

# 罗氏公司血管内皮生长因子抗体技术 专利分析

张弛<sup>1</sup>, 张颖慧<sup>2</sup>

1. 国家知识产权局专利局医药生物发明审查部, 北京 100088
2. 国家知识产权局专利局审查业务管理部, 北京 100088

**摘要** 检索了罗氏公司血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体相关专利申请情况, 分析了贝伐珠单抗和兰尼单抗的技术研发路线、罗氏公司 VEGF 抗体相关在华专利布局情况, 对其未来技术研发趋势和方向进行了预测。

**关键词** 罗氏公司; VEGF 抗体; 专利分析

一个世纪以前, 人们已经观察到, 肿瘤的生长伴随着血管的增生。1971年, 美国科学家福克曼通过大量实验发现, 在没有新血管生成的情况下, 实体肿瘤单纯依靠弥散获取氧气及营养物质, 生长范围只能维持在 1~2 mm。当生长范围超过 2~3 mm 时, 肿瘤组织必须依靠新生血管生成来提供足够的氧气和营养物质以维持肿瘤的快速生长。福克曼在此基础上提出一种新的抗癌策略: 如果遏制血管的增生将会有效地抑制肿瘤的生长。此后的 10 年间, 人们一直致力于分离所谓的“肿瘤血管生成因子”, 并发现了表皮生长因子 FGF- $\alpha$ 、FGF- $\beta$  和转化生长因子 TGF- $\alpha$  等多种因子<sup>[1]</sup>。1989年6月, 罗氏公司的子公司基因泰克费拉拉等在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中纯化出了血管内皮生长因子(VEGF)家族的首个生长因子 VEGF-A, 并公开在 1989年8月4日(最早优先权日均为 1989年5月12日)向美国专利局提交的专利号为 US07/389,722 的专利申请中。随后, 罗氏围绕 VEGF 分子为靶标的抗体药物开展了相关研究, 并在此基础上开发出了贝伐珠单抗(Bevacizumab, 商品名 Avastin<sup>®</sup>)和兰尼单抗(Ranibizumab, 商品名 Lucentis<sup>®</sup>)2 大明星药物。

## 1 罗氏公司 VEGF 抗体技术研发路线

贝伐珠单抗是一种重组人源化单克隆抗体, 分子量约为 149 kD, 含有人源抗体的框架区和可结合 VEGF 的鼠源抗体的互补决定区。它能与 VEGF 结合并阻止其与内皮细胞表面上的受体结合, 从而阻断 VEGF 导致的内皮细胞扩增和新血管的形成。在接种了结肠癌的裸鼠(无胸腺)模型上, 使用贝

伐珠单抗可减少微血管生成并抑制转移病灶进展。2004年 Avastin<sup>®</sup> 获得美国食品和药物管理局(FDA)的批准, 成为美国第一个获得批准上市的抑制肿瘤血管生成的抗体药物。目前 FDA 已批准了 Avastin<sup>®</sup> 用于 6 种适应症, 包括转移性结肠癌(Metastatic Colorectal Cancer, mCRC), 非小细胞肺癌(Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC), 胶质母细胞瘤(Glioblastoma), 转移性肾细胞癌(Metastatic Renal Cell Carcinoma, mRCC), 宫颈癌、复发性或转移性癌(Persistent, Recurrent, or Metastatic Carcinoma of the Cervix), 铂耐药复发性上皮性卵巢癌、输卵管癌或原发性腹膜癌(Platinum-Resistant Recurrent Epithelial Ovarian, Fallopian Tube, or Primary Peritoneal Cancer)。2010年经国家食品药品监督管理局(CFDA)批准 Avastin<sup>®</sup> 进入中国, 商品名为安维汀<sup>®</sup>。兰尼单抗是贝伐珠单抗的姊妹药物, 是重组的 VEGF 人源化单抗 IgG1 的抗体片段, 不具有抗体 Fc 区, 分子量约为 48 kD, 是用于眼内治疗的抗体药物(图 1)。2006年 Lucentis<sup>®</sup> 被 FDA 批准用于治疗老年性黄斑(Age-Related Macular Degeneration, AMD), 2012年又被 FDA 批准用于治疗糖尿病黄斑水肿(Diabetic Macular Edema, DME)。

