



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102576016 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201080047076. X

A61K 31/015(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 09. 20

(30) 优先权数据

61/276, 969 2009. 09. 18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 04. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/049545 2010. 09. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02011/035274 EN 2011. 03. 24

(71) 申请人 阿布拉西斯生物科学有限责任公司

地址 美国加利福尼亚

(72) 发明人 V·德留 N·德赛

(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 刘晓东

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

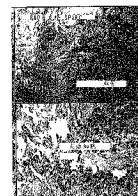
权利要求书 4 页 说明书 26 页 附图 12 页

(54) 发明名称

SPARC 微环境标签在癌症治疗中的应用

(57) 摘要

本发明提供了用于预测对疗法包括化学疗法、放射疗法、手术疗法和联合治疗的响应的基于抗 SPARC 抗体的多参数技术。



1. 利用化学治疗方案治疗哺乳动物中的肿瘤的方法,包括:
 - a. 制备所述肿瘤的多个组织学切片以用于免疫组织学;
 - b. 利用第一抗 SPARC 抗体对所述肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第一抗 SPARC 抗体优先对肿瘤细胞内的 SPARC 染色;
 - c. 利用第二抗 SPARC 抗体对所述肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第二抗 SPARC 抗体优先对成纤维细胞内的 SPARC 染色;
 - d. 测定所述第一抗 SPARC 抗体对该肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 / 基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的染色和所述第二抗体对该肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 / 基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的染色,从而确定 SPARC 微环境特征 (SMS);
 - e. 如果所述肿瘤 SMS 符合预定 SMS 的标准,则施用治疗有效量的治疗方案。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述预定 SMS 包括具有如下组成特征的免疫染色:利用第一抗体有至少 49% 的间质染色阳性,以及利用第二抗体染色至少如下:成纤维细胞评分为 66、成纤维细胞强度为 41、肿瘤强度为 26、炎症细胞强度为 51、炎症细胞评分为 55、血管 % 为 33、肿瘤评分为 54、血管强度为 64、成纤维细胞 % 为 54、血管强度为 64、炎症细胞 % 为 43 和间质评分为 62,其中所述疗法为包括 nab- 紫杉醇的方案,并且所述肿瘤为胰腺癌。
3. 权利要求 1 或 2 中任一项的方法,其中所述肿瘤选自口腔肿瘤、咽肿瘤、消化系统肿瘤、呼吸系统肿瘤、骨肿瘤、软骨瘤、骨转移瘤、肉瘤、皮肤肿瘤、黑素瘤、乳腺肿瘤、生殖系统肿瘤、泌尿道肿瘤、眼眶肿瘤、脑和中枢神经系统肿瘤、神经胶质瘤、内分泌系统肿瘤、甲状腺肿瘤、食管肿瘤、胃肿瘤、小肠肿瘤、结肠肿瘤、直肠肿瘤、肛门肿瘤、肝肿瘤、胆囊肿瘤、胰腺肿瘤、喉肿瘤、肺肿瘤、支气管肿瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、宫颈肿瘤、宫体肿瘤、卵巢肿瘤、外阴肿瘤、阴道肿瘤、前列腺肿瘤、前列腺癌、睾丸肿瘤、阴茎肿瘤、膀胱肿瘤、肾肿瘤、肾盂肿瘤、输尿管肿瘤、头颈肿瘤、甲状旁腺癌、何杰金病、非何杰金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性髓样白血病和慢性髓样白血病。
4. 权利要求 3 的方法,其中所述肿瘤为胰腺癌。
5. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述哺乳动物为人。
6. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述化学治疗方案包括紫杉醇。
7. 权利要求 6 的方法,其中所述化学治疗方案包括 nab- 紫杉醇。
8. 用于预测哺乳动物内的肿瘤对化学治疗方案的响应的方法,包括:
 - a. 制备所述肿瘤的多个组织学切片以获得 SPARC 微环境标签 (SMS);
 - b. 利用第一抗 SPARC 抗体对所述肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第一抗 SPARC 抗体优先对肿瘤细胞中的 SPARC 染色;
 - c. 利用第二抗 SPARC 抗体对所述肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第二抗 SPARC 抗体优先对成纤维细胞中的 SPARC 染色;
 - d. 测定所述第一抗 SPARC 抗体对所述肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 / 基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的染色和所述第二抗体对肿瘤血管和肿瘤间质的染色;
 - e. 如果所述免疫染色证实了预定 SMS,则预测对所述化学治疗方案有阳性响应。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述预定 SMS 包括具有如下组成特征的免疫染色:利用所述第一抗体有至少 82%的间质染色阳性,以及利用所述第二抗体染色至少如下:成纤维细胞评分为 87、成纤维细胞强度为 68、肿瘤强度为 49、炎症细胞强度为 42、炎症细胞评分为 67、血管%为 68、肿瘤评分为 76、血管强度为 46、成纤维细胞%为 51、血管强度为 75、炎症细胞%为 59 和间质评分为 62,其中所述疗法为包括 nab-紫杉醇的方案,并且所述肿瘤为胰腺癌。

10. 权利要求 8 或 9 中任一项的方法,其中所述肿瘤选自口腔肿瘤、咽肿瘤、消化系统肿瘤、呼吸系统肿瘤、骨肿瘤、软骨瘤、骨转移瘤、肉瘤、皮肤肿瘤、黑素瘤、乳腺肿瘤、生殖系统肿瘤、泌尿道肿瘤、眼眶肿瘤、脑和中枢神经系统肿瘤、神经胶质瘤、内分泌系统肿瘤、甲状腺肿瘤、食管肿瘤、胃肿瘤、小肠肿瘤、结肠肿瘤、直肠肿瘤、肛门肿瘤、肝肿瘤、胆囊肿瘤、胰腺肿瘤、喉肿瘤、肺肿瘤、支气管肿瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、宫颈肿瘤、宫体肿瘤、卵巢肿瘤、外阴肿瘤、阴道肿瘤、前列腺肿瘤、前列腺癌、睾丸肿瘤、阴茎肿瘤、膀胱肿瘤、肾肿瘤、肾盂肿瘤、输尿管肿瘤、头颈肿瘤、甲状旁腺癌、何杰金病、非何杰金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性髓样白血病和慢性髓样白血病。

11. 权利要求 10 的方法,其中所述肿瘤为胰腺肿瘤。

12. 权利要求 8-10 中任一项的方法,其中所述哺乳动物为人。

13. 权利要求 8-10 中任一项的方法,其中所述化学治疗方案包括紫杉醇。

14. 权利要求 8-10 中任一项的方法,其中所述化学治疗方案包括 nab-紫杉醇。

15. 用于预测具有肿瘤的哺乳动物中该肿瘤的进展是否低风险的方法,包括:

a. 制备所述肿瘤的多个组织学切片以获得 SPARC 微环境标签 (SMS);

b. 利用第一抗 SPARC 抗体对所述肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第一抗 SPARC 抗体优先对肿瘤细胞内的 SPARC 染色;

c. 利用第二抗 SPARC 抗体对所述肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第二抗 SPARC 抗体优先对成纤维细胞内的 SPARC 染色;

d. 测定所述第一抗 SPARC 抗体对所述肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质/基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的染色和所述第二抗体对所述肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质/基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的染色;和

e. 如果所述肿瘤 SMS 符合预定 SMS 的标准,则确定存在进展的低风险。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述肿瘤为乳腺癌,并且所述预定 SMS 包括具有如下组成特征的免疫染色:利用第一抗体产生至少 82%的间质染色阳性,以及利用第二抗体染色至少如下:成纤维细胞评分为 87、成纤维细胞强度为 68、肿瘤强度为 49、炎症细胞强度为 42、炎症细胞评分为 67、血管%为 68、肿瘤评分为 76、血管强度为 46、成纤维细胞%为 51、血管强度为 75、炎症细胞%为 59 和间质评分为 62,其中所述疗法为包括 nab-紫杉醇的方案,并且所述肿瘤为胰腺癌。

17. 权利要求 15 或 16 中任一项的方法,其中所述肿瘤选自口腔肿瘤、咽肿瘤、消化系统肿瘤、呼吸系统肿瘤、骨肿瘤、软骨瘤、骨转移瘤、肉瘤、皮肤肿瘤、黑素瘤、乳腺肿瘤、生殖系统肿瘤、泌尿道肿瘤、眼眶肿瘤、脑和中枢神经系统肿瘤、神经胶质瘤、内分泌系统肿瘤、

甲状腺肿瘤、食管肿瘤、胃肿瘤、小肠肿瘤、结肠肿瘤、直肠肿瘤、肛门肿瘤、肝肿瘤、胆囊肿瘤、胰腺肿瘤、喉肿瘤、肺肿瘤、支气管肿瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、宫颈肿瘤、宫体肿瘤、卵巢肿瘤、外阴肿瘤、阴道肿瘤、前列腺肿瘤、前列腺癌、睾丸肿瘤、阴茎肿瘤、泌尿膀胱肿瘤、肾肿瘤、肾盂肿瘤、输尿管肿瘤、头颈肿瘤、甲状旁腺癌、何杰金病、非何杰金淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性髓样白血病和慢性髓样白血病。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述肿瘤为胰腺癌。

19. 权利要求 17 的方法,其中所述肿瘤为乳腺癌。

20. 权利要求 15-17 中任一项的方法,其中所述哺乳动物为人。

21. 权利要求 15-17 中任一项的方法,其中利用包括紫杉醇的化学治疗方案治疗所述哺乳动物。

22. 权利要求 15-17 中任一项的方法,其中所述化学治疗方案包括 nab- 紫杉醇。

23. 利用疗法治疗第一哺乳动物的肿瘤的方法,包括:

a. 测定该疗法的两个或更多个预测性 SMS,包括:

i. 制备来自对该疗法具有已知结果的其它哺乳动物的肿瘤的多个组织学切片;

ii. 利用第一抗 SPARC 抗体对来自对该疗法具有已知结果的所述其它哺乳动物的每一个肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第一抗 SPARC 抗体优先对肿瘤细胞内的 SPARC 染色;

iii. 利用第二抗 SPARC 抗体对来自对该疗法具有已知结果的所述其它哺乳动物的每一个肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第二抗 SPARC 抗体优先对成纤维细胞内的 SPARC 染色;

iv. 确定所述第一抗 SPARC 抗体对来自对该疗法具有已知结果的其它哺乳动物的每一个肿瘤在所述肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质/基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的免疫染色模式,和所述第二抗体对来自对该疗法具有已知结果的其它哺乳动物的肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质/基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的免疫染色,从而确定来自对该疗法具有已知结果的所述其它哺乳动物的每一个肿瘤的 SMS;

v. 将来自对该疗法具有已知结果的所述其它哺乳动物的每一个肿瘤的肿瘤 SMS 聚类成两个或更多个结果组,其中每一个结果组的 SMS 质心定义了预测性 SMS;

b. 通过包含下述的方法确定来自所述第一哺乳动物的肿瘤的 SMS:

i. 制备来自所述第一哺乳动物的肿瘤的多个组织学切片;

ii. 利用第一抗 SPARC 抗体对来自所述第一哺乳动物的所述肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第一抗 SPARC 抗体优先对肿瘤细胞内的 SPARC 染色;

iii. 利用第二抗 SPARC 抗体对来自所述第一哺乳动物的所述肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第二抗 SPARC 抗体优先对成纤维细胞内的 SPARC 染色,

iv. 测定第一抗 SPARC 抗体对所述第一哺乳动物的肿瘤在该肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质/基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的免疫染色模式和所述第二抗体对所述第一哺乳动物的所述肿瘤在该肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质/基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的免疫染

色,从而确定所述第一哺乳动物的肿瘤 SMS;

c. 测定来自所述第一哺乳动物的肿瘤的 SMS 与 (a) 中测定的预测性 SMS 的欧几里德距离,并且将来自第一哺乳动物的所述肿瘤分类为具有最接近的预测性 SMS 的结果组的成员;

d. 如果来自所述第一哺乳动物的肿瘤的 SMS 作图至响应所述疗法的结果组,则给所述第一哺乳动物施用治疗有效量的所述疗法。

24. 权利要求 23 的方法,其中所述第一哺乳动物的肿瘤与来自对该疗法具有已知结果的其它哺乳动物的所述肿瘤属于相同类型。

25. 权利要求 23 的方法,其中所述疗法包括 nab- 紫杉醇。

26. 权利要求 23 的方法,其中来自所述第一哺乳动物的所述肿瘤为胰腺癌。

27. 权利要求 23 的方法,其中通过 K- 均值、自组织地图和层次聚类中的一个或多个进行来自对该疗法具有已知结果的所述其它哺乳动物的每一个肿瘤的肿瘤 SMS 的聚类。

SPARC 微环境标签在癌症治疗中的应用

[0001] 相关案例

[0002] 本申请要求 2009 年 9 月 18 日提交的美国临时专利申请 No. 61/27,969 (将其通过引用并入本文) 的利益。

[0003] 发明背景

[0004] 酸性的富含半胱氨酸的分泌蛋白 (也被称作骨粘连蛋白 (osteonectin), BM40 或 SPARC, 在下文中“SPARC”), 是一种基质相关的蛋白质, 其引起细胞形状的变化, 抑制细胞周期进展和影响细胞外基质的合成 (Bradshaw 等人, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 100 :6045-6050(2003))。鼠 SPARC 基因于 1986 年被克隆 (Mason 等人, EMBO J. 5 : 1465-1472(1986)), 全长人 SPARC cDNA 于 1987 年得到克隆和测序 (Swaroop 等人, Genomics 2 :37-47(1988))。SPARC 的表达在发育上受到调控, 主要在正常发育或响应于损伤而发生重塑的组织中表达。例如, 在发育中的骨和牙齿中高水平表达 SPARC 蛋白 (参见, 例如, Lane 等人, FASEB J. ,8,163173(1994) ;Yan & Sage, J. Histochem. Cytochem. 47 : 1495-1505(1999))。

[0005] SPARC 在几种侵袭性癌症中被上调, 但在相应的正常组织中不存在 (Porter 等人, J. Histochem. Cytochem. ,43,791(1995))。SPARC 的表达在多种肿瘤 (例如, 膀胱、肝、卵巢、肾、肠和乳腺) 中被诱导。例如, 在膀胱癌中, SPARC 的表达与晚期癌症相关。已显示 T2 或更晚期的侵袭性膀胱癌相对于 T1 期的膀胱癌 (或更加较浅表性肿瘤) 表达更高水 SPARC 和更加不良的预后 (参见, 例如, Yamanaka 等人, J. Urology, 166, 2495 2499(2001))。在脑膜瘤中, SPARC 的表达仅与侵袭性肿瘤相关 (参见, 例如, Rempel 等人, Clinical Cancer Res. , 5, 237241(1999))。也已在 74.5% 的原位侵袭性乳腺癌损伤 (参见, 例如, Bellahcene, 等人, Am. J. Pathol. ,146,95 100(1995)) 和 54.2% 的乳腺浸润性导管癌 (参见, 例如, Kim 等人, J. Korean Med. Sci. ,13,652 657(1998)) 中检测到 SPARC 的表达。SPARC 的表达还与乳腺癌的频繁微钙化相关 (参见, 例如, Bellahcene 等人, 同上), 这表明 SPARC 表达可能负责乳腺转移灶对骨的亲和性。

