

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：97136179

C07K16/28 (2006.01)

※ 申請日期：97. 9. 19

※IPC 分類：A61K 39/395 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

A61P35/00

(2006.01)

血管生成之抑制

INHIBITION OF ANGIOGENESIS

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商建南德克公司

GENENTECH, INC.

代表人：(中文/英文)

提摩西 R 史瓦茲

SCHWARTZ, TIMOTHY R.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州舊金山市DNA路1號

1 DNA WAY, SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 法拉拉 拿坡理恩
FERRARA, NAPOLEONE
2. 法伯德 蕭杰
SHOJAEI, FARBOD
3. 吳淑明
WU, XIUMIN
4. 鐘翠玲
ZHONG, CUILING

國 籍：(中文/英文)

- | | |
|------------|---------|
| 1. 美國 | U.S.A. |
| 2. 加拿大 | CANADA |
| 3. 芬蘭 | FINLAND |
| 4. 中華人民共和國 | P.R.C. |

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家(地區)申請專利：

【格式請依：受理國家(地區)、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2007年09月21日；60/974,382

2. 美國；2008年07月23日；61/083,071

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☒ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明大體係關於對發炎性細胞介導之血管生成之抑制。特定言之，本發明係關於使用Bv8拮抗劑(諸如，抗Bv8抗體)預防或治療腫瘤血管生成及抑制腫瘤發展。

【先前技術】

十足的確定血管生成在腫瘤發展及轉移中發揮重要作用且抗血管生成在臨床上具有有效之抗癌對策(Folkman, J., *Nat Med* 1, 27-31 (1995); Ferrara, N及Kerbel, R.S., *Nature* 438, 967-974 (2005); Carmeliet, P., *Nat Med* 9, 653-660 (2003))。血管生成亦在多種其他病症(包括年齡相關之黃斑變性(AMD))中發揮關鍵病理作用。據報導脈絡膜新血管生成至少部分地依賴於嗜中性白血球浸潤(Zhou等人, *Mol Vis* 11:414-424 (2005))。傳統上已認為腫瘤細胞為血管生成之介體的主要來源(Folkman, J., *N Engl J Med* 385, 1182-1186 (1971))。實際上，許多研究已證明癌細胞可產生多種血管生成因子，包括血管內皮生長因子-A(VEGF-A)、血管生成素(angiopoietin)、肝細胞生長因子(HGF)及鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)，且致癌基因或腫瘤抑制基因中之各種突變可導致至少一些此等因子之產生增加(Rak, J.等人, *Cancer Res* 55, 4575-4580 (1995); Witzigmann等人, *Cancer Res* 55, 1358-1364 (1995))。然而，目前強有力之證據支持由纖維母細胞、外膜細胞、間葉幹細胞及發炎性免疫細胞組成之基質及內皮祖細胞亦不僅經由分泌

血管生成因子且亦藉由調節免疫系統來促成腫瘤生長的觀點(Hanahan, D.及 Weinberg, R. A., *Cell* 100, 57-70 (2000); Coussens, L.M.及 Werb, Z., *Nature* 420, 860-867 (2002); Blankenstein T., *Curr Opin Immunol* 17:180-186 (2005); Karnoub 等人, *Nature* 449:557-563 (2005); Orimo 等人, *Cell Cycle* 5:1497-1601 (2006); 及 Rafii, S. 等人, *Nat Rev Cancer* 2, 826-835 (2002))。雖然潛在地, 此等細胞中的一些可藉由免疫監視機制抑制腫瘤生長, 但許多證據顯示腫瘤中白血球及其他發炎性細胞之顯著浸潤意味不良之預後(Coussens 等人, 見上文)。

近來研究已將不同骨髓細胞群體直接牽涉於成人之腫瘤血管生成(Da Palma, M., 等人, *Nat Med* 9, 789-795 (2003); Yang, L. 等人, *Cancer Cell* 6, 409-421 (2004); De Palma M., 等人, *Cancer Cell* 8, 211-226 (2005))及 VEGF 誘發之新血管生成(Grunewald, M. 等人, *Cell* 124, 175-189 (2006))之調節中。最近研究已提供證明 CD11b+Gr1+ 骨髓細胞在介導一些腫瘤模型中抗 VEGF 治療難治性中之作用的證據(Shojaei, F. 等人, *Cell* 124, 175-189 (2006))。已描述嗜中性白血球在多階段癌發生之轉殖基因模型中啟動血管生成開關中的作用(Nozawa, H. 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 12493-12498 (2006))。骨髓細胞可局部分泌血管生成因子或產生諸如基質金屬蛋白酶-9 之蛋白酶(Yang, L. 等人, 見上文; Nozawa 等人, 見上文; van Kempen, L.C. 等人, *Eur J Cancer* 42, 728-734 (2006)), 該等因子或蛋白

酶轉而又可藉由增加腫瘤微環境中 VEGF-A 之生物可用性及活性來促進血管生成 (Bergers G. 等人, *Nat Cell Biol* 2, 737-744 (2000))。然而, 吾人對骨髓細胞自 BM 活動且促進腫瘤形成之機制的瞭解尚不完全。

Bv8 及 EG-VEGF 為兩種高度相關之分泌性蛋白質, 亦稱為激動素-1 (prokineticin-1) 及激動素-2, 其在結構上屬於由稱為輔脂酶摺疊之五個雙硫橋基元定義之肽的較大類別 (DeCouter, J. 等人, *Nature* 420, 860-867 (2002); LeCouter, J. 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2685-2690 (2003); Li, M. 等人, *Mol Pharmacol* 59, 692-698 (2001))。最初 Bv8 鑑別為來自蛙多彩鈴蟾 (*Bombina variegata*) 之皮膚的分泌性蛋白質 (Mollay, C. 等人, *Eur J Pharmacol* 374, 189-196 (1999))。Bv8 之選殖及表現描述於 2003 年 3 月 13 日公開之 WO 03/020892 中。Bv8 及 EG-VEGF 結合兩種高度相關之 G-蛋白質偶合受體 (GPCR) EG-VEGF/PKR-1(R1) 及 EG-VEGF/PKR-2(R2) (Masuda, Y 等人, *Biochem Biophys Res Commun* 293, 496-402 (2002); Lin, D.C. 等人, *J Biol Chem* 277, 19276-19280 (2002))。EG-VEGF 及 Bv8 經表徵為對特定內皮細胞類型具有選擇性之有絲分裂原 (LeCouter, J. 等人, (2001) 及 (2003), 見上文)。其他活性已歸於此家族, 包括傷痛刺激 (Mollay, C. 等人, 見上文)、胃腸道運動 (Li, M. 等人, 見上文)、對晝夜運動節律之調控 (Cheng, M.Y. 等人, *Nature* 417, 405-410 (2002)) 及嗅球神經生成 (Matsumoto, S. 等人, *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 4140-

4145 (2006))。此外，Bv8或EG-VEGF在活體外刺激粒細胞及單核細胞群落之產生(LeCouter, J.等人，(2003)，見上文；Dorsch, M.等人，*J. Leukoc Biol* 78(2), 426-34 (2005))。已將Bv8表徵為巨噬細胞之化學引誘劑(LeCouter等人，*Proc Natl Acad Sci USA* 101, 16813-16919 (2004))。

認識到血管內皮生長因子(VEGF)作為病理性病狀中血管生成之主要調節劑已引起對阻斷VEGF活性之大量嘗試。VEGF為血管生成之最佳表徵及最有效之正調節劑之一。參見例如Ferrara, N.及Kerbel, R.S. **Angiogenesis as a therapeutic target**. *Nature* 438:967-74 (2005)。除作為血管生成及血管發生中之血管生成因子外，VEGF還作為多效生長因子在諸如內皮細胞存活、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展現多種生物作用。Ferrara及Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-25。此外，研究已報導VEGF對諸如視網膜色素上皮細胞、胰管細胞及雪旺細胞(Schwann cell)之數種非內皮細胞類型具有促有絲分裂作用。參見例如Guerrin等人，*J. Cell Physiol.* 164:385-394 (1995)；Oberg-Welsh等人，*Mol. Cell. Endocrinol.* 126:125-132 (1997)；及Sondell等人，*J. Neurosci.* 19:5731-5740 (1999)。

認識到血管內皮生長因子(VEGF)作為病理性病狀中血管生成之主要調節劑已引起對阻斷VEGF活性之大量嘗試。抑制性抗VEGF受體抗體、可溶性受體構築體、反義策略、針對VEGF之RNA適體及低分子量VEGF受體酪胺酸

激酶(RTK)抑制劑均已提出用於干擾VEGF信號轉導。參見例如 Siemeister 等人, *Cancer Metastasis Rev.* 17:241-248 (1998)。抗VEGF中和抗體已展示抑制裸小鼠中多種人類腫瘤細胞株之生長(Kim等人, *Nature* 362:841-844 (1993); Warren 等人, *J. Clin. Invest.* 95:1789-1797 (1995); Borgström 等人, *Cancer Res.* 56:4032-4039 (1996); 及 Melnyk 等人, *Cancer Res.* 56:921-924 (1996))且亦抑制缺血性視網膜病症之模型中的眼內血管生成(Adamis等人, *Arch. Ophthalmol.* 114:66-71 (1996))。實際上, 人化抗VEGF抗體貝伐單抗(bevacizumab)(AVASTIN®, Genentech, South San Francisco, CA)已經US FDA批准, 與靜脈內基於5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)(5-FU)之化學療法組合用於患有結腸或直腸之轉移性癌之患者的第一線或第二線治療, 且與卡鉑(carboplatin)及太平洋紫杉醇(paclitaxel)組合用於患有不可切除之局部發展的復發性或轉移性非鱗狀非小細胞肺癌(NSCLC)之患者的第一線治療。參見例如 Ferrara 等人, *Nature Reviews Drug Discovery*, 3:391-400 (2004)。

然而, 治療化合物干擾腫瘤生長之長期能力時常受到抗藥性發展限制。對各種細胞毒性化合物之抗性的若干機制已主要在單細胞腫瘤模型中鑑別出且在功能方面加以表徵。參見例如 Longley, D.B. 及 Johnston, P.G. **Molecular mechanisms of drug resistance.** *J Pathol* 205:275-92 (2005)。此外, 宿主基質-腫瘤細胞相互作用可在抗藥表型中涉及。基質細胞分泌多種促血管生成因子且不傾向於具

有與腫瘤細胞相同之遺傳不穩定性及突變速率增加 (Kerbel, R.S. **Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents.** *Bioessays* 13:31-6 (1991))。Ferrara及Kerbel以及Hazlehurst等人在Ferrara, N.及Kerbel, R.S. **Angiogenesis as a therapeutic target.** *Nature* 438:967-74 (2005)中回顧；及Hazlehurst, L.A., Landowski, T.H.及Dalton, W.S. **Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death.** *Oncogene* 22:7396-402 (2003)。

在臨床前模型中，用人化單株抗體貝伐單抗 (AVASTIN®, Genentech, South San Francisco, CA)或貝伐單抗之鼠類前驅體(A4.6.1(產生A4.6.1之融合瘤細胞株，3/29/91寄存，ATCC HB-10709))阻斷VEGF信號轉導在所測試之大部分異種移植模型中顯著抑制腫瘤生長且減少腫瘤血管生成(Gerber及Ferrara在Gerber, H.P.及Ferrara, N. **Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies.** *Cancer Res* 65:671-80 (2005)中回顧)。

當在腫瘤生長早期階段開始治療時，單藥劑抗VEGF治療之藥理學作用最為明顯。若治療延遲直至腫瘤完全形成，則抑制作用通常短暫且腫瘤最終發展出抗性。參見例如Klement, G.等人，**Differences in therapeutic indexes of combination metronomic chemotherapy and an anti-**

VEGFR-2 antibody in multidrug-resistant human breast cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 8:221-32 (2002)。 在對抗 VEGF 治療之該抗性背後的細胞及分子事件為複雜的。參見例如 Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G. 及 Hanahan, D. **Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8:299-309 (2005)；** 及 Kerbel, R.S. 等人，**Possible mechanisms of acquired resistance to antiangiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev* 20:79-86 (2001)。** 可能涉及多種因子。舉例而言，用靶向 VEGF 及纖維母細胞生長因子 (FGF) 信號轉導之化合物組合治療在胰島癌發生之遺傳模型中之晚期腫瘤中改良功效且延遲抗性發作。參見 Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G. 及 Hanahan, D. **Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 8, 299-309 (2005)。** 其他研究者已鑑別出腫瘤浸潤性基質纖維母細胞作為替代性促血管生成因子之有效來源。參見例如 Dong, J. 等人，**VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *Embo J* 23:2800-10 (2004)；** 及 Orimo, A. 等人，**Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated**

SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121:335-48 (2005)。

發炎性細胞可藉由分泌發炎性細胞因子來參與血管生成，該等因子可影響內皮細胞活化、增殖、遷移及存活 (Albini 等人及 Balkwill 等人在 Albini, A., Tosetti, F., Benelli, R. 及 Noonan, D.M. **Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res* 65:10637-41 (2005)** 及 Balkwill, F., Charles, K.A. 及 Mantovani, A. **Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7:211-7 (2005)** 中回顧)。若干腫瘤浸潤性發炎性細胞分泌促血管生成因子，包括單核細胞/巨噬細胞(參見例如 De Palma, M. 等人，**Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 8:211-26 (2005)**；及 Yang, L. 等人，**Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 6:409-21 (2004)**)、T-淋巴細胞及B-淋巴細胞(參見例如 Freeman, M.R. 等人，**Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res* 55:4140-5 (1995)**)、血管白血球(參見例如 Conejo-Garcia, J.R. 等人，**Vascular leukocytes**

contribute to tumor vascularization. *Blood* 105:679-81 (2005))、樹突狀細胞(參見例如 Conejo-Garcia, J.R. 等人, **Tumor-infiltrating dendritic cell precursors recruited by a beta-defensin contribute to vasculogenesis under the influence of Vegf-A.** *Nat Med* 10:950-8 (2004))、嗜中性白血球(參見例如 Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D. 及 Werb, Z. **MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis.** *Cell* 103:481-90 (2000))及肥大細胞(參見例如 Coussens, L.M. 等人, **Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis.** *Genes Dev* 13:382-97 (1999); 及 de Visser 及 Coussens 在 de Visser, K.E., Eichten, A. 及 Coussens, L.M. **Paradoxical roles of the immune system during cancer development.** *Nat Rev Cancer* 6:24-37 (2006) 中回顧)。提出骨髓來源之內皮祖細胞(EPC(參見例如 Lyden, D. 等人, **Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth.** *Nat Med* 7, 1194-201 (2001)))及血管周祖細胞(參見例如 Song, S., Ewald, A.J., Stallcup, W., Werb, Z. 及 Bergers, G. **PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival.** *Nat Cell Biol* 7:870-9 (2005))促進腫瘤生長之一些實驗模型中之血管形成(Rafii 等人在 Rafii, S., Lyden, D., Benezra,

R., Hattori, K.及Heissig, B. **Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy?** *Nat Rev Cancer* 2:826-35 (2002)中回顧)。骨髓譜系造血細胞(包括腫瘤相關巨噬細胞(TAM))展示直接藉由分泌血管生成因子或間接藉由產生胞外基質降解蛋白酶、該蛋白酶轉而又釋放整合之血管生成因子來刺激血管生成(Lewis, C.E. 及 Pollard, J.W. **Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments.** *Cancer Research* 66:605-612 (2006)；及 Naldini, A.及 Carraro, F. **Role of inflammatory mediators in angiogenesis.** *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:3-8 (2005)中回顧)。在骨髓細胞譜系中，當與腫瘤細胞共同注射時，自帶有腫瘤之小鼠之脾分離的CD11b+Gr1+祖細胞促進血管生成(參見例如 Yang 等人，**Expansion of myeloid immune suppressor Gr+ CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis.** *Cancer Cell* 6:409-21 (2004))且腫瘤浸潤性巨噬細胞數目與一些人類腫瘤之不良預後相關(Balkwill等人在Balkwill, F., Charles, K.A.及 Mantovani, A. **Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease.** *Cancer Cell* 7:211-7 (2005)中回顧)。然而，在另一研究中，巨噬細胞抑制小鼠中之實驗腫瘤生長，表明其作為抗癌治療之潛能。參見例如 Kohchi, C. 等人，**Utilization of macrophages in anticancer therapy: the macrophage network theory.**

Anticancer Res 24:3311-20 (2004)。Shojaei, F. Wu 等人，**Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b(+)Gr1(+) myeloid cells.** *Nat Biotechnology* 2007 25(8):911-20 報導 CD11b(+)Gr1(+) 骨髓細胞在腫瘤對用抗 VEGF 抗體治療之抗性中的作用。類似發現揭示於 2007 年 3 月 28 日申請之同在申請中之美國申請案第 11/692681 號中。

儘管骨髓細胞相對豐富且其具有產生促血管生成因子之潛能，但其在抗 VEGF 治療之腫瘤抗性中之作用尚為未知。發現及瞭解骨髓細胞、抗性腫瘤及其產生之因子的生物功能存在需要。如以下揭示內容回顧後顯而易見，本發明解決此等及其他需要。

【發明內容】

本發明係至少部分地基於指示 Bv8 調控腫瘤發展期間 CD11b+Gr1+ 細胞自骨髓(BM)之活動且促進腫瘤血管生成的實驗資料。因此，本發明提供用於診斷及治療對用 VEGF 拮抗劑治療有抗性之腫瘤的方法及組合物。

在一態樣中，本發明係關於一種治療腫瘤之方法，其包含向具有先前經血管內皮生長因子(VEGF)拮抗劑治療之腫瘤的哺乳動物受檢者(諸如，人類受檢者)投與有效量之 Bv8 拮抗劑。人類受檢者可能(但不必)用 VEGF 拮抗劑難以治療。

在一實施例中，VEGF 拮抗劑為抗 VEGF 抗體或其片段，其中抗 VEGF 抗體可(例如)為貝伐單抗或其片段或變異體。

在另一實施例中，Bv8拮抗劑為抗Bv8或抗Bv8受體單株抗體或其片段，其中Bv8受體可為PKR-1/EG-VEGFR1或PKR-2/EG-VEGFR2。抗體結合之Bv8為所治療哺乳動物的天然序列Bv8多肽。類似地，抗體結合之Bv8受體為所治療哺乳動物的天然序列Bv8受體。

抗體或抗體片段可為嵌合、人化或人類抗體或抗體片段。

在另一實施例中，向受檢者進一步投與抗VEGF抗體，其中VEGF可為任何VEGF分子，尤其包括(但不限於)165-胺基酸血管內皮細胞生長因子及相關121-、145-、189-及206-胺基酸血管內皮細胞生長因子以及其天然存在之等位基因及加工形式。

在一特定實施例中，抗VEGF抗體為貝伐單抗或其片段或變異體。

在另一實施例中，除投與Bv8拮抗劑及視情況VEGF拮抗劑外，哺乳動物受檢者(諸如，人類患者)還經一或多種其他骨髓細胞減少劑治療，該等減少劑諸如Grl拮抗劑、彈性蛋白酶抑制劑、MCP-1拮抗劑及/或MIP-1 α 拮抗劑。

在另一實施例中，使所治療之哺乳動物受檢者(諸如，人類受檢者)經受化學療法及/或放射療法，其中化學療法可(例如)包含投與細胞毒性劑。較佳地，額外治療為稱為用於治療所靶向之特定腫瘤之"標準護理"的治療。

腫瘤可為任何種類之良性或癌性腫瘤，包括(但不限於)癌瘤，包括腺癌、淋巴瘤、胚細胞瘤、黑色素瘤、肉瘤及

白血病。本文中之較佳癌症為結腸癌、直腸癌、肺癌及乳癌，尤其結腸或直腸之轉移癌或非鱗狀非小細胞肺癌(NSCLC)。

在一特定實施例中，以上方法進一步包含藉由相對於治療前數目或頻率測定自哺乳動物受檢者(諸如，人類)獲得之生物樣品中循環及/或骨髓CD11b+Gr1+細胞之數目及/或頻率來監測治療功效的步驟。

在另一態樣中，本發明係關於一種治療腫瘤之方法，其包含

(a)向帶有腫瘤之哺乳動物受檢者(諸如，人類)投與有效量之Bv8拮抗劑，及

(b)藉由相對於治療前數目或頻率測定自哺乳動物受檢者(諸如，人類)獲得之生物樣品中循環及/或骨髓CD11b+Gr1+細胞之數目及/或頻率來監測該治療的功效，其中減少之數目或頻率表明治療有效。

在另一態樣中，本發明係關於一種抑制哺乳動物(諸如，人類受檢者)中發炎性細胞介導之血管生成的方法，其包含向受檢者投與有效量之Bv8拮抗劑。

拮抗劑可(例如)為抗Bv8或抗Bv8受體單株抗體或其片段，其可為嵌合、人化或人類抗體或抗體片段。抗體結合之Bv8為所治療哺乳動物的天然序列Bv8多肽。類似地，抗體結合之Bv8受體為所治療哺乳動物的天然序列Bv8受體。

該方法可進一步包含藉由相對於治療前數目或頻率測定

自哺乳動物受檢者(諸如，人類)獲得之生物樣品中循環及/或骨髓CD11b+Gr1+細胞之數目及/或頻率來監測治療功效的步驟。

在另一實施例中，該方法可進一步包含投與另一血管生成抑制劑，諸如針對血管生成因子之抗體。

血管生成因子之實例包括(但不限於)血管內皮生長因子(VEGF)、血管生成素、肝細胞生長因子(HGF)及鹼性纖維母細胞生長因子(bFGF)。

在另一態樣中，本發明係關於一種鑑別帶有腫瘤之人類受檢者以供用Bv8拮抗劑治療的方法，其包含確定受檢者用VEGF拮抗劑難以治療。

在另一態樣中，本發明係關於藉由單獨或與G-CSF拮抗劑組合投與Bv8拮抗劑來抑制由G-CSF刺激之嗜中性白血球活動。

本發明進一步係關於藉由Bv8拮抗劑抑制Bv8介導之骨髓譜系細胞遷移。

本發明進一步係關於藉由投與Bv8拮抗劑去除CD11b+Gr1+骨髓細胞以抑制腫瘤發展及/或生長。

在另一態樣中，本發明係關於一種治療腫瘤之方法，其包含向帶有腫瘤之人類受檢者投與有效量之G-CSF拮抗劑。

在一特定實施例中，G-CSF拮抗劑為抗G-CSF抗體或抗體片段。抗體或抗體片段可為嵌合、人化或人類抗體或抗體片段。視情況，將G-CSF拮抗劑與Bv8拮抗劑及/或VEGF

拮抗劑(諸如，抗Bv8抗體及/或抗VEGF抗體)組合投與。

在另一實施例中，將G-CSF拮抗劑與不同抗腫瘤劑及/或治療方案(諸如，化學療法及/或放射療法)組合投與。

在另一態樣中，本發明係關於一種抑制人類受檢者中嗜中性白血球遷移之方法，其包含向受檢者投與有效量之Bv8拮抗劑。

在另一態樣中，本發明係關於一種治療受益於抗血管生成療法之非贅生性病狀之方法，其包含向先前經診斷患有該非贅生性病狀且經血管內皮生長因子(VEGF)拮抗劑治療之人類受檢者投與有效量之Bv8拮抗劑。

在一實施例中，非贅生性病狀係用VEGF拮抗劑難以治療。

非贅生性病狀可(例如)選自由以下各病組成之群：不良或異常肥大、關節炎、類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬、牛皮癬斑塊、肉狀瘤病、動脈粥樣硬化、動脈粥樣硬化斑、因心肌梗塞導致之水腫、糖尿病性及其他增生性視網膜病、晶狀體後纖維組織增生、新生血管性青光眼、年齡相關之黃斑變性、糖尿病性黃斑水腫、角膜新血管生成、角膜移植物新血管生成、角膜移植排斥反應、視網膜/脈絡膜新血管生成、隅角新血管生成(虹膜紅變)、眼部新生血管疾病、血管再狹窄、動靜脈畸形(AVM)、腦膜瘤、血管瘤、血管纖維瘤、甲狀腺增生(包括格雷夫氏病(Grave's disease))、角膜及其他組織移植、慢性發炎、肺部發炎、急性肺損傷/ARDS、敗血症、原發性肺動脈高壓、惡性肺

部積液、腦水腫(例如，與急性中風/閉合性頭部損傷/外傷有關)、滑膜發炎、RA中之血管翳形成、骨化性肌炎、肥厚性骨形成、骨關節炎(OA)、難治性腹水、多囊性卵巢病、子宮內膜異位、第三間隔流體疾病(3rd spacing of fluid diseases)(胰腺炎、間隔症候群、燒傷、腸病)、子宮纖維瘤、早產、諸如IBD之慢性發炎(克羅恩氏病(Crohn's disease)及潰瘍性結腸炎)、腎同種異體移植排斥反應、發炎性腸病、腎病症候群、不良或異常組織腫塊生長(非癌症)、肥胖症、脂肪組織腫塊生長、血友病性關節、肥厚性瘢痕、頭髮生長之抑制、奧韋氏症候群(Osler-Weber syndrome)、化膿性肉芽腫晶狀體後纖維組織增生、硬皮病、沙眼、血管黏附、滑膜炎、皮炎、先兆子癇、腹水、心包積液及胸腔積液。

在另一態樣中，本發明係關於中和抗Bv8抗體及包含該抗體之組合物。

在一特定實施例中，中和抗體基本上與鼠類抗Bv8抗體3F1或2B9結合相同抗原決定基或與鼠類抗Bv8抗體3F1或2B9結合相同抗原決定基。正如之前所述，抗體可為抗體片段，且可為嵌合、人化或人類抗體。

【實施方式】

在整個本說明書中，BM=骨髓，且PB=周圍血液。

在詳細描述本發明之前，應瞭解本發明不侷限於特定組合物或生物系統，組合物或生物系統無疑可變化。亦應瞭解本文中所使用之術語僅為達成描述特定實施例之目的而

並非意欲具有限制性。如本說明書及隨附申請專利範圍中所使用，除非上下文另外清楚規定，否則單數形式"一"及"該"包括複數個指示物。因此，舉例而言，提及"一分子"視情況包括兩個或兩個以上該等分子之組合及其類似情形。

A. 定義

術語"Bv8"、"Bv8同源物"、"激動素-2"(亦稱"PK2"、"KAL4"及"MIT1")在本文中可互換使用且係指天然序列、Bv8多肽、Bv8變異體及嵌合Bv8，其中每一者均在本文中予以定義。

Bv8核酸為編碼如上定義之Bv8多肽之RNA或DNA，或在嚴格雜交條件下與該DNA或RNA雜交且保持與其穩定結合且長度大於約10個核苷酸者。嚴格條件為彼等條件：(1)對於洗滌而言，採用低離子強度及高溫，例如50°C下0.15 M NaCl/0.015 M檸檬酸鈉/0.1% NaDodSO₄；或(2)雜交期間使用變性劑，諸如甲醯胺，例如42°C下具有0.1%牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯啉酮/50 mM磷酸鈉緩衝液(pH 6.5)及750 mM NaCl、75 mM檸檬酸鈉之50%(v/v)甲醯胺。

當核酸與另一核酸序列處於功能關係中時，該核酸係經可操作性連接。Bv8核酸可在載體中與另一核酸序列可操作性連接以使得其可在特定宿主生物體中表現。此可藉由此項技術中熟知之方法進行。舉例而言，若前序列或分泌性前導序列之DNA表現為參與多肽分泌之前體蛋白，則其

係與多肽之DNA可操作性連接；若啟動子或增強子影響序列之轉錄，則其係與編碼序列可操作性連接；或若核糖體結合位點經定位以有助於轉譯，則其與編碼序列可操作性連接。一般而言，"可操作性連接"意謂所連接之DNA序列為毗連的，且在分泌性前導序列之狀況下為毗連的且處於閱讀相中。然而，增強子不必毗連。連接係藉由在適宜限制性位點處連接來實現。若該等位點不存在，則根據習知實務使用合成寡核苷酸配接子或連接子。

"天然序列Bv8"包含無論其製備模式如何，均具有與來源於自然界之Bv8相同之胺基酸序列的多肽。因此，天然序列Bv8可具有天然存在之人類Bv8、鼠類Bv8或來自任何其他哺乳動物物種之Bv8的胺基酸序列。舉例而言，全長天然序列人類Bv8胺基酸序列展示於圖8(SEQ ID NO: 2)中。第二全長天然序列人類Bv8展示於圖10(SEQ ID NO: 4)中。此兩個序列為編碼標準肝素結合域之外顯子替代性拼接的結果。因此，胺基酸序列展示於圖8中之天然序列人類Bv8(SEQ ID NO: 2)包含肝素結合域，而圖10中描繪之天然序列Bv8(SEQ ID NO: 4)不含肝素結合域。天然序列小鼠Bv8胺基酸序列展示於圖12(SEQ ID NO: 6)中。人類及鼠類Bv8序列亦揭示於(例如)Wechselberger等人(FEBS Lett. 462:177-181 (1999))及Li等人(Mol. Pharm. 59:692-698 (2001))中。該等天然序列Bv8可自自然界分離或可藉由重組及/或合成方式產生。術語"天然序列Bv8"尤其包涵Bv8之天然存在之前形式(prepro form)、原形式(pro form)

及成熟形式及截短形式、天然存在之變異形式(例如, 替代性拼接形式, 諸如圖10中所示之替代性拼接形式(SEQ ID NO: 4))及天然存在之等位基因變異體。一較佳天然序列Bv8為如圖8中所示之全長天然序列人類Bv8(SEQ ID NO: 2)。

"Bv8變異體"為由於在天然序列內插入、缺失、修飾及/或取代一或多個胺基酸殘基而具有與人類及鼠類Bv8之天然序列Bv8多肽(諸如, 圖8、10及12中所示之彼等Bv8多肽(SEQ ID NO: 2、4及6))之序列不同之胺基酸序列的生物活性Bv8多肽。Bv8變異體一般與天然序列Bv8(諸如, 圖8之人類Bv8(SEQ ID NO: 2))具有小於100%之序列一致性。然而, 通常生物活性Bv8變異體將具有與天然存在之Bv8(諸如, 圖8之人類Bv8(SEQ ID NO: 2))具至少約70%胺基酸序列一致性、較佳至少約75%、更佳至少約80%、甚至更佳至少約85%、甚至更佳至少約90%之胺基酸序列一致性的胺基酸序列, 其中至少約95%至至少約99%胺基酸序列一致性以1%增量遞增較佳。Bv8變異體包括保留相應天然序列Bv8多肽之生物活性之具有至少5個胺基酸的肽片段。Bv8變異體亦包括在天然Bv8序列之N-或C-末端或天然Bv8序列內添加一或多個胺基酸殘基之Bv8多肽。Bv8變異體亦包括多個胺基酸殘基缺失且視情況經一或多個胺基酸殘基取代之Bv8多肽。亦可(例如)藉由經不同於天然存在之胺基酸之部分取代或藉由修飾胺基酸殘基以產生非天然存在之胺基酸來共價修飾Bv8變異體。Bv8變異體可包含肝

素結合域。

一般而言，多肽"變異體"(亦即，本文所揭示之任何多肽之變異體)意謂與相應天然序列多肽具有至少約80%胺基酸序列一致性之生物活性多肽。該等變異體包括(例如)在多肽之N-及/或C-末端添加或缺失一或多個胺基酸(天然存在之胺基酸及/或非天然存在之胺基酸)殘基的多肽。通常，變異體與天然序列多肽具有至少約80%胺基酸序列一致性或至少約90%胺基酸序列一致性或至少約95%或更大胺基酸序列一致性。變異體亦包括天然序列之通常具有生物活性之多肽片段(例如，子序列、截短等)。

本文中"胺基酸序列一致性百分比(%)"定義為在將序列及必要時引入之間隙比對以實現最大序列一致性百分比而不考慮作為序列一致性之部分的任何保守取代後，候選序列中與所選序列中胺基酸殘基一致之胺基酸殘基的百分比。為測定胺基酸序列一致性百分比而進行之比對可以此項技術中熟知之多種方式實現，例如使用可公開獲得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可確定用於量測比對之適當參數，包括在所比較之全長序列上實現最大比對所需之任何演算法。然而，為達成本文之目的，如下所述，藉由使用序列比較電腦程式ALIGN-2獲得胺基酸序列一致性%之值。ALIGN-2序列比較電腦程式係由Genentech, Inc.進程式設計，已在使用者文件下申請於美國版權局(U.S. Copyright Office, Washington D.C.,

20559)，其中其以美國版權註冊編號TXU510087註冊，且可經由Genentech, Inc.(South San Francisco, California)公開獲得。ALIGN-2程式應經編譯以用於UNIX操作系統上，例如數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且不改變。

為達成本文之目的，給定胺基酸序列A對、與或相對給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性%(或者其可表述為具有或包含對、與或相對給定胺基酸序列B的特定胺基酸序列一致性%的給定胺基酸序列A)計算如下：

$$100 \times \text{分數 } X/Y$$

其中X為由於A與B之程式比對而藉由序列比對程式ALIGN-2評分為一致匹配的胺基酸殘基數目，且其中Y為B中胺基酸殘基之總數。應瞭解在胺基酸序列A之長度與胺基酸序列B之長度不等之情況下，A對B之胺基酸序列一致性%不等於B對A之胺基酸序列一致性%。

"嵌合Bv8"分子為包含與異源多肽融合或結合之全長Bv8或其一或多個域的多肽。嵌合Bv8分子一般將與天然存在之Bv8共有至少一種生物學性質。嵌合Bv8分子之一實例為抗原決定基經標籤標記以供純化目的之分子。另一嵌合Bv8分子為Bv8免疫黏附素。

術語"抗原決定基經標籤標記"在用於本文中時係指包含與"標籤多肽"融合之Bv8的嵌合多肽。標籤多肽具有足夠殘基以提供抗原決定基(抗體可針對其產生)，而其足夠短以使得其不干擾Bv8之生物活性。標籤多肽較佳相當獨特

以便針對其之抗體實質上不與其他抗原決定基交叉反應。合適標籤多肽一般具有至少6個胺基酸殘基，且通常介於約8-50個胺基酸殘基之間(較佳介於約9-30個殘基之間)。較佳為聚組胺酸序列，其結合鎳，允許藉由如所述之Ni-NTA層析法分離所標記之蛋白質(參見例如 Lindsay 等人，Neuron 17:571-574 (1996))。

"經分離Bv8"意謂自Bv8來源純化或藉由重組或合成方法製備且經純化之Bv8。經純化Bv8實質上不含其他多肽或肽。此處"實質上不含"意謂經其他來源蛋白質污染少於約5%、較佳少於約2%、更佳少於約1%、甚至更佳少於約0.5%、最佳少於約0.1%。

"基本純"蛋白質意謂包含以組合物總重量計至少約90 wt%、較佳至少約95 wt%、更佳至少約90 wt%、甚至更佳至少約95 wt%之蛋白質的組合物。"基本同源"蛋白質意謂包含以組合物總重量計至少約99 wt%之蛋白質的組合物。

術語"拮抗劑"在用於本文時係指能夠中和、阻斷、抑制、消除、降低或干擾本發明蛋白質之活性(包括在配位體之狀況下其與一或多個受體之結合或在受體狀況下其與一或多個配位體之結合)的分子。拮抗劑包括抗體及其抗原結合片段、蛋白質、肽、醣蛋白、醣肽、醣脂、多醣、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、醫藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。拮抗劑亦包括本發明蛋白質之小分子抑制劑及與蛋白質特異性結合從而隔絕蛋白質與其標靶結合之融合蛋白、受體分子及衍生物、蛋

白質之拮抗劑變異體、針對本發明蛋白質之反義分子、RNA適體及針對本發明蛋白質之核糖酶。

"阻斷"抗體或"拮抗劑"抗體為抑制或降低其所結合之抗原之生物活性的抗體。某些阻斷抗體或拮抗劑抗體實質上或完全抑制抗原之生物活性。

如本文所用之術語"Bv8拮抗劑"係指部分或完全阻斷、抑制或中和天然序列Bv8在腫瘤發展期間調節骨髓活動及/或促進血管生成之能力的任何分子。合適拮抗劑分子尤其包括拮抗劑抗體及其抗原結合片段、蛋白質、肽、醣蛋白、醣肽、醣脂、多醣、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、醫藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。拮抗劑亦包括Bv8之小分子抑制劑及與Bv8特異性結合從而隔絕Bv8與其標靶結合之融合蛋白、受體分子及衍生物、Bv8之拮抗劑變異體、針對Bv8之反義分子、RNA適體及針對Bv8之核糖酶。

詳言之，Bv8拮抗劑包括(但不限於)與天然序列Bv8多肽或天然序列Bv8受體(PKR-1/EG-VEGFR1或PKR-2/EG-VEGFR2)多肽特異性結合之抗體及抗體片段。用於鑑別Bv8多肽之拮抗劑的方法可包含使Bv8多肽與候選拮抗劑分子接觸且量測Bv8調節骨髓細胞活動及/或促進腫瘤血管生成之能力的可偵測變化。

為達成本文之目的，與Bv8或G-CSF有關之"活性"係指保留天然或天然存在之Bv8或G-CSF之生物活性及/或免疫活性的Bv8或G-CSF之形式，其中"生物"活性係指天然或

天然存在之Bv8或G-CSF具有的由天然或天然存在之Bv8或G-CSF引起之生物功能(抑制性或刺激性)，但不為誘導產生針對抗原性抗原決定基之抗體的能力，且"免疫"活性係指天然或天然存在之Bv8或G-CSF具有的誘導產生針對抗原性抗原決定基之抗體的能力。一較佳Bv8生物活性為調節骨髓細胞活動及/或促進腫瘤血管生成之能力。

"Bv8受體"為Bv8結合且介導Bv8之生物學性質的分子。因此，在其含義內術語"Bv8受體"包括PKR1/EG-VEGF受體-1及PKR2/EG-VEGF受體-2(LeCouter等人，2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2685-2690；Lin等人，2002, *J. Biol. Chem.*, 277:19276-19280；Masuda等人，2002, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 293:396-402)。

如本文所用之術語"VEGF"係指天然序列血管內皮生長因子及其變異體。

術語"VEGF"及"VEGF-A"可互換使用以指天然序列165-胺基酸血管內皮細胞生長因子及相關121-、145-、183-、189-及206-胺基酸血管內皮細胞生長因子，如Leung等人，*Science*, 246:1306 (1989)；Houck等人，*Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991)及Robinson & Stringer, *Journal of Cell Science*, 144(5):853-865 (2001)所述，以及其天然存在之等位基因及加工形式以及其變異體。VEGF-A為包括VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F及PlGF之基因家族之部分。VEGF-A主要與兩個高親和力受體酪胺酸激酶VEGFR-1(Flt-1)及VEGFR-2(Flk-1/KDR)結合，後

者為 VEGF-A 之血管內皮細胞促有絲分裂信號的主要傳遞質。術語 "VEGF" 或 "VEGF-A" 亦指來自非人類物種(諸如，小鼠、大鼠或靈長類動物)之 VEGF。有時來自特定物種之 VEGF 由諸如用於人類 VEGF 之 hVEGF 或用於鼠類 VEGF 之 mVEGF 的術語來指示。術語 "VEGF" 亦用以指包含 165-胺基酸人類血管內皮細胞生長因子之胺基酸 8 至 109 或 1 至 109 之多肽的截短形式或片段。在本申請案中對任何該等 VEGF 形式之提及可藉由(例如)"VEGF(8-109)"、"VEGF(1-109)" 或 "VEGF₁₆₅" 加以鑑別。"截短"天然 VEGF 之胺基酸位置係如天然 VEGF 序列中所指示來編號。舉例而言，截短天然 VEGF 中胺基酸位置 17(甲硫胺酸)亦為天然 VEGF 中之位置 17(甲硫胺酸)。截短天然 VEGF 對 KDR 及 Flt-1 受體具有可與天然序列 VEGF 相比之結合親和力。

"VEGF 拮抗劑"係指能夠中和、阻斷、抑制、消除、降低或干擾天然序列 VEGF 之活性(包括其與一或多個 VEGF 受體之結合)的分子(肽基或非肽基)。VEGF 拮抗劑包括抗 VEGF 抗體及其抗原結合片段、與 VEGF 特異性結合從而隔絕 VEGF 與一或多個受體(例如，可溶性 VEGF 受體蛋白或其 VEGF 結合片段或嵌合 VEGF 受體蛋白)結合之受體分子及衍生物、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)及融合蛋白(例如，VEGF-Trap(Regeneron)、VEGF₁₂₁-介樂寧(gelonin)(Peregrine))。VEGF 拮抗劑亦包括 VEGF 之拮抗劑變異體、針對 VEGF 之反義分子、RNA 適體及針對 VEGF 或 VEGF 受

體之核糖酶。適用於本發明方法中之 VEGF 拮抗劑進一步包括特異性結合 VEGF 之肽基或非肽基化合物，諸如抗 VEGF 抗體及其抗原結合片段、與 VEGF 特異性結合之多肽或其片段；與編碼 VEGF 多肽之核酸分子之至少一個片段互補的反義核鹼基寡聚物；與編碼 VEGF 多肽之核酸分子之至少一個片段互補的小 RNA；靶向 VEGF 之核糖酶；針對 VEGF 之肽體；及 VEGF 適體。在一實施例中，VEGF 拮抗劑將 VEGF 之表現量或生物活性降低或抑制至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90% 或更多。在另一實施例中，受 VEGF 拮抗劑抑制之 VEGF 為 VEGF(8-109)、VEGF(1-109) 或 VEGF₁₆₅。

術語 "抗 VEGF 抗體" 或 "與 VEGF 結合之抗體" 係指能夠以足夠親和力及特異性與 VEGF 結合以使得抗體在靶向 VEGF 時適用作診斷劑及 / 或治療劑的抗體。舉例而言，本發明之抗 VEGF 抗體可用作靶向及干擾涉及 VEGF 活性之疾病或病狀的治療劑。參見例如美國專利 6,582,959、6,703,020；WO 98/45332、WO 96/30046、WO 94/10202、WO 2005/044853；EP 0666868B1；美國專利申請案 20030206899、20030190317、20030203409、20050112126、20050186208 及 20050112126；Popkov 等人，*Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004)；及 WO 2005012359。所選抗體通常將具有足夠強之對 VEGF 之結合親和力，例如，抗體可以 100 nM-1 pM 之間的 K_d 值結合 hVEGF。抗體親和力可藉由 (例如) 基於表面電漿共振之檢定 (諸如，如 PCT 申請

公開案第 WO 2005/012359 號中所述之 BIAcore™ 檢定)、酶聯免疫吸附檢定(ELISA)及競爭檢定(例如, RIA's)來測定。可使抗體經受其他生物活性檢定(例如)以評估其作為治療劑之有效性。該等檢定在此項技術中已知且取決於標靶抗原及抗體之預定用途。實例包括 HUVEC 抑制檢定; 腫瘤細胞生長抑制檢定(如(例如)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)檢定(美國專利 5,500,362); 及促效活性或血細胞生成檢定(參見 WO 95/27062)。抗 VEGF 抗體通常並不與諸如 VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 或 VEGF-E 之其他 VEGF 同源物結合, 亦不與諸如 PlGF、PDGF 或 bFGF 之其他生長因子結合。在一實施例中, 抗 VEGF 抗體包括與由融合瘤 ATCC HB 10709 產生之單株抗 VEGF 抗體 A4.6.1 結合相同抗原決定基的單株抗體; 根據 Presta 等人, (1997) Cancer Res. 57:4593-4599 產生之重組人化抗 VEGF 單株抗體, 包括(但不限於)稱為 "貝伐單抗(BV)" 之抗體, 亦稱為 "rhuMAb VEGF" 或 "AVASTIN®"。貝伐單抗包含突變型人類 IgG1 構架區及來自阻斷人類 VEGF 與其受體結合之鼠類抗 hVEGF 單株抗體 A.4.6.1 的抗原結合互補判定區。貝伐單抗胺基酸序列之約 93%(包括大部分構架區)係來源於人類 IgG1, 且序列之約 7% 係來源於鼠類抗體 A4.6.1。貝伐單抗具有約 149,000 道爾頓之分子質量且經糖基化。貝伐單抗及其他人化抗 VEGF 抗體進一步描述於 2005 年 2 月 26 日頒予之美國專利第 6,884,879 號中。其他較佳抗體包括如 PCT 申請公開案第

WO 2005/012359號中所述之G6或B20系列抗體(例如, G6-23、G6-31、B20-4.1)。關於其他較佳抗體, 請參見美國專利第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)。

根據本發明之"G6系列抗體"為來源於根據PCT申請公開案第WO 2005/012359號之圖7、24-26及34-35中之任一者的G6抗體或G6來源之抗體之序列的抗VEGF抗體。

"造血幹細胞/祖細胞"或"原始造血細胞"為能夠分化形成更定型或成熟之血細胞類型的細胞。"淋巴血細胞譜系"為能夠分化形成淋巴細胞(B細胞或T細胞)之彼等造血前驅細胞。同樣,"淋巴細胞生成"為淋巴細胞之形成。"紅血細胞譜系"為能夠分化形成紅血球(紅血細胞)之彼等造血前驅細胞且"紅血球生成"為紅血球之形成。

為達成本文之目的, 短語"骨髓血細胞譜系"包涵除如上定義之淋巴血細胞譜系及紅血細胞譜系以外的所有造血祖細胞, 且"骨髓生成"包含血細胞(除淋巴細胞及紅血球以外)之形成。

骨髓細胞群體可富集於骨髓免疫細胞Gr1+/CD11b+(或CD11b+Gr1+)或Gr1+/Mac-1+中。此等細胞表現巨噬細胞譜系之骨髓細胞的標記物CD11b及粒細胞之標記物Gr1。

可藉由免疫黏附淘選(例如)使用針對Gr1+之抗體來選擇Gr1+/CD11b+。

"骨髓細胞減少劑"係指減少或除去骨髓細胞群體之藥劑。通常，骨髓細胞減少劑將減少或除去骨髓細胞、CD11b+Gr1+、單核細胞、巨噬細胞等。骨髓細胞減少劑之實例包括(但不限於)Gr1拮抗劑、CD11b拮抗劑、CD18拮抗劑、彈性蛋白酶抑制劑、MCP-1拮抗劑、MIP-1 α 拮抗劑等。

術語"Gr1拮抗劑"在用於本文中時係指與Gr1結合且抑制或實質上降低Gr1之生物活性之分子。Gr1拮抗劑之非限制性實例包括抗體、蛋白質、肽、醣蛋白、醣肽、醣脂、多糖、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、醫藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。在本發明之一實施例中，Gr1拮抗劑為抗體，尤其為結合人類Gr1之抗Gr1抗體。

術語"CD11b拮抗劑"在用於本文中時係指與CD11b結合且抑制或實質上降低CD11b生物活性之分子。通常，該拮抗劑將阻斷(部分或完全)細胞(例如，未成熟骨髓細胞)在其細胞表面表現CD11b次單元以與內皮結合之能力。CD11b拮抗劑之非限制性實例包括抗體、蛋白質、肽、醣蛋白、醣肽、醣脂、多糖、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、醫藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。在本發明之一實施例中，CD11b拮抗劑為抗體，尤其結合人類CD11b之抗CD11b抗體。例示性CD11b抗體

包括 MY904(美國專利第 4,840,793 號)、1B6c(參見 Zhang 等人, *Brain Research* 698:79-85 (1995)) ; CBRN1/5 及 CBRM1/19(WO 94/08620)。

術語 "CD18 拮抗劑" 在用於本文中時係指與 CD18(較佳人類 CD18) 結合且抑制或實質上降低 CD18 生物活性之分子。通常, 該拮抗劑將阻斷(部分或完全)細胞(例如, 嗜中性白血球)在其細胞表面表現 CD18 次單元以與內皮結合之能力。CD18 拮抗劑之非限制性實例包括抗體、蛋白質、肽、醣蛋白、醣肽、醣脂、多醣、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、醫藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。在本發明之一實施例中, CD18 拮抗劑為抗體。

抗 CD18 抗體之實例包括 MHM23(Hildreth 等人, *Eur. J. Immunol.* 13:202-208 (1983)) ; M18/2(IgG_{2a} ; Sanches-Madrid 等人, *J. Exp. Med.* 158:586-602 (1983)) ; H52(美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC) 寄存編號 HB 10160) ; Mas191c 及 1OT18(Vermot Desroches 等人, *Scand. J. Immunol.* 33:277-286 (1991)) ; 及 NA-8(WO 94/12214)。在一實施例中, 抗體為與 MHM23 或 H52 所結合之 CD18 抗原決定基結合的抗體。在本發明之一實施例中, 抗體對 CD18 多肽具有高度親和力。在某些實施例中, 抗體可結合與 CD11b 締合之 CD18 胞外域中之區域, 且抗體亦可解離 α 及 P 鏈(例如, 抗體可解離 CD11b 與 CD18 複合物, 對於 MHM23 抗體而言為如此)。

單核細胞趨化蛋白(MCP-1)為參與先天免疫及Th2效應反應及CD4+ T細胞分化之趨化因子。參見例如Paul, W. E., *Fundamental Immunology*, 第5版, Lippincott Williams & Wilkins, (Philadelphia, 2003)第801-840頁。

術語"MCP-1拮抗劑"在用於本文中時係指與MCP-1結合且抑制或實質上降低MCP-1生物活性之分子。MCP-1拮抗劑之非限制性實例包括抗體、蛋白質、肽、醣蛋白、醣肽、醣脂、多醣、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、醫藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。在本發明之一實施例中，MCP-1拮抗劑為抗體，尤其結合人類MCP-1之抗MCP-1抗體。

巨噬細胞發炎性蛋白 α 及 β (MIP-1 α 及 β)為已知趨化因子。MIP-1 α 參與先天免疫及Th1效應反應及CD4+ T細胞分化。參見例如Paul, W. E., *Fundamental Immunology*, 第5版, Lippincott Williams & Wilkins, (Philadelphia, 2003)第801-840頁。

術語"MIP-1 α 拮抗劑"在用於本文中時係指與MIP-1 α 結合且抑制或實質上降低MIP-1 α 生物活性之分子。MIP-1 α 拮抗劑之非限制性實例包括抗體、蛋白質、肽、醣蛋白、醣肽、醣脂、多醣、寡醣、核酸、生物有機分子、肽模擬物、醫藥劑及其代謝物、轉錄及轉譯控制序列及其類似物。在本發明之一實施例中，MIP-1 α 拮抗劑為抗體，尤其結合人類MIP-1 α 之抗MIP-1 α 抗體。

"URCGP"係指在來自抗VEGF抗性腫瘤之CD11b+Gr+1細

胞中受到上調的蛋白質。URCGP包括(但不限於)嗜中性白血球彈性蛋白酶、CD14、expi、IL-13R、LDLR、TLR-1、RLF、Endo-Lip、SOCS13、FGF13、IL-4R、IL-11R、IL-1RII、IFN TM1、TNFRSF18、WNT5A、分泌載體膜1、HSP86、EGFR、EphRB2、GPCR25、HGF、類血管生成素-6、Eph-RA7、信號素V1b(Semaphorin V1b)、神經營養素5、密蛋白-18(Claudin-18)、MDC15、ECM及ADAMTS7B。在某些實施例中，URCGP係指IL-13R、TLR-1、Endo-Lip、FGF13及/或IL-4R。

"DRCGP"係指在來自抗VEGF抗性腫瘤之CD11b+Gr1+細胞中受到下調的蛋白質。DRCGP包括(但不限於)THBS1、Crea7、水通道蛋白-1(Aquaporin-1)、溶質載體家族蛋白(SCF38)、載脂蛋白E(APOE)、脂肪酸結合蛋白(FABP)、NCAM-140、纖維結合蛋白III型、WIP、CD74、ICAM-2、Jagged1、Itga4、ITGB7、TGF-BII-R、TGFb IEP、Smad4、BMPRI1A、CD83、凝集素結合蛋白-1(Dectin-1)、CD48、E-選擇素(E-selectin)、IL-15、細胞因子信號轉導抑制物4、Cytos4及CX3CR1。在某些實施例中，DRCGP係指THBS1及/或Crea7。

"URRTP"係指在抗VEGF抗性腫瘤中受到上調的蛋白質。URRTP包括(但不限於)Notch2、DMD8、MCP-1、ITGB7、G-CSF、IL-8R、MIP2、MSCA、GM-CSF、IL-1R、Meg-SF、HSP1A、IL-1R、G-CSFR、IGF2、HSP9A、FGF18、ELM1、Ldga、清道夫受體A型、巨噬細胞C-型

凝集素、Pigr3、巨噬細胞SRT-1、G蛋白偶合受體、ScyA7、IL-1R2、IL-1誘導蛋白、IL-1 β 及IL1X前驅體。在某些實施例中，URRTP係指MSCA、MIP2、IL-8R及/或G-CSF。

"DRRTP"係指在抗VEGF抗性之腫瘤中受到下調的蛋白質。URRTP包括(但不限於)IL10-R2、Erb-2.1、窖蛋白3(Caveolin3)、Semcap3、INTG4、THBSP-4、ErbB3、JAM、Eng、JAM、Eng、JAM-2、Pecam1、Tlr3、TGF-B、FIZZ1、Wfs1、TP 14A、EMAP、SULF-2、胞外基質2、CTFG、TFPI、XCP2、Ramp2、ROR- α 、Ephrin B1、類SPARC 1及信號素A。在某些實施例中，DRRTP係指IL10-R2、THBSP-4及/或JAM-2。

術語"偵測"以最廣泛意義使用以包括對標靶分子之定性及定量量測。

術語"生物樣品"係指來自任何動物，但較佳來自哺乳動物，更佳來自人類之身體樣品。該等樣品包括生物流體，諸如血液、血清、血漿、骨髓、玻璃體液、淋巴液、滑液、卵泡液、精液、羊水、乳汁、全血、尿、腦脊液、唾液、痰、淚、汗、黏液及組織培養基以及組織提取物(諸如，勻化組織)及細胞提取物。本文中較佳生物樣品為血清、血漿、尿或骨髓樣品。

術語"抗體"以最廣泛意義使用且尤其涵蓋單株抗體(包括全長或完整單株抗體)、多株抗體、多價抗體、由至少兩個完整抗體形成之多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)及

抗體片段(見下文)，只要該等抗體片段展現所需生物活性即可。

除非另外指示，否則表述"多價抗體"在整個本說明書中用以表示包含三個或三個以上抗原結合位點之抗體。多價抗體通常經工程化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。本發明之定義所涵蓋之抗體片段的實例包括：(i) Fab片段，其具有VL、CL、VH及CH1域；(ii) Fab'片段，其為在CH1域之C-末端具有一或多個半胱胺酸殘基之Fab片段；(iii) Fd片段，其具有VH及CH1域；(iv) Fd'片段，其具有VH及CH1域且在CH1域之C-末端具有一或多個半胱胺酸殘基；(v) Fv片段，其具有抗體之單臂之VL及VH域；(vi) dAb片段(Ward等人，*Nature* 341, 544-546 (1989))，其由VH域組成；(vii)經分離CDR區；(viii) F(ab')₂片段，其為包括兩個在鉸鏈區由雙硫橋連接之Fab'片段的二價片段；(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"，其在同一多肽鏈中包含與輕鏈可變域(VL)連接之重鏈可變域(VH)(參見例如EP 404,097；WO 93/11161；及Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993))；(xi) "線性抗體"，其包含一對串聯Fd區段(VH-

CH1-VH-CH1)，該對串聯Fd區段連同互補輕鏈多肽一起形成抗原結合區對(Zapata等人，*Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)；及美國專利第5,641,870號)。

如本文所用之術語"單株抗體"係指自一群實質上同源之抗體獲得之抗體，亦即構成此群體之個別抗體除可以微量存在之可能突變(例如，天然存在之突變)外均相同。因此，修飾語"單株"表明抗體並非為離散抗體之混合物的特徵。單株抗體具有針對單一抗原之高度特異性。在某些實施例中，單株抗體通常包括包含結合標靶之多肽序列之抗體，其中藉由包括自複數個多肽序列選擇單個標靶結合多肽序列的方法來獲得該標靶結合多肽序列。舉例而言，選擇方法可為自複數個純系(諸如，融合瘤純系、噬菌體純系或重組DNA純系之池)選擇獨特純系。應瞭解所選標靶結合序列可進一步經改變(例如)以改良對標靶之親和力、使標靶結合序列人化、改良其在細胞培養物中之產生、降低其在活體內之免疫原性、產生多特異性抗體等，且包含經改變標靶結合序列的抗體亦為本發明之單株抗體。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不同，各單株抗體針對抗原上之單個決定子。除其特異性外，單株抗體製劑亦因其通常未受其他免疫球蛋白污染而有利。

修飾語"單株"表明抗體係自實質上同源之抗體群體獲得之特徵，且不應理解為需要藉由任何特定方法產生該抗體。舉例而言，根據本發明待使用之單株抗體可藉由多種

技術製備，該等技術包括(例如)融合瘤方法(例如，Kohler 及 Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975)；Hongo 等人，*Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995)；Harlow 等人，*Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press，第2版1988)；Hammerling 等人，*Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、重組DNA方法(參見例如美國專利第4,816,567號)、噬菌體呈現技術(參見例如 Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)；Marks 等人，*J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991)；Sidhu 等人，*J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004)；Lee 等人，*J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004)；及 Lee 等人，*J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004))及用於在具有編碼人類免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白基因座或基因之部分或全部的動物中產生人類或類人抗體的技術(參見例如 WO 1998/24893、WO 1996/34096、WO 1996/33735、WO 1991/10741；Jakobovits 等人 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993)；Jakobovits 等人，*Nature* 362: 255-258 (1993)；Bruggemann 等人，*Year in Immunol.* 7:33 (1993)；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號及第5,661,016號；Marks 等人，*Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)；Lonberg 等人，*Nature* 368: 856-859 (1994)；

Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994) ; Fishwild 等人 ,
Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996) ; Neuberger, *Nature
 Biotechnol.* 14: 826 (1996) ; 及 Lonberg 及 Huszar, *Intern.
 Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)) 。

本文中單株抗體尤其包括"嵌合"抗體(其中重鏈及/或輕鏈之一部分與來源於特定物種或屬於特定抗體類別或子類之抗體中的相應序列一致或同源, 而鏈之剩餘部分與來源於另一物種或屬於另一抗體類別或子類之抗體中的相應序列一致或同源)以及該等抗體之片段, 只要其展現所需生物活性即可(美國專利第4,816,567號; 及 Morrison 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984))。

"人化"形式之非人類(例如, 鼠類)抗體為含有來源於非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。在很大程度上, 人化抗體為來自接受者高變區之殘基係經來自非人類物種(供體抗體)(諸如, 小鼠、大鼠、兔或具有所需特異性、親和力及容量之非人類靈長類動物)高變區之殘基置換的人類免疫球蛋白(接受者抗體)。在某些情況下, 人類免疫球蛋白之構架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外, 人化抗體可包含在接受者抗體或供體抗體中不存在之殘基。進行此等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言, 人化抗體將包含實質上全部之至少一個且通常兩個可變域, 其中全部或實質上全部高變環對應於非人類免疫球蛋白之彼等高變環且全部或實質上全部FR為人類免疫球蛋白序列之彼等FR。人化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區

(Fc)(通常為人類免疫球蛋白之免疫球蛋白恆定區)之至少一部分。進一步詳情請參見 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) 。亦參見例如 Vaswani 及 Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998) ; Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995) ; Hurle 及 Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994) ; 及美國專利第 6,982,321 號及第 7,087,409 號。亦參見 van Dijk 及 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001) 。人類抗體可藉由將抗原投與經修飾以回應抗原激發而產生該等抗體但已使其內源基因座失效之轉殖基因動物(例如, 經免疫之異種小鼠)來製備(關於 XENOMOUSE™ 技術, 請參見例如美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,584 號)。關於經由人類 B 細胞融合瘤技術產生人類抗體, 亦請參見例如 Li 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) 。

"人類抗體"為具有對應於由人類產生之抗體之胺基酸序列的胺基酸序列及/或已使用如本文揭示用於製備人類抗體之任何技術來製備的抗體。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化抗體。人類抗體可使用此項技術中已知之各種技術來產生。在一實施例中, 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, *PNAS (USA)* 95:6157-6162 (1998) ;

Hoogenboom 及 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991) ; Marks 等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991))。亦可藉由將人類免疫球蛋白基因座引入轉殖基因動物(例如, 已使內源免疫球蛋白基因部分或完全失活之小鼠)中來製備人類抗體。在激發後, 觀測到人類抗體產生, 其在所有方面(包括基因重排、裝配及抗體譜系)均與人類中所見之抗體極為類似。此方法描述於(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, 及以下科學公開案中: 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, 可經由使產生針對標靶抗原之抗體的人類 B 淋巴細胞永生化來製備人類抗體(該等 B 淋巴細胞可自個體回收或可已在活體外經免疫)。參見例如 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。

術語"可變"係指可變域之某些部分在抗體間序列廣泛不同且用於各特定抗體對其特定抗原之結合及特異性的事實。然而, 可變性在整個抗體可變域中並非均勻分布。其在輕鏈可變域及重鏈可變域中均集中於三個稱為高變區之

區段中。可變域之更高度保守之部分稱為構架區(FR)。天然重鏈及輕鏈之可變域各自包含四個FR區，該等FR區主要採用 β 摺疊片狀構型，由三個高變區連接，該等高變區形成環連接且在某些狀況下形成 β 摺疊片狀結構之部分。各鏈中之高變區藉由FR緊密固持在一起，且與來自另一鏈之高變區一起促進形成抗體之抗原結合位點(參見Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。恆定域不直接參與抗體與抗原之結合，但展現各種效應功能，諸如抗體依賴性細胞毒性中抗體之參與。

術語"高變區"、"HVR"或"HV"在用於本文中時係指抗體中負責抗原結合之胺基酸殘基。舉例而言，術語高變區係指抗體可變域中序列高變及/或在結構上形成確定環的區域。一般而言，抗體包含六個HVR；三個在VH中(H1、H2、H3)且三個在VL中(L1、L2、L3)。在天然抗體中，H3及L3顯示六個HVR中之最高多樣性，且咸信尤其H3在賦予針對抗體之良好特異性中起獨特作用。參見例如Xu等人，*Immunity* 13:37-45 (2000)；Johnson及Wu，*Methods in Molecular Biology* 248:1-25(Lo編，Human Press, Totowa, NJ, 2003)。實際上，僅由重鏈組成之天然存在之駱駝抗體(camelid antibody)在缺乏輕鏈之情況下具有功能性且穩定。參見例如Hamers-Casterman等人，*Nature* 363:446-448 (1993)；Sheriff等人，*Nature Struct. Biol.* 3:733-736