在专利申请 WO9410202A 中首次公开了罗氏公司筛选获得的鼠源 A4.6.1 抗体(图 2), 而鼠源单抗对人体有较强的免疫原性, 可能会诱发人抗鼠抗体(HAMA)反应, 并且其在人体循环系统中往往很快地会被清除掉。20世纪80年代以后, 研究者开始尝试用各种方法对鼠源性单克隆抗体进行改造, 致力于在保留与抗原结合的高亲和力的基础上, 减少异源性

收稿日期: 2016-05-17; 修回日期: 2016-05-23

作者简介: 张弛(通信作者), 硕士研究生, 研究方向为民商法学, 电子信箱: zhangchi\_1@sipo.gov.cn; 张颖慧(共同第一作者), 硕士研究生, 研究方向为民商法学, 电子信箱: zhangyinghui@sipo.gov.cn

引用格式: 张弛, 张颖慧. 罗氏公司血管内皮生长因子抗体技术专利分析[J]. 科技导报, 2016, 34(11): 48-52; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2016.11.008

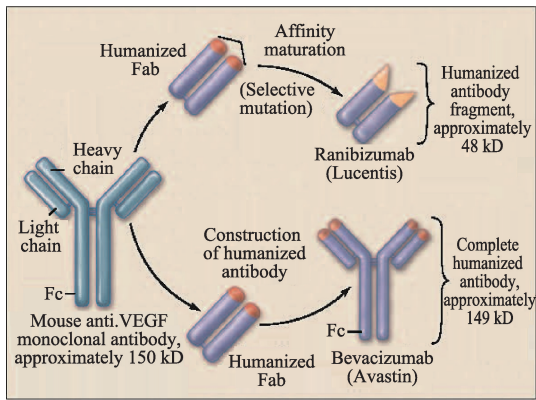
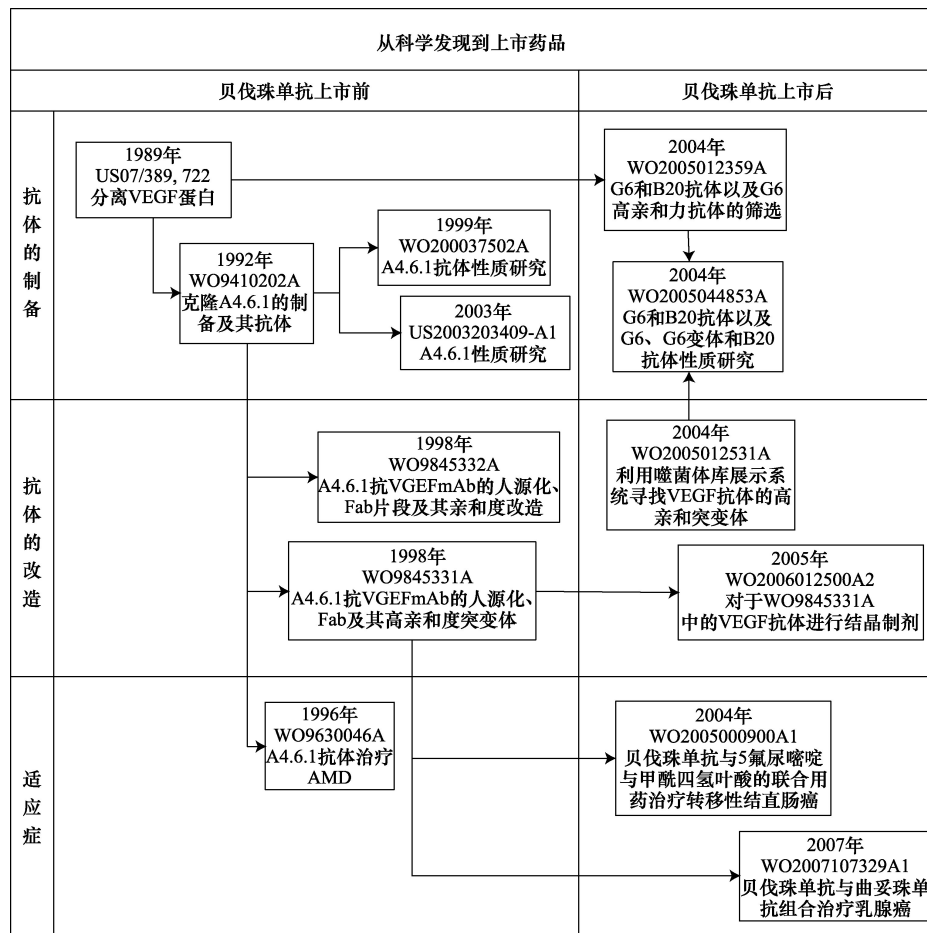


