

(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2014-507640

(P2014-507640A)

(43) 公表日 平成26年3月27日(2014.3.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 27/62 (2006.01)</b>	GO 1 N 27/62 Z N A V	2 G O 4 1
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	2 G O 4 5
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
<b>GO 1 N 33/68 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/68	4 H O 4 5
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2013-547627 (P2013-547627)	(71) 出願人	505343745
(86) (22) 出願日	平成23年12月27日 (2011.12.27)		エクスプレッション、パソロジー、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成25年8月7日 (2013.8.7)		EXPRESSION PATHOLOGY, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/067439		アメリカ合衆国メリーランド州、ロックビル、メディカル、センター、ドライブ、9620、スイート、100
(87) 国際公開番号	W02012/092302	(74) 代理人	100117787
(87) 国際公開日	平成24年7月5日 (2012.7.5)		弁理士 勝沼 宏仁
(31) 優先権主張番号	61/427, 396	(74) 代理人	100091487
(32) 優先日	平成22年12月27日 (2010.12.27)		弁理士 中村 行孝
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100107342
			弁理士 横田 修孝
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 cMETタンパク質SRM/MRMアッセイ

## (57) 【要約】

肝細胞増殖因子受容体(cMET)タンパク質からのあるペプチド、およびそれらのペプチドの誘導されたイオン化特性が提供される。本ペプチドは、質量分析に基づいた選択反応モニタリング(Selected Reaction Monitoring: SRM)質量分析の方法によって、ホルマリン中で固定化された生物学的試料中、直接cMETタンパク質を定量するために有益であり、また多重反応モニタリング(Multiple Reaction Monitoring: MRM)質量分析とも呼ばれる。そのような生物学的試料は、化学的に保存および固定化され、そこで、生物学的試料は、ホルマリン固定組織/細胞、ホルマリン固定/パラフィン包埋(FFPE)組織/細胞、FFPE組織ブロックおよびこれらのブロックからの細胞、およびホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織培養細胞を含む、ホルマリン含有試薬/固定剤で処理した組織および細胞から選択される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生物学的試料中の肝細胞増殖因子受容体 ( c M E T ) タンパク質のレベルを測定するための方法であって、質量分析を用いて、前記生物学的試料から調製されたタンパク質消化物中の、1つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量を検出すること、および/または定量すること、ならびに前記試料中の改変または未改変 c M E T タンパク質のレベルを計算すること、を含んでなり、前記レベルが、相対レベルまたは絶対レベルである、方法。

## 【請求項 2】

1つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量を検出すること、および/または定量することの前に、前記タンパク質消化物を分画する段階をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記分画する段階が、ゲル電気泳動、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、ナノ逆相液体クロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィーまたは逆相高性能液体クロマトグラフィーからなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記生物学的試料の前記タンパク質消化物が、L i q u i d T i s s u e ( 商標 ) プロトコールによって調製される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記タンパク質消化物が、プロテアーゼ消化物を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記タンパク質消化物が、トリプシン消化物を含む、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記質量分析が、タンデム質量分析、イオントラップ質量分析、三連四重極質量分析、M A L D I - T O F 質量分析、M A L D I 質量分析および/または飛行時間質量分析を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

使用した質量分析のモードが、選択反応モニタリング ( S e l e c t e d R e a c t i o n M o n i t o r i n g : S R M ) 、多重反応モニタリング ( M u l t i p l e R e a c t i o n M o n i t o r i n g : M R M ) 、および/または多数の選択反応モニタリング ( m S R M ) である、請求項 7 に記載の方法。

30

## 【請求項 9】

前記 c M E T 断片ペプチドが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 および配列番号 12 に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 8 いずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記生物学的試料が血液試料、尿試料、血清試料、腹水試料、痰試料、リンパ液、唾液試料、細胞または固体組織である、請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 11】

前記組織が、ホルマリン固定組織である、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記組織が、パラフィン包埋組織である、請求項 10 または 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記組織が、腫瘍から得られる、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記腫瘍が原発腫瘍である、請求項 13 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記腫瘍が二次腫瘍である、請求項 13 に記載の方法。

50

**【請求項 16】**

さらに、改変または未改変 c M E T 断片ペプチドを定量することを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 17】**

c M E T 断片ペプチドを定量することが、1つの生物学的試料中の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 または配列番号 12 に記載の、c M E T の約 8 ~ 約 45 アミノ酸残基のアミノ酸配列を含む、1つまたはそれ以上の c M E T 断片ペプチドの量を、異なる別の生物学的試料中の同一の c M E T 断片ペプチドの量と比較することを含む、請求項 16 に記載の方法。

10

**【請求項 18】**

1つまたはそれ以上の c M E T 断片ペプチドを定量することが、公知の量の添加した内部標準ペプチドとの比較により、生物学的試料中の c M E T 断片ペプチドそれぞれの量を測定することを含み、生物学的試料中の各 c M E T 断片ペプチドを、同一のアミノ酸配列を有する内部標準ペプチドと比較する、請求項 17 に記載の方法。

**【請求項 19】**

内部標準ペプチドが、同位体標識されたペプチドである、請求項 18 に記載の方法。

**【請求項 20】**

前記アイソトープ標識内部標準ペプチドが、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{34}\text{S}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^2\text{H}$  またはそれらの組み合わせから選択される、1つまたはそれ以上の重安定アイソトープを含む、請求項 19 に記載の方法。

20

**【請求項 21】**

タンパク質消化物中の 1つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量を検出すること、および / または定量することが、改変または未改変 c M E T タンパク質の存在、および被験体中のがんと関連を示唆する、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 22】**

さらに、前記 1つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量を検出すること、および / または定量することの結果、または前記 c M E T タンパク質のレベルを、がんの診断ステージ / グレード / 状態と関連させることを含む、請求項 21 に記載の方法。

30

**【請求項 23】**

前記 1つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量を検出すること、および / または定量することの結果、または前記 c M E T タンパク質のレベルを、がんの診断ステージ / グレード / 状態と関連させることを、がんの診断ステージ / グレード / 状態に関するさらなる情報を提供するために、多重フォーマットにて、他のタンパク質または他のタンパク質からのペプチドの量を検出すること、および / または定量すること、と組み合わせる、請求項 22 に記載の方法。

**【請求項 24】**

さらに、前記生物学的試料を得た被験体に対して、1つまたはそれ以上の c M E T 断片ペプチドの存在、不在または量、または c M E T タンパク質のレベルに基づいた処置を選択することを含む、請求項 1 に記載の方法。

40

**【請求項 25】**

前記生物学的試料を得た患者に、治療的に効果的な量の治療薬剤を投与することをさらに含み、治療薬剤および / または投与した治療薬剤の量が、1つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量または c M E T タンパク質のレベルに基づく、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 26】**

治療的薬剤が、c M E T タンパク質に結合する、および / またはその生物学的活性を阻害する、請求項 24 および 25 に記載の方法。

**【請求項 27】**

50

前記生物学的試料が、Liquid Tissue (商標) プロトコールおよび試薬を用いて、1つまたはそれ以上の改変または未改変 cMET 断片ペプチドの量を定量化するために処理された、ホルマリン固定腫瘍組織である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 1 つまたはそれ以上の改変または未改変 cMET 断片ペプチドが、2 つまたはそれ以上、3 つまたはそれ以上、4 つまたはそれ以上、5 つまたはそれ以上、6 つまたはそれ以上、8 つまたはそれ以上、または 10 個またはそれ以上の表 1 中のペプチドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

表 2 中のペプチドの量を定量することを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 30】

1 つまたはそれ以上、2 つまたはそれ以上、3 つまたはそれ以上、4 つまたはそれ以上、5 つまたはそれ以上、6 つまたはそれ以上、8 つまたはそれ以上、または 10 個またはそれ以上の表 1 中のペプチドまたはそれに対する抗体を含む組成物。

