(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2013-505268
(P2013-505268A)
(43)公表日　平成25年2月14日(2013.2.14)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	2G045
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	4C084
A61K 31/337	(2006.01)	A61K	31/337	4C086
A61P 35/04	(2006.01)	A61P	35/04	
A61P 35/02	(2006.01)	A61P	35/02	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 45 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-529971 (P2012-529971)
(86)(22)出願日　平成22年9月20日 (2010.9.20)
(85)翻訳文提出日　平成24年5月16日 (2012.5.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/049545
(87)国際公開番号　WO2011/035274
(87)国際公開日　平成23年3月24日 (2011.3.24)
(31)優先権主張番号　61/276,969
(32)優先日　平成21年9月18日 (2009.9.18)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　508235494
アブラクシス　バイオサイエンス　リミテッド　ライアビリティー　カンパニー
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９００２５、ロス　アンジェルス、ウィルシャー　ブールヴァード　１１７５５、スウィート　２１００
(74)代理人　100080791
弁理士　高島　一
(74)代理人　100125070
弁理士　土井　京子
(74)代理人　100136629
弁理士　鎌田　光宜
(74)代理人　100121212
弁理士　田村　弥栄子

最終頁に続く

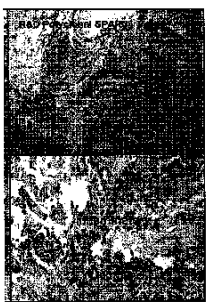
(54)【発明の名称】癌の治療におけるＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャの使用

(57)【要約】
本発明は、化学療法、放射線療法、手術療法及び併用療法を含む療法への応答を予測するための、マルチパラメトリック抗ＳＰＡＲＣ抗体ベースの技術を提供する。
【選択図】図１

FIG. 1A



FIG. 1B



【特許請求の範囲】
【請求項１】
化学療法レジメンで哺乳動物中の腫瘍を治療する方法であって、
ａ．免疫組織学のために腫瘍の複数の組織切片を調製する工程；
ｂ．該腫瘍の１以上の組織切片を第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、腫瘍細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；
ｃ．該腫瘍の１以上の組織切片を第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、繊維芽細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；
ｄ．第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体による腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの染色を決定し、かつ第二の抗体による腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの染色を決定し、それにより、ＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャ（ＳＭＳ）を決定する工程；
ｅ．腫瘍ＳＭＳが所定のＳＭＳの基準を満たす場合に、治療有効量の化学療法レジメンを投与する工程、
を含む、方法。
【請求項２】
所定のＳＭＳが、第一の抗体での少なくとも４９％の間質染色ポジティブと、第二の抗体での少なくとも６６の繊維芽細胞スコア、４１の繊維芽細胞強度、２６の腫瘍強度、５１の炎症細胞強度、５５の炎症細胞スコア、３３の血管％、５４の腫瘍スコア、６４の血管強度、５４の繊維芽細胞％、６４の血管強度、４３の炎症細胞％及び６２の間質スコアの染色とを有する複合プロフィールでの免疫染色を含み、療法がｎａｂ－パクリタキセルを含むレジメンであり、腫瘍が膵臓癌である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
腫瘍が、口腔腫瘍、咽頭腫瘍、消化器系腫瘍、呼吸器系腫瘍、骨腫瘍、軟骨腫瘍、骨転移、肉腫、皮膚腫瘍、黒色腫、乳房腫瘍、生殖器系腫瘍、泌尿器腫瘍、眼窩腫瘍、脳及び中枢神経系の腫瘍、神経膠腫、内分泌系腫瘍、甲状腺腫瘍、食道腫瘍、胃腫瘍、小腸腫瘍、結腸腫瘍、直腸腫瘍、肛門腫瘍、肝臓腫瘍、胆嚢腫瘍、膵臓腫瘍、喉頭腫瘍、肺の腫瘍、気管支腫瘍、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、子宮頸部腫瘍、子宮体腫瘍、卵巣腫瘍、外陰部腫瘍、膣腫瘍、前立腺腫瘍、前立腺癌腫、精巣腫瘍、陰茎の腫瘍、膀胱腫瘍、腎臓の腫瘍、腎盂の腫瘍、尿管の腫瘍、頭頸部腫瘍、副甲状腺癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病及び慢性骨髄性白血病からなる群より選択される、請求項１又は２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４】
腫瘍が膵臓癌である、請求項３に記載の方法。
【請求項５】
哺乳動物がヒトである、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
化学療法レジメンがパクリタキセルを含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
化学療法レジメンがｎａｂ－パクリタキセルを含む、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
化学療法レジメンに対する哺乳動物中の腫瘍の応答を予測する方法であって、
ａ．ＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャ（ＳＭＳ）を得るために腫瘍の複数の組織切片を調製する工程；
ｂ．該腫瘍の１以上の組織切片を第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、腫瘍細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；

ｃ．該腫瘍の１以上の組織切片を第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、繊維芽細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；
ｄ．第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体による腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの染色を決定し、かつ第二の抗体による腫瘍血管及び腫瘍間質の染色を決定する工程；
ｅ．所定のＳＭＳが免疫染色によって実証される場合に、該化学療法レジメンに対するポジティブ応答を予測する工程、
を含む、方法。

【請求項９】

所定のＳＭＳが、第一の抗体での少なくとも８２％の間質染色ポジティブと、第二の抗体での少なくとも８７の繊維芽細胞スコア、６８の繊維芽細胞強度、４９の腫瘍強度、４２の炎症細胞強度、６７の炎症細胞スコア、６８の血管％、７６の腫瘍スコア、４６の血管強度、５１の繊維芽細胞％、７５の血管強度、５９の炎症細胞％及び６２の間質スコアの染色とを有する複合プロフィールでの免疫染色を含み、療法がｎａｂ－パクリタキセルを含むレジメンであり、腫瘍が膵臓癌である、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

腫瘍が、口腔腫瘍、咽頭腫瘍、消化器系腫瘍、呼吸器系腫瘍、骨腫瘍、軟骨腫瘍、骨転移、肉腫、皮膚腫瘍、黒色腫、乳房腫瘍、生殖器系腫瘍、泌尿器腫瘍、眼窩腫瘍、脳及び中枢神経系の腫瘍、神経膠腫、内分泌系腫瘍、甲状腺腫瘍、食道腫瘍、胃腫瘍、小腸腫瘍、結腸腫瘍、直腸腫瘍、肛門腫瘍、肝臓腫瘍、胆嚢腫瘍、膵臓腫瘍、喉頭腫瘍、肺の腫瘍、気管支腫瘍、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、子宮頸部腫瘍、子宮体腫瘍、卵巣腫瘍、外陰部腫瘍、膣腫瘍、前立腺腫瘍、前立腺癌腫、精巣腫瘍、陰茎の腫瘍、膀胱腫瘍、腎臓の腫瘍、腎盂の腫瘍、尿管の腫瘍、頭頸部腫瘍、副甲状腺癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病及び慢性骨髄性白血病からなる群より選択される、請求項８又は９のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１１】

腫瘍が膵臓腫瘍である、請求項１０に記載の方法。

【請求項１２】

哺乳動物がヒトである、請求項８～１０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１３】

化学療法レジメンがパクリタキセルを含む、請求項８～１０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１４】

化学療法レジメンがｎａｂ－パクリタキセルを含む、請求項８～１０のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１５】

腫瘍を有する哺乳動物が、該腫瘍の低リスクの進行を有するか否かを予測する方法であって、
ａ．ＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャ（ＳＭＳ）を得るために腫瘍の複数の組織切片を調製する工程；
ｂ．該腫瘍の１以上の組織切片を第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、腫瘍細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；
ｃ．該腫瘍の１以上の組織切片を第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、繊維芽細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；
ｄ．第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体による腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの染色を決定し、かつ第二の抗体による腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの染色を決定する工程；及び

ｅ．腫瘍ＳＭＳが所定のＳＭＳの基準を満たす場合に、低リスクの進行が存在すると決定する工程、
を含む、方法。
【請求項１６】
腫瘍が乳癌であり、所定のＳＭＳが、第一の抗体での少なくとも８２％の間質染色ポジティブと、第二の抗体での少なくとも８７の繊維芽細胞スコア、６８の繊維芽細胞強度、４９の腫瘍強度、４２の炎症細胞強度、６７の炎症細胞スコア、６８の血管％、７６の腫瘍スコア、４６の血管強度、５１の繊維芽細胞％、７５の血管強度、５９の炎症細胞％及び６２の間質スコアの染色とを有する複合プロフィールでの免疫染色を含み、療法がｎａｂ－パクリタキセルを含むレジメンであり、腫瘍が膵臓癌である、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
腫瘍が、口腔腫瘍、咽頭腫瘍、消化器系腫瘍、呼吸器系腫瘍、骨腫瘍、軟骨腫瘍、骨転移、肉腫、皮膚腫瘍、黒色腫、乳房腫瘍、生殖器系腫瘍、泌尿器腫瘍、眼窩腫瘍、脳及び中枢神経系の腫瘍、神経膠腫、内分泌系腫瘍、甲状腺腫瘍、食道腫瘍、胃腫瘍、小腸腫瘍、結腸腫瘍、直腸腫瘍、肛門腫瘍、肝臓腫瘍、胆嚢腫瘍、膵臓腫瘍、喉頭腫瘍、肺の腫瘍、気管支腫瘍、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、子宮頸部腫瘍、子宮体腫瘍、卵巣腫瘍、外陰部腫瘍、膣腫瘍、前立腺腫瘍、前立腺癌腫、精巣腫瘍、陰茎の腫瘍、膀胱腫瘍、腎臓の腫瘍、腎盂の腫瘍、尿管の腫瘍、頭頸部腫瘍、副甲状腺癌、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病及び慢性骨髄性白血病からなる群より選択される、請求項１５又は１６に記載の方法。
【請求項１８】
腫瘍が膵臓癌である、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
腫瘍が乳癌である、請求項１７に記載の方法。
【請求項２０】
哺乳動物がヒトである、請求項１５～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１】
哺乳動物が、パクリタキセルを含む化学療法レジメンで治療される、請求項１５～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
化学療法レジメンがｎａｂ－パクリタキセルを含む、請求項１５～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２３】
第一の哺乳動物由来の腫瘍を療法により治療する方法であって、
ａ．以下を含む、該療法につき２つ以上の予測的ＳＭＳを決定する工程：
ｉ．該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物から、腫瘍の複数の組織切片を調製する工程；
ｉｉ．該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の腫瘍のそれぞれの１以上の組織切片を第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、腫瘍細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；
ｉｉｉ．該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の腫瘍のそれぞれの１以上の組織切片を第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、繊維芽細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；
ｉｖ．第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体による、該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の腫瘍のそれぞれに、該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの免疫染色パターンを決定し、かつ第二の抗体による、該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の腫瘍内の腫瘍細胞、繊

維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの免疫染色を決定することによって、該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の各腫瘍のＳＭＳを決定する工程；

ｖ．該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の各腫瘍の腫瘍ＳＭＳを、２つ以上の転帰グループにクラスタリングする工程であって、各転帰グループのＳＭＳ重心が予測的ＳＭＳを規定する、工程；

ｂ．以下を含むプロセスによって、第一の哺乳動物由来の腫瘍のＳＭＳを決定する工程：

ｉ．第一の哺乳動物由来の腫瘍の複数の組織切片を調製する工程；

ｉｉ．該第一の哺乳動物由来の腫瘍の１以上の組織切片を第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、腫瘍細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；

ｉｉｉ．該第一の哺乳動物由来の腫瘍の１以上の組織切片を第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、繊維芽細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；

ｉｖ．第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体による、該第一の哺乳動物由来の腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせについて、第一の哺乳動物における腫瘍の免疫染色パターンを決定し、かつ第二の抗体による、該第一の哺乳動物由来の腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの、第一の哺乳動物由来の腫瘍の免疫染色を決定することによって、第一の哺乳動物の腫瘍ＳＭＳを決定する工程；

ｃ．第一の哺乳動物のＳＭＳから（ａ）で決定した予測的ＳＭＳまでの該腫瘍のユークリッド距離を決定し、第一の哺乳動物由来の腫瘍を、最も近い予測的ＳＭＳを有する転帰グループの一員として分類する工程；

ｄ．第一の哺乳動物のＳＭＳ由来の腫瘍が、該療法に応答する転帰グループにマッピングされる場合、治療有効量の療法を該第一の哺乳動物に投与する工程、

を含む、方法。

【請求項２４】

第一の哺乳動物由来の腫瘍が、前記療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の腫瘍と同じ型の腫瘍である、請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

療法がｎａｂ－パクリタキセルを含む、請求項２３に記載の方法。

【請求項２６】

第一の哺乳動物由来の腫瘍が膵臓癌である、請求項２３に記載の方法。

【請求項２７】

前記療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の各腫瘍の腫瘍ＳＭＳのクラスタリングが、Ｋ平均、自己組織化マップ及び階層的クラスタリングの１以上によって実施される、請求項２３に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

関連事件

本特許出願は、２００９年９月１８日出願の米国仮特許出願第６１／２７，９６９号（これは本明細書中に参照により組み込まれる）の利益を主張する。

【背景技術】

【０００２】

分泌タンパク質酸性及びシステインリッチ（Ｓｅｃｒｅｔｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ａｃｉｄｉｃ ａｎｄ ｒｉｃｈ ｉｎ ｃｙｓｔｅｉｎｅ）（オステオネクチン、ＢＭ４０又はＳＰＡＲＣとしても知られる）（本明細書中で以下「ＳＰＡＲＣ」）は、細胞形状の変化を引き起こし、細胞周期の進行を阻害し、細胞外マトリックスの合成に影響を与える

、マトリックス結合タンパク質である（Ｂｒａｄｓｈａｗら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １００：６０４５－６０５０（２００３））。マウスＳＰＡＲＣ遺伝子は１９８６年にクローニングされ（Ｍａｓｏｎら、ＥＭＢＯ Ｊ．５：１４６５－１４７２（１９８６））、全長ヒトＳＰＡＲＣ ｃＤＮＡは、１９８７年にクローニングされ配列決定された（Ｓｗａｒｏｏｐら、Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ２：３７－４７（１９８８））。ＳＰＡＲＣ発現は発生的に調節され、正常な発生の間に又は創傷に応答してリモデリングを受けている組織において主に発現される。例えば、高レベルのＳＰＡＲＣタンパク質は、発生中の骨及び歯において発現される（例えば、Ｌａｎｅら、ＦＡＳＥＢ Ｊ．，８，１６３ １７３（１９９４）；Ｙａｎ ＆ Ｓａｇｅ，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．４７：１４９５－１５０５（１９９９）を参照）。

【０００３】

ＳＰＡＲＣはいくつかの侵襲性癌で上方制御されるが、対応する正常組織には存在しない（Ｐｏｒｔｅｒら、Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．，４３，７９１（１９９５））。ＳＰＡＲＣ発現は、種々の腫瘍（例えば、膀胱、肝臓、卵巣、腎臓、腸及び乳房）において誘導される。例えば、膀胱癌では、ＳＰＡＲＣ発現は進行した癌腫に関連している。病期Ｔ２以上の浸潤性膀胱腫瘍は、病期Ｔ１の膀胱腫瘍（又はそれより低い表在性腫瘍）と比較して高いレベルのＳＰＡＲＣを発現することが示されており、予後がより不良である（例えば、Ｙａｍａｎａｋａら、Ｊ．Ｕｒｏｌｏｇｙ，１６６，２４９５ ２４９９（２００１）を参照）。髄膜腫では、ＳＰＡＲＣ発現は、浸潤性腫瘍のみと関連している（例えば、Ｒｅｍｐｅｌら、Ｃｌｉｎｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，５，２３７ ２４１（１９９９）を参照）。ＳＰＡＲＣ発現は、上皮内浸潤性乳癌病変の７４．５％（例えば、Ｂｅｌｌａｈｃｅｎｅら、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．，１４６，９５ １００（１９９５）を参照）及び浸潤性乳管癌の５４．２％（例えば、Ｋｉｍら、Ｊ．Ｋｏｒｅａｎ Ｍｅｄ．Ｓｃｉ．，１３，６５２ ６５７（１９９８）を参照）においても検出されている。ＳＰＡＲＣ発現は、乳癌における頻繁な微小石灰化とも関連しており（例えば、上記Ｂｅｌｌａｈｃｅｎｅらを参照）、ＳＰＡＲＣ発現が、骨への乳房転移の親和性を担っている可能性があることを示唆している。