图1 贝伐珠单抗与兰尼单抗示意图<sup>[2]</sup>  
Fig.1 Schematic diagram of bevacizumab and ranibizumab<sup>[2]</sup>

抗体的免疫原性,这推动了抗体人源化的进程<sup>[3]</sup>。在Presta等的努力下,通过将A4.6.1产生的6个鼠源CDR与人源VLK1-Cl轻链恒定区和VH III-CH1重链恒定区相结合,构建获得了人源化的VEGF抗体。所获得的人源化抗VEGF单克隆抗体与VEGF的亲合力与原抗体相似,实现了在不损失亲和性的

前提下对抗VEGF抗体的人源化,该人源化的VEGF抗体公开在WO9845331A和WO9845332A专利申请中。基因泰克对VEGF抗体的挖掘并不仅限于人源化改造和亲和性提高。1994年Ferrara与Lloyd Paul Aiello等分析了视网膜疾病患者的眼液,发现VEGF与新生血管引发的眼部疾病有关<sup>[4]</sup>。1996年,Ferrara与Anthony Adamis在猴子模型上进行了实验,结果表明抗VEGF抗体具有治疗过度血管增生导致的湿性老年性黄斑(AMD)的可能,因此于同年提交了专利申请WO9630046A,要求了抗VEGF抗体在治疗AMD方面的用途的权利。然而阅读该专利申请文件可以发现,其具体实施方式所记载的内容与公开号WO941020A的专利申请并无不同,仅仅是在其发明内容部分对抗VEGF抗体与AMD的关系进行了理论分析,没有对其实际的效果进行验证。之后,Ferrara和他的同事们考虑到贝伐珠单抗注射入血管后会广泛影响血管的形成,对于年龄偏大的人群恐怕有造成心脑血管疾病的风险,因此Ferrara和Henry Lowman等人对抗VEGF抗体进行了片段化处理,并通过突变提高其亲和性,以便药物直接递送到眼内发挥作用,从而制备获得了兰尼单抗,并与贝伐珠单抗一起公开在WO9845331A和WO9845332A专利申请中。



注:图中时间为该专利申请的最早优先权日

图2 贝伐珠单抗和兰尼单抗技术研发路线  
Fig.2 Technical development roadmap of Bevacizumab and ranibizumab

## 2 罗氏公司 VEGF 抗体在华专利布局

目前,距离 Avastin<sup>®</sup>和 Lucentis<sup>®</sup>分子专利 20 年的保护期已经不足 5 年,国内已有多家企业围绕其生物类似物开展了技术研发。通过对罗氏公司 VEGF 抗体相关的中国专利申请进行分析,可以为中国相关领域的技术研发提供参考资料。

截止到 2013 年 8 月 20 日,罗氏 VEGF 抗体相关专利申请总量中在华专利申请共计 115 件,已授权的有权专利约为 24.3%,未决案件约为 41%,无权案件中“视为撤回”的申请所占比率最大,共 25 件(图 3)。1998—2003 年,罗氏在中国共申请 18 件 VEGF 抗体相关专利申请,其中 11 件已经获得授权,所占比率高达 61%。对于这一时期的专利申请通过深入研究发现,其主要是抗-血管内皮生长因子的抗体和低分子化的激动剂抗体两件专利申请及其分案,反映了罗氏一贯的专利申请策略:对于重要专利申请,在争取母案获得授权的同时,极力通过分案争取更大的保护范围。特别是对于抗-血管内皮生长因子的抗体这一专利申请,该专利申请是贝伐珠单抗的核心专利,罗氏为了更好地争取自己的利益,在这一重要专利申请的基础上共提交了 4 份分案申请。而对于那些被驳回和授权无望的重要申请,罗氏也同样擅长利用分案制度为自己争取利益。这一点从 2004—2006 年间的申请可以看出,被驳回与视撤的 15 个案件中 7 个都提交了分案,这些分案目前仍处于未决状态。2009 年后的专利申请大多仍处于未决状态,其中以与 VEGF 抗体应用相关的专利申请所占比较大,这也体现了罗氏对于 VEGF 抗体已经由初期的

