒性游離藥物。可衍生為用於本發明之前藥形式的細胞毒性藥物之實例包括(但不限於)上文所述之化學治療劑。

「放射治療」意謂使用定向 γ 射線或 β 射線對細胞誘導足夠破壞，以便限制細胞正常發揮功能之能力或完全破壞細胞。應瞭解，此項技術中已知多種測定治療劑量及持續時間之方式。以一次投與形式給予典型治療且典型劑量介於每日10至200單位(戈雷(Gray))之範圍內。

「降低或抑制」意謂引起較佳20%或20%以上，更佳50%或50%以上，及最佳75%、85%、90%、95%或95%以上之總體降低的能力。降低或抑制可指所治療病症之症狀、轉移或微小轉移之存在或尺寸、原發腫瘤之尺寸、休眠腫瘤之存在或尺寸，或血管生成病症中血管之尺寸或數目。

術語「靜脈內輸注」係指歷經超過約5分鐘，較佳在約

30至90分鐘之間的時段將藥物引入至動物或人類患者之靜脈中，但根據本發明，靜脈內輸注或者投與10小時或少於10小時。

術語「靜脈內團式注射(intravenous bolus)」或「靜脈內推注(intravenous push)」係指將藥物投與至動物或人類之靜脈中，使得身體在約15分鐘或少於15分鐘，較佳5分鐘或少於5分鐘內接收藥物。

術語「皮下投與」係指藉由自藥物容器相對較慢地持續傳遞將藥物引入動物或人類患者之皮膚下，較佳皮膚與下伏組織之間的囊(pocket)內。該囊可藉由向上及遠離下伏組織收縮(pinching)或提拉(drawing)皮膚而產生。

術語「皮下輸注」係指藉由自藥物容器相對較慢地持續傳遞歷時包括(但不限於)30分鐘或少於30分鐘，或90分鐘或少於90分鐘之時段將藥物引入動物或人類患者之皮膚下，較佳皮膚與下伏組織之間的囊內。視情況，輸注可藉由皮下植入藥物傳遞泵(植入動物或人類患者之皮膚下)來進行，其中該泵傳遞預定量之藥物歷時預定時段，諸如30分鐘、90分鐘，或跨越治療方案長度之時段。

術語「皮下團式注射」係指將藥物投與至動物或人類患者之皮膚下方，其中團式藥物傳遞較佳少於約15分鐘，更佳少於5分鐘，且最佳少於60秒。較佳在皮膚與下伏組織之間的囊內投與，其中該囊例如藉由向上及遠離下伏組織收縮或提拉皮膚而產生。

「病症」為任何將得益於使用抗VEGF抗體之治療的病

狀。其包括慢性及急性病症或疾病，包括使哺乳動物易患所討論之病症之病理學病狀。本文中待治療之病症的非限制性實例包括癌症；良性及惡性腫瘤；白血病及淋巴惡性疾病；神經元、神經膠質、星形膠質細胞、下視丘及其他腺體、巨噬細胞、上皮、基質及囊胚腔病症；及發炎性病變、血管生成病症及免疫學病變。

術語「治療有效量」係指有效治療哺乳動物疾病或病症之藥物量。在癌症之情況下，治療有效量之藥物可減少癌細胞數目；減小腫瘤尺寸；抑制(亦即在某種程度上減緩且較佳停止)癌細胞浸潤至周邊器官中；抑制(亦即在某種程度上減緩且較佳停止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；及/或在某種程度上減輕一或多種與病症相關之症狀。對於治療腫瘤休眠或微小轉移，治療有效量之藥物可減少微小轉移之數目或增殖；降低或防止休眠腫瘤生長；或降低或防止腫瘤在治療或移除(例如使用抗癌治療，諸如手術、放射治療或化學治療)之後復發。就藥物可防止現有癌細胞生長及/或殺死現有癌細胞而言，其可具有細胞生長抑制性及/或細胞毒性。對於癌症治療，可例如藉由評估存活、無病存活(DFS)之持續時間、疾病進展時間(TTP)、無進展存活(PFS)之持續時間、反應率(RR)、反應持續時間、緩解時間及/或生活品質來量測活體內功效。有效量可改良無病存活(DFS)、改良總存活(OS)、降低復發可能性、延長復發時間、延長遠端復發(亦即原發部位外部之復發)之時間、治癒癌症、改良癌症

症狀(例如使用癌症特定調查所判斷)、減少第二原發癌之出現等。

「治療」係指治療性處理與防止性措施。需要治療者包括已患有病症者以及欲防止病症者，包括欲防止癌症出現或復發者。

如本文中所示，「積極治療」係指投與患者治療藥物之時段。舉例而言，若每2週投與患者治療藥物歷經一年之時期，接著無治療或其他治療，則使用治療藥物之積極治療為一年時期，在此期間正投與患者該藥物。

詞「標記」在用於本文中時係指直接或間接結合於多肽之可偵測化合物或組合物。標記本身可為可偵測的(例如放射性同位素標記或螢光標記)，或在酶促標記之情況下可催化可偵測之受質化合物或組合物的化學變化。

本說明書中所提及之所有公開案、專利申請案及專利皆以引用的方式併入本文中，其引用的程度如同特定且個別地將各獨立公開案、專利或專利申請案以引用的方式併入一般。

II. 抗VEGF抗體及拮抗劑

(i) VEGF抗原

欲用於製造抗體之VEGF抗原可為例如VEGF₁₆₅分子以及VEGF之其他同功異型物，或其含有所需抗原決定基之片段。適用於產生本發明之抗VEGF抗體之其他VEGF形式將對熟習此項技術者顯而易見。

藉由首先篩選自人類細胞製備之cDNA文庫，使用牛

VEGF cDNA 作為雜交探針來獲得人類 VEGF。Leung 等人，(1989) *Science*, 246:1306。藉此鑑別之一個 cDNA 編碼與牛 VEGF 具有大於 95% 同源性之 165 個胺基酸之蛋白質；此 165 個胺基酸之蛋白質通常稱作人類 VEGF(hVEGF) 或 VEGF₁₆₅。藉由在哺乳動物宿主細胞中表現人類 VEGF cDNA 來確認人類 VEGF 之有絲分裂活性。由以人類 VEGF cDNA 轉染之細胞調節之培養基促進毛細管內皮細胞增殖，而對照細胞不促進毛細管內皮細胞增殖。Leung 等人，(1989) *Science*, 同上文。

儘管可自天然來源分離及純化血管內皮細胞生長因子以用於後續治療用途，但濾泡細胞中相對較低之蛋白質濃度與高成本(均就回收 VEGF 之努力及費用而言)證實商業上無效。因此，進一步努力經由重組 DNA 技術選殖及表現 VEGF。(例如參看 Ferrara, *Laboratory Investigation* 72:615-618 (1995)，及其中所引用之參考文獻)。

VEGF 係以多種由替代性 RNA 剪接產生之均二聚形式(每個單體 121、145、165、189 及 206 個胺基酸)表現於各種組織中。VEGF₁₂₁ 為不結合肝素之可溶有絲分裂原；增長形式之 VEGF 以逐漸增高之親和力結合肝素。肝素結合形式之 VEGF 可藉由纖維蛋白溶酶在羧基端裂解以釋放可擴散形式之 VEGF。在纖維蛋白溶酶裂解後鑑別之羧基端肽之胺基酸序列為 Arg₁₁₀-Ala₁₁₁。以均二聚體形式分離之胺基端「核心」蛋白 VEGF(1-110) 以較之完整 VEGF₁₆₅ 均二聚體類似之親和力結合中和性單株抗體(諸如稱作 4.6.1 及

3.2E3.1.1之抗體)及可溶形式之VEGF受體。

最近亦已鑑別若干與VEGF結構相關之分子，包括胎盤生長因子(PlGF)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D及VEGF-E。Ferrara及Davis-Smyth (1987) *Endocr. Rev.*, 同上文；Ogawa等人，*J. Biological Chem.* 273:31273-31281(1998)；Meyer等人，*EMBO J.*, 18:363-374(1999)。受體酪胺酸激酶Flt-4(VEGFR-3)已經鑑別為VEGF-C及VEGF-D之受體。Joukov等人，*EMBO. J.* 15:1751(1996)；Lee等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1988-1992(1996)；Achen等人，(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:548-553。已顯示VEGF-C涉及淋巴血管生成之調節。Jeltsch等人，*Science* 276:1423-1425(1997)。

已鑑別兩種VEGF受體，即Flt-1(亦稱為VEGFR-1)及KDR(亦稱為VEGFR-2)。Shibuya等人，(1990) *Oncogene* 8:519-527；de Vries等人，(1992) *Science* 255:989-991；Terman等人，(1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1579-1586。已顯示神經纖毛蛋白-1為選擇性VEGF受體，能夠結合肝素結合性VEGF同功異型物(Soker等人，(1998) *Cell* 92:735-45)。Flt-1與KDR均屬於受體酪胺酸激酶(RTK)家族。RTK包含具有各種生物活性之跨膜受體之大家族。目前，已鑑別至少十九(19)種不同的RTK子族。受體酪胺酸激酶(RTK)家族包括對於各種細胞類型之生長及分化至關重要之受體(Yarden及Ullrich (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57:433-478；Ullrich及Schlessinger (1990) *Cell*

61:243-254)。RTK之固有功能在配位體結合後經活化，使得受體及多種細胞受質磷酸化，且隨後引起各種細胞反應(Ullrich及Schlessinger (1990) *Cell* 61:203-212)。因此，藉由與特異性生長因子(配位體)細胞外相互作用，通常繼而進行受體二聚化、刺激內源蛋白質(intrinsic protein)酪胺酸激酶活性及受體轉磷酸化(receptor transphosphorylation)來起始受體酪胺酸激酶介導之信號轉導。藉此產生結合位點用於細胞內信號轉導分子且使得與一系列(a spectrum of)有助於適當細胞反應(例如細胞分裂、分化、代謝效應、細胞外微環境變化)之細胞質信號傳導分子形成複合物，參看Schlessinger及Ullrich (1992) *Neuron* 9:1-20。在結構上，Flt-1與KDR均具有七個在細胞外域中之免疫球蛋白樣域、單一跨膜區，及雜有激酶插入域之一致酪胺酸激酶序列。Matthews等人，(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9026-9030；Terman等人，(1991) *Oncogene* 6:1677-1683。

(ii) 抗VEGF抗體

適用於本發明方法中之抗VEGF抗體包括任何以足夠親和力及特異性結合於VEGF且可降低或抑制VEGF生物活性之抗體或其抗原結合片段。抗VEGF抗體通常將不結合於諸如VEGF-B或VEGF-C之其他VEGF同系物，亦不結合於諸如PlGF、PDGF或bFGF之其他生長因子。

在本發明之某些實施例中，抗VEGF抗體包括(但不限於)結合於與融合瘤ATCC HB 10709所產生之單株抗VEGF

抗體 A4.6.1 情形下相同的抗原決定基之單株抗體；根據 Presta 等人，(1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599 產生之重組人類化抗 VEGF 單株抗體。在一個實施例中，抗 VEGF 抗體為「貝伐單抗 (BV)」，其亦稱為「rhuMAb VEGF」或「AVASTIN®」。其包含突變之人類 IgG1 構架區，及來自阻斷人類 VEGF 結合於其受體的鼠類抗 hVEGF 單株抗體 A.4.6.1 之抗原結合互補決定區。貝伐單抗之胺基酸序列之約 93% (包括大部分構架區) 源自人類 IgG1，且該序列之約 7% 源自鼠類抗體 A4.6.1。

