

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102006885 A

(43) 申请公布日 2011.04.06

(21) 申请号 200780047541.8

代理人 葛强 郭玥

(22) 申请日 2007.10.22

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

60/853,260 2006.10.20 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.06.22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2007/082164 2007.10.22

(87) PCT申请的公布数据

WO2008/133706 EN 2008.11.06

(71) 申请人 先灵公司

地址 美国新泽西州

申请人 佐马技术有限公司

(72) 发明人 舒曼 · 罗摩占罗

瓦尔特 · 罗伯特 · 比索普

琳达 · 玛萨特 黄超白

(74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有限公司 11111

权利要求书 3 页 说明书 24 页 序列表 8 页
附图 13 页

(54) 发明名称

完全人源抗 VEGF 抗体及其使用方法

(57) 摘要

血管内皮生长因子 (VEGF) 的过量表达与多种状态相关联, 这些状态涉及血管生长异常。本发明公开了可特异性结合人 VEGF 的完全人源抗体, 其可抑制 VEGF 与 VEGF-R1 和 VEGF-R2 的结合, 从而抑制 VEGF 的信号传导。由于它们具有抑制 VEGF 信号传导的活性, 本发明中公开的抗体可用于在体内和体外治疗血管生成以及多种与血管生成相关的状态。

1. 一种被分离的抗体或其抗原结合片段,含有,
 - (1) 一重链可变区,含有以下重链 CDR 氨基酸序列:SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8,和 / 或
 - (2) 一轻链可变区,含有以下轻链 CDR 氨基酸序列 (a)SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:10,和 SEQ ID NO:11,或 (b)SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13 和 SEQ ID NO:14。
2. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区含有如 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列。
3. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变区含有如 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列。
4. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区含有如 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列。
5. 如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述轻链可变区含有如 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列。
6. 如权利要求 1-5 任一所示的抗体或其抗原结合片段,其进一步含有一 IgG 2 恒定区。
7. 如权利要求 1-5 任一所示的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体与 hVEGF₁₆₅ 结合的 K_D 值为 ≤ 2.0 nM。
8. 如权利要求 1-5 任一所示的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体与 hVEGF₁₆₅ 结合的抗原表位与贝伐单抗结合的抗原表位重叠。
9. 如权利要求 1-5 任一所示的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体可阻断 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF-R1 和 VEGF-R2 的结合。
10. 一种在所需对象中抑制血管生成的方法,包括对所述对象给药治疗有效剂量的如权利要求 1-5 任一所述的抗体或其抗原结合片段。
11. 一种在所需对象中治疗与血管生成异常相关的疾病的方法,包括对所述对象给药治疗有效剂量的如权利要求 1-5 任一所述的抗体或其抗原结合片段。
12. 一种在所需对象中治疗与 VEGF 信号传导相关的炎症疾病的方法,包括对所述对象给药治疗有效剂量的如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段。
13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述疾病选自下组:类风湿性关节炎、牛皮癣、硬皮病、慢性阻塞性肺部疾病、以及哮喘。
14. 一种在所需对象中治疗湿性急性视网膜黄斑变性或糖尿病视网膜病变的方法,包括对所述对象给药治疗有效剂量的如权利要求 1-5 任一所述的抗体或其抗原结合片段。
15. 一种在所需对象中治疗与 VEGF 信号传导增高相关的癌症的方法,包括对所述对象给药治疗有效剂量的如权利要求 1 所述的抗体或其抗原结合片段。
16. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段进一步含有一缀合物。
17. 如权利要求 16 所述的方法,其中所述缀合物选自下组:毒素、细胞因子,以及化疗药物。
18. 一种成套物件,含有如权利要求 1-5 任一所述的抗体或其抗原结合片段。
19. 一种被分离的多核苷酸,其编码如 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ

IDNO :5, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :7, SEQ ID NO :8, SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :10, SEQ IDNO :11, SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :13, 或 SEQ ID NO :14 任一所示的氨基酸序列。

20. 一种被分离的载体, 含有如权利要求 19 所述的多核苷酸。

21. 一种被分离的宿主细胞, 含有如权利要求 20 所述的载体。

22. 一种完全人源抗体, 其中所述抗体含有一种或多种选自下组的特征:

(1) 与 hVEGF₁₆₅ 结合的 K_D 值至少 10 倍低于该抗体与 mVEGF₁₆₅ 结合的 K_D 值;

(2) 与 hVEGF₁₆₅ 结合的 K_D 值 ≤ 2.0 nM;

(3) 与 hVEGF₁₆₅ 结合的抗原表位与贝伐单抗结合的抗原表位重叠;

(4) 阻断 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF 受体的结合; 或

(5) 抑制 hVEGF₁₆₅ 诱导的 VEGF 受体的磷酸化。

23. 如权利要求 22 所述的完全人源抗体, 其中所述抗体与 hVEGF₁₆₅ 结合的 K_D 值 ≤ 2.0 nM。

24. 如权利要求 22 所述的完全人源抗体, 其中所述抗体与 hVEGF₁₆₅ 结合的抗原表位与贝伐单抗结合的抗原表位重叠。

25. 如权利要求 22 所述的完全人源抗体, 其中所述抗体阻断 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF 受体的结合。

26. 如权利要求 25 所述的完全人源抗体, 其中所述 VEGF 受体为 VEGF-R1 或 VEGF-R2。

27. 如权利要求 22 所述的完全人源抗体, 其中所述抗体可抑制 hVEGF₁₆₅ 诱导的 VEGF 受体的磷酸化。

28. 如权利要求 22 所述的完全人源抗体, 其中所述抗体含有一重链可变区, 该重链可变区含有以下重链 CDR 氨基酸序列: SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :7, 和 SEQ ID NO :8。

29. 如权利要求 28 所述的完全人源抗体, 其进一步含有一轻链可变区, 该轻链可变区含有以下轻链 CDR 氨基酸序列: SEQ ID NO :9, SEQ ID NO :10, 和 SEQ ID NO :11。

30. 如权利要求 29 所述的完全人源抗体, 其中所述重链可变区含有如 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有如 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列。

31. 如权利要求 28 所述的完全人源抗体, 其进一步含有一轻链可变区, 该轻链可变区含有以下轻链 CDR 氨基酸序列: SEQ ID NO :12, SEQ ID NO :13 和 SEQ ID NO :14。

32. 如权利要求 31 所述的完全人源抗体, 其中所述重链可变区含有如 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列, 所述轻链可变区含有如 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列。

33. 如权利要求 1-5 任一所述的抗体或抗原结合片段, 其为完全抗体。

34. 如权利要求 33 所述的抗体, 其为单克隆抗体。

35. 如权利要求 33 所述的抗体, 其为多克隆抗体。

36. 如权利要求 33 所述的抗体, 其为重组抗体。

37. 如权利要求 33 所述的抗体, 其为双特异性抗体。

38. 如权利要求 33 所述的抗体, 其为人源化抗体。

39. 如权利要求 33 所述的抗体, 其为契合抗体。

40. 如权利要求 33 所述的抗体, 其为完全人源抗体。

41. 一种被分离的人源抗体, 其含有一轻链可变区, 该轻链可变区含有如 SEQ ID NO :3 所示的氨基酸序列, 和一重链可变区, 该重链可变区含有如 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序

列。

42. 一种被分离的人源抗体,其含有一轻链可变区,该轻链可变区含有如 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列,和一重链可变区,该重链可变区含有如 SEQ ID NO :4 所示的氨基酸序列。

43. 一种药物组合物,其含有如权利要求 41 所述的抗体和一药用可接受的运载物。

44. 一种药物组合物,其含有如权利要求 42 所述的抗体和一药用可接受的运载物。

45. 一种药物组合物,其含有如权利要求 1-5 任一所述的抗体或抗原结合片段,以及一药用可接受的运载物。

46. 一种被分离的抗体或其抗原结合片段,其含有 XPA. 10. 064 或 XPA. 10. 072 的重链互补决定域中的至少一条,以及 XPA. 10. 064 或 XPA. 10. 072 的轻链互补决定域中的至少一条。

47. 如权利要求 46 所述的被分离的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链互补决定域选自下组 :XPA. 10. 064 或 XPA. 10. 072 的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、以及其组合。

48. 如权利要求 46 所述的被分离的抗体或抗原结合片段,其中所述轻链互补决定域选自下组 :XPA. 10. 064 或 XPA. 10. 072 的 LCDR1、LCDR2、LCDR3、以及其组合。

完全人源抗 VEGF 抗体及其使用方法

相关申请

[0001] 本申请要求美国临时申请 60/853,260 的优先权,该临时申请于 2006 年 10 月 20 日递交,其全文皆引用包括在本发明中。

技术背景

[0002] 血管内皮生长因子 (VEGF) 是一类主要的促血管生成蛋白,其参与内皮细胞激活、增殖、和生存,特别是参与视网膜增殖性病变和肿瘤发生过程。VEGF 属于 VEGF-PDGF (血小板衍生生长因子) 超家族,为小糖蛋白二聚体,可结合表达在血管和淋巴内皮细胞上的受体。目前在 VEGF 家族中有七种已知配体:VEGF-A (VEGF)、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E (衍生自病毒)、或胎盘生长因子 (PlGF)-1 和 -2。这些 VEGF 配体通过结合三种已知 VEGF 受体 (VEGF-R) 中一种或多种来实现其作用,每种 VEGF 受体都具有酪氨酸激酶的活性。绝大多数的 VEGF-R1 (Flt-1) 表达在内皮细胞和单核细胞上,可结合 VEGF 和 VEGF-B,介导内皮和单核细胞的迁移。VEGF-R2 (即,人 KDR 或鼠 Flk-1) 主要表达在内皮细胞上,对 VEGF (以及 VEGF-C 和 VEGF-D 的特定片段) 有选择性,介导 VEGF 诱导的内皮细胞增殖,生存和迁移,以及血管通透性。VEGF-R3 (Flt-4) 主要表达在淋巴内皮细胞上,可与 VEGF-C 和 VEGF-D 结合促进淋巴管生成。VEGF-R1, VEGF-R2, 和 VEGF-R3 各自表达在某些肿瘤细胞上。VEGF 与 VEGF 受体的结合引发受体二聚化,导致随后的受体激活和信号转导。VEGF 与 VEGF-R2 的结合可开启某信号转导通路,该通路在促血管生成中起主导作用。这个通路包括受体激活以及随后产生的细胞内信号传导。在这种情况下下的受体激活需要三个基本事件:(I) VEGF 与 VEGF-R2 结合,(II) 受体二聚化,以及 (III) 受体酪氨酸激酶的受体自身磷酸化 (以及由此的激活)。细胞内信使例如磷脂酶 C 和磷脂酰肌醇-3-激酶可直接结合 VEGF-R2 的自身磷酸化形式并被受体酪氨酸激酶磷酸化,这随后引发细胞内的级联信号传导并导致细胞核信号,该信号最终促使细胞增殖、迁移和生存 (抗凋亡),并提高血管通透性。

[0003] 血管生成异常与多种疾病状态相关,包括癌症 (Holash 2002)。VEGF 信号通路是唯一一个被证实的在正常血管生长中和多种疾病相关的病态血管生长中都起作用的信号传导通路 (Eriksson 1999; Ferrara 1999; Yancopoulos 2000)。VEGF 可促进血管内皮细胞生长以及增加血管通透性 (Ferrara 2004)。

[0004] 以前的研究揭示,在大多数肿瘤种类中 VEGF 的表达水平都有提高 (Berkman 1993; Brown 1993; Brown 1995; Dvorak 1995; Mattern 1996)。研究表明患眼部血管增生性疾病如湿性 AMD 的病人中 VEGF 的水平升高。湿性 AMD 在总的 AMD 病例中仅占约 10%,但却在因 AMD 导致的失明中占到近 90%。湿性 AMD 以脉络膜新生血管 (CNV) 为特征,即在视网膜的视网膜色素上皮细胞层下面的异常血管生长。VEGF-A 被认为在这些血管生成中起主要作用,这些血管在黄斑下面渗漏并导致视网膜扭曲和视力损伤。

[0005] 已有多个分子被开发用于抑制 VEGF 与其受体间的相互作用,或抑制 VEGF 受体的酪氨酸激酶活性,这些分子已在临床研究的多个阶段。例如,BAY43-9006 (索拉非尼,拜耳公司),SU11248 (舒尼替尼),和瓦他拉尼 (Vatalanib, 诺华公司) 都是 VEGF-R2 激酶抑制剂,

已被作为潜在的癌症药物开发。VEGF-TRAP (Regeneron, 赛诺非安万特公司) 是 VEGF-R1 和 VEGF-R2 的胞外结构域杂合体, 对 VEGF 有高度的结合亲和力 (Holash 2002 ; Dupont 2005)。VEGF-TRAP 目前正在进行治疗实体肿瘤的临床研究。抗体还被广泛开发用作 VEGF 通路的抑制剂。例如, IMC-1C11 (Imclone) 是结合 VEGF-R2 的契合单克隆抗体 (Hunt 2001)。目前正在进行治疗研究, 以确定 IMC-1C11 在治疗恶性肠癌中的疗效。CDP-791 (Imclone) 是一个聚乙二醇化的人源化 Fab, 可结合 VEGF-R2。IMC-1121B (Imclone) 是一个完全人源单克隆抗体, 可结合 VEGF-R2, 具有较高的亲和力, 可阻断 VEGF 和 VEGF-R2 间的相互作用 (Miao, H. Q., et al. 2005. Biochem Biophys Res Commun 345 :438-445)。IMC-18F1 (Imclone) 是一个完全人源的单克隆抗体, 可结合 VEGF-R1, 具有较高的亲和力, 可阻断 VEGF 和 VEGF-R1 间的相互作用。2C3 (Peregrine) 是一个鼠源抗体, 可结合 VEGF 并可阻断 VEGF 和 VEGF-R2 间的相互作用, 但不阻断 VEGF-R1。Ranibizumab (Lucentis®, Genentech) 是一个衍生自贝伐单抗的人源化的 Fab, 最近被批准用于治疗湿性急性黄斑变性 (AMD) (Michels 2004 ; Rosenfeld 2005)。

[0006] 最常用的靶向作用于 VEGF 的生物制剂是人源化的 IgG1 单克隆抗体贝伐单抗 (a. k. a., Avastin®, Genentech; 本发明中也被称为 BM-1)。贝伐单抗是通过将鼠源单克隆抗体 A. 4. 6. 1 进行人源化开发得到, 其含有约 93% 的人源序列和 7% 鼠源序列 (Presta 1997 ; Ferrara 2004)。贝伐单抗与 VEGF 的结合亲和力为约为 500pM, 可抑制 VEGF 与 VEGF-R1 和 VEGF-R2 的结合。贝伐单抗在人体内的消除半衰期为 17-21 天 (Ferrara 2004)。贝伐单抗已被批准用于治疗恶性肠癌 (Presta 1997 ; Rosenfeld 2005)。研究还显示, 贝伐单抗可能可以用于治疗新生血管性 AMD (Michels 2005)。

[0007] 虽然多种分子已被开发用于抑制 VEGF 通路, 但仍然需要更多具有更好结合特性和治疗性质的分子。本发明提供了可结合 VEGF 并抑制 VEGF 通路的完全人源抗体。由于这些抗体是完全人源的, 因此它们可以作为治疗物质使用, 且不具有先前开发的非人源抗体、契合抗体、或人源化抗体所具有的免疫原性副作用。

发明内容

[0008] 某些实施方式提供了一种抗体, 其含有如 SEQ ID NO :2 所示的重链序列和 SEQ ID NO :3 所示的轻链序列。某些其他实施方式提供了一种抗体, 其含有如 SEQ ID NO :4 所示的重链序列和 SEQ ID NO :5 所示的轻链序列。在某些上述实施方式中, 所述抗体含有 IgG2 恒定区。在某些上述实施方式中, 所述抗体与 hVEGF₁₆₅ 结合的 K_d 值为 ≤ 2. 0nM。在某些实施方式中, 所述抗体结合 hVEGF₁₆₅ 上的某一抗原表位, 该抗原表位与贝伐单抗结合的抗原表位重叠。在某些实施方式中, 所述抗体可阻断 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF-R1 和 VEGF-R2 的结合。

[0009] 某些实施方式提供了在所需对象中抑制血管生成的方法, 该方法通过在所述对象中给药治疗有效剂量的抗体, 该抗体含有如 SEQ ID NO :2 所示的重链序列和 SEQ ID NO :3 所示的轻链序列。某些其他实施方式提供了在所需对象中抑制血管生成的方法, 该方法通过在所述对象中给药治疗有效剂量的抗体, 该抗体含有如 SEQ ID NO :4 所示的重链序列和 SEQ ID NO :5 所示的轻链序列。

[0010] 某些实施方式提供了在所需对象中治疗与血管生成异常相关的疾病的方法, 该方法包括对所述对象给药治疗有效剂量的抗体, 该抗体含有如 SEQ ID NO :2 所示的重链序列

和 SEQ ID NO :3 所示的轻链序列。某些其他实施方式提供了在所需对象中治疗与血管生成异常相关的疾病的方法,该方法包括对所述对象给药治疗有效剂量的抗体,该抗体含有如 SEQ ID NO :4 所示的重链序列和 SEQ ID NO :5 所示的轻链序列。

[0011] 某些实施方式提供了在所需对象中治疗与 VEGF 信号传导相关的炎症性疾病的方法,该方法包括对所述对象给药治疗有效剂量的抗体,该抗体含有如 SEQ ID NO :2 所示的重链序列和 SEQ ID NO :3 所示的轻链序列。某些其他实施方式提供了在所需对象中治疗与 VEGF 信号传导相关的炎症性疾病的方法,该方法包括对所述对象给药治疗有效剂量的抗体,该抗体含有如 SEQ ID NO :4 所示的重链序列和 SEQ ID NO :5 所示的轻链序列。

[0012] 某些实施方式提供了在所需对象中治疗湿性急性视网膜黄斑变性或糖尿病视网膜病变的方法,该方法包括对所述对象给药治疗有效剂量的抗体,该抗体含有如 SEQ ID NO :2 所示的重链序列和 SEQ ID NO :3 所示的轻链序列。某些其他实施方式提供了在所需对象中治疗湿性急性视网膜黄斑变性或糖尿病视网膜病变的方法,该方法包括对所述对象给药治疗有效剂量的抗体,该抗体含有如 SEQ ID NO :4 所示的重链序列和 SEQ ID NO :5 所示的轻链序列。

[0013] 某些实施方式提供了在所需对象中治疗与 VEGF 信号传导增加相关的癌症的方法,该方法包括对所述对象给药治疗有效剂量的抗体,该抗体含有如 SEQ ID NO :2 所示的重链序列和 SEQ ID NO :3 所示的轻链序列。某些其他实施方式提供了在所需对象中治疗与 VEGF 信号传导增加相关的癌症的方法,该方法包括对所述对象给药治疗有效剂量的抗体,该抗体含有如 SEQ ID NO :4 所示的重链序列和 SEQ ID NO :5 所示的轻链序列。

