



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102667472 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201080047359. 4

(22) 申请日 2010. 06. 03

(30) 优先权数据

61/253, 036 2009. 10. 19 US

12/645, 355 2009. 12. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 04. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/037187 2010. 06. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/049645 EN 2011. 04. 28

(73) 专利权人 AVEO 制药公司

地址 美国马萨诸塞

(72) 发明人 林杰 冯斌 M·鲁滨逊 蒋锋

孙晓健

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 袁泉

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2008182255 A1, 2008. 07. 31,

US 2009215053 A1, 2009. 08. 27,

US 2009061422 A1, 2009. 03. 05,

CN 1945333 A, 2007. 04. 11,

C. Campas et al.. Tivozanib. 《Drugs of the Future》. 2009, 第 34 卷 (第 10 期), 第 793-796 页.

Cherifa Ayari et al.. Bladder Tumor Infiltrating Mature Dendritic Cells and Macrophages as Predictors of Response to Bacillus Calmette-Guerin Immunotherapy. 《European Urology》. 2009, 第 55 卷第 1386-1386 页.

审查员 肖吉

权利要求书1页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

Tivozanib 应答预测

(57) 摘要

本发明公开了预测人肿瘤对于使用 tivozanib(AV-951) 的治疗具有敏感性或抗性的诊断方法。该方法基于测量来自肿瘤的组织样品中巨噬细胞的含量。巨噬细胞含量的测量可基于对巨噬细胞标记物基因表达的分析, 例如通过 RNA 分析或免疫组织化学方法。

1. 用于测量 CD68 多肽表达或 CD68 mRNA 表达的试剂在制备用于鉴定肿瘤对使用 tivozanib 的治疗的抗性的试剂盒中的用途,所述试剂盒用在如下方法中,该方法包括:

(a) 通过使用所述试剂测量获得自考虑使用 tivozanib 进行治疗的人类患者的肿瘤的组织样品中 CD68 多肽表达或 CD68 mRNA 表达来测量巨噬细胞的含量,从而测定巨噬细胞值;和

(b) 将步骤 (a) 中测量的巨噬细胞值与通过使用所述试剂测量获得自之前用 tivozanib 进行治疗并对 tivozanib 显示具有抗性的人类患者和之前用 tivozanib 进行治疗并对 tivozanib 显示具有敏感性的人类患者的肿瘤的组织样品中 CD68 多肽表达或 CD68 mRNA 表达而确定的阈值进行比较;

其中,巨噬细胞值在阈值之上则表明该肿瘤对于使用 tivozanib 的治疗具有抗性。

2. 根据权利要求 1 的用途,其中所述试剂盒在下述方法中使用,所述方法包括 (a) 通过测量 CD68 多肽表达来测量巨噬细胞的含量并且 (b) 将步骤 (a) 中测量的巨噬细胞值与通过测量 CD68 多肽表达而确定的阈值进行比较。

3. 根据权利要求 1 的用途,其中所述试剂盒在下述方法中使用,所述方法包括 (a) 通过测量 CD68 mRNA 表达来测量巨噬细胞的含量并且 (b) 将步骤 (a) 中测量的巨噬细胞值与通过测量 CD68 mRNA 表达而确定的阈值进行比较。

4. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中通过免疫组织化学进行测量 CD68 多肽表达的步骤。

5. 根据权利要求 1 — 3 中任一项的用途,其中阈值的确定包括受试者工作特征曲线分析。

6. 根据权利要求 1 — 3 中任一项的用途,其中肿瘤选自乳腺肿瘤、肺肿瘤、肾肿瘤、结肠直肠肿瘤和胰腺肿瘤。

7. 根据权利要求 1 或 2 的用途,其中所述试剂是抗 CD68 抗体。

Tivozanib 应答预测

[0001] 对于相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 12 月 22 日提交的美国专利申请号 12/645,355 和 2009 年 10 月 19 日提交的美国临时专利申请号 61/253,036 的权益和优先权,以上申请的全部内容通过参考并入本文。

[0003] 发明的技术领域

[0004] 本发明的领域为分子生物学、肿瘤学和临床诊断学。

[0005] 发明的背景技术

[0006] 多数的癌症药物对于一些患者有效,而对于其他患者却没有效果。这是由肿瘤间的基因差异造成的,并且甚至在同一个患者的肿瘤之间也能观测到这种现象。不同的患者应答对于靶向治疗尤为显著。因此,在没有合适的测试用于测定哪些药物对于哪些患者有益的情况下,靶向治疗的整体潜在价值无法实现。根据国立卫生研究院 (NIH),将“生物标记物”定义为“能够客观地进行测量并评估的、作为正常生物学过程或致病过程的指示物或者对于治疗干预的药理学应答的特征”。

[0007] 基于发现生物标记物的改进诊断学的发展,通过提前鉴定哪些患者更可能对于给定的药物显示出临床应答,因而对于加快新药的开发具有潜在的价值。这将显著地减小临床试验的规模、时长和成本。如基因组学、蛋白质组学和分子成像的技术目前能够实现快速、灵敏且可靠地检测特定基因突变、特定基因的表达水平和其它分子生物标记物。尽管可应用检测各种肿瘤分子特征的技术很多,但由于已经发现的癌症生物标记物非常少,使得癌症生物标记物的临床应用在很大程度上还未实现。例如,近来的一篇综述文章说:

[0008] 迫切需要加快生物标记物和其应用的发展以促进对于癌症的诊断和治疗 (Cho, 2007, *Molecular Cancer* 6 :25.)。

[0009] 近来的另一篇关于癌症生物标记物的综述文章包括以下内容:

[0010] 挑战在于发现癌症生物标记物。尽管通过使用分子靶向试剂,对于几种肿瘤类型 (如慢性粒细胞性白血病、肠胃间质瘤、肺癌和多形性胶质母细胞瘤) 的分子靶向确定的亚群已经取得临床上的成功,但缺乏在患者中对靶向试剂评估的有效策略严重限制了更广泛地应用这些成功的范例。问题主要在于无法选择进行临床试验的分子上确定的癌症的患者以评估已经存在的这些新药物。解决的方法就需要能够可靠地确定非常有可能受益于特定试剂的患者的生物标记物 (Sawyers, 2008, *Nature* 452 :548-552, at 548.)。

[0011] 如以上的评论表明认识到需要发现临床可使用的生物标记物和基于这些生物标记物的诊断方法。

[0012] 存在三种不同类型的癌症生物标记物:(1) 预后生物标记物;(2) 预测性生物标记物和 (3) 药效 (PD) 生物标记物。预后生物标记物用于区分癌症,例如实体瘤,其根据攻击性,即生长和 / 或转移的速度,和对治疗的折射性 (refractiveness)。这有时也称为区分“结果好”肿瘤和“结果差”肿瘤。预测性生物标记物用于评估特定的患者受益于特定药物的治疗的可能性。例如,其中扩增 ERBB2 (HER2 或 NEU) 基因的乳腺肿瘤患者可能受益于使用曲妥珠单抗 (HERCEPTIN[®]) 的治疗,而没有 ERBB2 基因扩增的患者不太可能受益于使用

