



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107076749 B

(45) 授权公告日 2020.12.29

(21) 申请号 201580049558.1

(22) 申请日 2015.09.10

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107076749 A

(43) 申请公布日 2017.08.18

(30) 优先权数据
62/051,091 2014.09.16 US
62/099,630 2015.01.05 US(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.03.15(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/049279 2015.09.10(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/044041 EN 2016.03.24(73) 专利权人 瑞泽恩制药公司
地址 美国纽约州

(72) 发明人 T·N·西姆斯 B·高 I·洛伊

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 凌立 黄革生

(51) Int.Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102971001 A, 2013.03.13

CN 102711830 A, 2012.10.03

Hidetoshi Hayashi et al..Biomarkers of reactive resistance and early disease progression during chemotherapy plus bevacizumab treatment for colorectal carcinoma.《Oncotarget》.2014,第5卷(第9期),第2588-2595页.

Jennifer L. Spratlin et al..Phase I Pharmacologic and Biologic Study of Ramucirumab (IMC-1121B), a Fully Human Immunoglobulin G1 Monoclonal Antibody Targeting the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2.《JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY》.2010,第28卷(第5期),第780-787页.

审查员 赵晓明

权利要求书1页 说明书10页

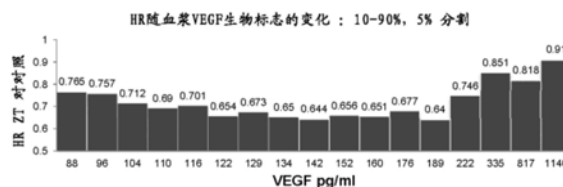
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

转移性结直肠癌抗血管发生治疗相关预测和预后生物标志

(57) 摘要

本发明提供用于治疗转移性结直肠癌的方法,其包括鉴定将有利地响应抗VEGF治疗的个体。根据本发明的某些方面,根据其VEGF-A的表达水平来鉴定个体。VEGF-A提高的表达水平指示对抗VEGF治疗的有利响应。本文还公开VEGF-A作为标记的用途,该标记用于鉴定预期对抗VEGF治疗具有更好的相对存活结果的患转移性结直肠癌个体。



1. VEGF拮抗剂与包含伊立替康、5-氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸的化疗方案FOLFIRI组合在制备用于治疗转移性结直肠癌 (mCRC) 的药物中的用途, 其中患者已经诊断为患有mCRC, 且根据显示的VEGF-A表达的提高了的血浆水平, 已经选择进行VEGF拮抗剂与FOLFIRI的组合治疗; 其中确定VEGF-A表达的提高了的血浆水平为治疗前88pg/mL-1140pg/ml, 且其中VEGF拮抗剂是ziv-aflibercept。

2. 权利要求1的用途, 其中所述VEGF-A表达水平为142pg/ml或更高。

3. 测定样品中VEGF水平的试剂在制备用于鉴定可能有利地响应治疗的转移性结直肠癌 (mCRC) 患者的方法的试剂盒中的用途, 所述方法测定从患者获得的血浆样品中的VEGF-A水平; 其中88-1140pg/ml的提高了的VEGF-A表达血浆水平将患者鉴定为可能有利地响应所述治疗的患者, 其中所述治疗包括对患者施用ziv-aflibercept与包含伊立替康、5-氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸的化疗方案FOLFIRI。

4. 权利要求3的用途, 其中所述VEGF-A表达水平为142pg/ml或更高。

5. 权利要求3的用途, 其中用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测量VEGF-A的表达的水平。

转移性结直肠癌抗血管发生治疗相关预测和预后生物标志

技术领域

[0001] 本发明涉及预测和预后生物标志在鉴定和治疗患者中的转移性癌症中的用途。

背景技术

[0002] 血管内皮生长因子 (VEGF) 是涉及血管发生的细胞因子。配体 VEGF-A 与 VEGF 受体-1 (VEGFR1) 和 VEGFR2 相互作用, 从而起始正常和肿瘤脉管系统 (vasculature) 中的血管发生信号传导途径。已知 VEGF 拮抗剂可用于治疗多种疾病和障碍, 包括癌症、眼病和其他涉及过度、不想要或不适当的血管发生的病症。VEGF 拮抗剂的实例是阿柏西普 (aflibercept) (也称为 VEGF 陷阱; 或 ziv-aflibercept, 其作为 **ZALTRAP®** 销售, Regeneron Pharmaceuticals, Inc., Tarrytown, NY)。阿柏西普是基于 VEGF 受体的嵌合分子, 其包含来自 VEGFR1 的结构域 2, 来自 VEGFR1 的结构域 2 与来自 VEGFR2 的结构域 3 融合, 来自 VEGFR2 的结构域 3 转通过铰链区附着于人 IgG1 的 Fc (a) 结构域。Ziv-aflibercept 批准用于治疗转移性结直肠癌 (metastatic colorectal cancer), 也在开发用于治疗其他癌性病症。VEGF 陷阱描述于例如美国专利号 7,070,959 中; 还参见 Holash 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 11393-11398 (2002)。

[0003] 迄今未验证过对 VEGF 抑制的抗性 or 敏感性的预测性生物标志。虽然 VEGF 拮抗剂已在癌症治疗中的显示巨大的前景, 但需要经验证的预测抗 VEGF 治疗功效的生物标志来有效鉴定和选择有利地响应抗 VEGF 治疗的患者亚群。因此, 本领域中存在对鉴定和验证施用抗 VEGF 治疗的转移性癌症患者中的预测和预后生物标志的未得到满足的需要。

