



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102573909 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201080046452. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 08. 11

A61K 39/395 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/234, 281 2009. 08. 15 US

61/266, 343 2009. 12. 03 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 16

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/045147 2010. 08. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02011/022264 EN 2011. 02. 24

(71) 申请人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 R. 斯瓦米 J. 汉布尔顿

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春

权利要求书 2 页 说明书 41 页

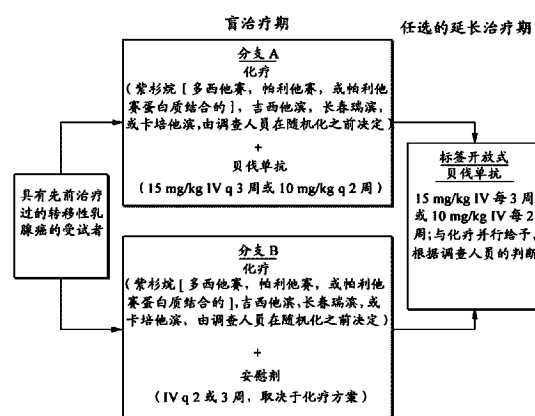
序列表 2 页 附图 4 页

(54) 发明名称

抗血管发生疗法用于治疗先前治疗过的乳腺癌

(57) 摘要

一般地, 本发明关注用抗 VEGF 抗体治疗疾病和病理状况。更具体地, 本发明关注在先前治疗过的转移性乳腺癌中与一种或多种别的抗肿瘤治疗剂组合使用抗 VEGF 抗体治疗对癌症易感或诊断有癌症的人患者。



1. 一种治疗诊断有转移性先前治疗过的乳腺癌的患者的方法,包括对患者进行组合化疗与施用有效量抗 VEGF 抗体的治疗方案,其中该治疗方案的治疗包括施用至少一种化疗剂,且其中该治疗方案有效延长患者的无进展存活。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述抗 VEGF 抗体与由杂交瘤 ATCC HB 10709 生成的单克隆抗 VEGF 抗体 A4.6.1 结合相同表位。

3. 权利要求 1 的方法,其中该抗 VEGF 抗体是人源化抗体。

4. 权利要求 2 的方法,其中该抗 VEGF 抗体是人源化 A4.6.1 抗体或其片段。

5. 权利要求 3 的方法,其中该抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。

6. 权利要求 1 的方法,其中该患者的无进展存活与单独用化疗治疗的另一患者相比延长至少约 2.1 个月或更长。

7. 权利要求 3 的方法,其中该抗 VEGF 抗体具有包含下述氨基酸序列的重链可变区:

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

和包含下述氨基酸序列的轻链可变区:

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

8. 一种用于在人患者中治疗先前治疗过的转移性乳腺癌的试剂盒,该试剂盒包括一种包装,该包装包含抗 VEGF 抗体组合物和与化疗组合使用该抗 VEGF 抗体组合物的说明书,其中该说明书记载接受化疗和贝伐单抗的患者的无进展存活是 7.2 个月及危害比 0.775 和 p 值 0.0072。

9. 权利要求 8 的试剂盒,其中该抗 VEGF 抗体具有包含下述氨基酸序列的重链可变区:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW
INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP
HYYGSSHWF DVWGQGTLLV VSS (SEQ ID No. 1)

和包含下述氨基酸序列的轻链可变区:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKVLIIYF
TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ
GTKVEIKR (SEQ ID No. 2)。

10. 权利要求 8 的试剂盒,其中该抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。

11. 一种指导具有癌症的人受试者的方法,该方法包括提供进行抗 VEGF 抗体对先前治疗过的转移性乳腺癌的乳腺癌治疗,从而延长患者的无进展存活的说明书。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述说明书进一步包括提供进行至少一种化疗剂的治疗的说明。

13. 权利要求 12 的方法,其中该抗 VEGF 抗体的治疗与该化疗剂的治疗并行。

14. 一种宣传方法,包括宣传在具有先前治疗过的转移性乳腺癌的人受试者中施用抗 VEGF 抗体治疗乳腺癌,从而延长患者的无进展存活。

15. 权利要求 14 的方法,其中该方法进一步包括宣传施用至少一种化疗剂。

16. 权利要求 15 的方法,其中该抗 VEGF 抗体的施用与该化疗剂的施用并行。
17. 权利要求 14 的方法,其中该宣传是通过包装插页进行,其中该包装插页提供接受抗 VEGF 抗体来进行癌症治疗的说明书。
18. 权利要求 14 的方法,其中该宣传是通过伴随该抗 VEGF 抗体之商业性配制剂的包装插页来进行的。
19. 权利要求 14 的方法,其中该宣传是通过伴随该化疗剂之商业性配制剂的包装插页来进行的。
20. 权利要求 14 的方法,其中该宣传是通过书面告知内科医师或健康护理提供者来进行的。
21. 权利要求 14 的方法,其中该宣传是通过口头告知内科医师或健康护理提供者来进行的。
22. 权利要求 14 的方法,其中该宣传之后是用该抗 VEGF 抗体治疗受试者。
23. 权利要求 15 的方法,其中该宣传之后是用该抗 VEGF 抗体和该化疗剂治疗受试者。
24. 一种商业方法,包括销售抗 VEGF 抗体,用于在具有先前治疗过的转移性乳腺癌的人受试者中治疗乳腺癌,从而延长患者的无进展存活。
25. 权利要求 24 的方法,其中该方法进一步包括销售化疗剂,用于与该抗 VEGF 抗体组合使用。
26. 权利要求 24 的方法,其中该销售之后用该抗 VEGF 抗体治疗受试者。
27. 权利要求 24 的方法,其中该销售之后用该抗 VEGF 抗体和该化疗剂治疗受试者。
28. 一种商业方法,包括与抗 VEGF 抗体组合销售化疗剂,用于在具有先前治疗过的转移性乳腺癌的人受试者中治疗乳腺癌,从而延长患者的无进展存活。
29. 权利要求 28 的方法,其中该销售之后用该化疗剂和该抗 VEGF 抗体的组合治疗受试者。

抗血管发生疗法用于治疗先前治疗过的乳腺癌

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2009 年 12 月 3 日提交的美国临时申请流水号 61/266, 343 和 2009 年 8 月 15 日提交的美国临时申请流水号 61/234, 281 的优先权和权益, 将其说明书完整收入本文。

发明领域

[0003] 一般地, 本发明涉及人疾病和病理状况的治疗。更具体地, 本发明涉及抗血管发生疗法单独或与其它抗癌疗法组合在治疗先前治疗过的乳腺癌中的用途。

[0004] 发明背景

[0005] 癌症仍然是对人类健康的最致命威胁之一。在美国, 癌症每年影响近 130 万新患者, 而且是位于心脏病之后的第二位死因, 占 4 例死亡中的大约 1 例。还预测癌症可能在 5 年内超越心血管疾病成为第一位死因。实体瘤对大多数上述死亡负有责任。虽然某些癌症的医学治疗中已经取得了重大进步, 但是所有癌症的总体 5 年存活率在最近 20 年里只改进了约 10%。癌症 (或称作恶性肿瘤) 以不受控制的方式快速生长和转移, 使得及时检测和治疗极端困难。

[0006] 乳腺癌是在美国每年杀死许多女性的一种疾病。根据美国癌症学会, 大约 40, 000 人会在 2008 年死于该疾病。每年诊断超过 180, 000 例乳腺癌新病例, 而且估计 8 位女性中 1 位会发生乳腺癌。这些数目指示乳腺癌是今天女性面对的最危险疾病之一。转移性乳腺癌一般是不能治愈的, 只有少数患者在标准化疗之后实现长期存活 (Greenberg et al., J. Clin. Oncol. 14 :2197-2205 (1996))。

[0007] 乳腺癌的基础生物学的知识在过去三十年里指数式扩增, 其中一些对疗法具有影响。使用针对 HER2 的重组人源化单克隆抗体 (曲妥单抗, 也称作 **Herceptin®**, Genentech, South San Francisco), 222 名具有过表达 HER2 的转移性乳腺癌的女性的一项多国标签开放式 II 期试验发现了 15% 的响应率及 6 例经过验证的完全响应 (Cobleigh et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 17 :97 (1998))。一项随机化 III 期试验评估了将 Herceptin 添加至帕利他赛的或多柔比星加环磷酰胺组合的一线化疗的安全性和功效。将 Herceptin 添加至化疗时总体响应率和距进展时间与单独的化疗相比显著改善 (Slamon et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 17 :98 (1998))。Herceptin 的添加延长了总体存活 (Norton et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. 18 :127a (1999))。

[0008] 虽然曲妥单抗是第一种批准用于治疗具有过表达 HER2 的癌症的乳腺癌患者亚群的新型的基于生物学的治疗剂, 但是数种其它办法已经显示出希望, 而且已经进入临床。然而, 估计新诊断为转移性乳腺癌的女性中 75% 是 HER2 阴性的。抑制血管发生的化合物已经引起到达别的乳腺癌群体的特别兴趣, 而且已经成为美国和外国临床试验的主题。

[0009] 由于癌症仍然是最致命威胁之一, 因此患者需要别的癌症疗法。本发明解决这些和其它需要, 正如阅读下述公开后会显而易见的。

[0010] 发明概述

[0011] 提供抗 VEGF 抗体有效治疗具有先前治疗过的转移性乳腺癌的乳腺癌患者的用途。特别地,本发明提供来自人受试者中具有先前治疗过的转移性乳腺癌的受试者中贝伐单抗 (bevacizumab, **AVASTIN®**) 与化疗方案组合的一项随机化 III 期临床试验的数据。所述化疗方案包括紫杉烷疗法 (例如帕利他赛 q3wk 或每周一次,帕利他赛蛋白质结合颗粒 (例如 **Abraxane®**) 或多西他赛)、吉西他滨、长春瑞滨或卡培他滨疗法。该试验的成功显示将抗 VEGF 抗体添加至化疗提供统计上显著的且临床上有意义的好处,作为先前治疗过的乳腺癌患者的二线疗法。

[0012] 在具有转移性乳腺癌的人受试者中使用贝伐单抗的临床研究中获得的结果显示功效 (如通过无进展存活 (PFS) 评估的) 是正的,尤其是与单独的化疗剂的 PFS 数据相比。临床试验中与化疗 (紫杉烷疗法、卡培他滨、吉西他滨或长春瑞滨) 组合接受贝伐单抗的受试者具有与单独用化疗治疗的受试者相比延长的无进展存活。该差异在统计上是显著的。

[0013] 因而,本发明提供一种治疗诊断有先前治疗过的转移性乳腺癌的患者的方法,包括对患者进行化疗与施用有效量抗 VEGF 抗体相组合的治疗方案。将化疗与施用抗 VEGF 的相组合的治疗方案有效延长患者的无进展存活 (Progression free survival, PFS)。

[0014] 在某些实施方案中, PFS 延长约 0.5 个月、1 个月、1.2 个月、2 个月、2.1 个月、2.2 个月、2.8 个月、3 个月、等。在一个实施方案中, PFS 延长约 2.1 个月。在一个实施方案中, PFS 延长约 2.2 个月。在一个实施方案中, PFS 延长约 2.8 个月。

[0015] 可以依照本发明使用任何展现抗癌活性的化疗剂。在某些实施方案中,化疗剂选自下组:烷化剂、抗代谢物、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物及相关抑制剂、长春花生物碱、表鬼臼毒素、抗生素、L-天冬酰胺酶、拓扑异构酶抑制剂、干扰素、铂配位复合物、葱二酮取代脲、甲胍衍生物、肾上腺皮质阻抑剂、肾上腺皮质类固醇、妊娠素、雌激素、抗雌激素、雄激素、抗雄激素、和促性腺素释放激素类似物。在某些实施方案中,化疗剂是例如卡培他滨、紫杉烷、帕利他赛、多西他赛、帕利他赛蛋白质结合颗粒 (例如 **Abraxane®**)、吉西他滨、长春瑞滨或其组合。在某些实施方案中,化疗剂是例如卡培他滨、紫杉烷、帕利他赛、多西他赛、帕利他赛蛋白质结合颗粒 (例如 **Abraxane®**)、吉西他滨、或其组合。在某些实施方案中,化疗剂是例如卡培他滨、紫杉烷、帕利他赛、多西他赛蛋白质结合颗粒 (例如 **Abraxane®**)、或其组合。可以在要与抗 VEGF 抗体施用组合施用的混合物中使用两种或更多种化疗剂。

[0016] 依照本发明的治疗的临床好处可以通过例如无进展存活 (PFS) 的持续时间、治疗失败的时间、客观响应率响应的持续时间来测量。

[0017] 因而,本发明的特征在于一种指导具有先前治疗过的癌症 (例如乳腺癌) 的人受试者的方法,其通过提供说明书来接受抗 VEGF 抗体的治疗,从而延长受试者无进展存活的时间、降低受试者癌症复发的可能性、或提高受试者存活的可能性。在一些实施方案中,该方法进一步包括提供说明书来接受至少一种化疗剂的治疗。抗 VEGF 抗体的治疗可以与化疗剂的治疗并行或序贯进行。在某些实施方案中,如指导方法指导的那样治疗受试者。

[0018] 本发明还提供一种宣传方法,包括宣传施用抗 VEGF 抗体来在人受试者中治疗先前治疗过的癌症 (例如乳腺癌)。在一些实施方案中,该方法进一步包括宣传施用至少一种化疗剂。抗 VEGF 抗体的施用可以与化疗剂的施用并行或序贯进行。所述宣传可以通过任何可得手段来进行。在一些实施方案中,所述宣传通过伴随抗 VEGF 抗体之商业性配制剂的

包装插页来进行。所述宣传也可以通过伴随化疗剂之商业性配制剂的包装插页来进行。所述宣传可以通过书面或口头告知内科医师或健康护理提供者来进行。在一些实施方案中,所述宣传通过包装插页来进行,其中包装插页提供说明书来接受抗 VEGF 抗体的疗法。在一些实施方案中,所述宣传之后是在有或无化疗剂的情况中用抗 VEGF 抗体治疗受试者。

[0019] 本发明提供一种商业方法,包括销售抗 VEGF 抗体,用于在人受试者中治疗先前治疗过的癌症(例如乳腺癌),从而延长无进展存活、降低受试者癌症复发的可能性、或提高受试者存活的可能性。在一些实施方案中,该方法进一步包括销售化疗剂,用于与抗 VEGF 抗体组合使用。在一些实施方案中,销售之后是在有或无化疗剂的情况中用抗 VEGF 抗体治疗受试者。

[0020] 还提供一种商业方法,包括与抗 VEGF 抗体组合销售化疗剂,用于在人受试者中治疗先前治疗过的癌症(例如乳腺癌),从而延长无进展存活、降低受试者癌症复发的可能性、或提高受试者存活的可能性。在一些实施方案中,销售之后用化疗剂和抗 VEGF 抗体的组合治疗受试者。

[0021] 在本发明的每一种方法中,抗 VEGF 抗体可替换为 VEGF 特异性拮抗剂,例如下文所述 VEGF 受体分子或嵌合 VEGF 受体分子。在本发明方法的某些实施方案中,抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段可以是单克隆抗体、嵌合抗体、完全人的抗体、或人源化抗体。在本发明的方法中有用的例示性抗体包括贝伐单抗(AVASTIN®)、G6 抗体、B20 抗体、及其片段。在某些实施方案中,抗 VEGF 抗体具有包含下述氨基酸序列的重链可变区:

[0022] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWRQA PGKGLEWVGW

[0023] INTYTGEPTY AADFRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP

[0024] HYYGSSHWF DVWGQGTLLV VSS(SEQ ID No. 1)

[0025] 和包含下述氨基酸序列的轻链可变区:

[0026] DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQK GKAPKVLIFY

[0027] TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ

[0028] GTKVEIKR(SEQ ID No. 2)。

[0029] 抗体或其抗原结合片段也可以是缺少 Fc 部分的抗体、F(ab')₂、Fab、或 Fv 结构。

[0030] 在一个实施方案中,治疗是 VEGF 特异性拮抗剂(例如抗 VEGF 抗体)和至少一种化疗剂的组合。

[0031] 可以关于癌症治疗来实践本发明的每一种方法,包括但不限于癌瘤、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、和白血病。此类癌症的更特别例子包括乳腺癌、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、肺的鳞癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝肉瘤(hepatoma)、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、肾癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、胃癌、黑素瘤、和各种类型的头颈癌。在一些实施方案中,受试者具有 HER2 阴性转移性先前治疗过的乳腺癌。

[0032] 上述每一个方面可进一步包括对受试者监测癌症复发。监测可例如通过评估无进展存活(PFS)或总体存活(OS)或客观响应率(ORR)来实现。在一个实施方案中,在治疗启动之后评估 PFS 或 OS 或 ORR。

[0033] 根据疾病的类型和严重性,抗 VEGF 抗体(例如贝伐单抗)的优选剂量在本文中有

描述,而且范围可以为约 1 μ g/kg 至约 50mg/kg,最优选约 5mg/kg 至约 15mg/kg,包括但不限于 5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg 或 15mg/kg。施药频率会随疾病的类型和严重性而变化。对于几天或更长时间里的重复施用,根据状况,治疗为持续直到癌症得到治疗或实现期望治疗效果,如通过本文所述或本领域已知方法测量的。在一个例子中,本发明的抗 VEGF 抗体每周、每两周、或每三周施用一次,剂量范围为约 5mg/kg 至约 15mg/kg,包括但不限于 5mg/kg、7.5mg/kg、10mg/kg 或 15mg/kg。然而,其它剂量方案可以是有用的。本发明疗法的进展易于通过常规技术和测定法来监测。

[0034] 在上述每一个方面别的实施方案中,局部或系统(例如口服或静脉内)施用 VEGF 特异性拮抗剂(例如抗 VEGF 抗体)。在其它实施方案中,治疗的一个方面是在延长治疗期或维持疗法中用 VEGF 特异性拮抗剂,如由临床医师评估或如本文所述的。

[0035] 在其它实施方案中,VEGF 特异性拮抗剂对先前治疗过的转移性乳腺癌的治疗与别的抗癌疗法组合,包括但不限于手术、放疗、化疗、分化疗法、生物疗法、免疫疗法、血管发生抑制剂、细胞毒剂和抗增殖化合物。VEGF 特异性拮抗剂治疗还可包括上述类型的治疗方案的任何组合。在一些实施方案中,化疗剂和 VEGF 特异性拮抗剂并行施用。

[0036] 在包括别的抗癌疗法的实施方案中,可以在施用 VEGF 特异性拮抗剂之前、期间(例如同时)、或之后用别的抗癌疗法来进一步治疗受试者。在一个实施方案中,单独或与抗癌疗法一起施用的 VEGF 特异性拮抗剂可以作为维持疗法来施用。

[0037] 根据详述、附图、和权利要求,本发明的其它特征和优点会是显而易见的。

[0038] 附图简述

[0039] 图 1 描绘使用贝伐单抗(分支 A)或安慰剂(分支 B)与各种化疗的先前治疗过的转移性乳腺癌试验的研究设计。

[0040] 图 2 描绘图 1 中研究的 PFS 的主要终点分析。

[0041] 图 3 描绘图 1 中研究的 PFS 的分组特异性分析。

[0042] 图 4 描绘图 1 中研究的客观响应率。

[0043] 发明详述

[0044] I. 定义

[0045] 术语“VEGF”或“VEGF-A”用于指 165 个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子及相关的 121 个、145 个、189 个和 206 个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子,如例如 Leung et al. Science, 246:1306(1989);及 Houck et al. Mol. Endocrin., 5:1806(1991) 所述,及其天然存在的等位基因形式和加工形式。VEGF-A 是包括 VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、VEGF-F 和 PlGF 在内的基因家族的一部分。VEGF-A 主要结合两种高亲和力受体酪氨酸激酶,即 VEGFR-1(Flt-1) 和 VEGFR-2(Flk-1/KDR),后者是 VEGF-A 血管内皮细胞有丝分裂信号的主要递质。另外,神经毡蛋白-1 已经被鉴定为肝素结合 VEGF-A 同种型(isoform)的受体,而且可在血管发育中发挥作用。术语“VEGF”或“VEGF-A”还指来自非人物种诸如小鼠、大鼠或灵长类动物的 VEGF。有时,来自特定物种的 VEGF 表示如下,hVEGF 表示人 VEGF, mVEGF 表示鼠 VEGF。术语“VEGF”还用于指包含 165 个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子的氨基酸第 8-109 位或第 1-109 位的截短形式多肽。本申请中可能通过例如“VEGF(8-109)”、“VEGF(1-109)”或“VEGF₁₆₅”来鉴别任何此类形式 VEGF。“截短的”天然 VEGF 的氨基酸位置如天然 VEGF 序列中所示编号。例如,截短的天然 VEGF 中的第 17 位氨基酸(甲硫氨酸)也

