

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035674**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.07.24

(51) Int. Cl. **G01N 33/574 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201790211

(22) Дата подачи заявки
2015.07.16

(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТОГО, ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ ПАЦИЕНТ, ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО СТРАДАЮЩИЙ ОТ РАКА, КАНДИДАТОМ ДЛЯ ТЕРАПИИ АФЛИБЕРЦЕПТОМ

(31) 14306172.9

(32) 2014.07.18

(33) EP

(43) 2017.05.31

(86) PCT/EP2015/066262

(87) WO 2016/008975 2016.01.21

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ (FR)

(72) Изобретатель:
**Широн-Блондель Мариэль (FR),
Ламбрехтс Дитер (BE), Магерини
Эмманюэль, Тюйе Венсен (FR)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2010216168

A ABAJO ET AL.: "Identification of predictive circulating biomarkers of bevacizumab-containing regimen efficacy in pre-treated metastatic colorectal cancer patients", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 107, no. 2, 14 June 2012 (2012-06-14), pages 287-290, XP055163014, ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/bjc.2012.242, the whole document, abstract, page 288, column 1, paragraph 2, page 289, column 1, paragraph 2

Hidetoshi Hayashi ET AL.: "Biomarkers of reactive resistance and early disease progression during chemotherapy plus bevacizumab treatment for colorectal carcinoma", Oncotarget, 15 May 2014 (2014-05-15), page 2588, XP055163018, United States, Retrieved from the Internet: URL:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/248 09949 [retrieved on 2015-01-19] the whole document, page 2591, column 1, paragraph 1, table 2

S. KOPETZ ET AL.: "Phase II Trial of Infusional Fluorouracil, Irinotecan, and Bevacizumab for Metastatic Colorectal Cancer: Efficacy and Circulating Angiogenic Biomarkers Associated With Therapeutic Resistance", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 28, no. 3, 14 December 2009 (2009-12-14), pages 453-459, XP055163029, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2009.24.8252, the whole document, abstract
US-A1-2014051642

(57) Настоящее изобретение касается способа определения того, является ли пациент, предположительно страдающий от рака, кандидатом для терапии афлиберцептом указанного рака, предусматривающий стадию проведения по меньшей мере одного анализа биологического образца пациента для измерения уровня IL-8 в начальный момент времени, где, если уровень IL-8 в биологическом образце ниже эталонного уровня экспрессии IL-8, то пациента определяют как кандидата для указанной терапии, где эталонный уровень экспрессии IL-8 находится в диапазоне приблизительно от 10 до приблизительно 30 пг/мл, а также предложен способ лечения рака у пациента, которого определили как кандидата для терапии афлиберцептом.

B1

035674

035674 B1

Настоящее изобретение касается способа определения того, является ли пациент, предположительно страдающий от рака, кандидатом для терапии афлиберцептом указанного рака.

Афлиберцепт или зив-афлиберцепт, также называемый VEGFR1R2-Fc.DELTA.C1 Flt1D2.Flt1D3.Fc.DELTA.C1 или AVE0005, представляет собой гомодимерный белок, в котором каждый димер содержит два идентичных мономера, каждый из которых является белком слияния, содержащим сигнальную последовательность VEGFR1, слитую с Ig-доменом D2 рецептора VEGFR1, который собственнo слит с Ig-доменом D3 рецептора VEGFR2, в свою очередь слитого с Fc-доменом IgG1.

Белковая цепь является гликозилированной N-ацетил-глюкозамином, фукозой, галактозой, маннозой и сиаловыми кислотами, участвующими в образовании углеводных структур. N-связанные олигосахариды состоят главным образом из би-антеннарных структур с одной или двумя концевыми сиаловыми кислотами или без них. Мономер характеризуется аминокислотной последовательностью под SEQ ID №1.

Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) уже одобрило афлиберцепт под торговой маркой EYLEA® для лечения пациентов с неоваскулярной (влажной) возрастной макулодистрофией (AMD). В частности, EYLEA® является торговой маркой афлиберцепта, полученного, обработанного и составленного для интравитреального введения.

В ходе регистрации афлиберцепта (zaltraP) для применения в лечении рака и с учетом утвержденного применения афлиберцепта для лечения AMD FDA потребовало присвоить другое название (зив-афлиберцепт) соединению, используемому в лечении рака. Таким образом, зив-афлиберцепт является наименованием лекарственного препарата (USAN), официально присвоенным FDA для обозначения фармацевтической композиции, содержащей афлиберцепт в виде полученной, обработанной и составленной формы для введения путем внутривенной инфузии. Зив-афлиберцепт был утвержден FDA для продажи под торговой маркой ZALTRAP® для лечения метастатического колоректального рака (mCRC).

Европейское агентство по оценке и контролю лекарственных средств (EMA) также утвердило ZALTRAP®, однако не предложило разделить названия для данного соединения. Таким образом, в Европейском союзе название "афлиберцепт" используют независимо от показания.

ZALTRAP® и EYLEA® получали посредством несколько отличающихся способов. Они оба содержат афлиберцепт или зив-афлиберцепт, но соотношение агрегированных афлиберцепта и зив-афлиберцепта в ZALTRAP® и EYLEA® несколько отличается.

Утверждение ZALTRAP® основывалось на данных, полученных из исследования VELOUR - многоцентрового, рандомизированного, плацебо-контролируемого исследования III фазы, в котором сравнивали эффективность афлиберцепта в сравнении с плацебо в комбинации со схемой FOLFIRI для пациентов с mCRC, которых ранее лечили по схеме, содержащей оксалиплатин.

AFFIRM, открытое, не являющееся сравнительным исследованием II фазы, проводили для оценки комбинации афлиберцепта и модифицированного FOLFOX6 (mFOLFOX6), которую использовали в качестве терапии первой линии пациентам с mCRC. Основным конечным показателем была 12-месячная выживаемость без прогрессирования заболевания (PFS), тогда как изучение биомаркеров было одной из дополнительных задач.

В попытке понять ключевые факторы, связанные с эффективностью и безопасностью афлиберцепта, проводили исследование с оценкой биомаркеров для лечения афлиберцептом с проспективным сбором данных, опухолевых тканей и последовательным отбором образцов плазмы крови у пациентов, которые принимали участие в исследовании AFFIRM.

Белки плазмы крови и аллели, которые представляют либо однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в генах сигнального пути ангиогенеза, либо соматические мутации в ключевых онкогенах mCRC, анализировали для оценки их способности прогнозировать ответ пациента на афлиберцепт в отношении показателя PFS. В дальнейшем также оценивали, коррелирует ли какой-либо из данных маркеров с антиангиогенными, индуцированными лекарственным средством АЕ (неблагоприятными эффектами), такими как перфорация желудочно-кишечного тракта, тромбоз, гипертензия и протеинурия.

Несмотря на эффективность и безопасность афлиберцепта в лечении рака, целью остается улучшение идентификации пациентов, которые должны получить большую пользу от лечения.

Было обнаружено, что высокие уровни IL8 в начальный момент времени коррелируют с более короткими показателями времени выживаемости, при этом пациенты с повышающимися уровнями IL8 в ходе лечения более подвержены прогрессированию заболевания. Это свидетельствует о том, что пациенты с высокими уровнями IL8 в начальный момент времени или в ходе лечения подвергаются повышенному риску прогрессирования заболевания в ходе терапии афлиберцептом.

Роль IL8 в-развитии и росте опухоли рассмотрена в уровне техники.

Во II фазе исследования пациенты с гепатоцеллюлярной карциномой получали бевацизумаб (Boige V, Malka D, Bourredjem A et al. Efficacy, safety, and biomarkers of single-agent bevacizumab therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Oncologist* 2012; 17: 1063-1072). Циркулирующие в крови эндотелиоциты (SEC) и цитокины и ангиогенные факторы плазмы крови (CAF) измеряли в начальный момент времени и на протяжении лечения.

Данное исследование показало, что повышенные уровни IL-8 (выше 80 пг/мл) и IL-6 в начальный

момент времени коррелировали как с более коротким периодом выживаемости без прогрессирования заболевания (PFS), так и с более коротким временем общей выживаемости (OS).

Однако авторы ссылаются на другое исследование с сорафенибом, где, в противоположность этому, IL-8 был единственным цитокином в плазме крови, не связанным с результатом в виде PFS.