貝伐單抗及其他人類化抗 VEGF 抗體係進一步描述於 2005 年 2 月 26 日頒予之美國專利第 6,884,879 號中。其他抗體包括 G6 或 B20 系列抗體 (例如 G6-31、B20-4.1)，如 PCT 公開案第 WO 2005/012359 號、PCT 公開案第 WO 2005/044853 號及美國專利申請案 60/991,302 中所述，此等專利申請案之內容係以引用的方式明確併入本文中。關於其他抗體，參看美國專利第 7,060,269 號、第 6,582,959 號、第 6,703,020 號；第 6,054,297 號；WO 98/45332；WO 96/30046；WO 94/10202；EP 0666868B1；美國專利申請公開案第 2006009360 號、第 20050186208 號、第 20030206899 號、第 20030190317 號、第 20030203409 號及第 20050112126 號；及 Popkov 等人，*Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004)。其他抗體包括結合於人類 VEGF 上包含殘基 F17、M18、D19、Y21、Y25、Q89、I91、K101、E103 及 C104 或者包含殘基 F17、

Y21、Q22、Y25、D63、I83及Q89之功能抗原決定基的抗體。

在本發明之一個實施例中，抗VEGF抗體含有包含以下胺基酸序列之重鏈可變區：

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWFY DVWGQGTLLV VSS (SEQ ID NO: 1)

及包含以下胺基酸序列之輕鏈可變區：

DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCSASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
GTKVEIKR (SEQ ID NO: 2)。

本發明之「G6系列抗體」為根據PCT公開案第WO 2005/012359號(其全部揭示內容係以引用的方式明確併入本文中)之圖7、24-26及34-35中任一者的源自G6抗體或G6來源抗體之序列的抗VEGF抗體。亦參看PCT公開案第WO 2005/044853號，其全部揭示內容係以引用的方式明確併入本文中。在一個實施例中，G6系列抗體結合於人類VEGF上包含殘基F17、Y21、Q22、Y25、D63、I83及Q89之功能抗原決定基。

本發明之「B20系列抗體」為根據PCT公開案第WO 2005/012359號(其全部揭示內容係以引用的方式明確併入本文中)之圖27-29中任一者的源自B20抗體或B20來源抗體之序列的抗VEGF抗體。亦參看PCT公開案第WO 2005/044853號，及美國專利申請案60/991,302，此等專利申請案之內容係以引用的方式明確併入本文中。在一個實施例中，B20系列抗體結合於人類VEGF上包含殘基F17、

M18、D19、Y21、Y25、Q89、I91、K101、E103及C104之功能抗原決定基。

本發明之「功能抗原決定基」係指抗原中積極有助於結合抗體之胺基酸殘基。抗原之任一積極作用性殘基之突變(例如野生型VEGF之突變(藉由丙胺酸)或同系物突變)均將破壞抗體之結合，使得抗體之相對親和力比率(突變型VEGF之IC₅₀/野生型VEGF之IC₅₀)將大於5(參看WO 2005/012359之實例2)。在一個實施例中，藉由溶液結合噬菌體呈現ELISA測定相對親和力比率。簡言之，在4°C下以欲在PBS中2 µg/ml濃度下測試之Fab形式抗體塗佈96孔Maxisorp免疫培養盤(NUNC)隔夜，且在室溫下以PBS、0.5% BSA及0.05% Tween20(PBT)阻斷2小時。首先在室溫下在塗佈Fab之培養盤上培育噬菌體呈現hVEGF丙胺酸點突變體(殘基8-109形式)或野生型hVEGF(8-109)於PBT中之連續稀釋液歷時15分鐘，且以PBS、0.05% Tween20(PBST)洗滌培養盤。以1:5000稀釋於PBT中之抗M13單株抗體辣根過氧化酶(Amersham Pharmacia)結合物偵測結合之噬菌體，以3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD)受質顯色約5分鐘，以1.0 M H₃PO₄淬滅，且在450 nm下以分光光度法讀取。IC₅₀值之比率(IC_{50,ala}/IC_{50,wt})表示結合親和力(相對結合親和力)之降低倍數。

(iii) VEGF受體分子

兩種最佳表徵之VEGF受體為VEGFR1(亦稱為Flt-1)及

VEGFR2(亦稱為鼠類同系物之KDR及FLK-1)。各VEGF家族成員之各受體之特異性不同，但VEGF-A結合於Flt-1與KDR。全長Flt-1受體包括具有七個Ig域之細胞外域、跨膜域及具有酪胺酸激酶活性之細胞內域。細胞外域涉及結合VEGF且細胞內域涉及信號轉導。

特異性結合於VEGF之VEGF受體分子或其片段可用於本發明方法中以結合及螯合VEGF蛋白，藉此防止其信號傳導。在某些實施例中，VEGF受體分子或其VEGF結合片段為可溶形式，諸如sFlt-1。該受體之可溶形式藉由結合於VEGF對VEGF蛋白之生物活性發揮抑制作用，藉此防止其結合於靶細胞表面上存在之其天然受體。亦包括VEGF受體融合蛋白，其實例將於下文中描述。

嵌合VEGF受體蛋白為具有源自至少兩種不同蛋白質之胺基酸序列的受體分子，該至少兩種不同蛋白質中至少一者為VEGF受體蛋白(例如flt-1或KDR受體)，其能夠結合於VEGF且抑制VEGF之生物活性。在某些實施例中，本發明之嵌合VEGF受體蛋白係由源自僅兩種不同VEGF受體分子之胺基酸序列組成；然而，包含來自flt-1及/或KDR受體之細胞外配位體結合區之一、二、三、四、五、六或所有七個Ig樣域之胺基酸序列可與來自其他無關蛋白質之胺基酸序列(例如免疫球蛋白序列)連接。Ig樣域所組合之其他胺基酸序列將對一般技術者顯而易見。嵌合VEGF受體蛋白之實例包括例如可溶Flt-1/Fc、KDR/Fc或FLt-1/KDR/Fc(亦稱為VEGF Trap)。(例如參看PCT申請案公開案第WO

97/44453號)

本發明之可溶VEGF受體蛋白或嵌合VEGF受體蛋白包括未經由跨膜域固定於細胞表面之VEGF受體蛋白。因此，儘管可溶形式之VEGF受體(包括嵌合受體蛋白)能夠結合於VEGF且使VEGF失活，但其不包含跨膜域且因此一般不會與表現該分子的細胞之細胞膜締合。

III. 治療用途

本發明提供一種輔助治療方法，其包含投與個體VEGF特異性拮抗劑，例如抗VEGF抗體，歷時一年以上。在一些實施例中，個體患有非轉移性結腸直腸癌。在該方法之一些實施例中，在確定性手術之後投與VEGF特異性拮抗劑。本文中所治療之個體一般處於癌症復發之風險中。

在一些實施例中，輔助治療方法延長患者之無病存活(DFS)或總存活(OS)。在一些實施例中，在起始治療後約2至5年評估(例如分析)DFS或OS。亦提供一種輔助治療方法，其包含投與癌症患者有效量之VEGF特異性拮抗劑，其中在以VEGF特異性拮抗劑積極治療期間癌症進展經防止或延遲，且其中積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以VEGF特異性拮抗劑積極治療之後，癌症進展經防止或延遲約3、4、5或6個月。本發明進一步提供一種輔助治療方法，其包含投與癌症患者有效量之VEGF特異性拮抗劑，其中在以VEGF特異性拮抗劑積極治療期間癌症復發經防止或延遲，且其中使用VEGF特異性拮抗劑之積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以

VEGF特異性拮抗劑積極治療之後，癌症復發經防止或延遲約3、4、5或6個月。在某些實施例中，在確定性手術之後投與患者VEGF特異性拮抗劑。在某些實施例中，包含投與抗VEGF抗體之輔助治療在治療起始之後持續至少2年、至少3年、至少4年、至少5年、至少10年或10年以上。

本發明提供一種輔助治療方法，其包含投與已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術的患者有效量之VEGF特異性拮抗劑以延長患者之DFS或OS，其中投與VEGF特異性拮抗劑歷時一年以上。在一些實施例中，在起始治療後約2至5年評估(例如分析)DFS或OS。亦提供一種輔助治療方法，其包含投與已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術的患者有效量之VEGF特異性拮抗劑，其中在以VEGF特異性拮抗劑積極治療期間癌症進展經防止或延遲，且其中積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以VEGF特異性拮抗劑積極治療之後，癌症進展經防止或延遲約3、4、5或6個月。本發明進一步提供一種輔助治療方法，其包含投與已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術的患者有效量之VEGF特異性拮抗劑，其中在以VEGF特異性拮抗劑積極治療期間癌症復發經防止或延遲，且其中使用VEGF特異性拮抗劑之積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以VEGF特異性拮抗劑積極治療之後，癌症復發經防止或延遲約3、4、5或6個月。在某些實施例中，包含投與抗VEGF抗體之輔助治療在治療起始之後持續至少2年、至

少3年、至少4年、至少5年、至少10年或10年以上。

本發明進一步提供一種治療已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術的患者之方法，其包含投與該患者包含有效量之VEGF特異性拮抗劑的輔助治療以延長患者之DFS或OS，其中投與VEGF特異性拮抗劑歷時一年以上。在一些實施例中，在起始治療後約2至5年評估(例如分析)DFS或OS。亦提供一種治療已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術的患者之方法，其包含投與該患者包含有效量之VEGF特異性拮抗劑的輔助治療，其中在以VEGF特異性拮抗劑積極治療期間癌症進展經防止或延遲，且其中積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以VEGF特異性拮抗劑積極治療之後，癌症進展經防止或延遲約3、4、5或6個月。本發明進一步提供一種治療已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術的患者之方法，其包含投與該患者包含有效量之VEGF特異性拮抗劑的輔助治療，其中在以VEGF特異性拮抗劑積極治療期間癌症復發經防止或延遲，且其中使用VEGF特異性拮抗劑之積極治療持續一年以上。在一些實施例中，已停止以VEGF特異性拮抗劑積極治療之後，癌症復發經防止或延遲約3、4、5或6個月。在某些實施例中，該方法包含投與抗VEGF抗體，在治療起始之後歷時至少2年、至少3年、至少4年、至少5年、至少10年或10年以上。

舉例而言，一種方法可包括以下步驟：a)包含複數個週期之第一階段，其中各週期包含以預定時間間隔投與個體

有效量之 VEGF 特異性拮抗劑，例如抗 VEGF 抗體，諸如貝伐單抗，及視情況選用之至少一種化學治療劑；及 b) 包含複數個週期之第二階段，其中各週期包含投與個體有效量之 VEGF 特異性拮抗劑，例如抗 VEGF 抗體，諸如貝伐單抗，而不以預定時間間隔投與任何化學治療劑；其中組合之第一與第二階段在初始術後治療之後持續至少一年。在一些實施例中，組合之第一與第二階段在初始術後治療之後持續一年以上。在一些實施例中，第二階段在初始術後治療之後持續 1 年以上、至少 2 年、至少 3 年、至少 4 年、至少 5 年或至少 10 年。在一個實施例中，第一階段包含第一複數個治療週期，其中投與 VEGF 特異性拮抗劑(例如貝伐單抗)及第一化學治療方案，接著為第二複數個治療週期，其中投與 VEGF 特異性拮抗劑(例如抗 VEGF 抗體，諸如貝伐單抗)及第二化學治療方案。

在一個實例中，該方法包括每 14 天 1 次投與經修飾之 FOLFOX6(奧沙利鉑(85 mg/m^2)與並行之甲醯四氫葉酸(400 mg/m^2)及 5-FU(400 mg/m^2 ，靜脈內團式注射)(第 1 天)及 5-FU(2400 mg/m^2)(在第 1 天及第 2 天歷經 46 小時))歷時 12 個週期(6 個月)，外加在各化學治療週期之第 1 天在奧沙利鉑之前投與貝伐單抗(5 mg/kg ，靜脈內)，每 14 天 1 次歷時 1 年或 1 年以上。

在一個投與時程中，本發明之輔助治療包含第一階段，其中在複數個治療週期中投與患者 VEGF 特異性拮抗劑(例如抗 VEGF 抗體)及一或多種化學治療劑；及第二階段，其