【０００４】

驚くべきことに、ＳＰＡＲＣは、いくつかの系において抗腫瘍活性を有することも示されている。ＳＰＡＲＣは、Ｇ１中期で細胞を停止させる強力な細胞周期阻害剤であり（Ｙａｎ ＆ Ｓａｇｅ，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．４７：１４９５－１５０５（１９９９））、ＳＰＡＲＣの誘導性の発現は、ｉｎ ｖｉｔｒｏモデル系で乳癌細胞の増殖を阻害することが示されている（Ｄｈａｎｅｓｕａｎら、Ｂｒｅａｓｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．Ｔｒｅａｔ．７５：７３－８５（２００２））。同様に、外因性ＳＰＡＲＣは、ＨＯＳＥ（ヒト卵巣表層上皮）及び卵巣癌細胞の両方の増殖を、濃度依存的様式で減少させることができる。さらに、ＳＰＡＲＣは、卵巣癌細胞においてアポトーシスを誘導する。さらに、卵巣上皮細胞などの細胞上のＳＰＡＲＣ受容体が報告されている。その受容体に対するＳＰＡＲＣの結合は、ＳＰＡＲＣの腫瘍抑制機能を媒介する組織特異的なシグナル伝達経路を作動させる可能性が高いことが提唱されている（Ｙｉｕら、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１５９：６０９－６２２（２００１））。精製されたＳＰＡＲＣは、血管新生を阻害し、ｉｎ ｖｉｖｏ異種移植片モデル系において神経芽細胞腫の腫瘍増殖を害することも報告されている（Ｃｈｌｅｎｓｋｉら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６２：７３５７－７３６３（２００２））。

【０００５】

これらの矛盾するように思われる結果は、未成熟ＳＰＡＲＣの示差的なスプライシング及び翻訳後修飾から生じるＳＰＡＲＣの多数の形態に起因する可能性がある。結果として、例えば繊維芽細胞ＳＰＡＲＣは、血小板ＳＰＡＲＣとは異なる分子である。さらに、ＳＰＡＲＣは、示差的にグリコシル化される（Ｋａｕｆｍａｎら、Ｇｌｙｃｏｂｉｏｌｏｇｙ １４（７）：６０９－６１９（２００４）を参照）。ＳＰＡＲＣは、多様なプロテアーゼによって容易に分解され、細胞外環境においてターンオーバーを受けると考えられる

。細胞外プロテアーゼによるＳＰＡＲＣのターンオーバーは、新規ＳＰＡＲＣエピトープの露出を生じる（Ｌａｎｅ　＆　Ｓａｇｅ，ＦＡＳＥＢ　Ｊ．８（２）：１６３－１７３（１９９４））。これらの因子は、広い範囲の免疫組織学的染色パターンを生じる。各抗体は、顕著に異なる染色パターンを生じ得る。

【０００６】

癌は、以下の３つの型の治療のうち１つ又はそれらの組み合わせによって現在主に治療されている：手術、放射線及び化学療法。手術は一般に、初期段階の癌の治療にのみ有効である。癌を有する個体の５０％より多くにとっては、診断される時までに、彼らは有効な手術治療の候補ではなくなっている。放射線治療は、初期及び中期段階の癌で、臨床的に局在化した疾患を示す個体に対してのみ有効であり、転移を有する癌の後期段階には有効ではない。

【０００７】

化学療法は、細胞複製又は細胞代謝の破壊を含む。化学療法は有効であり得るが、重篤な副作用（例えば、嘔吐、低い白血球数（ＷＢＣ）、脱毛、体重減少及び他の毒性作用）が存在する。非常に毒性の高い副作用に起因して、癌を有する多くの個体が、完全な化学療法レジメン（ｒｅｇｉｍｅ）を首尾よく完了することができない。化学療法が誘導する副作用は、個体の生活の質に顕著に影響を与え、治療に対する個体のコンプライアンスに劇的に影響を与え得る。さらに、化学療法剤に関連する有害な副作用は一般に、これらの薬物の投与における主要な用量規制毒性（ＤＬＴ）である。例えば、粘膜炎は、いくつかの抗癌剤（代謝拮抗細胞傷害剤５－ＦＵ、メトトレキサート、及びドキソルビシンなどの抗腫瘍抗生物質が含まれる）に関する主要な用量規制毒性である。重篤な場合、化学療法が誘導するこれらの副作用の多くは、入院につながり得るか、或いは疼痛のための鎮痛薬による治療を必要とし得る。さらに、化学療法に対する耐性の低さは、癌を有する一部の個体において死をもたらし得る。抗癌薬の極端な副作用は、標的特異性が低いことによって引き起こされる。薬物は、意図した標的である腫瘍だけでなく、ほとんどの正常臓器を通って循環する。副作用を引き起こす標的特異性の低さはまた、正確に標的化されるのが一部の薬物だけなので、化学療法の効力を低下させる。化学療法の効力は、標的腫瘍内の抗癌薬の保持の低さによってさらに低下させられる。

【０００８】

癌の重篤度及び幅広さに起因して、手術、化学療法及び放射線治療の欠点を克服する、かかる疾患及び障害の有効な治療が強く必要とされている。特に、化学療法に関連する重篤な副作用を考慮すると、腫瘍が化学療法レジメンに応答するか否かを特定することが必要である。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００９】

本明細書中に記載される発明は、種々のＳＰＡＲＣ抗体で観察される不均質な免疫組織学の利用に基づく癌の新規治療方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本発明は、第一の哺乳動物中の腫瘍を療法により治療する方法を提供し、この方法は以下を含む：

以下を含む、該療法につき２つ以上の予測的ＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャ（ＳＰＡＲＣ　Ｍｉｃｒｏｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ　Ｓｉｇｎａｔｕｒｅｓ；「ＳＭＳ」）を決定する工程：該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物から、腫瘍の複数の組織切片を調製する工程；該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の腫瘍のそれぞれの１以上の組織切片を第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、腫瘍細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の腫瘍のそれぞれの１以上の組織切片を第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、繊維芽細胞中のＳ

ＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体による、該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の腫瘍のそれぞれの、腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの免疫染色パターンを決定し、かつ第二の抗体による、腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの免疫染色を決定することによって、該療法につき既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の各腫瘍のＳＭＳを決定する工程；既知の転帰を有する他の哺乳動物由来の各腫瘍の腫瘍ＳＭＳを、２つ以上の転帰グループにクラスタリングする工程であって、各転帰グループからのクラスターのＳＭＳ重心が予測的ＳＭＳを規定する、工程。次に、以下を含むプロセスによって、第一の哺乳動物由来の腫瘍のＳＭＳを決定する：第一の哺乳動物由来の腫瘍の複数の組織切片を調製する工程；該第一の哺乳動物由来の腫瘍の１以上の組織切片を第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、腫瘍細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；該第一の哺乳動物由来の腫瘍の１以上の組織切片を第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、繊維芽細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体による、腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせについて、第一の哺乳動物における腫瘍の免疫染色パターンを決定し、かつ第二の抗体による、腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの、第一の哺乳動物由来の腫瘍の免疫染色を決定することによって、第一の哺乳動物の腫瘍ＳＭＳを決定する工程；及び第一の哺乳動物の腫瘍ＳＭＳから（ａ）で決定した予測的ＳＭＳまでのユークリッド距離を決定し、第一の哺乳動物の腫瘍を、最も近い予測的ＳＭＳを有する転帰グループの一員として分類する工程。第一の哺乳動物の腫瘍ＳＭＳが、該療法に応答する転帰グループにマッピングされる場合、該第一の哺乳動物に対する治療有効量の療法。

【００１１】

本発明に従う実施形態には、第一の哺乳動物中の同じ腫瘍型が、研究した全ての「他の哺乳動物」の腫瘍型と同じである実施形態が含まれる。使用され得る任意の適切な療法としては、化学療法、放射線療法、手術療法、代替療法及びそれらの組合わせが挙げられた。適切な療法には、例えば、ｎａｂ－パクリタキセルを含む療法が挙げられる。適切な腫瘍としては、乳癌、膵臓癌及び黒色腫が挙げられる。クラスタリングは、Ｋ平均クラスタリング、自己組織化マップ及び階層的クラスタリングなどを含む任意の適切な方法によって実施され得る。

【００１２】

本発明は、化学療法レジメン又は他の適切な療法で哺乳動物中の腫瘍を治療する方法を提供し、この方法は以下を含む：

ａ．ＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャ（ＳＭＳ）を得るために腫瘍の複数の組織切片を調製する工程；

ｂ．該腫瘍の組織切片を第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、腫瘍細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；

ｃ．該腫瘍の組織切片を第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、繊維芽細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；

ｄ．第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体による腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの染色を決定し、かつ第二の抗体による腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの染色を決定する工程；

ｅ．決定されたＳＭＳが、化学療法レジメン又は他の適切な療法の使用を示す所定のＳＭＳの基準を満たす場合に、治療有効量の療法を投与する工程。

【００１３】
療法の使用を示す、本発明が提供する所定のＳＭＳには、第一の抗体での少なくとも４９％の間質染色ポジティブと、第二の抗体での少なくとも６６の繊維芽細胞スコア、４１の繊維芽細胞強度、２６の腫瘍強度、５１の炎症細胞強度、５５の炎症細胞スコア、３３の血管％、５４の腫瘍スコア、６４の血管強度、５４の繊維芽細胞％、６４の血管強度、４３の炎症細胞％及び６２の間質スコアの染色とを有する免疫染色を含むものが挙げられ、ここで、療法はｎａｂ－パクリタキセルを含むレジメンであり、腫瘍は膵臓癌である。即ち、療法が使用されるべきであることを示す、腫瘍におけるＳＰＡＲＣ発現からのこれら１６の基準を含むＳＭＳを使用する。本発明に従う、所定のＳＭＳのこのグループ中のかかる所定のＳＭＳには、腫瘍におけるＳＰＡＲＣ発現の２～１５のこれら基準のみからなるものも含まれる。
【００１４】
当業者は、さらなる所定のＳＭＳが、他の一連の腫瘍のクラスター分析によって同定できることを容易に理解するであろう。
【００１５】
本発明はまた、化学療法レジメン又は他の適切な療法に対する哺乳動物中の腫瘍の応答を予測するためのキットも提供し、これは以下を含む：
ａ．第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体による免疫染色（該第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、腫瘍細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する）、及び
ｂ．第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体による免疫染色（該第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、繊維芽細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する）。
【００１６】
本発明はまた、化学療法又は他の適切な療法に対する応答、及び腫瘍を有する哺乳動物が低リスクの腫瘍の進行又は腫瘍による死を有するか否かを予測する方法を提供し、この方法は以下を含む：ＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャ（ＳＭＳ）を得るために腫瘍の複数の組織切片を調製する工程；該腫瘍の組織切片を第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、腫瘍細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；該腫瘍の組織切片を第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程であって、該第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、繊維芽細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する、工程；第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体による腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの染色を決定し、かつ第二の抗体による腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス、血管、神経組織及び正常な解剖学的形態、又はそれらの任意の組合わせの染色を決定する工程；並びに所定のＳＭＳが存在する場合に、化学療法に対するポジティブ応答、又は低リスクの進行若しくは死が存在することを予測する工程。
【００１７】
本発明はまた、化学療法レジメンに対する哺乳動物中の腫瘍の応答（病理学的応答、全生存又は無進行生存として規定される応答を含むが、これらに限定されない）を予測する方法を提供する：腫瘍の組織切片を抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程（該抗ＳＰＡＲＣ抗体は、ＭＡＢ９４１モノクローナル抗体によって認識されるエピトープを認識する）；及び抗ＳＰＡＲＣ抗体による組織切片中の腫瘍細胞の染色が存在する場合、化学療法レジメンに対する不良な応答を予測する工程。特に、本発明は、化学療法レジメンに対する膵臓癌腫の応答を予測する方法を提供し、この化学療法レジメンは、アルブミン結合ナノ粒子パクリタキセル及びゲムシタビンを投与することを含む。
【００１８】
本発明はまた、化学療法レジメンに対する哺乳動物中の腫瘍の応答を予測する方法を提供し、この方法は以下を含む：腫瘍の組織切片を、ＡＦ９４１ポリクローナル抗体によって認識される免疫優性エピトープを認識する抗ＳＰＡＲＣ抗体で免疫染色する工程；及び抗ＳＰＡＲＣ抗体による組織切片中の腫瘍細胞の染色が存在する場合、化学療法レジメンに対するポジティブ応答を予測する工程。特に、本発明は、化学療法レジメンに対する腫

瘍の応答を予測する方法を提供し、この化学療法レジメンは、アルブミン結合ナノ粒子パクリタキセル及びゲムシタビンを投与することを含む。

【００１９】

本発明により提供される方法のいずれか１つには、哺乳動物がヒト患者である方法も含まれる。

【図面の簡単な説明】

【００２０】

【図１】図１は、２つの異なる抗ＳＰＡＲＣ抗体、モノクローナル（Ａ）、ポリクローナル（Ｂ）によって生成されたＳＰＡＲＣ免疫染色の異なるパターンを示す。

【図２】図２は、ｎａｂ－パクリタキセルベースのレジメンで治療した、Ｄ染色パターンを示すか又は示さないかのいずれかの乳癌患者についての生存曲線を示す。

【図３】図３は、乳癌患者における無進行生存（ＰＦＳ）データのＫ平均クラスタリングからのヒートダイアグラムを示す。

【図４Ａ】図４Ａは、乳癌における無進行生存（ＰＦＳ）に対するＴＮ（Ａ）ステータスの影響を反映する生存曲線を示す。

【図４Ｂ】図４Ｂは、乳癌における無進行生存（ＰＦＳ）に対するＥＲ（Ｂ）ステータスの影響を反映する生存曲線を示す。

【図４Ｃ】図４Ｃは、乳癌における無進行生存（ＰＦＳ）に対するＰＲ（Ｃ）ステータスの影響を反映する生存曲線を示す。

【図５】図５は、乳癌におけるＰＦＳに対するＳＭＳ（ＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャ）及びＴＮステータスの影響を反映する生存曲線を示す。