(1996)。

本文中使用的且包涵許多關於HVR之描繪。Kabat互補判定區(CDR)係基於序列可變性且最常使用(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。另外, Chothia指出結構環之位置(Chothia及Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))。AbM HVR代表Kabat HVR與Chothia結構環之間的折衷, 且為Oxford Molecular之AbM抗體模型化軟體所用。"接觸" HVR係基於對可獲得複雜晶體結構的分析。以下註釋來自此等HVR中之每一者的殘基。

環	Kabat	AbM	Chothia	接觸
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B(Kabat編號))
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35(Chothia編號)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVR可包含如下"擴展HVR": VL中之24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)及89-97或89-96(L3), 及VH中26-35(H1)、50-65或49-65(H2)及93-102、94-102或95-102(H3)。可變域殘基係根據Kabat等人(見上文)關於此等定義中之每一者來編號。

"構架區"或"FR"殘基為除如本文所定義之高變區殘基以外之彼等可變域殘基。

術語"如 Kabat 中之可變域殘基編號"或"如 Kabat 中之胺基酸位置編號"及其變化形式係指 Kabat 等人(見上文)中對於抗體彙編之重鏈可變域或輕鏈可變域所用的編號系統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有對應於使可變域之 FR 或 HVR 縮短或插入其中的更少或額外胺基酸。舉例而言，重鏈可變域可包括在 H2 之殘基 52 後插入之單個胺基酸(根據 Kabat 為殘基 52a)及在重鏈 FR 殘基 82 後插入之殘基(例如，根據 Kabat 為殘基 82a、82b 及 82c 等)。藉由在同源區將抗體序列與"標準" Kabat 編號序列比對，可確定給定抗體之殘基的 Kabat 編號。

在整個本說明書及申請專利範圍中，當提及可變域中之殘基(大致為輕鏈之殘基 1-107 及重鏈之殘基 1-113)時一般使用 Kabat 編號系統(例如 Kabat 等人，*Sequences of Immunological Interest*。第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。當提及免疫球蛋白重鏈恆定區中之殘基時，一般使用"EU 編號系統"或"EU 索引"(例如以引用的方式明確併入本文中之 Kabat 等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第 5 版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中所報導之 EU 索引)。除非本文中另有說明，否則提及抗體可變域中之殘基編號意謂藉由 Kabat 編號系統編號之殘基。除非本文中另有說明，否則提及抗體恆定域中之殘基編號意謂藉由 EU 編號系統編號之殘基(例如，參見美國臨時申請案第 60/640,323 號，

EU編號之圖)。

視抗體重鏈恆定域之胺基酸序列而定，抗體(免疫球蛋白)可歸於不同類別。存在五個主要免疫球蛋白類別：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且此等免疫球蛋白中之若干者可進一步分成子類(同型)，例如IgG1(包括非A及A異型)、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同免疫球蛋白類別之重鏈恆定域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同類別免疫球蛋白之次單元結構及三維構型為吾人所熟知且一般性描述於(例如)Abbas等人，*Cellular and Mol. Immunology*，第4版(W.B. Saunders, Co., 2000)中。抗體可為由抗體與一或多個其他蛋白質或肽共價或非共價締合而形成之較大融合分子之部分。

來自任何脊椎動物物種之抗體(免疫球蛋白)之"輕鏈"可基於其恆定域之胺基酸序列而歸於稱為 κ 及 λ 的兩種明顯不同類型中之一者。

術語"Fc區"用以定義免疫球蛋白重鏈之C末端區，其可藉由以木瓜蛋白酶消化完整抗體來產生。Fc區可為天然序列Fc區或變異型Fc區。雖然免疫球蛋白重鏈之Fc區之邊界可改變，但人類IgG重鏈Fc區通常定義為自約Cys226位置上之胺基酸殘基或自約Pro230位置伸展至該Fc區之羧基末端。Fc區之C末端離胺酸(根據EU編號系統為殘基447)可(例如)在抗體產生或純化期間或藉由將編碼抗體重鏈之核酸重組工程化來移除。因此，完整抗體之組成可包含所有K447殘基經移除之抗體群體、K447殘基未移除之抗體群

體及具有含K447殘基之抗體與無K447殘基之抗體的混合物之抗體群體。免疫球蛋白之Fc區一般包含兩個恆定域CH2域及CH3域，且視情況包含CH4域。

除非本文中另外指示，否則免疫球蛋白重鏈中殘基之編號為如Kabat等人(見上文)中的EU索引之編號。"如Kabat中之EU索引"係指人類IgG1 EU抗體之殘基編號。

本文中"Fc區鏈"意謂Fc區之兩條多肽鏈中之一者。

人類IgG Fc區之"CH2域"(亦稱為"Cg2"域)通常自約231位置上之胺基酸殘基延伸至約340位置上之胺基酸殘基。CH2域因其並不與另一域緊密配對而獨特。實際上，兩條N-連接之分枝碳水化合物鏈插入完整天然IgG分子之兩個CH2域之間。已推測碳水化合物可能提供對域-域配對之取代且有助於使CH2域穩定。Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)。本文中CH2域可為天然序列CH2域或變異型CH2域。

"CH3域"包含Fc區中CH2域之C末端的一段殘基(亦即，自IgG之約341位置上之胺基酸殘基至約447位置上之胺基酸殘基)。本文中之CH3區可為天然序列CH3域或變異型CH3域(例如，在一鏈中引入"隆突"且相應地在另一鏈中引入"空穴"之CH3域；參見美國專利第5,821,333號，其以引用的方式併入明確本文中)。該等變異型CH3域可用以製備如本文所述之多特異性(例如，雙特異性)抗體。

"鉸鏈區"一般定義為自人類IgG1之約Glu216或約Cys226伸展至約Pro230(Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206

(1985))。藉由將形成重鏈間S-S鍵之第一及最後半胱胺酸殘基置放於同一位置，可將其他IgG同型之鉸鏈區與IgG1序列對準。本文中之鉸鏈區可為天然序列鉸鏈區或變異型鉸鏈區。變異型鉸鏈區之兩條多肽鏈一般每一多肽鏈保留至少一個半胱胺酸殘基，以便變異型鉸鏈區之兩條多肽鏈可在兩條鏈之間形成二硫鍵。本文中之較佳鉸鏈區為天然序列人類鉸鏈區，例如天然序列人類IgG1鉸鏈區。

"功能性Fc區"具有天然序列Fc區之至少一種"效應功能"。例示性"效應功能"包括C1q結合、補體依賴性細胞毒性(CDC)、Fc受體結合、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、吞噬作用、下調細胞表面受體(例如，B細胞受體；BCR)等。該等效應功能一般需要使Fc區與結合域(例如，抗體可變域)組合且可使用此項技術中已知用於評估該等抗體效應功能之各種檢定來評估。

"天然序列Fc區"包含與自然界中存在之Fc區的胺基酸序列一致之胺基酸序列。天然序列人類Fc區包括天然序列人類IgG1 Fc區(非A及A異型)、天然序列人類IgG2 Fc區、天然序列人類IgG3 Fc區及天然序列人類IgG4 Fc區以及其天然存在之變異體。

"完整"抗體為包含抗原結合可變區以及輕鏈恆定域(CL)及重鏈恆定域CH1、CH2及CH3的抗體。恆定域可為天然序列恆定域(例如，人類天然序列恆定域)或其胺基酸序列變異體。完整抗體較佳具有一或多種效應功能。

"親本抗體"或"野生型"抗體為包含與如本文所揭示之抗

體變異體相比缺乏一或多個胺基酸序列改變之胺基酸序列的抗體。因此，親本抗體一般具有胺基酸序列與如本文所揭示之抗體變異體之相應高變區的胺基酸序列不同之至少一個高變區。親本多肽可包含天然序列(亦即，天然存在)抗體(包括天然存在之等位基因變異體)或具有預先存在的對天然存在之序列之胺基酸序列修飾(諸如，插入、缺失及/或其他改變)的抗體。在整個本揭示案中，"野生型"、"WT"、"wt"及"親本"抗體可互換使用。

如本文所用之"抗體變異體"或"變異型抗體"係指具有與親本抗體之胺基酸序列不同的胺基酸序列之抗體。較佳地，抗體變異體包含具有在自然界中不存在之胺基酸序列之重鏈可變域或輕鏈可變域。該等變異體與親本抗體必定具有小於100%之序列一致性或相似性。在一較佳實施例中，抗體變異體將具有與親本抗體之重鏈或輕鏈可變域之胺基酸序列有75%至小於100%、更佳約80%至小於100%、更佳約85%至小於100%、更佳約90%至小於100%且最佳約95%至小於100%胺基酸序列一致性或相似性的胺基酸序列。抗體變異體一般為在一或多個高變區中包含一或多個胺基酸改變或包含與一或多個高變區鄰接之一或多個胺基酸改變的抗體。

"變異型Fc區"包含由於至少一個胺基酸修飾而與天然序列Fc區之胺基酸序列不同的胺基酸序列。在某些實施例中，與天然序列Fc區或親本多肽之Fc區相比，變異型Fc區具有至少一個胺基酸取代，例如在天然序列Fc區或親本多

肽之Fc區中具有約1至約10個胺基酸取代且較佳具有約1至約5個胺基酸取代，例如在天然序列Fc區或親本多肽之Fc區中具有約1至約10個胺基酸取代且較佳具有約1至約5個胺基酸取代。本文中之變異型Fc區將通常與天然序列Fc區及/或親本多肽之Fc區具有(例如)至少約80%序列一致性，或與其具有至少約90%序列一致性，或與其具有至少約95%或更高序列一致性。

抗體"效應功能"係指可歸因於抗體之Fc區(天然序列Fc區或胺基酸序列變異型Fc區)之彼等生物活性且會隨抗體同型而變。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性(CDC)、Fc受體結合、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)、吞噬作用、下調細胞表面受體(例如，B細胞受體)及B細胞活化。

"抗體依賴性細胞介導之細胞毒性"或"ADCC"係指細胞毒性之一種形式，其中結合至存在於某些細胞毒性細胞(例如，自然殺手(NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)上之Fc受體(FcR)的分泌型Ig使此等細胞毒性效應細胞能夠與帶有抗原之標靶細胞特異性結合且隨後用細胞毒素殺死該標靶細胞。用於介導ADCC之原生細胞NK細胞僅表現FcγRIII，而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。造血細胞上之FcR表現概述於Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)第464頁之表3中。為評估所關注分子之ADCC活性，可執行活體外ADCC檢定，諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中所述之檢定。用於該

等檢定之適用效應細胞包括周圍血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。或者或另外，可在活體內(例如動物模型中，諸如 Clynes等人，*PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)中揭示之動物模型中)評估所關注分子之ADCC活性。

"人類效應細胞"為表現一或多種FcR且執行效應功能之白血球。在某些實施例中，該等細胞至少表現FcγRIII且執行ADCC效應功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括周圍血液單核細胞(PBMC)、自然殺手(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球；一般以PBMC及NK細胞為較佳。效應細胞可自其天然來源(例如，血液或如本文所述之PBMC)分離。

"Fc受體"或"FcR"描述一種與抗體之Fc區結合的受體。在一些實施例中，FcR為天然人類FcR。在一些實施例中，FcR為結合IgG抗體之受體(γ受體)且包括FcγRI、FcγRII及FcγRIII子類之受體，包括彼等受體之等位基因變異體及替代性拼接形式。FcγRII受體包括FcγRIIA("活化受體")及FcγRIIB("抑制受體")，其具有主要在其細胞質域方面有所不同之類似胺基酸序列。活化受體FcγRIIA在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之活化基元(ITAM)。抑制受體FcγRIIB在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元(ITIM)。(參見例如 Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。FcR在下列文獻中加以回顧：例如，Ravetch及Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)；Capel等人，*Immunomethods* 4:25-34 (1994)；及de

Haas等人，*J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)。包括未來待鑑別者之其他FcR涵蓋於本文之術語"FcR"中。

術語"Fc受體"或"FcR"亦包括新生受體FcRn，其負責將母體IgG轉移至胎兒(Guyer等人，*J. Immunol.* 117:587 (1976)及Kim等人，*J. Immunol.* 24:249 (1994))且調節免疫球蛋白之內穩定。已知量測與FcRn之結合之方法(參見例如Ghetie及Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie 等人，*Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton等人，*J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219(Hinton等人)。

可在例如表現人類FcRn之轉殖基因小鼠或經轉染人類細胞株中或在投與具有變異型Fc區之多肽之靈長類動物中檢定人類FcRn高親和力結合多肽在活體內與人類FcRn之結合及其血清半衰期。WO 2000/42072(Presta)描述具有經改良或減弱之與FcR之結合的抗體變異體。亦參見例如Shields等人，*J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)。

"補體依賴性細胞毒性"或"CDC"係指標靶細胞在補體存在下之溶解。藉由使補體系統之第一組份(C1q)結合至與其同源抗原結合之抗體(為合適子類)，引發典型補體路徑之活化。為評估補體活化，可執行(例如)如Gazzano-Santoro等人，*J. Immunol. Methods* 202:163(1996)中所述之CDC檢定。在例如美國專利第6,194,551 B1號及WO 1999/51642中描述具有改變之Fc區胺基酸序列(具有變異型Fc區之多肽)及增強或減低之C1q結合能力的多肽變異體。

亦參見例如 Idusogie 等人，*J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)。

"親和力成熟"抗體為一或多個CDR中具有一或多個改變之抗體，與不具有彼等改變之親本抗體相比，該等改變使抗體對抗原之親和力得以改良。在一實施例中，親和力成熟抗體對標靶抗原具有奈莫耳(nanomolar)或甚至皮莫耳(picomolar)之親和力。藉由此項技術中已知之程序產生親和力成熟抗體。Marks等人，*Bio/Technology* 10:779-783 (1992)描述藉由VH及VL域改組進行親和力成熟。CDR及/或構架殘基之隨機突變誘發係由以下文獻描述：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)。

本文中"可撓性連接子"係指包含兩個或兩個以上藉由肽鍵連接之胺基酸殘基之肽且提供其所連接之兩個多肽(諸如，兩個Fd區)更多旋轉自由度。該旋轉自由度允許由可撓性連接子連接之兩個或兩個以上抗原結合位點更有效地各自接近標靶抗原。合適可撓性連接子肽序列之實例包括gly-ser、gly-ser-gly-ser(SEQ ID NO: 34)、ala-ser及gly-gly-gly-ser(SEQ ID NO: 35)。

"二聚域"係由至少兩個胺基酸殘基(一般為半胱胺酸殘基)或至少兩個肽或多肽(其可具有相同或不同胺基酸序列)

之締合形成。肽或多肽可經由共價及/或非共價締合彼此相互作用。本文中二聚域之實例包括：Fc區；鉸鏈區；CH3域；CH4域；CH1-CL對；如以引用的方式明確併入本文中之美國專利第5,821,333號中所述，與工程化"球形突出物"及/或"隆突"之界面；白胺酸拉鏈(例如，jun/fos白胺酸拉鏈，參見Kostelney等人，*J. Immunol.*, 148: 1547-1553 (1992))；或酵母GCN4白胺酸拉鏈)；異白胺酸拉鏈；受體二聚體對(例如，介白素-8受體(IL-8R)；及整合素異源二聚體，諸如LFA-1及GPIIb/IIIa)或其二聚區；二聚配位體多肽(例如，神經生長因子(NGF)、神經營養素-3(NT-3)、介白素-8(IL-8)、血管內皮生長因子(VEGF)、VEGF-C、VEGF-D、PDGF成員及腦來源之神經營養性因子(BDNF)；參見Arakawa等人，*J. Biol. Chem.* 269(45): 27833-27839 (1994)及Radziejewski等人，*Biochem.* 32(48): 1350 (1993))，或其二聚區；能夠形成二硫鍵之半胱胺酸殘基對；肽或多肽對，各包含至少一個半胱胺酸殘基(例如，約1、2或3至約10個半胱胺酸殘基)以使得二硫鍵可在該等肽或多肽之間形成(下文中為"合成鉸鏈")；及抗體可變域。本文中最佳二聚域為Fc區或鉸鏈區。

抗體之"功能性抗原結合位點"為能夠結合標靶抗原之位點。雖然抗原結合位點之抗原結合親和力未必如抗原結合位點所來源之親本抗體般強，但結合抗原之能力須可使用已知用於評估抗體與抗原之結合的多種方法中之任一者量測。此外，本文中多價抗體之各抗原結合位點之抗原結合

親和力無須在數量上相同。對於本文中之多聚體抗體而言，可使用超速離心分析來評估功能性抗原結合位點之數目。根據此分析方法，組合不同比率之標靶抗原與多聚體抗體且計算出複合物之平均分子量，從而假定功能性結合位點之不同數目。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"之抗體為具有一或多個將其與結合相同抗原之其他抗體相區別的該抗體之生物學特徵之抗體。

為篩檢與由所關注抗體結合之抗原上的抗原決定基結合之抗體，可執行諸如 *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow及David Lane (1988)中描述之常規交叉阻斷檢定。

術語"抗原決定基"用以指蛋白質抗原上(單株或多株)抗體之結合位點。

"Bv8拮抗劑抗體"意謂作為如上文定義之Bv8拮抗劑且因此部分或完全阻斷、抑制或中和Bv8在腫瘤發展期間調節骨髓活動及/或促進血管生成之能力的抗體。

術語"Bv8免疫黏附素"可與術語"Bv8-免疫球蛋白嵌合體"互換使用且係指將至少一部分Bv8分子(天然或變異體)與免疫球蛋白序列組合之嵌合分子。免疫球蛋白序列較佳(但不一定)為免疫球蛋白恆定域。免疫黏附素可具有人類抗體之多種有價值化學及生物學性質。因為免疫黏附素可由具有與合適人類免疫球蛋白鉸鏈及恆定域(Fc)序列相關

之所需特異性的人類蛋白序列構築，所以所關注之結合特異性可完全使用人類組份實現。該等免疫黏附素對患者之免疫原性最低，且對於長期或重複使用而言為安全的。

已描述用於治療用途之同源多聚體免疫黏附素之實例包括用於阻斷HIV與細胞表面CD4結合的CD4-IgG免疫黏附素。自I期臨床試驗(其中向臨分娩之孕婦投與CD4-IgG)獲得之資料表明此免疫黏附素可用於預防HIV之母-胎轉移(Ashkenazi 等人，Intern. Rev. Immunol. 10:219-227 (1993))。亦已研發出結合腫瘤壞死因子(TNF)之免疫黏附素。TNF為促發炎性細胞因子，其展示作為敗血性休克之主要介體。基於敗血性休克之小鼠模型，TNF受體免疫黏附素展示有望成為臨床用於治療敗血性休克之候選藥物(Ashkenazi, A.等人，(1991) PNAS USA 88:10535-10539)。ENBREL®(依那西普(etanercept))(一種包含與IgG Fc區融合之TNF受體序列之免疫黏附素)經美國食品與藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration，FDA)於1998年11月2日批准用於治療類風濕性關節炎。ENBREL®在治療類風濕性關節炎方面之新擴展之用途經FDA於2000年6月6日批准。關於TNF阻斷劑(包括，ENBREL®)之最新資訊，請參見Lovell等人，N. Engl. J Med. 342: 763-169 (2000)，及第810-811頁上之隨附社論；及Weinblatt等人，N. Engl. J. Med. 340: 253-259 (1999)；Maini及Taylor, Annu. Rev. Med. 51: 207-229 (2000)中之回顧。

類似於雙特異性抗體，若免疫黏附素結構之兩個臂具有

不同特異性，則該免疫黏附素稱為"雙特異性免疫黏附素"。Dietsch等人，J. Immunol. Methods 162:123 (1993)描述組合黏附分子之胞外域、E-選擇素及P-選擇素的此類雙特異性免疫黏附素，該等選擇素中之每一者在自然界中表現於不同細胞類型中。結合研究表明與其所來源之單特異性免疫黏附素相比，所形成之雙特異性免疫球蛋白融合蛋白具有增強之結合骨髓細胞株之能力。

術語"異源黏附素"可與表述"嵌合異源多聚體黏附素"互換使用且係指嵌合分子(胺基酸序列)之複合物，其中各嵌合分子將生物活性部分(諸如，各異源多聚體受體單體之胞外域)與多聚域組合。"多聚域"促進異源多聚體複合物內嵌合分子之穩定相互作用。多聚域可經由免疫球蛋白序列、白胺酸拉鏈、疏水區、親水區或在嵌合異源多聚體之嵌合分子之間形成分子間二硫鍵之游離硫醇相互作用。多聚域可包含免疫球蛋白恆定區。此外，多聚區可經工程化，以使得空間相互作用不僅促進穩定相互作用，且亦進一步促進自單體混合物形成異源二聚體勝於同源二聚體。藉由用較大側鏈(例如，酪胺酸或色胺酸)置換來自第一多肽之界面之小胺基酸側鏈來構築"隆突"。視情況藉由用較小側鏈(例如，丙胺酸或蘇胺酸)置換大的胺基酸側鏈在第二多肽之界面上產生具有與隆突相同或相似大小之補償性"空穴"。免疫球蛋白序列較佳(但不一定)為免疫球蛋白恆定域。本發明嵌合體中之免疫球蛋白部分可自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亞型、IgA、IgE、IgD或IgM獲得，但

較佳為IgG1或IgG3。

如本文所用之"治療"為一種獲得有益或所需臨床結果之方法。為達成本發明之目的，有益或所需臨床結果包括(但不限於)舒緩症狀、減低疾病程度、穩定(亦即，不惡化)疾病病況、延遲或減緩疾病進程、改善或減輕疾病病況及好轉(無論部分還是全部)(無論為可偵測抑或不可偵測)。
"治療"亦可意謂當與未接收治療之情況下所預期之存活相比時存活延長。
"治療"係出於防止病症發展或改變病症病理之目的而進行之介入。因此，"治療"係指治療性治療與預防治療性或預防性措施兩者。需要治療者包括已患有病症者以及有待預防病症者。特定言之，治療可直接防止、減緩或以其他方式減少細胞變性或損害之病理學，諸如與骨髓細胞活動及/或腫瘤血管生成有關之疾病或病狀的病理學。

術語"有效量"或"治療有效量"係指有效治療哺乳動物中疾病或病症之藥物之量。在癌症之狀況下，有效量之藥物可減少癌細胞數目；減小腫瘤大小；抑制(亦即，在某種程度上減緩且通常停止)癌細胞浸潤至周圍器官；抑制(亦即，在某種程度上減緩且通常停止)腫瘤轉移；在某種程度上抑制腫瘤生長；允許治療抗性腫瘤；及/或在某種程度上減輕與癌症有關之一或多種症狀。在藥物可阻止生長及/或殺死已存在之癌細胞的程度上，藥物可抑制細胞生長及/或具有細胞毒性。對於癌症治療而言，活體內功效可(例如)藉由評估存活持續時間、疾病進程之時間(TTP)、

反應速率(RR)、反應持續時間及/或生活品質來量測。

"長期"投藥係指如與短暫模式相反，以連續模式投與藥劑，以便維持初始治療作用(活性)歷時延長時間段。"間歇"投藥為並非中斷而在本質上循環之不連續進行的治療。

出於治療之目的，"哺乳動物"係指歸類為包括人類、其他高級靈長類動物、齧齒動物、家畜及農場動物及動物園、運動或玩賞動物(諸如，小鼠、大鼠、犬、貓、牛、馬、綿羊、豬、山羊、兔等)之哺乳動物的任何動物。較佳地，哺乳動物為人類。

如本文所用之"腫瘤"係指所有贅生性細胞生長及增殖(無論為惡性抑或良性)及所有癌前及癌細胞及組織。

術語"癌症"及"癌"係指或描述哺乳動物中通常以不受調節之細胞生長為特徵的生理病狀。癌症之實例包括(但不限於)癌瘤、淋巴瘤、胚細胞瘤、肉瘤及白血病或淋巴惡性腫瘤。該等癌症之更特定實例包括腎癌、乳癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、肺癌(包括小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌及肺鱗狀細胞癌)、鱗狀細胞癌(例如，上皮鱗狀細胞癌)、頸癌、卵巢癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌(包括胃腸癌)、胃腸基質腫瘤(GIST)、胰腺癌、頭頸癌、神經膠母細胞瘤、視網膜母細胞瘤、星形細胞瘤、卵泡膜細胞瘤、男性細胞瘤、肝細胞瘤、血液惡性腫瘤(包括非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkins lymphoma)(NHL)、多發性骨髓瘤及急性血液惡性腫瘤)、子宮內膜或子宮癌、子宮內膜異位、纖維肉

瘤、絨膜癌、唾液腺癌、陰門癌、甲狀腺癌、食道癌、肝癌、肛門癌、陰莖癌、鼻咽癌、喉癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、黑色素瘤、皮膚癌、神經鞘瘤、少突神經膠質瘤、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、骨肉瘤、平滑肌肉瘤、尿道癌、甲狀腺癌、威姆氏腫瘤(Wilm's tumor)以及B細胞淋巴瘤(包括低度/濾泡性非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)；小淋巴細胞(SL)NHL；中度/濾泡性NHL；中度彌漫性NHL；高度免疫母細胞性NHL；高度淋巴母細胞性NHL；高度小非核裂細胞NHL；腫塊性病變NHL；套細胞淋巴瘤；AIDS相關之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；及移植後淋巴組織增生病症(PTLD)以及與母斑病、水腫(諸如，與腦腫瘤有關之水腫)及梅格斯氏症候群(Meigs's syndrome)有關之異常血管增殖。如本文所用之"腫瘤"係指所有贅生性細胞生長及增殖(無論為惡性抑或良性)及所有前癌及癌細胞及組織。

術語"抗性腫瘤"係指在癌症治療過程中對包含至少一種VEGF拮抗劑之癌症療法完全不起反應或喪失反應或展示降低之反應的癌症、癌細胞或腫瘤。抗性腫瘤亦指在本文中診斷為抗性之腫瘤(在本文中亦稱為"抗VEGF抗性腫瘤")。在某些實施例中，與對包括至少一種VEGF拮抗劑之療法敏感的腫瘤相比，抗性腫瘤中之CD11b+Gr1+細胞增加。

術語"抗贅生性組合物"係指適用於治療癌症之包含至少

一種活性治療劑(例如"抗癌劑")的組合物。治療劑(抗癌劑)之實例包括(但不限於)例如化學治療劑、生長抑制劑、細胞毒性劑、放射療法中使用之藥劑、抗血管生成劑、細胞凋亡劑、抗微管蛋白劑、毒素及其他治療癌症之藥劑，例如抗VEGF中和抗體、VEGF拮抗劑、抗-HER-2、抗-CD20、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、埃羅替尼(erlotinib)、COX-2抑制劑(例如，塞來考昔(celecoxib))、干擾素、細胞因子、與ErbB2、ErbB3、ErbB4或VEGF受體中一或多者結合之拮抗劑(例如，中和抗體)、血小板來源生長因子(PDGF)及/或幹細胞因子(SCF)之受體酪胺酸激酶之抑制劑(例如，甲磺酸伊馬替尼(imatinib mesylate)(Gleevec® Novartis))、TRAIL/Apo2及其他生物活性劑及有機化學劑等。其組合亦包括在本發明內。

如本文所用之術語"細胞毒性劑"係指抑制或阻礙細胞功能且/或引起細胞破壞之物質。該術語欲包括放射性同位素(例如， ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 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。

"生長抑制劑"在用於本文中時係指活體外及/或活體內抑制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期中之細胞百分比者。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進程(在除S期外之位置)之藥劑，諸如誘發G1

停滯及M期停滯之藥劑。經典M期阻斷劑包括長春花類(vincas)(長春新鹼(vincristine)及長春鹼(vinblastine))、TAXOL®及topo II抑制劑，諸如羥道諾紅黴素(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、道諾黴素(daunorubicin)、依託泊苷(etoposide)及博萊黴素(bleomycin)。彼等阻滯G1之藥劑亦造成S期停滯，例如DNA烷基化劑，諸如他莫昔芬(tamoxifen)、潑尼松(prednisone)、達卡巴嗪(dacarbazine)、氮芥(mechlorethamine)、順鉑(cisplatin)、甲胺喋呤(methotrexate)、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頁中。

"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：烷基化劑，諸如噻替派(thiotepa)及CYTOXAN®環磷醯胺；烷基磺酸鹽，諸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡巴醌(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)、三伸乙基三聚氰胺(triethylenemelamine)、三伸乙基磷醯胺(triethylenephosphoramidate)、三伸乙基硫代磷醯胺(triethylenethiophosphoramidate)及三甲蜜胺

(trimethylolomelamine)；多聚乙醯(acetogenins)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))； Δ -9-四氫大麻酚(delta-9-tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol, MARINOL®))； β -拉帕酮(beta-lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼(colchicine)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓朴替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊諾替康(irinotecan；CAMPTOSAR®)、乙醯基喜樹鹼(acetylcamptothecin)、斯考普萊叮(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚蟲素(bryostatin)；卡利斯塔叮(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)；足葉草毒素(podophyllotoxin)；足葉草酸(podophyllinic acid)；替尼泊甙(teniposide)；念珠藻環肽(cryptophycin)(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽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)；盤克斯塔叮(pancratistatin)；沙考的汀(sarcodictyin)；海綿抑素(spongistatin)；氮芥，諸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、荼氮芥(chlornaphazine)、環磷醯胺、雌氮芥(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、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)、新氮芥(novembichin)、膽固醇苯乙酸氮芥(phenesterine)、松龍苯芥(prednimustine)、曲洛磷胺

(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard)；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)及拉甯司汀(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 $\gamma 1$ 及刺孢黴素 $\omega 1$ (參見例如 Agnew, *Chem Intl. Ed. Engl.*, 33: 183-186 (1994))；達米辛(dynemicin)，包括達米辛 A；艾斯帕米辛(esperamicin)；以及新制癌菌素(neocarzinostatin)發色團及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)、阿克拉黴素(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、奧斯拉米辛(authramycin)、氮雜絲胺酸(azaserine)、博萊黴素、放線菌素 C(cactinomycin)、卡拉比辛(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌黴素(carzinophilin)、克羅米辛(chromomycinis)、放線菌素 D(dactinomycin)、道諾黴素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-正白胺酸、羥道諾紅黴素(包括 ADRIAMYCIN® N-嗎啉基-羥道諾紅黴素(morpholino-doxorubicin)、氰基 N-嗎啉基-羥道諾紅黴素(cyanomorpholino-doxorubicin)、2-N-吡咯基-羥道諾紅黴素、鹽酸羥道諾紅黴素脂質體注射液(DOXIL®)及脫氧羥道諾紅黴素(deoxydoxorubicin))、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)、佐柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤、吉西他賓(gemcitabine)(GEMZAR®)、替加氟(tegafur)(UFTORAL®)、卡西他賓(capecitabine)(XELODA®)、埃坡黴素(epothilone)及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤(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)、噻咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙脫氧尿苷(dideoxyuridine)、脫氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿核苷(floxuridine)；雄激素，諸如二甲睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitioanol)、美雄烷(mepitiothane)、睾內酯(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(frolinic acid)；

醋葡內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；伊利盧拉(eniluracil)；安吖啶(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)；地吖醯(diaziquone)；艾弗利散(elfornithine)；依利醋銨(elliptinium acetate)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂(gallium nitrate)；羥基脲(hydroxyurea)；香菇糖(lentinan)；羅尼達寧(lonidainine)；類美登素(maytansinoid)，諸如美登素(maytansine)及胺沙托辛(ansamitocins)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醯(mitoxantrone)；莫比達摩(mopidanmol)；硝拉維林(nitraerine)；噴司他丁(pentostatin)；凡那明(phenamet)；吡柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醯(losoxantrone)；2-乙基醯肼(2-ethylhydrazide)；普魯苳肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根黴菌素(rhizoxin)；西佐糖(sizofiran)；鍺螺旋胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醯(triaziquone)；2,2'-2''-三氯三乙基胺；單端孢黴烯族毒素(trichothecene)(尤其 T-2 毒素、弗納庫林 A(verracurin A)、桿孢菌素 A(roridin A)及胺癸叮(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(vindesine)(ELDISINE®、FILDESIN®)；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)；阿糖胞苷(arabinoside)("Ara-C")；噻替派；紫杉醇(taxoid)，例如太平洋紫杉醇(TAXOL®)；太平洋紫杉醇之白蛋白工程化奈米微粒調配物(ABRAXANETM)及多西他賽(doxetaxel)(TAXOTERE®)；克羅南布(chloranbucil)；6-硫鳥嘌呤(6-thioguanine)；巯基嘌呤(mercaptopurine)；甲胺喋呤；鉑類似物，諸如順鉑及卡鉑；長春花鹼(VELBAN®)；鉑；依託泊苷(VP-16)；異環磷醯胺；米托蒽醌(mitoxantrone)；長春新鹼(vincristine)(ONCOVIN®)；奧沙利鉑(oxaliplatin)；盧考弗文(leucovorin)；長春瑞賓(vinorelbine)(NAVELBINE®)；諾凡特龍(novantrone)；依達曲沙(edatrexate)；道諾黴素；胺基喋呤；伊班膦酸鹽(ibandronate)；拓撲異構酶抑制劑RFS 2000；二氟甲基鳥胺酸(difluoromethylornithine)(DMFO)；類視色素，諸如視黃酸(retinoic acid)；任何上述治療劑之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物；以及兩種或兩種以上上述治療劑之組合，諸如CHOP(環磷醯胺、羥道諾紅黴素、長春新鹼及潑尼松龍(prednisolone)之組合療法之縮寫)及FOLFOX(奧沙利鉑(oxaliplatin)(ELOXATIN™)與5-FU及盧考弗文組合之治療方案之縮寫)。

此定義中亦包括抗激素劑，其用以調節、減少、阻斷或抑制可促進癌生長之激素之作用且其通常呈全身性或整個

身體治療之形式。其可為激素本身。實例包括抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，例如包括他莫昔芬(tamoxifen)(包括 NOLVADEX® 他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene)(EVISTA®)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬(4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬(trioxifene)、雷洛昔芬鹽酸鹽(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及托瑞米芬(toremifene)(FARESTON®)；抗孕酮；雌激素受體下調劑(ERD)；具有抑制或關閉卵巢之功能的藥劑，例如黃體生成激素釋放激素(LHRH)促效劑，諸如乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)(LUPRON® 及 ELIGARD®)、乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、乙酸布舍瑞林(buserelin acetate)及曲特瑞林(tripterelin)；其他抗雄激素，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯米特(nilutamide)及比卡魯胺(bicalutamide)；及抑制芳香酶(其調節腎上腺中之雌激素產生)之芳香酶抑制劑，諸如4(5)-咪唑、胺魯米特、乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)(MEGASE®)、依西美坦(exemestane)(AROMASIN®)、弗米斯坦(formestane)、法屈唑(fadrozole)、伏羅唑(vorozole) (RIVISOR®)、來曲唑(letrozole)(FEMARA®)及安美達錠(anastrozole)(ARIMIDEX®)。此外，化學治療劑之該定義包括雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(例如，BONEFOS®或OSTAC®)、依替膦酸鹽(DIDROCAL®)、NE-58095、唑來膦酸(zoledronic acid)/唑來膦酸鹽(ZOMETA®)、阿倫膦酸鹽(alendronate)(FOSAMAX®)、帕米膦酸鹽(pamidronate)

(AREDIA®)、替魯膦酸(tiludronate)(Skelid®)或利塞膦酸鹽(risedronate)(ACTONEL®)；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，尤其抑制牽涉於黏附細胞增殖中之信號轉導途徑中之基因表現的彼等反義寡核苷酸，諸如PKC- α 、Raf、H-Ras及表皮生長因子受體(EGF-R)；疫苗，諸如THERATOPE®疫苗及基因療法疫苗，例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗及VAXID®疫苗；拓撲異構酶1抑制劑(例如LURTOTECAN®)；rmRH(例如，ABARELIX®)；二甲苯磺酸拉帕替尼(lapatinib ditosylate)(ErbB-2及EGFR雙重酪胺酸激酶小分子抑制劑，亦稱為GW572016)；COX-2抑制劑，諸如塞內昔布(CELEBREX®；4-(5-(4-甲基苯基)-3-(三氟甲基)-1H-吡唑-1-基)苯磺醯胺)；及任何上述治療劑之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

術語"細胞因子"為由作用於另一細胞之一細胞群體釋放作為胞間介體之蛋白質的通用術語。該等細胞因子之實例為淋巴因子、單核球激素及傳統多肽激素。該等細胞因子中包括以下各物：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；甲狀旁腺激素；甲狀腺素；胰島素；胰島素原；鬆弛素；鬆弛素原；醣蛋白激素，諸如促濾泡激素(FSH)、促甲狀腺激素(TSH)及黃體生成激素(LH)；肝生長因子；纖維母細胞生長因子；泌乳素；胎盤催乳激素；腫瘤壞死因子- α 及腫瘤壞死因子- β ；繆勒氏管抑制物質(mullerian-inhibiting substance)；小鼠

促性腺激素相關肽；抑制素；活化素；血管內皮生長因子（例如，VEGF、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E）；胎盤來源生長因子(PlGF)；血小板來源生長因子(PDGF，例如PDGFA、PDGFB、PDGFC、PDGFD)；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-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20-IL-30；分泌性球蛋白/子宮球蛋白；制瘤素M(OSM)；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)。如本文所用之術語細胞因子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因子之生物活性等效物。

如本申請案中所用之術語"前藥"係指醫藥活性物質之前驅物或衍生物形式，該形式與親本藥物相比，對腫瘤細胞之細胞毒性較小，且能夠酶促活化或轉化成活性更強之親本形式。參見例如 Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, 第 375-382 頁，第 615 屆貝爾法斯特會議 (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)：含有磷酸鹽之前藥、含有硫代磷酸鹽之前藥、含有硫酸鹽之前藥、含有肽之前藥、經 D-胺基酸修飾之前藥、糖基化前藥、含有 β -內醯胺之前藥、含有視情況經取代之苯氧基乙醯胺之前藥或含有視情況經取代之苯乙醯胺之前藥、可轉化成活性更強之細胞毒性游離藥物之 5-氟胞嘧啶及其他 5-氟尿苷(5-fluorouridine)前藥。可衍生為供本發明用之前藥形式之細胞毒性藥物的實例包括(但不限於)上文所述之彼等化學治療劑。

"血管生成因子或血管生成劑"為刺激血管發育，例如促進血管生成、內皮細胞生長、血管穩定及/或血管發生等之生長因子。舉例而言，血管生成因子包括(但不限於)(例如)VEGF及VEGF家族成員、PlGF、PDGF家族、纖維母細胞生長因子家族(FGF)、TIE配位體(血管生成素)、ephrin、ANGPTL3、ANGPTL4等。其亦包括加速創傷癒合之因子，諸如生長激素、類胰島素生長因子-I(IGF-I)、VIGF、表皮生長因子(EGF)、CTGF及其家族成員及TGF- α 及TGF- β 。參見例如 Klagsbrun 及 D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-39 (1991)；Streit 及 Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003)；Ferrara 及 Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999)；Tonini 等人，*Oncogene*, 22:6549-

6556 (2003)(例如，表1列出血管生成因子)；及 Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)。

"抗血管生成劑"或"血管生成抑制劑"係指直接或間接地抑制血管生成、血管發生或非所需之血管通透性的小分子量物質、聚核苷酸、多肽、經分離蛋白質、重組蛋白、抗體或其接合物或融合蛋白。舉例而言，抗血管生成劑為針對如上定義之血管生成劑之抗體或其他拮抗劑，例如針對 VEGF 之抗體、針對 VEGF 受體之抗體、阻斷 VEGF 受體信號轉導之小分子(例如，PTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT/SU11248(蘋果酸舒尼替尼(sunitinib malate))、AMG706)。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、內皮生長抑素等。參見例如 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療法)；Ferrara 及 Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999)；Tonini 等人, *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003)(例如，表2列出抗血管生成因子)；及 Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)(例如，表1列出臨床試驗中所使用之抗血管生成劑)。

如本文所用之術語"免疫抑制劑"係指用於抑制或掩蔽本文中所治療之哺乳動物之免疫系統的物質。其包括抑制細胞因子產生、下調或抑制自體抗原表現或掩蔽 MHC 抗原之物質。該等藥劑之實例包括 2-胺基-6-芳基-5-取代嘧啶(參見美國專利第 4,665,077 號)；非類固醇消炎藥(NSAID)；更

昔洛韋(ganciclovir)、他克莫司(tacrolimus)、糖皮質激素(glucocorticoid)(諸如,皮質醇(cortisol)或醛固酮(aldoosterone))、消炎劑(諸如,環加氧酶抑制劑、5-脂肪加氧酶或白三烯受體拮抗劑);嘌呤拮抗劑,諸如硫唑嘌呤(azathioprine)或微酚酸酯(mycophenolate mofetil)(MMF);烷基化劑,諸如環磷醯胺;溴隱亭(bromocryptine);達那唑(danazol);胺苯硯(dapsone);戊二醛(glutaraldehyde)(如美國專利第4,120,649號中所述,其掩蔽MHC抗原);MHC抗原及MHC片段之抗個體基因型抗體;環孢菌素A(cyclosporin A);類固醇,諸如皮質類固醇(corticosteroid)或糖皮質類固醇(glucocorticosteroid)或糖皮質激素類似物,例如潑尼松(prednisone)、甲潑尼龍(methylprednisolone)及地塞米松(dexamethasone);二氫葉酸還原酶抑制劑,諸如甲胺喋呤(經口或皮下);羥基氯喹(hydroxycloquine);柳氮磺吡啶(sulfasalazine);來氟米特(leflunomide);細胞因子或細胞因子受體抗體,包括抗干擾素- α 抗體、抗干擾素- β 抗體或抗干擾素- γ 抗體、抗腫瘤壞死因子- α 抗體(英利昔單抗(infliximab)或阿達木單抗(adalimumab))、抗TNF- α 免疫黏附素(依那西普)、抗腫瘤壞死因子- β 抗體、抗介白素-2抗體及抗IL-2受體抗體;抗LFA-1抗體,包括抗CD11a及抗CD18抗體;抗L3T4抗體;異源抗淋巴細胞球蛋白;pan-T抗體,較佳抗CD3或抗CD4/CD4a抗體;含有LFA-3結合域之可溶性肽(1990年7月26日公開之WO 1990/08187);鏈激酶(streptokinase);

TGF- β ; 鏈道酶 (streptodornase) ; 來自宿主之 RNA 或 DNA ; FK506 ; RS-61443 ; 去氧精胍啉 (deoxyspergualin) ; 雷帕黴素 (rapamycin) ; T細胞受體 (Cohen等人, 美國專利第 5,114,721 號) ; T細胞受體片段 (Offner 等人, *Science*, 251: 430-432 (1991) ; WO 1990/11294 ; Ianeway, *Nature*, 341: 482 (1989) ; 及 WO 1991/01133) ; 及 T細胞受體抗體 (EP 340,109) , 諸如 T10B9 。

"非類固醇消炎藥"或"NSAID"之實例為乙醯水楊酸 (acetylsalicylic acid) 、布洛芬 (ibuprofen) 、萘普生 (naproxen) 、吲哚美辛 (indomethacin) 、舒林酸 (sulindac) 、托美丁 (tolmetin) , 包括其鹽及衍生物等。

疾病之"病理學"包括所有有損患者健康之現象。對於癌症而言, 其包括(但不限於)異常或不受控之細胞生長、轉移, 干擾相鄰細胞之正常功能, 以異常含量釋放細胞因子或其他分泌產物, 抑制或惡化發炎性或免疫反應等。

與一或多種其他治療劑"組合"投藥包括同時(並行)及以任何順序連續投藥。

如本文所用之"載劑"包括醫藥學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑, 其在所用劑量及濃度下對向其暴露之細胞或哺乳動物無毒。生理學上可接受之載劑通常為水性 pH 值緩衝溶液。生理學上可接受之載劑之實例包括: 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; 低分子量(小於約 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、麩胺醯胺、天冬醯
胺、精胺酸或離胺酸；單醣、雙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；糖醇，
諸如甘露糖醇或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉；及/
或非離子型界面活性劑，諸如TWEEN™、聚乙二醇(PEG)
及PLURONICS™。

"脂質體"為由適用於將藥物(諸如，Bv8多肽或其抗體)傳
遞至哺乳動物之各種類型之脂質、磷脂及/或界面活性劑
構成的小微脂粒。脂質體之組份通常排列為雙層形式，類
似於生物膜之脂質排列。

本文中定義"小分子"具有低於約500道爾頓(Dalton)之分
子量。

"胺基酸改變"係指預定胺基酸序列之胺基酸序列變化。
例示性改變包括插入、取代及缺失。"胺基酸取代"係指將
預定胺基酸序列中存在之胺基酸殘基用另一不同胺基酸殘
基置換。

"置換"胺基酸殘基係指置換或取代胺基酸序列中之另一
胺基酸殘基的胺基酸殘基。置換殘基可為天然存在或非天
然存在之胺基酸殘基。

"胺基酸插入"係指將一或多個胺基酸殘基引入預定胺基
酸序列中。胺基酸插入可包含"肽插入"，在此狀況下將包
含由肽鍵聯接之兩個或兩個以上胺基酸殘基的肽引入預定
胺基酸序列中。在胺基酸插入包含肽插入之情況下，所插

入之肽可藉由隨機突變誘發產生，以使得其具有自然界中不存在之胺基酸序列。"與高變區相鄰"之胺基酸改變係指在高變區之N末端及/或C末端引入或取代一或多個胺基酸殘基，以使得所插入或置換之胺基酸殘基中之至少一者與所討論高變區之N末端或C末端胺基酸殘基形成肽鍵。

"天然存在之胺基酸殘基"為由遺傳密碼編碼之胺基酸，一般選自由以下各物組成之群：丙胺酸(Ala)；精胺酸(Arg)；天冬醯胺(Asn)；天冬胺酸(Asp)；半胱胺酸(Cys)；麩胺醯胺(Gln)；麩胺酸(Glu)；甘胺酸(Gly)；組胺酸(His)；異白胺酸(Ile)；白胺酸(Leu)；離胺酸(Lys)；甲硫胺酸(Met)；苯丙胺酸(Phe)；脯胺酸(Pro)；絲胺酸(Ser)；蘇胺酸(Thr)；色胺酸(Trp)；酪胺酸(Tyr)；及纈胺酸(Val)。

本文中"非天然存在之胺基酸殘基"為除上文列出之彼等天然存在之胺基酸殘基以外之胺基酸殘基，其能夠共價結合多肽鏈中之相鄰胺基酸殘基。非天然存在之胺基酸殘基之實例包括正白胺酸、鳥胺酸、正纈胺酸、高絲胺酸及其他胺基酸殘基類似物，諸如Ellman等人，Meth. Enzym. 202:301-336 (1991)中所述者。為產生該等非天然存在之胺基酸殘基，可使用Noren等人，Science 244:182 (1989)及Ellman等人(見上文)之程序。簡言之，此等程序包含用非天然存在之胺基酸殘基以化學方式活化抑制tRNA，接著活體外轉錄及轉譯該RNA。

如本文所用，具有"高親和力"之抗體為具有奈莫耳(nM)

範圍或更佳之 K_D 或解離常數的抗體。"奈莫耳範圍或更佳"之 K_D 可由 X nM表示，其中 X 為小於約10之數字。

術語"絲狀噬菌體"係指能夠在其表面上呈現異源多肽之病毒粒子且包括(但不限於)f1、fd、Pf1及M13。絲狀噬菌體可含有可選擇標記物，諸如四環素(例如，"fd-tet")。各種絲狀噬菌體呈現系統為熟習此項技術者所熟知(參見例如 Zacher 等人，**Gene** 9: 127-140 (1980), Smith 等人，**Science** 228: 1315-1317 (1985)及 Parmley 及 Smith **Gene** 73: 305-318 (1988))。

術語"淘選"用以指在載運對標靶具有高度親和力及特異性之化合物(諸如抗體)之噬菌體之鑑別及分離中的多輪篩檢過程。

術語"短干擾RNA(siRNA)"係指干擾基因表現之小雙鏈RNA。siRNA為RNA干涉(雙鏈RNA使同源基因沉默之過程)之中間物。siRNA通常由兩個具有約15-25個核苷酸長度之形成雙鏈體之單鏈RNA組成，其可包括單鏈懸垂物。藉由酶促複合物(例如，聚合酶)加工雙鏈RNA使得雙鏈RNA裂解，從而產生siRNA。siRNA之反義鏈由RNA干涉(RNAi)沉默複合物用以引導mRNA裂解，藉此促進mRNA降解。例如在哺乳動物細胞中，為使用siRNA使特定基因沉默，選擇鹼基配對區以避免可能與無關mRNA互補。RNAi沉默複合物已在此項技術中(諸如)藉由 Fire 等人，**Nature** 391:806-811 (1998)及 McManus 等人，**Nat. Rev. Genet.** 3(10):737-47 (2002)鑑別。

術語"干擾RNA(RNAi)"在本文中用以指導致特定mRNA催化降解且因此可用於抑制/降低特定基因表現之雙鏈RNA。

"有效量"為足以實現有益或所需治療(包括預防)結果之量。有效量可以一或多次投藥投與。

如本文所用之表述"細胞"、"細胞株"及"細胞培養物"可互換使用且所有該等名稱包括子代。因此，詞語"轉型體"及"經轉型之細胞"包括初級宿主細胞及來源於其而不考慮轉移數目之培養物。亦應瞭解所有子代可能由於蓄意或偶然性突變而在DNA含量方面不精確一致。術語"子代"係指在最初轉型細胞或細胞株後之每一代的任何及所有後代。包括針對最初轉型細胞中所篩檢之具有相同功能或生物活性之突變型子代。在意欲使用不同名稱之情況下，此將因上下文而明顯。

雜交反應之"嚴格性"可易於藉由一般技術者確定，且一般為依據於探針長度、洗滌溫度及鹽濃度之經驗計算值。一般而言，較長探針需要較高溫度以供當黏接，而較短探針需要較低溫度。雜交一般取決於互補鏈存在於低於其熔融溫度之環境中時變性DNA之再黏接能力。探針與可雜交序列之間的所需一致性程度愈高，可使用之相對溫度愈高。因此，由此可見較高相對溫度將傾向於使反應條件更嚴格，而較低溫度將傾向於使反應條件嚴格性較低。關於雜交反應嚴格性之其他詳情及說明，請參見 Ausubel 等人，**Current Protocols in Molecular Biology**, Wiley

Interscience Publishers, (1995)。

如本文中所定義，"高嚴格條件"藉由以下方面來鑑別：
 (1)對於洗滌而言，採用低離子強度及高溫；50℃下0.015 M氯化鈉/0.0015 M檸檬酸鈉/0.1%十二烷基硫酸鈉；(2)雜交期間採用變性劑；42℃下具有0.1%牛血清白蛋白/0.1% Ficoll/0.1%聚乙烯吡咯啉酮/50 mM磷酸鈉緩衝液(pH 6.5)及750 mM氯化鈉、75 mM檸檬酸鈉之50% (v/v)甲醯胺；或(3)採用42℃下50%甲醯胺、5×SSC (0.75 M NaCl、0.075 M檸檬酸鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 6.8)、0.1%焦磷酸鈉、5 × 丹哈德溶液(Denhardt's solution)、經超音波處理之鮭魚精DNA (50 µg/ml)、0.1% SDS及10%硫酸葡聚糖，以及42℃下於0.2×SSC (氯化鈉/檸檬酸鈉)中及55℃下於50%甲醯胺中洗滌，接著55℃下由含有EDTA之0.1×SSC組成的高嚴格洗滌液中洗滌。

"中等嚴格條件"可如 Sambrook 等人，**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989所述來鑑別，且包括在37℃下在包含以下各物之溶液中培育隔夜：20%甲醯胺、5×SSC(150 mM NaCl、15 mM檸檬酸三鈉)、50 mM磷酸鈉(pH 7.6)、5 × 丹哈德溶液、10%硫酸葡聚糖及20 mg/mL變性剪切鮭魚精DNA，接著在1×SSC中在約37-50℃下洗滌過濾器。熟習技工將認識到必要時如何調整溫度、離子強度等以適應諸如探針長度及其類似因素之因素。

B.詳細描述

本發明係至少部分地基於認識到Bv8在引起腫瘤對包括投與至少一種VEGF拮抗劑(諸如, 抗VEGF抗體)之治療具有抗性的細胞及分子事件中起重要作用。本發明進一步基於認識到Bv8表現對G-CSF敏銳反應且因此與參與調控嗜中性白血球分化及產生之主要內穩定機制相關聯。

2007年3月28日申請之同在申請中之申請案第11/692,681號(其全部揭示內容以引用的方式明確併入本文中)描述造血骨髓來源細胞之募集與腫瘤發展對抗VEGF治療之抗性之間的關聯。免疫系統包括造血細胞, 其包括紅血球、淋巴細胞及骨髓譜系之細胞。此等細胞類型均由相同多能幹細胞產生。在成人中, 血細胞生成發生在骨髓中, 其中幹細胞偶爾分裂以產生更多幹細胞(自我更新)及各種定型祖細胞。正是定型祖細胞對特定調控因子反應而產生造血細胞。此等調控因子主要由周圍基質細胞且在其他組織中產生, 且包括(例如)群落刺激因子(CSF)、紅血球生成素(EPO)、介白素3(IL3)、粒細胞/巨噬細胞CSF(GM-CSF)、粒細胞CSF(G-CSF)、巨噬細胞CSF(M-CSF)及STEEL因子。已提出癌症患者中免疫系統之改變造成免疫系統成功攻擊癌症之能力喪失或降低, 因此使腫瘤生長得以發展。參見例如 Gabrilovich 等人, **Antibodies to Vascular Endothelial Growth Factor Enhances the Efficacy of Cancer Immunotherapy by Improving Endogenous Dendritic Cell Function**, *Clinical Cancer Research* 5:2963-2970 (1999)。由腫瘤產生之因子可引起異常骨髓生成且可

使得對腫瘤之免疫反應受到抑制。參見例如 Kusmartsev 及 Gabrilovich, **Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression**. *Cancer Immunol Immunother*. 51: 293-298 (2002)。

近來研究已直接暗示 CD11b+Gr1+ 骨髓細胞介導針對抗 VEGF 療法之難治性。(Shojaei, F. 等人, *Nature Biotechnol* 25:911-20 (2007)) 及同在申請中之申請案第 11/692,681 號。CD11/CD18 家族在結構及遺傳上與調節細胞黏附相互作用 (其包括胚胎形成、對細胞外受質之黏附及細胞分化) 之受體的更大整合素家族相關 (Hynes, R. O., *Cell* 48: 549-554 (1987); Kishimoto 等人, *Adv. Immunol.* 46: 149-182 (1989); Kishimoto 等人, *Cell* 48: 681-690 (1987); 及 Ruoslahti 等人, *Science* 238: 491-497 (1987))。整合素為包含與 β 次單元非共價締合之 α 次單元的一類跨膜異源二聚體。 β 次單元一般能夠與一個以上 α 次單元締合且共用共同 β 次單元之異源二聚體已分類為整合素群體內之亞家族 (Larson 及 Springer, **Structure and function of leukocyte integrins**, *Immunol. Rev.* 114: 181-217 (1990))。

已發現 CD11/CD18 家族之整合素分子及其細胞配位體介導尤其發炎中之多種細胞-細胞相互作用。已證明此等蛋白質對免疫系統中之黏附功能而言為關鍵的 (Kishimoto 等人, *Adv. Immunol.* 46: 149-182 (1989))。針對 LFA-1 之單株抗體展示阻斷白血球對內皮細胞之黏附 (Dustin 等人, *J. Cell. Biol.* 107: 321-331 (1988); Smith 等人, *J. Clin.*

Invest. 83: 2008-2017 (1989))且抑制T細胞活化(Kuypers等人, *Res. Immunol.*, 140: 461 (1989))、抗原特異性CTL殺傷所需之接合物形成(Kishimoto等人, *Adv. Immunol.* 46: 149-182 (1989))、T細胞增殖(Davignon等人, *J. Immunol.* 127: 590-595 (1981))及NK細胞殺傷(Krensky等人, *J. Immunol.* 131: 611-616 (1983))。

黏附受體分子之CD11/CD18家族包含四個高度相關之細胞表面糖蛋白：LFA-1(CD11a/CD18)、Mac-1(CD11b/CD18)、p150.95(CD11c/CD18)及(CD11d/CD18)。此等異源二聚體中之每一者具有獨特 α -鏈(CD11a、b、c或d)及不變 β -鏈(CD18)。位於白血球上之CD18整合素可與表現於血管內皮及其他細胞上之胞間黏附分子-1(ICAM-1)結合，藉此介導白血球黏附及跨內皮遷移。LFA-1存在於除巨噬細胞子集之外的所有成熟白血球之表面上且認為其係主要淋巴整合素。Mac-1、p150.95及CD11d/CD18之表現主要侷限於骨髓譜系之細胞(其包括嗜中性白血球、單核細胞、巨噬細胞及肥大細胞)。CD11b+Gr1+為亦在骨髓細胞上發現之標記物。已表明成熟骨髓細胞與未成熟骨髓細胞之間的平衡為癌症之指標且在進行性腫瘤生長中平衡朝向具有減少及功能樹突狀細胞之未成熟骨髓細胞移動。參見例如Kusmartsev及Gabrilovich, **Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression.** *Cancer Immunol Immunother.* 51:293-298 (2002)。例如藉由在帶有腫瘤之小鼠中使未成熟骨髓細胞分化使平衡移動改良癌

症疫苗之作用。參見Kusmartsev等人，*All-trans-Retinoic Acid Eliminates Immature Myeloid Cells from Tumor-bearing Mice and Improves the Effect of Vaccination. Cancer Research* 63:4441-4449 (2003)。亦在癌症患者中觀測到循環中VEGF之含量與未成熟骨髓細胞之數目增加相關。參見Almand等人，*Clinical significance of defective dendritic cells differentiation in cancer. Clin. Cancer Res.* 6:1755 (2000)。

展示CD11b+Gr1+骨髓細胞之活動及活化可導致針對抗VEGF治療之抗性。亦已展示自帶有腫瘤之小鼠分離的骨髓來源之CD11b+Gr1+骨髓細胞可在腫瘤中賦予針對抗VEGF治療之抗性且來自抗VEGF抵抗物(但非抗VEGF敏感性腫瘤)之調節培養基刺激CD11b+Gr1+細胞之遷移。

本文中揭示之實驗資料證明Bv8調控腫瘤發展期間CD11b+Gr1+細胞自骨髓之活動，以及局部促進腫瘤血管生成。因此，Bv8有望成為用於治療對VEGF拮抗劑治療有抗性之腫瘤的標靶。

本文中揭示之資料亦表明Bv8表現對G-CSF敏銳反應且因此與參與調控嗜中性白血球分化及產生之主要內穩定機制相關聯。由於Bv8在非腫瘤類型之發炎性細胞介導之血管生成的病理學中發揮較廣泛作用，所以一般而言，Bv8亦有望成為用於抑制非所需之發炎性細胞介導之血管生成的標靶。

C.製備充當腫瘤血管生成抑制劑之抗Bv8抗體

藉由本發明之結合及活性檢定鑑別之抗體可籍由此項技術中已知之方法(包括重組DNA技術之技術)產生。

(i) 抗原製備

視情況與其他分子接合之可溶性抗原或其片段可用作產生抗體之免疫原。對於跨膜分子(諸如，受體)而言，此等分子之片段(例如，受體之胞外域)可用作免疫原。或者，表現跨膜分子之細胞可用作免疫原。該等細胞可來源於天然來源(例如，癌細胞株)或可為已藉由重組技術轉型以表現跨膜分子之細胞。適用於製備抗體之其他抗原及其形式對熟習此項技術者而言將顯而易見。

(ii) 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中產生。使用雙官能劑或衍生化劑(例如，順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基磺基丁二醯亞胺酯(經由半胱胺酸殘基接合)、N-羥基丁二醯亞胺(經由離胺酸殘基)、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))使相關抗原與在待免疫之物種中具有免疫原性之蛋白質(例如，匙孔螺血藍蛋白、血清白蛋白、牛甲狀球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制劑)接合可為適用的。

藉由將(例如)100 μg 或5 μg 蛋白質或接合物(分別用於兔或小鼠)與3體積弗氏完全佐劑(Freund's complete adjuvant)組合且在多個部位皮內注射該溶液針對抗原、免疫原性接合物或衍生物使動物免疫。1個月後，用1/5至1/10初始量之於弗氏完全佐劑中之肽或接合物藉由在多個部位進行皮

下注射來使動物增強。7至14天後，將動物放血且檢定血清之抗體效價。增強動物直至效價穩定。較佳使用具有同一抗原但與不同蛋白質接合及/或經由不同交聯試劑接合之接合物增強動物。接合物亦可在重組細胞培養物中以蛋白質融合物形式製得。諸如羂之凝集劑亦適用於增強免疫反應。

(iii)單株抗體

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備，或可由重組DNA方法製備(美國專利第4,816,567號)。在融合瘤方法中，如上文所述使小鼠或其他適當宿主動物(諸如，倉鼠或獼猴)免疫以誘導出產生或能夠產生將與用於免疫之蛋白質特異性結合之抗體的淋巴細胞。或者，可在活體外使淋巴細胞免疫。接著，使用諸如聚乙二醇之合適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))。

將如此製備之融合瘤細胞接種且生長於較佳含有一或多種抑制未融合親本骨髓瘤細胞之生長或存活之物質的合適培養基中。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基轉移酶(HGPRT或HPRT)，則用於融合瘤之培養基通常將包括次黃嘌呤、胺基喋呤(aminopterin)及胸苷(HAT培養基)，該等物質防止HGPRT缺陷型細胞生長。

較佳骨髓瘤細胞為有效融合、支持由所選擇之產生抗體的細胞穩定高含量產生抗體的彼等骨髓瘤細胞，且對諸如HAT培養基之培養基敏感。其中，較佳骨髓瘤細胞株為鼠類骨髓瘤細胞株，諸如來源於可獲自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA之MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤之彼等細胞株及可獲自美國典型培養物保藏中心(Rockville, Md. USA)之SP-2或X63-Ag8-653細胞。亦已描述人類骨髓瘤及小鼠-人類雜合骨髓瘤細胞株用於產生人類單株抗體(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))。