中在複數個維持週期中以單一藥劑形式使用 VEGF 特異性拮抗劑(例如抗 VEGF 抗體)。視特定治療計劃而定，各治療週期係由一週至三週組成。舉例而言，治療週期可包括貝伐單抗作為 VEGF 特異性拮抗劑且可為三週，其意謂患者每三週接受一劑化學治療及一劑貝伐單抗。治療週期亦可為兩週，其意謂患者每隔一週接受一劑化學治療及一劑貝伐單抗。整個第一階段之治療可持續約 4-12 個週期。在第二(即維持)階段期間，視特定週期之長度而定，可每兩週或每三週給予貝伐單抗，且歷時總共約 10-50 個週期。在某些實施例中，輔助治療自治療(例如初始術後治療)起始起持續至少一年，且其後將追蹤個體之進展。在一些實施例中，抗 VEGF 抗體輔助治療自治療起始起持續 1 年以上、至少 2 年、至少 3 年、至少 4 年、至少 5 年或至少 10 年或直至死亡為止。

視疾病類型及嚴重程度而定，抗 VEGF 抗體之較佳劑量係在約 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至約 50 mg/kg ，最佳約 5 mg/kg 至約 15 mg/kg 之範圍內，包括(但不限於)7.5 mg/kg 或 10 mg/kg 。在一些態樣中，化學治療方案涉及傳統高劑量間歇式投與。在一些其他態樣中，使用較小且較頻繁之劑量投與化學治療劑而無預定中斷(「節拍化學治療(metronomic chemotherapy)」)。藉由習知技術及檢驗容易地監測本發明治療之進展。

與以化學治療(例如甲醯四氫葉酸、奧沙利鉑、5-FU、伊立替康或其組合)單獨治療之個體相比，投與抗體及化

學治療可在癌症患者中降低疾病復發(原發器官之癌症復發及/或遠端復發)之可能性。

在一個態樣中，本發明提供一種輔助治療方法，其包含投與癌症患者以下確定性手術、有效量之抗VEGF抗體以延長患者之無病存活(DFS)或總存活(OS)。可在起始治療後約2至5年評估(例如分析)DFS或OS。在一些實施例中，在起始治療後1、2、3、4、5、6、7、8、9或10年評估(例如分析)DFS或OS。本發明亦提供一種防止患者癌症復發之方法，其包含投與該患者有效量之抗VEGF抗體，其中該投與抗VEGF抗體會防止癌症復發。本發明進一步提供一種降低患者癌症復發之可能性的方法，其包含投與該患者有效量之抗VEGF抗體，其中該投與抗VEGF抗體會降低癌症復發之可能性。在本發明方法之一些實施例中，該投與VEGF特異性拮抗劑會防止出現臨床上可偵測的腫瘤或其轉移，或降低出現臨床上可偵測的腫瘤或其轉移之可能性。

對於輔助治療，可投與一定量的VEGF特異性拮抗劑或投與該拮抗劑歷時一定時間(例如對於歷經一段時間之特定治療方案)，以降低(例如達20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或90%以上)或抑制腫瘤轉移；以降低或抑制腫瘤生長或腫瘤細胞增殖；以降低或防止休眠腫瘤生長；以降低或防止微小轉移生長或增殖；以降低或防止腫瘤在治療或移除之後再生長；及/或在某種程度上減輕一或多種與癌症相關之症狀。

一般在個體已自手術恢復一段時間之後投與VEGF特異性拮抗劑。此時段可包括創口癒合或手術切口癒合所需之時期、降低創口開裂的風險所需之時段，或個體恢復至基本上類似於或優於手術前健康程度之健康程度所需之時段。在完成確定性手術與首次投與VEGF特異性拮抗劑之間的時期亦可包括藥物假日所需之時期，其中個體需要或要求各治療方案之間間隔一段時間。在完成確定性手術與開始VEGF特異性拮抗劑治療之間的時段一般可包括小於一週、1週、2週、3週、4週(28天)、5週、6週、7週、8週、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月、1年、2年、3年或3年以上。在一個實施例中，在確定性手術與投與VEGF特異性拮抗劑之間的時段大於2週且小於1年。

在一個實例中，以有效延長無病存活(DFS)或總存活(OS)之量投與VEGF特異性拮抗劑，例如抗VEGF抗體。可在初始投與抗體後約2至5年評估(例如分析)DFS或OS。在某些實施例中，在起始治療後或在初始診斷後約3-5年、約4-5年或至少約4年，或至少約5年評估(例如分析)個體之DFS或OS。

VEGF特異性拮抗劑可以單一藥劑形式投與。本發明亦提供使用至少一種VEGF特異性拮抗劑與一或多種其他抗癌治療之組合。抗癌治療之實例包括(但不限於)手術、放射治療(放射線治療)、生物治療、免疫治療、化學治療或此等治療之組合。另外，細胞毒性劑、抗血管生成劑及抗

增殖劑可與 VEGF 特異性拮抗劑組合使用。

在某些態樣中，VEGF 特異性拮抗劑係與一或多種化學治療劑組合用於輔助治療以便在確定性手術之後治療結腸直腸癌。多種化學治療劑可用於本發明之組合治療方法中。所涵蓋之化學治療劑之例示性及非限制性清單提供於本文中之「定義」部分下，或描述於本文中。

在一個實例中，本發明特徵為使用 VEGF 特異性拮抗劑與一或多種化學治療劑(例如混合物)。在癌症為結腸直腸癌之一些實施例中，化學治療劑可為特定用於結腸直腸癌之化學治療劑，包括(但不限於)甲醯四氫葉酸、5-氟尿嘧啶、奧沙利鉑、伊立替康或兩種或兩種以上此等化學治療劑之組合。組合投與包括使用個別調配物或單一醫藥調配物同時投與，及以任一順序連續投與，其中較佳有一時段兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性。此等化學治療劑之製劑及給藥時程可根據製造商之說明書使用，或由熟習此項技術者憑經驗決定。化學治療之製劑及給藥時程亦描述於 *Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)* 中。化學治療劑可在投與 VEGF 特異性拮抗劑之前或之後或同時給予。

組合投與包括使用個別調配物或單一醫藥調配物共投與或並行投與，及以任一順序連續投與，其中視情況有一時段兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性。因此，化學治療劑可在投與 VEGF 特異性拮抗劑(例如抗 VEGF 抗體)之前或之後投與。在此實施例中，在至少一次投與化學治療

劑與至少一次投與 VEGF 特異性拮抗劑(例如抗 VEGF 抗體)之間的時間較佳為約 1 個月或少於 1 個月，最佳為約 3 週、2 週或少於 2 週。或者，化學治療劑與抗 VEGF 抗體以單一調配物或個別調配物並行投與患者。使用化學治療劑(例如甲醯四氫葉酸、奧沙利鉑、5-FU、伊立替康或其組合)與抗 VEGF 抗體(例如貝伐單抗)組合的治療可對患者產生協同或大於加成之治療益處。

化學治療劑在投與時通常以其已知劑量投與，或視情況因藥物之組合作用或由於投與抗代謝物化學治療劑而造成之陰性副作用而降低劑量。此等化學治療劑之製備及給藥時程可根據製造商之說明書使用或由熟習此項技術者憑經驗確定。

在一些其他態樣中，適於與本發明之抗 VEGF 抗體一起用於組合腫瘤治療之其他治療劑包括涉及腫瘤生長之其他因子(諸如 EGFR、ErbB2(亦稱為 Her2)、ErbB3、ErbB4 或 TNF)之拮抗劑。有時，亦宜投與患者一或多種細胞激素。在一較佳實施例中，抗 VEGF 抗體與生長抑制劑或細胞毒性劑共投與。舉例而言，可首先投與生長抑制劑或細胞毒性劑，接著投與抗 VEGF 抗體。然而，亦涵蓋同時投與或首先投與抗 VEGF 抗體。生長抑制劑之適合劑量為目前所用之劑量且可因生長抑制劑與抗 VEGF 抗體之組合作用(協同作用)而降低。

如所治療之特定適應症所必需，本文中之調配物亦可能含有一種以上活性化合物，較佳為具有不會對彼此造成不

利影響之互補活性的活性化合物。舉例而言，可能需要在
一種調配物中進一步提供結合於EGFR、VEGF(例如結合
VEGF上的不同抗原決定基之抗體)、VEGFR或ErbB2(例如
Herceptin®)之抗體。或者或另外，組合物可包含細胞毒性
劑、細胞激素、生長抑制劑及/或小分子VEGFR拮抗劑。
此等分子宜以有效達成預定目的之量組合存在。

在某些態樣中，適於與本發明抗體一起用於組合癌症治
療之其他治療劑包括其他抗血管生成劑。許多抗血管生成
劑已得到鑑別且在此項技術中為已知的，包括Carmeliet及
Jain, *Nature* 407(6801):249-57 (2000)中所列者。本發明之
抗VEGF抗體較佳與以下組合使用：另一種VEGF拮抗劑或
VEGF受體拮抗劑，諸如VEGF變異體、可溶VEGF受體片
段、能夠阻斷VEGF或VEGFR之適體、中和性抗VEGFR抗
體、VEGFR酪胺酸激酶之低分子量抑制劑及其任何組合。
或者或另外，兩種或兩種以上抗VEGF抗體可共投與患
者。

對於輔助治療，VEGF特異性拮抗劑之適當劑量可視如
上文所定義之待治療疾病的類型、疾病嚴重程度及病程、
先前治療、患者之臨床病史及對VEGF特異性拮抗劑之反
應及主治醫師之判斷而定。VEGF特異性拮抗劑宜一次性
或歷經一系列治療投與患者。在組合治療方案中，本發明
之VEGF特異性拮抗劑及一或多種抗癌治療劑係以治療有
效或協同量投與。如本文中所用，治療有效量致使共投與
VEGF特異性拮抗劑與一或多種其他治療劑或投與本發明

組合物時，如上所述之癌症有所減少或受到抑制。治療協同量為協同或顯著防止癌症復發所必需之VEGF特異性拮抗劑及一或多種其他治療劑之量。

VEGF特異性拮抗劑及一或多種其他治療劑可以足以減少或消除腫瘤、休眠腫瘤或微小轉移出現或復發之量及時間同時或依次投與。VEGF特異性拮抗劑及一或多種其他治療劑可以維持治療之形式投與以防止腫瘤復發或降低腫瘤復發之可能性。

一般技術者應瞭解，化學治療劑或其他抗癌劑之適當劑量一般將約為已用於臨床治療中之劑量，例如在臨床治療中化學治療劑係單獨投與或與其他化學治療劑組合投與。視所治療之病狀而定，劑量將可能發生變化。投與治療之醫師將能夠確定個別個體之適當劑量。

除上文治療方案之外，患者亦可經受放射治療。

在某些實施例中，所投與之抗VEGF抗體為完整之裸抗體。然而，抗VEGF抗體可與細胞毒性劑結合。在某些實施例中，所結合之抗體及/或其所結合之抗原係由細胞內化，使得結合物在殺死其所結合之癌細胞方面之治療功效提高。在一個實施例中，細胞毒性劑靶向或干擾癌細胞中之核酸。此等細胞毒性劑之實例包括美登素類、刺孢黴素、核糖核酸酶及DNA核酸內切酶。

IV. 劑量及持續時間

VEGF特異性拮抗劑組合物將以與優良醫學規範一致之方式經調配、給藥及投與。此情形中之考慮因素包括所治

療之特定病症、所治療之特定個體、個別患者之臨床病狀、病因、藥劑傳遞部位、投與方法、投與時程安排(scheduling)及醫務人員已知之其他因素。待投與之VEGF特異性拮抗劑的「治療有效量」將取決於此等考慮因素，且為以下情形所必需之最小量：防止、改善或治療或穩定化良性、癌前期或早期癌症；或治療或防止腫瘤、休眠腫瘤或微小轉移出現或復發，例如在新輔助(neoadjuvant)背景或輔助背景下。VEGF特異性拮抗劑不需(但視情況)與一或多種目前用以防止或治療癌症或產生癌症之風險的藥劑一起調配。此等其他藥劑之有效量視調配物中存在之VEGF特異性拮抗劑之量、病症或治療之類型及上文所討論之其他因素而定。此等藥劑一般以與上文所用相同之劑量及投藥途徑使用或為此前所用劑量之約1%至99%。

