



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105188742 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201480026267. 6

(22) 申请日 2014. 03. 14

(66) 本国优先权数据

PCT/CN2013/072638 2013. 03. 14 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/028714 2014. 03. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/153018 EN 2014. 09. 25

(71) 申请人 中美冠科生物技术(太仓)有限公司

地址 215400 江苏省苏州市太仓经济开发区
北京西路 6 号科技创业园

(72) 发明人 杨劼 Y·陈 H·Q·李 蔡杰

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 罗天乐

(51) Int. Cl.

A61K 39/00(2006. 01)

权利要求书2页 说明书35页

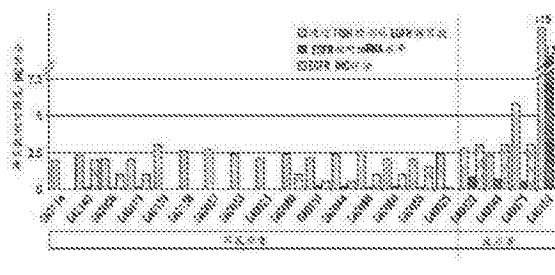
序列表10页 附图12页

(54) 发明名称

EGFR 生物标志物用于利用抗 EGFR 试剂治疗胃癌的用途

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗胃肿瘤,具体地治疗先前已被确定具有 EGFR 生物标志物的患者的方法。胃癌(GC)是最常见和最致命的癌症之一,每年全世界有约 100 万例诊断和约 70 万例死亡,在东亚具有高发病率。



1. 一种用于治疗胃肿瘤的方法,其包括向需要此种治疗的患者施用有效量的抗 EGFR 试剂,其中所述患者已被确定含有 EGFR 生物标志物。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述胃肿瘤是胃腺癌。
3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述抗 EGFR 试剂是抗 EGFR 抗体。
4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述抗 EGFR 试剂是西妥昔单抗、帕尼单抗、尼妥珠单抗、抗体 806、Sym004 或 MM-151。
5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述抗 EGFR 试剂是两种或更多种抗 EGFR 试剂的组合。
6. 根据权利要求 1 所述的方法,其还包括施用与胃肿瘤的标准治疗组合的抗 EGFR 试剂。
7. 根据权利要求 1 所述的方法,其还包括施用与化学疗法或放射疗法组合的抗 EGFR 试剂。
8. 根据权利要求 1 所述的方法,其还包括施用与顺铂和卡培他滨或 5-氟尿嘧啶、奥沙利铂、伊立替康、多西他赛、紫杉醇、多柔比星、丝裂霉素 C、依托泊苷、吉西他滨、卡铂组合的抗 EGFR 试剂。
9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述 EGFR 生物标志物是 EGFR 基因扩增或 EGFR 过表达。
10. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述 EGFR 基因扩增包括比预定数目更多的 EGFR 基因拷贝数。
11. 根据权利要求 9 所述的方法,其中所述 EGFR 过表达包括比预定水平高的 EGFR RNA、蛋白质或活性的水平。
12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述患者已被确定含有 EGFR 生物标志物但不含有 HER2 生物标志物。
13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述患者被施予抗 EGFR 试剂而非抗 HER2 试剂。
14. 一种用于确定患者是否适合于抗 EGFR 治疗的方法,其包括检测所述患者的样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在,其中 EGFR 生物标志物的存在指示所述患者适合于所述抗 EGFR 治疗。
15. 一种提供实验室服务的方法,其包括接收胃肿瘤患者的样本,进行测试以检测所述样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在,和为所述患者的保健提供者提供所述测试结果。
16. 一种用于监测抗 EGFR 治疗在患有胃肿瘤的受试者中的反应或功效的方法,其包括检测来自所述受试者的生物样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在,其中所述 EGFR 生物标志物是相较于预定标准水平的 EGFR 基因扩增或 EGFR 过表达,并且其中所述 EGFR 生物标志物的存在指示利用所述抗 EGFR 治疗的治疗的功效。
17. 一种用于确定用于治疗患有胃肿瘤的受试者的治疗方案的方法,其包括检测来自所述受试者的生物样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在,其中所述 EGFR 生物标志物是相较于预定标准水平的 EGFR 基因扩增或 EGFR 过表达,并且其中基于所述生物样本中所述 EGFR 生物标志物的存在或不存在确定治疗方案。
18. 一种用于预测针对患有胃肿瘤的受试者的治疗功效的方法,其包括检测来自所述受试者的生物样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在,其中所述 EGFR 生物标志物是相较于

于预定标准水平的 EGFR 基因扩增或 EGFR 过表达,并且其中 EGFR 生物标志物的存在指示阳性治疗功效。

19. 一种提供数据的方法,其包括:(a) 检测来自患有胃肿瘤的受试者的生物样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在,和 (b) 为保健提供者提供关于 EGFR 生物标志物的存在或不存在的信息,以供诊断或治疗受试者。

20. 根据权利要求 20 所述的方法,其还包括在所述检测步骤之前从所述保健提供者接收所述生物样本。

21. 一种为监测、预测或测定抗 EGFR 治疗的治疗功效提供有用的信息的方法,其包括 (a) 检测来自患有胃肿瘤的受试者的生物样本中的 EGFR 生物标志物相较于预定标准水平的存在或不存在,和 (b) 为提供所述治疗功效的预测或测定的实体提供关于 EGFR 生物标志物的存在或不存在的信息。

22. 根据权利要求 1-21 中任一项所述的方法,其中在所述抗 EGFR 治疗之前检测 EGFR 活性的基线水平,以及当与预定标准水平相比较时 EGFR 活性的基线水平的升高指示 EGFR 生物标志物的存在。

23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的方法,其中所述生物样本选自血液、皮肤、毛发、毛囊、唾液、口腔粘液、阴道粘液、汗液、泪液、上皮组织、尿液、精子、精液、精浆、前列腺液、射精前液体(考珀液)、排泄物、活检、腹水、脑脊液、淋巴液以及组织提取物样本或活检样本。

24. 一种试剂盒,其包含适合用于检测 EGFR 生物标志物的试剂和用于按照权利要求 1 的所述方法使用 EGFR 生物标志物治疗胃肿瘤的说明书。

EGFR 生物标志物用于利用抗 EGFR 试剂治疗胃癌的用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 3 月 14 日提交的国际专利申请号 PCT/CN2013/072638 的权益，所述国际专利申请出于所有目的通过引用整体并入本文。

发明领域

[0003] 本申请总体上涉及用于治疗胃肿瘤，具体地治疗先前已被确定具有特定表皮生长因子受体 (EGFR) 生物标志物的患者的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 胃癌 (GC) 是最常见和最致命的癌症之一，每年全世界有约 100 万例诊断和约 70 万例死亡¹，在东亚具有高发病率²。然而，对于大多数 GC 患者，除了手术以外，可用的有效治疗选项非常少。曲妥珠单抗(Herceptin®)，一种靶向 HER2 的单克隆抗体，是唯一被批准的靶向疗法，但限制于小部分具有较高 HER2 (EGFR2) 基因表达³和扩增的 GC 患者。可在 GC 中显示显著益处的最近批准的药物可特别期望满足此迫切需要。EGFR，也称为 ERBB1/HER1，属于 HER2 的相同家族，并且是在上皮癌，包括结肠直肠癌 (CRC)、GC 和非小细胞肺癌 (NSCLC) 等中表达的受体酪氨酸激酶 (RTK)。西妥昔单抗是结合 EGFR 并且阻断其配体诱导的下游信号转导，从而抑制细胞增殖的单克隆抗体。西妥昔单抗已被美国食品与药品管理局 (FDA) 批准用于治疗不激活密码子 12/13 处的 KRAS 突变⁴的表达 EGFR 的转移性 CRC (mCRC)，和头颈鳞状细胞癌 (SCCHN)⁵，但西妥昔单抗尚未被批准用于治疗 GC。存在几个关于西妥昔单抗 / 化疗治疗剂用于晚期 GC 的联合治疗的 II 期临床试验，但研究尚未显示超过当前护理标准 (SOC) 的显著更好的临床益处⁶⁻⁸。由 Merck Serona 资助的随机对照 III 期试验最近已被报导不能满足其主要终点 (NCT00678535 :Erbix in Combination With Xeloda and Cisplatin in Advanced Esophago-gastric Cancer, 或 EXPAND)。

[0006] 从而迫切需要新的有效靶向疗法。本发明提供该有利方面和其它有利方面。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明的一个方面提供用于治疗胃肿瘤的方法，其包括向需要此种治疗的患者施用有效量的药物。在一些实施方案中，所述药物针对表皮生长因子受体 (EGFR)。在一些实施方案中，所述药物针对 EGFR 的信号转导途径的下游。在一些实施方案中，所述药物是 EGFR 的配体的拮抗剂或抗体，例如表皮生长因子 (EGF)、转化生长因子 α (TGF α)、HB-EGF、双调蛋白、 β -细胞素、epigen 和 / 或表皮调节素的拮抗剂或抗体。在一些实施方案中，所述药物是小分子。在一些实施方案中，所述药物针对由 EGFR 与 ErbB 受体家族的另一个成员形成的异二聚体诸如 EfbB2/Her2/neu。在一些实施方案中，所述药物针对由 EGFR 形成的同二聚体。在一些实施方案中，所述药物是针对 EGFR 的抗体或抗体样治疗性实体 (抗 EGFR 抗体治疗)，例如西妥昔单抗。在一些实施方案中，患者已被确定含有 EGFR 生物标志物。在所述方法的一个实施方案中，胃肿瘤是胃腺癌。在所述方法的另一个实施方案中，抗 EGFR 试剂是抗 EGFR 抗体。在另一个实施方案中，抗 EGFR 试剂是西妥昔单抗、帕尼单抗、尼妥珠单抗、抗体 806、Sym004 或 MM-151。在某些实施方案中，抗 EGFR 试剂是 2 种或更多种抗 EGFR 试剂

的组合。在另一个实施方案中,所述方法还包括施用与胃肿瘤的标准治疗组合的抗 EGFR 试剂。在一个实施方案中,所述方法还包括施用与化学疗法或放射疗法组合的抗 EGFR 试剂。在其它实施方案中,所述方法包括施用与顺铂和卡培他滨、5- 氟尿嘧啶、奥沙利铂、伊立替康、多西他赛、紫杉醇、多柔比星、丝裂霉素 C、依托泊苷、吉西他滨或卡铂的一种或多种组合的抗 EGFR 试剂。如在本文中进一步概述的,在一个实施方案中,EGFR 生物标志物是 EGFR 基因扩增或 EGFR 过表达。在这一点上,EGFR 基因扩增可包含比预定数目多的 EGFR 基因拷贝数。EGFR 过表达可包含比预定水平高的水平的 EGFR RNA、蛋白质或活性。在所述方法的某些实施方案中,患者已被确定含有 EGFR 生物标志物但不含 HER2 生物标志物。因此,在一个实施方案中,向患者施用抗 EGFR 试剂而不施用抗 HER2 试剂。

[0009] 本发明的另一个方面提供用于确定患者是否适合抗 EGFR 治疗的方法,其包括检测患者的样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在,其中 EGFR 生物标志物的存在指示患者适合于抗 EGFR 治疗。在一些实施方案中,所述治疗包括一种或多种针对 EGFR 的药物、针对 EGFR 的信号转导途径下游的药物、针对 EGFR 的配体的药物、针对由 EGFR 形成的同二聚体或由 EGFR 与 ErbB 受体家族的另一个成员形成的异二聚体的药物。在一些实施方案中,所述药物是抗 EGFR 试剂。在一些实施方案中,抗 EGFR 试剂包括抗 EGFR 抗体。在一些实施方案中,抗 EGFR 抗体包括西妥昔单抗。

[0010] 本发明的其它方面提供用于提供实验室服务的方法,其包括接收具有胃肿瘤的患者样本,进行测试以检测样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在,和向患者的保健提供者提供测试结果。

[0011] 本发明的另一个方面提供一种试剂盒,其包含适合用于 EGFR 生物标志物的检测的试剂和按照本文中描述的方法使用 EGFR 生物标志物治疗胃肿瘤的说明书。

[0012] 在另一个实施方案中,本发明提供了为预测、测定、评价或监测利用抗 EGFR 药物,例如利用西妥昔单抗的胃肿瘤治疗或其治疗功效提供有用信息的方法。所述方法包括确定患者是否具有 EGFR 生物标志物。

[0013] 在另一个实施方案中,本发明提供用于监测患有胃肿瘤的受试者的抗 EGFR 治疗的反应或功效的方法。在一些实施方案中,所述方法包括检测受试者的生物样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在。在一些实施方案中,EGFR 生物标志物是相较于预定的标准水平的 EGFR 基因扩增和 / 或 EGFR 过表达。在一些实施方案中,EGFR 生物标志物的存在指示患者是治疗的反应者,并且抗 EGFR 治疗在患者中可具有功效,然而 EGFR 生物标志物的不存在指示患者不是治疗的反应者,并且抗 EGFR 治疗在患者中可能不具有功效。

[0014] 在另一个实施方案中,本发明提供用于确定治疗患有胃肿瘤的受试者的治疗方案的方法。在一些实施方案中,所述方法包括检测受试者的生物样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在。在一些实施方案中,EGFR 生物标志物是相较于预定标准水平的 EGFR 基因扩增和 / 或 EGFR 过表达。在一些实施方案中,基于生物样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在确定治疗方案。

[0015] 在另一个实施方案中,本发明提供用于预测对于患有胃肿瘤的受试者的治疗功效的方法。在一些实施方案中,所述方法包括检测受试者的生物样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在。在一些实施方案中,EGFR 生物标志物是相较于预定标准水平的 EGFR 基因扩增和 / 或 EGFR 过表达。在一些实施方案中,EGFR 生物标志物的存在指示积极治疗功效。

[0016] 在另一个实施方案中,本发明提供用于提供数据的方法。在一些实施方案中,所述方法包括检测患有胃肿瘤的受试者的生物样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在。在一些实施方案中,所述方法还包括为保健提供者提供关于 EGFR 生物标志物的存在或不存在的的信息以供诊断或治疗受试者。在一些实施方案中,所述方法还包括在检测步骤之前从保健提供者接收生物样本。

[0017] 在另一个实施方案中,本发明提供为监测、预测或测定抗 EGFR 治疗的治疗功效提供有用信息的方法。在一些实施方案中,所述方法包括检测患有胃肿瘤的受试者的生物样本中 EGFR 生物标志物相较于预定标准水平的存在或不存在。在一些实施方案中,所述方法还包括为提供治疗功效的预测或测定的实体提供关于 EGFR 生物标志物的存在或不存在的的信息。

[0018] 对于本文中描述的所有方法,在一些实施方案中,在抗 EGFR 治疗之前检测患者中的 EGFR 活性的基线水平。EGFR 活性的此类基线水平包括,但不限于 EGFR 基因拷贝数、转录物丰度、转录物稳定性、转录速率、翻译速率、翻译后修饰、蛋白质丰度、蛋白质稳定性和/或蛋白质酶促活性等。在一些实施方案中,当与预定标准水平相比较时患者中的 EGFR 活性的基线水平的升高指示 EGFR 生物标志物的存在。

[0019] 对于本文中描述的所有方法,在一些实施方案中,生物样本选自血液、皮肤、毛发、毛囊、唾液、口腔粘液、阴道粘液、汗液、泪液、上皮组织、尿液、精子、精液、精浆、前列腺液、射精前液体(考珀液)、排泄物、活检、腹水、脑脊液、淋巴液以及组织提取物样本或活检样本。

[0020] 附图简述

[0021] 结合以下与附图结合获得的详细描述,可更全面地理解本发明,其中:

[0022] 图 1. GC-ADC **HuPrime®**模型对西妥昔单抗起反应:图 A(图 1A):通过西妥昔单抗产生的反应者(上面 3 个模型)和非反应者(下面三排 8 个模型)的代表性肿瘤生长抑制。图 B(图 1B):模型 GA0022 的药效分析。在 0、6、24 和 72 小时时间点西妥昔单抗治疗后模型 GA0022 肿瘤的 pERK-IHC 分析。显示了 IHC 图像和评分。图 C(图 1C):通过肿瘤对西妥昔单抗(DT/DC)的反应分选 PDX-GC 模型。右边部分的反应者展示较高的 EGFR mRNA 水平和 IHC 染色强度,和仅有的两例(GA0075 和 GA0152, CN > 5) 基因扩增。

[0023] 图 2. 抗肿瘤活性与 EGFR 基因扩增和过表达的相关性。(加框的项表示具有 EGFR 基因扩增的模型)。图 A(图 2A):GC-ADC 肿瘤对西妥昔单抗反应的瀑布图;图 B(图 2B):使用 Affymetrix SNP6 芯片分析进行的 GC 模型的 EGFR 基因拷贝数分析。图 C(图 2C):如 Affymetix GeneChip HG-U219 测量的相对 mRNA 水平。D 如通过 pPCR 测量的 EGFR mRNA 表达。

[0024] 图 3. 将 Loboda RAS 途径标签评分对比随时间推移的肿瘤尺寸绘图。发现 Loboda RAS 途径标签评分与肿瘤反应几乎没有相关性。

[0025] 图 4. 具有 EGFR 过表达/基因扩增的 GC-ADC **HuPrime®**模型不具有 HER2 过表达/基因扩增。图 A:EGFR 和 HER2 表达水平;图 B:EGFR 和 HER2 基因拷贝数。

[0026] 图 5. 反应者和非反应者的代表性图像。反应者 GA0152 和 GA0075 展示 IHC 评分 3+,和基因扩增(GA0075, CN = 5.8;GA0152, CN > 15),然而非反应者 GA0119 和 GA0139 具有 IHC 低表达并且无基因扩增。左边:反应者和非反应者的代表性肿瘤生长曲线。中间:肿

瘤模型的 IHC 分析;右边:胃癌的双色 FISH 测定。

[0027] 发明详述

[0028] 本发明总体上涉及用于利用抗 EGFR 试剂治疗胃肿瘤,具体地治疗先前已被确定具有特定 EGFR 生物标志物的患者的方法。本发明允许通过向患者施用治疗剂即抗 EGFR 抗体来治疗对所述治疗较大可能起反应的患者,所述患者经发现具有扩增的编码 EGFR 蛋白的基因或 EGFR 过表达(如通过 mRNA 表达、蛋白质表达或活性水平测量的。本发明部分基于如下发现:EGFR 基因扩增(例如如通过荧光原位杂交(FISH),通过微阵列分析,或通过本领域中已知的其它方法检测的)或 EGFR 过表达提供了选择用于治疗的患者基础,因为 EGFR 基因扩增或 EGFR 过表达使反应与治疗关联。

[0029] 在一个方面,本发明提供用于确定患者是否适合于抗 EGFR 治疗的方法,其包括检测患者的样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在,其中 EGFR 生物标志物的存在指示患者适合于抗 EGFR 治疗。

[0030] 所述药物可以是针对表皮生长因子受体(EGFR)的任何药物。如本文中所用,针对 EGFR 的药物是指可改变 EGFR 的活性的组合物,诸如可增加、减小、消除、增强、延迟、减弱或阻断 EGFR 的活性的组合物。在一些实施方案中,所述组合物在转录水平、翻译水平、翻译后水平和/或蛋白质水平上针对 EGFR。所述组合物可特异性靶向 EGFR 或靶向至少 EGFR。在一些实施方案中,所述组合物可引起 EGFR 的基因抑制和/或基因沉默,例如敲低或敲除 EGFR。在一些实施方案中,所述组合物可改变 EGFR 蛋白活性,诸如改变 EGFR 与其配体的结合活性和/或其诱导下游信号转导途径的能力。在一些实施方案中,所述药物是 EGFR 的配体的拮抗剂或抗体,例如,表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 α (TGF α)、HB-EGF、双调蛋白、 β -细胞素、epigen 和/或表皮调节素的拮抗剂或抗体。在一些实施方案中,所述药物可靶向 EGFR 和/或配体并且阻断配体-受体结合。在一些实施方案中,所述药物可引起受体和/或配体的构象变化以及减弱或灭活 EGFR 介导的细胞信号转导。

[0031] 在一些实施方案中,所述药物针对由 EGFR 与 ErbB 受体家族的另一个成员形成的异二聚体诸如 EfbB2/Her2/neu,或由两个 EGFR 分子形成的同二聚体。

[0032] 在一些实施方案中,所述药物针对 EGFR 的信号转导途径下游。如本文中所用,术语“针对 EGFR 的信号转导途径下游的药物”是指包含可改变 EGFR 的信号转导途径下游诸如 EGFR 的一个或多个下游靶标的活性的试剂的组合物。EGFR 信号转导途径在 Sechacharyulu 等人 (Targeting the EGFR signaling pathway in cancer therapy, Expert Opin Ther Targets, 2012 年 1 月;16(1):15-31.), Oda 等人 (A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling, Molecular Systems Biology 1: 2005.0010) 中以及发育 EGFR 信号转导途径在 (Pathway Maps, Thomson Reuters, 2012) 中进行了描述,所述每一篇文献出于所有目的整体并入本文。

[0033] 在一些实施方案中,所述药物包括小分子。如本文中所用,术语“小分子”是指具有小于 500MW 的分子量的分子,其中所述药物是非肽基或肽试剂。在一些实施方案中,所述药物包括蛋白质或多肽。在一些实施方案中,所述药物包括杂交分子。在一些实施方案中,所述药物为抗体。在一些实施方案中,所述药物为抗 EGFR 抗体。在一些实施方案中,所述药物为抗 EGFR 配体抗体。在一些实施方案中,所述药物为人源化抗 EGFR 配体抗体。在一些实施方案中,所述抗体为单克隆抗体。