[0014] 某些实施方式提供了一种成套物件 (kit),其含有一种抗体,该抗体含有如 SEQ ID NO :2 所示的重链序列和 SEQ ID NO :3 所示的轻链序列。其他实施方式提供了一种成套物件,其含有一种抗体,该抗体含有如 SEQ ID NO :4 所示的重链序列和 SEQ ID NO :5 所示的轻链序列。

[0015] 某些实施方式提供了多核苷酸,该多核苷酸编码如 SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :4,和 / 或 SEQ ID NO :5 所示的氨基酸序列。某些其他实施方式提供了载体,该载体含有这些多核苷酸,某些其他实施方式提供了含有这些载体的宿主细胞。

附图说明

[0016] 图 1 :XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 的重链可变区 (包括 HCDR) 和轻链可变区 (包括 LCDR)。

[0017] 图 2 :XPA. 10. 064 IgG2 与人 hVEGF₁₆₅ 结合的 Biacore 分析。

[0018] 图 3 :XPA. 10. 072 IgG2 与人 hVEGF₁₆₅ 结合的 Biacore 分析。

[0019] 图 4 :贝伐单抗与人 hVEGF₁₆₅ 结合的 Biacore 分析。

[0020] 图 5 :贝伐单抗 (BM1)、XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 对人 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF-R1 结合的抑制作用。

[0021] 图 6 :贝伐单抗 (BM1)、XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 对人 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF-R2 结合的抑制作用。

[0022] 图 7 :贝伐单抗 (BM1)、XPA. 10. 064 (064) 和 XPA. 10. 072 (072) 结合 hVEGF₁₆₅ 抗原表位的分析。

[0023] 图 8 :XPA. 10. 064 和 G153-694 的共定位。A 列为 XPA. 10. 064 的染色结果。B 列为 G153-694 的染色结果。C 列为核染料的染色结果。D 列为合并后的图像,强度高的(白色)表示共定位。

[0024] 图 9 :XPA. 10. 072 和 G153-694 的共定位。A 列为 XPA. 10. 072 的染色结果。B 列为 G153-694 的染色结果。C 列为核染料的染色结果。D 列为合并后的图像,强度高的(白色)表示共定位。

[0025] 图 10 :XPA. 10. 064 IgG2(A) 和 XPA. 10. 072 IgG2(B) 对 HUVEC 的生长抑制。

[0026] 图 11 :对 HUVEC 用 hVEGF₁₆₅ 进行剂量滴定(dose titration)后,VEGF-R2 的磷酸化水平升高。

[0027] 图 12 :对 HUVEC 用 hVEGF₁₆₅ 加贝伐单抗进行剂量滴定(dose titration)后,VEGF-R2 的磷酸化水平降低。

[0028] 图 13 :XPA. 10. 064(064) 和 XPA. 10. 072(072) IgG2 抑制 hVEGF₁₆₅ 诱导的 VEGF-R2 磷酸化。

[0029] 图 14 :基底胶栓(Matrigel Plugs)的可视计分。由于 PH07-VAL-021 血红蛋白试验未获得胶栓实验的发现,因此开发了可视计分。

[0030] 图 15 :基底胶栓实验显示在多个剂量的贝伐单抗(BM-1)、XPA. 10. 064(064),和 XPA. 10. 072(072) 存在下,血管生成的抑制。

[0031] 图 16 :基底胶栓实验测定的血管生成抑制。数值为两个不知情的打分员(blind scorers)给出的结果的平均值。(A) 无细胞;(B) DU145 加 α KLH;(C) 贝伐单抗(0. 1mg/kg);(D) 贝伐单抗(1mg/kg);(E) 贝伐单抗(5mg/kg);(F) XPA. 10. 064(0. 1mg/kg);(G) XPA. 10. 064(1mg/kg);(H) XPA. 10. 064(5mg/kg);(I) XPA. 10. 072(0. 1mg/kg);(J) XPA. 10. 072(1mg/kg);(K) XPA. 10. 072(5mg/kg)。

[0032] 图 17 :XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 在体内对 A673 肿瘤生长的抑制。(1) 只有溶媒;(2) 0. 5mg/kg 的 XPA. 10. 064 IgG2;(3) 5mg/kg 的 XPA. 10. 064 IgG2;(4) 0. 5mg/kg 的 XPA. 10. 072 IgG2;(5) 5mg/kg 的 XPA. 10. 072 IgG2;(6) 5mg/kg 的 CHO. KLH IgG2;(7) 0. 5mg/kg 的贝伐单抗;(8) 5mg/kg 的贝伐单抗(第 8 组)。

具体说明书

[0033] 本发明的以下说明仅旨在描述本发明的多种实施方式。同样的,所讨论的具体改进不应被理解为对本发明范围的限制。本领域熟练技术人员可以很容易地知道,在不跳出本发明范围的情况下可以做出多种等同物、改变和修改,应理解这样的等同实施方式是包括在本发明中的。

缩略语

[0034] 本发明中使用了如下的缩略语:ADCC,抗体-依赖的细胞介导的细胞毒反应;AMD,年龄相关性黄斑变性;CDC,补体依赖性的细胞毒反应;CNV,脉络新生血管;COPD,慢性阻塞性肺疾病;HUVEC,人脐静脉内皮细胞;hVEGF,人 VEGF;mVEGF,鼠 VEGF;PD,药效动力学;PK,药物代谢动力学;RA,类风湿性关节炎;RIA,放射性免疫共沉淀;VEGF,血管内皮生长因子;VEGF-R,血管内皮生长因子受体;VHL,视网膜及中枢神经血管瘤病(von Hippel/Lindau);

X- 反应性,交叉反应性。

定义

[0035] 本发明中的“抗体”是指任意免疫球蛋白,包括可结合某特定抗原的单克隆抗体、多克隆抗体、或多特异性抗体或双特异性抗体。一个完整的抗体包含两条重链和两条轻链。每条重链由一可变区和第一、第二、以及第三恒定区组成,每条轻链由一可变区和一恒定区组成。抗体呈“Y”型,“Y”型结构的颈部由两条重链的第二和第三恒定区组成,其通过二硫键结合。“Y”型结构的每条臂包括一条重链的可变区和第一恒定区,其与一条轻链的可变区和恒定区相结合。轻链和重链的可变区决定抗原的结合。两条链中的可变区通常含有三个高变环状结构,称为互补决定区(CDR)(轻链(L)的CDR包含LCDR1、LCDR2和LCDR3,重链(H)的CDR包含HCDR1、HCDR2、HCDR3)。三个CDR介于被称为构架区(FrameworkRegions, FR)的侧翼序列(frinking stretches)之间,构架区比CDR更加高度保守并形成支架支撑超变环。重链和轻链的恒定区与抗原结合无关,但具有多种效应功能。根据其重链恒定区的氨基酸序列可将抗体分类。抗体的主要种类有IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,这些种类中的一些类又被分为亚类,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1或IgA2等。

[0036] 本发明中的“抗原结合片段”进一步指免疫球蛋白片段或抗体片段(即,免疫球蛋白分子的至少一段具有免疫活性的部分),例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、单链抗体分子、由含有一个或多个CDR的免疫球蛋白分子的任何片段形成的多特异性抗体。另外,本发明中的抗原结合片段还可含有来自某特定人源免疫球蛋白的一个或多个CDR,其被移接至来自一个或多个不同人源免疫球蛋白的框架区。抗原结合片段可结合母免疫球蛋白或母抗体结合的靶位。

[0037] 抗体的“Fab”片段是指由一条轻链(包括可变区和恒定区)和一条重链的可变区和第一恒定区经二硫键结合起来的那部分抗体分子。

[0038] “Fab'”片段是指包含了部分铰链区的Fab片段。

[0039] “F(ab')₂”是指Fab'的二聚体。

[0040] 抗体的“Fc”是指由一条重链的第二、第三恒定区经二硫键与另一条重链的第二、第三恒定区结合组成的那部分抗体。抗体的Fc段负责多种不同的效应功能如ADCC,和CDC,但不参与抗原的结合。

[0041] 抗体的“Fv”是指含有完整抗原结合位点的最小抗体片段。Fv片段由单条轻链的可变区和单条重链的可变区结合组成。

[0042] “单链Fv抗体”或“scFv”是指由轻链可变区与重链可变区直接相连或通过一个肽链连接而成的工程抗体(Houston 1988)。

[0043] “单链抗体Fv-Fc抗体”或“scFv-Fc”是指由连接到某抗体Fc段的scFv组成的工程抗体。

[0044] 本发明中的“抗原表位”是指抗原分子中与抗体结合的那部分氨基酸或原子基团。在本发明中,如果两种抗体表现出对抗原的竞争性结合,则这两种抗体在该抗原上结合相同的抗原表位。例如,如果本发明中公开的某抗体或其抗原结合片段与贝伐单抗竞争结合VEGF,则该抗体被认为是与贝伐单抗结合相同的抗原表位。

[0045] 本发明中的“VEGF”或“VEGF配体”是指目前已知的七种VEGF配体:VEGF-A、

VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E（衍生自病毒）、或胎盘生长因子（PIGF）-1 或 -2。就 VEGF-A 而言，目前已知有四种剪接变体，每种都显示出独特的生物学功能。含 165 个氨基酸的异构体（VEGF₁₆₅，SEQ ID NO:1）可同时以肝素结合的形式以及可溶的形式存在。含 121 个氨基酸的异构体（VEGF₁₂₁）缺失人 VEGF₁₆₅ 中对应于在第 115 位残基和第 159 位残基间的区域的片段，且只以可溶性形式存在。较长的 189 和 206 个氨基酸的异构体（分别对应于 VEGF₁₈₉ 和 VEGF₂₀₆）保留了与肝素结合的能力。本发明中提供的抗体对 VEGF₁₆₅ 表现出高结合亲和力，但在某些实施方式中，可能对非人 VEGF 蛋白或其他 VEGF 异构体产生交叉作用或表现出低水平的结合亲和力。

[0046] 本发明中对某种状态的“治疗”或“疗法”可指预防或减轻该状态，减缓该状态发生或发展的速度，减少发展为该状态的风险，预防或延迟与该状态相关的症状发展，减少或终止与该状态相关的症状，产生该状态的完全或部分的逆转，或以上的组合。对于肿瘤来说，“治疗”或“疗法”可以指根除某肿瘤的部分或全部，抑制或减缓肿瘤的生长和转移，预防或减缓肿瘤的发展，或以上的某些组合。

[0047] 本发明中的“特异性结合”是指，两分子间的非随机结合反应，如抗体与导致该抗体产生的配体间的反应。在本发明中，特异性结合第一种配体的抗体可表现出与第二种配体的交叉反应性或低水平的结合亲和力。在某些实施方式中，一种可特异性结合某配体的抗体与该配体的结合亲和力 (K_D) $\leq 10^{-7}M$ （如： $5 \times 10^{-8}M$, $10^{-8}M$, $5 \times 10^{-9}M$, $10^{-9}M$, $10^{-10}M$ ）。本发明中的 K_D 是指解离速度与结合速度的比值 (k_{off}/k_{on})，可通过本领域公知的方法测定。在另外的实施方式中，一种可特异性结合第一种配体的抗体，其与第一种配体的结合亲和力可高于或低于与第二种配体结合的亲和力至少 10 倍（如 ≥ 15 倍， ≥ 20 倍， ≥ 50 倍， $\geq 10^2$ 倍， $\geq 10^3$ 倍， $\geq 10^4$ 倍）。在另外的实施方式中，一种可特异性结合某配体的抗体其结合亲和力 (K_D) 为 $\leq 10^{-7}M$ ，但对第二种配体可几乎不表现出结合亲和力。

[0048] 本发明中的“被分离”是指“经人工”由自然状态改变。如果自然界中出现某种“被分离”的组合物或物质，那么其已经被改变或脱离其原始环境，或二者均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在的多核苷酸或多肽是未“被分离”的，但如果这些多核苷酸或多肽与之在天然状态下共存的物质足够分离并以足够纯的状态存在，则可以认为是“被分离”。本发明中的“被分离”不排除与其他化合物或物质混合的人造或合成混合物，也不排除不影响活性的杂质的存在。

[0049] 本发明中“载体”是指一种运载工具，可将编码某蛋白的多核苷酸操作性地插入其中从而使该蛋白获得表达。载体可用于转化、转导或转染宿主细胞，使其携带的遗传元件在宿主细胞内得以表达。举例来说，载体包括质粒、噬菌粒、柯斯质粒、人工染色体如酵母人工染色体 (YAC)、细菌人工染色体 (BAC) 或 P1 衍生的人工染色体 (PAC)、细菌噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体，以及动物病毒等。用作载体的动物病毒种类有逆转录病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒（如 SV40）。载体可含有多种控制表达的元件，包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。载体还可包括协助其进入细胞的成分，包括但不限于，病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳。

[0050] 本发明中“宿主细胞”是指导入载体的细胞。宿主细胞可选自多种细胞种类，包括例如细菌细胞如大肠杆菌或枯草菌，真菌细胞如酵母细胞或曲霉菌细胞，昆虫细胞如果蝇

S2 细胞或夜蛾 Sf9 细胞,或者动物细胞如成纤维细胞, CHO 细胞, COS 细胞, NS0 细胞, HeLa 细胞, BHK 细胞, HEK 293 细胞, 或人细胞。

[0051] 本发明中的“与血管生成异常相关的疾病”是指,任何由于血管生长增加,特别是与 VEGF 信号通路相关联的血管生长增加,而导致、加剧、或以其他形式相关联的状态。这些状态包括由依赖于新生血管才能生长的肿瘤,眼部疾病例如湿性 AMD,以及炎症状态例如类风湿性关节炎、牛皮癣、硬皮病、慢性阻塞性肺部疾病,或哮喘。

[0052] 本发明中的“阻断结合”或“竞争性结合”的能力是指抗体将两个分子间结合的相互作用抑制到 50% 或更高的能力。在某些实施方式中,这种抑制作用可以大于 60%,在某些实施方式中大于 70%,在某些实施方式中大于 80%,在某些实施方式中大于 90%。在某些实施方式中,被抑制的结合相互作用可以是贝伐单抗与 hVEGF₁₆₅ 的结合。在某些实施方式中,被抑制的结合相互作用可以是 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF-R1 和 / 或 VEGF-R2 结合。

[0053] 本发明中的“治疗有效剂量”是指,某种药物有效治疗某种疾病或状态的剂量或浓度。例如,对于本发明中公开的抗体在治疗癌症上的用途来说,抗体的治疗有效剂量是指在该剂量或浓度下,该抗体可以根除全部或部分肿瘤、抑制或减缓肿瘤生长及转移、预防或延缓肿瘤的发展,或以上的某些组合。又例如,治疗剂量可从约 0.01mg/kg 到约 100mg/kg,如,在约 0.01mg/kg 和约 50mg/kg 之间(如,约 0.1mg/kg, 1mg/kg, 或 10mg/kg)。在某些实施方式中,初始治疗剂量不超过约 100mg/kg 或 50mg/kg,后续治疗剂量为至少 0.01mg/kg。某给药剂量可以是每天给药、两周给药、每周给药、或每月给药。

完全人源 VEGF 抗体

[0054] 完全人源抗体与鼠源抗体、契合抗体、或人源化抗体相比,在安全性和疗效上都有多个潜在优势。第一,完全人源抗体不含非人源残基,从而使其在给药后不易产生宿主免疫反应。第二,与其他抗体种类相比,完全人源抗体通常表现出较低的清除率。降低的清除率可以允许较低的剂量和给药频率。

[0055] 本发明中提供了两种完全人源抗体, XPA. 10.064 和 XPA. 10.072, 其可特异性结合 hVEGF₁₆₅。XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 通过用 hVEGF₁₆₅ 筛选噬菌体展示 scFv 文库得到。XPA. 10.072 的重链和轻链可变区序列分别在 SEQ ID NO:2 和 SEQ ID NO:3 中列出, XPA. 10.064 的重链和轻链可变区序列分别在 SEQ ID NO:4 和 SEQ ID NO:5 中列出。在 SEQ ID NO:2 中列出的 XPA. 10.072 重链可变区含有 CDR, 在第 31-35 位氨基酸残基 (CDRH1, SEQ ID NO:6), 第 50-66 位氨基酸残基 (CDRH2, SEQ ID NO:7), 以及在第 99-108 位氨基酸残基 (CDRH3, SEQ ID NO:8)。在 SEQ ID NO:3 中列出的 XPA. 10.072 轻链可变区含有 CDR, 在第 26-35 位氨基酸残基 (072CDRL1, SEQ ID NO:9), 第 51-57 位氨基酸残基 (072CDRL2, SEQ ID NO:10), 以及在第 90-100 位氨基酸残基 (072CDRL3, SEQ ID NO:11)。在 SEQ ID NO:4 中列出的 XPA. 10.064 重链可变区含有 CDR, 在第 31-35 位氨基酸残基 (CNRH1, SEQ ID NO:6), 第 50-66 位氨基酸残基 (CDRH2, SEQ ID NO:7), 以及在第 90-108 位氨基酸残基 (CDRH3, SEQ ID NO:8)。在 SEQ ID NO:5 中列出的 XPA. 10.064 轻链可变区含有 CDR, 在第 26-35 位氨基酸残基 (064CDRL1, SEQ ID NO:12), 第 51-57 位氨基酸残基 (064CDRL2, SEQ ID NO:13), 以及在第 90-100 位氨基酸残基 (064CDRL3, SEQ ID NO:14)。

[0056] 鉴于 XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 这两种 scFv 在 ELISA 实验中可结合 hVEGF₁₆₅,

具有高亲和力,而且可抑制 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF-R1 和 VEGF-R2 的结合,因此选择将这些抗体转换成 scFv-Fc 和 IgG2,以用于其它功能性研究。Biacore 分析结果显示,XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 的 IgG2 对 hVEGF₁₆₅ 表现出了相似的高结合亲和力,但是对 mVEGF₁₆₅ 只表现出微弱的结合力。两种抗体都可结合 hVEGF₁₂₁。XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 的 IgG2 对 hVEGF₁₆₅ 的结合亲和力分别为 1.5nM 和 1.7nM,两种抗体的解离速率约为贝伐单抗的两倍。Biacore 分析结果还显示,XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 的 IgG2 对 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF-R1 和 VEGF-R2 的结合抑制作用比贝伐单抗更强。XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 抑制 VEGF 信号传导的作用通过 ELISA 实验得到证明,两种抗体都可抑制 hVEGF₁₆₅ 诱导的 VEGF-R2 的磷酸化。

[0057] 抗原表位分析显示,XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 可结合 hVEGF₁₆₅ 上的线性抗原表位,且这些抗原表位与贝伐单抗结合的抗原表位至少在某种程度上重叠。免疫组化分析显示,与贝伐单抗不同,XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 都表现出大范围的组织交叉反应性。两种抗体都可抑制 HUVEC 的增殖,都可在体内抑制血管生成和肿瘤生长。表 1 列出了 XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 的性质总结。