[0004] 发明概述

[0005] 根据本发明的一个方面, 提供用于在个体中治疗癌症的方法。例如, 本发明的此方面的方法包括对该个体施用 VEGF 拮抗剂, 其中该个体已经诊断为患有转移性癌症, 且根据显示的预测生物标志如 VEGF-A 的表达提高, 已经选择进行 VEGF 拮抗剂治疗。在某些实施方案中, 根据与患有癌症的个体中较低的生物标志表达水平的比较确定预测生物标志的表达提高。在一个实施方案中, 该转移性癌症是转移性结直肠癌 (mCRC)。

[0006] 根据本发明的另一方面, 提供用于在个体中治疗晚期卵巢癌的方法。本发明的此方面的方法包括对该个体施用 VEGF 拮抗剂, 其中该个体已诊断为患有晚期卵巢癌, 且已根据显示白细胞介素-6 (IL-6) 的表达改变 (即提高或降低) 而选择进行 VEGF 拮抗剂治疗。在某些实施方案中, 根据与非患癌个体中 IL-6 表达水平的比较确定该个体中 IL-6 的表达改变。在将癌症患者鉴定为显示 IL-6 表达提高的情况下, 该患者可以按照本发明, 通过施用 VEGF 拮抗剂和 IL-6 或 IL-6 受体拮抗剂的组合有效地治疗。

[0007] 根据本发明的另一方面, 提供用于鉴定可能有利地响应抗 VEGF 治疗的患有转移性结直肠癌的个体的方法。本发明的此方面的方法包括从该患者获得样品, 并测量该样品中预测生物标志如 VEGF-A (或本文所述的一种或多种其他预测生物标志) 的水平, 其中与 mCRC 患者中较低的生物标志表达水平相比, 预测生物标志的表达提高 (鉴定为本文中其他地方公开的“高”水平) 将该患者鉴定为可能有利地响应抗 VEGF 治疗的患者。

[0008] 在一些实施方案中,该抗VEGF治疗包括对有需要的个体施用VEGF拮抗剂。用于本发明方法的VEGF拮抗剂可以是抗VEGF抗体、抗VEGF受体抗体或基于VEGF受体的嵌合分子(VEGF陷阱)。在某些实施方案中,该VEGF拮抗剂是ziv-aflibercept。

[0009] 在一些实施方案中,该抗VEGF治疗可以与化疗剂和/或化疗方案组合施用。示例性化疗剂/方案包括亚叶酸(folinic acid)、5-氟尿嘧啶和奥沙利铂(即FOLFOX治疗),及亚叶酸、5-氟尿嘧啶和伊立替康(即FLOFIRI治疗)。

[0010] 在某些实施方案中,从该患者获得的样品选自血液、血清和血浆。

[0011] 本发明的其他实施方案将从以下发明详述的评论变得显而易见。

[0012] 附图简述

[0013] 图1是“高”生物标志组的风险比(HR)变化图。“高”生物标志组定义为阿柏西普与FOLFIRI组合治疗的mCRC患者的3期研究中转移性结直肠癌(mCRC)患者亚组中血浆VEGF生物标志浓度截止值在88至1140pg/mL的范围内。

[0014] 图2是“高”生物标志组的HR变化图。“高”生物标志组定义为阿柏西普与FOLFIRI组合治疗的mCRC患者的3期研究中mCRC患者亚组中血浆IL-8生物标志浓度(表示为pg/mL)截止值在5.1至111pg/mL的范围内。

[0015] 图3显示阿柏西普单一治疗的晚期卵巢癌患者2期研究中高或低白细胞介素-6(IL-6)水平与卵巢癌患者总体存活分数的相关性。

[0016] 发明详述

[0017] 在描述本发明之前,应理解,本发明不限于所描述的具体方法和实验条件,因为这类方法和条件可以变动。还应理解,本文所用的术语仅是为了描述具体实施方案的目的,并非旨在限制,因为本发明的范围仅受限于所附权利要求书。

[0018] 除非另有说明,本文所用的所有科学和技术术语具有与本发明所属领域普通技术人员的通常理解相同的含义。在用于提到所引用的具体数值时,本文所用的术语“约”指该值可以从所引用的值变动不超过1%。例如,本文所用的表述“约100”包括99和101及之间的所有值(例如99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0019] 虽然与本文所述的那些相似或等同的任何方法和材料都可以用于实施本发明,但现在描述优选的方法和材料。本文提到的所有出版物在此以其整体引入作为参考。

[0020] 预测和预后生物标志

[0021] 本发明部分基于发现其在癌症患者中的表达水平(高于或低于中位数表达水平)与抗血管发生剂治疗后增强的总体存活(OS)相关的某些生物标志蛋白质的鉴定。具体而言,鉴定出某些蛋白质生物标志,该蛋白质生物标志在以较高或较低的水平在转移性结直肠癌(mCRC)患者中表达时与这类患者在VEGF拮抗剂ziv-aflibercept治疗后增强的总体存活相关。可以在本发明的背景中用于鉴定可能有利地响应ziv-aflibercept治疗的患者的示例性生物标志是VEGF-A。在某些实施方案中,发现与患有mCRC且未用VEGF拮抗剂治疗过的患者中的VEGF-A表达水平相比具有更高VEGF-A水平的患者在使用抗VEGF疗法治疗时,具有改善的存活结果。在某些实施方案中,可以用一种或多种生物标志的表达提高或降低作为特征成分,来鉴定可能有利地响应ziv-aflibercept治疗的患者。例如,该特征可以包括VEGF途径蛋白质(如VEGF-R2和VEGF-R3)或炎症相关标志如巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)和表面活性蛋白D(SPD)。

[0022] 在相关方面,本发明涉及某些蛋白质生物标志的鉴定,该蛋白质生物标志在以高于或低于晚期卵巢癌患者中的中位数水平表达时与这类患者在VEGF拮抗剂ziv-aflibercept治疗后增强的总体存活相关。可以在本发明的背景中用于鉴定可能有利地响应ziv-aflibercept治疗的患者的示例性生物标志是细胞因子白细胞介素-6 (IL-6)。在某些实施方案中,发现与患有晚期卵巢癌且未用VEGF拮抗剂治疗过的患者中的中位数IL-6表达水平相比,具有较低IL-6水平的患者在用抗VEGF疗法治疗时具有改善的存活结果。