【図６】図６は、乳癌におけるＰＦＳに対するＳＭＳ及びＥＲステータスの影響を反映する生存曲線を示す。

【図７】図７は、乳癌におけるＰＦＳに対するＳＭＳ及びＰＲステータスの影響を反映する生存曲線を示す。

【図８】図８は、５つの生存カテゴリーを使用した、乳癌患者における応答データのクラスタリングからのヒートダイアグラムを示す。

【図９】図９は、２つの生存カテゴリーを使用した、乳癌患者における応答データのクラスタリングからのヒートダイアグラムを示す。

【図１０】図１０は、患者を良好な予後のＳＭＳ群及び不良な予後のＳＭＳ群に分けた、膵臓癌におけるＰＦＳデータのＫ平均クラスタリングからのヒートダイアグラムを示す。

【図１１Ａ】図１１は、ＳＭＳに基づく、膵臓癌におけるＰＦＳ（Ａ）及び全生存（ＯＳ）（Ｂ）に関する生存曲線を示す。

【図１１Ｂ】図１１は、ＳＭＳに基づく、膵臓癌におけるＰＦＳ（Ａ）及び全生存（ＯＳ）（Ｂ）に関する生存曲線を示す。

【図１２Ａ】図１２は、ＣＡ１９ステータスに基づく、膵臓癌におけるＰＦＳ（Ａ）及び全生存（ＯＳ）（Ｂ）に関する生存曲線を示す。

【図１２Ｂ】図１２は、ＣＡ１９ステータスに基づく、膵臓癌におけるＰＦＳ（Ａ）及び全生存（ＯＳ）（Ｂ）に関する生存曲線を示す。

【図１３】図１３は、膵臓癌における、ＰＦＳに対するＳＭＳ及びＣＡ１９ステータスの影響を反映する生存曲線を示す。

【図１４】図１４は、膵臓癌における、ＯＳに対するＳＭＳ及びＣＡ１９ステータスの影響を反映する生存曲線を示す。

【図１５】図１５は、患者を良好なＰＦＳ群及び不良なＰＦＳ群に分けた、黒色腫患者におけるＰＦＳデータのＫ平均クラスタリングからのヒートダイアグラムを示す。

【図１６】図１６は、ＳＭＳに基づく、黒色腫におけるＰＦＳ（Ａ）及び全生存（ＯＳ）（Ｂ）に関する生存曲線を示す。

【発明を実施するための形態】

【００２１】

本明細書中で使用する場合、用語「腫瘍」とは、良性であれ悪性（癌性）であれ、原発

部位の病変であれ転移であれ、任意の新生物成長、増殖又は細胞塊をいう。本明細書中で使用する場合、用語「癌」とは、正常な増殖制御に対する感受性を失った細胞の増殖によって引き起こされる又は特徴付けられる、増殖性障害をいう。同じ組織型の癌は通常同じ組織に起源し、それらの生物学的特徴に基づいて種々のサブタイプに分割され得る。癌の４つの一般的カテゴリーは、癌腫（上皮組織由来）、肉腫（結合組織又は中胚葉由来）、白血病（造血組織由来）及びリンパ腫（リンパ組織由来）である。２００を超える異なる型の癌が知られており、身体の全ての臓器及び組織が罹患し得る。癌の定義を限定しない癌の具体例には、黒色腫、白血病、星状細胞腫、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、リンパ腫、神経膠腫、ホジキンリンパ腫及び慢性リンパ球性白血病が含まれ得る。種々の癌に罹患し得る臓器及び組織の例には、膵臓、乳房、甲状腺、卵巣、子宮、精巣、前立腺、甲状腺、下垂体、副腎、腎臓、胃、食道又は直腸、頭頸部、骨、神経系、皮膚、血液、鼻咽頭組織、肺、泌尿器、子宮頸部、膣、外分泌腺及び内分泌腺が含まれる。或いは、癌は、多中心性でも、未知の原発部位の癌（ＣＵＰＳ）でもよい。

【００２２】

本明細書中で使用する場合、「癌性細胞」とは、形質転換事象を受け、その増殖が、その形質転換事象前と同程度まではもはや制御されない、細胞をいう。

【００２３】

本明細書中で使用する場合、「医薬」は、患者又は試験対象に投与され得る、効果を生じ得る組成物である。その効果は、化学的、生物学的又は物理的であり得、患者又は試験対象は、ヒト又は非ヒト動物（例えば、げっ歯類又はトランスジェニックマウス）であり得る。この組成物は、合成により製造された、天然に見出される、又は部分的に合成起源の、別個の分子組成を有する有機又は無機の低分子を含み得る。この群に含まれるのは、ヌクレオチド、核酸、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、又はこれらの実体の少なくとも１つを含む複合体である。医薬は、有効組成物単独からなってもよく、医薬上許容される賦形剤と組み合わせてもよい。

【００２４】

本明細書中で使用する場合、「医薬上許容される賦形剤」には、生理学的に適合性の、任意の及び全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌（ａｎｔｉｂａｃｔｅｒｉａｌ）剤、抗菌（ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂｉａｌ）剤若しくは抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤などが含まれる。賦形剤は、静脈内、腹腔内、筋内、髄腔内又は経口投与に適したものであり得る。賦形剤には、無菌の注射可能な溶液又は分散物の即時調製のための、無菌の水性溶液又は分散物が含まれ得る。医薬の調製のためのかかる媒体の使用は、当該分野で公知である。

【００２５】

本明細書中で使用する場合、医薬、薬物又は療法の「有効量」又は「薬理学的有効量」又は「治療有効量」とは、投与されると、それが使用される期間にわたって、送達された医薬、薬物又は療法が治療レベルの濃度に達する、量をいう。これは、送達様式、投薬期間、医薬を受ける対象の年齢、体重、一般的健康、性別及び食餌に依存し得る。どの用量が「薬理学的有効量」であるかの決定は、当業者の能力の範囲内の慣用の最適化を必要とする。癌細胞又は癌性細胞は、癌細胞を死滅させる又は腫瘍サイズを低下させる、癌増殖全体を低下させる（即ち、血管要素（ａｎｇｉｏ　ｅｌｅｍｅｎｔ）の低下によって）及び／又は転移を阻害するレジメンの能力に基づいた所与の治療レジメン又は化学療法剤に対して「感受性」又は「抵抗性」として記載され得る。治療レジメンに抵抗性の癌細胞は、そのレジメンに応答しない可能性があり、増殖を継続し得る。治療レジメンに感受性の癌細胞は、細胞死、腫瘍サイズの低下、全増殖（腫瘍量）の低下又は転移の阻害を生じるレジメンに対して応答し得る。

【００２６】

本明細書中で使用する場合、「治療レジメン」又は「療法」とは、癌性細胞にとって有害な少なくとも１種の剤の投与をいう。本発明に従う使用に適した治療レジメンには、「化学療法レジメン」、「放射線療法レジメン」、「代替療法レジメン」及びそれらの組合

わせが含まれるが、これらに限定されない。

【００２７】

本明細書中で使用する場合、「化学療法」とは、癌性細胞を破壊するほど有害な少なくとも１種の化学療法剤の投与をいう。臨床医に入手可能なかかる化学療法剤は多数存在する。化学療法剤は、単一のボーラス用量で対象に投与してもよく、より小さい用量で経時的に投与してもよい。単一の化学療法剤を使用してもよく（単剤療法）、１より多い剤を組合わせて使用してもよい（併用療法）。化学療法は、ある種の型の癌を治療するために単独で使用してもよい。或いは、化学療法は、本明細書中に記載するような放射線療法又は代替療法（例えば免疫療法）などの、他の型の治療と組合わせて使用してもよい。さらに、化学療法増感剤（ｃｈｅｍｏｓｅｎｓｉｔｉｚｅｒ）を、化学療法剤との併用療法として投与してもよい。

【００２８】

本明細書中で使用する場合、「化学療法剤」又は「抗癌薬」とは、癌を治療するために使用され得、一般に、癌性細胞を直接死滅させる能力を有する医薬をいう。化学療法剤の例には、アルキル化剤、代謝拮抗薬、天然産物、ホルモン及びアンタゴニスト、並びに種々の剤（ｍｉｓｃｅｌｌａｎｅｏｕｓ　ａｇｅｎｔ）が含まれる。代替名の例は括弧中に示す。アルキル化剤の例には、メクロレタミン、スクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン（Ｌ－サルコリシン）及びクロラムブシルなどのナイトロジェンマスタード；ヘキサメチルメラミン及びチオテパなどのエチレンイミン及びメチルメラミン；ブスルファンなどのスルホン酸アルキル；カルムスチン（ＢＣＮＵ）、セムスチン（メチル－ＣＣＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）及びストレプトゾシン（ストレプトゾトシン）などのニトロソウレア；リン酸エストラムスチンなどのＤＮＡ合成アンタゴニスト；並びにダカルバジン（ＤＴＩＣ、ジメチル－トリアゼノイミダゾールカルボキサミド）及びテモゾロミドなどのトリアジンが挙げられる。代謝拮抗薬の例には、メトトレキサート（アメトプテリン）などの葉酸アナログ；フルオロウラシン（ｆｌｕｏｒｏｕｒａｃｉｎ）（５－フルオロウラシル、５－ＦＵ、５ＦＵ）、フロクスウリジン（フルオロデオキシウリジン、ＦＵｄＲ）、シタラビン（シトシンアラビノシド）及びゲムシタビンなどのピリミジンアナログ；メルカプトプリン（６－メルカプトプリン、６－ＭＰ）、チオグアニン（６－チオグアニン、ＴＧ）及びペントスタチン（２’－デオキシコホルマイシン、デオキシコホルマイシン）、クラドリビン及びフルダラビンなどのプリンアナログ；並びにアムサクリンなどのトポイソメラーゼ阻害剤が挙げられる。天然産物の例には、ビンブラスチン（ＶＬＢ）及びビンクリスチンなどのビンカアルカロイド；パクリタキセル及びドセタキセル（Ｔａｘｏｔｅｒｅ）などのタキサン；エトポシド及びテニポシドなどのエピポドフィロトキシン；トポテカン及びイリノテカンなどのカンプトテシン；ダクチノマイシン（アクチノマイシンＤ）、ダウノルビシン（ダウノマイシン、ルビドマイシン）、ドキソルビシン、ブレオマイシン、マイトマイシン（マイトマイシンＣ）、イダルビシン、エピルビシンなどの抗生物質；Ｌ－アスパラギナーゼなどの酵素；並びにインターフェロンα及びインターロイキン２などの生物学的応答調節物質が挙げられる。ホルモン及びアンタゴニストの例には、ブセレリンなどの黄体形成放出ホルモン（ｌｕｔｅｉｎｉｓｉｎｇ　ｒｅｌｅａｓｉｎｇ　ｈｏｒｍｏｎ）アゴニスト；プレドニゾン及び関連製剤などの副腎皮質ホルモン；カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン及び酢酸メゲストロールなどのプロゲスチン；ジエチルスチルベストロール及びエチニルエストラジオール並びに関連製剤などのエストロゲン；タモキシフェン及びアナストロゾールなどのエストロゲンアンタゴニスト；プロピオン酸テストステロン及びフルオキシメステロン並びに関連製剤などのアンドロゲン；フルタミド及びビカルタミドなどのアンドロゲンアンタゴニスト；並びにリュープロリドなどの性腺刺激ホルモン放出ホルモンアナログが挙げられる。種々の剤の例としては、サリドマイド；シスプラチン（ｃｉｓ－ＤＤＰ）、オキサリプラチン及びカルボプラチンなどの白金配位錯体；ミトキサントロンなどのアントラセンジオン；ヒドロキシウレアなどの置換尿素；プロカルバジン（Ｎ－メチルヒドラジン、ＭＩＨ）などのメチルヒドラジン誘導体；ミトタン（ｏ，ｐ’－ＤＤＤ）及びアミノ

グルテチミドなどの副腎皮質抑制剤；ベキサロテンなどのＲＸＲアゴニスト；並びにイマチニブなどのチロシンキナーゼ阻害剤が挙げられる。化学療法剤のこれら及びさらなる例の代替名及び商標名、並びに投薬及び投与レジメンを含むそれらの使用方法は、当業者に公知であろう。特に、本発明に従う使用に適した化学療法剤には、ナノ粒子アルブミン結合パクリタキセルが含まれるが、これに限定されない。

【００２９】

ＡＢＩ－００７としても知られるＡｂｒａｘａｎｅ™は、好ましい化学療法剤である。Ａｂｒａｘａｎｅ™は、パクリタキセルのアルブミン－ナノ粒子製剤である。ビヒクルとしてのアルブミンナノ粒子の使用は、生理食塩水で再構成したときにコロイドの形成を生じる。臨床研究に基づいて、Ａｂｒａｘａｎｅ™の使用は、Ｔａｘｏｌ™と比較して低下した過敏症反応によって特徴付けられることが示されている。従って、Ａｂｒａｘａｎｅ™を受ける患者には前投薬は必要ない。

【００３０】

アルブミン－ナノ粒子製剤の別の利点は、毒性の乳化剤を排除することによって、Ｔａｘｏｌ™で可能なものよりもより頻繁な間隔でより高い用量のパクリタキセルを投与することが可能である点である。増強された効力は、（ｉ）より高い耐容量（３００ｍｇ／ｍ^2）、（ｉｉ）より長い半減期、（ｉｉｉ）延長された局所腫瘍アベイラビリティ及び／又は（ｉｖ）ｉｎ　ｖｉｖｏ放出Ａｂｒａｘａｎｅ™の持続の結果として、固形腫瘍で見られた可能性がある。

【００３１】

ポジティブ応答は、少なくとも５％、好ましくは少なくとも１０％、より好ましくは少なくとも１５％、なおより好ましくは少なくとも２０％、最も好ましくは少なくとも２５％又はそれ以上の計量（ｍｅｔｒｉｃ）の改善によって示される、病理学的応答（腫瘍サイズ又は腫瘍量の低下）、全生存又は無進行生存が挙げられるがこれらに限定されないものとして規定される。或いは、計量は、療法なし又は事前療法又は代替療法と比較して統計的に有意な量の改善を示す。

【００３２】

ネガティブ応答には、病理学的進行、全体生存の低下又は無進行生存の低下が含まれるが、これらに限定されない。

【００３３】

本明細書中で使用する場合、用語「放射線療法レジメン」又は「放射線療法」とは、癌性細胞を死滅させるための放射線の投与をいう。放射線は、細胞内の種々の分子と相互作用するが、細胞死を生じる主な標的はデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）である。しかし、放射線療法はしばしば、細胞膜及び核膜並びに他のオルガネラにも損傷を生じる。ＤＮＡ損傷は通常、糖－リン酸骨格における一本鎖及び二本鎖の破壊を含む。さらに、細胞機能を破壊し得る、ＤＮＡ及びタンパク質の架橋も存在し得る。放射線の型に依存して、ＤＮＡ損傷のメカニズムは、生物学的効果比と同様に変動し得る。例えば、重粒子（即ち、プロトン、中性子）は、ＤＮＡを直接損傷し、より高い生物学的効果比を有する。電磁放射線は、細胞水のイオン化によって主に生成される短寿命のヒドロキシルフリーラジカルを介して作用する間接的イオン化を生じる。放射線の臨床適用は、体外照射（外部線源から）及びブラキセラピー（患者中に移植又は挿入された放射線源を使用する）からなる。体外照射はＸ線及び／又はγ線からなるが、ブラキセラピーは、崩壊して、α粒子、又はγ線と共にβ粒子を放出する、放射性核種を使用する。

【００３４】

放射線療法はさらに、放射線増感剤として作用する化学療法剤との併用化学療法で使用され得る。個々の患者に適した放射線療法の具体的選択は、組織及び癌の病期を考慮して、ケアの現場で当業者により決定され得る。

【００３５】

本明細書中で使用する場合、「代替療法レジメン」又は「代替療法」には、例えば、生物学的応答調節物質（ポリペプチド－、炭水化物－及び脂質－生物学的応答調節物質が含

まれる）、毒素、レクチン、血管新生抑制剤、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、Ｉｒｅｓｓａ™（ゲフィチニブ）、Ｔａｒｃｅｖａ™（エルロチニブ）、Ｅｒｂｉｔｕｘ™（セツキシマブ）、メシル酸イマチニブ（Ｇｌｅｅｖｅｃ™）、プロテオソーム（ｐｒｏｔｅｏｓｏｍｅ）阻害剤（例えば、ボルテゾミブ、Ｖｅｌｃａｄｅ™）；ＰＴＫ７８７（ＺＫ２２２５８４）などのＶＥＧＦＲ２阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤（例えば、ＺＭ４４７４３９）；ラパマイシンの哺乳動物標的（ｍＴＯＲ）阻害剤、シクロオキシゲナーゼ－２（ＣＯＸ－２）阻害剤、ラパマイシン阻害剤（例えば、シロリムス、Ｒａｐａｍｕｎｅ™）；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、ティピファニブ、Ｚａｒｎｅｓｔｒａ）；マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤（例えば、ＢＡＹ　１２－９５６６；硫酸化多糖テコガラン（ｔｅｃｏｇａｌａｎ））；血管新生阻害剤（例えば、Ａｖａｓｔｉｎ™（ベバシズマブ）；ＴＮＰ－４などのフマギリンアナログ；カルボキシアミノトリアゾール；ＢＢ－９４及びＢＢ－２５１６；サリドマイド；インターロイキン－１２；リノミド（ｌｉｎｏｍｉｄｅ）；ペプチド断片；並びに血管増殖因子及び血管増殖因子受容体に対する抗体）；血小板由来増殖因子受容体阻害剤、プロテインキナーゼＣ阻害剤、マイトジェン活性化キナーゼ阻害剤、マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ阻害剤、ラウス肉腫ウイルス形質転換癌遺伝子（ＳＲＣ）阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、低分子量低酸素誘導因子阻害剤、ヘッジホッグ阻害剤、及びＴＧＦ－βシグナル伝達阻害剤が含まれ得る。さらに、免疫療法剤も、代替療法レジメンとして考慮されるであろう。例としては、ケモカイン、ケモタキシン、サイトカイン、インターロイキン又は組織因子が挙げられる。適切な免疫療法剤には、予め形成された抗体を含む血清又はγグロブリン；非特異的免疫賦活剤；能動的特異的免疫療法；及び養子免疫療法も含まれる。さらに、代替療法には、ポリヌクレオチド（アンチセンス分子が含まれる）、ポリペプチド、抗体、遺伝子治療ベクターなどの、他の生物学ベースの化学実体が含まれ得る。かかる代替療法は、単独若しくは併用で、又は本明細書中に記載される他の治療レジメンと組合わせて投与され得る。代替療法レジメンで使用されるこれらの剤及び代替療法レジメンで使用される剤のさらなる例の代替名及び商標名、並びに投薬及び投与レジメンを含むそれらの使用方法は、当分野に精通した医師に公知であろう。さらに、併用療法において代替療法レジメン（投薬及び投与レジメンを含む）で使用される化学療法剤及び他の剤の使用方法も、当業者に公知であろう。

