(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113015747 A
(43)申请公布日 2021.06.22

(21)申请号 201980069047.4
(22)申请日 2019.10.18
(30)优先权数据
62/748114 2018.10.19 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.19
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/078327 2019.10.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/079209 EN 2020.04.23
(71)申请人 默克专利股份公司
地址 德国达姆施塔特
(72)发明人 G·马西米尼 I·策利克
J·施特劳布 R·布伦斯
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李志强 彭昶
(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 31/4745(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/04(2006.01)

权利要求书6页 说明书78页
序列表5页 附图9页

(54)发明名称

用于治疗结肠直肠癌的阿比妥单抗

(57)摘要

本发明涉及结肠直肠癌的治疗方法，所述治疗包括抗α-v整联蛋白(受体)抗体阿比妥单抗的施用。优选地，本发明涉及治疗结肠直肠癌、II-IV期结肠直肠癌、转移性结肠直肠癌、左侧结肠直肠癌和/或左侧转移性结肠直肠癌的方法，其包括向有此需要的患者施用所述阿比妥单抗。本发明还涉及阿比妥单抗用于制造用于治疗结肠直肠癌，优选如本文所述的结肠直肠癌的药剂的用途，和/或阿比妥单抗用于制造用于治疗结肠直肠癌的药剂的用途，所述药剂与合适的靶向疗法概念，例如生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体和/或化学疗法组合。

CN 113015747 A

1.一种治疗人的结肠直肠癌的方法,所述方法包括将阿比妥单抗施用于所述人,其中所述结肠直肠癌的特征在于高αvβ6整联蛋白表达。

2.一种治疗人的结肠直肠癌的方法,所述方法包括将阿比妥单抗施用于所述人,其中所述结肠直肠癌是左侧结肠直肠癌。

3.一种治疗左侧结肠直肠癌的方法,所述方法包括将阿比妥单抗施用于所述人,其中所述左侧结肠直肠癌的特征在于高αvβ6整联蛋白表达。

4.根据权利要求1、2或3的方法,其中所述人还接受至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体和/或化学疗法。

5.根据权利要求1、2、3和/或4的方法,其中所述结肠直肠癌是II期、III期或IV期结肠直肠癌。

6.根据权利要求1、2、3、4和/或5中一项或多项的方法,其中所述结肠直肠癌是转移性结肠直肠癌或左侧转移性结肠直肠癌。

7.根据权利要求1、2、3、4、5和/或6中一项或多项的方法,其中所述结肠直肠癌是特征在于高αvβ6整联蛋白表达的左侧结肠直肠癌或左侧转移性结肠直肠癌。

8.根据权利要求1至7中一项或多项的方法,其中所述结肠直肠癌是RAS野生型和/或KRAS野生型结肠直肠癌。

9.权利要求1至8中一项或多项的方法,其中所述结肠直肠癌是RAS野生型和/或KRAS野生型左侧结肠直肠癌、或者RAS野生型和/或KRAS野生型左侧转移性结肠直肠癌。

10.根据权利要求1至9中一项或多项的方法,其中所述结肠直肠癌是特征在于高αvβ6整联蛋白表达的II期、III期或IV期RAS野生型和/或KRAS野生型左侧结肠直肠癌、或者RAS野生型和/或KRAS野生型左侧转移性结肠直肠癌。

11.根据权利要求1至10中一项或多项的方法,其中所述结肠直肠癌是特征在于高αvβ6整联蛋白表达的RAS野生型和/或KRAS野生型左侧转移性结肠直肠癌。

12.根据权利要求1至11中一项或多项的方法,其中所述左侧结肠直肠癌是新近诊断的结肠直肠癌。

13.根据权利要求1至12中一项或多项的方法,其中所述方法在一线治疗设置下应用。

14.根据权利要求4至13中一项或多项的方法,其中所述方法在伴随治疗设置下应用。

15.根据权利要求4至14中一项或多项的方法,其中所述方法在辅助治疗设置下应用。

16.根据权利要求4至15中一项或多项的方法,其中所述方法在新辅助治疗设置下应用。

17.根据权利要求4至15中一项或多项的方法,其中所述人接受与所述阿比妥单抗伴随的所述至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体、和/或所述化学疗法。

18.根据权利要求4至16中一项或多项的方法,其中所述至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体包含西妥昔单抗、贝伐珠单抗和/或帕尼单抗。

19.根据权利要求4至18中一项或多项的方法,其中所述至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体选自西妥昔单抗和贝伐珠单抗。

20.根据权利要求5至18中一项或多项的方法,其中所述化学疗法包含选自以下的一种或多种化合物:伊立替康、氟尿嘧啶、替加氟/尿嘧啶(UFT)、亚叶酸、奥沙利铂、阿柏西普、瑞格非尼、卡培他滨及其前药、及它们的盐和溶剂化物。

21.根据权利要求4至20中一项或多项的方法,其中所述化学疗法根据FOLFIRI方案进行施用。

22. 根据权利要求4至20中一项或多项的方法,其中所述化学疗法根据FOLFOX方案进行施用。

23.根据权利要求4至22中一项或多项的方法,其中所述化学疗法包含

a)选自伊立替康、氟尿嘧啶(5-FU)和亚叶酸(甲酰四氢叶酸)的一种或多种化合物及其前药,

或者

b)选自奥沙利铂、氟尿嘧啶(5-FU)和亚叶酸(甲酰四氢叶酸)的一种或多种化合物及其前药,

及它们的盐和溶剂化物。

24. 根据权利要求1至23中一项或多项的方法,其中所述阿比妥单抗以每周375 mg至750 mg的量、每第二周750 mg至1500 mg的量、或每月1500 mg至3000 mg的量施用于所述人。

25. 根据权利要求1至24中一项或多项的方法,其中所述阿比妥单抗以每周约500 mg、每第二周约1000 mg、或每月约2000 mg的量施用于所述人。

26.根据权利要求1至25中一项或多项的方法,其中所述阿比妥单抗施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

27.根据权利要求1至26中一项或多项的方法,其中所述阿比妥单抗施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约2周的持续时间。

28. 根据权利要求4至27中一项或多项的方法,其中所述至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体以每周75 mg至1000 mg、每第二周150 mg至2000 mg、或每月300 mg至4000 mg的量施用于所述人。

29. 根据权利要求18至28中一项或多项的方法,其中所述西妥昔单抗以每周约150 mg/m^2至550 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m^2至1100 mg/m^2、或每月约600 mg/m^2至2200 mg/m^2的量施用于所述人。

30.根据权利要求18至29中一项或多项的方法,其中所述西妥昔单抗施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

31.根据权利要求18至30中一项或多项的方法,其中所述西妥昔单抗施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约2周的持续时间,其中所述西妥昔单抗每周或每第二周施用于所述人。

32.根据权利要求18至31中一项或多项的方法,其中所述西妥昔单抗施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约2周的持续时间,其中所述西妥昔单抗按以下施用于所述人:

a)在每个周期过程中,且优选在每个周期的开始时,以约500 mg/m^2的量,

或者

b)在每个周期的第一周开始时,以约400 mg/m^2的量,且在每个周期的第二周开始时,以约250 mg/m^2的量。

33. 根据权利要求18至28中一项或多项的方法,其中所述贝伐珠单抗以每周约1 mg/kg至10 mg/kg的量、每第二周3 mg/kg至15 mg/kg、或每月约6 mg/kg至30 mg/kg的量施用

于所述人。

34.根据权利要求18至28和33中一项或多项的方法,其中所述贝伐珠单抗施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

35.根据权利要求18至28和33至34中一项或多项的方法,其中所述贝伐珠单抗施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约2周的持续时间,其中所述贝伐珠单抗每周或每第二周施用于所述人。

36.根据权利要求18至28和33至35中一项或多项的方法,其中所述贝伐珠单抗施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约2周的持续时间,其中所述贝伐珠单抗按以下施用于所述人:

a)在每个周期过程中,且优选在每个周期的开始时,以约3 mg/kg至15 mg/kg的量或以5 mg/kg至10 mg/kg的量,

或者

b)在每个周期过程中,且优选在每个周期的开始时,以约7.5 mg/kg的量。

37. 根据权利要求18至28中一项或多项的方法,其中所述帕尼单抗以每周约1 mg/kg至10 mg/kg的量、每第二周3 mg/kg至15 mg/kg、或每月约6 mg/kg至30 mg/kg的量施用于所述人。

38.根据权利要求18至28和37中一项或多项的方法,其中所述帕尼单抗施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

39.根据权利要求18至28和37至38中一项或多项的方法,其中所述帕尼单抗施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约2周的持续时间,其中所述帕尼单抗每周或每第二周施用于所述人。

40.根据权利要求18至28和37至39中一项或多项的方法,其中所述帕尼单抗施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约2周的持续时间,其中所述帕尼单抗按以下施用于所述人:

a)在每个周期过程中,且优选在每个周期的开始时,以约3 mg/kg至15 mg/kg的量或以4 mg/kg至10 mg/kg的量,

或者

b)在每个周期过程中,且优选在每个周期的开始时,以约6 mg/kg的量。

41.根据权利要求29至32和/或权利要求37至40中一项或多项的方法,其中所述结肠直肠癌是RAS野生型和/或KRAS野生型结肠直肠癌。

42. 根据权利要求29至32和/或权利要求37至40中一项或多项的方法,其中所述结肠直肠癌是RAS野生型和/或KRAS野生型左侧结肠直肠癌、或者RAS野生型和/或KRAS野生型左侧转移性结肠直肠癌。

43.根据权利要求4至42中一项或多项的方法,其中所述化学疗法施用于所述人至少6个周期,每个周期具有约2周的持续时间,其中

a)所述伊立替康和/或其前药、盐和/或溶剂化物,

b)所述亚叶酸和/或其前药、盐和/或溶剂化物,

和/或

c)所述氟尿嘧啶(5-FU)和/或其前药、盐和/或溶剂化物,

在每个周期过程中，优选在每个周期的开始时和/或在每个周期的每周开始时，施用于所述人。

44.根据权利要求4至43中一项或多项的方法，其中所述人还接受化学疗法，所述化学疗法包含：

a)以每周50 mg/m^2至150 mg/m^2的量、每第二周100 mg/m^2至300 mg/m^2的量、或每月200 mg/m^2至600 mg/m^2的量的伊立替康和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的亚叶酸和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m^2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的氟尿嘧啶(5-FU)和/或其前药、盐和/或溶剂化物。

45.根据权利要求4至44中一项或多项的方法，其中所述人还接受化学疗法，所述化学疗法包含：

a)以每周50 mg/m^2至150 mg/m^2的量、每第二周100 mg/m^2至300 mg/m^2的量、或每月200 mg/m^2至600 mg/m^2的量的伊立替康和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的亚叶酸和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)以每周1000 mg/m^2至3000 mg/m^2的量、每第二周2000 mg/m^2至6000 mg/m^2的量、或每月4000 mg/m^2至12000 mg/m^2的量，优选每第二周2000 mg/m^2至3200 mg/m^2的量的氟尿嘧啶(5-FU)和/或其前药、盐和/或溶剂化物。

46. 根据权利要求4至45中一项或多项的方法，其中所述化学疗法施用于所述人至少6个周期，每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

47.根据权利要求4至42中一项或多项的方法，其中所述化学疗法施用于所述人至少6个周期，每个周期具有约2周的持续时间，其中

a)所述奥沙利铂和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)所述亚叶酸和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)所述氟尿嘧啶(5-FU)和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

在每个周期过程中，且优选在每个周期的开始时，施用于所述人。

48.根据权利要求4至42和47中一项或多项的方法，其中所述人还接受化学疗法，所述化学疗法包含：

a)以每周20 mg/m^2至120 mg/m^2的量、每第二周40 mg/m^2至240 mg/m^2的量、或每月80 mg/m^2至480 mg/m^2的量的奥沙利铂和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的亚叶酸和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m^2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的5-FU和/或其前药、盐和/或溶剂化物。

49.根据权利要求4至42和47至48中一项或多项的方法，其中所述人还接受化学疗法，所述化学疗法包含：

a)以每周20 mg/m^2至120 mg/m^2的量、每第二周40 mg/m^2至240 mg/m^2的量、或每月80 mg/m^2至480 mg/m^2的量的奥沙利铂和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的亚叶酸和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)以每周1000 mg/m^2至3000 mg/m^2的量、每第二周2000 mg/m^2至6000 mg/m^2的量、或每月4000 mg/m^2至12000 mg/m^2的量，优选每第二周2000 mg/m^2至3200 mg/m^2的量的5-FU和/或其前药、盐和/或溶剂化物。

50. 根据权利要求4至42和47至49中一项或多项的方法，其中所述化学疗法施用于所述人至少6个周期，每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

51.根据权利要求4至42和47至50中一项或多项的方法，其中所述化学疗法施用于所述人至少6个周期，每个周期具有约2周的持续时间，其中

a)所述奥沙利铂和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)所述亚叶酸和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)所述5-FU和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

在每个周期过程中，且优选在每个周期的开始时，施用于所述人。

52.根据权利要求1至51中一项或多项的方法，其中所述原发性肿瘤定位于结肠中。

53.根据权利要求1至52中一项或多项的方法，其中所述原发性肿瘤定位于结肠的左侧中。

54.阿比妥单抗用于制造药剂的用途，所述药剂用于与西妥昔单抗和/或FOLFIRI组合治疗具有高αvβ6整联蛋白表达的患者的RAS野生型、和/或KRAS野生型左侧转移性结肠直肠癌(mCRC)。

55.阿比妥单抗用于制造药剂的用途，所述药剂用于与西妥昔单抗和FOLFIRI组合治疗具有高αvβ6整联蛋白表达的患者的RAS野生型左侧转移性结肠直肠癌(mCRC)。

56.阿比妥单抗用于制造药剂的用途，所述药剂用于与西妥昔单抗和/或FOLFIRI组合治疗具有高αvβ6整联蛋白表达的患者的RAS野生型、和/或KRAS野生型左侧转移性结肠癌。

57.阿比妥单抗用于制造药剂的用途，所述药剂用于与西妥昔单抗和/或伊立替康组合治疗具有高αvβ6整联蛋白表达的患者的RAS野生型、和/或KRAS野生型左侧转移性结肠癌或转移性结肠直肠癌。

58.阿比妥单抗用于制造药剂的用途，所述药剂用于与西妥昔单抗和伊立替康组合，优选与亚叶酸和/或5-FU组合治疗具有高αvβ6整联蛋白表达的患者的RAS野生型左侧转移性结肠癌或转移性结肠直肠癌。

59.根据权利要求54至58中一项或多项的阿比妥单抗的用途，其中所述治疗是一线治疗。

60.根据权利要求54至59中一项或多项的阿比妥单抗的用途，其中待治疗的转移性结肠癌和/或转移性结肠直肠癌是III期和/或IV期癌症。

61. 根据权利要求54至60中一项或多项的阿比妥单抗的用途，其中所述药物以这样的方式施用于患者，使得所施用的阿比妥单抗的量为每第二周约1000 mg或每月约2000 mg。

62.根据权利要求54至61中一项或多项的阿比妥单抗的用途，其中具有高αvβ6整联蛋白表达的所述患者的特征在于大于70的αvβ6整联蛋白组织评分。

63.根据权利要求54至62中一项或多项的阿比妥单抗的用途，其中所述治疗施用至少6、至少8、至少10或至少12个周期，每个周期由两周或约两周组成。

64.根据权利要求54至62中一项或多项的阿比妥单抗的用途，其中所述阿比妥单抗、所述西妥昔单抗和/或所述FOLFIRI每第二周施用于所述患者，优选以两周或约两周的周期。

用于治疗结肠直肠癌的阿比妥单抗

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求于2018年10月19日提交的临时申请62/748,114的权益,所述临时申请整体引入作为参考。

技术领域

[0002] 本发明涉及结肠直肠癌的治疗方法,所述治疗包括抗α-v整联蛋白(受体)抗体阿比妥单抗的施用。优选地,本发明涉及治疗结肠直肠癌、II-IV期结肠直肠癌、转移性结肠直肠癌、左侧结肠直肠癌和/或左侧转移性结肠直肠癌的方法,其包括向有此需要的患者施用所述阿比妥单抗。更优选地,本发明涉及治疗结肠直肠癌的方法,优选上文给定种类或阶段的结肠直肠癌,所述方法包括抗α-v整联蛋白(受体)抗体阿比妥单抗的施用,加上用于所述种类或阶段的结肠直肠癌的现有治疗或治疗方案。因此,本发明还涉及阿比妥单抗用于制造用于治疗结肠直肠癌,优选如本文所述的结肠直肠癌的药剂的用途,和/或阿比妥单抗用于制造用于治疗结肠直肠癌的药剂的用途,所述药剂与合适的靶向疗法概念,例如生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体和/或化学疗法组合。

背景技术

[0003] 结肠直肠癌(优选地也称为结肠癌、直肠癌和/或肠癌)是癌症在结肠或直肠(大肠的部分)中发展的时候。正是由于细胞的异常生长,它们一般具有侵袭或扩散到身体的其它部分的能力。

[0004] 迄今为止,用于结肠直肠癌的治疗可能包括手术、放射疗法、化学疗法和靶向疗法的某种组合。局限在结肠的壁内的癌症可以通过手术治愈,然而,已广泛扩散的癌症通常不能用集中于改善生活质量和症状的管理来治愈。美国的五年生存率为约65%。然而,这取决于癌症的进展程度、是否可以通过手术去除所有癌症、以及患者的整体健康。在全球范围内,结肠直肠癌是第三大最常见的癌症类型,占所有病例的约10%。2012年,它导致140万新病例,并且引起694,000例死亡。它在发达国家中更常见,超过65%在所述发达国家中发生。它在女性中比在男性中更少见。

[0005] 在结肠癌和直肠癌两者中,在某些情况下,除手术之外还可以使用化学疗法。在直肠癌中,化学疗法可以在新辅助疗法设置下使用。

[0006] 如果癌症已进入淋巴结,则添加化学治疗试剂氟尿嘧啶或卡培他滨增加预期寿命。如果淋巴结不含癌症,则化学疗法的益处是有争议的。如果癌症是广泛转移或无法切除的,则到目前为止,治疗主要是姑息性的。通常,在这种设置下,可以使用许多不同的化学治疗药剂。用于这种状况的化学治疗药物可能包括卡培他滨、氟尿嘧啶、伊立替康、甲酰四氢叶酸、奥沙利铂和UFT。优选地,氟尿嘧啶可以作为其前药例如卡培他滨和/或5-氟胞嘧啶施用。有时使用的另一类试剂是表皮生长因子受体抑制剂。

[0007] 尽管放射和化学疗法的组合可能对于直肠癌有用,但由于肠对放射的敏感性,它在结肠癌中的使用不是常规的。正如化学疗法,放射疗法可以用于某些阶段的直肠癌的新

辅助疗法和辅助疗法设置下。

[0008] 然而，适应症结肠直肠癌(CRC)是本领域已知且广泛理解的。优选地，结肠直肠癌是异质适应症疾病，其可以优选地通过特征来区分，所述特征包括但不限于起源位置、受影响组织的种类和/或当疾病发展时的疾病阶段。结肠直肠癌的分期是本领域广泛已知且理解的。优选地，将不同的发展阶段分为四个或五个类别，优选四个类别。最早阶段的结肠直肠癌优选分类为“0期”(非常早期的癌症)，然后范围从I(1)期到IV(4)期。通常，数目越小，癌症已发展、进展和/或扩散得越少。数目越大例如IV期优选意指癌症已扩散得越多。并且在一个阶段内，较早的字母优选意指较低的阶段。尽管每个人的癌症经历都是独特的，但处于相似阶段的癌症趋于具有相似的前景，并且经常以大致相同的方式进行治疗。

[0009] 最常用于结肠直肠癌的分期系统是美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer)(AJCC)TNM 系统，其基于以下3个关键信息片段：

· 肿瘤的范围(大小)(T)：癌症已在结肠或直肠的壁内生长到多远？如图1中所示，从内层到外层的这些层包括：

内层衬里(粘膜)，其为几乎所有结肠直肠癌在其中起始的层。这包括薄肌肉层(粘膜肌层)。

[0010] 在该肌肉层下方的纤维组织(粘膜下层)

厚肌肉层(固有肌层)

薄的最外层结缔组织(浆膜下层和浆膜)，其覆盖大部分结肠，但不覆盖直肠

· 扩散到附近的淋巴结(N)：癌症是否已扩散到附近的淋巴结？

· 扩散(转移)到远处部位(M)：癌症是否已扩散到远处淋巴结或远处器官，例如肝或肺？

下述系统是2018年1月生效的最新的AJCC系统。它使用*病理阶段*(也称为*手术阶段*)，其通过检查在手术过程中切除的组织来确定。这也称为*手术分期*。这可能比*临床分期*更准确，所述临床分期考虑了身体检查、活组织检查和成像测试的结果，优选*在*手术*前*完成。

[0011] T、N和M之后的数目或字母提供关于这些因素各自的更多细节。数目越高意味着癌症越晚期。一旦个人的T、N和M类别已确定，这种信息就在称为*阶段分组*的过程中进行组合，以分配整体阶段。

[0012] 表1：AJCC阶段

AJCC 阶段	阶段分组	阶段描述*
0	Tis N0 M0	癌症处于其最早的阶段。这个阶段也称为原位癌或粘膜内癌（Tis）。它尚未生长超出结肠或直肠的内层（粘膜）。
I	T1 或 T2 N0 M0	癌症已生长穿过粘膜肌层进入粘膜下层内（T1），并且它也可能已生长到固有肌层内（T2）。它尚未扩散到附近的淋巴结（N0）或远处部位（M0）。
IIA	T3 N0 M0	癌症已生长到结肠或直肠的最外层内，但尚未穿过它们（T3）。它尚未到达附近器官。它尚未扩散到附近的淋巴结（N0）或远处部位（M0）。

IIB	**T4a** **N0** **M0**	癌症已生长穿过结肠或直肠的壁，但尚未生长到附近的其它组织或器官内（T4a）。它尚未扩散到附近的淋巴结（N0）或远处部位（M0）。
IIC	**T4b** **N0** **M0**	癌症已生长穿过结肠或直肠的壁，并且附着至或已生长到附近的其它组织或器官内（T4b）。它尚未扩散到附近的淋巴结（N0）或远处部位（M0）。
IIIA	**T1 或 T2** **N1/N1c** **M0**	癌症已生长穿过粘膜层进入粘膜下层内（T1），并且它也可能已生长到固有肌层内（T2）。它已扩散到 1 至 3 个附近的淋巴结（N1）或淋巴结附近的脂肪区域内，但尚未扩散到淋巴结本身（N1c）。它尚未扩散到远处部位（M0）。
	或者	

	T1 **N2a** **M0**	癌症已生长穿过粘膜进入粘膜下层内（T1）。它已扩散到 4 至 6 个附近的淋巴结（N2a）。它尚未扩散到远处部位（M0）。
IIIB	**T3 或 T4a 、N1/N1c M0**	癌症已生长到结肠或直肠的最外层内（T3）或者穿过脏层腹膜（T4a），但尚未到达附近器官。它已扩散到 1 至 3 个附近的淋巴结（N1a 或 N1b）或淋巴结附近的脂肪区域内，但尚未扩散到淋巴结本身（N1c）。它尚未扩散到远处部位（M0）。
	或者	
	T2 或 T3 **N2a** **M0**	癌症已生长到固有肌层（T2）或者结肠或直肠的最外层内（T3）。它已扩散到 4 至 6 个附近的淋巴结（N2a）。它尚未扩散到远处部位（M0）。

	或者	
	T1 或 T2 N2b M0	癌症已生长穿过粘膜进入粘膜下层内（T1），并且它也可能已生长到固有肌层内（T2）。它已扩散到 7 个或更多个附近的淋巴结（N2b）。它尚未扩散到远处部位（M0）。
IIIC	T4a N2a M0	癌症已生长穿过结肠或直肠的壁（包括脏层腹膜），但尚未到达附近器官（T4a）。它已扩散到 4 至 6 个附近的淋巴结（N2a）。它尚未扩散到远处部位（M0）。
	或者	
	T3 或 T4a N2b M0	癌症已生长到结肠或直肠的最外层（T3）或者穿过脏层腹膜（T4a），但尚未到达附近器官。它已扩散到 7 个或更多个附近的淋巴

		结（N2b）。它尚未扩散到远处部位（M0）。
	或者	
	T4b **N1 或 N2** **M0**	癌症已生长穿过结肠或直肠的壁，并且附着至或已生长到附近的其它组织或器官（T4b）。它已扩散到至少一个附近的淋巴结或淋巴结附近的脂肪区域内（N1 或 N2）。它尚未扩散到远处部位（M0）。
IVA	**任何 T** **任何 N** **M1a**	癌症可能已经或尚未生长穿过结肠或直肠的壁（任何 T）。它可能已经或尚未扩散到附近的淋巴结（任何 N）。它已扩散到 1 个远处器官（例如肝或肺）或远处的淋巴结集，但尚未扩散到腹膜（腹腔的衬里）的远处部分（M1a）。

IVB	**任何 T** **任何 N** **M1b**	癌症可能已经或尚未生长穿过结肠或直肠的壁（任何 T）。它可能已经或尚未扩散到附近的淋巴结（任何 N）。它已扩散到多于 1 个远处器官（例如肝或肺）或远处的淋巴结集，但尚未扩散到腹膜（腹腔的衬里）的远处部分（M1b）。
IVC	**任何 T** **任何 N** **M1c**	癌症可能已经或尚未生长穿过结肠或直肠的壁（任何 T）。它可能已经或尚未扩散到附近的淋巴结（任何 N）。它已扩散到腹膜（腹腔的衬里）的远处部分，并且可能已经或尚未扩散到远处器官或淋巴结（M1c）。

*下述另外的类别未在上表1中列出：

· TX:由于缺乏信息,无法评价主要肿瘤。

[0013] · T0:无原发性肿瘤的证据。

[0014] · NX:由于缺乏信息,无法评价局部淋巴结。

[0015] 更一般地,结肠直肠癌可以分类为四期:I期、II期、III期和IV期。阶段越高,结肠直肠癌越晚期。优选地,I期意味着癌症可以在特异性结肠直肠位置处诊断出,但还没有真正开始生长。在II期结肠直肠癌中,肿瘤已在原始结肠直肠位置中生长,但并未扩展超出该位置,而在III期中,癌症已例如经由转移扩散到原始结肠直肠位置之外,但仅至最小程度。通常,在III期中的结肠直肠癌仅已扩散到附近的组织,例如邻近的组织和附近的淋巴结。最后,在IV期中,癌症已扩散到结肠直肠区域中的原始位置之外到其它组织,例如远处的淋巴结、骨骼、肝、和/或脑,参见例如,Matias Riihimäki,Akseli Hemminki,Jan Sundquist,Kari Hemminki,Scientific Reports | 6:29765 | DOI: 10.1038/srep29765,其公开内容优选地整体引入本文作为参考。

[0016] 自1996年以来,用于CRC和/或mCRC的治疗选项已得到扩展,特别是随着化学疗法(如伊立替康和奥沙利铂)以及靶向试剂(如西妥昔单抗、帕尼单抗、阿柏西普、瑞格非尼和贝伐珠单抗)的引入。当前,借助于包含5-FU和伊立替康的组合化学疗法方案,来治疗结肠直肠癌且尤其是晚期结肠直肠癌是已确立的治疗。这些已改善了患者结果,但仍有大多数患者因其疾病而死亡。

[0017] 随着CRC的分子生物学的理解渐增、以及新近发现的方向性对治疗结果的影响,靶

向肿瘤生长和进展必需的因子的新的组合疗法提供了患者结果改善的最大希望。本质上，现有的mCRC治疗仍基于破坏肿瘤细胞的五种不同作用机制，即阻断胸苷酸合成酶、嵌入DNA(铂化合物)、靶向拓扑异构酶I(伊立替康)、靶向生长因子或生长因子受体，包括但不限于EGF(表皮生长因子)、EGFR(表皮生长因子受体)、VEGF(血管内皮生长因子)和/或VEGFR(血管内皮生长因子受体)。

[0018] 整联蛋白抑制剂的使用假定为影响癌细胞的存活和血管生成两者，因为整联蛋白由肿瘤细胞以及内皮细胞表达。尽管很难区别对肿瘤生长的作用与对血管生成的作用，但当靶向的整联蛋白由肿瘤细胞和内皮细胞两者表达时，可以预测这些抑制剂的最大应答。

[0019] 骨骼是各种癌症(包括但不限于CRC)的频繁转移部位之一。Bisanz等人(Molecular Therapy 2005;12,634-643)示出了α-v整联蛋白对例如骨骼中的前列腺肿瘤存活的积极作用。进一步的研究(McCabe等人，Oncogene 2007;26,6238-6243)证实了，肿瘤细胞上的αvβ3整联蛋白激活对于识别关键的骨特异性基质蛋白是必需的。这些数据提示了，αvβ3整联蛋白调节远处转移灶中的癌症生长。

[0020] 由于整联蛋白假定为介导肿瘤细胞与骨骼微环境之间的相互作用并促进骨骼中的生长，因此使用整联蛋白抑制剂的潜在应用是预防CRC癌骨病变。这些病变优选是成骨的和/或溶骨的，并且在癌症患者中频繁检测到。在一些癌症中，超过80%的患者在尸检时已确认骨转移。

[0021] 此外，免疫组织化学分析已证实了在大比例的人CRC癌组织样品中存在αv整联蛋白。

[0022] 因此，迫切需要提供用于治疗结肠直肠癌的新型高效治疗试剂和/或高度有效的治疗方案。因此，本发明的优选目的是提供用于人的更有效、耐受性更好的治疗，所述人尤其是患有结肠直肠癌(CRC)和/或其转移，且尤其是转移性结肠直肠癌(mCRC)的人患者，优选不依赖于转移灶的位置，因此优选导致增强的总生存期(OS)、无进展生存期(PFS)、生活质量(QOL)和/或增加的中值生存。

发明内容

[0023] 根据本发明，通过提供抗α-v整联蛋白(受体)抗体阿比妥单抗，用于治疗具有肿瘤和/或转移灶的患者的结肠直肠癌的方法，满足了提供用于治疗结肠直肠癌的新型高效治疗试剂的高度需求，所述肿瘤和/或转移灶具有高整联蛋白表达，且尤其是高αvβ6整联蛋白表达。更优选地，通过提供抗α-v整联蛋白(受体)抗体阿比妥单抗，满足了提供用于治疗尤其是具有肿瘤和/或转移灶的患者的结肠直肠癌的新型高效治疗试剂的高度需求，所述结肠直肠癌优选左侧结肠直肠癌，更优选左侧转移性结肠直肠癌，所述肿瘤和/或转移灶具有高整联蛋白表达，且尤其是高αvβ6整联蛋白表达。优选地，根据本发明，还满足了提供用于治疗结肠直肠癌的新型高度有效治疗方案的到目前为止高度未满足的需求。

[0024] 在这方面，已发现阿比妥单抗优选在结肠直肠癌中具有直接和间接的抗肿瘤活性两者。

[0025] 阿比妥单抗是针对人整联蛋白受体α-β亚基的重组人源化单克隆IgG2抗体拮抗剂。阿比妥单抗是对于αv整联蛋白特异性的泛整联蛋白抑制剂，抑制所有αv异二聚体(αvβ1、β3、β5、β6和β8)。具体地，阿比妥单抗抑制αvβ6，其在转移性结肠直肠癌(mCRC)中展示增

强的活性,并且已作为该疾病的负面预后因素进行讨论(Bates RC,Bellovin DI,Brown C等人"Transcriptional activation of integrin β6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma". The Journal of Clinical Investigation. 2005;115(2):339-347;Niu Z,Wang J,Muhammad S等人"Protein expression of eIF4E and integrin αvβ6 in colon cancer can predict clinical significance,reveal their correlation and imply possible mechanism of interaction" Cell & Bioscience. 2014;Yang GY,Guo S,Dong CY等人"Integrin αvβ6 sustains and promotes tumor invasive growth in colon cancer progression". World Journal of Gastroenterol. 2015;21(24):7457-7467),其公开内容优选地整体引入本文作为参考。整联蛋白是细胞粘附分子家族,其在广泛范围的细胞-细胞外基质(ECM)和细胞间相互作用中起作用。Arnaout MA,Goodman SL,Xiong JP. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. Curr Opin Cell Biol. 2007;19(5):495-507,其公开内容优选地整体引入本文作为参考。整联蛋白是ECM蛋白的异二聚跨膜受体,由alpha(α)和beta(β)亚基组成。它们通过与其分别的ECM配体结合被激活。在这种相互作用之后,整联蛋白可以触发细胞内激酶级联,以调节细胞增殖和存活,并且变得与肌动蛋白细胞骨架结合,以驱动细胞附着和运动(Goel HL,Languino LR. Integrin signaling in cancer. Cancer Treat Res. 2004;119:15 31,其公开内容优选地整体引入本文作为参考)。

[0026] α-v-整联蛋白在血管生成、增生的肿瘤血管中、以及在某些类型的肿瘤细胞上高度表达。已证实了αvβ6整联蛋白家族的成员在肿瘤进展、肿瘤血管生成和转移中起直接作用(Nemeth JA,Nakada MT,Trikha M等人Alpha-v integrins as therapeutic targets in oncology. Cancer Invest. 2007;25(7):632-646,其公开内容优选地整体引入本文作为参考)。