是天然 VEGF 中的第 17 位（甲硫氨酸）。截短的天然 VEGF 具有与天然 VEGF 相当的对 KDR 和 Flt-1 受体的结合亲和力。

[0046] “抗 VEGF 抗体”指以足够亲和力和特异性结合 VEGF 的抗体。所选择的抗体通常会具有对 VEGF 的结合亲和力，例如，该抗体可以以介于 100nM-1pM 之间的 Kd 值结合 hVEGF。抗体亲和力可通过例如基于表面等离子共振的测定法（诸如 PCT 申请公开文本 No. WO2005/012359 中所记载的 BIAcore 测定法）；酶联免疫吸附测定法（ELISA）；和竞争测定法（例如 RIA）来测定。在某些实施方案中，本发明的抗 VEGF 抗体可用作治疗剂，用于靶向和干扰其中涉及 VEGF 活性的疾病或疾患。还有，可对该抗体进行其它生物学活性测定法，例如为了评估其作为治疗剂的效力所进行的生物学活性测定法。此类测定法是本领域已知的，而且取决于抗体的靶抗原和预定用途。例子包括但不限于 HUVEC 抑制测定法；肿瘤细胞生长抑制测定法（如例如 WO 89/06692 中所记载的）。抗 VEGF 抗体通常不会结合其它 VEGF 同系物，诸如 VEGF-B 或 VEGF-C，也不会结合其它生长因子，诸如 PlGF、PDGF 或 bFGF。

[0047] “VEGF 拮抗剂”指能够中和、阻断、抑制、消除、降低或干扰 VEGF 活性（包括其与一种或多种 VEGF 受体的结合）的分子。VEGF 拮抗剂包括抗 VEGF 抗体及其抗原结合片段、特异性结合 VEGF 由此使其隔绝与一种或多种受体结合的受体分子及衍生物、抗 VEGF 受体抗体和 VEGF 受体拮抗剂诸如 VEGFR 酪氨酸激酶的小分子抑制剂。

[0048] “天然序列”多肽包括与衍生自自然界的多肽具有相同氨基酸序列的多肽。如此，天然序列多肽可以具有来自任何哺乳动物的天然存在多肽的氨基酸序列。此类天然序列多肽可以从自然界分离，或者可以通过重组或合成手段来生产。术语“天然序列”多肽明确涵盖该多肽的天然存在的截短或分泌形式（例如胞外结构域序列）、天然存在的变体形式（例如可变剪接形式）、及天然存在的等位变体。

[0049] 多肽“变体”意指与天然序列多肽具有至少约 80% 氨基酸序列同一性的生物学活性多肽。此类变体包括例如在多肽的 N- 末端或 C- 末端添加或删除一个或多个氨基酸残基的多肽。通常，变体与天然序列多肽将具有至少约 80% 的氨基酸序列同一性，更优选的是，至少约 90% 的氨基酸序列同一性，和甚至更优选的是，至少约 95% 的氨基酸序列同一性。

[0050] 术语“抗体”在本文中以最广义使用，包括单克隆抗体（包括全长或完整单克隆抗体）、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）、及抗体片段（见下文），只要它们展现出期望的生物学活性。

[0051] 贯穿说明书和权利要求书，本文中免疫球蛋白重链残基的编号方式是如 Kabat 等，《Sequences of Proteins of Immunological Interest》，第 5 版，PublicHealth Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) 中的 EU 索引的编号方式，明确收入本文作为参考。“如 Kabat 中的 EU 索引”指人 IgG1 EU 抗体的残基编号方式。

[0052] 在一个实施方案中，依照本发明的“Kd”或“Kd 值”是通过如下测定法所述使用 Fab 型式的抗体和 VEGF 分子进行的放射性标记 VEGF 结合测定法（RIA）来测量的：通过在存在未标记 VEGF 的滴定系列的条件下，用最小浓度的 ¹²⁵I 标记 VEGF(109) 平衡 Fab，然后用抗 Fab 抗体包被的平板捕捉结合的 VEGF 来测量 Fab 对 VEGF 的溶液结合亲和力（Chen, et al., J Mol Biol 293 :865-881(1999)）。在一个例子中，为了确定测定条件，用 50mM 碳酸钠（pH 9.6）中的 5 μg/ml 捕捉用抗 Fab 抗体（Cappel Labs）包被微量滴定板（Dynex）过夜，随后用 PBS 中的 2%（w/v）牛血清清蛋白在室温（约 23℃）封闭 2-5 小时。在非吸

附平板 (Nunc#269620) 中, 将 100pM 或 26pM [125 I]-VEGF(109) 与连续稀释的目的 Fab (例如 Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599(1997) 中的 Fab-12) 混合。然后将目的 Fab 保温过夜; 不过, 保温可持续 65 个小时以保证达到平衡。此后, 将混合物转移至捕捉板以进行室温保温 1 小时。然后除去溶液, 并用含 0.1% Tween® 20 的 PBS 洗板 8 次。平板干燥后, 加入 150 μ l/孔闪烁液 (MicroScint-20; Packard), 然后在 Topcount 伽马计数器 (Packard) 上对平板计数 10 分钟。选择各 Fab 给出小于或等于最大结合之 20% 的浓度用于竞争性结合测定法。依照另一实施方案, K_d 或 K_d 值是通过表面等离子共振测定法使用 BIAcore™-2000 或 BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 在 25°C 使用固定化 hVEGF(8-109) CM5 芯片在约 10 个响应单位 (RU) 测量的。简而言之, 依照供应商的说明书用盐酸 N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。用 10mM 乙酸钠 pH 4.8 将人 VEGF 稀释至 5 μ g/ml (约 0.2 μ M), 然后以 5 μ l/分钟的流速注入至获得约 10 个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入人 VEGF 后, 注入 1M 乙醇胺以封闭未反应基团。为了进行动力学测量, 在 25°C 以约 25 μ l/分钟的流速注入在含 0.05% Tween® 20 的 PBS (PBST) 中两倍连续稀释的 Fab (0.78nM 至 500nM)。使用简单一对朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (BIAcore Evaluation Software version 3.2) 通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。平衡解离常数 (K_d) 以比率 k_{off}/k_{on} 计算。参见例如 Chen, Y., et al., J Mol Biol 293:865-881(1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法, 结合速率超过 $10^6 M^{-1} S^{-1}$, 那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定, 即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (astop-flow equipped spectrophotometer) (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco™ 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用搅拌比色杯的测量, 在存在浓度渐增的人 VEGF 短形式 (8-109) 或小鼠 VEGF 的条件下, 测量 PBS, pH 7.2 中的 20nM 抗 VEGF 抗体 (Fab 形式) 在 25°C 的荧光发射强度 (激发 = 295nm; 发射 = 340nm, 16nm 带通 (band pass)) 的升高或降低。依照本发明的“ K_d ”或“ K_d 值”在一个实施方案中通过本领域已知技术来测量。

[0053] “阻断性”抗体或抗体“拮抗剂”指抑制或降低其所结合的抗原的生物学活性的抗体。例如, VEGF 特异性拮抗性抗体结合 VEGF 并抑制 VEGF 诱导血管内皮细胞增殖或诱导血管通透性的能力。优选的阻断性抗体或拮抗性抗体完全抑制抗原的生物学活性。

[0054] 除非另有说明, 表述“多价抗体”贯穿本说明书用于指包含三个或更多抗原结合位点的抗体。例如, 多价抗体改造成具有三个或更多个抗原结合位点, 而且一般不是天然序列 IgM 或 IgA 抗体。

[0055] “抗体片段”只包含完整抗体的一部分, 一般包括完整抗体的抗原结合位点, 因此保留了与抗原结合的能力。此定义所涵盖的抗体片段的例子包括: (i) Fab 片段, 其具有 VL、CL、VH 和 CH1 结构域; (ii) Fab' 片段, 其是在 CH1 结构域的 C-末端具有一个或多个半胱氨酸残基的 Fab 片段; (iii) Fd 片段, 其具有 VH 和 CH1 结构域; (iv) Fd' 片段, 其具有 VH 和 CH1 结构域及 CH1 结构域 C-末端的一个或多个半胱氨酸残基; (v) Fv 片段, 其具有抗体单臂的 VL 和 VH 结构域; (vi) dAb 片段 (Ward et al., Nature 341:544-546(1989)), 其由 VH 结构域组成; (vii) 分离的 CDR 区; (viii) F(ab')₂ 片段, 包含通过铰链区的二硫键相连的两个 Fab' 片段的二价片段; (ix) 单链抗体分子 (例如单链 Fv; scFv) (Bird et al., Science

242:423-426(1988) 和 Huston et al., PNAS(USA) 85:5879-5883(1988));(x) “双抗体”, 其具有两个抗原结合位点, 包含在同一条多肽链中相连的重链可变域 (VH) 和轻链可变域 (VL) (参见例如 EP 404, 097; W093/11161; 和 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448(1993));(xi) “线性抗体”, 其包含一对串联的 Fd 区段 (VH-CH1-VH-CH1), 与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区 (Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062(1995) 和美国专利 5, 641, 870)。

[0056] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体, 即构成群体的各抗体个体是相同的, 除了可以以极小量存在的可能的天然存在突变形式外。单克隆抗体是高度特异性的, 针对单一抗原。此外, 与典型的包含针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体的多克隆抗体制备物不同, 每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如, 将依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由 Kohler 等 Nature 256:495, (1975) 记载的杂交瘤方法来制备, 或者可通过重组 DNA 方法来制备 (参见例如美国专利 No. 4, 816, 567)。“单克隆抗体”还可使用例如 Clackson 等 Nature 352:624-628, (1991) 或 Marks 等 J. Mol. Biol. 222:581-597, (1991) 中记载的技术从噬菌体抗体库分离。

[0057] “Fv”片段是包含完整抗原识别和结合位点的抗体片段。该区域由紧密结合 (该结合的本质可以是共价的, 例如在 scFv 中) 的一个重链可变域 (区) 和一个轻链可变域 (区) 的二聚体组成。正是在这种构造中, 每个可变域 (区) 的三个 CDR 相互作用而在 V_H - V_L 二聚体表面上限定了一个抗原结合位点。六个 CDR 或其子集 (subset) 一起赋予抗体以抗原结合特异性。然而, 即使是单个可变域 (区) (或是只包含对抗原特异性的三个 CDR 的半个 Fv) 也具有识别和结合抗原的能力, 只是通常亲和力低于完整结合位点。

[0058] 在用于本文时, “抗体可变域 (区)”指抗体分子的轻链和重链中包含互补决定区 (CDR; 即 CDR1、CDR2、和 CDR3) 和框架区 (FR) 氨基酸序列的那部分。 V_H 指重链可变域 (区)。 V_L 指轻链可变域 (区)。依照本发明所使用的方法, 归为 CDR 和 FR 的氨基酸位置可以依照 Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 和 1991)) 来限定。抗体或抗原结合片段的氨基酸编号方式也依照 Kabat 的氨基酸编号。

[0059] 在用于本文时, 术语“互补决定区 (CDR; 即 CDR1、CDR2、和 CDR3) 指抗体可变域 (区) 中其存在是抗原结合所必需的氨基酸残基。每个可变域通常具有三个 CDR, 鉴定为 CDR1、CDR2 和 CDR3。每个互补决定区可以包含来自如 Kabat 定义的“互补决定区”的氨基酸残基 (即大约是轻链可变域的残基 24-34 (L1)、50-56 (L2) 和 89-97 (L3) 及重链可变域的残基 31-35 (H1)、50-65 (H2) 和 95-102 (H3); Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 和 / 或来自“高变环”的残基 (即大约是轻链可变域的残基 26-32 (L1)、50-52 (L2) 和 91-96 (L3) 及重链可变域的残基 26-32 (H1)、53-55 (H2) 和 96-101 (H3); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。在有些情况中, 互补决定区可以包含来自 Kabat 定义的 CDR 和高变环二者的氨基酸。例如, 抗体 4D5 重链的 CDRH1 包含氨基酸 26-35。

[0060] “框架区” (以下的 FR) 指可变域中 CDR 残基以外的残基。每个可变域通常具有四

个 FR, 鉴定为 FR1、FR2、FR3 和 FR4。如果 CDR 是依照 Kabat 定义的, 那么轻链 FR 残基位于大约轻链残基 1-23 (LCFR1)、35-49 (LCFR2)、57-88 (LCFR3)、和 98-107 (LCFR4), 而重链 FR 残基位于大约重链残基 1-30 (HCFR1)、36-49 (HCFR2)、66-94 (HCFR3)、和 103-113 (HCFR4)。如果 CDR 包含来自高变环的氨基酸残基, 那么轻链 FR 残基位于大约轻链残基 1-25 (LCFR1)、33-49 (LCFR2)、53-90 (LCFR3)、和 97-107 (LCFR4), 而重链 FR 残基位于大约重链残基 1-25 (HCFR1)、33-52 (HCFR2)、56-95 (HCFR3)、和 102-113 (HCFR4)。在有些情况中, 在 CDR 包含来自 Kabat 定义的 CDR 和高变环二者的氨基酸时, FR 残基将做相应的调整。例如, 当 CDRH1 包含氨基酸 H26-H35 时, 重链 FR1 残基位于 1-25 位, 而 FR2 残基位于 36-49 位。

[0061] “Fab”片段包含轻链的可变域和恒定域及重链的可变域和第一恒定域 (CH1)。F(ab')₂ 抗体片段包含一对 Fab 片段, 它们一般在它们羧基末端附近通过它们之间的铰链半胱氨酸共价连接。本领域还知道抗体片段的其它化学偶联形式。

[0062] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的 V_H 和 V_L 结构域, 其中这些结构域存在于一条多肽链上。一般而言, Fv 多肽在 V_H 与 V_L 结构域之间进一步包含多肽接头, 其使得 scFv 能够形成结合抗原的期望结构。关于 scFv 的综述参见 Pluckthun, 于《The Pharmacology of Monoclonal Antibodies》, 第 113 卷, Rosenberg 和 Moore 编, Springer-Verlag, New York, 第 269-315 页, 1994。

[0063] 术语“双抗体 (diabody)”指具有两个抗原结合位点的小型抗体片段, 该片段在同一条多肽链 (V_H 及 V_L) 中包含相连的重链可变域 (V_H) 和轻链可变域 (V_L)。通过使用过短的接头使得同一条链上的两个结构域之间不能配对, 迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对, 从而产生两个抗原结合位点。双抗体更完整的记载于例如 EP 404, 097 ; WO 93/11161 ; Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 :6444-6448(1993)。

[0064] 表述“线性抗体”指 Zapata 等, Protein Eng, 8(10) :1057-1062(1995) 中所描述的抗体。简言之, 这些抗体包含一对串联的 Fd 区段 (V_H-C_H1-V_H-C_H1), 该区段与互补的轻链多肽一起形成抗原结合区对。线性抗体可以是双特异性的, 或者是单特异性的。

[0065] 单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体 (免疫球蛋白), 其中重链和 / 或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源, 而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源, 以及此类抗体的片段, 只要它们展现出期望的生物学活性 (美国专利 No. 4, 816, 567 ; Morrison 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6851-6855), (1984)。

[0066] 非人 (例如鼠) 抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上, 人源化抗体指人免疫球蛋白 (受体抗体) 中的高变区残基用具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种 (供体抗体) 诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中, 将人免疫球蛋白的 Fv 框架区 (FR) 残基用相应的非人残基替换。此外, 人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常, 人源化抗体包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变区, 其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环, 且所有或基本上所有 FR 区是人免疫球蛋白序列的 FR。人源化抗体任选还包含至少部分免疫球蛋白恒定区 (Fc), 通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones et al., Nature 321 :522-525(1986) ; Riechmann et al., Nature 332 :323-329(1988) ; Presta,

Curr. Op. Struct. Biol. 2 :593-596 (1992)。

[0067] “人抗体”指拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和 / 或使用本文所公开的用于生成抗体的任何技术生成的抗体。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可使用本领域已知的多种技术来生成。在一个实施方案中,人抗体是从噬菌体文库选择的,该噬菌体文库表达人抗体 (Vaughan et al., Nature Biotechnology 14 :309-314 (1996) ;Sheets et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 95 :6157-6162 (1998) ;Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol. 227 :381 (1991) ;Marks et al., J. Mol. Biol. 222 :581 (1991))。人抗体还可通过将人免疫球蛋白基因座导入内源免疫球蛋白基因已经部分或完全灭活的转基因动物 (例如小鼠) 来生成。在受到攻击时,观察到人抗体生成,它在所有方面与在人体中看到的极其相似,包括基因重排、装配和抗体全集。这种方法记载于例如美国专利 No. 5,545,807 ;5,545,806 ;5,569,825 ;5,625,126 ;5,633,425 ;5,661,016, 及以下科学出版物: Marks et al., Bio/Technology 10 :779-783 (1992) ;Lonberg et al., Nature 368 :856-859 (1994) ;Morrison, Nature 368 :812-13 (1994) ;Fishwild et al., Nature Biotechnology 14 :845-51 (1996) ;Neuberger, Nature Biotechnology 14 :826 (1996) ;Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 :65-93 (1995)。或者,人抗体可通过生成针对靶抗原的抗体的人 B 淋巴细胞的永生化来制备 (此类 B 淋巴细胞可从个体回收,或者可在体外免疫)。参见例如 Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985) ;Boerner et al., J. Immunol. 147 (1) :86-95 (1991) ;及美国专利 No. 5,750,373。

[0068] “亲和力成熟的”抗体指在抗体的一个或多个 CDR 中具有一处或多处改变、导致该抗体对抗原的亲和力与没有这些改变的亲本抗体相比有所改进的抗体。优选的亲和力成熟的抗体具有纳摩尔或甚至皮摩尔量级的对靶抗原的亲和力。亲和力成熟的抗体可通过本领域已知规程来生成。Marks et al., Bio/Technology 10 :779-783 (1992) 记载了通过 VH 和 VL 结构域改组进行的亲和力成熟。以下文献记载了 CDR 和 / 或框架残基的随机诱变: Barbas et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91 :3809-3813 (1994) ;Schier et al., Gene 169 :147-155 (1995) ;Yelton et al., J. Immunol. 155 :1994-2004 (1995) ;Jackson et al., J. Immunol. 154 (7) :3310-9 (1995) ;Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226 :889-896 (1992)。

[0069] 抗体的“功能性抗原结合位点”指能够结合靶抗原的位点。抗原结合位点的抗原结合亲和力不必像衍生该抗原结合位点的亲本抗体那样强,但是结合抗原的能力必须是使用已知用于评估抗体对抗原结合的多种方法之任一可测量到的。此外,本文中多价抗体的每个抗原结合位点的抗原结合亲和力不必在量上相同。对于本文中的多聚体抗体,功能性抗原结合位点的数目可以使用超速离心分析来评估,如美国专利申请公开文本 No. 20050186208 中所记载的。依照这种分析方法,将靶抗原与多聚体抗体以不同比例混合,并计算复合物的平均分子量,其中假设不同数目的功能性结合位点。将这些理论值与得到的实际实验值进行比较以评估功能性结合位点的数目。