關於針對抗原之單株抗體之產生，對生長融合瘤細胞之培養基進行檢定。由融合瘤細胞產生之單株抗體之結合特異性較佳藉由免疫沈澱法或藉由諸如放射免疫檢定(RIA)或酶聯免疫吸附檢定(ELISA)之活體外結合檢定來測定。

在鑑別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，可藉由限制稀釋程序將純系次選殖且藉由標準方法使其生長(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103頁(Academic Press, 1986))。用於達成此目的之合適培養基包括(例如)D-MEM或RPMI-1640培養基。此外，融合瘤細胞可在動物體內以腹水腫瘤形式活體內生長。

藉由諸如蛋白質A-瓊脂糖、羥磷灰石層析法、凝膠電

泳、透析或親和力層析法之習知免疫球蛋白純化程序，合適地將由次純系分泌之單株抗體自培養基、腹水流體或血清中分離。

使用習知程序(例如，藉由使用能夠與編碼單株抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合的寡核苷酸探針)容易將編碼單株抗體之DNA分離且定序。融合瘤細胞充當該DNA之較佳來源。分離後，可將DNA置放於表現載體中，隨後將該等表現載體轉染至不另外產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如，大腸桿菌(*E. coli*)細胞、猿猴COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中，以在重組宿主細胞中獲得單株抗體之合成。抗體之重組產生將在下文中更詳細地描述。

在另一實施例中，可使用 McCafferty 等人，*Nature*, 348:552-554 (1990)中所述之技術自所產生之抗體噬菌體文庫分離抗體或抗體片段。

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分離鼠類及人類抗體。後續公開案描述藉由鏈改組(Marks 等人，*Bio/Technology*, 10:779-783 (1992))以及作為構築極大噬菌體文庫之策略的組合感染及活體內重組來產生高親和力(nM 範圍)人類抗體(Waterhouse 等人，*Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993))。因此，此等技術為用於分離單株抗體之傳統單株抗體融合瘤技術之可行替代方案。

亦可(例如)藉由用人類重鏈及輕鏈恆定域之編碼序列替代同源鼠類序列(美國專利第4,816,567號; Morrison等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984))或藉由使整個或部分非免疫球蛋白多肽之編碼序列與免疫球蛋白編碼序列共價聯接來修飾DNA。

通常, 該等非免疫球蛋白多肽取代抗體之恆定域, 或其取代抗體之一個抗原組合位點之可變域以產生包含一個對抗原具有特異性之抗原組合位點及另一個對不同抗原具有特異性之抗原組合位點的嵌合二價抗體。

(iv)人化及人類抗體

人化抗體具有自非人類來源引入其中之一或多個胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基通常稱為"輸入"殘基, 其通常係取自"輸入"可變域。人化基本上可根據Winter及合作者之方法(Jones等人, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等人, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen等人, Science, 239:1534-1536 (1988)), 藉由用齧齒動物CDR或CDR序列取代人類抗體之相應序列來執行。因此, 該等"人化"抗體為嵌合抗體(美國專利第4,816,567號), 其中實質上小於完整人類可變域已由來自非人類物種之相應序列取代。實際上, 人化抗體通常為一些CDR殘基及可能一些FR殘基由來自齧齒動物抗體中類似位點之殘基取代的人類抗體。

待用於製備人化抗體之人類輕鏈及重鏈可變域之選擇對降低抗原性而言極為重要。根據所謂"最佳匹配"方法, 針

對已知人類可變域序列之整個文庫篩檢齧齒動物抗體之可變域序列。隨後，將最接近齧齒動物序列之人類序列作為人化抗體之人類構架(FR)接受(Sims等人，J. Immunol., 151:2296 (1993)；Chothia等人，J. Mol. Biol., 196:901 (1987))。另一方法使用來源於具有輕鏈或重鏈特定子群之所有人類抗體之一致序列的特定構架。若干不同人化抗體可使用同一構架(Carter等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)；Presta等人，J. Immunol., 151:2623 (1993))。

此外，重要的是抗體經人化而保留對抗原之高度親和力及其他有利生物學性質。為實現此目標，根據一較佳方法，藉由使用親本序列及人化序列之三維模型來分析親本序列及各種構想人化產物的方法製備人化抗體。三維免疫球蛋白模型普遍可得且為熟習此項技術者所熟知。可利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。對此等顯示之檢驗准許分析殘基在候選免疫球蛋白序列之功能中之可能作用，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，可自接受者序列及輸入序列選擇FR殘基且將其加以組合，以便達成所需抗體特徵，諸如對標靶抗原之親和力增強。CDR殘基一般直接且最主要參與對抗原結合之影響。

或者，目前可能產生在缺乏內源性免疫球蛋白產生之情況下在免疫後能夠產生全譜系人類抗體之轉殖基因動物(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.sub.H)基因之純合子缺失導致內源性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該等生殖系突變型小鼠中將會使得在抗原激發後產生人類抗體。參見例如 Jakobovits 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits 等人, Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann 等人, Year in Immuno., 7:33 (1993); 及 Duchosal 等人, Nature 355:258 (1992)。人類抗體亦可來源於噬菌體呈現文庫(Hoogenboom 等人, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks 等人, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan 等人, Nature Biotech 14:309 (1996))。下文進一步描述自抗體噬菌體呈現文庫產生人類抗體。

(v) 抗體片段

已開發出各種用於產生抗體片段之技術。此等片段傳統上經由完整抗體之蛋白水解消化獲得(參見例如 Morimoto 等人, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992) 及 Brennan 等人, Science, 229:81 (1985))。然而, 現可藉由重組宿主細胞直接產生此等片段。舉例而言, 可自以上所討論之抗體噬菌體文庫分離該等抗體片段。或者, 可直接自大腸桿菌回收 Fab'-SH 片段且使其化學偶合以形成 $F(ab')_2$ 片段(Carter 等人, Bio/Technology 10:163-167 (1992))。在如下文實例中所述之另一實施例中, 使用促進 $F(ab')_2$ 分子組裝之白胺酸拉鏈 GCN4 來形成 $F(ab')_2$ 。根據另一方法, 可自重組宿主細胞

培養物直接分離 $F(ab')_2$ 片段。用於產生抗體片段之其他技術對熟練從業者將顯而易見。在其他實施例中，所選擇之抗體為單鏈 F_v 片段(scFv)。參見WO 93/16185。

(vi)多特異性抗體

多特異性抗體對至少兩種不同抗原決定基具有結合特異性，其中該等抗原決定基通常來自不同抗原。雖然該等分子通常僅結合兩種不同抗原決定基(亦即，雙特異性抗體，BsAb)，但用於本文中時此表述涵蓋具有額外特異性之抗體，諸如三特異性抗體。BsAb之實例包括一臂針對Bv8且另一臂針對VEGF或EG-VEGF之彼等BsAb。

此項技術中已知用於製備雙特異性抗體之方法。全長雙特異性抗體之傳統產生係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現，其中該兩個鏈具有不同特異性(Millstein等人，Nature, 305:537-539 (1983))。因為免疫球蛋白重鏈及輕鏈隨機搭配，所以此等融合瘤(四融合瘤(quadromas))產生10種不同抗體分子之潛在混合物，其中僅一種分子具有正確的雙特異性結構。通常藉由親和力層析步驟進行之正確分子之純化相當繁瑣且產物產率低。類似之程序揭示於WO 93/08829及Traunecker等人，EMBO J., 10:3655-3659 (1991)中。根據一不同方法，使具有所需結合特異性(抗體-抗原組合位點)之抗體可變域與免疫球蛋白恆定域序列融合。較佳與包含鉸鏈區、CH2區及CH3區之至少部分之免疫球蛋白重鏈恆定域融合。其較佳具有第一重鏈恆定區(CH1)，該恆定區含有輕鏈結合所必需之位點(存在於融合

物中之至少一者中)。將編碼免疫球蛋白重鏈融合物及必要時編碼免疫球蛋白輕鏈之DNA插入獨立表現載體中且共轉染至合適宿主生物體中。在構築中所使用之3種多肽鏈之不相等比率提供最佳產率之實施例中，此舉提供調整3種多肽片段之相互比例之高靈活性。然而，當等比率之至少兩種多肽鏈之表現產生高產率時或當比率不具有特別之重要性時，有可能將兩種或所有三種多肽鏈之編碼序列插入一個表現載體中。

在此方法之一較佳實施例中，雙特異性抗體包含一臂中具有第一結合特異性之雜交免疫球蛋白重鏈及另一臂中之雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)。發現此不對稱結構有利於自非所需免疫球蛋白鏈組合分離所需雙特異性化合物，此係因為雙特異性分子之僅一半中存在免疫球蛋白輕鏈會提供容易的分離方法。此方法揭示於WO 94/04690中。關於產生雙特異性抗體之其他詳情，請參見例如Suresh等人，**Methods in Enzymology**, 121:210 (1986)。

根據WO 96/27011中所述之另一方法，可將一對抗體分子之間的界面工程化以使自重組細胞培養物回收之異源二聚體的百分比最大。較佳界面包含抗體恆定域之CH3域之至少一部分。在此方法中，用較大側鏈(例如，酪胺酸或色胺酸)置換一或多個來自第一抗體分子之界面之小胺基酸側鏈。藉由用較小側鏈(例如，丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈在第二抗體分子之界面上產生與大側鏈具有相

同或相似大小之補償性"空穴"。此舉提供使異源二聚體之產率增加超過諸如同源二聚體之其他非所需最終產物的機制。

雙特異性抗體包括交聯或"異源接合物"抗體。舉例而言，可使異源接合物中之一抗體與抗生物素蛋白(avidin)偶合，使另一者與生物素偶合。已提出(例如)該等抗體使免疫系統細胞靶向非所需細胞(美國專利第4,676,980號)且用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/200373)。異源接合物抗體可使用任何適宜交聯方法製得。合適交聯劑以及許多交聯技術已為此項技術中所熟知且揭示於美國專利第4,676,980號中。

文獻中亦已描述由抗體片段產生雙特異性抗體之技術。舉例而言，可使用化學鍵聯製備雙特異性抗體。Brennan等人，*Science* 229: 81 (1985)描述使完整抗體蛋白水解裂解以產生 $F(ab')_2$ 片段之程序。在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下，此等片段經還原以使鄰近二硫醇穩定且阻止分子間二硫化物形成。接著，使所產生之 Fab' 片段轉化為硫基硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。接著，藉由用巯基乙胺還原使一 Fab' -TNB衍生物再轉化為 Fab' -硫醇且將其與等莫耳量之另一 Fab' -TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作酶之選擇性固定劑。

亦可直接自大腸桿菌回收 Fab' -SH片段且可使其化學偶合以形成雙特異性抗體。Shalaby等人，*J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)描述完全人化雙特異性抗體 $F(ab')_2$ 分子之產

生。各Fab'片段自大腸桿菌單獨分泌且使其經受活體外定向化學偶合以形成雙特異性抗體。

亦已描述多種直接自重組細胞培養物製備及分離雙特異性抗體片段之技術。舉例而言，已使用白胺酸拉鏈產生雙特異性抗體。Kostelny等人，*J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。藉由基因融合使來自Fos蛋白及Jun蛋白之白胺酸拉鏈肽與兩種不同抗體之Fab'部分連接。使抗體同源二聚體在鉸鏈區處經還原以形成單體且接著再氧化以形成抗體異源二聚體。亦可利用此方法產生抗體同源二聚體。Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)所述之"雙功能抗體"技術已提供用於製備雙特異性抗體片段之替代機制。該等片段包含藉由過短從而不允許在同一鏈上之兩個域之間配對之連接子與輕鏈可變域(VL)連接之重鏈可變域(VH)。因此，一個片段之VH域及VL域被迫與另一片段之互補VL域及VH域配對，從而形成兩個抗原結合位點。亦已報導利用單鏈Fv(sFv)二聚體製備雙特異性抗體片段之另一策略。參見Gruber等人，*J. Immunol.*, 152:5368 (1994)。

涵蓋具有超過兩個價數之抗體。舉例而言，可製備三特異性抗體。Tuft等人，*J. Immunol.* 147: 60 (1991)。

(vii)效應功能工程化

可能需要關於效應功能修飾本發明之抗體，以便增強抗體之有效性。舉例而言，可將半胱胺酸殘基引入Fc區中，藉此使得在此區中形成鏈間二硫鍵。如此產生之同源二聚

體抗體可具有改良之內化能力及/或增強之補體介導之細胞殺傷及抗體依賴性細胞毒性(ADCC)。參見Caron等人，J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)及Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)。亦可如Wolff等人，Cancer Research 53:2560-2565 (1993)中所述，使用異源雙功能交聯劑製備具有增強之抗腫瘤活性之同源二聚體抗體。或者，可將具有雙Fc區之抗體工程化且藉此該抗體可具有增強之補體溶解作用及ADCC能力。參見Stevenson等人，Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)。

(viii)抗體-補救受體結合抗原決定基融合物

在本發明之某些實施例中，可能需要使用抗體片段而非完整抗體，(例如)以增強腫瘤滲透性。在此狀況下，可能需要修飾抗體片段以增加其血清半衰期。此可(例如)藉由將補救受體結合抗原決定基併入抗體片段中(例如，藉由使抗體片段中之合適區域突變，或藉由將抗原決定基併入肽標籤中，接著(例如)藉由DNA或肽合成將該肽標籤融合於抗體片段之末端或中間)來達成。

補救受體結合抗原決定基較佳構成來自Fc域之一或兩個環之任一或多個胺基酸殘基經轉移至抗體片段之類似位置的區域。甚至更佳地，轉移來自Fc域之一或兩個環之三個或三個以上殘基。更佳地，抗原決定基係取自Fc區(例如，IgG之Fc區)之CH2域且轉移至抗體之CH1、CH3或V.sub.H區或一個以上此類區中。或者，抗原決定基係取自Fc區之CH2域且轉移至抗體片段之CL區或VL區或兩者

中。

(ix)對抗體之其他共價修飾

對抗體之共價修飾包括在本發明之範疇內。若適用，則其可藉由化學合成或藉由抗體之酶促或化學裂解進行。藉由使抗體之目標胺基酸殘基與能夠與所選側鏈或N或C末端殘基反應之有機衍生化劑反應，將其他類型之抗體共價修飾引入分子中。共價修飾之實例描述於以引用的方式明確併入本文中之美國專利第5,534,615號中。一較佳類型之抗體共價修飾包含以美國專利第4,640,835號、第4,496,689號、第4,301,144號、第4,670,417號、第4,791,192號或第4,179,337號中所闡述之方式使抗體與多種非蛋白聚合物(例如，聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯)中之一者連接。

本發明亦係關於包含與細胞毒性劑(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，放射性接合物))接合之本文所述之抗體的免疫接合物。多種放射性核素可用於產生放射性接合物抗體。實例包括(但不限於)(例如) ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及 ^{186}Re 。

已在上文描述適用於產生該等免疫接合物之化學治療劑。舉例而言，可將BCNU、鏈脲黴素、長春新鹼、5-氟尿嘧啶、美國專利5,053,394、5,770,710中所述之總稱為LL-E33288複合物之藥劑家族、艾斯帕米辛(美國專利5,877,296)等(亦參見本文中化學治療劑之定義)與本發明之抗體或其片段接合。

為選擇性地破壞腫瘤，抗體可包含高度放射性原子。多種放射性同位素可用於產生放射性接合抗體或其片段。實例包括(但不限於)(例如) ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{32}P 、 ^{212}Pb 、 ^{111}In 、Lu之放射性同位素等。當使用接合物以供診斷時，其可包含用於閃爍攝影術研究之放射性原子(例如， $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 或 ^{123}I)或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，MRI)之自旋標記(諸如，碘-123、碘-131、銥-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵)。

可以已知之方式將放射性標記或其他標記併入接合物中。舉例而言，肽可用生物學方法合成，或可藉由使用(例如)包含以氟-19代替氫之適當胺基酸前驅物進行化學胺基酸合成來合成。諸如 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 或 ^{123}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 及 ^{111}In 之標記可經由肽中之半胱胺酸殘基連接。釷-90可經由離胺酸殘基連接。IODOGEN方法(Fraker等人(1978)*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57)可用於併入碘-123。參見例如 *Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy*(Chatal, CRC Press 1989)，其詳細描述其他方法。

可使用之酶促活性毒素及其片段包括白喉A鏈(diphtheria A chain)、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(獲自綠膿假單胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈(ricin A chain)、相思豆毒素A鏈(abrin A chain)、葫蘆根毒素A鏈(modeccin A chain)、 α -帶麴菌素(alpha-sarcin)、油桐蛋白(*Aleurites fordii* protein)、康乃

馨蛋白、美洲商陸蛋白 (*Phytolacca americana* protein)(PAPI、PAPII 及 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制劑、麻瘋樹毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (crotonin)、肥皂草 (*Saponaire officinalis*) 抑制劑、天堂果蛋白 (gelonin)、有絲分裂素 (mitogellin)、侷限麴菌素 (restrictocin)、酚黴素 (phenomycin)、新黴素 (neomycin) 及黴菌毒素 (tricothecene)。參見例如 1993 年 10 月 28 日公開之 WO 93/21232。

抗體與細胞毒性劑之接合物可使用多種雙官能蛋白質偶合劑來製得，該等蛋白質偶合劑諸如 N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯 (SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯、亞胺基硫雜環戊烷 (IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如，己二醯亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如，辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛(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-重氮鹽衍生物(諸如，雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如，甲苯 2,6-二異氰酸酯)及雙活性氯化合物(諸如，1,5-二氯-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如 Vitetta 等人，*Science* 238: 1098 (1987) 中所述來製備。碳 14 標記之 1-異硫氰酸酯基苄基-3-甲基二仲乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 為一種用於使放射性核苷酸與抗體接合之例示性螯合劑。參見 WO 94/11026。連接子可為有利於使細胞毒性藥物在細胞中釋放之"可裂解連接子"。舉例而言，可使用酸不穩定性連接

子、肽酶敏感性連接子、光不穩定性連接子、二甲基連接子或含二硫化物之連接子 (Chari 等人, *Cancer Research* 52:127-131 (1992); 美國專利第 5,208,020 號)。

或者, 包含抗 VEGF 及 / 或抗本發明蛋白質之抗體及細胞毒性劑之融合蛋白可 (例如) 藉由重組技術或肽合成製得。DNA 之長度可包含編碼接合物之兩個部分的各別區域, 該等區域彼此相鄰或由編碼不破壞接合物所需性質之連接子肽之區域分離。

在某些實施例中, 使抗體與 "受體" (諸如, 抗生蛋白鏈菌素 (streptavidin)) 接合以用於預靶向腫瘤, 其中向患者投與抗體-受體接合物, 接著使用清除劑將未結合之接合物自循環中移除, 且接著投與與細胞毒性劑 (例如, 放射性核苷酸) 接合之 "配位體" (例如, 抗生物素蛋白)。在某些實施例中, 在抗體與具有核溶解活性之化合物 (例如, 核糖核酸酶或 DNA 核酸內切酶, 諸如脫氧核糖核酸酶; DNase) 之間形成免疫接合物。

本發明提供與一或多個類美登素分子接合之本發明抗體。類美登素為有絲分裂抑制劑, 其藉由抑制微管蛋白聚合而起作用。美登素最先係自東非灌木齒葉美登木 (*Maytenus serrata*) 分離 (美國專利第 3,896,111 號)。隨後, 發現某些微生物亦產生類美登素, 諸如美登醇 (maytansinol) 及 C-3 美登醇酯 (美國專利第 4,151,042 號)。合成美登醇及其衍生物及類似物揭示於 (例如) 美國專利第 4,137,230 號、第 4,248,870 號、第 4,256,746 號、第

4,260,608 號 、 第 4,265,814 號 、 第 4,294,757 號 、 第 4,307,016 號 、 第 4,308,268 號 、 第 4,308,269 號 、 第 4,309,428 號 、 第 4,313,946 號 、 第 4,315,929 號 、 第 4,317,821 號 、 第 4,322,348 號 、 第 4,331,598 號 、 第 4,361,650 號 、 第 4,364,866 號 、 第 4,424,219 號 、 第 4,450,254 號 、 第 4,362,663 號 及 第 4,371,533 號 中 。

可使本發明之抗體與類美登素分子接合，而不顯著減弱抗體或類美登素分子之生物活性。每個抗體分子平均接合 3-4 個類美登素分子展示增強對標靶細胞之細胞毒性的功效，而對抗體之功能或溶解性並無不利影響，但期望甚至一分子毒素/抗體即可增強細胞毒性，而優於使用裸露抗體。類美登素為此項技術中所熟知，且可藉由已知技術合成或自天然來源分離。合適類美登素揭示於(例如)美國專利第 5,208,020 號及上文提及之其他專利及非專利公開案中。在一實施例中，類美登素為美登醇及在美登醇分子之芳族環或其他位置上經改質之美登醇類似物，諸如各種美登醇酯。

此項技術中已知多種用於製備抗體-類美登素接合物之連接基團，包括(例如)美國專利第 5,208,020 號或歐洲專利 0 425 235 B1 及 Chari 等人，*Cancer Research* 52:127-131 (1992) 中所揭示之彼等連接基團。連接基團包括如以上識別之專利中所揭示之二硫醚基、硫醚基、酸不穩定性基團、光不穩定性基團、肽酶不穩定性基團或酯酶不穩定性基團，二硫醚基及硫醚基較佳。

抗體與類美登素之接合物可使用多種雙官能蛋白質偶合劑來製得，該等蛋白質偶合劑諸如 N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯 (SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯、亞胺基硫雜環戊烷 (IT)、醯亞胺酯之雙官能衍生物(諸如，己二醯亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)、活性酯(諸如，辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛(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-重氮鹽衍生物(諸如，雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如，甲苯 2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如，1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。典型偶合劑包括 N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯 (SPDP)(Carlsson 等人，*Biochem. J.* 173:723-737 [1978])及 N-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯 (SPP) 以提供二硫鍵。

視連接類型而定，可使連接子與類美登素分子之各種位置連接。舉例而言，可使用習知偶合技術藉由與羥基反應而形成酯鍵。反應可發生在具有羥基之 C-3 位置、經羥甲基改質之 C-14 位置、經羥基改質之 C-15 位置及具有羥基之 C-20 位置上。鍵聯在美登醇或美登醇類似物之 C-3 位置上形成。

另一所關注之免疫接合物包含與一或多個刺孢黴素 (calicheamicin) 分子接合之本發明抗體。抗生素之刺孢黴素家族能夠以亞皮莫耳濃度產生雙鏈 DNA 斷裂。關於刺孢黴素家族之接合物的製備，請參見美國專利 5,712,374、

5,714,586 、 5,739,116 、 5,767,285 、 5,770,701 、 5,770,710 、 5,773,001 、 5,877,296(所有均頒予 American Cyanamid Company)。可使用之刺孢黴素結構類似物包括(但不限於) γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙醯基- γ_1^I 、PSAG及 θ_1^I (Hinman等人, *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode等人, *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998)及先前所提及之頒予 American Cyanamid之美國專利)。抗體可接合之另一抗腫瘤藥物為QFA, 其為抗葉酸劑(antifolate)。刺孢黴素及QFA均具有細胞內作用位點且不易於穿過質膜。因此, 此等藥劑經由抗體介導之內化而被細胞吸收, 從而極大地增強了其細胞毒性作用。

(x)自合成抗體噬菌體文庫產生抗體

在一較佳實施例中, 本發明提供一種使用獨特噬菌體呈現方法產生及選擇新穎抗體之方法。該方法包含基於單一構架模板產生合成抗體噬菌體文庫, 設計可變域內之足夠多樣性, 呈現具有多樣化可變域之多肽, 選擇具有靶向抗原之高度親和力的候選抗體, 及分離所選抗體。

噬菌體呈現方法之詳情可見於(例如)2003年12月11日公開之WO 03/102157(其全部揭示內容以引用的方式明確併入本文中)。

在一態樣中, 本發明中所用之抗體文庫可藉由使抗體可變域之至少一個CDR中的溶劑可及位置及/或高多樣性位置突變來產生。使用本文所提供之方法可使一些或所有CDR突變。在一些實施例中, 可較佳藉由使CDRH1、

CDRH2及CDRH3中之位置突變以形成單一文庫或藉由使CDRL3及CDRH3中之位置突變以形成單一文庫或藉由使CDRL3及CDRH1、CDRH2及CDRH3中之位置突變以形成單一文庫來產生多樣化抗體文庫。

可產生(例如)在CDRH1、CDRH2及CDRH3之溶劑可及位置及/或高多樣性位置中具有突變的抗體可變域文庫。可產生在CDRL1、CDRL2及CDRL3中具有突變之另一文庫。此等文庫亦可彼此結合使用以產生具有所需親和力之結合子。舉例而言，在進行用於與標靶抗原結合之重鏈文庫的一或多輪選擇後，可將輕鏈文庫置換至重鏈結合子之群中以進行其他輪選擇，從而增強結合子之親和力。

較佳地，藉由在重鏈序列可變區之CDRH3區中用變異型胺基酸取代初始胺基酸來產生文庫。所得文庫可含有複數個抗體序列，其中序列多樣性主要存在於重鏈序列之CDRH3區中。

在一態樣中，文庫係在人化抗體4D5序列或人化抗體4D5序列之構架胺基酸序列之情形下產生。較佳地，文庫係藉由用DVK密碼子組編碼之胺基酸取代重鏈之至少殘基95-100a來產生，其中DVK密碼子組係用以編碼此等位置中之每一者的一組變異型胺基酸。適用於產生此等取代之寡核苷酸組之一實例包含序列(DVK)₇。在一些實施例中，文庫係藉由用DVK及NNK密碼子組兩者編碼之胺基酸取代殘基95-100a來產生。適用於產生此等取代之寡核苷酸組之一實例包含序列(DVK)₆(NNK)。在另一實施例中，文庫係

藉由用 *DVK* 及 *NNK* 密碼子組兩者編碼之胺基酸取代至少殘基 95-100a 來產生。適用於產生此等取代之寡核苷酸組之一實例包含序列 $(DVK)_5(NNK)$ 。適用於產生此等取代之寡核苷酸組之另一實例包含序列 $(NNK)_6$ 。合適寡核苷酸序列之其他實例可藉由熟習此項技術者根據本文所述之標準來確定。

在另一實施例中，利用不同 CDRH3 設計來分離高親和力結合子且分離用於多種抗原決定基之結合子。此文庫中產生之 CDRH3 的長度範圍為 11 至 13 個胺基酸，但亦可產生不同於此之長度。H3 多樣性可藉由使用 *NNK*、*DVK* 及 *NVK* 密碼子組以及 N 及 / 或 C 末端之更有限多樣性來擴大。

多樣性亦可在 CDRH1 及 CDRH2 中產生。CDR-H1 及 H2 多樣性之設計遵從模擬如所述具有集中比先前設計更緊密匹配天然多樣性之多樣性的修飾之天然抗體譜系的靶向策略。

對於 CDRH3 之多樣性而言，可單獨構築具有不同 H3 長度之多個文庫且接著組合以選擇靶向抗原之結合子。使用如先前及下文所述之固體支撐物選擇及溶液分選法，可將該多個文庫彙集及分選。可採用多個分選策略。舉例而言，一變化形式包含對與固體結合之標靶進行分選，接著對可存在於融合多肽上之標籤（例如，抗 gD 標籤）進行分選，且接著對與固體結合之標靶進行另一分選。或者，可首先針對與固體表面結合之標靶分選文庫，接著使用標靶抗原濃度降低之溶液相結合分選經溶離之結合子。利用不

同分選方法之組合使僅高度表現序列之選擇最少且選擇出大量不同高親和力純系。

針對標靶抗原之高親和力結合子可自文庫中分離。限制H1/H2區之多樣性減少簡併性約 10^4 至 10^5 倍且允許更多H3多樣性提供更高親和力結合子。利用具有不同類型CDRH3多樣性(例如，利用DVK或NVT)之文庫允許分離可與標靶抗原之不同抗原決定基結合之結合子。

在自如上所述之彙集文庫中分離之結合子中，已發現藉由提供有限輕鏈多樣性可進一步改良親和力。在此實施例中輕鏈多樣性如下產生：CDRL1中：由RDT編碼胺基酸位置28；由RKT編碼胺基酸位置29；由RVW編碼胺基酸位置30；由ANW編碼胺基酸位置31；由THT編碼胺基酸位置32；視情況，由CTG編碼胺基酸位置33；CDRL2中：由KBG編碼胺基酸位置50；由AVC編碼胺基酸位置53；及視情況，由GMA編碼胺基酸位置55；CDRL3中：由TMT或SRT或兩者編碼胺基酸位置91；由DMC編碼胺基酸位置92；由RVT編碼胺基酸位置93；由NHT編碼胺基酸位置94；且由TWT或YKG或兩者編碼胺基酸位置96。

在另一實施例中，產生具有CDRH1、CDRH2及CDRH3區多樣性之文庫。在此實施例中，使用多種H3區長度及主要使用密碼子組XYZ及NNK或NNS產生CDRH3多樣性。可使用個別寡核苷酸形成文庫且將文庫彙集或將寡核苷酸彙集以形成文庫子集。可針對與固體結合之標靶，分選此實施例之文庫。可針對特異性及親和力使用ELISA檢定來篩

檢自多次分選分離之純系。對於特異性而言，可針對所需標靶抗原以及其他非標靶抗原來篩檢純系。接著可在溶液結合競爭ELISA檢定或點樣競爭檢定中針對親和力來篩檢針對標靶抗原之彼等結合子。可利用如上所述製備之XYZ密碼子組將高親和力結合子自文庫中分離。此等結合子可如抗體或抗原結合片段易於在細胞培養物中以高產率產生。

在一些實施例中，可能需要產生CDRH3區長度具有更大多樣性之文庫。舉例而言，可能需要產生CDRH3區在約7至19個胺基酸範圍內之文庫。

自此等實施例之文庫分離的高親和力結合子易於在細菌及真核細胞培養物中以高產率產生。載體可經設計以易於移除諸如gD標籤之序列、病毒鞘蛋白組份序列及/或添加恆定區序列以供以高產率產生全長抗體或抗原結合片段。

可將具有CDRH3突變之文庫與含有其他CDR(例如，CDRL1、CDRL2、CDRL3、CDRH1及/或CDRH2)變異型式之文庫組合。因此，例如在一實施例中，將CDRH3文庫與使用預定密碼子組在位置28、29、30、31及/或32上具有變異型胺基酸的人化4D5抗體序列情形下產生之CDRL3文庫組合。在另一實施例中，可將具有CDRH3突變之文庫與包含變異型CDRH1及/或CDRH2重鏈可變域之文庫組合。在一實施例中，使用在位置28、30、31、32及33上具有變異型胺基酸之人化抗體4D5產生CDRH1文庫。可使用預定密碼子組藉由在位置50、52、53、54、56及58上具有變異

型胺基酸之人化抗體4D5序列產生CDRH2文庫。

(xi)抗體變異體

自噬菌體文庫產生之新穎抗體可經進一步修飾以產生具有比親本抗體改良之物理、化學及/或生物學性質的抗體突變體。在所用檢定為生物活性檢定之情況下，抗體突變體在所選檢定中較佳具有比親本抗體在該檢定中之生物活性好至少約10倍、較佳好至少約20倍、更佳好至少約50倍及有時好至少約100倍或200倍的生物活性。舉例而言，抗Bv8抗體突變體較佳具有比親本抗體之結合親和力強至少約10倍、較佳強至少約20倍、更佳強至少約50倍及有時強至少約100倍或200倍的對Bv8之結合親和力。

為產生抗體突變體，將一或多個胺基酸改變(例如，取代)引入親本抗體之一或多個高變區中。或者或另外，可將構架區殘基之一或多個改變(例如，取代)引入親本抗體中，其中此一或多個改變使得抗體突變體對來自第二哺乳動物物種之抗原的結合親和力得以改良。修飾之構架區殘基之實例包括直接非共價結合抗原之彼等構架區殘基(Amit等人，(1986) *Science* 233:747-753)、與CDR構形相互作用/影響CDR構形相互作用之彼等構架區殘基(Chothia等人，(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917)及/或參與V_L-V_H界面之彼等構架區殘基(EP 239 400 B1)。在某些實施例中，對一或多個該等構架區殘基之修飾使得抗體對來自第二哺乳動物物種之抗原的結合親和力得以增強。舉例而言，在本發明之此實施例中，可改變約一至約五個構架殘基。有

時，甚至在無高變區殘基已改變之情況下，此可足以產生適用於臨床前試驗之抗體突變體。然而，通常抗體突變體將包含額外高變區改變。

改變之高變區殘基可隨機變化，尤其在親本抗體之起始結合親和力使得該等隨機產生之抗體突變體可易於篩檢之情況下。

一種適用於產生該等抗體突變體之程序稱為"丙胺酸掃描突變誘發"(Cunningham及Wells (1989) *Science* 244:1081-1085)。此處，將一或多個高變區殘基經丙胺酸或聚丙胺酸殘基置換以影響胺基酸與來自第二哺乳動物物種之抗原的相互作用。接著藉由在取代位點處或針對取代位點引入進一步或其他突變來改進彼等證實對取代具有功能敏感性之高變區殘基。因此，雖然用於引入胺基酸序列變異之位點經預先確定，但突變性質本身無需預先確定。如本文所述針對生物活性來篩檢以此方式產生之丙胺酸突變體。

通常將以保守取代開始，諸如展示於下文"較佳取代"之標題下的彼等保守取代。若該等取代引起生物活性(例如，結合親和力)變化，則可引入下表中稱為"例示性取代"或如下文參考胺基酸類別進一步描述之更實質性變化且篩檢產物。

較佳取代：

初始殘基	例示性取代	較佳取代
Ala(A)	val ; leu ; ile	val
Arg(R)	lys ; gln ; asn	lys
Asn(N)	gln ; his ; lys ; arg	gln
Asp(D)	glu	glu
Cys(C)	ser	ser
Gln(Q)	asn	asn
Glu(E)	asp	asp
Gly(G)	pro ; ala	ala
His(H)	asn ; gln ; lys ; arg	arg
Ile(I)	leu ; val ; met ; ala ; phe ; 正白 胺酸	leu
Leu(L)	正白胺酸 ; ile ; val ; met ; ala ; phe	ile
Lys(K)	arg ; gln ; asn	arg
Met(M)	leu ; phe ; ile	leu
Phe(F)	leu ; val ; ile ; ala ; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr ; phe	tyr
Tyr(Y)	trp ; phe ; thr ; ser	phe
Val(V)	ile ; leu ; met ; phe ; ala ; 正白 胺酸	leu

對抗體生物學性質之甚至更實質性修飾係藉由選擇對維持以下各方面之作用顯著不同的取代來實現：(a)取代區中多肽主鏈結構，例如呈摺疊片狀或螺旋構形；(b)標靶位點處分子之電荷或疏水性；或(c)側鏈體積。基於共同側鏈性

質，將天然存在之殘基分組：

(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；及

(6)芳族：trp、tyr、phe。

非保守性取代將使此等類別中之一者之成員換成另一類別。

在另一實施例中，使用噬菌體呈現使選用於修飾之位點親和力成熟(見上文)。

藉由此項技術中已知之多種方法製備編碼胺基酸序列突變體之核酸分子。此等方法包括(但不限於)使親本抗體之早期製備突變或非突變型式發生寡核苷酸介導之(或定點)突變誘發、PCR突變誘發及序列盒突變誘發。用於製備突變體之較佳方法為定點突變誘發(參見例如Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488)。

在某些實施例中，抗體突變體僅具有單個經取代之高變區殘基。在其他實施例中，親本抗體之兩個或兩個以上高變區殘基會經取代，例如約兩個至約十個高變區取代。

通常，具有經改良生物學性質的抗體突變體具有與親本抗體之重鏈或輕鏈可變域之胺基酸序列至少75%、更佳至少80%、更佳至少85%、更佳至少90%且最佳至少95%胺基酸序列一致性或相似性的胺基酸序列。關於此序列之一致

性或相似性在本文中定義為在將序列及必要時引入之缺口比對以實現最大序列一致性百分比後，候選序列中與親本抗體殘基一致(亦即，相同殘基)或相似(亦即，來自基於共同側鏈性質之相同群的胺基酸殘基，見上文)之胺基酸殘基百分比。N-末端、C-末端或內部擴展、缺失或插入至可變域外之抗體序列中無一應被解釋為影響序列一致性或相似性。

在產生抗體突變體後，測定該分子相對於親本抗體之生物活性。如上所述，此可包含測定抗體之結合親和力及/或其他生物活性。在本發明之一較佳實施例中，製備一組抗體突變體且針對其對抗原或其片段之結合親和力來篩檢該組抗體突變體。使選自此初始篩檢之一或多個抗體突變體視情況經受一或多個其他生物活性檢定以證實具有增強之結合親和力的抗體突變體實際上適用於(例如)臨床前研究。

可使如此選擇之抗體突變體經受進一步修飾，通常視預定抗體用途而定。該等修飾可包含進一步改變胺基酸序列、與異源多肽融合及/或共價修飾(諸如下文詳細說明之彼等修飾)。上文詳細說明關於胺基酸序列改變之例示性修飾。舉例而言，亦可取代任何不參與維持抗體突變體之適當構形的半胱胺酸殘基，一般係以絲胺酸取代以改良分子之氧化穩定性並且防止異常交聯。反之，可將半胱胺酸鍵添加至抗體中以改良其穩定性(尤其在抗體為諸如Fv片段之抗體片段之情況下)。另一類型胺基酸突變體具有改

變之糖基化模式。此可藉由使抗體中存在之一或多個碳水化合物部分缺失及/或添加抗體中不存在之一或多個糖基化位點來實現。抗體之糖基化通常為N-連接型或O-連接型。N-連接型係指碳水化合物部分與天冬醯胺殘基之側鏈連接。三肽序列天冬醯胺-X-絲胺酸及天冬醯胺-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸以外之任何胺基酸)為用於碳水化合物部分與天冬醯胺側鏈之酶促連接的識別序列。因此，多肽中存在此等三肽序列中之任一者產生潛在糖基化位點。O-連接型糖基化係指糖N-乙醯基半乳糖胺、半乳糖或木糖中之一者與羥基胺基酸(最常見為絲胺酸或蘇胺酸)的連接但亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。將糖基化位點添加至抗體中便利地藉由改變胺基酸序列，以使其含有上述三肽序列中之一或多者來實現(對N-連接型糖基化位點而言)。該改變亦可藉由向初始抗體之序列中添加一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基或用一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基進行取代來實現(對O-連接型糖基化位點而言)。

在抗體包含Fc區之情況下，可改變與其連接之碳水化合物。舉例而言，具有缺乏連接於抗體Fc區之海藻糖的成熟碳水化合物結構的抗體描述於美國專利申請案第US 2003/0157108號(Presta, L.)中。亦參見US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。在連接於抗體Fc區之碳水化合物中具有等分N-乙醯基葡糖胺(GlcNAc)之抗體提及於WO 2003/011878 (Jean-Mairet等人)及美國專利第6,602,684號(Umana等人)中。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報導於WO 1997/30087(Patel等人)中。關於具有連接於Fc區之經改變碳水化合物化合物的抗體，亦請參見WO 1998/58964(Raju, S.)及WO 1999/22764(Raju, S.)。關於具有經修飾糖基化之抗原結合分子，亦請參見US 2005/0123546(Umana等人)。

本文中之較佳糖基化變異體包含與Fc區連接之碳水化合物結構缺乏海藻糖之Fc區。該等變異體具有改良之ADCC功能。視情況，Fc區進一步在其中包含一或多個進一步改良ADCC之胺基酸取代，例如在Fc區之位置298、333及/或334(殘基之Eu編號)處之取代。與"去海藻糖基化"或"海藻糖缺乏"抗體有關之公開案的實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO 2005/053742；Okazaki等人，*J. Mol. Biol.* 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人，*Biotech. Bioeng.* 87: 614 (2004)。產生去海藻糖基化抗體之細胞株之實例包括缺乏蛋白質海藻糖基化之Lec13 CHO細胞(Ripka等人，*Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號(Presta, L)；及Adams等人之WO 2004/056312，尤其在實例11下)及基因剔除細胞株，諸如 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因FUT8經剔除之CHO細胞(Yamane-Ohnuki等人，*Biotech. Bioeng.*

87: 614 (2004))。

(xii) 抗體之重組產生

為重組產生抗體，將編碼抗體之核酸分離且插入可複製載體中以供進一步選殖(DNA擴增)或表現。編碼單株抗體之DNA易於分離及使用習知程序(例如，藉由使用能夠與編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合的寡核苷酸探針)定序。可利用多種載體。載體組件一般包括(但不限於)以下各物中之一或多者：信號序列、複製起點、一或多個標記物基因、增強子元件、啟動子及轉錄終止序列(例如，如以引用的方式明確併入本文中之美國專利第5,534,615號中所述)。

適用於選殖或表現本文之載體中之DNA的宿主細胞為上文所述之原核生物、酵母或高級真核生物細胞。出於此目的之合適原核生物包括真細菌，諸如革蘭氏陰性(Gram-negative)或格蘭氏陽性(Gram-positive)生物體，例如腸內菌科(Enterobacteriaceae)，諸如埃希氏菌(*Escherichia*)(例如，大腸桿菌)、腸桿菌(*Enterobacter*)、歐文菌(*Erwinia*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、變形菌(*Proteus*)、沙門氏菌(*Salmonella*)(例如，鼠傷寒沙門菌(*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌(*Serratia*)(例如，黏質沙雷菌(*Serratia marcescans*))及志賀菌(*Shigella*)，以及芽孢桿菌(*Bacilli*)(諸如，枯草芽孢桿菌(*B. subtilis*)及益生芽孢桿菌(*B. licheniformis*)(例如，1989年4月12日公開之DD 266,710中揭示之益生芽孢桿菌41P))、假單胞菌

(*Pseudomonas*)(諸如，綠膿桿菌(*P. aeruginosa*))及鏈黴菌(*Streptomyces*)。一種較佳大腸桿菌選殖宿主為大腸桿菌 294(ATCC 31,446)，不過諸如大腸桿菌 B、大腸桿菌 X 1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌 W3110(ATCC 27,325)之其他菌株亦合適。此等實例為說明性而非限制性。

除原核生物外，諸如絲狀真菌或酵母之真核微生物亦為抗體編碼載體之合適選殖或表現宿主。在低級真核宿主微生物中，釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通麵包酵母(baker's yeast)最常用。然而，大量其他類屬、物種及菌株在本文中通常可用且適用，諸如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)；刻魯維酵母(*Kluyveromyces*)宿主，諸如乳酸刻魯維酵母(*K. lactis*)、脆壁刻魯維酵母(*K. fragilis*)(ATCC 12,424)、保加利亞刻魯維酵母(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045)、魏氏刻魯維酵母(*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178)、華爾狄刻魯維酵母(*K. waltii*)(ATCC 56,500)、果蠅刻魯維酵母(*K. drosophilum*)(ATCC 36,906)、耐熱刻魯維酵母(*K. thermotolerans*)及馬克斯刻魯維酵母(*K. marxianus*)；耶氏酵母(*Yarrowia*)(EP 402,226)；甲醇酵母(*Pichia pastoris*)(EP 183,070)；念珠菌(*Candida*)；裏氏木黴(*Trichoderma reesia*)(EP 244,234)；粗糙脈孢菌(*Neurospora crassa*)；許旺酵母(*Schwanniomyces*)，諸如西方許旺酵母(*Schwanniomyces occidentalis*)；及絲狀真菌，諸如脈孢菌(*Neurospora*)、青黴菌(*Penicillium*)、彎頸黴菌

(*Tolypocladium*)及曲黴菌(*Aspergillus*)宿主，諸如構巢黴黴(*A. nidulans*)及黑黴黴(*A. niger*)。

用於表現糖基化抗體之合適宿主細胞來源於多細胞生物體。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑別來自諸如草地黏蟲(*Spodoptera frugiperda*)(毛蟲)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)(蚊)、白紋伊蚊(*Aedes albopictus*)(蚊)、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)(果蠅)及家蠶(*Bombyx mori*)之宿主的大量桿狀病毒株及變異體及相應容許昆蟲宿主細胞。多種用於轉染之病毒株公開可得，例如苜蓿丫紋夜蛾(*Autographa californica*)NPV之L-1變異體及家蠶NPV之Bm-5病毒株，且根據本發明該等病毒可用作本文中之病毒，尤其用於轉染草地黏蟲細胞。棉花、玉米、馬鈴薯、大豆、矮牽牛、番茄及煙草之植物細胞培養物亦可用作宿主。

然而，對脊椎動物細胞最為關注，且脊椎動物細胞在培養物(組織培養物)中之繁殖已成為一種常規程序。適用哺乳動物宿主細胞株之實例為經SV40轉型之猴腎CV1細胞株(COS-7, ATCC CRL 1651)；人類胚胎腎細胞株(293細胞或經次選殖以在懸浮培養物中生長之293細胞，Graham等人，*J. Gen Virol.* 36:59 (1977))；幼倉鼠腎細胞(BHK, ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO, Urlaub等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；小鼠足細胞(sertoli cell)(TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；非洲綠猴腎細胞

(VERO-76, ATCC CRL-1587); 人類宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2); 犬腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34); 水牛鼠肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人類肺細胞(W138, ATCC CCL 75); 人類肝細胞(Hep G2, HB 8065); 小鼠乳房腫瘤(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI細胞(Mather等人, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5細胞; FS4細胞; 及人類肝細胞瘤細胞株(Hep G2)。

用上述用於產生抗體之表現或選殖載體轉型宿主細胞, 且將該等宿主細胞培養於適當時經改質以供誘導啟動子、選擇轉化子或擴增編碼所需序列之基因的習知營養培養基中。

用以產生本發明抗體之宿主細胞可在多種培養基中培養。諸如 Ham's F10(Sigma)、最低必需培養基(MEM, Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及杜爾貝科改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(DMEM, Sigma)之市售培養基適於培養該等宿主細胞。此外, Ham等人, Meth. Enz. 58:44 (1979); Barnes等人, Anal. Biochem. 102:255 (1980); 美國專利第 4,767,704 號; 第 4,657,866 號; 第 4,927,762 號; 第 4,560,655 號; 或第 5,122,469 號; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美國專利第 Re. 30,985 號中所述之任何培養基可用作宿主細胞之培養基。此等培養基中之任一者均可在必要時補充激素及/或其他生長因子(諸如, 胰島素、運鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如, 氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(諸如, HEPES)、核苷酸

(諸如，腺苷及胸苷)、抗生素(諸如，GENTAMYCIN™)、微量元素(定義為通常以在微莫耳濃度範圍內之最終濃度存在的無機化合物)及葡萄糖或等效能量來源。亦可包括熟習此項技術者所已知之適合濃度的任何其他必需補充劑。培養條件(諸如，溫度、pH值及其類似條件)為先前選用於表現之宿主細胞所用之條件，且對一般技術者而言將顯而易見。

當使用重組技術時，可在周質間隙中以細胞內方式產生抗體或使其直接分泌至培養基中。若抗體在細胞內產生，則作為第一步，例如藉由離心或超濾來移除宿主細胞或溶解細胞之顆粒碎片。在抗體被分泌至培養基中之情況下，一般首先使用市售蛋白質濃縮過濾器(例如，Amicon或Millipore Pellicon超濾單元)濃縮來自該等表現系統之上清液。在任何先前步驟中可包括諸如PMSF之蛋白酶抑制劑以抑制蛋白水解，且可包括抗生素以防止外來污染物生長。

自細胞製備之抗體組合物可使用(例如)羧磷灰石層析法、凝膠電泳法、透析及親和力層析法來純化，其中親和力層析法為較佳純化技術。蛋白質A作為親和力配位體之適宜性係視存在於抗體中之任何免疫球蛋白Fc域的種類及同型而定。蛋白質A可用於純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈之抗體(Lindmark等人，J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。對所有小鼠同型及人類 $\gamma 3$ 推薦蛋白質G(Guss等人，EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。雖然親和力配位體所

連接之基質最通常為瓊脂糖，但可用其他基質。與使用瓊脂糖可達成之流動速率及處理時間相比，機械穩定性基質（諸如，受控孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯)允許更快之流動速率及更短之處理時間。在抗體包含CH3域之情況下，Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)適用於純化。視待回收之抗體而定，亦可利用其他用於蛋白質純化之技術，諸如經離子交換管柱分級分離、乙醇沈澱、逆相HPLC、經二氧化矽層析、經陰離子或陽離子交換樹脂（諸如，聚天冬胺酸管柱）肝素瓊脂糖™層析的層析、層析聚焦、SDS-PAGE及硫酸銨沈澱。

D. Bv8拮抗劑之用途

本發明之Bv8拮抗劑可單獨或與其他治療劑組合用於抑制血管生成、尤其發炎性細胞依賴性血管生成及/或腫瘤形成。

本發明治療方法之主要目標為展示或已知對VEGF拮抗劑、尤其抗VEGF抗體治療具有抗性之腫瘤。

待由本發明方法治療之疾病及病症的實例包括贅生性病症，諸如本文中在術語"癌症"及"癌"下所述之彼等疾病及病症。可經受本發明拮抗劑治療之非贅生性病狀包括(但不限於)(例如)不良或異常肥大、關節炎、類風濕性關節炎(RA)、牛皮癬、牛皮癬斑塊、肉狀瘤病、動脈粥樣硬化、動脈粥樣硬化斑、因心肌梗塞導致之水腫、糖尿病性及其他增生性視網膜病變(包括早產兒視網膜病)、晶狀體後纖維組織增生、新生血管性青光眼、年齡相關之黃斑變性、

糖尿病性黃斑水腫、角膜新血管生成、角膜移植物新血管生成、角膜移植排斥反應、視網膜/脈絡膜新血管生成、隅角新血管生成(虹膜紅變)、眼部新生血管疾病、血管再狹窄、動靜脈畸形(AVM)、腦膜瘤、血管瘤、血管纖維瘤、甲狀腺增生(包括格雷夫氏病)、角膜及其他組織移植、慢性發炎、肺部發炎、急性肺損傷/ARDS、敗血症、原發性肺動脈高壓、惡性肺部積液、腦水腫(例如，與急性中風/閉合性頭部損傷/外傷有關)、滑膜發炎、RA中之血管翳形成、骨化性肌炎、肥厚性骨形成、骨關節炎(OA)、難治性腹水、多囊卵巢病、子宮內膜異位、第三間隔流體疾病(胰腺炎、間隔症候群、燒傷、腸病)、子宮纖維瘤、早產、諸如IBD之慢性發炎(克羅恩氏病及潰瘍性結腸炎)、腎同種異體移植排斥反應、發炎性腸病、腎病症候群、不良或異常組織腫塊生長(非癌症)、肥胖症、脂肪組織腫塊生長、血友病性關節、肥厚性瘢痕、頭髮生長之抑制、奧韋氏症候群、化膿性肉芽腫晶狀體後纖維組織增生、硬皮病、沙眼、血管黏附、滑膜炎、皮炎、先兆子癇、腹水、心包積液(諸如，與心包炎有關之心包積液)及胸腔積液。

本發明提供本發明之與另一療法組合投與Bv8拮抗劑之組合療法。組合治療尤其包括與諸如抗VEGF抗體之VEGF拮抗劑組合投與本文中之Bv8拮抗劑。此外或其他，本文中之Bv8拮抗劑可與一或多種其他藥劑(例如，骨髓細胞減少劑、抗癌劑或治療劑、抗血管生成劑或抗新血管生成治

療劑)組合投與以治療各種贅生性或非贅生性病狀，諸如發炎性細胞依賴性血管生成或腫瘤形成。

在一實施例中，贅生性或非贅生性病狀特徵為與異常或不良血管生成有關之對VEGF拮抗劑治療有抗性的病理性病症。可將本發明之拮抗劑與有效達成彼等目的之另一藥劑於同一組合物中或以獨立組合物形式連續或組合投與。或者或另外，可投與本發明之多種拮抗劑、藥劑及/或促效劑。

拮抗劑及/或藥劑之投藥可(例如)以單一組合物形式或以兩種或兩種以上不同組合物形式使用相同或不同投藥途徑同時進行。或者或另外，投藥可以任何次序連續進行。在某些實施例中，兩種或兩種以上組合物之投藥之間可存在數分鐘至數天至數週至數月之範圍內的時間間隔。舉例而言，可首先投與VEGF拮抗劑，接著投與本發明之不同拮抗劑或藥劑，例如骨髓細胞減少劑(不為VEGF拮抗劑)。然而，亦涵蓋同時投與本發明之不同拮抗劑或藥劑或首先投與本發明之不同拮抗劑或藥劑。

所投之治療劑之有效量將由醫師或獸醫來判斷。進行劑量投藥及調整以實現對待治療之病狀的最大控制。另外，劑量將視諸如待使用之治療劑類型及所治療之特定患者之因素而定。VEGF拮抗劑之合適劑量為彼等目前所用量且由於VEGF拮抗劑及本發明之不同拮抗劑之組合作用(協同作用)而可降低。在某些實施例中，抑制劑之組合加強單一抑制劑之功效。術語"加強"係指常用或批准劑量之治療

劑的功效得以改良。亦參見本文中標題為醫藥組合物之部分。

與癌症有關之抗血管生成療法為旨在抑制提供營養物以支持腫瘤生長所需之腫瘤血管發展的癌症治療策略。因為血管生成牽涉於原發性腫瘤生長與轉移中，所以本發明所提供之抗血管生成治療能夠抑制腫瘤在原發性部位處之贅生性生長，以及預防腫瘤在繼發性部位處之轉移，從而容許由其他治療劑攻擊腫瘤。在本發明之一實施例中，抗癌劑或治療劑為抗血管生成劑。在另一實施例中，抗癌劑為化學治療劑。

此項技術中已鑑別出且已知多種抗血管生成劑，包括本文中所列出之彼等藥劑，例如定義下及例如 Carmeliet及 Jain, *Nature* 407:249-257 (2000)；Ferrara 等人，*Nature Reviews:Drug Discovery*, 3:391-400 (2004)；及 Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003)所列之彼等藥劑。亦參見美國專利申請案 US 20030055006。在一實施例中，本發明之拮抗劑與抗-VEGF中和抗體(或片段)及/或另一VEGF拮抗劑或VEGF受體拮抗劑組合使用，該另一VEGF拮抗劑或VEGF受體拮抗劑包括(但不限於)(例如)可溶性VEGF受體(例如，VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3、神經素(neuropillin)(例如，NRP1、NRP2))片段、能夠阻斷VEGF或VEGFR之適體、中和抗-VEGFR抗體、VEGFR酪胺酸激酶(RTK)之低分子量抑制劑、VEGF之反義策略、針對VEGF或VEGF受體之核糖酶、VEGF之拮抗劑變異體；及

其任何組合。或者或另外，除 VEGF 拮抗劑及本發明之其他藥劑外，視情況亦可向患者共投與兩種或兩種以上血管生成抑制劑。在某些實施例中，一或多種其他治療劑(例如，抗癌劑)可與本發明之藥劑、VEGF 拮抗劑及/或抗血管生成劑組合投與。

在本發明之某些態樣中，適用於與本發明之 Bv8 拮抗劑組合治療腫瘤的其他治療劑包括其他癌症療法(例如，外科手術、放射性治療(例如，包含照射或投與放射性物質)、化學療法、本文中所列舉及此項技術中已知之抗癌劑之治療或其組合)。或者或另外，可向患者共投與本文中揭示之兩種或兩種以上結合相同或兩種或兩種以上不同抗原的抗體。有時，亦向患者投與一或多種細胞因子可為有益的。

在某些態樣中，本發明提供一種藉由向易患癌症或診斷有癌症之患者投與有效量之 VEGF 拮抗劑及本發明之拮抗劑及一或多種化學治療劑來阻斷或減緩抗性腫瘤生長或癌細胞生長的方法。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一例示性及非限制性清單提供於本文中"定義"下。

如一般技術者所瞭解，化學治療劑之合適劑量一般約為已用於單獨或與其他化學治療劑組合投與化學治療劑之臨床療法中的彼等量。視所治療之病狀而定，可能存在劑量變化。施行治療之醫師能夠確定對於個別受檢者之合適劑量。

本發明亦提供用於抑制或預防復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長的方法及組合物。復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長係用於描述一種病狀，其中患者經受一或多種現行療法(例如癌症療法，諸如化學療法、放射療法、外科手術、激素療法及/或生物學療法/免疫療法、抗VEGF抗體療法，尤其針對特定癌症之標準治療方案)或經該等療法治療在臨床上不足以治療該等患者，或該等患者不再自療法中收到任何有益效果，以致此等患者需要其他有效療法。如本文中所用，該短語亦可指"無反應/難治"患者之病狀，例如其描述對療法反應卻遭受副作用、發展抗性、對療法不反應、對療法不令人滿意地反應等的患者。在各個實施例中，癌症為復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長，其中癌細胞數目尚未顯著減小或已增加，或腫瘤大小尚未顯著減小或已增加，或無法使大小或癌細胞數目更進一步減小。藉由此項技術已知用於檢定治療對癌細胞之有效性的任何方法，使用在此類情形中"復發性"或"難治"或"無反應"之業內公認之含義，可活體內或活體外確定癌細胞是否為復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長。對抗-VEGF治療有抗性的腫瘤為復發性腫瘤生長之一實例。

本發明提供藉由投與一或多種本發明之拮抗劑來阻斷或減緩受檢者中復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長，以阻斷或減緩受檢者之復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長的方法。在某些實施例中，拮抗劑可在癌症治療劑之後投與。在某些實施例中，本發明之拮抗劑與癌症療法(例

如，化學療法)同時投與。或者或另外，拮抗劑療法與另一癌症療法交替進行，此可以任何次序進行。本發明亦涵蓋投與一或多種抑制性抗體以預防易患癌症之患者之癌症發作或復發的方法。一般而言，受檢者曾經歷癌症療法或當前正經歷癌症療法。在一實施例中，癌症療法為以抗血管生成劑(例如，VEGF拮抗劑)治療。抗血管生成劑包括此項技術中已知之彼等藥劑及本文中定義下存在之彼等藥劑。在一實施例中，抗血管生成劑為抗VEGF中和抗體或片段(例如人化A4.6.1、AVASTIN®(Genentech, South San Francisco, CA)、Y0317、M4、G6、B20、2C3等)。參見例如美國專利6,582,959、6,884,879、6,703,020；WO 98/45332、WO 96/30046、WO 94/10202；EP 0666868B1；美國專利申請案 20030206899、20030190317、20030203409及20050112126；Popkov等人，*Journal of Immunological Methods* 288:149-164 (2004)；及WO 2005012359。其他藥劑可與VEGF拮抗劑及本發明之拮抗劑組合投與，以阻斷或減緩復發性腫瘤生長或復發性癌細胞生長，例如，參見本文中之標題為組合療法之部分。

在一實施例中，本發明之Bv8拮抗劑可與一或多種骨髓細胞減少劑組合投與，該一或多種骨髓細胞減少劑包括(但不限於)降低Gr1、嗜中性白血球彈性蛋白酶、MCP-1、MIP-1 α 、URCGP或URRTP之表現的治療劑。與本發明之Bv8拮抗劑組合使用之骨髓細胞減少劑尤其包括呈單獨或任何組合形式之Gr1拮抗劑、Cd11B拮抗劑、CD18拮抗

劑、彈性蛋白酶抑制劑、MCP-1拮抗劑、MIP-1 α 拮抗劑、氯屈膦酸鹽(clodronate)。

此外，本發明之Bv8拮抗劑可與激素、輻射及化學治療劑組合投與，藉此使癌細胞對此等藥劑中之一或多者重新敏感，接著可投與(或繼續投與)此等藥劑以治療或控制癌症，包括預防轉移。

可藉由提供一或多個來自受檢者之包括能夠表現一或多種與編碼URCGP、DRCGP、URRTP或DRRTP之核酸同源的核酸序列之細胞的測試細胞群體，評估對VEGF拮抗劑治療之腫瘤敏感性。將該等序列之表現與參考細胞群體相比較。可使用任何參考細胞群體，只要已知該參考細胞群體中之細胞的VEGF拮抗劑敏感狀態即可。可對同時或在不同時間下量測之測試及參考樣品進行比較。後者之一實例為使用彙編表現資訊，例如序列資料庫，其集合關於在敏感狀態已知之細胞中已知序列表現量的資訊。在本發明之某些實施例中，參考細胞群體富含CD11b+Gr1+骨髓細胞。在本發明之某些實施例中，參考細胞群體富含腫瘤細胞。

對VEGF拮抗劑治療有抗性之腫瘤亦可使用2007年3月28日申請之同在申請中之申請案第11/692,682號中所提供的診斷標記物組來鑑別。舉例而言，標記物組可包括2個或2個以上、3個或3個以上、4個或4個以上、5個或5個以上、6個或6個以上、7個或7個以上、8個或8個以上、9個或9個以上、10個或10個以上、12個或12以上、13個或13個以

上、14個或14個以上、15個或15個以上、20個或20個以上或全組分子。分子為編碼蛋白質或具有改變之表現及/或活性之蛋白質的核酸且選自以下各物：Notch2、DMD8、MCP-1、ITGB7、G-CSF、IL-8R、MIP2、MSCA、GM-CSF、IL-1R、Meg-SF、HSP1A、IL-1R、G-CSFR、IL10-R1、Erb-2.1、窖蛋白3、Semcap3、INTG4、THBSP-4、ErbB3、JAM、Eng、JAM、Eng、JAM-2、Pecam1、Tlr3、嗜中性白血球彈性蛋白酶、CD14、expi、Il-13R、LDLR、TLR-1、RLF、Endo-Lip、SOCS13、FGF13、IL-4R、THBS1、Crea7、水通道蛋白-1、SCF38、APOE、FABP、IL-11R、IL-1RII、IFN TM1、TNFRSF18、WNT5A、分泌載體膜1、HSP86、EGFR、EphRB2、GPCR25、HGF、類血管生成素-6、Eph-RA7、信號素V1b、神經營養素5、密蛋白-18、MDC15、ECM、ADAMTS7B、NCAM-140、纖維結合蛋白III型、WIP、CD74、ICAM-2、Jagged1、Itga4、ITGB7、TGF-BII-R、TGFb IEP、Smad4、BMPR1A、CD83、凝集素結合蛋白-1、CD48、E-選擇素、IL-15、細胞因子信號轉導抑制物4、Cytot4、CX3CR1、IGF2、HSP9A、FGF18、ELM1、Ledgfa、清道夫受體A型、巨噬細胞C-型凝集素、Pigr3、巨噬細胞SRT-1、G蛋白偶合受體、ScyA7、IL-1R2、IL-1誘導蛋白、IL-1 β 、ILIX前驅體、TGF-B、FIZZ1、Wfs1、TP 14A、EMAP、SULF-2、胞外基質2、CTFG、TFPI、XCP2、Ramp2、ROR- α 、Ephrin B1、類SPARC 1及信號素