[0023] 本文所用的“预测”生物标志指提供关于治疗干预在患者中的作用的信息的生物标志。预测生物标志也可以是治疗靶标。预测生物标志可以用于患者选择,具体而言,用于鉴定将有利地响应具体治疗的患者。在本发明的背景中,预测生物标志包括表达提高或降低的蛋白质生物标志,其与患有癌症(如转移性结直肠癌或卵巢癌)且用抗VEGF疗法治疗的患者与未用抗VEGF疗法治疗的处于相似情况的患者相比改善的存活结果相关。见于本文所示例的研究中的预测生物标志的实例是VEGF-A。与患有mCRC但未用ziv-aflibercept治疗的患者相比,具有提高的VEGF-A表达且用ziv-aflibercept治疗的mCRC患者具有更高的总体存活概率。预测生物标志的另一实例是IL-6。与患有卵巢癌但未用ziv-aflibercept治疗的患者相比,具有提高的IL-6表达且用ziv-aflibercept治疗的卵巢癌患者具有更低的总体存活概率。预测生物标志的其他实例包括VEGF-R2、VEGF-R3、SPD和MIF。某些生物标志可以分类为预测和预后生物标志二者。在用VEGF拮抗剂治疗癌症的背景中可以分类为预测和预后生物标志的生物标志的实例是IL-8。

[0024] 本发明还涉及与mCRC总体存活相关的某些预后生物标志的鉴定。预后生物标志包括蛋白质,在以高于或低于转移性结直肠癌(mCRC)患者中的正常水平表达时,其与患者的不考虑治疗的增强的总体存活相关。可以在本发明的背景中用于鉴定具有潜在增强的mCRC总体存活的患者的示例性预后生物标志包括血管生成素-2 (Ang-2)、C反应蛋白(CRP)和NRP1。

[0025] 本文所用的“预后”生物标志指提供关于患者的不考虑治疗的总体癌症结果的信息的生物标志。预后生物标志可以提供关于接受治愈性治疗的患者中的复发的信息。在一些实施方案中,预后生物标志的表达改变与转移性疾病患者中的无进展存活期相关。在本发明的背景中,术语“预后”生物标志指与患者中转移性癌症差的预后相关的蛋白质生物标志的表达改变。例如,本文中显示,无论是否用抗VEGF疗法治疗患者,与具有低Ang-2或CRP水平的患者相比,具有高血浆Ang-2或CRP水平的mCRC患者的mCRC预后差(例如存活概率降低)。

[0026] 可以通过直接或间接测量从患者获得的组织样品、肿瘤样品(例如活检组织)或流体样品中生物标志的绝对或相对量来测定患者中预测和预后生物标志的水平。流体样品可以选自血液、血浆和血清。可以用诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)的技术、或其他蛋白质检测和分析方法、以及通过测量编码蛋白质生物标志的核酸(例如mRNA)的量,来测量样品中生物标志的量。涉及直接测量或检测样品中的具体蛋白质生物标志的测定可以用例如对生物标志特异的抗体或其他抗原结合蛋白质来达到。这类抗体或抗原结合蛋白质可以用可检测化合物如荧光团或放射性化合物标记。因此,本发明还包括特异性结合本文所述的任意预测或预后生物标志的抗体和抗原结合蛋白质,以及包含这类抗体的试剂盒和诊断方法,及其用途。

[0027] 具体生物标志的参考表达水平可以确定为单个值或值的范围,其根据在例如健康个体的群体中或需要治疗的个体的群体中测量的生物标志表达水平来确定。根据本发明的某些实施方案,根据在需要ziv-aflibercept治疗的个体的群体中测量的生物标志表达水平来确定生物标志的参考表达水平。所分析的群体可以根据所测量的具体生物标志的表达水平划分为百分位数。在一些情况下,参考水平可以定义为提供ziv-aflibercept治疗对其基本有效的癌症患者和ziv-aflibercept治疗对其有效性较差或次优的癌症患者之间的最佳分开的百分位。具体生物标志的参考表达水平可以(i)根据研究群体的大小和(ii)取决于用于测量生物标志表达的方法而变。

[0028] VEGF拮抗剂

[0029] 本文所用的表述“VEGF拮抗剂”指阻断、降低或干扰血管内皮生长因子(VEGF)或VEGF受体的正常生物学活性的任何分子。VEGF拮抗剂包括干扰VEGF和天然VEGF受体间相互作用的分子,例如结合VEGF或VEGF受体并阻止或以其他方式妨碍VEGF和VEGF受体间相互作用的分子。具体的示例性VEGF拮抗剂包括抗VEGF抗体(例如贝伐单抗[**AVASTIN®**]、抗VEGF受体抗体(例如抗VEGFR1抗体、抗VEGFR2抗体等)和基于VEGF受体的嵌合分子(本文中也称为“VEGF陷阱”)。

[0030] 基于VEGF受体的嵌合分子包括这样的嵌合多肽,其包含VEGFR1(也称为Flt1)和/或VEGFR2(也称为Flk1或KDR)的两个或多个免疫球蛋白(Ig)样结构域,且还可以包含多聚化结构域(例如便于两个或多个嵌合多肽的多聚化[例如二聚化]的Fc结构域)。示例性基于VEGF受体的嵌合分子是称为VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)的分子(也称为阿柏西普或ziv-aflibercept,在产品名**ZALTRAP®**下销售),其由核酸序列SEQ ID NO:1编码。VEGFR1R2-Fc Δ C1(a)包含三个成分:(1)包含SEQ ID NO:2的氨基酸27至129的VEGFR1成分;(2)包含SEQ ID NO:2的氨基酸130至231的VEGFR2成分;和(3)包含SEQ ID NO:2的氨基酸232至457的多聚化成分(“Fc Δ C1(a)”) (SEQ ID NO:2的C端氨基酸[即K458]可以包含或不包含在用于本发明方法的VEGF拮抗剂中;参见美国专利7,396,664)。SEQ ID NO:2的氨基酸1-26是信号序列。