Во II фазе другого исследования пациенты с метастатическим колоректальным раком (mCRC) получали бевацизумаб (Kopetz S, Hoff PM, Morris JS et al. Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. J Clin Oncol 2010; 28: 453-459).

Уровни САФ у 37 пациентов оценивали в начальный момент времени, в ходе лечения и во время прогрессирования заболевания (PD).

Авторы сделали заключение, что повышенный IL-8 в начальный момент времени, выше медианного значения в 3,7 пг/мл, ассоциировался с более короткими показателями времени PFS.

Данные результаты были получены с бевацизумабом, который представляет собой антитело. Афлиберцепт является не антителом, а белком слияния и, таким образом, характеризуется другим механизмом действия.

Невозможно прогнозировать влияние биомаркера на эффективность противоракового лечения при использовании указанного лекарственного средства, исходя из результатов, полученных с другим лекарственным средством.

Тем более пороговая величина, выше или ниже которой пациент считается кандидатом для лечения, не может быть экстраполирована на два разных лекарственных средства.

Настоящее изобретение относится к применению интерлейкина-8 (IL-8) в качестве биомаркера для прогнозирования результата лечения афлиберцептом пациента, предположительно страдающего от рака.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение предусматривает способ определения того, является ли пациент, предположительно страдающий от рака, кандидатом для терапии афлиберцептом указанного рака, предусматривающий стадию проведения по меньшей мере одного анализа биологического образца пациента для измерения уровня IL-8 в начальный момент времени, где, если уровень IL-8 в биологическом образце ниже эталонного уровня экспрессии IL-8, то пациента определяют как кандидата для указанной терапии, где эталонный уровень экспрессии IL-8 находится в диапазоне приблизительно от 10 до приблизительно 30 пг/мл.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение предусматривает способ определения того, является ли пациент, предположительно страдающий от рака, кандидатом для терапии афлиберцептом указанного рака, предусматривающий стадию проведения по меньшей мере одного анализа биологического образца пациента для измерения уровня IL-8 в начальный момент времени, где, если уровень IL-8 в биологическом образце выше эталонного уровня экспрессии IL-8, то пациента определяют как не являющегося кандидатом для указанной терапии, где эталонный уровень экспрессии IL-8 находится в диапазоне приблизительно от 10 до приблизительно 30 пг/мл.

Согласно варианту осуществления эталонный уровень экспрессии IL-8 находится в диапазоне приблизительно от 10 до приблизительно 30 пг/мл.

Согласно дополнительному варианту осуществления эталонный уровень экспрессии IL-8 находится в диапазоне приблизительно от 15 до приблизительно 25 пг/мл или приблизительно от 17 до приблизительно 21 пг/мл.

Согласно дополнительному варианту осуществления эталонный уровень экспрессии IL-8 составляет приблизительно 18, приблизительно 19 или приблизительно 20 пг/мл.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения пациента с раком с помощью афлиберцепта, предусматривающему введение терапевтически эффективного количества афлиберцепта пациенту, которого определили как кандидата для терапии афлиберцептом согласно способу, указанному выше.

Дополнительной целью настоящего изобретения является способ оценки риска обеспечения возможности безопасного применения афлиберцепта в лечении пациента, предположительно страдающего от рака, при этом указанный способ предусматривает следующие стадии:

(а) определение уровня интерлейкина-8 (IL-8) в биологическом образце от пациента до начала лечения афлиберцептом;

(b) определение уровня интерлейкина-8 (IL-8) в биологическом образце от пациента в ходе лечения;

(с) сравнение уровня интерлейкина-8 (IL-8), определенного на стадии (b), с уровнем, определенным на стадии (а), при этом более высокий уровень интерлейкина-8 (IL-8) в образце из стадии (b) по сравнению с уровнем в образце из стадии (а) свидетельствует о необходимости проведения мониторинга пациента.

Согласно варианту осуществления одного из способов, описанных выше, биологический образец выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки и плазмы крови.

Согласно варианту осуществления одного из способов, описанных выше, рак представляет собой рак толстого кишечника, колоректальный рак или рак прямой кишки.

Согласно дополнительному варианту осуществления одного из способов колоректальный рак представляет собой метастатический колоректальный рак.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения субъекта подвергают лечению афлиберцептом и его дополнительно подвергают химиотерапевтическому лечению оксалиплатином, 5-фторурацилом (5-FU) и фолиниевой кислотой (т.е. лечению FOLFOX), фолиниевой кислотой, 5-фторурацилом и ириноцетаном (т.е. лечению FOLFIRI) или 5-фторурацилом и фолиниевой кислотой (т.е. лечению FUFOL или LV5FU2).

Химиотерапевтическое лечение может представлять собой комбинацию по меньшей мере из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или не более 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 средств, таких как, например, комбинация оксалиплатина, 5-фторурацила (5-FU) и фолиниевой кислоты (т.е. лечение FOLFOX или модифицированное лечение FOLFOX6, как описано в примере ниже), комбинация фолиниевой кислоты, 5-фторурацила и ириноцетана (т.е. лечение FOLFIRI), или комбинация 5-фторурацила и фолиниевой кислоты (т.е. лечение FUFOL или LV5FU2).

В связи с этим заявка WO 2012146610 относится к способу лечения mCRC с использованием афлиберцепта в комбинации с FOLFIRI. Содержание данной заявки включено посредством ссылки.

Согласно варианту осуществления одного из способов, описанных выше, терапевтически эффективные количества афлиберцепта, оксалиплатина, 5-фторурацила (5-FU) и фолиниевой кислоты вводят указанному пациенту.

Согласно варианту осуществления одного из способов, описанных выше, терапевтически эффективные количества афлиберцепта, фолиниевой кислоты, 5-фторурацила (5-FU) и ириноцетана вводят указанному пациенту.

Согласно дополнительному варианту осуществления одного из способов, описанных выше, пациенту вводят фолиниевую кислоту в дозе, находящейся в диапазоне приблизительно от 200 до приблизительно 600 мг/м², 5-фторурацил (5-FU) в дозе, находящейся в диапазоне приблизительно от 2000 до приблизительно 4000 мг/м², ириноцетан в дозе, находящейся в диапазоне приблизительно от 100 до приблизительно 300 мг/м², и афлиберцепт в дозе, находящейся в диапазоне приблизительно от 1 до приблизительно 10 мг/кг.

Согласно дополнительному варианту осуществления одного из способов, описанных выше, пациенту вводят фолиниевую кислоту в дозе, составляющей приблизительно 400 мг/м², 5-фторурацил (5-FU) в дозе, составляющей приблизительно 2800 мг/м², ириноцетан в дозе, составляющей приблизительно 180 мг/м², и афлиберцепт в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг.

Согласно дополнительному варианту осуществления одного из способов, описанных выше, фолиниевую кислоту вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 400 мг/м², 5-фторурацил (5-FU) вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 2800 мг/м², ириноцетан вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 180 мг/м², и афлиберцепт вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг, и при этом комбинацию вводят каждые две недели.

Согласно дополнительному варианту осуществления одного из способов, описанных выше, фолиниевую кислоту, 5-фторурацил (5-FU), ириноцетан и афлиберцепт вводят внутривенно каждые две недели в течение периода, находящегося в диапазоне от 9 до 18 недель.

Согласно дополнительному варианту осуществления одного из способов, описанных выше, фолиниевую кислоту вводят внутривенно непосредственно после введения афлиберцепта. Ее также можно вводить внутривенно непосредственно после введения афлиберцепта в течение периода, составляющего приблизительно 2 ч.

Согласно дополнительному варианту осуществления одного из способов, описанных выше, ириноцетан вводят внутривенно непосредственно после введения афлиберцепта. Его также можно вводить внутривенно непосредственно после введения афлиберцепта в течение периода, составляющего приблизительно 90 мин.

Согласно дополнительному варианту осуществления одного из способов, описанных выше, 5-фторурацил (5-FU) вводят непосредственно после введения афлиберцепта.

Согласно дополнительному варианту осуществления одного из способов, описанных выше, первое количество 5-фторурацила (5-FU) вводят внутривенно непосредственно после введения афлиберцепта, а второе количество 5-FU вводят внутривенно после первого количества посредством непрерывной инфузии.