A。在本發明之一實施例中，提供偵測蛋白質之抗體。在一實施例中，分子係來源於CD11b+Gr1+細胞且包括(例如)IL-13R、TLR-1、Endo-Lip、FGF13、IL-4R、THBS1及Crea7。在另一實施例中，分子係來源於抗性腫瘤且包括(例如)MSCA、MIP2、IL-8R、G-CSF、IL10-R2、THBSP-4及JAM-2。

E. 醫藥組合物及投藥

根據已知之方法，諸如團式靜脈內投藥或藉由在一段時間內連續輸液，藉由肌肉內、腹膜內、腦脊髓內、皮下、關節內、滑膜內、鞘內、經口、局部或吸入途徑及/或皮下投藥，向人類患者投與單獨或與其他治療劑組合之本發明之Bv8拮抗劑(諸如，抗Bv8抗體)。

在某些實施例中，本發明之治療包含組合投與Bv8拮抗劑及VEGF拮抗劑及/或一或多種骨髓細胞減少劑或化學治療劑。在一實施例中，存在其他抗癌劑，例如一或多種不同抗血管生成劑、一或多種化學治療劑等。本發明亦涵蓋投與多種抑制劑，例如針對同一抗原之多種抗體或針對本發明之不同蛋白質之多種抗體。在一實施例中，投與不同化學治療劑與本文中Bv8拮抗劑之混合物。組合投藥包括使用獨立調配物或單一醫藥調配物之共投藥及/或任一次序之連續投藥。舉例而言，VEGF拮抗劑可在投與Bv8拮抗劑之前、之後、交替，或可與其同時給與。在一實施例中，存在兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性之時間段。

出於預防或治療疾病之目的，本發明藥劑之合適劑量將視如上所定義之待治療疾病之類型、疾病之嚴重程度及病程、抑制劑係出於預防抑或治療之目的而投與、先前療法、患者之臨床病史及對抑制劑之反應以及主治醫師之判斷而定。將抑制劑合適地在某一時刻或經一系列治療投與患者。在組合療法方案中，本發明之組合物係以治療有效量或治療協同量投與。如本文所用之治療有效量為使得投與本發明之組合物及/或共投與VEGF拮抗劑與一或多種其他治療劑使得靶向疾病或病狀減緩或受到抑制的量。投與藥劑組合之作用可為累加作用。在一實施例中，投藥結果為協同效應。治療協同量為協同或顯著減緩或消除與特定疾病有關之病狀或症狀所必需的VEGF拮抗劑及一或多種其他治療劑(例如，Bv8拮抗劑及視情況骨髓細胞減少劑、化學治療劑及/或抗癌劑)之量。

視疾病類型及嚴重程度而定，無論(例如)藉由一或多種獨立投藥抑或藉由連續輸液，約1 $\mu\text{g/kg}$ 至50 mg/kg (例如，0.1-20 mg/kg)之Bv8拮抗劑、VEGF拮抗劑、骨髓細胞減少劑、化學治療劑或抗癌劑均為向患者投與之初始候選劑量。視以上提及之因素而定，典型日劑量可在約1 $\mu\text{g/kg}$ 至約100 mg/kg 或更多之範圍內。對於經數天或更長時間之重複投藥而言，視病狀而定，持續治療直至對疾病症狀之所需抑制出現為止。然而，其他給藥方案可為適用的。通常，臨床醫師將投與本發明之分子直至達到提供所需生物效應之劑量。本發明之療法進程易於藉由習知技術及檢

定監測。

舉例而言，血管生成抑制劑(例如，抗VEGF抗體，諸如AVASTIN® (Genentech))之製備及給藥時程可根據製造商之說明使用或由熟練執業醫生憑經驗確定。在另一實例中，該等化學治療劑之製備及給藥時程可根據製造商之說明使用或由熟練執業醫生憑經驗確定。化學療法之製備及給藥時程亦描述於*Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)中。

本發明治療之功效可藉由評估贅生性或非贅生性病症中常用之各個終點來量測。舉例而言，可藉由例如(但不限於)腫瘤退化、腫瘤重量或大小縮減、進展時間、存活持續時間、無進展存活期、總反應速率、反應持續時間、生活品質、蛋白質表現及/或活性來評估癌症治療。因為本文所述之抗血管生成劑靶向腫瘤血管系統且未必為贅生性細胞自身，所以其代表一種獨特類別之抗癌藥，且因此可能需要對藥物之臨床反應的獨特量測及定義。舉例而言，在二維分析中50%以上之腫瘤縮減為宣布反應之標準定點。然而，本發明之抑制劑可抑制轉移性蔓延而未縮減原發性腫瘤，且可能僅發揮使腫瘤靜止之作用。因此，可採用測定療法功效之方法，包括(例如)量測血管生成之血漿或尿標記物及經由輻射成像量測反應。

在本發明之另一實施例中，提供含有適用於治療上述病症或診斷病症之物質的製品。該製品包含容器、標記及包裝插頁。合適容器包括(例如)瓶子、小瓶、注射器等。容

器可由諸如玻璃或塑膠之多種材料形成。在一實施例中，容器保存有效治療病狀之組合物且可具有無菌接取孔(例如該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VEGF調節劑且至少一種第二活性劑為骨髓細胞減少劑及/或化學治療劑。容器上或與容器相關聯之標籤指示組合物係用於治療所選擇之病狀。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。

本發明之其他詳情由以下非限制性實例說明。

實例 1

材料及方法

藉由 Taqman™ 分析基因表現

使用 RNeasy Mini Kit®(Qiagen)自組織或細胞製備 RNA。每一反應使用 50 ng 總 RNA 以供即時 PCR(Taqman™)分析。對於小鼠/人類 Bv8 及 EG-VEGF/Bv8 受體 1(PKR-1/EG-VEGFR1, R-1)而言，睪丸 RNA(BD Biosciences)用作對照。對於小鼠/人類 EG-VEGF/Bv8 受體 2(PKR-2/EG-VEGFR2, R2)而言，下視丘或全腦(BD Biosciences)用作對照組織。反應在 9600 仿真型 7500 即時(Perkin Elmer)PCR 系統(Applied Biosystems)上進行且使用序列偵測系統(Sequence Detection System, SDS)軟體以標準曲線進行絕對定量。針對同一樣品中之看家基因 RPL19，進一步定量各基因之表現量。為證實腫瘤相關內皮細胞中 VEGFR-1、

VEGFR-2、EG-VEGF/Bv8 R1及EG-VEGF/Bv8 R2之表現，使用 Titan One Tube™ RT-PCR系統(Roche)進行標準RT-PCR，且在2%瓊脂糖凝膠(Invitrogen)上檢查最終產物以確定正確大小。Taqman™引子之序列如下：

小鼠Bv8正向引子：GCA TGA CAG GAG TCA TCA TTT T (SEQ ID NO: 7)，反向引子：AAA TGG CAG GAT ATC AGG AAA(SEQ ID NO: 8)，探針：AAA CTT TAT TTG TAA CCC AAA GGT CTA ATG TAA ATG GA(SEQ ID NO: 9)；

人類Bv8正向引子：ATG GCA CGG AAG CTA GGA(SEQ ID NO: 10)，反向引子：GCA GAG CTG AAG TCC TCT TGA(SEQ ID NO: 11)，探針：TGC TGC TGG ACC CTT CCT AAA CCT(SEQ ID NO: 12)；

小鼠Bv8 R1正向引子：CAG CGC ACA TGA AGA CTT G(SEQ ID NO: 13)，反向引子：GTC ATC TTC GGT TTC CTG AGT(SEQ ID NO: 14)，探針：TCC AGG CAG CAC CCC TGA TG(SEQ ID NO: 15)；

小鼠Bv8 R2正向引子：GAA CTC CAC GTG AGC GCA(SEQ ID NO: 16)，反向引子：GGG TCC CAT GTT GAT GAT GC(SEQ ID NO: 17)，探針：CTC CCT GAT ACA CAC CAG CCC ACC TG(SEQ ID NO: 18)；

人類Bv8 R1正向引子：CTG GAA GGC TTC TTA CAA TGG(SEQ ID NO: 19)，反向引子：GGC ATC CCA ATT GTC TTG A(SEQ ID NO: 20)，探針：TCC AGG TCT GCA

CTG GAC TTA CCG(SEQ ID NO: 21) ;

人類Bv8 R2正向引子：TCA CCA TCG TTC GTG ACT TC(SEQ ID NO: 22)，反向引子：AGA AGG CAG TGA GGT AGT GCT T(SEQ ID NO: 23)，探針：TCC TTC ACG AAC ACA GTG GGG AA(SEQ ID NO: 24)；

小鼠RPL19正向引子：AGG TCA AAG GGA ATG TGT TCA AA(SEQ ID NO: 25)，反向引子：CCT TGT CTG CCT TCA GCT TGT(SEQ ID NO: 26)，探針：ACA AGC GCA TCC TCA TGG AGC ACA TC(SEQ ID NO: 27)；

人類RPL19正向引子：CGC AAG CGC CGT GAA(SEQ ID NO: 28)，反向引子：GGT CTC TTC CTC CTT GGA TAA AGT C(SEQ ID NO: 29)，探針：CCA GGC CAA GAA GGA GGA GAT CAT CA(SEQ ID NO: 30)。

流式細胞儀

自植入若干腫瘤類型之小鼠收集BM單核細胞(BMMNC)、PB及腫瘤細胞。使用Ack(Cambrax, MA)溶解緩衝液將紅血細胞溶解，接著用與APC接合之大鼠抗小鼠CD11b(Miltenyi Biotech, CA)及與PE接合之大鼠抗小鼠Grl(BD Biosciences, CA)染色。為除去死細胞，將7AAD(胺基放線菌素D；BD Biosciences CA)添加至所有樣品中，隨後以FACSCalibur儀器採集資料。

遷移檢定

根據製造商提供之方案，自未處理之Beige裸小鼠分離BMMNC，且使用CD11b微珠(Miltenyi Biotech, CA)分選

CD11b+Gr1+ 群體。將經分選細胞之等分試樣用抗CD11bAPC及抗Gr1-PE染色以確保CD11b+Gr1+細胞之純度(100%)。為進行遷移檢定，將 2.0×10^5 個細胞塗鋪於穿孔(transwell)(Corning Incorporated, NY)之上室上。下室在獨立孔中含有600 μ L補充有含有人類Bv8、對照抗體及鼠類重組VEGF之BIT(Stem Cell Technologies, BC, Canada)的培養基IMDM(Gibco BRL, CA)。將細胞在37°C及5% CO₂下培育9小時，且藉由計數下室中之細胞來評估CD11b+Gr1+細胞之遷移。

培養BMMN細胞中Bv8基因表現之調控

重組小鼠MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-2、bFGF、VEGF、GM-CSF、G-CSF、SDF-1及TNF α 係自R&D Systems(Minneapolis, MN)購得。重組小鼠KC、IFN γ 、Bv8(激動素-2)、IL-4、IL-10、IL-13、TGF- β 係來自PeproTech Inc. (Rocky Hill, New Jersey)。除在50 ng/ml下測試之VEGF及Bv8外，所有細胞因子均以10 ng/ml使用。使用1:3稀釋之調節培養基(最終FBS濃度為0.17%)。針對總細胞數目，將資料正規化。用含有10% FBS之DMEM自小鼠腿骨衝出BM細胞。將細胞以1200 rpm離心5 min且再懸浮於含有0.2% BSA(低內毒素，Serologicals Corp. Norcross, GA)之HBSS培養基中。在5% CO₂恆溫箱中於37°C下將兩百萬個細胞在具有各種細胞因子之24孔盤中培育4小時。接著將細胞轉移至eppendorf管中，離心且以RNA溶解緩衝液(Qiagen, Valencia, CA)溶解。使用

RPL19(核糖體蛋白L19)作為內部對照基因，藉由Taqman™評估 *Bv8* 表現。在一些狀況下，使用FACS分選法獲得CD11b+Gr1+或CD11b-Gr1-BM細胞。

為測試抗G-CSF抗體對由腫瘤環境誘導之 *Bv8* 基因表現的作用，將自Balb c/裸小鼠分離之BMMNC用已植入小鼠中24-36小時之HM7腫瘤的溶解產物或用對照緩衝液處理4小時。在添加至BMMNC中之前，將腫瘤溶解產物用各種濃度之山羊抗G-CSF中和多株IgG(AF-414-NA, R&D Systems)或對照山羊IgG(R&D Systems)預培育45 min。證實抗G-CSF IgG阻斷小鼠及人類G-CSF之能力。接著使用Taqman™分析來評估 *Bv8* 在BMMNC中之表現。9隻動物用於該研究且分析來自3個獨立研究之資料。

由腫瘤細胞調節之培養基之收集

將A673、HM7、HPAC及Calu6細胞在生長培養基中培養，直至其達到約90%長滿。接著將生長培養基轉換成含0.5% FBS之DMEM:F12(50:50)培養基。將密度為 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 之指數生長之TIB42細胞轉換至含有0.5% FBS之DMEM:F12培養基中。培育三天後，收集調節培養基。使用Vi-Cell™XR細胞存活力分析儀(Beckman Coulter)量測細胞存活力及總細胞數目。

腫瘤細胞增殖檢定

將A673、HM7、HPAC及Calu6細胞胰蛋白酶化，且在含有0.5% FBS之培養基中洗滌，接著接種至96孔黑色Viewplate(Packard Bioscience Company, Meriden, CT)中。

將細胞用各種量之Bv8(PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ)培育3天。含有10% FBS之培養基用作陽性對照。使用細胞增殖ELISA套組(Roche)藉由併入BrdU來評估細胞增殖。

活體內G-CSF及抗G-CSF研究

每天對八週大之Balb/c小鼠皮下注射10 µg重組人類G-CSF(Neupogen, Amgen)，連續八天。給與對照動物PBS。在研究結束時，取BM、全血及脾樣品進行分析。在G-CSF中斷後，將一組動物維持兩天。使用自動操作之高解析度的基於流式細胞儀之血液分析儀(CellDyn 3000)計數嗜中性白血球。藉由ELISA量測血清及BM之Bv8含量。

為確定Bv8在G-CSF誘導之CD11b+Gr1+細胞活動中的作用，Balb/c裸小鼠接收兩次抗Bv8抗體給藥(5+5 mg/kg)，相隔12小時，接著在第二次給與Mab後4小時，對小鼠給與G-CSF(R&D Systems；每隻小鼠2 µg)。作為陽性對照，使用大鼠抗小鼠G-CSF Mab(Mab414, R&D Systems；每隻小鼠10 µg)，其以與抗Bv8相同之間隔時間給與，接著對小鼠給與G-CSF。6小時後，將小鼠放血且如所述測定CD11b+Gr1+細胞之頻率。為確定G-CSF在缺乏腫瘤之情況下調控Bv8表現的作用，每天對Balb/c裸小鼠腹膜內注射對照大鼠IgG(Genentech)或大鼠抗G-CSF Mab(Mab414, R&D Systems，每隻小鼠10 µg)，連續8天。使動物安樂死且自BMMNC提取出總蛋白質。如所述，藉由ELISA量測Bv8含量。為評估G-CSF在調控腫瘤中Bv8表現之重要性，將Balb/c裸小鼠用10 µg如上所述之大鼠抗G-CSF Mab或大

鼠IgG預處理，12小時後，植入HM7細胞(5×10^6 /小鼠)。將空Matrigel™植入對照中。接著動物每天接收抗體投藥，歷時2天。在Matrigel™或腫瘤植入48小時後，使小鼠安樂死且如上所述量測BMMNC中之Bv8含量。

抗Bv8中和抗體之產生及篩檢

產生針對重組人類Bv8蛋白之小鼠單株抗體。使用兩個獨立檢定來篩檢抗體。如所述(LeCouter等人，2003，見上文)，一檢定係基於Bv8蛋白誘導牛腎上腺皮質來源之內皮細胞增殖的能力。第二檢定依賴於Bv8誘導穩定表現其受體中每一者之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞中之信號級聯的能力。簡言之，使在NFAT啟動子控制下穩定表現 β -內醯胺酶基因之CHO細胞(Invitrogen)生長於補充有10%胎牛血清之DMEM中。轉導於pMSCV-潮黴素(Hygromycin)中之人類PKR1或PKR2 cDNA(Masuda, Y.等人，見上文，及Lin, D.C.等人，見上文)。在500 mg/ml潮黴素中選擇表現轉殖基因之細胞，歷時2週。如製造商建議，由於反應細胞在用hBv8刺激16 h後能夠裂解基於FRET之螢光受質CCF4，所以隨後藉由FACS分選法分離反應細胞。中和抗體由於其能夠阻斷Bv8誘導之 β -內醯胺酶表現而得以鑑別。在各種濃度之經純化小鼠單株抗Bv8抗體存在或不存在之情況下，藉由100-200 ng/ml之hBv8刺激CHO-NFAT β -內醯胺酶PKR1或PKR2，歷時16 h。刺激後，將細胞用CCF4培育1小時且用96孔盤讀數器Envision™(Perkin Helmer)量測螢光。

為直接確定Bv8在腫瘤形成期間之作用，利用中和抗Bv8單株抗體(Mab)。採用鼠類Mab 3F1及2B9，其與小鼠及人類Bv8交叉反應。基於此等Mab抑制Bv8刺激之腎上腺皮質內皮細胞增殖(LeCouter等人，*Nature* 412:877-884 (2001))及抑制經Bv8 GPCR轉染之CHO細胞中之信號轉導的能力，選擇此等Mab。Mab 2B9最大抑制約70%之人類或小鼠Bv8蛋白之促有絲分裂作用，而Mab 3F1抑制多達50%。然而，濃度各為5-10 $\mu\text{g/ml}$ 之該兩種Mab之組合完全阻斷由100 ng/ml人類或小鼠Bv8引起之促有絲分裂作用。單獨或組合測試之抗體在基本條件下或在用結構上無關之VEGF-A或相關之EG-VEGF刺激後對內皮細胞增殖無影響。在寬濃度範圍內，抗Bv8 Mab及Bv8自身亦對此研究中測試之腫瘤細胞株之增殖均無任何可偵測影響(資料未圖示)。

為確定活體內最有效之治療方案，在初始實驗中，在A673模型中用個別及組合之Mab 3F1及2B9執行劑量-反應研究。如藉由活體外資料所預測，兩種Mab之組合比單一Mab有效。每週兩次投與5 mg/kg之各Mab實現對腫瘤生長之最大抑制作用。因此，在所有隨後概念證明實驗中均使用此方案。除A673橫紋肌肉瘤外，亦測試包括人類HM-7、Jurkat、HPAC及Calu-6細胞株及小鼠EL-4及TIB42淋巴瘤之其他模型。

活體內腫瘤研究

使人類腫瘤細胞株Calu-6、A-673、JURKAT、HPAC及

HM7 以及小鼠淋巴瘤細胞株 EL4 及 TIB42 生長於 Ham's F12、低葡萄糖 DMEM(1:1)(補充有 10% v/v FBS、1% v/v 盤尼西林(penicillin)/鏈黴素(streptomycin)、2 mM L-Gln 及 1 μ g/ml Fungizone™(Invitrogen™, CA)) 中。在 95% 空氣 / 5% CO₂ 之氣氛中於 37°C 下培育細胞。對於小鼠異種移植實驗而言，將腫瘤細胞以 1×10^8 個細胞 / 毫升之濃度懸浮，且皮下注射(每隻小鼠 100 μ l)至 Balb-c 或 Beige 裸 XID 免疫缺陷型小鼠(Harlan Sprague Dawley, IN)之背部腰窩中。在腫瘤細胞接種後 24 或 48 小時之時刻，開始腹膜內投與抗 Bv8 mAb 2B9 及 3F1，總劑量為 10 mg/kg(各 Mab 為 5 mg/kg)(n = 10)。採用抗豚草(Ragweed)Mab 及抗 VEGF Mab G6.31 或 B20 作為對照(Liang, W.C. 等人, *J Biol Chem* 281, 951-961 (2006))。此後，每週處理小鼠 2 次。使用橢球體積公式 ($6 \times L \times W \times H$ ，其中 L=長度，W=寬度且 H=高度)，每兩天計算腫瘤體積(Tomayko, M.M. 及 Reynolds, C.P., *Cancer Chemother Pharmacol* 24, 148-154 (1989))。為進行組間差異之統計學分析，使用 JMP 軟體(SAS Institute Inc.)相繼執行單因子 ANOVA 及 Tukey HSD 成對分析。p 值 < 0.005 視為顯著。

組織學分析及免疫組織化學

將腫瘤固定於中性緩衝福馬林(formalin)中 24 小時，接著進行石蠟包埋。如先前所述(參考文獻)，執行 H&E 染色及免疫組織化學。簡言之，在 99°C 下，接著在室溫下(各為 20 分鐘)，使用標靶抗原恢復溶液(DAKO)執行使用大鼠

抗小鼠PLVAP單株MECA-32(BD-Pharmingen)之免疫組織化學染色。連續使用生物素標記之二級抗體(Vector)及Vectastain ABC Elite™試劑偵測初級抗體。使用金屬增強之DAB(Pierce Chemical, IL)產生反應產物。用蘇木精(hematoxylin)將切片輕微複染，脫水且蓋上蓋玻片。

腺病毒載體之構築

先前描述編碼LacZ及mVEGF₁₆₄之腺病毒載體(LeCouter等人，2001，見上文)。使用AdEasy XL™腺病毒載體系統(Stratagene)產生腺病毒mBv8。使用AdEasy XL™腺病毒載體系統(Stratagene)產生腺病毒mBv8。在其C末端具有6xHis標籤之mBV8之cDNA(SEQ ID NO: 36)經選殖在pShuttle-CMV載體之XhoI位點與Hind III位點之間。使用pAdEasy-1™，將所得pShuttle-CMV-mBV8質體重組於BJ5183-AD-1(一種經腺病毒主鏈預轉型之電穿孔感受態菌株)中。接著將重組腺病毒Bv8質體轉染至AD-293細胞中以封裝病毒粒子。藉由CsCl梯度純化腺病毒儲備物。使用Adeno-X rapid™滴定套組(Clontech)滴定腺病毒。

腫瘤相關內皮細胞之分離及表徵

基本上如先前所述(Hida等人，*Cancer Res* 64:8249-8255 (2004))，使用磁珠分選系統(Miltenyi Biotech)分離腫瘤相關內皮細胞(TAEC)。簡言之，將TIB42小鼠淋巴瘤細胞注入雌性Beige裸小鼠之背部側腰窩中。當腫瘤達到約1000 mm³之直徑時，將其切除，切碎，且接著用膠原酶II(Worthington Biochemical Corporation)消化。接著使用

100 μm 至40 μm 網格過濾細胞懸浮液。根據製造商之說明，最終使用FITC-CD31抗體(BD Biosciences)分選CD31+細胞。將CD31+細胞接種於存在EGM-2MV培養基(Cambrex)之塗佈明膠之盤中。培養24 h後，藉由用PBS洗滌數次來移除CD31+非黏附細胞。

對於RT-PCR而言，使用RNeasy™小型套組(QIAGEN)自所培養之細胞提取RNA。對於所示實驗而言，對於各50 μl 反應使用80 ng RNA且將cDNA擴增28次循環。按要求利用引子序列。

在補充有0.5% BSA之基本培養基中使TIB42-TAEC細胞饑餓6 h。接著將細胞用人類重組Bv8(200 ng/ml; PeproTech)、完全培養基(CM)、VEGF(100 ng/ml; PeproTech)或BSA(0.5%)刺激。在指定時間點收集細胞提取物。使用PhosphoPlus p44/42 MAPK™抗體套組(Cell signaling)執行對來自TIB42-TAEC細胞之提取物之西方墨點分析。為評估此結果之一致性及可重複性，雙重複測試各條件且執行實驗三次，其中結果類似。

對於活體外管形成而言，在不含血清之培養基中使TIB42-TAEC細胞(繼代6-8)饑餓5 h。此後，將細胞收集且再懸浮於補充有5% BSA之無血清培養基中且用VEGF-A(100 ng/ml)、Bv8(200 ng/ml)或未添加(對照)處理。對於特異性測試而言，在抗Bv8 Mab(10 $\mu\text{g/ml}$)存在下培育Bv8。將 5×10^5 個細胞接種於經Matrigel™ (BD Biosciences)預塗佈之24孔盤中之每一孔中，且在36小時後評估管形

成。

微電腦層析成像血管攝影術

帶有HM7腫瘤之動物接收50 μ l腹膜內注射之肝素，10分鐘後，藉由吸入二氧化碳而安樂死。打開胸腔，在心尖進行切割，且將聚乙烯套管(內徑0.58 mm，外徑0.96 mm)穿過左心室且用5-0絲質縫合線固定於升主動脈。以6 ml/min之速率灌注17 ml 0.1 mM硝普鈉(sodium nitroprusside)於0.9%鹽水中之溶液以提供最大血管舒張之狀況且移除血液。如製造商所推薦，製備MICROFIL[®](Carver, MA)(一種市售鉻酸鉛乳膠)且以2 ml/min之速率灌注17 ml。使注入之乳膠混合物在室溫下聚合60分鐘，接著解剖所關注之組織。將切割之腫瘤浸入10%中性緩衝之福馬林中。

接著用 μ CT40TM(SCANCO Medical, Basserdorf, Switzerland)X射線微電腦層析成像(micro-CT)系統使腫瘤成像。以大豆油作為背景培養基，使腫瘤成像。藉由在45 kV之能階、177 μ A之電流及300毫秒之積分時間下操作X射線管來產生micro-CT影像。在16 μ m之各向同性解析度下獲得軸向影像。

藉由一系列圖像處理步驟提取血管網路及腫瘤。將1195個Hounsfield單位(HU)之強度臨限及形態過濾(腐蝕及擴張)應用於容量micro-CT影像資料以提取血管體積(VV)。以類似方式，使用-8個HU之強度臨限，自背景提取出腫瘤體積(TV)。自VV與TV之比率確定血管密度(VV/TV)。藉由目測來自樣品子集之分割結果來確定血管及腫瘤強度臨

限。藉由以C++及Python書寫之採用AVW影像處理軟體文庫(AnalyzeDirect Inc., Lenexa, KS)之內部影像分析演算法執行計算。藉由使用Analyze 6.0(AnalyzeDirect Inc., Lenexa, KS)(一種影像分析套裝軟體)自mirco-CT資料產生三維(3D)表面透視圖。使用JMP統計套裝軟體(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)執行統計學分析。使用Dunnett測試進行多重比較來評估mirco-CT量度(VV、TV、VV/TV)之組比較。p值小於0.05視為顯著。

Bv8蛋白之部分純化及BMMNC溶解產物之西方墨點分析。

每天向Balb/c小鼠(n=20)皮下注射人類G-CSF(每天10 µg, Amgen)且腹膜內注射mGM-CSF(每天0.5 µg, PeproTech), 歷時4天, 以擴增CD11b+gr1+群體。在第5天, 將BM細胞分離且將細胞糝粒再懸浮於2 ml 0.5% Triton X-100™中。接著迫使細胞溶解產物穿過25規格針4次, 且將鹽濃度調整至50 mM NaCl。將粗提取物施用於經20 mM Tris pH 7.2、50 mM NaCl預平衡之肝素-瓊脂糖®管柱(Hi-Trap, 1 ml)。使用兩步線性梯度溶離管柱: 20 mM Tris(pH 7.2)中50 mM至1 M NaCl, 且接著1 M至2 M NaCl。流動速率為1 ml/min。在280 nm下監測吸光率。收集1 ml溶離份且使用ELISA及西方墨點法針對mBv8進行檢定。對於西方墨點分析而言, 使用Microcon YM-3®旋轉管柱(MILLIPORE)將100 µl溶離份濃縮4倍且接著加樣於4-20% SDS-PAGE(Invitrogen)上。使用於阻斷緩衝液

(PBST, PBS 中 0.1% Tween 20 及 5% 脫脂乳) 中之總濃度為 10 $\mu\text{g/ml}$ 之三種針對 mBv8 的倉鼠抗體 (2D3、3B8 及 4E10) 之組合將墨點染色隔夜。在洗滌三次後, 將墨點用接合辣根過氧化物酶之山羊抗倉鼠 IgG (ImmunoResearch Laboratories) 培育, 且接著使用增強化學發光加上西方墨點法偵測系統™ (GE Healthcare Bio-Science) 顯色。

小鼠 Bv8 ELISA

在 4°C 下將 MaxiSorp® 96 孔微孔盤 (Nalge Nunc International, Rochester, NY) 用 50 mM 碳酸鹽緩衝液 (pH 9.6) 中 1.0 mg/ml 亦與小鼠 Bv8 結合之 3F1 抗體 (小鼠抗人類 BV8 抗體) 塗佈隔夜。將培養盤用含有 0.05% 聚山梨醇酯 20 之 PBS 洗滌, 且在室溫下用 PBS 中之 0.5% 牛血清白蛋白、10 ppm Proclin 300™ (Supelco, Bellefonte, PA) 阻斷 1 h。在將培養盤洗滌之後, 將於含有 0.5% 牛血清白蛋白、0.05% 聚山梨醇酯 20、10 ppm Proclin 300® (Supelco, Bellefonte, PA) 及 0.35 N NaCl 之 PBS (樣品緩衝液) 中之小鼠 BV8 標準物 (2 倍連續稀釋之 0.039-2.50 ng/ml, Genentech) 及樣品 (最小 1:10 稀釋) 添加至該等培養盤中。將培養盤在室溫下培育 2 h。藉由洗滌步驟移除未結合之抗體。藉由添加生物素標記之 4E10 抗體 (倉鼠抗小鼠 BV8 抗體, Genentech), 接著添加抗生蛋白鏈菌素-HRP (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) 及 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺 (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) 作為受質來偵測與該等盤結合之抗體。藉由添加 1M 磷酸來終止反應。在

Titertek™ 疊式讀數器 (ICN, Costa Mesa, CA) 上在 450 nm 下讀取吸光率。使用四參數回歸曲線擬合程式 (Genentech) 擬合標準物之滴定曲線。使用落在標準曲線範圍內之資料點來計算樣品中之小鼠 BV8 濃度。

此檢定可容許 10% 小鼠血清及 10% 溶解緩衝液且對血清及組織溶解產物樣品具有 0.39 ng/ml 之敏感性。其對 BV8 具有特異性。至多 30 mg/ml 之抗 VEGFG6-31 人類 IgG1、人類 G-CSF 及人類 VEGF 或至多 5 mg/ml 之人類 EG-VEGF 僅產生背景信號。此 ELISA 亦偵測人類 BV8，但效率為 26% 或更小。至多 14 ng/ml 之抗 BV8 3F1 及至多 124 ng/ml 之抗 BV8 2B9 的存在不顯著影響對樣品緩衝液中 0.5 ng/ml BV8 之偵測。

結果

為確定 BM 中 Bv8 表現是否受遠距離部位處之腫瘤生長影響，將 A673 及 HM7 腫瘤細胞移植於免疫缺陷型小鼠中。如圖 1a 中所說明，藉由 ELISA，與植入空 Matrigel™ 相比，兩種腫瘤之植入使得 BM 中 Bv8 含量顯著增加。

為表徵 BM 中產生之 Bv8 蛋白且驗證 ELISA，使小鼠骨髓單核細胞 (BMMNC) 溶解產物經受肝素-瓊脂糖親和力層析。如補充(下文為 S)圖 1a 中所說明，Bv8 與管柱強烈結合且在約 0.4 M NaCl 存在下溶離為單峰。此由西方墨點分析證實，該分析證明免疫活性溶離份中存在所期望之約 9 kDa 之帶 (S 圖 1b)。

BMMNC 包含若干細胞子集，主要包含骨髓及淋巴譜

系。為闡明BMMNC之何種子集富含Bv8，將若干腫瘤細胞株(包括 A673、Calu-6、HM7、HPAC及 Jurkat)植入小鼠中。Taqman™分析表明與CD11b-Gr1-細胞(主要為非骨髓子集)相比，Bv8在CD11b+Gr1+骨髓細胞(主要由嗜中性白血球組成但亦包括巨噬細胞譜系之細胞)(Yang等人，*Cancer Cell* 6:409-421 (2004)；Dahl等人，*Nat Immunol* 4:1029-1036 (2003)；Lagasse及 Weissman, *J Immunol Methods* 197:139-150 (1996))中高度表現(圖 1b)。

為鑑別可能參與調控Bv8表現之分子，藉由Taqman™檢測一組細胞因子/趨化因子誘導未分選BMMNC中Bv8表現的能力。大部分細胞因子不引起BMMNC中Bv8之任何顯著上調(圖 1c)。然而，G-CSF(10 ng/ml)引起Bv8顯著上調(>27倍，圖 1c)。所測試之細胞因子中無一者引起VEGF-A顯著上調(資料未圖示)。

對BMMNC之不同子集之分析揭示G-CSF引起Bv8上調超過經純化CD11b+Gr1+細胞中之背景100倍以上(圖 1d)。在全BM或CD11b-Gr1-溶離份中偵測到實質上較低之G-CSF介導的Bv8上調。意外地，GM-CSF對Bv8表現無影響(圖 1c及d)，因此強調此因子調控之高度選擇性。有趣地，在未分選BM細胞上測試時未展示任何顯著刺激之IL-6及SDF-1在對經純化CD11b+Gr1+細胞測試時引起顯著的2-3倍之Bv8上調(圖 1c及d)。

為進一步表徵CD11b+Gr1+細胞中對G-CSF之反應，測試較低之在生理學上更相關之濃度的細胞因子是否可能誘導

Bv8表現。先前研究亦展示Bv8基因表現可因低氧而增加(LeCouter等人, 2003, 見上文)且因此希望測試低氧是否可能調控Bv8對G-CSF之反應。如圖1e中所示, 在低氧條件下低至20 pg/ml之G-CSF引起約10倍之對Bv8表現的刺激。此刺激顯著高於在含氧量正常條件下所偵測到之刺激(約5倍)。除活體外研究外, 在活體內亦證實G-CSF對Bv8之上調。向Balb/c小鼠投與重組G-CSF使得BM(圖1f)及血清(圖2a)中Bv8蛋白含量隨時間性及劑量而增加, 此與周圍血液(PB)嗜中性白血球之增加(圖2b)一致。在Balb-c裸小鼠中獲得類似結果(資料未圖示)。明顯地, 早至投與G-CSF後24小時, BM之中Bv8含量即增加超過背景約30倍。血清含量亦顯著增加。在中斷G-CSF後48小時內, BM及血清Bv8回至基線含量附近, 表明BM中Bv8受G-CSF緊密調控。然而, 投與G-CSF對腎臟、腦及肝臟中之Bv8含量無影響(資料未圖示)。

G-CSF為粒細胞生成之主要調控劑, 引起骨髓/粒細胞祖細胞分化成嗜中性白血球。G-CSF亦在嗜中性白血球對多種環境應力反應而自BM活動中起關鍵作用, 且由若干細胞類型(包括內皮細胞及纖維母細胞)分泌(Christopher, M.J.及Link, D.C., *Curr Opin Hematol* 14, 3-8 (2007))。此外, G-CSF以及其他造血細胞因子(包括IL-6及SDF-1)由腫瘤及/或惡性腫瘤中之基質細胞組成性表現(Mueller, M.M.及Fusenig, N.E., *Differentiation* 70, 486-497 (2002)中回顧)。為測試G-CSF、IL-6或SDF-1是否在吾人之腫瘤模型

中表現，在經腫瘤細胞或腫瘤相關纖維母細胞調節的培養基中量測此等細胞因子之含量。如S表1中所示，雖然在不同濃度下，但在兩個隔室中其均可偵測。因此，G-CSF(及/或其他細胞因子)介導的BM中Bv8之上調可促成骨髓細胞之活動。隨後此等細胞回歸腫瘤中可受其他細胞因子調控且亦可能受由腫瘤相關骨髓細胞分泌的Bv8調控。

為確定G-CSF在腫瘤微環境中調控Bv8表現之潛在作用，在抗G-CSF或對照抗體存在下將培養之BMMNC用來自HM7腫瘤之溶解產物之等分試樣培育(圖1g)。對Bv8轉錄物之分析證明與經對照IgG處理之孔相比，經抗G-CSF處理之BMMNC中Bv8表現顯著隨劑量而減少。有趣地，在抗G-CSF存在下，Bv8之表現量低於未經刺激之量，表明腫瘤勻漿中存在之Bv8表現抑制劑的非對立活動。活體內研究證實G-CSF在調控Bv8表現中之關鍵作用。與對照相比，在經抗G-CSF處理之不帶腫瘤之小鼠中Bv8蛋白顯著減少(圖1h)。

接著，測試G-CSF在介導帶有腫瘤小鼠之BM中Bv8上調方面是否起作用。如圖1i中所說明，單株抗G-CSF抗體而非對照IgG幾乎消除植入腫瘤後不久出現在BM中之Bv8蛋白峰。使用多株山羊抗G-CSF IgG獲得極類似之結果(資料未圖示)。抗G-CSF處理亦使得不帶腫瘤及帶有腫瘤小鼠中循環以及BM CD11b+Gr1+細胞之頻率明顯降低(S圖2c-f)。因此，雖然未排除涉及其他因素，但發現結果表明在活體外與活體內Bv8表現均取決於G-CSF。

假定 G-CSF 強烈上調 Bv8，希望測定 Bv8 是否可促成由重組 G-CSF 誘導之嗜中性白血球活動(圖 1j)。次最大劑量之 G-CSF(2 μ g)在 6 小時內誘導 CD11b+Gr1+顯著活動至小鼠之周圍血液。G-CSF 之作用由抗 G-CSF 抗體完全阻斷。抗 Bv8 抗體(下文中為抗 Bv8)亦抑制 G-CSF 介導之 CD11b+Gr1+細胞活動(圖 1j)。然而，抗 Bv8 對由最大劑量之 G-CSF(10 μ g)誘導之活動幾乎無影響。因此，Bv8 可用以調節或加強由 G-CSF 刺激之嗜中性白血球活動。

在穿孔檢定中，在活體外 Bv8 促進 BM CD11b+Gr1+細胞之遷移，程度可與 SDF-1 相比(S圖 3a)。抗 Bv8 完全抑制 Bv8 刺激之骨髓細胞遷移，但對 SDF-1 誘導之遷移無任何影響，因此證實該等作用之特異性。BM 中 Bv8 受體 R1 及 R2(S圖 3b 及 c)之 Taqman™ 分析揭示與 R1 相比 R2 表現較高。然而，R1 與 R2 在介導 BMMNC 中之 Bv8 信號轉導方面的確切作用有待確定。此等發現結果表明細胞類型特異性上調 Bv8 及其受體為植入腫瘤後骨髓基因活化程式之部分。為進一步表徵 Bv8 對造血系統之細胞的作用，將去除譜系(缺乏 CD11b+Gr1+細胞之 Lin-)與 CD11b+Gr1+細胞兩者自未處理小鼠之 BM 分離且用重組 Bv8 處理。對 Lin-群體之分析表明與對照相比，在經 Bv8 處理之細胞中 CD11b+Gr1+細胞表現較高，此表明 Bv8 改變祖細胞群體至骨髓譜系細胞之去向(S圖 3d)。此外，對細胞存活力之分析展示在經 Bv8 處理之孔中死細胞的數目顯著低於對照，此表明 Bv8 為原始造血細胞之潛在存活因子(S圖 3d)。為在功能上評估 Bv8 對

Lin-細胞之作用，對經Bv8處理之細胞執行CFU分析，該分析展示與經對照處理之細胞相比群落數目更大($p < 0.05$)(S圖3e)。對CD11b+Gr1+細胞之分析進一步支持Bv8作為存活因子之作用，此係因為與對照相比，經Bv8處理之細胞含有更少死細胞(S圖3f)。最終，用Bv8處理CD11b+Gr1+細胞以隨時間變化之方式引起MAPK路徑活化(資料未圖示)。

為闡明Bv8在正常血細胞生成中之作用，在不帶腫瘤之小鼠中測試抗Bv8或抗豚草(下文中為對照)抗體。抗Bv8與對照均未展示對Balb/c裸小鼠中正常血細胞生成及血液學參數的任何明顯影響(S圖4)。此等資料表明在穩態生理條件下，Bv8在血細胞生成調控中之作用極為有限。

為研究Bv8在活體內腫瘤生長中之重要性，測試投與抗Bv8或對照抗體是否可能影響移植至免疫缺陷型小鼠中之若干腫瘤細胞株的生長。如圖2中所說明，在所有檢測之腫瘤模型中，與經對照處理之動物相比，投與抗Bv8使得腫瘤體積及最終腫瘤重量顯著減少。在A673模型中，生長抑制為約80%且接近使用抗VEGF Mab G6.31(下文中為抗VEGF)或B20(資料未圖示)(該兩者阻斷小鼠及人類VEGF-A)實現之生長抑制(Liang等人, *J Biol Chem* 281:951-961 (2006))(圖2a)。HM7腫瘤模型亦證明抗Bv8處理顯著抑制生長(圖2b)。在來源於人類HPAC(圖2c)及Jurkat(圖2d)細胞株之腫瘤中亦觀測到顯著抑制。所示腫瘤植入實驗在Balb/c裸小鼠中執行。在Beige裸小鼠中亦獲得類似結果

(資料未圖示)。除人類異種移植外，單獨或與抗VEGF抗體組合之抗Bv8亦展示有效減小TIB-42抗VEGF難治性腫瘤之腫瘤體積(圖2f)。中斷處理導致帶有A673(S圖3g)及HM7腫瘤(S圖3h)之小鼠中腫瘤快速生長。此外，腫瘤分析揭示浸潤性CD11b+Gr1+細胞數目之增加(S圖3i及j)。

為監測在腫瘤形成不同階段之骨髓細胞，研究在不同時間點A673模型中BM、PB及腫瘤中CD11b+Gr1+細胞之動力學(S圖5)。BM分析未揭示經抗Bv8及對照處理之小鼠之間存在CD11b+Gr1+細胞頻率之任何顯著差異(S圖5a)。然而，在所有測試時間點，與經對照處理之小鼠相比，經抗Bv8處理之小鼠中之PB中CD11b+Gr1+細胞之數目(資料未圖示)及頻率存在明顯降低(S圖5b)。此外，發現與對照相比，在經抗Bv8處理之腫瘤中在數個時間點A673腫瘤中CD11b+Gr1+細胞的數目明顯減少(S圖5c)。使用流式細胞儀(代表性FACS概況展示於S圖6中)，亦研究在植入Calu-6、HM7、HPAC及Jurkat細胞之小鼠之PB、腫瘤、BM及脾中CD11b+Gr1+群體之動力學(圖3a及b以及S圖7d及e)。與A673腫瘤中時間-過程研究相符，用抗Bv8處理使得PB中CD11b+Gr1+細胞之頻率顯著降低，在上文提及之所有腫瘤模型中亦為如此(圖3a)。亦觀測到經抗Bv8處理之動物中腫瘤中之CD11b+Gr1+數目明顯減少(圖3b)。此等發現結果表明Bv8調控CD11b+Gr1+細胞活動及潛在回歸腫瘤。此外，嗜中性白血球(主要藉由Gr1之表現加以鑑別(Okazaki, T.等人, *Int Immunol* 18, 1-9 (2006)))似乎為受抗Bv8處理

影響之主要群體。

先前研究已展示移植骨髓細胞(包括CD11b+Gr1+細胞)增強腫瘤生長，而其去除可降低腫瘤生長。為直接評估骨髓子集在Bv8調控之腫瘤生長中的作用，在植入腫瘤7天後自帶有A673或HM7腫瘤之小鼠分離BM CD11b+Gr1+細胞且將其注射至腫瘤中。此在經抗Bv8處理之動物中導致腫瘤生長更快(圖3c及d)。因此，過量CD11b+Gr1+細胞可使由抗Bv8處理引起之生長抑制無效。為進一步表徵骨髓及腫瘤中之骨髓子集，使用F480作為CD11b子集中浸潤性巨噬細胞之標記物。發現用抗Bv8處理導致植入A673之小鼠中骨髓及腫瘤內巨噬細胞(CD11b+F480+)的數目均少量減少(資料未圖示)。因此，抗Bv8似乎主要影響粒細胞，且在更適度之程度上影響腫瘤內巨噬細胞子集。

觀測到與植入Matrigel™之小鼠相比，帶有腫瘤之小鼠之BM及脾中CD11b+Gr1+頻率顯著增加(S圖7a及b)，然而，與在PB及腫瘤中觀測到之減少對比，抗Bv8處理未顯著影響BM及脾中CD11b+Gr1+細胞之頻率。自帶有A673及HM7腫瘤之小鼠分離的BM及脾細胞之CFU分析(S圖7c)展示與經對照處理之小鼠相比，經抗Bv8處理之小鼠中之群落的數目顯著降低。此等發現結果表明活體內Bv8之中和作用削弱脾細胞及BM細胞活體外分化及形成群落之能力。

抗Bv8抗體之抗腫瘤作用的量級不可能僅由腫瘤中CD11b+Gr1+細胞數目減少來說明，預期該數目減少使得

MMP-9 及 VEGF-A 之含量減少 (Yan 等人, *Cancer Cell* 6:409-421 (2004); Nozawa 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:12493-12498 (2006))。很可能 Bv8 活性之局部中和作用為抗 Bv8 之抗腫瘤作用的主要機制。Bv8 及相關 EG-VEGF 已表徵為對特定內皮細胞類型具有選擇性之有絲分裂原 (Bergers, G. 等人, *Nat Cell Biol* 2, 737-744 (2000); Lin, R. 等人, *J Biol Chem* 277, 8724-8729 (2002))。因此, 設法確定 Bv8 是否影響腫瘤血管結構。建立且表徵來自異種移植腫瘤之腫瘤相關內皮細胞 (TAEC) 之培養物。TAEC 在 Matrigel™ 中對 VEGF-A 反應而形成管, 而對照孔展示極少或無管形成之證據 (S 圖 8a)。添加 Bv8 蛋白在可與由 VEGF-A 誘導之管形成相比的程度上促進管形成 (S 圖 8a)。抗 Bv8 抗體阻斷 Bv8 誘導之管形成, 但不抑制由 VEGF 誘導之管形成。此等發現結果證實該等作用之特異性且亦表明 Bv8 及 VEGF 採用不同路徑來誘導 TAEC 中之管形成。PCR 分析證實 TAEC 中內皮細胞而非上皮細胞之標記物 (諸如, CD31、VEGFR2 及 Tie2) 的表現, 證實 TAEC 之內皮性質 (S 圖 8b)。與此等發現結果相符合, Bv8 或 VEGF-A 導致對 TAEC 中 MAP 激酶磷酸化之強烈誘導 (S 圖 8c)。Taqman™ 分析展示 TAEC 中 EG-VEGF/PKR-1 及 EG-VEGF/PKR-2 兩者之表現 (資料未圖示)。然而, 重組 Bv8 無法活體外刺激數個腫瘤細胞株之增殖 (S 圖 8d), 此進一步支持 Bv8 主要靶向腫瘤環境中內皮細胞之假設。

為確證 Bv8 可局部促進腫瘤血管生成之假設, 將編碼

mBv8之重組腺病毒(Av-Bv8)腫瘤內傳遞至帶有HM7腫瘤之小鼠中。Av-LacZ及Av-VEGF分別用作陰性及陽性對照。為使重組蛋白之任何全身性效應最小，投與低效價病毒(10^7 pfu)。與對照Av-LacZ相比，Av-Bv8導致腫瘤體積增加，可與由Av-VEGF誘導之腫瘤體積增加相比(圖4a)。與活體外觀測結果相符，投與Av-Bv8導致與Av-LacZ及Av-VEGF相比，CD11b+Gr1+之活動增強(圖4b)。較高效價(10^9 pfu)之Av-Bv8亦增強腫瘤生長且引起PB及腫瘤中CD11b+Gr1+細胞之較高活動(資料未圖示)。

為評估腫瘤血管結構，採用X光微電腦層析成像(micro-CT)(Garcia-Sanz, A. 等人, *Hypertension* 31, 440-444 (1998); Maehara, N., *Eur radiol* 13, 1559-1565 (2003); Kwon, H.M.等人, *J Clin Invest* 101, 1551-1556 (1998))。micro-CT提供對整個腫瘤中腫瘤血管結構之全面分析且因此可克服一些其他方法(諸如免疫組織化學(IHC))中所固有之一些限制。該分析證明Av-Bv8及Av-VEGF具有幾乎不能區別之作用，此係因為兩者均引起與Av-LacZ組相比血管體積之增加($p < 0.05$)(圖4c)。來自各處理組之完整腫瘤塊之代表性影像展示於圖4e中。藉由確定用於分析之體積計量區域之影像處理演算法產生所提取血管網路(紅色)及腫瘤(灰色)之表面透視圖。MECA-32之IHC證實在投與Av-Bv8後，相對於對照Av-LacZ，HM7腫瘤之血管表面積顯著增加(圖9a)。

為進一步研究Bv8在腫瘤血管生成中之作用，使用功能

缺失方法(loss of function approach)，分析經抗Bv8、抗VEGF或對照抗體處理之HM7腫瘤中之腫瘤血管結構。與圖2中所說明之實驗相符，抗Bv8處理引起與對照處理之小鼠相比，腫瘤體積(圖4f)及循環CD11b+Gr1+細胞(圖4g)明顯降低。使用與上述相同之micro-CT血管攝影法，對腫瘤血管結構之分析揭示相對於經對照處理之腫瘤，抗Bv8與抗VEGF組兩者中血管體積均明顯降低(圖4h)。相對於對照，抗Bv8及抗VEGF組中血管密度(VV/TV)亦顯著降低(圖4i)。micro-CT資料支持經抗Bv8處理之小鼠中腫瘤生長之抑制係腫瘤血管發展受到抑制之結果的假設。整個腫瘤塊之代表性影像展示於圖4j中。因此，使用功能獲得及缺失方法，資料表明Bv8主要經由誘導腫瘤血管生成來促進腫瘤生長。組織學檢查亦與Bv8在促進腫瘤血管生成中之作用相符(圖9b)。對Jurkat腫瘤中內皮細胞之分析表明類似於抗VEGF，投與抗Bv8抗體顯著抑制腫瘤血管形成。

為表徵各種組織中以隨時間變化之方式的Bv8表現(圖5)，量測帶有HM7腫瘤且經對照或抗VEGF處理之小鼠中BM(圖5a)、PB(圖5b)、脾(圖5c)及腫瘤(圖5d)中的Bv8蛋白含量。對經對照處理之小鼠中Bv8蛋白含量之分析揭示在植入腫瘤後不久在BM、PB及脾中之峰。然而，抗VEGF處理之小鼠在該等早期階段展示最小Bv8表現，可能因為該處理引起有效腫瘤抑制。然而，在後面時間點，與獨立於VEGF之腫瘤生長之開始相符，經抗VEGF處理之小鼠中，尤其在PB、脾及腫瘤中，Bv8含量顯著增加(圖5b-d)。與

此等發現結果相符，觀測到經抗 VEGF 處理 15 或 21 天之 A673 及 HM7 腫瘤之壞死區中 Gr1+ 細胞大量浸潤(圖 5e)。可能解釋為由抗 VEGF 引起之長期低氧及 / 或腫瘤壞死引發 BM 活化及嗜中性白血球募集。此等發現結果與展示在若干鼠類腫瘤模型中抗 VEGF 處理引起 Bv8 mRNA 上調之早期實驗相符，表明 Bv8 可造成針對抗 VEGF 療法之抗性(資料未圖示)。為進一步確定腫瘤中 Bv8 之來源，將 A673、Calu-6、HM7、HPAC 及 Jurkat 腫瘤中之細胞群體再分級分離成 CD11b+ 及 CD11b- 部分。Taqman™ 分析展示與陰性部分相比，CD11b+ 隔室中之 mBv8 轉錄物受到顯著上調(圖 5f)。然而，使用人類 Bv8 引子，PCR 未鑑別出任一群體(亦即，腫瘤相關之 CD11b+ 及 CD11b-)中之任何人類 Bv8(圖 5f)，表明腫瘤基質、尤其骨髓細胞為所有測試腫瘤中 Bv8 之主要來源。與此等發現結果相符，所測試之腫瘤細胞株中無一者活體外產生可由 ELISA 偵測之 Bv8 蛋白含量(資料未圖示)。

因此，當與抗 VEGF 組合時，抗 Bv8 處理可最有效。為測試此假設，將 HM7(圖 6a)或 A673 細胞(圖 6b)植入小鼠且在腫瘤達到約 400 mm³ 體積後開始處理。與存在較低腫瘤內 Bv8 含量相符，與早期階段處理相比，抗 Bv8 處理對 HM7 及 A673 腫瘤中之腫瘤生長抑制具有較小作用(圖 2)。抗 VEGF 提供更完全之抑制，但腫瘤最終逃脫。然而，與各單一療法相比，抗 VEGF 與抗 Bv8 處理之組合顯著 ($p < 0.05$) 抑制腫瘤生長。同樣，組合療法使得 TIB42(圖 2e)及

EL4鼠類淋巴瘤(圖6c)(兩者用抗VEGF均難以治療)中腫瘤體積及重量明顯降低。因此，資料表明抗Bv8處理在難以用抗VEGF治療治癒之腫瘤中具有用於組合療法之潛能。

為證實抗Bv8之作用不侷限於免疫缺陷型小鼠，將鼠類抗VEGF抗性EL4細胞株植入免疫缺陷型及免疫活性小鼠中且測試抗Bv8或抗VEGF單一療法以及組合之作用。如圖6c及d中所說明，該等處理之作用在該兩個細胞株中幾乎不可區別。此等發現結果表明即使在完整免疫系統存在下抗Bv8亦可抑制腫瘤生長。為進一步支持此結論，抗Bv8處理在免疫活性小鼠中Rip-Tag多階段癌發生模型中抑制血管生成開關(未公開之觀測結果)。

已知細胞毒性劑引起造血細胞自BM活動(Neben, S.等人, *Blood* 81, 1960-1967 (1993))。此外，化學療法誘導之腫瘤壞死可引起諸如G-CSF之趨化因子釋放，接著嗜中性白血球之產生補償性增加(Kavgaci, H.等人, *J Exp Clin Cancer Res* 21, 475-479 (2002))。因此，設法研究用單獨或與抗VEGF組合之細胞毒性劑處理是否可能影響抗Bv8處理之功效。出於此目的，將A673細胞植入小鼠中且將該等小鼠用單獨或與抗Bv8、抗VEGF或兩種處理之組合組合之順鉑處理。在經單獨或與抗VEGF組合之順鉑處理的小鼠中，血清中Bv8含量顯著($p < 0.05$)增加(圖6e)。抗Bv8與抗VEGF均增強順鉑之抗腫瘤活性。然而，順鉑加抗VEGF及抗Bv8之組合使得A673中腫瘤生長幾乎完全被抑制($p < 0.05$; 圖6f)。因此，抗Bv8處理可與抗VEGF或細胞毒性劑

組合用作添加劑。S圖8說明Bv8在腫瘤形成中之作用之模型。

增長之證據表明影響腫瘤募集或骨髓細胞之血管生成性質可代表一種新穎抗癌策略(Shojaei, F.等人, *Nature Biotechnol* 25:911-20 (2007))。然而, 實現此目標之進展已受到介體之複雜性及潛在冗餘性阻礙。發現結果表明儘管存在該複雜性, 但阻斷單一細胞因子Bv8之作用對多個腫瘤類型之生長具有顯著影響。因此, 此等資料提高Bv8或其受體代表將來抗血管生成療法之治療標靶的可能性。需要其他研究來進一步確定此信號轉導系統在不同腫瘤類型及腫瘤發展之不同階段的作用。有趣地, 近來研究展示投與G-CSF可加速腫瘤生長(Okazaki, T.等人, 見上文; Hirbe, A.C.等人, *Blood* 109, 3424-3431 (2007))。Bv8上調是否促成該等作用為值得進一步研究之令人關注之可能性。反之, 抗G-CSF抗體藉由降低Bv8表現可抑制腫瘤生長。吾人之實驗室正研究此可能性。

最終, 關於Bv8表現對G-CSF非常敏銳地反應的發現結果將Bv8與嗜中性白血球分化及產生之調控中所涉及的主要內穩定機制相關聯。因此, 有可能Bv8起更廣泛之病理生理作用, 包括非腫瘤類型之發炎性細胞介導之血管生成。

實例2

材料及方法

自新鮮骨髓收集物分離全部人類骨髓細胞

新鮮骨髓樣品係獲自 ALLCELLS(Emeryville, CA)。首先將骨髓用含有 10% FBS 之 DMEM 稀釋且接著使其通過 40 μ m 細胞過濾器(BD Biosciences, Bedford, MA)以移除組織碎片。將細胞在 1200 rpm 下離心 5 min 且在冰冷 0.2% NaCl 存在下將紅血細胞溶解，歷時 30 秒，接著添加冰冷 1.6% NaCl。

自周圍血液分離嗜中性白血球、單核細胞及淋巴細胞

分離程序如先前所述(Kulczycki A, Jr. *J Immunol* 133:849-854 (1984))，進行較少修改。簡言之，將新鮮肝素化健康人類血液(Health Services, Genentech Inc.)塗覆於 CAPPEL LSM 淋巴細胞分離培養基(MP Biomedicals, Solon, Ohio)上。在無制動下以 3000 rpm 離心 15 min 後，移除血漿且收集處於分裂間期之單核細胞。使用單核細胞分離套組 II(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)及 FACS 分選法進一步純化單核細胞。藉由 FACS 藉由 $CD14^+$ $CD16^-$ 表現來評估細胞群體之純度。藉由收集與管柱結合之細胞來收穫淋巴細胞且對 T 淋巴細胞而言藉由檢測 CD3 表現且對 B 淋巴細胞而言藉由檢測 CD19 表現來檢測其純度。藉由小心移除直接在紅血細胞上之層，接著添加在 0.9% NaCl 中製備之 HBSS(無 Ca^{2+} 及 Mg^{2+})及 6% 葡聚糖 500(GE Healthcare Bio-sciences AB, Sweden)來收集嗜中性白血球。在使紅血細胞在 RT 下靜置 30-60 min 後，移除上清液中之嗜中性白血球。進一步移除任何殘餘紅血細胞，直至消除 90% 以上之紅血細胞。藉由 FACS 分析以 $CD15^+$ $CD16^+$ 群體來評估細胞純度。藉由

FACS及形態學分析，所有三個來自周圍血液之群體(嗜中性白血球、單核細胞及淋巴細胞)純度在95%以上。接著在使用之前將細胞用含有0.2% BSA(低內毒素，Serologicals Corp. Norcross, GA)之HBSS洗滌一次。

藉由Taqman分析基因表現

使用RNeasy™小型套組(Qiagen)製備RNA。對於即時PCR(Taqman)分析每一反應使用50 ng總RNA。對於人類Bv8而言，睪丸RNA(BD Biosciences)用作對照。反應在9600仿真型7500即時PCR系統(Applied Biosystems, Foster City, CA)上進行且使用序列偵測系統(SDS)軟體對標準曲線進行絕對定量。相對於同一樣品中之看家基因RPL19，進一步定量各基因之表現量。Taqman引子之序列如下：人類Bv8正向引子：ATG GCA CGG AAG CTA GGA(SEQ ID NO: 10)，反向引子：GCA GAG CTG AAG TCC TCT TGA(SEQ ID NO: 11)，探針：TGC TGC TGG ACC CTT CCT AAA CCT(SEQ ID NO: 12)；人類RPL19正向引子：CGC AAG CGC CGT GAA(SEQ ID NO: 28)，反向引子：GGT CTC TTC CTC CTT GGA TAA AGT C(SEQ ID NO: 29)，探針：CCA GGC CAA GAA GGA GGA GAT CAT CA(SEQ ID NO: 30)。人類特異性VEGF正向引子：AAT GAC GAG GGC CTG GAG T(SEQ ID NO: 31)，反向引子：TTG ATC CGC ATA ATC TGC ATG(SEQ ID NO: 32)，探針：TGT GCC CAC TGA GGA GTC CAA CAT CA(SEQ ID NO: 33)。

人類 PKR1/EG-VEGFR1 及 PKR2/EG-VEGFR2 之 Taqman 試劑係自 Applied Biosystems 獲得。

對培養血細胞中 Bv8 基因表現之調控

重組人類 MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-2、bFGF、VEGF、GM-CSF、G-CSF、SDF-1 α 、M-CSF、紅血球生成素 (EPO) 及 TNF α 係自 R&D Systems (Minneapolis, MN) 購得。重組人類 IL-8、IFN γ 、Bv8 (激動素-2)、IL-4、IL-10、IL-13、TGF- β 係來自 PeproTech Inc. (Rocky Hill, New Jersey)。SCF (幹細胞因子) 係來自 Invitrogen Biosource (Carlsbad, CA)。在一些狀況下，使用來自 Amgen 之 G-CSF (白血球生成素 (Neupogen)/ 非格司亭 (Filgrastim))。所有細胞因子均以 10 ng/ml 使用。將剛純化之細胞洗滌且再懸浮於含有 0.2% BSA (低內毒素，Serologicals Corp. Norcross, GA) 之 HBSS 培養基中。在 5% CO₂ 恆溫箱中於 37°C 下將兩百萬個細胞在具有各種細胞因子及趨化因子之 24 孔盤中培育 4 小時。接著將細胞轉移至 eppendorf 管中，離心且用 RNA 溶解緩衝液 (Qiagen, Valencia, CA) 溶解。使用 RPL19 (核糖體蛋白 L19) 作為內部對照基因，藉由 Taqman 評估 Bv8 表現。

自周圍血液嗜中性白血球部分純化 Bv8 蛋白

如上所述自 500 ml 新鮮人類血液分離嗜中性白血球。將細胞糰粒懸浮於 10 ml 具有蛋白酶抑制劑 (Roche) 之 0.5% Triton X-100 中且在震盪器上於 4°C 下溶解 10 min。接著迫使細胞溶解產物穿過 25 規格針兩次，且將鹽濃度調整至 50

mM NaCl、20 mM Tris. HCl(pH 7.3)。將粗提取物施用於經20 mM Tris(pH 7.2)、50 mM NaCl及0.5% Triton X-100預平衡之肝素-瓊脂糖管柱 (Amersham Biosciences, Sweden)。使用以下線性梯度溶離管柱：在0.5% Triton X-100存在下20 mM Tris(pH 7.3)中50 mM至2 M NaCl。流動速率為1 ml/min。在280 nm下監測吸光率。收集1 ml溶離份且藉由ELISA檢定人類Bv8。接著將峰值Bv8溶離份及若干非峰值溶離份彙集，且使用Microcon離心過濾器設備Ultracel YM-3(Millipore, Bedford, MA)濃縮達至10倍且測試其生物活性。