[0027] 根据本发明,在具有高整联蛋白表达,优选高αvβ6整联蛋白表达的CRC患者中,用阿比妥单抗靶向整联蛋白(包括αvβ6,但不限于αvβ6)是令人惊讶地有利的治疗CRC和/或mCRC的新的方法,尤其是当与在CRC和/或mCRC中已显示功效的其它靶向治疗剂和/或化学疗法组合时。

[0028] 因此,本发明的优选主题包括下述中的一种或多种:

一种治疗一个或多个人的结肠直肠癌的方法,优选如上文和/或下文所述,所述方法包括将阿比妥单抗施用于所述人,其中所述结肠直肠癌的特征在于或具有高αvβ6整联蛋白表达。

[0029] 一种治疗一个或多个人的结肠直肠癌的方法,优选如上文和/或下文所述,所述方法包括将阿比妥单抗施用于所述人,其中所述结肠直肠癌是左侧结肠直肠癌。

[0030] 一种治疗左侧结肠直肠癌的方法,优选如上文和/或下文所述,所述方法包括将阿比妥单抗施用于所述人,其中所述左侧结肠直肠癌的特征在于或具有高αvβ6整联蛋白表达。

[0031] 如上文和/或下文所述的方法,其中所述结肠直肠癌是转移性结肠直肠癌。

[0032] 如上文和/或下文所述的方法,其中以每第二周约1000 mg的量或以每月约2000 mg的量,将所述阿比妥单抗施用于所述人。

[0033] 如上文和/或下文所述的方法,其中所述人还接受至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体、和/或化学疗法。

[0034] 如上文和/或下文所述的方法,其中所述人在如上文和/或下文所述的结肠直肠癌的治疗中,还接受当前护理标准(SoC)的一种或多种治疗选项。

[0035] 如上文和/或下文所述的方法,其中

a)所述结肠直肠癌是RAS野生型和/或KRAS野生型左侧结肠直肠癌、或RAS野生型和/或KRAS野生型左侧转移性结肠直肠癌,

b)所述人还接受至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体,其优选为西妥昔单抗,和

c)所述人任选地根据FOLFIRI或FOLFOX方案,优选根据FOLFIRI方案接受化学疗法。

[0036] 下文更详细地讨论了本发明的进一步方面。

附图说明

[0037] 图1显示了人肠组织和结肠壁层的一般结构。

[0038] 图2显示了基于单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组(POSEIDON)中的αvβ6表达的OS曲线,其中αvβ6 > 中值是在24个月时的较低曲线,而αvβ6 < 中值是在24个月时的较高曲线。

[0039] 图3显示了在具有右侧和左侧肿瘤两者的患者(POSEIDON)中,基于高αvβ6表达,并且用阿比妥单抗 + 西妥昔单抗 + 伊立替康相对于单独的西妥昔单抗 + 伊立替康(SOC)治疗的OS曲线,其中SoC是在24个月时的最低曲线;阿比妥单抗500 mg是在24个月时的中间曲线;而阿比妥单抗 1000 mg是在24个月时的最高曲线。

[0040] 图4显示了试验的II期部分的CONSORT图解。

[0041] 图5A显示了关于ITT群体中的PFS的卡普兰-迈耶曲线(Kaplan-Meier curve),其中SoC、阿比妥单抗 500 mg和阿比妥单抗 1000 mg都是在16个月时等同的曲线。

[0042] 图5B显示了关于ITT群体中的OS的卡普兰-迈耶曲线,其中SoC是在24个月时的中间曲线;阿比妥单抗500 mg是在24个月时的最低曲线;而阿比妥单抗 1000 mg是在24个月时的最高曲线。

[0043] 图6显示了直方图,其显示了关于具有可获得的肿瘤块的所有患者(n=197)的αvβ6组织评分、以及关于该群体的中值组织评分(70)。通过使用下式将与αvβ6染色强度和频率有关的数据进行整合,对于每个患者生成组织评分:1 ×(弱染色细胞的百分比[1+])+ 2 ×(中等染色细胞的百分比[2+])+ 3 ×(强染色细胞的百分比[3+])[12]。

[0044] 图7接受单独的西妥昔单抗 + 伊立替康(Poseidon研究)、具有高和低αvβ6表达的患者的OS曲线,其中αvβ6 > 中值是在24个月时的较低曲线;αvβ6 < 中值是在24个月时的较高曲线;CI是置信区间;且HR是危害比。

[0045] 图8显示了在具有右侧和左侧肿瘤两者的患者(Poseidon研究)中,用阿比妥单抗 + 西妥昔单抗 + 伊立替康相对于单独的西妥昔单抗 + 伊立替康(SOC)治疗的、具有高αvβ6表达的患者的OS曲线,其中SoC是在24个月时的最低曲线;阿比妥单抗500 mg是在24个月时的中间曲线;阿比妥单抗1000 mg是在24个月时的最高曲线;CI是置信区间;HR是危害比;

且SoC是护理标准。

[0046] 图9A显示了在具有高αvβ6表达、左侧的患者(Poseidon研究)中的OS的回顾性分析,其中SoC是在24个月时的最低曲线;阿比妥单抗500 mg是在24个月时的中间曲线;阿比妥单抗1000 mg是在24个月时的最高曲线。

[0047] 图9B显示了在具有高αvβ6表达、右侧的患者(Poseidon研究)中的OS的回顾性分析,其中SoC是在18个月时的最低曲线;阿比妥单抗500 mg是在18个月时的中间曲线;而阿比妥单抗1000 mg是在18个月时的最高曲线。

具体实施方式

[0048] 组织化学数据显示了,αv-整联蛋白的靶在CRC和/或mCRC的肿瘤血管系统和肿瘤细胞上表达。特别地,αvβ6整联蛋白的表达也已作为CRC中的预后因素进行讨论,因为它已在多于700个mCRC患者中进行分析(Bates RC,Bellovin DI,Brown C等人"Transcriptional activation of integrin β6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma". The Journal of Clinical Investigation. 2005;115(2):339-347;Niu Z,Wang J,Muhammad S等人"Protein expression of eIF4E and integrin αvβ6 in colon cancer can predict clinical significance,reveal their correlation and imply possible mechanism of interaction" Cell & Bioscience. 2014;Yang GY,Guo S,Dong CY等人"Integrin αvβ6 sustains and promotes tumor invasive growth in colon cancer progression". World Journal of Gastroenterol. 2015;21(24):7457-7467),其公开内容优选地整体引入本文作为参考。因此,根据本发明,结肠癌和/或直肠癌肿瘤中的高αvβ6表达被认为是这些患者的肿瘤进展和不良生存的指标。

[0049] 在我们最近对从POSEIDON研究(Elez E,Kocáková I,Höhler T等人Abituzumab combined with cetuximab plus irinotecan versus cetuximab plus irinotecan alone for patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: the randomised phase I/II POSEIDON trial. Annals of Oncology. 2015;26: 132-140,其公开内容优选地整体引入本文作为参考)获得的数据的重新评估中,探索了与西妥昔单抗和伊立替康组合的阿比妥单抗在二线KRAS WT mCRC中的活性,单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组的分析证实了,高αvβ6表达与较差的结果相关,优选显示了高αvβ6表达是负面预后因素(图2)。另外,我们最近对来自POSEIDON研究的数据的重新评估显示了,用阿比妥单抗治疗的具有高αvβ6表达的患者达到了更高的PFS,因此,优选显示了高αvβ6表达预测对阿比妥单抗的应答。

[0050] 此外,在阿比妥单抗治疗的背景下,我们发现了越来越多的证据,CRC且尤其是mCRC是遗传异质性疾病,并且起于结肠的不同侧(左相对于右)的肿瘤具有不同的临床结果(Bever KM,Le DT. An Expanding Role for Immunotherapy in Colorectal Cancers. Journal of the National Comprehensive Cancer Network. 2017;15(3):401-410;Lee MS,Menter DG,Kopets S. Right Versus Left Colon Cancer Biology: Integrating the Consensus Molecular Subtypes. Journal of the National Comprehensive Cancer Network. 2017;15(3):411-419,Lee B等人Left versus right sided

colorectal cancer: Teasing out drivers of disparity in outcomes in metastatic disease. Journal of Clinical Oncology. 2017;35:4_suppl,682-682.,其公开内容优选地整体引入本文作为参考)。在KRAS野生型(WT)或RAS WT mCRC患者中,比较不同类别的靶向试剂的活性的分析提示了,在mCRC的背景下,原发性肿瘤位置(侧)对于临床结果可能既是预后性的又是预测性的。

[0051] 回顾性分析调查了六个随机试验(CRYSTAL、FIRE-3、CALGB 80405、PRIME、PEAK和20050181)中包括的、患有无法切除的RAS WT和/或KRAS WT mCRC的患者的原发性肿瘤位置的预后和预测影响,比较了化学疗法加上EGFR抗体疗法(实验分组)与化学疗法或化学疗法和贝伐珠单抗(对照分组)。具有左侧肿瘤相对于右侧肿瘤的患者的总生存期(OS)和无进展生存期(PFS)的危害比(HR)和95%置信区间(CI),以及客观应答率(ORR)的优势比(OR)通过合并各个研究的HR/OR进行评估[10]。

[0052] 通过治疗效应与肿瘤侧的回顾性相关性来评估预测值。这种分析的结果揭示了,关于跨越6个试验随机分配的5,760个患者中的2,159个(37.5%)可获得的原发性肿瘤位置和RAS突变状态,515个右侧和1,644个左侧,对于OS(分别为HR 2.03(95% CI: 1.69-2.42)和1.38(1.17-1.63))、PFS(HR 1.59(1.34-1.88)和1.25(1.06-1.47))和ORR(OR 0.38(0.28-0.50)和0.56(0.43-0.73)),在合并的对照分组和实验分组两者中,与具有左侧肿瘤的患者相比,对于具有右侧肿瘤的患者观察到明显更差的预后。

[0053] 就预测效应而言,与对于具有右侧肿瘤的患者(对于OS和PFS分别为HR 1.12(0.87-1.45)和1.12(0.87-1.44))没有显著益处相比,在具有左侧肿瘤的患者(对于OS和PFS分别为HR 0.75(0.67-0.84)和0.78(0.70-0.87))中,观察到关于化学疗法加上EGFR抗体疗法的显著益处;P值分别为<0.001和0.002。对于ORR,与具有右侧肿瘤的患者(HR 1.47(0.94-2.29))相比,在具有左侧肿瘤的患者(HR 2.12(1.77-2.55))中,存在朝向化学疗法加上EGFR抗体疗法的更大益处的趋势(P值为0.07)。

[0054] 该分析显示了,在RAS WT和/或KRAS WT mCRC患者中,与具有左侧肿瘤的患者相比,关于具有右侧肿瘤的患者的OS、PFS和ORR的更差预后,以及肿瘤侧的预测效应,伴随与化学疗法或贝伐珠单抗相比,化学疗法加上西妥昔单抗的更大效应,该效应在具有左侧肿瘤的患者中是最大的,尽管结果基于这些试验中的患者亚群和分析的回顾性质。

[0055] 非临床研究数据

αv-整联蛋白在跨越大量肿瘤适应症的原发性肿瘤和转移灶的各种肿瘤细胞、肿瘤侵袭性血管和肿瘤基质细胞上表达。

[0056] 优选地,阿比妥单抗具有通过抑制血管生成、通过修饰基质和/或通过直接靶向肿瘤细胞,来抑制肿瘤进展的能力。

[0057] 在体外,阿比妥单抗已显示优选地干扰涉及肿瘤血管生成中的几个方面,例如内皮细胞对EMC的附着、焦点接触的不稳定、内皮细胞迁移、血管生成生长因子信号的传递和/或内皮细胞生存力。在体内,阿比妥单抗的抗血管生成效应可以并且优选地已在各种动物模型中得到证实。

[0058] 阿比妥单抗优选还直接影响肿瘤细胞。阿比妥单抗优选降低肿瘤细胞对αv整联蛋白配体的附着。在具有不同αv-整联蛋白异二聚体表达的不同适应症的几种肿瘤异种移植模型中,阿比妥单抗优选地抑制肿瘤生长。除其单一治疗活性之外,在各种模型中,阿比妥

单抗还可以显示为增强几种化学治疗剂和西妥昔单抗的效应。

[0059] 在食蟹猴中阿比妥单抗的重复剂量毒性研究内，在安全性药理学评估期间，并未观察到主要身体系统(如心血管和呼吸系统)或临床行为的有关发现。在慢性6个月IV输注毒性研究中，并未观察到治疗有关的心率、ECG参数包括QTc间期的损害。

[0060] 总之，本文提供的科学证据支持了阿比妥单抗作为具有抗血管生成和直接抗肿瘤活性的药物的用途，当单独或与护理标准(SoC)治疗选项组合，或者优选与生长因子靶向性单克隆抗体或生长因子受体靶向性单克隆抗体(包括但不限于西妥昔单抗)、和/或化学疗法组合使用时，所述阿比妥单抗优选地提供了用于治疗结肠直肠癌，且尤其是转移性结肠直肠癌(优选地如本文所述的)的令人惊讶地有利的治疗概念。

[0061] 临床研究数据

用于KRAS WT mCRC患者的I/II期研究

EMR 62242-004 “POSEIDON Study[7]”是开放标签、随机分配、有对照的、多中心、I/II期试验，其调查了相对于单独的西妥昔单抗 + 伊立替康，与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的以两种剂量(即500 mg和1,000 mg IV)的阿比妥单抗作为KRAS WT、mCRC患者的二线治疗。如果KRAS WT mCRC患者在用含奥沙利铂的治疗方案的一线化学疗法后是难治的或进展，则他们对于入选是合格的。

[0062] 该研究是I/II期研究剂量寻找/安全性研究，以表征与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的、不同剂量水平的阿比妥单抗的重复施用的安全性和耐受性概况。该研究的主要目标是根据PFS评价两种阿比妥单抗剂量的抗癌活性。

[0063] 次要目标是就总生存期(OS)、肿瘤进展时间(TTP)、肿瘤应答(实体瘤中的应答评估标准[RECIST]，版本1.0)和治疗失败时间(TTF)而言，评估两种阿比妥单抗剂量的功效。

[0064] 其它目标包括通过探索在血液中循环和/或由肿瘤表达的候选蛋白与功效和安全性终点之间的关系，对于处于调查的治疗鉴定潜在的应答预测标记物。

[0065] 总共232个患者入选，在I期部分中的16个以及在研究的随机分配的II期部分中的216个患者。

[0066] 在II期部分中，将73个患者随机分配到与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗 500 mg IV剂量组，将71个患者随机分配到与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗 1000 mg IV剂量组，并且将72个患者随机分配到单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组。符合方案(PP)分析集中的患者数目为197(与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗500 mg组中的66个，与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗 1000 mg组中的65个，单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组中的66个)。具有严重方案偏离的患者的发生率较低，并且在所有治疗组之间一般是相似的。

[0067] ITT群体中的功效结果：

主要功效终点是基于研究者的评价的PFS。截至数据截止日期，相对于单独的西妥昔单抗 + 伊立替康，个别的与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗 500 mg、以及与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的1000 mg，由Cox比例风险模型估计的HR分别为1.13(95% CI: 0.78,1.64)和1.11(95% CI: 0.77,1.61)，指示了组间无差异。跨越与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗 500 mg、与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗1000 mg、以及单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组(分别为5.4个月[95% CI: 4.1、6.0]、5.6个月

[95% CI: 4.1、6.9]、以及5.6个月[95% CI: 4.2、6.9])，中值PFS时间是可比较的。

[0068] 来自OS分析的结果显示了，朝向阿比妥单抗的有利发现的可能趋势。与单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组相比，在与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗组中，具有事件(因任何原因的死亡)的患者数目和百分比更低，在与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗 500 mg、与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗1000 mg、以及单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组中，分别具有39(53.4%)、35(49.3%)和45(62.5%)个患者。相对于单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组，与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗500 mg和1000 mg组的HR分别为0.83(95% CI:0.54,1.28)和0.80(95% CI:0.52,1.25)，有利于阿比妥单抗。对于与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗500 mg、与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗1000 mg、以及单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组，中值OS分别为15.0个月(95% CI: 10.9,19.2)、14.4个月(95% CI: 9.8,19.3)、以及11.6个月(95% CI: 9.8,15.7)。

[0069] 探索性生物标记物结果：

下述高水平概览概括了主要生物标记物发现：

执行了基于免疫组织化学的靶(αvβ3、αvβ5、αvβ6、αvβ8、泛αvβ)和靶配体(骨桥蛋白、玻连蛋白)的表达分析。

[0070] 整联蛋白αvβ6的高表达被鉴定为负面预后(预测单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组中的较短生存期)，并且预测用阿比妥单抗治疗的延长OS。αvβ6生物标记物亚组由197个患者组成，代表POSEIDON研究的随机分配部分的91% ITT群体。

[0071] 对于包括整联蛋白αvβ3、αvβ5、αvβ8、泛αvβ和骨桥蛋白的候选标记物，执行另外的免疫组织化学，然而，所测试的另外标记物无一显示了预后或预测相关性。

[0072] 含有VEGF的一线治疗对具有高αvβ6组织评分的患者OS的影响分析，揭示了关于2组中的HR无差异。

[0073] 免疫原性结果：

阿比妥单抗的免疫原性特征有利地是阳性的，因为没有患者对于阿比妥单抗的中和抗体测试呈阳性。

[0074] 安全性结果：

除了单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组的1个患者之外，该研究中所有患者都经历了1次或多次治疗中出现的AE。具有视为与3种研究用药中的至少1种有关的TEAE的患者数目和百分比跨越3个组是可比较的；具有视为与阿比妥单抗有关的TEAE的患者数目和百分比，在阿比妥单抗500 mg和1000 mg组中分别为35(48.6%)个患者和39(56.5%)个患者。

[0075] 相对于单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组，3级或更高的TEAE在阿比妥单抗500 mg和1000 mg组中以略微更高的发生率得到报告(分别为52 [72.2%]、54 [78.3%]和49 [67.1%]个患者)。分别在阿比妥单抗500 mg和1000 mg组中的16(22.2%)和12(17.4%)个患者中，报告了导致阿比妥单抗停用的TEAE；不存在与剂量的明显关系。相对于其它治疗组，严重TEAE的发生率在阿比妥单抗1000 mg治疗组中是最高的：跨越阿比妥单抗 500 mg、阿比妥单抗 1000 mg、以及单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组，发生率分别为26(36.1%)、34(49.3%)和29(39.7%)个患者。具有致命结果的TEAE分别在9(12.5%)、7(10.1%)和6(8.2%)个患者中发生。

[0076] 总的来说，在POSEIDON研究中，从250 mg到1000 mg阿比妥单抗的剂量上升是良好耐受的，并且没有观察到主要的安全性关注。

[0077] 生物标记物结果：

POSEIDON研究包括通过免疫组织化学关于αvβ6表达的预先计划的测试。高相对于低αvβ6表达似乎是这些患者中关于生存的预后标记物，并且具有高αvβ6表达的患者似乎受益于用阿比妥单抗的治疗(图3)。

[0078] 为了鉴定从阿比妥单抗的添加中受益最大的患者群体，进行了进一步的分析。由于高αvβ6表达暗示为在肿瘤中表达时，关于生存的负面预后因素，因此单独的西妥昔单抗 + 伊立替康的治疗效应看起来是有限的。另外，由于发现高αvβ6表达是对阿比妥单抗应答的预测因素，因此假定作为αvβ6整联蛋白抑制剂的阿比妥单抗，导致这些患者的亚组中的更长PFS和OS。

[0079] 具有高αvβ6表达的左侧群体(POSEIDON)中的功效结果：

我们对POSEIDON研究的数据的重新评估揭示了，在~73%的患者中，发现肿瘤的位置在结肠的左侧上，并且在与西妥昔单抗 + 伊立替康组合的阿比妥单抗与单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组之间是均匀分布的。基于通过国际指南(NCCN，ESMO 2017)关于RAS WT和/或KRAS WT mCRC中的左侧肿瘤的建议，对POSEIDON研究数据进行了进一步的探索性分析，以探索与右侧CRC相比，在具有高αvβ6表达的左侧患者中，用阿比妥单抗的治疗效应。令人惊讶的是，在左侧CRC患者群体中观察到非常有利的治疗效应。

[0080] 表2:POSEIDON研究的重新评估的结果

PFS 月（n）					
	高组织评分			低组织评分	
	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	阿比妥单抗 500 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康
所有患者	6.9（31）	5.6（36）	4.2（26）	4.9（35）	5.8（34）
右 CRC	2.6（11）	2.8（6）	4.2（9）	3.5（8）	4.2（5）
左 CRC	8.6（20）	5.6（30）	4.2（22）	5.4（27）	6.5（29）

PFS 月（n）					
	高组织评分			低组织评分	
	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	阿比妥单抗 500 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康
所有患者	6.9（31）	5.6（36）	4.2（26）	4.9（35）	5.8（34）
右 CRC	2.6（11）	2.8（6）	4.2（9）	3.5（8）	4.2（5）
左 CRC	8.6（20）	5.6（30）	4.2（22）	5.4（27）	6.5（29）

PFS 月（n）					
	高组织评分			低组织评分	
	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	阿比妥单抗 500 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康
所有患者	6.9（31）	5.6（36）	4.2（26）	4.9（35）	5.8（34）
右 CRC	2.6（11）	2.8（6）	4.2（9）	3.5（8）	4.2（5）
左 CRC	8.6（20）	5.6（30）	4.2（22）	5.4（27）	6.5（29）

PFS 月（n）					
	高组织评分			低组织评分	
	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	阿比妥单抗 500 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康
所有患者	6.9（31）	5.6（36）	4.2（26）	4.9（35）	5.8（34）
右 CRC	2.6（11）	2.8（6）	4.2（9）	3.5（8）	4.2（5）
左 CRC	8.6（20）	5.6（30）	4.2（22）	5.4（27）	6.5（29）

客观应答率%（n）					
	高组织评分			低组织评分	
	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	阿比妥单抗 500 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康
所有患者	35.5（31）	30.6（36）	16.1（31）	20.0（35）	32.4（34）
右 CRC	18.2（11）	0（6）	0（9）	12.5（8）	20.0（5）
左 CRC	45.0（20）	36.7（30）	22.7（22）	22.2（27）	34.5（29）

总生存期月（n）					
	高组织评分			低组织评分	
	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	阿比妥单抗 500 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康	阿比妥单抗 1000 mg +西妥昔单抗 +伊立替康	西妥昔单抗 + 伊立替康
所有患者	20.6 （31）	15.5 （36）	10.2 （31）	12.8 （35）	15.9 （34）
右 CRC	9.8（11）	5.1（6）	9.5（9）	8.6（8）	10.0（5）
左 CRC	25.6 （20）	17.1 （30）	10.2 （22）	13.6 （27）	15.9 （29）

关于 OS 的危害比					
阿比妥单抗	群体	HR	HR. 95CILL	HR.95CIUL	p 值
500/1000 mg	左/αvβ6 - 上文	0.454	0.257	0.805	0.0068
500 mg	左/αvβ6 - 上文	0.527	0.284	0.976	0.0416
1000 mg	左/αvβ6 - 上文	0.357	0.171	0.746	0.0061

左侧结肠直肠癌

术语“左侧结肠直肠癌”和“左侧结肠癌”是本领域已知且理解的，包括癌或肿瘤各自的定位，并且可以与“右侧结肠直肠癌”或“右侧结肠癌”区别开。根据本发明，治疗“左侧结肠直肠癌”和“左侧结肠癌”的方法是优选的。

[0081] 为了更详细地说明，结肠的近段和远段优选地被认为具有不同的胚胎学起源。从盲肠延伸到横结肠近侧三分之二的段优选地被认为衍生自中肠。包含横结肠远侧三分之一至上肛管的段优选地被认为衍生自后肠。如果将远侧横结肠视为右结肠和左结肠之间的边界，则右结肠优选包括盲肠、升结肠、肝曲和横结肠，且左结肠优选包括脾曲、降结肠和乙状结肠。基于这些发现，我们建议可以将结肠直肠癌分成三种不同的疾病实体：右结肠癌、左结肠癌和直肠癌，参见例如：Michal Mik，Maciej Berut，Lukasz Dziki，Radzislaw Trzcinski，Adam Dziki；Arch Med Sci 2017；13，1：157-162，其公开内容优选地整体引入本文作为参考。

[0082] 更具体而言，在本发明的上下文中，“左侧结肠直肠癌”和“左侧结肠癌”优选是结肠的部分，优选包括直肠，并且更优选排除直肠，所述直肠通过其为结肠曲的天然解剖分离线进行限定。

[0083] 在本发明的上下文中，左侧结肠直肠癌或左侧结肠癌定义为定位于所述结肠曲左侧的组织中的癌症。因此，在本发明的上下文中，定位于结肠曲右侧(优选包括横结肠)的癌症，被视为“右侧结肠直肠癌”或“右侧结肠癌”。

[0084] 用于将癌症或肿瘤实际诊断和/或定位为左侧的方法是本领域已知且理解的。优选地，在解剖学上、光学上或感官上，优选在光学上，例如在手术期间探索性的或经由结肠镜检查术，执行作为左侧的定位。然而，包括但不限于CT、MRT、MRI、X射线、超声和医学超声的成像方法，同样适合于确定人类、人患者或患者是否患有左侧CRC和/或mCRC。关于进一步信息，还参见美国癌症协会结肠直肠癌筛查指南(American Cancer Society Guideline for Colorectal Cancer Screening)。

[0085] 高αvβ6整联蛋白表达

在CRC和/或mCRC的背景下，确定高αvβ6整联蛋白表达的方法是本领域已知且理解的。已知程序包括经由组织学方法，例如免疫组织化学，优选使用肿瘤组织，确定αvβ6整联蛋白表达。合适的此类方法是本领域已知的，并且例如在以下中描述：Simon L. Goodman，Hans Juergen Grote和Claudia Wilm；Biology Open 1，329-340(2012)，其公开内容优选包括到本文件内作为参考。

[0086] 整联蛋白αvβ3、αvβ5、αvβ6、αvβ8和泛αv表达，且尤其是αvβ6整联蛋白表达，优选使用免疫组织化学对福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织进行评价，优选如先前在以下中描述的：Goodman SL，Grote HJ，Wilm C. “Matched rabbit monoclonal antibodies against αv-series integrins reveal a novel αvβ3-LIBS epitope，and permit routine staining of archival paraffin samples of human tumors”. Biol Open 2012；1：329-340，其公开内容优选地整体引入本文作为参考。

[0087] 关于染色强度和频率的数据用于计算在0-300的连续标度上的组织评分，如先前在以下中描述的：Pirker R，Pereira JR，von Pawel J等人“EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small cell lung cancer：analysis of data from the phase 3 FLEX study”. Lancet Oncol 2012；13：33-42，其公开内容优选地整体引入本文作为参考。

[0088] 优选地，因此获得的免疫组织化学染色的FFPE样品进行病理学评估。一般而言，病

理学家定量占优势的染色强度,指定染色模式并估计阳性染色的肿瘤组织的百分比。优选地,对于免疫组织化学染色的肿瘤组织的半定量评估,待应用H评分分类,优选地按照如上文引用的McCarty KS Jr等人,1985中描述的程序。因此,优选将阴性(0)、弱染色(1)、中等染色(2)和强染色(3)面积估计为肿瘤组织的百分比。随后,优选地如下计算分别的组织评分(H评分):

H评分=(弱)%+(中等)% x 2 +(强)% x 3

所获得的组织评分优选如下文给出的进行分类:

表3:组织评分

H评分	分类
0-50	阴性
51-100	弱阳性
101-200	中等阳性
201-300	强阳性

在本发明的上下文中,如果去分类(declassification)至少是弱阳性,优选如果它是中等阳性,且尤其是如果它是强阳性,则将αvβ6整联蛋白表达分类为高的。

[0089] 可替代地,高于中值水平的αvβ6整联蛋白表达也可以优选地视为高αvβ6整联蛋白表达。

[0090] 更优选地,对于根据本发明的用途,高αvβ6整联蛋白表达的特征在于大于60(> 60),优选大于70(> 70),更优选大于80(> 70),甚至更优选大于90(> 90),且尤其是大于100(> 100)的组织评分,优选如本文所述和/或本文在这方面引用的文献中获得的组织评分,或类似于如本文所述和/或引用的方法获得的组织评分(his disc)。然而,甚至更高的组织评分是同样优选的,例如> 110、> 120、> 130、> 140、> 150、> 160、> 170、> 180、> 190或> 200。

[0091] 然而,在POSEIDON研究中已证明了,大于70(> 70)的组织评分是在阿比妥单抗治疗的背景下,满足"高αvβ6整联蛋白表达"标准的合适阈值。

[0092] RAS野生型和/或KRAS野生型状态

RAS测试在结肠直肠癌和/或转移性结肠直肠癌中的重要性及其确定方法,优选包括但不限于RAS野生型和/或KRAS野生型状态的确定是本领域已知且理解的,并且例如在以下中进行描述:J Han JM Van Krieken,Etienne Rouleau,Marjolijn J. L. Ligtenberg,Nicola Normanno,Scott D. Patterson,Andreas Jung,Virchows Arch(2016)468:383-396。

[0093] 用于确定CRC和/或mCRC患者的RAS WT、KRAS WT和/或NRAS WT状态的合适测试,是在全世界商购可得的并且在全球各地的医院中执行,并且优选已经过EMA和/或FDA批准。用于确定RAS WT、KRAS WT和/或NRAS WT状态的合适测试和测试程序在本文的实验节段中进行描述。

[0094] 此外,其公开内容优选地整体引入本文作为参考的N. Normanno,R. Esposito Abate,M. Lambiase,L. Forgione,C. Cardone,A. Iannaccone,A. Sacco,A. M. Rachiglio,E. Martinelli,D. Rizzi,S. Pisconti,M. Biglietto,R. Bordonaro,T. Troiani,T. P. Latiano,F. Giuliani,S. Leo,A. Rinaldi,E. Maiello,F. Ciardiello;

Annals of Oncology 29: 112-118,2018,J. Vidal等人,Annals of Oncology 28: 1325-1332,2017,J. Grasselli等人,Annals of Oncology 28: 1294-1301,2017,描述了用于确定RAS WT、KRAS WT和/或NRAS WT状态的合适的替代方法。

[0095] 在本发明的上下文中,RAS优选包括KRAS和/或NRAS,并且优选包括KRAS和NRAS两者。尤其优选地,对于包含西妥昔单抗的根据本发明的治疗,RAS优选由KRAS和NRAS组成。已发现分别的野生型状态是关于至少一些生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体(但不限于西妥昔单抗和帕尼单抗)的重要生物标记物。一段时间以来,西妥昔单抗功效已主要与KRAS野生型状态相关,但它目前优选地还与RAS野生型状态相关。与此形成对比,帕尼单抗功效优选地已主要与NRAS野生型状态相关。然而,帕尼单抗功效也可以优选地通过RAS和/或野生型测试进行评价,参见例如Rafael G. Amado,Michael Wolf,Marc Peeters,Eric Van Cutsem,Salvatore Siena,Daniel J. Freeman,Todd Juan,Robert Sikorski,Sid Suggs,Robert Radinsky,Scott D. Patterson和David D. Chang,Clin Oncol 26:1626-1634(2008),其公开内容整体引入本文作为参考。

[0096] 另外,主要指南推荐西妥昔单抗用于一线左侧RAS WT mCRC的治疗(NCCN指南版本2。2017年更新了结肠癌;Arnold D,Cutsem E. V,Cervantes A等人Metastatic Colorectal Cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Annals of Oncology. 2014;25(suppl 3): iii1-iii9.)。

[0097] 如优选地待根据本发明使用的,RAS WT状态的确定优选地不同于KRAS WT状态的确定,例如如在进行POSEIDON研究时执行的,当时仅排除了KRAS外显子2,而没有排除外显子4和NRAS外显子2-4突变(=RAS突变)。因此,对于根据本发明的治疗方法,待治疗的患者优选是RAS WT CRC/mCRC患者,而不是KRAS WT CRC/mCRC患者。作为所述RAS测试的结果,优选地从待根据本发明的方法治疗的优选患者亚组中,排除具有KRAS外显子2-4和NRAS外显子2-4突变(=RAS突变)两者的患者。

[0098] 因此,RAS野生型测试将优选地排除KRAS突变和NRAS突变的患者两者。

[0099] 结果,RAS野生型状态优选包含KRAS野生型状态和NRAS野生型状态,并且更优选包含KRAS野生型状态和NRAS野生型状态。

[0100] 因此,在本发明的上下文中,RAS WT测试优选包括KRAS WT测试和/或NRAS WT测试,并且优选包括KRAS WT测试和NRAS WT测试两者。尤其优选地,对于包含西妥昔单抗的根据本发明的治疗,RAS WT测试优选由KRAS WT测试和NRAS WT测试组成。

[0101] 因此,本发明的优选主题因此是:

[1]一种治疗人的结肠直肠癌的方法,所述方法包括将阿比妥单抗施用于有此需要的人,其中所述结肠直肠癌具有高αvβ6整联蛋白表达。

[0102] [2]一种治疗人的结肠直肠癌的方法,所述方法包括将阿比妥单抗施用于有此需要的人,其中所述结肠直肠癌是左侧结肠直肠癌。

[0103] [3]如本文所述,优选如上文和/或下文所述的治疗左侧结肠直肠癌的方法,所述方法包括将阿比妥单抗施用于有此需要的人,其中所述左侧结肠直肠癌具有高αvβ6整联蛋白表达。

[0104] [4]如本文所述,优选如上文和/或下文所述,更优选如上文和/或下文的编号节段中所述,且尤其是如编号[1]、[2]或[3]的一个或多个节段中所述的方法,其中有此需要的

