

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580020748.7

[51] Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/336 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月13日

[11] 公开号 CN 1980699A

[22] 申请日 2005.5.16

[21] 申请号 200580020748.7

[30] 优先权

[32] 2004.5.14 [33] US [31] 60/571,622

[32] 2005.2.18 [33] US [31] 60/654,261

[86] 国际申请 PCT/US2005/017174 2005.5.16

[87] 国际公布 WO2005/117952 英 2005.12.15

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.22

[71] 申请人 阿布拉西斯生物科学公司

地址 美国加利福尼亚

[72] 发明人 V·特利乌 N·P·德赛

P·苏恩-施昂

[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

代理人 李华英

权利要求书5页 说明书23页 附图2页

[54] 发明名称

利用白蛋白-结合蛋白作为靶标的治疗方法

[57] 摘要

本发明提供了用于测定哺乳动物肿瘤对化疗剂的应答的方法,包括检测和定量分离自人的样品中的 SPARC 蛋白。本发明还提供了用于将化疗剂递送至表达 SPARC 的人肿瘤的方法,包括给予包含偶联至结合 SPARC 蛋白的化合物的化疗剂的药物组合物。本发明进一步提供了包含偶联至能结合 SPARC 蛋白的化合物的化疗剂和药学可接受载体的组合物。

1. 用于测定哺乳动物肿瘤对化疗剂应答的方法，该方法包括 (a) 从哺乳动物分离生物样品，(b) 检测生物样品中 SPARC 蛋白的表达，和 (c) 定量生物样品中 SPARC 蛋白的量。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述生物样品分离自肿瘤。
3. 权利要求 1 的方法，其中所述生物样品分离自体液。
4. 权利要求 3 的方法，其中所述体液选自脑脊液、血液、血浆、血清和尿液。
5. 权利要求 1 的方法，其中所述肿瘤位于膀胱、肝脏、卵巢、肾、消化道、脑或乳腺。
6. 权利要求 1 的方法，其中所述哺乳动物为人。
7. 用于将治疗剂递送至哺乳动物中疾病部位的方法，该方法包括给予哺乳动物治疗有效量的药物组合物，其中所述药物组合物包含偶联至能结合白蛋白-结合蛋白的化合物的治疗剂以及药学可接受载体，条件是所述药物组合物不包含超过 50% 的纳米颗粒形式的治疗剂。
8. 权利要求 7 的方法，其中所述药物组合物不包含超过 10% 的纳米颗粒形式的治疗剂。
9. 权利要求 7 的方法，其中所述药物组合物不包含超过 5% 的纳米颗粒形式的治疗剂。
10. 权利要求 7 的方法，其中所述白蛋白-结合蛋白为 SPARC 蛋白。
11. 权利要求 7 的方法，其中所述疾病部位为肿瘤。
12. 权利要求 7 的方法，其中所述治疗剂为诊断试剂。
13. 权利要求 12 的方法，其中所述诊断试剂选自放射性试剂、MRI 造影剂、X 射线造影剂、超声造影剂和 PET 造影剂。
14. 权利要求 7 的方法，其中所述化合物为结合 SPARC 蛋白的配体。
15. 权利要求 14 的方法，其中所述配体选自钙阳离子 (Ca^{2+})、铜阳离子 (Cu^{2+})、铁阳离子 (Fe^{2+})、血小板来源的生长因子 (PDGF)、血管内皮细胞生长因子 (VEGF)、胶原 I、胶原 II、胶原 III、胶原 IV、

胶原 V 和胶原 IX、玻连蛋白、血小板反应蛋白-1、内皮细胞、血小板、白蛋白和羟基磷灰石。

16. 权利要求 7 的方法，其中能结合白蛋白-结合蛋白的化合物为小分子。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述小分子选自化学品、蛋白质和糖类。

18. 权利要求 7 的方法，其中能结合白蛋白-结合蛋白的化合物为 SPARC 蛋白的抗体。

19. 权利要求 11 的方法，其中所述肿瘤位于膀胱、肝脏、卵巢、肾、消化道、脑或乳腺。

20. 权利要求 7 的方法，其中所述哺乳动物为人。

21. 权利要求 7 的方法，其中给药途径选自静脉内的、腹腔内的、瘤内的和吸入的。

22. 权利要求 18 的方法，其中所述抗体为多克隆抗体。

23. 权利要求 22 的方法，其中所述抗体在选自鸡、大鼠、小鼠、兔、豚鼠、仓鼠、绵羊、母牛和山羊的动物中制备。

24. 权利要求 18 的方法，其中所述抗体为人源化的。

25. 权利要求 18 的方法，其中所述抗体为单克隆的。

26. 权利要求 25 的方法，其中所述抗体通过产生抗-SPARC 抗体的单个细胞系与骨髓瘤系融合而制备。

27. 权利要求 18 的方法，其中所述抗体通过选自下组的方法而体外制备：肽合成器、通过展示噬菌体转化入抗体、以及抗体的重链和轻链基因可变区的诱变或合成。

28. 权利要求 18 的方法，其中所述抗体选自单价的、多价的、单特异性的、双特异性的、单链的和 Fab 片段。

29. 权利要求 27 的方法，其中所述抗体为嵌合体。

30. 权利要求 18 的方法，其中所述治疗剂选自酪氨酸激酶抑制剂、激酶抑制剂、生物活性剂、生物分子、放射性核素、阿霉素、安沙霉素、抗生素、门冬酰胺酶、博来霉素、白消安、顺氯氨铂、卡波氯氨铂、亚

硝脲氮芥、卡西他滨、苯丁酸氮芥、阿糖胞苷、环磷酰胺、喜树碱、氮烯唑胺、放线菌素、柔红霉素、右雷佐生、多烯紫杉醇、阿霉素、鬼臼亚乙苷、埃博霉素、5-氟脱氧尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、依立替康、环己亚硝脲、二氯甲二乙胺、巯嘌呤、mephalan、氮甲喋呤、雷帕霉素(西罗莫司(sirrolimus))、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、亚硝基脲、紫杉醇、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、丙卡巴肼、美罗华、链脲霉素、鬼臼噻吩苷、硫鸟嘌呤、三胺硫磷、紫杉烷、长春花碱、长春新碱、长春瑞宾、泰索、考布他汀、discodermolides、反铂、抗-血管内皮细胞生长因子化合物(“抗-VEGF”)、抗-表皮生长因子受体化合物(“抗-EGFR”)、5-氟尿嘧啶及其衍生物和组合。

