



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102223897 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 23

(21) 申请号 200980146589. 3

A61K 31/00(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 11. 20

A61P 35/04(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/117, 102 2008. 11. 22 US

61/178, 009 2009. 05. 13 US

61/179, 307 2009. 05. 18 US

(56) 对比文件

CN 1829741 A, 2006. 09. 06, 权利要求 1-46, 说明书第 4 页第 10 行 - 第 6 页第 1 段, 第 7 页第 8 行 - 第 8 页第 1 行, 第 13 页最后一段 - 第 14 页第一段, 第 41 页最后一段.

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日

2011. 05. 20

Sledge et al.. 2007 ASCO Annual Meeting proceedings part I,. 《J of Clinical Oncology》. 2007, 第 25 卷 (第 18S 期), 全文.

(86) PCT 国际申请的申请数据

PCT/US2009/065381 2009. 11. 20

审查员 曹丙洲

(87) PCT 国际申请的公布数据

W02010/059969 EN 2010. 05. 27

(83) 生物保藏信息

ATCC HB10709 1991. 03. 29

(73) 专利权人 霍夫曼 - 拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 格温德琳·法伊夫 潘仕春 周贤

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
11021

代理人 吴小明

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006. 01)

权利要求书2页 说明书45页

序列表2页 附图5页

(54) 发明名称

抗-VEGF 抗体与化学治疗联合用于治疗乳腺癌的应用

(57) 摘要

本发明通常涉及使用抗-VEGF 抗体进行的疾病和病理病症治疗。更具体地, 本发明涉及使用-VEGF 抗体, 优选与一种或多种另外的抗肿瘤治疗剂联合治疗易患乳腺癌或诊断患有乳腺癌的人类受试者。

1. 有效量的至少一种化学治疗剂和抗-VEGF 抗体在制备治疗诊断患有局部复发的乳腺癌或转移性乳腺癌的受试者的试剂盒中的应用, 其中所述受试者没有接受用于局部复发的乳腺癌或转移性乳腺癌的任何化学治疗, 和/或自最后一次给药小于或等于 12 个月复发时没有接受预先的辅助化学治疗, 并且其中当与仅用化学治疗进行治疗的另一名受试者相比较时, 所述受试者的无进展的存活被延长至少约 1 个月或更多, 其中所述治疗方案中的化学治疗剂选自 FEC: 5-氟尿嘧啶、表柔比星和环磷酰胺, 或 FAC: 5-氟尿嘧啶、多柔比星和环磷酰胺, 或 AC: 多柔比星和环磷酰胺, 或 EC: 表柔比星和环磷酰胺。

2. 权利要求 1 的应用, 其中所述抗-VEGF 抗体与由杂交瘤 ATCC HB10709 生成的单克隆抗-VEGF 抗体 A4.6.1 结合相同的表位。

3. 权利要求 1 的应用, 其中所述抗-VEGF 抗体是人源化抗体。

4. 权利要求 1 的应用, 其中所述受试者是 HER2- 阴性的。

5. 权利要求 1 的应用, 其中所述抗-VEGF 抗体是贝伐珠单抗。

6. 权利要求 5 的应用, 其中贝伐珠单抗的施用是在每 21 天周期的第 1 天以 15mg/kg 静脉内施用, 并且所述化学治疗是 FEC: 在第 1 天以 500mg/m² 静脉内施用的 5-氟尿嘧啶, 在第 1 天以 90-100mg/m² 静脉内施用的表柔比星和在第 1 天以 500mg/m² 静脉内施用的环磷酰胺, 或 FAC: 在第 1 天以 500mg/m² 静脉内施用的 5-氟尿嘧啶, 在第 1 天以 50mg/m² 静脉内施用的多柔比星和在第 1 天以 500mg/m² 静脉内施用的环磷酰胺, 或 AC: 在第 1 天以 50-60mg/m² 静脉内施用的多柔比星和在第 1 天以 500-600mg/m² 静脉内施用的环磷酰胺, 或 EC: 在每 3 周的第 1 天以 90-100mg/m² 静脉内施用的表柔比星和在每 3 周的第 1 天以 500-600mg/m² 静脉内施用的环磷酰胺。

7. 权利要求 1 的应用, 其中所述抗-VEGF 抗体具有由以下氨基酸序列所示的重链可变区:

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGWINTYTGEPTY
AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYPHYYGSSHWYF DVWGQGTLLV VSS (SEQ ID
No. 1)

和具有由以下氨基酸序列所示的轻链可变区:

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIIYFTSSLHSGVPS
RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQGTKVEIKR (SEQ ID No. 2)。

8. 抗-VEGF 抗体在制备用于治疗受试者中的局部复发的乳腺癌或转移性乳腺癌的药物中的应用, 其中所述受试者没有接受用于局部复发的乳腺癌或转移性乳腺癌的任何化学治疗, 和/或自最后一次给药小于或等于 12 个月复发时没有接受预先的辅助化学治疗, 其中当与仅用化学治疗进行治疗的另一名受试者相比较时, 所述应用延长了所述受试者的无进展存活至少约 1 个月或更多, 并且其中所述药物还包括至少一种化疗剂, 其中所述化疗剂是 FEC: 5-氟尿嘧啶、表柔比星和环磷酰胺, 或 FAC: 5-氟尿嘧啶、多柔比星和环磷酰胺, 或 AC: 多柔比星和环磷酰胺, 或 EC: 表柔比星和环磷酰胺。

9. 权利要求 8 的应用, 其中所述抗-VEGF 抗体是人源化抗体。

10. 权利要求 8 的应用, 其中所述抗-VEGF 抗体是贝伐珠单抗。

11. 权利要求 8 的应用, 其中所述受试者是 HER2- 阴性的。

12. 权利要求 10 的应用, 其中贝伐珠单抗的施用是在每 21 天周期的第 1 天以 15mg/kg

静脉内施用,并且所述化学治疗是 FEC: 在第 1 天以 $500\text{mg}/\text{m}^2$ 静脉内施用的 5- 氟尿嘧啶,在第 1 天以 $90\text{--}100\text{mg}/\text{m}^2$ 静脉内施用的表柔比星和在第 1 天以 $500\text{mg}/\text{m}^2$ 静脉内施用的环磷酰胺,或 FAC: 在第 1 天以 $500\text{mg}/\text{m}^2$ 静脉内施用的 5- 氟尿嘧啶,在第 1 天以 $50\text{mg}/\text{m}^2$ 静脉内施用的多柔比星和在第 1 天以 $500\text{mg}/\text{m}^2$ 静脉内施用的环磷酰胺,或 AC : 在第 1 天以 $50\text{--}60\text{mg}/\text{m}^2$ 静脉内施用的多柔比星和在第 1 天以 $500\text{--}600\text{mg}/\text{m}^2$ 静脉内施用的环磷酰胺,或 EC : 在每 3 周的第 1 天以 $90\text{--}100\text{mg}/\text{m}^2$ 静脉内施用的表柔比星和在每 3 周的第 1 天以 $500\text{--}600\text{mg}/\text{m}^2$ 静脉内施用的环磷酰胺。

抗-VEGF 抗体与化学治疗联合用于治疗乳腺癌的应用

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求下列美国临时申请的优先权和利益：于 2009 年 5 月 18 日提交的美国临时申请系列号 61/179,307, 于 2009 年 5 月 13 日提交的美国临时申请系列号 61/178,009, 和于 2008 年 11 月 22 日提交的美国临时申请系列号 61/117,102, 它们的说明书完全结合于此。

发明领域

[0003] 本发明通常涉及人类疾病和病理病症的治疗。更具体地, 本发明涉及抗血管发生治疗, 其单独或与其它抗癌治疗联合用于乳腺癌的治疗。

[0004] 背景

[0005] 癌症仍然是人类健康的一种最致命的危险。在美国, 每年癌症感染几乎 130 万名新患者, 并且是次于心脏病的第二大死亡原因, 大约在 4 例死亡中占一例。乳腺癌是第二最常见形式的癌症, 并且是美国妇女中的第二大癌症杀手。还预测, 在五年内, 癌症可能超过心血管病成为第一死亡原因。实体瘤引起这些死亡中的大部分。尽管在某些癌症的医学治疗中已有重大进步, 但是在过去二十年里, 对于所有癌症整体五年的生存率仅提高约 10%。癌症, 或恶性肿瘤, 转移并且以不可控的形式快速生长, 这使得及时的检测和治疗变得极其困难。

[0006] 在美国, 乳腺癌是一种每年致许多妇女死亡的疾病。根据美国癌症学会, 在 2008 年, 大约 40,000 人死于这一疾病。每年诊断出超过 180,000 例新乳腺癌病例, 并且估计每八名妇女中有一名将发展乳腺癌。这些数字表明, 乳腺癌是现今妇女所面对的一种最危险的疾病。

[0007] 转移性乳腺癌通常是不能治愈的, 仅有少量的患者在标准的化学治疗后获得长期的存活。Greenberg 等, J. Clin. Oncol. (临床肿瘤学杂志) 14:2197-2205 (1996)。

[0008] 在最近三十年内, 乳腺癌的基础生物学知识呈指数扩展, 其中一些对治疗具有影响。使用针对 HER2 的重组人源化单克隆抗体 (曲妥单抗 (trastuzumab), 也已知为 Herceptin[®], Genentech, 南旧金山), 222 名患有过表达 HER2 的转移性乳腺癌的妇女的多国、开放标记的 II 期试验发现 15% 的响应率, 其中有六名证实是完全响应 (Cobleigh 等, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. (美国临床肿瘤学学会进展) 17:97 (1998))。随机的 III 期试验评估了向使用紫杉醇或多柔比星加环磷酰胺组合的第一线化学治疗中加入 Herceptin 的安全性和功效。与单独的化疗相比, 随着向化疗中加入 Herceptin, 整体响应率和进展的时间显著改善 (Slamon 等, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. (美国临床肿瘤学学会进展) 17:98 (1998))。更重要地, 加入 Herceptin 延长了整体的存活 (Norton 等, Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. (美国临床肿瘤学学会进展) 18:127a (1999))。

[0009] 尽管曲妥单抗是核准用于治疗患有过表达 HER2 的癌症的乳腺癌患者亚群的第一种新型、基于生物学的治疗剂, 但是几种其它的方法已表现出希望, 并且已经进入临床。估计 75% 的新诊断出转移性乳腺癌的妇女是 HER2- 阴性的。抑制血管发生的化合物已经对涉

及其它乳腺癌群体产生特别的兴趣,并且已经成为且正成为美国和国外临床试验的目标。

[0010] 血管发生是一种重要的细胞事件,其中血管内皮细胞增生、切除并且改组,从而由现有的血管网络形成新的血管。存在令人信服的证据说明血管供应的发展对于正常和病理性增生过程是重要的 (Folkman 和 Klagsbrun *Science* (科学) 235 :442-447(1987))。氧和养分的递送,以及分解代谢产物的去除,代表了在多细胞生物体中发生的大部分生长过程中的限速步骤。

[0011] 尽管认为诱导新血管是肿瘤血管发生的主要模式,但是最近的数据已经表明一些肿瘤可能通过吸收 (co-opting) 现有的宿主血管进行生长。然后,吸收的血管系统退化,这导致肿瘤退化,所述肿瘤退化最终通过在肿瘤边缘由缺氧诱导的血管发生而逆转。Holash 等 *Science* (科学) 284 :1994-1998(1999)。

[0012] 正常和异常血管发生的一种关键的正调节剂是血管内皮生长因子 (VEGF)-A。VEGF-A 是包括 VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, 和 PlGF 的基因家族的一部分。VEGF-A 主要结合两种高亲和性受体酪氨酸激酶 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 已被鉴定为关于结合肝素的 VEGF-A 同种型的受体,并且可在血管发育中起作用。

[0013] 除了作为血管发生和脉管发生中的血管形成因子之外,VEGF 作为一种多效生长因子,在其它生理学过程中表现出多种生物学作用,所述生理学过程诸如内皮细胞存活、血管渗透性和血管舒张、单核细胞趋化性和钙流入。Ferrara 和 Davis-Smyth(1997),同上所述。此外,有研究报道了 VEGF 对一些非内皮细胞类型的促有丝分裂作用,所述非内皮细胞类型如视网膜色素上皮细胞、胰管细胞和施旺细胞。Guerrin 等, *J. Cell Physiol.* (细胞生理学杂志) 164 :385-394(1995); Oberg-Welsh 等 *Mol. Cell. Endocrinol.* (分子细胞内分泌学) 126 :125-132(1997); Sondell 等 *J. Neurosci.* (神经学杂志) 19 :5731-5740(1999)。

[0014] VEGF 作为病理学病症中血管发生的主要调节剂的认识导致在涉及病理性血管发生的病症中阻断 VEGF 活性的多种尝试。在大部分恶性病中,VEGF 表达上调,并且在多种实体瘤中,VEGF 的过表达与较晚期阶段相关或与较差的预后相关。因此,抑制 VEGF 信号传导途径的分子已经用于治疗相对晚期的实体瘤,在所述相对晚期的实体瘤中,病理性血管发生是显著的。

[0015] 由于癌症仍然是一种最具致死性的威胁,所以需要用于患者的另外的癌症治疗。具体地,需要用于患有 MBC 的患者的治疗,从而改善疾病控制以预防症状,同时使毒性最小化。本发明解决这这些和别的需要,在阅读了下述公开内容后这些将变得显而易见。

[0016] 概述

[0017] 本发明涉及抗 -VEGF 抗体用于有效治疗患有先前未治疗的转移性乳腺癌的乳腺癌患者的应用。具体地,本发明提供来自在人类受试者中患有先前未治疗的转移性乳腺癌的受试者中进行的贝伐珠单抗 (bevacizumab) (AVASTIN®) 与化学治疗联合的随机化 III 期临床试验的数据。所述化学治疗方案包括紫杉烷 (taxane) 治疗 (例如,多西他赛 (docetaxel) 或紫杉醇 (paclitaxel) 蛋白结合的粒子 (例如, Abraxane®)), 蒽环霉素 (anthracycline) 治疗 (例如,多柔比星 (doxorubicin), 表柔比星 (epirubicin) 或其组合) 或卡培他滨 (capecitabine) 治疗。在一些实施方案中,所述治疗用作局部复发或先前未治疗的转移性乳腺癌的一线治疗。试验的成功表明向标准化学治疗中加入抗 -VEGF 抗体

为乳腺癌患者提供了统计学显著的和临床有意义的益处。另外,安全性与先前的贝伐珠单抗试验的结果一致。

[0018] 在患有转移性乳腺癌的人类受试者中使用贝伐珠单抗的临床研究中获得的结果表明,通过无进展存活 (PFS) 评估的功效是阳性的,尤其是当与单独的化疗剂的无进展存活 (PFS) 数据比较时。与仅用紫杉烷治疗 (例如,多西他赛或紫杉醇蛋白结合的粒子 (例如, Abraxane®))/ 蒽环霉素治疗 (例如,多柔比星,表柔比星或其组合) 治疗的受试者相比,临床试验中接受贝伐珠单抗与紫杉烷治疗 (例如,多西他赛或紫杉醇蛋白结合的粒子 (例如, Abraxane®))/ 蒽环霉素治疗 (例如,多柔比星,表柔比星或其组合) 联合的受试者的无进展存活提高。与仅用卡培他滨治疗法治疗的受试者相比,如下述,临床试验中接受贝伐珠单抗联合卡培他滨治疗的受试者的无进展存活提高。差异是特别显著的。

[0019] 因此,本发明提供治疗诊断患有先前未治疗的转移性乳腺癌的受试者的方法,所述方法包括向所述受试者实施包括有效量的至少一种化学治疗和抗 -VEGF 抗体的治疗方案,其中所述受试者没有接受用于局部复发的或转移性乳腺癌的任何化学治疗。任选地,所述受试者是 HER2- 阴性的。在一些实施方案中,所述受试者是 HER2 阳性的。任选地,所述受试者自最后一次给药小于或等于 12 个月复发时没有接受预先的辅助化学治疗。联合化学治疗和施用抗 -VEGF 的治疗方案有效延长了受试者的无进展存活 (PFS)。在某些实施方案中,联合化学治疗和抗 -VEGF 抗体的治疗方案具有与先前的贝伐珠单抗试验结果相一致的安全性模式。

[0020] 本发明还提供抗 -VEGF 抗体与至少一种化疗剂在制备用于治疗受试者中先前未治疗的转移性乳腺癌的药物中的应用,其中所述受试者没有接受用于局部复发的或转移性乳腺癌的任何化学治疗。任选地,所述受试者是 HER2- 阴性的。在一些实施方案中,所述受试者是 HER2 阳性的。任选地,所述受试者自最后一次给药小于或等于 12 个月复发时没有接受预先的辅助化学治疗。抗 -VEGF 和化疗剂的应用有效延长受试者的无进展存活 (PFS)。在某些实施方案中,使用化疗剂和抗 -VEGF 抗体具有与先前的贝伐珠单抗试验结果相一致的安全性模式。

[0021] 本发明还提供抗 -VEGF 抗体,其用于治疗受试者中局部复发或转移性乳腺癌的方法中,所述方法包括对所述受试者实施包括有效量的化学治疗和抗 -VEGF 抗体的治疗方案,其中所述受试者没有接受用于局部复发或转移性乳腺癌的任何化学治疗。任选地,所述受试者是 HER2- 阴性的。在一些实施方案中,所述受试者是 HER2 阳性的。任选地,所述受试者自最后一次给药小于或等于 12 个月复发时没有接受预先的辅助化学治疗。联合化学治疗和施用抗 -VEGF 的治疗方案有效延长受试者的无进展存活 (PFS)。在某些实施方案中,联合化学治疗和抗 -VEGF 抗体的治疗方案具有与先前的贝伐珠单抗试验结果相一致的安全性模式。

[0022] 在本发明提供的任何方法、应用和组合物的特定实施方案中, PFS 延长约 1 个月, 1.2 个月, 2 个月, 2.4 个月, 2.9 个月, 3 个月, 3.5 个月, 4 个月, 6 个月, 7 个月, 8 个月, 9 个月, 1 年, 约 2 年, 约 3 年等。在一个实施方案中, PFS 延长约 2.9 个月 - 3.5 个月 (例如, 使用卡培他滨)。在一个实施方案中, PFS 延长约 1.2 个月 - 约 2.4 个月 (例如, 使用紫杉烷 / 蒽环霉素)。

[0023] 按照本发明提供的任何方法、应用和组合物,可以使用任何表现出抗癌活性的

化疗剂。在某些实施方案中,所述化疗剂选自由下列各项组成的组:烷基化试剂,抗代谢药,叶酸类似物,嘧啶类似物,嘌呤类似物和相关抑制剂,长春生物碱(vinca alkaloids),表鬼臼毒素(epipodopyllotoxins),抗生素,L-天冬酰胺酶(L-Asparaginase),拓扑异构酶抑制剂,干扰素,铂配位复合物,蒽二酮取代的脲(anthracenedione substituted urea),甲胍衍生物,肾上腺皮质抑制剂(adrenocortical suppressant),肾上腺皮质类固醇(adrenocorticosteroides),黄体酮(progestins),雌激素(estrogens),抗雌激素(antiestrogen),雄激素(androgens),抗雄激素(antiandrogen),和促性腺素释放素类似物(gonadotropin-releasing hormone analog)。在某些实施方案中,化疗剂是,例如,卡培他滨,紫杉烷,蒽环霉素,紫杉醇,多西他赛,紫杉醇蛋白结合的粒子(paclitaxel protein-bound particles)(例如,Abraxane®),多柔比星,表柔比星,5-氟尿嘧啶,环磷酰胺或它们的组合。可以使用两种或多种化疗剂(例如,在混合剂(cocktail)中)与抗-VEGF 抗体组合施用。

[0024] 例如,按照本发明在本文中提供的任何方法、应用和组合物的临床益处可以通过无进展存活(PFS)的持续时间、至治疗失败的时间、客观响应率和响应的持续时间来测量。

[0025] 因此,本发明描述通过提供接受使用抗-VEGF 抗体的治疗的指示而指导患有如乳腺癌的人类受试者的方法,从而提高受试者的无进展的存活,降低受试者癌症复发的危险或增加受试者存活的可能性。在一些实施方案中,所述方法还包括提供接受使用至少一种化疗剂的治疗的指示。使用抗-VEGF 抗体的治疗可以与使用化疗剂的治疗同时进行或先后进行。在某些实施方案中,受试者按照指导方法所指示那样进行治疗。

[0026] 本发明还提供推广方法(promotional method),所述方法包括推广施用抗-VEGF 抗体,例如用于治疗人类受试者中的乳腺癌。在一些实施方案中,所述方法还包括推广至少一种化疗剂的施用。施用抗-VEGF 抗体可以与施用化疗剂同时进行或先后进行。推广可以通过任何可用的方式进行。在一些实施方案中,推广可以通过抗-VEGF 抗体商业化制剂所附有的包装插页进行。推广还可以通过化疗剂的商业化制剂所附有的包装插页进行。推广可以通过与医师或保健护理者的书面或口头交流进行。在一些实施方案中,推广可以通过包装插页进行,其中包装插页提供接受使用抗-VEGF 抗体的治疗的指示。在一些实施方案中,推广在使用与或不与化疗剂一起的抗-VEGF 抗体治疗受试者之前进行。

[0027] 本发明提供一种商业方法,所述方法包括市场化抗-VEGF 抗体,例如用于治疗人类受试者中的乳腺癌,从而增加无进展的存活,或减少受试者癌症复发的可能性或增加受试者存活的可能性。在一些实施方案中,所述方法还包括市场化与抗-VEGF 抗体组合使用的化疗剂。在一些实施方案中,市场化在使用与或不与化疗剂一起的抗-VEGF 抗体治疗受试者之前进行。

[0028] 本发明还提供一种商业方法,所述方法包括销售与抗-VEGF 抗体组合的化疗剂,例如用于治疗人类受试者中的乳腺癌,从而增加无进展的存活,或减少受试者癌症复发的可能性或增加受试者存活的可能性。在一些实施方案中,销售在使用化疗剂与抗-VEGF 抗体组合治疗受试者之前进行。

[0029] 在本发明提供的任何方法、应用和组合物中,所述抗-VEGF 抗体可以用 VEGF 特异性拮抗剂替代,所述 VEGF 特异性拮抗剂例如本文所述的 VEGF 受体分子或嵌合的 VEGF 受体分子。在本发明提供的方法、应用和组合物的某些实施方案中,所述抗-VEGF 抗体是贝伐珠

单抗。所述抗-VEGF 抗体,或其抗原结合片段,可以是单克隆抗体,嵌合抗体,完全的人抗体,或人源化的抗体。有效用于本发明方法的示例性抗体包括贝伐珠单抗 (AVASTIN®), G6 抗体, B20 抗体, 及其片段。在某些实施方案中,所述抗-VEGF 抗体具有包含下述氨基酸序列的重链可变区:

[0030] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW

[0031] INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP

[0032] HYYGSSHWYF DVWGQGTLLV VSS (SEQ ID No. 1)

[0033] 并且具有包括下述氨基酸序列的轻链可变区:

[0034] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKPKAPKVLIIYF

[0035] TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ

[0036] GTKVEIKR (SEQ ID No. 2).