視疾病之類型及嚴重程度而定，約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至100 mg/kg (例如0.1-20 mg/kg)VEGF特異性拮抗劑為投與患者之初始候選劑量，例如藉由一或多次個別投與或藉由連續輸注而投與。視上述因素而定，典型日劑量可介於約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至約100 mg/kg 或100 mg/kg 以上之範圍內。尤其需要之劑量包括例如7.5 mg/kg 、10 mg/kg 及15 mg/kg 。對於歷經數天或更久重複投藥，視病狀而定，持續治療直至如藉由上文所述或此項技術中已知之方法所量測，癌症得到治療為止。然而，其他給藥方案亦可能適用。在一個實例中，若VEGF特異性拮抗劑為抗體，則每週、每兩週或每三週一次以約5 mg/kg 至約15 mg/kg 之劑量範圍(包括(但不

限於)7.5 mg/kg或10 mg/kg)投與本發明抗體。藉由習知技術及檢驗容易地監測本發明治療之進展。

治療之持續時間將持續與醫學上所指定一樣長之時間或直至實現所需治療效應(例如本文所述之效應)為止。在一些實施例中，治療持續一年以上。在某些實施例中，VEGF特異性拮抗劑治療持續2個月、4個月、6個月、8個月、10個月、1年、2年、3年、4年、5年，或歷時直至個體壽命之數年時期。在一些實施例中，繼續治療直至疾病進展為止。在一些實施例中，在疾病未復發下繼續治療。

根據已知方法，諸如團式靜脈內投藥，或藉由連續輸注一段時間，藉由肌肉內、腹膜內、腦脊髓內(intracerebrospinal)、皮下、關節內、滑膜內、鞘內、經口、局部或吸入途徑投與個體(例如人類患者)本發明之VEGF特異性拮抗劑。若廣泛副作用或毒性係與VEGF拮抗作用相關，則尤其需要局部投藥。離體策略亦可用於治療應用。離體策略包括以編碼VEGF拮抗劑之聚核苷酸轉染或轉導獲自個體之細胞。接著使經轉染或轉導之細胞返回個體。細胞可為多種類型中之任一者，包括(不限於)造血細胞(例如骨髓細胞、巨噬細胞、單核細胞、樹突狀細胞、T細胞或B細胞)、纖維母細胞、上皮細胞、內皮細胞、角質細胞或肌細胞。

舉例而言，若VEGF特異性拮抗劑為抗體，則該抗體可藉由任何適合方式投與，包括非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內，及必要時對於局部免疫抑制治療而言，包括病

灶內投與。非經腸輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投與。另外，宜藉由脈衝輸注(pulse infusion)投與抗體，尤其使用下降劑量之抗體。較佳藉由注射，最佳藉由靜脈內或皮下注射給藥，部分地取決於投藥為短暫的或長期的。

在另一實例中，當腫瘤之病症或位置允許時，例如藉由直接注射來局部投與VEGF特異性拮抗劑化合物，且可定期重複注射。亦可在手術切除腫瘤之後將VEGF特異性拮抗劑全身性傳遞至個體或直接傳遞至腫瘤細胞，例如傳遞至腫瘤或腫瘤床，以防止或降低例如休眠腫瘤或微小轉移之局部復發或轉移。

或者，可將含有編碼VEGF特異性拮抗劑之核酸序列的抑制性核酸分子或聚核苷酸傳遞至個體中之適當細胞。在某些實施例中，可將核酸引導至腫瘤本身。

核酸可藉由任何適於所用載體之方式引入細胞中。此項技術中熟知許多此類方法(Sambrook等人，同上文；及Watson等人，Recombinant DNA，第2版第12章，Scientific American Books, 1992)。基因傳遞方法之實例包括脂質體介導之轉染、電穿孔、磷酸鈣/DEAE聚葡萄糖法、基因槍及微注射。

V. 醫藥調配物

根據本發明使用之抗體的治療調配物係使用此項技術中已知之標準方法，例如藉由混合具有所需純度之抗體與視情況選用之生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑，而

以凍乾調配物或水溶液形式製備 (Remington's Pharmaceutical Sciences (第20版), A. Gennaro編, 2000, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對受體無毒, 且包括緩衝劑, 諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸; 抗氧化劑, 包括抗壞血酸及甲硫胺酸; 防腐劑(諸如氯化十八烷基二甲基苄銨; 氯化六羥季銨; 氯化苯甲煙銨、苄索氯銨(benzethonium chloride); 苯酚、丁醇或苯甲醇; 對羥基苯甲酸烷酯, 諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯; 兒茶酚; 間苯二酚; 環己醇; 3-戊醇; 及間甲酚); 低分子量(少於約10個殘基)多肽; 蛋白質, 諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白; 親水性聚合物, 諸如聚乙烯吡咯啉酮; 胺基酸, 諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸; 單醣、二醣及其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合劑, 諸如EDTA; 糖, 諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇; 成鹽抗衡離子, 諸如鈉; 金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物); 及/或非離子界面活性劑, 諸如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。較佳之凍乾抗VEGF抗體調配物係描述於WO 97/04801中, 該案係以引用的方式明確併入本文中。

調配物視情況(但較佳地)含有醫藥學上可接受之鹽, 該鹽通常為例如氯化鈉, 且較佳處於約生理學濃度下。本發明調配物可視情況含有醫藥學上可接受之防腐劑。在一些

實施例中，防腐劑濃度介於0.1%至2.0%(通常為v/v)之範圍內。適合之防腐劑包括醫藥技術中已知之防腐劑。苯甲醇、苯酚、間甲酚、對羥基苯甲酸甲酯及對羥基苯甲酸丙酯為防腐劑之實例。本發明調配物可視情況包括濃度為0.005%至0.02%之醫藥學上可接受之界面活性劑。

在一個實施例中，在100 mg及400 mg無防腐劑之單次使用小瓶中提供貝伐單抗以傳遞4 ml或16 ml貝伐單抗(25 mg/ml)用於治療用途。100 mg產物可在240 mg去水 α,α -海藻糖、23.2 mg磷酸鈉(一元，單水合物)、4.8 mg磷酸鈉(二元，無水)、1.6 mg聚山梨醇酯20及注射用水(USP)中調配。400 mg產物可在960 mg去水 α,α -海藻糖、92.8 mg磷酸鈉(一元，單水合物)、19.2 mg磷酸鈉(二元，無水)、6.4 mg聚山梨醇酯20及注射用水(USP)中調配。

如所治療之特定適應症所必需，本文中之調配物亦可能含有一種以上活性化合物，較佳為具有不會對彼此造成不利影響之互補活性的活性化合物。舉例而言，可能需要在一種調配物中進一步提供結合於EGFR、VEGF(例如結合VEGF上的不同抗原決定基之抗體)、VEGFR或ErbB2(例如Herceptin®)之抗體。或者或另外，組合物可包含細胞毒性劑、細胞激素、生長抑制劑及/或小分子VEGFR拮抗劑。此等分子宜以有效達成預定目的之量組合存在。

活性成份亦可覆埋於例如藉由凝聚技術或界面聚合製備之微囊(例如分別為羥甲基纖維素或明膠微囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊)、膠體藥物傳遞系統(例如脂質體、白蛋白

微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)或巨乳液中。此等技術係揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences, 同上文。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適合實例包括含有抗體之固體疏水性聚合物的半滲透基質，該等基質為成形物品形式，例如膜或微囊。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如聚(2-羥乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚丙交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸與 γ 乙基-L-麩胺酸酯之共聚物、不可降解之乙烯-乙酸乙烯酯、可降解之乳酸-乙醇酸共聚物(諸如LUPRON DEPOTTM，由乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙立德構成之可注射微球體)及聚D-(-)-3-羥丁酸。儘管諸如乙烯-乙酸乙烯酯與乳酸-乙醇酸之聚合物能使分子釋放超過100天，但某些水凝膠釋放蛋白質之時段較短。當囊封抗體長時間保留於體內時，其可能因在37°C下暴露於水分而變性或聚集，導致生物活性損失及可能之免疫原性變化。視所涉及之機制而定，可擬出合理之穩定化策略。舉例而言，若發現聚集機制為經由硫基-二硫化物互換形成分子間S-S鍵，則穩定化可藉由修飾硫氫基殘基、自酸性溶液凍乾、控制水分含量、使用適當添加劑及開發出特定聚合物基質組合物而達成。

欲用於活體內投與之調配物必須為無菌的。此易於藉由經無菌濾膜過濾實現。

VI. 治療功效

本發明提供癌症患者中之輔助治療方法，其中該治療在

未引起顯著毒性或不利效應之情況下產生有利抗癌效應。本發明治療之功效可藉由各種常用於評估癌症治療之終點來量測，該等終點包括(但不限於)存活持續時間、無病存活、無進展存活、疾病進展時間、緩解時間及/或生活品質。因為本發明之抗血管生成劑靶向腫瘤血管結構且未必靶向贅生性細胞本身，故其代表一類獨特之抗癌藥，且因此可能需要對藥物之臨床反應進行獨特量測及定義。本發明之抗VEGF抗體可能引起轉移性擴散之抑制或可能僅發揮腫瘤抑制(tumouristatic)效應。因此，應採用測定抗血管生成治療之功效的新穎方法，包括例如經由放射成像量測血管生成之血漿或尿標誌物及量測反應。

在一個實施例中，本發明提供防止人類患者癌症復發或降低人類患者癌症復發之可能性的方法。

在一個實例中，以有效延長DFS或OS之量投與VEGF特异性拮抗劑，例如抗VEGF抗體，其中在初始投與抗體後約2至5年評估(例如分析)DFS或OS。在某些實施例中，在起始治療後或在初始診斷後約3-5年、約4-5年或至少約4年，或至少約5年，或至少約6年，或至少約7年，或至少約8年，或至少約9年，或至少約10年評估(例如分析)個體之DFS或OS。

在一個實施例中，本發明方法可用於增加易患或經診斷患有癌症或癌症復發之個體的存活持續時間。存活持續時間係定義為自首次投與藥物至死亡之時間。存活持續時間亦可藉由治療組相對於對照組之分層危險比率(HR)量測，

HR表示患者在治療期間死亡之風險。

在又一實施例中，本發明之治療顯著提高易患或經診斷患有癌症且以各種抗癌治療加以治療之個體(例如人類患者)之組的反應率。反應率係定義為對治療起反應之經治療患者的百分比。在一個態樣中，與以手術、放射治療或化學治療單獨治療之組相比，使用抗VEGF抗體與手術、放射治療或一或多種化學治療劑的本發明之組合治療顯著提高經治療患者組的反應率。

VII. 抗體產生

(i) 多株抗體

多株抗體較佳藉由多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射相關抗原及佐劑而在動物體內產生。使用雙功能或衍生化試劑使相關抗原與在待免疫物種內具有免疫原性之蛋白質結合可能有用，該蛋白質為例如匙孔螺血氫蛋白、血清白蛋白、牛甲狀腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑，該雙功能或衍生化試劑例如為馬來醯亞胺基苯甲醯基磺基丁二醯亞胺酯(經由半胱胺酸殘基結合)、N-羥基丁二醯亞胺(經由離胺酸殘基結合)、戊二醛、丁二酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中R及 R^1 為不同烷基)。

藉由將例如100 μg 或5 μg 蛋白質或結合物(分別對於兔或小鼠)與3體積之弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)組合且在多個部位經皮內注射該溶液來使動物對抗原、免疫原性結合物或衍生物免疫。一個月後，藉由在多個部位皮下注射，用含1/5至1/10初始量之肽或結合物的弗氏完全

佐劑使動物增強免疫。7至14天後，對動物抽血且檢驗血清中之抗體力價。使動物增強免疫直至該力價平穩。動物較佳係用相同抗原與不同蛋白質結合及/或經由不同交聯試劑結合之結合物增強免疫。結合物亦可在重組細胞培養物中以蛋白融合物之形式產生。又，宜使用諸如羰之聚集劑來增強免疫反應。

(ii) 單株抗體

此項技術中可獲得多種製造本文中單株抗體之方法。舉例而言，單株抗體可使用由Kohler等人，*Nature*, 256:495 (1975)首先描述之融合瘤方法製得，或可藉由重組DNA方法(美國專利第4,816,567號)製得。