[0006] 令人惊讶地, 还显示 SPARC 在某些系统中具有抗肿瘤活性。SPARC 是一种有力的细胞周期抑制剂, 将细胞阻止在 G1 中期 (Yan & Sage, J. Histochem. Cytochem. 47 : 1495-1505(1999)), 并且已显示 SPARC 的诱导型表达在体外模型系统中抑制乳腺癌细胞的增殖 (Dhanesuan 等人, Breast Cancer Res. Treat. 75 :73-85(2002))。类似地, 外源 SPARC 可以以浓度依赖性方式减少 HOSE (人卵巢表面上皮) 和卵巢癌细胞的增殖。此外, SPARC 诱导卵巢癌细胞的细胞凋亡。此外, 已报导了细胞例如卵巢上皮细胞上的 SPARC 受体。已有人提出, SPARC 对其受体的结合可能触发介导 SPARC 的肿瘤抑制功能的组织特异性信号转导途径 (Yiu 等人, Am. J. Pathol. 159 :609-622(2001))。也已报导纯化的 SPARC 在体内异种移植物模型系统中抑制血管生成和减弱神经母细胞瘤的肿瘤生长 (Chlenski 等人, Cancer Res. 62 :7357-7363(2002))。

[0007] 这些看起来相矛盾的结果可能是由于 SPARC 的许多形式所致, 这些形式因未成熟 SPARC 的差异剪接和翻译后修饰而引起。因此, 例如, 成纤维细胞 SPARC 是与血小板 SPARC

不同的分子。此外, SPARC 被差异性糖基化。(参见 Kaufman 等人, *Glycobiology* 14(7): 609-619(2004))。SPARC 易于被多种蛋白酶降解, 并且似乎在细胞外环境中发生转换。细胞外蛋白酶对 SPARC 的转换导致新型 SPARC 表位的暴露 (Lane & Sage, *FASEB J.* 8(2): 163-173(1994))。这些因素导致了宽范围的免疫组织学染色模式。每一种抗体可产生显著不同的染色模式。

[0008] 癌症现主要利用三类别型的疗法: 手术、放射疗法和化学疗法之一或其组合来进行治疗。手术通常仅对于治疗癌症的早期是有效的。对于超过 50% 的患癌个体, 在他们被诊断时, 他们不再是有效手术治疗的候选者。放射疗法仅对于患有处于癌症的早期和中期的临床局限性疾病的患者有效, 对于具有转移的癌症晚期是无效的。

[0009] 化学疗法包括细胞复制或细胞代谢的破坏。化学疗法可以是有效的, 但存在严重的副作用, 例如呕吐、低白细胞 (WBC)、脱发、体重减轻和其它毒效应。由于极端的毒副作用, 许多患有癌症的个体不能成功地完成完整的化学治疗方案。化学疗法诱导的副作用明显影响了个体的生活质量并且可显著地影响个体对治疗的顺从性。此外, 与化学治疗剂相关的有害副作用通常是此类药物施用的主要剂量限制性毒性 (DLT)。例如, 粘膜炎为几种抗癌剂 (包括抗代谢物细胞毒性剂 5-FU、甲氨蝶呤和抗肿瘤抗生素例如多柔比星) 的主要剂量限制性毒性。当严重时, 这类化学疗法诱导的副作用中的许多副作用可导致住院治疗, 或需要利用治疗疼痛的镇痛药来进行治疗。此外, 对化学疗法的较差耐受性在一些患癌个体中可导致死亡。抗癌药物的极端副作用是由较差的靶特异性引起的。药物在大多数正常器官以及目标靶即肿瘤中循环。引起副作用的较差靶特异性还降低了化学疗法的功效, 因为只有一部分药物被正确靶向。化疗疗法的功效因抗癌药物在靶肿瘤中的较短保留而被进一步降低。

[0010] 由于癌症的严重性和广泛性, 存在对此类疾病或障碍的有效治疗的巨大需要, 这些治疗能够克服手术、化学疗法和放射治疗的缺点。具体地, 鉴于与化学疗法相关的严重副作用, 需要鉴定将对化学治疗方案产生响应或不响应的肿瘤。

[0011] 本文中描述的本发明提供了基于利用不同 SPARC 抗体观察到的异质免疫组织学进行癌症治疗的新型方法。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供了利用疗法治疗第一哺乳动物的肿瘤的方法, 所述方法包括: 确定用于该疗法两个或更多个预测性 SPARC 微环境标签 (SPARC Microenvironmental Signature, “SMS”), 包括: 制备来自对所述疗法具有已知结果的其它哺乳动物的肿瘤的多个组织学切片; 利用第一抗 SPARC 抗体对来自对所述治疗具有已知结果的所述其它哺乳动物的每一个肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色, 其中所述第一抗 SPARC 抗体优先对肿瘤细胞内的 SPARC 染色; 利用第二抗 SPARC 抗体对来自对该疗法具有已知结果的所述其它哺乳动物的每一个肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色, 其中所述第二抗 SPARC 抗体优先对成纤维细胞内的 SPARC 染色; 测定第一抗 SPARC 抗体对来自对该疗法具有已知结果的其它哺乳动物的每一个肿瘤在肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 (acellular stroma) / 基质、血管、神经组织、正常解剖组织 (anatomy) 或其任何组合的免疫染色模式, 和第二抗体对肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 / 基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的免疫染色, 从而确定来自对该疗法具有

已知结果的所述其它哺乳动物的每一个肿瘤的 SMS ;使来自具有已知结果的所述其它哺乳动物的每一个肿瘤的肿瘤 SMS 聚类成两个或更多个结果组,其中来自每一个结果组的簇的 SMS 质心 (centroid) 定义了预测性 SMS。然后,通过包含下述的方法确定来自第一哺乳动物的肿瘤的 SMS :制备第一哺乳动物的肿瘤的多个组织学切片 ;利用第一抗 SPARC 抗体对来自所述第一哺乳动物的肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第一抗 SPARC 抗体优先对肿瘤细胞内的 SPARC 染色 ;利用第二抗 SPARC 抗体对来自所述第一哺乳动物的肿瘤的一个或多个所述组织学切片进行免疫染色,其中所述第二抗 SPARC 抗体优先对成纤维细胞内的 SPARC 染色 ;测定第一抗 SPARC 抗体对第一哺乳动物的肿瘤针对于肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 / 基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的免疫染色模式和第二抗体对第一哺乳动物的肿瘤针对于肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 / 基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的免疫染色,从而确定第一哺乳动物的肿瘤 SMS ;和测定第一哺乳动物的肿瘤 SMS 与 (a) 中测定的预测性 SMS 的欧几里德距离 (Euclidian distance), 并且将第一哺乳动物的肿瘤分类为具有最接近的预测性 SMS 的结果组的成员。如果第一哺乳动物的肿瘤 SMS 作图至对该疗法产生响应的结果组,则给该第一哺乳动物施用治疗有效量的所述疗法。

[0014] 根据本发明的实施方案包括,其中第一哺乳动物的相同肿瘤类型与所研究的所有所述“其它哺乳动物”的肿瘤类型相同。可使用任何适当的疗法,包括化学疗法、放射疗法、手术疗法、替代疗法 (alternative therapy) 及其组合。适当的疗法包括例如包括 nab- 紫杉醇的疗法。适当的肿瘤包括乳腺癌、前列腺癌和黑素瘤。可通过任何适当的方法进行聚类,包括例如 K- 均值聚类 (K-means clustering)、自组织地图 (Self Organizing Map) 和层次聚类 (Hierarchical clustering)。

[0015] 本发明提供了利用化学治疗方案或其它合适的疗法治疗哺乳动物内的肿瘤的方法,包括:

[0016] a. 制备所述肿瘤的多个组织学切片以获得 SPARC 微环境标签 (SMS),

[0017] b. 利用第一抗 SPARC 抗体对肿瘤的组织学切片进行免疫染色,其中第一抗 SPARC 抗体优先对肿瘤细胞内的 SPARC 染色,

[0018] c. 利用第二抗 SPARC 抗体对所述肿瘤的组织学切片进行免疫染色,其中所述第二抗 SPARC 抗体优先对成纤维细胞内的 SPARC 染色,

[0019] d. 测定第一抗 SPARC 抗体对肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 / 基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的染色和第二抗体对肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 / 基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的染色,

[0020] e. 如果测定的 SM 符合指示使用所述化学治疗方案或其它适当疗法的预定 SMS 的标准,则施用治疗有效量的所述疗法。

[0021] 本发明提供的指示疗法使用的预定 SMS 包括包含如下免疫染色特征的 SMS,所述免疫染色特征为利用第一抗体产生至少 49% 的间质染色阳性,以及利用第二抗体染色至少如下:成纤维细胞评分为 66、成纤维细胞强度为 41、肿瘤强度为 26、炎症细胞强度为 51、炎症细胞评分为 55、血管%为 33、肿瘤评分为 54、血管强度为 64、成纤维细胞%为 54、血管强度为 64、成纤维细胞%为 54、血管强度为 64、炎症细胞%为 43 和间质评分为 62,其中所述

疗法为包括 nab- 紫杉醇的方案, 并且所述肿瘤为胰腺癌。即, 应用包括这 16 个来自肿瘤中 SPARC 表达的标准的 SMS 来指示应当使用疗法。根据本发明的以及该预定 SMS 组中的这类预定 SMS 也包括只由肿瘤中 SPARC 表达的这些标准中的 2-15 个组成的 SMS。

[0022] 本领域普通技术人员将容易地认识到, 可通过其它系列的肿瘤进行聚类分析来鉴定另外的预定 SMS。

[0023] 本发明还提供了用于预测哺乳动物中的肿瘤对化学治疗方案或其它适当疗法的响应的试剂盒, 其中包括:

[0024] a. 利用第一抗 SPARC 抗体的免疫染色, 其中第一抗 SPARC 抗体优先对肿瘤细胞内的 SPARC 染色, 和

[0025] b. 利用第二抗 SPARC 抗体的免疫染色, 其中第二抗 SPARC 抗体优先对成纤维细胞内的 SPARC 染色。

[0026] 本发明还提供了预测对化学疗法或其它适当疗法的响应以及具有肿瘤的哺乳动物对于肿瘤进展或因肿瘤而死亡是否低风险的方法, 所述方法包括: 制备所述肿瘤的多个组织学切片以获得 SPARC 微环境标签 (SMS), 用第一抗 SPARC 抗体免疫染色肿瘤的组织学切片, 其中所述第一抗 SPARC 抗体优先对肿瘤细胞内的 SPARC 染色, 用第二抗 SPARC 抗体对肿瘤的组织学切片进行免疫染色, 其中所述第二抗 SPARC 抗体优先对成纤维细胞内的 SPARC 染色, 测定利用第一抗 SPARC 抗体对肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 / 基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的染色, 以及利用第二抗体对肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 / 基质、血管、神经组织、正常解剖组织或其任何组合的染色, 以及, 如果存在预定 SMS, 则预测对化学疗法的阳性响应或者疾病进展或死亡存在低风险。

[0027] 本发明还提供了预测哺乳动物内的肿瘤对化学治疗方案的响应 (包括定义为但不限于病理响应、总体存活或无疾病进展存活 (progression free survival) 的响应) 的方法, 包括: 用抗 SPARC 抗体对所述肿瘤的组织学切片进行免疫染色, 其中所述抗 SPARC 抗体识别被 MAB941 单克隆抗体识别的表位, 以及如果该抗 SPARC 抗体对组织学切片中的肿瘤细胞存在染色, 则预测对所述化学治疗方案的不良响应。具体地, 本发明提供了预测胰腺癌对化学治疗方案的响应的方法, 其中所述化学治疗方案包括施用白蛋白结合型纳米颗粒紫杉醇和吉西他滨。

[0028] 本发明还提供了用于预测哺乳动物中的肿瘤对化学治疗方案的响应的方法, 包括: 用识别被 AF941 多克隆抗体识别的免疫显性表位 (immunodominant epitope) 的抗 SPARC 抗体对肿瘤的组织学切片进行免疫染色, 以及如果该抗 SPARC 抗体对组织学切片中的肿瘤细胞有染色, 则预测对所述化学治疗方案的阳性响应。具体地, 本发明提供了预测肿瘤对化学治疗方案的响应的方法, 其中所述化学治疗方案包括施用白蛋白结合型纳米颗粒紫杉醇和吉西他滨。

[0029] 由本发明提供的任何方法均包括其中所述哺乳动物为人患者的方法。

[0030] 几个附图视图的概述

[0031] 图 1 描述了由两种不同抗 SPARC 抗体 (单克隆 (A)、多克隆 (B)) 产生的 SPARC 免疫染色的不同模式。

[0032] 图 2 描述了利用基于 nab- 紫杉醇的方案治疗的、并且表达或不表达 D 染色模式的

乳腺癌患者的存活曲线。

[0033] 图 3 描述了来自乳腺癌患者的无疾病进展存活 (PFS) 数据的 K- 均值聚类的热图。

[0034] 图 4A-C 描述了反映 TN(A)、ER(B) 和 PR(C) 状态对乳腺癌的无疾病进展存活 (PFS) 的影响的存活曲线。

[0035] 图 5 描述了反映 SMS (SPARC 微环境标签) 和 TN 状态对乳腺癌的 PFS 的影响的存活曲线。

[0036] 图 6 描述了反映 SMS 和 ER 状态对乳腺癌的 PFS 的影响的存活曲线。

[0037] 图 7 描述了反映 SMS 和 PR 状态对乳腺癌的 PFS 的影响的存活曲线。

[0038] 图 8 描述了来自使用 5 个存活类别 (survival category) 对乳腺癌患者的响应数据的聚类的热图。

[0039] 图 9 描述了来自使用 2 个存活类别对乳腺癌患者的响应数据的聚类的热图。

[0040] 图 10 描述了来自将患者分成良好预后和不良预后 SMS 组的胰腺癌 PFS 数据的 K- 均值聚类的热图。

[0041] 图 11 描述了基于 SMS 的胰腺癌内无疾病进展存活 (A) 和总体存活 (OS) (B) 的存活曲线。

[0042] 图 12 描述了基于 CA19 状态的胰腺癌无疾病进展存活 (A) 和总体存活 (OS) (B) 的存活曲线。

[0043] 图 13 描述了反映 SMS 和 CA19 状态对胰腺癌 PFS 的影响的存活曲线。

[0044] 图 14 描述了反映 SMS 和 CA19 对胰腺癌 OS 的影响的存活曲线。

[0045] 图 15 描述了来自将患者分成良好和不良 PFS 组的黑色素瘤患者 PFS 数据的 K- 均值聚类的热图。

[0046] 图 16 描述了基于 SMS 的黑色素瘤 PFS (A) 和总体存活 (OS) (B) 的存活曲线。

[0047] 发明详述

[0048] 如本文中所使用的,术语“肿瘤”是指任何赘生性生长、增殖或细胞团,无论是良性还是恶性的(癌性的),无论是原发部位损伤还是转移灶。如本文中所使用的,术语“癌症”是指由对正常生长控制已失去易感性的细胞的增殖引起或表征的增殖性障碍。相同组织类型的癌症通常源于相同组织,并且可基于它们的生物学特征而被分成不同亚型。癌症的 4 个常见类型为癌(上皮组织衍生的)、肉瘤(结缔组织或中胚层衍生的)、白血病(造血组织衍生的)和淋巴瘤(淋巴组织衍生的)。已知 200 多种不同类型的癌症,身体的每一个器官和组织可被影响。癌症的一些具体实例(不限制癌症的定义)可包括黑色素瘤、白血病、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、淋巴瘤、神经胶质瘤、何杰金氏淋巴瘤和慢性淋巴细胞性白血病。可被不同癌症影响的器官和组织的实例包括胰腺、乳腺、甲状腺、卵巢、子宫、睾丸、前列腺、甲状腺、垂体、肾上腺、肾、胃、食道或直肠、头与颈、骨、神经系统、皮肤、血液、鼻咽组织、肺、泌尿道、宫颈、阴道、外分泌腺和内分泌腺。可选择地,癌症可以为多中心的或具有不明原发部位(CUPS)。