研发改造阶段转向市场应用开发阶段。

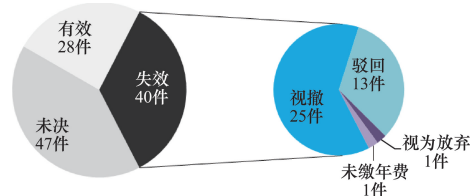
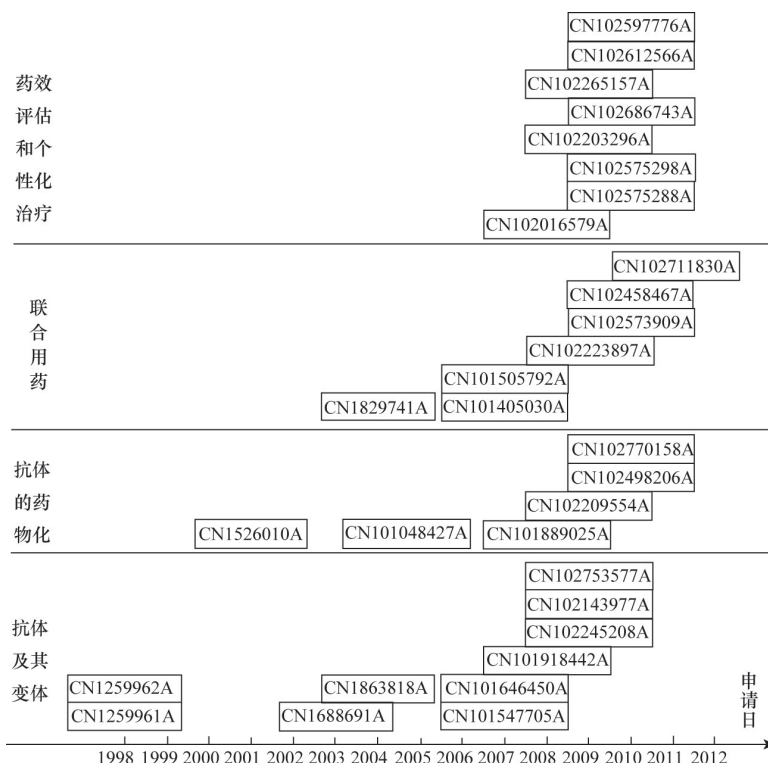


图 3 罗氏在华的 VEGF 抗体专利权利状态  
Fig.3 States of VEGF antibody related patent rights of Roche in China

对罗氏抗 VEGF 抗体的在华重要专利进行深入分析(图 4),可以看出 CN1259961A 和 CN1259962A 是贝伐珠单抗和兰尼单抗的 2 个基础专利,2 份申请的实施例内容近似。CN1259962A 是国际申请 WO9845331 的中文同族,于 1998 年 4 月 3 日提出,公开了 A4.6.1 的人源化抗体的制备过程:首先构建获得最初的人源化 A4.6.1 Fab 片段(hu2.0),该片段是将 A4.6.1 的 CDR 移植到人的 VLK1-VHIII 框架上。该最初的人源化抗体与 VEGF 的结合力非常弱,甚至无法检测;然后经过一系列的随机突变改造,最终筛选获得具有高亲和力的全长抗体 Fab-12 和 Fab 片段 Y0317,即贝伐珠单抗和兰尼单抗。随后罗氏以该专利申请为基础,向中国专利局陆续提交了 4 份分案申请,其中 CN101210050A 和 CN101210051A 为 2007 年提交的分案申请,CN101665536A 和 CN101838328A 为 2009 年提交的分案申请。