[0034] 在一些实施方案中,所述药物为抗 EGFR 抗体。在一些实施方案中,所述药物为西妥昔单抗或其功能性变体或衍生物。抗 EGFR 抗体的非限制性实例已在 PCT 公开号 WO/2011/140151、WO/2007/058823、WO/2011/080209、WO/2010/080463、WO/2012/020059、WO/2011/080209、WO/2011/059762、WO/2011/152525、WO/2011/140254、WO/2010/034441、WO/2011/156617、WO/2005/090407、WO/2013/006547、WO/2008/140493、WO/2011/156617、美国专利号 5942602、6129915、7723484、7618631、7598350 和美国专利申请公开号 20100166755、20080274114、20130142812、20110158987、20120107234、20110117110、20110287002、20120149879、20120282633、20100009390、20050238640、20060154334、20120231021 和 20130149299 中进行了描述,所述每个申请、专利和专利申请出于所有目的通过引用整体并入。

[0035] 如本文中所用,术语“表皮生长因子受体”(“EGFR”)是指编码结合表皮生长因子(EGF)并从而被其激活的膜多肽的基因。EGFR 在文献中也被称为 ERBB、ERBB1 和 HER1。示例性 EGFR 是人表皮生长因子受体(参见 Ullrich 等人(1984)Nature 309:418-425; Genbank 登录号 NP-005219.2;完整编码序列 AY588246.1)。EGF 配体的结合激活 EGFR(例如导致细胞内促有丝分裂信号转导的活化,EGFR 的自磷酸化)。本领域普通技术人员将理解,除了 EGF 以外,其它配体也可结合于 EGFR 并使其激活。此类配体的实例包括,但不限于,双调蛋白、表皮调节素、TGF- α 、 β -细胞素和发夹结合 EGF(HB-EGF)。人 EGFR 的细胞内结构域包含包含从邻近跨膜结构域的氨基酸直至 EGFR 的 COOH-末端的多肽序列。细胞内结构域,除其它以外,包含酪氨酸激酶结构域。

[0036] 如本文中所用,“EGFR 基因”是指编码 EGFR 基因产物的核酸,所述 EGFR 基因产物例如,EGFR mRNA、EGFR 多肽等。

[0037] 如本文中所用,“抗 EGFR 试剂”是指能够直接或间接结合于 EGFR 并且抑制 EGFR 的激活,或调节 EGFR 的信号转导途径下游的活性的任何试剂。抗 EGFR 试剂包括结合于 EGFR 并且抑制 EGFR 的激活的抗体,以及抑制 EGFR 激活的小分子酪氨酸激酶抑制剂或“激酶抑制剂”。针对 EGFR 的抗体包括 IgG;IgM;IgA;保留 EGFR 结合能力的抗体片段,例如,Fv、Fab、F(ab)₂、单链抗体等;嵌合抗体等。EGFR 的小分子酪氨酸激酶抑制剂包括 EGFR-选择性酪氨酸激酶抑制剂。EGFR 的小分子酪氨酸激酶抑制剂可具有在约 50Da 至约 10,000Da 的范围内的分子量。

[0038] 根据本发明,“抗 EGFR 试剂”或“EGFR 抑制剂”可以是抑制(阻断、降低、拮抗、减少、逆转)表皮生长因子受体(EGFR),包括任何 EGFR 的表达和/或生物活性的任何试剂。因此,抗 EGFR 试剂可包括,但不限于药品/化合物/肽设计或选择、抗体或其抗原结合片段、蛋白质、肽、核酸(包括核酶、反义核酸、RNAi 和适体)或抑制 EGFR 的表达和/或生物活性的任何其它试剂。例如,已知的 EGFR 的抑制剂包括药物吉非替尼(ZD 1839, Iressa®, AstraZeneca, UK) 和埃罗替尼(OSI 774, Tarceva®, Genentech, USA) 以及单克隆抗体、西妥昔单抗(Erbitux®, Imclone, Bristol-Myers Squibb)。然而,本发明不限于这些特定的试剂,并且可包括此类试剂或具有与这些试剂大体上相似的生物活性的试剂的激动剂。蛋白质诸如 EGFR 的生物活性或生物作用是指通过如在体内(即,在所述蛋白质的天然生理环境中)或体外(即,在实验室条件下)测量的或观察到的由所述蛋白质的天然存在的形式

展示或表现的任何功能。EGFR 的生物活性包括,但不限于,与 EGF 的结合、受体同或异二聚化、酪氨酸激酶活性和与细胞自动调节和发育相关的下游活性。

[0039] 酪氨酸激酶抑制剂代表靶向细胞诸如肿瘤细胞中的受体和 / 或非受体酪氨酸激酶的一类治疗剂或药物。在某些情况下,酪氨酸激酶抑制剂是靶向疗法的基于抗体(例如,抗酪氨酸激酶单克隆抗体等)或基于多核苷酸(例如,酪氨酸激酶反义寡核苷酸、小干扰核糖核酸,等)形式。优选地,酪氨酸激酶抑制剂是通过结合酶的 ATP 结合位点抑制靶酪氨酸激酶的小分子。小分子酪氨酸激酶抑制剂的实例包括,但不限于,吉非替尼(Iressa®)、舒尼替尼(Sutent®; SU11248)、埃罗替尼(Tarceva®; OSI-1774)、拉帕替尼(GW572016;GW2016)、卡奈替尼(CI 1033)、塞玛替尼(semaxinib)(SU5416)、伐他拉尼(PTK787/ZK222584)、索拉非尼(BAY 43-9006)、伊马替尼(Gleevec®; ST1571)、达沙替尼(BMS-354825)、来氟米特(SU10)、凡德他尼(Zactima®; ZD6474)、其药学上可接受的盐、其衍生物、其类似物及其组合。适合用于本发明的酪氨酸激酶抑制剂的另外实例包括喹唑啉(例如,PD 153035,4-(3-氯苯胺基)喹唑啉等)、吡啶并嘧啶、嘧啶并嘧啶、吡咯并嘧啶(例如,CGP 59326、CGP 60261、CGP 62706 等)、吡唑并嘧啶、4-(苯基氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶、姜黄素(二阿魏酰基甲烷)、4,5-双(4-氟苯胺基)邻苯二甲酰亚胺、含硝基噻吩部分的 tyrphostines、喹喔啉(参见例如,美国专利号 5,804,396)、tryphostins(参见,例如,美国专利号 5,804,396)、PD0183805、PKI-166、EKB-569、IMC-1C11, Affinitac®(LY900003;ISIS 3521),和 PCT 公开号 WO 99/09016、WO 98/43960、WO 97/38983、WO 99/06378、WO 99/06396、WO 96/30347、WO 96/33978、WO 96/33979 和 WO 96/33980 中描述的酪氨酸激酶抑制剂。

[0040] 示例性抗 EGFR 试剂为抗 EGFR 抗体,包括但不限于抗 EGFR 抗体:西妥昔单抗(ERBITUX™)、帕尼单抗(VECTIBIX™)、马妥珠单抗、尼妥珠单抗、抗体 806、Sym004 和 MM-151(以它们的鼠形式、嵌合形式或人源化形式存在的),包括它们的免疫有效片段(Fab、Fv)和免疫缀合物,尤其是免疫细胞因子。对于 EGFR 细胞外结构域是特异的其它抗体(或其它结合分子)在本领域中是已知的并且被设想用于本文中(参见,例如,美国专利号 5,459,061、5,558,864、5,891,996、6,217,866、6,235,883、6,699,473 和 7,060,808;欧洲专利号 EP0359282 和 EP0667165)。

[0041] 如本文中所用,术语“肿瘤样本”意指包含获自癌症患者的肿瘤材料的样本。该术语包括临床样本,例如通过手术切除获得的组织和通过活检(诸如例如髓芯活检或细针活检)获得的组织。术语还涵盖包括获自除原发肿瘤外的部位的肿瘤细胞例如循环肿瘤细胞的样本。术语涵盖为患者的肿瘤细胞的后代的细胞,例如,来源于原发肿瘤细胞或循环肿瘤细胞的细胞培养物样本。该术语涵盖可包括在体内从肿瘤细胞脱落的蛋白质或核酸材料的样本,例如骨髓、血液、血浆、血清等。该术语还涵盖针对肿瘤细胞富集的或另外地在它们获得后处理的样本以及包括从患者的肿瘤材料获得的多核苷酸和 / 或多肽的样本。

[0042] 如本文中所用,术语“标志物”或“生物标志物”涵盖广泛的细胞内和细胞外事件以及整个生物体的生理变化。标志物可基本代表细胞功能的任何方面,例如,但不限于,信号转导分子、转录因子、代谢产物、基因转录物的产生水平或速率,以及蛋白质的翻译后修饰。标志物可包括转录物水平、速率和 / 或稳定性的部分和 / 或全基因组分析,以及蛋白质

水平、活性和 / 或修饰的部分和 / 或全蛋白质组分析。标签可以指相较于临床上正常受试者待治疗的受试者中被上调或下调的基因或基因产物。标签还可指相较于未治疗受试者被治疗的患有疾病的受试者中被上调或下调的基因或基因产物。即, 基因或基因产物对于其可用于 (任选地与其它基因或基因产物一起) 的被处理的细胞是充分特异, 以鉴定、预测或检测小分子的功效。因此, 在一些实施方案中, 标签是具有化合物在患病细胞中的功效或该患病细胞对利用化合物的治疗的反应的特征的基因或基因产物。

[0043] 如本文中所用, “EGFR 生物标志物” 是指 EGFR 基因扩增和 / 或 EGFR 的过表达。EGFR 的过表达可涉及如通过转录物丰度、转录物稳定性、转录速率、翻译速率、翻译后修饰、蛋白质丰度、蛋白质稳定性和 / 或蛋白质酶促活性、mRNA、蛋白质和 / 或蛋白质活性等测量的过表达。如本文中所用, 术语 “基因活性” 是指基因表达水平、RNA 活性水平或蛋白质活性水平。如本文中所用, 术语 “RNA 活性水平” 是指 mRNA 丰度、合成速率和 / 或稳定性等。如本文中所用, 术语 “蛋白质活性水平” 是指蛋白质丰度、合成速率、稳定性、酶促活性、磷酸化速率等。

[0044] 在一些实施方案中, 关于生物标志物的信息获自一个或多个测试。测试可由受试者自身, 由医生, 由护士, 由测试实验室, 由保健提供者或能够进行所述测试的任何其它方来进行。随后可由相同方或由第二方, 诸如受试者自身、医生、护士、测试实验室、保健提供者、内科医生、临床试验人员、医院、实验室、研究所或能够分析测试以确定受试者是否对药物起反应的任何其他方来分析含有生物标志物信息的测试结果。

[0045] 在某些实施方案中, 可建立 EGFR 基因拷贝数或 EGFR 的过表达的阈值水平, 以及将患者肿瘤样本中的 EGFR 基因拷贝数或 EGFR mRNA 或蛋白质的表达水平与 “预定阈值水平” (也称为 “预定水平” 或 “预定截止值”) 比较。

[0046] EGFR 拷贝数或表达水平的预定水平, 有时被称为预定截止值, 可使用本领域中已知的方法, 特别地使用接受者操作特征曲线或 “ROC” 曲线来建立。实际上, ROC 曲线通常通过将变量值对比其在 “正常” 和 “患病” 群体中的相对频率绘制曲线, 和 / 或通过比较来自治疗前、治疗期和 / 或治疗后的受试者的结果来计算。在某些实施方案中, 比较正常样本对比测试样本的 EGFR 表达或基因拷贝数, 或这两者。在一些实施方案中, EGFR 基因拷贝数为至少 3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个拷贝。在一些实施方案中, 通过与一个或多个标准水平比较或通过与本领域中已知为标准水平的水平比较来测定增加。测量基因扩增、增加的表达、增加的 RNA 或 DNA 水平以及确定蛋白质是否具有组成型活性的方法在本领域中是公知的并且任何此类方法可用于本发明。

[0047] 为了测定 EGFR 生物标志物或其它目标生物标志物诸如 HER2 的存在或不存在, 将从用于特定测试或测定的报告基团检测到的信号与对应于预定截止值或预定阈值水平的信号进行比较。在一个实施方案中, 用于生物标志物的检测的预定阈值水平是从不患有所述疾病例如不患有胃癌的患者的样本获得的平均水平 (average mean level)。一般地, 产生高于预定阈值水平 3 个标准差的样本被认为对于癌症呈阳性。在可选择的优选实施方案中, 按照 Sackett 等人, *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, Little Brown and Co., 1985, 第 106-7 页的方法, 使用 ROC 测定截止值。简言之, 在该实施方案中, 可从对应于用于诊断测试结果的每一个可能的截止值的成对真阳性率 (即, 灵敏度) 和假阳性率 (100% 特异度) 的曲线图测定截止值。曲线图上最接近左上

角的截止值（即，包围最大面积的值）是最准确的截止值，并且产生高于通过该方法测定的截止值的信号的样本可被认为是阳性的。或者，可将截止值沿着曲线图向左偏移，以使假阳性率降至最低，或向右偏移，以使假阴性率降至最低。一般地，产生高于通过该方法测定的截止值的信号的样本被认为对癌症呈阳性。

[0048] 在一些实施方案中，可将代表患者对利用抗 EGFR 试剂的治疗的反应的 ROC 曲线用于定义目标函数。例如，目标函数可反映 ROC 曲线下面积。通过使针对用抗 EGFR 试剂治疗的患者的 EGFR 基因拷贝数（例如，EGFR 基因扩增）或 EGFR 的过表达的水平的曲线下面积最大化，可使癌症患者是否将对利用抗 EGFR 试剂的治疗起反应最大化。在一些其它实施方案中，可约束 ROC 曲线以提供大于特定值的曲线下面积。具有 0.5 的曲线下面积的 ROC 曲线表示完全随机性，然而 1.0 的曲线下面积反映两组的完全分离。因此，在某些实施方案中，最小可接受值，诸如 0.75，可用作约束条件。

[0049] 在一些其它实施方案中，其它特性诸如 ROC 曲线的斜率等于 1 所处的点的使用；灵敏度与特异度的积是最大时所处的点的使用；或这些 ROC- 曲线特性的两个或更多个的组合可用于定义目标函数。

[0050] 在某些实施方案中，EGFR 过表达（例如，mRNA 或蛋白质表达）以这样的水平存在，所述水平在肿瘤组织中为在肿瘤由其产生的相同类型的正常组织中的至少约 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍或更多。

[0051] 在一些实施方案中，肿瘤样本中 EGFR 基因拷贝数或 EGFR 的过表达的水平或这两种水平相对于预定阈值水平的升高指示癌症患者将对利用抗 EGFR 试剂的治疗起反应。在一些实施方案中，肿瘤样本中 EGFR 基因拷贝数相对于预定阈值水平的下降的水平指示癌症患者将对利用 EGFR 抑制剂的治疗不起反应。

[0052] 本发明还部分涉及如下观察，具有 EGFR 生物标志物（过表达和 / 或基因扩增）的 HuPrime 模型也不具有 HER2 生物标志物（过表达和 / 或基因扩增）以及反之亦然，即在单个模型中不会同时观察到 EGFR 和 HER2 的过表达（基因扩增）（参见实施例）。因此，在一个实施方案中，肿瘤样本中 EGFR 基因拷贝数或 EGFR 过表达相对于预定阈值水平的升高的水平以及 HER2 生物标志物的缺乏，被用于选择利用抗 EGFR 试剂的进行治疗的患者的指标。在这一点上，人酪氨酸激酶受体类型受体（HER2）基因的核苷酸序列在本领域中也是已知的，并且可见于例如 GenBank 登录号 M16789、M16790、M16791、M16792 和 M11730（全部通过引用并入本文）下。核苷酸探针和抗 HER2 抗体在本领域中也是已知的并且可获得用作 HER2 基因和蛋白质的探针以测定其表达水平 / 活性。

[0053] 术语“基因拷贝数”（GCN）通常被定义为每基因组的基因数目。术语“EGFR 基因拷贝数”意指每细胞核的 EGFR 基因数目的比率。在非致瘤性或非赘生性细胞中，EGFR 基因拷贝数接近或小于 2。在非致瘤性或或非赘生性来源的组织切片中，如果利用原位杂交检测的话，GCN 接近或小于 2。

[0054] 术语“增加的 EGFR 基因拷贝数”、“扩增的 EGFR 基因拷贝数”或“EGFR 基因扩增”意指与患者相关的肿瘤的细胞中的上文中定义的比率比与相同来源的非赘生性细胞相关的肿瘤的细胞中的特定比率或阈值水平高或被扩增。在一个实施方案中，所述比率或阈值水平（EGFR 基因的数目 / 细胞核）大于 2 或 3 或 4 或 5 或 6 或 7。在另一个实施方案中，所述比率或阈值水平接近或大于 4。在某些实施方案中，术语增加的或扩增的 EGFR 基因拷

贝数意指大于非致瘤性或非赘生性细胞中的 EGFR 基因拷贝数的 GCN。在某些实施方案中, EGFR GCN 或阈值水平可大于 4, 诸如 4.5、5.5、6.5、7.5、8.5、9.5、10.5、11.5、12.5、13.5、14.5、15.5、16 或更大。在某些实施方案中, EGFR GCN 或阈值水平可小于 4, 诸如 3.5、3 或 2.5。

[0055] 在一些实施方案中, 接近或大于 4 的 EGFR 基因拷贝数鉴定可能对利用 -EGFR 试剂的治疗起反应的癌症患者。

[0056] 根据这些适用于“增加的”或“扩增的” EGFR 基因拷贝数的前述值, 由对利用 EGFR 抑制剂或抗 EGFR 抗体的治疗不起反应, 或无有效或积极地反应, 或无反应的患者的肿瘤细胞呈现的相对减少或更低或无扩增的拷贝数的比率值小于 2。在一个实施方案中, 所述比率或阈值水平小于 4。在一些实施方案中, 小于 4 的 EGFR 基因拷贝数鉴定了癌症患者和可能对利用抗 EGFR 试剂的治疗无反应的患者。

[0057] 用于测定 EGFR 生物标志物, 例如 EGFR 或其它目标生物标志物 (例如, HER2 生物标志物) 的基因扩增或过表达的存在的方法包括基因表达谱分析。此类方法包括基于多核苷酸的杂交分析、基于多核苷酸的测序的方法和基于蛋白组学的方法。本领域中已知的用于定量样本中的 mRNA 表达的示例性方法包括 northern 印迹和原位杂交 (Parker 和 Barnes, *Methods in Molecular Biology* 106:247-283(1999)); RNA 酶保护测定 (Hod, *Biotechniques* 13:852-854(1992)) 和基于 PCR 的方法, 诸如反转录 PCT (RT-PCR) (Weis 等人, *Trends in Genetics* 8:263-264(1992))。可使用可识别序列特异性双链体, 包括 DNA 双链体、RNA 双链体和 DNA-RNA 杂交双链体或 DNA-蛋白质双链体的抗体。下一代测序、qPCR、qcPCR 和数字 PCR 也可用于测定 EGFR 表达水平。

[0058] 用于检测核酸诸如 RNA 或 DNA 的水平的方法在本领域中已被详尽描述并且对于本领域普通技术人员来说是公知的。用于检测 RNA 的方法可包括但不限于 RT-PCR、northern 印迹分析、基因表达分析、微阵列分析、基因表达芯片分析、杂交技术 (包括 FISH)、表达微珠芯片测定和色谱分析以及本领域中已知的任何其它技术。用于检测 DNA 的方法可包括但不限于 PCR、实时 PCR、数字 PCR、杂交 (包括 FISH)、微阵列分析、SNP 检测测定、SNP 基因分型测定和色谱分析以及本领域中已知的任何其它技术。

[0059] 用于检测蛋白质和多肽的方法包括但不限于蛋白质浓度的分光光度测定、定量氨基酸分析、蛋白质浓度测定、色谱测定、免疫印迹分析、凝胶电泳, (随后染色方法, 但不限于考马斯蓝、银染、Syber Green、Syber Gold)、杂交、多重细胞因子测定、免疫测定、ELISA、二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白测定、Bradford 蛋白质测定和 Lowry 蛋白质测定以及本领域中已知的任何其它技术。蛋白质检测还可包括检测稳定的或具有活性的蛋白质的水平, 并且还可使用方法诸如动力学测定、激酶测定、酶测定和翻译后修饰测定 (例如, 用于测定磷酸化和糖基化状态的测定)。

[0060] 如本文中所用, 术语“预定标准水平”或“预定活性特征谱”是指代表特定群体中一种或多种生物标志物的平均、代表性特性或特征的标准化数据或数据集。此类特性或特征包括, 但不限于, 转录物丰度、转录物稳定性、转录速率、翻译速率、翻译后修饰、蛋白质丰度、蛋白质稳定性和 / 或蛋白质酶促活性等。在一些实施方案中, 受试者的特定群体由约 5 个、约 10 个、约 20 个、约 50 个、约 100 个、约 200 个、约 300 个、约 400 个、约 500 个、约 1000 个、约 5000 个、约 10K 个或更多的个体受试者组成。预定活性特征谱可以是在受试者的特

定群体已被全部暴露于药物之前、期间或之后收集的标准化数据或数据集。在一些实施方案中,所述特定群体由临床上正常的受试者组成。如本文中所用,术语“临床上正常的受试者”是指不具有或大体上不具有与胃肿瘤相关的症状的受试者。预定标准水平可使用多种本领域普通技术人员已知的方法来确定。一般地,用于生物标志物的标准水平通过测定足够大数量的获自正常健康对照受试者的样本中的 EGFR 生物标志物的水平来测定。在一些实施方案中,标准水平信息可获自公共可获得的数据库以及其它来源。(参见,例如,Bunk, D. M., Clin. Biochem. Rev., 28(4):131-137(2007); Suraj Peril, 等人, Genome Res. 13: 2363-2371(2003); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Twenty First Edition(2005)。

[0061] 关于与生物标志物水平的检测、定量和比较相关的方法,参见,例如, Current Protocols in Molecular Biology, 编辑 Ausubel, Frederick M. (2010); Current Protocols in Protein Science Last, 编辑 Coligan, John E., 等人 (2010); Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 编辑 Egli, Martin (2010); Current Protocols in Bioinformatics, 编辑 Baxevanis, Andreas D. (2010); 和 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 3 版, Sambrook, Joseph (2001), 所述所有文献通过引用整体并入本文。