人还接受至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体、和/或化学疗法。

[0105] [5]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]、[2]、[3]和/或[4]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述结肠直肠癌是II期、III期或IV期结肠直肠癌。

[0106] [6]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]、[2]、[3]、[4]和/或[5]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述结肠直肠癌是转移性结肠直肠癌或左侧转移性结肠直肠癌。

[0107] [7]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]、[2]、[3]、[4]、[5]和/或[6]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述结肠直肠癌是具有高αvβ6整联蛋白表达的左侧结肠直肠癌或左侧转移性结肠直肠癌。

[0108] [8]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]至[7]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述结肠直肠癌是RAS野生型和/或KRAS野生型结肠直肠癌。

[0109] [9]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]至[8]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述结肠直肠癌是RAS野生型和/或KRAS野生型左侧结肠直肠癌、或者RAS野生型和/或KRAS野生型左侧转移性结肠直肠癌。

[0110] [10]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]至[9]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述结肠直肠癌是具有高αvβ6整联蛋白表达的II期、III期或IV期RAS野生型和/或KRAS野生型左侧结肠直肠癌、或者RAS野生型和/或KRAS野生型左侧转移性结肠直肠癌。

[0111] [11]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]至[10]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述结肠直肠癌是具有高αvβ6整联蛋白表达的RAS野生型和/或KRAS野生型左侧转移性结肠直肠癌。

[0112] [12]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]至[11]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述左侧结肠直肠癌是新近诊断的结肠直肠癌。

[0113] [13]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]至[12]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述方法在一线治疗设置下应用。

[0114] [14]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[13]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述方法在伴随治疗设置下应用。

[0115] [15]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[14]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述方法在辅助治疗设置下应用。

[0116] [16]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[15]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述方法在新

辅助治疗设置下应用。

[0117] [17]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[15]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述人接受与所述阿比妥单抗伴随的所述至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体、和/或所述任选的化学疗法。

[0118] [18]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[16]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体包含西妥昔单抗、贝伐珠单抗和/或帕尼单抗。

[0119] [19]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[18]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体选自西妥昔单抗和贝伐珠单抗。

[0120] [20]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[5]至[18]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述化学疗法包含选自以下的一种或多种化合物：伊立替康、氟尿嘧啶(5-FU)或其前药，优选卡培他滨和/或5-氟胞嘧啶、替加氟/尿嘧啶(UFT)、亚叶酸(甲酰四氢叶酸)、奥沙利铂(乐沙定)、阿柏西普、瑞格非尼、卡培他滨及其前药，

及它们的盐和溶剂化物。

[0121] [21]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[20]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述化学疗法根据FOLFIRI方案进行施用。

[0122] [22]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[20]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述化学疗法根据FOLFOX方案进行施用。

[0123] [23]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[22]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述化学疗法包含

a)选自伊立替康、氟尿嘧啶(5-FU)和亚叶酸(甲酰四氢叶酸)的一种或多种化合物及其前药，

或者

b)选自奥沙利铂(例如乐沙定)、氟尿嘧啶(5-FU)和亚叶酸(例如甲酰四氢叶酸)的一种或多种化合物及其前药，

及它们的盐和溶剂化物。

[0124] [24]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]至[23]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述阿比妥单抗以每周375 mg至750 mg的量、每第二周750 mg至1500 mg的量、或每月1500 mg至3000 mg的量施用于所述人。

[0125] [25]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]至[24]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述阿比妥单抗以每周约500 mg、每第二周约1000 mg、或每月约2000 mg的量施用于所述人。

[0126] [26]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]至[25]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述阿比妥单抗施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

[0127] [27]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[1]至[26]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述阿比妥单抗施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约2周的持续时间。

[0128] [28]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[27]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体以每周75 mg至1000 mg、每第二周150 mg至2000 mg、或每月300 mg至4000 mg的量施用于所述人。

[0129] [29]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[28]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述西妥昔单抗以每周约150 mg/m^2至550 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m^2至1100 mg/m^2、或每月约600 mg/m^2至2200 mg/m^2的量施用于所述人。

[0130] [30]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[29]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述西妥昔单抗施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

[0131] [31]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[30]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述西妥昔单抗施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约2周的持续时间，其中所述西妥昔单抗每周或每第二周施用于所述人。

[0132] [32]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[31]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述西妥昔单抗施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约2周的持续时间，其中所述西妥昔单抗按以下施用于所述人：

a)在每个周期过程中，且优选在每个周期的开始时，以约500 mg/m^2的量，

或者

b)在每个周期的第一周开始时，以约400 mg/m^2的量，且在每个周期的第二周开始时，以约250 mg/m^2的量。

[0133] [33]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[28]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述贝伐珠单抗以每周约1 mg/kg至10 mg/kg的量、每第二周3 mg/kg至15 mg/kg、或每月约6 mg/kg至30 mg/kg的量施用于所述人。

[0134] [34]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[28]和[33]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述

贝伐珠单抗施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

[0135] [35]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[28]和[33]至[34]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述贝伐珠单抗施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约2周的持续时间，其中所述贝伐珠单抗每周或每第二周施用于所述人。

[0136] [36]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[28]和[33]至[35]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述贝伐珠单抗施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约2周的持续时间，其中所述贝伐珠单抗按以下施用于所述人：

a)在每个周期过程中，且优选在每个周期的开始时，以约3 mg/kg至15 mg/kg的量或以5 mg/kg至10 mg/kg的量，

或者

b)在每个周期过程中，且优选在每个周期的开始时，以约7.5 mg/kg的量。

[0137] [37]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[28]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述帕尼单抗以每周约1 mg/kg至10 mg/kg的量、每第二周3 mg/kg至15 mg/kg、或每月约6 mg/kg至30 mg/kg的量施用于所述人。

[0138] [38]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[28]和[37]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述帕尼单抗施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

[0139] [39]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[28]和[37]至[38]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述帕尼单抗施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约2周的持续时间，其中所述帕尼单抗每周或每第二周施用于所述人。

[0140] [40]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[18]至[28]和[37]至[39]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述帕尼单抗施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约2周的持续时间，其中所述帕尼单抗按以下施用于所述人：

a)在每个周期过程中，且优选在每个周期的开始时，以约3 mg/kg至15 mg/kg的量或以4 mg/kg至10 mg/kg的量，

或者

b)在每个周期过程中，且优选在每个周期的开始时，以约6 mg/kg的量。

[0141] [41]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节

段中所述，且尤其是如编号[29]至[32]的一个或多个节段和/或编号[37]至[40]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述结肠直肠癌是RAS野生型和/或KRAS野生型结肠直肠癌。

[0142] [42]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[29]至[32]的一个或多个节段和/或编号[37]至[40]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述结肠直肠癌是RAS野生型和/或KRAS野生型左侧结肠直肠癌、或者RAS野生型和/或KRAS野生型左侧转移性结肠直肠癌。

[0143] [43]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[42]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述化学疗法施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约2周的持续时间，其中

a)所述伊立替康和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)所述亚叶酸和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)所述氟尿嘧啶(5-FU)和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

在每个周期过程中，优选在每个周期的开始时和/或在每个周期的每周开始时，施用于所述人。

[0144] [44]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[43]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述人还接受化学疗法，所述化学疗法包含：

a)以每周50 mg/m^2至150 mg/m^2的量、每第二周100 mg/m^2至300 mg/m^2的量、或每月200 mg/m^2至600 mg/m^2的量的伊立替康和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的亚叶酸(外消旋)和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m^2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的氟尿嘧啶(5-FU)和/或其前药、盐和/或溶剂化物。

[0145] [45]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[44]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述人还接受化学疗法，所述化学疗法包含：

a)以每周50 mg/m^2至150 mg/m^2的量、每第二周100 mg/m^2至300 mg/m^2的量、或每月200 mg/m^2至600 mg/m^2的量的伊立替康和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的亚叶酸(外消旋)和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)以每周1000 mg/m^2至3000 mg/m^2的量、每第二周2000 mg/m^2至6000 mg/m^2的量、或每月4000 mg/m^2至12000 mg/m^2的量，优选每第二周2000 mg/m^2至3200 mg/m^2的量的氟尿嘧啶(5-FU)和/或其前药、盐和/或溶剂化物。

[0146] [46]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[45]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述化学疗法

施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

[0147] [47]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[42]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述化学疗法施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约2周的持续时间，其中

a)所述奥沙利铂和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)所述亚叶酸和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)所述氟尿嘧啶(5-FU)和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

在每个周期过程中，且优选在每个周期的开始时，施用于所述人。

[0148] [48]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[42]和[47]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述人还接受化学疗法，所述化学疗法包含：

a)以每周20 mg/m^2至120 mg/m^2的量、每第二周40 mg/m^2至240 mg/m^2的量、或每月80 mg/m^2至480 mg/m^2的量的奥沙利铂和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的亚叶酸(外消旋)和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m^2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的5-FU和/或其前药、盐和/或溶剂化物。

[0149] [49]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[42]和[47]至[48]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述人还接受化学疗法，所述化学疗法包含：

a)以每周20 mg/m^2至120 mg/m^2的量、每第二周40 mg/m^2至240 mg/m^2的量、或每月80 mg/m^2至480 mg/m^2的量的奥沙利铂和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

b)以每周150 mg/m^2至250 mg/m^2的量、每第二周300 mg/m2至500 mg/m^2的量、或每月600 mg/m^2至1000 mg/m^2的量的亚叶酸(外消旋)和/或其前药、盐和/或溶剂化物，

和/或

c)以每周1000 mg/m^2至3000 mg/m^2的量、每第二周2000 mg/m^2至6000 mg/m^2的量、或每月4000 mg/m^2至12000 mg/m^2的量，优选每第二周2000 mg/m^2至3200 mg/m^2的量的5-FU和/或其前药、盐和/或溶剂化物。

[0150] [50]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[42]和[47]至[49]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述化学疗法施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其是至少12个周期，每个周期具有约1周、约2周、约4周或约一个月的持续时间。

[0151] [51]如本文所述，优选如上文和/或下文所述，更优选如上文和/或下文的编号节段中所述，且尤其是如编号[4]至[42]和[47]至[50]的一个或多个节段中所述的方法，其中所述化学疗法施用于所述人至少6个周期，优选至少8个周期，更优选至少10个周期，且尤其

是至少12个周期,每个周期具有约2周的持续时间,其中

a)所述奥沙利铂和/或其前药、盐和/或溶剂化物,

b)所述亚叶酸和/或其前药、盐和/或溶剂化物,

和/或

c)所述5-FU和/或其前药、盐和/或溶剂化物,

在每个周期过程中,且优选在每个周期的开始时,施用于所述人。

[0152] [52]如本文所述,优选如上文和/或下文所述,更优选如上文和/或下文的编号节段中所述,且尤其是如编号[1]至[51]的一个或多个节段中所述的方法,其中原发性肿瘤定位于结肠中。

[0153] [53]如本文所述,优选如上文和/或下文所述,更优选如上文和/或下文的编号节段中所述,且尤其是如编号[1]至[52]的一个或多个节段中所述的方法,其中原发性肿瘤定位于结肠的左侧中。

[0154] [54]一种用于治疗具有高αvβ6整联蛋白表达的患者的RAS野生型、和/或KRAS野生型左侧转移性结肠直肠癌(mCRC)的方法,所述方法包括向所述患者施用与西妥昔单抗和/或FOLFIRI组合的阿比妥单抗。

[0155] [55]一种用于治疗具有高αvβ6整联蛋白表达的患者的RAS野生型左侧转移性结肠直肠癌(mCRC)的方法,所述方法包括向所述患者施用与西妥昔单抗和FOLFIRI组合的阿比妥单抗。

[0156] [56]一种用于治疗具有高αvβ6整联蛋白表达的患者的RAS野生型、和/或KRAS野生型左侧转移性结肠癌的方法,所述方法包括向所述患者施用与西妥昔单抗和/或FOLFIRI组合的阿比妥单抗。

[0157] [57]一种用于治疗具有高αvβ6整联蛋白表达的患者的RAS野生型、和/或KRAS野生型左侧转移性结肠癌或转移性结肠直肠癌的方法,所述方法包括向所述患者施用与西妥昔单抗和/或伊立替康组合的阿比妥单抗。

[0158] [58]一种用于治疗具有高αvβ6整联蛋白表达的患者的RAS野生型左侧转移性结肠癌或转移性结肠直肠癌的方法,所述方法包括向所述患者施用与西妥昔单抗和伊立替康组合,优选与亚叶酸和/或5-FU组合的阿比妥单抗。

[0159] [59]根据编号[54]至[58]的一个或多个节段的方法,其中所述治疗是一线治疗。

[0160] [60]根据编号[54]至[59]的一个或多个节段的方法,其中待治疗的转移性结肠癌和/或转移性结肠直肠癌是III期和/或IV期癌症。

[0161] [61]根据编号[54]至[60]的一个或多个节段的方法,其中所述药物以这样的方式施用于患者,使得所施用的阿比妥单抗的量为每第二周约1000 mg或每月约2000 mg。

[0162] [62]根据编号[54]至[61]的一个或多个节段的方法,其中具有高αvβ6整联蛋白表达的所述患者具有大于70,优选大于80,更优选大于90,且尤其是大于100、大于120或大于150的αvβ6整联蛋白组织评分。

[0163] [63]根据编号[54]至[62]的一个或多个节段的方法,其中所述治疗施用至少6、至少8、至少10或至少12个周期,每个周期由两周或约两周组成。

[0164] [64]根据编号[54]至[63]的一个或多个节段的方法,其中所述阿比妥单抗、所述西妥昔单抗和/或所述FOLFIRI每第二周施用于所述患者,优选以两周或约两周的周期。

[0165] [65]根据编号[54]至[64]的一个或多个节段的方法，其中所述方法如编号[1]至[53]的一个或多个节段中所述的进一步定义。

[0166] [65]根据编号[1]至[64]的一个或多个节段的方法，其中待用阿比妥单抗治疗的人或患者具有高αvβ6整联蛋白表达，优选通过大于70，优选大于80，更优选大于90，且尤其是大于100、大于120或大于150的αvβ6整联蛋白组织评分进行定量，其中所述组织评分通过根据Simon L. Goodman，Biology Open 1，329-340(2012)执行的免疫组织化学来确定，并且组织评分分类根据McCarty Jr KS，Arch Pathol Lab Med 109: 716-721(1985)来执行。

[0167] 因此，本发明的优选主题是阿比妥单抗在治疗结肠直肠癌，优选具有高αvβ6表达的左侧CRC和/或mCRC患者，优选接受一线治疗的患者的结肠直肠癌的用途。尤其优选的是与至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体(优选选自西妥昔单抗和帕尼单抗)组合的阿比妥单抗，在治疗RAS野生型(WT)和/或KRAS野生型CRC和/或mCRC患者的结肠直肠癌的用途。

[0168] 同样尤其优选的是，优选如上文和/或下文所述的，与推荐的结肠直肠癌的护理标准(SOC)，且尤其是推荐的护理标准(SOC)治疗方案(其优选地选自优选包括西妥昔单抗或帕尼单抗，更优选西妥昔单抗的推荐的护理标准(SOC)治疗方案)组合，任选地与FOLFIRI或FOLFOX，优选FOLFIRI组合的阿比妥单抗用于以下的用途：

i)治疗RAS WT CRC和/或mCRC，

ii)治疗KRAS WT CRC和/或mCRC，

iii)治疗左侧RAS WT CRC和/或mCRC，

iv)治疗左侧KRAS WT CRC和/或mCRC，

v)治疗一线左侧RAS WT CRC和/或mCRC，和

vi)治疗一线左侧KRAS WT CRC和/或mCRC。这些治疗选项是充分确认的，尤其是在一线RAS WT和/或KRAS WT CRC和/或mCRC中，优选在一线RAS WT和/或KRAS WT mCRC中，并且根据最近的分析，尤其优选在左侧CRC和/或mCRC中，甚至更优选在左侧CRC和/或mCRC中。

[0169] 另外，主要指南推荐这种治疗方法例如用于一线左侧RAS WT和/或KRAS WT mCRC(参考NCCN指南11，ESMO指南12)。

[0170] 如上文和/或下文所述的阿比妥单抗的用途以及根据本发明的治疗方法，对于已确认RAS WT状态的一个或多个人或人患者是尤其优选的。该患者组优选地不同于具有确认的KRAS WT状态的人或人患者，例如在POSEIDON研究中治疗的人或人患者，在仅排除了KRAS外显子2，而不排除外显子4和NRAS外显子2-4突变(=RAS突变)的范围内。因此，与KRAS WT CRC患者相比，RAS WT CRC患者对于根据本发明进行治疗是更优选的。因此，具有KRAS外显子2-4和NRAS外显子2-4突变(=RAS突变)的患者，并非根据本发明进行治疗的人或人患者的最优选群体的部分。另外，在CRC中显示BRAF突变的人或人患者优选被认为是具有较差结果的CRC患者的亚组，其优选地需要不同的治疗方法。然而，BRAF突变被认为在右侧CRC中发生。

[0171] 因此，尤其是对于包含阿比妥单抗 + 西妥昔单抗 + 伊立替康的根据本发明的方法，尤其是在具有高αvβ6整联蛋白表达的一个或多个或人患者中，优选地被认为确认了根据本发明的方法的协同作用。

[0172] 因此，根据本发明尤其优选的是优选地如本文所述的治疗CRC和/或mCRC，优选地

mCRC的方法，其中骨干治疗的选择是基于伊立替康的化学疗法，优选FOLFIRI，尤其是用于一线治疗。此外，西妥昔单抗 + FOLFIRI被CRC和/或mCRC的国际指南推荐为SOC，且尤其是推荐为治疗左侧RAS WT mCRC的SOC。优选地，骨干治疗的选择由肿瘤生物学驱动，尤其是在这些一线患者中。根据本发明尤其优选的是如本文所述的治疗CRC和/或mCRC，优选mCRC的方法，其包括向治疗方案中添加5-FU。因此，在本发明的上下文中，尤其优选的是包含添加到西妥昔单抗和FOLFIRI中的阿比妥单抗的治疗方案，优选包括5-FU。

[0173] 还优选的是任选地与FOLFIRI或FOLFOX组合的，包含西妥昔单抗和/或FOLFOX的骨干治疗，或包含贝伐珠单抗的骨干治疗。

[0174] 在本文所述的治疗方法或治疗中的用途中，阿比妥单抗优选以每周至少250 mg的量、每第二周至少500 mg的量、或每月至少1000 mg的量施用于所述人、人患者或患者。阿比妥单抗优选以每周1000 mg或更少的最大量、每第二周2000 mg或更少的最大量、或每月4000 mg或或更少的最大量施用于所述人、人患者或患者。优选地，阿比妥单抗根据所谓的“固定给药(flat dosing)”方案进行施用，所述方案意味着每个人(类)、人患者或仅患者接受限定量或剂量的阿比妥单抗，而不依赖于体重或体表等等。

[0175] 如果没有另外明确定义，阿比妥单抗的施用优选意指将阿比妥单抗施用于一个或多个人(类)、人患者或仅患者，并且相对于此给予的量优选为每个人(类)、每个人患者或仅每个患者的量。在根据本文描述的本发明的治疗方法、医学用途和/或治疗方案的上下文中，这同样优选地适用于所有活性成分、活性要素或药剂。

[0176] 更优选地，阿比妥单抗以每周375 mg至750 mg的量、每第二周750 mg至1500 mg的量、或每月1500 mg至3000 mg的量进行施用。

[0177] 甚至更优选地，阿比妥单抗以每周450 mg至550 mg的量、每第二周900 mg至1100 mg的量、或每月1800 mg至2200 mg的量进行施用。

[0178] 通常，在限定的时间间隔内重复肿瘤治疗，所述间隔优选称为“周期”。术语“周期(cycle)”或“周期(cycles)”是本领域已知且理解的。通常，一个周期是一周或多周的时间间隔，优选一周、两周、三周或四周，这之后，就具体人类、人患者或仅患者而言，重复基本上相同的治疗。根据本发明，尤其是就阿比妥单抗的施用而言，一个周期优选具有两周或约两周的持续时间。

[0179] 甚至更优选地，阿比妥单抗以每个周期900 mg至1100 mg的量进行施用，每个周期优选由两周或约两周组成。优选地，在每个周期的开始时，优选在每个周期的第1天或第2天时，更优选在每个周期的第1天时，施用所述阿比妥单抗。

[0180] 尤其优选地，阿比妥单抗以每个周期约1000 mg的量进行施用，每个周期优选由两周或约两周组成。优选地，在每个周期的开始时，优选在每个周期的第1天或第2天时，更优选在每个周期的第1天时，施用所述阿比妥单抗。

[0181] 尤其优选地，阿比妥单抗以每个周期约1000 mg的量(固定剂量)施用于患者，每个周期优选由两周或约两周组成。优选地，在每个周期的开始时，优选在每个周期的第1天或第2天时，更优选在每个周期的第1天时，施用所述阿比妥单抗。

[0182] 优选地，阿比妥单抗与至少一种生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体和/或化学疗法组合进行施用。生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体是本领域已知的。优选的生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体包含西妥昔单抗、贝伐珠单抗和/或帕

尼单抗。优选地，所述生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体选自西妥昔单抗、贝伐珠单抗和/或帕尼单抗，其中尤其优选的是西妥昔单抗。

[0183] 就其本身而言的西妥昔单抗和施用西妥昔单抗的合适剂量方案是本领域已知的。优选地，西妥昔单抗以每周约150 mg/m^{2}至550 mg/m^{2}的量、每第二周300 mg/m^{2}至1100 mg/m^2、或每月约600 mg/m^{2}至2200 mg/m^{2}的量进行施用。

[0184] 更优选地，西妥昔单抗以每周约200 mg/m^{2}至350 mg/m^{2}的量、每第二周400 mg/m^{2}至700 mg/m^2、或每月约800 mg/m^{2}至1400 mg/m^{2}的量进行施用。

[0185] 甚至更优选地，西妥昔单抗以每个周期450 mg/m^{2}至750 mg/m^{2}的量进行施用，每个周期优选由两周或约两周组成。

[0186] 优选地，所述西妥昔单抗在两周的每个周期的开始时，优选在每个周期的第1天或第2天时，更优选在每个周期(由两周或约两周组成)的第1天时进行施用，或可替代地，将待施用的西妥昔单抗的量分成两个部分，一个部分在每个周期的第一周开始时给予，而第二部分在每个周期的第二周开始时给予。优选地，将这些部分以约1:1的比率或以2:1至4:1的比率，并且尤其优选以约3:2的比率分开。尤其优选地，所述西妥昔单抗以每个周期(由两周或约两周组成)约500 mg/m^{2}的量进行施用，优选在每个周期的第1天或第2天时，更优选每个周期的第1天，或者它以每个周期约650 mg/m^{2}的量进行施用，第一个为在每个周期的第一周开始时约400 mg/m^2，而剩余的为在每个周期的第二周(和最后一周)开始时约250 mg/m^2。

[0187] 优选地，所述阿比妥单抗与FOLFIRI组合进行施用。甚至更优选地，所述阿比妥单抗与所述西妥昔单抗和FOLFIRI组合进行施用。FOLFIRI包含亚叶酸(甲酰四氢叶酸)、氟尿嘧啶(5-FU)和伊立替康和/或其前药、盐和/或溶剂化物，或者更优选由亚叶酸(甲酰四氢叶酸)、氟尿嘧啶(5-FU)和伊立替康和/或其前药、盐和/或溶剂化物组成。

[0188] 就其本身而言的FOLFIRI及其施用是本领域已知且理解的。优选地，根据FOLFIRI方案施用FOLFIRI。

[0189] 甚至更优选地，如下所述施用FOLFIRI：

就其本身而言的亚叶酸(优选外消旋亚叶酸)和/或其前药、盐和/或溶剂化物，以及关于它的合适剂量方案是本领域已知的。优选地，它以每周150 mg/m^{2}至250 mg/m^{2}的量、每第二周300 mg/m^{2}至500 mg/m^{2}的量、或每月600 mg/m^{2}至1000 mg/m^{2}的量进行施用。更优选地，它以每个周期300 mg/m^{2}至500 mg/m^{2}的量进行施用，每个周期优选由两周或约两周组成。甚至更优选地，它以每个周期约400 mg/m^{2}的量进行施用，每个周期优选由两周或约两周组成。优选地，它在每个周期的开始时，优选在每个周期的第1天或第2天时，更优选在每个周期的第1天时进行施用，所述周期由两周或约两周组成。

[0190] 就其本身而言的氟尿嘧啶(5-FU)和/或其前药、盐和/或溶剂化物，以及关于其施用的合适剂量方案是本领域已知的。优选地，它以每周1000 mg/m^{2}至3000 mg/m^{2}的量、每第二周2000 mg/m^{2}至6000 mg/m^{2}的量、或每月4000 mg/m^{2}至12000 mg/m^{2}的量，更优选以每第二周2000 mg/m^{2}至3200 mg/m^{2}的量进行施用。甚至更优选地，它以每周1200 mg/m^{2}至1500 mg/m^{2}的量、每第二周2400 mg/m^{2}至3000 mg/m^{2}的量、或每月4800 mg/m^{2}至6000 mg/m^{2}的量，更优选以每第二周2000 mg/m^{2}至3000 mg/m^{2}的量进行施用。甚至更优选地，它以每个周期约2000 mg/m^{2}或约2800 mg/m^{2}的量进行施用，每个周期优选由两周或约两周组成。优选地，它

在每个周期的开始时，优选在每个周期的第1天或第2天时进行施用。更优选地，它在第1天时作为约400 mg/m^2的i.V.推注进行施用，并且在第1天和/或第2天时作为总共约2400 mg/m^2的一次或多次另外的静脉内输注进行施用，或者可替代地在第1天和/或第2天时作为2400 mg/m^2的连续输注进行施用。

[0191] 就其本身而言的伊立替康和/或其前药、盐和/或溶剂化物，以及关于其施用的合适剂量方案是本领域已知的。优选地，它以每周50 mg/m^2至150 mg/m^2的量、每第二周100 mg/m^2至300 mg/m^2的量、或每月200 mg/m^2至600 mg/m^2的量，更优选地，以每周80 mg/m^2至100 mg/m^2的量、每第二周160 mg/m^2至200 mg/m^2的量、或每月320 mg/m^2至400 mg/m^2的量进行施用。甚至更优选地，它以每个周期160 mg/m^2至200 mg/m^2的量进行施用，每个周期优选由两周或约两周组成。优选地，它在每个周期的开始时，优选在每个周期的第1天或第2天时，更优选在每个周期的第1天时进行施用，所述周期由两周或约两周组成。

[0192] 在新近观察到的1000 mg阿比妥单抗剂量的功效没有显著增加毒性的基础上，在测试的患者数目最多的情况下，1000 mg剂量是最优选的剂量，优选以2周一次的施用间隔给予，优选地也称为每两周或约两周的周期。另外，对于在稳态下的所述1000 mg剂量，在2周一次的施用间隔过程中，阿比妥单抗的血清谷浓度始终高于非线性清除途径的IC99。

[0193] 优选地，将所述1000 mg 阿比妥单抗剂量(优选IV施用)与西妥昔单抗 + FOLFIRI(优选也是IV施用的)组合给予具有高αvβ6整联蛋白表达的RAS WT、左侧mCRC患者，更优选地给予具有高αvβ6整联蛋白表达的新近诊断的RAS WT、左侧mCRC患者，且尤其是对于一线治疗合格的患者。

[0194] 在西妥昔单抗施用的背景下，高度推荐在西妥昔单抗施用之前，通过当地实验室确认RAS WT或KRAS WT mCRC。通过中央实验室确定高αvβ6整联蛋白表达是尤其优选的，并且优选在筛查时完成。

[0195] 优选地，根据在这方面的护理标准方案，具有确认的高αvβ6整联蛋白表达和RAS WT或KRAS WT状态的患者，用阿比妥单抗 1000 mg(每第二周 = 1个周期)加上西妥昔单抗 + FOLFIRI进行治疗。

[0196] 优选地，治疗持续至少6个周期，更优选至少8个周期，且尤其是至少10个周期。通常，施用不少于6或8个周期。通常，执行最多约20个周期，优选约18个周期、约16个周期、约14个周期或约12个周期。然而，施用于每个患者的周期数目由负责的肿瘤科医生自行决定。

[0197] 优选地，就无进展生存期(PFS)，优选地通过研究者的无进展生存期(PFS)而言，加入SoC中，并且更优选地加入西妥昔单抗 + FOLFIRI中的根据本发明的阿比妥单抗治疗，优于SoC，并且更优选地优于单独的西妥昔单抗 + FOLFIRI。

[0198] 优选地，就选自以下的一个或多个下述标准而言：通过研究者的总生存期(OS)、客观应答率(ORR)、应答深度(DPR)和早期肿瘤缩小(ETS)，根据本发明的治疗方法优于根据现有技术的治疗方案。

[0199] 更优选地，就安全性和耐受性而言，优选地甚至考虑到更高的功效，根据本发明的治疗方法与根据现有技术的治疗方案是可比较的。

[0200] 因此，根据本发明的方法治疗优选地在下文给出的一个或多个特征中显示有利的结果：

- 更高的总生存期(OS)，

● 更高的客观应答率(ORR)，

● 更高的应答深度(DPR)和

● 早期肿瘤缩小(ETS)，

● 具有潜在治愈意图的二次切除率的更高可能性

● 有利的总体安全性概况，例如以及在下述一种或多种中的至少合理的结果：AE(包括具有致命结果的AE)的频率、严重性和严重程度，导致停药的AE的频率和性质，临床上显著的异常实验室参数和生命体征的频率和性质，抗药物抗体(结合和/或中和)的频率。

[0201] 为了实现根据本发明的治疗，且尤其是根据本发明的优选治疗的益处，一个或多个人、人患者或患者优选应满足下述标准中的一种或多种，优选两种或更多种，且尤其是三种或更多种：

● 转移性结肠直肠癌，优选IV期转移性结肠直肠癌，更优选新近诊断的转移性结肠直肠癌、或新近诊断的IV期转移性结肠直肠癌的证据；

● 在结肠(包括左脾曲)或直肠的左侧上的原发性肿瘤位置；或优选地在结肠(包括左侧脾曲)的左侧上的原发性肿瘤位置，但排除直肠；

● 通过局部评价证实的肿瘤(原发性肿瘤或转移灶)中的野生型RAS突变状态；或优选通过局部评价证实的肿瘤(原发性肿瘤或转移灶)中的野生型KRAS突变状态；

● 如通过中央实验室评价测定的，肿瘤组织样本显示高αvβ6整联蛋白表达；或优选肿瘤组织样本(福尔马林固定、石蜡包埋的块)，优选来自初次切除术和/或(如果可获得的话)来自转移部位的手术样品。

[0202] 为了实现根据本发明的治疗，且尤其是根据本发明的优选治疗的益处，一个或多个人、人患者或患者应优选不具有任何RAS或BRAF突变，且尤其是任何证实的RAS或BRAF突变。

[0203] 根据本发明的尤其优选的剂量方案在下文直接进行描述，并且包含以下或优选由以下组成：

治疗作为2周周期进行IV施用，每个周期(2周)由以下组成：

西妥昔单抗：

400 mg/m^2(优选通过经过120分钟的IV输注)，

随后为每周一次的250 mg/m^2(优选通过经过60分钟的IV输注)

或者

每两周500 mg/m^2(优选通过IV输注，最初经过120分钟，随后为60至90分钟)

+(在西妥昔单抗输注完成后的60分钟[±5分钟])：

阿比妥单抗：

1000 mg：每2周(优选通过经过60分钟的IV输注)

+(在阿比妥单抗输注完成后的60分钟[±5分钟])

FOLFIRI：

每2周

伊立替康180 mg/m^2 IV，第1天30 - 90分钟

亚叶酸(优选外消旋的)400 mg/m^2 IV，第1天120分钟

5-FU第1天400 mg/m^2推注

5-FU 2400 mg/m² IV,优选在第1-2天经过46小时的时期。

[0204] 然而,西妥昔单抗和FOLFIRI优选根据当地标准并符合国际指南(如NCCN、ESMO)的推荐进行施用。关于西妥昔单抗和FOLFIRI的剂量调整优选地根据标签或当地公认的实践由研究者酌情决定。

[0205] 通常,施用时间表是西妥昔单抗,随后分别为阿比妥单抗(或者其它生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体)和FOLFIRI(或其它化学疗法,优选FOLFOX)。

[0206] 优选地,在西妥昔单抗(或者其它生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体)输注结束与阿比妥单抗输注开始之间,应该始终留出一个小时。优选地,在阿比妥单抗输注结束与FOLFIRI(或其它化学疗法,优选FOLFOX)输注开始之间,应该始终留出一个小时,以便允许分别评价任何药剂有关的副作用。

[0207] 根据本发明的治疗方案应优选地应用最少6个周期,且更优选地最少8个周期,且尤其是最少10个周期。除非出现不可接受的毒性,否则根据本发明的治疗方案优选持续直至疾病消退或疾病进展。

[0208] 阿比妥单抗(EMD 525797)(mAb DI-17E6)目前优选作为用于IV输注的无菌溶液可获得。阿比妥单抗优选在含有稳定剂和氯化钠作为等渗剂的缓冲盐水中配制为25 mg/mL溶液。

[0209] 通常,阿比妥单抗1000 mg作为1小时(±5分钟)IV输注进行施用。恒定的输注速率可以优选地通过使用微处理器控制的输注泵来实现。

[0210] 通常,阿比妥单抗的施用在第1天时(优选在西妥昔单抗(或者其它生长因子或生长因子受体靶向性单克隆抗体)输注完成后的60分钟[±5分钟])发生,并且随后每2周,即优选在两周或约两周的每个周期的第1天时发生。

