



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107624071 A

(43)申请公布日 2018.01.23

(21)申请号 201680028727.8

(22)申请日 2016.04.14

(30)优先权数据

62/149,184 2015.04.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.11.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/027497 2016.04.14

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2016/168440 EN 2016.10.20

(71)申请人 诺福泰克公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 丹尼尔·约翰·奥沙尼斯

(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219

代理人 金海霞 杨青

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/82(2006.01)

权利要求书4页 说明书27页

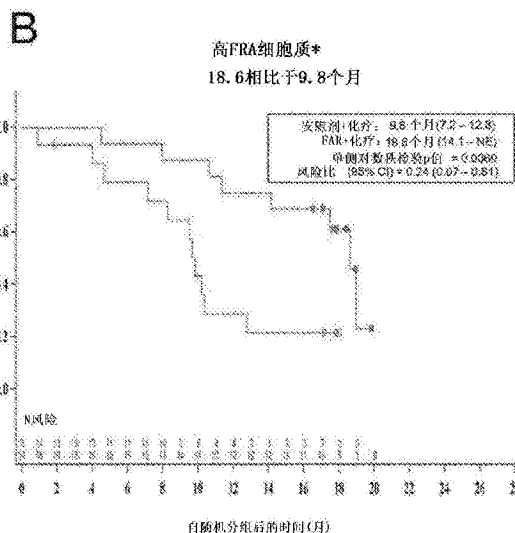
序列表21页 附图7页

(54)发明名称

肺癌治疗方法

(57)摘要

本文中提供了用于预测患有叶酸受体 $\alpha$  (FRA)表达型肺癌的患者中用FRA靶向剂治疗的响应可能性的方法。还提供了用FRA靶向剂治疗患者的FRA表达型肺癌的方法。该方法包括定量或确定生物样品中患者的FRA表达水平,并将患者的FRA表达水平与用于定量FRA表达水平的参考标准进行比较,其中如果患者的FRA表达水平等于或超过该参考FRA表达水平,则患者有可能对用FRA靶向剂治疗作出响应。还提供了用于预测所鉴定的FRA表达型肺癌患者群体的响应和用于治疗所述群体的相关试剂盒。



1. 一种用免疫特异性结合叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 的抗体治疗患者的叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 表达型肺癌的方法, 所述方法包含:

确定患者的生物样品中所述患者的FRA表达水平;

将所述患者的FRA表达水平与参考FRA表达水平进行比较; 以及

如果所述患者的FRA表达水平等于或超过所述参考FRA表达水平, 向所述患者施用治疗有效量的所述抗体。

2. 一种治疗患者的叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 表达型肺癌的方法, 所述方法包括向所述患者施用免疫特异性结合叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 的抗体, 其中所述患者的FRA表达水平等于或超过参考FRA表达水平。

3. 一种用于预测患有叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 表达型肺癌的患者中用免疫特异性结合叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 的抗体治疗的响应可能性的方法, 所述方法包含:

确定患者的生物样品中所述患者的FRA表达水平; 以及

将所述患者的FRA表达水平与参考FRA表达水平进行比较,

其中如果所述患者的FRA表达水平等于或超过所述参考FRA表达水平, 所述患者有可能对用所述免疫特异性结合FRA的抗体治疗作出响应。

4. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述参考FRA表达水平对应于如下所述的FRA表达水平: 超过该水平时, 施用所述免疫特异性结合FRA的抗体的罹患所述FRA表达型肺癌的患者群体相对于施用安慰剂的罹患所述FRA表达型肺癌的患者群体, 表现出至少一种临床结果的统计学显著性改善。

5. 权利要求4的方法, 其中所述患者群体还被施用化疗剂。

6. 权利要求5的方法, 其中所述化疗剂包含紫杉烷、顺铂、卡铂和/或培美曲塞。

7. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述FRA表达水平通过蛋白质定量或RNA定量来测量。

8. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述FRA表达水平通过免疫组织化学分析来测量。

9. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述FRA表达水平是细胞质FRA表达。

10. 权利要求1至8任一项的方法, 其中所述FRA表达水平是膜FRA表达。

11. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述免疫特异性结合FRA的抗体与毒素缀合。

12. 权利要求11的方法, 其中所述毒素包含微管抑制剂、DNA损伤剂、DNA修复抑制剂或信号转导抑制剂。

13. 权利要求11的方法, 其中所述DNA损伤剂包含放射性核素。

14. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述免疫特异性结合FRA的抗体是:

包含SEQ ID NO:1作为CDRH1、SEQ ID NO:2作为CDRH2、SEQ ID NO:3作为CDRH3、SEQ ID NO:4作为CDRL1、SEQ ID NO:5作为CDRL2和SEQ ID NO:6作为CDRL3的抗体;

包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的成熟轻链可变区和含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的成熟重链可变区的抗体;

法勒珠单抗;

包含分别与SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8具有至少90%并优选至少95%或99%序列同一性的成熟轻链和重链可变区的特异性结合叶酸受体 $\alpha$ 的抗体; 或

能够竞争性抑制法勒珠单抗与叶酸受体 $\alpha$ 结合的抗体或其衍生物。

15. 前述权利要求任一项的方法, 其还包含向所述患者施用治疗有效量的化疗剂。
16. 权利要求15的方法, 其中所述化疗剂包含含铂化合物。
17. 权利要求16的方法, 其中所述含铂化合物包含顺铂或卡铂。
18. 前述权利要求任一项的方法, 其还包含向所述患者施用治疗有效量的紫杉烷。
19. 权利要求18的方法, 其中所述紫杉烷是紫杉醇。
20. 权利要求15、16、17、18或19的方法, 其还包含向所述患者施用治疗有效量的培美曲塞。
21. 权利要求1至14任一项的方法, 其还包含向所述患者施用卡铂和紫杉醇。
22. 权利要求21的方法, 其中将卡铂施用于所述患者以达到约6或更小的曲线下面积(AUC)。
23. 权利要求21或22的方法, 其中将紫杉醇以约50mg/m<sup>2</sup>至约250mg/m<sup>2</sup>的剂量施用于所述患者。
24. 权利要求1至14任一项的方法, 其还包含向所述患者施用卡铂和培美曲塞。
25. 权利要求24的方法, 其中将所述卡铂施用于所述患者以达到约5-6或更小的曲线下面积。
26. 权利要求24或25的方法, 其中将所述培美曲塞以约400至约600mg/m<sup>2</sup>的剂量施用于所述患者。
27. 权利要求1至14任一项的方法, 其还包含向所述患者施用顺铂和培美曲塞。
28. 权利要求27的方法, 其中将顺铂以约50mg/m<sup>2</sup>至约250mg/m<sup>2</sup>的剂量施用于所述患者。
29. 权利要求27或28的方法, 其中培美曲塞以约400mg/m<sup>2</sup>至约600mg/m<sup>2</sup>的剂量施用。
30. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述FRA表达水平用至少一种以下抗体通过免疫测定来确定:
  - (a) 与法勒珠单抗结合相同表位的抗体;
  - (b) 包含SEQ ID NO:1 (GFTFSGYGLS) 作为CDRH1、SEQ ID NO:2 (MISSGGSYTTYADSVKG) 作为CDRH2、SEQ ID NO:3 (HGDDPAWFAY) 作为CDRH3、SEQ ID NO:4 (SVSSSISNNLH) 作为CDRL1、SEQ ID NO:5 (GTSNLAS) 作为CDRL2和SEQ ID NO:6 (QQWSSYPYMYT) 作为CDRL3的抗体;
  - (c) 包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的成熟轻链可变区和含有氨基酸SEQ ID NO:8的成熟重链可变区的抗体;
  - (d) 法勒珠单抗;
  - (e) 548908抗体;
  - (f) 与所述548908抗体结合相同表位的抗体;
  - (g) 6D398抗体;
  - (h) 与所述6D398抗体结合相同表位的抗体;
  - (i) BN3.2抗体;
  - (j) 与所述BN3.2抗体结合相同表位的抗体;
  - (k) 与26B3抗体结合相同表位的抗体;
  - (l) 包含SEQ ID NO:14 (GYFMN) 作为CDRH1、SEQ ID NO:15 (RIFPYNGDTFYNQKFKG) 作为CDRH2、SEQ ID NO:16 (GTHYFDY) 作为CDRH3、SEQ ID NO:17 (RTSENIFSYLA) 作为CDRL1、SEQ ID NO:18 (NAKTLAE) 作为CDRL2和SEQ ID NO:19 (QHYYAFPWT) 作为CDRL3的抗体;

- (m) 26B3抗体;
  - (n) 与19D4抗体结合相同表位的抗体;
  - (o) 包含SEQ ID NO:20 (HPYMH) 作为CDRH1、SEQ ID NO:21 (RIDPANGNTKYDPKFQG) 作为CDRH2、SEQ ID NO:22 (EEVADYTM DY) 作为CDRH3、SEQ ID NO:23 (RASESVD TYGNNFIH) 作为CDRL1、SEQ ID NO:24 (LASNLES) 作为CDRL2和SEQ ID NO:25 (QQNNGDPWT) 作为CDRL3的抗体;
  - (p) 19D4抗体;
  - (q) 与9F3抗体结合相同表位的抗体;
  - (r) 包含SEQ ID NO:26 (SGYYWN) 作为CDRH1、SEQ ID NO:27 (YIKSDGSNNYNPSLKN) 作为CDRH2、SEQ ID NO:28 (EWKAMDY) 作为CDRH3、SEQ ID NO:29 (RASSTVSYSYLH) 作为CDRL1、SEQ ID NO:30 (GTSNLAS) 作为CDRL2和SEQ ID NO:31 (QQYSGYPLT) 作为CDRL3的抗体;
  - (s) 9F3抗体;
  - (t) 与24F12抗体结合相同表位的抗体;
  - (u) 包含SEQ ID NO:32 (SYAMS) 作为CDRH1、SEQ ID NO:33 (EIGSGGSYTYYPDTV TG) 作为CDRH2、SEQ ID NO:34 (ETTAGYFDY) 作为CDRH3、SEQ ID NO:35 (SASQGINN FLN) 作为CDRL1、SEQ ID NO:36 (YTSSLHS) 作为CDRL2和SEQ ID NO:37 (QHFSKLPWT) 作为CDRL3的抗体;
  - (v) 24F12抗体;
  - (w) 包含选自以下的轻链可变区的抗体:
    - (i) LK26HuVK;
    - (ii) LK26HuVKY;
    - (iii) LK26HuVKPW; 和
    - (iv) LK26HuVKPW, Y;
  - (x) 包含选自以下的重链可变区的抗体:
    - (i) LK26HuVH;
    - (ii) LK26HuVH FAIS, N;
    - (iii) LK26HuVH SLF;
    - (iv) LK26HuVH I, I;
    - (v) LK26KOLHuVH;
  - (y) 包含重链可变区LK26KOLHuVH (SEQ ID NO:46) 和轻链可变区LK26HuVKPW, Y (SEQ ID NO:41) 的抗体;
  - (z) 包含重链可变区LK26HuVH SLF (SEQ ID NO:44) 和轻链可变区LK26HuVKPW, Y (SEQ ID NO:41) 的抗体;
  - (aa) 包含重链可变区LK26HuVH FAIS, N (SEQ ID NO:43) 和轻链可变区LK26HuVKPW, Y (SEQ ID NO:41) 的抗体; 和
  - (bb) 鼠类单克隆LK26抗体。
31. 前述权利要求任一项的方法, 其中所述患者的FRA表达水平通过数字成像技术或手动病理学定量来评估。
32. 权利要求7的方法, 其中所述患者的FRA表达水平通过FRAMSCOR或HBSCOR来评估。
33. 权利要求32的方法, 其中所述参考FRA表达水平是42%+1或更高的抗FRA染色。
34. 权利要求32的方法, 其中所述参考FRA表达水平是21%+2或更高的抗FRA染色。

35. 权利要求32的方法,其中所述参考FRA表达水平是14%+3或更高的染色。
36. 权利要求32的方法,其中所述参考FRA表达水平是FRAMSCOR为7。
37. 权利要求32的方法,其中所述参考FRA表达水平是HBSCOR为0.25。
38. 前述权利要求任一项的方法,其中所述生物样品是全血、血清、血浆、循环细胞、循环肿瘤细胞、游离细胞、组织、胸腔积液、尿液、唾液、痰液或支气管冲洗液。
39. 前述权利要求任一项的方法,其中所述生物样品包含胸膜组织。
40. 前述权利要求任一项的方法,其中所述生物样品包含来源于积液的胸膜细胞。
41. 权利要求4的方法,其中所述至少一个临床结果是无进展生存期和/或总生存期。
42. 前述权利要求任一项的方法,其中所述FRA表达型肺癌是FRA表达型非小细胞肺癌(NSCLC)。
43. 权利要求42的方法,其中所述NSCLC是腺癌。

## 肺癌治疗方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2015年4月17日提交的美国临时申请No.62/149184的权益,所述美国临时申请的内容以其整体通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含已经以ASCII格式电子提交并以其整体通过引用并入本文的序列表。所述ASCII副本,创建于2016年4月13日,名称为104018.000950\_SL.txt,大小为30,473字节。

### 技术领域

[0005] 本文所述的主体涉及用于预测患有叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 表达型肺癌的患者中用FRA靶向剂治疗的响应可能性的方法,以及用FRA靶向剂治疗患者的FRA表达型肺癌的方法。

### 背景技术

[0006] 根据美国癌症协会(American Cancer Society),据估算,在2015年在美国将诊断出221,200例肺和支气管癌症的新病例,占全部新癌症病例的约14%。另外,据估算,在2015年在美国将发生158,040例因肺和支气管癌症的死亡,占全部癌症死亡的约27%。全部肺癌中的大约84%是非小细胞肺癌(NSCLC),五年生存率仅为18%。美国癌症协会2015年癌症事实与数字。亚特兰大:美国癌症协会,2015(American Cancer Society.Cancer Facts& Figures 2015.Atlanta:American Cancer Society.2015)。

[0007] 晚期NSCLC仍然是难以治疗的癌症,其中持久的长期生存极为罕见。化疗,尤其是基于铂的双药(platinum-based doublets),是已建立的用于不具有或具有未知的用于靶向疗法的活化突变的患者的治疗。当为患有晚期NSCLC的患者选择化疗时,组织学是一个越来越显著的因素。(Li等,J Clin Oncol 2013;31:1039-1049)。晚期NSCLC的大型3期研究发现,在患有腺癌或大细胞癌的对象中,顺铂加培美曲塞在与顺铂加吉西他滨比较时,提供了统计学优异的总生存期(OS)。(Scagliotti等,J Clin Oncol 2008;26:3543-3551)。然而,在同一研究中,那些具有鳞状细胞组织学的对象当用吉西他滨加顺铂治疗时具有更好的结果。

[0008] 近来已经鉴定到许多驱动突变,其允许靶向疗法在NSCLC中具有更好的结果。肺癌突变联盟(Lung Cancer Mutation Consortium)在他们评估的1,007例腺癌患者的64%中发现了这样的“可行性(actionable)”突变,最常见的是KRAS、EGFR和ALK。在这项研究中,使用靶向疗法导致接受靶向疗法的具有致癌驱动突变的患者亚组的中位OS为3.5年,相比之下,具有所鉴定的突变但未接受靶向疗法的那些患者的OS为2.4年,而没有表现出致癌驱动突变的那些患者的OS为2.1年( $P=0.001$ )。(Kris等,JAMA 2014;311:1998-2006)。

[0009] 叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 是一种细胞表面GPI锚定蛋白,其表达和生物学与许多恶性细胞类型相关。已经开发出FRA的抗体并在临床前和临床研究中进行测试,以在其肿瘤表达这种抗原的患者中评估它们对抑制癌症生长的作用。最近已经进行了在卵巢癌和肺癌中的试