[0062] EGFR 表达水平还可使用多种可获得的微阵列中的任何一种来评估。在该方法中,将目标多核苷酸序列(包括 cDNA 和寡核苷酸)排列在基底上。随后在适合于与从测试样本的 mRNA 产生的可检测地标记的 cDNA 特异性杂交的条件下接触排列的序列。mRNA 的来源通常是从肿瘤样本,和任选地从作为内部对照的相同的患者的正常组织或细胞系分离的总 RNA。可以例如从冷冻或存档的石蜡包埋的并且固定的(例如福尔马林-固定的)组织样本提取 mRNA。用于本文的示例性微阵列包括,但不限于 Affymetrix HG-U219 GeneChip 或 Affymetrix SNP6 阵列(Affymetrix, Santa Clara, CA)。

[0063] 在某些实施方案中,EGFR 基因拷贝数或 mRNA 表达水平的检测使用杂交测定来实现。核酸杂交只包括将探针(例如,寡核苷酸或更大的多核苷酸)与靶核酸在其中探针与其互补靶标可通过互补碱基配对形成稳定的杂交双链体的条件下接触。如本文中所用,杂交条件是指在其下使用核酸分子来鉴定相似核酸分子的标准杂交条件。此类标准条件公开于例如 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989. Sambrook 等人(同上)中,所述参考文献通过引用整体并入本文(具体参见,第 9.31-9.62 页)中。此外,计算实现允许不同程度的核苷酸错配的杂交的适当的杂交和洗涤条件的公式对于本领域普通技术人员来说是已知的。

[0064] 在低严格度条件(例如,低温和/或高盐)下,在即使其中退火的序列不是优选地互补的情况中,将形成杂交双链体(例如, DNA:DNA、RNA:RNA 或 RNA:DNA)。因此,杂交的特异性在较低严格度下降低。相反地,在较高严格度(例如,较高的温度或较低的盐)下,成功的杂交需要较少的错配。

[0065] 杂交的核酸通过检测连接至样本核酸的一个或多个标记来检测。可利用本领域普通技术人员公知的许多方法中的任何方法掺入所述标记。

[0066] 在一个实施方案中,EGFR 基因拷贝数使用 FISH 分析来检测。FISH(双色)法可使用商购可得的试剂和方法,诸如本文中的实施例中描述的那些试剂和方法来进行。(参

见,例如,Abbott PathVysion EGFR DNA Probe 试剂盒 (Abbott, Downers Grove, IL)。在某些实施方案中,用于此类 FISH 分析的经标记的探针包含对于染色体 7p12 上的 EGFR 基因座是特异的光谱橙色荧光团标记的 EGFR(303kb),和 / 或被靶向位于染色体 7 的着丝粒区域 (CEP7 ;7p11.1-q11.1) 的 α -卫星 DNA 序列的光谱绿色荧光团标记的染色体计数器探针 (5.4kb)。

[0067] 许多常规检测法利用酶。一般用于灵敏性检测的酶底物的类型通常是比色、放射性或荧光。常规比色底物在酶对生色底物作用后产生新的颜色 (或光谱吸收的变化)。该类型的检测是有利的,因为产生的色原可通过光学显微镜检查或利用光谱设备来容易地检测。用于检测的设备成本通常也低于其它方法;例如在病理学中,通过酶辣根过氧化物酶作用于底物 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 产生的褐色只需要简单的明场光学显微镜来观察活检切片。可与辣根过氧化物酶结合使用的其它色原包括,但不限于,3-氨基-9-乙基咔唑 (AEC) 和 Bajoran 紫。可与碱性磷酸酶结合使用的其它色原包括,但不限于,坚固红和 Ferangi 蓝。许多色原对于本领域普通技术人员来说是可获得的,并且通过由公司诸如 Thermo Fisher Scientific 提供的目录商购获得。

[0068] 检测方法中所用的各种标记包括荧光染料 (例如,异硫氰酸荧光素、德克萨斯红、罗丹明等) 和酶 (例如,LacZ、CAT、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶,和葡萄糖氧化酶、乙酰胆碱酯酶等,通常用作可检测的酶),或能够形成复合物如链霉亲和素 / 生物素、抗生物素蛋白 / 生物素或抗原 / 抗体复合物的结合对的成员,包括,例如,兔 IgG 和抗兔 IgG;荧光团;光散射或等离子体共振材料,诸如金或银颗粒或量子点;或放射性标记;和用为本领域普通技术人员已知的任何其它信号生成标记物 (如例如由 Richard P. Hoagland 在 the Molecular Probes Handbook 的第 6 版增刊中描述的) 标记的探针。在某些实施方案中,经标记的探针包括对于染色体 7p12 上的 EGFR 基因座是特异的光谱橙色荧光团标记的 EGFR(303kb),和 / 或被靶向位于染色体 7 的着丝粒区域 (CEP7 ;7p11.1-q11.1) 的 α -卫星 DNA 序列的光谱绿色荧光团标记的染色体计数器探针 (5.4kb)。

[0069] 在某些实施方案中,所述杂交核酸,诸如 EGFR 基因或其片段,通过金属标记或“酶促金属学 (enzymatic metallography)”和最优选地在银的情况下原位杂交 (SISH) 测定 (参见例如,专利申请 US20080299555 A1) 来检测。具体地,酶促金属学允许通过常规明视场显微镜检测染色体中的单拷贝的靶基因而无需浸油。SISH 还使得能够以允许单个地计数信号 (诸如针对单个基因拷贝的离散金属沉积点) 的分辨率检测基因拷贝。在一个实施方案中,本发明允许检测细胞核中的人染色体 7 中的至少 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或更多个拷贝的 EGFR 基因,如离散金属沉积。

[0070] 可以例如使用 FISH 或 SISH 测定测量根据本发明的肿瘤细胞中细胞核中的基因和染色体的拷贝数,并且可以例如在免疫组织化学测定中评价肿瘤细胞核、细胞质和 / 或膜中的蛋白质表达。可在原发肿瘤、转移肿瘤、局部复发的肿瘤或其它肿瘤背景中进行这些测试,例如 FISH、SISH 和免疫组织化学,以及其它检测法。肿瘤样本可以是新鲜的、冷冻的、固定的或以另外方式保存的。

[0071] 人表皮生长因子受体 (EGFR) 基因的核苷酸序列在本领域中是已知的,并且可例如根据 GenBank 登录号 AY588246 (通过引用并入本文) 找到。核苷酸探针在本领域中也是已知的,并且可获得用作检测 EGFR 基因的探针。例如,用于检测 EGFR 和染色体 7 着丝粒序

列的此类探针是可获得的（例如，LSI EGFR SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen 探针（Vysis, Abbott Laboratories））。

[0072] 可检测合适的组织，诸如通过活检获得的肿瘤组织和细胞材料中的蛋白质表达。例如，可将可被固定的患者肿瘤活检样本与选择性结合待检测的蛋白质的抗体、抗体片段或适体接触，和确定所述抗体、其片段或适体是否已结合于所述蛋白质。蛋白质表达可使用本领域中的多种标准方法来测量，包括，但不限于：Western 印迹、免疫印迹、酶联免疫吸附测定（ELISA）、放射免疫测定（RIA）、免疫沉淀、表面等离子体共振、化学发光、荧光偏振、磷光、免疫组织化学分析、基质辅助激光解吸 / 电离时间飞行（MALDI-TOF）质谱分析，显微细胞计数（microcytometry）、微阵列，显微镜检查、荧光激活细胞分选（FACS）和流式细胞术。在一个实施方案中，免疫组织化学（IHC）分析用于检测蛋白质表达。IHC 法和用于检测蛋白表达的评估标准详细地描述于例如 Hirsch 等人，J. Clin. Oncol. 2003, 21 :3798-3807 中。

[0073] EGFR 基因扩增或过表达可导致增强的 EGFR 活性。异常高的 EGFR 激活导致几种细胞内底物的磷酸化，这又产生促有丝分裂信号转导以及其它肿瘤诱导活性。因此，在某些实施方案中，测定 EGFR 生物标志物的存在可包括测量 EGFR 生物活性的一个或多个指标，如使用细胞增殖测定、细胞凋亡测定、受体结合测定、受体磷酸化测定等测定的。

[0074] 关于涉及生物标志物水平的检测、定量和比较的方法，参见，例如，Current Protocols in Molecular Biology，编辑 Ausubel, Frederick M. (2010) ;Current Protocols in Protein Science Last, 编辑 Coligan, John E., 等人 (2010) ;Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 编辑 Egli, Martin (2010) ;Current Protocols in Bioinformatics, 编辑 Baxevanis, Andreas D. (2010) ; 和 Molecular Cloning :A Laboratory Manual, 第 3 版, Sambrook, Joseph (2001), 所述所有参考文献通过引用整体并入本文。

[0075] 本发明的另一个方面提如下方法，所述方法用于提供实验室服务，包括接收胃肿瘤患者的样本，进行如本文中所述的测试以检测样本中 EGFR 生物标志物的存在或不存在，和为患者的保健提供者提供测试结果。

[0076] 本发明还提供试剂盒，所述试剂盒包含适合用于检测 EGFR 生物标志物的试剂和根据本文中描述的方法使用所述 EGFR 生物标志物确定用于胃肿瘤患者的治疗选项的说明书。此类试剂盒通常包含进行诊断测定必需的两种或更多种组分。组分可以是化合物、试剂、容器和 / 或设备。例如，试剂盒中的一个容器可含有特异性结合 EGFR（和 / 或在某些实施方案中，HER2 蛋白）的单克隆抗体或其片段。此类抗体或片段可被提供来附接于支持材料，如上文中描述的。一个或多个另外的容器可密封组分，诸如试剂或缓冲液，以用于测定。此类试剂盒还可或可选择地含有如上所述含有适合用于抗体结合的直接或间接检测的报告基团的检测试剂。

[0077] 或者，试剂盒可被设计来检测生物样本中编码 EGFR（和 / 或 HER2）蛋白的 mRNA 的水平，或用于检测 EGFR 基因扩增。此类试剂盒通常包含至少一种与 EGFR DNA 或编码 EGFR 蛋白的多核苷酸杂交的如上所述的寡核苷酸探针或引物。此类寡核苷酸可以用于例如 PCR 或杂交测定中。可存在于此类试剂盒内的另外的组分包括有利于编码 EGFR 或 HER2 蛋白的多核苷酸的检测的第二寡核苷酸和 / 或诊断试剂或容器。

[0078] 用于获得生物样本的方法在本领域中是公知的，并且可使用用于获得生物样本的

任何标准方法。用于本发明的方法的生物样本包括但不限于血清、血液、血浆、全血和其衍生物、皮肤、毛发、毛囊、唾液、口腔粘液、阴道粘液、汗液、泪液、上皮组织、尿液、精子、精液、精浆、前列腺液、射精前液体（考珀液）、排泄物、活检、腹水、脑脊液、淋巴液以及组织提取物样本或活检（参见，例如，Clinical Proteomics :Methods and Protocols, 第 428 卷，于 Methods in Molecular Biology, 编辑 Antonia Vlahou(2008) 中）。在一个实施方案中，本发明的生物样本发明包括食道的任何细胞或组织样本，例如食道癌的原位或循环或迁移细胞。在另一个实施方案中，本发明的生物样本包括食道的任何提取物，或细胞或组织样本的部分或全部级分，例如，食道癌的原位或循环或迁移细胞。

[0079] 药物组合物和治疗方法

[0080] 本发明提供用于治疗胃肿瘤的方法，其包括向需要治疗的患者施用治疗有效量的如本文中描述的抗 EGFR 试剂，其中所述患者已被确定为含有 EGFR 生物标志物。如本文中所用，术语“有效量”是指使得能够获得所需治疗结果的一种或多种化合物的量。有效量可包含在一个或多个剂量内，即，可能需要单次剂量或多次剂量来获得所需治疗终点。如本文中所用，术语“治疗有效量”是指治疗病症，或减轻或防止损伤或损害（任选地不引起显著的负面或有害副作用）所需的一种或多种试剂的水平或量。例如，治疗有效量包括足以产生所需治疗结果（例如疾病或病症的严重度的减轻）的包含例如一种或多种可调节 EGFR 途径的化合物的药物制剂的量。在一个实施方案中，胃肿瘤是胃腺癌。本文中描述的方法包括用于治疗任何类型的胃癌，包括肠道和弥漫性胃腺癌、胃肠道间质瘤（GIST）、胃肠道平滑肌肉瘤、胃肠道类癌和胃肠道淋巴瘤的方法，其中患者已被确定含有如本文中定义的 EGFR 生物标志物。在某些实施方案中，所述方法用于治疗胃癌。在具体的实施方案中，所述方法包括用于治疗表达 EGFR 的癌症，诸如胃癌的方法，其中所述癌症不是食管胃腺癌（OGA）或转移性结直肠癌。在一个实施方案中，本发明提供用于治疗胃肿瘤的方法，其包括向需要此种治疗的患者施用治疗有效量的如本文中描述的抗 EGFR 试剂，其中所述患者已被确定含有 EGFR 生物标志物但不含有 HER2 生物标志物。

[0081] 另一个实施方案提供用于通过向癌症患者施用治疗有效量的本文中公开的抗 EGFR 试剂（诸如 EGFR 特异性抗体）来预防胃癌的转移的方法，所述胃癌包括，但不限于，肠道和弥漫性胃腺癌、胃肠道间质瘤（GIST）、胃肠道平滑肌肉瘤、胃肠道类癌和胃肠道淋巴瘤，其中所述患者已被确定含有如本文中定义的 EGFR 生物标志物。在这一点上，本发明方法包括施用一定量的抗 EGFR 试剂，所述试剂，在施用后，以统计上显著的方式（即，相对于对于本领域普通技术人员来说是已知的适当对照）抑制、预防或延迟胃癌的转移。在某些实施方案中，所述患者已被确定含有 EGFR 生物标志物但不含有 HER2 生物标志物。因此，在一个实施方案中，本发明提供用于预防胃癌的转移的方法，其中有此需要的患者被施予抗 EGFR 试剂而非抗 HER2 试剂。

[0082] 如本文中所用，术语“治疗（treatment/treating）”等是指为了获得疗效施用试剂或进行方法（例如，放射、手术方法等）。疗效在完全或部分预防疾病诸如癌症，或其症状方面可以是预防性，和 / 或在实现疾病和 / 或疾病的症状的部分或完全治愈方面可以是治疗性的。如本文中所用，“治疗”涵盖哺乳动物的，特别地人的疾病，诸如癌症的任何治疗，并且包括：(a) 防止疾病或疾病的症状在可对疾病易感但还未被诊断为患有其（例如，包括可与原发疾病相关或由其引起的疾病）的受试者中发生；(b) 抑制疾病，即阻止其发展；和

(c) 缓解疾病,即引起疾病的消退或阻止其进展。

[0083] 如本文中所用,在患者对抗 EGFR 试剂治疗起反应的背景中,术语“起反应的”、“有益的反应”、“有益的患者反应”和“临床上有益的反应”、“临床益处”等可互换使用并且指与不利的反应(对治疗无反应和/或具有不利的事件)相反的有利的患者对药物的反应。在个体患者中,有益的反应可根据许多临床参数来表达,包括可检测的肿瘤消失(完全反应,CR)、肿瘤尺寸和/或癌细胞数目的减小(部分反应,PR)、肿瘤生长停滞(稳定的疾病,SD)、抗肿瘤免疫应答的增强、可能地导致肿瘤的消退或排斥、与肿瘤相关的一个或多个症状的达到一定程度的缓解;治疗后存活期的长度的增加;和/或治疗后给定的点上减少的死亡率。肿瘤尺寸和/或癌细胞数目和/或肿瘤转移的持续增加指示对治疗的有益反应的缺乏。

[0084] 在群体中,药物的临床益处,即其功效可基于一个或多个终点来评价。例如,在一个实施方案中,总反应率(ORR)的分析将在用药物治疗后经历 CR 或 PR 的那些患者分类为反应者。疾病控制(DC)的分析将用药物治疗后经历 CR、PR 或 SD 的那些患者分类为反应者。

[0085] 如本文中使用的,术语“无进展生存期”是指从患者的治疗直至患者的癌症进展或死亡(无论哪个首先发生)的时间间隔。

[0086] 如本文中所用,根据本发明的反应者是在抗 EGFR 治疗后展现治疗功效(例如,展现有益的临床反应)的个体。如果患者已被确定为具有 EGFR 生物标志物,那么患者是反应者,其将在用抗 EGFR 试剂治疗后展现有益的临床反应。

[0087] 如本文中所用,术语“非反应者”或“无反应”是指在用 EGFR 抑制剂治疗后不展现治疗功效(例如,有益的临床反应)的患者。在某些实施方案中,非反应者可能已被确定为具有 EGFR 生物标志物。在一些其它实施方案中,非反应者可能已被确定为不具有 EGFR 生物标志物。

[0088] 短语“确定治疗功效”或“确定治疗的功效”及其变型可包括用于确定治疗正为受试者提供益处的任何方法。术语“治疗功效”及其变型通常通过由与疾病相关的一个或多个体征或症状的减轻来指示,并且可由本领域普通技术人员容易地确定。“治疗功效”还可指通常与疾病的标准或非标准治疗,即用于治疗癌症的化学疗法或放射疗法相关的毒性的体征和症状的预防或改善。治疗功效的确定通常是适应症和疾病特异性的并且可包括本领域中已知或可获得的用于确定治疗将对患者提供有益作用的任何方法。例如,治疗功效的证据可包括但不限于疾病或适应症的缓解,对于癌症这可包括但不限于肿瘤尺寸、肿瘤转移等的减小或减少。此外,治疗功效还可包括受试者的总体健康的一般性改善,诸如但不限于患者生活质量的提高,预测的受试者存活率的增加、抑郁的减轻或适应症的复发率的降低(缓解时间的增加)。(参见,例如,Physicians' Desk Reference(2010))。

[0089] 对于本发明的方法,所述 EGFR 生物标志物可以是 EGFR 基因扩增和/或 EGFR 过表达的任何体外或体内指标,诸如 EGFR RNA 水平、具有组成型活性的 EGFR、EGFR 活性、EGFR 途径活化或 EGFR 途径的信号转导。在一个实施方案中,EGFR 生物标志物包括与 EGFR 基因扩增和/或 EGFR 过表达相关的 DNA、RNA 或蛋白质水平上的任何突变形式,诸如 L858R/T790M 双突变、插入突变(外显子 20:2319-2320)、缺失突变(外显子 19:2236-2350)。在另一个实施方案中,EGFR 生物标志物包括与 EGFR 基因扩增和/或 EGFR 过表达直接或间接相关的

任何测量。在一些实施方案中,EGFR 生物标志物选自当与预定标准水平比较时,EGFR 基因扩增、增加的 EGFR 表达、升高的 EGFR RNA 水平、具有组成型活性的 EGFR 和增强的 EGFR 途径活化或增强的 EGFR 途径信号转导。

[0090] 本文中描述的抗 EGFR 试剂诸如抗 EGFR 抗体以纯的形式或以适当的药物组合的施用可通过用于起着类似效用的试剂的任何可接受的施用模式来进行。药物组合物可通过将抗 EGFR 试剂(例如,抗体)或含抗 EGFR 试剂组合物与适当的生理上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合来制备,并且可被配制成呈固体、半固体、液体或气体形式的制剂,诸如片剂、胶囊、粉剂、颗粒、软膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球和气溶胶。此外、其它药物活性成分(包括如本文其它地方所述的其它抗癌剂)和/或合适的赋形剂诸如盐、缓冲液和稳定剂,但不必存在于组合物中。施用可以通过多种不同的途径来实现,包括,但不限于口服、肠胃外、经鼻、静脉内、皮内、皮下或局部途径。优选的施用模式取决于待治疗或预防疾病的性质。施用后,减少、抑制、防止或延迟癌症的进展和/或转移的量被认为是有效的。

[0091] 抗 EGFR 抗体治疗可包括使用抗 EGFR 抗体或抗体样治疗剂(包括(无任何限制)具有一个或多个抗 EGFR CDR 的任何分子)的任何治疗。在一个实施方案中,抗 EGFR 抗体治疗包括任何批准的抗 EGFR 抗体,例如,西妥昔单抗(也称为爱必妥(erbitux))或其生物相似物或衍生物,例如完全人抗 EGFR 抗体等。西妥昔单抗(由 ImClone 和 Bristol-Myers Squibb 在北关和由 Merck KGaA 在世界上其余地方销售的)是阻断表皮生长因子(EGF)受体(EGFR)的激活的重组人/小鼠嵌合单克隆抗体。西妥昔单抗可通过静脉内输注来提供用于转移性结直肠癌和头颈癌的治疗。在一些实施方案中,将西妥昔单抗配制于 pH 7.0 至 7.4 的无菌无色液体中。在一些实施方案中,以 2mg/mL 的浓度将西妥昔单抗配制在 100mg(50mL)或 200mg(100mL)中。在一些实施方案中,将西妥昔单抗配制在单次使用小瓶中。在一些实施方案中,西妥昔单抗制剂包含 8.48mg/mL 氯化钠、1.88mg/mL 磷酸氢二钠七水合物、0.41mg/mL 磷酸二氢钠一水合物和无菌注射用水。用于施用西妥昔单抗的方法和制剂是医学领域普通技术人员公知的,并且施用西妥昔单抗、西妥昔单抗的给药方案或用于西妥昔单抗的配制的任何公知方法预期用于本发明的方法。详细的组成和使用西妥昔单抗的方法描述于描述于美国专利号 8075916、7977336、6217866,所述每一个专利出于所有目的通过引用整体并入。