[0037] 所述抗体、或其抗原结合片段还可以是缺少 Fc 部分、F(ab')₂、Fab、或 Fv 结构的抗体。

[0038] 在本发明提供的方法、应用和组合物一个实施方案中,所述治疗是 VEGF- 特异性拮抗剂如抗-VEGF 抗体与至少一种化疗剂的组合。在本发明提供的方法、应用和组合物的其它实施方案中,所述 VEGF- 特异性拮抗剂是单一治疗。

[0039] 可以实施本发明提供的任何方法、应用和组合物中的任一种以进行癌症治疗,所述癌症包括但不限于,腺癌 (carcinoma)、淋巴瘤 (lymphoma)、母细胞瘤 (blastoma)、肉瘤 (sarcoma) 和白血病 (leukemia)。所述癌症的更具体的实例包括乳腺癌,鳞状细胞癌 (squamous cell cancer),小细胞肺癌 (small-cell lung cancer),非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer),肺腺癌 (adenocarcinoma of the lung),肺鳞状癌 (squamous carcinoma of the lung),腹膜癌 (cancer of the peritoneum),肝细胞癌 (hepatocellular cancer),胃肠道癌 (gastrointestinal cancer),胰腺癌 (pancreatic cancer),成胶质细胞瘤 (glioblastoma),宫颈癌 (cervical cancer),卵巢癌 (ovarian cancer),肝癌 (liver cancer),膀胱癌 (bladder cancer),肝细胞瘤 (hepatoma),结肠癌 (colon cancer),结肠直肠癌 (colorectal cancer),子宫内膜或子宫癌 (endometrial or uterine carcinoma),唾液腺癌 (salivary gland carcinoma),肾癌 (kidney cancer),肝癌 (liver cancer),前列腺癌 (prostate cancer),肾癌 (renal cancer),外阴癌 (vulval cancer),甲状腺癌 (thyroid cancer),肝癌 (hepatic carcinoma),胃癌 (gastric cancer),黑素瘤 (melanoma),和各种类型的头和颈癌 (head and neck cancer)。在本发明的方法的一些实施方案中,所述受试者患有转移性乳腺癌。在本发明提供的方法、应用和组合物的一些实施方案中,所述受试者患有先前未治疗的转移性乳腺癌。在一些实施方案中,所述受试者患有 HER2- 阴性转移性乳腺癌。

[0040] 上述方面中的每一方面还可以包括监测受试者的癌症复发。例如,监测可以通过评估无进展的存活 (PFS) 或整体存活 (OS) 或客观响应率 (ORR) 完成。在一个实施方案中, PFS 或 OS 或 ORR 在治疗开始之后评估。

[0041] 取决于疾病的类型和严重性,本文记述了抗-VEGF 抗体如贝伐珠单抗的优选剂量,并且该优选剂量可以在约 1 μg/kg- 约 50mg/kg,更优选地约 5mg/kg- 约 15mg/kg 的范围内,包括但不限于 5mg/kg, 7.5mg/kg, 10mg/kg 或 15mg/kg。施用的频率将取决于疾病的类型

和严重性而不同。对于数天或更久时间内的重复施用,取决于病症,治疗维持至癌症被治疗或至获得通过本发明所述的方法或本领域已知的方法测量的理想的治疗效果。在一个实施例中,抗-VEGF 抗体每周施用一次,每两周一次,或每三周一次,以约 5mg/kg- 约 15mg/kg 范围内的剂量施用,所述剂量包括但不限于,5mg/kg,7.5mg/kg,10mg/kg 或 15mg/kg。然而,可以使用其他剂量方案。本发明的治疗的进展易于通过常规技术和测定法监测。

[0042] 在上述方面的每一个方面的另外的实施方案中,局部或系统(例如,口服或静脉内)施用所述 VEGF- 特异性拮抗剂,例如,抗-VEGF 抗体。在其他实施方案中,治疗的一个方面是在单一治疗中使用 VEGF- 特异性拮抗剂,或是单一治疗持续 VEGF- 特异性拮抗剂治疗期间,例如,在延长的治疗期或维持治疗中,如通过临床医师或本文所述测定那样。

[0043] 在本发明提供的方法、应用和组合物的其它实施方案中,使用 VEGF- 特异性拮抗剂的治疗、应用或组合物与另外的抗癌治疗联合,所述另外的抗癌治疗包括但不限于,手术,放射性治疗,化学治疗,区分性治疗(differentiating therapy),生物治疗,免疫治疗,血管发生抑制剂,细胞毒性剂和/或抗增生化合物。使用 VEGF- 特异性拮抗剂的治疗、应用和组合物还可以包括上述各类型的治疗方案的任意组合。在一些实施方案中,化疗剂和 VEGF- 特异性拮抗剂同时施用。

[0044] 在本发明提供的包括另外的抗癌治疗的方法、应用和组合物的实施方案中,受试者可以在施用 VEGF- 特异性拮抗剂之前、过程中(例如,同时)、或之后进一步用另外的抗癌治疗进行治疗。在一个实施方案中,可以施用单独施用的或与抗癌治疗一起施用的 VEGF- 特异性拮抗剂作为维持治疗。

[0045] 本发明的其他特征和优点将通过下述详述、附图和权利要求变得清楚。

[0046] 附图简述

[0047] 图 1 描述使用贝伐珠单抗(BV)或安慰剂(PL)与各种化学治疗进行的转移性乳腺癌试验的研究设计。

[0048] 图 2 描述卡培他滨试验组的无进展存活(PFS)曲线。INV(研究者)是由研究者测定的 PFS,IRC 是由独立评估委员会(independent review committee,IRC)测定的 PFS,其中安慰剂是 PL,贝伐珠单抗是 BV。

[0049] 图 3 描述紫杉烷/蒽环霉素试验组的 PFS 曲线。INV 是由研究者测定的 PFS,IRC 是由独立评估委员会(IRC)测定的 PFS,其中安慰剂是 PL,贝伐珠单抗是 BV。

[0050] 图 4 描述在卡培他滨和紫杉烷/蒽环霉素试验组中的 PFS 亚组分析。

[0051] 图 5 描述卡培他滨(Cape)和紫杉烷/蒽环霉素(T/Antra)组的客观响应率。

[0052] 图 6 描述紫杉烷/蒽环霉素(T/Anthra)组的 PFS 亚组分析。

[0053] 详述

[0054] I. 定义

[0055] 术语“VEGF”或“VEGF-A”用来指 165 个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子与相关的 121-,145-,189-,和 206- 个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子,例如,其如由 Leung 等 Science(科学),246:1306(1989),和 Houck 等 Mol.Endocrin.(分子内分泌学),5:1806(1991)所述,以及其天然存在的等位和加工形式。VEGF-A 是包括 VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, 和 PlGF 的基因家族的一部分。VEGF-A 主要结合两种高亲和性受体酪氨酸激酶 VEGFR-1(Flt-1) 和 VEGFR-2(Flk-1/KDR),后者是 VEGF-A 的血管内皮细胞有丝

分裂信号的主要递质。另外,神经毡蛋白-1已被鉴定为关于结合肝素的 VEGF-A 同种型的受体,并且可在血管发育中起作用。术语“VEGF”或“VEGF-A”还指来自非人物种如小鼠、大鼠或灵长动物的 VEGFs。有时,来自特定物种的 VEGF 由术语指示,如 hVEGF 指示人 VEGF 或 mVEGF 指示鼠 VEGF。典型地,VEGF 指人 VEGF。术语“VEGF”还用来指多肽的剪截形式或片段,其包括所述 165 个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子的氨基酸 8-109 或 1-109。在本申请中可以确定对任何所述形式的 VEGF 的引用,例如,通过“VEGF(8-109),”“VEGF(1-109)”或“VEGF165”。关于“剪截的”天然 VEGF 的氨基酸位置如在天然 VEGF 序列中所示进行编号。例如,在剪截的天然 VEGF 中的氨基酸位置 17(甲硫氨酸)也是天然 VEGF 中的位置 17(甲硫氨酸)。与天然 VEGF 相比,剪截的天然 VEGF 具有针对 KDR 和 Flt-1 受体的结合亲和性。

[0056] “抗-VEGF 抗体”是以充分的亲和力和特异性结合 VEGF 的抗体。所选择的抗体通常具有针对 VEGF 的结合亲和性,例如,所述抗体可以以 100nM-1pM 的 Kd 值结合 hVEGF。例如,抗体亲和性可以通过基于表面等离子共振的测定法(如在 PCT 申请公布号 WO2005/012359 中所述的 BIAcore 测定法)进行确定;通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)进行确定;和竞争测定法(例如 RIA's)进行确定。在某些实施方案中,本发明的抗-VEGF 抗体可以在靶向和干扰其中涉及 VEGF 活性的疾病或病症中用作治疗剂。此外,所述抗体可以进行其他生物学活性测定,例如,以评估其作为治疗剂的功效。所述测定法在本领域中是已知的,并且取决于靶抗原和所述抗体的目的应用。实例包括 HUVEC 抑制测定法;肿瘤细胞生长抑制测定法(例如,如在 WO 89/06692 中所述);抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)和补体介导的细胞毒性(CDC)测定法(美国专利 5,500,362);和激动剂活性或造血测定法(参见 WO 95/27062)。抗-VEGF 抗体通常不结合其他 VEGF 同源物,如 VEGF-B 或 VEGF-C,也不结合其他生长因子,如 PlGF, PDGF 或 bFGF。

[0057] “VEGF 拮抗剂”指能够中和、阻断、抑制、消除、减少或干扰 VEGF 活性的分子,所述 VEGF 活性包括其与一种或多种 VEGF 受体的结合。VEGF 拮抗剂包括抗-VEGF 抗体及其结合抗原的片段、特异性结合 VEGF 的受体分子和衍生物,由此隔离其与一种或多种受体、抗-VEGF 受体抗体和 VEGF 受体拮抗剂如 VEGFR 酪氨酸激酶的小分子抑制剂的结合。

[0058] “天然序列”多肽包括具有与来源于天然的多肽相同的氨基酸序列。因此,天然序列多肽可以具有来自任何哺乳动物的天然存在的多肽的氨基酸序列。所述天然序列多肽可以由天然分离或可以通过重组或合成方式产生。术语“天然序列”多肽特别包括天然存在的剪截的或分泌形式的多肽(例如,细胞外结构域序列),多肽的天然存在的变体形式(例如,交替剪接的形式)和天然存在的等位变体。

[0059] 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活性多肽。所述变体包括,例如,其中在多肽的 N 端或 C 端添加、或删除一个或多个氨基酸残基的多肽。通常,变体具有与天然序列多肽至少约 80%的氨基酸序列同一性,更优选地至少约 90%的氨基酸序列同一性,并且甚至更优选地至少约 95%的氨基酸序列同一性。

[0060] 术语“抗体”以最广泛的意义应用,并且包括单克隆抗体(包括全长或完整的单克隆抗体),多克隆抗体,多价抗体,多特异性抗体(例如,双特异性抗体),和抗体片段(见下),只要其表现出理想的生物学活性。

[0061] 在整个说明书和权利要求书中,免疫球蛋白重链残基的编号是如在 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest(免疫兴趣蛋白的序列),5th

Ed. Public Health Service(公共卫生署), National Institutes of Health(全国卫生所), Bethesda, Md. (1991) 中的 EU 索引的编号, 该文献通过引用清楚地结合在本文中。“如 Kabat 的 EU 索引”指人 IgG1 EU 抗体的残基编号。

[0062] 在一个实施方案中, 本发明所述的“Kd”或“Kd 值”是通过如下述测定法所述的使用 Fab 版本的抗体和 VEGF 分子进行的放射标记的 VEGF 结合测定法 (RIA) 测量的: 所述测定法通过在存在滴定系列的未标记的 VEGF 的条件下, 通过用最低浓度的 (^{125}I)- 标记的 VEGF (109) 平衡 Fab, 然后用抗 -Fab 抗体包被的平板捕获结合的 VEGF 来测量 Fabs 针对 VEGF 的溶液结合亲和性 (Chen, 等, (1999) J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 293 :865-881)。在一个实施例中, 为了建立测定的条件, 将微量滴定板 (Dynex) 用在 50mM 碳酸钠 (pH 9.6) 中的 5ug/ml 捕获抗 -Fab 抗体 (Cappel Labs) 包被过夜, 随后在室温 (约 23°C) 下用在 PBS 中的 2% (w/v) 牛血清白蛋白封闭 2-5 小时。在非吸附平板 (Nunc #269620) 上, 将 100pM 或 26pM [^{125}I] VEGF (109) 与目的 Fab 如 Fab-12 的连续稀释物混合 (Presta 等, (1997) Cancer Res. (癌症研究) 57 :4593-4599)。然后, 将目的 Fab 温育过夜; 然而, 温育可以持续 65 小时, 以保证达到平衡。此后, 将混合物转移到捕获板上在室温下温育 1 小时。然后, 去除溶液, 并且将平板用含 0.1% 吐温 -20 的 PBS 洗涤 8 次。当平板晾干时, 加入 150ul/ 孔的闪烁剂 (MicroScint-20 ;Packard), 将平板在 Topcount γ 计数器 (Packard) 上计数 10 分钟。选择给出小于或等于 20% 最大结合的每种 Fab 的浓度用于竞争结合测定。按照另一个实施方案, Kd 或 Kd 值是通过表面等离子共振测定法使用 BIAcoreTM-2000 或 BIAcoreTM-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) 在 25°C 使用固定的 hVEGF (8-109) CM5 芯片以 ~10 个应答单位 (RU) 测量的。简言之, 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.)。将人 VEGF 用 10mM 乙酸钠 pH4.8 稀释至 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0.2 μM), 然后以 5 $\mu\text{l/分钟}$ 的流速注入, 至获得约 10 个应答单位 (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 $\mu\text{l/分钟}$ 的流速注入在含 0.05% 吐温 20 的 PBS (PBST) 中的两倍连续稀释的 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 (Kd) 以比率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 计算。参见例如 Chen, Y. 等, (1999) J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 293 :865-881。如果根据上述表面等离子共振测定法, 结合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$, 那么结合速率可使用荧光淬灭技术来测定, 即如在分光计诸如配备了断流装置的分光光度计 (stop-flow equipped spectrophotometer) (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-Aminco 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用搅拌比色杯 (stirred cuvette) 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) 的升高或降低。

[0063] “封闭”抗体或抗体“拮抗剂”是一种抑制或减少其所结合的抗原的生物学活性的物质。例如, VEGF- 特异性拮抗剂抗体结合 VEGF 并且抑制 VEGF 诱导血管发生、诱导血管内皮细胞增生或诱导血管渗透性的能力。在某些实施方案中, 封闭抗体或拮抗剂抗体完全抑制抗原的生物学活性。

[0064] 除非另外指明,表述“多价抗体”在整个说明书中用来指示包括三个或多个抗原结合位点的抗体。例如,改造多价抗体以具有三个或多个抗原结合位点,并且通常不是天然序列的 IgM 或 IgA 抗体。

[0065] “抗体片段”仅包括完整抗体的一部分,通常包括完整抗体的抗原结合位点,并且因此保留与抗原结合的能力。该定义所涵盖的抗体片段的实例包括:(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 端具有一个或多个半胱氨酸残基的 Fab 片段;(iii) 具有 VH 和 CH1 结构域的 Fd 片段;(iv) 具有 VH 和 CH1 结构域且在 CH1 结构域的 C 端具有一个或多个半胱氨酸残基的 Fd' 片段;(v) 具有抗体的单臂的 VL 和 VH 结构域的 Fv 片段;(vi) dAb 片段 (Ward 等, Nature (自然) 341, 544-546 (1989)), 其由 VH 结构域组成;(vii) 分离的 CDR 区;(viii) F(ab')₂ 片段,其为一种在铰链区通过二硫键连接的两个 Fab' 片段的二价片段;(ix) 单链抗体分子 (例如,单链 Fv; scFv) (Bird 等, Science (科学) 242:423-426 (1988); 和 Huston 等, PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988)); (x) 具有两个抗原结合位点的“双抗体”,其在一多肽链中包括与轻链可变结构域 (VL) 连接的重链可变结构域 (VH) (参见,例如, EP 404,097; WO 93/11161; 和 Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报), 90:6444-6448 (1993)); (xi) “线性抗体”,其包括一对串联 Fd 区段 (VH-CH1-VH-CH1), 其与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区 (Zapata 等 Protein Eng. (蛋白质工程) 8(10):1057-1062 (1995); 和美国专利号 5,641,870)。

[0066] 术语“单克隆抗体”用在本文中是指从一群基本上同质的抗体中获得的抗体,即除了可能以少量存在的天然存在的突变之外,该群体所包含的各个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一的抗原。此外,多克隆抗体制剂典型地包括针对不同决定簇 (表位) 的不同抗体,与所述多克隆抗体制剂相反,每个单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。修饰词“单克隆”不被解释为抗体的生产需要通过任何特定的方法。例如,按照本发明使用的单克隆抗体可以通过由 Kohler 等, Nature (自然), 256:495 (1975) 首先描述的杂交瘤方法制备,或可以通过重组 DNA 方法 (参见,例如,美国专利号 4,816,567) 制备。“单克隆抗体”还可以从噬菌体抗体文库分离,例如,使用 Clackson 等, Nature (自然), 352:624-628 (1991) 或 Marks 等, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志), 222:581-597 (1991) 中所述的技术。

[0067] “Fv”片段是包含完整的抗原识别和结合位点的抗体片段。该区域由本质可以是共价的紧密缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成,例如在 scFv 中。正是在每个可变结构域的三个 CDRs 相互作用的这种构型中限定了 V_H-V_L 二聚体表面上的抗原结合位点。笼统来说,6 个 CDRs 或其子集赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变结构域 (或只包含对抗原特异的三个 CDR 的半个 Fv) 也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力通常低于完整结合位点。

[0068] 当用于本文时,“抗体可变结构域”是指抗体分子的轻链和重链的部分,其包括互补决定区 (CDRs; 即, CDR1, CDR2, 和 CDR3), 和构架区 (FRs) 的氨基酸序列。V_H 是指重链可变结构域。V_L 是指轻链可变结构域。按照本发明所用的方法,为 CDRs 和 FRs 指定的氨基酸位置可以按照 Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest (免疫兴趣的蛋白质序列) (National Institutes of Health (全国卫生研究所), Bethesda, Md., 1987 和 1991)) 定义。抗体或抗原结合片段的氨基酸编号也按照 Kabat 编号进行。

[0069] 当用于本文时,术语“互补决定区”(CDRs;即,CDR1,CDR2,和 CDR3)是指抗体可变结构域的氨基酸残基,其存在对于抗原结合是必需的。每个可变结构域典型地具有三个 CDR 区,鉴定为 CDR1,CDR2 和 CDR3。每个互补决定区可以包括来自 Kabat 定义的“互补决定区”的氨基酸残基(即,大约在轻链可变结构域中的残基 24-34(L1),50-56(L2) 和 89-97(L3)以及在重链可变结构域中的 31-35(H1),50-65(H2) 和 95-102(H3);Kabat 等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*(免疫兴趣的蛋白质序列),5th Ed.Public Health Service(公共卫生署),National Institutes of Health(全国卫生研究所),Bethesda,MD. (1991)) 和/或来自“高变环”的那些残基(即,大约在轻链可变结构域中的残基 26-32(L1),50-52(L2) 和 91-96(L3) 以及在重链可变结构域中的 26-32(H1),53-55(H2) 和 96-101(H3);Chothia 和 Lesk J. *Mol. Biol.* (分子生物学杂志) 196 :901-917(1987))。在一些情形中,互补决定区可以包括来自 Kabat 定义的 CDR 区和高变环二者的氨基酸。例如,抗体 4D5 的重链的 CDRH1 包括氨基酸 26-35。

[0070] “构架区”(以下为 FR)是 CDR 残基之外的那些可变结构域残基。每个可变结构域通常具有鉴定为 FR1、FR2、FR3 和 FR4 的四个 FR。如果所述 CDR 根据 Kabat 来定义,轻链 FR 残基大致位于残基 1-23(LCFR1),35-49(LCFR2),57-88(LCFR3),和 98-107(LCFR4),并且重链 FR 残基大致位于重链残基中的残基 1-30(HCFR1),36-49(HCFR2),66-94(HCFR3),和 103-113(HCFR4)。如果所述 CDR 包含来自高变环的氨基酸残基,轻链 FR 残基大致位于轻链中的残基 1-25(LCFR1),33-49(LCFR2),53-90(LCFR3),和 97-107(LCFR4),且重链 FR 残基大致位于重链残基中的残基 1-25(HCFR1),33-52(HCFR2),56-95(HCFR3),和 102-113(HCFR4)。有些情况下,当 CDR 包含来自根据 Kabat 定义的 CDR 和高变环的那些氨基酸时,FR 残基会相应调节。例如,当 CDRH1 包括氨基酸 H26-H35 时,重链 FR1 残基在位点 1-25 且 FR2 残基在位点 36-49。

[0071] “Fab”片段包含轻链的可变结构域和恒定结构域以及重链的可变结构域和第一恒定结构域(CH1)。F(ab')₂ 抗体片段包括一对通常通过它们之间的铰链半胱氨酸在它们的羧基端附近共价连接的 Fab 片段。抗体片段的其它化学偶联在本领域中也是已知的。

[0072] “单链 Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体 V_H和 V_L结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,Fv 多肽还包含在 V_H和 V_L结构域之间的多肽接头,其使得 scFv 能够形成理想的抗原结合结构。关于 scFv 的综述,参见,Pluckthun,在 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*(单克隆抗体的药理学),Vol 113, Rosenberg 和 Moore 编. Springer-Verlag, New York,第 269-315 页(1994)中。

[0073] 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,所述片段包含在同一多肽链(V_H和 V_L)中与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H)。通过使用短接头,所述接头太短而不允许在同链上的两个结构域之间配对,迫使所述结构域与另一条链的互补结构域配对,并且产生两个抗原结合位点。双抗体在例如 EP 404,097;WO 93/11161;和 Hollinger 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*(美国科学院院刊),90 :6444-6448(1993)中有更充分的描述。

[0074] 表述“线性抗体”指在 Zapata 等, *Protein Eng.*(蛋白质工程),8(10): 1057-1062(1995)中所述的抗体。简言之,这些抗体包含一对串联的 Fd 片段(V_H-C_H1-V_H-C_H1),其与互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或

单特异性的。

[0075] 本文的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体（免疫球蛋白）以及所述抗体的片段，只要它们表现出理想的生物活性，在所述“嵌合”抗体中，重链和 / 或轻链的一部分与来源于特定物种的抗体或属于特定抗体种类或亚类的抗体中的相对应的序列相同或同源，而链的其余部分与来源于另一种物种的抗体或属于另一种抗体种类或亚类的抗体中的相对应序列相同或同源（美国专利号 4,816,567；和 Morrison 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 81:6851-6855(1984)）。

[0076] 非人（例如鼠）抗体的“人源化”形式指最低限度包含源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）中的受体的高变区残基用具有期望的特异性、亲和力和能力的非人物种（供体抗体）诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的高变区残基替换的人免疫球蛋白。在有些情况中，将人免疫球蛋白的 Fv 构架区 (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找到的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。一般而言，人源化抗体将包含基本上全部的至少一个、典型地两个下述可变结构域，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。人源化抗体任选还将包含至少部分免疫球蛋白恒定区 (Fc)，典型地是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见 Jones 等, Nature (自然) 321:522-525(1986)；Riechmann 等, Nature (自然) 332:323-329(1988)；和 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. (结构生物学新观点) 2:593-596(1992)。