[0058] 因此,在某些实施方式中提供了分别含有如 SEQ ID NO :4 和 SEQ ID NO :5 所列的 XPA. 10.064 轻链和重链的抗体。在其他实施方式中,提供了分别含有如 SEQ ID NO :2 和 SEQ ID NO :3 所列的 XPA. 10.072 轻链和重链的抗体。鉴于本发明中提供的抗体对 hVEGF₁₆₅ 和 hVEGF₁₂₁ 有高亲和力,以及可阻断 VEGF 与 VEGF-R1 和 VEGF-R2 的结合及阻断 VEGF- 诱导的受体磷酸化,这些抗体可用于抑制 VEGF 信号传导及阻断 VEGF 通路。在这个基础上,所述抗体可用于治疗与 VEGF 表达相关的多种状态。

[0059] 本发明中提供的抗体已被发现可抑制 HUVEC 增殖以及在体外抑制血管生成。因此,所述抗体可用于治疗与血管生成增加相关的多种状态。例如,所述抗体可用于治疗癌症,通过抑制肿瘤位点的血管增殖从而抑制肿瘤生长。相同地,所述抗体可用于治疗癌症,通过破坏肿瘤位点的血管,从而导致肿瘤坏死。本发明中公开的抗体在治疗癌症方面的疗效在体内已经得到证实。

[0060] 某些实施方式提供的抗体可抑制血管生成和 / 或肿瘤生长,其抑制程度与贝伐单抗相近或更强。在体内 A673 肿瘤生长抑制实验中,XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 在所有的测试剂量中都抑制了 A673 肿瘤的生长,抑制程度与贝伐单抗相近。某些实施方式公开的抗体在以低于贝伐单抗的剂量或浓度给药时也抑制了血管生成和 / 或肿瘤生长,抑制程度与贝伐单抗相同或更高。本发明中提供的抗体与贝伐单抗相比,可表现出相似或更佳的药代动力学性质。例如,所述抗体与贝伐单抗相比可表现出更长的循环半衰期或更低的免疫原性。在某些实施方式中,所述抗体与贝伐单抗相比表现出相似或更佳的药代动力学性质,但所述抗体的给药间隔可长于贝伐单抗,不具有贝伐单抗在给药间隔较长时导致的负面作用。

[0061] 本发明中公开的抗体可用于治疗任何与血管生成异常相关的状态,所述血管生成异常至少部分被 VEGF 通路控制。这些状态,通常与 VEGF 表达水平升高相关,包括与血管生成增加相关的眼部疾病,如湿性 AMD 或增殖性视网膜病变如糖尿病性视网膜病变,糖尿病肾病和其他糖尿病血管增生疾病,囊性纤维化病以及多种肿瘤 (Amoroso 1997 ;McColley 2000 ;Khamaisi 2003)。

[0062] 可用本发明中公开的抗体治疗的肿瘤种类包括但不限于恶性肿瘤、淋巴瘤、胚细

胞瘤、肉瘤、白血病、或淋巴的恶性肿瘤。更具体地,可用本发明中公开的抗体治疗的肿瘤种类包括但不限于鳞状细胞癌例如上皮鳞状细胞癌,肺癌包括小细胞肺癌和非小细胞肺癌,腹膜癌、肝细胞癌、胃癌例如胃肠癌、胰腺癌、胶质母细胞脑瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝肿瘤 (heptoma)、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、肠癌、外阴癌、甲状腺癌、肝细胞癌、肛门癌、阴茎癌、头颈癌、以及儿童癌如小儿肉瘤。此外,肿瘤可以是恶性的(如,癌症)或良性的(如增生、囊肿、拟孢囊、错构瘤和良性肿瘤)。

[0063] 可用本发明中公开的抗体治疗的肿瘤种类也可包括与某特定生物标记相关的癌症。例如,生物标记包括,但不限于,视网膜及中枢神经血管瘤病 (von Hippel/Lindau, VHL) 肿瘤抑制基因中的突变和 / 或缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 的过量表达。在某些实施方式中,所述抗体可用于治疗在 VHL 肿瘤抑制基因中存在突变的癌症。VHL 基因中的突变会导致缺氧诱导转录因子 1 α 和 2 α 组成性稳定,从而结合 VEGF 基因的增强子元件并刺激血管生成 (Harris2000)。可用本发明中公开的抗体进行治疗的 VHL 突变的肿瘤种类包括,例如,中枢神经系统血管母细胞瘤、视网膜血管母细胞瘤、内淋巴囊肿瘤,透明细胞性肾细胞癌和 / 或肾囊肿、嗜铬细胞瘤、胰腺囊肿、神经内分泌瘤、附睾和阔韧带囊腺瘤。首先根据是否存在 VHL 基因突变对受试对象通过已知方法进行选择或筛选,筛选方法例如使用突变特异性的巢式逆转录聚合酶链式反应或巢式单链构象多态性分析的分子检测方法 (Ashida et al., J. Urol. 169 :20898-93 (2003))。再挑选出识别的对象,并用本发明中的抗体进行治疗。在其他实施方式中,所述抗体可用于在对象中治疗有 HIF-1 α 过量表达的癌症。HIF-1 α 过量表达可通过对组织(如,脑组织、乳房组织、宫颈组织、食管组织、口咽组织、卵巢组织和前列腺组织)进行活组织检查的方法检查。再对筛选出的对象用所述抗体治疗或者用所述抗体与 HIF-1 α 抑制剂联用治疗, HIF-1 α 抑制剂例如 2- 甲氧雌二醇、4-O- 甲基三白草醇 (4-O-methylsarcosine)、双木脂素 A (manassantin A)、双木脂素 B1 (manassantin B1)、NSC-134754、NSC-643735、拓扑替康、SCH66336、PX-478、R115777、西妥昔单抗、103D5R、以及非甾体抗炎药(见 Kimbro&Simons, Endocrine-Related Cancer, 13 :739-749 (2006))。

[0064] 其他可用本发明中描述的抗体治疗的状态包括炎症性状态如类风湿性关节炎、牛皮癣、硬皮病、慢性阻塞性肺疾病,以及哮喘。某些实施方式提供的抗体可用于治疗某种已经对贝伐单抗疗法产生耐药性的状态。

[0065] 本发明中提供的抗体可用于多种非治疗用途。在某些实施方式中,所述抗体可作为亲和纯化剂用于纯化 hVEGF₁₆₅, 其他 VEGF 异构体,或其片段。在这些实施方式中,可通过本领域已知方法将所述抗体固定在某固相上,如树脂或滤纸上。所述抗体也可以用于从溶液中沉淀 hVEGF₁₆₅, 其他 VEGF 异构体,或其片段。在其他非治疗用途的实施方式中,所述抗体可应用于多种体外或体内的诊断或检测中。在某些这样的实施方式中,所述抗体可以缀合到某可检测的标记上。在某些这样的实施方式中,所述抗体可以不缀合到某可检测的标记上,但可通过可结合所述抗体的标记抗体来检测。某些实施方式中公开的抗体可用于检测 hVEGF₁₆₅ 的表达。在某些这样的实施方式中,所述抗体可用于诊断与 hVEGF₁₆₅ 表达升高相关的状态。例如,所述抗体可与来自某对象的生物样本接触,从而诊断在该对象中与 hVEGF₁₆₅ 表达升高相关的状态。同样地,所述抗体可直接给药于所述对象,利用本领域中已知方法检测所述抗体与 hVEGF₁₆₅ 的结合。

[0066] 突变的抗原表位结合研究表明,本发明中公开的抗体结合 VEGF 上的线性抗原表

位,该抗原表位与贝伐单抗识别的抗原表位至少部分重叠。因此,在某些实施方式中,本发明中公开的抗体可结合含有 hVEGF₁₆₅ 第 79-94 位氨基酸残基 (SEQ ID NO:1) 的抗原表位,或由 hVEGF₁₆₅ 第 79-94 位氨基酸残基 (SEQ ID NO:1) 组成的抗原表位。同样地,所述抗体可结合与 SEQ ID NO:1 的第 79-94 位氨基酸残基所对应的序列完全或部分重叠的抗原表位。基于抗原表位的重叠,某些实施方式中公开的抗体可竞争性地抑制贝伐单抗与 hVEGF₁₆₅ 的结合。

[0067] 本发明中提供的抗体在优选的情况下在人体中的清除半衰期 (T_{1/2}) 可与贝伐单抗相似或更高,贝伐单抗的半衰期为 17-21 天。清除半衰期,指给药抗体的血浆浓度降至低一半时所需的时间,可通过本领域中的已知方法计算。某些实施方式中公开的抗体的清除半衰期可以是至少 17 天。在某些其他实施方式中,可以是 17-21 天,在某些这样的实施方式中可以是大于 21 天。

[0068] 本发明中公开的抗原结合片段可含有全长抗体的某一片段或某几片段,例如, Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、或 scFv 片段。这些片段可由全长抗体经本领域已知的方法制得,例如用酶进行蛋白水解剪切,如用木瓜蛋白酶制得 Fab 片段或用胃蛋白酶制得 F(ab')₂ 片段。某些实施方式中公开的抗体可含有来自 SEQ ID NOs:2-5 的一种或多种 CDR,其被移接至一种或多种人源框架区。

[0069] 本领域技术人员可知,本发明中提供的抗体可与多种缀合物偶联或关联或联用 (参见,例如, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989))。这些缀合物与所述抗体的连接可通过共价键、亲和结合、夹入 (intercalation)、协同结合、复合、关联、混合、或添加等,以及其他方法。某些实施方式中,所述的抗体可通过工程化使其含有抗原表位结合部位以外的特定位点,这些位点可被用于结合一种或多种缀合物。例如,这种位点可包括一种或多种反应性氨基酸残基,例如半胱氨酸或组氨酸残基,以促使其与某缀合物形成共价连接。在某些实施方式中,所述抗体可间接连接于某缀合物,或通过另一个缀合物连接。例如,所述抗体可与生物素缀合,然后间接缀合至另一种亲和素缀合的缀合物。

[0070] 在某些实施方式中,与公开的抗体相连或联合使用的缀合物可包含一种或多种物质,这些物质旨在改变所述抗体的一种或多种药物代谢性质 (PK),例如聚乙二醇 (PEG) 可增加所述抗体的半衰期或降低其免疫源性 (见,例如, Katre 1990)。

[0071] 在某些实施方式中,缀合物可含有一种或多种细胞因子,其在本发明中指任何在细胞上作为细胞间调节因子的蛋白。细胞因子的实例包括但不限于淋巴细胞因子、单核因子、人生长激素、N-甲硫氨酰基人生长激素、牛生长激素、甲状旁腺激素、甲状腺素、胰岛素、胰岛素原、耻骨松弛激素、耻骨松弛激素原、卵泡刺激素 (FSH)、促甲状腺素 (TSH)、黄体生成素 (LH)、肝生长因子、纤维原生长因子、泌乳刺激素、胎盘催乳激素、肿瘤坏死因子 α 和 β 、繆勒 (氏) 管抑制物质、小鼠促性腺激素相关肽、抑制素、活化素、整联蛋白、促血小板生成素 (TPO)、神经生长因子如 NGF- β 、血小板生长因子、转化生长因子如: TGF- α 和 TGF- β 、胰岛素样生长因子 I 和 II、促红细胞生成素 (EPO)、成骨因子、干扰素如: 干扰素- α 、- β 、和 - γ ; 集落刺激因子如: 巨噬细胞-CSF、粒细胞巨噬细胞 CSF、和粒细胞-CSF、白介素如: 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、以及 IL-12、

肿瘤坏死因子如：TNF- α 和 TNF- β ，以及其他多肽因子。本发明中的抗体及其抗原结合物可以与前述的任意细胞因子联合应用和 / 或给药。

[0072] 在某些实施方式中，与所述的抗体结合或联用的缀合物可含有一种或多种化疗药物，本发明中所述的化疗药物是指任何可用于治疗癌症的物质。化疗药物实例包括，但不限于，替莫唑胺、特异性结合 IGF1 受体的抗体、洛那法尼 (lonafarnib)、骨化三醇、坦西莫司、伊立替康、喜树碱、阿霉素、亚德里亚霉素，毒素类例如蓖麻毒素、白喉毒素或其他细菌、真菌、植物或动物来源的毒素，凝结剂、烷化剂例如噻替派和环磷酰胺 (CYTOXANTM)、烷基磺酸盐类例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡，氮丙啶类例如苯佐替派 (benzodopa)、卡波醌、美妥替哌 (meturedopa)、乌瑞替派 (uredopa)，乙撑亚胺类和甲基蜜胺类如六甲蜜胺、曲他胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基三聚氰胺，氮芥类例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺 (cholophosphamide)、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、盐酸氮芥氧盐酸盐 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲磷胺和尿嘧啶氮芥，亚硝基脲类如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀，抗生素类如阿克拉霉素、放线菌素、氨基霉素 (authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素 (bleomycins)、放线菌素 C、卡奇霉素、卡拉星 (carabycin)、卡波霉素 (carnomycin)、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素 D、柔红霉素、地托比星、6- 重氮 -5- 氧化 -L 正亮氨酸、阿霉素、表阿霉素、依索比星、依达比星、麻西罗霉素 (marcellomycin)，丝裂霉素、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素 (peplomycin)、紫菜霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星 (rodorubicin)、链黑菌素、链脲佐菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他汀、佐柔比星、抗代谢剂如甲氨蝶呤和 5- 氟尿嘧啶 (5-FU)，叶酸类似物如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙、嘌呤类似物如氟达拉滨，6- 巯基嘌呤，硫咪疏鸟嘌呤 (thiamiprine)，疏鸟嘌呤，嘧啶类似物如安西他滨、阿扎胞苷、6- 氮杂尿嘧啶、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU、雄激素类例如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯，抗肾上腺类例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦，叶酸补充剂例如亚叶酸、醋葡醛内酯、醛磷酰胺、氨基乙酰丙酸、安吖啶、bestrabucil、比生群、依达曲沙 (edatraxate)、地磷酰胺 (defofamine)、秋水仙胺、地吖醌、依氟鸟氨酸 (elformithine)、依利醋铵、依托格鲁、硝酸镓、羟基脲、香菇多糖、氯尼达明、米托胍脲、米托蒽醌、莫派达醇、硝氮吖啶 (nitracrine)、喷司他丁、蛋氨酸 (phenamet)、吡柔比星、鬼臼毒素、2- 乙基肼 (2-ethylhydrazide)、甲苄肼、PSKTM、雷佐生、西佐喃、锗螺胺、细交链孢菌酮酸、三亚胺醌、三 (2- 氯乙基) 胺、氨基甲酸乙酯、长春地辛、达卡巴嗪、甘露醇氮芥、二溴甘露醇、二溴卫矛醇、哌泊溴烷、加西托星 (gacytosine)、阿糖胞苷 (" Ara-C ")、环磷酰胺、噻替派、紫杉醇类例如紫杉醇 (泰素TM，百时美施贵宝公司肿瘤部，普林斯顿，新泽西) 以及多西他塞 (泰素帝 TAXOTERETM，Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)，阿博利斯 (ABRAXANE) (结合白蛋白的粒径为约 130nm 的紫杉醇注射用混悬剂)，苯丁酸氮芥，吉西他滨，6- 硫鸟嘌呤，硫嘌呤，甲氨蝶呤，铂类类似物如顺铂或卡铂、赛特铂 (satraplatin)、奥沙利铂、长春碱，铂，依托泊苷 (VP-16)，异环磷酰胺，丝裂霉素 C，米托蒽醌，长春新碱，长春瑞宾，诺维本，米托蒽醌，替尼泊苷，柔红霉素，氨基蝶呤，希罗达，伊班磷酸钠，CPT-11，端粒酶抑制剂 RFS 2000，二氟甲基鸟氨酸 (DMFO)，维甲酸，埃斯培拉霉素 (esperamicins)、卡培他滨、吉西他滨 (gemcitabine)，以及药用可接受的盐类、酸类、和 / 或以上任一衍生物。化疗药物也可

包括抗激素药物,其作用于调控或抑制激素在肿瘤上的作用,例如抗雌激素类药物包括他莫西芬、雷洛西芬、抑制 4(5)-咪唑类的芳香化酶,4-羟基他莫西芬,曲沃昔芬,雷洛昔芬,LY117018,奥诺前列素,托瑞米芬(法乐通),以及抗雄激素类包括氟他胺,尼鲁米特,比卡鲁胺,亮丙瑞林,戈舍瑞林。本发明提供的抗体和抗原结合片段可与任一前述化疗药物联合使用和/或给药。

[0073] 在某些实施方式中,与公开的抗体相连的缀合物可含有一种或多种可检测的标记。所述标记包括,但不限于,放射性同位素如 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、和 ^{32}P 、其他镧系元素、化学发光标记物、荧光标记物例如:荧光素、罗丹明、丹黄酰(dansyl)、藻红素、或得克萨斯红(Texas Red),以及酶-底物标记物例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、或 β -D-半乳糖苷酶。

[0074] 为治疗与高 VEGF 表达水平和/或血管生成增加相关的疾病,本发明中的抗体可以在某有效剂量下与药用可接受的媒介进行制剂。这种制剂可以包括生理可耐受的液体、凝胶、固体运载物(carrier)、稀释剂、佐剂、或辅料,或以上的某些组合。有效剂量部分取决于对象的体重、年龄、和健康状况,以及给药途径和肿瘤发展程度。含有所述抗体的药物制剂可单独给药或与其他已知治疗物质联合给药。例如,所述抗体可以与任何已知的可抑制 VEGF 信号通路的治疗药物联合用药,包括其他抗体或基于抗体的药物。同样地,抗体也可与不抑制 VEGF 信号通路但靶向作用于与目的疾病相关的另一通路或另一症状的治疗药物联合用药。例如,本发明中的抗体可与化疗、放疗、和/或手术联用,以治疗癌症。与其他治疗药物“联用”的抗体不是必须与该药物同时给药。在另一种治疗物质给药之前或之后给药的抗体在本发明中也被认为是与该治疗药物“联用”。抗体可以通过皮下、腹腔、静脉、肌肉、皮下或透皮注射以及其他方式给药。

[0075] 某些实施方式提供了表达所述抗体的表达系统。这些表达系统包括编码所述抗体的多核苷酸,含有这些多核苷酸的载体,以及含有这些载体的宿主细胞。编码所述抗体的多核苷酸可通过本领域已知方法被分离或合成,并插入可复制的载体中进行放大或克隆。编码所述抗体可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)的多核苷酸可从单个载体中表达,或者可用两个分开的载体表达,再在体外进行组装。在某些实施方式中,它们可以在同一细胞中由两个分开的载体中共同表达并在细胞内进行组装(见,例如,美国专利号 5,595,898)。适用的载体可含有多种调控序列,如启动子、增强子、或转录起始序列,以及用于表型选择的编码标记物的基因。这样的附加序列在本领域中公知。在某些实施方式中,所述载体可含有编码人 IgG2 免疫球蛋白的重链恒定区(C_H)和轻链恒定区(C_L)的多核苷酸序列。或者,所述载体可仅表达所述抗体的 V_H 和 V_L 链,而表达出的多肽含有一 Fv 片段而不是完整的抗体。载体可以插入适当的宿主细胞中从而放大或表达所述的多核苷酸序列。所述宿主细胞可以在本领域已知的多种培养液中培养并产生抗体,培养液例如最低基本培养液(MEM)(Sigma)、RPMI-1640(Sigma),Dulbecco 改良 Eagle 培养液(DMEM)(Sigma)和 Ham' s F10(Sigma)。培养液可添加多种物质,例如激素、生长因子、盐类、缓冲液、核苷、抗生素、微量元素,葡萄糖、或其他能量源。培养条件例如温度和 pH 可通过本领域公知的参数进行调节。

[0076] 本发明所述的抗体可含有缀合物用于向癌细胞中进行特异性传递。另外,所述抗体与肿瘤细胞的结合可以用于招募宿主免疫反应。这种宿主免疫反应可通过双价抗体得到增强,双价抗体的其中一个结合位点对应于本发明提供的完全人源抗体而另一个结合位点

则识别细胞毒 T 细胞。

[0077] 在某些实施方式中,所述的抗体可含有高岩藻糖含量的寡聚多糖。在其他实施方式中,所述的抗体可含有低岩藻糖含量,例如无岩藻糖的 Fc 抗体。本发明所述的低岩藻糖抗体可通过具有低岩藻糖糖基化活性的细胞系制得,例如大鼠 YB2/0 细胞 (Shinkawa2003) 或 CHO 变体细胞系 Lec13(Shields 2002)。

[0078] 药物组合物。本发明的范围内包括了药物组合物,其含有本发明所述的抗体或抗原结合片段以及关联的药用可接受的运载物(例如,以单个组合物形式存在或分开存在于成套物件中)。药物组合物可通过药学领域任何公知的方法制备;见,例如,Gilman,et al., (eds) (1990), The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press; A. Gennaro(ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania.; Avis, et al., (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, New York; Lieberman, et al., (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, New York; 以及 Lieberman, et al., (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, New York.