在融合瘤方法中，如上所述使小鼠或諸如倉鼠或獼猴之其他適當宿主動物免疫以引發產生或能夠產生將特異性結合於用於免疫之蛋白質之抗體的淋巴細胞。或者，可於活體外免疫淋巴細胞。接著使用諸如聚乙二醇之適合融合劑將淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合以形成融合瘤細胞(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第59-103頁(Academic Press, 1986))。

接種由此製備之融合瘤細胞且使其於較佳含有一或多種抑制未融合之親本骨髓瘤細胞生長或存活之物質的適合培養基中生長。舉例而言，若親本骨髓瘤細胞缺乏酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則融合瘤之培養基通常將包括次黃嘌呤、胺基蝶呤及胸苷(HAT培養基)，該等物質將防止HGPRT缺陷型細胞生長。

較佳骨髓瘤細胞為有效融合、藉由所選之抗體產生細胞支持抗體之穩定高含量產生且對諸如HAT培養基之培養基敏感的骨髓瘤細胞。其中，較佳之骨髓瘤細胞株為鼠類骨髓瘤細胞株，諸如源自可獲自沙克生物研究所細胞分佈中心 (Salk Institute Cell Distribution Center)(San Diego, California USA)之MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤及可獲自美國菌種保存中心(Rockville, Maryland USA)之SP-2或X63-Ag8-653細胞的骨髓瘤細胞株。亦已關於人類單株抗體之製造描述人類骨髓瘤及小鼠-人類異源骨髓瘤細胞株 (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984) ; Brodeur等人, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 第51-63頁 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

檢驗生長融合瘤細胞之培養基中針對抗原之單株抗體之產生。較佳藉由免疫沈澱或藉由活體外結合檢驗(諸如放射免疫檢驗(RIA)或酶聯免疫吸附檢驗(ELISA))來測定融合瘤細胞所產生之單株抗體的結合特異性。

在鑑別出產生具有所需特異性、親和力及/或活性之抗體的融合瘤細胞後，可藉由限制性稀釋程序次選殖純系且藉由標準方法使其生長(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第59-103頁 (Academic Press, 1986))。適於達成此目的之培養基包括例如D-MEM或RPMI-1640培養基。另外，融合瘤細胞可在動物體內以腹水腫瘤形式活體內生長。

藉由習知免疫球蛋白純化程序，諸如蛋白質A-瓊脂糖 (Sepharose)、羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析法，宜將由次純系分泌之單株抗體與培養基、腹水液或血清分離。

編碼單株抗體之DNA易於使用習知程序(例如藉由使用能夠特異性結合於編碼單株抗體之重鏈及輕鏈之基因的寡核苷酸探針)分離及測序。融合瘤細胞充當此DNA之較佳來源。在分離出DNA後，即可將其置於表現載體中，該等表現載體接著轉染至不會另外產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌(*E. coli*)細胞、猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中，以實現重組宿主細胞中單株抗體之合成。下文將較詳細地描述抗體之重組產生。

在另一實施例中，抗體或抗體片段可自使用McCafferty等人，*Nature*, 348:552-554 (1990)中所述之技術產生之抗體噬菌體文庫分離。Clackson等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)及Marks等人，*J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)分別描述使用噬菌體文庫來分離鼠類抗體與人類抗體。後續出版物描述藉由鏈改組產生高親和力(nM範圍)人類抗體(Marks等人，*Bio/Technology*, 10:779-783 (1992))，以及描述組合性感染及活體內重組作為構築極大噬菌體文庫之策略(Waterhouse等人，*Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993))。因此，對於分離單株抗體，此等技術為傳統單株抗體融合瘤技術之可行性替代技術。

DNA亦可例如藉由以人類重鏈及輕鏈恆定域之編碼序列

取代同源鼠類序列(美國專利第4,816,567號; Morrison等人, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), 或藉由將非免疫球蛋白多肽之全部或部分編碼序列共價連接於免疫球蛋白編碼序列而經修飾。

通常, 以此等非免疫球蛋白多肽取代抗體之恆定域, 或以其取代抗體之一個抗原結合位點(antigen-combining site)之可變域, 以產生包含一個對一種抗原具有特異性之抗原結合位點及另一個對另一種抗原具有特異性之抗原結合位點的嵌合二價抗體。

(iii) 人類化抗體及人類抗體

人類化抗體具有一或多個自非人類來源引入其中之胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基常稱作「輸入」殘基, 通常獲自「輸入」可變域。可基本上按照 Winter及同事之方法(Jones等人, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等人, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), 藉由以齧齒動物 CDR 或 CDR 序列取代人類抗體之相應序列來進行人類化。因此, 此等「人類化」抗體為嵌合抗體(美國專利第4,816,567號), 其中實質上一部分人類可變域已由來自非人類物種之相應序列取代。實際上, 人類化抗體通常為一些 CDR 殘基及可能一些 FR 殘基經來自齧齒動物抗體之類似位點之殘基取代的人類抗體。

欲用於製造人類化抗體之人類可變域(輕鏈與重鏈)之選擇對於降低抗原性極為重要。根據所謂「最佳適配(best-

fit)」方法，針對已知人類可變域序列之整個文庫來篩選齧齒動物抗體之可變域序列。接著接受最接近於齧齒動物序列之人類序列作為人類化抗體之人類構架(FR)(Sims等人，*J. Immunol.*, 151:2296 (1993)；Chothia等人，*J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987))。另一種方法使用源自特定輕鏈或重鏈子群之所有人類抗體之共同序列的特定構架。同一構架可用於若干不同的人類化抗體(Carter等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992)；Presta等人，*J. Immunol.*, 151:2623 (1993))。

更重要的是，抗體經人類化且保留對抗原之高親和力及其他有利生物特性。為達成此目標，根據一較佳方法，藉由使用親本及人類化序列之三維模型分析親本序列及各種概念性人類化產物之方法來製備人類化抗體。三維免疫球蛋白模型通常可用且為熟習此項技術者所熟知。可用說明且顯示所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構的電腦程式。對此等顯示之檢查允許分析殘基對候選免疫球蛋白序列之功能的可能作用，亦即分析影響候選免疫球蛋白結合其抗原之能力的殘基。以此方式，可自受體及輸入序列選擇FR殘基且組合，以便實現所需抗體特徵，諸如增加之對靶抗原的親和力。一般而言，CDR殘基直接地且最主要涉及影響抗原結合。

人類化抗VEGF抗體及其親和力成熟變異體描述於例如2005年2月26日頒予之美國專利第6,884,879號中。

目前，有可能產生在免疫後能夠在不產生內源免疫球蛋白

白之情況下產生完全人類抗體譜的轉殖基因動物(例如小鼠)。舉例而言，已描述嵌合及生殖系突變型小鼠中抗體重鏈連接區(J_H)基因之同種接合子缺失會導致內源抗體產生受到完全抑制。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至此等生殖系突變型小鼠中將使得抗原攻毒後隨即產生人類抗體。例如參看 Jakobovits 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993)；Jakobovits 等人，*Nature*, 362:255-258 (1993)；Bruggemann 等人，*Year in Immuno.*, 7:33 (1993)；及 Duchosal 等人，*Nature* 355:258 (1992)。

或者，可使用噬菌體呈現技術(McCafferty 等人，*Nature* 348:552-553 (1990))自來自未經免疫供體之免疫球蛋白可變(V)域基因譜活體外產生人類抗體及抗體片段。根據此技術，將抗體V域基因同框選殖至絲狀噬菌體(諸如M13或fd)之主要或次要鞘蛋白基因中，且作為功能性抗體片段呈現於噬菌體粒子之表面上。因為絲狀粒子含有噬菌體基因組之單股DNA複本，故基於抗體功能特性之選擇亦導致選擇編碼顯示彼等特性之抗體的基因。因此，噬菌體模擬B細胞之一些特性。噬菌體呈現可以多種形式進行；關於其回顧，例如參看 Johnson, Kevin S.及 Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993)。V基因區段之若干來源可用於噬菌體呈現。Clackson 等人，*Nature*, 352:624-628 (1991)自源於免疫小鼠脾臟之小型V基因隨機組合文庫分離出各種抗噁唑酮抗體。可構築來自未經免疫人類供體之V基因譜，且可基本上按照由Marks等

人，*J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)或Griffith等人，*EMBO J.* 12:725-734 (1993)所述之技術來分離針對各種抗原(包括自體抗原)之抗體。亦參看美國專利第5,565,332號及第5,573,905號。

如上文所討論，亦可藉由活體外活化之B細胞產生人類抗體(參看美國專利5,567,610及5,229,275)。

人類單株抗VEGF抗體描述於1998年3月24日頒予之美國專利第5,730,977號中。

(iv) 抗體片段

已開發出各種製造抗體片段之技術。傳統上，此等片段係經由完整抗體之蛋白水解消化得到(例如參看Morimoto等人，*Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992)及Brennan等人，*Science*, 229:81 (1985))。然而，此等片段現可由重組宿主細胞直接產生。舉例而言，抗體片段可自上文討論之抗體噬菌體文庫分離。或者，Fab'-SH片段可自大腸桿菌直接回收且以化學方式偶合形成F(ab')₂片段(Carter等人，*Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。根據另一種方法，F(ab')₂片段可自重組宿主細胞培養物直接分離。製造抗體片段之其他技術將為熟習此項技術者顯而易見。在其他實施例中，所選抗體為單鏈Fv片段(scFv)。參看WO 93/16185。

(vi) 其他胺基酸序列修飾

涵蓋本文所述之抗體之胺基酸序列修飾。舉例而言，可能需要改良抗體之結合親和力及/或其他生物特性。抗體

之胺基酸序列變異體係藉由將適當核苷酸變化引入抗體核酸中或藉由肽合成來製備。此等修飾包括例如抗體之胺基酸序列內殘基之缺失及/或插入及/或取代。缺失、插入及取代可任意組合以獲得最終構築體，限制條件為最終構築體具有所需特徵。胺基酸變化亦可能改變抗體之轉譯後過程，諸如改變糖基化位點之編號或位置。

適用於鑑別抗體之某些殘基或區域為較佳突變誘發位置之方法稱作「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)所述。此處，鑑別一個殘基或一組靶殘基(例如帶電殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且用中性或帶負電荷之胺基酸(最佳為丙胺酸或聚丙胺酸)置換以影響胺基酸與抗原之相互作用。接著藉由在取代位點或針對取代位點引入另外或其他變異來改進顯示對取代具有功能敏感性之胺基酸位置。因此，儘管供引入胺基酸序列變異之位點係預定的，但突變本身之性質無需預定。舉例而言，為分析既定位點之突變效能，在靶密碼子或區域上進行ala掃描或隨機突變誘發，且針對所需活性篩選所表現之抗體變異體。

胺基酸序列插入包括長度介於一個殘基至含有一百個或一百個以上殘基之多肽之範圍內的胺基端及/或羧基端融合物，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基之抗體或與細胞毒性多肽融合之抗體。抗體分子之其他插入變異體包括抗體之N端或C端與增加抗體血清半衰期之酶(例如對於ADEPT)

或多肽的融合物。

另一類變異體為胺基酸取代變異體。此等變異體在抗體分子中具有至少一個胺基酸殘基經不同殘基置換。最關注之供取代突變誘發的位點包括高變區，但亦涵蓋FR變化。

抗體生物特性之實質改變係藉由選擇取代實現，該等取代對保持以下之效應顯著不同：(a)取代區域中多肽主鏈之結構，例如呈摺疊或螺旋構形，(b)靶位點處分子之電荷或疏水性，或(c)側鏈體積。胺基酸可根據其側鏈特性之相似性分組(A. L. Lehninger, *Biochemistry*, 第2版, 第73-75頁, Worth Publishers, New York (1975))：

(1)非極性：Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M)

(2)不帶電極性：Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q)

(3)酸性：Asp(D)、Glu(E)