[0211] 优选在治疗和/或筛查之前,需要通过当地实验室确认RAS WT mCRC。优选在治疗之前和/或在筛查阶段时,需要通过中央实验室确定高αvβ6整联蛋白表达。

[0212] 筛查优选包括下述项中的一种或多种:

表4:筛查

原发性肿瘤位置和疾病程度	原发性肿瘤分期和/或优选 TNM 分期 肿瘤侧(左)的确定和记录
生物标记物评价	可从局部原发性肿瘤(野生型)获得的 RAS 或 KRAS 突变分析 用于评价 αvβ6 整联蛋白表达(高表达)的 FFPE 肿瘤块

待通过根据本发明的治疗方法解决的优选目标优选包括无进展生存期(PFS)、总生存期(OS)、客观应答率(ORR)、应答深度(DPR)、早期肿瘤缩小(ETS)和/或具有潜在治愈意

图的二次切除率。

[0213] 应答深度(DPR)优选确定为在治疗期间的最大肿瘤缩小百分比。

[0214] 早期肿瘤缩小(ETS)优选确定为实现最长肿瘤直径之和距离基线≥20 %降低的患者比例。

[0215] 具有潜在治愈意图的二次切除率优选如下进行确定

在研究治疗期间转移灶的可切除性变得明显的患者应该经历转移灶的手术切除。

[0216] 在此临床研究方案的范围内,进行具有治愈意图的转移灶的二次切除要求客观缓解(CR或PR)的先前证实。

[0217] 具有注册和推荐的国际非专利名称(INN)“阿比妥单抗”的已知单克隆抗αv抗体,有时也称为DI-17E6、DI17E6、EMR62242或EMD 525797。

[0218] 阿比妥单抗(Abituzumab)或阿比妥单抗(abituzumab)是针对α-v整联蛋白(受体)的改造的专门定制的IgG2杂交单克隆抗体。该抗体在WO 2009/010290中详细描述,其公开内容整体引入本文作为参考。

[0219] 它的高变区(CDR)衍生自鼠mAb 17E6(EMD 73034)。这种亲本小鼠IgG1抗体例如通过Mitjans等人(1995;J.Cell Sci. 108,2825),以及专利US 5,985,278和EP 719 859进行描述。小鼠mAb 17E6由杂交瘤细胞系272-17E6产生,并且在登录号DSM ACC2160下进行保藏。

[0220] 它的轻链结构域衍生自人源化单克隆抗EGFR抗体425(马妥珠单抗)。这种抗体例如在EP 0 531 472B1中详细描述,并且衍生自其鼠配对物425(小鼠MAb 425,ATCC HB9629)。该抗体针对人A431癌细胞系而产生,并且发现与人表皮生长因子受体(EGFR)的外部结构域上的多肽表位结合。马妥珠单抗已在临床试验中显示了高功效。

[0221] 一般地,如根据本发明使用的抗αv整联蛋白抗体阿比妥单抗/DI17E6包含:

(i)衍生自小鼠单克隆抗αv整联蛋白抗体17E6的CDR轻链区和重链区

(ii)取自人源化单克隆抗EGFR抗体425的轻链构架区,

(iii)衍生自小鼠单克隆抗αv整联蛋白抗体17E6的重链构架区,任选地包含在特异性位置处的氨基酸的一个或多个突变,和

(iv)衍生自人IgG2的重链恒定区和人恒定κ轻链区,其中在所述IgG2结构域中,IgG2铰链区被人IgG1铰链结构域替换,并且其中任选地已进行在IgG2内的一个或多个突变。

[0222] 具体地,如用于治疗,优选地如本文所述和/或请求保护的治疗,并且优选地如上文和下文所述的临床试验中使用的阿比妥单抗/DI17E6(也指定为“DI17E6γ2h(N297Q)”或“EMD 525797”),具有下述氨基酸序列:

(i)可变和恒定轻链序列(SEQ ID No. 1):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLAWYQQKPGKAPKLLIYYTSKIHSGVPSRFSGSGSGTDYTFTISSLQPEDIATYYCQQGNTFPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC,和

(iv)可变和恒定重链序列(SEQ ID No. 2):

QVQLQQSGGELAKPGASVKVSCKASGYTFSSFWMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNEIFRDKATMTTDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASFLGRGAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG

CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVEPKS SDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQA QSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK，

其中加下划线的序列代表具有CDR的可变区(粗体，与亲本小鼠抗体相同)。修饰的IgG1铰链区由EPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID No. 3)表示，并且AQ是IgG2结构域内的取代。

[0223] 然而，如WO 2009/010290中所示，根据本发明的教导，也可以使用DI17E6的变体。因此，在重链构架区域内包含一个或多个修饰的DI17E6变体可以用于如所述的前列腺癌患者的治疗中，

FR1: QVQLQQSGAELAEPGASVKMSCKASGYTFS(SEQ ID No. 4)

FR2: WVKQRPGQGLEWIG(SEQ ID No. 5)

FR3: KATMTADTSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYYCAS(SEQ ID No. 6)

FR4: WGQGTSVTVSS(SEQ ID No. 7)，

其中一个或多个粗体和加下划线的位置是突变的。更详细地，重链构架区的下述位置在下述位置中的一个、多个或全部处是突变的：A9、E13、M20、K38、R40、A72、S76、Q82、G85、T87、S91和S113。与通过其上文序列定义的DI17E6相比，这些变体显示了相同或非常相似的生物活性和功效。

[0224] 一般而言，如所述的本发明还包括DI17E6抗体的修饰和变体，其在功能上和/或药学上等同于或类似于未修饰的DI17E6，并且其中与DI17E6的分别可变区相比，CDR区以及重链和轻链可变区在其氨基酸序列中是至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的。另外，本发明优选还包括DI17E6抗体的修饰和变体，其在功能上和/或药学上等同于或类似于未修饰的DI17E6，其中与DI17E6的分别恒定区相比，恒定区在其氨基酸序列中是至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的。抗体IgG链的恒定区中的变化可能改善特异性，如免疫原性、ADCC等等。

[0225] 优选地，如所述的本发明还包括DI17E6抗体的修饰和变体，其在功能上和/或药学上等同于或类似于(未修饰的)DI17E6或阿比妥单抗，并且其中与DI17E6的分别重链和轻链可变区相比，重链和轻链可变区在其氨基酸序列中是至少95%、至少98%、至少99%、至少99.5% 或至少99.9%相同的。另外，本发明还包括DI17E6抗体的修饰和变体，其在功能上和/或药学上等同于或类似于未修饰的DI17E6，优选如该段落上文所述，其中与DI17E6的分别恒定区相比，恒定区在其氨基酸序列中是至少90%、或至少95%、或至少99%、或至少99.5%、或至少99.9%相同的。抗体IgG链的恒定区中的变化可能改善特异性，如免疫原性、ADCC等等。

[0226] 甚至更优选地，如所述的本发明还包括DI17E6抗体的修饰和变体，其在功能上和/或药学上等同于或类似于(未修饰的)DI17E6或阿比妥单抗，并且其中与DI17E6的可变重链和/或轻链区域上的分别CDR区相比，可变重链和/或轻链上的CDR区在其氨基酸序列中是至少90%、至少92%、至少94%、至少96%、至少98%或至少99%相同的。另外，本发明还包括DI17E6抗体的修饰和变体，其在功能上和/或药学上等同于或类似于未修饰的DI17E6，优选如该段落上文所述，其中与DI17E6的分别恒定区相比，恒定区在其氨基酸序列中是至少90%、或至少95%、或至少99%、或至少99.5%、或至少99.9%相同的。

[0227] 尤其优选地，如所述的本发明还包括DI17E6抗体的修饰和变体，其在功能上和/或

药学上等同于或类似于(未修饰的)DI17E6或阿比妥单抗,其中重链和轻链CDR区与(未修饰的)DI17E6或阿比妥单抗是100%相同的,但其中与DI17E6的分别重链和轻链可变区相比,除所述CDR区外的重链和轻链可变区在其氨基酸序列中是至少95%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同的。另外,本发明优选地还包括DI17E6抗体的修饰和变体,其在功能上和/或药学上等同于或类似于未修饰的DI17E6,优选如该段落上文所述,其中与DI17E6的分别恒定区相比,恒定区在其氨基酸序列中是至少90%、或至少95%、或至少99%、或至少99.5%、或至少99.9%相同的。

[0228] 尤其优选地,如所述的本发明还包括DI17E6抗体的修饰和变体,其在功能上和/或药学上等同于或类似于(未修饰的)DI17E6或阿比妥单抗,其中与DI17E6的可变重链和/或轻链区域上的分别CDR区相比,可变重链和/或轻链上的CDR区在其氨基酸序列中是至少90%、至少92%、至少94%、至少96%或至少98%相同的,并且其中与DI17E6的分别重链和轻链可变区相比,除所述CDR区外的重链和轻链可变区在其氨基酸序列中是至少95%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同的。另外,本发明优选地还包括DI17E6抗体的修饰和变体,其在功能上和/或药学上等同于或类似于未修饰的DI17E6,优选如该段落上文所述,其中与DI17E6的分别恒定区相比,恒定区在其氨基酸序列中是至少90%、或至少95%、或至少99%、或至少99.5%、或至少99.9%相同的。

[0229] 进一步尤其优选用于如本文所述使用的是DI17E6抗体的修饰或变体,其优选在功能上和/或药学上等同于或类似于(未修饰的)DI17E6或阿比妥单抗(其包含根据SEQ ID No. 1和/或根据SEQ ID No. 2的序列),其中SEQ ID No. 1的序列和/或SEQ ID No. 2的序列的1至10个氨基酸,优选1至5个氨基酸,且尤其是1至3个氨基酸被不同的氨基酸,优选不同的天然存在的氨基酸取代。因此,进一步尤其优选用于如本文所述使用的是DI17E6抗体的修饰或变体,其优选在功能上和/或药学上等同于或类似于(未修饰的)DI17E6或阿比妥单抗(其由根据SEQ ID No. 1和/或根据SEQ ID No. 2的序列组成),其中SEQ ID No. 1的序列和/或SEQ ID No. 2的序列的1至10个氨基酸,优选1至5个氨基酸,且尤其是1至3个氨基酸被不同的氨基酸,优选不同的天然存在的氨基酸取代。因此,进一步尤其优选用于如本文所述使用的是DI17E6抗体的修饰或变体,其优选在功能上和/或药学上等同于或类似于(未修饰的)DI17E6或阿比妥单抗,其包含与SEQ ID No. 1和/或SEQ ID No. 2的序列至少98%,优选至少99%,且尤其是至少99.9%相同的序列。因此,进一步尤其优选用于如本文所述使用的是DI17E6抗体的修饰或变体,其优选在功能上和/或药学上等同于或类似于(未修饰的)DI17E6或阿比妥单抗,其由与SEQ ID No. 1和/或SEQ ID No. 2的序列至少98%,优选至少99%,且尤其是至少99.9%相同的序列组成。

[0230] 尤其优选地,DI17E6抗体或阿比妥单抗是如上文和下文所述的IgG2亚类的重组、去免疫的单克隆抗体,其靶向并抑制配体与人αv-整联蛋白的结合。尤其优选地,通常存在于所述DI17E6抗体或阿比妥单抗的Fc区中的碳水化合物结构,已通过使通常充当附着点的氨基酸残基遗传改变而去除,致使分子去糖基化。抗体尤其优选由4条多肽链组成:由各447个氨基酸组成的2条相同的重链、以及由各214个氨基酸组成的2条相同的轻链。通常,通过共价键(二硫键)和非共价键的组合,将4条链结合在一起。该分子的近似分子量为145 kDa。

[0231] 然而,对于所有方法、用途和治疗,最优选的是具有注册的国际非专利名称(INN)阿比妥单抗的抗体。

[0232] 在阿比妥单抗的单一剂量和多重剂量后的PK评价优选暗示,它根据如对于靶向膜相关受体的其它抗体所述的受体介导的清除模型表现。与健康志愿者中的较早研究的发现一致,mCRPC患者中的阿比妥单抗的 PK是剂量依赖性的,其清除率占优势地由未结合受体的可用性决定。在优选使用的阿比妥单抗的剂量下,可以假定在1000 mg或更高的剂量下,优选地几乎所有受体都被饱和,并且优选地不促成药物清除,或者仅至很小的程度。

[0233] 如本文使用的,术语"化学疗法"是本领域理解的。优选地,它理解为使用一种或多种抗癌药(化学治疗试剂)作为化学疗法方案的部分的一类癌症治疗。

[0234] 根据本发明的理解,术语"化学治疗剂"或"化学治疗试剂"或"抗肿瘤剂"优选视为"细胞毒素剂"和/或"细胞生长抑制剂"类别的成员,并且包括这样的化学试剂,其直接地而不是通过机制如生物应答修饰间接地对肿瘤细胞发挥抗肿瘤效应,即,预防赘生物细胞的发展、成熟或扩散。根据本发明的合适的化学治疗试剂优选是天然或合成的化学化合物,但优选并不明确地排除除蛋白质、多肽外的生物分子。化学治疗剂或试剂的实例优选包括烷化剂,例如氮芥、乙烯亚胺化合物、烷基磺酸盐和具有烷基化作用的其它化合物,例如亚硝基脲、顺铂和达卡巴嗪;抗代谢物,例如叶酸、嘌呤或嘧啶拮抗剂;有丝分裂抑制剂,例如长春花生物碱和鬼臼毒素的衍生物;细胞毒性抗生素和喜树碱衍生物。

[0235] 优选的化学治疗试剂或化学疗法包括氨磷汀(ethyol)、卡巴他赛、顺铂、达卡巴嗪(DTIC)、放线菌素、多西他赛、甲氯乙胺、链脲佐菌素、环磷酰胺、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、多柔比星(阿霉素)、多柔比星脂质体(doxil)、吉西他滨(健择)、柔红霉素、柔红霉素脂质体(daunoxome)、丙卡巴肼、酮康唑、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊苷、氨甲蝶呤、5-氟尿嘧啶(5-FU)、长春碱、长春新碱、博来霉素、紫杉醇(泰素)、多西他赛(泰索帝)、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、克拉屈滨、喜树碱、CPT-11、10-羟基-7-乙基喜树碱(SN38)、达卡巴嗪、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、伊达比星、美司钠、干扰素α、干扰素β、伊立替康、米托蒽醌、托泊替康、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、链脲佐菌素、他莫昔芬、替尼泊苷、睾内酯、硫鸟嘌呤、噻替派、尿嘧啶芥末、长春瑞滨、苯丁酸氮芥及其组合。

[0236] 与阿比妥单抗组合的根据本发明更优选的化学治疗试剂是卡巴他赛、顺铂、多西他赛、吉西他滨、多柔比星、紫杉醇(泰素)、伊立替康和博来霉素。

[0237] 用于与阿比妥单抗组合的根据本发明甚至更优选的化学治疗试剂优选地选自伊立替康、氟尿嘧啶(5-FU)、替加氟/尿嘧啶(UFT)、亚叶酸(甲酰四氢叶酸)、奥沙利铂(乐沙定)、阿柏西普、瑞格非尼、卡培他滨及其前药,

及它们的盐和溶剂化物。

[0238] 用于与阿比妥单抗组合的根据本发明最优选的化学治疗试剂优选选自伊立替康、氟尿嘧啶(5-FU)和亚叶酸(甲酰四氢叶酸)及其前药,或选自奥沙利铂、氟尿嘧啶(5-FU)和亚叶酸(甲酰四氢叶酸)及其前药,

及它们的盐和溶剂化物。

[0239] 阿比妥单抗通常通过静脉内注射进行施用,然而,本领域对于抗体/蛋白质药物方便的其它施用形式是可应用的。所有标准输注溶液和制剂都是适用的,例如WO 2005/077414或WO 2003/053465中所述,包括脂质体制剂。另外,有利的是提供装载有DI17E6和任选的(以增加细胞毒性)化学治疗药物的人血清白蛋白纳米颗粒(Biomaterials 2010,8,

2388-98;Wagner等人)。

[0240] 如果没有另外明确定义,则其活性成分、活性要素(API)、药剂或国际非专利名称(INN)的命名优选包括其所有前药、盐和溶剂化物,尤其是在功能上等价和/或从临床观点认为合适的替代物。

[0241] 如果没有另外明确定义,则术语人、人类、人患者或患者在本文中优选可互换使用或作为同义词使用。

[0242] 如果没有另外明确定义,则术语人(类)、人患者或(仅)患者在本文中优选可互换使用或作为同义词使用。

[0243] 如果没有另外明确定义,或者不利于特定术语使用的上下文,则以单数形式的术语的使用优选地意味着包括以复数形式的该术语,并且以复数形式的术语的使用优选地意味着包括以单数形式的该术语。

[0244] 根据本发明尤其优选的是如本文所述的主题,其中将两个或更多个优选的、更优选的和/或尤其优选的实施方案、方面和/或主题的特征组合成一个实施方案、方面和/或主题。优选地,根据本发明,优选的主题或实施方案可以与其它优选的主题或实施方案组合;更优选的主题或实施方案可以与其它较不优选或甚至更优选的主题或实施方案组合;尤其优选的主题或实施方案可以与其它恰好优选或恰好甚至更优选的主题或实施方案组合,等等。

[0245] 如本文关于数目、数字、范围和/或量使用的术语“约”优选地意指“大约”和/或“大致”。这些术语的含义是本领域众所周知的,并且优选包括正/负15%,且尤其是正/负10%的分别数目、数字、范围和/或量的变化、偏差和/或可变性。

[0246] 在任何情况下,如本文关于数目、数字、范围和/或量使用的术语“约”优选地意指“大约”和/或“大致”。这些术语的含义是本领域众所周知的,并且优选包括至少正/负5%的分别数目、数字、范围和/或量的变化、偏差和/或可变性。

[0247] 如本文使用的,术语“病症”和“疾病”是本领域众所周知且理解的。在本发明的上下文中,如果它们在本文中使用的上下文没有强烈暗示其它含义,则它们优选地作为同义词使用,并且因此优选地是可互换的。相应地,如本文使用的,术语“纤维化病症”和“纤维化疾病”也是本领域众所周知且理解的。在本发明的上下文中,如果它们在本文中使用的上下文没有强烈暗示其它含义,则它们优选地作为同义词使用,并且因此优选地是可互换的。

[0248] 在医学上下文中,包括但不限于治疗方案、给药时间表和临床试验设计,为了通过患者、医务人员和/或医生的使用方便和/或容易,以及结果的可靠性和/或可重复性等,术语“周”/“一周”、“月”/“一个月”和/或“年”/“一年”,可以伴随与公历的定义的轻微偏离而使用。例如,在所述医学背景下,一个月经常指的是28天,而一年经常指的是48周。

[0249] 因此,在本发明的上下文中,术语“周”或“一周”优选指约5、约6或约7天,更优选约7天的时间段。

[0250] 在医学上下文中,术语“月”或“一个月”优选指约28、约29、约30或约31天,更优选约28、约30或约31天的时间段。

[0251] 在医学上下文中,术语“年”或“一年”优选指约12个月的时间段,或者约48、约50或约52周的时间段,更优选地12个月,或者48或约52周的时间段。

[0252] 下文借助于实施例更详细地解释本发明。本发明优选地可以在请求保护的整个范

围内实施，并不限于此处给出的实施例。

[0253] 此外，给出下述实施例以便帮助技术人员通过例证的方式更好地理解本发明。实施例并不预期限制由权利要求所赋予的保护范围。对于实施例中定义的方法、化合物、组合物和/或用途所例证的特点、特性和优点，可以分配给未在实施例中具体描述和/或定义，但落入权利要求中定义的范围内的其它方法、化合物、组合物和/或用途。

[0254] 因此，下述实施例更详细地描述了本发明，但并不限制如请求保护的本发明及其范围。

[0255] 下述实施例更详细地描述了本发明，但并不限制如请求保护的本发明及其范围。

实施例

[0256] 实施例1：

与西妥昔单抗加上伊立替康组合的阿比妥单抗相对于单独的西妥昔单抗加上伊立替康，用于KRAS野生型转移性结肠直肠癌患者：随机分配的I/II期POSEIDON试验

还参见：Annals of Oncology 26: 132-140，2015

背景：整联蛋白涉及肿瘤进展和转移，并且在结肠直肠癌(CRC)细胞上差异表达。靶向整联蛋白αv异二聚体的人源化单克隆抗体，阿比妥单抗(EMD 525797)已证实临床前活性。该试验设计为评价与西妥昔单抗和伊立替康组合的不同剂量的阿比妥单抗的耐受性(I期)，并且探索该组合相对于西妥昔单抗和伊立替康在转移性CRC(mCRC)患者中的功效和耐受性(II期部分)。

[0257] 方法：合格的患者患有KRAS(外显子2)野生型mCRC，并且已接受先前的含奥沙利铂疗法。该试验包含使用与标准护理(SoC：西妥昔单抗加上伊立替康)组合的、高达1000 mg的阿比妥单抗剂量的初始安全导入，以及II期部分，其中将患者按1 : 1 : 1随机分配，以接受与SoC组合的每两周一次的阿比妥单抗500 mg(分组A)或1000 mg(分组B)、或单独的SoC(分组C)。主要终点是研究者评价的无进展生存期(PFS)。次要终点包括总生存期(OS)、应答率(RR)和耐受性。还评价了肿瘤整联蛋白表达与结果之间的关联。

[0258] 结果：I期显示了高达1000 mg的阿比妥单抗剂量与SoC组合是良好耐受的。七十三(分组A)、71(分组B)和72(分组C)个患者被随机分配到II期部分。基线特征是平衡的。PFS在三个分组中是相似的：分组A相对于SoC，危害比(HR)1.13 [95%置信区间(CI)0.78-1.64]；分组B相对于SoC，HR 1.11(95% CI 0.77-1.61)。RR也是相似的。观察到朝向改善的OS的趋势：分组A相对于SoC，HR 0.83(95% CI 0.54-1.28)；分组B相对于SoC，HR 0.80(95% CI 0.52-1.25)。在72%、78%和67%的患者中，观察到≥3级的治疗出现的不良事件。与分组C相比，高肿瘤整联蛋白αvβ6表达与分组A [HR 0.55(0.30-1.00)]和B [HR 0.41(0.21-0.81)]中的更长OS相关。

[0259] 结论：尽管预先定义的探索性生物标记物分析鉴定了阿比妥单抗在其中可能有益的患者亚组，但仍未达到主要的PFS终点。与西妥昔单抗和伊立替康组合的阿比妥单抗的耐受性是可接受的。进一步研究是有必要的。

[0260] ClinicalTrials.gov标识符：NCT01008475

关键词：阿比妥单抗，结肠直肠癌，整联蛋白，生物标记物，单克隆抗体，I/II期

前言

在过去的20年中,转移性结肠直肠癌(mCRC)的治疗选项已得到扩展,特别是随着化学疗法(如伊立替康和奥沙利铂)以及靶向试剂(如西妥昔单抗、帕尼单抗、阿柏西普、瑞格非尼和贝伐珠单抗)的引入[1: Van Cutsem E,Cervantes A,Nordlinger B等人Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis,treatment and follow-up. Ann Oncol 2014;25(suppl 3): iii1-iii9]。这已改善了患者结果,但仍有大多数患者因其疾病而死亡。随着CRC的分子生物学的理解渐增,靶向肿瘤生长和进展必需的因子的新的疗法提供了患者结果改善的最大希望[2: Ciombor KK,Berlin J. Targeting metastatic colorectal cancer—present and emerging treatment options. Phar mgenomics Pers Med 2014;7: 137-144]。整联蛋白构成跨膜、异二聚体糖蛋白(包含α和β亚基)家族,其在正常细胞和肿瘤细胞两者中介导各种细胞间和细胞-细胞外基质(ECM)相互作用[3: Goodman SL,Picard M. Integrins as therapeutic targets. Trends Pharmacol Sci 2012;33: 405-412]。整联蛋白促进肿瘤细胞存活,转移和血管生成[4: Nemeth JA,Nakada MT,Trikha M等人Alpha-v integrins as therapeutic targets in oncology. Cancer Invest 2007;25: 632-646]。研究已显示整联蛋白αvβ5和αvβ6在CRC细胞上表达,而整联蛋白αvβ3和αvβ5在肿瘤相关血管上表达[5,6: Goodman SL,Grote HJ,Wilm C. Matched rabbit monoclonal antibodies against αv-series integrins reveal a novel αvβ3-LIBS epitope,and permit routine staining of archival paraffin samples of human tumors. Biol Open 2012;1: 329-340;Agrez MV,Bates RC,Mitchell D等人Multiplicity of fibronectin-binding alpha V integrin receptors in colorectal cancer. Br J Cancer 1996;73: 887-892]。整联蛋白αvβ6的过表达与早期mCRC患者的中值总生存期(OS)中的显著降低相关[7: Bates RC,Bellovin DI,Brown C等人Transcriptional activation of integrin β6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. J Clin Invest 2005;115: 339-347]。因此,αv整联蛋白,且特别是αvβ6,代表了mCRC中的疗法的合理靶。人源化单克隆IgG2抗体阿比妥单抗(EMD 525797)与αv整联蛋白亚基特异性结合,抑制了与ECM中的配体的相互作用。这可能阻止细胞附着和运动,并且诱导细胞凋亡[3,8: Goodman SL,Picard M. Integrins as therapeutic targets. Trends Pharmacol Sci 2012;33: 405-412;Mitjans F,Sander D,Adan J等人An anti-alpha v-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice. J Cell Sci 1995;108(Pt 8): 2825-2838]。在临床前研究中,已观察到阿比妥单抗在人肿瘤异种移植模型中的抗肿瘤活性;当将阿比妥单抗与西妥昔单抗或伊立替康组合时,观察到比单独的任一试剂更大的活性[Merck KGaA,文件数据]。此外,阿比妥单抗单一疗法的临床研究已证实了其耐受性[9,10: Uhl W,Zuhlsdorf M,Koernicke T等人Safety,tolerability,and pharmacokinetics of the novel alphav-integrin antibody EMD 525797(DI17E6) in healthy subjects after ascending single intravenous doses. Invest New Drugs 2014;32: 347-354;Wirth M,Heidenreich A,Gschwend JE等人A multicenter phase 1 study of EMD 525797(DI17E6),a novel humanized monoclonal antibody targeting alphav integrins,in progressive castration-resistant prostate

cancer with bone metastases after chemotherapy. Eur Urol 2014;65: 897-904]。我们已进行了I/II期试验,以表征在已接受用含奥沙利铂方案的先前疗法的KRAS外显子2野生型mCRC患者中,与伊立替康和西妥昔单抗(mCRC的标准治疗(SoC)选项)组合的不同剂量的阿比妥单抗的耐受性。该试验的II期部分比较了与伊立替康和西妥昔单抗组合的阿比妥单抗,与伊立替康加上西妥昔单抗在这些患者中的功效。

[0261] 患者和方法

研究设计和治疗

这项开放标签、多中心的I/II期研究(ClinicalTrials.gov标识符:NCT01008475)由每个机构的机构审查委员会(Institutional Review Board)批准。所有患者在入选前给予知情同意书。该研究根据赫尔辛基宣言(Declaration of Helsinki)的原则进行。在I期的剂量递增部分中,使用了经典的'3 + 3'设计,其中合格的患者每2周i.v.接受与SoC组合的阿比妥单抗 250、500、750或1000 mg。参考靶饱和的程度,基于潜在活性剂量范围的药代动力学(PK)建模,来选择阿比妥单抗剂量。患者在周期1的第1天时接受西妥昔单抗400 mg/m2,并且其后每周接受一次250 mg/m2。在西妥昔单抗输注完成后≥60 分钟施用阿比妥单抗,并且在阿比妥单抗输注完成后≥60分钟施用伊立替康180 mg/m2(最大体表面积2.0 m2),以允许评价输注有关的副作用。继续治疗直到疾病进展或无法接受的毒性。剂量限制毒性(DLT)定义为:在治疗的前2周内的治疗有关死亡;或与研究治疗有关的任何3/4级非血液学毒性或4级血液学毒性。对于西妥昔单抗和伊立替康预计的毒性,例如4级嗜中性粒细胞减少症或白细胞减少症而无发热且持续≤5天,以及无充分支持护理的3/4级腹泻,不包括作为DLT [11: Elez E,Kocáková I,Höhler T等人Phase I study of EMD 525797 (DI17E6),an antibody targeting αvβ integrins,in combination with cetuximab and irinotecan,as a second-line treatment for patients with k-ras wild-type metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2012;30(suppl): abstract 3539]。在试验的随机分配的II期部分中,患者按1 : 1 : 1集中随机分配至与SoC组合的每2周一次的阿比妥单抗 500 mg或阿比妥单抗 1000 mg、或SoC(每周一次的西妥昔单抗和每2周一次的伊立替康)治疗(数字可在Annals of Oncology处在线获得;参见图4)。关于II期部分的两种阿比妥单抗剂量的选择是由于来自I期部分的不足够数据的可用性,以允许选择一种剂量,并且主要是PK引导的以达到不同水平的靶饱和:每2周一次的阿比妥单抗 500 mg很可能提供在其下已观察到临床前活性的血清浓度;选择每2周一次的阿比妥单抗 1000 mg,以提供始终高于剂量之间的非线性清除途径的IC99的稳态血清谷浓度。基于先前是否已施用抗血管内皮生长因子(VEGF)疗法,对患者进行分层。治疗持续直到如通过研究者评价的射线照相记录的疾病进展、无法接受的毒性、对于治愈性切除的合格性(研究者的评价)或撤回同意书。

[0262] 患者

具有组织学确认的KRAS外显子2野生型mCRC、记录的远处转移、以及先前未照射区域中的至少一个射线照相记录的可测量病灶的年龄≥18岁的成人是合格的。所有患者都必须具有失败的先前的含奥沙利铂/氟嘧啶方案,其定义为在最后一次剂量后6个月内的疾病进展或不耐受。患者具有美国东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group)(ECOG)体力状态0或1,或Karnofsky体力状态≥80%,以及可接受的实验室参数(包括绝对嗜

中性粒细胞计数≥1.5 × 109/l、血小板≥100 × 109/l、血红蛋白≥9 g/dl和胆红素≥1.5 ×正常上限)。关键的排除标准包括用任何表皮生长因子受体抑制剂的先前治疗,已知的脑转移,临床上有关的冠状动脉疾病,不受控制的高血压以及过去12个月内的心肌梗塞病史。

[0263] 评价

在筛查过程中,所有患者都要求提供肿瘤块用于KRAS突变分析和整联蛋白表达的评价。如先前所述 [5: Goodman SL,Grote HJ,Wilm C. Matched rabbit monoclonal antibodies against αv-series integrins reveal a novel αvβ3-LIBS epitope,and permit routine staining of archival paraffin samples of human tumors. Biol Open 2012;1: 329-340],使用对福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织的免疫组织化学,来评价整联蛋白αvβ3、αvβ5、αvβ6、αvβ8和泛αv的表达。如先前所述[12: Pirker R,Pereira JR,von Pawel J等人EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. Lancet Oncol 2012;13: 33-4],关于染色强度和频率的数据用于计算在0-300的连续标度上的组织评分。从研究进入的时间直到研究药物的最终剂量后的31天,监测患者的治疗出现的不良事件(TEAE)。通过研究者评价了研究药物与TEAE之间的因果关系。在基线时以及从随机分配日期直到疾病进展或死亡的每6周,使用计算机断层扫描(CT)或磁共振成像(MRI)扫描,通过成像来评价肿瘤。RECIST用于客观地评价应答[13: Therasse P,Arbuck SG,Eisenhauer EA等人New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer,National Cancer Institute of the United States,National Cancer Institute of Canada. J Natl Cancer Inst 2000;92: 205-216]。完全和部分应答(CR或PR)必须通过在初次扫描后≥6周的扫描进行确认。在试验的随机分配的II期部分过程中,所有扫描都由独立审查委员会进行审查。在初始筛查后,出于除死亡外的任何原因退出试验而无肿瘤评价的所有患者,都经历了包括CT或MRI扫描的最终治疗评价。统计考虑因素描述统计学用于概括方案定义的DLT的I期主要终点、以及每种剂量水平的其它数据。试验的随机分配的II期部分的主要终点是无进展生存期(PFS),其定义为从随机分配到最后一次肿瘤评价后12周内的疾病进展或因任何原因死亡的时间。计划213个患者(每分组71个)的样品大小,以观察拒绝无药物活性的无效假设所需的173次PFS事件,具有85%的功效,假定相对于SoC为0.67的危害比(SoC),中值PFS从用SoC的4.0个月增加到用基于阿比妥单抗的疗法的6.0个月,以及25%(双侧)的显著性水平(α)。II期部分的次要终点包括OS、进展时间、治疗失败时间、应答和疾病控制率以及安全性。预定的探索性终点包括肿瘤整联蛋白表达与功效的关联。功效的主要分析使用了意向性治疗(ITT)群体,其包含随机分配的所有患者。安全性分析群体包括接受至少一个剂量的任何研究药物的所有患者。使用描述统计学来概括数据。通过先前抗癌治疗(抗VEGF是/否)分层的时序检验用于分析事件发生时间的终点。用治疗和先前的抗癌治疗(抗VEGF是/否)作为协变量的Cox比例风险模型用于估计HR。使用SAS ® 系统(8.2或更高版本)进行统计分析。为了评价肿瘤整联蛋白表达与患者结果的关联的探索性终点,中值组织评分最初用作高表达和低表达之间的截止。然后围绕中值改变截止,以评价该中值对于试验中的患者群