31. 权利要求 30 的方法，其中所述治疗剂为激酶抑制剂。

32. 权利要求 31 的方法，其中所述激酶抑制剂为染料木黄酮。

33. 权利要求 30 的方法，其中所述治疗剂为生物分子。

34. 权利要求 33 的方法，其中所述生物分子选自 tTF 和 TNF。

35. 权利要求 18 的方法，其中所述治疗剂为放射性核素。

36. 权利要求 18 的方法，其中所述治疗剂为介导补体激活和细胞介导的对肿瘤的细胞毒性的抗体。

37. 权利要求 18 的方法，其中所述肿瘤位于膀胱、肝脏、卵巢、肾、消化道、脑或乳腺。

38. 权利要求 18 的方法，其中所述哺乳动物为人。

39. 权利要求 18 的方法，其中给药途径为静脉内的、腹腔内的、瘤内的或吸入的。

40. 包含偶联至能结合 SPARC 蛋白的化合物的治疗剂和药学可接受载体的组合物，条件是该组合物不包含超过 50% 的纳米颗粒形式的所述治疗剂。

41. 权利要求 40 的组合物，其中能结合 SPARC 蛋白的化合物为抗体或其片段。

42. 权利要求 41 的组合物，其中所述抗体或其片段为人源化的并且

选自单价的、多价的、单特异性的、双特异性的、单链的、单价 Fab'、二价 Fab2、scfv、双抗体和嵌合体。

43. 权利要求 41 的组合物，其中所述治疗剂为化学治疗剂、放射性核素或肽。

44. 权利要求 41 的组合物，其中所述抗体为多克隆的。

45. 权利要求 44 的组合物，其中所述抗体在选自鸡、大鼠、小鼠、兔、豚鼠、仓鼠、绵羊、母牛和山羊的动物中制备。

46. 权利要求 45 的组合物，其中所述抗体为人源化的。

47. 权利要求 41 的组合物，其中所述抗体为单克隆的。

48. 权利要求 47 的组合物，其中所述抗体通过产生抗-SPARC 抗体的单个细胞系与骨髓瘤系融合而制备。

49. 权利要求 41 的组合物，其中所述抗体通过选自下组的方法而体外制备：肽合成器、通过展示噬菌体转化入抗体、以及抗体的重链和轻链基因可变区的诱变或合成。

50. 权利要求 41 的组合物，其中所述治疗剂选自酪氨酸激酶抑制剂、激酶抑制剂、生物活性剂、生物分子、放射性核素、阿霉素、安沙霉素、抗生素、门冬酰胺酶、博来霉素、白消安、顺氯氨铂、卡波氯氨铂、亚硝脲氮芥、卡西他滨、苯丁酸氮芥、阿糖胞苷、环磷酰胺、喜树碱、氮烯唑胺、放线菌素、柔红霉素、右雷佐生、多烯紫杉醇、阿霉素、鬼臼亚乙苷、埃博霉素、5-氟脱氧尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、依立替康、环己亚硝脲、二氯甲二乙胺、巯嘌呤、mephalan、氮甲喋呤、雷帕霉素(西罗莫司(sirrolimus))、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、亚硝基脲、紫杉醇、帕米膦酸盐、喷司他丁、普卡霉素、丙卡巴肼、美罗华、链脲霉素、鬼臼噻吩苷、硫鸟嘌呤、三胺硫磷、紫杉烷、长春花碱、长春新碱、长春瑞宾、泰索、考布他汀、discodermolides、反铂、抗-血管内皮细胞生长因子化合物(“抗-VEGF”)、抗-表皮生长因子受体化合物(“抗-EGFR”)、5-氟尿嘧啶及其衍生物和组合。

51. 权利要求 41 的组合物，其中所述治疗剂为激酶抑制剂。

52. 权利要求 41 的组合物, 其中所述治疗剂为选自 tTF 和 TNF 的生物分子。

53. 权利要求 41 的组合物, 其中所述治疗剂为放射性核素。

54. 权利要求 41 的组合物, 其中所述治疗剂为介导补体激活和细胞介导的对肿瘤的细胞毒性的抗体。

55. 权利要求 41 的组合物, 其中给药途径为静脉内的、腹腔内的、瘤内的或吸入的。

56. 包含 SPARC 识别基团和治疗剂的递送试剂, 其中所述治疗剂偶联至 SPARC 识别基团, 条件是所述递送试剂不包含超过 50% 的纳米颗粒形式的所述治疗剂。

57. 权利要求 56 的递送试剂, 其中所述 SPARC 识别基团包含抗体或其片段, 选自单价 Fab'、二价 Fab2、scfv、双抗体、嵌合体抗体或其片段, 并且其中所述治疗剂为化学治疗剂、放射性核素、肽、细胞毒剂、激酶抑制剂、生物分子或诊断试剂和其组合。

58. 权利要求 56 的递送试剂, 其中所述 SPARC 识别基团为人源化抗体或其片段。

59. 用于将化疗剂递送至哺乳动物肿瘤的方法, 其中所述方法包括给予哺乳动物治疗有效量的药物组合物, 其中所述药物组合物包含偶联至能结合白蛋白的 SPARC 蛋白的化疗剂和药学可接受载体。

60. 权利要求 59 的方法, 其中所述 SPARC 从选自杆状病毒或腺病毒的病毒表达。

61. 权利要求 59 的方法, 其中所述 SPARC 利用色谱法纯化。

62. 权利要求 61 的方法, 其中所述色谱法选自离子、大小排阻或 C-18 色谱法。

利用白蛋白-结合蛋白作为靶标的治疗方法

技术领域

本发明涉及用于治疗癌症以及其他疾病（包括组织和器官异常增殖、增生、重塑、炎性活性）的方法。本发明进一步涉及利用识别白蛋白-结合蛋白的合适配体用于靶向、显影和测定哺乳动物肿瘤对化疗剂的应答的方法。

背景技术

已显示白蛋白纳米颗粒制剂减少不充分可溶的治疗剂的毒性。例如，美国专利 6,537,579 公开了没有毒性的乳化剂的白蛋白-纳米颗粒紫杉醇制剂。

以商标 Taxol[®]由 Bristol Myers Squibb 销售的抗癌剂紫杉醇目前批准用于数种癌症，包括卵巢、肺和乳腺癌的治疗。使用紫杉醇的主要局限性是其溶解度差。因此，Taxol[®]制剂包含作为溶解赋形剂的 Cremophor[®]EL，但该制剂中 Cremophor[®]的存在与动物（Lorenz 等，Agents Actions 7, 63-67, 1987）和人中（Weiss 等，J. Clin. Oncol. 8, 1263-1268, 1990）严重的过敏反应有关。因此，接受 Taxol[®]的患者需要以皮质类固醇（地塞米松）和抗组胺药预先给药以降低由于 Cremophor[®]的存在而发生的过敏和过敏反应。

相反，亦称为 ABI-007 的 Abraxane[®]为由 Abraxis Oncology 销售的，无 Cremophor[®]的紫杉醇白蛋白-纳米颗粒制剂。当用盐水重制时白蛋白纳米颗粒作为赋形剂的使用产生胶体形式。基于临床研究，已表明 Abraxane[®]的使用与 Taxol[®]相比以降低的过敏反应为特征。因此，接受 Abraxane[®]的患者不需要预先给药。

白蛋白-纳米颗粒制剂的另一个优点为通过排除有毒的乳化剂，可以比目前用 Taxol[®]可能的更频繁的时间间隔给予更高剂量的紫杉醇。

存在的潜力为可在实体瘤中看到的由于下列原因而产生的增强的效力：(i) 更高的耐受剂量 (300 mg/m^2)、(ii) 更长的半衰期、(iii) 延长的局部肿瘤有效性和/或 (iv) 体内持续释放。Abraxane[®]降低过敏反应而维持或改善药物的化疗作用。

已知 $<200\text{nm}$ 大小的胶体纳米颗粒或颗粒由于渗漏性脉管系统而易于在肿瘤部位集中。已对一些脂质体制剂描述了该作用 (Papahadjopoulos, 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 11460, 1991); (Gabizon, A., Cancer Res., 52, 891, 1992); (Dvorak, 等, Am. J. Pathol. 133, 95, 1988); (Dunn, 等, Pharm, Res., 11, 1016-1022, 1994); 和 (Gref, 等, Science 263, 1600-1603, 1994)。可能的是当与该药物以其溶解 (含有 Cremophor[®]) 形式给药相比时, 在肿瘤部位集中的紫杉醇纳米颗粒可引起药物在该肿瘤部位的缓释而产生更大的效力。

所述纳米颗粒制剂包括至少约 50% 纳米颗粒形式的活性剂。此外, 所述纳米颗粒制剂包含至少约 60%、至少约 70%、至少约 80% 或至少约 90% 纳米颗粒形式的活性剂。另外, 所述纳米颗粒制剂包含至少约 95% 或至少约 98% 纳米颗粒形式的活性剂。

酸性的、富含半胱氨酸的分泌蛋白 (SPARC), 亦称骨粘连蛋白 (osteonectin), 为 281 个氨基酸的糖蛋白。SPARC 对多种配体具有亲和力, 包括阳离子 (例如, Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+})、生长因子 (例如, 血小板来源的生长因子 (PDGF) 和血管内皮细胞生长因子 (VEGF))、细胞外基质 (ECM) 蛋白 (例如, 胶原 I-V 和胶原 IX、玻连蛋白 (vitronectin) 和血小板反应蛋白-1)、内皮细胞、血小板、白蛋白和羟基磷灰石。SPARC 表达受发育调控, 并且主要在正常发育或损伤应答期间在经重塑的组织中表达 (参见, 例如, Lane 等, *FASEB J.*, 8, 163-173 (1994))。发育的骨和牙中表达高水平的 SPARC 蛋白。