注:公开号中线对齐时间为该专利申请的申请日

图 4 罗氏在华重要 VEGF 抗体相关专利

Fig. 4 VEGF antibody related important patents of Roche in China,

通过阅读可以发现,这些申请在提出时的权利要求都是类似的,但授权文本的保护范围则是层次不同、各有侧重。母案CN1259962A中通过噬菌体文库技术构建了多种不同结构的Fab变体,测定了其活性和与VEGF的亲密度,然而母案最终的保护范围仅包括一种由3个重链CDR限定的变体,其他未予以保护的大量变体则成为了罗氏的“蓄水库”。2007年罗氏以母案CN1259962A为基础,提出分案申请CN10120050A和CN101210051A,其中CN101210051A在母案授权文本的基础上进一步限定了3个轻链CDR,即要求保护用6个CDR限定的抗体。而CN10120050A中则要求保护了一种含有不同于母案授权文本的3个重链CDR的抗体,其也同时限定了3个轻链CDR。此外,上述3份专利申请的授权文本中都包括该抗体可以治疗肿瘤(对应贝伐珠单抗)和视网膜疾病(对应兰尼单抗)。而CN101665536A的授权文本则是以马库什的撰写形式,一方面将母案CN1259962A中保护的变体与分案CN10129950A中保护的变体都囊括其内,另一方面因马库什要素之间的交叉匹配而囊括了更多的变体,同时还进一步包括了药物制剂、诊断用途、试剂盒等多种保护主题。2009年申请的另一件分案CN101838328A尚处于权利未决状态,仅从其公开文本中难以判断最终的结果。罗氏在母案中公开了大量的Fab变体,一方面能够作为数据支持其争取较大的保护范围;另一方面作为技术储备,也使罗氏能够利用分案制度将后续开发的有市场潜力的变体加以保护。但这种操作模式也存在着明显的风险,因为根据“捐献原则”,说明书中公开但未予保护的变体,有可能被视为申

请人对公有领域的捐献。

除了A4.6.1的人源化VEGF抗体以外,罗氏还开发出G6和B20系列VEGF抗体,该系列抗体的基础专利是2004年申请的CN1863818A,是国际申请WO200501359的中文同族。2007年申请的CN101547705A和CN101646450A中分别公开了G6-31对多发性骨髓瘤、中良性肠腺瘤、中良性垂体腺瘤和胰腺瘤的治疗效果。

此外,罗氏还在不断地对抗体进行结构改造,以期提高其功效。2003年申请的CN1688691A公开了与抗原结合速率更高的VEGF抗体变体,其利用一系列标准鉴定“结合速率扩增位点”,即潜在诱变位点,并据此进行诱变,从而获得与抗原结合速率较高的变体。2009年申请的CN102143977A和CN102753577A则分别要求保护能同时结合Her2和VEGF的双特异性抗体以及同时能抗VEGF抗体和抗ANG-2抗体的双特异性抗体。同年还提交CN102245208A申请,公开了Fc区域发生两个或更多个氨基酸替换的抗VEGF抗体,使得抗体的半衰期得以延长。另外,2008年申请的CN101918442A的权利要求中以取代的形式囊括了大量的抗VEGF抗体,但实施例中并未对如此多的抗体进行功能测试,仅测定了B20.4.1抗体的亲和力与肿瘤抑制效果,该专利可以视为是罗氏的一种圈地性公开。

在抗体的药物化方面,基于制备方法的保密性较高和侵权取证难度较大等原因,与其他公司一样,罗氏在这一技术分支上的专利布局量相对小的多,但从上游抗体的制备直到下游抗体的制剂都有涉及(表1)。

