(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0092597
(43) 공개일자 2012년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/015* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7009670
(22) 출원일자(국제) 2010년09월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년04월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/049545
(87) 국제공개번호 WO 2011/035274
국제공개일자 2011년03월24일
(30) 우선권주장
61/276,969 2009년09월18일 미국(US)

(71) 출원인
아브락시스 바이오사이언스, 엘엘씨
미국 90025 캘리포니아주 로스앤젤레스 스위트 2100 윌샤이어 불바드 11755
(72) 발명자
트리에우 부옹
미국 캘리포니아 91302 칼라바사스 노스 시노투스 플레이스 3965
데자이 네일
미국 캘리포니아 90025 로스앤젤레스 스위트 2000 윌셔어 불바드 11755
(74) 대리인
이훈, 이두희

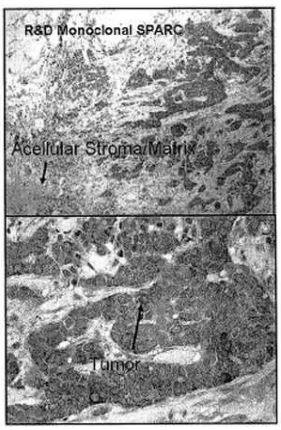
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **암 치료에 있어 ＳＰＡＲＣ 미세환경 시그니처의 용도**

(57) 요 약

이 발명은 화학요법, 방사선 요법, 수술 요법과 조합 요법을 포함한 치료법에 대한 반응을 예측하는 다변수 항-SPARC 항체를 기초로한 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

a. 면역조직학용 복수의 종양의 조직학적 절편을 제조하고;

b. 제일 항-SPARC 항체로 하나 이상의 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제일 항-SPARC 항체는 종양 세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며;

c. 제이 항-SPARC 항체로 하나 이상의 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제이 항-SPARC 항체는 섬유아세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며;

d. 제일 항-SPARC 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내의 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경조직과 정상 해부의 염색과, 제이 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내의 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직과 정상 해부의 염색을 측정하여, SPARC 미세환경 시그니처(SMS) 측정하고;

e. 종양 SMS가 기정 SMS의 기준을 만족시키면 치료적 유효량의 화학요법제를 투여하는 것을 포함하는

화학요법으로 포유류의 종양을 치료하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 기정 SMS가 제일 항체로 양성을 염색하는 최소한 49%의 스트로마와, 제이 항체로 염색하는 최소한 66의 섬유아세포 스코어, 41의 섬유아세포 강도, 26의 종양 강도, 51의 염증성 세포 강도, 55의 염증성 세포 스코어, 33의 혈관 %, 54의 종양 스코어, 64의 혈관 강도, 54의 섬유아세포 %, 64의 혈관 강도, 43의 염증성 세포 %, 62의 스트로마 스코어를 갖는 복합 프로파일로 항체 염색하는 것을 포함하고, 여기서 치료법은 nab-파클리탁셀을 함유하는 요법이고 종양은 췌장암인 방법.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 종양을 구강종양, 인두종양, 소화계종양, 호흡계종양, 골종양, 연골종양, 골전이병, 육종, 피부종양, 흑색종, 유방종양, 생식계종양, 요로종양, 안구공종양, 뇌와 중추신경계종양, 교세포종, 내분비계종양, 갑상선종양, 식도종양, 위종양, 소장종양, 결장종양, 직장종양, 항문종양, 간종양, 담낭종양, 췌장종양, 후드종양, 폐종양, 기관지종양, 비-소세포 폐암종, 소세포 폐암종, 자궁경관종양, 자궁내분비 선종양, 난소종양, 음부종양, 질종양, 전립선암종, 고환종양, 음경종양, 방광종양, 신장종양, 신우종양, 요관종양, 머리와 목종양, 부갑상선 암, 호지킨 병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병에서 선택하는 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 종양이 췌장암인 방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류가 사람인 방법.

청구항 6

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 화학요법에 파클리탁셀을 함유하는 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 화학 요법에 nab-파클리탁셀을 함유하는 방법.

청구항 8

a. SPARC 미세환경 시그니처(SMS)를 얻기 위하여 복수의 종양의 조직학적 절편을 제조하고;

b. 제일 항-SPARC 항체로 하나 이상의 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제일 항-SPARC 항체는 종양 세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며;

c. 제이 항-SPARC 항체로 하나 이상의 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제이 항-SPARC 항체는 섬유아세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며;

d. 제일 항-SPARC 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내의 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경조직과 정상 해부의 염색과, 제이 항체로 종양 혈관, 종양 스트로마의 염색을 측정하고;

e. 기정 SMS가 항체 염색에 의하여 증명되면 화학 요법에 대한 양성 반응을 예측하는 것을 포함하는 화학요법으로 포유류의 종양 반응을 예측하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 기정, SMS가 제일 항체로 양성을 염색하는 최소한 82%의 스트로마와, 제이 항체로 염색하는 최소한 87의 섬유아세포 스코어, 68의 섬유아세포 강도, 49의 종양 강도, 42의 염증성 세포 강도, 67의 염증성 세포 스코어, 68의 혈관 %, 76의 종양 스코어, 46의 혈관 강도, 51의 섬유아세포 %, 75의 혈관 강도, 59의 염증성 세포 %와 62의 스트로마 스코어를 갖는 복합프로파일로 항체 염색하는 것을 포함하고, 여기서 치료법은 nab-파클리탁셀을 함유하는 요법이고 종양은 췌장앙인 방법.

청구항 10

제 8항 중 또는 제 9항에 있어서, 종양을 구강종양, 인두종양, 소화계종양, 호흡계종양, 골종양, 연골종양, 골전이병, 육종, 피부종양, 흑색종, 유방종양, 생식계종양, 요로종양, 안구공종양, 뇌와 중추신경계종양, 교세포종, 내분비계종양, 갑상선종양, 식도종양, 위종양, 소장종양, 결장종양, 직장종양, 항문종양, 간종양, 담낭종양, 췌장종양, 후드종양, 폐종양, 기관지종양, 비-소세포 폐암종, 소세포 폐암종, 자궁경관종양, 자궁내분비 선종양, 난소종양, 음부종양, 질종양, 전립선종양, 전립선암종, 고환종양, 음경종양, 방광종양, 신장종양, 신우종양, 요관종양, 머리와 목종양, 부갑상선 암, 호지킨 병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병에서 선택하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 종양이 췌장암인 방법.

청구항 12

제 8항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류가 사람인 방법.

청구항 13

제 8항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 화학요법에 파클리탁셀을 함유하는 방법.

청구항 14

제 8항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서, 화학요법에 nab-파클리탁셀을 함유하는 방법.

청구항 15

종양을 갖는 포유류가 그 종양의 낮은 위험의 진행을 가질때

a. SPARC 미세환경 시그니처(SMS)를 얻기 위하여 복수의 종양의 조직학적 절편을 제조하고;

b. 제일 항-SPARC 항체로 하나 이상의 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제일 항-SPARC 항체는 종양 세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며;

c. 제이 항-SPARC 항체로 하나 이상의 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제이 항-SPARC 항체는 섬유아세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며;

d. 제일 항-SPARC 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내의 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직과 정상 해부의 염색과, 제이 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내의 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직과 정상 해부의 염색을 측정하고;

e. 종양 SMS가 기성 SMS의 기준을 만족시키면 낮은 위험의 진행임을 측정하는 것을 포함하는 예측 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서, 종양이 유방암이고 기성 SMS가 제일 항체로 양성을 염색하는 최소한 82%의 스트로마와, 제이 항체로 염색하는 최소한 87의 섬유아세포 스코어, 68의 섬유아세포 강도, 49의 종양 강도, 42의 염증성 세포 강도, 67의 염증성 세포 스코어, 68의 혈관 %, 76의 종양 스코어, 46의 혈관 강도, 51의 섬유아세포 %, 75의 혈관 강도, 59의 염증성 세포 %와 62의 스트로마 스코어를 갖는 복합 프로파일로 항체 염색하는 것을 포함하고, 여기서 치료법은 nab-파클리탁셀을 함유하는 요법이고 종양은 췌장암인 방법.

청구항 17

제 15항 또는 제 16항에 있어서, 종양을 구강종양, 인두종양, 소화계종양, 호흡계종양, 골종양, 연골종양, 골전이병, 육종, 피부종양, 흑색종, 유방종양, 생식계종양, 요로종양, 안구공종양, 뇌와 중추신경계종양, 교세포종, 내분비계종양, 갑상선종양, 식도종양, 위종양, 소장종양, 결장종양, 직장종양, 항문종양, 간종양, 담낭종양, 췌장종양, 후드종양, 폐종양, 기관지종양, 비-소세포 폐암종, 소세포 폐암종, 자궁경관종양, 자궁내분비 선종양, 난소종양, 음부종양, 질종양, 전립선종양, 전립선암종, 고환종양, 음경종양, 방광종양, 신장종양, 신우종양, 요관종양, 머리와 목종양, 부갑상선 암, 호지킨 병, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 백혈병, 급성 림프구 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병에서 선택하는 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 종양이 췌장암인 방법.

청구항 19

제 17항에 있어서, 종양이 유방암인 방법.

청구항 20

제 15항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류가 사람인 방법.

청구항 21

제 15항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류를 파클리탁셀을 함유하는 화학요법으로 치료하는 방법.

청구항 22

제 15항 내지 제 17항 중 어느 한 항에 있어서, 화학요법에 nab-파클리탁셀을 함유하는 방법.

청구항 23

a, i 공지의 치료 성과를 갖는 다른 포유류에서 나온 복수의 종양의 조직학적 절편을 제조하고;

ii 제일 항-SPARC 항체로, 공지의 치료 성과를 갖는 다른 포유류의 하나 이상의 각 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제일 항-SPARC 항체는 종양 세포에서 SPARC을 우선적으로 염색하며;

iii 제이 항-SPARC 항체로, 공지의 치료 성과를 갖는 다른 포유류의 하나 이상의 각 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제이 항-SPARC 항체는 섬유아세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며;

iv 제일 항-SPARC 항체로, 공지의 치료 성과를 갖는 다른 포유류의 종양 또는 이들의 조합물 내의 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직과 정상 해부에 대한 공지의 치료 성과를 갖는 다른 포유류의 각 종양의 항체 염색 패턴과, 제이 항체로, 공지의 치료 성과를 갖는 다른 포유류의 종양과 이들의 조합물 내의 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직과 정상 해부의 항체 염색을 측정하여, 공지의 치료 성과를 갖는 다른 포유류의 각 종양의 SMS를 측정하고;

v 공지의 치료 성과를 갖는 다른 포유류의 각 종양의 종양 SMS를 둘 이상의 성과 그룹으로 균주군 형성하고, 여기서 각 성과 그룹의 SMS 중심은 예측 SMS로 정의하는 것으로 이루어지는 치료에 대한 둘 이상의 예측 SMS를 측정하고;

b. i 제일 포유류의 복수의 종양의 조직학적 절편을 제조하고;

ii 제일 항-SPARC 항체로, 제일 포유류의 하나 이상의 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제일 항-SPARC 항체는 종양 세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며;

iii 제이 항-SPARC 항체로, 제일 포유류의 하나 이상의 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제이 항-SPARC 항체는 섬유아세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며;

iv 제일 항-SPARC 항체로, 제일 포유류의 종양 또는 이들의 조합물 내의 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경조직과 정상 해부에 대한 제일 포유류 종양의 항체 염색 패턴과, 제이 항체로, 제일 포유류의 종양 또는 이들의 조합물 내의 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직과 정상 해부의 제일 포유류의 종양을 항체 염색을 측정하여, 제일 포유류의 SMS를 측정하는 것을 포함하는 과정에 의하여 제일 포유류의 종양의 SMS를 측정하고;

c. 제일 포유류의 SMS에서 (a)에서 측정된 예측 SMS까지 종양의 유클리드 거리를 측정하고 최조밀 예측 SMS를 갖는 성과 그룹의 멤버로서 제일 포유류의 종양을 분류하고;

d. 제일 포유류의 SMS의 종양이 치료에 반응하는 성과 그룹에 위치하면 제일 포유류에 치료적 유효량의 치료제를 투여하는 것을 포함하는 치료법으로 제일 포유류의 종양을 치료하는 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서, 제일 포유류의 종양이 공지 치료 성과를 갖는 다른 포유류의 종양과 동일한 형인 방법.

청구항 25

제 23항에 있어서, 치료법에 nab-파클리탁셀을 함유하는 방법.

청구항 26

제 23항에 있어서, 제일 포유류의 종양이 췌장암인 방법.

청구항 27

제 23항에 있어서, 공지의 치료 성과를 갖는 다른 포유류의 각 종양의 종양 SMS의 균주군 형성을 하나 이상의 K-평균, 자체 조직화 지도와 계층적 균주군 형성에 의하여 행하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 이 출원은 2009년 09월 18일자 제출된 미국 가특허번호 61/27,969의 이점을 청구한 것이고, 이 특허출원은 참고적으로 여기에 혼입되어 있다.

[0002] 여기에 기술된 이 발명은 다른 SPARC 항체로 관찰된 이질성 면역조직학의 개발을 기초로한 암치료의 새로운 방법을 제공한다.

배 경 기 술

[0003] 시스테인의 풍부한, 산성 분비 단백질(또한 오스테오넥틴, BM40, 또는 SPARC로 알려져 있음) (이후 "SPARC"라 한다)은 세포 형상의 변화를 유도하고, 세포-순환 진행을 억제하고, 세포외 기질의 합성에 영향을 미치는 기질-관련 단백질을 뜻한다(Bradshaw 등, Proc. Nat. Acad. Sci. 미국 100: 6045-6050 (2003)). 마우스 SPARC 유전자는 1986년에 클론화 되었고 (Mason 등, EMBO J. 5: 1465-1472 (1986) 전장 사람 SPARC cDNA는 1987년에 클론화되고 서열화되었다(Swaroop 등, Genomics 2: 37-47 (1988). SPARC 발현은 발전적으로 조절되고 정상 발육하는 동안 또는 상처에 대한 반응에 개조를 받는 조직에서 우세하게 발현하고, 예를들면 높은 수준의 SPARC 단백질은 뼈와 치아 발육에 발현된다(참조. 예를들어, Lane 등, FASEB J., 8, 163 173 (1994); Yan & Sage, J. Histochem. Cytochem. 47:1495-1505 (1999)).

[0004] SPARC는 몇몇 공격성 암에서는 조절되지 않지만, 해당 정상 조직에는 존재하지 않는다(Porter, 등. J. Histochem. Cytochem., 43, 791 (1995)). SPARC 발현은 여러가지 종양(예를들어, 방광, 간, 난소, 신장, 장과

유방)사이에서 유발된다. 방광암에서, 예를들어. SPARC 발현은 진전된 암종과 연관된다. 단계 T2 또는 그 이상의 침입성 방광 종양이 나타나서 단계 T1의 방광 종양보다 더 높은 수준의 SPARC(또는 그 이하의 외면의 종양)가 발현하고, 더 불량한 예후를 갖는다(참조, 예를들어, Yamanaka 등., J. Urology, 166, 2495 2499 (2001)). 수막종에서, SPARC 발현은 침입성 종양만이 관련된다(참조, 예를들어, Rempel 등., Clincal Cancer Res., 5, 237-241 (1999)). 또한 SPARC 발현은 74.5%의 침입성 유방 암종 병변의 원위치(참조, 예를들어, Bellahcene 등., Am. J. Pathol, 146, 95-100 (1995))와, 54.2%의 유방 유관 상피내 암종의 침윤(참조, 예를들어, KIM 등., J Korean Med. ScL, 13, 652-657 (1998))에서 검출된다. 또한. SPARC 발현은 유방암에서 흔한 미세석회화와 관련되고(참조, 예를들어, 상기한 Bellahcene 등.,), SPARC 발현은 뼈에 대한 유방전이 친화성에 있는 것으로 예상된다.

[0005] 놀랍게도, 또한 SPARAC는 몇몇 시스템에서 항-종양 활성을 갖는 것으로 나타났다. SPARC는 mid-G_1의 세포를 억제하는 강한 세포 순환 억제제이고(Yan & Sage, J. Histochem. Cytochem. 47:1495-1505 (1999))이고, SPARC의 유도성 발현은 생체외 모델계에서 유방암 세포증식을 억제하는 것으로 나타나 있다(Dhanesuan 등, Breast Cancer Res. Treat. 75:73-85 (2002)). 비슷한 것으로, 외인성 SPARC는 농축-의존 방법으로 두 HOSE(사람 난소 표면 상피)와 난소 암세포의 증식을 감소시킬 수 있다. 더불어, SPARC는 난소 암세포의 세포 자연사를 유도한다. 더우기, 난소 상피 세포와 같은 세포에 관한 SPARC 수용체가 보고되어 있다. 이들 수용체에 SPARC의 결합은 SPARC의 종양 억제 기능을 매개하는 유발 조직-특이적 신호 경로일 것이다(Yiu 등, Am. J. Pathol. 159:609-622 (2001)). 또한 정제된 SPARC는 맥관 형성을 억제하고 생체내 이종이식 모델계에서 신경아세포종 성장을 손상시키는 것으로 보고되어 있다(Chlenski 등, Cancer Res. 62:7357-7363 (2002)).

[0006] 이러한 외관상 일치하지 않는 결과는 SPARC의 여러가지 형태에 기인하고, 이들은 미숙한 SPARC의 후 번역수식과 상위한 스플라이싱을 가져온다. 더불어, SPARC는 차별적으로 글리콜실화된다(참조. Kaufman 등., Glycobiology 14(7): 609-619 (2004)). SPARC는 여러가지 프로테아제에 의하여 쉽게 붕괴되고 세포외 환경에서 반전되는 것으로 나타난다. 세포외 프로테아제에 의한 SPARC의 반전은 새로운 SPARC 에피토프의 노출을 가져온다(Lane & Sage, FASEB J. 8 (2): 163-173 (1994)). 이러한 인자는 광범위한 면역조직학적 염색 패턴을 가져온다. 각 항체는 현저히 다른 염색 패턴을 생성시킬 수 있다.

[0007] 암은 현재 하나 또는 세가지 형의 치료: 수술, 방사선과 화학요법의 조합으로 주로 치료된다. 일반적으로 수술은 암의 초기 단계를 치료하는데만 효과적이다. 50%이상의 암개에 있어서, 이들은 진단되는 시간에 따라 이들이 효과적 수술 치료 후보는 아니다. 방사선 치료는 초기에 임상적으로 위치하는 질병으로 존재하는 개인에 대하여서만 효과가 있고 전이를 갖는 후기 단계의 암에는 효과가 없다.