体是否可接受。

[0264] 结果

I期剂量递增研究

在2009年10月至2010年10月之间,16个患者入选了I期剂量递增研究。在任何剂量水平上均未观察到DLT(补充表S1,可在Annals of Oncology处在线获得;参见下表5)。然而,由于在DLT观察期后,前三个患者之一因与阿比妥单抗无关的原因死亡,因此另外三个患者以750 mg的剂量入选。入选了另外四个患者,因为一个患者接受了阿比妥单抗250 mg,而不是计划的750 mg剂量。阿比妥单抗有关的TEAE并不常见,并且包括3级低钾血症(以250 mg的一个患者)和3级快速性心律失常(以1000 mg的一个患者)(补充表S1,可在Annals of Oncology处在线获得;参见下表5)。并未观察到4级嗜中性粒细胞减少症、3/4级血小板减少症或血红蛋白的3/4级减少;研究方案并未恶化肾、肝或肺功能以及心输出量。阿比妥单抗的剂量持续时间一般随着剂量渐增而增加;在所有剂量水平下,中值相对剂量强度都>96%。维持西妥昔单抗和伊立替康的相对剂量强度。在所有剂量水平下都观察到抗肿瘤活性的证据,具有1个CR和4个PR,以及7个稳定疾病的患者(补充表S1,可在Annals of Oncology处在线获得;参见下表5)。总之,这些数据证明与西妥昔单抗和伊立替康组合的阿比妥单抗的进一步评估是合理的。

[0265] 表5:入选I期剂量递增研究的患者的特征、安全性和功效

	阿比妥单抗剂量（mg）			
	250（*n*=3）	500（*n*=3）	750（*n*=7）	1,000（*n*=3）
特征				
中值年龄，岁（范围）	61（51-74）	62（45-66）	60（53-66）	65（55-69）
男性:女性，*n*（%）	1（33）/2（67）	2（67）/1（33）	3（43）/4（57）	1（33）/2（67）
白种人，*n*（%）	3（100）	3（100）	7（100）	3（100）
ECOG体力状态，*n*（%）				
0	3（100）	2（67）	4（57）	1（33）
1	0	1（33）	2（29）	2（67）
2	0	0	1（14）	0
IV期，*n*（%）	3（100）	3（100）	7（100）	3（100）
先前化学疗法，*n*（%）*	3（100）	3（100）	7（100）	3（100）
先前放射疗法，*n*（%）	0	0	4（57）	1（33）
安全性				
DLT，*n*（%）	0	0	0	0
3/4级TEAE，*n*（%）	3（100）	1（33）	5（71）	3（100）
阿比妥单抗有关的3/4级TEAE，*n*（%）	1（33）	0	0	1（33）
阿比妥单抗有关的严重TEAE，*n*（%）	1（33）	0	0	1（33）
导致研究停药的阿比妥单抗有关的TEAE，*n*（%）	1（33）	0	0	0
致命TEAE，*n*（%）	0	0	2（29）	0
治疗有关的致命TEAE，*n*（%）	0	0	0	0
功效				
CR/PR/SD，*n*（%）	0（0）/1（33）/2（67）	0（0）/0（0）/1（33）	1（14）/1（14）/3（43）†	0（0）/2（67）/1（33）
疾病对照，*n*（%）‡	2（67）	0	4（57）	3（100）

*所有患者已接受用于mCRC的一线含奥沙利铂/氟嘧啶疗法

† 两个患者无法评估

‡定义为CR、PR或SD≥42天

CR，完全应答；ECOG，美国东部肿瘤协作组；PR，部分应答；SD，稳定疾病；TEAE，治疗出现的不良事件。

[0266] 随机分配的II期研究

患者。

[0267] 在2011年4月至2013年10月之间，总共216个患者入选并随机分配。CONSORT图解显示于图4中。

[0268] 在阿比妥单抗 500 mg、阿比妥单抗 1000 mg和SoC分组中，关于试验的中值(范围)时间(知情同意至死亡、停药或试验的最后一次评价)，分别为13.6(0.1-26.2)、12.3(0.5-27.3+)和11.6(0.6-28.8+)个月。在98%的中值相对剂量强度下，阿比妥单抗治疗的中值持续时间总体为4.1个月。三个治疗分组中患者的基线特征一般是良好平衡的(表6)。安全性。阿比妥单抗分组中的所有患者以及SoC分组中除了一个之外的所有患者(99%)都经历了TEAE(表5)；在阿比妥单抗 500 mg、阿比妥单抗 1000 mg和SoC分组中，分别在72%、78%和67%的患者中观察到≥3级的TEAE。这些数据指示了，阿比妥单抗与西妥昔单抗和伊立替康组合具有可接受的安全性概况。然而，基于研究者的评价，阿比妥单抗分组中~50%的TEAE，包括阿比妥单抗 500和1000 mg分组中17%和29%的患者中的≥3级TEAE，怀疑与阿比妥单抗有关；严重的阿比妥单抗有关的TEAE包括发热性嗜中性粒细胞减少症、结肠炎、直肠脓肿、周围神经病变和急性肾衰竭，各自在用阿比妥单抗500 mg治疗的一个患者中发生；以及嗜中性粒细胞减少症、胃肠道感染和深静脉血栓形成，各自在用阿比妥单抗1000 mg治疗的一个患者中发生。在数据截止时，39(54%)、35(51%)和45(62%)个患者分别已在阿比妥单抗500 mg、阿比妥单抗1000 mg和SoC分组中死亡。两者均由于败血症的两例死亡(阿比妥单抗1000 mg分组中的一个和SoC分组中的一个)被视为与伊立替康有关；32/39、30/35和38/45例死亡是由于疾病进展。功效。关于ITT群体的功效数据显示于表7和图5A-B中。这些显示了PFS和应答率(RR)在治疗分组之间并无不同。中值OS对于阿比妥单抗 500 mg [HR 0.83(95% CI 0.54-1.28)相对于SoC]为15.0 [95%置信区间(CI)10.9-19.2]个月，对于阿比妥单抗 1000 mg [HR 0.80(95% CI 0.52-1.25)相对于SoC]为14.4(95% CI 9.8-19.3)个月，以及对于SoC为11.6(95% CI 9.8- 15.7)个月(图5B)。

表6. 基线人口统计数据（ITT群体）

特征	阿比妥单抗 500 mg + 西妥昔单抗 + 伊立替康（*N* = 73）	阿比妥单抗 1000 mg + 西妥昔单抗 + 伊立替康（*N* = 71）[a]	西妥昔单抗 + 伊立替康（*N* = 72）
中值年龄，岁（范围）	60 (27–83)	61 (25–83)	58 (26–76)
自 CRC 诊断以来的中值时间，月（范围）	13 (3–108)	14 (2–118)	13 (3–95)
男性/女性，*n*（%）	37 (51)/36 (49)	48 (68)/23 (32)	45 (63)/27 (37)
ECOG 体力状态，*n*（%）			
0	35 (48)	30 (42)	30 (42)
1	37 (51)	40 (56)	42 (58)
丢失	1 (1)	1 (1)	0
确诊的 IV 期疾病，*n*（%）	72 (99)	71 (100)	72 (100)
先前手术，*n*（%）	68 (93)	53 (75)	62 (86)
先前放射疗法，*n*（%）	10 (14)	10 (14)	11 (15)
先前抗癌药物疗法，*n*（%）	73 (100)	71 (100)	72 (100)
先前抗 VEGF 疗法，*n*（%）	32 (44)	30 (42)	32 (44)

[a] 一个患者并未接受阿比妥单抗，但的确接受了单次西妥昔单抗输注，并且为了安全性分析的目的，视为在 SoC 分组内。

表7.关于ITT群体以及通过整联蛋白αvβ6表达水平的功效数据。

结果	ITT群体			高整联蛋白 αvβ6 表达			低整联蛋白 αvβ6 表达		
	阿比妥单抗 500 mg + 西妥昔单抗 + 伊立替康 (*N*-73)	阿比妥单抗 1000 mg + 西妥昔单抗 + 伊立替康 (*N*-73)	西妥昔单抗 + 伊立替康 (*N*-72)	阿比妥单抗 500 mg + 西妥昔单抗 + 伊立替康 (*N*-36)	阿比妥单抗 1000 mg + 西妥昔单抗 + 伊立替康 (*N*-31)	西妥昔单抗 + 伊立替康 (*N*-31)	阿比妥单抗 500 mg + 西妥昔单抗 + 伊立替康 (*N*-30)	阿比妥单抗 1000 mg + 西妥昔单抗 + 伊立替康 (*N*-35)	西妥昔单抗 + 伊立替康 (*N*-34)
中值 PFS (月)	5.4	5.6	5.6	5.6	6.9	4.2	4.2	4.9	5.8
95% CI	4.1 6.0	4.1 6.9	4.2 6.9	2.8 8.3	2.7 9.7	2.6 6.9	2.8 6.0	2.8 6.9	4.2 9.9
HR	1.13	1.11		0.84	0.71		1.50	1.74	
95% CI	0.78 1.64	0.77 1.63		0.49 1.45	0.40 1.26		0.84 2.65	1.02 3.00	
*P*值				0.535	0.245		0.168	0.044	
中值 OS (月)	15.0	14.4	11.6	15.0	NR	10.2	13.4	12.8	13.8
95% CI	10.9 19.2	9.8 19.3	9.8 15.7	10.5 23.2	9.7 NR	5.8 13.1	6.2 21.7	7.9 17.5	10.0 NR
HR	0.83	0.80		0.55	0.41		1.48	1.58	
95% CI	0.54 1.28	0.52 1.25		0.30 1.00	0.21 0.81		0.74 2.97	0.82 3.06	
*P*值				0.048	0.010		0.271	0.172	
应答率 (%)	27	25	26	30.6	32.3	16.1	27	25	32
95% CI	18 39	16 37	17 38	16.3 48.1	16.7 51.4	5.5 33.7	12 46	10 40	17 51
OR	1.05	0.95		2.29	2.48		0.76	0.62	
95% CI	0.51 2.19	0.45 2.00		0.70 7.53	0.73 8.37		0.26 2.24	0.21 1.80	

NR，未达到；OR，优势比。

[0269] 生物标记物分析

为了更好地理解αv整联蛋白表达与结果之间的关系而进行的预先计划的探索性

生物标记物分析,提示了高整联蛋白αvβ6表达[高于研究群体(n = 197)的中值;中值组织评分 = 70](数字可在Annals of Oncology处在线获得;参见图6)对于SoC分组中的OS可能是负面预后的,并且可能预测对于用阿比妥单抗治疗的延长OS(图7和8;表7)。分析还提示了,RR在具有高整联蛋白αvβ6表达的肿瘤的患者中可能是改善的。相比之下,具有低整联蛋白αvβ6表达(低于中值)的肿瘤的患者似乎并未从阿比妥单抗疗法中受益(表7)。包括的具有肿瘤整联蛋白αvβ6组织评分0(n = 24)的患者太少,而不允许分析该群体。泛αv整联蛋白水平(中值组织评分 = 230)的预测和预后价值似乎类似于整联蛋白αvβ6的预测和预后价值,而整联蛋白αvβ5的水平似乎并非预测或预后的,并且整联蛋白αvβ3和αvβ8并未表达(数据未显示)。

[0270] 讨论

这是首次报告的CRC患者中的整联蛋白抑制剂的临床试验。在已接受先前奥沙利铂疗法的未选择的mCRC群体中,向西妥昔单抗加上伊立替康中添加阿比妥单抗具有有限的活性;然而,预先指定的探索性生物标记物分析提示了,阿比妥单抗可能在具有显示高整联蛋白αvβ6表达的肿瘤的患者中产生OS益处。OS代表癌症中的临床试验的金标准终点[14,15: European Medicines Agency. Guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man. In Committee for Medicinal Products for Human Use(编辑),London,UK: European Medicines Agency 2013;Food and Drug Administration. Guidance for industry: clinical trial endpoints for the approval of cancer drugs and biologics. In Services USDoHaH(编辑),Rockville,MD,USA: Food and Drug Administration 2007],并且虽然OS是该试验中的次要终点,但探索性的生物标记物研究数据提示了,具有主要OS终点、在具有高肿瘤αvβ6表达的患者群体中的进一步研究是有必要的。选择适当的患者群体的伴随诊断测试的开发对于进一步的试验是至关重要的。预先计划的探索性分析提示了,整联蛋白αvβ6表达可能是负面的预后因素,其中具有高水平的患者具有比具有低水平的患者短~4个月的中值OS [HR 1.95(95% CI 1.04-3.67)],与显示具有高肿瘤整联蛋白αvβ6表达的早期mCRC患者中明显较差的OS的先前研究一致[7: Bates RC,Bellovin DI,Brown C等人Transcriptional activation of integrin β6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. J Clin Invest 2005;115:339-347]。然而,用阿比妥单抗治疗,分析提示了,与对照分组相比,具有高肿瘤整联蛋白αvβ6表达的患者的死亡风险可能降低高达59%。在具有不良预后的这个生物标记物选择群体中,用阿比妥单抗疗法,PFS和RR也似乎是增加的。相比之下,我们并未证实整联蛋白αvβ5水平与临床结果之间的任何关联;先前没有研究已报告了整联蛋白αvβ5在CRC中的预后或预测作用。早期癌症中的研究提示了,整联蛋白αvβ6涉及上皮-间充质转换(EMT),其增强了上皮肿瘤如CRC的侵袭行为[16: Bates RC. Colorectal cancer progression: integrin alphavbeta6 and the epithelial mesenchymal transition(EMT). Cell Cycle 2005;4: 1350-1352]。EMT过程也可能促成转移性疾病,并且在肝和淋巴转移中可见的高水平的整联蛋白αvβ6提示了,整联蛋白αvβ6在mCRC的侵袭性中的作用[7,16: Bates RC,Bellovin DI,Brown C等人Transcriptional activation of integrin β6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of

aggressive colon carcinoma. J Clin Invest 2005;115: 339-347;Bates RC. Colorectal cancer progression: integrin alphavbeta6 and the epithelial mesenchymal transition(EMT). Cell Cycle 2005;4: 1350-1352]。此外,整联蛋白αvβ6是潜伏性转化生长因子-β(TGF-β)的已知激活物,其在结肠癌进展过程中刺激肿瘤生长和侵袭[16: Bates RC. Colorectal cancer progression: integrin alphavbeta6 and the epithelial mesenchymal transition(EMT). Cell Cycle 2005;4: 1350-1352]。因此,抑制整联蛋白αvβ6的疗法具有靶向侵袭和转移肿瘤细胞的潜力,其可能解释了在该试验中具有高αvβ6表达的肿瘤的患者中,用阿比妥单抗观察到的OS和PFS的改善。TGF-β在调控免疫功能中也具有关键作用,并且整联蛋白对此过程是至关重要的[17: Travis MA, Sheppard D. TGF-beta activation and function in immunity. Annu Rev Immunol 2014;32: 51-82]。通过阿比妥单抗的肿瘤整联蛋白αvβ6抑制以减少TGF-β对抗肿瘤免疫应答的抑制活性的潜力,可能解释了阿比妥单抗对OS比PFS和RR显然更显著的作用。这项研究在解释数据时具有需要考虑的几个局限性。关键局限性在于试验是II期试验,并且生物标记物数据虽然是假说生成的,仍基于预先计划的探索性分析。需要进行进一步的试验,以确认αv整联蛋白在用阿比妥单抗治疗的mCRC患者中的预后和预测价值。总的来说,我们的数据指示了,整联蛋白靶向疗法可能在选择的mCRC患者的治疗中具有作用。探索性分析指示了,基于阿比妥单抗的疗法在具有高整联蛋白αvβ6表达的肿瘤的患者中可能是有效的,所述患者否则具有不良预后。这个群体中的进一步试验和伴随诊断测试的潜在开发是有必要的,以进一步评价阿比妥单抗在mCRC中的活性。

[0271] 参考文献

1. Van Cutsem E,Cervantes A,Nordlinger B等人Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis,treatment and follow-up. Ann Oncol 2014;25(suppl 3): iii1-iii9.

2. Ciombor KK,Berlin J. Targeting metastatic colorectal cancer—present and emerging treatment options. Phar mgenomics Pers Med 2014;7: 137-144.

3. Goodman SL,Picard M. Integrins as therapeutic targets. Trends Pharmacol Sci 2012;33: 405-412.

4. Nemeth JA,Nakada MT,Trikha M等人Alpha-v integrins as therapeutic targets in oncology. Cancer Invest 2007;25: 632-646.

5. Goodman SL,Grote HJ,Wilm C. Matched rabbit monoclonal antibodies against αv-series integrins reveal a novel αvβ3-LIBS epitope,and permit routine staining of archival paraffin samples of human tumors. Biol Open 2012;1: 329-340.

6. Agrez MV,Bates RC,Mitchell D等人Multiplicity of fibronectin-binding alpha V integrin receptors in colorectal cancer. Br J Cancer 1996;73: 887-892.

7. Bates RC,Bellovin DI,Brown C等人Transcriptional activation of integrin β6 during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel

prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. J Clin Invest 2005;115: 339-347.

8. Mitjans F,Sander D,Adan J等人An anti-alpha v-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice. J Cell Sci 1995;108(Pt 8): 2825-2838.

9. Uhl W,Zuhlsdorf M,Koernicke T等人Safety,tolerability,and pharmacokinetics of the novel alphav-integrin antibody EMD 525797(DI17E6)in healthy subjects after ascending single intravenous doses. Invest New Drugs 2014;32: 347-354.

10. Wirth M,Heidenreich A,Gschwend JE等人A multicenter phase 1 study of EMD 525797(DI17E6),a novel humanized monoclonal antibody targeting alphav integrins,in progressive castration-resistant prostate cancer with bone metastases after chemotherapy. Eur Urol 2014;65: 897-904.

11. Elez E,Kocáková I,Höhler T等人Phase I study of EMD 525797 (DI17E6),an antibody targeting αvβ integrins,in combination with cetuximab and irinotecan,as a second-line treatment for patients with k-ras wild-type metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol 2012;30(suppl): abstract 3539.

12. Pirker R,Pereira JR,von Pawel J等人EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small cel lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. Lancet Oncol 2012;13: 33-42.

13. Therasse P,Arbuck SG,Eisenhauer EA等人New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer,National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. J Natl Cancer Inst 2000;92: 205-216.

14. European Medicines Agency. Guideline on the evaluation of anticancer medicinal products in man. In Committee for Medicinal Products for Human Use(编辑),London,UK: European Medicines Agency 2013.

15. Food and Drug Administration. Guidance for industry: clinical trial endpoints for the approval of cancer drugs and biologics. In Services USDoHaH(编辑),Rockville,MD,USA: Food and Drug Administration 2007. 16. Bates RC. Colorectal cancer progression: integrin alphavbeta6 and the epithelial mesenchymal transition(EMT). Cell Cycle 2005;4: 1350-1352.

17. Travis MA,Sheppard D. TGF-beta activation and function in immunity. Annu Rev Immunol 2014;32: 51-82。

[0272] 实施例2:

关于用阿比妥单抗靶向患有转移性结肠直肠癌(mCRC)的患者中的整联蛋白的患者选择。随机分配的I/II期Poseidon研究的回顾性分析。

[0273] 前言

靶向整联蛋白(具体地αvβ6)是治疗mCRC的新的方法。组织化学数据已显示,阿比妥单抗(αv整联蛋白)的靶在CRC的肿瘤血管和肿瘤细胞上表达。

[0274] 特别地,αvβ6整联蛋白表达也已提议作为CRC中的预后因素,因为它已在多于700个mCRC患者中进行分析[1-4](Bates RC等人J Clin Invest. 2005;115(2):339-347;Niu Z等人Cell Biosci;2014;4:23;Yang GY等人World J Gastroenterol. 2015;21(24):7457-7467;Elez E等人Ann Oncol. 2015;26:132-140)。结肠癌肿瘤中的高αvβ6表达是这些患者的肿瘤进展和不良生存的指标。

[0275] 存在越来越多的证据,mCRC是遗传异质性疾病,并且起于结肠的不同侧(左相对于右)的肿瘤具有不同的临床结果[5](Arnold D等人Ann Oncol. 2017;28:1713-1729)。在k-RAS野生型(WT)或RAS WT mCRC患者中,比较不同类别的靶向试剂的活性的先前分析提示了,原发性肿瘤位置(侧)对于临床结果可能既是预后性的又是预测性的。

[0276] αvβ6的这种回顾性数据分析基于来自Poseidon研究的探索性数据,调查了右侧和左侧k-RAS WT CRC之间的差异,以及当用阿比妥单抗治疗时,右侧相对于左侧mCRC患者及其结果中是否存在差异。

[0277] 背景

在探索了与西妥昔单抗和伊立替康组合的阿比妥单抗在二线k-RAS WT mCRC中的活性的Poseidon研究(NCT01008475)[4](Elez E等人Ann Oncol. 2015;26:132-140)中,单独的西妥昔单抗 + 伊立替康组的分析也证实了高αvβ6表达与较差的结果相关,提示了高αvβ6表达是负面的预后因素(图7)。

[0278] 意向性治疗群体中的主要终点,无进展生存期(PFS),在先前Poseidon研究中的二线k-RAS WT(k-RAS WT外显子2)mCRC的I/II期中,未能证实统计学显著的益处[4](Elez E等人Ann Oncol. 2015;26:132-140)。

[0279] 预先计划的探索性生物标记物分析提示了,高整联蛋白αvβ6表达对于对照分组的总生存期(OS)可能是负面预后的,并且对于在阿比妥单抗治疗下的延长OS是预测性的[4](Elez E等人Ann Oncol. 2015;26:132-140)。

[0280] Poseidon研究的先前探索性数据分析显示了,用阿比妥单抗治疗的具有高αvβ6表达(组织评分> 70)的患者达到了更高的PFS、OS和客观应答率(ORR),其提示了高αvβ6表达(组织评分> 70)预测对阿比妥单抗的应答(图8)。

[0281] 方法

Poseidon研究的回顾性分析

福尔马林固定的石蜡包埋的肿瘤组织中的整联蛋白αvβ6表达分析是Poseidon研究的部分;进行预先计划的患者材料的回顾性分析(n = 98个具有高αvβ6表达的患者,以及n = 99个具有低αvβ6表达的患者)。

[0282] 执行Poseidon研究数据的回顾性分析,以将肿瘤位置的影响(左n = 152相对于右n = 44,一个患者患有右和左结肠直肠癌两者)与整联蛋白αvβ6表达(低相对于高)关联。分析了关于添加到伊立替康 + 西妥昔单抗中的阿比妥单抗的OS、PFS和ORR(表8、图9A、9B)。

[0283] 表8:Poseidon研究的回顾性分析:PFS、ORR和OS

PFS，月（n）					
	高组织评分			低组织评分	
	阿比妥单抗 1000 mg＋西妥昔单抗＋伊立替康	阿比妥单抗 500 mg＋西妥昔单抗＋伊立替康	西妥昔单抗＋伊立替康	阿比妥单抗 1000 mg＋西妥昔单抗＋伊立替康	西妥昔单抗＋伊立替康
所有患者	6.9（31）	5.6（36）	4.2（26）	4.9（35）	5.8（34）
右 CRC	2.6（11）	2.8（6）	4.2（9）	3.5（8）	4.2（5）
左 CRC	8.6（20）	5.6（30）	4.2（22）	5.4（27）	6.5（29）

ORR，%（n）					
	高组织评分			低组织评分	
	阿比妥单抗 1000 mg＋西妥昔单抗＋伊立替康	阿比妥单抗 500 mg＋西妥昔单抗＋伊立替康	西妥昔单抗＋伊立替康	阿比妥单抗 1000 mg＋西妥昔单抗＋伊立替康	西妥昔单抗＋伊立替康
所有患者	35.5（31）	30.6（36）	16.1（26）	20.0（35）	32.4（34）
右 CRC	18.2（11）	0（6）	0（9）	12.5（8）	20.0（5）
左 CRC	45.0（20）	36.7（30）	22.7（22）	22.2（27）	34.5（29）

OS，（n）					
	高组织评分			低组织评分	
	阿比妥单抗1000 mg＋西妥昔单抗＋伊立替康	阿比妥单抗500 mg＋西妥昔单抗＋伊立替康	西妥昔单抗＋伊立替康	阿比妥单抗1000 mg＋西妥昔单抗＋伊立替康	西妥昔单抗＋伊立替康
所有患者	20.6（31）	15.5（36）	10.2（31）	12.8（35）	15.9（34）
右CRC	9.8（11）	5.1（6）	9.5（9）	8.6（8）	10.0（5）
左CRC	25.6（20）	17.1（30）	10.2（22）	13.6（27）	15.9（29）

CRC,结肠直肠癌;ORR,客观应答率;OS,总生存期;PFS,无进展生存期。

[0284] 表9：Poseidon研究的回顾性分析:关于OS的HR

阿比妥单抗	群体	HR	HR 95%置信生存	P值
500/1000 mg	左/αvβ6-上文	0.454	0.257-0.805	0.0068
500 mg	左/αvβ6-上文	0.527	0.284-0.976	0.0416
1000 mg	左/αvβ6-上文	0.357	0.171-0.746	0.0061

HR,危害比;OS,总生存期。

[0285] 结论

尽管样品大小很小,但与单独的伊立替康 + 西妥昔单抗相比,具有左侧k-RAS WT mCRC以及在其肿瘤中的αvβ6整联蛋白高表达的患者看起来最受益于向伊立替康 + 西妥昔单抗中添加阿比妥单抗。

[0286] 在具有低组织评分的患者未见益处。

[0287] 在Poseidon研究中,高达1000 mg的阿比妥单抗剂量与伊立替康 + 西妥昔单抗组合是良好耐受的。[5](Arnold D等人Ann Oncol. 2017;28:1713-1729)。

[0288] 二线Poseidon研究的这种回顾性数据分析确认了,在接受EGFR抑制剂(例如西妥昔单抗或帕尼单抗)用于其一线转移性疾病的患者中,k-RAS WT mCRC中的左侧相对于右侧的治疗效应差异的观察。[5](Arnold D等人Ann Oncol. 2017;28:1713-1729)。

[0289] 独立地,αvβ6整联蛋白表达可以充当mCRC中的新生物标记物。

[0290] 参考文献

1. Bates RC等人J Clin Invest. 2005;115(2):339-347.2. Niu Z等人Cell Biosci;2014;4:23.

3. Yang GY等人World J Gastroenterol. 2015;21(24):7457-7467

4. Elez E等人Ann Oncol. 2015;26:132-140.

5. Arnold D等人Ann Oncol. 2017;28:1713-1729。

[0291] 实施例3：

RAS野生型、KRAS野生型和/或NRAS野生型测试程序

Therascreen® KRAS RGQ PCR试剂盒和方法

I. 一般信息

装置通用名称:实时PCR测试

装置商品名称:*therascreen®* KRAS RGQ PCR Kit

装置Procode：OWD

申请人姓名和地址:QIAGEN Manchester Ltd.

Skelton House,Lloyd Street North

Manchester,UK M15 6SH

专家组建议日期：无

上市前批准申请(PMA)编号:P110027

FDA批准通知书日期：2014年5月23日

加急：不适用

therascreen® KRAS RGQ PCR Kit的原始PMA(P110030)于2012年7月6日获得批准,并且指示为基于未检测到KRAS突变的测试结果,帮助鉴定用Erbitux®(西妥昔单抗)治疗的CRC患者。支持该指示的SSED可在CDRH网站上获得,并且在此处引入作为参考。提交了当前的PMA(P110027),以扩展关于*therascreen®* KRAS RGQ PCR Kit的指示。

[0292] II. 使用的适应症

therascreen® KRAS RGQ PCR Kit是在Rotor-Gene Q MDx仪器上使用的实时定性PCR测定,用于检测人KRAS癌基因中的七个体细胞突变,使用从福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)结肠直肠癌(CRC)组织中提取的DNA。*therascreen®* KRAS RGQ PCR Kit预期基于未检测到KRAS突变的测试结果,帮助鉴定用Erbitux®(西妥昔单抗)和Vectibix®(帕尼单抗)治疗的CRC患者。

[0293] III. 禁忌症

无。

[0294] IV. 警告和注意事项

警告和注意事项可以在*therascreen®* KRAS RGQ PCR Kit标签中找到。

[0295] V. 装置描述

下述部件构成整个装置：

· QIAGEN QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit

· QIAGEN *therascreen®* KRAS RGQ PCR Kit

· QIAGEN Rotor-Gene Q MDx,软件版本2.1.0和KRAS Assay Package

样本制备

将福尔马林固定、石蜡包埋的(FFPE)块切片成载玻片。染色玻片用于确认肿瘤含量超过组织的20%,并且可获得4mm^{2}的最小肿瘤面积。从玻片上刮下单个未染色的组织切片

用于DNA提取。如果切片具有小于20%的肿瘤含量，则切片应进行宏观解剖。使用QIAGEN QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit和修改的方案，从取自结肠直肠癌患者的FFPE组织的5 μm玻璃固定切片中，手动提取且纯化DNA。用二甲苯使肿瘤组织脱石蜡，并且用乙醇萃取二甲苯。在变性条件下，用蛋白酶K将样品裂解一小时。将样品在90°C下加热，以逆转基因组DNA的福尔马林交联。使样品通过基于二氧化硅的膜，使得基因组DNA与膜结合并去除污染物。纯化的基因组DNA从膜洗脱到200 μL洗脱缓冲液内。所提取的DNA贮存于-20°C下。

[0296] PCR扩增和检测

QIAGEN *therascreen*® KRAS RGQ PCR Kit含有用于八个分开反应的试剂；扩增且检测KRAS癌基因的外显子2中的密码子12和13中的突变的7个突变特异性反应，以及扩增且检测KRAS癌基因中的外显子4的区域的一个对照反应。KRAS RGQ Kit中的每个反应利用与荧光团标记的Scorpion® 引物组合的、扩增阻碍突变系统(ARMS®)等位基因特异性聚合酶链反应(PCR)，以在非突变的基因组DNA(突变阴性；野生型)的背景下，选择性扩增突变的基因组DNA模板(突变阳性)，以检测任何所得的扩增产物。ARMS技术利用Taq聚合酶区分在PCR引物的3'端处的匹配与错配的能力。Scorpion是含有与探针共价连接的PCR引物的双功能分子。探针掺入荧光团[羧基荧光素(FAM™)]和猝灭剂两者，所述猝灭剂猝灭荧光团的荧光。在PCR期间，当探针与ARMS扩增子结合时，荧光团和猝灭剂变得分开，导致可检测的荧光增加。

[0297] 在用突变特异性测试反应测试之前，必须用对照反应对每个DNA样品进行测试，以确定DNA的质量和数量对于测定的工作范围是否足够和适当。对照反应Ct值用于评价样品中的总可扩增DNA，并且必须落入每个样品的预先指定的范围内。

[0298] 从对照反应获得的结果的解释如下：

表10：从对照反应获得的结果的解释

对照Ct值	解释	动作
> 32.00	可扩增DNA的数量不足以用于突变分析。	应当提取并测试另外的样品
< 21.92	可扩增DNA的数量对于突变分析太高。	用试剂盒中提供的样品稀释水稀释
21.92 ≤ 对照Ct ≥ 32.00	可扩增DNA的数量适合于突变分析。	---

关于用对照反应混合物评价DNA样品的运行参数是用于使用突变反应混合物的突变分析的相同运行参数。运行参数为：(1)在95°C保持15分钟，以激活Taq聚合酶；(2)95°C 30秒以变性以及60°C 1分钟以退火/延伸的40个循环的PCR。在其下来自特定反应的荧光跨越预定阈值的PCR循环被定义为Ct值。通过*therascreen*® KRAS RGQ Kit检测到的KRAS癌基因的密码子12和13中的七个突变在下文列出：

表11：通过*therascreen*® KRAS RGQ Kit检测到的KRAS致癌基因的密码子12和13中的七个突变

突变	碱基变化
GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC

测试对照

每个测试运行必须含有内部对照、阳性对照和阴性对照。如果阴性对照指示测试运行已被污染(Ct值高于FAM通道的设定值),或者阳性对照的Ct值位于设定范围之外(FAM和HEX通道两者),则测试运行视为无效。

[0299] 表12:运行有效性标准

反应混合物	样品	RGQ通道	有效Ct范围*
对照	阳性对照	FAM	23.50至29.50
对照	无模板对照	FAM	无扩增
对照	无模板对照	HEX	31.91至35.16
突变	阳性对照	FAM	23.50至29.50
突变	无模板对照	FAM	无扩增
突变	无模板对照	HEX	31.91至35.16

*范围是包括性的

内部对照:

所有八个反应都含有另外的ARMS引物和HEX标记的Scorpion引物,用于扩增和检测用作内部对照的合成的非KRAS有关寡核苷酸模板。Scorpion引物用HEX进行标记,以在对照和突变反应中与FAM标记的Scorpion区分开。在每个反应中,将内部对照反应设计为两个反应中较弱的一个。这通过使用非常低浓度的内部对照模板来实现。内部对照反应设计为不依赖于突变特异性扩增而工作,但如果它被FAM反应"击败",则在强扩增的存在下可能失败。在七个突变反应的任何一个中,具有失败的内部对照反应的突变阴性结果被报告为无效结果。内部对照用于检测抑制剂或总反应失败。

[0300] *阳性对照:*

阳性对照包含代表通过*therascreen®* KRAS RGQ Kit检测的每个突变的合成寡核苷酸混合物。阳性对照的检测确认了试剂盒中的每种反应混合物的正确起作用。