[0079] 含有本发明中所述抗体或抗原结合片段的药物组合物,可选择与另一化疗药物联合,并可采用常规药用可接受辅料和添加剂通过常规的方法制备。所述的药用可接受的辅料和添加剂包括,无毒的可兼容的填充物、粘合剂、崩解剂、缓冲液、防腐剂、抗氧剂、润滑剂、搅味剂、增稠剂、着色剂、乳化剂以及类似物。所有的给药途径都可使用,包括但不限于,注射途径(如,皮下注射、静脉注射、腹腔注射、肌肉注射、外用给药、腹腔注射、吸入、颅内注射)以及非注射途径(如,口服给药、鼻腔给药、眼内给药、舌下给药、直肠给药、或外用给药)。

[0080] 注射剂可制备成常规的形式,可以是液体溶液或混悬液,可以是固体形式,该固体形式可在注射前于液体中形成溶液或混悬液,或者是乳剂。所述的注射剂,溶液和乳剂也可含有一种或多种辅料。辅料包括,例如,水、盐、葡萄糖、甘油、或乙醇。另外,如果需要的话,用于给药的药物组合物还可以含有少量的无毒佐剂如保湿剂或乳化剂, pH 缓冲剂、稳定剂、增溶剂、以及其他这样的物质,例如,醋酸钠、山梨醇酐单月桂酸酯、油酸三乙醇胺和环糊精。

[0081] 在本发明的某个实施方式中,注射制剂中使用的药用可接受运载物包括水相介质、非水相介质、抗微生物物质、等渗物质、缓冲液、抗氧剂、局部麻醉剂、助悬剂和分散剂、乳化剂、螯合剂、及其他药用可接受的物质。

[0082] 水相介质的实例包括氯化钠注射液,林格氏液注射液,等渗葡萄糖注射液,无菌水注射液,葡萄糖和乳酸林格氏注射液。非水相注射介质包括植物来源的不挥发性油,棉花子油,玉米油,芝麻油,和花生油。细菌抑制或真菌抑制浓度的抗菌物质可加入包装在多剂量容器中的注射制剂中,抗菌物质包括酚类或甲酚类,汞制剂,苯甲醇,氯代丁醇,甲基和丙基对羟基苯甲酸酯、噻汞撒、氯苯甲烷铵和氯苯乙铵。等渗剂包括氯化钠和葡萄糖。缓冲液包括磷酸盐和枸橼酸盐缓冲液。抗氧化剂包括硫酸氢钠。局部麻醉剂包括盐酸普鲁卡因。助悬剂和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、和聚乙烯吡咯烷酮。乳化剂包括聚山梨醇酯 80(吐温-80)。金属离子的螯合剂包括 EDTA(乙二胺四乙酸)或 EGTA(乙二醇四乙酸)。药用运载物还可包括用于水混溶介质的乙醇、聚乙二醇、丙二醇;以及用于 pH 调

节的氢氧化钠、盐酸、枸橼酸、或乳酸。

[0083] 在本发明的某一实施方式中,注射给药的制剂可包括现用的无菌溶液、使用前现与溶剂混合的无菌干燥的可溶物,如冻干粉,包括皮下片、注射即用的无菌混悬剂、使用前现与介质混合的无菌干燥不溶产品以及无菌乳剂。所述溶液可以为水相或非水相。

[0084] 本发明所述的抗体或其抗原结合片段,可以选择与另一个化疗药物关联,可对所述抗体或其抗原结合片段的浓度进行调节,使得一次注射可提供有效量,并产生理想的药理效果。本领域公知,精确的剂量取决于,尤其是,病人或动物的年龄、体重、以及状态。

[0085] 在本发明的某一实施方式中,单位剂量的注射制剂包装在一个安瓿、一支管或一支带有针的针筒中。本领域习知,所有注射给药的制剂应为无菌。

[0086] 在本发明的某一实施方式中,通过在某适当的溶剂中溶解所述抗体或其抗原结合片段可制备无菌冻干的粉末,所述抗体或抗原结合片段可选择与另一化疗物质联合,或者与其药物可接受的衍生物联合。所述溶剂可含有一种辅料,其可使所述粉末或由所述粉末制得的重组溶液的稳定性提高或其他药理组分得到改善。适用的辅料包括,但不限于,葡萄糖、三梨糖醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他适用的物质。所述溶剂还可含有缓冲液,如枸橼酸缓冲液、磷酸钠或磷酸钾缓冲液或其他本技术人员公知的缓冲液,在一种实施方式中,缓冲液的 pH 为中性。在本领域技术人员公知的标准条件下进行所述溶液随后的过滤除菌,以及冻干可制得理想的制剂。在一种实施方式中,将所得的溶剂分装至小管中进行冻干。每支小管可容纳单次剂量或多次剂量的所述抗 VEGF 抗体或其抗原结合片段或其组合物。每支小管中的装入量可略微高于每次剂量所需或多次剂量所需(例如约 10% 过量),从而保证取样精确和给药精确。冻干粉可在适当的条件下储存,如在约 4℃ 到室温范围。

[0087] 冻干粉用注射用水重溶后得到可注射给药的制剂。在本发明的一种实施方式中,将冻干粉加至注射用水中或其他适当的液体运载物中进行重溶。精确的剂量取决于所选的治疗。该剂量可根据经验确定。

[0088] 本发明提供了以下实施例,旨在更好地说明本发明,而不应被理解为限制本发明的范围。对于提到的具体材料,其仅仅旨在说明而不在于限制本发明。本领域技术人员在无需创造性劳动以及不离开本发明范围的情况下,开发出等同的方法或反应物。应理解,对本发明中所述的过程可以做出多种变动但仍然包括在本发明的范围内。发明人认为这样的变动包括在本发明的范围内。实施例 1:制备可结合 hVEGF₁₆₅ 的抗体

[0089] 使用固定的 hVEGF₁₆₅ 筛选人源单链 Fv(scFv) 噬菌体展示文库,确定一组具有结合 hVEGF₁₆₅ 能力的抗体片段。通过标准方法进行筛选(如:Methods in Molecular Biology, vol.178:Antibody Phage Display:Method and Protocols Edited by:P. M. O'Brien and R. Aitken, Humana Press;,"Panning of Antibody Phage-Display Libraries,"Coomber, D. W. J., pp. 133-145, 和 "Selection of Antibodies Against Biotinylated Antigens,"Chames, P., et al. pp. 147-157)。

[0090] 简单的说,用 50 μ l 溶于 PBS 的浓度为 10 μ g/ml 的重组 hVEGF₁₆₅(R&D Systems, 分类号 293-VE) 对 NUNC® MAXISORP 板的三个孔中进行包被。经过 4℃ 过夜培养后,用含 5% 牛奶的 PBS 溶液在室温下对自由结合位点进行包封一小时。然后,在包封后的孔中加入约 200 μ l 溶于 5% 牛奶的 PBS 的噬菌体库,室温培养大约一到两小时。冲洗孔并使用标准方

法洗脱结合的噬菌体（见，如：Sambrook and Russell, Molecule Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001）。洗脱后的噬菌体在 37℃ 时感染对数生长期的大肠杆菌 TG1 宿主细胞，进行扩增。以 2500rpm 的转速离心 5 分钟收集被感染的 TG1 细胞，并铺板至 15cm 2YT-氨苄青霉素-2% 葡萄糖琼脂板上，30℃ 培养过夜。然后使用扩增的噬菌体重复筛选过程。

[0091] 筛选、洗脱和扩增的循环过程重复三轮，浓度逐渐降低（如：第一轮用 50 μ g/ml hVEGF₁₆₅，第二轮用 10 μ g/ml，第三轮用 10 μ g/ml），直到铺板的 TG1 细胞的单克隆被用于接种 96 孔板中的培养液。将微量培养生长至 OD600 达到 0.6，加入 1mM IPTG 诱导可溶性 scFv 的表达，并在 30℃ 振荡培养过夜。旋转沉淀细菌，使用周质提取物，以标准 ELISA 检测法检测 scFv 对固定 hVEGF₁₆₅ 的结合。实施例 2：使用 XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 scFv 阻断 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF 受体的结合

[0092] 使用基于微孔板的竞争性筛选 DELFIA 实验 (Perkins Elmer, Waltham, MA) 检测实施例 1 中具有 hVEGF₁₆₅ 结合能力的噬菌体克隆，阻断 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF-R1 和 / 或 VEGF-R2 的结合能力。

[0093] 简单的说，将生物素化的 hVEGF₁₆₅ 溶液以 1 : 1 的体积比加入到实施例 1 中得到的周质提取物中，使 hVEGF₁₆₅ 的终浓度为 0.5 μ g/ml。将 100 μ l 该混合物加入到 VEGF-R1 或 VEGF-R2 包被的板中 (R&D Systems: VEGF-R1/F1t-1, 货号 321-FL; VEGF-R2/KDR/F1k-1, 货号 357-KD)，室温培养 1.5 小时。用 PBST 洗板。以 50 μ l/孔加入溶于 DELFIA 检测缓冲液的 1 : 250 稀释的 Europium-链霉素溶液。室温培养一小时，然后使用 DELFIA 洗涤缓冲液洗涤。以 50 μ l/孔加入 DELFIA 增强缓冲液，并将板在室温培养 5 分钟。使用实时荧光 Gemini 读板仪读板。实施例 3. scFv 向 scFv-Fc 和 IgG 的转化

[0094] 选用在实施例 2 中对 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF-R1 和 / 或 VEGF-R2 结合抑制超过 60% 的两个 scFv，XPA. 10.064 和 XPA. 10.072，用于转化 scFv-Fc 和 / 或 IgG。XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 的轻链可变区（包括轻链 CDRs）和重链可变区（包括重链 CDRs）如图 1 所示。重链 CDRs（如：HCDR1, HCDR2 和 HCDR3）和轻链 CDRs（如：LCDR1, LCDR2 和 LCDR3）通过 Kabat 计数系统确定 (Kabat, E. A., et al. 1987, in Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, NIH, USA)。XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3 被确定为如 SEQ ID Nos. 6, 7 和 8 分别所示的氨基酸序列。XPA. 10.064 的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3 被确定为如 SEQ ID Nos. 12, 13 和 14 分别所示的氨基酸序列。XPA. 10.072 的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3 被确定为如 SEQ ID Nos. 9, 10 和 11 分别所示的氨基酸序列。

[0095] 为了将 XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 转化为 scFv-Fc 融合蛋白，将 scFv 的 cDNAs 克隆至真核表达载体，该真核表达载体经修饰后可编码 gamma-2 (γ 2) 重链恒定区 CH2 和 CH3 结构域的基因 (U. S. Patent No. 7,192,737; WO 2004/033693)。

[0096] 为了将 XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 转化为 IgG，将重链和轻链的可变区克隆入至真核表达杂体，该真核表达载体编码 kappa (κ), lambda (λ), 或 gamma-2 (γ 2) 重链和轻链恒定区基因 (US 2006/0121604)。

[0097] 按前人所述方法 (US 2006/0121604)，在细胞中瞬时表达 XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 的 scFv-Fc 和 IgG 抗体。在培养的第六天收集转染细胞的上清液。使用蛋白 A

色谱纯化 IgG。 实施例 4：用 Biacore 分析 XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 的 scFv-Fc 和 IgG 结合动力学

[0098] 使用 BIACORE 2000 和 CM5 传感芯片 (Biacore) 检测 XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 的 scFv-Fc 的结合亲和力, 其中蛋白 A/G (Pierce) 以高密度固定在所有的流动细胞上。实验所用稀释缓冲液和流动缓冲溶液为含有 1 : 50 稀释的 Chemiblocker® (Chemicon) 的 HBS-EP (Biacore) 溶液。抗体捕捉通过在流动细胞 2 (fc2) 上以 20 μ l/ 分钟的速度注入不定体积的稀释过的 XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 的 scFv 进行, 从而实现约 50-70 RU 的抗体捕捉。抗体的浓度约为 0.5 μ g/ml。用 Kinject 将 sf21 细胞表达的 hVEGF₁₆₅ 以 30 μ l/ 分钟的速度注射 5 分钟以上, 并带有 15 分钟的 fc1 和 fc2 的解离。以三倍系列稀释制备四个 hVEGF₁₆₅ 稀释液, 得到的浓度为 5 μ g/ml (119nM), 1.667 μ g/ml (39.7nM), 0.55 μ g/ml (13.2nM) 和 0.185 μ g/ml (4.4nM)。以 50 μ l 每分钟的速度注入 100mM HCl 两次, 每次 12 秒, 进行再生 (Regenerations)。用 Scrubber2 处理数据, 并在对照流动细胞注射和空白注射两次参考后, 根据 1 : 1 Langmuir 作用模型修正。XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 的 scFv-Fcs 表现对 hVEGF₁₆₅ 几乎一致的高结合亲和力。

[0099] 用相似的方法检测了 XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 IgG2 的结合动力学。XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 IgG2s 均可特异性结合 hVEGF₁₆₅, 两者亲和力相近, 均为低的个位数纳摩尔级别 (图 2-4), 同时表现出微弱的 mVEGF₁₆₅ 结合力。两种抗体都表现出了与贝伐单抗类似的 k_a 值 (表 2)。 实施例 5. XPA. 10. 064 and XPA. 10. 072 IgGs 对 hVEGF₁₆₅ 和 VEGF 受体结合的阻断作用

[0100] 使用 Biacore 2000 和 CM5 芯片检测 XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 IgG2 阻断 hVEGF₁₆₅ 与 VEGF-R1 和 / 或 VEGF-R2 结合的能力。

[0101] 通过氨基偶联 (Biacore) 将 VEGF 受体 (R&D Systems) 以约 15,000 的密度固定在 CM5 芯片上。VEGF-R2 固定在 fc2 而 VEGF-R1 固定在 fc4。流动细胞 1 和 3 作为参照, 使用与受体固定的流动细胞相同的方法激活和阻断。以 1 : 1 的比例将抗体样本或缓冲溶液与 0.15 μ g/ml 溶于 HBS-EP 冲洗缓冲溶液的 hVEGF₁₆₅ 溶液混合。抗体的最终浓度为 15, 5, 1.667, 0.556, 0.185, 0.0617, 0.0206 和 0 μ g/ml。在 Biacore 分析开始前培养样品至少一小时。所有样品都重复注射, 每组抗体重复都有其各自的阳性和阴性对照 (分别为没有 VEGF 抗体和没有 VEGF)。样品以 10 μ l/ 分的速度向所有流动细胞注射 1.5 分钟。以 50 μ l/ 分的速度注射 Glycine, pH 1.75 用于再生。

[0102] 为了分析数据, 结合相的线性部分 (30 秒到 1 分钟) 的斜率采用线性拟合确定。用每一点的信号减去最接近空白的值, 然后除以对应 100% 的对照信号 (无抗体) 从而确定该周期中的抑制百分比。数据由 GraphPad Prism 绘制成图, 并用 sigmoidal 量效曲线拟合计算 EC50。

[0103] XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 IgG2 都能阻断 hVEGF₁₆₅ 和 VEGF-R1 与 VEGF-R2 结合, 其阻断水平与贝伐单抗相近 (图 5-6, 表 3)。表 3

	贝伐单抗	XPA. 10. 064	XPA. 10. 072

hVEGF ₁₆₅ /VEGF-R1 (EC50)	0.1002	0.1589	0.1211
hVEGF ₁₆₅ /VEGF-R2 (EC50)	0.06328	0.1287	0.1730

实施例 6. 分析 XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 结合的 hVEGF₁₆₅ 抗原表位

[0104] 为了确定 XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 识别的 hVEGF₁₆₅ 抗原表位是线型或立体型, 将 200ng 热变性的未还原的或还原的重组 hVEGF₁₆₅ 样品分别在 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳检测。电泳后的蛋白质被转移到 Immulon-P 膜, 同时将蛋白印迹与 XPA. 10.064 IgG, XPA. 10.072IgG 或贝伐单抗杂交, 并与 1 μg/ml 二抗羊抗人 IgG HRP 缀合抗体培养。通过增强化学荧光 (ECL) 底物 (Pierce) 检测结合作用。

[0105] XPA. 10.064, XPA. 10.072 和贝伐单抗均结合 hVEGF₁₆₅ 的线性抗原表位 (图 7)。 实施例 7. XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 hVEGF₁₂₁ 抗原表位结合研究

[0106] 为了确定 XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 是否结合与贝伐单抗相同的 hVEGF₁₂₁ 抗原表位, 使用多种 hVEGF₁₂₁ 突变体进行三次 ELISA 竞争结合实验。

