



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107106688 A

(43)申请公布日 2017.08.29

(21)申请号 201580070085.3

(22)申请日 2015.11.09

(30)优先权数据

62/079,787 2014.11.14 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.06.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/059733 2015.11.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/077227 EN 2016.05.19

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 肖圆圆 C·拜斯 Y·崔

N·C·肯萨尔瓦

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61K 31/337(2006.01)

A61K 31/704(2006.01)

A61K 31/4745(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书4页 说明书30页 附图17页

(54)发明名称

预测对VEGF拮抗剂的响应

(57)摘要

本发明描述了高CD31和/或肿瘤VEGFA作为用于确定对VEGF拮抗剂,诸如贝伐单抗的患者益处或响应性的选择标准的用途。本发明还描述了高CD31和/或肿瘤VEGFA作为用于用VEGF拮抗剂,诸如贝伐单抗治疗正在经历化学疗法和/或抗癌疗法方案的癌症患者,诸如卵巢癌患者的选择标准的用途。

1. 一种治疗癌症患者的方法,所述方法包括对所述患者施用治疗有效量的VEGF拮抗剂,其中已经确定所述患者的癌症以分别比所述癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达CD31和/或肿瘤VEGFA。

2. 权利要求1的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中CD31表达的中值水平多的水平表达CD31。

3. 权利要求1或2的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中CD31表达的第75百分位数多的水平表达CD31。

4. 权利要求1-3中任一项的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达肿瘤VEGFA。

5. 权利要求1-4中任一项的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中肿瘤VEGFA表达的第75百分位数多的水平表达肿瘤VEGFA。

6. 权利要求1-5中任一项的方法,其中所述癌症选自下组:结肠直肠癌、乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾癌(肾细胞癌)或脑癌(成胶质细胞瘤)。

7. 权利要求1-6中任一项的方法,其中所述癌症是选自下组的妇科癌症:卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、和外阴癌。

8. 权利要求7的方法,其中所述妇科癌症是卵巢癌。

9. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述癌症是铂抗性的、铂敏感性的、晚期的、不应性的、或复发性的。

10. 权利要求1-9中任一项的方法,其中所述VEGF拮抗剂的施用改善所述患者中的无进展存活(PFS)。

11. 权利要求1-10中任一项的方法,其中所述VEGF拮抗剂的施用改善所述患者中的总体存活(OS)。

12. 权利要求1-11中任一项的方法,其中与化学疗法方案中的一种或多种别的化学治疗剂组合施用所述VEGF拮抗剂。

13. 权利要求12的方法,其中所述一种或多种别的化学治疗剂选自下组:化学治疗剂、HER抗体、针对肿瘤关联抗原的抗体、抗激素化合物、保心药、细胞因子、EGFR靶向性药物、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、COX抑制剂、非类固醇抗炎药、法尼基转移酶抑制剂、结合癌胚蛋白CA 125的抗体、Her2疫苗、HER靶向疗法、Raf或ras抑制剂、脂质体多柔比星、托泊替康、紫杉烷、双重酪氨酸激酶抑制剂、TLK286、EMD-7200、治疗恶心的药物、预防或治疗皮疹的药物或标准痤疮疗法、预防或治疗腹泻的药物、体温降低药物、和造血生长因子。

14. 权利要求12的方法,其中所述化学治疗剂是吉西他滨、卡铂、奥沙利铂、伊立替康、氟嘧啶(例如5-FU)、帕利他赛(例如Inab-帕利他赛)、多西他赛、托泊替康、卡培他滨、甲酰四氢叶酸、替莫唑胺、干扰素- α 、或脂质体多柔比星(例如PEG化的脂质体多柔比星)。

15. 权利要求12的方法,其中所述化学疗法方案包括施用卡铂和帕利他赛;卡铂和吉西他滨;或帕利他赛、托泊替康、或PEG化的脂质体多柔比星。

16. 权利要求12的方法,其中所述化学疗法方案包括施用卡培他滨和帕利他赛;或卡培他滨和多西他赛。

17. 权利要求12的方法,其中所述化学疗法方案包括施用替莫唑胺和任选的放射疗法。

18. 权利要求12的方法,其中所述化学疗法方案包括施用氟嘧啶、伊立替康、顺铂、氟嘧

啶和奥沙利铂;氟嘧啶和伊立替康;氟嘧啶、甲酰四氢叶酸、和奥沙利铂;或伊立替康、氟嘧啶、和甲酰四氢叶酸。

19. 权利要求12的方法,其中所述化学疗法方案包括施用帕利他赛和托泊替康;或帕利他赛和顺铂。

20. 权利要求12的方法,其中所述化学疗法方案包括施用干扰素- α 2a。

21. 权利要求1-20中任一项的方法,其中所述VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体。

22. 权利要求21的方法,其中所述抗VEGF抗体是贝伐单抗。

23. 权利要求1-22中任一项的方法,其中通过免疫组织化学(IHC)方法检测CD31和/或肿瘤VEGFA表达。

24. 权利要求1-23中任一项的方法,其中使用所述患者的所述癌症中检测的CD31表达水平测定所述患者的所述癌症中CD31微血管结构(CD31MVD)的密度,并且任选地其中将所述患者的癌症的CD31MVD与所述癌症类型中CD31MVD的中值水平比较。

25. 一种鉴定可受益于VEGF拮抗剂的施用的患有癌症的患者的方法,所述方法包括:

a) 测定自所述患者获得的样品中CD31和/或肿瘤VEGFA的表达水平,其中CD31和/或肿瘤VEGFA以分别比所述癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达指示所述患者可受益于VEGF拮抗剂的施用,并且任选地

b) 对所述患者以治疗有效量施用所述VEGF拮抗剂。

26. 一种预测患者对施用VEGF拮抗剂以治疗癌症的响应性的方法,所述方法包括:

a) 测定自所述患者获得的样品中CD31和/或肿瘤VEGFA的表达水平,其中CD31和/或肿瘤VEGFA以分别比所述癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达指示所述患者更有可能响应VEGF拮抗剂的施用,并且任选地

b) 对所述患者以治疗有效量施用所述VEGF拮抗剂。

27. 权利要求25或26的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中CD31表达的中值水平多的水平表达CD31。

28. 权利要求25-27中任一项的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中CD31表达的第75百分位数多的水平表达CD31。

29. 权利要求25-28中任一项的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达肿瘤VEGFA。

30. 权利要求25-29中任一项的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中肿瘤VEGFA表达的第75百分位数多的水平表达肿瘤VEGFA。

31. 权利要求25-30中任一项的方法,其中所述癌症是选自下组的妇科癌症:卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、和外阴癌。

32. 权利要求31的方法,其中所述妇科癌症是卵巢癌。

33. 权利要求25-32中任一项的方法,其中所述癌症是铂抗性的、铂敏感性的、晚期的、不应性的、或复发性的。

34. 权利要求25-33中任一项的方法,其中所述样品是肿瘤组织样品。

35. 权利要求25-34中任一项的方法,其中在新辅助或辅助疗法前获得所述样品。

36. 权利要求25-35中任一项的方法,其中通过免疫组织化学(IHC)方法检测CD31和/或肿瘤VEGFA表达。

37. 权利要求25-36中任一项的方法,其中与化学疗法方案中的一种或多种别的化学治疗剂组合施用所述VEGF拮抗剂。

38. 权利要求37的方法,其中所述一种或多种别的化学治疗剂选自下组:化学治疗剂、HER抗体、针对肿瘤关联抗原的抗体、抗激素化合物、保心药、细胞因子、EGFR靶向性药物、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、COX抑制剂、非类固醇抗炎药、法尼基转移酶抑制剂、结合癌胚蛋白CA 125的抗体、Her2疫苗、HER靶向疗法、Raf或ras抑制剂、脂质体多柔比星、托泊替康、紫杉烷、双重酪氨酸激酶抑制剂、TLK286、EMD-7200、治疗恶心的药物、预防或治疗皮疹的药物或标准痤疮疗法、预防或治疗腹泻的药物、体温降低药物、和造血生长因子。

39. 权利要求37的方法,其中所述化学疗法方案包括施用卡铂和帕利他赛。

40. 权利要求25-39中任一项的方法,其中所述VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体。

41. 权利要求40的方法,其中所述抗VEGF抗体是贝伐单抗。

42. 权利要求25-41中任一项的方法,其中使用所述患者的所述癌症中检测的CD31表达水平测定所述患者的所述癌症中CD31微血管结构(CD31MVD)的密度,并且任选地其中将所述患者的样品的CD31MVD与所述癌症类型中CD31MVD的中值水平比较。

43. 一种用于患有癌症的患者预后的方法,所述方法包括:

a) 测定自所述患者获得的样品中的CD31表达水平,

b) 将所述CD31表达水平与所述癌症类型中的CD31中值水平比较,并且

c) 确定所述患者的预后,其中较差的预后是在CD31表达处于比CD31表达的中值水平多的水平时。

44. 权利要求43的方法,其中在施用抗癌剂前实施所述方法以提供存活的施用前预后。

45. 权利要求43或44的方法,其进一步包括在确定所述患者具有较差的存活预后时将所述患者鉴定为很可能受益于VEGF拮抗剂施用的步骤。

46. 权利要求43-45中任一项的方法,其进一步包括若确定所述患者具有较差的预后,则以治疗有效量对所述患者施用VEGF拮抗剂的步骤。

47. 权利要求43-46中任一项的方法,其中所述存活是无进展存活或总体存活。

48. 权利要求43-47中任一项的方法,其中所述VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体。

49. 权利要求48的方法,其中所述抗VEGF抗体是贝伐单抗。

50. 权利要求43-49中任一项的方法,其中使用所述患者的所述样品中检测的CD31表达水平测定所述患者的所述癌症中CD31微血管结构(CD31MVD)的密度,并且任选地其中将所述患者的样品的CD31MVD与所述癌症类型中CD31MVD的中值水平比较。

51. 一种治疗癌症患者的方法,所述方法包括对所述患者施用治疗有效量的与VEGF拮抗剂不同的治疗剂,其中已经确定所述患者的癌症以分别比所述癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平小的水平表达CD31和/或肿瘤VEGFA。

52. 权利要求51的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中CD31表达的中值水平小的水平表达CD31。

53. 权利要求52的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中CD31表达的第25百分位数小的水平表达CD31。

54. 权利要求51的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中肿瘤VEGFA表达的中值水平小的水平表达肿瘤VEGFA。

55. 权利要求54的方法,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中肿瘤VEGFA表达的第25百分位数小的水平表达肿瘤VEGFA。

56. 权利要求51-55中任一项的方法,其中所述癌症选自下组:结肠直肠癌、乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾癌(肾细胞癌)、或脑癌(成胶质细胞瘤)。

57. 权利要求51-55中任一项的方法,其中所述癌症是选自下组的妇科癌症:卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌、和外阴癌。

58. 权利要求57的方法,其中所述妇科癌症是卵巢癌。

59. 权利要求51-58中任一项的方法,其中使用所述患者的所述癌症中检测的CD31表达水平测定所述患者的所述癌症中CD31微血管结构(CD31MVD)的密度,并且任选地其中将所述患者的样品的CD31MVD与所述癌症类型中CD31MVD的中值水平比较。

60. 供治疗癌症患者的方法中使用的VEGF拮抗剂,其中已经确定所述患者的癌症以分别比所述癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平小的水平表达CD31和/或肿瘤VEGFA,并且所述方法包括对所述患者施用治疗有效量的所述VEGF拮抗剂。

61. 供治疗癌症患者的方法中使用的与VEGF拮抗剂不同的治疗剂,其中已经确定所述患者的癌症以分别比所述癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平小的水平表达CD31和/或肿瘤VEGFA,并且所述方法包括对所述患者施用治疗有效量的所述与VEGF拮抗剂不同的治疗剂。

预测对VEGF拮抗剂的响应

发明领域

[0001] 本发明涉及用于鉴定会受益于用VEGF拮抗剂,例如抗VEGF抗体的治疗的患者的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 血管发生对于癌症形成是必需的,不仅调节原发性肿瘤大小和生长,而且还影响侵入性和转移潜力。因而,已经调查介导血管生成过程的机制作为定向抗癌疗法的潜在靶物。在血管生成调节剂的研究中早期,发现了血管内皮生长因子(VEGF)信号传导途径调节多种癌症类型中的血管生成活性,并且已经开发了多种治疗剂在各点上调节此途径。尽管在临床上使用血管生成抑制剂已经显示成功,但是并不是所有的患者都对此治疗响应或完全响应。此类不完全响应的根本机制是未知的。因此,需要用于鉴定对抗血管生成癌症疗法敏感性或响应的患者亚组。

[0004] 贝伐单抗(Avastin®)是一种特异性结合并阻断VEGF生物学效应的重组人源化单克隆IgG1抗体。在欧洲已经批准贝伐单抗用于治疗五种常见类型癌症的晚期阶段:结肠直肠癌、乳腺癌、小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌和肾癌,每年共造成超过250万例死亡。在美国,贝伐单抗是FDA批准的第一种抗血管生成疗法,并且现在已经批准它用于治疗五种肿瘤类型:结肠直肠癌、NSCLC、脑癌(胶质母细胞瘤),肾癌(肾细胞癌)和宫颈癌。迄今为止,已经用贝伐单抗治疗治疗了超过50万名患者,并且一项具有超过450项临床试验的全面临床项目正在调查在治疗不同背景(例如晚期或早期疾病)中的多种癌症类型(包括结肠直肠癌、乳腺癌、NSCLC、脑、胃、卵巢和前列腺癌)中进一步使用贝伐单抗。

[0005] 贝伐单抗已经显示作为共治疗剂的希望,当与一大批化学疗法和其它抗癌治疗联合时表明效力。例如,III期研究已经证明将贝伐单抗与标准化学治疗方案组合的有益效果(见例如Saltz et al.,2008,J.Clin.Oncol.,26:2013-2019;Yang et al.,2008,Clin.Cancer Res.,14:5893-5899;Hurwitz et al.,2004,N.Engl.J.Med.,350:2335-2342)。然而,与在以前的血管生成抑制剂研究中一样,这些III期研究中的一些已经显示,一部分患者对将贝伐单抗添加至其化学治疗方案经历不完全响应。

[0006] 因而,需要鉴定那些可能不仅对单独的血管发生抑制剂(例如贝伐单抗),而且还对包含血管生成抑制剂(例如贝伐单抗)的联合疗法响应或具有改善的响应的患者的方法。

[0007] 发明概述

[0008] 在一个方面中,本发明特征在于治疗癌症患者的方法,所述方法包括对所述患者施用治疗有效量的VEGF拮抗剂,其中已经确定所述患者的癌症以分别比癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达CD31和/或肿瘤VEGFA。在相关的方面,本发明特征在于在治疗癌症患者的方法中使用的VEGF拮抗剂,其中已经确定所述患者的癌症以分别比癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达CD31和/或肿瘤VEGFA,并且所述方法包括对所述患者施用治疗有效量的VEGF拮抗剂。

[0009] 在第二个方面中,本发明特征在于鉴定可受益于VEGF拮抗剂的施用的患有癌症的患者的方法,所述方法包括:a)测定自所述患者获得的样品中CD31和/或肿瘤VEGFA的表达

水平,其中CD31和/或肿瘤VEGFA以分别比所述癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达指示所述患者可受益于VEGF拮抗剂的施用,并且任选地b)对所述患者以治疗有效量施用所述VEGF拮抗剂。

[0010] 在第三个方面中,本发明特征在于预测患者对施用VEGF拮抗剂以治疗癌症的响应性的方法,所述方法包括:a)测定自所述患者获得的样品中CD31和/或肿瘤VEGFA的表达水平,其中CD31和/或肿瘤VEGFA以分别比所述癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达指示所述患者更有可能对VEGF拮抗剂的施用是响应性的,并且任选地b)对所述患者以治疗有效量施用所述VEGF拮抗剂。

[0011] 在某些实施方案中,样品是肿瘤组织样品。在其它实施方案中,在新辅助或辅助疗法前获得所述样品。

[0012] 在别的实施方案中,已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中CD31表达的中值水平多的水平表达CD31。在此实施方案的具体的方面,已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中CD31表达的第75百分位数多的水平表达CD31。

[0013] 在又一个实施方案中,已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达肿瘤VEGFA。在此实施方案的具体的方面,已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中肿瘤VEGFA表达的第75百分位数多的水平表达肿瘤VEGFA。

[0014] 在一个具体的实施方案中,VEGF拮抗剂的施用改善患者中的无进展存活(PFS)。在第二个具体的实施方案中,VEGF拮抗剂的施用改善患者中的总体存活(OS)。在第三个具体的实施方案中,与化学疗法方案中的一种或多种别的化学治疗剂联合施用VEGF拮抗剂。

[0015] 在一些实施方案中,一种或多种别的化学治疗剂选自下组:化学治疗剂、HER抗体、针对肿瘤关联抗原的抗体、抗激素化合物、保心药、细胞因子、EGFR靶向性药物、抗血管生成剂、酪氨酸激酶抑制剂、COX抑制剂、非类固醇抗炎药、法尼基转移酶抑制剂、结合癌胚蛋白CA 125的抗体、Her2疫苗、HER靶向疗法、Raf或ras抑制剂、脂质体多柔比星、托泊替康、紫杉烷、双重酪氨酸激酶抑制剂、TLK286、EMD-7200、治疗恶心的药物、预防或治疗皮疹的药物或标准痤疮疗法、预防或治疗腹泻的药物、体温降低药物、和造血生长因子。在一些优选的实施方案中,化学治疗剂是吉西他滨、卡铂、奥沙利铂、伊立替康、氟嘧啶(例如5-FU)、帕利他赛(例如nab-帕利他赛)、多西他赛、托泊替康、卡培他滨、甲酰四氢叶酸、替莫唑胺、干扰素- α 、或脂质体多柔比星(例如PEG化的脂质体多柔比星)。

[0016] 在某些实施方案中,化学疗法方案包括施用卡铂和帕利他赛;卡铂和吉西他滨;或帕利他赛、托泊替康、或PEG化的脂质体多柔比星。在其它实施方案中,化学疗法方案包括施用卡培他滨和帕利他赛;或卡培他滨和多西他赛。在又一些实施方案中,化学疗法方案包含施用替莫唑胺和任选地放射疗法。在别的实施方案中,化学疗法方案包括施用氟嘧啶、伊立替康、顺铂、氟嘧啶和奥沙利铂;氟嘧啶和伊立替康;氟嘧啶、甲酰四氢叶酸、和奥沙利铂;或伊立替康、氟嘧啶、和甲酰四氢叶酸。在又一个实施方案中,化学疗法方案包括施用帕利他赛和托泊替康;或帕利他赛和顺铂。在最后的实施方案中,化学疗法方案包括施用干扰素- α 2a。

[0017] 在第四个方面中,本发明特征在于用于预后患有癌症的患者的方法,所述方法包括:a)测定自所述患者获得的样品中的CD31表达水平,b)将所述CD31表达水平与所述癌症类型中的CD31中值水平比较,并且c)确定所述患者的预后,其中较差的预后是在CD31表达

处于比CD31表达的中值水平多的水平时。

[0018] 在某些方面中,方法进一步包括在确定所述患者具有较差的存活预后时将所述患者鉴定为很可能受益于VEGF拮抗剂施用的步骤。在又一个方面中,本方法进一步包括若确定所述患者具有较差的预后,则以治疗有效量对所述患者施用VEGF拮抗剂的步骤。在一些实施方案中,VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体。在优选的实施方案中,抗VEGF抗体是贝伐单抗。

[0019] 在一个实施方案中,在施用抗癌剂前实施所述方法以提供存活的施用前预后。在第二个实施方案中,存活是无进展存活或总体存活。

[0020] 在第五个方面中,本发明特征在于治疗癌症患者的方法,所述方法包括对所述患者施用治疗有效量的除VEGF拮抗剂以外的治疗剂,其中已经确定所述患者的癌症以分别比癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平小的水平表达CD31和/或肿瘤VEGFA。在相关的方面中,本发明特征在于在治疗癌症患者的方法中使用除VEGF拮抗剂以外的治疗剂,其中已经确定所述患者的癌症以分别比癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平小的水平表达CD31和/或肿瘤VEGFA,并且所述方法包括对所述患者施用治疗有效量的除VEGF拮抗剂以外的治疗剂。

[0021] 在一个实施方案中,已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中CD31表达的中值水平小的水平表达CD31。在此实施方案的某些方面中,已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中CD31表达的第25百分位数小的水平表达CD31。

[0022] 在另一个实施方案中,已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中肿瘤VEGFA表达的中值水平小的水平表达肿瘤VEGFA。在此实施方案的某些方面中,已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中肿瘤VEGFA表达的第25百分位数小的水平表达肿瘤VEGFA。

[0023] 在本发明的具体的实施方案中,癌症选自下组:结肠直肠癌、乳腺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾癌(肾细胞癌)或脑癌(成胶质细胞瘤)。在本发明的其它具体的实施方案中,癌症是选自下组的妇科癌症:卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌和外阴癌。在优选的实施方案中,妇科癌症是卵巢癌。在本发明的又一个实施方案中,癌症是铂抗性的、铂敏感性的、晚期、不应性、或复发性。

[0024] 在别的实施方案中,使用所述患者的所述样品中检测的CD31表达水平确定所述患者的所述癌症中的CD31微血管结构(CD31 MVD)的密度,并且任选地其中将所述患者的样品的CD31 MVD与所述癌症类型中CD31 MVD的中值水平比较。在一些具体的实施方案中,通过免疫组织化学(IHC)方法检测CD31和/或肿瘤VEGFA表达。

[0025] 在一些优选的实施方案中,VEGF拮抗剂是抗VEGF抗体。在具体的优选实施方案中,抗VEGF抗体是贝伐单抗。

[0026] 附图简述

[0027] 图1是示意图,其显示了用于评估将贝伐单抗添加至卡铂-帕利他赛化学疗法方案以治疗III/IV期卵巢癌的效果的III期试验设计。

[0028] 图2的图显示了样品患者群体中的CD31表达的分布。

[0029] 图3是显示统计学分析的结果的表和依照在规定的截留处肿瘤细胞生物标志物亚组的对照(帕利他赛-卡铂-安慰剂(CPP))对贝伐单抗维持(帕利他赛-卡铂-贝伐单抗(CPB15+))的无进展存活(PFS)的Forest图。

