



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102770760 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201180011032. 6

代理人 王芝艳 吴小瑛

(22) 申请日 2011. 02. 22

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 30/72 (2006. 01)

61/338, 938 2010. 02. 24 US

G01N 33/48 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 24

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/000323 2011. 02. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02011/106084 EN 2011. 09. 01

(71) 申请人 佰欧迪塞克斯公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 朱莉娅·格里戈里耶沃

海因里希·罗德 马克西姆·齐平

(74) 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司
72003

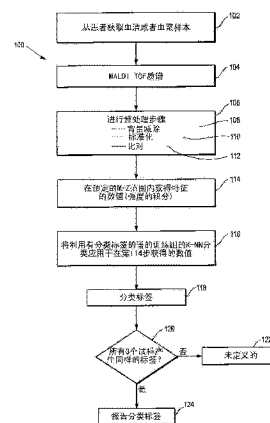
权利要求书 3 页 说明书 25 页 附图 8 页

(54) 发明名称

利用质谱分析选择施用治疗剂的癌症患者

(57) 摘要

利用质谱数据分析和分类算法的方法提供了测定实体上皮瘤癌症患者是否可能受益于治疗剂或治疗剂的组合的能力,其中所述治疗剂靶向参与 MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)途径或自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC(蛋白激酶 C)途径或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 途径的受体的拮抗剂、受体或蛋白,例如靶向 EGFR 和/或 HER2 的治疗剂。所述方法还提供了测定癌症患者是否可能受益于靶向 EFGR 的治疗剂和靶向 COX2 的治疗剂的组合的能力,或者测定癌症患者是否可能受益于用 NF- κ B 抑制剂治疗的能力。



1. 鉴定实体上皮瘤癌症患者可能受益于利用治疗剂或治疗剂的组合的治疗或者可能不受益于利用所述治疗剂或治疗剂的组合的治疗的方法,其中,所述治疗剂靶向参与 MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)途径或者自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC(蛋白激酶 C)途径或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 途径的受体的激动剂、受体或蛋白,所述方法包括以下步骤:

a) 获得所述实体上皮瘤癌症患者的基于血的样本的质谱;

b) 在步骤 a) 获得的质谱上进行一个或者多个预定的预处理步骤;

c) 在进行了步骤 b) 在所述质谱上的预处理步骤后,在所述谱中于一个或者多个预定的 m/z 范围获得所选特征的积分强度值;

d) 将步骤 c) 获得的数值用在分类算法中,所述分类算法使用了包括由其他实体瘤患者的基于血的样本产生的带分类标签的谱的训练组,以鉴别所述患者可能受益于或可能不受益于利用所述治疗剂或治疗剂的组合的治疗。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述治疗剂或者治疗剂的组合靶向 EGFR 和 VEGF。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述治疗剂或者治疗剂的组合靶向 HER2。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述治疗剂或者治疗剂的组合包含曲妥单抗。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述治疗剂或者治疗剂的组合靶向 EGFR,且其中所述分类算法产生分类标签,所述分类标签鉴定所述患者可能受益于利用 COX2 抑制剂和靶向 EGFR 的治疗剂的联合治疗,并可能不受益于仅靶向 EGFR 的治疗剂的治疗。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中,所述 COX2 抑制剂包括塞来昔布。

7. 根据权利要求 5 所述的方法,其中,所述 COX2 抑制剂包括罗非昔布。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,通过分类标签进一步鉴定所述患者可能受益于利用 NF- κ B 抑制剂的治疗。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述一个或者多个预定的 m/z 范围选自以下 m/z 范围组成的组:

5732 至 5795

5811 至 5875

6398 至 6469

11376 至 11515

11459 至 11599

11614 至 11756

11687 至 11831

11830 至 11976

12375 至 12529

23183 至 23525

23279 至 23622,和

65902 至 67502。

10. 仪器,其经配置用以鉴定实体上皮瘤癌症患者可能受益于利用治疗剂或治疗剂的组合的治疗或者可能不受益于利用所述治疗剂或治疗剂的组合的治疗,其中,所述治疗

剂靶向参与 MAPK(丝裂原活化蛋白激酶)途径或者自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC(蛋白激酶 C)途径或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 途径的受体的激动剂、受体或蛋白;

储存装置,用于储存所述实体上皮瘤癌症患者的基于血的样本的质谱;

执行软件指令的处理器,其经配置用以 a) 在所述质谱上进行一个或者多个预定的预处理步骤;b) 在所述质谱中于一个或多个预定的 m/z 范围获得特征的积分强度值;和 c) 将步骤 b) 获得的数值用在分类算法中,所述算法使用了包括由其他实体上皮瘤癌症患者的基于血的样本产生的带分类标签的谱的训练组,以鉴别所述患者可能受益于或可能不受益于所述治疗剂或治疗剂的组合。

11. 根据权利要求 10 所述的仪器,其中,所述治疗剂或者治疗剂的组合靶向 HER2。

12. 根据权利要求 10 所述的仪器,其中,所述治疗剂或者治疗剂的组合靶向 EGFR 和 VEGF。

13. 根据权利要求 10 中所述的仪器,其中,所述治疗剂或者治疗剂的组合包含曲妥单抗。

14. 根据权利要求 10 中所述的仪器,其中,所述治疗剂靶向 EGFR,且其中所述分类算法产生分类标签,所述分类标签鉴定患者可能受益于 COX2 抑制剂和靶向 EGFR 的治疗剂的联合治疗并可能不受益于仅靶向 EGFR 的治疗剂的治疗。

15. 根据权利要求 14 所述的仪器,其中,所述 COX2 抑制剂包括塞来昔布。

16. 根据权利要求 14 所述的仪器,其中,所述 COX2 抑制剂包括罗非昔布。

17. 根据权利要求 10 所述的仪器,其中,所述患者被进一步鉴定可能受益于利用 NF- κ B 抑制剂的治疗。

18. 根据权利要求 10 所述的仪器,其中,所述预定 m/z 范围选自由以下 m/z 范围组成的组:

5732 至 5795

5811 至 5875

6398 至 6469

11376 至 11515

11459 至 11599

11614 至 11756

11687 至 11831

11830 至 11976

12375 至 12529

23183 至 23525

23279 至 23622,和

65902 至 67502。

19. 预测癌症患者是否可能受益于 COX2 抑制剂和 EGFR 抑制剂联合给药的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 获取所述癌症患者的基于血的样本的质谱;

b) 在步骤 a) 获得的质谱上进行一个或者多个预定的预处理步骤;

c) 在进行了步骤 b) 在质谱数据上的预处理步骤后, 在所述谱中于一个或者多个预定 m/z 范围获得所选特征的积分强度值;

d) 将步骤 c) 获得的数值用在分类算法中, 所述分类算法使用了包括由其他实体上皮瘤癌症患者的基于血的样本产生的带分类标签的谱的训练组, 用以鉴定所述患者可能受益于或者可能不受益于 COX2 抑制剂和 EGFR 抑制剂联合给药的治疗。

20. 根据权利要求 19 所述的方法, 其中, 所述预定的 m/z 范围选自以下 m/z 范围组成的组:

5732 至 5795

5811 至 5875

6398 至 6469

11376 至 11515

11459 至 11599

11614 至 11756

11687 至 11831

11830 至 11976

12375 至 12529

23183 至 23525

23279 至 23622, 和

65902 至 67502。

21. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中, 所述方法在实验室测试中心实施。

22. 根据权利要求 19 所述的方法, 其中, 所述方法在实验室测试中心实施。

23. 仪器, 其经配置用于预测癌症患者是否可能受益于 COX2 抑制剂和 EGFR 抑制剂联合给药, 所述仪器包括:

储存装置, 用于储存所述癌症患者的基于血的样本的质谱;

执行软件指令的处理器, 其经配置用以 a) 在所述质谱上进行一个或者多个预定的预处理步骤; b) 在进行了步骤 a) 在所述质谱上的预处理步骤后, 在所述谱中于一个或多个预定的 m/z 范围获得特征的积分强度值; 和 c) 将步骤 b) 获得的数值用在分类算法中, 所述算法使用了包括由其他癌症患者的基于血的样本产生的带分类标签的谱的训练组, 以鉴定所述患者可能受益于或者可能不受益于 COX2 抑制剂和 EGFR 抑制剂联合给药的治疗。

利用质谱分析选择施用治疗剂的癌症患者

[0001] 优先权

[0002] 本申请根据 35U. S. C. § 119(e) 要求 2010 年 2 月 24 日递交的美国临时专利申请第 61/338, 938 号的优先权, 该申请的内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及预测癌症患者是否可能受益于或可能不受益于施用某些类型和种类的药物和 / 或其组合的方法和系统。所述方法和系统涉及使用从所述患者的基于血的样本获得的质谱数据和经配置作为在所述质谱数据上操作的分类器的计算机。

背景技术

[0004] 本发明的受让人 Biodesix 公司已经研发出了一种称为 VeriStrat 的测试法, 该测试法预测非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者是否可能受益于或可能不受益于表皮生长因子受体 (EGFR) 途径靶向药物的治疗。该测试方法描述在美国专利 7, 736, 905 中, 该专利的内容通过引用并入本文。该测试法还描述在 Taguchi F. et al. 1 中, 该文献的内容也通过引用并入本文。所述测试法的其他应用还描述在美国专利 7, 858, 390、7, 858, 389 和 7, 867, 775 中, 其内容通过引用并入本文。

[0005] 简言之, VeriStrat 测试法基于癌症患者的血清和 / 或血浆样本。通过 MALDI-TOF 质谱和在计算机中执行的数据分析运算的结合, 该测试法对在预定 m/z 范围的八个积分峰强度的组与来自训练群组 (training cohort) 的进行比较, 从而针对患者样本产生分类标签: VeriStrat “好”、VeriStrat “差”或 VeriStrat “不定”。在多个临床验证研究中表明, 在使用表皮生长因子受体抑制性药物治疗时, 预处理血清 / 血浆为 VeriStrat “好”的结果显著好于样本导致 VeriStrat “差”标记的患者。在少数情况下 (少于 2%), 不能作出判断, 从而导致 VeriStrat “不定”标签。VeriStrat 可以从本发明的受让人 Biodesix 公司商购, 并用于非小细胞肺癌患者的治疗选择。

[0006] 多数现代基于生物标记物的测试法对肿瘤类型和组织学、具体的干预治疗和临床病理因素都是非常特异的。例如, 基于肿瘤组织的基因测试, 如用于 EGFR 结构域中的突变、KRAS 突变和通过荧光原位杂交 (FISH) 的基因拷贝数分析的测试, 似乎仅在非常特异的病症下有作用。虽然 EGFR 突变可产生腺癌第一系 NSCLC 中针对吉非替尼响应的指征, 但由于这些突变在该类型的 NSCLC 中的极度罕见, 其对鳞状细胞癌并不显示类似的用途。KRAS 突变可与结直肠癌中的西妥昔单抗 (cetuximab) 响应相关联, 但企图将其运用在 NSCLC 中却并不成功。没有有益于头颈鳞状细胞癌 (SCCHN) 的 EGFR- 抑制剂 (EGFRI) 的已知标记物。这些基因测试法的局限性可能与其集中于非常特异的突变有关, 而这些突变仅为复杂的致癌机制的小部分。而且, 所有这些测试都基于一种还原论观点, 即将肿瘤生物学还原至仅为肿瘤细胞, 并忽视了肿瘤细胞与由血管支持系统的内皮细胞、细胞外基质和参与与癌症有关的慢性炎症机制的免疫系统组分 (例如炎症细胞和各种趋化因子和细胞因子) 组成的肿瘤微环境之间重要的相互作用。

发明内容

[0007] 本发明提供了发明人对于肿瘤细胞中的何种途径与 VeriStrat “差” 上皮肿瘤的显著特征有关的理解与证据。本发明提供的所述理解的证据基于多个方面, 包括临床证据、现象学证据 (phenomenological evidence)、文献分析和基于来自癌症患者的血清样本的质谱分析的分子证据。本发明描述的认知的实现可以采用新方法 (例如实际测试法) 的形式, 所述新方法用于预测癌症患者是否可能受益于或可能不受益于某种类型的药物或其组合, 这将在下文详述。

[0008] 简言之, 对于鉴定为 VeriStrat “差” 的患者, VeriStrat 测试法测定了自生长和存活因子受体 (如 EGFR) 下游的一个或多个途径的活化, 可能的候选途径包括经典和非经典 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶)、Akt 以及 PKC (蛋白激酶 C) 调节的反应 (参见图 2)。化疗和安慰剂对照的结果的变化表明, 这些途径的自身活化可能会导致较差的预后, 并可表明 NF- κ B (活化 B 细胞的核因子 κ 轻链增强子) 的参与, NF- κ B 是重要的转录因子, 调节细胞应答并在炎症和免疫应答以及细胞增殖与存活的调节中起重要作用。还已知其与对化疗的响应相关。

[0009] 一般地, VeriStrat 测试识别具有较差预后的亚群, 并预测实体上皮瘤癌症患者对使用治疗剂或治疗剂的组合的治疗的不同收益, 所述治疗剂靶向参与 MAPK 途径或自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC 或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 的受体的激动剂、受体或蛋白。此类药剂的实例有 EGFR 抑制剂。经预测可能受益于抗 EGFR 药剂的患者以 VeriStrat “好” 标签标识; 相反, 经预测可能不受益于抗 EGFR 药剂的患者以 VeriStrat “差” 标签标识。本文使用的术语 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶) 是至少三个相关级联 (cascade) 的代称, 而不是指单个酶 (参见图 2)。

[0010] 因此, 对于 VeriStrat “差” 标签的患者而言, VeriStrat 测试是将 “差” 患者诊断为具有不良预后的癌症患者亚群的诊断。事实上, VeriStrat “差” 患者可以被认为具有不同于 VeriStrat “好” 患者的疾病状态。

[0011] 另外, 具有 VeriStrat “好” 标签的癌症患者更可能从使用靶向参与 MAPK 途径的受体的激动剂、受体或蛋白的治疗剂或治疗剂的组合中获得更多的受益; 而具有 VeriStrat “差” 标签的患者则可能不从此类治疗剂中获得临床上的受益。另一方面, VeriStrat “差” 患者可能从阻止这些途径的下游的、独立于所述受体的活化的治疗或联合治疗中获益。

[0012] 如所附的权利要求所示, 这种理解的实际应用可以采取几种形式。所述方法包括获得癌症患者的基于血的样本的质谱数据, 以及使用作为分类器发挥功能的程序式计算机分析所述谱。作为一种形式, 本发明公开了鉴定实体上皮瘤癌症患者可能受益于使用治疗剂或治疗剂的组合的治疗, 或者可能不受益于所述治疗剂或治疗剂的组合的治疗的方法, 其中所述治疗剂靶向参与 MAPK 途径或自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC (蛋白激酶 C) 途径或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 途径的受体的拮抗剂、受体或蛋白, 所述方法包括以下步骤: a) 获得实体上皮瘤癌症患者的基于血的样本的质谱; b) 对步骤 a) 获得的质谱进行一个或多个预定的预处理步骤; c) 在进行了步骤 b) 对质谱的预处理步骤后, 在所述谱中于一个或多个预定的 m/z 范围获得所选特征的积分强度值; 和 d) 将步骤 c) 获得