[0092] 在一些实施方案中,可将本发明的生物标志物与指示相同药物和/或用于治疗胃肿瘤患者的不同药物的功效的另一种生物标志物一起使用。

[0093] 在一些实施方案中,获自样本的信息包括基于 EGFR 基因扩增或 EGFR 基因过表达水平的升高或降低的指数值。例如,可基于增加或减少的比率为 EGFR 基因扩增或 EGFR 基因过表达的水平指定指数值。在一些实施方案中,增加或减少越大,则指数值越大。在一些实施方案中,可将指数值汇编为组以产生组合。在一些实施方案中,将组合与预定标准相比较。在一些实施方案中,组合与预定标准的比较指示利用治疗实体的治疗的治疗功效。在一些实施方案中,组合与预定标准的比较可用于修改利用治疗实体的治疗的治疗方案。

[0094] 在某些实施方案中,施用的量足以导致肿瘤消退,如通过存活肿瘤的量的统计上显著的减少,例如肿瘤质量的至少 50% 的减少,或由改变的(例如,具有统计显著性的减少)扫描尺寸指示的。在其它实施方案中,施用的量足以导致胃癌的临床上的减少。

[0095] 治疗的精确剂量和持续时间是待治疗的疾病的函数,并且可使用已知的测试方案或通过在本领域中已知的模型系统中测试组合物并从其外推来通过经验确定。还可进行临床对照试验。剂量还可随待缓解的病症的严重度而变化。通常配制并施用药物组合物以产生治疗上有用的作用同时使不期望的副作用减小至最低程度。组合物可被施用一次,或可被分成许多更小的剂量来以一定的时间间隔施用。对于任何特定的受试者,可按照个体需要随时间推移调整特定的剂量方案。

[0096] 可单独施用或与其它已知的癌症治疗诸如放射疗法、化学疗法、移植、免疫疗法、激素疗法、光动力学疗法等组合地施用包含如本文中描述的抗 EGFR 试剂的组合物。还可将组合物与抗生素组合施用。在一些实施方案中,化学治疗剂包括但不限于长春碱、长春新碱、更生霉素、柔红霉素、多柔比星、依托泊苷、光辉霉素、紫杉醇、多西他赛、顺铂、卡铂、氟尿嘧啶、亚叶酸和依立替康。在一些实施方案中,靶向治疗剂包括但不限于贝伐单抗、曲妥珠单抗、埃罗替尼、帕尼单抗、索拉非尼、英夫利昔单抗、阿达木单抗、巴利昔单抗、达珠单抗和奥马珠单抗。在一些实施方案中,以约 40Gy 至 80Gy 的剂量施用放射治疗剂。在一些实施方案中,剂量为约 50Gy 至约 70Gy,在一些实施方案中,剂量为约 50Gy 至约 65Gy。在一些实施方案中,以约 50Gy、约 55Gy、约 60Gy 或约 65Gy 的剂量施用放射治疗剂。

[0097] 施用这些和相关药物组合物的典型途径从而包括,但不限于,口服、局部、经皮肤、吸入、胃肠外、舌下、口腔、直肠、阴道和鼻内途径。如本文中所用,术语肠胃外包括皮下注射、静脉内、肌内、胸骨内注射或输注技术。配制根据本发明的某些实施方案的药物组合物,以允许其中包含的活性成分在向患者施用该组合物后是生物可利用的。将向受试者或患者施用的组合物可采取 1 个或多个剂量单位的形式,其中例如,片剂可以是单个剂量单位,呈气溶胶形式的本文中描述抗 EGFR 试剂的容器可以容纳多个剂量单位。对于本领域普通技术人员来说,制备此类剂型的实际方法是已知,或将是显而易见的;例如,参见 Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第 20 版 (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000)。待施用的组合物将在任何情况下含有治疗有效量的抗 EGFR 试剂,例如如本文中所述的抗 EGFR 抗体,以用于根据本文中的教义治疗目标疾病或病症。

[0098] 药物组合物可呈固体或液体形式。在一个实施方案中,载体是颗粒剂,以便组合物呈例如片剂或粉剂形式。载体可以是液体,其中组合物是例如口服油、注射液体或气溶胶,其用于例如吸入施用。当想要口服施用,药物组合物优选呈固体或液体形式,其中半固体、半液体、悬浮液和凝胶形式被包含在本文中被当作为固体或液体的形式中。

[0099] 作为用于口服施用的固体组合物,可将药物组合物配制成粉剂、粒剂、压制的片段剂、丸剂、胶囊、口香糖、晶片等。此类固体组合物将通常含有一种或多种惰性稀释剂或可食用的载体。此外,可存在以下试剂的一种或多种:粘合剂诸如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂诸如淀粉、乳糖或糊精;崩解剂诸如藻酸、藻酸钠、Primogel、玉米淀粉等;润滑剂诸如硬脂酸镁或 Sterotex;助流剂诸如胶体二氧化硅;甜味剂诸如蔗糖或糖精;调味剂诸如薄荷、水杨酸甲酯或甜橙香精;和着色剂。当药物组合物呈胶囊形式,例如明胶胶囊时,其可能,除了上述类型的材料以外,还含液体载体诸如聚乙二醇或油。

[0100] 药物组合物可呈液体形式,例如,酏剂、糖浆剂、溶液、乳液或悬浮液。作为两个实例,液体可用于口服施用或通过注射递送。当期望口服施用时,优选组合物,除了现有化合

物外,还含有甜味剂、防腐剂、染料 / 着色剂和风味增强剂中的一种或多种。在期望通过注射施用的组合物中,可包含表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0101] 液体药物组合物,无论它们是溶液、悬浮液还是其它类似的形式,可包括以下试剂的一种或多种:无菌稀释剂诸如注射用水、盐水溶液,优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠、不挥发性油诸如合成的单或二甘油酯(其可作为溶剂或悬浮介质)、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它溶剂;抗微生物剂诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐和用于调节张力的试剂诸如氯化钠或葡萄糖。肠胃外制剂可被封装在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。在某些实施方案中,生理盐水是优选的组合物。可注射药物组合物优选是无菌的。

[0102] 期望用于胃肠外或口服施用的液体药物组合物应当含有一定量的抗 EGFR 试剂,诸如本文中描述的 EGFR 特异性抗体,以便可获得适当的剂量。通常地,该量为至少 0.01% 的组合物中的抗体。当期望口服施用,可使该量在组合物的重量的 0.1% 与约 70% 之间变化。某些口服药物组合物含有约 4% 至约 75% 的抗体。在某些实施方案中,制备根据本发明的药物组合物和制剂,以使胃肠外剂量单位在稀释前含有按重量计 0.01% 至 10% 的抗体。

[0103] 该药物组合物可意欲用于局部施用,在这种情况下,载体可适当地包括溶液、乳液、软膏或凝胶基剂。基质,例如,可包括以下材料的一种或多种:凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂诸如水和醇,以及乳化剂和稳定剂。增稠剂可存在于用于局部施用的药物组合物中。如果期望进行经皮施用,该组合物可包含经皮贴剂或离子电渗装置。该药物组合物可意欲以例如栓剂的形式用于直肠施用,所述栓剂将在直肠中融化并释放出药物。用于直肠施用的组合物可含有油性基质作为合适的无刺激性赋形剂。此类基质包括,但不限于,羊毛脂、可可脂和聚乙二醇。

[0104] 药物组合物可包含各种材料,所述材料改变固体或液体剂量单位的物理形式。例如,组合物可包含形成包围活性成分的涂层壳体的材料。形成涂层壳体的材料通常是惰性的,并且可选自例如糖、虫胶以及其它肠包衣剂。或者,可将活性成分封装在明胶胶囊中。呈固体或液体形式的药物组合物可包含结合本发明的抗体并从而帮助化合物递送的试剂。可在该能力中发挥作用的适当试剂包括其它单克隆或多克隆抗体,一种或多种蛋白质或脂质体。药物组合物可基本上由可作为气溶胶施用的剂量单位组成。术语气溶胶用于指范围从具有胶体性质的系统变化至由加压包装组成的系统的多种系统。递送可以通过液化或压缩气体或通过分配活性成分的适当的泵系统。可在单相、双相或三相系统中递送双气溶胶以递送活性成分。气溶胶的递送包括可一起形成试剂盒的必需容器、激活剂、阀门、子容器等。本领域普通技术人员可确定优选的气溶胶而无需过度实验。

[0105] 药物组合物可通过制药领域中公知的方法来制备。例如期望通过注射施用的药物组合物可通过将包含抗 EGFR 试剂,诸如本文中描述的 EGFR 特异性抗体和任选的一种或多种盐、缓冲剂和 / 或稳定剂的组合物与无菌蒸馏水组合以形成溶液来制备。可添加表面活性剂以促进均一溶液或悬浮液的形成。表面活性剂是与抗体组合物非共价相互作用以促进抗体在含水递送系统中的溶解或均匀悬浮的化合物。

[0106] 可以以治疗有效的量施用组合物,所述治疗有效量将取决于多种因素,所述因素包括所使用的特定化合物(例如,EGFR 特异性抗体)的活性;化合物代谢稳定性和作用长度;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;施用模式和时间;排泄速率;药物组合;特定病症或状况的严重程度;和受试者经历的治疗。

[0107] 还可将包含抗 EGFR 试剂诸如 EGFR 特异性抗体的组合物与一种或多种其它治疗剂同时施用,在所述其它治疗剂施用之前或施用之后施用。在一个实施方案中,本发明提供用于治疗胃肿瘤的方法,其包括向需要此种治疗的患者施用有效量的两种或更多种抗 EGFR 试剂的组合,其中所述患者已被确定含有 EGFR 生物标志物。在这一点上,所述治疗可包含有效量的选自西妥昔单抗、帕尼单抗、尼妥珠单抗、抗体 806、Sym004、MM-151 和本文中描述的其它抗 EGFR 试剂的两种或更多种抗 EGFR 试剂的组合。

[0108] 在一个实施方案中,本发明提供用于治疗胃肿瘤的方法,其包括向需要此种治疗的患者施用有效量的抗 EGFR 试剂,其中所述患者已被确定含有与胃癌的护理治疗的标准组合的 EGFR 生物标志物。胃癌的标准治疗包括:手术、放射疗法或化学疗法,或这些治疗的组合。手术可包括去除胃的患病部分和附近淋巴结的手术或在某些情况下可包括胃切除术。目前,对于胃癌的治疗不存在世界范围内使用的单一标准化疗治疗。然而,化疗治疗可包括至少两种药物氟尿嘧啶(5-FU, Adrucil)和顺铂(Platinol)的组合。与 5-FU 类似(诸如卡培他滨或 Xeloda)和与顺铂类似(诸如奥沙利铂或乐沙定)的其它药物似乎是等同的。通常使用的其它药物包括多西他赛(Taxotere)、紫杉醇(Taxol)、伊立替康(Camptosar)和表柔比星(Ellence)。

[0109] 如可由本领域普通技术人员所理解的,联合治疗可包括含有抗 EGFR 试剂和一种或多种另外的活性剂的单一药物剂量制剂的施用,以及在其自己的分开的剂量制剂中包含抗 EGFR 试剂和每一种活性剂的组合物的施用。例如,可将如本文中描述的抗 EGFR 抗体和其它活性剂在单一口服剂量组合物诸如片剂或胶囊中一起向患者施用,或每一种试剂以单独的口服剂量制剂施用。类似地,可将如本文中描述的抗 EGFR 抗体和另一种活化剂在单一胃肠外剂量组合物中诸如在盐溶液或其它生理上可接受的溶液中一起向患者施用,或每一种试剂以单独的胃肠外剂量制剂施用。当使用单独的剂量制剂时,可在基本上相同的时间(即同时),或在单独错开的时间(即相继地)并以任意顺序施用包含抗 EGFR 试剂诸如抗体的组合物和一种或多种另外的活性剂;联合治疗被理解为包括所有这些方案。

[0110] 因此,在某些实施方案中,还设想了与一种或多种其它治疗剂组合的包含抗 EGFR 试剂诸如 EGFR 特异性抗体的组合物的施用。此类治疗剂在本领域中可被接受为用于如本文中描述的特定疾病状态(诸如癌症,特别地胃癌)的标准治疗。设想的示例性治疗剂包括细胞因子、生长因子、类固醇、NSAID、DMARD、抗炎剂、化学治疗剂、放射治疗剂或其它活性辅助剂。

[0111] 在某些实施方案中,可将抗 EGFR 试剂,诸如抗 EGFR 抗体与任何数量的化学治疗剂结合向被鉴定为具有 EGFR 生物标志物的患者施用。化学治疗剂的实例包括烷化剂,诸如塞替派和环磷酰胺(CYTOXAN™);烷基磺酸酯诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶诸如苯并多巴,卡波醌、甲基多巴和尿多巴;乙烯亚胺和甲基三聚氰胺,包括六甲蜜胺、三乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三甲基三聚氰胺;氮芥诸如苯丁酸氮芥、萘氮芥、胆磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、氮芥氧化物盐酸盐、关法

仑、新恩比兴、胆固醇苯乙酸氮芥、泼尼氮芥、氯乙环磷酰胺、尿嘧啶氮芥；亚硝基脲诸如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀；抗生素诸如阿克拉霉素 (aclacinomycin)、放线菌素、安曲霉素、重氮丝氨酸、博莱霉素、放线菌素 C、加利车霉素、卡拉比星 (carabycin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素、放线菌素 D、柔红霉素、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素类、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链佐星、杀结核菌素、乌苯关司、净司他丁、佐柔比星；抗代谢产物诸如甲氨蝶呤和 5-氟尿嘧啶 (5-FU)；叶酸类似物诸如二甲叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙；嘌呤类似物诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-阿扎尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷、5-FU；雄激素、诸如卡普睾酮、屈他雄酮丙酸、环硫雄醇、关雄烷、睾内酯；抗肾上腺素药诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦；叶酸补充剂，诸如亚叶酸；醋葡醛内酯；醛磷酰胺糖苷；氨基乙酰丙酸；安吡啶；bestrabucil；比生群；依达曲沙；地磷酰胺 (defofamine)；秋水仙胺；地吡醌；依氟鸟氨酸；依利乙胺；依托格鲁；硝酸镓；羟基脲；香菇多糖；氯尼达明；米托胍脲；米托蒽醌；莫派达醇；硝氮丙吡啶；喷司他丁；蛋氨酸氮芥；吡柔比星；足叶草酸；2-鬼臼酸乙肼；甲基苄肼；PSK, RTM；丙亚胺；西左非兰；螺环锗；细格孢氮杂酸；三亚胺醌；2,2',2''-三氯三乙胺；氨基甲酸乙酯；长春地辛；达卡巴嗪；甘露醇氮芥；二溴甘露醇；二溴卫矛醇；哌泊溴烷；gacytosine；阿糖胞苷 ("Ara-C")；环磷酰胺；塞替派；紫杉烷类，诸如紫杉酚 (TAXOL®，Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N. J.) 和多西他赛 (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, France)；苯丁酸氮芥；吉西他滨；6-硫代鸟嘌呤，硫嘌呤，氨甲喋呤；铂类似物如顺铂和卡铂；奥沙利铂；伊立替康；长春花碱；铂；依托泊苷 (VP-16)；异环磷酰胺；丝裂霉素 C；米托蒽醌；长春新碱；长春瑞滨；诺维本；诺肖林；替尼泊苷；柔红霉素；氨基蝶呤；希罗达；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000；二氟甲基鸟氨酸 (DMFO)；视黄酸衍生物如 Targretin™ (贝沙罗汀)、Panretin™ (阿利维 a 酸)；ONTAK™ (地尼白介素)；埃斯波霉素；卡培他滨；和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。还包括在该定义中的是用于调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂，诸如抗雌激素类，包括例如他莫昔芬、雷洛昔芬、芳香酶抑制 4(5)-咪唑、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬、LY117018、奥那司酮和托瑞米芬 (Fareston)；和抗雄激素类，诸如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林；和上述任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0112] 可将多种其它治疗剂与本文中描述的抗 EGFR 试剂结合使用。在一个实施方案中，向被鉴定为具有 EGFR 生物标志物的患者施用抗 EGFR 试剂与抗炎剂。抗炎剂或药物包括，但不限于，类固醇和糖皮质激素类（包括倍他米松、布地奈德、地塞米松、醋酸氢化可的松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松龙、泼尼松、曲安西龙）、非甾体抗炎药 (NSAIDs)，包括阿司匹林、布洛芬、萘普生、甲氨蝶呤、柳氮磺胺吡啶、来氟米特、抗 TNF 药物、环磷酰胺和麦考酚酯。

[0113] 示例性 NSAID 选自由以下组成的组：布洛芬、萘普生、萘普生钠、Cox-2 抑制剂诸如 VIOXX® (罗非昔布) 和 CELEBREX® (塞来昔布) 以及唾液酸盐 (sialylates)。示

例性镇痛药选自自由以下组成的组：醋氨酚、羟考酮、盐酸丙氧芬的曲马多。示例性糖皮质激素类选自自由以下组成的组：可的松、地塞米松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松龙或泼尼松。示例性生物反应改性剂包括针对细胞表面标志物（例如，CD4、CD5 等）的分子、细胞因子抑制剂诸如 TNF 拮抗剂（例如，依那西普 (ENBREL®)、阿达木单抗 (HUMIRA®) 和英夫利昔单抗 (REMICADE®)、趋化因子抑制剂和粘附分子抑制剂。生物反应改性剂包括单克隆抗体以及分子的重组形式。示例性 DMARD 包括硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素、甲氨蝶呤、青霉胺、来氟米特、柳氮磺吡啶、羟氯喹、金（口服（金诺芬）和肌肉注射）和米诺环素。

[0114] 包含本文中描述的抗 EGFR 试剂诸如 EGFR 特异性抗体的组合物，可用保护抗体免受从身体快速清除的载体，诸如时间释放制剂或包衣来制备。此类载体包括控释制剂，诸如，但不限于，埋植剂和微胶囊化递送系统，以及生物可降解的生物相容性聚合物，诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、聚原酸酯、聚乳酸和本领域普通技术人员已知的其它制剂。

[0115] 实施例 1

[0116] EGFR 基因扩增和过表达是对胃腺癌的西妥昔单抗治疗起反应的预测性生物标志物

[0117] 本实施例描述了为了鉴定反应者和非反应者，随后发现预测性生物标志物而在一个组群的全分子注释的（表达和突变特征谱分析）初始亚洲胃腺癌 (GC-ADC) 患者来源的异种移植物 (PDX) 中进行的随机西妥昔单抗试验的结果。

[0118] 引言和概述

[0119] 无任何体外操作的患者来源异种移植物 (PDX) 反映了患者的组织病理学和遗传学特征谱⁹⁻¹⁴。其作为临床前癌症模型具有提高的预测能力，并且使得能够进行真正的个体化疗法和发现预测性生物标志物。所述模型也称为“Avatar 小鼠”或“xenopatient”，并且它们的大集合可潜在地反映患者中的肿瘤多样性。由于癌症患者群体的广泛多样性，因此临床试验的成功很大程度上取决于包含可能地表达期望的靶标并且具有正确的基因特征谱的反应者，和排除非反应者。这些模型从而可用于通过建立临床试验形式的模型来检验研究的靶向药物。

[0120] 建立称为 GC-ADC HuPrime® 模型（与先前描述 NSCLC-HuPrime 类似）¹⁵ 的胃腺癌 (GC-ADC) PDX 的大集合。测试 19 个 GC HuPrime® 的组群以评价肿瘤对西妥昔单抗的反应，并且发现一个亚组的具有 EGFR 基因扩增和过表达的 GC-ADC 对西妥昔单抗作出良好反应。该观察表明 EGFR 基因拷贝和 / 或过表达可用作预测患者对西妥昔单抗的反应的潜在实用单一生物标志物，这是与 GC-ADC 中的 HER2/ Herceptin® 情形的该情况类似的情形。使用 EGFR 基因拷贝数作为患者选择标准的具有前景的临床研究对于进一步确认观察是必要的，并且可导致西妥昔单抗作为 GC-ADC 治疗的最终监管批准。

[0121] 发现：在测试的 19 个 PDX GC 模型中，有 4 个模型 (21%) 对西妥昔单抗起反应（通过 $\Delta T / \Delta C > 20\%$ 定义的）。表达特征谱分析和拷贝数变异分析显示所有 4 个反应者具有扩增的 EGFR 基因和 / 或相应高的 EGFR 表达，与 15 个非反应者 ($\Delta T / \Delta C > 20\%$) 相反。该结果与在 EXTRA（其中具有 EGFR 扩增的所有 4 个患者都是反应者的 II 期试验）中产生的观察一致。这些结果表明 EGFR 基因扩增和 / 或高表达是该亚组的 GC-ADC 的关键致癌驱动者，这对于 NSCLC 和 CRC 是不常见的。

[0122] 解释:EGFR 基因扩增和过表达可用作 GC-ADC 的西妥昔单抗反应的单一预测生物标志物。

[0123] 材料和方法

[0124] 患者样本、异种移植物、西妥昔单抗治疗实验和模型表征。在按先前描述的方法手术¹⁰后,立即将手术取出的新鲜 GC 肿瘤组织用于皮下移植进 6-8 周龄雌性 Balb/c 裸鼠 (Beijing HFK Bioscience Co.Ltd.,Beijing,China)。将已建立的肿瘤模型连续地再移植以进行传代和进行研究。患者样本的存取和使用由北京肿瘤医院伦理委员会以及来自患者的知情同意书批准。所有程序在 Crown Bioscience SFP 设施中于无菌条件下进行。严格按照美国国立卫生研究院的实验动物护理与使用指南中的推荐来进行参与我们的研究的所有实验动物的实验。方案由 Crown Bioscience,Inc. (Crown Bioscience IACUC Committee) 的动物实验伦理委员会批准。

[0125] 用于在 PDX 模型中评价肿瘤对西妥昔单抗的反应的方法先前已进行了详细描述^{15,17}。每周两次监测肿瘤生长,并且计算 % $\Delta T / \Delta C$ 值以用于评估肿瘤对西妥昔单抗的反应 (ΔT = 处理组的肿瘤体积变化并且 ΔC = 对照组的肿瘤体积变化)。