[0030] 图4显示了CD31高和低表达者(以50%截留二分)的PFS的Kaplan Meier曲线,其比

较CPP与CPB15+。

[0031] 图5是显示统计学分析的结果和依照CD31表达的25%、50%、和75%截留二分的CD31亚组, CPP对CPB15+的PFS的Forest图。

[0032] 图6的表显示了指定的CD31亚组内的PFS治疗效果的危害比 (HR) 评估, 其调节患者表现状态、疾病阶段、和削体 (debulking) 手术结果。

[0033] 图7是显示统计学分析的结果的表和依照特定截留处的肿瘤细胞生物标志物亚组, CPP对CPB15+的总体存活 (OS) 的Forest图。

[0034] 图8是显示统计学分析的结果的表和依照CD31表达的25%、50%、和75%截留二分的CD31亚组, CPP对CPB15+的OS的Forest图。

[0035] 图9A显示了CD31高和低表达者 (以50%截留二分) 的OS的Kaplan Meier曲线, 其比较CPP与CPB15+。

[0036] 图9B显示了CD31高和低表达者 (以75%截留二分) 的OS的Kaplan Meier曲线, 其比较CPP与CPB15+。

[0037] 图10的表显示了指定的亚组内的OS治疗效果的HR评估, 其调节患者表现状态、疾病阶段、和削体 (debulking) 手术结果。

[0038] 图11是亚群治疗效果模式图 (STEPP) 分析, 其基于CD31水平比较预先限定的患者亚群内治疗分组 (CPP对CPB15+) 之间的PFS (左图) 和OS (右图)。中间实线曲线上的每个点代表群体的25%。

[0039] 图12显示了肿瘤VEGFA高和低表达者 (以75%截留二分) 的PFS的Kaplan Meier曲线, 其比较CPP与CPB15+。

[0040] 图13显示了肿瘤VEGFA高和低表达者 (以75%截留二分) 的OS的Kaplan Meier曲线, 其比较CPP与CPB15+。

[0041] 图14的表显示了指定的治疗组内的PFS和OS治疗效果的HR评估, 其调节患者表现状态、疾病阶段、和削体手术结果。

[0042] 图15是显示统计学分析的结果的表和依照肿瘤VEGFA表达的25%、50%、和75%截留二分的VEGF亚组, CPP对CPB15+的PFS的Forest图。

[0043] 图16是显示统计学分析的结果的表和依照肿瘤VEGFA表达的25%、50%、和75%截留二分的VEGFA亚组, CPP对CPB15+的OS的Forest图。

[0044] 图17是亚群治疗效果模式图 (STEPP) 分析, 其基于肿瘤VEGFA水平比较预先限定的患者亚群内治疗分组 (CPP对CPB15+) 之间的PFS (左图) 和OS (右图)。中间实线曲线上的每个点代表群体的25%。

[0045] 发明详述

[0046] I. 引言

[0047] 本发明部分基于以下发现, 即相对于具有癌症 (特别是妇科癌症, 诸如卵巢癌) 的给定患者群体中的表达水平, 给定患者中CD31和/或肿瘤VEGFA的肿瘤表达水平与同化学疗法方案联合施用血管生成抑制剂的那些患者中的治疗效果相关联。具体地, 将较高的微血管密度水平 (如通过每 mm^2 的CD31血管结构数目测量) 和/或肿瘤VEGFA的变化鉴定为响应贝伐单抗对卡铂-帕利他赛化学治疗方案的添加, 卵巢癌患者的改善的无进展存活 (PFS) 和改善的总体存活 (OS) 的候选标志物/预测器。将表现出对贝伐单抗对这些化学疗法方案的添

加的响应或敏感性的患者鉴定为相对于诊断为或具有癌症(特别是妇科癌症,诸如卵巢癌)的给定患者群体中的表达水平具有增加的CD31和/或肿瘤VEGFA表达。依照本发明,发现了较大的贝伐单抗治疗效果与肿瘤细胞中的高CD31微血管密度(CD31 MVD)表达和/或高肿瘤VEGFA表达有关。

[0048] 如此,本发明提供了治疗癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道和外阴癌)或乳腺癌(例如转移性乳腺癌(MBC);还见下文))患者的方法,其通过对患者施用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)进行,其中已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中中值水平高的水平表达CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA。本发明还提供了鉴定可受益于VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)施用(任选地,在另一种抗癌疗法外)的癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道和外阴癌)或乳腺癌(例如转移性乳腺癌(MBC);还见下文))患者或者鉴定可以对用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)的治疗更为响应的患者的方法,其通过测定来自患者的肿瘤样品中的CD31和/或肿瘤VEGFA表达水平进行,其中若CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA的表达处于比癌症类型中CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平,则施用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)。

[0049] II. 定义

[0050] 蛋白质“表达”指将基因中编码的信息转化成信使RNA(mRNA),然后转化成蛋白质。

[0051] “表达”感兴趣的蛋白质(诸如CD31和/或肿瘤VEGFA)的样品或细胞是其中的编码蛋白质的mRNA、或蛋白质,包括其片段确定为存在于样品或细胞中的。

[0052] “已经确定为以比癌症类型中CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达”或“表达”CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA的样品、细胞、肿瘤或癌症是其中的CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA表达的水平对于所述癌症类型对技术人员而言认为是“高CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA水平”的。一般地,此类水平会在相对于相同癌症类型的样品、细胞、肿瘤或癌症的群体中的CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA水平的约50%直至约100%(例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、或95%)的范围中。例如,用于达到中值表达水平的群体一般可以是卵巢癌样品或其亚组,诸如化学疗法抗性卵巢癌、铂抗性卵巢癌,及晚期、不应性、或复发性卵巢癌。本文中的实施例证明了可以如何测定中值表达水平。这可以构成表达的绝对值。如此,参考本文中的图5和8,认为以高水平表达CD31MVD的卵巢患者的截留可以是约17.78或更多(第25百分位数)、约25.19或更多(第50百分位数)、约35.8或更多(第75百分位数)、等等。在规定的测定条件下的测定法,诸如在免疫组织化学(IHC)方法(例如如本文中公开的),且最优选地如实施例1中的IHC测定法中量化此类绝对值。优选地,CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA表达的水平超过或处于第50百分位数(例如第50、第55、第60、第65、第68、或第70百分位数),且最优选地超过或处于第75百分位数(例如第75、第76、第78、第80、第85、第90、或第95百分位数)。“确定或已经确定癌症表达”或“癌症表达”提及特定生物标志物(例如CD31和/或肿瘤VEGFA)使用,指生物标志物(例如CD31和/或肿瘤VEGFA)的表达,如使用诊断测试、本文中描述的任何检测方法、等等测定的。在CD31的情况中,表达在癌症或肿瘤组织内的血管的内皮细胞中,而VEGFA表达在癌症或肿瘤细胞中发生。此外,就CD31而言,在本发明的方法中,可以使用患者样品中检测的CD31表达水平测定患者癌症中的CD31微血管结构(CD31 MVD)的密度,并且任选地,可以将患者的样品的CD31MVD与癌症类型中CD31 MVD的中

值水平比较。

[0053] “组织或细胞样品”指从受试者或患者的组织得到的细胞的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织,像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活组织检查或抽吸物;血液或任何血液组分;体液,诸如脑脊液、羊膜液、腹膜液、或间隙液;来自受试者的妊娠或发育中任何时间的细胞或血浆。组织样品还可以是原代的或培养的细胞或细胞系。任选地,组织或细胞样品是从癌性组织/器官获得的。组织样品可以包含在自然界中天然不与组织混杂的化合物,诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。为了本文中的目的,组织样品的“切片”指单块或单片组织样品,例如自组织样品切下来的一薄片组织或细胞。

[0054] “肿瘤样品”在本文中指衍生自患者肿瘤或包含来自患者肿瘤的肿瘤细胞的样品。肿瘤样品的例子在本文中包括但不限于肿瘤活组织检查、循环中的肿瘤细胞、循环中的血浆蛋白质、腹水、衍生自肿瘤或展现出肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系,以及保存的肿瘤样品,诸如福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤样品或冷冻的肿瘤样品。在肿瘤细胞外,肿瘤样品可以包含血管。

[0055] “关联”意指以任何方式比较第一分析或方案的性能和/或结果与第二分析或方案的性能和/或结果。例如,可以在实施第二方案中使用第一分析或方案的结果和/或可以使用第一分析或方案的结果确定是否应当实施第二分析或方案。就基因表达分析或方案的实施方案而言,可以使用基因表达分析或方案的结果确定是否应当实施特定的治疗方案。

[0056] 如本文中使用的,术语“生物标志”一般指其在哺乳动物组织或细胞之中或之上的表达可以通过标准方法(或本文中所公开的方法)来检测,并且是哺乳动物或组织对基于使用例如抗血管发生剂,诸如VEGF特异性抑制剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)抑制血管发生的治疗方案的敏感性的预测、诊断和/或预后的分子,包括基因、蛋白质、碳水化合物结构、或糖脂。任选地,确定了此类生物标志物的表达高于对对照/参照组织或细胞样品观察到的。可以例如使用高通量多重免疫测定法,诸如那些自Rules Based Medicine, Inc.或Meso Scale Discovery购得的测定法来测定此类生物标志物的表达。也可以使用例如PCR或FACS测定法、免疫组织化学测定法或基于基因芯片的测定法来测定生物标志的表达。

[0057] “VEGF拮抗剂”或“VEGF特异性拮抗剂”指能够结合VEGF,降低VEGF表达水平,或者中和、阻断、抑制、消除、降低或干扰VEGF生物学活性(包括但不限于VEGF与一种或多种VEGF受体的结合、VEGF信号传导及由VEGF介导的血管发生和内皮细胞存活或增殖)的分子。例如,能够中和、阻断、抑制、消除、降低或干扰VEGF生物学活性的分子可以通过结合一种或多种VEGF受体(VEGFR)(例如VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、膜结合VEGF受体(mbVEGFR)、或可溶性VEGF受体(sVEGFR))施加其效应。在本发明的方法中有用的VEGF特异性拮抗剂包括特异性结合VEGF的多肽、抗VEGF抗体及其抗原结合片段、特异性结合VEGF由此使其隔绝与一种或多种受体结合的受体分子和衍生物、融合蛋白(例如VEGF-Trap (Regeneron))、和VEGF₁₂₁-白树毒素(Peregrine)。VEGF特异性拮抗剂还包括VEGF多肽的拮抗剂变体、至少与编码VEGF多肽的核酸分子的片段互补的反义核碱基寡聚物;至少与编码VEGF多肽的核酸分子的片段互补的小RNA;靶向VEGF的核酶;针对VEGF的肽体;和VEGF适体。VEGF拮抗剂还包括结合VEGFR的多肽、抗VEGFR抗体、及其抗原结合片段,和结合VEGFR,从而阻断、抑制、消除、降低或干扰VEGF生物学活性(例如VEGF信号传导)的衍生物、或融合蛋白。VEGF特异性拮抗剂还包括结

合VEGF或VEGFR且能够阻断、抑制、消除、降低、或干扰VEGF生物学活性的非肽小分子。如此，术语“VEGF活性”明确包括VEGF介导的VEGF生物学活性。在某些实施方案中，VEGF拮抗剂将VEGF的表达水平或生物学活性降低或抑制了至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在一些实施方案中，由VEGF特异性拮抗剂抑制的VEGF是VEGF(8-109)、VEGF(1-109)、或VEGF₁₆₅。

[0058] 如本文中使用的，VEGF拮抗剂可以包括但不限于抗VEGFR2抗体及相关分子(例如雷莫芦单抗(ramucirumab)、tanibirumab、阿柏西普(aflibercept))、抗VEGFR1抗体及相关分子(例如icrucumab、阿柏西普(VEGF Trap-Eye; EYLEA®)、和ziv-aflibercept(VEGF Trap; ZALTRAP®))、双特异性VEGF抗体(例如MP-0250、vanucizumab(VEGF-ANG2)、和US 2001/0236388中公开的双特异性抗体)、包含抗VEGF、抗VEGFR1、和抗VEGFR2臂中两种的组合的双特异性抗体、抗VEGFA抗体(例如贝伐单抗，赛伐珠单抗(sevacizumab))、抗VEGFB抗体、抗VEGFC抗体(例如VGX-100)、抗VEGFD抗体、和非肽小分子VEGF拮抗剂(例如帕唑帕尼(pazopanib)、阿西替尼(axitinib)、凡德他尼(vandetanib)、瑞戈非尼(stivarga)、卡博替尼(cabozantinib)、lenvatinib、尼达尼布(nintedanib)、orantinib、拉帕替尼(telatinib)、dovitinib、西地尼布(cediranib)、莫特沙芬(motesanib)、索凡替尼(sulfatinib)、阿帕替尼(apatinib)、foretinib、法米替尼(famitinib)、和tivozanib)。

[0059] “抗VEGF抗体”是以足够的亲和力和特异性结合VEGF的抗体。在某些实施方案中，抗体会对VEGF具有足够高的结合亲和力，例如抗体可以以100nM⁻¹pM的K_d值结合hVEGF。可以例如通过基于表面等离子共振的测定法(诸如如PCT申请公开No. W02005/012359中描述的BIAcore测定法);酶联免疫吸附测定法(ELISA);和竞争测定法(例如RIA)测定抗体亲和力。

[0060] 在某些实施方案中，可以在靶向和干扰牵涉VEGF活性的疾病或状况中使用抗VEGF抗体作为治疗剂。还有，抗体可以进行其它生物学活性测定法，例如以评估其作为治疗剂的有效性。此类测定法是本领域中已知的，并且取决于靶抗原和抗体的意图使用。例子包括HUVEC抑制测定法;肿瘤细胞生长抑制测定法(如例如记载于W0 89/06692);抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)和补体介导的细胞毒性(CDC)测定法(美国专利No. 5,500,362);和激动活性或造血测定法(见W0 95/27062)。抗VEGF抗体通常不会结合其它VEGF同源物，诸如VEGF-B或VEGF-C，也不结合其它生长因子诸如PlGF、PDGF、或bFGF。在一个实施方案中，抗VEGF抗体是与由杂交瘤ATCC HB 10709生成的单克隆抗VEGF抗体A4.6.1结合相同表位的单克隆抗体。在另一个实施方案中，抗VEGF抗体是依照Presta et al. (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599生成的重组人源化抗VEGF单克隆抗体，包括但不限于称为贝伐单抗(BV; AVASTIN®)的抗体。

[0061] 抗VEGF抗体“贝伐单抗(BV)”，又称为“rhumaB VEGF”或“AVASTIN®”是一种依照Presta et al. (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599生成的重组人源化抗VEGF单克隆抗体。它包含突变人IgG1框架区和来自阻断人VEGF与其受体结合的鼠抗hVEGF单克隆抗体A.4.6.1的抗原结合互补决定区。自人IgG1衍生贝伐单抗的氨基酸序列的约93% (包括大多数框架区)，并且自鼠抗体A4.6.1衍生序列的约7%。贝伐单抗具有约149,000道尔顿的分子量并且是糖基化的。贝伐单抗和其它人源化抗VEGF抗体进一步记载于2005年2月26日公告的美国专利No. 6,884,879，通过提及将其全部公开内容明确收入本文。别的优选的抗体包

括G6或B20系列抗体(例如G6-31,B20-4.1),如记载于PCT申请公开No.WO 2005/012359的。关于别的优选的抗体,见美国专利No.7,060,269,6,582,959,6,703,020;6,054,297;WO98/45332;WO 96/30046;WO94/10202;EP 0666868B1;美国专利申请公开文本No.2006009360,20050186208,20030206899,20030190317,20030203409,和20050112126;以及Popkov et al.,Journal of Immunological Methods 288:149-164(2004)。其它优选的抗体包括那些结合人VEGF上的功能性表位的,所述功能性表位包含残基F17、M18、D19、Y21、Y25、Q89、191、K101、E103、和C104或备选包含残基F17、Y21、Q22、Y25、D63、183、和Q89。

[0062] 术语“抗体”以最广义使用,并且明确涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们展现出期望的生物学活性。

[0063] “阻断性”抗体或抗体“拮抗剂”指抑制或降低其所结合的抗原的生物学活性的抗体。例如,VEGF特异性拮抗性抗体结合VEGF并抑制VEGF诱导血管内皮细胞增殖的能力。优选的阻断性抗体或拮抗性抗体完全抑制抗原的生物学活性。

[0064] 除非另有说明,表述“多价抗体”贯穿本说明书用于指包含三个或更多抗原结合位点的抗体。优选地,多价抗体改造成具有三个或更多个抗原结合位点,而且一般不是天然序列IgM或IgA抗体。

[0065] “Fv”片段是包含完整抗原识别和结合位点的抗体片段。该区域由紧密结合(该结合的本质可以是共价的,例如在scFv中)的一个重链可变域(区)和一个轻链可变域(区)的二聚体组成。正是在这种构造中,每个可变域(区)的三个CDR相互作用而在V_H-V_L二聚体表面上限定了一个抗原结合位点。六个CDR或其子集(subset)一起赋予抗体以抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或是只包含对抗原特异性的三个CDR的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,只是通常亲和力低于完整结合位点。

[0066] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各抗体个体是相同的,除了可以以极小量存在的可能的天然存在突变形式外。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原性位点。此外,与典型的包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制备物不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”指示抗体作为自基本上同质的抗体群体获得的特征,并且不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由Kohler等Nature 256:495,(1975)记载的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组DNA方法来制备(参见例如美国专利No.4,816,567)。“单克隆抗体”还可使用例如Clackson等Nature 352:624-628,(1991)和Marks等J.Mol.Biol.222:581-597,(1991)中记载的技术从噬菌体抗体库分离。

[0067] 单克隆抗体在本文中明确包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们展现出期望的生物学活性(美国专利No.4,816,567;Morrison等Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855),(1984)。

[0068] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式指最低限度包含衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗体。在极大程度上,人源化抗体指人免疫球蛋白(受体抗体)中的高变区残基用

具有期望特异性、亲和力和能力的非人物种(供体抗体)诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类的高变区残基替换的免疫球蛋白。在有些情况中,将人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基用相应的非人残基替换。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供体抗体中没有发现的残基。进行这些修饰是为了进一步改进抗体的性能。通常,人源化抗体包含至少一个、通常两个基本上整个如下可变域,其中所有或基本上所有高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体任选还包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。更多细节参见Jones et al.,*Nature* 321:522-525(1986);Riechmann et al.,*Nature* 332:323-329(1988);Presta, *Curr.Op.Struct.Biol.*2:593-596(1992)。

[0069] “人抗体”指拥有与由人生成的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列和/或使用本文所公开的用于生成抗体的任何技术生成的抗体。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可使用本领域已知的多种技术来生成。在一个实施方案中,人抗体是从噬菌体文库选择的,该噬菌体文库表达人抗体(Vaughan et al.,*Nature Biotechnology* 14:309-314(1996);Sheets et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.*95:6157-6162(1998);Hoogenboom and Winter,*J.Mol.Biol.*227:381(1991);Marks et al.,*J.Mol.Biol.*222:581(1991))。人抗体还可通过将人免疫球蛋白基因座导入内源免疫球蛋白基因已经部分或完全灭活的转基因动物(例如小鼠)来生成。在受到攻击时,观察到人抗体生成,它在所有方面与在人体中看到的极其相似,包括基因重排、装配和抗体全集。这种方法记载于例如美国专利No.5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016,及以下科学出版物:Marks et al.,*Bio/Technology* 10:779-783(1992);Lonberg et al.,*Nature* 368:856-859(1994);Morrison,*Nature* 368:812-13(1994);Fishwild et al.,*Nature Biotechnology* 14:845-51(1996);Neuberger,*Nature Biotechnology* 14:826(1996);Lonberg and Huszar,*Intern.Rev.Immunol.*13:65-93(1995)。或者,人抗体可通过生成针对靶抗原的抗体的人B淋巴细胞的永生化来制备(此类B淋巴细胞可从个体回收,或者可在体外免疫)。参见例如Cole et al.,*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*,Alan R.Liss,p.77(1985);Boerner et al.,*J.Immunol.*147(1):86-95(1991);及美国专利No.5,750,373。

[0070] “分离的”多肽或“分离的”抗体指已经鉴定且自其天然环境的一种成分分开和/或回收的抗体。其天然环境的污染性成分指将会干扰该多肽或抗体的诊断或治疗用途的物质,可包括酶、激素、和其它蛋白质性质或非蛋白质性质的溶质。在优选的实施方案中,将多肽或抗体纯化至(1)根据Lowry法的测定,多肽或抗体重量超过95%,且最优选地按重量计超过99%,(2)足以通过使用转杯式测序仪获得至少15个残基的N-末端或内部氨基酸序列的程度,或(3)根据还原性或非还原性条件下的SDS-PAGE及使用考马斯蓝或优选地银染色,达到同质。由于多肽的天然环境的至少一种成分不会存在,那么分离的多肽或抗体包括重组细胞内的原位多肽或抗体。然而,分离的多肽或抗体通常将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0071] 如本文中使用的,“治疗/处理”指试图改变所治疗个体或细胞的自然进程的临床干预,并且可以是为了预防或在临床病理学的进程中进行。治疗的期望效果包括预防疾病的发生或复发、缓解症状、削弱疾病的任何直接或间接病理学后果、减缓疾病进展的速率、

改善或减轻疾病状态、及免除或改善预后。在一些实施方案中,本发明的方法和组合物可用于试图延迟疾病或病症的发展。

[0072] 术语“治疗有效量”或“有效量”指在患者中有效治疗癌症的药物量。有效量的药物可减少癌细胞的数目;缩小肿瘤的尺寸;抑制(即一定程度的减缓和优选阻止)癌细胞浸润到周围器官中;抑制(即一定程度的减缓和优选阻止)肿瘤转移;一定程度的抑制肿瘤生长;和/或一定程度的减轻一种或多种与癌症有关的症状。根据药物可阻止现有癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞的程度,它可以是抑制细胞的和/或毒害细胞的(细胞毒性的)。有效量可延长无进展存活(例如根据实体瘤的响应评估标准(Response Evaluation Criteria for Solid Tumors, RECIST)或CA-125变化的测量),导致客观响应(包括部分响应,PR或完全响应,CR),改善存活(包括总体存活和无进展存活),和/或改善癌症的一种或多种症状(例如根据FOSI的评估)。最优选地,所述药物的治疗有效量有效改善无进展存活(PFS)和/或总体存活(OS)。