人類Bv8 ELISA

在4°C下將MaxiSorp® 96孔微孔盤 (Nalge Nunc International, Rochester, NY)用於50 mM碳酸鹽緩衝液(pH 9.6)中之1.0 µg/ml 3F1小鼠單株抗體(Genentech Inc.)塗佈隔夜。將培養盤用含有0.05%聚山梨醇酯20之PBS洗滌，且在室溫下用於PBS中之0.5%牛血清白蛋白、15 p.p.m.(百萬分率)Proclin 300(Supelco, Bellefonte, PA)阻斷1 h。在將培養盤洗滌之後，將於含有0.5%牛血清白蛋白、0.05%聚山梨醇酯20、15 p.p.m. Proclin 300(Supelco, Bellefonte, PA)及0.35 N NaCl之PBS(樣品緩衝液)中之人類BV8標準物(2倍連續稀釋之0.020-2.5 ng/ml, PeproTech, Rocky Hill, NJ)及樣品(最小1:10稀釋)連續稀釋且添加至各孔中。將培養盤在室溫下培育2 h，接著進行洗滌步驟。藉由添加二級抗體生物素標記之倉鼠抗BV8抗體純系3B8(Genentech

Inc.)，接著添加抗生蛋白鏈菌素-HRP(GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom)及3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)作為受質來偵測結合之Bv8。藉由添加1M磷酸來終止反應。在ThermoMax微盤讀數器(Molecular Devices, Menlo Park, CA)上在450 nm下讀取吸光率。使用四參數回歸曲線擬合程式(Genentech Inc.)計算標準物之滴定曲線。藉由外推樣品之光學密度值至標準曲線中之資料範圍來計算人類Bv8濃度。Bv8 ELISA能夠量測多達10%溶解緩衝液且具有偵測組織溶解產物中低至0.20 ng/ml Bv8之敏感性。針對Bv8，特定發展ELISA且優化，此係因為至多30 µg/ml之人類EG-VEGF、VEGF-A、VEGF-C及G-CSF(R&D Systems, Minneapolis, MN)僅產生背景信號；至多30 µg/ml之此等分子及抗VEGF(Genentech Inc.)之存在不影響對樣品緩衝液中100 pg/ml人類Bv8之偵測。此ELISA亦可偵測小鼠Bv8，但敏感性小於7%。

Bv8生物活性檢定

GeneBLAzer® NFAT-CHO 細胞係自 Invitrogen Corporation(Carlsbad, CA)獲得。將細胞用 PKR1/EG-VEGFR1穩定轉染且生長在含有10%透析血清、0.1 mM NEAA、2 mM GlutaMax™(Gibco)、1 mM丙酮酸鈉、10 µg/ml Zeocin、500 µg/ml潮黴素之DMEM(高葡萄糖)中。在5% CO₂、37℃下，以80毫升/孔中 2.5×10^4 個細胞將細胞塗鋪至1% DMEM中96孔Viewplate(Packard)中隔夜。在

第二天，將細胞用藉由來自 Millipore 之 Microcon 離心過濾器設備 (Ultracel YM-3) 濃縮之各種管柱溶離份處理。在 1% DMEM 中製備之 0.2-0.02 ng/ml hBv8 (Peprotech Inc.) 用作陽性對照。1 小時後，將培養基移除且用含有 0.1% BSA 及含 1 mM CCF4 (Invitrogen Corporation) 之 6X 加樣緩衝液的 80 ml 漢克斯溶液 (Hank's solution) 置換。將培養盤在室溫下在黑暗中培育 1.5 h 且在 410 nm 之激發波長及 450/520 nm 之發射波長下在 Wallac 盤式讀數器上讀取。陰性對照為未添加配位體之細胞及僅具有對照培養基之細胞。在添加 β -內醯胺酶受質 CCF4 之前 1 h，將 CHO 細胞用重組人類 Bv8 或彙集之溶離份刺激。為評估管柱溶離份之特異性，添加 20 mg/ml 之抗 Bv8 抗體 2B9 及 3F1。

分析來自經 G-CSF 處理之供體之白血球

在 G-CSF 處理 4-5 天後，藉由單采 (apheresis) 收集 (Cellular Therapy and Cell Processing Facilities, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) 自正常供體獲得周圍白血球。藉由相同程序自未經處理之個體收集白血球且其用作未成對對照。接著將細胞濃縮且再懸浮於具有人類血清白蛋白加 10% DMSO 之防冷凍培養基中。在 37°C 水浴中融解後，藉由台盼藍排除測試 (trypan blue exclusion test)，細胞存活力 >95%。將細胞用含有 0.2% BSA 之 HBSS 緩衝液簡單洗滌且在 RNA 溶解緩衝液 (Qiagen) 或含有蛋白酶抑制劑 (Roche) 之 RIPA 緩衝液中溶解以提取 RNA 或量測蛋白質。

周圍血液嗜中性白血球之趨化性

將 10^6 個細胞用含有 0.2% BSA 之 HBSS 洗滌，隨後放入具有 5 μm 孔徑之穿孔插入皿 (Corning Incorporated, Lowell, MA) 中。在下室中，添加單獨培養基或具有各種濃度 (最大為 200 ng/ml) 之各種細胞因子之培養基。在 37°C 下 3 h 後，轉移下室中之細胞，將其與 9 ml ZPAK 溶液混合且在 Z2 Coulter 粒子數及大小分析儀 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) 上計數。

人類白血病細胞之培養

U937、HL-60、THP-1、Hel 92.1.7、KG-1、K562、Jurkat 細胞係自 ATCC® (Manassas, VA) 獲得。使大部分細胞生長於含有 10% FBS 之 RPMI 中。使 KG-1 細胞生長於含有 20% FBS 之伊斯科夫改良杜爾貝科培養基 (Iscove's modified Dulbecco's medium) 中。對於 THP-1 細胞而言，使用具有丙酮酸鈉、HEPES 及 β -巰基乙醇之含有 10% FBS 之 RPMI。對於調控研究而言，使用 1 百萬個存活力高於 95% 之細胞。在含有 0.2% BSA 之 1 ml HBSS 培養基中在含氧量正常及低氧條件下執行調控研究，歷時 4 h。

統計學分析

使用學生 t 檢驗 (Student t-test) 來計算統計學顯著性。

結果

人類骨髓及各種血細胞中 Bv8 之調控

先前已報導 G-CSF 引起小鼠骨髓細胞及周圍嗜中性白血球中 Bv8 表現顯著上調 (>30 倍) (Shojaei 等人, *Nature*

450:825-831 (2007)及實例1)。

在本發明之研究中，評估G-CSF是否亦為經分離人類周圍嗜中性白血球及全部骨髓細胞中Bv8表現之誘導劑。10 ng/ml G-CSF在4 h內引起平均7倍(在6-12範圍內)之Bv8表現誘導。與小鼠嗜中性白血球相比較低之成倍增加可至少部分地歸因於人類細胞中較高之基礎Bv8表現(資料未圖示)。時間-過程研究表明G-CSF在4 h內誘導Bv8 mRNA，且該作用維持長達24 h(資料未圖示)。鑑別出GM-CSF為人類骨髓細胞及嗜中性白血球中Bv8表現之另一正調控劑(圖14A及B)。觀測到在10 ng/ml GM-CSF下Bv8表現顯著增加約2.5倍。此與展示GM-CSF未誘導Bv8之小鼠嗜中性白血球不同。包括IL-6、IL-1 β 及EPO(紅血球生成素)之所測試之其他細胞因子對嗜中性白血球或骨髓細胞中的人類Bv8表現無刺激作用。

不同於嗜中性白血球，單核細胞及淋巴細胞未展示對G-CSF反應之Bv8表現的任何改變(圖14C及D)。意外地，GM-CSF減少人類單核細胞中的Bv8表現，其中在4 h處理後抑制約75%。IL-10上調單核細胞及淋巴細胞中之Bv8表現，而SDF-1 α 僅展示對單核細胞之顯著刺激作用(圖14C及D)。與嗜中性白血球或骨髓細胞相比，在單核細胞及淋巴細胞中存在較低基礎程度之Bv8表現(資料未圖示)。

總之，G-CSF及GM-CSF對嗜中性白血球中Bv8基因表現之影響相當獨特，此係因為兩種相關細胞因子M-CSF及SCF無影響。

人類骨髓細胞及嗜中性白血球中Bv8受體之調控

與表現PKR1/EG-VEGFR1及PKR2/EG-VEGFR2兩者之小鼠嗜中性白血球不同，經分離人類嗜中性白血球僅表現可偵測含量之PKR2/EG-VEGFR2。在活體外培育4 h後，GM-CSF而非G-CSF引起PKR2/EG-VEGFR2表現顯著上調(平均誘導4倍)(圖15A)。在人類骨髓中，G-CSF與GM-CSF兩者似乎均調控PKR2/EG-VEGFR2至顯著含量(圖15B)。

在來自經G-CSF處理之供體之活動周圍單核細胞中Bv8及PKR2/EG-VEGFR2之上調

經由單採收集自11個未經處理及12個經G-CSF處理之個體獲得周圍血液單核細胞。藉由Taqman檢測Bv8基因表現且亦藉由ELISA量測Bv8蛋白含量。與來自未經處理供體之單核細胞相比，在經G-CSF活動之單核細胞中偵測到約4.5倍之Bv8表現增加及10倍之蛋白質含量增加(圖16)。類似地，當將患者用G-CSF處理4-5天時，在臨床收集之白血球中可偵測到PKR2/EG-VEGFR2而非PKR1/EG-VEGFR1。與未經處理之對照樣品相比，來自經G-CSF處理之個體之單核細胞展示PKR2/EG-VEGFR2表現之顯著誘導(約2倍)(圖16B)。

由人類嗜中性白血球產生之Bv8具有生物活性

為表徵Bv8蛋白，將周圍人類嗜中性白血球顆粒溶解於0.5% Triton® X-100中。接著使嗜中性白血球溶解產物經受如材料及方法中所述之肝素-瓊脂糖親和力層析。如圖14A中所說明，類似於小鼠Bv8蛋白，Bv8結合於管柱且在

約 0.4 M NaCl 存在下溶離。ELISA 進一步證實溶離份 9、10 及 11 中存在 Bv8 (圖 17A)。

因為在增殖檢定中發現甚至痕量之 Triton® X-100 對內皮細胞亦具有顯著細胞毒性，所以設法在需要較短刺激時間之檢定中測試嗜中性白血球來源之 Bv8 蛋白的活性。利用如材料及方法中所述之 PKR1/EG-VEGFR1 穩定轉染之 CHO 細胞。如所料，重組人類 Bv8 (0.2-200 ng/ml) 引起劑量依賴性刺激 (資料未圖示)。如圖 17B 中所示，與 Triton® X-100 緩衝液對照相比，含有免疫活性 Bv8 之管柱溶離份展示顯著刺激。然而，缺乏免疫活性 Bv8 之副溶離份未展示刺激作用。抗 Bv8 抗體亦阻斷彙集之含 Bv8 之溶離份的刺激。所測試至多 200 ng/ml 之 VEGF-A 未引起任何反應，進一步證實該等作用之特異性。

Bv8 對嗜中性白血球遷移之作用

測試 Bv8 對人類嗜中性白血球可能具有趨化作用之可能性。如圖 18 中所說明，Bv8 誘導趨化性之顯著刺激，其中最大影響超過對照約 3 倍。有趣地，最大刺激出現在極低 Bv8 濃度 (約 2 pM) 下。在 6 個獨立供體中觀測到類似模式 (圖 18)。諸如 SDF-1 α 、IL-8 及 G-CSF 之其他趨化因子需要較高濃度 (20 nM) 來刺激嗜中性白血球遷移。VEGF 及 MCP-1 在所有測試濃度下均未展示任何效應 (資料未圖示)。

Bv8 在各種人類白血病細胞株中之表現及受 G-CSF 之調控

為確定 Bv8 是否由白血病細胞表現，測試一組人類細胞株。在 Jurkat 及 K562 細胞株中不可偵測到 Bv8 之表現 (資料

未圖示)。然而，在HL-60、KG-1、Hel 92.1.7及U937細胞株中發現可偵測之Bv8 mRNA含量。10 ng/ml G-CSF在若干細胞株中誘導Bv8表現增加(2-3倍)(補充表2)。然而，在所測試之任何細胞株中未觀測到GM-CSF之顯著誘導。在急性早幼粒細胞白血病細胞株HL-60中G-CSF與GM-CSF均不影響Bv8表現。

討論

嗜中性白血球及其他骨髓細胞由於其在先天免疫中之作用而為人所熟知，其提供對抗病原體之第一道防線(Bendelac及Fearon, *Curr Opin Immunol* 9:1-3 (1997))。此等細胞參與多種急性及慢性發炎過程亦為公認(O'Shea及Murray, *Immunity* 28:477-487 (2008))。此外，最初在19世紀提出之發炎細胞與癌症之間的關聯近來已受到廣泛實驗及臨床支持(Coussens及Werb, *Nature* 420:860-867 (2002); Lin及Karin, *J Clin Invest* 117:1175-1183 (2007)中回顧)。多種促發炎性細胞因子及趨化因子之分泌可直接促進腫瘤生長及血管生成。此外，腫瘤浸潤性骨髓細胞由於其能夠下調包括CD4⁺及CD8⁺細胞之T細胞亞型之免疫反應而可利於腫瘤生長，因此針對CD11b⁺Gr1⁺細胞之至少一個子集命名骨髓來源之抑制細胞(MDSC)(Talmadge JE, *Clin Cancer Res* 3:5243-5248 (2007)中回顧)。

近來研究已測試骨髓細胞亦可能在介導腫瘤模型中VEGF阻斷劑之難治性中發揮作用的假設(Shojaei等人, *Nature Biotechnology* 25:911-920 (2007))。與敏感腫瘤相

比，抗 VEGF 難治腫瘤與腫瘤浸潤性 CD11b⁺Gr1⁺細胞之頻率顯著增加相關聯 (Shojaei 等人，見上文)。在評估由 CD11b⁺Gr1⁺細胞介導之獨立於 VEGF 之血管生成的機制時，分泌型蛋白質 Bv8 之直系同源物經鑑別為關鍵調控劑 (Shojaei 等人，*Nature* 450:825-831 (2007))。此等研究 (包括實例 1 中所提供之資料) 提供 Bv8 不僅為異種移植中 (Shojaei 等人，*Nature*, 2007，見上文)，且亦為癌症發展之轉殖基因小鼠模型中 (Shojaei 等人，*Proc Natl Acad Sci USA* 105:2640-2645 (2008)) 腫瘤發展期間骨髓細胞活動及血管生成之介體的證據。

本發明之研究旨在表徵人類骨髓及成熟血細胞中之 Bv8 表現。分析表明各種細胞因子對人類血細胞中 Bv8 表現之調控具有細胞類型特異性。類似於小鼠，最高 Bv8 表現存在於骨髓細胞及嗜中性白血球中，而較低表現量在單核細胞及淋巴細胞中偵測到。為證實 Bv8 蛋白具有生物活性，將 Bv8 自人類嗜中性白血球部分純化且在生物檢定中證明其活性。此外，在本發明之研究中，鑑別出 Bv8 之一種新穎活性，活體外在極低濃度下促進嗜中性白血球遷移之能力，表明可能來自不為嗜中性白血球之來源的 Bv8 可能在生理學上調控嗜中性白血球遷移。此外，本發明之結果展示在 Bv8 之兩種受體中，僅 PKR2/EG-VEGFR2 在經分離人類嗜中性白血球與經 G-CSF 活動之細胞兩者中表現，表明其實際上為牽涉於 Bv8 造血作用中之主要受體。

G-CSF 為嗜中性白血球及骨髓細胞中 Bv8 表現之主要誘

導劑，不過其對單核細胞及淋巴細胞無影響。重要地，如藉由來自經G-CSF處理之供體之周圍血液中的表現增加所評估，可活體內證明Bv8上調。G-CSF可由腫瘤微環境內的基質細胞、纖維母細胞及內皮細胞產生。GM-CSF上調人類嗜中性白血球及骨髓細胞中之Bv8激起興趣，此係因為此因子在小鼠單核細胞中未引起該效應。實際上已知G-CSF與GM-CSF均調節來自骨髓之嗜中性白血球及單核細胞的增殖、分化、存活及成熟。兩種因子亦可由多種非造血細胞(包括纖維母細胞、內皮細胞、角質細胞及腫瘤細胞)產生。此外，若干報導表明群落刺激因子至少在實驗系統中可促進惡性生長(Karcher等人，*Int J Cancer* 118:2182-2189 (2006)；Morales-Arias等人，*Cancer* 110:1568-1577 (2007)；Okazaki等人，*International Immunology* 18:1-9 (2006))。

IL-10與SDF-1 α 均顯著上調人類單核細胞中之Bv8表現。在淋巴細胞中，IL-10為Bv8表現之主要誘導劑。有趣地，大量證據支持腫瘤浸潤性巨噬細胞及淋巴細胞在分泌血管生成因子(諸如，VEGF)中之作用(Freeman等人，*Cancer Res* 55:4140-4145 (1995)；Lewis及Murdoch，*Am J Pathol* 167:627-635 (2005))。因此，此等細胞類型產生之Bv8可造成血管生成且亦可具有其他有待確定之調控作用。最初描述為由T輔助細胞2(Th2)產生之細胞因子(Boyman等人，*Curr Opin Immunol* 19:320-326 (2007))，IL-10亦牽涉於血管生成中(Silvestre等人，*Circ Res.* 87:448-452 (2000)；

Sakamoto 等人，*Int J Cancer* 118:1909-1914 (2006))。

總之，研究證明人類造血細胞中 Bv8 之表現及調控相對於小鼠而言實質上保守，此提供進一步研究 Bv8 在人類腫瘤及發炎性病變中之病理生理作用及 Bv8 抑制劑之治療性應用的基礎。

整個揭示內容中所引用之所有參考文獻均以全文引用的方式明確併入本文中。

雖然本發明已參考視為特定實施例者加以描述，但應瞭解本發明不侷限於該等實施例。相反，意欲本發明涵蓋包括在隨附申請專利範圍之精神及範疇內的各種修改及等效形式。

在整個本申請案中(包括申請專利範圍)，術語"包含"用作包括性、開放性變換短語，其並不排除其他未敘述之要素或方法步驟。

【圖式簡單說明】

圖 1. 對 BM 細胞上 Bv8 表現及活性之調控。a. 腫瘤誘導 BM 中 Bv8 蛋白之表現。將 A673 或 HM7 腫瘤細胞植入 Beige 裸小鼠。特定 ELISA 展示 6 天後相對於植入 Matrigel™ 之小鼠，植入腫瘤之 BMMNC 中 Bv8 含量較高 ($p < 0.05$)。b. 在 BM 細胞之 CD11b+Gr1+ 子集中 Bv8 表現受到特異性上調。將 A673、HM7、HPAC、Calu-6 及 Jurkat 細胞植入 Beige 裸小鼠。10 天後，將 CD11b+Gr1+ 骨髓細胞自小鼠 BM 分離且 Taqman™ 分析測定骨髓及非骨髓 (CD11b-Gr1-) 子集中之 Bv8 表現。星號表明當比較各腫瘤中 CD11b+Gr1+ 與相應 CD11b-Gr1- 群

體時之顯著差異($p < 0.05$)。c. G-CSF為Bv8表現之主要誘導劑。將BMMNC自未處理小鼠分離且用一系列細胞因子及趨化因子培育且如方法中所述，藉由Taqman™評估Bv8表現。d. G-CSF為CD11b+Gr1+細胞中Bv8之主要誘導劑。將BMMNC自Balb-c小鼠分離且藉由FACS分選成CD11b+Gr1+及CD11b-Gr1-子集。如方法中所述，將全部BM CD11b+Gr1+及CD11b-Gr1-群體用SDF1 α 、G-CSF及GM-CSF處理。e.低氧增強骨髓細胞中藉由G-CSF進行之Bv8上調。在含氧量正常或低氧(1% O₂)條件下將BM CD11b+Gr1+用20或2500 pg/ml之G-CSF培育4 h。f.注射G-CSF後，BM中Bv8含量顯著增加。在第0天將Balb-c小鼠皮下注射G-CSF且接著每天注射，歷時8天。在第1天、第3天、第6天及第8天取BM樣品，且如所述量測Bv8蛋白含量。g.用抗G-CSF處理抑制G-CSF誘導之Bv8上調。如所指示，將剛分離之BMMNC用HM7腫瘤溶解產物及各種濃度之抗G-CSF培育。藉由Taqman™監測BMMNC中Bv8之表現。h.抗G-CSF降低不帶腫瘤小鼠之BM中Bv8之含量。將Balb/c裸小鼠用PBS、對照IgG及抗G-CSF處理且如方法中所述，藉由ELISA量測BMMNC中Bv8之含量。i.抗G-CSF降低帶有HM7腫瘤小鼠之BM中的Bv8含量。詳情請參見方法。腫瘤或Matrigel™植入48小時後，如所述，量測BMMNC中Bv8蛋白之含量。j. Bv8在由G-CSF誘導之嗜中性白血球活動中起作用。如方法中所述，將Balb/c裸小鼠用若干藥劑(包括抗G-CSF、抗Bv8、對照Mab及對照IgG抗

體)在12小時內腹膜內處理兩次。在最後注射6 h後，將所有小鼠放血，且如所述，在FACSCalibur流式細胞儀(Becton Dickinson)中測定CD11b+Gr1+細胞之頻率。

圖 2. 抗 Bv8 抗體對移植於裸小鼠中之腫瘤細胞株之生長的作用。如正文中所述，將 A673(a)、HM7(b)、HPAC(c)及 Jurkat(d)腫瘤細胞植入 Balb-c 裸小鼠中。在腫瘤細胞接種 24-48 小時後，開始用對照(抗豚草)、抗 Bv8 或抗 VEGF-A Mab(n = 10)之處理。每週量測腫瘤體積兩次。在實驗結束時測定腫瘤重量。所示資料為平均值±SEM。星號指示與對照處理組相比抗 Bv8 或抗 VEGF 之顯著差異($p < 0.05$)。e. 抗 Bv8 及抗 VEGF 具有抑制抗 VEGF 抗性腫瘤中腫瘤生長的累加效應。將 TIB42 細胞植入 Beige 裸小鼠中且將該等小鼠用對照、抗 Bv8、抗 VEGF 及抗 Bv8 加抗 VEGF 抗體處理。插圖展示所有四個處理中之最終腫瘤重量。C：對照，AV：抗 VEGF，AB：抗 Bv8。

圖 3. 抗 Bv8 治療減少若干模型中 PB 及腫瘤中之 CD11b+Gr1+細胞。a 及 b. 將 A673、Calu6、HM7、HPAC 及 Jurkat 細胞植入裸小鼠(n=5)中。接著如方法中所述，將小鼠用抗 Bv8 或對照 Mab 處理。在腫瘤植入 10 天後，進行分析，且如所述，量測 PB(a)及腫瘤(b)中 CD11b+、Gr1+及 CD11b+Gr1+細胞之頻率。部分 a 中之插圖展示 Matrigel™ 小鼠中 CD11b+、Gr1+及 CD11b+Gr1+細胞之頻率。c 及 d. 腫瘤內注射 BM CD11b+Gr1+可使抗 Bv8 處理對腫瘤生長之抑制無效。將 A673(c)及 HM7(d)腫瘤植入裸小鼠中且將裸小

鼠用抗Bv8或對照Mab處理。在第7天(由箭頭表示)，使用CD11b+珠粒，將CD11b+Gr1+細胞與經A673及HM7腫瘤預致敏之小鼠BM分離。將經純化之群體直接注射至帶有腫瘤之小鼠中且如所述，繼續處理。

圖4. Bv8調控腫瘤血管生成。如所述，將 5×10^6 個HM7細胞植入免疫缺陷型小鼠中。植入5天後，對小鼠注射 10^7 pfu之Av-Bv8、Av-VEGF或Av-LacZ。a.所有處理中之最終腫瘤體積量測結果表明與Av-LacZ腫瘤相比Av-Bv8及Av-VEGF中腫瘤體積之顯著差異。b.與Av-VEGF及Av-LacZ動物相比，在經Av-Bv8處理之小鼠中周圍血液(PB)中CD11b+Gr1+細胞之頻率更大。c及d. Micro-CT分析揭示與注射LacZ之小鼠相比，注射Bv8-及VEGF-腺病毒之小鼠中血管體積增加(c)。e.展示注射Av-LacZ、Av-VEGF及Av-Bv8之腫瘤的代表性影像。分別以紅色及灰色展示血管網路及腫瘤。f.抗Bv8 Mab處理藉由影響腫瘤血管結構來抑制腫瘤生長。將HM7細胞植入裸小鼠中且將裸小鼠用抗Bv8、抗VEGF或對照抗體處理。與圖2b中之資料相符，抗Bv8與抗VEGF處理與對照相比均產生顯著之腫瘤生長抑制。g.與抗VEGF及對照相比，抗Bv8處理降低PB中循環CD11b+Gr1+之頻率。h及i.上述Micro-CT方法展示與對照處理之小鼠相比，抗Bv8處理之小鼠中血管體積(h)及血管密度(i)顯著降低。抑制程度類似於抗VEGF處理所提供之抑制程度。j.展示抗Bv8、抗VEGF及對照處理之代表性micro-CT血管攝影資料。分別以紅色及灰色展示血管網路

及腫瘤。

圖 5. 抗 VEGF 處理誘導 Bv8 表現。 a-d. 將 HM7 細胞植入裸小鼠中且如所述，將裸小鼠用抗 VEGF 或對照 Mab 處理。在腫瘤植入後第 1 天、第 3 天、第 6 天、第 9 天、第 12 天及第 15 天，量測 BM(a)、PB(b)、脾(c)及腫瘤(d)中之 Bv8 蛋白濃度。所有實驗均與植入 Matrigel™ 及未處理之小鼠並行執行。e. IHC 資料進一步證實植入 A673 及 HM7 之動物中嗜中性白血球之浸潤。自帶有 A673 或 HM7 且經對照、抗 Bv8 或抗 VEGF 抗體處理 15 天之小鼠提供福馬林固定切片。如"方法"中所述，將切片用抗 Gr1 抗體染色。f. CD11b⁺ 細胞為腫瘤中 Bv8 之主要來源。將 A673、Calu-6、HM7、HPAC 及 Jurkat 細胞植入 Beige 裸小鼠中，且在腫瘤細胞移植後第 10 天使該等小鼠安樂死。如所述，使用 CD11b 微珠粒將富含 CD11b⁺ 之細胞群體分離。使用對小鼠 Bv8 轉錄物具有特異性之 Taqman™ 引子分析 Bv8 之表現。使用小鼠 GAPDH 將資料正規化。

圖 6. 抗 Bv8 具有與抗 VEGF 或細胞毒性化學療法之累加效應。 a 及 b. 當在腫瘤發展早期開始處理時，抗 Bv8 處理最有效。將 HM7(a) 及 A673(b) 腫瘤植入裸小鼠中且該等小鼠未接收任何處理直至腫瘤達到約 400 mm³。接著將小鼠用對照、抗 Bv8、抗 VEGF 或抗體組合(抗 VEGF 加抗 Bv8)處理。腫瘤體積如所述來量測。* 表明組合療法與抗 VEGF 單一療法之間的腫瘤體積顯著差異 (p < 0.05)。c 及 d. 當與抗 VEGF 組合使用時，抗 Bv8 在抗 VEGF 抗性腫瘤中具有累加效應。

將EL4細胞植入裸小鼠(c)及C57Bl/6(d)小鼠中且該等小鼠經受對照、抗Bv8、抗VEGF或組合之處理。如所述來量測腫瘤體積及最終腫瘤重量。*表明與各單一療法或組合療法相比，對照中腫瘤體積之顯著差異($p<0.5$)。腫瘤體積差異在比較組合與各單一療法時亦為顯著。e.順鉑及抗VEGF處理增加血清中之Bv8濃度。將A673細胞植入Beige裸小鼠中且將該等小鼠用PBS、順鉑(5 mg/kg)加對照抗體、順鉑加抗Bv8或順鉑加抗VEGF或順鉑、抗Bv8及抗VEGF之組合處理。藉由ELISA量測血清Bv8蛋白濃度。f.化學療法加抗VEGF及抗Bv8可有效抑制形成之A673腫瘤的腫瘤生長。對Beige裸小鼠注射A673細胞且在腫瘤細胞植入13天後接收如上所提及之處理。*表明組合療法與順鉑加對照之間的顯著差異($p<0.05$)。

圖7.編碼人類Bv8同源物之cDNA之核苷酸序列(SEQ ID NO: 1)。亦以粗體及下劃線呈現各別起始及終止密碼子之位置。

圖8.如來源於SEQ ID NO: 1之編碼序列之人類Bv8同源物多肽的胺基酸序列(SEQ ID NO: 2)。推定信號序列包含胺基酸1至21。

圖9.編碼人類Bv8同源物之替代性拼接型式的cDNA之核苷酸序列(SEQ ID NO: 3)。亦以粗體及下劃線呈現各別起始及終止密碼子之位置。

圖10.如來源於SEQ ID NO: 3之編碼序列之人類Bv8同源物多肽的胺基酸序列(SEQ ID NO: 4)。

圖 11.小鼠 Bv8 同源物之核苷酸序列 (SEQ ID NO: 5)。亦以粗體及下劃線呈現各別起始及終止密碼子之位置。

圖 12.如來源於 SEQ ID NO: 5 之編碼序列之小鼠 Bv8 同源物多肽的胺基酸序列 (SEQ ID NO: 6)。

圖 13.小鼠 (SEQ ID NO: 37) 與人類 (SEQ ID NO: 2) Bv8 同源物之比對。潛在肝素結合域經加框。如所示，此域在替代性拼接轉錄物中不存在。小鼠與人類 Bv8 同源物約 96% 一致。

圖 14.使用經純化之人類血細胞及新鮮骨髓細胞活體外調控 Bv8 表現。將細胞用 10 ng/ml 之細胞因子或趨化因子處理 4 小時，接著經受針對 Bv8 表現之 RNA 提取及 Taqman 分析。針對內部對照基因 RPL19，將所有資料進一步正規化為成倍變化，其中未經處理之樣品為 1。20 個未經藥物治療之不同人類供體用於如材料及方法中所述之研究。右側展示藉由 FACS 獲得之經純化細胞及其標記物表現的代表性影像。(A) 新鮮骨髓細胞，(B) 嗜中性白血球，(C) 單核細胞，(D) 淋巴細胞。*** 與未經處理之對照相比， $p < 0.01$ 。

圖 15.人類骨髓細胞及嗜中性白血球中藉由各種 G-CSF 相關細胞因子調控 Bv8 受體 PKR2/EG-VEGFR2 表現。將 (A) 新鮮分離之嗜中性白血球或 (B) 骨髓細胞用各種 G-CSF 相關細胞因子處理。在活體外培育 4 小時後，收集細胞且藉由 Taqman 提取 RNA 以供 PKR2/EG-VEGFR2 表現。將 RPL19 用作正規化之內部對照基因。使用 3 個獨立健康供體進行實

驗。展示各個別供體對細胞因子之反應，且接著在插圖中繪示來自所有3個供體之平均表現量。***與未經處理之對照相比， $p < 0.01$ 。

圖 16. Bv8及PKR2/EG-VEGFR2在來自經G-CSF處理之供體之單核細胞中受到上調。在RNA提取或溶解於含有蛋白酶抑制劑之RIPA緩衝液之前，將來自經G-CSF處理($n = 12$)及未經處理之個體($n=11$)(未成對)之白血球簡單洗滌且粒化。執行對Bv8(A)、PKR2/EG-VEGFR2表現(C)之Taqman分析及特異性人類Bv8 ELISA(B)。對於Taqman而言，針對RPL19表現將資料正規化，且對於ELISA而言，針對總蛋白質濃度將資料正規化。***與未經處理之對照相比， $p < 0.01$ 。

圖 17.由人類嗜中性白血球產生之Bv8蛋白的表徵。(A)如材料及方法中所述，將人類嗜中性白血球分離且溶解。如所述將溶解產物塗覆於肝素-瓊脂糖。在約0.4 M NaCl存在下溶離之溶離份9、10及11具有最高Bv8含量。此處所示資料代表3個獨立分離。(B)來自人類嗜中性白血球之經純化人類Bv8之生物活性。經PKR1/EG-VEGFR1轉染之GeneBLAzer NFAT-CHO細胞用以偵測Bv8誘導之G蛋白偶合受體信號轉導路徑下游之活化。使用20 ng/ml之重組人類Bv8作為陽性對照，且使用200 ng/ml之人類VEGF作為陰性對照。將資料進一步正規化為成倍變化，其中未經處理之細胞為1。***與未經處理或緩衝液對照相比， $p < 0.01$ 。進行三個獨立研究。

序列表

<110>美商建南德克公司

<120> 血管生成之抑制

<130> GNE-0256

<140> 097136179

<141> 2008-09-19

<150> 60/974,382

<151> 2007-09-21

<150> 61/083,071

<151> 2008-07-23

<160> 37

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 427

<212> DNA

<213> 智人

<400> 1

tgagggcgcc atgaggagcc tgtgctgcgc ccactcctg ctctcttgc tgcgcccgc 60
gctgctgctc acgccccgcg ctggggacgc cgccgtgac accggggctt glgacaagga 120
ctcccaatgt ggtggaggca tgtgctgtgc tgtcagtatc tgggtcaaga gcataaggat 180
ttgcacacct atgggcaaac tgggagacag ctgccatcca ctgactcgta aaaacaattt 240
tggaaatgga aggcaggaaa gaagaaagag gaagagaagc aaaaggaaaa aggaggttcc 300
atTTTTtggg cggaggatgc atcacacttg ccaatgtctg ccaggcttgg cctgtttacg 360
gacttcaatt aaccgatita ttgttttagc ccaaaagtaa tcgctctgga gtagaaacca 420
aatgtga 427

<210> 2

<211> 129

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

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

100 105 110

Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln
115 120 125

Lys

<210> 3
<211> 363
<212> DNA
<213> 智人

<400> 3
gaggcgcca tgaggagcct gtgctgcgcc ccactcctgc tcctcttgct gctgccgccc 60
ctgctgctca cgtcccgcgc tggggacgcc gccgtgatca ccggggcttg tgacaaggac 120
tcccaatgtg gtggaggcat gtgctgtgct glcagtatct gggtaagag cataaggatt 180
tgcacacctt tgggcaaact gggagacagc tgccatccac tgactcgtaa agttccattt 240
tttgggcgga ggaatgatca cacttgccca tgtctgccag gcttggcctg ttacggact 300
tcatttaacc gatttatttg tttagcccaa aagtaalcgc tctggagtag aaaccaaatg 360
tga 363

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4
Met Arg Ser Leu Cys Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
1 5 10 15
Pro Leu Leu Leu Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly
20 25 30
Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val
35 40 45
Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu
50 55 60
Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Phe Gly Arg
65 70 75 80
Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg
85 90 95
Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln Lys
100 105

<210> 5
<211> 1338
<212> DNA
<213> 鼠類物種

<400> 5
cggacgcgtg ggcgtccctt aaccgccacc gcgtcccgcc gacgccatgg gggaccgcgc 60
ctgtgccccg ctactgtctt tctgtgctgt accgtgtgtg ttacaccgc ccgccgggga 120

```

tgccgcggtc atcaccgggg cttagcacia ggactctcag tgcggaggag gcatgtgctg 180
tgctgtcagt atctgggtta agagcataag gatctgcaca cctatgggcc aagtgggcga 240
cagctgccac cccctgactc ggaaagtcc attttggggg cggaggatgc accacacctg 300
cccclgcctg ccaggccttg cgtgtttaag gacttcttcc aaccggltta ttgtcttgcc 360
ccggaaatga tcactctgaa gtaggaactt gaaatgcgac cctccgctgc acaatgtccg 420
tcgagtctca ctgttaattg tggcaaacia agaatactcc agaaagaaat gtctctcccc 480
ttctctgact ttccaagtaa cgtttctatc ttgtattttt gaagtggctt ttttttttt 540
ttttttttcc ttctcttgaa ggaaagtttt gatttttgga gagallata gaggacttcc 600
tgacatggct tctcatttcc ctgtttatgt ttgtccttga catttttgaa tgccaataac 660
aactgttttc acaaatagga gaataagagg gaacaatctg ttgcagaaac ttctttttgc 720
cctttgcccc actcgcctcg ccccgccccg ccccgccctg cccatgcgca gacagacaca 780
cccttactct tcaaagactc tgatgacct cacttactg tagcatgtg ggtttctaca 840
cttccccgcc ttgtgtgttg acccactgag gaggtcaga gagctagcac tgtacaggit 900
tgaaccagat cccccaagca gctcatttgg ggcagacgtt gggagcgctc caggaaactt 960
cctgcaccca tctggccac tggctttcag ttctgtgttt taactggttg gaggacaaaa 1020
ttaacgggac cctgaaggaa cctggccctg ttatctagat ttgtttaagt aaaagacatt 1080
ttctcttgtt tgltgaatat tacatgtctt ttcttttttt atctgaagct tttttttttt 1140
ttctttaagt ctcttltgtg gagacatttt aaagaacgcc actcgaggaa gcatltgatit 1200
tcatytggca tgacaggagt catcatlttt aaaaatcggt gttaaattat aatttaact 1260
ttatttgtaa cccaaaggty taatgtaaat ggatttcttg atatcctgcc atttgtactg 1320
gtatcaatat ttttatgt 1338

```

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> 鼠類物種

<400> 6
Met Gly Asp Pro Arg Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
1 5 10 15

Leu Leu Phe Thr Pro Pro Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly Ala
20 25 30

Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val Ser
35 40 45

Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Gln Val Gly
50 55 60

Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Trp Gly Arg Arg
65 70 75 80

Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr
85 90 95

Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Arg Lys

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”

<400> 7
gcatgacagg aglcatcatt tt 22

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”

<400> 8
aaatggcagg atatcaggaa a 21

<210> 9
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成探针”

<400> 9
aaactttatt tgaacccaa aggtcctaatg taaatgga 38

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”

<400> 10
atggcacgga agctagga 18

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”

<400> 11
gcagagctga agtcctcttg a 21

<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成探针”

<400> 12 tgctgctgga cccttcctaa acct	24
<210> 13 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”	
<400> 13 cagcgacat gaagacttg	19
<210> 14 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”	
<400> 14 gtcatcttcg gtttcctgag t	21
<210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意= “人工序列之描述：合成探针”	
<400> 15 tccaggcagc acccctgatg	20
<210> 16 <211> 18 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”	
<400> 16 gaactccacg tgagcgca	18
<210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”	
<400> 17 gggtcccatg ttgatgatgc	20
<210> 18 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列	

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成探针”

<400> 18
ctccctgata cacaccagcc cacctg 26

<210> 19
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”

<400> 19
ctggaaggct tcctacaatg g 21

<210> 20
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”

<400> 20
ggcatcccaa ttgtcttga 19

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成探针”

<400> 21
tccaggtctg cactggactt accg 24

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”

<400> 22
tcaccalcgt tcgtgacttc 20

<210> 23
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”

<400> 23
agaaggcagt gaggtagtc tt 22

<210> 24

<211> 23 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意 = “人工序列之描述：合成探针”	
<400> 24 tccttcacga acacagtggg gaa	23
<210> 25 <211> 23 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意 = “人工序列之描述：合成引子”	
<400> 25 aggtcaaagg gaatgtgttc aaa	23
<210> 26 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意 = “人工序列之描述：合成引子”	
<400> 26 ccttgctgc cttcagcttg t	21
<210> 27 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意 = “人工序列之描述：合成探针”	
<400> 27 acaagcgcat cctcatggag cacatc	26
<210> 28 <211> 15 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意 = “人工序列之描述：合成引子”	
<400> 28 cgcaagcgcc gtgaa	15
<210> 29 <211> 25 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意 = “人工序列之描述：合成引子”	
<400> 29 ggctcttccc tccttgata aagtc	25

<210> 30 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意= “人工序列之描述：合成探针”	
<400> 30 ccaggccaag aaggaggaga tcatca	26
<210> 31 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”	
<400> 31 aatgacgagg gcctggagt	19
<210> 32 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意= “人工序列之描述：合成引子”	
<400> 32 tlgatccgca taatctgcat g	21
<210> 33 <211> 26 <212> DNA <213> 人工序列 <220> <223> /注意= “人工序列之描述：合成探针”	
<400> 33 tgtgccact gaggagtcca acatca	26
<210> 34 <211> 4 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”	
<400> 34 Gly Ser Gly Ser 1	
<210> 35 <211> 4 <212> PRT <213> 人工序列 <220>	

<223> /注意= “人工序列之描述：合成肽”

<400> 35
Gly Gly Gly Ser
1

<210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注意= “人工序列之描述：合成6x His tag”

<400> 36
His His His His His His
1 5

<210> 37
<211> 130
<212> PRT
<213> 鼠類物種

<400> 37
Met Gly Asp Pro Arg Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro
1 5 10 15

Pro Leu Leu Phe Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly
20 25 30

Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val
35 40 45

Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Gln Val
50 55 60

Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Ser His Val Ala Asn Gly
65 70 75 80

Arg Gln Glu Arg Arg Arg Ala Lys Arg Arg Lys Arg Lys Lys Glu Val
85 90 95

Val Pro Phe Trp Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro
100 105 110

Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala
115 120 125

Arg Lys
130

五、中文發明摘要：

本發明大體係關於對發炎性細胞介導之血管生成之抑制作用。特定言之，本發明係關於使用 Bv8 拮抗劑(諸如，抗 Bv8 抗體)預防或治療腫瘤血管生成及抑制腫瘤發展。

六、英文發明摘要：

The present invention relates generally to the inhibition of inflammatory cell-mediated angiogenesis. In particular, the invention concerns the prevention or treatment of tumor angiogenesis, and the inhibition of tumor development, using Bv8 antagonists, such as anti-Bv8 antibodies.

十一、圖式：

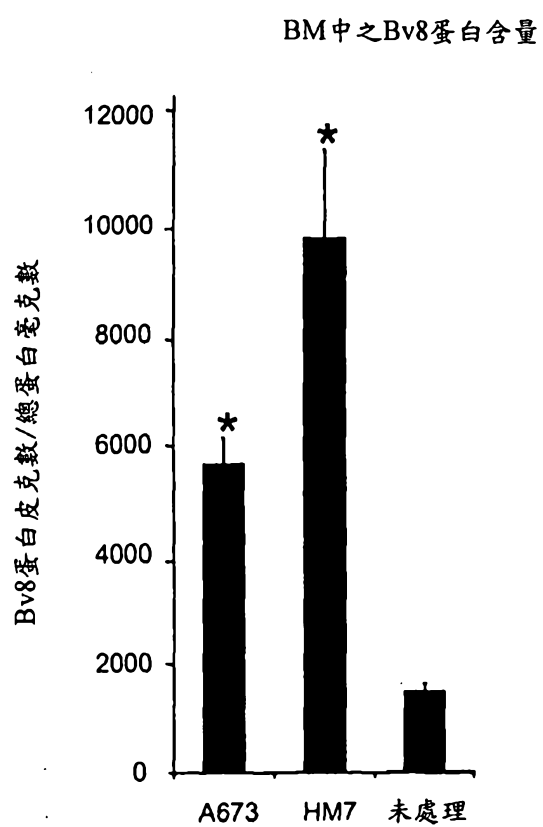


圖 1a

BM骨髓細胞中之Bv8表現

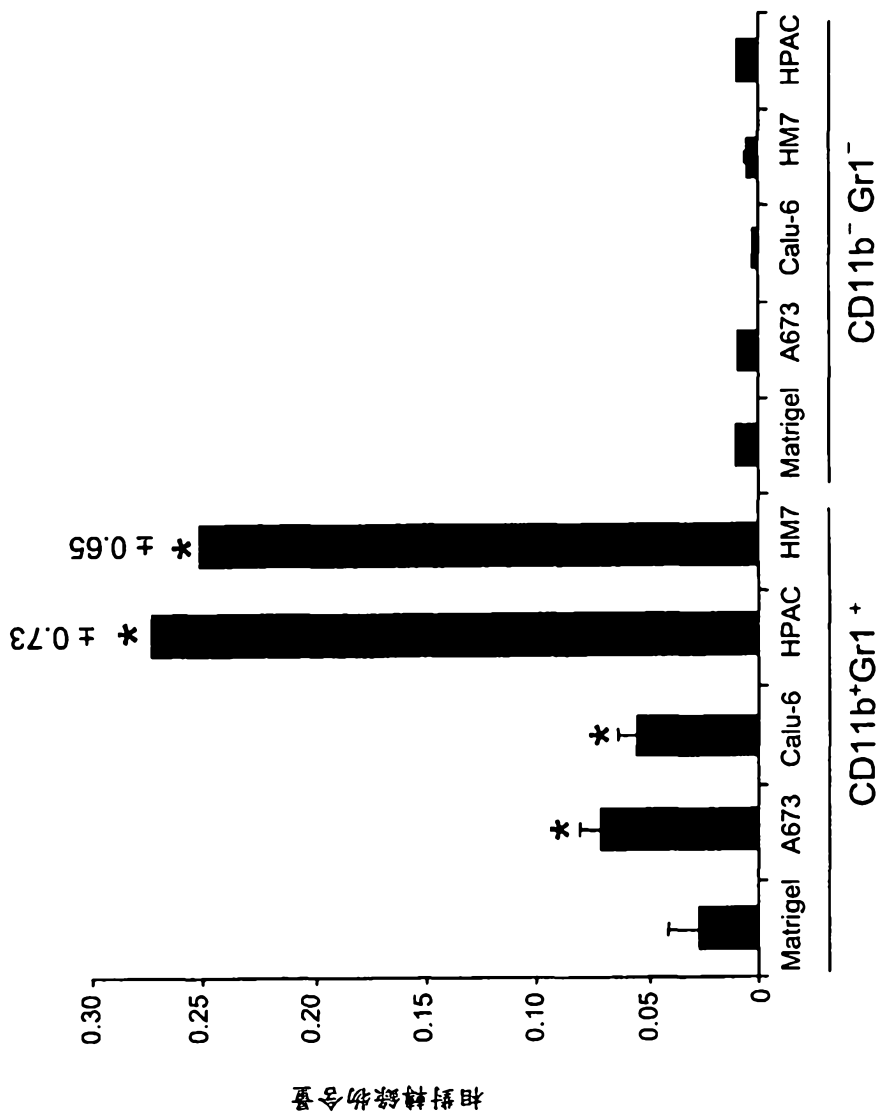
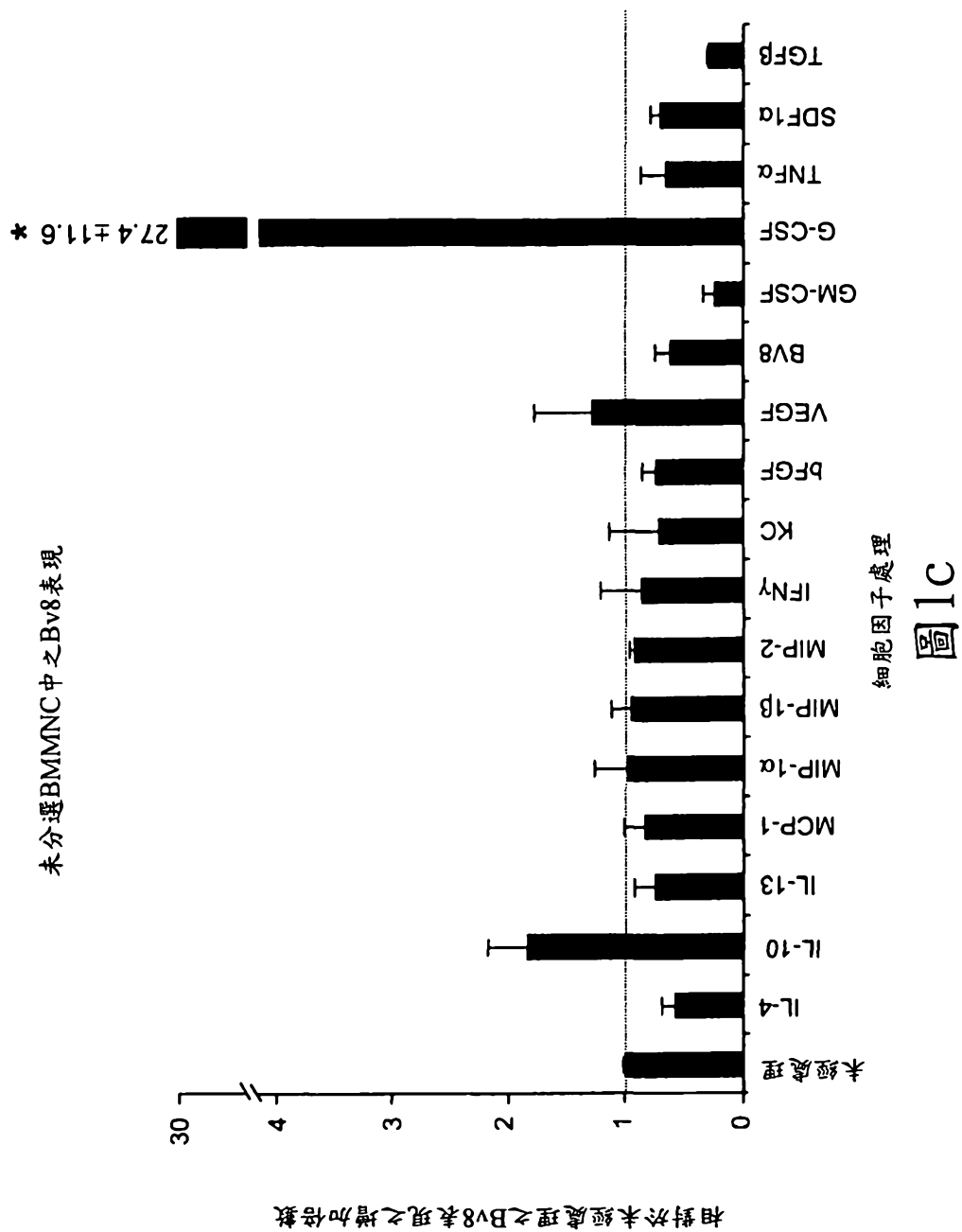
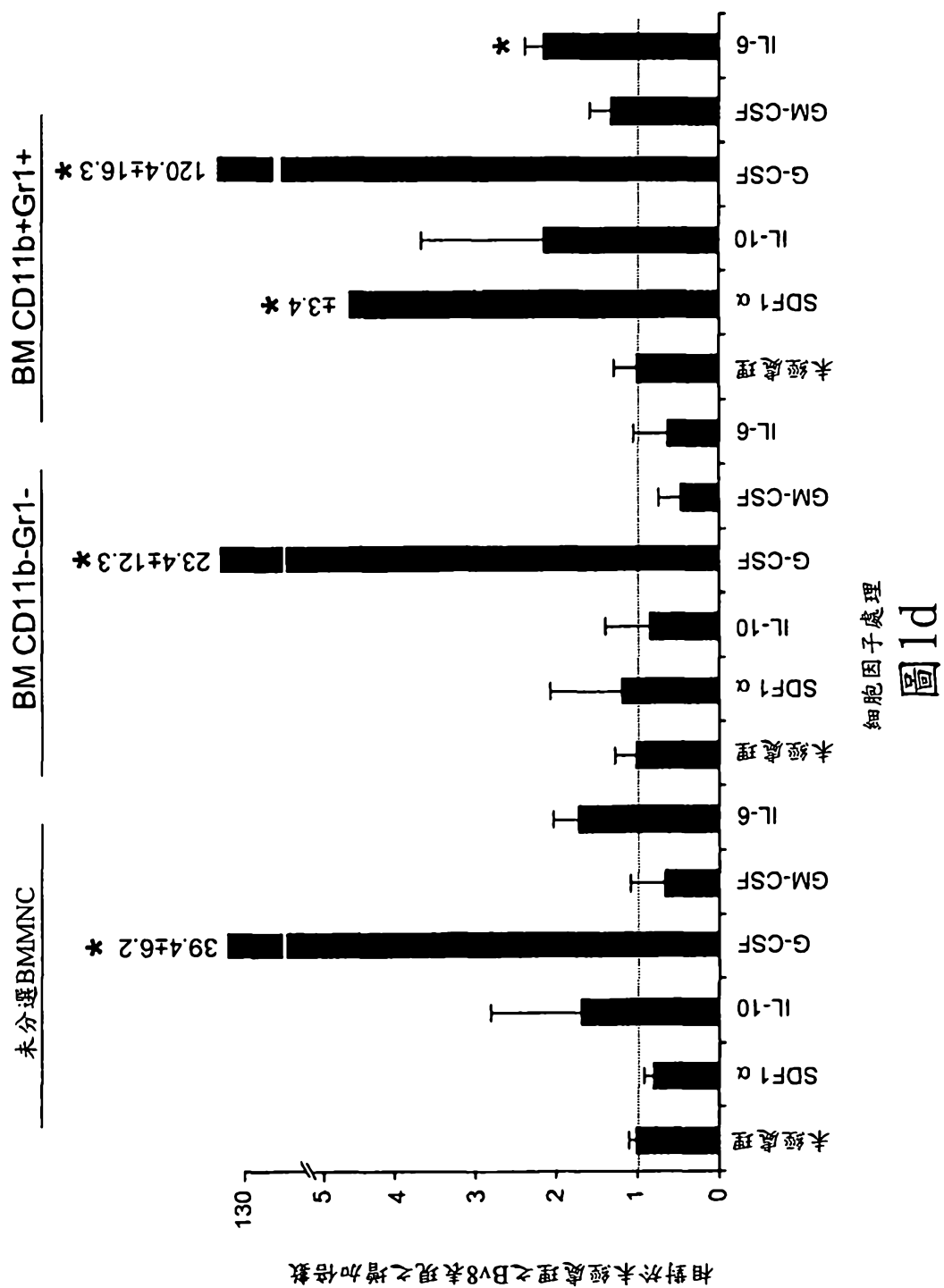


圖1b





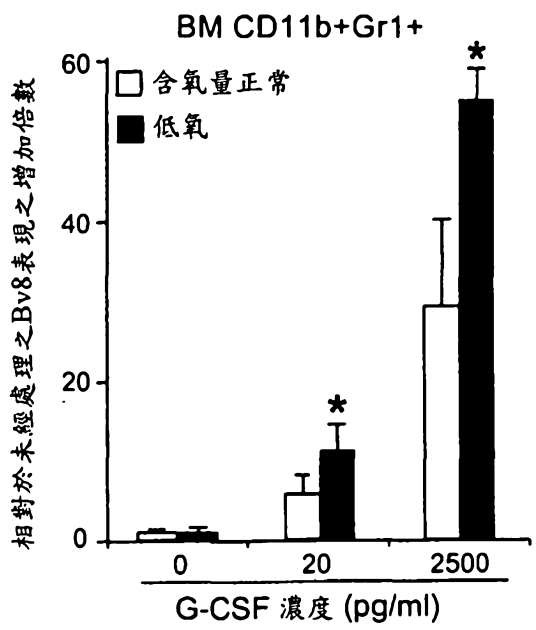


圖1e

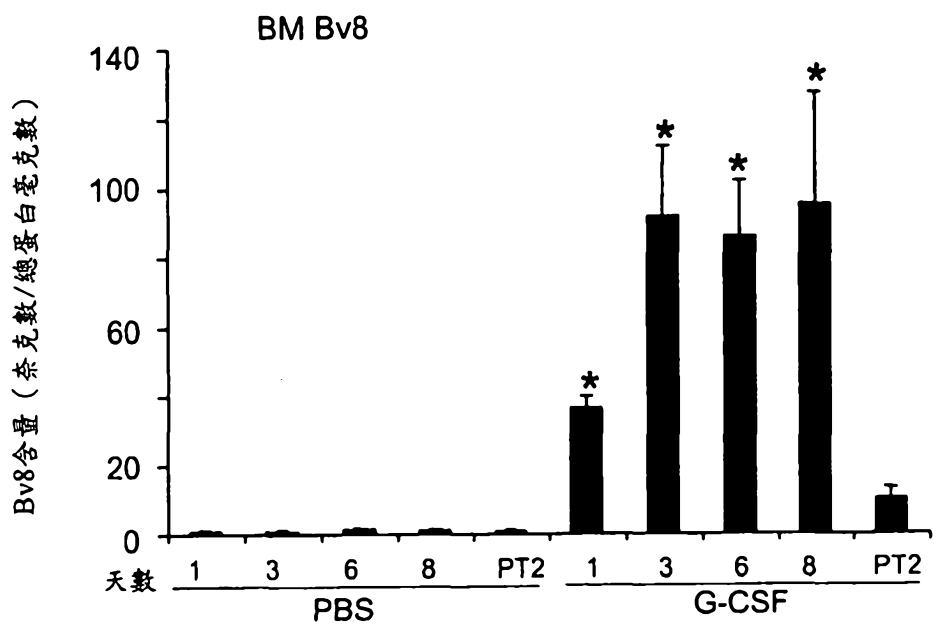


圖1f

經腫瘤溶解產物培育之BMMNC中之抗GCSF處理

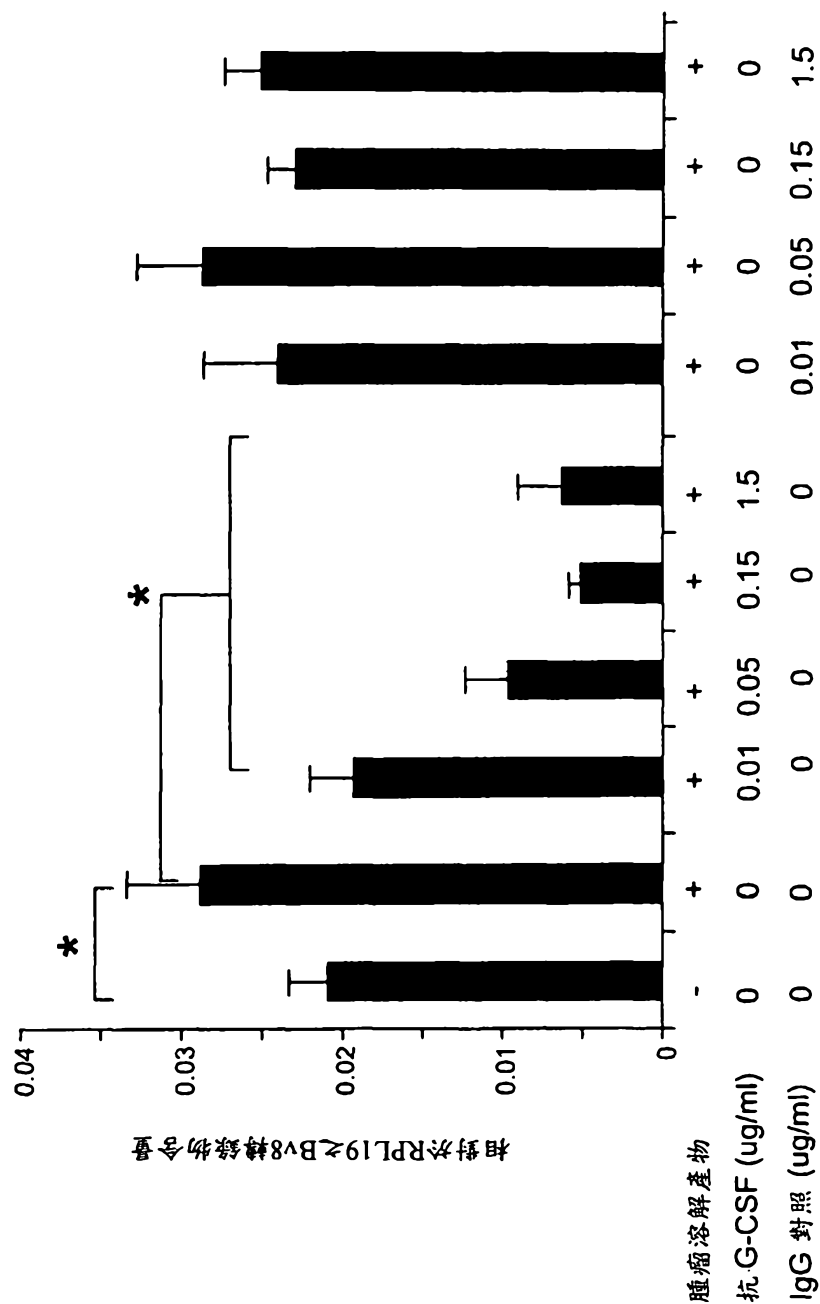
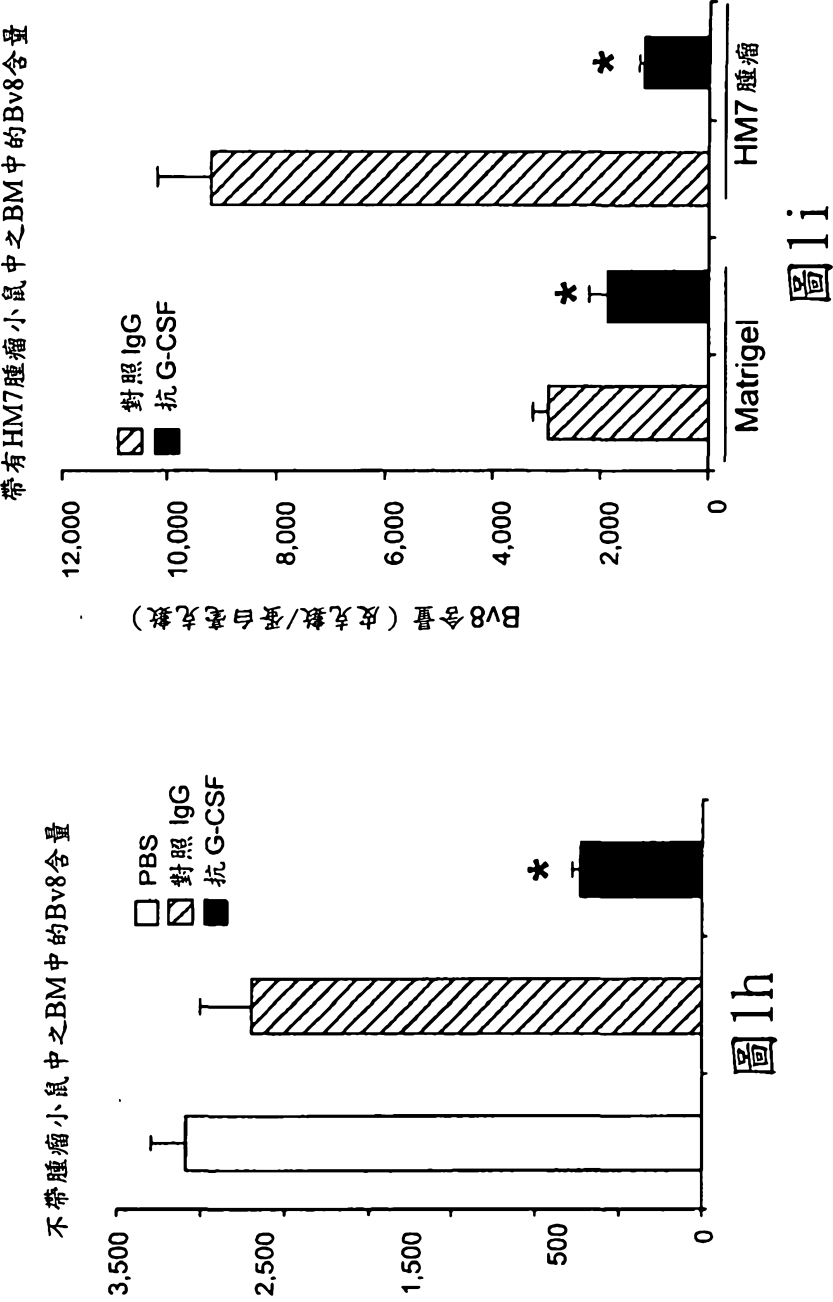