[0008] 화학요법에는 세포복제 또는 세포 대사의 파괴가 있다. 화학요법은 효과적이나, 몇가지 부작용, 예를들어. 구토, 낮은 백혈구(WBC), 모발손실, 체중감소와 기타 중독작용이 있다. 심한 중독 부작용 때문에, 여러개개의 암은 완전한 화학치료 요법을 성공적으로 끝낼 수가 없다. 화학요법-유도된 부작용은 개개의 생명질에 현저하게 나쁜 영향을 주고 치료하는 개개의 유순도에 극적으로 영향을 미칠 수 있다. 더불어, 화학요법제와 관련되는 유해 부작용은 일반적으로 이들 약제투여에 있어 주 투약량-한정 독성(DLT)이 있다. 예를들면, 점막염은 항대사제 세포독성제 5-U, 메토트레사이트와, 독소루비산과 같은 항종양 항생물질을 포함한 몇몇 항암제의 주투약량 한정 독성이다. 많은 이들 화학요법-유도된 부작용에 있어 심하면 입원해야하고, 또는 통증치료용 진통제로 치료해야 한다. 몇몇 개개의 암은 화학요법에 대한 불량한 내성으로 인하여 사망할 수 있다. 항암제의 극한 부작용은 불량한 표적 특이성을 야기시킨다. 약제는 의도되는 표적의 암은 물론 가장 정상적인 기관을 순환한다. 또한 부작용을 일으키는 불량한 표적 특이성은 약제의 분획만이 정확하게 표적되기 때문에 화학요법의 효능은 감소한다. 화학요법의 효능은 표적 종양내의 항암제의 불량한 보존으로 더 감소된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 암의 심도와 폭에 따라, 수술, 화학요법과 방사선 치료의 결점을 극복하기 위하여, 이와 같은 질병 또는 장애의 효과적인 치료가 크게 필요한 것이다. 특히, 화학요법과 연관되는 일련의 부작용을 보아, 종양이 화학치료 요법에 반응하는지 또는 하지 않는지를 확인할 필요가 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 이 발명은 공지의 치료 성과를 갖는 다른 포유류로부터 종양의 복수의 조직학적 절편을 제조하고; 제일 항-

SPARC 항체로, 공지된 치료 성과를 갖는, 다른 포유로부터 각 종양의 하나 이상의 조직학적 절편을 항체로 염색하고, 여기서 제일 항-SPARC 항체는 종양 세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며; 제이 항-SPARC 항체로, 공지의 치료 성과를 갖는, 다른 포유류로부터의 각 종양의 하나 이상의 조직학적 절편을 항체로 염색하고, 여기서 제이 항-SPARC 항체는 섬유아세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며; 제일 항-SPARC 항체로 종양 또는 이들의 조합물내에서 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경조직, 정상 해부에 대한 공지의 치료 성과를 갖는 다른 포유류로부터의 각 종양의 패턴을 항체로 염색하고 제이 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내에서 종양세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관 신경 조직, 정상 해부를 항체 염색하여 측정하므로서, 공지의 치료 성과를 갖는, 다른 포유류로부터 각 종양의 SPARC 미세환경 시그니처("SMSs")를 측정하고; 둘 이상의 성과 그룹으로 공지의 성과를 갖는, 다른 포유류로부터 각 종양의 종양 SMSs으로 균주군을 형성하고, 여기서 각 성과 그룹에서 나온 균주군의 SMS중심으로 예측 SMS를 정의하는 것으로 이루어지는 둘 이상의 치료용 예측 SPARC 미세환경 시그니처(SMSs)를 측정하여서 하는 치료를 갖는 제일 포유류 종양의 치료방법을 제공한다. 다음, 제일 포유류에서 나온 SMS는 제일 포유류로부터 종양의 복수의 조직학적 절편을 제조하고; 제일 항-SPARC 항체로 제일 포유류로부터의 하나 이상의 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제일 항-SPARC 항체는 종양세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며; 제이 항-SPARC 항체로 제일 포유류로부터의 종양의 하나 이상의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 이차 항-SPARC 항체는 섬유아세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며; 제일 항-SPARC 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내에서 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직, 정상 해부에 대한 제일 포유류에서 종양의 패턴을 항체 염색하고, 제이 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내에서 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직, 정상 해부의 제일 포유류에서 나온 종양을 항체 염색하여 측정하므로서, 제일 포유류의 종양 SMS를 측정하고; (a)에서 측정된 예측 SMSs에 대한 제일 포유류의 종양 SMS의 유클리드 거리를 측정하고 최대 근접 예측 SMS를 갖는 성과 그룹의 멤버로서 제일 포유류을 종양을 분류하여서 하는 방법으로 측정된다. 제일 포유류의 종양 SMS가 치료에 반응하는 성과 그룹에 위치하면 제일 포유류에 치료적 유효량의 치료제를 투여한다. 이 발명에 따른 구성에 있어, 제일 포유류에서 동일한 종양형이 연구된 모든 "다른 포유류"에서와 동일한 것을 포함된다. 사용될 수 있는 어떠한 적당한 요법에는 화학 요법, 방사선 요법, 외과적 요법, 선택적 요법과 이들의 조합이 있다. 적당한 요법제는 예를들어 nab-파클리탁셀인 것을 포함한다. 종양은 유방암, 췌장암과 흑색종이 적합하다. 균주군 형성은 예를들어, K-평균 균주군 형성, 자체 조직화 지도와 계층적 균주군 형성을 포함한, 적당한 방법으로 행한다.

[0011] 이 발명은 화학 요법 또는 다음의 다른 적합한 요법으로 포유류의 종양을 치료하는 방법을 제공한다:

[0012] a. SPARC 미세환경 시그니처(SMS)를 얻기위하여 복수의 종양의 조직학적 절편을 제조,

[0013] b. 제일 항-SPARC 항체로 종양의 조직학적 절편을 항체 염색, 여기서 제일 항-SPARC 항체는 종양 세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며,

[0014] c. 제이 항-SPARC 항체로 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제이 항-SPARC 항체는 섬유아세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며,

[0015] d. 제일 항-SPARC 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내의 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직, 정상 해부의 염색과 제이 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내에서 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직, 정상 해부의 염색을 측정하고,

[0016] e. 측정된 SMS가 화학 요법 또는 기타 적당한 요법의 사용을 나타내는 기정 SMS의 기준을 만나면 치료적 유효량의 치료제를 투여한다.

[0017] 요법의 사용을 나타내는 이 발명에 의하여 제공되는 기정 SMSs는 제일 항체로 양성을 염색하는 최소한 49%의 스트로마와 제이 항체로 염색한 최소한 66의 섬유아세포 스코어, 41의 섬유아세포 강도, 26의 종양 강도, 51의 염증성 세포 강도, 55의 염증성 세포 스코어, 33의 혈관 %, 54의 종양 스코어, 64의 혈관 강도, 54의 섬유아세포 %, 64의 혈관 강도, 43의 염증성 세포 %와 62의 스트로마 스코어로 항체 염색하는 것으로 이루어지는 것을 포함하며, 여기서 치료법은 nab-파클리탁셀을 함유하는 요법이고 종양은, 즉 요법을 사용해야 함을 나타내는 종양에서 SPARC 발현에서 나온 이들 16기준을 갖는 SMS를 사용한 췌장암이다: 또한 이 발명에 따른 이와 같은 기정 SMSs와 기정 SMSs의 이러한 그룹에서 종양에서 SPARC 발현의 2~15 이들 기준만으로 이루어지는 것을 포함한다.

[0018] 이 분야의 당업자는 부가적 기정 SMSs가 다른 일련의 종양의 균주군 분석에 의하여 확인될 수 있음을 쉽게 인식할 수 있을 것이다.

[0019] 또한 이 발명은 화학 요법 또는 다음과 같은 적당한 요법으로 포유류에서 종양의 반응을 예측하는 키트를 제공한다:

[0020] a. 제일 항-SPARC 항체로 항체 염색, 여기서 제일 항-SPARC 항체는 종양 세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며,

[0021] b. 제이 항-SPARC 항체로 항체 염색, 여기서 제이 항-SPARC 항체는 섬유아세포에서 SPARC를 우선적으로 염색한다.

[0022] 또한, 이 발명은 SPARC 미세환경 시그니처(SMS)를 얻기 위하여 종양의 복수를 조직학적 절편을 제조하고, 제일 항-SPARC 항체로 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제일 항-SPARC 항체는 종양 세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며, 제이 항-SPARC 항체로 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 제이 항-SPARC 항체는 섬유아세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며, 제일 항-SPARC 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내에서 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직, 정상 해부의 염색과 제이 항체로 종양 또는 이들의 조합물 내에서 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질, 혈관, 신경 조직, 정상 해부의 염색을 측정하고, 화학 요법 또는 기정 SMS일때 낮은 위험의 진행 또는 사망인 것에 대한 반응을 양성으로 예측하는 것으로 이루어지는 화학 요법 또는 기타 적당한 요법과 종양을 갖는 포유류가 종양에서 낮은 위험의 진행 또는 사망을 갖는지 여부에 대한 반응을 예측하는 방법을 제공한다.

[0023] 또한 이 발명은 항-SPARC 항체로 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 여기서 항-SPARC 항체는 MAB 941 단클론성 항체에 의하여 인식되는 에피토프를 인식하며, 항-SPARC 항체로 조직학적 절편에서 종양 세포를 염색할 때 화학 요법으로 불량한 반응을 예측하여서 하는, 병리학적 반응, 전체 생존 또는 진행 무생존에 한정되는 것은 아니나 정의된 반응을 갖는 화학 요법에 대한 포유류에서 종양의 반응을 예측하는 방법을 제공한다. 특히, 이 발명은 화학 요법에 대한 췌장암의 반응을 예측하는 방법을 제공하며, 여기서 화학요법은 알부민 결합 나노입자 파클리탁셀과 겜시타빈의 투여를 포함한다.

[0024] 또한, 이 발명은 AF 941 다클론성 항체에 의하여 인식되는 면역우성 에피토프를 인식하는 항-SPARC 항체로 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하고, 항-SPARC 항체로 조직학적 절편에서 종양 세포를 염색할 때 화학 요법에 대한 양성 반응을 예측하는 것으로 이루어지는 화학 요법에 대한 포유류의 종양 반응을 예측하는 방법을 제공한다. 특히, 이 발명은 화학 요법에 대한 종양의 반응을 예측하는 방법을 제공하며, 여기서 화학 요법은 알부민 결합 파클리탁셀과 겜시타빈의 투여를 포함한다.

[0025] 이 발명에 의하여 제공되는 방법 중 어느 하나는 포유류가 사람 환자인 방법을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 두 다른 항-SPARC 항체, 단클론(A). 다클론(B)에 의하여 발생되는 SPARC 항체 염색의 다른 패턴을 표시한 것이고,

도 2는 nab-파클리탁셀 기초 요법과 D염색 패턴의 발현 여부로 치료되는 유방암 환자에 대한 생존 곡선을 나타낸 것이고,

도 3은 유방암 환자에서 진행 무 생존(PFS)의 K-평균 균주군 형성에서 나온 열 도표를 나타낸 것이고;

도 4는 유방암에서 진행 무 생존(PFS)에 관한 TN(A), ER(B)과 RP(C)상태의 결과를 반영한 생존 곡선을 나타낸 것이고,

도 5는 유방암에서 PFS에 관한 SMS(SPARC 미세환경 시그니처)와 TN 상태의 결과를 반영한 생존 곡선을 나타낸 것이고,

도 6은 유방암에서 PFS에 관한 SMS와 ER 상태의 결과를 반영한 생존 곡선을 나타낸 것이고,

도 7은 유방암에서 PFS에 관한 SMS와 PR 상태의 결과를 반영한 생존 곡선을 나타낸 것이고,

도 8은 다섯 생존 카테고리를 사용하여 유방암 환자의 반응 데이타의 균주군 형성에서 나온 열 도표를 나타낸 것이고,

도 9는 두 생존 카테고리를 사용하여 유방암 환자의 반응 데이타의 균주군 형성에서 나온 열 도표를 나타낸 것이고,

도 10은 환자를 양호한 예후와 불량한 예후 SMS 그룹으로 나눈 췌장암의 PFS 데이타의 K-평균 균주군 형성에서 나온 열 도표를 나타낸 것이고,

도 11은 (A)에서 PFS와 SMS를 기초로한 췌장암에서 전체 생존(OS) (B)에 대한 생존 곡선을 나타낸 것이고,

도 12는 (A)에서 PFS와 CA 19 상태를 기초로한 췌장암에서 전체 생존(OB) (B)에 대한 생존 곡선을 나타낸 것이며,

도 13은 췌장암에서 PFS에 관한 SMS와 CA 19 상태의 결과를 반영한 생존 곡선을 나타낸 것이고,

도 14는 췌장암에서 OS에 관한 SMS와 CA 19 상태의 결과를 반영한 생존 곡선을 나타낸 것이고,

도 15는 환자를 양호 및 불량 PFS 그룹으로 나눈 흑색종 환자의 K-평균 균주군 형성에서 나온 열 도표를 나타낸 것이고,

도 16은 (A)에서 PFS 와 SMS 를 기초로한 흑색종에서 전체 생존(OB) (B)에 대한 생존 곡선을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 여기에 사용된 "종양"이란 용어는 양성 또는 악성(암성) 여부, 주부위 병소 또는 전이 여부의 어떠한 신생물성 성장, 증식 또는 세포집단을 뜻한다. 여기에 사용된 "암"이란 용어는 정상 성장억제제에 대하여 감수성을 잃은 세포증식에 의하여 일어나거나 특징을 갖는 증식성 장애를 뜻한다. 동일한 조직형의 암은 통상 동일한 조직에서 나오고, 이들의 생물학적 특성을 기초로한 다른 아형으로 분할된다. 암의 네가지 일반 카테고리에는 암종(상피조직 유도), 육종(결합조직 또는 중배엽 유도), 백혈병(혈액-형성 조직 유도)와 림프종(림프조직 유도)이 있다. 200가지 이상의 다른 형의 암이 알려져 있고, 몸체의 모든 기관과 조직에 영향을 미친다. 암의 정의가 한정되어 있지 않은 특수한 암의 예를들면. 흑색종, 백혈병, 성상세포종, 교모세포종, 망막모세포종, 림프종, 교세포종, 호지킨 림프종과 만성 림프구 백혈병이 있다. 여러가지 암에 의하여 영향을 받는 기관과 조직의 예를들면, 췌장, 유방, 갑상선, 난소, 자궁, 고환, 전립선, 갑상선, 뇌하수체, 부신, 신장, 위, 식도 또는 직장, 머리와 목, 골, 신경계, 피부, 혈액, 상인두 조직, 폐, 뇨관, 자궁, 질, 외분비선과 내분비선이 있다. 선택적으로, 암은 다중심 또는 알려지지 않은 주부위(CUPS)에 있다.

[0028] 여기에서 사용된 "암세포"란 암화를 받고 이 암화전과 동일한 범위로 성장이 더이상 조절되지 않는 세포를 뜻한다. 종양은 조직내 또는 조직상 또는 환자나 시험 대상체에서 고체 또는 반-고체 덩어리로서 흔히 발견되는, 암세포의 집합을 뜻한다.

[0029] 여기서 사용되는 "약물"이란 환자 또는 시험 대상체에 투여하여 효과를 가져올 수 있는 조성물을 뜻한다. 효과는 화학적, 생물학적 또는 물리학적인 것을 뜻하고, 환자 또는 시험 대상체는 사람 또는, 설치류 또는 형질전환 마우스와 같은 비-사람 동물을 뜻한다. 조성물은 유기 또는 무기 소분자를 포함하고 다른 분자 조성물은 합성으로 만들거나, 자연에서 발견하거나 또는 부분합성으로 제조한다. 이러한 그룹에 포함되는 것은 뉴클레오티드, 핵산, 아미노산, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질 또는 최소한 하나의 이들 구성요소를 함유하는 복합체가 있다. 약물은 유효적 조성물 단독 또는 약학적으로 허용할 수 있는 부형제와 조합하여 이루어질 수 있다.

[0030] 여기서 사용된 "약학적으로 허용할 수 있는 부형제"란 생리적으로 화합할 수 있는 용매, 분산매, 피복물, 항박테리아제, 항균제 또는 항진균제, 등장제와 흡수 지연제 등의 어느 하나 또는 모두를 포함한다. 부형제는 정맥내, 복강내, 근육내, 척수강내, 또는 경구 투여에 적합하다. 부형제는 멸균주사액 또는 분산액을 임시 제조하기 위하여 멸균수용액 또는 분산액을 포함할 수 있다. 약물을 제조하기 위한 이러한 매체의 사용은 이 분야에 알려져 있다.

[0031] 여기에 사용된 약물, 약제 또는 치료제의 "유효량" 또는 "약리학적 유효량" 또는 "치료적 유효량"이란 이를 사용하는 용어에서 유래된 것으로 투여시 약물, 약제 또는 치료제의 치료적 수준의 농도에 도달하는 양을 뜻한다. 이것은 약물을 받는 대상체에 대한, 방출 형태, 투약기간, 나이, 체중, 일반건강, 성별과 식이에 따른다. 투약에서 "약리학적 유효량"의 결정에는 통상의 최적 조건이 요구되며, 이는 이 분야의 통상의 지식을 가진자가 할 수 있다. 암 또는 암세포는 암세포를 괴사시키거나 종양크기를 감소시키고, 전체 암 성장을 감소시키거나(즉, 혈관형성 감소를 통하여), 전이를 억제시키는 요법의 능력을 기초로하는 주어진 치료요법 또는 화학요법제에 대한 "감수성" 또는 "내성"과 같이 기술될 수 있다. 치료요법에 내성을 갖는 암세포는 요법에 대하여 반응하지 않고 증식을 계속한다. 치료요법에 대하여 감수성을 갖는 세포괴사, 종양크기감소, 감소된 전체 성장(종양 반복), 또는 전이 억제를 가져오는 요법에 대하여 반응한다.

[0032] 여기에 사용된 "치료요법" 또는 "치료"는 암세포에 유해한 최소한 하나의 제제의 투여를 뜻한다. 이 발명에 의하여 사용하는데 적합한 치료요법은, 제한되는 것은 아니나, "화학 치료요법", "방사선 치료요법", "선택적 치료요법"과 이들의 조합에 있다.

[0033] 여기에 사용된, "화학 치료요법"은 암세포를 파괴하는데 유해한 최소한 하나의 화학요법제를 투여하는 것을 뜻한다. 임상의가 이용할 수 있는 이와 같은 화학요법제에는 미리애드가 있다. 화학요법제는 대형환제의 단일 투약량으로 대상체에 투여하거나, 시간에 따라 더 작은 투약량으로 투여할 수 있다. 단일 화학요법제를 사용하거나(단일-제제치료) 또는 하나 이상의 제제를 조합하여 사용할 수 있다(조합치료), 화학요법은 단독으로 사용하여 몇가지 형의 암을 치료할 수 있다. 다른 형의 치료와 조합하여 예를들어, 상기한 바와같은 방사선 요법 또는 선택적 요법(예를들어 면역요법)과 사용할 수 있다. 더불어 화학감작제는 화학요법제와 조합한 요법으로 투여할 수 있다.