【００３６】

特に、適切な代替療法レジメンには、例えば、Ｈｅｒ２に対する抗体（例えば、Ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ）、ＥＧＦ又はＥＧＦ受容体に対する抗体、ＶＥＧＦに対する抗体（例えば、Ｂｅｖａｃｉｚｕｍａｂ）又はＶＥＧＦ受容体に対する抗体、ＣＤ２０に対する抗体などの、癌細胞の表面上の分子に対する抗体が含まれるが、これらに限定されない。治療剤はさらに、補体活性化、細胞媒介性細胞傷害、アポトーシス誘導、細胞死誘導及びオプソニン化のうち１以上を媒介する、任意の抗体又は抗体断片を含み得る。例えば、かかる抗体断片は、完全又は部分Ｆｃドメインであり得る。

【００３７】

本明細書中で使用する場合、用語「組織切片」とは、顕微鏡スライドに載せるため及び任意の適切なプロトコルで染色するために適した組織サンプルの薄い切片をいう。本明細書中で使用する場合、「組織切片を免疫染色する」とは、細胞及び（ａｒｅ）細胞内マトリックスの成分への抗体の結合から生じる、組織切片の細胞及び細胞内マトリックスの染色をいう。本明細書中で使用する場合、構造を「支配的に（ｐｒｅｄｏｍｉｎａｎｔｌｙ）」又は「選択的に（ｐｒｅｆｅｒｅｎｔｉａｌｌｙ）」（例えば、繊維芽細胞を上回って癌細胞を）染色するためには、組織切片中の選択的に染色された構造の免疫染色は、任意の適切な系により病理学者によって分類された強度のものでなければならない（例えば以下を含む：当業者により顕微鏡で観察された場合には３／３、１／３の強度のみでの十分な他の全ての構造の染色、又は０／３（染色なし）を示す）。

【００３８】

本明細書中で使用する場合、用語「エピトープ」とは、抗体が結合する三次元構造、特

に、抗体に標的化されるアミノ酸配列をいう。本明細書中で使用する場合、用語「ＭＡＢ９４１モノクローナル抗体によって認識されるエピトープ」とは、ＭＡＢ９４１モノクローナル抗体が結合する、ＳＰＡＲＣ中のアミノ酸配列をいう。（ＳＰＡＲＣモノクローナル抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）、カタログ番号ＭＡＢ９４１）

【００３９】

本明細書中で使用する場合、「免疫優性（ｉｍｕｎｏｄｏｍｉｎａｎｔ）エピトープ」とは、最大の集合的結合活性でポリクローナル抗血清中の抗体が結合する三次元構造をいう。特に、そのポリクローナル抗体を使用する免疫染色プロトコルでの染色パターンを担うエピトープ。本明細書中で使用する場合、用語「ＡＦ９４１ポリクローナル（ｐｏｌｙｃｏｎａｌ）抗体によって認識される免疫優性ＳＰＡＲＣエピトープ」とは、ＡＦ９４１ポリクローナル抗血清によって最大の結合活性で見出される、ＳＰＡＲＣペプチド及びアミノ酸配列をいう。従って、これらのＳＰＡＲＣペプチド及びアミノ酸配列への結合及びそれらの染色が生じ、免疫染色の大部分が観察される。（ＳＰＡＲＣポリクローナル抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）、カタログ番号ＡＦ９４１）

【００４０】

「抗体」とは、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二量体、多量体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）を意味するが、これらに限定されない。抗体は、マウス、ヒト、ヒト化、キメラ、又は他の種由来のものであり得る。抗体は、特異的抗原を認識しそれに結合し得る、免疫系によって産生されるタンパク質である。標的抗原は一般に、複数の抗体上のＣＤＲによって認識される多数の結合部位（エピトープともいう）を有する。異なるエピトープに特異的に結合するそれぞれの抗体は、異なる構造を有する。従って、１つの抗原は、１つより多い対応する抗体を有し得る。

【００４１】

抗体には、全長免疫グロブリン分子、又は全長免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分（即ち、目的の標的の抗原又はその一部を免疫特異的に結合する抗原結合部位を含む分子）が含まれる。標的には、癌細胞、又は自己免疫疾患に関連する自己抗原を産生する他の細胞が含まれる。

【００４２】

本明細書中に開示する免疫グロブリンは、任意のクラス（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ及びＩｇＡ）又はサブクラス（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１及びＩｇＡ２）の免疫グロブリン分子であり得る。免疫グロブリンは、任意の種由来であり得る。

【００４３】

「抗体断片」は、所望の生物活性を維持する、全長抗体の部分を含む。「抗体断片」は一般に、その抗原結合領域即ち可変領域である。抗体断片の例には、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２及びＦｖ断片；ダイアボディ（ｄｉａｂｏｄｙ）；直鎖抗体；Ｆａｂ発現ライブラリーにより産生される断片、抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体、ＣＤＲ（相補性決定領域）、及び癌細胞抗原、ウイルス抗原若しくは微生物抗原に免疫特異的に結合する上記のいずれかのエピトープ結合断片、単鎖抗体分子；並びに抗体断片から形成された多重特異性抗体が含まれる。

【００４４】

本明細書中で言及するモノクローナル抗体には、具体的には、それが所望の生物活性を示す限り、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種由来又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同であるが、鎖の残部が、別の種由来又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗体、並びにかかる抗体の断片が含まれる（米国特許第４，８１６，５６７号）。本明細書中で目的とするキメラ抗体には、非ヒト霊長類（例えば、旧世界ザル又は類人猿）由来の可変ドメイン抗原結合配列とヒト定常領域配列とを含む、「霊長類化

」抗体が含まれる。

【００４５】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」及び「ＡＤＣＣ」とは、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球及びマクロファージ）が、標的細胞上の結合抗体を認識し、続いてその標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性の反応をいう。ＡＤＣＣを媒介する主な細胞であるＮＫ細胞はＦｃγＲＩＩＩのみを発現するが、単球はＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ及びＦｃγＲＩＩＩを発現する。目的の分子のＡＤＣＣ活性を評価するために、ｉｎ ｖｉｔｒｏ ＡＤＣＣアッセイが実施され得る（米国特許第５，００３，６２１号；米国特許第５，８２１，３３７号）。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が挙げられる。

【００４６】

「細胞死を誘導する」抗体は、生存細胞を非生存にする抗体である。ｉｎ ｖｉｔｒｏの細胞死は、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）又は補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）によって誘導される細胞死を識別するために、補体及び免疫エフェクター細胞の非存在下で実施され得る。従って、細胞死に関するアッセイは、熱不活化血清を使用して（即ち、補体の非存在下）、かつ免疫エフェクター細胞の非存在下で実施され得る。抗体が細胞死を誘導できるか否かを決定するために、ヨウ化プロピジウム（ＰＩ）、トリパンブルー又は７ＡＡＤの取り込みによって評価される膜一体性の喪失が、未処理の細胞と比較して評価され得る。細胞死誘導抗体は、ＢＴ４７４細胞におけるＰＩ取り込みアッセイにおいてＰＩ取り込みを誘導する抗体である。

【００４７】

「アポトーシスを誘導する」抗体は、アネキシンＶの結合、ＤＮＡの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化及び／又は膜小胞（アポトーシス小体と呼ばれる）形成によって決定されるプログラム細胞死を誘導する抗体である。

【００４８】

本明細書中で使用する場合、「化学療法増感剤」又は「増感剤」は、化学療法剤、放射線療法治療又は代替療法レジメンの治療効果を増強し得、従って、かかる治療又は剤の効力を改善し得る、医薬である。治療に対する腫瘍又は癌性細胞の感受性又は抵抗性はまた、例えば、腫瘍サイズ、腫瘍量又は転移の発生をある期間にわたり測定することによって、ヒト又はげっ歯類などの動物において測定され得る。例えば、ヒトについて約２ヶ月、約３ヶ月、約４ヶ月又は約６ヶ月、マウスについて約２～４週間、約３～５週間又は４～６週間。組成物又は治療方法は、治療感受性の増加又は抵抗性の減少が、かかる組成物又は方法なしの治療感受性又は抵抗性と比較して、約１０％以上、例えば、約３０％、約４０％、約５０％、約６０％、約７０％、約８０％又はそれ以上から約２倍、約３倍、約４倍、約５倍、約１０倍、約１５倍、約２０倍又はそれ以上までである場合、その治療的療法に対する腫瘍又は癌性細胞の応答を増感し得る。治療的療法に対する感受性又は抵抗性の決定は、当該分野で慣用であり、当業者の技術範囲内である。

【００４９】

用語「ペプチド」、「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、相互交換可能に使用され得、ペプチド結合又は改変されたペプチド結合によって共有結合した少なくとも２つのアミノ酸からなる化合物（例えば、ペプチドにさらなる所望の特性（例えば、増加した半減期）を提供し得るペプチドアイソスター（改変されたペプチド結合））をいう。ペプチドは、少なくとも２つのアミノ酸を含み得る。本明細書中に記載されるペプチド又はタンパク質を構成するアミノ酸は、天然プロセス（例えば翻訳後プロセシング）又は当該分野で周知の化学的修飾技術のいずれかによって修飾されていてもよい。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖及びアミノ末端若しくはカルボキシル末端を含む、ペプチド中の任意の場所に生じ得る。同じ型の修飾が、所与のペプチド中のいくつかの部位に、同程度又は異なる程度で存在し得ることが理解される。

【００５０】

組織アレイは、当業者に公知の任意の適切な方法によって製造され染色され得る。例えば、ホルマリン固定したパラフィン包埋腫瘍ブロックからの組織コア（１つのブロックにつき最も代表的な領域からの２つのコア）をアレイして（Ｂｅｅｃｈｅｒ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｓｉｌｖｅｒ Ｓｐｒｉｎｇ、Ｍｄ）、それぞれ２．０ｍｍの大きさのコアの組織マイクロアレイを創出することができ、それを正に荷電したスライド上に置いた。次いで、検体を載せたスライドを６０℃のオーブン中に１時間置き、冷却し、脱パラフィン処理し、キシレン及び段階的エタノール溶液～水で再水和する。全てのスライドを３％過酸化水素水溶液中で５分間クエンチして、内在性ペルオキシダーゼに対しブロックする。抗原賦活化（ａｎｔｉｇｅｎ ｒｅｔｒｉｅｖａｌ）は、任意の適切な技術（例えば、検体をクエン酸溶液（ｐＨ６．１）（コードＳ１６９９、Ｄａｋｏ、Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ、Ｃａｌｉｆ）中に、野菜蒸し器を使用して９４℃で２０分間置き、次いで１５分間冷却する加熱法）によって実施できる。次いで、スライドを、適切な抗体を使用する免疫組織化学で使用するために、Ｄａｋｏ Ａｕｔｏｓｔａｉｎｅｒ免疫染色システムに置く。この方法は、以下を連続して適用することに基づく：（１）局在化させる抗原に対する一次抗体、（２）ビオチン化連結抗体、（３）酵素コンジュゲート化ストレプトアビジン、及び（４）基質色素源（ＤＡＢ）。次いで、スライドを、Ｒｉｃｈａｒｄ－Ａｌｌａｎヘマトキシリン（Ｋａｌａｍａｚｏｏ、Ｍｉｃｈ）で対比染色し、段階的エタノール溶液中で脱水し、上にカバーガラスを載せた。

【００５１】

２色二重免疫染色は、当業者に公知の任意の適切なプロトコルを使用して実施できる。例えば、限定ではないが、パラフィン包埋した組織ブロックを４μｍに切断し、正に荷電したスライド上に置くことができる。次いで、検体を載せたスライドを６０℃のオーブン中に１時間置き、冷却し、脱パラフィン処理し、キシレン及び段階的エタノール溶液～水で再水和した。次いで、全てのスライドを３％過酸化水素水溶液中で５分間クエンチして、内在性ペルオキシダーゼに対しブロックする。抗原賦活化は、当業者に公知の任意の適切な技術を使用して実施できる。例えば、野菜蒸し器を使用して、検体をクエン酸溶液（ｐＨ６．１）中に９４℃で２５分間（既に言及した個々の抗体についての２０分間と比較）置き、１５分間冷却する加熱法により。次いで、スライドを、免疫組織化学で使用するために、例えば、Ｄａｋｏ Ａｕｔｏｓｔａｉｎｅｒ免疫染色システムに置くことができる。

【００５２】

第一の一次抗体を、室温で３０分間インキュベートする。検出システムＥｎＶｉｓｉｏｎ＋デュアルリンク（Ｄａｋｏ、コードＫ４０６１）を３０分間インキュベートする。最後に、ＤＡＢ色素源を添加する。第二の一次抗体を適用する前に、無血清タンパク質ブロック（Ｄａｋｏ、コードＸ０９０９）を添加して、バックグラウンド及び一次抗体間のクロスオーバーを最小化する。第二の一次抗体を室温で１時間インキュベートする。ＥｎＶｉｓｉｏｎ＋デュアルリンク（Ｄａｋｏ、コードＫ４０６１）を検出システムとして再度使用し、３０分間インキュベートした。２種の抗体による染色が容易に識別できるように、ＮｏｖａＲＥＤ（Ｖｅｃｔｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ、Ｃａｌｉｆ）を第二の一次と共に使用できる。次いで、スライドを、Ｒｉｃｈａｒｄ－Ａｌｌａｎヘマトキシリンで対比染色し、段階的エタノール溶液中で脱水し、上にカバーガラスを載せる。

【００５３】

腫瘍及び繊維芽細胞のＳＰＡＲＣ染色の正確な識別についてアッセイするために適切な抗ＳＰＡＲＣ抗体は、組織マイクロアレイを使用して同定できる。当該分野で公知の標準的方法で製造されたモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体が使用できる。

【００５４】

選択されたブロックからの二連の０．６ｍｍコアを含む組織マイクロアレイは、Ｂｅｅｃｈｅｒ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ Ｍｉｃｒｏ Ｔｉｓｓｕｅ Ａｒｒａｙｅｒを使用して構築できる。４マイクロメートルの厚さの切片を、完成したアレイブロックから切り

出し、シラン処理したガラススライドに移すことができる。次いで、これらのアレイからの切片を、ヘマトキシリン及びエオシンで染色して、妥当性を評価することができる。マイクロ波抗原賦活化は、加圧調理器（Ｎｏｒｄｉｃ　Ｗａｒｅ）中で１０ｍＭクエン酸塩緩衝液（ｐＨ６．０）中にスライドを置き、緩衝液が加圧下で沸騰するまで４分間、高出力でマイクロ波照射することからなり得る。この時点で、マイクロ波照射を停止させ、スライドを加圧調理器中でさらに２０分間インキュベートし、その後取り出してリンスした。プロテアーゼ抗原賦活化は、供給業者の推奨するプロトコルに従ってプロテアーゼ－１溶液（Ｖｅｎｔａｎａ）中で４分間インキュベートすることからなる。