[0073] “存活”指患者保持活着,并且包括总体存活及无进展存活。

[0074] “总体存活”指患者自诊断或治疗时间起保持限定时期活着,诸如1年、5年、等等。

[0075] 短语“无进展存活”在本发明的上下文中指治疗期间和治疗后,依照治疗内科医生或调查人员的评估,患者的疾病不变坏,即不进展的时间长度。如技术人员会领会的,若与类似情况的患者的对照组的平均或均值无进展存活时间相比,患者经历更长的疾病不进展的时间长度,则患者的无进展存活得到改善或增强。

[0076] “延长存活”意指相对于未治疗的患者(即相对于未用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)治疗的患者),或相对于不以指定水平表达CD31或肿瘤VEGFA的患者,和/或相对于用批准的抗肿瘤剂(诸如托泊替坎(topotecan)或脂质体多柔比星,其中癌症是卵巢癌)治疗的患者,延长经治疗的患者中的总体或无进展存活。

[0077] 治疗剂的“固定的”(fixed)或“平坦的”(flat)剂量在本文中指不考虑患者的体重(WT)或体表面积(BSA)而施用于人患者的剂量。因此,固定的或平坦的剂量不是作为mg/kg剂量或mg/m²剂量提供的,而是作为治疗剂的绝对量提供的。

[0078] “加载”(loading)剂量在本文中一般包括施用于患者的治疗剂的初始剂量,后续其一个或多个维持剂量。一般而言,施用单个加载剂量,但本文中也设想了多个加载剂量。通常,所施用的加载剂量的量超过所施用的维持剂量的量,和/或加载剂量的施用比维持剂量更频繁,从而比使用维持剂量更早达到治疗剂的期望稳态浓度。

[0079] “维持”(maintenance)剂量或“延长”剂量在本文中指在治疗期间施用于患者的一个或多个剂量的治疗剂。通常,维持剂量以一定的治疗间隔施用,诸如大约每周一次,大约每两周一次,大约每三周一次,或大约每四周一次。

[0080] 短语“响应”在本发明的背景中指示患有、怀疑患有或倾向于患有癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道和外阴癌)或乳腺癌(例如MBC;还见下文))的受试者/患者显示对化学疗法方案的响应,所述化学疗法方案包含抗VEGF剂,诸如抗VEGF抗体,例如贝伐单抗的添加。技术人员会容易能够确定依照本发明的方法用抗VEGF剂,诸如抗VEGF抗体,例如贝伐单抗治疗的对象是否显示响应。例如,可以卵巢癌的降低的罹患,诸如降低和/或停止的肿瘤生长、肿瘤大小的缩小、和/或一种或多种卵巢癌症状,例如卵巢出血、疼痛、贫血的改善反映响应。优选地,可以通过降低或减少的癌症转移转化的指

数或癌症指数,例如预防转移形成或转移的数目或大小的降低反映响应。

[0081] 依照本发明的短语“患有…的患者”指显示癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌)或乳腺癌(例如转移性MBC;还见下文))的临床体征的患者。短语“易受”或“易于”在癌症的上下文中指基于例如,可能的遗传素因、预先或最终暴露于危险的和/或致癌的化合物,或暴露于致癌性物理危险,诸如辐射,患者中的适应症疾病。

[0082] 如本文中使用的,术语“施用”意指通过本领域中已知的用于施用治疗性抗体的任何合适的手段对需要此类治疗或医学干预的患者施用血管生成抑制剂,例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗,和/或包含血管生成抑制剂,例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗的药物组合物/治疗方案。非限制性施用路径包括口服、静脉内、腹膜内、皮下、肌内、表面、皮内、鼻内或支气管内施用(例如通过吸入实现)。在本发明的上下文中特别优选的是肠胃外施用,例如静脉内施用。就用于治疗结肠直肠癌的贝伐单抗而言,依照EMA的优选剂量是每2周给予一次的5mg/kg或10mg/kg体重或每3周给予一次的7.5mg/kg或15mg/kg体重。对于治疗NSCLC,优选的剂量是与卡铂和帕利他赛组合通过输注每3周给予一次的15mg/kg。对于治疗肾细胞癌,优选的剂量是通过与干扰素 α -2a一起输注或者作为单一疗法每2周给予一次的10mg/kg。对于治疗宫颈癌,优选剂量是通过输注每三周给予一次并且与下列化学疗法方案之一组合施用15mg/kg:帕利他赛和顺铂或帕利他赛和托泊替康。对于治疗胶质母细胞瘤,优选的剂量是通过输注每两周给予一次的10mg/kg。

[0083] 术语“癌症”和“癌性”指或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调控的生理疾患。此定义中包括良性和恶性癌症。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、和肺的鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(gastric or stomach cancer)(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer or hepatic carcinoma)、膀胱癌、肝瘤(hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌(kidney or renal cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、及各种类型的头和颈癌,以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中级/滤泡性NHL、中级弥漫性NHL、高级成免疫细胞性NHL、高级成淋巴细胞性NHL、高级小无核裂细胞性NHL、贮积病(bulky disease)NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤、和瓦尔登斯特伦氏(Waldenstrom)巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性成淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病、和移植后淋巴增殖性病症(PTLD)、以及与癍痣病(phakomatoses)、水肿(诸如与脑瘤有关的)和梅格斯氏(Meigs)综合征有关的异常血管增殖。

[0084] “能够响应VEGF拮抗剂的癌症类型”是在用VEGF拮抗剂,诸如VEGF抗体(例如贝伐单抗)或小分子抑制剂治疗时依照熟练肿瘤学家已知的治疗有效性的任何标准显示其伴随的患者中的治疗有效性益处,所述标准包括那些在本文中详细描述,但是特别地就存活(包括无进展存活(PFS)和/或总体存活(OS))而言。优选地,此类癌症选自妇科癌症(例如卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、宫颈癌、子宫内膜癌、阴道癌和外阴癌)、乳腺癌(例如MBC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、前列腺癌和结肠直肠癌。最优选地,癌症是妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道和外阴癌,包括此类癌症的铂抗性形式)或乳腺癌,和/或其晚期、

不应性或复发性形式。

[0085] “晚期”癌症指通过局部侵入或转移而扩散到最初的部位或器官之外的癌症。

[0086] “不应性”癌症指即使对癌症患者施用抗肿瘤剂,诸如化疗剂,仍然发生进展的癌症。不应性癌症的一个例子是铂不应性癌症。

[0087] “复发性”癌症指在对初始疗法的响应之后,在初始部位或远端部位再次生长的癌症。

[0088] 在本文中,“患者”是人患者。患者可以是“癌症患者”,即患有或有风险患有一种或多种癌症症状的患者。

[0089] 在以“单一抗肿瘤剂”施用VEGF拮抗剂的情况中,它是为了治疗癌症施用的唯一的抗肿瘤剂,即它不与另一种抗肿瘤剂,诸如化学疗法组合施用。

[0090] “护理标准”在本文中意指常规用于治疗特定癌症形式的一种或多种抗肿瘤剂。例如,对于铂抗性卵巢癌,护理标准是托泊替康或脂质体多柔比星。

[0091] “化学治疗剂”包括在治疗癌症中有用的化学化合物。化学治疗剂的例子包括厄洛替尼(erlotinib) (**TARCEVA®**, Genentech/OSI Pharm.), 硼替佐米(bortezomib) (**VELCADE®**, Millennium Pharm.), 双硫仑(disulfiram), 没食子酸表没食子儿茶精(epigallocatechin gallate), salinosporamide A, carfilzomib, 17-AAG (格尔德霉素(geldanamycin)), 根赤壳菌素(radicicol), 乳酸脱氢酶A (LDH-A), 氟维司群(fulvestrant) (**FASLODEX®**, AstraZeneca), 舒尼替尼(sunitib) (**SUTENT®**, Pfizer/Sugen), 来曲唑(letrozole) (**FEMARA®**, Novartis), 甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate) (**GLEEVEC®**, Novartis), finasunate (**VATALANIB®**, Novartis), 奥沙利铂(oxaliplatin) (**ELOXATIN®**, Sanofi), 5-FU (5-氟尿嘧啶), 甲酰四氢叶酸(leucovorin), 雷帕霉素(Rapamycin) (西罗莫司(Sirolimus), **RAPAMUNE®**, Wyeth), 拉帕替尼(Lapatinib) (**TYKERB®**, GSK572016, Glaxo Smith Kline), Lonafamib (SCH 66336), 索拉非尼(sorafenib) (**NEXAVAR®**, Bayer Labs), 吉非替尼(gefitinib) (**IRESSA®**, AstraZeneca), AG1478, 烷化剂类(alkylating agents), 诸如塞替派(thiotepa) 和 **CYTOXAN®** 环磷酰胺(cyclophosphamide); 磺酸烷基酯类(alkyl sulfonates), 诸如白消安(busulfan), 英丙舒凡(improsulfan) 和哌泊舒凡(piposulfan); 氮丙啶类(aziridines), 诸如苯佐替派(benzodopa), 卡波醌(carboquone), 美妥替派(meturedopa), 和乌瑞替派(uredopa); 乙撑亚胺类(ethylenimines) 和甲基蜜胺类(methylamelamines), 包括六甲蜜胺(altretamine), 三乙撑蜜胺(triethylenemelamine), 三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate), 三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate) 和三羟甲蜜胺(trimethylomelamine); 番荔枝内酯类(acetogenins) (尤其是布拉他辛(bullatacin) 和布拉他辛酮(bullatacinone)); 喜树碱(camptothecin) (包括托泊替康(topotecan) 和伊立替康(irinotecan)); 苔藓抑素(bryostatin); callystatin; CC-1065 (包括其阿多来新(adozelesin), 卡折来新(carzelesin) 和比折来新(bizelesin) 合成类似物); 隐藻素类(cryptophycins) (特别是隐藻素1和隐藻素8); 肾上腺皮质类固醇类(adrenocorticosteroids), 包括泼尼松(prednisone) 和泼尼松龙(prednisolone); 醋酸环丙孕酮(cyproterone acetate); 5 α -还

原酶,包括非那雄胺(finasteride)和度他雄胺(dutasteride);vorinostat,romidepsin, panobinostat,丙戊酸(valproic acid),mocetinostat多拉司他汀(dolastatin);阿地白介素(aldesleukin),滑石(talc)duocarmycin(包括合成类似物,KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);pancratistatin;sarcodictyin;海绵抑素(spongistatin);氮芥类(nitrogen mustards),诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil),萘氮芥(chlomaphazine),胆磷酰胺(chlorophosphamide),雌莫司汀(estramustine),异环磷酰胺(ifosfamide),双氯乙基甲胺(mechlorethamine),盐酸氧氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride),美法仑(melphalan),新氮芥(novembichin),苯芥胆甾醇(phenesterine),泼尼莫司汀(prednimustine),曲磷胺(trofوسفamide),尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝脲类(nitrosoureas),诸如卡莫司汀(carmustine),氯脲菌素(chlorozotocin),福莫司汀(fotemustine),洛莫司汀(lomustine),尼莫司汀(nimustine),和雷莫司汀(ranimustine);抗生素类,诸如烯二炔类抗生素(例如加利车霉素(calicheamicin),尤其是加利车霉素 γ II和加利车霉素 ω II (Angew Chem.Intl.Ed.Engl.1994,33:183-186);萘环类抗生素(dynemicin),包括dynemicin A;二膦酸盐类(bisphosphonates),诸如氯膦酸盐(clodronate);埃斯波霉素(esperamicin);以及新制癌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔类抗生素发色团),阿克拉霉素(aclacinomysins),放线菌素(actinomycin),氨茴霉素(authramycin),偶氮丝氨酸(azaserine),博来霉素(bleomycin),放线菌素C(cactinomycin),carabycin,洋红霉素(caminomycin),嗜癌霉素(carzinophilin),色霉素(chromomycinis),放线菌素D(dactinomycin),柔红霉素(daunorubicin),地托比星(detorubicin),6-二氮-5-氧-L-正亮氨酸,ADRIAMYCIN®(多柔比星(doxorubicin)),吗啉代多柔比星,氰基吗啉代多柔比星,2-吡咯代多柔比星和脱氧多柔比星),表柔比星(epirubicin),依索比星(esorubicin),伊达比星(idarubicin),麻西罗霉素(marcellomycin),丝裂霉素(mitomycin)诸如丝裂霉素C,霉酚酸(mycophenolic acid),诺拉霉素(nogalamycin),橄榄霉素(olivomycin),培洛霉素(peplomycin),泊非霉素(porfiromycin),嘌呤霉素(puromycin),三铁阿霉素(quelamycin),罗多比星(rodorubicin),链黑菌素(streptonigrin),链佐星(streptozocin),杀结核菌素(tubercidin),乌苯美司(ubenimex),净司他丁(zinostatin),佐柔比星(zorubicin);抗代谢物类,诸如甲氨蝶呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(flourouracil) (5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸(denopterin),甲氨蝶呤,蝶酰三谷氨酸(pteropterin),三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine),6-巯基嘌呤(mercaptapurine),硫咪嘌呤(thiamiprine),硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine),阿扎胞苷(azacitidine),6-氮尿苷,卡莫氟(carmofur),阿糖胞苷(cytarabine),双脱氧尿苷(dideoxyuridine),去氧氟尿苷(doxifluridine),依诺他滨(enocitabine),氟尿苷(floxuridine);雄激素类,诸如卡鲁睾酮(calusterone),丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate),表硫雄醇(epitiostanol),美雄烷(mepitiostane),睾内酯(testolactone);抗肾上腺类,诸如氨鲁米特(aminoglutethimide),米托坦(mitotane),曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸(frolinic acid);醋葡萄糖内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吡啶

(amsacrine); bestrabucil; 比生群 (bisantrene); 依达曲沙 (edatraxate); 地磷酰胺 (defofamine); 地美可辛 (demecolcine); 地吡醌 (diaziquone); elfomithine; 依利醋铵 (elliptinium acetate); epothilone; 依托格鲁 (etoglucid); 硝酸镓; 羟脲 (hydroxyurea); 香菇多糖 (lentinan); 氯尼达明 (lonidainine); 美登木素生物碱类 (maytansinoids), 诸如美登素 (maytansine) 和安丝菌素 (ansamitocin); 米托胍脲 (mitoguazone); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 莫哌达醇 (mopidamnol); 二胺硝吡啶 (nitraerine); 喷司他丁 (pentostatin); 蛋氨酸芥 (phenamet); 吡柔比星 (pirarubicin); 洛索蒽醌 (losoxantrone); 鬼臼酸 (podophyllinic acid); 2-乙基酰肼 (ethylhydrazide); 丙卡巴肼 (procarbazine); **PSK®** 多糖复合物 (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 雷佐生 (razoxane); 根霉素 (rhizoxin); 西索菲兰 (sizofuran); 螺旋锗 (spirogermanium); 细交链孢菌酮酸 (tenuazonic acid); 三亚胺醌 (triaziquone); 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢菌素类 (trichothecenes) (尤其是T-2毒素, 疣孢菌素 (verracurin) A, 杆孢菌素 (roridin) A 和蛇行菌素 (anguidine)); 乌拉坦 (urethan); 长春地辛 (vindesine); 达卡巴嗪 (dacarbazine); 甘露醇氮芥 (mannomustine); 二溴甘露醇 (mitobronitol); 二溴卫矛醇 (mitolactol); 哌泊溴烷 (pipobroman); gacytosine; 阿糖胞苷 (arabinoside) ("Ara-C"); 环磷酰胺 (cyclophosphamide); 塞替派 (thiotepa); 类紫杉醇 (taxoids), 例如泰素 (TAXOL) (帕利他赛 (paclitaxel); Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), **ABRAXANE®** (无克列莫佛 (Cremophor) 的), 帕利他赛的清蛋白改造的纳米颗粒剂型 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.) 和泰索帝 (**TAXOTERE®**) (多西他赛 (docetaxel, doxetaxel); Sanofi-Aventis); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); **GEMZAR®** (吉西他滨 (gemcitabine)); 6-硫鸟嘌呤 (thioguanine); 巯基嘌呤 (mercaptopurine); 甲氨蝶呤 (methotrexate); 铂类似物, 诸如顺铂 (cisplatin) 和卡铂 (carboplatin); 长春碱 (vinblastine); 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine); **NAVELBINE®** (长春瑞滨 (vinorelbine)); 能灭瘤 (novantrone); 替尼泊苷 (teniposide); 依达曲沙 (edatrexate); 道诺霉素 (daunomycin); 氨基蝶呤 (aminopterin); 卡培他滨 (capecitabine) (**XELODA®**); 伊本膦酸盐 (ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (DMF0); 类视黄酸 (retinoids), 诸如视黄酸 (retinoic acid); 及任何上述各项的药可接受盐, 酸或衍生物。

[0092] 化学治疗剂还包括 (i) 起调节或抑制激素对肿瘤作用的作用的抗激素剂, 诸如抗雌激素类和选择性雌激素受体调控物类 (SERM), 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®**; 柠檬酸他莫昔芬), 雷洛昔芬 (raloxifene), 屈洛昔芬 (droloxifene), iodoxyfene, 4-羟基他莫昔芬, 曲沃昔芬 (trioxifene), 那洛昔芬 (keoxifene), LY117018, 奥那司酮 (onapristone), 和 **FARESTON®** (柠檬酸托瑞米芬 (toremifene citrate)); (ii) 抑制在肾上腺中调节雌激素生成的芳香酶的芳香酶抑制剂, 诸如例如 4(5)-咪唑, 氨鲁米特 (aminoglutethimide), **MEGASE®** (醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate)), **AROMASIN®** (依西美坦 (exemestane); Pfizer), 福美坦 (formestane), 法偈唑 (fadrozole), **RIVISOR®** (伏罗唑 (vorozole)), **FEMARA®** (来曲唑 (letrozole));

Novartis), 和 **ARIMIDEX®** (阿那曲唑 (anastrozole); AstraZeneca); (iii) 抗雄激素类, 诸如氟他米特 (flutamide), 尼鲁米特 (nilutamide), 比卡米特 (bicalutamide), 亮丙瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin); 布舍瑞林 (buserelin), 曲普瑞林 (tripterelin), 醋酸甲羟孕酮 (medroxyprogesterone acetate), 己烯雌酚 (diethylstilbestrol), 倍美力 (premarin), 氟甲睾酮 (fluoxymesterone), 全反式视黄酸, 芬维A胺 (fenretinide), 以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物); (iv) 蛋白质激酶抑制剂; (v) 脂质激酶抑制剂; (vi) 反义寡核苷酸, 特别是抑制牵涉异常细胞增殖的信号传导途经中的基因表达的反义寡核苷酸, 诸如例如 PKC- α , Ralf 和 H-Ras; (vii) 核酶, 诸如 VEGF 表达抑制剂 (例如 **ANGIOZYME®**) 和 HER2 表达抑制剂; (viii) 疫苗, 诸如基因疗法疫苗, 例如 **ALLOVECTIN®**, **LEUVECTIN®**, 和 **VAXID®**; **PROLEUKIN®**, rIL-2; 拓扑异构酶 I 抑制剂, 诸如 **LURTOTECAN®**; **ABARELIX®** rmRH; 和 (ix) 及任何上述药剂的药学可接受盐, 酸和衍生物。

[0093] 化学治疗剂还包括抗体, 诸如阿仑珠单抗 (alemtuzumab) (Campath), 贝伐珠单抗 (bevacizumab) (**AVASTIN®**, Genentech), 西妥昔单抗 (cetuximab) (**ERBITUX®**, Imclone); 帕尼单抗 (panitumumab) (**VECTIBIX®**, Amgen), 利妥昔单抗 (rituximab) (**RITUXAN®**, Genentech/Biogen Idec), 帕妥珠单抗 (pertuzumab) (**OMNITARG®**, 2C4, Genentech), 曲妥珠单抗 (**HERCEPTIN®**, Genentech), 托西莫单抗 (tositumomab) (Bexxar, Corixa), 和抗体药物缀合物, 吉妥珠单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamicin) (**MYLOTARG®**, Wyeth)。具有作为与本发明化合物组合的药剂的治疗潜力的别的人源化单克隆抗体包括: 阿泊珠单抗 (apolizumab), 阿塞珠单抗 (aselizumab), atlizumab, 巴匹珠单抗 (bapineuzumab), bivatumab mertansine, 莫坎妥珠单抗 (cantuzumab mertansine), 西利珠单抗 (cedelizumab), 培舍珠单抗 (certolizumab pegol), cidfusituzumab, cidtuzumab, 达克珠单抗 (daclizumab), 依库珠单抗 (eculizumab), 依法珠单抗 (efalizumab), 依帕珠单抗 (epratuzumab), 厄利珠单抗 (erlizumab), 非维珠单抗 (felvizumab), 芳妥珠单抗 (fontolizumab), 吉妥珠单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamicin), 英妥珠单抗奥佐米星 (inotuzumab ozogamicin), 伊匹木单抗 (ipilimumab), 拉贝珠单抗 (labetuzumab), 林妥珠单抗 (lintuzumab), 马妥珠单抗 (matuzumab), 美泊利单抗 (mepolizumab), 莫维珠单抗 (motavizumab), motovizumab, 那他珠单抗 (natalizumab), 尼妥珠单抗 (nimotuzumab), nolovizumab, numavizumab, ocrelizumab, 奥马珠单抗 (omalizumab), 帕利珠单抗 (palivizumab), 帕考珠单抗 (pascolizumab), pecfusituzumab, pectuzumab, 培克珠单抗 (pexelizumab), ralivizumab, 雷珠单抗 (ranibizumab), reslivizumab, 瑞利珠单抗 (reslizumab), resyvizumab, 罗维珠单抗 (rovelizumab), 卢利珠单抗 (ruplizumab), 西罗珠单抗 (sibrotuzumab), 西利珠单抗 (siplizumab), 索土珠单抗 (sontuzumab), tacatuzumab tetraxetan, tadocizumab, 他利珠单抗 (talizumab), 特非珠单抗 (tefibazumab), 托珠单抗 (tocilizumab), 托利珠单抗 (toralizumab), tucotuzumab 西莫白介素 (celmoleukin), tucusituzumab, umavizumab, 乌珠单抗 (urtioxazumab), 优特克单抗 (ustekinumab), 维西珠单抗 (visilizumab), 和抗白介素-12 (ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories), 其为经遗传修饰以识别白介素-12p40 蛋白的重组