Согласно дополнительному варианту осуществления одного из способов, описанных выше, приблизительно 400 мг/м² 5-фторурацила (5-FU) вводят внутривенно за период, составляющий от 2 до 4 мин после введения афлиберцепта, и при этом 2400 мг/м² 5-FU вводят внутривенно в течение более приблизительно 46 ч после введения 400 мг/м² посредством непрерывной инфузии.

Согласно варианту осуществления указанного пациента предварительно подвергали лечению с помощью терапии на основе оксалиплатина или бевацизумаба.

Согласно другому варианту осуществления химиотерапия, лучевая терапия или хирургическое вмешательство у указанного пациента были неудачными.

Вышеуказанные способы по настоящему изобретению и его применение могут представлять собой, например, *in vitro* или *ex vivo* способы и применение.

Средства для измерения уровня экспрессии белка IL8 хорошо известны из уровня техники и вклю-

чают иммунологический анализ, такой как анализ ELISA. Средства для измерения белка IL8 включают антитела, специфически связывающиеся с IL8. Можно осуществлять мечение таких средств с использованием выявляемого соединения, такого как флуорофоры или радиоактивные соединения. Например, можно осуществлять мечение зонда или антитела, специфически связывающихся с IL8, с использованием выявляемого соединения. Альтернативно, если набор содержит антитело, то данный набор может дополнительно содержать вторичное антитело, меченное выявляемым соединением, которое связывается с немеченым антителом, специфически связывающимся с IL8.

Средства для измерения уровня экспрессии IL8 могут также включать такие реагенты как, например, реакционные и/или отмывочные буферы. Средства могут находиться, например, во флаконах или титрационных микропланшетах, или могут быть закрепленными на твердой подложке, такой как микрочип, что может быть в случае для праймеров и зондов.

Афлиберцепт предложен в составе, который не причиняет вреда пациенту, подлежащему лечению.

Согласно варианту осуществления афлиберцепт предложен в составе с сахарозой и полисорбатом 20 (стабилизаторами), хлоридом натрия, цитратным буфером и натрий-фосфатным буфером, с доведенным до определенного значения pH.

Согласно другому варианту осуществления афлиберцепт поставляют в двух формах выпуска лекарственного средства: форма выпуска со 100 мг афлиберцепта /4,0 мл (номинальная концентрация); вторая форма выпуска с 200 мг афлиберцепта /8,0 мл (номинальная концентрация).

Обе формы выпуска изготавливают из одного основного стерильного раствора с концентрацией афлиберцепта, составляющей 25 мг/мл.

Перед инфузией пациенту концентрированный раствор разбавляют 0,9% раствором хлорида натрия или 5% декстрозой.

Противораковые средства, которые используют в упомянутом выше способе или в применении, предлагают в фармацевтически приемлемом носителе, наполнителе или разбавителе, который не причиняет вреда пациенту, подлежащему лечению.

Фармацевтически приемлемые носители и наполнитель, которые можно использовать в композициях по настоящему изобретению, включают без ограничения ионообменные вещества, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, самоэмульгирующиеся системы для доставки лекарственных средств (SEDDS), как, например, d-α-токоферол полиэтиленгликоль 1000 сукцинат, поверхностно-активные вещества, используемые в фармацевтических лекарственных формах, такие как разновидности Tween, или другие подобные полимерные матрицы для доставки, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, неполные глицеридные смеси насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протамин сульфат, гидрофосфат натрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, полиакрилаты, воск, блок-сополимеры полиэтилена и полиоксипропилена, полиэтиленгликоль и ланолин.

Специалистам будет понятно, что композиции предпочтительно составляют так, чтобы они были совместимы с предполагаемым путем введения. Примеры подходящих путей введения включают парентеральный путь, включая, например, внутримышечные, подкожные, внутривенные, внутрибрюшинные или местные внутриопухолевые инъекции. Пероральный путь также можно использовать при условии, что композиция находится в подходящей для перорального введения форме, способной защитить активное вещество от ферментов желудка и кишечника.

Термины "терапия", "терапевтический", "лечение" и "проведение лечения" используют в данном документе для характеристики терапевтического способа или способа, который направлен на (1) замедление или остановку прогрессирования, обострения или ухудшения симптомов течения заболевания или болезненного состояния, по отношению к которым используют данный термин; (2) облегчение или осуществление уменьшения интенсивности симптомов течения заболевания или болезненного состояния, по отношению к которым данный термин используют; и/или (3) регрессию или излечение течения заболевания или болезненного состояния, по отношению к которым данный термин используют.

В данном документе термины "интерлейкин-8" и "IL-8" используют взаимозаменяемо, и они относятся ко всем встречающимся в природе изоформам, включая альтернативные сплайс-варианты, аллельные варианты, и включают встречающиеся в природе варианты, SNP (однонуклеотидные полиморфизмы) и усеченные или секретированные формы белка IL-8.

В частности, термин "интерлейкин 8" относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность или состоящему из нее, которая соответствует последовательности в базе UniProtKB/Swiss-Prot с номером доступа P10145 (SEQ ID NO: 2), и/или

a) полипептиду, соответствующему зрелой изоформе полипептида (a) (т.е. полученной после расщепления сигнального пептида); и/или

b) аллельному варианту полипептида (a) или (b); и/или

c) сплайс-варианту полипептида (a), (b) или (c); и/или

d) постоянно активному мутанту полипептида (a), (b), (c) или (d);

е) изоформе, полученной посредством протеолитического процессинга полипептида (а), (b), (c), (d) или (е).

Под выражением "изоформа полипептида" понимают полипептид, который характеризуется по меньшей мере приблизительно 50, 55, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью аминокислотной последовательности к эталонной последовательности полноразмерного полипептида и характеризуется аналогичной биологической активностью. В контексте настоящей заявки процент идентичности рассчитывали с использованием глобального выравнивания последовательностей (т.е. две последовательности сравнивали по всей их длине). Способы сравнения идентичности двух или более последовательностей хорошо известны из уровня техники. Например, можно использовать программу "needle", использующую алгоритм глобального выравнивания последовательностей Нидлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970 J. Mol. Biol. 48:443-453) для нахождения оптимального выравнивания (с учетом гэпов) двух последовательностей по всей длине. Программа Needle является, например, доступной в сети Интернет на сайте ebi.ac.uk. Процент идентичности в соответствии с настоящим изобретением может быть рассчитан с использованием программы EMBOSS::needle (глобальной) с параметром "открытие гэпа", равным 10,0, параметром "продолжение гэпа", равным 0,5, и с матрицей Blosum62.

"Изоформа" также относится ко всем посттрансляционно модифицированным формам белка IL-8. Посттрансляционно модифицированные изоформы могут включать ацетилированные, формилированные, липоилированные, миристоилированные, пальмитоилированные, алкилированные, метилированные, амидированные, гликозилированные, гидроксильные, нитрозилированные, фосфорилированные, сульфатированные, полисиалированные и сиалированные формы.

"Эталонный уровень экспрессии IL-8" может быть определен как отдельное значение или диапазон значений, который определяют на основе уровня экспрессии IL-8, измеренного, например, в популяции здоровых субъектов или в популяции субъектов, нуждающихся в терапии афлиберцептом.

Согласно варианту осуществления эталонный уровень экспрессии IL-8 определяют на основе уровня экспрессии IL-8, измеренного в популяции субъектов, нуждающихся в терапии афлиберцептом.

Как правило, анализируемую популяцию можно разделить в процентилях на основе измеренного уровня экспрессии IL-8. Эталонный уровень можно определить как процентиль, который обеспечивает наилучшее разделение пациентов, страдающих от рака, для которых лечение афлиберцептом являлось эффективным, и пациентов, страдающих от рака, для которых лечение афлиберцептом являлось недостаточно эффективным для излечения.

В исследовании, описанном в примере 1 ниже, эталонный уровень экспрессии IL-8 составлял 19 пг/мл (77-й процентиль).

Однако эталонный уровень экспрессии IL-8 может варьировать i) в зависимости от размера исследуемой популяции и ii) в зависимости от способа, используемого для измерения экспрессии IL-8.