[0301] *阴性对照:*

therascreen® KRAS RGQ Kit含有无核酸酶的水,以用作无模板对照(NTC)反应。NTC充当阴性对照,并且评价在测定设置过程中的潜在污染。

[0302] 仪器和软件

Rotor-Gene Q(RGQ)MDx Instrument是实时PCR分析仪,其设计用于扩增DNA的热循环和实时检测。RGQ MDx Instrument控制且监测PCR反应,并且包括基于PCR结果确定突变状态的软件。它掺入离心转子设计用于在PCR反应过程中的热循环,其中每个试管在移动

的空气腔室中旋转。根据软件确定的循环，样品在低质量空气烘箱中进行加热且冷却，所述循环启动PCR循环的不同阶段，对于每次PCR运行总共40个循环。在RGQ MDx Instrument中，样品通过发光二极管从腔室的底部激发。能量通过在管的底部处的薄壁传递。发射的荧光通过在腔室的侧面上的发射滤光片，并且被光电倍增管检测到。当每个管与检测光学器件对准时，执行检测；管每150毫秒旋转经过激发/检测光学器件。荧光信号监测PCR反应的进程。该仪器能够支持高达六个光学通道（六个激发源和六个检测滤光片），然而，therascreen® KRAS RGQ Kit仅使用其中两个通道(FAM和HEX通道)。

[0303] *therascreen®* KRAS Assay Package由两个模板组成："therascreen® KRAS QC Locked Template"(用于DNA样品评价)和"therascreen® KRAS Locked Template"(用于KRAS突变检测)。这些模板含有PCR运行参数并计算结果。相同的运行参数用于通过对照反应混合物的DNA样品评价，以及使用突变反应混合物的KRAS突变检测两者。

[0304] RGQ MDx Instrument软件支持实时分析程序。软件确定Ct值，计算ΔCt值，并且将这些与如上所述掺入软件内的突变特异性截止值进行比较。软件内嵌入标志/警告系统，以便告知用户该测定的潜在问题，并且指示在有效的试验运行内的无效试验运行或无效样品(不适当的DNA水平或内部对照失败)。对于无效运行或无效样品并不报告结果。KRAS RGQ Kit的用户无法做出突变状态的主观确定，因为他们无权访问Ct或ΔCt值，而只能看到由软件报告的突变状态调用。

[0305] 结果解释

对照反应的Ct反映了样品中的可扩增KRAS模板的总量，而等位基因特异性反应的Ct反映了样品内的KRAS突变的量。对照反应和等位基因特异性反应之间的Ct值差异(ΔCt)指示了样品内的突变比例。随着样品中的突变型DNA的比例增加，ΔCt值接近0。随着样品中的突变型DNA的比例减少，ΔCt值增加(接近阳性调用相对于阴性调用的阈值)。当ΔCt测量超过突变型反应的ΔCt截止值时，该测定报告未检测到突变(例如，对于7个突变呈阴性)。

[0306] 对于每个样品，由RGQ MDx Instrument软件执行计算，以确定7种突变特异性反应各自的ΔCt值(FAM通道)：

[突变反应Ct值] - [对照反应Ct值] = ΔCt

根据预定的分析Ct和ΔCt值，Rotor-Gene Q软件定性地确定DNA样品的突变状态，并且报告哪些样品含有哪个突变。每个样品具有七个可能的ΔCt值(每个突变一个)。将这些值与掺入RGQ MDx Instrument软件内的预先制定的规格(截止值)进行比较，以确定样品是突变阳性还是阴性的，以及存在哪种突变(如果有的话)。当突变反应的ΔCt值小于或等于该反应的截止值时，样品为KRAS突变阳性的。测定结果展示为“突变阳性”、“未检测到突变”、“无效”，或者，如果运行对照失败，则为“运行对照失败”。对于突变阳性样品，报告了特异性突变。

[0307] 表13:突变测定和截止

突变测定	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
截止(ΔCt)	≤ 8.0	≤ 6.6	≤ 8.0	≤ 8.0	≤ 8.0	≤ 7.5	≤ 7.5

VI.替代实践和程序

存在矫正结肠直肠癌的几种其它替代方法：手术、射频消融、冷冻手术、化学疗法、放射疗法和靶向疗法。每种替代方法具有其自身的优点和缺点。患者应与他/她的医生充分

讨论这些替代方法,以选择最能满足期望和生活方式的方法。

[0308] 为了选择可能受益于Vectibix(帕尼单抗)靶向疗法的患者,不存在用于测试结肠直肠癌组织的其它FDA认证(cleared)或批准的替代方法,用于检测KRAS癌基因中的突变。

[0309] cobas® KRAS Mutation Test

I.一般信息

装置通用名称:实时PCR测试

装置商品名称:cobas® KRAS Mutation Test

装置Procode:OWD

申请人姓名和地址:Roche Molecular Systems,Inc.(RMS)

4300 Hacienda Drive

Pleasanton,CA 94588-2722

专家组建议日期:无

上市前批准申请(PMA)编号:P140023

FDA批准通知书日期:2015年5月7日

加急:不适用

II. 使用的适应症

用于与cobas® 4800 System一起使用的cobas® KRAS Mutation Test是实时PCR测试,用于检测衍生自福尔马林固定的石蜡包埋的人结肠直肠癌(CRC)肿瘤组织的DNA中,KRAS基因的密码子12和13中的七个体细胞突变。该测试预期用作鉴定CRC患者的辅助,基于未检测到突变的结果,对于所述CRC患者可能指示用Erbitux®(西妥昔单抗)或Vectibix®(帕尼单抗)的治疗。样本使用用于手动样品制备的cobas® DNA Sample Preparation Kit、以及用于自动化扩增和检测的cobas z 480分析仪进行处理。

[0310] III. 禁忌症

不存在关于该测试使用的已知禁忌症。

[0311] IV. 警告和注意事项

警告和注意事项可以在cobas® KRAS Mutation Test产品标签中找到。

[0312] V. 装置描述

cobas® KRAS Mutation Test由两个试剂盒和一个系统平台组成。cobas® 4800 System平台的细节在下文“仪器和软件”中进行描述。试剂盒提供了执行测试的两个主要过程的必需试剂:

1. cobas® DNA Sample Preparation试剂盒提供了用于手动样本制备的试剂,以从福尔马林固定、石蜡包埋的组织(FFPET)中获得基因组DNA。

[0313] 2. cobas® KRAS Mutation Test试剂盒提供了用于KRAS突变的自动化实时PCR扩增和检测的试剂。

[0314] 样本制备

使用cobas® DNA Sample Preparation Kit,基于核酸与玻璃纤维结合的手动样本制备,来处理FFPET样本并分离基因组DNA。通过在高温下与蛋白酶和离液裂解/结合缓冲液一起温育,来裂解FFPET样本的脱石蜡的5 μm切片,所述缓冲液释放核酸并保护释放的基因组DNA免于DNA酶。随后,将异丙醇添加到裂解混合物中,然后将其通过具有玻璃纤维过滤

器芯的柱进行离心。在离心过程中，基因组DNA结合到玻璃纤维过滤器的表面。通过离心去除未结合的物质，例如盐、蛋白质和其它细胞杂质。将吸附的核酸洗涤，然后用水溶液洗脱。基因组DNA的量进行分光光度法测定，并且调整至2 ng/μL的固定浓度。将二十五(25)μL含50 ng基因组DNA的洗脱物，与25 μL每种活化的主混合物试剂(来自cobas® KRAS Mutation Test试剂盒)，在96孔板中组合。一旦已将对照和样品加入96孔板中，就将板转移到cobas z 480分析仪，用于自动化扩增和检测。

[0315] PCR扩增

靶选择和扩增

cobas® KRAS Mutation Test试剂盒使用这样的引物，其定义了人基因组DNA中的含有KRAS密码子12和13的外显子2的85碱基对序列。扩增仅在引物之间的KRAS基因的区域中发生；整个KRAS基因不被扩增。下表14中提供了预期的靶突变。

[0316] 表14:cobas® KRAS Mutation Test的预期靶突变列表

密码子	突变ID	核苷酸变化	AA变化	COSMIC ID
12	c.34G>T	GGT>TGT	G12C	516
	c.34G>A	GGT>AGT	G12S	517
	c.34G>C	GGT>CGT	G12R	518
	c.35G>T	GGT>GTT	G12V	520
	c.35G>A	GGT>GAT	G12D	521
	c.35G>C	GGT>GCT	G12A	522
13	c.38G>A	GGC>GAC	G13D	532

栖热菌属(*Thermus*)物种Z05 DNA聚合酶的衍生物用于靶扩增。首先，加热PCR反应混合物，以使基因组DNA变性并暴露引物靶序列。随着混合物冷却，上游和下游引物对靶DNA序列退火。在二价金属离子和过量dNTP的存在下，Z05 DNA聚合酶延伸每个退火的引物，因此合成第二条DNA链。这完成了PCR的第一个循环，产生双链DNA拷贝，其包括KRAS基因的靶向85碱基对区域。该过程对于多个循环进行重复，其中每个循环有效地使扩增子DNA的量倍增。

[0317] 通过使用AmpErase(尿嘧啶-N-糖基化酶)酶和脱氧尿苷三磷酸(dUTP)，在cobas® KRAS Mutation Test中实现了来自样本的靶核酸的选择性扩增。AmpErase酶催化含有脱氧尿苷但不含胸苷的DNA链的破坏。脱氧尿苷不存在于天然存在的DNA中，但由于使用dUTP代替胸苷三磷酸作为反应混合物试剂中的三磷酸核苷酸之一，而始终存在于扩增子中；因此，仅扩增子含有脱氧尿苷。在靶DNA扩增之前，脱氧尿苷致使污染的扩增子对通过AmpErase酶的破坏敏感。AmpErase酶在高于55°C的温度下(即，在热循环步骤自始至终)失活，并且因此并不破坏靶扩增子。

[0318] *自动化实时突变检测*

cobas z 480分析仪实时测量通过特异性PCR产物生成的荧光量。在扩增后，使用cobas® KRAS Mutation Test生成的每个扩增子经受解链程序，其中温度从40°C升高到95°C(TaqMelt)。野生型特异性探针在低温下与野生型和突变型扩增子两者结合。在结合状态下，在探针的5'端上的荧光素报告染料与3'端猝灭剂染料足够远离，允许荧光染料发出特异性波长的光。随着温度升高，探针与扩增子解离，允许猝灭染料与荧光染料变得非常接

近,减少了可测量的荧光量。与探针完全匹配的扩增子(野生型)在比具有一个或多个错配的扩增子(突变型)更高的温度下解链。测量在每个温度增量下的荧光量,并计算解链温度。当解链温度在指定范围内时,可以检测到密码子12和13中的突变型KRAS序列的存在。为了避免检测到密码子12和密码子13沉默突变(无氨基酸变化),修饰的碱基充当通用碱基,并且产生在野生型范围内的解链温度。

[0319] 仪器和软件

cobas® 4800系统由cobas® 4800系统SR2.1软件加以控制,所述软件提供核心软件引擎和用户界面。该核心系统软件设计为允许使用分析物特异性分析软件包(ASAP),在系统上执行多重测定。测试系统的cobas z 480分析仪部件还具有其自身的内部仪器控制软件,其由核心软件驱动。所有这些软件部件都在设计控制过程和有关软件标准下进行开发。

[0320] 专用的控制器计算机运行cobas® 4800 SR2.1 System软件,并且提供与cobas z 480和实验室信息系统(LIS)的接口。计算机还用ASAP处理荧光信号,并将测试结果存储在受控数据库中。完整的系统允许用户对于每个样本手动创建测试工作订单。软件向导将指导用户通过必要的步骤以执行运行,所述运行包括cobas z 480维护处理、测试选择、样本ID输入、试剂和微孔板条形码输入、微孔板加载和运行开始。

[0321] 4800 System在cobas z 480分析仪的处理和分析过程中跟踪每个样本。一旦热运行完成,ASAP就使用数据分析算法来处理荧光数据,评价对照的有效性,并且使用测定特异性结果解释逻辑来确定结果。然后,该软件以三种格式向用户提供结果:可打印的PDF结果报告、基于图形用户界面(GUI)的结果查看器、以及将结果导出到LIS。cobas® 4800 System软件包括验证的KRAS数据分析算法,以确定样品结果和运行有效性。

[0322] 结果解释

通过分析软件计算解链曲线的解链温度(Tm)和峰高(PH),并且来自所有突变型对照、阴性对照和校准物反应的值用于确定运行是否有效。如果运行有效,则分析软件将通过针对Tm和PH的可接受范围评估Tm和PH,来确定样本的有效性和突变状态。

[0323] 对于其观察到突变型Tm的样本被报告为“检测到突变”,并且报告突变型反应(表15)。由于可能的突变数目和解链技术的性质,未指定密码子内的特异性突变。

[0324] 对于其并未观察到突变型Tm的样本被报告为“未检测到突变”(表15)。对于其密码子12/13反应孔无效的样本被报告为“无效的”。对于其观察到超出范围Tm的样本(既不是野生型也不是突变型范围)被报告为“无效的”。所有有效样本都具有至少一个解链峰(突变型、野生型或两者)。没有解链峰的样本是无效的。

[0325] 表15:cobas® KRAS Mutation Test的结果解释

cobas® KRAS Mutation Test结果		解释
测试结果	突变结果	
检测到突变	密码子12/13	在KRAS密码子12或密码子13中检测到突变
未检测到突变	N/A	在KRAS密码子12或密码子13中未检测到突变
无效的	N/A	结果是无效的。遵循包装插页中概述的说明，重复测试具有无效结果的样品
失败的	N/A	由于硬件或软件故障，运行失败

测试对照和校准物

提供了一个KRAS突变型对照(MC)和一个KRAS阴性对照,以充当外部运行对照。通过探针检测野生型密码子12和13充当内部全过程对照。

[0326] 1．*KRAS突变型对照*:突变型对照是双重突变型线性化DNA质粒、以及来自野生型细胞系的基因组DNA的共混物。该质粒含有KRAS密码子12(Asp,GAT)和KRAS密码子61(His,CAC)的突变型序列。突变型对照包括在每次运行中,并且充当除了样品制备之外的每一个步骤的过程对照。突变型对照反应必须具有在分别的可接受范围内的KRAS野生型和KRAS密码子12/13突变型解链温度,用于运行视为有效的。

[0327] 2．*KRAS阴性对照*:阴性对照是全过程对照,并且作用于鉴定cobas® DNA Sample Preparation试剂盒和cobas® KRAS Mutation试剂盒的潜在试剂或过程污染。解链峰高值必须低于预先制定的运行视为有效的截止值。对于阴性对照没有提供试剂。DNA样本稀释物(DNA SD)用作阴性对照。

[0328] 3．*KRAS校准物*:KRAS校准物由野生型基因组DNA组成,并且充当解链温度(Tm)校准物,以补偿运行间以及仪器间的温度变化性。在分析突变状态之前,野生型峰Tm通过分析软件用于调整突变型对照和所有样本的Tm值。

[0329] VI．替代实践和程序

在对于西妥昔单抗(Erbitux)或帕尼单抗(Vectibix)治疗合格的患者的选择中,目前存在一种FDA批准的替代物,用于测试福尔马林固定、石蜡包埋的CRC组织的KRAS突变状态。即,QIAGEN *therascreen* KRAS RGQ PCR试剂盒在PMA P110030和P110027下获得批准。

[0330] FoundationOne CDx™

I．一般信息

装置通用名称：下一代测序

肿瘤学实验对象组、体细胞或种系

变体检测系统

装置商品名称：FoundationOne CDx™

装置Procode：PQP

申请人姓名和地址:Foundation Medicine,Inc.

150 Second Street

Cambridge,MA 02141

专家组建议日期：无

上市前批准申请(PMA)编号:P170019

FDA批准通知书日期：2017年11月30日

突破性装置:于2016年6月15日被授予突破性装置状态[以前的加急访问路径(EAP)],因为该装置(1)预期诊断威胁生命或不可逆转地致残性疾病或状况,(2)代表了突破性技术,其提供了超过现有合法上市技术的临床上有意义的优点,并且(3)装置的可用性符合患者的最大利益。

[0331] II. 使用的适应症

FoundationOne CDx™(F1CDx)是基于下一代测序的体外诊断装置,用于检测324个基因中的取代、插入和缺失改变(插入-失)和拷贝数改变(CNA)以及选择的基因重排,以及基因组标记包括微卫星不稳定性(MSI)和肿瘤突变负荷(TMB),使用从福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)肿瘤组织样本中分离的DNA。该测试预期作为伴随诊断,以根据批准的治疗产品标签,鉴定可能从用表16列出的靶向疗法的治疗中受益的患者。另外,F1CDx预期提供肿瘤突变概况分析,以由合格的医疗保健专业人员,根据肿瘤学专业指南,对于患有实体恶性赘生物的癌症患者使用。F1CDx测试是在Foundation Medicine,Inc处执行的单位点测定。

[0332] 表16:伴随诊断适应症

适应症	生物标记物	疗法
非小细胞肺癌（NSCLC）	*EGFR* 外显子 19 缺失和 *EGFR* 外显子 21 L858R 改变	Gilotrif®（阿法替尼）、Iressa®（吉非替尼）或 Tarceva®（厄洛替尼）
	EGFR 外显子 20 T790M 改变	Tagrisso®（奥希替尼）
	ALK 重排	Alecensa®（艾乐替尼）、Xalkori®（克唑替尼）或 Zykadia®（塞瑞替尼）
	BRAF V600E	与 Mekinist®（曲美替尼）组合的 Tafinlar®（达拉非尼）
黑色素瘤	*BRAF* V600E	Tafinlar®（达拉非尼）或 Zelboraf®（维罗非尼）
	BRAF V600E 和 V600K	与 Zelboraf®（维莫非尼）组合的 Mekinist®（曲美替尼）或 Cotellic®（考比替尼）
乳腺癌	*ERBB2*（HER2）扩增	Herceptin®（曲妥珠单抗）、Kadcyla®（恩美曲妥珠单抗（ado-trastuzumab-emtansine））或 Perjeta®（帕妥珠单抗）
结肠直肠癌	*KRAS* 野生型（密码子 12 和 13 中的突变的不存在）	Erbitux®（西妥昔单抗）
	KRAS（外显子 2、3 和 4）和 *NRAS*（外显子 2、3 和 4）	Vectibix®（帕尼单抗）
卵巢癌	*BRCA1/2* 改变	Rubraca®（卢卡帕尼）

III. 禁忌症

不存在已知的禁忌症。

[0333] IV. 警告/注意事项和限制

警告/注意事项和限制包括在FoundationOne CDx测定标签中。

[0334] V. 装置描述

FoundationOne CDx(F1CDx)是在Foundation Medicine,Inc处执行的单位点测定。该测定包括用于测试DNA的试剂、软件、仪器和程序,所述DNA从福尔马林固定、石蜡包埋的(FFPE)肿瘤样品中提取。该测定采用来自常规FFPE活组织检查或手术切除样本的单一DNA提取方法,其中50-1000 ng经历全基因组鸟枪文库构建,并且基于杂交捕获了来自309个癌症有关基因的所有编码外显子、1个启动子区、1个非编码RNA(ncRNA),并且从34个常见的重排基因中选择内含子区,其中21个还包括编码外显子(关于F1CDx中包括的基因的完整列表,参考下表17和表18)。因此,该测定总共检测到总共324个基因中的改变。使用Illumina® Hi Seq平台,杂交捕获选择的文库被测序至较高的均匀深度(靶向> 500X中值覆盖率,其中> 99%外显子在覆盖率> 100X下)。使用定制的分析流水线(pipeline)处理序列数据,所述分析流水线设计为检测所有类别的基因组改变,包括碱基取代、插入缺失、拷贝数改变(扩增和纯合子缺失)和选择的基因组重排(例如基因融合)。另外,还报告了基因组标记,包括微卫星不稳定性(MSI)和肿瘤突变负荷(TMB)。

[0335] 表17:F1CD中包括的具有完全编码外显子区的基因,用于检测取代、插入-缺失(插入缺失)和拷贝数改变(CNA)

ABL1	*BRAF*	*CDKN1A*	*EPHA3*	*FGFR4*	*IKZF1*	*MCL1*	*NKX2-1*	*PMS2*	*RNF43*	*TET2*
ACVR1B	*BRCA1*	*CDKN1B*	*EPHB1*	*FH*	*INPP4B*	*MDM2*	*NOTCH1*	*POLD1*	*ROS1*	*TGFBR2*
AKT1	*BRCA2*	*CDKN2A*	*EPHB4*	*FLCN*	*IRF2*	*MDM4*	*NOTCH2*	*POLE*	*RPTOR*	*TIPARP*
AKT2	*BRD4*	*CDKN2B*	*ERBB2*	*FLT1*	*IRF4*	*MED12*	*NOTCH3*	*PPARG*	*SDHA*	*TNFAIP3*
AKT3	*BRIP1*	*CDKN2C*	*ERBB3*	*FLT3*	*IRS2*	*MEF2B*	*NPM1*	*PPP2R1A*	*SDHB*	*TNFRSF14*
ALK	*BTG1*	*CEBPA*	*ERBB4*	*FOXL2*	*JAK1*	*MEN1*	*NRAS*	*PPP2R2A*	*SDHC*	*TP53*
ALOX12B	*BTG2*	*CHEK1*	*ERCC4*	*FUBP1*	*JAK2*	*MERTK*	*NT5C2*	*PRDM1*	*SDHD*	*TSC1*
AMER1	*BTK*	*CHEK2*	*ERG*	*GABRA6*	*JAK3*	*MET*	*NTRK1*	*PRKAR1A*	*SETD2*	*TSC2*
APC	*C11orf30*	*CIC*	*ERRFI1*	*GATA3*	*JUN*	*MITF*	*NTRK2*	*PRKCI*	*SF3B1*	*TYRO3*
AR	*CALR*	*CREBBP*	*ESR1*	*GATA4*	*KDM5A*	*MKNK1*	*NTRK3*	*PTCH1*	*SGK1*	*U2AF1*
ARAF	*CARD11*	*CRKL*	*EZH2*	*GATA6*	*KDM5C*	*MLH1*	*P2RY8*	*PTEN*	*SMAD2*	*VEGFA*
ARFRP1	*CASP8*	*CSF1R*	*FAM46C*	*GID4 (C17orf39)*	*KDM6A*	*MPL*	*PALB2*	*PTPN11*	*SMAD4*	*VHL*
ARID1A	*CBFB*	*CSF3R*	*FANCA*	*GNA11*	*KDR*	*MRE11A*	*PARK2*	*PTPRO*	*SMARCA4*	*WHSC1*
ASXL1	*CBL*	*CTCF*	*FANCC*	*GNA13*	*KEAP1*	*MSH2*	*PARP1*	*QKI*	*SMARCB1*	*WHSC1L1*
ATM	*CCND1*	*CTNNA1*	*FANCG*	*GNAQ*	*KEL*	*MSH3*	*PARP2*	*RAC1*	*SMO*	*WT1*
ATR	*CCND2*	*CTNNB1*	*FANCL*	*GNAS*	*KIT*	*MSH6*	*PARP3*	*RAD21*	*SNCAIP*	*XPO1*
ATRX	*CCND3*	*CUL3*	*FAS*	*GRM3*	*KLHL6*	*MST1R*	*PAX5*	*RAD51*	*SOCS1*	*XRCC2*
AURKA	*CCNE1*	*CUL4A*	*FBXW7*	*GSK3B*	*KMT2A (MLL)*	*MTAP*	*PBRM1*	*RAD51B*	*SOX2*	*ZNF217*
AURKB	*CD22*	*CXCR4*	*FGF10*	*H3F3A*	*KMT2D (MLL2)*	*MTOR*	*PDCD1*	*RAD51C*	*SOX9*	*ZNF703*
AXIN1	*CD274*	*CYP17A1*	*FGF12*	*HDAC1*	*KRAS*	*MUTYH*	*PDCD1LG2*	*RAD51D*	*SPEN*	
AXL	*CD70*	*DAXX*	*FGF14*	*HGF*	*LTK*	*MYC*	*PDGFRA*	*RAD52*	*SPOP*	
BAP1	*CD79A*	*DDR1*	*FGF19*	*HNF1A*	*LYN*	*MYCL*	*PDGFRB*	*RAD54L*	*SRC*	

BARD1	*CD79B*	*DDR2*	*FGF23*	*HRAS*	*MAF*	*MYCN*	*PDK1*	*RAF1*	*STAG2*	
BCL2	*CDC73*	*DIS3*	*FGF3*	*HSD3B1*	*MAP2K1*	*MYD88*	*PIK3C2B*	*RARA*	*STAT3*	
BCL2L1	*CDH1*	*DNMT3A*	*FGF4*	*ID3*	*MAP2K2*	*NBN*	*PIK3C2G*	*RB1*	*STK11*	
BCL2L2	*CDK12*	*DOT1L*	*FGF6*	*IDH1*	*MAP2K4*	*NF1*	*PIK3CA*	*RBM10*	*SUFU*	
BCL6	*CDK4*	*EED*	*FGFR1*	*IDH2*	*MAP3K1*	*NF2*	*PIK3CB*	*REL*	*SYK*	
BCOR	*CDK6*	*EGFR*	*FGFR2*	*IGF1R*	*MAP3K13*	*NFE2L2*	*PIK3R1*	*RET*	*TBX3*	
BCORL1	*CDK8*	*EP300*	*FGFR3*	*IKBKE*	*MAPK1*	*NFKBIA*	*PIM1*	*RICTOR*	*TEK*	

表18:具有选择内含子区的基因,用于检测基因重排、启动子区和ncRNA基因

ALK 内含子 *18, 19*	*BRCA1* 内含子 *2, 7, 8, 12, 16, 19, 20*	*ETV4* 内含子 *5, 6*	*EZR* 内含子 *9-11*	*KIT* 内含子 *16*	*MYC* 内含子 *1*	*NUTM1* 内含子 *1*	*RET* 内含子 *7-11*	*SLC34A2* 内含子 *4*
BCL2 3'UTR	*BRCA2* 内含子 *2*	*ETV5* 内含子 *6, 7*	*FGFR1* 内含子 *1, 5, 17*	*KMT2A (MLL)* 内含子 *6-11*	*NOTCH2* 内含子 *26*	*PDGFRA* 内含子 *7, 9, 11*	*ROS1* 内含子 *31-35*	*TERC ncRNA*
BCR 内含子 *8, 13, 14*	*CD74* 内含子 *6-8*	*ETV6* 内含子 *5, 6*	*FGFR2* 内含子 *1, 17*	*MSH2* 内含子 *5*	*NTRK1* 内含子 *8-10*	*RAF1* 内含子 *4-8*	*RSPO2* 内含子 *1*	*TERT* 启动子
BRAF 内含子 *7-10*	*EGFR* 内含子 *7, 15, 24-27*	*EWSR1* 内含子 *7-13*	*FGFR3* 内含子 *17*	*MYB* 内含子 *14*	*NTRK2* 内含子 *12*	*RARA* 内含子 *2*	*SDC4* 内含子 *2*	*TMPRSS2* 内含子 *1-3*

测试输出

测试的输出包括:

类别1:预期用途的表16中注明的CDx要求

类别2:具有临床意义的证据的癌症突变

类别3:具有潜在临床意义的癌症突变

除预期用途声明的表16中列出(即,类别2和3)外的基因组发现,对于任何具体治疗产品的标记用途不是说明性或决定性的。

[0336] 测试试剂盒内容物

该测试包括样品运输试剂盒,其被运送到订购实验室。运送试剂盒含有下述组分:

· 样本制备说明书

· 运送说明书

· 返回运送标签

仪器

F1CDx测定预期用序列号控制的仪器执行,如下表19中所示。所有仪器都通过Foundation Medicine,Inc.(FMI)在FM1的质量体系下认证。

[0337] 表19:用于与F1CDx测定一起的仪器

仪器
Illumina HiSeq 4000
Illumina cDot
Beckman Biomek NXP Span-8 Liquid Handler
Thermo Scientific Kingfisher Flex DW 96

测试过程

F1CDx测定过程中包括的所有测定试剂都通过FMI认证,并且遵从医疗装置质量系统法规(Quality System Regulation)(QSR)。

[0338] A. 样本收集和制备

遵循标准病理学实践,收集并制备福尔马林固定、石蜡包埋(FFPE)的肿瘤样本。FFPE样本可以作为未染色的玻片或作为FFPE块接收。

[0339] 在开始测定之前,制备苏木精和曙红(H&E)染色的玻片,然后由委员会认证的病

理学家进行审查,以确认疾病的肿瘤学,并且确保存在足够的组织(0.6 mm^3)、肿瘤含量(≥20%肿瘤)和足够的有核细胞,以进行测定。

[0340] B. DNA提取

将通过病理学审查的样本排队等待DNA提取,其始于通过用蛋白酶K缓冲液消化而裂解来自FFPE组织的细胞,随后为使用96孔KingFisher™ FLEX Magnetic Particle Processor的自动化纯化。

[0341] 在DNA提取完成后,在文库构建(LC)之前,使用提供的λ DNA标准(Invitrogen),通过Quant-iT™ PicoGreen®荧光测定,来定量双链DNA(dsDNA)。样品必须产生最少55 ng的基因组DNA,以确保足够的DNA用于质量对照(QC)并进行LC。

[0342] C.文库构建

文库构建(LC)始于DNA标准化至50-1000 ng。在使用1.8X体积的AMPure® XP Beads(Agencourt®)的纯化前,通过使用Covaris LE220的自适应聚焦声处理,将标准化的DNA样品随机剪切(片段化)至~200 bp。在Bravo Benchbot(Agilent)上,在96孔板(Eppendorf)中,执行用NEBNext®试剂(通过NEB的定制填充试剂盒)的固相可逆固定(SPRI)纯化和后续文库构建,所述试剂包括用于末端修复、dA添加和连接的混合物,使用"用珠(with-bead)"方案,以使可重复性和文库产率达到最大。索引化(6 bp条形码)测序文库用HiFi™(κ)进行PCR扩增10个循环,然后进行1.8X SPRI纯化。执行用于QC的纯化和稀释。

[0343] 在LC之后,使用在Molecular Devices Multimode SpectraMax M2板阅读器上的Quant-iT™ OliGreen® ssDNA Assay Kit(Life Technologies)读数,通过从纯化的文库中定量单链DNA(ssDNA)来执行QC程序。产生不足够的测序文库的文库是失败的。

[0344] D.杂交捕获

杂交捕获(HC)始于每个文库标准化至500-2000 ng。标准化的样品然后经历溶液杂交,其使用> 50倍摩尔过量的个别合成的5'-生物素化DNA 120 bp寡核苷酸池执行。诱饵靶向~1.8 Mb的人基因组,包括309个癌症有关基因的所有编码外显子、35个基因的内含子或非编码区,加上遍布整个基因组的> 3500个单核苷酸多态性(SNP)。通过将覆盖靶外显子(60 bp重叠)和内含子(20 bp重叠)的重叠120 bp DNA序列间隔进行平铺,来设计诱饵,其中每个靶最少三个诱饵;SNP靶各自分配一个诱饵。如通过UCSC Genome RepeatMasker跟踪定义的,内含子诱饵对于重复元素进行过滤。

[0345] 在杂交后,将文库-诱饵双链体在顺磁性MyOne™链霉抗生物素蛋白珠(Invitrogen)上捕获,并且通过在25°C下用1X SSC洗涤一次、以及在55°C下用0.25X SSC洗涤四次,来去除脱靶材料。加入PCR主混合物,以直接从洗涤的珠中扩增(12个循环)捕获的文库。在12个循环的扩增后,将样品进行1.8X SPRI纯化。执行用于QC的纯化和稀释。

[0346] 使用在Molecular Devices Multimode SpectraMax M2板阅读器上的Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit(Life Technologies)读数,通过测量dsDNA产率,来执行用于杂交捕获的质量对照。产生少于140 ng的测序文库的捕获文库是失败的。

[0347] E. 测序

测序使用在具有模式化流动池技术的Illumina cBot上的离板(off-board)聚类来执行,以从单个DNA模板生成单克隆簇,随后为在Illumina HiSeq 4000上,使用边合成边

测序(SBS)化学的测序。荧光标记的3'封闭的dNTP连同聚合酶一起通过流动池掺入,以产生通过激光激发的生长中的核苷酸链。照相机捕获所掺入的碱基的发射颜色,然后将其切割掉。然后去除终止子,以允许核苷酸恢复其天然形式,并且允许聚合酶向生长链添加另一个碱基。对于每个新的测序循环添加一个新的荧光标记的3'封闭的dNTP库。随着新碱基加入生长链中,颜色对于每个新循环改变。这种方法允许平行测序DNA克隆拷贝的数百万的离散簇。

[0348] F. 序列分析

序列数据使用由FMI开发的专有软件进行分析。使用Burrows-Wheeler Aligner(BWA)v0.5.9,将序列数据映射到人基因组(hg19)。使用P Picard 1.47(http://picard.sourceforge.net)和SAMtools 0.1.12a,来执行PCR一式两份读数的去除和序列度量收集。使用Genome Analysis Toolkit(GATK)1.0.4705来执行局部比对优化。变体调用仅在通过测试靶向的基因组区域中执行。

[0349] 碱基取代检测使用贝叶斯方法执行,所述方法允许在低突变体等位基因频率(MAF)下检测新的体细胞改变,并且通过掺入组织特异性的先前期望,而增加了关于在热点位点处的改变的敏感性。具有低映射(映射质量< 25)或碱基调用质量(质量≤ 2的碱基调用)的读数被丢弃。最终调用在MAF ≥ 5%(在热点处的MAF ≥ 1 %)下进行。