表1 罗氏VEGF抗体药物化重点专利

Table 1 VEGF antibody pharmaceutical process related important patents of Roche

申请日	公开号	内容简介
2001-12-07	CN1526010A	生产抗VEGF抗体的突变的大肠杆菌,其对异源多肽的降解作用降低,使多肽产量提高
2010-08-06	CN102498206A	在补充天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酸的无谷氨酰胺培养基中,CHO细胞生产的抗VEGF抗体获得最高滴度
2005-07-22	CN101048427A	抗VEGF抗体在氯化锌和乙酸钠缓冲液中结晶的方法,现有技术中多为有机或聚合沉淀剂法,本申请可以避免使用有机或聚合剂
2008-10-29	CN101889025A	阳离子交换树脂纯化贝伐珠单抗工艺参数的改进,具有更低CHOP水平的收集物和更高的步骤产率
2009-09-05	CN102209554A	在制剂中添加Met和Trp能阻止抗VEGF抗体的氧化反应
2010-12-20	CN102770158A	抗VEGF抗体在介于pH4.0-6.0的精氨酸乙酸盐缓冲液中更加稳定,抗VEGF在pH5.2的200 mm精氨酸乙酸盐、0.04%PS20中,且100mg/mL蛋白质浓度是稳定的且具有降低的聚集物和二聚体形成

从2007年开始,罗氏在VEGF抗体的联合用药方面进行了大量的专利布局。在乳腺癌治疗方面,有2组专利较为醒目,第一组是2007年申请的CN101405030A和CN101505792A,分别要求保护在人乳腺癌模型中,贝伐珠单抗或曲妥珠单抗单独应用治疗失败后的二者联用。这一组专利将罗氏在乳腺癌方面最为重要的2个产品Avastin®和Herceptin®联系起来。另一组则是2009年申请的CN102223897A和2010年申请的CN102573909A,分别要求保护使用贝伐珠单抗与紫杉烷/蒽环霉素/卡培他滨联用于先前

未治疗的乳腺癌患者或者贝伐珠单抗与紫杉烷/吉西他滨/卡培他滨/长春瑞滨联合用于先前有过治疗的转移性乳腺癌患者。该组专利则将阿瓦斯汀与市面上常用的化疗药物联系起来,并且覆盖了不同时期的乳腺癌患者。罗氏在贝伐珠单抗与化疗药物的联用方面还有其他的专利申请。早在2004年,安维汀®尚未通过CFDA的审批时,罗氏就已经提交了专利申请CN1829741A,要求保护贝伐珠单抗与伊立替康/氟尿嘧啶/甲酰四氢叶酸等化疗药联合治疗转移性结直肠癌。其中的转移性结直肠癌是安维汀®的药品说明书中给出的最主

要的适应症。2010年申请的CN102458467A公开了mFOLF-  
OX6与贝伐珠单抗联合治疗一年及以上结直肠癌,具有临床  
显著的益处。2011年申请的CN102711830A则公开了奥沙利  
铂化学疗法方案,使用XELOX和FOLFOX4结合贝伐珠单抗  
治疗结直肠癌。不仅如此,罗氏在研究其他抗体药物时,一  
旦发现其从机理和适应症方面能够与抗VEGF抗体联合使用  
时,便会将对这样的联合用药方式提出专利申请。例如2007年  
申请的CN101489576A公开了抗DLL4抗体YW26.82能单独  
抑制肿瘤生长,且与抗VEGF抗体联合使用表现出增强的功  
效;同年申请的CN101743253A公开了神经毡蛋白的VEGF  
阻断性抗体,其能降低小鼠视网膜中的血管重构,且与抗  
VEGF的作用相加可以减缓肿瘤生长;2008年申请的  
CN102037015A公开了与抗VEGF类似的抗Bv8抗体能显著  
抑制肿瘤血管形成,相比于单一疗法,抗VEGF和抗Bv8的联  
合处理抑制肿瘤生长更为显著;2008年申请的  
CN101918022A公开了将ALK-1胞外域经多肽接头附着至人  
IgG1 Fc区生成的ALK1.Fc分子能够影响视网膜血管发育和  
抑制肿瘤生长,与抗VEGF抗体联合使用增强抗肿瘤效果。