Уровень белка интерлейкина 8 можно определить, например, с использованием способов иммунологического выявления, таких как анализ ELISA. Способы включают антитело, которое связывается с белком интерлейкин 8, например моноклональное или поликлональное антитело, вариант или фрагменты антитела, такие как одноцепочечное антитело, диатело, минитело, одноцепочечный Fv-фрагмент (sc(Fv)), sc(Fv)₂ антитело, Fab-фрагмент, или F(ab')₂-фрагмент, или однодоменное антитело. Такие антитела хорошо известны из уровня техники и являются коммерчески доступными. В частности, их также можно получить посредством иммунизации животных (например, кроликов, крыс или мышей) белком интерлейкин 8. Антитела можно использовать для определения экспрессии белка в ряде иммунологических анализов, включающих системы конкурентного и неконкурентного анализа, использующие такие методики как вестерн-блоттинг, иммуногистохимический анализ/иммунофлуоресценция (т.е. определение белка в фиксированных клетках или тканях), радиоиммунологический анализ, такой как RIA (изотопный иммунологический анализ), ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ), иммунологические анализы по типу "сэндвич", реакция иммунопреципитации, реакция иммунодиффузии, реакция агглютинации, реакция связывания комплемента, иммунорадиометрические анализы, иммунофлуоресцентные анализы, например FIA (иммунологический флуоресцентный анализ), хемилюминесцентные иммунологические анализы, ECLIA (электрохемилюминесцентный иммунологический анализ) и иммунологические анализы с использованием белка А. Данные анализы являются стандартными и хорошо известны специалисту в данной области (Ausubel et al. (1994) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York).

Экспрессию белка интерлейкин 8 можно также определить посредством протеомного способа, такого как масс-спектрометрические анализы (LC-MS или LC-MS/MS). Качественные и количественные масс-спектрометрические методики известны и используются в уровне техники. Для этого целевые пептиды, специфические к маркерным белкам, выбирают и количественно определяют на основе калибровочных кривых, построенных по данным анализа синтетических пептидов, меченных стабильными изотопами. Продукты ферментативного расщепления, в которые добавляли определенное количество меченных изотопами целевых пептидов, анализировали посредством жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией. Соотношение меченных и немеченных целевых пептидов измеряли для

оценки концентраций целевых пептидов и, следовательно, концентрации маркерного белка.

Выражение "циркулирующий IL8" предназначено для обозначения белков IL8, присутствующих в крови, сыворотке и плазме крови.

"Субъект" или "пациент" может быть человеком или отличным от человека млекопитающим, таким как обезьяны, собаки, кошки, морские свинки, хомяки, кролики, коровы, лошади, козы и овца.

Фиг. 1 и 2 иллюстрируют взаимосвязь между уровнями IL8 и вероятностью прогрессирования заболевания. Приведенное на фигурах представляет собой вероятность прогрессирования заболевания после 12 месяцев по отношению к уровням IL-8 в плазме крови в начальный момент времени (фиг. 1) и различие между уровнями IL-8 в плазме крови в начальный момент времени и последней контрольной точкой до начала прогрессирования заболевания (фиг. 2). Вкратце, на фиг. 1 показано, что высокие уровни IL8 коррелируют с повышенной вероятностью прогрессирования заболевания и что данный эффект несколько больше выражен у пациентов, которых лечили афлиберцептом в сравнении с лечением FOLFOX. С другой стороны, на фиг. 2 показано, что повышение IL8 по отношению к начальному моменту времени также соответствует прогрессированию заболевания. Поскольку показатели повышения IL8 нанесены по логарифмической шкале, значения в диапазоне от -3 до 0 соответствуют повышению IL8, составляющему <1 пг/мл, где значения в диапазоне от 0 до 3 представляют показатели повышения, составляющие >1 пг/мл. Таким образом, данные показывают, что даже небольшое повышение IL8 по отношению к начальному моменту времени уже соответствует повышенной вероятности прогрессирования заболевания в группе с афлиберцептом.

Пример. Влияние интерлейкина 8 на PFS в исследовании AFFIRM. Исследование EFC10668 (AFFIRM).

EFC10668 планировали как рандомизированное, международное исследование, в котором сравнивали возникновение неблагоприятных эффектов у пациента с метастатическим колоректальным раком (MCRC), которого подвергали лечению с помощью

i) модифицированной FOLFOX6 (комбинации оксалиплатина, 5-фторурацила (5-FU) и фолиниевой кислоты), которую вводили внутривенно каждые 2 недели в качестве лечения первой линии (группа A); или

ii) афлиберцепта в дозе, составляющей 4 мг/кг, в сочетании с модифицированной FOLFOX6, которую вводили внутривенно каждые 2 недели в качестве лечения первой линии.

Схема введения

Пациентам вводили внутривенно либо афлиберцепт, после которого непосредственно вводили оксалиплатин, 5-фторурацил (5-FU) и фолиниевую кислоту (модифицированная схема FOLFOX6), либо модифицированную FOLFOX6 отдельно, в зависимости от группы, в которую их определяли.

Данное лечение повторяли каждые 2 недели до наступления прогрессирования (или неприемлемой токсичности, или отзыва согласия пациента).

Доза

Пациенты, которых рандомизировали в группу с афлиберцептом, получали 4 мг/кг IV каждые 2 недели.

Следующие лекарственные средства вводили пациентам в обеих группах лечения: оксалиплатин (Eloxatin®), фолиниевая кислота (также известная как лейковорин), 5-фторурацил.

Составы оксалиплатина, 5-фторурацила и фолиниевой кислоты: используемые продукты были в наличии в аптеке больницы/клиники.

Путь введения: IV.

Доза: оксалиплатин, фолиниевую кислоту и 5-фторурацил вводили согласно схеме mFOLFOX6 в следующих дозах:

85 мг/м² оксалиплатина в виде 2-часовой IV инфузии в день 1,

350 мг/м² фолиниевой кислоты в виде 2-часовой IV инфузии в день 1,

400 мг/м² 5-фторурацила в виде болюсного IV введения в день 1, а затем 2400 мг/м² в виде 46-часовой непрерывной IV инфузии, начиная в день 1.

В случае если площадь поверхности тела $>2,0$ м², то фактические дозы оксалиплатина и 5-FU приводили к максимальной BSA, составляющей 2,0 м², по соображениям безопасности. В случае тяжелой интоксикации планировали уменьшение дозы, и/или отсрочку введения препарата, и/или прекращение лечения. Модифицированную схему FOLFOX6 использовали после введения афлиберцепта.

Продолжительность лечения

Лечение конкретного пациента осуществляли до наступления прогрессирования или до тех пор, пока не наступит неприемлемая токсичность или пациент не отзовет свое согласие.

Продолжительность лечения составляла примерно 12 месяцев.

Демографические данные и характеристики исходного уровня

В табл. 1 ниже сравнивают демографические данные и характеристики пациентов в начальный момент времени между популяциями, которые оценивают в отношении биомаркеров и которые не оценивают в отношении биомаркеров.

"Популяция, которую оценивают в отношении биомаркеров" определена как популяция пациентов,

которые предоставляли образец крови/опухоли для оценки биомаркера; в то время как "популяция, которую не оценивают в отношении биомаркеров" относится к пациентам, которые не предоставляли образец крови/опухоли для оценки биомаркеров (например, пациенты, которые не давали согласие на исследование в отношении биомаркеров).

Все характеристики являются подобными между популяциями, за исключением региона происхождения пациентов: Восточная Европа обычно более широко представлена, а другие страны обычно представлены в меньшей степени в популяции, которую оценивают в отношении биомаркеров, по сравнению с популяцией, которую не оценивают в отношении биомаркеров.