[0077] “人抗体”是具有与由人产生的抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列和 / 或使用本文所公开的制备人抗体的任一种技术制备的抗体。人抗体的这一定义特异性排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可以使用本领域中已知的多种技术产生。在一个实施方案中，人抗体选自噬菌体文库，其中所述噬菌体文库表达人抗体 (Vaughan 等 Nature Biotechnology (自然生物技术) 14:309-314(1996)；Sheets 等 Proc. Natl. Acad. Sci. (美国国家科学院学报) 95:6157-6162(1998)；Hoogenboom 和 Winter, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志), 227:381(1991)；Marks 等, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志), 222:581(1991))。人抗体还可以通过将人免疫球蛋白基因座引入到转基因动物如小鼠中进行制备，在所述转基因动物中，内源性免疫球蛋白基因已被部分或完全失活。当攻击时，观察到人抗体产生，这在所有方面中与在人类中观察到的密切相似，包括基因重排，装配，和抗体所有成员。例如，这种方法记述在美国专利号 5,545,807；5,545,806；5,569,825；5,625,126；5,633,425；5,661,016 中，和记述在下述科学出版物中：Marks 等, Bio/Technology (生物技术) 10:779-783(1992)；Lonberg 等, Nature (自然) 368:856-859(1994)；Morrison, Nature (自然) 368:812-13(1994)；Fishwild 等, Nature Biotechnology (自然生物技术) 14:845-51(1996)；Neuberger, Nature Biotechnology (自然生物技术) 14:826(1996)；Lonberg 和 Huszar, Intern. Rev. Immunol. (国际免疫学综述) 13:65-93(1995)。备选地，人抗体可以通过使生产针对靶抗原的抗体的人 B 淋巴细胞无限增殖而制备（所述 B 淋巴细胞可以从个体回收或在体外进行免疫）。参见，例如，Cole 等, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (单克隆抗体和癌症治疗), Alan R. Liss, 第 77 页 (1985)；Boerner 等, J. Immunol. (免疫学杂志), 147(1):86-95(1991)；和美国专利号 5,750,373。

[0078] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个 CDRs 中具有一个或多个改变的抗体,与不具有这些改变的亲本抗体相比,这些改变导致抗体对抗原亲和力的提高。优选亲和力成熟的抗体具有针对靶抗原的纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。亲和力成熟的抗体通过本领域已知的方法产生。Marks 等, *Bio/Technology* (生物技术) 10 :779-783(1992) 记述了通过 VH 和 VL 结构域改组进行的亲和力成熟。CDR 和 / 或构架残基的随机诱变记述在 Barbas 等, *Proc Nat. Acad. Sci. USA* (美国国家科学院学报) 91 :3809-3813(1994) ;Schier 等 *Gene* (基因) 169 :147-155(1995) ;Yelton 等 *J. Immunol.* (免疫学杂志) 155 :1994-2004(1995) ;Jackson 等, *J. Immunol.* (免疫学杂志) 154 (7) :3310-9(1995) ;和 Hawkins 等, *J. Mol. Biol.* (分子生物学杂志) 226 :889-896(1992) 中。

[0079] 抗体的“功能性抗原结合位点”是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如所述抗原结合位点所来源的亲本抗体那样强,但是结合抗原的能力必须是可以使用已知用于评价抗体与抗原结合的多种方法中的任一种进行测量的。此外,本发明的多价抗体的每个抗原结合位点的抗原结合亲和力在数量上不必是相同的。对于本发明的多聚体抗体,可以使用如美国专利申请公布号 20050186208 的实施例 2 所述的超离心分析来评估功能性抗原结合位点的数目。根据这种分析方法,组合不同比例的靶抗原与多聚体抗体,并且假设功能性结合位点的数目不同,计算所述复合物的平均分子量。将这些理论值与所获得的实际实验值进行比较,以评估功能性结合位点的数目。

[0080] 具有指定抗体的“生物学特征”的抗体是具有将所述抗体与结合相同抗原的其它抗体区分开来的一种或多种抗体生物学特征的抗体。

[0081] 为了筛选与目的抗体所结合的抗原上的表位相结合的抗体,可以进行常规交叉阻断测定,诸如在 *Antibodies, A Laboratory Manual* (抗体,实验室手册), Cold Spring Harbor Laboratory (冷泉港实验室), Ed Harlow 和 David Lane (1988) 中所述的交叉阻断测定。

[0082] “物种依赖型抗体”是这样的抗体:与其针对来自第二哺乳动物物种的抗原同源物的所具有的结合亲和力相比,其针对来自第一哺乳动物物种的抗原具有更强的结合亲和力。通常,物种依赖型抗体与人抗原“特异性结合”(即,具有不大于约 $1 \times 10^{-7} \text{M}$, 优选不大于约 $1 \times 10^{-8} \text{M}$, 且最优选不大于约 $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 的结合亲和力 (K_d) 值),但是与其针对人抗原的结合亲和力相比,其针对来自第二非人哺乳动物物种的抗原同源物所具有的结合亲和力相对弱至少约 50 倍、或至少约 500 倍、或至少约 1000 倍。所述物种依赖型抗体可以是上述定义的各种类型抗体中的任一种,但是典型地是人源化抗体或人抗体。

[0083] 当用于本文时,“抗体突变体”或“抗体变体”指物种依赖型抗体的氨基酸序列变体,其中所述物种依赖型抗体的一个或多个氨基酸残基已被修饰。所述突变体必须与物种依赖型抗体具有小于 100% 的序列同一性或相似性。在一个实施方案中,所述抗体突变体与物种依赖型抗体的重链可变结构域或轻链可变结构域任一种的氨基酸序列具有至少 75% 的氨基酸序列同一性或相似性,更优选至少 80%、更优选至少 85%、更优选至少 90%、且最优选至少 95% 的氨基酸序列同一性或相似性。关于这一序列的同一性或相似性在本文中定义为在比对序列且在需要时引入缺口(以获得最大百分比的序列同一性)后,候选序列中与物种依赖型抗体残基相同(即,相同残基)或相似(即,基于共有侧链特性,来自于同一组的氨基酸残基,见下)的氨基酸残基的百分比。在可变结构域外抗体序列中的 N 端、C

端、或内部延伸、缺失或插入无一应该被解释为影响序列的同一性或相似性。

[0084] 为了提高包含本发明的氨基酸序列的抗体或多肽的半衰期,人们可以将补救受体结合表位(salvage receptor binding epitope)附着在抗体(特别是抗体片段)上,例如,如在美国专利 5,739,277 中所述。例如,编码所述补救受体结合表位的核酸分子可以与编码本发明多肽序列的核酸符合框架地连接,从而使由改造的核酸分子表达的融合蛋白包含补救受体结合表位和本发明的多肽序列。当用在本文中时,术语“补救受体结合表位”指 IgG 分子(例如, IgG₁, IgG₂, IgG₃, 或 IgG₄) 的 Fc 区的表位,其负责提高 IgG 分子的体内血清半衰期(例如, Ghetie 等, Ann. Rev. Immunol. (免疫学年度综述) 18 :739-766 (2000), 表 1)。具有在抗体 Fc 区中取代和提高的半衰期的抗体也记述在 W000/42072, W0 02/060919 ; Shields 等, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 276 :6591-6604 (2001) ; Hinton, J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 279 :6213-6216 (2004) 中。在另一个实施方案中,例如,血清半衰期也可以通过附着其它多肽序列而提高。例如,可以将本发明方法所用的抗体或其它多肽附着到血清白蛋白上或血清白蛋白的结合 FcRn 受体或血清白蛋白结合肽的部分上,从而使血清白蛋白与所述抗体或多肽结合,例如,所述多肽序列公开在 W001/45746 中。在一个实施方案中,待附着的血清白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提高。关于血清白蛋白结合肽序列,还参见 Dennis 等 J. Biol. Chem. (生物化学杂志) 277 :35035-35043 (2002)。

[0085] “嵌合 VEGF 受体蛋白”是具有来源于至少两种不同蛋白的氨基酸序列的 VEGF 受体分子,其中至少一种蛋白是 VEGF 受体蛋白。在某些实施方案中,嵌合 VEGF 受体蛋白能够结合 VEGF 和抑制 VEGF 的生物学活性。

[0086] “分离的”抗体是由其天然环境的成分鉴定和分离和 / 或回收的抗体。其天然环境的污染性成分是干扰所述抗体的诊断或治疗应用的物质,并且可以包括酶、激素、和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在某些实施方案中,如通过 Lowry 方法确定,抗体被纯化 (1) 至大于 95 重量%的抗体,并且最优选地大于 99 重量%, (2) 至通过使用离心杯测序仪 (spinning cup sequenator) 足以获得至少 15 个残基的 N 端或内部氨基酸序列的程度,或 (3) 至通过还原条件或非还原条件下的 SDS-PAGE 使用考马斯蓝或银染的均匀性。分离的抗体包括在重组细胞中的原位抗体,因为至少一种抗体天然环境的成分将不存在。然而,通常,分离的抗体通过至少一个纯化步骤制备。

[0087] “片段”意指优选包含参照核酸分子或多肽的完整长度的至少 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 或更多的多肽或核酸分子的部分。片段可以包含 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 或 100, 200, 300, 400, 500, 600, 或更多个核苷酸或 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 个氨基酸或更多个氨基酸。

[0088] “抗血管发生剂”或“血管发生抑制剂”指直接或间接抑制血管发生、脉管发生或不理想的血管渗透性的小分子量物质、多核苷酸、多肽、分离的蛋白、重组蛋白、抗体、其缀合物或融合蛋白。应该理解,所述抗血管发生剂包括结合并且阻断血管形成因子或其受体的血管形成活性的那些试剂。例如,抗血管发生剂是针对血管发生剂的抗体或其它拮抗剂,如在整个说明书中所定义或本领域中已知,例如,但不限于,针对 VEGF-A 或针对 VEGF-A 受体(例如, KDR 受体或 Flt-1 受体)的抗体, VEGF- 截留, 抗 -PDGFR 抑制剂, 如 GleevecTM (Imatinib Mesylate)。抗血管发生剂还包括天然的血管发生抑制剂,例

如,血管生成素(angiotatin),内皮抑素(endostatin)等。参见,例如,Klagsbrun 和 D' Amore, Annu. Rev. Physiol. (生理学年度综述),53:217-39(1991);Streit 和 Detmar, Oncogene(癌基因),22:3172-3179(2003)(例如,表 3 列出在恶性黑素瘤中的抗血管发生治疗);Ferrara & Alitalo, Nature Medicine(自然医学)5:1359-1364(1999);Tonini 等, Oncogene(癌基因),22:6549-6556(2003)(例如,表 2 列出了已知的抗血管形成因子);和 Sato. Int. J. Clin. Oncol. (国际临床肿瘤学杂志),8:200-206(2003)(例如,表 1 列出了临床试验中所用的抗血管发生剂)。

[0089] “维持”剂量在本文中指在治疗期间过程中或之后施用给受试者的治疗剂的一个或多个剂量。通常,维持剂量以间隔的治疗时间间隔施用,如约每周,约每两周,约每三周,或约每四周施用。

[0090] “存活”指受试者保持活着,并且包括无进展存活(PFS)和整体存活(OS)。存活可以通过 Kaplan-Meier 法估算,并且使用分层的时序检验(stratified log-rank test)计算存活的任何差异。

[0091] “无进展存活(PFS)”指从治疗(或随机化)到第一次疾病进展或死亡的时间。例如,其是受试者从治疗的起始或从最初的诊断保持活着没有癌症复发的时间,例如,持续确定的时间阶段,如约 1 个月,1.2 个月,2 个月,2.4 个月,2.9 个月,3 个月,3.5 个月,4 个月,6 个月,7 个月,8 个月,9 个月,1 年,约 2 年,约 3 年等。在一个实施方案中,PFS 延长约 2.9 个月-3.5 个月(例如,使用卡培他滨)。在一个实施方案中,PFS 延长约 1.2 个月-约 2.4 个月(例如,使用紫杉烷/蒽环霉素)。在本发明的一个方面中,PFS 可以通过实体瘤的响应评估标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST)进行评估。

[0092] “整体存活”指受试者从治疗起始或从最初的诊断保持活着确定的时间阶段,如约 1 年,约 2 年,约 3 年,约 4 年,约 5 年,约 10 年等。在构成本发明基础的研究中,用于存活分析的事件是任何原因的死亡。

[0093] “延长的存活”或“提高的存活可能性”意指相对于未治疗的受试者(即,相对于未用 VEGF 特异性拮抗剂如 VEGF 抗体治疗的受试者)或相对于对照治疗方案,如仅用化疗剂的治疗(诸如在乳腺癌标准护理中所用的那些化疗剂,例如,卡培他滨,紫杉烷,蒽环霉素,紫杉醇,多西他赛,紫杉醇蛋白结合的粒子(例如,Abraxane®),多柔比星,表柔比星,5-氟尿嘧啶,环磷酰胺或它们的组合),在治疗的受试者中增加的 PFS 和/或 OS。在治疗开始后或在最初诊断之后,监测存活至少约 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。

[0094] 危害比(HR)是事件率的统计学定义。为了本发明的目的,危害比定义为表示在任意具体时间点,在实验组中的事件概率除以对照组中的事件概率。无进展存活分析中的“危害比”是在随访期间与对照比较表示治疗的死亡危险减少的两种无进展存活曲线之间的差异的总结。

[0095] 术语“同时地”用作本发明中是指施用两种或多种治疗剂,其中至少部分施用在时间上是重合的。因此,同时施用包括这样的给药方案:此时在中断一种或多种其它试剂的施用后,继续一种或多种试剂的施用。

[0096] “单一治疗”意指在治疗期间过程中仅包括用于癌症或肿瘤治疗的单种治疗剂的治疗方案。使用 VEGF-特异性拮抗剂的单一治疗意指在治疗期间过程中施用 VEGF 特异性

拮抗剂而不实施另外的抗癌治疗。

[0097] “维持治疗”意指提供减少疾病复发或进展的可能性的治疗方案。可以提供维持治疗任意时间长度,包括延长的时间期间至受试者的寿命期间。维持治疗可以在最初的治疗后提供或与最初的治疗或另外的治疗联合提供。维持治疗所用的剂量可以变化,并且可以包括与用于其它类型的治疗的剂量相比减少的剂量。还参见本文中的“维持”。

[0098] 术语“癌症”和“癌性”是指或者描述哺乳动物中典型地特征在于不可调控的细胞生长的生理学状态。包含于这种定义的是良性和恶性癌症以及静止期肿瘤或微转移病 (micrometastases)。癌症的例子包括,但不限于,癌 (carcinoma)、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。这类癌症的更具体的例子包括乳腺癌、鳞状细胞癌、肺癌 (包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、和肺鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃的或胃癌 (gastric or stomach cancer) (包括胃肠癌 (gastrointestinal cancer))、胰腺癌、成胶质细胞瘤 (glioblastoma)、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤 (hepatoma)、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌 (kidney or renal cancer)、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌 (hepatic carcinoma)、和各种类型的头和颈癌 (head and neck cancer)、以及 B 细胞淋巴瘤 (包括低级 / 滤泡性非霍奇金淋巴瘤 (NHL) (follicular non-Hodgkin' s lymphoma); 小淋巴细胞 (SL) NHL; 中级 / 滤泡性 NHL; 中级弥散性 NHL; 高级成免疫细胞 NHL; 高级成淋巴细胞 NHL; 高级小非分裂细胞 NHL; 大病 NHL (bulky disease NHL); 套细胞淋巴瘤 (mantle cell lymphoma); AIDS- 相关的淋巴瘤; 和沃尔登斯特伦巨球蛋白血症 (Waldenstrom' s Macroglobulinemia); 慢性淋巴细胞白血病 (CLL); 急性淋巴细胞白血病 (ALL); 多毛细胞白血病 (Hairy cell leukemia); 慢性骨髓细胞白血病; 和移植后淋巴增生性障碍 (post-transplant lymphoproliferative disorder) (PTLD), 以及与斑痣性错构瘤病 (phakomatoses) 相关的异常血管增生, 水肿 (诸如与脑肿瘤相关的水肿), 和梅格斯综合征 (Meigs' syndrome)。

[0099] “转移”意指癌症由其初始位点向身体的其它位置扩散。癌细胞可以脱离原代肿瘤, 渗透到淋巴和血管中, 通过血液循环, 并且在身体中其它位置的正常组织中的远端病灶生长 (转移)。转移可以是局部的或远端的。转移是一个顺序过程, 在脱离原代肿瘤的肿瘤细胞上偶然发生, 通过血流传播, 并且在远端部位停止。在新的部位, 细胞建立血液供应, 并且可以生长形成威胁生命的团块 (mass)。肿瘤细胞内的刺激性和抑制性分子途径调控这一行为, 并且在远端部位, 肿瘤细胞和宿主细胞之间的相互作用也是重要的。

[0100] “受试者”意指哺乳动物, 包括但不限于, 人或非人哺乳动物, 诸如牛、马、犬、羊或猫。优选地, 所述受试者是人。在本发明中, 患者也是受试者。

[0101] 对于本发明的方法, 术语“指示”受试者意指通过任何方式, 但是优选以书面形式, 如以包装插页或其它书面推广材料的形式, 提供关于适用疗法、药物、治疗、治疗方案等的指导。

[0102] 对于本发明的方法, 术语“推广”意指通过任何方式, 包括书面形式, 如以包装插页形式, 提供、广告、销售、或描述特定的药物、药物组合、或治疗模式 (treatment modality)。本发明的推广是指推广治疗剂, 如 VEGF 拮抗剂, 例如, 抗-VEGF 抗体, 或推广化疗剂, 用于适应症, 如乳腺癌治疗, 其中所述推广是由食品和药物管理局 (FDA) 授权的, 其已经在受试者群体中证明与统计学显著性治疗功效和可接受的安全性相关。

[0103] 术语“市场化”用在本发明中描述推广、销售或分配产品（例如，药物）。市场化具体包括具有使产品商业化目的的包装、广告、和任何商业活动。

[0104] 受试者“群体”是指一组患有癌症的受试者，如在临床试验中，或按照 FDA 关于特定适应症如乳腺癌治疗的核准由肿瘤科医生观察到的。在一个实施方案中，所述群体包括至少约 1200 名受试者。

[0105] 术语“抗癌治疗”是指有效用于治疗癌症的治疗。抗癌治疗剂的实例包括，但不限于，例如，手术、化疗剂、生长抑制剂、细胞毒性试剂、放射性治疗中所有的试剂、抗血管发生剂、细胞凋亡剂、抗微管蛋白剂、和其它治疗癌症的试剂，如抗-HER-2 抗体（例如，Herceptin®），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，厄洛替尼（erlotinib）（Tarceva®）），血小板来源的生长因子抑制剂（例如，Gleevec™（Imatinib Mesylate）），COX-2 抑制剂（例如，塞来考昔（celecoxib）），干扰素，细胞因子，结合下述一种或多种靶标的拮抗剂（例如，中和抗体）：ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA 或 VEGF 受体，TRAIL/Apo2，和其它生物活性和有机化学剂等。它们的组合也包含在本发明中。

[0106] 术语“细胞毒性试剂”用作本发明中指抑制或防止细胞功能和 / 或引起细胞破坏的物质。该术语意欲包括放射性同位素（例如 At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³²和 Lu 的放射性同位素），化疗剂，和毒素如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶学活性毒素，包括其片段和 / 或变体。

[0107] “化疗剂”是有效用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括有效用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括烷化剂类（alkylating agents），如塞替派（thiotepa）和 CYTOXAN® 环磷酰胺（cyclophosphamide）；烷基磺酸酯（alkyl sulfonates）如白消安（busulfan），英丙舒凡（improsulfan）和哌泊舒凡（piposulfan）；吡丙啶类（aziridines）如苯佐替派（benzodopa）、卡波醌（carboquone）、美妥替派（meturedopa）和乌瑞替派（uredopa）；乙烯亚胺（ethylenimines）和甲基蜜胺类（methylamelamines），包括六甲蜜胺（altretamine）、曲他胺（triethylenemelamine）、三亚乙基磷酰胺（triethylenephosphoramidate）、三乙撑硫代磷酰胺（triethylenethiophosphoramidate）和三羟甲蜜胺（trimethylolomelamine）；acetogenins（特别是布拉他辛（bullatacin）和布拉他辛酮（bullatacinone））；喜树碱（camptothecin）（包括合成的类似物托泊替康（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）；倍癌霉素（duocarmycin）（包括合成的类似物、KW-2189 和 CBI-TM1）；艾榴素（eleutherobin）；pancratistatin；匍枝珊瑚醇（sarcodictyin）；海绵素（spongistatin）；氮芥（nitrogen mustards）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）、氮芥（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（nitrosureas）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); 抗生素类如烯二炔类 (enediynes) 抗生素 (例如, 加利车霉素 (calicheamicin)、特别是加利车霉素 γ II 和加利车霉素 ω II (参见, 例如, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))); 烯二炔蒽环类抗生素 (dynemicin), 包括烯二炔蒽环类抗生素 A (dynemicin A); 二膦酸盐类 (diphosphonates), 如氯膦酸盐 (clodronate); 埃斯波霉素 (esperamicin); 以及新制癌菌素 (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 (aclacinomysins)、放线菌素 (actinomycin)、安曲霉素 (anthramycin)、偶氮丝氨酸 (azaserine)、博来霉素 (bleomycins)、放线菌素 C (cactinomycin)、carabycin、洋红霉素 (carminomycin)、嗜癌霉素 (carzinophilin)、色霉素 (chromomycinis)、放线菌素 D (dactinomycin)、柔红霉素 (daunorubicin)、地托比星 (detorubicin)、6-重氮基-5-氧-L-正亮氨酸 (6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、ADRIAMYCIN® 多柔比星 (doxorubicin) (包括吗啉代-多柔比星 (morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉代-多柔比星 (cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯啉代-多柔比星 (2-pyrrolino-doxorubicin) 和脱氧多柔比星 (deoxydoxorubicin))、表柔比星 (epirubicin)、依索比星 (esorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、马塞罗霉素 (marcellomycin)、丝裂霉素 (mitomycins) 如丝裂霉素 C、麦考酚酸 (mycophenolic acid)、诺拉霉素 (nogalamycin)、橄榄霉素 (olivomycins)、培洛霉素 (peplomycin)、potfiromycin、嘌呤霉素 (puromycin)、三铁阿霉素 (quelamycin)、罗多比星 (rodoxubicin)、链黑霉素 (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); 抗代谢物如甲氨喋呤 (methotrexate) 和 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil) (5-FU); 叶酸类似物如二甲叶酸 (denopterin)、甲氨喋呤、喋罗呤 (pteropterin)、三甲曲沙 (trimetrexate); 嘌呤类似物如氟达拉滨 (fludarabine)、6-巯基嘌呤 (6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤 (thiamiprine)、硫鸟嘌呤 (thioguanine); 嘧啶类似物如安西他滨 (ancitabine)、阿扎胞苷 (azacitidine)、6-氮尿苷 (6-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); 雄激素类诸如卡鲁甾酮 (calusterone)、丙酸屈他雄酮 (dromostanolone propionate)、环硫雄醇 (epitiostanol)、美雄烷 (mepitiostane)、睾内酯 (testolactone); 抗肾上腺药 (anti-adrenals) 如氨鲁米特 (aminoglutethimide)、米托坦 (mitotane)、曲洛司坦 (trilostane); 叶酸补充剂如亚叶酸 (folinic acid); 醋葡醛内酯 (aceglatone); aldophosphamide glycoside; 5-氨基酮戊酸 (aminolevulinic acid); 恩尿嘧啶 (eniluracil); 安吡啶 (amsacrine); bestabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); defofamine; 秋水仙胺 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfornithine; 依利醋铵 (elliptinium acetate); epothilone; 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓 (gallium nitrate); 羟脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidainine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids) 如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocins); 米托胍脲 (mitoguanzone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidanmol); 尼曲吡啶 (nitraerine); 喷司他丁 (pentostatin); 异丙嗪 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 鬼臼酸 (podophyllinic acid);