【００５５】

エピトープマッピングも、当業者に公知の標準的技術を使用して実施できる。例えば、Ｅｄ　Ｈａｒｌｏｗ及びＤａｖｉｄ　ＬａｎｅによるＵｓｉｎｇ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，ＵＳＡ，１９９９；これは、その全体が本明細書に参照により組み込まれる）中の「Ｅｐｉｔｏｐｅ　Ｍａｐｐｉｎｇ」、第１１章からのプロトコル。エピトープをマッピングすることにより、エピトープ特異的抗体が、標準的な技術によって容易に産生できる。

【００５６】

第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体及び第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体で腫瘍の組織切片を免疫染色することによってＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャ（ＳＭＳ）を決定するための方法論（第一の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、腫瘍細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色し、第二の抗ＳＰＡＲＣ抗体は、繊維芽細胞中のＳＰＡＲＣを選択的に染色する）。ＳＰＡＲＣ発現の７つの構成要素（ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ）を、２つの異なる抗体を使用して決定した：腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス（間質）、血管、神経及び他の正常な解剖学的形態。腫瘍の構成要素のそれぞれについて、各視野中の染色細胞の割合、染色強度（０～４）及びスコア（従属変数）を決定した（患者１人当たりの合計変数：７構成要素×２抗体×３スコア＝４２の変数がスコアリングされる）。

【００５７】

スコアリングは、ポジティブ細胞の割合と染色強度とを組み合わせたものである。ポジティブに染色された細胞がない又はポジティブに染色された構成要素がない場合、スコアをネガティブとした。染色強度が何であれ＜１０％の細胞がポジティブであった場合、強度が２＋以下で＜２０％の細胞がポジティブであった場合、又は強度が１＋で＜３０％の細胞がポジティブであった場合、スコアを「弱くポジティブ」とした。強度が４＋で１０～４０％の細胞がポジティブであった場合、強度が３＋で１０～５０％の細胞がポジティブであった場合、強度が２＋で２０～７０％の細胞がポジティブであった場合、又は強度が４＋以下で１０～４０％の細胞がポジティブであった場合、又は強度が１＋以下で＞３０％の細胞がポジティブであった場合、スコアを「中程度にポジティブ」とした。強度が４＋で＞４０％の細胞がポジティブであった場合、又は強度が３＋で＞５０％の細胞がポジティブである場合、強度が２＋で＞７０％の細胞がポジティブであった場合、スコアを「強くポジティブ」とした。

【００５８】

Ｅｌｅｍｅｎｔｓｐｒｉｎｇ™ソフトウェアスイート中のクラスタリングプログラム及びＮｅｘｕｓ™アレイ分析プログラムを使用して、このデータをマイニングした。さらに、ＡＮＯＶＡ又はｔ検定（独立（ｕｎｐａｉｒｅｄ））統計をパラメータについて決定し、示唆されたクラスタリングは、種々の転帰パラメータに関する識別力を有した。

【００５９】

階層的クラスタリングは、データの良好な「初回通過（ｆｉｒｓｔ　ｐａｓｓ）」分析を提供する、広く使用されるデータマイニング技術である。これは、いくつかの技術のうち１つを反復して使用すること、１つのデータポイント（即ち、測定されたパラメータ値）又は「エレメント」で開始すること、及びエレメントをそれらの最も近いものと組み合わせて、クラスター及びクラスターの関連（ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ）を段階的に構築す

ること、を含む。最終結果は階層ツリーである（例えば図３）。クラスター間の距離は、それらの平均発現パターン間の距離によって規定される。クラスターの視覚的表示は、全ての生物学者によく知られる、容易に理解される階層ツリー又はダイアグラムの形態で生成される。ツリー構造により、エレメント間又はエレメントセット間の発現パターンがどれほど似ているかを視覚的に理解することが容易になる。

【００６０】

非階層的クラスタリング技術は、エレメントの数ＮをＫ個のクラスターにグループ化する。２つの例は、Ｋ平均クラスタリング及び自己組織化マップである。Ｋ平均クラスタリングは、所定の数（Ｋ）のクラスター、又は「重心」から開始し、３工程のプロセスを含む。第一に、エレメントを重心にランダムに割り当てる。次いで第二に、平均クラスター間距離及び平均クラスター内距離を計算する。最後に、エレメントを１つのクラスターから別のクラスターに移動させる。工程２及び３を、クラスター内距離が最小化し、かつクラスター間距離が最大化するまで繰り返し、典型的には、Ｋ個の球状（ｒｏｕｎｄ　ｓｈａｐｅｄ）クラスターを生じる。新たなエレメントを、最も近い重心を有するクラスター中にグループ化する。重心は、クラスター中の全ての点の平均である。Ｋ平均クラスタリングは、グループの数がわかっている場合にエレメントをクラスタリングするのに優れている。例えば、癌性組織及び非癌性組織を含むデータセットを、Ｋ平均クラスタリングに従って分析して、２群の遺伝子（癌と共に変化するもの及び変化しないもの）を同定することができよう。

【００６１】

自己組織化マップ（ＳＯＭ）は、ニューラルネットワーク技術によりノードをｎ次元の「エレメント空間」に繰り返しマッピングすることで生成される。この技術は、分析前に部分的構造が課される（クラスター及び次元の数を割り当てなければならない）ので、予備知識を組み込む。次いで、ランダムベクトルが生成され、各ノードに加えられる。次に、これらのベクトルとランダムに選択した遺伝子との間の距離を計算する。遺伝子に最も近いベクトルが更新され、それをエレメントのベクトルにより近づける。このプロセスを、それ以上の変更が加わらなくなるまで、何回でも繰り返される。このプロセスは、大きい次元のエレメント空間を、より管理可能で理解可能なものに変換する。

【００６２】

ＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャ（ＳＭＳ）とは、組織学的位置、強度、及び各抗体での免疫染色の頻度によって示される、２つの抗ＳＰＡＲＣ抗体での染色パターンを意味する。「クラスタリング」とは、それらの臨床転帰に基づいてＳＭＳをグループ化し、１つのグループを別のグループから識別することに寄与するＳＭＳ構成要素を同定するための、任意の適切なクラスタリング方法の使用を意味する。適切な方法には、例えば、Ｋ平均、自己組織化マップ及び階層的クラスタリングが挙げられる（これらは全て、当業者に公知の市販のソフトウェアによって実施できる）。「重心」は、クラスターグループを規定するパラメータの範囲である。この適用では、これ（ｉｎ）は具体的に、種々のＳＭＳグループを識別するＳＭＳ構成要素値（例えば、「レスポンダー」として分類されるための基準）をさす。転帰グループへの割り当ては、あなたのグループを規定する入手可能なデータをどの重心が最もよく示すかを決定するプロセスである。

【００６３】

全てのクラスタリング技術は特定の条件下では優れているが、それらには当業者に公知の制限もある。例えば、階層的クラスタリングは、現実性を反映しているかどうかわからないデータに対して、厳格な関係構造を課す。Ｋ平均クラスタリング及びＳＯＭ生成は、所定数のクラスターを必要とする。これは、特定の状況ではよく機能するが、遺伝子の関連を決定するなどの先の見えない予備データ分析に関しては、クラスターの適切な数を前もって決めることができない。Ｋ平均クラスタリングには、超球状（ｆａｉｒｌｙ　ｒｏｕｎｄ）クラスターを生成する点でさらなる制限があり、閉じた又は幾何学的形状のクラスターの同定が不正確になる。最後に、クラスタリングはエレメントのグループ間の関連を示すが、クラスター内のエレメント間の関連性（作用の方向など）についての結論を引

き出すことはできない。

【００６４】

エレメントの数を減少させることは、上記分類法が適用され得る前に実施されることが望まれる重要な工程である。これは、学習の正確さを改善するために、可能な限り多くの判別情報を保存するために実施すべきである。適切に規定されたエレメントは、同じクラスの全てのサンプルについて同じ発現パターンを有し、異なるクラスに属するサンプルとは異なる発現パターンを有するはずである。クラス予測のための「最短収縮重心（ｎｅａｒｅｓｔ　ｓｈｒｕｎｋｅｎ　ｃｅｎｔｒｏｉｄ）」法は、各クラスの原型として「収縮」重心を使用し、各クラスを最もよく特徴付けるエレメントのサブセットを同定する。この方法は、閾値との比較によって、クラス重心のそれぞれを、全てのクラスについての全重心に向けて「収縮させる」。この収縮は、ノイズのあるエレメントの影響を排除することによって分類をより正確にし、結果として、エレメントを自動的に選択する。新たなサンプルのエレメントプロフィールは、これらのクラス重心のそれぞれと比較される。二乗距離において、それに最も近い重心を持つクラスは、その新たなサンプルのための予測されたクラスである。

【００６５】

分類のために適切なエレメントを選択する際に考慮する因子が２つ存在する：クラス内の距離及びクラス間の距離である。同じクラス中の全てのサンプルについてのエレメントのレベルが小さい分散できわめて一貫しているが、異なるクラスのサンプル間では大きく異なっている場合、そのエレメントは、分類のための良好な候補とみなされる。遺伝子は、異なるクラスに関する判別情報を有する。最短収縮重心法では、クラス内の分散をさらに考慮に入れて、クラス内の遺伝子の良好性を評価した。クラス重心とエレメントの全重心との間の差異は、各クラス内の分散によって分割されて、より低い分散でより大きい重みをエレメントに与える。閾値は、得られた正規化されたクラス重心の差異に適用される。これが全てのクラスについて小さい場合、これはゼロに設定され、エレメントが排除されることを意味する。これにより、最終的な予測モデルで使用されるエレメントの数が減らされる。

【００６６】

相関ルールは、エレメント間の関連性、ある遺伝子といくつかの他のグループのエレメントとの間の関連性を同定するために使用でき、最終的に、特定の処理作用（ｔｒｅａｔｍｅｎｔ　ａｃｔｉｏｎ）を示し得る。第一工程は、データを離散化して、Ｂｏｏｌｅａｎ又は三次（ｔｅｒｔｉａｒｙ）表示に変換する。次いでカットオフ値が定められ、それに対して、データが上方制御又は下方制御されたと分類される。カットオフ値よりも高い値を有する、上方制御された遺伝子は、「１」の値を割り当てられる。カットオフ値よりも低い値を有する、下方制御された遺伝子は、「０」の値を割り当てられる。或いは、２つのカットオフ値が割り当てられ得、遺伝子は、上方制御された（１の値を割り当てられる）、下方制御された（－１の値を割り当てられる）又は変化なし（０の値を割り当てられる）として分類され得る。

【００６７】

任意の適切な用量の血管新生阻害剤が使用され得る（例えば、少なくとも１週間の投薬サイクルで、約５ｍｇ／ｋｇ～約１５ｍｇ／ｋｇの用量で投与されるＡｖａｓｔｉｎ）。

【００６８】

疎水性化学療法剤は、１．０以下、好ましくは２．０以下、最も好ましくは５．０以下のＨＬＢ（ＨＬＢは、親水性／親油性バランス数である）を有し、例えば薬剤エポチロン、ドセタキセル、パクリタキセルが含まれる。タキサンなどの微小管阻害剤としては、エポチロン、ドセタキセル、パクリタキセル及びそれらの組合わせが挙げられる。「それらの組合わせ」とは、１種より多い薬物（例えば、ドセタキセル及びパクリタキセル）を含む剤形の投与、並びにエポチロン、ドセタキセル及びパクリタキセルの、連続的ではあるが時間的には別個の投与（例えば、１つのサイクルでのドセタキセルの使用及び次のサイクルでのパクリタキセルの使用）の両方をいう。特に好ましい化学療法剤は、タンパク質

結合薬物の粒子を含み、例えば、タンパク質結合薬物粒子を構成するタンパク質がアルブミンを含むものが挙げられるがそれに限定されず、化学療法剤の５０％より多くがナノ粒子形態であるものが挙げられる。最も好ましくは、化学療法剤は、アルブミン結合パクリタキセルの粒子、例えばＡｂｒａｘａｎｅ^{TM}を含む。適切なナノ粒子製剤は、少なくとも約５０％の活性剤をナノ粒子の形態で含む製剤であるが、それに限定されない。他の適切なナノ粒子製剤は、少なくとも約６０％、好ましくは少なくとも約７０％、より好ましくは少なくとも約８０％、又はなおより好ましくは少なくとも約９０％の活性剤を、ナノ粒子の形態で含む。さらに、かかるナノ粒子製剤は、最も好ましくは、少なくとも約９５％～少なくとも約９８％の活性剤を、ナノ粒子の形態で含むことができる。

【００６９】

Ｈｅｒ２陽性乳癌に適した療法には、以下を含むレジメンも含まれる：各２８日サイクルの１日目、８日目、１５日目に１２５ｍｇ／ｍ^{2}のネオアジュバントｎａｂ－パクリタキセル、各２８日サイクルの１日目にカルボプラチンＡＵＣ６を６サイクル；４ｍｇ／ｋｇ負荷とその後の２ｍｇ／ｋｇ／ｗｋのＴｒａｓｔｕｚｕｍａｂ、及び５ｍｇ／ｋｇ／ｗｋのＢｅｖａｃｉｚｕｍａｂ；その後の原発性腫瘍の外科的除去；並びに術後治療有効量のＴｒａｓｔｕｚｕｍａｂ及びＢｅｖａｃｉｚｕｍａｂを５２週間。Ｈｅｒ２陰性乳癌に適した療法は、例えば、ｎａｂ－パクリタキセル（１７５ｍｇ／ｍ^2）、ゲムシタビン（２０００ｍｇ／ｍ^2）及びエピルビシン（５０ｍｇ／ｍ^2）による１４日間を６サイクル含む術前療法；その後の外科的除去；並びに（１４日間を４サイクル）及びｎａｂ－パクリタキセル（２２０ｍｇ／ｍ^2）＋ゲムシタビン（２０００ｍｇ／ｍ^2）を含む術後療法、を含む。

【００７０】

以下の実施例は本発明をさらに説明するが、本発明の範囲を何ら限定するものでないと解釈すべきことは当然である。

【実施例】

【００７１】

実施例１

本研究の目的は、腫瘍微小環境中のどのＳＰＡＲＣ異性体及び機能が患者の転帰に関与するかを評価すること、及び特に、ＳＰＡＲＣ免疫染色のパターンとナノ粒子アルブミン結合（ｎａｂ）パクリタキセル（即ち、Ａｂｒａｘａｎｅ（登録商標））を用いた患者の転帰との間に相関があるかどうかを決定することであった。

【００７２】

ｎａｂ－パクリタキセルは、腫瘍細胞に進入するために、内皮細胞ｇｐ６０－アルブミン受容体輸送及び腫瘍が分泌するＳＰＡＲＣへの結合を含む、アルブミン輸送の内在性経路を利用できる。頭頸部癌における最初の前臨床研究及び小規模の後向き臨床研究は、腫瘍組織における内在性ＳＰＡＲＣの増加が、ｎａｂ－パクリタキセル治療に対する有望な応答を予測し得ることを示唆した（Ｄｅｓａｉら、２００９，Ｔｒａｎｓ　Ｏｎｃ．２，５９－６４）。

【００７３】

４つの前向き研究が、ＳＰＡＲＣ腫瘍免疫染色パターン即ち「ＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャ」（ＳＭＳ）が、ｎａｂ－パクリタキセルレジメンで治療したときに再発のリスクが低い患者と高い患者を識別できるかどうかを試験した。