【請求項 31】

1 つまたは 2 つの表 2 のペプチドまたはそれに対する抗体を含む、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記組成物が、本質的に純粋であるか、または他のタンパク質、膜脂質および / または核酸の任意の組み合わせから選択される他の細胞性コンポーネントを含まない、請求項 30 または 31 の組成物。

20

【請求項 33】

前記ペプチドが、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{34}\text{S}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^2\text{H}$  またはそれらの組み合わせから選択される 1 つまたはそれ以上、2 つまたはそれ以上、または 3 つまたはそれ以上の重安定アイソトープを含む、アイソトープで標識された内部標準ペプチドである、請求項 30 または請求項 31 に記載の組成物。

【請求項 34】

前記ペプチドが、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{34}\text{S}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^2\text{H}$  またはそれらの組み合わせから選択される 1 つまたはそれ以上、2 つまたはそれ以上、または 3 つまたはそれ以上の重安定アイソトープを含む、アイソトープで標識された内部標準ペプチドである、請求項 32 に記載の組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

【0001】

本願は、2010年12月27日に出版された米国特許仮出願第 61 / 427 , 396 号に基づく優先権を主張するものであり、その内容はすべて参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

諸言

cMET として、また HGF / SF 受容体、プロトオンコジーン c-Met、散乱係数受容体タンパク質およびチロシン - タンパク質キナーゼ Met として引用される、肝細胞増殖因子受容体の部分列から由来する特定のペプチドが提供される。各ペプチドに対するペプチド配列と断片 / 遷移イオンが、多重反応モニタリング (Multiple Reaction Monitoring: MRM) アッセイ (複数可) としても引用可能な、質量分析に基づいた選択反応モニタリング (Selected Reaction Monitoring: SRM) アッセイ (複数可) にてとりわけ有用であり、本明細書以下では、SRM / MRM アッセイ (複数可) と呼ぶ。cMET タンパク質の SRM / MRM 定量解析に対する、1 つのそのようなペプチドの利用を記述する。

40

【0003】

本 SRM / MRM アッセイは、cMET タンパク質からの 1 つまたはそれ以上の特定の

50

ペプチドの存在を検出するため、および相対的または絶対的量を測定するために使用可能であり、したがって、質量分析によって生物学的試料から得た当該タンパク質調製物中のcMETタンパク質の量を測定する手段を提供する。

#### 【0004】

本明細書で記述したSRM/MRMアッセイは、ホルマリン固定がん患者組織のような、患者組織試料から入手した細胞から調製した複合タンパク質溶解物試料中で直接cMETペプチドを測定可能である。ホルマリン固定組織からタンパク質試料を調製する方法は、その内容が全て参考文献によって本明細書に組み込まれている米国特許第7,473,532号明細書に記述されている。本特許に記述された方法は、Expression Pathology Inc. (Rockville, MD) から入手可能な、Liquid Tissue (商標) 試薬およびプロトコルを用いて、便利に実施されてよい。

10

#### 【0005】

がん患者から外科的に取り除いた組織のホルムアルデヒド/ホルマリン固定は、病理学的実施において、受け入れられた慣習である。結果として、ホルムアルデヒド/ホルマリン固定パラフィン包埋組織が、これらの患者からの組織の、もっとも広く利用可能な形状である。ホルムアルデヒド/ホルマリン固定は典型的には、ホルマリンとして引用されるホルムアルデヒドの水溶液を利用する。「100%」ホルマリンは、酸化と重合化の程度を制限するために、少量の安定化剤、通常メタノールを含む、水中のホルムアルデヒドの飽和溶液(約40容量%または37質量%ホルムアルデヒド)からなる。組織を保存するもっとも一般的な方法は、一般に10%中性緩衝ホルマリンと呼ばれる、水性ホルムアルデヒド中、長時間(8時間~48時間)、全組織を浸し、続いて室温にて長期間保存のために、固定した全組織をパラフィンワックス中に包埋することである。したがって、ホルマリン固定がん組織を解析するための分子解析方法が、がん患者組織の解析に対して、もっとも許容され、頻繁に使用される方法であろう。

20

#### 【0006】

SRM/MRMアッセイからの結果を、その組織(生物学的試料)が回収され、保存された患者または被験体の特定の組織試料(例えばがん組織試料)内のcMETタンパク質の実際の、そして正確な定量レベルを相互に関係づけるために使用可能である。これは、がんに関する診断情報を提供するだけでなく、医師または他の医療専門家が患者に対する適切な治療を決定することを許容する。疾患組織または他の患者試料中のタンパク質発現のレベルに関する診断的および治療的に重要な情報を提供するそのようなアッセイは、コンパニオン診断アッセイと呼ばれる。例えば、そのようなアッセイは、がんのステージまたは程度を診断し、患者がもっとも応答する可能性のある治療薬剤を決定することが可能である。

30

#### 【発明の概要】

#### 【0007】

本明細書で記述したアッセイは、cMETタンパク質からの特定の未改変ペプチドの相対的または絶対的レベルを測定し、cMETタンパク質からの特定の改変ペプチドの相対的または絶対的レベルも測定可能である。改変の例には、ペプチド上に存在するリン酸化アミノ産残基、糖付加アミノ酸残基が含まれる。

40

#### 【0008】

cMETタンパク質の相対的定量レベルが、SRM/MRM法によって、例えば、異なる試料(例えば対照試料および患者の組織から調製した試料)中の個々のcMETペプチドのSRM/MRM痕跡ピーク面積(例えば痕跡ピーク面積または統合断片イオン強度)を比較することによって、決定される。あるいは、1つまたはそれ以上のさらなる、または異なる生物学的試料中のcMETタンパク質含有量で、1つの生物学的試料中の相対cMETタンパク質含有量を決定するために、多数のcMET痕跡ペプチドに対する、多数のSRM/MRM痕跡ピーク面積を比較することが可能であり、ここでは、各ペプチドがその固有の特定のSRM/MRM痕跡ピークを有する。本方法において、cMETタンパク質からの特定のペプチドまたはペプチド類の量、したがって、cMETタンパク質の量

50

が、同一の実験条件下、2つ以上の生物学的試料にわたり、同一のcMETペプチドまたはペプチド類に関して決定される。さらに、生物学的試料からの同一のタンパク質調節物内で、SRM/MRM法によるペプチドに対する痕跡ピーク面積を、異なるタンパク質またはタンパク質類からの、他の、および異なるペプチドまたはペプチド類に対する痕跡ピーク面積と比較することによって、単一の試料内のcMETタンパク質からの当該ペプチドまたはペプチド類に関して相対量を計算可能である。この様にして、cMETタンパク質からの特定のペプチドの量、したがって、cMETタンパク質の量を、同一の試料中、一つ一つに関して決定する。これらのアプローチは、生物学的試料からのタンパク質調節物中のcMETペプチドの絶対重量対容量、重量対重量にかかわらず、ピーク面積によって決定したような量が、一つ一つ相関する、試料間および試料内で、他のペプチドまたはペプチド類の量に対するcMETタンパク質からの個々のペプチドまたはペプチド類の定量を産出する。異なる試料間の個々の痕跡ピーク面積に関する相対定量データは、試料あたり解析されたタンパク質量に対して標準化される。相対定量は、相対タンパク質量、他のペプチド/タンパク質に関して1つのペプチド/タンパク質への洞察を得るために、単一の試料中、および/または多くの試料にわたり同時に、多数のタンパク質およびcMETタンパク質からの多くのペプチドにわたって実施可能である。