2- 乙基酰肼 (2-ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); PSK ® 多糖复合物 (JHS Natural Products (JHS 天然产品), Eugene, OR); 雷佐生 (razoxane); 利索新 (rhizoxin); 西佐喃 (sizofiran); 锗螺胺 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''- 三氯三乙胺 (2,2',2''-trichlorotriethylamine); 单端孢霉烯族化合物 (trichothecenes) (特别是 T-2 毒素、verracurin A、杆孢菌素 A (roridin A) 和 anguidine); 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; 阿拉伯糖苷 (arabinoside) (“Ara-C”); 环磷酰胺; 塞替哌 (thiotepa); 紫杉烷类化合物 (taxoids), 例如, TAXOL ® 紫杉醇 (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, 新泽西) ABRAXANE ® 无克列莫佛 (Cremophor-free)、紫杉醇的白蛋白改造的纳米颗粒制剂 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, 伊利诺伊州); 和 TAXOTERE ® 多西他赛 (doxorubicin) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, 法国); chlorambucil; GEMZAR ® 吉西他滨 (gemcitabine); 6- 硫鸟嘌呤 (6-thioguanine); 巯嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨喋呤; 铂类似物如顺铂 (cisplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin) 和卡铂 (carboplatin); 长春碱 (vinblastine); 铂; 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); 诺安托 (novantrone); 替尼泊苷 (teniposide); 依达曲沙 (edatrexate); 柔红霉素 (daunomycin); 氨基喋呤 (aminopterin); 希罗达 (xeloda); 伊班膦酸盐 (ibandronate); 伊立替康 (irinotecan) (Camptosar, CPT-11) (包括伊立替康与 5-FU 和亚叶酸 (leucovorin) 的治疗方案); 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (difluoromethylornithine) (DMFO); 维甲类 (retinoids) 如视黄酸 (retinoic acid); 卡培他滨 (capecitabine); 康普瑞汀 (combretastatin); 亚叶酸 (leucovorin) (LV); 奥沙利铂 (oxaliplatin), 包括奥沙利铂治疗方案 (FOLFOX); 拉帕替尼 (lapatinib) (Tykerb ®); 下列的抑制剂: PKC- α , Raf, H-Ras, EGFR (例如, 厄洛替尼 (erlotinib) (Tarceva ®)) 和 VEGF-A, 所述抑制剂减少细胞增殖, 以及上述任一种的药用盐、酸或衍生物。

[0108] 抗激素试剂也包含在这一定义中, 其起作用调控或抑制激素对肿瘤的作用, 如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂 (SERMs), 其包括, 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 (4-hydroxytamoxifen), 曲沃昔芬 (trioxifene), keoxifene, LY117018, 奥那司酮 (onapristone), 和 FARESTON • 托瑞米芬 (toremifene); 抑制芳香酶的芳香酶抑制剂, 其调节肾上腺中的雌激素生产, 诸如例如, 4(5)- 咪唑, 氨鲁米特 (aminoglutethimide), MEGASE ® 醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate), AROMASIN ® 依西美坦 (exemestane), 福美坦 (formestane), 法偈唑 (fadrozole), RIVISOR ® 伏氯唑 (vorozole), FEMARA ® 来曲唑 (letrozole), 和 ARIMIDEX ® 阿那曲唑 (anastrozole); 和抗雄激素类如氟他胺 (flutamide), 尼鲁米特 (nilutamide), 比卡鲁胺 (bicalutamide), 亮丙立德 (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 (1,3-dioxolane nucleoside cytosine analog)); 反义寡核苷酸, 特别是抑制异常细胞增殖中所涉及的信号传导途径中的基因 (诸如例如, PKC- α , Ralf 和 H-Ras) 表达的那些; 核酶如 VEGF 表达抑制剂 (例如, ANGIOZYME ® 核酶) 和 HER2 表达抑

制剂；疫苗如基因治疗疫苗，例如，ALLOVECTIN®疫苗，LEUVECTIN®疫苗，和 VAXID®疫苗；PROLEUKIN® rIL-2；LURTOTECAN®拓扑异构酶 1 抑制剂；ABARELIX® rmRH；以及上述任一种的药用盐、酸或衍生物。

[0109] 术语“细胞因子”是一般性术语，指由一个细胞群释放的对另一个细胞起细胞间调节剂作用的蛋白。此种细胞因子的实例是淋巴细胞因子 (lymphokines)、单核细胞因子 (monokines) 和传统的多肽激素。细胞因子中包括的是生长激素如人生长激素、N- 甲硫氨酰基人生长激素，和牛生长激素；甲状旁腺素；甲状腺素；胰岛素；胰岛素原；松弛素；松弛素原；糖蛋白激素如促卵泡激素 (FSH)、甲状腺刺激素 (TSH) 和黄体生成素 (LH)；表皮生长因子；肝细胞生长因子；成纤维细胞生长因子；催乳素；胎盘催乳素；肿瘤坏死因子- α 和- β ；苗勒氏管抑制物质 (mullerian-inhibiting substance)；小鼠促性腺激素相关肽；抑制素 (inhibin)；激活蛋白 (activin)；血管内皮生长因子；整联蛋白 (integrin)；血小板生成素 (TPO)；神经生长因子如 NGF- α ；血小板生长因子；转化生长因子 (TGFs) 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)；骨诱导因子 (osteoinductive factors)；干扰素如干扰素- α 、- β 和- γ ，集落刺激因子 (CSFs) 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)；白细胞介素 (ILs) 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；肿瘤坏死因子如 TNF- α 或 TNF- β ；和其它多肽因子，包括 LIF 和 kit 配体 (KL)。当用于本文时，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，以及天然序列细胞因子的生物活性等价物。

[0110] 当用于本文时，“生长抑制剂”指在体外和 / 或体内抑制细胞生长的化合物或组合物。因此，所述生长抑制剂可以是显著减少处于 S 期的细胞百分数的一种试剂。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期进展（处于除 S 期外的阶段）的试剂，如诱导 G1 停滞和 M 期停滞的试剂。经典的 M 期阻断剂包括长春花属类 (vincas)（长春新碱和长春碱），TAXOL®，和 topo II 抑制剂如多柔比星，表柔比星，柔红霉素，依托泊苷，和博来霉素。这些停滞 G1 的试剂还溢出进入 S 期停滞，例如，DNA 烷基化试剂，如他莫昔芬，泼尼松 (prednisone)，达卡巴嗪 (dacarbazine)，氮芥 (mechlorethamine)，顺铂，甲氨喋呤，5- 氟尿嘧啶，和 ara-C。其它的信息可以在 Murakami 等 (WB Saunders: Philadelphia, 1995) 的 The Molecular Basis of Cancer (癌症的分子基础)，Mendelsohn 和 Israel 编，第 1 章，题目为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs (细胞周期调控，癌基因，和抗肿瘤药)”中找到，特别是第 13 页中找到。

[0111] 术语“药物前体”用在本申请中是指药物活性物质的前体或衍生物形式，其较亲本药物对肿瘤细胞的细胞毒性更小并且能够被酶活化或转化为更具活性的亲本形式。参见，例如，Wilman, " Prodrugs in Cancer Chemotherapy (癌症化疗中的药物前体)" Biochemical Society Transactions (生物化学学会学报), 14, 第 375-382 页, 615th Meeting Belfast (1986) 和 Stella 等, " Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, (药物前体: 靶向药物递送的化学方法)" Directed Drug Delivery (定向药物递送), Borchardt 等, (编辑), 第 247-267 页, Humana Press (1985)。本发明的药物前体包括，但不限于，含磷酸盐的药物前体，含硫代磷酸盐的药物前体，含硫酸盐的药物前体，含肽的药物前体，D- 氨基酸修饰的药物前体，糖基化药物前体，含 β - 内酰胺的药物前体，

含任选取代的苯氧基乙酰胺的药物前体或含任选取代的苯基乙酰胺的药物前体,可以被转化为更具活性的无细胞毒性的药物的 5- 氟胞嘧啶和其它 5- 氟尿嘧啶药物前体。可以被衍生成用于本发明的药物前体形式的细胞毒性药物的实例包括,但不限于,上述那些化疗剂。

[0112] “放射性治疗”意指使用定向的 γ 射线或 β 射线诱导充分的细胞损害,从而限制其正常行使功能的能力或完全破坏细胞。应该理解,本领域中存在已知的多种方式来确定治疗的剂量和持续时间。典型的治疗提供为一次施用并且典型的剂量在 10-200 单位 (Grays)/ 天范围内。

[0113] “减少或抑制”意指引起完全减少,优选 20% 或更多,更优选 50% 或更多,最优选 75%, 85%, 90%, 95%, 或更多的能力。减少或抑制可以针对被治疗的病症的症状,转移或微转移的存在或大小,原发瘤的大小,静止瘤的存在或大小,或血管发生性病症中的血管的大小或数量。

[0114] 术语“静脉内输注”是指在大于约 5 分钟的时间期间内,优选约 30-90 分钟的时间期间内,将药物导入到动物或人类受试者的静脉中,尽管按照本发明,静脉内输注备选地实施 10 小时以内。

[0115] 术语“静脉内推注 (intravenous bolus or intravenous push)”是指向动物或人的静脉施用药物,以致机体在约 15 分钟以内、优选 5 分钟以内接受所述药物。

[0116] 术语“皮下施用”指将药物在动物或人类受试者的皮肤下导入,优选在处于皮肤和下部组织之间的小囊 (pocket) 内,通过由药物容器相对缓慢、持续不变的递送而导入。小囊可以通过捏起或拉起皮肤并与下部组织脱离而产生。

[0117] 术语“皮下输注”指将药物在动物或人类受试者的皮肤下导入,优选在处于皮肤和下部组织之间的小囊内,通过由药物容器在一定时间期间内相对缓慢、持续不变的递送而导入,所述时间期间包括但不限于,30 分钟以内,或 90 分钟以内。任选地,输注可以通过皮下植入药物递送泵进行,其植入在动物或人类受试者的皮肤下方,其中所述泵在预定的时间期间内,如 30 分钟,90 分钟,或跨越治疗方案时长的时间期间内,递送预定量的药物。

[0118] 术语“皮下推注”指在动物或人类受试者的皮肤下进行药物施用,其中推注药物递送优选小于约 15 分钟,更优选小于 5 分钟,最优选小于 60 秒。施用优选地在皮肤和下部组织之间的小囊内进行,其中所述小囊,例如,通过捏起或拉起皮肤并与下部组织脱离产生。

[0119] “病症”是将通过使用抗体的治疗受益的任何病症。这包括慢性和急性的病症或疾病,包括那些使哺乳动物倾向于患有讨论的病症的病理学病症。本发明中治疗的病症的非限制性实例包括癌症;良性和恶性肿瘤;白血病和淋巴恶性病;神经元、神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑的和其它腺状、巨噬细胞、上皮细胞、间质和囊胚腔的病症;和炎症、血管发生和免疫学病症。

[0120] 术语“治疗有效量”指有效治疗哺乳动物中的疾病或病症的药物的量。在癌症的情形中,治疗有效量的药物可以减少癌细胞的数量;减少肿瘤尺寸;抑制(即,在某种程度上减缓并且优选地停止)癌细胞向外周器官的浸润;抑制(即,在某种程度上减缓并且优选地停止)肿瘤转移;在某种程度上抑制肿瘤生长;和/或在某种程度上减轻与病症相关的一种或多种症状。在药物可以防止生长和/或杀死已有的癌细胞的程度上,药物可能是抑制细胞生长的和/或细胞毒性的。对于癌症治疗,例如,体内功效可以通过评估存活的持续时间、无进展存活 (PFS) 的持续时间、响应率 (RR)、响应的持续时间、和/或生命质量而测量。

[0121] “治疗”指治疗性治疗和预防性或防范性措施。需要治疗的那些包括已经患有病症的那些以及要预防所述病症的那些。

[0122] 词语“标记”用在本发明中是指直接或间接与多肽缀合的可检测的化合物或组合物。所述标记可以本身是可检测的(例如,放射同位素标记或荧光标记),或者,在酶标记的情形中,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0123] II. 抗-VEGF 抗体和拮抗剂

[0124] (i) VEGF 抗原

[0125] 用于生产抗体的 VEGF 抗原可以是,例如,VEGF₁₆₅分子以及其它 VEGF 同种型或其包含所需要的表位的片段。有效用于产生本发明的抗-VEGF 抗体的其它形式的 VEGF 对于本领域的技术人员来说是清楚的。

[0126] 人 VEGF 通过首先使用牛 VEGF cDNA 作为杂交探针筛选由人细胞制备的 cDNA 文库而获得。Leung 等 (1989) Science (科学), 246:1306。由此鉴定的一种 cDNA 编码与牛 VEGF 具有大于 95% 同源性的 165 个氨基酸的蛋白;该 165 个氨基酸的蛋白通常称为人 VEGF (hVEGF) 或 VEGF₁₆₅。通过在哺乳动物宿主细胞中表达人 VEGF cDNA 而证实人 VEGF 的促有丝分裂活性。由转染了人 VEGF cDNA 的细胞调节的培养基促进毛细管内皮细胞的增殖,而对照细胞没有促进。Leung 等 (1989) Science (科学), 同上所述。进行其它的尝试来通过重组 DNA 技术克隆和表达 VEGF。(参见,例如, Ferrara, Laboratory Investigation (实验室研究) 72:615-618 (1995), 以及其中引用的参考文献)。

[0127] VEGF 在多种组织中表达为由交替的 RNA 剪接形成的多种同源二聚体形式(每个单体 121, 145, 165, 189, 和 206 个氨基酸)。VEGF₁₂₁是一种不与肝素结合的可溶的促分裂原;越长形式的 VEGF 以逐渐增高的亲和力结合肝素。肝素结合形式的 VEGF 可以通过纤溶酶在羧基端分解,从而释放可扩散形式的 VEGF。在纤溶酶分解后鉴定的羧基端肽的氨基酸序列为 Arg₁₁₀-Ala₁₁₁。氨基端“核心”蛋白, VEGF (1-110), 以同源二聚体分离,与完整的 VEGF₁₆₅同源二聚体相比,其以相似的亲和力结合中和单克隆抗体(诸如称为 4.6.1 和 3.2E3.1.1 的抗体)和可溶形式的 VEGF 受体。

[0128] 最近也已经鉴定了在结构上与 VEGF 相关的一些分子,包括胎盘生长因子 (PIGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 和 VEGF-E。Ferrara 和 Davis-Smyth (1987) Endocr. Rev., 同前所述; Ogawa 等 J. Biological Chem. (生物化学杂志) 273:31273-31281 (1998); Meyer 等 EMBO J. (胚胎学杂志), 18:363-374 (1999)。受体酪氨酸激酶 Flt-4 (VEGFR-3), 已被鉴定为关于 VEGF-C 和 VEGF-D 的受体。Joukov 等 EMBO J. (胚胎学杂志) 15:1751 (1996); Lee 等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 93:1988-1992 (1996); Achen 等 (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报) 95:548-553。已表明 VEGF-C 参与淋巴血管发生的调控。Jeltsch 等 Science (科学) 276:1423-1425 (1997)。

[0129] 已经鉴定了两种 VEGF 受体, Flt-1 (也称为 VEGFR-1) 和 KDR (也称为 VEGFR-2)。Shibuya 等 (1990) Oncogene (癌基因) 8:519-527; de Vries 等 (1992) Science (科学) 255:989-991; Terman 等 (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. (生物化学生物物理学研究通讯) 187:1579-1586。已表明神经毡蛋白-1 是一种选择性 VEGF 受体,其能够与肝素结合的 VEGF 同种型结合 (Soker 等 (1998) Cell (细胞) 92:735-45)。

[0130] (ii) 抗-VEGF 抗体

[0131] 有效用于本发明的方法的抗-VEGF 抗体包括以充分的亲和力和特异性结合 VEGF 并且可以减少或抑制 VEGF 的生物学活性的任何抗体、或其抗原结合片段。抗-VEGF 抗体通常不结合其它 VEGF 同源物,如 VEGF-B 或 VEGF-C,也不结合其它生长因子,如 PlGF,PDGF,或 bFGF。

[0132] 在本发明的某些实施方案中,抗-VEGF 抗体包括,但不限于,单克隆抗体,其与由杂交瘤 ATCC HB 10709 产生的单克隆抗-VEGF 抗体 A4.6.1 结合相同的表位;重组人源化抗-VEGF 单克隆抗体,其按照 Presta 等 (1997) Cancer Res. (癌症研究) 57:4593-4599 产生。在一个实施方案中,所述抗-VEGF 抗体是“贝伐珠单抗 (Bevacizumab) (BV)”,其也称为“rhuMAb VEGF”或“AVASTIN®”。其包括突变的人 IgG1 构架区和来自鼠抗-hVEGF 单克隆抗体 A.4.6.1 的抗原结合互补决定区,所述鼠抗-hVEGF 单克隆抗体 A.4.6.1 阻断人 VEGF 与其受体的结合。约 93% 的贝伐珠单抗氨基酸序列,包括大部分的构架区,来源于人 IgG1,并且约 7% 的序列来源于鼠抗体 A4.6.1。

[0133] 贝伐珠单抗 (AVASTIN®) 是由 FDA 核准的第一种抗血管发生治疗法,并且核准用于治疗转移性结肠直肠癌 (与基于静脉内 5-FU 的化学治疗联合的一线 and 二线治疗),晚期非鳞状、非小细胞肺癌 (NSCLC) (与卡铂和紫杉醇联合的对不可切除的、局部晚期、复发或转移性 NSCLC 的一线治疗) 和转移性 HER2- 阴性乳腺癌 (与紫杉醇联合治疗先前未治疗的、转移性 HER2- 阴性乳腺癌)。

[0134] 贝伐珠单抗和其它人源化抗-VEGF 抗体进一步记述在 2005 年 2 月 26 日授权的美国专利号 6,884,879 中。其它抗体包括 G6 或 B20 系列抗体 (例如, G6-31, B20-4.1), 其记述在 PCT 公布号 W02005/012359, PCT 公布号 W02005/044853, 和美国专利申请 60/991,302 中, 这些专利申请的内容通过引用清楚地结合在本文中。对于其它抗体, 参见美国专利号 7,060,269, 6,582,959, 6,703,020 ; 6,054,297 ; W098/45332 ; W096/30046 ; W094/10202 ; EP 0666868B1 ; 美国专利申请公布号 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409, 和 20050112126 ; 和 Popkov 等, Journal of Immunological Methods (免疫学方法杂志) 288:149-164 (2004)。其它抗体包括结合人 VEGF 上的功能性表位的那些, 所述人 VEGF 上的功能性表位包括残基 F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103, 和 C104, 或者备选地包括残基 F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 和 Q89。

[0135] 在本发明的一个实施方案中, 所述抗-VEGF 抗体具有包含下述氨基酸序列的重链可变区:

[0136] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW

[0137] INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP

[0138] HYYGSSHWFY DVWGQGTLLV TSS (SEQ ID No. 1)

[0139] 和具有包含下述氨基酸序列的轻链可变区:

[0140] DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT TCSASQDIS NYLNWYQQKPK GKAPKVLIIYF

[0141] TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGG

[0142] GTKVEIKR (SEQ ID No. 2).

[0143] 本发明所述的“G6 系列抗体”是来源于 PCT 公布号 W02005/012359 的图 7, 24-26, 和 34-35 中任一附图所述的 G6 抗体序列或 G6- 来源的抗体序列的抗-VEGF 抗体, 所述 PCT 申请公布的完整内容通过引用清楚地结合在本文中。还参见 PCT 公布号 W02005/044853, 其

完整内容通过引用清楚地结合在本文中。在一个实施方案中, G6 系列抗体结合人 VEGF 上包含残基 F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 和 Q89 的功能性表位。

[0144] 本发明所述的“B20 系列抗体”是来源于 PCT 公布号 W02005/012359 的图 27-29 中任一附图所述的 B20 抗体序列或 B20- 来源的抗体序列的抗-VEGF 抗体, 所述 PCT 申请公布的完整内容通过引用清楚地结合在本文中。还参见 PCT 公布号 W02005/044853 和美国专利申请 60/991, 302, 其完整内容通过引用清楚地结合在本文中。在一个实施方案中, B20 系列抗体结合人 VEGF 上包含残基 F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103, 和 C104 的功能性表位。

[0145] 本发明所述的“功能性表位”是指积极有助于抗体结合的抗原氨基酸残基。抗原的积极帮助性的残基中任一个的突变(例如, 野生型 VEGF 的丙氨酸突变或同源突变)将破坏抗体的结合, 以使抗体的相对亲和力比例(IC₅₀ 突变 VEGF/IC₅₀ 野生型 VEGF) 大于 5(参见 W02005/012359 的实施例 2)。在一个实施方案中, 通过溶液结合的噬菌体展示 ELISA 确定相对亲和力比例。简言之, 将 96-孔 Maxisorp 免疫板(NUNC)用在 PBS 中浓度为 2 μ g/ml 的待检测的 Fab 形式的抗体在 4 $^{\circ}$ C 包被过夜, 并且在室温下用 PBS, 0.5% BSA, 和 0.05% 吐温 20(PBT) 封闭 2 小时。将在 PBT 中的噬菌体展示 hVEGF 丙氨酸点突变体(残基 8-109 形式)或野生型 hVEGF(8-109)的连续稀释液首先在室温下在 Fab-包被的板上温育 15 分钟, 将板用 PBS, 0.05% 吐温 20(PBST) 洗涤。结合的噬菌体用在 PBT 中 1 : 5000 稀释的抗-M13 单克隆抗体辣根过氧化物酶(Amersham Pharmacia)缀合物检测, 用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB, Kirkegaard & Perry Labs, Gaithersburg, MD)底物显色约 5 分钟, 用 1.0M H₃PO₄ 淬灭, 并且在 450nm 分光光度计读取。IC₅₀ 值的比例(IC₅₀, ala/IC₅₀, wt)表示结合亲和力减少的倍数(相对结合亲和力)。

[0146] (iii) VEGF 受体分子

[0147] 两种最佳表征的 VEGF 受体为 VEGFR1(也称为 Flt-1)和 VEGFR2(关于鼠同源物也称为 KDR 和 FLK-1)。每种受体针对每种 VEGF 家族成员的特异性不同, 但是 VEGF-A 结合 Flt-1 和 KDR 二者。Flt-1 和 KDR 属于受体酪氨酸激酶(RTKs)家族。RTKs 包括具有多样生物学活性的跨膜受体大家族。已经鉴定了至少十九种(19 种)不同的 RTK 亚家族。受体酪氨酸激酶(RTK)家族包括对多种细胞类型的生长和分化非常关键的受体(Yarden 和 Ullrich(1988)Ann. Rev. Biochem. (生物化学年度综述)57:433-478; Ullrich 和 Schlessinger(1990)Cell(细胞)61:243-254)。当配体结合时, RTKs 固有的功能被激活, 这导致受体和多种细胞底物的磷酸化, 并且随后导致多种细胞反应(Ullrich & Schlessinger(1990)Cell(细胞)61:203-212)。因此, 通过与特异性生长因子(配体)的细胞外相互作用, 典型地然后是受体二聚化, 刺激固有的蛋白酪氨酸激酶活性和受体转磷酸作用而起始受体酪氨酸激酶介导的信号转导。由此产生用于细胞内信号转导分子的结合位点, 并且导致形成具有促进适当的细胞反应的细胞质信号传导分子光谱的复合物。(例如, 细胞分裂, 分化, 代谢作用, 细胞外微环境的改变)。参见, Schlessinger 和 Ullrich(1992)Neuron(神经元)9:1-20。在结构上, Flt-1 和 KDR 在细胞外结构域具有 7 个免疫球蛋白样结构域, 单个跨膜区, 和由激酶-插入物结构域中断的共有的酪氨酸激酶序列。Matthews 等(1991)Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国国家科学院学报)88:9026-9030; Terman 等(1991)Oncogene(癌基因)6:1677-1683。细胞外结构域参与 VEGF 结合, 并且细胞内结构域参与信