【００７４】

４つの臨床試験から患者の転帰を評価した（表１）。

【００７５】

【表１－１】

検体及び転帰データを提供した臨床試験

研究	適応症	相	患者数	SPARC IHC を有する患者数	レジメン
N057E	切除不能な病期 IV の黒色腫	II	76	40	nab-パクリタキセル (100-150mg/m^2) wkly 3/4 カルボプラチン(AUC2) wkly 3/4
CA040	転移性膵臓癌	I/II	63	37	nab-パクリタキセル (100-150mg/m^2) wkly 3/4 ゲムシタビン (1000mg/m2) wkly 3/4
BRE73	ネオアジュバント 乳癌(HER2-)	II	123	83	術前: (14 日間を 6 サイクル) nab-パクリタキセル (175mg/m^2)+ゲムシタビン(2000mg/m2)+エピルビシン(50mg/m^2) 術後:(14 日間を 4 サイクル) nab-パクリタキセル (220mg/m^2)+ゲムシタビン(2000mg/m^2)

【００７６】

【表１－２】

BRE83	ネオアジュバント 乳癌(HER2+)	II	30	30	術前: (28日間を6サイクル) nab-パクリタキセル (100mg/m²) wkly ¾+カルボプラチン(AUC6)+トラスツズマブ(4mg/kg負荷、次いで2mg/kg/wk)+ベバシズマブ(5mg/kg/wk) 術後 維持(1yr): トラスツズマブ (6mg/kg) q3wk ベバシズマブ (15mg/kg)q3wk

【００７７】

全体として、この方法は、以下を連続して適用することに基づく：（１）局在化させる抗原に対する一次抗体、（２）ビオチン化連結抗体、（３）酵素コンジュゲート化ストレプトアビジン、及び（４）基質色素源（ＤＡＢ）。次いで、スライドを、Ｒｉｃｈａｒｄ－Ａｌｌａｎヘマトキシリン（Ｋａｌａｍａｚｏｏ、Ｍｉｃｈ）で対比染色し、段階的エタノール溶液中で脱水し、上にカバーガラスを載せる。全てのスライドは、自動染色装置（Ｄａｋｏ　Ｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ　Ａｕｔｏｓｔａｉｎｅｒ、Ｄａｋｏ、Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ、ＣＡ）を使用して染色した。

【００７８】

本実施例における免疫染色は、以下に記載のように実施した。ＳＰＡＲＣに対する一連の抗体を評価した。詳細な免疫組織学的評価は、Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｂｏａｒｄ　ｏｆ　Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ認定の病理学者が実施した。染色スコアは０～４＋のスケールで割り当てた。４＋が最もポジティブである。腫瘍のどの構成要素がＳＰＡＲＣ活性に重要であるかは未知であったので、腫瘍、血管、繊維芽細胞、間質細胞、炎症細胞及び正常な解剖学的構造における染色を含む、種々の構成要素の分解を実施した。

【００７９】

ホルマリン固定したパラフィン包埋腫瘍ブロックからの組織コア（１つのブロックにつき最も代表的な領域からの２つのコア）をアレイして（Ｂｅｅｃｈｅｒ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｓｉｌｖｅｒ　Ｓｐｒｉｎｇ、Ｍｄ）、それぞれ２．０ｍｍの大きさのコアの組織マイクロアレイを創出し、それを正に荷電したスライド上に置く。検体を載せたスライドを６０℃のオーブン中に１時間置き、冷却し、脱パラフィン処理し、キシレン及び段階的エタノール溶液～水で再水和する。全てのスライドを３％過酸化水素水溶液中で５分

間クエンチして、内在性ペルオキシダーゼに対しブロックする。

【００８０】

染色が見られない場合に抗原賦活化を実施し、同じ視野中の正常組織の染色を内部ポジティブコントロールとする。抗原賦活化は、検体をクエン酸溶液（ｐＨ６．１）（コードＳ１６９９、Ｄａｋｏ、Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ、Ｃａｌｉｆ）中に、野菜蒸し器を使用して９４℃で２０分間置き、次いで１５分間冷却する加熱法によって実施する。次いで、スライドを、適切な抗体を使用する免疫組織化学で使用するために、Ｄａｋｏ Ｃｙｔｏｍａｔｉｏｎ Ａｕｔｏｓｔａｉｎｅｒ（Ｄａｋｏ、Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ、ＣＡ）などの免疫染色システムに置く。

【００８１】

ＳＰＡＲＣに対する異なる親和性を有する２つの抗体をこの研究のために特定した：モノクローナル抗体（本明細書中で以下「Ｍ」で示す）（ＳＰＡＲＣモノクローナル抗体（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）、カタログ番号ＭＡＢ９４１ロット番号ＥＣＨ０４５０１１、トリスベースの希釈液で１：１００希釈）及びポリクローナル抗体（本明細書中で以下「Ｐ」で示す）（ＳＰＡＲＣポリクローナル抗体（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）、カタログ番号ＡＦ９４１ロット番号ＥＷＮ０４、トリスベースの希釈液で１：５０希釈）。腫瘍の組織切片をスライド上に調製し、標準的な免疫染色プロトコルを使用して染色した。簡潔に述べると、ホルマリン固定したパラフィン包埋腫瘍ブロックからの組織コア（１つのブロックにつき最も代表的な領域からの２つのコア）をアレイして（Ｂｅｅｃｈｅｒ Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ、Ｓｉｌｖｅｒ Ｓｐｒｉｎｇ、Ｍｄ）、それぞれ２．０ｍｍの大きさのコアの組織マイクロアレイを創出し、それを正に荷電したスライド上に置いた。次いで、検体を載せたスライドを６０℃のオーブン中に１時間置き、冷却し、脱パラフィン処理し、キシレン及び段階的エタノール溶液～水で再水和した。次いで、全てのスライドを３％過酸化水素水溶液中で５分間クエンチして、内在性ペルオキシダーゼに対しブロックした。抗原賦活化は、野菜蒸し器を使用して、検体をクエン酸溶液（ｐＨ６．１）中に９４℃で２５分間（既に言及した個々の抗体についての２０分間と比較）置き、１５分間冷却する加熱法により実施する。次いで、スライドを、免疫組織化学で使用するために、例えば、免疫染色システム（Ｄａｋｏ、Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ、ＣＡ）に置く。

【００８２】

全てのスライドを３％過酸化水素水溶液中で５分間クエンチして、内在性ペルオキシダーゼに対しブロックした。緩衝液リンスの後、スライドを抗体Ｍ又はネガティブコントロール試薬と共に３０分間インキュベートした。マウス西洋ワサビペルオキシダーゼポリマーキット（Ｍｏｕｓｅ ＭＡＣＨ ３ ＨＲＰ Ｐｏｌｙｍｅｒ Ｋｉｔ、Ｂｉｏｃａｒｅ Ｍｅｄｉｃａｌ、Ｃｏｎｃｏｒｄ、ＣＡ）を、１試薬につき２０分間インキュベートした。もう一度緩衝液リンスした後、ＤＡＢ色素源（Ｄａｋｏ、Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ、ＣＡ）を１０分間適用した。ヘマトキシリンを使用してスライドを対比染色した。抗体Ｐで検体を免疫染色するために同じプロトコルを使用したが、１試薬につき１５分間インキュベートしたアビジン－ビオチン検出キット（Ｂｉｏｃａｒｅ Ｍｅｄｉｃａｌ、Ｃｏｎｃｏｒｄ、ＣＡ）を、ＨＲＰ検出キットの代わりに使用した。

【００８３】

一連の腫瘍におけるＳＰＡＲＣ発現の詳細な病理学的評価は、委員会認定の病理学者が実施した。免疫組織化学により決定されるＳＰＡＲＣ発現レベルを、種々の腫瘍構成要素についてスコアリングした。スコアは０～３のスケールでＳＰＡＲＣ発現レベルに割り当て、３を最もポジティブなスコアとした。これは、当該分野で一般に実施され、当業者に周知である。使用したモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体は、表２に示すように、異なるＳＰＡＲＣ発現パターンを検出した。

【００８４】

【表２】

M及びＰの免疫染色プロフィール

	腫瘍			繊維芽細胞		
	抗体P	抗体M		抗体P	抗体M	
乳房	30/106	35/106	p=ns	82/107	26/107	p<0.0001
膵臓	20/36	7/36	p=0.0031	18/29	5/29	p=0.0011
黒色腫	30/41	20/41	p=0.0408	19/33	14/33	p=ns

【００８５】

ポリクローナル抗体は、繊維芽細胞関連ＳＰＡＲＣの選択的な染色を実証したが、モノクローナル抗体は、腫瘍関連ＳＰＡＲＣを選択的に染色した（図１）。

【００８６】

これらの染色優先性から、以下のパターンを定め、一連の腫瘍におけるそれらの予測値について分析した：

Ａ、いずれかの構成要素で３＋が見出された場合。

Ｂ、モノクローナル抗ＳＰＡＲＣ抗体により、いずれかの構成要素で３＋が見出された場合。

Ｃ、モノクローナル抗ＳＰＡＲＣ抗体により、いずれかの構成要素で３＋が見出された場合。

Ｄ、両方の抗ＳＰＡＲＣ抗体で、腫瘍細胞で３＋が見出された場合。

Ｅ、両方の抗ＳＰＡＲＣ抗体で、繊維芽細胞で３＋が見出された場合。

【００８７】

ロジスティック回帰及び比例ハザードを使用して、種々の腫瘍におけるＳＰＡＲＣ染色パターンに対し、ＳＭＳと応答、無進行生存（ＰＦＳ）及び全生存（ＯＳ）との間の任意の相関を同定する。

【００８８】

分析した第一の腫瘍セットは、切除不能な病期ＩＶの黒色腫を有する患者における、カルボプラチン及びｎａｂ－パクリタキセル（別名ＡＢＩ－００７）の第ＩＩ相試験であった（Ｎ０５７Ｅ研究）。Ｄパターン、とより良い全生存との間に、統計的に有意な相関が存在した（図２）。

【００８９】

腫瘍の第二のセットは、ｎａｂ－パクリタキセル用量で治療した、進行した膵臓腺癌患者由来であった（ＣＡ０４０研究）。研究した３２人の患者は、全範囲の応答を有した（表３．奏効率）。

【００９０】

【表３】

奏効率

応答	CR	PR	SD	PD
32人の患者のうちのＮ	2 (6%)	14 (44%)	14 (44%)	2 (6%)

（*ＣＲ、完全奏功；ＰＲ、部分応答；ＳＤ、応答なし及び安定；ＰＤ、応答なし及び進行）

【００９１】

ポリクローナル抗体による腫瘍の染色は、この第二のセットの腫瘍（進行した膵臓癌）において、治療に対する応答性を予測した（片側ｔ検定、ｐ＝０．０２７）。さらに、モノクローナル抗体による腫瘍細胞の染色は、より悪い全生存及び無進行生存を予測した。さらに、Ｂパターンの染色は、これらの膵臓腺癌患者において、このレジメンによる最悪の無進行生存を予測した。

【００９２】

本実施例は、ＳＰＡＲＣ免疫組織化学が、ｎａｂ－パクリタキセルベースの化学療法に対する応答を予測するための有益な方法であることを実証している。

【００９３】

実施例２

ＳＰＡＲＣ免疫染色からの染色パターンデータのより体系的な分析を行い、予後情報を生じたパターンを同定した。実施例１で研究したのと同じ腫瘍セットからの染色パターンデータを、種々の形態のクラスター分析を使用してマイニングし、種々の腫瘍におけるＳＰＡＲＣ染色パターンに対し、応答、無進行生存（ＰＦＳ）及び全生存（ＯＳ）について、最も特徴的なＳＰＡＲＣ発現の構成要素（免疫染色パターンにより示される）を同定した。上述のように、予後に影響を与えることがわかったパターンを、「ＳＰＡＲＣ微小環境シグネチャ」（「ＳＭＳ」）という。

【００９４】

ＳＰＡＲＣ発現を、７つの腫瘍構成要素において、２つの異なる抗体を使用して決定した：腫瘍内の腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、無細胞間質／マトリックス（間質）、血管、神経及び他の正常な解剖学的形態。次いで、腫瘍構成要素のそれぞれについて、染色細胞の割合、染色強度（０～４）及び「スコア」を決定した。「スコア」は、染色細胞の割合と染色強度とを組み合わせたものである。ポジティブに染色された細胞がない又はポジティブに染色された構成要素がなかった場合、スコアを「ネガティブ」とした。≦２０％の細胞がポジティブで強度が２＋以下であった場合、スコアを「弱くポジティブ」とし、≦３０％の細胞がポジティブ又は強度が１＋以下であった場合も、「弱くポジティブ」とした。強度が４＋で１０～４０％の細胞がポジティブであった場合、強度が３＋で１０～５０％の細胞がポジティブであった場合、強度が２＋で２０～７０％の細胞がポジティブであった場合、又は強度が４＋以下で２０～４０％の細胞がポジティブであった場合、又は強度が１＋以下で＞３０％の細胞がポジティブであった場合、スコアを「中程度にポジティブ」とした。強度が４＋で＞４０％の細胞がポジティブであった場合、又は強度が３＋で＞５０％の細胞がポジティブであった場合、強度が２＋で＞７０％の細胞がポジティブであった場合、スコアを「強くポジティブ」とした。

【００９５】

Ｅｌｅｍｅｎｔｓｐｒｉｎｇ（登録商標）ソフトウェアスイート中のクラスタリングプログラム及びＮｅｘｕｓ（登録商標）アレイ分析プログラムを使用して、このデータをマイニングした。さらに、ＡＮＯＶＡ又はｔ検定（独立）統計をパラメータについて決定し

、示されたクラスタリングは識別力を有した。

【００９６】

ＳＭＳパターンを、ＢＲＥ７３乳癌研究からの染色データで同定した。Ｋ平均クラスター分析は、優れたＰＦＳを有する患者を、免疫染色に基づいて識別した。２４ヶ月でのＰＦＳは、「不良な」ＳＰＡＲＣパターンを示す患者について５６％であったのに対し、「良好な」ＳＰＡＲＣ良好パターンを有する患者では９１％のＰＦＳであった。

【００９７】

さらに、これらの患者を予後グループに分類したパラメータを特定した（表４）（「カットオフ値」は、良好な予後グループに分類される必要がある値である）（図３も参照）。

【００９８】

【表４】

乳癌におけるＰＦＳについてのＳＭＳ構成要素

SMS 構成要素	カットオフ値	p 値
P 炎症細胞%	≥50%	<0.0001
M 腫瘍%	≥70%	<0.0001
P 血管%	≥70%	<0.0001
M 繊維芽細胞%	≥70%	<0.0001
M 血管%	≥70%	<0.0001
M 間質%	≥70%	<0.0001
P 間質%	≥70%	<0.0001
M 炎症細胞%	≥70%	<0.0001

【００９９】

予測されたように、エストロゲン受容体（ＥＲ）、プロゲステロン受容体（ＰＲ）及びトリプルネガティブ（Ｔｒｉｐｌｅ　Ｎｅｇａｔｉｖｅ（ＴＮ））ステータスは、ＰＦＳを予測した（図４Ａ～Ｃ）。驚くべきことに、ＳＭＳは、独立したリスク因子として（即ち、既知のリスク因子ＥＲ／ＰＲ／トリプルネガティブステータスとは独立して（表５））機能した。

【０１００】

【表５】

乳癌におけるＳＭＳ及び既知のリスク因子

	ER- (N=39)	PR- (N=42)	トリプルネガティブ (N=30)
既知のリスク因子と共に SPARC 良好 SMS	15/37(41%)	16/37(43%)	10/37(27%)
既知のリスク因子と共に SPARC 不良 SMS	24/46(52%)	26/46(57%)	20/46(43%)
統計	p=ns	p=ns	p=ns

【０１０１】

さらに、ＳＭＳを既知のリスク因子に加えた場合、研究したｎａｂ－パクリタキセルベースのレジメンについて、低リスクグループに基づくＰＦＳと高リスクグループに基づくＰＦＳとの間の層別化又は識別が改善された（図５～７）。２４ヶ月でのＰＦＳは、０、１及び２個のリスク因子を有するグループ間で有意に異なっていた。しかし、トリプルネガティブステータスへのＳＰＡＲＣ　ＳＭＳの追加は、さらに、低リスク患者（０リスク因子）と高リスク患者（≧２リスク因子）とを識別した（異なる数のリスク因子について対数ランクのｐ値：０因子　対　２因子、ｐ＝０．０００９；１因子　対　２因子、ｐ＝０．０３９）（図５）。また、１個のリスク因子を有するグループは、特徴的であり、中間のリスクを有することが見出された。