验,以测试抗FRA抗体对这些疾病的作用(Armstrong等,Gynecol.Oncol.2013Jun;129(3):452-8;Thomas等,Lung Cancer.2013;80(1):15-8)。这些试验的结果表明,抗FRA疗法未能在广泛、未富集或生物标志物选择的异质意向治疗群体中提供统计学显著的临床益处,所述群体部分包含患有表现出变化的FRA抗原水平以及可能影响抗FRA抗体药理活性的其它因素的癌症的患者(Vergote等,Cancer Metastasis Rev.2015Jan 7,DOI 10.1007/s10555-014-9539-8;Thomas等,Lung Cancer.2013;80(1):15-8.)。虽然大多数抗FRA抗体临床研究包括了所有到来者,但无一基于FRA表达水平来选择患者以确定肿瘤中FRA表达的阈值水平是否可能与抗FRA抗体疗法的治疗响应相关。目前没有数据提示FRA表达水平与抗FRA抗体疗法的治疗响应的相关性。实际上,对于许多肿瘤抗原而言,肿瘤抗原表达与抗原靶向疗法响应之间的相关关系的发现尚难以确定。研究最多的肿瘤抗原之一,HER2,是证实不存在表达-临床益处相关性的许多实例之一,由此已经发现,用抗HER2抗体赫赛汀(曲妥珠单抗)治疗的患者,不管肿瘤抗原高或低,都具有临床益处(Paik et.al;N Engl J Med 2008;358:1409-1411)。

[0010] 对于鉴定对靶向FRA的治疗方案会有响应的NSCLC患者的方法存在着迫切需要。本文所述的方法和试剂盒满足了这种需要。

## 发明内容

[0011] 本文提供了用于预测患有叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 表达型肺癌的患者中用叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 靶向剂治疗的响应可能性的方法。用于预测这种治疗响应可能性的方法包括确定生物样品中患者的FRA表达水平;以及将患者的FRA表达水平与参考FRA表达水平进行比较。如果患者的FRA表达水平等于或超过所述参考FRA表达水平,患者有可能对用FRA靶向剂治疗作出响应。

[0012] 本文还提供了用FRA靶向剂治疗患者的叶酸受体 $\alpha$ FRA表达型肺癌的方法。这样的方法包括确定生物样品中患者的FRA表达水平;将患者的FRA表达水平与参考FRA表达水平进行比较;以及如果患者的FRA表达水平等于或超过所述参考FRA表达水平,则将所述FRA靶向剂施用于患者。在一些实施方案中,在使用或不使用所述FRA靶向剂的情况下,向患者施用化疗剂(例如,如本文所述的标准护理(standard of care)化疗)。

[0013] 在本文所述的用于预测用叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 靶向剂治疗的响应可能性的方法和用FRA靶向剂治疗患者的叶酸受体 $\alpha$ FRA表达型肺癌的方法的一些实施方案中,所述FRA靶向剂包含免疫特异性结合FRA的抗体或其抗原结合片段。在优选的实施方案中,这类免疫特异性结合FRA的抗体包含法勒珠单抗(farletuzumab)。在一些实施方案中,所述免疫特异性结合FRA的抗体与毒素例如微管抑制剂、DNA损伤剂(例如放射性核素)、DNA修复抑制剂或信号转导抑制剂缀合。根据本文所述的方法能用作FRA靶向剂的示例性抗体-药物缀合物是IMGN853。在本文所述的方法的一些实施方案中,所述FRA靶向剂是vintafolide。

[0014] 在本文所述的方法的一些实施方案中,所述FRA表达型肺癌是FRA表达型非小细胞肺癌(NSCLC)。在一些实施方案中,所述NSCLC是腺癌。

[0015] 对于上述方法中的每一种,所述参考FRA表达水平对应于如下所述的FRA表达水平:超过该水平时,施用所述FRA靶向剂的罹患FRA表达型肺癌的患者群体相对于施用安慰剂的罹患FRA表达型肺癌的患者群体,表现出至少一种临床结果的统计学显著性改善。所述

改善的临床结果可以是,例如,无进展生存期和/或总生存期。在一些实施方案中,所述参考FRA表达水平对应于如本文所述的42%+1或更高的抗FRA染色。在一些实施方案中,所述参考FRA表达水平是如本文所述的21%+2或更高的抗FRA染色。在一些实施方案中,所述参考FRA表达水平是如本文所述的14%+3或更高的染色。在一些实施方案中,所述参考FRA表达水平是FRAMSCOR (或M评分) 为7。在一些实施方案中,所述参考FRA表达水平是HBSCOR为0.25。

[0016] 在一些实施方案中,所述罹患FRA表达型肺癌的患者群体还被施用化疗剂,例如紫杉烷、含铂化合物(例如顺铂,卡铂)和抗叶酸剂(例如培美曲塞),或其任何组合。

[0017] FRA表达水平可以根据本文所述的方法通过蛋白质定量或RNA定量来测量。可以测量细胞质或膜的FRA表达。在优选的实施方案中,所述FRA表达水平通过免疫组织化学分析来测量。在优选的实施方案中,所述FRA表达水平用至少一种以下抗体通过免疫测定来确定:

[0018] (a) 与法勒珠单抗结合相同表位的抗体;

[0019] (b) 包含SEQ ID NO:1 (GFTFSGYGLS) 作为CDRH1、SEQ ID NO:2 (MISSGGSYTYADSVKG) 作为CDRH2、SEQ ID NO:3 (HGDDPAWFAY) 作为CDRH3、SEQ ID NO:4 (SVSSSISSNNLH) 作为CDRL1、SEQ ID NO:5 (GTSNLAS) 作为CDRL2和SEQ ID NO:6 (QQWSSYPYMYT) 作为CDRL3的抗体;

[0020] (c) 包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的成熟轻链可变区和含有氨基酸SEQ ID NO:8的成熟重链可变区的抗体;

[0021] (d) 法勒珠单抗;

[0022] (e) 548908抗体;

[0023] (f) 与所述548908抗体结合相同表位的抗体;

[0024] (g) 6D398抗体;

[0025] (h) 与所述6D398抗体结合相同表位的抗体;

[0026] (i) BN3.2抗体(Leica Biosystems);

[0027] (j) 与所述BN3.2抗体结合相同表位的抗体;

[0028] (k) 与26B3抗体结合相同表位的抗体;

[0029] (l) 包含SEQ ID NO:14 (GYFMN) 作为CDRH1、SEQ ID NO:15 (RIFPYNGDTFYNQKFKG) 作为CDRH2、SEQ ID NO:16 (GTHYFDY) 作为CDRH3、SEQ ID NO:17 (RTSENIFFSYLA) 作为CDRL1、SEQ ID NO:18 (NAKTLAE) 作为CDRL2和SEQ ID NO:19 (QHYYAFPWT) 作为CDRL3的抗体;

[0030] (m) 26B3抗体;

[0031] (n) 与19D4抗体结合相同表位的抗体;

[0032] (o) 包含SEQ ID NO:20 (HPYMH) 作为CDRH1、SEQ ID NO:21 (RIDPANGNTKYDPKFQG) 作为CDRH2、SEQ ID NO:22 (EEVADYTM DY) 作为CDRH3、SEQ ID NO:23 (RASESVDTYGNFIH) 作为CDRL1、SEQ ID NO:24 (LASNLES) 作为CDRL2和SEQ ID NO:25 (QQNNGDPWT) 作为CDRL3的抗体;

[0033] (p) 19D4抗体;

[0034] (q) 与9F3抗体结合相同表位的抗体;

[0035] (r) 包含SEQ ID NO:26 (SGYYWN) 作为CDRH1、SEQ ID NO:27 (YIKSDGSNNYNPSLKN) 作为CDRH2、SEQ ID NO:28 (EWKAMDY) 作为CDRH3、SEQ ID NO:29 (RASSTVSYSYLH) 作为CDRL1、

SEQ ID NO:30 (GTSNLAS) 作为CDRL2和SEQ ID NO:31 (QQYSGYPLT) 作为CDRL3的抗体;

[0036] (s) 9F3抗体;

[0037] (t) 与24F12抗体结合相同表位的抗体;

[0038] (u) 包含SEQ ID NO:32 (SYAMS) 作为CDRH1、SEQ ID NO:33 (EIGSGGSYTYYPDVTG) 作为CDRH2、SEQ ID NO:34 (ETTAGYFDY) 作为CDRH3、SEQ ID NO:35 (SASQGINNFLN) 作为CDRL1、SEQ ID NO:36 (YTSSLHS) 作为CDRL2和SEQ ID NO:37 (QHFSKLPWT) 作为CDRL3的抗体;

[0039] (v) 24F12抗体;

[0040] (w) 包含选自以下的轻链可变区的抗体:

[0041] (i) LK26HuVK;

[0042] (ii) LK26HuVKY;

[0043] (iii) LK26HuVKPW; 和

[0044] (iv) LK26HuVKPW,Y;

[0045] (x) 包含选自以下的重链可变区的抗体:

[0046] (i) LK26HuVH;

[0047] (ii) LK26HuVH FAIS,N;

[0048] (iii) LK26HuVH SLF;

[0049] (iv) LK26HuVH I,I;

[0050] (v) LK26KOLHuVH;

[0051] (y) 包含重链可变区LK26KOLHuVH (SEQ ID NO:46) 和轻链可变区LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO:41) 的抗体;

[0052] (z) 包含重链可变区LK26HuVH SLF (SEQ ID NO:44) 和轻链可变区LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO:41) 的抗体;

[0053] (aa) 包含重链可变区LK26HuVH FAIS,N (SEQ ID NO:43) 和轻链可变区LK26HuVKPW,Y (SEQ ID NO:41) 的抗体; 和

[0054] (bb) 鼠类单克隆LK26抗体。

[0055] 在本文描述的方法中,FRA表达水平可以通过数字成像技术或手动病理学定量来评估。在一些实施方案中,所述FRA表达水平通过FRAMSCOR或HBSCOR来评估。

[0056] 根据本文所述的方法测定的生物样品可以是尿液、血液、血清、血浆、唾液、循环细胞、循环肿瘤细胞、或肿瘤组织(例如胸膜组织)。在一些实施方案中,所述生物样品包含来源于积液的胸膜细胞。

[0057] 所描述的方法还可以包括向所述患者施用化疗剂,不管所述患者的FRA表达水平是否等于或超过所述参考FRA表达水平。在优选的实施方案中,所述化疗剂包括含铂化合物,例如顺铂或卡铂;紫杉烷(例如紫杉醇);抗叶酸剂(例如培美曲塞);或其任何组合。例如,在本文所述的方法中,所述患者可以被施用卡铂和紫杉醇;卡铂和培美曲塞;或顺铂和培美曲塞。

[0058] 在详细描述以及所提供的实施例和相关附图中更详细地提供了所概括的主题的其它方面。

## 附图说明

[0059] 在结合附图阅读时,进一步理解所述发明内容以及以下的详细描述。为了说明所公开的方法,在附图中显示了方法的示例性实施方案;然而,所述方法不限于所公开的具体实施方案。在附图中:

[0060] 图1显示了用于经由FRAMSCOR和HBSCOR进行FRA定量的胸膜组织适合性。正常(左上图)或恶性非小细胞肺腺癌(NSCLC)组织样品(所有其他图)从患者取得。组织被福尔马林固定并切片到载玻片上并利用26B3抗FRA抗体针对FRA表达进行染色。染色的载玻片通过显微术来可视化,并经由摄影术来记录。该图表示适合于定量的FRA细胞质或膜染色的胸膜组织样本和染色(上排)。从FRA表达临床结果相关性研究中省略了组织保存差、组织形态学差或过度染色的样本以及由胸腔积液而不是胸膜组织中的恶性细胞组成的样本。后者的实例显示在下排。来源于积液的细胞可用于测量抗FRA治疗响应所需的最低FRA水平。

[0061] 图2显示了用于恶性胸膜组织中FRA表达的+1(低表达)、+2(中等水平)和+3(高水平)评分的参考数据集的代表性样品。

[0062] 图3显示了利用HBSCOR方法测量FRA的细胞质水平对临床结果(总生存期)的代表性表达切割点分析(expression cut-point analysis)。在FRA表达水平超过~0.29或更高的HBSCOR的患者中观察到响应的显著改善。在该水平下,与肿瘤FRA表达水平低于该值的患者相比,观察到显著的临床响应(风险比 $<0.5$ )。在HBSCOR为0.25或更高的法勒珠单抗治疗的患者中观察到积极的临床结果(风险比 $<0.7$ )。

[0063] 图4A和4B示出了用标准护理(SOC)化疗+/-法勒珠单抗治疗并表达高水平的定位于膜的(FRAMSCOR)FRA的患者的临床响应。图A显示了利用FRAMSCOR法具有高水平FRA的患者中总生存期(OS)的代表性测量结果,其中用法勒珠单抗+SOC(蓝线;三角)治疗并且FRAMSCOR大于7的患者显示出超过安慰剂+SOC治疗的患者(红线;圆)的临床有意义的OS改善,分别为18.3个月相比于10.0个月(风险比为0.54; $p=0.0266$ )。当测量PFS时观察到类似的临床益处。图B显示,用法勒珠单抗+SOC(蓝线;三角)治疗并且FRAMSCOR小于7的患者没有超过安慰剂+SOC治疗患者(红线;圆)的临床有意义的OS改善( $p=0.386$ )。

[0064] 图5A和5B示出了利用HBSCOR法所确定的,表达高水平的细胞质FRA并用标准护理化疗+/-法勒珠单抗治疗的患者(图B)相比于表达低水平的细胞质FRA的患者(图A)的临床响应。图A显示了具有低水平FRA的患者中总生存期(OS)的代表性测量结果,其中未达最佳HBSCOR(HBSCOR $<0.38$ )的患者在用法勒珠单抗(实心圆)治疗时与安慰剂对照(空心圆)相比没有临床改善(风险比1.03; $p=0.5389$ )。图B显示具有最佳HBSCOR的患者总生存期的统计学显著性改善(HBSCOR $\geq 0.38$ ;风险比0.24; $p=0.0069$ ),其解释为总生存期提高8.8个月。在测量PFS时也观察到相似的效果。

[0065] 说明性实施方式的详细描述

[0066] 通过结合附图参考以下详细描述可以更容易地理解所公开的方法,所述附图构成本公开的一部分。要理解,所公开的方法不限于在本文中描述和/或显示的具体方法,并且本文中使用的术语仅用于以举例的方式描述特定实施方案的目的,并不打算限制所要求保护的方法。

[0067] 类似地,除非另有具体说明,否则关于可能的机制或作用方式或改进理由的任何描述都意味着仅仅是说明性的,并且所公开的方法不被任何这样提议的机制或作用方式或改进理由的正确性或不正确性所约束。

[0068] 要领会,本文中为了清楚起见在分开的实施方案的背景下描述的所公开方法的某些特征,也可以在单一实施方案中以组合形式提供。相反,为了简洁起见在单一实施方案的背景下描述的所公开方法的各种特征,也可以分开或以任何子组合形式提供。

[0069] 在本文中使用时,不带数量指示的指称物包括多个指称物。

[0070] 本文中使用的术语“约”,当涉及可测量的值例如量、持续时间等时,意味着包括指定值的最多±10%的变异,因为这样的变异适合于执行所公开的方法。除非另有说明,否则在说明书和权利要求中使用的表示成分的量、性质例如分子量、反应条件等的所有数字应理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。因此,除非有与此相反的指示,否则在下面的说明书和权利要求中阐述的数值参数是近似值,其可取决于本发明寻求获得的期望性质而变化。至少,并且并非试图将等同原则的应用限于权利要求的范围,每个数值参数至少应该根据所报告的有效位数的数字并通过应用平常的四舍五入技术来解释。