圖1g



抗Bv8處理對G-CSF誘導之CD11b+Gr1+活動的作用

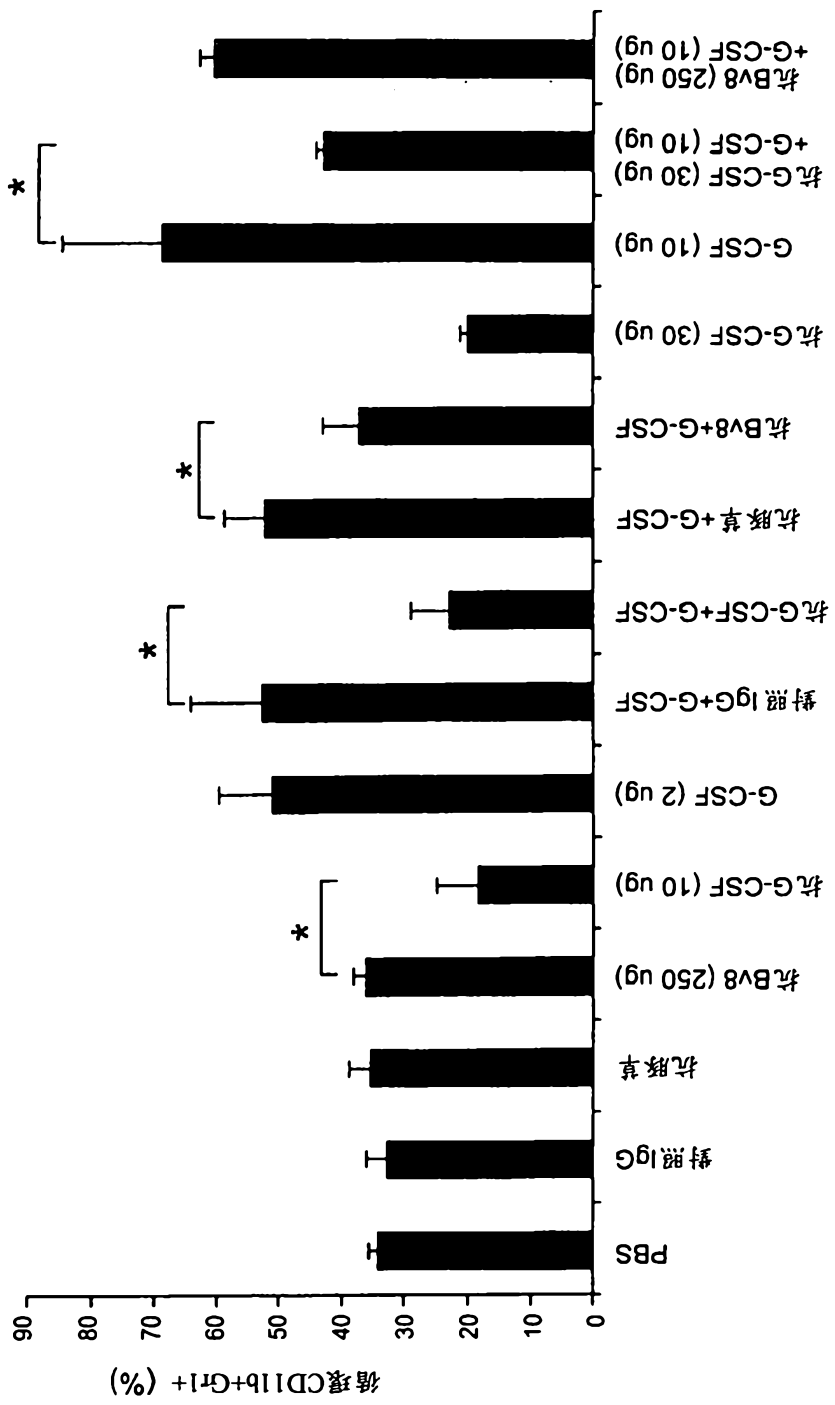


圖1j

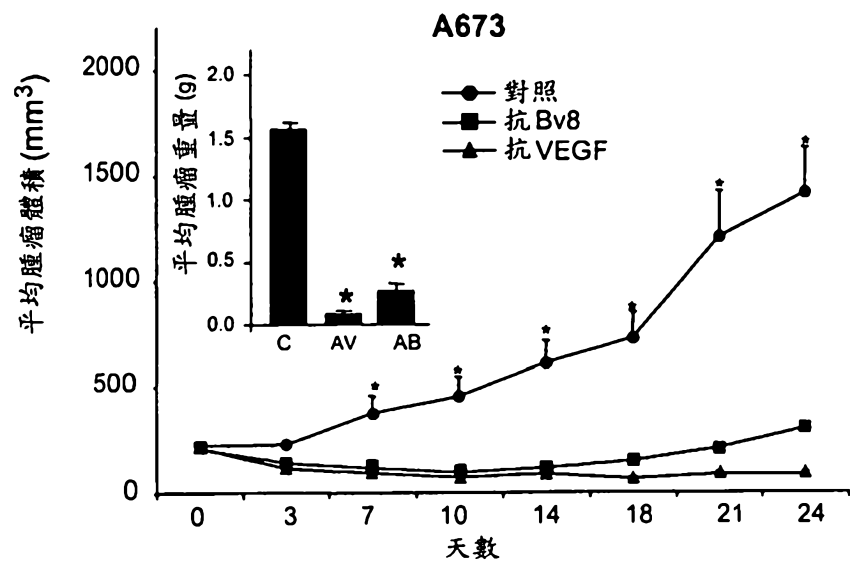


圖2a

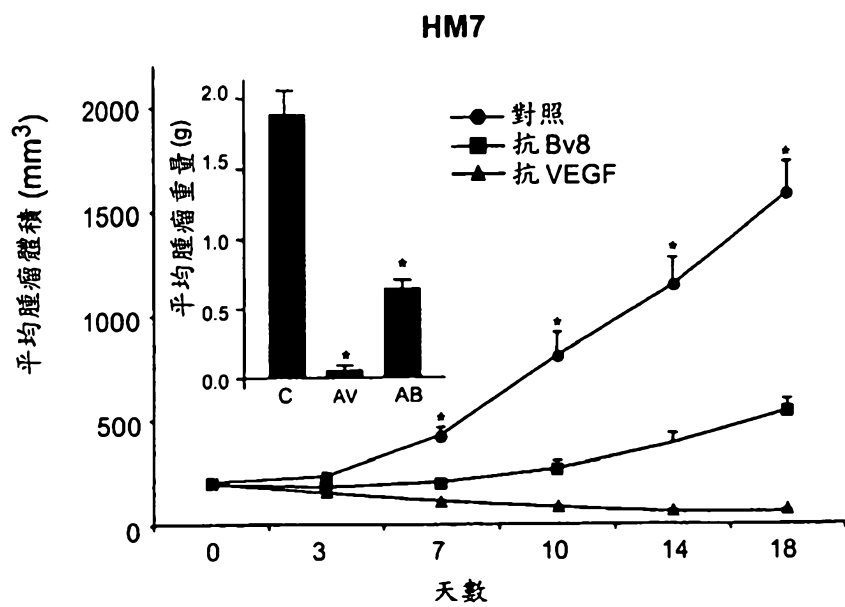


圖2b

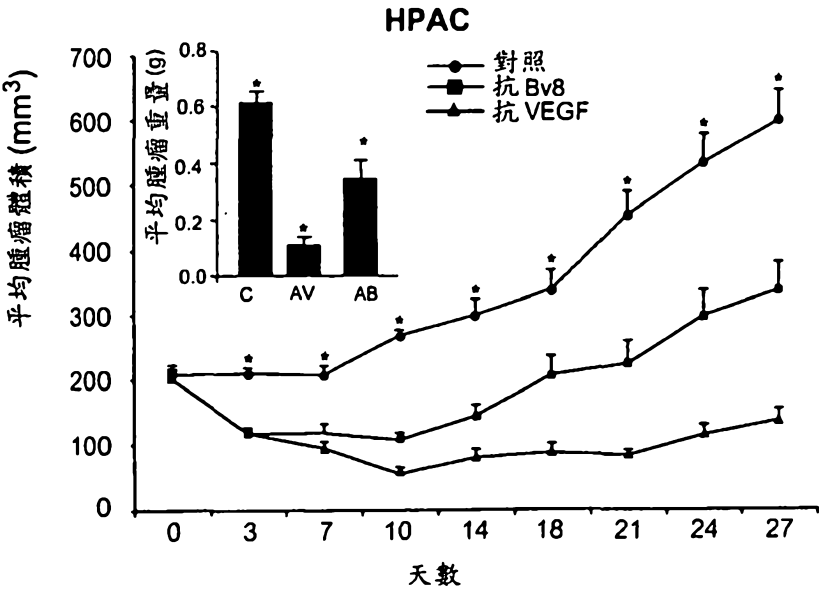


圖 2c

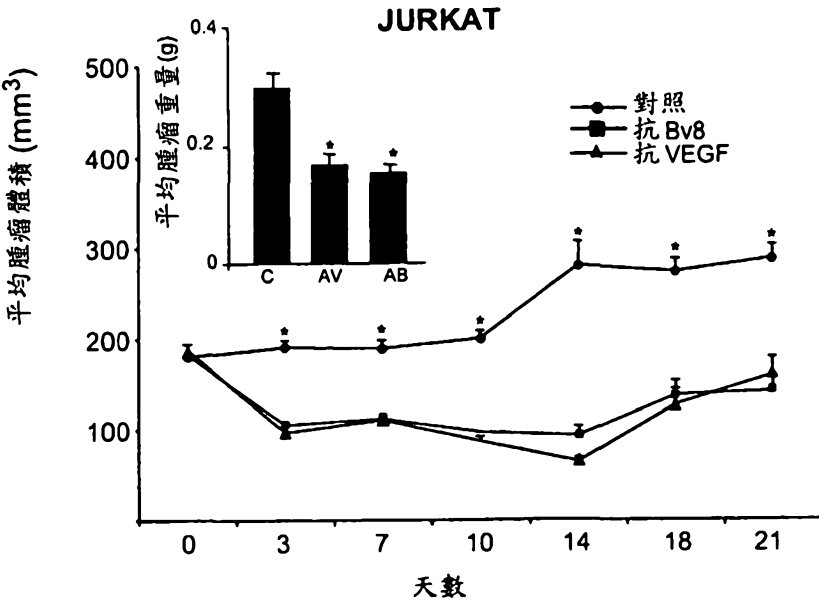


圖 2d

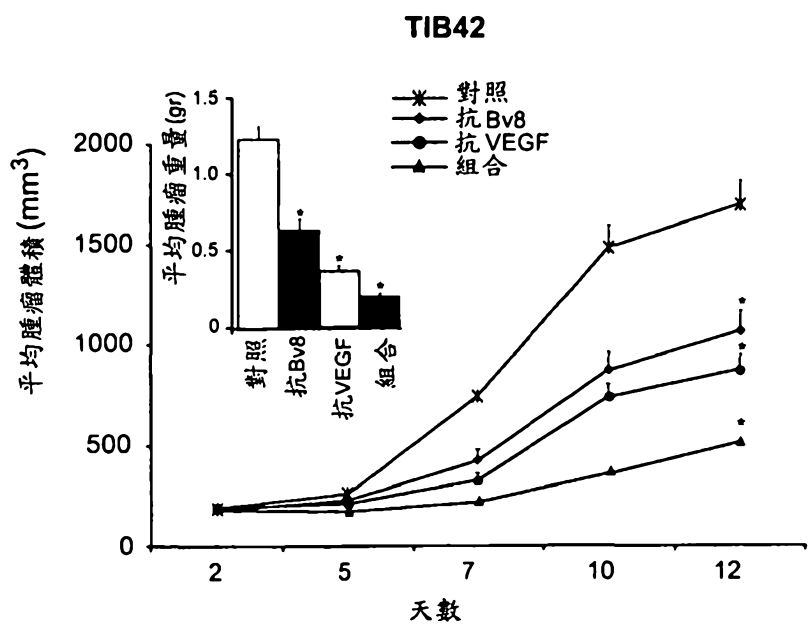


圖2e

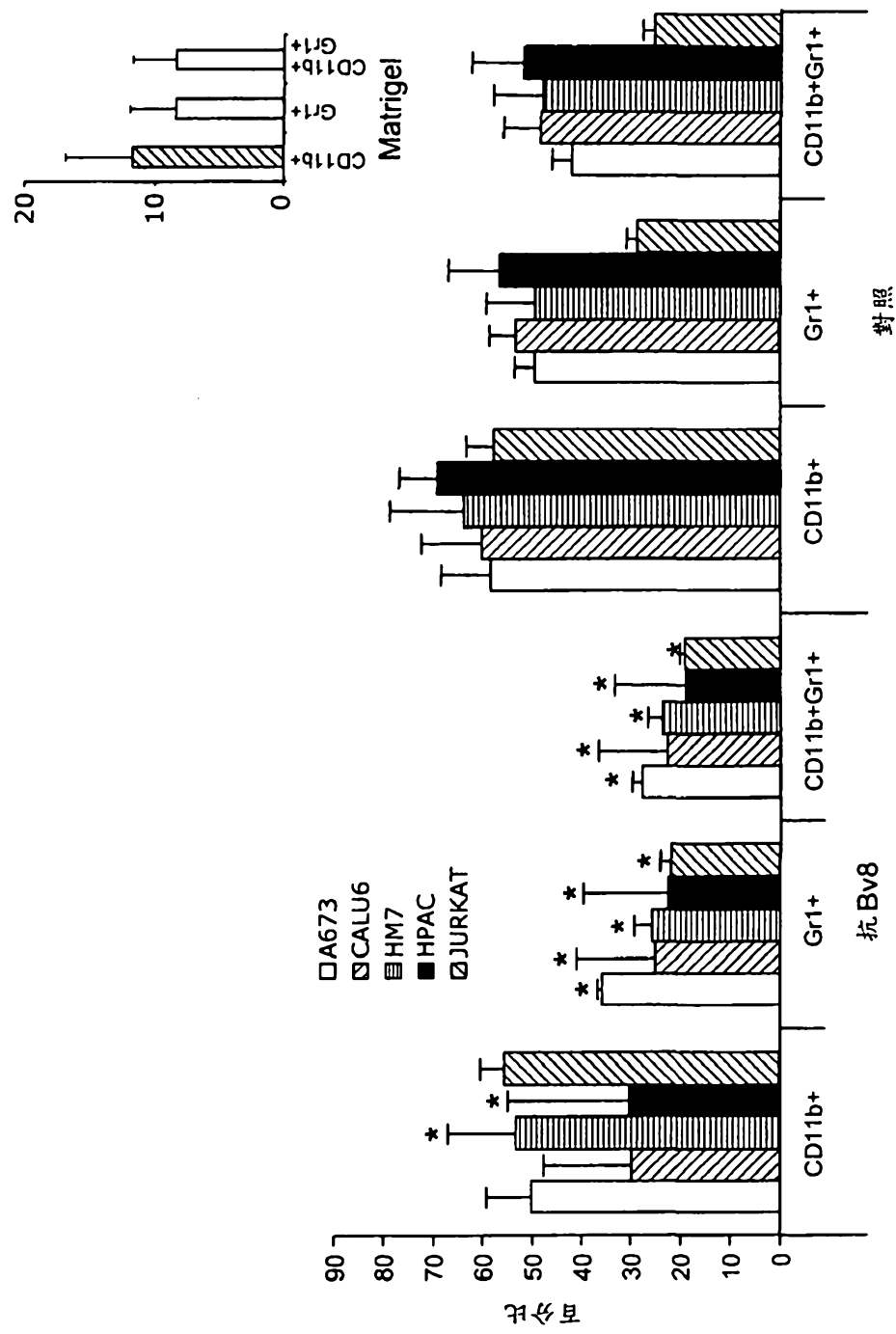


圖3a
周圍血液



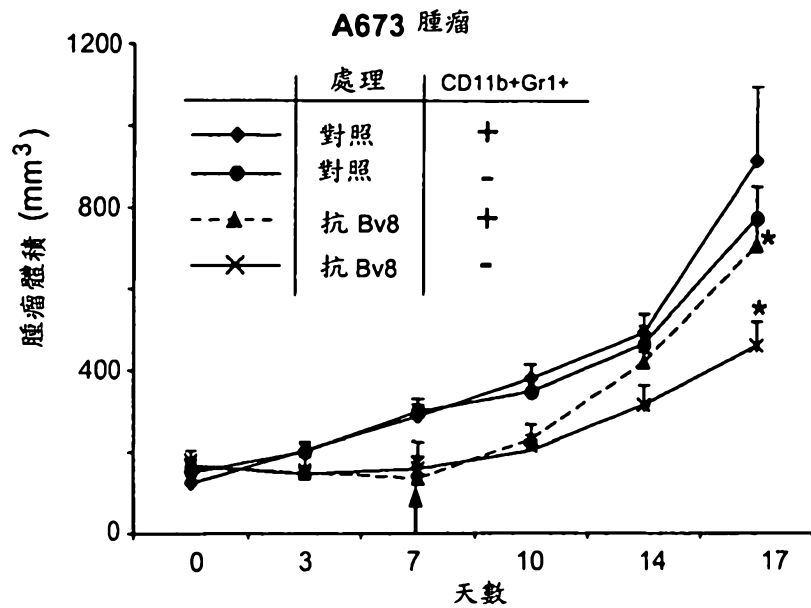


圖 3c

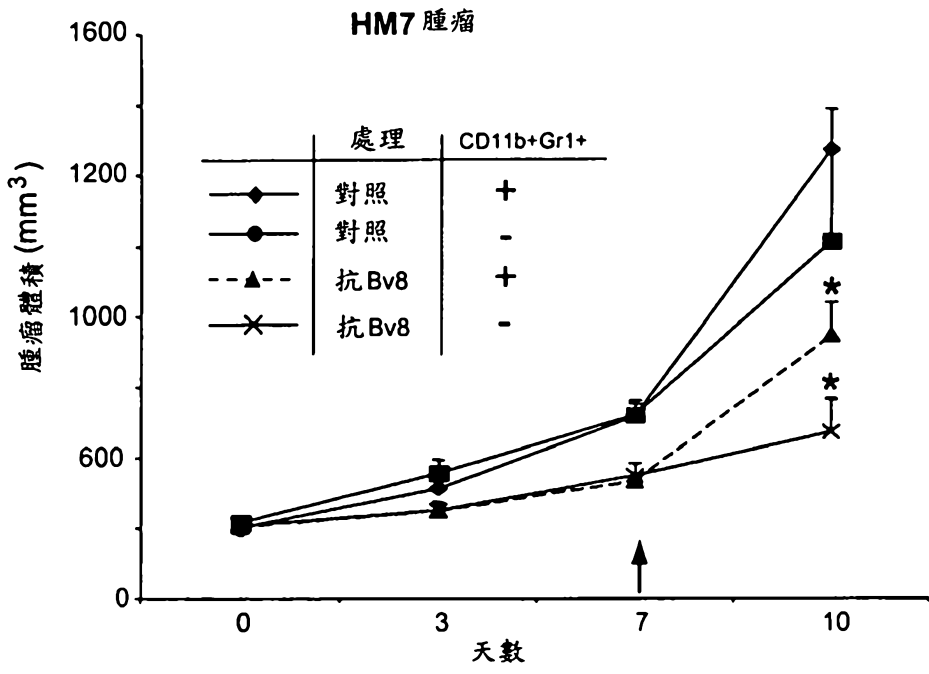


圖 3d

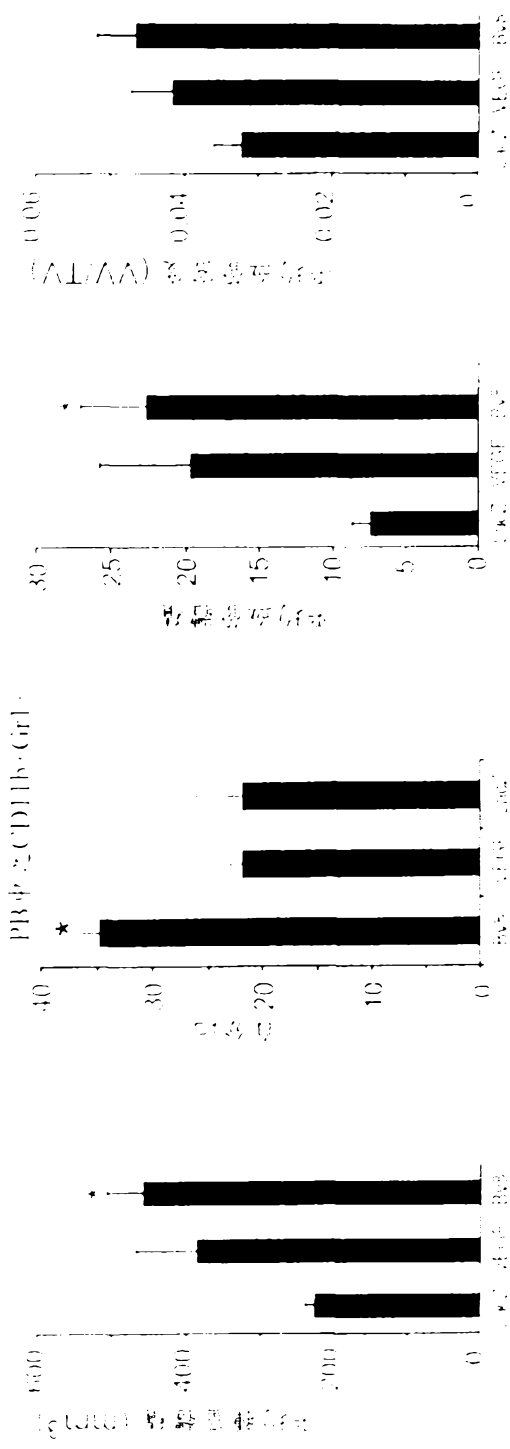


图4a 图4b 图4c 图4d

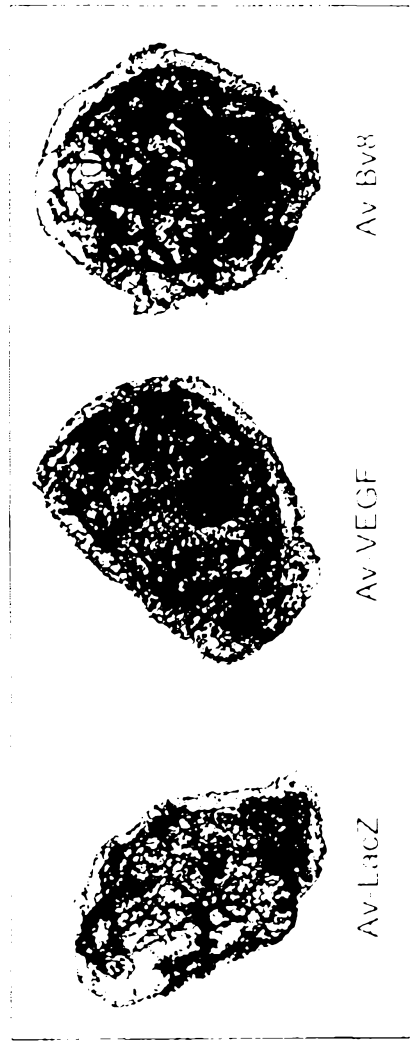
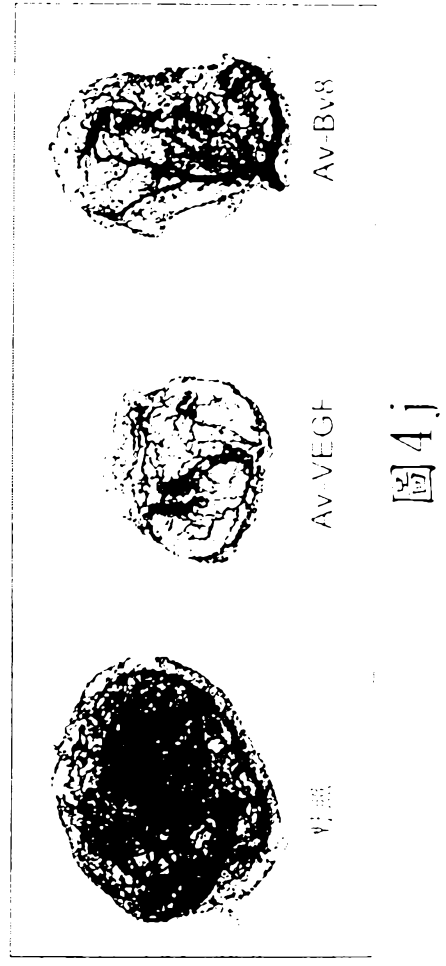
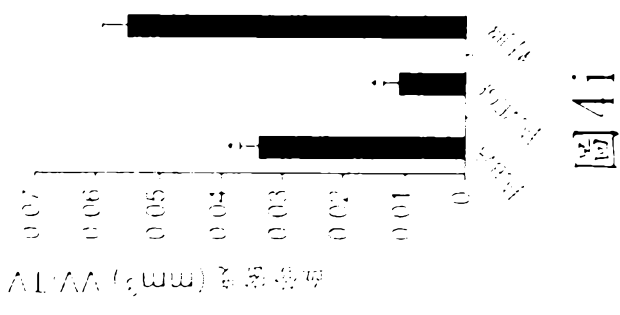
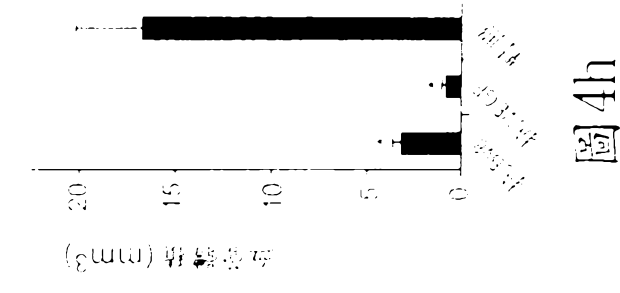
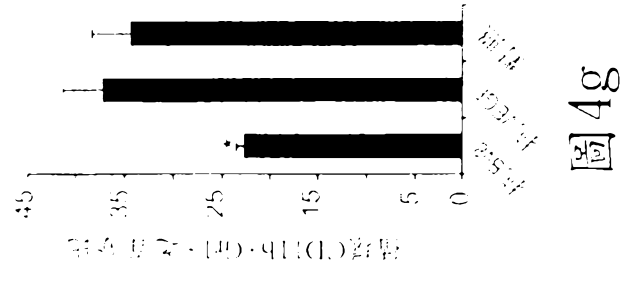
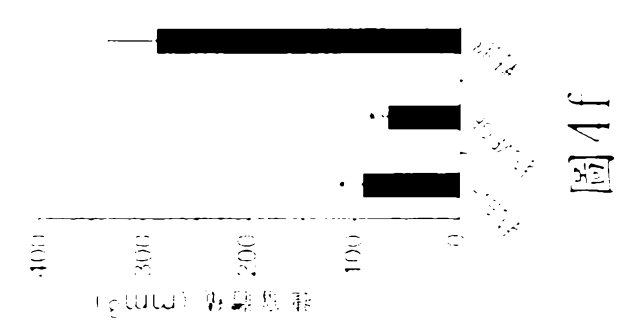
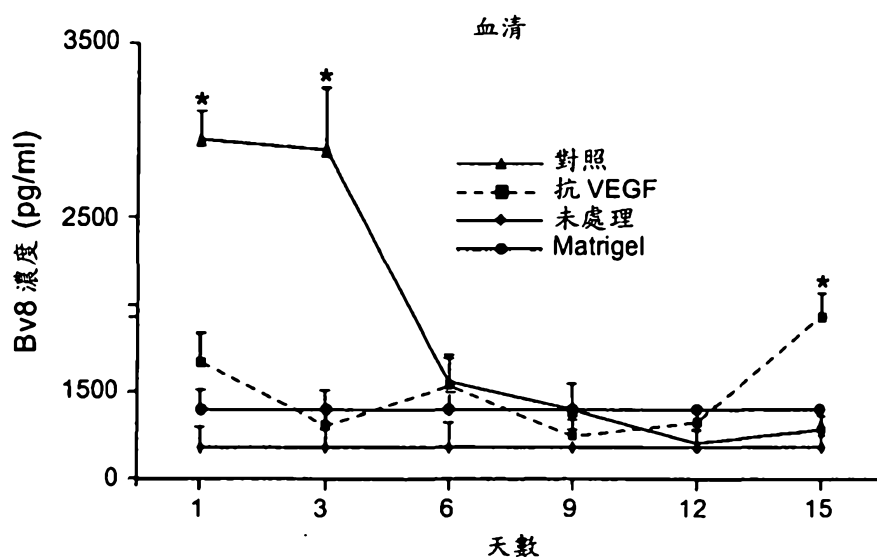
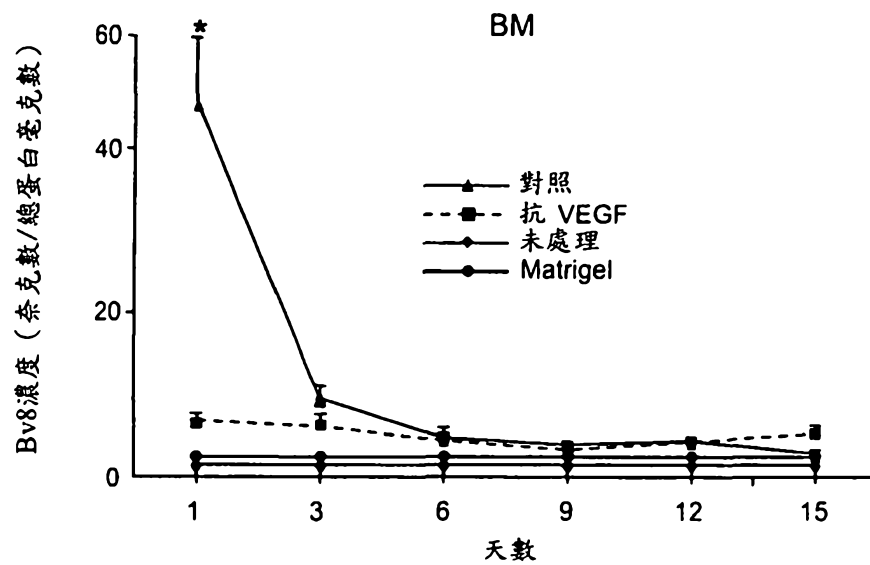
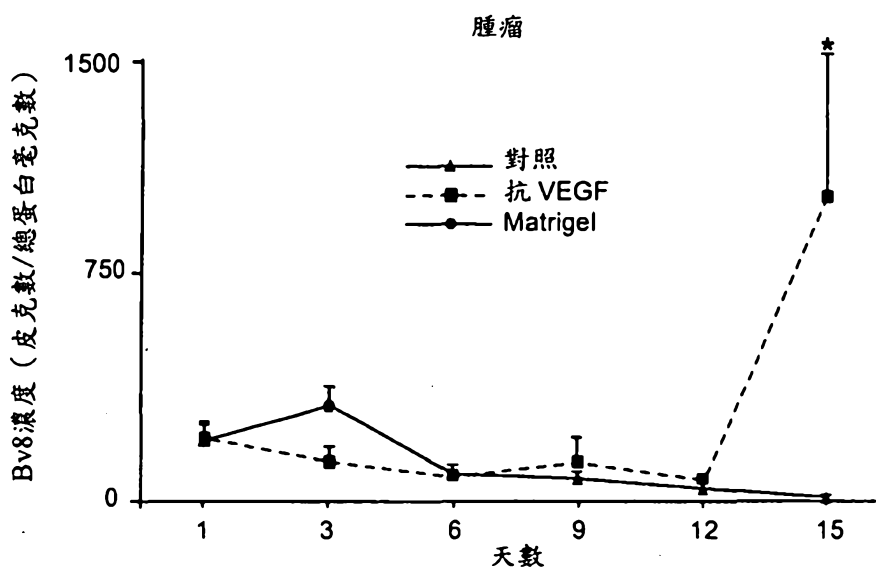
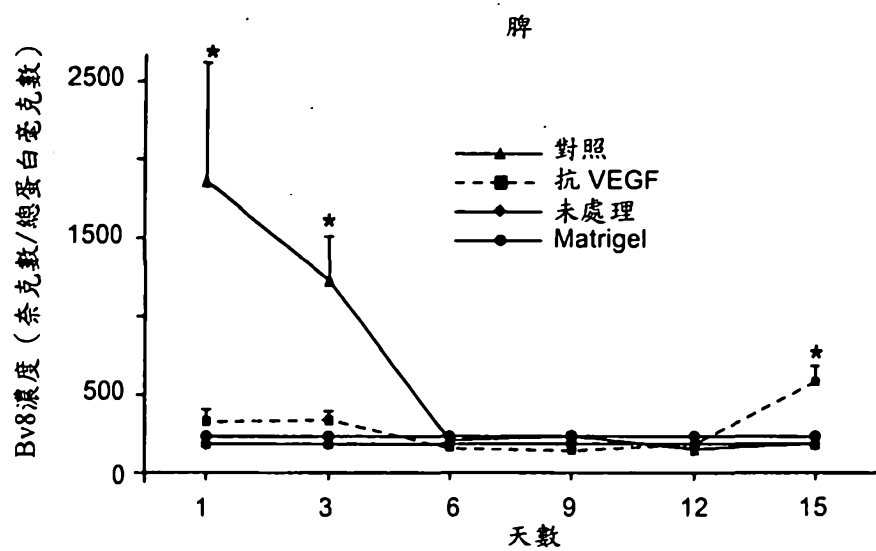


图4e







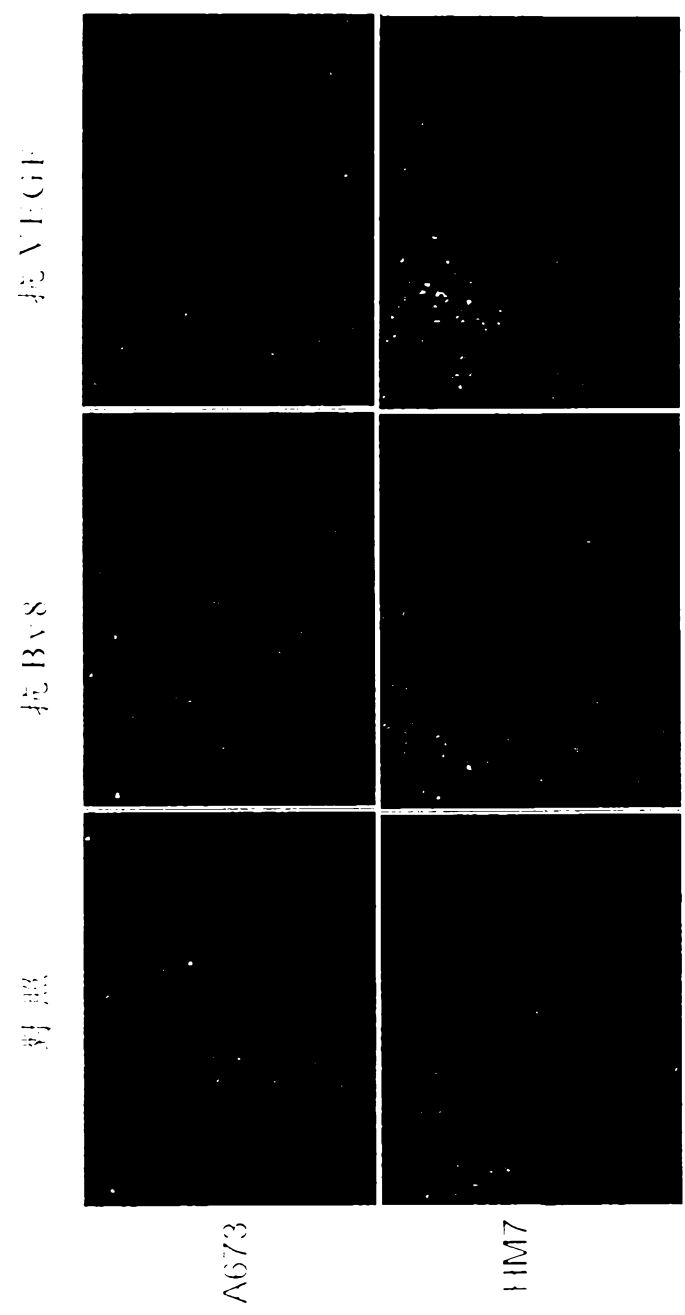


图 5c

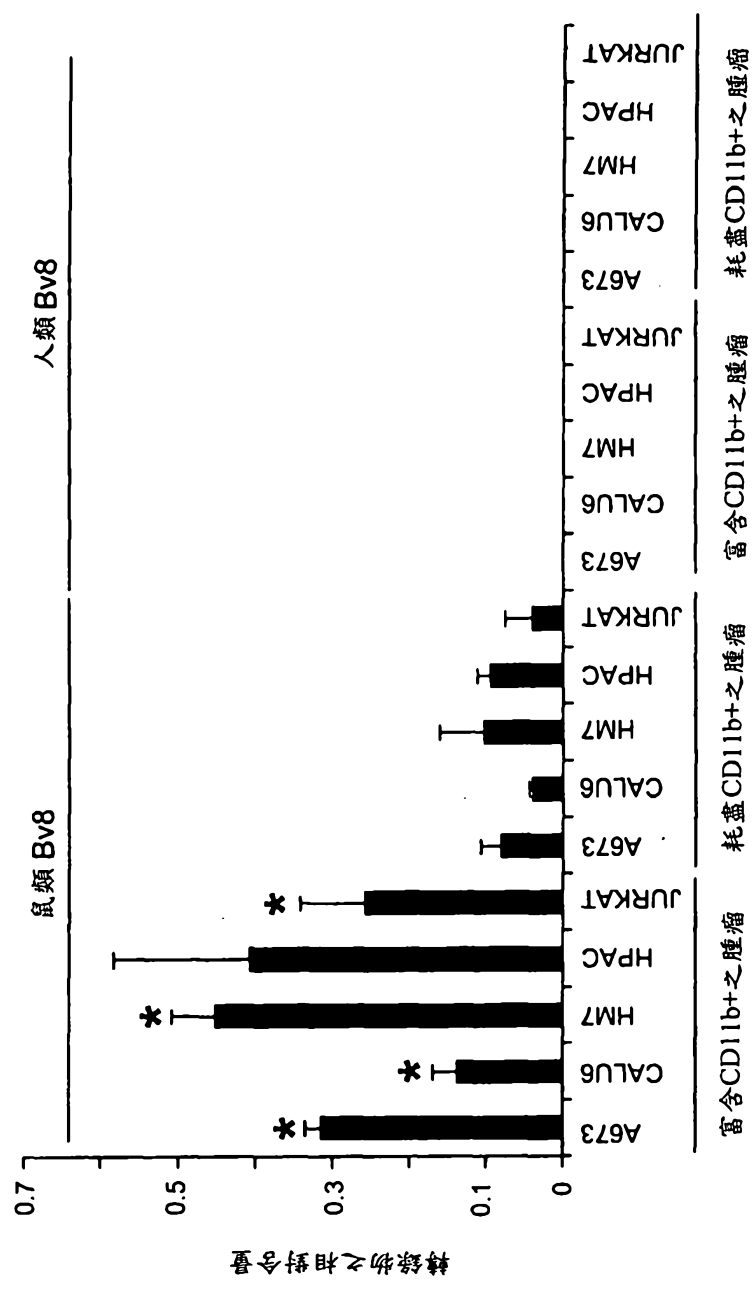
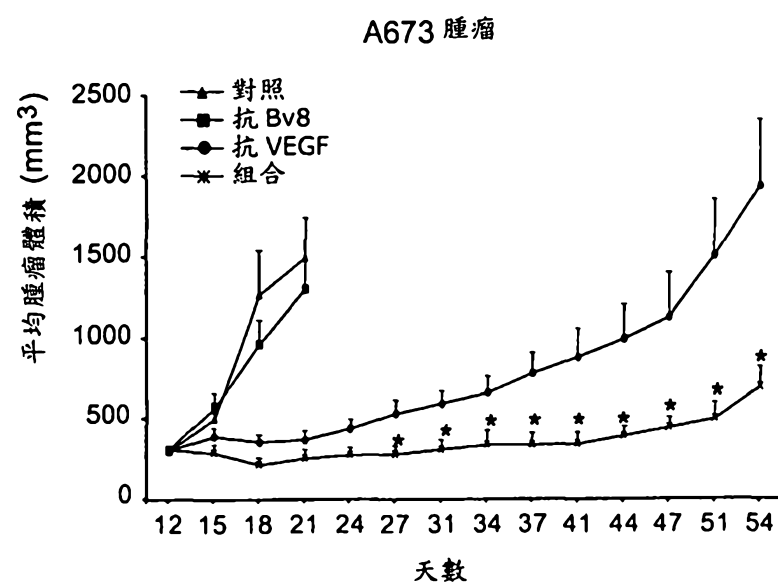
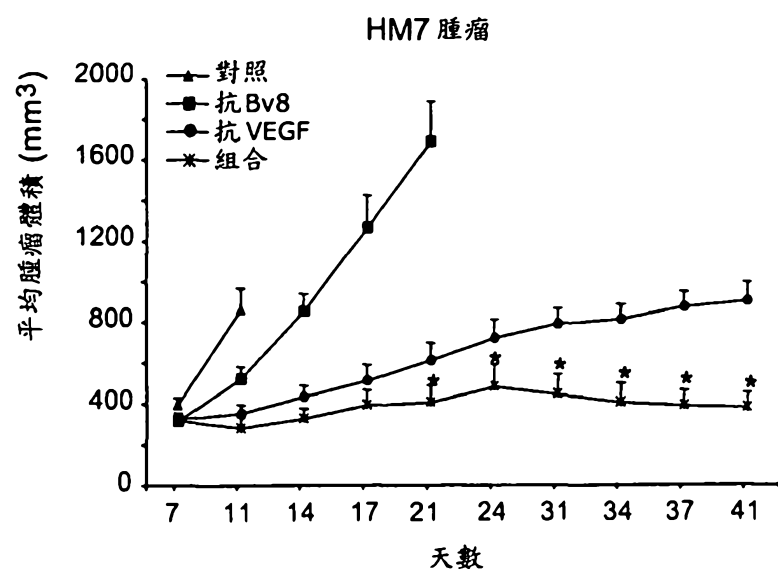


圖5f



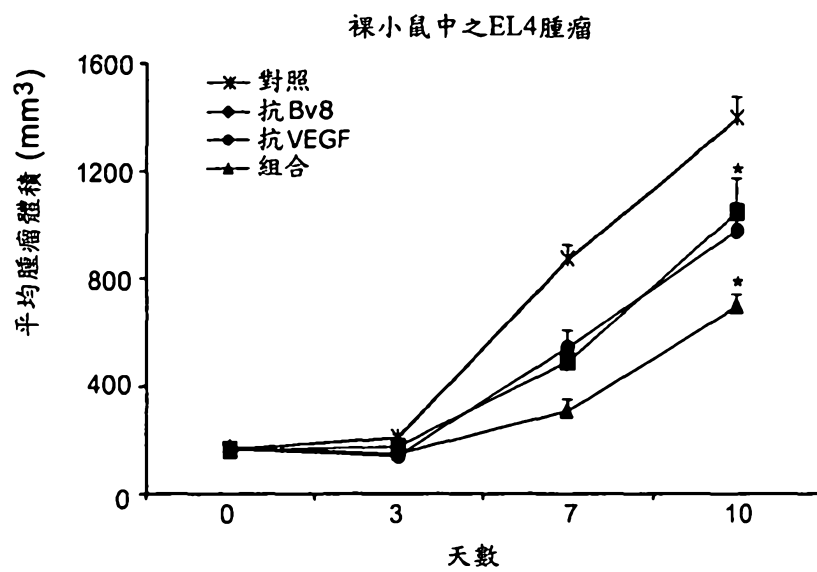


圖 6c

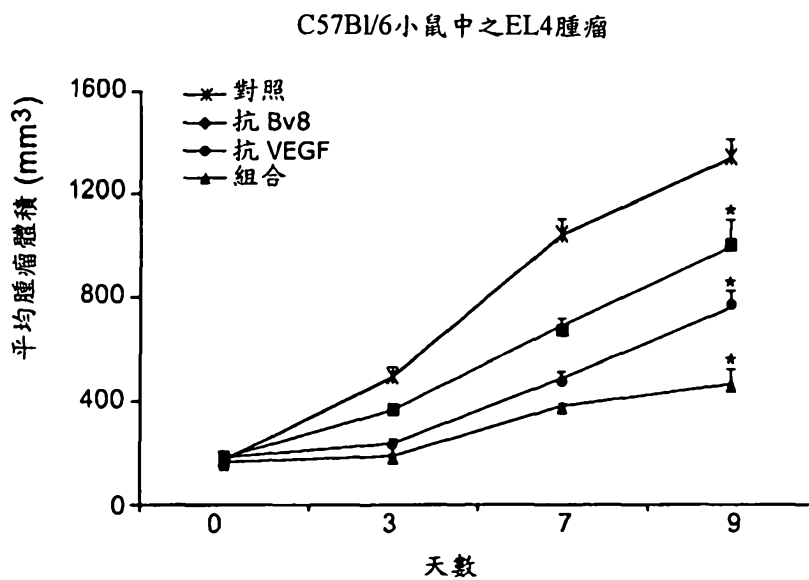
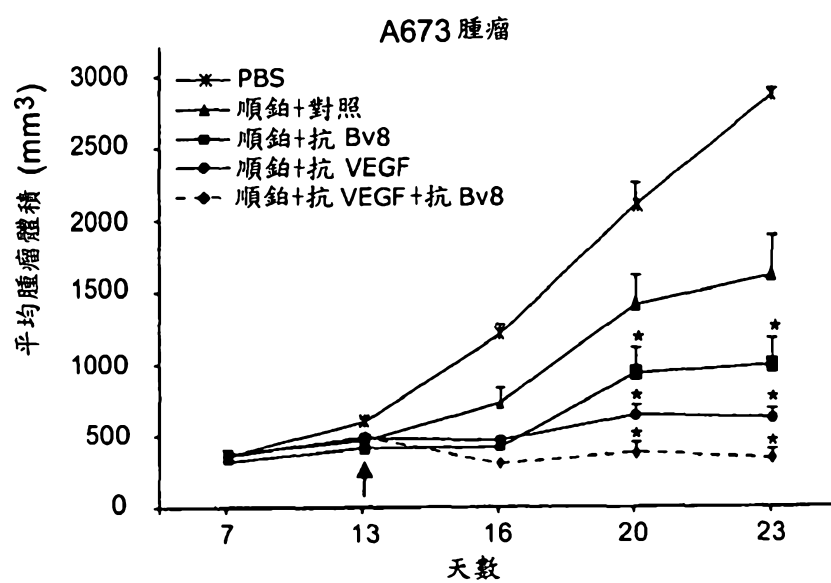
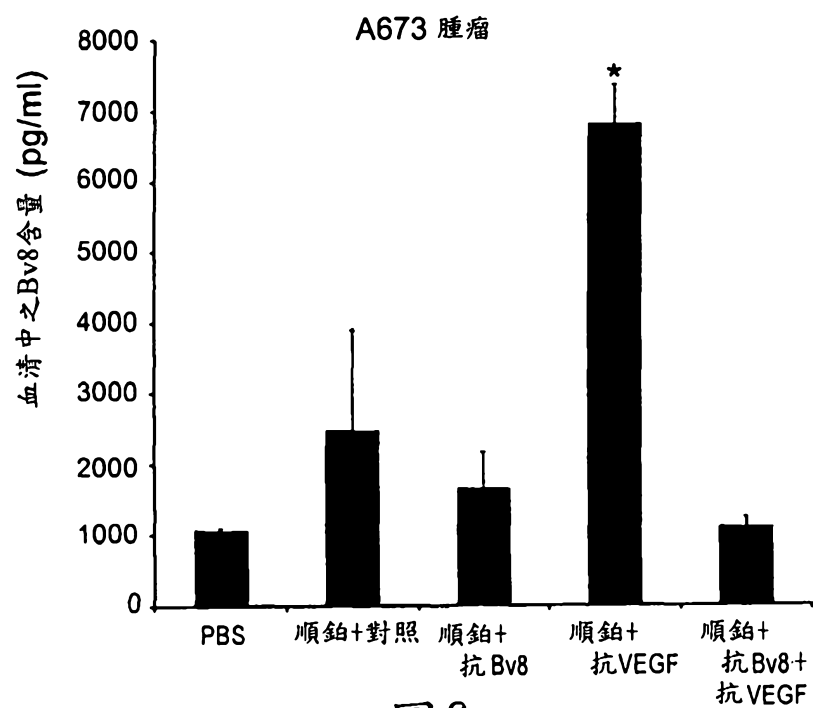


圖 6d



TGAGGGCGCCATGAGGAGCCTGTGCTGCGCCCCACTCCTGCTCCTCTTGCTGCTGCCGCC
 GCTGCTGCTCACGCCCCGCGCTGGGGACGCCGCGTGATCACCGGGGCTTGTGACAAGGA
 CTCCCAATGTGGTGGAGGCATGTGCTGTGCTGTCAGTATCTGGGTCAAGAGCATAAGGAT
 TTGCACACCTATGGGCAACTGGGAGACAGCTGCCATCCACTGACTCGTAAAAACAATTT
 TGGAAATGGAAGGCAGGAAAGAAGAAAGAGGAAGAGAAGCAAAAGGAAAAAGGAGGTTCC
 ATTTTTTGGGCGGAGGATGCATCACACTTGCCCATGTCTGCCAGGCTTGGCCTGTTTACG
 GACTTCATTTAACCGATTTATTTGTTTAGCCCAAAGTAAATCGCTCTGGAGTAGAAACCA
 AATGTGA

圖 7

MRSLLCCAPLLLLLLLLPPLLLTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWKSIRICT
 PMGKLGDSCHPLTRKNNFGNGRQERRKRKRSKRKKRVFFGRRMHHTCPCLPGLACLRT
 SFNRFICLAQK

蛋白質之重要特徵：

信號序列：

1-21

跨膜域：

無

cMAP-及cGMP-依賴性蛋白激酶磷酸化位點：

87-90

N-肉豆蔻酸化位點：

41-46

42-47

43-48

醯胺化位點：

99-102

圖 8

GAGGGCGCCATGAGGAGCCTGTGCTGCGCCCCACTCCTGCTCCTCTTGCTGCTGCCGCCG
 CTGCTGCTCACGCCCCGCGCTGGGGACGCCGCCGTGATCACGGGGGCTTGTGACAAGGAC
 TCCCAATGTGGTGGAGGCATGTGCTGTGCTGTCAGTATCTGGGTCAAGAGCATAAGGATT
 TGCACACCTATGGGCAAACCTGGGAGACAGCTGCCATCCACTGACTCGTAAAGTTCCATTT
 TTTGGGCGGAGGATGCATCACACTTGCCCATGTCTGCCAGGCTTGGCCTGTTTACGGACT
 TCATTTAACCGATTTATTTGTTTAGCCCAAAGTAATCGCTCTGGAGTAGAAACCAAATG
 TGA

圖9

MRS LCCAP LLLLLLLP LLLTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWKSIRICT
 PMGKLGDSCHPLTRKVPFFGRRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLAQK

蛋白質之重要特徵：

信號序列：

1-21

跨膜域：

無

N-肉豆蔻酸化位點：

41-46

42-47

43-48

醯胺化位點：

78-81

圖10

圖 11

MGDPRCAPLLLLLLLPLLFPPAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICTP
MGQVGDSCHPLTRKVPFWGRRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLARK

蛋白質之重要特徵：

信號序列：

1-20

跨膜域：

無

N-肉豆蔻酸化位點：

40-45

41-46

42-47

醯胺化位點：

77-80

圖12

MRSLCCAPLLLLLLLPLLLTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSI 50 人類

MGDPRCAPLLLLLLLPLLFPPRAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSI 50 小鼠

