(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107667292 B
(45)授权公告日 2020.06.19

(21)申请号 201680013857.4
(22)申请日 2016.03.10
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107667292 A
(43)申请公布日 2018.02.06
(30)优先权数据
15382109.5 2015.03.11 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.09.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/055143 2016.03.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/142471 EN 2016.09.15
(73)专利权人 生物医学研究所(IDIBELL)
地址 西班牙埃普拉特約布里加
专利权人 加泰维尼亚肿瘤研究所 (ICO)
(72)发明人 O·卡萨诺瓦卡萨诺瓦
G·吉梅内斯瓦莱里奥
M·奥乔亚德奥尔扎
V·纳瓦罗佩雷斯 N·巴萨尼
H·维达格尔
(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 赵蓉民 张全信
(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)
(56)对比文件
CN 101993919 A,2011.03.30,
审查员 张婷

权利要求书1页 说明书17页 附图23页

(54)发明名称

癌症标志物PD-ECGF

(57)摘要

本发明属于癌症领域,涉及癌症检测、诊断、监测的预测以及疗法应答的预测,尤其是应用血小板衍生内皮细胞生长因子(PD-ECGF)进行疾病进展预测和抗血管生成疗法中应答预测。

CN 107667292 B

1.一种用于诊断受试者癌症的试剂盒,所述试剂盒包含

(i)用于测定受试者样本中PD-ECGF水平的工具,其中所述样本为生物体液样本,以及

(ii)将(i)中获得的水平与参考值进行比较的工具,

其中

-如与参考值相比,受试者样本中PD-ECGF水平升高,则受试者被诊断患有癌症;

-如与参考值相比,受试者样本中PD-ECGF水平降低,则受试者被诊断为不患有癌症;

其中所述癌症选自肾细胞癌、非转移性乳腺癌或结肠直肠癌,

其中所述测定的PD-ECGF水平为PD-ECGF蛋白水平。

2.一种预测癌症患者对抗血管生成疗法的应答的试剂盒,其中所述抗血管生成疗法为非多柔比星或干扰素疗法,所述试剂盒包含

(i)用于测定所述受试者样本中PD-ECGF水平的工具,以及

(ii)将(i)中获得的水平与参考值进行比较的工具,

其中

-与参考值比较,如果受试者样本的PD-ECGF水平是增长的,这显示癌症患者对于抗血管生成疗法的应答不好;

-与参考值比较,如果受试者样本的PD-ECGF水平是降低的,这显示癌症患者对于抗血管生成疗法的应答优良,

其中所述测定的PD-ECGF水平为PD-ECGF蛋白水平。

3.根据权利要求2所述的试剂盒,其中所测量的应答是一种癌症早期进展的表征。

4.根据权利要求2或3所述的试剂盒,其中所述抗血管生成疗法开始于PD-ECGF水平测定完成之后。

5.根据权利要求2所述的试剂盒,其中所述样本为组织样本或生物体液样本。

6.根据权利要求5所述的试剂盒,其中所述组织样本为肿瘤来源的样本,并且其中生物体液样本为血浆样本。

7.根据权利要求6所述的试剂盒,其中所述肿瘤为原发瘤或转移瘤。

8.根据权利要求1或2所述的试剂盒,其中所述参考值通过测定健康受试者样本或测定未被诊断为患有癌症的受试者样本所得。

9.根据权利要求1或2所述的试剂盒,其中PD-ECGF蛋白水平可以通过免疫组织化学、ELISA或Western印迹方法测定。

10.根据权利要求2所述的试剂盒,其中癌症选自肾细胞癌、乳腺癌或结肠直肠癌。

11.PD-ECGF用于制造用于诊断来自受试者的生物体液样本中的癌症的应用,其中所述癌症选自肾细胞癌、非转移性乳腺癌或结肠直肠癌。

12.PD-ECGF用于制造用于测定癌症患者对于抗血管生成疗法的应答的抗体的应用,其中所述抗血管生成疗法为非多柔比星或干扰素疗法。

13.根据权利要求12所述的应用,其中所述癌症选自肾细胞癌、乳腺癌或结肠直肠癌。

癌症标志物PD-ECGF

发明领域

[0001] 本发明属于癌症领域，尤其是属于有利于癌症诊断和预后的生物标志物，其中受试者样本中PD-ECGF生物标志物的变化水平有助于受试者的癌症诊断或癌症受试者的预后。

[0002] 发明背景

[0003] 肾细胞癌(RCC)的发病率已呈逐年稳定上升的趋势。人们对于这种癌症的生物学认识也有了长足的进步。由于这些进步，目前已经有了针对晚期病人的新治疗策略。

[0004] US8029981B2涉及了包含测定缺氧可诱导型蛋白-2(HIG2)水平的RCC诊断方法。US7611839B2涉及一种在受试者中确认RCC诊断的方法，该方法包含了延长因子-1α2(EEF1A2)和Toll样受体-2(TLR2)的水平测定。

[0005] 然而，在RCC的临床治疗中，尚无可以进行常规应用的生物标志物。特别是在最近的十年，RCC预后的方法仍未改变。一般情况下，RCC的治疗是通过组织学来分类的；病人仍会继续暴露于潜在的有毒疗法之中，但不指示疗法应答的概率。因此，在RCC的诊断和/或预后中，仍需要对本领域中潜在生物标志物进行确定。

[0006] 在世界范围内，乳腺癌为第二大常见类型癌症(10.4％；位于肺癌之后)以及第五大常见癌症死亡的病因(位于肺癌、胃癌、肝癌和结肠癌之后)。在全世界女性人群之中，乳腺癌在导致癌症死亡的病因中居于首位。自20世纪70年代起，世界范围内乳腺癌的病例显著增加，这一现象也与西方世界的现代生活方式有关。北美女性是世界上乳腺癌发生率最高的人群。

[0007] 具有预后和/或治疗价值的已知乳腺分子标志物包括激素受体，例如雌激素受体(ER)和孕激素受体(PR)、HER-2致癌基因、Ki-67和p53。最新研究确认的乳腺癌分子靶点包括CXCR4、小窝蛋白(caveolin)和FOXP3。

[0008] 结肠直肠癌每年导致世界上655000人死亡，成为西方世界中第三大常见癌症形式和第二大癌症死亡的致病原因。许多类结肠直肠癌被认为是由结肠腺瘤性息肉引起的。这些蘑菇状的增生通常是良性的，但有些可能随着时间发展成为癌症。大多数时候，局部结肠癌的诊断是通过结肠镜来确定的。

[0009] 手术切除是早期结直肠癌(I期至III期)的主要治疗方法，并且评估潜在治愈性手术后预后的最有力工具是对切除标本进行的病理分析。虽然预测术后结局的最强因素是病理阶段的各种参数，但其他临床，分子和组织学特征也可能会影响预后，这一过程与病情阶段相互独立。对于IV期病人，预后与远隔转移性疾病的位置和程度具有更为密切的关系。

[0010] 癌胚抗原(CEA)水平是结肠直肠癌中最常用的肿瘤标志物。手术前可以对CEA水平进行检测，以便对预后进行预测，治疗期间可以利用CEA水平来评估治疗中或治疗结束后的患者应答，监测病情复发。CA 19-9是一种血液标志物，它的水平在结肠直肠癌中可能会升高。MSI(微卫星不稳定性)可用于确诊早期结肠癌，这时的癌症可能需要更积极治疗，或当某些患者由于具有某些癌症类型的家族型综合征风险，需要进行进一步的遗传检测时，MSI还可以用于对于这些患者的确认工作之中。最近，有研究者已经提出血清miR-21可以作为

结肠直肠癌的早期诊断和预后的生物标志物(Toiyama等人.2013J.Natl.Cancer Inst.105(12):849-859)。

[0011] 然而,由于乳腺癌和结肠直肠癌都具有高患病率,本领域仍对诊断和/或预测所述癌症应答的标志物需求不断。

发明概要

[0012] 发明人通过免疫组织化学、ELISA和Western印迹方法对于PD-ECGF蛋白的表达水平进行了分析。通过免疫组织化学分析发现,非癌组织样本中未检测出PD-ECGF(共12个样本,阳性率为0,0%),但在69例RCC患者中67例(>97%)组织样本中观察到PD-ECGF蛋白,在17例乳腺癌患者的组织样本中,10例(59%)也发现了PD-ECGF蛋白的。因此,确认组织样本中PD-ECGF的表达水平可以用于癌症的检测、诊断或检测之中。

[0013] 另外,肾细胞癌和结肠直肠癌患者在抗血管生成疗法中出现各种应答,本发明人发现PD-ECGF的表达是对这些应答的一项预测因子,实验结果显示,在疗法开始前的肿瘤中PD-ECGF水平与疾病早期进展风险的具有相关性(Kaplan-Meier和Gehan-Breslow-Wilcoxon检验,p<0,045)。因此,PD-ECGF表达在预测治疗中癌症的进展状况具有潜在价值,因此可以作为患者抗血管生成疗法中应答的预测因子。

[0014] 并且,结肠直肠癌患者,如果血浆中PD-ECGF水平较高,其发生早期进展的风险也显著升高,见PD-ECGF和肿瘤进展的显著风险比分析(风险比,p<0.041)。因此血浆中PD-ECGF蛋白水平在预测治疗中癌症进展状况中具有潜在价值,因此可以作为患者抗血管生成疗法中应答的预测因子。

[0015] 这些发现支持将PD-ECGF作为一种新型生物标志物对RCC、乳腺癌、结肠直肠癌和其他类型癌症患者进行检测,诊断,疾病监测和应答预测。

[0016] 因此,首先,本发明涉及了一种受试者癌症的诊断方法,包含

[0017] (i)了所述受试者样本中PD-ECGF水平的确定,

[0018] (ii)以及将所获得的水平与(i)参考值进行比较,

[0019] 其中

[0020] -如与参考值相比,受试者样本中PD-ECGF水平升高,则受试者被诊断患有癌症;

[0021] -如与参考值相比,受试者样本中PD-ECGF水平降低,则受试者被诊断为不患有癌症。

[0022] 在另一方面,本发明涉及一种接受抗血管生成疗法的癌症受试者所产生的应答预测方法,其中所述抗血管生成疗法为非多柔比星或干扰素疗法,该方法包含

[0023] (i)了所述受试者样本中PD-ECGF水平的确定,

[0024] (ii)以及将所获得的水平与(i)参考值进行比较,

[0025] 其中

[0026] -如与参考值相比,受试者样本中PD-ECGF水平升高,说明机体在抗血管生成治疗中发生了不良应答;

[0027] -如与参考值相比,受试者样本中PD-ECGF水平降低,说明机体在抗血管生成治疗中发生了良性应答。

[0028] 进一步地,本发明涉及一种PD-ECGF在受试者癌症诊断和/或接受抗血管生成疗法

的癌症患者的应答确定过程中的应用,其中所述抗血管生成疗法为非多柔比星或干扰素治疗。

附图说明

[0029] 图1.使用免疫组织化学方法测定患者或健康受试者的肿瘤或非肿瘤组织样本中PD-ECGF的蛋白水平。

[0030] 图2.使用免疫组织化学方法测定RCC癌症患者肿瘤组织样本中PD-ECGF的蛋白水平。

[0031] 图3.使用免疫组织化学方法测定乳腺癌患者肿瘤组织样本中PD-ECGF的蛋白水平。

[0032] 图4.RCC患者无进展生存期-肿瘤组织中PD-ECGF表达水平的Kaplan-Meier生存期图。

[0033] 图5.使用ELISA方法测定健康供体或癌症患者血浆样本中PD-ECGF的蛋白水平。

[0034] 图6.使用ELISA方法测定RCC癌症患者血浆样本中PD-ECGF的蛋白水平。

[0035] 图7.使用ELISA方法测定乳腺癌患者血浆样本中PD-ECGF的蛋白水平。

[0036] 图8.使用ELISA方法测定结肠直肠癌患者血浆样本中PD-ECGF的蛋白水平。

[0037] 图9.PD-ECGF血浆蛋白水平与结肠直肠癌患者肿瘤进展的风险比关联度。

[0038] 图10.RCC患者无进展生存期-血浆中PD-ECGF表达水平的Kaplan-Meier生存期图。

[0039] 图11.结肠直肠腺瘤癌患者的Kaplan-Meier无疾病生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(7个样本)。参考文献:结直肠腺瘤(TCGA,Provisional)。

[0040] 图12.胶质母细胞瘤患者的Kaplan-Meier总体生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(291个样本)。参考文献:Brennan CW等人,胶质母细胞瘤的体细胞基因组背景。细胞。20130ct10;155(2):462-77.

[0041] 图13.肾透明细胞癌患者的Kaplan-Meier总体生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(413个样本)。参考文献:肾透明细胞癌(TCGA,Provisional)。

[0042] 图14.肾透明细胞癌患者的Kaplan-Meier无疾病生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(413个样本)。参考文献:肾透明细胞癌(TCGA,Provisional)。

[0043] 图15.肾透明细胞癌患者的Kaplan-Meier总体生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(392个样本)。参考文献:癌症基因组图谱研究网络。透明细胞(细胞癌)综合分子表征。Nature(《自然》)2013Jul4;499(7456):43-9.

[0044] 图16.肾乳头状细胞癌患者的Kaplan-Meier无疾病生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(161个样本)。参考文献:肾乳头状细胞癌(TCGA,Provisional)。

[0045] 图17.肺腺癌患者Kaplan-Meier总体生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(230个样本)。参考文献:肺腺癌(TCGA,Provisional)。

[0046] 图18.肺腺癌患者的Kaplan-Meier无疾病生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(230个样本)。参考文献:肺腺癌(TCGA,Provisional)。

[0047] 图19.前列腺腺癌(瘤)患者Kaplan-Meier无疾病生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(85个样本)。参考文献:Taylor BS et al.,人类前列腺癌综合基因组分析。癌细胞。2010Jul 13;18(1):11-22.

[0048] 图20.睾丸生殖细胞癌患者Kaplan-Meier总体生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(149个样本)。参考文献:睾丸生殖细胞癌(TCGA,Provisional)。

[0049] 图21.胸腺瘤患者Kaplan-Meier总体生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(124个样本)。参考文献:胸腺瘤(TCGA,Provisional)。

[0050] 图22.胸腺瘤患者Kaplan-Meier无疾病生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(124个样本)。参考文献:胸腺瘤(TCGA,Provisional)。

[0051] 图23.乳头状甲状腺癌患者Kaplan-Meier总体生存期图,其中PD-ECGF表达发生了改变。全部完整的肿瘤(388个样本)。参考文献:癌症基因组图谱研究网络。乳头状甲状腺癌的综合基因组表征。细胞。20140ct 23;159(3):676-90.

[0052] 发明详细说明

[0053] 定义:

[0054] 这里所使用的术语“抗血管生成疗法”指的是基于至少一种抗血管生成剂的疗法。术语“抗血管生成剂”或“血管生成抑制剂”指的是一种靶定血管生成过程(例如,血管形成的过程)的试剂,所述血管生成过程包含但不限于肿瘤血管生成。在这种情况下,抑制可以指阻断血管形成过程,延迟或降低血管生长速度。

[0055] 术语“癌症”指的是一种疾病,该疾病表征为细胞分裂失控(或细胞存活或凋亡抗性增加)和细胞具有浸润其它周围细胞(浸润)的能力并且可以扩散到机体其它部位,而其它部位并不是这些细胞通过淋巴管和血管,通过血液循环,在正常情况下所处的位置(转移),随后浸润到机体的其它正常组织之中。根据是否通过浸润和转移方式进行扩散,肿瘤被分为良性或恶性肿瘤。良性肿瘤不能通过浸润或转移方式进行扩散,即它们只能在局部生长;然而恶性肿瘤就具有通过浸润和转移进行扩散的能力。已知癌症相关的生物过程包括血管生成、免疫细胞浸润、细胞迁移和转移。术语癌症包含但不限于肺癌、肉瘤、恶性黑素瘤、胸膜间皮瘤、膀胱癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、肝癌、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、食管癌,肾上腺癌、腮腺癌、头颈癌、宫颈癌、子宫内膜癌,肝癌,间皮瘤、多发性骨髓瘤、白血病和淋巴瘤。在本发明的具体实施例中,所述癌症为肾细胞癌(RCC)、乳腺癌或结肠直肠癌。术语“乳腺癌”指的是任何乳腺细胞的恶性增殖紊乱,以输乳管内层或提供输乳管的小叶细胞发生紊乱最为常见。起源于导管的癌症称为导管癌,而起源于小叶的癌症称为小叶癌。术语“结肠直肠癌”,也称为“结肠癌”,“直肠癌”或“肠癌”指的是一种以结肠或直肠或阑尾细胞发生细胞生长失控的癌症。术语“肾细胞癌”也称为“肾癌”或“肾腺瘤”指的是肾脏的任何组织具有肿瘤细胞的癌症,所述癌症包含透明细胞癌(与颗粒细胞或不与颗粒细胞混合)、嗜色肾细胞癌、肾横纹肌样瘤、嫌色细胞癌、嗜酸细胞癌、集合管癌、移行细胞癌和肉瘤样肿瘤。

[0056] 这里所使用的术语“诊断”涉及了一种尝试确定和/或确认受试者可能疾病的过程,即诊断规程和根据该过程所形成的意见,即“诊断意见”。因此,诊断可以认为是一种对受试者疾病进行尝试分类,分为一系列单独且有区别的类别,从而作出治疗决定和制定预后。特别是,术语“癌症诊断”指的是对受试者肿瘤的存在性进行确认或检测的能力。这种检测过程由于是本领域技术人员所能理解的,不会要求其针对所有分析样本的结果都是正确的。然而,这一过程要求所分析样本中被正确分类的量应当具有统计学显著性。本领域技术人员可以使用不同的统计工具来建立所述统计学显著的量;所述统计工具中演示性、非局