10

20

30

40

50

**【0009】**

cMETタンパク質の絶対定量レベルは例えば、それによって、1つの生物学的試料中のcMETタンパク質からの個々のペプチドのSRM/MRM痕跡ピーク面積を、公知量の「スパイクした」内部標準のSRM/MRM痕跡ピーク面積と比較する、SRM/MRM法によって決定される。1つの実施形態において、内部標準は、1つまたはそれ以上の重アイソトープで標識した1つまたはそれ以上のアミノ酸残基を含む同一の実際のcMETペプチドの合成バージョンである。そのようなアイソトープ標識化内部標準は、質量分析解析が、天然のcMETペプチド痕跡ピークから異なり、区別できる、そして比較ピークとして使用可能な、予想可能で、一定なSRM/MRM痕跡ピークを産出するように、合成される。したがって、内部標準を、生物学的試料からのタンパク質またはペプチド調製物内に公知の量でスパイクし、質量測定によって解析した時に、天然のペプチドのSRM/MRM痕跡ピーク面積を、内部標準ペプチドのSRM/MRM痕跡ピーク面積と比較し、この数的比較は、生物学的試料からの本来のタンパク質調製物中に存在する天然のペプチドの絶対モル濃度および/または絶対重量いずれかを示す。断片ペプチドに対する絶対定量データが、試料あたり解析されたタンパク質量にしたがって表示される。絶対定量は、個々の生物学的試料中、および個々の試料の全コホート中の絶対タンパク質量への洞察を得るために、単一試料内で同時に多くのペプチド、したがってタンパク質にわたり、および/または多くの試料にわたり、実施可能である。

**【0010】**

SRM/MRMアッセイ法を、例えば、ホルマリン固定組織のような患者由来の組織中直接、がんのステージの診断を補助するため、およびどの治療薬剤が、その患者を処置するために使用するためにもっとも有益であるかを決定することを補助するために使用可能である。部分的または全腫瘍の治療的除去のためのような手術を通して、または疑わしい疾患が存在するか、またはしないかを決定するために実施された生検手順を通してのいずれかで、患者より除去されるがん組織が、特定のタンパク質またはタンパク質類が、そしてどの形態のタンパク質が患者組織中に存在するかを決定するために解析される。さらに、タンパク質または多数のタンパク質の発現レベルを決定し、健康人組織にて発見される「正常な」または参照レベルと比較可能である。健康人組織にてみられる正常または参照レベルのタンパク質は、例えば、がんを有しない1人またはそれ以上の個人の関連組織から由来してよい。あるいは、正常または参照レベルは、がんに影響を受けていない関連組織の解析によって、がんを有する個人に対して得られてよい。

**【0011】**

タンパク質レベル(例えばcMETレベル)のアッセイをまた、cMETレベルを利用することによってがんを診断された患者または被験体中のがんのステージを診断するため

に使用可能でもある。タンパク質またはペプチドのレベルまたは量は、SRM/MRMアッセイによって決定されるタンパク質またはペプチドのモル数、質量または重量で表される定量として定義可能である。レベルまたは量は、(例えばタンパク質のマイクロモル/マイクログラム、またはタンパク質のマイクログラム/マイクログラムとして表される)解析した溶解物中のタンパク質または他のコンポーネントの総レベルまたは量に対して標準化してよい。さらに、タンパク質またはペプチドのレベルまたは量を、例えばマイクロモルまたはナノグラム/マイクロリットルにて表される、容積基準に基づいて決定してよい。SRM/MRMアッセイによって決定されたようなタンパク質またはペプチドのレベルまたは量を、解析した細胞数に対して標準化することも可能である。cMETに関する情報をしたがって、正常組織で観察されたレベルと、cMETタンパク質(またはcMETタンパク質の断片ペプチド)のレベルを相関させることによって、がんのステージまたはグレードを決定することを補助するために使用可能である。

10

20

30

40

50

#### 【0012】

一旦がんのステージおよび/またはグレード、および/またはcMETタンパク質発現特徴が決定されたならば、情報を、例えばアッセイしたタンパク質またはタンパク質(複数可)(例えばcMET)の異常発現によって特徴付けられるがん組織を特に処置するために開発された(化学および生物学的)治療薬剤のリストと適合可能である。例えばcMETタンパク質または当該タンパク質を発現している細胞/組織を特に標的化する治療薬剤のリストへのcMETタンパク質アッセイからのマッチング情報は、疾患を処置するためのパーソナライズ医療アプローチと呼ばれるものを定義する。本明細書で記述したアッセイ方法は、診断および処置決断のためのソースとして、患者固有の組織からのタンパク質の解析を用いることによる、パーソナライズ医療アプローチの基礎を形成する。

#### 【0013】

本発明のある実施形態を以下に記述する。

1. 生物学的試料中の肝細胞増殖因子受容体(cMET)タンパク質のレベルを測定するための方法であって、質量分析を用いて、前記生物学的試料から調製されたタンパク質消化物中の、1つまたはそれ以上の改変または未改変cMET断片ペプチドの量を検出すること、および/または定量すること、ならびに前記試料中の改変または未改変cMETタンパク質のレベルを計算すること、を含んでなり、前記レベルが、相対レベルまたは絶対レベルである、方法。
2. 1つまたはそれ以上の改変または未改変cMET断片ペプチドの量を検出すること、および/または定量することの前に、前記タンパク質消化物を分画する段階をさらに含む、実施形態1に記載の方法。
3. 前記分画する段階が、ゲル電気泳動、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、ナノ逆相液体クロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィーまたは逆相高性能液体クロマトグラフィーからなる群より選択される、実施形態2に記載の方法。
4. 前記生物学的試料の前記タンパク質消化物が、Liquid Tissue(商標)プロトコールによって調製される、実施形態1~3のいずれか1つに記載の方法。
5. 前記タンパク質消化物が、プロテアーゼ消化物を含む、実施形態1~3のいずれかに記載の方法。
6. 前記タンパク質消化物が、トリプシン消化物を含む、実施形態5に記載の方法。
7. 前記質量分析が、タンデム質量分析、イオントラップ質量分析、三連四重極質量分析、MALDI-TOF質量分析、MALDI質量分析および/または飛行時間質量分析を含む、実施形態1~6のいずれかに記載の方法。
8. 使用した質量分析のモードが、選択反応モニタリング(Selected Reaction Monitoring: SRM)、多重反応モニタリング(Multiple Reaction Monitoring: MRM)、および/または多数の選択反応モニタリング(mSRM)である、実施形態7に記載の方法。
9. 前記cMET断片ペプチドが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番

号 1 1 および配列番号 1 2 に記載されるアミノ酸配列を含む、実施様態 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

1 0 . 前記生物学的試料が血液試料、尿試料、血清試料、腹水試料、痰試料、リンパ液、唾液試料、細胞または固体組織である、実施様態 0 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

1 1 . 前記組織がホルマリン固定組織である、実施様態 1 0 に記載の方法。

1 2 . 前記組織がパラフィン包埋組織である、実施様態 1 0 または 1 1 に記載の方法。

1 3 . 前記組織が腫瘍から得られる、実施様態 1 0 に記載の方法。

1 4 . 前記腫瘍が原発腫瘍である、実施様態 1 3 に記載の方法。

1 5 . 前記腫瘍が二次腫瘍である、実施様態 1 3 に記載の方法。

1 6 . さらに、改変または未改変 c M E T 断片ペプチドを定量することを含む、実施様態 0 ~ 1 5 のいずれかに記載の方法。

1 7 . c M E T 断片ペプチドを定量することが、1 つの生物学的試料中の配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 1 または配列番号 1 2 に記載の、c M E T の約 8 ~ 約 4 5 アミノ酸残基のアミノ酸配列を含む、1 つまたはそれ以上の c M E T 断片ペプチドの量を、異なる別の生物学的試料中の同一の c M E T 断片ペプチドの量と比較することを含む、実施様態 1 6 に記載の方法。

1 8 . 1 つまたはそれ以上の c M E T 断片ペプチドを定量することが、公知の量の添加した内部標準ペプチドとの比較により、生物学的試料中の c M E T 断片ペプチドそれぞれの量を測定することを含み、生物学的試料中の各 c M E T 断片ペプチドを、同一のアミノ酸配列を有する内部標準ペプチドと比較する、実施様態 1 7 に記載の方法。