曲妥珠单抗的治疗。PD 生物标记物是患者服药时药物对患者的有效性的指示。相应地,在新药的临床开发早期阶段,经常使用 PD 生物标记物指导剂量水平和服药的频率。对于生物标记物的讨论,见例如 Sawyers, 2008, Nature 452 :548-552。

[0013] Tivozanib(也称为 AV-951) 是 VEGF 受体 1、2、3 的有效的和选择性的小分子抑制剂。Tivozanib 显示出对于全部三种受体的皮摩尔级的抑制活性,并且其在临床前模型中显示出抗肿瘤活性(Nakamura et al., 2006, Cancer Res. 66 :9134-9142)。在 272 名患者的 2 期临床实验中, Tivozanib 已经得到积极的中间结果(Bhargava et al., 2009, ASCO Genitourinary Cancers Symposium, Abstract No. 283)。

[0014] 尽管对于 VEGF 靶向治疗进行了大量的临床前和临床研究,但是对于抗-VEGF 试剂的抗肿瘤活性的机理还没有完全了解。对于其它类型的靶向治疗,一些而非全部的患者受益于使用 tivozanib 治疗。VEGF 生物学的复杂性使得 tivozanib 对于任何给定肿瘤的作用难以预测。因此,需要基于能够用于确定肿瘤患者可能(或者没有可能)对使用 tivozanib 的治疗应答的预测性生物标记物的诊断方法。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明部分基于在发现来自哺乳动物肿瘤的组织样品中升高的巨噬细胞含量(例如增加的巨噬细胞数量或巨噬细胞标记物表达的升高,例如巨噬细胞标记物蛋白表达的增加或编码巨噬细胞标记物蛋白的 mRNA 表达量的增加)与对于使用 tivozanib 的治疗的抗性相关。相应地,本发明提供鉴定肿瘤可能对使用 tivozanib 的治疗具有抗性的方法。该方法包括:(a) 测量来自肿瘤的组织样品中巨噬细胞的含量,从而测定巨噬细胞值;和(b) 将巨噬细胞值与阈值确定分析所确定的阈值进行比较。巨噬细胞值大于阈值说明肿瘤可能对使用 tivozanib 的治疗具有抗性。巨噬细胞值小于阈值则说明肿瘤可能对使用 tivozanib 的治疗具有应答性。

[0017] 在本发明一些实施方式中,通过测量巨噬细胞标记物蛋白质的存在或量实现对巨噬细胞含量的测量。在其它实施方式中,通过测量给定的细胞群中巨噬细胞的数量实现对巨噬细胞含量的测量。例如,可以采用涉及检测巨噬细胞标记物蛋白的免疫组织化学实现对巨噬细胞含量的测量。在另一个实施方式中,通过测量编码巨噬细胞标记物蛋白的 mRNA 存在或量实现对巨噬细胞含量的测量。巨噬细胞标记物蛋白的实例包括 CCR2、CD14、CD68、CD163、CSF1R 和 MSR1。阈值确定分析包括受试者工作特征曲线分析。本发明的方法可用于测试多种类型的肿瘤,例如乳腺肿瘤、肺肿瘤、肾肿瘤、结肠直肠肿瘤和胰腺肿瘤。

[0018] 附图的简要描述

[0019] 图 1 是显示 26 个单独的小鼠乳腺肿瘤的巨噬细胞值(%)的条形图,根据巨噬细胞含量由小到大排列。前八个肿瘤(由左至右)被分类为实施例 1 中所描述的对使用 tivozanib 的治疗应答(tivozanib 敏感性肿瘤)。剩下的 18 个被分类为实施例 1 中所描述的对使用 tivozanib 的治疗不应答(tivozanib 抗性肿瘤)。误差条说明标准误差(n = 3)。用 MSR1-阳性细胞或 F4/80-阳性细胞(通过 IHC 测定的)除以细胞总数再乘以 100% 来计算巨噬细胞值(%)。

[0020] 图 2 是图 1 中 tivozanib 敏感性肿瘤和图 1 中 tivozanib 抗性肿瘤的平均巨噬细胞值(给定样品中 MSR1-阳性细胞或 F4/80-阳性细胞除以细胞总数的比例)的条形图。在 tivozanib 敏感性肿瘤中,平均巨噬细胞比例为 8.2% ± 3.3%。在 tivozanib 抗性肿瘤

中,平均巨噬细胞比例为 $36.4\% \pm 13.4\%$ 。

[0021] 图 3 是显示当通过 IHC 分析小鼠乳腺肿瘤连续切片时,MSR1- 阳性细胞数量或 F4/80- 阳性细胞数量之间的高度相关性 ($R^2 = .944$) 的线性回归图 ($y = 1.439x + 6.468$)。

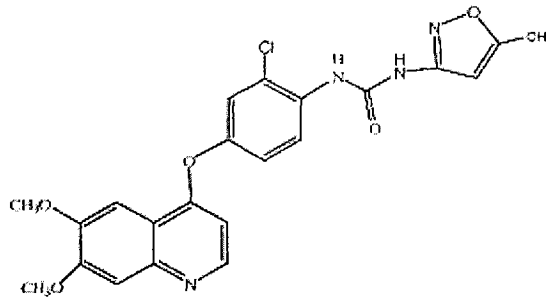
[0022] 图 4 是显示线性回归趋势线的散点图。线性回归分析说明了通过 CD68 IHC 测量的巨噬细胞含量与人肾细胞癌对于使用 tivozanib 的治疗的应答的高度相关性。在 21 位测试的患者中, Rho 的值为 0.52, $p = 0.017$ (Spearman 相关)。这表明观察到的表达 CD68 细胞标记物的细胞数量余越大,肿瘤对 tivozanib 的抗性越强。实线表示线性回归。

[0023] 发明的详细描述

[0024] 定义

[0025] 这里所使用的“AV-951”和“t ivozanib”指 N-{2- 氯 -4[(6,7- 二甲氧基 -4- 喹啉) 氧]- 苯基}-N'-(5- 甲基 -3- 异噁唑基) 脲,其具有如下的化学结构,并包括它的盐和多形体:

[0026]



[0027] 这里所使用的“巨噬细胞标记物蛋白”指巨噬细胞表面蛋白,对其检测可用于在来自肿瘤的组织样品中的存在的其它类型的细胞中鉴定巨噬细胞。示例性的人巨噬细胞标记物蛋白为 CCR2、CD14、CD68、CD163、CSF1R 和 MSR1。实施本发明时也可使用其它巨噬细胞标记物蛋白。

[0028] 这里所使用的“最佳阈值”指区分仪在假阴性调用 (false negative call) 与假阳性调用 (false positive call) 之间给出最期望平衡的阈值。

[0029] 这里所使用的“受试者工作特征”(ROC) 曲线指对于二元区分系统的假阳性率 (敏感) 对真阳性率 (特异度) 的图。在构建 ROC 曲线时,应用以下定义:

[0030] 假阴性率“FNR” = $1 - \text{TPR}$

[0031] 真阳性率“TPR” = $\text{真阳性} / (\text{真阳性} + \text{假阴性})$

[0032] 假阳性率“FPR” = $\text{假阳性} / (\text{假阳性} + \text{真阴性})$

[0033] 这里所使用的关于治疗的肿瘤对治疗方式的“敏感”或“应答”,指肿瘤显示出:(a) 生长减慢,(b) 生长停止,或 (c) 衰退。

[0034] 这里所使用的“巨噬细胞值”指表明肿瘤中巨噬细胞含量的水平的数量值。例如,在一个实施方式中,巨噬细胞值能表示为给定细胞群中巨噬细胞的数量,其能够表示为百分比、比例或其它形式。在其它实施方式中,巨噬细胞值能够表示为密度,即肿瘤单位体积中的巨噬细胞的数量。在另一个实施方式中,巨噬细胞值可以表示为巨噬细胞标记物蛋白或编码巨噬细胞标记物蛋白 mRNA 的表达水平。蛋白表达水平可通过例如 ELISA 或其它免疫学方法获得。基因表达水平可通过例如 qRT-PCR、微阵列或其它分析方法获得。可对巨噬细胞值相对于阈值进行解释,该阈值可在阈值确定分析如使用 ROC 曲线分析中进行实验地

确定。

[0035] 这里所使用的“阈值确定分析”指对表示给定的肿瘤类型,例如人肾细胞癌的数据库进行分析以确定该特定肿瘤类型的阈值。表示给定的肿瘤类型的数据库包括对于这些肿瘤组的每种肿瘤的:(a) 实际肿瘤应答数据(对 tivozanib 有应答或无应答),和(b) 巨噬细胞含量。

[0036] 这里所使用的“阈值”指在该值以上就将肿瘤分类为可能对使用 tivozanib 的治疗有抗性。

[0037] 这里所使用的“CCR2”(趋化因子(C-C基序)受体2也称为CD192、CKR2、CMKBR2、MCP-1-R、CC-CKR-2、FLJ78302、MGC103828、MGC111760和MGC168006)指由Entrez GeneID No. 729230确定的基因编码的人类蛋白及其等位基因突变体。

[0038] 这里所使用的“CD14”指由Entrez GeneID No. 929确定的基因编码的人类蛋白及其等位基因突变体。

[0039] 这里所使用的“CD68”(也称为GP110、SCARD1和DKFZp686M18236)指由Entrez GeneID No. 968确定的基因编码的人类蛋白及其等位基因突变体。

[0040] 这里所使用的“CD163”(也称为M130和MM130)指由Entrez GeneID No. 9332确定的基因编码的人类蛋白及其等位基因突变体。

[0041] 这里所使用的“CSF1R”(集落刺激因子1受体,也称为CSFR、FMS、FIM2、C-FMS和CD115)指由Entrez GeneID No. 1436确定的基因编码的人类蛋白及其等位基因突变体。

[0042] 这里所使用的“MSR1”(巨噬细胞清道夫受体1,也称为CD204、SCARA1、SR-A、phSR1和phSR2)指由Entrez GeneID No. 4481确定的基因编码的人类蛋白及其等位基因突变体。

[0043] 这里所使用的“F4/80”(也称为EMR1、Ly71、GPF480、TM7LN3、DD7A5-7和EGF-TM7)指由Entrez GeneID No. 13733确定的基因编码的人类蛋白及其等位基因突变体。

[0044] 组织样品

[0045] 将来自人类患者中肿瘤的组织样品用作RNA源、蛋白源或用于免疫组织化学(IHC)的超薄切片源,从而通过实施本发明能够测定样品中巨噬细胞含量的水平。使用传统的肿瘤活组织检查仪器和方法获得该组织样品。内镜活组织检查、切除活组织检查、切开式活组织检查、穿刺活组织检查、钻孔活组织检查、刮取活组织检查和皮肤活组织检查是所属技术领域的技术人员能够用于获得肿瘤样品的已知医学方法的实例。该肿瘤组织样品应足够大以提供充足的RNA、蛋白或薄片,用于测量标记物基因(例如CD68)的表达水平或通过IHC显示巨噬细胞,例如CD68-阳性细胞表达。

[0046] 肿瘤组织样品可以是能够检测巨噬细胞含量的任何形式。换言之,组织样品必须充足以进行RNA提取、蛋白提取或制备薄片。相应地,组织样品可以为新鲜的、通过适当的低温技术保存的或者通过非低温技术保存的。处理临床活组织检查样本的标准过程是在福尔马林中固定样本,然后将其包埋在石蜡中。这种形式的样品通常称为福尔马林固定、石蜡包埋(FFPE)的组织。用于后续分析的组织制备的合适技术是所属技术领域的技术人员所熟知的。

[0047] 巨噬细胞含量

[0048] 实施本发明的过程中,可通过任何适当的方法(包括几种)测定组织样品(例如来自肿瘤)中巨噬细胞含量的水平(例如巨噬细胞数量或巨噬细胞标记物的表达,例如巨

噬细胞标记物蛋白的表达或编码巨噬细胞标记物蛋白的 mRNA 的表达)。例如,通过检测一种或多种已知可作为巨噬细胞标记物的基因的表达来间接进行巨噬细胞含量的测量。在所属的技术领域存在多种测量基因表达的方法。可应用这些方法来测定巨噬细胞标记物蛋白或编码的巨噬细胞标记物蛋白的 mRNA 的水平。示例性人巨噬细胞标记物基因为 CCR2、CD14、CD68、CD163、CSF1R 和 MSR1。也可以使用其它的巨噬细胞标记物。

[0049] RNA 分析

[0050] 传统的微阵列和定量聚合酶链式反应(QPCR)是在 mRNA 水平测定巨噬细胞标记物基因表达水平的方法的实例。在本发明的一些实施方式中,根据标准操作规程从目的细胞、肿瘤或组织提取 RNA。在其它的实施方式中,使用不需要 RNA 分离的技术进行 RNA 分析。

[0051] RNA 分离

[0052] 快速有效地从组织样品中提取具核 mRNA,即 poly(a)RNA 的方法已很好地创建并是所属技术领域的技术人员所熟知的。参见例如 Ausubel 等人,1997, *Current Protocols of Molecular Biology*, John Wiley&Sons。组织样品可以是新鲜、冰冻或固定的石蜡包埋(FFPE)的样品,如临床研究肿瘤样本。通常,从新鲜或冰冻的组织样品中分离的 RNA 具有比来自 FFPE 样品的 RNA 更低片段化的倾向。然而,肿瘤材料的 FFPE 样品更容易获得,且 FFPE 样品是用于本发明的方法的合适 RNA 源。关于 FFPE 样品作为利用 RT-PCR 进行基因扩增分析的 RNA 源的讨论,参见,例如 Clark-Langone 等人,2007, *BMC Genomics* 8:279。也参见 De Andrés 等人,1995, *Biotechniques* 18:42044;和 Baker 等人,美国专利申请公布号 2005/0095634。使用可商购获得的带有供应商 RNA 提取和制备说明书的试剂盒是非常广泛和普遍的。多种 RNA 分离产品和完全试剂盒的商业供应商包括 Qiagen (Valencia, CA)、Invitrogen (Carlsbad, CA)、Ambion (Austin, TX) 和 Exiqon (Woburn, MA)。