限的例子包括确定置信区间、确定P值、学生t检验和Fisher判别函数等。(详见,例如Dowdy and Wearden,Statistics for Research,John Wiley&Sons,New York 1983)置信区间优选至少90％、至少95％、至少97％、至少98％至少99％。p值优选小于0.1、小于0.05、小于0.01、小于0.005或小于0.0001。本发明的教导优选允许对所测定组或分析人群中的至少60％、至少70％、至少80％或至少90％的受试者做出正确诊断。

[0057] 这里所使用的术语“表达水平”指的是受试者样本中基因所产生的可测量的基因产物的量,其中所述基因产物可以是转录产物或转译产物。根据本领域技术人员的理解,基因表达水平可以通过测定所述基因的信使RNA水平或所述基因的蛋白水平表示。在本发明的条件下,编码PD-ECGF的基因表达水平可以通过测量该基因编码的mRNA水平或测量该基因编码的蛋白水平,即PD-ECGF蛋白或其变体的水平。PD-ECGF蛋白变体包括该蛋白所有生理学上相关的转译后化学修饰形式,例如糖基化、磷酸化、乙酰化等,但要具有该蛋白的功能。所述术语包括任何哺乳生物的PD-ECGF蛋白,包括但不限于家养或农场动物(牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物)、灵长类动物和人类。优选是,PD-ECGF为人源蛋白。

[0058] 本文所用的术语“血小板衍生的内皮细胞生长因子”或“PD-ECGF”也称为“血小板衍生的内皮细胞生长因子-1”,“ECGF-1”或“ECGF1”,“胶质抑素”,“血小板衍生的内皮细胞有丝分裂原”,“胸苷磷酸化酶”或“TP”,并且涉及最初从血小板中分离并显示内皮促有丝分裂活性的细胞质蛋白。这是一种酸性、非糖基化蛋白,分子量为45kDa,合成前体含有482个氨基酸,通过N-末端加工而成。如果是从胎盘中分离获得的,该蛋白在N-末端还会多出五个氨基酸。体内环境下,PE-ECGF的丝氨酸残基会被磷酸化,但这种磷酸化的生物学意义尚未可知。人类编码PD-ECGF的基因位于第22号染色体上,基因ID为1890(NCBI GenBank,2014年3月1日更新)。PD-ECGF具有很多转录产物变体:转录变体1(NCBI GenBank检索号:NM_001113755.2)可以编码与变体2、3和4相同的异构体1;转录变体2(NM_001953.4)在5'UTR上使用了一个交替剪接位点;转录变体3(NM_001113756.2)与变体1相比,差异位于5'UTR;转录变体4(NM_001257988.1)与变体1相比,其在5'UTR上使用了一个交替剪接位点;转录变体5(NM_001257989.1)与变体1相比,其在5'UTR和3'编码区都使用了交替剪接位点,编码异构体2,所述异构体2与异构体1相比,在C末端区多了一端序列。人源PD-ECGF的氨基酸序列在NCBI GenBank的检索号为AAB03344.2(含有482个氨基酸,2000年2月3日版本),在UniProKB/Swiss-Prot检索号为P19971.2(截止2014年2月19,Uniprot版本号167)。

[0059] 本发明中所使用的“预测受试者对于抗血管生成疗法的应答”涉及使用抗血管生成疗法作为治疗干预手段后对于治疗结果的预测。治疗结果可以通过任何常见患者进展终点来确定,例如一个不好或好的结果(例如长期生存期、总体生存期、疾病专有生存期、无进展生存期或无疾病生存期的可能性);复发、疾病进展或死亡率。本领域技术人员对应答预测都理解,虽然很希望是,但也不必要求对100％的接受诊断或评估的受试者都准确。然而,这一术语需要对所要确定的受试者中具有统计学显著性的数量是正确的,从而可以提高针疗法应答的预测准确概率。受试者是否具有统计显著性,可以直接由本领域技术人员使用各种公知的统计学统计评估工具来确定,例如,确定置信区间、p值、学生t检验、Mann-Whitney检验等,详见Dowdy and Wearden,Statistics for Research,John Wiley&Sons,New York 1983。优选置信区间为至少50％、至少60％、至少70％、至少80％、至少90％、至少95％。p值优选0.05、0.025、0.001或更低。任何在患者应答确定中广泛接受的参数都可以在

本干预中进行使用，包括但不限于疾病进展。

[0060] 本发明中所使用的术语“参考值”指的是一种实验室数值，它作为参考用于通过实验室检查受试者或受试者来源的样本获得数值或数据。参考值或参考水平可以是绝对值、相对值、具有上限或下限的值，一个数值范围、算术平均值、中位值、平均值或与特定参照或基线值的一种比较值。参考值可以是基于单独样本得到的数值，例如，受试者从测试开始前的早期样本中所获得的数值。参考值可以是来源于大量样本的数值，例如来自实际年龄匹配组的受试者人群，或基于一系列包含或排除测试样本的样本组。在使用干预方法来确定癌症诊断或预测正接受抗血管生成疗法的癌症受试者的应答时，应当给出合适的参考值。

[0061] 本文所用的术语“样本”或“生物样本”是指从受试者分离的生物材料。所述生物材料包含任何适合进行检测RNA或蛋白水平的生物材料。在具体实施例中，样本包含遗传材料，例如来自研究中受试者的DNA、基因组DNA(gDNA)、互补DNA(cDNA)、RNA、不均一核RNA(hnRNA)和mRNA等。样本可以从任何合适的组织或生物体液中分离得到，例如血液、唾液、血浆、血清、尿液、脑脊髓液(CSF)、粪便、手术标本、从活体检查获得的样本、以及嵌入石蜡中的组织样本。分离样本的方法为本领域技术人员所已知的。尤其是，从活体检查中获得样本的方法包括生物团的总分配，或微解剖或其他本领域已知的细胞分离方法为了简化样本的保存和处理过程，这些样本可以使用福尔马林固定，然后使用石蜡包埋或快速冷冻并随后使用低温固化介质进行包埋，例如OCT-Compound，通过进入浸入超低温介质中，使样本快速冷冻。在一项具体实施例中，根据本发明的方法得到的受试者样本为一种生物体液样本。在一项具体实施例中，根据本发明的方法得到的受试者样本选自由血液、血清、血浆和组织样本组成的样本组合；最好选自血浆和组织样本的样本组合。

[0062] 术语“受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”涉及被分类为哺乳动物的所有动物，包括但不限于家畜和农场动物，灵长类和人类，例如人、非人灵长类动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物。优选是，所述受试者为任何年龄、性别或种族的男性或女性。

[0063] 本发明所使用的术语“疗法”包含任何旨在终止、预防、辅助和/或降低本文所述临床疾病易感性的治疗类型。在优选实施例中，术语“疗法”涉及预防性疗法(即一种降低本文定义的临床病症、紊乱或病症易感性的疗法)。因此“疗法”、“治疗”及相似表述指的是获得目的药学的和/或生理的作用，包括人等哺乳动物的任何病理疾病和紊乱的任何疗法。所述作用可以是在完全或部分地预防本文中疾病或症状方面具有预防作用和/或在部分或完全至于疾病方面具有治疗作用和/或由于所述疾病原因而产生的不良作用。即“疗法”包括(1)预防受试者发病或疾病复发，(2)抑制疾病，例如阻止疾病发展，(3)停止或终止病症或至少与其相关的症状，使宿主不再遭受疾病或其症状的折磨，例如导致疾病或其症状消退，例如通过恢复或修复丢失的，缺失的或有缺陷的功能，或刺激低效的过程，或(4)缓解、减轻或改善疾病或与之相关的症状，其中改善是广义上改善，指的是指至少降低参数量级，例如炎症，疼痛和/或免疫缺陷。

[0064] 本发明的癌症诊断方法

[0065] 本发明的研究者发现，通过使用免疫组织化学分析，非癌组织样本中未检测出PD-ECGF(共12个样本，阳性率为0，0％)，但在69例RCC患者中67例(>97％)组织样本中观察到PD-ECGF蛋白，在16例乳腺癌患者的组织样本中，9例(56％)也发现了PD-ECGF蛋白的(见实

施例1)。相似地,通过ELISA分析发现,在16例RCC患者的血浆样本中14例(>87%)和16例乳腺癌患者中11例(69%),和58例结肠直肠癌患者中52例(90%)的患者样本中都观察到PD-ECGF的表达(见实施例2)。

[0066] 因此,在第一方面,本发明涉及了一种受试者癌症的诊断方法,包含

[0067] (i)了所述受试者样本中PD-ECGF水平的确定,

[0068] (ii)以及将所获得的水平与(i)参考值进行比较,

[0069] 其中

[0070] -如与参考值相比,受试者样本中PD-ECGF水平升高,则受试者被诊断患有癌症;

[0071] -如与参考值相比,受试者样本中PD-ECGF水平降低,则受试者被诊断为不患有癌症。

[0072] 因此,在本发明诊断方法的第一步中,应当对待确诊受试者的样本中PD-ECGF表达水平进行测定。所要测定PD-ECGF表达水平的样本可以为任何包含潜在肿瘤细胞的样本。在一项具体实施例中,含有潜在肿瘤细胞的样本是一种生物体液样本。在一项具体实施例中,含有潜在肿瘤细胞的样本是潜在的肿瘤组织或其部分。在一项更为具体实施例中,所述潜在肿瘤组织是待确诊为肾癌患者的肾组织样本,或待确诊为乳腺癌患者的乳腺组织样本,或待确诊为结肠直肠癌患者的结肠直肠组织样本。所述样本可以通过常规方法获得,例如通过本领域普通技术人员所熟知的方法进行的活体检查、外科切除或抽吸(穿刺)。通过活体检查获得样本的方法包括生物团总分配、或微切除或其他已知的细胞分离方法包括肾切除术和部分肿瘤切除术。肿瘤细胞还可以通过细针穿刺(抽吸)细胞学方法额外获得。为了简化样本的保存和处理过程,这些样本可以使用福尔马林固定,然后使用石蜡包埋或快速冷冻并随后使用低温固化介质进行包埋,例如OCT-Compound,通过进入浸入超低温介质中,使样本快速冷冻。

[0073] 在另一项实施例中,所要测定PD-ECGF表达水平的样本是待确诊患者的生物体液。在一项优选实施例中,所述生物体液选自血液,尤其是外周血、血浆或血清。血液样本一般通过动脉或静脉穿刺获得,一般为肘部内侧或手背上的静脉,血液样品被收集到密封的小药瓶或注射器中。通常可以在脚跟上或手指的远端指骨上进行毛细血管穿刺,以便进行微量法分析。血清可以从全血样本获得,在没有抗凝剂的情况下,让样本平衡10分钟,使其凝固,随后在1500rpm的速度下离心10分钟,以便将细胞(沉淀)与血清(上清液)进行分离。而要获得血浆样品,需要将全血与抗凝血剂进行接触,3000rpm离心20分钟。所述临床沉淀对应的是组成成分,而上清液对应的是血浆。所获得的血清或血浆可以转移到存储管中,以便通过本发明的方法进行样本分析。

[0074] 在涉及本发明诊断方法的一项具体实施例中,所要测定PD-ECGF表达水平的样本为血浆样本或组织样本。在一项具体实施例中,当要进行乳腺癌诊断时,应当对血浆样本或乳腺组织样本的PD-ECGF表达水平进行测定。在一项具体的可选择的实施例中,当要进行肾细胞癌(RCC)诊断时,应当对血浆样本或肾组织样本的PD-ECGF表达水平进行测定。在一项具体的可选择的实施例中,当要进行结肠直肠癌诊断时,应当对血浆样本或结肠直肠组织样本的PD-ECGF表达水平进行测定。

[0075] 如前文所述,基因表达水平可以通过测量所述基因的信使RNA水平或测量所述基因编码的蛋白水平,即PD-ECGF蛋白或其变体的水平。PD-ECGF蛋白变体包括该蛋白所有生

理学上相关的转译后化学修饰形式，例如糖基化、磷酸化、乙酰化等，但要具有该蛋白的功能。所述术语包括任何哺乳生物的PD-ECGF蛋白，包括但不限于家养或农场动物(牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿动物)、灵长类动物和人类。优选是，PD-ECGF为人源蛋白。

[0076] 为了测量基因的mRNA水平，生物样本可以通过物理、机械或化学方式绞碎组织或细胞结构，将细胞内组分释放到水性或有机溶剂中，获得核酸，进行进一步分析。核酸可以通过技术人员已知的规程和现有商业方法从样本中提取出来。RNA可以使用任何本领域常见方法从冷冻或新鲜样本中提取出来，例如Sambrook,J.,等人,2001。分子克隆:实验室手册，第3版，冷泉港实验室出版社，纽约，第1-3卷。优选是，实验需要谨慎，防止提取过程中防止RNA降解。

[0077] 可以使用福尔马林固定并石蜡包埋的组织样本提取的mRNA进行表达水平的测定。mRNA可以从存档的病例样本或首次脱石蜡的活体检查样本中分离得到。一项示例性脱石蜡化过程涉及使用二甲苯等有机溶剂清洗石蜡化样本的过程。脱石蜡化样本可以使用含低级醇的水性溶液进行再水合化过程。合适的低级醇包括甲醇、乙醇、丙醇和丁醇脱石蜡化样本可以通过后续降低低级醇溶液浓度的清洗来进行再水合化，例如，可选地，所述样品同时进行脱石蜡化和再水合化。所述样品随后被裂解，从样品中提取RNA。也可以从新鲜的肿瘤组织(例如被切除的肿瘤)中获得所述样本。在一项具体实施例中，样本可以来自新鲜的肿瘤组织或OCT包埋的冷冻组织。在另一项优选的实施例中，样本可以来自结肠镜检过程，随后进行石蜡包埋。

[0078] 为了将不同组织中mRNA表达值正常化，很可能要将对照RNA的表达值与测试样本中目标mRNA的表达水平进行比较。本发明中“对照RNA”涉及一种RNA，相较于非肿瘤细胞，其在肿瘤细胞中的表达水平不发生变化或发生有限量的变化。优选是，对照RNA是来自于管家基因的mRNA，编码组成型表达蛋白，承担必需的细胞功能。本发明中所使用的优选管家基因包括β-2-微球蛋白、泛素、18-S核糖体蛋白、亲环蛋白、IPO8、HPRT、GAPDH、PSMB4、微管蛋白和β-肌动蛋白。在一项优选实施例中，所述对照RNA为GAPDH、IPO8、HPRT、β-肌动蛋白、18-S核糖体蛋白或PSMB4mRNA。

[0079] 在一项实施例中，根据比较阈值循环(Ct)方法进行相对基因表达的定量，内部对照为GAPDH、IPO8、HPRT、β-肌动蛋白或PSMB4，使用RNA对照品进行曲线校正。根据公式2-(ΔCt样本-ΔCt校正品)进行最终结果的确定，其中将对照基因的值减去目的基因的Ct值得到校正品和样本的ΔCT值。

[0080] 选用合适方法进行mRNA水平上的基因表达水平测定，方法包括但不限于测定mRNA表达水平的标准测试，例如qPCR、RT-PCR、RNA保护分析、Northern印迹、RNA斑点印迹、原位杂交、微阵列技术、基于标签的方法如基因表达(SAGE)的连续分析，包括变体方法诸如LongSAGE和SuperSAGE、微阵列分析、原位杂交的荧光分析(FISH)，包括变体方法诸如Flow-FISH、qFiSH和双重融合FISH(D-FISH)等。

[0081] 选用合适方法进行蛋白水平上的基因表达水平测定，方法包括但不限于测定蛋白表达水平的常规测试，例如使用可以与由所述基因编码的蛋白质(或其含有抗原决定簇的片段)特异结合的抗体，随后对所得的抗体-抗原复合物进行定量。在一项具体实施例中，PD-ECGF的蛋白水平定量可以使用确定蛋白表达水平的标准检测方法，例如Western印迹或Western转移，ELISA(酶联免疫吸附测定)，RIA(放射免疫测定)，竞争性EIA(竞争酶免疫测

定),DAS-ELISA(双抗体夹心ELISA),免疫细胞化学和免疫组织化学技术,基于使用生物芯片或包括特异性抗体的蛋白质微阵列技术,或基于胶体沉淀的测定形式,例如试纸。

[0082] 这些检测中所应用的抗体可以是,例如,多克隆血清、杂交瘤上清液或单克隆抗体、抗体片段、Fv、Fab、Fab'和F(ab')2、ScFv、双抗体、三抗体、四体抗体和人源化抗体。同时,抗体可以被标记或不被标记。在只为演示目的所提供的非排他性的实施例中,可被使用的标志物包括放射性同位素、酶、荧光团、化学发光试剂、酶底物或辅因子、酶抑制剂、颗粒、着色剂等。本发明中可以使用大量众所周知的测定法,测定方法中使用了非标记抗体(一抗)和标记抗体(二抗);这些技术包括Western印迹或Western转移、ELISA、RIA、竞争性EIA、DAS-ELISA、免疫细胞化学和免疫组织化学方法,基于使用生物芯片或包括特异性抗体的蛋白质微阵列技术,或基于胶体沉淀的测定形式,例如试纸。其它检测和定量目的蛋白水平的方法包括亲和色谱、结合-配体检测方法等。