[0031] 生物标志和治疗转移性癌症的方法

[0032] 本发明包括用于治疗个体中的癌症(例如晚期癌症、转移性癌症等)的方法。本发明的此方面的方法包括对该个体施用VEGF拮抗剂,其中该个体已诊断为患有癌症(例如转移性结直肠癌、晚期卵巢癌),且已根据显示生物标志的表达提高而选择进行VEGF拮抗剂治疗,其中根据与该生物标志在患有转移性癌症的个体中较低的表达水平(即参考水平)的比较确定生物标志的表达提高。该VEGF拮抗剂可以包含基于VEGF受体的嵌合分子(VEGF陷阱)。VEGF陷阱的实例是ziv-aflibercept。在某些实施方案中,该患者可以与包含甲酰四氢叶酸(也称为亚叶酸)、5-氟尿嘧啶和伊立替康(其组合称为“FOLFIRI”)的化疗方案组合施用VEGF拮抗剂。

[0033] 术语“个体”和“患者”在本文中可互换使用,指需要针对癌症,优选转移性癌症进行治疗的个体。

[0034] 本发明还包括用于鉴定可能有利地响应抗VEGF治疗的转移性结直肠癌(mCRC)患者的方法。该方法包括从该患者获得样品,并测量该样品中诸如VEGF-A、VEGF-R2、VEGF-R3、

MIF和/或IL-8的生物标志的水平,其中与该生物标志在患有mCRC的个体中较低的表达水平(即参考水平)相比,提高的生物标志表达将该患者鉴定为可能有利地响应抗VEGF治疗的患者。在备选实施方案中,该方法包括从该患者获得样品,并测量该样品中诸如SPD的生物标志的水平,其中与该生物标志在患有mCRC的个体中较高的表达水平(即参考水平)相比,较低的生物标志表达将该患者鉴定为可能有利地响应抗VEGF治疗的患者。

[0035] 本发明还包括用于鉴定可能有利地响应抗VEGF治疗的晚期卵巢癌患者的方法。该方法包括从该患者获得样品,并测量该样品中诸如IL-6的生物标志的水平,其中与该生物标志在患有卵巢癌的个体中的中位数表达水平(即参考水平)相比,改变的生物标志表达将该患者鉴定为可能有利地响应抗VEGF治疗的患者。

[0036] 本文所用的“可能有利地响应”抗VEGF治疗的患者指患有癌症(例如mCRC、卵巢癌)的患者,预期其在施用该抗VEGF治疗时显示选自以下的作用:与患有癌症且未接受抗VEGF治疗的患者相比,改善的总体存活、无进展存活期增加、肿瘤消退和肿瘤复发概率降低。改善的存活时间是指,与未接受抗VEGF治疗的处于相似情况的患有癌症的个体相比,约1周、2周、4周、2个月、4个月、6个月、8个月、10个月、12个月、14个月、16个月、18个月、20个月、22个月、24个月、26个月、28个月、30个月、36个月、40个月或更长的存活。

[0037] 本发明还包括确定个体中mCRC的预后的方法。本发明的此方面的方法包括从该个体获得样品,并测量该样品中生物标志的水平,其中与该生物标志在患有mCRC的个体中的中位数表达水平相比改变的生物标志表达(提高或降低的表达)将该患者鉴定为预后差的患者。在某些实施方案中,该生物标志选自血管生成素-2(Ang-2)和C-反应蛋白(CRP)。在某些实施方案中,生物表示的表达降低将该患者鉴定为预后良好的患者。在某些实施方案中,预后良好包括选自以下的作用:总体存活增加、无进展存活、肿瘤生长减少、肿瘤消退和患者中肿瘤复发的抑制。例如,在本研究中,发明人发现,低血浆Ang-2或CRP水平与mCRC患者更高概率的总体存活相关。

实施例

[0038] 提供以下实施例以便为本领域普通技术人员提供如何制备和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并非旨在限制发明人视之为其发明的范围。已作出努力来就所使用的数字(例如量、温度等)确保准确性,但应说明一些实验误差和偏差。除非另有说明,部分是按重量计的部分,分子量是平均分子量,温度以摄氏度表示,压力为处于或接近大气压。

[0039] 实施例1:来自VEGF陷阱在转移性结直肠癌患者中的3期临床试验的基线血浆样品中潜在的预测和预后生物标志的鉴定

[0040] 前言

[0041] **ZALTRAP®**(ziv-aflibercept,也称为VEGF陷阱)是结合并中和VEGFR1和VEGFR2的配体(例如VEGF-A、PLGF和VEGF-B)的VEGF-R1-R2-Fc嵌合蛋白质,已批准用于治疗转移性结直肠癌(mCRC)(尤其是在之前包括奥沙利铂的治疗后进展的患者中与FOLFIRI[包含伊立替康、5-氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸的化疗方案]组合)。

[0042] 从FOLFIRI+/-ziv-aflibercept的1226名患者的关键性、随机化和安慰剂对照注册试验(VELOUR, ClinicalTrials.gov 识别号: NCT00561470)分析了血浆和肿瘤样品,以鉴

定预后和预测因子二者。此实施例给出基线血浆样品的分析,目的是鉴定ziv-aflibercept反应的可能的生物标志。

[0043] 结果

[0044] 进行了来自553份基线血浆样品的蛋白质生物标志的回顾性分析。所收集的样品所代表的群体类似于总VELOUR群体。用多重免疫测定和ELISA针对98种分析物的水平分析了样品。根据中位数值将生物标志值二分为生物标志“高”和“低”组,然后就治疗后患者的总体存活(OS)进行分析。