[0070] 具有指定抗体的“生物学特征”的抗体指拥有该指定抗体区别于其它结合相同抗原的抗体的一项或多项生物学特征的抗体。

[0071] 为了筛选结合抗原上感兴趣抗体所结合的表位的抗体,可以实施常规交叉阻断测定法,诸如 Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow

and David Lane(1988) 中所记载的。

[0072] “物种依赖性抗体”指这样一种抗体,其对来自第一哺乳动物物种的抗原具有强于对来自第二哺乳动物物种的该抗原同系物的结合亲和力。通常,物种依赖性抗体“特异性结合”人类抗原(例如具有不超过约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$, 或不超过约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$, 或不超过约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 的结合亲和力 (K_d)),但对来自第二非人哺乳动物物种的该抗原同系物具有比其对人类抗原的结合亲和力弱至少约 50 倍,或至少约 500 倍,或至少约 1000 倍的结合亲和力。物种依赖性抗体可以是如上定义的各种类型的抗体,但典型的是人源化抗体或人抗体。

[0073] 在用于本文时,“抗体突变体”或“抗体变体”指物种依赖性抗体的氨基酸序列变体,其中物种依赖性抗体的一个或多个氨基酸残基发生了修饰。此类突变体与物种依赖性抗体必然具有小于 100% 的序列同一性或相似性。在一个的实施方案中,抗体突变体所具有的氨基酸序列与物种依赖性抗体的重链或轻链可变域的氨基酸序列具有至少 75%、更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、最优选至少 95% 的氨基酸序列同一性或相似性。关于此序列的同一性或相似性在本文中定义为在比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后,候选序列中与物种依赖性抗体残基相同(即相同残基)或相似(即根据共同侧链特性来自同一组的氨基酸残基,见下文)的氨基酸残基的百分比。N-末端、C-末端、或对可变域(区)之外的抗体序列内部的延伸、删除、或插入都不应视为影响序列同一性或相似性。

[0074] 为了延长包含本发明氨基酸序列的抗体或多肽的半衰期,可如例如美国专利 No. 5,739,277 中所记载的将补救受体结合表位附着于抗体(尤其是抗体片段)。例如,可以将编码补救受体结合表位的核酸分子与编码本发明多肽序列的核酸在同一读码框内相连接,使得由改造后的核酸分子编码的融合蛋白包含补救受体结合表位和本发明的多肽序列。在用于本文时,术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子(例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或 IgG₄)的 Fc 区中负责延长 IgG 分子体内血清半衰期的表位(例如 Ghetie et al., Ann. Rev. Immunol. 18 :739-766 (2000), 表 1)。其 Fc 区中有替代且血清半衰期延长的抗体还记载于 W000/42072 ;WO 02/060919 ;Shields et al., J. Biol. Chem. 276 :6591-6604 (2001) ; Hinton, J. Biol. Chem. 279 :6213-6216 (2004))。在另一个实施方案中,还可以通过例如附着其它多肽序列来延长血清半衰期。例如,可以将在本发明的方法中有用的抗体或其它多肽附着于血清清蛋白或血清清蛋白中结合 FcRn 受体或血清清蛋白结合肽的那部分,使得血清清蛋白结合该抗体或多肽,例如此类多肽序列披露于 W001/45746。在一个实施方案中,待附着的血清清蛋白肽包含氨基酸序列 DICLPRWGCLW。在另一个实施方案中, Fab 的半衰期通过这些方法得到了延长。血清清蛋白结合肽序列还可参见 Dennis et al., J. Biol. Chem. 277 :35035-35043 (2002)。

[0075] “嵌合 VEGF 受体蛋白”指具有衍生自至少两种不同蛋白质(其中至少一种是 VEGF 受体蛋白)的氨基酸序列的 VEGF 受体分子。在某些实施方案中,嵌合 VEGF 受体蛋白能够结合 VEGF 并抑制 VEGF 的生物学活性。

[0076] “分离的”抗体指已经鉴定且自其天然环境的一种成分分开和/或回收的多肽或抗体。其天然环境的污染性成分指将会干扰该抗体的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在某些实施方案中,将抗体纯化至(1) 根据 Lowry 法的测定,抗体重量超过 95%,最优选重量超过 99%, (2) 足以通过使用转杯式测序

仪获得至少 15 个残基的 N- 末端或内部氨基酸序列的程度, 或 (3) 根据还原性或非还原性条件下的 SDS-PAGE 及使用考马斯蓝或银染色, 达到同质。既然抗体天然环境的至少一种成分不会存在, 那么分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体。然而, 分离的抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0077] “片段”指多肽和核酸分子的一部分, 其优选含有参比核酸分子或多肽全长的至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或更多。所述片段可含有 10、20、30、40、50、60、70、80、90、或 100、200、300、400、500、600、或更多个核苷酸, 或者 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、190、200 或更多个氨基酸。

[0078] “抗血管发生剂”或“血管发生抑制剂”指或直接或间接抑制血管发生 (angiogenesis)、血管生成 (vasculogenesis)、或不想要的血管通透性的小分子量物质、多核苷酸、多肽、分离的蛋白质、重组蛋白、抗体、或其偶联物或融合蛋白。应当理解, 抗血管发生剂包括那些结合并阻断血管发生因子或其受体的血管发生活性的药剂。例如, 抗血管发生剂是贯穿说明书定义的或本领域已知的血管发生剂的抗体或其它拮抗剂, 例如但不限于 VEGF-A 的抗体、VEGF-A 受体 (例如 KDR 受体和 / 或 Flt-1 受体) 的抗体、VEGF- 陷阱 (VEGF-trap)、抗 PDGFR 抑制剂诸如 Gleevec™ (Imatinib Mesylate)。抗血管发生剂还包括天然血管发生抑制剂, 例如血管他丁 (angiostatin)、内皮他丁 (endostatin) 等。参见例如 Klagsbrun and D' Amore, *Annu. Rev. Physiol.* 53 :217-39 (1991); Streit and Detmar, *Oncogene* 22 :3172-3179 (2003) (例如列举恶性黑素瘤中抗血管发生疗法的表 3); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5 (12) :1359-1364 (1999); Tonini 等, *Oncogene* 22 :6549-6556 (2003) (例如列举已知抗血管发生因子的表 2); Sato, *Int. J. Clin. Oncol.* 8 :200-206 (2003) (例如列举临床试验中所使用的抗血管发生剂的表 1)。

[0079] “维持” (maintenance) 剂量在本文中指在治疗期间或之后施用于患者的一个或多个剂量的治疗剂。通常, 维持剂量以一定的治疗间隔施用, 例如以大约每周, 大约每两周, 大约每三周, 或大约每四周的间隔施用。

[0080] “存活” (survival) 指患者保持存活, 包括无进展存活 (progression free survival) (PFS) 和总体存活 (overall survival) (OS)。存活可通过 Kaplan-Meier 法来评估, 而且存活的任何差异可使用分层时序检验 (stratified log-rank test) 来计算。

[0081] “无进展存活 (Progression free survival) (PFS)”指自治疗 (或随机化) 至第一次疾病进展或死亡的时间。例如, 它指如下的时间, 即自治疗启动或自初始诊断起, 例如限定的时间段, 诸如约 0.5 个月、1 个月、2 个月、2.1 个月、2.2 个月、2.8 个月、3 个月、等, 患者仍然活着且癌症没有复发。在一个实施方案中, PFS 延长约 2.1 个月。在本发明的一个方面, PFS 可通过实体瘤响应评价标准 (RECIST) 来评估。

[0082] “总体存活 (overall survival)”指患者自治疗启动或自初始诊断起保持一定时期活着, 诸如约 1 年、约 2 年、约 3 年、约 4 年、约 5 年、约 10 年、等。

[0083] “延长存活 (extending survival)”或“提高存活可能性”意味着使接受治疗的患者的 PFS 和 / 或 OS 相对于未接受治疗的患者 (即相对于未用 VEGF 特异性拮抗剂, 例如 VEGF 抗体治疗的患者) 或相对于对照治疗方案 (诸如只用化疗剂的治疗, 诸如乳腺癌的治疗 (care) 中使用的那些) 有延长。存活在治疗启动之后或在初始诊断之后监测至少约 1 个月、2 个月、4 个月、6 个月、9 个月、或至少约 1 年、或至少约 2 年、或至少约 3 年、或至少约

4 年、或至少约 5 年、或至少约 10 年、等。

[0084] 危害比 (Hazard ratio, HR) 是事件比率的统计定义。为了本发明的目的,危害比定义为代表任何特定时间点时实验分部中的事件概率除以对照分部中的事件概率。无进展存活分析中的“危害比 (hazard ratio)”是两条无进展存活曲线之间的差异的汇总,代表随访期里与对照相比治疗的死亡风险降低。

[0085] 术语“并行”在本文中用于指使用两种或更多种治疗剂,其中至少部分施用在时间上交叠。因而,并行施用包括如下的剂量给药方案,一种或多种药剂的施用中断后施用一种或多种其它药剂。

[0086] “维持疗法”意指为了降低疾病复发或进展的可能性而给予的治疗方案。维持疗法可持续任意长时间,包括长至受试者终身的延长的时段。维持疗法可在初始疗法之后或与初始或别的疗法联合提供。用于维持疗法的剂量可变化,而且可包括与其它类型的疗法使用的剂量相比降低的剂量。

[0087] 术语“癌症”和“癌性”指或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调控的生理疾患。此定义中包括良性和恶性癌症以及休眠肿瘤或微转移。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、和白血病。此类癌症的更具体例子包括乳腺癌、鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、和肺的鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(gastric or stomach cancer)(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer or hepatic carcinoma)、膀胱癌、肝瘤(hepatoma)、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌(kidney or renal cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、及各种类型的头和颈癌,以及 B 细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中级/滤泡性 NHL、中级弥漫性 NHL、高级成免疫细胞性 NHL、高级成淋巴细胞性 NHL、高级小无核裂细胞性 NHL、贮积病(bulky disease)NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS 相关淋巴瘤、和瓦尔登斯特伦氏(Waldenstrom)巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病、和移植后淋巴增殖性病症(PTLD)、以及与癍痣病(phakomatoses)、水肿(诸如与脑瘤有关的)和梅格斯氏(Meigs)综合征有关的异常血管增殖。

[0088] “转移”指癌自其原发部位传播至身体中的其它位置。癌细胞能脱离原发性肿瘤,渗透入淋巴和血管,经由血流而循环,和在身体中其它地方的正常组织中的远端病灶(转移)中生长。转移可以是当地的或远端的。转移是一个连续过程,视肿瘤细胞自原发性肿瘤脱落、经由血流而传播、并在远端部位停止而定。在新的部位,该细胞建立血供且能生长至形成危及生命的团块。肿瘤细胞内的刺激性和抑制性分子途径调节这种行为,而且肿瘤细胞与远端部位中的宿主细胞之间的相互作用也是重要的。

[0089] “受试者”指哺乳动物,包括但不限于人或非人哺乳动物,诸如牛、马、犬、绵羊、或猫。优选地,受试者指人。在本文中,患者也是受试者。

[0090] 对于本发明的方法,术语“指导”受试者意味着通过任何手段,但是优选书面地,诸如以包装插页或其它书面推广材料的形式提供关于可应用疗法、药疗、处理、处理方案、等等的指导。

[0091] 对于本发明的方法,术语“宣传(promoting)”意味着通过任何手段,包括书面地,诸如以包装插页的形式提供、登广告、出售、或描述特定药物、药物组合、或治疗模态。宣传

在本文中指治疗剂,诸如 VEGF 拮抗剂,例如抗 VEGF 抗体或化疗剂用于适应证,诸如乳腺癌治疗的宣传,其中此类宣传得到食品和药品管理局 (FDA) 批准,认为已证明与受试者群体中统计上显著的治疗功效和可接受的安全性有关。

[0092] 术语“销售”在本文中用于描述产品(例如药物)的宣传、出售或分发。销售具体包括目的在于包装、登广告、和任何使产品商业化的商业活动。

[0093] 受试者“群体”指一组癌症受试者,诸如临床试验中的,或对特定适应证诸如乳腺癌疗法 FDA 批准之后肿瘤学家看到的。

[0094] 术语“抗癌疗法”指在治疗癌症中有用的疗法。抗癌治疗剂的例子包括但不限于例如外科手术、化疗剂、生长抑制剂、细胞毒剂、放射疗法中所使用的药剂、抗血管发生剂、凋亡剂、抗微管蛋白剂、和其它治疗癌症的药剂,诸如抗 HER-2 抗体、抗 CD20 抗体、表皮生长因子受体 (EGFR) 拮抗剂(例如酪氨酸激酶抑制剂)、HER1/EGFR 抑制剂(例如 erlotinib (Tarceva®))、血小板衍生生长因子抑制剂(例如 Gleevec™(Imatinib Mesylate))、COX-2 抑制剂(例如 celecoxib)、干扰素、细胞因子、结合一种或多种以下靶物的拮抗剂(例如中和性抗体、小分子抑制剂、等)(ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR- β 、BlyS、APRIL、BCMA 或 VEGF 受体、VEGF、TRAIL/Apo2)、和其它生物活性和有机化学剂,等。本发明还包括它们的组合。

[0095] 术语“细胞毒剂”在用于本文时指抑制或阻止细胞功能和 / 或引起细胞破坏的物质。该术语意图包括放射性同位素(例如 At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、p³² 和 Lu 的放射性同位素)、化疗剂、和毒素诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物起源的酶活毒素,包括其片段和 / 或变体。

[0096] “化疗剂”指可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括可用于治疗癌症的化学化合物。化疗剂的例子包括烷化剂类 (alkylating agents), 诸如塞替派 (thiotepa) 和 CYTOXAN® 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 磺酸烷基酯类 (alkyl sulfonates), 诸如白消安 (busulfan)、英丙舒凡 (improsulfan) 和哌泊舒凡 (pipsulfan); 氮丙啶类 (aziridines), 诸如苯佐替派 (benzodepa)、卡波醌 (carboquone)、美妥替派 (meturedpa) 和乌瑞替派 (uredepa); 乙撑亚胺类 (ethylenimines) 和甲基蜜胺类 (methylamelamines), 包括六甲蜜胺 (altretamine)、三乙撑蜜胺 (triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺 (triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺 (triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺 (trimethylolomelamine); 番荔枝内酯类 (acetogenins) (尤其是布拉他辛 (bullatacin) 和布拉他辛酮 (bullatacinone)); 喜树碱 (camptothecin) (包括合成类似物托泊替康 (topotecan)); 苔藓抑素 (bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新 (adozelesin)、卡折来新 (carzelesin) 和比折来新 (bizelesin) 合成类似物); 隐藻素类 (cryptophycins) (特别是隐藻素 1 和隐藻素 8); 多拉司他汀 (dolastatin); duocarmycin (包括合成类似物, KW-2189 和 CB1-TM1); 艾榴塞洛素 (eleutherobin); pancratistatin; sarcodictyin; 海绵抑素 (spongistatin); 氮芥类 (nitrogen mustards), 诸如苯丁酸氮芥 (chlorambucil)、萘氮芥 (chlornaphazine)、胆磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀 (estramustine)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、双氯乙基甲胺 (mechlorethamine)、盐酸氧氮芥 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑 (melphalan)、新氮芥 (novembichin)、苯芥胆甾醇 (phenesterine)、泼尼莫

司汀 (prednimustine)、曲磷胺 (trofosfamide)、尿嘧啶氮芥 (uracil mustard) ; 亚硝脲类 (nitrosoureas), 诸如卡莫司汀 (carmustine)、氯脲菌素 (chlorozotocin)、福莫司汀 (fotemustine)、洛莫司汀 (lomustine)、尼莫司汀 (nimustine) 和雷莫司汀 (ranimustine) ; 抗生素类, 诸如烯二炔类抗生素 (enediyne) (例如加利车霉素 (calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (参见例如 Agnew (1994) Chem. Intl. Ed. Engl. 33 :183-186) ; 蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括 dynemicin A ; 二膦酸盐类 (bisphosphonates), 诸如氯膦酸盐 (clodronate) ; 埃斯波霉素 (esperamicin) ; 以及新制癌素 (neocarzinostatin) 发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素 (actinomycin)、氨茴霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycin)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycin)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸、ADRIAMYCIN® 多柔比星 (doxorubicin) (包括吗啉代多柔比星、氰基吗啉代多柔比星、2-吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、麻西罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素类 (mitomycins) 诸如丝裂霉素 C、霉酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycin)、培洛霉素 (peplomycin)、泊非霉素 (potfiromycin)、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素 (streptonigrin)、链佐星 (streptozocin)、杀结核菌素 (tubercidin)、乌苯美司 (ubenimex)、净司他丁 (zinostatin)、佐柔比星 (zorubicin) ; 抗代谢物类, 诸如甲氨蝶呤 (methotrexate) 和 5-氟尿嘧啶 (5-FU) ; 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨蝶呤 (methotrexate)、蝶罗呤 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate) ; 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine) ; 嘧啶类似物, 诸如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷 (azauridine)、卡莫氟 (carmofur)、阿糖胞苷 (cytarabine)、双脱氧尿苷 (dideoxyuridine)、去氧氟尿苷 (doxifluridine)、依诺他滨 (enocitabine)、氟尿苷 (floxuridine) ; 雄激素类, 诸如卡鲁睾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、表硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone) ; 抗肾上腺类, 诸如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane) ; 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸 (folinic acid) ; 醋葡萄糖醛内酯 (aceglatone) ; 醛磷酸胺糖苷 (aldophosphamide glycoside) ; 氨基乙酰丙酸 (aminolevulinic acid) ; 恩尿嘧啶 (eniluracil) ; 安吡啶 (amsacrine) ; bestrabucil ; 比生群 (bisantrene) ; 依达曲沙 (edatraxate) ; 地磷酰胺 (defosfamide) ; 地美可辛 (demecolcine) ; 地吡醌 (diaziquone) ; elfornithine ; 依利醋铵 (elliptinium acetate) ; 埃坡霉素 (epothilone) ; 依托格鲁 (etoglucid) ; 硝酸镓 ; 羟脲 (hydroxyurea) ; 香菇多糖 (lentinan) ; 氯尼达明 (lonidamine) ; 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin) ; 米托胍脲 (mitoguazone) ; 米托蒽醌 (mitoxantrone) ; 莫哌达醇 (mopidamol) ; 二胺硝吡啶 (nitracrine) ; 喷司他丁 (pentostatin) ; 蛋氨酸氮芥 (phenamet) ; 吡柔比星 (pirarubicin) ; 洛索蒽醌

(losoxantrone); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 2- 乙基酰肼 (ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofiran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2'' - 三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecenes) (尤其是 T-2 毒素、疣孢菌素 (verrucarin)A、杆孢菌素 (roridin)A 和蛇行菌素 (anguidin)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露莫司汀 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinside) (“Ara-C”); 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 塞替派 (thiotepa); 类紫杉醇类 (taxoids), 例如 **TAXOL®** 帕利他塞 (paclitaxel) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.)、**ABRAXANE®** 不含克列莫佛 (Cremophor)、清蛋白改造纳米颗粒剂型帕利他塞 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 和 **TAXOTERE®** 多西他塞 (doxetaxel) (**Rhône**-Poulenc Rorer, Antony, France); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); **GEMZAR®** 吉西他滨 (gemcitabine); 6- 硫鸟嘌呤 (thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨蝶呤 (methotrexate); 铂类似物, 诸如顺铂 (cisplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin) 和卡铂 (carboplatin); 长春碱 (vinblastine); 铂 (platinum); 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine); **NAVELBINE®** 长春瑞滨 (vinorelbine); 能灭瘤 (novantrone); 替尼泊苷 (teniposide); 依达曲沙 (edatrexate); 道诺霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤 (aminopterin); 希罗达 (xeloda); 伊本膦酸盐 (ibandronate); 伊立替康 (irinotecan) (Camptosar, CPT-11) (包括伊立替康及 5-FU 和亚叶酸的治疗方案); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMFO); 类视黄酸类 (retinoids), 诸如视黄酸 (retinoic acid); 卡培他滨 (capecitabine); 考布他汀 (combretastatin); 亚叶酸 (leucovorin) (LV); 奥沙利铂 (oxaliplatin), 包括奥沙利铂治疗方案 (FOLFOX); lapatinib (**Tykerb®**); PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR (例如 erlotinib (**Tarceva®**)) 和 VEGF-A 的、降低细胞增殖的抑制剂; 及任何上述物质的药剂学可接受的盐、酸或衍生物。

