



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102016579 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 08

(21) 申请号 200880125826. 3

(22) 申请日 2008. 11. 26

(30) 优先权数据

60/991, 616 2007. 11. 30 US

61/038, 699 2008. 03. 21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 07. 29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/084933 2008. 11. 26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/073540 EN 2009. 06. 11

(83) 生物保藏信息

ATCC HB-10709 1991. 03. 29

(73) 专利权人 健泰科生物技术公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 布赖恩·P·施奈德

米兰·拉多维科 乔治·W·斯莱奇

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/50(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2007/0207486 A1, 2007. 09. 06, 摘

要, 权利要求 1-11, 说明书第【0018】、【0092】、

【0120】-【0127】段.

Schneider 等. Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer. 《Breast Cancer Res Treat.》. 2007, 第 111 卷 (第 1 期), 157-163.

Pande 等. Hypertension Secondary to Anti-angiogenic Therapy: Experience with Bevacizumab.. 《ANTICANCER RESEARCH》. 2007, (第 27 期), 3465-3470.

Awata 等. A Common Polymorphism in the 5'-Untranslated Region of the VEGF Gene Is Associated With Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes Diabetes. 《Brief Genetics Report》. 2002, (第 51 期), 1635-1639.

Suganthalakshmi 等. Association of VEGF and eNOS gene polymorphisms in type 2 diabetic retinopathy.. 《Molecular Vision》. 2006, (第 12 期), 336-341.

审查员 樊颖

权利要求书1页 说明书14页

(54) 发明名称

VEGF 多态性和抗血管发生疗法

(57) 摘要

通过对自患者分离的样品筛选特定基因组多态性, 确定患者是否处于与抗 VEGF 疗有关的高血压的特定风险或是否具有较大可能性受益于抗 VEGF 疗法的方法。

1. 对 VEGF-2578C/A 处的基因组多态性特异性的至少一种寡核苷酸在制备试剂中的用途,所述试剂用于一种预测患有乳腺癌的患者是否具有升高的受益于 VEGF 拮抗剂治疗的可能性的方法,其中所述方法包括对自所述患者分离的样品筛选 VEGF-2578C/A 处的基因组多态性,且其中若相应的基因型包含 VEGF-2578AA,则患者具有升高的受益于 VEGF 拮抗剂治疗的可能性。

2. 对 VEGF-1154G/A 处的基因组多态性特异性的至少一种寡核苷酸在制备试剂中的用途,所述试剂用于一种预测患有乳腺癌的患者是否具有升高的受益于 VEGF 拮抗剂治疗的可能性的方法,其中所述方法包括对自所述患者分离的样品筛选 VEGF-1154G/A 处的基因组多态性,且其中若相应的基因型包含 VEGF-1154AA,则患者具有升高的受益于 VEGF 拮抗剂治疗的可能性。

3. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述 VEGF 拮抗剂是抗 VEGF 抗体。

4. 权利要求 3 的用途,其中所述抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。

5. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述患者正在用 VEGF 拮抗剂治疗乳腺癌。

6. 权利要求 5 的用途,其中所述方法进一步包括施用抗肿瘤组合物。

7. 权利要求 1 或 2 的用途,其中所述乳腺癌是转移性乳腺癌。

8. 权利要求 5 的用途,其中所述 VEGF 拮抗剂是抗 VEGF 抗体。

9. 权利要求 8 的用途,其中所述抗 VEGF 抗体是贝伐单抗。

VEGF 多态性和抗血管发生疗法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2007 年 11 月 30 日提交的美国临时申请 No. 60/991,616 和 2008 年 3 月 21 日提交的美国临时申请 No. 61/038,699 的权益,通过述及将其公开内容完整收入本文。

发明领域

[0003] 一般而言,本申请涉及与抗血管发生疗法有关的人类疾病和病症的治疗。具体而言,本发明涉及癌症的抗血管发生疗法,其或是单独施用的或是与其它抗癌疗法组合施用的。

[0004] 发明背景

[0005] 癌症仍然是人类健康的最致命威胁之一,在美国每年影响超过 1 百万新患者。实体瘤对那些死亡大多负有责任。虽然某些癌症的医学治疗取得了显著进展,但是当前的治疗方法相对没有选择性:手术切除患病组织;放射疗法缩小实体瘤;及化学疗法杀死正在快速分裂的细胞。这些治疗方法可导致众多副作用,在有些情况中严重到限制可给予的剂量并如此排除潜在有效药物的使用。

[0006] 血管发生是重要的细胞事件,其中血管内皮细胞增殖、消减和重新组织,从而从现有的血管网络形成新血管。血管发生对于大多数原发瘤的生长及其后续转移是至关重要的。血管内皮细胞生长因子(VEGF),也称作 VEGF-A 或血管通透因子(VPF),被报道成正常和异常血管发生二者的枢轴调节物。Ferrara and Davis-Smyth(1997)Endocrine Rev. 18: 4-25; Ferrara(1999)J. Mol. Med. 77:527-543。

[0007] 抗 VEGF 抗体“贝伐单抗”(Bevacizumab),也称作“BV”、“rhuMAbVEGF”、或“**Avastin**®”,是依照 Presta et al. (1997)Cancer Res. 57:4593-4599 生成的一种重组人源化抗 VEGF 单克隆抗体,当前在美国获得批准用于治疗转移性结肠直肠癌、非小细胞肺癌、和转移性乳腺癌。与其它癌症治疗方法一样,**Avastin**® 疗法与某些副作用有关,包括升高的高血压的风险。

[0008] 当特定基因中的不同等位基因导致不同表型时,群体中存在遗传多态性。此类多态性可以在决定治疗性药物的功效和安全性中发挥作用。例如,已经显示了 VEGF 中的特定多态性与乳腺癌的发病率有关。Schneider et al. (2008)Breast Cancer Research and Treatment 111:157-63。

[0009] 别的预示特定疗法的功效或安全性的多态性的鉴定可用于更好地为那些会最佳地受益于该疗法的患者调整该疗法。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明部分基于 VEGF 中如下的多态性的鉴定,所述多态性在正在经历抗 VEGF 疗法(包括用**Avastin**®)的患者中预示升高的受益于 VEGF 拮抗剂治疗的可能性和/或升高的高血压的风险。