[0045] 对于OS,血浆生物标志群体中风险比(HR)为0.809,总VELOUR群体中HR=0.817。对于无进展存活(PFS),血浆生物标志群体中HR=0.752,VELOUR中HR=0.758。患者人口统计数据(包括ECOG状态)在组间相似。将几个生物标志鉴定为OS的潜在预测或预后生物标志(或二者),HR<0.7(错误发现率为0.05,相互作用p<0.10)。没有生物标志亚组对应于ziv-aflibercept治疗的更差OS。

[0046] 将8个生物标志鉴定为OS的潜在预测生物标志(风险比(HR)<0.7;p<0.01,甚至在解释多重检验后也显著),而将23个生物标志鉴定为OS的潜在预后生物标志(p<0.01)。高水平VEGF-A(中位数=142pg/mL)作为对ziv-aflibercept治疗的反应的潜在预测生物标志之一出现。表1显示具有高或低血浆VEGF-A水平的对照和ziv-aflibercept治疗患者的中位数总体存活的初步分析。

[0047] 表1:具有高或低血浆VEGF-A水平的对照和ziv-aflibercept治疗患者的中位数总体存活的初步分析

	对照的中位数 OS (95% CI)	ziv-aflibercept 的 中位数 OS (95% CI)	HR (95% CI)	时序检验 p-值
总数: 事件数, n/N (%)	207/265 (78.1%)	195/288 (67.7%)		
VEGF (低水平): 事件数, n/N (%)	95/132 (72%)	96/142 (67.6%)		
VEGF_(低水平)	13.1 (10.8 至 17.1)	12.8 (11.9 至 16.2)	0.963 (0.725 至 1.28)	0.7947
VEGF (高水平): 事件数, n/N (%)	112/133 (84.2%)	99/146 (67.8%)		
VEGF_(高水平)	9.7 (8.5 至 11.3)	12.5 (10.4 至 15.9)	0.644 (0.49 至 0.845)	0.0013

[0049] 如表1中所示,用ziv-aflibercept治疗的具有高血浆VEGF-A水平的患者显示比对照组高的总体存活。HR计算为0.644(相互作用p-值:0.056),其表明VEGF-A是潜在的预测标志。就PFS显示了相当的结果(HR=0.599,95%CI:0.453-0.792,p=0.001)。类似地,在具有高VEGF-A水平的患者中,总响应率(ORR)从对照组中的6.2%提高至阿柏西普治疗组中的22.7%。

[0050] 用88-1140pg/mL范围内的VEGF值(分类为“高”)来按5%递升增量确定截止值。对于<222pg/mL的VEGF截止值,OS的HR稳定(图1)。在更高的VEGF水平(>335pg/mL),ziv-aflibercept作用并不显著(患者中最高的20%)。

[0051] 将VEGF途径蛋白质VEGF-R2和VEGF-R3鉴定为潜在的预测生物标志。发现用ziv-aflibercept治疗的具有高血浆sVEGF-R2(中位数:4.2pg/mL)的患者可能具有比对照组好

的OS (HR=0.686, 95%CI:0.49-0.85, $p=0.008$)。就PFS发现了相当的结果 (HR=0.679, 95%CI:0.516-0.893, $p=0.005$)。发现用ziv-aflibercept治疗的具有高血浆sVEGF-R3 (中位数:35pg/mL) 的患者可能具有比对照组好的OS (HR=0.686; $p=0.008$)。就PFS获得了相当的结果 (HR=0.711, 95%CI:0.545-0.927, $p=0.01$)。

[0052] 将表面活性蛋白D (SPD) 鉴定为潜在的预测标志。用ziv-aflibercept治疗的具有低血浆SPD水平的患者显示高于对照组的总体存活 (13.9个月对9.7个月; HR=0.598, 95%CI:0.453-0.791, p 值<0.001)。针对PFS观察到了相当的结果 (HR=0.581, 95%CI:0.437-0.773, p 值<0.001)。在具有低SPD水平的患者中, 总响应率从对照组中的8.1%提高到阿柏西普治疗组中的25.6%。

[0053] 将巨噬细胞迁移抑制因子 (MIF) 鉴定为潜在的预测标志。用ziv-aflibercept治疗的具有高血浆MIF的患者显示高于对照组的总体存活 (12.7个月对9.5个月; HR=0.67, 95%CI:0.512-0.875, p 值:0.003)。就PFS显示了相似的结果 (HR=0.607, 95%CI:0.463-0.797, p 值<0.001)。在具有高血浆MIF水平的患者中, 总响应率从对照组中的10.5%提高到阿柏西普治疗组中的20.9%。

[0054] 将嗜酸细胞活化趋化因子-1 (Eotaxin-1, CCL11) 鉴定为潜在的预测标志。用ziv-aflibercept治疗的具有高血浆嗜酸细胞活化趋化因子-1的患者显示更高的存活概率 (HR:0.661, 95%CI:0.497-0.879; p -值0.004)。就PFS显示了相似的结果 (HR=0.701, 95%CI:0.528-0.929, p 值0.012)。在具有高血浆嗜酸细胞活化趋化因子-1水平的患者中, 总响应率从对照组中的8.7%提高到阿柏西普治疗组中的23.3%。在多变量分析中, 嗜酸细胞活化趋化因子-1预测对ziv-aflibercept的相应。

[0055] 将hepsin鉴定为潜在的预测标志。用ziv-aflibercept治疗的具有高血浆hepsin的患者显示更高的存活概率 (HR:0.671, 95%CI:0.511-0.881; p -值0.004)。就PFS显示了相似的结果 (HR=0.661, 95%CI:0.501-0.871, p 值0.003)。在具有高血浆hepsin水平的患者中, 总响应率从对照组中的10%提高到阿柏西普治疗组中的22.5%。在多变量分析中, hepsin预测对ziv-aflibercept的相应。