[0097] 该定义还包括作用于调节或抑制激素对肿瘤作用的抗激素剂诸如抗雌激素类和选择性雌激素受体调控物类 (SERM), 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®** 他莫昔芬)、雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4- 羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、那洛昔芬 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和 **FARESTON®** 托瑞米芬 (toremifene); 抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂, 诸如例如 4(5)-咪唑、氨基鲁米特 (aminogluthetimide)、**MEGASE®** 醋酸甲地孕酮 (megestrolacetate)、**AROMASIN®** 依西美坦 (exemestane)、福美坦 (formestane)、法偈唑 (fadrozole)、**RIVISOR®** 伏罗唑 (vorozole)、**FEMARA®** 来曲唑 (letrozole) 和 **ARIMIDEX®** 阿那曲唑 (anastrozole); 抗雄激素类, 诸如氟他米特 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡米特 (bicalutamide)、亮丙瑞林 (leuprolide)、和戈舍瑞林 (goserelin); 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3- 二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); 反义寡核苷酸, 特别是抑制涉及异常 (abherent) 细胞增殖的信号途经中的基因表达的反义寡核苷酸, 诸如例如 PKC- α 、Ralf

和 H-Ras ;核酶,诸如 VEGF 表达抑制剂(例如ANGIOZYME®核酸)和 HER2 表达抑制剂;疫苗,诸如基因疗法疫苗,例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗;PROLEUKIN® rIL-2 ;LURTOTECAN®拓扑异构酶 1 抑制剂;ABARELIX® rmRH ;及任何上述物质的药剂学可接受的盐、酸或衍生物。

[0098] 术语“细胞因子”是由一种细胞群释放,作为细胞间介质作用于另一细胞的蛋白质的通称。此类细胞因子的例子有淋巴因子、单核因子和传统的多肽激素。细胞因子中包括生长激素,诸如人生长激素、N-甲硫氨酰人生长激素和牛生长激素;甲状旁腺素;甲状腺素;胰岛素;胰岛素原;松驰素;松驰素原;糖蛋白激素类,诸如促卵泡激素(FSH)、促甲状腺激素(TSH)和促黄体激素(LH);表皮生长因子;肝生长因子;成纤维细胞生长因子;促乳素;胎盘催乳素;肿瘤坏死因子- α 和- β ;穆勒氏(Mullerian)抑制性物质;小鼠促性腺激素相关肽;抑制素;激活素;血管内皮生长因子;整联蛋白;血小板生成素(TPO);神经生长因子,诸如 NGF- α ;血小板生长因子;转化生长因子(TGF),诸如 TGF- α 和 TGF- β ;胰岛素样生长因子-I和-II;红细胞生成素(EPO);骨诱导因子(osteoinductive factor);干扰素,诸如干扰素- α 、- β 和- γ ;集落刺激因子(CSF),诸如巨噬细胞 CSF(M-CSF)、粒细胞-巨噬细胞 CSF(GM-CSF)和粒细胞 CSF(G-CSF);白介素(IL),诸如 IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12;肿瘤坏死因子,诸如 TNF- α 或 TNF- β ;及其它多肽因子,包括 LIF 和 kit 配体(KL)。在用于本文时,术语细胞因子包括来自天然来源或来自重组细胞培养物的蛋白质及天然序列细胞因子的生物学活性等效物。

[0099] “生长抑制剂”在用于本文时指在体外和/或在体内抑制细胞生长的化合物或组合物。如此,生长抑制剂可以是显著降低处于 S 期的细胞百分比的药剂。生长抑制剂的例子包括阻断细胞周期行进(处于 S 期以外的位置)的药剂,诸如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的药剂。经典的 M 期阻断剂包括长春药类(vincas)(长春新碱(vincristine)和长春碱(vinblastine))、TAXOL®、和拓扑异构酶 II 抑制剂诸如多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、依托泊苷(etoposide)和博来霉素(bleomycin)。那些阻滞 G1 的药剂也溢出进入 S 期停滞,例如 DNA 烷化剂类诸如他莫昔芬(tamoxifen)、泼尼松(prednisone)、达卡巴嗪(dacarbazine)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine)、顺铂(cisplatin)、甲氨喋呤(methotrexate)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)和 ara-C。更多信息可参见 The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel 编,第 1 章,题为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”, Murakami et al., WB Saunders, Philadelphia(1995),尤其是第 13 页。

[0100] 术语“前体药物”在用于本申请时指与母药(parent drug)相比对肿瘤细胞的细胞毒性较小并能够酶促活化或转变为更具活性母药形式的药用活性物质的前体或衍生物形式。参见例如 Wilman,“Prodrugs in Cancer Chemotherapy”, Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast(1986)和 Stella 等,“Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”, Directed Drug Delivery, Borchardt 等,编, pp. 247-267, Humana Press(1985)。本发明的前体药物包括但不限于含磷酸盐/酯前体药物、含硫代磷酸盐/酯前体药物、含硫酸盐/酯前体药物、含肽前体药物、D-氨基酸修饰前体药物、糖基化前体药物、含 β -内酰胺前体药物、含任选取代苯氧基乙酰胺的前体药

物或含任选取代苯乙酰胺的前体药物、可转化为更具活性而无细胞毒性的药物的 5- 氟胞嘧啶和其它 5- 氟尿苷前体药物。可衍生为本发明使用的前体药物形式的细胞毒性药物的例子包括但不限于上文描述的那些化疗剂。

[0101] “放射疗法”或“放疗”指使用定向伽马射线或贝塔射线来诱发对细胞的足够损伤,以限制细胞正常发挥功能的能力或全然破坏细胞。应当领会,本领域知道许多方式来确定治疗的剂量和持续时间。典型的治疗作为一次施用来给予,而典型的剂量范围为每天 10-200 个单位(戈瑞(Gray))。

[0102] “降低或抑制”指阻止/延迟或引起优选 20%或更多、更优选 50%或更多、且最优选 75%、85%、90%、95%、或更多的总体降低的能力。降低或抑制可以指所治疗的病症的症状、转移或微转移的存在或大小、原发性肿瘤的大小、肿瘤的存在或大小、或血管发生性病症中血管的大小或数目。

[0103] 术语“静脉内输注”指以超过约 5 分钟的一段时间,优选 30-90 分钟,将药物导入动物或人患者的静脉,尽管依照本发明,静脉内输注或可施用 10 小时或更短。

[0104] 术语“静脉内推注”或“静脉内快速注射”指在约 15 分钟内或更短,优选 5 分钟或更短,将药物施用到动物或人的静脉中使得机体接受药物。

[0105] 术语“皮下施用”指通过自药物容器的相对较慢的、持续投递,将药物导入动物或人患者的皮肤下,优选在皮肤和皮下组织间的袋内。所述袋可通过夹起或拉起皮肤并远离皮下组织来创建。

[0106] 术语“皮下输注”指以一段时间,包括但不限于 30 分钟或更短,或者 90 分钟或更短,通过自药物容器的相对较慢的、持续投递,将药物导入动物或人患者的皮肤下,优选在皮肤和皮下组织间的袋内。任选的是,输注可通过植入动物或人患者皮肤下的药物投递泵的皮下植入来进行,其中所述泵以预定的一段时间,诸如 30 分钟、90 分钟、或跨越治疗方案持续时间的一段时间,投递预定量的药物。

[0107] 术语“皮下推注”指将药物施用至动物或人患者的皮肤下,其中推注药物投递优选短于约 15 分钟,更优选短于 5 分钟,最优选短于 60 秒。施用优选在皮肤和皮下组织间的袋内,其中所述袋可通过例如夹起或拉起皮肤并远离皮下组织来创建。

[0108] “病症”指任何会受益于使用抗体的治疗的疾患。这包括慢性和急性病症或疾病,包括那些使哺乳动物倾向于所讨论病症的病理状况。本文中待治疗的病症的非限制性例子包括癌症;良性和恶性肿瘤;白血病和淋巴样恶性肿瘤;神经元、神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞、上皮、基质和囊胚腔病症;及炎性、血管发生性和免疫学病症。

[0109] 术语“治疗有效量”指在哺乳动物中有效治疗疾病或病症的药物量。在癌症的情况下,治疗有效量的药物可减少癌细胞的数目;缩小肿瘤的尺寸;抑制(即一定程度的减缓,优选阻止)癌细胞浸润入周围器官;抑制(即一定程度的减缓,优选阻止)肿瘤转移;一定程度地抑制肿瘤生长;和/或一定程度的减轻一种或多种与病症有关的症状。根据药物可阻止现有癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞的程度,它可以是细胞抑制性的和/或细胞毒性的。对于癌症疗法,可以例如通过评价存活持续时间、无进展存活持续时间(PFS)、响应率(RR)、响应持续时间、和/或生活质量来测量体内功效。

[0110] “治疗”或“处理”指治疗性处理和预防性或防范性措施二者。需要治疗的受试者

包括早就患有病症的受试者以及要预防病症的受试者。

[0111] 术语“标记物”在用于本文时指与多肽直接或间接偶联的可检测化合物或组合物。标记物可以是自身可被检测的（例如放射性同位素标记物或荧光标记物），或者在酶标记物的情况中，可催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0112] II. 抗 VEGF 抗体和拮抗剂

[0113] (i) VEGF 抗原

[0114] 要用于生成抗体的 VEGF 抗原可以是例如 VEGF₁₆₅ 分子以及 VEGF 的其它同等型或其含有期望表位的片段。可用于生成本发明的抗 VEGF 抗体的其它形式的 VEGF 对于本领域技术人员会是显而易见的。

[0115] 人 VEGF 首先是使用牛 VEGF cDNA 作为杂交探针筛选自人细胞制备的 cDNA 文库而获得的。Leung et al. (1989) Science, 246 :1306。一种由此鉴定出的 cDNA 编码一种 165 个氨基酸的蛋白质，其与牛 VEGF 具有超过 95% 的同源性；此 165 个氨基酸的蛋白质通常称作人 VEGF (hVEGF) 或 VEGF₁₆₅。人 VEGF 的促有丝分裂活性通过在哺乳动物宿主细胞中表达人 VEGF 得到了验证。由经人 VEGF cDNA 转染的细胞条件化的培养基促进毛细血管内皮细胞增殖，而对照细胞不然。Leung et al. (1989) Science, 见上文。

[0116] 虽然可以自天然来源分离和纯化血管内皮细胞生长因子，随后用于治疗用途，但是该蛋白质在滤泡细胞中相对低的浓度和回收 VEGF 所需要的努力和费用两个方面的高成本证明在商业上是无益的。因而，进行进一步努力来经重组 DNA 技术克隆和表达 VEGF。（参见例如 Ferrara, Laboratory Investigation 72 :615-618 (1995) 及其中引用的参考文献）。

[0117] 源自可变 RNA 剪接，VEGF 在多种组织中作为多种同二聚体形式（每个单体 121、145、165、189、和 206 个氨基酸）表达。VEGF₁₂₁ 是一种可溶性丝裂原，不结合肝素；更长形式的 VEGF 以越来越高的亲和力结合肝素。肝素结合形式的 VEGF 可以在羧基末端被纤溶酶切割以释放可扩散形式的 VEGF。纤溶酶切割后鉴定出的羧基末端肽的氨基酸测序是 Arg110-Ala111。作为同二聚体分离到的氨基末端“核心”蛋白，VEGF (1-110) 以与完整 VEGF₁₆₅ 同二聚体相比相似的亲和力结合中和性单克隆抗体（诸如称作 4.6.1 和 3.2E3.1.1 的抗体）和可溶性形式的 VEGF 受体。

[0118] 最近还鉴定出数种在结构上与 VEGF 有关的分子，包括胎盘生长因子 (PlGF)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 和 VEGF-E。Ferrara 和 Davis-Smyth (1987) Endocr. Rev., 见上文；Ogawa et al. J. Biological Chem. 273 :31273-31281 (1998)；Meyer et al. EMBO J., 18 :363-374 (1999)。受体酪氨酸激酶 Flt-4 (VEGFR-3) 鉴定为 VEGF-C 和 VEGF-D 的受体。Joukov et al. EMBO J. 15 :1751 (1996)；Lee et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :1988-1992 (1996)；Achen et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :548-553。VEGF-C 显示出涉及对淋巴管发生的调节。Jeltsch et al. Science 276 :1423-1425 (1997)。

[0119] (ii) 抗 VEGF 抗体

[0120] 在本发明的方法中有用的抗 VEGF 抗体包括任何抗体或其抗原结合片段，它们以足够亲和力和特异性结合 VEGF 且能降低或抑制 VEGF 的生物学活性。抗 VEGF 抗体通常不会结合其它 VEGF 同源物，诸如 VEGF-B 或 VEGF-C，也不会结合其它生长因子，诸如 PlGF、PDGF、或 bFGF。

[0121] 在本发明的某些实施方案中，抗 VEGF 抗体包括但不限于与由杂交瘤 ATCC HB

10709 生成的单克隆抗 VEGF 抗体 A4.6.1; 依照 Presta et al. (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599 生成的重组人源化抗 VEGF 单克隆抗体结合相同表位的单克隆抗体。在一个实施方案中, 抗 VEGF 抗体是“贝伐单抗 (BV)”, 也称作“rhuMAb VEGF”或“AVASTIN®”。它包含经过突变的人 IgG1 框架区和来自小鼠抗 hVEGF 单克隆抗体 A.4.6.1 的抗原结合互补决定区, 阻断人 VEGF 结合其受体。贝伐单抗大约 93% 的氨基酸序列 (包括大部分框架区) 是自人 IgG1 衍生, 而且约 7% 的序列是自小鼠抗体 A4.6.1 衍生的。

[0122] 贝伐单抗和其它人源化抗 VEGF 抗体进一步记载于 2005 年 2 月 26 日公告的美国专利 No. 6,884,879。别的抗体包括 G6 或 B20 系列抗体 (例如 G6-31、B20-4.1), 如记载于 PCT 公开号 W02005/012359、PCT 公开号 W02005/044853、和美国专利申请公开 US2009-0142343, 通过述及明确将这些专利申请的内容收入本文。对于别的抗体, 参见美国专利 No. 7,060,269, 6,582,959, 6,703,020 ; 6,054,297 ; W098/45332 ; W0 96/30046 ; W094/10202 ; EP 0666868B1 ; 美国专利申请公开文本 No. 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409, 和 20050112126 ; 和 Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288 : 149-164 (2004)。其它抗体包括那些结合人 VEGF 上包含残基 F17、M18、D19、Y21、Y25、Q89、I91、K101、E103、和 C104 或者包含残基 F17、Y21、Q22、Y25、D63、I83 和 Q89 的功能性表位的。

[0123] 在本发明的一个实施方案中, 抗 VEGF 抗体具有重链可变区, 其包含下述氨基酸序列 :

[0124] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW INTYTGEPTY

[0125] AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP HYYGSSHWFYF DVWGQGTLLV

[0126] VSS (SEQ ID No. 1)

[0127] 和轻链可变区, 其包含下述氨基酸序列 :

[0128] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYF TSSLHSGVPS

[0129] RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ GTKVEIKR (SEQ ID No. 2)。

[0130] 依照本发明的“G6 系列抗体”指自 G6 抗体的序列衍生的抗 VEGF 抗体或依照 PCT 公开文本 No. W02005/012359 的图 7、24-26、和 34-35 之任一的 G6 衍生抗体, 通过述及将其整个公开内容收入本文。还可参见 PCT 公开文本 No. W02005/044853, 通过述及将这些专利申请的内容明确收入本文。在一个实施方案中, G6 系列抗体结合人 VEGF 上的功能性表位, 其包含残基 F17、Y21、Q22、Y25、D63、I83 和 Q89。

[0131] 依照本发明的“B20 系列抗体”指自 B20 抗体的序列衍生的抗 VEGF 抗体或依照 PCT 公开文本 No. W02005/012359 的图 27-29 之任一的 B20 衍生抗体, 通过述及将其整个公开内容收入本文。还可参见 PCT 公开文本 No. W02005/044853 和美国专利申请公开 US2009-0142343, 通过述及将这些专利申请的内容明确收入本文。在一个实施方案中, B20 系列抗体结合人 VEGF 上的功能性表位, 其包含残基 F17、M18、D19、Y21、Y25、Q89、I91、K101、E103、和 C104。

[0132] 依照本发明的“功能性表位”指抗原中有力地促进抗体结合的氨基酸残基。抗原中贡献巨大的残基中任一个的突变 (例如, 丙氨酸或同系物突变对野生型 VEGF 的突变) 会破坏抗体的结合, 使得抗体的相对亲和力比 (IC₅₀ 突变型 VEGF/IC₅₀ 野生型 VEGF) 会大于 5 (参见 W02005/012359 的实施例 2)。在一个实施方案中, 相对亲和力比是通过溶液结合噬

菌体展示 ELISA 测定的。简言之,将 96 孔 Maxisorp 免疫板 (NUNC) 用 Fab 形式的待测试抗体以 PBS 中 2 μ g/ml 的浓度于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜,并用 PBS、0.5% BSA、和 0.05% Tween20 (PBT) 于室温封闭 2 小时。首先将展示 hVEGF 丙氨酸点突变体 (残基 8-109 形式) 或野生型 hVEGF (8-109) 的噬菌体在 PBT 中的连续稀释液在 Fab 包被的板上于室温温育 15 分钟,并用 PBS、0.05% Tween20 (PBST) 清洗板。用在 PBT 中 1 : 5000 稀释的抗 M13 单克隆抗体辣根过氧化物酶 (Amersham Pharmacia) 偶联物检测所结合的噬菌体,用 3,3',5,5' - 四甲基联苯胺 (TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD) 底物显色大约 5 分钟,用 1.0M H₃PO₄ 淬灭,并以分光光度法于 450nm 读数。IC₅₀ 值的比 (IC₅₀, ala/IC₅₀, wt) 代表了结合亲和力的降低倍数 (相对结合亲和力)。

[0133] (iii) VEGF 受体分子

[0134] 已经鉴定出两种 VEGF 受体,即 Flt-1 (也称作 VEGFR-1) 和 KDR (也称作 VEGFR-2)。Shibuya et al. (1990) *Oncogene* 8:519-527; de Vries et al. (1992) *Science* 255:989-991; Terman et al. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187:1579-1586。每一种受体对每一种 VEGF 家族成员的特异性有所不同,但是 VEGF-A 结合 Flt-1 和 KDR 二者。神经毡蛋白 -1 显示为选择性 VEGF 受体,能够结合肝素结合性 VEGF 同等型 (Soker et al. (1998) *Cell* 92:735-45)。Flt-1 和 KDR 都属于受体酪氨酸激酶 (RTK) 家族。RTK 包含具有多样生物学活性的跨膜受体的大家族。目前,鉴定出至少十九 (19) 个独特 RTK 亚家族。受体酪氨酸激酶 (RTK) 家族包括对于多种细胞类型的生长和分化至关重要的受体 (Yarden 和 Ullrich (1988) *Ann. Rev. Biochem.* 57:433-478; Ullrich 和 Schlessinger (1990) *Cell* 61:243-254)。RTK 的内在功能在配体结合后被活化,导致受体和多种细胞底物磷酸化,随后导致多种细胞应答 (Ullrich & Schlessinger (1990) *Cell* 61:203-212)。如此,受体酪氨酸激酶介导的信号转导通过与特定生长因子 (配体) 的细胞外相互作用而启动,通常接着是受体二聚化、刺激内在蛋白质酪氨酸激酶活性和受体转磷酸。由此为细胞内信号转导分子创建结合位点,并导致与一系列细胞质信号传导分子的复合物形成,推动适宜细胞应答。(例如细胞分裂、分化、代谢影响、细胞外微环境的变化) 参见 Schlessinger 和 Ullrich (1992) *Neuron* 9:1-20。在结构上,Flt-1 和 KDR 都具有胞外域中的七个免疫球蛋白样结构域、单个跨膜区、和被激酶插入域中断的共有酪氨酸激酶序列。Matthews et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9026-9030; Terman et al. (1991) *Oncogene* 6:1677-1683。