[0126] 模型表征,包括使用 Affy U219、SNP6、IHC、qPCR 进行的表达谱分析、癌基因突变分析,已在先前进行了详细描述^{15,17}。

[0127] 抗肿瘤活性的评价。当肿瘤体积达到 100-150mm 时,将小鼠随机分入 2 组,每组 5 只具有相似平均肿瘤体积的小鼠。分组后立即用媒介物 (PBS,每周一次腹膜内注射或 IP,进行 2 周) 处理对照组,并且用西妥昔单抗 (每周一次 IP 注射,持续 2 周,50mg/kg, Merck KGaA) 注射处理组。每周 2 次监测肿瘤生长,计算 DT/DC 值以评估肿瘤对处理的反应 (处理组中的 DT 5 肿瘤体积变化和对照组中的 DC 5 肿瘤体积变化)。用于异种移植的小鼠的总数为 200 只 (对于 20 个 PDX 模型,10 只小鼠 / 模型)。

[0128] GC 肿瘤的 EGFR IHC 分析。将标准免疫组织化学 (IHC) 用于分析来自 PDX 异种移植物模型的肿瘤组织。简言之,按照标准组织学程序将组织固定在 10% 中性缓冲福尔马林中,随后包埋在石蜡中。在脱蜡和再水化后,在 95uC 下将 3-mm 厚的组织切片于 0.01M 柠檬酸钠 (pH 6.0) 溶液中预处理 30 分钟,随后以 15200 的终稀释度用兔抗人 EGFR 抗体 (Cell Signaling, Boston, USA) 进行染色。使用 Detection System HRP Polymer 试剂盒 (Lab Vision,Fremont,USA) 检测阳性染色。将 DAB 用作显色底物,并用 Gill's 苏木精 (Fisher Scientific,Fair Lawn, NJ) 对切片进行复染。随后按照由 Shia 等人在 2005 年推荐的标准由 3 个观察者以盲方式独立地对测试样本评分:当在肿瘤中不存在特异性膜染色时评分为 0,并且当存在高于本底水平的肿瘤细胞膜的任何染色时为评分为正。基于膜的染色强度将正的案例进一步分类为 11、21 和 31。通过在低倍 (1003) 下扫描肿瘤切片来鉴定强度最大的区域,随后在高放大倍数 (4003) 下,使用具有 DP71 数码相机 (Olympus,Melville,NY) 的 Olympus BX51 显微镜检查系统对图像进行照相。

[0129] GC-PDX 的基因表达谱分析和基因拷贝数分析。从荷瘤小鼠收集新鲜 GCPDX 肿瘤组织,将其快速冷冻,并在用于遗传和基因组分析之前于 280uC 下贮存。关于基因谱分析,按照制造商的说明书使用 Trizol (Invitrogen,Carlsbad,CA) 从冷冻组织分离总 RNA,随后使用 RNeasy mini 柱 (Qiagen) 进行纯化。在 Bioanalyzer (Agilent) 上评估 RNA 质量。按照标准方案 (GenChip® 3' IVT 表达试剂盒用户手册,P/N 702646 Rev. 8, Affymetrix) 只

将具有高质量 (RIN. 8) 的 RNA 样本用于在 Affymetrix HG-U219 阵列板上进行表达谱测定。通过 RMA 算法对所有样本的原始 CEL 数据集进行标准化。探针组强度表示为 $\log(2)$ 转化的值。对于使用 Affymetrix SNP6.0 芯片的 CNV 测定,按照制造商的说明书,使用基因组 DNA 组织和血液分离试剂盒 (Qiagen) 分离和纯化基因组 DNA。按照标准 Affymetrix 方案 (Genome wide snp6_manual, Affymetrix) 进行 DNA 处理和芯片杂交。将原始 CEL 数据进行 QC 化并过滤以除去低检出率样本,并且通过 PICNIC 和 / 或 PennCNV 法进行基因拷贝数分析。对于所有样本,通过定量 RT-PCR 测定相对 EGFR 基因表达水平。使用人 EGFR 特异性引物,通过 TaqMan q-PCR 使提取的 mRNA 经历扩增。人 GAPDH 基因用作参照。从 Applied Biosystems 获得 EGFR 的 TaqMan 探针和引物 (测定 ID :Hs01076078_m1)、GAPDH (测定 ID :Hs99999905_m1)。使用 DCT 相对定量处理由系统产生的原始数据。DCT5 (靶基因的 CT 值) - (参照基因的 CT 值)。随后将 DCT 值转化成强度值 (相对 mRNA 水平 $5^{-2 \times (2DCT)}$)。同样地,也通过定量 PCR 测定 EGFR 基因拷贝数。简言之,通过 TaqMan q-PCR 使相同基因组 DNA 经历扩增。EGFR 的引物 (测定 ID :Hs04960197_cn) 和 RNA 酶 P (作为内源参照) (部分编号 4401631) 购自 Applied Biosystems。将原始数据传至 CopyCaller 软件并进行分析。

[0130] EGFR 突变分析。进行与对西妥昔单抗的抗性相关的常见致癌基因诸如 EGFR (外显子 18 ;19 ;20 ;21)、KRAS (外显子 2 ;3 ;4)、BRAF (外显子 15 ;V600E)、c-MET (外显子 14 ;16 ;17 ;18 ;19 ;21)、PI3KC (外显子 1 ;9 ;20) 的基因热点分析以鉴定肿瘤中的突变。简言之,按照制造商的说明书,使用上述试剂盒从组织提取基因组 DNA。用于突变分析的引物示于表 5 中。在 50μL 含有如下试剂的反应混合物中进行聚合酶链式反应 :100ng 的基因组 DNA、5μL 103PCR 缓冲液、0.2mM 的每一种引物、0.2mM 43dNTP 和 1μL TaGE。将反应进行 40 个扩增循环。将扩增的 PCR 产物进行凝胶纯化,并随后通过 Sanger 自动化测序仪 (ABI) 进行测序。已通过 BLAST 搜索确保引物对人基因的特异性。使用 BioEdit 软件进行测序数据比对分析和突变鉴定。

[0131] CFISH 分析。按照制造商的方案 (Abbott, Downers Grove, IL), 使用 Abbott PathVysion EGFR DNA 探针试剂盒进行 FISH (双色) 程序。光谱橙色荧光团标记的 EGFR (303kb) 对于染色体 7p12 上的 EGFR 基因座是特异的,并且光谱绿色荧光团标记的染色体计数器探针 (5.4kb) 靶向位于染色体 7 的着丝粒区域 (CEP7 ;7p11.1-q11.1) 的 α -卫星 DNA 序列。简言之,对 FFPE 切片进行脱蜡,随后用胃蛋白酶进行消化,并杂交。使经处理的载片变性,并与探针杂交,随后用 15 μ L DAPI/抗褪色溶液进行复染,然后用配备有单带通滤波器组的 OLYMPUS BX51 荧光显微镜 (OLYMPUS BX51, Japan) 在 1000 倍下进行扫描,以检测 DAPI、罗丹明 (7p12) 和 FITC (染色体 7)。

[0132] 统计分析。使用学生 t 检验 (对于两个比较) 和单因素 ANOVA 检验 (用于多重比较) 评价肿瘤体积的数据。使用 SPSS 16.0 分析所有数据。P < 0.05 被认为是统计上显著的。Fisher's 精确检验用于评估 EGFR 扩增模型与非扩增模型之间的反应差异 (参见 quantitativeskills.com/sisa/statistics/fisher.htm)。

[0133] 结果

[0134] 一个亚组的 GC **HuPrime**[®] 模型对西妥昔单抗起反应。我们开始通过进行用于评估潜在的西妥昔单抗活性的临床试验样研究来测试随机选择的 GC-ADC **HuPrime**[®] 模型的

组群。这些模型首先通过皮下接种将从 GC-ADC 患者手术取出的肿瘤组织移植进免疫受损的 Balb/c 裸鼠来建立。原始患者诊断和描述概述于表 2 和表 3 中。第二,使 19 个随机选择的模型经历每周一次的西妥昔单抗处理,持续 2 周 (1mg/ 小鼠或 50mg/kg)。肿瘤对西妥昔单抗的反应通过 $\Delta T/\Delta C^{15}$ 来定量,并且概述于表 4 中。可按照活性将模型分成两类:4/19 或 21% 的 GC-ADC HuPrime[®] 对西妥昔单抗处理起反应 (几乎完全反应, $\Delta T/\Delta C < 0\%$); 15/19 或 79% 不起反应 (具有部分或完全抗性, $\Delta T/\Delta C > 30\%$)。这两个种类的代表性肿瘤生长抑制曲线示于图 1A 中。通过 $\Delta T/\Delta C$ 值测量的肿瘤反应的定量概述于表 1A 和表 1B 中。GA0152 和 GA0075 是西妥昔单抗敏感模型的实例,然而 GA0119 和 GA0139 是抗性模型。在 GC-ADC 模型中看到这些相当不同的反应与我们在 CRC¹⁷ 和 NSCLC¹⁵ HuPrime[®] 模型中观察到的反应有些不同。然而,我们的数据表明,一个亚组的 GC 可潜在地从西妥昔单抗获益。也值得指出的是,由于低于 100% 的移植植物植入转化率 (在我们手上通常为 30 至 50%) 和反应者或非反应者中的偏向性转化率的可能性,在该 GC-ADC 研究中观察到的 21% 的反应者可能不一定反映 GC-ADC 患者群体中的潜在反应者的真实百分比。

[0135] 约 50% 的反应者展现 EGFR 基因扩增。为了发现西妥昔单抗反应的潜在预测性标志物,我们因此进行这些模型的分子表征,包括全基因组拷贝数变异和转录组特征谱分析,首先,我们使用 Affymetrix 全基因组人 SNP6.0 阵列和 PICNIC (预测癌症中的积分拷贝数 (Predicting Integral Copy Numbers In Cancer)) 算法调查 GC-PDX 的拷贝数变异。我们发现所有 4 个反应者的 EGFR 拷贝数高于大多数的那些非反应者 (表 1, $P = 0.002$)。为了进一步确认该发现,我们通过实时定量 PCR (q-PCR) 评估 EGFR 基因拷贝数,并且发现所有反应者具有 ≥ 4 的拷贝数,然而只 16 个非反应者中只有 2 个 (12.5%) 具有 ≥ 4 的拷贝数。这两个组之间的差异是显著的 ($P = 0.008$)。通过 SNP6 1 PICNIC 分析得到的最高值 15 和通过 q-PCR 得到的 1040.9 来自 GA0152,共也是最佳反应者。

[0136] 为了进一步确认 EGFR 基因扩增,我们还进行荧光原位杂交 (FISH),一种用于测定 HER2 基因扩增以在临床实践中指导晚期 GC 的抗 HER2 治疗的更精确的测定。观察至少 100 个非重叠间期细胞核的 EGFR 的拷贝数。EGFR 状态被评分为每细胞核 EGFR 信号的数目。我们的结果显示在 2/4 (50%) 的分别具有 5.8 (GA0075) 和 .15 (GA0152) 的平均拷贝数的反应者中存在 EGFR 扩增 (图 1C,表 1)。GA0152 也具有 .15 的 EGFR/CEP7 比率。因此,2/4 (50%) 的反应者可通过 EGFR 扩增来预测。

[0137] 随后通过进行单剂量药效分析研究,EGFR 信号转导是否确实这些肿瘤中被西妥昔单抗灭活。荷瘤动物首先用西妥昔单抗处理,随后在处理 6、24 和 72 小时的时间点上收获肿瘤。作为实例,通过免疫化学分析 (IHC) 处理分析 GA0022 肿瘤组织的 pERK (EGFR 信号转导的下游效应子)。结果明确地显示肿瘤中 pERK 的减少 (图 1B),与相同模型中观察到抗肿瘤活性相关。

[0138] 控制 CRC 的对西妥昔单抗反应的因子似乎对 GC-ADC 的反应没有显著贡献。为了发现观察到的 GC-ADC 的反应的预测性生物标志物,系统性分析该组群的模型的一些常见致癌基因的表达和基因拷贝数以及基因突变。激活突变,包括 KRAS、BRAF (V600E)、c-MET、EGFR、AKT 和 PI3KC 的突变与 CRC 患者的对西妥昔单抗的抗性相关^{15,17 21}。因此,首先通过这些致癌基因的热点突变测序分析这些模型。有趣地,少数测试的模型,无论是反应者还是

非反应者,显示除 PIK3CA 中的含 G13D 的 GA0139 和含 327-329 缺失的 GA044 外的任何突变(表 1)。因此,GC **HuPrime**[®]对西妥昔单抗的无反应很明显不能简单地归因于这些致癌基因突变。

[0139] 在单独的早期研究中,已观察到 CRC **HuPrime**[®]对西妥昔单抗的反应依赖于 RAS 途径信号转导,或与低 Loboda-RAS 途径标签评分相关^{17,22}。从而有趣地知道 RAS 信号转导途径或 Loboda 评分是否对 GC **HuPrime**[®]反应具有相似影响。令我们惊讶的是,发现 Loboda RAS 途径标签评分与肿瘤反应几乎没有关系(参见图 3),这表明 RAS 途径的活化状态对 GC-ADC 的对西妥昔单抗的反应或抗性的贡献没有在 CRC 中看到的大。

[0140] EGFR 基因扩增似乎是一个亚组的对西妥昔单抗起反应的 GC-ADC **HuPrime**[®]中的致癌驱动者。然而,在另一方面,Affymetix HG-U219 GeneChip 分析显示所有 4 个反应者表达高水平的 EGFR(mRNA 水平),并且所有 15 个弱反应者与较低水平的表达相关(图 2A 和 2C,表 1)。该观察似乎是合理的,因为通过较高的表达获得的 EGFR 的较高活性可驱动这些肿瘤的致癌转化,从而通过西妥昔单抗的灭活可抑制肿瘤生长。

[0141] 此外,使用 Affymetrix SNP6 分析,通过检查基因拷贝研究较高 EGFR 表达背后的遗传缺陷(图 2B)。有趣地,所有反应者具有对应的 EGFR 基因扩增(图 2A 和 2B)(表 1,表 4)(P -值 < 0.00026 ,按照 Fisher's 精确检验)。该几近完美的关系表明 EGFR 基因扩增可能是反应者中的关键致癌驱动者,和用于预测 GC-ADC 中对西妥昔单抗的反应的潜在实用单一生物标志物。为了进一步确认基因扩增,我们还进行 EGFR-荧光原位杂交,或 FISH(一种临床实用测定),以评估所有这些模型的 EGFR 基因扩增状态。FISH 数据确实确认了通过 SNP6 看到的观察。作为实例,GA152 FISH 分析明确地表明 EGFR 扩增。临床上接受的 FISH 程序使得能够在西妥昔单抗 GC-ADC 治疗的临床上开发用于西妥昔单抗治疗的伴随诊断。

[0142]

表 1A. GC HuPrimer® 模型小组的特征谱

模型 ID	T/C	EGFR SNP6 PICNIC	FGFR2 SNP6	HER2 SNP6	EGFR U219 强度	EGFR (q-PCR)	EGFR (FISH)	CEP7 (FISH)	比率 (EGFR/ CEP7)	EGFR 相对 强度	蛋白 EGFR IHC 评分 荧光
GA0114	1.62	6	15	5	2.9	5.1	1.9	1.9	0.96	0	0
GA2140	1.32				NE	3.8	2.3	2.2	1.04	0.1	2
GA0119	0.93	5	3	5	3.6	2.1	2	2	1.03	0.14	1
GA0139	0.91	5	5	15	2.9	4.8	3	2.7	1.09	0	0
GA0138	0.9	5	5	5	2.3	2.7	2.6	2	1.29	0	0
GA0037	0.88	5	5	6	2.5	3.7	2.7	2.3	1.16	0	0
GA0033	0.81	5	15	4	2.4	3.9	2.4	2	1.21	0.02	0
GA0023	0.78	4	4	5	2.5	1.9	2.1	2.5	0.83	0.02	0
GA0080	0.75	6	6	4	2.8	3.7	2.4	2.1	1.16	0.02	1
GA0151	0.7				4	1.4	2.1	2.2	0.93	0.2	1
GA0044	0.69	5	6	4	3.1	2.1	2.4	2.3	1.03	0.13	1
GA0098	0.55	5	4	5	4.2	3.7	2.5	2.1	1.2	0.07	1
GA0060	0.45	5	4	15	4.2	3.1	2	2.2	0.91	0.13	1
GA0025	0.31				3.8	2.1	2.3	2.3	1.05	0.1	0
GA0022	-0.071	7	5	4	6.5	5.4	2.8	3	1.39	0.81	3
GA0046	-0.072	7	4	3	6.9	4.3	2.3	2.3	1.03	0.62	3
GA0075	-0.098	8	4	5	5.8	4.6	5.8	2	1.12	0.5	3
GA0152	-0.121	15	3	5	10.5	1040.9	>15		>15	13	3
P 值 (非反应者 对反应者)	0.002	0.002			0.003	0.008	0.029		0.099	0.002	0.002

阴影表示反应者；NE：不可评价的

[0143]

表IB GC HuPrimer® 模型小组的特征谱

模型ID	EGFR 外显子 18;19;20;21	k-RAS 外显子 2,3,4	BRAF 外显子 15	c-MET外显子 14; 16;17;18;19;21	PIK3CA 外显子 9;20
GA0114	WT	WT	WT	WT	WT
GA2140					
GA0119	WT	WT	WT	WT	WT
GA0139	WT	G13D	WT	WT	WT
GA0138	WT	WT	WT	WT	WT
GA0037	WT	WT	WT	WT	WT
GA0033	WT	WT	WT	WT	WT
GA0023	WT	WT	WT	WT	WT
GA0080	WT	WT	WT	WT	WT
GA0151	WT	WT	WT	WT	WT
GA0044	WT	WT	WT	WT	缺失 327-329
GA0098	WT	WT	WT	WT	G545Y
GA0060	WT	WT	WT	WT	WT
GA0025	WT	WT	WT	WT	WT
GA0022	WT	WT	WT	WT	WT
GA046	WT	WT	WT	WT	WT
GA0075	WT	WT	WT	WT	WT
GA0152	WT	WT	WT	WT	WT

阴影表示反应者

[0144]

表 2. GC 患者的诊断和病理学，以及对应的模型病理学确认

最初的医院病理学报告		
ID	性别	
GA0114	女	胃腺癌
GA2140	男	具有坏死的胃体至胃窦的中度至低分化腺癌，肿瘤块：12×11cm。肿瘤侵入通过胃壁。区域性 LN: NO.1 LN(0/6), NO.2 LN(0/1), NO.3 LN(0/6), NO.5 LN(0/2), NO.6 LN(0/2), NO.7, 8, 9 LN(0/5), NO.4d LN(0/4)。IHC 结果: CD44(+), cMet(+), EGFR(+), HER2(1+), Ki-67(>75%), MMP7(+), P170(+), P27(+25~50%), P53(+<25%), TOP2II(+50~75%)。
	男	胃贲门的腺癌，具有粘液腺癌和一些印戒细胞癌、溃疡类型，低分化，肿瘤块：6.5cm×7cm×2cm，侵入浆膜和神经丛。邻近断端有恶性细胞。区域性 LN: 小弯的 LN(6/6)，左胃 LN(5/6)，下幽门 LN(1/1)。
GA0139	男	胃贲门的腺癌，具有乳头状腺癌，溃疡型，中度分化，肿瘤块：6.5 cm×7 cm×1 cm，侵入脂肪组织外部浆膜。邻近于两个断端没有恶性细胞。区域性 LN: 小弯的 LN(0/11)，食管旁 LN(0/4)。
GA0138	男	胃的腺癌，侵袭性的，溃疡型，低分化，肿瘤块：11cm×9cm×3cm，侵入深部肌层，邻近于两个断端无可见肿瘤细胞。区域性 LN: 小弯的 LN(1/5)。
GA0037	男	胃贲门的腺癌，溃疡型，低分化，肿瘤块：4cm×4cm×2.5cm，侵入浆膜。邻近于两个断端无可见恶性细胞。区域性 LN: 小弯的 LN(0/9)。
GA0033	男	胃贲门的腺癌，溃疡型，低分化，肿瘤块：9cm×6cm×1.5cm，侵入浆膜，并伴有坏死和少量淋巴细胞沉积。邻近于两个断端无可见恶性细胞。区域性 LN: 心肌 LN(0/5)，胃左 LN(0/7)。
GA0023	女	腺癌，溃疡型，低分化的。
GA0080	男	1.胃贲门的腺癌，侵袭型，中度-低分化，肿瘤块：8cm×6cm×1.5cm，侵入浆膜。邻近于两个断端无可见恶性细胞。区域性 LN: 区域性 LN: 心肌 LN(1/5)，胃左 LN(2/2)。2. 肝炎，乙型
GA0044	男	肝源性转移腺癌，中-低分化。患者在 2 年前做过胃癌手术。
GA0025	女	胃大弯的印戒细胞癌，部分是粘液腺癌，凸型，肿瘤块：3.5cm×3.5cm×2cm，通过胃壁侵入。区域性 LN: LN 环绕腹腔干(1/1)。IHC 结果: HER-1(-), HER-2(-), p53(-), p170(-), Ki-67(+25~50%), VEGF(+), Top-IIα(+<25%)，p16(-)。

[0145]

GA0022	男	胃贲门的腺癌，溃疡型，中-低分化，肿瘤块：5cm×4cm×2.5cm，通过胃壁侵入浆膜层。邻近于两个断端无可见恶性细胞。区域性LN：胃左LN(5/9)，下旁肺静脉的LN(0/6)。
GA0046	男	来源于胃小弯中的食道的连接处的腺癌，凸出溃疡型，低分化，肿瘤块：6cm×5cm×1.5cm。恶性细胞侵入通过胃壁和食道。区域性LN：小弯的LN(3/14)。IHC 结果：HER-1(+), HER-2(-), P53(+ 25~50%), P170(-), Ki-67(+ 25~50, VEGF(++), Top-α(+约 10%)。p16(-)。
GA0075	女	贲门和胃底的腺癌，浸润溃疡型，中度-低分化，肿瘤块：6.5cm×5cm×1.5cm，侵入浆膜。邻近于两个断端无恶性细胞。区域性LN：小弯的LN(1/6)，心肌LN(0/4)，心胃的LN(0/4)，旁-下肺静脉的LN(0/3)。
GAF152	女	低分化腺癌(P0, P5)。