专有人序列全长IgG1 λ 抗体。

[0094] 化学治疗剂还包括“EGFR抑制剂”，其指结合EGFR或以其它方式直接与EGFR相互作用并阻止或降低其信号传导活性的化合物，其另外还称作“EGFR拮抗剂”。此类药剂的例子包括结合EGFR的抗体和小分子。结合EGFR的抗体的例子包括MAb 579 (ATCC CRL HB8506)，MAb 455 (ATCC CRL HB8507)，MAb 225 (ATCC CRL 8508)，MAb 528 (ATCC CRL 8509) (参见美国专利No.4,943,533, Mendelsohn et al.) 及其变体，诸如嵌合化的225 (C225或西妥昔单抗；**ERBUTIX®**) 和重构的人225 (H225) (参见W096/40210, Imclone Systems Inc.)；IMC-11F8，一种完全人的EGFR靶向抗体 (Imclone)；结合II型突变体EGFR的抗体 (美国专利No.5,212,290)；结合EGFR的人源化和嵌合抗体，如美国专利No.5,891,996中所述；和结合EGFR的人抗体，诸如ABX-EGF或帕尼单抗 (Panitumumab) (参见W098/50433, Abgenix/Amgen)；EMD 55900 (Stragliotto et al., Eur.J.Cancer 32A:636-640 (1996))；EMD7200 (matuzumab)，一种针对EGFR且与EGF和TGF- α 二者竞争EGFR结合的人源化EGFR抗体 (EMD/Merck)；人EGFR抗体，HuMax-EGFR (GenMab)；称作E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3和E7.6.3且描述在US 6,235,883中的完全人抗体；MDX-447 (Medarex Inc)；和mAb 806或人源化mAb 806 (Johns et al., J.Biol.Chem.279 (29):30375-30384 (2004))。抗EGFR抗体可与细胞毒剂缀合，由此产生免疫缀合物 (参见例如EP 659,439A2, Merck Patent GmbH)。EGFR拮抗剂包括小分子，诸如美国专利No.5,616,582, 5,457,105, 5,475,001, 5,654,307, 5,679,683, 6,084,095, 6,265,410, 6,455,534, 6,521,620, 6,596,726, 6,713,484, 5,770,599, 6,140,332, 5,866,572, 6,399,602, 6,344,459, 6,602,863, 6,391,874, 6,344,455, 5,760,041, 6,002,008, 和5,747,498, 以及PCT公开文本W098/14451, W098/50038, W099/09016, 和W099/24037中描述的化合物。具体的小分子EGFR拮抗剂包括OSI-774 (CP-358774, 厄洛替尼 (erlotinib), **TARCEVA®**, Genentech/OSI Pharmaceuticals)；PD 183805 (CI 1033, 2-丙烯酰胺, N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-[3-(4-吗啉基)丙氧基]-6-喹唑啉基]-, 二氢氯化物, Pfizer Inc.)；ZD1839, 吉非替尼 (gefitinib) (**IRESSA®**) 4-(3'-氯-4'-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉代丙氧基)喹唑啉, AstraZeneca)；ZM 105180 ((6-氨基-4-(3-甲基苯基-氨基)-喹唑啉, Zeneca)；BIBX-1382 (N8-(3-氯-4-氟-苯基)-N2-(1-甲基-哌啶-4-基)-嘧啶并[5,4-d]嘧啶-2,8-二胺, Boehringer Ingelheim)；PKI-166 ((R)-4-[4-[(1-苯基乙基)氨基]-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚)；(R)-6-(4-羟基苯基)-4-[[(1-苯基乙基)氨基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶)；CL-387785 (N-[4-[(3-溴苯基)氨基]-6-喹唑啉基]-2-丁炔酰胺)；EKB-569 (N-[4-[(3-氯-4-氟苯基)氨基]-3-氰基-7-乙氧基-6-喹唑啉基]-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺) (Wyeth)；AG1478 (Pfizer)；AG1571 (SU 5271; Pfizer)；双重EGFR/HER2酪氨酸激酶抑制剂，诸如拉帕替尼 (lapatinib) **TYKERB®**, GSK572016或N-[3-氯4-[(3-氟苯基)甲氧基]苯基]-6[[[2-甲基磺酰基]乙基]氨基]甲基]-2-呋喃基]-4-喹唑啉胺)。

[0095] 化学治疗剂还包括“酪氨酸激酶抑制剂”，包括前一段中提到的EGFR靶向药物；小分子HER2酪氨酸激酶抑制剂，诸如可从Takeda获得的TAK165；CP-724,714，一种口服ErbB2受体酪氨酸激酶选择性抑制剂 (Pfizer和OSI)；优先结合EGFR但抑制HER2和EGFR过表达细胞二者的双重HER抑制剂，诸如EKB-569 (可从Wyeth获得)；拉帕替尼 (lapatinib) (GSK572016；可从Glaxo-SmithKline获得)，一种口服HER2和EGFR酪氨酸激酶抑制剂；PKI-

166 (可从Novartis获得); 泛HER抑制剂, 诸如卡奈替尼 (canertinib) (CI-1033; Pharmacia); Raf-1抑制剂, 诸如可从ISIS Pharmaceuticals获得的, 抑制Raf-1信号传导的反义药剂ISIS-5132; 非HER靶向TK抑制剂, 诸如甲磺酸伊马替尼 (GLEEVEC®, 可得自Glaxo SmithKline); 多靶向酪氨酸激酶抑制剂, 诸如舒尼替尼 (sunitinib) (SUTENT®, 可从Pfizer获得); VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂, 诸如瓦他拉尼 (vatalanib) (PTK787/ZK222584, 可从Novartis/Schering AG获得); MAPK胞外调控激酶I抑制剂CI-1040 (可从Pharmacia获得); 喹唑啉类, 诸如PD 153035, 4-(3-氯苯胺基)喹唑啉; 吡啶并嘧啶类; 嘧啶并嘧啶类; 吡咯并嘧啶类, 诸如CGP 59326, CGP 60261和CGP 62706; 吡唑并嘧啶类, 4-(苯基氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶类; 姜黄素 (二阿魏酰甲烷, 4,5-双(4-氟苯胺基)-酞酰亚胺); 含有硝基噻吩模块的tyrphostine; PD-0183805 (Warner-Lambers); 反义分子 (例如那些与编码HER的核酸结合的反义分子); 喹啉类 (美国专利No.5,804,396); tryphostins (美国专利No.5,804,396); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); 泛HER抑制剂, 诸如CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); 甲磺酸伊马替尼 (GLEEVEC®); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Pfizer); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone), 雷帕霉素 (西罗莫司, RAPAMUNE®); 或任何下列专利公开文本中描述的: 美国专利No.5,804,396; W01999/09016 (American Cyanamid); W01998/43960 (American Cyanamid); W01997/38983 (Warner Lambert); W01999/06378 (Warner Lambert); W01999/06396 (Warner Lambert); W01996/30347 (Pfizer, Inc); W01996/33978 (Zeneca); W01996/3397 (Zeneca) 和W01996/33980 (Zeneca)。

[0096] 化学治疗剂还包括地塞米松 (dexamethasone), 干扰素, 秋水仙素 (colchicine), 氯苯氨啉 (metoprine), 环孢霉素 (cyclosporine), 两性霉素 (amphotericin), 甲硝唑 (metronidazole), 阿仑单抗 (alemtuzumab), 阿利维A酸 (alitretinoin), 别嘌醇 (allopurinol), 氨磷汀 (amifostine), 三氧化二砷 (arsenic trioxide), 天冬酰胺酶 (asparaginase), 活的BCG, 贝伐珠单抗 (bevacuzimab), 贝沙罗汀 (bexarotene), 克拉屈滨 (cladribine), 里本灵 (clofarabine), darbepoetin alfa, 地尼白介素 (denileukin), 右雷佐生 (dexrazoxane), 阿法依伯汀 (epoetin alfa), 厄洛替尼 (elotinib), 非格司亭 (filgrastim), 醋酸组氨瑞林 (histrelin acetate), ibritumomab, 干扰素 α -2a, 干扰素 α -2b, lenalidomide, 左旋咪唑 (levamisole), 美司钠 (mesna), 甲氧沙林 (methoxsalen), 诺龙 (nandrolone), 奈拉滨 (nelarabine), 诺非单抗 (nofetumomab), 奥普瑞白介素 (oprelvekin), palifermin, 帕米膦酸盐 (pamidronate), 培加酶 (pegademase), 培门冬酶 (pegaspargase), PEG非格司亭 (pegfilgrastim), 培美曲塞二钠 (pemetrexed disodium), 普卡霉素 (plicamycin), 卟吩姆钠 (porfimer sodium), 喹纳克林 (quinacrine), 拉布立酶 (rasburicase), 沙格司亭 (sargramostim), 替莫唑胺 (temozolomide), VM-26, 6-TG, 托瑞米芬 (toremifene), tretinoin, ATRA, 戊柔比星 (valrubicin), 唑来膦酸盐 (zoledronate), 和唑来膦酸 (zoledronic acid), 及其药学可接受盐。

[0097] “基于铂的化学治疗剂”或“platin”意指作为铂的配位络合物的抗肿瘤药。基于铂的化学治疗剂的例子包括卡铂、顺铂和Oxaliplatinum。

[0098] “基于铂的化学疗法”意指用一种或多种基于铂的化学治疗剂,任选与一种或多种其它化学治疗剂组合的疗法。

[0099] “化学疗法抗性”癌症指在接受化学疗法方案时进展的患者中的癌症(即患者是“化学疗法不应性的”),或者患者在完成化学疗法方案后12个月内(例如6个月内)进展。

[0100] “铂抗性”癌症指在接受基于铂的化学疗法时进展的患者中的癌症(即患者是“铂不应性的”),或者患者在完成基于铂的化学疗法方案后12个月内(例如6个月内)进展。

[0101] “放射疗法”指使用定向伽马射线或贝塔射线来诱发对细胞的足够损伤,以限制其正常发挥功能的能力或全然破坏细胞。应当领会,本领域知道许多方式来确定治疗的剂量和持续时间。典型的治疗作为一次施用来给予,而典型的剂量范围为每天10-200个单位(戈瑞(Gray))。

[0102] 术语“益处”以最广义使用,指任何期望的效果,并且明确包括如本文中限定的临床益处。可以通过评估各种终点来测量临床益处,例如在某种程度上抑制疾病进展,包括减缓和完全阻滞;减少疾病事件和/或症状数目;减小损伤尺寸;抑制(即降低、减缓或完全阻止)疾病细胞渗入临近的周围器官和/或组织;抑制(即降低、减缓或完全阻止)疾病扩散;降低自身免疫应答(其可以但是不必导致疾病损伤的消退或消融);在某种程度上减轻一种或多种与病症有关的症状;延长治疗后无疾病表现(例如无进展存活)的长度;延长的总体存活;较高的应答率;和/或降低治疗后给定时间点的死亡率。

[0103] III.方法

[0104] A.治疗方法

[0105] 本发明在本文中提供了用于治疗具有能够响应VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)的一类癌症的患者的方法,其牵涉对患者施用治疗有效量的拮抗剂,其中已经确定所述患者的癌症以比癌症类型中CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平表达CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA。优选地,已经确定所述患者的癌症以比所述癌症类型中CD31和/或肿瘤VEGFA表达的第50百分位数多,且最优选地比第75百分位数大的水平表达CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA。

[0106] 在具体的实施方案中,本发明提供了用于治疗妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌)或乳腺癌(例如MBC)患者的方法,其牵涉对患者施用治疗有效量的VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗),其中已经确定患者的癌症以比癌症中的CD31 MVD表达的中值水平多的水平表达CD31 MVD,和/或其中已经确定患者的癌症样品以比癌症的CD31表达的第75百分位数大的水平表达CD31 MVD,和/或以比中值水平大的水平表达肿瘤VEGFA,和/或其中已经确定患者的癌症样品以比癌症中的肿瘤VEGFA表达的第75百分位数大的水平表达肿瘤VEGFA。任选地,这些方法牵涉共施用VEGF拮抗剂与一种或多种别的化学治疗剂(例如卡铂和/或帕利他赛),如下文进一步描述的。

[0107] 在另一个方面中,本发明提供了用于为具有一类癌症的患者选择疗法的方法,所述患者能够响应VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)的施用(任选地与一种或多种别的化学治疗剂组合),所述方法牵涉测定来自患者的癌症样品中的CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA表达,并且若已经确定癌症样品以比癌症类型中CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平大的水平具有CD31 MVD和/或表达肿瘤VEGFA,则选择VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)。在此实施方案中,优选地,癌症类型是妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、

宫颈、子宫内膜、阴道和外阴癌)或乳腺癌(例如MBC),包括其铂抗性、和/或晚期、不应性和/或复发形式。任选地,化学治疗剂可以是卡铂和/或帕利他赛。

[0108] 在上文的定义部分中列出了可以用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)治疗的各种癌症类型的例子。优选的癌症类型包括妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道和外阴癌)。在多个实施方案中,治疗的癌症是晚期、不应性、复发性、化学疗法抗性和/或铂抗性癌症。

[0109] 用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)(任选与一种或多种化学治疗剂(例如卡铂和/或帕利他赛)组合)的疗法优选延长和/或改善存活,包括无进展存活(PFS)和/或总体存活(OS)。在一个实施方案中,用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)的疗法比通过施用批准的抗肿瘤剂、或标准护理对治疗的癌症实现的存活大至少约20%延长存活。在优选的实施方案中,患者具有妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌)或乳腺癌(例如MBC)。任选地,患者可以具有癌症的晚期、不应性、复发性、化学疗法抗性、和/或铂抗性形式。

[0110] 依照已知的方法,诸如静脉内施用,例如以推注或者通过在一段时间里连续输注,通过肌肉内、腹膜内、脑脊柱内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、表面或吸入路径对人患者施用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗),任选地与一种或多种化学治疗剂(例如卡铂和/或帕利他赛)组合。抗体的静脉内施用是优选的。

[0111] 对于预防或治疗癌症,VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)和/或化学治疗剂的剂量会取决于如上文定义的要治疗的癌症的类型、癌症的严重性和过程、抗体是否用于预防或治疗目的施用、先前疗法、患者的临床史和对药物的响应、和主治内科医生的判断。在一个实施方案中,以每2周一次给予的5mg/kg体重、每2周一次给予的10mg/kg体重、每3周一次给予的7.5mg/kg体重、或每3周一次给予的15mg/kg体重施用VEGF拮抗剂(例如贝伐单抗)。

[0112] 在一个实施方案中,施用固定剂量的VEGF拮抗剂。可以一次或在一系列治疗里适当对患者施用固定剂量。在施用固定剂量的情况中,优选地,它在约20mg至约2000mg抑制剂的范围中。例如,固定剂量可以是约420mg、约525mg、约840mg、或约1050mg抑制剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)。在施用一系列剂量的情况中,例如可以约每周、约每2周、约每3周、或约每4周,但是优选地约每3周施用这些。例如,可以继续施用固定剂量,直至疾病进展、不利事件、或如由内科医生确定的其它时间。例如,可以施用约2、3、或4、直至约17或更多个固定剂量。

[0113] 在一个实施方案中,施用一个或多个加载剂量的VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗),接着是一个或多个维持剂量。在另一个实施方案中,可以对患者施用多个相同剂量。依照本发明的一个优选的实施方案,施用约840mg(加载剂量)的固定剂量的VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗),接着是一剂或多剂约420mg(维持剂量)拮抗剂。优选地,约每3周施用维持剂量,持续总共至少两剂,直至17剂或更多。

[0114] 依照本发明的另一个优选的实施方案,例如每3周施用一个或多个固定剂量的约1050mg VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)。依照此实施方案,施用1、2或更多个固定剂量,例如持续直至1年(17个循环),以及更长(如期望的话)。

[0115] 在另一个实施方案中,施用固定剂量的约1050mg VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,

诸如贝伐单抗)作为加载剂量,接着是约525mg的一个或多个维持剂量。依照此实施方案,可以每3周对患者施用约1、2或更多个维持剂量。

[0116] 虽然可以以单一抗肿瘤剂施用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)或化学治疗剂,但是任选地,用抑制剂(或化学治疗剂)和一种或多种(别的)化学治疗剂的组合治疗患者。本文中的例示性化学治疗剂包括:吉西他滨、卡铂、奥沙利铂、伊立替康、氟嘧啶(例如5-FU)、帕利他赛(例如nab-帕利他赛)、多西他赛、托泊替康、卡培他滨、替莫唑胺、干扰素- α 、和/或脂质体多柔比星(例如PEG化的脂质体多柔比星)。在一些实施方案中,至少一种化学治疗剂是卡铂或帕利他赛。组合施用包括使用分开的配制剂或单一药物配制剂的共施用或同时施用,和任意次序的连续施用,其中优选地,存在有这两种(或所有)活性剂同时施加其生物活性的时间段。如此,可以在施用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)之前或之后施用化学治疗剂。在此实施方案中,在化学治疗剂的至少一次施用和VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)的至少一次施用之间的时机优选是约1个月或更少,且最优选是约2周或更少。或者,在单一配制剂或分开的配制剂中对患者同时施用化学治疗剂和抑制剂。用化学治疗剂(例如卡铂和/或帕利他赛)和VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)的组合的治疗可以导致对患者的协同、或大于叠加的治疗益处。

[0117] 用于与VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)组合(例如用于卵巢癌疗法)的特别期望的化学治疗剂包括:化学治疗剂诸如铂化合物(例如卡铂)、泰素诸如帕利他赛或多西他赛、托泊替康、或脂质体多柔比星。

[0118] 用于与VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)组合(例如用于晚期阶段上皮卵巢癌、输卵管癌、或原发性腹膜癌疗法)的特别期望的化学治疗剂包括:化学治疗剂诸如卡铂和帕利他赛。

[0119] 用于与VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)组合(例如用于铂敏感性上皮卵巢癌、输卵管癌、或原发性腹膜癌疗法)的特别期望的化学治疗剂包括:化学治疗剂诸如卡铂和吉西他滨。

[0120] 用于与VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)组合(例如用于铂抗性复发性上皮卵巢癌、输卵管癌、或原发性腹膜癌疗法)的特别期望的化学治疗剂包括:化学治疗剂诸如帕利他赛、托泊替康、或PEG化的脂质体多柔比星。

[0121] 用于与VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)组合(例如用于乳腺癌疗法)的特别期望的化学治疗剂包括:化学治疗剂诸如卡培他滨、和泰素诸如帕利他赛(例如nab-帕利他赛)或多西他赛。

[0122] 用于与VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)组合(例如用于胶质母细胞瘤疗法)的特别期望的化学治疗剂包括:化学治疗剂诸如替莫唑胺,任选地与放射疗法组合。

[0123] 用于与VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)组合(例如用于结肠直肠癌疗法)的特别期望的化学治疗剂包括:化学治疗剂诸如氟嘧啶(例如5-FU)、帕利他赛、顺铂、托泊替康、伊立替康、氟嘧啶-奥沙利铂、氟嘧啶-伊立替康、FOLF0X4(5-FU、甲酰四氢叶酸、奥沙利铂)、和IFL(伊立替康、5-FU、甲酰四氢叶酸)。

[0124] 用于与VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)组合(例如用于肾细胞癌疗法)的特别期望的化学治疗剂包括:化学治疗剂诸如干扰素- α 2a。

[0125] 用于与VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)组合(例如用于宫颈癌疗法)的特别期望的化学治疗剂包括:化学治疗剂诸如帕利他赛、顺铂、托泊替康、与顺铂组合的帕利他赛、和与托泊替康组合的帕利他赛。

[0126] 因此,化学治疗剂(若施用的话)通常以已知的剂量施用,或任选地由于药物的组合作用或可归因于化学治疗剂施用的负面副作用而降低。可以依照制造商的用法说明或者如由熟练从业人员凭经验确定的那样使用用于此类化学治疗剂的制备和给药日程表。在化学治疗剂是帕利他赛的情况中,优选地,以约 $130\text{mg}/\text{m}^2$ 至 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 之间的剂量(例如约 $175\text{mg}/\text{m}^2$)例如在3小时里每3周一次施用它。在化学治疗剂是卡铂的情况中,优选地,通过使用Calvert公式计算卡铂的剂量施用它,所述Calvert公式基于患者先前存在的肾功能或肾功能和期望的血小板最低值。肾排泄是卡铂的主要消除路径。如与基于体表面积的经验剂量计算相比此给药公式的使用允许补偿治疗前肾功能的患者变化,其在其它情况中可以导致给药不足(在具有高于平均值的肾功能的患者中)或过度给药(在具有受损的肾功能的患者中)。使用单一药剂卡铂的 $4\text{--}6\text{mg}/\text{mL}/\text{min}$ 靶标AUC似乎在先前经治疗的患者中提供最合适的剂量范围。

[0127] 除了VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)和化学治疗剂外,可以与其组合其它治疗方案。例如,可以施用第二(第三、第四、等等)化学治疗剂,其中第二化学治疗剂是抗代谢物化学治疗剂,或不作为抗代谢物的化学治疗剂。例如,第二化学治疗剂可以是紫杉烷(诸如帕利他赛或多西他赛)、卡培他滨、或基于铂的化学治疗剂(诸如卡铂、顺铂、或奥沙利铂)、蒽环类抗生素(诸如多柔比星,包括脂质体多柔比星)、托泊替康、培美曲塞、长春花生物碱(诸如长春瑞滨)、和TLK 286。可以施用不同化学治疗剂的“混合物”。

[0128] 可以与VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)和/或化学治疗剂组合的其它治疗剂包括下列任一项或多项:HER抑制剂、HER二聚化抑制剂(例如生长抑制性HER2抗体诸如曲妥珠单抗或诱导HER2过表达细胞凋亡的HER2抗体诸如7C2、7F3或其人源化变体);针对不同肿瘤相关抗原诸如EGFR、HER3、HER4的抗体;抗激素化合物,例如抗雌激素化合物诸如他莫昔芬,或芳香酶抑制剂;心脏保护剂(以预防或减轻与治疗有关的任何心肌功能障碍);细胞因子;EGFR靶向药物(诸如TARCEVA®、IRESSA®或cetuximab);酪氨酸激酶抑制剂;COX抑制剂(例如COX-1或COX-2抑制剂);非类固醇抗炎药,celecoxib (CELEBREX®);法呢基转移酶抑制剂(例如可从Johnson and Johnson购买的Tipifarnib/ZARNESTRA® R115777或可从Schering-Plough购买的Lonafarnib SCH66336);结合癌胚蛋白CA 125的抗体,诸如Oregovomab (MoAb B43.13);HER2疫苗(诸如Pharmexia的HER2 Auto Vac疫苗,或Dendreon的APC8024蛋白质疫苗,或GSK/Corixa的HER2肽疫苗);其它HER靶向疗法(例如曲妥珠单抗、西妥昔单抗、ABX-EGF、EMD7200、gefitinib、erlotinib、CP724714、CI1033、GW572016、IMC-11F8、TAK165等);Raf和/或ras抑制剂(参见例如WO 2003/86467);盐酸多柔比星脂质体注射液(DOXIL®);拓扑异构酶I抑制剂诸如托泊替康;紫杉烷;HER2与EGFR双重酪氨酸激酶抑制剂诸如lapatinib/GW572016;TLK286 (TELCYTA®);EMD-7200;治疗恶心的药物,诸如血清素拮抗剂、类固醇或苯并二氮卓;预防或治疗皮疹的药物或标准痤疮疗法,包括局部或口服抗生素;治疗或预防腹泻的药物;降体温药物,诸如醋氨酚(acetaminophen)、苯海拉明(diphenhydramine)或麦啉