[0135] 特异性结合 VEGF 的 VEGF 受体分子或其片段可以在本发明的方法中用于结合和隔绝 VEGF 蛋白,由此阻止它发信号。在某些实施方案中,VEGF 受体分子或其 VEGF 结合片段是可溶性形式,诸如 sFlt-1。受体的可溶性形式发挥对 VEGF 蛋白生物学活性的抑制效应,其通过结合 VEGF,由此阻止它结合其在靶细胞表面上存在的天然受体来实现。还包括 VEGF 受体融合蛋白,下文描述了它们的例子。

[0136] 嵌合 VEGF 受体蛋白指具有自至少两种不同蛋白质 (其中至少一种是 VEGF 受体蛋白,例如 flt-1 或 KDR 受体) 衍生的氨基酸序列且能够结合并抑制 VEGF 生物学活性的受体分子。在某些实施方案中,本发明的嵌合 VEGF 受体蛋白由自只有两种不同 VEGF 受体分子衍生的氨基酸序列组成;然而,可以将包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、或所有七个来自 flt-1 和 / 或 KDR 受体胞外配体结合区的 Ig 样结构域的氨基酸序列连接至来自其它无关蛋白质的氨基酸序列,例如免疫球蛋白序列。与 Ig 样结构域组合的其它氨基酸

序列对于本领域普通技术人员会是显而易见的。嵌合 VEGF 受体蛋白的例子包括例如可溶性 Flt-1/Fc、KDR/Fc、或 FLt 1/KDR/Fc (也称作 VEGF Trap) (参见例如 PCT 申请公开文本 No. W097/44453)。

[0137] 本发明的可溶性 VEGF 受体蛋白或嵌合 VEGF 受体蛋白包括没有经跨膜结构域而固定至细胞表面的 VEGF 受体蛋白。因此, VEGF 受体 (包括嵌合受体蛋白) 的可溶性形式, 虽然能够结合并灭活 VEGF, 但是不包含跨膜结构域, 并如此一般不会变成与该分子在其中表达的细胞的细胞膜相结合。

[0138] III. 抗 VEGF 抗体的治疗用途

[0139] 本发明涵盖抗血管发生疗法, 一种致力于抑制为支持肿瘤生长而提供营养所需要的肿瘤血管发育的新型癌症治疗策略。因为血管发生涉及原发性肿瘤生长和转移二者, 所以本发明提供的抗血管发生治疗不但能够在原发性位点抑制肿瘤的赘生性生长, 而且能够预防肿瘤在继发性位点的转移, 从而容许由其它治疗剂攻击肿瘤。

[0140] 具体地, 本发明提供一种治疗诊断有先前治疗过的转移性乳腺癌的患者的方法, 包括对患者进行组合化疗与施用有效量抗 VEGF 抗体的治疗方案。

[0141] 组合疗法

[0142] 本发明的特征在于至少一种 VEGF 特异性拮抗剂与一种或多种别的抗癌疗法的组合的用途。抗癌疗法的例子包括但不限于手术、放射疗法 (放疗)、生物疗法、免疫疗法、化疗、或这些疗法的组合。另外, 细胞毒剂、抗血管发生剂和抗增殖剂可以与 VEGF 特异性拮抗剂组合使用。

[0143] 在某些方面, 本发明提供一种治疗先前治疗过的乳腺癌的方法, 其通过将有效量的抗 VEGF 抗体和一种或多种化疗剂施用于对先前治疗过的转移性癌症易感或诊断有先前治疗过的转移性癌症的患者。多种化疗剂可用于本发明的组合治疗方法。本文中在“定义”下提供或本文中描述所涵盖的化疗剂的例示性和非限制性列表。

[0144] 在一个例子中, 本发明的特征在于 VEGF 特异性拮抗剂与一种或多种化疗剂 (例如混合物) 或其任意组合的用途。组合施用包括同时施用、使用分开的配制剂或单一药物配制剂, 及任一次序的序贯施用, 其中优选的是有一段时间所有活性剂同时发挥它们的生物学活性。此类化疗剂的制备和剂量给药方案可依照制造商的使用说明来使用或由熟练从业人员凭经验确定。化疗的制备和剂量给药方案还记载于 Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)。化疗剂可以在施用 VEGF 特异性拮抗剂之前或之后施用, 或者可以与它同时给予。

[0145] 在一些其它方面, 对于本发明抗体的组合肿瘤疗法有用的其它治疗剂包括涉及肿瘤生长的其它因子诸如但不限于 EGFR、ErbB2 (也称作 Her2)、ErbB3、ErbB4、或 TNF 的拮抗剂。有时, 还对患者施用一种或多种细胞因子可能是有益的。在一个实施方案中, 与生长抑制剂一起共施用抗 VEGF 抗体。例如, 可以先施用生长抑制剂, 接着是 VEGF 抗体。然而, 也涵盖同时施用或先施用 VEGF 抗体。生长抑制剂的合适剂量就是当前所用的那些, 而且可以由于生长抑制剂与抗 VEGF 抗体的联合作用 (协同) 而降低。

[0146] 本文中的配制剂还可含有所治疗具体适应证所必需的超过一种活性化合物, 优选活性互补且彼此没有不利影响的。例如, 可能希望在一种配制剂中进一步提供结合 EGFR、VEGF (例如结合 VEGF 上不同表位的抗体)、VEGFR、或 ErbB2 (例如 Herceptin®) 的抗体。

或者 / 另外,所述组合物可包含细胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂和 / 或小分子 VEGFR 拮抗剂。合适的是,此类分子以对于预定目的有效的量组合存在。

[0147] 在某些方面,对于本发明抗体的组合癌症疗法有用的其它治疗剂包括其它抗血管发生剂。已经鉴定了许多抗血管发生剂,而且是本领域已知的,包括 Carmeliet 和 Jain(2000) 列出的那些。在一个实施方案中,本发明的抗 VEGF 抗体与另一种 VEGF 拮抗剂或 VEGF 受体拮抗剂诸如 VEGF 变体、可溶性 VEGF 受体片段、能够阻断 VEGF 或 VEGFR 的适体、中和性抗 VEGFR 抗体、VEGFR 酪氨酸激酶的低分子量抑制剂及其任意组合联合使用。或者 / 另外,可以对患者共施用两种或更多种抗 VEGF 抗体。

[0148] 对于疾病的预防或治疗,VEGF 特异性拮抗剂的适宜剂量会取决于要治疗的疾病的类型(如上文定义的)、疾病的严重程度和过程、施用 VEGF 特异性拮抗剂是为了预防还是治疗目的、在先疗法、患者的临床史和对 VEGF 特异性拮抗剂的响应、及主治内科医师的判断。可以将 VEGF 特异性拮抗剂一次性或者在一系列治疗中适当地施用于患者。在组合治疗方案中,本发明的 VEGF 特异性拮抗剂和一种或多种抗癌治疗剂以治疗有效量或协同量施用。如本文中使用的,治疗有效量指导致如上所述癌症得到减轻或抑制的本发明组合物的施用量,或 VEGF 特异性拮抗剂和一种或多种其它治疗剂的共施用量。治疗协同量指协同地或显著地减轻或消除与特定疾病有关的状况或症状所必需的 VEGF 特异性拮抗剂和一种或多种其它治疗剂的量。

[0149] VEGF 特异性拮抗剂和一种或多种其它治疗剂可同时或序贯施用,量和时间足以减少或消除肿瘤、休眠肿瘤、或微转移的发生或复发。VEGF 特异性拮抗剂和一种或多种其它治疗剂可作为维持疗法来施用,以预防或降低肿瘤复发可能性。

[0150] 正如本领域普通技术人员会理解的,化疗剂或其它抗癌剂的适宜剂量一般大约会是临床疗法(例如单独地或与其它化疗剂组合地施用化疗剂的)中早就采用的剂量。剂量变化有可能会随所治疗的状况而发生。施用治疗的内科医师会能够确定对受试者个体适宜的剂量。

[0151] 在上述治疗方案之外,患者可经受放射疗法。

[0152] 在某些实施方案中,施用的 VEGF 抗体是完整裸抗体。然而,VEGF 抗体可以偶联细胞毒剂。在某些实施方案中,偶联的抗体和 / 或它结合的抗原被细胞内化,导致偶联物杀伤它结合的癌细胞方面的治疗功效升高。在一个实施方案中,细胞毒剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。此类细胞毒剂的例子包括美登木素生物碱、加利车霉素、核糖核酸酶和 DNA 内切核酸酶。

[0153] 本发明的特征还在于一种指导具有先前治疗过的乳腺癌的人受试者的方法,其通过提供说明书来接受抗 VEGF 抗体的治疗,从而延长无进展存活的时间、降低受试者癌症复发的可能性、或提高受试者存活的可能性。在一些实施方案中,该方法进一步包括提供说明书来接受至少一种化疗剂的治疗。抗 VEGF 抗体的治疗可以与化疗剂的治疗并行或序贯进行。在某些实施方案中,如指导方法指导的那样治疗受试者。通过在有或无化疗的情况中施用抗 VEGF 抗体对乳腺癌的治疗可以持续至癌症复发或死亡。

[0154] 本发明进一步提供一种宣传方法,包括宣传施用抗 VEGF 抗体来在人受试者中治疗先前治疗过的乳腺癌。在一些实施方案中,该方法进一步包括宣传施用至少一种化疗剂。抗 VEGF 抗体的施用可以与化疗剂的施用并行或序贯进行。宣传可以通过任何可得手段来

进行。在一些实施方案中,宣传通过伴随抗 VEGF 抗体之商业性配制剂的包装插页来进行。宣传也可以通过伴随化疗剂之商业性配制剂的包装插页来进行。宣传可以通过书面或口头告知内科医师或健康护理提供者来进行。在一些实施方案中,宣传通过包装插页来进行,其中包装插页提供说明书来接受抗 VEGF 抗体的乳腺癌疗法。在又一个实施方案中,包装插页包括实施例 1 下的一些或所有结果。在一些实施方案中,宣传之后是在有或无化疗剂的情况中用抗 VEGF 抗体治疗受试者。

[0155] 本发明提供一种商业方法,包括销售抗 VEGF 抗体,用于在人受试者中治疗先前治疗过的乳腺癌,从而延长受试者无进展存活的时间、降低受试者癌症复发的可能性、或提高受试者存活的可能性。在一些实施方案中,该方法进一步包括销售化疗剂,用于与抗 VEGF 抗体组合使用。在一些实施方案中,销售之后是在有或无化疗剂的情况中用抗 VEGF 抗体治疗受试者。

[0156] 还提供一种商业方法,包括与抗 VEGF 抗体组合销售化疗剂,用于在人受试者中治疗先前治疗过的乳腺癌,从而延长受试者无进展存活的时间、降低受试者癌症复发的可能性、或提高受试者存活的可能性。在一些实施方案中,销售之后是用化疗剂和抗 VEGF 抗体的组合治疗受试者。

[0157] IV. 剂量和持续时间

[0158] VEGF 特异性拮抗剂组合物会以一种符合良好的医学实践的方式配制、确定剂量及施用。在此内容中考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体受试者、患者个体的临床状况、病症的起因、投递药剂的部位、施药的方法、施药的日程安排、和医学从业人员知道的其它因素。要施用的 VEGF 特异性拮抗剂的“治疗有效量”会由此类考虑事项来决定,而且是预防、改善、或治疗、或稳定癌症;延长距进展的时间(无进展存活的持续时间);或者治疗或预防肿瘤、休眠的肿瘤、或微转移(先前治疗过的癌症的)发生或复发所必需的最小量。VEGF 特异性拮抗剂不是必须的但任选可以与一种或多种当前用于预防或治疗癌症或发生癌症的风险的药剂一起配制。此类其它药剂的有效量取决于配制剂中存在的 VEGF 特异性拮抗剂的量、病症或治疗的类型、及上文讨论的其它因素。这些一般以与以前所用相同的剂量和施用路径来使用,或者以以前所采用剂量的约 1-99% 施用。

[0159] 根据疾病的类型和严重程度,约 $1 \mu\text{g/kg}$ 至 100mg/kg (例如 0.1mg/kg - 20mg/kg) VEGF 特异性拮抗剂作为初始候选剂量施用于患者,无论例如通过一次或多次分开的施用或通过持续输注。一个典型的日剂量范围可以是约 $1 \mu\text{g/kg}$ 至约 100mg/kg 或更多,这取决于上文所述因素。特别想要的剂量包括例如 5mg/kg 、 7.5mg/kg 、 10mg/kg 、和 15mg/kg 。对于几天或更长时间里的重复施用,根据状况,治疗为持续直到癌症得到治疗,如通过上文所述或本领域已知方法测量的。然而,其它剂量方案可以是有用的。在一个例子中,如果 VEGF 特异性拮抗剂是抗体的话,本发明的抗体每周、每两周、或每三周施用一次,剂量范围为约 5mg/kg 至约 15mg/kg ,包括但不限于 5mg/kg 、 7.5mg/kg 、 10mg/kg 或 15mg/kg 。本发明疗法的进展易于通过常规技术和测定法来监测。在其它实施方案中,此类剂量给药方案与化疗方案组合使用,作为用于治疗先前治疗过的转移性乳腺癌的二线疗法。下文实施例 1 中提供关于合适剂量的进一步信息。

[0160] 治疗的持续时间会持续像医嘱指示的那样长时间或直到实现想要的治疗效果(例如本文所述那些)。

[0161] 依照已知方法给受试者（例如人类患者）施用本发明的 VEGF 特异性拮抗剂，诸如静脉内施用（像推注或通过一段时间里的连续输注），通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、表面、或吸入路径。如果 VEGF 拮抗作用与广泛的副作用或毒性有关，那么局部施用是特别想要的。回体 (ex vivo) 策略也可用于治疗性应用。回体策略涉及用编码 VEGF 拮抗剂的多核苷酸转染或转导自受试者获得的细胞。然后将经过转染或转导的细胞返回受试者。细胞可以是极其多种类型之任一，包括但不限于造血细胞（例如，骨髓细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、T 细胞、或 B 细胞）、成纤维细胞、上皮细胞、内皮细胞、角质形成细胞、或肌肉细胞。

[0162] 例如，如果 VEGF 特异性拮抗剂是抗体的话，通过任何合适手段来施用抗体，包括胃肠外、皮下、腹膜内、肺内、和鼻内，及（如果想要局部免疫抑制治疗的话）病灶内施用。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下施用。另外，合适的是，通过脉冲输注来施用抗体，特别是使用递减剂量的抗体。优选的是，通过注射给予剂量给药，最优选的是，通过静脉内或皮下注射给予剂量给药，这部分取决于施药是短期的还是长期的。

[0163] 在另一个例子中，在病症或肿瘤位置允许时，局部施用 VEGF 特异性拮抗剂化合物，例如通过直接注射，而且可以周期性重复注射。也可以在手术切除肿瘤后系统地 / 全身地将 VEGF 特异性拮抗剂投递至受试者或直接投递至肿瘤细胞，例如肿瘤或肿瘤床，用以预防或降低局部复发或转移（例如休眠肿瘤或微转移肿瘤）。

[0164] 或者，可以将含有编码 VEGF 特异性拮抗剂的核酸序列的抑制性核酸分子或多核苷酸投递至受试者中的适宜细胞。在某些实施方案中，可以将所述核酸导向肿瘤自身。

[0165] 可以通过对于所采用的载体而言适宜的任何手段将核酸导入细胞中。许多此类方法是本领域公知的 (Sambrook et al., supra, 和 Watson et al., Recombinant DNA, Chapter 12, 2d edition, Scientific American Books, 1992)。基因投递方法的例子包括脂质体介导的转染、电穿孔、磷酸钙 / DEAE 右旋糖苷法、基因枪、和显微注射。

[0166] V. 药物配制剂

[0167] 依照本发明使用的抗体的治疗用配制剂以冻干配制剂或水溶液的形式，通过将具有期望纯度的抗体与任选的制药学可接受载体、赋形剂或稳定剂 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) 混合来制备供贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的，而且包括缓冲剂，诸如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂（诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵；氯化己烷双胺；苯扎氯铵、苯索氯铵；酚、丁醇或苯甲醇；对羟基苯甲酸烃基酯，诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚）；低分子量（少于约 10 个残基）多肽；蛋白质，诸如血清清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如 EDTA；糖类，诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐相反离子，诸如钠；金属复合物（例如 Zn-蛋白质复合物）；和 / 或非离子表面活性剂，诸如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。冻干抗 VEGF 抗体配制剂的例子记载于 WO 97/04801，通过述及明确收入本文。

[0168] 任选的是，配制剂含有药学可接受盐，典型的是例如氯化钠，且常常是大约为生理浓度。任选的是，本发明的配制剂可含有药学可接受防腐剂。在一些实施方案中，防腐剂的

浓度范围为 0.1-2.0%，典型的是 v/v。合适的防腐剂包括药学领域已知的那些。苯甲醇、酚、间甲酚、对羟基苯甲酸甲酯、和对羟基苯甲酸丙酯是防腐剂的例子。任选的是，本发明的配制剂可包括药学可接受表面活性剂，其浓度为 0.005-0.02%。

[0169] 在一个实施方案中，在 100mg 和 400mg 不含防腐剂的、单次使用管形瓶中供应贝伐单抗来投递 4ml 或 16ml 贝伐单抗 (25mg/ml)，用于治疗用途。在 240mg 脱水 α ， α -海藻糖 (dehydrate)、23.2mg 磷酸钠（单碱的，单水合物）、4.8mg 磷酸钠（二碱的，无水的）、1.6mg 聚山梨酯 20、和注射用水，USP 中配制 100mg 产物。在 960mg 脱水 α ， α -海藻糖、92.8mg 磷酸钠（单碱的，单水合物）、19.2mg 磷酸钠（二碱的，无水的）、6.4mg 聚山梨酯 20、和注射用水，USP 中配制 400mg 产物。还可参见贝伐单抗的标签。贝伐单抗当前可在某些国家和地区购得。

[0170] 本文中的配制剂还可含有所治疗具体适应症所必需的超过一种活性化合物，优选活性互补且彼此没有不利影响的。例如，可能希望在一种配制剂中进一步提供结合 EGFR、VEGF（例如结合 VEGF 上不同表位的抗体）、VEGFR、或 ErbB2（例如 Herceptin®）的抗体。或者 / 另外，组合物可包含细胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂和 / 或 VEGFR 拮抗剂（例如小分子抑制剂、多肽、等）。合适的是，此类分子以对于预定目的有效的量组合存在。

[0171] 活性成分还可包载入例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊（例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚（甲基丙烯酸甲酯）微胶囊）、胶状药物投递系统（例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）、或粗滴乳状液。此类技术披露于例如 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)。

[0172] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质，该基质以定型产品的形式存在，例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶（例如聚（2-羟乙基-甲基丙烯酸酯）或聚（乙烯醇））、聚交酯（美国专利 No. 3,773,919）、L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如 LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体）及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子 100 天以上，但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当封装的抗体在体内长时间维持时，它们可能由于暴露于 37℃ 的潮湿环境而变性或聚集，导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如，如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换而形成分子间 S-S 键，那么可通过修饰巯基、由酸性溶液冻干、控制湿度、采用适宜添加剂和开发特定的聚合物基质组合物来实现稳定化。

[0173] 用于体内施用的配制剂可以是无菌的。这可容易地通过使用无菌滤膜过滤来实现。

[0174] VI. 治疗功效

[0175] 本发明的治疗的主要优点是在人患者中产生显著的抗癌效果，不引起显著毒性或不利作用，使得患者总体受益于治疗的能力。本发明的治疗的功效可通过评估癌症治疗中常用的各种终点来测量，包括但不限于肿瘤消退、肿瘤重量或尺寸缩小、距进展的时间、存活的持续时间、无进展存活、总体响应率、响应的持续时间、和生活质量。因为本发明的抗血管发生剂靶向肿瘤血管系统且不必然靶向赘生性细胞自身，所以它们代表了一类独特的抗癌药，并因此可要求对药物的临床响应的独特测量和定义。例如，二维分析中大于 50% 的肿