阴影表示反应者

表3. GC患者的临床病理学参数和对应的PDX模型的病理学确认。

ID	性别	肿瘤尺寸 (cm)	壁侵入 深度	淋巴结 转移	远侧 转移	TNM 阶段	组织学 (患者和PDX)	分化
GA0006	男	>5.0	T4a	N1	M0	IIIa	腺癌	中度-低
GA0022	男	≤5.0	T4a	N2	M0	IIIb	腺癌	中度-低
GA0023	女	≤5.0	T4a	N2	M0	IIIb	腺癌	低
GA0025	女	≤5.0	T4a	N1	M0	IIIa	印戒细胞癌	低
GA0033	男	>5.0	T4a	N0	M0	IIb		低
GA0037	男	≤5.0	T4a	N0	M0	IIIc		低
GA0044	男	来自肝的病变		n0	M1	IV		中度-低
GA0046	男			N2	M0	IIIb	腺癌	低
GA0055	女	≤5.0	T4a	N3b	M0	IIIc	腺癌	中度
GA0060	男	≤5.0	T4a	N3a	M0	IIIc	腺癌	中度-低
GA0075	女	>5.0	T4a	N1	M0	IIIa	腺癌	中度-低
GA0080	男	>5.0	T4a	N2	M0	IIIb	腺癌	中度-低
GA0098	男	≤5.0	T4a	N0	M0	IIb	腺癌	中度-低
GA0114	女	>5.0	T4a	N1	M0	IIIa	腺癌	中度
GA0119	男	>5.0	T4a	N3b	M0	IIIc	腺癌	中度-低
GA0138	男	>5.0	T2	N1	N0	IIa	腺癌	低
GA0139	男	>5.0	T4a	N0	M0	IIb	腺癌	低
GA0151	女	>5.0	T4a	N1	M0	IIIc	腺癌	良好
GA0152	女	>5.0	T4a	N0	M0	IIIb	腺癌	中度-低
GA2140	男	>5.0	T4a	N0	M0	IIc	腺癌	中度-低

*按照由国际抗癌联盟推荐的第8版肿瘤-结节-转移(TNM)分类进行GC阶段分类。

[0147] 表 4. 通过不同方法测定 EGFR 拷贝数

[0148]

模型 ID	EGFR SNP6 PICNIC	EGFR qPCR	EGFR FISH
GA0114	6		N/A
GA2140			N/A
GA0119	5		0.99
GA0139	5	1.06	
GA0138	5	0.96	
GA0037	5	1.50	
GA0033	5	+0.64	
GA0023	4	0.00	
GA0080	6	0.94	
GA0151		N/A	
GA0044	5	N/A	
GA0098	5	N/A	
GA0060	5	N/A	+
GA0025	N/A	0.32	
GA0022	7	1.21	
GA046	7	N/A	
GA0075	8	2.29	
GA0152	15	8.22	

[0149] 阴影表示反应者

[0150] 表 5. 用于突变分析的引物的小组。

[0151]

突变	引物
EGFR	
外显子18	正向 5'-CATGGTGAGGGCTGAGGTGA-3' (SEQ ID NO: 1) 反向 5'-CCCCACCCAGACCATGAGAGG-3' (SEQ ID NO: 2)
外显子19	正向 5'-GTGCATCGCTGGTAACATCCA-3' (SEQ ID NO: 3) 反向 5'-GGAGATGAGCAGGGTCTAGAGCA-3' (SEQ ID NO: 4)
外显子20	正向 5'-CGCATTCATGCGTCTTCACC-3' (SEQ ID NO: 5) 反向 5'-CTATCCCAGGAGCGCAGACC-3' (SEQ ID NO: 6)
外显子21	正向 5'-TGGCATGAACATGACCCTGAA-3' (SEQ ID NO: 7) 反向 5'-CAGCCTGGTCCCTGGTGTC-3' (SEQ ID NO: 8)
KRAS	
外显子2	正向 5'-TTATGTGTGACATGTTCTAAT-3' (SEQ ID NO: 9) 反向 5'-AGAATGGTCCTGCACCAGTAA-3' (SEQ ID NO: 10)
外显子3	正向 5'-TCAAGTCCTTTGCCCATTTT-3' (SEQ ID NO: 11) 反向 5'-TGCATGGCATTAGCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 12)
外显子4	正向 5'-TTGTGGACAGGTTTTGAAAGA-3' (SEQ ID NO: 13) 反向 5'-AGAAGCAATGCCCTCTCAAG-3' (SEQ ID NO: 14)
BRAF	
外显子15	正向 5'-CTCTTCATAATGCTTGCTC-3' (SEQ ID NO: 15) 反向 5'-GTGAATACTGGGAACCTATG-3' (SEQ ID NO: 16)
c-MET	
外显子14	正向 5'-TGGGCACTGGGTCAAAGTCTC-3' (SEQ ID NO: 17) 反向 5'-AACAATGTCACAACCCACTGAGGTA-3' (SEQ ID NO: 18)
外显子16	正向 5'-ATTAAATGTTACGCAGTGCTAAC-3' (SEQ ID NO: 19) 反向 5'-GGTTGCAAACCACAAAAGTAT-3' (SEQ ID NO: 20)
外显子17	正向 5'-GTATTCACTGTTCCATAATGAAGT-3' (SEQ ID NO: 21) 反向 5'-GATGGCTGGCTTACAGCTAGTT-3' (SEQ ID NO: 22)
外显子18	正向 5'-AACAGTAGATGCTTAGTTTATGCT-3' (SEQ ID NO: 23) 反向 5'-AACAGATTCCTCCTTGTCACCTT-3' (SEQ ID NO: 24)
外显子19	正向 5'-TTCTATTTCAGCCACGGGTAAT-3' (SEQ ID NO: 25) 反向 5'-ATGAAAGTAAAAGAGGAGAACTC-3' (SEQ ID NO: 26)
外显子21	正向 5'-CACCCCTAAAGCCGAAATGCG-3' (SEQ ID NO: 27) 反向 5'-CAAGGAGCAAAGAATATCGATGGC-3' (SEQ ID NO: 28)
PI3KCA	
外显子1	正向 5'-CTCCACGACCATCATCAGG-3' (SEQ ID NO: 29) 反向 5'-GATTACGAAGGTATTGGTTTAGACAG-3' (SEQ ID NO: 30)
外显子9	正向 5'-GATTGGTTCTTTTCCTGTCTCTG-3' (SEQ ID NO: 31) 反向 5'-CCACAAATATCAATTTACAACCATTG-3' (SEQ ID NO: 32)
外显子20	正向 5'-TGGGGTAAAGGGAATCAAAAG-3' (SEQ ID NO: 33) 反向 5'-CCTATGCAATCGGTCTTTGC-3' (SEQ ID NO: 34)

[0152] 所有反应者展现较高 EGFR mRNA 表达水平。在另一方面,使用 Affymetrix HG-U219GeneChip 进行的转录组特征谱分析显示所有 4 个反应者都表达比所有 16 个非反应者更高的水平的 EGFR mRNA 表达 ($P = 0.003$) (表 1)。EGFR 基因表达通过对比管家基因 GAPDH 的 q-RT-PCR (定量反转录-PCR) 来进一步定量。在所测试的样本中,4 个展现高 EGFR mRNA 水平 (相对强度 ≥ 0.5 , 任意定义的) 的样本全都反应者,与显示中等至低 EGFR mRNA 水平 (相对强度 ≤ 0.1) 的剩余模型相反 (表 1, 图 1C)。差异是显著的 ($P = 0.002$)。具体地,最高值来自 GA0152 (10.5, 通过 GeneChip 分析, 和 13, 通过 q-RT-PCR), 其可归因于上述

EGFR 扩增。

[0153] 所有反应者展现较高 EGFR 免疫组织化学评分。随后我们进行 EGFR 免疫组织化学 (IHC)，一种测定针对 GC 的抗 HER2 治疗的 HER2 表达的临床上实用的测定。IHC 在 12/20 (60%) 的模型中显示阳性 EGFR 免疫染色。在它们当中，6/12 具有为 11 的染色强度评分，3/12 具有为 21 的染色强度评分，以及 3/12 具有为 31 的染色强度评分。所有反应者中都发现 EGFR IHC 31，然而非反应者展示较低的 EGFR IHC 评分 0-21 ($P = 0.002$) (表 1, 图 1C)。典型的 EGFR 强免疫染色 (GA0152 和 GA0075) 示于图 1B 中。这些结果表明 EGFR 高表达 (在 mRNA 和蛋白质水平上) 与对西妥昔单抗的反应相关。相关致癌基因的突变是罕见的。还已通过热点突变测序在这些模型中研究与 EGFR 途径相关的一些常见致癌基因例如 KRAS、BRAF (V600E)、c-MET、EGFR、AKT 和 PI3KC 的基因突变。有趣地，少数测试的模型，无论是反应者还是非反应者，都显示除 PIK3CA 中的含 G13D KRAS 突变的 GA0139、含 327-329 缺失的 GA0044 和含 G545Y PIK3CA 突变的 GA0098 外的任何异常 (表 1)。因此，GC 异种移植对西妥昔单抗的无反应很明显不能简单地归因于这些致癌基因突变。

[0154] 讨论

[0155] 本研究明确地表明，一个亚组的具有 EGFR 基因扩增和过表达的 GC-ADC HuPrime[®] 模型对西妥昔单抗起反应 (4/4)。与此一致，在 EXTRA II 期试验中 4 个 EGFR 扩增的患者中有 4 个是针对西妥昔单抗与顺铂 / 卡培他滨的联合治疗反应者 (NCT00477711)¹⁶，从而支持 PDX 模型的假定的预测能力和我们的假说：EGFR 是西妥昔单抗 GC-ADC 治疗的预测性生物标志物。当数据变得可获得时，该假定还可通过回顾性检查最近在胃 - 食道癌中完成的 III 期试验 EXPAND 来确认。可在临床环境中常规地进行用于 EGFR 基因扩增的 FISH，从而使得该方法能够用作比较诊断法。因此，可容易地实施此类前瞻性试验。最终的批准为 GC-ADC 患者提供了除了用于具有 HER2 基因扩增的患者的曲妥珠单抗 (Herceptin[®])³ 以外的另一种靶向疗法。

[0156] 然而在 NSCLC (Yang 等人，提交中) 和 CRC¹⁷ HuPrime[®] 中未观察到在 GC HuPrime[®] 对西妥昔单抗的反应中所看到对 EGFR 基因扩增的重度依赖性，这表明不同癌症类型之间的巨大差异。非常有趣地，GC-ADC 中的该 EGFR 依赖性以某种方式反映了 GC-ADC 中的曲妥珠单抗反应的 Her2 依赖性。该相似性为 GC 的西妥昔单抗治疗的伴随诊断 (正如曲妥珠单抗的伴随诊断一样) 提供了明确可行的开发途径。

[0157] 另一个有趣的观察是具有 EGFR 过表达 (也为基因扩增) 的模型不具有 HER2 过表达 (或基因扩增)，并且反之亦然，即在单个模型中未观察到这两个基因的同时过表达 (基因扩增) (参见图 4A 和 4B)。该观察表明两个基因的扩增 / 过表达不驱动肿瘤形成。因此，合理的是，没有理由使用西妥昔单抗和曲妥珠单抗的组合来治疗 GC 患者。

[0158] 我们的数据指向 GC 中的西妥昔单抗反应与 mRNA 和蛋白质水平上的 EGFR 高表达以及 EGFR 基因扩增之间的正相关。该相关通过具有最高 EGFR mRNA 表达、IHC 评分和基因扩增的 GA0152 来举例说明。数据似乎表明通过更较高表达产生的 EGFR 的较高活性驱动这些肿瘤中的致癌转化，从而利用西妥昔单抗来使其失活，从而抑制肿瘤生长。EGFR 的过表达在两种情况下可归因于基因扩增。

[0159] 我们的数据还显示 mRNA 和蛋白质水平上的 EGFR 高表达与反应相关。然而，由于

不在临床样本中常规地测定 EGFR 基因的 mRNA 表达,并且 IHC 可由于生物和技术因素的原因而具有争议,因此我们建议 FISH 与 IHC 测试的组合适合于作为常规临床实践(与抗 HER2 治疗的临床实践类似)来预测西妥昔单抗功效。

[0160] 总之,我们的研究表明具有高 EGFR mRNA 表达和 IHC 评分的 GC 亚型可受益于西妥昔单抗治疗,并且通过 FISH 检测的 EGFR 基因扩增也可精确地预测反应者,阳性预测值约为 50%。这些标志物对于将来指导潜在成功的临床试验和最终作为用于临床治疗的患者分层指导是有帮助的。

[0161] 参考文献

[0162] 1.Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 2006 May 10 ;24(14) :2137-50.

[0163] 2. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol*. 2003 Jan ;56(1) :1-9.

[0164] 3. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA) : a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 Aug 28 ;376(9742) :687-97.

[0165] 4. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*. 2008 Mar 13 ;358(11) :1160-74.

[0166] 5. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer : 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol*. Jan ;11(1) :21-8.

[0167] 6. Pinto C, Di Fabio F, Barone C, Siena S, Falcone A, Cascinu S, et al. Phase II study of cetuximab in combination with cisplatin and docetaxel in patients with untreated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (DOCETUX study). *Br J Cancer*. 2009 Oct 20 ;101(8) :1261-8.

[0168] 7. Pinto C, Di Fabio F, Siena S, Cascinu S, Rojas Llimpe FL, Ceccarelli C, et al. Phase II study of cetuximab in combination with FOLFIRI in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (FOLCETUX study). *Ann Oncol*. 2007 Mar ;18(3) :510-7.

[0169] 8. Lordick F, Luber B, Lorenzen S, Hegewisch-Becker S, Folprecht G, Woll E, et al. Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer : a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Br J Cancer*. 2010 Feb 2 ;102(3) :500-5.

[0170] 9. Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature*. 2010

Apr 15 ;464(7291) :999-1005.

[0171] 10. Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, et al. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res.* 2007 Jul 1 ;13(13) :3989-98.

[0172] 11. Nemati F, Sastre-Garau X, Laurent C, Couturier J, Mariani P, Desjardins L, et al. Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors. *Clin Cancer Res.* 2010 Apr 15 ;16(8) :2352-62.

[0173] 12. Nemati F, Daniel C, Arvelo F, Legrier ME, Froget B, Livartowski A, et al. Clinical relevance of human cancer xenografts as a tool for preclinical assessment: example of in-vivo evaluation of topotecan-based chemotherapy in a panel of human small-cell lung cancer xenografts. *Anticancer Drugs.* 2010 Jan ; 21(1) :25-32.

[0174] 13. Fichtner I, Rolff J, Soong R, Hoffmann J, Hammer S, Sommer A, et al. Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 15 ;14(20) :6456-68.

[0175] 14. Hennessey PT, Ochs MF, Mydlarz WW, Hsueh W, Cope L, Yu W, et al. Promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines is significantly different than methylation in primary tumors and xenografts. *PLoS One.* 2011 ;6(5) :e20584.

[0176] 15. Yang M, Xiaoming Song, Jianyun Deng, Jie Cai, Taiping Chen, Jean-Pierre Wery, Yiyu Chen and Qixiang Li. Overcoming drug resistance with tailored treatment regimen in patient derived xenografts from naïve Asian NSCLC patients resistant to EGFR inhibitors. 2012; Submitted.

[0177] 16. Zhang X, Jianming Xu, Lin Shen, Lin Yang, Jun Liang, Nong Xu, Yuxian Bai⁶, Jiejun Wang. A Multicenter Prospective Phase II study of Cetuximab with Cisplatin/Capecitabine for untreated patients with Advanced Gastric or Esophago-gastric Adenocarcinoma (EXTRA study). 2012.

[0178] 17. Chen D, Petra Ross-Macdonald, Sheng Guo, Jie Cai, Rolf Ryseck, Craig Fairchild, Heshani de Silva, Jian Cao, Aiqing He, Xiaoming Song, Mengmeng Yang, Jianyun Deng, Taiping Chen¹, Jean-Pierre Wery¹, Yiyu Chen¹ and Qixiang Li. Cetuximab response in CRC patient-derived xenografts is predicted by RAS pathway activation rather than KRAS mutation status. 2012.

[0179] 18. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006 Apr 15 ;66(8) :3992-5.

[0180] 19. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilias G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of

cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer:a retrospective consortium analysis.Lancet Oncol.2010 Aug;11(8):753-62.

[0181] 20.De Roock W,De Vriendt V,Normanno N,Ciardiello F,Tejpar S.KRAS,BRAF,PIK3CA, and PTEN mutations:implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer.Lancet Oncol.2011 Jun;12(6):594-603.

[0182] 21.Di Nicolantonio F,Martini M,Molinari F,Sartore-Bianchi A,Arena S,Saletti P, et al.Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer.J Clin Oncol.2008 Dec 10;26(35):5705-12.

[0183] 22.Loboda A,Nebozhyn M,Klinghoffer R,Frazier J,Chastain M,Arthur W, et al.A gene expression signature of RAS pathway dependence predicts response to PI3K and RAS pathway inhibitors and expands the population of RAS pathway activated tumors.BMC Med Genomics.2010;3:26.

[0184] 23.Jemal et al.CA.Cancer J.Clin.61,69-90(2011)

[0185] 24.Han et al.,Phase II study and biomarker analysis of cetuximab combined with modified FOLFOX6 in advanced gastric cancer Br.J.Cancer 100,298-304(2009)

[0186] 25.Kim et al.A prospective phase II study of cetuximab in combination with XELOX(capecitabine and oxaliplatin)in patients with metastatic and/or recurrent advanced gastric cancer.Invest.New Drugs 29,366-373(2011)

[0187] 26.Lordick et al.Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer(EXPAND):a randomised,open-label phase 3 trial.Lancet Oncol.14,490-499(2013)

[0188] 27.Luber et al.Biomarker analysis of cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric and oesophago-gastric junction cancer:results from a phase II trial of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie(AIO)BMC Cancer 11,509(2011)

[0189] 28.Shia et al.,Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma:an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study.Mod.Pathol.

[0001]

序列表

- <110> 中美冠科生物技术有限公司
杨劼
Y • 陈
H • Q • 李
蔡杰
- <120> EGFR 生物标志物用于利用抗 EGFR 试剂治疗胃癌的用途
- <130> CRB1-004/01W0 317670-2012
- <150> PCT/CN2013/072638
<151> 2013-03-14
- <160> 34
- <170> PatentIn 3.5 版
- <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> EGFR 外显子 18 正向引物
- <400> 1
catggtaggg gcagaggtga 20
- <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> EGFR 外显子 18 反向引物
- <400> 2
ccccaccaga ccatgagagg 20
- <210> 3

[0002]

<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	EGFR 外显子 19 正向引物	
<400>	3	
	gtgcatcgct ggtaacatcc a	21
<210>	4	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	EGFR 外显子 19 反向引物	
<400>	4	
	ggagatgagc aggtctaga gca	23
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	EGFR 外显子 20 正向引物	
<400>	5	
	cgcattcatg cgtcttcacc	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	EGFR 外显子 20 反向引物	
<400>	6	

[0003]

ctatcccagg agcgcagacc	20
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> EGFR 外显子 21 正向引物	
<400> 7	
tggcatgaac atgacctga a	21
<210> 8	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> EGFR 外显子 21 反向引物	
<400> 8	
cagcctggtc cctggtgtc	19
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> KRAS 外显子 2 正向引物	
<400> 9	
ttatgtgtga catgttctaa t	21
<210> 10	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0004]

<220>

<223> KRAS 外显子 2 反向引物

<400> 10

agaatgggtcc tgcaccagta a

21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> KRAS 外显子 3 正向引物

<400> 11

tcaagtcctt tgcccatTTT

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> KRAS 外显子 3 反向引物

<400> 12

tgcattggcat tagcaaagac

20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> KRAS 外显子 4 正向引物

<400> 13

ttgtggacag gttttgaaag a

21

<210> 14

[0005]

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	KRAS 外显子 4 反向引物	
<400>	14	
	agaagcaatg cccctctcaag	20
<210>	15	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BRAF 外显子 15 正向引物	
<400>	15	
	ctcttcataa tgccttgctc	19
<210>	16	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BRAF 外显子 15 反向引物	
<400>	16	
	gtgaataactg ggaactatg	19
<210>	17	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c-MET 外显子 14 正向引物	
<400>	17	

[0006]

tgggcactgg gfcaggctct c	21
<210> 18	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c-MET 外显子 14 反向引物	
<400> 18	
aacaatgtca caaccactg aggta	25
<210> 19	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c-MET 外显子 16 正向引物	
<400> 19	
attaaatgtt acgcagtgtt aac	23
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> c-MET 外显子 16 反向引物	
<400> 20	
ggttgcaaac cacaaaagta t	21
<210> 21	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0007]

<220>		
<223>	c-MET 外显子 17 正向引物	
<400>	21	
	gtattcactg ttccataatg aagt	24
<210>	22	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c-MET 外显子 17 反向引物	
<400>	22	
	gatggctggc ttacagctag tt	22
<210>	23	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c-MET 外显子 18 正向引物	
<400>	23	
	aacagtagat gcttagttta tgct	24
<210>	24	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c-MET 外显子 18 反向引物	
<400>	24	
	aacagattcc tccttgtcac tt	22
<210>	25	

[0008]

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c-MET 外显子 19 正向引物	
<400>	25	
	ttctatttca gccacgggta at	22
<210>	26	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c-MET 外显子 19 反向引物	
<400>	26	
	atgaaagtaa aagaggagaa actc	24
<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c-MET 外显子 21 正向引物	
<400>	27	
	caccctaaag ccgaaatgcg	20
<210>	28	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	c-MET 外显子 21 反向引物	
<400>	28	