[0056] 将一些生物标志鉴定为潜在的预测和预后生物标志二者。白细胞介素-8 (IL-8) 可以是预测标志以及预后标志。用ziv-aflibercept治疗的具有低血浆IL-8水平的患者显示高于对照治疗的患者的总体存活 (9.4个月对8.0个月; HR=0.632, 95%CI:0.489-0.817, p 值:0.0006)。针对PFS获得了相当的结果 (4.9个月对3.9个月; HR=0.694, 95%CI:0.534-0.902, p 值0.005)。还将IL-8鉴定为潜在的预后标志。发现具有低血浆IL-8水平的患者具有更好的OS (对于阿柏西普治疗的患者为18.8个月对9.4个月, HR=2.319, $p=0$; 对于对照为19.8个月对8.0个月, HR=4.48, $p=0$)。

[0057] 用5.1-111pg/mL范围内的IL-8值 (分类为“高”) 来按5%递升增量确定截止值。对于<49pg/mL的IL-8截止水平, OS的HR稳定 (图2)。在20-31pg/mL之间的水平观察到了最佳HR。在更高的IL-8水平 (>63pg/mL), ziv-aflibercept作用并不显著 (患者中最高的20%)。

[0058] 神经毡蛋白-1 (NRP1) 可以是预后标志。对于阿柏西普治疗的患者 (18.7个月对10.0个月, HR=2.104, $p<0.001$) 及对于对照 (14.2个月对9.0个月, HR=2.032, $p<0.001$), 发现具有低血浆NRP1的患者具有更好的OS。

[0059] 血管生成素2 (Ang-2) 和C-反应蛋白作为潜在的预后标志出现。

[0060] 表2显示具有高或低Ang-2水平的对照和治疗的患者的中位数总体存活的初步分析

[0061] 表2:具有高或低Ang-2水平的对照和治疗的患者的中位数总体存活的初步分析

	对照的中位数 OS (95% CI)	ziv-aflibercept 的中 位数 OS (95% CI)	HR (95% CI)	时序检 验 p-值
总数: 事件数, n/N (%)	207/265 (78.1%)	195/288 (67.7%)		
Ang-2 (低水平): 事件数, n/N (%)	85/118 (72%)	87/152 (57.2%)		
Ang-2 (低水平)	13.7 (11.7 至 17.7)	18 (14.4 至 21.8)	0.74 (0.549 至 0.998)	0.0475
Ang-2 (高水平): 事件数, n/N (%)	122/147 (83%)	108/136 (79.4%)		
Ang-2 (高水平)	9.6 (9 至 11.3)	10.3 (8.5 至 12.2)	0.892 (0.687 至 1.159)	0.3894

[0063] 如表2中所示,不考虑治疗,具有低血浆Ang-2水平(<3.9ng/mL)的患者显示比具有高Ang-2水平的患者更好的存活结果。高Ang-2水平在对照和治疗的患者的亚组中都与预后效应差相关(治疗的患者中HR=1.83;对照中HR=1.54)(相互作用p-值:0.366)。未发现统计上显著的预测效应与Ang-2表达相关。

[0064] 表3显示具有高或低CRP水平的对照和治疗的患者的中位数总体存活的初步分析。

[0065] 表3:具有高或低CRP水平的对照和治疗的患者的中位数总体存活的初步分析

	对照的中位数 OS (95% CI)	ziv-aflibercept 的中 位数 OS (95% CI)	HR (95% CI)	时序检 验 p-值
总数: 事件数, n/N (%)	207/265 (78.1%)	195/288 (67.7%)		
CRP (低水平): 事件数, n/N (%)	85/131 (64.9%)	76/145 (52.4%)		
CRP (低水平)	17.4 (13.7 至 20.5)	19.1 (16.7 至 25.1)	0.765 (0.56 至 1.045)	0.0905
CRP (高水平): 事件数, n/N (%)	122/134 (91%)	119/143 (83.2%)		
CRP (高水平)	8.6 (7.1 至 9.7)	9.4 (7.8 至 11.5)	0.763 (0.592 至 0.984)	0.0354

[0067] 如表3中所示,不考虑治疗,具有低血浆CRP水平(<9.4μg/mL)的患者显示比具有高CRP水平的患者更好的存活结果。高CRP水平在对照和治疗的患者的亚组中都与预后效应差相关(治疗的患者中HR=2.553,p<0.001;对照中HR=2.773,p<0.001)。未发现预测效应与CRP表达相关。

[0068] 没有生物标志亚组对应于ziv-aflibercept治疗的更差OS。

[0069] 表4总结阿柏西普治疗的前几名潜在预测标志的结果。

[0070] 表4:研究中的前几名潜在预测标志的结果

[0071]

生物标志	中位数(最小, 最大)	高或低生物标志组	风险比 (ZT 对对照)	P-值*	相互作用 P-值
IL-8	20 pg/mL (2, 4504 pg/mL)	高	0.63	4.00E-04	0.022
MIF	0.3 ng/mL (0.015, 29 ng/mL)	高	0.67	0.003	0.087
嗜酸细胞活化趋化因子-1	73 pg/mL (27-487 pg/mL)	高	0.66	0.0041	0.087
VEGF	142 pg/mL (25, 2350 pg/mL)	高	0.64	0.0013	0.056
VEGFR2	4.2 pg/mL (1, 9 pg/mL)	高	0.69	0.0082	0.157^
VEGFR3	35 ng/mL (3, 125 pg/mL)	高	0.69	0.0061	0.177^
Hepsin	771 pg/mL (190-1860 pg/mL)	高	0.69	0.0038	0.06
SPD	7.7 ng/mL (0.19, 85 ng/mL)	低	0.60	3.00E-04	0.003