[0034] 여기에 사용된 "화학요법제" 또는 "항암제"는 암치료에 사용하고 일반적으로 직접 암세포를 괴사시키는 능력을 갖는 약물을 뜻한다. 화학요법제의 예를들면. 알킬화제, 항대사물질, 천연생성물, 호르몬 및 길항물질과 기타 제제가 있다. 교호명의 예는 괄호에 표시했다. 알킬화제의 예를들면, 메클로르에타민, 시클로포스파미드, 이소스파미드, 멜파란(L-사르콜리신)과 클로람부신과 같은 질소 머스타드; 에틸에니민 및 헥사메틸멜라민과 같은 메틸멜라민과 티오테파; 부술판과 같은 알킬 술포네이트; 카르무스틴(BCNU), 세무스틴(메틸-CCNU); 로무스틴(CCNU)과 스트렙토조신(스트렙토조토신)과 같은 니트로소우레아; 인산에스트라무스틴과 같은 DNA 합성 길항물질; 다카르바진(DTIC, 디메틸-트리아제노이미다졸카르복스아미드)와 테모졸로미드와 같은 트리아진이 있다. 항대사물질의 예를들면, 메토트렉에이트(아메토프테린)와 같은 폴산 유사체; 플루오로우라신(5-플루오로우라실, 5-FU, 5FU), 플록수리딘(플루오로데옥시우리딘, FUdR), 시타라빈(시토신 아라비노시드)와 젬시타빈과 같은 피리미딘 유사체; 머캅토푸린(6-머캅토푸린, 6-MP), 티오구아닌(6-티오구아닌, TG), 및 펜토스타틴(2'-데옥시코포르마이신, 데옥시포르마이신), 클라드리빈과 플루다라빈과 같은 푸린 유사체; 암사크린과 같은 위상이성질화 효소억제제가 있다. 천연 생성물의 예를들면 빈블라스틴(VLB)과 빈크리스틴과 같은 빈카 알카로이드; 파클리탁셀과 도세탁셀(탁소테르)과 같은 탁산; 에토포시드와 테나포시드와 같은 에피포도필로톡신; 토포테칸과 이리노테칸과 같은 캄프토테신; 닥티노마이신(악티노마이신 D), 다우노루비신(다우노마이신, 루비도마이신), 독소루비신, 블레오마이신, 미토마이신(미토마이신 C), 이다루비신, 에피루비신과 같은 항생물질; L-아스파라기나아제와 같은 효소; 인터페론 알파와 인터류킨 2와 같은 생물학적 반응 수식인자가 있다. 호르몬과 길항물질의 예를들면, 부세레린과 같은 항체형성 호르몬 방출 작동제; 프레드니손과 같은 아드레노코르티코스테로이드와 관련 제제;히드록시프로게스테론 카프로에이트, 초산 메드록시프로게스테론과, 초산 메게스트롤과 같은 프로게스틴; 디에틸스틸베스트롤과 에틴일 에스트라디올과 같은 에스트로겐과 관련 제제; 타목시펜과 안나스트로졸과 같은 에스트로겐 길항물질; 프로피온산 테스토스테론과 플루옥시메스테론과 같은 안드로겐과 관련 제제; 플루타미드와 비칼루타미드와 같은 안드로겐 길항물질; 류프롤리드와 같은 고나도트로핀-방출 호르몬 유사체가 있다. 기타 제제의 예를들면, 탈리도미드; 시스플라틴(cis-DDP), 옥사리플라틴과 카르보플라틴과 같은 백금 배위 복합체; 미톡산트론과 같은 안트라센에디온; 히드록시우레아와 같은 치환된 우레아; 프로카르바진(N-메틸히드라진, MIH)과 같은 메틸히드라진 유도체; 미토탄(o,p'-DDD)과 아미노글루테티미드와 같은 아드레노코르티칼 억제제; 벡사로텐과 같은 RXR 작용제; 이마티니브와 같은 티로신 키나아제 억제제가 있다. 이들의 교호명과 상품명과 화학요법제의 부가적 예와, 투약과 투여 요법을 포함한 이들의 사용 방법은 이 분야의 전문가에게 알려져 있다. 특히 이 발명에 의하여 사용하는데 적합한 화학요법제에는 제한없이, 나노입자 알부민-결합 파클리탁셀이 있다.

[0035] 또한 ABI-007으로 알려져 있는 Abraxane™이 바람직한 화학요법제이다. Abraxane™은 파클리탁셀의 알부민-나노입자 제제이다. 부형제로서 알부민 나노입자를 사용하면 염수와 재구성 했을때 콜로이드 제제를 가져온다. 임상적 연구를 기초로 하면, Abraxane™의 사용은 Taxol™과 비교했을 때, 감소된 과민성 반응의 특징을 갖는 것으로 나타났다: 따라서, 예비투약은 Abraxane™을 받은 환자에게는 요구되지 않는다.

[0036] 알부민-나노입자 제제의 다른 이점은 독성 유화제를 배제하므로서 Taxol™에서 보다 더 빈번한 간격으로 더 높은 투약량의 파클리탁셀을 투여할 수 있는 것이다. 증강된 효능을 (ⅰ)더 높은 허용 투약량(300 mg/m2), (ii)더 긴 반감기, (iii)지속되는 국소 종양 가용성 과/또는 (iv)지속되는 생체내 방출 Abraxane™의 결과로서 고체 종양에서 볼 수 있는 잠재력이 있다.

[0037] 양성 반응은 한정되어 있는 것은 아니나, 최소한 5%, 바람직하기로는 최소한 10%, 더 바람직하기로는 최소한 15%, 더욱 바람직하기로는 최소한 20%, 가장 바람직하기로는 최소한 25% 또는 그 이상의 계량 개선으로 나타나는 병리학적 반응(종양 크기 또는 덩어리 감소), 전체 생존, 또는 진행 무 생존을 포함하는 것으로 정의된다.

또한, 무치료나 종전 또는 선택적 치료와 비교하여 통계적으로 상당한 양의 개량을 나타낸다.

[0038] 음성 반응은 한정되어 있는 것은 병리학적 진행, 감소된 전체 또는 진행 무 생존을 포함한다.

[0039] 여기에 사용된 "방사선 치료요법" 또는 "방사선 치료"란 용어는 암세포를 괴사시키기 위한 방사선 투여를 뜻한다. 방사선은 세포내의 여러가지 분자와 상호작용하지만, 세포괴사를 가져오는 일차 표적은 데옥시리보핵산(DNA)이다. 그러나, 방사선 치료는 세포 및 핵막과 기타 세포 소기관에 손상을 가져온다. 통상 DNA 손상에는 당분-인산 주쇄에서 단쇄 및 이중쇄 파괴를 포함한다. 더우기, 세포기능을 와해 시킬 수 있는 DNA와 단백질의 가교일 수 있다. 방사선 형에 따라, DNA 손상의 메카니즘은 상대의 생물학적 효과에 따라 변할 수 있다. 예를들면, 중 입자(즉. 양자, 중성자)는 직적 DNA에 손상을 주고 더 큰 상대의 생물학적 효과를 가져온다. 전자기 방사선은 세포 수분의 이온화에 의하여 일차적으로 생성되는 단수명 히드록시 유리기를 통하여 간접 이온화 작용을 가져온다. 방사선의 임상적 적용은 외부 비임 방사선(외부 공급원으로부터)과 근접치료(환자에게 이식되거나 삽입되는 방사선 공급원을 사용하여)로 구성된다. 외부 비임 방사선은 X-선 과/또는 감마선으로 구성되고, 근접 치료에서는 감마선에 따라 알파 입자, 또는 베타입자를 붕괴하고 방출하는 방사성 핵을 사용한다.

[0040] 방사선 치료는 방사선 증감제로서 작용하는 화학요법제와 함께 조합하여 화학 요법에 사용할 수 있다. 개별 환자에 적합한 특별한 방사선 요법의 특이적 선택은 암의 조직과 단계를 고려하여 전문가에 의하여 주의하여 결정할 수 있다.

[0041] 여기서 사용되는 "선택적 치료요법" 또는 "선택적 치료"란 용어 예를들어. 생물학적 반응 수식인자(폴리펩티드-, 카르보하드레이트-,와 지질-생물학적 반응 수식인자 포함), 톡신, 렉틴, 항혈관형성제, 수용체 트로신 키나아제 억제제(예를들어 Iressa™(게피티니브)), Tarceva™(에르로티니브), Erbitux™(세툭시마브), 이마티니브 메실레이트(Gleevec™), 프로테오솜 억제제(예를들어. 보르테조미브, Velcade™); PTK787 (ZK222584)와 같은 VEGFR2억제제, 아우로라 키나아제 억제제(예를들어 ZM447439); 포유류 표적의 라파마이신(mTOR)억제제, 시클로옥시게나아제-2(COX-2)억제제, 라파마이신 억제제(예를들어 시로리무스, RapamuneTM); 파르네실트란스페라아제 억제제(예를들어, 티피파르니브, 자르네스트라); 기질 금속단백질 분해효소 억제제(예를들어, BAY 12-9566; 황산화 다당류 테코갈란); 혈관형성 억제제(예를들어, Avastin.™(베바시주마브)); TNP-4와 같은 푸마길린의 유도체; 카르복시아미노트리아졸; BB-94와 BB-2516; 탈리도미드; 인터류킨-12; 리노미드; 펩티드 단편; 혈관 성장인자와 혈관 성장인자 수용체에 대한 항체; 혈소판 유도 성장인자 수용체 억제제; 단백질 키나아제 C억제제, 미토겐-활성화 키나아제 억제제, 미토겐-활성화 단백질 키나아제 키나아제 억제제, 라우스 육종 바이러스 형질전환 암유전자(SRC)억제제, 히스톤데아세틸라아제 억제제, 소 저산소증-유도성인자 억제제, 헤지호그 억제제와 TGF-β, 신호 억제제를 포함한다. 더우기, 면역요법제에서는 선택적 치료요법을 고려하여야한다. 예를들면, 케모킨, 케모탁신, 시토킨, 인터류킨, 또는 조직인자가 있다. 또한 적당한 면역요법제에는 전성 항체를 함유하는 혈청 또는 감마 글로불린; 비특이성 면역자극 보조제; 활성 특이적 면역요법과 양자 면역요법이 있다. 더불어, 선택적 치료에는 안티센스분자, 폴리펩티, 항생물질, 유전자 요법 벡터 등을 포함한 폴리뉴클레오티드와 같은 기타 생물학적-기초 화학적 구성물이 있다. 이와 같은 선택적 치료는 단독으로 또는 조합하여, 또는 여기에 기술된 다른 치료요법과 조합하여 투여할 수 있다. 선택적 치료요법에 사용된 이들 제제의 교호명과 상품명 및 선택적 치료요법에 사용된 제제의 부가적 예와 투약과 투여요법을 포함한 이들의 사용 방법은 이 분야의 전문 의사에게 알려져 있다. 더우기 화학요법제의 사용 방법과 투약 및 투여 요법을 포함한 조합 치료에서의 선택적 치료요법에 사용되는 기타 약제는 이 분야의 전문가에게 알려져 있다.

[0042] 특히, 적당한 선택적 치료요법은 한정되는 것은 아니나 Her2(예를들어, 트라스투루마브), EGF 또는 EGF수용체, VEGF(예를들어, 베바시주마브) 또는 VEGF수용체, CD20 등에 대한 항체와 같은 암세포 표면상의 분자에 대한 항체를 포함한다. 치료제는 하나 그 이상의 보체 활성화, 세포 매개 세포독성, 세포 자연사 유도, 세포 괴사 유도와 옵신화를 매개하는 어떠한 항체 또는 항체 단편을 함유할 수 있다. 예를들어 이와 같은 항체단편은 전체 또는 부분적 Fc영역을 가질 수 있다.

[0043] 여기에 사용된 "조직학적 절편"이란 용어는 현미경 슬라이드에 설치하는데와 어떠한 적당한 프로토콜로 염색하는데 적합한 조직 시료의 엷은 절편을 뜻한다. 여기에 사용된 "조직학적 절편의 항체 염색"이란 세포내 기질인 세포 성분에 항체의 결합으로 나오는 조직학적 절편의 세포내 기질과 세포의 염색을 뜻한다. 여기에 사용된 "우세하게" 또는 "바람직하게"란 구조체, 예를들어 섬유아세포 상의 암세포를 염색하는 것이고, 조직학적 절편에서 바람직하게 염색된 구조체의 항체 염색은 이 분야의 전문가가 현미경으로 관찰했을때 예를들어 3/3을 포함하는 어떠한 적당한 시스템에 의하여 병리학자가 등급의 강도를 가져야하고, 모든 다른 구조체는 1/3의 강도만으로 염색되거나 0/3(염색없음)을 나타낸다.

[0044] 여기에 사용된 "에피토프"란 용어는 항체에 의하여 결합된 삼차원 구조, 특히 항체에 의하여 표적된 아미노산 서열을 뜻한다. 여기에 사용된 "MAB941 단클론 항체에 의하여 인식되는 에피토프"란 용어는 MAB941 단클론 항체에 의하여 결합된 SPARC의 아미노산 서열을 뜻한다(SPARC 단클론 항체 (R&D Systems, Minneapolis, MN), 카달로그 # MAB941).

[0045] 여기에 사용된 "면역우세 에피토프"란 항체 다클론 항혈청의 항체에 의하여 최대의 집단 결합 혈성과 결합된 삼차원 구조체를 뜻한다. 특히, 에피토프는 다클론 항혈청을 사용한 항체 염색 프로토콜에서 염색 패턴을 가질 수 있다. 여기에 사용된 "AF941 다클론 항체에 의하여 인식되는 면역우세 SPARC 에피토프"란 용어는 AF941 다클론 항혈청에 의하여 최대의 결합 활성을 갖는 것으로 알려진 SPARC 펩티드와 아미노산 서열을 뜻한다. 따라서, 이들 SPARC 펩티드와 아미노산 서열의 결합과 염색을 가져오고 대부분의 항체 염색이 관찰된다(SPARC 다클론 항체 ((R&D Systems, Minneapolis, MN), 카달로그 # AF941).

[0046] 여기서 "항체"란 한정되어 있는 것은 아니나, 단클론 항체, 다클론 항체, 이량체, 다량체, 다특이성 항체(예를들어, 이특이성 항체)를 뜻한다. 항체는 다른 종에서 교화, 키메라 또는 유도된 마우스, 사람일 수 있다. 항체는 특이한 항원으로 인식 및 결합할 수 있는 면역계에 의하여 발생 되는 단백질이다. 일반적으로 표적 항원은 다수 항체상에서 CDRs에 의하여 인식되는 에피토프라 불리우는 여러결합 부위를 갖는다. 다른 에피토프에 특이하게 결합하는 각 항체는 다른 구조를 갖는다. 따라서, 하나의 항원은 하나의 대응하는 항체보다 더 많이 가질 수 있다.

[0047] 항체는 전장 면역글로불린 분자 또는 전장 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉. 관련 표적의 항원 또는 이들의 부분이 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함한다. 표적물에는 자가 면역질병과 연관되는 자가 면역 항체를 생성시키는 암세포 또는 다른 세포들이 있다.

[0048] 여기에 기술된 면역글로불린은 면역글로불린 분자 중 어떠한 종류(예를들어, IgG, IgE, IgM, IgD 과 IgA) 또는 아류(예를들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 과 IgA2)일 수 있다. 면역글로불린은 어떠한 종에서 유도될 수 있다.

[0049] "항체 단편"은 원하는 생물학적 활성을 유지하는 전장 항체의 일부분을 함유한다. 통상 "항체 단편"은 항원 결합 또는 이들의 가변성 영역이다. 항체 단편의 예를들면, Fab, Fab', F(ab')2와 Fv단편; 디아보디; 선형항체; Fab 발현 라이브러리에 의하여 생성되는 단편, 항- 이디오타입성(항-Id)항체, CDR(상보성 측정 영역)과, 암세포 항원, 바이러스 항원 또는 미생물 항원, 단일-쇄 항체 분자에 면역특이적으로 결합하는 상기 중 어느 하나의 에피토프-결합 단편; 항체 단편에서 형성된 다특이성 항체가 있다.

[0050] 단클론 항체는 중쇄 와/또는 경쇄의 일부분이 특별한 종에서 유도된 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 동종이거나 또는 특별한 항체류 또는 아류에 속하고, 쇄의 나머지는 다른 종에서 유도된 항체의 대응하는 서열과 동일하거나 동종이거나 또는 다른 항체류 또는 아류에 속하는 "키메라"항체는 물론 이들이 원하는 생물학적 활성을 나타내는한 이와 같은 항체의 단편을 포함한다(미국 특허번호 4,816,567), 여기서 중요 키메라 항체에는 비-사람 영장류에서 유도된 가변성 영역 항원-결합 서열(예를들어, Old World Monkey 또는 Ape)과 사람 불변영역 서열을 함유하는 "프라이머타이즈드(primatized)"항체가 포함된다.

[0051] "항체-의존성 세포-매개 세포독성"과 "ADCC"란 Fc수용체(FcRs)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포(예를들어, Natural Killer(NK)세포, 뉴트로필과, 대식세포)가 표적 세포상에 결합되는 항체를 인식한 다음 표적 세포의 용해를 일으키는 세포-매개 반응을 뜻한다. ADCC, NK 세포를 매개하는 1차 세포는 Fc.γ.RIII 만을 발현하고, 반면에 단세포는 FcγRI, FcγRII과 FcγRIII을 발현한다. 중요 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 생체외 ADCC 검정을 행한다(미국 특허번호5,003,621; 미국 특허번호 5,821,337). 이와 같은 검정에 유용한 효과 세포에는 말초혈 단핵세포(PBMC)와 내츄럴 킬러(NK)세포가 있다.

[0052] "세포 사멸 유도" 항체는 생존가능한 세포가 비 생존가능한 세포로 되는 것이다. 생체외 세포사멸은 보체와 면역 효과 세포 없이 측정하여 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성(CDC)에 의하여 유도되는 세포 사멸을 구별할 수 있다. 따라서, 세포사멸에 대한 검정은 열 비활성화 혈청(즉 보체없이)을 사용하여 면역 효과 세포없이 행할 수 있다. 항체가 세포 사멸을 유도할 수 있는지 여부를 측정하기 위하여, 요오드 프로피듐(PI), 트리판 블루 또는 7AAD의 섭취량에 따라 평가되는 막 보존성 손실은 미반응 세포와 비교하여 평가될 수 있다. 세포 사멸-유도항체는 BT474 세포의 PI 섭취량 검정에서 PI 섭취량을 유도하는 것이다.

[0053] "세포 자연사 유도" 항체는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포수축, 소포체의 이완, 세포 단편화 와/또는 막

소포의 형성(세포 자연사 몸체)에 의하여 측정되는 계획된 세포 사멸을 유도하는 것이다.

[0054] 여기서 사용된 "화학감작제" 또는 "감작제"란 화학요법제, 방사선 치료요법 또는 선택적 치료요법의 치료효과를 강화하는 약물을 뜻하며, 따라서 이와 같은 치료 또는 제제의 효능을 개량한다. 또한 종양 또는 암세포의 치료에 대한 감수성 또는 내성은 예를들어, 일정기간 이상 종양크기, 종양 덩어리 또는 전이 발생율을 측정하여, 사람 또는 설치류 같은 동물에서 측정한다. 예를들면, 사람에 대하여는 약2, 약3, 약4 또는 약6개월과 마우스에 대하여는 약2-4, 약3-5, 또는 약4-6주 측정한다. 조성물 또는 치료방법은 치료 감수성의 증가 또는 내성의 감소가 이러한 조성물 또는 방법 없이 치료한 감수성 또는 내성에 비하여 약 2-배, 약3-배, 약4-배, 약10-배, 약15-배, 약20-배 또는 그 이상으로 약 10% 또는 그 이상, 예를들어 약 30%, 약40%, 약50%, 약60%, 약70%, 약80% 또는 그 이상이면 치료요법에 대한 종양 또는 암세포의 반응을 감작시킨다. 치료요법에 대한 감수성 또는 내성의 결정은 이 분야에서와 이 분야의 전문가에게는 일반적인 것이다.

[0055] "펩티드", "폴리펩티드"와 "단백질"이란 용어는 교체하여 사용할 수 있고, 펩티드 결합 또는 수식된 펩티드결합, 예를들어, 증가된 반감기와 같이, 펩티드에 대하여 부가적으로 원하는 성질을 제공하는 펩티드 등입체(수식된 펩티드 결합)에 의하여 공유 결합되는 최소한 두개의 아미노산 잔기로 구성되는 화합물을 뜻한다. 펩티드는 최소한 두개의 아미노산을 함유한다. 또한 여기에 기술된 펩티드 또는 단백질을 함유하는 아미노산은 번역 후 과정과 같은 자연 과정에 의하여 아니면, 이 분야에 잘 알려져 있는 화학적 수식법에 의하여 수식될 수 있다. 수식은 펩티드 주쇄, 아미노산 측쇄와 아미노 또는 카르복실 말단을 포함하여, 펩티드 어느 곳에서나 일어날 수 있다. 동일한 형의 수식은 주어진 펩티드의 몇몇 부위에서 동일 또는 변화한 정도로 존재할 수 있다.