[0012] 一方面,本发明提供一种预测患者是否处于升高的与 VEGF 拮抗剂治疗有关

的高血压的风险的方法,包括对自所述患者分离的样品筛选选自 VEGF(-1498C/T) 和 VEGF(-634G/C) 的基因组多态性,其中若相应的基因型包含 VEGF(-1498C) 或 VEGF(-634G),则患者处于升高的与 VEGF 拮抗剂治疗有关的高血压的风险。在一些实施方案中,所述 VEGF 拮抗剂是抗 VEGF 抗体,例如贝伐单抗。在一些实施方案中,所述治疗进一步包括施用抗肿瘤组合物。在一些实施方案中,所述患者正在治疗癌症,例如乳腺癌。

[0013] 另一方面,本发明提供一种用于预测患者是否处于升高的与 VEGF 拮抗剂治疗有关的高血压的风险的试剂盒,包括对 VEGF 中选自下组的多态性特异性的第一寡核苷酸和第二寡核苷酸:VEGF(-1498C/T) 和 VEGF(-634G/C)。在一些实施方案中,所述试剂盒中的所述寡核苷酸对于扩增 VEGF 中包含这些多态性之一的区域是有用的。

[0014] 另一方面,本发明提供一种预测患者是否具有升高的受益于 VEGF 拮抗剂治疗的可能性的方法,包括对自所述患者分离的样品筛选 VEGF(-2578C/A) 或 VEGF(-1154G/A) 处的基因组多态性,其中若相应的基因型包含 VEGF(-2578AA) 或 VEGF(1154AA),则患者具有升高的受益于 VEGF 拮抗剂治疗的可能性。在一些实施方案中,所述 VEGF 拮抗剂是抗 VEGF 抗体,例如贝伐单抗。在一些实施方案中,所述治疗进一步包括施用抗肿瘤组合物。在一些实施方案中,所述患者正在治疗癌症,例如乳腺癌。

[0015] 另一方面,本发明提供一种用于预测患者是否具有升高的受益于 VEGF 拮抗剂治疗的可能性的试剂盒,包括对 VEGF 中选自下组的多态性特异性的第一寡核苷酸和第二寡核苷酸:VEGF(-2578C/A) 和 VEGF(-1154G/A)。在一些实施方案中,所述试剂盒中的所述寡核苷酸对于扩增 VEGF 中包含这些多态性之一的区域是有用的。

[0016] 发明详述

[0017] 除非另有说明,本发明的实施将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些都在本领域的技术范围内。这些技术在文献中有充分解释,诸如“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”,第二版(Sambrook et al., 1989);“Oligonucleotide Synthesis”(M. J. Gait 编, 1984);“Animal Cell Culture”(R. I. Freshney 编, 1987);“Methods in Enzymology”(Academic Press, Inc.);“Current Protocols in Molecular Biology”(F. M. Ausubel et al. 编, 1987, 及其周期性的更新);“PCR: The Polymerase Chain Reaction”(Mullis et al. 编, 1994)。

[0018] 除非另有定义,本文中所使用的技术和科学术语与本发明所属领域普通技术人员通常的理解具有相同的含义。以下文献为本领域技术人员提供了本申请中所使用的许多术语的一般性指导:Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 第二版, J. Wiley & Sons (New York, N. Y. 1994), 和 March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 第四版, John Wiley & Sons (New York, N. Y. 1992)。

[0019] 通过述及完整收录本文中所引用的所有参考文献(包括专利申请和出版物)。

[0020] 定义

[0021] 如本文中所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“所述”、“该”包括复数,除非上下文另有明确说明。例如,“一个/种”细胞还会包括“多个/种细胞”。

[0022] 术语“包含”意图指组合物和方法包括所叙述的要件,但是不排除其它要件。

[0023] 术语“VEGF”和“VEGF-A”可互换使用,指 165 个氨基酸的血管内皮细胞生长因子及

相关的 121 个、189 个和 206 个氨基酸的血管内皮细胞生长因子,如 Leung et al., Science 246 :1306(1989) 和 Houck et al., Mol. Endocrin. 5 :1806(1991) 所述,及其天然存在等位形式和加工形式。术语“VEGF”还用于指包含 165 个氨基酸的人血管内皮细胞生长因子的氨基酸第 8-109 位或第 1-109 位的截短形式多肽。本申请中可能通过例如“VEGF(8-109)”、“VEGF(1-109)”或“VEGF165”来鉴别任何此类形式的 VEGF。“截短的”天然 VEGF 的氨基酸位置如天然 VEGF 序列中所示编号。例如,截短的天然 VEGF 中的第 17 位氨基酸(甲硫氨酸)也是天然 VEGF 中的第 17 位(甲硫氨酸)。截短的天然 VEGF 具有与天然 VEGF 相当的对 KDR 和 Flt-1 受体的结合亲和力。

[0024] “VEGF 抗体”指以足够亲和力和特异性结合 VEGF 的抗体。优选的是,本发明的抗 VEGF 抗体可在靶向和干扰其中牵涉 VEGF 活性的疾病或疾患时用作治疗剂。抗 VEGF 抗体通常不会结合其它 VEGF 同系物,诸如 VEGF-B 或 VEGF-C,也不会结合其它生长因子,诸如 PlGF、PDGF 或 bFGF。优选的抗 VEGF 抗体是与杂交瘤 ATCC HB 10709 所生成的单克隆抗 VEGF 抗体 A4.6.1 结合相同表位的单克隆抗体。更优选的是,抗 VEGF 抗体是依照 Presta et al., Cancer Res. 57 :4593-4599(1997) 生成的重组人源化抗 VEGF 单克隆抗体,包括但不限于称为 bevacizumab(贝伐单抗;BV;Avastin®)的抗体。

[0025] “VEGF 拮抗剂”指能够中和、阻断、抑制、消除、降低或干扰 VEGF 活性,包括其与一种或多种 VEGF 受体的结合的分子。VEGF 拮抗剂包括抗 VEGF 抗体及其抗原结合片段、受体分子及特异性结合 VEGF 由此使其隔绝与一种或多种受体结合的衍生物、抗 VEGF 受体抗体和 VEGF 受体拮抗剂诸如 VEGFR 酪氨酸激酶的小分子抑制剂。