的数值用在分类算法中,所述分类算法使用了包括由其他实体瘤患者的基于血的样本产生的带分类标签的谱的训练组,以鉴别所述患者可能受益于或可能不受益于利用所述治疗剂或治疗剂的组合的治疗。

[0013] 在另一实施方式中,描述了用于预测癌症患者是否可能受益于 COX2 抑制剂和 EGFR 抑制剂的联合给药的方法,所述方法包括以下步骤:

[0014] a) 获得癌症患者的基于血的样本的质谱;

[0015] b) 对步骤 a) 获得的质谱进行一个或多个预定的预处理步骤;

[0016] c) 在进行了步骤 b) 对质谱的预处理步骤后,在所述谱中于一个或多个预定的 m/z 范围获得所选特征的积分强度值;和

[0017] d) 将步骤 c) 获得的数值用在分类算法中,所述分类算法使用了包括由其他实体上皮瘤患者的基于血的样本产生的带分类标签的谱的训练组,以鉴别所述患者可能受益于或可能不受益于 COX2 抑制剂和 EGFR 抑制剂的联合给药的治疗。

附图说明

[0018] 图 1 是表示对患者基于血的样本进行 VeriStrat 测试的步骤的流程图;

[0019] 图 2 是人细胞中所选信号转导途径的示意图;

[0020] 图 3 是血清淀粉样蛋白 A (SAA) 同种型的所选生物活性及其在癌症发展和治疗抗性中的可能作用的示意图;

[0021] 图 4 是 EGFR 信号转导途径、其相互作用和 SAA 活化的可能点的示意图;

[0022] 图 5 是包括 EGFR 及其抑制剂的 ErbB 家族生长因子受体的示意图,出自 Yarden Y, Shilo BZ. SnapShot:EGFR signaling pathway. Cell 2007;131:1018;

[0023] 图 6 是所公开的所有 VeriStrat 分析的治疗组的 VeriStrat 好患者和 VeriStrat 差患者之间的危险比 (hazard ratio) 的森林图;

[0024] 图 7 是接受不同化疗治疗的患者的整体存活率 (OS) 与所述患者的 VeriStrat 标签 (“好”和“差”) 的 Kaplan-Meier 图的示意图;

[0025] 图 8 是在不同浓度吉非替尼存在下吉非替尼敏感细胞系 HCC4006 和吉非替尼抗性细胞系 A549 在 VeriStrat “差”和 VeriStrat “好”血清中的生长曲线。

[0026] 发明详述

[0027] 定义

[0028] 除非本发明的内容中另有明确的说明,否则本发明使用的单数形式 “a”、“an” 和 “the” 包括复数个指示物。

[0029] 本发明使用的术语 “实体上皮瘤” 包括但并不必然限于 NSCLC、SCCHN、乳腺癌、肾癌、胰腺癌、黑色素瘤和结直肠癌 (CRC)。

[0030] 本发明中使用的术语 “靶向参与 MAPK 途径或自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC 或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 的受体的拮抗剂、受体或蛋白的治疗剂或治疗剂的组合” 包括但不限于靶向 erbB 受体家族 (包括 EGFR (HER1)、HER2、HER3 和 HER4), VEGF 受体 (VEGFR2), 肝细胞生长因子受体 (HGFR 或 MET), G- 蛋白偶联受体, 胰岛素样生长因子 (IGF) 受体, VEGF, 诸如 TGF α 和 EGF 的生长因子, 和自 Akt 或 ERK/JNK/p38MAPK 上游或在 Akt 或 ERK/JNK/p38MAPK 处或 PKC 途径的任何其他蛋白的一种或多种治疗剂。此外, 本

发明使用的术语“靶向参与 MAPK 途径或自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC 途径或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 途径的受体的激动剂、受体或蛋白的治疗剂或治疗剂的组合”包括已知的治疗剂,以及靶向还没有被发现或被公开的这些蛋白的治疗剂。而且,所述的治疗剂的组合包括治疗剂的任意组合,而无论其是否已经用在实体上皮瘤的联合治疗中。应当指出,即便一种药剂被鉴定为特定蛋白或途径的抑制剂,这样的分类并不意在代表对其作用机制的说明,这是因为这些药剂中的很多的作用机制并没有完全弄清。例如但并非旨在穷举,这些治疗剂包括:

[0031] (1) TKI (酪氨酸激酶抑制剂): 目前市场上的和处于 I-III 期临床试验的被归类为小分子酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 的药物有很多。TKI 可靶向诸如表皮生长因子受体 (EGFR) 的特异分子受体,也可靶向多个受体 (被称为“多重激酶抑制剂”)。这些药物包括但不限于厄洛替尼 (erlotinib)、吉非替尼 (gefitinib)、索拉非尼 (sorafenib)、舒尼替尼 (sunitinib)、帕唑帕尼 (pazopanib)、伊马替尼 (imatinib)、尼罗替尼 (nilotinib)、拉帕替尼 (lapatinib)。

[0032] 基于抗体的抑制剂包括西妥昔单抗 (Cetuximab, anti-EGFR)、潘尼单抗 (Panitumumab, anti-EGFR) 和曲妥单抗 (Trastuzumab, anti-Her2)。

[0033] (2) HGFR 或 MET 抑制剂: 目前处于 I-III 期临床试验的抑制 MET 或 P13K (自 MET 下游的信号转导酶) 的药物有很多,这些药物正处于不同程度的研究中但目前没有应用于临床。例如, XL880 是 MET 和 VEGFR2 的潜在抑制剂。本发明使用的术语“MET 抑制剂”包括,但不限于: AMG 208、AMG102、ARQ 197、AV-299、MetMab、GSK 1363089 (XL880)、EMD 1214063、EMD 1204831、MGCD265、Crizotinib (PF-02341066)、PF-04217903、MP470。

[0034] (3) COX2 抑制剂: 本发明使用的术语“COX2 抑制剂”包括,但不限于选择性 COX2 抑制剂: 塞来昔布 (celecoxib)、罗非昔布 (rofecoxib)、伐地昔布 (valdecoxib) 和罗美昔布 (lumiracoxib)。

[0035] (4) 抑制 COX1 与 COX2 两者的其他非甾体类消炎药 (NSAID), 例如布洛芬 (ibuprofen)、阿司匹林 (aspirin)、吲哚美辛 (indomethacin) 和舒林酸 (sulindac)。已证明此类药物也抑制 NF- κ B 活化。

[0036] (5) 其他 NF- κ B 抑制剂。本发明使用的术语“NF- κ B 抑制剂”包括,但不限于三氧化二砷 (ATO)、萨立多胺 (thalidomide) 及其类似物、白藜芦醇 (resveratrol)。此外,还认为 COX2 抑制剂也对 NF- κ B 途径有抑制作用。因此,诸如布洛芬、阿司匹林、吲哚美辛和舒林酸的 NSAID 也显示抑制 NF- κ B 活化,并因此被视为 NF- κ B 抑制剂。

[0037] 本发明使用的术语“VEGF 抑制剂”包括,但不限于贝伐单抗 (Bevacizumab)、西地尼布 (Cediranib)、阿西替尼 (Axitinib)、莫替沙尼 (Motesanib)、BIBF 1120、拉木西单抗 (Ramucirumab)、VEGF Trap、Linifanib (ABT869)、Tivozanib、BMS 690514、XL880、舒尼替尼、索拉非尼、Brivanib、XL-184、帕唑帕尼。

[0038] 本发明使用的术语“靶向治疗”是指使用诸如特定酶的单克隆抗体或小分子抑制剂的药物或其他物质,用以识别和攻击诸如受体的特定分子的一类治疗。这样的实例有 EGFR-TKI (厄洛替尼、吉非替尼)、西妥昔单抗、贝伐单抗等。

[0039] 本发明使用的术语“非靶向化疗”或“化疗”是指通过干扰 DNA (例如,诸如顺铂 (cisplatin)、卡铂 (carboplatin)、奥沙利铂 (oxaliplatin) 的烷化剂,诸如 5-氟尿嘧啶

或培美曲塞 (pemetrexed) 的抗代谢物,或诸如依立替康 (irinotecan) 的拓扑异构酶抑制剂) 或通过干扰细胞分裂 (诸如长春瑞滨 (vinorelbine)、多西紫杉醇 (docetaxel)、紫杉醇 (paclitaxel)) 来干扰细胞迅速分裂的治疗。

[0040] 本发明使用的术语“预后”是指在缺少治疗或应用标准治疗下与临床结果相关的因子或测定,其可以被认为是疾病自然史的测定。

[0041] 术语“预测”是与受益或不能受益于特定治疗相关的因子或测定。一个预测因子表明一种依赖于预测标志的治疗的不同受益²。本发明使用的术语“疾病状况”是指可以通过不同预后和/或对治疗和/或特定分子和/或代谢特征的不同响应而表征的诊断病况的具体亚类。

[0042] 讨论

[0043] 本发明人已发现,由于 VeriStrat 测试是基于由血清样本的质谱数据获得的标记,因此其能够对目前基于生物标记物的大多数测试法都不能测定的与癌症相关的一般因子进行测定。该事实促成了利用 VeriStrat 测试法进行治疗选择的新的实际应用,这将在下文进行讨论。特别地,所述 VeriStrat 测试导致了鉴定为 VeriStrat “好”的患者与鉴定为 VeriStrat “差”的患者之间生存曲线的类似分离,而无论 EGFR 抑制的作用机制如何。在本发明人之前的工作中,VeriStrat 测试使用了用小分子 EGFR-酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼 (Iressa) 和厄洛替尼 (Tarceva) 治疗的患者样本组,所述抑制剂通过阻断酶的 ATP-结合位点而抑制所述受体¹。对于另一种在 NSCLC 和结肠直肠癌 (CRC) 中均靶向 EGFR 的治疗剂西妥昔单抗 (Erbix)³,发明人观测到在鉴定为 VeriStrat “好”的患者与鉴定为 VeriStrat “差”的患者之间的类似分离。西妥昔单抗是直接阻断 EGF 受体的抗体。

[0044] 此外,VeriStrat 测试跨临床病理特征 (across clinico-pathological characteristics) 地显示在鉴定为 VeriStrat “好”的患者与鉴定为 VeriStrat “差”的患者之间的类似分离。例如,VeriStrat 测试可以应用于胰腺癌患者,也可以用于鳞状细胞癌患者。

[0045] 而且,VeriStrat 测试在多种实体上皮瘤中均显示在鉴定为 VeriStrat “好”的患者与鉴定为 VeriStrat “差”的患者之间的分离。本发明人在 NSCLC、头颈鳞状细胞癌 (SCCHN) 与 CRC 中均观测到该结果³。

[0046] 此外,本发明人发现,通过使用非靶向化疗治疗的住院病人的 VeriStrat 测试分类的生存曲线分离根据群体、干预类型和肿瘤类型而变化。在某些非靶向化疗治疗的组中有分离的证据,而在其他组则没有分离。在安慰剂组 (即无干预组) 中也观察到强分离,这表明 VeriStrat 测试具有预后部分。

[0047] 图 6 的森林图汇总了对目前公开的或出现的 VeriStrat 测试的全部分析的数据。该数据显示,对于所研究的每个治疗组,VeriStrat “好”与 VeriStrat “差”的患者之间的整体存活率的危险比 (HR)。可以看出数据根据治疗类型而分组。获得的危险比的范围表明,VeriStrat 的确表示作为特定类型治疗的结果的较好或较差结果,并因此具有预测效力。

[0048] 在图 6 中,B 为贝伐单抗,C 为西妥昔单抗,CT 为化疗,E 为厄洛替尼,G 为吉非替尼的治疗。文献或简报为:[1].D.Carbonate,《第二届欧洲肺癌会议》,2010 年 4 月;[2]Biodesix 的数据档案,更新自 F.Taguchi 等,《J Natl Cancer Inst》,2007 年 6 月 6 日,99(11):838-846¹;C.Chung et al.,Cancer Epidemiol

Biomarkers Prev. 2010Feb;19(2):358-65³, [4]D. Carbone et al., Lung Cancer 2010 Sept;69(3):337-340⁴.

[0049] 对非靶向化疗治疗群的再分析表明,虽然在用紫杉烷(taxanes)治疗的亚群中没有观察到明显分离,但在使用不含紫杉烷的化疗方案治疗的 VeriStrat “好”与 VeriStrat “差”之间存在分离(参见图 7)。

[0050] 一种测试方法具有如此广泛的应用范围是非常罕见的。

[0051] 总之,以下结论来自上述讨论以及图 6 和 7:

[0052] 1. VeriStrat 测试显示,对于 EGFR 抑制剂(EGFRI)单治疗,在 VeriStrat 好与 VeriStrat 差亚组之间约 .45 的危险比的分离,

[0053] - 不依赖于 EGFRI 作用机制,例如,对于小分子 TKI(厄洛替尼、吉非替尼)和基于 EGFRI 的抗体(受体)抑制剂,如西妥昔单抗。

[0054] - 不依赖于组织学类型,例如腺癌和鳞状细胞癌,和

[0055] - 不依赖于器官,例如 NSCLC、SCCHN 和 CRC。

[0056] 2. 没有观察到与其他群体特征的显著关联:

[0057] - 不与遗传标记物,例如 EGFR 突变状态或 KRAS 状态;

[0058] - 不与诸如性别和种族的群体的特征。

[0059] 3. VeriStrat 具有显示为在没有治疗时 VeriStrat 差与 VeriStrat 好亚组之间的分离的强预后部分。

[0060] - 但是,在 VeriStrat “差”亚组中没有 EGFRI 单治疗的可测治疗受益,即在 VeriStrat 差亚组中使用厄洛替尼的治疗与用安慰剂的治疗基本相当;而在 VeriStrat “好”亚组中有可测的 EGFRI 治疗受益。

[0061] - 联合治疗的效果取决于特定的药物组合及其对互相作用的途径的影响。

[0062] 所有这些事实和仅在 VeriStrat “差”组中的样本质谱中观察到特异峰的观察结果一起得出以下结论:VeriStrat 在实体上皮瘤中界定了具有临床意义(较差的结果)的新的疾病状态。所观察到的现象可以对 VeriStrat “差”肿瘤的分子状态进行初步推论:由于 EGFRI 对这类患者没有效,并且由于 TKI 和基于抗体的治疗的效果相同,在 VeriStrat “差”受试者中在所述受体和酪氨酸激酶结构域以下的通路可能与 VeriStrat “好”受试者的不同,即其被上调。由于本发明人没有观察到与 KRAS 突变状态的关联,本发明人进而得出结论:受影响的途径在 RAS 以下。