[0056] 조직 배열은 이 분야의 전문가에게 알려져 있는 소정의 적당한 방법에 의하여 만들어지고 염색될 수 있다. 예를들면, 포르말린-고정되고, 파라핀-포매된 종양 블록에서 나온 조직 코어(블록당 가장 대표적인 부분에서 2코어)를 배열하여(Beecher Instruments, Silver Spring, Md) 각 2.0mm로 측정한 코어의 조직 마이크로어레이를 일으키고 양전하된 슬라이드상에 놓을 수 있다. 표본을 갖는 슬라이드를 1시간동안 60℃의 오븐에 넣은 다음, 냉각하고, 탈파라핀화하고 키실렌과 등급 에탄올 수용액으로 재수화한다. 모든 슬라이드를 3% 과산화수소 수용액에서 5분동안 급냉하여 내인성 과산화 효소의 블록으로 한다. 항원 회수는 소정의 적당한 방법, 예를들어, 표본을 채소 증기 가열기를 사용하여 94℃에서 20분 동안 시트르산 용액 pH 6.1 (code SI 699, Dako, Carpinteria, Calif)에 넣은 다음, 15분 동안 냉각시키는 가열 방법으로 행할 수 있다. 다음 슬라이드를 적당한 항체를 이용하는 면역조직화학을 사용하는 다코 자동 염색기 항체 염색장치에 넣는다. 이 방법은 (1) 위치하는 항원에 대한 일차 항체, (2) 바이오틴화 결합 항체, (3) 효소-결합 스트렙타비딘과 (4) 기질 색소원(DAB)의 연속적 사용을 기초로 한다. 슬라이드를 리차드-알란 헤마톡실린(Kalamazoo, Mich)에서 대조 염색한 다음, 등급 에탄올 용액으로 탈수하고, 덮개 유리로 덮는다.

[0057] 2-색상 항체 염색은 이 분야의 전문가에게 알려져 있는 소정의 적당한 프로토콜을 사용하여 행할 수 있다. 예를들면, 제한적인 것은 아니고, 파라핀-포매된 조직 블록을 4㎛로 절단하여 양전하된 슬라이드에 놓는다. 표본을 갖는 슬라이드를 1시간 동안 60℃의 오븐에 넣은 다음, 냉각하고, 탈파라핀화하고, 키실렌과 등급 에탄올 수용액으로 탈수한다. 모든 슬라이드를 3% 과산화수소 수용액에서 5분 동안 급냉한 다음, 내인성 과산화 효소의 블록으로 한다. 항원 회수는 이 분야의 전문가에게 알려져 있는 소정의 적당한 프로토콜을 사용하여 행할 수 있다. 예를들면 표본을 94℃에서 25분 동안(전술한 개별 항체의 20분과 비교) 시트르산 용액(pH 6.1)에 넣고 채소 증기 가열기를 사용하여 15분 동안 냉각시켜서 하는 가열 방법으로 행할 수 있다. 슬라이드를 예를들어, 면역조직화학을 사용하는 다코 자동 염색기 항체 염색 장치에 넣을 수 있다.

[0058] 첫번째 일차 항체는 실온에서 30분 동안 배양한다. 검출 시스템, En비전+이중링크(Dako, code K4061)은 30분 동안 배양한다. 끝으로 DAB 색소원을 가한다. 두번째 일차 항체를 사용하기 전에 혈청-유리 단백질 블록을 가하여(Dako, code X0909) 일차 항체 사이의 배경과 교차를 최소화 한다. 두번째 일차 항체를 실온에서 1시간 동안 배양한다. En비전+이중링크(Dako, code K4061)를 검출 시스템으로 다시 사용하고 30분 동안 배양한다. 두 항체에 의한 염색을 쉽게 차별화 할 수 있도록 NovaRED (Vector Laboratories, Burlingame, Calif)를 일차 이차에 사용할 수 있다. 슬라이드를 리차드-알란 헤마톡실린에서 대조 염색한 다음, 등급 에탄올 용액으로 탈수하고, 덮개 유리로 덮는다.

[0059] 적당한 항-SPARC 항체는 조직 마이크로어레이를 사용하여 확인하여 종양과 섬유아세포 SPARC 염색의 정확한 분포를 위하여 배치한다. 이 분야에 알려져 있는 표준 방법에 의하여 제조한 단클론 및 다클론성 항체를 사용할 수 있다.

[0060] 선택된 블록에서 나온 이중 0.6-mm 코어를 함유하는 조직 마이크로어레이는 Beecher Instruments Micro Tissue

Arrayer를 사용하여 구성할 수 있다. 네-미크로미터-두께 절편은 완성된 배열 블록에서 절단될 수 있고 실란화 유리 슬라이드로 옮긴다. 이들 배열에서 나온 절편은 헤마톡실린과 에오진으로 염색하여 적당히 평가할 수 있다.

[0061] 마이크로파 항원 회수는 압력 쿠커(Nordic Ware)에 10mM 시트르산염 완충제(pH 6.0)에서 슬라이드를 놓고 완충제가 4분 동안 압력하에 끓을 때까지 고전력으로 마이크로파 처리로 구성할 수 있다. 이 점에서, 마이크로파 처리를 중지하고, 슬라이드를 20분 더 압력 쿠커에서 배양한 후, 이들을 제거하여 행군다. 단백질 분해 효소 항원 회수는 공급자의 권장 프로토콜에 따라 단백질 분해 효소-1 용액(Ventana)에서 4-분 배양으로 이루어진다.

[0062] 에피토프 지도 작성은 이 분야에 알려져 있는 표준 방법을 사용하여 행할 수 있다. 예를들면, Ed Harlow와 David Lane에 의한 Using Antibodies에서 제 11장 "Epitope Mapping"의 프로토콜. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1999, 이들은 전체가 참고적으로 여기에 혼입되어 있다. 에피토프 지도 작성에 의하여, 에피토프-특이적 항체는 표준 기술에 의하여 쉽게 발생될 수 있다.

[0063] 제일 항-SPARC 항체 및 제이 항-SPARC 항체로 종양의 조직학적 절편을 항체 염색하여 SPARC 미세환경 시그니처(SMS)를 측정하는 방법론이 있으며, 여기서 제일 항-SPARC 항체는 종양 세포에서 SPARC를 우선적으로 염색하며, 제이 항-SPARC 항체는 섬유아세포에서 SPARC를 우선적으로 염색한다. SPARC 발현의 일곱 성분은 두 다른 항체로 측정한다: 종양 내에서의 종양 세포, 섬유아세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질(스트로마), 혈관, 신경과 기타 정상 해부, 종양의 각 성분에 대한 각 부분에 염색된 세포의 퍼센트, 염색 강도(0-4)와 스코어(변수에 의존)를 측정한다(환자당 전체 변수: 7성분 × 2항체 × 3스코어 = 42변수 스코어).

[0064] 스코어는 양성 세포 퍼센트와 염색 강도를 조합한 것이다. 스코어는 세포가 없으면 음성이고 염색된 성분이 없으면 양성이다. 스코어는 염색의 강도가 무엇이든, <10%의 세포가 양성이고, 강도가 2+ 또는 그 이하이고, <20%의 세포가 양성이거나 또는 강도가 1+이고 <30%의 세포가 양성이면 "약한 양성"을 뜻한다. 스코어는 강도가 4+이고 10-40%의 세포가 양성이고, 강도가 3+이고 10-50%의 세포가 양성이고, 강도가 2+이고 20-70%의 세포가 양성이고, 또는 강도가 4+ 또는 그 이하이고 10-40%의 세포가 양성이거나 강도가 1+ 또는 그 이하이고 >30%의 세포가 양성이면 "중간 양성"을 뜻한다. 강도가 4+이고 >40%의 세포가 양성이거나, 또는 강도가 3+이고 >50%의 세포가 양성이고, 강도가 2+이고 >70%의 세포가 양성이면, "강한 양성"을 뜻한다.

[0065] 이러한 데이타는 Elementspring™ 소프트웨어 스위트와 Nexus™ 배열 분석 프로그램에서 균주군 형성 프로그램의 사용에 따른 것이다. 더불어, ANOVA 또는 t-시험(쌍이 아닌)통계는 예상된 균주군 형성이 여러가지 성과 파라미터의 판별력을 갖는 파라미터로 측정한다.

[0066] 계층적 균주군 형성은 데이타의 양호한 "제일 패스" 분석을 제공하는 고가로 사용된 데이타 채취 방법인 것이다. 이는 반복적으로 일곱 방법 중 하나를 사용, 하나의 데이타 점(즉, 측정된 파라미터 값) 또는 "요소"로 시작과 이들의 최근접 이웃과 요소의 조합, 점진적으로 구성하는 균주군과 균주군의 연합을 포함한다. 최종 결과는 계층적 수목도(예를들어 도 3)이다. 균주군 사이의 거리는 이들의 평균 발현 패턴 사이의 거리에 의하여 정의된다. 균주군의 가시적 표현은 모든 생물학자가 쉽게 이해하고 잘 알 수 있는 계층적 수목도, 또는 수상도의 형태로 나타낸다. 수목 구조는 발현 패턴이 요소 또는 요소의 세트 사이에서 유사하게 있음을 가시적으로 쉽게 볼 수 있도록 이루어져야 한다.

[0067] N 수의 요소를 K 균주군으로 하는 비-계층적 균주군 형성 방법군이 있다. 두가지 예를들면 K-평균 균주군 형성과 자체 조직화 지도가 있다. K-평균 균주군 형성은 균주군 또는 "중심"의 기정(K)수로 시작하고, 세가지 단계 과정이 있다. 첫째, 요소는 중심에 무작위로 지정되는 것이다. 둘째, 평균 사이 및 내부-균주군 거리를 계산한다. 끝으로 요소를 한 균주군에서 다른 균주군으로 이동시킨다. 단계 둘 및 셋은 내부-균주군 거리가 최소화되고 사이-균주군 거리가 최대화될 때까지 반복하면, 대표적으로 K 둥근형 균주군이 나온다. 새로운 요소는 최근접 중심을 갖는 균주군에 분류된다. 중심은 균주군에서 모든 점의 평균이 된다. K-평균 균주군 형성은 알려져 있는 그룹수의 균주군 형성 요소보다 탁월하다. 예를들면, 데이타세트 함유 암종과 비-암종 조직은 K-평규뉴 균주군 형성에 따라 분석되어 2그룹의 유전자: 앞으로 변하는 것과 변하지 않는 것을 동정할 수 있다.

[0068] 자체 조직화 지도(SOM)는 신경망 기술을 통하여 n-차원 "요소 공간"으로 반복적으로 지도 마디에 발생된다. 이러한 기술은 부분 구조가 분석되기 전에 부과되기 때문에(균주군과 차원의 수는 지정되어야 한다) 종래 지식에 포함된다. 이때, 무작위 벡터가 일어나 각 마디에 부가된다. 다음 벡터와 무작위로 선택된 유전자 사이를 계산한다. 유전자에 밀접한 벡터를 새롭게 하여 이를 그 이상으로 요소의 벡터와 같이 만든다. 과정은 더이상 변화가 이루어질 수 없을 때까지 수천번 반복한다. 이 과정은 큰차원의 요소 공간을 그 이상의 관리하기 쉽고 이해

할 수 있는 것으로 전환 시킨다.

[0069] SPARC 미세환경 시그니처(SMS)에 있어 이는 각 항체로 항체 염색하는 조직학적 위치, 강도와 빈도에 의하여 나타나는 것과 같이 두 항-SPARC 항체로 염색하는 패턴을 뜻한다. "균주군 형성"에 있어 이는 그들의 임상 성과를 기초로한 SMSs 그룹에 소정의 적당한 균주군 형성 방법을 사용하고 한 그룹과 다른 그룹을 구별하는데 기여하는 SMS 성분을 동정하는 것을 뜻한다. 적당한 방법의 예를들면. K-평균, 자체 조직화 지도와 계층적 균주군 형성이 있으며(이들 모두는 전문가에게 알려져 있는 통상적으로 이용할 수 있는 소프트웨어에 의하여 행할 수 있다). "중심"이란 균주군 그룹을 정의하는 파라미터의 범위를 뜻한다. 이러한 사용에 있어 이는 특히 다른 SMS 그룹을 구별하는 SMS 성분 값, 예를들어 "응답자"로서 분류되는 기준을 뜻한다. 성과 그룹에 대한 지정은 중심이 그룹을 정의하는데 이용할 수 있는 데이타를 최선으로 나타내는 것을 결정하는 과정이다.

[0070] 모든 균주군 방법은 소정의 조건하에서 탁월하고 또한 이들은 한계를 가지며, 이는 이 분야의 전문가에게 알려져 있다. 예를들면, 계층적 균주군 형성은 실재 영향을 미치거나 미치지 않는 데이타에 엄격한 관계 구조를 부과한다. K-평균 균주군 형성과 SOM 발생은 예측된 수의 균주군을 요구한다. 이것은 소정의 위치에서 작업하는 것이 좋지만, 유전자 상호관계를 측정하는 것과 같이 탐색 데이타 분석을 은폐해야하며, 적당한 수의 균주군은 시간 전에 측정될 수 없다. K-평균 균주군은 완전히 둥근 균주군을 생성하는 부가적 제한을 가지며, 근접하거나 기하학적 형상인 균주군의 부정확한 동정을 가져온다. 끝으로 균주군 형성은 요소 그룹 사이의 군집을 나타내며, 결론은 작용 방향과 같은, 균주군 내의 요소 사이에서 상호관계를 유도할 수가 없는 것이다.

[0071] 요소 수를 감소시키는 것은 상술한 분류 방법을 사용할 수 있기 전에 바람직하게 행하는 중요한 단계이다. 이를 행하여 학습 정확도를 개량할 수 있는 만큼 많은 판별 정보를 보전해야한다. 적당히 정의된 요소는 동일한 종류의 모든 시료에 대하여 동일한 발현 패턴을 가져야 하고, 다른 종류에 속하는 시료와 다른 발현 패턴을 가져야 한다. 종류 예측을 위한 "최근접 수축된 중심" 방법은 각 종류에 대한 원형으로서 "수축된" 중심을 사용하고 각 종류에 최선의 특징을 갖는 요소의 부분 집합을 동정한다. 방법은 한계치와 비교하여 모든 종류의 전체 중심을 향한 각 종류 중심을 "수축한다". 이러한 수축은 잡음 요소의 작용을 제거하여 더 정확한 분류를 이루고 결과에 따라 자동적으로 요소를 선택한다. 새로운 시료의 요소 윤곽을 이들 각 종류 중심과 비교한다. 가장 근접한 종류 중심은 제곱 거리에 있어 새로운 시료에 대한 예측된 종류이다.

[0072] 분류를 위한 적당한 요소를 선택하는데는 다음 두가지 인자가 있다:

[0073] 종류 내의 거리와 종류들 사이의 거리, 동일한 종류에서 모든 시료의 요소 수준이 작은 변화로 완전하게 일치하지만, 다른 종류의 시료들 사이에서 크게 다르면, 요소는 분류에 대한 양호한 후보자로 생각된다. 유전자는 다른 종류에 대한 판별 정보를 갖는다. 최근접 수축된 중심 방법에 있어, 종류 내의 변화는 종류 내의 유전자 양호성을 측정하기 위하여 더 고려해야한다. 종류 중심과 요소의 전체 중심 사이의 차이를 각 종류 내의 가변도로 나누어서 낮은 가변도를 갖는 요소보다 더 큰 중량을 나타낸다. 한계치는 나온 정상화 종류 중심 차이에 적용한다. 모든 종류를 작게하면, 요소 제거를 의미하는 영으로 고정한다. 이것은 최종 예측 모델에 사용되는 요소의 수를 감소하는 것이다.

[0074] 집합 규칙은 요소들 사이의 상호 관계, 유전자와 몇몇 다른 요소 그룹 사이의 상호관계를 동정하는데 사용될 수 있고, 궁극적으로 특별한 처리 작용을 나타낼 수 있다. 첫째 단계는 데이타를 분리화하여 이를 부울 또는 삼차 표기로 전환하는 것이다. 이때 차단값은 상향 조정 또는 하향 조정하여 분류한 데이타와 비교하여 설정한다. 차단 값보다 더 큰 값을 갖는 상향 조정된 유저전자는 '1'의 값으로 표시한다. 차단 값보다 낮은 값을 갖는 하향 조정된 유전자는 '0'의 값으로 표시한다. 또한 두 차단값으로 표시할 수 있고, 유전자는 상향 조정(1의 값으로 표시), 하향 조정(-1의 값으로 표시) 또는 무변화(0의 값으로 표시)로서 분류할 수 있다.

[0075] 혈관 형성 억제제의 적당한 투약량을 사용할 수 있으며, 예를들면 Avastin은 최소한 일주일의 투약 주기로 약 5 ㎎/㎏ 내지 약 15㎎/㎏의 투약량을 투여했다.

[0076] 소수성 화학요법제는 1.0 또는 그이하, 바람직하기로는 2.0 또는 그이하, 가장 바람직하기로는 5.0 또는 그 이하의 HLB(HLB는 친수성/친유성 평형수 이다)을 갖고 예를들면 에포틸론, 도세탁셀, 파클리탁셀이 있다. 탁산과 같은 미세소관 억제제에는 에포틸론, 도세탁셀, 파클리탁셀과 이들의 조합물이 있다. "이들의 조합물"이란 에포틸론, 도세탁셀과 파클리탁셀의 순차적이지만 시간적으로 다른 투여(예를들어, 한 주기에서 도세탁셀을 다음에서 파클리탁셀을 사용)는 물론 하나 이상의 약제, 예를들어 도세탁셀과 파클리탁셀을 함유하는 투약 형태의 투여를 뜻한다. 특히 바람직한 화학요법제는 한정되어 있는 것은 아니나, 단백질-결합 약제 입자를 구성하는 단백질이 50%이상의 화학요법제가 나노입자 형태인 것을 포함하는 알부민을 갖는 단백질-결합 약제의 입자를 함유하

는 것이다. 가장 바람직한 화학요법제는 예를들어 Abraxane™과 같은 알부민-결합 파클리탁셀의 입자를 함유하는 것이다. 적당한 나노 입자 제제는 나노 입자 형태의 최소한 약 50%의 활성제를 함유하는 것에 한정되지 않는다. 기타 적당한 나노 입자 제제는 최소한 약 60%, 바람직하기로는 최소한 약 70%, 더 바람직하기로는 최소한 약 80% 또는 더욱 바람직하기로는 최소한 약 90%의 나노 입자 형태의 활성제를 함유하는 것이다. 더우기 이와 같은 나노 입자 제제는 최소한 약 95% 내지 최소한 약 98%의 나노 입자 형태의 활성제를 함유하는 것이 가장 바람직할 수 있다.