1 9 . 内部標準ペプチドが、同位体標識されたペプチドである、実施様態 1 8 に記載の方法。

2 0 . 前記アイソトープ標識内部標準ペプチドが、 $^{18}O$ 、 $^{17}O$ 、 $^{34}S$ 、 $^{15}N$ 、 $^{13}C$ 、 $^2H$  またはそれらの組み合わせから選択される、1 つまたはそれ以上の重安定アイソトープを含む、実施様態 1 9 に記載の方法。

2 1 . タンパク質消化物中の 1 つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量を検出すること、および / または定量することが、改変または未改変 c M E T タンパク質の存在、および被験体中のがんとの関連を示唆する、実施様態 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の方法。

2 2 . さらに、前記 1 つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量を検出すること、および / または定量することの結果、または前記 c M E T タンパク質のレベルを、がんの診断ステージ / グレード / 状態と関連させることをさらに含む、実施様態 2 1 に記載の方法。

2 3 . 前記 1 つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量を検出すること、および / または定量することの結果、または前記 c M E T タンパク質のレベルを、がんの診断ステージ / グレード / 状態と関連させることを、がんの診断ステージ / グレード / 状態に関するさらなる情報を提供するために、多重フォーマットにて、他のタンパク質または他のタンパク質からのペプチドの量を検出すること、および / または定量すること、と組み合わせる、実施様態 2 2 に記載の方法。

2 4 . さらに、前記生物学的試料を得た被験体に対して、1 つまたはそれ以上の c M E T 断片ペプチドの存在、不在または量、または c M E T タンパク質のレベルに基づいた処置を選択することを含む、実施様態 1 ~ 2 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

2 5 . 前記生物学的試料を得た患者に、治療的に効果的な量の治療薬剤を投与することをさらに含み、治療薬剤および / または投与した治療薬剤の量が、1 つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量または c M E T タンパク質のレベルに基づく、実施形態 1 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

2 6 . 治療的薬剤が、c M E T タンパク質に結合する、および / またはその生物学的活性を阻害する、実施形態 2 4 および 2 5 に記載の方法。

2 7 . 前記生物学的試料が、L i q u i d T i s s u e ( 商標 ) プロトコールおよび試

10

20

30

40

50

薬を用いて、1つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量を定量化するために処理された、ホルマリン固定腫瘍組織である、実施形態 1 ~ 2 6 に記載の方法。

2 8 . 前記 1 つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドが、2 つまたはそれ以上、3 つまたはそれ以上、4 つまたはそれ以上、5 つまたはそれ以上、6 つまたはそれ以上、8 つまたはそれ以上、または 1 0 個またはそれ以上の表 1 中のペプチドである、実施形態 1 ~ 2 7 のいずれかに記載の方法。

2 9 . 表 2 中のペプチドの量を定量化することを含む、実施形態 1 ~ 2 8 のいずれかに記載の方法。

3 0 . 1 つまたはそれ以上、2 つまたはそれ以上、3 つまたはそれ以上、4 つまたはそれ以上、5 つまたはそれ以上、6 つまたはそれ以上、8 つまたはそれ以上、または 1 0 個またはそれ以上の表 1 中のペプチドまたはそれに対する抗体を含む組成物。

3 1 . 1 つまたは 2 つの表 2 のペプチドまたはそれに対する抗体を含む、実施形態 3 0 に記載の組成物。

3 2 . 前記組成物が、本質的に純粋であるか、または他のタンパク質、膜脂質および/または核酸の任意の組み合わせから選択される他の細胞性コンポーネントを含まない、請求項 3 0 または 3 1 に記載の組成物。

3 3 . 前記ペプチドが、 $^{18}O$ 、 $^{17}O$ 、 $^{34}S$ 、 $^{15}N$ 、 $^{13}C$ 、 $^2H$  またはそれらの組み合わせから選択される 1 つまたはそれ以上、2 つまたはそれ以上、または 3 つまたはそれ以上の重安定アイソトープを含む、アイソトープで標識された内部標準ペプチドである、実施形態 3 0 ~ 3 2 のいずれかに記載の組成物。

3 4 . さらに、前記タンパク質消化物中の 1 つ、2 つ、3 つまたはそれ以上の核酸のレベル(量)または配列を査定すること、または決定することを含む、実施形態 1 ~ 2 9 に記載の方法。

3 5 . 前記核酸が、1 つまたはそれ以上、任意に 2 つまたはそれ以上、または 3 つ全ての、c M e t、I G F - 1 R、E G F R または任意のそれらの断片をコードし、および/または任意の 1 つまたはそれ以上、任意の 2 つまたはそれ以上、または 3 つ全ての、c M e t、I G F - 1 R、E G F R または任意のそれらの断片のアンチセンス配列である、実施形態 3 4 に記載の方法。

3 6 . 前記断片が、独立して、長さにして約 1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0 または 5 0 ヌクレオチドより長い長さを有する、請求項 3 5 に記載の方法。

3 7 . 配列を査定することおよび決定することに、1 つまたはそれ以上のシーケンシング方法によって、ヌクレオチドの配列を決定すること、制限断片多型解析、同一性検出、挿入を実施すること、および/または単一塩基対多型、転移および/または塩基転換を含むが、これらに限定はされない、変異の存在を検出すること、が含まれる、実施形態 3 4 ~ 3 5 のいずれかに記載の方法。

#### 【発明の具体的説明】

##### 【0014】

原則として、例えば公知の特異性のプロテアーゼ(例えばトリプシン)で消化することによって調製した、c M E T タンパク質から由来した任意の予測ペプチドを、質量分析に基づく S R M / M R M アッセイを用いる、試料中の c M E T タンパク質の存在度を決定するために、サロゲートレポーターとして使用可能である。同様に、潜在的に、c M E T タンパク質中で改変されると公知である部位にて、アミノ酸残基を含む任意の予測ペプチド配列をまた、試料中 c M E T タンパク質の改変の程度をアッセイするために、潜在的に使用してもよい。

##### 【0015】

c M E T 断片ペプチドは、米国特許第 7, 4 7 3, 5 3 2 号明細書中で提供される L i q u i d T i s s u e (商標) プロトコールの利用によることを含む種々の手段によって産出されてよい。L i q u i d T i s s u e (商標) プロトコールおよび試薬は、組織/生物学的試料中のタンパク質のタンパク質分解消化によって、ホルマリン固定パラフ

10

20

30

40

50

イン包埋組織からの質量分析解析のために好適なペプチド試料を産出することが可能である。Liquid Tissue (商標) プロトコルにおいて、タンパク質架橋を戻すかまたは放出するために、組織/生物学的を、高温にて長時間(例えば、約10分間~約4時間、約80~約100)緩衝液中で加熱する。使用した緩衝液は、中性緩衝液(例えばTrisベースの緩衝液、または界面活性剤を含む緩衝液)であり、有利に、質量分析解析と干渉しない緩衝液である。次に、組織/生物学的試料を、前記生物学的試料の組織および細胞性構造を破壊し、前記試料を液化するのに十分な時間(例えば、37~65の温度にて、30分間~24時間)、トリプシン、キモトリプシン、ペプシンおよびエンドプロテアーゼLys-Cを含むが、これらに限定はされない、1つまたはそれ以上のプロテアーゼで処理する。加熱およびタンパク質分解の結果が、液体、可溶性、希釈可能生体分子溶解物である。