[0072] *针对错误发现率调整时序检验P-值

[0073] ^VEGF-R2和VEGF-R3落在显著性水平之下

[0074] 表5总结试验中的一些潜在预后标志。

[0075] 表5: 研究中的潜在预后标志

[0076]

生物标志	中位数(最小, 最大)	对照治疗		Ziv-aflibercept 治疗	
		风险比 (高对低)	P-值	风险比 (高对低)	P-值
IL-8	20 pg/mL (2, 4504 pg/mL)	4.4810	<0.001	2.3189	<0.001
CRP	9.4 mg/mL (6, 390 pg/mL)	2.7732	<0.001	2.5535	<0.001
NRP1	160 ng/mL (34, 387 ng/mL)	2.0324	<0.001	2.104	<0.001
ANG2	3.9 ng/mL (1, 59 pg/mL)	1.5447	0.002	1.8293	<0.001

[0077] 结论

[0078] 在本研究中, 鉴定了包括例如VEGF-A的响应ziv-aflibercept的多个预测生物标志。高VEGF-A组中的患者(即血浆水平>142pg/mL)似乎从阿柏西普治疗受益最多。用VEGF-R2和VEGF-R3观察到了相似的结果。VEGF-R2和VEGF-R3作为特征成分进行进一步研究可以很有意义。但是, 在最高VEGF水平, 发现受益下降。此外, 在本分析的过程中还鉴定出几个预后生物标志。备选血管发生因子(例如Ang-2)表达提高或炎症标志(例如CRP)增加的患者亚组与结果差相关。低NRP-1可以是存活的预后标志。在缺乏ziv-aflibercept治疗的情况下, 含有高VEGF途径标志的样品也与结果差相关。在患者中鉴定相关途径对优化联合治疗的功效很重要。

[0079] 实施例2:来自VEGF陷阱在卵巢癌患者中的2期临床试验的血清样品中的潜在生物标志的鉴定

[0080] 在晚期卵巢癌的国际、双盲、2期研究 (ClinicalTrials.gov识别号:NCT00327171) 中,用阿柏西普作为单一治疗。患者每两周接受2mg/kg或4mg/kg剂量的阿柏西普,并监测总体响应。分析血清样品来鉴定潜在的预测和预后标志。在此实施例中,在96名患者的亚组中测量了白细胞介素-6 (IL-6) 的血清水平。

[0081] 研究在两条臂中都显示5%的适度响应率。在根据低(<中位数)和高(>中位数) IL-6血清水平分层数据时,变得很明显,与具有低IL-6水平(<中位数)的患者相比,具有高IL-6水平(>中位数)的患者显示更差的响应(即显著更差的存活)(图3)。结果表明高IL-6水平和对抗VEGF治疗的更差响应之间的相关性。IL-6水平提高可以是在某些患者中观察到的对抗VEGF治疗的抗性的直接或间接原因。因此,此实施例的结果表明,针对IL-6水平提高筛查癌症患者可以鉴定出某些患者,其治疗结果可以通过将抗VEGF治疗与抗IL-6或抗IL-6R治疗组合而得到增强,从而在这些患者中对抗或延迟对抗VEGF治疗的抗性的发展。

[0082] 本发明的范围不受限于文所述的具体实施方案。实际上,对本领域技术人员而言,除本文所述的那些之外,本发明的多种修改将从前述说明书和附图变得显而易见。这类修改旨在落在所附权利要求书的范围之内。

序 列 表

<110> 瑞泽恩制药公司 (Regeneron Pharmaceuticals, Inc.)
 <120> 转移性结直肠癌抗血管发生治疗相关预测和预后生物标志
 <130> 10101W001
 <160> 2
 <170> FastSEQ Windows 版本 4.0

<210> 1
 <211> 1377
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VEGF 陷阱
 <400> 1

[0001]

```

atggtcagct actgggacac cggggctcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc 60
acaggatcta gttccggaag tgataccggt agacctttcg tagagatgta cagtgaatc 120
cccgaatta tacacatgac tgaaggaagg gagctcgtca ttccctgccg gggtacgtca 180
cctaacaatca ctgttacttt aaaaaagttt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa 240
cgcataatct gggacagtag aaagggttc atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata 300
gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca 360
catcgacaaa ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta 420
tctgttgagg aaaagcttgt cttaaattgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt 480
gacttcaact gggaataccc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac 540
ctaaaaaccc agtctgggag tgagatgaag aaatttttga gcaccttaac tatagatggt 600
gtaacccgga gtgaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag 660
aagaacagca catttgtcag ggtccatgaa aaggacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 720
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac 780
accctcatga tctcccgac cctgaggtc acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa 840
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 900
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 960
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgaagg tctccaacaa agccctccca 1020
gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1080
accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggte 1140
aaaggcttct atcccagcga catgccctg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaa 1200
aactacaaga ccagcctcc cgtgctggac tccgacggct cttcttctct ctacagcaag 1260
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320
gaggctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga 1377

```

<210> 2
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> VEGF 陷阱

<400> 2
 Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser
 1 5 10 15
 Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Ser Asp Thr Gly Arg Pro
 20 25 30
 Phe Val Glu Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu
 35 40 45
 Gly Arg Glu Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr
 50 55 60
 Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys
 65 70 75 80
 Arg Ile Ile Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr
 85 90 95
 Tyr Lys Glu Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His
 100 105 110
 Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
 115 120 125
 Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 130 135 140
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile
 145 150 155 160
 Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu
 [0002] 165 170 175
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe
 180 185 190
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu
 195 200 205
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr
 210 215 220
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350

[0003] Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
355 360 365
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