[0009]

caaggagcaa agaatacga tggc

24

<210> 29

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PI3KCA 外显子 1 正向引物

<400> 29

ctccacgacc atcatcagg

19

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PI3KCA 外显子 1 反向引物

<400> 30

gattacgaag gtattggttt agacag

26

<210> 31

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PI3KCA 外显子 9 正向引物

<400> 31

gattggttct ttcctgtctc tg

22

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

[0010]

<220>

<223> PI3KCA 外显子 9 反向引物

<400> 32

ccacaaatat caatttaca ccatg

26

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PI3KCA 外显子 20 正向引物

<400> 33

tggggtaaag ggaatcaaaa g

21

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PI3KCA 外显子 20 反向引物

<400> 34

cctatgcaat eggtctttgc

20

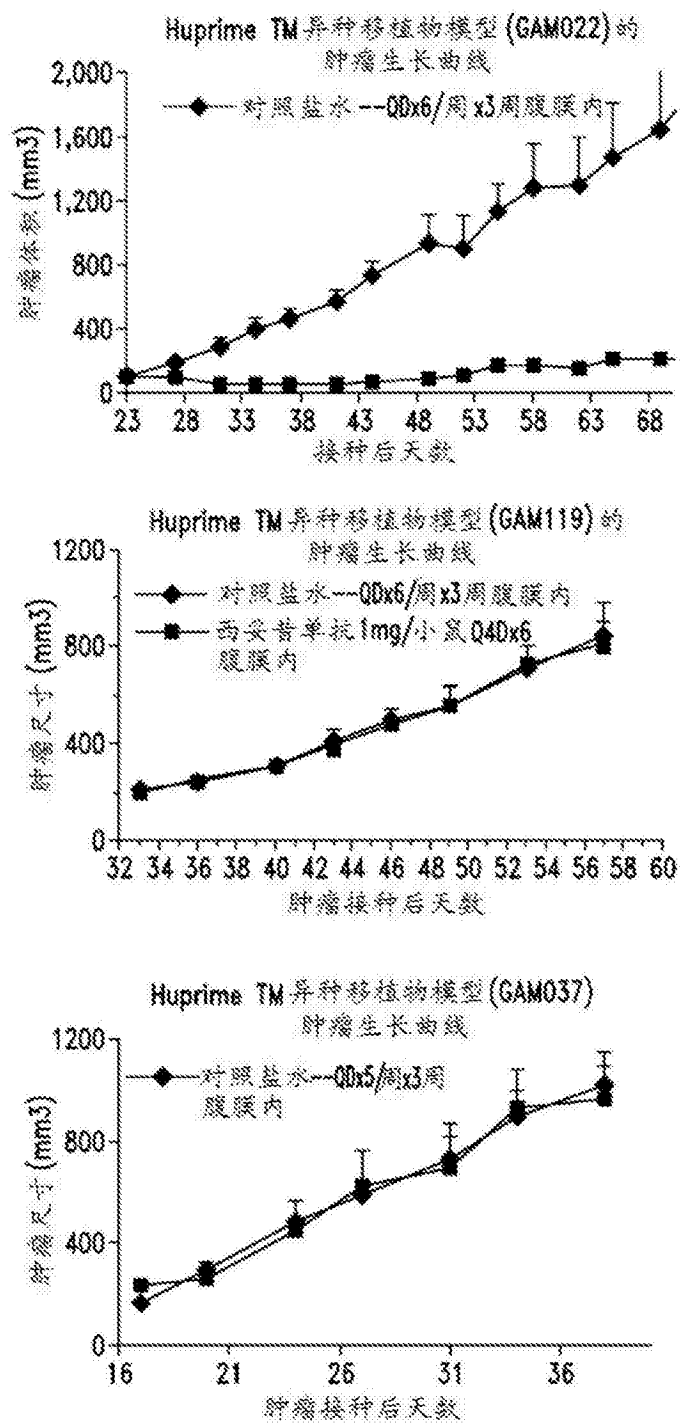


图 1A

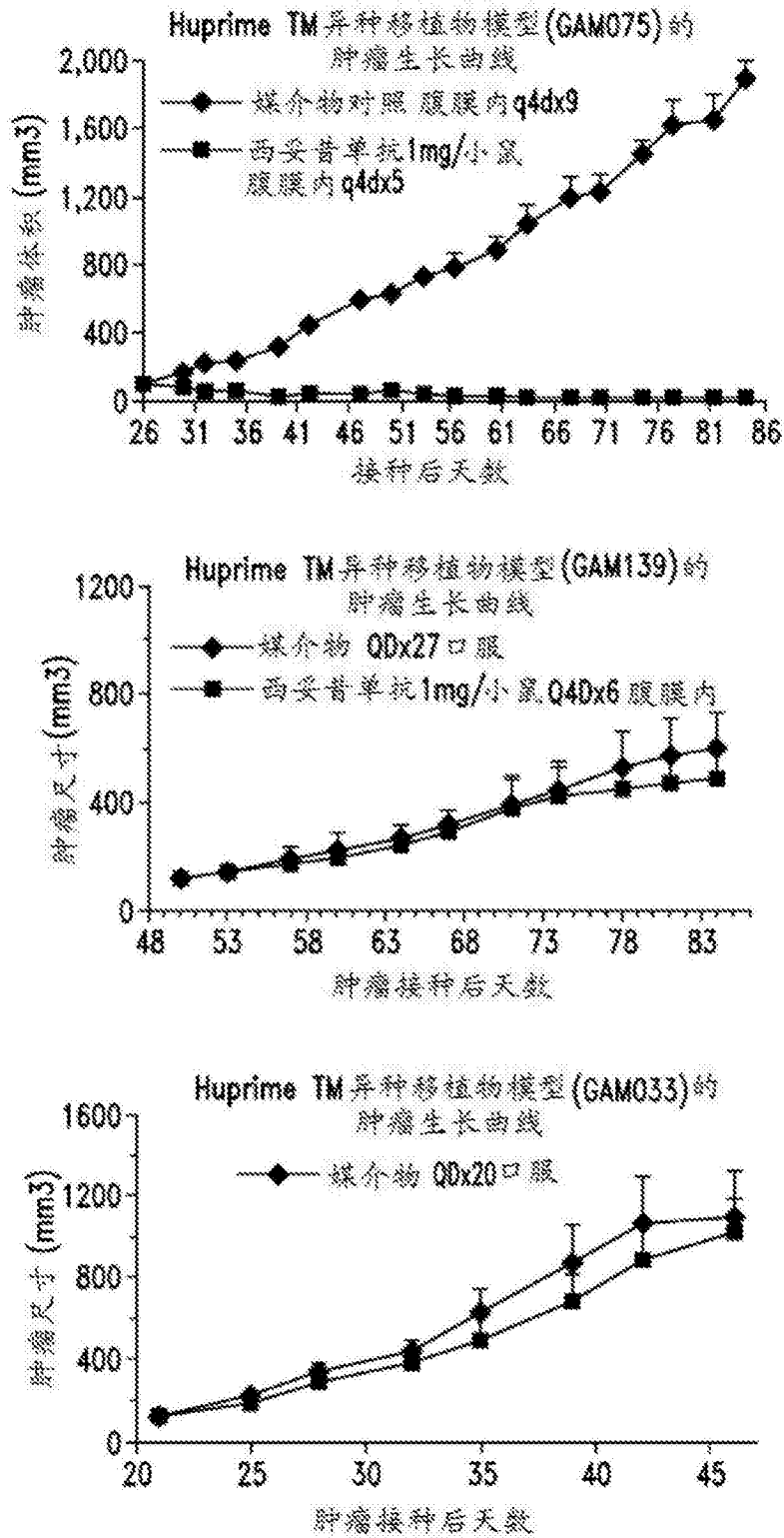


图 1A(续)

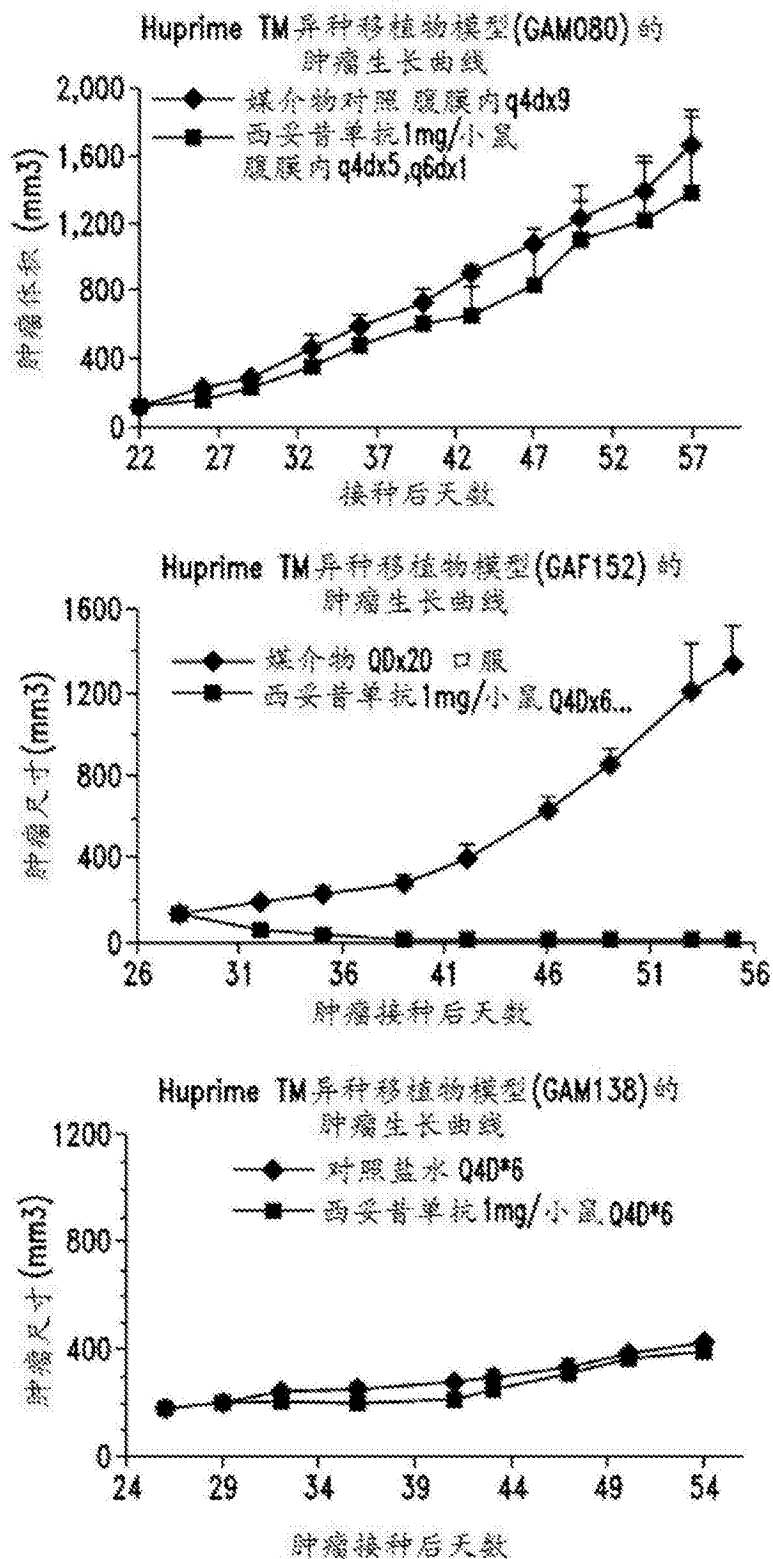


图 1A(续)

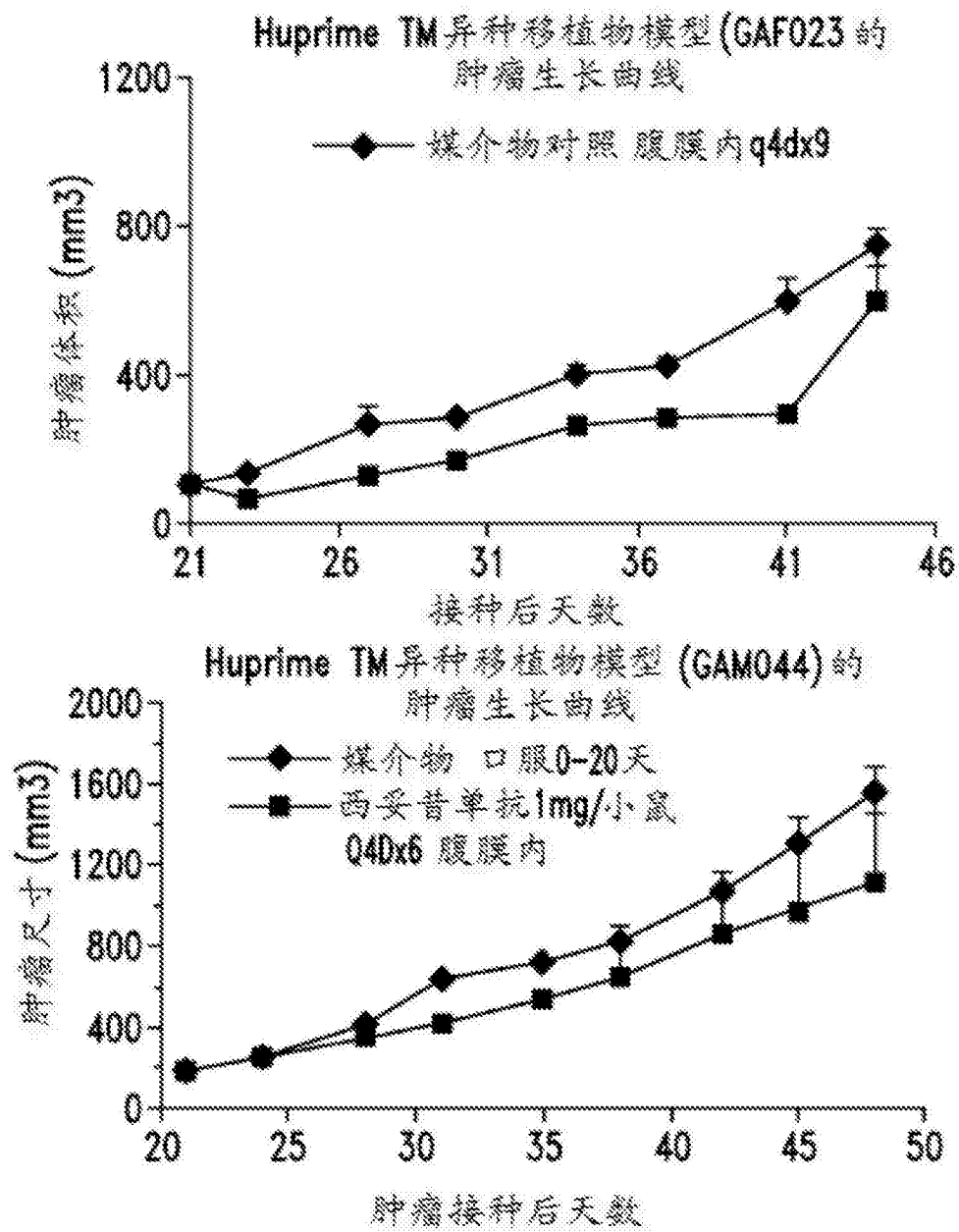


图 1A(续)