瘤缩小是宣告响应的标准截留。然而,本发明的抗 VEGF 抗体可引起对转移性扩散的抑制,没有原发性肿瘤的缩小,或者可仅仅发挥抑制肿瘤的效果。因而,可任选采用测定抗血管发生疗法的功效的新办法,包括例如测量血管发生的血浆或尿标志物及经由放射学成像测量响应。

[0176] 在另一个实施方案中,本发明提供用于延长对先前治疗过的癌症易感或诊断有先前治疗过的癌症的人患者的无进展存活的方法。距疾病进展时间定义为自施用药物至疾病进展或死亡的时间。在一个实施方案中,本发明使用抗 VEGF 抗体和一种或多种化疗剂的组合治疗将无进展存活显著延长至少约 0.5 个月、1 个月、2 个月、2.1 个月、2.2 个月、2.8 个月或更长。在一个实施方案中,与单独用化疗治疗相比,本发明使用抗 VEGF 抗体和一种或多种化疗剂的组合治疗将无进展存活显著延长约 1 至约 5 个月。在一个实施方案中,与没有贝伐单抗的疗法中的 5.1 个月相比,用贝伐单抗治疗的患者中以月计的 PFS 中值是 7.2, HR 为 0.775, p 值 (log-序) 为 0.0072。在另一个实施方案中,以月计的 PFS 见图 3。

[0177] 在又一个实施方案中,本发明的治疗在用各种治疗剂治疗的先前治疗过的癌症易感或诊断有先前治疗过的癌症的人患者群中显著提高响应率。响应率定义为接受治疗的患者中响应治疗的百分比。一方面,与单独用化疗治疗的群相比,本发明使用抗 VEGF 抗体和一种或多种化疗剂的组合治疗显著提高接受治疗的患者群中的响应率。

[0178] 一方面,本发明提供用于在对癌症易感或诊断有癌症的人患者或人患者群中延长响应的持续时间的方法。响应的持续时间定义为自初始响应至疾病进展的时间。

[0179] 在一个实施方案中,本发明可用于延长对癌症易感或诊断有癌症的人患者的存活持续时间。

[0180] VII. 抗体生成

[0181] (i) 多克隆抗体

[0182] 多克隆抗体优选在动物中生成,通过多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射相关抗原和佐剂。使用双功能或衍生化试剂,例如马来酰亚氨基苯甲酰基磺基琥珀酰亚胺酯 (通过半胱氨酸残基偶联)、N-羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、 SOCl_2 或 $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中 R 和 R_1 是不同的烃基),将相关抗原与在待免疫物种中有免疫原性的蛋白质偶联可能是有用的,例如匙孔虫凝血蛋白、血清清蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0183] 通过将例如 100 μg 或 5 μg 蛋白质或偶联物 (分别用于兔或小鼠) 与 3 倍体积的弗氏完全佐剂混和并将该溶液皮内注射于多个部位,将动物针对抗原、免疫原性偶联物或衍生物进行免疫。1 个月后,通过多个部位的皮下注射,用弗氏完全佐剂中初始量 1/5-1/10 的肽或偶联物对动物进行加强免疫。7-14 天后,采集动物的血液并测定血清的抗体滴度。对动物进行加强免疫直到滴度达到平台 (plateau)。优选的是,将动物用相同抗原但与不同蛋白质和 / 或通过不同交联剂偶联得到的偶联物进行加强免疫。偶联物还可在重组细胞培养中作为蛋白质融合物来制备。同样,适当使用凝聚剂诸如明矾来增强免疫应答。

[0184] (ii) 单克隆抗体

[0185] 本领域有多种方法可用于制备本文中的单克隆抗体。例如,单克隆抗体可以使用最初由 Kohler 等, Nature, 256 :495 (1975) 记载的杂交瘤方法来生成,或者可以通过 DNA 重组方法 (美国专利 No. 4,816,567) 来生成。

[0186] 在杂交瘤方法中,如上所述免疫小鼠或其它适宜的宿主动物,诸如仓鼠或猕猴,以引发生成或能够生成如下抗体的淋巴细胞,所述抗体将特异性结合用于免疫的蛋白质。或者,可以在体外免疫淋巴细胞。然后使用合适的融合剂诸如聚乙二醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤细胞 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。

[0187] 将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养,所述培养基优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质。例如,若亲本骨髓瘤细胞缺少次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶 (HGPRT 或 HPRT),则用于杂交瘤的培养基典型的将含有次黄嘌呤、氨基喋呤和胸苷 (HAT 培养基),这些物质阻止 HGPRT 缺陷细胞生长。

[0188] 优选的骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持所选择的抗体生产细胞稳定且高水平地生成抗体、且对培养基诸如 HAT 培养基敏感的骨髓瘤细胞。其中,骨髓瘤细胞系的例子是鼠骨髓瘤系,诸如那些自可从索尔克研究所细胞分配中心 (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA) 获得的 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤和可从美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA) 获得的 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也可用于生成单克隆抗体 (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur 等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

[0189] 可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养基测定针对抗原的单克隆抗体的生成。优选的是,通过免疫沉淀或通过体外结合测定法,诸如放射性免疫测定法 (RIA) 或酶联免疫吸附测定法 (ELISA),测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。

[0190] 在鉴定出生成具有期望特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,所述克隆就可通过有限稀释操作程序进行亚克隆,并通过标准方法进行培养 (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。适于这一目的的培养基包括例如 D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可在动物中作为腹水瘤进行体内培养。

[0191] 可通过常规免疫球蛋白纯化操作程序,诸如例如蛋白 A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析、或亲和层析,将由亚克隆分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清适当分开。

[0192] 编码单克隆抗体的 DNA 易于使用常规操作程序分离和测序 (例如通过使用能够特异性结合编码单克隆抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。杂交瘤细胞是此类 DNA 的来源。一旦分离,就可将 DNA 置于表达载体中,然后将该表达载体转染到不另外生成免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞中,诸如大肠杆菌细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或骨髓瘤细胞,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。抗体的重组生产在下文中有更详细描述。

[0193] 在另一个实施方案中,可从使用 McCafferty 等, *Nature*, 348:552-554 (1990) 中记载的技术构建的噬菌体抗体库中分离抗体或抗体片段。Clackson 等, *Nature*, 352:624-628 (1991) 及 Marks 等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) 分别记载了使用噬菌体文库进行的鼠和人抗体的分离。后续出版物记载了通过链改组生成高亲和力 (nM 范围) 的人抗

体 (Marks 等, Bio/Technology 10 :779-783(1992)), 以及组合感染和体内重组作为构建非常大的噬菌体文库的策略 (Waterhouse 等, Nuc. Acids Res. 21 :2265-2266(1993))。如此, 这些技术是用于分离单克隆抗体的传统单克隆抗体杂交瘤技术的可行替代方法。

[0194] 也可以修饰 DNA, 例如通过用人重链和轻链恒定域的编码序列替代同源鼠序列 (美国专利 No. 4, 816, 567 ;Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 :6851(1984)), 或通过将免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列共价连接。

[0195] 典型地, 用此类非免疫球蛋白多肽替代抗体的恒定域, 或者用它们替代抗体的一个抗原结合位点的可变域, 以产生嵌合二价抗体, 它包含对一种抗原具有特异性的一个抗原结合位点和对不同抗原具有特异性的另一个抗原结合位点。

[0196] (iii) 人源化抗体和人抗体

[0197] 人源化抗体具有一个或多个导入其中的来自非人来源的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基常常称作“输入”残基, 它们通常取自“输入”可变域。人源化可基本上遵循 Winter 及其同事的方法进行 (Jones 等, Nature, 321 :522-525(1986) ;Riechmann 等, Nature, 332 :323-327(1988) ;Verhoeyen 等, Science, 239 :1534-1536(1988)), 即用啮齿类 CDR 或 CDR 序列替代人抗体的相应序列。因此, 此类“人源化”抗体是嵌合抗体 (美国专利 4, 816, 567), 其中基本上小于整个人可变域的区域用来自非人物种的相应序列替代。在实践中, 人源化抗体通常是其中一些 CDR 残基以及可能一些 FR 残基用来自啮齿类抗体中类似位点的残基替代的人抗体。

[0198] 用于制备人源化抗体的人可变域的选择, 包括轻链和重链, 对于降低抗原性非常重要。依照所谓的“最适” (best-fit) 法, 用啮齿类抗体的可变域序列对已知的人可变域序列的整个文库进行筛选。然后选择与啮齿类序列最接近的人序列作为人源化抗体的人框架 (FR) (Sims 等, J. Immunol., 151 :2296(1993) ;Chothia 等, J. Mol. Biol., 196 :901(1987))。另一种方法使用由特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列衍生的特定框架。同一框架可被用于数种不同的人源化抗体 (Carter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 :4285(1992) ;Presta 等, J. Immunol., 151 :2623(1993))。

[0199] 更为重要的是, 抗体在人源化后保持对抗原的高亲和力及其它有利的生物学特性。为了实现这一目的, 依照一个实施方案, 通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念性人源化产物的方法来制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的, 且为本领域技术人员所熟悉。还可获得图解和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序。检查这些显示图像能够分析残基在候选免疫球蛋白序列行使功能中的可能作用, 即分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。这样, 可从受体和输入序列中选出 FR 残基并进行组合, 从而获得期望抗体特征, 诸如对靶抗原的亲和力提高。通常, CDR 残基直接且最实质地涉及对抗原结合的影响。

[0200] 人源化抗 VEGF 抗体及其亲和力成熟变体记载于例如 2005 年 2 月 26 日公告的美国专利 No. 6, 884, 879。

[0201] 现在有可能生成在缺乏内源免疫球蛋白生成的情况下能够在免疫时生成抗体完整全集的转基因动物 (例如小鼠)。例如, 已经描述了嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区 (JH) 基因的纯合删除导致内源抗体生成的完全抑制。在此类种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将导致在抗原攻击时生成抗体。参见例如 Jakobovits 等,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 :2551(1993) ;Jakobovits 等, Nature, 362 :255-258(1993) ; Bruggermann 等, Yearin Immuno., 7 :33(1993) ;及 Duchosal 等, Nature, 355 :258(1992)。

[0202] 或者,噬菌体展示技术 (McCafferty 等, Nature 348 :552-553(1990)) 可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变域 (V) 基因全集生成抗体和抗体片段。依照这种技术,将抗体可变域基因以符合读码框的方式克隆入丝状噬菌体诸如 M13 或 fd 的主要或次要外壳蛋白基因,并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状噬菌体颗粒包含噬菌体基因组的单链 DNA 拷贝,以抗体的功能特性为基础进行选择也导致编码展示那些特性的抗体的基因得到选择。如此,噬菌体模拟 B 细胞的一些特性。噬菌体展示可以以多种形式进行,综述参见例如 Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3 :564-571(1993)。V 基因区段的数种来源可用于噬菌体展示。Clackson 等, Nature 352 :624-628(1991) 从衍生自经免疫小鼠脾的小型 V 基因随机组合文库中分离出大量不同的抗噁唑酮抗体。可基本上遵循 Marks 等, J. Mol. Biol. 222 :581-597(1991) 或 Griffith 等, EMBO J. 12 :725-734(1993) 所记载的技术,自未免疫人供体构建 V 基因全集和分离针对大量不同抗原 (包括自身抗原) 的抗体。还可参见美国专利 No. 5, 565, 332 和 5, 573, 905。

[0203] 如上所述,还可通过体外活化 B 细胞来生成抗体 (参见美国专利 No. 5, 567, 610 和 5, 229, 275)。

[0204] 人单克隆抗 VEGF 抗体记载于 1998 年 3 月 24 日公告的美国专利 No. 5, 730, 977。

[0205] (iv) 抗体片段

[0206] 已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上,通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段 (参见例如 Morimoto 等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24 :107-117(1992) ;及 Brennan 等, Science, 229 :81(1985))。然而,现在可直接由重组宿主细胞生成这些片段。例如,可以从上文讨论的噬菌体抗体库分离抗体片段。或者,可直接从大肠杆菌回收 Fab' -SH 片段并化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter 等, Bio/Technology 10 :163-167(1992))。依照另一种方法,可直接从重组宿主细胞培养物分离 F(ab')₂ 片段。用于生成抗体片段的其它技术对熟练从业人员将是显而易见的。在其它实施方案中,所选抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。参见 WO 93/16185。

[0207] (vi) 其它氨基酸序列修饰

[0208] 设想了本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能希望改进抗体的结合亲和力和 / 或其它生物学特性。通过将适宜的核苷酸变化引入抗体核酸或者通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内的残基删除和 / 或插入和 / 或替代。只要最终的构建物具有期望的特性,可进行删除、插入和替代的任意组合以获得最终的构建物。氨基酸变化还可改变抗体的翻译后加工,诸如改变糖基化位点的数目或位置。

[0209] 可用于鉴定抗体中作为优选诱变位置的某些残基或区域的一种方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如 Cunningham and Wells, Science 244 :1081-1085(1989) 所记载的。这里,鉴定了一个残基或一组靶残基 (例如带电荷的残基,诸如精氨酸、天冬氨酸、组氨酸、赖氨酸和谷氨酸),并用中性或带负电荷的氨基酸 (最优选丙氨酸或聚丙氨酸) 替换,以影响氨基酸与抗原的相互作用。然后通过在对替代位点引入更多或其它变体,推敲那些对替代展现出功能敏感性的氨基酸位置。如此,虽然引入氨基酸序列变异的位点是预先决定的,但是

突变本身的性质不需要预先决定。例如,为了分析给定位点处的突变的后果,在靶密码子或区域进行丙氨酸扫描诱变或随机诱变,并对所表达的抗体变体筛选期望活性。

[0210] 氨基酸序列插入包括氨基和 / 或羧基末端的融合,长度范围从一个残基至包含上百个或更多残基的多肽,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有 N- 末端甲硫氨酰残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其它插入变体包括在抗体的 N- 或 C- 末端融合酶 (例如用于 ADEPT) 或延长抗体血清半衰期的多肽。

[0211] 另一类变体是氨基酸替代变体。这些变体在抗体分子中有至少一个氨基酸残基用不同残基替换。最感兴趣进行替代诱变的位点包括高变区,但也设想了 FR 改变。

[0212] 对抗体生物学特性的实质性修饰通过选择在保持以下方面的效果上显著不同的替代来完成 : (a) 替代区域的多肽主链的结构,例如作为折叠片或螺旋构象, (b) 靶位点处分子的电荷或疏水性,或 (c) 侧链的体积。根据其侧链特性的相似性,可以将氨基酸如下分组 (A. L. Lehninger, Biochemistry, 第 2 版, pp. 73-75, Worth Publishers, New York, (1975)) :

[0213] (1) 非极性的 :Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、Ile (I)、Pro (P)、Phe (F)、Trp (W)、Met (M)

[0214] (2) 不带电荷的、极性的 :Gly (G)、Ser (S)、Thr (T)、Cys (C)、Tyr (Y)、Asn (N)、Gln (Q)

[0215] (3) 酸性的 :Asp (D)、Glu (E)

[0216] (4) 碱性的 :Lys (K)、Arg (R)、His (H)

[0217] 或者,基于共同的侧链特性,可以将天然存在残基如下分组 :

[0218] (1) 疏水性的 :正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile ;

[0219] (2) 中性、亲水性的 :Cys、Ser、Thr、Asn、Gln ;

[0220] (3) 酸性的 :Asp、Glu ;

[0221] (4) 碱性的 :His、Lys、Arg ;

[0222] (5) 影响链取向的残基 :Gly、Pro ;

[0223] (6) 芳香族的 :Trp、Tyr、Phe。

[0224] 非保守替代将需要用这些类别之一的一个成员替换另一个类别的。

[0225] 任何不涉及保持抗体正确构象的半胱氨酸残基也可替代,一般用丝氨酸,以改进分子的氧化稳定性和防止异常交联。相反,可以向抗体中添加半胱氨酸键以改进其稳定性 (特别是当抗体是抗体片段诸如 Fv 片段时)。

[0226] 替代变体的一个例子牵涉替代亲本抗体 (例如人源化或人抗体) 的一个或多个高变区残基。一般而言,选择用于进一步开发的所得变体相对于产生它们的亲本抗体将具有改良的生物学特性。用于产生此类替代变体的一种便利方法涉及使用噬菌体展示的亲和力成熟。简而言之,将数个高变区位点 (例如 6-7 个位点) 突变,在每个位点产生所有可能的氨基酸替代。如此产生的抗体变体以单价形式展示在丝状噬菌体颗粒上,作为与每个颗粒内包装的 M13 基因 III 产物的融合物。然后如本文所公开的对噬菌体展示的变体筛选其生物学活性 (例如结合亲和力)。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点,可进行丙氨酸扫描诱变以鉴定对抗原结合具有重要贡献的高变区残基。或者 / 另外,分析抗原 - 抗体复合物的晶体结构,以鉴定抗体与人 VEGF 之间的接触点可能是有益的。此类接触残基及邻近残基是依照本文详述的技术进行替代的候选位点。一旦产生此类变体,就如本文所述对该组变体

进行筛选,可选择在一种或多种相关测定法中具有优良特性的抗体用于进一步的开发。

[0227] 抗体的另一类氨基酸变体改变了抗体的原始糖基化样式。改变意味着删除在抗体中发现的一个或多个碳水化合物模块,和/或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。

[0228] 抗体的糖基化典型的或是 N-连接的或是 O-连接的。N-连接指碳水化合物模块附着于天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中 X 是除脯氨酸外的任何氨基酸)是将碳水化合物模块酶促附着于天冬酰胺侧链的识别序列。如此,多肽中这两种三肽序列任一的存在产生了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化指将糖类 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,最常见的是丝氨酸或苏氨酸,但也可使用 5-羟脯氨酸或 5-羟赖氨酸。

[0229] 对抗体添加糖基化位点可通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列而便利的完成(用于 N-连接的糖基化位点)。该改变还可通过向原始抗体的序列中添加或替代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基来进行(用于 O-连接的糖基化位点)。

[0230] 若抗体包含 Fc 区,则可改变附着其上的碳水化合物。例如,美国专利申请 US 2003/0157108 A1(Presta, L.) 中记载了有缺少岩藻糖的成熟碳水化合物结构附着于抗体 Fc 区的抗体。还可参见 US 2004/0093621 A1(Kyowa HakkoKogyo Co., Ltd.)。WO 03/011878(Jean-Mairet et al.) 和美国专利 No. 6, 602, 684(Umana et al.) 中提到了在附着于抗体 Fc 区的碳水化合物中有等分 N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 的抗体。WO 97/30087(Patel et al.) 中报告了在附着于抗体 Fc 区的寡糖中有至少一个半乳糖残基的抗体。关于有更改碳水化合物附着于其 Fc 区的抗体还可参见 WO 98/58964(Raju, S.) 和 WO 99/22764(Raju, S.)。

[0231] 可能希望在效应器功能方面修饰本发明的抗体,例如增强抗体的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和/或补体依赖性细胞毒性 (CDC)。这可通过在抗体 Fc 区中引入一处或多处氨基酸替代来实现。或者/另外,可以在 Fc 区中引入半胱氨酸残基,从而容许在该区中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可具有改良的内在化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤和抗体依赖性细胞的细胞毒性 (ADCC)。参见 Caron et al., J. Exp. Med. 176 :1191-1195(1992) 和 Shopes, B., J. Immunol. 148 :2918-2922(1992)。具有增强的抗肿瘤活性的同二聚体抗体还可使用如 Wolff et al., Cancer Research 53 : 2560-2565(1993) 中记载的异双功能交联剂来制备。或者,抗体可改造成具有双重 Fc 区,由此可具有增强的补体溶胞和 ADCC 能力。参见 Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3 :219-230(1989)。