[0026] 术语“抗体”以最广义使用,包括单克隆抗体(包括全长的或完整的单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、及抗体片段,只要它们展现出期望的生物学活性。

[0027] 术语“单克隆抗体”在用于本文时指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体相同,除了可能以极小量存在的可能的天然存在突变外。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原。此外,与典型的包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,将依照本发明使用的单克隆抗体可通过最初由 Kohler et al., Nature 256 :495(1975) 记载的杂交瘤方法来制备,或者可通过重组 DNA 方法来制备(参见例如美国专利 No. 4,816,567)。“单克隆抗体”还可使用例如 Clackson et al., Nature 352 :624-628(1991) 或 Marks et al., J. Mol. Biol. 222 :581-597(1991) 中记载的技术从噬菌体抗体库分离。

[0028] “病症”指任何会受益于使用抗体的治疗的疾患。这包括慢性和急性病症或疾病,包括那些使哺乳动物倾向于所讨论病症的病理状况。本文中待治疗的病症的非限制性例子包括良性和恶性肿瘤;白血病和淋巴样恶性肿瘤;神经元、神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑和其它腺体、巨噬细胞、上皮、基质和囊胚腔病症;及炎症疾病、血管发生性疾病和免疫学病症。

[0029] 术语“治疗有效量”指在哺乳动物中有效治疗疾病或病症的药物量。在癌症的情况下,治疗有效量的药物可减少癌细胞的数目;缩小肿瘤的尺寸;抑制(即一定程度的减缓,优选阻止)癌细胞浸润入周围器官;抑制(即一定程度的减缓,优选阻止)肿瘤转移;一定

程度的抑制肿瘤生长 ;和 / 或一定程度的减轻一种或多种与病症有关的症状。根据药物可阻止现有癌细胞生长和 / 或杀死现有癌细胞的程度,它可以是细胞抑制性的和 / 或细胞毒性的。对于癌症疗法,体内功效可以通过例如评估总体存活 (OS)、无进展存活 (PFS)、距疾病进展的时间 (TTP)、响应率 (RR)、响应持续时间、和 / 或生活质量来测量。

[0030] “治疗”指治疗性处理和预防性或防范性措施二者。需要治疗的受试者包括早就患有病症的受试者以及要预防病症的受试者。

[0031] 术语“癌症”和“癌性”指或描述哺乳动物中特征通常为细胞生长不受调控的生理疾患。癌症的例子包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、和白血病。此类癌症的更具体例子包括鳞状细胞癌、肺癌 (包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌、和肺的鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌 (gastric or stomach cancer) (包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌 (liver cancer or hepatic carcinoma)、膀胱癌、肝肉瘤 (hepatoma)、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾癌 (kidney or renal cancer)、肝癌 (liver cancer)、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌 (hepatic carcinoma) 及各种类型的头和颈癌,以及 B 细胞淋巴瘤 (包括低级 / 滤泡性非何杰金氏淋巴瘤 (NHL)、小淋巴细胞性 (SL) NHL、中级 / 滤泡性 NHL、中级弥漫性 NHL、高级成免疫细胞性 NHL、高级成淋巴细胞性 NHL、高级小无核裂细胞性 NHL、贮积病 (bulky disease) NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS 相关淋巴瘤、和瓦尔登斯特伦氏 (Waldenstrom) 巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、急性成淋巴细胞性白血病 (ALL)、毛细胞性白血病、慢性成髓细胞性白血病、和移植后淋巴增殖性病症 (PTLD)、以及与癍痣病 (phakomatoses)、水肿 (诸如与脑瘤有关的) 和梅格斯氏 (Meigs) 综合征有关的异常血管增殖。

[0032] 术语“抗肿瘤组合物”指在治疗癌症中有用的组合物,其包含至少一种能够抑制或阻止肿瘤生长或功能和 / 或引起肿瘤细胞破坏的活性治疗剂。适合在抗肿瘤组合物中用于治疗癌症的治疗剂包括但不限于化疗剂、放射性同位素、毒素、细胞因子诸如干扰素、和靶向细胞因子、细胞因子受体或与肿瘤细胞有关的抗原的拮抗剂。优选的是,所述治疗剂是化疗剂。

[0033] “化疗剂”指在癌症治疗中有用的化学化合物。

[0034] “分离的”核酸分子指已经鉴定且与多肽核酸的天然来源中通常与之关联的至少一种污染性核酸分子分开的核酸分子。分离的核酸分子不同于在自然界中发现它时的形式或背景。分离的核酸分子因此与存在于天然细胞中时的核酸分子有区别。然而,分离的核酸分子包括通常表达该多肽的细胞中所包含的核酸分子,例如当所述核酸分子在所述细胞中的染色体定位不同于它在天然细胞中的染色体定位时。

[0035] 术语“多态性”指基因的序列中在群体内变化的位置。多态性由不同的“等位基因”构成。这样的多态性的位置通过其在基因中的位置及在那里找到的不同碱基来鉴别。例如,VEGF-1498C/T 指示 VEGF 基因中第 -1498 位处有 C 和 T 之间的变异。这两种可能的变体 (C 和 T) 是两种不同等位基因。因为基因型由两种分开的等位基因构成,所以在任何一名个体中可观察到数种可能变体之任一 (例如,这个例子是 CC、CT、或 TT)。

[0036] 术语“基因型”指细胞或组织样品中某种基因的特定等位基因。在上文的例子中,CC、CT、或 TT 是 VEGF-1498C/T 多态性处可能的基因型。

[0037] 术语“样品”包括取自患者的细胞或组织样品。例如,样品可包括肿瘤样品、与肿

瘤类型对应的正常组织的样品、取自肿瘤周围区域的组织样品、或血细胞。

[0038] 样品中特定基因型的鉴定可通过本领域技术人员公知的多种方法任一来实施。例如,使用本领域公知的技术,通过克隆等位基因并对它测序,可实现多态性的鉴定。或者,可以自基因组 DNA 扩增基因序列,例如使用 PCR,并对产物测序。下文描述了用于对患者 DNA 分析给定遗传基因座处突变的数种非限制性方法。