[0350] 为了检测插入缺失,使用de-Bruijn方法执行在每个靶向外显子中的从头局部组装。关键步骤是:

· 收集对于其至少一个读数映射到靶区域的所有读数对。

[0351] · 将每个读数分解为组成成分k-聚体,并且构建存在的所有候选非参考单倍型的可列举图形表示(de-Bruijn)。

[0352] · 就原始读数数据而言评估每个替代单倍型的支持,以生成突变候选物。经由无缺口比对,将所有读数与每个候选单倍型进行比较,并且将每个读数的读数'投票'分配给具有最佳匹配的候选物。候选物之间的关系通过拆分读数投票来解决,通过已经支持每种单倍型的读数数目进行加权。将此过程迭代,直到选择了'获胜'单倍型。

[0353] · 将候选物针对参考基因组进行比对,以报告改变调用。

[0354] 插入缺失候选物的过滤与碱基替换相似地进行,具有在重复和邻近序列质量度量下凭经验增加的等位基因频率阈值,如GA TK中实现的:相邻碱基错配的% < 25%,平均相邻碱基质量> 25,支持读数错配的平均数目≤ 2。在MAF ≥ 5%(在热点处的MAF ≥ 3%)下进行最终调用。

[0355] 使用比较基因组杂交(CGH)样方法检测拷贝数改变(CNA)。首先,通过将在所有外显子和全基因组SNP(~3,500)下获得的序列覆盖率针对过程匹配的正常对照进行标准化,来获得样品的对数比概况。使用测序SNP的等位基因频率,对该概况进行分割和解释,以估计在每个区段下的肿瘤纯度和拷贝数。在肿瘤纯度≥ 20%的样品中,在具有≥ 6个拷贝的区段下调用扩增(或对于三倍体≥ 7个拷贝/对于四倍体肿瘤≥ 8个拷贝),以及在0个拷贝下的纯合子缺失。ERBB2中的扩增在对于二倍体肿瘤具有≥ 5个拷贝的区段中被调用为阳性。

[0356] 通过分析嵌合读数对来鉴定基因组重排。嵌合读数对定义为对于其读数映射到分开的染色体上,或者距离超过10兆碱基(Mb)的读数对。对通过该对的基因组坐标进行聚类,

并且含有至少五(5)个[对于已知融合为三(3)个]嵌合对的聚类被鉴定为重排候选物。候选物的过滤通过映射质量(聚类中的平均读数映射质量必须为30或更高)和比对位置的分布来执行。重排就预测的功能(例如,融合基因的产生)进行注释。

[0357] 为了确定微卫星不稳定性(MSI)状态,在F1CDx测定中具有足够覆盖率的95个内含子均聚物重复基因座(人参考基因组中长10-20 bp)就长度可变性进行分析,并且经由主成分分析汇总为总体MSI评分。使用95个基因座,对于每个样品,在跨越基因座的每个读数中计算重复长度。记录重复长度的平均值和方差。主成分分析(PCA)用于将190维数据投影到一维(第一主成分)上,其使数据分开达到最大,产生MSI评分。给每个样品分配MSI高(MSI-H)或MSI稳定(MSS)的定性状态;通过手动无监督聚类,给MSI评分范围分配MSI-H或MSS。给具有低覆盖率(< 250X中值)的样品分配MSI-未知的状态。

[0358] 肿瘤突变负荷(TMB)通过以下进行测量:计数以5%或更高的等位基因频率存在的所有同义和非同义变体,并且根据已知种系多态性的公开数据库(包括单核苷酸多态性数据库(dbSNP)和外显子组整合联合(Exome Aggregation Consortium)(ExAC)),过滤掉潜在的种系变体。在数据库查询后仍存在的另外种系改变就潜在的种系状态进行评价,并且使用体细胞种系/接合性(SGZ)算法过滤掉。此外,将已知和可能的驱动突变过滤掉,以排除数据集的偏差。然后将所得到的突变数目除以对应于所计数的总变体数目或793 kb的编码区。所得到的数目作为每Mb单位的突变(mut/Mb)传达。

[0359] 在分析流水线完成后,变体数据在FMI定制开发的CATi软件应用程序中展示,具有序列质量控制度量。作为每一个样品的数据分析QC的部分,F1CDx测定通过使用SNP概况算法来评价交叉污染,降低了可能由于意外污染事件而发生的假阳性调用的风险。序列数据由训练有素的生物信息学人员进行审查。未通过任何QC度量的样品将自动保留,且不发布。

[0360] G. 报告生成

批准的结果通过具有CDx有关信息的自动化软件进行注释,并且与患者人口统计信息以及由FMI作为专业服务提供的任何另外信息合并,然后由实验室主管或指定人员批准和发布。

[0361] H. 与系统有关的内部过程对照

阳性对照

每个测定运行包括一式两份运行的对照样品。对照样品含有十个HapMap细胞系的池,并且用作阳性突变检测对照。跨越整个靶向区域中存在的一百(100)种不同的种系SNP需要通过分析流水线进行检测。如果未如预计的检测到SNP,则这导致QC失败,因为它指示潜在的处理错误。

[0362] 灵敏度对照

制备用作阳性对照的HapMap对照池,以含有以5%-10% MAF的变体,其必须通过分析流水线进行检测,以确保每次运行的预计灵敏度。

[0363] 阴性对照

样品在LC阶段进行分子条形码编码。分析内仅掺入具有完全分子条形码序列的读数。分析流水线包括算法,其分析每个样本的SNP概况,以鉴定在分子条形码编码之前可能已发生的潜在污染,并且可以检测到低于1%的污染。

[0364] VI. 替代实践和程序

如F1CDx预期用途声明的表16中列出的，存在FDA批准的伴随诊断(CDx)替代物，用于使用FFPE肿瘤样本的基因改变检测。下表20中列出了批准的CDx测试；关于另外的细节，参见在https://www.fda.gov/MedicalDevices/ProductsandMedicalProcedures/InVitroDiagnostics/ucm301431.htm?source=govdelivery处的FDA认证或批准的伴随诊断装置列表。

[0365] 表20：关于通过F1CDx靶向的基因的FDA批准的CDx测定列表

	装置	公司	技术	疗法	适应症
HER2-扩增	PathVysion HER-2 DNA Probe kit	Abbott Molecular, inc.	FISH	赫赛汀（曲妥珠单抗）	乳腺癌
	Pathway Anti-HER-2/neu（4B5）	Ventana Meidical Systems，Inc.	IHC	赫赛汀（曲妥珠单抗）	乳腺癌
	Rabbit Monoclonal Primary Antibody Insite HER-2/neu Kit	Biogenex Laboratories，Inc	IHC	赫赛汀（曲妥珠单抗）	乳腺癌
	Spot-Light HER2 CISH Kit	Life technologies, Inc.	CISH	赫赛汀（曲妥珠单抗）	乳腺癌
	Bond Oracle Her2 IHC System	Leica Biosystems	IHC	赫赛汀（曲妥珠单抗）	乳腺癌
	HER2 CISH pharmDx Kit	Dako Denmark A/S	CISH	赫赛汀（曲妥珠单抗）	乳腺癌
	INFORM HER2 DUAL ISH DNA Probe Cocktail	Ventana Medical Systems，Inc.	Dual ISH	赫赛汀（曲妥珠单抗）	乳腺癌
	HercepTest	Dako Denmark A/S	IHC	赫赛汀（曲妥珠单抗） Perjeta（培妥珠单抗） Kadcyla（恩美曲妥珠单抗）	乳腺癌 胃或胃食管连接部腺癌
	HER2 FISH pharmDx kit	Dako Denmark A/S	FISH	赫赛汀（曲妥珠单抗） Perjeta（培妥珠单抗） Kadcyla（恩美曲妥珠单抗）	乳腺癌 胃或胃食管连接部腺癌
BRAF-V600	THxID BRAF Kit	biomereux	PCR	Mekinist（曲美替尼）	黑色素瘤
	cobas BRAFV600 Mutation Test	Roche Molecular Systems，Inc	PCR	Zelboraf（维莫非尼）	黑色素瘤
BRAF-600E	THxID BRAF Kit	BioMerieux	PCR	Tafinlar（达拉非尼）	黑色素瘤
	Oncomine Dx Target Test	Life Technologies, Inc.	NGS	Tafinlar（达拉非尼） Mekinist（曲美替尼）	非小细胞肺癌
NRAS	Praxis Extended Ras Panel	Illumina	NGS	Vectibix（帕尼单抗）	结肠直肠癌
KRAS	cobas KRAS Mutation Test	Roche Molecular Systems，Inc.	PCR	Erbitux（西妥昔单抗） Vectibix（帕尼单抗）	结肠直肠癌
	therascreen KRAS RGQ PCR Kit	QIAGEN	PCR	Erbitux（西妥昔单抗） Vectibix（帕尼单抗）	结肠直肠癌
	Praxis Extended Ras Panel	Illumina	NGS	Vectibix（帕尼单抗）	结肠直肠癌
ALK-融合物	Vysis ALK Break Apart FISH Probe kit	Abbott Molecular, Inc.	FISH	Xalkori（克唑替尼）	非小细胞肺癌
	ALK（D5F3）CDx Assay	Ventana Medical Systems，Inc	IHC	Xalkori（克唑替尼）	非小细胞肺癌
EGFR-外显子19缺失&L858R	cobas EGFR MutationTestv2	Roche Molecular Systems，Inc	PCR	Tarceva（厄洛替尼）	非小细胞肺癌
	therascreen EGFR RGQ PCR kit	QIAGEN	PCR	Gilotrif（阿法替尼） Isressa（吉非替尼）	非小细胞肺癌
	Oncomine Dx Target Test	Life Technologies, Inc.	NGS	Isressa（吉非替尼）	非小细胞肺癌
EGFR T790M	cobas EGFR MutationTestv2	Roche Molecular Systems，Inc.	PCR	Tagrisso（奥希替尼）	非小细胞肺癌
BRCA 1/2	FoundationFocus CDx$_{BRCA}$	Foundation Medical, Inc.	NGS	Rubraca（卢卡帕尼）	晚期卵巢癌

缩写：FISH - 荧光原位杂交；IHC - 免疫组织化学；CISH - 生色原位杂交；ISH - 原位杂交；PCR - 聚合酶链反应；NGS - 下一代测序。

[0366] VII. 上市历史

Foundation Medicine,Inc.最初设计并开发了FoundationOne®实验室开发的测试(F1 LDT),并且在2012年测试了第一个商业样品。F1LDT已用于检测FFPE肿瘤组织样本中的基因组改变的存在。F1 LDT未获得FDA认证或批准。

[0367] F1CDx测定尚未在美国或任何外国上市。

[0368] *therascreen*® KRAS RGQ PCR Kit(2012)

I. 一般信息

装置通用名称：实时PCR测试

装置商品名称：*therascreen*® KRAS RGQ PCR Kit

装置Procode：OWD

申请人姓名和地址:QIAGEN Manchester Ltd.

Skelton House,Lloyd Street North

Manchester,UK M15 6SH

专家组建议日期：无

上市前批准申请(PMA)编号:P110030

FDA批准通知书日期：2012年7月6日

加急:不适用

II. 使用的适应症

therascreen KRAS RGQ PCR Kit是在Rotor-Gene Q MDx仪器上使用的实时定性PCR测定,用于检测人KRAS癌基因中的七个体细胞突变,使用从福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE)结肠直肠癌(CRC)组织中提取的DNA。*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit预期基于未检测到KRAS突变的测试结果,帮助鉴定用Erbitux®(西妥昔单抗)治疗的CRC患者。

[0369] III. 禁忌症

无。

[0370] IV. 警告和注意事项

警告和注意事项可以在*therascreen*® KRAS RGQ PCR Kit标签中找到。

[0371] V. 装置描述

下述部件构成整个装置：

· QIAGEN QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit

· QIAGEN *therascreen*® KRAS RGQ PCR Kit

· QIAGEN Rotor-Gene Q MDx,软件版本2.1.0和KRAS Assay Package

样本制备

将福尔马林固定、石蜡包埋的(FFPE)块切片成载玻片。染色玻片用于确认肿瘤含量超过组织的20%,并且可获得4mm^{2}的最小肿瘤面积。从玻片上刮下单个未染色的组织切片用于DNA提取。如果切片具有小于20%的肿瘤含量,则切片应进行宏观解剖。使用QIAGEN QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit和修改的方案,从取自结肠直肠癌患者的FFPE组织的5 μm玻璃固定切片中,手动提取且纯化DNA。用二甲苯使肿瘤组织脱石蜡,并且用乙醇萃取二甲苯。在变性条件下,用蛋白酶K将样品裂解一小时。将样品在90°C下加热,以逆转基因组DNA的福尔马林交联。使样品通过基于二氧化硅的膜,使得基因组DNA与膜结合并去除污染

物。纯化的基因组DNA从膜洗脱到200 μL洗脱缓冲液内。所提取的DNA贮存于-20°C下。

[0372] PCR扩增和检测

QIAGEN *therascreen*® KRAS RGQ PCR Kit含有用于八个分开反应的试剂;扩增且检测K-Ras癌基因的外显子2中的密码子12和13中的突变的7个突变特异性反应,以及扩增且检测K-Ras癌基因中的外显子4的区域的一个对照反应。KRAS RGQ Kit中的每个反应利用与荧光团标记的Scorpion®引物组合的、扩增阻碍突变系统(ARMS®)等位基因特异性聚合酶链反应(PCR),以在非突变的基因组DNA(突变阴性;野生型)的背景下,选择性扩增突变的基因组DNA模板(突变阳性),以检测任何所得的扩增产物。ARMS技术利用Taq聚合酶区分在PCR引物的3'端处的匹配与错配的能力。Scorpion是含有与探针共价连接的PCR引物的双功能分子。探针掺入荧光团[羧基荧光素(FAM™)]和猝灭剂两者,所述猝灭剂猝灭荧光团的荧光。在PCR期间,当探针与ARMS扩增子结合时,荧光团和猝灭剂变得分开,导致可检测的荧光增加。

[0373] 在用突变特异性测试反应测试之前,必须用对照反应对每个DNA样品进行测试,以确定DNA的质量和数量对于测定的工作范围是否足够和适当。对照反应Ct值用于评价样品中的总可扩增DNA,并且必须落入每个样品的预先指定的范围内。

[0374] 从对照反应获得的结果的解释如下:

表21:从对照反应获得的结果的解释

对照Ct值	解释	动作
> 32.00	可扩增DNA的数量不足以用于突变分析。	应当提取并测试另外的样品
< 21.92	可扩增DNA的数量对于突变分析太高。	用试剂盒中提供的样品稀释水稀释
21.92 ≤ 对照Ct ≥ 32.00	可扩增DNA的数量适合于突变分析。	---

关于用对照反应混合物评价DNA样品的运行参数是用于使用突变反应混合物的突变分析的相同运行参数。运行参数为:(1)在95°C保持15分钟,以激活Taq聚合酶;(2)95°C 30秒以变性以及60°C 1分钟以退火/延伸的40个循环的PCR。在其下来自特定反应的荧光跨越预定阈值的PCR循环被定义为Ct值。通过试剂盒检测到的K-RAS癌基因的密码子12和13中的七个突变在下文列出:

表22:通过试剂盒检测到的K-RAS致癌基因的密码子12和13中的七个突变

突变	碱基变化
GLY12ALA (G12A)	GGT>GCT
GLY12ASP (G12D)	GGT>GAT
GLY12ARG (G12R)	GGT>CGT
GLY12CYS (G12C)	GGT>TGT
GLY12SER (G12S)	GGT>AGT
GLY12VAL (G12V)	GGT>GTT
GLY13ASP (G13D)	GGC>GAC

测试对照

每个测试运行必须含有内部对照、阳性对照和阴性对照。如果阴性对照指示测试运行已被污染(Ct值高于FAM通道的设定值),或者阳性对照的Ct值位于设定范围之外(FAM和HEX通道两者),则测试运行视为无效。

[0375] 表23:运行有效性标准

反应混合物	样品	RGQ通道	有效Ct范围*
对照	阳性对照	FAM	23.50至29.50
对照	无模板对照	FAM	无扩增
对照	无模板对照	HEX	31.91至35.16
突变	阳性对照	FAM	23.50至29.50
突变	无模板对照	FAM	无扩增
突变	无模板对照	HEX	31.91至35.16

*范围是包括性的

内部对照：

所有八个反应都含有另外的ARMS引物和HEX标记的Scorpion引物，用于扩增和检测用作内部对照的合成的非K-Ras有关寡核苷酸模板。Scorpion引物用HEX进行标记，以在对照和突变反应中与FAM标记的Scorpion区分开。在每个反应中，将内部对照反应设计为两个反应中较弱的一个。这通过使用非常低浓度的内部对照模板来实现。内部对照反应设计为不依赖于突变特异性扩增而工作，但如果它被FAM反应“击败”，则在强扩增的存在下可能失败。在七个突变反应的任何一个中，具有失败的内部对照反应的突变阴性结果被报告为无效结果。内部对照用于检测抑制剂或总反应失败。

[0376] *阳性对照：*

阳性对照包含代表通过KRAS Kit检测到的每个突变的合成寡核苷酸混合物。阳性对照的检测确认了试剂盒中的每种反应混合物的正确起作用。

[0377] *阴性对照：*

KRAS RGQ Kit含有无核酸酶的水，以用作无模板对照(NTC)反应。NTC充当阴性对照，并且评价在测定设置过程中的潜在污染。

[0378] 仪器和软件

Rotor-Gene Q(RGQ)MDx Instrument是实时PCR分析仪，其设计用于扩增DNA的热循环和实时检测。RGQ MDx Instrument控制且监测PCR反应，并且包括基于PCR结果确定突变状态的软件。它掺入离心转子设计用于在PCR反应过程中的热循环，其中每个试管在移动的空气腔室中旋转。根据软件确定的循环，样品在低质量空气烘箱中进行加热且冷却，所述循环启动PCR循环的不同阶段，对于每次PCR运行总共40个循环。在RGQ MDx Instrument中，样品通过发光二极管从腔室的底部激发。能量通过在管的底部处的薄壁传递。发射的荧光通过在腔室的侧面上的发射滤光片，并且被光电倍增管检测到。当每个管与检测光学器件对准时，执行检测；管每150毫秒旋转经过激发/检测光学器件。荧光信号监测PCR反应的进程。该仪器能够支持高达六个光学通道(六个激发源和六个检测滤光片)，然而，KRAS Kit仅使用其中两个通道(FAM和HEX通道)。

[0379] *therascreen* KRAS Assay Package由两个模板组成:"therascreen KRAS QC Locked Template"(用于DNA样品评价)和"therascreen KRAS Locked Template"(用于KRAS突变检测)。这些模板含有PCR运行参数并计算结果。相同的运行参数用于通过对照反应混合物的DNA样品评价，以及使用突变反应混合物的KRAS突变检测两者。

[0380] RGQ MDx Instrument软件支持实时分析程序。软件确定Ct值，计算ΔCt值，并且将这些与如上所述掺入软件内的突变特异性截止值进行比较。软件内嵌入标志/警告系统，以

便告知用户该测定的潜在问题，并且指示在有效的试验运行内的无效试验运行或无效样品(不适当的DNA水平或内部对照失败)。对于无效运行或无效样品并不报告结果。KRAS RGQ Kit的用户无法做出突变状态的主观确定，因为他们无权访问Ct或ΔCt值，而只能看到由软件报告的突变状态调用。

[0381] 结果解释

对照反应的Ct反映了样品中的可扩增K-Ras模板的总量，而等位基因特异性反应的Ct反映了样品内的K-Ras突变的量。对照反应和等位基因特异性反应之间的Ct值差异(ΔCt)指示了样品内的突变比例。随着样品中的突变型DNA的比例增加，ΔCt值接近0。随着样品中的突变型DNA的比例减少，ΔCt值增加(接近阳性调用相对于阴性调用的阈值)。当ΔCt测量超过突变型反应的ΔCt截止值时，该测定报告未检测到突变(例如，对于7个突变呈阴性)。

[0382] 对于每个样品，由RGQ MDx Instrument软件执行计算，以确定7种突变特异性反应各自的ΔCt值(FAM通道)：

[突变反应Ct值] - [对照反应Ct值] = ΔCt

根据预定的分析Ct和ΔCt值，Rotor-Gene Q软件定性地确定DNA样品的突变状态，并且报告哪些样品含有哪个突变。每个样品具有七个可能的ΔCt值(每个突变一个)。将这些值与掺入RGQ MDx Instrument软件内的预先制定的规格(截止值)进行比较，以确定样品是突变阳性还是阴性的，以及存在哪种突变(如果有的话)。当突变反应的ΔCt值小于或等于该反应的截止值时，样品为K-Ras突变阳性的。测定结果展示为“突变阳性”、“未检测到突变”、“无效”，或者，如果运行对照失败，则为“运行对照失败”。对于突变阳性样品，报告了特异性突变。

[0383] 表24:突变测定和截止

突变测定	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
截止（ΔCt）	≤8.0	≤6.6	≤8.0	≤8.0	≤8.0	≤7.5	≤7.5

VI. 替代实践和程序

不存在用于测试结肠直肠癌组织的其它FDA认证或批准的替代方法，用于检测K-Ras癌基因中的突变，用于选择可能受益于Erbitux®(西妥昔单抗)疗法的患者。

[0384] 实施例4:高αvβ6整联蛋白表达状态的确定

4. 方法

4.1 免疫组织化学

使用针对整联蛋白αvβ5、αvβ3、αv、αvβ6、αvβ8和β3，以及玻连蛋白、骨桥蛋白、Ki67和CD31的抗体，执行FFPE组织的免疫组织化学。所有抗整联蛋白抗体和有关的染色方案都由Merck Serono提供。将方案进一步调整至在Indivumed的实验室中的染色仪器。检测玻连蛋白、骨桥蛋白、Ki67和CD31的免疫组织化学方案先前已在Indivumed建立，并且得到Merck Serono的批准。作为质量对照，在每次运行中，执行细胞系和组织的IHC(运行对照)。此外，对于每一个运行对照制备同种型对照。

[0385] 对于IHC染色，FFPE组织由Merck Serono/Covance提供。将用作运行对照和同种型对照的FFPE阳性对照样品(细胞系或组织)切片成3 μm切片，并且固定到带正电的Super

Frost® Ultra Plus载玻片(Roth,Karlsruhe)上。IHC在Discovery® XT染色仪器(Roche/Ventana Medical Systems Inc.)上实施。FFPE玻片在染色仪器内进行脱石蜡,并且使用ChromoMap Detection Kit(Roche Diagnostics Deutschland GmbH)在Discovery® XT上进行免疫染色。详细的染色程序例如在以下中进行描述:Goodman SL,Grote HJ,Wilm C. Matched rabbit monoclonal antibodies against αv-series integrins reveal a novel αvβ3-LIBS epitope,and permit routine staining of archival paraffin samples of human tumors. Biol Open 2012;1: 329-340。其后,用补充有洗涤剂的热水手动洗涤玻片,随后为在最后一步中仅用自来水和dH2O的洗涤。为了脱水,将玻片转移至升序的乙醇系列(2 x 80%、2 x 96%、2 x无水EtOH)中,且分别温育1 - 3分钟。在脱水后,将玻片转移到二甲苯中(3 x 2分钟),并且最后自动嵌入Pertex中。

[0386] 4.1.1 抗整联蛋白αvβ6

4.1.1.1 抗整联蛋白αvβ6抗体和同种型对照

表25:抗整联蛋白αvβ6抗体和同种型对照

名称	克隆	供应商	宿主物种	原液浓度	工作稀释度
抗整联蛋白avß6	EM05201	Merck Serono	兔	1.0 mg/ml	1:2000
兔IgG	DA1E	Cell Signaling Technology	兔	2.5 mg/ml	1:5000

4.2. 自动程序/方案

程序步骤(DiscoveryXT):

程序:Res IHC Omni-UltraMap HRP XT(方案概述)

Discovery XT Staining Module

Indivumed,Falkenried 88,20251 Hamburg

方案编号307

方案名称:A-avb6(107)

创建日期:10.5.2013

1 组织样品[选定]

2石蜡[选定]

3 脱石蜡[选定]

4 酶[选定]

5 施加一滴[蛋白酶2](酶),盖上盖玻片,并温育[12分钟]

6 抗体[选定]

7 抗体自动分配[选定]

8 标准Ab温育(选定)

9 施加一滴[抗体23](抗体),并温育[32分钟]

10 施加一滴[OMap抗Rb HRP](多聚体HRP),盖上盖玻片,并温育[16分钟]

11复染色[选定]

12标准[选定]

13施加一滴[苏木精II](复染色),盖上盖玻片,并温育[8分钟]

14后复染[选定]

15施加一滴[变蓝试剂](后复染),盖上盖玻片,并温育[4分钟]

16玻片清洁[选定]

4.2.组织病理学评估

免疫组织化学染色的FFPE样品通过Indivumed的病理学家进行评估。一般而言，病理学家定量占优势的染色强度，指定染色模式并估计阳性染色的肿瘤组织的百分比。使用H&E染色的切片确定肿瘤含量以及组织类型。下文描述了用于半定量评估的评分系统。此外，定义了免疫组织化学染色的亚细胞区室。因此，病理学家区分了膜(m)、核(n)和细胞质(c)。根据需要，在注释中提到了染色模式的更详细描述。为了分析肿瘤组织的增殖速率，执行抗Ki67 IHC。病理学家通过评估100个肿瘤细胞来确定Ki67阳性肿瘤细胞的百分比。

[0387] 4.2.1组织评分(H评分)：肿瘤细胞的评估

对于免疫组织化学染色的肿瘤组织的半定量评估，如以下中所述应用了H评分分类：McCarty Jr KS,Miller LS,Cox EB,Konrath J,McCarty Sr KS "Estrogen receptor analyses: Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies". Arch Pathol Lab Med 109: 716-721(1985)，其公开内容优选地整体引入本文作为参考。因此，将阴性(0)、弱染色(1)、中等染色(2)和强染色(3)面积估计为肿瘤组织的百分比。随后，如下计算H评分：

H评分=(弱)%+(中等)% x 2 +(强)% x 3

表26：组织评分

H评分	分类
0 - 50	阴性
51 - 100	弱阳性
101 - 200	中等阳性
201 - 300	强阳性

在阿比妥单抗治疗的背景下，优选将相应地获得的大于70(> 70)的组织评分认为是满足"高αvβ6整联蛋白表达"标准的合适阈值。

序列表

<110> Merck Patent GmbH

<120> 用于治疗结肠直肠癌的阿比妥单抗

<130> P18-218 PCT

<150> US62/748,114
<151> 2018-10-19

<160> 7

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

[0001]