[0071] 术语“抗体”是指(a)免疫球蛋白多肽,即含有特异性结合特定抗原(例如叶酸受体 $\alpha$ )的抗原结合位点的免疫球蛋白家族多肽,包括所有免疫球蛋白同种型(IgG、IgA、IgE、IgM、IgD和IgY)、类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2)、亚类、以及每种同种型的各种单体和多聚形式,除非另有说明,和(b)这样的免疫球蛋白多肽的保守取代变体,所述变体免疫特异性结合抗原(例如叶酸受体 $\alpha$ )。抗体被一般性描述在例如Harlow&Lane,《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988)中。除非从上下文中可显而易见地看出不是如此,否则对抗体的指称也包括如下文更详细描述抗体衍生物。

[0072] “抗体片段”包含全长抗体的一部分,通常为其抗原结合区或可变区,例如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双价抗体;生物抗体(biobodies);线性抗体;单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。已经开发了用于生产抗体片段的各种技术,包括抗体的蛋白水解消化和在宿主细胞中的重组生产;然而,生产抗体片段的其它技术对于本领域从业者来说是显而易见的。在一些实施方案中,所选择的抗体片段是单链Fv片段(scFv)。“单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,所述Fv多肽还包含在所述V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域之间的多肽接头,其使得scFv能够形成抗原结合所需的结构。关于scFv和其他抗体片段的综述,参见James D.Marks,《抗体工程(Antibody Engineering)》,第2章,Oxford University Press(1995)(Carl K.Borrebaeck 编著)。

[0073] “抗体衍生物”是指通过异源分子的共价连接例如通过异源多肽(例如,细胞毒素)或治疗剂(例如化疗剂)的连接、或通过与抗体通常不相关的糖基化、去糖基化、乙酰化或磷酸化等来修饰的如上定义的抗体。

[0074] 术语“单克隆抗体”是指来源于单细胞克隆(包括任何真核或原核细胞克隆或者噬菌体克隆)的抗体,而不是其产生的方法。因此,术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。

[0075] “抗原”是抗体特异性结合的实体。例如,叶酸受体 $\alpha$ 是抗叶酸受体 $\alpha$ 抗体特异性结合的抗原。

[0076] FRA靶向剂是靶向FRA或通过FRA发挥其作用的治疗剂。FRA靶向剂包括但不限于FRA结合蛋白,例如免疫特异性结合FRA的抗体及其抗原结合片段,例如法勒珠单抗;这样的

抗体和抗原结合片段的药物缀合物,例如IMGN853 (Immunogen);以及小分子,例如vintafolide (EC 145;Endocyte)。Vintafolide是叶酸-去乙酰基长春碱单酰肼缀合物,其允许经由FRA和胞吞将药物释放到癌细胞的细胞质中。在优选的实施方案中,FRA靶向剂是法勒珠单抗。

[0077] 术语“癌症”和“肿瘤”是本领域中公知的,并且是指在例如对象中存在具有致癌细胞典型特征的细胞,所述特征例如不受控的增殖、永生性、转移潜能、快速的生长和增殖速率、以及某些特征性的形态学特征。癌细胞经常是以肿瘤的形式,但这样的细胞可以单独存在于对象内,或者可以是非致瘤性的癌细胞,如白血病细胞。在本文中使用时,术语“癌症”包括恶变前和恶性的癌症。

[0078] 在本文中使用时,术语“叶酸受体 $\alpha$ ”(也称为FRA、FR- $\alpha$ 、FOLR-1或FOLR1)是指叶酸的高亲和性受体的 $\alpha$ 同种型。膜结合的FRA通过糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚而连接于细胞表面,在膜和内吞室之间再循环,并能够将叶酸转运到细胞中。FRA在各种上皮组织中表达,包括女性生殖道、胎盘、乳腺、肾近端小管、脉络丛,肺和唾液腺的上皮组织。FRA的可溶形式包括但不限于通过蛋白酶或磷脂酶对膜锚定叶酸受体的作用而获得的那些形式。

[0079] 人类FRA的共有核苷酸和氨基酸序列在本文中分别如SEQ ID NO:9和10所示。

[0080] SEQ ID NO:9

	tcaaggtaa acgacaagga cagacatggc tcagcggatg acaacacagc tgctgctcct	60
	tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg attgcatggg ccaggactga	120
	gettetcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa aagccaggcc ccgaggacaa	180
	gttgcattgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc tgttctacca acaccagcca	240
	ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac tggaaccact gtggagagat	300
	ggcaactgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc ctctacgagt gctcccccaa	360
	ctfggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc aaagagcggg tactgaactg	420
	gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat tgctgcacct cctacacctg	480
[0081]	caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg ttaacaagt gcgcagtggg	540
	agctgcctgc caaccttcc atttctactt ccccacacce actgttctgt gcaatgaaat	600
	ctggactcac tctacaagg tcagcaacta cagccgaggg agtggccgct gcatccagat	660
	gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg gcgaggttct atgctgcage	720
	catgagtggg gctgggcect gggcagcctg gcctttcctg cttagcctgg ccctaatget	780
	gctgtggetg ctacgtgac ctccttttac cttctgatac ctggaaatcc ctgccctgtt	840
	cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg tcgggcctct gacagccact	900
	ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat ttggaaaaaa aaaaaaaaaa	960
	aa	962
[0082]	SEQ ID NO: 10	
[0083]	Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Val Trp Val	
[0084]	Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu	
[0085]	Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly	
[0086]	Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala	
[0087]	Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr	
[0088]	Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys	
[0089]	Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn	
[0090]	Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg	
[0091]	Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu	
[0092]	Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp	

[0093] Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln  
[0094] Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile  
[0095] Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg  
[0096] Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu  
[0097] Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala  
[0098] Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu  
[0099] Ser

[0100] 本文中使用的术语包括变体例如天然存在的等位基因变体或含有至少一个氨基酸取代的序列。

[0101] 在本文中使用时,术语“不与细胞结合”是指不与细胞例如癌细胞的细胞膜相连的蛋白质。在具体实施方案中,不与细胞结合的FRA未结合到任何细胞,并且自由地漂浮或溶解在生物流体例如尿液、血清、血浆或胸腔积液中。例如,不与细胞结合的蛋白质可以从正常细胞或癌细胞例如从癌细胞表面脱落、分泌或输出到生物流体中。

[0102] 在本文中使用时,指定RNA的“水平”或“表达水平”是指利用本领域已知的用于测量RNA水平的任何方法确定的RNA水平。这样的方法包括但不限于分光光度测定法(例如,紫外吸光度)、荧光测定法、杂交测定和微毛细管电泳。

[0103] 在本文中使用时,指定蛋白质的“水平”或“表达水平”是指使用本领域已知的用于测量蛋白质水平的任何方法确定的蛋白质水平。这样的方法包括例如电泳、毛细管电泳、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、超扩散色谱、流体或凝胶沉淀反应、吸收光谱法、比色测定、分光光度测定、流式细胞术、免疫扩散(单向或双向)、溶液相测定、免疫荧光测定法、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、溶液相测定、免疫电泳、Western印迹、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定和电化学发光免疫测定(在下面示例)等。在优选实施方案中,使用基于抗体的技术确定所述水平,如本文更详细描述。

[0104] 免疫测定中用来确定指定蛋白质例如FRA的表达水平的抗体,可以用可检测的标记物进行标记。关于结合剂或抗体,术语“标记”旨在包括通过将可检测的物质与所述结合剂或抗体偶联(即,物理连接)来直接标记所述结合剂或抗体,以及通过与另一种被直接标记的试剂的反应性来间接标记所述结合剂或抗体。间接标记的实例包括利用荧光标记的第二抗体检测第一抗体。在一种实施方案中,所述抗体被标记,例如放射标记、发色团标记、荧光团标记或酶标记。在另一种实施方案中,所述抗体是抗体衍生物(例如,与底物或与蛋白质-配体对(例如生物素-链霉亲和素)的蛋白质或配体缀合的抗体,或抗体片段(例如单链抗体、分离的抗体高变结构域))。

[0105] 特异性标志物(例如,FRA)的表达水平可通过本领域已知的任何RNA或蛋白质定量方法来确定。这样的方法包括但不限于分光光度测定法(例如,紫外吸光度)、荧光测定法、杂交测定、电泳、毛细管电泳、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、超扩散色谱、流体或凝胶沉淀反应、吸收光谱法、比色测定、分光光度测定、流式细胞术、免疫扩散(单向或双向)、溶液相测定、免疫荧光测定法、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、溶液相测定、免疫电泳、Western印迹、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定和电化学发光免疫测定(在下面示例)等。在优选实施方案中,使用基于抗体的技术确定所述水平,如本文更详细描述。在优选实施方案中,采用(例如,肿瘤组织的)免疫组织化学分析。在一种

实施方案中,使用蛋白质组学方法,例如质谱法。质谱法是一种分析技术,其由电离化学化合物以产生带电分子(或其片段)并测量它们的质荷比组成。在典型的质谱法程序中,从对象获得样品,加载到质谱上,并通过不同的方法(例如通过用电子束撞击它们)电离其组分(例如,FRA),导致形成带电粒子(离子)。然后在所述离子运行通过电磁场时,从离子运动计算所述粒子的质荷比。

[0106] 例如,涉及向蛋白质结合芯片施加样品例如尿液或血清的基质相关激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)或表面增强激光解吸/电离飞行时间质谱(SELDI-TOF MS)(Wright,G.L.,Jr.等.(2002)Expert Rev Mol Diagn 2:549;Li,J.等.(2002)Clin Chem 48:1296;Laronga,C.等.(2003)Dis Markers 19:229;Petricoin,E.F.等.(2002) 359:572;Adam,B.L.等.(2002)Cancer Res 62:3609;Tolson,J.等.(2004)Lab Invest 84:845;Xiao,Z.等.(2001)Cancer Res 61:6029)可用于确定FRA的水平。

[0107] 此外,用于确定标志物(例如,FRA)水平的体内技术包括向对象引入针对所述标志物的标记抗体,其与所述标志物结合以使其能够检测。可以使用标准成像技术(例如PET)来确定对象中所述可检测标志物的存在、水平或位置。

[0108] 在本文中使用时,“罹患”或“患有肺癌”的对象是被有资格的临床医生临床诊断为患有任何期的肺癌的对象,或表现出这种癌症的一种或多种征兆或症状并随后被有资格的临床医生临床诊断为患有这种癌症的对象。用作叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的动物模型的非人类对象也可落在“罹患叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌”的对象的范围内。

[0109] 在本文中使用时,“叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌”包括特征在于癌细胞在其表面上表达或存在叶酸受体 $\alpha$ 的任何肺癌类型。肺癌可以,但不要求,被临床诊断为表达FRA才能被如本文所用的术语“叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌”所包括。短语“叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌”具体包括FRA表达型非小细胞肺癌(NSCLC)和FRA表达型非小细胞肺腺癌。

[0110] 术语“样品”或“生物样品”在本文中使用时是指从对象分离的相似的体液、细胞或组织以及存在于对象内的体液、细胞或组织的集合。评估FRA表达水平的样品可以来源于尿液、血液、血清、血浆、胸腔积液、痰液、支气管冲洗液、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织相关的细胞(即游离细胞)、组织(例如,胸膜组织、手术切除的肿瘤组织、活组织检查,包括细针抽吸),组织学制备物等。

[0111] 在一些实施方案中,只对样品的一部分进行测定以确定标志物的水平,或者对样品的各个部分进行各种测定以确定标志物的水平。此外,在许多实施方案中,所述样品可以在所述测定之前通过物理或化学手段预处理。例如,在测定样品的标志物之前,可以对所述样品进行离心、稀释和/或用增溶物质处理(例如胍处理)。这样的技术用来提高所述测定的准确性、可靠性和重现性。

[0112] 术语“参考表达水平”,当用于描述标志物(例如,FRA)的表达水平时,是指用于与来源于对象的样品中所述标志物的水平进行比较的已认可或预先确定的标志物水平。在一种实施方案中,FRA的参考表达水平是利用用FRA靶向剂(例如,免疫特异性结合FRA的抗体)治疗的罹患FRA表达型肺癌的患者群体相对于接受安慰剂代替所述FRA靶向剂的罹患FRA表达型肺癌的患者群体进行预先确定的。除了抗体或安慰剂之外,患者群体还可以接受用于这种FRA表达型肺癌的标准护理疗法。

[0113] 在本文中使用时,术语“将样品”与特异性结合剂例如抗体“接触”包括将所述样品

或其任何部分暴露于所述结合剂,使得至少一部分所述样品与所述结合剂进行接触。在将所述样品或其部分与所述结合剂接触的动作之前,所述样品或其部分可以用某种方式改变,例如通过对它进行物理或化学处理(例如稀释或胍处理)。

[0114] 术语“抑制”是指降低了可测量的量或完全防止。

[0115] 在抗FRA治疗剂对叶酸受体 $\alpha$ 表达细胞的作用的背景下,术语“贫化”是指所述叶酸受体 $\alpha$ 表达细胞的数量减少或消除。

[0116] 在根据本文所述的方法使用的抗体的背景下,术语“功能性”表明所述抗体(1)能够结合抗原和/或(2)贫化或抑制抗原表达细胞的增殖。

[0117] 术语“治疗”或“积极的治疗响应”是指在处于任何临床分期的所述叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的临床或诊断症状发生后,通过向对象施用FRA靶向剂,减慢、停止或逆转了患者的叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的进展,如由所述疾病的临床或诊断症状的减少或消除所证明的。治疗可以包括例如症状严重性、症状数量或复发频率的下降,FRA表达型肺癌细胞的贫化,FRA表达型肺癌细胞生长的抑制,或特定临床结果(例如,无进展生存期、总生存期)的统计学显著和/或临床相关的改善。

[0118] 短语“对用FRA靶向剂治疗有响应”意在表示在施用所述FRA靶向剂后,候选对象(即,患有FRA表达型肺癌的个体)会具有关于所述肺癌的积极的治疗响应。

[0119] 术语“药学上可接受的”是指在组成、制剂、稳定性、患者接受性和生物利用度方面从药理学/毒理学角度来看患者可接受的以及从物理/化学角度来看制造药物化学家可接受的那些性质和/或物质,并包括由联邦或州政府的监管机构批准的或者在美国药典或其他普遍认可的药典中列出的用于动物、更特别是人类的性质和/或物质。术语“药学上相容的成分”是指与抗叶酸受体 $\alpha$ 抗体一起施用的药学上可接受的稀释剂、佐剂、赋形剂或介质。“药学上可接受的载体”是指不干扰活性成分的生物活性的有效性并且对其所施用的宿主无毒的介质。

[0120] 术语“有效量”和“治疗有效量”在本文中可互换使用,并且在施用药剂的背景下,是指足以抑制患者中叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的一种或多种临床或诊断症状的发生或改善所述症状的所述药剂(例如,FRA靶向剂)的量。药剂的治疗有效量可以根据因素例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重以及所述药剂在所述个体中引起所需的响应的能力而变化。这样的结果可以包括但不限于由本领域适合的任何手段所确定的叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的治疗。根据本文所述的方法以“有效方案”施用有效量的药剂。术语“有效方案”是指足以实现叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的治疗的所述药剂的量和给药频率的组合。

[0121] 术语“患者”和“对象”可互换使用,是指接受诊断性、预防性或治疗性治疗的人类和其他非人类动物,包括兽医对象。术语“非人类动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如非人类的灵长类动物、小鼠、兔、羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物和爬行动物。在优选的实施方案中,所述对象是人类。

[0122] 治疗剂通常基本上是纯的,没有不想要的污染物。这意味着药剂通常为至少约50%w/w(重量/重量)纯的,以及基本上不含干扰性蛋白质和污染物。有时,所述药剂是至少约80%w/w、更优选至少90或约95%w/w纯的。然而,使用常规的蛋白质纯化技术,能获得至少99%纯度w/w的同质肽。

[0123] 用于预测用FRA靶向剂治疗的响应可能性的方法

[0124] 本文中提供了用于预测患有叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 表达型肺癌的患者中用FRA靶向剂(例如,免疫特异性结合FRA的抗体)治疗的响应可能性的方法。在本文中所述的用于预测用FRA靶向剂治疗的响应可能性的方法的一些实施方案中,所述FRA表达型肺癌是非小细胞肺癌(NSCLC)。在一些实施方案中,所述NSCLC是腺癌。