10

## 【0016】

一旦溶解物を調製したならば、試料中のペプチドを、質量分析による、それらの解析および測定を促進する種々の技術にかけてよい。1つの実施形態において、ペプチドを、例えば、免疫学に基づく精製(例えば免疫親和カクロマトグラフィー)、イオン選択的培地上でのクロマトグラフィーのような親和性技術、またはペプチドが改変されている場合、炭化水素改変ペプチドの分離のためのレクチンのような、適切な培地を用いる分離によって、分離してよい。1つの実施形態において、質量分析解析の前に、ペプチドの免疫学的分離を使用する、SISCAPA法を使用する。SISCAPA技術は、例えば米国特許第7,623,686号明細書に記述されている。他の実施形態において、レクチン親和性法(例えば、親和性精製および/またはクロマトグラフィー)を、質量分析による解析の前に、溶解物からペプチドを分離するために使用してよい。レクチンベースの方法を含む、ペプチドの群の分離のための方法は、例えばGengら、J. Chromatography B, 752:293-306(2001)にて記述される。免疫親和カクロマトグラフィー技術、レクチン親和力技術および親和力分離および/またはクロマトグラフィーの他の形態(例えば逆相、サイズベース分離、イオン交換)を、質量分析によるペプチドの解析を促進するために、任意の好適な組み合わせで使用してよい。

20

## 【0017】

驚くべきことに、cMETタンパク質からの多くの可能性のあるペプチド配列が、すぐには明白ではない理由のために、質量分析ベースのSRM/MRMアッセイにおける利用に好適ではないか、または無効であることがわかった。とりわけ、cMetタンパク質からの多くのトリプシンペプチドが、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織からのLiquid Tissue溶解物中、効果的には、または全く検出不可能であることがわかった。MRM/SRMのためのもっとも好適なペプチドを推定することが不可能であったので、cMETタンパク質に対する、信頼性があり、正確なSRM/MRMアッセイを開発するために、実際のLiquid Tissue(商標)溶解物中の改変および未改変ペプチドを実験的に同定する必要があった。任意の理論にとられることなしに、いくつかのペプチドが、よくイオン化せず、または他のタンパク質から異なる断片を産出せず、ペプチドはまた、分離(例えば液体クロマトグラフィー)において良好に分解できず、またはガラスまたはプラスチックウェアに接着するので、質量分析によって検出することが難しいと信じられる。したがって、ホルマリン固定組織資料から調製した、Liquid Tissue溶解物中で検出可能なcMetタンパク質からのペプチド(例えば表1および2中のペプチド)は、cMet SRM/MRMアッセイを、SRM/MRMアッセイにて使用可能であるペプチドである。

30

40

## 【0018】

本明細書の種々の実施形態にてみられるcMETペプチド(例えば表1および2)は、ホルマリン固定がん組織から入手した細胞から調製した、複合体Liquid Tissue(商標)溶解物内のすべてのタンパク質のプロテアーゼ消化によって、cMETタンパク質より誘導された。他に言及しない限り、各例において、プロテアーゼはトリプシンであった。Liquid Tissue(商標)溶解物をついで、質量分析によって解析

50

して、質量分析によって検出し、解析される c M E T タンパク質から由来したそのようなペプチドを測定した。質量分析解析のためのペプチドの特定の好ましいサブセットの同定は、以下に基づいた。1) L i q u i d T i s s u e (商標) 溶解物の質量分析解析において、どのタンパク質からのペプチドまたはペプチド類がイオン化するかどうか、の実験的測定および2) L i q u i d T i s s u e (商標) 溶解物を調製することにおいて使用したプロトコールと実験条件で存続させるためのペプチドの能力。この後者の特性は、ペプチドのアミノ酸配列に対してだけでなく、試料調製の間、改変形態で存続する、ペプチド内の改変アミノ酸残基の能力に対しても拡張する。

【0019】

【表1】

10

ペプチド	ペプチド配列
配列番号 1	SNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTK
配列番号 2	ETKDGFMFLTDQSYIDVLPEFR
配列番号 3	GHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVK
配列番号 4	TKAFFMLDGLSKYFDLIYVHNPVFK
配列番号 5	MKAPAVLAPGILVLLFTLVQR
配列番号 6	EVFNILQAAYVSKPGAQLAR
配列番号 7	GDLTIANLGTSEGR
配列番号 8	QIKDLGSELVR
配列番号 9	FINFFVGNTINSSYFPDHPLHSISVR
配列番号 10	ITDIGEVSQFLTEGIIMK
配列番号 11	AFFMLDGLSK
配列番号 12	NLNSVSVPR
配列番号 13	TEFTTALQR

20

30

【0020】

【表2】

配列番号	ペプチド配列	モノ同位体質量	前駆体電荷状態	前駆体 m/z	遷移 m/z	イオン型
配列番号 11	AFFMLDGLSK	1241.65986	2	621.333008	632.3608	y6
			2	621.333008	745.4449	y7
			2	621.333008	876.4854	y8
			2	621.333008	1023.554	y9
			2	621.333008	1170.622	y10
			2	621.333008	1241.659	y11
配列番号 12	NLNSVSVPR	985.54252	2	493.273987	557.34	y5
			2	493.273987	644.3721	y6
			2	493.273987	758.415	y7
			2	493.273987	871.499	y8
			2	493.273987	985.542	y9

40

【0021】

ホルマリン(ホルムアルデヒド)固定組織から直接入手した細胞からのタンパク質溶解物を、組織顕微解剖を介して試料チューブ内へ細胞を回収することと、続く長期間の L i q u i d T i s s u e (商標) 緩衝液中細胞を熱することを伴う L i q u i d T i s s u e (商標) 試薬およびプロトコールを用いて調製した。一旦ホルマリン誘導架橋が、負に作用したならば、組織/細胞をついで、例えばプロテアーゼトリプシンを含むが、こ

50

れに限定はされないような、プロテアーゼを用いる予測可能な様式にて完了まで消化する。各タンパク質溶解物が、プロテアーゼによる完全なままのポリペプチドの消化によって、ペプチドの一群に変わる。データが、各タンパク質溶解物中に存在するすべての細胞性タンパク質から、質量分析によって同定可能なほどできるだけ多くのペプチドの同定として表された、ペプチドの多重グローバルプロテオミクスサーベイを実施するために、(例えば、イオントラップ質量分析によって)各Liquid Tissue (商標)溶解物を解析する。イオントラップ質量分析器、または単一の複合タンパク質/ペプチド溶解物からの可能な限り多くのペプチドの同定のために、グローバルフィッティングを実施することが可能な他の型の質量分析器を使用する。イオントラップ質量分析器がしかしながら、ペプチドのグローバルプロファイリングのために、もっともよい質量分析器の型であってよい。SRM/MRMアッセイを、MALDI、イオントラップまたは三連四重極を含む任意の型の質量分析器上で開発および実施可能であり、SRM/MRMアッセイに対するもっとも有利な器具プラットフォームは、三連四重極器具プラットフォームであるとしばしば考えられる。

10

20

30

40

50

#### 【0022】

一旦、出来るだけ多くのペプチドが、使用した条件下、単独溶解物の単独MS解析にて同定された場合、ペプチドのリストを順に並べ、その溶解物中で検出されたタンパク質を決定するために使用した。この工程を、多重Liquid Tissue (商標)溶解物に対して繰り返し、非常に大きなペプチドのリストを、単独データセット内に順に並べた。この型のデータセットは、(プロテアーゼ消化後に)解析された生物学的試料の型、とりわけ生物学的試料のLiquid Tissue (商標)溶解物中で検出可能なペプチドを表すと考えることが可能であり、したがって例えばcMETタンパク質のような、得特定のタンパク質に対するペプチドを含む。