(meperidine);造血生长因子等。

[0129] 任何上文记录的共施用药剂的合适的剂量是那些目前使用的,并且可以由于药剂和抑制剂的组合作用(协同)而降低。在上述治疗方案外,患者可以进行肿瘤和/或癌细胞的手术除去和/或放射疗法。

[0130] 在VEGF拮抗剂是抗体(例如贝伐单抗)的情况下,优选地,施用的抗体是裸抗体。施用的VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)可以是与细胞毒剂缀合的。优选地,缀合物和/或其结合的抗原受到细胞内在化,导致缀合物杀伤其所结合的癌细胞的治疗功效提高。在一个优选的实施方案中,细胞毒剂靶向或干扰癌细胞中的核酸。此类细胞毒剂的例子包括美登木素生物碱类(maytansinoids)、加利车霉素(calicheamicin)、核糖核酸酶和DNA内切核酸酶。

[0131] 可以通过基因疗法施用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)。关于使用基因疗法产生细胞内抗体,见例如1996年3月14日公开的WO 96/07321。有两种主要方法使核酸(任选包含在载体中)进入患者的细胞,即体内(in vivo)和回体(ex vivo)。对于体内投递,通常在需要抗体的部位将核酸直接注射到患者体内。对于回体治疗,取出患者的细胞,将核酸导入这些分离的细胞,并将经过修饰的细胞或是直接施用于患者,或是例如封装入多孔膜内并植入患者体内(参见例如美国专利第4,892,538号和第5,283,187号)。有多种技术可用于将核酸导入可存活细胞。这些技术根据是将核酸转移至体外培养细胞还是目的宿主的体内细胞而有所变化。适于在体外将核酸转移到哺乳动物细胞中的技术包括使用脂质体、电穿孔、显微注射、细胞融合、DEAE-右旋糖苷、磷酸钙沉淀法等。常用于回体投递基因的载体是逆转录病毒。目前优选的体内核酸转移技术包括用病毒载体(诸如腺病毒、I型单纯疱疹病毒或腺伴随病毒)和基于脂质的系统(可用于脂质介导的基因转移的脂质有例如DOTMA、DOPE和DC-Chol)进行的转染。在有些情况中,希望与靶向靶细胞的试剂一起提供核酸源,所述试剂诸如对细胞表面膜蛋白或靶细胞特异的抗体、靶细胞上受体的配体等。在采用脂质体时,与胞吞作用相关细胞表面膜蛋白结合的蛋白质可用于靶向和/或促进摄入,例如对特定细胞类型具有向性的衣壳蛋白或其片段、在循环中发生内在化的蛋白质的抗体、及靶向细胞内定位和延长细胞内半衰期的蛋白质。受体介导的胞吞技术记载于例如Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3410-3414 (1990)。关于目前已知的基因标记和基因治疗方案的综述参见Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)。还可参见WO 93/25673及其引用的参考文献。

[0132] B. 预后、诊断和检测的方法

[0133] 本发明提供了用于改善患有癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌)、或乳腺癌(例如MBC; 还见下文))的患者的无进展存活(PFS)和总体存活(OS)的方法,其通过用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)治疗,任选地与化学疗法方案组合进行。本发明还提供了鉴定患有癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌)或乳腺癌(例如转移性乳腺癌(MBC); 还见下文))的患者的方法,所述患者可受益于VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)的施用,任选地与化学疗法方案组合。这些方法牵涉测定CD31和/或肿瘤VEGFA的表达水平,并且将它们与癌症类型中的中值水平比较,其中CD31和/或肿瘤VEGFA比所述癌症类型中表达的中值表达水平多的水平表达指示所述患者可受益于VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)

的施用,任选地在另一种抗癌疗法(例如化学疗法方案(例如卡铂和/或帕利他赛))外。

[0134] 本发明进一步提供了用于评估患者对VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)(任选地与化学疗法方案组合)的敏感性或响应性的方法,其通过相对于诊断为癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌),或乳腺癌(例如转移性乳腺癌(MBC);还见下文))的患者中的对照水平,测定CD31和/或肿瘤VEGFA中的一种或多种的表达水平进行。

[0135] 本发明进一步提供了患有癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌),或乳腺癌(例如转移性乳腺癌(MBC);还见下文))的患者的预后的方法,其通过测定自患者获得的样品中的CD31和/或肿瘤VEGFA表达水平,分别比较CD31 MVD和/或肿瘤表达VEGFA的水平与癌症类型中CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平,并且确定患者的预后进行。较差的预后在CD31 MVD和/或肿瘤VEGFA表达处于比CD31和/或肿瘤VEGFA表达的中值水平多的水平时。任选地,方法包括当确定患者具有较差的存活预后时将患者鉴定为很可能受益于VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)的施用的步骤,并且进一步任选地包括若确定患者具有较差的预后,则以治疗有效量对患者施用VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)的步骤。

[0136] 因而,本发明涉及与对血管生成抑制剂,例如VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)(任选地与化学治疗方案,诸如基于卡铂的化学疗法组合)的敏感性或响应性关联的癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌),或乳腺癌(例如MBC;还见上文))生物标志物的鉴定、选择和使用。在此方面中,本发明涉及使用相对于诊断为癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌),或乳腺癌(例如MBC;还见上文))的患者中建立的对照(例如中值),CD31和/或肿瘤VEGFA中一种或多种的肿瘤特异性表达序型来鉴定对将血管发生抑制剂,例如VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)添加至标准化学疗法敏感或响应的患者。本发明进一步涉及用于通过将血管发生抑制剂,例如VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)添加至标准化学疗法(例如基于卡铂的和/或基于帕利他赛的化学疗法)改善患有癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌),或乳腺癌(例如MBC;还见上文))的患者的PFS和/或OS的方法,其通过相对于诊断为癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌)或乳腺癌(例如MBC;还见上文))的患者中的对照(例如中值)测定CD31和/或肿瘤VEGFA中一种或多种的肿瘤特异性表达水平进行。

[0137] 可以通过本领域中已知的适合于测定患者样品中的特定蛋白质水平的任何方法评估CD31和/或肿瘤VEGFA的表达水平,并且优选地通过采用对CD31和/或肿瘤VEGFA特异性的抗体的免疫组织化学(“IHC”)方法测定。此类方法是本领域中公知且常规实施的,并且相应的商业抗体和/或试剂盒是容易可用的。例如,用于VEGFA和CD31的商品化抗体/测试试剂盒可以分别以克隆SP28自Abcam, Inc. (Cambridge, Mass., U.S.A.), 以及以克隆JC70A自Dako A/S (Glostrup, Denmark) 获得。优选地,使用抗体或试剂盒制造商的试剂和/或方案推荐评估本发明的标志物/指示剂蛋白的表达水平。熟练技术人员还会意识到通过IHC方法测定CD31和/或肿瘤VEGFA的表达水平的进一步手段。因此,可以由本领域技术人员在无需过度负担的情况中常规地且可重复地测定本发明的一种或多种标志物/指示剂的表达水平。然而,为了确保准确和可重现的结果,本发明还涵盖在可以确保测试规程的验证的专门实

验室中测试患者样品。

[0138] 优选地,在含有或怀疑含有癌细胞的生物学样品中评估CD31和/或肿瘤VEGFA的表达水平。样品可以是例如卵巢组织切除、卵巢组织活组织检查或自患有、疑似患有或诊断患有癌症(例如,妇科癌症,特别是卵巢癌)的患者获得的转移性损伤。优选地,样品是卵巢组织的样品、卵巢肿瘤的切除或活组织检查、已知或疑似的转移性卵巢癌损伤或切片、或者已知或怀疑包含循环癌细胞,例如卵巢癌细胞的血液样品,例如外周血样品。样品可以包含癌细胞(即肿瘤细胞)和非癌性细胞两者,并且在某些实施方案中,包含癌性和非癌细胞两者。在包括测定样品(见例如下述例子)中的血管数目的本发明的方面,样品包含癌/肿瘤细胞和作为内皮细胞的非癌性细胞两者。熟练技术人员(例如病理学家)可以容易地辨别癌细胞与非癌性,例如内皮细胞,以及测定样品内的血管数目,例如通过染色样品以检测内皮细胞标志物,例如CD31。作为血管数目的直接测定的备选或在血管数目的直接测定外,也可以测定一种或多种内皮细胞标志物,例如CD31的表达水平,该水平与血管数目相关联。获得生物学样品,包括组织切除、活组织检查和体液,例如包含癌/肿瘤细胞的血液样品的方法在本领域中是公知的。在一些实施方案中,在开始任何化学治疗方案或疗法,例如用于治疗癌症或管理或改善其症状的疗法前收集自患者获得的样品。因此,在一些实施方案中,在施用化学治疗剂,或开始化学疗法方案前收集样品。

[0139] 在上文描述的方法外,本发明还涵盖用于评估一种或多种肿瘤CD31和/或肿瘤VEGFA的表达水平的进一步的免疫组织化学方法,例如通过Western印迹法和基于ELISA的检测进行。可以在用于测定血管数目的备选或别的方法中采用类似的方法,包括测定一种或多种内皮细胞标志物,例如CD31的肿瘤特异性表达水平。如本领域中理解的,也可以通过本领域中已知的任何合适的方法,诸如Northern印迹法、实时PCR、和RT-PCR在mRNA水平评估本发明的标志物/指示剂蛋白的表达水平。基于免疫组织化学的和基于mRNA的检测方法和系统在本领域中是公知的,并且可以从诸如Lottspeich (Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, 1998) 或 Sambrook and Russell (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A., 2001) 等标准教科书导出。描述的方法特别用于相对于在诊断为癌症(例如,妇科癌症,诸如卵巢癌)晚期阶段的群体中建立的对照水平测定患者或患者组中CD31和/或肿瘤VEGFA的表达水平。

[0140] 也可以通过利用免疫凝集、免疫沉淀(例如免疫扩散、免疫电泳、免疫固定)、Western印迹技术(例如(原位)免疫组织化学、(原位)免疫细胞化学、亲和层析、酶免疫测定法)等在蛋白质水平上测定VEGFA和/或一种或多种内皮细胞标志物,例如CD31中一种或多种的表达水平。也可以通过物理方法,例如光度测定法测定溶液中纯化的多肽的量。量化混合物中的特定多肽的方法通常依赖于例如抗体的特异性结合。

[0141] 如上文提及的,也可以在编码VEGFA和/或如本文中描述的用于测定血管数目的一种或多种内皮细胞标志物,例如CD31的相应基因的减少的表达中反映依照本发明的标志物/指示剂蛋白的表达水平。因此,可以实施翻译前的基因产物(例如剪接、未剪接或部分剪接的mRNA)的定量评估,以评估相应基因的表达。本领域技术人员知道要在此情况中使用的标准方法或者可以从标准教科书(例如, Sambrook, 2001, 同上)推导出这些方法。例如,可以通过Northern印迹、实时PCR等获得编码本文中描述的一种或多种VEGFA和/或用于测定血管数目的一种或多种内皮细胞标志物,例如CD31中的mRNA的相应浓度/量的定量数据。

[0142] 为了在本文中描述的检测方法中使用,技术人员具有标记由本发明涵盖的多肽或寡核苷酸的能力。如本领域中常规实施的,可以依照本领域中已知的标准方法标记和显现用于检测用于IHC方法的mRNA水平和/或抗体或抗体片段的杂交探针。通常使用的系统的非限制性例子包括使用放射性标记物、酶标记物、荧光标签、生物素-亲和素复合物、化学发光等。

[0143] 作为依照本文中描述的方法测定CD31和肿瘤VEGFA中的一种或多种的表达水平的备选或除此之外,可以测定相对于诊断为癌症(例如妇科癌症(例如卵巢、腹膜、输卵管、宫颈、子宫内膜、阴道或外阴癌)或乳腺癌(例如MBC;还见上文))的患者中建立的对照水平,肿瘤样品中的血管数目作为对血管发生抑制剂,例如VEGF拮抗剂(例如抗VEGF抗体,诸如贝伐单抗)(任选地在标准疗法外)敏感或响应的患者的生物标志物和指征。

实施例

[0144] CD31和肿瘤VEGFA作为一线卵巢癌中的改善的贝伐单抗功效的预测生物标志物:肿瘤组织回顾性分析

[0145] A. 样品和受试者

[0146] 自具有新诊断的、先前未治疗的、亚最佳的晚期阶段上皮卵巢和原发性腹膜癌,并且参与卡铂和帕利他赛加安慰剂(CPP)的III期试验,对卡铂和帕利他赛加同时的贝伐单抗及之后的安慰剂(CPB15)、对卡铂和帕利他赛加同时且延长的贝伐单抗(CPT15+)的患者收集肿瘤组织样品(图1)。意图治疗(ITT)群体分析包括1,852名患者,并且生物标志物可评估群体(BEP)群体分析包括1,438名患者。

[0147] B. 分析方法

[0148] 使用标准化统计学工具产生来自此研究的分析结果以解决以下疑问:

[0149] 1.) 生物标志物群体的代表性:通过治疗组汇总关键基线人口统计数据 and 预后特征(包括分层变量和具有已知预后意义的任何变量)和功效结果,并且在生物标志物和ITT群体之间比较以调查与生物标志物的利用度有关的任何潜在选择偏倚。

[0150] 2.) 生物标志物特性:绘制基线时生物标志物的总体分布,并且使用描述统计量(均值、标准差和范围)来汇总患者群体的基线生物标志物值。使用二变量图调查生物标志物和关键的人口统计预后变量之间的关系。通过对照分组中的临床功效的估值评估生物标志物的预后特性,并且将相应的95%置信区间制成表格。

[0151] 3.) 生物标志物的预测特性:使用探索图形学评估基线时测量的生物标志物的预测效应。连续生物标志物的STEPP(亚组治疗效应模式图)和预先规定的截留(四分位数)处的Forest图是主要输出以探索截留选择。

[0152] 4.) 亚组分析:一旦确定截留,使用具有相互作用项的统计学模型并且通过比较通过生物标志物的预先规定的数值限定的两组患者中的治疗效果评估基线时测量的生物标志物的预测效果。提供了Kaplan-Meier曲线和Forest图的标准输出。另外,评估生物标志物高或低组内的分组内的选择偏倚。

[0153] C. 结果

[0154] 患者人口统计数据

[0155] 对于给定的生物标志物,BEP群体包括随机化并且具有基线时的无缺生物标志物

数据的所有受试者。非生物标志物群体定义为对生物标志物可评估群体的补充。对于此研究, BEP包括具有无缺CD31RNA数据的患者。通过治疗组汇总了关键人口统计数据和基线特征(包括分层变量和具有已知预后意义的任何变量)和效力结果,并且在生物标志物和意图治疗(ITT)群体之间比较以调查与生物标志物的缺失的状态有关的任何潜在的选择偏倚。在本研究中, ITT(N=1852)和BEP(N=1438)群体之间的无进展存活(PFS)和总体存活(OS)是相当的。表1中显示了ITT和BEP群体中的患者人口统计数据的详情。

[0156] 表1: ITT对BEP患者人口统计数据

	CPP		CPB15		CPB15+	
	ITT	TCB31NV	ITT	TCB31NV	ITT	TCB31NV
GOG表现状态						
总计	625	483	625	463	623	492
0	311 (49.76%)	254 (48.45%)	314 (50.34%)	242 (52.27%)	307 (49.28%)	246 (50%)
1或2	314 (50.24%)	229 (47.55%)	311 (49.76%)	221 (47.73%)	316 (50.72%)	246 (50%)
阶段						
总计	625	483	625	463	623	492
III期, 最佳制体	219 (35.04%)	163 (33.73%)	204 (32.64%)	152 (32.83%)	215 (34.67%)	165 (33.54%)
III期, 亚最佳制体	253 (40.48%)	200 (41.41%)	256 (40.96%)	183 (39.52%)	242 (38.84%)	200 (40.65%)
IV期	153 (24.48%)	120 (24.84%)	165 (26.4%)	128 (27.65%)	166 (26.48%)	127 (25.81%)
残留疾病大小						
N	625	483	625	463	623	492
均值	2.57	2.69	2.5	2.59	2.63	2.67
SD	3.49	3.66	3.5	3.78	3.77	3.88
中值	1.5	1.5	1.5	1.4	1.5	1.5
最小-最大	0...30	0...30	0...30	0...30	0...30	0...30
腹水						
总计	625	483	625	463	623	492
未知	17 (3.72%)	13 (2.69%)	34 (5.44%)	17 (3.67%)	13 (2.09%)	11 (2.24%)
否	154 (24.64%)	121 (25.05%)	141 (22.56%)	101 (21.81%)	165 (26.48%)	133 (27.02%)
是	454 (72.64%)	349 (72.26%)	460 (73.6%)	345 (74.51%)	445 (71.43%)	349 (70.73%)
可测量的疾病						
总计	625	483	625	463	623	492
否	229 (36.64%)	162 (33.54%)	232 (37.12%)	173 (37.37%)	230 (35.31%)	176 (35.77%)
是	396 (63.36%)	321 (66.46%)	393 (62.88%)	290 (62.63%)	403 (64.69%)	316 (64.22%)
基线CA-125						
总计	625	483	625	463	623	492
异常	590 (94.4%)	467 (94.82%)	586 (93.76%)	439 (94.82%)	592 (95.02%)	467 (94.92%)
正常	35 (5.6%)	26 (5.38%)	39 (6.24%)	24 (5.18%)	31 (4.98%)	25 (5.08%)

[0158] CD31免疫组织化学方法

[0159] 使用CD31的免疫组织化学染色检测血管。CD31染色来自不同类型的血管的内皮, 包括淋巴血管和肝窦内皮细胞。经CD31染色的结构的形状范围为线样(纵向切割毛细管)至单细胞样(横截毛细管)。使用Ventana **Benchmark®** XT平台(Ventana, Tucson, Ariz. USA)实施CD31(PECAM-1)的免疫组织化学检测。通过使用来自Ventana的小鼠单克隆抗体(克隆1A10)显现CD31的检测。免疫组织化学是用于检测组织(在此情况中为经福尔马林固定的、经石蜡包埋的组织)中靶抗原(例如CD31)的存在或缺乏的半定量方法。简言之, 使用用ultra view™ Universal DAB检测试剂盒的方案号91。在脱石蜡处理和再水合后, 通过于37℃温育抗CD31抗体32分钟实施抗体恢复。对每个IHC测定法准备验证报告, 其显示了准确性、特异性、线性、和精确性(可再现性和可重复性)。记录外部对照载玻片和内在对照元件的染色。如下更详细描述这些方法。

[0160] 通过测定固定组织样品中的血管数目(每mm²的数目)和血管的体积分数(以%计)评估CD31血管染色。一般地, 使用基于体视学的方法对视场进行系统性一致随机取样以评分CD31染色。20x放大率或40x放大率用15ROI的最大值选择最小值3的感兴趣区域(ROI)。

[0161] 在图像顶部放置网格以容许评估。然后, 将选定的ROI图像与预先得定的网格组合。通过对网格点计数评估体积分数, 所述网格点通过落在感兴趣的组织、细胞或结构顶部

的计数网络的交叉线形成。此分数代表感兴趣的组织、细胞或结构的体积密度。通常,仅考虑交叉(或网格点)的右上角。不计数位于明显的组织撕裂内或肿瘤组织外的网格点。计数肿瘤结构内的小的坏死区,因为认为它们是肿瘤的部分。还计数位于血管腔内的网格点。仅分析>75%的区域由组织组成的网格(例如25个网格点中 ≥ 19 或81个网格点中 ≥ 61)。若情况不是这样,则自分析省略该区域。

[0162] 在发现染色的内皮细胞或血管腔位于网格点右上角内时,针对V血管计数网格点(代表血管的网格点的量)。在仅染色大血管的单一内皮细胞时,构成此血管的所有其它内皮细胞在它们填充网格点的右上角时针对V血管计数。在染色的感兴趣的细胞或结构填充网格点右上角时,针对V计数网格点(代表其它细胞群体或结构的网格点的量)。由于其它感兴趣的细胞群体或结构可以随染色而变化,在评分表中限定对V计数的其它细胞或结构。

[0163] 对于N(血管数目)的估计,就体积分数的测定而言使用相同的网格。光栅网格的外边界描绘了具有给定面积的计数室。不计数穿过网格左边线或底部线的血管结构。若血管结构仅在网格内染色,但清楚的是血管越过边界,则不对它计数。在组织切片中,计数具有清楚的腔的血管。还计数没有具有血管外观的腔的染色结构。对于一些染色测定法,需要进一步区别弱和强染色强度。

[0164] 肿瘤VEGFA免疫组织化学方法

[0165] 使用Autostainer和PT模块仪器进行肿瘤VEGFA的免疫组织化学检测。用于检测肿瘤VEGFA的一抗是R547(abcam-ab27620(HGX-R547))。抗体是针对人VEGFA的N端部分生成的预稀释的兔单克隆抗体(SP28)。使用的免疫原序列与其它VEGF同种型(包括VEGF-B、VEGF-C和VEGF-D)共享约30-40%的同一性。通过遵循HistoGeneX染色方案针对肿瘤VEGFA染色石蜡包埋组织。检测/评分的最低阳性是通过特定评分系统测定的预设置的检测限,并且设置为以最弱染色强度1+染色的细胞的1%,进一步如下描述。为了确保在线性区域中实施染色,不用不同浓度一抗实施实验。使用来自Dako(N1699)的N通用阴性对照兔IgG作为阴性对照。对IgG对照检查VEGFA免疫反应性,并且呈VEGFA阴性,而阳性样品在肿瘤细胞中以及人胎盘中的合体滋养层中显示清楚且强烈的胞质VEGFA阳性。每个染色运行仅实施一次阴性外部对照。