号转导。

[0148] 特异性结合 VEGF 的 VEGF 受体分子或其片段可以用于本发明的方法,以结合并且螯合 VEGF 蛋白,由此防止其信号传导。在某些实施方案中,所述 VEGF 受体分子、或其 VEGF 结合片段是可溶形式,如 sFlt-1。可溶形式的受体通过与 VEGF 结合表现出对 VEGF 蛋白的生物学活性的抑制作用,由此防止其与其在靶细胞表面上存在的天然受体结合。还包括 VEGF 受体融合蛋白,其实例在下文中描述。

[0149] 嵌合 VEGF 受体蛋白是具有来源于至少两种不同蛋白的氨基酸序列的受体分子,其中至少一种蛋白是 VEGF 受体蛋白(例如,flt-1 或 KDR 受体),其能够结合 VEGF 并且抑制 VEGF 的生物学活性。在某些实施方案中,本发明的嵌合 VEGF 受体蛋白由仅来源于两种不同的 VEGF 受体分子的氨基酸序列组成;然而,包含来自 flt-1 和 / 或 KDR 受体的细胞外配体结合区的一个、两个、三个、四个、五个、六个、或全部七个 Ig 样结构域的氨基酸序列可以与来自其它不相关蛋白如免疫球蛋白序列的氨基酸序列连接。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来说是显而易见的。嵌合 VEGF 受体蛋白的实例包括,例如,可溶性 Flt-1/Fc, KDR/Fc, 或 FLt-1/KDR/Fc(也称为 VEGF Trap)。(例如,参见, PCT 申请公布号 W097/44453)。

[0150] 本发明的可溶性 VEGF 受体蛋白或嵌合 VEGF 受体蛋白包括不通过跨膜结构域固定在细胞表面上的 VEGF 受体蛋白。因此,可溶形式的 VEGF 受体,包括嵌合受体蛋白,尽管能够结合并且使 VEGF 失活,但是不包括跨膜结构域,并且因此通常不与表达所述分子的细胞的细胞膜相缔合。

[0151] III. 抗 -VEGF 抗体的治疗应用和组合

[0152] 本发明包括抗血管发生治疗,其作为一种新型癌症治疗策略,目的在于抑制为支持肿瘤生长提供营养所需要的肿瘤血管的发育。由于血管发生参与原发瘤生长和转移,本发明所提供的抗血管发生治疗能够在原发部位抑制肿瘤的瘤性生长,并且在继发部位防止肿瘤的转移,因此允许通过其它治疗法攻击肿瘤。

[0153] 具体地,本发明提供治疗诊断患有先前未治疗的转移性乳腺癌的受试者的方法,所述方法包括对所述受试者实施联合有效量的至少一种化疗剂和抗 -VEGF 抗体的治疗方案,其中所述受试者没有接受任何用于局部复发的或转移性乳腺癌的化学治疗。任选地,所述受试者自最后一次给药小于或等于 12 个月复发时没有接受预先的辅助化学治疗。联合化学治疗和施用抗 -VEGF 的治疗方案有效延长了受试者的无进展存活 (PFS)。本发明还提供抗 -VEGF 抗体与至少一种化疗剂在制备用于治疗受试者中先前未治疗的转移性乳腺癌的药物中的应用,其中所述受试者没有接受任何用于局部复发的或转移性乳腺癌的化学治疗。任选地,所述受试者自最后一次给药小于或等于 12 个月复发时没有接受预先的辅助化学治疗。抗 -VEGF 和化疗剂的应用有效延长受试者的无进展存活 (PFS)。本发明还提供抗 -VEGF 抗体,其用于治疗受试者中局部复发的或转移性乳腺癌的方法,所述方法包括对受试者实施联合有效量的至少一种化疗剂和抗 -VEGF 抗体的治疗方案,其中所述受试者没有接受任何用于局部复发的或转移性乳腺癌的化学治疗。任选地,所述受试者自最后一次给药小于或等于 12 个月复发时没有接受预先的辅助化学治疗。抗 -VEGF 和化疗剂的应用有效延长受试者的无进展存活 (PFS)。在某些实施方案中,本发明的任何方法、应用和组合中,实施化学治疗和施用抗 -VEGF 抗体具有与先前的贝伐珠单抗试验结果(参见,例如,

贝伐珠单抗产品插页)相一致的安全性模式。

[0154] 在本发明的一些实施方案中,受试者是 HER2 阴性的。在本发明的一些实施方案中,受试者是 HER2 阳性的。公认 HER2 在某些乳腺癌中是重要的前兆性和预兆性因子。参见,例如,Slamon DJ,等 Science(科学). 1989 ;244 :707-712 ;和 **Sjögren S**,等 J Clin Oncol. (临床肿瘤学杂志)1998 ;16 :462-469。HER2 基因扩增是一种持久的基因改变,导致连续的 HER2 受体(HER2 蛋白)的过表达。参见,例如,Simon R,等 J Natl Cancer Inst. (国家癌症研究杂志)2001 ;93 :1141-11465 ;和 Sliwkowski MX,等 Semin Oncol. (肿瘤学研讨会)1999 ;26(suppl 12) :60-70。一些研究已经表明,HER2 过表达(基因本身的多余拷贝,或过量的基因的蛋白产物)与减少的整体存活相关。参见,例如,Slamon DJ,等 Science(科学). 1987 ;235 :177-182 ;和 Paik S,等 J Clin Oncol. (临床肿瘤学杂志)1990 ;8 :103-112。一些商业测定可用来确定 HER2 状态,例如,用于蛋白的 HercepTest[®]和 Pathway[™]以及用于基因改变的 PathVysion[®]和 HER2FISH pharmDx[™]。

[0155] 联合治疗

[0156] 本发明描述组合至少一种 VEGF 特异性拮抗剂与一种或多种另外的抗癌治疗的应用或组合物。抗癌治疗的实例包括但不限于,手术,放射线治疗(放射性治疗),生物治疗,免疫治疗,化学治疗,或这些治疗的组合。另外,细胞毒性试剂,抗血管发生和抗增生试剂可以与 VEGF 特异性拮抗剂联合使用。

[0157] 在任意所述方法和应用的某些方面中,本发明提供乳腺癌治疗,其通过向易患、或诊断患有局部复发的或先前未治疗的转移性乳腺癌的受试者施用有效量的抗-VEGF 抗体和一种或多种化疗剂。多种化疗剂可以用于本发明的联合治疗方法和应用。所涉及的化疗剂的示例性和非限制性列表在本文中在“定义”部分提供,或在本文中描述。

[0158] 在一个实施例中,本发明描述 VEGF- 特异性拮抗剂与一种或多种化疗剂(例如,混合剂)或其任意组合的方法和应用。在某些实施方案中,所述化疗剂为,例如,卡培他滨,紫杉烷,蒽环霉素,紫杉醇,多西他赛,紫杉醇蛋白-结合的粒子(例如,Abraxane[®]),多柔比星,表柔比星,5- 氟尿嘧啶,环磷酰胺或它们组合的治疗。在某些实施方案中,VEGF 拮抗剂(例如,抗-VEGF 抗体)与拉帕替尼(lapatinib)(Tykerb[®])组合。组合的施用包括使用独立的制剂或单一药物制剂进行的同时施用,和以任意顺序进行的连续施用,其中优选地存在一定的时间期间,此时两种(或全部)活性试剂同时发挥其生物学活性。关于所述化疗剂的制剂和给药时间方案可以按照供应商的说明书进行或由有经验的执业者凭经验确定。关于化学治疗的制剂和给药时间方案也记述在 Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992) 中。化疗剂可以在施用 VEGF- 特异性拮抗剂之前或之后,或可以与其同时给予。

[0159] 在任意所述方法和应用的一些其它方面中,有效用于使用本发明的抗体的联合肿瘤治疗的其它治疗剂包括参与肿瘤生长的其它因子如 EGFR, ErbB2(也称为 Her2), ErbB3, ErbB4, 或 TNF 的拮抗剂。有时,还向受试者施用一种或多种细胞因子也可能是有益的。在一个实施方案中,VEGF 抗体与生长抑制剂同时施用。例如,可以先施用生长抑制剂,然后施用 VEGF 抗体。然而,也考虑了同时施用或先施用 VEGF。生长抑制剂的适当的剂量是目前使用的那些剂量,并且由于生长抑制剂和抗-VEGF 抗体的联合作用(协同性)可以降低。

[0160] 本发明的制剂还可以包含多于一种所治疗的具体适应症所需要的活性化合物,优

选具有彼此没有不利影响的补充活性的那些化合物。例如,可以理想地在一种制剂中进一步提供结合 EGFR, VEGF (例如,结合 VEGF 上的不同表位或相同表位的抗体), VEGFR, 或 ErbB2 (例如, Herceptin®) 的抗体。备选地,或另外,所述组合物可以包含细胞毒性试剂,细胞因子,生长抑制剂和 / 或 VEGFR 拮抗剂。所述分子适当地以有效用于意欲目的的量存在于组合中。

[0161] 在任意所述方法和应用的某些方面中,有效用于使用本发明的抗体的联合癌症治疗的其它治疗剂包括其它抗血管发生试剂。在本领域中已经鉴定了多种抗血管发生试剂并且是已知的,包括 Carmeliet 和 Jain(2000) 所列出的那些。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(如 VEGF 变体,可溶性 VEGF 受体片段,能够阻断 VEGF 或 VEGFR 的适体,中和抗-VEGFR 抗体, VEGFR 酪氨酸激酶低分子量抑制剂以及它们的组合)组合使用。备选地,或另外地,两种或多种抗-VEGF 抗体可以同时施用给受试者。

[0162] 为了预防或治疗疾病, VEGF- 特异性拮抗剂的适当剂量取决于要治疗的疾病(如上文定义)的类型,疾病的严重性和病程,所述 VEGF- 特异性拮抗剂是否为预防或治疗目的而施用,先前的治疗,受试者的临床病史和针对 VEGF- 特异性拮抗剂的反应,和主治医师的判断。 VEGF- 特异性拮抗剂适当地以一次或一系列治疗施用给受试者。在联合治疗方案中,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。当用于本文时,治疗有效量是这样的,以使 VEGF- 特异性拮抗剂和一种或多种其它治疗剂的共同施用,或本发明的组合物的施用,导致上文所述的癌症的减轻或抑制。治疗协同量是协同性或显著减轻或消除与具体疾病相关的病症或症状所需要的 VEGF- 特异性拮抗剂和一种或多种其它治疗剂的量。

[0163] VEGF- 特异性拮抗剂和一种或多种其它治疗剂可以以足以减少或消除肿瘤、静止瘤或微转移的发生或复发的量和时间同时施用或先后施用。 VEGF- 特异性拮抗剂和一种或多种其它治疗剂可以作为维持治疗施用,以预防或减少肿瘤复发的可能性。

[0164] 本领域普通技术人员应该明白,化疗剂或其它抗癌剂的适当的剂量通常约为临床治疗中已经使用的那些剂量,例如,在化学治疗单独实施或与其它化学治疗联合实施的情形中。取决于被治疗的病症,可能发生剂量改变。实施治疗的医师能够确定用于个体受试者的适当剂量。

[0165] 除了上述治疗方案,受试者可以进行放射性治疗。

[0166] 在任意所述方法、应用和组合物的某些实施方案中,所施用的 VEGF 抗体是完整的、裸露的抗体。然而,所述 VEGF 抗体可以与细胞毒性试剂缀合。在任意所述方法、应用和组合物的某些实施方案中,细胞将所缀合的抗体和 / 或其所结合的抗原内在化,这导致所述缀合物在杀死其所结合的癌细胞中具有增加的治疗功效。在一个实施方案中,所述细胞毒性试剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。所述细胞毒性试剂的实例包括美坦生类化合物(maytansinoids),加利车霉素(calicheamicins),核糖核酸酶和 DNA 核酸内切酶。

[0167] 本发明还描述通过提供接受使用抗-VEGF 抗体的治疗的指示而指导患有乳腺癌的人类受试者或保健护理者的方法,从而增加无进展存活的时间,降低受试者癌症复发的危险或增加受试者存活的可能性。在一些实施方案中,所述方法还包括提供接受使用至少一种化疗剂的治疗的指示。使用抗-VEGF 抗体的治疗可以与使用化疗剂的治疗同时进行或

先后进行。在某些实施方案中,受试者按照指导方法所指示那样进行治疗。通过与或不与化学治疗一起施用抗-VEGF 抗体治疗乳腺癌可以持续到癌症复发或死亡。

[0168] 本发明还提供推广方法,所述方法包括推广施用抗-VEGF 抗体,用于治疗人类受试者中的乳腺癌。在一些实施方案中,所述方法还包括推广至少一种化疗剂的施用。施用抗-VEGF 抗体可以与施用化疗剂同时进行或先后进行。推广可以通过任何可用的方式进行。在一些实施方案中,推广可以通过抗-VEGF 抗体商业化制剂所附有的包装插页进行。推广还可以通过化疗剂的商业化制剂所附有的包装插页进行。推广可以通过与医师或保健护理者的书面或口头交流进行。在一些实施方案中,推广可以通过包装插页进行,其中包装插页提供接受使用抗-VEGF 抗体的乳腺癌治疗的指示。在另外的实施方案中,包装插页包括实施例 1 的一些或全部结果。在一些实施方案中,推广在使用与或不与化疗剂一起的抗-VEGF 抗体治疗受试者之前进行。

[0169] 本发明提供一种商业方法,所述方法包括市场化抗-VEGF 抗体,用于治疗人类受试者中的乳腺癌,从而增加受试者无进展存活的时间,减少受试者癌症复发的可能性或增加受试者存活的可能性。在一些实施方案中,所述方法还包括市场化与抗-VEGF 抗体组合使用的化疗剂。在一些实施方案中,市场化在使用与或不与化疗剂一起的抗-VEGF 抗体治疗受试者之前进行。

[0170] 本发明还提供一种商业方法,所述方法包括市场化与抗-VEGF 抗体组合的化疗剂,用于治疗人类受试者中的乳腺癌,从而增加受试者的无进展存活的时间,减少受试者癌症复发的可能性或增加受试者存活的可能性。在一些实施方案中,市场化在使用化疗剂与抗-VEGF 抗体组合治疗受试者之前进行。

[0171] IV. 剂量和持续时间

[0172] 可以与优良医学实践一致的方式配制、剂量给药和施用 VEGF 特异性拮抗剂组合物。在此情形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、受试者个体的临床状态、病症的起因、递送药剂的部位、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。通过所述考虑确定待施用的 VEGF 特异性拮抗剂的“治疗有效量”,这是预防、缓解或治疗或稳定癌症所需的最小量;是增加进展前时间(无进展存活持续的时间)或治疗或防止肿瘤、静止瘤、或微转移的发生或复发所需的最小量。VEGF 特异性拮抗剂不是必需而是任选与目前用于预防或治疗癌症或发生癌症的风险的一种或多种药剂一起配制。此类其它药剂的有效量取决于制剂中存在的 VEGF 特异性拮抗剂的量、病症或治疗的类型、和上文讨论的其它因素。这些通常是以与上文所用相同剂量和施用途径使用,或是迄今所用剂量的大约 1-99%。

[0173] 取决于疾病的类型和严重性,对于施用给受试者,约 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ - 100mg/kg (例如, 0.1 - 20mg/kg) VEGF- 特异性拮抗剂是起始候选剂量,例如,而不管是通过一次或多次分开的施用,还是通过连续的输注。典型的每日剂量可以在约 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ - 约 100mg/kg 或更多的范围内,这取决于上述提及的因素。特别理想的剂量包括,例如, 5mg/kg , 7.5mg/kg , 10mg/kg , 和 15mg/kg 。对于数天或更久时间的重复施用,取决于病症,治疗维持至癌症被治疗,如通过上述方法或本领域已知的方法测量的。然而,可以使用其他剂量方案。在一个实施例中,如果所述 VEGF- 特异性拮抗剂是抗体,则本发明的抗体每周施用一次,每两周一次,或每三周一次,以约 5mg/kg - 约 15mg/kg 范围内的剂量施用,所述剂量包括但不限于, 5mg/kg , 7.5mg/

kg, 10mg/kg 或 15mg/kg。本发明的治疗的进展易于通过常规技术和测定法监测。在其它实施方案中,所述给药方案与化学治疗方案联合用作治疗局部复发的或转移性乳腺癌的一线治疗。关于适当的剂量的进一步的信息在下述实施例中提供。

[0174] 治疗的持续时间将继续至医学指示的那样久或至获得理想的治疗效果(例如,本文所述的那些)。在某些实施方案中,所述 VEGF- 特异性拮抗剂治疗持续 1 个月,2 个月,4 个月,6 个月,8 个月,10 个月,1 年,2 年,3 年,4 年,5 年,或直至受试者寿命年限的期间。

[0175] 本发明的 VEGF- 特异性拮抗剂依照已知的方法施用给受试者,例如人类受试者,诸如,作为推注或通过一段时间的连续输注的静脉内施用,通过肌肉内的、腹膜内的、脑脊内的、皮下的、关节内的、滑膜内的、鞘内的、口腔的、局部的、或吸入途径。如果广泛的副作用或毒性与 VEGF 拮抗剂相关,局部施用可以是特别期望的。先体外后体内(ex vivo)策略也可在治疗性应用中使用。先体外后体内策略涉及用编码 VEGF 拮抗剂的多核苷酸转染或转导从受试者获得的细胞。该转染或转导的细胞然后回输至受试者。该细胞可以是许多类型的任一种,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、角质细胞或肌细胞。

[0176] 例如,如果所述 VEGF- 特异性拮抗剂是抗体,则所述抗体通过任何适当的方式施用,包括肠胃外、皮下、腹膜内、肺内、和鼻内,并且,如果需要用于局部的免疫抑制治疗,则通过损伤内施用。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下施用。另外,所述抗体适当地通过脉冲输注(pulse infusion)施用,特别是使用递减的抗体剂量。优选地,给药通过注射进行,最优选地通过静脉内或皮下注射,这部分取决于所述施用是短暂的还是长时间的。

[0177] 在另一个实施例中,当病症或肿瘤的部位允许时,VEGF- 特异性拮抗剂化合物局部施用,例如,通过直接的注射进行,并且所述注射可以周期性重复进行。VEGF- 特异性拮抗剂还可以系统递送至受试者或直接递送至肿瘤细胞,例如,至肿瘤或手术切除肿瘤后的瘤床,例如,从而防止或减少静止瘤或微转移的局部复发或转移。

[0178] 备选地,可以将包含编码 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递送至受试者中适当的细胞。在某些实施方案中,可以将核酸靶向肿瘤本身。

[0179] 可以通过适于所用的载体的任何方式将核酸引入细胞中。多种所述方法在本领域中是公知的(Sambrook 等,同前所述,和 Watson 等,Recombinant DNA,第 12 章,第 2 版,Scientific American Books,1992)。基因递送的方法实例包括脂质体介导的转染、电穿孔、磷酸钙/DEAE 葡聚糖方法、基因枪、和显微注射。

[0180] V. 药物制剂

[0181] 按照本发明使用的试剂(例如,抗体)的治疗性制剂通过将具有所需纯度的抗体与任选的药用载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药典)第 16 版,Osol, A. Ed. (1980))混合而制备成冻干制剂或水溶液的形式用于储存。可用的载体、赋形剂、或稳定剂在所用的剂量和浓度对受体是无毒的,并且其包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸;抗氧化剂,其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(octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride);六甲氯铵(hexamethonium chloride);苯扎氯铵(benzalkonium chloride),苯索氯胺(benzethonium chloride);苯酚,丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯(alkyl

parabens) 如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚 (catechol);间苯二酚 (resorcinol);环己醇;3-戊醇;和间甲酚 (m-cresol));低分子量(小于约 10 个残基)多肽;蛋白,诸如血清白蛋白,明胶,或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone);氨基酸,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,如 EDTA;糖,如蔗糖,甘露醇,海藻糖或山梨醇;形成盐的反离子,如钠;金属络合物(例如 Zn-蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂如 TWEEN™, PLURONICS™或聚乙二醇 (PEG)。冻干的抗-VEGF 抗体制剂记述在 WO 97/04801 中,其通过引用清楚地结合在本文中。

[0182] 任选地,但是优选地,所述制剂包含药用盐,典型地,例如,氯化钠,并且优选地以大约生理浓度存在。任选地,本发明的制剂可以包含药用防腐剂。在一些实施方案中,防腐剂的浓度在 0.1-2.0%,典型地为 v/v 浓度。合适的防腐剂包括制药领域已知的那些。苯甲醇、苯酚、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实例。任选地,本发明的制剂可以包括浓度为 0.005-0.02% 的药用表面活性剂。

[0183] 典型地,贝伐珠单抗以 100mg 和 400mg 不含防腐剂、单次用小瓶提供用于治疗应用,以递送 4ml 或 16ml 的贝伐珠单抗 (25mg/ml)。将 100mg 产品配制在 240mg α , α -无水海藻糖,23.2mg 磷酸钠(一元碱,一水合物),4.8mg 磷酸钠(二元碱,无水),1.6mg 聚山梨酸酯 20,和注射用水,USP 中。将 400mg 产品配制在 960mg α , α -无水海藻糖,92.8mg 磷酸钠(一元碱,一水合物),19.2mg 磷酸钠(二元碱,无水),6.4mg 聚山梨酸酯 20,和注射用水,USP 中。也参见贝伐珠单抗的标签。

[0184] 当对于被治疗的具体适应症所需要时,本发明的制剂也可以包含多于一种活性化合物,优选具有彼此没有不利影响的补充活性的那些。例如,可以理想地在一种制剂中进一步提供结合 EGFR, VEGF(例如,结合 VEGF 上的不同表位的抗体), VEGFR,或 ErbB2(例如, Herceptin®) 的抗体。备选地,或另外地,所述组合物可以包含细胞毒性试剂,细胞因子,生长抑制剂和/或 VEGFR 拮抗剂。所述分子适当地以有效用于意欲的目的的量组合存在。

[0185] 活性成分也可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合作用制备的微胶囊中,,例如,分别在羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中,包埋在胶质药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微胶囊、微乳状液、纳米粒子和纳米胶囊)中或包埋在粗乳状液中。Remington's Pharmaceutical Sciences(雷明顿药典)第 16 版, Osol, A. Ed. (1980) 公开了所述技术。

[0186] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适的实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述基质采用定形物品的形式,例如,薄膜、或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如,聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯),或聚(乙烯醇)),聚交酯(美国专利号 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酯(ethylene-vinyl acetate),可降解的乳酸-乙醇酸共聚物如 LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的注射用微球体),和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。尽管聚合物如乙烯乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸能够在 100 天以上释放分子,但是某些水凝胶在较短的时间期间内释放蛋白质。当包封的抗体长时间保留在体内时,由于在 37°C 暴露于水分,它们可能变性或聚集,导致生物学活性的丧失和可能的免疫原性改变。依赖于所涉及的机制,可以设计合理的稳定性策略。例如,如果发现聚集机制是由于通过巯基-二硫键互换形成成分