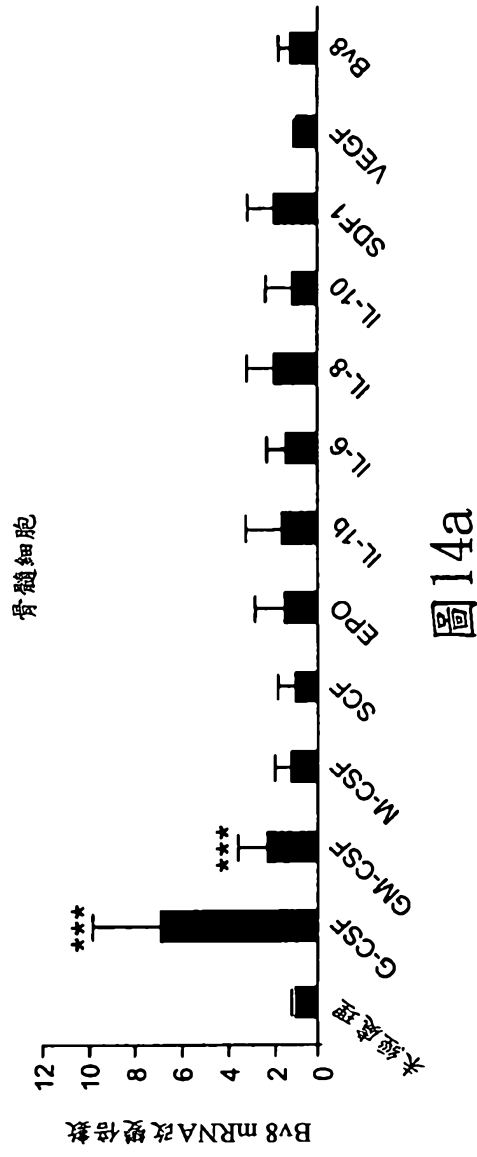
W VKSIRICTPMGKLGDSCHPLTRKNNFGNGRQERRKRKRSKRKKEVPFF-G

W VKSIRICTPMGQVGDSCHPLTRKSHVANGRQERRAKRRKRKKEVVPFWG

RRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLAQK

RRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLARK

圖13



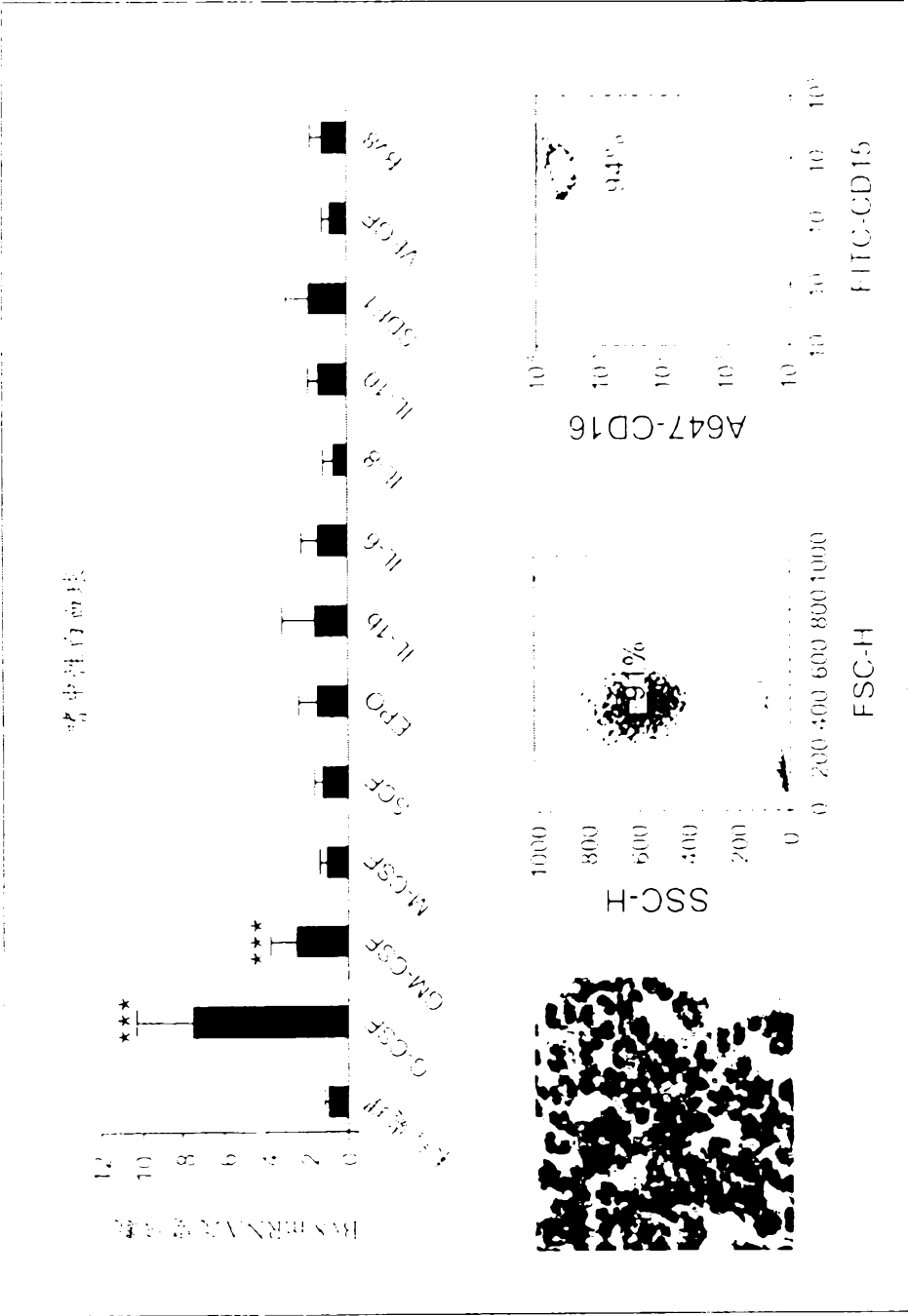


圖 14b

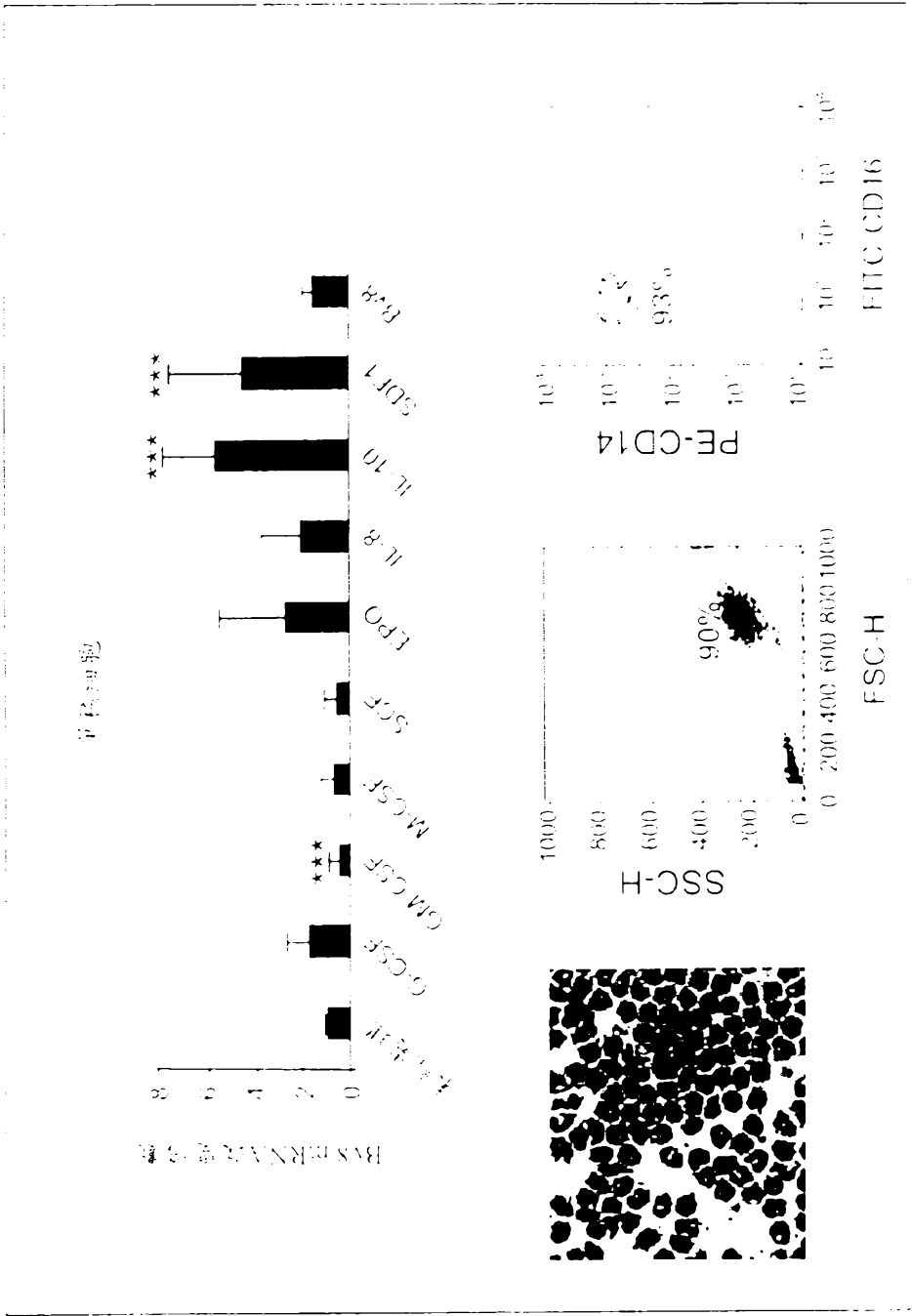


图 14c

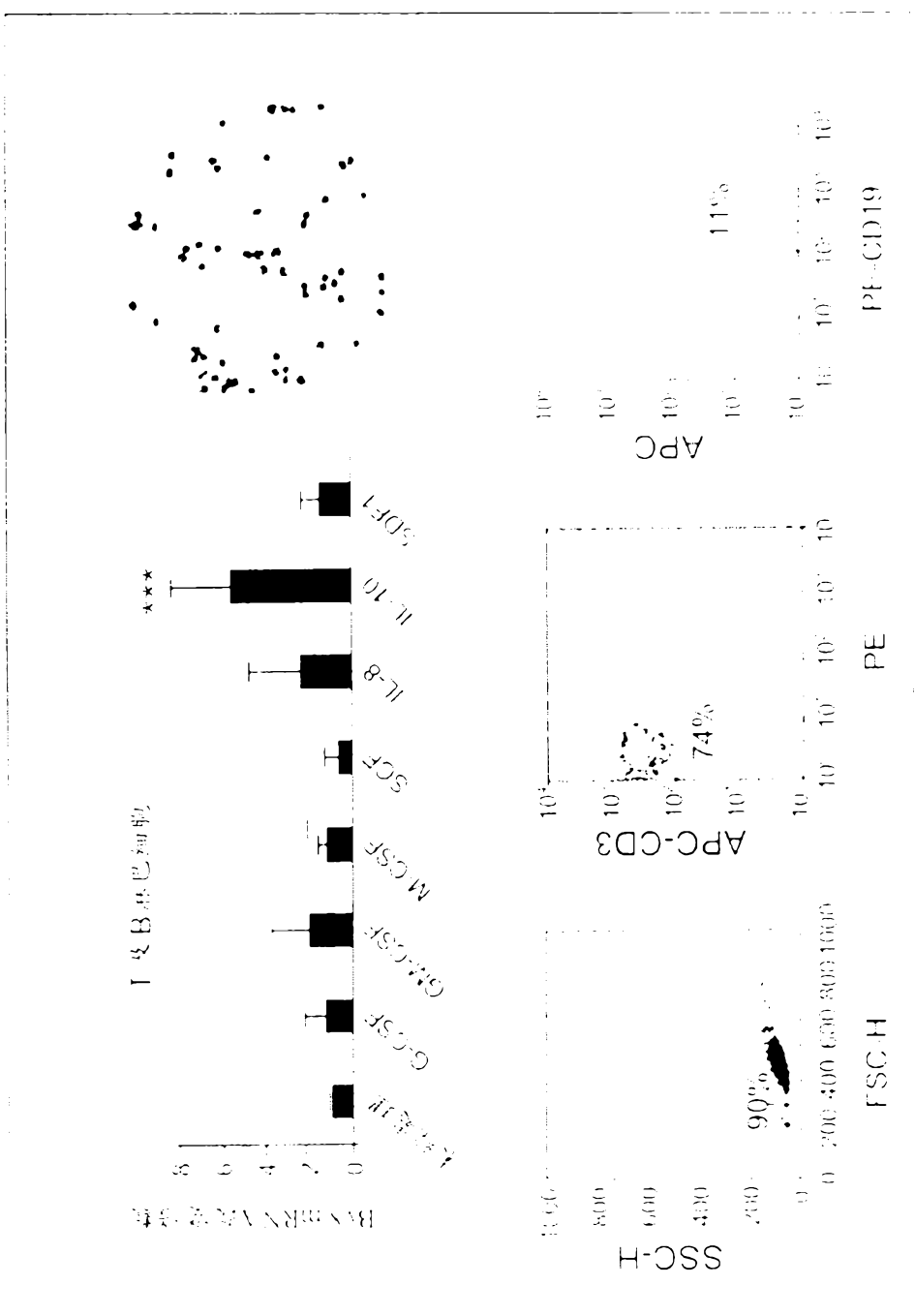


図14d

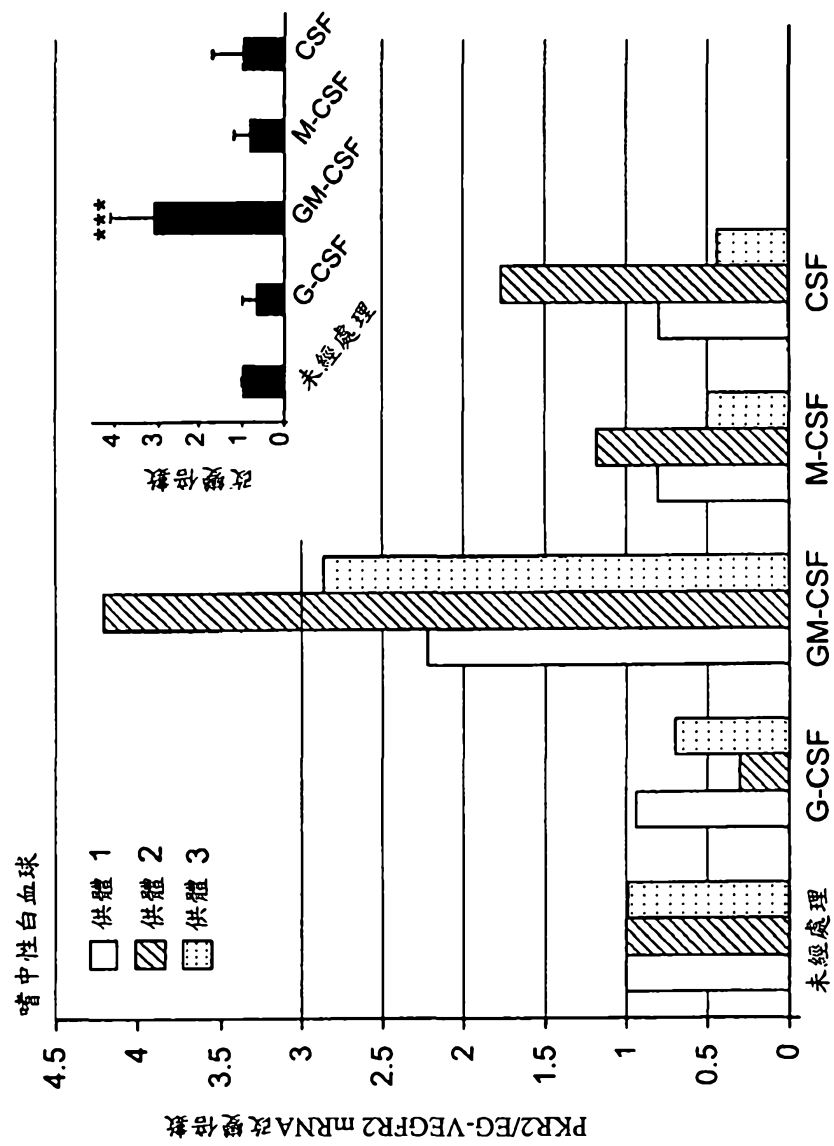


圖15a

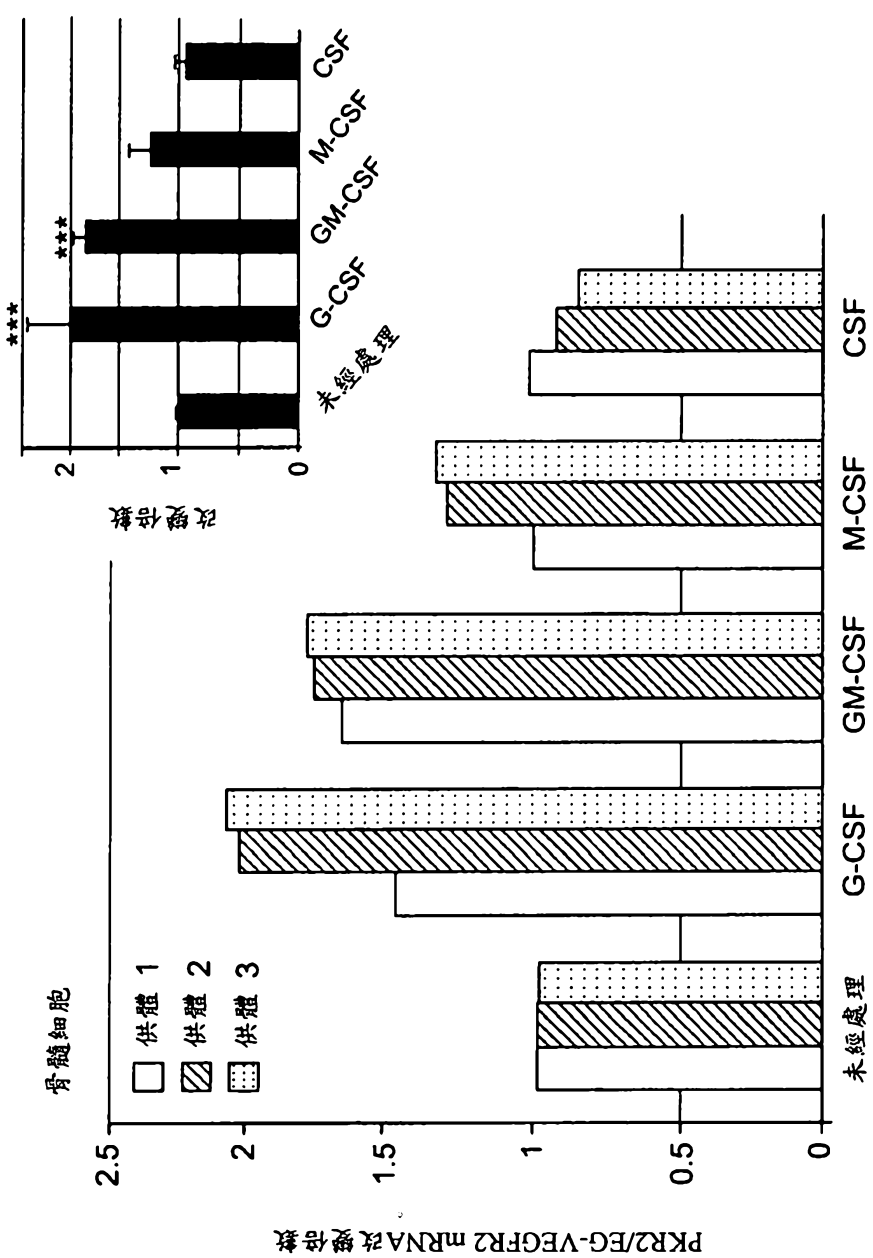


圖15b

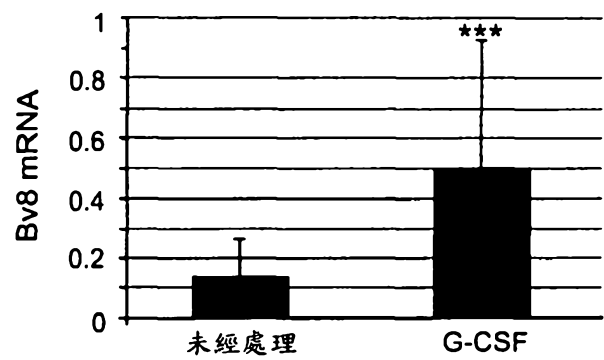


圖16a

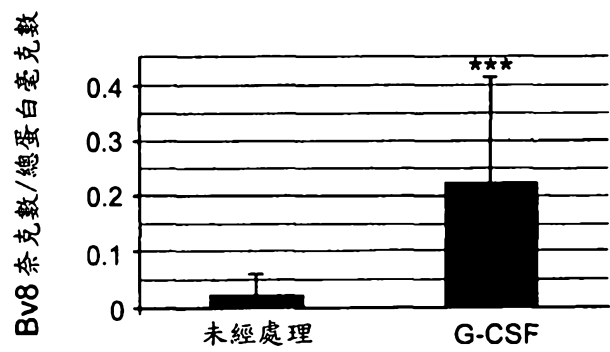


圖16b

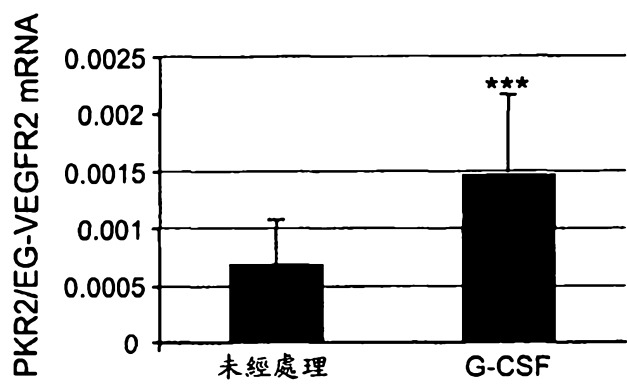
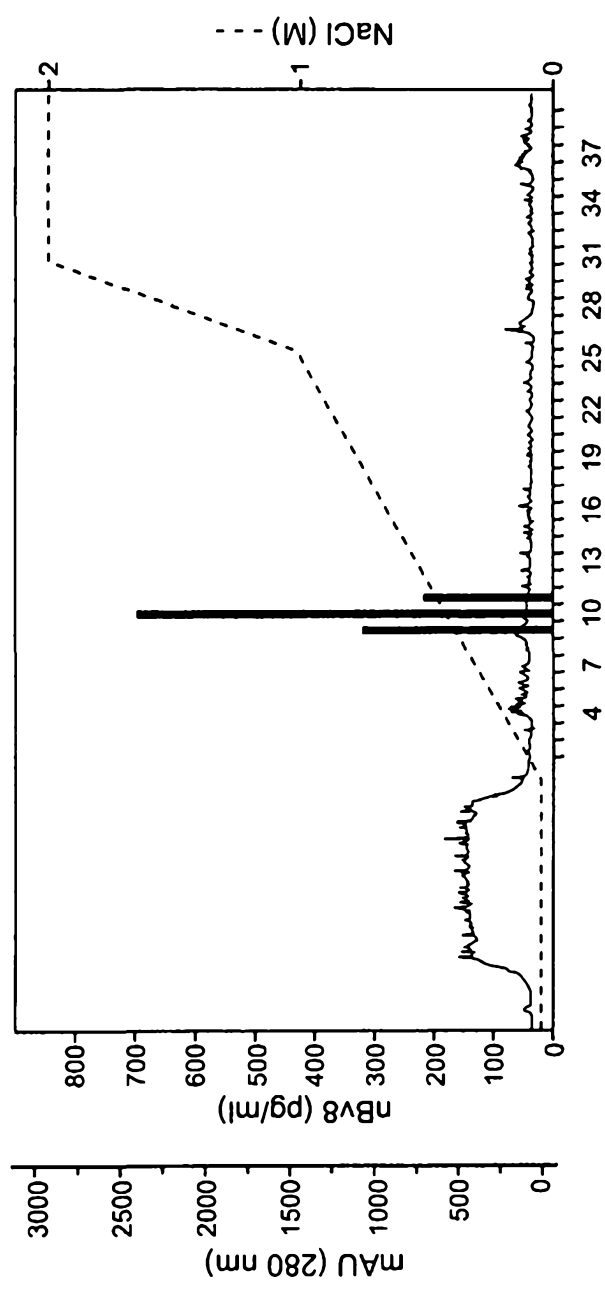


圖16c



肝素管柱溶離份

圖17a

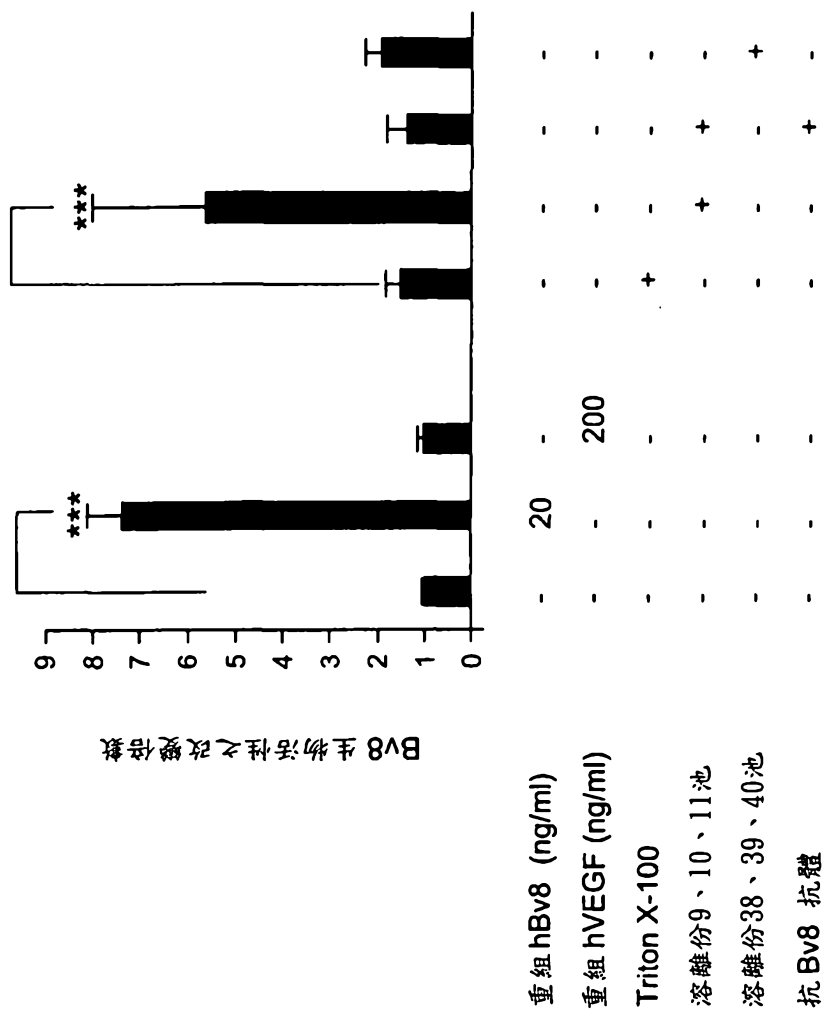


圖17b

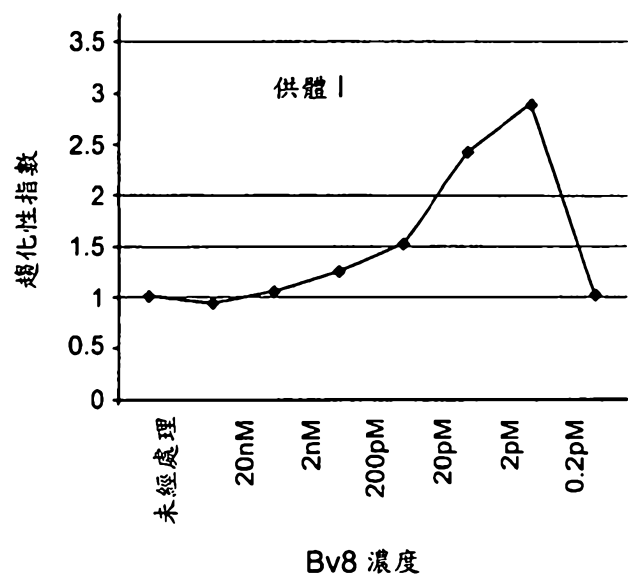


圖 18a

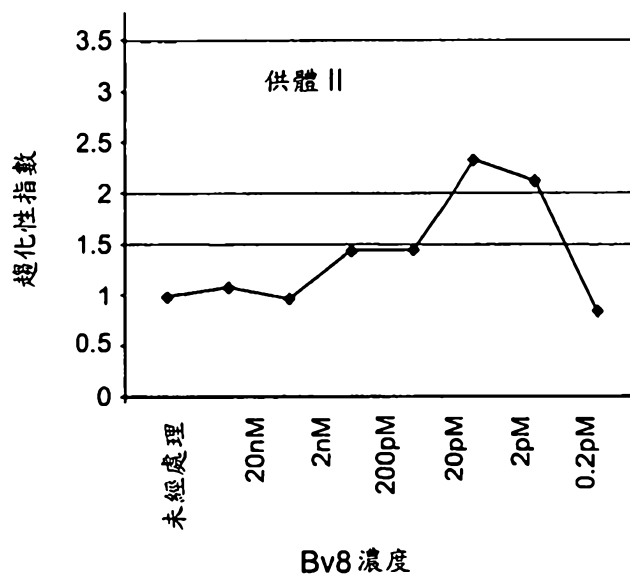


圖 18b

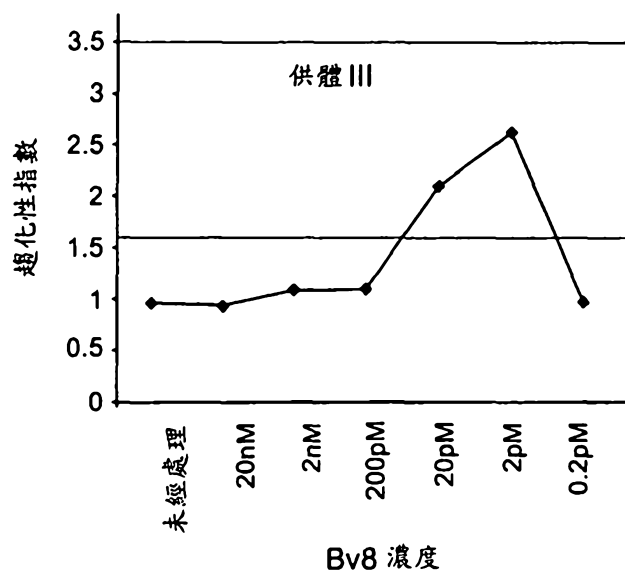


圖 18c

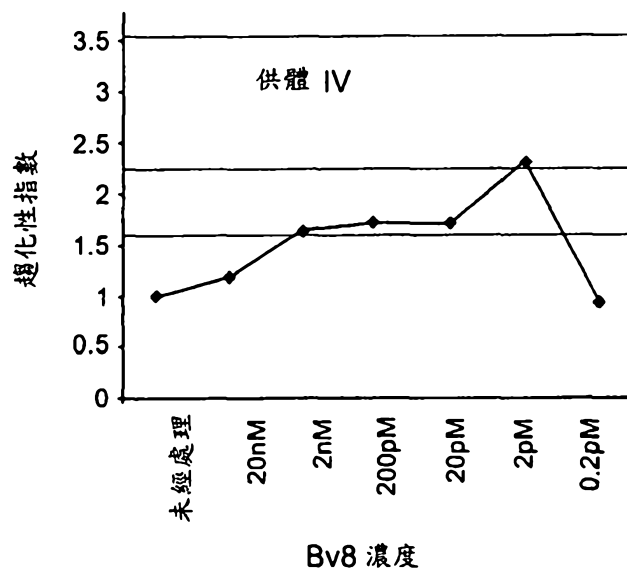


圖 18d

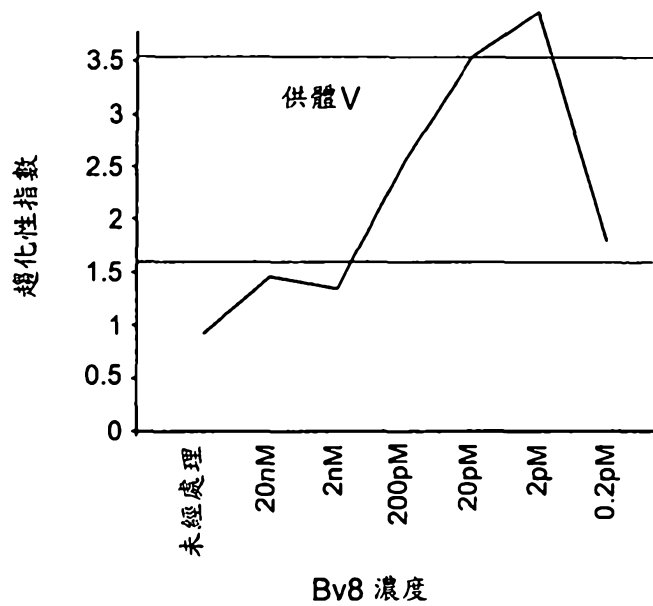


圖18e

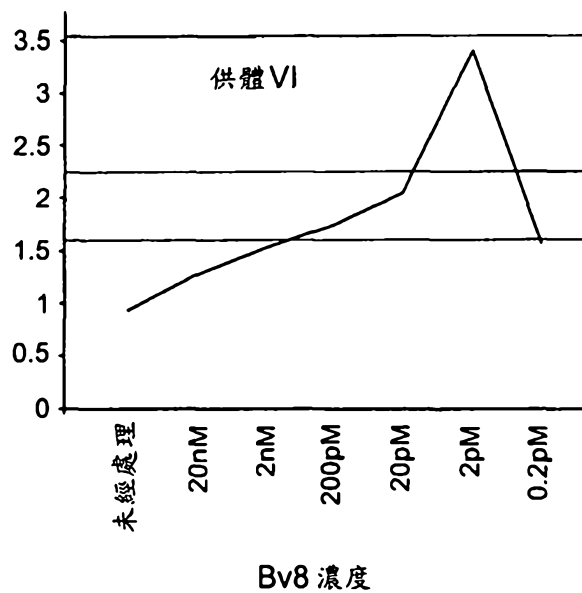


圖18f

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(4)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

圖 18. 嗜中性白血球對 Bv8 反應而遷移。將懸浮在含有 0.2% BSA 之 HBSS 中之 10^6 個嗜中性白血球置放於具有 5 μ m 孔徑之穿孔插入皿中。將單獨培養基或具有純化重組人類 Bv8 (0.2 pM-20 nM) 或各種濃度 (至多 20 nM) 之其他已知趨化因子 (諸如, SDF-1 α) 的培養基添加至下腔室中。在 37°C 下 3 小時後, 計數下腔室中之細胞且將資料進一步正規化為成倍增加, 其中未經處理之樣品為 1。對 6 個健康供體執行實驗。

圖 19. 由 BMMNC 產生之 Bv8 蛋白的表徵。a. 如實例 1 之材料及方法部分中所述, 將小鼠骨髓來源之單核細胞 (BMMNC) 分離且溶解。將溶解產物塗覆於在 20 mM Tris pH 7.2、50 mM NaCl 中預平衡之肝素-瓊脂糖™管柱。如材料及方法中所述以 NaCl 梯度溶離管柱。藉由 ELISA 量測各溶離份中之 Bv8 濃度。在約 0.4 M NaCl 存在下溶離之溶離份 13 及 14 具有最高 Bv8 含量。b. 與 ELISA 資料相符, 西方墨點分析展示 Bv8 高度富含於溶離份 13 及 14 中。

圖 20. G-CSF 為正常小鼠及帶有腫瘤小鼠中 Bv8 表現之關鍵調控劑。a. 注射 G-CSF 後, 血清中 Bv8 含量顯著增加。在第 0 天對 Balb-c 裸小鼠腹膜內注射 G-CSF 且接著每天注射, 歷時 8 天。在第 1 天、第 3 天、第 6 天及第 8 天取樣。b. 來自以上實驗之嗜中性白血球計數展示經 G-CSF 處理之小鼠中循環嗜中性白血球的數目增加。c 及 d. 將 Balb/c 裸小鼠用 PBS、對照 IgG 及抗 G-CSF 連續處理 8 天, 且如所述使用 FACS 染色測定周圍血液 (PB)(c) 及 BM(d) 中 CD11b+Gr1+ 細

胞之頻率。e及f.在植入腫瘤-Matrigel™之前，將Balb/c裸小鼠用抗G-CSF或對照IgG抗體預處理12小時。將Matrigel™及帶有腫瘤之小鼠用抗G-CSF或對照IgG連續處理兩天。在最終分析時，使用FACS研究PB(e)及BM(f)中CD11b+Gr1+之頻率。

圖21. a. Bv8誘導CD11b+Gr1+骨髓細胞之穿孔遷移。對照為PBS或單獨培養基。b及c. BMMNC中Bv8受體之表現。如所述，將A673、HM7、HPAC或Calu-06細胞植入Beige裸小鼠中。10天後，將CD11b+Gr1+骨髓細胞自BM分離且執行Taqman™分析以研究與植入Matrigel™小鼠相比腫瘤之骨髓及非骨髓(CD11b-Gr1-)子集中之EG-VEGFR表現。該分析揭示BMMNC中EG-VEGF/PK-R2(c)比EG-VEGF/PK-R1(b)表現量高。d. Bv8改變祖細胞群體至骨髓細胞(CD11b+Gr1+)之去向且亦抑制Lin-群體中之細胞死亡。將自Beige裸小鼠之BMMNC分離之Lin-溶離份用Bv8培育5天且在FACSCalibur機器中評估CD11b+Gr1+細胞之頻率。此外，採用7AAD染色來量測各處理中死細胞的數目。e. Bv8誘導祖細胞之成株能力。將Lin-群體用Bv8或PBS處理5天且塗鋪在甲基纖維素上(每孔7500個細胞)且在5% CO₂及37℃中培育15天。差別及總群落數揭示經Bv8處理之細胞具有更大成株能力。f. Bv8為骨髓群體之存活因子。將自Beige/裸小鼠之BMMNC分離之CD11b+Gr1+細胞在培養基中培養且用Bv8(300 ng/ml)處理5天。使用7AAD染色在FACSCalibur機器中量測細胞死亡。g及h.中斷抗

Bv8處理導致快速腫瘤生長。將A673(e)及HM7(f)腫瘤植入小鼠中且如所述將該等小鼠用抗Bv8或對照抗體處理。如圖中箭頭所示，在植入後第7天停止處理。i及j.對於A673(i)及HM7(j)腫瘤而言，中斷抗Bv8處理導致CD11b+Gr1+細胞之回彈。

圖 22. 抗 Bv8 抗體對不帶腫瘤之小鼠中血細胞生成的作用。將 Balb/c 裸小鼠用 PBS、對照抗體或抗 Bv8 抗體以治療劑量處理 3 週。分析體重(a)、器官重量(b)以及 BM(c)、脾(d)及 PB(e)中骨髓及淋巴樣細胞之譜系。

圖 23. 用抗 Bv8 抗體處理降低 A673 模型中 PB 及腫瘤中 CD11b+Gr1+細胞的數目。將 5×10^6 個 A673 細胞植入 Beige/裸小鼠中且該等小鼠在植入後 48 小時，開始接收抗 Bv8 處理，且此後每週投與兩次。在經抗 Bv8 及對照處理之小鼠中監測不同時間點(亦即，植入後第 5 天、第 10 天、第 19 天及第 29 天)CD11b+(資料未圖示)、Gr1+(資料未圖示)及 CD11b+Gr1+細胞之動力學。**a.**將 BMMNC 自各處理組分離且經受如實例 1 之材料及方法部分中所述之染色程序。**b.**在各時間點將小鼠放血且使用 FACSCalibur 量測 CD11b+Gr1+之頻率。**c.**將腫瘤細胞個別計數且藉由將此等細胞之頻率乘以腫瘤細胞總數計算出 CD11b+Gr1+細胞數目。星號表明當將經抗 Bv8 處理之小鼠與相應對照處理群體相比時在各時間點之顯著差異($p < 0.05$)。

圖 24. 帶有腫瘤小鼠中 CD11b、Gr1 及 CD11b+Gr1+細胞群體之代表性 FACS 概況。將 5×10^6 個 A673、Calu6、

HM7、HPAC或Jurkat細胞植入Beige裸小鼠(n=5)中。如實例1之材料及方法部分中所述將小鼠用抗Bv8或對照Mab處理。在腫瘤植入後第10天，分析小鼠，且如所述，量測BM、PB、腫瘤及脾中CD11b⁺、Gr1⁺及CD11b⁺Gr1⁺細胞之頻率。

圖 25. 植入腫瘤增加BM及脾中CD11b⁺Gr1⁺之頻率。 將 5×10^6 個A673、Calu6、HM7、HPAC或Jurkat細胞植入Beige裸小鼠(n=5)中。如材料及方法中所述將小鼠用抗Bv8或對照Mab處理且接著將BM或脾細胞自帶有腫瘤小鼠分離且用抗G11及抗CD11b染色。圖表示BM(a)及脾(b)中CD11b⁺、Gr1⁺及CD11b⁺Gr1⁺細胞之百分比。右上側之插圖展示植入Matrigel™之小鼠中CD11b⁺、Gr1⁺及CD11b⁺Gr1⁺細胞之頻率。c. 抗Bv8處理降低BMMNC及脾細胞之成株能力。將A673及HM7細胞植入裸小鼠中且接著如所述將該等小鼠用抗Bv8或對照抗體處理。在植入腫瘤10天後，自帶有腫瘤小鼠收穫BMMNC及脾細胞，且將BMMNC及脾細胞接種以進行CFU檢定。

圖 26. Bv8促進TAEC中之管形成且不能刺激腫瘤細胞生長。 a. Bv8在活體外誘導內皮細胞中之管形成。將TEACS接種在塗有Matrigel™之培養盤上且接著用任一基本培養基(如實例1之材料及方法部分中所述之對照、Bv8或VEGF-A，存在或不存在抗Bv8)培育。圖(相差；初始放大倍數20X)展示培育36小時後內皮管之外觀。b. TAEC表現習知內皮細胞之標記物。藉由流式細胞儀(資料未圖示)及

RT-PCR使用TAEC、皮膚內皮細胞(SkEC)、上皮細胞及纖維母細胞中之CD31、VEGFR2、TIE2、VE-CADH、CK8及E-CADH來證實用於此等實驗中所用之TAEC之特性。GAPDH用作內部對照。c. TAEC對Bv8刺激反應而活化MAPK信號轉導。在37°C下將細胞用Bv8(200 ng/ml)、VEGF(陽性對照；40 ng/ml)、完全培養基(CM)或模擬物(0.5% DSA)處理5分鐘、10分鐘及20分鐘。實例1之材料及方法部分中所述之西方墨點分析偵測經Bv8處理之孔中的磷酸化MAPK(P-MAPK)，而模擬物(PBS)處理未誘導P-MAPK活化。d. Bv8未誘導腫瘤細胞增殖。將A673、Calu-6、HM7及HPAC細胞用不同濃度之重組Bv8處理且接著用BrdU脈衝。藉由併入BrdU來對增殖定量。

圖27. a. Bv8促進腫瘤血管生成。在植入腫瘤5天後，帶有HM7腫瘤之小鼠接收單腫瘤內劑量之Ad-LacZ、低效價Av-Bv8、高效價Av-Bv8及Av-VEGF。在腺病毒傳遞4天後，使用腫瘤切片之MECA-32染色，量測血管表面積。b. 抗Bv8處理使得腫瘤血管生成受抑制。將Jurkat細胞植入Beige裸小鼠中且將該等小鼠用對照(圖a-c)、抗Bv8(圖d-f)及抗VEGF(圖g-i)抗體處理。注意到抗Bv8或抗VEGF處理顯著抑制腫瘤血管生成。圖a、b、d、e、g、h為H&E染色且圖c、f、i為MECA-32染色(腫瘤區域由星號指示)。

圖28. Bv8在腫瘤生長中之作用。腫瘤細胞及腫瘤相關基質信號經由釋放趨化因子及細胞因子(諸如，G-CSF、IL-6及SDF-1)使BM中之Bv8上調。Bv8可藉由自分泌及旁

分泌機制擴大由G-CSF引起之骨髓細胞活動。已知腫瘤壞死促進骨髓細胞浸潤。藉由多種機制回歸腫瘤之骨髓細胞可局部產生Bv8，Bv8又直接刺激內皮細胞增殖及血管生成。細胞因子、低氧及抗VEGF療法亦可導致腫瘤微環境內骨髓細胞之Bv8表現增加。由腫瘤浸潤性骨髓細胞產生之Bv8亦可對BM傳遞信號以進一步促進活動、跨內皮遷移及骨髓細胞回歸腫瘤。

圖 29a.調節培養基中來自由異種移植物分離及培養之人類腫瘤細胞或腫瘤相關小鼠纖維母細胞的細胞因子含量。

圖 29b.將各種細胞株用10 ng/ml之G-CSF或GM-CSF處理4小時。隨後將RNA提取且經受Taqman分析，使用RPL19作為看家基因以供正規化。展示成倍變化，其中未經處理為1。***與未經處理之對照相比， $p < 0.01$ 。進行三個獨立研究。

103年7月16日修正本

十、申請專利範圍：

1. 一種抗Bv8抗體或其抗原結合片段與抗血管內皮生長因子(VEGF)抗體或其抗原結合片段之組合之用途，其係用於製備治療對用VEGF拮抗劑治療有抗性(refractory)之腫瘤之人類個體之醫藥品。
2. 如請求項1之用途，其中該抗VEGF抗體為貝伐單抗(bevacizumab)。
3. 如請求項1之用途，其中該抗Bv8抗體或其抗原結合片段為嵌合、人化或人類抗體。
4. 如請求項1之用途，其中該醫藥品係與化學療法或放射療法併用投予該人類個體。
5. 如請求項1之用途，其中該人類個體患有對用VEGF拮抗劑單一療法有抗性之腫瘤。

103年7月16日修正替換頁

第19a~29b圖

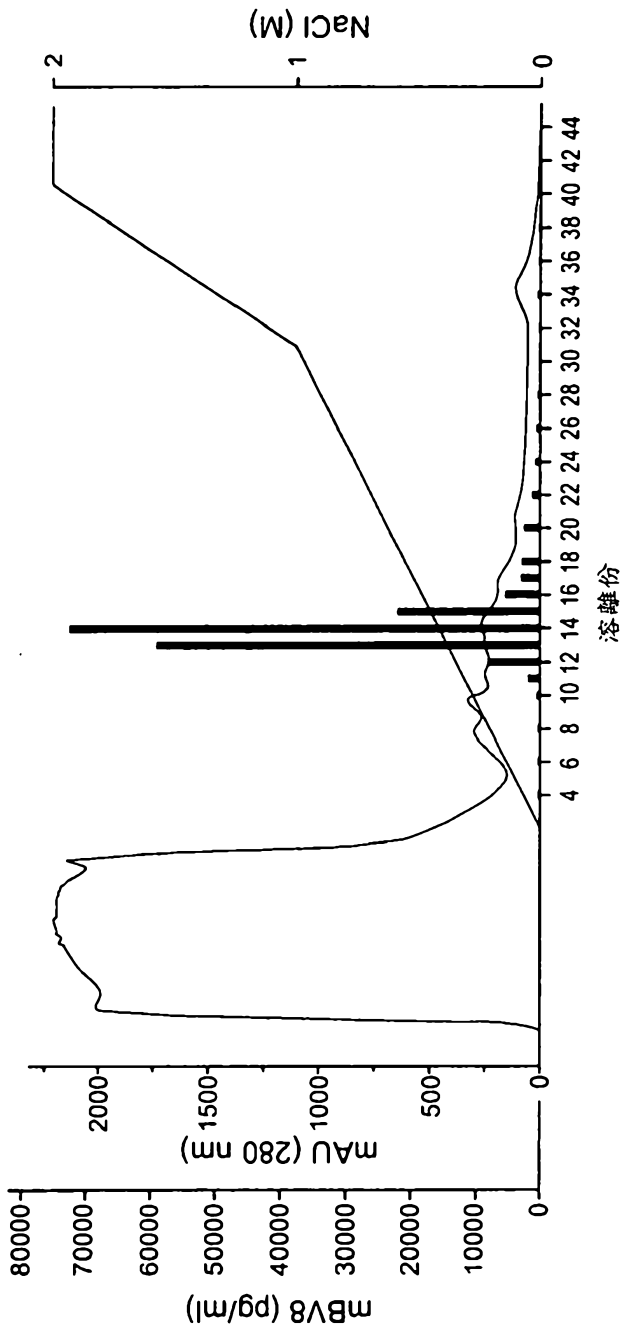


圖 19a

圖 19b



圖 19b

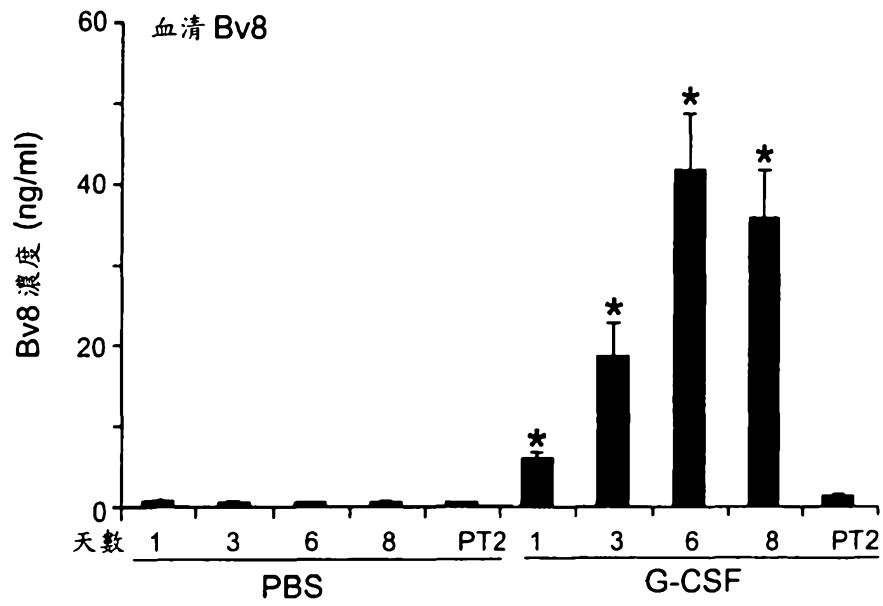


圖 20a

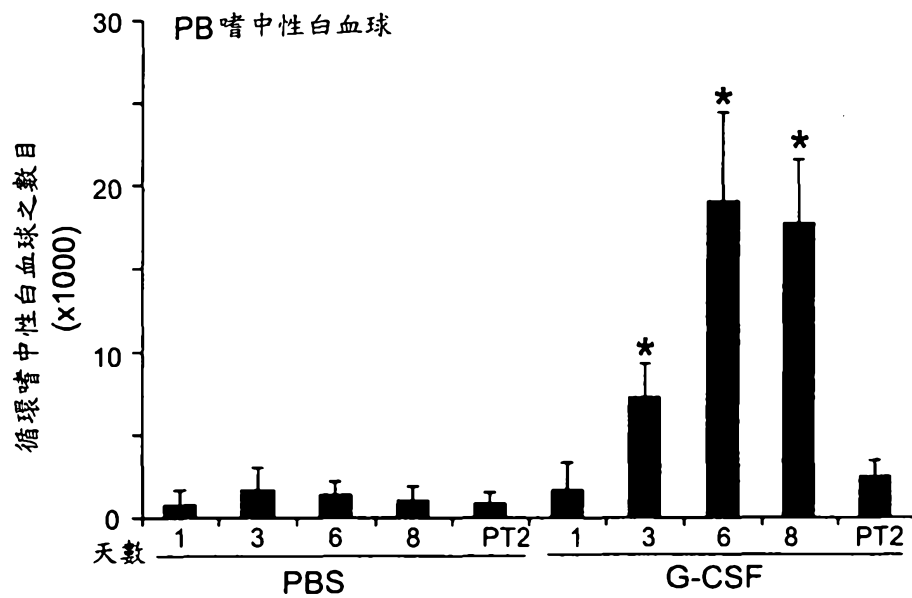


圖 20b

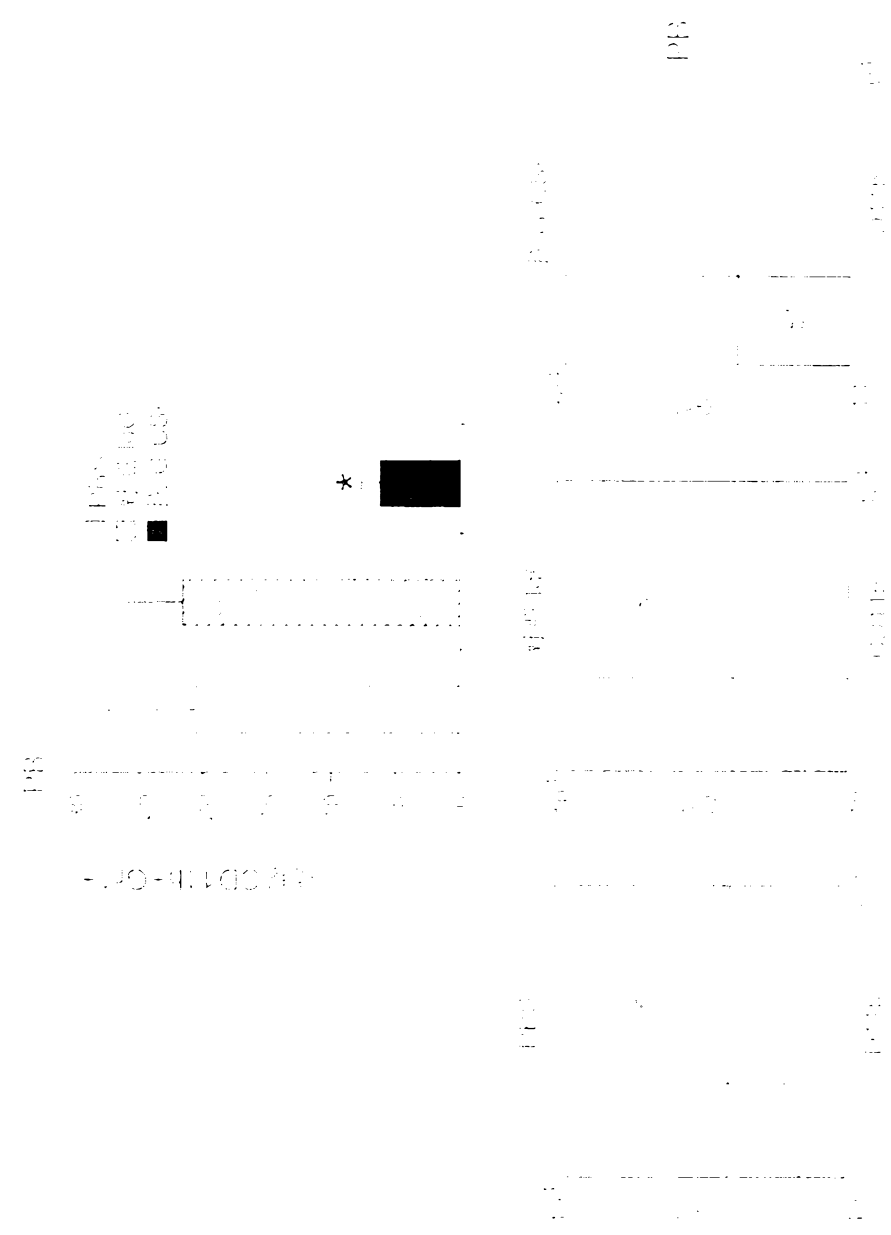
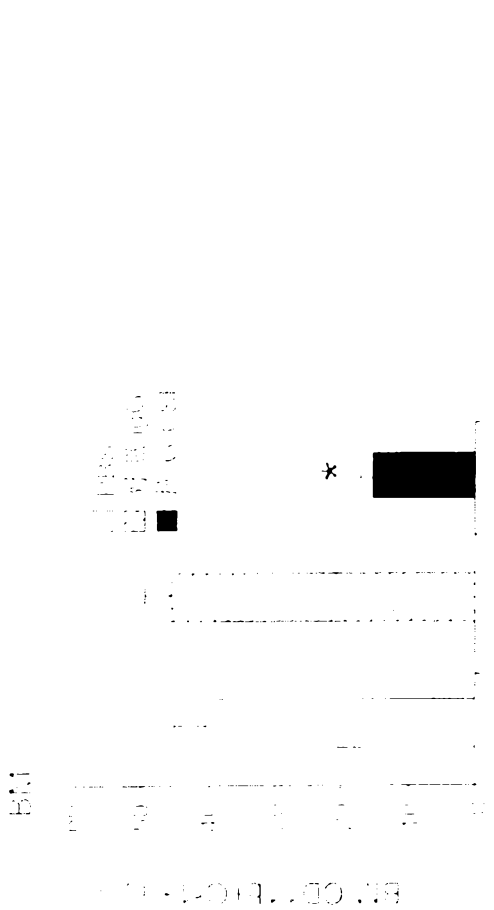


圖 20c



POC 圖

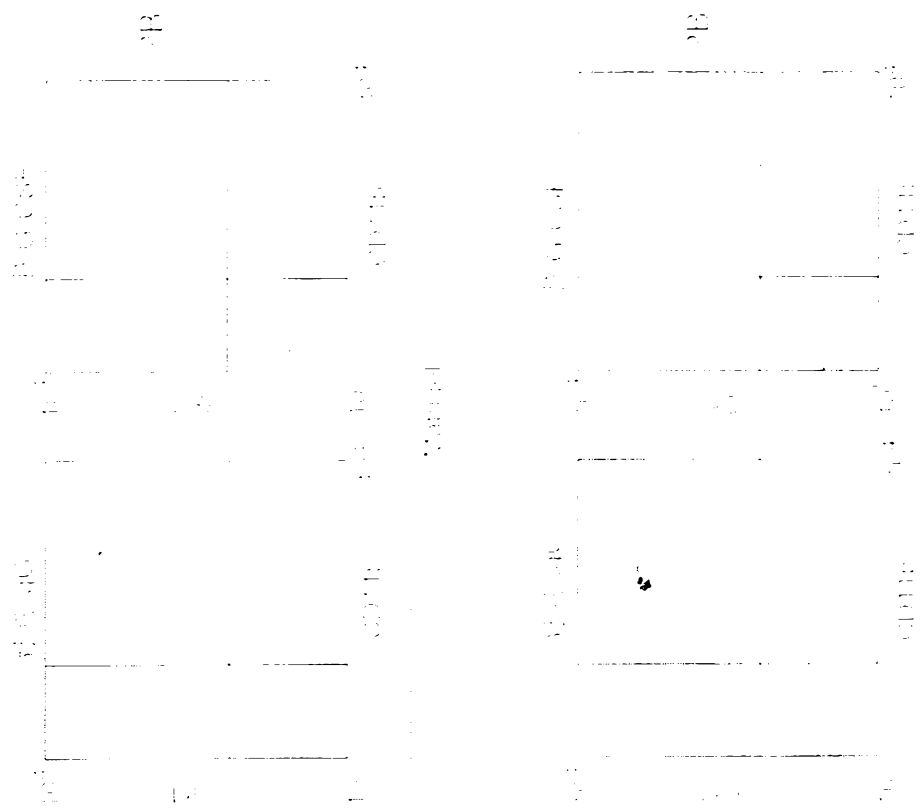
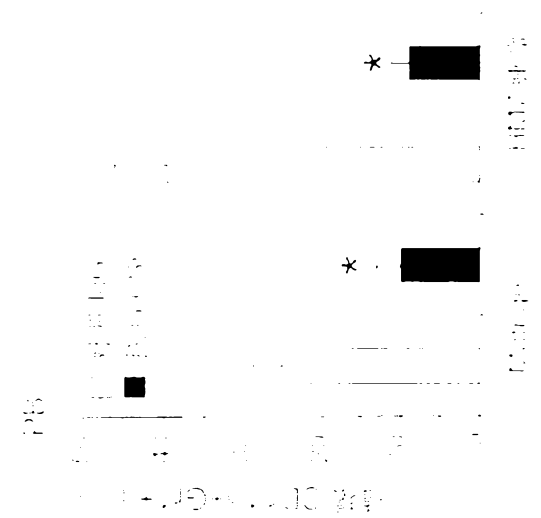