[0166] 使用其中显示膜、胞质或核染色的细胞百分比与其染色强度组合评分的系统评估肿瘤VEGFA染色。自评分矩阵提取最终结果并报告。根据方案,测定需要评估的组织部分,例如肿瘤的侵入性部分、整个肿瘤,原位癌等。另外,根据方案,测定需要评分的细胞区室(例如膜、胞质或核)。通常,分开评分细胞区室。

[0167] 评分包括染色强度的评估和在任何强度时阳性染色的细胞的比例。对于膜染色,还报告了完全基底外侧或完全染色的模式。将染色信号分成4种不同强度类别:0=无染色;1+=弱染色(在高倍放大率时可见);2+=中间(或中等)染色(在低倍放大率时可见);3+=强染色(即使在低倍放大率时也是明显的)。

[0168] 对于每个强度,评分染色的比例(百分比)。一起的所有强度的最大百分比(即所有强度时的所有百分比之和)必须为100%。一般地,分配染色强度和百分比的经验法则是:a)鉴定最主要的染色强度,并对其分配某个%;b)定义最低染色的%;c)在最低和最高类别之间分开剩余%;d)当染色阳性在0和10%之间时,推荐1%的准确性;e)当染色阳性超过10%时,建议5%的准确性。评分视场数目(ROI)选择为最佳(对于大组织样品,推荐至少10个

ROI), 并且依照基于体视学的随机样品方法选择系统一致随机。使用0、1+、2+、3+量表评分显示膜染色、胞质染色和核染色中每项的肿瘤细胞的百分比, 总计为100%。根据具体方案, 还使用用于表征染色模式的别的得分, 例如膜染色的完整性。当评分膜百分比时, 对于每个强度评估完全基底外侧或完全膜染色的百分比。仅在分化良好的腺癌中找到完全基底外侧染色。完全基底外侧染色指细胞的基底和两侧的染色。

[0169] 最终数据集基于如上文概述的观察结果。为了其它目的, 可以进行自最终数据的再计算以产生H得分、IRS得分或Allred得分。这些评分系统组合比例和强度评分两者以产生解读疗法有效性的类别。这些不同评分方法的再计算如下, 并且可以包含在数据库中:

[0170] H得分: 对于H得分, 将百分比乘以染色强度。产生的最高H得分为300。然后, 将阳性分为四类, 如下解读: 0-50=阴性; 51-100=弱阳性; 101-200=中等阳性; 201-300=强阳性。

[0171] IRS得分: IRS得分是观察到的阳性的最高百分比之和, 并与其染色强度的得分相乘。产生的最高IRS得分为12。然后, 将阳性分为五类, 如下解读: 0-1=阴性; 2-3=弱阳性; 4-8=中等阳性; 9-12=强阳性。

[0172] Allred得分/Quick得分: Allred得分或Quick得分是具有最高阳性百分比的得分与其染色强度得分的和。产生的最高的Allred得分或Quick得分是8。然后, 将解读对于Allred得分分为两类: 0-2=阴性; 3-8=阳性, 以及对于Quick得分分为四类: 0-1=阴性; 2-3=弱阳性; 4-6=中等阳性; 7-8=强阳性。

[0173] 生物标志物的性质

[0174] 在表2中概述了与血管发生和肿瘤发生相关的肿瘤组织免疫组织化学(IHC)生物标志物的调查。评估的IHC标志物揭示了两种特定生物标志物CD31和肿瘤VEGFA的升高的表达水平与接受卡铂和帕利他赛加同时且延长的贝伐单抗的受试者中改善的结果相关。

[0175] 表2: 评估的IHC标志物

[0176]

评估的 IHC 标志物

[0177]

- **CD31:** 泛内皮标志物。由 BEV 直接靶向的细胞区室的标志物
- **MVD INV** 血管密度的标准测量
- **MVF:** 每体积分数的微血管的评估

[0178]

2. **肿瘤 VEGFA (tVEGFA):** BEV 的分子靶物

[0179] 绘制基线时CD31的总体分布, 并用描述统计量(例如均值、标准差、中值和范围)汇总患者群体的基线生物标志物值(图2)。图3中显示了依照在规定截留时CD31和其它生物标志物的肿瘤细胞生物标志物表达, 患者亚组中的PFS的统计分析和Forest图。图7中显示了依照在规定截留时CD31和其它生物标志物的肿瘤细胞生物标志物表达, 患者亚组中的OS的统计分析和Forest图。就对生物标志物亚组内PFS的治疗效果的关联而言, 危害比指示所有患者亚组受益于贝伐单抗治疗(图3)。就对CD31和肿瘤VEGFA生物标志物亚组内OS的治疗效果的关联而言, 危害比指示具有高水平的CD31和/或肿瘤VEGFA的患者亚组(即高于中值或高于50%截留)受益于贝伐单抗治疗, 而具有低水平的CD31和/或肿瘤VEGFA的患者亚组(即, 低于中值或低于50%截留)在添加贝伐单抗的情况中不受益(图7)。

[0180] 治疗和CD31生物标志物效果

[0181] 进一步分析BEP群体内CD31的表达,并且在图4-6和8-11中显示。与CD31生物标志物亚组中在PFS效果的图3中显示的结果一致,基于%截留的患者亚组的四分位数分析确认,随着CD31表达水平升高,PFS也随着贝伐单抗治疗而改善(例如,如由危害比指示)(图5和图6)。图4中显示了CD31亚组在50%截留时PFS概率的Kaplan-Meier曲线。表达高CD31水平的患者展现出来自用贝伐单抗治疗的最大PFS益处,而显示在仅用卡铂-帕利他赛化疗方案治疗时的相同患者群体具有最差PFS预后。与仅用卡铂-帕利他赛治疗的表达低CD31水平的患者相比,表达低CD31水平的患者也获得用贝伐单抗的一些PFS益处。类似地,与CD31生物标志物亚组中的OS效果的图7中显示的结果一致,基于%截留的患者亚组的四分位数分析确认,随着CD31表达水平升高,用贝伐单抗治疗看到OS的明显改善(图8和10),在75%截留的情况中看到最大效果。由50%(图9A)和75%(图9B)截留定义的CD31亚组的存活概率的Kaplan-Meier曲线确认了在75%截留时在表达高CD31的患者中看到的增强的贝伐单抗治疗效果(图9B)。

[0182] 图11中显示的STEPP分析使用滑动窗方法来证明CD31表达水平与PFS和OS的危害比的关联。对于PFS,每个亚组中包含的患者(以中间实线表示)的危害比低于1.0,指示所有患者均获得来自贝伐单抗治疗的一些益处。然而,表达高水平CD31(CD31表达的前50%)的患者得到较大的来自贝伐单抗治疗的益处。就OS而言,高于约75%的CD31表达范围的患者(以中间实线表示)的危害比低于1.0,指示仅在高于约75%的CD31表达范围的患者中看到较大的益处。结果一起提示较高的CD31水平(即高于中值或高于CD31表达范围的50%)与经贝伐单抗治疗的患者中较长的PFS和OS两者相关。如此,数据支持CD31作为卵巢癌中改善的PFS和OS和增加的贝伐单抗功效的预测性生物标志物。

[0183] 治疗和肿瘤VEGFA生物标志物效果

[0184] 进一步分析BEP群体内肿瘤VEGFA的表达,并且在图12-17中详述。与CD31生物标志物效果形成对比,在50%截留(即CD31表达范围的前50%)时看到观察到的益处的情况中,在VEGFA表达的75%截留(即肿瘤VEGFA表达范围的前25%)时找到用贝伐单抗治疗观察到的PFS和OS的益处。如此,表达高水平VEGFA(即高于50%截留,特别是高于75%截留)的患者展现出来自用贝伐单抗治疗的最大PFS和OS(图12-14)。基于%截留对患者亚组中PFS的治疗效果的四分位数分析确认,一般地,具有高水平肿瘤VEGFA表达(即高于规定的%截留)的患者受益于用贝伐单抗的治疗(图15)。基于%截留对患者亚组中OS的治疗效果的四分位数分析显示了高水平的肿瘤VEGFA表达(特别是在50%和75%截留时)导致在用贝伐单抗治疗时OS的显著改善(图16)。

[0185] 图17中显示的STEPP分析使用滑动窗方法来证明肿瘤VEGFA表达水平与PFS和OS的危害比的关联。对于PFS,由中间实线表示的每个亚组中包括的患者的危害比低于1.0,指示所有患者获得来自贝伐单抗治疗的一些益处。就OS而言,高于约75%肿瘤VEGFA表达范围的患者(以中间实线表示)的危害比低于1.0,指示高于肿瘤VEGFA表达范围的约75%的较大益处(图17)。此外,滑动窗分析提示对于PFS比对于OS的更高的最佳肿瘤VEGFA截留。这些结果一起提示理论肿瘤VEGFA可以充当卵巢癌中改善的PFS和OS和增加的贝伐单抗功效的预测性生物标志物。

[0186] 虽然已经为了理解清楚的目的通过例示和实施例相当详细地描述了前述发明,但

是描述和实施例不应解释为限制本发明的范围。为了所有目的通过提及完整明确收录本文中引用的所有专利、专利申请、科学参考文献的公开内容,就像通过提及明确且单独收录每篇专利、专利申请、科学参考文献一样。