[0063] 基于上述观察结果、文献分析与其他证据,本发明人在此提供了关于何种肿瘤细胞的途径参与 VeriStrat “差”上皮肿瘤的独特特征的理解。简言之,本发明人认为,在鉴定为 VeriStrat “差”的患者中,VeriStrat 测定法测量了自 EGF 的受体下游的一个或多个途径的活化;可能的候选途径包括典型和非典型的 MAPK、PI3K/Akt 以及由 PKC 调节的反应(参见图 2 的 200A 和 200B)。化疗和安慰剂对照的结果的变化表明,这些途径的自身活化可能会导致较差的预后,并可表明 NF- κ B 转录因子的参与,NF- κ B 为一种重要的细胞存活调节因子,在炎症过程和癌症进程中起重要作用并与化疗响应有关。

[0064] 一般地,VeriStrat 测试鉴别出具有较差预后的亚群(VeriStrat “差”),并将预测实体上皮瘤癌症患者从使用治疗剂或治疗剂的组合的受益,所述治疗剂靶向参与 MAPK 途径或自 Akt 或 ERK JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC(蛋白激酶 C)或在 Akt 或 ERK JNK/p38 或 PKC

处的 PKC 的受体的激动剂、受体或蛋白。此类药剂的实例有 EGFR 抑制剂。将预测可能受益于抗 -EGFR 药剂的患者以 VeriStrat “好” 标签鉴别；相反，将预测可能不受益于抗 -EGFR 药剂的患者以 VeriStrat “差” 标签鉴别。具有 VeriStrat “差” 标签的患者可能不从用靶向活化 MAPK 途径的受体的所述治疗剂的治疗获得临床受益；另一方面，VeriStrat “差” 患者可能从阻止这些途径的下游的、独立于所述受体的活化的治疗或联合治疗中获得临床受益。

[0065] 术语 MAPK (有丝分裂原激活蛋白激酶) 在本文用于指至少三个相关级联，而不是单个酶 (参见图 2)。

[0066] 因此，对于 VeriStrat “差” 标签的患者，VeriStrat 测试是将“差” 患者诊断为具有差预后的癌症患者亚组的诊断。

[0067] 所述认知的实现可以采用新方法 (例如实际测试法) 的形式，所述新方法用于预测癌症患者是否可能受益于或可能不受益于某种类型的药物。

[0068] 在一个实际应用中，本发明可被认为是鉴定实体上皮瘤癌症患者可能受益于使用治疗剂或治疗剂的组合的治疗，或者可能不受益于所述治疗剂或治疗剂的组合的治疗的方法，其中所述治疗剂靶向参与 MAPK 途径或自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC 或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 的受体的拮抗剂、受体或蛋白，所述方法包括以下步骤：

[0069] a) 获得实体上皮瘤癌症患者的基于血的样本的质谱；

[0070] b) 对步骤 a) 获得的质谱进行一个或多个预定的预处理步骤 (例如背景减除、噪声估计、标准化和质谱比对)；

[0071] c) 在进行了步骤 b) 对质谱的预处理步骤后，在所述谱中于一个或多个预定的 m/z 范围 (且优选下文描述的与下表 1 列出的 m/z 峰对应的 m/z 范围) 获得所选特征的积分强度值；和

[0072] d) 将步骤 c) 获得的数值用在分类算法 (例如 k-最近邻法) 中，所述分类算法使用了包括由其他实体瘤患者的基于血的样本产生的带分类标签的谱的训练组，以鉴别所述患者可能受益于或可能不受益于利用所述治疗剂或所述治疗剂的组合的治疗。

[0073] 作为克服 VeriStrat “差” 患者对靶向疗法的抗性的一个具体实例，将诸如塞来昔布或罗非昔布的 COX2 抑制剂加入至 EGFR-I 中的治疗方案可以克服具有 VeriStrat “差” 标记的患者对 EGFR-I 的抗性。因此，VeriStrat 测试可用于作为包含 COX2 抑制剂和 EGFR-I 的联合治疗的处方的指标。

[0074] 作为另一个具体实例，认为所述 VeriStrat “差” 标记与 NF- κ B 的特定活化作用相关，因此所述测试可以用于选择最受益于 NF- κ B 抑制剂的患者，并因此减少了不必要的治疗和相关的发病。

[0075] 作为另一个具体实例，认为 VeriStrat “差” 标记与在临床上少受益于特定的非靶向化疗相关，具体地，所述药剂干扰 DNA 复制和基因表达，其例如顺铂、吉西他滨 (gemcitabine) 或培美曲塞 (pemetrexed)，这可能是因为 NF- κ B 因子参与该过程。

[0076] 对于分类为 VeriStrat “差” 的患者，加入 1) 阻止 MAPK 途径的下游的、独立于所述受体的活化的药剂，如 COX2 抑制剂；或 2) 将炎症性宿主反应减少至最低的药剂，或加入阻止串话 (cross-talk) 途径活化的其他靶向药剂，可以克服对所述靶向药剂的抗性。

[0077] VeriStrat 测试

[0078] 根据本发明公开的内容对实体上皮瘤癌症患者基于血的样本进行测试以选择出使用特定治疗剂或治疗剂的组合（例如靶向参与 MAPK 途径或自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC 途径或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 途径的受体的拮抗剂、受体或蛋白的药剂）治疗的患者方法，以流程图的形式作为方法 100 例示在图 1 中。

[0079] 在步骤 102 中，从患者获得了血清或血浆样本。在一个实施方式中，将所述血清样本分为三等份（三个试样），对每份样本独立地进行质谱分析和接下来的步骤 104、106（包括分步骤 108、110 和 112）、114、116 和 118。所述试样的数量可以变化，如可以有 4、5 或 10 个试样，而每个试样都进行下面的处理步骤。

[0080] 在步骤 104 中，将所述样本（试样）进行质谱。优选的质谱方法为基质辅助激光解吸电离（MALDI）飞行时间（TOF）质谱法，但也可以使用其他方法。如本领域公知的，质谱产生代表在多个质量 / 电荷 (m/z) 值的强度值的数据点。在一个实施方式中，解冻样本并在 1500rpm 下于 4°C 离心 5 分钟。然后，使用 MilliQ 水以 1:10 或 1:5 稀释血清样本。将稀释的样本以一式三份的方式点样在 MALDI 平板上三个随机分布的位置（即在三个不同的 MALDI 目标上）。将 0.75ul 稀释的血清点样至 MALDI 平板上后，加入 0.75ul 35mg/ml 的芥子酸 (sinapinic acid, 用 50% 乙腈和 0.1% 的三氟乙酸 (TFA) 配制)，然后用移液器上下混合 5 次。可以在室温下干燥平板。应当理解，在本发明的原则下也可以使用其他的方法和程序用于制备和处理血清。

[0081] 使用自动或手动采集谱的 Voyager DE-PRO 或 DE-STR MALDI TOF 质谱仪在线性模式下获得阳离子的质谱。从每个 MALDI 点的 7 或 5 个位置上收集 75 或 100 个谱，以针对每份血清样本产生平均 525 或 500 个谱。使用蛋白标准品（胰岛素（牛）、硫氧还蛋白（大肠杆菌）和脱辅基红蛋白 (Apomyoglobin, 马)）的混合物从外部校正所述谱。

[0082] 在步骤 106 中，将步骤 104 获得的谱进行一个或多个预定的预处理步骤。使用在步骤 104 获得的质谱数据上运行的软件指令在通用计算机中执行预处理步骤 106。所述预处理步骤 106 包括背景减除（步骤 108）、标准化（步骤 110）和比对（步骤 112）。所述背景减除的步骤优选包括在谱中产生强力且不对称的背景估计和从所述谱中减去所述背景。步骤 108 使用了美国专利 7,736,905B2 和美国专利申请公开 2005/0267689（其通过引用并入本文）描述的背景减除技术。标准化步骤 110 包括减去背景的谱的标准化。所述标准化步骤 110 可以采用如美国专利 7,736,905 描述的部分离子流标准化或全部离子流标准化的形式。如美国专利 7,736,905 描述的，步骤 112 将标准化的、减去背景的谱与预定的质量标度进行比对，其可以通过对分类器所使用的训练组的研究获得。

[0083] 一旦完成了所述预处理步骤 106，方法 100 继续进行步骤 114，以在所述谱中于预定 m/z 范围内获得所选特征的数据（峰）。使用峰查找算法的峰宽设定，可以在这些 m/z 范围内对标准化且减去背景的幅度 (amplitude) 进行积分，并将该积分值（即，在特征宽度间的曲线下面积）分配给 (assign) 特征。对在该 m/z 范围内没有检测到峰的谱，积分范围可设定为该特征的平均 m/z 位置附近的间隔，所述特征的宽度对应于当前 m/z 位置的峰宽。该步骤的具体内容也可以参考美国专利 7,736,905。

[0084] 在步骤 114 中，如美国专利 7,736,905 所描述的，在以下一个或多个 m/z 范围获得谱中特征的积分值：

[0085] 5732 至 5795

[0086] 5811 至 5875

[0087] 6398 至 6469

[0088] 11376 至 11515

[0089] 11459 至 11599

[0090] 11614 至 11756

[0091] 11687 至 11831

[0092] 11830 至 11976

[0093] 12375 至 12529

[0094] 23183 至 23525

[0095] 23279 至 23622 和

[0096] 65902 至 67502。

[0097] 在优选的实施方式中,在下表 1 显示的这些 m/z 范围中的 8 个,而且任选在所述所有 12 个范围获得数值。在美国专利 7,736,905 中阐述了这些峰的意义和发现方法。

[0098] 在步骤 116 中,将步骤 114 获得的数值提供给分类器,在示例性实施方式中的分类器是 K 最近邻 (KNN) 分类器。所述分类器使用来自大量其他患者(其可以是 NSCLC 癌症患者,或其他实体上皮癌症患者,例如 HNSCC、乳癌)的分类标记谱的训练组。将 KNN 分类算法应用于 114 的数值和训练组阐述于美国专利 7,736,905 中。也可以使用其他分类器(classifier),包括概率 KNN 分类器或其他分类器。

[0099] 在步骤 118 中,分类器针对质谱产生“好”、“差”或“不确定”的标签。如以上所述,步骤 104 至 118 是在来自给定患者样本的三个独立试样(或使用其他任意个试样)上平行进行的。在步骤 120 中,进行检验以确定是否所有试样都产生了相同的分类标签。如果没有,在步骤 122 得到如所示的不确定的结果。如果所有试样都产生了相同的标签,在步骤 124 报告如所示的标签。

[0100] 如本文所述,公开了在步骤 124 报告的分类标签的新的、预料不到的应用。

[0101] 应当理解,通常在一种程序式通用计算机中通过使用编码预处理步骤 106、在步骤 114 中获得谱值、在步骤 116 中应用 K-NN 分类算法和在步骤 118 中产生分类标签的软件,进行步骤 106、114、116 和 118。在步骤 116 中使用的有分类标签的谱的训练组储存在计算机的存储器中或存储在所述计算机可以访问的存储器中。

[0102] 如在本申请人在先的专利申请文献美国专利 7,736,905 中所描述的,所述方法和程序式计算机可以优选地在实验室测试处理中心完成。

[0103] 对 VeriStrat 测试的作用机制及其实际影响的理解来自几个方面,这将在下面的部分作进一步描述。

[0104] 来自蛋白 ID 的直接证据

[0105] VeriStrat 测定了来自血清或血浆的 MALDI-TOF MS 峰的强度。在一个实施方式中,VeriStrat 标记由下表 1 中的 8 个质谱峰组成。所述分类是通过估测强度(即特征值,通过在预定的 m/z 范围内(参见以上所列和表 1)对样本的质谱进行积分)并使用 7 最近邻分类算法将所观察到的 8 个特征值的组与来自训练组的进行关联而进行的。该程序使用了非线性组合中的特征值,并且不能获得一维得分的定义。从特征值的线性组合产生分值函数的尝试一直没能成功,而且总是导致更差的结果。看来这 8 个特征中所有或大多数都

可以用于产生临床上的用途。

[0106] 人们认为,确定所使用特征值的肽含量可能提供了对 VeriStrat 测试作用机制的理解。但是,由于仪器的 m/z 分辨率不够确保在给定的 m/z 范围内仅有一个蛋白或肽链这一事实,从而使这种理解复杂化。而且看来,多于 8 个肽组成了 8 个峰标记,其中一些可能是相同氨基酸序列的转译后修饰形式或氧化形式,而其他的肽可能仍为不明肽。此外,所述特征值(即估测的峰强度)不简单地与样本中给定分析物的丰度相对应。这是由于 MALDI 电离过程的复杂性,在该过程中击中检测器的离子数量为分析物的丰度与电离概率两者的函数。这种半定量方式对峰(特征值)的比较使得与蛋白 ID 的标准方法(LC-MS/MS)的比较变得困难。

[0107] 表 1:VeriStrat 中使用的峰。

[0108]

峰	m/z
1	5843
2	11445
3	11529
4	11685
5	11759
6	11903
7	12452
8	12579

[0109] 尽管存在上述困难,本申请人有关于表 1 的 3 个峰与血清淀粉样蛋白 A(SAA) 同种型相关的有力证据。申请人在合并的 VeriStrat “好”和 VeriStrat “差”样本间进行了差异凝胶(DIGE)分析,并成功地分离了具有足够序列覆盖的 m/z 11529 和 11685 处的峰,从而将其鉴定为 SAA19-122 和 SAA20-122。理论质量与所观察到的 m/z 值很好地相吻合。在凝胶上观察到的 0.4 的 PI 移动也与理论上的预测很好地相吻合。申请人还认为,在 m/z 5843 处的峰是在 m/z 11685 处的峰的双倍带电荷形式。这些峰已经被其他文献所报道⁵(Ducet, et al. Electrophoresis 1996, 17, 866-876 Kiernan et al. FEBS Letters 2003, 537, 166-170)。还有可能在 11445 处的峰是与母本 SAA 蛋白的 C 末端截断序列相关的另一种 SAA 同种型。

[0110] 虽然清楚 VeriStrat 标记中存在其他蛋白或蛋白同种型,可能 SAA 同种型在 VeriStrat 测试的作用机制中具有重要的作用。在下面的部分,申请人将基于以下发现提供一种 VeriStrat 测试作用机制的可能理论:SAA 是 VeriStrat “差”标记中至少三个峰的主要部分,SAA 与某些受体的相互作用以及这些相互作用的生物学结果的已知信息,以及多种癌细胞中都存在功能性结合 SAA 的这些受体的信息。但是,本发明并不是必然基于该理论,而且该理论也不是用于限制本发明。