[0049] 如本文中所使用的,“癌细胞”是指已经历转化事件并且其生长的调控不再达到与所述转化事件之前相同的程度的细胞。

[0050] 如本文中所使用的,“药剂”为可被施用给患者或测试受试者、能够产生效应的组合物。所述效应可以是化学、生物或物理效应,所述患者或测试受试者可以是人或非人动物

例如啮齿类动物或转基因小鼠。所述组合物可包括合成制造的、自然界中发现的或部分合成来源的具有不同分子组成的小的有机或无机分子。该组中包括的是核苷酸、核酸、氨基酸、肽、多肽、蛋白质或包含这类实体中至少一种的复合物。药剂可由单独的或与药学上可接受的赋形剂组合的有效组合物组成。

[0051] 如本文中所使用的,“药学上可接受的赋形剂”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂、抗微生物或抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。赋形剂可适合于静脉内、腹膜内、肌内、硬膜内或口服施用。赋形剂可包括无菌含水溶液或分散体,用于临时制备无菌注射液或分散体。这类介质用于制备药剂的用途在本领域是已知的。

[0052] 如本文中所使用的,药剂、药物或疗法的“有效量”或“药理有效量”或“治疗有效量”是指在施用后其在使用期间达到所递送的药剂、药物或疗法的治疗水平的浓度的量。这可取决于递送模式、剂量的时期、接受药剂的受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食。确定何种剂量是“药理有效量”需要在本领域普通技术人员的能力之内的常规最优化。基于给定的治疗方案杀死癌细胞或缩小肿瘤大小、降低总癌症生长(即通过减少血管元件(angio element))和/或抑制转移的能力,可将癌症或癌细胞描述为对该治疗方案或化学治疗剂“敏感”或“具有抗性”。对治疗方案有抗性的癌细胞可能对所述方案不响应并且可能继续增殖。对治疗方案敏感的癌细胞可对所述方案有响应,从而导致细胞死亡、肿瘤大小的减小、总体生长(肿瘤负荷)减少或转移的抑制。

[0053] 如本文中所使用的,“治疗方案”或“疗法”是指施用对癌细胞有害的至少一种试剂。按照本发明使用的适当的治疗方案包括但不限于“化学治疗方案”、“放射治疗方案”、“替代治疗方案”及其组合。

[0054] 如本文中所使用的,“化学疗法”是指至少一种有害地破坏癌细胞的化学治疗剂的施用。存在许多临床医生可获得的这类化学治疗剂。可以以单次大剂量(single bolus dose)施用化学治疗剂给受试者,或可以在一段时间内以更小的剂量施用所述化学治疗剂。可使用单一化学治疗剂(单药疗法(single-agent therapy))或可组合使用超过一种试剂(联合治疗(combination therapy))。可单独使用化学疗法来治疗一些类型的癌症。可选择地,可将化学疗法与其它类型的治疗例如本文中描述的放射疗法或替代疗法(例如免疫疗法)组合使用。此外,可将化学增敏剂与化学治疗剂以联合治疗的方式施用。

[0055] 如本文中所使用的,“化学治疗剂”或“抗癌药”是指可用于治疗癌症并且通常具有直接杀死癌细胞的能力的药剂。化学治疗剂的实例包括烷化剂、抗代谢药、天然产物、激素和拮抗剂以及混杂剂(miscellaneous agents)。备选名称的实例示于括号内。烷化剂的实例包括氮芥例如二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑(L-沙可来新)和苯丁酸氮芥;乙烯亚胺类和甲基蜜胺类例如六甲嘧啶和噻替派;烷基磺酸盐例如白消安;亚硝基脲例如卡莫司汀(BCNU)、司莫司汀(甲基-CCNU)、洛莫司汀(CCNU)和链佐星(链脲霉素);DNA合成拮抗剂例如磷酸雌莫司汀;和三嗪例如达卡巴嗪(DTIC,二甲基-三 azeno 咪唑羧酰胺)和替莫唑胺。抗代谢药的实例包括叶酸类似物例如甲氨蝶呤(氨甲蝶呤);嘧啶类似物例如氟尿嘧啶(5-氟尿嘧啶,5-FU、5FU)、氟尿苷(氟脱氧尿苷,FUdR)、阿糖胞苷(胞嘧啶阿糖核苷)和吉西他滨;嘌呤类似物例如巯基嘌呤(6-巯基嘌呤,6-MP)、硫鸟嘌呤(6-硫鸟嘌呤,TG)和喷司他丁(2'-脱氧助间型霉素,脱氧助间型霉素)、克拉屈滨和氟达拉滨;以及拓扑异构酶抑制剂例如安吡啶。天然产物的实例包括长春花生物碱类例如长春碱

(VLB) 和长春新碱;紫杉烷类例如紫杉醇和多西他赛(泰索帝);表鬼臼毒素例如依托泊苷和替尼泊苷;喜树碱例如托泊替坎和伊立替康;抗生素例如更生霉素(放线菌素D)、柔红霉素(道诺霉素,红比霉素)、多柔比星、博来霉素、丝裂霉素(丝裂霉素C)、伊达比星、表柔比星;酶例如L-天冬酰胺酶;和生物反应调节剂(biological response modifier)例如干扰素 α 和白细胞介素2。激素和拮抗剂的实例包括促黄体释放激素(luteinising releasing hormone)激动剂例如布舍瑞林;肾上腺皮质类固醇例如泼尼松和相关制剂;孕激素例如己酸羟孕酮、醋酸甲羟孕酮和醋酸甲地孕酮;雌激素例如二乙基己烯雌酚和炔雌醇以及相关制剂;雌激素拮抗剂例如他莫昔芬和阿那曲唑;雄激素例如丙酸睾酮和氟甲睾酮以及相关制剂;雄激素拮抗剂例如氟他胺和比卡鲁胺;和促性腺激素-释放激素类似物例如亮丙瑞林。混杂剂的实例包括沙立度胺;铂配位络合物例如顺铂(顺-DDP)、奥沙利铂和卡铂;蒽二酮类例如米托蒽醌;取代的脲类例如羟基脲;甲基胍衍生物例如丙卡巴胍(N-甲基胍,MIH);肾上腺皮质抑制剂例如米托坦(o, p'-DDD)和氨鲁米特;RXR激动剂例如贝沙罗汀;和酪氨酸激酶抑制剂例如伊马替尼。此类药物的备选名称和商品名称以及化学治疗剂的其它实例和它们的使用方法(包括给药和施用方案)对于本领域普通技术人员来说是已知的。具体地,按照本发明使用的适当的化学治疗剂包括但不限于纳米颗粒白蛋白结合型紫杉醇。

[0056] Abraxane™,也称为ABI-007,是一种优选的化学治疗剂。Abraxane™为紫杉醇的白蛋白-纳米颗粒制剂。当利用盐水重建时,使用白蛋白纳米颗粒作为媒介物导致胶体形成。基于临床研究,已知Abraxane™的使用具有与Taxol™相比较有所减少的超敏反应的特征。因此,术前用药法(premedication)对于接受Abraxane™的患者不是必需的。

[0057] 白蛋白-纳米颗粒制剂的其它有利方面是通过排除毒性乳化剂,有可能以比对于Taxol™可能采用的间隔更频繁的间隔施用更高剂量的紫杉醇。由于(i)更高的可耐受剂量(300mg/m²)、(ii)更长的半衰期、(iii)延长的局部肿瘤可获得性和/或(iv)持续的体内释放Abraxane™,存在实体瘤中看到增强功效的潜能。

[0058] 阳性响应被定义为包括但不限于病理响应(肿瘤大小或负荷的减小)、总体存活或无疾病进展存活,如由度量方式至少5%,优选至少10%,更优选至少15%,更优选至少20%,最优选至少25%或更多的提高显示的。可选择地,该度量方式显示与无替代疗法或替代疗法之前相比较有统计上显著的量的提高。

[0059] 阴性响应包括但不限于病理进展、总存活或无疾病进展存活减小。

[0060] 如本文中所使用的,术语“放射治疗方案”或“放射疗法”是指杀死癌细胞的辐射的施用。辐射与细胞内的各种分子相互作用,但导致细胞死亡的主要靶为脱氧核糖核酸(DNA)。然而,放射疗法通常还导致对细胞膜和细胞核膜或其它细胞器的损伤。DNA损伤通常包括糖-磷酸主链的单链和双链断裂。此外,存在DNA与蛋白质的交联,这可破坏细胞功能。取决于辐射的类型,DNA损伤的机制可变化,相对生物有效性同样地也可变化。例如,重粒子(即质子、中子)直接破坏DNA并且具有更大的相对生物有效性。电磁场辐射通过主要由细胞水的电离产生的短寿命羟基自由基导致间接电离作用。辐射的临床应用由外线束辐射(来自外部来源)和距离放射疗法(brachytherapy)(使用植入或插入患者的辐射源)组成。外线束辐射由X射线和/或 γ 射线组成,而距离放射疗法应用衰变并且发射 α 粒子或 β 粒子以及 γ 射线的放射性核。

[0061] 还可将放射疗法与化学疗法组合使用,其中化学治疗剂用作放射增敏剂。适合于个体患者的放射疗法的具体选择可由进行护理的本领域技术人员通过考虑癌症的组织 and 分期来确定。

[0062] 如本文中所使用的,术语“替代治疗方案”或“替代疗法”可包括例如生物反应调节剂(包括多肽、碳水化合物和脂质生物响应调节剂)、毒素、凝集素、抗血管生成因子、受体酪氨酸激酶抑制剂(例如 Iressa™(吉非替尼)、Tarceva™(埃罗替尼)、Erbix™(西妥昔单抗)、伊马替尼甲磺酸盐(Gleevec™)、蛋白体抑制剂(例如硼替佐米, Velcade™);VE GFR2 抑制剂例如 PTK787(ZK222584)、极光激酶抑制剂(例如 ZM447439);雷帕霉素的哺乳动物靶(mTOR)抑制剂、环加氧酶-2(COX-2)抑制剂、雷帕霉素抑制剂(例如西罗莫司, Rapamune™);法呢酰基转移酶抑制剂(例如替吡法尼, Zarnestra);基质金属蛋白酶抑制剂(例如 BAY 12-9566;硫酸化多糖 tecogalan);血管生成抑制剂(例如 Avastin™(贝伐单抗);夫马洁林(fumagillin)的类似物例如 TNP-4;羧胺三唑;BB-94 和 BB-2516;沙立度胺;白细胞介素-12;利诺胺;肽片段;以及针对血管生长因子和血管生长因子受体的抗体);血小板衍生生长因子受体抑制剂、蛋白激酶 C 抑制剂、丝裂原活化激酶(mitogen-activated kinase)抑制剂、丝裂原活化蛋白激酶抑制剂、劳斯肉瘤病毒转化癌基因(SRC)抑制剂、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂、小低氧诱导因子抑制剂、hedgehog 抑制剂和 TGF- β 信号转导抑制剂。此外,也可在替代治疗方案中考虑使用免疫治疗剂。实例包括趋化因子、化学趋向素(chemotaxin)、细胞因子、白细胞介素或组织因子。适当的免疫治疗剂还包括含血清或 γ 球蛋白的预先形成抗体;非特异性免疫刺激佐剂;活性特异性免疫疗法;和过继免疫疗法。此外,替代疗法可包括其它基于生物学的化学实体,例如多核苷酸,包括反义分子、多肽、抗体、基因疗法载体等。可将此类替代治疗剂单独或组合或与本文中描述的其它治疗方案组合施用。替代治疗方案中使用的此类试剂的备选名称和商品名称以及替代治疗方案中使用的其它实例和它们的使用方法(包括给药和施用方案)对于本领域医生来说是已知的。此外,在联合疗法的替代治疗方案中使用化学治疗剂和其它试剂的方法(包括给药和施用方案)对于本领域普通技术人员来说也是已知的。

[0063] 具体地,适当的替代治疗方案包括但不限于针对癌细胞表面上的分子的抗体,例如针对 Her2(例如,曲妥珠单抗)、EGF 或 EGF 受体、VEGF(例如,贝伐珠单抗)或 VEGF 受体 CD20 等的抗体。治疗剂还包括介导补体激活、细胞介导的细胞毒性、诱导细胞凋亡、诱导细胞死亡和调理中的一个项或多项的任何抗体或抗体片段。例如,这样的抗体片段可以是完整或部分 Fc 结构域。

[0064] 如本文中所使用的,术语“组织学切片”是指适合用于封固在显微镜载玻片上并且利用任何适当的方案染色的组织样品薄切片。如本文中所使用的,“对组织学切片进行免疫染色”是指因抗体与作为细胞内基质的细胞组分结合而产生的组织学切片的细胞和细胞内基质的染色。如本文中所使用的,为了“显著(predominantly)”或“优先(preferentially)”染色某一结构(例如,癌细胞优先于成纤维细胞),组织学切片中被优先染色的结构的免疫染色应当具有通过病理学家利用任何适当的系统分级的强度,例如当由本领域普通技术人员利用显微镜观察时为 3/3,同时所有其它结构染色只具有 1/3 的强度或显示 0/3(无染色)。

[0065] 如本文中所使用的,术语“表位”是指被抗体结合的三维结构,特别地被抗体靶向

的氨基酸序列。如本文中所使用的,术语“被 MAB941 单克隆抗体识别的表位”是指被 MAB941 单克隆抗体结合的 SPARC 的氨基酸序列。(SPARC 单克隆抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 目录号 MAB941)。

[0066] 如本文中所使用的,“免疫显性表位”是指被多克隆抗血清中的抗体以最大集合亲和力 (collective avidity) 结合的三维结构。具体地,表位在利用该多克隆抗血清的免疫染色方案中负责染色模式。如本文中所使用的,术语“被 AF941 多克隆抗体识别的免疫显性 SPARC 表位”是指发现 AF941 多克隆抗血清对其有最大亲和力的 SPARC 肽和氨基酸序列。因此,对这类 SPARC 肽和氨基酸序列的结合和染色导致大部分被观察到的免疫染色。(SPARC 多克隆抗体 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 目录号 AF941)。

[0067] “抗体”意指但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)。抗体可以是鼠、人、人源化、嵌合抗体或来源于其它物种。抗体为由免疫系统产生的蛋白质,其能够识别并且结合特定抗原。靶抗原通常具有被多个抗体上的 CDR 识别的多个结合位点,也称为表位。特异性结合不同表位的每一种抗体具有不同的结构。因此,一种抗原具有超过一种相应的抗体。

[0068] 抗体包括全长免疫球蛋白分子或全长免疫球蛋白分子的免疫学活性部分,即包含免疫特异性结合目标靶的抗原或其部分的抗原结合部位的分子。靶包括癌细胞或产生与自身免疫疾病相关的自身免疫抗体的其它细胞。

[0069] 本文中公开的免疫球蛋白可以是免疫球蛋白分子的任何类别(例如, IgG、IgE、IgM、IgD 和 IgA) 或亚类(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2)。免疫球蛋白可来源于任何物种。

[0070] “抗体片段”包括全长抗体的一部分,其保持期望的生物活性。“抗体片段”通常为抗原结合部分或其可变区。抗体片段的实例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;双体;线性抗体;由 Fab 表达文库产生的片段、抗独特型(抗-Id)抗体、CDR(互补决定区)和任何上述抗体的表位结合片段,其免疫特异性结合癌细胞抗原、病毒抗原或微生物抗原,单链抗体分子;和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0071] 本文中提及的单克隆抗体明确地包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种的抗体或属于特定抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与源自另一物种的抗体或属于另一抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们显示需要的生物活性(美国专利 No. 4, 816, 567)。本文中的目标嵌合抗体包括“灵长类源化的 (primatized)”抗体,其包含源自非人灵长类动物(例如,旧大陆猴或猿猴)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列。