SPARC 为数种侵袭性癌症中上调的细胞基质蛋白, 但在正常组织中缺乏 (Porter 等, *J. Histochem. Cytochem.*, 43, 791 (1995))。实际上, 在各种肿瘤中 (例如, 膀胱、肝脏、卵巢、肾、消化道和乳

腺) 诱导 SPARC 表达。例如膀胱癌中, SPARC 表达与晚期癌症相关。已显示 T2 级或更晚级的侵袭性膀胱肿瘤比 T1 级膀胱肿瘤(或更次级浅表肿瘤)表达更高水平的 SPARC, 并且预后较差(参见例如, Yamanaka 等, *J. Urology*, 166, 2495-2499 (2001))。脑膜瘤中, SPARC 表达仅与侵袭性肿瘤相关(参见例如, Rempel 等., *Clinical Cancer Res.*, 5, 237-241 (1999))。还在 74.5% 的原位侵袭性乳腺癌病变中(参见例如, Bellahcene, 等, *Am. J. Pathol.*, 146, 95-100 (1995)), 以及 54.2% 的乳腺浸润管癌中(参见例如, Kim 等, *J. Korean Med. Sci.*, 13, 652-657 (1998)) 检测到 SPARC 表达。SPARC 表达还与乳腺癌中常见的微钙化有关(参见例如, Bellahcene 等, 上文), 提示 SPARC 表达可能负责乳腺转移性病灶对骨的亲和力。还已知 SPARC 结合白蛋白(参见例如, Schnitzer, *J. Biol. Chem.*, 269, 6072 (1994))。

抗体疗法是用于控制疾病的有效方法, 其中可鉴定特定的蛋白质标志物。实例包括 Avastin-抗-VEGF 抗体、Rituxan-抗-CD20 抗体和 Remicade-抗-TNF 抗体。因而, SPARC 的抗体代表用于治疗人和其他哺乳动物肿瘤、以及表达 SPARC 蛋白的其他增殖的、增生的、重塑和炎性病征的重要治疗剂。此外, 与显影或造影剂偶联的 SPARC 抗体将是检测和诊断所述病症的工具。

仍然存在治疗人和其他哺乳动物肿瘤、以及其他增殖的、增生的、重塑和炎性病征的方法的需要。另外, 仍然存在测定人或其他哺乳动物肿瘤应答的需要以评估化疗剂的有效性。此外, 需要合适的方法以检测和诊断所述病症。根据在此提供的本发明的说明书, 本发明的这些和其他的优点, 以及另外的发明特征将是显而易见的。

发明内容

本发明提供了用于测定哺乳动物肿瘤对化疗剂的应答的方法, 其中该方法包括步骤 (a) 从哺乳动物分离生物样品, (b) 检测生物样品中 SPARC 蛋白的表达, 和 (c) 定量生物样品中 SPARC 蛋白的量。本发明进一步提供了利用白蛋白-结合蛋白作为疗法, 利用 SPARC 和

SPARC 的抗体或 SPARC 结合-蛋白作为疗法,用于将化疗剂递送至哺乳动物疾病部位的方法,其中该方法包括给予哺乳动物治疗有效量的药物组合物,其中该药物组合物包含与能结合白蛋白-结合蛋白的化合物偶联的化疗剂和药学可接受载体。此外,本发明提供了包含与能结合 SPARC 蛋白的化合物偶联的化疗剂和药学可接受载体的组合物。另外,本发明提供了包含 SPARC 识别基团和治疗剂的递送试剂,其中所述治疗剂与 SPARC 识别基团偶联。此外,本发明提供了用于将化疗剂递送至哺乳动物肿瘤的方法,其中该方法包括给予哺乳动物治疗有效量的药物组合物,其中该药物组合物包含与能结合白蛋白的 SPARC 蛋白偶联的化疗剂和药学可接受载体。本发明的组合物可以是小分子、大分子或蛋白质。

附图说明

图 1 图解说明了 MX-1 肿瘤异种移植物中染色的白蛋白和 SPARC。

图 2 图解说明了紫杉醇通过单层内皮细胞的转胞吞作用。

发明详述

目前已发现包含白蛋白-结合蛋白的组合物存在另外的定位机制。白蛋白-结合蛋白,如 SPARC、cubilin 和 TGF β ,可用于将治疗剂靶向以白蛋白-结合蛋白的过表达为特征的疾病部位。

本发明提供了与试剂偶联的基团的用途,其中所述基团能结合白蛋白-结合蛋白,如 SPARC、cubilin 或 TGF β ,并且所述试剂为疾病的治疗、显影或递送试剂,所述疾病中白蛋白-结合蛋白起着重要作用并且相对正常组织过表达。优选,白蛋白-结合蛋白选自 SPARC、cubilin 或 TGF β 。最优选,白蛋白-结合蛋白为 SPARC 并且结合白蛋白-结合蛋白的基团为 SPARC 识别基团。合适的 SPARC 识别基团包括但不限于,配体、小分子、抗体。

本发明还提供了用于测定人或其他哺乳动物肿瘤对化疗剂的应答的方法。该方法包括(a)从人分离生物样品,(b)检测生物样品中

SPARC 蛋白的表达, 和 (c) 定量生物样品中 SPARC 蛋白的量。一旦确定肿瘤表达的 SPARC 的量, 可例如通过将 SPARC 的表达与所给治疗剂的剂量相关联而确定化疗剂的有效性。本发明还提供了 SPARC 抗体作为疾病治疗剂或显影剂的用途, 该疾病中 SPARC 起着重要作用并且相对正常组织过表达。

在下文中, 为简单起见所有结合白蛋白的蛋白质 (包括 SPARC) 称为 SPARC。SPARC 蛋白负责某些人肿瘤中白蛋白的累积。由于白蛋白为化疗药物的主要载体, SPARC 的表达水平为透过和保留在肿瘤中的化疗药物量的指示。因此, SPARC 的表达水平为肿瘤对化疗应答的预示。

在本发明方法的上下文中可从目的哺乳动物分离任何合适的生物样品。优选, 如通过肿瘤活组织检查从肿瘤分离生物样品。或者, 可从哺乳动物的体液, 包括例如, 脑脊液、血液、血浆、血清或尿液分离生物样品。用于分离生物样品的技术和方法为本领域技术人员所知。

任何合适的药物活性剂可用于本发明方法 (例如, 与 SPARC 识别基团偶联的化疗剂), 只要该活性剂的转运或结合需要白蛋白。合适的活性剂包括但不限于, 酪氨酸激酶抑制剂 (染料木黄酮)、生物活性剂 (TNF 或 tTF)、放射性核素 (例如, ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{211}At 、 ^{32}P 和其他已知治疗放射性核素)、阿霉素、安沙霉素抗生素、门冬酰胺酶、博来霉素、白消安、顺氯氨铂、卡波氯氨铂、亚硝脲氮芥、卡西他滨、苯丁酸氮芥、阿糖胞苷、环磷酰胺、喜树碱、氮烯唑胺、放线菌素、柔红霉素、右雷佐生、多烯紫杉醇、阿霉素、鬼臼亚乙苷、埃博霉素、5-氟脱氧尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、依立替康、环己亚硝脲、二氯甲二乙胺、巯嘌呤、mephalan、氨甲喋呤、雷帕霉素 (西罗莫司 (sirolimus)) 和衍生物、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、亚硝基脲 (nitrosurea)、紫杉醇、帕米膦酸盐 (pamidronate)、喷司他丁、普卡霉素、丙卡巴肼、美罗华 (rituximab、CD20 人鼠嵌合性单克隆抗体)、链脲霉素、鬼臼噻吩苷、硫鸟嘌呤、三胺硫磷、紫杉烷、长春花碱、长春新碱、

长春瑞滨、泰索 (taxol, 紫杉酚)、考布他汀 (combretastatins)、discodermolides、反铂 (transplatinum)、血管靶向试剂、抗-血管内皮细胞生长因子化合物 (“抗-VEGF”)、抗-表皮生长因子受体化合物 (“抗-EGFR”)、5-氟尿嘧啶和其衍生物。