【０１０２】

ＥＲへのＳＰＡＲＣ　ＳＭＳクラスターの追加は、さらに、低リスク患者（０リスク因子）と高リスク患者（２リスク因子）とを識別した（異なる数のリスク因子について対数ランクのｐ値：０因子　対　２因子、ｐ＝０．０００１；１因子　対２因子、ｐ＝０．０２６）（図６）。

【０１０３】

ＥＲへのＳＰＡＲＣ　ＳＭＳクラスターの追加は、さらに、低リスク患者（０リスク因子）と高リスク患者（２リスク因子）とを識別した（異なる数のリスク因子について対数ランクのｐ値：０因子　対　２因子、ｐ＝０．０００４；１因子　対　２因子、ｐ＝ｎｓ．）（図７）。これらの結果は、療法に対する応答、進行又は死を予測する先行技術のマーカーとＳＭＳとの組合わせが、かかるマーカーの予後の正確さを改善できることを実証している。

【０１０４】

応答は、部分完全（ｐＣＲ）、完全奏効（ＣＲ）、部分応答（ＰＲ）、（ＳＤ）、（ＰＤ）、入手できず（Ｎ／Ａ）と分類した（表７）。応答に関するＳＭＳを、クラスター分析でも同定した（図８）。

【０１０５】

【表６】

応答グループ

応答	N
pCR	9
CR	9
PR	54
SD	5
PD	2
N/A	4

【０１０６】

或いは、応答転帰が示され得、レスポンダー（ｐＣＲ、ＣＲ、ＰＲ；ｎ＝７２）及び非レスポンダー（ＳＤ、ＰＤ；ｎ＝７）にグループ分けできた。応答の二成分分類について、ＳＭＳをクラスター分析でも同定した（図９）。

【０１０７】

応答ＳＭＳに関与するパラメータを、クラスター分析で同定した（図９）（表７）。

【０１０８】

【表７】

乳癌応答ＳＭＳ構成要素

SMS 構成要素	カットオフ値	p 値
M 間質%	≥60%	0.002
M 腫瘍%	≥60%	0.027
M 血管%	≥60%	0.0497
P 腫瘍%	≥60%	0.054

【０１０９】

ＣＡ０４０膵臓癌試験からのデータも分析した。さらに、この分析は、同じ患者からの細胞学的検体に拡張できた。

【０１１０】

階層的クラスタリングを膵臓癌データに対して実施して、患者をＳＭＳに基づいて２つのグループに分けた。これらのグループを、ＰＦＳ及びＯＳ転帰について分析した。クラスタリングにより、ＳＰＡＲＣ低リスク構成要素が、総合して、高リスク構成要素よりもＳＰＡＲＣにおいて有意に高い（約３３％）ことが明らかである（合計スコア８３９　対　６２９、有意な平均の合計）。試験した全ての区画（腫瘍細胞、繊維芽細胞、炎症細胞、血管及び無細胞間質）にわたる個々の構成要素は、低リスクグループについてＳＰＡＲＣがより高かった。

【０１１１】

さらに、ポジティブ細胞の割合を使用し、０＋＝０、１＋＝２５、２＋＝５０、３＋＝７５、４＋＝１００として強度を数値化し、「ネガティブ」＝０、「弱くポジティブ」＝３３、「中程度にポジティブ」＝６６「強くポジティブ」＝１００としてスコアを数値化

することで、以下の全体的結果が得られた（ここでも、最も重要なパラメータが同定された（図１０）（表８）及びカットオフ値（表９）。

【０１１２】

【表８】

膵臓癌ＳＭＳ構成要素

変数の平均	SPARC 高リスク	SPARC 低リスク	高リスク 対 低リスク クラスターｐ値
Poly 繊維芽細胞スコア	65.52	86.83	1.01E-06
Poly 繊維芽細胞強度	40.63	67.81	1.57E-04
Poly 腫瘍強度	25.84	48.80	2.27E-04
Mab 間質　%	61.88	82.00	3.28E-03
Poly 炎症細胞強度	25.84	42.26	4.29E-03
Poly 炎症細胞スコア	49.05	67.14	7.49E-03
Poly 血管　%	50.94	68.00	8.09E-03
Poly 腫瘍スコア	54.72	75.55	8.10E-03
Poly 血管強度	32.81	45.96	9.44E-03
Poly 繊維芽細胞　%	54.06	70.63	1.37E-02
Poly 血管スコア	63.52	75.03	2.02E-02
Poly 炎症細胞　%	42.66	58.50	2.81E-02
Poly 間質スコア	61.88	50.55	5.00E-02
Mab 間質強度	21.63	16.63	8.64E-02
Poly 腫瘍　%	56.56	69.75	1.06E-01
Mab 繊維芽細胞強度	25.83	32.94	1.37E-01
Mab 腫瘍強度	28.16	35.73	1.63E-01
Mab 間質スコア	46.56	37.91	1.99E-01
Poly 間質　%	69.06	78.00	2.51E-01
Mab 血管強度	22.39	24.90	4.50E-01
Mab 炎症細胞強度	24.31	27.03	4.54E-01
Mab 繊維芽細胞スコア	56.77	53.00	5.58E-01
Mab 血管スコア	52.20	48.94	6.09E-01
Mab 繊維芽細胞　%	55.78	52.38	6.31E-01
Mab 腫瘍　%	65.63	63.00	7.30E-01
Poly 間質強度	26.56	25.85	8.60E-01
Mab 腫瘍スコア	58.88	59.99	8.74E-01
Mab 炎症細胞スコア	47.53	46.81	9.04E-01
Mab 血管　%	59.06	58.25	9.05E-01
Mab 炎症細胞　%	46.88	47.38	9.47E-01
平均の合計	**1393.11**	**1617.51**	

【０１１３】

従って、カットオフ値は以下であった

【０１１４】

【表９】

膵臓カットオフ（有意なｐ値を有する構成要素を使用する）

構成要素	カットオフ値 高リスク	カットオフ値 低リスク
Ｐ繊維芽細胞スコア	≦66	≧87
Ｐ繊維芽細胞強度	≦41	≧68
Ｐ腫瘍強度	≦26	≧49
Ｍ間質％	≦49	≧82
Ｐ炎症細胞強度	51	42
Ｐ炎症細胞スコア	≦55	≧67
Ｐ血管％	≦33	≧68
Ｐ腫瘍スコア	≦54	≧76
Ｐ血管強度	64	46
Ｐ繊維芽細胞％	≦54	≧71
Ｐ血管強度	≦64	≧75
Ｐ炎症細胞％	≦43	≧59
Ｐ間質スコア	≦62	≧51

【０１１５】

ＳＭＳは、ＯＳについては不良であるがＰＦＳについては不良でない良好な転帰を識別できた（図１１Ａ及びＢ）。ＣＡ１９－９レベルは、膵臓癌における迅速な進行の既知のリスク因子であり、試験において、ＣＡ１９－９レベルはＰＦＳグループとＯＳグループとを分類できた（図１２）。しかし、リスク因子ＳＰＡＲＣ不良とＣＡ１９－９≧２０００Ｕ／ｍｌとの間には相関がなかった。従って、ＳＰＡＲＣ及びＣＡ１９－１は、全生存についての独立した予後因子であることが見出された（表１０）。

【０１１６】

【表１０】

膵臓癌に関するＳＭＳはＣＡ１９－９とは独立である

	CA19-9 <2000U/ml	CA19-9 ≥2000U/ml	統計
CA19-9グループにおける、SPARC不良シグネチャを有する患者の分布	7/20(35%)	6/15(40%)	p=ns

	SPARC不良	SPARC良好	統計
SPARCクラスターにおけるCA19-9≥2000U/mlを有する患者の分布	6/13(46%)	9/22(41%)	p=ns

【０１１７】

驚くべきことに、ＣＡ　１９－１レベルと合わせたＳＭＳは、層別化ＰＦＳ及びＯＳを改善した（図１３及び１４）。

【０１１８】

ＳＭＳの有用性のさらなる分析を、ＡＢＸ０５４試験からの進行した黒色腫患者で行った。ここでも、予後パラメータ（表１１）を、階層的クラスタリングを使用して同定した（図１５及び１６）。

【０１１９】

【表１１】

黒色腫ＰＦＳ予後パラメータ

SMS構成要素	カットオフ値	p値
M血管%	≦50%	<0.0001
M間質スコア	僅かにポジティブ	<0.0001
M炎症細胞%	≦50%	<0.0001
M血管スコア	僅かにポジティブ	<0.0001
M炎症細胞スコア	僅かにポジティブ	<0.0001
M間質%	≦50%	<0.0001
M繊維芽細胞強度	1+から2+	<0.0001
M血管強度	1+から2+	0.0006
M腫瘍強度	1+から2+	0.0007
M腫瘍細胞スコア	僅かにポジティブ	0.0021
M繊維芽細胞%	≦50%	0.0022
M炎症細胞強度	1+から2+	0.0029
M繊維芽細胞スコア	僅かにポジティブ	0.0036
M腫瘍%	≦50%	0.0205

【０１２０】

実施例３

これは、ＳＭＳを生成するためのＫ平均クラスタリングの使用及び個体をリスクグループに分類するためのその使用の予言的実施例である。

【０１２１】

まず、各ＳＭＳ構成要素についての重心を、トレーニングセットを使用して規定する必要がある。７人の個体の各々に対するＭ％腫瘍及びＰ％腫瘍などのＳＭＳの２つの構成要素のスコアからなる仮想データセットを考慮する：

【０１２２】

【表１２】

対象	M%腫瘍	P%腫瘍
1	10	10
2	15	20
3	30	40
4	50	70
5	35	50
6	45	50
7	5	45

【０１２３】

このデータセットは、２つのクラスター（例えば、レスポンダー及び非レスポンダー）にグループ分けされる。感覚的な最初の区分を見出すための第一工程として、２人の個体のＭ％腫瘍値及びＰ％腫瘍値を最も遠ざけ（ユークリッド距離測定を使用）、既知の異なる応答を用い、最初のクラスター平均を規定し、以下を与える：

【０１２４】

【表１３】

	個体	平均ベクトル(重心)
レスポンダークラスター	1	(10,10)
非レスポンダークラスター	4	(50,70)

【０１２５】

次に残りの個体を連続して試験し、クラスター平均へのユークリッド距離に関して、最も近いクラスターに割り当てる。新たな成員を追加するたびに、平均ベクトルを再計算する。これにより、以下の一連の工程が導かれる：

【０１２６】

【表１４】

	レスポンダー クラスター		非レスポンダー クラスター	
工程	個体	平均 ベクトル (重心)	個体	平均 ベクトル (重心)
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)

【０１２７】
ここで最初の区分が変更され、この時点で２つのクラスターが以下の特徴を有する：
【０１２８】
【表１５】

	個体	平均ベクトル (重心)
レスポンダー	1,2,3	(18,23)
非レスポンダー	4,5,6,7	(41,54)

【０１２９】
各個体が数学的に又は現実世界のいずれかで正しいクラスターに割り当てられたことを確信することはまだできない。次の工程は、それ自身のクラスター平均までの各個体の距離と反対のクラスターのクラスター平均までの各個体の距離とを比較することによって、クラスターの数学的性質を検討する。結果として：
【０１３０】

【表１６】

個体	レスポンダークラスターの平均（重心）までの距離	非応答クラスターの平均（重心）までの距離
1	15	54
2	04	43
3	21	18
4	57	18
5	32	07
6	38	06
7	28	11

【０１３１】
個体３のみが、それ自体のクラスターよりも反対のクラスターの平均に近い。言い換えると、各個体のそれ自体のクラスター平均までの距離は、他のクラスターの平均までの距離よりも（ｔｈａｔ）小さいはずである（これは個体３には当てはまらない）。従って、個体３は、もう一方のクラスターに再配置され、新たな区分を生じる：

【０１３２】
【表１７】

	個体	平均ベクトル(重心)
レスポンダー	1,2	(13,15)
非レスポンダー	3,4,5,6,7	(39,51)

【０１３３】
その後、応答に基づく個体の再配置を行ない、数学的に再度試験する。ここで、再配置の反復を、再配置がそれ以上起こらなくなるまで、この新たな区分から継続する。しかし、この実施例では、各個体はこのとき、他のクラスターのクラスター平均よりもそれ自体のクラスター平均に近く、反復を停止して、最終クラスター解として最後の区分を選択する。

【０１３４】
次いで、任意の新たな個体を、それらにより近い重心に基づいて、レスポンダー又は非レスポンダーとして分類できよう。

【０１３５】
さらに、この実施例を通じて２つの構成要素を使用したが、トレーニングセットを処理した後、最も特徴的な構成要素を任意の適切な方法で決定でき、それらの構成要素のみを使用して、重心を規定し、新たな個体を分類する。

【０１３６】

刊行物、特許出願及び特許を含む、本明細書中に引用した全ての参考文献は、それぞれの参考文献が参照によって組み込まれることが個々にかつ具体的に示されているのと同程度又はその全体が本明細書中に記載されているのと同程度まで、参照によって本明細書中に組み込まれる。

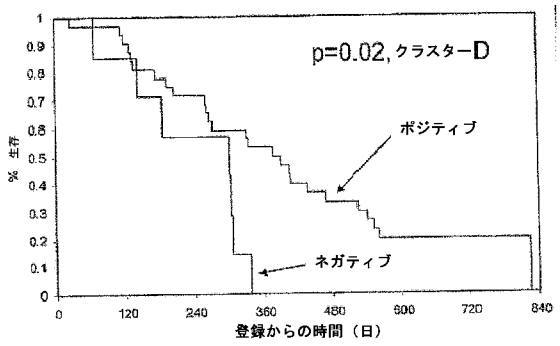
【０１３７】

本発明の説明に関して（特に、以下の特許請求の範囲に関して）、用語「ａ」及び「ａｎ」及び「ｔｈｅ」並びに同様の指示対象の使用は、本明細書中に特記しないか文脈と明らかに矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方をカバーすると解釈すべきである。用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」、「有する（ｈａｖｉｎｇ）」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」及び「含む（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）」は、特記しない限り、オープンエンドの用語（即ち、「～を含むがそれらに限定されない」を意味する）と解釈すべきである。本明細書中の値の範囲の記述は、本明細書中に特記しない限り、その範囲内に入る各個別の値に個々に言及する省略方法として働くことのみを意図しており、各個別の値は、それが本明細書中に個々に記述されているかのように本明細書中に組み込まれる。本明細書中に記載される全ての方法は、本明細書中に特記しない又は文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施できる。本明細書中に提供される任意の及び全ての例又は例示的語句（例えば、「など（ｓｕｃｈ　ａｓ）」）の使用は、本発明をよりよく説明することのみを意図しており、特段特許請求されない限り、本発明の範囲に限定を課すものではない。本明細書中の全ての語句は、特許請求されていない任意の要素を本発明の実施に必須のものとして示していると解釈すべきではない。

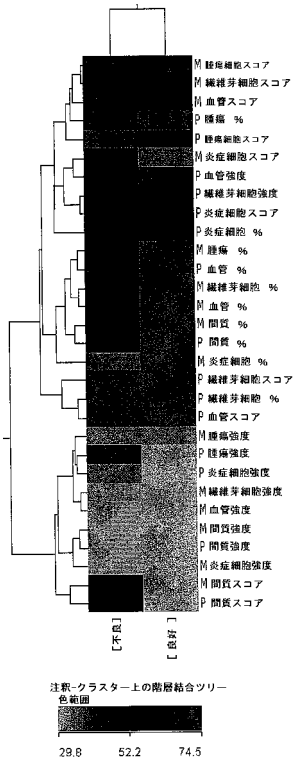
【０１３８】

発明を実施するための発明者が知る最良の形態を含む、本発明の好ましい実施形態が本明細書中に記載されている。これらの好ましい実施形態のバリエーションは、上述の説明を読めば当業者に明らかとなり得る。本発明者らは、当業者がかかるバリエーションを適宜使用することを予期しており、本発明者らは、本明細書中に具体的に記載されたのとは異なる方法で本発明が実施されることを意図している。従って、本発明は、適用法によって許容されるとおり、本明細書中に添付した特許請求の範囲に記載される対象の全ての改変及び等価物を含む。さらに、その全ての可能なバリエーションでの上記要素の任意の組合わせが、本明細書中に特記しない又は文脈と明らかに矛盾しない限り、本発明によって包含される。