[0072] “抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性”和“ADCC”是指细胞介导的反应,其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒性细胞(例如,天然杀伤 (NK) 细胞、嗜中性白细胞和巨噬细胞) 识别靶细胞上的结合抗体,随后引起靶细胞裂解。介导 ADCC 的主要细胞即 NK 细胞仅表达 Fc γ RIII, 而单核细胞表达 Fc γ RI、Fc γ R II 和 Fc γ RIII。为了测定目标分子的 ADCC 活性,可以进行体外 ADCC 测定(美国专利 No. 5, 003, 621; 美国专利 No. 5, 821, 337)。用于此类测定的有用的效应细胞包括外周血单个核细胞 (PBMC) 和天然杀伤 (NK) 细胞。

[0073] “诱导细胞死亡”的抗体为引起活细胞变成不存活的抗体。可以在补体和免疫效应细胞不存在的情况下测定体外细胞死亡,以区分由抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性

(ADCC) 或补体依赖细胞毒性 (CDC) 诱导的细胞死亡。因此,可以使用热灭活的血清(即,在补体不存在的情况下)和在免疫效应细胞不存在的情况下进行细胞死亡的测定。为了测定抗体是否能够诱导细胞死亡,可以测定相对于未处理的细胞而言膜完整性的丧失,这可以通过碘化丙啶 (PI)、台盼蓝或 7AAD 的摄取来评价。细胞死亡诱导性抗体是在 PI 摄取测定中诱导 BT474 细胞摄取 PI 的那些抗体。

[0074] “诱导细胞凋亡”的抗体是诱导程序性细胞死亡的抗体,如通过膜联蛋白 V 的结合、DNA 的片段化、细胞皱缩、内质网膨胀、细胞片段化和 / 或膜囊泡(称作凋亡小体)的形成来测定。

[0075] 如本文中所使用的,“化学增敏剂”或“致敏物质”为可增强化学治疗剂、放射治疗或替代治疗方案的疗效,从而增强这样的治疗或试剂的功效率的药剂。也可在动物例如人或啮齿类动物中通过例如在一段时间内测量肿瘤大小、肿瘤负荷或转移灶的发病率来测量肿瘤或癌细胞对治疗的敏感性或抗性。例如,对于人进行约 2、约 3、约 4 或约 6 个月,对于小鼠进行约 2-4、约 3-5 或约 4-6 周。如果与在这样的组合物或方法不存在的情况下的治疗敏感性或抗性相比较,治疗敏感性增加或抗性减小达到约 10% 或更高,例如约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80% 或更高或约为 2 倍、约为 3 倍、约为 4 倍、约为 5 倍、约为 10 倍、约为 15 倍、约为 20 倍或更多,则所述组合物或治疗方法可增加肿瘤或癌细胞对治疗性治疗的反应敏感性。测定对治疗性治疗的敏感性或抗性在本领域是常规的,并且在本领域普通技术人员的能力范围之内。

[0076] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,意指由通过肽键或经修饰的肽键例如肽等排物 (peptide isostere) (经修饰的肽键) (其可为肽提供额外的期望的性质例如增加半衰期) 共价连接的至少两个氨基酸残基组成的化合物。肽可包括至少两个氨基酸。本文中描述的包含氨基酸的肽或蛋白质还可通过天然过程例如翻译后加工或通过本领域公知的化学修饰技术进行进一步修饰。修饰可在肽中的任何地方发生,包括肽主链、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。应理解,相同类型的修饰可以以相同或不同的程度存在于给定肽的若干位置上。

[0077] 可利用本领域普通技术人员已知的任何适当方法制备组织阵列并且对其进行染色。例如,可排列来自福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤块的组织核心(每块 2 个来自最具代表性的区域的核心) (Beecher Instruments, Silver Spring, Md) 以产生各自测量为 2.0mm 的核心的组织微阵列并且将其置于带正电荷的载玻片上。随后将具有样品的载玻片置于 60°C 烘箱中进行 1 小时,冷却,通过二甲苯脱蜡和通过梯度乙醇溶液至水对其再水化。将所有载玻片于 3% 过氧化氢水溶液中猝灭 5 分钟以封闭内源过氧化物酶。可利用任何适当的技术例如加热法(其中将样品置于柠檬酸溶液, pH 6.1 (编号 S1699, Dako, Carpinteria, Calif) 中于 94°C (使用蔬菜蒸笼 (vegetable steamer)) 下进行 20 分钟,然后冷却 15 分钟) 来进行抗原修复。随后将载玻片置于 Dako Autostainer 免疫染色系统上以用于利用适当的抗体进行的免疫组织化学。该方法基于如下物质的连续施用:(1) 抗定位的抗原的一抗,(2) 生物素化的连接抗体,(3) 缀合有酶的链霉抗生物素蛋白和 (4) 底物色素原 (DAB)。随后在 Richard-Allan 苏木精 (Kalamazoo, Mich) 中对载玻片进行复染,通过梯度乙醇溶液脱水,然后盖上盖玻片。

[0078] 可使用本领域普通技术人员已知的任何适当的方案进行 2- 色双免疫染色。例如,

可以以 4 μm 切割石蜡包埋的组织块,将其置于带正荷的载玻片上,但不限于此。随后将具有样品的载玻片置于 60℃烘箱中进行 1 小时,冷却,通过二甲苯脱蜡和通过梯度乙醇溶液至水对其再水化。将所有载玻片于 3%过氧化氢水溶液中猝灭 5 分钟以封闭内源过氧化物酶。可利用本领域普通技术人员已知的任何适当的方案进行抗原修复。例如利用加热法,其中将样品置于柠檬酸溶液 (pH 6.1) 中于 94℃ (使用蔬菜蒸笼) 进行 25 分钟 (与对于先前提及的单一抗体的 20 分钟相比较),随后冷却 15 分钟。随后将载玻片置于 Dako Autostainer 免疫染色系统上以用于免疫组织化学。

[0079] 将第一抗在室温下温育 30 分钟。将检测系统 EnVision+dual link (Dako, 编号 K4061) 温育 30 分钟。最后,加入 DAB 色素原。在应用第二抗前,加入无血清的蛋白质封闭剂 (Dako, 编号 X0909) 以使本底和一抗之间的交叉反应降至最低。将第二抗在室温下温育 1 小时。再将 EnVision+dual link (Dako, code K4061) 用作检测系统,并且温育 30 分钟。可将 NovaRED (Vector Laboratories, Burlingame, Calif) 与第二抗一起使用以便可容易地区分由所述两种抗体产生的染色。随后在 Richard-Allan 苏木精中对载玻片进行复染,通过梯度乙醇溶液脱水,盖上盖玻片。

[0080] 可使用组织微阵列测定肿瘤和成纤维细胞 SPARC 染色的正确分布来鉴定适当的抗 SPARC 抗体。可使用通过本领域已知的标准技术制备的单克隆和多克隆抗体。

[0081] 可使用 Beecher Instruments Micro Tissue Arrayer 来建立包含来自选定块的一式二份重复的 0.6-mm 核心的组织微阵列。可从完成的阵列块切割 4 微米厚的切片,将其转移至硅烷化的载玻片上。随后可用苏木精和伊红对来自这些阵列的切片进行染色以估计适合性。微波抗原修复可由将载玻片在高压锅 (pressure cooker) (Nordic Ware) 中置于 10mM 柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 中和以大功率进行微波加热直至缓冲液在压力下沸腾 4 分钟组成。此时,终止微波加热,将载玻片在高压锅内再温育 20 分钟,之后将它们取出,进行漂洗。蛋白酶抗原修复由按照提供商推荐的方案在蛋白酶-1 溶液 (Ventana) 中进行的 4 分钟温育组成。

[0082] 还可使用本领域已知的标准技术进行表位作图。例如,使用 Using Antibodies by Ed Harlow 和 David Lane. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1999 (通过将其引用整体并入本文) 的第 11 章“Epitope Mapping”的方案。通过对表位作图,可利用标准技术容易地产生表位特异性抗体。

[0083] 用于确定 SPARC 微环境标签 (SMS) 的方法是利用第一抗 SPARC 抗体 (其中所述第一抗 SPARC 抗体优先对肿瘤细胞内的 SPARC 染色) 和利用第二抗 SPARC 抗体 (其中所述第二抗 SPARC 抗体优先对成纤维细胞内的 SPARC 染色) 对肿瘤的组织学切片进行免疫染色。利用两种不同的抗体测定 SPARC 表达的七个组分:肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质/基质(间质)、血管、神经和其它正常解剖组织。测定每一个视野内染色细胞的百分比、染色强度 (0-4) 和肿瘤的每一个组分的评分 (因变量) (每患者的总变量: 7 个组分 x 2 种抗体 x 3 个评分 = 42 个被评分变量)。

[0084] 评分组合了阳性细胞%和染色强度。如果没有细胞或没有组分被阳性染色则评分为负数。如果少于 10%的细胞为阳性 (无论染色强度如何),强度为 2+ 或更小并且少于 20%的细胞为阳性,或强度为 1+ 并且少于 30%的细胞为阳性,则评分为“弱阳性”。如果强度为 4+ 并且 10-40%的细胞为阳性,强度为 3+ 并且 10-50%的细胞为阳性,强度为 2+ 并且

20-70%的细胞为阳性,或强度为 4+ 或更小并且 10-40%的细胞为阳性,或强度为 1+ 或更小并且超过 30%的细胞为阳性,则评分为“中等阳性”。如果强度为 4+ 并且超过 40%的细胞为阳性,或强度为 3+ 并且超过 50%的细胞为阳性,强度为 2+ 并且超过 70%的细胞为阳性,则评分为“强阳性”。

[0085] 使用 Elementspring™ 软件组中的聚类程序和 Nexus™ 阵列分析程序挖掘该数据。此外,对于聚类分析显示对各种结果参数区分力较差的参数,测定 ANOVA 或 t- 检验 (未成对的) 统计。

[0086] 层次聚类为广泛使用的数据挖掘技术,其提供了数据的良好‘一遍通过 (first pass)’ 分析。其包括反复使用几个技术之一,从一个数据点 (即,测量的参数值) 或“要素”开始,然后将要素与它们的最接近的邻居组合,逐渐建立簇 (cluster) 和簇联合 (association)。最终结果为层次树 (hierarchical tree) (例如,图 3)。各簇之间的距离由它们的平均表达模式之间的距离确定。以为所有生物学家熟悉和容易理解的层次树或系统树图的形式产生了簇的可视展现。这种树结构使得可容易地视觉上看出要素或要素组之间的表达模式的相似程度如何。

[0087] 非层次聚类技术将 N 个要素归类至 K 个簇中。两个具体实例为 K- 均值聚类 (K-Means clustering) 和自组织地图 (Self Organizing Maps)。K- 均值聚类始于预定 (K) 数目的簇,或“质心”,并且包括 3 步骤过程。第一,将各要素随机分配至质心。第二,随后计算平均的簇间和簇内距离。最后,将要素从一个簇移至另一个簇。重复步骤 2 和 3 直至簇内距离最小化和簇间距离最大化,这通常导致 K 个圆形簇。将新要素分类在具有最接近的质心的簇中。质心是簇中所有点的平均值。K- 均值聚类擅长于在其中组的数目已知时对要素进行聚类。例如,可按照 K- 均值聚类来分析包含癌性和非癌性组织的数据集以鉴定 2 组基因:因癌症而改变的基因和未改变的基因。

[0088] 通过神经网络技术将节点反复作图至 n 维“要素空间”来产生自组织地图 (SOM)。该技术整合了现有知识,因为在分析之前赋予了部分结构 (必须分配簇的数目和维数)。随后,产生随机向量,将其加至每一个节点。然后,计算向量与随机选择的基因之间的距离。更新离所述基因最接近的向量,使其更象要素的向量。重复该方法数千次直至不能再产生变化。该方法将高维要素空间转变成更易操纵和更易理解的某种东西。

[0089] SPARC 微环境标签 (SMS) 意指利用两种抗 SPARC 抗体的染色模式,如通过每一种抗体的免疫染色的组织学定位、强度和频率所显示的。关于“聚类”,其意指使用任何适当的聚类方法基于 SMS 的临床结果而将 SMS 分组和鉴定有助于区分一组与另一组的 SMS 组分。适当的方法包括例如 K- 均值、自组织地图和层次聚类 (其全都可利用本领域普通技术人员已知的商购可得软件来进行)。“质心”是确定聚类组的参数范围。在本申请中,其明确地是指区分不同 SMS 组的 SMS 组分值,例如,用于分类为“应答者”的标准。分配至结果组是确定哪个质心最好地代表可获得的确定你所属组的数据的方法。

[0090] 虽然所有聚类技术在某些条件下很出色,但它们也具有局限性,这对本领域普通技术人员来说是已知的。例如,层次聚类对可能反映或不反映现实性的数据赋予刚性关联结构 (rigid relational structure)。K- 均值聚类和 SOM 产生需要预定数目的簇。这在某些情况下十分合适,但对于完全未知的探索性数据分析如确定基因关系而言,不能事先确定簇的适当数目。K- 均值聚类具有另外的局限性,即其产生相当圆的簇,从而导致不能准

确地鉴定封闭的或具有几何形状的簇。最后,虽然聚类分析显示了要素组之间的联系,但不能得出关于簇内各要素之间关系(例如作用的方向)的结论。

[0091] 减少要素的数目是一个重要的步骤,理想地在可应用上述分类方法之前进行该步骤。应当进行该步骤以保持尽可能多的判别信息来提高学习精度(learning accuracy)。正确定义的要素应当对于相同类别的所有样品具有相同的表达模式,并且对于属于不同类别的样品具有不同的表达模式。用于类别预测的“最接近收缩质心(nearest shrunken centroid)”法使用“缩小的”质心作为每一个类别的原型,并且鉴定最佳地表征每一个类别的要素亚组。所述方法通过与阈值比较而将每一个类别质心向所有类别的总体质心收缩。该收缩通过消除噪音要素的作用而使得分类更准确,因此自动地选择要素。将新样品的要素特征与这些类别质心的每一个相比较。以平方距离最接近其质心的类别为该新样品的预测的类别。

[0092] 在选择用于分类的适当要素中要考虑两个因素:类别内的距离和类别之间的距离。当同一类别内的所有样品的要素水平相当一致(具有小的变化),但在不同类别的样品之间极不相同,该要素被认为是分类的良好候选者。基因具有不同类别的判别信息。在最接近收缩质心法中,进一步考虑类别内的变化以测量类别内基因的良好度(goodness)。将类别质心与要素的总体质心之间的差异除以每一个类别中的差异,以给具有更小差异的要素提供更大的权重。将阈值用于所得的标准化类别质心差异。如果其对于所有类别均较小,则将其设置为0,这意味着消除了所述要素。这样可减少用于最终预测模型的要素数目。

[0093] 可将关联法则用于鉴定要素之间的关系、基因与几个其它组要素之间的关系,并且最终可指示特定的治疗作用。第一步骤是离散化数据并且将其转变成布尔或第三记法(tertiary notation)。随后建立截断值,针对该值将数据归类为上调或下调。具有高于此截断值的数值的被上调基因被分配数值‘1’。具有低于该截断值的数值的被下调基因被分配数值‘0’。可选择地,可分配两个截断值,并且可将基因归类为被上调的(并且分配数值1)、被下调的(并且分配数值-1)或未改变(并且分配数值0)。