[0125] 所描述的用于预测患有叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 表达型肺癌的患者中用FRA靶向剂治疗的响应可能性的方法包括确定患者的生物样品中所述患者的FRA表达水平。

[0126] 确定患者生物样品中的FRA表达水平可以在诊断后、手术切除后、一线疗法开始后、一线疗法完成后、癌症的症状进展、血清学进展和/或放射学进展后、二线或更高线疗法开始后、和/或这样的疗法完成后进行。

[0127] 在所公开的用于预测患有叶酸受体 $\alpha$  (FRA) 表达型肺癌的患者中用FRA靶向剂治疗的响应可能性的方法中,所述FRA表达水平可以通过本领域已知的任何手段(包括已知的RNA或蛋白质定量方法)来确定。这样的方法包括但不限于利用抗体来检测蛋白质表达、核酸杂交、定量RT-PCR、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、免疫组织化学、荧光激活的细胞分选(FACS)、荧光测定法、杂交测定、电泳、毛细管电泳、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、超扩散色谱、流体或凝胶沉淀反应、吸收光谱法、比色测定、分光光度测定、流式细胞术、免疫扩散(单向或双向)、溶液相测定、免疫沉淀、平衡透析、免疫扩散、溶液相测定、免疫电泳、Western印迹、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定和电化学发光免疫测定等。在优选实施方案中,使用基于抗体的技术确定所述水平,如本文更详细描述。在优选实施方案中,采用(例如,胸膜组织的)免疫组织化学分析。确定FRA表达水平的步骤可以离体或体内进行。

[0128] 对于离体评估,用于确定FRA表达水平的所述生物样品可以是尿液、全血、血清、血浆、胸腔积液、痰液、支气管冲洗液、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织相关的细胞(即游离细胞)、组织(例如,胸膜组织、手术切除的肿瘤组织、活组织检查,包括细针抽吸)、组织学制备物等。进行所述测定的组织样品可以被固定或冷冻以允许组织学切片。优选地,将切除的组织样品固定在醛固定剂如甲醛、多聚甲醛、戊二醛;或重金属固定剂如氯化汞中。更优选地,将切除的组织样品在福尔马林中固定并包埋在石蜡中,然后与抗体一起温育。任选地,FFPE样本可以用柠檬酸盐、EDTA、酶消化或加热进行处理,以增加表位的可及性。或者,可以从来自自己知或疑似肺癌的细胞中分离蛋白质级分,并通过ELISA、Western印迹、免疫沉淀等进行分析。在另一种变化方案中,细胞可以通过FACS分析来分析叶酸受体 $\alpha$ 的表达。在又一种变化方案中,可来自自己知或疑似肺癌的细胞提取mRNA。然后可以通过与编码叶酸受体 $\alpha$ 的DNA结合的核酸探针杂交来分析mRNA或由其衍生的核酸,例如cDNA。

[0129] 例如,确定FRA表达水平的步骤可以包括确定从对象获得的肺癌组织的生物样品中的FRA表达水平。FRA表达水平可以通过免疫测定来确定,其中将含有已知或怀疑来自癌症(例如肺癌)的细胞的样品与抗FRA抗体或抗原结合片段接触。接触后,确定所述抗体或抗原结合片段与所述样本中细胞的结合事件的存在或不存在。所述结合与该样本中在癌细胞上表达的抗原的存在或不存在相关。通常,将所述样品与所述抗FRA抗体或抗原结合片段的能够产生可检测信号的标记的特异性结合配偶体接触。或者,所述抗FRA抗体或片段本身可以被标记。标记物类型的实例包括酶标记物、放射性同位素标记物、非放射性标记物、荧光标记物、毒素标记物和化学发光标记物。许多这样的标记物对于本领域技术人员是容易知

道的。例如,合适的标记物包括,但不应被认为限于,放射性标记物、荧光标记物(例如 DyLight®649)、表位标签、生物素、发色团标记物、ECL标记物、或酶。更具体地,所描述的标记物包括钆、<sup>111</sup>In-DOTA、<sup>111</sup>In-二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和β-半乳糖苷酶、聚组氨酸(HIS标签)、吖啶染料、花青染料、荧光酮染料、噻嗪染料、菲啶染料、罗丹明染料、Alexafluor®染料等。检测到来自所述标记物的信号表明样品中存在特异性结合叶酸受体α的抗体或片段。

[0130] 如上所述,在一些实施方案中,FRA表达水平可以通过免疫测定来确定,其中将含有已知或怀疑来自癌症(例如肺癌)的细胞的样品与抗FRA抗体或抗原结合片段接触。在一些实施方案中,FRA不与样品中的细胞结合。用于确定来源于对象的样品中的FRA表达水平的方法被公开在例如美国公布No. 20130017195中,所述美国公布通过引用并入本文。用于确定来源于对象的样品中不与细胞结合的FRA的表达水平的方法被公开在例如美国公布No. 20120207771中,所述美国公布通过引用并入本文。在确定所述FRA表达水平中采用的样品可以来源于例如尿液、血液、血清、血浆、胸腔积液、痰液、支气管冲洗液、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织相关的细胞(即游离细胞)、组织(例如,胸膜组织、手术切除的肿瘤组织、活组织检查,包括细针抽吸)、组织学制备物等。在优选的实施方案中,所述样品是组织、尿液或血清。

[0131] 在各个方面,所述FRA表达水平通过将所述样品与结合FRA的抗体接触来确定。例如,所述抗FRA抗体可以选自:

[0132] (a) 与MORAb-003抗体结合相同表位的抗体;

[0133] (b) 包含 SEQ ID NO:1 (GFTFSGYGLS) 作为CDRH1、SEQ ID NO:2 (MISSGGSYTYADSVKG) 作为CDRH2、SEQ ID NO:3 (HGDDPAWFAY) 作为CDRH3、SEQ ID NO:4 (SVSSSISNNLH) 作为CDRL1、SEQ ID NO:5 (GTSNLAS) 作为CDRL2和SEQ ID NO:6 (QQWSSYPMYT) 作为CDRL3的抗体;

[0134] (c) 包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的成熟轻链可变区

1 DIQLTQSPSS LSASVGDRVITITCSVSSSIS SNNLHWYQQK PGKAPKPWIY  
51 GTSNLASGVP SRFSGSGSGT DYTFTISLQ PEDIATYYCQ QWSSYPMYT

[0135] 101 FGQGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ  
151 WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT  
201 HQGLSSPVTK SFNRGEC

[0136] 和含有氨基酸SEQ ID NO:8的成熟重链可变区的抗体:

1 EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSASGFTFS GYGLSWVRQA PGKGLEWVAM  
51 ISSGGSYTYY ADSVKGRFAI SRDNAKNTLF LQMDSL RPED TGVYFCARHG  
101 DDPAWFAYWG QGTPVTVSSA STKGPSVPEPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD  
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVTV PSSSLGTQTY

[0137] 201 ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCP CPAPPELLGGP SVFLFPPKPK  
251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS  
301 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV  
351 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL  
401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPGK

- [0138] (CDR带有下划线)；
- [0139] (d) 如美国公布No.20090274697和美国专利No.8,124,083中所述的MORAb-003抗体(USAN名称:法勒珠单抗),所述美国公布和美国专利各自的全部内容通过引用并入本文；
- [0140] (e) 548908抗体(Novus;目录号MAB5646)；
- [0141] (f) 与所述548908抗体结合相同表位的抗体；
- [0142] (g) 6D398抗体(USBiological Life Sciences)；
- [0143] (h) 与所述6D398抗体结合相同表位的抗体；
- [0144] (i) BN3.2抗体(Leica Biosystems)；
- [0145] (j) 与所述BN3.2抗体结合相同表位的抗体；
- [0146] (k) 与26B3抗体结合相同表位的抗体；
- [0147] (l) 包含SEQ ID NO:14(GYFMN)作为CDRH1、SEQ ID NO:15(RIFPYNGDTFYNQKFKG)作为CDRH2、SEQ ID NO:16(GTHYFDY)作为CDRH3、SEQ ID NO:17(RTSENIFFSYLA)作为CDRL1、SEQ ID NO:18(NAKTLAE)作为CDRL2和SEQ ID NO:19(QHHYAFPWT)作为CDRL3的抗体；
- [0148] (m) 26B3抗体；
- [0149] (n) 与19D4抗体结合相同表位的抗体；
- [0150] (o) 包含SEQ ID NO:20(HPYMH)作为CDRH1、SEQ ID NO:21(RIDPANGNTKYDPKFQG)作为CDRH2、SEQ ID NO:22(EEVADYTM DY)作为CDRH3、SEQ ID NO:23(RASESVDTYGNNFIH)作为CDRL1、SEQ ID NO:24(LASNLES)作为CDRL2和SEQ ID NO:25(QQNGDPWT)作为CDRL3的抗体；
- [0151] (p) 19D4抗体(参见美国专利8,475,795)；
- [0152] (q) 与9F3抗体结合相同表位的抗体；
- [0153] (r) 包含SEQ ID NO:26(SGYYWN)作为CDRH1、SEQ ID NO:27(YIKSDGSNNYNPSLKN)作为CDRH2、SEQ ID NO:28(EWKAMDY)作为CDRH3、SEQ ID NO:29(RASSTVSYSYLH)作为CDRL1、SEQ ID NO:30(GTSNLAS)作为CDRL2和SEQ ID NO:31(QQYSGYPLT)作为CDRL3的抗体；
- [0154] (s) 9F3抗体(参见美国专利8,475,795)；
- [0155] (t) 与24F12抗体结合相同表位的抗体；
- [0156] (u) 包含SEQ ID NO:32(SYAMS)作为CDRH1、SEQ ID NO:33(EIGSGGSYTYYPDTVTG)作为CDRH2、SEQ ID NO:34(ETTAGYFDY)作为CDRH3、SEQ ID NO:35(SASQGINNFLN)作为CDRL1、SEQ ID NO:36(YTSSLHS)作为CDRL2和SEQ ID NO:37(QHFSKLPWT)作为CDRL3的抗体；
- [0157] (v) 24F12抗体(参见美国专利8,475,795)；
- [0158] (w) 包含选自以下的轻链可变区的抗体：
- [0159] (i) 如SEQ ID NO:38中所示的LK26HuVK：
- [0160] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
- [0161] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn
- [0162] Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
- [0163] Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
- [0164] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln
- [0165] Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro
- [0166] Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys,
- [0167] (ii) 如SEQ ID NO:39中所示的LK26HuVKY：

- [0168] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
[0169] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn  
[0170] Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu  
[0171] Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
[0172] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
[0173] Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
[0174] Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys,  
[0175] (iii) 如SEQ ID NO:40中所示的LK26HuVKPW:  
[0176] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
[0177] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn  
[0178] Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp  
[0179] Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
[0180] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
[0181] Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
[0182] Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys,  
[0183] 和  
[0184] (iv) 如SEQ ID NO:41中所示的LK26HuVKPW,Y:  
[0185] Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
[0186] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn  
[0187] Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp  
[0188] Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
[0189] Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
[0190] Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
[0191] Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys;  
[0192] (x) 包含选自以下的重链可变区的抗体:  
[0193] (i) 如SEQ ID NO:42中所示的LK26HuVH:  
[0194] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln  
[0195] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
[0196] Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val  
[0197] Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
[0198] Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
[0199] Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
[0200] Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
[0201] Ser Leu Val Thr Val Ser Ser,  
[0202] (ii) 如SEQ ID NO:43中所示的LK26HuVH FAIS,N:  
[0203] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln  
[0204] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
[0205] Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val  
[0206] Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

- [0207] Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
[0208] Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
[0209] Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
[0210] Ser Leu Val Thr Val Ser Ser,  
[0211] (iii) 如SEQ ID NO:44中所示的LK26HuVH SLF:  
[0212] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln  
[0213] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
[0214] Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val  
[0215] Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
[0216] Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Ser Leu Phe  
[0217] Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
[0218] Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
[0219] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser,  
[0220] (iv) 如SEQ ID NO:45中所示的LK26HuVH I,I:  
[0221] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln  
[0222] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
[0223] Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val  
[0224] Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
[0225] Lys Gly Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
[0226] Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Ile Cys  
[0227] Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
[0228] Ser Leu Val Thr Val Ser Ser,  
[0229] (v) 如SEQ ID NO:46中所示的LK26KOLHuVH:  
[0230] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
[0231] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
[0232] Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
[0233] Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
[0234] Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
[0235] Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
[0236] Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
[0237] Thr Pro Val Thr Val Ser Ser;  
[0238] (y) 包含重链可变区LK26KOLHuVH(SEQ ID NO:46)和轻链可变区LK26HuVKPW,Y  
(SEQ ID NO:41)的抗体;  
[0239] (z) 包含重链可变区LK26HuVH SLF(SEQ ID NO:44)和轻链可变区LK26HuVKPW,Y  
(SEQ ID NO:41)的抗体;  
[0240] (aa) 包含重链可变区LK26HuVH FAIS,N(SEQ ID NO:43)和轻链可变区  
LK26HuVKPW,Y(SEQ ID NO:41)的抗体;以及  
[0241] (bb) 鼠类单克隆LK26抗体,其重链和轻链在本文中分别如SEQID NO:11和12所示:  
[0242] SEQ ID NO:11

[0243] Gln Val Xaa Leu Gln Xaa Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
[0244] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
[0245] Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
[0246] Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
[0247] Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe  
[0248] Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Ile Cys  
[0249] Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
[0250] Thr Leu Val Thr Val Ser Ala (其中Xaa是指任何氨基酸)  
[0251] SEQ ID NO:12  
[0252] Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ala Ala Ser Pro Gly  
[0253] Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn  
[0254] Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu Thr Ser Pro Lys Pro Trp  
[0255] Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Leu Arg Phe Arg  
[0256] Gly Phe Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu  
[0257] Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
[0258] Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0259] 如欧洲专利申请No.86104170.5(Rettig)中所述,该专利申请的全部内容通过引用并入本文。在某些实施方案中,所述抗FRA抗体包括(i)重链可变区LK26KOLHuVH(SEQ ID NO:46)和轻链可变区LK26HuVKPW,Y(SEQ ID NO:41);重链可变区LK26HuVH SLF(SEQ ID NO:44)和轻链可变区LK26HuVKPW,Y(SEQ ID NO:41);或重链可变区LK26HuVH FAIS,N(SEQ ID NO:43)和轻链可变区LK26HuVKPW,Y(SEQ ID NO:41)。产生MORAb-003的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞已于2006年4月24日保藏于ATCC(10801 University Boulevard,Manassas,VA 20110),并分配了登录号PTA-7552。

[0260] 免疫特异性结合叶酸受体 $\alpha$ 的其它有用的抗体包含分别与SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8具有至少90%并优选至少95%或99%序列同一性的成熟轻链和重链可变区。免疫特异性结合叶酸受体 $\alpha$ 的其它有用的抗体或其衍生物能够竞争性地抑制法勒珠单抗与叶酸受体 $\alpha$ 的结合,例如通过免疫测定来确定。竞争性抑制意味着抗体当以至少两倍并优选五倍过量存在时,将法勒珠单抗与叶酸受体 $\alpha$ 的结合抑制至少50%,更典型至少60%,更加典型至少70%,最典型至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%。

[0261] 免疫特异性结合叶酸受体 $\alpha$ 的抗体也可以是上文公开的抗叶酸受体 $\alpha$ 抗体的衍生物。典型的修饰包括例如糖基化、去糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/阻断基团衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其它蛋白质连接等等。另外,所述衍生物可以含有一种或多种非经典的氨基酸。

[0262] 在某些实施方案中,所述抗FRA抗体选自鼠类抗体、人类抗体、人源化抗体、双特异性抗体、嵌合抗体、Fab、Fab'2、ScFv、SMIP、亲合体(affibody)、avimer、versabody、纳米抗体(nanobody)、生物抗体(biobody)和结构域抗体。可选地或组合地,所述抗FRA抗体用例如选自放射标记物、生物素标记物、发色团标记物、荧光团标记物或酶标记物的标记物进行标记。