[0053] 通常, RNA 分离开始于组织/细胞破碎。组织/细胞破碎过程中,期望将 RNases 对 RNA 的降解最小化。在 RNA 分离过程中限制 RNases 活性的一个方法是在细胞破碎时保证变性剂与细胞内容物接触。另一种通常使用的方法是在 RNA 分离过程中包括一种或多种蛋白酶。可选的是,在收集时,室温下,将组织样品浸入 RNA 稳定化溶液中。稳定化溶液快速渗入细胞中,稳定化 RNA 用于在 4°C 的保存,从而进行后续的分选。一种这样的稳定化溶液为可商购获得的 **RNAlater®** (Ambion, Austin, TX)。

[0054] 在一些操作规程中,通过氯化铯密度梯度离心从破碎的肿瘤材料中分离总 RNA。通常, mRNA 占全部细胞 RNA 的约 1% -5%。固定化的 Oligo(dT),例如 oligo(dT) 纤维素通常用于从核糖体 RNA 与转移 RNA 中分离 mRNA。如果在分离后进行保存, RNA 必须保存在无 RNase 环境中。稳定保存分离的 RNA 的方法是所属的技术领域熟知的。可获得用于稳定保存 RNA 的多种商业化产品。

[0055] 微阵列

[0056] 使用传统的 DNA 微阵列表达谱分析技术可测量编码巨噬细胞标记物蛋白的一种或多种基因的 mRNA 表达水平。DNA 微阵列是安装在固体表面或基材如玻璃、塑料或硅上的特定 DNA 片段或探针的集合,每种特定的 DNA 片段占据阵列中的已知位置。通常在严格杂交条件下与标记的 RNA 样品进行杂交,以检测和定量对应于阵列中的每个探针的 RNA 分子。在严格洗涤以除去非特异性结合样品材料后,使用激光共聚焦显微镜或其它合适的检测方法扫描微阵列。现代商品化的 DNA 微阵列,通常称为 DNA 芯片,典型地含有数万个探针,因

此能够同时测量数万个基因。实施本发明时可使用这样的微阵列。备选地,实施本发明时也可使用含有测量编码巨噬细胞标记物蛋白的一种或多种基因表达所需的少量探针的定制芯片,加上必要的对照或标准,例如用于数据标准化。

[0057] 为便于进行数据标准化,可采用双色微阵列读取器。在双色(两通道)系统中,用以第一波长发射的第一荧光基团标记样品,而用以不同波长发射的第二荧光基团标记 RNA 或 cDNA 标准。例如,在双色微阵列系统中经常一起使用 Cy3(570nm) 和 Cy5(670nm)。

[0058] DNA 微阵列技术发达、可商购获得并广泛使用。因此,在实施本发明的方法过程中,所属技术领域的普通技术人员不需要过度实验,就能够使用微阵列技术测量编码巨噬细胞标记物蛋白的基因的表达水平。DNA 微阵列芯片、试剂(例如用于 RNA 或 cDNA 制备, RNA 或 cDNA 标记,杂交和洗涤溶液的试剂)、仪器(例如微阵列读取器)和操作规程在所属技术领域为人们所熟知并可通过各种商业资源获得。微阵列系统的供应商包括 Agilent Technologies(Santa Clara,CA) 和 Affymetrix(Santa Clara,CA),但也可以使用其它 PCR 系统。

[0059] 定量 RT-PCR

[0060] 表示编码巨噬细胞标记物蛋白的个别基因的 mRNA 水平可使用传统的定量逆转录酶聚合酶链式反应(qRT-PCR) 技术进行测量。qRT-PCR 的优点包括灵敏度、适应性、定量准确度以及区分非常相关的 mRNA 的能力。关于处理用于定量 PCR 的组织样品的指导可从不同资源获得,包括 qRT-PCR 的商业产品的制造商或供应商(例如 Qiagen(Valencia, CA) 和 Ambion(Austin, TX))。自动运行 qRT-PCR 的仪器系统可商购获得,并常规应用于很多实验室中。众所周知的商用系统的实例是 Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System(Applied Biosystems, Foster City, CA)。

[0061] 一旦将分离的 mRNA 分离出来,通过 RT-PCR 的基因表达谱分析的第一步骤是将 mRNA 模板逆转录为随后在 PCR 反应中被指数倍地扩增的 cDNA。两种常用的逆转录酶是禽类成髓细胞瘤病毒逆转录酶(AMV-RT) 和莫罗尼鼠白血病病毒逆转录酶(MMLV-RT)。逆转录反应典型地使用特定引物、随机六聚体或 oligo(dT) 引物进行引发。合适的引物可商购获得,例如 GeneAmp® RNA PCR 试剂盒(Perkin Elmer, Waltham, MA)。得到的 cDNA 产物可用作后续的聚合酶链式反应中的模板。

[0062] 使用热稳定 DNA- 依赖的 DNA 聚合酶进行 PCR 步骤。在 PCR 系统中最常用的聚合酶是水生栖热菌(Thermus aquaticus, Taq) 聚合酶。PCR 的选择性根据所使用的互补于用于扩增的所靶向 DNA 区域的引物,所述区域即从编码巨噬细胞标记物蛋白的基因逆转录的 cDNA 区域。因此,在本发明中使用 qRT-PCR 时,对每种标记物基因特异的引物基于基因的 cDNA 序列。可根据供应商的说明书使用商业技术,如 SYBR® green 或 TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA)。通过比较看家基因如 β -actin 或 GAPDH 的水平,能够就样品间上样的差异标准化信使 RNA 水平。mRNA 表达水平能够以相对于任何单一对照样品如来自正常、非肿瘤组织或细胞的 mRNA 来表示。备选地,其能够以相对于肿瘤样品组或肿瘤细胞系的库中的 mRNA,或者相对于可商购获得的对照 mRNA 组的 mRNA 进行表示。

[0063] 用于 PCR 分析编码巨噬细胞标记物蛋白的基因表达水平的合适引物组可由所属技术领域的技术人员进行设计和合成,而不需要花费过量实验。备选地,用于实施本发明的 PCR 引物组能从商业资源,例如 Applied Biosystems 购买。PCR 引物优选长度为约 17-25

个核苷酸。使用 T_m 估计的传统算法可以设计具有特定解链温度 (T_m) 的引物。用于引物设计和 T_m 估计的软件可通过商购获得,例如 Primer Express™(Applied Biosystems),也能够通过网络获得,例如 Primer3(麻省理工学院)。通过应用已建立的 PCR 引物设计规则,可以应用大量的不同引物以测量任何给定基因的表达水平,其中包括巨噬细胞标记物基因,如 CD14、CD68、MSR1、CSFR1、CD163 和 CCR2。