[0039] 可使用 DNA 微阵列技术,例如 DNA 芯片装置和用于高通量筛选应用的高密度微阵列和低密度微阵列。用于制作微阵列的方法是本领域已知的,而且包括各种喷墨 (inkjet) 和微量喷射沉积 (microjet deposition) 或点样 (spotting) 技术和工艺、原位或芯片上光刻 (photolithographic) 寡核苷酸合成工艺、和电子 DNA 探针寻址工艺。DNA 微阵列杂交应用已经在基因表达分析及短串联重复 (STR)、单核苷酸多态性 (SNP)、点突变的基因型分析领域中成功应用。别的方法包括干扰 RNA 微阵列及微阵列与其它方法诸如激光捕捉显微解剖 (LCM)、比较性基因组杂交 (CGH) 和染色质免疫沉淀 (ChIP) 的组合。参见例如 He et al. (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.* 593 :117-133 和 Heller (2002) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4 :129-153。其它方法包括 PCR、xMAP、侵入者测定法、质谱术、和焦磷酸测序 (Wang et al. (2007) 593 :105-106)。

[0040] 另一种检测方法是使用与多态性位点交叠且在多态性区域周围具有约 5 个、或约 10 个、或约 20 个、或约 25 个、或约 30 个核苷酸的探针的等位基因特异性杂交。例如,将能够特异性杂交至等位变体的数种探针附着至固相支持物,例如“芯片”。可以通过多种工艺 (包括平板印刷术 (lithography)) 将寡核苷酸结合至固体支持物。使用这些包含寡核苷酸的芯片 (也称作“DNA 探针阵列”) 的突变检测分析记载于例如 Cronin et al. (1996) *Human Mutation* 7 :244。

[0041] 在其它检测方法中,必须首先至少扩增基因的一部分,之后鉴定等位变体。扩增可通过例如 PCR 和 / 或 LCR 或本领域公知的其它方法来实施。

[0042] 在一些情况中,来自受试者的 DNA 中特定等位基因的存在可通过限制酶分析来显示。例如,特定核苷酸多态性可导致包含限制性位点的核苷酸序列,该限制性位点在其它等位变体的核苷酸序列中不存在。

[0043] 在又一个实施方案中,可使用针对切割剂 (诸如核酸酶、羟胺或四氧化锇及哌啶) 的保护来检测 RNA/RNA、DNA/DNA、或 RNA/DNA 异源双链体中的错配碱基 (参见例如 Myers et al. (1985) *Science* 230 :1242)。一般而言,“错配切割”技术如下开始,即提供通过将包含基因等位变体核苷酸序列的对照核酸 (任选经过标记的,例如 RNA 或 DNA) 与自组织样品获得的样品核酸 (例如 RNA 或 DNA) 杂交而形成的异源双链体。用切割双链体中单链区的试剂处理双链的双链体,其中双链体诸如基于对照和样品链间碱基对错配形成的双链体。例如,可以用 RNA 酶处理 RNA/DNA 双链体、用 S1 核酸酶处理 DNA/DNA 杂合物以酶促消化错配区域。或者,可以用羟胺或四氧化锇及哌啶处理 DNA/DNA 或 RNA/DNA 双链体以消化错配区域。在消化错配区域后,在变性聚丙烯酰胺凝胶上根据大小将所得材料分开以确定对照和样品核酸是否具有相同核苷酸序列或它们有哪些核苷酸不同。参见例如美国专利 No. 6, 455, 249 ; Cotton et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 :4397 ; Saleeba et al. (1992) *Meth. Enzymol.* 217 :286-295。

[0044] 电泳迁移率的改变也可用于鉴定特定等位变体。例如,可使用单链构象多态性

(SSCP) 来检测突变型与野生型核酸之间的电泳迁移率差异 (Orita et al. (1989) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 86 :2766 ;Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285 :125-144 和 Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9 :73-79)。将样品和对照核酸的单链 DNA 片段变性并让其复性。单链核酸的二级结构随序列而变化, 所得电泳迁移率改变能够检测甚至单个碱基的变化。DNA 片段可以标记或用经过标记的探针检测。通过使用 RNA (而非 DNA), 其中二级结构对序列中的变化更加敏感, 可增强该测定法的灵敏度。在另一个优选的实施方案中, 该方法基于电泳迁移率变化利用异源双链体分析将双链异双链体分子分开 (Keen et al. (1991) *Trends Genet.* 7 :5)。

[0045] 等位变体的身份还可如下获得, 即分析包含多态性区域的核酸在含有变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶中的移动, 这使用变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 来测定 (Myers et al. (1985) *Nature* 313 :495)。当使用 DGGE 作为分析方法时, 会修饰 DNA 以确保它不会完全变性, 例如通过 PCR 添加解链温度高的、富含 GC 的 DNA 的大约 40bp 的 GC 夹。在另一个实施方案中, 使用温度梯度代替变性剂梯度以鉴定对照和样品 DNA 的迁移率差异 (Rosenbaum 和 Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265 :1275)。

[0046] 用于检测 2 条核酸间至少一个核苷酸的差异的技术的例子包括但不限于选择性寡核苷酸杂交、选择性扩增、或选择性引物延伸。例如, 可以制备寡核苷酸探针, 其中将已知的多态性核苷酸放置在中心 (等位基因特异性探针), 然后在只在找到完美匹配才容许杂交的条件下杂交至靶 DNA (Saiki et al. (1986) *Nature* 324 :163) ;Saiki et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 :6230)。此类等位基因特异性寡核苷酸杂交技术可用于检测基因多态性区域中的核苷酸变化。例如, 将具有特定等位变体核苷酸序列的寡核苷酸附着至杂交膜, 然后将此膜与经过标记的样品核酸杂交。然后, 对杂交信号的分析会揭示样品核酸的核苷酸的身份。

[0047] 或者, 可以与本发明组合使用依赖于选择性 PCR 扩增的等位基因特异性扩增技术。作为引物用于特异性扩增的寡核苷酸可以在分子的中心 (使得扩增依赖于差异杂交) (Gibbs et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17 :2437-2448) 或在一条引物的 3' 末端尽头处 (在适宜的条件下, 可防止错配或缩短聚合酶延伸) (Prossner (1993) *Tibtech* 11 :238 和 Newton et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17 :2503) 携带感兴趣等位变体。此技术也称作“PROBE”, 即探针寡聚物碱基延伸 (Probe Oligo Base Extension)。另外, 可能想要在突变区域中引入新的限制性位点以创建基于切割的检测 (Gasparini et al. (1992) *Mol. Cell. Probes* 6 :1)。