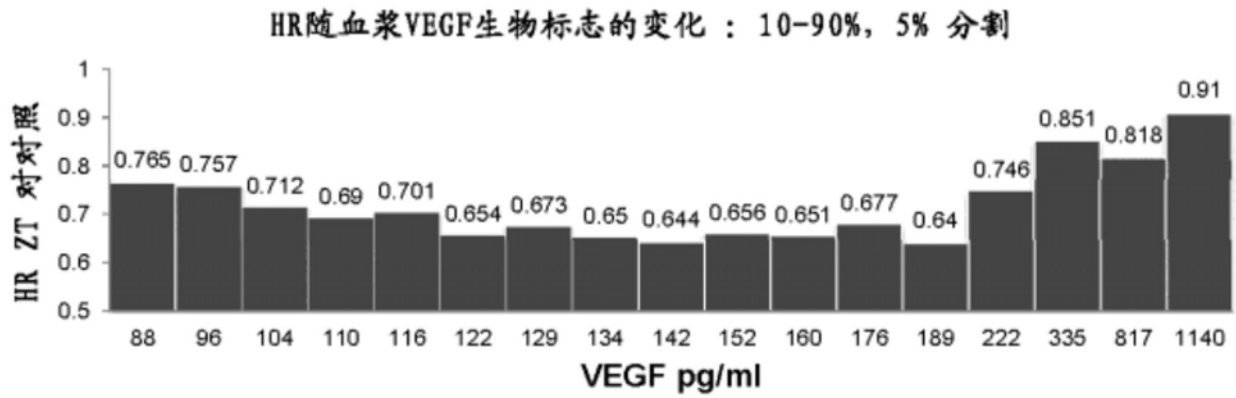


图1

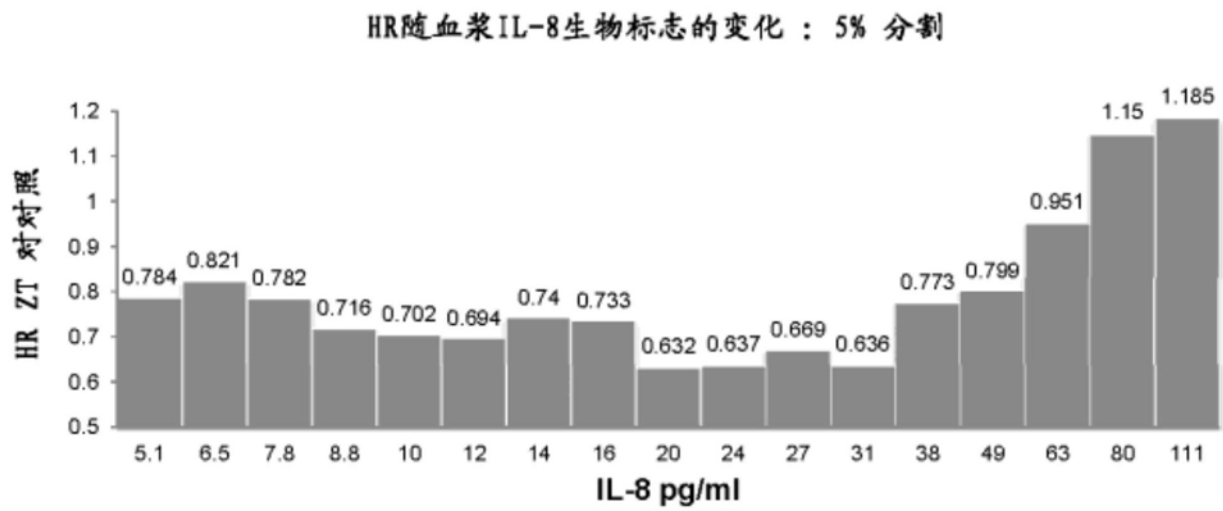
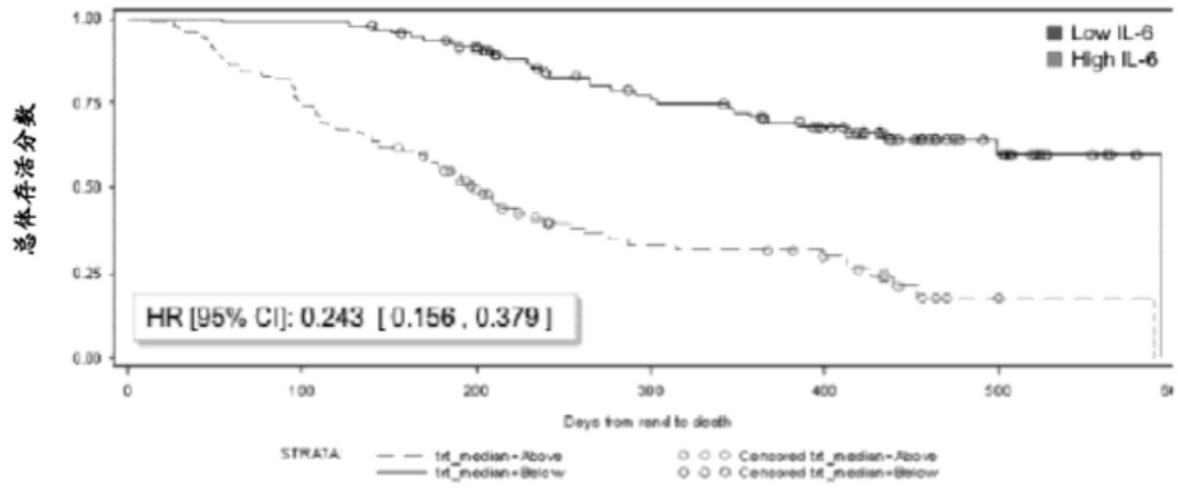


图2



生物标志亚组群体	事件/总数	Kaplan Meier 估计	95%置信区间	P-值
高IL-6 (>3.86 pg/ml)	66/94	198.000	(158, 239)	<0.0001
低IL-6 (<3.86 pg/ml)	30/93	593.000	(499, 593)	

图3