Таблица 1. Обобщенные результаты демографических данных пациентов и характеристик пациентов в начальный момент времени - популяция, которую оценивают в отношении биомаркеров

	Популяция, которую не оценивают в отношении биомаркеров		Популяция, которую оценивают в отношении биомаркеров		p-значение
	mFolfox6 (N=57)	Афлибер-цепт/mFolf ox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Афлибер-цепт/mFolf ox6 (N=70)	
Пол [n (%)]					1,0000 ^a
Число	57	49	60	70	
Мужской	32 (56,1%)	33 (67,3%)	36 (60,0%)	43 (61,4%)	
Женский	25 (43,9%)	16 (32,7%)	24 (40,0%)	27 (38,6%)	
Возраст (лет)					0,2811 ^b
Число	57	49	60	70	
Медиана	66,0	62,0	62,0	62,5	
Среднее значение (SD)	63,7 (10,0)	61,8 (9,5)	61,3 (9,4)	61,7 (8,7)	
Минимум: Максимум	44: 87	29: 75	37: 81	41: 79	
Возрастная группа [n (%)]					0,2421 ^a
Число	57	49	60	70	
<65	27 (47,4%)	28 (57,1%)	38 (63,3%)	42 (60,0%)	
≥65 но <75	23 (40,4%)	20 (40,8%)	20 (33,3%)	25 (35,7%)	
≥75	7 (12,3%)	1 (2,0%)	2 (3,3%)	3 (4,3%)	

Раса [n (%)]					0,0640 ^a
Число	57	49	60	70	
Европеиды/белые	41 (71,9%)	37 (75,5%)	49 (81,7%)	60 (85,7%)	
Черные	0	0	0	1 (1,4%)	
Азиаты/представители восточной расы	16 (28,1%)	11 (22,4%)	11 (18,3%)	9 (12,9%)	
Другие	0	1 (2,0%)	0	0	
Регион					0,0029 ^a
Число	57	49	60	70	
Западная Европа	37 (64,9%)	30 (61,2%)	37 (61,7%)	45 (64,3%)	
Восточная Европа	3 (5,3%)	3 (6,1%)	12 (20,0%)	12 (17,1%)	
Другие страны	17 (29,8%)	16 (32,7%)	11 (18,3%)	13 (18,6%)	
BSA (м2)					0,1091 ^b
Число	57	49	60	70	
Медиана	1,8	1,8	1,8	1,8	
Среднее значение (SD)	1,7 (0,2)	1,8 (0,2)	1,8 (0,2)	1,8 (0,2)	
Минимум: Максимум	1: 2	1: 2	1: 2	1: 2	
Вес (кг)					0,0838 ^b
Число	57	49	60	70	
Медиана	67,6	70,0	73,2	71,4	
Среднее значение (SD)	67,3 (14,1)	71,1 (16,6)	74,0 (17,0)	71,5 (15,6)	
Минимум: Максимум	40: 107	40: 115	48: 134	40: 117	

^aсравнение показателей плотности распределения на основе точного критерия Фишера - 2-стороннего

^bС использованием дисперсионного анализа (типа 3) с факторами: ВЮРОР, ВЮРОР. Данные с пропущенными значениями для факторов или ответа исключили из статистических анализов

Плотность распределения ковариат сравнивали между популяциями, которые оценивают и которые не оценивают в отношении биомаркеров.

Примечание: Западная Европа= Германия, Италия, Испания, Соединенное Королевство; Восточная Европа= Российская Федерация; другие страны= Австралия, Корея.

Характеристики заболевания в начальный момент времени

Характеристики заболевания в начальный момент времени были аналогичными у двух популяций (см. табл. 2 и 3 ниже).

Таблица 2. Обобщенные результаты характеристик заболеваний при постановке первичного диагноза

	Популяция, которую не оценивают в отношении биомаркеров		Популяция, которую оценивают в отношении биомаркеров		р-значение
	mFolfox6 (N=57)	Афлибер-цент/мFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Афлибер-цент/мFolfox6 (N=70)	
Первичная локализация [n (%)]					0,7045 ^a
Число	57	49	60	70	
Толстая кишка	27 (47,4%)	26 (53,1%)	31 (51,7%)	33 (47,1%)	
Ректосигмовидный отдел ободочной кишки	9 (15,8%)	15 (30,6%)	16 (26,7%)	19 (27,1%)	
Прямая кишка	21 (36,8%)	8 (16,3%)	13 (21,7%)	18 (25,7%)	
Гистологический тип [n (%)]					
Число	57	49	60	70	
Аденокарцинома	57 (100%)	49 (100%)	60 (100%)	70 (100%)	
Определение стадии при постановке диагноза [n (%)]					0,2297 ^a
Число	56	48	57	68	
Стадия I	1 (1,8%)	0	2 (3,5%)	2 (2,9%)	
Стадия II	2 (3,6%)	1 (2,1%)	6 (10,5%)	4 (5,9%)	
Стадия III	5 (8,9%)	3 (6,3%)	3 (5,3%)	4 (5,9%)	
Стадия IV	48 (85,7%)	44 (91,7%)	46 (80,7%)	58 (85,3%)	
Время от постановки диагноза до рандомизации (месяцы) *					0,6620 ^b
Число	57	49	60	69	
Медиана	1,4	1,8	1,6	1,7	
Среднее значение (SD)	12,6 (30,9)	9,2 (16,9)	9,8 (19,8)	9,7 (17,5)	
Минимум: Максимум	0: 149	0: 80	0: 84	0: 80	

^aсравнение показателей плотности распределения на основе точного критерия Фишера - 2-стороннего

^bС использованием дисперсионного анализа (типа 3) с факторами: ВЮРОР, ВЮРОР

*Если день исходной даты постановки диагноза пропущен, то его рассматривают как первый день месяца

Данные с пропущенными значениями для факторов или ответа исключили из статистических анализов.

Плотность распределения ковариат сравнивали между популяциями, которые оценивают и которые не оценивают в отношении биомаркеров.

Таблица 3. Обобщенные результаты органов, пораженных в начальный момент времени

	Популяция, которую не оценивают в отношении биомаркеров		Популяция, которую оценивают в отношении биомаркеров		р-значение
	mFolfox6 (N=57)	Афлибер-цепт/mFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Афлибер-цепт/mFolfox6 (N=70)	
Число пораженных метастазами органов в начальный момент времени (за исключением первичной локализации) [n (%)]					0,1711 ^a
Число	57	49	60	70	
0	0	0	1 (1,7%)	0	
1	16 (28,1%)	15 (30,6%)	15 (25,0%)	12 (17,1%)	
>1	41 (71,9%)	34 (69,4%)	44 (73,3%)	58 (82,9%)	
Пораженные метастазами органы в начальный момент времени (за исключением первичной локализации) [n (%)]					
	57 (100%)	49 (100%)	59 (98,3%)	70 (100%)	
Печень	44 (77,2%)	42 (85,7%)	47 (78,3%)	57 (81,4%)	
Легкие	27 (47,4%)	18 (36,7%)	25 (41,7%)	28 (40,0%)	
Лимфатические узлы	26 (45,6%)	25 (51,0%)	30 (50,0%)	38 (54,3%)	
Мышцы/мягкие ткани	9 (15,8%)	6 (12,2%)	14 (23,3%)	10 (14,3%)	
Брюшина	8 (14,0%)	7 (14,3%)	8 (13,3%)	16 (22,9%)	
Плевра	5 (8,8%)	7 (14,3%)	2 (3,3%)	1 (1,4%)	
Надпочечники	2 (3,5%)	0	1 (1,7%)	1 (1,4%)	
Кости	2 (3,5%)	1 (2,0%)	4 (6,7%)	4 (5,7%)	
Почки	1 (1,8%)	0	0	0	
Селезенка	1 (1,8%)	1 (2,0%)	1 (1,7%)	1 (1,4%)	
Мочевой пузырь	0	0	1 (1,7%)	1 (1,4%)	

Пораженные метастазами органы в классе начального момента времени (за исключением первичной локализации) [n (%)]					0,3536 ^a
Число	57	49	60	70	
Метастазы в печени отсутствуют, или наличие метастазов в печени и других органах	49 (86,0%)	39 (79,6%)	51 (85,0%)	63 (90,0%)	
Метастазы только в печени	8 (14,0%)	10 (20,4%)	9 (15,0%)	7 (10,0%)	

^aсравнение показателей плотности распределения на основе точного критерия Фишера - 2-стороннего

*Проценты не суммируются (сумма больше чем 100%)

Данные с пропущенными значениями для факторов или ответа исключили из статистических анализов.

Плотность распределения ковариат сравнивали между популяциями, которые оценивают и которые не оценивают в отношении биомаркеров.

Оценка безопасности

А. Продолжительность воздействия.