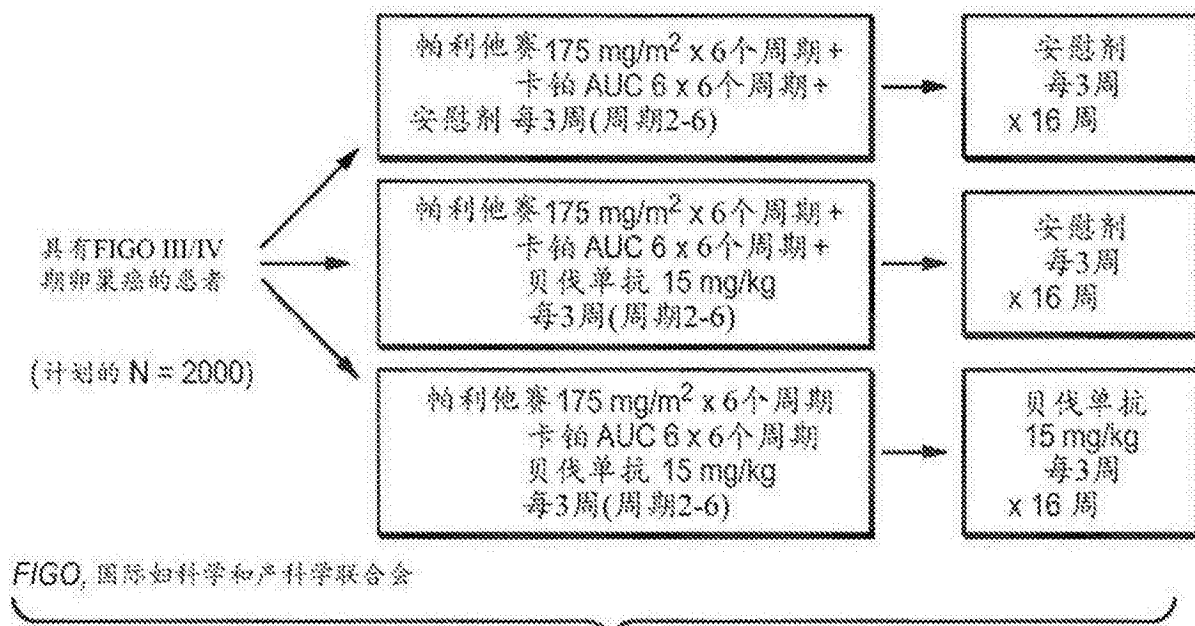


图1

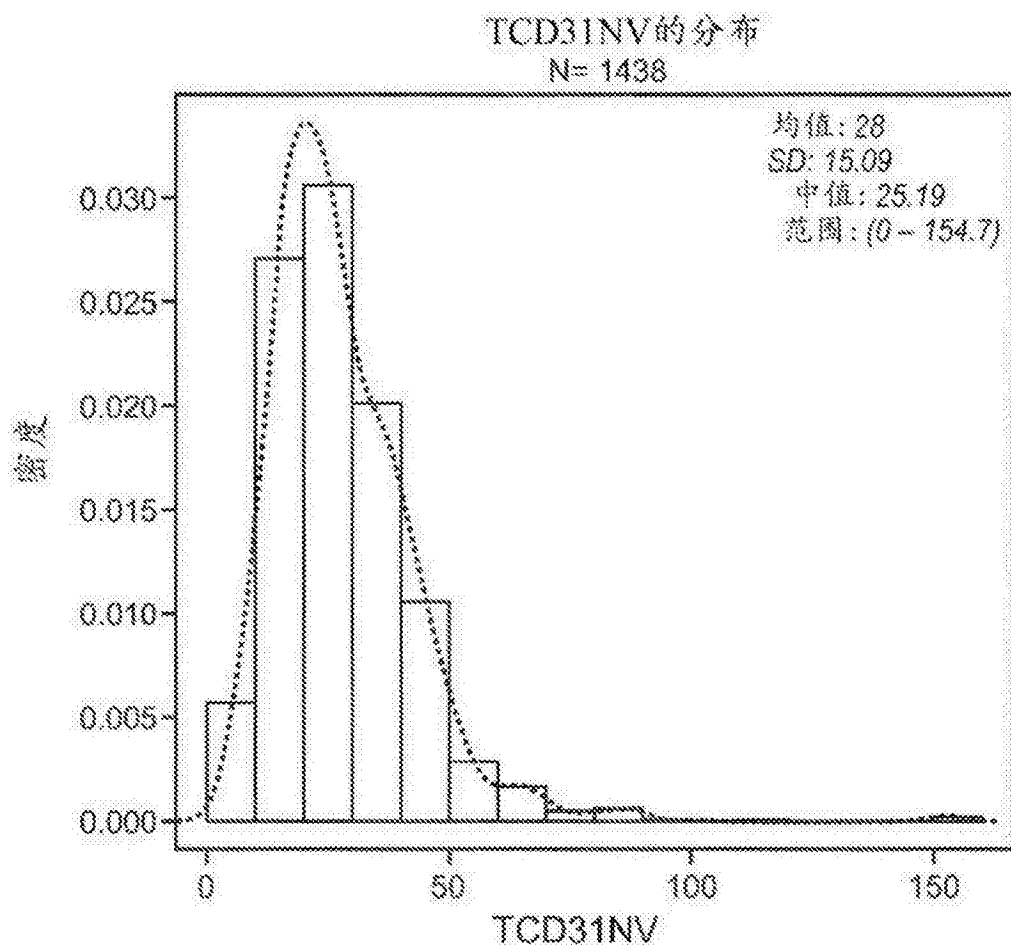


图2

亚组内治疗效果与TTMPFS的关联

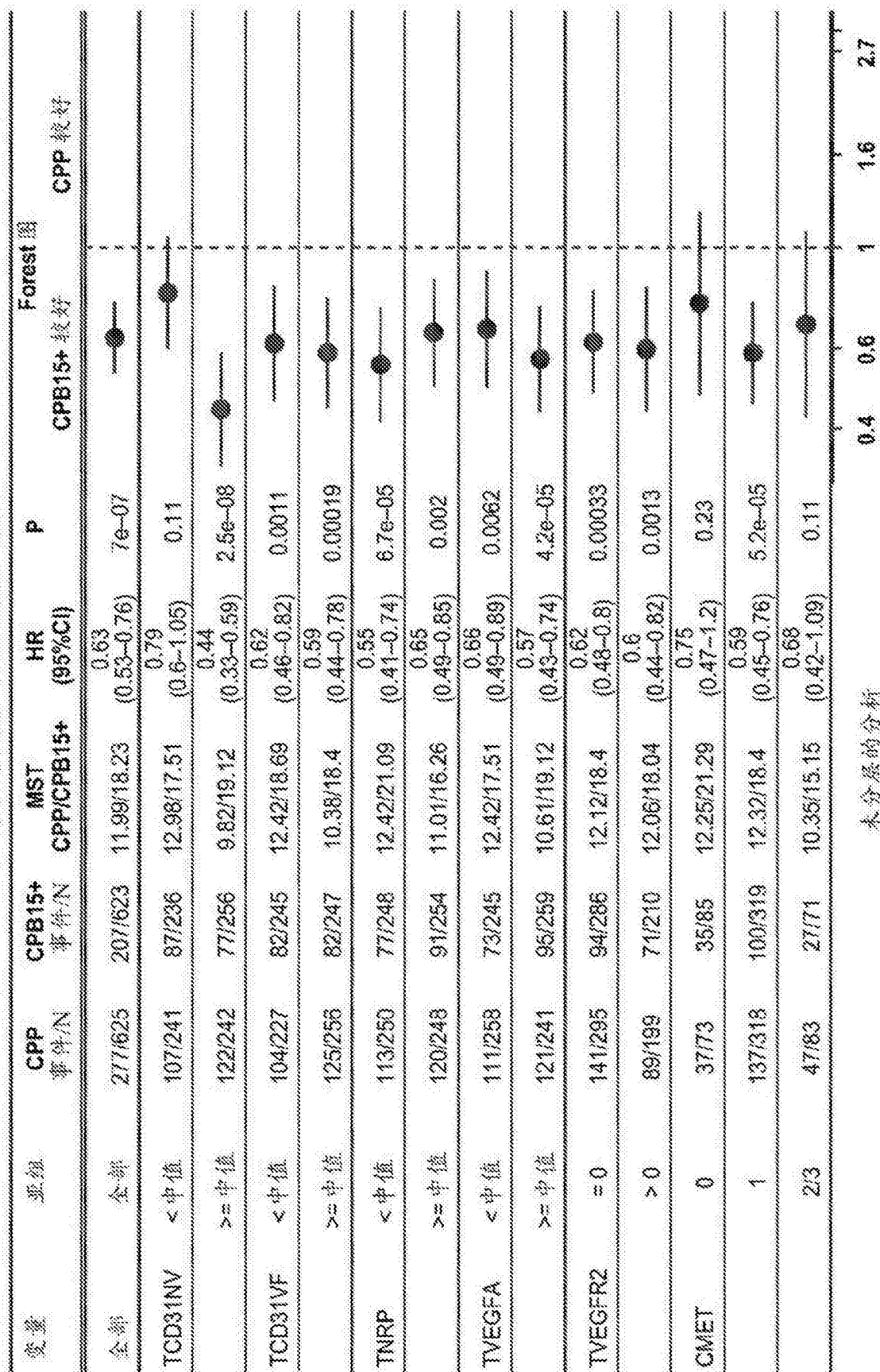


图3

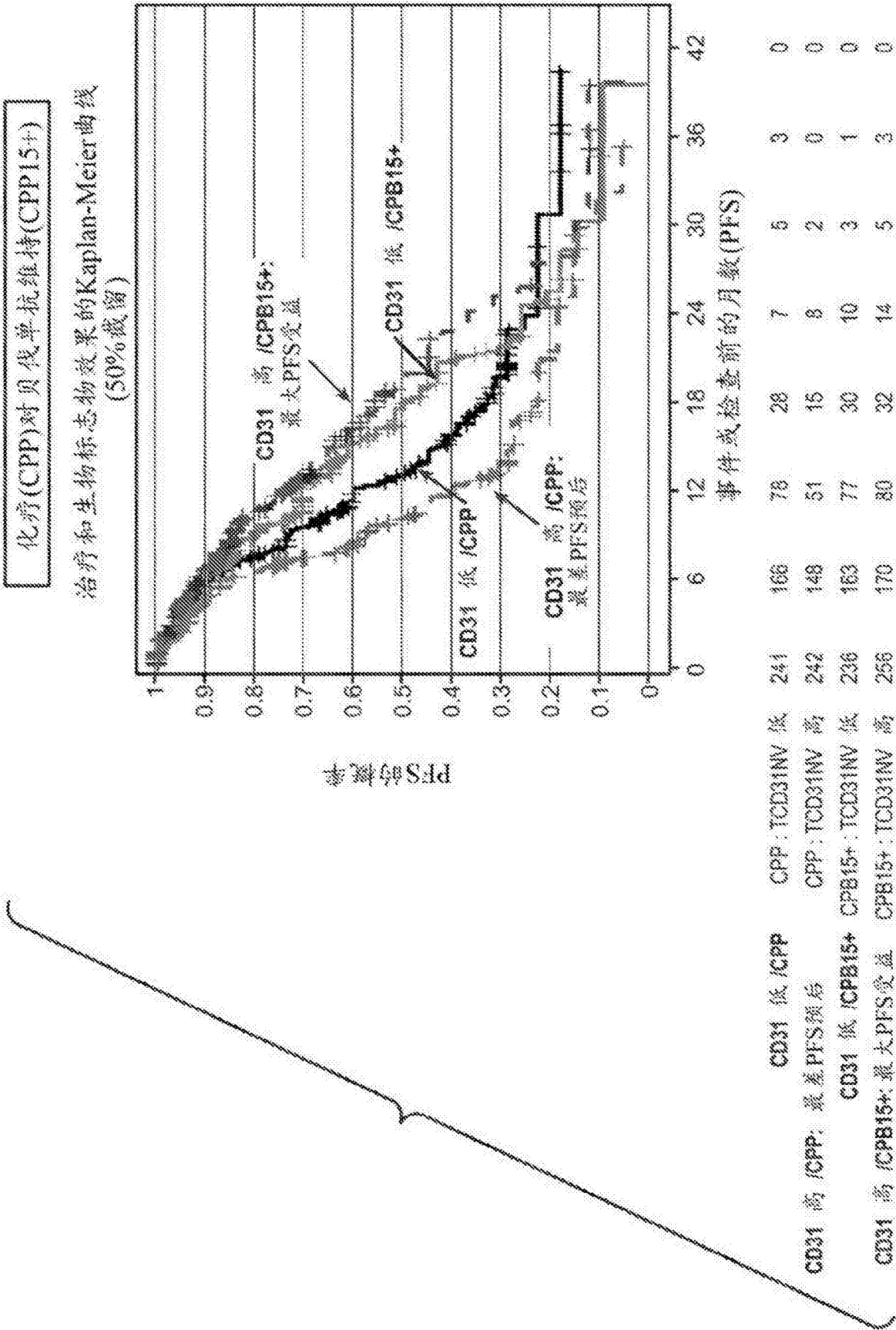


图4

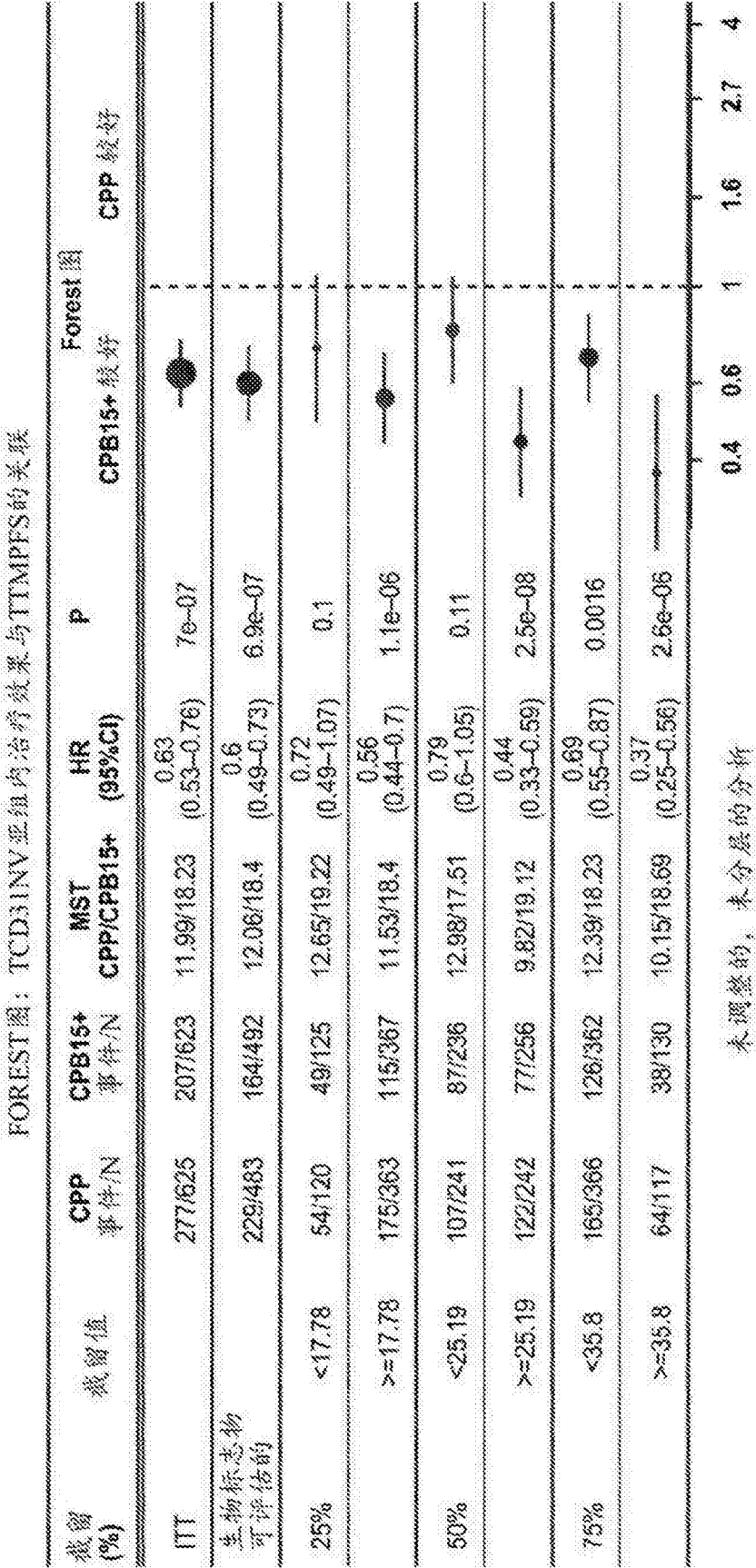


图5

CPP 对 CPB15+	生物标志物低亚组				
	BM 水平	PFS HR	CI	P值	Bonferroni 修正
	低 (底部50%)	0.77	(0.58;1.02)	0.0655	>0.05
	低 (底部75%)	0.67	(0.53;0.84)	0.000711*	<0.05
	生物标志物高亚组				
	BM 水平	PFS HR	CI	P值	Bonferroni 修正
	高 (顶部50%)	0.45	(0.34;0.6)	3.81e-08*	<0.05
	高 (顶部75%)	0.39	(0.26;0.58)	4.05e-06*	<0.05

图6

亚组内治疗效果与TTMDIED的关联

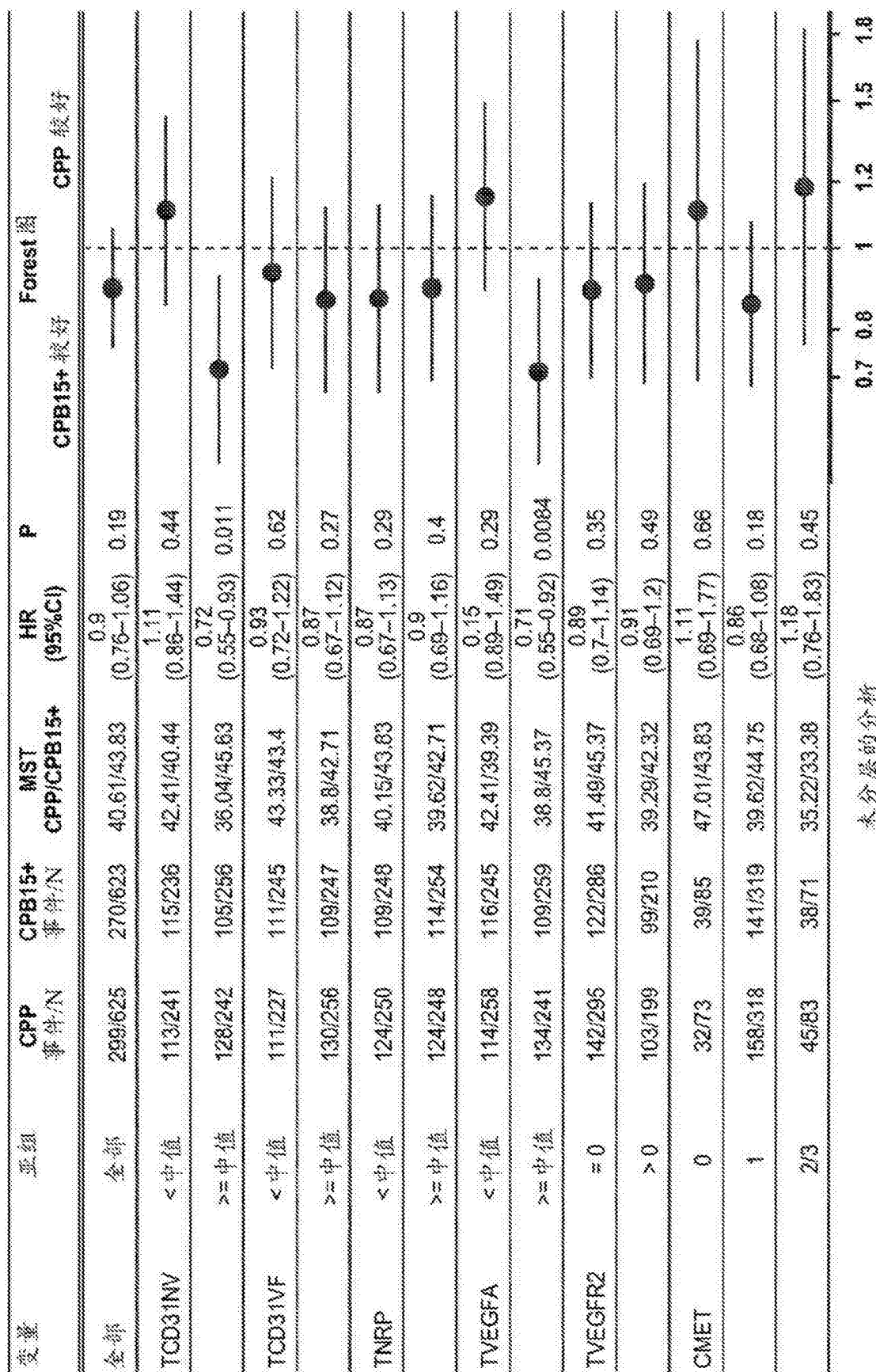


图7

FOREST图：ICD3INV亚组内治疗效果与TTMDIED的关联

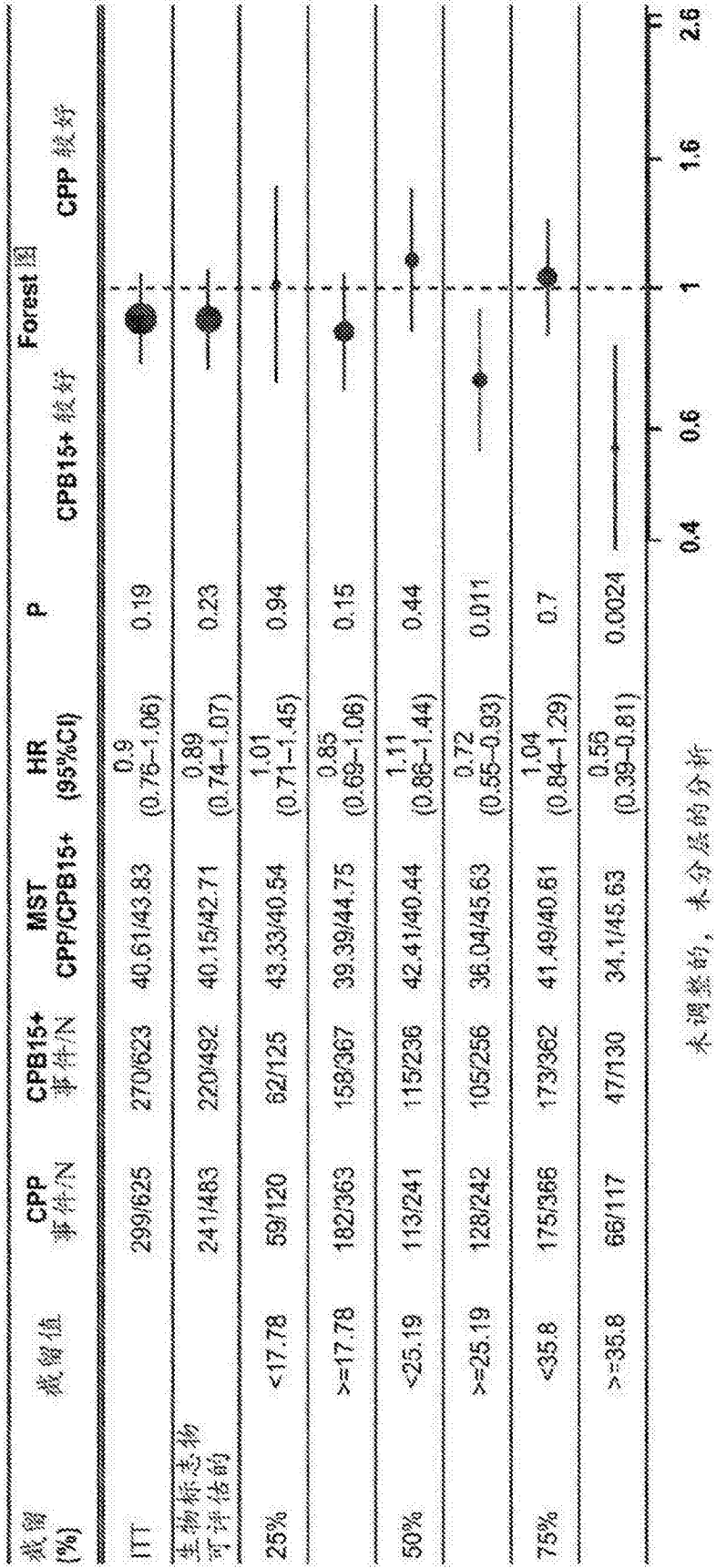


图8

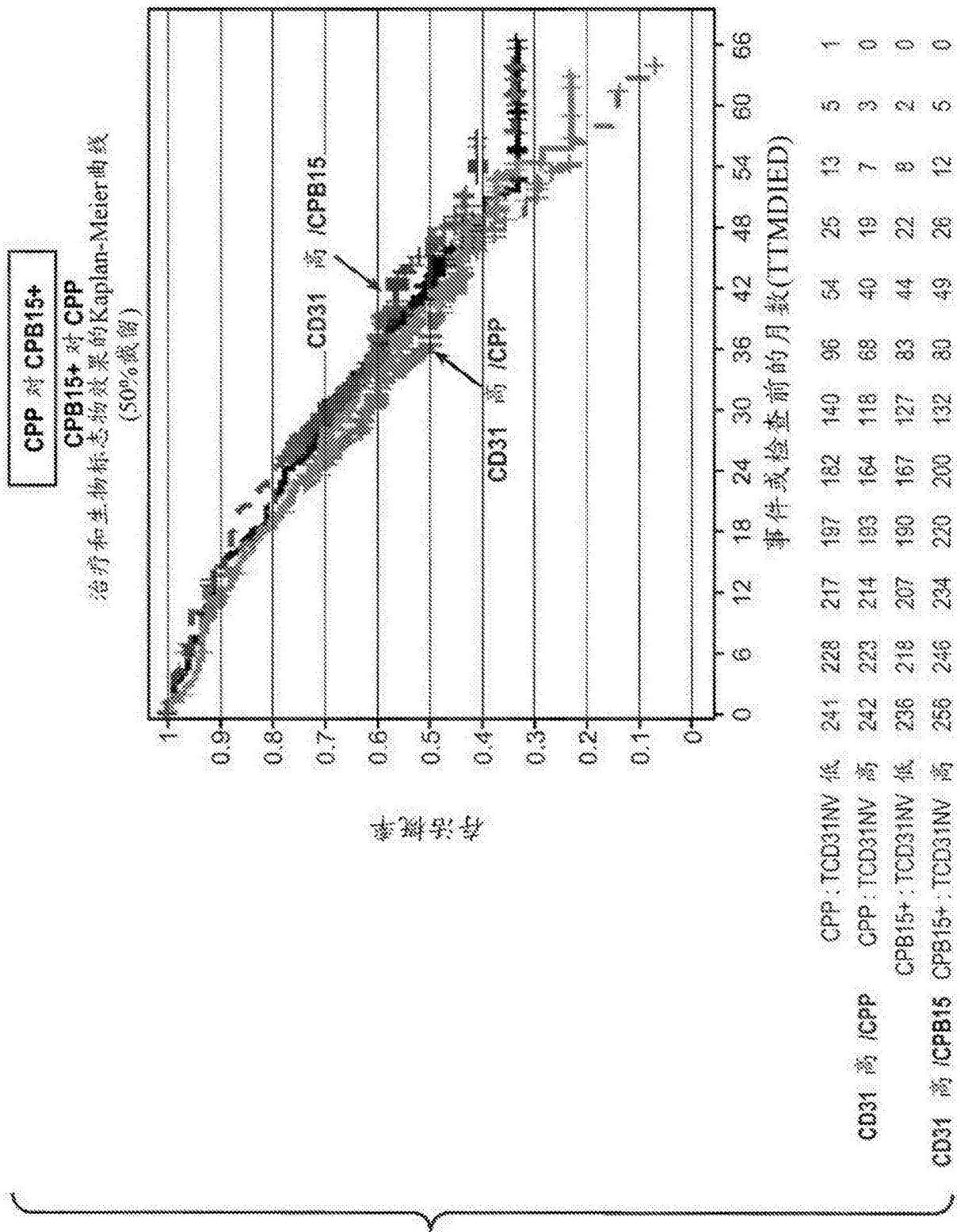


图9A

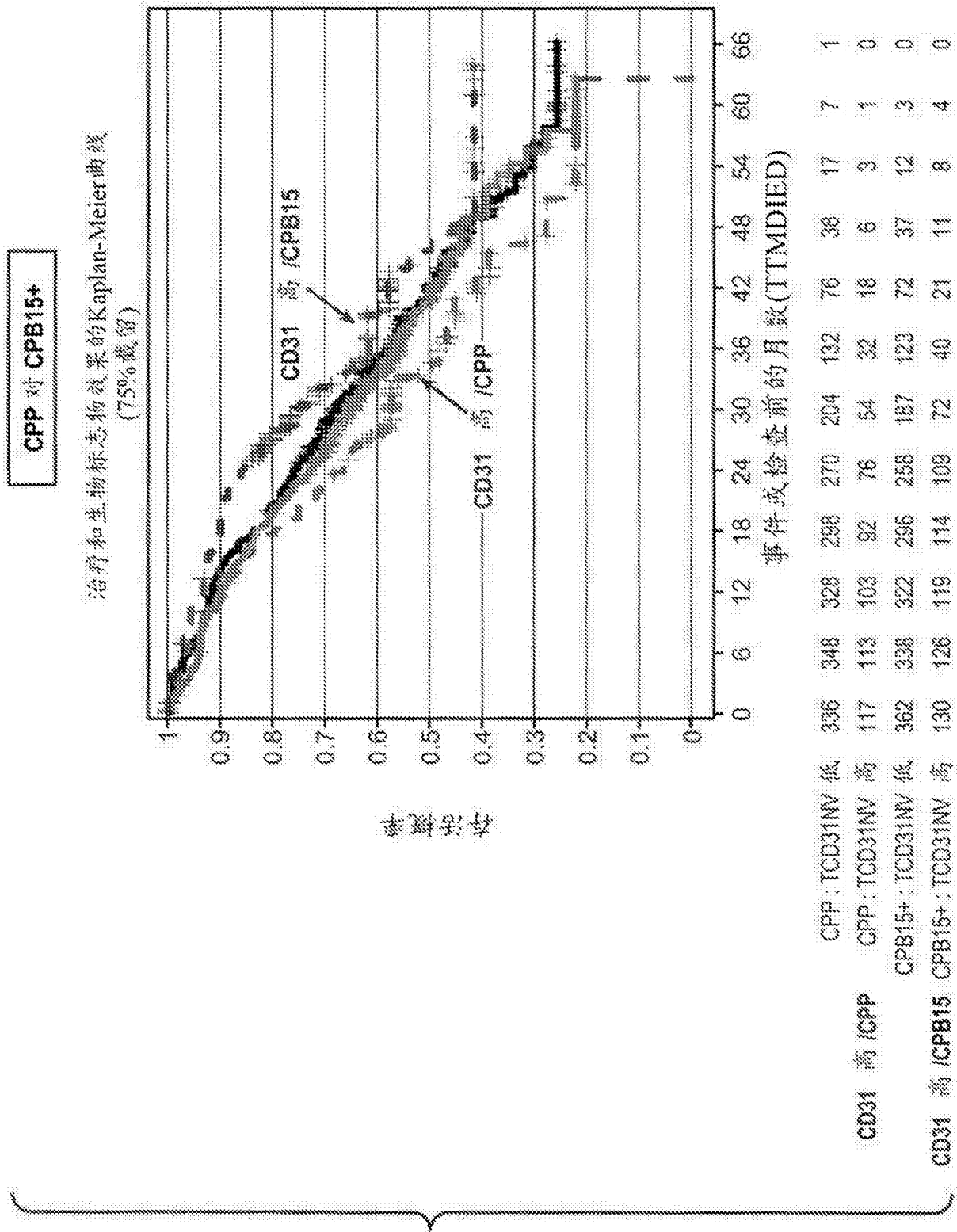


图9B

CPP 对 CPB15+	生物标志物低亚组				
	BM 水平	OS HR	CI	P值	Bonferroni 修正
	低 (底部50%)	1.08	(0.83;1.4)	0.551	>0.05
	低 (底部75%)	1.03	(0.83;1.27)	0.791	>0.05
	生物标志物高亚组				
	BM 水平	OS HR	CI	P值	Bonferroni 修正
	高 (顶部50%)	0.73	(0.56;0.94)	0.0155*	0.093
	高 (顶部75%)	0.56	(0.39;0.82)	0.00251*	0.01506 (<0.05)