[0111] 关于 SAA 作为癌症生物标志的现有技术:参见文献⁶⁻¹⁶。

[0112] SAA:生物学功能和在肿瘤发病机理中的作用

[0113] 功能

[0114] SAA 是进化中高度保守的序列¹⁷ 以及 SAA 表达在响应感染、外伤或病理中的明显提高这些事实说明了 SAA 家族的重要作用。但至今还未完全弄清 SAA 家族的确切生物学功能。SAA 作为 HDL 的组分而参与脂质转运和代谢,而且可能在疾病的急性期具有保护作用¹⁸,而在慢性病况下 SAA 可能成为有害因素。在诸如类风湿性关节炎的一些疾病中,SAA 的持续高表达会导致淀粉样蛋白 A 淀粉样变性¹⁹。但是,SAA 蛋白在临床上的重要功能的范围更加广泛,并包括参与慢性炎症和癌症发生。后两个作用紧密相关并在 Vlasova 和 Moshkovskii²⁰ 以及 Malle 等人²¹ 的综述中进行了详细讨论。

[0115] SAA 在癌症发生中的作用可归因于其多方面的生物学活性:参与炎症,包括通过促炎症基因表达活化和细胞因子调节来支持慢性过程,参与细胞外基质降解,抗凋亡特性,以及包括丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) (其与癌症发生有错综复杂的关系) 在内的特定途径的活化。

[0116] 已证明 SAA 能够用作细胞外基质 (ECM) 粘合蛋白²² 并能诱导基质金属蛋白酶 (MMP)^{18,23},其在 ECM 降解和重模建中起重要作用,并与癌症发生、转移和肿瘤扩散有关^{24,25}。

[0117] SAA 的免疫相关功能由其细胞因子样活性确定,其可以刺激 IL-8、TNF- α 和 IL-1 β ^{26,27} (其可能诱导用于 SAA 表达的正反馈) 以及 IL-12 和 IL-23 (其在细胞介导的免疫应答中起重要作用²⁸) 的产生。而且已经表明,SAA 可以活化 PI3K 和 p38MAPK。

[0118] SAA 参与调节炎症可能与其诱导 COX2 表达的能力有关,与此同时也与 NF- κ B 和 MAPK 途径的活化有关^{29,30}。癌症与炎症的主要相互关系是无数研究和综述的主题³¹⁻³⁷。最近的大部分数据表明,SAA 可能作为二个过程之间的传递质之一而发挥重要作用,这是因为其活化关键炎症和癌症发生途径 (例如典型的和非典型的 MAPK 途径和转录因子 NF- κ B),并且可能参与它们的串话。与 VeriStrat 标记关联的 SAA 水平的提高,可以被用于测定所述途径的活化的有用方法。

[0119] 与 SAA 生物学活性有关的受体和途径

[0120] 已知 NF- κ B 转录因子在大量的表皮和血液恶性病中被组成型地活化,并且认为其通过调节抗 - 和促 - 凋亡靶基因、基质金属蛋白酶表达、血管生成和细胞周期⁴¹ 而对促进炎症相关癌症^{38,39,40} 至关重要。另一方面,NF- κ B 还可以发挥促 - 凋亡基因活性并能与肿瘤抑制基因 p53 协作以诱导细胞凋亡。实际作用依赖于涉及的刺激物、细胞型和亚基⁴³。Rel/NF- κ B 因子的抗 - 和促 - 细胞凋亡效应并不一定是非此即彼的,但可以通过相同靶基因的上调而在同一细胞中相继出现⁴⁴。NF- κ B 可能是炎症和癌症间的主要联系之一,这是因为其与诸如 IL-6、TNF- α 和趋化因子 (包括 MMP 和 COX-2) 的促炎症细胞因子的诱导相关^{35,45,46}。NF- κ B 的活化可以被 EGF 诱导:EGF 刺激通过 NF- κ B 的活化而防止死亡受体诱导的细胞凋亡。

[0121] 在包括肺癌⁴⁸ 在内的多种潜在恶性、恶性和转移性人表皮细胞癌⁴⁷ 中都观测到了 COX-2 的过表达⁴⁸。COX2 通过前列腺素 E2 (PGE2) 介导细胞增殖、血管发生、细胞凋亡和细胞迁移,还反式活化丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 级联的瘤性信号传导^{49,50}。COX 通过 Erk 活化而反式活化 MAPK^{49,92}。该关系是相互的:通过 MAPK 途径作用的表皮生长因子 (EGF) 在一些表皮细胞中大幅引导 COX2 的活化作用⁵¹。已表明 EGFR 通过 TGF α 的活化刺激了 COX2,从而导致 PGE2 释放的增加和有丝分裂的增加⁵²。

[0122] 丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 级联在正常的细胞生物学中以及癌症的发展中有重要作用, 因为其转导来自活化的生长因子受体的生长刺激信号。通常通过生长因子之一结合至膜受体酪氨酸激酶受体 (RTK) 而起始 MAPK 信号转导, 从而导致 Raf、MEK 和胞外信号调节激酶 (Erk) 的参与。最近的研究表明, 从 RTK 到 ERK 的信号传导比仅为线性的 Ras 依赖型途径更加复杂, 而且已经鉴定出了在确定 ETK- 介导的 ERK 信号传导的强度、持续时间和细胞定位中发挥关键作用的大量信号传导调节子。SAA 在很多表皮细胞中功能性地与一些受体结合, 而且这种结合可以引起 NF- κ B 和 MAPK 两个途径的下游活化, 这在上文进行了描述并可导致 VeriStrat “差” 患者对特定治疗的抗性 (也参见上文的描述)。对一些所述受体的概述如下:

[0123] FPRL 受体

[0124] FPRL 受体在包括肝细胞⁵³、肠表皮细胞⁵⁴和肺细胞⁵⁵在内的多种细胞中均有表达。SAA 与 FPRL-1 (经典的 G- 蛋白耦合受体之一) 相互作用, 并触发对细胞功能和表皮细胞增殖和 / 或凋亡的调节至关重要的信号传导网络。SAA 与 FPRL1 的结合导致了白介素的活化和诱导。FPRL 的参与活化了与细胞凋亡和癌症的发展有关^{56, 57, 41} 的蛋白激酶 C (PKC) 和转录因子 NF- κ B 途径³⁰。还表明, SAA 与 FPRL1 的结合导致中性粒细胞和类风湿滑膜细胞的细胞凋亡营救 (其由 MAPK ERK1/2 的磷酸化、PI3K/Akt 信号传导和 STAT3 活化介导) 和细胞内 Ca^{2+} 的释放^{58, 59, 60}, 因而促进细胞增殖和存活。

[0125] SR-BI 受体

[0126] 清道夫受体 B-I (SR-BI) 被鉴定为高密度脂蛋白受体, 介导选择性的胆固醇摄取⁶¹。SR-BI 在类固醇组织和肝中有大量表达, 但还在炎症过程中在巨噬细胞和单核细胞中被上调; SR-BI 高表达已经在人动脉粥样硬化损害中在充满脂质的巨噬细胞中得到证明, 而且也以 SAA 存在为特征。亦表明 SAA 促进由 SR-BI 介导的细胞胆固醇的流出⁶²。

[0127] Baranova 等⁶³ 证明了在与 ERK1/2 和 p38MAPK 的磷酸化以及 IL-8 分泌有关的 HeLa 和 THP1 (人急性单核细胞性白血病细胞系) 细胞中 SAA 与 SR-BI 的特异性结合。SR-BI 受体的表达出现在包括人肺癌细胞系在内的不同细胞中⁶⁴。

[0128] RAGE

[0129] 晚期糖基化终产物受体 (RAGE) 只在肺中以容易测定的水平恒定表达, 但在炎症位点增长很快, 主要在炎症和上皮细胞上。发现在上皮细胞中, RAGE (膜结合或可溶性蛋白) 通过应激显著上调。通过 RAGE 的持久信号传导诱导了存活途径并减少了细胞凋亡和坏死 (伴随着 ATP 的消耗)。这导致了在很多情况下产生出现上皮细胞恶性的环境的慢性炎症⁶⁵。RAGE 过表达与前列腺、结肠和胃肿瘤有关; 而肺和食道癌的晚期阶段是以 RAGE 的下调为特征的⁶⁶。在口腔鳞状细胞癌中, RAGE 的表达与肿瘤进程和复发极度相关, 而且 RAGE- 阳性患者表现出明显更短的无病存活期。在其他多个配体中发现 SAA 与晚期糖基化终产物受体 (RAGE) 结合并通过 ERK1/2 和 p38MAPK 途径诱导 NF- κ B (没有诱导 COX 途径)⁶⁷。

[0130] TLR

[0131] 最近的研究表明, SAA 可能作为类 toll 受体 (TLR) TLR4 和 TLR2 的内在拮抗剂²¹。发现 TLR4 在许多人类癌症细胞中都有表达^{68, 69}。在肺癌中, 显示 TLR4 的活化促进免疫抑制细胞因子 TGF- β 、促血管生成趋化因子 IL-8 和 VEGF 的产生。提高的 VEGF 和 IL-8 分泌与 p38MAPK 活化有关⁷⁰。SAA 对 TLR4 的活化需要 p42/44 和 p38MAPK 的磷酸化⁷¹。

[0132] TLR2 也显示作为 SAA 的功能性受体。表达 TLR2 的 HeLa 细胞通过 NF- κ B 的有力激活而响应 SAA ;SAA 刺激导致 TLR2-HeLa 细胞中 ERK1/2 (P-ERK1/2)、p38MAPK (P-p38) 和 JNK (P-JNK) MAPKs 的磷酸化的增强,以及 I κ B α (NF κ B 抑制剂) 降解的加速⁷²。在巨噬细胞中证明了作为 SAA 的特异活化结果的 NF- κ B 的刺激⁷³。

[0133] 图 3 给出了 SAA 的可能相互作用及其在癌症发展和治疗抗性中的生物学作用的简化示意图。可以看出,可以根据多个途径的串话考察 SAA 的生物学功能,其中所述途径通过 SAA 与多种受体的相互作用而触发,其最终会聚于至少一种主要 MAPK 途径 (ERK、p38 和 JNK) 的活化^{21,41},和 / 或会聚于 NF- κ B 的活化。这些相互作用中的一些例示于图 4 的 EGFR 转导途径图中。

[0134] EGFR 是一种活化包括 Ras-Raf-Mek 以及由 3-磷酸肌醇激酶 (PI3K)、Akt 和 PKC 组成的途径在内的几个主要下游信号传导途径的酪氨酸激酶受体 (TKR)。这反过来可对通过与 NF- κ B 转录活化途径和与炎症途径 (例如由 COX2 诱导的途径) 的多种串话联系而相互作用的增殖、存活、侵入、转移性扩散和肿瘤血管生成产生影响。SAA 可能能够活化独立于酪氨酸激酶受体的这些途径 (如宽箭头所示)。

[0135] EGFR 的过表达和 / 或组成型活化与包括脑、胸、肠和肺在内的多种癌症有关。级联中成分的改变引起所述途径的活化,并被认为是与癌症诱导和进展相关,例如活化 EGFR 激酶结构域 (在非吸烟者中) 或 KRAS (在吸烟者中) 的突变与肺癌的早期发展有关^{74,75}。Ras 蛋白在约 25% 的癌症中被组成型地活化,引起独立于上游调节的有丝分裂信号传导。最近收集的大部分数据表明,非线性信号传导和反式活化在癌症发展和进程中起重要作用。

[0136] SAA 相互作用和抗癌症治疗的抗性

[0137] 化疗、放射和抗炎治疗

[0138] 如上文所描述的和图 3、4 所示, SAA 与大量受体的相互作用导致与癌症治疗抗性相关的途径的活化。前面讨论了 NF- κ B 在化学和放射抗性中的作用⁴¹。NF- κ B 的抑制通过增强细胞凋亡应答而产生对放疗⁷⁸和死亡细胞因子的敏感。同时,暴露于放射和某些化疗药物导致 NF- κ B 的活化和随后对细胞凋亡的抗性^{81,79}。已经证明,抑制化疗 (吉西他滨) 诱导的 NF- κ B 活化恢复了 NSCLC 细胞系对化疗诱导凋亡的敏感性^{82,81}。另一方面,在某些情况下,显示 NF- κ B 与化疗的敏感性有关,如曾经提出 NF- κ B 是紫杉醇诱导的细胞死亡所必须的⁸²。

[0139] 考虑到这一信息,由血浆或血清中提高的 SAA 浓度 (VeriStrat “差”的患者的特征) 得出的一个可能结论是,增加的 SAA 可引起 NF- κ B 转录因子和 MAPK 途径的活化。这可能与癌症对放疗的初步抗性有关,并可影响到患者对化疗的响应。然而,存在多个因素,应该针对各类型的治疗和患者组群单独对其进行评估。

[0140] NF- κ B 抑制剂,如三氧化二砷、姜黄素、萨立多胺均经过大量的临床试验。然而,由于 NF- κ B 抑制剂也增强了化疗诱导的正常造血母细胞的细胞凋亡,在化疗中使用 NF- κ B 抑制剂作为辅助剂可能会延缓骨髓恢复。应当认为,由于 NF- κ B 在激活固有免疫应答和适应免疫应答中起着关键作用,长期使用抑制剂可能与免疫缺陷的风险相关⁴¹。

[0141] 事实上,如果 VeriStrat “差”标记与特定的 NF- κ B 活化有关,这个标记可以用来选择从 NF- κ B 抑制剂中获益最多的患者,并可减少不必要的治疗和相关发病。

[0142] 受体酪氨酸激酶 - 靶向治疗

[0143] erbB 受体和 MAPK 途径

[0144] EGFR 和 HER2 属于表皮生长因子受体 (EGFR) 家族,这一家族由四个成员 (EGFR (HER1)、erbB4 (HER4)、erbB3 (HER3) 和 erbB2 (HER2 基因)) 组成。由于大多数上皮癌表现异常活化的表皮生长因子受体 (EGFR) 和 HER2 受体,这些受体的特异性抑制成为癌症靶向治疗的策略,并成为许多研究的课题。

[0145] 在没有配体的情况下,EGFR 受体以抑制激酶活性的构象存在。配体结合启动了暴露出“二聚环”的构象改变,引发受体二聚化。这些转变被传达跨细胞膜,从而活化激酶结构域。对该活化方案的改变发现于 ErbB 家族中。ErbB-3 不是一个功能激酶,但能够反式活化二聚体配偶体,而 HER2/ErbB-2 是“锁定”于活性构象中的不需要配体 (ligand-less) 的致癌受体。

[0146] 这种二聚化导致酪氨酸激酶功能的活化,通过三个主要信号传导途径导致信号传导,并最终导致逃避凋亡、持续的血管生成、抗生长信号的抗性、生长信号的自足和转移^{77, 83}。

[0147] 级联成分的改变导致途径的活化,并被认为是与癌症的诱发和进展相关,例如活化 EGFR 激酶结构域 (在非吸烟者中) 或 KRAS 基因 (在吸烟者中) 的突变与肺癌的早期发展相关^{74, 72}。Ras 蛋白在约 25% 的肿瘤中被组成型地活化,引起独立于上游调控的有丝分裂信号传导^{76, 77}。