[0263] 在另一个方面,来源于对象的样品中的叶酸受体 $\alpha$ (FRA)表达水平通过双抗体夹心

测定来评估。在所述夹心测定的一些实施方案中,将所述样品与(a)固定在固体支持物上的9F3抗体和标记的24F12抗体、(b)固定在固体支持物上的26B3抗体和标记的19D4抗体、以及(c)固定在固体支持物上的9F3抗体和标记的26B3抗体接触。例如,所述样品可以是尿液、全血、血清、血浆、胸腔积液、痰液、支气管冲洗液、循环细胞、循环肿瘤细胞、非组织相关的细胞(即游离细胞)、组织(例如,胸膜组织、手术切除的肿瘤组织、活组织检查,包括细针抽吸),组织学制备物等。

[0264] 在某些实施方案中,在确定所述样品中的FRA表达水平之前,用胍处理所述样品。可选地或组合地,在确定所述样品中的FRA表达水平之前,将所述样品稀释。可选地或组合地,在确定所述样品中的FRA表达水平之前,将所述样品离心、涡旋或二者兼有。

[0265] 在另一种变化方案中,通过向患者施用标记的抗FRA抗体或其抗原结合片段并通过体内成像检测所述抗体或片段,可以体内检测已知或疑似肺癌中的FRA表达水平。任何上述抗体同样可用于体内成像分析。

[0266] 肺组织样品中的FRA水平可以(但不需要)相对于一种或多种标准来确定。所述标准可以是历史或同时确定的。所述标准例如可以是来自不同对象的已知是癌性的FRA表达型肺组织样品、来自不同对象的已知不是癌性的FRA表达型肺组织样品、来自已知不表达FRA的患者或其他对象的组织、或FRA表达型肺癌细胞系。

[0267] 相对于标准(如果使用的话)存在来自抗FRA抗体或片段与FRA结合的可检测信号,表明所述组织样品中存在FRA,并且可检测的结合水平提供了FRA表达水平的指示。在对组织切片进行的测定中,所述表达水平可以表示为显示出可检测的FRA表达的样品的表面积百分比。可选地或附加地,所述表达水平(强度)可用作样品中的总表达或样品中表达FRA的细胞的度量。所述表达强度可以例如使用先前所描述的方法,经由组织切片的数字成像或手动显微镜评估来确定(Potts, Drug Discov Today, 2009; 14 (19-20) : 935-41; O' Shannessy 等, Oncotarget, 2012; 3 (4) : 414-25; 美国专利8,475,795; 制造商说明书, 目录号 IPI4006K G10 (Biocare Medical; Concord, CA)。FRA表达强度可以用于确定如本文所述的FRAMSCOR或HBSCOR。具体来说,假设0、1+、2+、3+评分系统如下(见图2), FRAMSCOR (M-评分) 按加权平均数计算:

[0268]  $x = 1 + \text{染色的肿瘤}\%$

[0269]  $y = 2 + \text{染色的肿瘤}\%$

[0270]  $z = 3 + \text{染色的肿瘤}\%$

[0271] 则T

[0272] 
$$M = \frac{x + 2y + 3z}{6}$$

[0273] 例如,如果患者肿瘤的20%FRA染色为+1、10%FRA染色为+2以及20%FRA染色为+3,则M评分=16.6。HBSCOR (H-评分) 报告了从靶组织室中的所有细胞计算的生物标志物染色(在本案中为FRA染色)的平均光密度值。它利用专有的组织识别特征,经由线性评分以及H-评分的连续扩展来确定组织室,而无需细胞分类。所述H-评分是病理学家和本领域技术人员通常用于对组织中的生物标志物表达进行评分的标准评分方法,其根本上是所有强度水平下的强度评分之和(1+, +2x 2+, +3x 3+)。HBSCOR是从细胞测量结果(光密度)的总和除以细胞总数得出的。HBSCOR继而报告了从靶组织室中的所有细胞计算的生物标志物染色的

值。该计算利用下式进行量化：

$$[0274] \quad \text{HBSCOR} = \frac{\text{细胞} \sum \text{细胞测量结果}}{\text{细胞数量}}$$

[0275] 一旦确定了患者的FRA表达水平，就将其与参考FRA表达水平进行比较。在优选实施方案中，患者的FRA表达水平按照FRAMSCOR（即，M-评分）或HBSCOR（即H-评分）提供，以与参考FRA表达水平比较。在优选实施方案中，所述参考FRA表达水平是预先确定的。例如，可以使用来自具有低、中和高FRA表达水平的无关患者的样品来建立参考数据集。该数据集代表了一种标准，通过所述标准将相对FRA表达水平在患者之间进行比较并利用所述手动和数字分析FRAMSCOR和HBSCOR方法进行量化。在一些实施方案中，所述参考FRA表达水平通过将施用所述FRA靶向剂的罹患FRA表达型肺癌的患者群体与施用安慰剂的罹患FRA表达型肺癌的患者群体进行比较来确定。所述罹患FRA表达型肺癌的患者群体也可以接受标准护理化疗。罹患FRA表达型肺癌的各个群体中每个患者的FRA表达水平根据上述方法来确定。监测所述患者群体的临床结果（例如，无进展生存期或总生存期）。然后如下面提供的实施例中所述，比较所述患者群体相对于FRA表达水平的临床结果。所述参考FRA表达水平对应于如下所述的FRA表达水平：超过该水平时，施用所述FRA靶向剂（例如，免疫特异性结合FRA的抗体）的罹患FRA表达型肺癌的患者群体相对于施用安慰剂的罹患FRA表达型肺癌的患者群体，表现出至少一种临床结果的统计学显著性改善。患者FRA表达水平等于或超过所述参考FRA表达水平表明患者将受益于用所述FRA靶向剂的治疗。

[0276] 治疗方法

[0277] 本文还提供了治疗患有叶酸受体 $\alpha$ （FRA）表达型肺癌的患者的方法。在所述用于治疗患有FRA表达型肺癌的患者的方法的一些实施方案中，所述癌症是NSCLC。在一些实施方案中，所述NSCLC是腺癌。所公开的用于治疗患者的FRA表达型肺癌的方法包括将免疫特异性结合叶酸受体 $\alpha$ （FRA）的抗体施用于FRA表达水平等于或超过参考FRA表达水平的患者的方法。

[0278] 根据本文所述的治疗患有叶酸受体 $\alpha$ （FRA）表达型肺癌的患者的方法，对所述患者的生物样品中患者的FRA表达水平进行定量并将其与参考FRA表达水平进行比较，如上所述。如果患者的FRA表达水平等于或超过所述参考FRA表达水平，则所述患者被施用FRA靶向剂（例如，免疫特异性结合FRA的抗体）。

[0279] 在本文中所述的治疗方法的一些实施方案中，所述FRA靶向剂是vintafolide。在一些实施方案中，所述FRA靶向剂是免疫特异性结合FRA的抗体，例如但不限于免疫特异性结合肺癌细胞上表达的叶酸受体 $\alpha$ 的抗体；这样的抗体的抗原结合片段；衍生物；及其变体。在优选的实施方案中，所述免疫特异性结合叶酸受体 $\alpha$ 的抗体是选自以下的抗体：

[0280] (a) 包含SEQ ID NO:1作为CDRH1、SEQ ID NO:2作为CDRH2、SEQ ID NO:3作为CDRH3、SEQ ID NO:4作为CDRL1、SEQ ID NO:5作为CDRL2和SEQ ID NO:6作为CDRL3的抗体；

[0281] (b) 包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的成熟轻链可变区和/或含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的成熟重链可变区的抗体；

[0282] (c) 法勒珠单抗；

[0283] (d) 包含分别与SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8具有至少90%并优选至少95%或99%序列同一性的成熟轻链和重链可变区的特异性结合叶酸受体 $\alpha$ 的抗体;

[0284] (e) 如通过例如免疫测定而确定的,能够竞争性抑制法勒珠单抗与叶酸受体 $\alpha$ 结合的抗体或其衍生物。

[0285] 免疫特异性结合FRA的抗体衍生物也可用于本方法的实践中。典型的修饰包括例如糖基化、去糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/阻断基团衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其它蛋白质连接等等。另外,所述衍生物可以含有一种或多种非经典的氨基酸。在一些实施方案中,所述免疫特异性结合FRA的抗体与毒素缀合,所述毒素例如但不限于微管抑制剂、DNA损伤剂(例如放射性核素)、DNA修复抑制剂或信号转导抑制剂。用于抗体缀合的接头和用于抗体缀合的方法是本领域已知的。根据本文中所述的方法能用作FRA靶向剂的示例性抗体-药物缀合物是IMGN853。

[0286] 本发明的方法可以与其它治疗手段例如手术(例如,减瘤手术)、放射、靶向疗法、化疗、免疫疗法、使用生长因子抑制剂、或抗血管生成因子相组合。所述FRA靶向剂可以被同时施用于正在进行手术、化疗或放疗治疗的患者。或者,患者可以在施用所述FRA靶向剂之前或之后至少一小时至几个月,例如在施用所述FRA靶向剂之前或之后至少一小时、五小时、12小时、一天、一周、一个月或三个月,进行手术、化疗或放疗。例如,本文中提供的治疗方法的一些实施方案还包括除了所述FRA靶向剂之外,还向所述对象施用治疗有效量的含铂化合物、抗叶酸剂和/或紫杉烷。示例性的含铂化合物是顺铂或卡铂。用于所述治疗方法的紫杉烷的实例包括但不限于紫杉醇、多西紫杉醇、及其半合成、合成和/或修饰形式和制剂,包括但不限于那他紫杉醇(nab-paclitaxel) (Abraxane®)、卡巴他赛(Jevtana®)、DJ-927(Tesetaxel®)、聚谷氨酸紫杉醇(Opaxio®)、XRP9881(Larotaxel®)、EndoTAG+紫杉醇(EndoTAG®-1)、聚合胶束紫杉醇(Genexol-PM®)、DHA-紫杉醇(Taxoprexin®)、BMS-184476。示例性的抗叶酸剂是培美曲塞。含铂化合物可以每周一次、每两周一次、每三周一次、或每四周一次施用于所述患者。紫杉烷可以每周一次、每两周一次、每三周一次、或每四周一次施用于所述患者。抗叶酸剂可以每周一次、每两周一次、每三周一次、或每四周一次施用于所述患者。在其中将含铂化合物和紫杉烷或抗叶酸剂两者施用于患者作为治疗方案一部分的实施方案中,紫杉烷或抗叶酸剂可以在含铂化合物之前、之后或同时施用。

[0287] 在本文所述的治疗方法的一些实施方案中,在定量所述患者的FRA表达水平之前,所述患者可以接受肺癌的手术切除、用于治疗所述癌症的基于铂的在先疗法、基于紫杉烷的在先疗法、和/或基于铂和紫杉烷的在先疗法。在确定所述患者的FRA表达水平之前所述患者接受所述癌症的手术切除、用于治疗所述癌症的基于铂的在先疗法、基于紫杉烷的在先疗法、和/或基于铂和紫杉烷的在先疗法的这种方法的一些实施方案中,在确定所述患者的FRA表达水平的步骤之前,所述患者可能已经表现出所述癌症的症状进展、血清学进展、和/或放射学进展。

[0288] 根据本文所述的治疗方法施用所述治疗剂(包括所述FRA靶向剂、紫杉烷、抗叶酸剂和/或含铂化合物)可以通过本领域已知的任何手段来进行。

[0289] 各种递送系统可以用来施用所述治疗剂(包括所述FRA靶向剂、紫杉烷、抗叶酸剂和/或含铂化合物),包括皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。所述

药剂可例如通过输注或推注、通过经上皮或粘膜层(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收来施用。施用可以是全身或局部的。

[0290] 所述治疗剂可以通过注射、借助于导管、借助于栓剂或借助于植入物来施用,所述植入物是多孔的、无孔的或凝胶状的材料,包括膜,例如sialastic膜或纤维。本文所述供使用的治疗剂及其药物组合物可以用任何可接受的剂型例如胶囊、片剂、水性悬液、溶液等口服施用。

[0291] 施用所述治疗剂的优选方法包括但不限于静脉内注射和腹膜内施用。

[0292] 或者,可以以受控释放系统递送所述治疗剂。例如,可以使用泵(参见Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Sefton, 1989, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald等, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek等, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574)。或者,可以使用聚合材料(参见《受控释放的医疗应用(Medical Applications of Controlled Release)》(Langer&Wise编著, CRC Press, Boca Raton, Fla., 1974); 《受控的药物生物利用度, 药物产品设计和性能(Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance)》(Smolen&Ball编著, Wiley, New York, 1984); Ranger&Peppas, 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61。还参见Levy等, 1985, *Science* 228:190; During等, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard等, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105)。在例如前述的Langer中讨论了其他受控释放系统。

[0293] 所述治疗剂可以作为包含治疗或预防有效量的治疗剂和一种或多种药学上可接受或相容的成份的药物组合物施用。例如,所述药物组合物通常包括一种或多种药物载体(例如无菌液体,例如水和油,所述油包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等等)。当所述药物组合物被静脉内施用时,水是更典型的载体。盐水溶液(例如磷酸盐缓冲盐水)以及水性葡萄糖和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于可注射的溶液。合适的药物赋形剂包括例如淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,所述组合物也可含有少量的润湿或乳化剂、pH缓冲剂(例如氨基酸)和/或增溶剂或稳定剂(例如非离子型表面活性剂如吐温或糖如蔗糖、海藻糖等)。法勒珠单抗的优选制剂含有法勒珠单抗、磷酸钠、氯化钠(NaCl)和聚山梨醇酯80, pH 7.2。法勒珠单抗的优选最终制剂含有5mg/mL法勒珠单抗、10mM磷酸钠、150mM NaCl和0.01%聚山梨醇酯-80, pH 7.2。

[0294] 本文提供的药物组合物可采取溶液、悬液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、缓释制剂等的形式。也包括意图在使用之前不久转化成液体制剂的固体形式制剂。所述组合物可以用传统的粘合剂和载体如甘油三酯配制为栓剂。口服制剂可以包含标准载体,例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载体的实例被描述在E.W.M Martin的“雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)”中。这样的组合物含有治疗有效量的核酸或蛋白质,通常为纯化的形式,以及合适量的载体,以便提供用于适当施用于患者的形式。所述制剂对应于施用方式。

[0295] 通常,用于静脉内施用的组合物是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。必要时,所述药物也可以包括增溶剂和局部麻醉剂例如利诺卡因以缓解注射部位的疼痛。通常,所述成分在单位剂型中分开地或混合在一起供应,例如作为在指明活性剂的量的密封容器如安瓿

或小袋中的干燥的冻干粉末或浓缩物。当通过输注来施用所述药物组合物时，它可以用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶分配。当通过注射来施用所述药物组合物时，可以提供无菌注射用水或盐水的安瓿，以便所述成分可以在施用前混合。

[0296] 有效治疗肺癌的治疗剂的量可通过标准临床技术来确定。另外，可以任选地使用体外测定来帮助鉴定最佳剂量范围。在制剂中使用的精确剂量也取决于施用途径和癌症分期，并且应根据从业者的判断和每个患者的情况来决定。可以从体外或动物模型试验系统获得的剂量-响应曲线外推出有效剂量。可以在动物模型中配制剂量以达到循环血浆浓度范围，其包括在细胞培养物中确定的IC<sub>50</sub>（即达到症状的半数最大抑制的受试化合物的浓度）。

[0297] 例如，所述药剂的毒性和治疗功效可以通过用于确定LD<sub>50</sub>（引起群体的50%死亡的剂量）和ED<sub>50</sub>（在群体的50%中治疗有效的剂量）的标准药物程序在细胞培养物或实验动物中确定。毒性效应和治疗效应之间的剂量比是治疗指数，它可以表示为比率LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>。表现出大治疗指数的药物是优选的。当药剂表现出毒性副作用时，可以使用将所述药剂靶向受影响的组织部位的递送系统，以使对非叶酸受体 $\alpha$ 表达细胞的潜在损伤最小化，从而减少副作用。