[0064] qNPA™

[0065] 在本发明的一些实施方式中,使用不需要 RNA 提取或分离的技术进行 RNA 分析。这样的技术是定量核酸酶保护测定,其以名称 qNPA™(High Throughput Genomics, Inc, Tucson, AZ) 可商购获得。当待分析的肿瘤组织样品形式为 FFPE 材料时,这种技术是有益的。参见,例如 Roberts 等人,2007, Laboratory Investigation 87 :979-997。

[0066] 蛋白质分析

[0067] 在本发明的方法中,可在蛋白质水平检测巨噬细胞标记物基因表达。在蛋白质水平测量巨噬细胞标记物基因表达水平的方法的实例包括酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和 IHC 分析。

[0068] ELISA

[0069] 进行巨噬细胞标记物蛋白 ELISA,例如 CD68 ELISA,需要至少一种针对巨噬细胞标记物蛋白的抗体,即检测抗体。在示例性实施方式中,CD68 是巨噬细胞标记物蛋白。将来自待分析样品的 CD68 蛋白固定化于固体支持物,如聚苯乙烯微量滴定板上。可通过 CD68 的非特异性结合进行该固定化,例如通过对表面的吸附。备选地,也可通过特异性结合进行固定化,例如在“三明治”ELISA 中由捕获抗体(与检测抗体不同的抗-CD68 抗体)结合来自样品的 CD68 蛋白。对 CD68 进行固定化后,加入检测抗体,然后检测抗体与所结合的 CD68 形成复合物。检测抗体直接或间接地连接到酶上,例如通过特异性识别检测抗体的第二抗体。典型地,在每个步骤间,用温和洗涤液对带有结合的 CD68 的板进行洗涤。典型的 ELISA 操作规程还包括一个或多个封闭步骤,即使用非特异性结合蛋白如牛血清蛋白以阻止蛋白质试剂与板的不想要的非特异性结合。最终的洗涤步骤后,通过加入合适的酶底物对板进行显色,以提供可见的信号,该信号指示样品中 CD68 的量。底物为,例如发色底物或荧光底物。ELISA 方法、试剂和设备在所属技术领域为人们所熟知并可商购获得。

[0070] 需要理解的是其他巨噬细胞标记物蛋白,例如 CCR2、CD14、CD163、CSFR1 和 MSR1,及其它巨噬细胞特异性标记物蛋白,能够通过使用对每种巨噬细胞标记物蛋白特异的检测抗体的 ELISA 进行测量。

[0071] 免疫组织化学 (IHC)

[0072] 通过免疫组织化学测量(例如显示)给定细胞群中巨噬细胞的数量。通过 IHC 对巨噬细胞标记物蛋白的测定,例如 CD68 IHC,需要至少一种针对巨噬细胞标记物蛋白的抗体,例如至少一种抗 CD68 抗体。多种适于 IHC 的抗 CD68 抗体可商购获得。例如,合适的抗体能够购自 Dako North America, Inc. (Carpinter ia, CA)、abcam(Cambridge, MA)、Abnova(Walnut, CA)、R&DSys tems (Minneapolis, MN) 或 Invitrogen(Carlsbad, CA)。使用标准技术,可利用抗 CD68 抗体检测由肿瘤获得的切片中,如 5 微米切片中的 CD68 蛋白的存在,其中包括石蜡包埋的和冰冻的肿瘤切片。典型地,首先用一定的方式处理肿瘤切片以恢复在收集和保存肿瘤材料的初始过程中固定的蛋白的抗原结构。然后封闭玻片以阻止抗

CD68 检测抗体的非特异性结合。而后通过抗 CD68 抗体与 CD68 蛋白的结合来检测 CD68 蛋白的存在。检测（初级）抗体与酶直接地或间接地连接，例如通过特异性识别检测（初级）抗体的第二抗体或聚合物。典型地，在各步骤之间，用非特异性蛋白如牛血清蛋白洗涤和封闭肿瘤切片。使用合适的酶底物对玻片进行显色以产生可视信号。样品可用苏木精进行复染。

[0073] 需要理解的是其它巨噬细胞标记物蛋白，例如 CCR2、CD14、CD163、CSF1R 和 MSR1，及其它巨噬细胞特异性标记物蛋白，能够通过使用对每种巨噬细胞标记物蛋白特异的检测抗体的 IHC 进行检测。

[0074] 数据解释

[0075] 将肿瘤的巨噬细胞值与阈值相对比来进行解释。等于或大于阈值的巨噬细胞值解释为预测肿瘤可能对于 tivozanib 治疗具有抗性（非应答性）。备选地，等于或小于阈值的巨噬细胞值解释为预测肿瘤可能对于 tivozanib 治疗具有敏感性（应答性）。例如，如实施例 2 中所示，阈值计算为 MSR1- 阳性细胞或 F4/80- 阳性细胞（通过 IHC 测定的）除以细胞包总数的比例，为约 10% 至约 15%。

[0076] 通过应用阈值确定分析实验地确定（或者至少接近）最佳巨噬细胞阈值。优选的是，阈值确定分析包括受试者工作特征（ROC）曲线分析。ROC 曲线分析是已构建的统计学技术，其应用属于所属领域技术人员掌握的范畴。对于 ROC 曲线分析的讨论，通常参见 Zweig 等人，1993，" Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine, " Clin. Chem. 39 :561-577 ;和 Pepe, 2003, The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction, Oxford Press, New York.

[0077] 巨噬细胞值和最佳巨噬细胞阈值在肿瘤类型之间不同。因此，优选在代表待使用本发明的方法测试的任何给定肿瘤类型的一种或多种数据库进行阈值确定分析。用于阈值确定分析的数据库包括：(a) 实际的应答数据（应答或非应答），和 (b) 来自肿瘤组的每个肿瘤样品的巨噬细胞值。一旦确定了给定的肿瘤类型的巨噬细胞阈值，则该阈值能够用于解释那种肿瘤类型的肿瘤中的巨噬细胞值。

[0078] ROC 曲线分析如下进行。将巨噬细胞值大于或等于阈值的任何样品鉴定为非应答者（抗性的）。备选地，将巨噬细胞值小于或等于阈值的任何样品鉴定为应答者（敏感的）。对于来自样品的测试组的每一个巨噬细胞值，使用该值作为阈值区分为“应答者”和“非应答者”（假定调用）。该过程通过比较假定调用与数据组的实际应答数据，计算每个潜在阈值的 TPR (y 向量) 和 FPR (x 向量)。然后通过使用 TPR 向量和 FPR 向量制作散点图来构建 ROC 曲线。如果 ROC 曲线在 (0,0) 点至 (1.0,0.5) 点的对角线以上，则说明巨噬细胞测试结果好于随机情况。

[0079] ROC 曲线能用于鉴定最佳工作点。最佳工作点是在假阳性值针对假阴性值加权之间产生最佳平衡的点。这些值不需要相等。在 ROC 空间中的点 x, y 处区分的平均预期值由下式确定。