[0094] 可使用血管生成抑制剂的任何适当剂量,例如,以约5mg/kg至约15mg/kg的剂量施用阿瓦斯丁,给药周期为至少1周。

[0095] 疏水性化学治疗剂具有为1.0或更少,优选2.0或更少,最优选5.0或更少的HLB(HLB为亲水/亲脂平衡数),包括例如药剂埃博霉素(Epothilone)、多西他赛、紫杉醇。微管抑制剂例如紫杉烷类包括埃博霉素、多西他赛、紫杉醇及其组合。“其组合”是指包括超过一种药物例如多西他赛和紫杉醇的剂型的施用以及连续的、但时间上分开的埃博霉素、多西他赛和紫杉醇施用(例如,在一个周期中使用多西他赛,并且在下一个周期中使用紫杉醇)。特别优选的化学治疗剂包括蛋白质结合药物的颗粒,包括但不限于,其中组成蛋白质结合药物颗粒的蛋白质包括白蛋白,包括其中超过50%的化学治疗剂以纳米颗粒形式存在。最优选地,所述化学治疗剂包括白蛋白结合型紫杉醇的颗粒,例如Abraxane™。适当的纳米颗粒制剂不限于以纳米颗粒形式包含至少约50%活性剂的那些制剂。其它适当的纳米颗粒制剂包含至少约60%,优选至少约70%,更优选至少约80%,或更优选至少约90%的以纳米颗粒形式存在的活性剂。此外,这样的纳米颗粒制剂可最优选包含至少约95%至至少约98%的以纳米颗粒形式存在的活性剂。

[0096] Her2阳性乳腺癌的适当疗法还包括含有6个周期的下述处理的方案:在每一个28

天的周期的第 1、8、15 天以 125mg/m² 施加新辅助疗法 (neoadjuvant) nab- 紫杉醇、在每一个 28 天的周期的第 1 天施加卡铂 AUC6 ;以 4mg/kg 负荷施用曲妥珠单抗, 然后以 2mg/kg/wk 施用曲妥珠单抗和以 5mg/kg/wk 施用贝伐珠单抗 ;然后手术去除原发性肿瘤 ;以及术后治疗有效量的曲妥珠单抗和贝伐珠单抗, 进行 52 周。Her2 阴性乳腺癌的适当疗法包括例如, 术前疗法, 包括利用 nab- 紫杉醇 (175mg/m²)、吉西他滨 (2000mg/m²) 和表柔比星 (50mg/m²) 的 6 个 14 天周期 ;然后手术去除 ;以及术后疗法, 包括 (4 个 14 天的周期) 和 nab- 紫杉醇 (220mg/m²) + 吉西他滨 (2000mg/m²)。

[0097] 下列实施例进一步举例说明本发明, 但当然不应当被解释为以任何方式限制其范围。

[0098] 实施例 1

[0099] 本研究的目的是评估肿瘤微环境中哪一种 SPARC 同种型和功能负责患者的结果, 以及特别地确定 SPARC 免疫染色的模式与利用纳米颗粒白蛋白结合型 (nab) 紫杉醇 (即, Abraxane[®]) 的患者结果之间是否存在相关性。

[0100] nab- 紫杉醇可利用白蛋白运输的内源途径来进入肿瘤细胞, 包括内源细胞 gp60- 白蛋白受体运输和结合由肿瘤分泌的 SPARC。头颈癌的初始临床前研究和小型回顾性临床研究表明肿瘤组织内增加的内源 SPARC 可预测对 nab- 紫杉醇治疗的有利响应 (Desai 等人, 2009, Trans Onc. 2, 59-64)。

[0101] 进行 4 个前瞻性研究, 以确定 SPARC 肿瘤免疫染色模式即“SPARC 微环境标签” (SMS) 是否可区分在利用 nab- 紫杉醇方案治疗时具有低和高复发风险的患者。

[0102] 评估来自这 4 个临床试验的患者结果 (表 1)。

[0103] 表 1. 提供样品和结果数据的临床试验

[0104]

研究	适应症	分期	患者数目	具有 SPARC IHC 的患者数目	方案
N057E	不能切除的 IV 期黑素瘤	II	76	40	<i>nab</i> - 紫杉醇 (100-150 mg/m ²)每周 3/4 卡铂(AUC 2)每周 3/4
CA040	转移性胰腺癌	I/II	63	37	<i>nab</i> - 紫杉醇 (100-150 mg/m ²)每周 3/4 吉西他滨(1000 mg/m ²)每周 3/4
BRE73	新辅助疗法 乳腺癌 (HER2-)	II	123	83	术前： (6 个 14 天的周期) <i>nab</i> - 紫杉醇 (175 mg/m ²)+ 吉西他滨 (2000 mg/m ²)+ 表柔比星(50 mg/m ²) 术后:(4 个 14 天的周期) <i>nab</i> - 紫杉醇 (220 mg/m ²)+ 吉西他滨 (2000 mg/m ²)
BRE83	新辅助疗法 乳腺癌 (HER2+)	II	30	30	术前： (6 个 28 天的周期) <i>nab</i> -紫杉醇(100 mg/m ²)每周 ¾ + 卡铂 (AUC6)+ 曲妥珠单抗(4 mg/kg 载荷，然后 2 mg/kg/wk)+ 贝伐单抗(5 mg/kg/wk)

[0105]

					术后维持(1年): 曲妥珠单抗 (6 mg/kg)q3wk 贝伐单抗 (15 mg/kg)q3wk
--	--	--	--	--	---

[0106] 总体上,此方法基于如下物质的连续施用:(1) 抗待定位的抗原的一抗,(2) 生物素化的连接抗体,(3) 缀合有酶的链霉抗生物素蛋白和(4) 底物色素原(DAB)。随后在Richard-Allan 苏木精(Kalamazoo, Mich)中对载玻片进行复染,通过梯度乙醇溶液脱水,然后盖上盖玻片。使用自动染色装置(Dako Cytomation Autostainer,Dako,Carpinteria, CA)对所有载玻片进行染色。

[0107] 如下所述进行本实施例的免疫染色。评估抗 SPARC 的一系列抗体。由通过美国病理委员会(American Board of Pathology)认证的病理学家进行详细的免疫组织学评估。按照 0-4+ 的等级分配染色评分,4+ 为最阳性的。由于不知道肿瘤的哪一个组分对于 SPARC 的活性是重要的,因此进行各组分的分解,包括肿瘤、血管、成纤维细胞、间质细胞、炎症细胞和正常解剖组织内的染色。

[0108] 将来自福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤块(每块有 2 个来自最具代表性的区域的核心)的组织核心排成阵列(Beecher Instruments, Silver Spring, Md)以产生各自测量 2.0mm 的核心的组织微阵列,并且将其置于带正电荷的载玻片上。将具有样品的载玻片置于 60°C 烘箱中进行 1 小时,冷却,通过二甲苯脱蜡和通过梯度乙醇溶液至水对其再水化。将所有载玻片于 3% 过氧化氢水溶液中猝灭 5 分钟以封闭内源过氧化物酶。

[0109] 如果未看到染色,则进行抗原修复,以相同视野中的正常组织的染色用作内部阳性对照。可利用加热法进行抗原修复,其中将样品置于柠檬酸溶液,pH 6.1(编号 S1699, Dako, Carpinteria, Calif)中于 94°C(使用蔬菜蒸笼)下进行 20 分钟,然后冷却 15 分钟。随后将载玻片置于免疫染色系统例如 Dako Cytomation Autostainer(Dako, Carpinteria, CA)上,用于利用适当的抗体进行免疫组织化学。

[0110] 在本研究中鉴定到对 SPARC 具有差别亲和力的两种抗体,单克隆抗体(在下文中以“M”表示)(以 1:100 稀释于 tris 碱稀释剂中的 SPARC 单克隆抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN),目录号 MAB941 批号 ECH045011)和多克隆抗体(在下文中以“P”表示)(以 1:50 稀释于 tris 碱稀释剂中的 SPARC 多克隆抗体(R&D Systems, Minneapolis, MN),目录号 AF941 批号 EWN04)。在载玻片上制备肿瘤的组织学切片,使用标准免疫染色方案进行染色。简而言之,将来自福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤块的组织核心(每块有 2 个来自最具代表性的区域的核心)排成阵列(Beecher Instruments, Silver Spring, Md)以产生各自测量 2.0mm 的核心的组织微阵列,并且将其置于带正电荷的载玻片上。随后将具有样品的载玻片置于 60°C 烘箱中进行 1 小时,冷却,通过二甲苯脱蜡和通过梯度乙醇溶液至水对其再水化。随后将所有载玻片于 3% 过氧化氢水溶液中猝灭 5 分钟以封闭内源过氧化物酶。可利用加热法进行抗原修复,其中将样品置于柠檬酸溶液(pH 6.1)中于 94°C(使用蔬菜蒸笼)下进行 25 分钟(与先前提及对于单一抗体的 20 分钟相比较),然后冷却 15 分

钟。随后将载玻片置于免疫染色系统 (Dako, Carpinteria, CA) 上以用于免疫组织化学。

[0111] 将所有载玻片于 3% 过氧化氢水溶液中猝灭 5 分钟以封闭内源过氧化物酶。在缓冲液漂洗后,用抗体 M 或阴性对照试剂温育载玻片 30 分钟。对于每种试剂,将小鼠辣根过氧化物酶聚合物试剂盒 (小鼠 MACH 3 HRP Polymer 试剂盒, Biocare Medical, Concord, CA) 温育 20 分钟。在进行再一次缓冲液漂洗后,施用 DAB 色素原 (Dako, Carpinteria, CA), 进行 10 分钟。将苏木精用于复染载玻片。使用相同的方案,利用抗体 P 对样品进行免疫染色,但使用抗生物素蛋白 - 生物素检测试剂盒 (Biocare Medical, Concord, CA) (每种试剂温育 15 分钟) 替代 HRP 检测试剂盒。

[0112] 由委员会认证的病理学家进行一系列肿瘤内 SPARC 表达的详细病理学评估。针对不同肿瘤组分,对 SPARC 表达水平 (如通过免疫组织化学测定的) 进行评分。按 0-3 的等级将评分赋予 SPARC 表达水平,3 为最高阳性评分,这在本领域内常规地进行并且对于本领域普通技术人员来说是公知的。所使用的单克隆和多克隆抗体检测不同的 SPARC 表达模式,如表 2 中显示的。

[0113] 表 2. M 和 P 免疫染色特征

[0114]

	肿瘤			成纤维细胞		
	抗体 P	抗体 M		抗体 P	抗体 M	
乳腺	30/106	35/106	p = ns	82/107	26/107	p < 0.0001
胰腺	20/36	7/36	p = 0.0031	18/29	5/29	p = 0.0011
黑素瘤	30/41	20/41	p = 0.0408	19/33	14/33	p = ns

[0115] 所述多克隆抗体显示对成纤维细胞相关 SPARC 的优先染色,而所述单克隆抗体对肿瘤相关 SPARC 优先染色 (图 1)。

[0116] 根据这些染色优先性,建立下列模式分析它们在一系列肿瘤中的预测值:

[0117] A,当在任何组分中发现为 3+ 时。

[0118] B,当利用单克隆抗 SPARC 抗体在任何组分中发现为 3+ 时。

[0119] C,当利用单克隆抗 SPARC 抗体在任何组分中发现为 3+ 时。

[0120] D,当利用两种抗 SPARC 抗体在肿瘤细胞中发现为 3+ 时。

[0121] E,当利用两种抗 SPARC 抗体在成纤维细胞中发现为 3+ 时。

[0122] 将逻辑回归和成比例的危险用于鉴定 SMS 与响应、无疾病进展存活期 (PFS) 以及总体存活 (OS) 与各种肿瘤内 SPARC 染色模式之间的任何相关性。

[0123] 分析的第一肿瘤组为具有不能切除的 IV 期黑素瘤 (N057E 研究) 的患者的卡铂和 nab- 紫杉醇 (a. k. a., ABI-007) II 期试验。在 D 模式与更好的总体存活之间存在统计上显著的相关性 (图 2)。

[0124] 肿瘤的第二组来自自己利用 nab- 紫杉醇剂量 (CA040 研究) 治疗的晚期胰腺癌患

者。研究的 32 个患者具有全范围的响应（表 3. 应答率）。

[0125] 表 3. 应答率

[0126]

响应	CR	PR	SD	PD
32 个患者中数目	2 (6%)	14 (44%)	14 (44%)	2 (6%)

[0127] (*CR, 完全响应 ;PR, 部分响应 ;SD, 无响应和稳定的疾病 ;PD, 无响应和进行性疾病)

[0128] 在第二组肿瘤（晚期胰腺癌）中, 所述多克隆抗体对肿瘤的染色预示了对疗法的响应（单尾 t- 检验, $p = 0.027$ ）。此外, 所述单克隆抗体对肿瘤细胞的染色也预测了更差的总体存活和无疾病进展存活。此外, B 模式染色预示了胰腺癌患者中采用该方案的最差无疾病进展存活。

[0129] 本实施例证明了 SPARC 免疫组织化学是用于预测对基于 nab- 紫杉醇的化学疗法的响应的有效方法。

[0130] 实施例 2

[0131] 对来自 SPARC 免疫染色的染色模式数据进行更系统的分析, 以鉴定产生预后信息的模式。使用不同形式的聚类分析挖掘来自实施例 1 中研究的相同肿瘤组的染色模式数据, 以在各种肿瘤中就针对 SPARC 染色模式的响应、无疾病进展存活 (PFS) 和总体存活 (OS) 鉴定最具区分性的 SPARC 表达组分（如通过免疫染色模式显示的）。如上文中所指出的, 显现为预后重要的模式被称为“SPARC 微环境标签”（“SMS”）。

[0132] 利用两种不同抗体测定 7 个肿瘤组分: 肿瘤内的肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、无细胞间质 / 基质（间质）、血管、神经和其它正常解剖组织的 SPARC 表达。随后测定每一个肿瘤组分的染色细胞%、染色强度 (0-4) 和“评分”。“评分”组合了染色细胞%和染色强度。如果无细胞或无组分染色阳性, 则评分为“阴性”。如果少于等于 20% 的细胞为阳性并且强度为 2+ 或更低, 则评分为“弱阳性”, 如果少于等于 30% 的细胞为阳性或强度为 1+ 或更低, 则评分也为“弱阳性”。如果强度为 4+ 并且 10-40% 的细胞为阳性, 强度为 3+ 并且 10-50% 的细胞为阳性, 强度为 2+ 并且 20-70% 的细胞为阳性, 或强度为 4+ 或更低并且 20-40% 的细胞为阳性, 或强度为 1+ 或更低并且超过 30% 的细胞为阳性, 则评分为“中等阳性”。如果强度为 4+ 并且超过 40% 的细胞为阳性, 或强度为 3+ 并且超过 50% 的细胞为阳性, 强度为 2+ 并且超过 70% 的细胞为阳性, 则评分为“强阳性”。

[0133] 使用 Elementspring™ 软件组中的聚类程序和 Nexus™ 阵列分析程序挖掘该数据。此外, 对于聚类分析显示为具有判别能力的参数, 进行 ANOVA 或 t- 检验（未成对的）统计分析。

[0134] 以来自 BRE73 乳腺癌研究的染色数据鉴定 SMS 模式。K- 均值聚类分析基于免疫染色区分具有优良 PFS 的患者。具有“好”SPARC 良好模式的患者 24 个月 PSF 为 91%, 而显示“坏”SPARC 模式的患者 24 个月 PSF 为 56%。

[0135] 此外, 鉴定将这些患者分入各预后组的参数（表 4）（“截断值”为被分类在良好预

后组中所需的值) (也参见图 3)。

[0136] 表 4. 乳腺癌中 PFS 的 SMS 组分

[0137]

SMS 组分	截断值	p- 值
P 炎症细胞%	≥ 50%	< 0.0001
M 肿瘤%	≥ 70%	< 0.0001
P 血管%	≥ 70%	< 0.0001
M 成纤维细胞%	≥ 70%	< 0.0001
M 血管%	≥ 70%	< 0.0001
M 间质%	≥ 70%	< 0.0001
P 间质%	≥ 70%	< 0.0001
M 炎症细胞%	≥ 70%	< 0.0001

[0138] 如所预期的, 雌激素受体 (ER)、孕激素受体 (PR) 和三重阴性 (TN) 状态预测了 PFS (图 4A-C)。令人惊讶地, SMS 以一个独立风险因子 (即, 独立于已知的风险因子 ER/PR/三阴性状态 (表 5)) 起作用。

[0139] 表 5. 乳腺癌的 SMS 和已知的风险因子

	ER- (N=39)	PR- (N=42)	三重阴性 (N=30)
[0140] 具有已知风险因子的 SPARC 良好 SMS	15/37(41%)	16/37(43%)	10/37(27%)
具有已知风险因子的 SPARC 坏 SMS	24/46(52%)	26/46(57%)	20/46(43%)
统计	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>	<i>p=ns</i>

[0141] 此外, 当将 SMS 加入至已知风险因子时, 对于所研究的基于 nab-紫杉醇的方案, 其改善基于 PFS 的低风险组与高风险组之间的分层或区分 (图 5-7)。0、1 和 2 个风险因子的组之间在第 24 个月的 PFS 是显著不同的。但是, 将 SPARC SMS 加入三重阴性状态进一步区分了具有低风险 (0 个风险因子) 与具有高风险 (≥ 2 个风险因子) 的患者 (对于不同数目的风险因子, 对数分级 p 值为: 0 个因子对 2 个因子, $p = 0.0009$; 1 个因子对 2 个因子, $p = 0.039$) (图 5)。同样地, 还发现具有 1 个风险因子的组是独特的并且具有中等风险。

[0142] 将 SPARC SMS 簇加至 ER 进一步区分了具有低风险 (0 个风险因子) 与具有高风险

(2 个风险因子) 的患者 (对于不同数目的风险因子, 对数分级 p 值为 :0 个因子对 2 个因子, $p = 0.0001$;1 个因子对 2 个因子, $p = 0.026$) (图 6)。

[0143] 将 SPARC SMS 簇添加至 ER 进一步区分了具有低风险 (0 个风险因子) 与具有高风险 (2 个风险因子) 的患者 (对于不同数目的风险因子, 对数分级 p 值为 :0 个因子对 2 个因子, $p = 0.0004$;1 个因子对 2 个因子, $p = ns$) (图 7)。这些结果证实了 SMS 与预测对疗法的响应、进展或死亡的现有技术标志的组合可提高这类标志的预后准确度。

[0144] 响应被分类为部分完全 (pCR)、完全响 (CR)、部分响应 (PR)、(SD)、(PD)、不可获得的 (N/A) (表 7)。还通过聚类分析鉴定响应的 SMS (图 8)。

[0145] 表 6. 响应组

[0146]

响应	N
pCR	9
CR	9
PR	54
SD	5
PD	2
N/A	4

[0147] 可选择地, 可将响应结果显示为分组至应答者 (pCR、CR、PR ; $n = 72$) 和无应答者 (SD, PD ; $n = 7$) 中。对于该二元响应分类, 也利用聚类分析鉴定 SMS (图 9)。

[0148] 利用聚类分析鉴定参与响应 SMS 的参数 (图 9) (表 7)。

[0149] 表 7. 乳腺癌的响应 SMS 组分

[0150]

SMS 组分	截断值	p- 值
M 间质%	$\geq 60\%$	0.002
M 肿瘤%	$\geq 60\%$	0.027
M 血管%	$\geq 60\%$	0.0497
P 肿瘤%	$\geq 60\%$	0.054

[0151] 也分析来自 CA040 胰腺癌试验的数据。此外, 可将分析扩展至来自相同患者的细胞学样品。

[0152] 对胰腺癌数据进行层次聚类, 以便将患者基于 SMS 分入两个组。分析这两个组的 PFS 和 OS 结果。聚类分析显示综合在一起的 SPARC 低风险组分在 SPARC 上比高风险组分显著更高 (约 33%) (总评分为 839 对 629, 显著平均值的和)。对于低风险组, 所有检查的区

室（肿瘤细胞、成纤维细胞、炎症细胞、血管和无细胞间质）中各组分在 SPARC 上更高。

[0153] 此外,通过使用阳性细胞%和将强度定量为 0+ = 0、1+ = 25、2+ = 50、3+ = 75、4+ = 100 以及将评分评定为“阴性”= 0、“弱阳性”= 33、“中等阳性”= 66、“强阳性”= 100, 产生了下列总结果（同样,鉴定了最重要的参数（图 10）（表 8））和截断值（表 9）。

[0154] 表 8. 胰腺癌 SMS 组分

[0155]

变量的平均值	SPARC 高风险	SPARC 低风险人	高对低风险 簇 P-值
多克隆抗体成纤维细胞评分	65.52	86.83	1.01E-06
多克隆抗体成纤维细胞强度	40.63	67.81	1.57E-04
多克隆抗体肿瘤强度	25.84	48.80	2.27E-04
单克隆抗体间质%	61.88	82.00	3.28E-03
多克隆抗体炎症细胞强度	25.84	42.26	4.29E-03
多克隆抗体炎症细胞评分	49.05	67.14	7.49E-03
多克隆抗体血管%	50.94	68.00	8.09E-03
多克隆抗体肿瘤评分	54.72	75.55	8.10E-03
多克隆抗体血管强度	32.81	45.96	9.44E-03
多克隆抗体成纤维细胞%	54.06	70.63	1.37E-02
多克隆抗体血管评分	63.52	75.03	2.02E-02
多克隆抗体炎症细胞%	42.66	58.50	2.81E-02
多克隆抗体间质评分	61.88	50.55	5.00E-02
单克隆抗体间质强度	21.63	16.63	8.64E-02
多克隆抗体肿瘤%	56.56	69.75	1.06E-01
单克隆抗体成纤维细胞强度	25.83	32.94	1.37E-01
单克隆抗体肿瘤强度	28.16	35.73	1.63E-01
单克隆抗体间质评分	46.56	37.91	1.99E-01
多克隆抗体间质%	69.06	78.00	2.51E-01
单克隆抗体血管强度	22.39	24.90	4.50E-01
单克隆抗体炎症细胞强度	24.31	27.03	4.54E-01
单克隆抗体成纤维细胞评分	56.77	53.00	5.58E-01
单克隆抗体血管评分	52.20	48.94	6.09E-01
单克隆抗体成纤维细胞%	55.78	52.38	6.31E-01
单克隆抗体肿瘤%	65.63	63.00	7.30E-01
多克隆抗体间质强度	26.56	25.85	8.60E-01
单克隆抗体肿瘤评分	58.88	59.99	8.74E-01
单克隆抗体炎症细胞评分	47.53	46.81	9.04E-01
单克隆抗体血管%	59.06	58.25	9.05E-01
单克隆抗体炎症细胞%	46.88	47.38	9.47E-01
所有平均值的和	1393.11	1617.51	

[0156] 因此,截断值为:

[0157] 表 9. 胰腺截断值（使用具有显著 p 值的组分）

[0158]

组分	截断值 高风险	截断值 低风险
P 成纤维细胞评分	<66	>87
P 成纤维细胞强度	<41	>68
P 肿瘤强度	<26	>49
M 间质%	<49	>82
P 炎症细胞强度	51	42
P 炎症细胞评分	<55	>67
P 血管%	<33	>68
P 肿瘤评分	<54	>76
P 血管强度	64	46
P 成纤维细胞%	<54	>71
P 血管强度	<64	>75
P 炎症细胞%	<43	>59
P 间质评分	<62	>51

[0159] SMS 可区分 OS 的好与坏结果,但不能区分 PFS 的结果(图 11A 和 B)。CA19-9 水平是胰腺癌快速进展的已知风险因子,并且在试验中,CA19-9 水平能够分开 PFS 与 OS 组(图 12)。然而,在风险因子 SPARC(坏)与 CA19-9 ≥ 2000 U/ml 之间不存在相关性。因此,发现 SPARC 和 CA 19-1 是总体存活的独立预后因子(表 10)。

[0160] 表 10. 胰腺癌的 SMS 独立于 CA19-9

[0161]

	CA19-9 < 2000 U/ml	CA19-9 ≥ 2000 U/ml	统计
具有 SPARC(坏)标签的患者在 CA19-9 组中的分布	7/20(35%)	6/15(40%)	$p = ns$

[0162]

	SPARC(坏)	SPARC(好)	统计
CA19-9 \geq 2000 U/ml 的患者在 SPARC 簇 中的分布	6/13(46%)	9/22(41%)	$p = ns$

[0163] 令人惊讶地，SMS 与 CA 19-1 水平相组合改善了层次 PFS 和 OS(图 13 和 14)。

[0164] 在来自 ABX054 试验的晚期黑素瘤患者中进行 SMS 效用的进一步分析。再次使用层次聚类(图 15 和 16)鉴定预后参数(表 11)。

[0165] 表 11. 黑素瘤的 PFS 预后参数

[0166]

SMS 组分	截断值	p 值
M 血管%	$\leq 50\%$	< 0.0001
M 间质评分	轻微阳性	< 0.0001
M 炎症细胞%	$\leq 50\%$	< 0.0001
M 血管评分	轻微阳性	< 0.0001
M 炎症细胞评分	轻微阳性	< 0.0001
M 间质%	$\leq 50\%$	< 0.0001
M 成纤维细胞强度	1+ 至 2+	< 0.0001
M 血管强度	1+ 至 2+	0.0006
M 肿瘤强度	1+ 至 2+	0.0007
M 肿瘤细胞评分	轻微阳性	0.0021
M 成纤维细胞%	$\leq 50\%$	0.0022
M 炎症细胞强度	1+ 至 2+	0.0029
M 成纤维细胞评分	轻微阳性	0.0036
M 肿瘤%	$\leq 50\%$	0.0205

[0167] 实施例 3

[0168] 这是使用 K-均值聚类产生 SMS 以及将用于将个体分类至风险组中的假想实施例。

[0169] 首先必须使用训练集来定义每一个 SMS 组分的质心。对 7 个个体中的每一个，考

虑由 SMS 的两个组分例如 M%肿瘤和 P%肿瘤的评分组成的假设数据集：

[0170] 表 12.

[0171]

受试者	M%肿瘤	P%肿瘤
1	10	10
2	15	20
3	30	40
4	50	70
5	35	50
6	45	50
7	5	45

[0172] 将该数据集分组至两个簇，例如应答者和无应答者中。作为寻找可感觉到的初始分配中的第一步骤，用隔开最远（使用欧几里德距离测量）、并且具有已知不同响应的两个个体的 M%肿瘤和 P%肿瘤值确定初始簇均值，得到：

[0173] 表 13.

[0174]

	个体	均值向量(质心)
应答者簇	1	(10, 10)
无应答者簇	4	(50, 70)

[0175] 现按序列检查剩下的个体，将其分配至离它们最近（根据与簇平均值的欧几里德距离）的簇中。每一次加入新的成员时，再计算均值向量。这导致下列系列的步骤：

[0176] 表 14.

[0177]

	应答者簇		无应答者簇	
步骤	个体	均值向量(质心)	个体	均值向量(质心)
1	1	(10, 10)	4	(50, 70)
2	1, 2	(12, 15)	4	(50, 70)
3	1, 2, 3	(18, 23)	4	(50, 70)

[0178]

4	1, 2, 3	(18, 23)	4, 5	(42, 60)
5	1, 2, 3	(18, 23)	4, 5, 6	(43, 57)
6	1, 2, 3	(18, 23)	4, 5, 6, 7	(41, 54)

[0179] 现在初始分配已被改变,此阶段上的两个簇具有下列特征:

[0180] 表 15

[0181]

	个体	均值向量(质心)
应答者	1, 2, 3	(18, 23)
无应答者	4, 5, 6, 7	(41, 54)

[0182] 然而仍然不能确定每一个个体是否在数学上或在现实世界中已被分配至正确的簇中。下一步骤通过将每一个个体与其自己的簇平均值的间距以及与相对簇的平均值的间距相比较来评判簇的数学质量,得到:

[0183] 表 16.

[0184]

个体	至应答者簇 的均值(质心) 的距离	至无应答者簇 的均值(质心) 的距离
1	15	54
2	04	43
3	21	18
4	57	18
5	32	07
6	38	06
7	28	11

[0185] 只有个体 3 离相对簇的均值比其自己所属簇更近。换句话说,每一个个体与其自身簇的均值的距离应当小于与另一簇的均值的距离(对个体 3,情况并非如此)。因此,将个体 3 再分配至另一簇,得到新的分配

[0186] 表 17.

	个体	均值向量 (质心)
[0187]	应答者	1, 2 (13, 15)
	无应答者	3, 4, 5, 6, 7 (39, 51)

[0188] 此后,基于响应再分配个体,再次对此进行数学测试。现可从该新的分配继续进行反复再分配,直至不再有再分配发生。然而,在本实施例中,每一个个体离其自身簇的均值比离另一簇的均值更近,从而终止重复,选择最近的分配作为最终的簇方案。

[0189] 随后可基于它们离哪个质心更近而将任何新个体分类为应答者或无应答者。

[0190] 此外,虽然在整个本实施例中使用两个组分,但在已处理训练集后,可利用任何适当的方法确定最具判别力的组分,并且只将那些组分用于确定质心和分类新个体。

[0191] 本文引用的所有参考文献,包括公开物、专利申请和专利,均通过引用方式并入本文,达到如同每篇参考文献都单独且特别被指明通过引用方式并入并以其全文显示于本文的程度。

[0192] 在描述本发明的上下文中(尤其是以下权利要求的上下文中)术语“一种/个(a)”和“一种/个(an)”和“该/所述(the)”的使用应该被解释为涵盖了单数和复数,除非本文中另有指明或上下文明显矛盾。除非另有指明,否则术语“含有(comprising)”、“具有(having)”、“包括(including)”和“含有(containing)”应该被解释为开放式术语(即,意思是“包括但不限于”)。除非本文另有指明,否则本文中提及的数值范围仅仅是作为单独提及落在该范围内的每个单独数值的简便方式,并且每个单独数值并入本说明书中,如同在本文中单独提及一样。除非本文另有指明或者上下文明显矛盾,否则本文描述的所有方法可以通过任意合适的顺序进行。除非另有要求,否则本文提供的任意和所有实施例或示例性语言(例如“例如”)仅仅意在更好地诠释本发明,而不对本发明的范围进行限制作用。本说明书中的任何语言不应被解释为指明未要求保护的要素对于本发明的实施是必不可少的。

[0193] 在本文中描述了本发明的优选实施方式,包括本发明人己知的用于实施本发明的最佳模式。本领域普通技术人员在阅读了上述说明书之后,那些优选实施方式的变体会变得明显。本发明人预期技术人员视情况而应用此类变体,本发明人想到本发明可以按照除了本文特异性描述以外的方式来实施。因此,本发明包括适用法律所允许的随附的权利要求中提及的主题的所有修饰和等同物。此外,除非本文另有指明或上下文明显矛盾,否则本发明中包括上述要素的以其所有可能变体进行的任意组合。

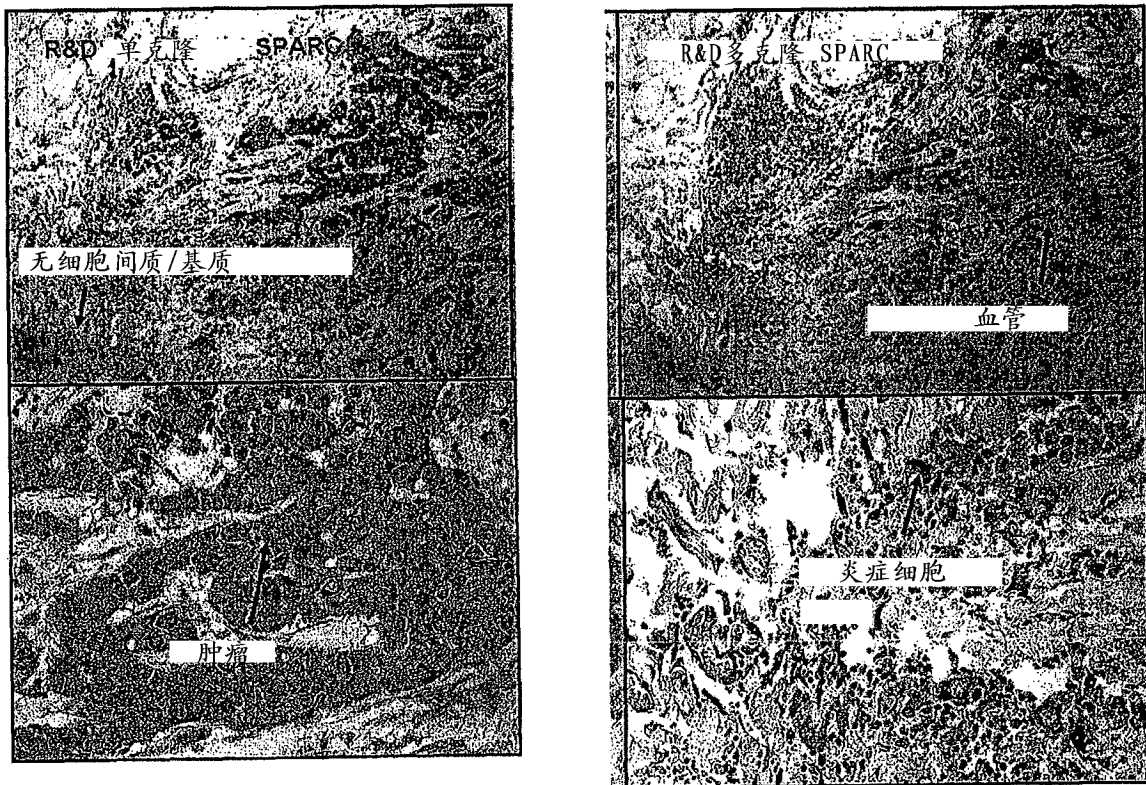


图 1A

图 1B

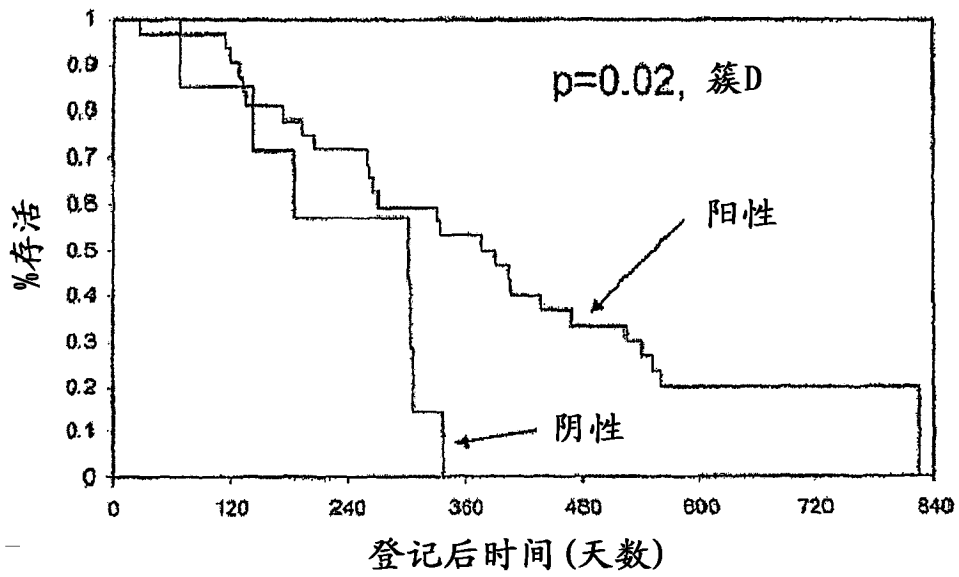
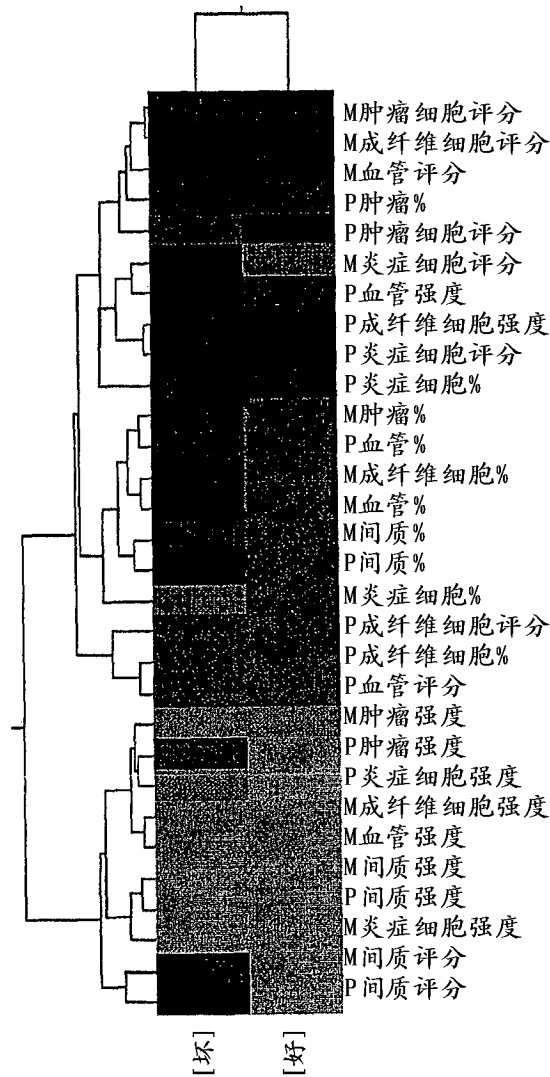