[0048] 在另一个实施方案中, 等位变体的鉴定使用寡核苷酸连接测定法 (OLA) 来进行, 如例如美国专利 No. 4, 998, 617 及 Laridegren, U. et al. *Science* 241 :1077-1080 (1988) 中所记载的。OLA 方案使用设计成能够杂交至靶物单链邻接序列的两种寡核苷酸。将所述寡核苷酸之一连接至分离标志, 例如生物素化的, 并可检测标记另一寡核苷酸。如果在靶分子中找到精确互补的序列, 那么所述寡核苷酸会杂交, 使得它们的末端邻近, 并创建连接底物。然后连接容许经过标记的寡核苷酸使用亲合素或其它生物素配体来回收。Nickerson, D. A. 等人描述了组合 PCR 和 OLA 特性的核酸检测测定法 (Nickerson, D. A. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 :8923-8927)。在此方法中, 使用 PCR 来实现靶 DNA 的指数扩增, 然后使用 OLA 来检测。

[0049] 本发明提供用于检测 VEGF 中单核苷酸多态性 (SNP) 的方法。因为单核苷酸多态性侧翼为不变序列的区域, 所以它们的分析只需要检测单个变异核苷酸的身份, 而且不必为每名患者测定完整基因序列。已经开发了数种方法来推动 SNP 的分析。

[0050] 通过使用专门化外切核酸酶抗性核苷酸, 可检测单碱基多态性, 如例如美国专利 No. 4, 656, 127 中所披露的。依照该方法, 容许与紧挨多态性位点 3' 的等位序列互补的引物杂交至自特定动物或人获得的靶分子。如果靶分子上的多态性位点含有与存在的特定外切核酸酶抗性核苷酸衍生物互补的核苷酸, 那么该衍生物会掺入到杂交引物的末端上。此类掺入使得引物对外切核酸酶有抗性, 并由此容许其检测。因为样品中外切核酸酶抗性衍生物的身份是已知的, 所以引物变得对外切核酸酶有抗性的发现揭示靶分子的多态性位点中存在的核苷酸与反应中使用的核苷酸衍生物互补。此方法的优点在于它不需要测定大量的无关序列数据。

[0051] 一种基于溶液的方法也可用于测定多态性位点的核苷酸的身份 (W091/02087)。如上所述, 采用与紧挨多态性位点 3' 的等位序列互补的引物。该方法使用经过标记的双脱氧核苷酸衍生物来测定该位点的核苷酸的身份, 如果与多态性位点的核苷酸互补的话, 该双脱氧核苷酸衍生物会掺入到所述引物的末端上。

[0052] 一种备选方法记载于 W0 92/15712。此方法使用经过标记的终止物与与多态性位点 3' 的序列互补的引物的混合物。所掺入的经过标记的终止物由所评估的靶分子的多态性位点中存在的核苷酸决定且与该核苷酸互补。该方法通常是异相测定法, 其中将引物或靶分子固定化至固相。

[0053] 用于测定 DNA 中多态性位点的许多其它引物指导核苷酸掺入规程已有记载 (Komher, J. S. et al. (1989) Nucl. Acids. Res. 17 :7779-7784 ; Sokolov, B. P. (1990) Nucl. Acids Res. 18 :3671 ; Syvanen, A. -C., et al. (1990) Genomics 8 :684-692 ; Kuppaswamy, M. N. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :1143-1147 ; Prezant, T. R. et al. (1992) Hum. Mutat. 1 :159-164 ; Ugozzoli, L. et al. (1992) GATA 9 :107-112 ; Nyren, P. et al. (1993) Anal. Biochem. 208 :171-175)。这些方法都依赖于掺入经过标记的脱氧核苷酸以区分多态性位点处的碱基。

[0054] 此外, 可以理解, 上述任何用于检测多态性变体或基因产物或基因改变的方法可用于监测疗程或疗法。

[0055] 本文所述方法可以通过例如利用预包装的诊断试剂盒来实施, 诸如下文所描述的那些, 其包含至少一种探针或引物核酸, 它们可方便地用于例如测定受试者是否处于形成与 VEGF 拮抗剂治疗有关的高血压的风险。

[0056] 供上述诊断和预后方法中使用的样品核酸可以自任何细胞类型或受试者组织获得。例如, 可以通过已知技术获得受试者的体液 (例如血液)。或者, 可以对干样品 (例如毛发或皮肤) 实施核酸测试。

[0057] 本文所述发明涉及用于测定和鉴定 VEGF 基因座处存在的等位基因的方法和组合物。此信息对于预测形成与 VEGF 拮抗剂治疗有关的高血压的风险水平是有用的。探针可用于直接测定样品的基因型, 或者可以与扩增同时或序贯使用。术语“探针”包括天然存在的或重组的单链或双链核酸或化学合成的核酸。它们可以通过切口平移 (nick translation)、Klenow 补平反应、PCR 或本领域知道的其它方法来标记。本发明的探针、它

们的制备和 / 或标记记载于 Sambrook et al. (1989) 见上文。探针可以是适合于选择性杂交至含有本发明多态性区域的核酸的任何长度多核苷酸。所使用的探针的长度会部分取决于所使用的测定法的性质和所采用的杂交条件。

[0058] 经过标记的探针还可以与多态性的扩增联合使用 (Holland et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 :7276-7280)。美国专利 No. 5, 210, 015 记载了用于在 PCR 期间提供扩增产物实时测量的基于荧光的办法。此类办法或是采用嵌入染料 (诸如溴化乙啶) 来指示存在的双链 DNA 的量, 或是采用含有荧光 - 淬灭剂对的探针 (也称作 “Taq-Man” 法), 其中探针在扩增期间遭到切割以释放荧光分子, 其浓度与存在的双链 DNA 的量成正比。在扩增期间, 当杂交至靶序列时, 探针受到聚合酶的核酸酶活性的消化, 从而释放荧光分子, 与淬灭剂分子分开, 由此引起来自报告分子的荧光出现。Taq-Man 法使用与靶多核苷酸含有多态性的区域退火的含有报告分子 - 淬灭剂分子对的探针。