子间 S-S 键, 可以通过修饰巯基残基, 由酸性溶液冻干, 控制含水量, 使用适当的添加剂, 和开发特异性聚合物基质组合物而实现稳定。

[0187] 用于体内施用的制剂可以是无菌的。这容易通过经由无菌过滤膜过滤而实现。

[0188] VI. 治疗功效

[0189] 本发明提供的任意方法、应用和组合物的主要优点在于在人类受试者中产生显著的抗癌作用而不引起显著的毒性或不利作用的能力, 以使所述受试者全面由治疗受益。在任意所述方法、应用或组合物的一个实施方案中, 安全性模式与先前的贝伐珠单抗 III 期研究相当。本发明的治疗的功效可以通过评价癌症治疗常用的多种终点进行检测, 包括但不限于, 肿瘤消退, 肿瘤重量或尺寸缩小, 进展时间, 存活持续时间, 无进展存活, 整体响应率, 响应的持续时间, 和生命质量。由于本发明的抗血管发生剂靶向肿瘤血管并且不必是肿瘤细胞本身, 它们代表了一类特有的抗癌药, 并且因此可以需要特有的针对药物的临床响应的测量和定义。例如, 在二维分析中大于 50% 的肿瘤缩小是表明有响应的标准截点 (cut-off)。然而本发明的抗-VEGF 抗体可以引起对转移扩散的抑制, 而不使原发瘤缩小, 或可以仅发挥肿瘤静止作用。因此, 应该使用新的确定抗血管发生治疗功效的方法, 包括, 例如, 测量血浆或尿血管发生的标记和通过放射线成像测量响应。

[0190] 在另一个实施方案中, 本发明提供用于增加易患癌症或诊断患有癌症的人类受试者的无进展存活的方法。疾病进展的时间定义为从施用药物到疾病进展或死亡的时间。在优选实施方案中, 当与仅用化学治疗的治疗相比时, 本发明使用抗-VEGF 抗体和一种或多种化疗剂的联合治疗显著提高无进展的存活至少约 1 个月, 1.2 个月, 2 个月, 2.4 个月, 2.9 个月, 3.5 个月, 优选地约 1 个月 - 约 5 个月。在一个实施方案中, 在使用贝伐珠单抗和紫杉烷治疗 (例如, 多西他赛或紫杉醇蛋白-结合的粒子 (例如, Abraxane®)) / 蒽环霉素治疗 (例如, 多柔比星, 表柔比星或它们的组合) 治疗的受试者中, 以月为单位的 PFS 中值 (95% CI) 为 9.2 个月 (8.6, 10.1), 相比较而言, 不使用贝伐珠单抗的紫杉烷 / 蒽环霉素治疗为 8.0 个月 (6.7, 8.4), HR (95% CI) 0.644 (0.522, 0.795), p-值 (log-rank) 小于 0.0001。在一个实施方案中, 在使用贝伐珠单抗和紫杉烷 / 蒽环霉素治疗的受试者中的 PFS 是 10.7 个月, 相比较而言, 在使用安慰剂和紫杉烷 / 蒽环霉素治疗的受试者中是 8.3 个月。在一个实施方案中, 在使用贝伐珠单抗和卡培他滨治疗的受试者中, 以月为单位的 PFS 中值 (95% CI) 是 8.6 个月 (8.1, 9.5), 相比较而言, 不使用贝伐珠单抗的卡培他滨治疗中为 5.7 个月 (4.3, 6.2), HR (95% CI) 0.688 (0.564, 0.840), p-值 (log-rank) 0.0002。在一个实施方案中, 在使用贝伐珠单抗和卡培他滨治疗的受试者中的 PFS 是 9.7 个月, 相比较而言, 在使用安慰剂和卡培他滨治疗的受试者中是 6.2 个月。

[0191] 在另一个实施方案中, 在使用多种治疗法进行治疗的易患癌症或诊断患有癌症的一组人类受试者中, 本发明的治疗显著提高响应率。响应率定义为响应治疗的被治疗受试者的百分数。在一个方面中, 与仅有化学治疗法治疗的组相比, 本发明的使用抗-VEGF 抗体和一种或多种化疗剂的联合治疗显著提高被治疗的受试者组中的响应率。

[0192] 在一个方面中, 本发明提供用于增加易患癌症或诊断患有癌症的人类受试者或人类受试者组中的响应的持续时间的办法。响应的持续时间定义为从初始响应到疾病进展的时间。

[0193] 在一个实施方案中, 本发明可以用于增加易患癌症或诊断患有癌症的人类受试者

的存活持续时间。

[0194] VII. 抗体生产

[0195] (i) 多克隆抗体

[0196] 多克隆抗体优选地在动物中通过多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射相关的抗原或佐剂而产生。使用双功能或衍生剂,例如,马来酰亚胺苯甲酰硫代琥珀酰亚胺酯 (maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester) (通过半胱氨酸残基缀合),N-羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基),戊二醛,琥珀酸酐,SOCl₂,或 R¹N = C = NR,其中 R 和 R¹是不同的烷基基团,将相关抗原缀合到在被免疫的物种中是免疫原性的蛋白上可能是有效的,所述蛋白例如,匙孔蛾血蓝蛋白,血清白蛋白,牛甲状腺球蛋白,或大豆胰岛素抑制剂,

[0197] 将动物针对抗原、免疫原性缀合物、或衍生物进行免疫,例如,通过组合 100 μg 或 5 μg 蛋白或缀合物 (分别用于兔或小鼠) 与 3 倍体积的弗氏完全佐剂,并且在多个部位皮内注射该溶液进行。一月后,将动物用在弗氏完全佐剂中的 1/5 至 1/10 初始量的肽或缀合物通过在多个部位的皮下注射进行加强。7-14 天后,对动物采血,并且检测血清的抗体滴度。对动物进行加强直至滴度达到稳定水平。优选地,将动物用相同抗原但是与不同蛋白缀合和 / 或通过不同的交联剂缀合的缀合物进行加强。缀合物也可以在重组细胞培养物中作为蛋白融合体制备。此外,适合使用聚集试剂如矾来增强免疫反应。

[0198] (ii) 单克隆抗体

[0199] 本文中制备单克隆抗体的多种方法在本领域中是可用的。例如,单克隆抗体可以使用最初由 Kohler 等, Nature (自然), 256 :495 (1975) 描述的杂交瘤技术、或通过重组 DNA 方法 (美国专利号 4,816,567) 制备。

[0200] 在杂交瘤方法中,将小鼠或其它适当的宿主动物,如仓鼠或猕猴,按上述免疫,以激发产生或能够产生特异性结合免疫所用的蛋白的抗体的淋巴细胞。备选地,淋巴细胞可以在体外免疫。然后,使用适当的融合剂,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 (单克隆抗体 : 原理与实践), 第 59-103 页 (Academic Press, 1986))。

[0201] 将这样制备的杂交瘤接种和生长在适当的培养基中,所述培养基优选地包含一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或存活物质。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺少这样的酶,即次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT 或 HPRT),则用于杂交瘤的培养基典型地将包括次黄嘌呤、氨基蝶呤、和胸苷 (HAT 培养基),所述物质防止 HGPRT- 缺陷型细胞生长。

[0202] 优选的骨髓瘤细胞是通过所选择的生产抗体的细胞有效融合、支持稳定的高水平抗体生产、并且对诸如 HAT 培养基的培养基敏感的那些细胞。其中,优选的骨髓瘤细胞系是鼠骨髓瘤株系,诸如来源于 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤的那些,其可从美国加利福尼亚州圣地亚哥的 Salk 细胞配送中心研究所 (Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA) 获得,以及 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞,其可从美国马里兰州 Rockville 的美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA) 获得。也记述了人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系用于生产人单克隆抗体 (Kozbor, J. Immunol. (免疫学杂志), 133 :3001 (1984) ; Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications (单克隆抗体生产技术和应用), 第

51-63 液 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0203] 检测杂交瘤细胞生长的培养基以检测针对所述抗原的单克隆抗体的生产。优选地,通过免疫沉淀或通过体外结合测定,诸如放射性免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA),来确定由杂交瘤细胞生产的单克隆抗体的结合特异性。

[0204] 在鉴定了生产具有所需要的特异性、亲和性和 / 或活性的抗体的杂交瘤细胞后,可以通过有限的稀释步骤亚克隆该克隆,并且通过标准方法 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (单克隆抗体: 原理和实践), 第 59-103 页 (Academic Press, 1986)) 生长。适用于该目的的培养基包括,例如, D-MEM 或 RPMI-1640 培养基。另外,杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水瘤体内生长。

[0205] 通过常规免疫球蛋白纯化方法,诸如例如,蛋白质 A- 琼脂糖、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析、或亲和层析,适当从培养基、腹水液、或血清分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。

[0206] 编码所述单克隆抗体的 DNA 容易使用常规方法 (例如,通过使用能够特异性结合编码所述单克隆抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针) 分离和测序。该杂交瘤细胞作为所述 DNA 的优选来源。当分离后,可以将 DNA 置于表达载体中,然后将载体转染到宿主细胞如大肠杆菌 (*E. coli*) 细胞、猿猴 COS 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、或不另外产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。抗体的重组生产将在下文中更详细的描述。

[0207] 在另一个实施方案中,抗体或抗体片段可以由使用 McCafferty 等, Nature (自然), 348 :552-554 (1990) 所述的技术产生的抗体噬菌体文库中分离。Clackson 等, Nature (自然), 352 :624-628 (1991) 和 Marks 等, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志), 222 :581-597 (1991) 分别描述了使用噬菌体文库进行的鼠抗体和人抗体的分离。后续的公开物描述了通过链改组 (Marks 等, Bio/Technology (生物技术), 10 :779-783 (1992)), 以及作为构建非常大的噬菌体文库的策略的组合感染和体内重组 (Waterhouse 等, Nuc. Acids. Res. (核酸研究), 21 :2265-2266 (1993)) 进行的高亲和力 (nM 等级) 人抗体的生产。因此,这些技术是用于单克隆抗体分离的常规单克隆抗体杂交瘤技术的可行性备选方案。

[0208] 例如,也可以通过取代人重链和轻链恒定区的编码序列以替代同源的鼠序列 (美国专利号 4,816,567; Morrison, 等, Proc. Natl Acad. Sci. USA (美国国家科学院学报), 81 :6851 (1984)), 或通过将免疫球蛋白编码序列共价连接到关于非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列上,来修饰 DNA。

[0209] 典型地,所述非免疫球蛋白多肽置换抗体的恒定结构域,或者它们置换抗体的一个抗原-结合位点的可变结构域,以产生嵌合的二价抗体,该二价抗体包括一个具有针对一种抗原的特异性的抗原-结合位点和另一个具有针对不同抗原的特异性的抗原-结合位点。

[0210] (iii) 人源化抗体和人抗体

[0211] 人源化的抗体具有由非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为“引入的”残基,其典型地来自“引入的”可变结构域。人源化可以基本上按 Winter 与同事 (Jones 等, Nature (自然), 321 :522-525 (1986); Riechmann 等, Nature (自然), 332 :323-327 (1988); Verhoeyen 等, Science (科学), 239 :1534-1536 (1988)) 的方法进行,通过用啮齿动物的 CDRs 或 CDR 序列取代人抗体的相对应序列进行。因此,所述“人源

化的”抗体是嵌合抗体（美国专利号 4,816,567），其中基本上小于完整的人可变结构域已用来自非人物种的相对应的序列取代。在实践中，人源化的抗体典型地是人抗体中的一些 CDR 残基和可能的一些 FR 残基被来自啮齿动物抗体中相似位点的残基取代的人抗体。

[0212] 用于制备人源化的抗体的人可变结构域（轻链和重链可变结构域）的选择对于减少抗原性非常重要。按照所谓的“最佳配合（best-fit）”方法，针对完整的已知的人可变结构域序列的文库筛选啮齿动物抗体的可变结构域的序列。然后接受最接近啮齿动物的序列的人序列作为用于人源化的抗体的人构架（FR）（Sims 等，J. Immunol.（免疫学杂志），151：2296（1993）；Chothia 等，J. Mol. Biol.（分子生物学杂志），196：901（1987））。另一种方法使用来源于特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列的特定的构架。相同的构架可以用于一些不同的人源化抗体（Carter 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA（美国国家科学院学报），89：4285（1992）；Presta 等，J. Immunol.（免疫学杂志），151：2623（1993））。

[0213] 更重要的是，抗体人源化应该保留针对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。为了实现这一目的，按照优选的方法，通过使用亲本序列和人源化序列的三维建模分析亲本序列和各种概念上的人源化产物的过程来制备人源化的抗体。对于本领域的技术人员，三维免疫球蛋白建模通常是可用的，并且是熟悉的。示例和展示所选的候选免疫球蛋白序列的可能的三维构象结构的计算机程序是可获得的。这些展示的检查允许分析这些残基在所述候选免疫球蛋白序列的功能中的可能的作用，即，分析影响所述候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的残基。以这种方式，可以选择 FR 残基，并且由接受体和引入的序列组合，以致获得所需要的抗体特征，如增加的针对靶抗原的亲和性。通常，CDR 残基直接且充分地参与影响抗原的结合。

[0214] 人源化抗-VEGF 抗体及其亲和力成熟的变体记述在，例如，2005 年 2 月 26 日授予的美国专利号 6,884,879 中。

[0215] 现在可以生产这样的转基因动物（例如，小鼠），所述转基因动物在免疫时能够生产人抗体的全部所有成员，而没有内源性免疫球蛋白生产。例如，已经描述在嵌合和种系突变小鼠中同源缺失抗体重链结合区（J_H）基因导致对内源性抗体生产的完全抑制。在所述种系突变小鼠中转移人种系免疫球蛋白基因阵列将在抗原攻击时导致人抗体的生产。参见，例如，Jakobovits 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA（美国国家科学院学报），90：2551（1993）；Jakobovits 等，Nature（自然），362：255-258（1993）；Bruggermann 等，Year in Immunol.（免疫学年代），7：33（1993）；和 Duchosal 等 Nature（自然）355：258（1992）。

[0216] 备选地，噬菌体展示技术（McCafferty 等，Nature（自然）348：552-553（1990））可以用来在体外由来自未免疫的供体的免疫球蛋白可变（V）结构域基因全体成员生产人抗体及抗体片段。按照这一技术，将抗体 V 结构域基因符合阅读框地克隆到丝状噬菌体如 M13 或 fd 的主要或次要衣壳蛋白基因中，并且在噬菌体粒子表面上以功能性抗体片段展示。由于丝状粒子包含单链 DNA 拷贝的噬菌体基因组，基于抗体的功能特性的选择还导致对编码展示这些特性的抗体的基因的选择。因此，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；对于它们的综述，参见例如，Johnson, Kevin S. 和 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology（现代结构生物学观点）3：564-571（1993）。一些 V 基因片段的来源可以用于噬菌体展示。Clackson 等，Nature（自然），352：624-628（1991）由来源于免疫小鼠的脾脏的 V 基因的小的随机组合文库分离了

抗-噁唑酮抗体的多样性阵列。可以构建来自未免疫的人供体的V基因的所有成员,并且可以基本上按照 Marks 等, J. Mol. Biol. (分子生物学杂志) 222:581-597 (1991), 或 Griffith 等, EMBO J. (胚胎学杂志) 12:725-734 (1993) 所述的技术分离针对多样性抗原阵列(包括自体抗原(self-antigens))的抗体。还参见美国专利号 5,565,332 和 5,573,905。

[0217] 如上文所述,人抗体还可以通过体外活化的B细胞产生(参见美国专利5,567,610 和 5,229,275)。

[0218] 人单克隆抗-VEGF 抗体记述在 1998 年 3 月 24 日授予的美国专利号 5,730,977 中。

[0219] (iv) 抗体片段

[0220] 已经研发了用于生产抗体片段的多种技术。通常,这些片段通过蛋白水解消化完整的抗体衍生而来(参见,例如,Morimoto 等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods (生物化学和生物物理方法杂志) 24:107-117 (1992) 和 Brennan 等, Science (科学), 229:81 (1985))。然而,现在,这些片段可以直接通过重组宿主细胞生产。例如,可以从上述抗体噬菌体文库分离抗体片段。备选地, Fab' -SH 片段可以直接从大肠杆菌 (E. coli) 回收,并且化学偶联以形成 F(ab')₂ 片段 (Carter 等, Bio/Technology (生物技术) 10:163-167 (1992))。按照另一种方法,可以直接从重组宿主细胞培养物分离 F(ab')₂ 片段。用于生产抗体片段的其他技术对于熟练的从业者是明显的。在其他实施方案中,选择的抗体是单链 Fv 片段 (scFv)。参见 WO 93/16185。

[0221] (v) 其他氨基酸序列修饰

[0222] 考虑了本文所述的抗体的氨基酸序列修饰。例如,提高抗体的结合亲和性和/或其他生物学特性可能是合乎需要的。通过将适当的核苷酸变化引入到抗体核酸中,或通过肽合成,而制备抗体的氨基酸序列变体。所述修饰包括,例如,由抗体氨基酸序列的缺失残基、和/或在抗体氨基酸序列内插入残基和/或在抗体氨基酸序列内的残基的取代。进行缺失、插入和取代的任意组合以形成最终的构建体,条件是最终构建体具有所需要的特征。氨基酸变化也可以改变抗体的翻译后过程,诸如改变糖基化位点的数目或位置。

[0223] 有效用于鉴定抗体关于诱变的优选位置的某些残基或区域的方法称为“丙氨酸扫描诱变”,如 Cunningham 和 Wells Science (科学), 244:1081-1085 (1989) 所述。此处,鉴定残基或目标残基的组(例如,带电荷的残基,如 arg, asp, his, lys, 和 glu) 并且用中性或带负电荷的氨基酸(最优选丙氨酸或聚丙氨酸)替换以影响所述氨基酸与抗原的相互作用。然后,通过在取代位点或为了取代位点引入另外的或其他变体,而精制表现出针对所述取代的功能敏感性的这些氨基酸位置。因此,尽管预先确定了用于引入氨基酸序列变化的位点,突变本身的性质不需要预先确定。例如,为了分析在给定位点突变的性能,在目标密码子或区域进行 ala 扫描或随机诱变,并且针对所需要的活性筛选所表达的抗体变体。

[0224] 氨基酸序列插入包括氨基和/或羧基端融合,其长度在一个残基到包含一百以上残基的多肽的范围内,以及在序列内插入单个或多个氨基酸残基。末端插入的实例包括具有 N 端甲硫氨酰残基的抗体或与细胞毒性多肽融合的抗体。抗体分子的其他插入变体包括在所述抗体的 N 端或 C 端与酶(例如,关于 ADEPT) 或增加所述抗体的血清半衰期的多肽的融合体。

[0225] 另一种类型的变体是氨基酸取代变体。这些变体在所述抗体分子中的至少一个氨基酸残基被不同的残基取代。取代诱变最感兴趣的位点包括高变区,但是也考虑 FR 改变。

[0226] 所述抗体的生物学特性的基本修饰通过选择其对保持下列各项的作用显著不同的取代而完成：(a) 在取代区域中的多肽主链的结构，例如，作为片层或螺旋构象，(b) 在靶位点处所述分子的电荷或疏水性，或 (c) 侧链的体积。氨基酸可以按照其侧链特性的相似性分组（在 A. L. Lehninger, 在 Biochemistry (生物科学), 第 2 版, 第 73-75 页, Worth Publishers, 纽约 (1975) 中）：

[0227] (1) 非极性 :Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0228] (2) 不带电荷极性 :Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0229] (3) 酸性 :Asp (D), Glu (E)

[0230] (4) 碱性 :Lys (K), Arg (R), His (H)

[0231] 备选地，基于常见的侧链特性，可以将天然存在的残基分成下组：

[0232] (1) 疏水性 :正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile ;

[0233] (2) 中性亲水性 :Cys, Ser, Thr, Asn, Gln ;

[0234] (3) 酸性 :Asp, Glu ;

[0235] (4) 碱性 :His, Lys, Arg ;

[0236] (5) 影响链取向的残基 :Gly, Pro ;

[0237] (6) 芳香族 :Trp, Tyr, Phe。

[0238] 非保守取代将允许这些组中一组的成员与另一组的交换。

[0239] 不参与保持所述抗体的正确构象的任何半胱氨酸残基也可以被取代，通常用丝氨酸取代，以提高分子的氧化稳定性并且防止异常交联。相反，可以向抗体中加入一个或多个半胱氨酸键，以提高其稳定性（特别地，其中所述抗体是抗体片段，如 Fv 片段）。

[0240] 一种特别优选类型的取代变体包括取代亲本抗体的一个或多个高变区残基（例如，人源化抗体或人抗体）。通常，相对于产生为进一步开发选择所得到的变体的亲本抗体，所述变体将具有提高的生物学特性。产生所述取代变体的便利方法包括使用噬菌体展示的亲合性成熟，简言之，将一些高变区位点（例如，6-7 个位点）突变，以在每个位点产生所有可能的氨基酸取代。这样产生的抗体变体以单价形式由丝状噬菌体粒子展示为在每个粒子内包装的与 M13 基因 III 产物的融合体。然后，关于噬菌体展示的变体的生物学活性（例如，结合亲和性）筛选所述噬菌体展示的变体，如本文所公开那样。为了鉴定用于修饰的候选高变区位点，可以进行丙氨酸扫描诱变以鉴定显著有助于抗原结合的高变区残基。备选地，或另外地，可以有益地分析抗原-抗体复合物的晶体结构，以鉴定在所述抗体和人 VEGF 之间的接触点。所述接触的残基和相邻的残基是按照本文详述的技术的取代的候选物。当产生所述变体时，将一组变体进行如本文所述的筛选，并且可以选择在一种或多种相关测定中具有优越特性的抗体用于进一步的研发。

[0241] 所述抗体的另一种类型的氨基酸变体改变该抗体的原始糖基化模式。改变意指删除该抗体中存在的一个或多个糖结构部分，和 / 或添加一个或多个该抗体中不存在的糖基化位点。

[0242] 抗体的糖基化典型地是 N- 连接或 O- 连接的。N- 连接是指糖结构部分附着到天冬酰胺残基侧链上。三肽序列天冬酰胺 -X- 丝氨酸和天冬酰胺 -X- 苏氨酸，其中 X 是除脯氨酸外的任意氨基酸，是关于糖结构部分与天冬酰胺侧链的酶促附着的识别序列。因此，多肽中存在这些三肽序列的任一种产生潜在的糖基化位点。O- 连接的糖基化是指下述糖之一附

着到羟基氨基酸上,最常见的是附着到丝氨酸或苏氨酸上:N-乙酰半乳糖胺,半乳糖,或木糖,尽管也可以使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸。

[0243] 向所述抗体添加糖基化位点便利地通过改变氨基酸序列使其包含一个或多个上述三肽序列(关于N-连接的糖基化位点)实现。这样的改变也可以通过向原始抗体序列中添加或取代一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基(关于O-连接的糖基化位点)而进行。

[0244] 当所述抗体包含Fc区时,可以改变附着在其上的糖。例如,在美国专利申请号US 2003/0157108 A1, Presta, L中记述了具有成熟的糖结构的抗体,其缺少附着在抗体Fc区上的岩藻糖。还参见US 2004/0093621 A1(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。在附着到抗体Fc区上的糖中具有等分N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine)(GlcNAc)的抗体参见W003/011878, Jean-Mairet等和美国专利号6,602,684, Umana等。W097/30087, Patel等报道了在附着到抗体Fc区上的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体。还参见W098/58964(Raju, S.)和W099/22764(Raju, S.),其关于具有附着到抗体Fc区上的改变的糖的抗体。