此外, 该药物活性剂可以是毒素如蓖麻毒 A、放射性核素、抗体自身的 Fc 片段、单链抗体、Fab 片段、双抗体等等。所选的药物活性剂本身可识别和结合 SPARC 或适当地附着于识别 SPARC 的 SPARC 识别基团, 包括例如, 蛋白质或非-蛋白质、抗体、抗体自身的 Fc 片段、单链抗体、Fab 片段、双抗体、肽或其他非-蛋白质小分子。

可根据本发明的方法给予一种或多种化疗剂的一种或多种剂量。本发明方法中化疗剂的类型和数量取决于针对的特定肿瘤类型的标准化疗方案。换言之, 特定的癌症可用单一化疗剂常规治疗, 而另一种可用化疗剂组合常规治疗。本领域中很好地描述了用于合适的疗法、化学疗法、放射性核素等等结合或联合抗体或其片段的方法。

本发明对其有效的疾病包括任何身体组织, 包括软组织、结缔组织、骨、实体器官、血管等等中增殖、组织重塑、增生、扩大的伤口愈合的异常情况。通过发明的组合物能治疗或诊断的疾病的实例包括癌症、糖尿病或其他视网膜病、炎症、关节炎、血管或人工血管移植物或血管内装置再狭窄等等。

根据本发明检测和治疗的肿瘤类型通常为人和其他哺乳动物中发现的那些。肿瘤也可以为接种的结果, 如实验动物中。人和其他动物情况中遇见肿瘤的许多类型和形式, 并且并不试图限制本方法对任何特定肿瘤类型或种类的应用。如已知的, 肿瘤包括由不受控制的和渐进性的细胞分裂产生的异常组织块, 并且通常也称为“瘤”。本发明方法可用于例如人中的肿瘤细胞和相关的基质细胞、实体瘤和与软组织有关的肿瘤, 如软组织肉瘤。肿瘤或癌症可位于口腔和咽、消化系统、呼吸系统、骨和关节 (例如, 骨转移性病灶)、软组织、皮肤 (例如, 黑色素瘤) 乳腺、生殖系统、泌尿系统、眼和眼眶、脑和中枢神经系统 (例如, 胶质瘤) 或内分泌系统 (例如, 甲状腺) 并且不一定

限于原发肿瘤或癌症。与口腔有关的组织包括但不限于，舌和口腔组织。癌症可产生于消化系统组织中，包括例如，食管、胃、小肠、结肠、直肠、肛门、肝脏、胆囊和胰腺。呼吸系统的癌症可影响喉、肺和支气管并且包括例如，非-小细胞肺癌。肿瘤可产生于子宫颈、子宫体、卵巢外阴、阴道、前列腺、睾丸和阴茎中，其组成雌雄生殖系统，以及膀胱、肾、肾盂和输尿管中，其包括泌尿系统。肿瘤或癌症可位于头和/或颈（例如，喉癌和甲状旁腺癌）。肿瘤或癌症也可位于造血系统或淋巴系统，并且包括例如，淋巴瘤（例如，恶性淋巴肉芽肿病和非-恶性淋巴肉芽肿淋巴瘤）、多发性骨髓瘤或白血病（例如，急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、慢性粒细胞性白血病等等）。优选，肿瘤位于膀胱、肝脏、卵巢、肾、消化道、脑或乳腺。

SPARC 蛋白具有对多种配体的亲和力。因此，本发明用于将治疗剂递送至疾病部位的方法以下列发现为基础：对 SPARC 具有亲和力的化合物或配体（包括白蛋白）可用于将治疗药物递送至疾病部位，而几乎没有或不递送至正常组织。

本发明还提供了将治疗组合物从血管转运通过内皮屏障进入肿瘤间质组织的方法。抗体疗法和化疗的主要障碍为转移通过内皮屏障进入肿瘤间质组织。白蛋白利用白蛋白受体转运机制而通过内皮屏障。该转运机制与文献报道的相同（gp60 和 albumin）或为其他未发现的机制。之前已报道背载于白蛋白上的治疗剂表现出增强的肿瘤摄取（Desai, N. 等 Increased endothelial transcytosis of nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-007) by endothelial gp60 receptors: a pathway inhibited by Taxol[®], 27th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (SABCS) (2004), 摘要#1071)。此外，通过内皮屏障的增强的转移可利用生理的白蛋白转运机制实现（Schnitzer, J.E.; Oh, P.J. Biol. Chem. 269, 6072-6082 (1994)）。

对于小分子，可进行改进以提高对白蛋白的药物亲和力。对于小分子制剂，可除去防止药物结合白蛋白的溶剂。或者如以下所述，小

分子可连接至白蛋白、白蛋白抗体、其片段或白蛋白-受体的配体。

对于生物分子如蛋白质、抗体和其片段，可以用白蛋白结合肽设计改造该生物制剂而使得其呈现对白蛋白的亲合力。肽可以为白蛋白结合序列、白蛋白的抗体或抗体片段、白蛋白载体的抗体或抗体片段（如 gp60/albondin/净化剂受体/或 TGF- β 受体），或胞膜窝中发现的任何蛋白质、白蛋白转运蛋白的抗体。本发明还涉及制备为具有一个 SPARC 化合价和另一个经内皮转运的效应器（如 gp60/albondin/净化剂受体/或 TGF- β 受体）化合价的嵌合体，或内皮细胞胞膜窝中发现的任何蛋白质的抗体或其合适的片段。

本发明还提供经 SPARC 抗体的补体固定和/或细胞招募介导的免疫应答而破坏 SPARC 表达组织（如肿瘤和心瓣再狭窄组织）的方法。在这种情况下，如同 Rituxan（一种抗-CD20 抗体），效应器部分为 Fc 片段，其可介导伴有 SPARC 表达细胞的直接破坏的补体激活或免疫细胞经细胞介导的免疫应答产生的组织破坏而招募至 SPARC 表达组织。

本发明还提供利用 SPARC 的中和抗体抑制 SPARC 活性的方法。中和抗体具有阻断 SPARC 与其效应器在体内相互作用的能力。例如，中和抗体可阻断 SPARC 与细胞表面组分的相互作用或 SPARC 结合其天然配体（如白蛋白、生长因子和 Ca^{2+} ）。

本发明还提供了用于测定人或其他哺乳动物肿瘤对抗-SPARC 疗法的应答的方法。该方法包括（a）从人分离生物样品，（b）检测生物样品中 SPARC 蛋白的表达，和（c）定量生物样品中 SPARC 蛋白的量。由于抗-SPARC 疗法依赖于疾病组织中 SPARC 抗体与 SPARC 的结合，疾病组织中 SPARC 的存在对于活性是必要的。

本发明进一步提供了使用结合至 SPARC 识别基团的一种或多种诊断试剂（如以上所述的抗体或其片段）的方法。诊断试剂包括放射性同位素或放射性核素、MRI 造影剂、X 射线造影剂、超声造影剂和 PET 造影剂。用于结合（conjugation）的方法为本领域所知。

可通过本领域已知的任何合适的方法检测和定量样品中 SPARC 蛋

白的表达。蛋白质检测和定量的合适的方法包括蛋白质印迹、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、银染、BCA 测定法 (Smith 等, *Anal. Biochem.*, 150, 76-85 (1985)), Lowry 蛋白质测定法 (例如在 Lowry 等, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275 (1951) 中描述), 其为基于蛋白质-铜复合物的比色测定法, 和 Bradford 蛋白质测定法 (例如在 Bradford 等, *Anal. Biochem.*, 72, 248 (1976) 中描述), 其基于根据蛋白质结合的考马斯蓝 G-250 吸光度的变化。可通过之前任何方法分析肿瘤活组织检查或其可通过利用抗-SPARC 抗体 (单克隆或多克隆的) 与合适的显象系统 (即, HRP 底物和 HRP-偶联的二抗) 一起的免疫组织化学分析。