[0059] 可以将探针附着于表面, 以用作 “基因芯片”。通过本领域技术人员知道的多种技术, 此类基因芯片可用于检测遗传变异。在一种技术中, 在基因芯片上排列寡核苷酸, 通过以杂交法进行的测序, 诸如美国专利 No. 6, 025, 136 和 6, 018, 041 中概述的, 用于测定 DNA 序列。还可以将本发明的探针用于遗传序列的荧光检测。此类技术已有记载, 例如美国专利 No. 5, 968, 740 和 5, 858, 659。还可以将探针附着于电极表面, 用于核酸序列的电化学检测, 诸如美国专利 No. 5, 952, 172 及 Kelley, S. O. et al. (1999) Nucl. Acids Res. 27 :4830-4837 中所记载的。

[0060] 另外, 可修饰用于探针或引物的分离的核酸以使其变得更加稳定。例示性的修饰的核酸分子包括 DNA 的氨基磷酸酯 (phosphoramidate)、硫代磷酸酯 (phosphothioate) 和甲基磷酸酯 (methylphosphonate) 类似物 (还可参见美国专利 No. 5, 176, 996 ; 5, 264, 564 和 5, 256, 775)。

[0061] 如上所述, 本发明还提供用于测定 VEGF 中存在的多态性区域的等位变体类型的诊断方法。在一些实施方案中, 所述方法使用包含与该 VEGF 多态性区域互补的核苷酸序列的探针或引物。因而, 本发明提供用于实施这些方法的试剂盒。

[0062] 在一些实施方案中, 本发明提供用于测定受试者是否处于形成与 VEGF 拮抗剂治疗有关的高血压的风险的试剂盒。在一些实施方案中, 本发明提供用于测定受试者是否具有受益于抗 VEGF 疗法的较大可能性的试剂盒。此类试剂盒含有一种或多种上文所述组合物和使用说明书。仅作为例子, 本发明还提供用于测定患者是否处于形成与 VEGF 拮抗剂治疗有关的高血压的风险的试剂盒, 包含对例如下述 VEGF 多态性区域特异性的第一和第二寡核苷酸: VEGF (-2578C/A)、VEGF (-1498C/T)、VEGF (-1154G/A) 或 VEGF (-634G/C)。又例如, 本发明还提供用于确定受试者是否具有受益于抗 VEGF 疗法的较大可能性的试剂盒, 包含对例如下述 VEGF 多态性区域特异性的第一和第二寡核苷酸: VEGF (-2578C/A) 或 VEGF (-1154G/A)。“对 (遗传基因座) 特异性的”寡核苷酸结合所述基因座的多态性区域或在所述基因座的多态性区域的附近结合。对于要用作扩增引物的寡核苷酸, 若引物足够接近以用于生成包含多态性区域的多核苷酸, 则说它们是附近的。在一个实施方案中, 若寡核苷酸在距离多态性约 1-2kb 内, 例如少于 1kb 结合, 则说它们是附近的。特异性的寡核苷酸能够杂交至序列, 而且在合适的条件下会不结合相差单个核苷酸的序列。

[0063] 试剂盒可包含至少一种能够特异性杂交至 VEGF 多态性区域的探针或引物和使用

说明书。所述试剂盒通常包含至少一种上文所述核酸。用于扩增 VEGF 至少一部分的试剂盒一般包含两种引物,其中至少一种能够杂交至等位变体序列。此类试剂盒适合于通过例如荧光检测、电化学检测、或其它检测来检测基因型。

[0064] 试剂盒中所包含的寡核苷酸(用作探针或引物)可以可检测标记。标记物可以直接(例如荧光标记物)或间接检测。间接检测可包括本领域技术人员知道的任何检测方法,包括生物素-亲和素相互作用、抗体结合等等。荧光标记的寡核苷酸还可包含淬灭分子。寡核苷酸可结合至表面。在一些实施方案中,所述表面是硅土或玻璃。在一些实施方案中,所述表面是金属电极。

[0065] 本发明的其它试剂盒包含实施所述测定法所必需的至少一种试剂。例如,所述试剂盒可包含酶。或者,所述试剂盒可包含缓冲液或任何其它必需试剂。

[0066] 试剂盒可包括本文中为测定受试者在 VEGF 多态性区域中的基因型而描述的所有或一些阳性对照、阴性对照、试剂、引物、测序标志物、探针和抗体。

[0067] 下面的实施例仅仅意图例示本发明的实践,而非作为限制而提供。通过述及明确收录将本文中所引用的所有专利和科学文献的完整公开内容。

实施例

[0068] 实施例 1 :VEGF 中的遗传多态性及它们与后果的关联

[0069] E2100 是一项 III 期组间试验,其在将贝伐单抗添加至帕利他塞 (paclitaxel) 来治疗具有先前未治疗的转移性乳腺癌的女性时证明了无进展存活 (PFS) 和响应率 (RR) 的改善。在接受贝伐单抗的女性中看到了显著更多的高血压和蛋白尿。

[0070] 样品

[0071] 我们对来自 E2100 乳腺癌 Avastin 试验的数据实施了回顾测试。该数据集包括 673 名符合条件的患者及 623 例疾病进展事件和 483 例死亡。其中,我们对来自 363 例符合条件的病例(随访中值 43 个月)的石蜡包埋肿瘤块测定了基因型。另外,377 例符合条件的病例可用于 VEGF IHC,而 341 例可用于 VEGFR-2IHC。所有标本是在没有患者标识符或临床结果信息的情况下“盲”分析的。

[0072] 多态性

[0073] 表 1 显示了我们所测试的多态性。

[0074] 表 1 :所测试的单核苷酸多态性 (SNP)

[0075]

基因	单核苷酸多态性 (SNP)	位置	高加索人: 罕见等位基因的频率 ¹	非洲裔美国人: 罕见等位基因的频率 ¹
VEGF	-2578 C/A	启动子	A=49%	A=24%
	-1498 C/T	启动子	C=49%	C=33%
	-1154 G/A	启动子	A=33%	A=10%
	-634 G/C	5' UTR	C=32%	C=35%
	936 C/T	3' UTR	T=15%	T=13%
VEGFR-2	889 G/A (V297I)	外显子7	A=9%	A=20%
	1416 A/T (Q472H)	外显子11	T=25%	T=10%