[0148] 目前在临床实践中用于多种实体瘤的有几种酪氨酸激酶抑制剂,其中包括两个小分子 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 - 厄洛替尼和吉非替尼,以及 EGFR 和 HER2 双重抑制剂拉帕替尼。批准临床应用还有抗 -HER2 人源化单克隆抗体曲妥单抗和两个抗 -EGFR 抗体 - 西妥昔单抗和潘尼单抗。

[0149] 在多个出版物中综述的固有和获得性酪氨酸激酶抑制剂 (小分子以及单克隆抗体) 抗性归因于多个因素,例如激活 KRAS 突变,met- 原癌基因的扩增⁸⁴ 和 T790M 突变。癌症及其显示响应靶向药剂的数个抗性途径的多样性使得通过单个药剂的治愈性治疗的前景更加暗淡,除其他原因之外是因为独立于配体与其受体的正常上游相互作用的信号传导的活化的可能性⁸⁴。越来越多的证据显示了多个酪氨酸激酶共表达、自受体下游的途径的串话和传导级联的下游激活的重要性。

[0150] 多个研究均表明,途径的反式活化是抗性机理之一。例如,胰岛素样生长因子 -I 受体 (IGF-1R) 信号传导显示能够弥补人类乳腺癌和前列腺癌细胞系中吉非替尼引起的 EGFR 阻断⁸⁵。可选的下游信号传导,特别是通过 Akt 活化,如通过致癌基因 PIK3CA 或其他的 RTK,已作为 NSCLC 中的 TKI 抗性机制之一⁸⁶。

[0151] Cappuzzo⁸⁸ 等人观察到,如果 Akt 被激活而 EGFR 表达呈阴性,非小细胞肺癌患者对吉非替尼的敏感性非常低,这证实 EGFR 独立性活化可导致吉非替尼抗性。

[0152] 本发明人通过 VeriStrat 测试测定提出, SAA 的相互作用可引起 MAPK 级联的 RTK 独立性激活,进而产生 TKI 抗性。这种 SAA 作用机制可能是直接或间接的。SAA 的直接作用可由其与 RAGE 或 TLR2 和 TLR4 受体的结合介导,导致典型 MAPK 途径的活化 (通过活化 JNK 和 p38)。Malle 等人²¹ 综述了这些受体在各种癌细胞表面以及癌相关细胞中的存在以及它们的相互作用。有直接证据表明,EGFR 途径的活化是 TLR 受体活化的结果⁶⁶。

[0153] SAA 的间接作用可通过以下来解释:通过 FPRL 受体发挥作用,导致白细胞介素 I16

和 I18 的释放,其反过来与 G 蛋白偶联受体发生反应,激活 PKC。(PKC 的活化导致细胞增殖和血管通透性增加,进而导致 MAPK 途径中 MEK 的活化)。此外,它还诱导 VEGF 表达。

[0154] SAA 是肺内皮细胞和巨噬细胞中 TLR4 的配体。据报道,在肿瘤细胞中表达的 TLR 的连接还提高了 VEGF 水平⁷⁰。

[0155] 该信息为负责 SAA 对所有三个主要 MAPK 途径的下游活化的机制的存在提供了证据。下游活化 MAPK 途径独立于 RTK 并可导致自“交互”检测点上游的靶向抑制的抗性。

[0156] 综上,利用 VeriStrat 测试法选择最适合包括联合治疗在内的特定治疗的患者可能有助于克服某些类型的耐药性。

[0157] 联合治疗和 VeriStrat 标记

[0158] TKI 和 COX2 抑制剂

[0159] 如以上所讨论的,SAA 能诱导 COX2 的表达。Huang 等人⁸⁷首次报道了 COX2 在肺癌中的过表达,在大约 70% 的腺癌中都观察到了 COX 的过表达⁸⁸,并在其他多个研究中均得到了证实。

[0160] 多个实验已经证实,COX2 和 EGFR 信号传导途径之间的串话。如以上所讨论的,通过 MAPK 途径发挥作用的表皮生长因子 (EGF) 在一些上皮细胞中大幅诱导 COX2 活性⁴⁷。TGF α 对 EGFR 的活化刺激了 COX2,并导致前列腺素 E2 (PGE2) 的释放和有丝分裂的增加⁴⁸。另一方面,COX-2 的产物前列腺素 E2 (PGE2) 可以反式活化 EGF 受体⁴⁵。在 NSCLC 中,证明 PEG2 以独立于 EGFR 的方式通过细胞内串话活化 MAPK/ERK 途径;这种作用通过 G-蛋白偶联受体和蛋白激酶 C (PKC) 介导,并可能有助于 EGFR-TKI 抗性。

[0161] 另一方面,显示 COX2 抑制剂抑制 NF- κ B 途径:塞来昔布通过抑制 Akt 和 IKK 而发挥其作用。在人非小细胞肺癌中,显示塞来昔布通过抑制 IKK 和 Akt 活化而抑制 NF- κ B 和 TNF 诱导的 JNK、p38MAPK 和 ERK 活化,导致 COX-2 以及炎症、增殖和癌症发生所需的其它基因的合成下降^{46,90}。包括阿司匹林和布洛芬在内的其他 NSAID,显示通过抑制 IKK 活化和 I κ B α 降解而发挥作用。结合以上,这些考虑为向标准癌症治疗中加入 COX2 提供了强有力的证据。

[0162] 在 NSCLC 中联合抗炎和酪氨酸激酶受体靶向治疗的研究以及其克服 EGFR-TKI 抗性的潜在在之前已有综述^{90,91}。所述试验结果均为阴性,发现吉非替尼和塞来昔布联合治疗的患者的应答率和存活率,以及用罗非昔布和厄洛替尼治疗的患者的疾病控制率^{92,93},与单药治疗中观察到的相似。

[0163] 可能由于 SAA 对该途径的上调作用,加入 COX 抑制剂的作用可能在 VeriStrat“差”的患者中更为明显。然而,由于 COX2 途径抑制对下游 MAPK 活性和对 NF- κ B 以及对其相互作用的作用幅度未知,所以所述作用幅度难以预测。这个假设值得进一步研究。

[0164] 细胞系的证据 (图 8)

[0165] 本发明人已经证明,VeriStrat“差”的血清可在肿瘤细胞中引起生物学效应,特别地,它可以提高药物敏感细胞系中细胞对吉非替尼的抗性。对吉非替尼敏感细胞系 HCC4006 (其具有 EGFR 外显子 19 的缺失) 和抗性细胞系 A549 (EGFR 野生型) 进行了实验。人血清来自 IIIB/IV 期 NSCLC 患者并且以 VS“好”或“差”表征。通过合并每个分类相的血清构成库,并用在生长抑制实验中。使用两种培养基组成接种细胞 (每个药剂浓度 10 个重复;2000 细胞/孔);添加有 10% 好血清的 RPMI 或添加有 10% 差血清的 RPMI。24 小时

后,加入吉非替尼,并将平板温育培养 6 天。用 MTT 实验测定生长抑制率。结果见下表 2 和图 8。

[0166] 表 2

[0167]

	HCC4006*		A549	
	好	差	好	差
IC ₅₀ μmol/L	0.054	0.098	>10	>10
0.03 μmol/L 的抑制率 (%)	32	10	0	0
0.06 μmol/L 的抑制率 (%)	55	25	0	1
0.10 μmol/L 的抑制率 (%)	82	52	3	0
0.30 μmol/L 的抑制率 (%)	93	84	2	2
0.60 μmol/L 的抑制率 (%)	96	93	14	11
1.0 μmol/L 的抑制率 (%)	ND	ND	13	10
3.0 μmol/L 的抑制率 (%)	ND	ND	22	20
6.0 μmol/L 的抑制率 (%)	ND	ND	25	32
10.0 μmol/L 的抑制率 (%)	ND	ND	34	40

[0168] * 在 HCC4006 中,通过 Mann-Whitney 检测“好”与“差”的值的 $P < 0.0001$ 。

[0169] 图 8 描述了显示在不同浓度吉非替尼存在下,吉非替尼敏感性细胞系 HCC4006 和吉非替尼抗性细胞系 A549 在 VeriStrat 差和 VeriStrat 好血清中的生长图。在图 8 中,通过在相应生长培养基中于给定浓度吉非替尼下的吸光度与在无所述药物下的平均吸光度之比,计算相对于对照的百分数 (%Control)。误差线对应于标准化测定值的标准偏差。

[0170] 敏感细胞的抑制在 VeriStrat “差”血清中培养时相对减少,但在抗肿瘤细胞中无显著变化。结果表明,VeriStrat “差”血清对肿瘤细胞有直接的生物效应,这与 VeriStrat “好”血清的作用不同。这些结果支持了本发明人对 VeriStrat 机制、其与宿主肿瘤相互作用的关系以及与靶向治疗在患者群体中的有效性的假设。

[0171] 化疗中的 VeriStrat

[0172] 如图 7 所示,VeriStrat “差”标记与对一些非靶向治疗的差的响应有关,而与其他无关。VeriStrat 分类可能与化疗结果有关,所述化疗干扰 DNA 复制,干扰 NF-κB 调节的基因转录(如顺铂、吉西他滨等),然而 VeriStrat 在非靶向治疗中应用的具体领域需要实验进一步论证。

[0173] VeriStrat 测试的实际应用的实例因而可能是,提供了一种用于预测癌症患者是否可能不受益于施用某些非靶向化疗方案的方法,所述方案为例如与 DNA 的复制和/或 NF-κB 转录因子调节的基因活化相互作用的方案,所述方法包括:对样本进行 VeriStrat 测试(图 1),如果结果为“差”分类标签,则产生患者可能不受益的结果。

[0174] 考虑来自文献的信息,即 SAA 增加引起 NF-κB 转录因子的活化以及 NF-κB 活化

在癌症进展和响应各种疗法中的作用, VeriStrat 标记可能与癌症对放疗的初步抗性以及与患者对化疗的响应有关。

[0175] 将 NF- κ B 抑制剂, 如三氧化二砷、姜黄素、萨立多胺作为抗癌药剂在临床试验中进行评价。然而, 由于缺乏对这些药剂响应的生物标记以及其副作用, 它们的可用性受到限制。VeriStrat 可用作 NF- κ B 的活化提高的生物标记, 由此用于选择可能最受益于 NF- κ B 抑制剂的患者 (据推测为 VeriStrat “差”)。

[0176] 综上所述, 本发明涵盖了图 1 的 VeriStrat 测试的额外应用。一般来讲, VeriStrat 测试将预测受益于使用治疗剂或者几种治疗剂的组合的癌症患者, 其中所述治疗剂靶向参与 MAPK 途径或自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC (蛋白激酶 C) 途径或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 途径的受体的拮抗剂、受体或蛋白。预测的级别将取决于特定的药物或药物组合。VeriStrat 测试将不预测靶向下游调节的药物的作用。

[0177] 在一个实施方式中, 本发明可被认为是鉴定实体上皮瘤癌症患者可能受益于使用治疗剂或治疗剂的组合的治疗, 或者可能不受益于所述治疗剂或治疗剂的组合的治疗的方法, 其中所述治疗剂靶向参与 MAPK 途径或自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC 途径或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 途径的受体的拮抗剂、受体或蛋白, 所述方法包括以下步骤:

[0178] a) 获得实体上皮瘤癌症患者的基于血的样本的质谱;

[0179] b) 对步骤 a) 获得的质谱进行一个或多个预定的预处理步骤 (例如背景减除、标准化和谱比对);

[0180] c) 在进行了步骤 b) 对质谱的预处理步骤后, 在所述谱中于一个或多个预定的 m/z 范围 (且优选上文描述的和表 1 列出的 m/z 峰对应的 m/z 范围) 获得所选特征的积分强度值; 和

[0181] d) 将步骤 c) 获得的数值用在分类算法 (例如 k-最近邻法) 中, 所述分类算法使用了包括由其他实体上皮瘤患者的基于血的样本产生的带分类标签的谱的训练组, 以鉴别所述患者可能受益于或可能不受益于利用所述治疗剂或所述治疗剂的组合的治疗。

[0182] 作为一个具体的实例, 向 EGFR-I 加入阻断 MAPK 途径的下游活化的靶向药剂可克服具有 VeriStrat “差” 标记的患者对 EGFR-I 的抗性。

[0183] 作为另一个具体的实例, 向 EGFR-I 加入 COX2 抑制剂塞来昔布或罗非昔布作为治疗方案可克服具有 VeriStrat “差” 标记的患者对 EGFR-I 的抗性。VeriStrat 测试可因此被用作包括 COX2 抑制剂和 EGFR-I 的联合治疗处方的指标。在一个具体的实施方案中, 预测癌症患者是否可能受益于施用 COX2 抑制剂和 EGFR-I 的方法包括以下步骤: a) 获得癌症患者的基于血的样本的质谱; b) 对步骤 a) 获得的质谱进行一个或多个预定的预处理步骤; c) 在进行了步骤 b) 对质谱的预处理步骤后, 在所述谱中于一个或多个预定的 m/z 范围 (且优选上文描述的和表 1 列出的 m/z 峰对应的 m/z 范围) 获得所选特征的积分强度值; 和 d) 将步骤 c) 获得的数值用在分类算法 (例如 k-最近邻法) 中, 所述分类算法使用了包括由其他实体上皮瘤患者的基于血的样本产生的带分类标签的谱的训练组, 以鉴别所述患者可能受益于或可能不受益于施用 COX2 抑制剂和 EGFR-I 的治疗。特别地, 如果分类标签为“差”, 则该患者被标示为可能受益。

[0184] 作为另一个具体的实例, VeriStrat “差” 标记被认为与特定的 NF- κ B 活化有关,

因此该测试能够用以选择从 NF- κ B 抑制剂和向标准化疗治疗中加入 COX2 抑制剂最受益的患者,并且同时用以减少不必要的治疗和相关发病。

[0185] 本发明的方法可作为实验室测试中心 (laboratory test center) 而执行,所述实验室测试中心接收癌症患者的基于血的样本 (或此类样本的质谱数据),将此类质谱数据存储在机器可读的存储器中,并例如利用程序式计算机在机器中如图 1 所示执行处理和分类步骤,以产生分类标记 (VeriStrat “好”或“差”),从而如上所述提供可能受益于利用治疗剂或治疗剂的组合的治疗的患者鉴定的预测。作为另一个实施方式,本发明可以被配置成仪器,该仪器经配置用以鉴定或预测癌症患者是否可能受益于 COX2 抑制剂和 EGFR 抑制剂的联合给药。所述仪器由以下的组合构成:存储设备,计算机存储器或数据库,用于存储癌症患者基于血的样本的质谱,和用于执行软件指令的处理器 (例如,程序式通用计算机的传统 CPU),其经配置用于 a) 在质谱上进行一个或者多个预定的预处理步骤 (参见图 1); b) 进行了步骤 a) 对质谱的预处理步骤后,在所述谱中于一个或多个预定的 m/z 范围 (例如表 1 所列峰涵盖的范围或上文列出的 m/z 范围) 获得所选特征的积分强度值;和 c) 将步骤 b) 获得的数值用在分类算法 (例如 KNN 分类算法) 中,所述算法使用了包括由其他癌症患者的基于血的样本产生的带分类标签的谱的训练组,以鉴别所述患者可能受益于或可能不受益于施用 COX2 抑制剂和 EGFR 抑制剂联合给药的治疗。

[0186] 作为另一个实例,本发明可以具体化为仪器,该仪器经配置用于鉴定实体上皮瘤癌症患者可能受益于使用治疗剂或治疗剂的组合的治疗,或者可能不受益于所述治疗剂或治疗剂的组合的治疗的方法,其中所述治疗剂靶向参与 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶) 途径或自 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 上游的 PKC (蛋白激酶 C) 途径或在 Akt 或 ERK/JNK/p38 或 PKC 处的 PKC 途径的受体的拮抗剂、受体或蛋白。所述仪器采用以下形式:存储实体上皮瘤癌症患者基于血的样本的质谱的存储设备,和用于执行软件指令的处理器,其经配置用于 a) 在质谱上进行一个或者多个预定的预处理步骤 (参见图 1); b) 进行了步骤 a) 对质谱的预处理步骤后,在所述质谱中于一个或多个预定的 m/z 范围 (例如表 1 所列峰涵盖的范围或上文列出的 m/z 范围) 获得所选特征的积分强度值;和 c) 将步骤 b) 获得的数值用在分类算法 (例如 KNN 分类算法) 中,所述算法使用了包括由其他实体上皮瘤癌症患者的基于血的样本产生的带分类标签的谱的训练组,以鉴别所述患者可能受益于或可能不受益于治疗剂或治疗剂的组合。

[0187] 所公开的发明的进一步实例描述在所附权利要求中。

[0188] 附录

[0189] 参考文献

[0190] 1. Taguchi F, Solomon B, Gregorc V, et al. Mass spectrometry to classify non-small-cell lung cancer patients for clinical outcome after treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a multicohort cross-institutional study. J Natl Cancer Inst 2007;99:838-46.