[0083] 另一方面,PD-ECGF蛋白水平的测定还可以通过建立组织微阵列(TMA)来实现,TMA含有受试者样本,然后通过免疫组织化学技术测定相应蛋白的表达水平。可以使用两个以上的病理学家进行免疫染色强度评估,使用统一、清晰的临界标准来进行打分,从而保证方法的可复制性。差异可以通过同时重新评估来解决。简单说,免疫染色的结果可以进行如下记录:阴性表达(0)vs.阳性表达,低表达(1+)vs.中度(2+)和高表达(3+),将肿瘤细胞的表达结果和每种标志物的特异临界值进行考量。作为一般标准,临界值的选择是为了促进可复制性,如果可能,还促进转化为生物学事件。可选地,可以使用成像方法和Rojo,M.G.等人公开的自动方法来进行免疫染色强度评估。(Folia Histochem.Cytobiol.2009;47:349-54)or Mulrane,L.等人(Expert Rev.Mol.Diagn.2008;8:707-25)。

[0084] 可选择地,在另一项具体实施例中,PD-ECGF蛋白水平使用Western印记进行测定。Western印记的原理:先前使用凝胶电泳在变性条件下对蛋白进行检测,固定在膜上,通常是尼龙纤维膜,然后使用特异抗体进行孵育后使用显色系统进行显色(例如化学发光剂)。

[0085] 在一项具体实施例中,本发明中的诊断方法所需要测定的PD-ECGF表达水平可以以PD-ECGF蛋白水平来表示。在一项更具体的实施例中,PD-ECGF蛋白水平通过ELISA、Western印记或免疫组织化学方法进行测定。

[0086] 本发明中术语蛋白,尤其是酶的"活性水平"指的是酶活性的测定,尤其是测定单位时间转化底物的摩尔数。

[0087] 确定酶活性水平的检测方法对技术人员来说是已知的,包括但不限于起始速度检测、进展曲线检测、瞬变动力学检测和松弛法。酶活性连续检测法包括但不限于分光光度法、荧光测定法、热量计法、比色法、化学发光法、光散射法和微量热泳测定法。酶活性间断检测法包括但不限于辐射测定和色谱测定法。正如技术人员所了解的,可能影响酶活性的因素包括盐浓度、温度、pH和底物浓度。

[0088] 在本发明诊断方法的第二步骤中,将要进行诊断的受试者样本的PD-ECGF表达水平与参考值进行对比。

[0089] 在使用本发明方法诊断受试者的癌症时,参考值是一名健康受试者的一个样本中测定的PD-ECGF表达水平,即未被诊断为患有癌症的受试者,或者是确诊患有癌症受试者的非肿瘤组织样本,优选参考值来自一名健康受试者或未被诊断患有癌症的受试者样本中测定的PD-ECGF表达水平。

[0090] 一旦参考值确定后，可以将样本中PD-ECGF表达水平与所述参考值进行比较，从而确认这是一种“增长”或“降低”的表达水平。例如，当与参考值比较时，发现表达水平的上升程度高于参考值至少1.1倍、1.5倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多的情况下，则被认为是“增长”的表达水平。另一方面，当与参考值比较时，发现表达水平的下降到参考值的至少0.9倍、0.75倍、0.2倍、0.1倍、0.05倍、0.025倍、0.02倍、0.01倍、0.005倍或更少的情况下，则被认为是“降低”的表达水平。

[0091] 因此，如果发现待确定诊断的受试者，其样本PD-ECGF表达水平与参考值比较，表达水平上升，则该受试者被诊断为患有癌症。可选择地，如果发现待确定诊断的受试者，其样本PD-ECGF表达水平与参考值比较，表达水平降低，则该受试者不能诊断为患有癌症。

[0092] 根据本发明预测抗血管生成疗法应答的方法

[0093] 本发明的研究者发现癌症患者中所测定的PD-ECGF水平与患者接受抗血管生成疗法后出现早期病情进展的风险具有统计学上显著的相关性。因此，进一步来讲，本发明涉及一种遭受癌症折磨并接受抗肿瘤治疗受试者的疗法应答预测方法，所述方法包含

[0094] (i)了所述受试者样本中PD-ECGF水平的确定，

[0095] (ii)以及将所获得的水平与(i)参考值进行比较，

[0096] 其中

[0097] -与参考值比较，如果受试者样本的PD-ECGF水平是增长的，这显示癌症患者对于疗法的应答不好；

[0098] -与参考值比较，如果受试者样本的PD-ECGF水平是降低的，这显示癌症患者对于疗法的应答优良。

[0099] 在一项具体实施例中，本发明涉及一种对接受抗血管生成疗法的癌症患者进行应答预测的方法，该方法包含

[0100] (i)了所述受试者样本中PD-ECGF水平的确定，

[0101] (ii)以及将所获得的水平与(i)参考值进行比较，

[0102] 其中

[0103] -与参考值比较，如果受试者样本的PD-ECGF水平是增长的，这显示癌症患者对于抗血管生成疗法的应答不好；-

[0104] -与参考值比较，如果受试者样本的PD-ECGF水平是降低的，这显示癌症患者对于抗血管生成疗法的应答优良。-

[0105] 在一项更具体的实施例中，本发明涉及一种对接受抗血管生成疗法的癌症患者进行应答预测的方法，其中所述抗血管生成疗法为非多柔比星或干扰素疗法，该方法包含

[0106] (i)了所述受试者样本中PD-ECGF水平的确定，

[0107] (ii)以及将所获得的水平与(i)参考值进行比较，

[0108] 其中

[0109] -与参考值比较，如果受试者样本的PD-ECGF水平是增长的，这显示癌症患者对于抗血管生成疗法的应答不好；-

[0110] -与参考值比较，如果受试者样本的PD-ECGF水平是降低的，这显示癌症患者对于抗血管生成疗法的应答优良。-

[0111] 在使用本发明方法预测对于接受抗血管生成疗法患者的应答进行预测的第一步，

对于疗法应答预测的癌症受试者，测定其样本中PD-ECGF的表达水平。

[0112] 需要测定PD-ECGF表达水平的样本可以是任何含有肿瘤细胞的样本。在一项具体实施例中，含有潜在肿瘤细胞的样本是一种生物体液样本。在一项具体实施例中，含有肿瘤细胞的样本是一种肿瘤组织或其部分。在一项更为具体的实施例中，所述肿瘤组织样本是来自患者的肾肿瘤组织样本，该患者接受了肾癌的抗血管生成的疗法，将对其应答进行预测，或来自接受抗血管生成治疗的应答预测的乳腺癌患者的乳腺肿瘤组织样本或来自患者的结肠直肠肿瘤组织样本，其中对该患者的结肠直肠癌的抗血管生成疗法的应答进行预测。可以通过常规方法获得所述样本，例如活检，手术切除或抽吸，通过使用相关医学领域的普通技术人员已知的，以及在本发明的诊断方法部分所描述的各种方法。在一项实施例中，含有肿瘤细胞的样本为原发瘤样本。在另一项实施例中，肿瘤为转移瘤，并且要测定PD-ECGF水平的样本为转移性样本。

[0113] 在另一项实施例中，要测定PD-ECGF水平的样本为患有癌症的患者生物体液，需要对该患者的疗法应答进行预测。在一项优选实施例中，所述生物体液选自血液，尤其是外周血、血浆或血清。获得血液、血清和血浆样本的方法是本领域技术人员已知的，并且已经在本发明的诊断方法部分进行了描述。

[0114] 在一项具体实施例中，本发明预测抗血管生成疗法应答的方法，其中要测定PD-ECGF表达水平的样本为血浆样本或组织样本。在一项具体实施例中，当进行乳腺癌抗血管生成疗法应答预测时，可以对血浆样本或乳腺肿瘤组织样本的PD-ECGF表达水平进行测定。在一项具体实施例中，当进行肾细胞癌(RCC)抗血管生成疗法应答预测时，可以对血浆样本或肾肿瘤组织样本的PD-ECGF表达水平进行测定。在另一项具体的可选实施例中，当进行结肠直肠癌(RCC)抗血管生成疗法应答预测时，可以对血浆样本或结肠直肠肿瘤组织样本的PD-ECGF表达水平进行测定。

[0115] 如前文所述，基因表达水平可以通过测量所述基因的信使RNA水平或测量所述基因编码的蛋白水平，即PD-ECGF蛋白或其变体的水平。PD-ECGF蛋白变体已在前文进行了描述，并被这一部分所包含。

[0116] 基于mRNA水平和蛋白水平的表达水平测定方法，尤其是PD-ECGF mRNA水平和PD-ECGF蛋白水平已在之前的诊断方法部分进行了描述，并被这一部分所包含。

[0117] 在一项具体实施例中，本发明预测抗血管生成疗法应答的方法中测定PD-ECGF表达水平为测定PD-ECGF蛋白水平。在一项更具体的实施例中，PD-ECGF蛋白水平通过ELISA、Western印记或免疫组织化学方法进行测定。

[0118] 在一项具体实施例中，使用本发明所述方法进行疗法应答预测的癌症受试者正在接受抗血管生成疗法，其中所述抗血管生成疗法是基于至少一种抗血管生成剂的疗法。

[0119] 本发明所述的抗血管生成剂和疗法包括但不限于抗VEGF剂，包括单克隆抗体，例如贝伐单抗(Avastin，一种重组人源化单克隆IgG1抗体，其在体外和体外检测系统中可以结合并抑制人类VEGFA的生物学活性)，抗体衍生物如兰尼珠单抗(Lucentis)或抗体片段如Fab IMC 1121或F200Fab或口服可用的小分子，这些小分子可以抑制由VEGF激活的酪氨酸激酶，如拉帕替尼(Tykerb)，舒尼替尼(Sutent)，索拉非尼(Nexavar)，阿替尼替和帕唑帕尼；抗成纤维细胞生长因子(抗FGF)试剂，如苏拉明及其衍生物，戊聚糖多硫酸酯，西替立尼，匹多巴尼或BIBF 1120)；抗EGF药物，如西妥昔单抗，吉非替尼或厄洛替尼和抗HGF药物，

如ARQ197、JNJ-38877605、PF-04217903、SGX523、NK4或AMG102;抗血管生成多肽,如血管抑素、内皮抑素、抗血管生成抗凝血酶III或sFRP-4。

[0120] 其他抗血管生成剂包括马里伐他汀;AG3340;COL-3、BMS-275291、沙利度胺、内皮抑素、SU5416、SU6668、EMD121974、2-甲氧基雌二醇、羧基氨基三唑、CMIOI(GBS毒素)、戊聚糖多硫酸盐、血管生成素2(Regeneron)、除莠霉素A、PNU145156E、16K催乳素片段、Linomide、沙利度胺、己酮可可碱、染料木素、TNP470、内皮抑素、紫杉醇、accutin、血管抑素、西多福韦、长春新碱、博来霉素、AGM-1470、血小板因子4或米诺环素。

[0121] 其他抗血管生成剂包括抗血管生成多肽,这种多肽具有抑制血管生成的能力,包括但不限于,如WO2007115376所述的血管抑素、内皮抑制素、抗血管生成抗凝血酶III、sFRP-4、抗VEGF抗体例如阿维珠单抗、贝伐单抗(avastin)、Fab IMC 1121和F200Fab。

[0122] 其他抗血管生成剂包括pegaptanib、舒尼替尼、帕唑帕尼、索拉非尼、瓦他拉尼和阿柏西普(VEGF-Trap)。

[0123] 其他抗血管生成剂包括VEGFR2阻断抗体,例如Ramucirumab(IMC-1121B)和DC101(也称为抗Flk-1mAb)。

[0124] 在一项具体实施例中,抗血管生成剂选自舒尼替尼,贝伐珠单抗和DC101的组合物。

[0125] 在一项实施例中,抗血管生成疗法不是含有蒽环类抗生素的疗法。在另一项实施例中,抗血管生成疗法不是含有多柔比星的疗法。在另一项实施例中,抗血管生成疗法不是含有干扰素的疗法。在另一项实施例中,抗血管生成疗法不是含有I型干扰素和/或II型的疗法。在另一项实施例中,抗血管生成疗法不是包含IFN-α、IFN-β、IFN-ε、IFN-κ和IFN-ω的疗法。在另一项实施例中,抗血管生成疗法不是含有IFN-γ的疗法。在另一项实施例中,抗血管生成疗法是佐剂疗法,即在手术切除肿瘤之后。在一项实施例中,抗血管生成疗法不是含有干扰素的佐剂治疗。在另一项实施例中,抗血管生成疗法不是含有I型干扰素和/或II型的佐剂疗法。在另一项实施例中,抗血管生成疗法不是包含IFN-α、IFN-β、IFN-ε、IFN-κ和IFN-ω的佐剂疗法。在另一项实施例中,抗血管生成疗法不是含有IFN-γ的佐剂疗法。

[0126] 测定特定试剂的抗血管生成活性的检测方法已在WO2003086299中描述,但不限于此。

[0127] 在本发明所述的应答预测方法的第二步中,在对癌症受试者的抗血管生成疗法应答进行测定时,将癌症受试者的样本的PD-ECGF表达水平与参考值进行比较。

[0128] 在根据本发明所述方法对于接受抗血管生成疗法的癌症患者进行应答预测时,合适的参考值可以来自患有癌症或曾患过癌症的受试者样本的PD-ECGF表达水平,所述受试者对于抗血管生成疗法具有良好的应答,所述此时测定的表达水平为正在接受治疗的病人。在另一个实施例中,参考值是健康患者中的PD-ECGF水平,即尚未被诊断患有癌症类型的患者,但需要对其疗法应答进行预测。

[0129] 一旦参考值确定后,可以将样本中PD-ECGF表达水平与所述参考值进行比较,从而确认这是一种“增长”或“降低”的表达水平。例如,当与参考值比较时,发现表达水平的上升程度高于参考值至少1.1倍、1.5倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多的情况下,则被认为是“增长”的表达水平。另一方面,当与参考值比较时,发现表达水平的下降到参考值的至少0.9倍、0.75倍、0.2倍、0.1倍、0.05倍、0.025倍、0.02

倍、0.01倍、0.005倍或更少的情况下，则被认为是“降低”的表达水平。

[0130] 因此，与参考值比较，如果在进行疗法应答预测的确定过程中，癌症受试者样品中的PD-ECGF的表达水平是增长的，这显示癌症患者对于疗法的应答不好。可选择是，与参考值比较，如果在进行疗法应答预测的确定过程中，癌症受试者样品中的PD-ECGF的表达水平是降低的，这显示癌症患者对于疗法的应答优良。

[0131] 本发明的应用

[0132] 另一方面，本发明涉及一种PD-ECGF在受试者的癌症诊断和/或预测癌症患者对抗血管生成疗法的应答中的应用。更具体地说，本发明涉及一种PD-ECGF在受试者的癌症诊断和/或预测癌症患者对抗血管生成疗法的应答中的用途，其中所述抗血管生成疗法为非多柔比星或非干扰素疗法。

[0133] 术语“癌症的诊断”和“癌症患者对抗血管生成治疗的应答的预测”已经在上文中进行了界定，并且同样适用于本发明所述的用途。在优选的实施例中，癌症选自由肾细胞癌(RCC)，乳腺癌和结肠直肠癌组成的类群。在优选的实施例中，本发明所述用途包括PD-ECGF多肽的应用。在一个实施例中，可以使用PD-ECGF多肽，和某种试剂，该试剂可以特异结合与PD-ECGF，例如抗体或适配体，从而确定PD-ECGF水平。-在优选的实施例中，本发明所述的用途包括编码PD-ECGF多肽的多核苷酸的应用。在一个实施例中，编码PD-ECGF多肽的多核苷酸通过使用能够特异性结合编码PD-ECGF的多核苷酸(例如特异性引物组或探针)的试剂来测定PD-ECGF水平。

[0134] ***

[0135] 以下实施例对本发明的说明本质上仅仅是说明性的并且决不是意在限制本发明的范围。

实施例

[0136] 实施例1确认组织PD-ECGF水平成为癌症患者检测、诊断和检测的癌症标志物。通过免疫组化法测定非癌或肿瘤组织样本中PD-ECGF才蛋白水平。

[0137] 通过免疫检测分析患者肿瘤中的PD-ECGF表达。使用小鼠单克隆抗胸腺嘧啶磷酸化酶[P-GF,44C]抗体(Abcam,ab 3151)。

[0138] 结果如下：

[0139] -在12例非癌组织中，未检测到PD-ECGF；因此，非癌组织的PD-ECGF水平与癌症患者的肿瘤中的PD-ECGF水平之间存在显着性差异(Mann-Whitney检验，$p<0.0001$)(图1)。

[0140] -通过免疫组织化学研究发现，69例RCC患者中的67例(>97％)组织样本和16例乳腺癌患者组织样本中的9例(56％)均观察到了PD-ECGF的蛋白表达。

[0141] -PD-ECGF分布与不同的位置(膜，细胞质和核)，从而根据位置不同，表达程度也不同，而且

[0142] -根据每种肿瘤固有性质的不同，PD-ECGF的表达水平也不同。

[0143] 在分析PD-ECGF基础(预处理)表达水平时，观察到肿瘤显示不同的基础表达水平(图2和3)，这可能取决于每个肿瘤的固有性质。

[0144] 实施例2确定血浆PD-ECGF水平为癌症患者检测、诊断和检测的癌症标志物。通过ELISA方法测定血浆样本中PD-ECGF的蛋白水平。

[0145] 通过ELISA方法分析健康受试者和癌症患者血浆中的PD-ECGF表达。使用一种人源胸苷磷酸化酶,TP ELISA试剂盒[CSB-E10814h]。

[0146] 结果如下:

[0147] -相较于癌症患者,无法测出健康受试者血浆中的PD-ECGF水平。从表达量上看,健康受试者和癌症患者的血浆PD-ECGF水平之间存在统计学显着性差异(Mann-Whitney检验,p=0.0013)(图5)。