[0232] WO 00/42072(Presta, L.) 记载了在存在人效应细胞时具有改良的 ADCC 功能的抗体,其中所述抗体在其 Fc 区中包含氨基酸替代。优选的是,具有改良的 ADCC 的抗体在 Fc 区的第 298、333 和/或 334 位 (Eu 残基编号方式) 包含替代。优选的是,改变的 Fc 区是在这些位置中的一个、两个或三个处包含替代或由其组成的人 IgG1 Fc 区。此类替代任选联合提高 C1q 结合和/或 CDC 的替代。

[0233] WO 99/51642、美国专利 No. 6, 194, 551 B1、美国专利 No. 6, 242, 195 B1、美国专利 No. 6, 528, 624 B1 和美国专利 No. 6, 538, 124(Idusogie et al.) 中记载了具有改变的 C1q 结合和/和补体依赖性细胞毒性 (CDC) 的抗体。所述抗体在其 Fc 区的第 270、322、326、327、

329、313、333 和 / 或 334 位 (Eu 残基编号方式) 氨基酸中的一个或多个处包含氨基酸替代。

[0234] 为了延长抗体的血清半衰期, 可以将补救受体结合表位掺入抗体 (尤其是抗体片段), 如例如美国专利 No. 5, 739, 277 中所记载的。在用于本文时, 术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子 (例如 IgG₁、IgG₂、IgG₃ 或 IgG₄) 的 Fc 区中负责延长 IgG 分子体内血清半衰期的表位。

[0235] WO 00/42072 (Presta, L.) 和 US 2005/0014934 A1 (Hinton et al.) 中记载了具有改良的对新生儿 Fc 受体 (FcRn) 的结合和延长的半衰期的抗体。这些抗体包含其中具有一处或多处改进 Fc 区对 FcRn 结合的替代的 Fc 区。例如, Fc 区可以在第 238、250、256、265、272、286、303、305、307、311、312、314、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428 或 434 位 (Eu 残基编号方式) 中的一个或多个处具有替代。在一个实施方案中, 具有改良的 FcRn 结合的含 Fc 区抗体变体在其 Fc 区的第 307、380 和 434 位 (Eu 残基编号方式) 中的一个、两个或三个处包含氨基酸替代。在一个实施方案中, 抗体具有 307/434 突变。

[0236] 还设想了具有三个或更多 (优选四个) 功能性抗原结合位点的工程化抗体 (美国专利申请 US 2002/0004587 A1, Miller et al.)。

[0237] 编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子可通过本领域知道的多种方法来制备。这些方法包括但不限于从天然来源分离 (在天然存在氨基酸序列变体的情况中), 或者通过对早期制备的抗体变体或非变体型式进行寡核苷酸介导的 (或定点) 诱变、PCR 诱变和盒式诱变来制备。

[0238] (v) 免疫偶联物

[0239] 本发明还关于包含偶联有细胞毒剂的本文所述抗体的免疫偶联物, 所述细胞毒剂诸如化疗剂、毒素 (例如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段) 或放射性同位素 (即放射偶联物)。

[0240] 上文已经描述了可用于生成此类免疫偶联物的化疗剂。可使用的酶活性毒素及其片段包括白喉毒素 A 链、白喉毒素的非结合活性片段、外毒素 A 链 (来自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒蛋白 (ricin) A 链、相思豆毒蛋白 (abrin) A 链、蒴莲根毒蛋白 (modeccin) A 链、 α -帚曲霉素 (sarcin)、油桐 (*Aleutites fordii*) 毒蛋白、香石竹 (*dianthin*) 毒蛋白、美洲商陆 (*Phytolacca americana*) 毒蛋白 (PAPI、PAPII 和 PAP-S)、苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制物、麻疯树毒蛋白 (curcin)、巴豆毒蛋白 (crotonin)、肥皂草 (*sapaonaria officinalis*) 抑制物、白树毒蛋白 (gelonin)、丝林霉素 (mitogellin)、局限曲菌素 (restrictocin)、酚霉素 (phenomycin)、依诺霉素 (enomycin) 和单端孢菌素 (trichothecenes)。多种放射性核素可用于生成放射偶联抗体。例子包括 ²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y 和 ¹⁸⁶Re。

[0241] 抗体和细胞毒剂的偶联物可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备, 诸如 N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP), 亚氨基硫烷 (IT), 亚氨酸酯 (诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯)、活性酯类 (诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯)、醛类 (诸如戊二醛)、双叠氮化合物 (诸如双 (对-叠氮苯甲酰基) 己二胺)、双重氮衍生物 (诸如双 (对-重氮苯甲酰基) 乙二胺)、二异氰酸酯 (诸如甲苯 2,6-二异氰酸酯)、和双活性氟化合物 (诸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯) 的双功能衍生物。例如, 可如 Vitetta 等 Science 238:1098 (1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14 标记的 1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺

五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见 WO 94/11026。

[0242] 在另一个实施方案中,可将抗体与“受体”(诸如链霉亲合素)偶联从而用于肿瘤预先靶向,其中对患者施用抗体-受体偶联物,接着使用清除剂由循环中清除未结合的偶联物,然后施用与细胞毒剂(例如放射性核苷酸)偶联的“配体”(例如亲合素)。

[0243] (vi) 免疫脂质体

[0244] 本文中公开的抗体还可配制成免疫脂质体。含有抗体的脂质体可通过本领域已知方法来制备,诸如参见 Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 :3688 (1985); Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 :4030 (1980); 及美国专利 No. 4, 485, 045 和 4, 544, 545。循环时间延长的脂质体披露于美国专利 No. 5, 013, 556。

[0245] 可用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和 PEG 衍生化磷脂酰乙醇胺 (PEG-PE) 的脂质组合物通过反相蒸发法生成特别有用的脂质体。将脂质体挤过具有设定孔径的滤器,产生具有期望直径的脂质体。可如 Martin 等, J. Biol. Chem. 257 :286-288 (1982) 中所述,将本发明抗体的 Fab' 片段经二硫化物交换反应与脂质体偶联。任选在脂质体中包含化疗剂。参见 Gabizon 等, J. National Cancer Inst. 81 (19) :1484 (1989)。

[0246] VIII. 制品和试剂盒

[0247] 在本发明的另一个实施方案中,提供了包含可用于治疗上文所述病症的物质的制品。制品包括容器、标签和包装插页。合适的容器包括例如瓶子、小管、注射器等。容器可用各种材料制成,诸如玻璃或塑料。容器中装有有效治疗疾患的组合物,而且可具有无菌存取口(例如容器可以是具有皮下注射针头可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小管)。所述组合物中的至少一种活性剂是抗 VEGF 抗体。贴在所述容器上或与其相连的标签指示该组合物用于治疗选择的疾患。制品可进一步包括第二容器,其中装有制药学可接受的缓冲剂,诸如磷酸盐缓冲盐水、林格氏 (Ringer) 溶液和右旋糖溶液。它还可包括商业和用户立场上所需的其它物质,包括其它缓冲剂、稀释剂、滤器、针头和注射器。另外,制品包含印有使用说明书的包装插页,包括例如指导该组合物的用户将该抗 VEGF 抗体组合物和化疗剂施用于具有先前治疗过的乳腺癌,任选,HER2 阴性的患者。在某些实施方案中,患者具有转移性癌症。在一些实施方案中,患者具有先前治疗过的转移性乳腺癌且是 HER2 阴性的。包装插页可任选包括在实施例 1 中找到的一些或所有结果。

[0248] VEGF 特异性拮抗剂可单独地或与其它抗癌治疗性化合物组合地包装成试剂盒。所述试剂盒可包括帮助对患者施用单位剂量的任选成分,诸如用于重建粉剂形式的管形瓶、用于注射的注射器、定制 IV 投递系统、吸入器、等。另外,单位剂量试剂盒可含有关于制备和施用组合物的使用说明。在某些实施方案中,说明书包括使用说明,包括例如指导该组合物的用户将该抗 VEGF 抗体组合物和化疗剂施用于具有先前治疗过的乳腺癌,任选,HER2 阴性的患者。在某些实施方案中,患者具有转移性癌症。在一些实施方案中,患者具有先前治疗过的转移性乳腺癌且是 HER2 阴性的。说明书可任选包括在实施例 1 中找到的一些或所有结果。试剂盒可制备成用于一名患者的单次使用的单位剂量 (single use unit dose)、用于具体患者的多次使用(以恒定的剂量或其中各种化合物的效力可随治疗进展而变化);或者,所述试剂盒可含有适合于对多名患者施用的多剂(“大量包装”)。试剂盒成分可在纸盒、泡罩包、瓶、管、等等中装配。

[0249] 材料保藏

[0250] 以下杂交瘤细胞系已经根据布达佩斯条约的规定保藏于美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) :

[0251] 抗体命名 ATCC 编号 保藏日期

[0252] A4.6.1 ATCC HB-10709 1991 年 3 月 29 日

[0253] 下面的实施例仅仅意图例示本发明的实践,不是作为限制而提供的。通过述及明确完整收录本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容。

实施例

[0254] 实施例 1。在具有先前治疗过的转移性乳腺癌的受试者中与化疗方案组合的贝伐单抗

[0255] 转移性乳腺癌 (MBC) 是一种不可治愈的疾病,大多数患者在诊断后 2 年内死于其疾病。参见 Greenberg, et al., 1996, J. Clin. Oncol. 14 :2197-205。在辅助疗法之后,具有晚期疾病的患者中大约 60% 呈现局部复发,而 40% 呈现远程转移。只有 10% 的患者在初始诊断时呈现转移性疾病。参见 Ryberg et al., 2001 Ann. Oncol. 12 :81-7。

[0256] 具有 MBC 的患者的治疗法则基于数个因素,包括临床、病理学、和组织学特征,诸如人表皮生长因子-2 (HER2) 扩增、激素受体状态、对激素剂的在先响应和 / 或失败、转移性疾病的数目和具体位点、及转移和辅助二者情况下的治疗史。众多细胞毒性化疗剂已经在 MBC 中显示出活性,包括蒽环类抗生素、紫杉烷、吉西他滨、卡培他滨、和长春瑞滨。用这些药剂看到的响应率和无进展间隔有所变化,取决于在先疗法的程度和类型及转移性疾病的程度。一般而言,基于蒽环类抗生素的组合疗法和紫杉烷 (帕利他赛和多西他赛) 已经在转移情况下在没有在先暴露于辅助背景下的药剂、且没有在先暴露于用于治疗转移性疾病的化疗的患者中显示出最大活性,响应率为 40-50% 且无进展存活 (PFS) 中值为大约 6-9 个月。参见 Hamilton and Hortobagyi 2005 J. Clin. Oncol. 23 :1760-75。正如预期的,在第一治疗之后或期间有进展的患者具有较短的无进展间隔 (4-6 个月) 和存活 (8-12 个月)。如此,需要找到能掺入治疗方案,会延长具有复发性疾病的患者的无进展间隔和存活二者的别的治疗。

[0257] 在 MBC 的二线治疗情况中,许多药剂已显示活性,包括抗微管蛋白药物 (紫杉烷、长春瑞滨) 和抗代谢物 (卡培他滨、吉西他滨)。在接受过在先蒽环类抗生素疗法的 MBC 患者的一项大型 III 期研究中,与丝裂霉素和长春碱相比,多西他赛是显著延长距疾病进展时间 (4.4 比 2.5 个月 ; $p = 0.001$) 和存活 (11.4 比 8.7 个月 ; $p = 0.0097$) 的第一位单一药剂。参见 Nabholz et al., 1999 J. Clin. Oncol. 17 :1413-24。在先前接受过蒽环类抗生素或不是蒽环类抗生素候选人的患者中,与单独的多西他赛相比,将卡培他滨添加至多西他赛导致距进展时间 (4.2 比 6.1 个月 ;危害比 = 0.652) 和存活 (11.5 比 14.5 个月 ;危害比 = 0.775) 进一步改善 ;然而,此组合的毒性有实质性升高。参见 O'Shaughnessy et al., 2002 J. Clin. Oncol. 20 :2812-23。单一药剂或药剂组合的别的研究未能证明清楚的存活优势。参见 Hamilton and Hortobagyi 2005 J. Clin. Oncol. 23 :1760-75。基于单独或组合使用的多种药剂的经验,当前的治疗范例是由多个因素 (包括在先疗法、无治疗间隔、毒性概况、和患者偏爱) 决定的具体药剂选项的序贯单一药剂疗法。

[0258] 尽管可利用这样的多种药剂,但还是需要二线设置中对 MBC 患者别的治疗。致力

于延迟疾病进展同时避免系统毒性的新治疗会代表这些患者的治疗中的重大进步。

[0259] 与单独的化疗相比，Avastin®（贝伐单抗）与化疗组合的一项 III 期研究（RIBBON 2）延长了其初始化疗已经停止运转的具有转移性 HER2 阴性乳腺癌的女性活着且没有疾病恶化的时间（无进展存活或 PFS）。该研究中治疗女性的医生选择与 Avastin 组合使用的化疗的类型，并在主要终点分析中一起评估化疗。不利事件与那些先前对 Avastin 报告的一致，而且在该研究中没有观察到新的 Avastin 安全性信号。

[0260] Ribbon 2 是一项国际、多中心、随机化、双盲、以安慰剂为对照的临床研究，登记了 684 名先前为其转移性疾病接受过化疗的具有转移性 HER2 阴性乳腺癌的患者。见表 1 中的研究行为和表 2 中的患者特征。该试验评估将 Avastin®（贝伐单抗）或安慰剂添加至调查人员的化疗选项。该研究中使用下述化疗方案：紫杉烷：帕利他赛，蛋白质结合的帕利他赛或多西他赛；吉西他滨；卡培他滨；或长春瑞滨。

[0261] 表 1：研究行为

[0262]

化疗分组	紫杉烷	吉西他滨	卡培他滨	长春瑞滨
登记，n (%)	304 (44.4)	160 (23.4)	144 (21.1)	76 (11.1)
贝伐单抗(BV)	201	108	97	53
安慰剂(PL)	103	52	47	23

[0263] 研究中的合格条件包括下述：

[0264] 符合研究条件的年龄：18 岁以上

[0265] 符合研究条件的性别：二者均可

[0266] 接受健康志愿者：否

[0267] 研究中的入选标准包括下述：

[0268] 签署知情同意表

[0269] ≥ 18 岁

[0270] 经过组织学验证的乳腺癌及已经进展的可测量或不可测量的转移性疾病（有脑转移历史的患者是符合研究参与条件的 [仅美国]，只要他们 / 她们的脑转移已经得到治疗且他们 / 她们在治疗之后没有进展或出血的证据且当时不需要地塞米松）

[0271] 施用一线设置中施用的一种（非调查的）化疗方案期间或之后疾病进展

[0272] ECOG 性能状态为 0 或 1

[0273] 对于有分娩可能的女性，使用非激素避孕的有效手段

[0274] 寿命预期 ≥ 3 个月

[0275] 愿意且能够遵守研究和随访规程

[0276] 研究中的淘汰标准包括下述：

[0277] 在没有化疗的情况下仅作为转移性疾病治疗的在先激素疗法。患者必须为了他们 / 她们的转移性疾病在一线设置中接受过化疗。不允许单独的激素疗法。

[0278] 对于接受过在先基于蒽环类抗生素的疗法的受试者，根据多门电路控制采集法（MUGA）或心脏回声图（ECHO），记录左心室射血分数 < 50 %

- [0279] 用超过一种在先细胞毒方案治疗 MBC
- [0280] HER2 阳性状态（具有未知的 HER2 状态、不可能测定 HER2 状态的患者符合此研究的条件）
- [0281] 未知的 ER 和 PR 状态
- [0282] 第 0 天前 21 天内为了缓解或脑转移以外的放射疗法、生物学疗法、或用于 MBC 的化疗
- [0283] 贝伐单抗或其它 VEGF 途径靶向疗法的在先疗法
- [0284] 未治疗的脑转移
- [0285] 控制不当的高血压
- [0286] 不稳定的咽峡炎
- [0287] 纽约心脏联合会 II 级以上 CHF
- [0288] 第 0 天（第一次贝伐单抗 / 安慰剂输注那天）前 6 个月内心肌梗死历史
- [0289] 第 0 天前 6 个月内中风或短暂性脑缺血发作历史
- [0290] 有临床意义的外周血管疾病
- [0291] 出血体质或凝血病的证据
- [0292] 第 0 天前 28 天内大型手术规程、切开活检、或重大外伤性损伤；预期研究期间需要大型选择手术
- [0293] 第 0 天前 7 天内小型手术、细针抽吸、或芯活检
- [0294] 第 0 天前 6 个月内腹疼、胃肠穿孔、或腹内脓肿历史
- [0295] 严重的、未愈合的伤口、溃疡、或骨折
- [0296] 前驱给药处理未能控制的对单克隆抗体疗法的过敏反应历史
- [0297] 第 0 天前 5 年内其它恶性肿瘤历史，转移或死亡风险可忽略的肿瘤除外，诸如控制不当的基细胞癌或皮肤鳞状细胞癌或宫颈原位癌
- [0298] 不当器官功能
- [0299] 妊娠（阳性血清妊娠测试）或哺乳
- [0300] 给出禁止使用调查药物或可能影响结果解读或使得受试者处于治疗并发症高风险的疾病或状况的合理怀疑的任何其它疾病、代谢功能障碍、体格检查发现、或临床实验室发现
- [0301] 贝伐单抗 (5mg/kg 每周等量)
- [0302] 15mg/kg IV q3 周；或
- [0303] 10mg/kg IV q2 周
- [0304] 加
- [0305] 化疗
- [0306] 紫杉烷
- [0307] 帕利他赛（例如Taxol®）:90mg/m² IV, 每周, 持续 3 周, 继以 1 周休息；或
- [0308] 帕利他赛（例如Taxol®）:175mg/m² IV, 每 3 周；或
- [0309] 帕利他赛蛋白质结合颗粒(Abraxane®): 260mg/m² IV, 每 3 周；或
- [0310] 多西他赛(Taxotere®): 75-100mg/m² IV, 每 3 周；或
- [0311] 吉西他滨(Gemzar®): 1250mg/m² IV, 每个 3 周周期的第 1 天和第 8 天；或

[0312] 长春瑞滨(Navelbine®): 30mg/m² IV, 每周 ;或

[0313] 卡培他滨(Xeloda®): 1000mg/m², 口服, 每个 3 周周期的第 1-14 天每天两次

[0314] 在该研究中, PFS 定义为自随机化至疾病进展或死亡的时间, 如在该研究中由治疗内科医师评估 (调查人员评估的)。次要终点包括客观响应率、响应的持续时间、1 年存活率、总体存活、化疗类型的 PFS 评估和安全性。结果指示 PFS (接受 Avastin+ 化疗的患者合并分组中的主要终点) 的延长 (HR = 0.775 ;p 值 (log- 序) = 0.0072)。PFS 中值 (95% CI) 在贝伐单抗 / 化疗分支 (图 1 的分支 A, n = 459) 中为 7.2 个月 (6.5, 7.6), 而在安慰剂 / 化疗分支 (图 1 的分支 B, n = 225) 中为 5.1 个月 (4.1, 6.0)。见表 3 PFS 的主要功效分析和图 2 (PFS 的主要终点) 和图 3 (PFS 的分组特异性分析)。PFS 结果一般在化疗分组间是一致的, 长春瑞滨小亚群除外。其它亚群 (年龄、三重阴性、等) 一般与主要 PFS 结果一致。观察到的总体 PFS 改善得到 ORR 的次要功效终点的支持。见图 4。OS 的中间功效分析见表 4。在该研究中没有观察到新的贝伐单抗安全性信号。见例如表 5, 安全性汇总, 安全性群 (safety population) ;表 6, 选定 AE, 安全性群 ;和表 7, 化疗分组的安全性汇总, 安全性群。贝伐单抗作为二线治疗对患者是有益的。

[0315] 表 2 :患者特征, ITT 群

[0316]