[0191] 2. Clark GM, Zborowski DM, Culbertson JL, et al. Clinical utility of epidermal growth factor receptor expression for selecting patients with advanced non-small cell lung cancer for treatment with erlotinib. J Thorac Oncol 2006;1:837-46.

- [0192] 3. Chung CH, Seeley EH, Roder H, et al. Detection of tumor epidermal growth factor receptor pathway dependence by serum mass spectrometry in cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:358-65.
- [0193] 4. Carbone DP, Salmon JS, Billheimer D, et al. VeriStrat((R)) classifier for survival and time to progression in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with erlotinib and bevacizumab. *Lung Cancer* 2009.
- [0194] 5. Kiernan UA, Tubbs A, Nedelkov D, Niederkofler EE, Nelson RW. Detection of novel truncated forms of human serum amyloid A protein in human plasma. *FEBS Lett* 2003;537:166-70.
- [0195] 6. Cremona M, Calabro E, Randi G, et al. Elevated levels of the acute-phase serum amyloid are associated with heightened lung cancer risk. *Cancer* 2010.
- [0196] 7. Benson MD, Eyanson S, Fineberg NS. Serum amyloid A in carcinoma of the lung. *Cancer* 1986;57:1783-7.
- [0197] 8. Biran H, Friedman N, Neumann L, Pras M, Shainkin-Kestenbaum R. Serum amyloid A (SAA) variations in patients with cancer: correlation with disease activity, stage, primary site, and prognosis. *J Clin Pathol* 1986;39:794-7.
- [0198] 9. Khan N, Cromer CJ, Campa M, Patz EF, Jr. Clinical utility of serum amyloid A and macrophage migration inhibitory factor as serum biomarkers for the detection of nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004;101:379-84.
- [0199] 10. Cho WC, Yip TT, Yip C, et al. Identification of serum amyloid a protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of nasopharyngeal cancer by serum proteomic profiling. *Clin Cancer Res* 2004;10:43-52.
- [0200] 11. Yokoi K, Shih LC, Kobayashi R, et al. Serum amyloid A as a tumor marker in sera of nude mice with orthotopic human pancreatic cancer and in plasma of patients with pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2005;27:1361-9.
- [0201] 12. Gutfeld O, Prus D, Ackerman Z, et al. Expression of serum amyloid A, in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa: implication for a role in colonic tumorigenesis. *J Histochem Cytochem* 2006;54:63-73.
- [0202] 13. Engwegen JY, Mehra N, Haanen JB, et al. Validation of SELDI-TOF MS serum protein profiles for renal cell carcinoma in new populations. *Lab Invest* 2007;87:161-72.
- [0203] 14. Dai S, Wang X, Liu L, et al. Discovery and identification of Serum Amyloid A protein elevated in lung cancer serum. *Sci China C Life Sci* 2007;50:305-11.
- [0204] 15. Liu DH, Wang XM, Zhang LJ, et al. Serum amyloid A protein: a potential biomarker correlated with clinical stage of lung cancer. *Biomed Environ Sci* 2007;20:33-40.
- [0205] 16. Michaeli A, Finci-Yeheskel Z, Dishon S, Linke RP, Levin M, Urieli-Shoval

S. Serum amyloid A enhances plasminogen activation: implication for a role in colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:368-73.

[0206] 17. Uhlar CM, Burgess CJ, Sharp PM, Whitehead AS. Evolution of the serum amyloid A (SAA) protein superfamily. *Genomics* 1994;19:228-35.

[0207] 18. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999;265:501-23.

[0208] 19. Sipe JD. Amyloidosis. *Annu Rev Biochem* 1992;61:947-75.

[0209] 20. Vlasova MA, Moshkovskii SA. Molecular interactions of acute phase serum amyloid A: possible involvement in carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2006;71:1051-9.

[0210] 21. Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A. Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:9-26.

[0211] 22. Preciado-Patt L, Levartowsky D, Prass M, HersHKoviz R, Lider O, Fridkin M. Inhibition of cell adhesion to glycoproteins of the extracellular matrix by peptides corresponding to serum amyloid A. Toward understanding the physiological role of an enigmatic protein. *Eur J Biochem* 1994;223:35-42.

[0212] 23. Migita K, Kawabe Y, Tominaga M, Origuchi T, Aoyagi T, Eguchi K. Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts. *Lab Invest* 1998;78:535-9.

[0213] 24. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009;326:1216-9.

[0214] 25. Vihinen P, Ala-aho R, Kahari VM. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5:203-20.

[0215] 26. Furlaneto CJ, Campa A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:405-8.

[0216] 27. Patel H, Fellowes R, Coade S, Woo P. Human serum amyloid A has cytokine-like properties. *Scand J Immunol* 1998;48:410-8.

[0217] 28. He R, Shepard LW, Chen J, Pan ZK, Ye RD. Serum amyloid A is an endogenous ligand that differentially induces IL-12 and IL-23. *J Immunol* 2006;177:4072-9.

[0218] 29. Malle E, Bollmann A, Steinmetz A, Gerns D, Leis HJ, Sattler W. Serum amyloid A (SAA) protein enhances formation of cyclooxygenase metabolites of activated human monocytes. *FEBS Lett* 1997;419:215-9.

[0219] 30. Jijon HB, Madsen KL, Walker JW, Allard B, Jobin C. Serum amyloid A activates NF- κ B and proinflammatory gene expression in human and murine intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* 2005;35:718-26.

[0220] 31. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-7.

[0221] 32. Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, Uffort E, Nealon W, Mark Evers

B. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann Surg* 2004;239:763-9;discussion 9-71.

[0222] 33. Ditsworth D, Zong WX. NF- κ B: key mediator of inflammation-associated cancer. *Cancer Biol Ther* 2004;3:1214-6.

[0223] 34. Balkwill F, Coussens LM. Cancer: an inflammatory link. *Nature* 2004;431:405-6.

[0224] 35. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006;4:221-33.

[0225] 36. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436-44.

[0226] 37. Lee JM, Yanagawa J, Peebles KA, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM. Inflammation in lung carcinogenesis: new targets for lung cancer chemoprevention and treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:208-17.

[0227] 38. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004;118:285-96.

[0228] 39. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431:461-6.

[0229] 40. Karin M. The I κ B kinase—a bridge between inflammation and cancer. *Cell Res* 2008;18:334-42.

[0230] 41. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF- κ B as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 2007;29:19-35.

[0231] 42. Graham B, Gibson SB. The two faces of NF κ B in cell survival responses. *Cell Cycle* 2005;4:1342-5.

[0232] 43. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML. The pro- or anti-apoptotic function of NF- κ B is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem* 2000;267:3828-35.

[0233] 44. Bernard D, Monte D, Vandenbunder B, Abbadie C. The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the upregulation of MnSOD. *Oncogene* 2002;21:4392-402.

[0234] 45. Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2:725-34.

[0235] 46. Shishodia S, Koul D, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates TNF-induced NF- κ B activation through inhibition of activation of I κ B kinase and Akt in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of COX-2 synthesis. *J Immunol* 2004;173:2011-22.

[0236] 47. Koki AT, Khan NK, Woerner BM, et al. Characterization of cyclooxygenase-2 (COX-2) during tumorigenesis in human epithelial

cancers:evidence for potential clinical utility of COX-2 inhibitors in epithelial cancers.Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002;66:13-8.

[0237] 48.Soslow RA,Dannenberg AJ,Rush D,et al.COX-2 is expressed in human pulmonary,colonic,and mammary tumors.Cancer 2000;89:2637-45.

[0238] 49.Pai R,Soreghan B,Szabo IL,Pavelka M,Baatar D,Tarnawski AS.Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor:a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy.Nat Med 2002;8:289-93.

[0239] 50.McKay MM,Morrison DK.Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK.Oncogene 2007;26:31 13-21.

[0240] 51.Richards JA,Petrel TA,Brueggemeier RW.Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells.J Steroid Biochem Mol Biol 2002;80:203-12.

[0241] 52.Coffey RJ,Hawkey CJ,Damstrup L,et al.Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2,basolateral release of prostaglandins,and mitogenesis in polarizing colon cancer cells.Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:657-62.

[0242] 53.Prossnitz ER,Ye RD.The N-formyl peptide receptor:a model for the study of chemoattractant receptor structure and function.Pharmacol Ther1997;74:73-102.

[0243] 54.Babbin BA,Lee WY,Parkos CA,et al.Annexin I regulates SKCO-15cell invasion by signaling through formyl peptide receptors.J Biol Chem2006;281:19588-99.

[0244] 55.Rescher U,Danielczyk A,Markoff A,Gerke V.Functional activation of the formyl peptide receptor by a new endogenous ligand in human lung A549cells.J Immunol 2002;169:1500-4.

[0245] 56.Su SB,Gong W,Gao JL,et al.A seven-transmembrane,Gprotein-coupled receptor,FPRL1,mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells.J Exp Med 1999;189:395-402.

[0246] 57.Biswas DK,Martin KJ,McAlister C,et al.Apoptosis caused by chemotherapeutic inhibition of nuclear factor-kappaB activation.Cancer Res2003;63:290-5.

[0247] 58.El Kebir D,Jozsef L,Khreiss T,et al.Aspirin-triggered lipoxins override the apoptosis-delaying action of serum amyloid A in human neutrophils:a novel mechanism for resolution of inflammation.J Immunol 2007;179:616-22.

[0248] 59.Lee HY,Kim MK,Park KS,et al.Serum amyloid A induces contrary immune responses via formyl peptide receptor-like 1 in human monocytes.Mol Pharmacol 2006;70:241-8.

[0249] 60.Lee MS,Yoo SA,Cho CS,Suh PG,Kim WU,Ryu SH.Serum amyloid A binding to

formyl peptide receptor-like 1 induces synovial hyperplasia and angiogenesis. *J Immunol* 2006;177:5585-94.

[0250] 61. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996;271:518-20.

[0251] 62. van der Westhuyzen DR, Cai L, de Beer MC, de Beer FC. Serum amyloid A promotes cholesterol efflux mediated by scavenger receptor B-I. *J Biol Chem* 2005;280:35890-5.

[0252] 63. Baranova IN, Vishnyakova TG, Bocharov AV, et al. Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMPII analogous-1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 2005;280:8031-40.

[0253] 64. Hrzenjak A, Reicher H, Wintersperger A, et al. Inhibition of lung carcinoma cell growth by high density lipoprotein-associated alpha-tocopheryl-succinate. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:1520-31.

[0254] 65. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med* 2009;7:17.

[0255] 66. Franklin WA. RAGE in lung tumors. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:106-7.

[0256] 67. Cai H, Song C, Endoh I, et al. Serum amyloid A induces monocyte tissue factor. *J Immunol* 2007;178:1852-60.

[0257] 68. Wang L, Liu Q, Sun Q, Zhang C, Chen T, Cao X. TLR4 signaling in cancer cells promotes chemoattraction of immature dendritic cells via autocrine CCL20. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:852-6.

[0258] 69. Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* 2007;133:1869-81.

[0259] 70. He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol* 2007;44:2850-9.

[0260] 71. Sandri S, Rodriguez D, Gomes E, Monteiro HP, Russo M, Campa A. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *J Leukoc Biol* 2008;83:1174-80.

[0261] 72. Cheng N, He R, Tian J, Ye PP, Ye RD. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J Immunol* 2008;181:22-6.

[0262] 73. He RL, Zhou J, Hanson CZ, Chen J, Cheng N, Ye RD. Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2. *Blood* 2009;113:429-37.

[0263] 74. Westra WH. Early glandular neoplasia of the lung. *Respir Res*

2000;1:163-9.

[0264] 75. Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res* 2005;65:7568-72.

[0265] 76. Medema RH, Bos JL. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog* 1993;4:615-61.

[0266] 77. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

[0267] 78. Shao R, Karunagaran D, Zhou BP, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB activity is involved in E1A-mediated sensitization of radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:32739-42.

[0268] 79. Yamagishi N, Miyakoshi J, Takebe H. Enhanced radiosensitivity by inhibition of nuclear factor kappa B activation in human malignant glioma cells. *Int J Radiat Biol* 1997;72:157-62.

[0269] 80. Luo JL, Kamata H, Karin M. The anti-death machinery in IKK/NF-kappaB signaling. *J Clin Immunol* 2005;25:541-50.

[0270] 81. Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor kappa B. *J Clin Invest* 1991;88:691-5.

[0271] 82. Jones DR, Broad RM, Madrid LV, Baldwin AS, Jr., Mayo MW. Inhibition of NF-kappaB sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Ann Thorac Surg* 2000;70:930-6;discussion6-7.

[0272] 83. Gazdar AF. Personalized Medicine and Inhibition of EGFR Signaling in Lung Cancer. *N Engl J Med* 2009.

[0273] 84. Lynch TJ, Jr., Blumenschein GR, Jr., Engelman JA, et al. Summary statement novel agents in the treatment of lung cancer: Fifth Cambridge Conference assessing opportunities for combination therapy. *J Thorac Oncol* 2008;3:S 107-12.

[0274] 85. Jones HE, Goddard L, Gee JM, et al. Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2004;11:793-814.