[0148] -通过ELISA分析发现,16例RCC患者血浆样本中的14例(>87%)、16例乳腺癌患者血浆样本中11例(69%)和58例结肠直肠癌患者的血浆样品中的52例(90%)中均观察到PD-ECGF的蛋白表达。

[0149] -病人特征不同,PD-ECGF的表达水平也不同。

[0150] -在分析PD-ECGF基础表达水平时,观察到不同患者显示出不同的基础表达水平(图6、7和8),这可能取决于每个患者的内在特征。

[0151] 实施例3使用免疫组织化学和ELISA方法确定PD-ECGF为抗血管生成疗法的应答预测因子。

[0152] 通过免疫检测分析患者肿瘤中的PD-ECGF表达。使用小鼠单克隆抗胸腺嘧啶磷酸化酶[P-GF,44C]抗体(Abcam,ab 3151)。

[0153] 结果如下:

[0154] -对63例患者的RCC组织样本中PD-ECGF水平进行评估;较高组织PD-ECGF水平和RCC患者出现较高早期进展风险之间存在显著关联(Kaplan-Meier和Gehan-Breslow-Wilcoxon检验,p=0.045)(图4)。

[0155] 另一方面,通过ELISA方法分析患者血浆中PD-ECGF表达。使用一种人源胸腺嘧啶磷酸化酶,TP ELISA试剂盒[CSB-E10814h]。

[0156] 结果如下:

[0157] -对52例患者的结肠直肠癌血浆样本中的PD-ECGF水平进行评估;血浆中PD-ECGF水平与早期进展的风险之间存在显著的关联,表现为结肠直肠癌患者疾病进展中PD-ECGF水平的显著风险比(使用风险比的后验概率来评估数据,后验风险比高于1的后验概率等于0.041,表明肿瘤进展与PD-ECGF水平之间的关联度)(图9)。

[0158] -对14例患者的RCC血浆样品中的PD-ECGF水平进行评估;较高血浆PD-ECGF水平和RCC患者出现较高早期进展风险之间存在显著关联(Kaplan-Meier和Log rank(Mantel-Cox)检验,p<0,07)。(图10)。

[0159] 因此,PD-ECGF表达在预测接受治疗的患者,其癌症进展中具有潜在价值。这些结果支持应用PD-ECGF,一种具有预测价值的新型生物标志物来预测RCC、乳腺癌、结肠直肠癌和其他癌症疗法的应答。

[0160] 实施例4PD-ECGF表达水平和癌症预后

[0161] 为了分析PD-ECGF表达水平与癌症预后之间的关系,本发明人通过使用cBioPortal来查阅癌症基因组学(www.cbioportal.org),基于具有低或高表达PD-ECGF的癌症患者情况,生成了Kaplan-Meier生存期曲线。(图A-M)。

[0162] 遵循以下方法生成图11-23:在网站www.cbioportal.org的主页上选择“查询(Query)”,从“选择癌症研究Select Cancer Study”中选择“癌症患者(*)研究(studies in

cancer patients*)”。在“选择基因组谱(Select Genomic Profiles)”中,仅选择“mRNA表达z-分数(mRNA Expression z-Scores)(RNA Seq V2 RSEM)”。“输入基因集(Enter Gene set)”,输入“TYPE”,然后点击“提交(Submit)”。Oncoprint会给出改变的百分数(见表1和表2),点击“生存期(Survival)”tab,总体生存期Kaplan-Meier预测图就会显示出来。

[0163] 表1癌细胞系中PD-ECGF变化百分率

[0164]

癌细胞系研究	PD-ECGF（变化百分数）
癌细胞百科全书（Novartis/Broad，自然 2012）所有完整的肿瘤（877 例样本）	12
NCI-60 细胞系(NCI, Cancer Res.2012) 所有完整的肿瘤（60 例样本）	7

[0165] 表2癌症患者中PD-ECGF变化百分率

[0166]

癌症患者研究	PD-ECGF 变化百分数
结肠直肠腺瘤（TCGA，Provisional） 所有完整的肿瘤（7例样本）	14%
胶质母细胞瘤（TCGA，自然 2008）所有完整的肿瘤（91例样本）	2%
胶质母细胞瘤（TCGA，细胞 2013）所有完整的肿瘤（291例样本）	3%
胃腺瘤（TCGA，Provisional）所有完整的肿瘤（33 例样本）	3%
肾透明细胞癌（TCGA，Provisional） 所有完整的肿瘤（413 例样本）	4%
肾透明细胞癌（TCGA，自然 2013） 所有完整的肿瘤（392 例样本）	5%
肾乳头状细胞癌（TCGA，Provisional）	5%

[0167]

癌症患者研究	PD-ECGF 变化百分数
所有完整的肿瘤（161 例样本）	
肺腺癌（TCGA，Provisional）所有完整的肿瘤 （230 例样本）	6%
前列腺癌（瘤）（MSKCC，癌症细胞 2010） 所有完整的肿瘤（85 例样本）	2%
前列腺癌（瘤）（TCGA，Provisional）所有完整的肿瘤 （332 例样本）	4%
睾丸生殖细胞癌（TCGA，Provisional） 所有完整的肿瘤（149 例样本）	4%
胸腺瘤（TCGA，Provisional）所有肿瘤（124 例样本）	5%
甲状腺癌（TCGA，Provisional）所有完整的肿瘤 （397 例样本）	6%
乳头状甲状腺癌（TCGA，细胞 2014） 所有完整的肿瘤（388 例样本）	6%

[0168] 结果如下所示：

[0169] -PD-ECGF水平发生改变的结肠直肠癌病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在无疾病生存期方面表现更差(图11)，

[0170] -PD-ECGF水平发生改变的胶质母细胞瘤病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在总体生存期方面表现更差(图12)，

[0171] -PD-ECGF水平发生改变的肾透明细胞癌病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在总体生存期方面表现更差(图13)，

[0172] -PD-ECGF水平发生改变的肾透明细胞癌病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在无疾病生存期方面表现更差(图14)，

[0173] -PD-ECGF水平发生改变的肾透明细胞癌病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在总体生存期方面表现更差(图15)，

[0174] -PD-ECGF水平发生改变的肾乳头状细胞癌病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在无疾病生存期方面表现更差(图16)，

[0175] -PD-ECGF水平发生改变的肺腺瘤病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在总体生存期方面表现更差(图17)，

[0176] -PD-ECGF水平发生改变的肺腺瘤病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在无疾病生存期方面表现更差(图18)，

[0177] -PD-ECGF水平发生改变的前列腺癌病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在无疾病

生存期方面表现更差(图19)，

[0178] -PD-ECGF水平发生改变的前列腺癌病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在总体生存期方面表现更差(图20)，

[0179] -PD-ECGF水平发生改变的胸腺瘤病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在总体生存期方面表现更差(图21)，

[0180] -PD-ECGF水平发生改变的胸腺瘤病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在无疾病生存期方面表现更差(图22)，

[0181] -PD-ECGF水平发生改变的乳头状甲状腺癌病例要比未发生PD-ECGF改变的病例在总体生存期方面表现更差(图23)。

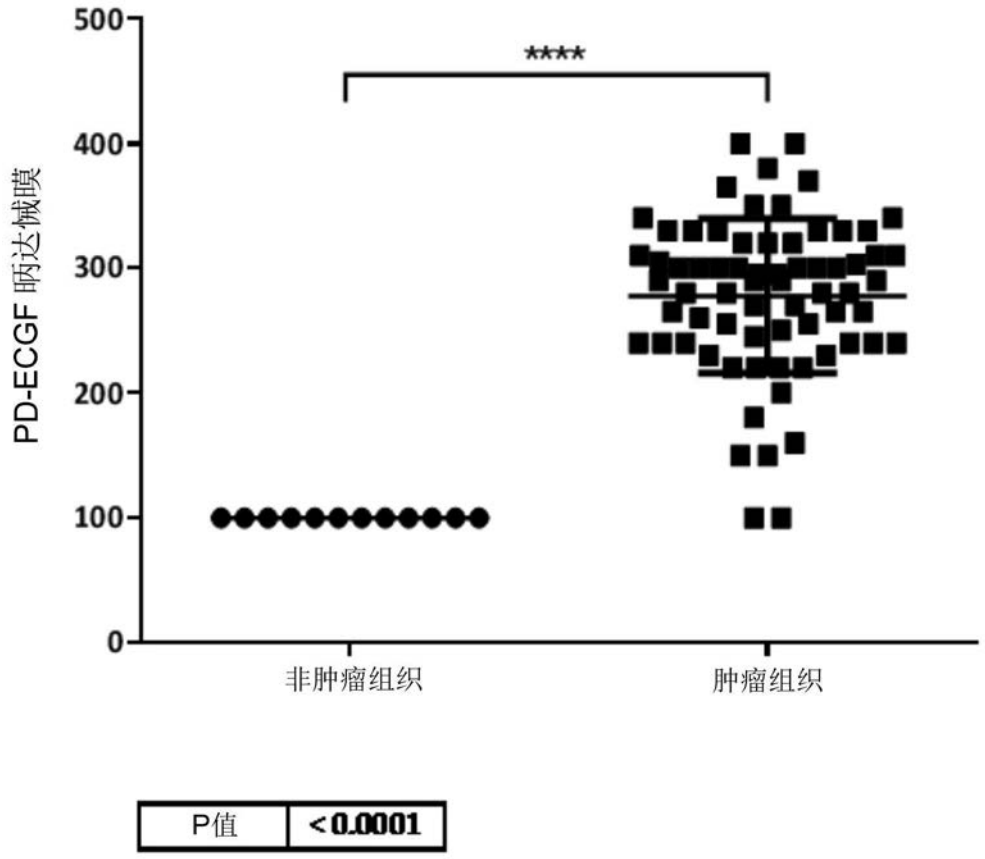


图1

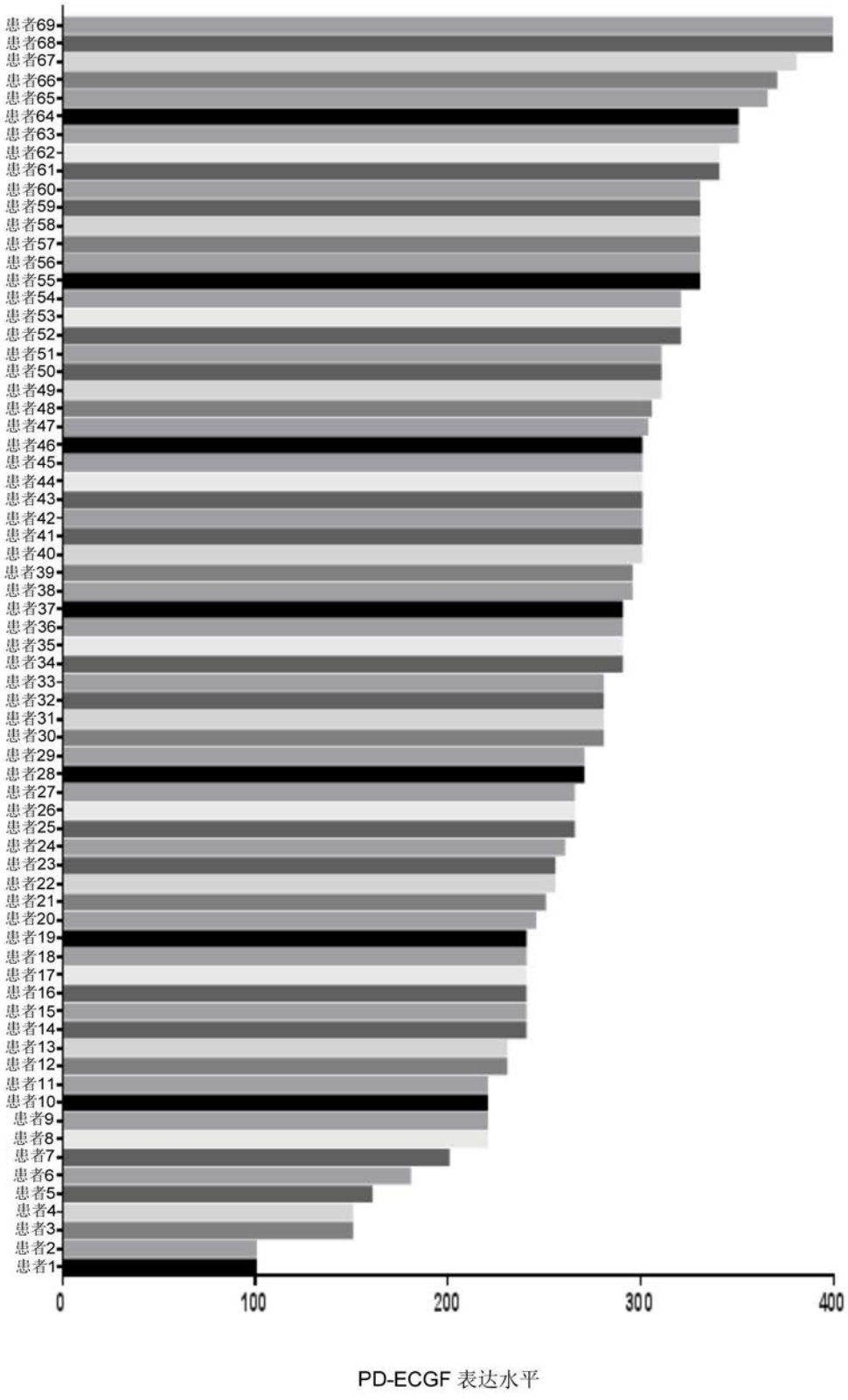

患者69
患者68
患者67
患者66
患者65
患者64
患者63
患者62
患者61
患者60
患者59
患者58
患者57
患者56
患者55
患者54
患者53
患者52
患者51
患者50
患者49
患者48
患者47
患者46
患者45
患者44
患者43
患者42
患者41
患者40
患者39
患者38
患者37
患者36
患者35
患者34
患者33
患者32
患者31
患者30
患者29
患者28
患者27
患者26
患者25
患者24
患者23
患者22
患者21
患者20
患者19
患者18
患者17
患者16
患者15
患者14
患者13
患者12
患者11
患者10
患者9
患者8
患者7
患者6
患者5
患者4
患者3
患者2
患者1
0
100
200
300
400
PD-ECGF 表达水平

图2

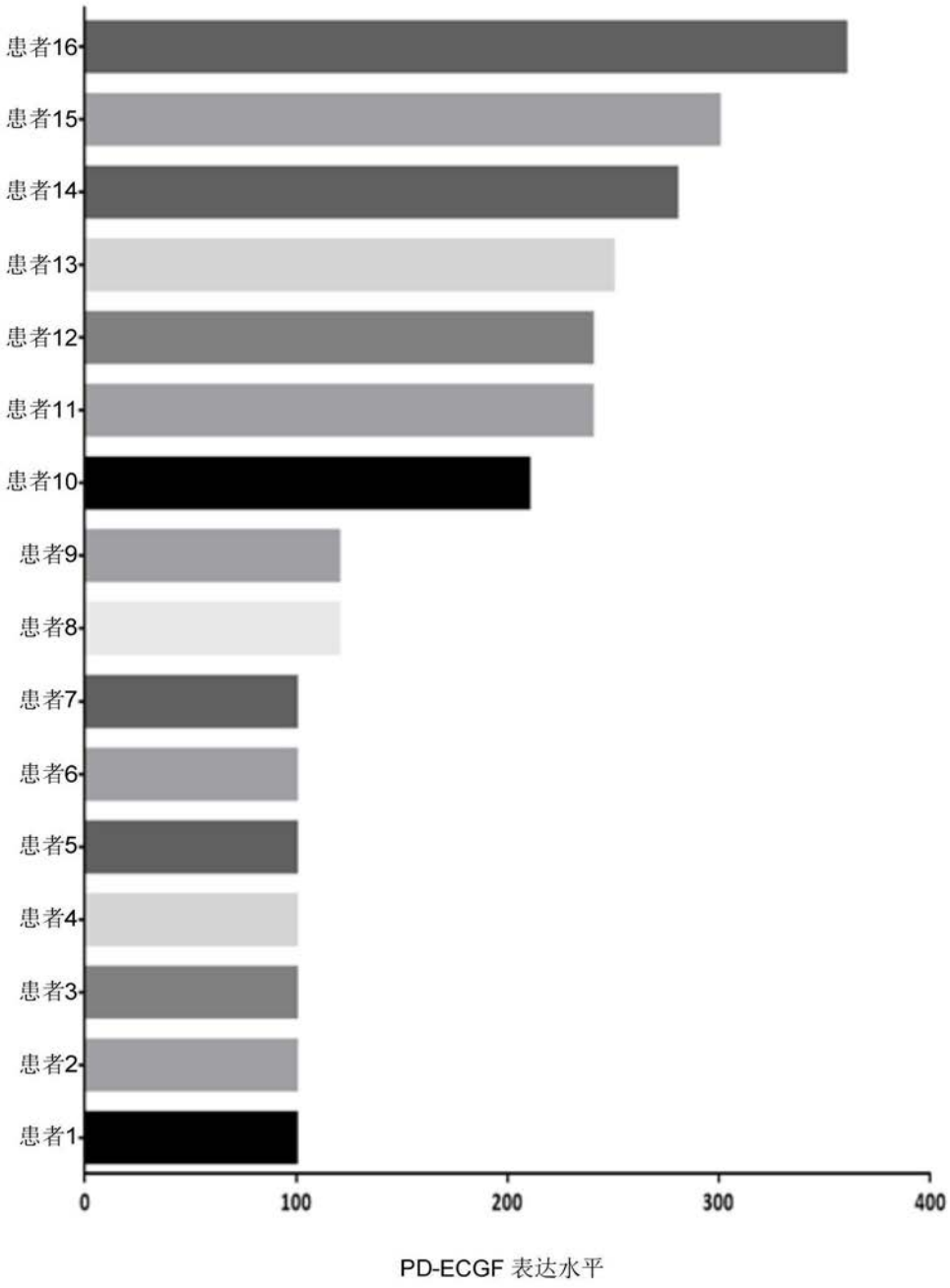

患者16
患者15
患者14
患者13
患者12
患者11
患者10
患者9
患者8
患者7
患者6
患者5
患者4
患者3
患者2
患者1
0
100
200
300
400
PD-ECGF 表达水平