#### 【0023】

1つの実施形態において、絶対または相対量のcMET受容体の測定において有用であると同定されたcMETトリプシンペプチドには、1つまたはそれ以上、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上、4つまたはそれ以上、5つまたはそれ以上、6つまたはそれ以上、8つまたはそれ以上、10個またはそれ以上の配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11および配列番号12のペプチドが含まれ、これらそれぞれが表1に記載される。これらのペプチドのそれぞれを、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織から調製した、Liquid Tissue (商標)溶解物中の質量分析によって検出した。したがって、表1中の各ペプチド、またはこれらのペプチドの任意の組み合わせ(例えば、1つまたはそれ以上、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上、4つまたはそれ以上、5つまたはそれ以上、6つまたはそれ以上、8つまたはそれ以上、10個またはそれ以上の表1中に記載したペプチド、およびとりわけ表2で見られるペプチドの組み合わせ)が、ホルマリン固定患者組織中で直接を含む、ヒト生物学的試料中のcMETタンパク質に対する定量的SRM/MRMでの使用のための候補である。

#### 【0024】

表1に記載したcMETトリプシンペプチドには、前立腺、大腸および乳を含む異なるヒト器官の多重の異なるホルマリン固定組織の多重Liquid Tissue (商標)溶解物から検出されたものが含まれる。各これらのペプチドは、ホルマリン固定組織中のcMETタンパク質の定量的SRM/MRMアッセイのために有用であると考えられる。さらに、これらの実験のデータ解析が、任意の特定の器官部位から、任意の特定のペプチドに対して優先傾向は観察されないことを示唆した。したがって、各これらのペプチドは、任意の生物学的試料から、または体内の任意の器官部位から発生する、任意のホルマリン固定組織からの、Liquid Tissue (商標)溶解物上での、cMETタンパク質のSRM/MRMアッセイを実施するために好適であると信じられる。

#### 【0025】

1つの実施形態において、表1中のペプチド、またはこれらのペプチドの任意の組み合

わせ（例えば、1つまたはそれ以上、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上、4つまたはそれ以上、5つまたはそれ以上、6つまたはそれ以上、8つまたはそれ以上、10個またはそれ以上の表1中に記載したペプチド、およびとりわけ表2で見られるペプチドの組み合わせ）が、免疫学的方法（例えばウエスタンブロッティングまたはELISA）を含むが限定はされない、質量分析に頼らない方法によってアッセイされる。どのようにペプチド（複数可）の量（絶対的または相対的）に指向する情報を得るかに関わらず、情報は、被験体におけるがんの存在を指摘すること（診断すること）、がんのステージ/グレード/状態を決定すること、予後を提供すること、または被験体/患者に対する治療または処置レジメを決定することを含む、本明細書で記述した任意の方法にて使用されてよい。

10

#### 【0026】

本明細書の実施形態には、1つまたはそれ以上、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上、4つまたはそれ以上、5つまたはそれ以上、6つまたはそれ以上、8つまたはそれ以上、10個またはそれ以上の表1中のペプチドを含む組成物が含まれる。いくつかの実施形態において、組成物には、表2中のペプチドが含まれる。ペプチドを含む組成物には、同位体で標識された、1つまたはそれ以上、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上、4つまたはそれ以上、5つまたはそれ以上、6つまたはそれ以上、8つまたはそれ以上、10個またはそれ以上のペプチドが含まれてよい。各ペプチドは、 $^{18}O$ 、 $^{17}O$ 、 $^{34}S$ 、 $^{15}N$ 、 $^{13}C$ 、 $^2H$ またはそれらの組み合わせからなる群より独立して選択された、1つまたはそれ以上の同位体で標識されてよい。同位体標識されているか、されていないか、いずれかのcMETタンパク質からのペプチドを含む組成物は、当該タンパク質からのすべてのペプチド（例えばトリプシンペプチドの完全組）を含む必要はない。いくつかの実施形態において、組成物は、1つまたはそれ以上、2つまたはそれ以上、3つまたはそれ以上、4つまたはそれ以上、5つまたはそれ以上、6つまたはそれ以上、8つまたはそれ以上、10個またはそれ以上のcMETからのペプチド、とりわけ表1または表2中に示されているペプチドを含まない。ペプチドを含む組成物は、乾燥または凍結乾燥材料、液体（例えば水性）溶液または懸濁液、アレイまたはプロットの形態であってよい。

20

#### 【0027】

SRM/MRMアッセイを実施する時に重要な考慮は、ペプチドの解析にて使用してよい器具の型である。SRM/MRMアッセイは、MALDI、イオントラップまたは三連四重極を含む任意の型の質量分析器上で開発および実施可能であるけれども、SRM/MRMアッセイに対して現在もっとも有益な器具プラットフォームはしばしば、三連四重極装置プラットフォームであると考えられる。この質量分析器の型は、細胞内に含まれるすべてのタンパク質からの、数百、数千~数百万の個々のペプチドからなっており、非常に複雑なタンパク質溶解物内の単一の単離標的ペプチドを解析するための、もっとも好適な器具であると考えられることができる。

30

#### 【0028】

cMETタンパク質から由来した各ペプチドに対してSRM/MRMアッセイを、最も効率的に実行するために、解析において、ペプチド配列に加えて、情報を利用することが望ましい。この追加情報は、アッセイが効果的に実施されるように、特定の標的化ペプチド（複数可）の正確で、焦点をあてた解析を実施するために、質量分析器（例えば三連四重極質量分析器）を指向すること、および指導することにおいて使用してよい。

40

#### 【0029】

一般に標的ペプチドについて、および特定のcMETペプチドについての追加情報には、1つまたはそれ以上の各ペプチドのモノ同位体質量、その前駆体電荷状態、前駆体m/z値、m/z遷移イオン、各遷移イオンのイオン型が含まれてよい。cMETタンパク質に対してSRM/MRMアッセイを開発するために使用してよい追加ペプチド情報は、例えば例によって表1中のリストからの2つのcMETペプチドによって示され、表2で示される。表2中の例によって示されたこれらの2つのcMETペプチドについて記述され

50

た同様の追加情報が、表 1 に含まれる他のペプチドの解析に対して、作成され、得られ、適用されてよい。

【 0 0 3 0 】

以下で記述した方法を、1) c M E T タンパク質に対する質量分析ベースの S R M / M R M アッセイのために使用可能である c M E T タンパク質から、候補ペプチドを同定する、2) 相互に関連づけるために、c M E T タンパク質からの標的ペプチドに関して、個々の S R M / M R M アッセイまたはアッセイ類を開発する、および 3) がん診断および/または最適な治療の選択に対して、定量アッセイを適用するために使用した。

【 0 0 3 1 】

アッセイ方法

1. c M E T タンパク質に対する S R M / M R M 候補断片ペプチドの同定

a. タンパク質を消化するために、(トリプシンを含んでよく、または含まなくてよい) プロテアーゼまたはプロテアーゼ類を用いて、ホルマリン固定生物学的試料から、L i q u i d T i s s u e (商標) タンパク質溶解物を調製する

b. イオンラップタンデム質量分析器上で、L i q u i d T i s s u e (商標) 溶解物中のすべてのタンパク質断片を解析し、c M E T タンパク質からすべての断片ペプチドを同定し、そこで個々の断片ペプチドは、リン酸化または糖付加のような任意のペプチド改変を含まない。

c. イオンラップタンデム質量分析器上で、L i q u i d T i s s u e (商標) 溶解物中のすべてのタンパク質断片を解析し、例えばリン酸化または糖付加残基のような、ペ

プチド改変を有する c M E T タンパク質からすべての断片ペプチドを同定する。

d. 全、完全長 c M E T タンパク質から特定の消化方法によって産出したすべてのペプチドが本質的に測定可能であるが、S R M / M R M アッセイの開発のために使用される好ましいペプチドは、ホルマリン固定生物学的試料から調製される、複合体 L i q u i d T i s s u e (商標) タンパク質溶解物中で直接、質量分析によって同定されるものである。

e. 患者組織内で、特に改変され(リン酸化された、糖付加されたなど)、ホルマリン固定生物学的試料からの L i q u i d T i s s u e (商標) 溶解物を解析した時に、質量分析器内でイオン化され、したがって検出可能であるペプチドは、c M E T タンパク質のペプチド改変をアッセイするための、候補ペプチドとして同定される。