В табл. 4 ниже показано, что пациентов в популяции, которую оценивают в отношении биомаркеров, подвергали лечению несколько дольше, чем пациентов в популяции, которую не оценивают в отношении биомаркеров (среднее число циклов 12, по сравнению с 9 или 10).

Отсутствовали различия в воздействии между группами, получающими лечение, в популяции, которую оценивают в отношении биомаркеров.

Таблица 4. Обобщенные результаты общего воздействия исследуемого лечения

	Популяция, которую не оценивают в отношении биомаркеров		Популяция, которую оценивают в отношении биомаркеров	
	mFolfox6 (N=56)	Афлибер-цент/мFolfox6 (N=49)	mFolfox6 (N=60)	Афлибер-цент/мFolfox6 (N=70)
Число циклов, которое получал пациент				
Сумма	614	572	770,0	865,0
Среднее значение (SD)	11,0 (7,0)	11,7 (9,5)	12,8 (7,0)	12,4 (7,9)
Медиана	10,0	9,0	12,0	12,0
Минимум: Максимум	1: 43	1: 44	3: 33	1: 42
Число циклов, которое получал пациент				
1	2 (3,6%)	3 (6,1%)	0	2 (2,9%)
2	2 (3,6%)	2 (4,1%)	0	2 (2,9%)
3	3 (5,4%)	1 (2,0%)	2 (3,3%)	2 (2,9%)
4	3 (5,4%)	4 (8,2%)	5 (8,3%)	8 (11,4%)
5	1 (1,8%)	0	1 (1,7%)	2 (2,9%)
6	1 (1,8%)	6 (12,2%)	0	4 (5,7%)
7	1 (1,8%)	5 (10,2%)	1 (1,7%)	3 (4,3%)
8	6 (10,7%)	1 (2,0%)	11 (18,3%)	2 (2,9%)
9	6 (10,7%)	3 (6,1%)	0	5 (7,1%)
10	5 (8,9%)	2 (4,1%)	4 (6,7%)	3 (4,3%)
11-15	16 (28,6%)	11 (22,4%)	21 (35,0%)	13 (18,6%)
16-20	7 (12,5%)	4 (8,2%)	6 (10,0%)	14 (20,0%)
21-25	1 (1,8%)	3 (6,1%)	5 (8,3%)	6 (8,6%)
>25	2 (3,6%)	4 (8,2%)	4 (6,7%)	4 (5,7%)
Продолжительность воздействия (недель)				
Число	56	49	60	70
Среднее значение (SD)	25,2 (16,0)	27,5 (22,4)	29,5 (16,4)	28,7 (18,7)
Медиана	24,1	23,1	27,3	25,4
Минимум: Максимум	2: 95	2: 106	6: 77	2: 88

Продолжительность воздействия= ((первая дата последнего цикла+14) - первая дата первого цикла)/7

SD: стандартное отклонение

В. Анализ показателей плазмы крови.

Концентрацию 27 цитокинов, факторов роста или растворимых рецепторов в плазме крови определяли с помощью конкурентного твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) с использованием двух наборов Fluorokine® MAP (панели А ангиогенеза человека и высокочувствительной панели цитокинов человека; R&D Systems). Конкурентные эксперименты проводили для исследования взаимосвязи афлиберцепта с выявлением VEGF-A, VEGF-D и плацентарного фактора роста (PlGF). Ангиопоэтин-2 (ANGPT2), SDF1- α , HGF, VEGF-C, растворимый VEGF рецептор 3 (sFLT4, sVEGFR3) и sVEGFR2 оценивали с помощью отдельного ELISA (R&D Systems). Маркеры в плазме крови анализировали в началь-

ный момент времени, в дни 30 и 60 после первой инфузии исследуемого препарата и через 30 дней после последней инфузии афлиберцепта.

Статистический анализ

Различия между пациентами, которых оценивают в отношении биомаркеров, и пациентами, которых не оценивают в отношении биомаркеров, определяли с использованием двухстороннего точного критерия Фишера для дискретных переменных и дисперсионного анализа для непрерывных переменных. Биомаркеры анализировали в виде количественных переменных посредством кодирования отсутствия или присутствия соматической мутации в виде 0 или 1 и SNP генотипов в виде 0, 1 или 2, в зависимости от числа присутствующих минорных аллелей. Линейные эффекты биомаркеров начального момента времени в отношении показателя PFS оценивали с использованием модели пропорциональных рисков Кокса со следующими независимыми ковариатами: общее состояние (0-1 против 2) по шкале Восточной объединенной группы онкологов (ECOG), метастазы только в печени (да/нет) и число органов с отдаленными метастазами (1 против >1), влияние лечения, влияние биомаркера и влияние взаимосвязи биомаркер-лечение. Значимость последних двух влияний исследовали одновременно с использованием критерия Вальда с двумя степенями свободы. Дополненные статистические методики описаны в дополнительных методиках.

Результаты

Из 236 пациентов популяции ИТТ в клиническом исследовании AFFIRM 227 (96%) оценивали в отношении ответа. Из них 130 (57%) предоставили по меньшей мере один биологический образец, 60 (46%) и 70 (54%) из которых участвовали в группах mFOLFOX6 и mFOLFOX6 плюс афлиберцепт соответственно. Отсутствовало существенное различие в уровне ложноположительных результатов (FDR)-скорректированного Р-значения, составляющего 0,05, между пациентами, которые предоставляли биологический образец, и теми, которые его не предоставили, с учетом биометрических характеристик пациентов, этнической принадлежности и характеристик заболеваний в начальный момент времени или в конечных точках эффективности и безопасности (табл. 1). Из тех, кто предоставил по меньшей мере один биологический образец, 51 (39%) предоставили образцы для анализа каждого из 3 типов биомаркеров, при этом 88 (68%) и 97 (74%) пациентов предоставили образцы для анализа 2 или 1 типов биомаркера соответственно. Каждый тип биомаркера анализировали по отдельности с тем, чтобы исключить группы пациентов, которые были слишком маленькими для субанализа.

Анализ показателей плазмы крови в отношении эффективности

Уровни 27 маркеров в плазме крови измеряли в разные моменты времени (т.е. на начальный момент времени 87 пациентов; через 30 и 60 дней после начала лечения 82 и 73 пациента; и через 30 дней после последнего лечения 56 пациентов), как указано в табл. 5.

Таблица 5. Число наблюдений на момент времени - всего, ниже предела количественного определения (LOQ) и выявления (LOD)

	Начальный момент времени			День 30			День 60			ЕОТ+30 дней		
	Общее количество	<LOQ	<LOD	Общее количество	<LOQ	<LOD	Общее количество	<LOQ	<LOD	Общее количество	<LOQ	<LOD
ANGPT1	87	1	1	80	1	0	73	0	0	56	0	0
ANGPT2	86	1		82	1		72	0		55	1	
CSF2	84	28	17	80	38	16	72	32	17	54	25	16
CXCL12	86	0	0	82	2	2	72	0	0	55	0	0
FGF1	87	14	14	80	16	16	73	18	18	56	8	8
Эндостатин	87			80			73			56		
FGF2	87	19	11	80	20	15	73	19	11	56	10	5
FIGF	87	12	12	80	4	4	73	1	1	56	1	1
HGF	86	0	0	82	7	7	72	1	1	55	1	1
IFNG	84	6	4	80	8	3	72	6	2	54	11	8
IL10	84	0	0	80	1	1	72	2	2	54	0	0
IL12	84	3	3	80	1	1	72	3	3	54	8	7
IL1B	84	1	1	80	0	0	72	1	1	54	4	4
IL2	84	3	2	80	3	1	72	1	1	54	8	6
IL4	84	2	2	80	1	1	72	2	2	54	7	7
IL5	84	2	1	80	3	0	72	1	0	54	1	1
IL6	84	0	0	80	2	1	72	0	0	54	1	1
IL8	84	0	0	80	1	1	72	0	0	54	0	0
PGF	87	8	8	80	6	6	73	2	2	56	1	1
TNF	84	2	1	80	2	1	72	1	0	54	2	1
PDGFA	87			80			73			56		
VEGFA	84	6	1	80	4	1	72	2	0	54	4	0
PDGFB	87			80			73			56		
VEGFC	86	1	1	82	0	0	72	0	0	55	1	0
sFLT4	86	0	0	82	7	7	72	1	1	55	1	1
THBS2	87			80			73			56		
sKDR	86	0	0	82	7	7	72	1	1	55	1	1

Все цитокины измеряли в пг/мл, однако задействовали некоторые преобразования, когда было необходимо получить симметрическое распределение или меньшие числовые значения (нг/мл) для ассоциативных моделей, как представлено в табл. 6.