[0298] 在一些实施方案中，可以以约0.01微克至约500毫克/千克对象体重的日剂量范围向所述对象施用本文所述的治疗剂。通常，施用于患有叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的患者的治疗剂（例如，FRA靶向剂，例如免疫特异性结合FRA的抗体，优选法勒珠单抗）的剂量为约0.1毫克/千克至约100毫克/千克对象体重。更通常地，施用于对象的剂量是约1.25毫克/千克至约12.5毫克/千克对象体重，或更加通常约2.5毫克/千克至约10.0毫克/千克对象体重。在一些实施方案中，施用于患有叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的对象的所述FRA靶向剂（例如，免疫特异性结合FRA的抗体，优选法勒珠单抗）的剂量为约5.0毫克/千克至约7.5毫克/千克对象体重。在本文所述的治疗方法的一些实施方案中，向所述对象施用约7.5mg/kg至约12.5mg/kg、优选约10mg/kg的所述FRA靶向剂（例如，免疫特异性结合FRA的抗体）负荷剂量。在本文所述的治疗方法的一些实施方案中，在治疗的前两周内向所述对象施用FRA靶向剂（例如，免疫特异性结合FRA的抗体）的两个负荷剂量，每周约7.5mg/kg至约12.5mg/kg，优选约10mg/kg。在一些实施方案中，施用于患有叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的对象的紫杉烷的剂量为约50毫克/平方米至约250毫克/平方米对象体重，优选约75mg/m<sup>2</sup>至约200mg/m<sup>2</sup>。在一些实施方案中，施用于患有叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的对象的卡铂的剂量为约AUC 3，优选约AUC 4，更优选约AUC 5-6，并且在一些优选实施方案中为约AUC 6。在一些实施方案中，施用于患有叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的对象的顺铂的剂量为约50毫克/平方米至约250毫克/平方米对象体重，优选约75mg/m<sup>2</sup>至约200mg/m<sup>2</sup>。在一些实施方案中，施用于患有叶酸受体 $\alpha$ 表达型肺癌的对象的抗叶酸剂的剂量为约400至约600mg/m<sup>2</sup>。在优选的实施方案中，将至少四至六个周期的化疗与施用所述FRA靶向剂联合施用于所述患者。

[0299] 为了有效的治疗，本领域技术人员可以推荐对于所治疗的对象来说足够的所述治疗剂的给药日程和剂量。可能优选的是，给药每天发生一次至四次或更多次、每周一次、每两周一次、每三周一次、或每四周一次，持续所需要的时间长度。通常，所述FRA靶向剂每周一次施用于所述对象。

[0300] 如果所述组合物被配制在持续递送介质中，则给药可以以较少的频率发生。给药

日程也可以取决于活性药物浓度而变化,而药物浓度可以取决于对象的需要。

#### [0301] 试剂盒

[0302] 本文进一步提供了用于预测患有FRA表达型肺癌的患者中用FRA靶向剂治疗的响应可能性的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒含有抗FRA抗体、用于容纳未使用时的所述抗体的容器、以及使用所述抗FRA抗体来确定对象的FRA表达水平的说明书。一个或多个另外的容器可以装入在标志物测定中要使用的要素,例如试剂或缓冲剂。这样的试剂盒也可以或可选地含有检测试剂,所述检测试剂含有适合于直接或间接检测抗体结合的报告基团。

[0303] 本文还提供了用于治疗患者的FRA表达型肺癌的试剂盒,其包含FRA靶向剂(例如,vintafolide、免疫特异性结合FRA的抗体如法勒珠单抗、或抗体-药物缀合物如IMGN853)、用于容纳未使用时的所述FRA靶向剂的容器、以及FRA靶向剂的使用说明书。法勒珠单抗是试剂盒中免疫特异性结合FRA的优选抗体。在一些实施方案中,所述用于治疗患有FRA表达型肺癌的对象的试剂盒也含有用于定量所述患者的生物样品中FRA表达水平的抗FRA抗体。这后一种抗FRA抗体可以与被治疗性施用的免疫特异性结合FRA的抗体相同或不同。在一些实施方案中,所述试剂盒也含有用于容纳未使用时的所述抗FRA抗体的容器、以及使用所述抗FRA抗体来确定对象的FRA表达水平的说明书。

[0304] 用于治疗患有FRA表达型肺癌的对象的试剂盒也可以含有如本文所述的其它治疗剂(例如,含铂化合物、紫杉烷和/或抗叶酸剂)。用于包含在所述试剂盒中的含铂化合物的实例包括但不限于顺铂和卡铂。用于包含在所述试剂盒中的紫杉烷的实例包括但不限于紫杉醇、多西紫杉醇、以及其半合成、合成和/或修饰的形式和制剂,包括但不限于那他紫杉醇(Abraxane®)、卡巴他赛(Jevtana®)、DJ-927(Tesetaxel®)、聚谷氨酸紫杉醇(Opaxio®)、XRP9881(Larotaxel®)、EndoTAG+紫杉醇(EndoTAG®-1)、聚合胶束紫杉醇(Genexol-PM®)、DHA-紫杉醇(Taxoprexin®)、BMS-184476。用于包含在所述试剂盒中的抗叶酸剂的实例是培美曲塞。所述治疗剂可以是适合于分配在试剂盒中的各种形式中的任一种。适合于分配在试剂盒中的治疗剂的形式可包括用于提供所述治疗剂的液体、粉末、片剂、悬液和类似制剂。所述试剂盒也可包含用于注射、重构或稀释所述治疗剂的药学上可接受的稀释剂(例如无菌水)。一个或多个另外的容器可以装入在标志物测定中要使用的要素,例如试剂或缓冲剂。这样的试剂盒也可以或可选地含有检测试剂,所述检测试剂含有适合于直接或间接检测抗体结合的报告基团。

[0305] 试剂盒通常还含有本文所述方法中使用的标签或说明书。所述标签或说明书是指在试剂盒的制造、运输、销售或使用过程中的任何时间随附于或以其他方式伴随试剂盒的任何书面或记录材料。它可以是由管控药品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通告,该通告反映了制造、使用或销售管理机构对人类施用的批准。所述标签或说明书也可以包括广告传单和小册子、包装材料、说明书、音频或录像带、电脑光盘、以及直接印在药物试剂盒上的文书。

[0306] 提供以下实施例是为了进一步描述本文中公开的一些实施方案。所述实施例旨在说明而不是限制所公开的实施方案。

#### [0307] 实施例1

**[0308] 患者**

[0309] 合格的对象必须具有新诊断的、不可切除的、组织学或细胞学确认的肺腺癌,通过免疫组织化学表明在至少5%的肿瘤细胞中有FRA表达(通过1+或更高的膜染色来界定),分类为IV期,利用计算机断层扫描(CT)或核磁共振成像(MRI)根据实体肿瘤响应评价标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)(RECIST) 1.1版有至少一个在单维上可测量的病灶(ClinicalTrials.gov的标识号为NCT01218516)。由于没有关于最大抗FRA抗体药理学作用在理论上可能需要的FRA阳性程度和频率的数据,因此其肿瘤有至少5%为+1强度膜FRA表达(使用本领域技术人员通常使用的方法)阳性的患者被指定为患有FRA阳性肿瘤并且对于入选研究是合格的。对象没有接受过有治愈其肺癌的意向的在先化疗、放疗或手术。

**[0310] 治疗**

[0311] 对象以1:1的比率随机分组以接受选择的铂双药(卡铂的曲线下面积(AUC)药代动力学暴露水平为6和紫杉醇200mg/m<sup>2</sup>;卡铂AUC 5-6和培美曲塞500mg/m<sup>2</sup>;或顺铂75mg/m<sup>2</sup>和培美曲塞500mg/m<sup>2</sup>)与法勒珠单抗或安慰剂。按照东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group)(ECOG)的表现状态(0或1)和所选的化疗方案的类型对随机分组进行分层。所有随机分组的对象用法勒珠单抗7.5mg/kg或安慰剂联合所述3种可接受的化疗方案中的一种来治疗;除了第一个周期以外,在21天周期的第1天静脉内(IV)施用;在第一个周期时,在第8天施用法勒珠单抗或安慰剂单一疗法作为负荷剂量。从第2周期开始,在所有其他周期的第1天将法勒珠单抗或安慰剂与化疗联合施用。

[0312] 所有方案可接受的铂双药每3周施用一次,持续至少4个、但不超过6个周期。化疗方案一旦开始就不变。根据国家特定的、批准的包装插页并基于对象所经历的毒性程度,化疗剂量可由于毒性而降低或延迟。如果化疗在第四周期之前停止或持续超过6周,则对象停止治疗方案。

[0313] 那些从联合疗法体验到临床益处的对象可以在每21天周期的第1天继续接受法勒珠单抗或安慰剂,直到有记录的射线照相进展或其他方案批准的疾病进展度量为止。一旦发生疾病进展,跟踪每个对象的生存状态,并对IV期肺腺癌采用额外的全身疗法。在此跟踪期间,在前9个月每个月接触对象,此后直到死亡前每2个月接触对象。

**[0314] 评估**

[0315] 在联合疗法期间每2个周期以及在单一疗法期间每3个周期进行射线照相疾病评价,按独立审查在本地审阅。CT扫描(或MRI)也独立地由中心审查利用RECIST v.1.1来评价。因任何原因在射线照相进展之前停止研究治疗的对象每9周进行射线照相跟踪,直到有记录的射线照相进展或其他方案批准的疾病进展度量为止。

[0316] 在整个研究中进行安全性评价,包括审查不良事件(AE)、体格检查、实验室评价、抗药物抗体(ADA)和心电图(ECG)。

[0317] PFS被定义为从随机分组日期到首次观察到通过RECIST基于放射学评估的进展或由研究者评估的明确临床疾病进展(例如新出现阳性体液细胞学)的日期、或在没有进展性疾病的情况下无论何种原因的死亡日期的时间(月)。

[0318] 为了证明肿瘤组织中的相对FRA表达水平或者阈值表达水平对于在患有非小细胞肺腺癌(NSCLC)的患者中提高与标准护理化疗(卡铂+紫杉醇;卡铂+培美曲塞;或顺铂+培美

曲塞)卡铂)联合的法勒珠单抗介导的临床改善是重要的,从未行化疗的IV期NSCLC腺癌患者的肿瘤病灶制备5 $\mu$ m组织切片载玻片,分析其细胞质或膜FRA表达水平。

[0319] FRA蛋白水平通过免疫组织化学(IHC)分析,对于本研究来说使用26B3抗FRA抗体(0'Shannessy等,Oncotarget,2012;3(4):414-25;也包含在目录号IPI4006K G10内(Biocare Medical;Concord,CA);也参见美国专利8,475,795)),按照标准方案说明书来确定。为了定量FRA表达,通过两种程序中的一种来确定水平,并由受过训练的病理学家以盲法方式分析。细胞质或膜FRA表达使用先前描述的方法(Potts,Drug Discov Today,2009;14(19-20):935-41;0'Shannessy等,Oncotarget,2012;3(4):414-25;美国专利8,475,795;制造商说明书,目录号IPI4006K G10(Biocare Medical;Concord,CA),经由数字成像或手动显微镜评估26B3染色的组织切片来确定。

[0320] 利用图像分析,经由根据Flagship Biosciences(Westminster,CO)的细胞图谱和/或染色图谱算法,对26B3染色的切片组织载玻片中的FRA进行数字分析。FRA表达的手工分析由具有本领域技术的受过训练的病理学家在两个独立实验室中通过显微镜评价来进行。

[0321] 为了定量通过数字成像或手动分析得到的膜或细胞质FRA表达水平,开发了一种算法以将FRA染色定量为肿瘤阳性和信号强度的百分比。为用于手动病理评分方法而鉴定的这些值被表示为膜染色的FRA M评分(FRAMSCOR)。为用于数字成像分析而鉴定的值被表示为细胞质染色的HBS评分(HBSCOR)。以前用于准确定量生物标志物表达水平的方法确定了,为了获得高度准确的评分,肿瘤切片必须轮廓分明并且IHC染色需要是均匀的。为了评估所获得的组织切片的质量和染色的质量以将患者纳入本研究,具有本领域技术的盲法病理学家独立地评价FRA 26B3染色的NSCLC肿瘤组织切片的完整性,以利用胸膜组织来源的标准比较胸膜组织中的FRA表达。在充分评估后,所述病理学家认为130个组织载玻片中有85个适合于FRAMSCOR和HBSCOR胸膜组织分析。虽然适合于检测FRA表达的“存在”,但其余45个载玻片的详细表达分析是不可能的,因为:1)组织保存差,排除了精确分析膜表达的能力;2)不能准确确定胸膜组织中的FRA表达(一小组载玻仅在胸腔积液背景内含有恶性细胞);和/或3)总体过度染色,阻止了在线性范围内的精确染色分析。图1显示了组织完整性/形态学和染色的适合性与那些作为意向治疗群体(ITT)原始临床组的一部分并且不适合通过FRAMSCOR或HBSCOR定量FRA表达的实例的对比。

[0322] 为了确定85个合适的胸膜肿瘤切片中的FRA染色强度,首先利用来自具有低、中和高FRA表达水平的无关患者的样品建立胸膜组织参考数据集。该数据集代表了一种标准,通过所述标准将相对FRA表达水平在患者之间进行比较并利用所述手动和数字分析FRAMSCOR和HBSCOR方法进行量化。图2提供了用于如本领域技术人员所知对NSCLC腺癌样品中的FRA进行+1(低表达)、+2(中等表达)和+3(高表达)评分的参考数据集的实例。另外,使用下面的公式将肿瘤阳性百分比也归入每种方法的算法内(肿瘤表面积1至100%阳性)(未显示)。

[0323] 假设0、1+、2+、3+评分系统如下(见图2),FRAMSCOR(M-评分)按加权平均数计算:

[0324]  $x = 1 + \text{染色的肿瘤}\%$

[0325]  $y = 2 + \text{染色的肿瘤}\%$

[0326]  $z = 3 + \text{染色的肿瘤}\%$

[0327] 则

$$[0328] \quad M = \frac{x+2y+3z}{6}$$

[0329] 例如,如果患者肿瘤的20% 26B3-FRA染色为+1、10% 26B3-FRA染色为+2以及20% 26B3-FRA染色为+3,则M评分=16.6。

[0330] HBSCOR报告了从靶组织室中的所有细胞计算的生物标志物染色(在本案中为FRA的26B3染色)的平均光密度值。它利用专有的组织识别特征,经由线性评分以及H评分的连续扩展来确定组织室,而无需细胞分类。所述H-评分是病理学家和本领域技术人员通常用于对组织中的生物标志物表达进行评分的标准评分方法,其根本上是所有强度水平下的强度评分之和(1+, +2x 2+, +3x 3+)。HBSCOR是从细胞测量结果(光密度)的总和除以细胞总数得出的。HBSCOR继而报告了从靶组织室中的所有细胞计算的生物标志物染色的值。该计算利用下式进行量化:

$$[0331] \quad \text{HBSCOR} = \frac{\text{细胞} \quad \Sigma \text{细胞测量结果}}{\text{细胞数量}}$$