[0275] 86. Engelman JA, Janne PA. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:2895-9.

[0276] 87. Huang M, Stolina M, Sharma S, et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin12 production. *Cancer Res* 1998;58:1208-16.

[0277] 88. Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in

adenocarcinomas. Cancer Res 1998;58:3761-4.

[0278] 89. Krysan K, Reckamp L, Dalwadi H, et al. Prostaglandin E2 activates mitogen-activated protein kinase/Erk pathway signaling and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells in an epidermal growth factor receptor-independent manner. Cancer Res 2005;65:6275-81.

[0279] 90. Krysan K, Reckamp KL, Sharma S, Dubinett SM. The potential and rationale for COX-2 inhibitors in lung cancer. Anticancer Agents Med Chem 2006;6:209-20.

[0280] 91. Reckamp KL, Gardner BK, Figlin RA, et al. Tumor response to combination celecoxib and erlotinib therapy in non-small cell lung cancer is associated with a low baseline matrix metalloproteinase-9 and a decline in serum-soluble E-cadherin. J Thorac Oncol 2008;3:1 17-24.

[0281] 92. Gadgeel SM, Ruckdeschel JC, Heath EI, Heilbrun LK, Venkatramanamoorthy R, Wozniak A. Phase II study of gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), and celecoxib, a cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, in patients with platinum refractory non-small cell lung cancer (NSCLC). J Thorac Oncol 2007;2:299-305.

[0282] 93. O'Byrne KJ, Danson S, Dunlop D, et al. Combination therapy with gefitinib and rofecoxib in patients with platinum-pretreated relapsed non small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2007;25:3266-73.