Таблица 6. Выбранные преобразования исходных уровней цитокинов в плазме крови (пг/мл)

Цитокин	Преобразование
ANGPT1	логарифм
ANGPT2	логарифм
CSF2	квадратный корень
CXCL12	нг/мл
FGF1	кубический корень
Эндостатин	логарифм
FGF2	квадратный корень
FIGF	кубический корень
HGF	логарифм
IFNG	квадратный корень
IL10	кубический корень
IL12	отсутствует
IL1B	кубический корень
IL2	квадратный корень
IL4	отсутствует
IL5	логарифм
IL6	логарифм
IL8	логарифм
PGF	нг/мл
TNF	квадратный корень
PDGFA	логарифм
VEGFA	логарифм
PDGFB	логарифм
VEGFC	логарифм
sFLT4	квадратный корень (нг/мл)
THBS2	логарифм
sKDR	квадратный корень (нг/мл)

Мы оценивали ассоциацию каждого маркера в плазме крови в начальный момент времени с показателем PFS, принимая во внимание при этом взаимосвязь с лечением (табл. 7). Наиболее низкое P-значение получили для IL8 (P=0,0211; FDR=0,596 и P=0,0218 для взаимосвязи).

Таблица 7. Влияние биомаркеров в плазме крови в начальный момент времени на PFS

Белок	Сочетанное влияние	P-значения		
		FDR-скорректированное сочетанное влияние	Влияние уровня маркеров в плазме крови	Эффект взаимосвязи уровня маркеров в плазме крови и лечения
IL8	0,0221	0,5962	0,6701	0,0218
THBS2	0,1408	0,6523	0,0545	0,2234
CXCL12	0,1610	0,6523	0,0573	0,1640
IL10	0,1669	0,6523	0,0647	0,1311
Ang1	0,1768	0,6523	0,0724	0,0831
FIGF	0,1974	0,6523	0,6826	0,1704
FGF2	0,2063	0,6523	0,1722	0,0768
sVEGFR2	0,2171	0,6523	0,1616	0,0812
PDGFA	0,2474	0,6523	0,1155	0,1052
IL6	0,2689	0,6523	0,1061	0,1838
FGF1	0,3185	0,6523	0,4759	0,1536
VEGF-A	0,3202	0,6523	0,2549	0,7133
CSF2	0,3272	0,6523	0,4278	0,1679
IL12	0,3587	0,6523	0,3664	0,1808
IFNg	0,3855	0,6523	0,8662	0,2984
IL4	0,3866	0,6523	0,7326	0,4796
PlGF	0,5008	0,7955	0,3018	0,2595
PDGFB	0,5442	0,8163	0,4795	0,2963
IL1B	0,6025	0,8439	0,3183	0,3595
HGF	0,6286	0,8439	0,3369	0,5093
IL2	0,6564	0,8439	0,7696	0,4093
Эндостатин	0,9021	0,9783	0,7429	0,9824
sFLT4	0,9063	0,9783	0,6849	0,8668
TNF	0,9461	0,9783	0,8736	0,7442
Ang2	0,9698	0,9783	0,9279	0,9747
VEGF-C	0,9772	0,9783	0,8375	0,8307
IL5	0,9783	0,9783	0,8813	0,8501

Показаны P-значения, ассоциированные с сочетанным влиянием, FDR-корректированным сочетанным влиянием, влиянием биомаркеров в плазме крови и эффектом взаимосвязи биомаркера и лечения.

Модель регрессии Кокса предполагает линейную взаимосвязь маркера в плазме крови и логарифма функции риска PFS, но поскольку эта гипотеза может быть нарушена при проведении анализа маркеров в непрерывном режиме, которые значительно изменяются, пороговый эффект может быть более релевантным. Мы изучили данную возможность посредством поиска оптимального порога отсечения, который максимально увеличивает взаимосвязь лечения и уровня маркера в плазме крови. Для IL8 оптимальный порог отсечения был на уровне 19 пг/мл (77-й перцентиль). Модель, в которой IL8 анализировали в качестве двоичной переменной с данным порогом, подходила в большей степени, чем модель с непрерывным анализом уровней IL8 (AIC 469,3 против 477,6). Пациенты с низкими уровнями IL8 (≤ 19 пг/мл, 77% пациентов) характеризовались более длительным показателем PFS в группе с афлиберцептом/mFLOFOX6, чем в группе с mFOLFOX6 (табл. 8).

Таблица 8. Оценка влияния биомаркеров согласно методике Каплана-Мейера на PFS в месяцах

	mFOLFOX6 Медиана (99% CI)	Афлиберцепт плюс mFOLFOX6 Медиана (99% CI)	Соотношение рисков в сравнении с mFOLFOX6 (99% CI)
Белки-маркеры в плазме крови			
Все пациенты	8,8 (6,57- 10,02)	8,5 (6,67-10,05)	0,979 (0,505-1,897)
IL8 ≤ 19 пг/мл	8,8 (5,62- 10,91)	9,3 (7,52-11,10)	0,764 (0,363-1,607)
IL8 > 19 пг/мл	8,8 (5,09- 15,64)	4,1 (2,33-8,54)	2,71 (0,735-9,984)

CI, доверительный интервал; mt, мутант; wt, дикий тип.

Мы также анализировали, можно ли было по изменениям маркеров в плазме крови, связанным с лечением, прогнозировать результат лечения афлиберцептом. Модель Кокса включала влияние уровней биомаркеров в плазме крови в начальный момент времени и различие в экспрессии, которую измеряли в начальный момент времени и в последний момент времени перед прекращением лечения, началом прогрессирования заболевания или летальным исходом (т.е. в дни 30 или 60 лечения), принимая во внимание взаимосвязь с группой пациентов, получающих лечение. IL8 являлся единственным маркером со значимым влиянием при изменении от начального момента времени в отношении показателя PFS (P=0,0018; FDR=0,0478; табл. 9). Данный эффект не отличался между группами пациентов, получающих лечение (P=0,2028). Высокие уровни IL8 в начальный момент времени или повышенные уровни IL8 после начального момента времени соответствовали более высокой вероятности прогрессирования заболевания в момент времени 12 месяцев (фиг. 1 и 2).

Таблица 9. Влияние изменений уровней маркеров в плазме крови от начального момента времени на показатель PFS

Белок	P-значения			
	Сочетанное влияние	Сочетанное влияние FDR-скорректированное	Изменение от влияния в начальный момент времени	Эффект взаимосвязи уровня маркеров в начальный момент времени и лечения
IL8	0,0018	0,0478	0,0006	0,2028
IL10	0,0342	0,4525	0,5214	0,8204
VEGFA	0,0619	0,4525	0,0189	0,0704
CXCL12	0,0670	0,4525	0,1714	0,0318
CSF2	0,0855	0,4619	0,0266	0,1682
VEGFC	0,1127	0,5072	0,0742	0,9355
IL5	0,1886	0,7275	0,0684	0,1657
Эндостатин	0,2418	0,7882	0,9988	0,2668
PDGFA	0,3092	0,7882	0,1508	0,9922
TNF	0,3209	0,7882	0,1770	0,1554
IL4	0,3211	0,7882	0,1938	0,7631
FGF2	0,3851	0,8191	0,6468	0,3957
sFLT4	0,3944	0,8191	0,2533	0,1729
THBS2	0,4677	0,8426	0,2387	0,6683
FGF1	0,4770	0,8426	0,4669	0,2242
PGF	0,4993	0,8426	0,2501	0,2755
ANGPT2	0,5638	0,8924	0,3373	0,8394
IL1B	0,6261	0,8924	0,3345	0,5414
PDGFB	0,6583	0,8924	0,3730	0,6009
IL12	0,6611	0,8924	0,7934	0,7744
IL2	0,7984	0,9482	0,9352	0,6027
sKDR	0,8375	0,9482	0,6009	0,5613
HGF	0,8383	0,9482	0,5804	0,5665
IFNG	0,8559	0,9482	0,6923	0,9101
ANGPT1	0,8814	0,9482	0,6269	0,8538
FIGF	0,9131	0,9482	0,6838	0,7528
IL6	0,9963	0,9963	0,9893	0,9594

Показаны P-значения (и FDR) сочетанного влияния маркеров в плазме крови и лечения при взаимо-

связи маркеров в плазме крови. Также представлены Р-значения для изменения от начального момента времени и взаимосвязь.