图3

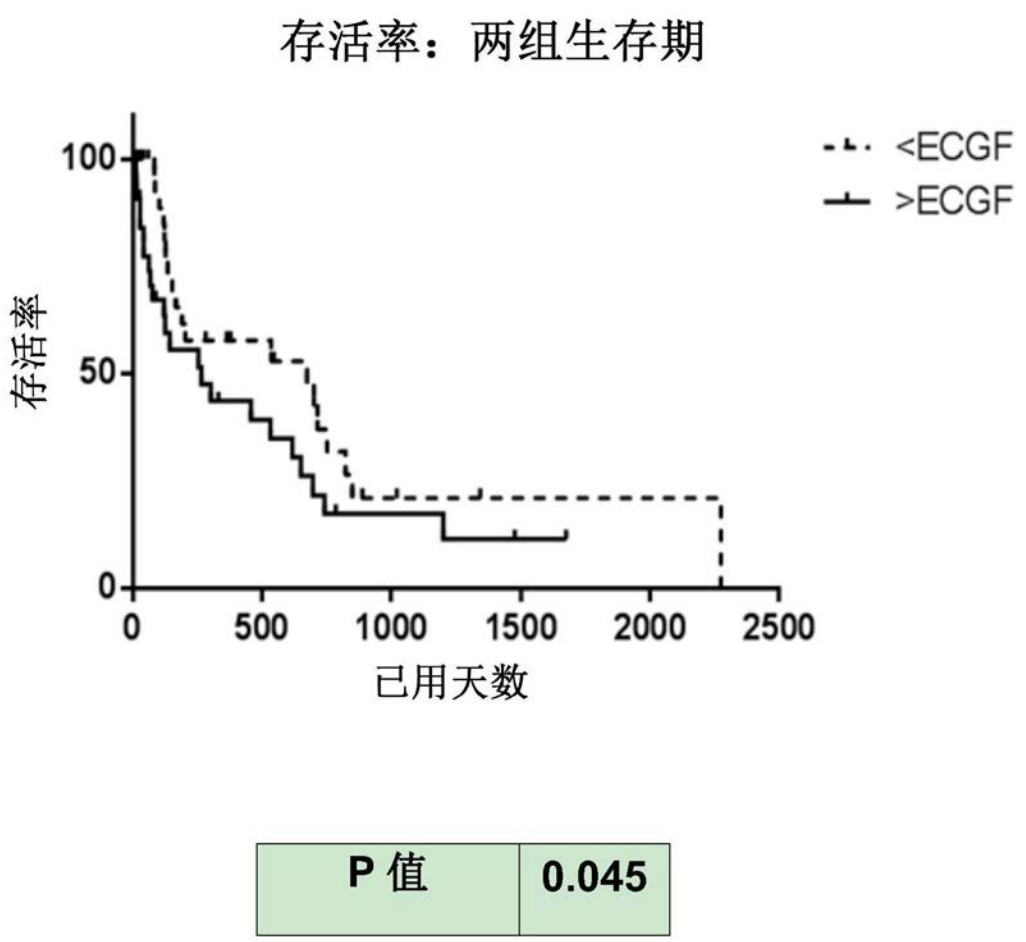

存活率：两组生存期
<ECGF
>ECGF
100
50
0
存活率
0
500
1000
1500
2000
2500
已用天数
P 值
0.045

图4

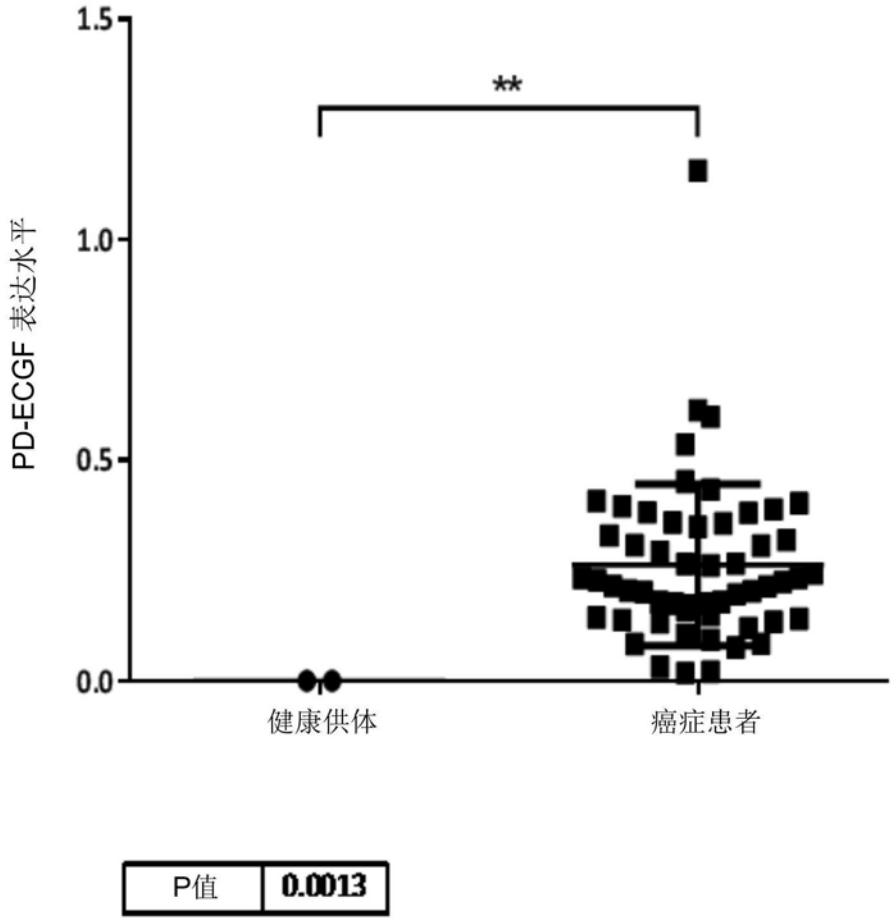


图5

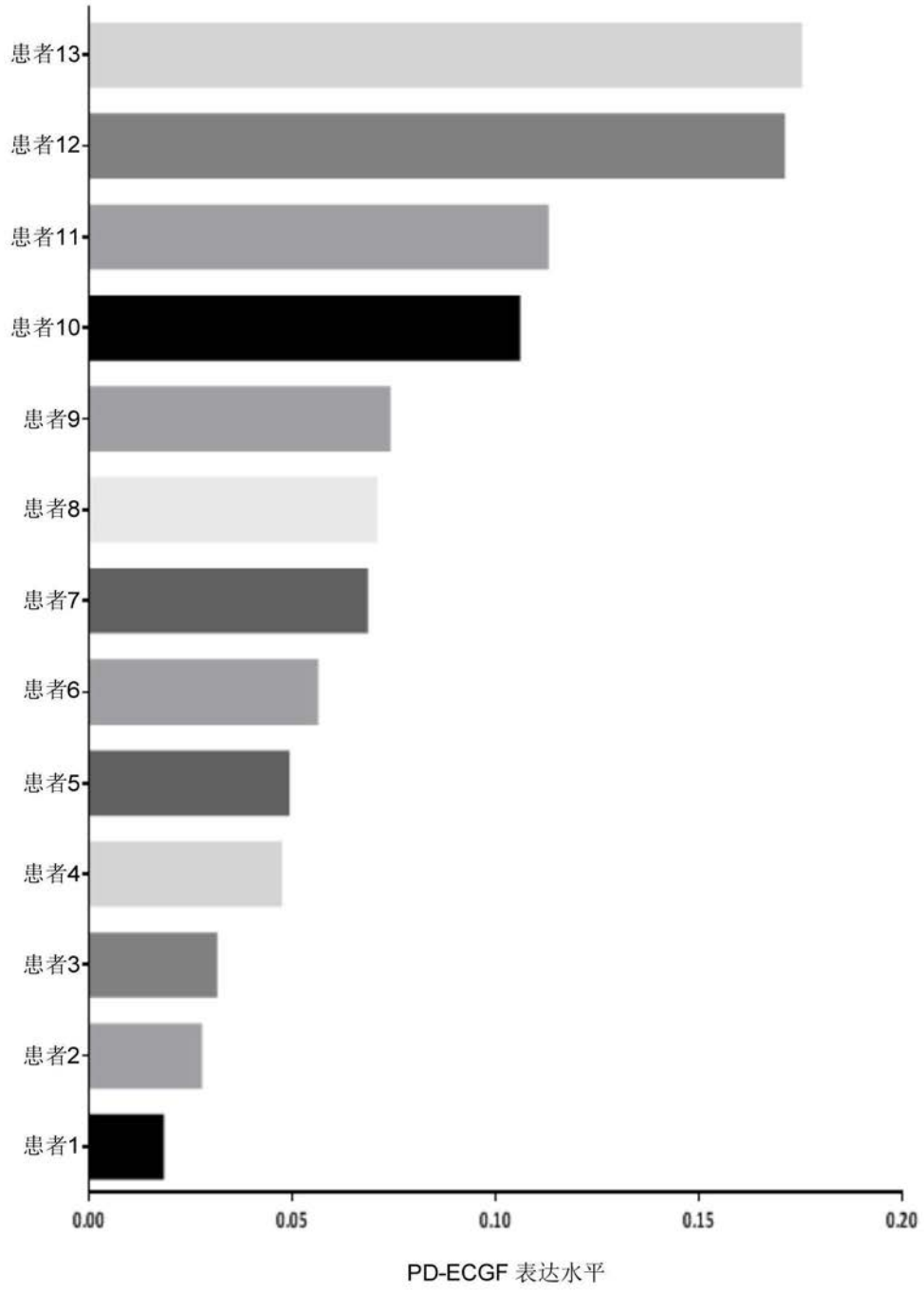

患者13
患者12
患者11
患者10
患者9
患者8
患者7
患者6
患者5
患者4
患者3
患者2
患者1
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
PD-ECGF 表达水平

图6

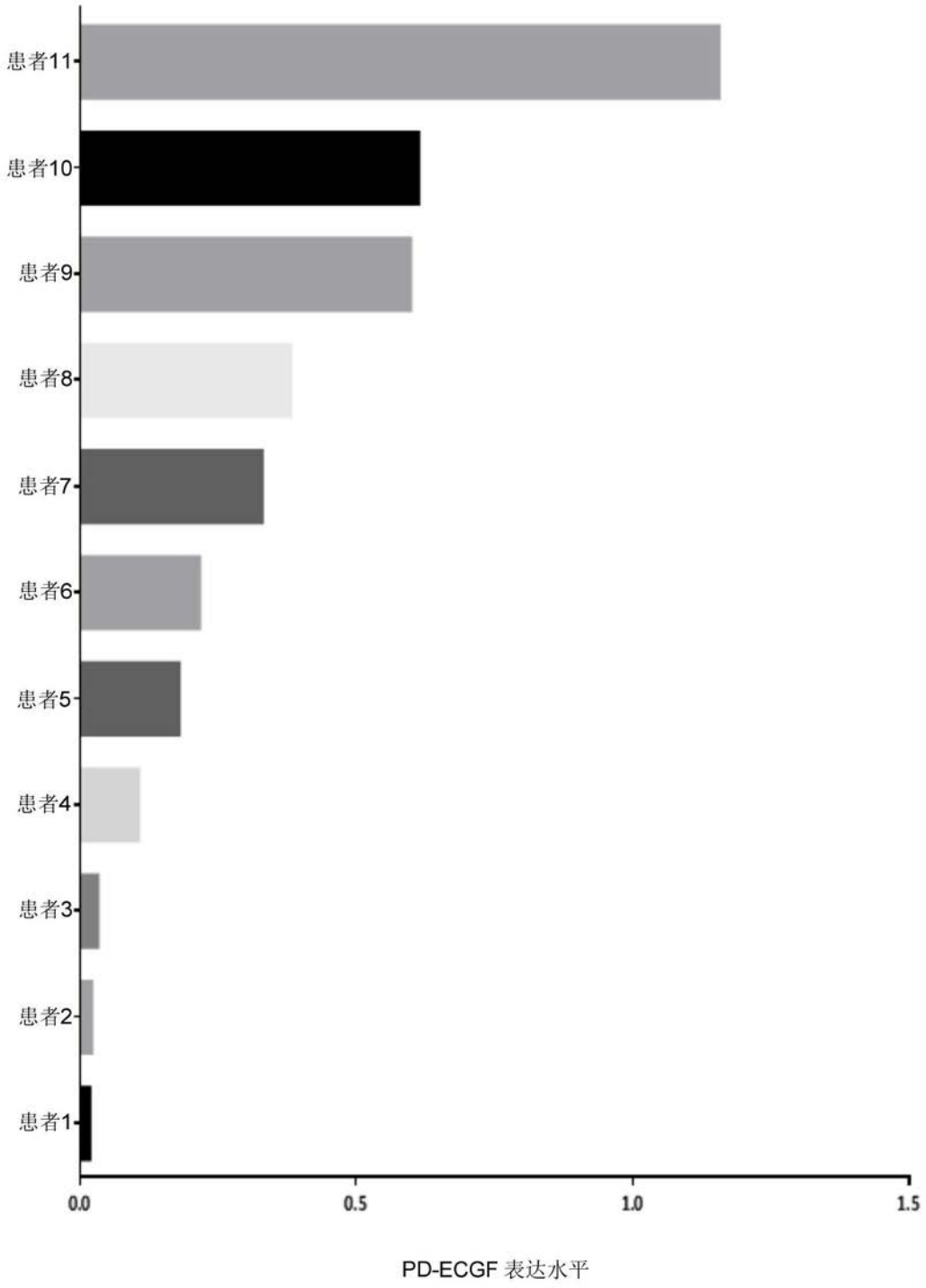

患者11
患者10
患者9
患者8
患者7
患者6
患者5
患者4
患者3
患者2
患者1
0.0
0.5
1.0
1.5
PD-ECGF 表达水平

图7

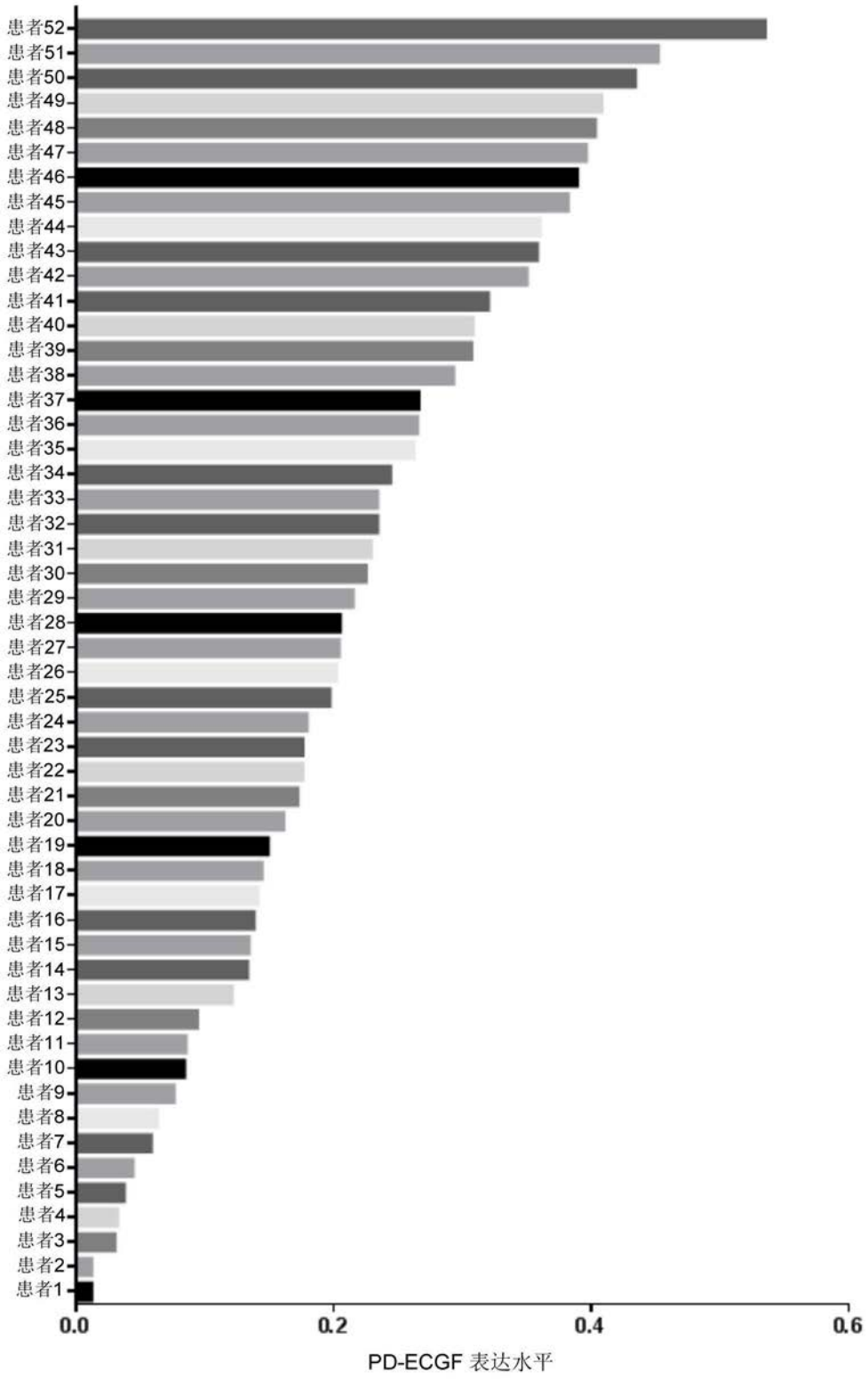

患者52
患者51
患者50
患者49
患者48
患者47
患者46
患者45
患者44
患者43
患者42
患者41
患者40
患者39
患者38
患者37
患者36
患者35
患者34
患者33
患者32
患者31
患者30
患者29
患者28
患者27
患者26
患者25
患者24
患者23
患者22
患者21
患者20
患者19
患者18
患者17
患者16
患者15
患者14
患者13
患者12
患者11
患者10
患者9
患者8
患者7
患者6
患者5
患者4
患者3
患者2
患者1
0.0
0.2
0.4
0.6
PD-ECGF 表达水平