[0107] 之前的突变体分析表明, VEGF 残基 M81, G88, Q89 和 G92 对于贝伐单抗与 hVEGF₁₆₅ 的结合很重要 (Fuh 2006)。为了确定这些残基是否对 XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 的结合同样重要, 制备了以下 hVEGF₁₂₁ 突变体: hVEGF₁₂₁-M81A, hVEGF₁₂₁-Q89A, hVEGF₁₂₁-G92A, 以及 hVEGF₁₂₁-G88S。突变体在 CHO-K1 细胞中瞬时表达, 收集细胞上清液用于 ELISA 结合分析。

[0108] 酶标板上分别用浓度为 1, 2 或 5 μg/ml 的 XPA. 10.064, XPA. 10.072, 贝伐单抗或者对照的多克隆羊抗人 VEGF (PAB) 包被, 在 4℃ 培养过夜。酶标板用溶于 PBS 的 30、60 或 100 μl 30% ChemiBlock™ 试剂 (Millipore) 室温封闭一小时, 在适当的孔中分别加入每一个突变体的 CHO-K1 培养上清液, 或 1 μg/ml 野生 hVEGF₁₂₁, 重组 hVEGF₁₆₅ 或重组 mVEGF₁₆₅。培养一个小时后, 洗涤酶标板并且用生物素化的羊多克隆抗-VEGF 抗体室温培养一小时。检测时使用 HRP 缀合的链霉亲和素, 而后使用 TMB 显色底物 (Calbiochem), 按照制造商的实验方法进行检测。

[0109] XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 与 hVEGF₁₂₁ 突变体的结合方式与贝伐单抗类似 (表 4-5), 这表明所述抗体结合重叠的或相同的抗原表位。 实施例 8. XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 的器官交叉反应

[0110] XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 的免疫组织化学 (IHC) 反应性采用冰冻的正常的人体组织阵列 (TMA) 通过单色显色技术进行评价。TMA 包括 32 种正常人体组织, 每一种类的组织由来自 2 到 3 个不同捐赠人的组织组成。除了 TMA 以外, 更大的正常人肝脏切片, 肾脏切片, 输卵管切片, 胰腺切片, 输尿管切片和肾上腺切片被用于确认 TMA 的染色结果或者用于代替 TMA 中缺少的组织。阳性对照包括点样在紫外-树脂切片上的 hVEGF 蛋白和表达高水平 hVEGF 的肾癌组织, 由抗 VEGF 的兔单克隆抗体的强染色评价确定。

[0111] 通过人对人 IHC 染色方法, 用 20 μg/ml 的 XPA. 10.064, XPA. 10.072 (人源 IgG2) 或者贝伐单抗对抗 TMA, 正常人体组织, 和 hVEGF 蛋白点样和肾癌阳性对照品染色。为了监测染色方法的有效性, 还包括了人体扁桃腺炎的例子。最终方法对扁桃腺组织的 B 细胞区

域的组织内源免疫球蛋白没有反应。阴性对照抗体为人源 IgG1 和 IgG2 (Sigma, St. Louis, MO) 和人源 KLH 抗体 CHO. KLHG2. 60 (IgG2)。

[0112] XPA. 10. 064, XPA. 10. 072 和贝伐单抗都能和 hVEGF 蛋白印迹反应, 其程度为 2-3+, 以 0-4+ 为打分范围, 其中 4+ 表示最高染色强度。对于肾癌组织, 贝伐单抗的染色模糊, 而 XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 的染色在肿瘤细胞的细胞质。

[0113] 人源 IgG1 和 IgG2 未染色任何组织结构, 仅给出了最低的背景染色。CHO. KLHG2. 60 能与肾上腺皮质细胞, 食管上皮细胞, 乳腺, 胰腺, 前列腺, 胃, 甲状腺, 子宫颈和输卵管发生反应。因为以上反应, 人源 IgG1 和 IgG2 被用作标准阴性对照。

[0114] XPA. 10. 064 在被检测的抗体中有最宽的组织反应谱。XPA. 10. 064 对膀胱、胃肠道、输卵管、乳腺、前列腺、输尿管和子宫的平滑肌细胞有强烈染色作用, 对输卵管、前列腺、皮肤、小肠、胃、甲状腺、输尿管、子宫内膜腺和子宫颈的上皮细胞也有很强的染色作用。另外, XPA. 10. 064 能染色某些小脑、大脑皮层和脊髓的某些神经元和神经纤维, 心肌和骨骼肌、脑下垂体细胞、肾小球细胞、肝窦状隙内皮细胞、胸腺的基质细胞、肺部的巨噬细胞和肾上腺皮质细胞。XPA. 10. 072 对小脑中的神经纤维, 大脑皮层和脊髓有强染色作用。XPA. 10. 072 还可染色胃肠道、输卵管、前列腺、输尿管以及子宫的平滑肌细胞, 食管、输卵管、乳腺、前列腺、胃、小肠、甲状腺和输尿管的上皮细胞, 肺部的巨噬细胞、以及胎盘中的成纤维细胞 / 组织细胞。贝伐单抗对所有的正常人组织染色呈阴性。

[0115] 为确定 XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 的免疫组化反应性是否代表靶向结合或非靶向结合, 使用了一种基于免疫荧光的多色方法。该方法是基于同时比较已知“黄金标准”的抗-VEGF 抗体与测试抗体的免疫反应性。测试抗体与“黄金标准”抗体的共定位表明测试抗体的靶向反应性, 而缺少共定位则表明非靶向反应性。

[0116] 阳性对照细胞 (Du145) 和阴性对照细胞 (Hek293) 的细胞团块冰冻切片用市售的鼠抗人 VEGF 抗体 (BD Pharmingen, 克隆 G153-694) 染色, 染色方法与前面实验中用到的色素 IHC 方法一致。该抗体可染色 Du145 细胞, 但不能染色 Hek293 细胞。另外, 结肠癌的冰冻切片用该抗体染色后在上皮组织和肿瘤相关基质组织处表现出特征性的反应性, 且有良好的内部阴性对照。因此, 将 G153-694 指定为“黄金标准”的阳性对照抗体。

[0117] 按照 Zenon IgG 标记试剂盒 (Molecular Probes) 的实验过程, 将原始抗体与荧光色素 (Fluorochrome) 缀合的 Fc 靶向的抗人 Fab 预培养, 然后用摩尔数过量的适当正常血清中和未反应的 Fab。将荧光抗体-Fab 复合物作为染色反应剂, 然后用 DAPI 进行细胞核对比染色。在这些共定位实验中, 用结肠腺癌冰冻切片 (组织号 4558) 作为 VEGF- 阳性组织对照。XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 抗体用红色 (Alexa Fluor 594) 标记, “黄金标准”抗体用绿色 (AlexaFluor 488) 标记。用反向颜色结合 (reverse color combination) 的方法重复实验, 结果基本一致。图像的获取采用了 Leica TCS-SP、model DM RXE 激光扫描共聚焦显微镜和 Leica 共聚焦软件, 版本 2.0 (Leica Microsystems, Wetzlar, 德国)。对多个区域以 400× (至少为 3) 的模式成像, 并对代表性的区域用 Image Pro 软件 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) 进行共聚焦分析。由于在前面的对结肠癌和冰冻团块切片的免疫组化实验中贝伐单抗基本上都呈阴性, 所以贝伐单抗未包括在共定位实验中。

[0118] 正如前面的免疫组化实验所预示, XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 表现出了相似的高度的共定位, XPA. 10. 064 的组织染色强度最高 (图 8-9)。实施例 9: XPA. 10. 064 和

XPA. 10. 072 抑制 HUVEC 增殖

[0119] 本实施例中测试了 XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 的 scFv-Fc 和 IgG2 对 HUVEC 增殖的阻断作用。

[0120] 混合 HUVEC 细胞 (Clonetics#CC-2519) 在 ECGM 完全培养基 (Clonetics#CC-3024) 加 BulletKit-2 (添加有 rhEGF、rhFGF、rhVGEF、抗坏血酸、氢化可的松、IGF、肝素、庆大霉素 / 两性霉素, 和 2% FBS) 中生长。细胞以每个 T-75 培养瓶以 $2-3 \times 10^5$ 个细胞的密度种瓶, 3 到 4 天后长至汇合。即将汇合的单层细胞用 PBS 洗, 胰蛋白酶消化, 然后用含有 PBS 的完全培养液中和。

[0121] 为测定 HUVEC 在 hVEGF₁₆₅ 存在下的增殖情况, 建立了 16 点的 hVEGF₁₆₅ 剂量滴定 (dose titration), 用本底生长培养液稀释表达自 HEK293 细胞的 hVEGF₁₆₅ (终浓度 0-200ng/ml, $2 \times$ 稀释, $2 \times$ 浓度, $50 \mu\text{l}$ / 孔)。HUVEC 细胞以 2×10^5 个细胞 / ml 的密度重悬于冷的含有 0.1% BSA 的本底培养液中, 每个 hVEGF₁₆₅ 滴定孔中加入 $50 \mu\text{l}$ 细胞 (1×10^4 个细胞 / 孔), 使终体积为 $100 \mu\text{l}$ / 孔。外侧孔 (outer wells) 用 PBS 填满, 培养板用封口膜密封以防止脱水。培养板在 37°C 、5% CO_2 的条件下培养 96 小时, 然后室温放置约 15-20 分钟以上。将 Cell TiterGlo (TTG, 普洛麦格公司) 化开并达到底物的温度, 在每孔中加入 $100 \mu\text{l}$ 底物 / 缓冲液混合物。培养板放在轨道孔板振荡器上振荡 1-2 分钟, 然后将每孔中的 $150 \mu\text{l}$ 转移至白底白壁的孔板中, 暗处培养 5-10 分钟。孔板在荧光计上整合 1 秒钟 (one second integration) 并读数。

[0122] 在生长抑制实验中, 配制 XPA. 10. 064, XPA. 10. 072, 和贝伐单抗的滴定剂 (终浓度为 0- $50 \mu\text{g/ml}$, $3 \times$ 稀释, $4 \times$ 浓度, 终体积为 $25 \mu\text{l}$ / 孔)。hVEGF₁₆₅: 抗体以 1 : 1 的比例加入, 生长因子和抗体均为 $4 \times$ 浓度, 培养板在 37°C 、5% CO_2 的条件下培养 2 小时。在 $50 \mu\text{l}$ / 孔的重悬 HUVEC 细胞中加入 $50 \mu\text{l}$ / 孔的 VEGF / 抗体复合物, 培养板培养 96 小时, 并用上述的 TiterGlo 缓冲液处理。

[0123] XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 的 scFv 和 IgG2 抑制了 HUVEC 的增殖。IgG2 的结果见图 10 和表 6 所示。表 6 : XPA. 10. 064, XPA. 10. 072, 和贝伐单抗对 HUVEC 细胞增殖的抑制

	EC50($\mu\text{g/ml}$)		
	XPA.10.064	XPA.10.072	BM-1
HEK293 hVEGF ₁₆₅	0.66	0.68	0.04

实施例 10 : XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 对 VEGF-R2 磷酸化的抑制

[0124] 通过 ELISA 分析 XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 对 hVEGF₁₆₅ 磷酸化 VEGF-R2 的抑制作用。

[0125] 为得到细胞裂解液培养板, 将传代第二代和第六代之间的 HUVEC 细胞化开并种板至 TC 培养瓶中的 EGM2 完全培养液 (Lonza) 中, 继续生长传代一到两代。将即将汇合的细胞用胰蛋白酶消化, 完全培养液中和, PBS 洗两次, 并计数。细胞以 1×10^5 个细胞 / 孔种板至 24 孔板中的完全培养液中 (3 个复孔), 并在 37°C 培养 24 小时。培养后, 将细胞用室温的 PBS 洗两次并在含 0.1% BSA 的 EBM2 培养液 (Lonza) 中饥饿 5 小时。倾出 PBS, 将细胞与剂量滴定的 hVEGF₁₆₅ (刺激) 或预复合的 XPA. 10. 064+hVEGF₁₆₅, XPA. 10. 072+hVEGF₁₆₅, 或贝伐单抗+hVEGF₁₆₅ (抑制) 共同培养 5 分钟。XPA. 10. 064+hVEGF₁₆₅ 和 XPA. 10. 072+hVEGF₁₆₅ 的

制备是通过以 1 : 1 的比例混合 $2\times$ 剂量滴定的抗体和 $2\times$ hVEGF₁₆₅ (终浓度 :20ng/ml) 并在 37℃ 培养 24 小时得到。倾出 hVEGF₁₆₅, XPA. 10. 064+hVEGF₁₆₅ 和 XPA. 10. 072+hVEGF₁₆₅, 将细胞用冰冷的 PBS 洗两次。加入 $65\mu\text{l}$ /孔的裂解液 (1% NP-40, 20mM Tris, pH8. 0, 137mM NaCl, 10% 甘油, 2mM EDTA, 1mM 活化的原钒酸钠, $10\mu\text{g/ml}$ 亮肽素), 将细胞在 4℃ 振摇 30 分钟直到被需要。

[0126] VEGF-R2 的特异性捕捉抗体 (R&D Systems, VEGF-R2/KDR/F1k-1, 货号 357-KD) 用 PBS 稀释至工作浓度 8. 0g/ml, 并以 $100\mu\text{l}$ /孔包被 96 孔板。VEGF-R2/KDR/F1k-1 可结合磷酸化和未磷酸化的 VEGF-R2。孔板密封并培养过夜。将每孔吸干并用洗脱缓冲液洗 5 次, 培养板中加入 $300\mu\text{l}$ /孔的封闭缓冲液并在室温培养 1 到 2 小时进行封闭。将每孔吸干并用洗脱缓冲液再洗 5 次, 每孔中加入 $100\mu\text{l}$ HUVEC 细胞裂解物。培养板室温培养 2 小时, 吸干各孔, 并用洗脱缓冲液洗 5 次。每孔中加入 $100\mu\text{l}$ HRP- 缀合的磷酸化酪氨酸的特异性检测抗体, 培养板盖好并在室温且无直接光照的条件下培养 2 小时。吸干各孔, 并用洗脱缓冲液洗 5 次, 每孔中加入 $100\mu\text{l}$ 底物溶液。培养板在室温且无直接光照的条件下培养 20 分钟, 每孔中加入 $50\mu\text{l}$ 终止液。用酶标仪在 450nm 处对每孔的光密度进行读数。

[0127] 用 hVEGF₁₆₅ 的剂量滴定处理后的 HUVEC 细胞中磷酸化的 VEGF-R2 出现了增加 (图 11)。用贝伐单抗 +hVEGF₁₆₅ 处理后的 HUVEC 细胞中 VEGF-R2 的磷酸化出现降低 (图 12)。用 XPA. 10. 064+hVEGF₁₆₅ 或 XPA. 10. 072+hVEGF₁₆₅ 处理的 HUVEC 细胞中 VEGF-R2 磷酸化出现了降低。图 13 对每个抗体的结果进行了总结。实施例 11 :XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 抑制血管生成

[0128] XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 在体内抑制血管生成的作用通过基底胶栓 (Matrigel plug) 实验进行测定。

[0129] 6-7 周龄的雌性 NU/NU 小鼠腹部皮下注射 0. 5ml 含有 2×10^6 个 DU145 细胞的基底胶 (Matrigel), 其可产生人 VEGF 从而诱导血管生成。在第 0 天和第 3 天对小鼠腹腔注射溶媒对照或 0. 1, 1, 或 5mg/kg XPA. 10. 064, XPA. 10. 072, 或贝伐单抗。在第 7 天, 处死小鼠, 取出基底胶栓, 称重, 以及拍照。对栓子在 0 到 3 之间进行视觉打分, 打分基于以下标准 :0, 无颜色无明显血管 ;1, 略有色有少许血管 ;2, 黄红色伴有明显血管 ;3, 均匀红色或粉红色伴有深色血管 (图 14)。由不知情的打分者 (blind scorer) 对栓子打分, 打分者收到的照片中栓子的顺序已被打乱。

[0130] 给药 XPA. 10. 064 在所有测试剂量下都导致血管生成显著降低, 而给药 XPA. 10. 072 在 1mg/kg 或 5mg/kg 时导致血管生成显著降低 (图 15 和 16)。血管生成抑制的水平与观察到的贝伐单抗存在时的水平相似。

[0131] 在最后一剂抗体给药 4 天后通过 ELISA 实验测定 XPA. 10. 064, XPA. 10. 072, 和贝伐单抗在小鼠血清中的浓度。在任一测试剂量下, 三种抗体在抗体水平上没有显著差别。实施例 12 :XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 抑制肿瘤生长

[0132] XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 抑制肿瘤生长的作用在 A673 横纹肌肉瘤肿瘤生长模型中通过前人公开的方法 (Liang 2006) 进行测定。体外培养的 A673 细胞生长至汇合, 然后收细胞并在无菌的基底胶中重悬。对六周龄的雌性裸鼠两胁皮下注射含 5×10^6 个细胞的基底胶, 得到异种移植物。当肿瘤大小达到约 100mm^3 时, 小鼠被随机分成八组, 每组十只, 分别腹腔注射溶媒 (第 1 组), 0. 5mg/kg XPA. 10. 064 IgG2 (第 2 组), 5mg/kg XPA. 10. 064

IgG2(第3组),0.5mg/kg XPA. 10.072 IgG2(第4组),5mg/kg XPA. 10.072 IgG2(第5组),5mg/kgCHO. KLH IgG2(第6组),0.5mg/kg 贝伐单抗(第7组),或5mg/kg 贝伐单抗(第8组),每周注射两次,持续18天(总共6剂)。最后一剂给药后24小时,72小时和168小时收集血液和组织样本。

[0133] 在测试的两个剂量下,XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 给药后都显著抑制了肿瘤在体内的生长(图17)。两种抗体产生的生长抑制率均略高于贝伐单抗在所有剂量下观察到的抑制率。所有抗体在某一剂量下的血清水平均相似(0.5mg/kg,血清水平约5-7 μ g/ml;5mg/kg,血清水平约75-100 μ g/ml)。

[0134] 如前所述,以上内容仅旨在说明本发明的多种实施方式。以上讨论的具体改进不应理解为对本发明范围的限制。本领域技术人员可知,在不脱离本发明范围的前提下可以做出多种等同物、变动、或修改,应理解这样的等同实施方式包括在本发明内。本发明引用的所有参考文献的全文都被引用,如同其全文已包括在本发明中。参考文献1. Amoroso, A., et al. 1997. Eur Rev Med Pharmacol Sci 1:17-25. 2. Azzazy, H. E., Highsmith, W. E. Jr. 2002. Clin Biochem 35:425-445. 3. Berkman, R. A., et al. 1993. J Clin Invest 91:153-159. 4. Brown, L. F., et al. 1993. Cancer Res 53:4727-4735. 5. Brown, L. F., et al. 1995. Human Pathol 26:86-91. 6. Cumbers, S. J., et al. 2002. Nat Biotechnol 20:1129-1134. 7. Dimmeler, S., Dernbach, E., Zeiher, A. M. 2000. FEBS Lett 477:258-262. 8. Dupont, J., et al. 2005. Proc Am Soc Clin Oncol 23:199s. 9. Dvorak, H. F., et al. 1995. Am J Pathol 146:1029-1039. 10. Eriksson, U., Alitalo, K. 1999. Curr Top Microbiol Immunol 237:41-57. 11. Ferrara, N. 1999. Curr Top Microbiol Immunol 237:1-30. 12. Ferrara, N., et al. 2004. Nat Rev Drug Discov 3:391-395. 13. Fishwild, D. M., et al. 1996. Nat Biotechnol 14:845-851. 14. Fuh, G., et al. 2006. J Biol Chem 281:6625-6631. 15. Giri, J. G., et al. 1994. EMBO J 13:2822-2830. 16. Harris, A. L. 2000. Oncologist 5 Suppl 1:32-36. 17. Hawkins, R. E., Russell, S. J., Winter, G. 1992. J. Mol Biol. 226:889-896. 18. Holash, J., et al. 2002. Proc Natl Acad Sci USA 99:11393-11398. 19. Houston, et al. 1988. Proc Natl Acad Sci USA 85:5879-5883. 20. Hunt, S. 2001. Curr Opin Mol Ther 3:418-424. 21. Jianhua, H., Kontos, C. D. 2002. J Biol Chem 277:10760-10766. 22. Jostock, T., et al. 2004. J Immunol Methods 289:65-80. 23. Katre, N. V. 1990. J Immunol 144:209-213. 24. Khamaisi, M., et al. 2003. Nephrol Dial Transplant 18:1427-1430. 25. Kim, K. S., et al. 2003. J. Biol Chem 278:11449. 26. Lee, Y. K., et al. 2004. Blood 104:788-794. 27. Li, J., et al. 2006. Proc Natl Acad Sci USA 103:3557-3562. 28. Liang, W-C, et al. 2006. J Biol Chem 281:951-961. 29. Lonberg, N. 2005. Nat Biotechnol 23:1117-1125. 30. Lowman, H. B. 1998. Phage display of peptide libraries on protein scaffolds. In: S. Cabilly, Editor, Methods in Molecular Biology, vol. 87: Combinatorial Peptide Library Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp. 249-264. 31. Mattern, J., Koomagi, R., Volm, M. 1996. Brit J Cancer 73:931-934. 32. McColley, S. A., et al. 2000. Am J Respir Crit Care Med 161:1877-1880. 33. Mendez, M. J., et al. 1997. Nat Genet 15:146-156. 34. Michels, S., Rosenfeld, P. J. 2004. Retinal Physician 1:16-22. 35. Michels, S., et al. 2005.