[0332] 使用上文所述的FRAMSCOR和HBSCOR方法在盲法分析下对含有患者来源的组织并利用26B3抗体针对FRA进行染色的可评价的载玻片进行分析和定量。首先利用表达切割点分析对数据进行分析。进行叶酸受体 $\alpha$  (FRA)表达与总生存期(OS)的相关性分析,以确定高或低FRA表达是否与法勒珠单抗治疗的治疗响应超过安慰剂对照治疗的患者相关。图3显示了这种分析的一个实例,其中经由所述HBSCOR方法对患者样本的FRA表达进行定量。正如所示,观察到患者OS的显著响应,因为法勒珠单抗治疗的表达较高水平FRA的患者与具有低表达的那些患者相比,出现临床阳性的风险比。为了根据无进展生存期(PFS)或OS来确定FRA表达和法勒珠单抗治疗对患者临床响应的总体影响,进行了Kaplan Meier分析。如图4所示,利用FRAMSCOR选择的高FRA膜表达的患者当用法勒珠单抗+SOC治疗时,与只用安慰剂+SOC治疗的患者相比( $p=0.386$ ),显示出OS的统计学显著的临床改善(8.4个月改善,HR 0.54; $p=0.0266$ )。与低膜染色(未显示)相比,在显示出高FRA膜染色的患者中也发现了改善的PFS响应。当使用利用HBSCOR方法具有最佳FRA细胞质表达的患者时,观察到相似的效果,其中用法勒珠单抗治疗的患者与用法勒珠单抗治疗的表达未达最佳的FRA水平的患者(图5,图A)相比,在PFS和OS上具有统计学显著的临床益处(图5,图B)。这些发现教导了,利用FRAMSCOR或HBSCOR方法在肺癌患者的活组织检查中鉴定FRA表达以确定那些表现出最低阈值水平的患者,用此来改善与只是招募表现出任何FRA表达的肿瘤患者(正如对ITT群体所做的)相比的治疗益处,后者未能在用法勒珠单抗+SOC治疗的患者中证实超过用安慰剂+SOC治疗的患者的统计学临床益处(PFS HR 0.91, $p=0.7045$ 和OS HR 0.91, $p=0.6525$ )。

[0333] 使用可能影响NSCLC肺癌患者对SOC治疗的临床响应的标准因素,例如吸烟、年龄或ECOG状态,进行多变量分析。在具有高水平FRA的患者中,在所述多变量分析中没有看到影响法勒珠单抗对临床响应的统计学正效应的作用。

[0334] 这些发现教导了,使用含有胸膜恶性组织并且以使得能够定量分析定位在膜或细胞质中的FRA表达的方式进行染色的高质量组织活检在用于鉴定可能对抗叶酸受体 $\alpha$ 抗体疗法作出响应的患者中的用途。随后的分析发现,来源于胸腔积液和细针抽吸物的患者样

品也可以被定量以鉴定那些表现出对于抗FRA治疗效果来说合适的FRA表达的患者。在这些病例中,可以开发基于非胸膜的参考标准用于比较。此外,这些结果证明,患有在膜和/或细胞质中表达较高水平FRA (如通过FRAMSCOR或HBSCOR方法所确定的) 的肿瘤的患者,在包括PFS和OS在内的临床结果上具有显著改善。这些教导应该将抗FRA抗体疗法的应用定位在最有可能对抗FRA抗体疗法作出响应的NSCLC患者中。FRA水平对于界定会对抗FRA抗体疗法与SOC的联合作出响应的患者来说是重要的。未来的试验和临床应用应包含表现出高于疗效最小切割点的必需的FRA阈值水平的患者的治疗。在此界定的那些水平包括FRAMSCOR大于或等于7以及HBSCOR大于或等于0.25的那些水平(见图3)。平均而言,这解释为NSCLC肿瘤的大于42%的FRA表达为+1强度、21%的FRA表达为+2强度和/或肿瘤的大于14%的FRA表达为+3强度。



<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
<400> 3  
His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr  
1                   5                   10  
<210> 4  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
<400> 4  
Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn Leu His  
1                   5                   10  
<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
<400> 5  
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1                   5  
<210> 6  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
<400> 6  
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr  
1                   5                   10

<210> 7  
 <211> 217  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"  
 <400> 7  
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn  
                   20                   25                   30  
 Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp  
                   35                   40                   45  
 Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
                   50                   55                   60  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln  
 65                   70                   75                   80  
 Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro  
                   85                   90                   95  
 Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr  
                   100                   105                   110  
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
                   115                   120                   125  
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
                   130                   135                   140  
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 145                   150                   155                   160  
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
                   165                   170                   175  
 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
                   180                   185                   190  
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
                   195                   200                   205  
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                   210                   215  
 <210> 8  
 <211> 449

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"  
 <400> 8  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
                   20                   25                   30  
 Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45  
 Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
                   100                   105                   110  
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
                   115                   120                   125  
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
                   130                   135                   140  
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp  
 145                   150                   155                   160  
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu  
                   165                   170                   175  
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser  
                   180                   185                   190  
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro  
                   195                   200                   205  
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys  
                   210                   215                   220  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
 225                   230                   235                   240  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
                   245                   250                   255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
260	265	270	
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
275	280	285	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
290	295	300	
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
	325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
	355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
	385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
	405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
	420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	435	440	445

Lys

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 962

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

```

tcaaggtaa acgacaagga cagacatggc tcageggatg acaacacagc tgctgctcct 60
tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg attgcatggg ccaggactga 120
gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa aagccaggcc ccgaggacaa 180
gttgcattgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgectgc tgtttacca acaccagcca 240
ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac tggaaccact gtggagagat 300
ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc ctctacgagt gctcccccaa 360
cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc aaagagcggg tactgaacgt 420
gccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat tgtcgcacct cctacacctg 480
caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg tttacaagt gcgcagtggg 540

```

agctgcctgc caaccttcc atttctactt cccacacccc actgtttctgt gcaatgaaat 600  
 ctggactcac tctacaagg tcagcaacta cagccgaggg agtggccgct gcatccagat 660  
 gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg gcgaggttct atgctgcagc 720  
 catgagtggg gctggggcct gggcagcctg gcctttcctg cttagcctgg ccctaagtct 780  
 gctgtggctg ctcagctgac ctctttttac cttctgatac ctggaaatcc ctgccctgtt 840  
 cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg tcgggcctct gacagccact 900  
 ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat ttggaaaaaa aaaaaaaaaa 960  
 aa 962

<210> 10

<211> 257

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met	Ala	Gln	Arg	Met	Thr	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Trp	Val
1				5					10					15	
Ala	Val	Val	Gly	Glu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Ala	Trp	Ala	Arg	Thr	Glu
			20					25					30		
Leu	Leu	Asn	Val	Cys	Met	Asn	Ala	Lys	His	His	Lys	Glu	Lys	Pro	Gly
		35					40					45			
Pro	Glu	Asp	Lys	Leu	His	Glu	Gln	Cys	Arg	Pro	Trp	Arg	Lys	Asn	Ala
	50					55					60				
Cys	Cys	Ser	Thr	Asn	Thr	Ser	Gln	Glu	Ala	His	Lys	Asp	Val	Ser	Tyr
65				70					75					80	
Leu	Tyr	Arg	Phe	Asn	Trp	Asn	His	Cys	Gly	Glu	Met	Ala	Pro	Ala	Cys
			85						90					95	
Lys	Arg	His	Phe	Ile	Gln	Asp	Thr	Cys	Leu	Tyr	Glu	Cys	Ser	Pro	Asn
			100					105						110	
Leu	Gly	Pro	Trp	Ile	Gln	Gln	Val	Asp	Gln	Ser	Trp	Arg	Lys	Glu	Arg
		115					120						125		
Val	Leu	Asn	Val	Pro	Leu	Cys	Lys	Glu	Asp	Cys	Glu	Gln	Trp	Trp	Glu
		130				135					140				
Asp	Cys	Arg	Thr	Ser	Tyr	Thr	Cys	Lys	Ser	Asn	Trp	His	Lys	Gly	Trp
145					150					155				160	
Asn	Trp	Thr	Ser	Gly	Phe	Asn	Lys	Cys	Ala	Val	Gly	Ala	Ala	Cys	Gln
				165					170					175	
Pro	Phe	His	Phe	Tyr	Phe	Pro	Thr	Pro	Thr	Val	Leu	Cys	Asn	Glu	Ile
				180					185					190	
Trp	Thr	His	Ser	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Tyr	Ser	Arg	Gly	Ser	Gly	Arg
				195				200						205	

Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu  
 210 215 220  
 Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala  
 225 230 235 240  
 Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu  
 245 250 255  
 Ser  
 <210> 11  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 polypeptide"  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Any amino acid  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (6)..(6)  
 <223> Any amino acid  
 <400> 11  
 Gln Val Xaa Leu Gln Xaa Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr  
 20 25 30  
 Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Ile Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

&lt;400&gt; 12

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

&lt;210&gt; 13

&lt;400&gt; 13

000

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; source

&lt;223&gt; /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

&lt;400&gt; 14

Gly Tyr Phe Met Asn

1 5

&lt;210&gt; 15

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
 <400> 15  
 Arg Ile Phe Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1                    5                    10                    15  
 Gly  
 <210> 16  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
 <400> 16  
 Gly Thr His Tyr Phe Asp Tyr  
 1                    5  
 <210> 17  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
 <400> 17  
 Arg Thr Ser Glu Asn Ile Phe Ser Tyr Leu Ala  
 1                    5                    10  
 <210> 18  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 18

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu

1                    5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 19

Gln His His Tyr Ala Phe Pro Trp Thr

1                    5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 20

His Pro Tyr Met His

1                    5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 21

Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 22  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
<400> 22  
Glu Glu Val Ala Asp Tyr Thr Met Asp Tyr  
1                    5                    10  
<210> 23  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
<400> 23  
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Tyr Gly Asn Asn Phe Ile His  
1                    5                    10                    15  
<210> 24  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
<400> 24  
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
1                    5  
<210> 25  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
 <400> 25  
 Gln Gln Asn Asn Gly Asp Pro Trp Thr  
 1                    5  
 <210> 26  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
 <400> 26  
 Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn  
 1                    5  
 <210> 27  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
 <400> 27  
 Tyr Ile Lys Ser Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 28  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <221> source  
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
 <400> 28  
 Glu Trp Lys Ala Met Asp Tyr  
 1                    5  
 <210> 29

<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
<400> 29  
Arg Ala Ser Ser Thr Val Ser Tyr Ser Tyr Leu His  
1                   5                   10  
<210> 30  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
<400> 30  
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1                   5  
<210> 31  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"  
<400> 31  
Gln Gln Tyr Ser Gly Tyr Pro Leu Thr  
1                   5  
<210> 32  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<221> source  
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide”

<400> 32

Ser Tyr Ala Met Ser

1                    5

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide”

<400> 33

Glu Ile Gly Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide”

<400> 34

Glu Thr Thr Ala Gly Tyr Phe Asp Tyr

1                    5

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide”

<400> 35

Ser Ala Ser Gln Gly Ile Asn Asn Phe Leu Asn

1                    5                    10

<210> 36



65	70	75	80
Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro			
	85	90	95
Tyr Met Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	110

<210> 39

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 39

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

<210> 40

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 40

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15

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

<210> 41

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 41

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

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 42

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

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 43

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



polypeptide”

<400> 45

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

<210> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide”

<400> 46

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

---

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Thr Val Ser Ser  
115

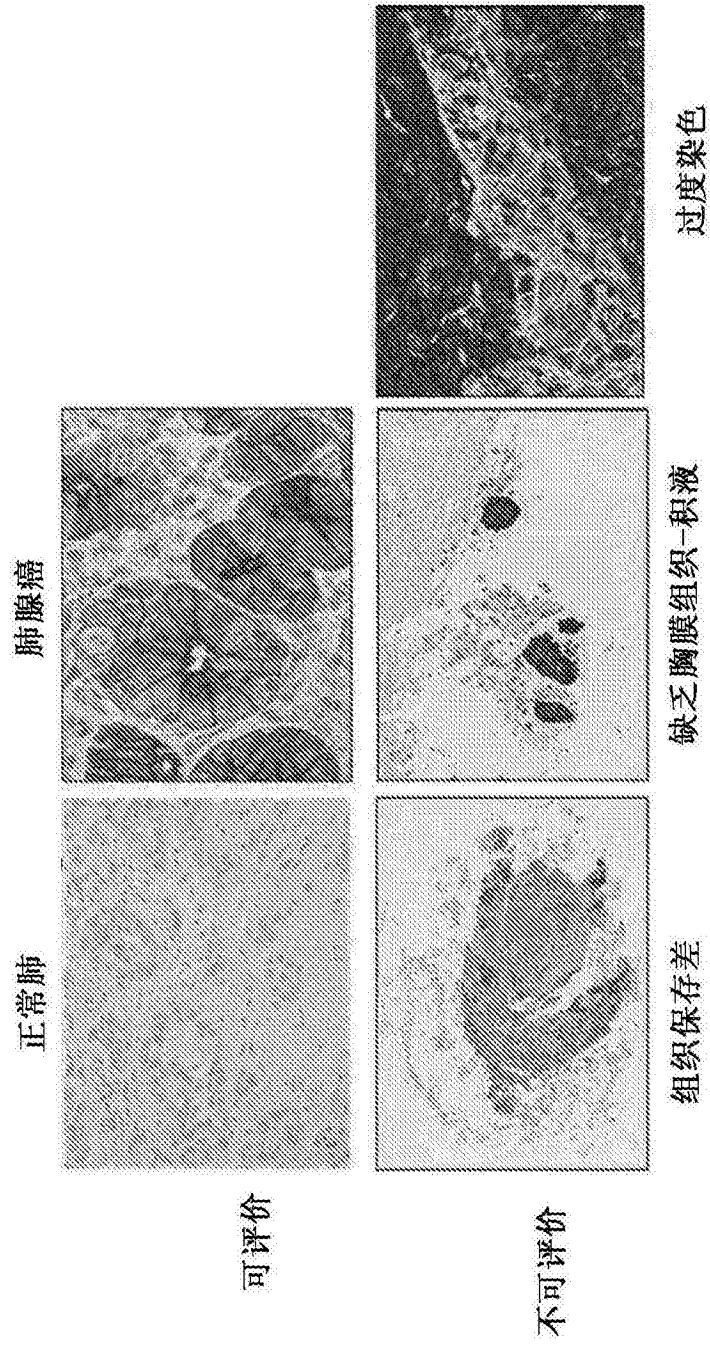


图1

非小细胞腺癌染色分级:

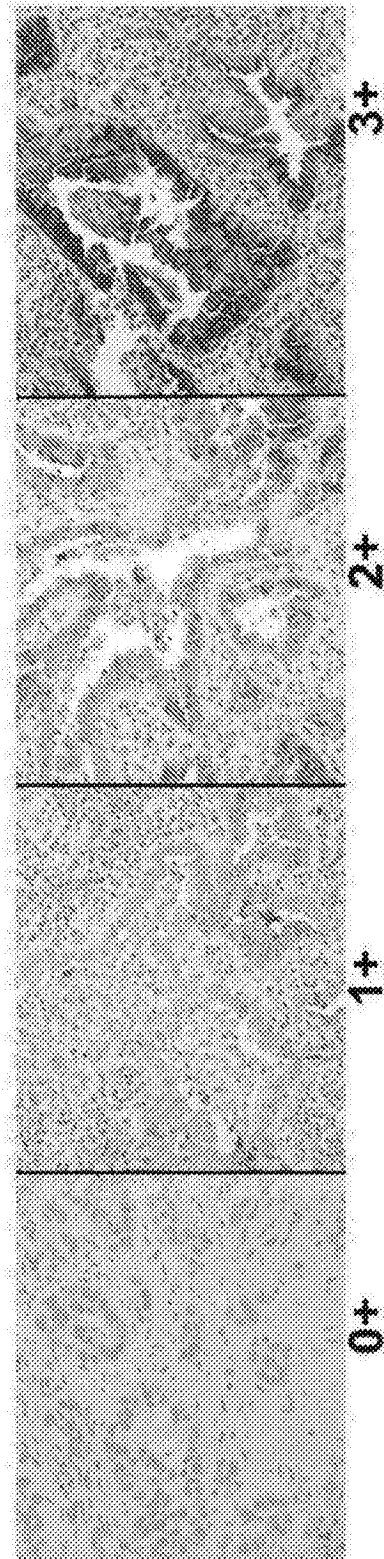


图2

在经由数字图像分析检测的不同FRA细胞质表达水平下用法勒珠单抗治疗的患者OS的风险比

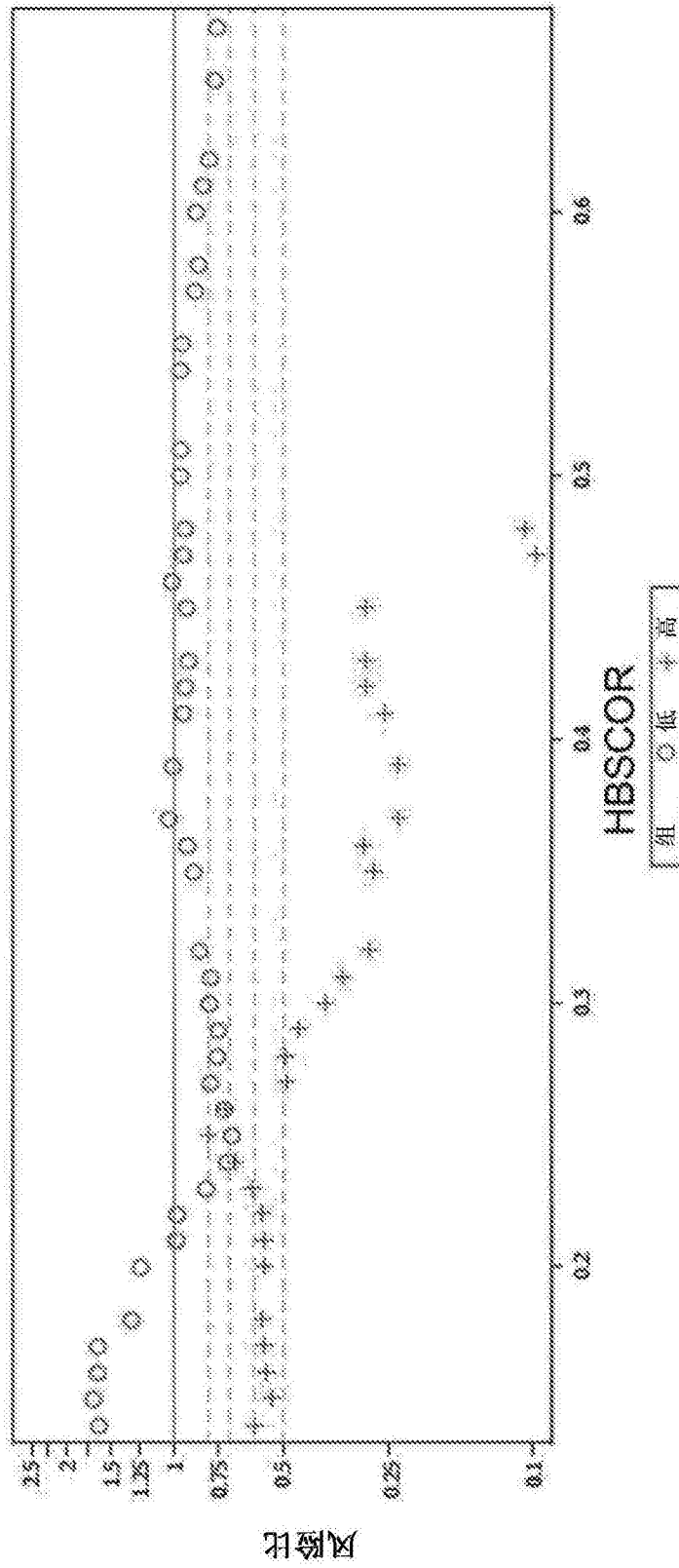
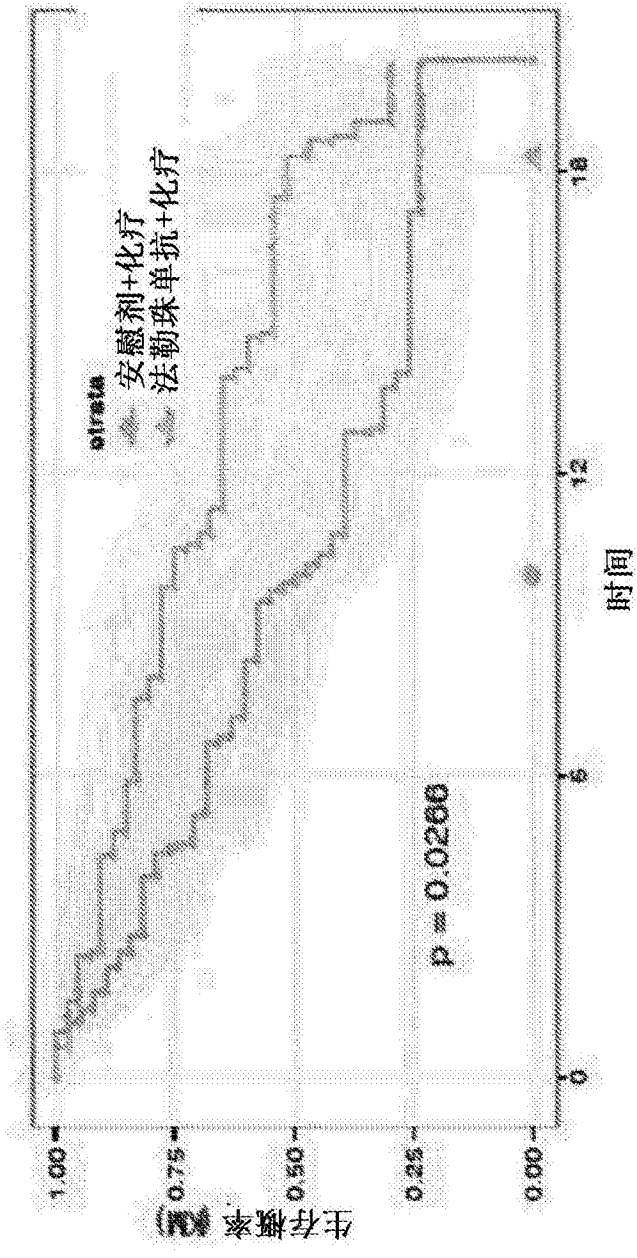


图3

A

PhenoPath. M评分超过截止值7



B

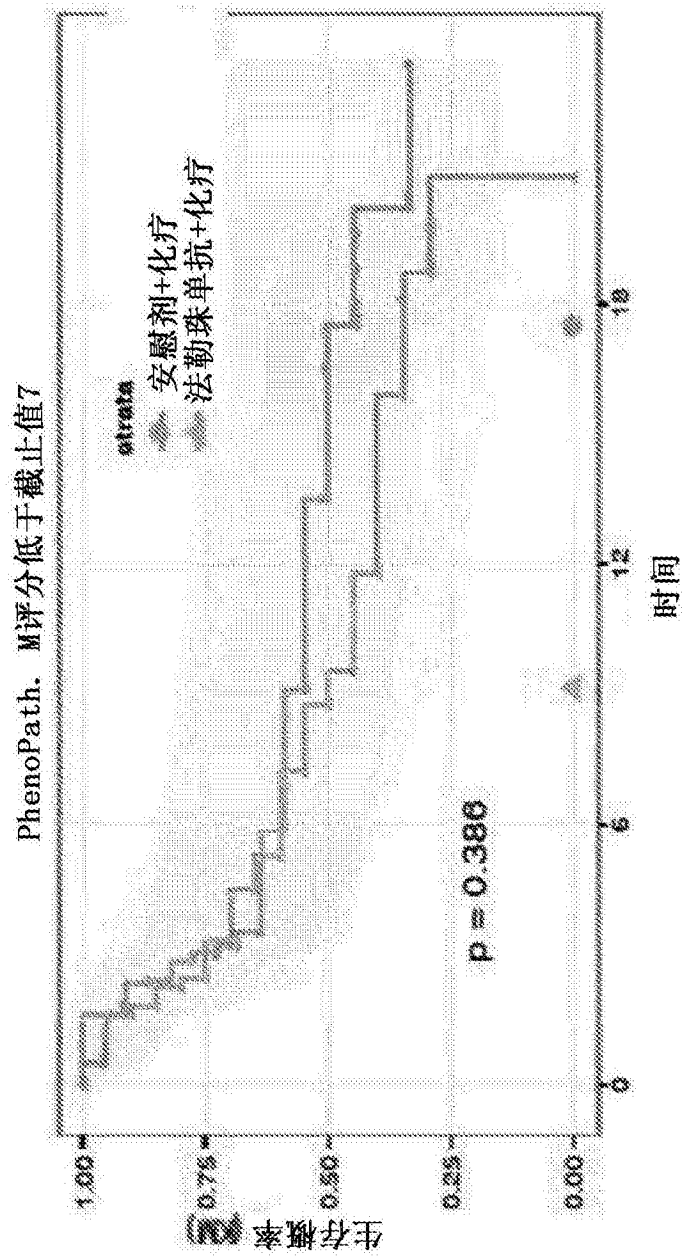
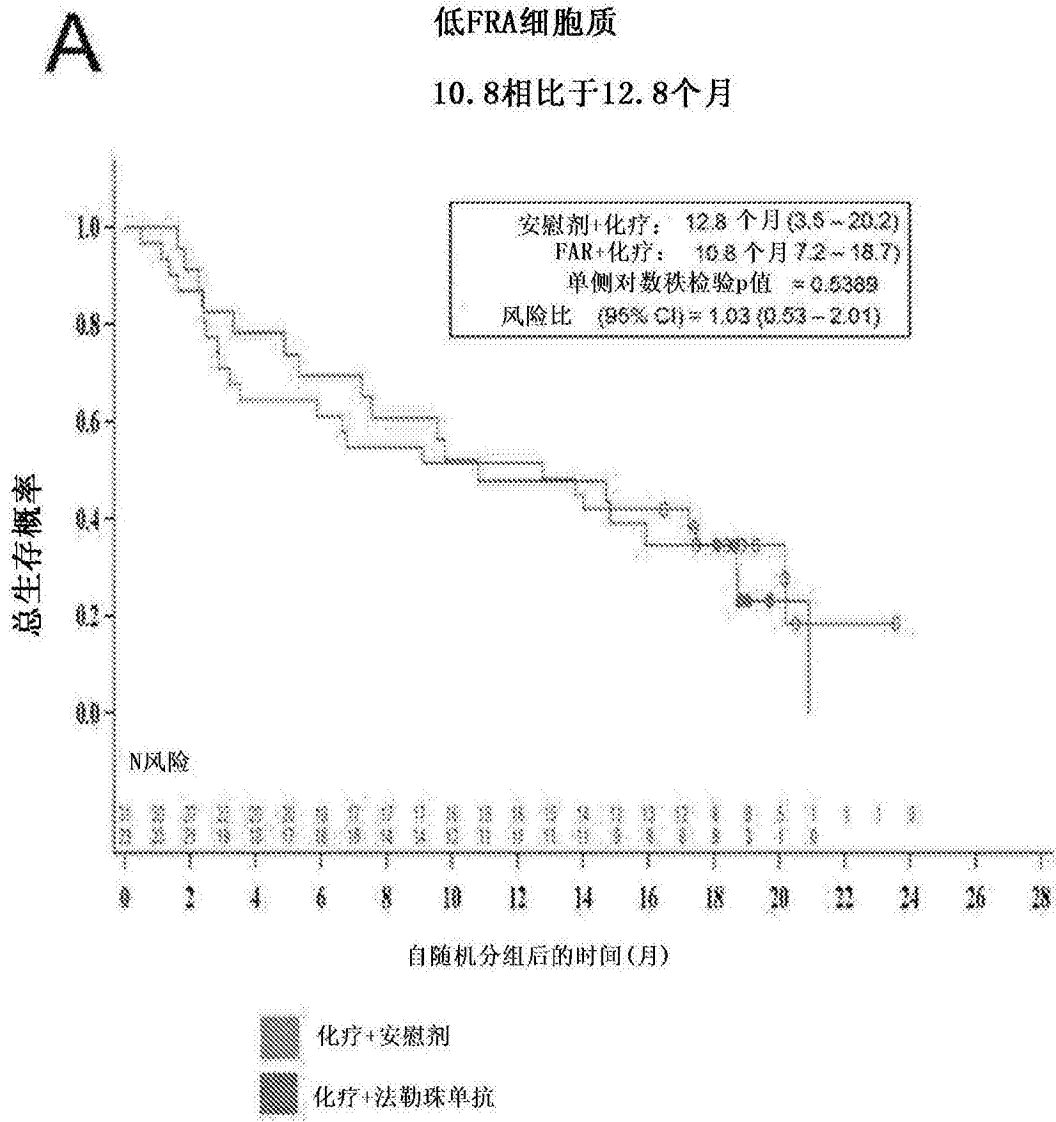


图4



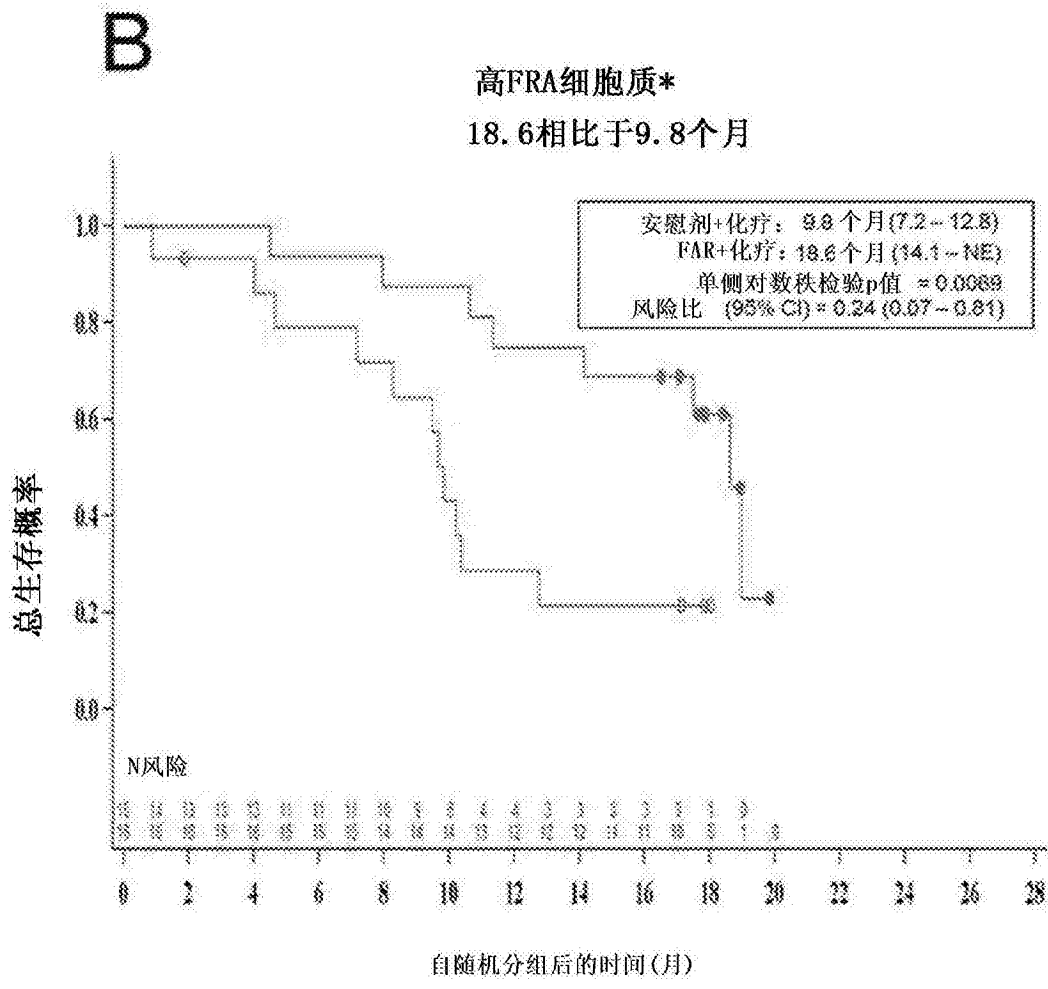


图5