<220>
<223> DI17E6 轻链

<400> 1

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
            20                  25                  30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Tyr Thr Ser Lys Ile His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Phe Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
            100                 105                 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
        115                 120                 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
    130                 135                 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
```

145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 2
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> DI17E6 重链

<400> 2
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Gly Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Glu Ile Phe
50 55 60
Arg Asp Lys Ala Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Phe Leu Gly Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

[0002]

[0003]

Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
210 215 220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ala Gln Ser Thr Phe Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 修饰的 IgG1 铰链区

<400> 3
Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>重链构架区

<400> 4
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Glu Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 5
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

[0004]

<220>
<223>重链构架区

<400> 5
Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 6
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223>重链构架区

<400> 6
Lys Ala Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln
1 5 10 15
Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser
20 25 30

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

[0005]
<220>
<223>重链构架区

<400> 7
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

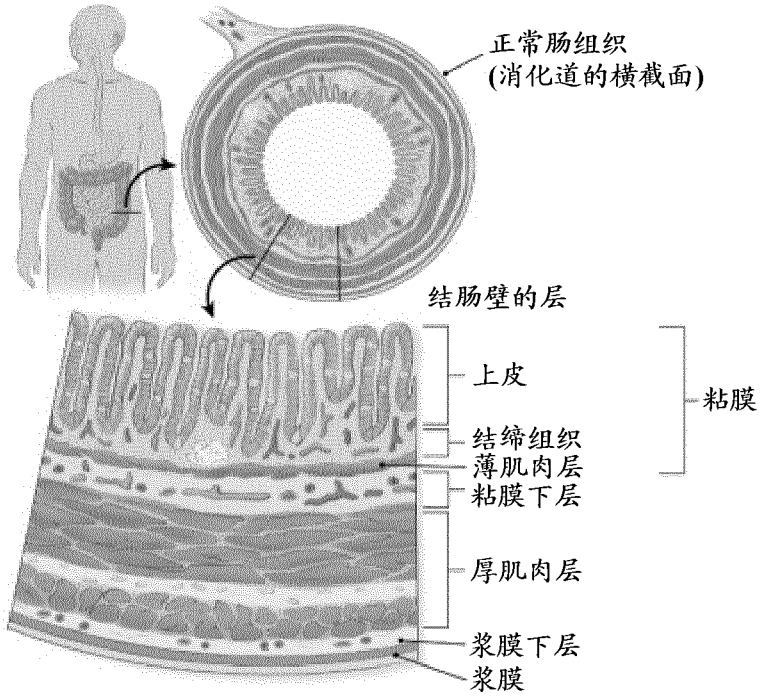

正常肠组织
(消化道的横截面)
结肠壁的层
上皮
结缔组织
薄肌肉层
粘膜下层
厚肌肉层
浆膜下层
浆膜
粘膜

图 1

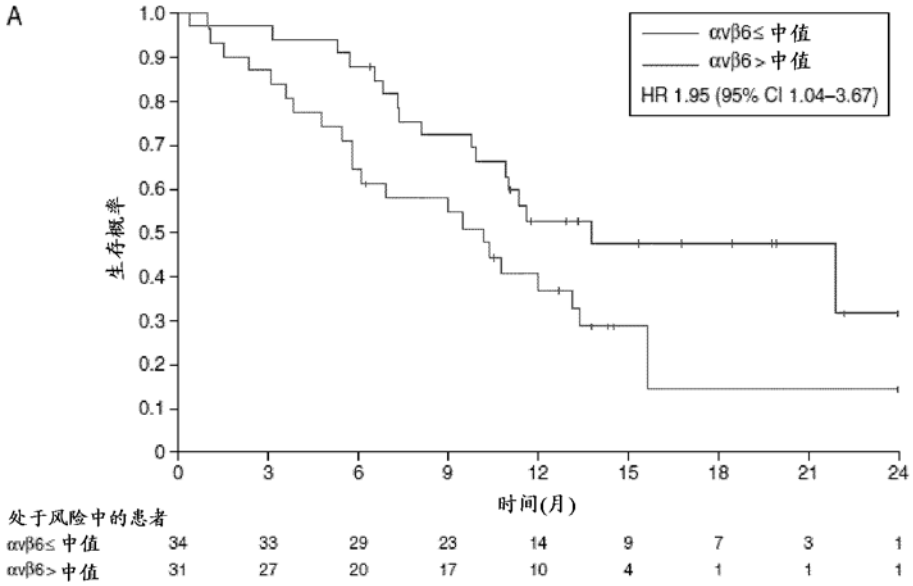

A
αvβ6≤ 中值
αvβ6> 中值
HR 1.95 (95% CI 1.04–3.67)
生存概率
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24
时间(月)
处于风险中的患者
αvβ6≤ 中值 34 33 29 23 14 9 7 3 1
αvβ6> 中值 31 27 20 17 10 4 1 1 1

图 2

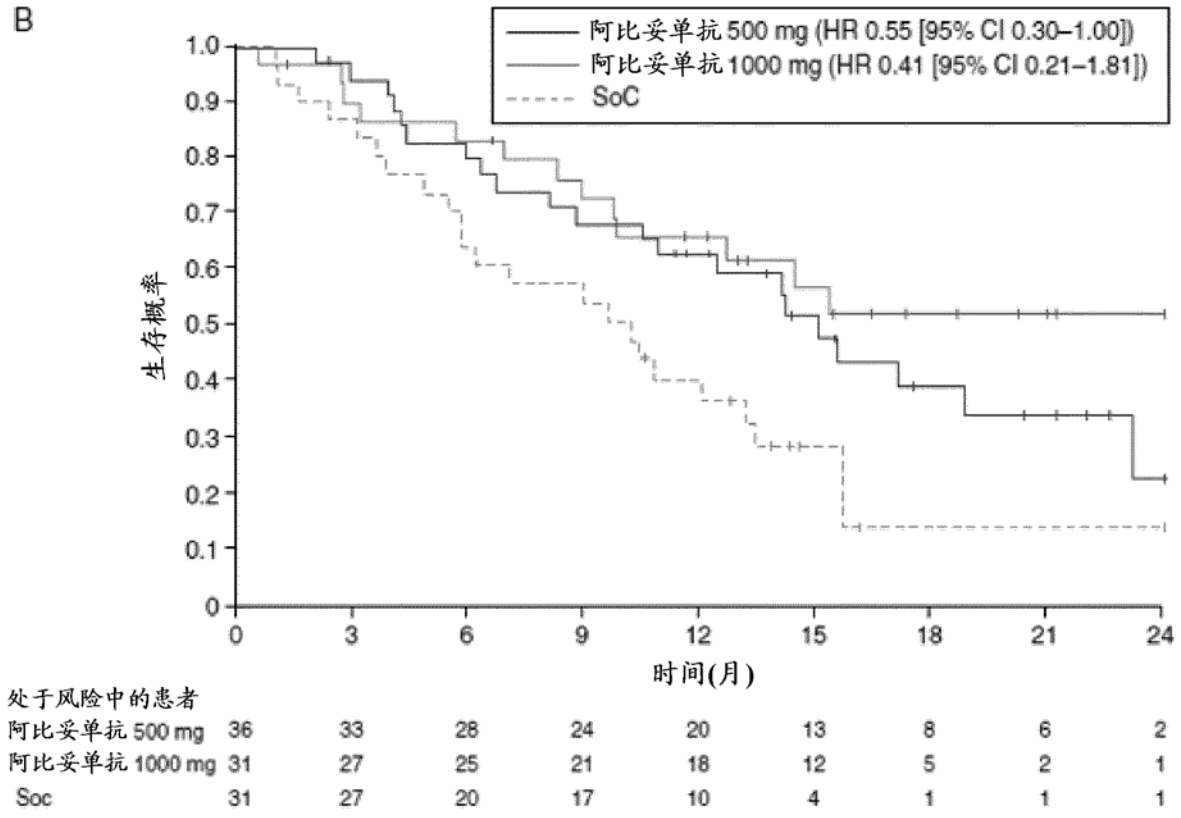

B
阿比妥单抗500 mg (HR 0.55 [95% CI 0.30–1.00])
阿比妥单抗1000 mg (HR 0.41 [95% CI 0.21–1.81])
SoC
生存概率
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24
时间(月)
处于风险中的患者
阿比妥单抗500 mg 36 33 28 24 20 13 8 6 2
阿比妥单抗1000 mg 31 27 25 21 18 12 5 2 1
Soc 31 27 20 17 10 4 1 1 1

图 3

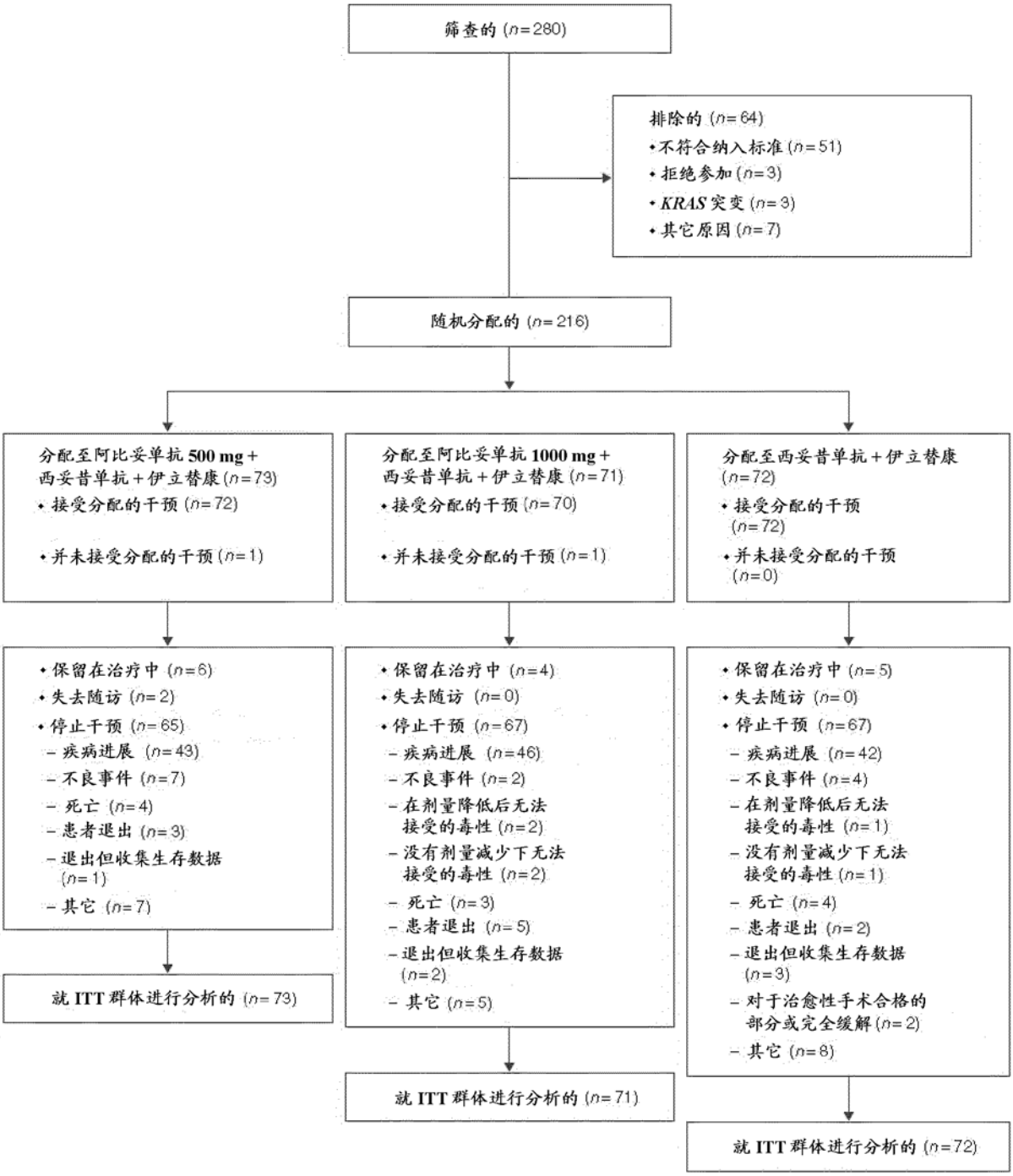

筛查的 (n=280)
排除的 (n=64)
• 不符合纳入标准 (n=51)
• 拒绝参加 (n=3)
• KRAS 突变 (n=3)
• 其它原因 (n=7)
随机分配的 (n=216)
分配至阿比妥单抗 500 mg + 西妥昔单抗 + 伊立替康 (n=73)
• 接受分配的干预 (n=72)
• 并未接受分配的干预 (n=1)
分配至阿比妥单抗 1000 mg + 西妥昔单抗 + 伊立替康 (n=71)
• 接受分配的干预 (n=70)
• 并未接受分配的干预 (n=1)
分配至西妥昔单抗 + 伊立替康 (n=72)
• 接受分配的干预 (n=72)
• 并未接受分配的干预 (n=0)
• 保留在治疗中 (n=6)
• 失去随访 (n=2)
• 停止干预 (n=65)
– 疾病进展 (n=43)
– 不良事件 (n=7)
– 死亡 (n=4)
– 患者退出 (n=3)
– 退出但收集生存数据 (n=1)
– 其它 (n=7)
• 保留在治疗中 (n=4)
• 失去随访 (n=0)
• 停止干预 (n=67)
– 疾病进展 (n=46)
– 不良事件 (n=2)
– 在剂量降低后无法接受的毒性 (n=2)
– 没有剂量减少下无法接受的毒性 (n=2)
– 死亡 (n=3)
– 患者退出 (n=5)
– 退出但收集生存数据 (n=2)
– 其它 (n=5)
• 保留在治疗中 (n=5)
• 失去随访 (n=0)
• 停止干预 (n=67)
– 疾病进展 (n=42)
– 不良事件 (n=4)
– 在剂量降低后无法接受的毒性 (n=1)
– 没有剂量减少下无法接受的毒性 (n=1)
– 死亡 (n=4)
– 患者退出 (n=2)
– 退出但收集生存数据 (n=3)
– 对于治愈性手术合格的部分或完全缓解 (n=2)
– 其它 (n=8)
就 ITT 群体进行分析的 (n=73)
就 ITT 群体进行分析的 (n=71)
就 ITT 群体进行分析的 (n=72)

图 4

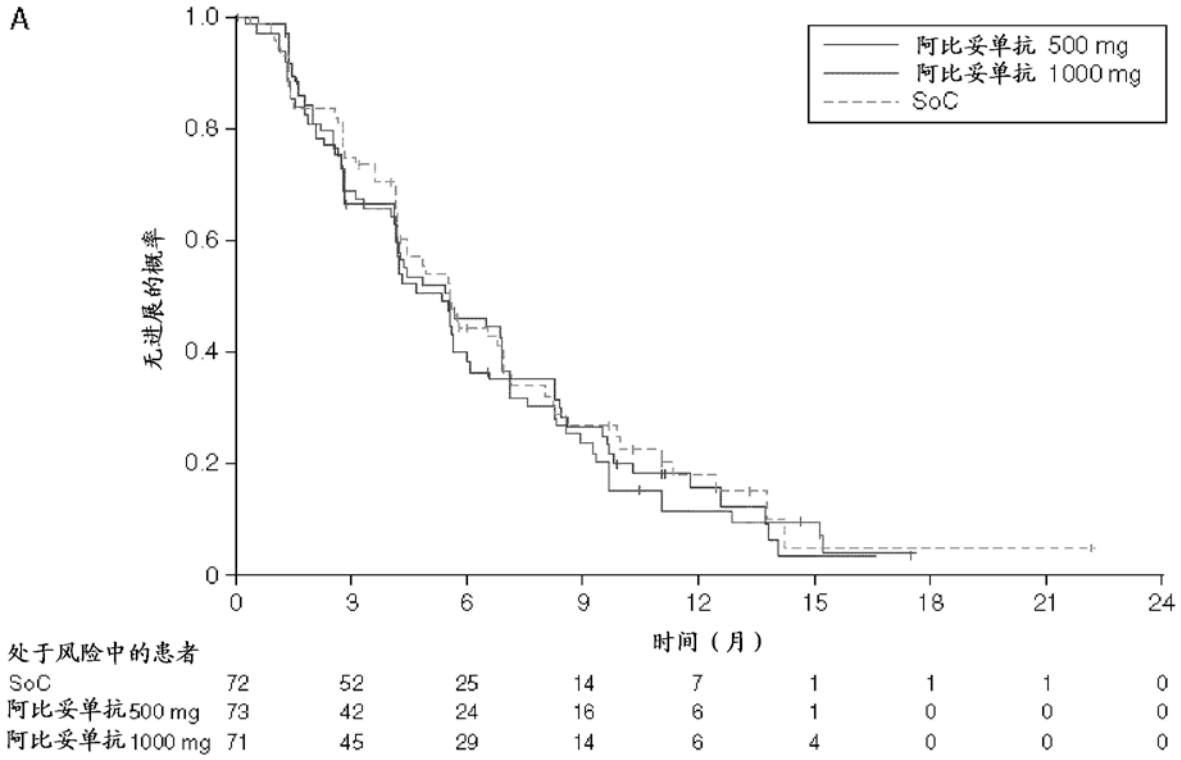

A
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
无进展的概率
阿比妥单抗 500 mg
阿比妥单抗 1000 mg
SoC
0 3 6 9 12 15 18 21 24
时间（月）
处于风险中的患者
SoC 72 52 25 14 7 1 1 1 0
阿比妥单抗500 mg 73 42 24 16 6 1 0 0 0
阿比妥单抗1000 mg 71 45 29 14 6 4 0 0 0

图 5A

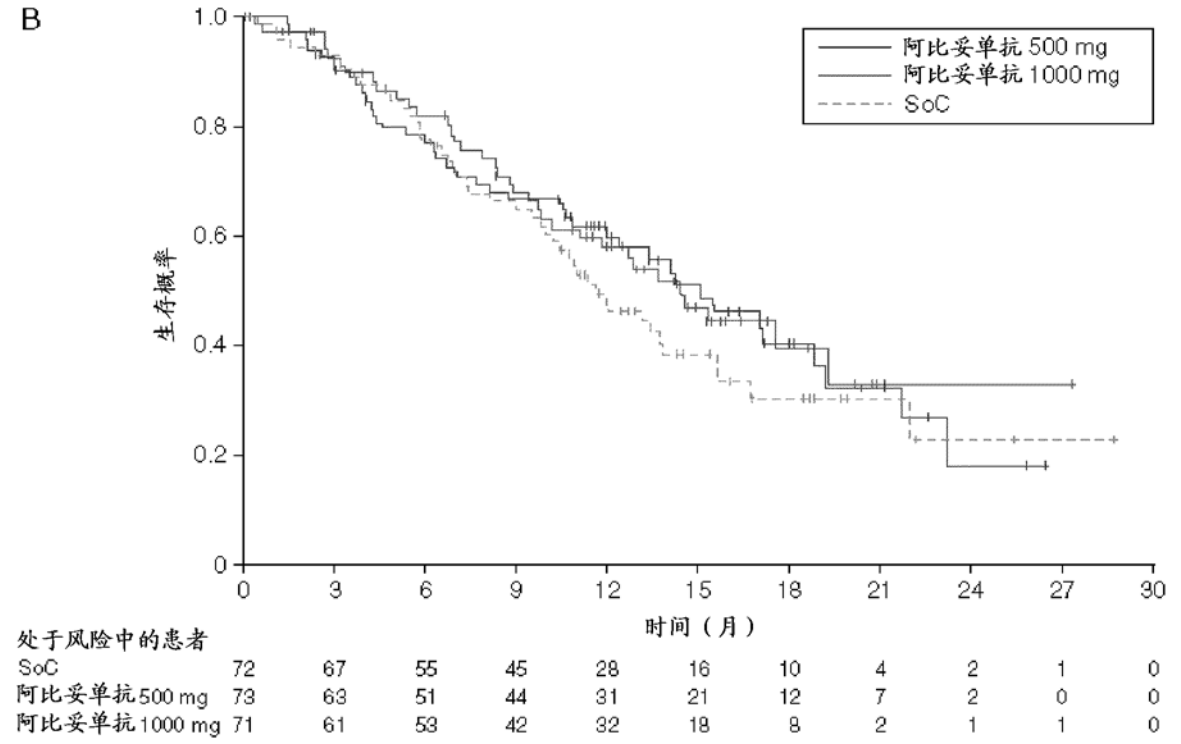

B
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
生存概率
阿比妥单抗 500 mg
阿比妥单抗 1000 mg
SoC
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30
时间（月）
处于风险中的患者
SoC 72 67 55 45 28 16 10 4 2 1 0
阿比妥单抗500 mg 73 63 51 44 31 21 12 7 2 0 0
阿比妥单抗1000 mg 71 61 53 42 32 18 8 2 1 1 0

图 5B

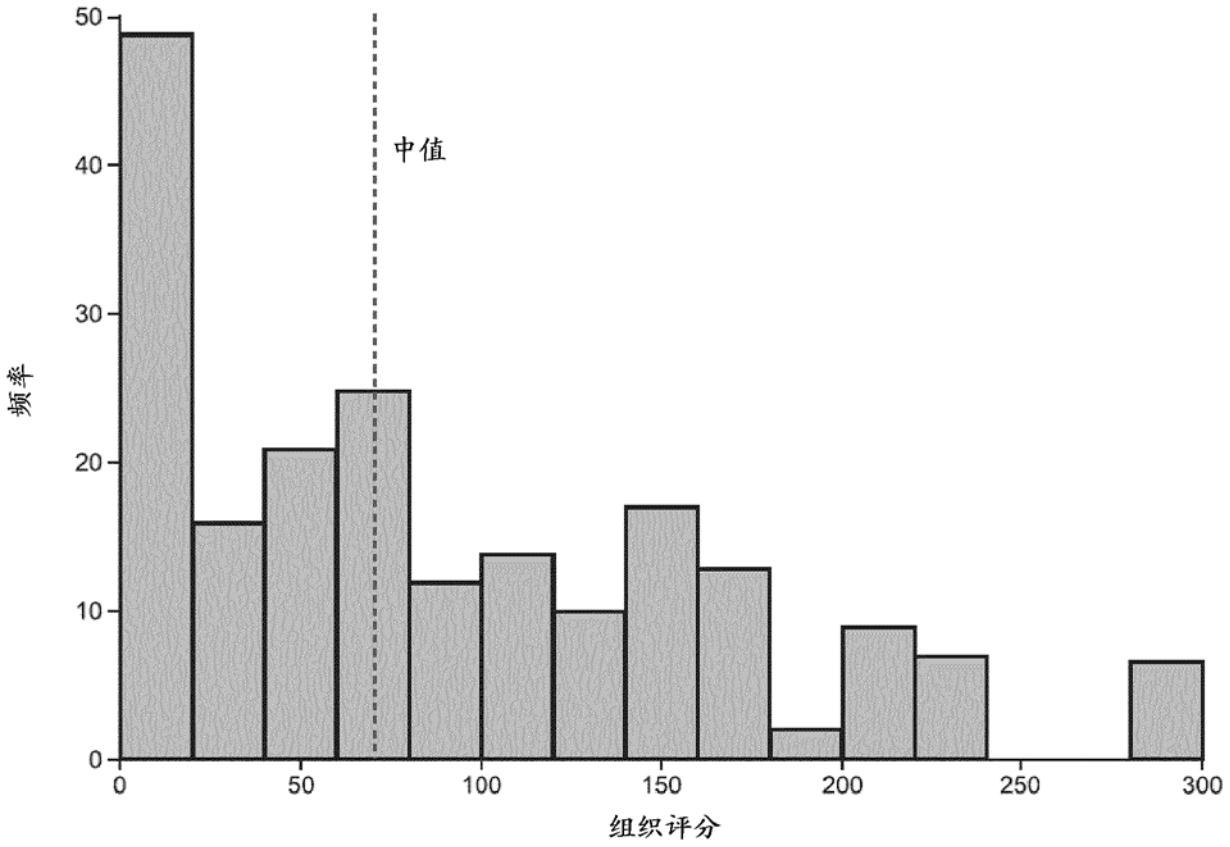


图 6

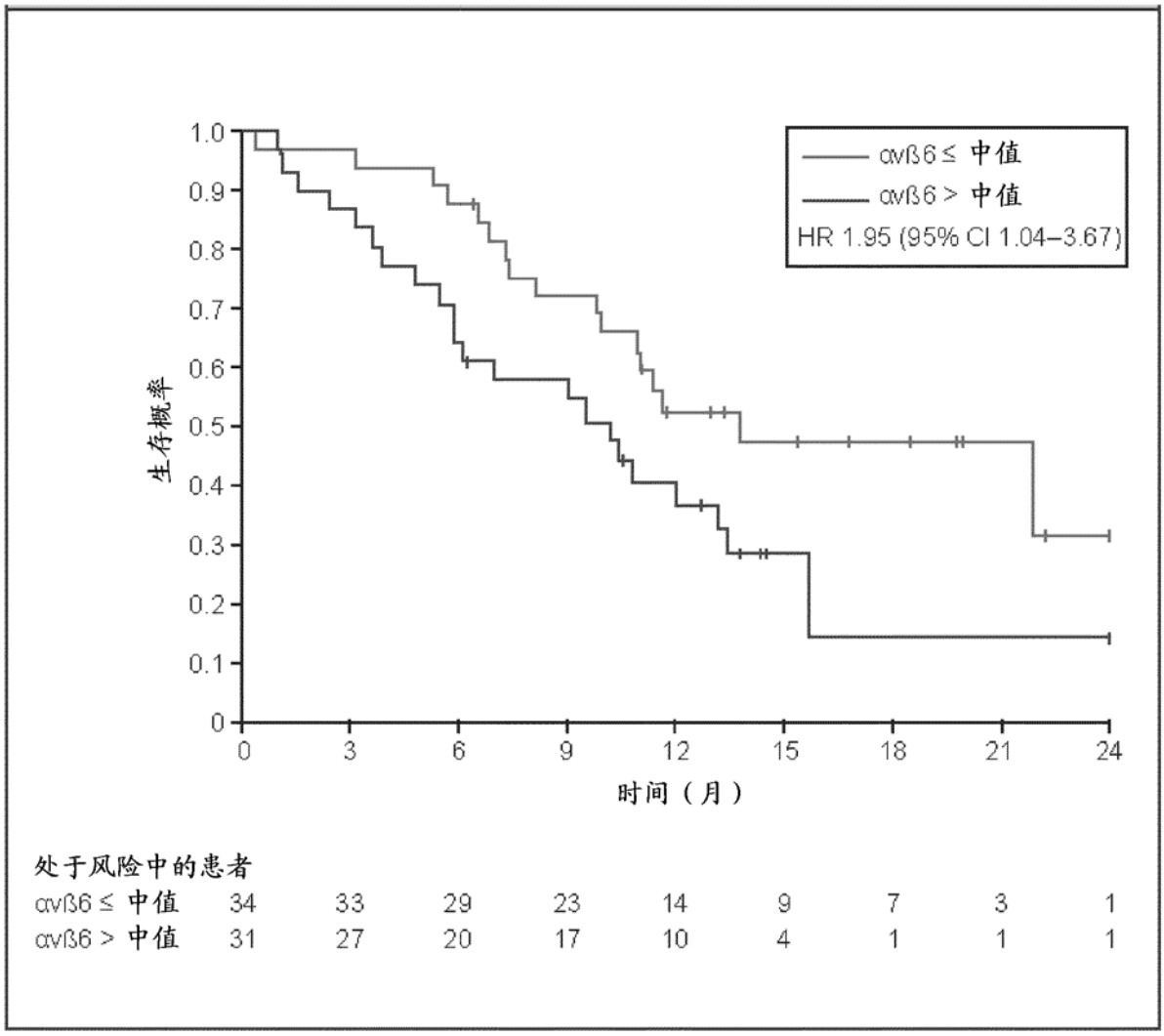

αvß6 ≤ 中值
αvß6 > 中值
HR 1.95 (95% CI 1.04–3.67)
生存概率
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24
时间（月）
处于风险中的患者
αvß6 ≤ 中值 34 33 29 23 14 9 7 3 1
αvß6 > 中值 31 27 20 17 10 4 1 1 1

图 7

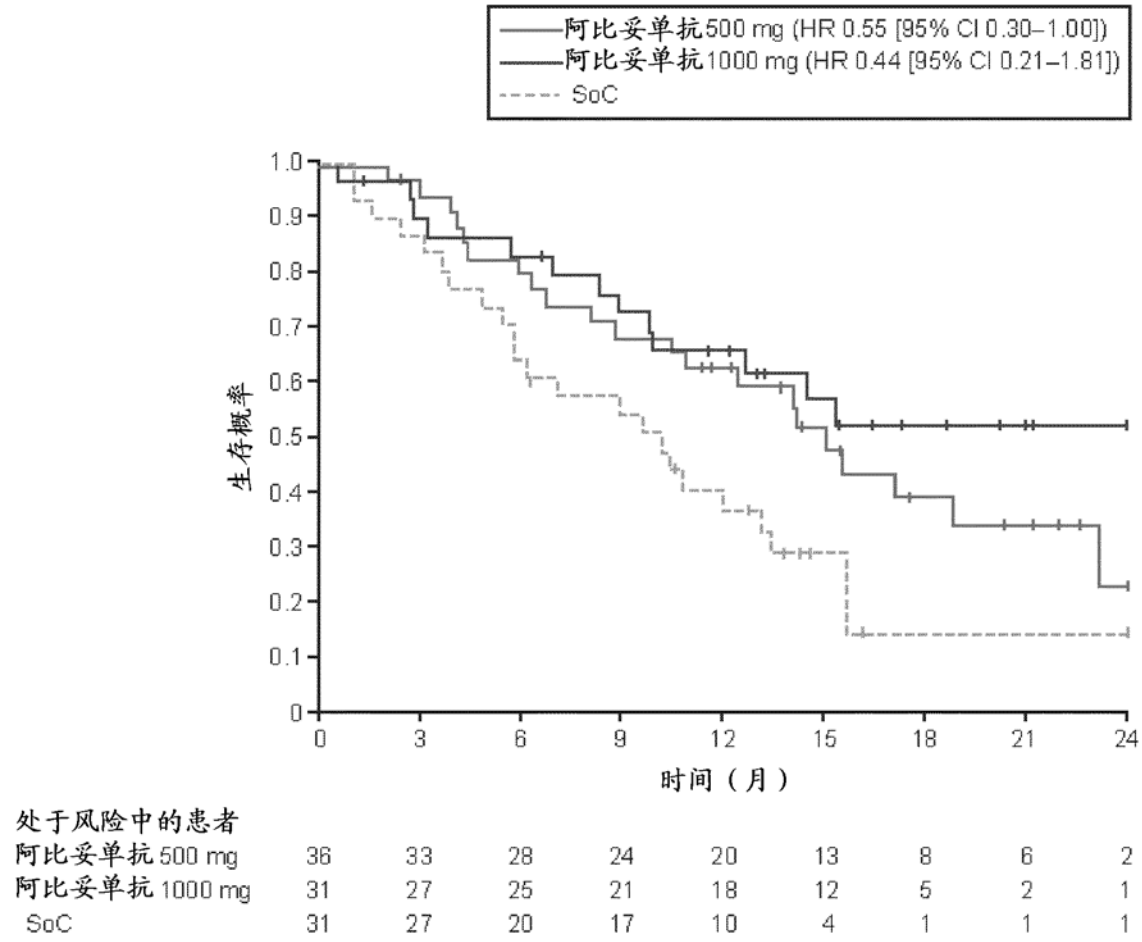

阿比妥单抗500 mg (HR 0.55 [95% CI 0.30–1.00])
阿比妥单抗1000 mg (HR 0.44 [95% CI 0.21–1.81])
SoC
生存概率
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0 3 6 9 12 15 18 21 24
时间（月）
处于风险中的患者
阿比妥单抗 500 mg 36 33 28 24 20 13 8 6 2
阿比妥单抗 1000 mg 31 27 25 21 18 12 5 2 1
SoC 31 27 20 17 10 4 1 1 1

图 8

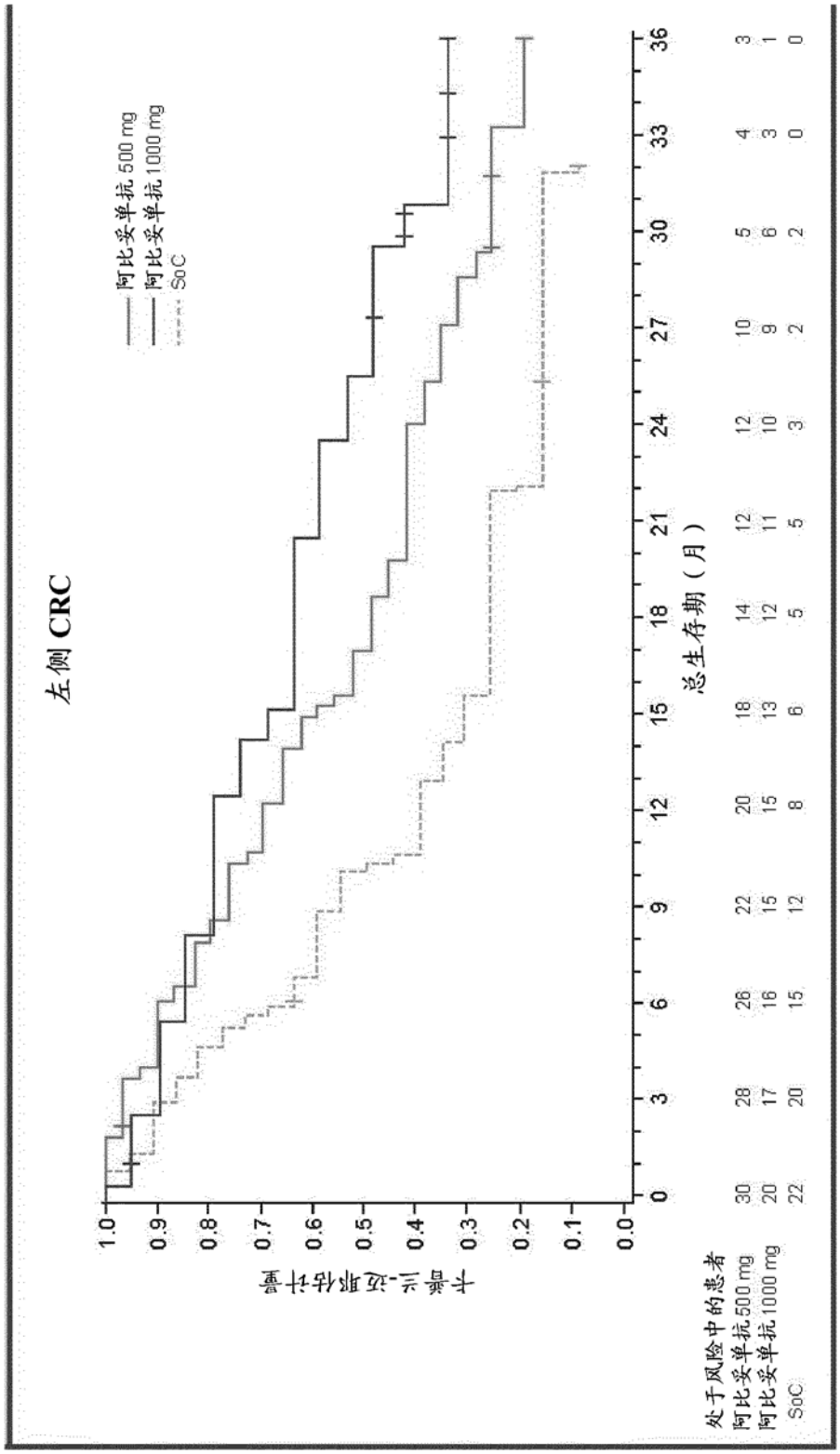

左侧 CRC
阿比妥单抗 500 mg
阿比妥单抗 1000 mg
SoC
卡普兰-迈耶估计量
总生存期（月）
处于风险中的患者
阿比妥单抗 500 mg 30 28 26 22 20 18 14 12 12 10 5 4 3
阿比妥单抗 1000 mg 20 17 16 15 15 13 12 11 10 9 6 3 1
SoC 22 20 15 12 8 6 5 5 3 2 2 0 0

图 9A

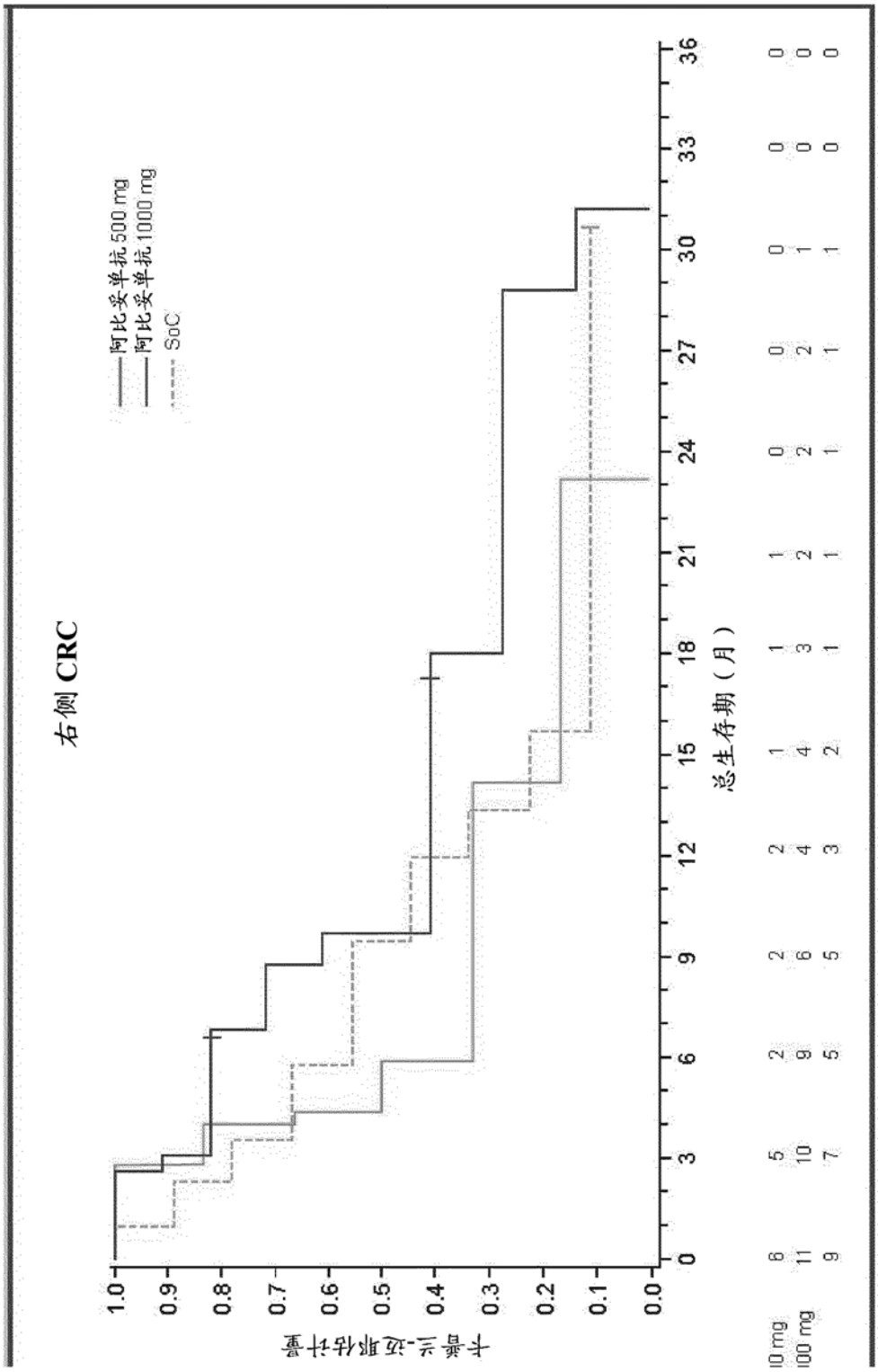

右侧 CRC
阿比安单抗 500 mg
阿比安单抗 1000 mg
SoC
卡普兰-迈耶估计量
总生存期（月）
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27 30 33 36
10 mg 8 5 2 2 2 1 1 1 0 0 0 0 0
00 mg 11 10 9 6 4 4 3 2 2 2 1 0 0
9 7 5 5 3 2 1 1 1 1 1 0 0

图 9B