	化疗/PL (n=225)	化疗/BV (n=459)
年龄, 岁		
中值	55.0	55.0
均值(范围)	55 (23–90)	55.6 (25–86)
≥65, %	19.6	22.0
ECOG PS 1, %	50.9	50.2
转移位点数目		
中值(范围)	2.5 (0–6)	2.5 (0–6)
≥3个位点, %	47.1	44.5
仅骨疾病, %	9.8	6.8
内脏疾病, %	25.3	26.8
HR阳性, %	73.3	71.7
三重阴性, %	20.9	24.4
自MBC诊断至第一次PD的时间间隔		
≥6个月, %	70.7	72.5
HER2阴性, %	85.3	83.9
-未知, %	13.8	14.6
可测定疾病, %	79.6	78.9

[0317] BV = 贝伐单抗, HR = 激素受体, PD = 疾病进展, PL = 安慰剂。

[0318] 表 3 :PFS 的主要功效分析, ITT 群

[0319]

	化疗/PL (n=225)	化疗/BV (n=459)
事件数目, n (%)	184 (81.8)	372 (81.0)
最早的起作用事件, n (%)		
渐进性疾病	170 (75.6)	341 (74.3)
死亡	14 (6.2)	31 (6.8)

[0320]

PFS (月)		
中值 (95% CI)	5.1 (4.1–6.0)	7.2 (6.5–7.6)
分组分析 HR (95% CI)	0.78 (0.64–0.93)	
p值(log-序)	0.0072	

[0321] 表 4 :OS 的中间功效分析 *, ITT 群

[0322]

	化疗/PL (n=225)	化疗/BV (n=459)
死亡数目, n (%)	109 (48.4)	206 (44.9)
OS (月)		
中值 (95% CI)	16.4 (14.6–20.2)	18.0 (17.1–20.2)
分组分析 HR (95% CI)	0.90 (0.71–1.14)	
p值(log-序)	0.3741	
1年存活率(%)	66.2	69.5

[0323] * 这是 57%信息 (315 例事件) 时的中间分析。

[0324] 表 5 :安全性汇总, 安全性群

[0325]

	化疗/PL (n=221)	化疗/BV (n=458)
n (%)		
选定AE* (≥3级)	50 (22.6)	163 (35.6)
SAE	39 (17.6)	112 (24.5)
导致中止/死亡的AE	16 (7.2)	61 (13.3)
导致死亡的AE	5 (2.3)	6 (1.3)

[0326] AE = 不利事件, BV = 贝伐单抗, PL = 安慰剂, SAE = 严重不利事件。

[0327] * 先前显示与 BV 有关的 AE

[0328] 表 6 :选定 AE (≥ 3 级), 安全性群

[0329]

	化疗/PL (n=221)	化疗/BV (n=458)
n (%)		

[0330]

嗜中性粒细胞减少	32 (14.5)	81 (17.7)
高血压	1 (0.5)	41 (9.0)
感觉神经病	13 (5.9)	30 (6.6)
蛋白尿	1 (0.5)	15 (3.3)
热性嗜中性粒细胞较少	6 (2.7)	10 (2.2)
出血事件	0 (0)	8 (1.7)
左心室收缩障碍	0 (0)	4 (0.9)
ATE	3 (1.4)	3 (0.7)
GI穿孔	0 (0)	3 (0.7)
伤口开裂	0 (0)	3 (0.7)
RPLS	0 (0)	0 (0)

[0331] ATE = 动脉血栓事件, GI = 胃肠, RPLS = 可逆后脑白质病综合征。

[0332] 表 7 : 化疗分组的安全性汇总, 安全性群

[0333]

	Tax/PL (n=101)	Tax/BV (n=200)	Gem/PL (n=52)	Gem/BV (n=108)
n (%)				
选定AE (等级≥3)	29 (28.7)	79 (39.5)	5 (9.6)	34 (31.5)
SAE	12 (11.9)	53 (26.5)	8 (15.4)	25 (23.1)
导致BV/PL中止或死亡的AE	4 (4.0)	12 (6.0)	4 (7.7)	6 (5.6)
导致死亡的AE	0 (0)	3 (1.5)	2 (3.8)	2 (1.9)
	Cape/PL (n=46)	Cape/BV (n=97)	Vin/PL (n=22)	Vin/BV (n=53)
n (%)				
选定AE (等级≥3)	2 (4.3)	20 (20.6)	14 (63.6)	30 (56.6)
SAE	12 (26.1)	18 (18.6)	7 (31.8)	16 (30.2)
导致BV/PL中止或死亡的AE	4 (8.7)	6 (6.2)	1 (4.5)	4 (7.5)
导致死亡的AE	2 (4.3)	1 (1.0)	1 (4.5)	0 (0)

- [0334] AE = 不利事件, SAE = 严重不利事件, Tax = 紫杉烷 (taxane), Gem = 吉西他滨,
- [0335] Cape = 卡培他滨, Vin = 长春瑞滨。

[0001]

序列表

<110> 霍夫曼-拉罗奇有限公司

<120> 抗血管发生疗法用于治疗先前治疗过的乳腺癌

<130> P4349R1 W0

<141> 2010-08-11

<150> US 61/266,343

<151> 2009-12-03

<150> US 61/234,281

<151> 2009-08-15

<160> 2

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 1

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5					10					15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr
				20					25					30
Asn	Tyr	Gly	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35					40					45
Glu	Trp	Val	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Tyr	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr
				50					55					60
Ala	Ala	Asp	Phe	Lys	Arg	Arg	Phe	Thr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser
				65					70					75
Lys	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80					85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Tyr	Pro	His	Tyr	Tyr	Gly	Ser
				95					100					105
Ser	His	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
				110					115					120
Val	Ser	Ser												

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列是合成的

<400> 2

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5					10					15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser
				20					25					30
Asn	Tyr	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
				35					40					45

[0002]

Val	Leu	Ile	Tyr	Phe	Thr	Ser	Ser	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	
				50					55					60	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	
				65					70					75	
Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	
				80					85					90	
Tyr	Ser	Thr	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	
				95					100					105	
Ile	Lys	Arg													

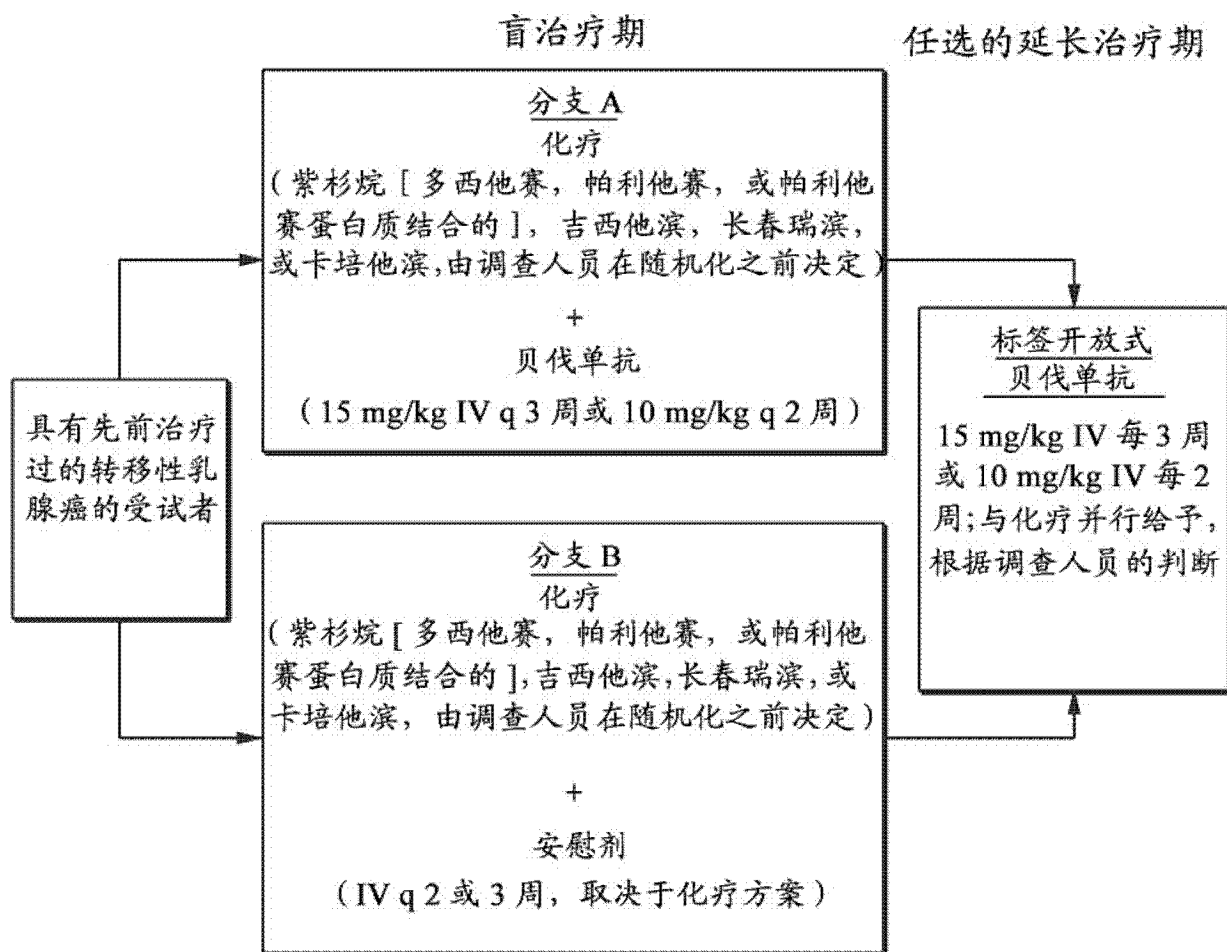


图 1

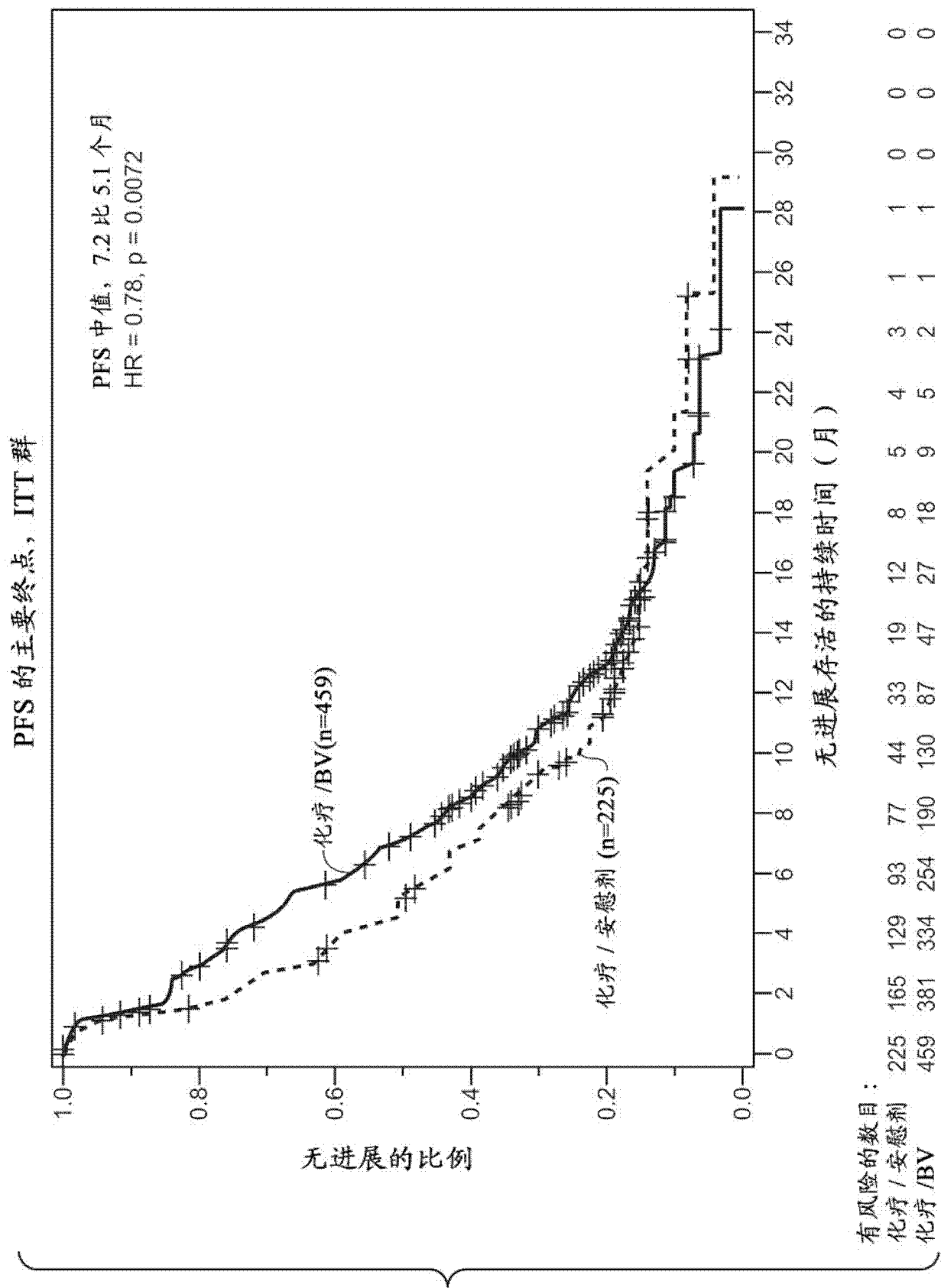


图 2

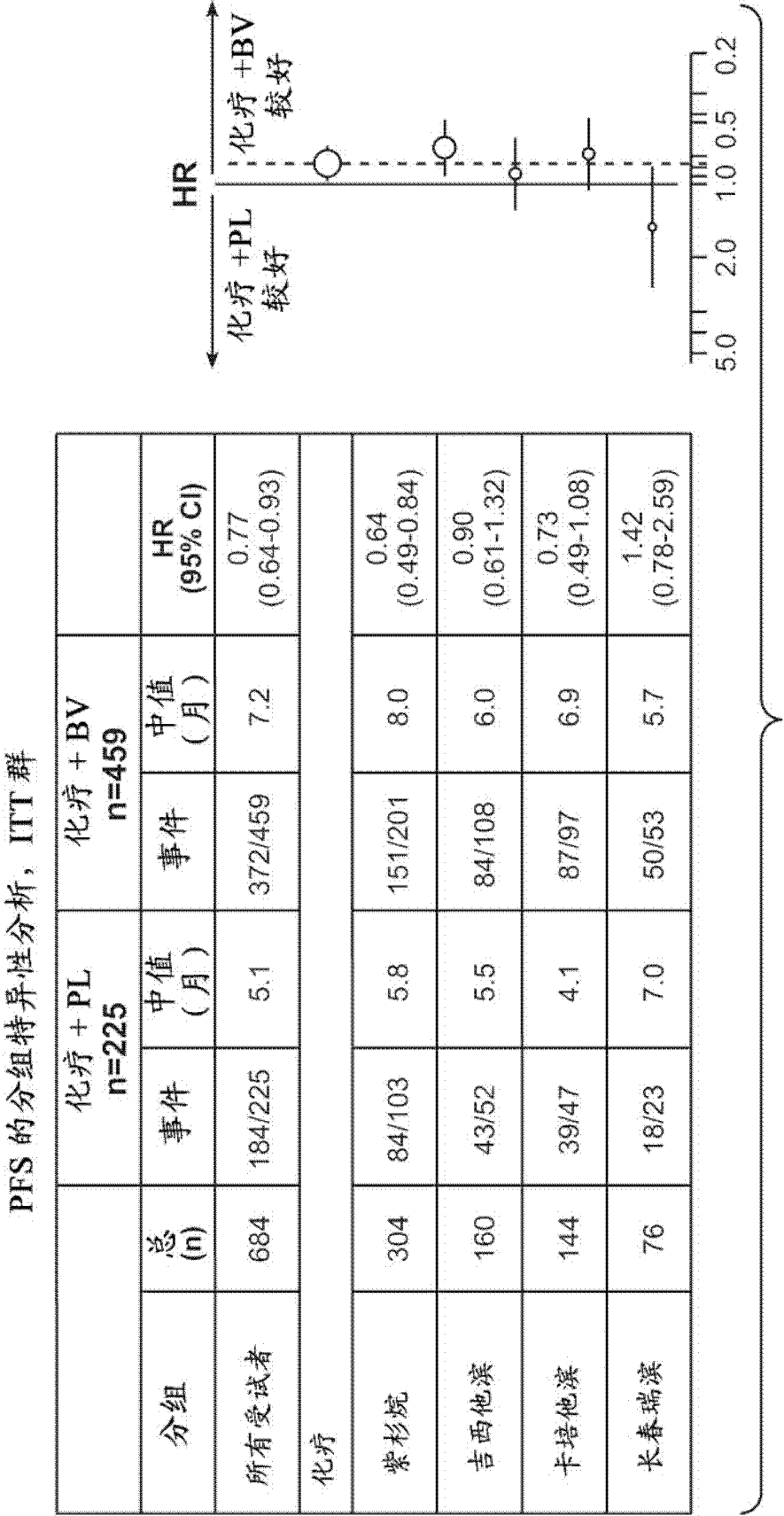


图 3

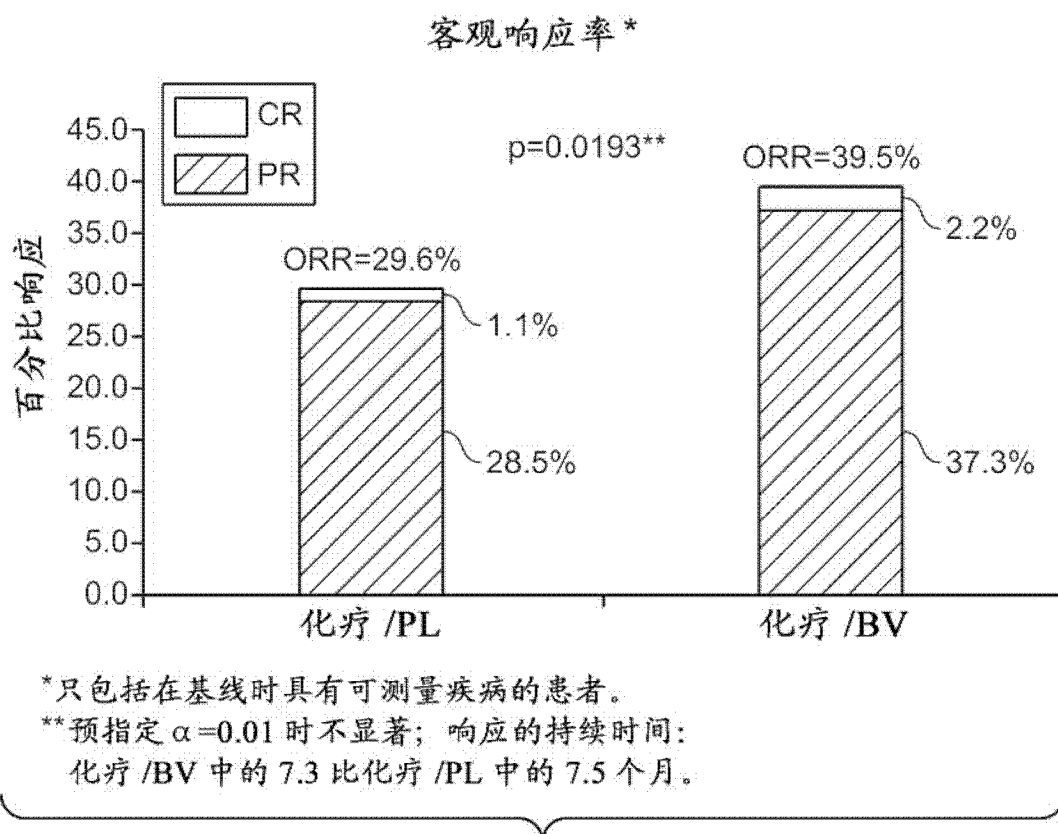


图 4