Opthamology 112 :1035-1047. 36. Murohara, T., et al. 1998. Circulation 97 :99-107. 37. Presta, L. G., et al. 1997. Cancer Res 57 :4593-4599. 38. Rosenfeld, P. J., Moshfeghi, A. A., Puliafito, C. A. 2005. Ophthalmic Surg Lasers Imaging 36 :331-335. 39. Shields, R. L., Lai, J., Keck, R. 2002. J Biol Chem 277 :26733-26740. 40. Shinkawa, T., et al. 2003. J Biol Chem 278 :3466-3473. 41. Tamura, M., et al. 1998. Science 280 :1614-1617. 42. Tomizuka, K., et al. 2000. Proc Natl Acad Sci USA 97 :722-727. 43. Yancopoulos, G. D., et al. 2000. Nature (London) 407 :242-248. 表 1 :XPA. 10. 064 和 XPA. 10. 072 性质总结

	XPA. 10. 064	XPA. 10. 072	贝伐单抗
HUVEC 增殖潜力 (HPP) : HEK293-hVEGF ₁₆₅ , IgG2 (IC50)	0. 07 μ g/ml (第二次实验中为 0. 66)	0. 68 μ g/ml	0. 04 μ g/ml
HPP :sf21-hVEGF ₁₆₅ , scFvFc (IC50)	0. 41 μ g/ml	> 1 μ g/ml	0. 06 μ g/ml
HPP :sf21-hVEGF ₁₆₅ , IgG2 (IC50)	0. 15 μ g/ml (第二次实验中为 0. 61)	0. 24 μ g/ml	0. 05 μ g/ml
与 hVEGF ₁₆₅ 结合 (kD)	1. 5nM (IgG2)	1. 7nM (IgG2)	0. 5nM (IgG2)
与 mVEGF ₁₆₅ 结合 (kD)	无结合	无结合	无结合
人 / 鼠交叉反应性	无	无	无
阻断 hVEGF ₁₆₅ 与 VEGF-R1 的结合	是 (scFv-Fc)	是 (scFv-Fc)	是
阻断 hVEGF ₁₆₅ 与 VEGF-R2 的结合	是 (scFv-Fc)	是 (scFv-Fc)	是

结合不同于贝伐单抗的 hVEGF ₁₆₅ 抗原表位	无	无	—
立体 vs. 线性抗原表位结合	线性	线性	线性
MPA (% α KLH 浓度 ; 2×5mg/kg)	20	26	38

表 2 :XPA. 10.064 和 XPA. 10.072 IgG2 与 hVEGF₁₆₅ 的结合亲和力

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Rmax (RU)	KD (M)	CHI2
BM1	1.22E+05	7.38E-05	20	6.05E-10	0.251
XPA. 10.064 与人	2.30E+05	2.86E-04	30	1.24E-09	0.379
XPA. 10.072 与人	1.68E+05	2.79E-04	29	1.66E-09	0.11

表 4 :抗体与 hVEGF 突变体的结合 : (注 :在本实验中,抗体以 5 μ g/ml 包被培养盘 ;加入 100 μ l 每种含突变体的 CHO 细胞上清液,使用 1 μ g/ml 人和鼠 VEGF₁₆₅。背景值为 CHO。在每个孔中较高的数值为“高于背景的倍数”,较低的数值为原始数据。)

	CHO	wt 121	M81A	G88S	Q89A	G92A	rHu-VEGF165	rMu-VEGF165
	2	3	4	5	6	7	8	9
PAB	1	28	18.8	8.4	10.8	23.9	26.9	1
	0.09	2.5575	1.7145	0.769	0.9852	2.1765	2.4544	0.0939
BM-1	0.9	39.4	13.1	0.9	5.3	35.6	36.7	0.9
	0.09	3.5953	1.1941	0.0828	0.4801	3.249	3.3501	0.0843
XPA.10.064	0.9	29.1	9.5	0.9	3.5	22.8	23	0.7
	0.085	2.6504	0.8678	0.0778	0.3194	2.0792	2.0946	0.0667
XPA.10.072	1.5	31.8	13.4	1	3.3	30.5	29.2	1.1
	0.142	2.902	1.2228	0.0951	0.2964	2.7809	2.6597	0.0982

表 5 :抗原表位结合的结果总结

	与野生型和突变型配体的结合						
抗体	野生型 121	M81A	G88S	Q89A	G92A	rHu-VEGF165	rMu-VEGF165
PAB	是	是	是	是	是	是	否
BM-1	是	减少	否	弱	是	是	否
XPA.10.064	是	减少	否	弱	是	是	否
XPA.10.072	是	减少	否	弱	是	是	否

SEQUENCE LISTING

<110> 先灵公司

佐马技术有限公司

<120> 完全人源抗 VEGF 抗体及其使用方法

<130>07552. 8001. CN00

<150>US 60/853, 260

<151>2006-10-20

<160>14

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>165

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	Lys
1			5					10						15	
Phe	Met	Asp	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu
			20					25					30		
Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys
			35					40					45		
Pro	Ser	Cys	Val	Pro	Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Asp	Glu
			50					55					60		
Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile
65						70				75					80
Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His	Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe
						85				90					95
Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys	Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Arg	Ala	Arg
						100				105					110
Gln	Glu	Asn	Pro	Cys	Gly	Pro	Cys	Ser	Glu	Arg	Arg	Lys	His	Leu	Phe
						115				120					125

Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser
 130 135 140
 Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys
 145 150 155 160
 Asp Lys Pro Arg Arg
 165

<210>2

<211>119

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(31).. (35)

<223>CDR1

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(50).. (66)

<223>CDR2

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(99).. (108)

<223>CDR3

<400>2

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

	85	90	95
Ala Arg Asp His Arg Ile Val Gly Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		

<210>3

<211>110

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(26).. (35)

<223>CDR1

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(51).. (57)

<223>CDR2

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(90).. (100)

<223>CDR3

<400>3

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

	85	90	95
Arg Val Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
100	105	110	

<210>4

<211>119

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(31).. (35)

<223>CDR1

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(50).. (66)

<223>CDR2

<220>

<221>MISC_FEATURE

<222>(99).. (108)

<223>CDR3

<400>4

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

	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210>5			
<211>110			
<212>PRT			
<213>Homo sapiens			
<220>			
<221>MISC_FEATURE			
<222>(26).. (35)			
<223>CDR1			
<220>			
<221>MISC_FEATURE			
<222>(51).. (57)			
<223>CDR2			
<220>			
<221>MISC_FEATURE			
<222>(90).. (100)			
<223>CDR3			
<400>5			
Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
1 5 10 15			
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn			
20 25 30			
Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
35 40 45			
Ile Tyr Arg Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
50 55 60			
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg			
65 70 75 80			
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu			
85 90 95			
Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu			
100 105 110			

<210>6

<211>5

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>6

Gly His Tyr Ile His

1 5

<210>7

<211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>7

Trp Ile Asn Pro Tyr Ser Gly Gly Thr Asn Phe Pro Arg Glu Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210>8

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>8

Asp His Arg Ile Val Gly Gly Leu Asp Tyr

1 5 10

<210>9

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>9

Ser Ser Asn Leu Gly Ser Asn Phe Val Tyr

1	5	10
---	---	----

<210>10

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>10

Arg Asn His Gln Arg Pro Ser

1	5
---	---

<210>11

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>11

Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu Arg Val Val Val

1	5	10
---	---	----

<210>12

<211>10

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>12

Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Tyr Val Tyr

1	5	10
---	---	----

<210>13

<211>7

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>13

Arg Asn Asp Gln Arg Pro Ser

1 5

<210>14

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>14

Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly ValVal

1 5 10

重链	
SEQ ID NO:2	
XPA.10.072	RLQLVQSGAEVRKPGASVKYSCKASGYSTFTGHYIEHWARQAPGQGLEWMGWINPYSGGTWTFPRFPQGRVTWTRDTSVNTVYVHELFTELSTSDTSVYYCARDRIYGGIDTWGQGTFLVTSS
SEQ ID NO:4	
XPA.10.064	EVQLVQSGAEVRKPGASVKYSCKASGYSTFTGHYIEHWARQAPGQGLEWMGWINPYSGGTWTFPRFPQGRVTWTRDTSVNTVYVHELFTELSTSDTSVYYCARDRIYGGIDTWGQGTFLVTSS
轻链	
SEQ ID NO:3	
XPA.10.072	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNLGSNFTVYQQLPCTAPKLLIYNEDQPSGVDFRFSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAEWDDSLFNVVFGGTKLTVL
SEQ ID NO:5	
XPA.10.064	SYVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGIDNTVYVYQQLPCTAPKLLIYNEDQPSGVDFRFSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLSGVWVFGGTKVTVL

CDRs为粗体显示，基于Kabat命名

图 1

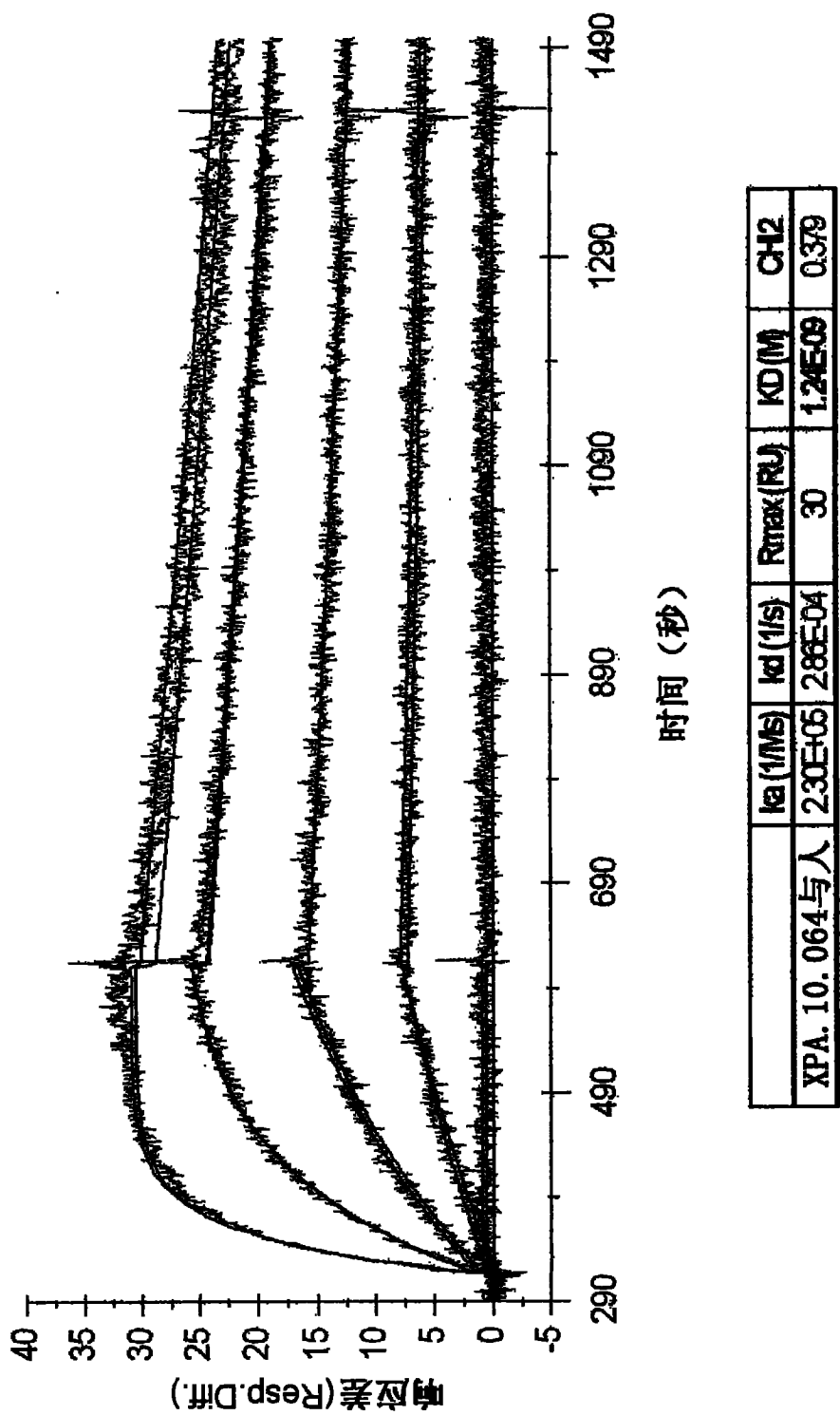


图 2

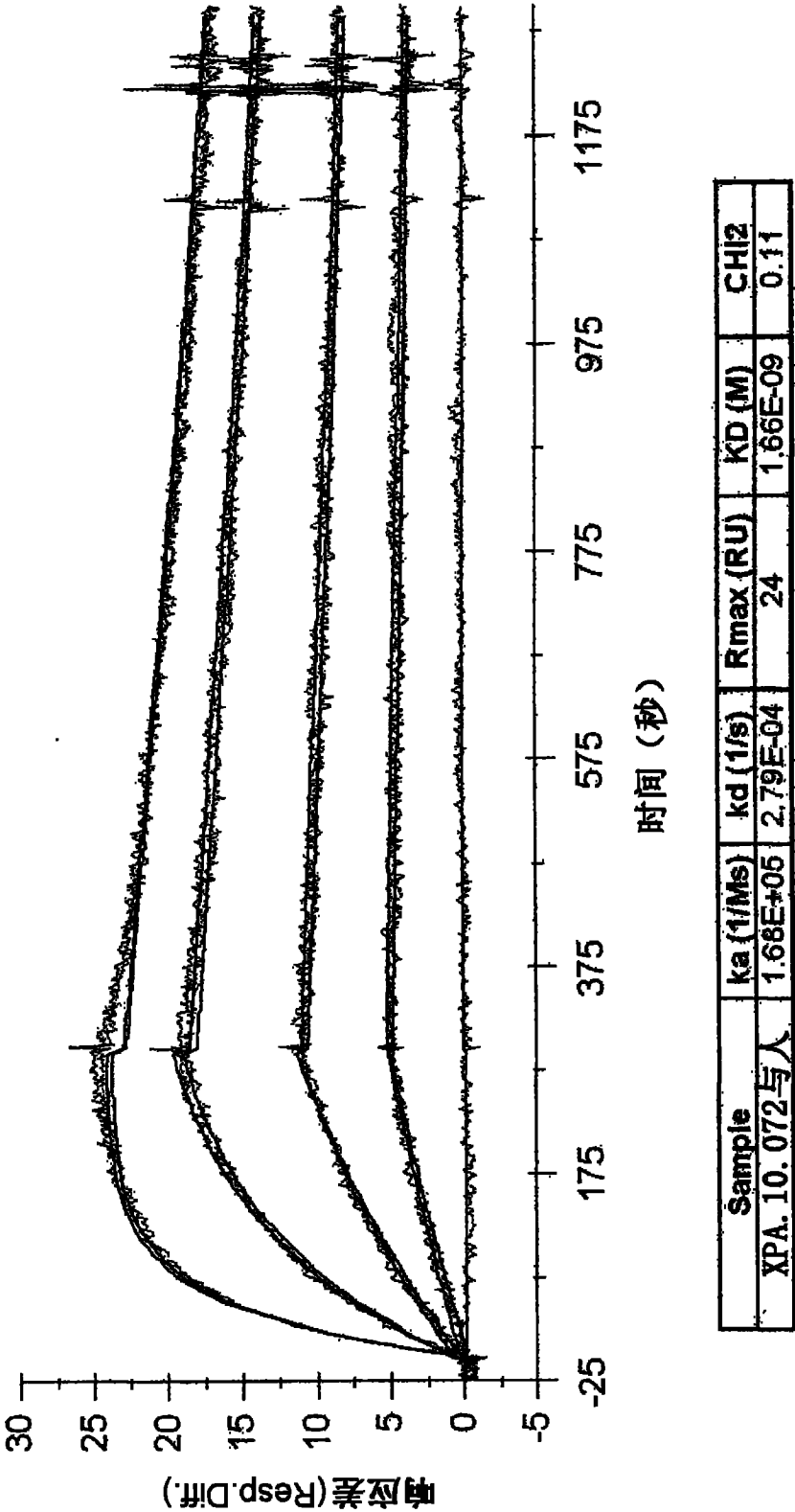


图 3

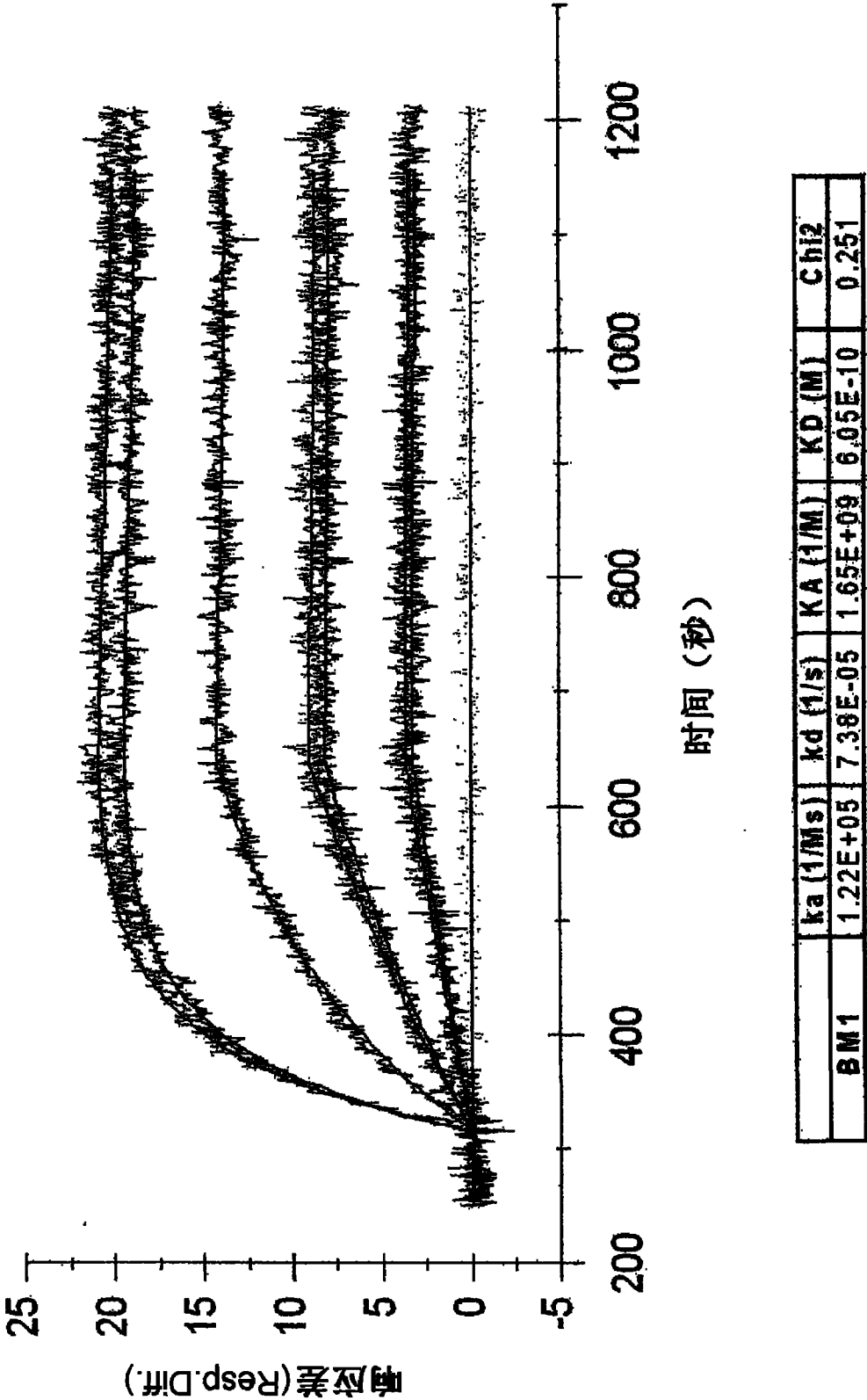


图 4

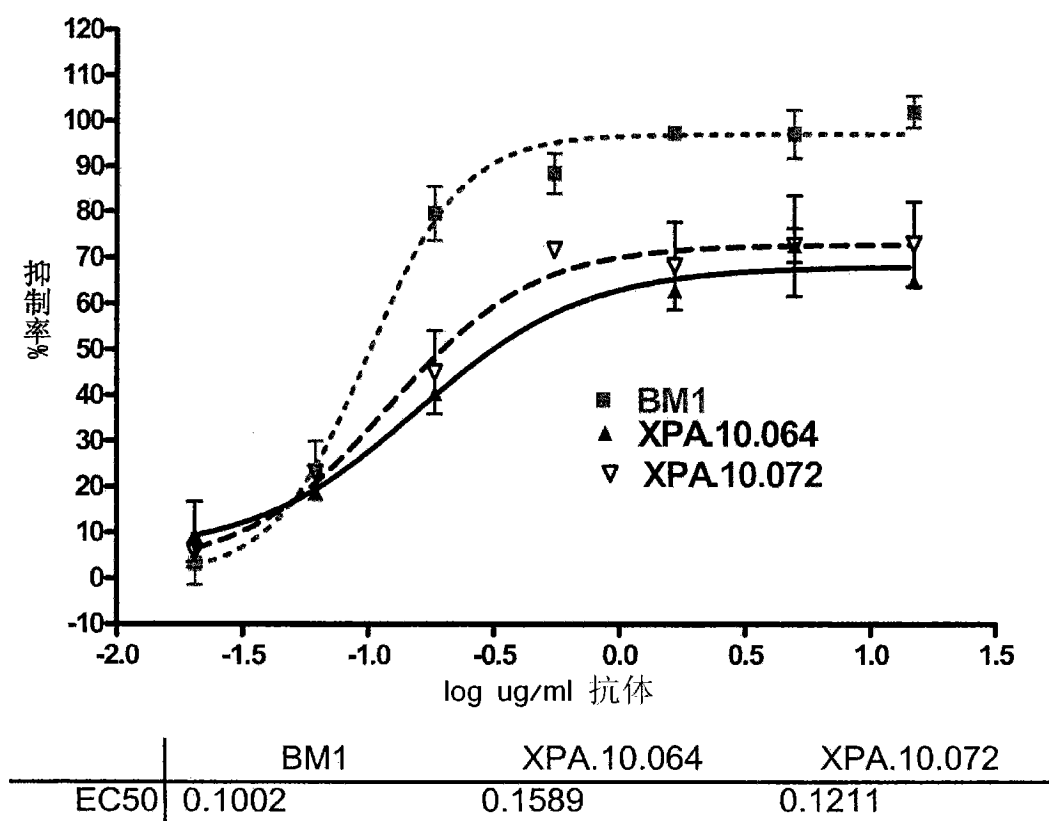


图 5

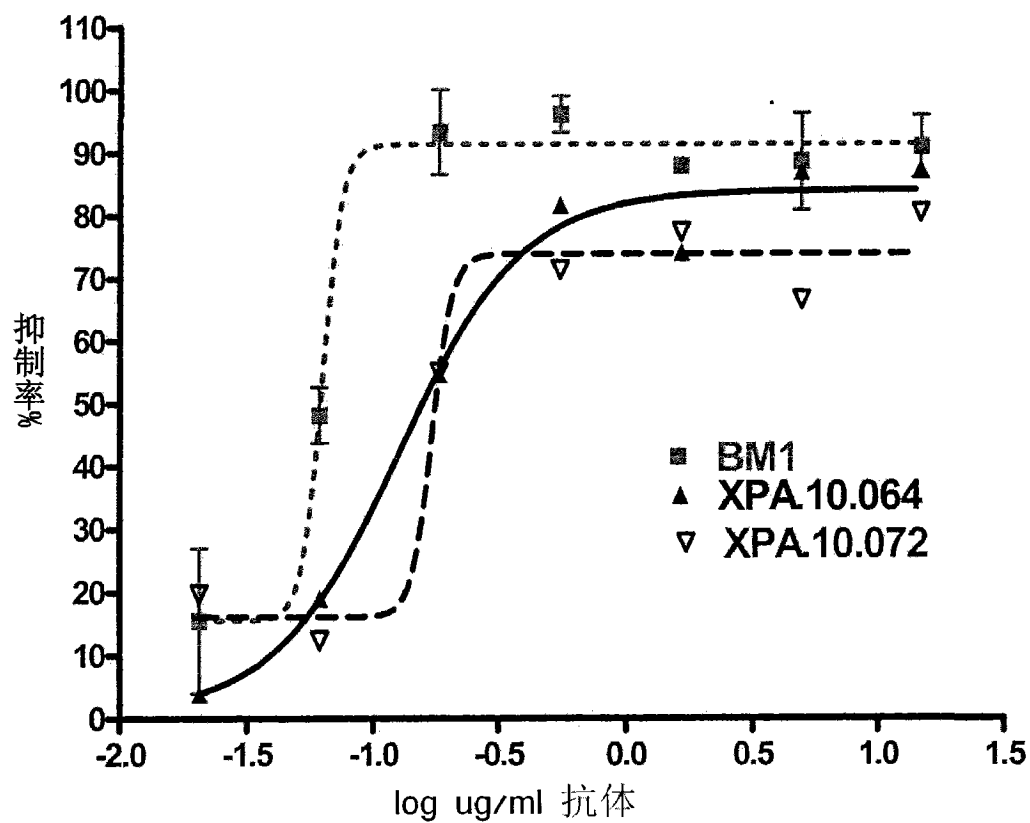
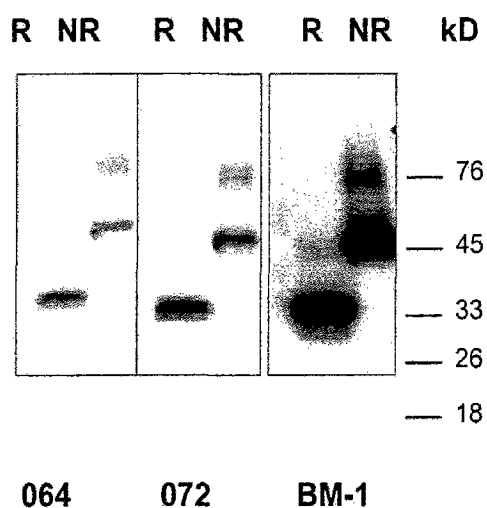