【 0 0 3 2 】

2. c M E T タンパク質からの断片ペプチドに対する質量分析アッセイ

a. L i q u i d T i s s u e (商標) 溶解物中で同定された、個々の断片ペプチドに対する、三連四重極質量分析器上での S R M / M R M アッセイを、c M E T タンパク質からのペプチドに適用する。

i. ゲル電気泳動、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、ナノ逆相液体クロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィーまたは逆相高性能液体クロマトグラフィーを含むが、これらの限定はされない最適なクロマトグラフィー条件に関して、断片ペプチドに対する最適な保持時間を決定する。

i i. 各ペプチドに対して S R M / M R M アッセイを開発するために、ペプチドのモノ同位体質量、各ペプチドに対する前駆体電荷状態、各ペプチドに対する前駆体 m / z 値、各ペプチドに対する m / z 遷移イオン、各断片ペプチドに対する各遷移イオンのイオン型を測定する。

i i i. S R M / M R M アッセイをついで、各ペプチドが、三連四重極質量分析器上で実施するような固有の S R M / M R M アッセイを正確に定義する、特徴的かつ固有の S R M / M R M 痕跡ピークを有する、三連四重極質量分析器上、( i ) および ( i i ) からの情報を用いて実施可能である。

b. S R M / M R M 質量分析解析から固有の S R M / M R M 痕跡ピーク面積の関数として検出される c M E T タンパク質の断片ペプチドの量が、特定のタンパク質溶解物中のタンパク質の相対量と絶対量の両方を示唆可能であるように、S R M / M R M 解析を実施する

10

20

30

40

50

。

i . 相対定量が、

1 . 1つのホルマリン固定生物学的試料からの、Liquid Tissue (商標) 溶解物中で検出されるcMETペプチドからの、SRM/MRM痕跡ピーク面積を、少なくとも第二、第三、第四またはそれ以上のホルマリン固定生物学的試料からの、少なくとも第二、第三、第四またはそれ以上のLiquid Tissue (商標) 溶解物中の同一のcMET断片ペプチドの同一のSRM/MRM痕跡ピーク面積と比較することにより、当該cMETタンパク質の存在の増加または減少を測定すること、

2 . 1つのホルマリン固定生物学的試料からの、Liquid Tissue (商標) 溶解物中で検出されるcMETペプチドからの、SRM/MRM痕跡ピーク面積を、異なる、そして分離した生物学的供給源から由来した他の試料中、他のタンパク質からの断片ペプチドから発展したSRM/MRM痕跡ピーク面積と比較することによって、当該cMETタンパク質の存在の増加または減少を測定することで、ペプチド断片に対する2つの試料間のSRM/MRM痕跡ピーク面積比較は、各試料中で解析されたタンパク質の量に対して標準化される。

3 . 種々の細胞条件下、それらの発現レベルを変化させない他のタンパク質のレベルに対して、cMETタンパク質のレベルの変化を標準化するために、cMETペプチドに対するSRM/MRM痕跡ピーク面積を、ホルマリン固定生物学的試料からの、同一のLiquid Tissue (商標) 溶解物内の、異なるタンパク質から誘導された他の断片ペプチドからのSRM/MRM痕跡ピーク面積と比較することによって、当該cMETタン

4 . これらのアッセイは、cMETタンパク質の、未改変断片ペプチドと改変断片ペプチドの両方に適用可能であり、そこで改変には、リン酸化および/または糖付加が含まれるが、これらに限定はされず、改変されたペプチドの相対レベルが、未改変ペプチドの相対量を測定するのと同じの様式にて測定される、  
によって達成されてよい。

ii . 当該ペプチドの絶対定量を、個々の生物学的試料中のcMETタンパク質からの断片ペプチドに対する、SRM/MRM痕跡ピーク面積を、生物学的試料からのタンパク質溶解物内へスパイクした、内部断片ペプチド標準のSRM/MRM痕跡ピーク面積と比較することによって達成してよい。

1 . 内部標準は、詮索されているcMETタンパク質からの断片ペプチドの標識された合成バージョンである。この標準を、公知の量で試料中にスパイクし、SRM/MRM痕跡ピーク面積を、別々に生物学的試料中の内部断片ペプチド標準と、天然の断片ペプチドに関して測定してよく、続いて両方のピーク面積を比較する。

2 . これは、未改変断片ペプチドと改変断片ペプチドに適用可能であり、そこで改変には、リン酸化および/または糖付加が含まれるが、これらの限定はされず、改変ペプチドの絶対レベルは、未改変ペプチドの絶対レベルを測定するのと同じの様式で決定可能である。

3 . がん診断および処置に、断片ペプチド定量を適用する

a . cMETタンパク質の断片ペプチドレベルの相対および/または絶対定量を実施し、またがん領域でよく理解されるように、患者腫瘍組織内のがんのステージ/グレード/状態に対する、cMETタンパク質発現の先に測定した関連が確認されたことを示す。

b . cMETタンパク質の断片ペプチドレベルの相対および/または絶対定量を実施し、異なる処置戦略からの臨床結果との相関を示し、ここで、本相関がすでに本領域で示されているか、または患者と、そのような患者からの組織のコホートにわたる、相関試験を通して将来示すことが可能である。一旦先に確立された相関、または将来誘導される相関のいずれかが、本アッセイによって確認されたならば、ついでアッセイ方法を、最適な処置戦略を決定するために使用可能である。

【0033】

ホルマリン固定患者由来組織の解析に基づいた、組織中のcMETタンパク質レベルの

査定により、各特定の患者についての、診断、予後および治療に関連した情報が提供される。1つの実施形態において、本明細書は、質量分析を用いて、前記生物学的試料から調製したタンパク質消化物中の1つまたはそれ以上の改変または未改変 c M E T 断片ペプチドの量を検出すること、および/または定量すること、および試料中の改変または未改変 c M E T タンパク質のレベルを計算することを含む、生物学的試料中の c M E T タンパク質のレベルを測定するための方法を記述しており、前記レベルは相対レベルまたは絶対レベルである。関連する実施形態において、1つまたはそれ以上の c M E T 断片ペプチドを定量することには、公知の量の添加した内部標準ペプチドに対する比較による、生物学的試料中の各 c M E T 断片ペプチドの量を測定することが含まれ、そこで生物学的試料中の各 c M E T 断片ペプチドが、同一のアミノ酸配列を有する内部標準ペプチドと比較される。いくつかの実施形態において、内部標準は、<sup>18</sup>O、<sup>17</sup>O、<sup>34</sup>S、<sup>15</sup>N、<sup>13</sup>C、<sup>2</sup>Hまたはそれらの組み合わせから選択される1つまたはそれ以上の重安定同位体を含む、同位体標識された内部標準ペプチドである。

10

#### 【0034】

本明細書で記述した生物学的試料中の c M E T タンパク質（またはそのサロゲートとしての断片ペプチド）のレベルを測定するための方法は、患者または被験体中のがんの診断指標として使用してよい。1つの実施形態において、c M E T タンパク質のレベルの測定からの結果を、組織中でみられる c M E T 受容体のレベルを正常および/またはがん性または前がん性組織にてみられるタンパク質のレベルと、関連させること（例えば比較すること）によって、がんの診断ステージ/グレード/状態を測定するために使用してよい。

20

#### 【0035】

核酸とタンパク質と両方が、同一の L i q u i d T i s s u e 生体分子調製物から解析可能であるので、同一の試料から疾患診断および薬物処理決断に関する追加情報を産出することが可能である。例えば、c M e t タンパク質は、特定の細胞シグナルタンパク質経路の活性化によって、制御されていない細胞増殖（がん）を刺激することが可能な、チロシンキナーゼ受容体である。c M e t が、増加レベルまで特定の細胞によって発現される場合、S R M によってアッセイした時に、細胞の状態およびそれらの制御されていない増殖に対する潜在力に関する情報が供給され、がんの発展がえられうる。