(4)鹼性：Lys(K)、Arg(R)、His(H)。

或者，天然存在之殘基可基於共同側鏈特性分組：

(1)疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3)酸性：Asp、Glu；

(4)鹼性：His、Lys、Arg；

(5)影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；

(6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守性取代將要求將此等種類之一的成員交換為另一

種類。

不涉及保持抗體適當構形之任何半胱胺酸殘基均亦可經取代，一般經絲胺酸取代，以改良分子之氧化穩定性且防止異常交聯。相反地，半胱胺酸鍵可添加至抗體中以改良其穩定性，尤其當抗體為諸如Fv片段之抗體片段時。

尤其較佳類型之取代變異體涉及取代親本抗體(例如人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，選擇用於進一步開發之所得變異體相對於產生其之親本抗體將具有改良之生物特性。產生此等取代變異體之便利方法包括使用噬菌體呈現之親和力成熟。簡言之，使若干高變區位點(例如6-7個位點)突變以在各位點產生所有可能之胺基取代。由此產生之抗體變異體以單價方式自絲狀噬菌體粒子呈現為與封裝於各粒子內之M13之基因III產物的融合物。接著針對如本文所揭示之生物活性(例如結合親和力)篩選噬菌體呈現之變異體。為鑑別供修飾之候選高變區位點，可進行丙胺酸掃描突變誘發以鑑別顯著有助於抗原結合之高變區殘基。或者或另外，宜分析抗原-抗體複合物之晶體結構以鑑別抗體與人類VEGF之間的接觸點。根據本文詳述之技術，此等接觸殘基及鄰近殘基為候選取代殘基。產生此等變異體之後，如本文所述對該組變異體進行篩選，且可在一或多個相關檢驗中選擇具有優良特性之抗體以供進一步開發。

抗體之另一類胺基酸變異體會改變抗體之原始糖基化模式。改變意謂缺失一或多個在抗體中所見之碳水化合物部

分，及/或添加一或多個在抗體中不存在之糖基化位點。

抗體之糖基化通常為N連接或O連接。N連接係指碳水化合物部分連接至天冬醯胺殘基之側鏈。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸外之任何胺基酸)為碳水化合物部分酶促連接至天冬醯胺側鏈之識別序列。因此，多肽中存在任一此等三肽序列均會產生潛在糖基化位點。O連接糖基化係指糖N-乙醯半乳糖、半乳糖或木糖之一連接至羥基胺基酸，最通常連接至絲胺酸或蘇胺酸，但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。

抗體中糖基化位點之添加宜藉由改變胺基酸序列使得其含有一或多種上述三肽序列來實現(對於N連接糖基化位點)。該變化亦可藉由將一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基添加至原始抗體之序列中或由其取代原始抗體之序列來實現(對於O連接糖基化位點)。

當抗體包含Fc區時，可改變連接於其之碳水化合物。舉例而言，美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號(Presta, L.)中描述具有缺乏海藻糖連接於抗體Fc區之成熟碳水化合物結構的抗體。亦參看US 2004/0093621 A1(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。WO 03/011878(Jean-Mairet等人)及美國專利第6,602,684號(Umana等人)中提及在連接於抗體Fc區之碳水化合物中具有對分N-乙醯葡糖胺(GlcNAc)之抗體。WO 97/30087(Patel等人)中報導在連接於抗體Fc區之寡糖中具有至少一個半乳糖殘基之抗體。關於具有經改變

碳水化合物連接於Fc區之抗體，亦參看 WO 98/58964(Raju, S.)及 WO 99/22764(Raju, S.)。

可能需要針對效應功能來修飾本發明抗體，例如以便增強抗體之抗原依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。此可藉由在抗體Fc區內引入一或多個胺基酸取代來實現。或者或另外，可將半胱胺酸殘基引入Fc區中，藉此使此區域中形成鏈間雙硫鍵。由此產生之均二聚抗體可具有改良之內化能力及/或增加之補體介導的細胞殺死及抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。參看 Caron 等人，*J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992)及 Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992)。亦可使用如 Wolff 等人，*Cancer Research* 53:2560-2565 (1993)中所述之雜二官能交聯劑來製備具有增強之抗腫瘤活性的均二聚抗體。或者，可工程改造具有雙Fc區且可能藉此具有增強之補體溶解及ADCC能力之抗體。參看 Stevenson 等人，*Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989)。

WO 00/42072(Presta, L.)描述在人類效應細胞存在下具有改良之ADCC功能的抗體，其中該等抗體在其Fc區中包含胺基酸取代。具有改良之ADCC的抗體較佳在Fc區之位置298、333及/或334(殘基之Eu編號)處包含取代。改變之Fc區較佳為一、二或三個此等位置處包含取代或由取代組成之人類IgG1 Fc區。此等取代視情況與增加C1q結合及/或CDC之取代組合。

WO 99/51642、美國專利第6,194,551 B1號、美國專利第

6,242,195 B1號、美國專利第6,528,624 B1號及美國專利第6,538,124號(Idsogie等人)中描述C1q結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)發生改變之抗體。該等抗體在其Fc區之胺基酸位置270、322、326、327、329、313、333及/或334(殘基之Eu編號)中的一或多處包含胺基酸取代。

例如美國專利5,739,277中所述，為增加抗體之血清半衰期，可將救助受體結合抗原決定基併入抗體(尤其為抗體片段)中。如本文中所用，術語「救助受體結合抗原決定基」係指IgG分子(例如IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄)之Fc區中負責增加IgG分子之活體內血清半衰期的抗原決定基。

WO 00/42072(Presta, L.)及US 2005/0014934 A1(Hinton等人)中描述對新生兒Fc受體(FcRn)之結合有所改良且半衰期增加之抗體。此等抗體包含具有一或多個取代之Fc區，該一或多個取代會改良Fc區與FcRn之結合。舉例而言，Fc區可在位置238、250、256、265、272、286、303、305、307、311、312、314、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428或434(殘基之Eu編號)中的一或多處具有取代。FcRn結合有所改良的較佳之包含Fc區之抗體變異體在其Fc區之位置307、380及434(殘基之Eu編號)中的一、二或三處包含胺基酸取代。在一個實施例中，抗體具有307/434突變。

亦涵蓋具有三個或三個以上(較佳為四個)功能性抗原結合位點之工程改造抗體(美國申請案第US 2002/0004587 A1號，Miller等人)。

編碼抗體之胺基酸序列變異體之核酸分子係藉由此項技術中已知之多種方法製備。此等方法包括(但不限於)自天然來源分離(在天然存在之胺基酸序列變異體下)，或藉由對較早製備之變異體或非變異體型抗體進行寡核苷酸介導的(或定點)突變誘發、PCR突變誘發及匣式突變誘發來製備。

(v) 免疫結合物

本發明亦係關於免疫結合物，其包含本文所述之抗體結合於細胞毒性劑，諸如化學治療劑、毒素(例如細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素，或其片段)或放射性同位素(亦即放射性結合物)。

上文已描述適用於產生此等免疫結合物之化學治療劑。可使用之酶促活性毒素及其片段包括白喉毒素A鏈、白喉毒素之無結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈、相思子毒素(abrin)A鏈、莫迪素(modeccin)A鏈、 α 帶麴菌素(alpha-sarcin)、油桐蛋白(*Aleurites fordii* protein)、康乃馨蛋白(dianthin protein)、洋商陸蛋白(*Phytolaca americana* protein)(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(momordica charantia)抑制劑、麻瘋樹毒蛋白(curcin)、巴豆毒素(crocin)、石鹼草(sapaonaria officinalis)抑制劑、白樹素、有絲分裂素、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素、伊諾黴素(enomycin)及黴菌毒素。多種放射性核種可用於製造放射性結合抗體。實例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及 ^{186}Re 。

抗體與細胞毒性劑之結合物係使用多種雙功能蛋白質偶合劑製造，該等蛋白質偶合劑為諸如3-(2-吡啶基二巰基)丙酸N-丁二醯亞胺酯(SPDP)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、醯亞胺酯之雙功能衍生物(諸如二亞胺代己二酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如辛二酸二丁二醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙重氮衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如2,6-二異氰酸甲苯酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，可如 Vitetta 等人，*Science* 238: 1098 (1987)中所述製備蓖麻毒素免疫毒素。經碳14標記之1-異硫氰基苯甲基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為將放射性核苷酸結合於抗體之例示性螯合劑。參看 WO 94/11026。

在另一實施例中，抗體可結合於「受體」(諸如抗生蛋白鏈菌素)以用於腫瘤預靶向，其中投與患者抗體-受體結合物，接著使用洗淨劑自循環中移除未結合之結合物且接著投與結合於細胞毒性劑(例如放射性核苷酸)之「配位體」(例如抗生物素蛋白)。

(vi) 免疫脂質體

本文所揭示之抗體亦可調配為免疫脂質體。含抗體之脂質體係藉由此項技術中已知之方法製備，該等方法諸如描述於 Epstein 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985)；Hwang 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980)；及美國專利第4,485,045號及第4,544,545號中。美

國專利第5,013,556號中揭示循環時間增加之脂質體。

特別有用之脂質體可藉由逆相蒸發法使用包含磷脂醯膽鹼、膽固醇及經PEG衍生化之磷脂醯乙醇胺(PEG-PE)之脂質組合物產生。經由具有規定孔徑之過濾器擠出脂質體以產生具有所需直徑之脂質體。本發明抗體之Fab'片段可經由二硫化物互換反應結合於脂質體(如Martin等人, *J. Biol. Chem.* 257: 286-288 (1982)中所述)。脂質體內視情況含有化學治療劑(諸如小紅莓)。參看Gabizon等人, *J. National Cancer Inst.* 81(19)1484 (1989)。

VIII. 製品及套組

在本發明之另一實施例中, 提供一種含有適用於治療上述病症之物質的製品。該製品包含容器、標籤及藥品說明書。適合之容器包括例如瓶、小瓶、注射器等。容器可自諸如玻璃或塑膠之各種材料形成。容器容納有效治療病狀之組合物且可具有無菌接取孔(access port)(例如, 容器可為具有可由皮下注射針刺穿之塞子的靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一種活性劑為抗VEGF抗體。容器上或容器所附之標籤指示該組合物用於治療所選病狀。製品可進一步包含第二容器, 其包含醫藥學上可接受之緩衝液, 諸如磷酸鹽緩衝生理食鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可進一步包括自商業及使用者觀點來看可需要之其他物質, 包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。另外, 製品包含具有使用說明之藥品說明書, 其包括例如不應將組合物與另一組合物組合使

用之警告，或指示組合物使用者將抗VEGF抗體組合物單獨或與抗癌組合物(例如甲醯四氫葉酸、5-FU、奧沙利鉑、伊立替康或其組合)組合投與患者。術語「使用說明」意謂藉由任何方式，例如以書面形式，諸如以藥品說明書或其他書面宣傳材料之形式提供可適用治療、藥物、治療、治療方案及其類似物之指導。

VEGF特異性拮抗劑可單獨封裝或與其他抗癌治療化合物組合封裝為套組。套組可包括有助於投與患者單位劑量之視情況選用的組件，諸如復原散劑形式之小瓶、注射用注射器、定製之靜脈內傳遞系統、吸入器等。另外，單位劑量套組可含有製備及投與組合物之說明書。套組可製造為供一個患者單次使用之單位劑量、供特定患者多次使用之劑量(在恆定劑量下或其中隨著治療進展，個別化合物在效能方面可能變化)；或套組可含有適於投與多個患者之多次劑量(「散裝(bulk packaging)」)。套組組分可組裝於紙箱、發泡包裝、瓶子、管及其類似物中。

本發明提供一種治療已接受癌症(例如原發腫瘤)確定性手術之患者的包含封裝之套組，其中該封裝包含抗VEGF抗體組合物及在輔助治療中使用抗VEGF抗體組合物之說明書，其中該等說明書陳述接受輔助治療之患者在起始輔助治療後1年之DFS為94.3，危險比率為0.60。

材料寄存

以下融合瘤細胞株已依據布達佩斯條約(Budapest Treaty)之條款寄存於美國菌種保存中心(ATCC)(Manassas,

VA, USA) :