[0076] 选择这些多态性是因为已知这些基因调控血管发生: 1) 它们涉及血管发生途径; 2) 它们具有已确立的遗传多态性; 3) 多态性的频率足够高, 使得在群体水平它对药物响应的影响会是有意义的; 和 / 或 4) 该多态性能以生物学有关方式改变基因的功能。

[0077] 测定 SNP 的基因型

[0078] 使用 **DNeasy®** 组织试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 自 20 微米石蜡包埋组织切片提取 DNA。通过基于 **Taqman®** 的实时 PCR 测定 SNP 的基因型。每处 SNP 的详情先前已记载于 Schneider, et al. (2007) "Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer." Breast Cancer Res. Treat. 总之, 在 88.2% 的病例中成功测定了基因型。这基于所分析的 SNP 而变化, 而且范围为 82% 至 92% 的成功率。对于所组合的所有 SNP, 精确地评估了来自对照组的 50% 和来自组合组的 50%。

[0079] 蛋白质表达的评估

[0080] 通过来自所提交的肿瘤块的 IHC, 评估了 VEGF 和 VEGFR-2 二者的蛋白质表达。对于 VEGF 评估, 将载玻片脱石蜡, 再水化并在装有 pH 6.0 的柠檬酸盐缓冲液的蒸锅 (vegetable steamer) 中放置 30 分钟。在载玻片冷却至室温后, 将它们在蒸馏水中清洗两次, 接着在含 0.05% Tween™ 20 (Fisher Scientific, Pittsburgh PA) 的磷酸盐缓冲盐水 (PBST) 中清洗两次。然后将载玻片放置在 Dako 自动染色仪 (Dako Cytomation, Carpinteria CA) 上。将载玻片与过氧化物酶封闭液 (Dako, S2001) 一起温育 10 分钟, 接着用 PBST 清洗三次, 总共最少 10 分钟。然后将载玻片序贯地与 1 : 100 稀释的抗 VEGF 抗体 (VG1, Lab Vision, Fremont CA) (60 分钟)、Dako Envision+ (Dako, K4001) (60 分钟) 和 DAB 底物-色原体系统 (Dako, K3466) 一起温育, 各步骤间用 PBST 清洗三次。将载玻片用 Harris 苏木精 (Fisher) 复染色, 脱水, 清洁并和盖上盖玻片。通过对整个载玻片评估具有胞质 VEGF 染色的侵入性肿瘤细胞的百分比来计算 VEGF-inv 得分。

[0081] 对于 VEGFR-2 IHC, 将福尔马林固定、石蜡包埋的乳房肿瘤切片首先脱石蜡并再水化。接着, 在 pH 9.0 的靶物修复液 (S2367, Dako, Carpinteria, CA) 中于 98°C 执行抗原修复 20 分钟。然后于室温应用双重内源酶封闭液 (K4065, EnVision™+Dual Link System-HRP, Dako) 5 分钟。于室温以 1 : 20 施用抗 VEGFR-2 克隆 55B11 家兔单克隆抗体 (#2479, Cell

Signaling Tech., Danvers, MA.) 2 小时。通过 EnVision+ 试剂盒的方案及略微改动来进行 DAB 的信号发生。复染色用苏木精 QS (H-3404, Vector, Burlingame, CA) 进行,接着是脱水和盖盖玻片。人胎盘或肝切片用作阳性对照。省略一抗和用家兔 IgG (X0936, Dako) 替代充当阴性对照。用 H- 得分法进行评分,如下计算: $\sum (u \times \alpha)$, 其中 u 是染色强度 (0 至 3+), 而 α 是以每种强度染色的肿瘤细胞的百分比 (0 至 100) (ref)。

[0082] 统计学

[0083] 使用 Kaplan-Meier 分析来评估事件-时间分布。使用 Cox 的比例危害法来评估基因型与时间对事件结果 (PFS 和 OS) 的关联。基于多重比较的 Bonferroni 修正,显著性水平 = 0.017 对应于每项多态性的总体 I 型出错率 0.05。假设所有比较是独立的,鉴于每项比较的 1.7% 假阳性率,在 21 项比较中发生至少一例假阳性的概率是约 0.3。使用 Fisher 的精确检验以显著性水平 $p = 0.05$ 来评估基因型与 RR (定义为完全响应 / 部分响应对病情稳定 / 病情进展) 和毒性 (3/4 级高血压) 的关联。使用 Kruskal-wallis 检验来研究基因型与表达的关联。对于 RR 和毒性,假设所有比较是独立的,鉴于每项比较的 5% 假阳性率,在 7 项比较中发生至少一例假阳性的概率是约 0.3。分别使用 Cox 的比例危害法和 Wilcoxon 秩和检验来评估表达与时间对事件结果 (PFS 和 OS) 和 RR 的关联。所有 p 值是双边的。

[0084] 基因型与功效的关系

[0085] 如 E2100 中所评估的,以对照组 (单独的帕利他塞) 和组合组 (帕利他塞和贝伐单抗) 二者中的功效比较所有候选基因型 (表 1)。功效参数包括 PFS (E2100 的主要终点)、OS、和 RR。VEGF-2578AA 因型和 VEGF-1154AA 基因型为组合组中的患者预测有利的 OS (表 2)。

[0086] 表 2: VEGF 基因型与总体存活 (OS) 的关系

[0087]

SNP	基因型比较 (以月计的中值OS 和频率)	危害比	置信区间	p值
VEGF -2578	CA (24.4; 42.6%) 对 AA (37.0; 20.8%)	1.78	(98.3%=0.96, 3.32)	0.026
	CC (22.2; 37.6%) 对 AA (37.0; 21%)	1.70	(98.3%=0.91, 3.17)	0.043
	CC (22.2; 37.6%) 对 CA (24.4; 42.6%)	0.99	(98.3%=0.62, 1.58)	0.95
	AA 对 CA+CC	0.58	(95%=0.36, 0.93)	0.023
VEGF -1154	GG (22.3; 56.9%) 对 GA (29.8; 38.8%)	1.60	(98.3%=0.98, 2.60)	0.022
	GG (22.3; 56.95) 对 AA (46.5; 9.4%)	2.69	(98.3%=1.10, 6.59)	0.008
	GA (29.8; 38.8%) 对 AA (46.5; 9.4%)	1.68	(98.3%=0.66, 4.30)	0.19
	AA 对 GA 对 GG	0.62	(95%=0.46, 0.83)	0.001