[0077] 또한 Her2 양성 유방암에 적합한 치료법에는 다음 여섯주기: 각 28일 주기 중 1,8,15일에 125mg/㎡로 신 보조제 nab-파클리탁셀; 각 28일 주기 중 1일에 카르보플라틴 AUC6; 4mg/kg의 양 다음 2mg/kg/주를 갖는 트라스투주마브와; 5mg/kg/주를 갖는 베바시주마브; 다음 일차 종양의 수술제거; 52주 동안 후수술 치료적 유효량의 트라스투주마브와 베바시주마브를 갖는 요법이 있다. Her2 음성 유방암에 적합한 치료법에는 예를들어 nab-파클리탁셀(175mg/㎡), 겜시타빈(2000mg/㎡)과 에피루비신(50mg/㎡)을 갖는 14일의 6주기; 다음 수술제거; (14일의 4주기)와 nab-파클리탁셀(220mg/㎡)+겜시타빈(2000mg/㎡))을 함유하는 후수술 치료법이 있다.

[0078] 다음 실시예는 이 발명을 더 예시한 것이고, 이 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 않된다.

실 시 예 1

[0079] 이 연구의 목적은 종양 미세환경에서 SPARC 이소형과 기능이 환자에 있어 성과가 있는지를 평가하고, 특히 SPARC 항체 염색의 패턴과 나노 입자 알부민-결합(nab) 파클리탁셀(Abraxane®)의 환자 성과 사이의 상호 관계 여부를 측정하는데 있다.

[0080] nab-파클리탁셀은 내피세포 gp60-알부민 수용체 운반을 포함하고 종양에 의하여 분비되는 SPARC에 결합하는 종양 세포에 들어가기 위한 알부민 운반의 내인성 경로로 이용할 수 있다. 머리와 목의 초기 후임상 시험과 작은 후향적 임상 시험은 종양 조직에서 증가 된 내인성 SPARC가 nab-파클리탁셀에 좋은 반응을 예측할 수 있음을 예상하게 한다(Desai 등. 2009, Trans One. 2, 59-64).

[0081] 네가지 전향적 연구에서는 SPARC 종양 항체 염색 패턴, 즉 "SPARC 미세환경 시그니처(SMS)"가 nab-파클리탁셀 요법으로 치료했을때 높고 낮은 재발 위험을 갖는 환자를 판별할 수 있는지 여부를 시험했다.

[0082] 네가지 임상 시험에서 나온 환자의 성과를 평가했다(표1)

표 1

[0083] 표 1. 표본과 성과 데이타를 제공한 임상 시험

연구	표 시	상	Pts번호	SPARC 1HC를 갖는 Pts번호	요 법
N057E	비절제단계 IV 흑색종	II	76	40	nab-파클리탁셀(100-150mg/㎡) 주 3/4 카르보플라틴(Auc2) 주 3/4
CA040	전이 췌장암	I/II	63	37	nab-파클리탁셀(100-150mg/㎡) 주 3/4 겜시타빈(1000mg/㎡) 주 3/4
BRE73	신보조제 유방암 (HER2-)	II	123	83	선수술: (14일의 6주기) nab-파클리탁셀(175mg/㎡)+겜시타빈(2000mg/㎡)+에피루비신(50mg/㎡) 후수술: (14일의 4주기) nab-파클리탁셀(220mg/㎡)+겜시타빈(2000mg/㎡)

BRE83	신보조제 유방암 (HER2+)	Ⅱ	30	30	선수술: (28일의 6주기) nab-파클리탁셀(100mg/㎡) 주 3/4+카르보플라틴(AUC6)+트라스투주마브(4mg/kg양. 다음 2mg/kg/주)+베바시주마브(5mg/kg/주) 후수술: 유지(1yr): 트라스투주마브(6mg/kg) q3주 베바시주마브(15mg/kg) q3주

[0084] 전체적으로, 이 방법은 (1)위치하는 항원에 대한 일차 항체, (2)바이오틴화 결합 항체, (3)효소-결합 스트렙타빈의 연속적 사용과, (4)기질 색소체(DAB)의 연속적 사용을 기초로 한다: 슬라이드를 리차드-알란 헤마톡실린(Kalamazoo, MI)에서 대조염색한 다음 등급 에탄올 용액으로 탈수하고, 덮개 유리로 덮는다. 모든 슬라이드를 자동 염색장치(Dako Cytomation Autostainer, Dako, Carpinteria, CA)를 사용하여 염색한다.

[0085] 이 실시예에서 항체 염색은 하술한 바와 같이 행한다. 일련의 항체를 SPARC에 대하여 평가한다: 상세한 면역조직학적 평가는 미국 병리학국에 의하여 인정된 병리학자가 행한다. 염색 스코어는 0~4의 스케일로 표시하고, 4+가 가장 양성이다. 종양의 성분의 SPARC 활성에 대한 중요성이 알려져 있지 않기 때문에, 종양, 혈관, 섬유아세포, 기질세포, 염증성 세포와 정상 해부의 염색을 포함한, 여러가지 성분의 분석을 행한다.

[0086] 포르말린-고정, 파라핀-포매 종양 블록으로부터 조직 코어(블록당 가장 대표적인 부분에서 2코어)를 배열하여(Beecher Instruments, Silver Spring, Md) 각 2.0mm로 측정하는 코어의 조직 마이크로어레이를 일으키고 양전하된 슬라이드에 놓는다. 표본을 갖는 슬라이드를 1시간 동안 60℃ 오븐에 넣고, 냉각하고, 탈파라핀하고, 키실렌과 등급 에탄올 수용액으로 재수화한다. 모든 슬라이드를 3% 과산화수소 수용액에서 5분 동안 급냉하여 내인성 과산화 효소 블록으로 한다.

[0087] 항원 회수는 염색이 관찰되지 않을때 내부 양성 조절로 작용하는 동일한 분야에서 정상 조직의 염색으로 행한다. 항원 회수는 표본을 채소 증기 가열기를 사용하요 94℃에서 20분 동안 pH 6.1의 시트르산 용액(code SI 699, Dako, Carpinteria, CA)에 넣은 다음 15분 동안 냉각하는 가열 방법으로 행한다. 이때 슬라이드는 적당한 항체를 이용하는 면역조직화학에 사용하는 (Dako, Carpinteria, CA)와 같은 항색 염색 장치에 넣는다.

[0088] SPARC에 대하여 다른 친화력을 갖는 두 항체는 이 연구에서 단클론성 항체(이후 "M"라 표시한다)(SPARC 단클론성 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN), catalog # MAB941 Lot # ECH045011 트리스주재 희석제로 1:100 희석)와 다클론성 항체(이후 "P"라 표시한다)(SPARC 다클론성 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN), catalog # AF941 Lot # EWN04 트리스주재 희석제로 1:50 희석)를 동정한다. 종양의 조직학적 절편을 슬라이드상에서 제조하고 표준 항체 염색 프로토콜을 사용하여 염색한다. 주로 포르말린-고정, 파라핀 포매 종양 블록에서 나온 조직 코어(블록당 가장 대표적인 부분에서 2코어)를 배열하여(Beecher Instruments, Silver Spring, Md) 각 2.0mm로 측정하는 코어의 조직 마이크로어레이를 일으키고 양전하된 슬라이드를 넣는다. 표본을 갖는 슬라이드를 1시간 동안 60℃ 오븐에 넣은 다음, 냉각하고, 탈파라핀화하고, 키실렌과 등급 에탄올 수용액으로 재수화한다. 모든 슬라이드를 3% 과산화수소 수용액에서 5분 동안 급냉하여 내인성 과산화효소의 블록으로 한다. 항원 회수는 채소 증기 가열기를 사용하여 표본을 94℃에서 25분 동안(전술한 개별 항체의 20분과 비교) 시트르산 용액(pH 6.1)에 넣고 15분 동안 냉각한다. 다음 슬라이드를 면역조직화학에 사용하기 위하여 항체 염색 장치(Dako, Carpinteria, CA)에 넣는다.

[0089] 모든 슬라이드를 3% 과산화수소 수용액에서 5분 동안 급냉하여 내인성 관산화효소의 블록으로 한다. 완충제로 세척한 후, 30분 동안 항체 M과 음성 대조 시약으로 슬라이드를 배양한다. 마우스 고추냉이 과산화효소 중합체 키트(Mouse MACH 3 HRP Polymer Kit, Biocare Medical, Concord, CA)를 시약당 20분 동안 배양하고, DAB 색소체(Dako, Carpinteria, CA)를 10분 동안 사용한다. 헤마톡실린을 사용하여 슬라이드를 대조 염색한다. 시약당 15분 동안 배양된 아비딘-바이오틴 검출 키트(Biocare Medical, Concord, CA)를 HRP 검출 키트 대신에 사용하

더라도, 동일한 프로토콜을 항체 P로 표본을 항체 염색하는데 사용한다.

[0090] 일련의 종양에서 SPARC 발현의 상세한 병리학적 평가는 광범위하게 인정된 병리학자가 행한다. 면역조직화학에 의하여 측정된, SPARC 발현 수준은 다른 종양 성분에 대하여 기록한다. 스코어는 이 분야에서 통상적으로 행하고 있고 이 분야의 전문가에게 잘 알려져 있는 바와 같이, 0-3의 스케일로 SPARC 발현 수준을 지정하고, 3은 최대의 양성 스코어이다. 사용된 단클론성과 다클론성 항체는 다음 표 2에 표시된 바와 같이 SPARC 발현의 다른 패턴으로 검출되었다.

표 2

[0091] 표 2. M과 P 항체 염색 프로파일

	종 양			섬유아세포		
	항체 P	항체 M		항체 P	항체 M	
유방	30/106	35/106	p = ns	82/107	26/107	p < 0.0001
췌장	20/36	7/36	p = 0.0031	18/29	5/29	p = 0.0011
흑색종	30/41	20/41	p = 0.0408	19/33	14/33	p = ns

[0092] 다클론성 항체는 섬유아세포 관련 SPARC를 바람직하게 염색함을 입증하였고, 반면에 단클론성 항체는 종양 관련 SPARC를 바람직하게 염색하였다. 이들 바람직한 염색으로부터 일련의 종양에서 그들의 예측치에 대하여 분석하여 다음과 같은 패턴을 설정한다:

[0093] A, 3+가 어느 성분에서 발견되었을때

[0094] B, 3+가 단클론성 항-SPARC 항체를 갖는 어느 성분에서 발견되었을 때,

[0095] C, 3+가 다클론성 항-SPARC 항체를 갖는 어느 성분에서 발견되었을 때,

[0096] D, 3+가 두 항-SPARC 항체를 갖는 종양 세포에서 발견되었을 때,

[0097] E, 3+가 두 항-SPARC 항체를 갖는 섬유아세포에서 발견되었을 때,

[0098] 로지스틱 회귀와 비례 위험율을 사용하여 여러 종양에서 SPARC 염색 패턴에 대한 SMS와 반응, 진행 무생존(PFS)과, 전체 생존(OS)사이의 소정의 상관 관계를 동정한다.

[0099] 분석된 첫번째 종양 세포는 비절제성 단계 Ⅳ 흑색종을 갖는 환자의 카르보플라틴과 nab-파클리탁셀(a.k.a, ABI-007)의 상Ⅱ 실험이다(N057E 시험). D 패턴과 더 양호한 전체 생존 사이의 상관 관계는 통계학적으로 탁월하게 나타났다.(도 2)

[0100] 두번째 종양 세트는 nab-파클리탁셀 투약량으로 처리한 진전된 췌장 선암종을 갖는 환자로부터 나왔다(CA040 시험). 시험된 32명의 환자는 전체 범위의 반응을 갖는다(표 3, 반응율)

표 3

[0101] 표 3, 반응율

반 응	CR	PR	SD	PD
32Pts의 N	2 (6%)	14 (44%)	14 (44%)	2 (6%)

[0102] (※ CR, 완전한 반응; PR, 부분반응; SD, 무반응과 안정성 질병; PD, 무반응과 진행성 질병)

[0103] 단클론성 염색으로 종양 염색은 이러한 두번째 종양 세트(진전된 췌장)의 치료에 대한 반응성을 예측되게 했다(하나의 테일 t-시험, P=0.027) 더불어, 단클론성 항체로 종양 세포의 염색을 더 불량한 전체 생존과 진행 무생존을 예측하게 했다. 또한, B 패턴 염색은 췌장 선암종을 갖는 이들 환자의 이와 같은 요법에 있어 가장 불량한 진행 무 생존을 예측하게 했다.

[0104] 이 실시예는 SPARC 면역조직화학이 nab-파클리탁셀을 기초로한 화학요법에 대한 반응을 예측하는 효과적인 방법임을 증명한다.

실 시 예 2

[0105] SPARC 항체 염색에서 나온 염색 패턴 데이타의 더 큰 계통 분석을 취하여 예후 정보를 가져오는 패턴을 동정하고, 실시예 1에서 시험된 동일한 종양 세트로부터 나온 염색 패턴 데이타로 여러가지 형태의 균주군 분석을 주의하여 사용하여 여러가지 종양의 SPARC 염색 패턴에 대한 반응, 진행 무 생존(PFS)과, 전체 생존(OS)에 대하여 가장 구별 가능한 성분을 동정한다. 상기한 바와 같이, 예후적으로 현저하게 발생되는 패턴은 "SPARC 미세환경 시그니처("SMS")라 한다.

[0106] SPARC 발현은 일곱가지 종양성분: 종양 내의 종양세포, 염증성 세포, 무세포성 스트로마/기질(스트로마), 혈관, 신경과, 기타 정상해부에서 두 다른 항체로 측정한다. 이때 염색된 세포의 퍼센트, 염색의 강도(0-4)와 "스코어"SMS 각 종양 성분에 대하여 측정한다. "스코어"는 염색된 세포의 퍼센트와 염색 강도를 조합한 것이다. 스코어는 세포가 없으면 "음성"이고 또는 염색된 성분이 없으면 양성이다. 스코어는 ≤20%의 세포가 양성이고 강도가 2+ 또는 그이하이면 "약한 양성"이고, 또한 ≤30%의 세포가 양성이고 강도가 1+ 또는 그이하이면 "약한 양성"이다. 스코어는 강도가 4+이고 10-40%의 세포가 양성이고, 강도가 3+이고 10-50%의 세포가 양성이고, 강도가 2+이고 20-70%의 세포가 양성이고, 또는 강도가 4+ 또는 그이하이고 20-40%의 세포가 양성이거나 강도가 1+ 또는 그이하이고 >30%의 세포가 양성이면 "중간 양성"이다. 스코어는 강도가 4+ 이고 >40%의 세포가 양성이거나, 또는 강도가 3+이고 >50%의 세포가 양성이고, 강도가 2+이고 >70%의 세포가 양성이면 "강한 양성"이다.

[0107] 이 데이타는 Elementspring® 소프트웨어 슈위트와 Nexus® 배열 분석 프로그램에서 균주군 형성 프로그램을 주의하여 사용한 것이다. 더불어, ANOVA 또는 t-시험(홀수)통계로 판별력을 갖는 것으로 나타난 균주군 형성 파라미터에 대하여 측정한다.

[0108] SMS는 BRE 73 유방암 연구에서 나온 염색 데이타로 동정한다. K-평균 균주군 분석 구별 환자는 우수한 PFS를 갖는 항체 염색을 기초로 한다. 24개월에서 PFS는 "불량" SPARC 패턴을 나타내는 환자에 있어서는 56%였고 반대로 "양호한" SPARC 양호 패턴을 갖는 환자에 있어서는 PFS 는 91%이다.

[0109] 더우기, 파라미터는 이들 환자를 예후 그룹(표 4)으로 분리하는 것으로 동정한다("차단값"은 양호한 예후 그룹으로 분류하는데 요구되는 값이다)(참조 도 3).

표 4

[0110] 표 4. 유방암에서 PFS의 SMS 성분

성분	차단값	p-값
P 염증성 세포 %	≥ 50%	<0.0001
M 종양 %	≥ 70%	<0.0001
P 혈관 %	≥ 70%	<0.0001
M 섬유아세포 %	≥ 70%	<0.0001
M 혈관 %	≥ 70%	<0.0001
M 스트로마 %	≥ 70%	<0.0001
P 스트로마 %	≥ 70%	<0.0001
M 염증성 세포 %	≥ 70%	<0.0001

[0111] 기대되는 에스트로겐 수용체(ER)로서, 프로게스테론 수용체(PR)과, 삼중 음성(TN) 상태가 PFS를 예측한다(도 4A-C). 놀랍게도, SMS는 독립적 위험 인자로서 작용한다(즉, 공지된 위험 인자의 독립성, ER/PR/삼중 음성 상태(표 5)).

표 5

[0112] 표 5. 유방암에서 SMS와 공지된 위험 인자

	ER- (N=39)	PR- (N=42)	삼중 음성 (N=30)
공지된 위험 인자를 갖는 SPARC 양호 SMS	15/37 (41%)	16/37 (43%)	10/37 (27%)

공지된 위험 인자를 갖는 SPARC 불량 SMS	24/46 (52%)	26/46 (57%)	20/46 (43%)
통 계	p=ns	p=ns	p=ns

[0113] 더우기, SMS를 공지된 위험 인자에 가했을때, 시험된 nab-파클리탁셀을 기초로한 요법에 대한 낮고 높은 위험 그룹을 기초로한 PFS 사이의 층상 구조 또는 판별을 개량했다. 그러나, 삼중 음성 상태에 SPARC SMS를 가하면 낮은 위험(0 위험 인자)과 높은 위험(≥ 2 위험 인자)을 환자가 더 판별된다(위험 인자의 다른 수에 대한 로그 순위 P값: 0 인자 대 2 인자, P=0.0009; 1 인자 대 2 인자, P=0.039)(도 5). 또한, 1 위험 인자를 갖는 그룹도 별개로 중간 위험을 갖는 것으로 알게되었다.

[0114] ER에 SPARC SMS 균주군을 가하면 낮은 위험(0 위험 인자)과 높은 위험(2 위험 인자)를 갖는 환자가 더 판별된다(위험 인자의 다른 수에 대한 로그순위 P값: 0 인자 대 2 인자, P=0.0001; 1 인자 대 2 인자, P=0.026)(도 6).

[0115] ER에 SPARC SMS 균주군을 가하면 낮은 위험(0 위험 인자)과 높은 위험(2 위험 인자)을 갖는 환자가 더 판별된다(위험 인자의 다른 수에 대한 로그순위 P값: 0 인자 대 2 인자, P=0.0004; 1 인자 대 2 인자, P=ns)(도 7). 이들 결과는 치료, 진행 또는 사망에 대한 반응을 예측하는 종래 마아커를 갖는 SMS의 조합이 이와 같은 마아커의 예후 정확도를 개량할 수 있음을 증명한다.

[0116] 반응은 부분적 완전 반응(PCR), 완전 반응(CR), 부분 반응(PR), (SD), (PD), 이용할 수 없는 것(N/A)으로 분류된다(표 7). 또한, 반응에 대한 SMS를 균주군 분석으로 동정한다(표 8).

표 6

[0117] 표 6. 반응 그룹

반 응	N
pCR	9
CR	9
PR	54
SD	5
PD	2
N/A	4

[0118] 또한, 반응은 응답자(pCR, CR, PR; n=72)와 비응답자(SD, PD; n=7)로 분류될 수 있다. 또한, 이러한 반응의 두 분류에 있어서, SMS도 균주군 분석에 의하여 동정한다(표 9).

[0119] 반응 SMS에 포함되는 파라미터는 균주군 분석에 의하여 동정한다(도 9)(표 7).

표 7

[0120] 표 7. 유방암 반응 SMS 성분

SMS 성 분	차단값	p-값
M 스트로마 %	≥ 60%	0.002
M 종양 %	≥ 60%	0.027
M 혈관 %	≥ 60%	0.0497
P 종양 %	≥ 60%	0.054

[0121] 또한 CA040 췌장암 시험에서 나온 데이타를 분석한다. 분석은 동일한 환자에서 나온 표본 세포학으로 확대될 수 있다.