#### 【0036】

I G F - 1 R および E G F R のような他の受容体チロシンキナーゼもまた、細胞内で c M e t と同一の役割を果たすことができる。これらの3つのタンパク質それぞれが、関連した細胞シグナル経路を通して、制御されていない細胞増殖に対してシグナルを発し、それぞれが、これらのタンパク質の1つに対する標的化治療を受領している細胞に、薬物体制を提供可能である。したがって、チロシンキナーゼ活性を導く過剰発現または変異が細胞内で上昇するかを測定するため、これらのタンパク質の任意の組み合わせ、または3つすべてに対して解析することが有益である。

30

#### 【0037】

1つの実施形態において、任意の2つまたはそれ以上の c M e t、I F G - 1 R および/または E G F R の S R M / M R M アッセイは、これらのタンパク質の1つ、2つまたは3つ全てが活性化されるかどうか、および薬物体制を与えようかどうかを測定するために、1つまたはそれ以上のアッセイと組み合わせて実施される。そのようなアッセイには、増加したチロシンキナーゼ活性に関連した変異が、S R M / M R M 解析のために使用したペプチド溶解物を産出するために使用した細胞内で存在するかを測定する為の、これらのタンパク質をコードしている核酸（例えば D N A、R N A または c D N A）の配列を査定することが含まれる。例えば、1つの実施形態において、E G F R タンパク質の活性化視野の核酸変異状態が、抗 E G F R 治療薬剤での処置決断に対して重要である。したがって、同一の L i q u i d T i s s u e 調製物中のタンパク質状態および変異状態両方の核酸およびタンパク質解析を提供することによって、より多くの情報が、処置戦略についての決断のため、そして同一の試料から有利に得ることが可能である。もう一つの実施形態において、同一の溶解物からの核酸を用いる、変異解析 I G F - 1 R および/または E G

40

50

F Rを実施する一方で、c M e tのS R M / M R Mアッセイを実施可能である。

【 0 0 3 8 】

方法および組成物の上記記述および例示的实施形態は、本明細書の範囲の例示である。当業者に対して明らかであろう変化のため、本明細書は、以上で記述したある実施形態に制限される意図はない。

【 配列表 】

2014507640000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 11/67439
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - G01N 30/72; G01N 33/483; A61K 38/18 (2012.01) USPC - 436/173, 436/63, 530/399 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - G01N 30/72; G01N 33/483; A61K 38/18 (2012.01) USPC - 436/173, 436/63, 530/399 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 530/350, 930/10, 120 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST(USPT, PGPB, EPAB, JPAB); Google Scholar; Thomson Innovation; Search terms: hepatocyte growth factor receptor, cMET, c-Met, mass spectrometry, MS, mass spec, standard, control, isotope, isotopically labeled, Liquid Tissue, protease, trypsin, gel electrophoresis, liquid chromatography, capillary electrophoresis, nanoreversed phase liquid chro		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2008/0159992 A1 (ROTMAN et al.) 3 July 2008 (03.07.2008) abstract; para [0026], [0056], [0059]; SEQ ID NOs: 37, 40, 66	30-32 9/(1-8), 17-20, 28, 29, 33, 34
Y	WO 2010/053717 A1 (AKERVALL) 14 May 2010 (14.05.2010) para [0010], [0014], [0021]-[0024], [0045], [0057]	1-8, 9/(1-8), 10-29, 33-34
Y	EP 2186879 A2 (Leigh) 19 May 2010 (19.05.2010) para [0011], [0019] [0028], [0038], [0043], [0051], [0059]-[0060], [0101], [0109]	1-8, 9/(1-8), 10-29, 33-34
Y	PRIETO et al., Liquid Tissue: proteomic profiling of formalin-fixed tissues. Biotechniques. June 2005, Suppl, pages 32-35. Especially abstract; p 32, left col, para 2	4, 9/(4), 11, 12, 27
Y, P	WO 2011/116028 A1 (ANDERSON) 22 September 2011 (22.09.2011) Entire document	1-34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 30 March 2012 (30.03.2012)		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">24 APR 2012</div>
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

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
<b>G 0 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	G 0 1 N 33/50	F	
C 0 7 K 14/705	(2006.01)	C 0 7 K 14/705		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, 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, R O, RS, 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, H U, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(72)発明者 デイビッド、ピー・クリッツマン

アメリカ合衆国メリーランド州、ガイザースバーグ、ウェルシュ、ロード、2 4 3 0 5

(72)発明者 トッド、ヘンブロー

アメリカ合衆国メリーランド州、ガイザースバーグ、ニューベリー、ロード、2 4 3 3 6

(72)発明者 シーノ、ティパランビル

アメリカ合衆国メリーランド州、フレデリック、シングルトン、テラス、3 7 3 0

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA04 EA03 EA12 FA12 GA03 GA06 GA09 HA01 HA02

JA02

2G045 AA26 CB02 DA36 FA36 FB03

4C084 AA17 NA05 ZB261

4H045 AA30 BA15 BA16 BA17 BA18 CA40 DA50 EA50 FA70

专利名称(译)	cMET蛋白SRM / MRM测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2014507640A</a>	公开(公告)日	2014-03-27
申请号	JP2013547627	申请日	2011-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	爱科谱迅病理研究公司		
申请(专利权)人(译)	表达, 病理学, 公司		
[标]发明人	デイビッドビークリッツマン トッドヘンブロー シーノティパランビル		
发明人	デイビッド、ビー.クリッツマン トッド、ヘンブロー シーノ、ティパランビル		
IPC分类号	G01N27/62 A61K45/00 A61P35/00 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/50 C07K14/705		
CPC分类号	G01N33/4833 G01N33/6848 G01N33/74 G01N2030/8831 G01N2333/71 G01N2800/52 G01N2800/56 G01N33/68 G01N33/6872 G01N2333/82 G01N2560/00		
FI分类号	G01N27/62.ZNA.V A61K45/00 A61P35/00 G01N33/68 G01N33/53.D G01N33/50.F C07K14/705		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA04 2G041/EA03 2G041/EA12 2G041/FA12 2G041/GA03 2G041/GA06 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/HA02 2G041/JA02 2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA36 2G045/FB03 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZB261 4H045/AA30 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA50 4H045/FA70		
代理人(译)	中村KoTakashi		
优先权	61/427396 2010-12-27 US		
其他公开文献	JP6047502B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

提供了来自肝细胞生长因子受体 ( cMET ) 蛋白的某些肽, 以及这些肽的诱导电离特性。该肽可用于通过基于质谱的选择反应监测 ( SRM ) 质谱法直接在福尔马林中固定的生物样品中定量直接cMET蛋白, 它也被称为多反应监测 ( MRM ) 质谱。这样的生物样品被化学保存和固定, 其中生物样品是福尔马林固定的组织/细胞, 福尔马林固定/石蜡包埋 ( FFPE ) 组织/细胞, FFPE组织块和这些来自阻断和福尔马林固定, 石蜡包埋的组织培养细胞的细胞, 以及用含福尔马林的试剂/固定剂处理的组织和细胞。

ペプチド	ペプチド配列
配列番号 1	SNSEIICCTTPSLQQLNLQLPLKTK
配列番号 2	ETKDGFMFLTDQSYIDVLPFR
配列番号 3	GHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVK
配列番号 4	TKAFFMLDGLSKYFDLIYVHNPVFK
配列番号 5	MKAPAVLAPGILVLLFTLVQR
配列番号 6	EVFNILQAAYVSKPGAQLAR
配列番号 7	GDLTIANLGTSEGR
配列番号 8	QIKDLGSELVR
配列番号 9	FINFFVGNTINSSYFPDHPHLSISVR
配列番号 10	ITDIGEVSQLTEGIIMK
配列番号 11	AFFMLDGLSK
配列番号 12	NLNSVSVPR
配列番号 13	TEFTTALQR