[0088] 这些基因型没有预测对照组中患者改善的 OS, 也没有预测任一组中卓越的 PFS 或 RR。因为具有 VEGF-2578 AA 基因型的患者的显著改善, 我们与 CA 和 CC 组合基因型比较对 AA 分析了 OS, 而且这项比较展示了有利于 AA 基因型的危害比 0.58 (95% C. I. : 0.36, 0.93; $p = 0.023$)。相应的 PFS 比较揭示了有利于 VEGF-2578AA 基因型的危害比 0.91 (95% C. I. : 0.62, 1.35; $p = 0.65$)。因为 VEGF-1154SNP 中明显的基因 - 剂量效应, 我们评估了基因 - 剂量效应, 而且这展示了有利于 VEGF-1154AA 基因型的危害比 0.62 (95% C. I. : 0.46, 0.83; $p = 0.001$)。对 PFS 同样的基因 - 剂量分析揭示了有利于 VEGF-1154AA 基因型的危害比 0.79 (95% C. I. : 0.62, 1.02; $p = 0.07$) (表 3)。

[0089] 表 3: VEGF 基因型与无进展存活 (PFS) 的关系

[0090]

SNP	基因型比较 (以月计的PFS中值)	危害比	置信区间	p值
VEGF -1154	AA (14.1) 对	0.79	(95%=0.62, 1.02)	0.07

[0091]

	GA (13.5) 对 GG (10.7)			
--	--------------------------	--	--	--

[0092] 对照组的总体存活中值为 25.2 个月, 而组合组为 26.7 个月。组合组中 VEGF-2578AA 和 VEGF-1154AA 基因型的总体存活显著更长, 分别为 37.0 个月和 46.5 个月。

[0093] 我们还组合 VEGF-2578 和 VEGF-1154 的所有基因型并评估与总体存活的关联。有 9 种可能的组合, 其中 4 组具有 3 例或更少的病例, 因此被排除在分析之外。对剩余 5 组分析与存活的关系 (表 4)。在比较 VEGF-2578/-1154AA/AA 基因型与所有其它基因型时, 总体存活有统计学显著的改善 ($p = 0.041$)。

[0094] 表 4 : 组合 VEGF 基因型与总体存活的比较

VEGF 基因型 -2578/-1154	以月计的 总体存活中值	%病例	与组合的其它 基因型比较
AA/AA	49.7	7.6	P=0.041
AA/GA	30.2	11.4	p=0.44
CA/GA	27.1	20.9	p=0.40
CA/GG	22.5	21.5	p=0.038
CC/GG	21.7	32.9	p=0.30
其它	----	5.7	

[0096] 基因型与毒性 (3/4 级高血压) 的关系

[0097] 将所有候选基因型 (表 1) 与最常见、显著的毒性, 即 3/4 级高血压 (根据常用毒性标准) 比较。在总试验 (parent trial) 中接受贝伐单抗的所有患者超过 15% 经历了 3/4 级高血压。我们在试验组中观察到, VEGF-1498C/T 和 -634G/C 二者处的特定等位基因与 3/4 级高血压有关。在与备选基因型相比时, VEGF-634CC 和 VEGF-1498TT 基因型与较少的 3/4 级高血压 (分别为 8% 和 0%) 有强关联 (表 5)。与 CA (21%) 和 AA (22%) 基因型相比时, VEGF-2578CC 基因型 (12%) 中有数目较少的高血压, 但是这没有达到统计学显著性 ($p = 0.32$)。在比较 VEGF-2578CC 与组合备选基因型 (CA/AA) 时, 有关联的趋势 ($p = 0.16$)。类似地, 与组合备选基因型 GA (22%) 和 GG (27%) 相比, VEGF-1154GG 基因型具有较少的高血压 (14%), 但是这没有达到统计学显著性 ($p = 0.15$)。

[0098] 表 5 : VEGF 基因型与 3/4 级高血压的关系

[0099]

单核苷酸多态性	按基因型计的%3/4级高血压 和（绝对数/百分比）	p值
VEGF -634	CC=0% (n=27; 15.3%) 对 GC=22% (n=82; 46.3%) 对 GG=19% (n=68; 38.4%)	0.013
	CC 对 GC+GG	0.005
VEGF -1498	TT=8% (n=60; 33.9%) 对 CT=22% (n=82; 46.3%) 对 CC=23% (n=35; 19.8%)	0.056
	TT 对 CC+CT	0.022

[0100] 基因型与表达 (IHC) 的关系

[0101] 将所有候选基因型（表 1）与 VEGF 和 VEGFR-2 二者的原发性肿瘤表达（通过 IHC 评估）比较。通过 VEGF_inv 得分评估 VEGF 表达程度，其中 VEGF_inv 得分的范围为 0 至 100（基于具有胞质 VEGF 染色的侵入性细胞的百分比）。通过 H 得分评估 VEGFR-2 表达的程度，其中 H 得分的范围可以是 0（未检测到表达）至 300（100% 的细胞具有最大的 3+ 表达）。对整个群体，将基因型与 VEGF 表达比较，而且没有测定到统计学显著关联。对于 VEGF-2578 基因型，有基因型与 VEGF_inv 得分之间关联的趋势。在与备选基因型（CA = 54（标准偏差 = 37）和 CC = 61（标准偏差 = 37））比较时，AA 基因型的得分均值较低（AA = 48（标准偏差 = 40）），但是这没有达到统计学显著性（ $p = 0.08$ ）。VEGF-1154AA 基因型也具有比备选基因型（GA = 53（标准偏差 = 38）和 GG = 58（标准偏差 = 37））低的表达均值（AA = 42（标准偏差 = 40）），但是这也没有达到统计学显著性（ $p = 0.13$ ）。无一基因型与 VEGFR-2 表达有关。

[0102] VEGF 和 VEGFR-2 表达与临床后果的关系

[0103] 将原发性肿瘤表达（通过 IHC 评估）与 E2100 中的结果（RR、PFS 和 OS）比较。在 VEGF 或 VEGFR-2 任一表达与结果之间没有统计学显著关联。这在评估对照组、组合组、或整个群组时是真的。