图 2



图例: 各簇的分层组合树
颜色范围

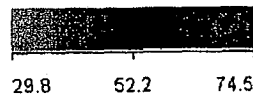


图 3

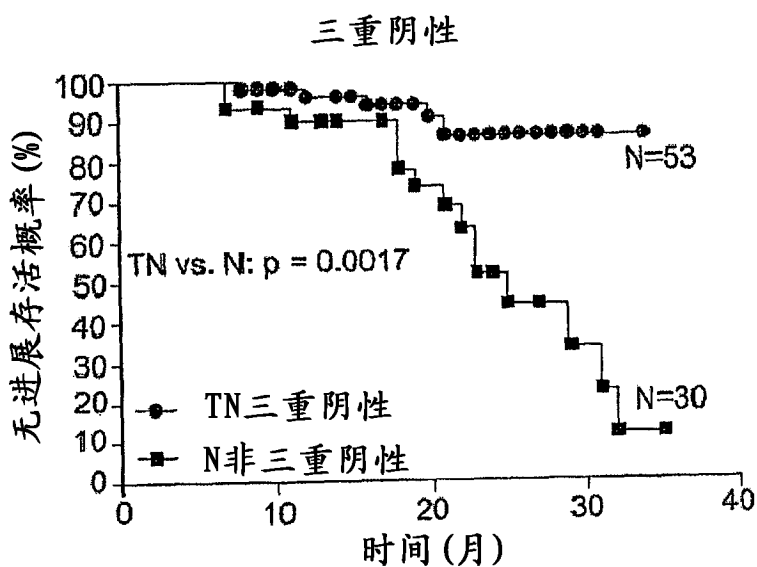


图 4A

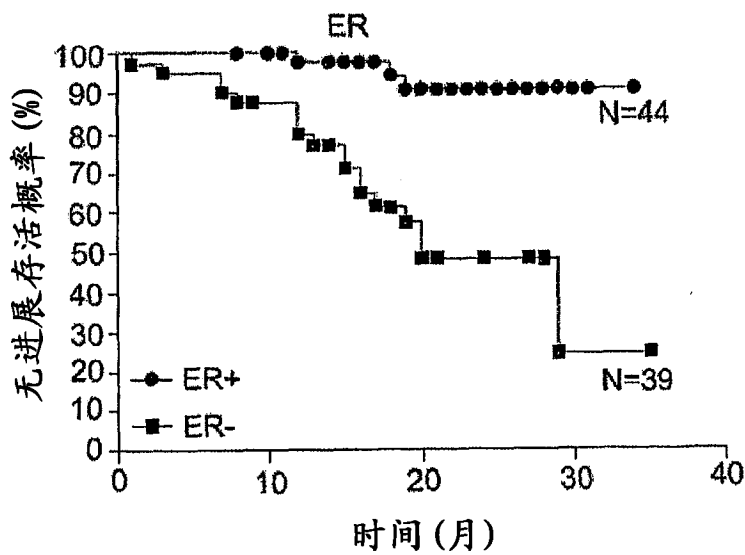


图 4B

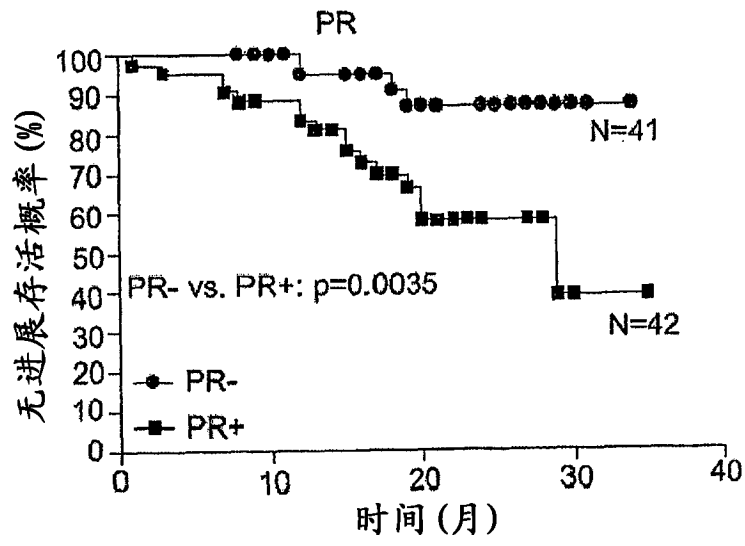


图 4C

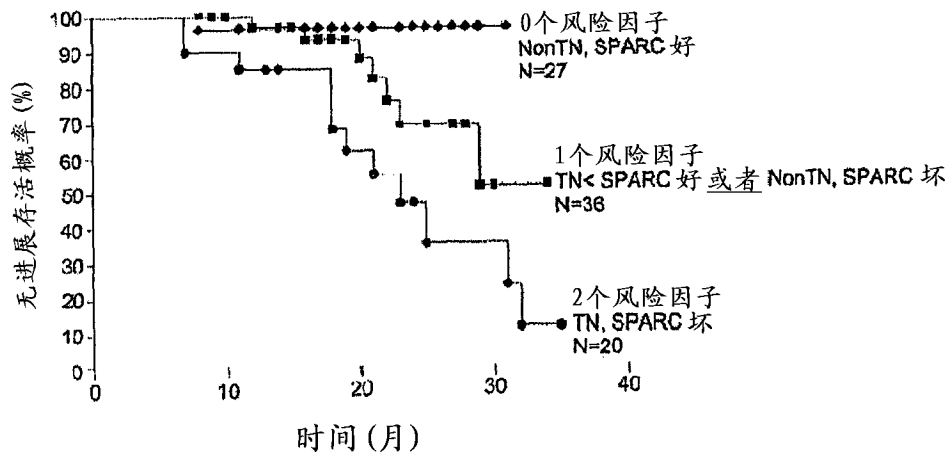


图 5

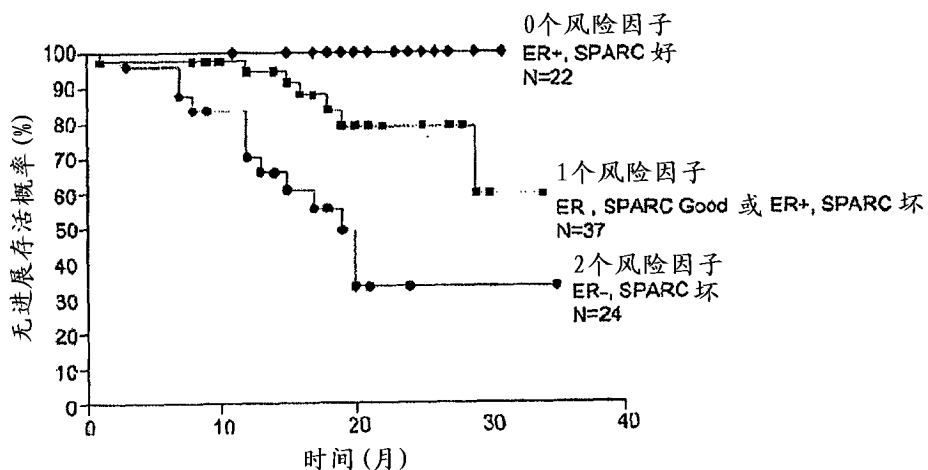


图 6

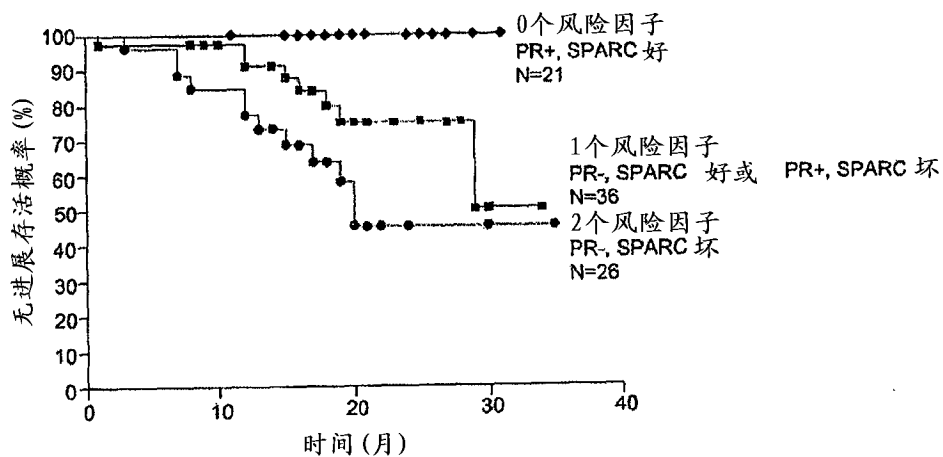


图 7

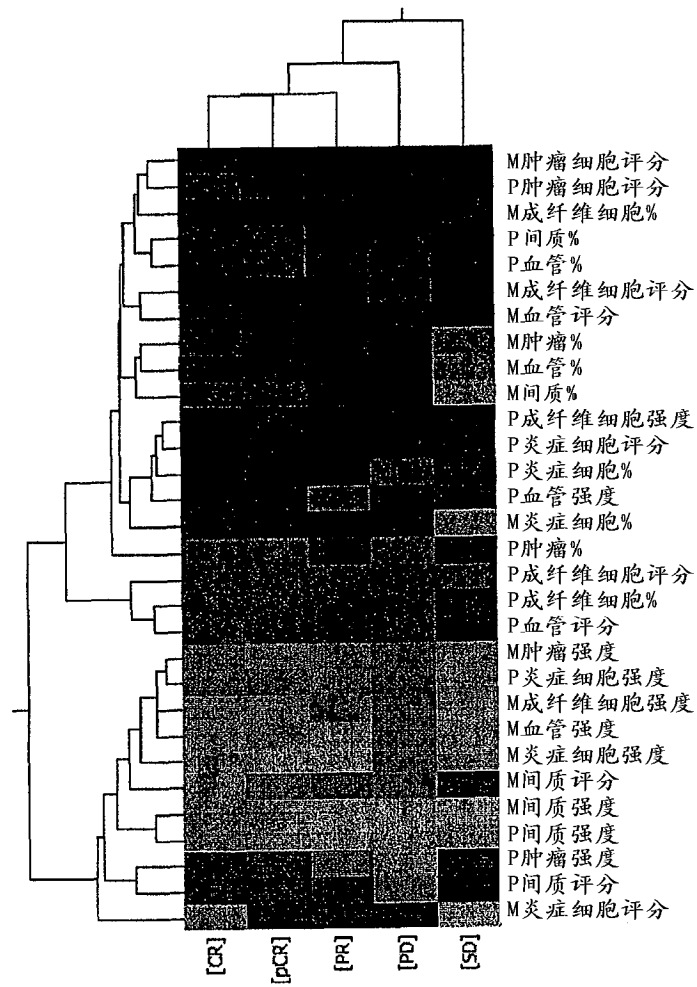
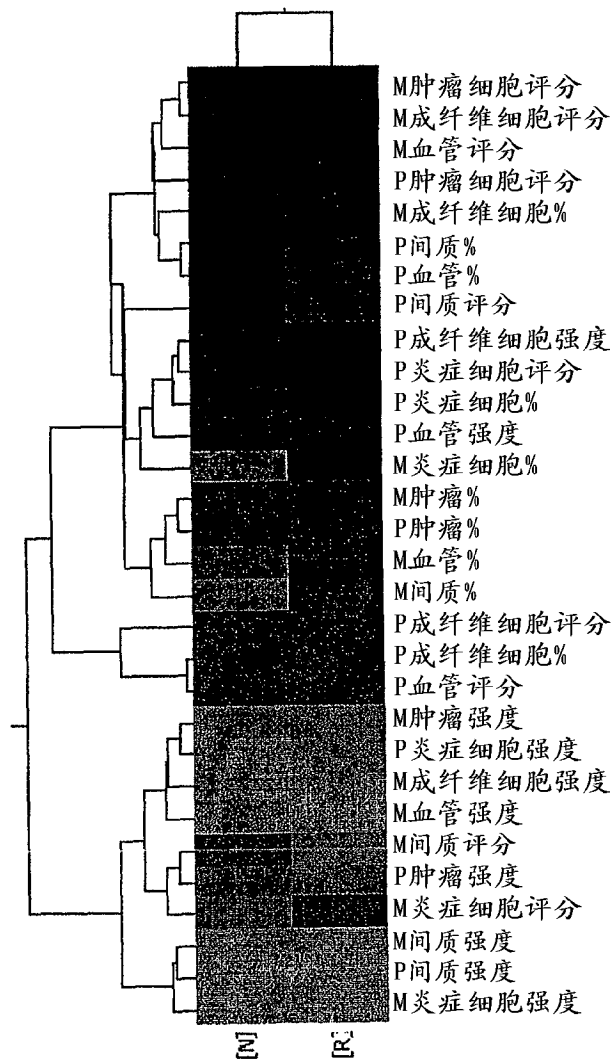


图 8



图例：响应2的分层组合树
颜色范围

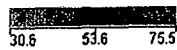


图 9

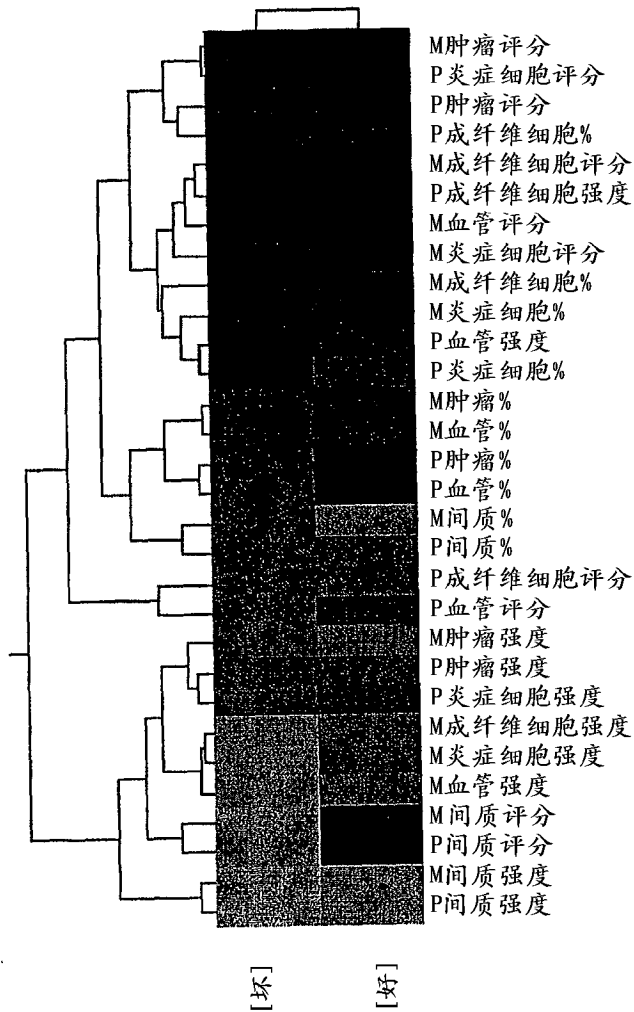


图 10

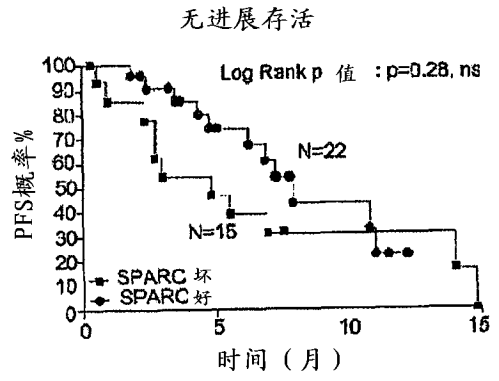


图 11A

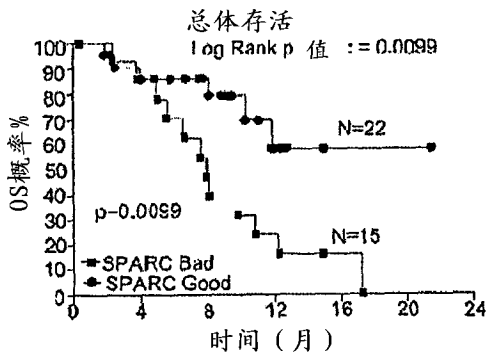


图 11B

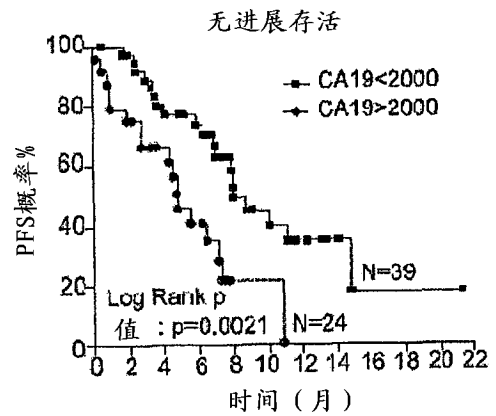


图 12A

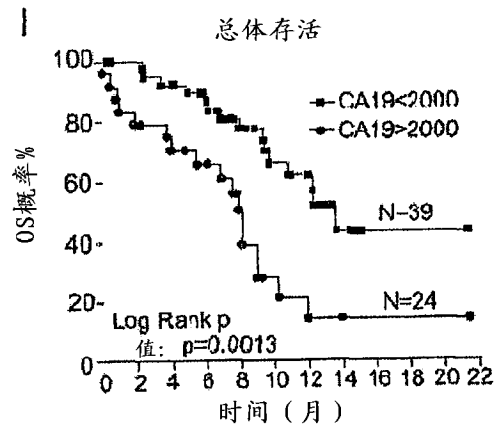


图 12B

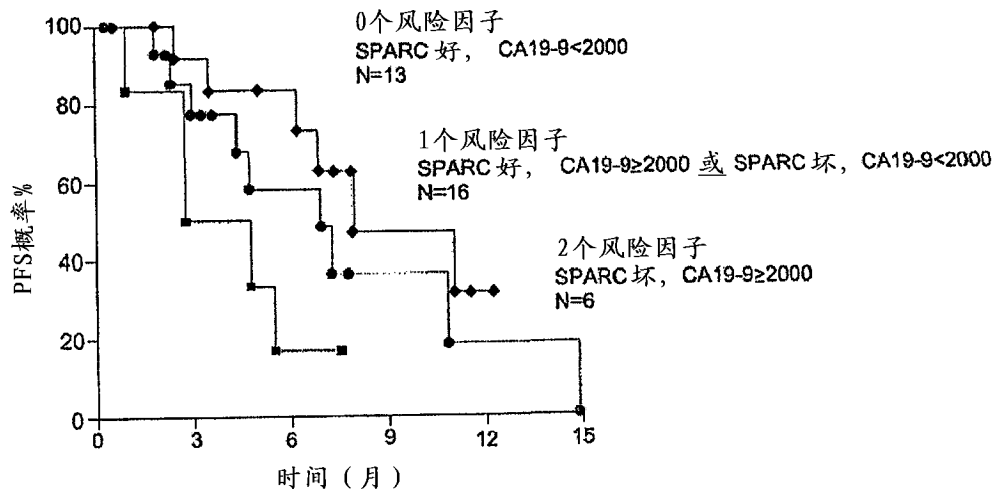


图 13

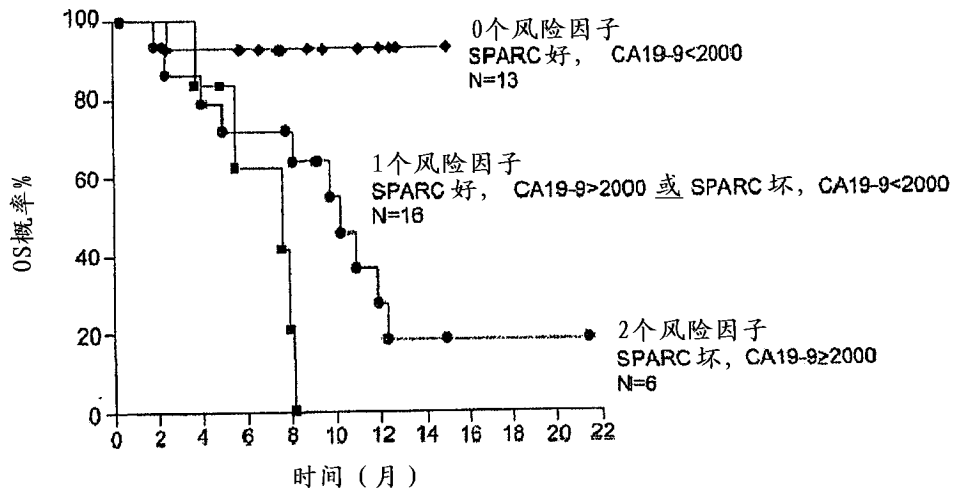


图 14

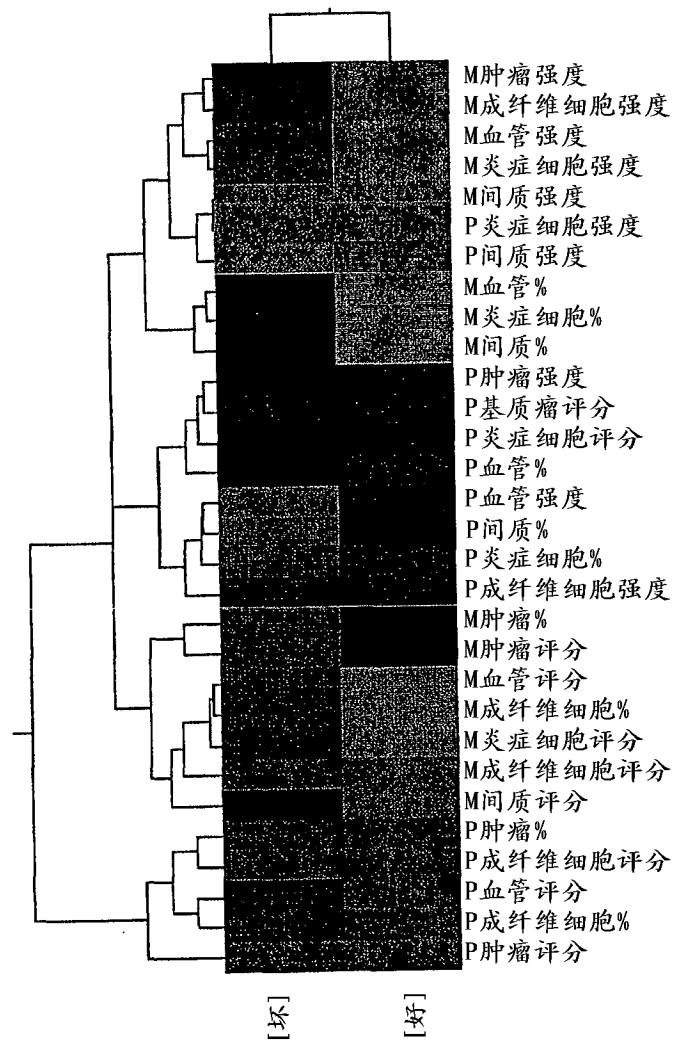


图 15

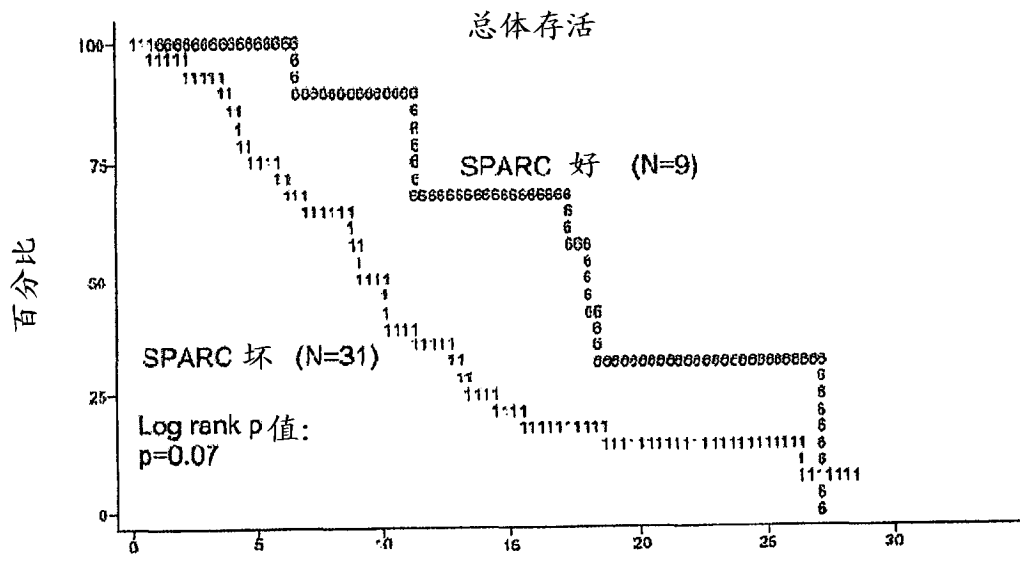


图 16

专利名称(译)	SPARC微环境标签在癌症治疗中的应用		
公开(公告)号	CN102576016A	公开(公告)日	2012-07-11
申请号	CN201080047076.X	申请日	2010-09-20
[标]申请(专利权)人(译)	阿布拉科斯生物科学有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿布拉西斯生物科学有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿布拉西斯生物科学有限责任公司		
[标]发明人	V德留 N德赛		
发明人	V· 德留 N· 德赛		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/015		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/566 A61K31/337 G01N2800/52 A61K47/643 A61K47/6929		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	61/276969 2009-09-18 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于预测对疗法包括化学疗法、放射疗法、手术疗法和联合治疗的响应的基于抗SPARC抗体的多参数技术。