对于G6和B20系列VEGF抗体也有联合用药相关的专  
利申请。例如,2007年申请了3项专利,其中CN101443359A  
公开了B20.4.1与抗EGFL7抗体在乳腺癌模型中具有协同效  
应;CN101448856A公开了抗Cr1抗体虽然不抑制肿瘤和血  
管,但能够增强G6-23的效果;CN101448858A公开了抗整联  
蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 抗体增强了抗VEGF抗体在乳腺癌、结肠癌(协同  
抗体为B20.4.1)、血管发生(协同抗体为贝伐珠单抗)模型中  
的功效,而抗整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 抗体没有增强化疗剂(例如伊立  
替康)在结肠癌模型中的活性,但也不阻碍其活性。2010年  
申请的CN102365297A则公开了另一种抗整联蛋白 $\alpha 5\beta 1$ 抗  
体,其与抗VEGF抗体B20.4.1联合可抑制神经胶质瘤。

早在2000年,罗氏就申请了专利CN1420987A以保护一  
种检测VEGF的ELISA方法及其试剂盒,该方法具有高敏感  
度且能够检测多种VEGF的同工型。该专利是罗氏在华专利  
中第一个与VEGF诊断和预后相关的专利申请。随着罗氏抗

VEGF抗体药物研发的日趋完善以及公司向个性化治疗方  
向的逐渐转型,罗氏从2008年起更加侧重于对VEGF抗体治  
疗效果的评估方面的研究,并先后向中国专利局提交了8件专  
利申请,其中使用生理生化参数判断VEGF抗体治疗效果的  
专利共3件,其余5件全部为采用基因型多态性(SNP)对  
VEGF抗体治疗效果进行预判,主要围绕乳腺癌、结直肠癌和  
老年性黄斑(AMD)3大适应症,据此可以推测罗氏今后将在  
SNP与预后的相关性上做更多的文章。

从总体上看,罗氏在华的VEGF抗体相关专利覆盖了抗  
体药物的4个方面。在抗体及其变体方面,握有CN1259962A  
和CN1863818A2大核心专利,分别保护了贝伐珠单抗和兰尼  
单抗以及G6和B20系列抗体;在抗体药品化方面,尽管申请  
数量不多,但覆盖了从抗体细胞株培养到制剂化的各个生产  
环节;在联合用药方面,罗氏为VEGF抗体匹配了大量其他抗  
体和常见化疗药物,并不断测试其后续研发的新抗体与  
VEGF抗体的联用效果;在治疗效果评估方面,则重点关注了  
基因多态性与VEGF抗体治疗效果的关系。根据4个方面在  
时间线上的展开情况,可以预计罗氏今后主要会在联合用药  
和治疗效果评估方面不断投入研发力量并继续提交专利申  
请,以加强其在VEGF抗体药物方面的保护力度。

#### 参考文献(References)

- [1] Ferrara N, Hillan K J, Gerber H P, et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, 3(5): 391-400.
- [2] Steinbrook R. The price of sight-ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration[J]. *New England Journal of Medicine*, 2006, 355(14): 1409-1412.
- [3] 吴炜霖, 仲人前. 人源化抗体的演进发展及应用现状[J]. *现代免疫学*. 2009, 29(4):337-340.  
Wu Weilin, Zhong Renqian. Development and application of humanized antibody[J]. *Current Immunology*. 2009, 29(4):337-340.
- [4] Aiello L P, Avery R L, Arrigg P G, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders[J]. *New England Journal of Medicine*, 1994, 331(22): 1480-1487.

## Analysis of VEGF antibody technology patents of roche

ZHANG Chi<sup>1</sup>, ZHANG Yinghui<sup>2</sup>

1. Pharmacy and Biotech Examination Department, The Patent Office, State Intellectual Property Office of the P R C, Beijing 100088, China

2. Patent Examination Administration Department, The Patent Office, State Intellectual Property Office of the P R C, Beijing 100088, China

**Abstract** This paper analyzes the technical development route of bevacizumab and ranibizumab based on the vascular endothelial growth factor(VEGF) antibody related patent applications of Roche. The layout in China of the VEGF related patents of Roche is also analyzed. Based on the above analyses, the future trends and directions of the technical research and development of VEGF antibody technology are predicted.

**Keywords** Roche; VEGF antibody; patent analysis

(编辑 傅雪)