圖 20c



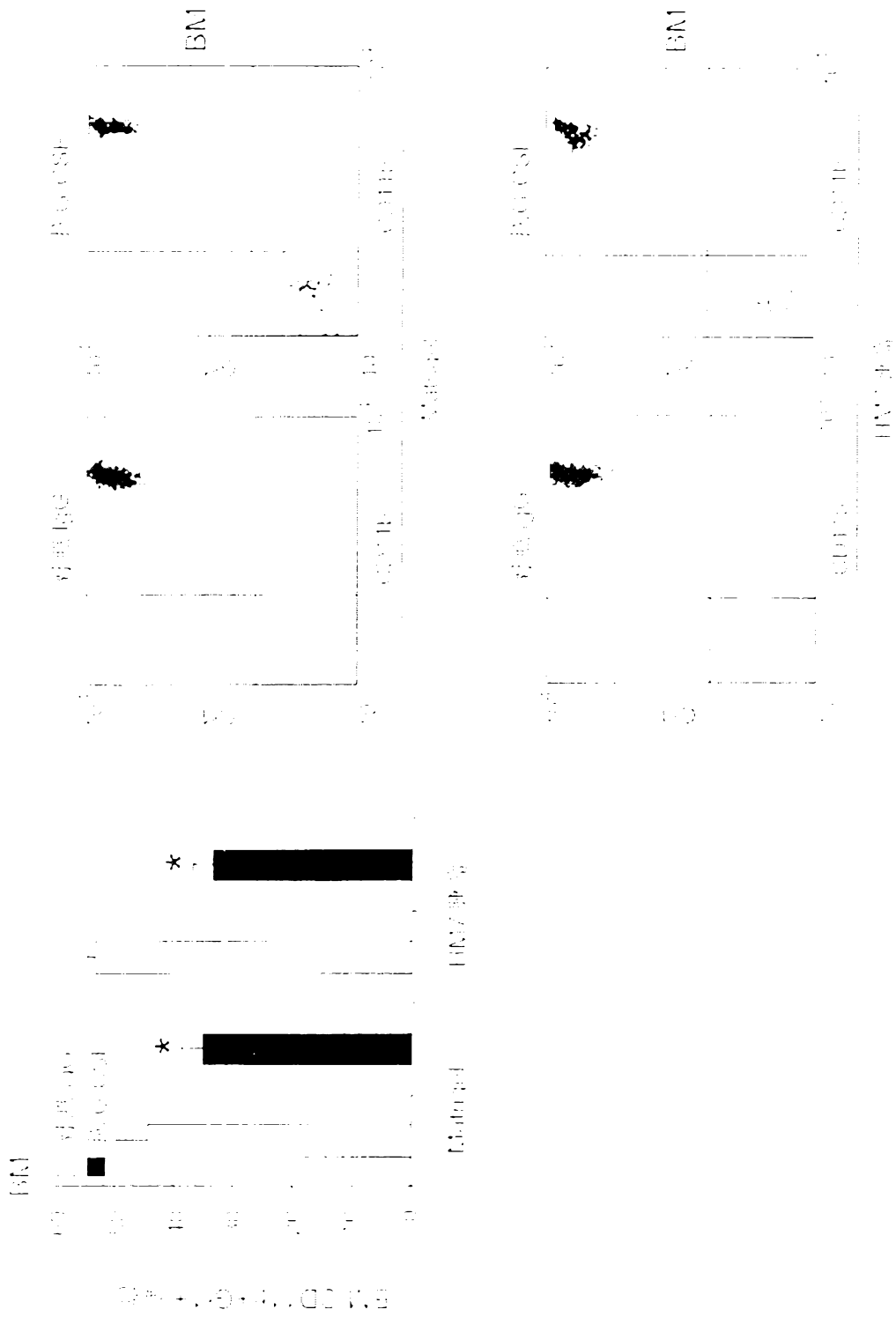


圖 20f

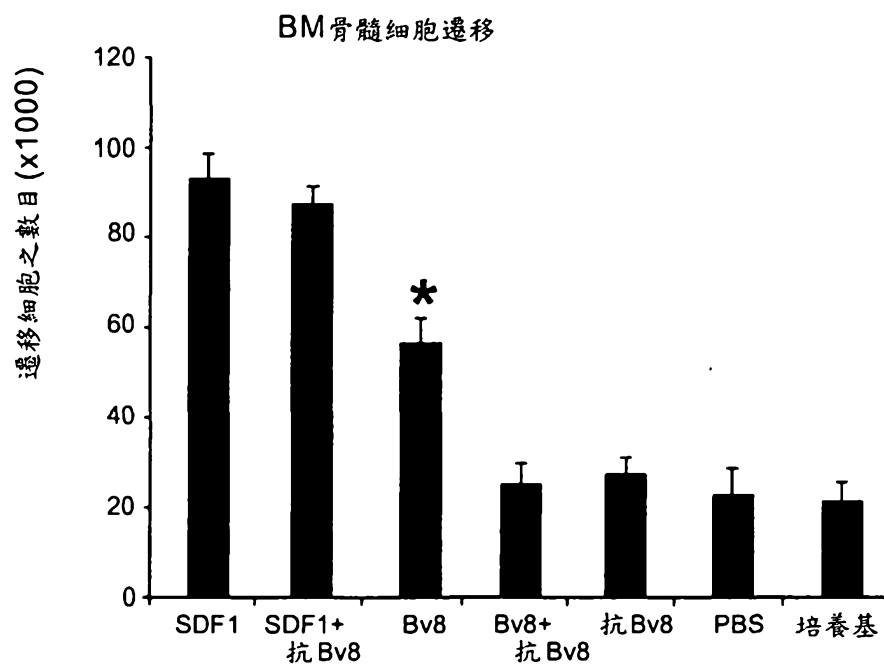


圖 21a

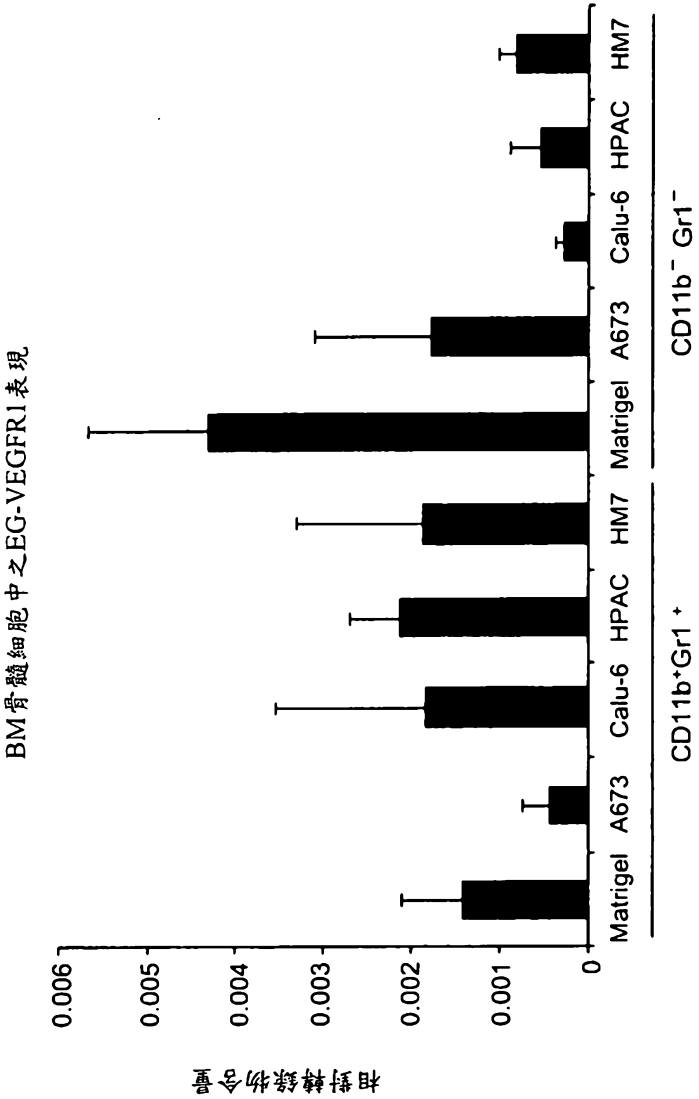


圖 21b

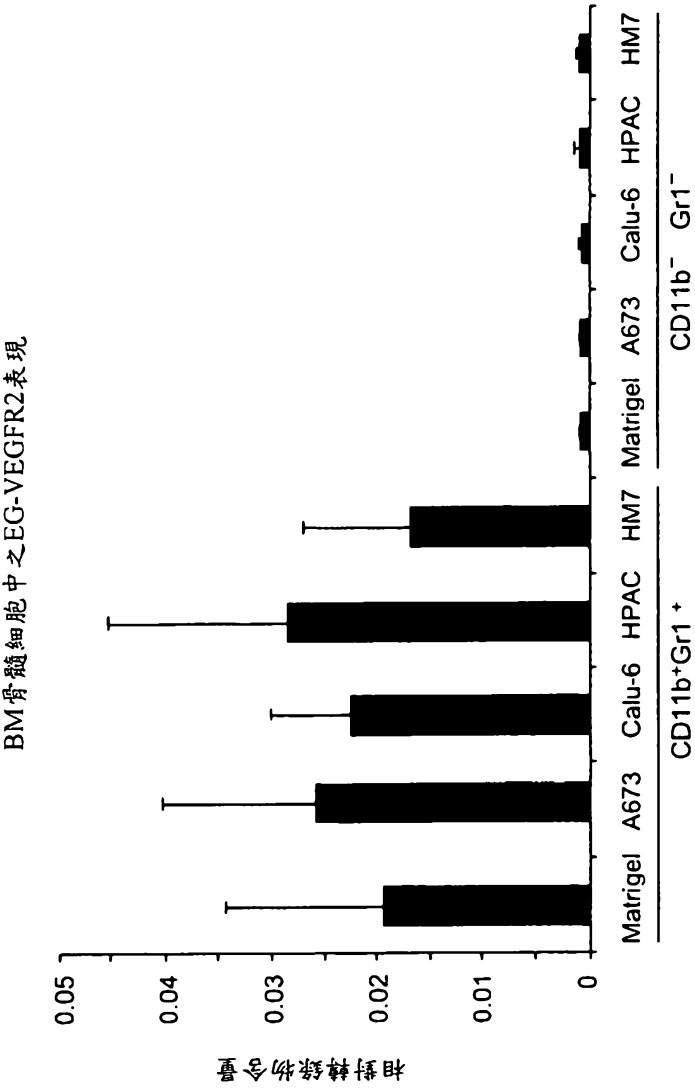


圖 21c

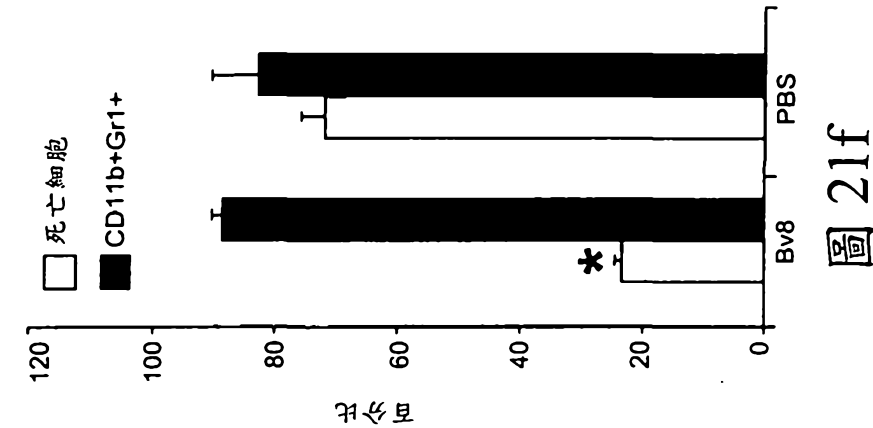


圖 21f

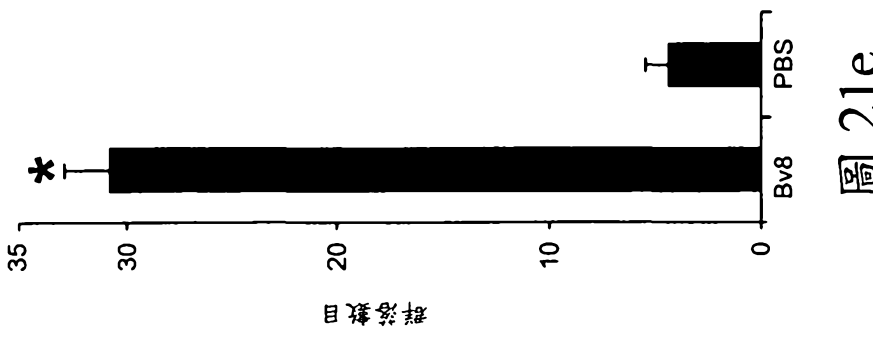


圖 21e

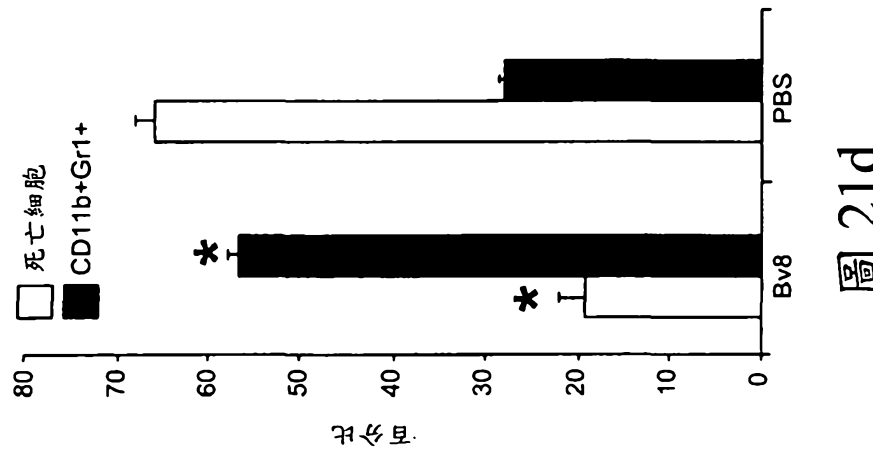


圖 21d

中斷抗Bv8處理之A673

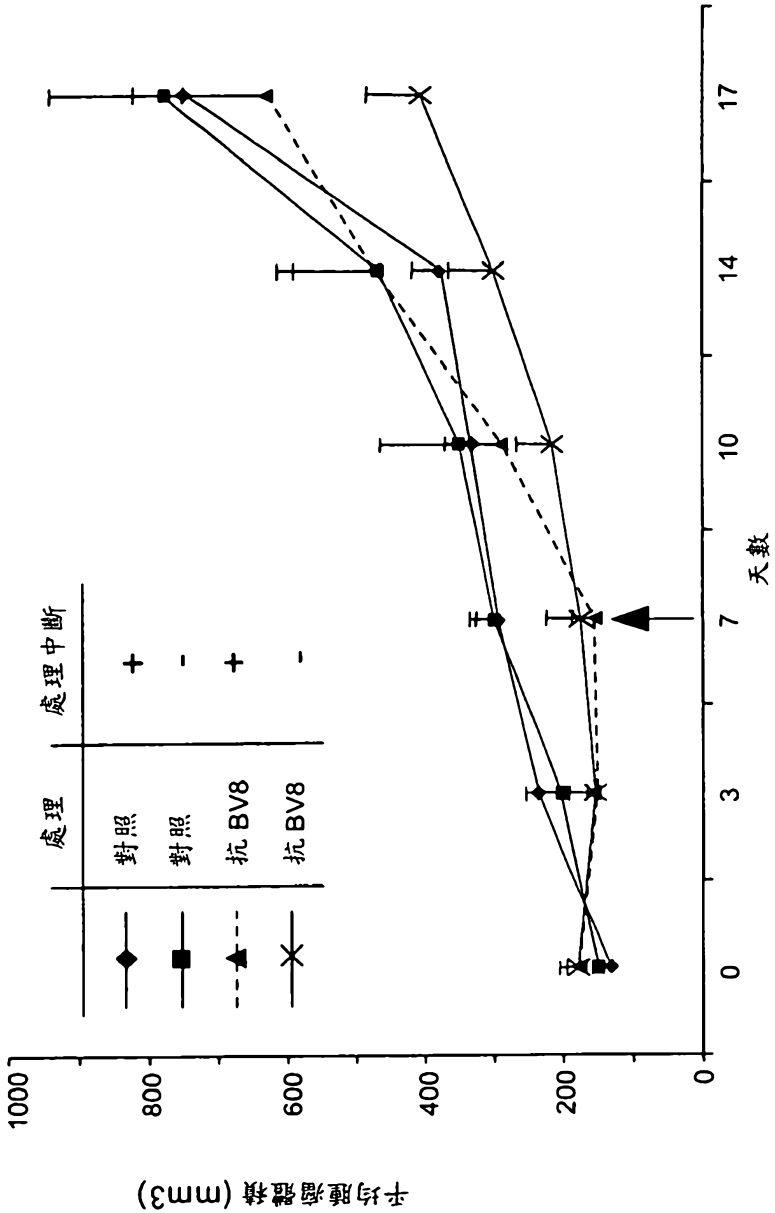
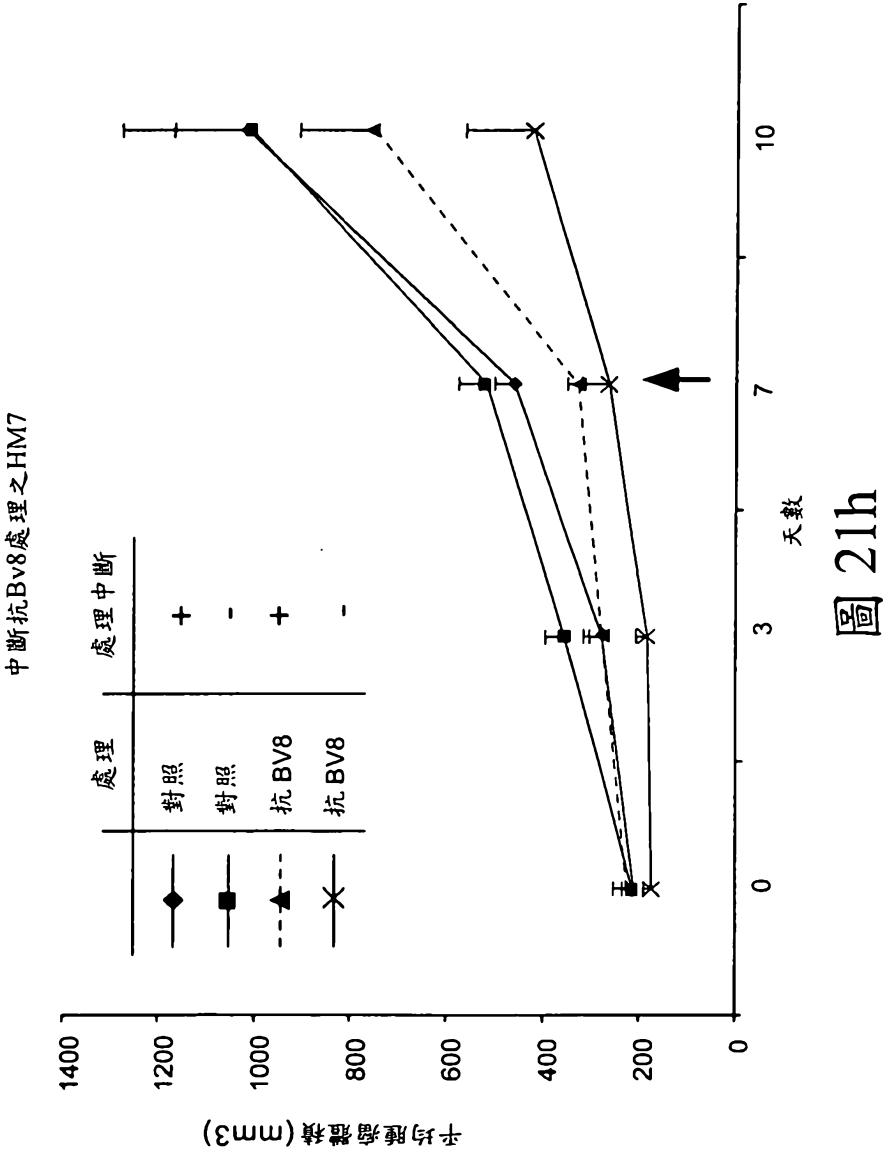


圖 21g



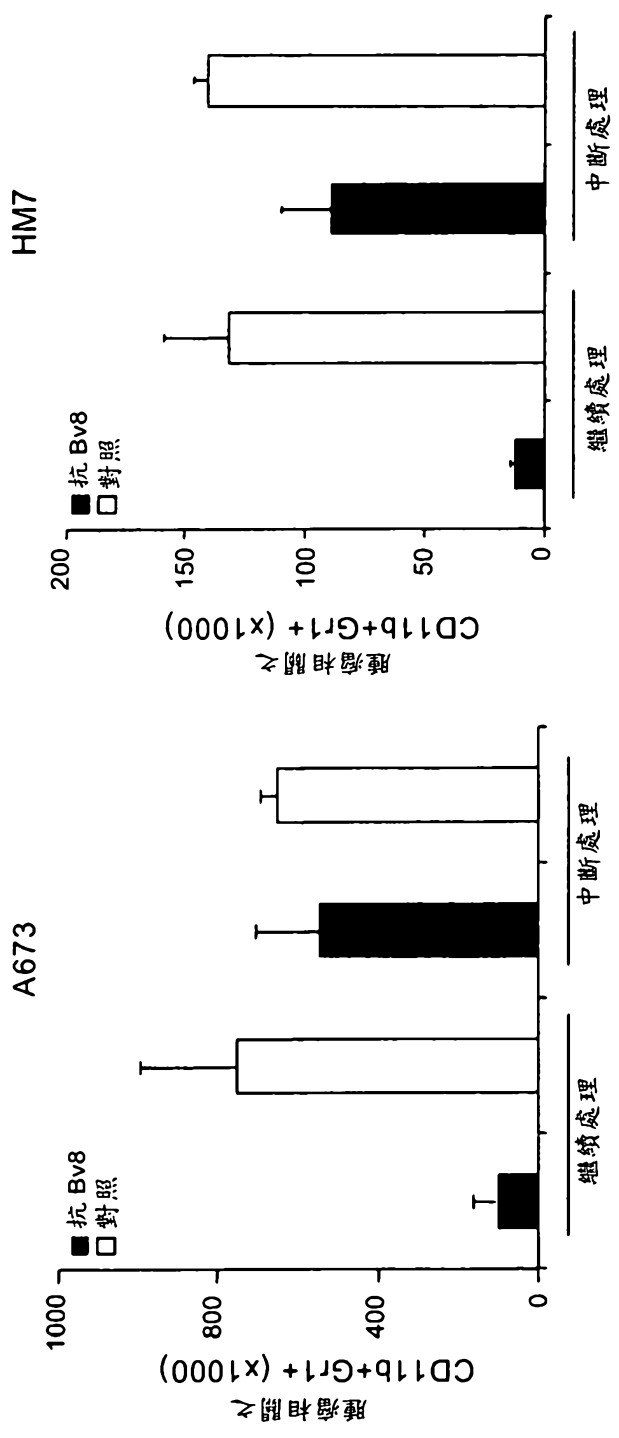


圖 21j

圖 21i

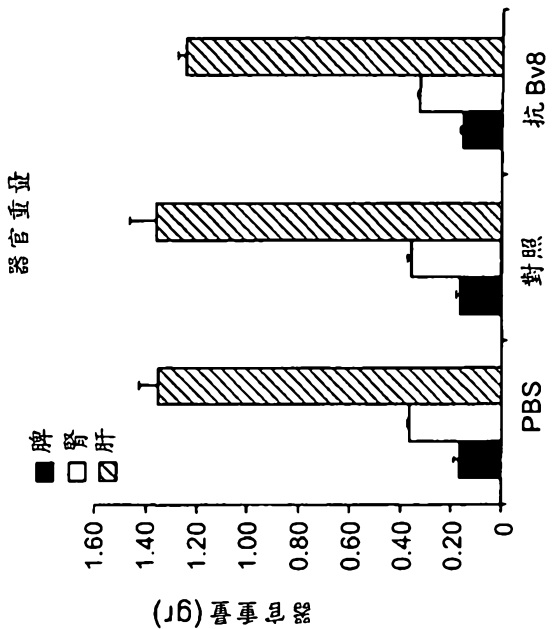


圖 22b

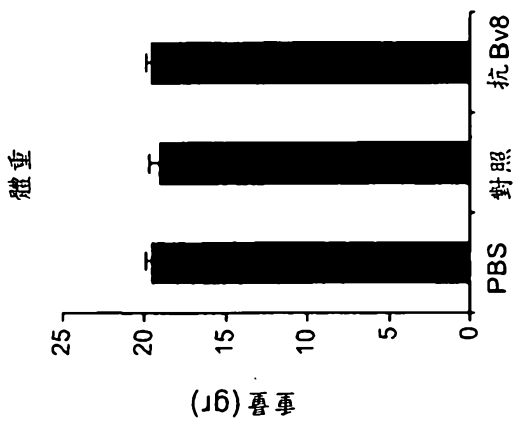
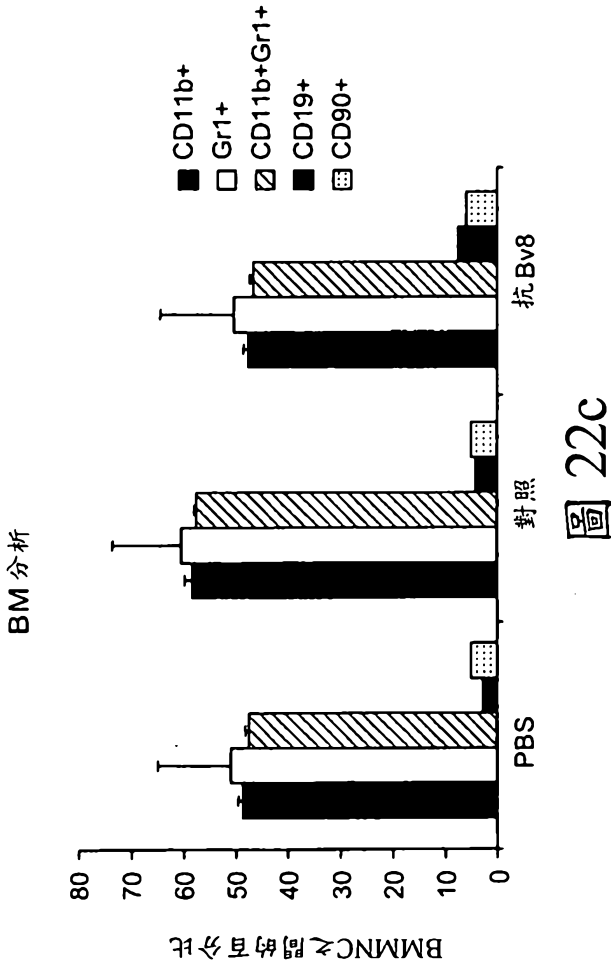
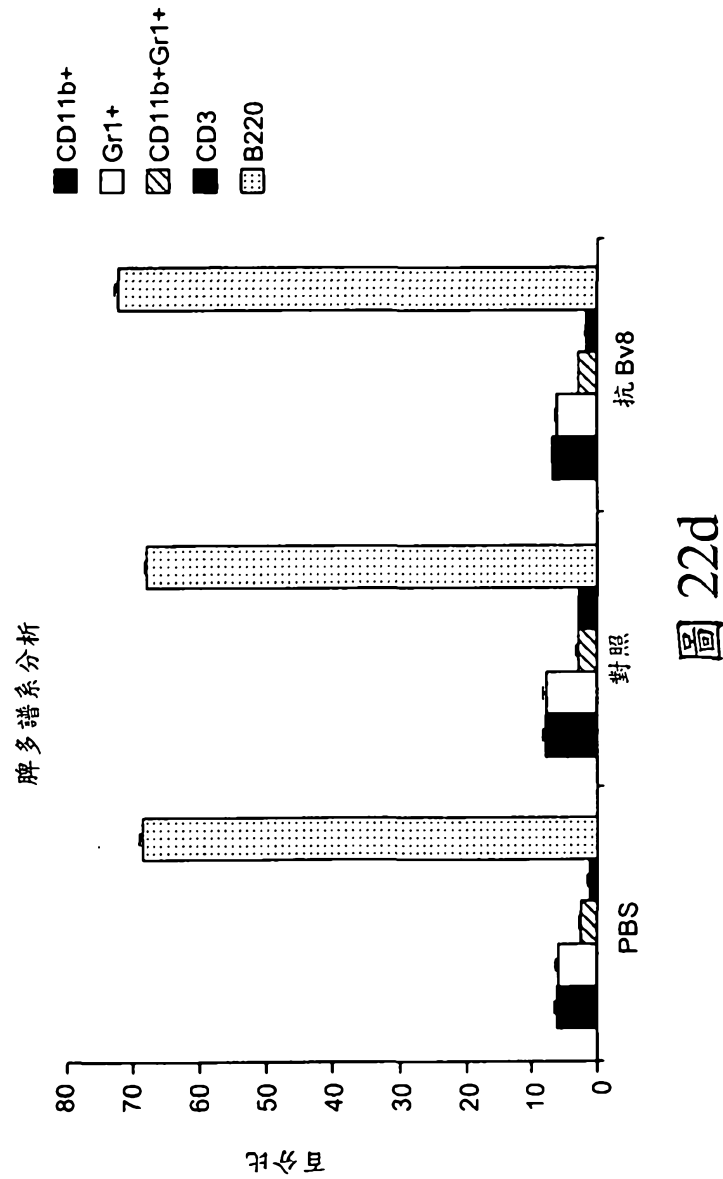


圖 22a





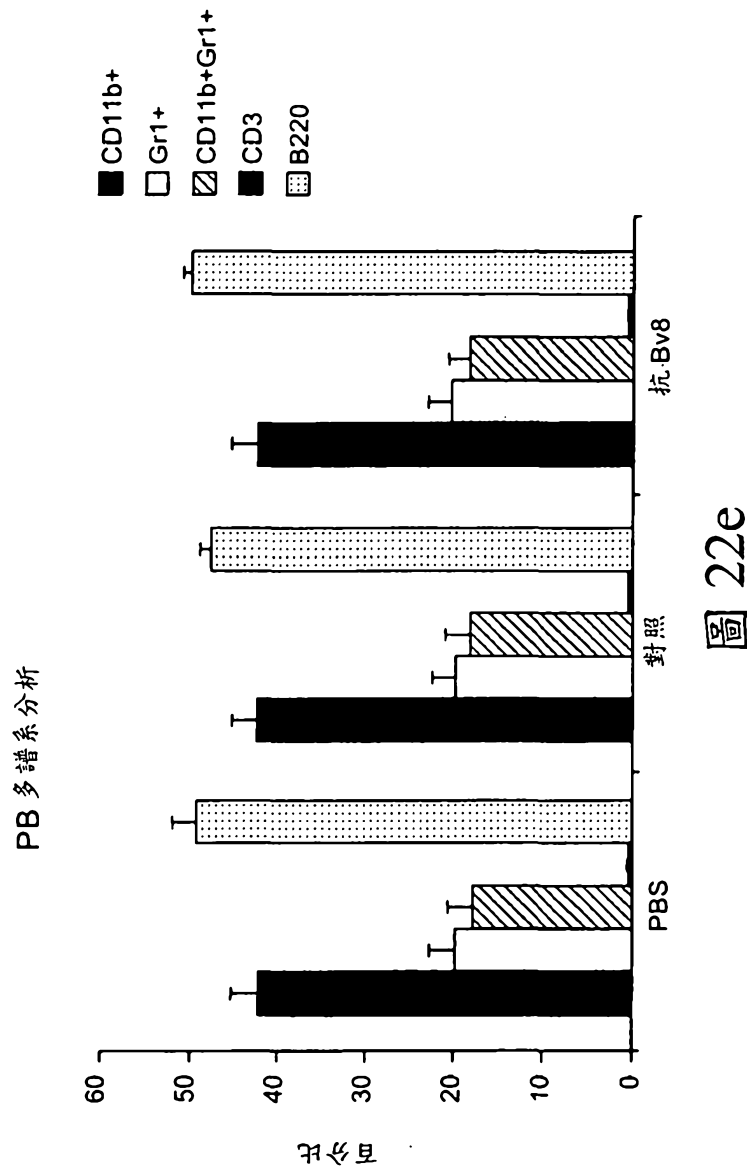


圖 22e

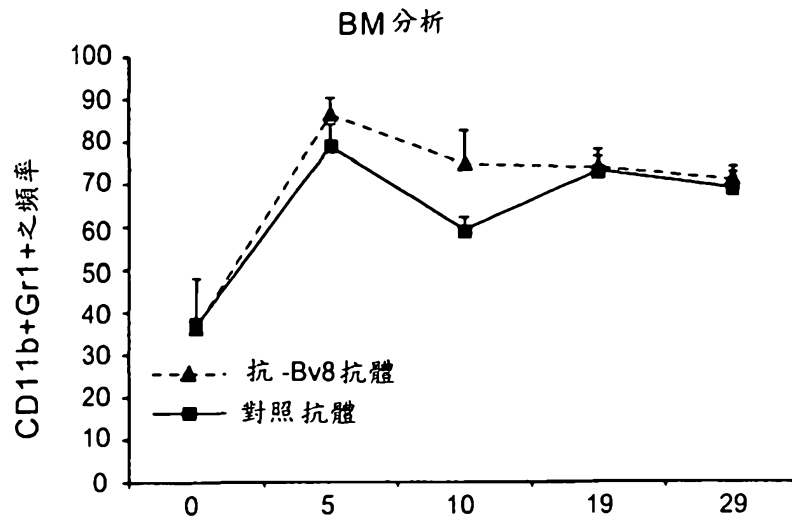


圖 23a

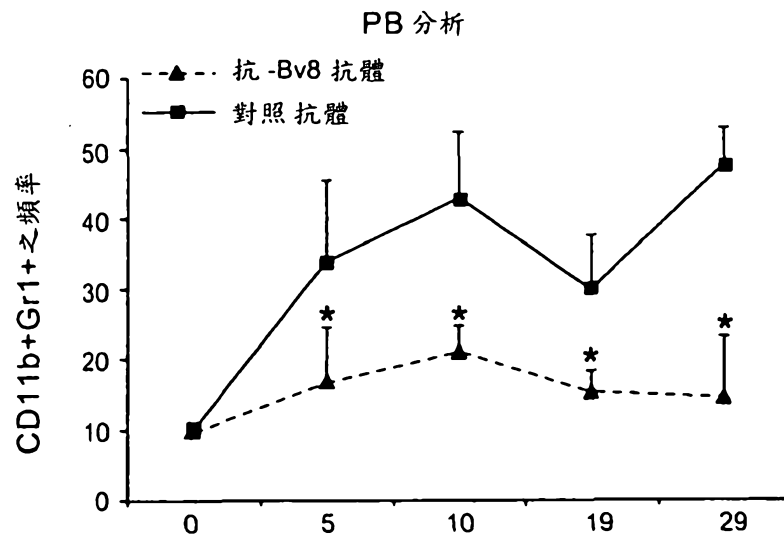


圖 23b

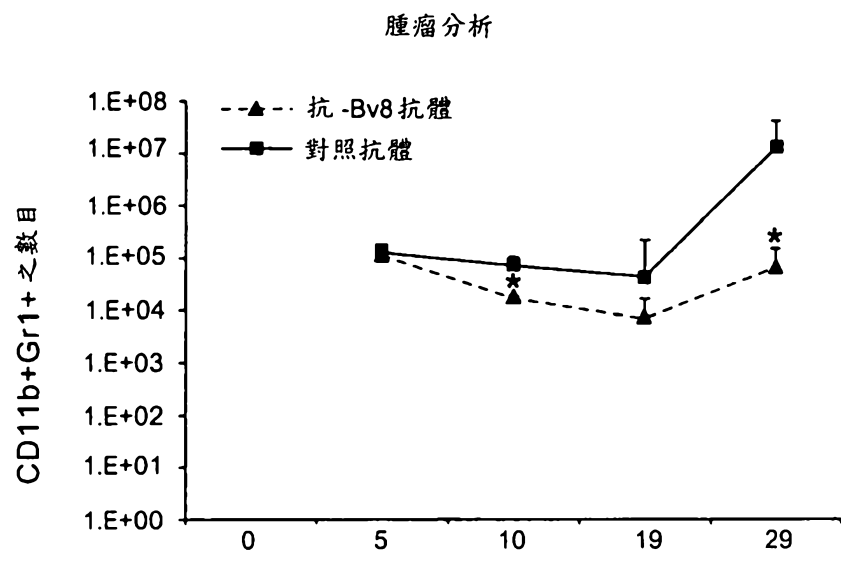


圖 23c

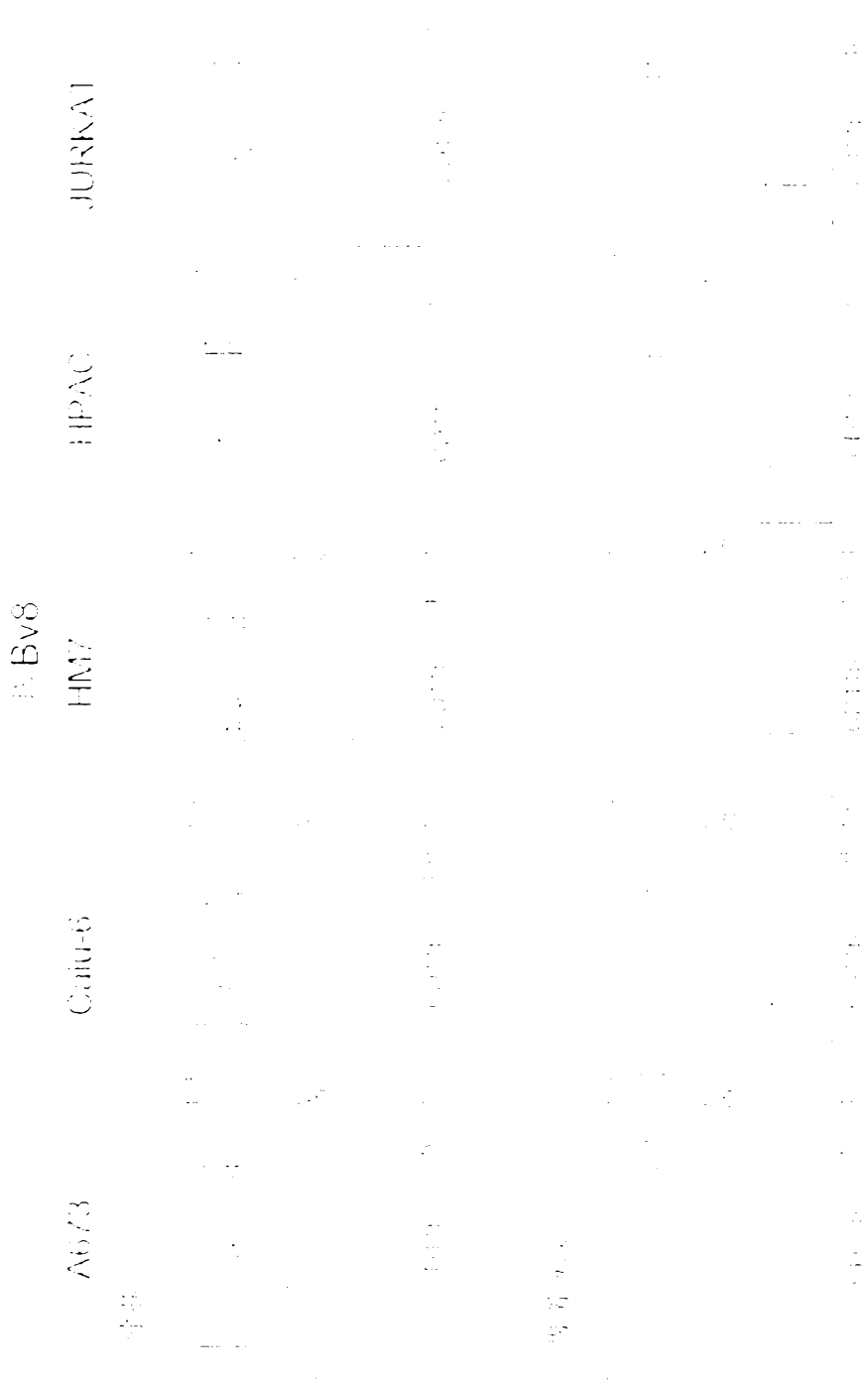


圖 24a

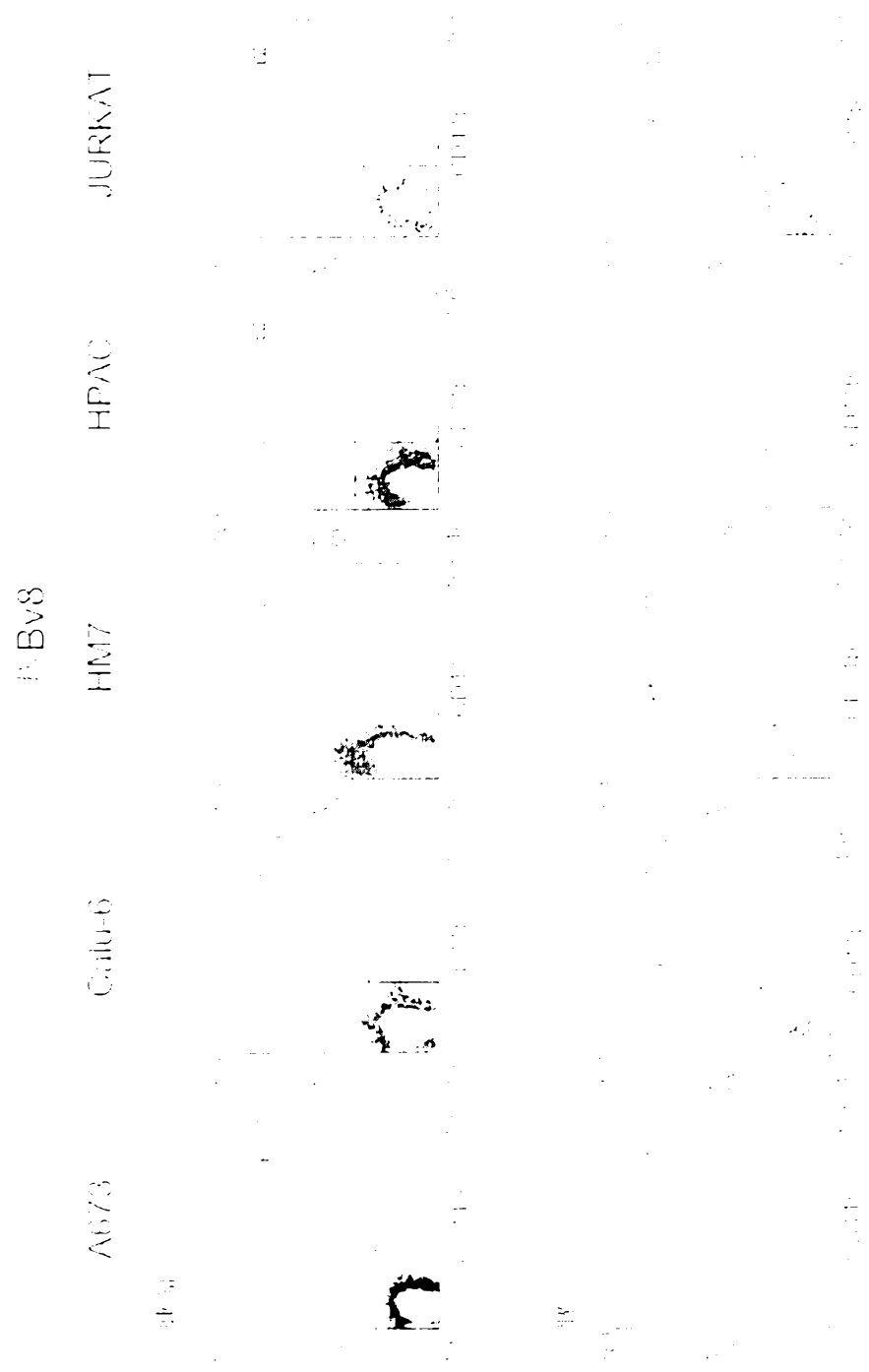


圖 24b

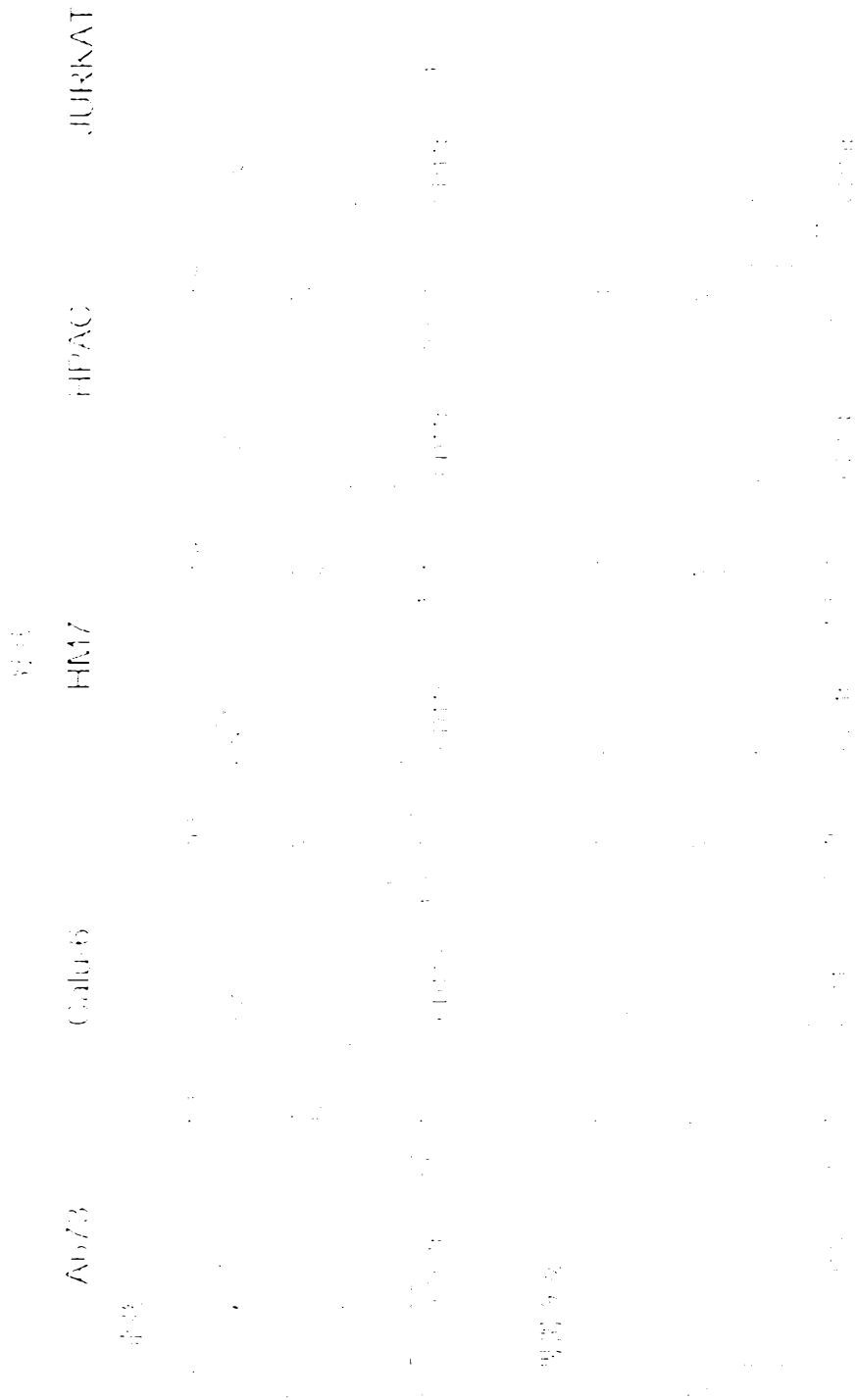


圖 24c

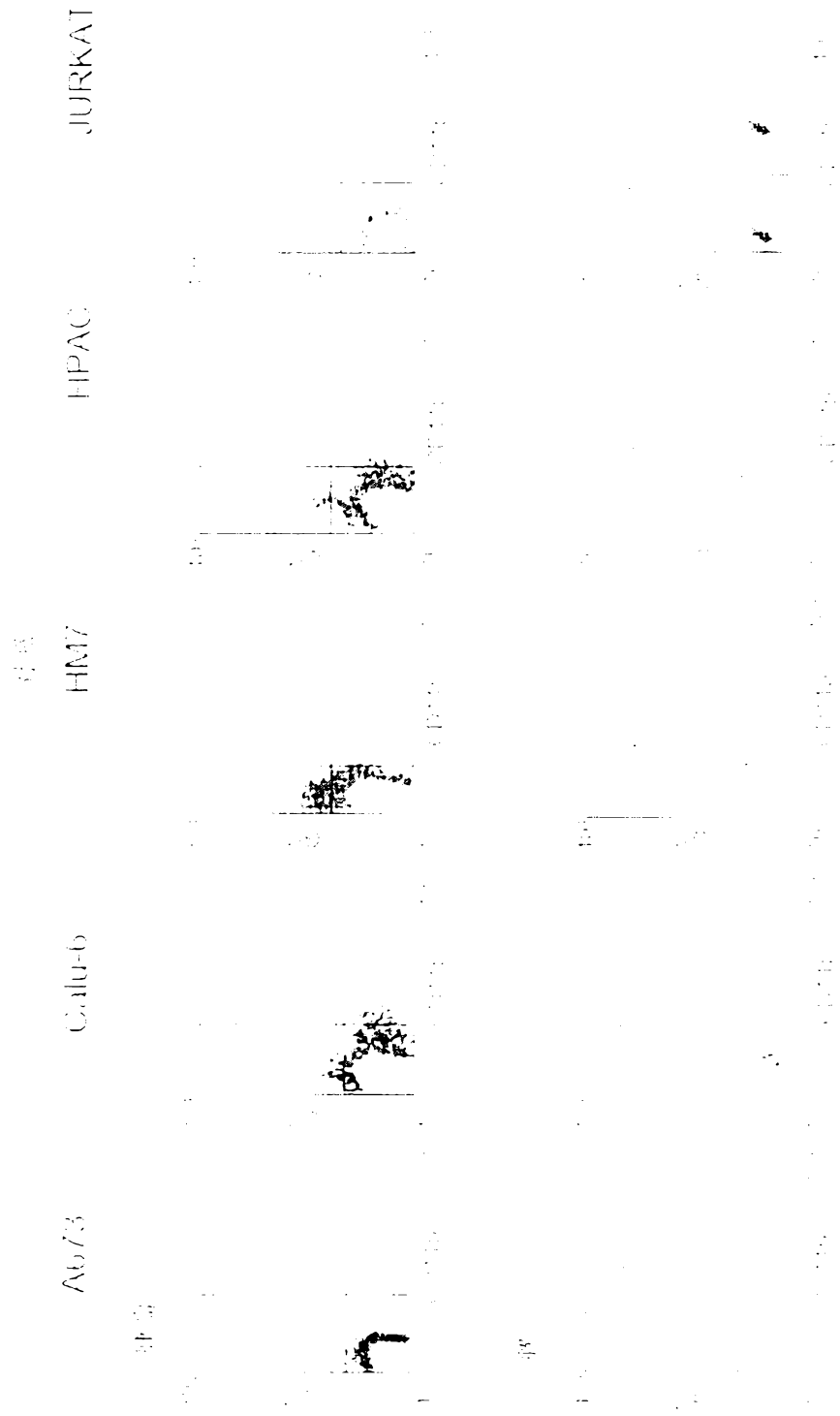


圖 24d

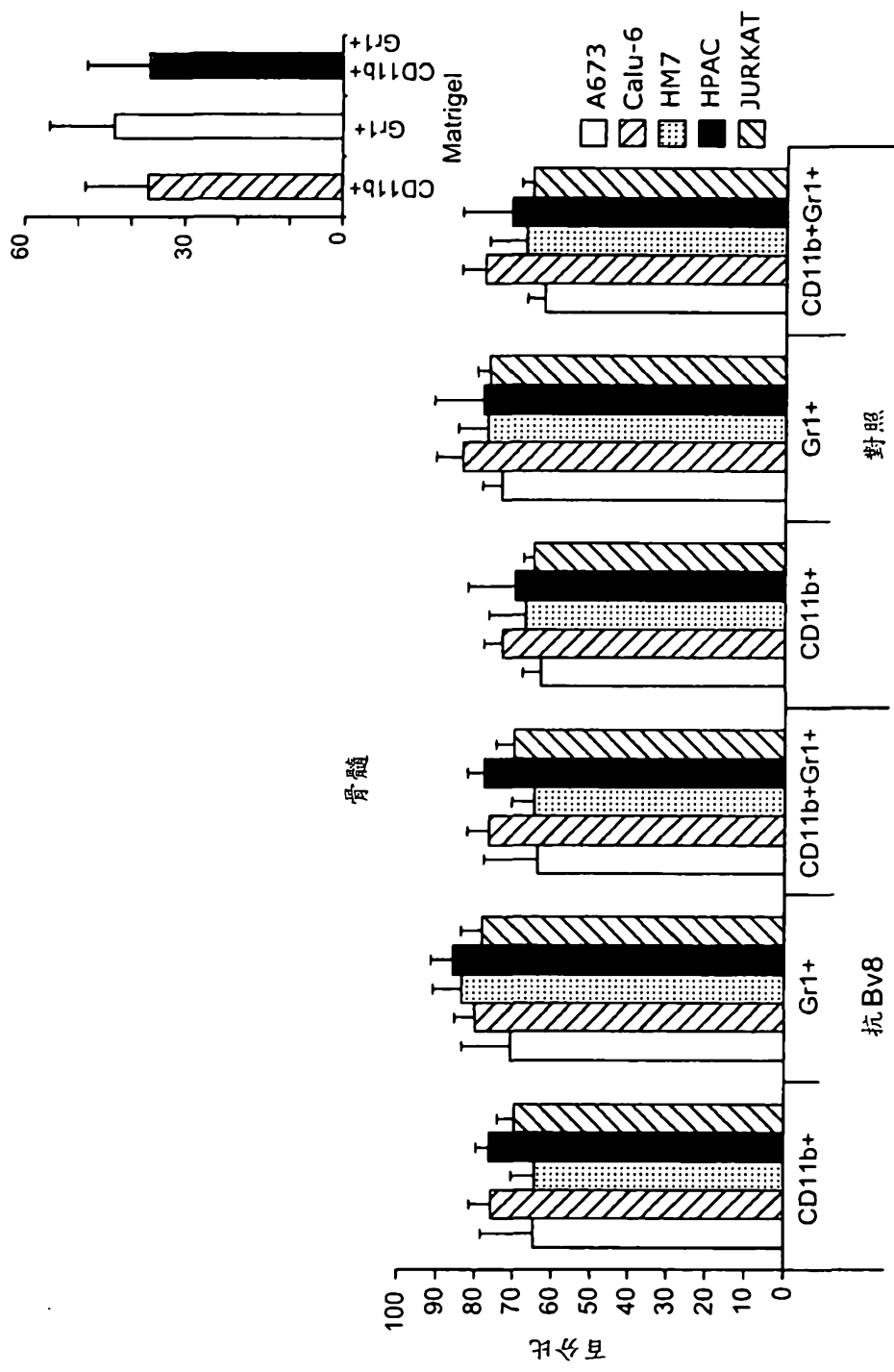


圖 25a

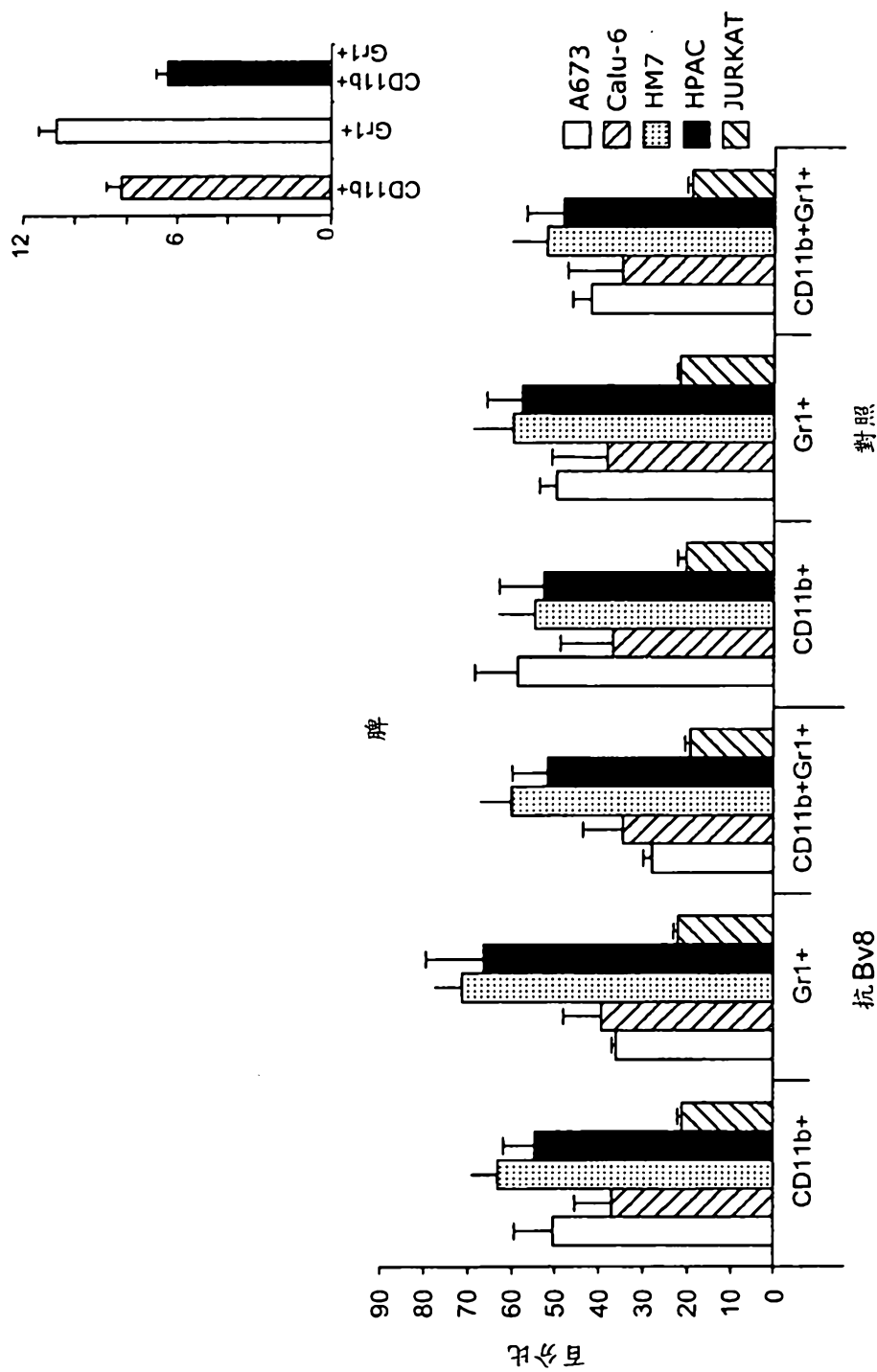


圖 25b

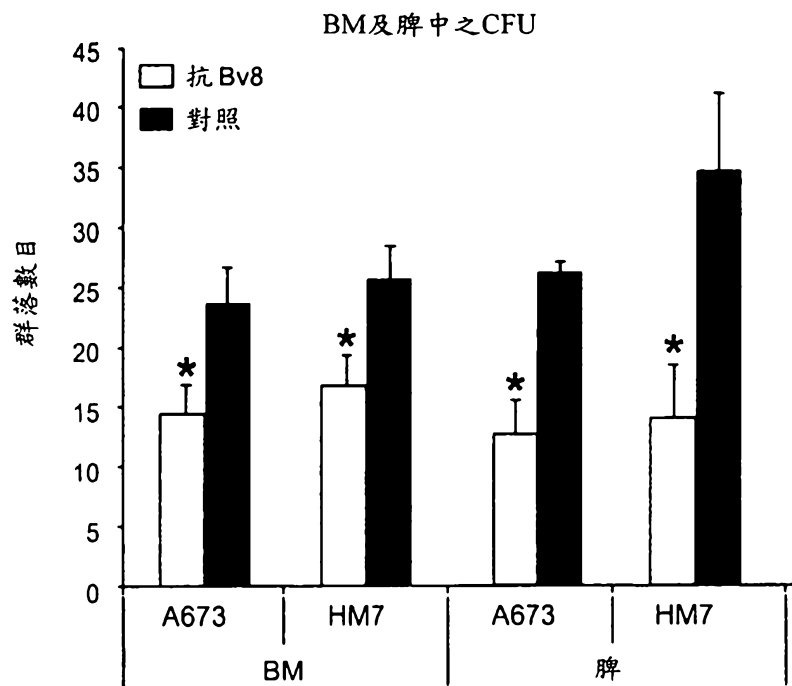


圖 25c

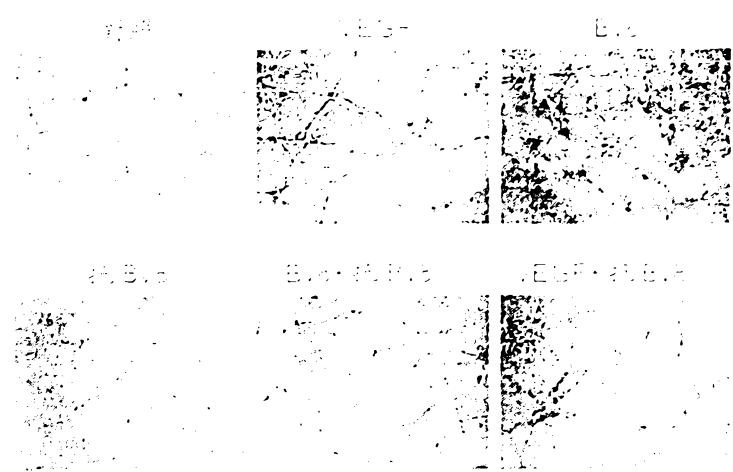


圖 26a

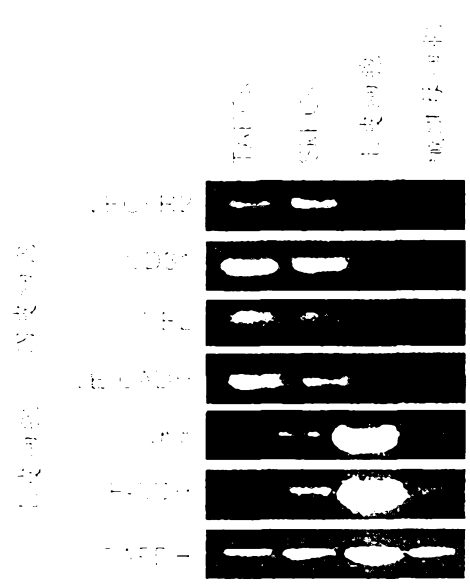
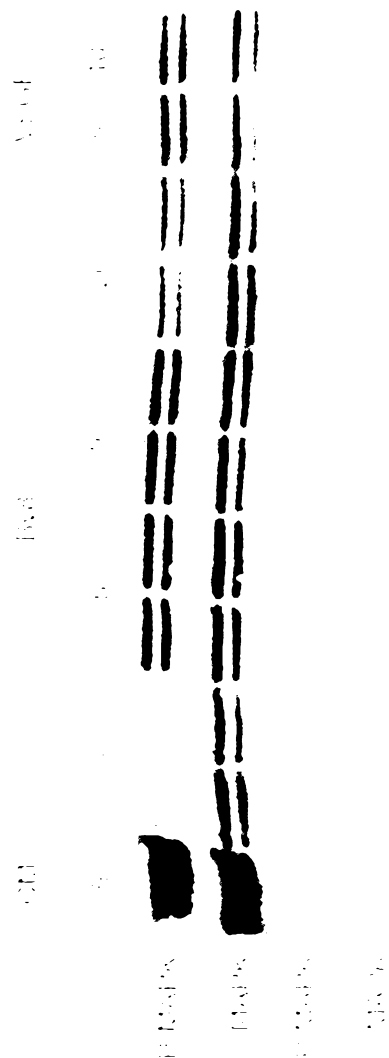


圖 26b



說明書, 頁 185

圖 26c

不含血清之培養基中腫瘤細胞之增殖

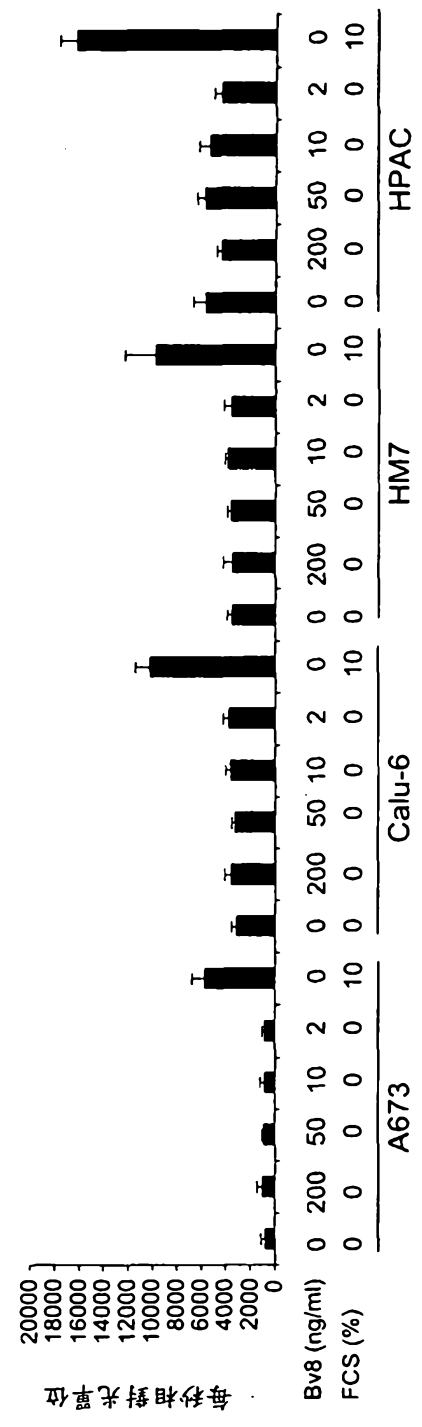


圖 26d

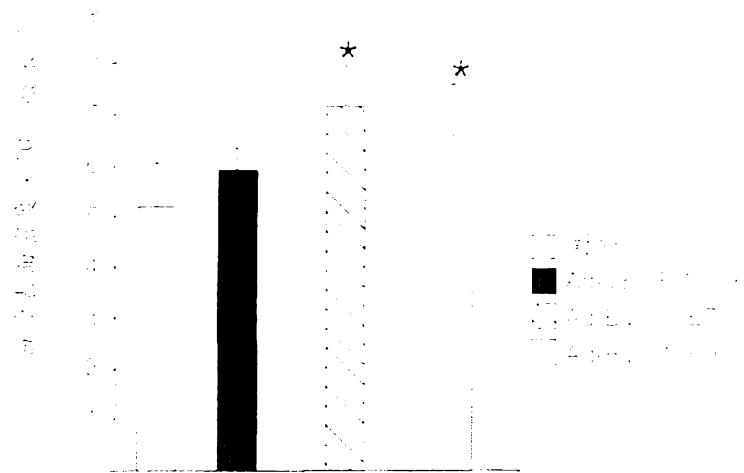


圖 27a



圖 27b

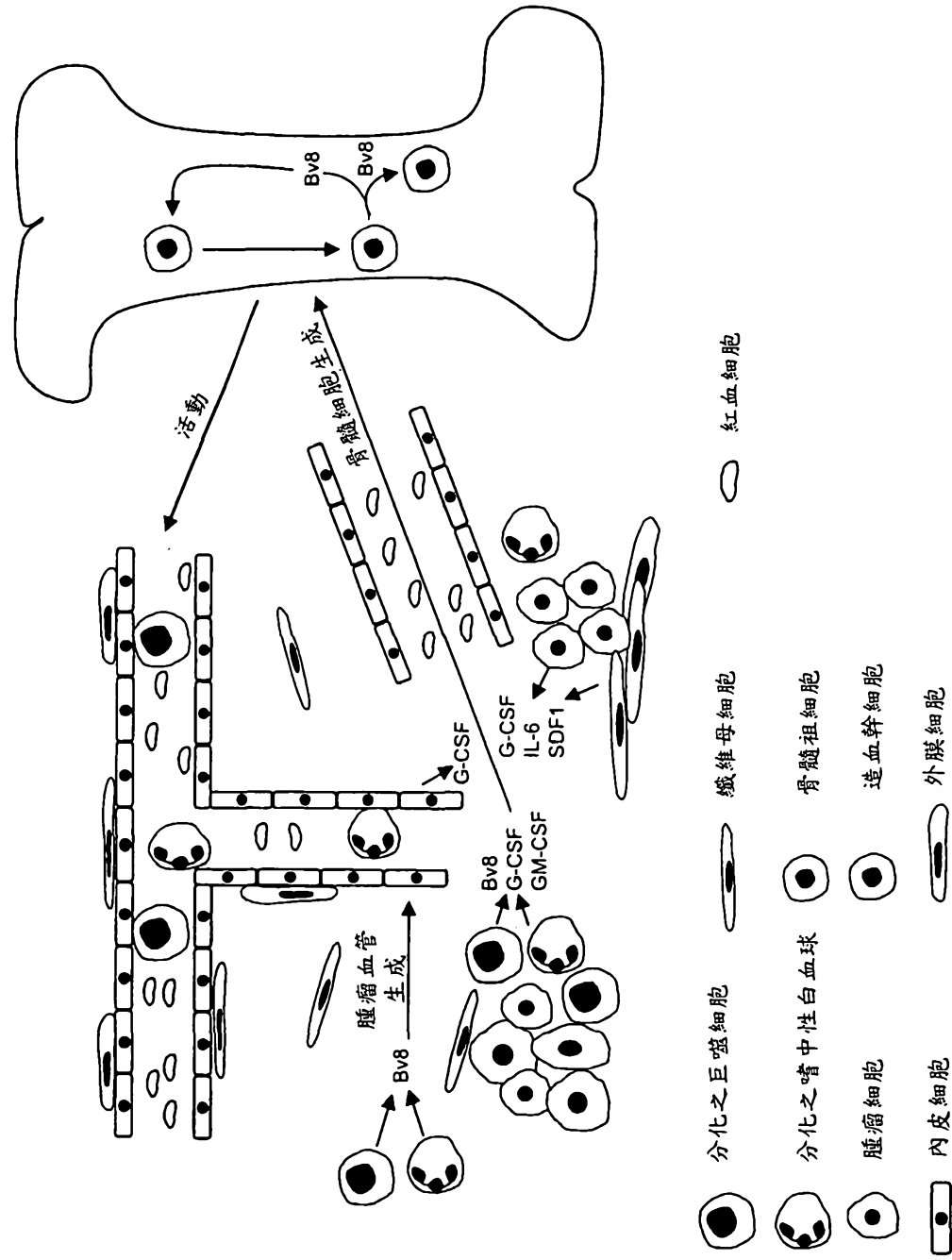


圖 28

調節培養基中來自由異種移植物分離及培養之人類腫瘤細胞或腫瘤相關小鼠
纖維母細胞的細胞因子含量

來源	IL-6	G-CSF	SDF-1
A673	138.7	20.6	15.6
HM7	1.1	1.3	16.4
HPAC	398.2	11.1	30.4
Calu-6	65	8.3	59.2
HM7 來源之纖維母細胞	892.1	60	27000
HPAC 來源之纖維母細胞	789.2	37.1	18000
Calu-6 來源之纖維母細胞	1487.7	163	17800

值 (皮克/ 3×10^5 個細胞) 為改變 <10% 之雙重複測定之平均值
針對各細胞因子執行合適物種特異性檢定

圖 29a

細胞株	細胞類型	G-CSF	GM-CSF
HL-60	前骨髓母細胞	1.1	0.8
KG-1	骨髓母細胞	1.9***	0.5
Hel 92.1.7	骨髓紅血球母細胞	3.3***	0.2
U-937	單核細胞	2.2***	1.5
Jurkat	T 淋巴細胞	0	0
K562	骨髓淋巴母細胞	0	0

圖 29b