抗體名稱	ATCC編號	寄存日期
A4.6.1	ATCC HB-10709	1991年3月29日

以下實例僅意欲說明本發明之實踐且不以限制方式提供。

實例

實例1.結腸直腸癌患者之貝伐單抗輔助治療

此實例係關於對獲自在國家外科輔助乳房及胃腸計劃(National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project)(NSABP C-08)臨床試驗中治療之結腸直腸癌個體之結果的分析。該研究之主要目標在於確定向治療結腸直腸癌之標準化學治療中添加貝伐單抗之臨床益處，如無病存活(DFS)所量度。第二目標在於確定在延長總存活方面是否存在臨床益處。此試驗中所用之標準化學治療為甲醯四氫葉酸、5-氟尿嘧啶及奧沙利鉑之組合。此試驗評估貝伐單抗(AVASTIN®)作為患有可切除的II期及III期結腸癌之患者之輔助治療的功效。

研究設計

NSABP C-08研究之設計描繪於圖1及圖2中。

在NSABP C-08試驗中，使用以下治療方案：

隊組A/第1組：經修飾之FOLFOX6(mFOLFOX6：奧沙利鉑(85 mg/m²)與並行之甲醯四氫葉酸(400 mg/m²)及5-FU(400 mg/m²，靜脈內團式注射)(第1天)及5-FU(2400 mg/m²)(在第1天及第2天歷經46小時))，每14天1次，歷時

12個週期(6個月)；

隊組B/第2組：經修飾之FOLFOX6，每14天1次，歷時12個週期(6個月)，外加在各化學治療週期之第1天在奧沙利鉑之前投與貝伐單抗(5 mg/kg，靜脈內)，每14天1次歷時1年。

貝伐單抗(AVASTIN®)以下述兩種小瓶尺寸供應，呈透明至微乳白色無菌液體形式以備用於非經腸投與：各100 mg(25 mg/ml-4 ml填充)玻璃小瓶含有貝伐單抗與磷酸鹽、海藻糖、聚山梨醇酯20及無菌注射用水(USP)，且各400 mg(25 mg/ml-16 ml填充)玻璃小瓶含有貝伐單抗與磷酸鹽、海藻糖、聚山梨醇酯20及無菌注射用水(USP)。藉由以下投與AVASTIN®：抽取5 mg/kg劑量之必需量且稀釋於總體積為100 ml之0.9%氯化鈉注射劑(Sodium Chloride Injection，USP)中，隨後靜脈內投與。

為適合於此等試驗，需要患者患有組織學上確認之結腸腺癌，其滿足以下階段之一：

(1)II期癌($T_{3或4}$ 、 N_0 、 M_0)(腫瘤已經由固有肌層侵入漿膜下層或侵入非腹膜化結腸周或直腸周組織(T_3)；或已直接侵入其他器官或結構及/或穿透腹膜髒層(T_4))，或

(2)III期癌(任何T、 $N_{1或2}$ 、 M_0)(腫瘤已侵入任何深度，累及區域淋巴結)。

若滿足所有以下條件，則患有藉由自原發腫瘤直接擴展而累及相鄰結構(例如膀胱、小腸、卵巢等)之T4腫瘤的患者為合格的：

- (1)相鄰結構之全部或一部分與原發腫瘤一起移除；
- (2)照外科醫生之看法，所有粗略可見之腫瘤均完全切除（「治癒性切除」）；
- (3)病理學家之組織評估確認切除樣品之邊緣未受到惡性細胞累及；及
- (4)將不會利用局部放射治療。

患有一種以上同步原發性結腸腫瘤之患者為合格的，分期分類(staging classification)係基於較晚期原發腫瘤。

患者須已藉由開腹術(open laprotomy)或腹腔鏡輔助之結腸切除術進行了腫瘤全切術(en bloc complete gross resection)(治癒性切除)。合格患者具有兩階段手術程序，首先提供減壓結腸造口術(decompressive colostomy)且接著在後一程序中具有確定性手術切除術。藉由內視鏡檢法，自肛門邊緣(anal verge)起腫瘤之遠端範圍須大於或等於12 cm。若患者不為內視鏡檢法之候選者，則如藉由外科檢查所確定，自肛門邊緣起腫瘤之遠端範圍須大於或等於12 cm。

患者為18歲或18歲以上，其ECOG體能狀態(performance status)為0或1，且照研究者之看法須具有至少5年之預期壽命(排除其癌症診斷)。

在隨機化時，患者之術後粒細胞絕對計數(absolute granulocyte count/AGC)須大於或等於 1500 mm^3 (或小於 $1500/\text{mm}^3$ ，若照研究者之看法，此表示正常之種族(ethnic/racial)變異)且其術後血小板計數須大於或等於

100,000/mm³。患者亦具有正常之肝功能及腎功能。

若先前患有惡性疾病(包括結腸直腸癌)之患者已無病至少5年且據其醫師認為處於低復發風險中，則該等患者為合格的。已得到有效治療之患有皮膚鱗狀細胞癌或基底細胞癌、原位黑色素瘤、子宮頸原位癌、結腸或直腸原位癌之患者即使在隨機化之前5年內診斷出此等病狀亦為合格的。

若患者具有任一種以下病狀，則其為不合格的：非腺癌之結腸癌、直腸腫瘤、隔離之遠端或非鄰接腹內轉移(即使切除)、惡性疾病所引發之全身性或放射治療、在進入研究之前6個月內與原發性結腸腫瘤無關之顯著性出血、嚴重或非癒合性創口、皮膚潰瘍或骨折、由內視鏡檢法確定為活動性之胃十二指腸潰瘍、重大手術程序、切開活組織檢查(open biopsy)或在隨機化之前28天內出現顯著外傷性損傷、預期在試驗過程期間需要重大手術程序、核心活組織檢查(core biopsy)或其他小程序、排除在隨機化之前7天內置放血管接取裝置(vascular access device)、不受控制之血壓(大於150/90 mmHg)、先前CNS腦血管局部缺血病史、6個月內周邊動脈局部缺血病史、6個月內內臟動脈局部缺血病史、伴隨之鹵化抗病毒劑、隨機化時臨床上顯著之周邊神經病(使用3.0版NCI不良事件常用術語準則(NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events Version 3.0)，2級或2級以上感覺神經或神經運動毒性)、將排除使用試驗中所用的任一研究藥物之非惡性全身性疾病、隨機

化時懷孕或哺乳、精神病症或上癮性病症或照研究者之看法將排除患者滿足研究試驗要求之其他病狀、PT (INR) > 1.5，除非該患者在用全劑量抗凝血劑且該個體對於穩定劑量之華法林(warfarin)或穩定劑量之低分子量肝素具有範圍內(in-range)INR，且該個體未有活動性出血或與高出血風險相關之病理學病狀。

此試驗之主要終點為無病存活(DFS)之持續時間。DFS之事件包括結腸癌復發之第一記錄跡象、第二原發癌或任何病因所致之死亡。第二終點為總存活(OS)之持續時間及與研究治療有關之毒性。總存活之事件包括任何病因所致之死亡。

使用以下準則進行結腸癌復發之診斷。對於腹部及/或骨盆部位：陽性細胞學或活組織檢查(若吻合)；

腹部、骨盆及腹膜後節點：(1)陽性細胞學或活組織檢查，(2)逐漸擴大之節點，如由以至少4週時間間隔分隔之兩次CT或MRI掃描所顯示，(3)如CT或MRI掃描所記錄，在塊狀物存在下輸尿管梗阻，或(4)單一CT或MRI掃描顯示明確塊狀物，藉由在該部位進行正PET掃描確認其為惡性的。

腹膜(包括內臟及壁腹膜或網膜)：(1)陽性細胞學或活組織檢查，或(2)逐漸擴大之腹膜內固體塊狀物，如由以至少4週時間間隔分隔之兩次CT或MRI掃描所顯示，或單一掃描，藉由在該部位進行正PET掃描確認其為惡性的。

腹水：陽性細胞學

肝臟：(1)陽性細胞學或活組織檢查，或(2)不與良性疾病相關之以下各者中三者：(i)新近或進行性肝腫大、異常肝臟外形(liver contour)；(ii)陽性放射性核苷酸肝臟掃描或聲波圖(sonogram)；(iii)正PET掃描，其確認異常CT掃描或MRI掃描且與上升之CEA相關；(iv)異常肝功能研究；或(V)在具有正常術後CEA值之患者中，由以4週時間間隔分隔之兩次測定所確認，CEA提高，亦即CEA力價持續上升至10倍上限標準值(應由同一實驗室使用相同方法進行測定)。

未作另外規定(NOS)之骨盆塊狀物：(1)陽性細胞學或活組織檢查，或(2)逐漸擴大之骨盆內固體塊狀物，如由以至少4週時間間隔分隔之兩次CT或MRI掃描所顯示，或(3)根據單一CT掃描，藉由在該部位進行正PET掃描確認為固體塊狀物。

腹壁、會陰(perineum)及疤痕：陽性細胞學或活組織檢查
非腹部及非骨盆部位：

骨架：對於所有僅骨之復發，均需要活組織檢查

肺：(1)陽性細胞學、吸出物(aspirate)或活組織檢查，或(2)感覺與肺部轉移一致之多個肺部節結之放射跡象。

骨髓：陽性細胞學、吸出物、活組織檢查或MRI掃描

中樞神經系統：(1)正CT或MRI掃描，通常在具有神經症狀之患者中；或(2)活組織檢查或細胞學(對於腦膜累及之診斷)。

只要可能，均以組織學方式確認第二原發癌之診斷。

結果

此試驗之結果表明在第一年期間(對應於積極治療期)，向化學治療中添加 AVASTIN®較之單獨化學治療顯著增加 DFS。資料顯示，此顯著益處不與任何增加之毒性或不良影響相關聯。

研究應計有 2,710 名患者(對照隊組 1,356 名及實驗隊組 1,354 名)。由於無追蹤或陽性手術邊緣(positive surgical margin)，未針對功效評估對照隊組之 18 名患者及實驗隊組之 20 名患者。另外，發現 22 名對照隊組患者及 15 名實驗隊組患者因其他原因而不合格，但包括於分析中。因此，對照隊組及實驗隊組中分別有 1,338 及 1,334 名患者包括於此等分析中。中位追蹤為 35.6 個月。治療隊組使患者特徵實現良好平衡。略超過一半之患者小於 60 歲，約 15% 大於 70 歲且存在相等性別分佈。II 期患者佔約 25%。

隨機化量測事件時間。除主要終點外，所有 p 值均評估為顯著的(在 0.05 程度下，兩側)。所有信賴區間均為 95%。自 Cox 模型計算危險比率(HR)且事件時間之 p 值係來自對數等級測試。只要可能，HR 及 p 值係藉由陽性節點之數目來分層。藉由費雪精確方法(Fischer's exact method)比較各比例。主要分析係基於治療意向原則，僅排除未追蹤患者及在隨機化時針對主要終點無風險之患者(已知具有轉移或陽性手術邊緣)。藉由 Muller 及 Wang 之方法(Biometrics 1994 50:61-76)計算潛在危險函數(underlying

hazard function)之平滑估計值。藉由 Gilbert 等人之方法 (Biometrics 2002 58:773-80)計算潛在危險比率之平滑估計值。

結果如下：

	患者數	事件數	3年DFS(%)	p值
mFOLFOX6	1338	312	75.5	
mFOLFOX6+ 貝伐單抗	1334	291	77.4	0.15

對於患有 II 期疾病之患者，實驗隊組及對照隊組之 3 年 DFS 分別為 87.4% 及 84.7% (HR=0.82 CI 0.54-1.25 ; p=0.35) 且對於 III 期疾病，實驗隊組及對照隊組之 3 年 DFS 分別為 74.2% 及 72.4% (HR=0.90 CI 0.76-1.07 ; p=0.23)。

最終危險比率 (HR) 為 0.888，p 值為 0.146。如下隨時間評估危險比率 (HR) 及 p 值：

起始治療 後之年數	1	1.25	1.5	2	2.5	3
HR	0.6	0.61	0.74	0.81	0.85	0.87
p值	0.0004	<0.0001	0.004	0.02	0.05	0.08