图8

风险比

	平均值	标准差	2,50%	中值	97,50%	P(HR>1)
PD-ECGF	0.708	0.151	0.457	0.697	1.034	0.041

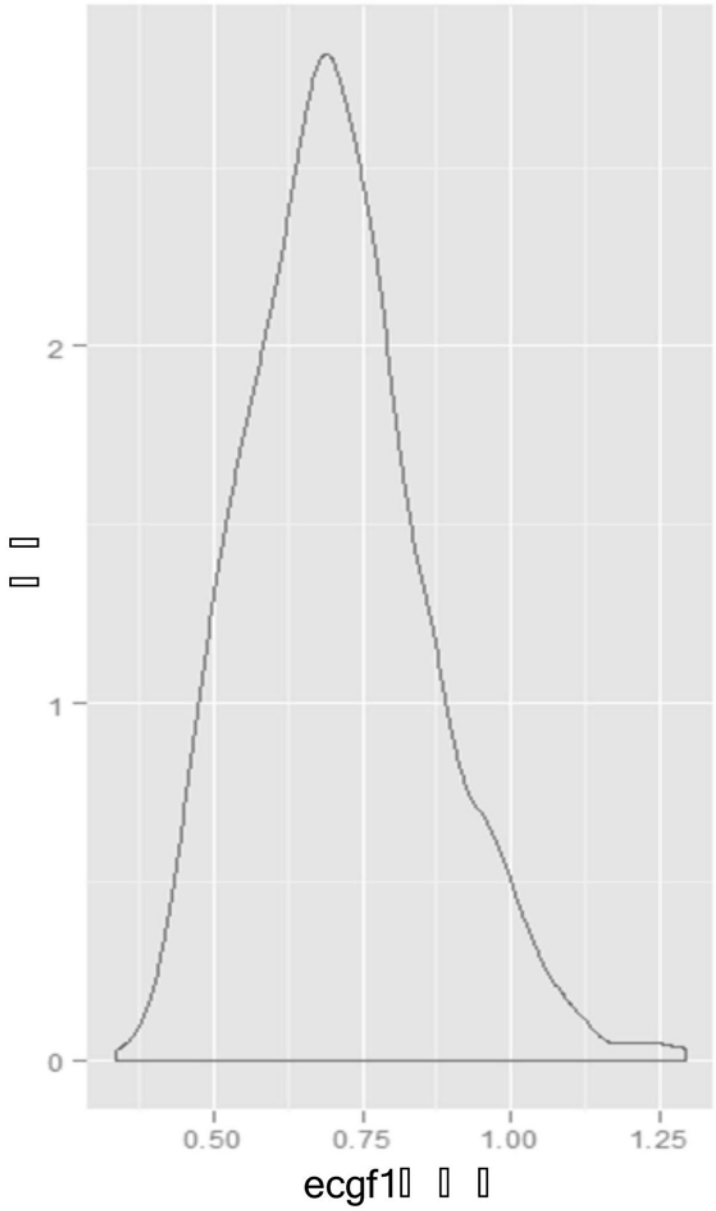


图9

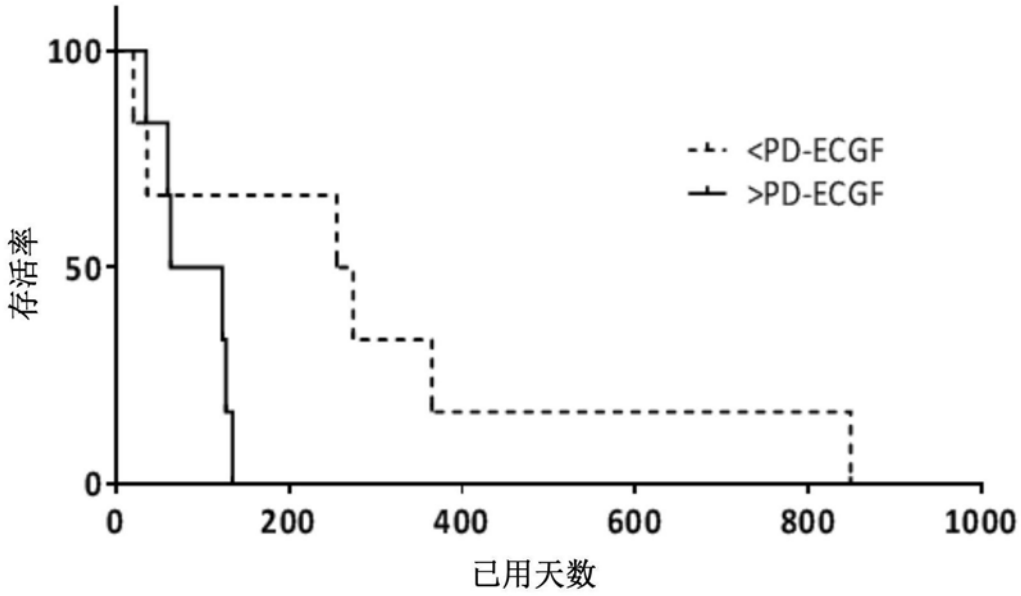
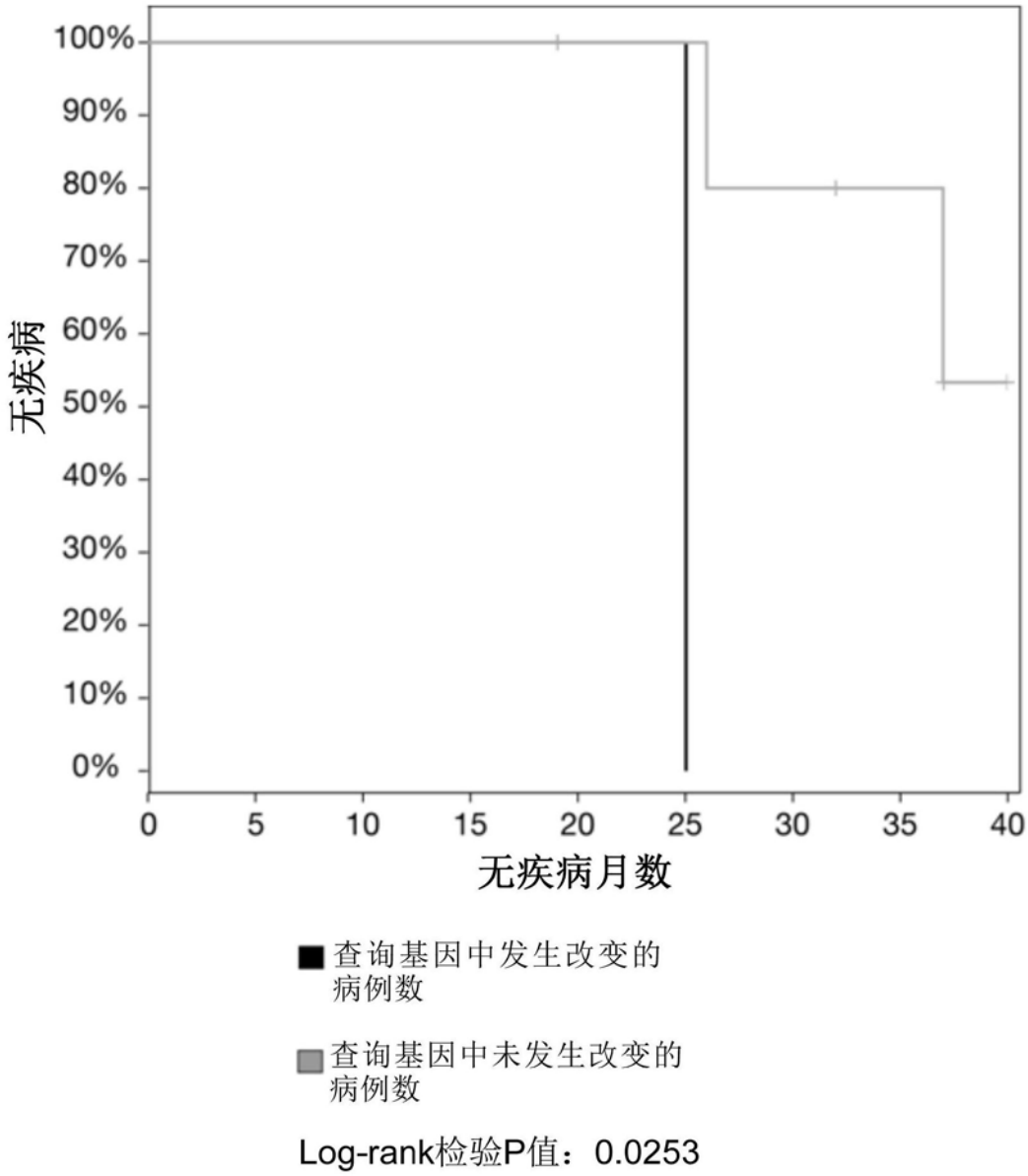
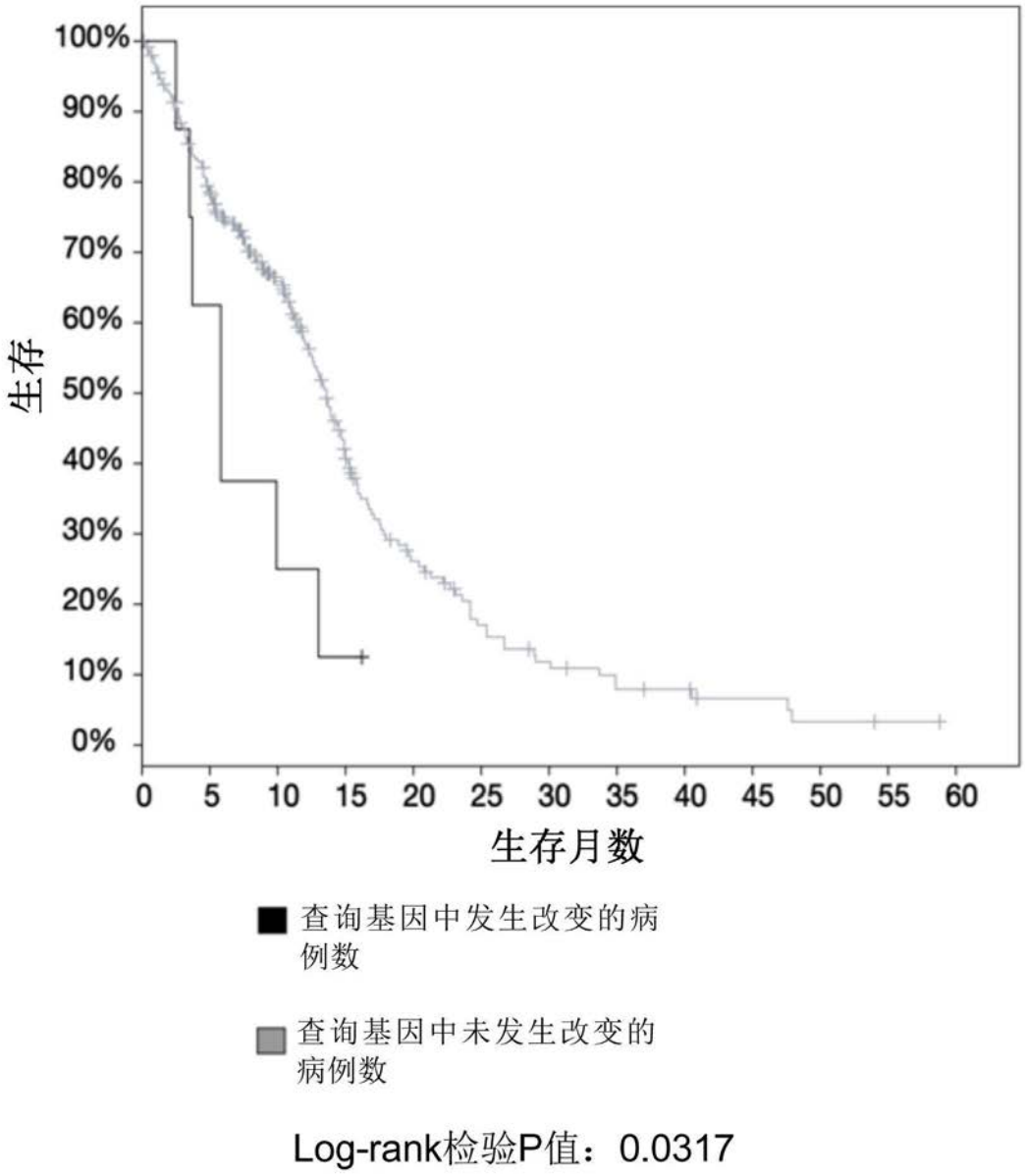


图10



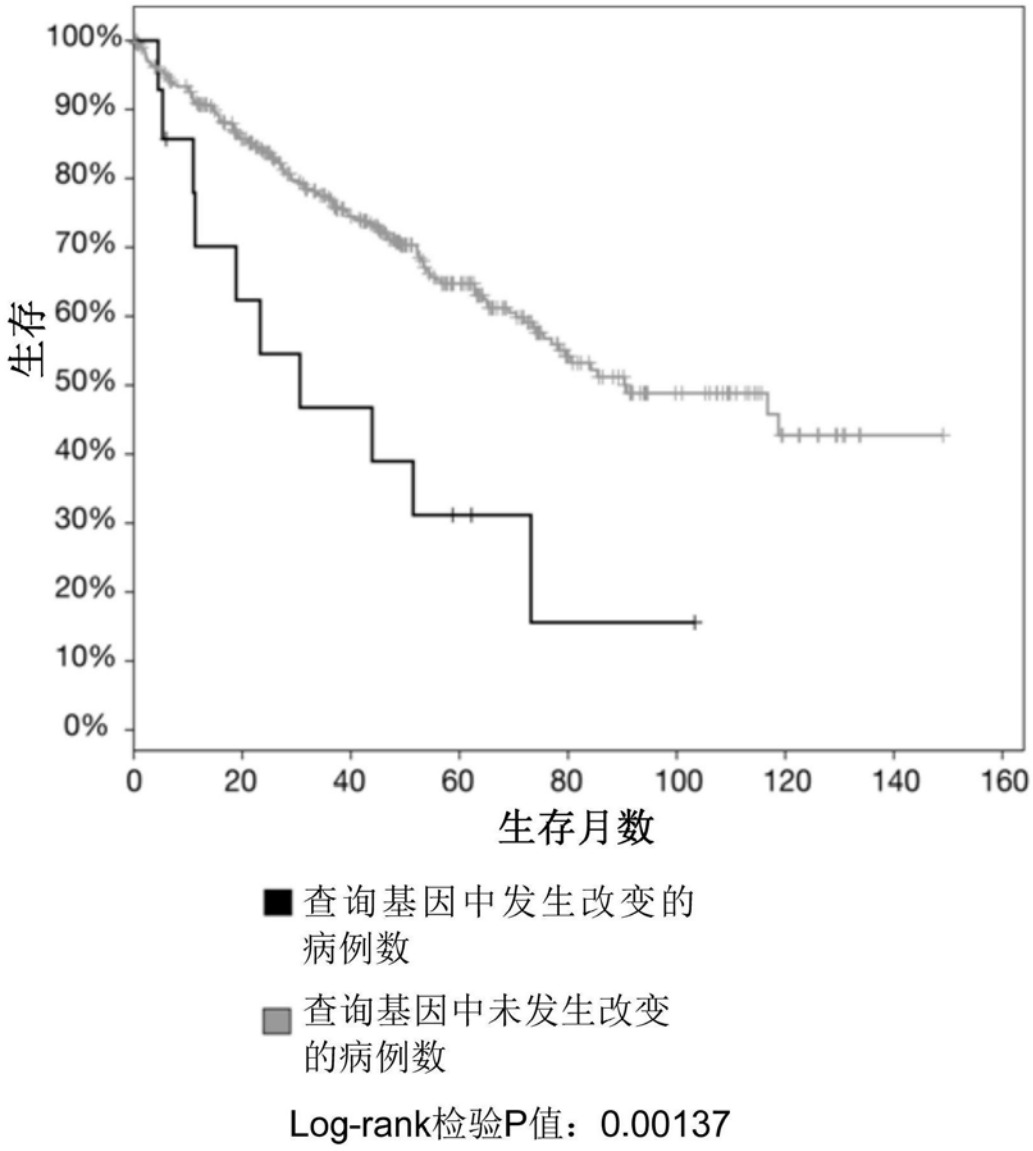
	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	1	1	25.03
查询基因中未发生改变的病例数	6	2	不适用