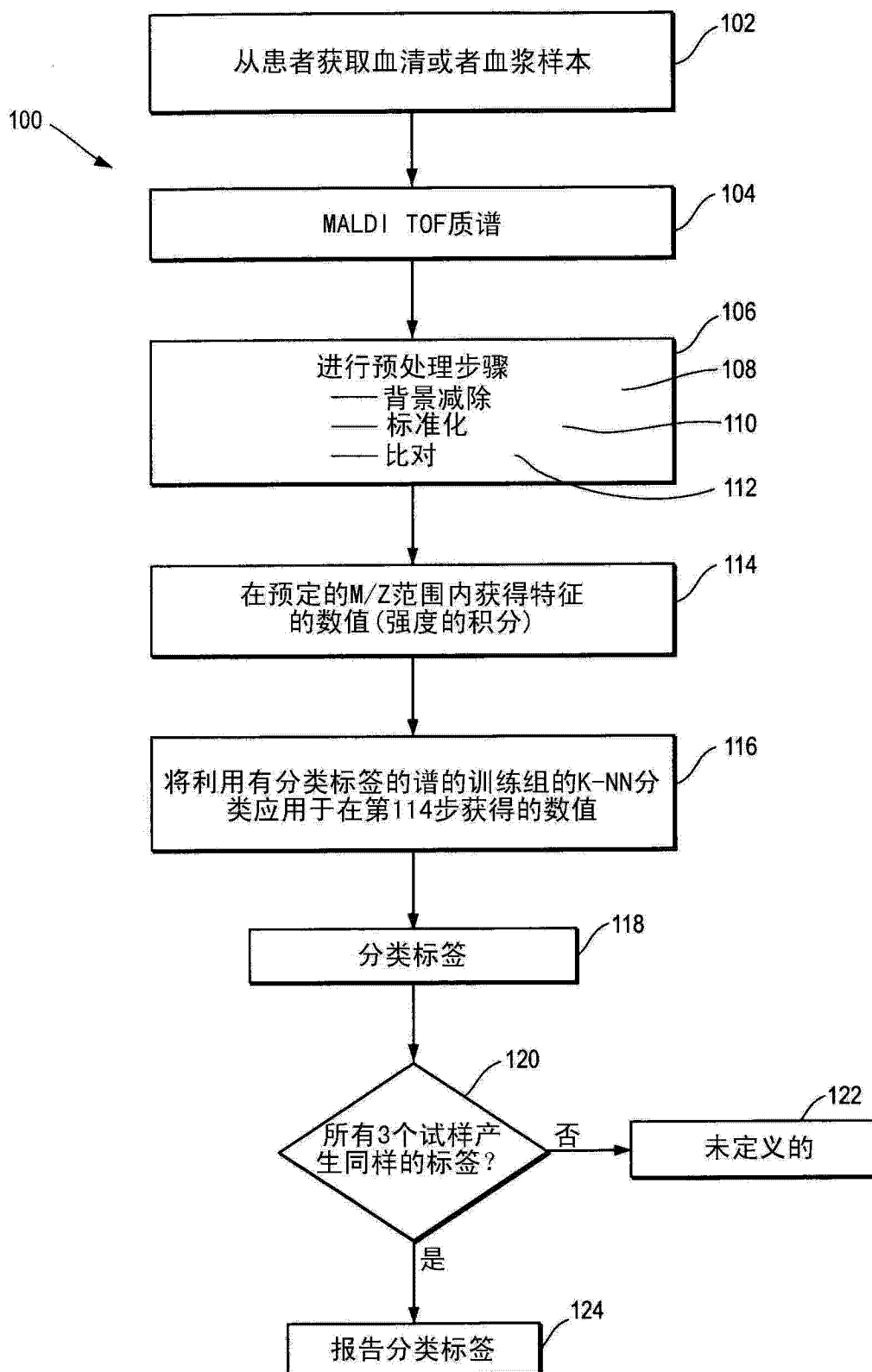


图 1

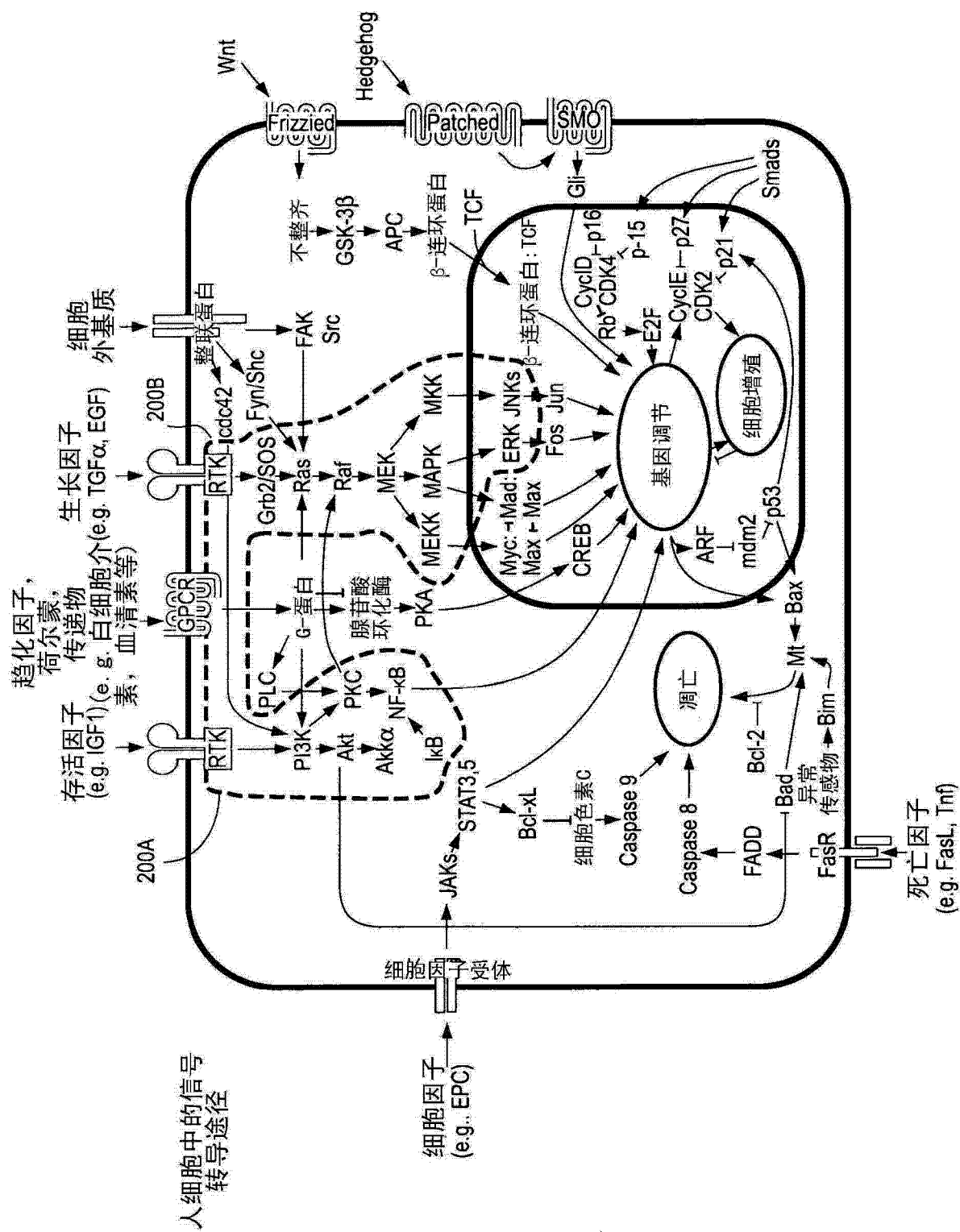


图 2

SAA 的所选择的生物活性及其在癌症
发展和治疗抗性中的可能作用

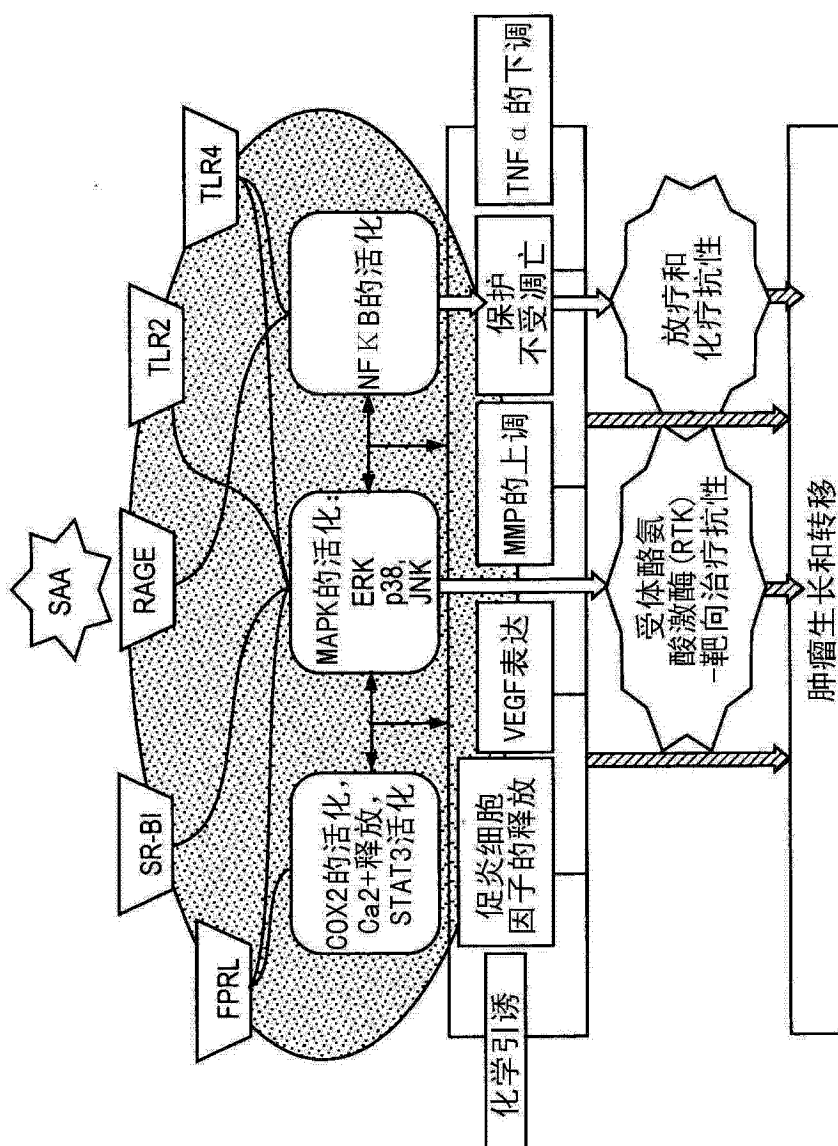


图 3

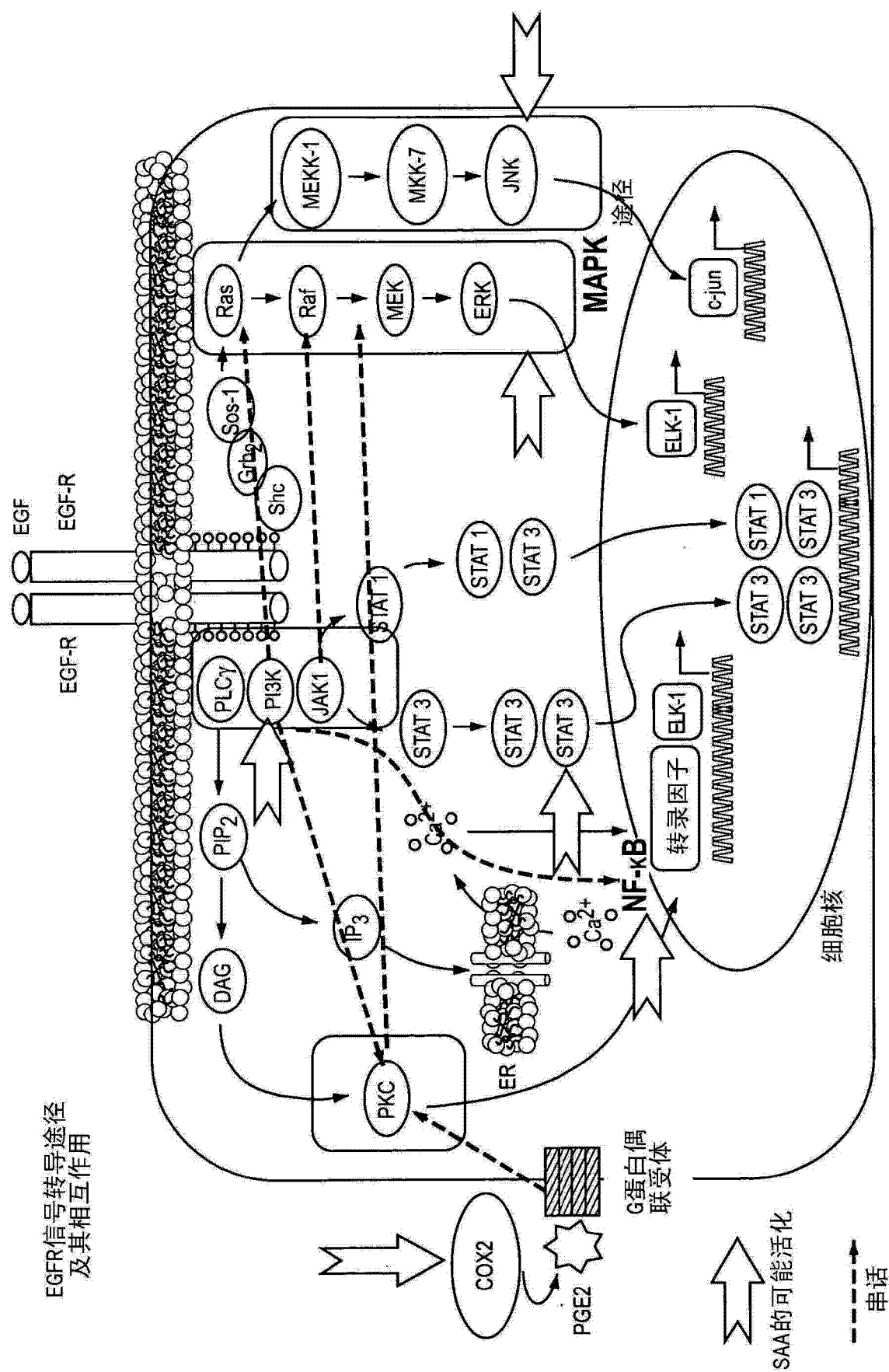


图 4

ErbB生长因子受体及其抑制剂

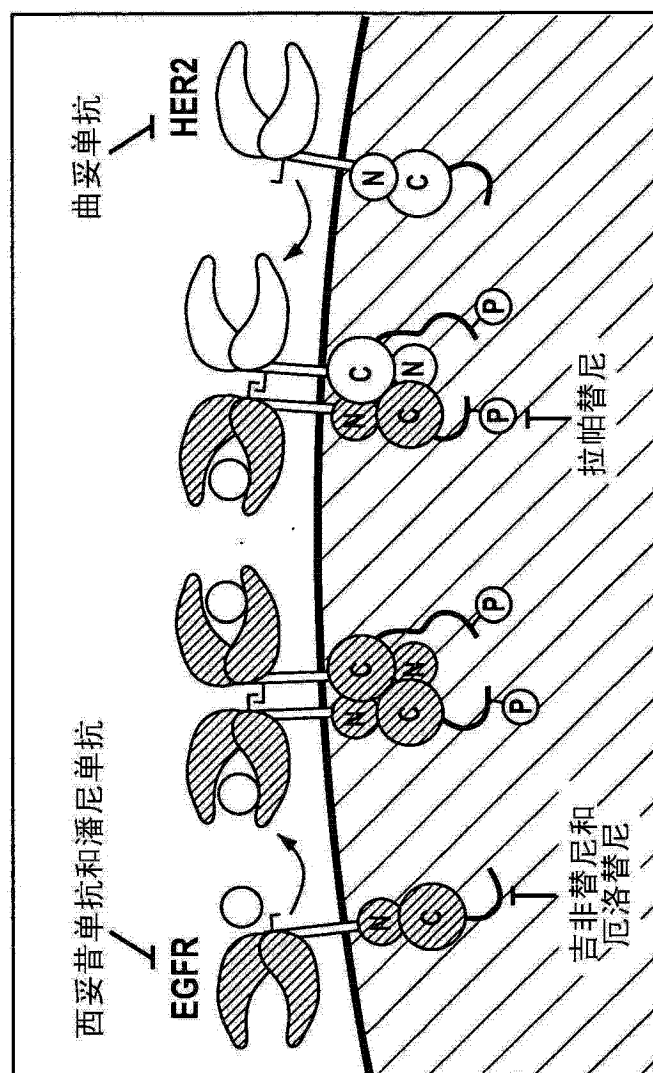


图 5

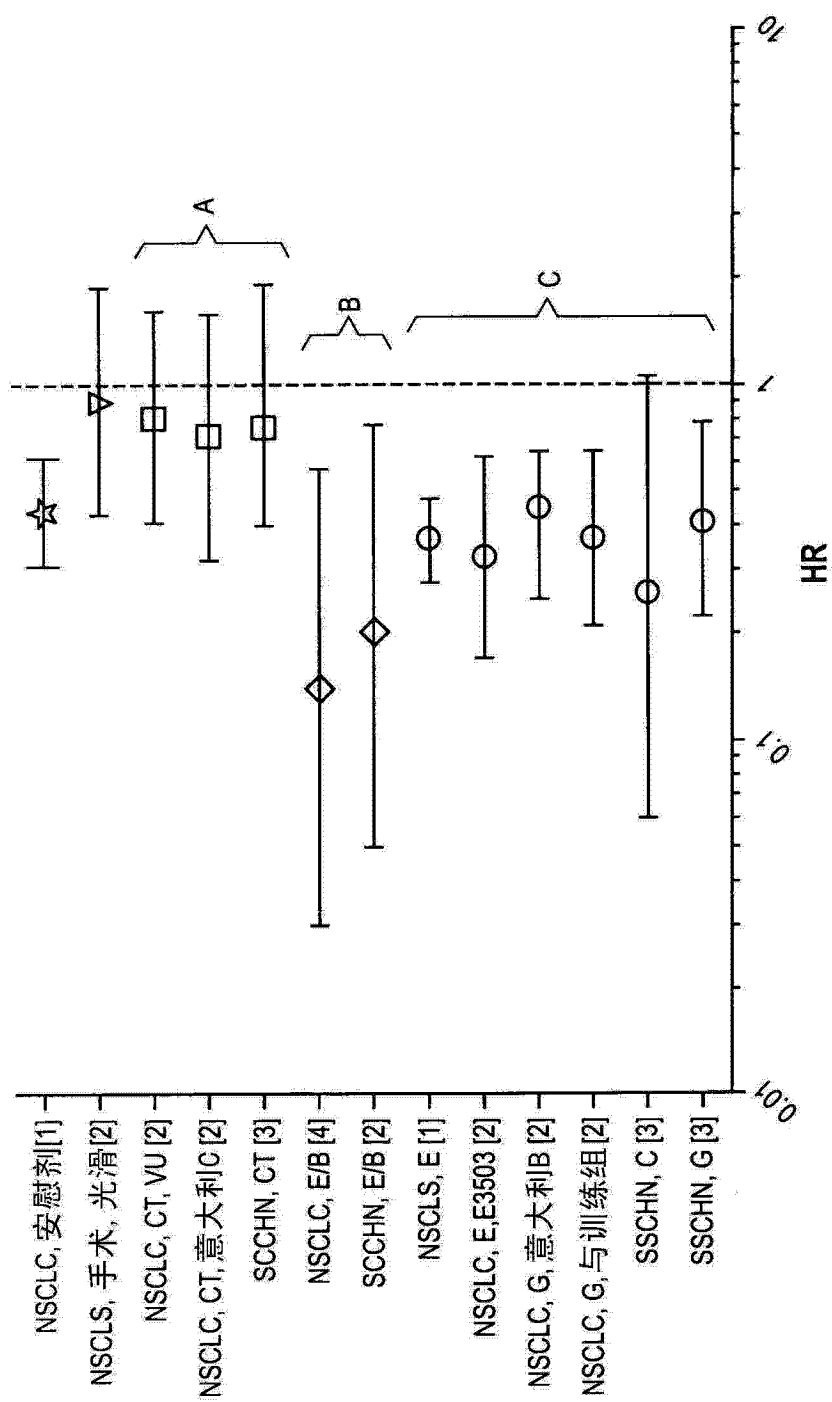


图 6

接受不同化疗治疗的患者通过VeriStrat的OS的Kaplan-Meier曲线

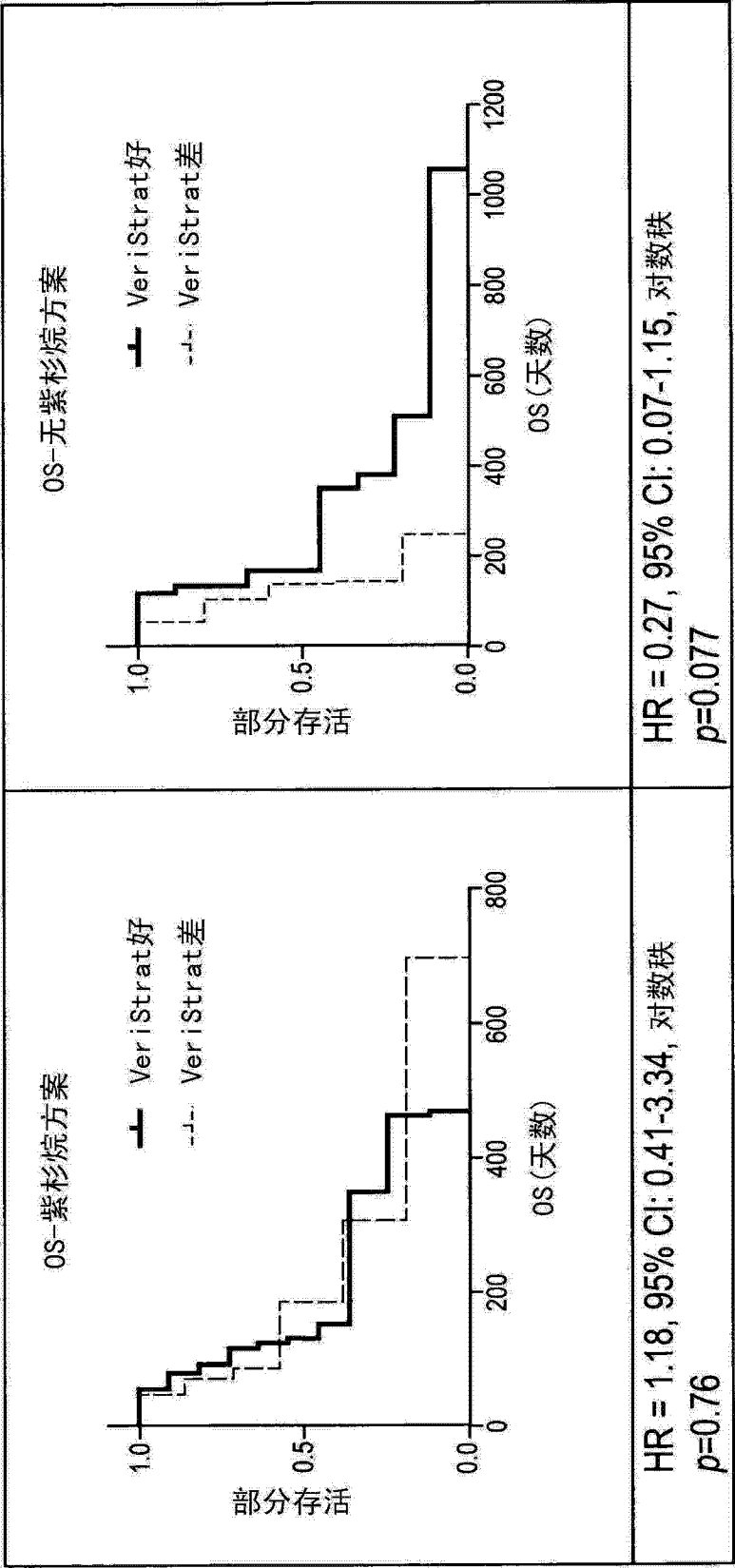


图 7

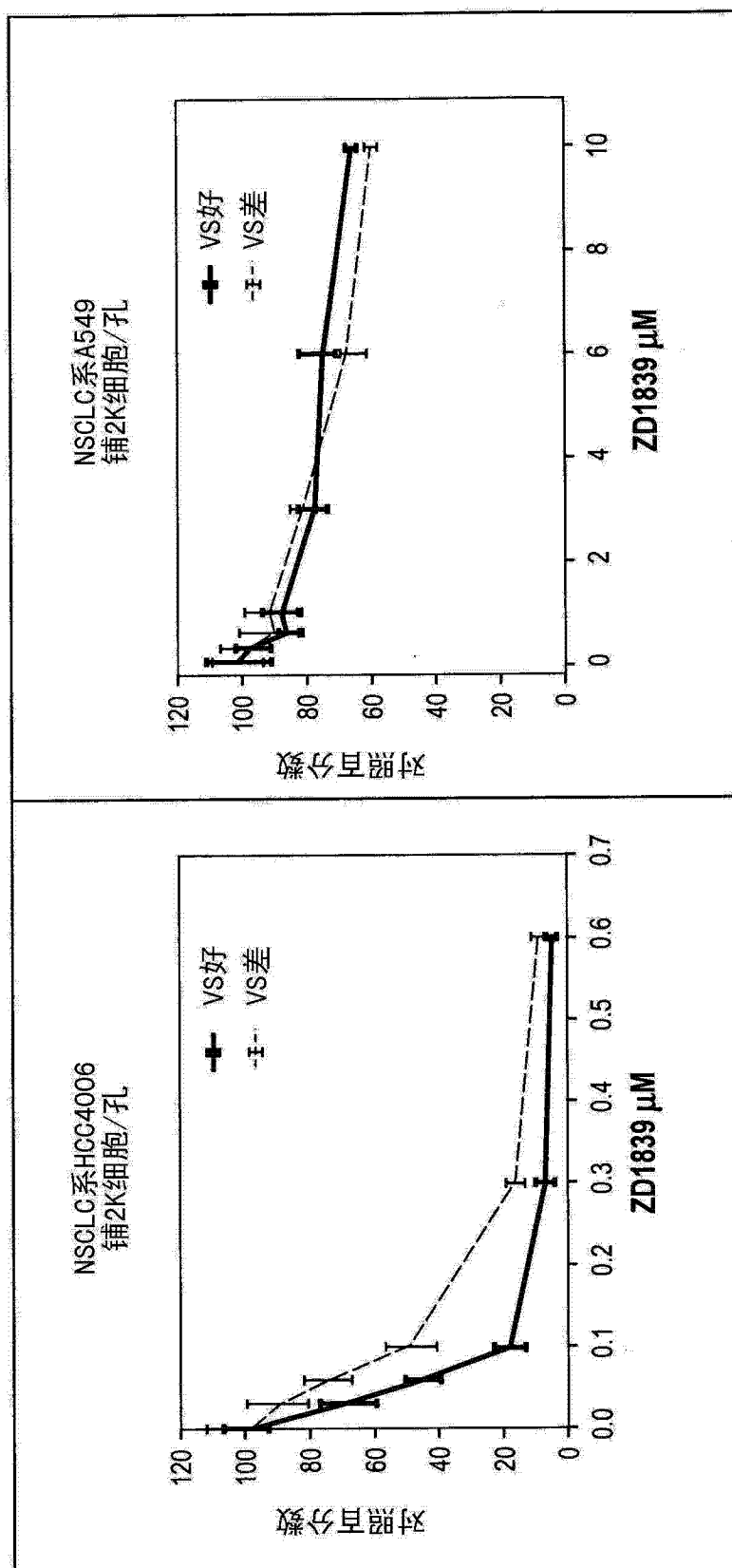


图 8