任何合适的 SPARC 抗体均可用于本发明的方法, 只要该抗体呈现特异性结合 SPARC。抗体可以是单克隆或多克隆的; 并且可通过动物的免疫产生或通过重组 DNA 技术 (如噬菌体展示和体外诱变或抗体重链和轻链基因可变区的合成) 而产生。多克隆抗体包括但不限于, 人抗体和源自例如下列动物的人源化抗体, 如鸟类 (例如, 鸡)、啮齿类 (例如, 大鼠、小鼠、仓鼠、豚鼠)、母牛、山羊、绵羊、兔等等。单克隆抗体包括源自抗体产生细胞 (包括但不限于人细胞) 的单个克隆的抗体, 和源自其他动物类型 (例如鸡、兔、大鼠、小鼠、仓鼠、豚鼠、母牛、山羊、绵羊等等) 的细胞的抗体。合成的抗体包括利用重组 DNA 技术经重链和轻链基因可变区的遗传工程而产生的抗体。合成的抗体还包括具有 SPARC 结合活性的化学合成的抗体片段或源自噬菌体展示或类似技术的抗体。

用于人的用途, 为了避免免疫原性和免疫应答, 优选利用人源化的抗-SPARC 抗体或合适的片段如 Fab'、Fab 或 Fab2。人源化抗体或其片段例如可利用下列已建立方法的一种产生: 1) 可利用人 IgG 主链代替 SPARC 抗体的可变 CDR 域而构建人源化抗体, 其中重链和轻链在分开的启动子下分别表达或在具有 IRES 序列的一个启动子下共表达; 2) 可利用设计改造具有人免疫系统的小鼠产生人源化单克隆抗体; 3) 可利用噬粒 (M13, λ 大肠杆菌噬菌体, 或能表面展示的任何噬菌体系统)

产生 SPARC 的人源化抗体。为了构建全长抗体，可变区可转移至重链和轻链的 CDR 上。哺乳动物细胞如 CHO、293 或人骨髓细胞中重链和轻链的共表达产生全长抗体。类似地，可利用沿用已久的方法制备 Fab'、Fab 或 Fab2 片段和单链抗体。

SPARC 的抗体也不限于完整的抗体或保留 SPARC 结合位点的抗体的片段（例如，Fab 和 Fab2）。抗体也不限于任何一类型的抗体，例如 IgM、IgA、IgG、IgE、IgD 和 IgY。抗体还限于二价抗体、单价或具有 SPARC 的一价和效应器（如 tTF 或蓖麻毒 A）的另一价的嵌合体。人源化抗体不限于 IgG。同样的技术可用于产生所有其他种类的抗体如 IgE、IgA、IgD、IgM，每种具有适于特定疾病靶向的不同的抗体-依赖的细胞毒性（ADCC）和补体依赖的细胞毒性（CDC）活性。抗体的功能片段可通过限制性蛋白质水解产生。这些片段可以是单价的（如 Fab'）或二价的（如 Fab2）。片段还可在大肠杆菌中作为单链 scfv 或双抗体合成。

本发明进一步提供了包含直接能发挥其药理学作用的药物活性剂或与能结合 SPARC 或其他白蛋白结合部分的化合物偶联的药物活性剂，和药学可接受载体的组合物。递送试剂，其可以是包含与 SPARC 识别基团偶联的药物活性剂的药物组合物，以使得治疗有效量的药物活性剂递送给哺乳动物的量给予哺乳动物，如人。

本发明还提供了用于将化疗剂递送给哺乳动物中肿瘤的方法。该方法包括给予人或其他哺乳动物治疗有效量的药物组合物，其中该药物组合物包含与能结合 SPARC 蛋白的化合物或配体偶联的化疗剂和药学可接受载体。在此阐述的与本发明的其他实施方案有关的化疗剂、肿瘤、哺乳动物和其组分的描述也适用于递送化疗剂至肿瘤的上述方法的那些相同方面。

优选，药物组合物不包含超过 50% 的纳米颗粒形式的治疗剂。更优选，药物组合物不包含超过 10% 的纳米颗粒形式的治疗剂。甚至更优选，药物组合物不包含超过 5%，或超过 4% 或超过 3% 的纳米颗粒形式的治疗剂。在更优选的实施方案中，药物组合物不包含超过 2% 或超

过 1%的纳米颗粒形式的治疗剂。最优选，药物组合物不包含任何纳米颗粒形式的治疗剂。

本发明还提供了用于将化疗剂递送至人或其他哺乳动物中肿瘤的方法。该方法包括给予人或其他哺乳动物治疗有效量的递送试剂，如药物组合物，其中该递送试剂（例如，药物组合物）包含与 SPARC 识别基团偶联的化疗剂。例如，化疗剂可偶联至 SPARC 识别基团（如识别 SPARC 蛋白的抗体）或仅偶联至 SPARC 抗体。药物组合物优选包含偶联至 SPARC 识别基团的化疗剂和药学可接受载体。在此阐述的与本发明的其他实施方案有关的化疗剂、肿瘤、哺乳动物和其组分的描述也适用于递送化疗剂至肿瘤的上述方法的那些相同方面。

在其他实施方案中，本发明提供了通过 SPARC 识别基团的方式递送药物活性剂至疾病部位的方法，该疾病以人或表达所述蛋白质或标志物的其他动物中 SPARC 或另一种白蛋白-结合蛋白或标志物的过表达为特征。所述疾病包括身体组织（例如软组织、结缔组织、骨、实体器官、血管等等）中增殖、组织重塑、增生、扩大的伤口愈合的异常情况。通过给予包含偶联至能结合 SPARC 蛋白或另一种白蛋白-结合蛋白的化合物或配体的治疗剂的药物组合物能治疗或诊断的疾病的实例包括癌症、糖尿病或其他视网膜病、炎症、关节炎、血管或人工血管移植或血管内装置再狭窄等等。在此阐述的与本发明的其他实施方案有关的药物活性剂、肿瘤、哺乳动物和其组分的描述也适用于递送药物活性剂的上述方法的那些相同方面。

仍然在其他实施方案中，本发明提供了用于递送药物活性剂（例如，仅 SPARC 抗体或结合至 SPARC 识别基团如 SPARC 抗体，放射性标记的 SPARC 抗体等等的化疗剂）至疾病部位的方法，该疾病以人或表达所述蛋白质或标志物的其他动物中 SPARC 的过表达为特征。所述疾病包括身体组织（例如软组织、结缔组织、骨、实体器官、血管等等）中增殖、组织重塑、增生、扩大的伤口愈合的异常情况。通过给予包含抗-SPARC 治疗的药物组合物能治疗或诊断的疾病的实例包括癌症、糖尿病或其他视网膜病、炎症、关节炎、血管或人工血管移植或血

管内装置再狭窄等等。这里阐述的与本发明的其他实施方案有关的药物活性剂、肿瘤、哺乳动物和其组分的描述也适用于递送药物活性剂的上述方法的那些相同方面。

在其他实施方案中，本发明方法包括给予哺乳动物治疗有效量的药物组合物，所述组合物包含偶联至能结合 SPARC 蛋白的化合物或配体的化疗剂。该化疗剂可利用任何合适的方法偶联至能结合 SPARC 蛋白的化合物或配体。优选，该化疗剂经共价键（包括例如二硫键）化学偶联至化合物。

本发明还提供了包括给予哺乳动物治疗有效量的药物组合物的方法，所述组合物包含偶联至 SPARC 识别基团的化疗剂或放射性元素。该化学治疗的或放射性的试剂可利用任何合适的方法偶联至识别 SPARC 的抗体。优选，该化疗剂可经共价键（包括例如二硫键）化学偶联至化合物。

优选，可用于本发明方法中的化合物或配体能结合 SPARC 蛋白。在本发明一优选的实施方案中，化合物为结合 SPARC 蛋白的配体。合适的配体实例包括钙阳离子(Ca^{2+})、铜阳离子(Cu^{2+})、铁阳离子(Fe^{2+})、血小板来源的生长因子 (PDGF)、血管内皮细胞生长因子 (VEGF)、胶原（例如，胶原 I、胶原 II、胶原 III、胶原 IV、胶原 V 和胶原 IX）、玻连蛋白 (vitronectin)、血小板反应蛋白-1、内皮细胞、血小板、白蛋白和羟基磷灰石阳离子。在本发明另一个优选的实施方案中，化合物为小分子。术语“小分子”指具有小于约 600 分子量的任何分子。合适的小分子的实例包括蛋白质、核酸、糖类、脂类、辅酶（例如维生素）、抗原、激素和神经递质。优选，小分子为化学的（例如，有机或无机化学的）肽或拟肽、蛋白质或糖类。在本发明又一个优选的实施方案中，化合物为直接针对 SPARC 蛋白的抗体。结合 SPARC 蛋白的合适的抗体或其片段可用于本发明方法中。