對於以 mFOLFOX6+ 貝伐單抗治療之患者，在起始治療後 1 年之 DFS 為 94.3，且對於以 mFOLFOX6 單獨治療之患者，該 DFS 為 90.7 (HR 為 0.60，p 值為 0.0004)。在最初的 1.25 年期間，貝伐單抗具有強效應 (HR=0.61 95% CI 0.48-0.78，p<0.0001)。此等資料表明，向化學治療中添加貝伐單抗會在投與患者貝伐單抗之積極治療期 (起始治療後的最初 12 個月) 期間及此後不久賦予臨床上有意義且顯著之

益處。此等結果亦首次顯示，投與貝伐單抗1年以上將有利於患者。

根據前述描述，顯而易見可對本文所述之發明進行變化及修改以將其用於各種用法及病狀中。此等實施例亦在以下申請專利範圍之範疇內。

【圖式簡單說明】

圖1描繪C-08試驗之治療方案。隊組A：經修飾之FOLFOX6(奧沙利鉑(85 mg/m^2)與並行之甲醯四氫葉酸(400 mg/m^2)及5-FU(400 mg/m^2 ，靜脈內團式注射)(第1天)及5-FU(2400 mg/m^2)(在第1天及第2天歷經46小時))，每14天1次，歷時12個週期(6個月)；隊組B：經修飾之FOLFOX6，每14天1次，歷時12個週期，外加在各化學治療週期之第1天在奧沙利鉑之前投與貝伐單抗(5 mg/kg ，靜脈內)，每14天1次歷時1年；

圖2描繪NSABP C-08試驗之研究設計。第1組：經修飾之FOLFOX6(奧沙利鉑(85 mg/m^2)與並行之甲醯四氫葉酸(400 mg/m^2)及5-FU(400 mg/m^2 ，靜脈內團式注射)(第1天)及5-FU(2400 mg/m^2)(在第1天及第2天歷經46小時))，每14天1次，歷時12個週期(6個月)；第2組：經修飾之FOLFOX6，每14天1次，歷時12個週期，外加在各化學治療週期之第1天在奧沙利鉑之前投與貝伐單抗(5 mg/kg ，靜脈內)，每14天1次歷時1年。

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 輔助癌症治療

<130> P4196R1 WO

<140> 099112369

<141> 2010-04-20

<150> 61/171,008

<151> 2009-04-20

<150> 61/171,318

<151> 2009-04-21

<150> 61/181,195

<151> 2009-05-26

<160> 2

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列經合成

<400> 1

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

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
50 55 60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
65 70 75

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
95 100 105

Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
110 115 120

Val Ser Ser

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列經合成

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90

Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys Arg

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：99112369

※申請日：99-06-20

※IPC分類：C07K

一、發明名稱：(中文/英文)

輔助癌症治療

ADJUVANT CANCER THERAPY

AGIK³⁹/395 (2006.01)

AGIP³⁵% (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明揭示用於輔助癌症治療之方法及包含抗VEGF抗體的組合物。

三、英文發明摘要：

Disclosed herein are methods and compositions comprising anti-VEGF antibodies for use in adjuvant cancer therapy.

七、申請專利範圍：

1. 一種 VEGF 特異性拮抗劑之用途，其用於製造供確定性手術之後輔助治療癌症患者以延長該患者之無病存活 (DFS) 或總存活 (OS) 的藥物，其中投與該藥物一年以上。
2. 如請求項 1 之用途，其中在使用該 VEGF 特異性拮抗劑治療起始後約 2 至約 5 年評估該 DFS 或 OS。
3. 如請求項 1 之用途，其中延長 DFS 或 OS 包含防止或延遲癌症復發，或防止或延遲第二原發癌出現。
4. 一種 VEGF 特異性拮抗劑之用途，其用於製造供確定性手術之後輔助治療癌症患者之藥物，其中在以該藥物積極治療期間該癌症之進展經防止或延遲，且其中該積極治療持續一年以上。
5. 如請求項 4 之用途，其中在以該藥物積極治療停止後，該癌症之進展經防止或延遲約 6 個月。
6. 一種 VEGF 特異性拮抗劑之用途，其用於製造供確定性手術之後輔助治療癌症患者之藥物，其中在以該藥物積極治療期間該癌症之復發經防止或延遲，且其中該積極治療持續一年以上。
7. 如請求項 6 之用途，其中在以該藥物積極治療停止後，該癌症之復發經防止或延遲約 6 個月。
8. 一種 VEGF 特異性拮抗劑之用途，其用於製造供輔助治療已接受癌症確定性手術之患者以延長該患者之 DFS 或 OS 的藥物，其中投與該藥物一年以上。

9. 如請求項8之用途，其中在使用該藥物治療起始後約2至約5年評估該DFS或OS。
10. 如請求項8之用途，其中延長DFS或OS包含防止或延遲癌症復發，或防止或延遲第二原發癌出現。
11. 一種VEGF特異性拮抗劑之用途，其用於製造供輔助治療已接受癌症確定性手術之患者的藥物，其中在以該藥物積極治療期間該癌症之進展經防止或延遲，且其中該積極治療持續一年以上。
12. 如請求項11之用途，其中在以該藥物積極治療停止後，該癌症之進展經防止或延遲約6個月。
13. 一種VEGF特異性拮抗劑之用途，其用於製造供輔助治療已接受癌症確定性手術之患者的藥物，其中在以該藥物積極治療期間該癌症之復發經防止或延遲，且其中該積極治療持續一年以上。
14. 如請求項13之用途，其中在以該藥物積極治療停止後，該癌症之復發經防止或延遲約6個月。
15. 一種VEGF特異性拮抗劑之用途，其用於製造供治療已接受癌症確定性手術之患者以延長該患者之DFS或OS作為輔助治療的藥物，其中投與該藥物一年以上。
16. 如請求項15之用途，其中在使用該藥物治療起始後約2至約5年評估該DFS或OS。
17. 如請求項15之用途，其中延長DFS或OS包含防止或延遲癌症復發，或防止或延遲第二原發癌出現。
18. 一種VEGF特異性拮抗劑之用途，其用於製造供治療已

- 接受癌症確定性手術之患者作為輔助治療的藥物，其中在該藥物積極治療期間該癌症之進展經防止或延遲，且其中該積極治療持續一年以上。
19. 如請求項18之用途，其中在該藥物積極治療停止後，該癌症之進展經防止或延遲約6個月。
 20. 一種VEGF特異性拮抗劑之用途，其用於製造供治療已接受癌症確定性手術之患者作為輔助治療的藥物，其中在該藥物積極治療期間該癌症之復發經防止或延遲，且其中該積極治療持續一年以上。
 21. 如請求項1至20中任一項之用途，其中投與該藥物防止或降低出現或復發臨床上可偵測的腫瘤或其轉移之可能性。
 22. 一種VEGF特異性拮抗劑之用途，其用於製造防止患者癌症復發作為輔助治療之藥物，其中投與該藥物一年以上。
 23. 一種VEGF特異性拮抗劑之用途，其用於製造降低患者癌症復發可能性作為輔助治療之藥物，其中投與該藥物一年以上。
 24. 如請求項22或23之用途，其中該患者在投與該藥物之前已接受確定性手術。
 25. 如請求項1至24中任一項之用途，其中該患者經鑑別為在確定性手術之後有癌症復發之風險或低存活可能性。
 26. 如請求項1至24中任一項之用途，其中該治療進一步包含投與該患者化學治療劑。

27. 如請求項26之用途，其中該藥物治療係與該化學治療劑治療並行。
28. 如請求項1至24中任一項之用途，其中該VEGF特異性拮抗劑為抗VEGF抗體。
29. 如請求項28之用途，其中在確定性手術之後至少28天投與該患者該抗VEGF抗體。
30. 如請求項28之用途，其中該抗VEGF抗體為貝伐單抗 (bevacizumab)。
31. 如請求項30之用途，其中該抗VEGF抗體與融合瘤 ATCC HB 10709所產生之單株抗VEGF抗體 A4.6.1結合相同的抗原決定基。
32. 如請求項30之用途，其中該抗VEGF抗體具有包含以下胺基酸序列之重鏈可變區：
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA
PGKGLEWVGWINTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED
TAVYYCAKYPHYYGSSHWFYF DVWGQGTLVT VSS (SEQ ID NO: 1)
及包含以下胺基酸序列之輕鏈可變區：
DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
GTKVEIKR (SEQ ID NO: 2)。
33. 如請求項1至32中任一項之用途，其中該癌症為結腸直腸癌、乳癌、肺癌、腎癌、胃癌、卵巢癌或神經膠母細胞瘤。
34. 一種治療已接受癌症確定性手術之患者之套組，其包含一種封裝，其中該封裝包含抗VEGF抗體組合物及在輔助治療中使用該抗VEGF抗體組合物之說明書，其中該

等說明書陳述接受該輔助治療之患者在起始該輔助治療後1年DFS為94.3，危險比率為0.60。

八、圖式：

隊組A：

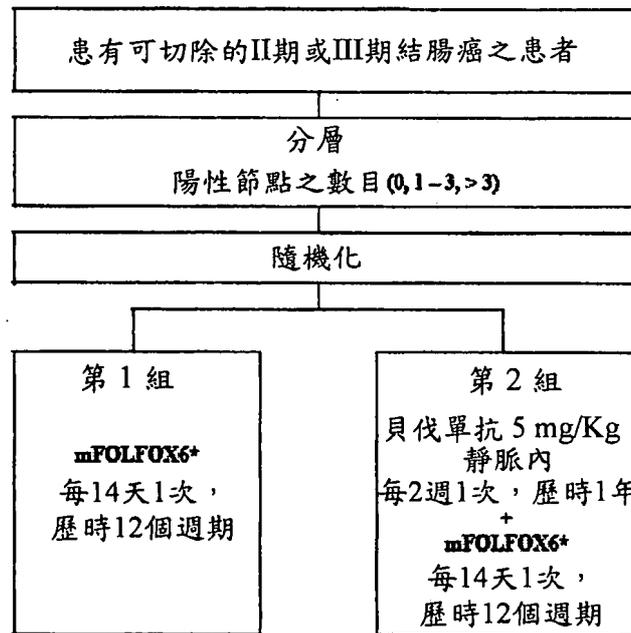
藥物	劑量	投藥	給藥間隔	計劃持續時間
奧沙利鉑	85 mg/m ²	用250 mL D5W之個別輸注袋及由Y線管 (Y-line tubing) 連接之個別管線靜脈內並行投與2小時	第1天 每14天1次	12個週期
甲醯四氫葉酸	400 mg/m ²			
5-FU	400 mg/m ²	靜脈內團式注射2至4分鐘		
5-FU	2400 mg/m ² 歷經46小時	靜脈內連續輸注46小時	第1天及第2天 每14天1次	

隊組B：

藥物	劑量	投藥	給藥間隔	計劃持續時間
貝伐單抗	5 mg/kg	稀釋於100 mL 0.9% NaCl溶液中，歷經以下時期靜脈內給予： 90分鐘-第1劑 60分鐘-第2劑 30分鐘-所有後續劑量 沖洗輸注管線	第1天 每14天1次	12個月
奧沙利鉑	85 mg/m ²	用250 mL D5W之個別輸注袋及由Y線管連接之個別管線靜脈內並行給予2小時	第1天 每14天1次	12個週期 (6個月)
甲醯四氫葉酸	400 mg/m ²			
5-FU	400 mg/m ²	靜脈內團式注射 2至4分鐘		
5-FU	2400 mg/m ² 歷經46小時	靜脈內連續輸注46小時	第1天及第2天 每14天1次	

圖 1

C-08圖解



•經修飾之FOLFOX6方案：

第1天靜脈內85 mg/m² 奧沙利鉑

第1天靜脈內400 mg/m² 甲醯四氫葉酸

第1天靜脈內團式注射400 mg/m² 5-FU

連續靜脈內輸注2400 mg/m² 5-FU歷經46小時（第1天及第2天）

圖2

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(1)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)