图11



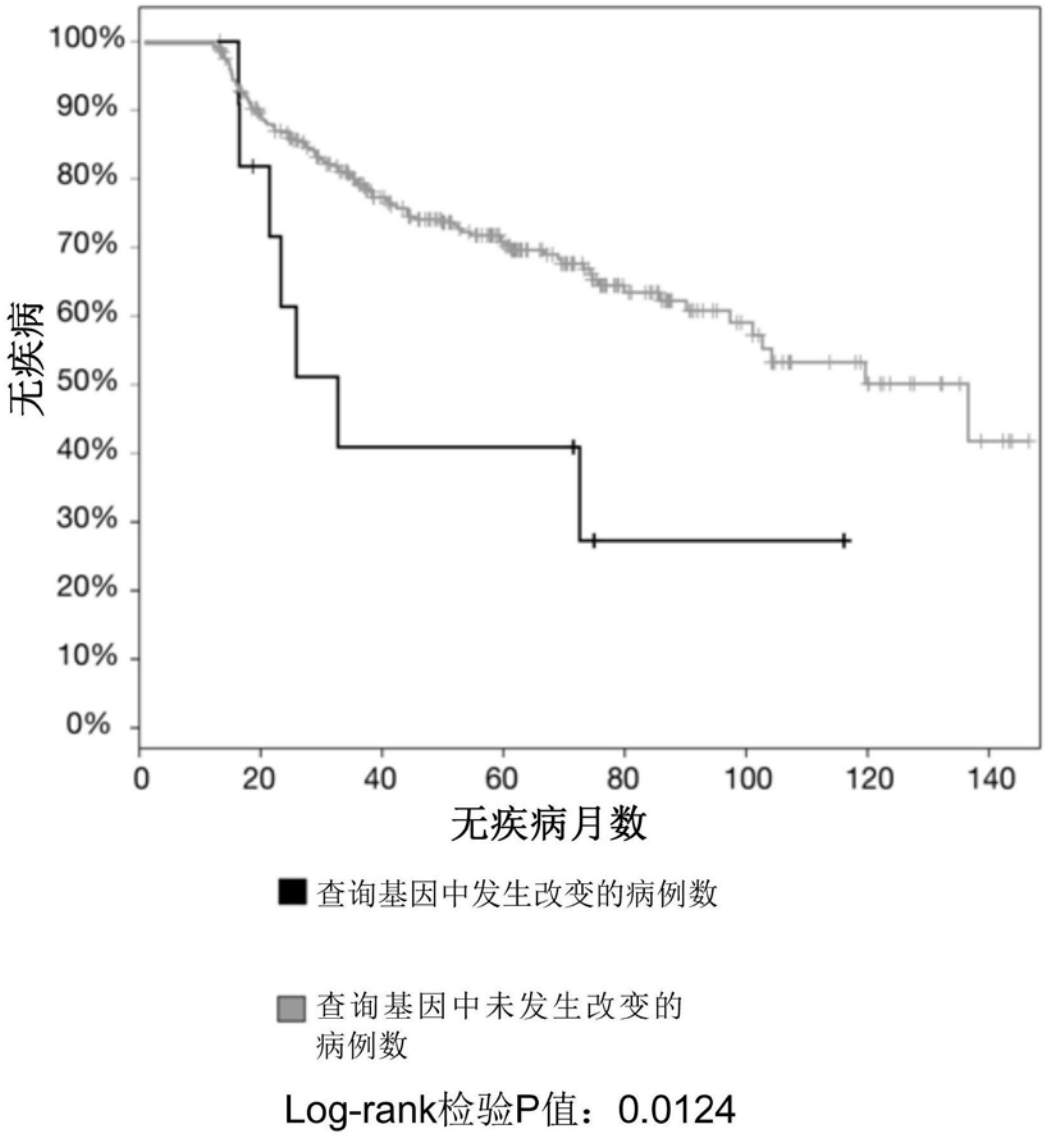
	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	8	7	5.8
查询基因中未发生改变的病例数	247	161	13.6

图12



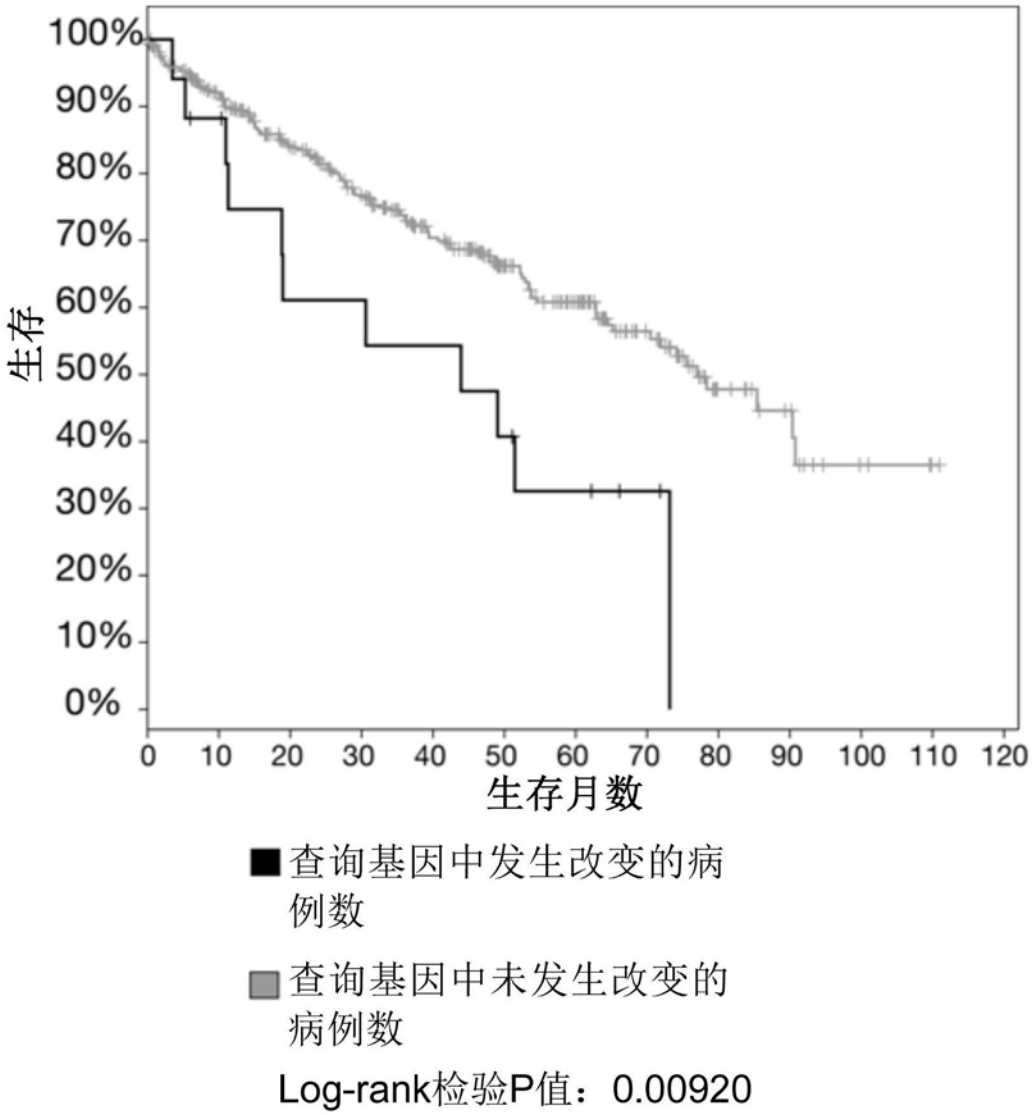
	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	15	10	30.62
查询基因中未发生改变的病例数	398	135	90.8

图13



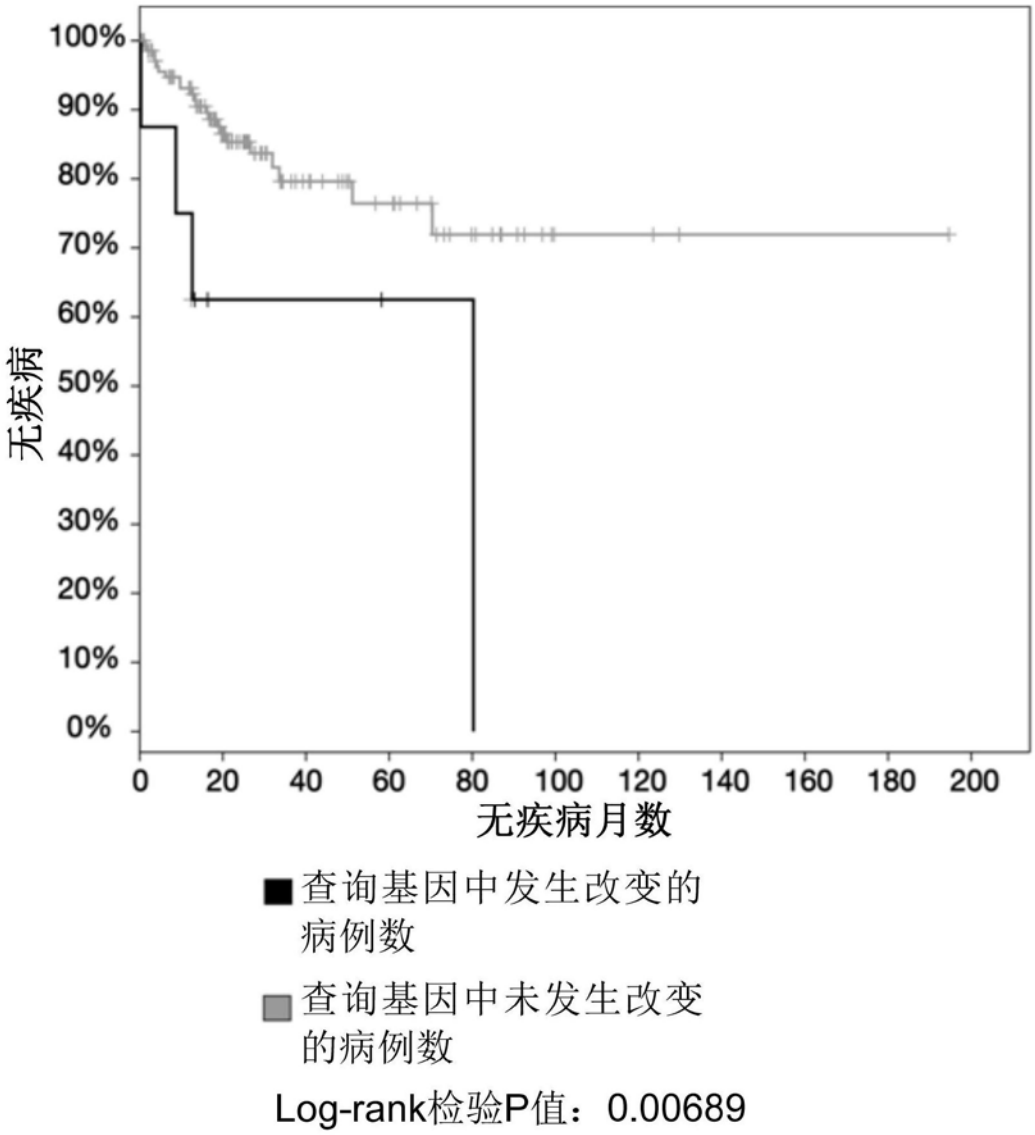
	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	12	7	19.97
查询基因中未发生改变的病例数	323	101	123.72

图14



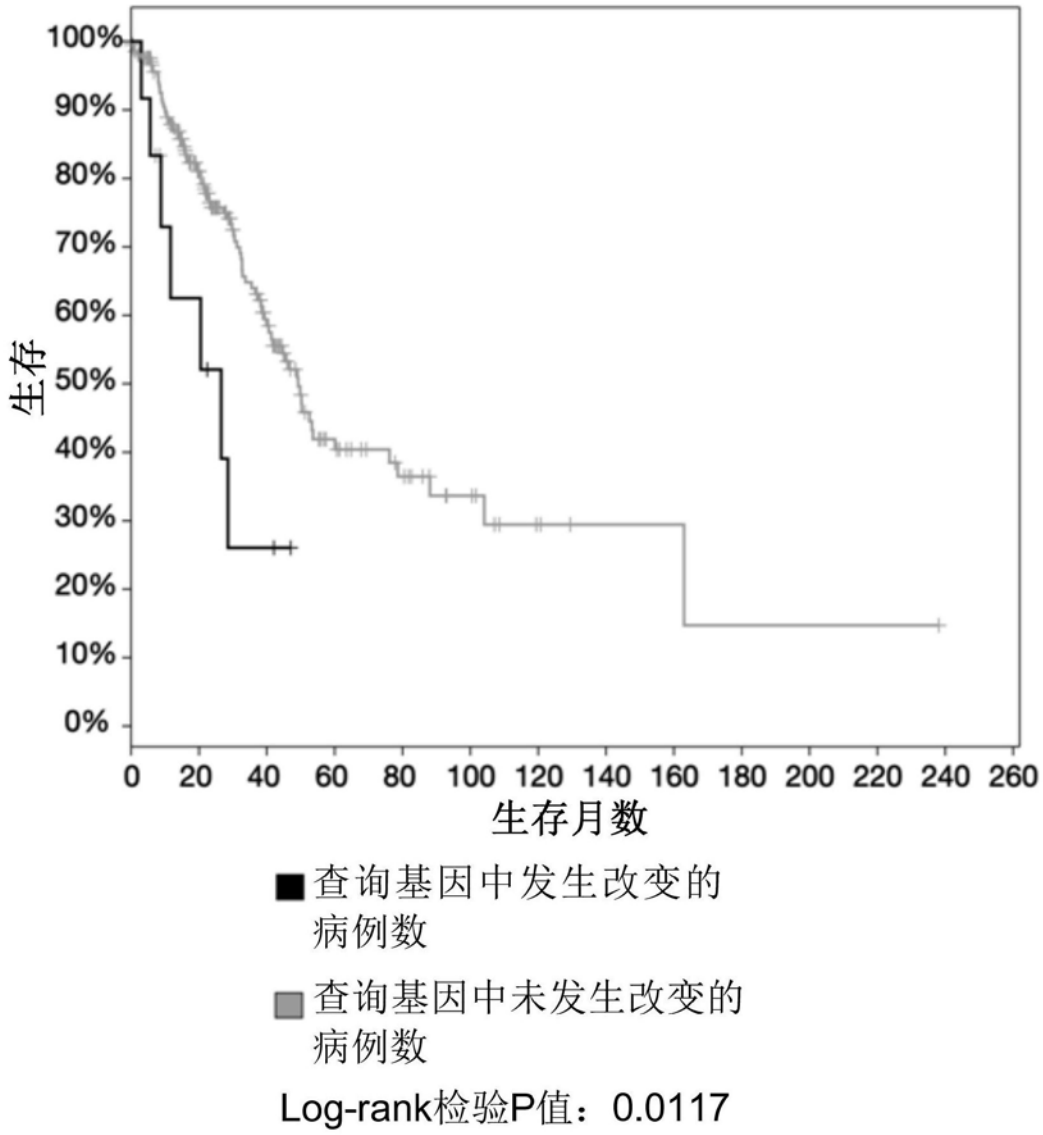
	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	18	11	34.927
查询基因中未发生改变的病例数	372	122	76.979

图15



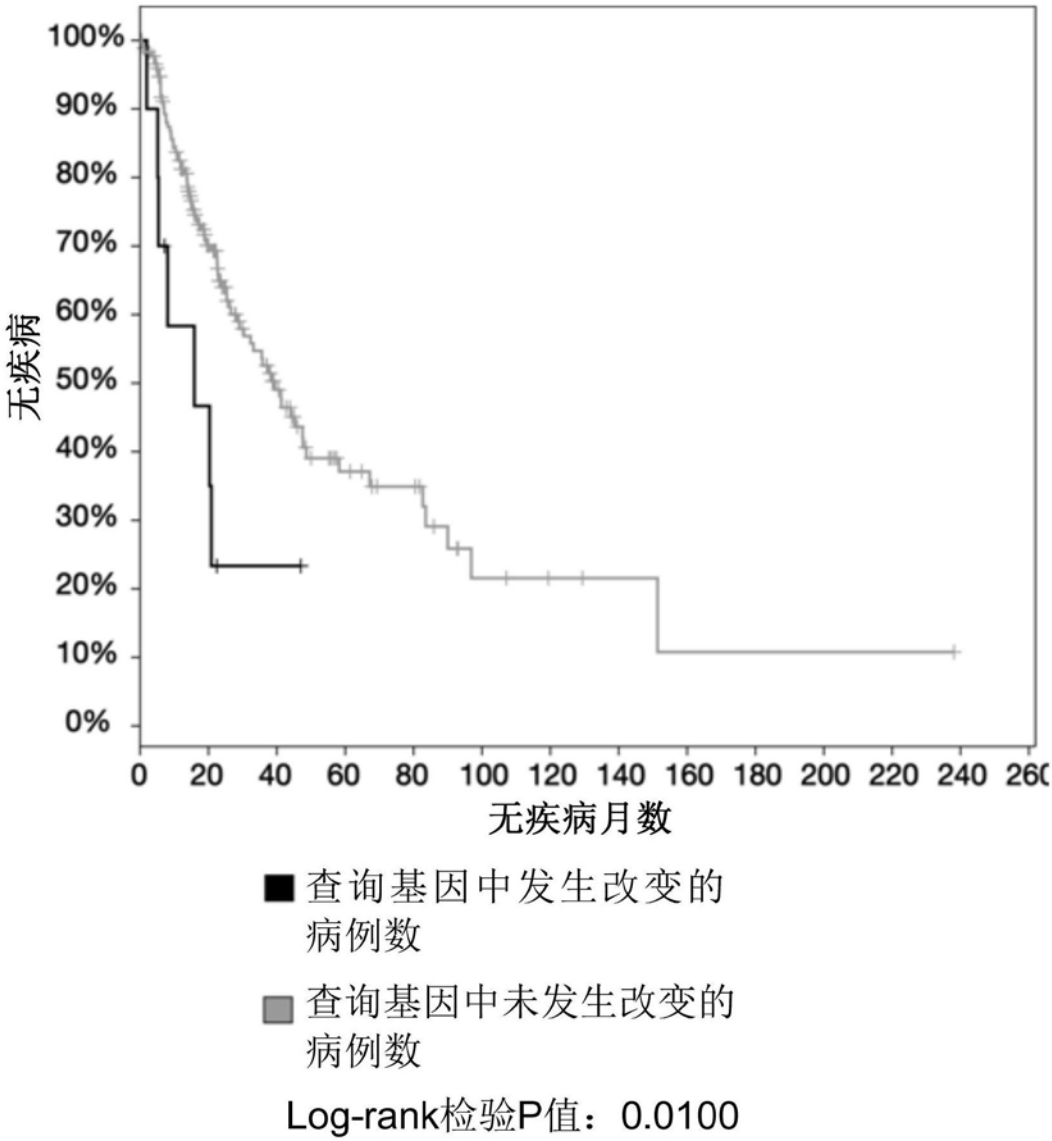
	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	8	4	78.81
查询基因中未发生改变的病例数	144	22	不适用