[0245] 关于效应器功能修饰本发明的抗体可能是合乎需要的,例如,以提高所述抗体的抗原依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。这可以通过向抗体的Fc区引入一个或多个氨基酸取代实现。备选地或另外地,可以向Fc区引入一个或多个半胱氨酸残基,由此允许在该区域形成链间二硫键。这样产生的同源二聚体抗体具有提高的内在化能力和/或提高的补体介导的细胞杀伤性和抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)。参见Caron等, J. Exp. Med. (实验医学杂志)176:1191-1195(1992)和Shopes, B. J. Immunol. (免疫学杂志)148:2918-2922(1992)。具有增加的抗肿瘤活性的同源二聚体抗体也可以使用Wolff等Cancer Research(癌症研究)53:2560-2565(1993)所述的异源双功能交联剂进行制备。备选地,可以改造抗体,其具有两个Fc区,并且由此可以具有提高的补体裂解和ADCC能力。参见Stevenson等Anti-Cancer Drug Design(抗癌药物设计)3:219-230(1989)。

[0246] W000/42072(Presta, L.)记述了在存在人效应器细胞时具有提高的ADCC功能的抗体,其中所述抗体包含在其Fc区中的氨基酸取代。优选地,具有提高的ADCC的抗体包含在Fc区的位置298,333,和/或334(残基的EU编号)的取代。优选地,改变的Fc区是人IgG1 Fc区,其包含在这些位置中的一个、两个或三个位置的取代或由在这些位置中的一个、两个或三个位置的取代组成。所述取代任选地与增加C1q结合和/或CDC的取代组合。

[0247] 具有改变的C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)的抗体记述在W099/51642,美国专利号6,194,551B1,美国专利号6,242,195B1,美国专利号6,528,624B1和美国专利号6,538,124(Idusogie等)中。所述抗体包含在其Fc区氨基酸位置270,322,326,327,329,313,333和/或334(残基的EU编号)中的一个或多个位置的氨基酸取代。

[0248] 为了增加抗体的血清半衰期,人们可以在抗体(特别是抗体片段)中结合补救受体结合表位(salvage receptor binding epitope),例如,如美国专利5,739,277所述。当用于本文时,术语“补救受体结合表位”是指IgG分子(例如,IgG₁, IgG₂, IgG₃,或IgG₄)Fc区负责增加所述IgG分子的体内血清半衰期的表位。

[0249] 具有提高的与新生期的Fc受体(FcRn)的结合、和增加的半衰期的抗体记述在W000/42072(Presta, L.)和US2005/0014934A1(Hinton等)中。这些抗体包括在其中具

有一个或多个提高 Fc 区与 FcRn 的结合的取代的 Fc 区。例如,所述 Fc 区可以在位置 238, 250, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 314, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428 或 434(残基的 Eu 编号)的一个或多个位置具有取代。优选的具有提高的 FcRn 结合的包含 Fc 区的抗体变体在其 Fc 区的位置 307, 380 和 434(残基的 Eu 编号)的一个、两个或三个位置包含氨基酸取代。在一个实施方案中,所述抗体具有 307/434 突变。

[0250] 也考虑了改造的具有三个或多个(优选 4 个)功能性抗原结合位点的抗体(美国申请号 US2002/0004587A1, Miller 等)。

[0251] 编码所述抗体的氨基酸序列变体的核酸分子通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括,但不限于,由天然来源分离(在天然存在氨基酸序列变体的情形中)或通过对先前制备的变体或抗体的非变体形式进行寡核苷酸介导的(或位点定向的)诱变、PCR 诱变与盒诱变来制备。

[0252] (vi) 免疫缀合物

[0253] 本发明还涉及免疫缀合物,其包含与细胞毒性试剂如化疗剂、毒素(例如,细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,或其片段)、或放射性同位素(即,放射性缀合物)缀合的本发明所述的抗体。

[0254] 有效用于产生所述免疫缀合物的化疗剂已经在上文进行了描述。可以使用的酶活性毒素及其片段包括白喉 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 A 链,相思豆毒蛋白 A 链,蒴莲根毒蛋白 IIA 链, α -帚曲霉素,油桐(*Aleurites fordii*)蛋白,香石竹毒蛋白(dianthin proteins),美洲商陆(*Phytolacca americana*)蛋白(PAPI, PAPII, 和 PAP-S),苦瓜(*Momordica charantia*)抑制剂,麻风树毒蛋白,巴豆毒蛋白,肥皂草(*Saponaire officinalis*)抑制剂,多花白树毒蛋白, mitogellin, 局限曲菌素,酚霉素,伊诺霉素(enomycin)和 tricothecenes。对于放射性缀合抗体的生产,多种放射性核是可获得的。实例包括 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y 和 ^{186}Re 。

[0255] 抗体和细胞毒性试剂的缀合物使用多种双功能蛋白偶联剂制备,诸如 N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP), iminothiolane(IT), 亚氨酸酯的双功能性衍生物(诸如 dimethyl adipimidate HCL), 活性酯(诸如二琥珀酰亚胺基辛二酸酯), 醛(诸如戊二醛(glutaredialdehyde)), 双叠氮化合物(诸如双(对-叠氮基苯甲酰基)己二胺), 双重氮化衍生物(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)。例如,蓖麻毒蛋白免疫毒素可以如 Vitetta 等 Science(科学)238:1098(1987)所述制备。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)是用于放射性核与抗体缀合的一种示例性螯合剂。参见 W094/11026。

[0256] 在另一个实施方案中,所述抗体可以与“受体”(如链霉抗生物素蛋白)缀合,用于肿瘤的预先靶向,其中将所述抗体-受体缀合物施用给受试者,然后使用清除剂将未结合的缀合物从循环中去除,然后施用与细胞毒性试剂(例如放射性核苷)缀合的“配体”(例如,抗生物素蛋白)。

[0257] (vii) 免疫脂质体

[0258] 本发明公开的抗体还可以配制成免疫脂质体。包含所述抗体的脂质体通过本领域已知的方法制备,诸如 Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(美国国家科学院学报), 82:

3688(1985);Hwang等,Proc. Natl Acad. Sci. USA(美国国家科学院学报),77:4030(1980);和美国专利号4,485,045与4,544,545所述。美国专利号5,013,556公开了具有延长的循环时间的脂质体。

[0259] 特别有用的脂质体可以通过反相蒸发法利用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物生成。脂质体通过确定孔尺寸的滤器挤出,以产生具有需要的直径的脂质体。本发明抗体的Fab'片段可以通过二硫键互换反应缀合到该脂质体上,如Martin等J. Biol. Chem. (生物化学杂志)257:286-288(1982)所述。在该脂质体中任选地包含化疗剂。参见Gabizon等J. National Cancer Inst. (国家癌症研究所杂志)81(19)1484(1989)。

[0260] VIII. 制品和试剂盒

[0261] 在本发明另一个实施方案中,提供一种制品,其含有有效用于治疗上述病症的材料。该制品包括容器、标签和包装插页。适合的容器包括,例如,瓶子、小瓶、注射器等。所述容器可以由各种材料诸如玻璃或塑料制成。容器装有对于所述病症的治疗有效的组合物,并且可以具有无菌的存取口(例如,所述容器可以是具有可被皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。组合物中至少一种活性试剂是抗-VEGF抗体。在容器上或与容器相关的标签标明该组合物是用于治疗所选的病症。该制品可以进一步包括第二容器,其中装有制药学可接受的缓冲液,例如磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和右旋糖溶液。它可以进一步包括从商业和用户立场出发理想的其它材料,包括其它的缓冲剂、稀释剂、滤器、针和注射器。另外,所述制品包括具有使用说明的包装插页,其包括,例如,指导该组合物的使用者向受试者施用抗-VEGF抗体组合物和化疗剂,例如,卡培他滨,紫杉烷,蒽环霉素,紫杉醇,多西他赛,紫杉醇蛋白-结合的粒子(例如,Abraxane®),多柔比星,表柔比星,5-氟尿嘧啶,环磷酰胺或它们的组合。所述包装插页可以任选地包含实施例1中存在的一些或所有结果。

[0262] VEGF-特异性拮抗剂可以单独包装或与其它抗癌治疗性化合物组合包装成试剂盒。所述试剂盒可以包括任选的辅助将单位剂量施用给受试者的元件,诸如用于重建粉剂形式的小瓶,用于注射的注射器,定制的静脉内递送系统,吸入器等。另外,单位剂量试剂盒可以包括关于制备和施用所述组合物的说明书。在某些实施方案中,该说明书包括使用说明,例如,包括指导该组合物的使用者向受试者施用抗-VEGF抗体组合物和化疗剂,例如,卡培他滨,紫杉烷,蒽环霉素,紫杉醇,多西他赛,紫杉醇蛋白-结合的粒子(例如,Abraxane®),多柔比星,表柔比星,5-氟尿嘧啶,环磷酰胺或它们的组合。所述说明书可以任选地包含实施例1中存在的一些或所有结果。所述试剂盒可以制成用于一名受试者的单次使用的单位剂量,用于特定受试者的多次使用(以恒定的剂量或其中单种化合物可以随治疗进展在效力中进行改变);或所述试剂盒可以包含适于施用给多名受试者的多个剂量(“大包装”)。所述试剂盒元件可以装配在纸箱、薄膜包装、瓶子、管等中。

[0263] 材料保藏

[0264] 下述杂交瘤细胞系已经依据布达佩斯条约保藏在美国典型培养物收藏中心(American Type Culture Collection)(ATCC),Manassas, VA, USA:

[0265]	抗体名称	ATCC No.	保藏日期
[0266]	A4.6.1	ATCC HB-10709	1991年3月29日

[0267] 下述实施例仅意欲举例说明本发明的实施,并不是以限制方式提供的。本文所应用的所有专利和科技文献的内容通过引用一起整体清楚地结合于此。

实施例

[0268] 实施例 1. 在患有先前未治疗的转移性乳腺癌的受试者中与化学治疗方案联合的贝伐珠单抗

[0269] 转移性乳腺癌 (MBC) 是不能治愈的疾病,大部分患者在诊断后的两年内死于该疾病 (Greenberg, 等, 1996, J. Clin. Oncol. (临床肿瘤学杂志) 14 :2197-205 ;Dawood, 等, 2008, J. Clin. Oncol. (临床肿瘤学杂志) 26 :4891-8 ;和 Chia 等, Cancer (癌症), 2007, 110 : 973-9)。在表现出 MBC 的患者中,约 60% 的患者先前患有已经复发的局部疾病,约 40% 的患者重新表现出转移性疾病。

[0270] MBC 的两个先前随机化的 III 期试验已经证明向使用紫杉烷类的最初化学治疗中加入贝伐珠单抗是有益的。在关键的 III 期 E2100 试验中,与仅用紫杉醇治疗的患者相比,用每周紫杉醇+贝伐珠单抗治疗的患者的无进展的存活 (PFS) 显著更久 (Miller et al., N. Engl. J. Med. (新英格兰医学杂志), 2007, 357 :2666-76)。类似地,AVADO 试验,研究贝伐珠单抗 (以 7.5 和 15mg/kg q3w) 与多西他赛的组合,发现与仅用多西他赛治疗的患者相比,用多西他赛+贝伐珠单抗治疗的患者具有更久的无进展的存活 (PFS) (Miles 等, 2008 ASCO Annual Meeting (ASCO 年会) Chicago, IL)。先前,评估贝伐珠单抗与卡培他滨的组合的关于先前治疗的 MBC 的随机化 III 期试验 (AVF2119g) 证明用卡培他滨+贝伐珠单抗治疗的那些的整体响应率 (ORR) 比仅用卡培他滨的那些更高,但是其未能满足提高 PFS 的主要目标 (Miller 等, J. Clin. Oncol. (临床肿瘤学杂志) 2005, 23 :792-9)。

[0271] 该实施例涉及对用紫杉烷类和非紫杉烷化学治疗的 RIBBON 1 临床试验中治疗的先前未治疗的转移性乳腺癌受试者获得的结果的分析。该研究的主要目标是确定向关于先前未治疗的转移性乳腺癌的标准化学治疗方案中添加贝伐珠单抗的临床益处,如通过基于研究者肿瘤评估的 PFS 测量的。参见,例如, O' Shaughnessy 和 Brufsky, (2008), Clinical Breast Cancer (临床乳腺癌), 8(4) :370-373。该试验包括两个研究组,其在针对其晚期 HER2- 阴性乳腺癌先前没有接受化学治疗的妇女中评估 AVASTIN® 与不同类型的化学治疗。在第一研究组中,妇女接受与基于紫杉烷或基于蒽环霉素的化学治疗联合的 AVASTIN 或安慰剂。在第二研究组中,妇女接受与卡培他滨化学治疗联合的 AVASTIN 或安慰剂。这一实施例的分析是基于来自 1237 名患者的信息进行的。这些试验评估贝伐珠单抗 (AVASTIN®) 作为用于先前未治疗的转移性乳腺癌患者的治疗的功效。

[0272] 研究设计

[0273] RIBBON1 研究的设计显示在图 1 中。

[0274] 在 RIBBON1 试验中,使用下述治疗流程:

[0275] 组 A:每 21 天周期的第 1 天静脉内施用贝伐珠单抗 15mg/kg IV 和群体 1,群体 2 或群体 3;

[0276] 组 B:每 21 天周期的第 1 天静脉内施用安慰剂和群体 1,群体 2 或群体 3。

[0277] 群体 1:每 3 周施用下述紫杉烷类的任一种:

[0278] 多西他赛 75-100mg/m² IV

[0279] 紫杉醇蛋白-结合的粒子 (Abraxane®) 260mg/m² IV

[0280] 群体 2:每 3 周将下述基于蒽环霉素的联合治疗的任一种用于先前未用蒽环霉素治疗的受试者:

[0281] FEC:在第 1 天,5-氟尿嘧啶 500mg/m² IV,表柔比星 90-100mg/m² IV 和环磷酰胺 500mg/m² IV

[0282] FAC:在第 1 天,5-氟尿嘧啶 500mg/m² IV,多柔比星 50mg/m² IV 和环磷酰胺 500mg/m² IV

[0283] AC:在第 1 天,多柔比星 50-60mg/m² IV 和环磷酰胺 500-600mg/m² IV

[0284] EC:在第 1 天,表柔比星 90-100mg/m² IV 和环磷酰胺 500-600mg/m² IV

[0285] 群体 3:在每 3 周周期的第 1-14 天每天两次口服卡培他滨 1000mg/m²。

[0286] 另外,在盲治疗期后,一些受试者每 3 周静脉内给予贝伐珠单抗 15mg/kg,或每 2 周静脉内给予贝伐珠单抗 10mg/ml;与化学治疗同时给予。

[0287] 贝伐珠单抗 (AVASTIN®) 提供为透明至略微乳白色、无色至浅棕色、无菌液体浓缩物,用于 IV 输注的溶液。贝伐珠单抗提供在 5-ml (100mg) 或 20-ml (400mg) 玻璃小瓶中,分别包含 4mL 或 16mL 贝伐珠单抗 (每个小瓶 25mg/ml)。小瓶包含贝伐珠单抗与磷酸盐、海藻糖、聚山梨酸酯 20 和无菌注射用水 (SWFI), USP。小瓶不包含防腐剂。在连续的静脉内施用前,将 AVASTIN®在 0.9%氯化钠注射液, USP 中稀释至 100ml 的总体积。

[0288] 方法

[0289] 符合条件的受试者/患者具有下述关键的合格标准:年龄 > 18 岁, ECOG 0 或 1 (ECOG 表现状态等级 (ECOG Performance Status Scale)), 关于局部复发的或转移性乳腺癌没有预先的化学治疗, Her2 阴性 (除非 Her2 阳性, 且曲妥珠单抗 (trastuzumab) 禁忌或不可用) 和 / 或如果自最后一次给药 > (或等于) 12 个月复发允许先前的辅助化学治疗。所有的受试者具有组织学或细胞学验证的乳腺癌, 受试者可能已经患有可测量的 (按照实体瘤的响应评估标准 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST))) 或不可测量的局部复发的或转移性疾病。局部复发的疾病不适合以治愈为目的的切除术。

[0290] 如果在第 0 天前中断大于或等于 1 周, 受试者可以接受辅助或转移设置的预先的激素治疗, 或者如果在第 0 天前中断大于或等于 12 个月, 受试者可以接受辅助的化学治疗。

[0291] 排除标准包括已知的 HER2- 阳性状态 (除非患者对于曲妥珠单抗治疗有进展, 或者曲妥珠单抗治疗禁忌或不可用); 在 12 个月内的预先的辅助或新的辅助化学治疗; 已知的中枢神经系统转移; 血压 > 150/100mmHg; 不稳定的心绞痛; 纽约心脏学会 II 级 (New York Heart Association Grade II) 以上的充血性心力衰竭 (CHF); 6 个月内的心肌梗死病史; 6 个月内的中风或暂时缺血发作病史; 临床显著的外周血管病; 出血素质或凝血病的迹象; 6 个月内的腹部瘘管、胃肠 (GI) 穿孔或腹内脓疡的病史; 术前用药不可控的针对单克隆抗体疗法的过敏反应病史; 严重的不可治愈性创伤; 不足的器官功能; 适合治愈目的的切除术的局部复发的疾病; 5 年内其它恶性病病史。如果选择蒽环霉素作为化学治疗, 患者还需要具有 ≥ 50% 的左心室射血分数 (left ejection fraction), 并且没有先前的蒽环霉素治疗史。

[0292] 该试验在世界范围内进行 (至少 22 个国家), 并且自然产生 1237 名受试者/患者 (紫杉烷 (T): 307; 蒽环霉素 (Anthra): 315; 和卡培他滨 (Cap): 615)。

[0293] 研究的主要终点是基于研究者评估的无进展的存活 (PFS), 其定义为从随机化到疾病进展或死亡的时间。Kaplan-Meier 法可以用来估算每个治疗组的平均 PFS。在某些实施方案中, 使用分层 Cox 衰减模型 (stratified Cox regression model), 以在分层 log-rank 检验中所用的相同分层因子 (stratified factors) 来估算关于 PFS 的危害比。在每个群体中的 PFS 分析以两面 $\alpha = 0.05$ 水平进行。使用分层 log-rank 检验比较治疗组之间的时间 - 至 - 事件数据。Kaplan-Meier 法用来估算时间 - 至 - 事件数据的持续时间。使用 Brookmeyer-Crowley 法计算关于平均时间 - 至 - 事件的 95% 置信区间。使用分层 Cox 衰减模型估算关于时间 - 至 - 事件数据的 HR。

[0294] 次要终点包括客观响应率 (ORR), 一年存活率, 整体存活 (OS), 和基于 IRC 评估和安全性的 PFS。OS 定义为从随机化到任何原因的死亡的时间。ORR 定义为在最初记录响应后 ≥ 28 天获得证实的完全的或部分响应的患者百分数。使用常规近似法评估治疗组之间的一年的存活率。使用分层 Mantel-Haenszel χ^2 检验比较在患有在基线可测量的疾病的患者中的 ORR。在所有的分层分析中包括随机化分层因子。

[0295] 结果

[0296] RIBBON1 是国际性的、多中心、随机化、双盲、安慰剂对照的临床研究, 其招募 1,237 名患有局部复发的或转移性 HER2- 阴性乳腺癌的受试者 / 患者, 所述受试者 / 患者没有接受关于其转移性疾病的化学治疗。参见表 1, 关于试验的受试者 / 患者特征。这些试验的主要终点是基于研究者的评估的无进展的存活 (PFS), 其定义为从随机化到疾病进展或死亡的时间。该试验的结果表明, 与单独的化学治疗相比, AVASTIN[®] 与下述使用的用于一线转移性 HER2- 阴性乳腺癌的化学治疗联合增加妇女没有她们的疾病进展的生存时间, 其定义为无进展存活 (PFS) 的主要终点。

[0297] 表 1: 受试者 / 患者特征

[0298]

	Cap		T/Anthra	
	PL (n=206)	BV (n=409)	PL (n=207)	BV (n=415)
平均年龄, 岁	57	56	55	55
ECOG PS 0	53	52	53	52
HR 阳性	71	76	74	74
三重阴性	24	21	22	23
≤12 个月无 疾病	22	27	41	37
辅助的化学 治疗	76	70	47	45
紫杉烷	41	39	15	15
蒽环霉素	69	60	30	30
≥ 3 个转移 位点	45	43	45	45
可测量的 dx	78	80	86	83

[0299] 该 III 期研究的结果为对患有先前未治疗的乳腺癌的患者使用抗血管发生剂作为一线治疗提供了直接的支持。向紫杉烷治疗（例如，多西他赛或紫杉醇蛋白 - 结合的粒子（例如，Abraxane®））/ 蒽环霉素治疗（例如，多柔比星，表柔比星或它们的组合）或卡培他滨治疗的化学治疗中加入贝伐珠单抗（其作为一种抗-VEGF 抗体），在乳腺癌患者中提供临床有意义且统计学显著的改善，例如，如通过无进展存活测量的。在用贝伐珠单抗和紫杉烷治疗（例如，多西他赛或紫杉醇蛋白 - 结合的粒子（例如，Abraxane®））/ 蒽环霉素治疗（例如，多柔比星，表柔比星或它们的组合）治疗的患者中，以月为单位的 PFS 平均值（95% CI）为 9.2 个月（8.6, 10.1），相比较而言，在不使用贝伐珠单抗的紫杉烷 / 蒽环霉素治疗中为 8.0 个月（6.7, 8.4），HR(95% CI) 0.644 (0.522, 0.795)，p- 值 (log-rank) 小于 0.0001。参见表 2。见图 3，观察研究者 (INV) 确定的 PFS 值和独立评估委员会 (IRC) 确定的 PFS 值。在用贝伐珠单抗和卡培他滨治疗的患者中，以月为单位的 PFS 平均值（95% CI）为 8.6 个月（8.1, 9.5），相比较而言，在不使用贝伐珠单抗的卡培他滨治疗中为 5.7 个月（4.3, 6.2），HR(95% CI) 0.688 (0.564, 0.840)，p- 值 (log-rank) 0.0002。参见表 2。参见图 2，观察研究者 (INV) 确定的 PFS 值和独立评估委员会 (IRC) 确定的 PFS 值。参见表 3 的次要终点，其中 PFS 被化学治疗亚组划分。参见图 4 和 6 关于不同群体的 PFS 亚组分析，例如，图 4 中卡培他滨和 T/ 蒽环霉素，图 6 中 T/ 蒽环霉素。参见图 5 关于客观响应率 (ORR) 和表 2。在响应者中，在关于两个群体的贝伐珠单抗组中，客观响应率的平均持续时间更久：卡培他滨

群体, 9.2 个月 (95% CI :8.5-10.4) 相对于 7.2 个月 (95% CI :5.1-9.3) ; 并且关于紫杉烷 / 蒽环霉素群体, 8.3 个月 (95% CI :7.2-10.7) 相对于 7.1 个月 (95% CI :6.2-8.8)。参见表 4 关于整体存活详情。不存在出乎意料的安全性信号。安全性与先前的贝伐珠单抗试验结果相一致。参见表 5 关于安全性总结。这种改善在临床上是有意义的。

[0300] 表 2 PFS 和 OS

[0301]