[0122] 계층적 균주군 형성을 췌장암에서 행하여 환자를 SMS를 기초로하는 두 그룹으로 분할한다. 이들 그룹을 PFS와 OS 성과에 대하여 분석한다. 균주군 형성은 함께 취한 SPARC 낮은 위험 성분이 높은 위험 성분보다 SPARC에서 현저히 더 높음(전체 스코어 839 대 629, 유효 평균의 총합)을 나타낸다. 시험된 모든 구역을 교차하는 개별성분(종양세포, 염증성 세포, 혈관과 무세포성 기질)은 낮은 위험 그룹의 SPARC에서 더 높다.

[0123] 더우기, 0+ = 0, 1+ = 25, 2+ = 50, 3+ = 75, 4+ = 100으로 퍼센트 양성 세포 사용 및 강도 측정과 "음성"=0,

"약한 양성"=33, "중간 양성"=66, "강한 양성"=100으로 스코어는 다음 전체 결과를 나타내며, 또한 가장 중요한 파라미터는 (도 10)(표 8)과 차단값(표 9)에서 확인된다.

표 8

표 8. 췌장암 SMS 성분

변수 평균	SPARC 높은 위험	SPARC 낮은 위험	높은 위험 대 낮은 위험 균죽군 P-값
다 섬유아세포 스코어	65.52	86.83	1.01E-06
다 섬유아세포 강도	40.63	67.81	1.57E-04
다 종양 강도	25.84	48.80	2.27E-04
마브 스트로마 %	61.88	82.00	3.28E-03
다 염증성 세포 강도	25.84	42.26	4.29E-03
다 염증성 세포 스코어	49.05	67.14	7.49E-03
다 혈관 %	50.94	68.00	8.09E-03
다 종양 스코어	54.72	75.55	8.10E-03
다 혈관 강도	32.81	45.96	9.44E-03
다 섬유아세포 %	54.06	70.63	1.37E-02
다 혈관 스코어	63.52	75.03	2.02E-02
다 염증성 세포 %	42.66	58.50	2.81E-02
다 스트로마 스코어	61.88	50.55	5.00E-02
마브 스트로마 강도	21.63	16.63	8.64E-02
다 종양 %	56.56	69.75	1.06E-01
마브 섬유아세포 강도	25.83	32.94	1.37E-01
마브 종양 강도	28.16	35.73	1.63E-01
마브 스트로마 스코어	46.56	37.91	1.99E-01
다 스트로마 %	69.06	78.00	2.51E-01
마브 혈관 강도	22.39	24.90	4.50E-01
마브 염증성 세포 강도	24.31	27.03	4.54E-01
마브 섬유아세포 스코어	56.77	53.00	5.58E-01
마브 혈관 스코어	52.20	48.94	6.09E-01
마브 섬유아세포 %	55.78	52.38	6.31E-01
마브 종양 %	65.63	63.00	7.30E-01
다 스트로마 강도	26.56	25.85	8.60E-01
마브 종양 스코어	58.88	59.99	8.74E-01
마브 염증성 세포 스코어	47.53	46.81	9.04E-01
마브 혈관 %	59.06	58.25	9.05E-01
마브 염증성 세포 %	46.88	47.38	9.47E-01
모든 평균의 총합	**1393.11**	**1617.51**	

[0124]

[0125] 따라서, 차단값은 다음과 같다.

표 9

표 9. 췌장 차단(유효 P-값을 갖는 성분)

성 분	차단값 높은 위험	차단값 낮은 위험
P 섬유아세포 스코어	≤66	≥87
P 섬유아세포 강도	≤41	≥68
P 종양 강도	≤26	≥49
M 스트로마 %	≤49	≥82
P 염증성 세포 강도	51	42
P 염증성 세포 스코어	≤55	≥67
P 혈관 %	≤33	≥68
P 종양 스코어	≤54	≥76
P 혈관 강도	64	46
P 섬유아세포 %	≤54	≥71
P 혈관 강도	≤64	≥75
P 염증성 세포 %	≤43	≥59
P 스트로마 %	≤62	≥51

[0126]

[0127] SMS는 OS의 불량과 양호한 성과를 구별할 수 있지만, PFS는 아니다(도 11, A와 B), CA 19-9 수준은 췌장암에서 급속한 진행의 공지된 위험 인자가 있고 CA 19-9 수준 시험에서 PFS와 OS 그룹을 분리할 수 있다(도 12). 그러나, 위험 인자 SPARC 불량과 CA 19-9≥2000 U/㎖ 사이의 상관 관계는 없다. 따라서, SPARC와 CA 19-1은 전체 생존에 있어 독립적 예후 인자임을 알 수 있다(표 10).

표 10

표 10. 췌장암의 SMS는 CA19-9의 독립임

	CA19-9 < 2000 U/ml	CA19-9 ≥ 2000 U/ml	통 계
CA19-9 그룹에서 SPARC 불량 시그니처를 갖는 Pts의 분포	7/20 (35%)	6/15 (40%)	*p = ns*

	SPARC 불량	SPARC 양호	통 계
SPARC 균주군에서 CA19-9 ≥2000 U/㎖를 갖는 Pts의 분포	6/13 (46%)	9/22 (41%)	*p = ns*

[0128]

[0129] 놀랍게도, CA 19-1 수준과 조합된 SMS는 층화 PFS와 OS를 개량한다(도 13과 14).

[0130] 또한, SMS의 유용성 분석은 ABX 054 시험으로 흑색종 진전 환자에서 행했다. 다시, 예후 파라미터(표 11)는 계층적 균주군 형성을 사용하여 동정한다(도 15와 16).

표 11

[0131] 표 11. 흑색종 PFS 예후 파라미터

SMS 성 분	차단값	p 값
M 혈관 %	≤ 50%	<0.0001
M 스트로마 스코어	약간 양성	<0.0001
M 염증성 세포 %	≤ 50%	<0.0001
M 혈관 스코어	약간 양성	<0.0001
M 염증성 세포 스코어	약간 양성	<0.0001
M 스트로마 %	≤ 50%	<0.0001
M 섬유아세포 강도	1+ to 2+	<0.0001
M 혈관 강도	1+ to 2+	0.0006
M 종양 강도	1+ to 2+	0.0007
M 종양 세포 스코어	약간 양성	0.0021
M 섬유아세포 %	≤ 50%	0.0022
M 염증성 세포 강도	1+ to 2+	0.0029
M 섬유아세포 스코어	약간 양성	0.0036
M 종양 %	≤ 50%	0.0205

실 시 예 3

[0132] 이 실시예는 SMS를 발생시키는 K-평균 균주군 형성을 사용한 예상적 예이고 이는 개체를 위험 그룹으로 분류하는데 사용한다.

[0133] 첫번째 각 SMS 성분에 대한 중심은 연습 세트를 사용하여 정의되어야 한다. SMS의 두 성분, 예를들어 일곱 개체의 각각에 관한 M% 종양과 P% 종양의 스코어를 구성하는 가상 데이타 세트를 고려해야한다.

표 12

[0134]

대상체	M% 종양	P% 종양
1	10	10
2	15	20
3	30	40
4	50	80
5	35	50
6	45	50
7	5	45

[0135] 이 데이타 세트는 두 균주군 형성, 예를들어, 응답자와 비-응답자로 분류하는데 있다.

[0136] 감지성 초기 분배를 찾음에 있어 제일 단계로서, 공지의 다른 반응을 갖고 가장 멀리 떨어진 두 개체의 M% 종양과 P% 종양값(유클리드 거리 측정을 사용)을 초기 균주군 평균으로 다음에 표시한 바와 같이 정의한다:

표 13

[0137]

	개체	평균벡터(중심)
응답자 균주군	1	(10, 10)
비응답자 균주군	4	(50, 70)

[0138] 잔존 개체는 유클리드 거리로 환산하여 균주군 평균에 가장 가까운 균주군에 배치한다. 평균 벡터는 새로운 멤버를 가하는 매시간 마다 재계산한다. 이것은 다음과 같은 일련의 단계를 유도한다:

표 14

[0139]

	응답자 균주군		비응답자 균주군	
단계	개체	평균 벡터(중심)	개체	평균 벡터(중심)
1	1	(10, 10)	4	(50, 70)

2	1, 2	(12, 15)	4	(50, 70)
3	1, 2, 3	(18, 23)	4	(50, 70)
4	1, 2, 3	(18, 23)	4, 5	(42, 60)
5	1, 2, 3	(18, 23)	4, 5, 6	(43, 57)
6	1, 2, 3	(18, 23)	4, 5, 6, 7	(41, 54)

[0140] 초기 분배를 변경하고, 이 단계에서 두 균주군은 다음과 같은 특징을 갖는다:

표 15

[0141]

	개체	평균 벡터(중심)
응답자	1, 2, 3	(18, 23)
비응답자	4, 5, 6, 7	(41, 54)

[0142] 각 개체가 수학적으로 아니면 실제 분야에서 우측 균주군으로 지정되는 것은 아직 확실히 알 수 없다. 다음 단계는 각 개체의 거리와 그 자신 균주군 평균과 비교하여 균주군의 수학적 질을 보이고 있고, 반대쪽 균주군은 다음과 같은 결과를 가져온다:

표 16

[0143]

개체	응답자 균주군의 평균에 대한 거리(중심)	비응답자 균주군의 평균에 대한 거리(중심)
1	15	54
2	04	43
3	21	18
4	57	18
5	32	07
6	38	06
7	28	11

[0144] 개체 3만은 그 자신보다 반대쪽 균주군의 평균보다 더 가깝다. 다시 말해서, 그들 자신 균주군 평균에 대한 각 개체의 거리는 다른 균주군의 평균(이는 개체 3을 갖는 경우에는 없다)에 대한 거리보다 더 작아야 한다. 따라서, 개체 3은 새로운 분배를 가져오는 다른 균주군에 재배치된다.

표 17

[0145]

	개체	평균 벡터(중심)
응답자	1, 2	(13, 15)
비응답자	3, 4, 5, 6, 7	(39, 51)

[0146] 이것은 반응을 기초로하는 개체들의 재배치에 따르고, 다시 이를 수학적으로 시험한다. 반복적 재배치는 더이상 재배치가 일어나지 않을 때까지 이러한 새로운 분배에서 바로 계속한다. 그러나, 이 실시예에서 각 개체는 다른 균주군보다 그 자신 균주군 평균에 더 가깝고 반복은 정지하고, 최종 균주군 해결로서 가장 늦은 분배를 선택한다.

[0147] 이때 소정의 새로운 개체들은 이들이 더 밀접한 중심을 기초로하여 응답자 또는 비응답자로 분류될 수 있다.

[0148] 더불어, 연습 세트를 처리한 후, 두 성분을 이 실시예 전체에 걸쳐서 사용할지라도, 가장 판별력이 있는 성분은 소정의 적당한 방법에 의하여 중심을 정의하는데 사용되는 이들 성분만을 측정할 수 있고 새로운 개체들을 분류한다.

[0149] 여기에서 인용된, 공보, 특허출원과 특허를 포함한, 모든 참고 문헌은 각 참고 문헌이 개별적으로 특별하게 표시되어 참고적으로 혼입되고 그들이 전체가 여기에 설명되는 것과 같이 동일한 범위로 여기에 참고적으로 혼입된다.

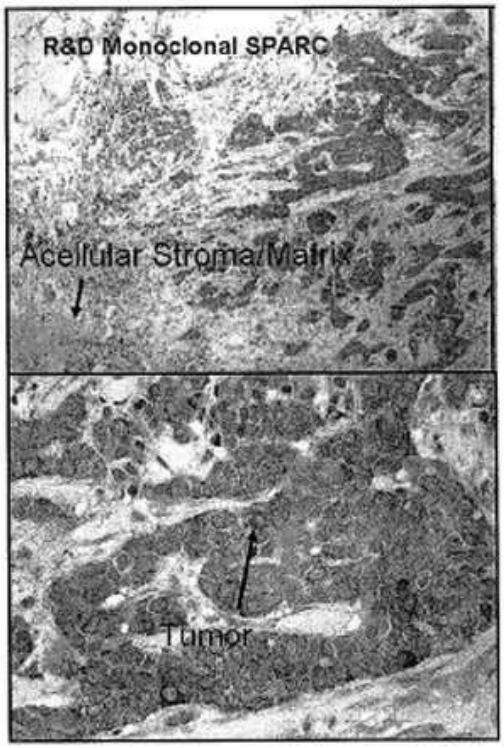
[0150] 이 발명을 기술한 문맥에서(특히 다음 특허 청구 범위의 문맥에서) "a" 및 "an"과 "the"와 유사한 지시 대상의

용어 사용은 여기서 다른 표시가 없거나 문맥에 분명한 부인이 없는 한 단수와 복수를 둘 다 커버 하는 것으로 해석된다. "포함하는(comprising)", "갖는(having)", "포함하는(including)", "함유하는(containing)"이란 용어는 다른 언급이 없는 한 제한 없는 용어(즉, "포함하나 이에 한정되지 않는(including, but not limited to)"의 의미)로 해석된다. 여기에서 값 범위의 기술은 다른 언급이 없는한, 범위에 들어가는 각 분리된 값으로 개별적으로 나타내는 속기 방법으로 단지 표시하고자 하는 것이고 각 분리된 값은 여기서 개별적으로 열거된 것과 같이 명세서에 혼입된다. 여기에 기술된 모든 방법은 여기에 다른 언급이 없거나 문맥에서 다른 분명한 부인이 없으면 어떠한 적당한 순서로 행할 수 있다. 여기에서 제공된 소정의 및 모든 실시예, 또는 예시한 언어(예를들어, "와 같은")의 사용은 다른 청구가 없는한, 이 발명을 단지 더 좋게 예시한 것이고 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다. 명세서의 언어는 발명의 실시에 필수적인 소정의 특허 청구되지 않은 요소를 나타내는 것으로 해석되어서는 않된다.

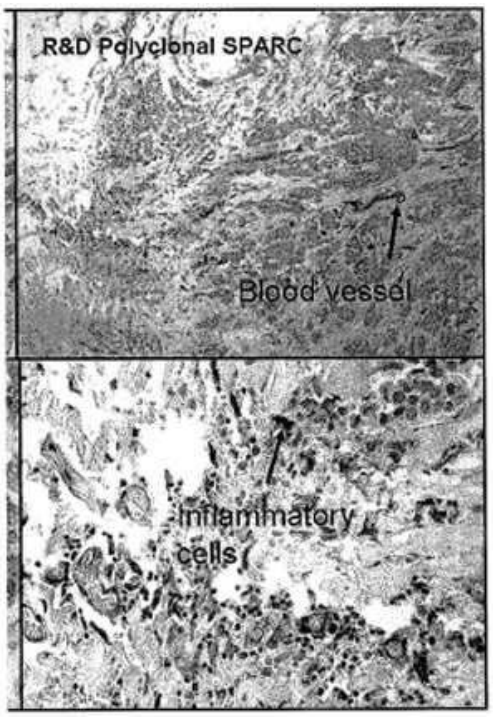
[0151] 이 발명의 바람직한 구성은 발명을 행하는 발명자에게 알려져 있는 가장 좋은 방법을 포함하여, 여기에 기술되어 있다. 이들 바람직한 구성의 변경은 전술한 설명의 판독에 따라 이 분야의 통상의 숙련자는 분명하게 알 수 있을 것이다. 발명자는 이러한 적당한 변경을 사용하는 숙련자를 예상하고 발명자는 여기에 특별히 기술된 것 이상의 다른 방법으로 발명을 실시하고자 할 것이다. 따라서, 이 발명에는 적용법에서 허용되는 첨부된 특허 청구 범위에 열거된 동등한 주제와 모든 수정이 포함된다. 더우기, 이의 모든 가능한 변경에 있어 상술한 요소의 소정의 조합은 여기 다른 언급이 없거나 문맥에 다른 분명한 부인이 없으면 이 발명에 포함된다.

도면

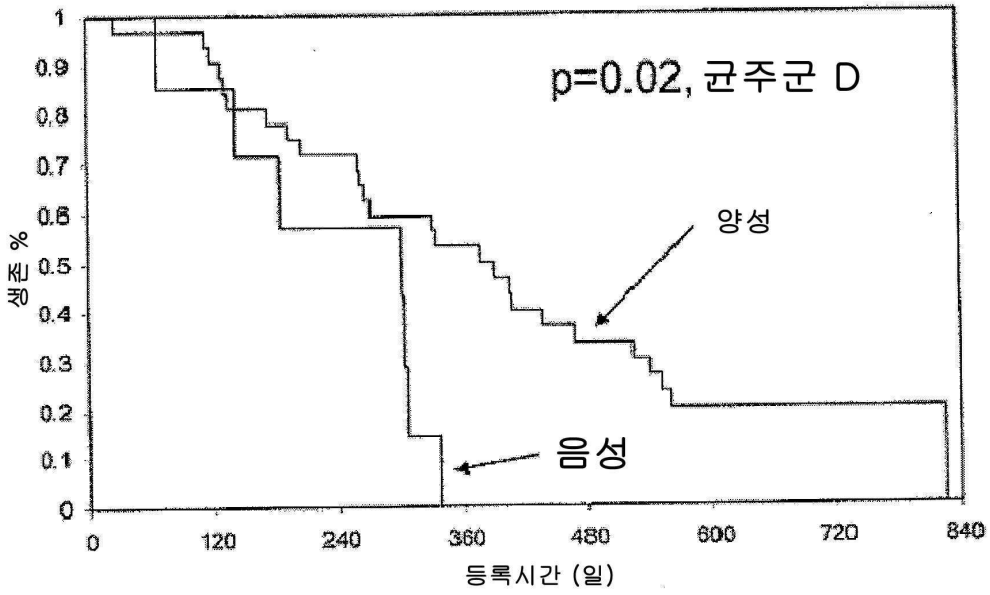
도면1a



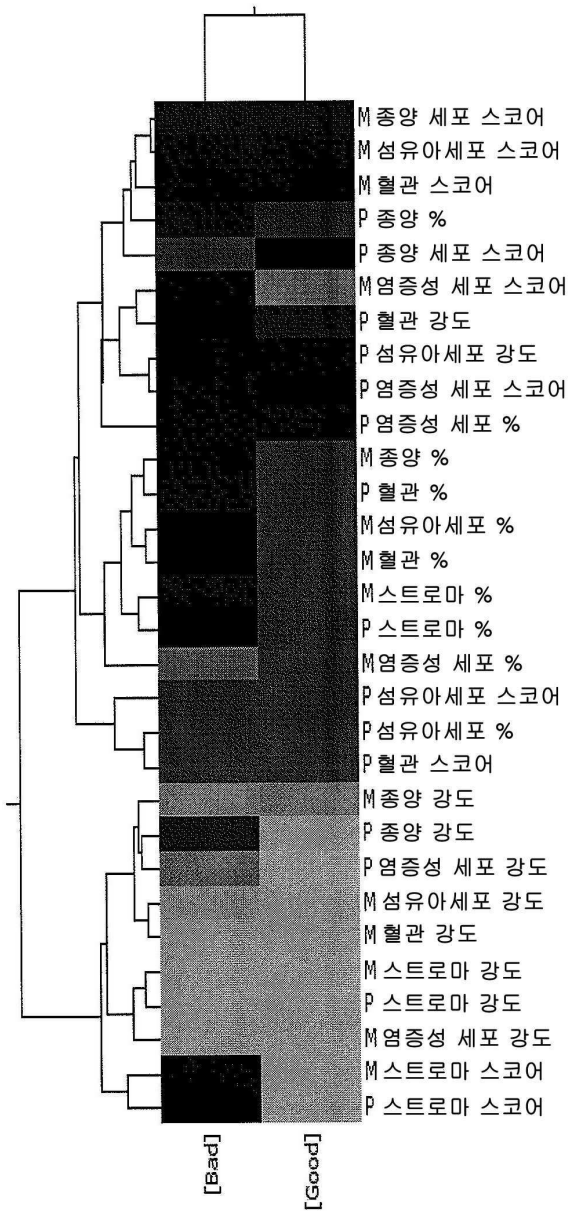
도면1b


R&D Polyclonal SPARC
Blood vessel
Inflammatory cells

도면2

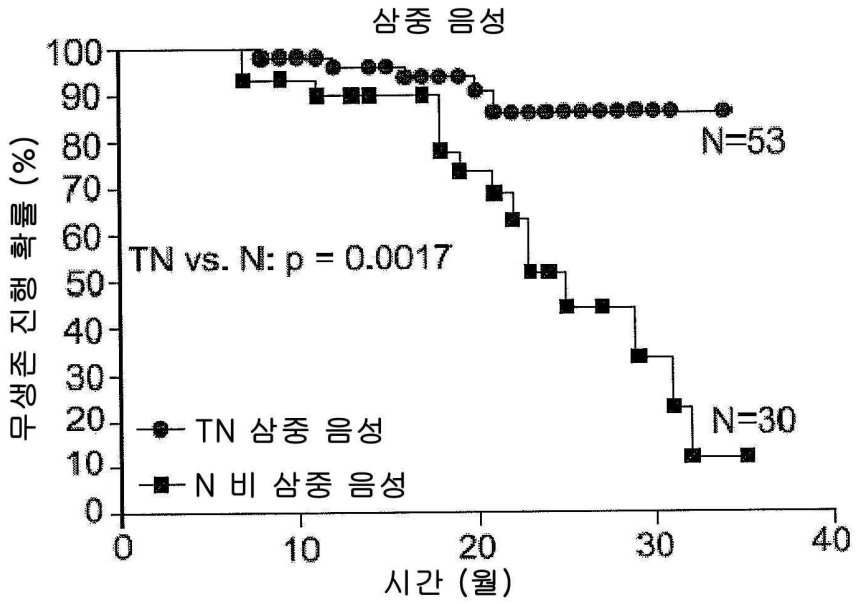

p=0.02, 균주군 D
양성
음성
생존 %
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
120
240
360
480
600
720
840
등록시간 (일)