图 6



克隆	抗原表位性质
XPA10.064	线性
XPA10.072	线性
BM-1	线性

图 7

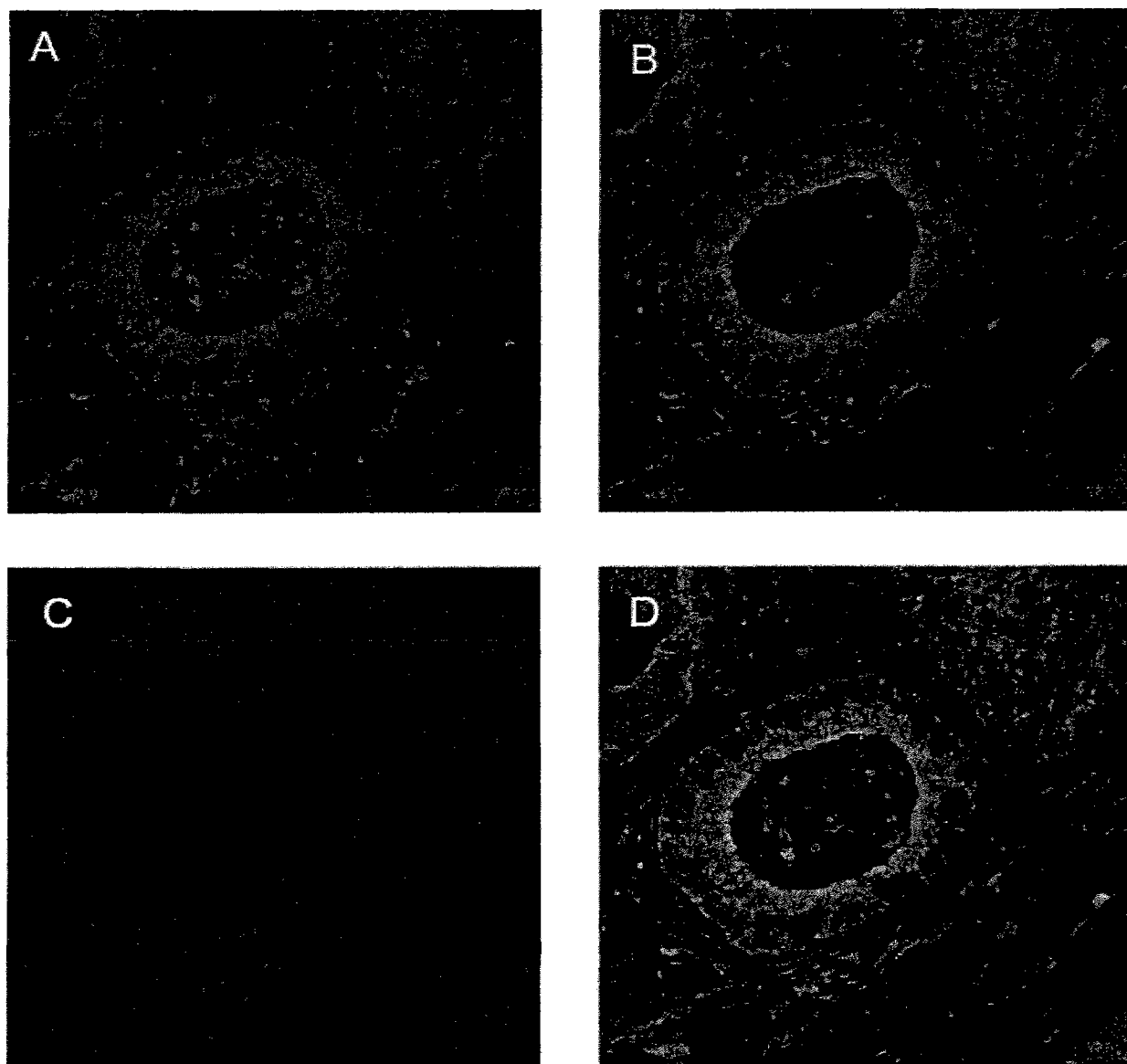


图 8

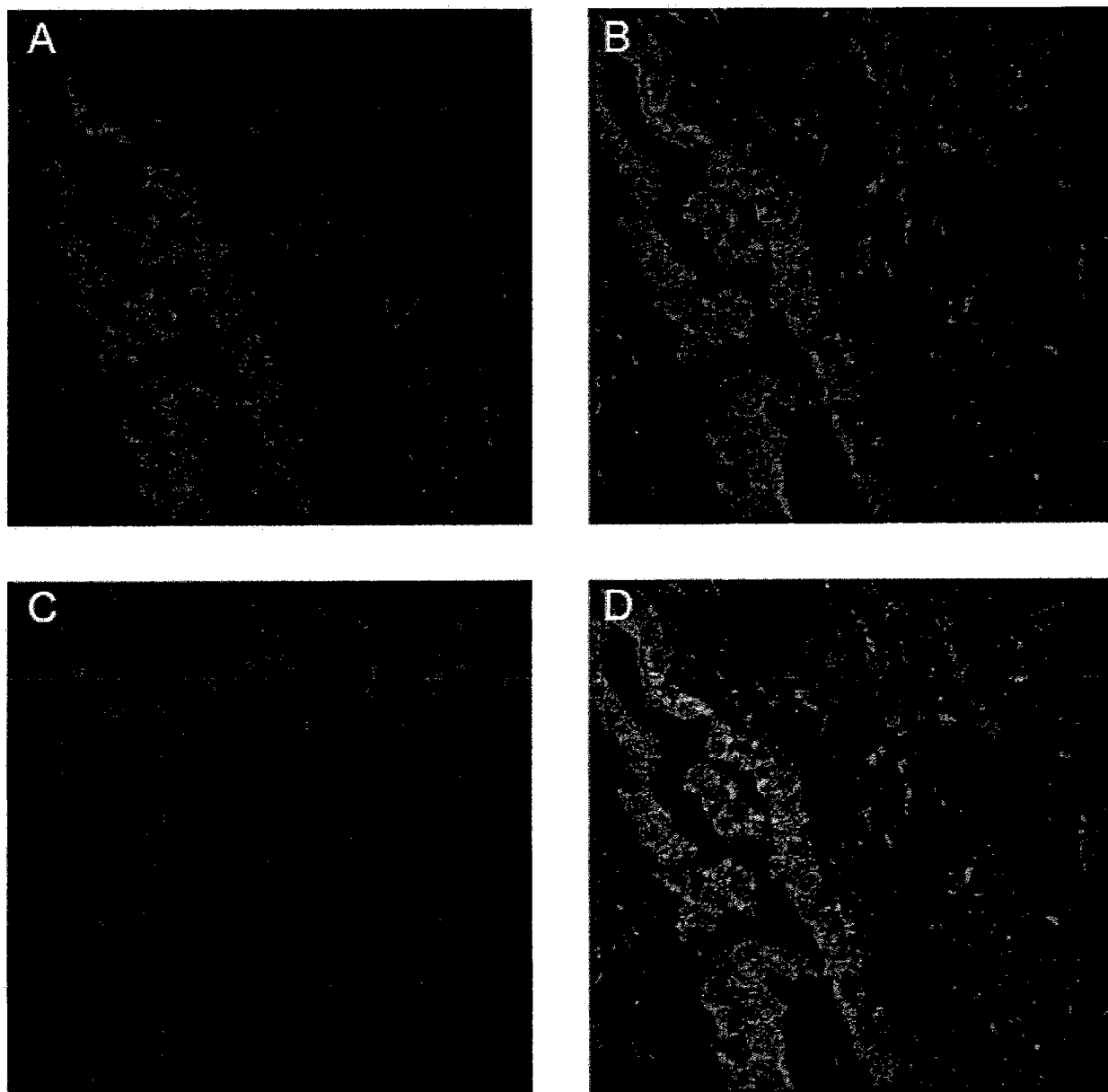


图 9

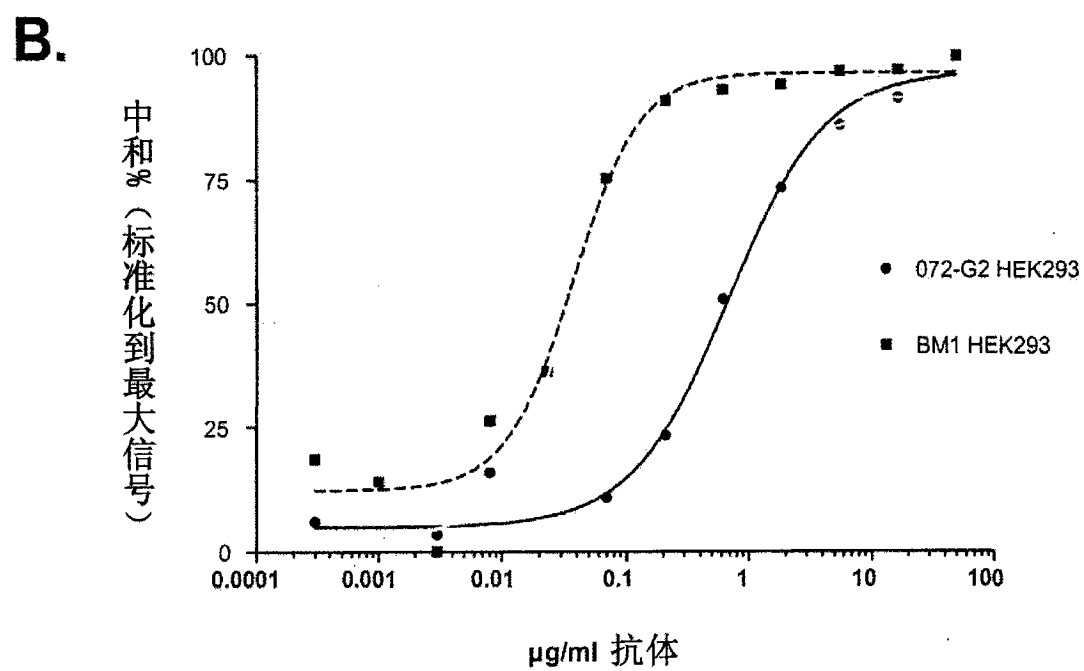
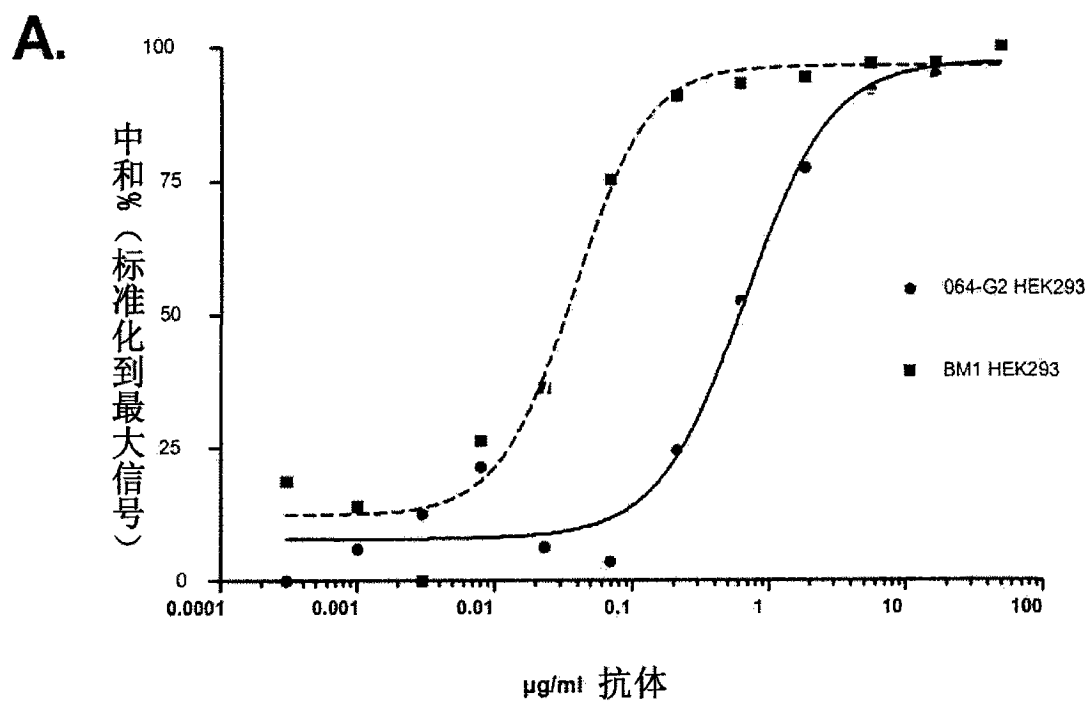


图 10

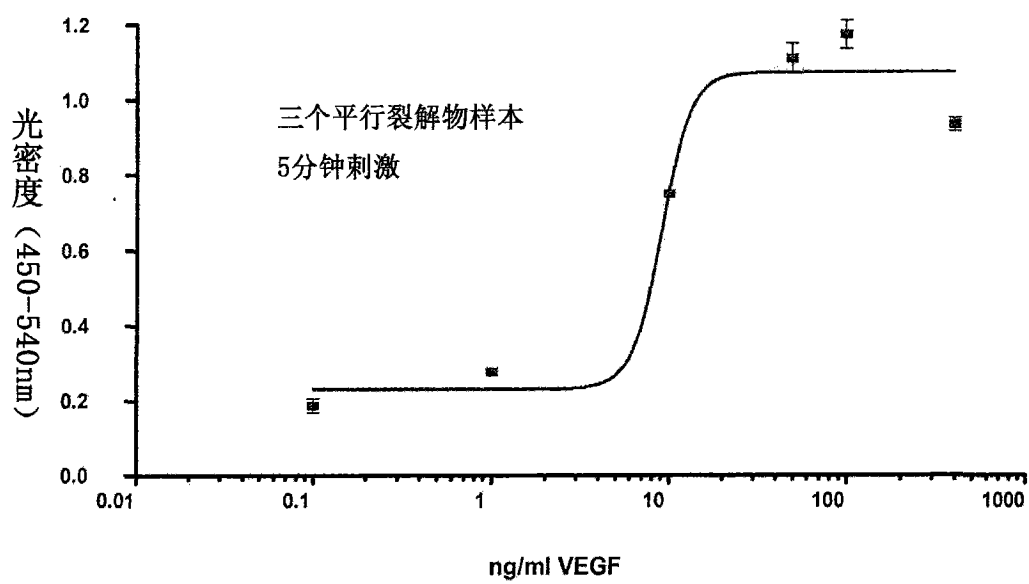


图 11

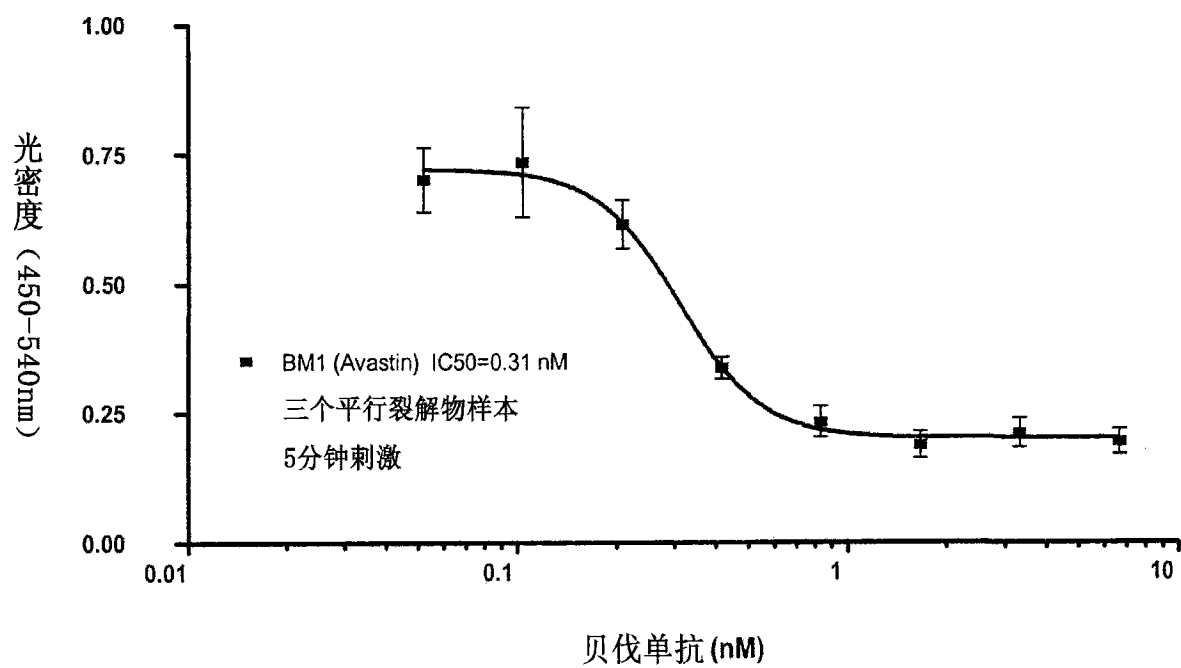


图 12

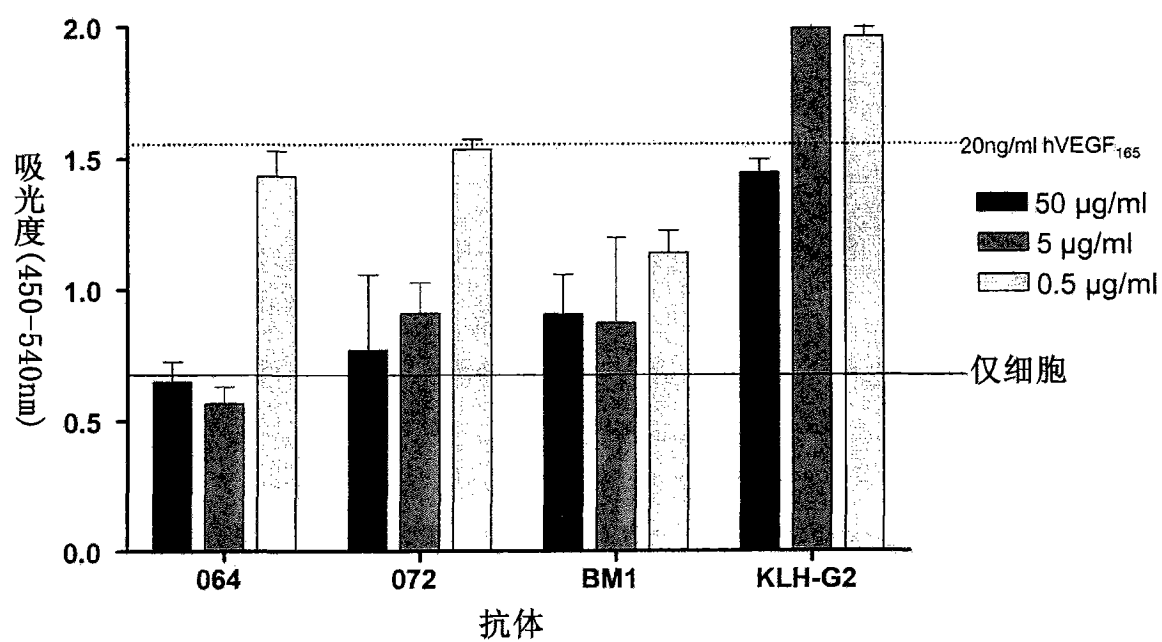
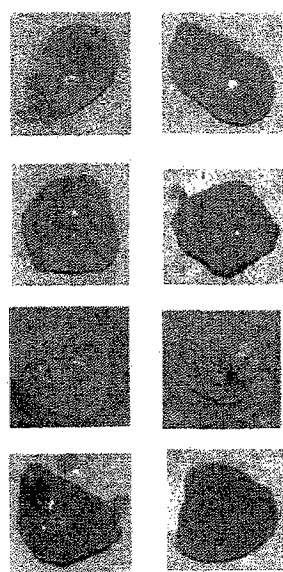


图 13



0 无色或无明显血管

1 略带色及少许血管

2 黄红色带明显血管

3 均匀红色或粉红色伴有深色血管

图 14

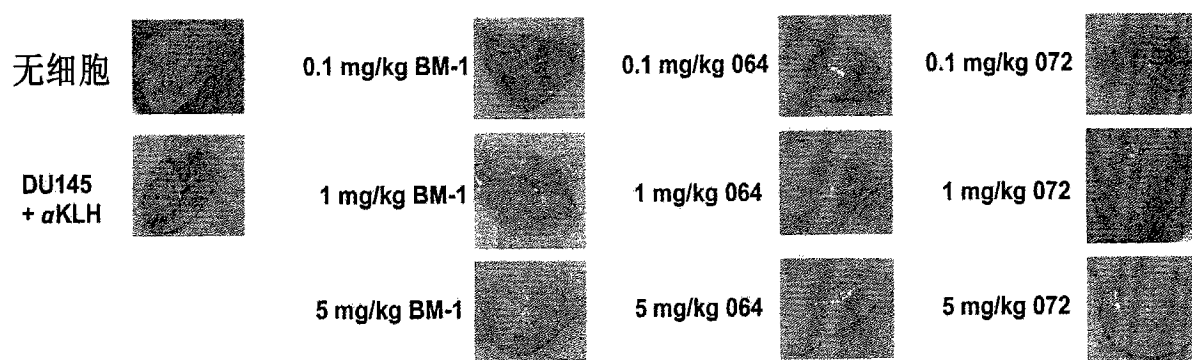


图 15

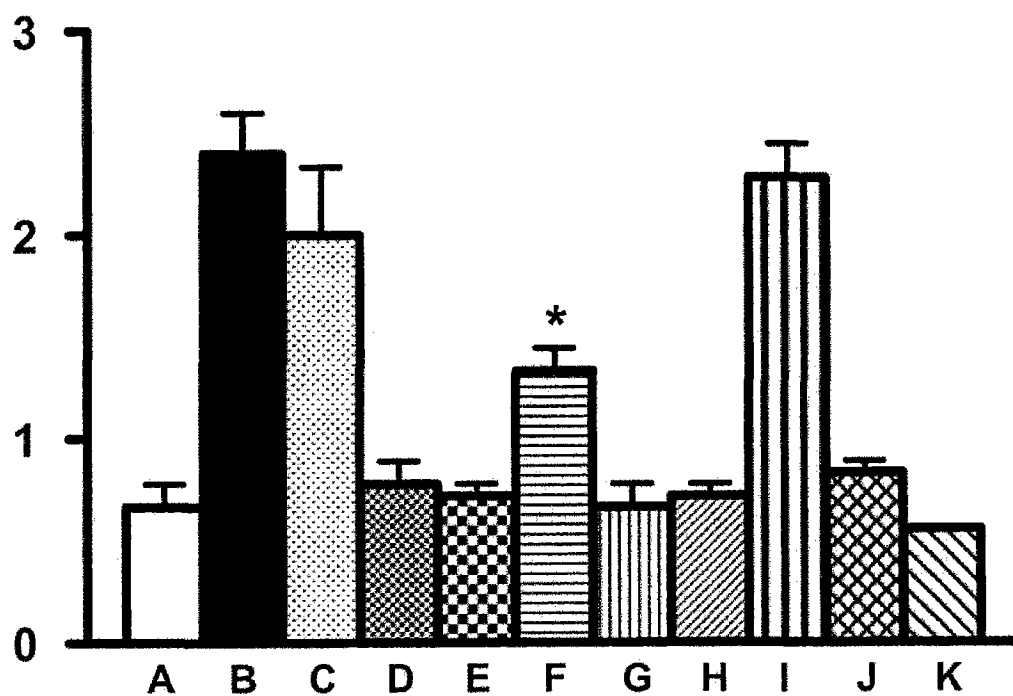


图 16

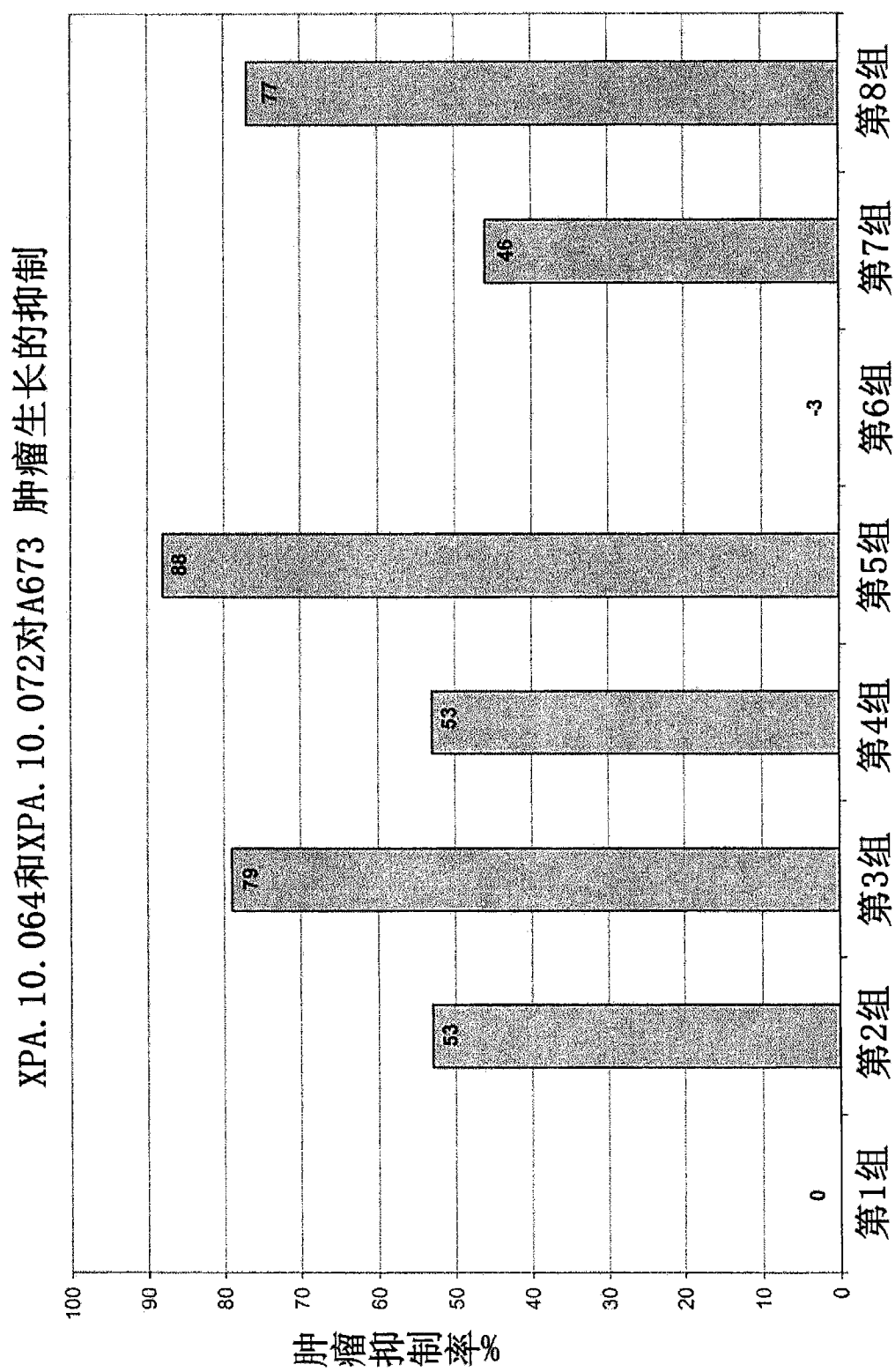


图 17