图10

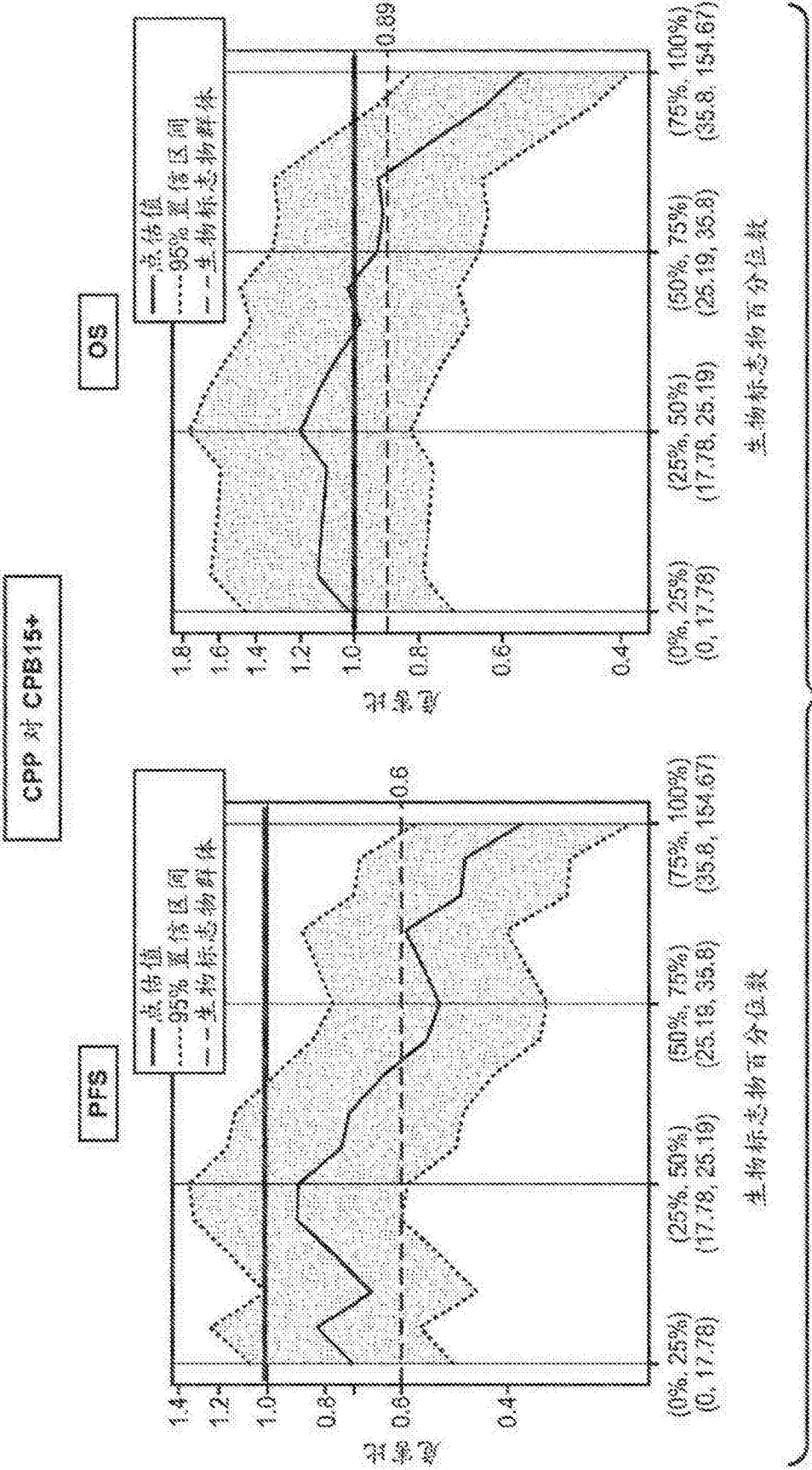


图11

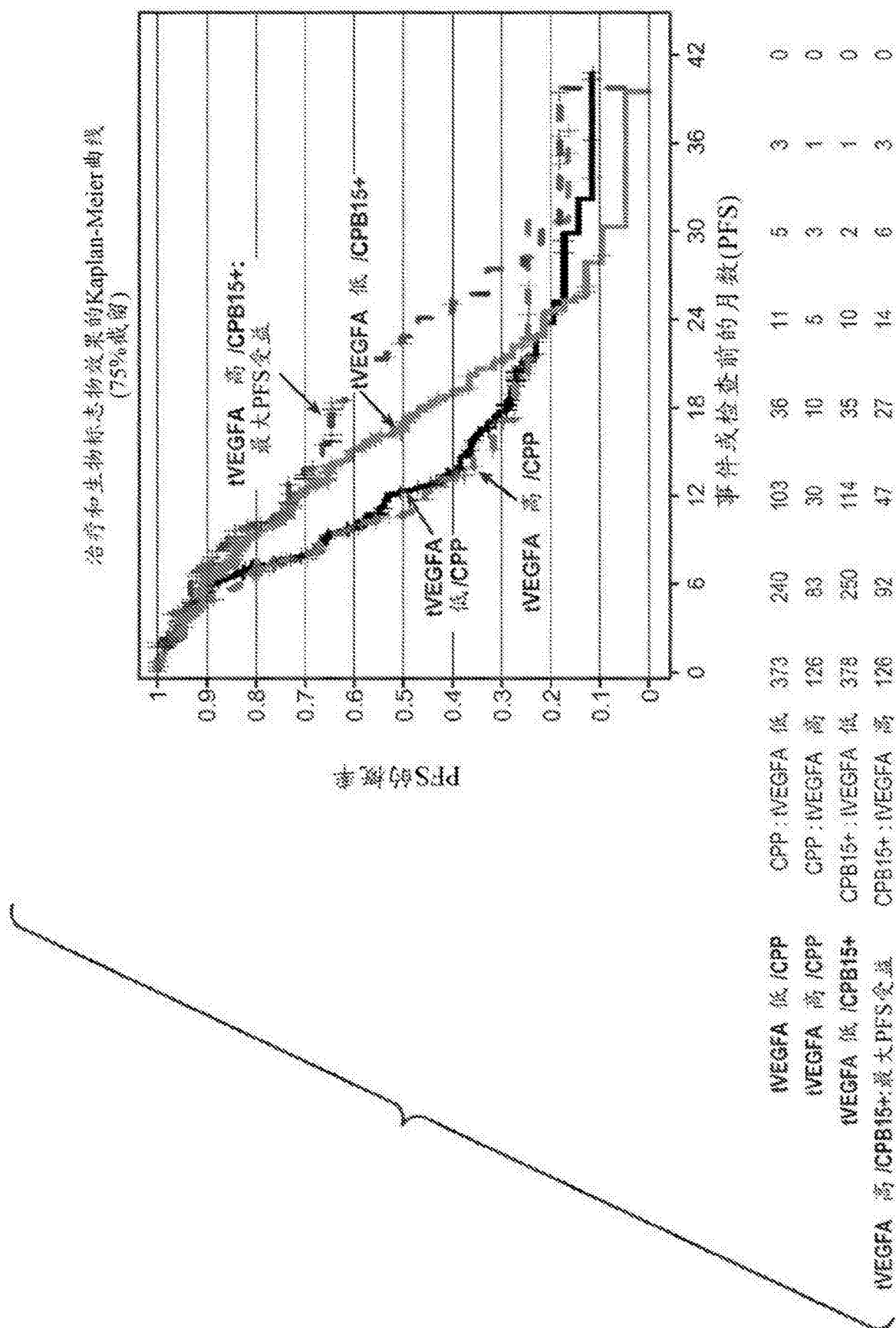


图12

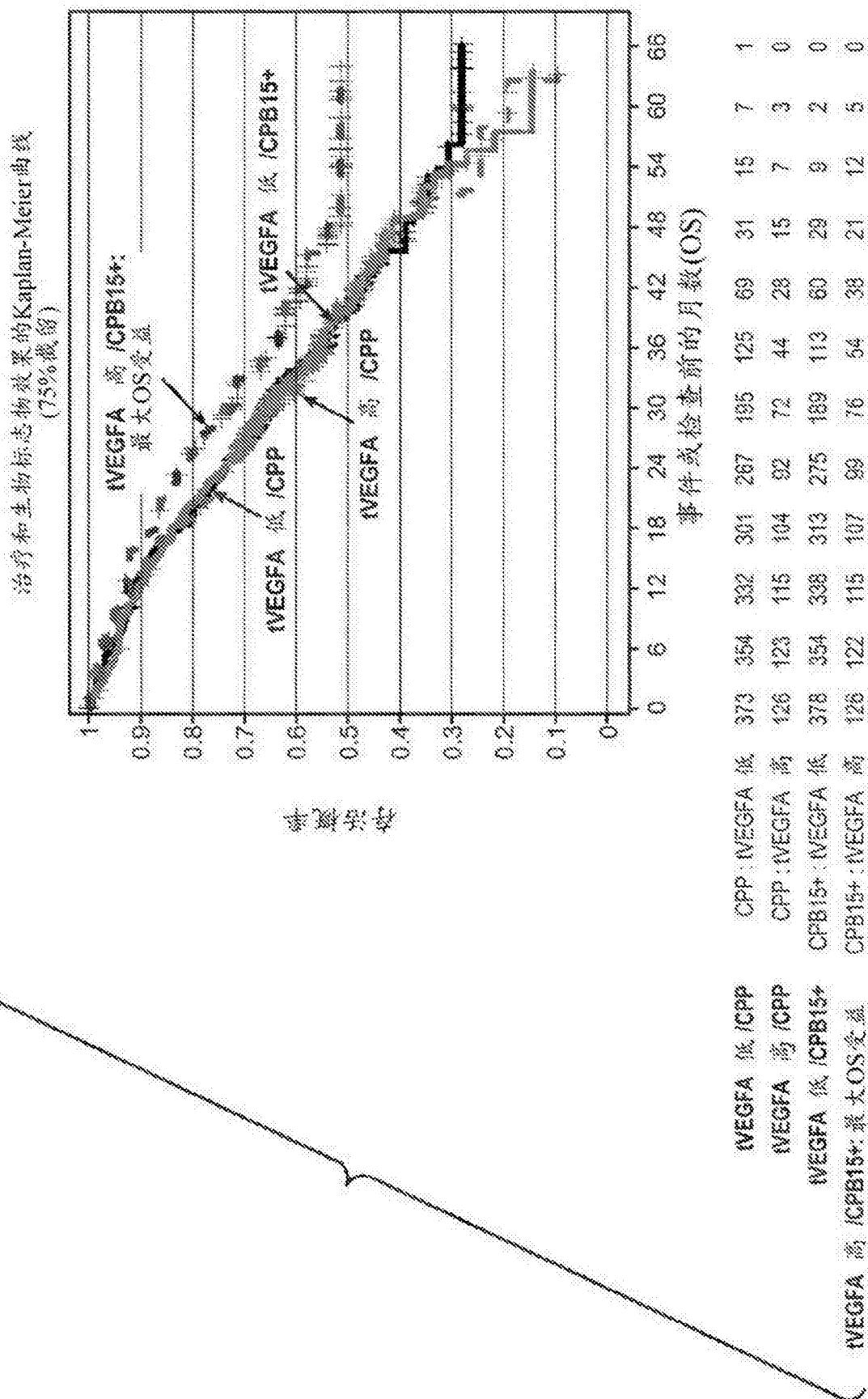


图13

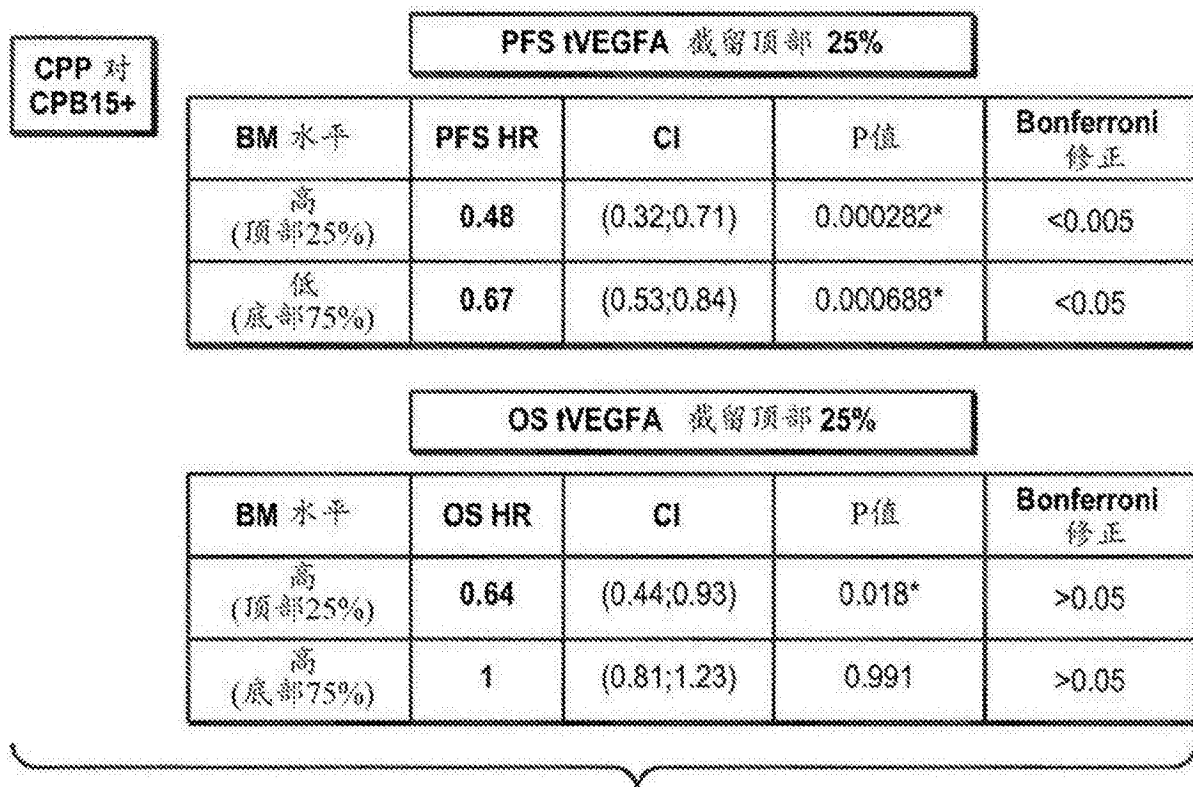


图14

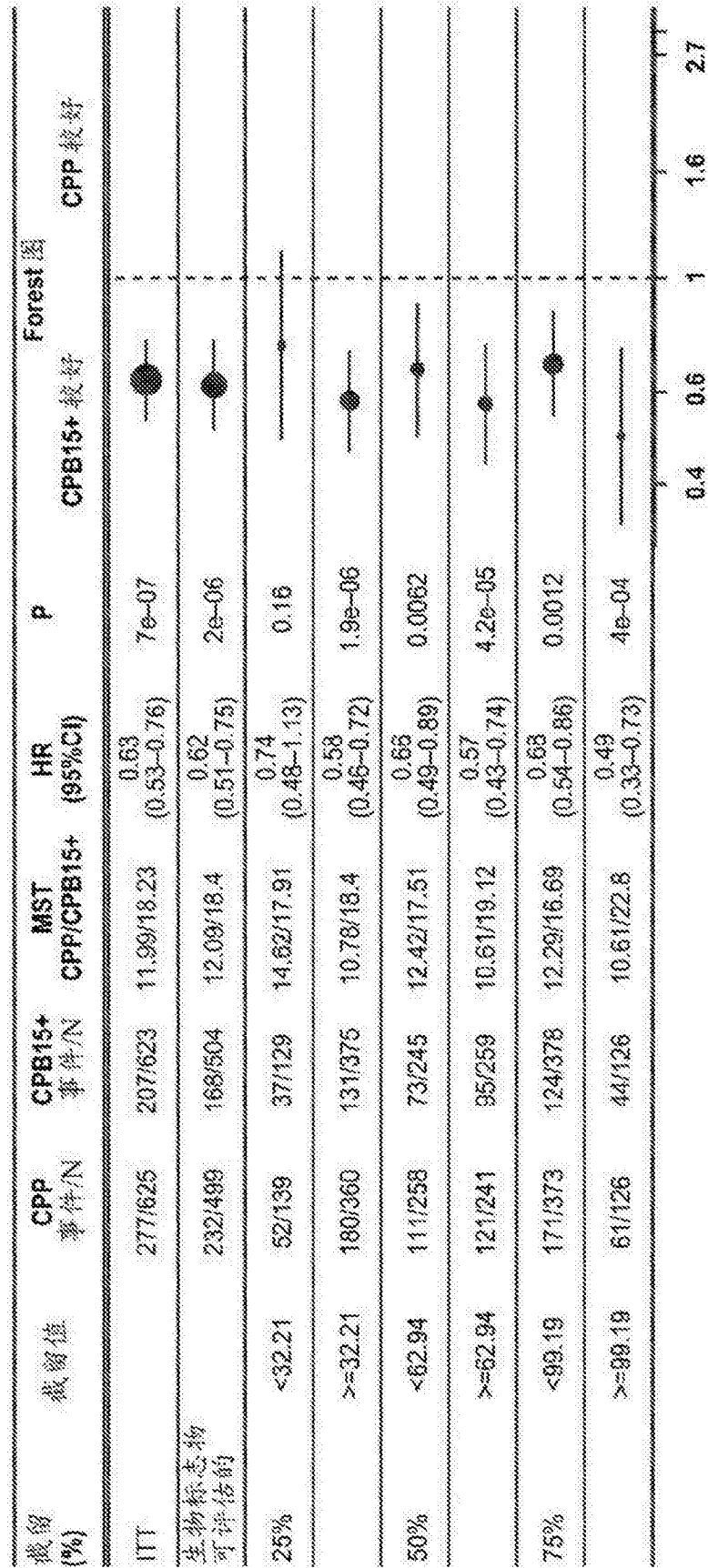


图15

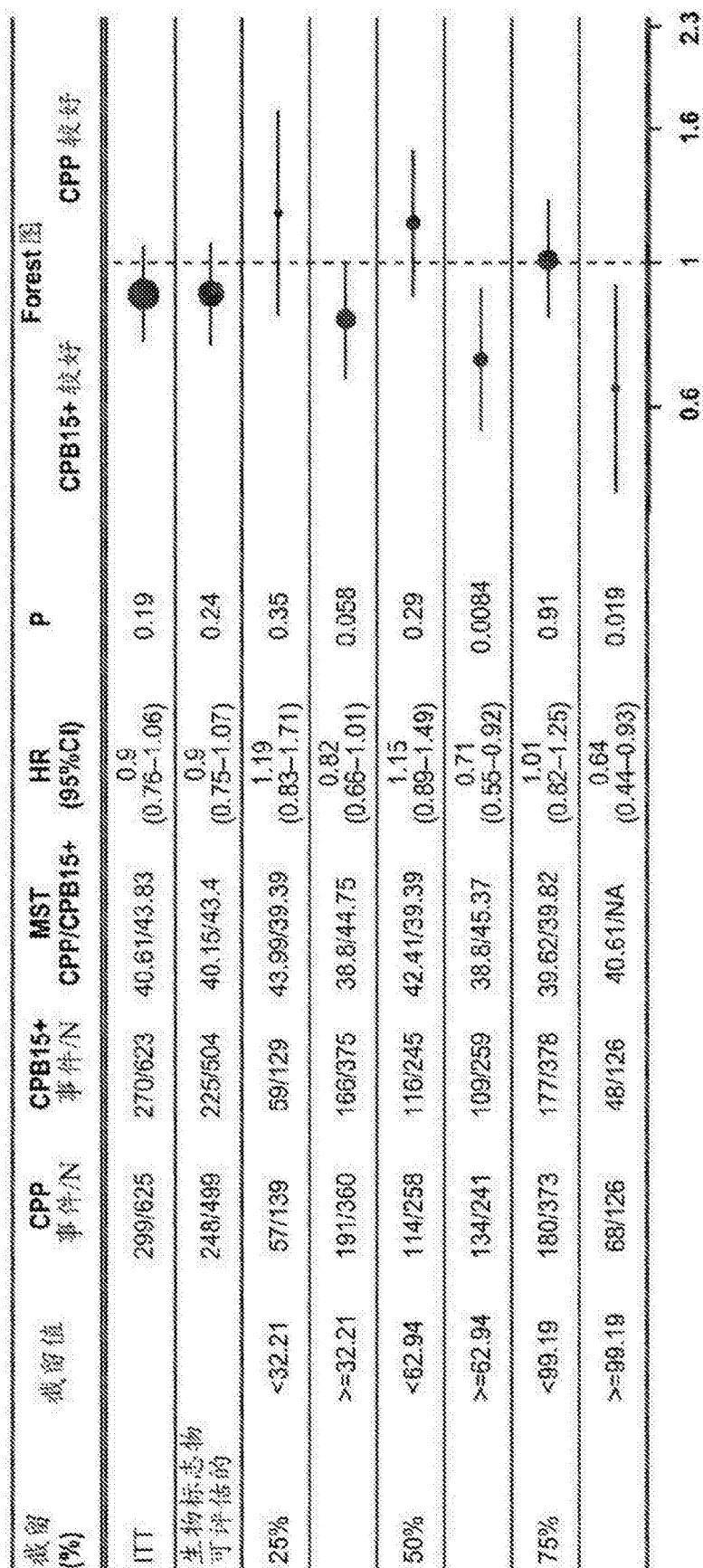


图16

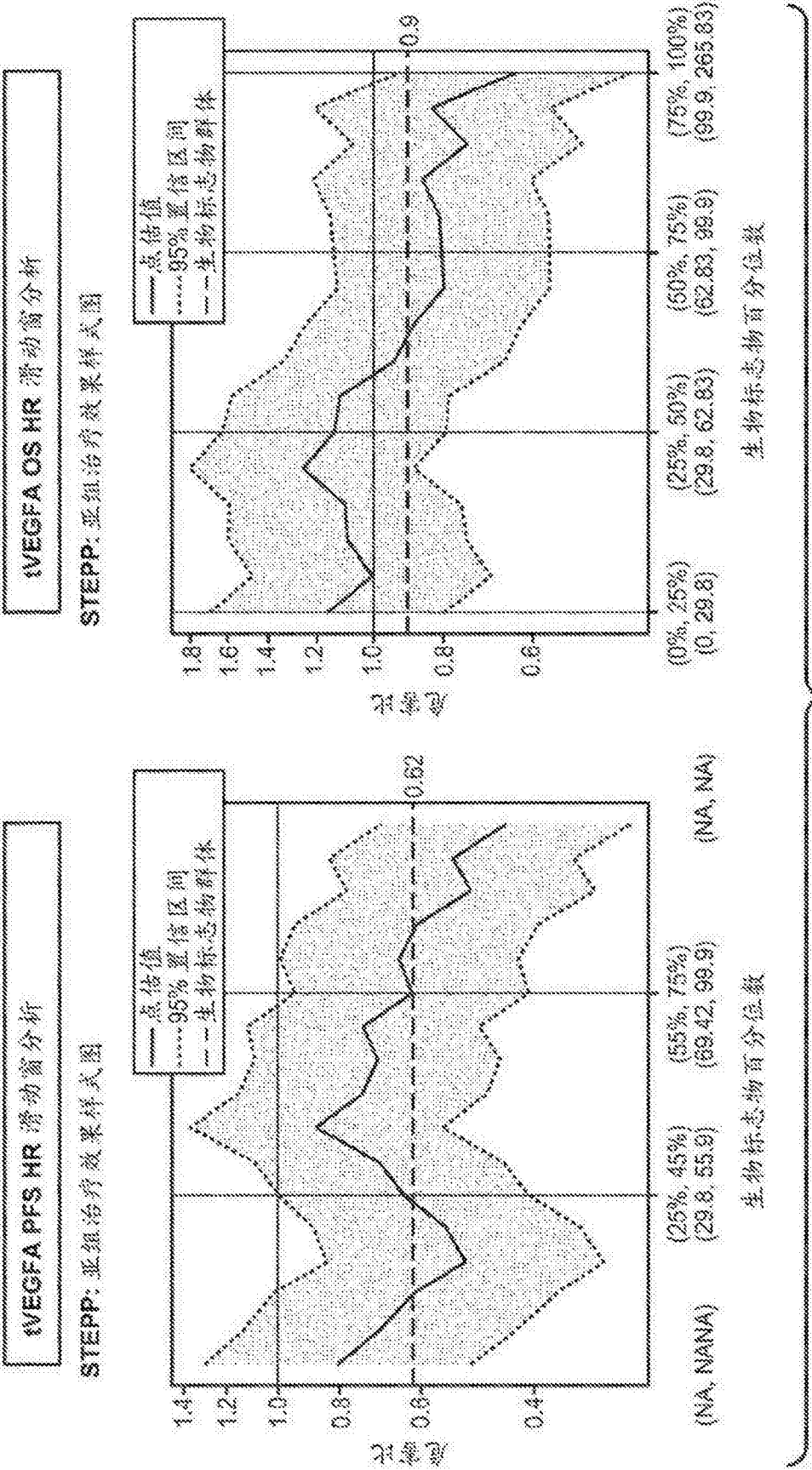


图17