[0080] $C = (1-p)\alpha*x+p*\beta(1-y)$

[0081] 其中：

[0082] α = 假阳性值

[0083] β = 遗漏阳性的值 (假阴性), 和

[0084] p = 阳性情况的比例

[0085] 通过赋予 α 和 β 不同的值, 使假阳性和假阴性具有不同的权重。例如, 如果决定以处理更多非应答者患者为代价以在应答性组中包括更多的患者, 可以增加 α 上的权重。在这种情况下, 假定假阳性和假阴性的值相同 (α 等于 β)。因此, 在 ROC 空间中的点 x, y 处的平均预期值是:

[0086] $C' = (1-p)*x+p*(1-y)$

[0087] 在使用假阳性和假阴性的所有对 (x, y) 后可以计算最小的 C' 。最佳阈值计算为在 C' 处的值 (x, y) 。

[0088] 除了预测肿瘤是否对于 tivozanib 治疗具有敏感性或抗性, 即二元区分外, 巨噬细胞值对于肿瘤是敏感性或抗性的可能性提供了大概但有用的指示。总体而言, 巨噬细胞值越小, 肿瘤对 tivozanib 更可能具有敏感性, 而巨噬细胞值越大, 肿瘤对 tivozanib 更可能具有抗性。

[0089] 试剂盒

[0090] 本发明包括诊断测试试剂盒, 其包括用于实施本发明的方法的特定组分。诊断测试试剂盒在实施诊断测定方面提高了便携性、速度和再现性。例如, 在本发明的示例性基于 qRT-PCR 的实施方式中, 基本的诊断测试试剂盒包括用于分析巨噬细胞标记物 (例如 CD68) 的表达的 PCR 引物。在其它实施方式中, 更精细检测试剂盒不仅包括 PCR 引物, 还包括缓冲剂、反应剂和使用 PCR 技术测量 CD68 表达水平的详细说明书。在一些实施方式中, 试剂盒包括测试所需要的除 RNA 样品外的测试操作规程和所有耗材。

[0091] 在本发明的示例性基于 DNA 微阵列的实施方式中, 检测试剂盒包括设计与特定仪器乙醛使用的微流卡 (阵列)。任选地, 微流卡为专门设计为测量巨噬细胞标记物基因表达的定制装置。这种定制微流卡可商购获得。例如 TaqMan Array 是设计与 Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) 一起使用的 384 孔微流卡 (阵列)。示例性的微流卡包括用于测量 CCR2、CD14、CD68、CD163、CSF1R 和 MSR1 表达的探针的任意组合, 加上必须的对照或标准, 例如用于数据标准化。其它的巨噬细胞标记物蛋白也可包括在微流卡上以实施本发明。

[0092] 在本发明的一些实施方式中, 检测试剂盒含有用于通过 IHC 测定肿瘤巨噬细胞含量的材料。例如 IHC 试剂盒可含有针对人巨噬细胞标记物的初级抗体, 例如小鼠抗人 CD68 抗体, 和与受体酶缀合的二级抗体, 例如辣根过氧化物酶。在一些实施方式中, 二级抗体被特异性识别初级抗体的缀合聚合物代替。

实施例

[0093] 通过以下实施例对本发明进行进一步的说明。提供实施例仅为示例说明的目的, 而不构成以任何方式对本发明的范围或内容的限定。

[0094] 实施例 1: 对 Tivozanib 的小鼠肿瘤应答

[0095] 使用超过 100 个小鼠乳腺肿瘤的文库 (BH 库) 鉴定对 tivozanib 具有敏感性的肿瘤 (应答者) 和对 tivozanib 具有抗性的肿瘤 (非应答者)。通过将来自形成 Her2 依赖、可诱导自发乳腺肿瘤的工程嵌合小鼠的超过 100 个自发小鼠乳腺肿瘤的原发肿瘤材料进

行体内增殖和冷冻保存而建立 BH 库。基本上按如下产生小鼠。

[0096] 使用如下四种构建体作为单独的片段对 Ink4a 突变纯合子 ES 细胞进行共转染：MMTV-rtTA、Tet0-Her2^{V664Eneu}、Tet0- 荧光素酶和 PGK- 嘌呤霉素。用 PCR 和 Southern 印记对嘌呤霉素抗性细胞进行基因分型。利用 northern 印记分析 ES 细胞中原癌基因的可诱导性。将转染的 ES 细胞注射入 C57BL/6 胚胎中，该胚胎被植入假孕雌性小鼠进行妊娠以生育嵌合小鼠。

[0097] 利用小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复序列 (MMTV) 驱动反式四环素转录反式激活因子 (rtTA) 的乳腺特异性表达。当以饮水的方式向小鼠提供强力霉素时，rtTA 提供 Her2 激活的原癌基因的乳腺特异性表达。

[0098] 使用来自小鼠的培养细胞经 RT-PCR 和荧光素酶测定分别验证 Her2 原癌基因和荧光素酶的可诱导性。从嵌合体小鼠中移取乳腺并用胶原酶进行消化。在强力霉素存在下培养收集的细胞团中的一半，另一半在没有强力霉素存在下进行培养。培养 5 天后，用胰蛋白酶消化细胞，并将十分之一的细胞用于荧光素酶测定，剩下的细胞用于 RNA 提取。

[0099] 对从 Her2 乳腺癌模型小鼠收集的肿瘤的组织学分析显示为侵入性腺癌。对两种主要的模式进行了区分。它们是实体片层生长模式和具有坏死中心的嵌套生长模式。对乳腺肿瘤的免疫组织化学分析表明肿瘤中存在两种细胞类型。第一种细胞类型是上皮来源型（角蛋白阳性），并显示 Her 2 表达和强增殖性。第二细胞类型是间质来源型，具有成纤维细胞样形态。这些细胞为胶原蛋白阳性，并不显示强增殖性，并显示间质的功能。在肿瘤的上皮部分的坏死中心可见细胞凋亡。进行肿瘤衰退研究（响应撤出强力霉素的衰退）以验证小鼠模型肿瘤依赖于 Her2 表达。在强力霉素诱导四环素 - 应答启动子之后，小鼠产生乳腺肿瘤的潜伏期为约 2-4 个月。

[0100] 使用细胞筛网通过对肿瘤的物理粉碎分离肿瘤细胞。典型地，将 1×10^5 个细胞与基质胶（50 : 50 体积）混合，并通过皮下注射进入雌性 NCr nu/nu 小鼠的肩胛骨间的上背部区。当这些肿瘤生长至约 500mm^3 ，通常需要 2-4 周时间，对其进行收集用于进一步增殖、药物应答测试和分析。分析包括微降谱分析、普通病理组织学分析和 IHC（对于肿瘤血管是 CD31，对于肿瘤细胞增值是 Ki67）。这一肿瘤群的特征在对于血管生发的关键参数中显示了显著程度的差异，如微脉管系统、VEGF 表达和特定基因表达谱。

[0101] 基本上如下进行对 tivozanib 的肿瘤应答的评估。通过将物理破碎的肿瘤细胞（与基质胶混合的）注射入七周大的雌性 NCr 裸鼠来建立皮下移植的肿瘤。待肿瘤达到约 $200-400\text{mm}^3$ ，将 30 只荷瘤小鼠随机划分为 3 个组。第一组接受媒介物。第二组通过口服真服每日接受 5mg/kg 的 tivozanib。第三组通过口服填服每日接受 20mg/kg 的 tivozanib。使用卡尺每周测量肿瘤两次，计算肿瘤体积。在治疗末期，收集肿瘤以进行病理组织学分析和 IHC 分析。