图16



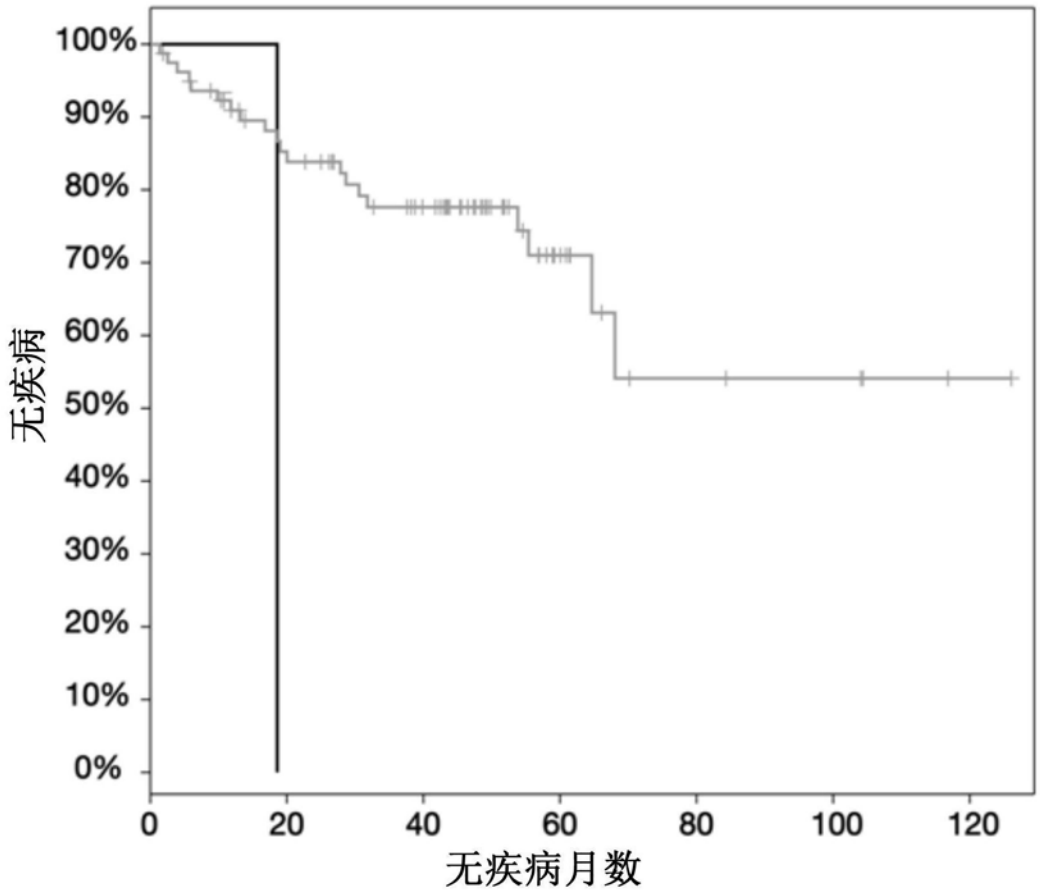
	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	12	7	26.54
查询基因中未发生改变的病例数	209	84	46.24

图17



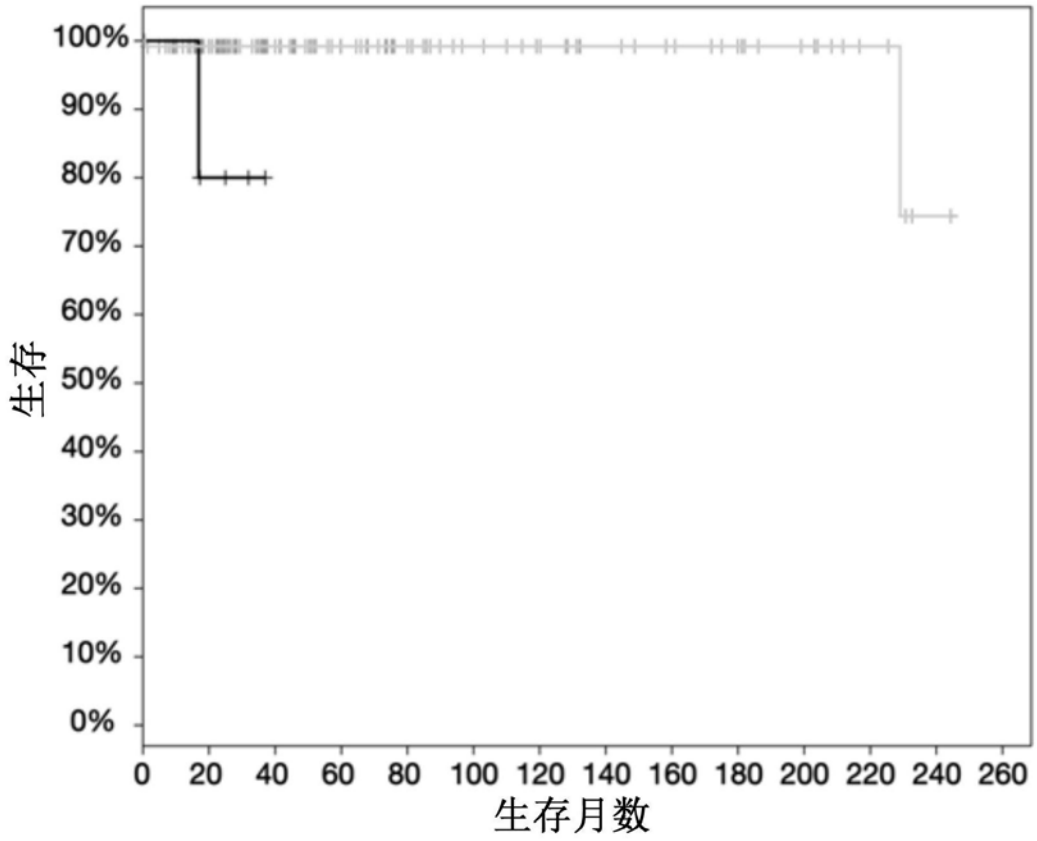
	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	10	7	15.87
查询基因中未发生改变的病例数	176	82	39.49

图18



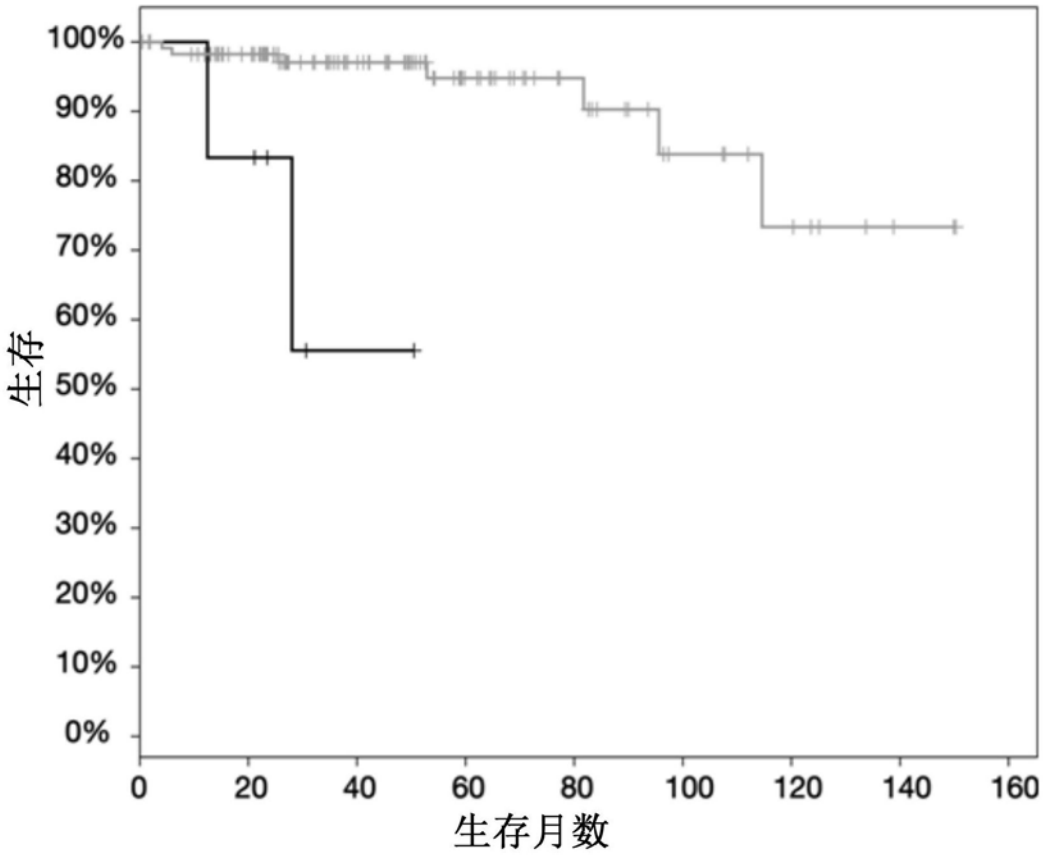
	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	1	1	18.83
查询基因中未发生改变的病例数	79	20	不适用

图19



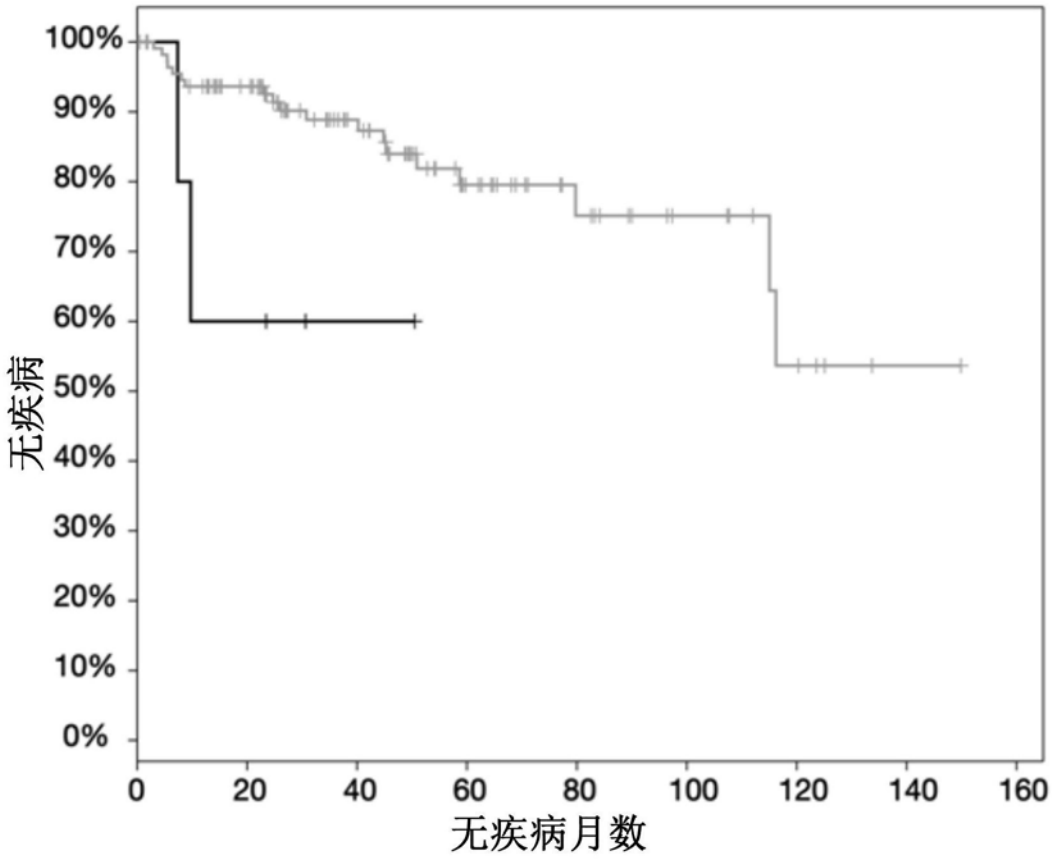
	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	5	1	不适用
查询基因中未发生改变的病例数	127	2	不适用

图20



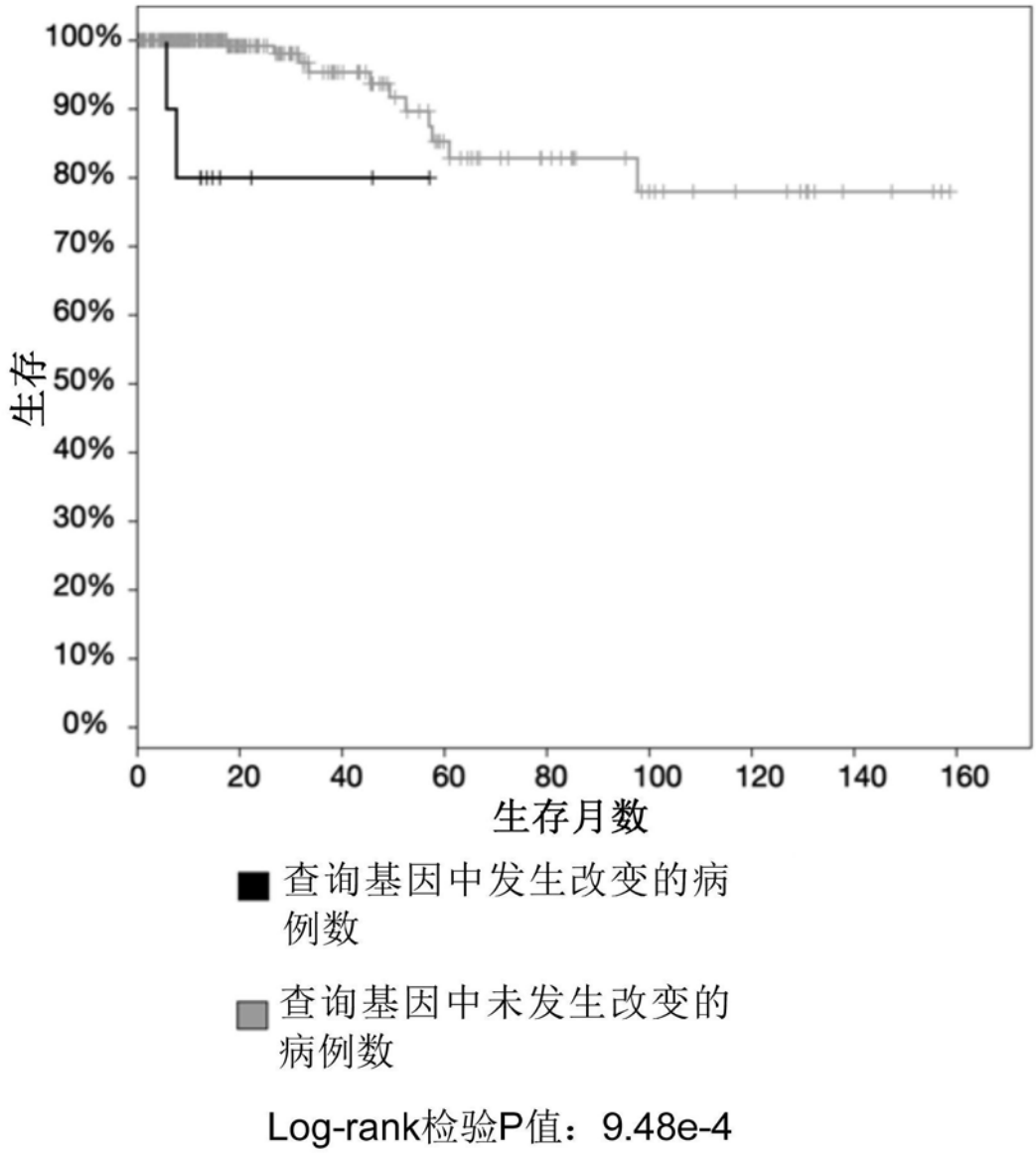
	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	6	2	不适用
查询基因中未发生改变的病例数	116	7	不适用

图21



	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	5	2	不适用
查询基因中未发生改变的病例数	113	19	不适用

图22



	总病例数	复发病例数	无疾病月数中位值
查询基因中发生改变的病例数	18	2	不适用
查询基因中未发生改变的病例数	296	11	不适用

图23