도면3

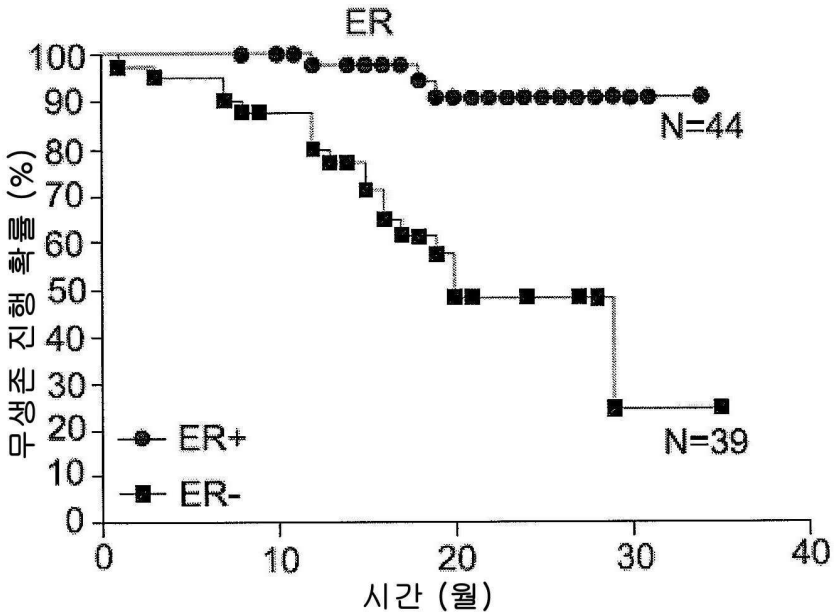


균주군에서 범례 - 계층적 조합 수목상

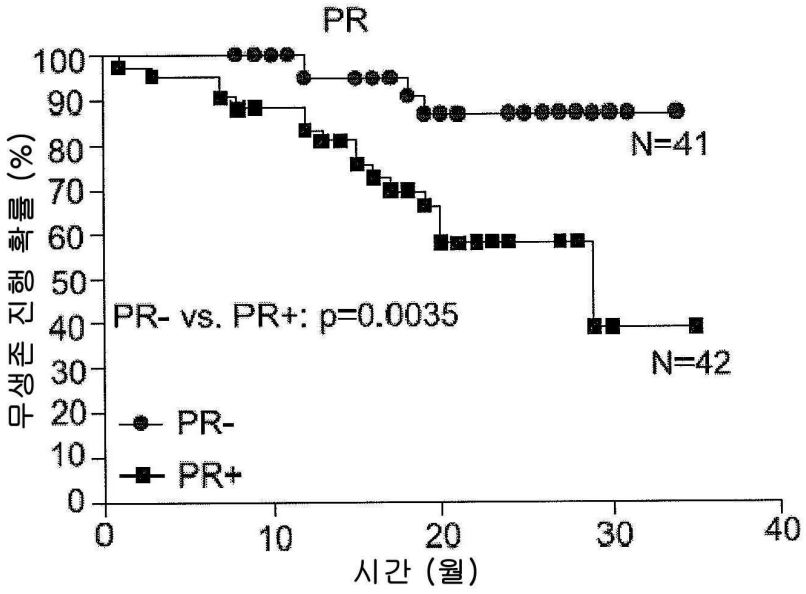
도면4a


삼중 음성
무생존 진행 확률 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
TN vs. N: p = 0.0017
N=53
N=30
TN 삼중 음성
N 비 삼중 음성
0
10
20
30
40
시간 (월)

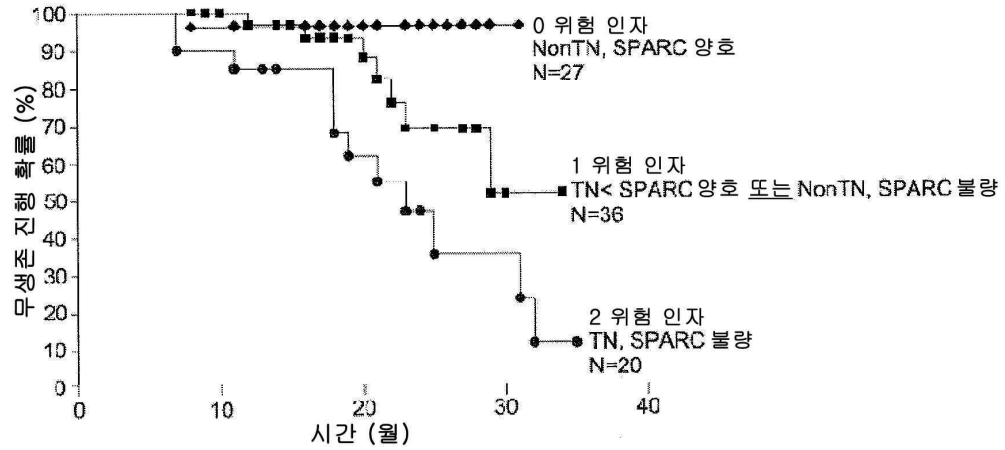
도면4b


ER
무생존 진행 확률 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
N=44
N=39
ER+
ER-
0
10
20
30
40
시간 (월)

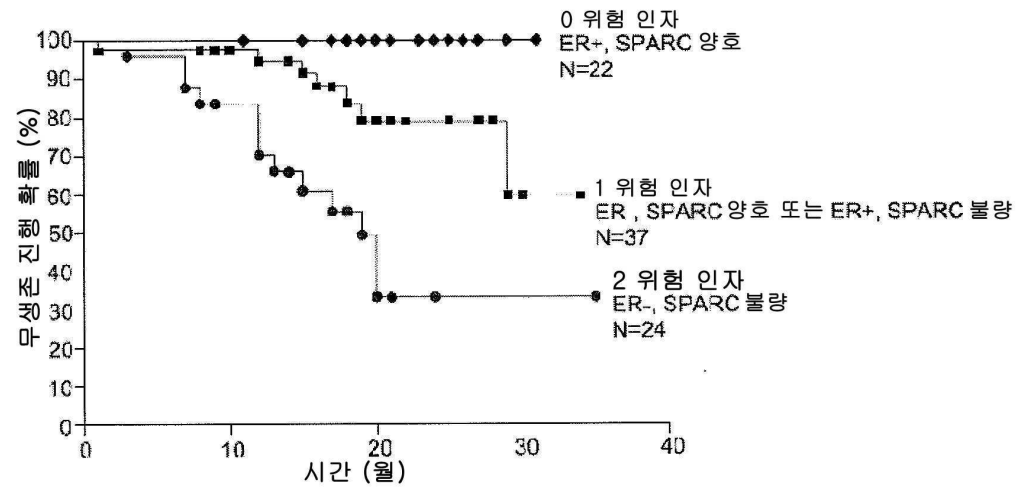
도면4c


PR
무생존 진행 확률 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
N=41
PR- vs. PR+: p=0.0035
N=42
PR-
PR+
0
10
20
30
40
시간 (월)

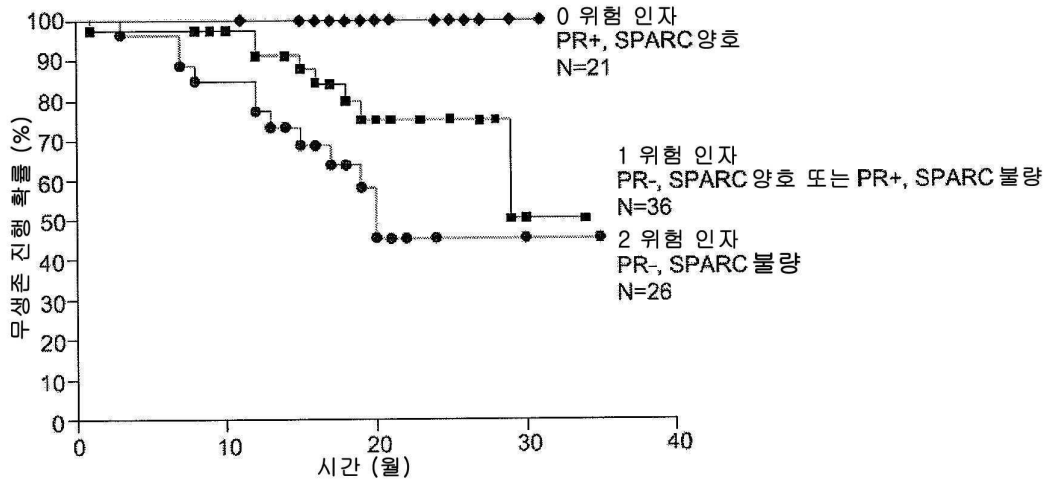
도면5


무생존 진행 확률 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 위험 인자
NonTN, SPARC 양호
N=27
1 위험 인자
TN< SPARC 양호 또는 NonTN, SPARC 불량
N=36
2 위험 인자
TN, SPARC 불량
N=20
0
10
20
30
40
시간 (월)

도면6


무생존 진행 확률 (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 위험 인자
ER+, SPARC 양호
N=22
1 위험 인자
ER , SPARC 양호 또는 ER+, SPARC 불량
N=37
2 위험 인자
ER-, SPARC 불량
N=24
0
10
20
30
40
시간 (월)

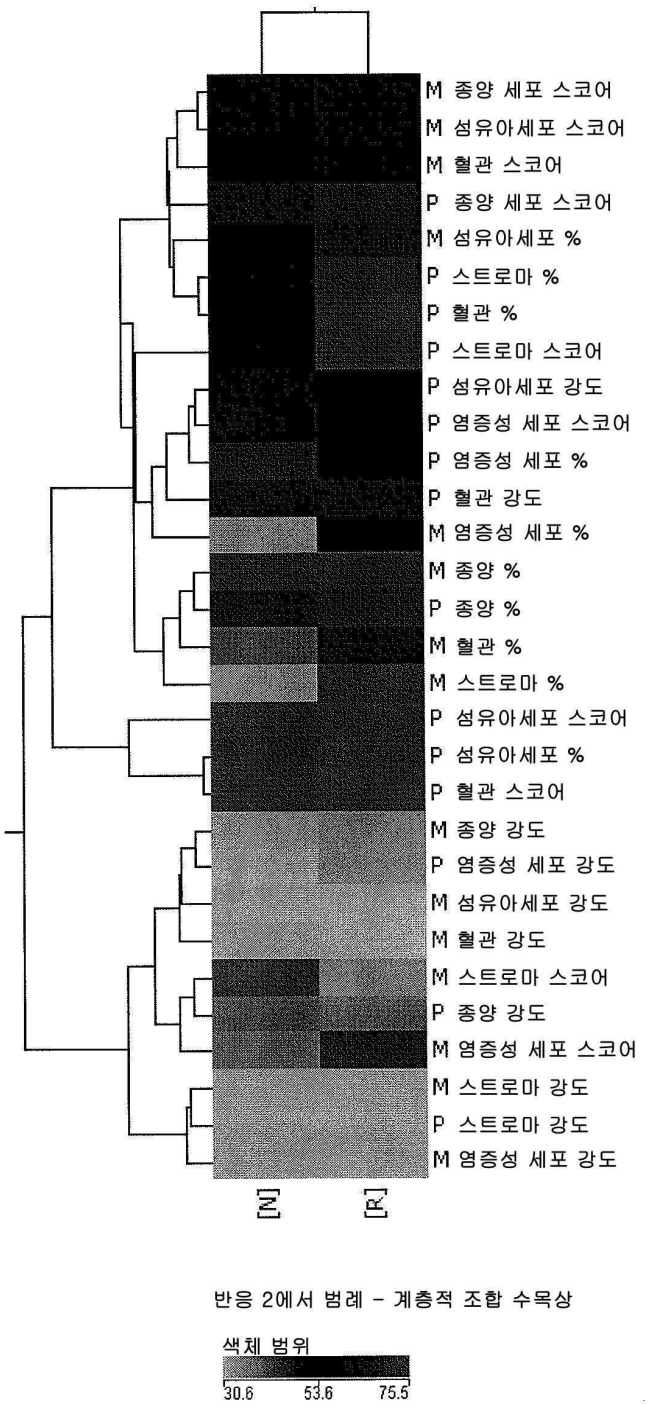
도면7


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
무생존 진행 확률 (%)
0
10
20
30
40
시간 (월)
0 위험 인자
PR+, SPARC 양호
N=21
1 위험 인자
PR-, SPARC 양호 또는 PR+, SPARC 불량
N=36
2 위험 인자
PR-, SPARC 불량
N=26

도면8


M 종양 세포 스코어
P 종양 세포 스코어
M 섬유아세포 %
P 스트로마 %
P 혈관 %
M 섬유아세포 %
M 혈관 스코어
M 종양 %
M 혈관 %
M 스트로마 %
P 섬유아세포 강도
P 염증성 세포 스코어
P 염증성 세포 %
P 혈관 강도
M 염증성 세포 %
P 종양 %
P 섬유아세포 스코어
P 섬유아세포 %
P 혈관 스코어
M 종양 강도
P 염증성 세포 강도
M 섬유아세포 강도
M 혈관 강도
M 염증성 세포 강도
M 스트로마 스코어
M 스트로마 강도
P 스트로마 강도
P 종양 강도
P 스트로마 스코어
M 염증성 세포 스코어
[CR]
[pCR]
[PR]
[PD]
[SD]