[0102] 这些研究表明肿瘤间对 tivozanib 的应答存在显著的差异。基于肿瘤生长抑制和典型的组织病理学及 IHC (CD31) 分析显示的血管生成抑制特征，来鉴定应答者和非应答者。典型地，当用 5mg/kg 的 tivozanib 治疗时，应答者表现出（经组织学分析）卡尺未测量到肿瘤生长，并且除了周围部分外接近对肿瘤的完全杀灭。应答性差异是可以预见的，因为小鼠模型肿瘤是自发产生的，从而预计其含有导致肿瘤发生的随机突变的的不同组，其中包括肿瘤血管生成。这种应答性差异是人们所期望的，因为这类类似于自然发生的人肿瘤

的差异,并因而能够鉴定 tivozanib 应答性肿瘤和 tivozanib 抗性肿瘤,从而应用于鉴定 tivozanib 应答特性或分子特征。

[0103] 实施例 2:小鼠乳腺肿瘤中的巨噬细胞含量

[0104] 将来自实施例 1 所描述的小鼠乳腺肿瘤实验组的组织样品(约 1000mm³)切除并在福尔马林中固定过夜。随后对固定的肿瘤进行石蜡处理以进行传统的 IHC 分析,从而测定每种肿瘤的巨噬细胞含量。利用 MSR1 或 F4/80 作为巨噬细胞表面标记物来鉴定巨噬细胞。对于 MSR1 IHC,用大鼠抗小鼠 MSR1 抗体(Dako North America, Inc., Carpinteria, CA)孵育 5 微米的石蜡切片。根据供应商的说明书,使用商购的大鼠抗小鼠 HRP- 聚合物检测试剂盒(Biocare Medical LLC, Concord, CA, Catalog No. RT517)来检测信号。对于 F4/80 IHC,在连续切片上使用大鼠抗小鼠 F4/80 抗体(Serotec, MCA497R)。使用相同的大鼠抗小鼠 HRP- 聚合物检测试剂盒来检测 F4/80 信号。

[0105] 在触控平板图像分析仪上投射高倍显微镜视野(200×)来对 MSR1 测定或 F4/80 测定中呈现阳性的巨噬细胞进行计数。对于每种乳腺肿瘤细胞,从贯穿肿瘤中心的切片的 5 个不同视野,分析三个生物学副本(n = 3,肿瘤来自相同研究)。通过 MSR1- 阳性细胞或 F4/80 阳性细胞除以全部细胞再乘以 100%来计算百分比形式的巨噬细胞值。对于每种肿瘤,以 15 张图像的平均值作为结果。关于肿瘤对 tivozanib 的应答性和肿瘤对 tivozanib 的非应答性的巨噬细胞值(%)的结果显示于图 1 中。

[0106] 在这些切片中,假定 MSR1 和 F4/80 能够起到可靠的巨噬细胞标记物的作用,预计两种标记物将产生相似的结果。作为实验对照,通过相关度分析进行验证,其产生正性相关, $R^2 = 0.944$ (图 3)。

[0107] 实施例 3:对 Tivozanib 的人肿瘤应答

[0108] 当可获得时,从参与 2 期临床试验(AV-951-07-201 研究)的人类患者收集来自之前肾切除或活组织检查的入库肿瘤组织。对参与该研究的患者要求:(a) 具有组织学或细胞学确认的复发性或转移性肾细胞癌或原发性肾细胞癌(RCC)(全部组织学意义上的), (b) 接受了不超过一种对 RCC 的在先系统治疗;和(c) 没有接受在先的 VEGF- 靶向治疗。在获得知情同意后,根据当地的规则,收集苏木精与曙红染色玻片及多至四个未染色玻片。

[0109] 该研究为 2 期、随机的、安慰剂对照的、多中心不连续研究,旨在评估 1.5mg 的 tivozanib 的安全性、无病生存率、抗肿瘤活性、药物代谢动力学/药效学和药物基因组学/代谢。参与研究的所有 272 位患者在开始的 16 周接受标签公开的 tivozanib。患者连续 3 周接受 1.5mg/天的 tivozanib,随后一周不摄入研究药物(1 周期 = 3 周摄入药物,1 周不摄入药物)。如果患者无法忍受 1.5mg 的剂量,则允许降低剂量至 1.0mg。每两个治疗周期对患者进行疾病评估。根据实体瘤应答评估标准(RECIST)(1.0 版)对应答进行评估。16 周后,对肿瘤衰退 $\geq 25\%$ 的患者,继续使用标签公开的 tivozanib 的治疗,而具有自基线 $< 25\%$ 的变化(增长或收缩)的患者,在随后的 12 周以双盲方式随机摄入 tivozanib 或安慰剂。从研究中剔除肿瘤大小增加 $\geq 25\%$ 的患者。分析中使用的肿瘤组织来自在基线具有可获得的肿瘤组织且在治疗开始时至少进行了一次肿瘤评估的患者。此外,随机安排入安慰剂组的患者不包括在该样品分析中。

[0110] 实施例 4:人 RCC 肿瘤中的巨噬细胞含量

[0111] 在来自福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织样品的 5 微米切片中测量实施例 3(上

述)所描述的来自临床研究的 21 个人 RCC 肿瘤中的巨噬细胞含量。用于检测人巨噬细胞的初级抗体为小鼠抗 - 人 CD68 抗体 (Dako, Catalog No. m0814)。根据供应商的说明书,用商购的小鼠抗人 HRP- 聚合物检测试剂盒 (Biocare Medical Catalog No. MHRP520) 显示初级抗体。

[0112] 在触控平板图像分析仪上投射高倍显微镜视野 (200×) 来对在 CD68 测定中鉴定为阳性的巨噬细胞进行计数。对于每个肿瘤,用 5 个随机选择的显微镜视野分析一个切片。通过 CD68 阳性细胞除以全部细胞再乘以 100 来计算以百分比形式的巨噬细胞值。发现人肿瘤中巨噬细胞含量与肿瘤对于使用 tivozanib 的治疗的抗性之间存在显著的相关性。更具体地讲,肿瘤中表达 CD68 的巨噬细胞数目越多,肿瘤对 tivozanib 的抗性更强。该结果概括于巨噬细胞值 (%) 与肿瘤对 tivozanib 应答的散点图中 (图 4)。结果表明通过测量肿瘤的巨噬细胞含量可以预测人肿瘤对 tivozanib 治疗的抗性。

[0113] 通过引用并入

[0114] 为了所有目的,这里所引用的每一个专利文献和科学论文的全部内容通过引用并入本文中。

[0115] 等效方式

[0116] 在不偏离其本质特征的前提下,本发明能够以其它具体形式体现。因此前面的实施方式应被视为示例性说明,而不是对于本文所描述的发明的限制。本发明的范围以由附属的权利要求说明,而不是前面说明书所指明,且权利要求的意义和范围的等效方式内的所有变法也包括在本文中。