已在几乎所有的癌症类型中证实肿瘤组织中 SPARC 的表达。已证实 SPARC 在肿瘤组织上的加工可源自 SPARC 的肿瘤表达或是基质细胞来源的。通过外源 SPARC 的给予，肿瘤的 SPARC 表型可从 SPARC 阴性

转换至 SPARC 阳性。因此，SPARC 阳性肿瘤将变为对化疗剂敏感的。或者，SPARC 可以为放射性同位素标记的或与不同的毒素偶联而赋予其直接或间接杀死肿瘤的能力。

可利用已知技术合成和纯化 SPARC。可通过将 SPARC 结构基因/cDNA 置于强启动子/翻译起始位点调控下而产生表达外源 SPARC 的细胞并且载体转染入哺乳动物细胞以驱动 SPARC 在这些细胞中的表达。或者，SPARC 可利用杆状病毒或其他病毒（如腺病毒）表达。通过这些细胞表达的 SPARC 可通过传统的纯化方法如离子交换、体积排阻或 C18 色谱法纯化。纯化的 SPARC 可与防腐剂配制于盐水中并且通过静脉内、通过气雾剂、通过皮下注射或其他方法给予。

本发明还提供了用于将化疗剂递送给哺乳动物肿瘤的方法。该方法包括给予哺乳动物治疗有效量的药物组合物，其中该药物组合物包含与能结合白蛋白的 SPARC 蛋白偶联的化疗剂和药学可接受载体。在此阐述的与本发明的其他实施方案有关的化疗剂、肿瘤、哺乳动物和其组分的描述也适用于递送化疗剂至肿瘤的上述方法的那些相同方面。

用于体内使用，偶联至能结合 SPARC 蛋白的化合物或配体的化疗剂如所希望地配制入包含生理学可接受载体的药物组合物中。任何合适的生理学可接受载体可用于本发明的上下文中，并且所述载体为本领域所熟知。

用于体内使用，抗-SPARC 治疗剂如所希望地配制入包含生理学可接受载体的药物组合物中。任何合适的生理学可接受载体可用于本发明的上下文中，并且所述载体为本领域所熟知。

载体通常为液体，但也可以是固体，或液体和固体组分的组合。如所希望的，载体为生理学可接受的（例如，药物或药理学可接受的）载体（例如，赋形剂或稀释剂）。生理学可接受的载体为大家所熟知并且很容易得到。至少部分地通过靶组织和/或细胞的定位以及用于给予该组合物的具体方法确定载体的选择。

通常，所述组合物可制成可注射的（无论是液体溶液或悬浮液）；

还可制备适于在注射之前添加液体而制备溶液或悬浮液的固体形式；并且还可乳化该制剂。适于注射用途的药物制剂包括无菌水溶液或分散体；包含已知的蛋白质稳定剂和冷冻保护剂的制剂，包含芝麻油、花生油或丙二醇水溶液的制剂以及用于无菌注射溶液或分散体临时制备的无菌粉剂。所有情况中，制剂必须为无菌的并且必须为至易于注射程度的液体。其在制备和贮藏条件下必须稳定并且必须保存时防微生物（如细菌和真菌）的污染作用。作为游离碱或药理学可接受盐的活性物质的溶液可适当地与表面活性剂（如羟基纤维素）混合制备于水中。分散体还可以制备于甘油、液体聚乙二醇和其混合物和油类中。在常规的贮藏和使用条件下，这些制剂包含防腐剂以防止微生物的生长。

偶联至结合 SPARC 蛋白的化合物或配体的化疗剂（例如，抗-SPARC 治疗）可以中性或盐形式配制入组合物中。药物可接受盐包括酸加成盐（与蛋白质的游离氨基形成的）并且其与无机酸类（例如，盐酸或磷酸）或有机酸类（如醋酸、草酸、酒石酸、杏仁酸等等）形成。与游离羧基形成的盐也可源自无机碱（例如，钠、钾、铵、钙或氢氧化铁），以及有机碱（如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等等）。

组合物可进一步包括任何其他合适的组分，尤其用于提高组合物和/或其终端使用的稳定性。因此，存在本发明组合物的多种合适的制剂。下列制剂和方法仅为论证性的而决不为限制。

适于经吸入给予的制剂包括气雾剂制剂。气雾剂制剂可置于加压的可接受推进剂中，如二氯二氟甲烷、丙烷、氮等等。其也可配制为常压制剂，用于通过喷雾器或雾化器递送。

适于肠胃外给药的制剂包括水性的和非水性的等渗无菌注射溶液，其可包含抗-氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使得该制剂与指定受体的血液等渗的溶质，以及水性的和非水性的无菌悬浮液，其可包括悬浮剂、增溶剂、稠化剂、稳定剂和防腐剂。制剂可以单元剂量或多剂量密封容器存在，如安瓿和小瓶，并且可以冷冻干燥（冻干）的状态保存，立即使用之前仅需添加无菌的液体赋形剂，例如注射用水。可从

之前所述的无菌粉剂、粒剂和片剂类型制备临时的注射溶液和悬浮液。本发明的一优选的实施方案中，偶联至结合 SPARC 蛋白的化合物（例如，抗-SPARC 治疗）的化疗剂被配制成为用于注射（例如，肠胃外给药）。在这方面，如所希望的，制剂适于瘤内给药，但也可配制成为用于静脉注射、腹膜内注射、皮下注射等等。

适于肛门给药的制剂可通过将活性组分与各种基质（如乳化基质或水溶性基质）混合而制备栓剂。适于阴道给药的制剂除了包含活性组分之外还含有本领域已知的合适的载体，所述制剂可以下列的方式存在：子宫托、棉塞、乳膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫或喷雾剂而存在。

此外，组合物可包含另外的治疗或生物学-活性剂。例如，可存在对特定的适应症治疗有效的治疗因子。控制炎症的因子，如布洛芬或甾体，可为减少与药物组合物的体内给药有关的肿胀和炎症以及生理痛苦的部分。

具体实施方式

下列实施例进一步举例说明本发明但不应该认为以任何方式限制其范围。

实施例 1

该实施例举例说明 SPARC 与白蛋白在 MX-1 肿瘤异种移植物中的共-定位。

已显示 3 期转移性的乳腺癌试验中紫杉醇白蛋白纳米颗粒（Abraxane, ABX 或 ABI-007）具有超过 Taxol (TAX) 的改善的响应率（33%对比 19%， $p < 0.0001$ ）（参见例如，O' Shaughnessy, SABCS）。近来证实了白蛋白-介导的紫杉醇（P）经内皮转运和 ABX 对比 TAX 的紫杉醇增加的瘤内累积（参见例如，Desai, SABCS 2003）。白蛋白结合 SPARC（参见例如，Schnitzer, *J. Biol. Chem.*, 269, 6072-82 (1994)）。

MX-1 肿瘤细胞系源于人乳腺癌。免疫染色人 MX-1 肿瘤异种移植物、人原发乳腺肿瘤组织（ $n=141$ ）和正常人乳腺组织（ $n=115$ ）的连

续低温切片并且对白蛋白、SPARC（利用抗-SPARC 抗体）和小窝蛋白（caveolin）-1 染色分级（0-4）。培养的 MX-1 细胞也对 SPARC 免疫染色。用放射性紫杉醇（P）（20 mg/kg IV）制备紫杉醇白蛋白纳米颗粒（Abraxane, ABX 或 ABI-007）和 Taxol（TAX），并且用于确定紫杉醇在无胸腺小鼠正常组织中的生物学分布。