	T/Anthr n=622		Cap n=615	
	pl n=207	B n=415	pl n=206	B N=409
PFS (HR, 95% CI)	0.644 (0.522, 0.795)		0.688 (0.564, 0.840)	
p-值 (Log-rank)	<0.0001		0.0002	
平均值 (月)	8.0	9.2	5.7	8.6
ORR (%)	67	177	38	115

[0302]

	(37.9%)	(51.3%)	(23.6%)	(35.4%)
p-值	0.0054		0.0097	
OS (HR, 95% CI)	1.032 (0.774, 1.376)		0.847 (0.631, 1.138)	
p-值(Log-rank)	0.8298		0.2706	
平均值 (月)	23.8	25.2	21.2	29.0

[0303] HR = 危害比

[0304] 表 3 次要终点 : 化学治疗亚组的 PFS (mPFS = 平均 PFS)

[0305]

	紫杉烷		Anthra	
	PL(n=104)	BV(n=203)	PL(n=103)	BV(n=212)
mPFS, 月	8.2	9.2	7.9	9.2
HR (95% CI)	0.75 (0.56–1.01)		0.55 (0.40–0.74)	
p-值	0.0547		<0.0001	

[0306] 表 4 :整体存活

[0307]

	Cap		T/Anthra	
	PL (n=206)	BV (n=409)	PL (n=207)	BV (n=415)
% 死亡	35	30	35	34
平均 OS, 月	21.2	29.0	23.8	25.2
HR (95% CI)	0.85 (0.63–1.14)		1.03 (0.77–1.38)	

[0308]

p-值	0.27		0.83	
1 年存活率 (%)	74	81	83	81
p-值	0.076		0.44	

[0309] 表 5 :安全性总结

[0310]

	Cape		紫杉烷		Anthra	
事件 (%)	PL (n=201)	BV (n=404)	PL (n=102)	BV (n=203)	PL (n=100)	BV (n=210)
所选 AEs*	9.0	22.0	22.5	43.8	16.0	28.1
SAEs	18.9	24.3	26.5	41.4	16.0	22.4
导致研究 药物 (PL 或 BV)中断 的 AEs	11.9	11.9	7.8	24.1	4.0	14.3
导致死亡 的 AEs **	2.5	2.0	2.9	3.4	3.0	1.4

[0311] *先前显示为与贝伐珠单抗相关的不利事件 (AEs)

[0312] **与转移性乳腺癌进展相关的排除 AEs

[0313] SAE- 严重不利事件

[0314] 向在转移性乳腺癌的一线治疗中所用的基于卡培他滨、紫杉烷或蒽环霉素的化学治疗方案中加入贝伐珠单抗导致 PFS 的统计学显著的提高,具有与先前的 III 期研究相当的安全性模式。

[0001]

序列表

<110> 健泰科有限公司等

<120> 用于乳腺癌治疗的抗血管发生治疗

<130> P4331R1 WO

<141> 2009-11-20

<150> US 61/117, 102

<151> 2008-11-22

<150> US 61/178, 009

<151> 2009-05-13

<150> US 61/179, 307

<151> 2009-05-18

<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

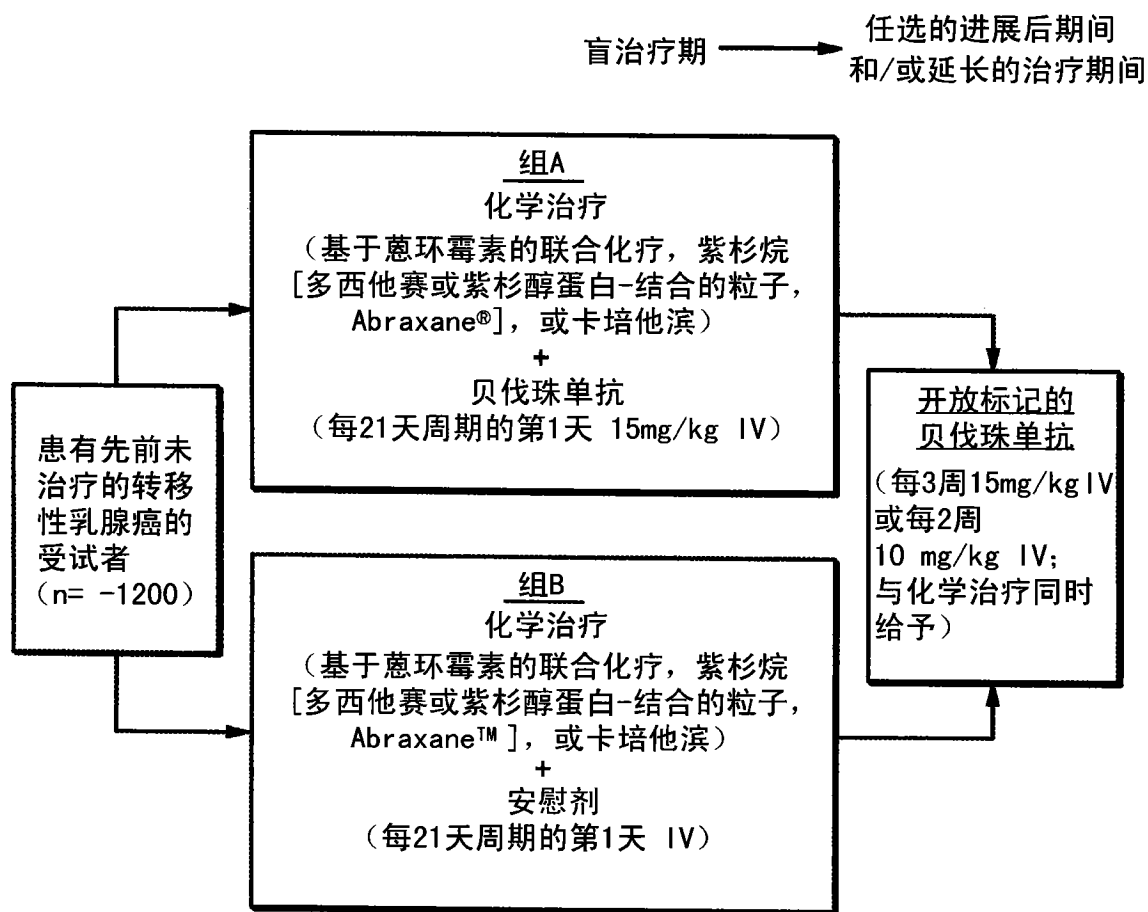
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Ser
				20					25					30

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

Val Leu Ile Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser

[0002]

					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														



群体1: 每3周施用下述紫杉烷类的任一种:

多西他赛 75-100 mg/m² IV

紫杉醇蛋白-结合的粒子(Abraxane®) 260 mg/m² IV

群体2: 每3周将下述基于蒽环霉素的联合化疗的任一种用于先前未用蒽环霉素治疗的受试者:

FEC: 在第1天, 5-氟尿嘧啶 500 mg/m² IV, 表柔比星90-100 mg/m² IV和环磷酰胺 500 mg/m² IV

FAC: 在第1天, 5-氟尿嘧啶500 mg/m² IV, 多柔比星 50 mg/m² IV和环磷酰胺 500 mg/m² IV

AC: 在第1天, 多柔比星 50-60 mg/m² IV和环磷酰胺 500-600 mg/m² IV

EC: 在第1天, 表柔比星 90-100 mg/m² IV和环磷酰胺 500-600 mg/m² IV

群体3: 在每3周周期的第1-14天每天两次口服卡培他滨 1000 mg/m²

图 1

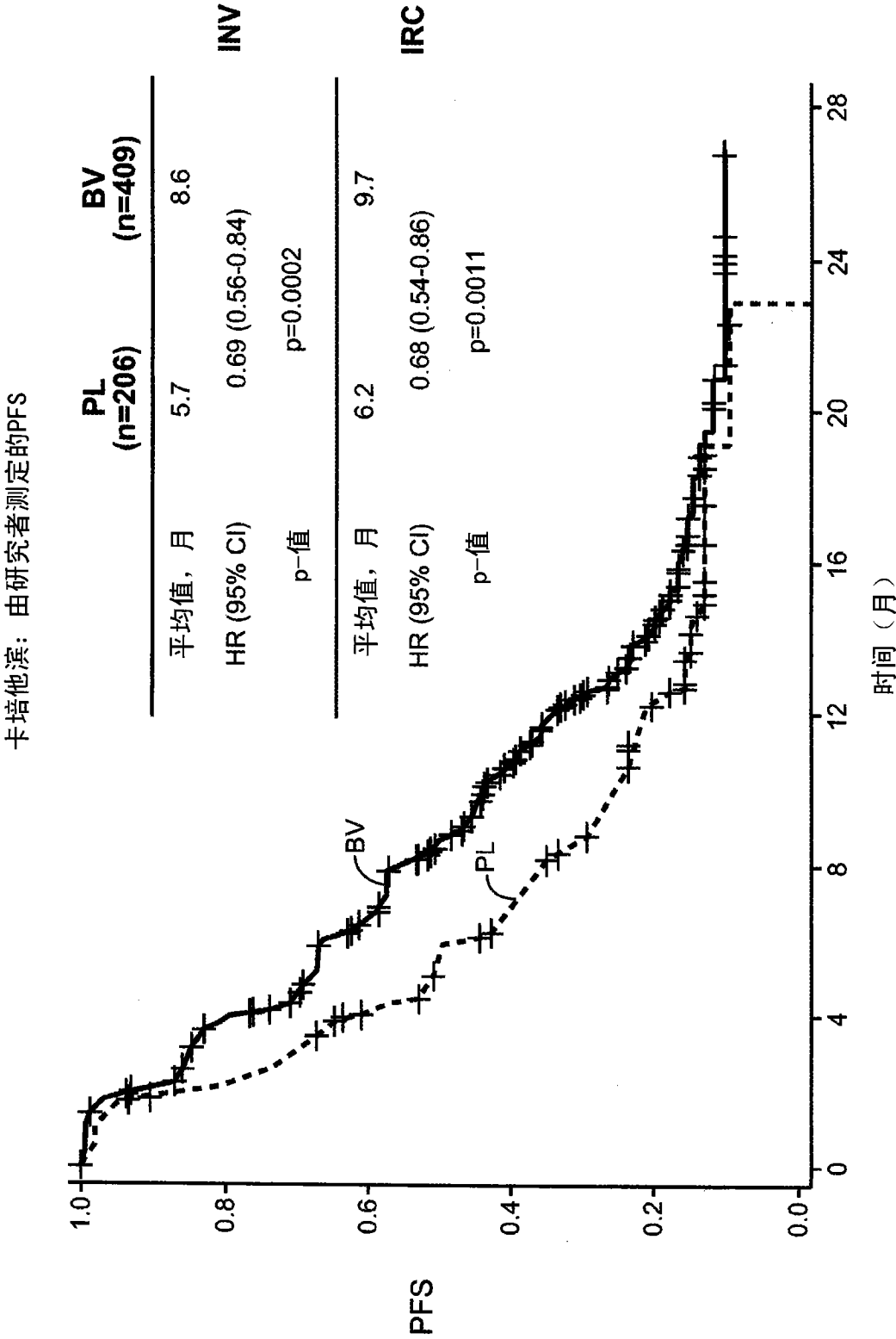
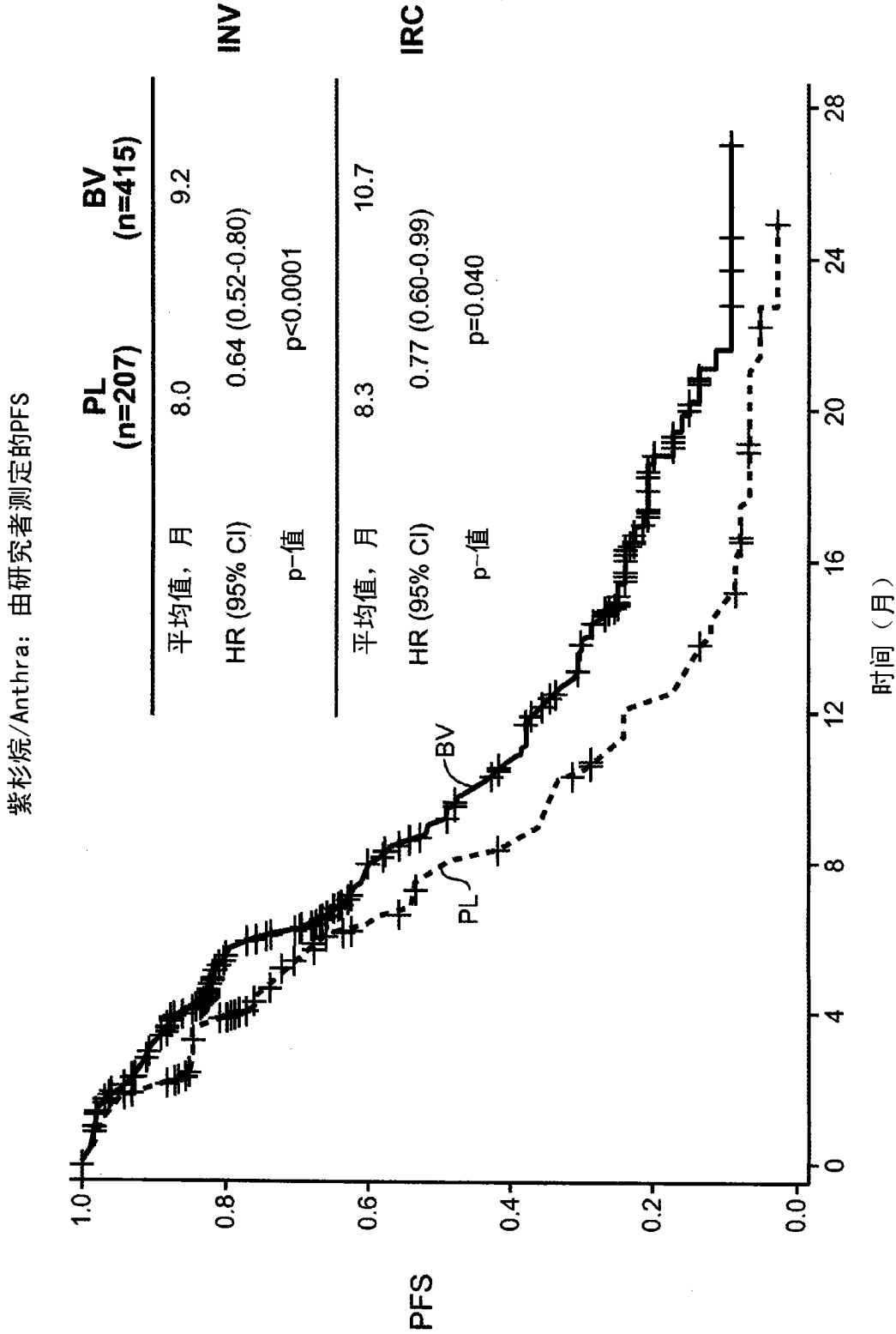


图 2



PFS的亚组分析，Cape和T/Anthra群体

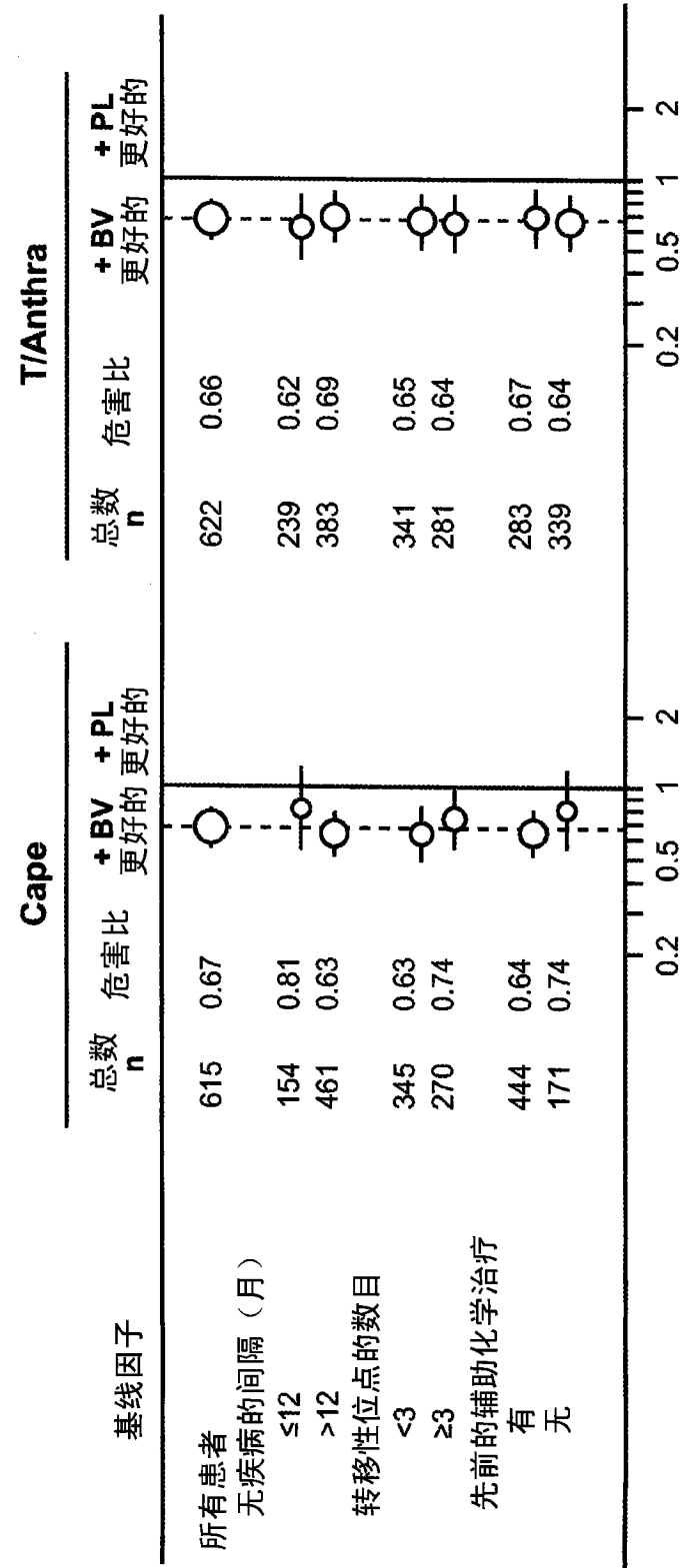


图 4

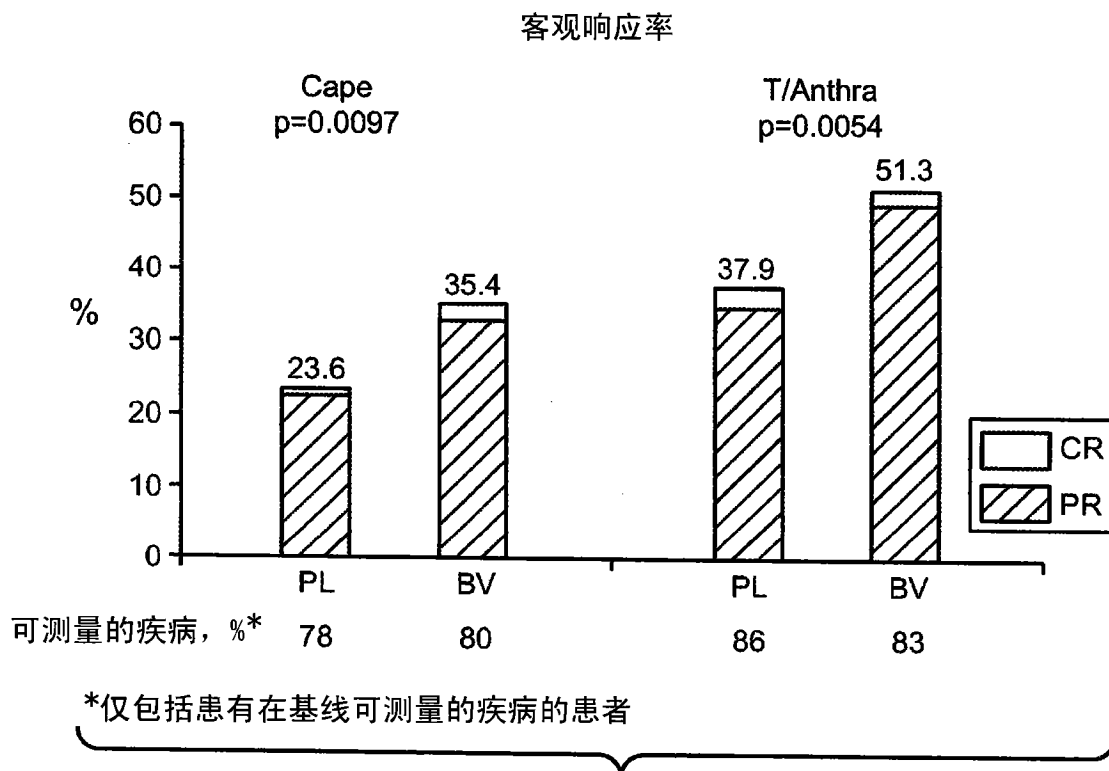


图 5

PFS的亚组分析, T/Anthra群体

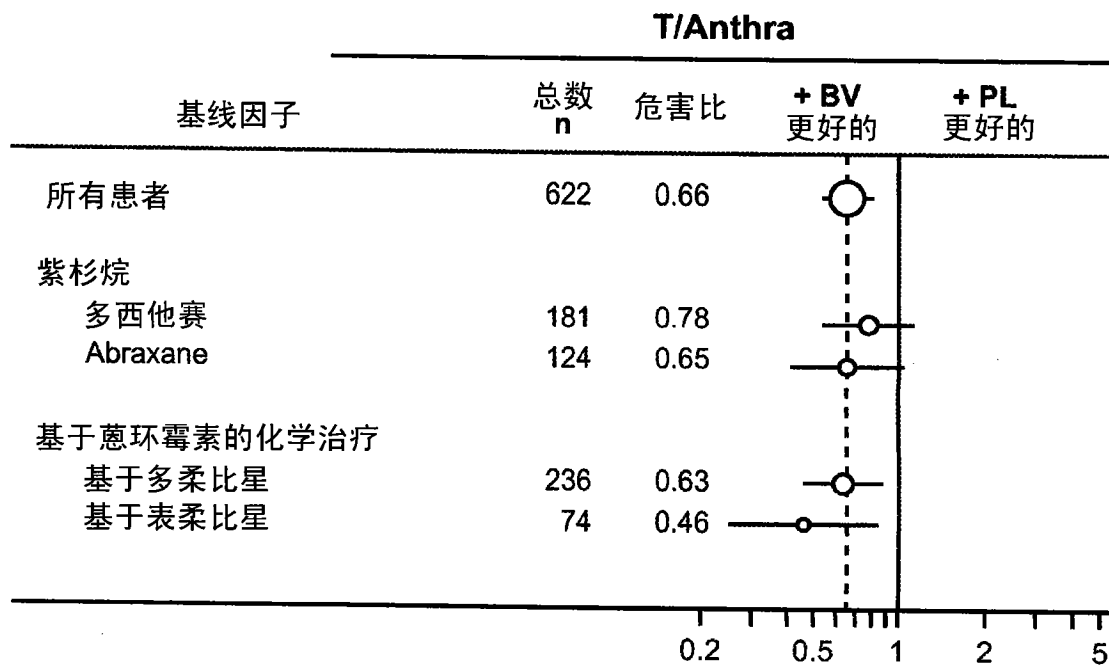


图 6