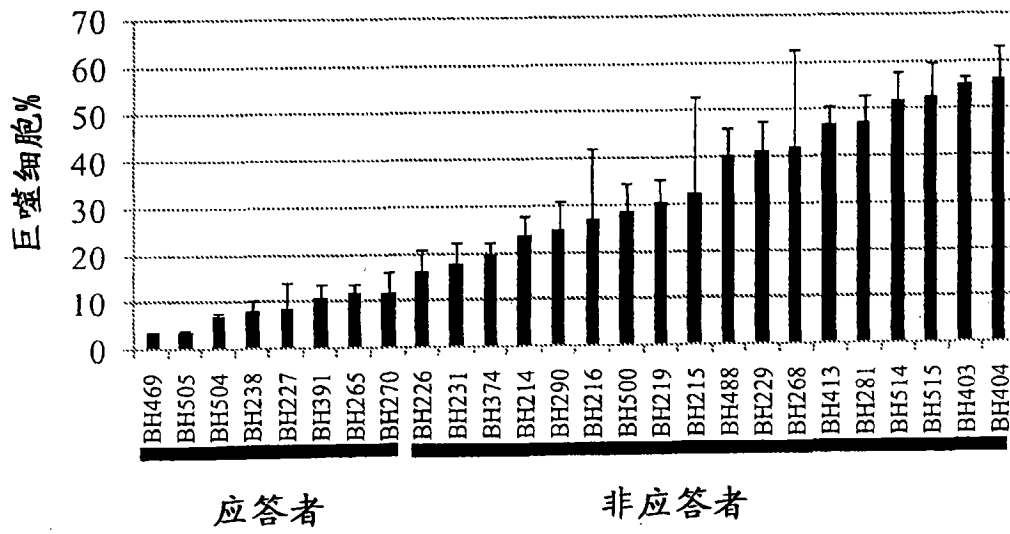


图 1

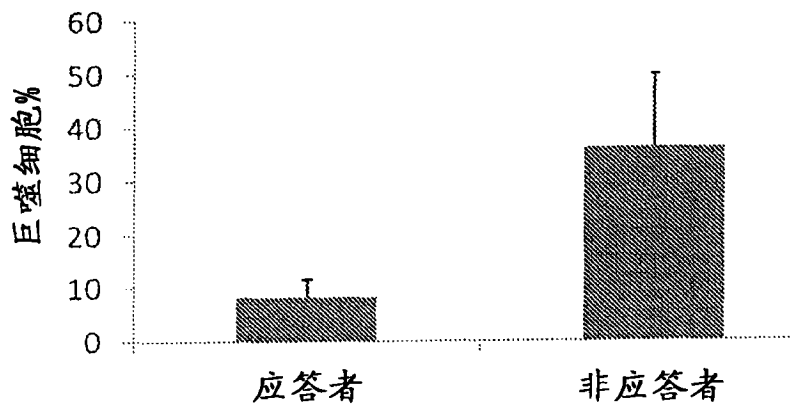


图 2

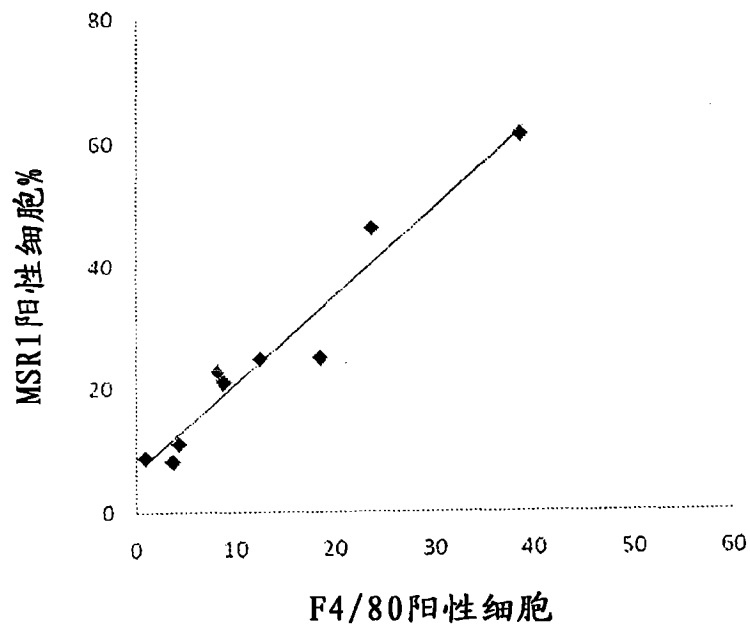


图 3

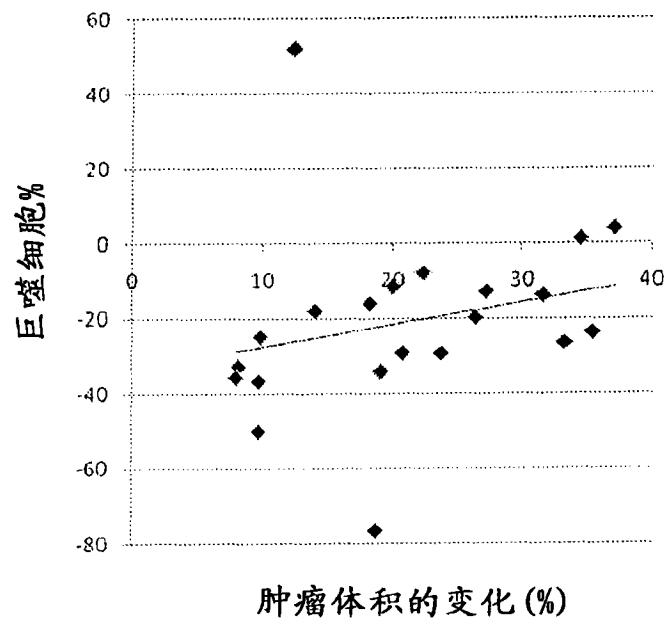


图 4

专利名称(译)	Tivozanib应答预测		
公开(公告)号	CN102667472B	公开(公告)日	2015-01-28
申请号	CN201080047359.4	申请日	2010-06-03
申请(专利权)人(译)	AVEO制药公司		
当前申请(专利权)人(译)	AVEO制药公司		
[标]发明人	林杰 冯斌 M·鲁滨逊 蒋锋 孙晓健		
发明人	林杰 冯斌 M·鲁滨逊 蒋锋 孙晓健		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6886 G01N33/57407 G01N33/57492 G01N2333/70596 G01N2800/52		
代理人(译)	袁泉		
审查员(译)	肖吉		
优先权	61/253036 2009-10-19 US 12/645355 2009-12-22 US		
其他公开文献	CN102667472A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了预测人肿瘤对于使用tivozanib(AV-951)的治疗具有敏感性或抗性的诊断方法。该方法基于测量来自肿瘤的组织样品中巨噬细胞的含量。巨噬细胞含量的测量可基于对巨噬细胞标记物基因表达的分析，例如通过RNA分析或免疫组织化学方法。