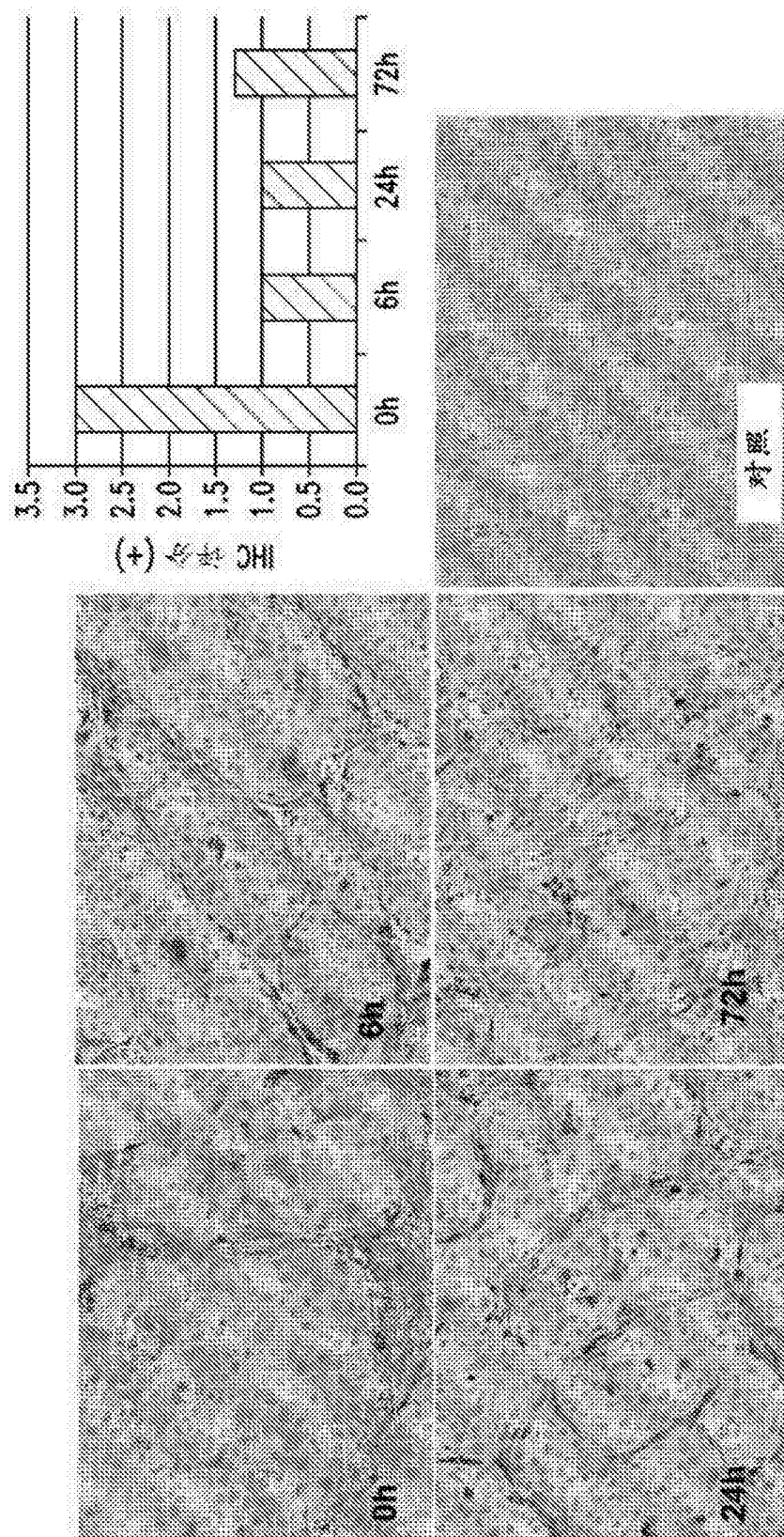


图 1B

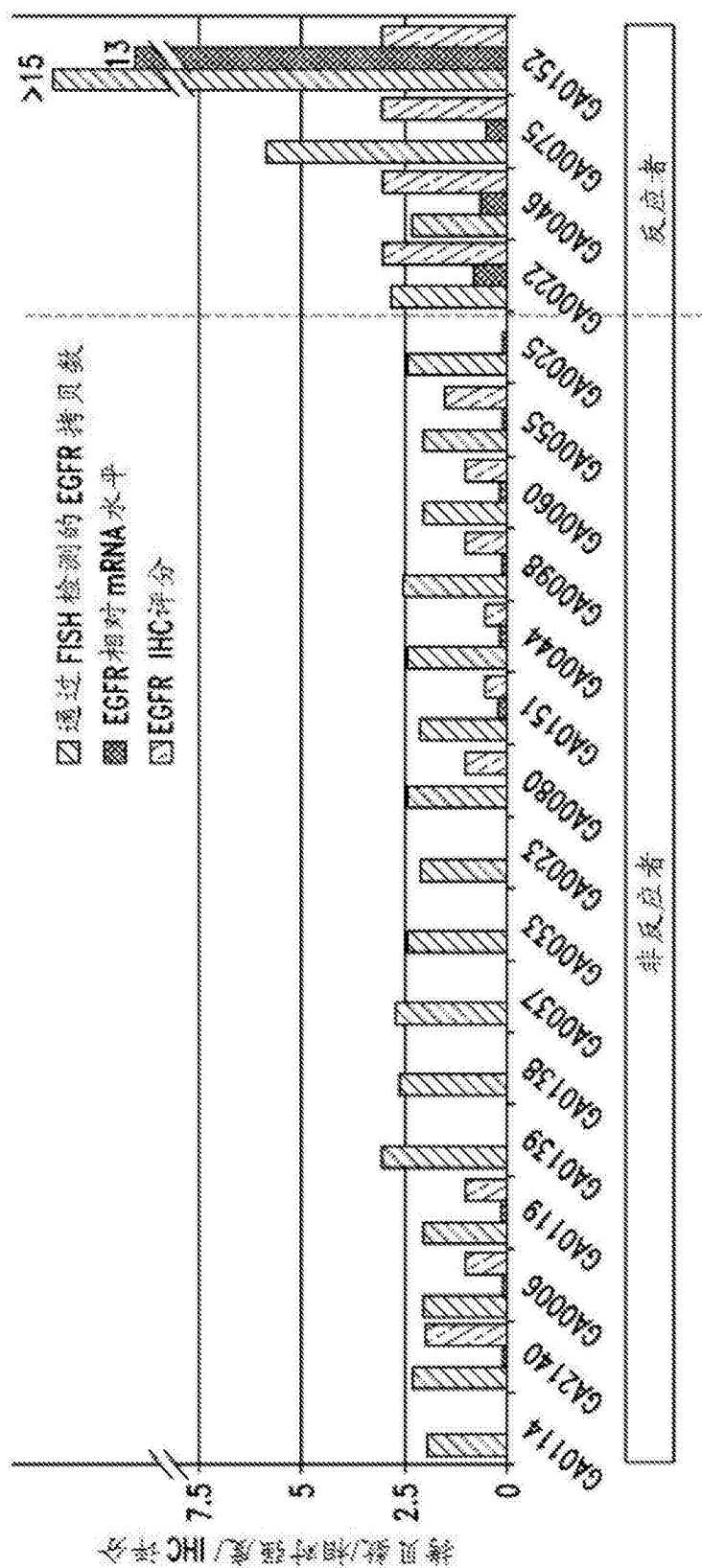
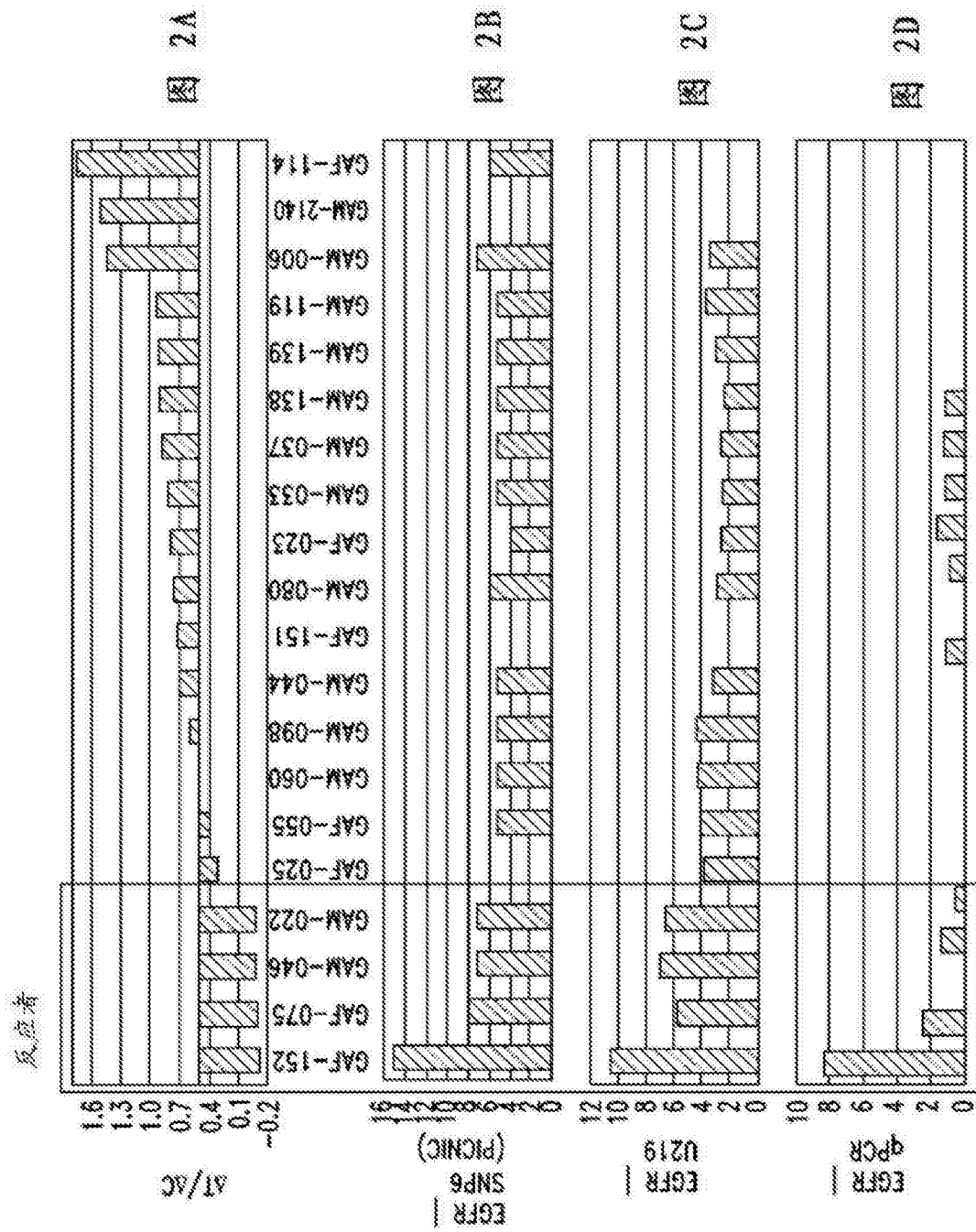


图 1C



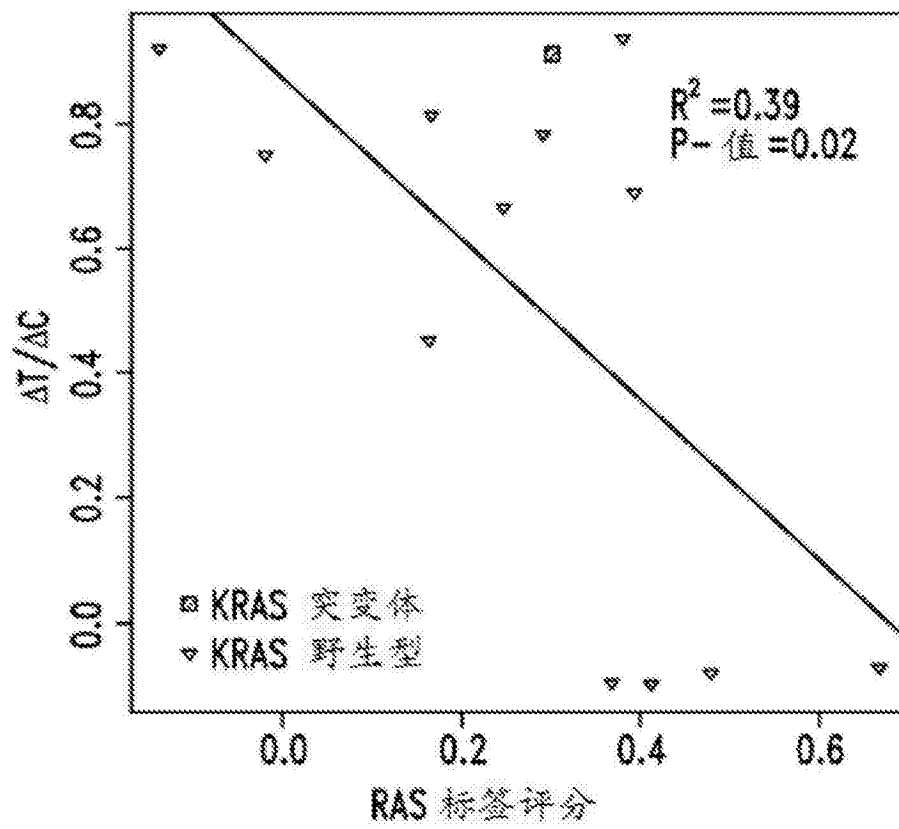


图 3

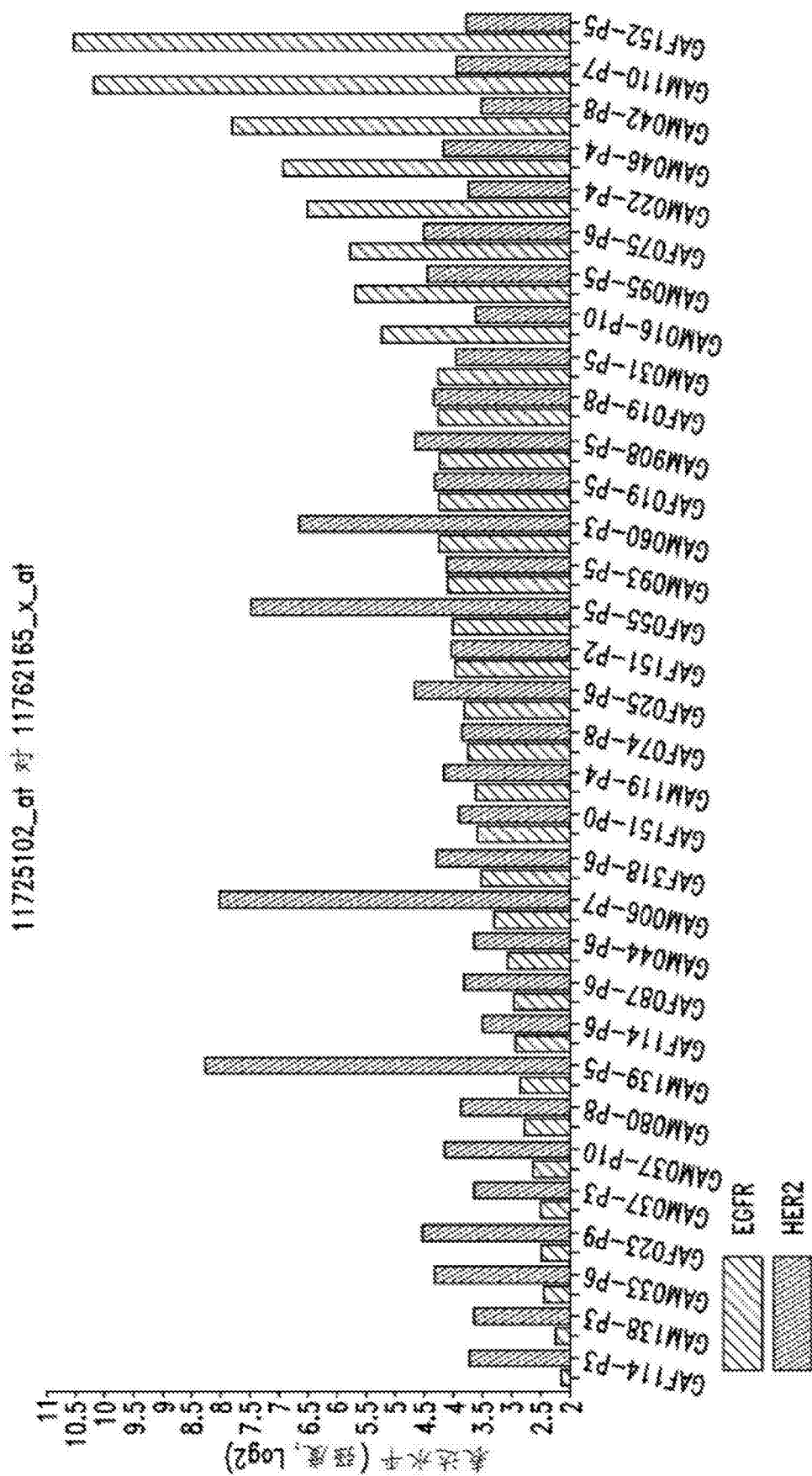


图 4A

基因拷贝数—PICNIC法—EGFR 对 ERBB2

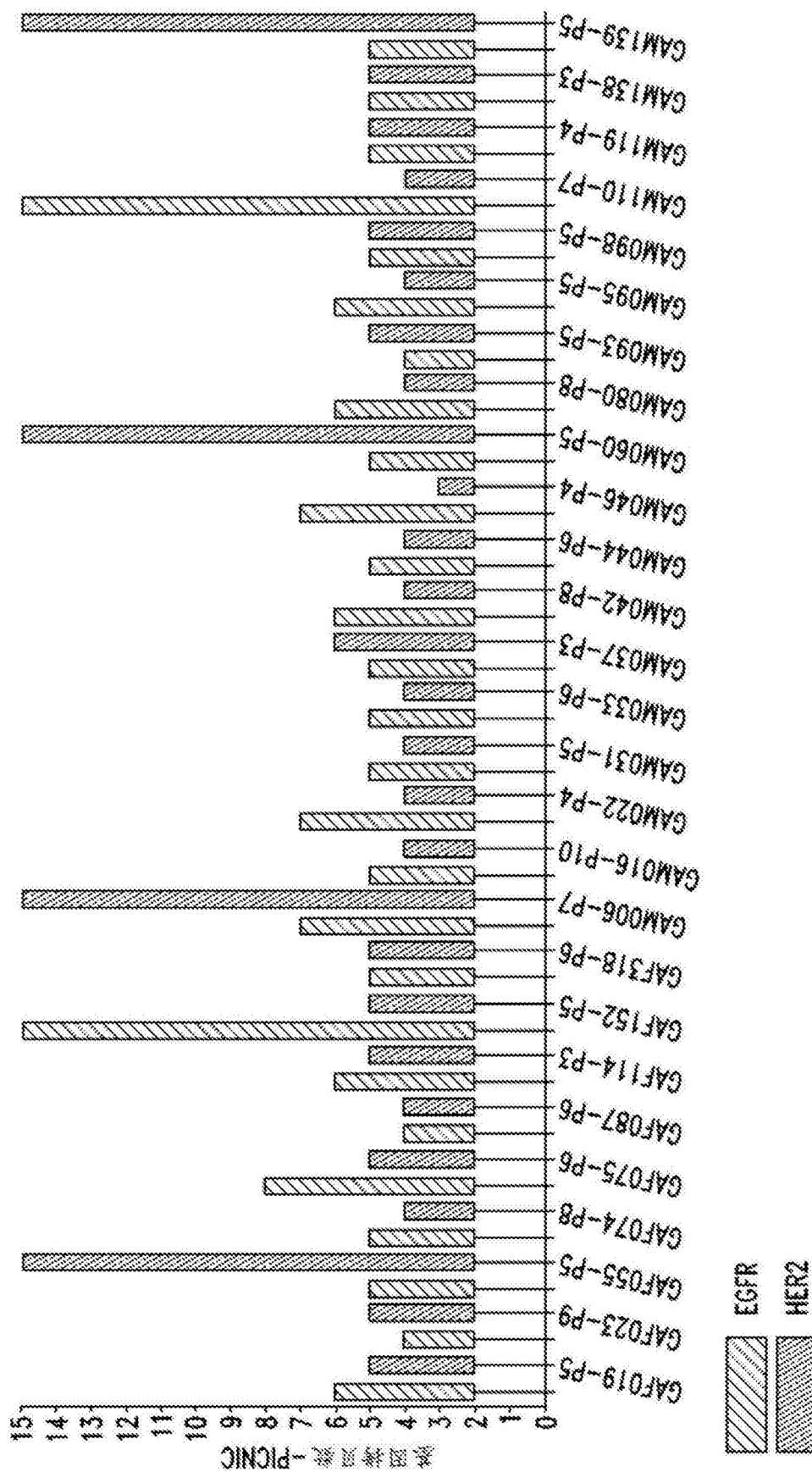


图 4B

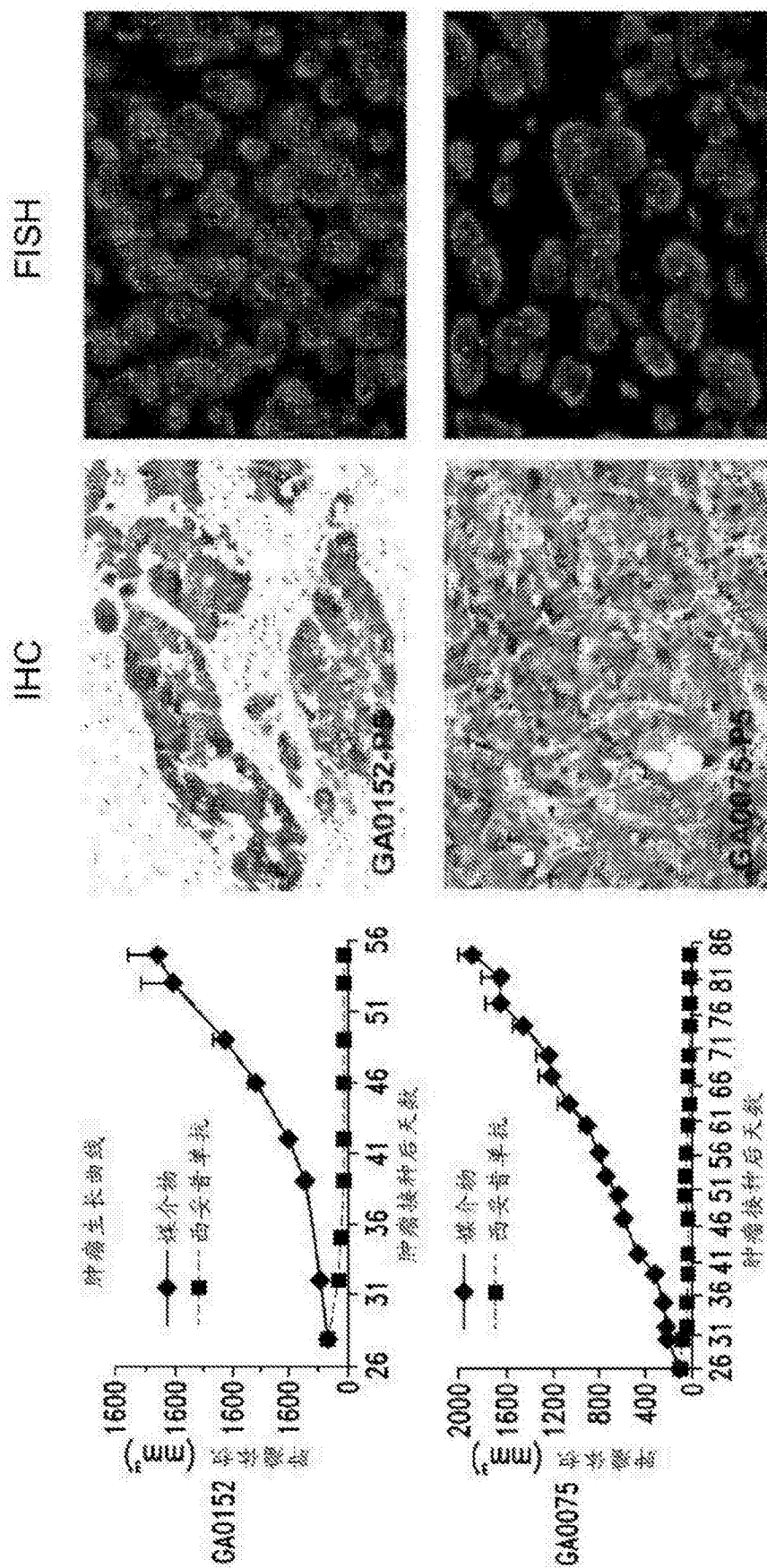


图 5

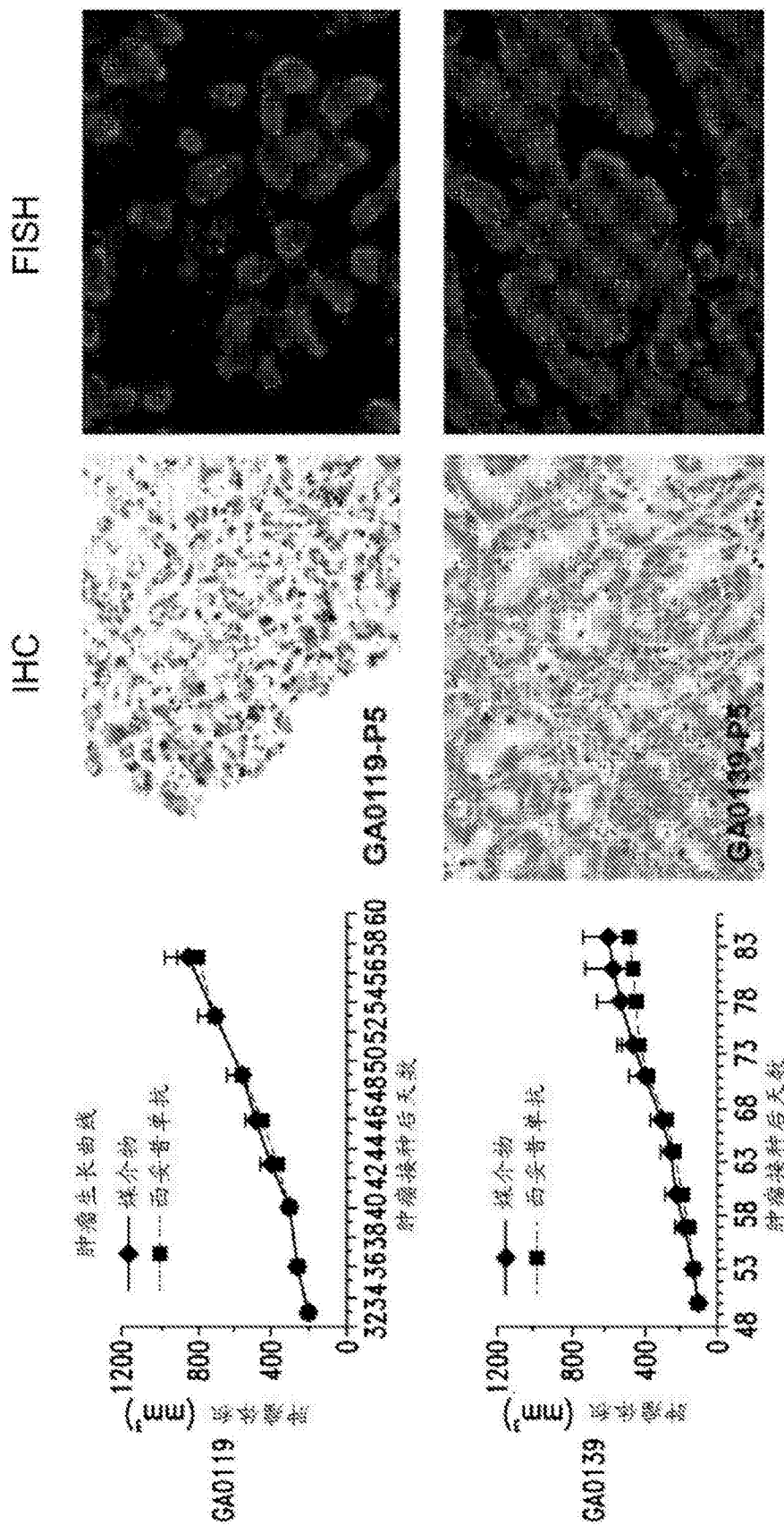


图5(续)