MX-1 肿瘤中白蛋白染色为聚集的并且与 SPARC 共-定位（图 1）。小窝蛋白-1 染色证实含有白蛋白的区域中血管密度与无白蛋白的区域无差异。SPARC 由 MX-1 培养细胞的表达通过用抗-SPARC 抗体阳性染色证实。对于 7/10 组织，正常组织中（SPARC 阴性）的紫杉醇累积对于 ABX 相比 TAX 明显更低（ $p \leq 0.004$ ）。与正常组织的 1% 相比，46% 的人原发乳腺肿瘤呈现强的 SPARC 染色（等级 > 2 ）（ $p < 0.0001$ ）。在 50 个肿瘤组织的亚组中，SPARC 表达与分级、ER 状态或 PgR 状态无关；然而 p53-阴性肿瘤中有高 SPARC 表达的趋势。

白蛋白和 SPARC 的共-定位提示 SPARC 通过其白蛋白结合活性可起乳腺肿瘤中白蛋白结合的瘤内靶标的作用。由于 ABX 中紫杉醇的转运取决于白蛋白（参见例如，Desai SABCS, 2003），此可解释 ABX 相比 TAX 改善的肿瘤累积。正常组织中 ABX 累积比 TAX 更低，与正常组织中缺乏 SPARC 表达相一致。对 SPARC 筛查患者使得能鉴定对 ABX 更多响应的患者。这些肿瘤中 SPARC 的存在允许利用抗-SPARC 抗体的靶向和治疗。

实施例 2

该实施例举例说明了 MX-1 肿瘤细胞中 SPARC 的表达。

MX-1 细胞培养于盖玻片上并且利用本领域已知的方法用针对人 SPARC 的抗体染色。观察到抗体染色，其证实 MX-1 表达 SPARC。这些结果提示 MX-1 肿瘤细胞中检测到的 SPARC 表达为 SPARC 通过 MX-1 肿瘤细胞分泌的结果。对于 MX-1 肿瘤细胞，染色比正常的初级细胞如 HUVEC（人脐静脉内皮细胞）、HLMVEC（人肺微血管内皮细胞）和 HMEC（人乳腺上皮细胞）更强。虽然大部分 SPARC 染色为内部 SPARC，如

通过共聚焦显微镜检查和未渗透细胞的染色证实的，检测到显著性水平的表面 SPARC。

实施例 3

该实施例举例说明了人乳腺癌细胞中 SPARC 蛋白的过表达。

利用 Cybrdi Inc. (Gaithersburg, MD) 的肿瘤阵列测定人乳腺癌细胞中的 SPARC 表达。分析结果在表 1 中显示。染色强度分级为“阴性”至 4+，数字越高对应的过表达强度就越大。与正常组织的 1%相比，49%的乳腺癌 SPARC 染色阳性（2+和以上）（ $p < 0.0001$ ）。

	SPARC 染色 (%)					
	阴性	-/+	1+	2+	3+	4+
癌细胞	31 (34%)	14 (15%)	1 (1%)	11 (12%)	9 (10%)	25 (27%)
正常细胞	93 (89%)	7 (7%)	4 (4%)	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)

实施例 4

该实施例举例说明了紫杉醇白蛋白纳米颗粒 (ABI-007) 的内皮受体 (gp60) -介导的小窝转胞吞作用。

证实 III 期转移性的乳腺癌试验中紫杉醇 (P) 白蛋白纳米颗粒 (Abraxane, ABX 或 ABI-007) 具有超过 Taxol 的改善的响应率 (33% 对比 19%, $p < 0.0001$) (SABCS, O' Shaughnessy 等, 2003)。Taxol (TAX) 中的 Cremophor 截留 P 微胶粒于血浆中，减少细胞分区可得到的紫杉醇 (参见例如, Sparreboom 等, *Cancer. Res.*, 59, 1454 (1999))。无胸腺小鼠中的研究显示与相等剂量的 TAX 相比, ABX 具有 30-40% 更高的瘤内紫杉醇浓度 (SABCS, Desai 等., 2003)。白蛋白通过特异性受体 (gp60) -介导的小窝转运通过内皮细胞 (EC) (参见例如, John 等, *Am. J. Physiol.*, 284, L187 (2001))。假设 ABX 中白蛋白-结合的紫杉醇可通过 gp60 转运通过肿瘤微血管 EC, 并且相比 TAX 该机制可能对于 ABX 尤其具有活性。

进行一系列的实验对 ABX 和 TAX 评估紫杉醇通过人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和人肺微血管内皮细胞 (HLMVEC) 的结合和转运。荧光紫杉醇 (FP) 用作探针并且荧光 ABX 和 TAX 与 FP 配制以探测紫杉醇通过培养在 transwell 装置上的 EC 单层的结合和转运。

对于 ABX, 紫杉醇结合细胞 (HUVEC) 比 TAX 高 10 倍。与 TAX 相比, 对于 HUVEC 和 HMVEC, 紫杉醇从 ABX 转运通过 EC 单层分别提高 2-3 倍和 2-4 倍。转运依赖于白蛋白。紫杉醇从 ABX 的转运受抗-SPARC 抗体存在的抑制, 所述抗体已知结合 gp60, 小窝白蛋白转胞吞作用必需的受体。已知的小窝转胞吞作用抑制剂, NEM 和 β -甲基环糊精 (BMC) 也抑制紫杉醇从 ABX 转运通过内皮单层 (图 2)。小窝转运的抑制将 P 从 ABX 的转运降低到 TAX 转运的水平。

这些结果证实紫杉醇通过 gp60-介导的小窝转胞吞作用从 ABX 主动转运通过 EC, 而 P 主要通过副细胞 (非-小窝) 机制从 TAX 似乎以 2-4 倍更低的速率转运。该途径可能在某种程度上引起所见的 ABX 相对 TAX 提高的紫杉醇的瘤内浓度。TAX 中的 Cremophor 抑制紫杉醇通过内皮细胞的转胞吞作用。

实施例 5

该实施例在头和颈鳞状癌中利用纳米颗粒白蛋白-结合的紫杉醇 (ABI-007) 证实 SPARC 过表达与高响应率的相关性。

头和颈 (H&N) 以及肛管的鳞状细胞癌 (SCC) 患者的 I 和 II 期临床研究中, 对于动脉内递送的纳米颗粒白蛋白-结合的紫杉醇 (Abraxane, ABX 或 ABI-007), 分别观察到 78% 和 64% 的响应率 (参见例如, Damascelli 等, *Cancer*, 92 (10), 2592-2602 (2001), 和 Damascelli 等, *AJR*, 181, 253-260 (2003))。在比较 ABX 和 Taxol (TAX) 的体外细胞毒性中, 观察到鳞状颈 (A431) 系对 ABX (0.004 $\mu\text{g/ml}$) 比 TAX (0.012 $\mu\text{g/ml}$) 表现出改善的 IC_{50} 。近来证实了白蛋白-介导的紫杉醇 (P) 经内皮小窝转运和 ABX 相比 TAX 的 P 增加的瘤内累积 (参见例如, Desai, SABCS 2003)。

免疫染色人 H&N 肿瘤组织 (n=119) 和正常人 H&N 组织 (n=15) 并且利用肿瘤和正常组织阵列对 SPARC 染色分级 (0-4)。利用多克隆兔抗-SPARC 抗体进行免疫染色。在新的 I 期剂量扩大研究中 (ABX IV 给予超过 30 分钟 q3w)，分析头和颈癌患者 (n=3) 的亚组对 ABX 的应答。

对比正常组织中的 0% (0/15)，H&N 肿瘤的 60% (72/119) 过表达 SPARC (等级 ≥ 2) ($p < 0.0001$)。I 期研究中，2/3 H&N 患者在 135 mg/m² (1 pt) 和 225 mg/m² (1 pt) 剂量水平的 2 轮治疗后达到部分响应 (PR)。在 260 mg/m² 下的 1/3 患者继续发展。

发现 60% 的鳞状 H&N 肿瘤中过表达 SPARC。此可解释之前在鳞状 H&N 癌中所见的由于白蛋白-结合的紫杉醇结合这些肿瘤中表达的 SPARC 而引起的高的 ABX 单-试剂活性。新的 I 期研究中 2/3 鳞状 H&N 肿瘤患者达到 PR。

SPARC 染色:

-	-----	0	-/+	1	2	3	4
H&N 肿瘤阵列:							
-	癌	17	14	16	23	20	29
-	-----	(14%)	(12%)	(13%)	(19%)	(17%)	(24%)
-	正常	13	0	2	0	0	0
-	-----	(87%)	(0%)	(13%)	(0%)	(0%)	(0%)

免疫染色人 H&N 肿瘤组织 (n=119) 和正常人 H&N 组织 (n=15) 并且利用肿瘤和正常组织阵列对 SPARC 染色分级 (0-4)。利用多克隆兔抗-SPARC 抗体进行免疫染色。对比正常组织中的 0% (0/15)，H&N 肿瘤的 60% (72/119) 过表达 SPARC (等级 ≥ 2) ($p < 0.0001$)。此可解释之前在鳞状 H&N 癌中所见的由于白蛋白-结合的紫杉醇结合这些肿瘤中表达的 SPARC 而引起的高的 ABX 单-药剂活性。

在新的 I 期剂量扩大研究中 (ABX IV 给予超过 30 分钟 q3w)，分析头和颈癌患者 (n=3) 的亚组对 ABX 的应答。I 期研究中，2/3 H&N 患者在 135 mg/m² (1 pt) 和 225 mg/m² (1 pt) 剂量水平的 2 轮治疗后达到部分响应 (PR)。在 260 mg/m² 下的 1/3 患者继续发展。来自

这些患者的肿瘤组织对 SPARC 染色并且 1 个应答患者显示 SPARC 强的过表达。

另一个用动脉内 Abraxane 治疗的头和颈(H&N)鳞状细胞癌(SCC)患者的 II 期临床研究中,注意到 68%的总响应率。对其组织分析 SPARC 染色的 10 个应答患者中,发现 70%强烈过表达 SPARC。

实施例 6

该实施例举例说明了标记的白蛋白进入 MX-1 肿瘤细胞的内在化作用和 MX-1 细胞内与胞内 SPARC 表达的共定位。

MX-1 细胞培养于盖玻片上并且用合适的药剂渗透。细胞暴露于荧光白蛋白并且洗涤后暴露于 SPARC 抗体。此后暴露于具有与白蛋白不同荧光标记的二次抗体。令人惊讶地观察到标记的白蛋白与存在的 SPARC 在细胞内的共定位,表明白蛋白迅速内在化并且靶向胞内 SPARC。

实施例 7

该实施例证实相比 Taxol, 包含紫杉醇和白蛋白的药物组合物经 gp60 (白蛋白受体)的内皮转胞吞作用的提高。

人肺微血管内皮细胞(HLMVEC)在 transwell 上生长至汇合。20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的包含紫杉醇和白蛋白的本发明药物组合物或包含荧光紫杉醇(Flutax)的 Taxol 添加至 transwell 上面的室。

利用荧光计连续监测紫杉醇通过转胞吞作用从上面的室转运至底下的室。还使用仅包含 Flutax 而无白蛋白的对照。具有 Flutax 的对照显示无转运,证实汇合的 HLMVEC 单层的完整性。5% HSA (生理浓度)存在下来自白蛋白-紫杉醇组合物的紫杉醇的转运比来自 Taxol 的紫杉醇更快。白蛋白-紫杉醇组合物和 Taxol 的转运速率常数(K_t)分别为 1.396h^{-1} 和 0.03h^{-1} 。对于白蛋白-紫杉醇组合物,转运通过单层的紫杉醇总量比 Taxol 高三倍。因此,白蛋白或包含针对 gp60 受体或其他内皮细胞受体的抗体或片段的其他合适的模拟物的使用可帮助所需

的治疗剂通过内皮屏障进入肿瘤间质组织的转运。

实施例 8

该实施例证实抗-SPARC 抗体特异性结合 SPARC。

通过超声处理从 HUVEC 细胞制备全细胞提取物。在 5-15%的 SDS-PAGE 上分离蛋白质，转移至 PVDF 膜上并且用 SPARC 的多克隆抗体和 SPARC 的单克隆抗体显象。两种抗体与 38kDa 的单一一条带反应，38KDa 为 SPARC 的正确分子量。当通过同样的方法分析 MX-1 时，在澄清的细胞裂解物或富含膜的膜级分中检测到 SPARC。

实施例 9

该实施例证实正常组织中 SPARC 表达的缺乏。

免疫染色正常人和小鼠组织并且利用肿瘤和正常组织阵列对 SPARC 染色分级 (0-4)。利用多克隆兔抗-SPARC 抗体进行免疫染色。除食管外，任何正常组织中不表达 SPARC。同样地，除了雌性小鼠的肾外，任何正常小鼠组织中不表达 SPARC。然而，有可能该表达归因于和 SPARC 同源的卵泡抑素 (follistatin)。

人正常组织中的 SPARC 表达

胃	0/8
结肠	0/9
直肠	0/15
肝脏	0/14
脾脏	0/10
肺	0/14
肾	1/14
脑	1/14
睾丸	0/8
前列腺	0/3
心脏	0/9

扁桃体	0/10
淋巴结	0/10
盲肠	0/10
食管	5/5
胰腺	0/5
眼球	0/5
卵巢	0/5

小鼠正常组织

肝脏	0/19
肾 (M)	0/8
肾 (F)	6/8
肺	0/16
肌肉	0/20
脑	0/20
心脏	0/18
胃	0/20
脾脏	0/20

所有参考文献，包括在此引用的出版物、专利申请和专利在此通过引用引入至本文，就像每一参考文献分别和明确地表明通过引用引入并且在此整体阐述的相同程度。

除非在此另有陈述或明显与上下文矛盾，在描述本发明的上下文中术语“一”和“一个”以及“这个”和类似的指代的使用（特别是在下列权利要求内容中）将视为包括单数和复数。除非另作说明，术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”认为是开放式术语（即指“包括但不限于”）。除非在此另有陈述，在此数值范围的列举仅试图用作分别涉及落入该范围的每一单独值的简写方法，并且每一单独的值并入说明书中就像其在此分别叙述一样。除非在此另有陈述或

明显与上下文矛盾，在此描述的所有方法可以任何合适的顺序进行。在此提供的任何和所有实施例或例证性的术语（例如“如”）的使用仅是想更好地阐明本发明并且除另外要求的以外，不造成对本发明范围的限制。说明书中术语不应视为表示本发明的实践所必需的任何未要求的要素。

在此描述了本发明优选的实施方案，包括发明人已知实施本发明的最佳方式。根据阅读上述说明书，那些优选实施方案的改变对本领域普通技术人员是显而易见的。发明人期望熟练技术工人酌情应用所述改变，并且发明人试图在在此具体描述之外实践本发明。因此，本发明包括如适用法允许的至此附加的权利要求中所叙述主题的所有改进和等同形式。另外，除非在此另有陈述或明显与上下文矛盾，其所有可能的改变中任何上述要素的组合包括在本发明中。

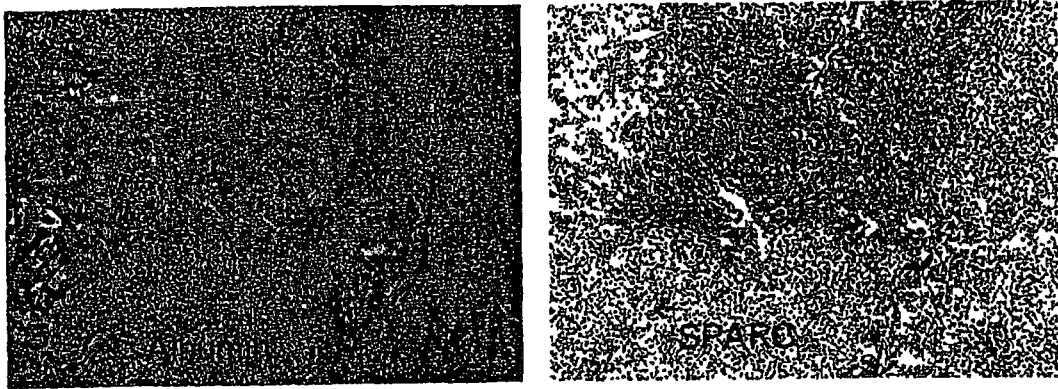


图1. MX-1异种移植肿瘤连续切片中白蛋白和SPARC的共定位。

图2. 紫杉醇通过单层内皮细胞的转胞吞作用