Когда биомаркеры в плазме крови измеряли только в начальный момент времени, IL8 оказывал наиболее значительное влияние на показатель PFS, что было лучше всего описано в виде порогового влияния с высоким уровнем циркулирующего в крови IL8 ($IL8 > 19$ пг/мл), связанным с более коротким показателем PFS у пациентов, которых лечили афлиберцептом.

Когда биомаркеры в плазме измеряли в начальный момент времени и в ходе лечения, высокие уровни циркулирующего в крови IL8 в начальный момент времени вместе с повышенными уровнями IL8, измеренными в ходе лечения, были значимо связаны со сниженным показателем PFS ($FDR=0,0478$).

Выводы

Мы установили, что высокие уровни IL8 в начальный момент времени связаны с более короткими показателями времени выживаемости, и пациенты с повышающимися в ходе лечения уровнями IL8 более подвержены прогрессированию заболевания.

Это свидетельствует о том, что пациенты с высокими уровнями IL8 в начальный момент времени или в ходе лечения подвергаются повышенному риску прогрессирования заболевания в ходе терапии афлиберцептом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения того, является ли пациент, предположительно страдающий от рака, кандидатом для терапии афлиберцептом указанного рака, предусматривающий стадию проведения по меньшей мере одного анализа биологического образца пациента для измерения уровня IL-8 в начальный момент времени, где, если уровень IL-8 в биологическом образце ниже эталонного уровня экспрессии IL-8, то пациента определяют как кандидата для указанной терапии, где эталонный уровень экспрессии IL-8 находится в диапазоне приблизительно от 10 до приблизительно 30 пг/мл.

2. Способ определения того, является ли пациент, предположительно страдающий от рака, кандидатом для терапии афлиберцептом указанного рака, предусматривающий стадию проведения по меньшей мере одного анализа биологического образца пациента для измерения уровня IL-8 в начальный момент времени, где, если уровень IL-8 в биологическом образце выше эталонного уровня экспрессии IL-8, то пациента определяют как не являющегося кандидатом для указанной терапии, где эталонный уровень экспрессии IL-8 находится в диапазоне приблизительно от 10 до приблизительно 30 пг/мл.

3. Способ лечения пациента с раком, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества афлиберцепта пациенту, которого определили как кандидата для терапии афлиберцептом согласно способу по п.1.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где уровень, измеренный по отношению к эталонному уровню экспрессии IL-8, составляет приблизительно 19 пг/мл.

5. Способ лечения рака афлиберцептом, предусматривающий стадии:
введение афлиберцепта пациенту, предположительно страдающему от рака;
определение уровня интерлейкина-8 (IL-8) в биологическом образце пациента,
где повышение уровня интерлейкина-8 (IL-8) свидетельствует о необходимости снизить количество афлиберцепта при последующих введениях.

6. Способ оценки риска обеспечения возможности безопасного применения афлиберцепта в лечении пациента, предположительно страдающего от рака, при этом указанный способ предусматривает следующие стадии:

(a) определение уровня интерлейкина-8 (IL-8) в биологическом образце от пациента до начала лечения афлиберцептом;

(b) определение уровня интерлейкина-8 (IL-8) в биологическом образце от пациента в ходе лечения;

(c) сравнение уровня интерлейкина-8 (IL-8), определенного на стадии (b), с уровнем, определенным на стадии (a),

при этом более высокий уровень интерлейкина-8 (IL-8) в образце из стадии (b) по сравнению с уровнем в образце из стадии (a) свидетельствует о необходимости проведения мониторинга пациента.

7. Способ по любому из пп.1-6, где биологический образец выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки и плазмы крови.

8. Способ по любому из пп.1-6, где рак представляет собой рак толстого кишечника, колоректальный рак или рак прямой кишки.

9. Способ по п.8, где колоректальный рак представляет собой метастатический колоректальный рак.

10. Способ по любому из пп.1-6, где определяемый уровень интерлейкина-8 (IL-8) представляет собой уровень циркулирующего в крови интерлейкина-8.

11. Способ по п.3 или 4, причем указанный способ предусматривает дополнительное введение указанному пациенту терапевтически эффективных количеств оксалиплатина, 5-фторурацила (5-FU) и фолиевой кислоты.

12. Способ по п.3 или 4, где указанный способ предусматривает дополнительное введение указан-

ному пациенту терапевтически эффективных количеств фолиниевой кислоты, и/или 5-фторурацила (5-FU), и/или ириноцетана.

13. Способ по п.3 или 4, где указанного пациента ранее подвергали лечению с помощью терапии на основе оксалиплатина или бевацизумаба.

14. Способ по п.3 или 4, где химиотерапия, лучевая терапия или хирургическое вмешательство у указанного пациента были неудачными.

15. Способ по п.3 или 4, где пациенту вводят фолиниевую кислоту в дозе, находящейся в диапазоне от 200 до 600 мг/м², 5-фторурацил (5-FU) в дозе, находящейся в диапазоне от 2000 до 4000 мг/м², ириноцетан в дозе, находящейся в диапазоне от 100 до 300 мг/м², и афлиберцепт в дозе, находящейся в диапазоне от 1 до 10 мг/кг.

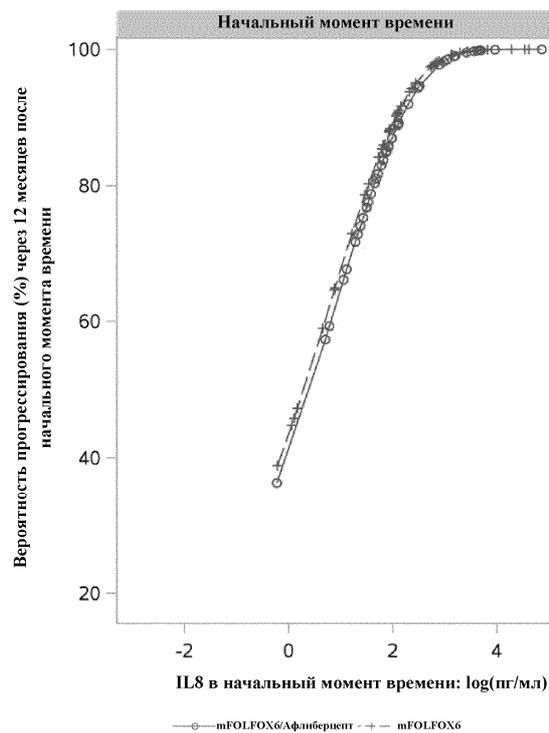
16. Способ по п.3 или 4 и п.15, где пациенту вводят фолиниевую кислоту в дозе, составляющей приблизительно 400 мг/м², 5-фторурацил (5-FU) в дозе, составляющей приблизительно 2800 мг/м², ириноцетан в дозе, составляющей приблизительно 180 мг/м², и афлиберцепт в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг.

17. Способ по п.3 или 4, п.15 и 16, где фолиниевую кислоту вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 400 мг/м², 5-фторурацил (5-FU) вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 2800 мг/м², ириноцетан вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 180 мг/м², и афлиберцепт вводят внутривенно в дозе, составляющей приблизительно 4 мг/кг, и при этом комбинацию вводят каждые две недели.

18. Способ по п.3 или 4 и пп.15-17, где фолиниевую кислоту, 5-фторурацил (5-FU), ириноцетан и афлиберцепт вводят внутривенно каждые две недели в течение периода, находящегося в диапазоне от 9 до 18 недель.

19. Способ по п.3 или 4 и пп.15-18, где фолиниевую кислоту вводят внутривенно непосредственно после введения афлиберцепта.

20. Способ по п.3 или 4 и пп.15-19, где фолиниевую кислоту вводят внутривенно непосредственно после введения афлиберцепта в течение периода, составляющего приблизительно 2 ч.



Фиг. 1