도면9

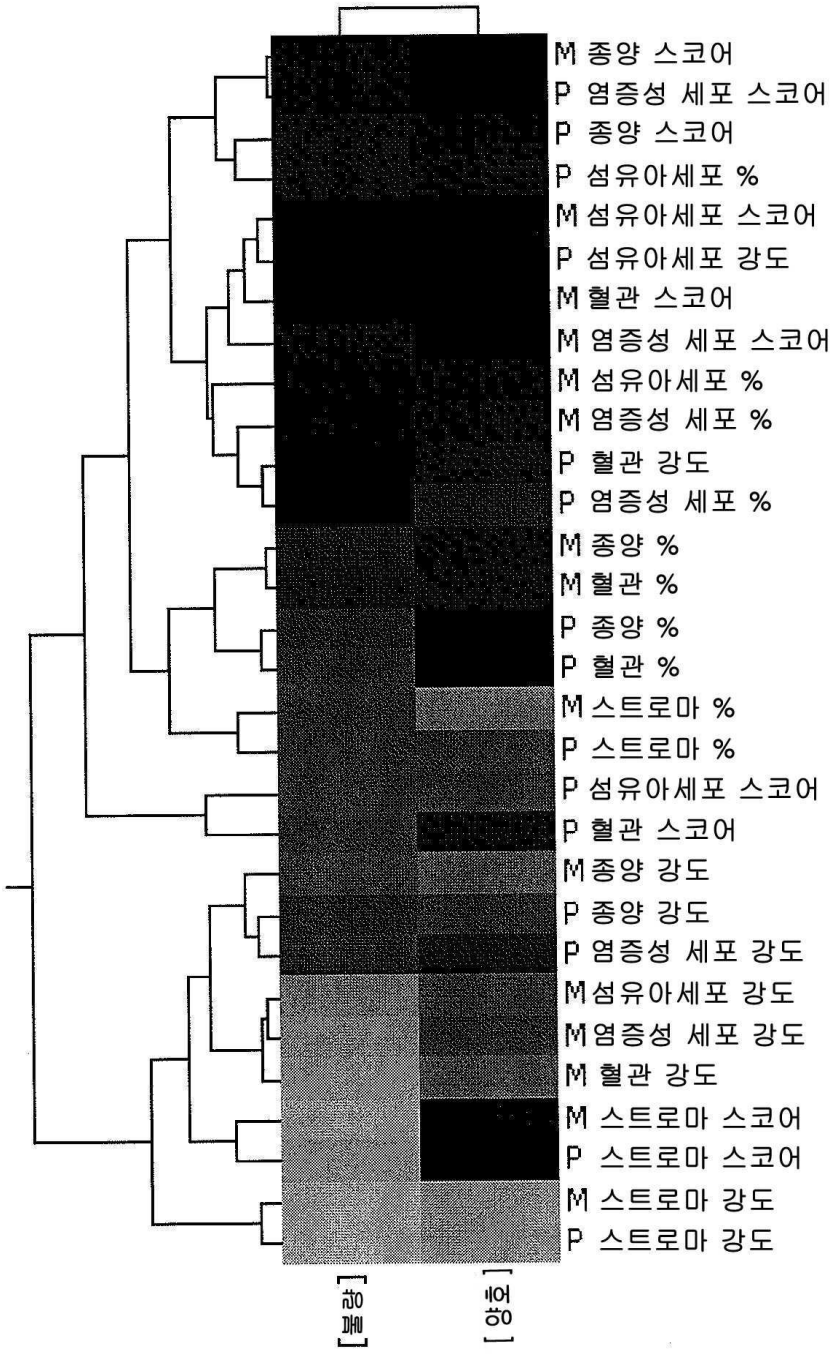


반응 2에서 범례 - 계층적 조합 수목상

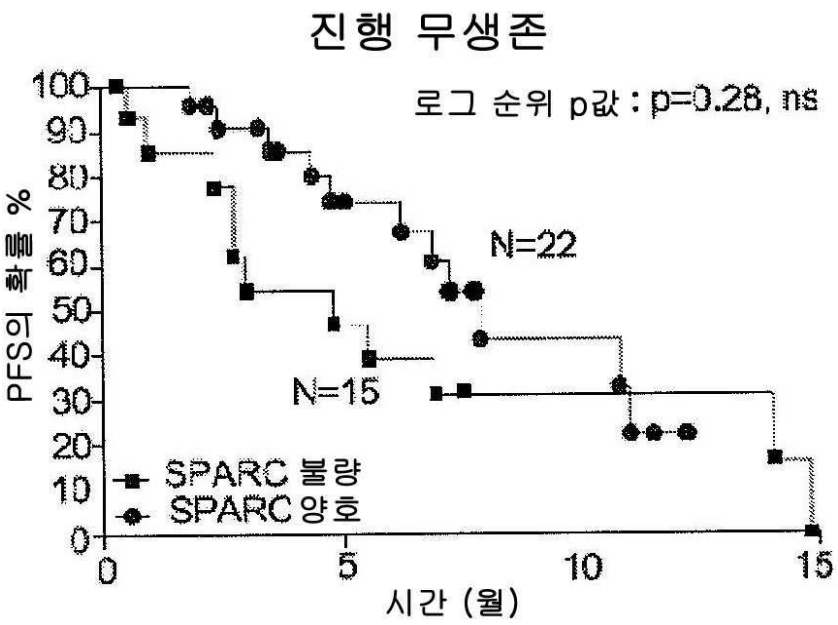
색체 범위

30.6 53.6 75.5

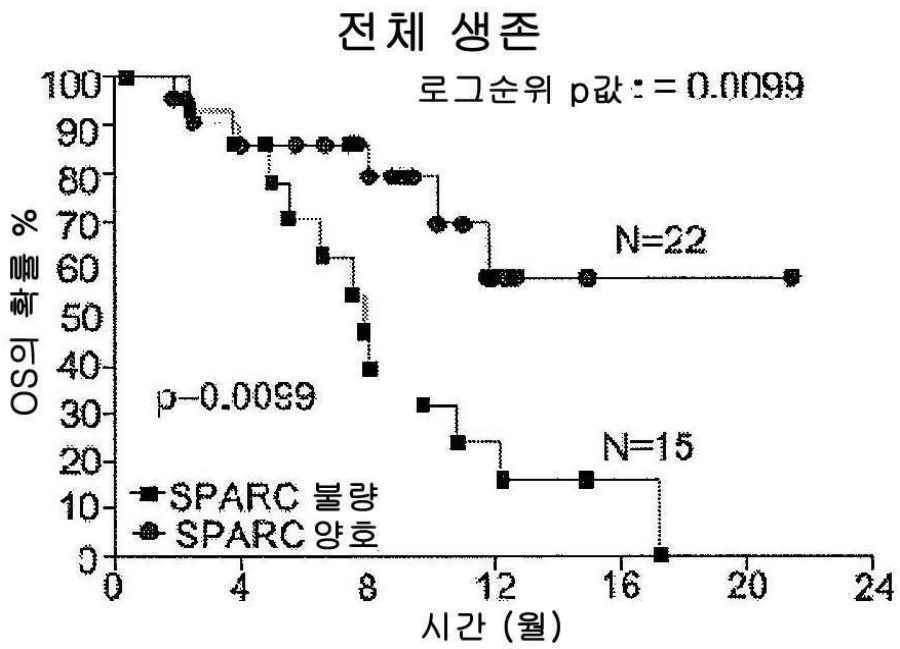
도면10


M 종양 스코어
P 염증성 세포 스코어
P 종양 스코어
P 섬유아세포 %
M 섬유아세포 스코어
P 섬유아세포 강도
M 혈관 스코어
M 염증성 세포 스코어
M 섬유아세포 %
M 염증성 세포 %
P 혈관 강도
P 염증성 세포 %
M 종양 %
M 혈관 %
P 종양 %
P 혈관 %
M 스트로마 %
P 스트로마 %
P 섬유아세포 스코어
P 혈관 스코어
M 종양 강도
P 종양 강도
P 염증성 세포 강도
M 섬유아세포 강도
M 염증성 세포 강도
M 혈관 강도
M 스트로마 스코어
P 스트로마 스코어
M 스트로마 강도
P 스트로마 강도
[정상]
[종양]

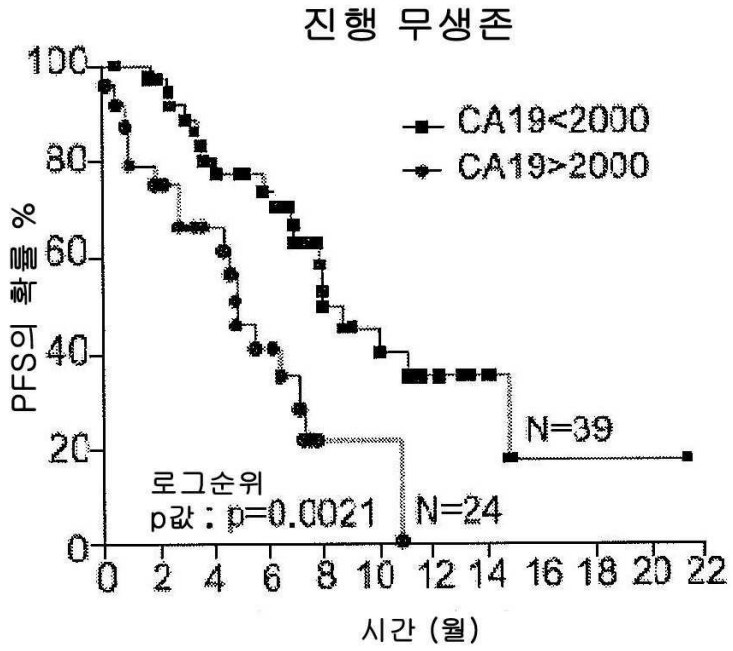
도면11a


진행 무생존
로그 순위 p값 : p=0.28, ns
PFS의 확률 %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
N=22
N=15
SPARC 불량
SPARC 양호
0
5
10
15
시간 (월)

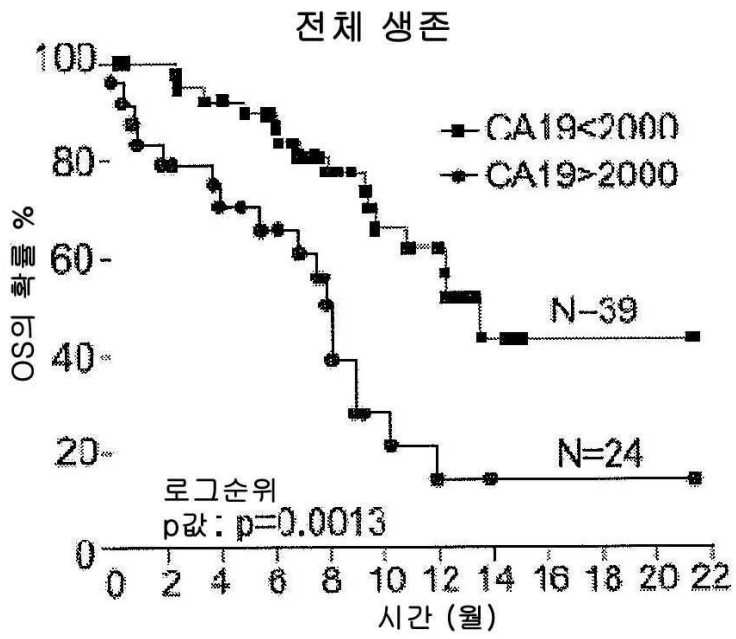
도면11b


전체 생존
로그순위 p값 : = 0.0099
OS의 확률 %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
N=22
p=0.0099
N=15
SPARC 불량
SPARC 양호
0
4
8
12
16
20
24
시간 (월)

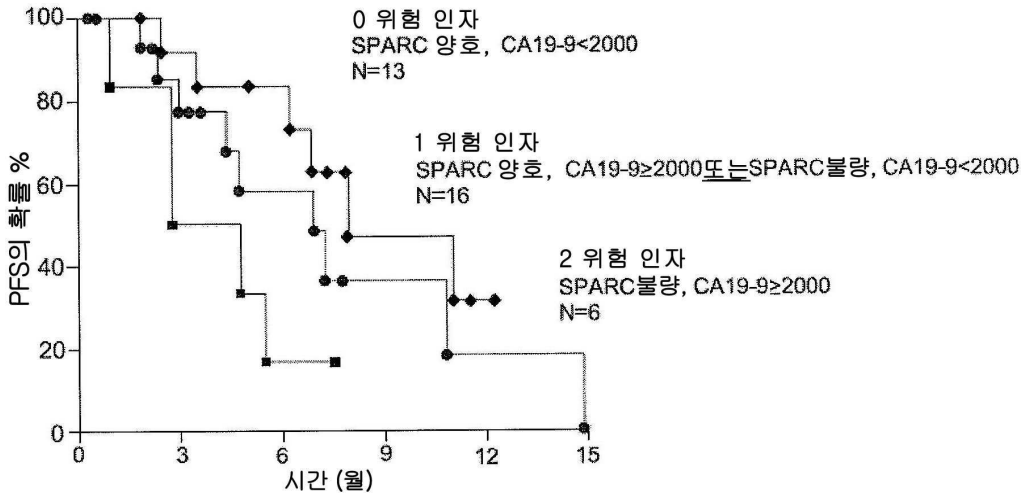
도면12a


진행 무생존
CA19<2000
CA19>2000
PFS의 확률 %
100
80
60
40
20
0
N=39
N=24
로그순위
p값 : p=0.0021
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
시간 (월)

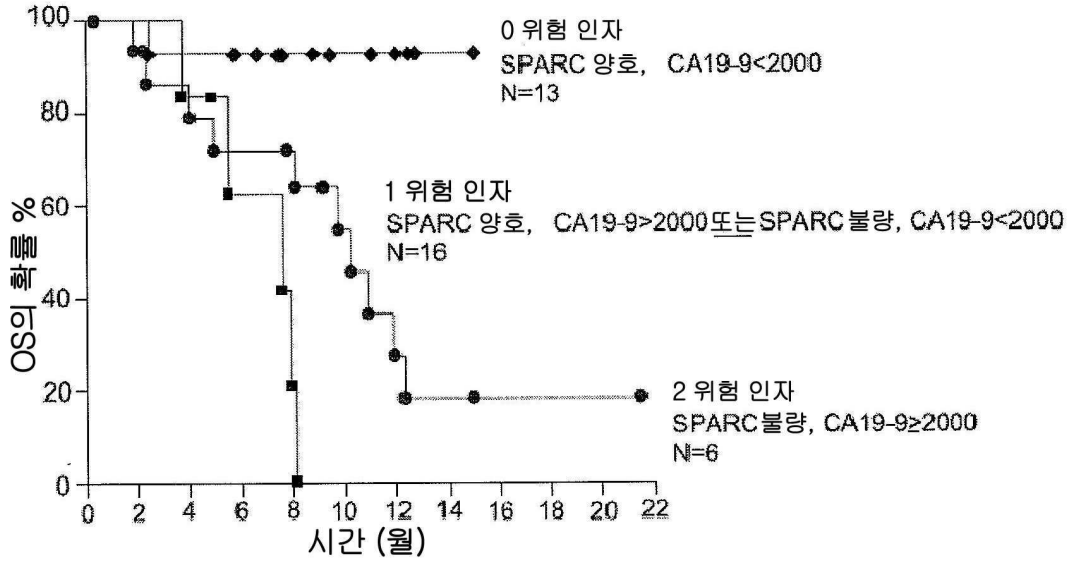
도면12b


전체 생존
CA19<2000
CA19>2000
OS의 확률 %
100
80
60
40
20
0
N=39
N=24
로그순위
p값 : p=0.0013
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
시간 (월)

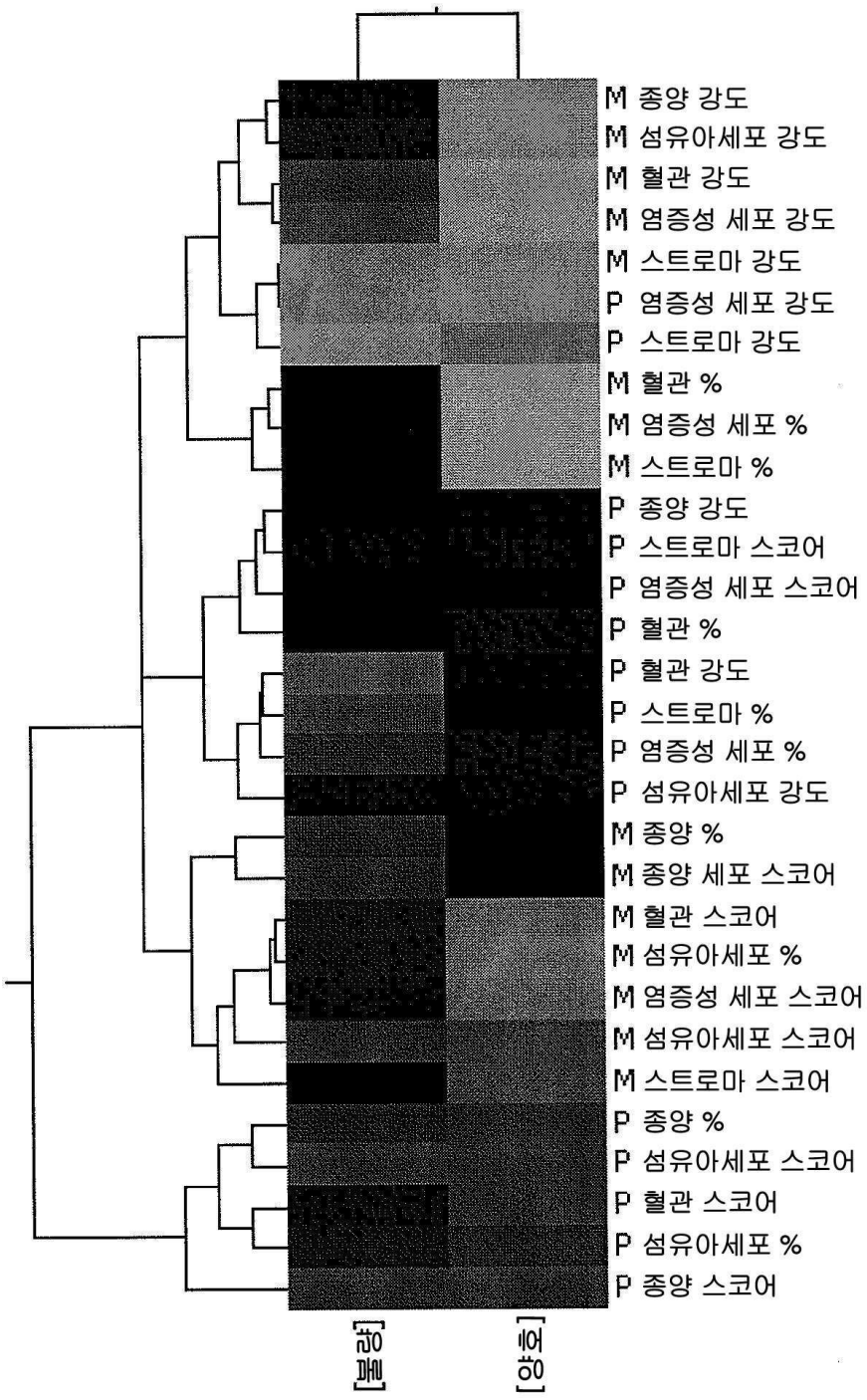
도면13


0 위험 인자
SPARC 양호, CA19-9<2000
N=13
1 위험 인자
SPARC 양호, CA19-9≥2000또는SPARC불량, CA19-9<2000
N=16
2 위험 인자
SPARC불량, CA19-9≥2000
N=6
PFS의 확률 %
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
시간 (월)

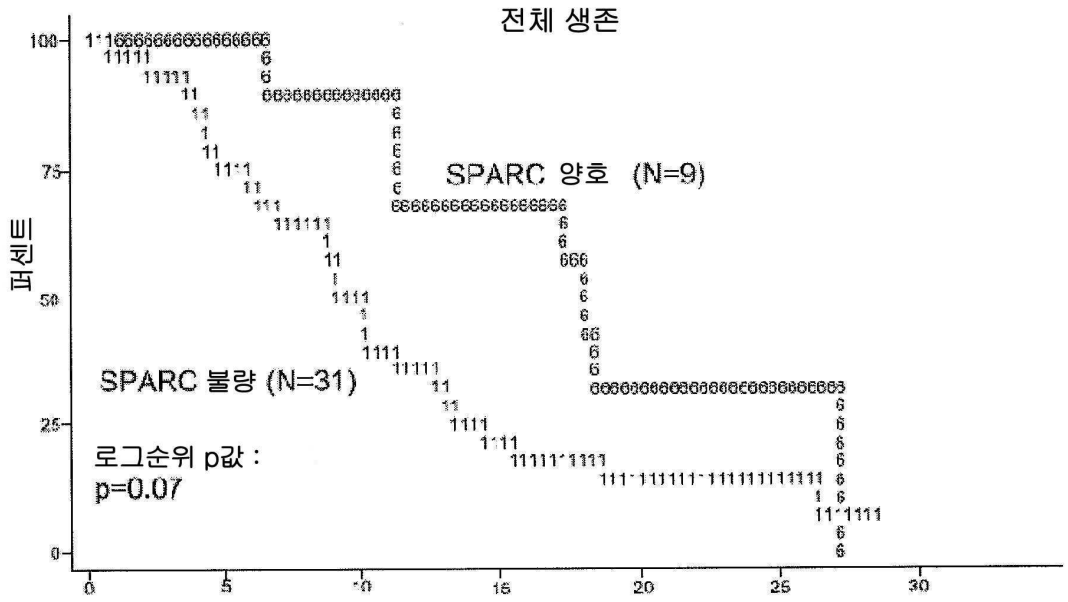
도면14


0 위험 인자
SPARC 양호, CA19-9<2000
N=13
1 위험 인자
SPARC 양호, CA19-9>2000또는SPARC 불량, CA19-9<2000
N=16
2 위험 인자
SPARC불량, CA19-9≥2000
N=6
OS의 확률 %
100
80
60
40
20
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
시간 (월)

도면15


M 종양 강도
M 섬유아세포 강도
M 혈관 강도
M 염증성 세포 강도
M 스트로마 강도
P 염증성 세포 강도
P 스트로마 강도
M 혈관 %
M 염증성 세포 %
M 스트로마 %
P 종양 강도
P 스트로마 스코어
P 염증성 세포 스코어
P 혈관 %
P 혈관 강도
P 스트로마 %
P 염증성 세포 %
P 섬유아세포 강도
M 종양 %
M 종양 세포 스코어
M 혈관 스코어
M 섬유아세포 %
M 염증성 세포 스코어
M 섬유아세포 스코어
M 스트로마 스코어
P 종양 %
P 섬유아세포 스코어
P 혈관 스코어
P 섬유아세포 %
P 종양 스코어
[혈관]
[염증]

도면16


전체 생존
퍼센트
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
30
SPARC 양호 (N=9)
SPARC 불량 (N=31)
로그순위 p값 :
p=0.07