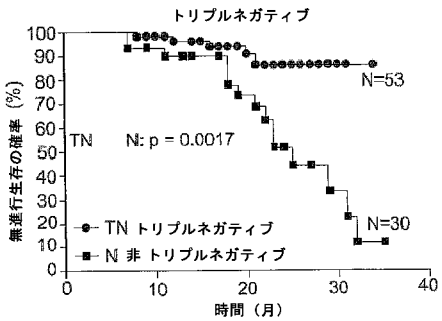
【図２】



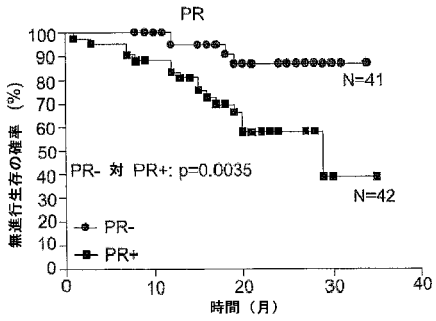
【図３】



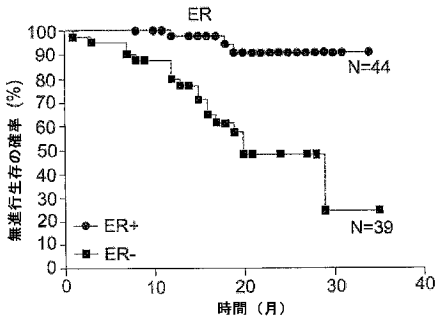
【図４Ａ】



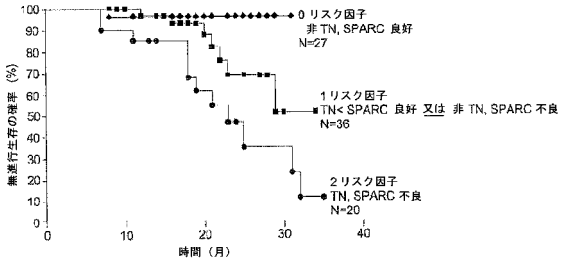
【図４Ｃ】



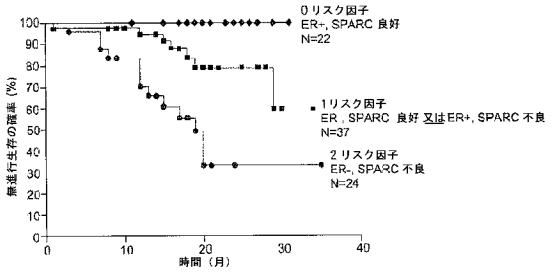
【図４Ｂ】



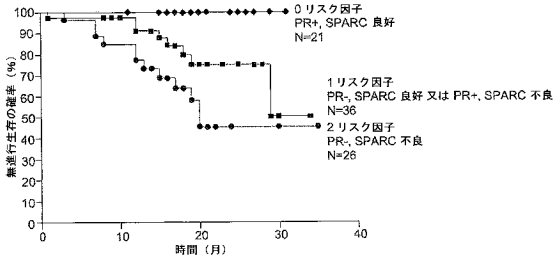
【図５】



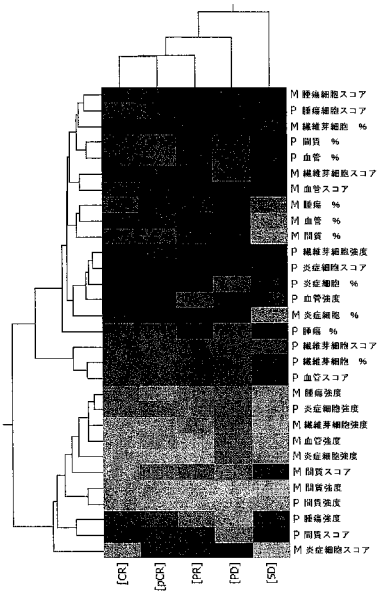
【図６】



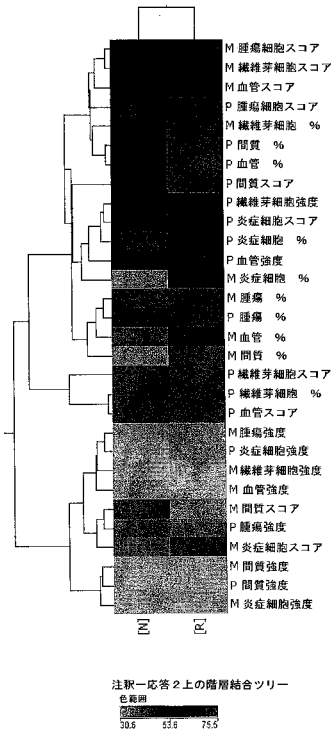
【図７】



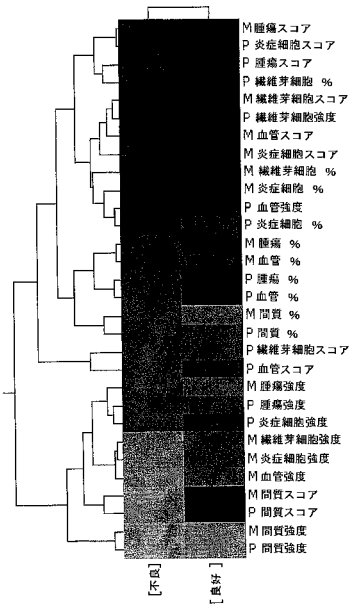
【図８】



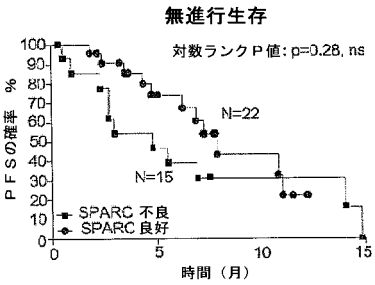
【図９】



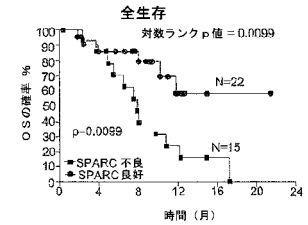
【図１０】



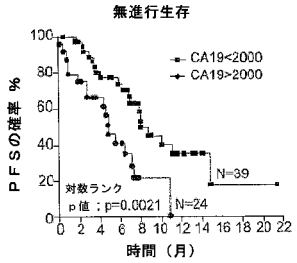
【図１１Ａ】



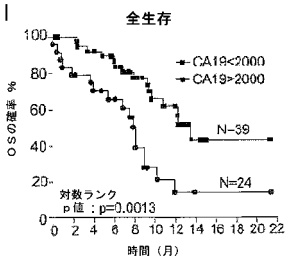
【図１１Ｂ】



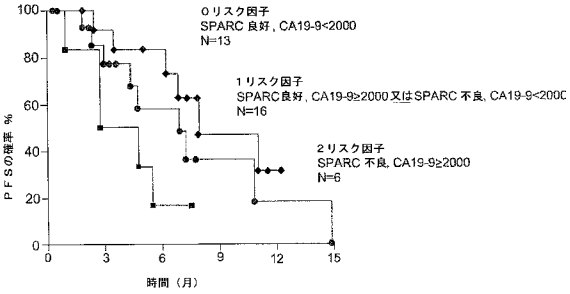
【図１２Ａ】



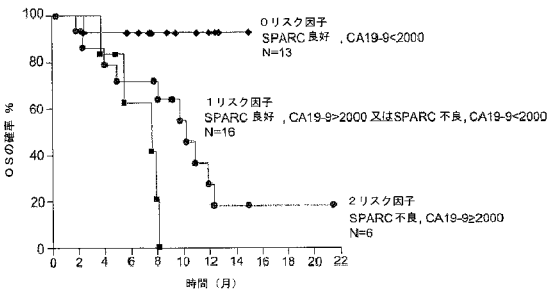
【図１２Ｂ】



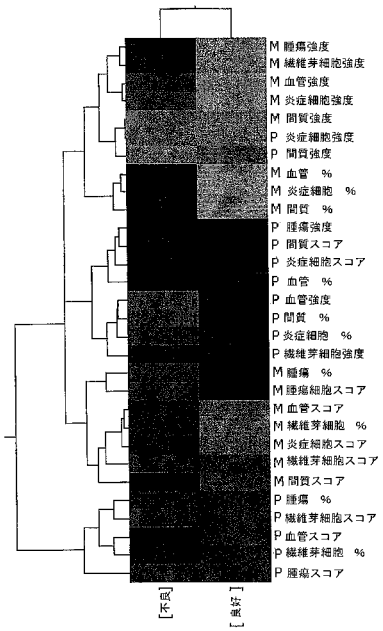
【図１３】



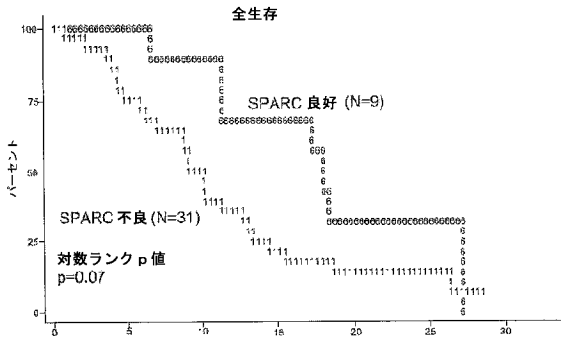
【図１４】



【図１５】



【図１６】


全生存
パーセント
100
75
50
25
0
0
5
10
15
20
25
30
SPARC 良好 (N=9)
SPARC 不良 (N=31)
対数ランク p 値
p=0.07

【図１】

図１Ａ

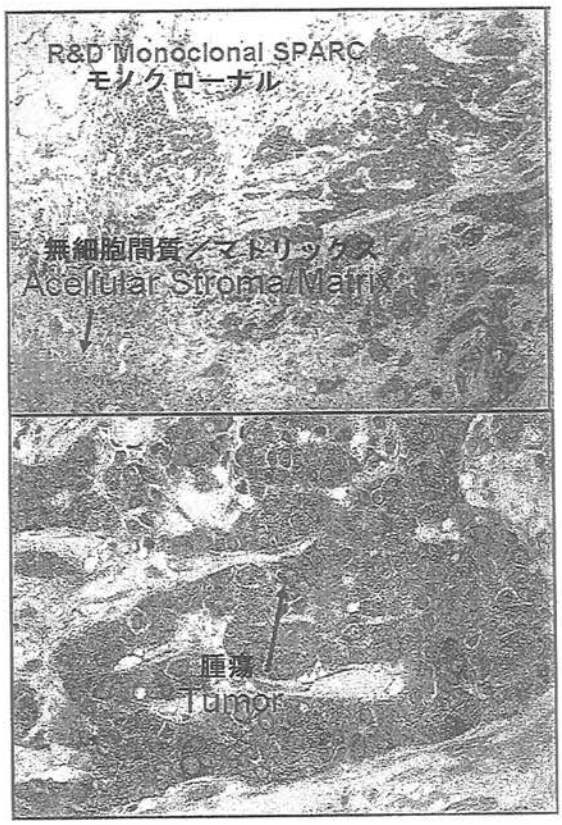
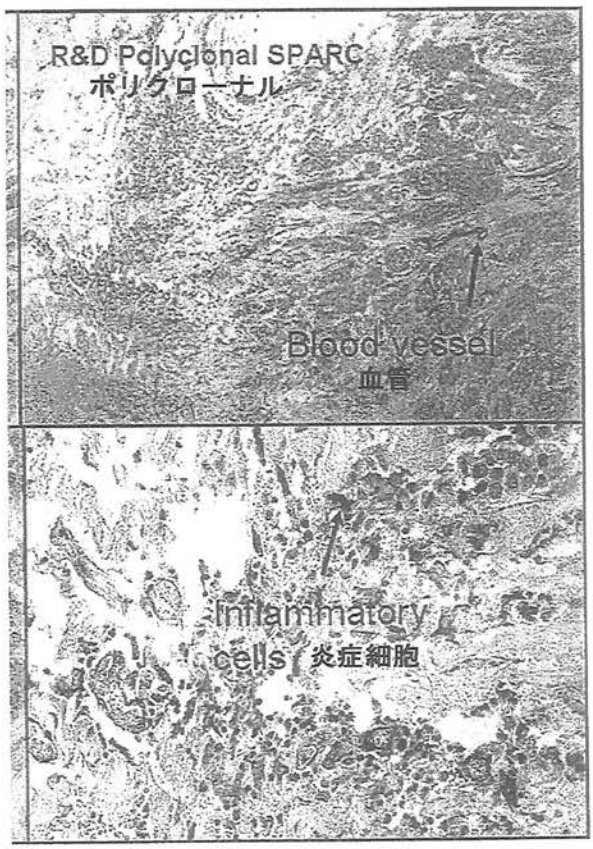

R&D Monoclonal SPARC
モノクローナル
無細胞間質／マトリックス
Acellular Stroma/Matrix
腫瘍
Tumor

図１Ｂ


R&D Polyclonal SPARC
ポリクローナル
Blood vessel
血管
Inflammatory
cells 炎症細胞

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/49545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - G01N 33/53; A61K 31/015 (2010.01)
USPC - 436/501, 514/764
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC(8) - G01N 33/53; A61K 31/015 (2010.01)
USPC - 436/501, 514/764

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WEST - DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=YES; OP=ADJ; Google Scholar
search terms: sparc, secreted protein acidic and rich in cysteine, cysteine-rich protein, osteonectin, bm40, bm-40, "basement-membrane protein 40, basement membrane protein 40, strom$, acell$, epithel$, matrix, ecm, profil$, pattern$, signatur$, express$ or level, stain$,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2007/0054271 A1 (POLYAK et al.) 08 March 2007 (08.03.2007) para [0007]-[0017]; [0022]; [0023]; [0044]; [0071]-[0074]; [0080]; [0081]; [0116]-[0119]; [0134]; [0137]; [0147]; [0151]-[0179]; [0193]; [0194]; abstract; Tables 1, 6, 15.	15 --- 1-4, 8-11, 16-19, 23-27
Y	US 2008/0255035 A1 (TRIEU et al.) 16 October 2008 (16.10.2008) para [0007]-[0010]; [0030]-[0035]; [0086]-[0088]; [0091]-[0093]; [0097]; [0101]-[0103]; [0108]; [0126]; [0146]; [0147]; [0168]; [0176]-[0178].	1-4, 8-11, 16-19, 23-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 October 2010 (20.10.2010)	29 OCT 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/49545

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 5-7, 12-14 and 20-22
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ｇ０１Ｎ　33/48	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/48	Ｐ
Ｇ０１Ｎ　33/574	*(2006.01)*	Ｇ０１Ｎ	33/574	Ａ

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人　100122688
弁理士　山本　健二
(74)代理人　100117743
弁理士　村田　美由紀
(74)代理人　100163658
弁理士　小池　順造
(74)代理人　100174296
弁理士　當麻　博文
(72)発明者　チェウ、ヴォン
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９１３０２、カラバサス、ノース　セアノサス　プレイス　３９６５
(72)発明者　デサイ、ニール
アメリカ合衆国、カリフォルニア州　９００２５、ロス　アンジェルス、スウィート　２０００、ウィルシャー　ブールヴァード　１１７５５

Ｆターム(参考) 2G045 AA26 CB01 DA36 FB03
4C084 AA17 NA14 ZB261 ZB271
4C086 AA01 AA02 BA02 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZB27