

(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2014-534949

(P2014-534949A)

(43) 公表日 平成26年12月25日(2014.12.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06 Z N A	2 G O 4 5
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/574 D	4 B O 6 3
G O 1 N 37/00 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 C O 8 4
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y	4 C O 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 110 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-530956 (P2014-530956)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月19日 (2012. 9. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年5月19日 (2014. 5. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/056106
 (87) 国際公開番号 W02013/043715
 (87) 国際公開日 平成25年3月28日 (2013. 3. 28)
 (31) 優先権主張番号 61/536, 436
 (32) 優先日 平成23年9月19日 (2011. 9. 19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/551, 328
 (32) 優先日 平成23年10月25日 (2011. 10. 25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/598, 783
 (32) 優先日 平成24年2月14日 (2012. 2. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 ウィルソン, ティモシー アール.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, デ
 ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー
 ジェネンテック, インコーポレイテッ
 ド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C-METアンタゴニストおよびB-R A Fアンタゴニストを含む組合せ処置

(57) 【要約】

本発明は一般的に分子生物学および増殖因子制御の分野に関する。より具体的には、本発明は、癌などの病理学的状態の治療のための療法に関する。

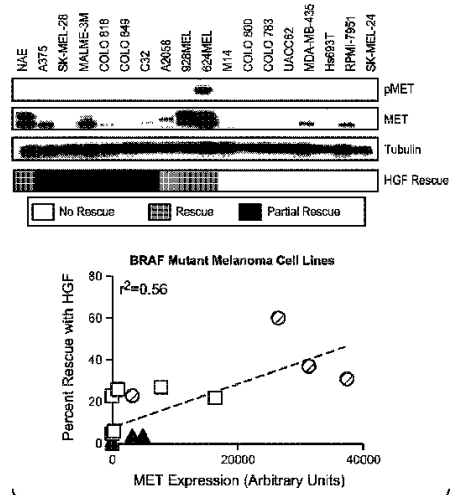


FIG. 4A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与することを
含む、癌を有する患者を処置するための方法。

【請求項 2】

有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与することを
含む、B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じる可能性が増加した癌患者を処置す
るための方法。

【請求項 3】

癌患者に、有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与
することを含む、B - r a f アンタゴニストに対する感受性を増加および / または回復さ
せるための方法。

10

【請求項 4】

癌患者に、有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与
することを含む、B - r a f アンタゴニスト感受性の期間を延長するための方法。

【請求項 5】

有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与すること
を含む、B - r a f アンタゴニスト耐性癌を有する患者を処置するための方法。

【請求項 6】

有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与すること
を含む、B - r a f アンタゴニストに対する応答の持続期間を延長するための方法。

20

【請求項 7】

有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与すること
を含む、患者における H G F 媒介性 B - r a f アンタゴニスト耐性癌の発生を遅延させるか
、または防止するための方法。

【請求項 8】

患者の癌が、B - r a f バイオマーカを発現することが示されている、請求項 1 ない
し 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

B - r a f バイオマーカが B - r a f V 6 0 0 である、請求項 8 に記載の方法。

30

【請求項 10】

B - r a f バイオマーカが B - r a f V 6 0 0 E である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

患者の癌における B - r a f 突然変異体バイオマーカ発現が、(a) 試料に対して遺
伝子発現プロファイリング、P C R ハイブリダイゼーションアッセイ、i n s i t u ハ
イブリダイゼーション、5 'ヌクレアーゼアッセイ、突然変異検出アッセイ、R N A - s
e q、マイクロアレイ分析、S A G E、M a s s A R R A Y 技術、または F I S H のうち
の 1 つまたは複数を実施すること、および (b) 試料中の B - r a f 突然変異体バイオマ
ーカの発現を決定することを含む方法を用いて決定される、請求項 8 ないし 1 0 のい
ずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 12】

患者の癌における B - r a f 突然変異体バイオマーカ発現が、(a) 患者癌試料から
抽出されたゲノム D N A に対して P C R を実施すること、および (b) 試料中の B - r a
f 突然変異体バイオマーカの発現を決定することを含む方法を用いて決定される、請
求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 13】

患者の癌が、c - m e t バイオマーカを発現することが示されている、請求項 1 ない
し 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

c - m e t バイオマーカがポリペプチドである、請求項 1 3 に記載の方法。

50

【請求項 15】

c - m e t バイオマーカー発現が免疫組織化学 (I H C) を用いて決定される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

c - m e t バイオマーカー発現が肝細胞増殖因子 (H G F) の発現を決定することにより決定される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

H G F が腫瘍または腫瘍間質中で発現される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

H G F 発現が患者の血清中で決定される、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 19】

c - m e t アンタゴニストがアンタゴニスト抗 c - m e t 抗体である、請求項 1 ないし 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

c - m e t アンタゴニストが、オナルツズマブ、クリゾチニブ、チバチニブ、カルボザンチニブ、M G C D - 265、フィクラツズマブ、ヒト化 T A K - 701、リロツムマブ、フォレチニブ、h 224 G 11、D N - 30、M K - 2461、E 7050、M K - 8033、P F - 4217903、A M G 208、J N J - 38877605、E M D 1204831、I N C - 280、L Y - 2801653、S G X - 126、R P 1040、L Y 2801653、B A Y - 853474 および / または L A 480 のうちの 1 つまたは複数である、請求項 1 ないし 19 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 21】

B - r a f アンタゴニストが、ソラフェニブ、P L X 4720、P L X - 3603、G S K 2118436、G D C - 0879、N - (3 - (5 - (4 - クロロフェニル) - 1 H - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 3 - カルボニル) - 2 , 4 - ジフルオロフェニル) プロパン - 1 - スルホンアミド、ベムラフェニブ、G S K 2118436、R A F 265 (N o v a r t i s)、X L 281、A R Q 736、B A Y 73 - 4506 のうちの 1 つまたは複数である、請求項 1 ないし 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

B - r a f アンタゴニストがベムラフェニブである、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 23】

B - r a f アンタゴニストが G S K 2118436 である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 24】

B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストが同時に投与される、請求項 1 ないし 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストが連続的に投与される、請求項 1 ないし 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

B - r a f アンタゴニストが c - m e t アンタゴニストの前に投与される、請求項 25 に記載の方法。

40

【請求項 27】

c - m e t アンタゴニストが B - r a f アンタゴニストの前に投与される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

少なくとも 1 つのさらなる処置を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 1 ないし 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

癌がメラノーマ、結腸直腸癌、卵巣癌、乳癌または甲状腺乳頭癌である、請求項 1 ないし 28 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 30】

癌が、B - r a f V 6 0 0 を発現することが示されたメラノーマである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

癌が B - r a f アンタゴニストに耐性である、請求項 1 ないし 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

患者が B - r a f アンタゴニストで以前に処置されていない、請求項 1 ないし 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

c - m e t バイオマーカー発現を決定するための方法であって、患者の癌が c - m e t バイオマーカーを発現するかどうかを決定するためのステップを含み、c - m e t バイオマーカー発現が、患者が、B - r a f アンタゴニストに対する患者の癌の感受性を増加させるため、B - r a f アンタゴニストに対する患者の癌の感受性を回復させるため、B - r a f アンタゴニストに対する患者の癌の感受性の期間を延長するため、および/または患者の癌における H G F 媒介性 B - r a f アンタゴニスト耐性の発生を防止するための、c - m e t アンタゴニストおよび B - r a f アンタゴニストを用いる処置の候補であることを示す、方法。

【請求項 34】

B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを用いる処置の候補として患者を同定するための方法であって、(a) 患者の癌が c - m e t バイオマーカーを発現すると決定すること；ならびに (b) B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを用いる処置の候補として患者を同定することを含む方法。

【請求項 35】

B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じる危険性があるとして患者を同定するための方法であって、(a) 患者の癌が c - m e t バイオマーカーを発現すると決定すること；および (b) B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じる危険性があるとして患者を同定することを含む方法。

【請求項 36】

ステップ (a) および (b) の後に、患者が有効量の c - m e t アンタゴニストおよび B - r a f アンタゴニストで処置される、請求項 34 または 35 に記載の方法。

【請求項 37】

患者における癌を処置するための B - r a f アンタゴニストの治療効果を決定する方法であって、前記患者から得られた試料中の c - m e t バイオマーカーおよび/または B - r a f バイオマーカーの存在を免疫アッセイ、E L I S A、ハイブリダイゼーションアッセイ、P C R、5'ヌクレアーゼアッセイ、I H C、および/または R T - P C R によって決定することと、B - r a f アンタゴニストを用いる処置のために患者を選択することを含む方法。

【請求項 38】

c - m e t アンタゴニストを用いる処置のために患者を選択することをさらに含む、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを用いて患者を処置することをさらに含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

メラノーマ患者の予後を決定する方法であって、患者に由来する試料中の c - m e t バイオマーカーの発現を決定することを含み、c - m e t バイオマーカーが H G F であり、H G F の発現が対象における癌の予後である、方法。

【請求項 41】

c - m e t アンタゴニストおよび B - r a f アンタゴニストを含むキット。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2】

有効量の c - m e t アントゴニストおよび B - r a f アントゴニストを患者に投与することを含む、メラノーマ患者を処置するための方法のための指示書をさらに含む、請求項 4 1 に記載のキット。

【請求項 4 3】

一緒に包装された、薬学的に許容される担体中の c - m e t アントゴニストと、c - m e t アントゴニストが B - r a f バイオマーカの発現に基づいてメラノーマを有する患者を処置するためのものであり、処置が B - r a f アントゴニストと組み合わせられることを示す添付文書とを含む製品。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

関連出願との相互参照

本出願は、2011年9月19日に出願された米国特許出願第61/536,436号、2011年10月25日に出願された米国特許出願第61/551,328号、2012年2月14日に出願された米国特許出願第61/598,783号および2012年5月1日に出願された米国特許出願第61/641,139号の優先権を主張し、これらはその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、E F S - W e b により A S C I I 形式で提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組込まれる。2012年8月28日に作成された前記 A S C I I コピーは、P 4 7 3 6 1 W O . t x t と命名され、16,669 バイトのサイズである。

【0003】

本発明は、分子生物学および増殖因子制御の分野に一般的に関する。より具体的には、本発明は、癌などの病理学的状態の処置のための療法に関する。

【背景技術】**【0004】**

癌は、依然としてヒトの健康に対して最も命取りとなる脅威の1つである。米国では、毎年約130万人の新しい患者が癌に罹り、癌は心疾患に次いで死因の第2位であり、4人の死亡のうちのおよそ1人を占める。例えば、乳癌は、2番目に最も一般的な形態の癌であり、米国人女性の間で癌による死亡の第2位である。また、癌は5年以内に死因の第1位として心血管疾患を上回るかもしれないと予測されている。固形腫瘍がこれらの死亡の多くを占める。特定の癌の医学的処置においては有意な進歩があったが、あらゆる癌の5年生存率は、過去20年で約10%しか改善していない。癌、または悪性腫瘍は転移し、制御されない様式で急速に増殖し、適時検出および処置を極端に困難にしている。

【0005】

癌の処置における有意な進歩にも拘らず、改善された療法が依然として求められている。

【0006】

特許出願および刊行物を含む、本明細書で引用される全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書に組込まれる。

【発明の概要】**【0007】**

癌患者を効率的に処置するための c - m e t アントゴニストの使用が提供される。本出願はまた、場合により、B - r a f アントゴニストと組み合わせた c - m e t アントゴニストを用いた疾患の処置における使用のための疾患を診断するためのより良好な方法も提供する。特に、B - r a f アントゴニストであるベムラフェニブ (P L X - 4 0 3 2) および c - m e t アントゴニストを用いる組合せ処置が、ベムラフェニブ単独での処置と比較して、著しく改善された部分的応答を含む、腫瘍転帰の統計的に有意な改善をもたらす

10

20

30

40

50

たことを示す結果が記載される。c - m e t 発現は、ベムラフェニブ処置に対する感受性と逆相関していた。さらに、より高レベルの循環肝細胞増殖因子 (H G F) を有する B - r a f 突然変異メラノーマを有する患者は、B - r a f アンタゴニストで処置されたより低レベルの循環 H G F レベルを有する患者と比較して、B - r a f アンタゴニストで処置された場合に実質的に低下した無進行生存および全生存を示した。

【 0 0 0 8 】

本発明は、c - m e t アンタゴニストを B - r a f アンタゴニストと組み合わせることによって、顕著な抗腫瘍活性をもたらす、癌などの病理学的状態を処置するための組合せ療法を提供する。

【 0 0 0 9 】

一態様において、有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニスト (組合せ) を投与することを含む、B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じる可能性が増加した癌患者を処置するための方法が提供される。

10

【 0 0 1 0 】

一態様において、癌患者に、有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与することを含む、B - r a f アンタゴニストに対する感受性を増加および / または回復させるための方法が提供される。

【 0 0 1 1 】

一態様において、癌患者に、有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与することを含む、B - r a f アンタゴニスト感受性の期間を延長するための方法が提供される。

20

【 0 0 1 2 】

一態様において、有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与することを含む、B - r a f 耐性 (B - r a f アンタゴニスト耐性) 癌を有する患者を処置するための方法が提供される。

【 0 0 1 3 】

一態様において、有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与することを含む、B - r a f アンタゴニストに対する応答の持続期間を延長するための方法が提供される。

【 0 0 1 4 】

一態様において、有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与することを含む、H G F 媒介性 B - r a f 耐性癌の発症を遅延させるか、または防止するための方法が提供される。

30

【 0 0 1 5 】

一態様において、c - m e t バイオマーカー発現を決定するための方法であって、患者の癌が c - m e t バイオマーカーを発現するかどうかを決定するためのステップを含み、c - m e t バイオマーカー発現が、患者が B - r a f アンタゴニスト耐性癌を有する可能性があることを示す、方法が提供される。いくつかの実施形態においては、患者の癌は、B - r a f バイオマーカーを発現することが示されている。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカー発現はタンパク質発現であり、I H C を用いて患者に由来する試料中で決定される。いくつかの実施形態においては、多量の c - m e t バイオマーカー (例えば、c - m e t I H C、または例えば、E L I S A もしくは I H C を用いる H G F の検出を用いて決定される) は、患者が B - r a f アンタゴニスト耐性癌を有する可能性が高いことを示す。本明細書で用いられる「上昇した」または「高い」c - m e t は、処置に対する患者の応答性と関連する c - m e t の量を指す。いくつかの実施形態においては、少量の c - m e t バイオマーカー (例えば、c - m e t I H C、または例えば、E L I S A もしくは I H C を用いる H G F の検出を用いて決定される) は、患者が B - r a f アンタゴニスト耐性癌を有する可能性が低いことを示す。いくつかの実施形態においては、高い c - m e t は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレット A 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5 および H E K - 2 9 3 の c - m e t 染色強度と比較して決定された低

40

50

い、中程度の、または高い c - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、高い c - m e t は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレット A 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5 および H E K - 2 9 3 の c - m e t 染色強度と比較して決定された中程度の、または高い c - m e t 発現である。本明細書で用いられる場合、「少」量の c - m e t は、処置に対する応答の欠如と関連する c - m e t の量を指すか、またはいくつかの実施形態においては、処置に対する応答の悪化（例えば、処置なしの場合と比較して臨床利益が低下する）と関連する c - m e t の量を指す。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e t は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレット A 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5 および H E K - 2 9 3 の c - m e t 染色強度と比較して決定された低いか、または全くない c - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e t 発現は、例

10

【 0 0 1 6 】

一態様において、c - m e t バイオマーカー発現を決定するための方法であって、患者の癌が c - m e t バイオマーカーを発現するかどうかを決定するステップを含み、c - m e t バイオマーカー発現が、患者が B - r a f 耐性癌を発症する可能性が高いことを示す、方法が提供される。いくつかの実施形態においては、患者の癌は、B - r a f バイオマーカーを発現することが示されている。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカー発現はタンパク質発現であり、I H C を用いて患者に由来する試料中で決定される。いくつかの実施形態においては、患者は B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t

アンタゴニストで処置される。いくつかの実施形態においては、多量の c - m e t バイオマーカー（例えば、c - m e t I H C、または例えば、E L I S A もしくは I H C を用いる H G F の検出を用いて決定される）は、患者が B - r a f アンタゴニスト耐性癌を有する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態においては、高い c - m e t は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレット A 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5 および H E K - 2 9 3 の c - m e t 染色強度と比較して決定された低い、中程度の、または高い c - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、高い c - m e t は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレット A 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5 および H E K - 2 9 3 の c - m e t 染色強度と比較して決定された中程度の、または高い c - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e t は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレット A 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5 および H E K - 2 9 3 の c - m e t 染色強度と比較して決定された低いか、または全くない c - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e t 発現は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレット A 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5 および H E K - 2 9 3 の c - m e t 染色強度と比較して決定された全くない c - m e t 発現である。

20

30

【 0 0 1 7 】

一態様において、c - m e t バイオマーカー発現を決定するための方法であって、患者の癌が c - m e t バイオマーカーを発現するかどうかを決定するステップを含み、c - m e t バイオマーカー発現が、患者が、B - r a f アンタゴニストに対する患者の癌の感受性を増加させるため、B - r a f アンタゴニストに対する患者の癌の感受性を回復させるため、B - r a f アンタゴニストに対する患者の癌の感受性の期間を延長するため、および/または患者の癌における H G F 媒介性 B - r a f アンタゴニスト耐性の発生を防止するための、c - m e t アンタゴニストおよび B - r a f アンタゴニストを用いる処置の候補であることを示す、方法が提供される。いくつかの実施形態においては、患者の癌は、B - r a f バイオマーカーを発現することが示されている。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカー発現はタンパク質発現であり、I H C を用いて患者に由来する試料中で決定される。いくつかの実施形態においては、患者は B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストで処置される。いくつかの実施形態においては、多量の c - m e t バイオマーカー（例えば、c - m e t I H C、または例えば、E L I S A もしくは I H C を用いる H G F の検出を用いて決定される）は、患者が B - r a f アン

40

50

タゴニスト耐性癌を有する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態においては、高いc - m e tは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびH E K - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された低い、中程度の、または高いc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、高いc - m e tは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびH E K - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された中程度の、または高いc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e tは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびH E K - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された低いか、または全くないc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e t発現は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびH E K - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された全くないc - m e t発現である。

10

【0018】

一態様において、B - r a fバイオマーカーを発現することが示された癌を有する患者のための療法を選択するための方法であって、患者に由来する試料中のc - m e tバイオマーカーの発現を決定すること、およびバイオマーカーの発現レベルに基づいて癌薬剤を選択することを含む方法が提供される。いくつかの実施形態においては、癌試料がc - m e tバイオマーカーを発現する場合にB - r a fアンタゴニストと組み合わせたc - m e tアンタゴニストを用いる処置のために患者が選択される。いくつかの実施形態においては、患者は、治療上有効量のc - m e tアンタゴニストおよびB - r a fアンタゴニストを用いて癌について処置される。いくつかの実施形態においては、癌試料が実質的に検出不可能なレベルのc - m e tバイオマーカーを発現する場合にc - m e tアンタゴニスト以外の癌薬剤を用いる処置のために患者が選択される。いくつかの実施形態においては、多量のc - m e tバイオマーカー（例えば、c - m e t I H C、または例えば、E L I S AもしくはI H Cを用いるH G Fの検出を用いて決定される）は、患者がB - r a fアンタゴニスト耐性癌を有する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態においては、高いc - m e tは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびH E K - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された低い、中程度の、または高いc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、高いc - m e tは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびH E K - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された中程度の、または高いc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e tは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびH E K - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された低いか、または全くないc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e t発現は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびH E K - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された全くないc - m e t発現である。

20

30

【0019】

一態様において、患者の癌がc - m e tバイオマーカーを発現すると決定することを含む、B - r a fアンタゴニストおよびc - m e tアンタゴニストを用いる処置の候補として患者を同定するための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、多量のc - m e tバイオマーカー（例えば、c - m e t I H C、または例えば、E L I S AもしくはI H Cを用いるH G Fの検出を用いて決定される）は、患者がB - r a fアンタゴニスト耐性癌を有する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態においては、高いc - m e tは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびH E K - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された低い、中程度の、または高いc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、高いc - m e tは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびH E K - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された中程度の、または高いc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e tは、例えば、本明細書に記載

40

50

の対照細胞ペレット A 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5 および H E K - 2 9 3 の c - m e t 染色強度と比較して決定された低いか、または全くない c - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e t 発現は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレット A 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5 および H E K - 2 9 3 の c - m e t 染色強度と比較して決定された全くない c - m e t 発現である。

【 0 0 2 0 】

一態様において、患者の癌が c - m e t バイオマーカを発現すると決定することを含む、B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じる危険性を有する患者を同定するための方法が提供される。

【 0 0 2 1 】

一態様において、患者における癌を処置するための B - r a f アンタゴニストの治療効果を決定する方法であって、前記患者から得られた試料中の c - m e t バイオマーカおよび/または B - r a f バイオマーカの存在を免疫アッセイ、E L I S A、ハイブリダイゼーションアッセイ、P C R、5'ヌクレアーゼアッセイ、I H C、および/または R T - P C R によって決定することを含み、c - m e t バイオマーカの存在が、B - r a f アンタゴニストが前記対象における癌を処置するのに治療上有効であることを示す、方法が提供される。いくつかの実施形態においては、患者の癌は、B - r a f バイオマーカを発現することが示されている。いくつかの実施形態においては、B - r a f バイオマーカは、B - r a f 突然変異体である。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体は、構成的に活性化された B - r a f である。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体は、B - r a f V 6 0 0 である。いくつかの実施形態においては、B - r a f V 6 0 0 は、B - r a f V 6 0 0 E である。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体は、B - r a f V 6 0 0 K (G T G > A A G)、V 6 0 0 R (G T G > A G G)、V 6 0 0 E (G T G > G A A) および/または V 6 0 0 D (G T G > G A T) のうちの1つまたは複数である。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体バイオマーカ発現は、(a) 試料 (患者癌試料など) に対して遺伝子発現プロファイリング、P C R (r t P C R もしくは対立遺伝子特異的 P C R など)、R N A - s e q、マイクロアレイ分析、S A G E、M a s s A R R A Y 技術、または F I S H のうちの1つまたは複数を実施すること；および (b) 試料中の B - r a f 突然変異体バイオマーカの発現を決定することを含む方法を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体バイオマーカ発現は、(a) 患者癌試料 (F F P E 固定された患者癌試料など) から抽出された核酸に対して P C R を実施すること；および (b) 試料中の B - r a f 突然変異体バイオマーカの発現を決定することを含む方法を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、患者の癌は、c - m e t バイオマーカを発現することが示されている。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカ発現は、免疫組織化学 (I H C) を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、c - m e t 発現は、対照細胞ペレットの c - m e t 染色強度と比較して決定され、高い c - m e t 発現は、細胞系 H E K - 2 9 3、A 5 4 9 および細胞系 H 4 4 1 と比較して決定された低い、中程度の、および強い c - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、c - m e t 発現は、対照細胞ペレットの c - m e t 染色強度と比較して決定され、高い c - m e t 発現は、細胞系 A 5 4 9 および細胞系 H 4 4 1 と比較して決定された中程度の、および強い c - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、c - m e t 発現は、低い c - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、c - m e t 発現は、対照細胞ペレットの c - m e t 染色強度と比較して決定され、低い c - m e t 発現は、細胞系 H 1 1 5 5 および細胞系 H E K - 2 9 3 と比較して決定された全くないか、または低い c - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、c - m e t 発現は、対照細胞ペレットの c - m e t 染色強度と比較して決定され、低い c - m e t 発現は、細胞系 H 1 1 5 5 と比較して決定された全くない c - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカ発現は核酸発現であり、P C R、R N A - s e q、マイクロアレイ分析、S A G E、M a s s A R R A Y 技術、または F I S H を用いて患者

10

20

30

40

50

に由来する試料中で決定される。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカ-発現は、ホスホ - E L I S A を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカ-発現は、ホスホ - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカ-発現は、肝細胞増殖因子 (H G F) の発現を決定することにより (例えば、E L I S A を用いる) 決定される。いくつかの実施形態においては、H G F 発現は自己分泌である。いくつかの実施形態においては、H G F は腫瘍または腫瘍間質中で発現される (例えば、I H C を用いて決定される)。いくつかの実施形態においては、発現は、患者の血清中で決定される (例えば、E L I S A を用いて決定される)。いくつかの実施形態においては、癌はメラノーマ、結腸直腸癌、乳癌、卵巣癌、または甲状腺癌である。いくつかの実施形態においては、癌はメラノーマである。いくつかの実施形態においては、癌は甲状腺乳頭癌である。

10

【 0 0 2 2 】

一態様において、本発明は、メラノーマ患者の予後を決定するための方法であって、患者に由来する試料中の c - m e t バイオマーカ-の発現を決定することを含み、c - m e t バイオマーカ-が H G F であり、H G F の発現が対象における癌の予後である、方法を提供する。いくつかの実施形態においては、H G F 発現の増加は、例えば、患者が B - r a f 阻害剤 (例えば、ベムラフェニブ) で処置された場合の無進行生存の低下および / または全生存の低下の予後である。いくつかの実施形態においては、H G F 発現は、例えば、E L I S A を用いて患者血清中で決定される。いくつかの実施形態においては、患者血清中での H G F 発現は、中央 H G F 発現レベル (集団における中央 H G F 発現レベルなど) よりも上である。いくつかの実施形態においては、患者血清中での H G F 発現は、例えば、約 3 3 0 n g / m l よりも上である。いくつかの実施形態においては、患者血清中での H G F 発現は、約 3 0 0 n g / m l、3 1 0 n g / m l、3 2 0 n g / m l、3 3 0 n g / m l、3 4 0 n g / m l、3 5 0 n g / m l、3 6 0 n g / m l、3 7 0 n g / m l、3 8 0 n g / m l、3 9 0 n g / m l、4 0 0 n g / m l、4 2 0 n g / m l、4 4 0 n g / m l、4 6 0 n g / m l、4 8 0 n g / m l、5 0 0 n g / m l 以上より上である。いくつかの実施形態においては、有効量の c - m e t アンタゴニストおよび B - r a f アンタゴニストを用いる処置のために患者が選択される。いくつかの実施形態においては、患者は有効量の c - m e t アンタゴニストおよび B - r a f アンタゴニストを用いて処置される。いくつかの実施形態においては、メラノーマは、B - r a f V 6 0 0 を発現する (発現することが示されている)。

20

30

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態においては、患者の癌は、B - r a f バイオマーカ-を発現することが示されている。B - r a f バイオマーカ-は、B - r a f 突然変異体であってもよい。B - r a f 突然変異体は、構成的に活性化された B - r a f である。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体は、B - r a f V 6 0 0 である。B - r a f V 6 0 0 は、B - r a f V 6 0 0 E であってもよい。B - r a f 突然変異体の非限定的例の一覧は、B - r a f V 6 0 0 K (G T G > A A G)、V 6 0 0 R (G T G > A G G)、V 6 0 0 E (G T G > G A A) および / または V 6 0 0 D (G T G > G A T) である。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体ポリペプチドが検出される。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体核酸が検出される。「V 6 0 0 E」とは、B - r a f のアミノ酸 6 0 0 位でのグルタミンのバリンへの置換をもたらすヌクレオチド 1 7 9 9 位での B R A F 中の突然変異 (T > A) を指す。「V 6 0 0 E」は、以前の番号付け系 (K u m a r ら、C l i n . C a n c e r R e s . 9 : 3 3 6 2 ~ 3 3 6 8 頁、2 0 0 3) の下では「V 5 9 9 E」(1 7 9 6 T > A) としても知られる。

40

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体バイオマーカ-発現は、(a) 試料 (患者癌試料など) に対して遺伝子発現プロファイリング、P C R (r t P C R もしくは対立遺伝子特異的 P C R)、R N A - s e q、5 'ヌクレアーゼアッセイ (例えば、T a q M a n)、マイクロアレイ分析、S A G E、M a s s A R R A Y 技術、または F I

50

SHのうちの一つまたは複数を実施すること；および（b）試料中のB - r a f突然変異体バイオマーカの発現を決定することを含む方法を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、B - r a f突然変異体バイオマーカ発現は、（a）患者癌試料（FFPE固定された患者癌試料など）から抽出された核酸に対してRT - PCRを実施すること；および（b）試料中のB - r a f突然変異体バイオマーカの発現を決定することを含む方法を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、B - r a f突然変異体バイオマーカ発現は、（a）患者癌試料（FFPE固定された患者癌試料など）から抽出された核酸に対してPCRを実施すること；および（b）試料中のB - r a f突然変異体バイオマーカの発現を決定することを含む方法を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、B - r a f突然変異体バイオマーカ発現は、（a）第1のオリゴヌクレオチドが標的配列の一つまたは複数の変異体と少なくとも部分的に相補的であり、第2のオリゴヌクレオチドが標的配列の一つまたは複数の変異体と少なくとも部分的に相補的であり、標的配列の一つの変異体とのみ相補的な少なくとも一つの内部選択的ヌクレオチドを有する、前記第1および第2のオリゴヌクレオチドを、B - r a f標的配列の少なくとも一つの変異体にハイブリダイズさせること；（b）核酸ポリメラーゼが、選択的ヌクレオチドが標的と塩基対を形成する場合には優先的に前記第2のオリゴヌクレオチドを伸長させることができるが、選択的ヌクレオチドが標的と塩基対を形成しない場合には実質的にあまり伸長させることができない前記ポリメラーゼを用いて第2のオリゴヌクレオチドを伸長させること；ならびに（c）伸長が、オリゴヌクレオチドが相補的選択的ヌクレオチドを有する標的配列の変異体の存在を示す、前記オリゴヌクレオチド伸長の産物を検出することを含む方法を用いて検出される。いくつかの実施形態においては、B - r a f標的配列の一つまたは複数の変異体は、野生型B - r a fおよびV 6 0 0 E B - r a fである。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態においては、患者の癌は、c - m e tバイオマーカを発現することが示されている。c - m e tバイオマーカは、c - m e tポリペプチドであってもよい。いくつかの実施形態においては、c - m e tバイオマーカ発現は、免疫組織化学（IHC）を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、多量のc - m e tバイオマーカ（例えば、c - m e t IHC、または例えば、ELISAもしくはIHCを用いるHGFの検出を用いて決定される）は、患者がB - r a fアンタゴニスト耐性癌を有する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態においては、高いc - m e tは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびHEK - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された低い、中程度の、または高いc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、高いc - m e tは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびHEK - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された中程度の、または高いc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e tは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびHEK - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された低いか、または全くないc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e t発現は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびHEK - 2 9 3のc - m e t染色強度と比較して決定された全くないc - m e t発現である。いくつかの実施形態においては、IHCスコアは2である。いくつかの実施形態においては、IHCスコアは3である。いくつかの実施形態においては、IHCスコアは1である。いくつかの実施形態においては、IHCスコアは0である。いくつかの実施形態においては、高いc - m e tバイオマーカ発現は、50%以上の腫瘍細胞が中程度のc - m e t染色強度、組み合わせた中程度の/高いc - m e t染色強度または高いc - m e t染色強度を有する。いくつかの実施形態においては、c - m e tバイオマーカ発現は、ホスホ - ELISAを用いて決定される。いくつかの実施形態においては、c - m e tバイオマーカ発現はホスホ - m e t発現であり、いくつかの実施形態においては、抗ホスホ - c - m e t抗体を用いて検出される。

【0026】

c - m e t バイオマーカー発現は、核酸発現であってもよい。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカーは、P C R (r t P C R もしくは対立遺伝子特異的 P C R など)、R N A - s e q、マイクロアレイ分析、S A G E、M a s s A R R A Y 技術、または F I S H を用いて患者に由来する試料中で決定される。

【0027】

肝細胞増殖因子 (H G F) の発現を決定することにより、c - m e t バイオマーカーを決定することができる。かくして、いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカーは H G F 発現であり、H G F 発現は、例えば、血清中で (例えば、E L I S A を用いて)、または I H C により (例えば、または腫瘍もしくは腫瘍間質) 検出される。H G F 発現は自己分泌であってもよい。H G F は腫瘍間質中で発現されてもよい。いくつかの実施形態においては、H G F 発現は、患者の血清中で決定される。いくつかの実施形態においては、H G F 発現レベルは、中央 H G F 発現レベルより上である。いくつかの実施形態においては、中央 H G F 発現レベルは、約 3 3 0 p g / m L である。いくつかの実施形態においては、血清中の H G F 発現は、中央 H G F 発現レベルより高い。いくつかの実施形態においては、血清中の H G F 発現は、約 3 3 0 p g / m l より高い。いくつかの実施形態においては、患者血清中の H G F 発現は、約 3 0 0 n g / m l、3 1 0 n g / m l、3 2 0 n g / m l、3 3 0 n g / m l、3 4 0 n g / m l、3 5 0 n g / m l、3 6 0 n g / m l、3 7 0 n g / m l、3 8 0 n g / m l、3 9 0 n g / m l、4 0 0 n g / m l、4 2 0 n g / m l、4 4 0 n g / m l、4 6 0 n g / m l、4 8 0 n g / m l、5 0 0 n g / m l 以上より上である。

10

20

【0028】

c - m e t アンタゴニストは、アンタゴニスト抗 c - m e t 抗体であってもよい。いくつかの実施形態においては、抗 c - m e t 抗体は、(a) 配列番号 1 に示される配列を含む H V R 1 - H C ; (b) 配列番号 2 に示される配列を含む H V R 2 - H C ; (c) 配列番号 3 に示される配列を含む H V R 3 - H C ; (d) 配列番号 4 に示される配列を含む H V R 1 - L C ; (e) 配列番号 5 に示される配列を含む H V R 2 - L C ; および (f) 配列番号 6 に示される配列を含む H V R 3 - L C を含む。いくつかの実施形態においては、抗 c - m e t 抗体は一価であり、(a) 配列番号 1 1 に示される配列を含む、重鎖を含む第 1 のポリペプチド ; (b) 配列番号 1 2 に示される配列を含む、軽鎖を含む第 2 のポリペプチド ; および配列番号 1 3 に示される配列を含む、F c 配列を含む第 3 のポリペプチドを含み、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインは複合体として存在し、単一の抗原結合アームを形成し、第 1 および第 2 の F c ポリペプチドは複合体として存在し、前記抗原結合アームを含む F a b 分子と比較して前記抗体断片の安定性を増加させる F c 領域を形成する。

30

【0029】

いくつかの実施形態においては、c - m e t アンタゴニストは、クリゾチニブ、チバチニブ、カルボザンチニブ、M G C D - 2 6 5、フィクラツズマブ、ヒト化 T A K - 7 0 1、リロツムマブ、フォレチニブ、h 2 2 4 G 1 1、D N - 3 0、M K - 2 4 6 1、E 7 0 5 0、M K - 8 0 3 3、P F - 4 2 1 7 9 0 3、A M G 2 0 8、J N J - 3 8 8 7 7 6 0 5、E M D 1 2 0 4 8 3 1、I N C - 2 8 0、L Y - 2 8 0 1 6 5 3、S G X - 1 2 6、R P 1 0 4 0、L Y 2 8 0 1 6 5 3、B A Y - 8 5 3 4 7 4、G D C - 0 7 1 2、および / または L A 4 8 0 のうちの 1 つまたは複数である。いくつかの実施形態においては、c - m e t アンタゴニストは、クリゾチニブである。いくつかの実施形態においては、c - m e t アンタゴニストは、チバチニブである。いくつかの実施形態においては、c - m e t アンタゴニストは G D C - 0 7 1 2 である。

40

【0030】

いくつかの実施形態においては、B - r a f アンタゴニストは、ソラフェニブ、P L X 4 7 2 0、P L X - 3 6 0 3、G S K 2 1 1 8 4 3 6、G D C - 0 8 7 9、N - (3 - (5 - (4 - クロロフェニル) - 1 H - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 3 - カルボニル)

50

- 2, 4 - ジフルオロフェニル) プロパン - 1 - スルホンアミド、ベムラフェニブ、GSK2118436、RAF265 (Novartis)、XL281、ARQ736、BAY73-4506のうちの一つまたは複数である。さらなる実施形態においては、B - rafアンタゴニストはベムラフェニブである。さらなる実施形態においては、B - rafアンタゴニストはGSK2118436である。B - rafアンタゴニストは、B - raf V600Eに選択的であってもよい。

【0031】

B - rafアンタゴニストとc - metアンタゴニストとを、同時に投与してもよい。B - rafアンタゴニストとc - metアンタゴニストとを、連続的に投与してもよい。いくつかの実施形態においては、B - rafアンタゴニストを、c - metアンタゴニストの前に投与する。いくつかの実施形態においては、c - metアンタゴニストを、B - rafアンタゴニストの前に投与する。

10

【0032】

一態様において、少なくとも1つのさらなる処置(癌薬剤など)を前記対象に投与することを含む方法が提供される。

【0033】

癌はメラノーマ、結腸直腸癌、卵巣癌、乳癌または甲状腺乳頭癌であってもよい。他の癌は、本明細書に記載される。いくつかの実施形態においては、癌はメラノーマである。いくつかの実施形態においては、癌はB - rafアンタゴニストに対して耐性である。いくつかの実施形態においては、患者は以前にB - rafアンタゴニストで処置されている。いくつかの実施形態においては、患者は以前にB - rafアンタゴニストで処置されていない。いくつかの実施形態においては、患者はB - rafアンタゴニストに対して不応性である。

20

【0034】

さらに、本発明は、標的聴衆に、c - metバイオマーカーの発現に基づいて、およびいくつかの実施形態においては、B - rafバイオマーカー(例えば、B - raf突然変異体バイオマーカー)の発現にさらに基づいて、癌を有する患者を処置するための癌薬剤の使用を奨励することを含む、癌薬剤(例えば、c - metアンタゴニスト)を宣伝する方法に関する。奨励は、利用可能な任意の手段によって行うことができる。いくつかの実施形態においては、奨励はc - metアンタゴニスト(抗c - met抗体など)の商業的製剤に添付される添付文書による。奨励はまた、第2の薬剤の商業的製剤に添付される添付文書によってもよい(処置が、c - metアンタゴニストと第2の薬剤、例えば、ベムラフェニブなどのB - rafアンタゴニストとの組合せ療法である場合)。奨励は、医師またはヘルスケア提供者に対する文書または口頭での連絡によるものであってもよい。いくつかの実施形態においては、奨励は、添付文書がc - metアンタゴニストを用いる療法、いくつかの実施形態においては、第2の薬剤、例えば、B - rafアンタゴニスト(ベムラフェニブなど)との組合せた療法を受けるための指示を提供する添付文書による。いくつかの実施形態においては、奨励を行った後、第2の薬剤(例えば、ベムラフェニブ)と共に、またはそれを用いずにc - metアンタゴニストで患者を処置する。いくつかの実施形態においては、奨励を行った後、c - metアンタゴニストを用いる処置と共に、またはそれを用いずに、第2の薬剤で患者を処置する。いくつかの実施形態においては、添付文書は、患者の癌試料が高いc - metバイオマーカーを発現した場合、患者を処置するためにc - metアンタゴニストが用いられるべきであることを示す。いくつかの実施形態においては、添付文書は、患者の癌試料が低いc - metバイオマーカーを発現する場合、患者を処置するためにc - metアンタゴニストが用いられるべきではないことを示す。

30

40

【0035】

いくつかの態様において、本発明は、例えば、患者の生存を増加させる、癌の再発の患者の危険性を低下させる、および/または患者の生存可能性を増加させるために、c - metアンタゴニスト(例えば、抗c - met抗体)を用いる処置、いくつかの実施形態に

50

おいては、第2の薬剤（B - r a f アントゴニスト、例えば、ベムラフェニブなど）を用いる処置を受ける指示を提供することにより、c - m e t バイオマーカを発現する癌（メラノーマなど）を有する患者を指示する方法を特徴とする。いくつかの実施形態においては、処置は、メラノーマ患者に、B - r a f アントゴニスト、例えば、ベムラフェニブと組み合わせて投与される抗c - m e t 抗体（例えば、M e t M A b）を投与することを含む。いくつかの実施形態においては、方法は、少なくとも1つの化学療法剤を用いる処置を受ける指示を提供することをさらに含む。特定の実施形態においては、患者は、指示する方法により指示された通りに処置される。

【0036】

本発明はまた、例えば、生存を増加させる、患者の癌の再発可能性を低下させる、および/または患者の生存可能性を増加させるために、ヒト患者の癌が高い（上昇した）c - m e t バイオマーカ発現を発現した前記患者における癌（例えば、メラノーマ）の処置のためにc - m e t アントゴニスト（例えば、抗c - m e t 抗体）を市販することを含む、ビジネス方法も提供する。いくつかの実施形態においては、処置は、癌患者に、抗c - m e t 抗体（例えば、オナルツズマブ（M e t M A b））、いくつかの実施形態においては、第2の薬剤（例えば、B - r a f アントゴニスト、例えば、ベムラフェニブ）を投与することを含む。

【0037】

一態様において、本発明は、癌（例えば、メラノーマ）患者に由来する試料中でのc - m e t バイオマーカの発現を決定するための1つまたは複数の試薬を含む診断キットを提供する。診断キットは、本明細書に記載の方法のいずれかと共に使用するのに好適である。いくつかの実施形態においては、キットは、メラノーマ患者を処置するためのc - m e t 薬剤を選択するためのキットを使用するための指示書を含む。いくつかの実施形態においては、処置は、癌患者に、抗c - m e t 抗体（例えば、オナルツズマブ（M e t M A b））、いくつかの実施形態においては、第2の薬剤（例えば、B - r a f アントゴニスト、例えば、ベムラフェニブ）を投与することを含む。

【0038】

本発明はまた、一緒に包装された、薬学的に許容される担体中のc - m e t アントゴニストと、c - m e t アントゴニストが、c - m e t バイオマーカの発現に基づいて癌を有する患者を処置するためのものであることを示す添付文書とを含む製品にも関する。処置方法は、本明細書に開示される任意の処置方法を含む。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1A】RTKリガンドが、癌遺伝子依存的癌細胞系におけるキナーゼ阻害を弱めたことを示す図である。RTKリガンドマトリックススクリーニングからの結果を示す図である。キナーゼ依存的癌細胞系を、RTKリガンド（50 ng / mL）の存在下または非存在下で、増加する濃度範囲の適切なキナーゼ阻害剤で処理した。

【図1B】RTKリガンドが、癌遺伝子依存的癌細胞系におけるキナーゼ阻害を弱めたことを示す図である。有効なキナーゼ阻害剤および6つの個々のRTKリガンドのそれぞれで同時処理された41種のキナーゼ依存的癌細胞系からのマトリックススクリーニング結果の概要である。NRはレスキューなしを示し、Pは部分的レスキューを示し、Rは完全なレスキューを示す。

【図1C】RTKリガンドが、癌遺伝子依存的癌細胞系におけるキナーゼ阻害を弱めたことを示す図である。薬剤処理された癌細胞系に対するRTKリガンド効果の多様性を示す細胞生存能力アッセイである（72 h）。細胞を、示された50 ng / mLのRTKリガンドで同時処理したところ、3つの異なる結果が観察された - レスキューなし、部分的レスキューまたは完全なレスキュー。エラーバーは、平均 + / - s . e . m . を表す。

【図2A】プロ生存経路再活性化がRTKリガンドレスキューと相関していたことを示す図である。キナーゼ阻害（1 μ M、2 h）後のAKTおよびERKリン酸化に対する急性RTKリガンド処理（50 ng / mL）の効果を示す免疫プロットである。RTKリガ

10

20

30

40

50

ドレスキューが示され、初回スクリーニングにより決定されたように（図1b）、灰色の四角は完全なレスキューを示し、黒色の四角は部分的レスキューを示す。

【図2B】プロ生存経路再活性化がRTKリガンドレスキューと関連していたことを示す図である。薬剤処理（72h）後の3つのキナーゼ依存的癌細胞系における細胞増殖の抑制を示す細胞生存能力アッセイである。細胞を、示されたように適切な二次キナーゼ阻害剤（0.5 μM）の存在下で、50 ng/mLのRTKリガンドで同時処理した。PD：PD173074、Lap：ラパチニブ、Criz：クリゾチニブ。エラーバーは、平均+/-s.e.m.を表す。

【図2C】プロ生存経路再活性化がRTKリガンドレスキューと関連していたことを示す図である。AKTおよびERKリン酸化に対する、RTKリガンド（50 ng/mL、2h）の存在下および非存在下での急性キナーゼ阻害（1 μM）の効果を示す免疫プロットである。細胞を、必要に応じて二次キナーゼ阻害剤（0.5 μM）で同時処理した。Sun：スニチニブ、PD：PD173074、PLX：PLX4032、Lap：ラパチニブ、Er1：エルロチニブ、Criz：クリゾチニブ。

【図3A】HGFがHER2増幅細胞系中でのラパチニブ耐性を促進したことを示す図である。示されたように、ラパチニブ（Lap、1 μM）、HGF（50 ng/mL）およびクリゾチニブ（Criz、0.5 μM）で処理した後のAU565 HER2増幅乳癌細胞におけるアポトーシス（PAPRの切断）の抑制を示す免疫プロットである。

【図3B】HGFがHER2増幅細胞系中でのラパチニブ耐性を促進したことを示す図である。HER2増幅乳癌細胞系のパネルにおけるpMETおよびMET発現を示す免疫プロットである。HGFレスキューが示され、初回スクリーニング（図1b）により決定されたように、黒色の四角は部分的レスキューを示す。

【図3C】HGFがHER2増幅細胞系中でのラパチニブ耐性を促進したことを示す図である。示されたように、ラパチニブ（Lap、1 μM）、HGF（50 ng/mL）またはクリゾチニブ（Criz、0.5 μM）のいずれかで処理されたAU565 HER2増幅乳癌細胞のSyto60染色である。細胞を示された時間、3日毎に処理した。画像は、3回の独立実験の代表であり、値は平均+/-s.d.を示す。

【図3D】HGFがHER2増幅細胞系中でのラパチニブ耐性を促進したことを示す図である。2つのMET陽性（AU565、HCC1954）および1つのMET陰性（BT474）HER2増幅細胞系におけるpAKTおよびpERKの再活性化を示す免疫プロットである。細胞を、示されたようにラパチニブ（Lap、1 μM）、HGF（50 ng/mL）またはクリゾチニブ（Criz、0.5 μM）のいずれかで処理した（2h）。

【図3E】HGFがHER2増幅細胞系中でのラパチニブ耐性を促進したことを示す図である。HER2陽性（3+）乳癌組織におけるMET発現を示す代表的なスライドである。

【図3F】HGFがHER2増幅細胞系中でのラパチニブ耐性を促進したことを示す図である。ラパチニブ（1 μM）およびHGF（50 ng/mL）で3回処理した後のAU565細胞を発現するより高いMETの選択である。

【図3G】HGFがHER2増幅細胞系中でのラパチニブ耐性を促進したことを示す図である。示されたように、ラパチニブ（5 μM）およびクリゾチニブ（1 μM）のいずれかで処理されたHCC1954 HER2増幅乳癌細胞のSyto60染色である。細胞を、示された時間、週に2回処理した。画像は、3回の独立実験の代表であり、値は平均+/-s.d.を示す。

【図4A】HGFがBRAF突然変異体メラノーマ細胞系におけるPLX4032耐性を促進したことを示す図である。左、BRAF突然変異体メラノーマ細胞系のパネルにおけるpMETおよびMET発現を示す免疫プロットである。HGFレスキューが示され、灰色の四角は完全なレスキューを示し、黒色の四角は部分的レスキューを示し、白色の四角はレスキューなしを示す。右、密度測定により決定されたMET発現と、HGFの存在下でPLX4032（1 μM）処理されたBRAF突然変異体メラノーマ系（72h）におけるレスキュー率（%）との相関を示す。

10

20

30

40

50

【図4B】HGFがBRAF突然変異体メラノーマ細胞系におけるPLX4032耐性を促進したことを示す図である。3つのMET陽性(NAE、624MEL、A375)および2つのMET陰性(M14、Hs693T)BRAF突然変異体細胞系におけるpERKの再活性化を示す免疫プロットである。細胞を、示されたようにPLX4032(PLX、 $1\mu\text{M}$)、HGF(50ng/mL)またはクリゾチニブ(Criz、 $0.5\mu\text{M}$)で処理した(2h)。

【図4C】HGFがBRAF突然変異体メラノーマ細胞系におけるPLX4032耐性を促進したことを示す図である。示されたようにPLX4032($5\mu\text{M}$)および/またはクリゾチニブ($1\mu\text{M}$)のいずれかで処理した624MEL BRAF突然変異体メラノーマ細胞のSyto60染色を示す。細胞を、示された時間、週に2回処理した。画像は、3回の独立実験の代表であり、値は平均 \pm s.d.を示す。

【図4D】HGFがBRAF突然変異体メラノーマ細胞系におけるPLX4032耐性を促進したことを示す図である。928MEL異種移植片におけるPLX4032処理の効果に対する、3D6 MET作動抗体を用いてMET受容体を活性化する効果を示す腫瘍増殖アッセイである。1群あたり10匹のマウスを、4週間、示されたように対照抗体(抗gp120)、3D6(抗MET作動抗体)、RG7204(PLX4032)またはGDC-0712(MET小分子阻害剤)のいずれかで処理した。エラーバーは、平均 \pm s.e.m.を表す。

【図5A】PDGF(50ng/mL 、30min)で刺激した後のPDGFRの活性化を示す免疫プロットである。

【図5B】シスプラチンおよび6つの個々のRTKリガンドで同時処理された6つのキナーゼ依存的癌細胞系からのスクリーニング結果の概要である。NRはレスキューなしを示す。

【図5C】薬剤処理(72h)後の3つのキナーゼ依存的癌細胞系における細胞増殖の抑制を示す細胞生存能力アッセイを示す。細胞を、示されたように適切な二次キナーゼ阻害剤($0.5\mu\text{M}$)の存在下で 50ng/mL のRTKリガンドで同時処理した。PD: PD173074、Lap: ラパチニブ、Criz: クリゾチニブ。エラーバーは、平均 \pm s.e.m.を表す。

【図5D】AKTおよびERKリン酸化に対する、RTKリガンド(50ng/mL 、2h)の存在下または非存在下での急性キナーゼ阻害($1\mu\text{M}$)の効果を示す免疫プロットである。細胞を、必要に応じて二次キナーゼ阻害剤($0.5\mu\text{M}$)で同時処理した。Criz: クリゾチニブ、PD: PD173074、Lap: ラパチニブ。

【図6A】マトリックススクリーニングからの41種のキナーゼ依存的癌細胞系のパネルにおけるMET、PDGFR、IGF1R、EGFR、HER2、HER3、FGFR1、FGFR2およびFGFR3の発現を示す免疫プロットである。RTKリガンドレスキューが示される;灰色の四角は完全なレスキューを示し、黒色の四角は部分的レスキューを示し、白色の四角はレスキューなしを示し、斜線の四角はリガンド結合キナーゼを示す。Xは除去された試料を示し、ampは増幅されていることを示し、mutは突然変異されていることを示す。-チューブリンを用いて等量を決定した。

【図6B】RTK発現を、キナーゼ阻害からキナーゼ依存的細胞をレスキューするRTKリガンドの能力と関連付ける表である。2x2分割表を用いて統計的有意性を決定した。p値を与える。

【図7A】受容体発現非RTKリガンドレスキュー細胞における下流の生存シグナルにカップリングしない受容体の活性化を示す免疫プロットである。PLX: PLX4032, Lap: ラパチニブ。

【図7B】受容体発現非RTKリガンドレスキュー細胞における少なくとも1つの下流の生存シグナルにカップリングした受容体の活性化を示す免疫プロットである。PLX: PLX4032、TAE: TAE684、Er1: エルロチニブ。

【図7C】RTKリガンドが、適切な受容体および受容体発現非RTKリガンドレスキュー細胞における対応する下流の生存シグナルを活性化することができないことを示す免疫

10

20

30

40

50

プロットである。PLX : PLX 4032、TAE : TAE 684、Er1 : エルロチニブ。

【図8A】TAE 684を用いる処理またはクリゾチニブ処理(72h)後の、H3122 EML4-ALK転座NSCLC癌細胞系における細胞増殖の抑制を示す細胞生存能力アッセイを示す図である。細胞を、50ng/mLのHGFで同時処理した。エラーバーは、平均+/-s.e.m.を表す。

【図8B】AKTおよびERKリン酸化に対する、HGF(50ng/mL、2h)の存在下および非存在下での急性TAE 684またはクリゾチニブ(1μM)処理の効果を示す免疫プロットである。

【図8C】示されたようにHGF(50ng/mL)の存在下および非存在下でTAE 684(2μM)で処理されたH2228 EML4-ALK転座NSCLC細胞のSyto60染色である。細胞を9日間にわたって、3日毎に処理した。

【図8D】示されたようにHGF(50ng/mL)の存在下および非存在下でエルロチニブ(5μM)で処理されたH358 EGF様リガンド誘導性NSCLC細胞のSyto60染色である。細胞を9日間にわたって、3日毎に処理した。画像は3回の独立実験の代表であり、値は平均+/-s.d.を示す。

【図9A】PLX 4032を用いる処理(72h)後の2つのBRAF突然変異体細胞系における細胞増殖の抑制を示す細胞生存能力アッセイを示す図である。細胞を、示されたように50ng/mLのRTKリガンドおよびクリゾチニブ(Criz, 0.5μM)で同時処理した。エラーバーは、平均+/-s.e.m.を表す。

【図9B】ラパチニブ(1μM)処理されたAU565 HER2増幅乳癌細胞におけるHGF(50ng/mL)刺激後の持続的生存シグナル(pAKTおよびpERK)を示す時間経過を示す図である。

【図10】BRAF V600Fを用いる細胞中の様々なRTKリガンドのレスキュー結果を示す図である。

【図11】示されたようにラパチニブ(5μM)およびクリゾチニブ(1μM)のいずれかで処理されたHCC1954 HER2増幅乳癌細胞のSyto60細胞染色を示す図である。細胞を、示された時間、週に2回処理した。画像は3回の独立実験の代表であり、値は平均+/-s.d.を示す。

【図12A】MET陽性(NAE、624MEL、928MEL、A375)およびMET陰性(M14、Hs693T)BRAF突然変異体細胞系におけるERKの再活性化を示す免疫プロットである。細胞を、示されたようにPLX 4032(PLX、1μM)、HGF(50ng/mL)またはクリゾチニブ(Criz, 0.5μM)で処理した(2h)。

【図12B】928MELおよび624MEL異種移植片におけるPLX 4032の増殖阻害活性に対する、3D6MET作動抗体を用いるMETを活性化する効果を示す腫瘍増殖アッセイを示す図である。マウス(1群あたり10匹)を、4週間、示されたように対照抗体(抗gp120)、3D6(抗MET作動抗体)、RG7204(PLX 4032)またはGDC-0712(MET小分子阻害剤)のいずれかで処理し、腫瘍体積を示された時間で測定した。エラーバーは、平均+/-s.e.m.を表す。2群間の差異を、二元配置分散分析を用いて決定した(* = 0.0008)。

【図13】PLX 4032で処置した転移性メラノーマ患者における無進行生存および全生存を示す図である。患者を、その血漿HGFレベルに基づいて2群に階層化した(緑色 < 中央HGF; 赤色 > 中央HGF)。

【図14A】PI3KおよびMAPK経路の両方を活性化することによるキナーゼ阻害の付加的レスキューを示す細胞生存能力アッセイを示す図である(72h)。AU565細胞を、10ng/mLのNRG1またはFGFと共にラパチニブ(1μM)で同時処理した。

【図14B】PI3K経路の阻害は、リガンド誘導性レスキューの逆転においてMAPK経路よりも強力であったことを示す細胞生存能力アッセイを示す図である。細胞を、HG

10

20

30

40

50

F (5 0 n g / m L) の存在下で適切なキナーゼ阻害剤で処理した。次いで、細胞を、100 n M の P I 3 K 阻害剤 (B E Z 2 3 5) または M A P K 阻害剤 (A Z D 6 2 4 4) のいずれかで処理した。エラーバーは、平均 + / - s . e . m . を表す。

【図15】マトリックススクリーニングに由来する41種のキナーゼ依存的癌細胞系におけるMET、PDGFR、IGF1R、EGFR、HER2、HER3、FGFR1、FGFR2およびFGFR3の発現を示す免疫プロットである。RTKリガンドレスキューが示される；灰色の四角は完全なレスキューを示し、暗灰色の四角は部分的レスキューを示し、白色の四角はレスキューなしを示し、黒色の四角はリガンド結合キナーゼを示す。Xは除去された試料を示し、ampは増幅されていることを示し、mutは突然変異されていることを示す。 - チューブリンを用いて等量を決定した。

10

【図16】示されたようにHGF (5 0 n g / m L) の存在下または非存在下でTAE684 (2 μ M) で処理されたH2228 EML4 - ALK転座NSCLC細胞のSyto60染色を示す図である。細胞を、9日間にわたって3日毎に処理した。画像は3回の独立実験の代表であり、値は平均 + / - s . d . を示す。

【図17A】SK-MEL-28細胞におけるPLX4032感受性に関する446種の試験した分泌因子の分析を示す図である。

【図17B】50 ng / m L のリガンドの存在下、5 μ M の P L X 4 0 3 2 の存在下での、SK-MEL-28細胞に関する446種の試験した分泌因子の分析 (7 2 h) からの結果の概要である。グラフは、元の分析からのリガンドおよびPLX4032感受性からSK-MEL-28細胞をレスキューした新しく同定された可溶性因子を表す。エラーバーは、平均 + / - s . e . m . を表す。

20

【図18】示されたようにPLX4032 (5 μ M) および / またはクリゾチニブ (1 μ M) のいずれかで処理されたA375および928MEL BRAF突然変異体メラノーマ細胞系のSyto60細胞染色を示す図である。細胞を、示された時間にわたって週に2回処理した。画像は3回の独立実験の代表であり、値は平均 + / - s . d . を示す。

【図19A】928MEL異種移植試験からの結果をまとめた表である。

【図19B】624MEL異種移植試験からの結果をまとめた表である。

【図20】投与前、サイクル1の126人の転移性メラノーマ患者に由来する血漿中のHGFタンパク質レベルのELISA結果の概要を示す図である。

【図21】培養物中でのBRAF突然変異体メラノーマ癌細胞におけるMETのIHC染色を示す図である。

30

【図22】クリゾチニブを用いる処理後のHCC1954およびAU565における細胞増殖の抑制を示す細胞生存能力アッセイ (7 2 h Syto60アッセイ) を示す図である。細胞を、クリゾチニブ (0 . 5 μ M) (MET TKI) およびラパチニブ (EGFR / HER2 TKI) の存在下で50 ng / m L のHGFで同時処理した。

【図23】AKTおよびERKリン酸化に対するNRG1 (5 0 n g / m L , 2 h) の存在下でのラパチニブ (1 μ M) の効果を示す免疫プロットである。細胞を、示されたようにエルロチニブ (0 . 5 μ M) で同時処理した。Lap : ラパチニブ、Er1 : エルロチニブ。

【図24A】投与前サイクル1のBRIM2試験に登録された126人の転移性メラノーマ患者からの、経験的密度 (黒色) を重ね合わせた、対数 (HGF) レベルの頻度分布を示すヒストグラム (斜線) である (正常からの逸脱に関するK o l m o g o r o v - S m i r n o f f p 値は0 . 1 8 である) 。

40

【図24B】PLX4032で処置された転移性メラノーマ患者における無進行生存 (PFS) および全生存 (OS) を示す図である。患者を、その血漿HGFレベルに基づいて3つの群に階層化した。事象 / 患者数および中央時間事象が、各群について示される。連続的結果に関する結果のcox比例モデルを用いて、ハザード比および対応するp値を算出した。

【図25A】GDC-0712の構造を示す図である。

【図25B】cMetおよび選択されたキナーゼに関する酵素IC50を示す。活性化c

50

Metキナーゼドメインによるポリ(Glu、Tyr)のリン酸化を用いてcMet効力を決定し、ELISAにより検出した。データは、複数回の決定(n=5)の幾何平均である。Invitrogenの標準的なプロトコールに従ってInvitrogen Selected Screenサービスを用いて、他のキナーゼアッセイを実行した。全てのIC50は、Kmの近似値で[ATP]を用いて決定した。

【図25C】細胞に基づくアッセイにおける選択されたRTKに対するGDC-0712の効力および選択性を示す図である。全てのアッセイは、10%FBSの存在下で化合物と共に2時間インキュベートした後、表中に特定された細胞系におけるRTK自己リン酸化を測定した。

【図25D】キナーゼ選択性プロファイリングデータである。GDC-0712を、Invitrogen Select Screenサービスを用いて210種のキナーゼのパネルに対して0.1μMでアッセイした。50%を超える阻害を示す全てのキナーゼが列挙される。

【図25E】GDC-0712キナーゼ選択性を図示したものである。0.1μMの化合物での特異的キナーゼの阻害率(%)を、ヒトキノム上にオーバーレイした円のサイズおよび色で表す。

【図26】GDC-0712を、国際特許出願WO2007103308A2に概略された手順に従って調製した。試薬および条件：(a) EtO₃CH、Mel drumの酸、80、76%；(b) Dowtherm、220、45%；(c) 3,4-ジフルオロニトロベンゼン、Cs₂CO₃、DMF、100、88%；(d) TFA、70、99%；(e) I₂、KOH、DMF、50、88%；(f) PMBCl、K₂CO₃、DMF、rt、61%；(g) SnCl₂二水和物、EtOH、65；(h) CuI、インドール-2-カルボン酸、DMSO、K₂CO₃、115、56%；(i) EDCI、HOBT、ipr₂EtNH、DMF、92%；(j) TFA、CH₂Cl₂、rt；(k) CH₃CHO、NaHB(OAc)₃、77%、2ステップを超える；(l) TFA、70、73%。

【発明を実施するための形態】

【0040】

I. 定義

本明細書において、「患者」はヒト患者である。患者は、「癌患者」、すなわち、癌の1つまたは複数の症状に罹患しているか、または罹患する危険性がある患者であってもよい。さらに、患者は、以前に処置された癌患者であってもよい。患者は、「メラノーマ癌患者」、すなわち、メラノーマの1つまたは複数の症状に罹患しているか、または罹患する危険性がある患者であってもよい。さらに、患者は、以前に処置されたメラノーマ患者であってもよい。

【0041】

本明細書で用いられる用語「c-met」または「Met」とは、別途指摘しない限り、任意の天然または変異体(天然もしくは合成)c-metポリペプチドを指す。用語「野生型c-met」は一般的には、天然に存在するc-metタンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。

【0042】

本明細書で用いられる用語「c-met変異体」とは、天然c-met配列中に1つまたは複数のアミノ酸突然変異を含むc-metポリペプチドを指す。場合により、1つまたは複数のアミノ酸突然変異は、(1つまたは複数の)アミノ酸置換を含む。

【0043】

「抗c-met抗体」は、十分な親和性および特異性でc-metに結合する抗体である。選択された抗体は通常、c-metに対する十分に強力な結合親和性を有し、例えば、その抗体は100nM~1pMのK_d値でヒトc-metに結合することができる。抗体親和性を、例えば、表面プラズモン共鳴に基づくアッセイ(PCT出願公開第WO2005/012359号に記載のBIAcoreアッセイなど)；酵素結合免疫吸着アッセ

10

20

30

40

50

イ (E L I S A) ; および競合アッセイ (例えば、 R I A の) により決定することができる。特定の実施形態においては、抗 c - m e t 抗体を、 c - m e t 活性が関与する疾患または状態の標的化および妨害における治療剤として用いることができる。また、前記抗体を他の生物活性アッセイにかけて、例えば、治療剤としてのその有効性を評価することもできる。そのようなアッセイは当業界で公知であり、標的抗原および抗体のための意図される使用に依存する。

【 0 0 4 4 】

「 c - m e t アンタゴニスト」 (「 c - m e t 阻害剤」と互換的に呼ばれる) は、 c - m e t 活性化または機能を妨害する薬剤である。特定の実施形態においては、 c - m e t 阻害剤は、約 1 , 0 0 0 n M 以下の c - m e t に対する結合親和性 (解離定数) を有する。別の実施形態においては、 c - m e t 阻害剤は、約 1 0 0 n M 以下の c - m e t に対する結合親和性を有する。別の実施形態においては、 c - m e t 阻害剤は、約 5 0 n M 以下の c - m e t に対する結合親和性を有する。別の実施形態においては、 c - m e t 阻害剤は、約 1 0 n M 以下の c - m e t に対する結合親和性を有する。別の実施形態においては、 c - m e t 阻害剤は、約 1 n M 以下の c - m e t に対する結合親和性を有する。特定の実施形態においては、 c - m e t 阻害剤は、 c - m e t に共有結合される。特定の実施形態においては、 c - m e t 阻害剤は、 1 , 0 0 0 n M 以下の I C 5 0 で c - m e t シグナリングを阻害する。別の実施形態においては、 c - m e t 阻害剤は、 5 0 0 n M 以下の I C 5 0 で c - m e t シグナリングを阻害する。別の実施形態においては、 c - m e t 阻害剤は、 5 0 n M 以下の I C 5 0 で c - m e t シグナリングを阻害する。別の実施形態においては、 c - m e t 阻害剤は、 1 0 n M 以下の I C 5 0 で c - m e t シグナリングを阻害する。別の実施形態においては、 c - m e t 阻害剤は、 1 n M 以下の I C 5 0 で c - m e t シグナリングを阻害する。

10

20

【 0 0 4 5 】

「 c - m e t 活性化」とは、 c - m e t 受容体の活性化、またはリン酸化を指す。一般に、 c - m e t 活性化は、シグナル伝達 (例えば、 c - m e t または基質ポリペプチド中の c - m e t 受容体リン酸化チロシン残基の細胞内キナーゼドメインにより引き起こされる) をもたらす。 c - m e t 活性化は、対象の c - m e t 受容体への c - m e t リガンド (H G F) 結合により媒介され得る。 c - m e t への H G F 結合は、 c - m e t のキナーゼドメインを活性化し、それによって、 c - m e t 中のチロシン残基のリン酸化および / または (1 つもしくは複数の) さらなる基質ポリペプチド中のチロシン残基のリン酸化をもたらし得る。

30

【 0 0 4 6 】

「 B - r a f 活性化」とは、 B - r a f キナーゼの活性化、またはリン酸化を指す。一般に、 B - r a f 活性化は、シグナル伝達をもたらし得る。

【 0 0 4 7 】

本明細書で用いられる用語「 B - r a f 」とは、別途指摘しない限り、任意の天然または変異体 (天然もしくは合成) B - r a f ポリペプチドを指す。用語「野生型 B - r a f 」は一般に、天然に存在する B - r a f タンパク質のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。

40

【 0 0 4 8 】

本明細書で用いられる用語「 B - r a f 変異体」とは、天然 B - r a f 配列中に 1 つまたは複数のアミノ酸突然変異を含む B - r a f ポリペプチドを指す。場合により、 1 つまたは複数のアミノ酸突然変異は、 (1 つまたは複数の) アミノ酸置換を含む。

【 0 0 4 9 】

「 B - r a f アンタゴニスト」 (「 B - r a f 阻害剤」と互換的に呼ばれる) は、 B - r a f 活性化または機能を妨害する薬剤である。特定の実施形態においては、 B - r a f 阻害剤は、約 1 , 0 0 0 n M 以下の B - r a f に対する結合親和性 (解離定数) を有する。別の実施形態においては、 B - r a f 阻害剤は、約 1 0 0 n M 以下の B - r a f に対する結合親和性を有する。別の実施形態においては、 B - r a f 阻害剤は、約 5 0 n M 以下

50

の B - r a f に対する結合親和性を有する。別の実施形態においては、B - r a f 阻害剤は、約 1 0 n M 以下の B - r a f に対する結合親和性を有する。別の実施形態においては、B - r a f 阻害剤は、約 1 n M 以下の B - r a f に対する結合親和性を有する。特定の実施形態においては、B - r a f 阻害剤は、1 , 0 0 0 n M 以下の I C 5 0 で B - r a f シグナリングを阻害する。別の実施形態においては、B - r a f 阻害剤は、5 0 0 n M 以下の I C 5 0 で B - r a f シグナリングを阻害する。別の実施形態においては、B - r a f 阻害剤は、5 0 n M 以下の I C 5 0 で B - r a f シグナリングを阻害する。別の実施形態においては、B - r a f 阻害剤は、1 0 n M 以下の I C 5 0 で B - r a f シグナリングを阻害する。別の実施形態においては、B - r a f 阻害剤は、1 n M 以下の I C 5 0 で B - r a f シグナリングを阻害する。

10

【 0 0 5 0 】

「V 6 0 0 E」とは、B - R a f のアミノ酸 6 0 0 位のグルタミンからバリンへの置換をもたらす B R A F 遺伝子中の突然変異を指す。「V 6 0 0 E」は、以前の番号付け系 (K u m a r ら、C l i n . C a n c e r R e s . 9 : 3 3 6 2 ~ 3 3 6 8 頁、2 0 0 3) の下では「V 5 9 9 E」としても知られる。

【 0 0 5 1 】

「親和性」とは、ある分子 (例えば、抗体) の単一の結合部位と、その結合パートナー (例えば、抗原) との非共有相互作用の総計の強度を指す。別途指摘しない限り、本明細書で用いられる「結合親和性」とは、結合対のメンバー (例えば、抗体と抗原) 間の 1 : 1 の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子 X のそのパートナー Y に対する親和性は、一般に、解離定数 (K d) により表すことができる。親和性を、本明細書に記載のものなどの当業界で公知の一般的な方法により測定することができる。結合親和性を測定するための特定の例示的实施形態は以下に記載される。

20

【 0 0 5 2 】

「選択的」または「より高い親和性」は、野生型タンパク質に対するよりも突然変異体タンパク質に対してより強固に (より低い解離定数) 結合するアンタゴニストを指す。いくつかの実施形態においては、より高い親和性または選択性は、少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50、100、200、300、400、500 倍以上のより高い結合である。本明細書で用いられる用語「B - r a f 標的化薬剤」とは、B - r a f に結合し、B - r a f 活性化を阻害する治療剤を指す。

30

【 0 0 5 3 】

本明細書で用いられる用語「c - m e t 標的化薬剤」とは、c - m e t に結合し、c - m e t 活性化を阻害する治療剤を指す。

【 0 0 5 4 】

例えば、受容体キナーゼ活性に適用される場合、本明細書で用いられる用語「構成的」とは、リガンドまたは他の活性化分子の存在に依存しない受容体の連続的シグナリング活性を指す。受容体の性質に応じて、全ての活性が構成的であってよいが、または受容体の活性が他の分子 (例えば、リガンド) の結合によりさらに活性化されてもよい。受容体の活性化をもたらす細胞事象は、当業者には周知である。例えば、活性化は、より高次元の受容体複合体へのオリゴマー化、例えば、ダイマー化、トリマー化などを含んでもよい。複合体は、単一の種のタンパク質、すなわち、ホモマー複合体を含んでもよい。あるいは、複合体は、少なくとも 2 つの異なるタンパク質種、すなわち、ヘテロマー複合体を含んでもよい。複合体形成は、例えば、細胞の表面上での通常形態または突然変異形態の受容体の過剰発現により引き起こされ得る。複合体形成はまた、受容体中での特定の突然変異または複数の突然変異によっても引き起こされ得る。

40

【 0 0 5 5 】

語句「遺伝子増幅」とは、特定の細胞または細胞系中である遺伝子または遺伝子断片の複数のコピーが形成されるプロセスを指す。複製される領域 (増幅 D N A のストレッチ) は、「アンプリコン」と呼ばれることが多い。通常、産生されるメッセンジャー R N A (m R N A) の量、すなわち、遺伝子発現のレベルはまた、発現される特定の遺伝子から作

50

られるコピー数に比例して増加する。

【0056】

「チロシンキナーゼ阻害剤」は、c - m e t 受容体またはB - r a f などのチロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性をある程度阻害する分子である。

【0057】

「c - m e t および / もしくはB - r a f 発現、増幅、または活性化を示す」癌または生物試料は、診断試験において、c - m e t および / もしくはB - r a f を発現する（例えば、過剰発現する）、増幅されたc - m e t および / もしくはB - r a f 遺伝子を有する、ならびに / またはさもなければc - m e t および / もしくはB - r a f の活性化もしくはリン酸化を示すものである。

10

【0058】

「c - m e t および / もしくはB - r a f 発現、増幅、または活性化を示さない」癌または生物試料は、診断試験において、c - m e t および / もしくはB - r a f を発現しない（例えば、過剰発現しない）、増幅されたc - m e t および / もしくはB - r a f 遺伝子を有さない、ならびに / またはさもなければc - m e t および / もしくはB - r a f の活性化もしくはリン酸化を示さないものである。

【0059】

「c - m e t および / もしくはB - r a f 活性化を示す」癌または生物試料は、診断試験において、c - m e t および / もしくはB - r a f の活性化またはリン酸化を示すものである。そのような活性を直接的（例えば、E L I S A もしくはI H C によりc - m e t および / もしくはB - r a f リン酸化を測定することによる）または間接的に決定することができる。

20

【0060】

「c - m e t および / もしくはB - r a f 活性化を示さない」癌または生物試料は、診断試験において、c - m e t および / もしくはB - r a f の活性化またはリン酸化を示さないものである。そのような活性を直接的（例えば、E L I S A もしくはI H C によりc - m e t および / もしくはB - r a f リン酸化を測定することによる）または間接的に決定することができる。

【0061】

「構成的c - m e t および / もしくはB - r a f 活性化を示す」癌または生物試料は、診断試験において、c - m e t および / もしくはB - r a f の構成的活性化またはリン酸化を示すものである。そのような活性を直接的（例えば、E L I S A によりc - m e t および / もしくはB - r a f リン酸化を測定することによる）または間接的に決定することができる。

30

【0062】

「c - m e t 増幅を示さない」癌または生物試料は、診断試験において、増幅されたc - m e t 遺伝子を有さないものである。

【0063】

「c - m e t を示す」癌または生物試料は、診断試験において、増幅されたc - m e t 遺伝子を有するものである。

40

【0064】

「構成的c - m e t および / もしくはB - r a f 活性化を示さない」癌または生物試料は、診断試験において、c - m e t および / もしくはB - r a f の構成的活性化またはリン酸化を示さないものである。そのような活性を直接的（例えば、E L I S A によりc - m e t および / もしくはB - r a f リン酸化を測定することによる）または間接的に決定することができる。

【0065】

「リン酸化」とは、B - r a f および / もしくはc - m e t 、またはその基質などの、タンパク質への1つまたは複数のリン酸基の付加を指す。

【0066】

50

本明細書の「ホスホ - E L I S A アッセイ」は、1つまたは複数の c - m e t および / または B - r a f のリン酸化が、リン酸化された c - m e t および / もしくは B - r a f を検出するための試薬、通常は抗体、基質、または下流のシグナリング分子を用いる酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) において評価されるアッセイである。好ましくは、リン酸化された c - m e t および / または B - r a f を検出する抗体が用いられる。このアッセイを、好ましくは、新鮮な、または凍結された生物試料に由来する細胞溶解物に対して実施することができる。

【 0 0 6 7 】

「 c - m e t 過剰発現または増幅」を有する癌細胞は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して有意により高いレベルの c - m e t タンパク質または遺伝子を有するものである。そのような過剰発現は、遺伝子増幅によるか、または転写もしくは翻訳の増加により引き起こされ得る。 c - m e t 過剰発現または増幅を、細胞の表面上に存在する c - m e t タンパク質のレベルの増加を評価することにより (例えば、免疫組織化学アッセイ ; I H C を介する) 、診断または予後アッセイにおいて決定することができる。その代わりに、またはそれに加えて、例えば、蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション (F I S H ; 1 9 9 8 年 1 0 月に公開された W O 9 8 / 4 5 4 7 9 を参照されたい) 、サザンブロッティング、またはポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 技術、例えば、定量的リアルタイム P C R (q R T - P C R) により、細胞中で C - m e t をコードする核酸のレベルを測定することができる。上記アッセイとは別に、様々な i n v i v o アッセイが当業者にとって利用可能である。例えば、場合により、検出可能な標識、例えば、放射性同位体で標識された抗体に、患者の体内の細胞を曝露し、患者中の細胞への抗体の結合を、例えば、放射活性の体外走査によるか、または抗体に予め曝露された患者から取得した生検を分析することにより評価することができる。

10

20

【 0 0 6 8 】

「 c - m e t を過剰発現または増幅しない」癌細胞は、同じ組織型の非癌性細胞と比較して正常レベルよりも高い c - m e t タンパク質または遺伝子を有さないものである。

【 0 0 6 9 】

本明細書で用いられる用語「突然変異」は、それぞれ、野生型タンパク質または核酸と比較した、特定のタンパク質または核酸 (遺伝子、 R N A) のアミノ酸または核酸配列における差異を意味する。突然変異したタンパク質または核酸を、ある遺伝子の1つの対立遺伝子 (異型) または両方の対立遺伝子 (同型) から発現させるか、またはその上に見出すことができ、体細胞または生殖系列であってもよい。本発明においては、突然変異は一般的には体細胞である。突然変異は、挿入、欠失、および点突然変異 (単一ヌクレオチド / アミノ酸多型など) などの配列再配置を含む。

30

【 0 0 7 0 】

「阻害する」こととは、参照と比較して活性、機能、および / または量を低下または減少させることである。

【 0 0 7 1 】

タンパク質「発現」とは、ある遺伝子にコードされた情報の、メッセンジャー R N A (m R N A) 、次いでタンパク質への変換を指す。

40

【 0 0 7 2 】

本明細書において、対象のタンパク質 (c - m e t 受容体など) を「発現する」試料または細胞は、そのタンパク質をコードする m R N A 、またはその断片を含むタンパク質が、試料または細胞中に存在すると決定されたものである。

【 0 0 7 3 】

「遮断」抗体または抗体「アンタゴニスト」は、それが結合する抗原の生物活性を阻害するか、または低下させるものである。好ましい遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を完全に阻害する。

【 0 0 7 4 】

患者の「集団」とは、例えば、臨床試験における、またはメラノーマ癌療法などの特定

50

の適応症についてFDA認可後に腫瘍学者により認められたような、癌を有する患者のグループを指す。

【0075】

本発明の方法について、患者を「指示すること」という用語は、任意の手段によるが、好ましくは、添付文書または他の文書化された奨励材料の形態などの文書により、適用可能な療法、薬剤、処置、処置レジメンなどに関する指示を提供することを意味する。

【0076】

本発明の方法について、用語「奨励すること」は、例えば、添付文書の形態などの文書を含む任意の手段により、特定の薬剤、薬剤の組合せ、または処置様式を提供すること、宣伝すること、販売すること、または説明することを意味する。本明細書における奨励することとは、メラノーマ処置などの適応症のための治療剤、例えば、抗c-met抗体および/またはB-r afアンタゴニストの奨励を指し、そのような奨励は、対象の集団における統計的に有意な治療効果および許容される安全性と関連することが証明されているものとして食品医薬品局(FDA)により認可されている。

10

【0077】

用語「市販すること」は、製品(例えば、薬剤)の奨励、販売または配布を説明するために本明細書で用いられる。市販することは、具体的には、包装すること、宣伝すること、および製品を市販する目的での任意の商活動を含む。

【0078】

本明細書の目的のために、「以前に処置された」癌患者は、以前の癌療法を受けたことがある。

20

【0079】

「不応性」癌は、化学療法剤などの抗腫瘍剤が癌患者に投与された場合でも進行する。

【0080】

「癌薬剤」は、癌を処置するのに有効な薬剤である。癌薬剤の例としては、以下に記載される化学療法剤および化学療法レジメンが挙げられる；c-metアンタゴニスト、例えば、抗c-met抗体、例えば、MetMAb；B-r afアンタゴニスト。

【0081】

本明細書で用いられる用語「バイオマーカー」または「マーカー」とは、組織もしくは細胞中もしくは上での発現または分泌を、公知の方法(または本明細書に開示される方法)により検出することができ、処置レジメンに対する細胞、組織、または患者の応答性を予測するか、またはそれを予測する(もしくは予測を補助する)ために用いることができる、遺伝子、mRNA、タンパク質、炭水化物構造、または糖脂質を含む分子を一般的に指す。

30

【0082】

癌(例えば、メラノーマ)患者に対する臨床利益の低下と関連するバイオマーカーの「量」または「レベル」とは、生物試料中の検出可能なバイオマーカーの欠如または低い検出可能レベルを指し、バイオマーカーのレベルは患者に対する臨床利益の低下と関連する。これらのものを、当業者には公知の、およびまた本発明により開示される方法により測定することができる。評価されるバイオマーカーの発現レベルまたは量を用いて、処置に対する応答を決定することができる。いくつかの実施形態においては、バイオマーカーの量またはレベルは、IHC(例えば、患者腫瘍試料の)および/またはELISAおよび/または5'ヌクレアーゼアッセイおよび/またはPCR(例えば、対立遺伝子特異的PCR)を用いて決定される。

40

【0083】

一般に、用語「発現のレベル」または「発現レベル」は互換的に用いられ、一般的には、生物試料中のポリヌクレオチド、mRNA、またはアミノ酸産物またはタンパク質の量を指す。「発現」は一般的に、遺伝子にコードされた情報が、細胞中に存在し、動作する構造に変換されるプロセスを指す。したがって、本発明による、遺伝子の「発現」は、ポリヌクレオチドへの転写、タンパク質への翻訳、またはさらにはタンパク質の翻訳後改変

50

を指してもよい。転写されるポリヌクレオチド、翻訳されるタンパク質、または翻訳後改変されるタンパク質の断片も、それらが選択的スプライシングにより生成された転写物もしくは分解された転写物を起源とするにしろ、または例えば、タンパク質分解によるタンパク質の翻訳後プロセッシングを起源とするにしろ、発現されると見なすべきである。いくつかの実施形態においては、「発現のレベル」は、IHCを用いて決定された場合、生物試料中のタンパク質の量を指す。

【0084】

「患者試料」とは、癌患者から得られた類似する細胞の集合を意味する。組織または細胞試料の供給源は、新鮮な、凍結された、および/もしくは保存された器官もしくは組織試料または生検もしくは吸引物に由来する固形組織；血液または任意の血液成分；脳脊髄液、羊水、腹腔液、または間質液などの体液；対象の妊娠または発生における任意の時点に由来する細胞であってもよい。組織試料は、保存剤、凝固防止剤、バッファー、固定剤、栄養素、抗生物質などの、天然の組織と天然では混ざらない化合物を含有してもよい。本明細書における腫瘍試料の例としては、限定されるものではないが、腫瘍生検、循環腫瘍細胞、血清または血漿、循環血漿タンパク質、腹水、腫瘍から誘導されたか、または腫瘍のような特徴を示す一次細胞培養物または細胞系、ならびにホルマリン固定、パラフィン包埋腫瘍試料または凍結腫瘍試料などの保存された腫瘍試料が挙げられる。一実施形態においては、試料は、メラノーマ腫瘍試料を含む。

10

【0085】

薬剤および同様の表現を用いる処置に対する患者の「有効な応答」または患者の「応答性」とは、癌薬剤の投与時に癌（例えば、メラノーマ）の危険性があるか、またはそれに罹患する患者に付与される臨床または治療利益を指す。そのような利益は、生存の延長（全生存および無進行生存を含む）；他覚的応答（完全な応答もしくは部分的応答を含む）をもたらすこと；または癌などの症候を改善することのいずれか1つまたは複数を含む。一実施形態においては、バイオマーカーは、同じレベルのバイオマーカーを発現しない患者と比較して、薬剤（例えば、抗c-met抗体）で処置した場合により高い無進行生存（PFS）を有することが期待される患者を同定するために用いられる。

20

【0086】

「生存」とは、生き残っている患者を指し、全生存ならびに無進行生存を含む。

【0087】

「全生存」とは、診断または処置の時点から、1年、5年などの規定の期間にわたって生き残っている患者を指す。

30

【0088】

「無進行生存」とは、癌が進行するか、または悪化することなく、生き残っている患者を指す。

【0089】

「生存の延長」とは、処置されていない患者と比較した（すなわち、薬剤で処置されていない患者と比較した）、または指定のレベルでバイオマーカーを発現しない患者と比較した、および/または認可された抗腫瘍剤（エルロチニブの化学療法レジメンなど）で処置された患者と比較した、処置された患者における全生存または無進行生存の増加を意味する。

40

【0090】

「他覚的応答」とは、完全な応答（CR）または部分的応答（PR）などの測定可能な応答を指す。

【0091】

「完全な応答」または「CR」とは、処置に応答した癌の全ての兆候の消失を意図する。これは、癌が治癒したことを必ずしも意味するわけではない。

【0092】

「部分的応答」または「PR」とは、処置に応答した、1つもしくは複数の腫瘍もしくは病変のサイズ、または体内の癌の程度の低下を指す。

50

【0093】

「処置」とは、治療的処置および予防的または保存的手段の両方を指す。処置を必要とするものとしては、良性、前癌性、または非転移性腫瘍を既に有しているもの、ならびに癌の発生または再発が防止されるべきものが挙げられる。

【0094】

用語「治療上有効量」とは、哺乳動物における疾患または障害を処置または防止する治療剤の量を指す。癌の場合、治療剤の治療上有効量は、癌細胞数を減少させる；原発腫瘍サイズを減少させる；末梢器官への癌細胞浸潤を阻害する（すなわち、ある程度遅延させる、好ましくは停止させる）；腫瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度遅延させる、好ましくは停止させる）；腫瘍増殖をある程度阻害する；および/または障害に伴う1つもしくは複数の症状をある程度軽減することができる。薬剤が癌細胞の増殖を防止する、および/または存在する癌細胞を殺傷することができる程度まで、それは細胞増殖抑制性および/または細胞傷害性であってよい。癌療法のために、*in vivo*での効力を、例えば、生存期間、疾患が進行するまでの時間（TTP）、応答率（RR）、応答期間、および/または生活の質を評価することにより測定することができる。

10

【0095】

用語「癌」および「癌性」は、典型的には制御されない細胞増殖を特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指すか、または説明する。良性および悪性の癌がこの定義に含まれる。「早期段階の癌」または「早期段階の腫瘍」とは、侵襲性もしくは転移性ではないか、またはステージ0、IもしくはIIの癌として分類される癌を意味する。癌の例としては、限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫（髄芽細胞腫および網膜芽細胞腫など）、肉腫（脂肪肉腫および滑膜細胞肉腫など）、神経内分泌腫瘍（カルチノイド腫瘍、ガストリノーマ、および島細胞癌など）中皮腫、神経鞘腫（聴神経腫など）、髄膜腫、腺癌、メラノーマ、および白血病またはリンパ性悪性腫瘍が挙げられる。そのような癌のより特定の例としては、メラノーマ、結腸直腸癌、甲状腺癌（例えば、甲状腺乳頭癌）、非小細胞肺癌（NSCLC）、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌、例えば、胃腸癌、膵臓癌、グリア芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌（転移性乳癌など）、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、胆管腫瘍、ならびに頭部および頸部癌が挙げられる。いくつかの実施形態においては、癌は、メラノーマ；結腸直腸癌；甲状腺癌、例えば、甲状腺乳頭癌；または卵巣癌である。

20

30

【0096】

単数形または複数形で用いられる場合、用語「ポリヌクレオチド」は、非改変RNAもしくはDNAまたは改変RNAもしくはDNAであってよい、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを一般的に指す。かくして、例えば、本明細書で定義されるポリヌクレオチドとしては、限定されるものではないが、一本鎖および二本鎖DNA、一本鎖および二本鎖領域を含むDNA、一本鎖および二本鎖RNA、ならびに一本鎖および二本鎖領域を含むRNA、一本鎖もしくはより典型的には、二本鎖であってもよく、または一本鎖および二本鎖領域を含むDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子が挙げられる。さらに、本明細書で用いられる用語「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNAまたはRNAとDNAの両方を含む三本鎖領域を指す。そのような領域中の鎖は、同じ分子に由来するか、または異なる分子に由来するものであってもよい。領域は、1つまたは複数の分子の全部を含んでもよいが、より典型的には、いくつかの分子のある領域のみを含む。三重らせん領域の分子の1つは、オリゴヌクレオチドであることが多い。用語「ポリヌクレオチド」は、具体的には、cDNAを含む。この用語は、1つまたは複数の改変塩基を含有するDNA（cDNAを含む）およびRNAを含む。かくして、安定性または他の理由で改変された骨格を有するDNAまたはRNAは、その用語が本明細書で意図される通り、「ポリヌクレオチド」である。さらに、イノシンなどの通常ではない塩基、またはトリチウム化塩基などの改変塩基を含むDNAまたはRNAは、本明細書で定義される通り用語「ポリヌクレオチド」に含まれる。一般に、用語「ポリヌクレオチド

40

50

」は、全ての化学的、酵素的および/または代謝的に改変された形態の非改変ポリヌクレオチド、ならびにウイルスおよび細胞、例えば、単純な、および複雑な細胞に特徴的な化学的形態のDNAおよびRNAを包含する。

【0097】

「化学療法剤」は、癌の処置において有用な化合物である。化学療法剤の例としては、チオテパおよびシクロホスファミド(CYTOXAN(登録商標))などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファンなどのスルホン酸アルキル；ベンゾドーパ、カルボクオン、メツレドーパ、およびウレドーパなどのアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロロメラミンなどのエチレンイミンおよびメチラメラミン；アセトゲニン(特に、プラタシンおよびプラタシノン)；デルタ-9-テトラヒドロカナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標))；ベータ-ラバコン；ラバコール；コルヒチン；ブテリン酸(buteclinic acid)；カンプトテシン(合成類似体トポテカン(HYCAMTIN(登録商標))、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン、および9-アミノカンプトテシンなど)；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体など)；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン(特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8)；ドラスタチン；デュオカルマイシン(合成類似体、KW-2189およびCB1-TM1など)；エリユテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムピシン、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタートなどの窒素マスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチンなどのニトロソウレア；エネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシガンマ1IおよびカリケアマイシンオメガI1(例えば、Nicolaouら、Angew. Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183~186頁(1994)を参照されたい)；CDP323、経口アルファ-4インテグリン阻害剤；ダイナミシン、例えば、ダイナミシンA；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連するクロモタンパク質エネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン(ADRIAMYCIN(登録商標))、モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、ドキシソルピシンHClリポソーム注射(DOXIL(登録商標))、リポソームドキシソルピシンTLCD-99(MYOCEP(登録商標))、ペグ化リポソームドキシソルピシン(CAELYX(登録商標))、およびデオキシドキシソルピシンなど)；エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCなどのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシンなどの抗生物質；メトトレキサート、ゲムシタピン(GEMZAR(登録商標))、テガフル(UFTORAL(登録商標))、カペシタピン(XELODA(登録商標))、エボチロン、および5-フルオロウラシル(5-FU)などの代謝拮抗物質；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオゲアニンなどのプリン類似体；アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジンなどのピリミジン類似体；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎物質；フロリン酸(frolin acid)

10

20

30

40

50

inic acid)などの葉酸補給剤;アセグラトン;アルドホスファミドグリコシド;
 ;アミノレブリン酸;エニルウラシル;アムサクリン;ベストラブシル;ピサントレン;
 エダトラキサート;デフォファミン;デメコルシン;ジアジクオン;エフロルニチン;酢
 酸エリプチニウム;エトグルシド;硝酸ガリウム;ヒドロキシウレア;レンチナン;ロニ
 ダイニン;メイタンシンおよびアンサミトシンなどのメイタンシノイド;ミトグアゾン;
 ミトキサントロン;モピダンモール;ニトラエリン(nitoraerine);ペント
 スタチン;フェナメット;ピラルピシン;ロソキサントロン;2-エチルヒドラジド;プ
 ロカルバジン;PSK(登録商標)ポリサッカリド複合体(JHS Natural P
 roducts、Eugene、OR);ラゾキサン;リゾキシン;シゾフィラン;スピ
 ロゲルマニウム;テヌアゾン酸;トリアジクオン;2,2',2''-トリクロロトリエ
 チルアミン;トリコテセン(特に、T-2毒素、ベラクリンA、ロリジンAおよびアング
 イジン);ウレタン;ダカルバジン;マンノムスチン;ミトブロニトール;ミトラクトー
 ル;ピポプロマン;ガシトシン;アラピノシド(「Ara-C」);チオテパ;タキソイ
 ド、例えば、パクリタキセル(TAXOL(登録商標))、パクリタキセルのアルブミン
 操作ナノ粒子製剤(ABRAXANE(商標))、およびドセタキセル(TAXOTERE
 (登録商標));クロラムブシル;6-チオグアニン;メルカプトプリン;メトトレキ
 サート;シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチンなどの白金剤;チュー
 ブリン重合化が微小管を形成するのを防止するピンカ、例えば、ピンプラスチン(VEL
 BAN(登録商標))、ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))、ピンデシン(E
 LDISINE(登録商標))、FILDESIN(登録商標)およびビノレルピン(N
 AVELBINE(登録商標));エトポシド(VP-16);イフォスファミド;ミ
 トキサントロン;ロイコボリン;ノバントロン;エダトレキサート;ダウノマイシン;ア
 ミノプテリン;イバンドロナート;トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000;ジフルオロ
 メチルオルニチン(DMFO);レチノイン酸、例えば、ベキサロテン(TARGRET
 IN(登録商標))などのレチノイド;クロドロナート(例えば、BONEFOS(登録
 商標)もしくはOSTAC(登録商標))、エチドロナート(DIDROCAL(登録商
 標))、NE-58095、ゾレドロ酸/ゾレドロナート(ZOMETA(登録商標))
)、アレンドロナート(FOSAMAX(登録商標))、パミドロナート(AREDIA
 (登録商標))、チルドロナート(SKELID(登録商標))、またはリセドロナート
 (ACTONEL(登録商標))などのビスホスホナート;トロキサシタピン(1,3-
 ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体);アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、
 異常な細胞増殖に關与するシグナリング経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例
 えば、PKC-アルファ、Raf、H-Ras、および上皮増殖因子受容体(EGF-R)
 ;THERATOPE(登録商標)ワクチンおよび遺伝子療法ワクチン、例えば、ALL
 OVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチンおよび
 VAXID(登録商標)ワクチンなどのワクチン;トポイソメラーゼ1阻害剤(例えば、
 LURTOTECAN(登録商標));rmRH(例えば、ABARELIX(登録商標))
 ;BAY439006(ソラフェニブ;Bayer);SU-11248(Pfizer);ペリフォシン、COX-2阻害剤(例
 えば、セレコキシブまたはエトリコキシブ)、プロテオソーム阻害剤(例えば、PS341);
 ボルテゾミブ(VELCADE(登録商標));CCI-779;チピファルニブ(R11577);オラフェニブ、
 ABT510;オブリメルセンナトリウム(GENASENSE(登録商標))などのBcl-
 2阻害剤;ピキサントロン;EGFR阻害剤(以下の定義を参照されたい);チロシンキ
 ナーゼ阻害剤(以下の定義を参照されたい);および上記のいずれかの薬学的に許容され
 る塩、酸または誘導体;ならびに上記の2つ以上の組合せ、例えば、シクロホスファミド
 、ドキシルピシン、ピンクリスチンおよびプレドニゾロンの組合せ療法の省略形であるC
 HOP、ならびに5-FUおよびロイコボリンと組み合わせたオキサリプラチン(ELO
 XANTIN(商標))を用いる処置レジメンの省略形であるFOLFOXが挙げられる。

【0098】

本明細書において、化学療法剤は、癌の増殖を促進し得るホルモンの効果を制御する、減少させる、遮断する、または阻害するように作用する「抗ホルモン剤」または「内分泌治療剤」を含む。それらは、それ自身ホルモンであってもよく、例えば、限定されるものではないが、混合アゴニスト/アンタゴニストプロファイルを有する抗エストロゲン剤、例えば、タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標））、4-ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン（FARESTON（登録商標））、イドキシフェン、ドロキシフェン、ラロキシフェン（EVISTA（登録商標））、トリオキシフェン、ケオキシフェン、および選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）、例えば、SERM3；アゴニスト特性を有さない純粋抗エストロゲン剤、例えば、フルベストラント（FASLODEX（登録商標））、およびEM800（そのような薬剤はエストロゲン受容体（ER）ダイマー化を遮断し、DNA結合を阻害し、ER代謝回転を増加させ、および/またはERレベルを抑制することができる）；アロマトラーゼ阻害剤、例えば、フォルメスタンおよびエキセメスタン（AROMASIN（登録商標））などのステロイド性アロマトラーゼ阻害剤、およびアナストラゾール（ARIMIDEX（登録商標））、レトロゾール（FEMARA（登録商標））およびアミノグルテチミドなどの非ステロイド性アロマトラーゼ阻害剤、およびボロゾール（RIVISOR（登録商標））、酢酸メゲストロール（MEGASE（登録商標））、ファドロゾール、および4（5）-イミダゾールなどの他のアロマトラーゼ阻害剤；黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、例えば、ロイプロリド（LUPRON（登録商標））およびELIGARD（登録商標））、ゴセレリン、プセレリン、およびトリプテレリン；性ステロイド剤、例えば、酢酸メゲストロールおよび酢酸メドロキシプロゲステロンなどのプロゲスチン、ジエチルスチルベストロールおよびプレマリンなどのエストロゲン、ならびにフルオキシメステロン、全てのトランスレチノイン酸およびフェンレチニドなどのアンドロゲン/レチノイド；オナプリストン；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方制御剤（ERD）；フルタミド、ニルタミドおよびピカルタミドなどの抗アンドロゲン剤；および上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸または誘導体；ならびに上記の2つ以上の組合せが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0099】

本明細書における化学療法剤または化学療法レジメンの特定例としては、アルキル化剤（例えば、クロラムブシル、ベンダムスチン、またはシクロホスファミド）；ヌクレオシド類似体または代謝拮抗物質（例えば、フルダラビン）、フルダラビンおよびシクロホスファミド（FC）；プレドニゾンまたはプレドニゾロン；アルキル化剤含有組合せ療法、例えば、シクロホスファミド、ピンクリスチン、プレドニゾロン（CHOP）、またはシクロホスファミド、ピンクリスチン、プレドニゾロン（CVP）などが挙げられる。

【0100】

「標的聴衆」は、例えば、個々の患者、患者集団、新聞、医学的文献、および雑誌の読者、テレビジョンまたはインターネットの閲覧者、ラジオまたはインターネットの視聴者、医師、製薬会社などの、特に、特定の目的、処置、または適応症のために市販または宣伝することによって特定の薬剤を奨励されるか、または奨励することを意図される人々の群または団体である。

【0101】

「添付文書」は、適応症、使用、用量、投与、禁忌、包装された製品と組み合わせられる他の治療剤製品、および/またはそのような治療剤製品の使用に関する警告などに関する情報を含む、治療剤製品の商業的包装に慣用的に含まれる指示書を指すように用いられる。

【0102】

本明細書における用語「抗体」は、最も広い意味で用いられ、様々な抗体構造、例えば、限定されるものではないが、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多特異的抗体（例えば、二特異的抗体）、および抗体断片を包含する。

【0103】

「抗体断片」とは、無傷抗体が結合する抗原に結合する無傷抗体の一部を含む、無傷抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；線状抗体；一本鎖抗体分子（例えば、scFv）；ならびに抗体断片から形成された多特異的抗体が挙げられる。

【0104】

「親和性成熟された」抗体とは、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらすような変化を有さない親抗体と比較して、1つまたは複数の超可変領域（HVR）における1つまたは複数の変化を有する抗体を指す。

【0105】

参照抗体と「同じエピトープに結合する抗体」とは、競合アッセイにおいて参照抗体のその抗原への結合を50%以上遮断する抗体を指し、および逆に、参照抗体は競合アッセイにおいて抗体のその抗原への結合を50%以上遮断する。

【0106】

用語「キメラ」抗体とは、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の供給源または種から誘導されるが、重鎖および/または軽鎖の残りが異なる供給源または種から誘導される抗体を指す。

【0107】

抗体の「クラス」とは、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域の型を指す。抗体の5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMが存在し、これらのいくつかはサブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁およびIgA₂にさらに分割することができる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ および μ と呼ばれる。

【0108】

本明細書で用いられる用語「細胞傷害性薬剤」とは、細胞機能を阻害もしくは防止する、および/または細胞死もしくは細胞破壊を引き起こす物質を指す。細胞傷害性薬剤としては、限定されるものではないが、放射性同位体（例えば、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²およびLuの放射性同位体）；化学療法剤または薬（例えば、メトトレキサート、アドリアマイシン、ピンカルカロイド（ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド）、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシンまたは他の挿入剤）；増殖阻害剤；核酸分解酵素などの酵素およびその断片；抗生物質；小分子毒素または細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、例えば、その断片および/または変異体；ならびに以下に開示される様々な抗腫瘍剤または抗癌剤が挙げられる。

【0109】

「エフェクター機能」とは、抗体アイソタイプと共に変化する、抗体のFc領域に帰するこれらの生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合および補体依存的細胞傷害性（CDC）；Fc受容体結合；抗体依存的細胞媒介性細胞傷害性（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御；およびB細胞活性化が挙げられる。

【0110】

本明細書における用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために用いられる。この用語は、天然配列Fc領域および変異体Fc領域を含む。一実施形態においては、ヒトIgG重鎖Fc領域は、重鎖のCys226、またはPro230から、カルボキシル末端までに及ぶ。しかしながら、Fc領域のC末端リシン（Lys447）は、存在しても、または存在しなくてもよい。本明細書で別途特定しない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabataら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、M

10

20

30

40

50

D、1991に記載のような、EU指数とも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。

【0111】

「フレームワーク」または「FR」とは、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に4つのFRドメイン:FR1、FR2、FR3、およびFR4からなる。したがって、HVRおよびFR配列は一般に、VH(またはVL)中の以下の配列中出现する:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0112】

用語「完全長抗体」、「無傷抗体」および「全抗体」は、天然抗体構造と実質的に類似する構造を有するか、または本明細書で定義されたFc領域を含む重鎖を有する抗体を指すように、本明細書では互換的に用いられる。

10

【0113】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞により産生されるか、またはヒト抗体レパトリーもしくは他のヒト抗体コード配列を使用する非ヒト起源から誘導される抗体のアミノ酸配列に一致するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は特に、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を含まない。

【0114】

「ヒト化」抗体とは、非ヒトHVRに由来するアミノ酸残基およびヒトFRに由来するアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。特定の実施形態においては、ヒト化抗体は、全ての、または実質的に全てのHVR(例えば、CDR)が非ヒト抗体のものに一致し、全ての、または実質的に全てのFRがヒト抗体のものに一致する、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含む。ヒト化抗体は場合により、ヒト抗体から誘導される抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。「ヒト化形態」の抗体、例えば、非ヒト抗体とは、ヒト化を受けた抗体を指す。

20

【0115】

本明細書で用いられる用語「超可変領域」または「HVR」とは、配列において超可変性である、および/または構造的に規定されたループ(「超可変ループ」)を形成する、それぞれの抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、天然の4鎖抗体は、6つのHVR;VH中に3つ(H1、H2、H3)およびVL中に3つ(L1、L2、L3)を含む。HVRは一般に、超可変ループおよび/または「相補性決定領域」(CDR)に由来するアミノ酸残基を含み、後者は最も高い配列可変性のものであり、および/または抗原認識に
関与する。超可変ループの例は、アミノ酸残基26~32(L1)、50~52(L2)、91~96(L3)、26~32(H1)、53~55(H2)、および96~101(H3)に生じる(ChothiaおよびLesk、J.Mol.Biol.196:901~917頁(1987))。例示的なCDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3)は、L1のアミノ酸残基24~34、L2の50~56、L3の89~97、H1の31~35B、H2の50~65、およびH3の95~102に生じる(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD(1991))。VH中のCDR1を除いて、CDRは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRはまた、抗原に接触する残基である、「特異性決定残基」または「SDR」も含む。SDRは、省略-CDR、またはa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含まれる。例示的なa-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、およびa-CDR-H3)は、L1のアミノ酸残基31~34、L2の50~55、L3の89~96、H1の31~35B、H2の50~58、およびH3の95~102に生じる(AlmagroおよびFransson、Front.Biosci.13:1619~1633頁(2008))を参照されたい)。別途指摘しない限り、可変ドメイン中のHVR残基および他の残基(例えば、FR残基)は、Kabatら、上掲に

30

40

50

従って本明細書で番号付けられる。一実施形態においては、本明細書の c - m e t 抗体は、配列番号 1 ~ 6 の H V R を含む。

【 0 1 1 6 】

「親和性」とは、ある分子（例えば、抗体）の単一の結合部位と、その結合パートナー（例えば、抗原）との非共有相互作用の総計の強度を指す。別途指摘しない限り、本明細書で用いられる「結合親和性」とは、結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）間の 1 : 1 の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子 X のそのパートナー Y に対する親和性は、一般に、解離定数 (K d) により表すことができる。親和性を、本明細書に記載のものなどの当業界で公知の一般的な方法により測定することができる。結合親和性を測定するための特定の例示的实施形態は以下に記載される。

10

【 0 1 1 7 】

「免疫コンジュゲート」は、限定されるものではないが、細胞傷害性薬剤などの 1 つまたは複数の異種分子にコンジュゲートされた抗体である。

【 0 1 1 8 】

本明細書で用いられる用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、例えば、天然に存在する突然変異を含むか、またはモノクローナル抗体調製物の産生の際に生じる可能なバリエーション抗体であり、一般に少量で存在する前記変異体を除いて、集団を含む個々の抗体は同一であり、および/または同じエピトープに結合する。典型的には、異なる決定基（エピトープ）を指向する異なる抗体を含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物のそれぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を指向する。かくして、修飾語句「モノクローナル」は、抗体の特徴が抗体の実質的に均一な集団から得られるものであり、任意の特定の手法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って用いられるモノクローナル抗体を、限定されるものではないが、ハイブリドーマ法、組換え DNA 法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法などの様々な技術により作製することができ、そのような方法およびモノクローナル抗体を作製するための他の例示的方法は、本明細書に記載される。

20

【 0 1 1 9 】

「ネイキッド抗体」とは、異種部分（例えば、細胞傷害部分）または放射性標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。ネイキッド抗体は、医薬製剤中に存在してもよい。

30

【 0 1 2 0 】

「天然抗体」とは、変化する構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然の I g G 抗体は、ジスルフィド結合した 2 つの同一の軽鎖および 2 つの同一の重鎖から構成される、約 1 5 0 , 0 0 0 ダルトンのヘテロテトラマー糖タンパク質である。N 末端から C 末端に向かって、それぞれの重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域 (V H)、次いで、3 つの定常ドメイン (C H 1、C H 2 および C H 3) を有する。同様に、N 末端から C 末端に向かって、それぞれの軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域 (V L)、次いで、定常軽鎖 (C L) ドメインを有する。抗体の軽鎖を、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ () およびラムダ () と呼ばれる、2 つの型のうちの 1 つに割り当てることができる。

40

【 0 1 2 1 】

用語「医薬製剤」とは、薬剤の生物活性が有効であることを許容するような形態にあり、製剤が投与される対象にとって許容できない毒性的なものであるさらなる成分を含有しない滅菌調製物を指す。

【 0 1 2 2 】

「滅菌」製剤は、無菌性であるか、またはあらゆる生きている微生物およびその胞子を含まない。

【 0 1 2 3 】

50

「キット」は、少なくとも1つの試薬、例えば、癌（例えば、メラノーマ、結腸直腸癌）の処置のための薬剤、またはバイオマーカー遺伝子もしくはタンパク質を特異的に検出するための試薬（例えば、抗体）を含む任意の製品（例えば、パッケージまたは容器）である。この製品は、好ましくは、本発明の方法を実施するための単位として奨励、配布、または販売される。

【0124】

「薬学的に許容される担体」とは、対象にとって非毒性的である、活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。薬学的に許容される担体としては、限定されるものではないが、バッファー、賦形剤、安定剤、または保存剤が挙げられる。

【0125】

参照ポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、配列を整列させ、必要に応じて、ギャップを導入して最大の配列同一性パーセントを達成した後、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義され、任意の保存的置換を配列同一性の部分と考慮しない。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的でのアラインメントを、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGNまたはMegalign(DNA STAR)ソフトウェアなどの公共的に利用可能なコンピュータソフトウェアを用いて、当業者の知識の範囲内にある様々な方法で達成することができる。当業者であれば、配列を整列させるための適切なパラメータ、例えば、比較される配列の全長にわたる最大のアラインメントを達成するのに必要とされる任意のアルゴリズムを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて生成される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.により著されたものであり、そのソースコードはU.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559にユーザ文書と共にファイルされており、U.S. Copyright Registration No. TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc., South San Francisco, Californiaから公共的に利用可能であるか、またはソースコードからコンパイルすることができる。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0DなどのUNIXオペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルするべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムにより設定され、変化しない。

【0126】

アミノ酸配列比較のためにALIGN-2を用いる状況では、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bへの、との、または、に対するアミノ酸配列同一性%(あるいは、所与のアミノ酸配列Bへの、との、または、に対する特定のアミノ酸配列同一性%を有するか、または含む所与のアミノ酸配列Aと表現することもできる)は、以下のように算出される：

分数 X/Y の100倍

(式中、Xは、配列アラインメントプログラムALIGN-2によるAとBとのそのプログラムのアラインメントにおける同一の一致としてスコア化されるアミノ酸残基の数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である)。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一性%は、Aに対するBのアミノ酸配列同一性%と等しくないであろう。別途特に記述しない限り、本明細書で用いられる全てのアミノ酸配列同一性%の値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて直前の段落に記載のように得られる。

【0127】

II. 癌薬剤

一態様において、本発明は、対象における、癌などの病理学的状態を処置するための組合せ療法におけるc-metアンタゴニストおよびB-rafアンタゴニストの使用を特徴とする。別の態様において、本発明は、本明細書に開示される1つまたは複数のバイオ

10

20

30

40

50

マーカーの発現に基づいて癌薬剤で処置することができる患者を選択することに関する。癌薬剤の例としては、限定されるものではないが、

- 抗 c - m e t 抗体などの c - m e t アンタゴニスト、
- B - r a f アンタゴニスト、
- 化学療法剤および化学療法レジメン、
- 癌、例えば、メラノーマを処置するための、開発中の、または認可された他の薬剤

またはその組合せが挙げられる。

【 0 1 2 8 】

c - m e t アンタゴニストの例としては、限定されるものではないが、可溶性 c - m e t 受容体、可溶性 H G F 変異体、c - m e t または H G F に結合するアプタマーまたはペプチボディ、c - m e t 小分子、抗 c - m e t 抗体および抗 H G F 抗体が挙げられる。

10

【 0 1 2 9 】

一実施形態においては、c - m e t アンタゴニストは、例えば、c - m e t を指向するか、または c - m e t に結合する抗体である。本明細書における抗体としては、モノクローナル抗体、例えば、キメラ、ヒト化またはヒト抗体が挙げられる。一実施形態においては、抗体は抗体断片、例えば、F v、F a b、F a b'、1アーム (o n e - a r m e d) 抗体、s c F v、ダイアボディ、または F (a b')₂断片である。別の実施形態においては、抗体は、完全長抗体、例えば、無傷の I g G 1 抗体または本明細書に定義された他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。一実施形態においては、抗体は一価である

20

【 0 1 3 0 】

別の実施形態においては、抗 c - m e t 抗体は、M e t M A b (オナルツズマブ) またはそのパイオシミラー型である。M e t M A b は、例えば、W O 2 0 0 6 / 0 1 5 3 7 1 ; J i n ら、C a n c e r R e s (2 0 0 8) 6 8 : 4 3 6 0 頁に開示されている。別の実施形態においては、抗 c - m e t 抗体は、(a) 配列 G Y T F T S Y W L H (配列番号 1) を含む H V R 1 - H C ; (b) 配列 G M I D P S N S D T R F N P N F K D (配列番号 2) を含む H V R 2 - H C ; および / または (c) 配列 A T Y R S Y V T P L D Y (配列番号 3) を含む H V R 3 - H C のうちの 1 つまたは複数を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態においては、抗体は、(a) 配列 K S S Q S L L Y T S S Q K N Y L A (配列番号 4) を含む H V R 1 - L C ; (b) 配列 W A S T R E S (配列番号 5) を含む H V R 2 - L C ; および / または (c) 配列 Q Q Y Y A Y P W T (配列番号 6) を含む H V R 3 - L C のうちの 1 つまたは複数を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態においては、抗 c - m e t 抗体は、(a) 配列 G Y T F T S Y W L H (配列番号 1) を含む H V R 1 - H C ; (b) 配列 G M I D P S N S D T R F N P N F K D (配列番号 2) を含む H V R 2 - H C ; および (c) 配列 A T Y R S Y V T P L D Y (配列番号 3) を含む H V R 3 - H C を含む重鎖可変ドメインと、(a) 配列 K S S Q S L L Y T S S Q K N Y L A (配列番号 4) を含む H V R 1 - L C ; (b) 配列 W A S T R E S (配列番号 5) を含む H V R 2 - L C ; および (c) 配列 Q Q Y Y A Y P W T (配列番号 6) を含む H V R 3 - L C を含む軽鎖可変ドメインとを含む。

30

40

【 0 1 3 1 】

上記実施形態のいずれかにおいて、例えば、抗 c - m e t 抗体はヒト化されていてもよい。一実施形態においては、抗 c - m e t 抗体は、上記実施形態のいずれかにおける H V R を含む、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。

【 0 1 3 2 】

50

別の態様において、抗 c - m e t 抗体は、配列番号 7 のアミノ酸配列に対する少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン (VH) 配列を含む。特定の実施形態においては、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する VH 配列は、参照配列と比較して置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗 c - m e t 抗体は、ヒト c - m e t に結合する能力を保持する。特定の実施形態においては、配列番号 7 において、合計 1 ~ 10 個のアミノ酸が置換、変化、挿入および/または欠失されている。特定の実施形態においては、置換、挿入、または欠失は HVR の外側の領域 (すなわち、FR) 中に存在する。場合により、抗 c - m e t 抗体は、配列番号 7 中の VH 配列、例えば、その配列の翻訳後改変を含む。

10

【0133】

別の態様において、抗体が配列番号 8 のアミノ酸配列に対する少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン (VL) を含む、抗 c - m e t 抗体が提供される。特定の実施形態においては、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する VL 配列は、参照配列と比較して置換 (例えば、保存的置換)、挿入、または欠失を含有するが、その配列を含む抗 c - m e t 抗体は、c - m e t に結合する能力を保持する。特定の実施形態においては、配列番号 8 において、合計 1 ~ 10 個のアミノ酸が置換、挿入および/または欠失されている。特定の実施形態においては、置換、挿入、または欠失は HVR の外側の領域 (すなわち、FR) 中に存在する。場合により、抗 c - m e t 抗体は、配列番号 8 中の VL 配列、例えば、その配列の翻訳後改変を含む。

20

【0134】

さらに別の実施形態においては、抗 c - m e t 抗体は、配列番号 8 のアミノ酸配列に対する少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する VL 領域と、配列番号 7 のアミノ酸配列に対する少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有する VH 領域とを含む。さらなる実施形態においては、抗 c - m e t 抗体は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む HVR - L1 ; 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む HVR - L2 ; 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む HVR - L3 ; 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む HVR - H1 ; 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む HVR - H2 ; および配列番号 6 のアミノ酸配列を含む HVR - H3 を含む。

30

【0135】

別の態様において、抗体が上記で提供された実施形態のいずれかに記載の VH、および上記で提供された実施形態のいずれかに記載の VL を含む抗 c - m e t 抗体が提供される。

【0136】

さらなる態様において、本発明は、本明細書で提供される抗 c - m e t 抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。例えば、特定の実施形態においては、配列番号 7 の VH 配列および配列番号 8 の VL 配列を含む抗 c - m e t 抗体と同じエピトープに結合するか、またはそれにより競合的に阻害され得る抗体が提供される。

40

【0137】

本発明のさらなる態様において、上記実施形態のいずれかに記載の抗 c - m e t 抗体は、モノクローナル抗体、例えば、一価、キメラ、ヒト化またはヒト抗体であってもよい。一実施形態においては、抗 c - m e t 抗体は、抗体断片、例えば、1 アーム、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、または F(ab')₂ 断片である。別の実施形態においては、抗体は、完全長抗体、例えば、無傷の IgG1 もしくは IgG4 抗体または本明細書で定義される他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。別の実施形態によれば、抗体は二特異的抗体である。一実施形態においては、二特異的抗体は HVR を含む

50

か、または上記のVHおよびVL領域を含む。

【0138】

いくつかの実施形態においては、抗c-met抗体は一価であり、(a)配列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNPDKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLLVTVSS(配列番号7)を有する重鎖可変ドメイン、CH1配列、および第1のFcポリペプチドを含む第1のポリペプチド；(b)配列：DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYTSNQKNYLAWYQQKPKGKAPKLLIYWASTRESGVP

SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKEIKR(配列番号8)を有する軽鎖可変ドメイン、およびCL1配列を含む第2のポリペプチド；ならびに(c)第2のFcポリペプチドを含む第3のポリペプチドを含み(またはそれからなるか、もしくは本質的にそれからなる)、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインは複合体として存在し、単一の抗原結合アームを形成し、第1および第2のFcポリペプチドは複合体で存在し、前記抗原結合アームを含むFab分子と比較して前記抗体断片の安定性を増加させるFc領域を形成する。いくつかの実施形態においては、第1のポリペプチドは、Fc配列：CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号9)を含み、第2のポリペプチドは、Fc配列：CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号10)を含む。

10
20

【0139】

別の実施形態においては、抗c-met抗体は一価であり、(a)配列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSTSYWLHWVRQAPGKGLEWVGMIDPSNSDTRFNPDKDRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCATYRSYVTPLDYWGQGTLLVTVSSASSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号11)を含む、重鎖を含む第1のポリペプチド；(b)配列：DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKSSQSLLYTSNQKNYLAWYQQKPKGKAPKLLIYWASTRESGVP

SRFSGSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYYAYPWTFGQGTKEIKRRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNLFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号12)を含む、軽鎖を含む第2のポリペプチド；および(c)配列：DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK

30
40
50

DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLWCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号13)を含む、Fc配列を含む第3のポリペプチドを含み、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインは複合体として存在し、単一の抗原結合アームを形成する。

【0140】

本発明の方法における使用にとって好適な他の抗c-met抗体は、本明細書に記載されており、当業界で公知である。例えば、WO05/016382に開示された抗c-met抗体(限定されるものではないが、抗体13.3.2、9.1.2、8.70.2、8.90.3など); GenoaのCBAにICLC番号PD03001として寄託されたハイブリドーマ細胞系により産生されるか、またはモノクローナル抗体により認識されるものと同じである、HGF受容体の鎖の細胞外ドメイン上のエピトープを認識する抗c-met抗体; WO2007/126799に開示された抗c-met抗体(限定されるものではないが、04536、05087、05088、05091、05092、04687、05097、05098、05100、05101、04541、05093、05094、04537、05102、05105、04696、04682など); WO2009/007427に開示された抗c-met抗体(限定されるものではないが、CNM、Institut Pasteur、Paris、Franceに、番号I-3731の下で2007年3月14日に、番号I-3732の下で2007年3月14日に、番号I-3786の下で2007年7月6日に、番号I-3724の下で2007年3月14日に寄託された抗体など); 20110129481に開示された抗c-met抗体; US20110104176に開示された抗c-met抗体; WO2009/134776に開示された抗c-met抗体; WO2010/059654に開示された抗c-met抗体; WO2011020925に開示された抗c-met抗体(限定されるものではないが、CNM、Institut Pasteur、Paris、Franceに、番号I-3949の下で2008年3月12日に寄託されたハイブリドーマおよび番号I-4273の下で2010年1月14日に寄託されたハイブリドーマから分泌される抗体など)である。

【0141】

一態様において、抗c-met抗体は、抗体断片内のFc配列の、ホモダイマー化を最小化しながら、ヘテロダイマー化を促進する少なくとも1つの特徴を含む。(1つまたは複数の)そのような特徴は、免疫グロブリン集団の収率および/または純度および/または均一性を改善する。一実施形態においては、抗体は、WO2005/063816に記載の「ノブ」および「ホール」を構成するFc突然変異を含む。例えば、ホール突然変異は、Fcポリペプチド中のT366A、L368Aおよび/またはY407Vの1つまたは複数であってよく、空洞突然変異はT366Wであってよい。

【0142】

いくつかの実施形態においては、c-metアンタゴニストは、抗肝細胞増殖因子(HGF)抗体、例えば、ヒト化抗HGF抗体TAK701、リロツムマブ、フィクラツズマブ、および/またはWO2007/143090に記載されたヒト化抗体2B8である。いくつかの実施形態においては、抗HGF抗体は、US7718174B2に記載された抗HGF抗体である。

【0143】

いくつかの実施形態においては、c-metアンタゴニストは、c-met小分子阻害剤である。小分子阻害剤は、好ましくはc-metに特異的に結合する本明細書で定義された結合ポリペプチドまたは抗体以外の有機分子であるのが好ましい。いくつかの実施形態においては、c-met小分子阻害剤は、選択的c-met小分子阻害剤である。いくつかの実施形態においては、c-metアンタゴニストは、キナーゼ阻害剤である。

【0144】

HGFに特異的に結合するc-met受容体分子またはその断片を、本発明の方法において用いて、例えば、HGFタンパク質に結合し、それを隔離することによって、そのシグナリングを防止することができる。好ましくは、c-met受容体分子、またはそのHGF結合断片は、可溶性形態である。いくつかの実施形態においては、可溶性形態の受容体は、HGFに結合することによりc-metタンパク質の生物活性に対する阻害効果を示し、それによって、それが標的細胞の表面上に存在するその天然の受容体に結合するのを防止する。また、例えば、以下に記載される、c-met受容体融合タンパク質も含まれる。

【0145】

本発明の可溶性c-met受容体タンパク質またはキメラc-met受容体タンパク質は、膜貫通ドメインを介して細胞の表面に固定されていないc-met受容体タンパク質を含む。そのようなものとして、キメラ受容体タンパク質などの可溶性形態のc-met受容体は、HGFに結合し、これを不活化することができるが、膜貫通ドメインを含まず、かくして、一般的には分子が発現される細胞の細胞膜と会合するようにならない。例えば、Kong - Beltran, M₅, Cancer Cell (2004) 6(1): 75~84頁を参照されたい。

【0146】

c-metに特異的に結合し、c-metの活性化を遮断するか、または減少させることによって、そのシグナリングを防止するHGF分子またはその断片を、本発明の方法において用いることができる。

【0147】

アプタマーは、HGFまたはc-metポリペプチドなどの標的分子に特異的に結合する三次構造を形成する核酸分子である。アプタマーの作製および治療的使用は、当業界で定着している。例えば、米国特許第5,475,096号を参照されたい。HGFアプタマーは、細胞外HGFに結合させることができる三次元コンフォメーションを採用する、ペグ化改変オリゴヌクレオチドである。アプタマーに関するさらなる情報は、米国特許出願公開第20060148748号に見出すことができる。

【0148】

ペプチボディは、免疫グロブリン分子の断片または一部をコードするアミノ酸配列に連結されたペプチド配列である。ポリペプチドを、限定されるものではないが、ファージディスプレイ技術などの、特異的結合のための任意の方法により選択された無作為化配列から誘導することができる。好ましい実施形態においては、選択されたポリペプチドを、免疫グロブリンのFc部分をコードするアミノ酸配列に連結することができる。HGFまたはc-metに特異的に結合し、それと拮抗するペプチボディも、本発明の方法において有用である。

【0149】

一実施形態においては、c-metアンタゴニストは、c-met細胞外ドメインに結合する。いくつかの実施形態においては、c-metアンタゴニストは、c-metキナーゼドメインに結合する。いくつかの実施形態においては、c-metアンタゴニストは、肝細胞増殖因子(HGF)とc-met結合について競合する。いくつかの実施形態においては、c-metアンタゴニストは、HGFに結合する。

【0150】

特定の実施形態においては、c-metアンタゴニストは、GDC-0712、SGX-523、クリゾチニブ(PF-02341066; 3-[(1R)-1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エトキシ]-5-(1-ピペリジン-4-イルピラゾール-4-イル)ピリジン-2-アミン; CAS番号877399-52-5); JNJ-38877605(CAS番号943540-75-8)、BMS-698769、PHA-665752(Pfizer)、SU5416、INC-280(Incyte; SU11274(Sugen; [(3Z)-N-(3-クロロフェニル)-3-(3,5

10

20

30

40

50

-ジメチル-4-[(4-メチルピペラジン-1-イル)カルボニル]-1H-ピロール-2-イル}メチレン)-N-メチル-2-オキソインドリン-5-スルホンアミド; CAS番号658084-23-2]), フォレチニブ(GSK1363089)、XL880(CAS番号849217-64-7; XL880はmetおよびVEGFR2およびKDRの阻害剤である); MGC D-265(Methyl Gene; MGC D-265はc-MET、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、RonおよびTie-2受容体を標的化する; CAS番号875337-44-3)、チバンチニブ(ARQ197; (-)-(3R,4R)-3-(5,6-ジヒドロ-4H-ピロロ[3,2,1-ij]キノリン-1-イル)-4-(1H-インドール-3-イル)ピロリジン-2,5-ジオン; Munchiら、Mol Cancer Ther June 2010 9; 1544頁を参照されたい; CAS番号905854-02-6)、LY-2801653(Lilly)、LY2875358(Lilly)、MP-470、リロツムマブ(AMG102、抗HGFモノクローナル抗体)、抗体223C4またはヒト化抗体223C4(WO2009/007427)、ヒト化L2G7(ヒト化TAK701; ヒト化抗HGFモノクローナル抗体); EMD1214063(Merck Sorono)、EMD1204831(Merck Sorono)、NK4、カボザンチニブ(XL-184、CAS番号849217-68-1; カボザンチニブはmetおよびVEGFR2の二重阻害剤である)、MP-470(Super Gen; c-KIT、MET、PDGFR、Flt3、およびAXLの新規阻害剤である)、Comp-1、フィクラツズマブ(AV-299; 抗HGFモノクローナル抗体)、E7050(Cas番号1196681-49-8; E7050はc-metおよびVEGFR2の二重阻害剤である(Esai)); MK-2461(Merck; N-(2R)-1,4-ジオキサソ-2-イルメチル)-N-メチル-N'-[3-(1-メチル-1H-ピラゾール-4-イル)-5-オキソ-5H-ベンゾ[4,5]シクロヘプタ[1,2-b]ピリジン-7-イル]スルファミド; CAS番号917879-39-1); MK8066(Merck)、PF4217903(Pfizer)、AMG208(Amgen)、SGX-126、RP1040、LY2801653、AMG458、EMD637830、BAY-853474、DP-3590のいずれか1つである。特定の実施形態においては、c-metアンタゴニストは、クリゾチニブ、チバンチニブ、カボザンチニブ、MGC D-265、フィクラツズマブ、ヒト化TAK-701、リロツムマブ、フォレチニブ、h224G11、DN-30、MK-2461、E7050、MK-8033、PF-4217903、AMG208、JNJ-38877605、EMD1204831、INC-280、LY-2801653、SGX-126、RP1040、LY2801653、BAY-853474、および/またはLA480のいずれか1つまたは複数である。特定の実施形態においては、c-metアンタゴニストは、クリゾチニブ、チバンチニブ、カボザンチニブ、MGC D-265、フィクラツズマブ、ヒト化TAK-701、リロツムマブ、および/またはフォレチニブのいずれか1つまたは複数である。いくつかの実施形態においては、c-metアンタゴニストは、GDC-0712である。

【0151】

B-rafアンタゴニストは、当業界で公知であり、例えば、ソラフェニブ、PLX4720、PLX-3603、GSK2118436、GDC-0879、N-(3-(5-(4-クロロフェニル)-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-カルボニル)-2,4-ジフルオロフェニル)プロパン-1-スルホンアミド、ならびにWO2007/002325、WO2007/002433、WO2009111278、WO2009111279、WO2009111277、WO2009111280および米国特許第7,491,829号に記載のものが挙げられる。他のB-rafアンタゴニストとしては、ベムラフェニブ(Zelobraf(登録商標)およびPLX-4032としても知られる)、GSK2118436、RAF265(Novartis)、XL281、ARQ736、BAY73-4506が挙げられる。いくつかの実施形態においては、B-rafアンタゴニストは、選択的B-rafアンタゴニストである。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

においては、B - r a f アントゴニストは、B - r a f V 6 0 0 の選択的アントゴニストである。いくつかの実施形態においては、B - r a f アントゴニストは、B - r a f V 6 0 0 E の選択的アントゴニストである。いくつかの実施形態においては、B - r a f V 6 0 0 は、B - r a f V 6 0 0 E、B - r a f V 6 0 0 K、および/またはV 6 0 0 Dである。いくつかの実施形態においては、B - r a f V 6 0 0 は、B - r a f V 6 0 0 Rである。

【0152】

B - r a f アントゴニストは、小分子阻害剤であってもよい。小分子阻害剤は、好ましくは、B - r a f に特異的に結合する、本明細書で定義されたポリペプチドまたは抗体以外の有機分子であるのが好ましい。いくつかの実施形態においては、B - r a f アントゴニストは、キナーゼ阻害剤である。いくつかの実施形態においては、B - r a f アントゴニストは、抗体、ペプチド、ペプチド模倣体、アプタマーまたはポリヌクレオチドである。

10

【0153】

一実施形態においては、抗体、例えば、本明細書に記載の方法において用いられる抗体は、以下のセクション1~6に記載のような特徴のいずれかを単独で、または組み合わせて含んでもよい。

【0154】

1. 抗体断片

特定の実施形態においては、本明細書に提供される抗体は抗体断片である。抗体断片には、F a b、F a b'、F a b' - S H、F (a b')₂、F vおよびs c F v断片、1アーム抗体ならびに下に記載される他の断片が含まれるが、これらに限定されない。ある種の抗体断片の概説については、Hudsonら、Nat. Med. 9: 129~134 (2003)を参照されたい。s c F v断片の概説については、例えば、Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、第113巻、RosenburgおよびMoore編、(Springer-Verlag、New York)、269~315ページ(1994)を参照されたい。WO93/16185;ならびに米国特許第5,571,894号および米国特許第5,587,458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含みin vivo半減期が増大しているF a bおよびF (a b')₂断片の考察については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。

20

30

【0155】

ダイアポディは、二価または二重特異性のこともある2つの抗原結合部位のある抗体断片である。例えば、EP404,097;WO1993/01161;Hudsonら、Nat. Med. 9: 129~134 (2003);およびHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444~6448 (1993)を参照されたい。トリアポディおよびテトラポディもHudsonら、Nat. Med. 9: 129~134 (2003)に記載されている。

【0156】

単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全てもしくは一部または軽鎖可変ドメインの全てもしくは一部を含む抗体断片である。特定の実施形態においては、単一ドメイン抗体はヒト単一ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA;例えば、米国特許第6,248,516号B1を参照)。

40

【0157】

1アーム抗体(すなわち、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインが単一の抗原結合アームを形成する)は、例えば、WO2005/063816;Martensら、Clin Cancer Res (2006)、12: 6144頁に開示されている。アントゴニスト機能を必要とする病理学的状態の処置のために、および抗体の二価性が望ましくないアゴニスト効果をもたらす場合、1アーム抗体(すなわち、単一の抗原結合アームを含む抗体)の一価形質は、標的分子への抗体の結合の際にアントゴニスト機能をもたらす、お

50

よび/または確保する。さらに、Fc領域を含む1アーム抗体は、類似する/実質的に同一の抗原結合特性を有するFab形態と比較して優れた薬物動態属性(増強された半減期および/または減少したin vivoでのクリアランス速度)を特徴とし、かくして、従来の一価Fab抗体の使用における主な欠点を克服する。1アーム抗体を作製するための技術としては、限定されるものではないが、「ノブインホール(knob-in-hole)」工学が挙げられる(例えば、米国特許第5,731,168号を参照されたい)。MetMAbは、1アーム抗体の例である。

【0158】

抗体断片は、本明細書に記載されているように、無傷の抗体のタンパク質消化および組換え宿主細胞(例えば、大腸菌(E. coli)またはファージ)による産生を含むがこれらに限定されない種々の技法により作製することができる。

10

【0159】

2. キメラおよびヒト化抗体

特定の実施形態においては、本明細書に提供される抗体はキメラ抗体である。ある種のキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号およびMorrissonら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81:6851~6855(1984)に記載されている。一例では、キメラ抗体は非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルなどの非ヒト霊長類由来の可変領域)およびヒト定常領域を含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のクラスまたはサブクラスから変えられている「クラス転換された」抗体である。キメラ抗体にはその抗原結合断片が含まれる。

20

【0160】

特定の実施形態においては、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、ヒトへの免疫原性を抑えるために親非ヒト抗体の特異性および親和性を保持したままヒト化される。一般的には、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR(またはその部分)が非ヒト抗体由来でFR(またはその部分)がヒト抗体配列由来である1つまたは複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、場合によって、ヒト定常領域の少なくとも一部も含むことになる。いくつかの実施形態においては、ヒト化抗体中の一部のFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を回復または改善するために非ヒト抗体(例えば、HVR残基が由来する抗体)由来の対応する残基で置換される。

30

【0161】

ヒト化抗体およびそれを作製する方法は、例えば、AlmagroおよびFransson、Front. Biosci. 13:1619~1633(2008)で概説されており、例えば、Riechmannら、Nature 332:323~329(1988); Queenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029~10033(1989); 米国特許第5,821,337号、米国特許第7,527,791号、米国特許第6,982,321号、および米国特許第7,087,409号; Kashmiriら、Methods 36:25~34(2005)(SDR(a-CDR)移植法を記載している); Padlan、Mol. Immunol. 28:489~498(1991)(「リサーフェイシング」を記載している); Dall'Acquaら、Methods 36:43~60(2005)(「FRシャフリング」を記載している); ならびにOsbourneら、Methods 36:61~68(2005)およびKlimkaら、Br. J. Cancer、83:252~260(2000)(FRシャフリングへの「誘導選択」アプローチを記載している)にさらに記載されている。

40

【0162】

ヒト化のために使用され得るヒトフレームワーク領域には、「ベストフィット」法を使用して選択されるフレームワーク領域(Simsら、J. Immunol. 151:2296(1993)); 軽鎖または重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列由来のフレームワーク領域(Carterら、Proc. Natl. Acad

50

. Sci. USA、89:4285(1992); および Prestara、J. Immunol.、151:2623(1993); ヒト成熟(体細胞的に変異した)フレームワーク領域またはヒト生殖系列フレームワーク領域(AlmagroおよびFransson、Front. Biosci. 13:1619~1633(2008)); およびFRライブラリーをスクリーニングすることに由来するフレームワーク領域(Bacara、J. Biol. Chem. 272:10678~10684(1997)およびRosokら、J. Biol. Chem. 271:22611~22618(1996))が含まれるが、これらに限定されない。

【0163】

3. ヒト抗体

特定の実施形態においては、本明細書に提供される抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は当技術分野で公知の種々の技法を使用して産生することができる。ヒト抗体は一般的には、van Dijkおよびvan de Winkel、Curr. Opin. Pharmacol. 5:368~74(2001)ならびにLonberg、Curr. Opin. Immunol. 20:450~459(2008)に記載されている。

【0164】

ヒト抗体は、抗原投与に応答してヒト可変領域を有する無傷のヒト抗体または無傷の抗体を産生するように改変されているトランスジェニック動物に免疫原を投与することにより調製し得る。そのような動物は典型的には、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有しており、その遺伝子座は内在性免疫グロブリン遺伝子座に取って代わる、または染色体外に存在するもしくは動物の染色体中に無作為に取り込まれる。そのようなトランスジェニックマウスでは、内在性免疫グロブリン遺伝子座は一般的には不活化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg、Nat. Biotech. 23:1117~1125(2005)を参照されたい。例えば、XENOMOUSE™(商標)技術を記載している米国特許第6,075,181号および米国特許第6,150,584号; HUMAB(登録商標)技術を記載している米国特許第5,770,429号; K-M MOUSE(登録商標)技術を記載している米国特許第7,041,870号およびVELOCI MOUSE(登録商標)技術を記載している米国特許出願公開第2007/0061900号も参照されたい。そのような動物により産生される無傷の抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによりさらに改変し得る。

【0165】

ヒト抗体はハイブリドーマベースの方法によっても作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髄腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髄腫細胞系は記載されている。(例えば、Kozbor J. Immunol.、133:3001(1984); Brodeurら、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、51~63ページ(Marcel Dekker, Inc.、New York、1987); およびBoernerら、J. Immunol.、147:86(1991)を参照されたい)。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して産生されるヒト抗体も、Liら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、103:3557~3562(2006)に記載されている。追加の方法には、例えば、米国特許第7,189,826号(ハイブリドーマ細胞系からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載している)およびNi、Xianda Mi Manyixue、26(4):265~268(2006)(ヒト-ヒトハイブリドーマを記載している)に記載されている方法が含まれる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオマ(Trioma)技術)も、VollmersおよびBrandlein、Histology and Histopathology、20(3):927~937(2005)ならびにVollmersおよびBrandlein、Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology、27(3):185~91(2005)に記載されてい

10

20

30

40

50

る。

【0166】

ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリーから選択されるFvクローン可変ドメイン配列を単離することによっても産生し得る。次に、そのような可変ドメイン配列は所望のヒト定常ドメインと組み合わせ得る。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択する技法は下に記載されている。

【0167】

4. ライブラリー由来抗体

本発明の抗体は、1種または複数の所望の活性を有する抗体を求めてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより単離し得る。例えば、ファージディスプレイライブラリーを作製し所望の結合特徴を有する抗体を求めてそのようなライブラリーをスクリーニングするための種々の方法は当技術分野では公知である。そのような方法は、Hoogenboomら、Methods in Molecular Biology 178:1~37 (O'Brienら編、Human Press、Totowa、NJ、2001)で概説されており、例えば、McCaffertyら、Nature 348:552~554; Clacksonら、Nature 352:624~628 (1991); Marksら、J. Mol. Biol. 222:581~597 (1992); MarksおよびBradbury、Methods in Molecular Biology 248:161~175 (Lo編 Human Press、Totowa、NJ、2003); Sidhuら、J. Mol. Biol. 338(2):299~310 (2004); Leeら、J. Mol. Biol. 340(5):1073~1093 (2004); Fellouse、Proc. Natl. Acad. Sci. US A 101(34):12467~12472 (2004); ならびにLeeら、J. Immunol. Methods 284(1-2):119~132 (2004)にさらに記載されている。

【0168】

ある種のファージディスプレイ法では、Winterら、Ann. Rev. Immunol.、12:433~455 (1994)に記載されているように、VHおよびVL遺伝子のレパートリーはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により別々にクローニングされ、ファージライブラリーにおいて無作為に組み換えられ、これは次に抗原結合ファージを求めてスクリーニングすることができる。ファージは典型的には、一本鎖Fv(scFv)断片としてまたはFab断片としてのいずれかで抗体断片を提示する。免疫源由来のライブラリーは、ハイブリドーマの構築を要することなく免疫原に対して高親和性の抗体を提供する。代わりに、Griffithsら、EMBO J、12:725~734 (1993)により記載されているように、未処置のレパートリーをクローニングして(例えば、ヒトから)いかなる免疫化もせずに広範な非自己抗原および自己抗原にも単一源の抗体を提供することができる。最後に、HoogenboomおよびWinter、J. Mol. Biol.、227:381~388 (1992)により記載されているように、幹細胞から再配列されていないV-遺伝子セグメントをクローニングし、高度に可変性のCDR3領域をコードし、in vitroで再配列を実現するランダム配列を含有するPCRプライマーを使用することにより、未処置のライブラリーを合成的に作製することもできる。ヒト抗体ファージライブラリーを記載する特許公報には、例えば、米国特許第5,750,373号、ならびに米国特許出願公開第2005/0079574号、米国特許出願公開第2005/0119455号、米国特許出願公開第2005/0266000号、米国特許出願公開第2007/0117126号、米国特許出願公開第2007/0160598号、米国特許出願公開第2007/0237764号、米国特許出願公開第2007/0292936号、および米国特許出願公開第2009/0002360号が含まれる。

【0169】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体または抗体断片は、本明細書ではヒト抗体ま

たはヒト抗体断片と見なされる。

【0170】

5. 多特異的抗体

特定の実施形態においては、本明細書に提供される抗体は多特異的抗体、例えば、二重特異的抗体である。多特異的抗体は、少なくとも2つの異なる部位に対する結合特異性を有するモノクローナル抗体である。特定の実施形態においては、結合特異性の1つはc - m e t に対してであり、もう1つは他の任意の抗原（例えば、B - r a f ）に対してである。特定の実施形態においては、二重特異的抗体はc - m e t の2つの異なるエピトープに結合し得る。二重特異的抗体を使用して、細胞傷害性薬剤をc - m e t を発現する細胞に局在化させてもよい。二重特異的抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製することができる。

10

【0171】

多特異的抗体を作製するための技法には、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の組換え同時発現（M i l s t e i n およびC u e l l o、N a t u r e 305 : 537 (1983)、W O 93 / 08829 およびT r a u n e c k e r ら、E M B O J . 10 : 3655 (1991) 参照）、および「ノブインホール」工学（例えば、米国特許第5,731,168号参照）が含まれるが、これらに限定されない。抗体Fcヘテロダイマー分子を作製するために静電的ステアリング効果を操作する（W O 2009 / 089004A1）；2つまたはそれよりも多い抗体または断片を架橋する（例えば、米国特許第4,676,980号およびB r e n n a n ら、S c i e n c e、229 : 81 (1985) 参照）；ロイシンジッパーを使用して二重特異的抗体を産生する（例えば、K o s t e l n y ら、J . I m m u n o l .、148 (5) : 1547 ~ 1553 (1992) 参照）；二重特異的抗体断片を作製するために「ダイアボディ」技術を使用する（例えば、H o l l i n g e r ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、90 : 6444 ~ 6448 (1993) 参照）；および一本鎖Fv (s Fv) ダイマーを使用する（例えば、G r u b e r ら、J . I m m u n o l .、152 : 5368 (1994) 参照）；ならびにT u t t ら、J . I m m u n o l . 147 : 60 (1991) に記載されている三重特異的抗体を調製することにより、多特異的抗体を作製してもよい。

20

【0172】

「オクタパス抗体」を含む、3つまたはそれよりも多い機能的抗原結合部位を有する操作された抗体も本明細書に含まれる（例えば、U S 2006 / 0025576A1 参照）。

30

【0173】

本明細書の抗体または断片には、c - m e t およびE G F R などの別の異なる抗原に結合する抗原結合部位を含む「二重作用F A b」または「D A F」も含まれる（例えば、U S 2008 / 0069820 参照）。

【0174】

6. 抗体バリエーション

特定の実施形態においては、本明細書で提供される抗体のアミノ酸配列変異体が想定される。例えば、抗体の結合親和性および/または他の生物学的特性を改善することが望ましい。抗体のアミノ酸配列変異体を、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な改変を導入することによるか、またはペプチド合成により調製することができる。そのような改変としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および/またはその中への挿入および/またはその置換が挙げられる。最終構築物が所望の特性、例えば、抗原結合を有するという条件で、欠失、挿入、および置換の任意の組合せを作製して、最終構築物を達成することができる。

40

【0175】

特定の実施形態においては、1つまたは複数のアミノ酸置換を有する抗体バリエーションが提供される。置換的突然変異誘発のための対象部位としては、H V R およびF R が挙げら

50

れる。アミノ酸置換を対象の抗体中に導入し、その産物を所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の低下、またはA D C CもしくはC D Cの改善についてスクリーニングすることができる。

【0176】

1つの型の置換変異体は、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の1つまたは複数の超可変領域残基を置換することを含む。一般に、さらなる試験のために選択される（1つまたは複数の）得られる変異体は、親抗体と比較して特定の生物学的特性（例えば、親和性の増加、免疫原性の減少）における改変（例えば、改善）を有する、および/または親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持しているであろう。例示的な置換変異体は、例えば、本明細書に記載のものなどのファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を用いて都合良く生成することができる親和性成熟抗体である。簡単に述べると、1つまたは複数のH V R残基を突然変異させ、バリエーション抗体をファージ上に展示させ、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングする。

10

【0177】

アミノ酸配列挿入物としては、1残基から、100個以上の残基を含有するポリペプチドまでの長さの範囲のアミノおよび/またはカルボキシル末端融合物、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入物が挙げられる。末端挿入物の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体としては、抗体のNもしくはC末端と酵素（例えば、A D E P Tのため）との融合物または抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドが挙げられる。

20

【0178】

特定の実施形態においては、本明細書に提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加するまたは減少するように変化させる。抗体へのグリコシル化部位の付加または削除は、1つまたは複数のグリコシル化部位が作り出されるまたは取り除かれるようにアミノ酸配列を変化させることにより都合よく実現し得る。

【0179】

抗体がF c領域を含む場合、それに結合している炭水化物を変化させ得る。哺乳動物細胞により産生された未処置の抗体は典型的には、一般的にはF c領域のC H 2ドメインのA s n 2 9 7へのN連結により結合している分岐した二分岐オリゴ糖を含む。例えば、W r i g h tら、T I B T E C H 1 5 : 2 6 ~ 3 2 (1 9 9 7)を参照されたい。オリゴ糖は種々の炭水化物、例えば、マンノース、N - アセチルグルコサミン (G l c N A c)、ガラクトース、およびシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造体の「幹」においてG l c N A cに結合しているフコースを含むことがある。いくつかの実施形態においては、本発明の抗体におけるオリゴ糖の改変は、ある種の改善された特性を有する抗体バリエーションを生み出すためになされ得る。

30

【0180】

一実施形態においては、F c領域に結合している（直接的にまたは間接的に）フコースを欠く炭水化物構造体を有する抗体バリエーションが提供される。例えば、そのような抗体中のフコースの量は、1% ~ 80%、1% ~ 65%、5% ~ 65%または20% ~ 40%まででもよい。フコースの量は、例えば、W O 2 0 0 8 / 0 7 7 5 4 6に記載されているように、M A L D I - T O F質量分析により測定された場合、A s n 2 9 7に結合している全てのグリコ構造体（例えば、複合体、ハイブリッドおよび高マンノース構造体）の合計と比べたA s n 2 9 7での糖鎖内のフコースの平均量を計算することにより決定される。A s n 2 9 7とは、F c領域のおおよそ297位（F c残基のE u番号付け）に位置しているアスパラギン残基のことであるが、A s n 2 9 7は、抗体中の小さな配列変動のせい、297位から約±3アミノ酸上流または下流、すなわち、294位 ~ 300位までの間に位置していることもある。そのようなフコシル化バリエーションは改善されたA D C C機能を有することがある。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号（P r e s t a , L . ）；米国特許出願公開第2004/0093621号（K y o w a H a k k o K o g y o C o . , L t d ）を参照されたい。「デフコシル化（d e f u c o

40

50

sylated)」または「フコース欠損」抗体バリエーションに関する出版物の例には、US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazakiら、J. Mol. Biol. 336:1239~1249 (2004); Yamane-Ohnukiら、Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)が含まれる。デフコシル化抗体を産生することができる細胞系の例には、タンパク質フコシル化を欠損する Lec13 CHO細胞 (Ripkaら、Arch. Biochem. Biophys. 249:533~545 (1986)); 米国特許出願公開第2003/0157108A1、Presta, L; およびWO 2004/056312A1、Adamsら、特に実施例11); およびアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞などのノックアウト細胞系 (例えば、Yamane-Ohnukiら、Biotech. Bioeng. 87:614ページ (2004); Kanda, Y.ら、Biotechnol. Bioeng.、94(4):680~688 (2006)); およびWO 2003/085107)が含まれる。

10

【0181】

二分されたオリゴ糖を有する、すなわち、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcにより二分されている抗体バリエーションがさらに提供される。そのような抗体バリエーションは減少したフコシル化および/または改善されたADCC機能を有し得る。そのような抗体バリエーションの例は、例えば、WO 2003/011878 (Jean-Mairetら); 米国特許第6,602,684号 (Umanaら); およびUS 2005/0123546 (Umanaら)に記載されている。Fc領域に結合しているオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体バリエーションも提供される。そのような抗体バリエーションは改善されたCDC機能を有し得る。そのような抗体バリエーションは、例えば、WO 1997/30087 (Patelら); WO 1998/58964 (Raju, S.); およびWO 1999/22764 (Raju, S.)に記載されている。

20

【0182】

特定の実施形態においては、1つまたは複数のアミノ酸改変を本明細書に提供される抗体のFc領域に導入し、それによりFc領域バリエーションを産生し得る。前記Fc領域バリエーションは、1つまたは複数のアミノ酸位にアミノ酸改変 (例えば、置換)を含むヒトFc領域配列 (例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4Fc領域)を含み得る。

30

【0183】

特定の実施形態においては、本発明は、いくつかのしかし全てではないエフェクター機能を有する抗体バリエーションであって、そのエフェクター機能のおかげで、in vivoでの抗体の半減期は重要であるがある種のエフェクター機能 (例えば、補体およびADCC)は必要ではないまたは有害である適用のための望ましい候補になる抗体バリエーションを想定している。

40

【0184】

エフェクター機能が減少した抗体には、Fc領域残基238、265、269、270、297、327および329のうちの1つまたは複数の置換がある抗体が含まれる (米国特許第6,737,056号)。そのようなFc変異体には、残基265および297のアラニンへの置換があるいわゆる「DANA」Fc変異体を含む、アミノ酸265位、269位、270位、297位および327位のうちの2つまたはそれよりも多い位での置換のあるFc変異体が含まれる (米国特許第7,332,581号)。

【0185】

FcRsへの結合が改善されているまたは減少しているある種の抗体バリエーションは記載

50

されている（例えば、米国特許第6,737,056号；WO2004/056312、および Shieldsら、J. Biol. Chem. 9(2):6591~6604(2001)参照）。

【0186】

特定の実施形態においては、抗体バリエーションはADCCを改善する1つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298位、333位、および/または334位での置換のあるFc領域を含む（残基のEU番号付け）。

【0187】

いくつかの実施形態においては、例えば、米国特許第6,194,551号、WO99/51642、および Idusogieら、J. Immunol. 164:4178~4184(2000)に記載されているように、変化した（すなわち、改善されたまたは減少した）C1q結合および/または補体依存性細胞傷害(CDC)をもたらす変化がFc領域においてなされる。

【0188】

半減期が増加し、母性IgGの胎児への移行の原因となる（Guyerら、J. Immunol. 117:587(1976)およびKimら、J. Immunol. 24:249(1994)）新生児Fc受容体(FcRn)への結合が改善された抗体はUS2005/0014934A1(Hintonら)に記載されている。それらの抗体は、Fc領域のFcRnへの結合を改善する1つまたは複数の置換がその中にあるFc領域を含む。そのようなFcバリエーションには、Fc領域残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424または434のうちの1つまたは複数に置換、例えば、Fc領域残基434の置換のあるFcバリエーションが含まれる（米国特許第7,371,826号）。

【0189】

Fc領域バリエーションの他の例に関しては、Duncan & Winter、Nature 322:738~40(1988)；米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821号；およびWO94/29351も参照されたい。

【0190】

特定の実施形態においては、抗体の1つまたは複数の残基がシステイン残基で置換されているシステイン操作抗体、例えば、「チオMAb」を作り出すのが望ましいことがある。特定の実施形態においては、置換される残基は抗体の接触可能部位に存在する。さらに本明細書で説明されるように、それらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基はそれにより抗体の接触可能部位に置かれ、この基を使用して抗体を、薬物部分またはリンカー薬物部分などの他の部分にコンジュゲートさせて、免疫コンジュゲートを作り出し得る。特定の実施形態においては、以下の残基：軽鎖のV205(Kabat番号付け)；重鎖のA118(EU番号付け)；および重鎖Fc領域のS400(EU番号付け)のうちの任意の1つまたは複数にシステインで置換し得る。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載される通りに産生し得る。

【0191】

特定の実施形態においては、本明細書で提供される抗体は、当業界で公知であり、容易に利用可能であるさらなる非タンパク質性部分を含有するようにさらに改変することができる。抗体の誘導体化にとって好適な部分としては、限定されるものではないが、水溶性ポリマーが挙げられる。水溶性ポリマーの非限定例としては、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーもしくはランダムコポリマー)、およびデキストランまたはポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレン(propylpropy

10

20

30

40

50

lene) オキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、およびその混合物が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため製造における利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量のものであってよく、分枝しているか、または分枝していなくてもよい。抗体に結合されるポリマーの数は、変化してもよく、2つ以上のポリマーが結合される場合、それらは同じか、または異なる分子であってもよい。一般に、誘導体化のために用いられるポリマーの数および/または型を、限定されるものではないが、改善しようとする抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体を規定の条件下での療法において用いることができるかどうかなどの考慮に基づいて決定することができる。

【0192】

別の実施形態においては、放射線への曝露により選択的に加熱することができる抗体および非タンパク質性部分のコンジュゲートが提供される。一実施形態においては、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである(Kamra, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600~11605頁(2005))。放射線は、任意の波長のものであってよく、限定されるものではないが、通常の細胞を害しないが、非タンパク質性部分を、抗体-非タンパク質性部分に近い細胞が殺傷される温度まで加熱する波長が挙げられる。

【0193】

一実施形態においては、薬剤は、化学療法剤または薬、増殖阻害剤、毒素(例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはその断片)、または放射性同位体などの、1つまたは複数の細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされた抗体(c-met抗体など)を含む免疫コンジュゲートである。

【0194】

一実施形態においては、免疫コンジュゲートは、マイタンシノイド(米国特許第5,208,020号、米国特許第5,416,064号および欧州特許EP0425235B1参照);モノメチルオーリスチン薬物部分DEおよびDF(MMAEおよびMMAF)などのオーリスチン(米国特許第5,635,483号および米国特許第5,780,588号および米国特許第7,498,298号参照);ドラスタチン;カリチアマイシンもしくはその誘導体(米国特許第5,712,374号、米国特許第5,714,586号、米国特許第5,739,116号、米国特許第5,767,285号、米国特許第5,770,701号、米国特許第5,770,710号、米国特許第5,773,001号、および米国特許第5,877,296号;Hinmanら、Cancer Res. 53:3336~3342(1993);およびLodeら、Cancer Res. 58:2925~2928(1998)参照);ダウノマイシンもしくはドキソルピシンなどのアントラサイクリン(Kratzら、Current Med. Chem. 13:477~523(2006);Jeffreyら、Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358~362(2006);Torgovら、Bioconj. Chem. 16:717~721(2005);Nagyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829~834(2000);Dubowchikら、Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529~1532(2002);Kingら、J. Med. Chem. 45:4336~4343(2002);および米国特許第6,630,579号参照);メトトレキサート;ビンデシン;ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、およびオルタタキセルなどのタキサン;トリコテシン;ならびにCC1065を含むがこれらに限定されない1つまたは複数の薬物に抗体がコンジュゲートされている抗体-薬物コンジュゲート(ADC)である。

【0195】

別の実施形態においては、免疫コンジュゲートは、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖(緑膿菌(Pseudomonas aeruginosa)由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファサルシン、シナアブラギ

10

20

30

40

50

リ (Aleurites fordii) タンパク質、ジアンチン (dianthin) タンパク質、ヨウシュヤマゴボウ (Phytolacca americana) タンパク質 (PAPI、PAPII、および PAP-S)、ニガウリ (momordica charantia) 阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ (sapaonarria officinalis) 阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン (mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン (phenomycin)、エノマイシン (enomycin)、およびトリコセセン (tricothecenes) を含むがこれらの限定されない酵素的に活性な毒素またはその断片にコンジュゲートされた本明細書に記載される抗体を含む。

【0196】

別の実施形態においては、免疫コンジュゲートは、放射性原子にコンジュゲートされて放射性コンジュゲートを形成する本明細書に記載される抗体を含む。放射性コンジュゲートの産生には種々の放射性同位元素が利用可能である。例には、At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹² および Lu の放射性同位体が含まれる。放射性コンジュゲートが検出に使用される場合、シンチグラフィ-研究用の放射性原子、例えば、tc99m もしくは I123、または再びヨウ素 123、ヨウ素 131、インジウム 111、フッ素 19、炭素 13、窒素 15、酸素 17、ガドリニウム、マンガンまたは鉄などの核磁気共鳴 (NMR) 画像法 (磁気共鳴画像法、mri としても知られる) 用のスピン標識を含むことがある。

【0197】

抗体と細胞傷害性薬剤のコンジュゲートは、N-サクシニミジル-3-(2-ピリジリジチオ)プロピオン酸 (SPDP)、サクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩 (SMCC)、イミノチオラン (IT)、イミドエステルの二機能性誘導体 (例えば、アジブイミド酸ジメチル HCl)、活性エステル (例えば、スベリン酸ジサクシニミジル)、アルデヒド (例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物 (例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビスジアゾニウム誘導体 (例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアン酸 (例えば、トルエン 2,6-ジイソシアン酸)、およびビス活性フッ素化合物 (例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン) などの種々の二機能的タンパク質カップリング剤を使用して作製し得る。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら、Science 238:1098 (1987) に記載される通りに調製することができる。炭素 14 標識 1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 (MX-DTPA) は、放射性ヌクレオチドを抗体にコンジュゲートするための例となるキレート剤である。WO94/11026 を参照されたい。前記リンカーは、細胞中での細胞傷害性薬の放出を促進する「切断可能リンカー」であり得る。例えば、酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、感光性リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー (Charira, Cancer Res. 52:127~131 (1992); 米国特許第 5,208,020 号) を使用してもよい。

【0198】

本明細書の免疫コンジュゲートまたは ADC は、市販されている BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIA B、スルホ-SMCC、およびスルホ-SMPB、ならびに SVSB (サクシニミジル-(4-ビニルスルホン)安息香酸) (例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A から) を含むがこれらの限定されない架橋剤試薬で調製されたそのようなコンジュゲートを明確に想定しているが、これらに限定されない。

【0199】

化学療法剤

本発明の組合せ療法は、1つまたは複数の化学療法剤を用いる処置をさらに含んでもよ

10

20

30

40

50

い。組合せ投与は、別々の製剤または単一の医薬製剤を用いる、同時投与または併用投与、およびいずれかの順序での連続的投与を含み、両方（または全部）の活性薬剤がその生物活性を同時に発揮する期間が存在するのが好ましい。投与される場合、化学療法剤は通常、それについて公知である用量、または場合により、薬剤の組合せ作用もしくは化学療法剤の投与に起因する負の副作用のため低下させた用量で投与される。そのような化学療法剤の調製および投与スケジュールは、製造業者の指示書に従って、または当業者により経験的に決定された通りに使用することができる。

【0200】

組み合わせることができる様々な化学療法剤が上記に開示されている。いくつかの実施形態においては、組み合わせられる化学療法剤は、タキソイド（ドセタキセルおよびパクリタキセルなど）、ピンカ（ピノレルピンもしくはピンプラスチンなど）、白金化合物（カルボプラチンもしくはシスプラチンなど）、アロマターゼ阻害剤（レトロゾール、アナストラゾール、もしくはエキセメスタンなど）、抗エストロゲン剤（例えば、フルベストラントもしくはタモキシフェン）、エトポシド、チオテパ、シクロホスファミド、メトトレキサート、リポソームドキシソルピシン、ペグ化リポソームドキシソルピシン、カペシタビン、ゲムシタビン、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブ）、またはプロテオソーム阻害剤（例えば、PS342）からなる群から選択される。いくつかの実施形態においては、化学療法剤は、テモゾロミドおよび/またはダカルバジンである。

10

【0201】

III. 組合せ療法

20

一態様において、有効（例えば、治療上有効）量のB-r a fアンタゴニストおよびc-m e tアンタゴニストを投与することを含む、癌を有する患者を処置するための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、c-m e tアンタゴニストは、抗c-m e t抗体（例えば、M e t M A b）である。いくつかの実施形態においては、処置は、ベムラフェニブなどのB-r a fアンタゴニストを組み合わせた抗c-m e t抗体（例えば、M e t M A b）を投与することを含む。いくつかの実施形態においては、抗c-m e t抗体は、M e t M A b（オナルツズマブ）である。

【0202】

別の態様において、有効量のB-r a fアンタゴニストおよびc-m e tアンタゴニストを投与することを含む、B-r a fアンタゴニストに対する耐性を生じる可能性が増加した癌患者を処置するための方法が提供される。

30

【0203】

別の態様において、有効量のB-r a fアンタゴニストおよびc-m e tアンタゴニストを癌患者に投与することを含む、B-r a fアンタゴニストに対する感受性を増加させるための方法が提供される。

【0204】

別の態様において、有効量のB-r a fアンタゴニストおよびc-m e tアンタゴニストを癌患者に投与することを含む、B-r a fアンタゴニストに対する感受性を回復させるための方法が提供される。

【0205】

別の態様において、有効量のB-r a fアンタゴニストおよびc-m e tアンタゴニストを癌患者に投与することを含む、B-r a fアンタゴニスト感受性の期間を延長させるための方法が提供される。

40

【0206】

別の態様において、有効量のB-r a fアンタゴニストおよびc-m e tアンタゴニストを投与することを含む、B-r a f耐性癌を有する患者を処置するための方法が提供される。

【0207】

別の態様において、有効量のB-r a fアンタゴニストおよびc-m e tアンタゴニストを投与することを含む、B-r a fアンタゴニストに対する応答を延長させるための方

50

法が提供される。

【0208】

別の態様において、有効量の B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与することを含む、HGF 媒介性 B - r a f 耐性癌の発生を遅延させるか、または防止する方法が提供される。

【0209】

別の態様において、患者の癌が c - m e t バイオマーカを発現するかどうかを決定すること、ならびに患者の癌が c - m e t バイオマーカを発現する場合、B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを投与することを含む、B - r a f バイオマーカ（例えば、B - r a f 突然変異体バイオマーカ）を発現することが示された癌を有する患者を処置するための方法が提供される。

10

【0210】

別の態様において、(i) 患者の癌が c - m e t バイオマーカの発現を生じるかどうかを決定するために b - r a f アンタゴニストで処置される患者をモニタリングすること、ならびに(ii) 患者の癌が c - m e t バイオマーカを発現することが示される場合、B - r a f アンタゴニストに加えて、c - m e t アンタゴニストを含むように患者の処置レジメンを改変することを含む、B - r a f バイオマーカ（例えば、B - r a f 突然変異体バイオマーカ）を発現することが示された癌を有する患者を処置するための方法が提供される。

20

【0211】

別の態様において、(i) 患者の癌が B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じるかどうかを決定するために B - r a f アンタゴニストで処置される患者をモニタリングすること、(ii) 患者の癌が c - m e t バイオマーカを発現するかどうかを決定するために患者を試験すること、および(iii) 患者の癌が c - m e t バイオマーカを発現することが示される場合、B - r a f アンタゴニストに加えて、c - m e t アンタゴニストを含むように患者の処置レジメンを改変することを含む、B - r a f バイオマーカ（例えば、B - r a f 突然変異体バイオマーカ）を発現することが示された癌を有する患者を処置するための方法が提供される。

【0212】

用語「癌」は、限定されるものではないが、前癌性増殖、良性腫瘍、および悪性腫瘍などの、増殖性障害の集合を包含する。良性腫瘍は、出現部位に局在化したままであり、遠隔部位に浸潤、侵襲、または転移する能力を有さない。悪性腫瘍は、それらの周囲の他の組織に侵襲し、これを損傷する。それらはまた、通常は血流を介して、またはリンパ節が位置するリンパ系を介して、出現部位から剥離し、身体他の部分に拡散する（転移する）能力を獲得することがある。原発腫瘍は、それらが生じる組織の型により分類される；転移性腫瘍は、癌細胞が誘導される組織型により分類される。時間と共に、悪性腫瘍の細胞は、より異常になり、正常細胞とは異なって見える。癌細胞の出現におけるこの変化は、腫瘍悪性度と呼ばれ、癌細胞は高分化型（低悪性度）、中分化型、低分化型、または未分化型（高悪性度）であると記載される。高分化型細胞は、全く正常な外見であり、それらが起源とする正常細胞と似ている。未分化型細胞は、細胞の起源を決定することが最早

30

40

【0213】

癌の段階評価システムは、癌が解剖学的にどれくらい遠くに拡散したかを記載するものであり、同様の予後および処置を用いる患者を同じ段階評価群に置くよう試みるものである。生検ならびに特定の画像化試験、例えば、胸部 X 線、マンノグラム、骨スキャン、CT スキャン、および MRI スキャンなどのいくつかの試験を実施して、癌を段階評価するのに助けることができる。また、血液試験および臨床評価を用いて、患者の健康全般を評価し、癌が特定の器官に拡散したかどうかを検出する。

【0214】

癌を段階評価するために、A m e r i c a n J o i n t C o m m i t t e e o n

50

Cancerは、癌、特に固形腫瘍を、TNM分類システムを用いる文字カテゴリーに初めて入れている。癌は、文字T（腫瘍サイズ）、N（触診可能なリンパ節）、および/またはM（転移）を指定される。T1、T2、T3、およびT4は、原発病変のサイズの増加を記載する；N0、N1、N2、N3はリンパ節転移の進行を示す；ならびにM0およびM1は遠隔転移の非存在または存在を反映する。

【0215】

Overall Stage GroupingまたはRoman Numeral Stagingとしても知られる第2の段階評価方法においては、癌は、原発病変のサイズならびにリンパ節拡散および遠隔転移の存在を含む、ステージ0～IVに分割される。このシステムにおいては、症例はRoman NumeralのI～IVにより示される4つのステージにグループ化されるか、または「再発」と分類される。in situでの腺管癌または乳癌についてはin situでの小葉癌などの、いくつかの癌については、ステージ0は「in situ」または「Tis」と呼ばれる。高悪性度アデノーマも、ステージ0として分類することができる。一般に、ステージIの癌は、通常は治癒可能である小さい局在化された癌であるが、ステージIVは通常、手術不可能であるか、または転移癌を表す。ステージIIおよびIIIの癌は通常、局部的に進行し、および/または局部リンパ節の転移を示す。一般に、ステージの数字が大きいくほど、より広範囲の疾患を示し、例えば、腫瘍サイズが大きくなり、ならびに/または近隣のリンパ節および/もしくは原発腫瘍に隣接する器官への癌の拡散が多くなる。これらのステージは、正確に定義されるが、その定義は癌のそれぞれの種類について異なり、当業者には公知である。

10

20

【0216】

NCI's Surveillance, Epidemiology, および End Results Program (SEER)などの多くの癌登録は、段階評価概要を用いる。このシステムは、あらゆる型の癌について用いられる。それは癌症例を5つの主要なカテゴリーにグループ化する。

【0217】

「in situ」は、それが始まった細胞層中にのみ存在する初期癌である。

【0218】

「限局性 (Localized)」は、拡散の証拠がなく、それが始まった器官に限定される癌である。

30

【0219】

「局所性 (Regional)」は、出現 (原発) 部位を超えて近隣のリンパ節または器官および組織に拡散した癌である。

【0220】

「遠隔 (Distant)」は、原発部位から遠隔器官または遠隔リンパ節に拡散した癌である。

【0221】

「不明 (Unknown)」は、ステージを示すための十分な情報がない症例を記載するために用いられる。

【0222】

さらに、原発腫瘍が除去された後、数ヶ月または数年で戻ることが、癌にとって一般的である。全ての眼に見える腫瘍が根絶された後に再発する癌は、再発疾患と呼ばれる。原発腫瘍の領域で再発する疾患は限局性再発であり、転移として再発する疾患は遠隔再発と呼ばれる。

40

【0223】

腫瘍は、固形腫瘍または非固形腫瘍または軟部組織腫瘍であってもよい。軟部組織腫瘍の例としては、白血病 (例えば、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、成人急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、成熟B細胞急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、前リンパ球性白血病、またはヘアリー細胞白血病) またはリンパ腫 (例えば、非ホジキンリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、またはホジキン病) が挙げられる。固形腫瘍と

50

しては、血液、骨髄、またはリンパ系以外の体組織の任意の癌が挙げられる。固形腫瘍は、上皮細胞起源のものと非上皮細胞起源のものにさらに分けることができる。上皮細胞固形腫瘍の例としては、胃腸管、結腸、乳房、前立腺、肺、腎臓、肝臓、膵臓、卵巣、頭部および頸部、口腔、胃、十二指腸、小腸、大腸、肛門、胆嚢、唇、鼻咽頭、皮膚、子宮、男性生殖器、泌尿器、膀胱、および皮膚の腫瘍が挙げられる。非上皮起源の固形腫瘍としては、肉腫、脳腫瘍、および骨腫瘍が挙げられる。いくつかの実施形態においては、癌はメラノーマ（例えば、B - r a f 突然変異体メラノーマ）である。いくつかの実施形態においては、癌は結腸直腸癌である。いくつかの実施形態においては、癌は乳癌（例えば、H e r 2 陽性乳癌）である。いくつかの実施形態においては、癌は甲状腺乳頭癌である。癌の他の例は、定義に提供されている。

10

【0224】

いくつかの実施形態においては、患者の癌はB - r a f バイオマーカを発現することが示されている。いくつかの実施形態においては、B - r a f バイオマーカはB - r a f 突然変異体である。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体は、B - r a f V 6 0 0 である。いくつかの実施形態においては、B - r a f V 6 0 0 は、B - r a f V 6 0 0 E である。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体は、構成的に活性である。

【0225】

いくつかの実施形態においては、患者の癌は、c - m e t バイオマーカを発現することが示されている。c - m e t 活性および発現の検出は、本明細書に記載されている。

20

【0226】

いくつかの実施形態においては、B - r a f 耐性癌とは、癌患者がB - r a f アンタゴニスト療法を受けているが進行した（すなわち、患者が「B - r a f 不応性」である）か、または患者がB - r a f アンタゴニストに基づく療法レジメンを完了した後、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月以上以内に進行したことを意味する。

【0227】

いくつかの実施形態においては、ベムラフェニブ耐性癌とは、癌患者がベムラフェニブに基づく療法を受けているが進行した（すなわち、患者が「ベムラフェニブ不応性」である）か、または患者がB - r a f アンタゴニストに基づく療法レジメンを完了した後、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月、4ヶ月、5ヶ月、6ヶ月、7ヶ月、8ヶ月、9ヶ月、10ヶ月、11ヶ月、12ヶ月以上以内に進行したことを意味する。

30

【0228】

いくつかの実施形態においては、例えば、B - r a f 阻害剤に対する耐性は、B - r a f アンタゴニストを用いる処置後に、または例えば、H G F への曝露後（例えば、H G F 媒介性耐性）に生じる（獲得される）。他の実施形態においては、患者（例えば、B - r a f 耐性癌を有する患者）は、B - r a f アンタゴニストで以前に処置されている。

【0229】

いくつかの実施形態においては、患者は、B - r a f アンタゴニストで現在処置されている。いくつかの実施形態においては、患者は、B - r a f アンタゴニストで以前に処置されていた。いくつかの実施形態においては、患者は、B - r a f アンタゴニストで以前に処置されていなかった。

40

【0230】

一態様において、癌患者はさらなる癌薬剤で処置される。いくつかの実施形態においては、さらなる癌薬剤は、化学療法剤である。いくつかの実施形態においては、さらなる癌薬剤は、Y e r v o y である。いくつかの実施形態においては、さらなる癌薬剤は、癌免疫療法剤である。いくつかの実施形態においては、さらなる癌薬剤は、異なる（さらなる）B - r a f アンタゴニストである。いくつかの実施形態においては、さらなる癌薬剤は、異なる（さらなる）c - m e t アンタゴニストである。

【0231】

50

一態様において、癌細胞に、B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを含有させることにより、前記細胞における B - r a f リン酸化を減少させるための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、細胞は、B - r a f アンタゴニストに対して耐性である（いくつかの実施形態においては、B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じている）。いくつかの実施形態においては、細胞は c - m e t バイオマーカを発現する。

【0232】

一態様において、癌細胞を B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストと接触させることを含む、前記細胞における P I 3 K 媒介性シグナリングを減少させるための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、細胞は、B - r a f アンタゴニストに対して耐性である（いくつかの実施形態においては、B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じている）。いくつかの実施形態においては、細胞は、c - m e t バイオマーカを発現する。

10

【0233】

一態様において、癌細胞に、B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを含有させることにより、前記細胞における P I 3 K 媒介性シグナリングを減少させるための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、細胞は、B - r a f アンタゴニストに対して耐性である（いくつかの実施形態においては、B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じている）。いくつかの実施形態においては、細胞は、c - m e t バイオマーカを発現する。

20

【0234】

一態様において、癌細胞に、B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを含有させることにより、前記細胞における M A P k 媒介性シグナリングを減少させるための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、細胞は、B - r a f アンタゴニストに対して耐性である（いくつかの実施形態においては、B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じている）。いくつかの実施形態においては、細胞は、c - m e t バイオマーカを発現する。

【0235】

一態様において、癌細胞に、B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを含有させることにより、前記細胞における A K T 媒介性シグナリングを減少させるための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、細胞は、B - r a f アンタゴニストに対して耐性である（いくつかの実施形態においては、B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じている）。いくつかの実施形態においては、細胞は、c - m e t バイオマーカを発現する。

30

【0236】

一態様において、癌細胞に、B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを含有させることにより、前記細胞における E R K 媒介性シグナリングを減少させるための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、細胞は、B - r a f アンタゴニストに対して耐性である（いくつかの実施形態においては、B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じている）。いくつかの実施形態においては、細胞は、c - m e t バイオマーカを発現する。

40

【0237】

一態様において、癌細胞に、B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを含有させることにより、前記細胞における B - r a f 媒介性シグナリングを減少させるための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、細胞は、B - r a f アンタゴニストに対して耐性である（いくつかの実施形態においては、B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じている）。いくつかの実施形態においては、細胞は、c - m e t バイオマーカを発現する。

【0238】

一態様において、癌細胞を、B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニス

50

トと接触させることを含む、癌細胞の成長および/もしくは増殖を減少させるか、または癌細胞のアポトーシスを増加させるための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、細胞は、B - r a f アントゴニストに対して耐性である（いくつかの実施形態においては、B - r a f アントゴニストに対する耐性を生じている）。いくつかの実施形態においては、細胞は、c - m e t バイオマーカーを発現する。

【0239】

一態様において、癌細胞を、B - r a f アントゴニストおよびc - m e t アントゴニストと接触させることを含む、癌細胞のアポトーシスを増加させるための方法が提供される。いくつかの実施形態においては、細胞は、B - r a f アントゴニストに対して耐性である（いくつかの実施形態においては、B - r a f アントゴニストに対する耐性を生じている）。いくつかの実施形態においては、細胞は、c - m e t バイオマーカーを発現する。

10

【0240】

本発明において用いられる治療剤を、良好な医療実務と一致する様式で製剤化、投薬、および投与することができる。この文脈での考慮のための因子としては、処置される特定の障害、処置される特定の対象、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、組み合わせられる薬剤の薬物間相互作用、および医師にとって公知の他の因子が挙げられる。

【0241】

治療剤は、所望の純度を有する活性成分を、任意の生理的に許容される担体、賦形剤または安定化剤と混合することにより、当業界で公知の標準的な方法を用いて調製される（Remington's Pharmaceutical Sciences（第20版）、A. Gennaro（編）、2000、Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA）。許容される担体としては、塩水、またはリン酸、クエン酸および他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸などの酸化防止剤；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンもしくはリシンなどのアミノ酸；グルコース、マンノースもしくはデキストリンなどの単糖類、二糖類および他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；マンニトールもしくはソルビトールなどの糖アルコール；ナトリウムなどの塩形成対抗イオン；ならびに/またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、もしくはPEGなどの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

20

30

【0242】

場合により、であるが好ましくは、製剤は、好ましくはほぼ生理学的な濃度の、薬学的に許容される塩、好ましくは、塩化ナトリウムを含有する。場合により、本発明の製剤は、薬学的に許容される保存剤を含有してもよい。いくつかの実施形態においては、保存剤の濃度は、0.1~2.0%、典型的には、v/vである。好適な保存剤としては、製薬業界で公知のものが挙げられる。ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、メチルパラベン、およびプロピルパラベンが好ましい保存剤である。場合により、本発明の製剤は、0.005~0.02%の濃度の薬学的に許容される界面活性剤を含んでもよい。

40

【0243】

また、本明細書に記載の製剤は、処置される特定の適応症にとって必要な1つより多い活性化化合物、好ましくは、互いに有害に作用しない相補的活性を有するものを含んでもよい。そのような分子は、好適には、意図される目的にとって有効である量で一緒に存在する。

【0244】

活性成分を、例えば、液滴形成技術によるか、または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中、コロイド薬剤送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒

50

子およびナノカプセル)中、またはマクロエマルジョン中に捕捉することもできる。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences、上掲に開示されている。

【0245】

本発明の治療剤は、ポラスとして、もしくは一定期間にわたる連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、皮下、関節内、滑膜内、くも膜下、経口、局所、または吸入経路などによる公知の方法に従って、ヒト患者に投与される。治療適用のために *ex vivo* 戦略を用いることもできる。*ex vivo* 戦略は、対象から得られた細胞に、*c-met* または *B-raf* アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドをトランスフェクトまたは形質導入することを含む。次いで、トランスフェクトまたは形質導入された細胞を、対象に戻す。この細胞は、限定されるものではないが、造血細胞(例えば、骨髄細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、T細胞、もしくはB細胞)、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイト、または筋肉細胞などの幅広い範囲の細胞型のいずれかであってよい。

10

【0246】

例えば、*c-met* または *B-raf* アンタゴニストが抗体である場合、抗体は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、および鼻内、ならびに必要に応じて、局部免疫抑制処置のためには、病変内投与などの任意の好適な手段により投与される。非経口注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が挙げられる。さらに、抗体は、特に抗体の用量を減少させながら、パルス注入により好適に投与される。好ましくは、投薬は、投与が簡単であるか、または慢性的であるかに部分的に応じて、注射、最も好ましくは、静脈内または皮下注射により与えられる。

20

【0247】

別の例においては、*c-met* または *B-raf* アンタゴニスト化合物は、局部的に、例えば、障害または腫瘍の位置が許す場合、直接注射により投与され、注射は定期的に繰り返してもよい。*c-met* または *B-raf* アンタゴニストを、対象に全身的に送達するか、または腫瘍細胞、例えば、腫瘍または腫瘍の外科的切除後の腫瘍床に直接送達して、局部再発または転移を防止するか、または減少させることもできる。

【0248】

組合せでの治療剤の投与は、典型的には、規定の期間(通常、選択された組合せに応じて、数分、数時間、数日または数週間)にわたって実行される。組合せ療法は、連続的様式でのこれらの治療剤の投与を包含することが意図される、すなわち、それぞれの治療剤は、異なる時間で投与され、ならびにこれらの治療剤、または少なくとも2つの治療剤の投与は実質的に同時の様式で行われる。

30

【0249】

治療剤を、同じ経路により、または異なる経路により投与することができる。例えば、組合せ中の *B-raf* および/または *c-met* アンタゴニストを、静脈内注射により投与することができるが、組合せ中のタンパク質キナーゼ阻害剤を経口投与することができる。あるいは、例えば、両方の治療剤を、経口投与するか、または両方の治療剤を、特定の治療剤に応じて静脈内注射により投与することができる。治療剤が投与される順序はまた、特定の薬剤に応じて変化する。

40

【0250】

疾患の型および重篤度に応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ (例えば、 $0.1 \sim 30 \text{mg}/\text{kg}$) の各治療剤が、例えば、1回もしくは複数回の個別投与による場合であっても、または連続注入による場合であっても、患者への投与のための初期候補用量である。典型的な日用量は、上記因子に応じて、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ 以上である。状態に応じて、数日以上にわたる反復投与のために、上記の方法により測定された場合に、癌が処置されるまで処置が持続される。しかしながら、他の用量レジメンも有用であり得る。一例においては、*c-met* または *B-raf* アンタゴニストが抗体である場合、本発明の抗体は、約 $5 \text{mg}/\text{kg} \sim 150 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲の用量で、2~3

50

週間毎に投与される。c - m e tまたはB - r a fアンタゴニストが経口の小分子化合物である場合、薬剤を約25mg/kg～約50mg/kgの用量で毎日投与することができる。さらに、本発明の経口化合物を、伝統的な高用量間欠的レジメンを用いて、またはスケジュール化された中断がないより低く、より頻繁な用量を用いて（「メトロノーム療法」と呼ばれる）投与することができる。間欠的レジメンを用いる場合、例えば、薬剤を、日用量および特定の適応症に応じて、2～3週間にわたって毎日、次いで1週間の中断；または4週間にわたって毎日、次いで2週間の中断で与えることができる。本発明の療法の進行は、従来の技術およびアッセイにより容易にモニタリングされる。

【0251】

本出願は、遺伝子療法によるc - m e tおよび/またはB - r a fアンタゴニストの投与を想定する。例えば、細胞内抗体を生成するための遺伝子療法の使用に関する1996年3月14日に公開されたWO96/07321を参照されたい。

【0252】

IV. 診断方法

いくつかの実施形態においては、本明細書に記載の患者は、例えば、療法の前および/または間および/または後に、診断試験にかけられる。

【0253】

一態様において、c - m e tバイオマーカー発現を決定するための方法であって、患者の癌がc - m e tバイオマーカーを発現するかどうかを決定するステップを含み、c - m e tバイオマーカー発現が、患者がB - r a fアンタゴニスト耐性癌を有する可能性があることを示す、方法が提供される。いくつかの実施形態においては、患者の癌は、B - r a fバイオマーカー（B - r a f突然変異体など）を発現することが示されている。いくつかの実施形態においては、c - m e tバイオマーカー発現はタンパク質発現であり、IHCを用いて患者に由来する試料中で決定される。いくつかの実施形態においては、患者はB - r a fアンタゴニストおよびc - m e tアンタゴニストで処置される。

【0254】

一態様において、c - m e tバイオマーカー発現を決定するための方法であって、患者の癌がc - m e tバイオマーカーを発現するかどうかを決定するステップを含み、c - m e tバイオマーカー発現が、患者がB - r a f耐性癌を生じる可能性があることを示す、方法が提供される。いくつかの実施形態においては、患者の癌は、B - r a fバイオマーカー（B - r a f突然変異体など）を発現することが示されている。いくつかの実施形態においては、c - m e tバイオマーカー発現はタンパク質発現であり、IHCを用いて患者に由来する試料中で決定される。いくつかの実施形態においては、患者はB - r a fアンタゴニストおよびc - m e tアンタゴニストで処置される。

【0255】

一態様において、c - m e tバイオマーカー発現を決定するための方法であって、患者の癌がc - m e tバイオマーカーを発現するかどうかを決定するステップを含み、c - m e tバイオマーカー発現が、患者が、B - r a fアンタゴニストに対する患者の癌の感受性を増加させるため、B - r a fアンタゴニストに対する患者の癌の感受性を回復させるため、B - r a fアンタゴニストに対する患者の癌の感受性の期間を延長するため、および/または患者の癌におけるHGF媒介性B - r a f薬剤耐性の発生を防止するための、c - m e tアンタゴニストおよびB - r a fアンタゴニストを用いる処置の候補であることを示す、方法が提供される。いくつかの実施形態においては、患者の癌は、B - r a fバイオマーカー（B - r a f突然変異体など）を発現することが示されている。いくつかの実施形態においては、c - m e tバイオマーカー発現はタンパク質発現であり、IHCを用いて患者に由来する試料中で決定される。いくつかの実施形態においては、患者はB - r a fアンタゴニストおよびc - m e tアンタゴニストで処置される。

【0256】

本発明はまた、B - r a fバイオマーカー（例えば、B - r a f突然変異体バイオマーカー）を発現することが示された癌を有する患者のための療法を選択する方法であって、

10

20

30

40

50

患者に由来する試料中の c - m e t バイオマーカ-の発現を決定すること、およびバイオマーカ-の発現レベルに基づいて癌薬剤を選択することを含む方法に関する。一実施形態においては、癌試料が c - m e t バイオマーカ-を発現する場合、B - r a f アンタゴニストと組み合わせた c - m e t アンタゴニスト（例えば、抗 c - m e t 抗体）を用いる処置のために患者が選択される。いくつかの実施形態においては、患者は、治療上有効量の c - m e t アンタゴニストおよび B - r a f アンタゴニストを用いて癌について処置される。かくして、いくつかの実施形態においては、患者の癌試料が c - m e t バイオマーカ-を発現する場合、c - m e t アンタゴニスト（例えば、抗 c - m e t 抗体）を用いる処置のために患者が選択され、（選択後）、患者は治療上有効量の c - m e t アンタゴニストおよび B - r a f アンタゴニストを用いて癌について処置される。別の実施形態においては、癌試料が実質的に検出不可能なレベルの c - m e t バイオマーカ-を発現する場合、c - m e t アンタゴニスト以外の癌薬剤を用いる処置のために患者が選択される。いくつかの実施形態においては、患者は、治療上有効量の c - m e t アンタゴニスト以外の癌薬剤を用いて癌について処置される（例えば、B - r a f アンタゴニストを用いて処置される）。かくして、いくつかの実施形態においては、癌試料が実質的に検出不可能なレベルで c - m e t バイオマーカ-を発現する場合、c - m e t アンタゴニスト以外の癌薬剤（例えば、B - r a f アンタゴニスト、例えば、ベムラフェニブ）を用いる処置のために患者が選択され、（選択後）、患者は治療上有効量の c - m e t アンタゴニストを用いて癌について処置される。

10

【0257】

20

別の態様において、本発明は、B - r a f アンタゴニストおよび c - m e t アンタゴニストを用いる処置の候補として患者を同定するための方法であって、患者の癌が c - m e t バイオマーカ-を発現すると決定することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態においては、患者は B - r a f アンタゴニストで処置（以前に処置）されている。いくつかの実施形態においては、患者の癌は、前記 B - r a f アンタゴニストに対して耐性である（例えば、耐性を獲得している）。

【0258】

別の態様において、本発明は、B - r a f アンタゴニストに対する耐性を生じる危険性がある患者を同定するための方法であって、患者の癌が c - m e t バイオマーカ-を発現すると決定することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態においては、患者は B - r a f アンタゴニストで処置（以前に処置）されている。いくつかの実施形態においては、患者は、B - r a f アンタゴニストで処置される。

30

【0259】

一態様において、本発明は、メラノーマ患者の予後を決定するための方法であって、患者に由来する試料中の c - m e t バイオマーカ-の発現を決定することを含み、c - m e t バイオマーカ-が H G F であり、H G F の発現が対象における癌の予後である、方法を提供する。いくつかの実施形態においては、H G F 発現の増加は、例えば、患者が B - r a f 阻害剤（例えば、ベムラフェニブ）で処置した場合の無進行生存および/または全生存の減少の予後である。いくつかの実施形態においては、H G F 発現は、例えば、E L I S A を用いて、患者血清中で決定される。いくつかの実施形態においては、患者血清中の H G F 発現は、中央 H G F 発現レベル（集団中での中央 H G F 発現レベルなど）よりも上である。いくつかの実施形態においては、患者血清中の H G F 発現は、例えば、約 330 ng / ml よりも上である。いくつかの実施形態においては、患者血清中の H G F 発現は、約 300 ng / ml、310 ng / ml、320 ng / ml、330 ng / ml、340 ng / ml、350 ng / ml、360 ng / ml、370 ng / ml、380 ng / ml、390 ng / ml、400 ng / ml、420 ng / ml、440 ng / ml、460 ng / ml、480 ng / ml、500 ng / ml 以上よりも上である。いくつかの実施形態においては、有効量の c - m e t アンタゴニストおよび B - r a f アンタゴニストを用いる処置のために患者が選択される。いくつかの実施形態においては、患者は、有効量の c - m e t アンタゴニストおよび B - r a f アンタゴニストで処置される。H G F

40

50

発現は、例えば、IHC（例えば、または腫瘍もしくは腫瘍間質）により検出される。

【0260】

c - m e t 発現、活性化および増幅の検出のための方法は、当業界で公知である。一態様において、c - m e t バイオマーカ-発現は、(a) 抗 c - m e t 抗体を用いる試料（患者癌試料など）のIHC分析を実施すること；および(b) 試料中のc - m e t バイオマーカ-の発現を決定することを含む方法を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、c - m e t IHC染色強度は、参照値と比較して決定される。いくつかの実施形態においては、多量のc - m e t バイオマーカ-（例えば、c - m e t IHCまたは例えば、ELISAもしくはIHCを用いるHGFの検出を用いて決定される）は、患者がB - r a f アントゴニスト耐性癌を有する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態においては、高いc - m e t は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5、およびHEK - 2 9 3のc - m e t 染色強度と比較して決定された低い、中程度の、または高いc - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、高いc - m e t は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびHEK - 2 9 3のc - m e t 染色強度と比較して決定された中程度の、または高いc - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e t は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびHEK - 2 9 3のc - m e t 染色強度と比較して決定された低いか、または全くないc - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c - m e t 発現は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA 5 4 9、H 4 4 1、H 1 1 5 5およびHEK - 2 9 3のc - m e t 染色強度と比較して決定された全くないc - m e t 発現である。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカ-発現は、例えば、本明細書の表Aに開示されるc - m e t 染色強度スコアリングスキームを用いて決定される。いくつかの実施形態においては、方法は、IHCスコアに基づいて患者を階層化することをさらに含む。いくつかの実施形態においては、IHCスコアは、1である。いくつかの実施形態においては、IHCスコアは0であり、c - m e t 発現が患者の癌において観察される。

10

20

30

40

50

【0261】

いくつかの実施形態においては、c - m e t 発現はポリヌクレオチド発現である。いくつかの実施形態においては、ポリヌクレオチドはRNAである。いくつかの実施形態においては、ポリヌクレオチドはDNAである。いくつかの実施形態においては、患者の癌は、2より大きい、3より大きい、4より大きい、5より大きい、6より大きい、7より大きい、8より大きい、またはそれ以上のc - m e t コピー数（例えば、FISH分析による）を発現することが示されている。いくつかの実施形態においては、c - m e t コピー数は、8未満、7未満、6未満、5未満、4未満、3未満である。

【0262】

HGFを本発明の方法に従って検出することができることが想定される。かくして、いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカ-はHGFであり、さらなる実施形態においては、HGF発現は自己分泌発現である。いくつかの実施形態においては、HGF発現は患者の癌において検出される。いくつかの実施形態においては、HGF発現は、患者の腫瘍間質において検出される。いくつかの実施形態においては、HGF発現は、例えば、ELISAを用いて、患者血清中で検出される。

【0263】

一態様において、c - m e t バイオマーカ-発現は、試料（患者の癌試料など）中のc - m e t バイオマーカ-の発現を決定するステップを含み、患者の試料が抗c - m e t 抗体を用いてIHC分析にかけられた試料である、方法を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、c - m e t IHC染色強度は、参照値と比較して決定される。いくつかの実施形態においては、多量のc - m e t バイオマーカ-（例えば、c - m e t IHCまたは例えば、ELISAもしくはIHCを用いるHGFの検出を用いて検出される）は、患者がB - r a f アントゴニスト耐性癌を有する可能性が高いことを示す。いくつかの実施形態においては、高いc - m e t は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレツ

トA549、H441、H1155、およびHEK-293のc-met染色強度と比較して決定された低い、中程度の、または高いc-met発現である。いくつかの実施形態においては、高いc-metは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA549、H441、H1155およびHEK-293のc-met染色強度と比較して決定された中程度の、または高いc-met発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c-metは、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA549、H441、H1155およびHEK-293のc-met染色強度と比較して決定された低いか、または全くないc-met発現である。いくつかの実施形態においては、「低い」c-met発現は、例えば、本明細書に記載の対照細胞ペレットA549、H441、H1155およびHEK-293のc-met染色強度と比較して決定された全くないc-met発現である。いくつかの実施形態においては、c-metバイオマーカー発現は、例えば、本明細書の表Aに開示されるc-met染色強度スコアリングスキームを用いて決定される。

10

20

30

40

50

【0264】

いくつかの実施形態においては、IHC分析は、その前またはその後、形態学的染色をさらに含む。一実施形態においては、ヘマトキシリンは、スライドの細胞核を染色するのに有用である。ヘマトキシリンは広く利用されている。好適なヘマトキシリンの例は、ヘマトキシリンII (Ventana) である。より明るい青色の核が望まれる場合、ヘマトキシリン染色の後に青味剤を用いることができる。IHCを用いるc-metバイオマーカーの検出が本明細書に開示され、c-met染色強度スコアリングスキームが、本明細書、例えば、表Aに開示される。本明細書に記載されるように、他のバイオマーカーを検出することができる。例示的な他のバイオマーカーは、本明細書に開示される。本明細書に開示される本発明のいずれかのいくつかの実施形態においては、高いc-metバイオマーカー発現は、本明細書の表Aに従って定義されたmet診断陽性の臨床状態である。本明細書に開示される本発明のいずれかのいくつかの実施形態においては、低いc-metバイオマーカー発現は、本明細書の表Aに従って定義されたmet診断陰性の臨床状態である。

【0265】

一態様において、c-metバイオマーカー発現は、(a) ウェスタンブロッティング、ELISA、ホスホ-ELISA、ホスホ-met抗体を用いるIHC、抗HGF抗体を用いるIHCのうちの1つまたは複数を実施すること；および(b) 試料中のc-metバイオマーカー(例えば、HGFなど)の発現を決定することを含む方法を用いて決定される。

【0266】

一態様において、c-met活性化は、(a) ホスホ-c-met抗体を用いるIHCまたはホスホ-ELISAのうちの1つまたは複数を実施すること；および(b) 試料中のホスホ-c-metバイオマーカー(例えば、ホスホ-c-met)の存在を決定することを含む方法を用いて決定される。

【0267】

一態様において、c-metバイオマーカー発現は、c-metの下流のシグナリング経路分子の発現または活性化、例えば、AKT(例えば、ホスホ-AKT)の発現または活性化、ERK(例えば、ホスホ-ERK)の発現または活性化を決定するステップを含む方法を用いて決定される。

【0268】

一態様において、c-metバイオマーカー発現は、(a) 試料(患者癌試料など)に対して遺伝子発現プロファイリング、PCR(rtPCRもしくは対立遺伝子特異的PCRなど)、5'ヌクレアーゼアッセイ(例えば、Taq-man)、RNA-seq、マイクロアレイ分析、SAGE、MassARRAY技術、in situハイブリダイゼーション(例えば、c-metおよび/もしくはHGF mRNAに関する)、IHC(例えば、c-metおよび/もしくはHGFポリペプチドに関する)またはFISHを実施すること；および(b) 試料中のc-metバイオマーカーの発現を決定することを含

む方法を用いて決定される。

【0269】

本明細書に記載のように、他のバイオマーカーを検出することができる。例示的な他のバイオマーカーは、本明細書に開示される。いくつかの実施形態においては、ALKバイオマーカーが検出される。いくつかの実施形態においては、FGF、FGFR、PDGF、および/またはPGFRバイオマーカーのうちの1つまたは複数が検出される。

【0270】

B - r a f および B - r a f 突然変異体の検出のための方法は当業界で公知であり、商業的に利用可能である。例えば、Hailatら、Diagn Mol Pathol . 2012年3月; 21(1): 1~8頁を参照されたい。いくつかの実施形態においては、V600E突然変異(V599E(1796T>A)としても知られる)は、エクソン15のコードン600中のヌクレオチド1799位における単一塩基突然変異(T>A)の存在を決定することを含む方法を用いて検出される。この突然変異はまた、ヌクレオチド1799~1800位における2塩基突然変異TG>AAからも生じ得る。2塩基突然変異を、1799位を評価することにより検出することもできる。いくつかの実施形態においては、1800位における置換の存在について核酸を評価することもできる。他の突然変異もコードン600において生じ得る。これらのものとしては、V600K、V600D、およびV600Rが挙げられる。いくつかの実施形態においては、V600E突然変異を検出するプローブは、他のコードン600突然変異、例えば、V600D、V600Kおよび/またはV600Rを検出することもできる。いくつかの実施形態においては、プローブは、コードン601における突然変異を検出することもできる。

10

20

【0271】

1799位における塩基置換の存在について、核酸、例えば、ゲノムDNAまたはmRNAを評価することにより、V600E突然変異の存在を決定することができる。いくつかの実施形態においては、核酸分析方法は、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを用いるハイブリダイゼーション、プライマー伸長、対立遺伝子特異的ライゲーション、配列決定、または電気泳動分離技術、例えば、一本鎖コンフォメーション多型(SSCP)およびヘテロ二本鎖分析のうちの1つまたは複数である。例示的なアッセイとしては、5'ヌクレアーゼアッセイ、対立遺伝子特異的PCR、鋳型特異的ダイターミネーター組込み、分子ビーコン対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドアッセイ、単一塩基伸長アッセイ、およびリアルタイムピロリン酸配列決定を用いる突然変異分析が挙げられる。増幅された配列の分析を、マイクロチップ、蛍光偏光アッセイ、およびマトリックス援用レーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析などの様々な技術を用いて実施することができる。用いることができる2つのさらなる方法は、Flapヌクレアーゼを用いる侵襲的切断に基づくアッセイおよび錠型プローブを用いる方法である。

30

【0272】

いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体は、B - r a f V600E(V600E突然変異(GTG>GAG)を含むB - r a f ポリペプチド)である。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体は、B - r a f V600K(GTG>AAG)、V600R(GTG>AGG)、V600E(GTG>GAA)および/またはV600D(GTG>GAT)のうちの1つまたは複数である。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体は、残基V600での突然変異体である。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体ポリヌクレオチドは、T1799A突然変異を含む。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体ポリヌクレオチドは、エクソン11および/またはエクソン15中に突然変異を含む。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体発現は、(a)試料(患者癌試料など)に対して遺伝子発現プロファイリング、PCR(rtPCRもしくは対立遺伝子特異的PCRなど)、5'ヌクレアーゼアッセイ、IHC、ハイブリダイゼーションアッセイ、RNA-seq、マイクロアレイ分析、SAGE、MassARRAY技術、またはFISHのうちの1つまたは複数を実施すること; および(b)試料中のB - r a f 突然変異体バイオマーカーの発現

40

50

を決定することを含む方法を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体バイオマーカー発現は、(a) 患者癌試料 (F F P E 固定された患者癌試料など) から抽出された核酸に対して P C R を実施すること ; および (b) 試料中の B - r a f 突然変異体バイオマーカーの発現を決定することを含む方法を用いて検出される。

【 0 2 7 3 】

患者に由来する試料は、本明細書に記載の 1 つまたは複数のバイオマーカーの発現について試験される。組織または細胞試料の供給源は、新鮮な、凍結された、および / または保存された器官もしくは組織試料または生検もしくは吸引物に由来する固形組織 ; 血液または任意の血液成分 ; 脳脊髄液、羊水、腹腔液、または間質液などの体液 ; 対象の妊娠または発生中の任意の時点に由来する細胞であってもよい。組織試料は、保存剤、凝固防止剤、バッファー、固定剤、栄養素、抗生物質などの、天然の組織と天然には混ざらない化合物を含んでもよい。本明細書における腫瘍試料の例としては、限定されるものではないが、腫瘍生検、腫瘍細胞、血清または血漿、循環血漿タンパク質、腹水、一次細胞培養物または腫瘍から誘導されるか、もしくは腫瘍のような特性を示す細胞系、ならびにホルマリン固定、パラフィン包埋腫瘍試料または凍結腫瘍試料などの保存された腫瘍試料が挙げられる。一実施形態においては、患者試料は、ホルマリン固定パラフィン包埋 (F F P E) 腫瘍試料 (例えば、メラノーマ腫瘍試料または結腸直腸癌腫瘍試料または腫瘍間質の試料) である。試料は、癌薬剤 (抗 c - m e t アンタゴニストなど) を用いる患者の処置の前に取得することができる。試料は、原発腫瘍から、または転移腫瘍から取得することができる。試料は、癌が初めて診断された時、または例えば、腫瘍が転移した後に取得することができる。いくつかの実施形態においては、腫瘍試料は、肺、皮膚、リンパ節、骨、肝臓、結腸、甲状腺、および / または卵巣のものである。

10

20

【 0 2 7 4 】

m R N A、タンパク質、または遺伝子増幅の発現を決定するための様々な方法としては、限定されるものではないが、遺伝子発現プロファイリング、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、例えば、定量的リアルタイム P C R (q R T - P C R)、対立遺伝子特異的 P C R、R N A - s e q、F I S H、マイクロアレイ分析、遺伝子発現の連続分析 (S A G E)、M a s s A R R A Y、プロテオミクス、免疫組織化学 (I H C) などが挙げられる。いくつかの実施形態においては、タンパク質発現が定量される。そのようなタンパク質分析を、例えば、患者腫瘍試料に対して I H C を用いて実施することができる。

30

【 0 2 7 5 】

ここで、バイオマーカー発現を決定するための様々な例示的方法を、より詳細に説明する。

【 0 2 7 6 】

1 . 遺伝子発現プロファイリング

一般に、遺伝子発現プロファイリングの方法を、2つの大きな群 : ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション分析に基づく方法、およびポリヌクレオチドの配列決定に基づく方法に分けることができる。試料中の m R N A 発現の定量のための当業界で公知の最も一般的に用いられる方法としては、ノーザンブロットングおよび *i n s i t u* ハイブリダイゼーション (P a r k e r & B a r n e s、M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y 1 0 6 : 2 4 7 ~ 2 8 3 頁 (1 9 9 9)) ; R N A s e 保護アッセイ (H o d、B i o t e c h n i q u e s 1 3 : 8 5 2 ~ 8 5 4 頁 (1 9 9 2)) ; およびポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) (W e i s ら、T r e n d s i n G e n e t i c s 8 : 2 6 3 ~ 2 6 4 頁 (1 9 9 2)) が挙げられる。あるいは、DNA二本鎖、RNA二本鎖、およびDNA - RNAハイブリッド二本鎖またはDNA - タンパク質二本鎖などの特定の二本鎖を認識することができる抗体を用いることができる。配列決定に基づく遺伝子発現分析のための代表的な方法としては、遺伝子発現の連続分析 (S A G E)、および大規模並行特徴配列決定 (M P S S) による遺伝子発現分析が挙げられる。

40

【 0 2 7 7 】

2 . ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) および 5 ' ヌクレアーゼアッセイ

50

高感度で可撓性のある定量法がPCRであり、例えば、薬剤処置を用いて、または用いずに異なる試料集団中、正常および腫瘍組織中でのmRNAレベルを比較するため、密接に関連するmRNA間を識別するため、ならびにRNA構造を分析するために用いることができる。しかしながら、他の核酸増幅プロトコル(すなわち、PCR以外)を、本明細書に記載の核酸分析法において用いることもできることに留意すべきである。例えば、好適な増幅法としては、リガーゼ連鎖反応(例えば、Wu & Wallace、Genomics 4:560~569頁、1988を参照されたい);鎖置換アッセイ(例えば、Walkerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:392~396頁、1992;米国特許第5,455,166号を参照されたい);およびいくつかの転写に基づく増幅システム、例えば、米国特許第5,437,990号;第5,409,818号;および第5,399,491号;転写増幅システム(TAS)(Kwohら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173~1177頁、1989);ならびに自己持続型配列複製(3SR)(Guatelliら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874~1878頁、1990;WO92/08800)が挙げられる。あるいは、プローブを検出可能なレベルまで増幅させる方法、例えば、Qレプリカーゼ増幅(Kramer & Lizardi、Nature 339:401~402頁、1989;Lomeliら、Clin. Chem. 35:1826~1831頁、1989)を用いることができる。公知の増幅方法の概説は、例えば、AbramsonおよびMyers、Current Opinion in Biotechnology 4:41~47頁、1993により提供されている。

10

20

【0278】

mRNAを、出発組織試料から単離することができる。出発材料は、典型的には、それぞれ、ヒト腫瘍または腫瘍細胞系、および対応する正常組織または細胞系から単離された全RNAである。かくして、RNAを、健康なドナーに由来するプールされたDNAと共に、乳房、肺、結腸、前立腺、脳、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、精巣、卵巣、子宮などの腫瘍または腫瘍細胞系を含む様々な原発腫瘍から単離することができる。mRNAの供給源が原発腫瘍である場合、例えば、凍結された、または保管されたパラフィン包埋および固定された(例えば、ホルマリン固定された)組織試料から、mRNAを抽出することができる。mRNA抽出のための一般的な方法は当業界で周知であり、Ausubelら、Current Protocols of Molecular Biology、John Wiley and Sons(1997)などの分子生物学の標準的教科書に開示されている。パラフィン包埋組織からのRNA抽出のための方法は、例えば、RuppおよびLocker、Lab Invest. 56:A67(1987)、およびDe Andresら、BioTechniques 18:42044頁(1995)に開示されている。特に、RNA単離を、製造業者の指示書に従って、Qiagenなどの商業的製造業者からの精製キット、バッファーセットおよびプロテアーゼを用いて実施することができる。例えば、培養中の細胞に由来する全RNAを、Qiagen RNeasyミニカラムを用いて単離することができる。他の商業的に入手可能なRNA単離キットとしては、MASTERPURE(登録商標)Complete DNAおよびRNA Purification Kit(EPICENTRE(登録商標)、Madison、Wis.)、およびParaffin Block RNA Isolation Kit(Ambion, Inc.)が挙げられる。組織試料に由来する全RNAを、RNA Stat-60(Tel-Test)を用いて単離することができる。腫瘍から調製されたRNAを、例えば、塩化セシウム密度勾配遠心分離により単離することができる。

30

40

【0279】

RNAはPCRのための鋳型として役立つことができないため、いくつかの実施形態においては、PCRによる遺伝子発現プロファイリングにおける第1のステップは、RNA鋳型のcDNAへの逆転写、次いで、PCR反応におけるその指数的増幅である。他の実施形態においては、例えば、米国特許第5,310,652号;第5,322,770号;第5,561,058号;第5,641,864号;および第5,693,517号に

50

記載のような混合逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いることができる。2つの最も一般的に用いられる逆転写酵素は、トリ骨髄芽球症ウイルス (avian myeloblastosis virus) 逆転写酵素 (AMV-RT) および Moloney マウス白血病ウイルス逆転写酵素 (MMLV-RT) である。逆転写ステップは、典型的には、発現プロファイリングの環境および目標に応じて、特異的プライマー、ランダムヘキサマー、またはオリゴ-dTプライマーを用いてプライミングされる。例えば、抽出されたRNAを、製造業者の指示書に従って、GENEAMP (商標) RNA PCRキット (Perkin Elmer, Calif., USA) を用いて逆転写することができる。次いで、誘導されたcDNAを、その後のPCR反応における鋳型として用いることができる。

10

【0280】

米国特許第5,210,015号;第5,487,972号;および第5,804,375号;ならびにHollandら、1988、Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.88:7276~7280頁に記載の「TaqMan (登録商標)」または「5'-ヌクレアーゼアッセイ」を用いることができる。TAQMAN (登録商標) PCRは、典型的には、その標的アンプリコンに結合したハイブリダイゼーションプローブを加水分解するTaqまたはTthポリメラーゼの5'-ヌクレアーゼ活性を用いるが、同等の5'-ヌクレアーゼ活性を有する任意の酵素を用いることもできる。2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、PCR反応に典型的なアンプリコンを作製する。第3のオリゴヌクレオチド、またはプローブは、2つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出するように設計される。プローブはTaq DNAポリメラーゼ酵素によっては伸長せず、リポーター蛍光染料およびクエンチャー蛍光染料を用いて標識される。リポーター染料からのレーザー誘導放射は、2つ染料がプローブ上にあるため、それらが一緒に近くに位置する場合、クエンチング染料によってクエンチされる。増幅反応の間に、Taq DNAポリメラーゼ酵素は、鋳型依存的様式でプローブを切断する。得られたプローブ断片は溶液中で解離し、遊離したリポーター染料からのシグナルは、第2のフルオロフォアのクエンチング効果を含まない。合成されたそれぞれの新しい分子について1分子のリポーター染料が遊離され、クエンチされていないリポーター染料の検出は、データの定量的解釈のための基礎を提供する。アッセイにおいて用いられるハイブリダイゼーションプローブは、例えば、V600E突然変異部位でBRAFの突然変異体と野生型対立遺伝子とを識別する対立遺伝子特異的プローブであってもよい。あるいは、前記方法を、増幅産物に結合する対立遺伝子特異的プライマーおよび標識されたプローブを用いて実施することができる。

20

30

【0281】

分解産物を検出するのに好適な任意の方法を、5'-ヌクレアーゼアッセイにおいて用いることができる。検出プローブは、2つの蛍光染料で標識されることが多く、そのうちの一方は他方の染料の蛍光をクエンチすることができる。プローブがハイブリダイズしていない状態にある場合にクエンチングが起こるように、またDNAポリメラーゼの5'から3'に向かうエキソヌクレアーゼ活性によるプローブの切断が2つの染料の間で起こるように、染料をプローブに結合させる、好ましくは、一方を5'末端に結合させ、他方を内部部位に結合させる。増幅は、染料の間でのプローブの切断と、それと同時に起こるクエンチングの消失および初期にクエンチされた染料から観察可能な蛍光の増加をもたらす。分解産物の蓄積を、反応蛍光の増加を測定することによりモニタリングする。米国特許第5,491,063号および第5,571,673号(両方とも参照により本明細書に組込まれる)は、増幅と同時に起こるプローブの分解を検出するための代替的方法を記載する。5'-ヌクレアーゼアッセイデータは最初、Ct、または閾値サイクルとして表すことができる。上記で考察された通り、全サイクルの間に蛍光値が記録され、増幅反応においてその時点までに増幅された産物の量である。蛍光シグナルが統計的に有意であるとして最初に記録される時点が、閾値サイクル(Ct)である。

40

【0282】

50

誤差および試料間変動の効果を最小化するために、PCRは通常、内部標準を用いて実施される。理想的な内部標準は、異なる組織間で定常レベルで発現され、実験処理によっては影響されない。遺伝子発現のパターンを正規化するために最もよく用いられるRNAは、ハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド-3-リン酸-デヒドロゲナーゼ(GAPDH)およびP-アクチンのmRNAである。

【0283】

いくつかの実施形態においては、V600Eを検出するプローブ、例えば、TTS155-BRAF__MUはまた、V600D(1799__1800TG>AT)およびV600K(1798__1799GT>AA)も検出する。いくつかの実施形態においては、V600E突然変異を検出するプローブはまた、K601E(1801A>G)およびV600R(1798__1799GT>AG)も検出する。

10

【0284】

いくつかの実施形態においては、プローブ配列と実質的に同一である配列を用いることができる。プローブ配列と実質的に同一である配列としては、プローブと同じ相補的配列にハイブリダイズするものが挙げられる。かくして、いくつかの実施形態においては、本発明における使用のためのプローブ配列は、少なくとも15個の連続するヌクレオチド、時には、少なくとも16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29または30個の連続するヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態においては、プライマーは、TTS155-BRAF__MUまたはTTS148-BRAF__WTの少なくとも27、28、29または30個の連続するヌクレオチドを有する。他の実施形態においては、本発明における使用のためのプライマーは、TTS155-BRAF__MUまたはTTS148-BRAF__WTに対する少なくとも80%の同一性、いくつかの実施形態においては、少なくとも85%の同一性、他の実施形態においては、少なくとも90%以上の同一性を有する。

20

【0285】

mRNA単離、精製、プライマー伸長および増幅などの、RNA源として固定されたパラフィン包埋組織を用いて遺伝子発現をプロファイルするための代表的なプロトコールのステップは、様々な公開された学術論文に与えられている(例えば、Hailatら、Diagn Mol Pathol. 2012年3月; 21(1): 1~8頁; Godfreyら、J. Molec. Diagnostics 2: 84~91頁(2000); Spechtら、Am. J. Pathol. 158: 419~29頁(2001))。簡単に述べると、いくつかの実施形態においては、代表的なプロセスは、パラフィン包埋腫瘍組織試料の約10マイクログラムの厚さの切片を切断することから始まる。次いで、RNAを抽出し、タンパク質およびDNAを除去する。RNA濃度の分析後、必要に応じて、RNA修復および/または増幅ステップを含有させ、遺伝子特異的プロモーターを用いてRNAを逆転写した後、PCRを行う。

30

【0286】

PCRプライマーおよびプローブは、増幅しようとする遺伝子中に存在するイントロン配列に基づいて設計される。この実施形態においては、プライマー/プローブ設計における第1のステップは、遺伝子内のイントロン配列の解明である。これは、公共的に利用可能なソフトウェアにより、例えば、Kent, W., Genome Res. 12(4): 656~64頁(2002)により開発されたDNA BLATソフトウェア、またはBLASTソフトウェア、例えば、そのバリエーションなどにより行うことができる。その後のステップは、PCRプライマーおよびプローブ設計の定着した方法に従う。

40

【0287】

非特異的シグナルを回避するために、プライマーおよびプローブを設計する時のイントロン内の反復配列をマスクすることが重要であり得る。これは、反復エレメントのライブラリーに対してDNA配列をスクリーニングし、反復エレメントがマスクされるクエリー配列を戻す、Baylor College of Medicineを通してオンラインで利用可能なRepeat Maskerプログラムを用いることにより容易に達成す

50

ることができる。次いで、マスクされたイントロン配列を用いて、Primer Express (Applied Biosystems); MGBアッセイバイデザイン (Applied Biosystems); Primer 3 (一般ユーザおよび生物学者プログラマーのためのWWW上のRozenおよびSkaltsky (2000) Primer 3、Krawetz S、Misener S (編) Bioinformatic s Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology、Humana Press、Totowa, N.J., 365~386頁)などの、任意の市販の、またはさもなければ公共的に利用可能なプライマー/プローブ設計パッケージを用いて、プライマーおよびプローブ配列を設計することができる。

10

【0288】

PCRプライマー設計において考慮される因子としては、プライマー長、融点(T_m)、およびG/C含量、特異性、相補的プライマー配列、および3'末端配列が挙げられる。一般的には、最適なPCRプライマーは、一般的には17~30塩基長であり、約20~80%、例えば、約50~60%のG+C塩基を含む。典型的には、50~80、例えば、約50~70のT_mが好ましい。

【0289】

PCRプライマーおよびプローブ設計に関するさらなる指針については、例えば、Dieffenbachら、「General Concepts for PCR Primer Design」、PCR Primer、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York、1995、133~155頁; InnisおよびGelfand、「Optimization of PCRs」、PCR Protocols、A Guide to Methods and Applications、CRC Press、London、1994、5~11頁; ならびにPlasterer, T.N. Primerselect: Primer and probe design、Methods Mol. Biol. 70: 520~527頁(1997)(全開示は参照により本明細書に明示的に組込まれる)を参照されたい。

20

【0290】

別の態様において、標的核酸の対立遺伝子特異的増幅を用いて、核酸突然変異の存在または非存在を検出することができる。増幅は、対立遺伝子特異的プライマーの使用を含む。

30

【0291】

一実施形態においては、本発明は、いくつかの変異体配列の形態で存在する、標的配列の変異体の対立遺伝子特異的増幅の方法であって、標的配列の少なくとも1つの変異体をおそらく含有する試料を用意すること; 標的配列の1つまたは複数の変異体と少なくとも部分的に相補的な第1のオリゴヌクレオチドを用意すること; 標的配列の1つまたは複数の変異体と少なくとも部分的に相補的であるが、標的配列の1つの変異体のみと相補的な少なくとも1つの内部選択ヌクレオチドを有する第2のオリゴヌクレオチドを用意すること; 前記第1および第2のオリゴヌクレオチドの、標的配列の少なくとも1つの変異体へのハイブリダイゼーションにとって好適な条件を用意すること; 核酸ポリメラーゼが、前記第2のオリゴヌクレオチドが前記相補的內部選択ヌクレオチドを有する標的配列の変異体にハイブリダイズした場合には前記第2のオリゴヌクレオチドを伸長させることができるが、前記第2のオリゴヌクレオチドが非相補的內部選択ヌクレオチドを有する標的配列の変異体にハイブリダイズした場合には前記第2のオリゴヌクレオチドを実質的にあまり伸長させることができない、前記ポリメラーゼによるオリゴヌクレオチド伸長にとって好適な条件を用意すること; ならびに配列のハイブリダイゼーションおよび伸長ステップを複数回反復することを含む方法である。

40

【0292】

本発明のいくつかの実施形態においては、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応、すなわち、

50

鋳型変性、オリゴヌクレオチドプライマーの鋳型へのアニーリング（ハイブリダイゼーション）、および核酸ポリメラーゼによるプライマーの伸長の反復サイクルを含む。いくつかの実施形態においては、アニーリングおよび伸長は、同じ温度ステップで行う。

【0293】

いくつかの実施形態においては、増幅反応は、ホットスタートプロトコルを含む。対立遺伝子特異的増幅の文脈においては、一致しない標的に関する対立遺伝子特異的プライマーの選択性を、ホットスタートプロトコルの使用により増強することができる。例えば、ワックスの使用、重要な試薬の残りの反応混合物からの分離（米国特許第5,411,876号）、抗体により可逆的に不活化された核酸ポリメラーゼ（米国特許第5,338,671号）、活性部位に特異的に結合するように設計されたオリゴヌクレオチドにより可逆的に不活化された核酸ポリメラーゼ（米国特許第5,840,867号）の使用または例えば、米国特許第5,677,152号および第5,773,528号に記載された可逆的的化学的改変を有する核酸ポリメラーゼの使用などの、多くのホットスタートプロトコルが当業界で公知である。

【0294】

本発明のいくつかの実施形態においては、対立遺伝子特異的増幅アッセイは、リアルタイムPCRアッセイである。リアルタイムPCRアッセイにおいては、増幅の尺度は、「閾値サイクル」またはCt値である。対立遺伝子特異的リアルタイムPCRアッセイの文脈においては、一致した鋳型と一致しない鋳型とのCt値の差異が、対立遺伝子またはアッセイの選択性の間の識別の尺度である。差異が大きい場合、一致しない鋳型の増幅の遅延が大きく、かくして、対立遺伝子間の識別が大きいことを示す。一致しない鋳型は、一致した鋳型よりもはるかに多量で存在することが多い。例えば、組織試料においては、ごく少量の細胞のみが悪性であり、対立遺伝子特異的増幅アッセイにより標的化される突然変異（「一致した鋳型」）を担持する。正常細胞中に存在する一致しない鋳型はあまり効率的に増幅されないが、圧倒的な数の正常細胞は増幅における遅延を克服し、突然変異鋳型の利点を打ち消す。野生型鋳型の存在下で稀な突然変異を検出するためには、対立遺伝子特異的増幅アッセイの特異性が重要である。COBAS（登録商標）4800 BRAF V600 Mutation Testが市販されており、リアルタイムPCR技術を利用している。反応におけるそれぞれの標的特異的オリゴヌクレオチドプローブは、リポーターとして役立つ蛍光染料、および無傷のプローブ内のリポーター染料からの蛍光放射を吸収する（クエンチする）クエンチャー分子で標識される。増幅の各サイクルの間に、アンプリコン中の一本鎖DNA配列と相補的なプローブが結合し、次いで、Z05 DNAポリメラーゼの5'から3'に向かうヌクレアーゼ活性により切断される。リポーター染料がこのヌクレアーゼ活性によりクエンチャーから分離されると、リポーター染料が適切なスペクトルの光により励起された時に特徴的な波長の蛍光を測定することができる。2つの異なるリポーター染料を用いて、標的特異的BRAF野生型（WT）プローブおよびBRAF V600E突然変異（MUT）プローブを標識する。専用の光チャンネルにおける2つの特徴的な波長で蛍光を測定することにより、2つのBRAF配列の増幅を単一の反応において独立に検出することができる。

【0295】

一実施形態においては、B-r a fとV600E B-r a fとを区別するプライマーが、米国特許出願公開第2011/0311968号に従って用いられる。

【0296】

いくつかの実施形態においては、B-r a f突然変異体ポリヌクレオチド（例えば、DNA）は、（a）患者癌試料（FFPE固定された患者癌試料など）から抽出された核酸（例えば、ゲノムDNA）に対してPCRを実施すること；および（b）試料中のB-r a f突然変異体ポリヌクレオチドの発現を決定することを含む方法を用いて検出される。いくつかの実施形態においては、B-r a f突然変異体ポリヌクレオチド発現は、（a）第1のオリゴヌクレオチドが標的配列の1つまたは複数の変異体と少なくとも部分的に相補的であり、第2のオリゴヌクレオチドが標的配列の1つまたは複数の変異体と少なくと

10

20

30

40

50

も部分的に相補的であり、標的配列の1つの変異体にのみ相補的な少なくとも1つの内部選択的ヌクレオチドを有する、前記第1および第2のオリゴヌクレオチドを、B - r a f 標的配列の少なくとも1つの変異体にハイブリダイズさせること；(b) 核酸ポリメラーゼが、選択的ヌクレオチドが標的と塩基対を形成する場合には優先的に前記第2のオリゴヌクレオチドを伸長させるが、前記選択的ヌクレオチドが標的と塩基対を形成しない場合、実質的にあまり前記第2のオリゴヌクレオチドを伸長させることができない、前記ポリメラーゼを用いて第2のオリゴヌクレオチドを伸長させること；ならびに(c) 伸長が、オリゴヌクレオチドが相補的選択的ヌクレオチドを有する標的配列の変異体の存在を示す、前記オリゴヌクレオチド伸長の産物を検出することを含む方法を用いて検出される。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体ポリヌクレオチド(例えば、DNA)は、(a) 患者癌試料(FFPE固定された患者癌試料など)から抽出された核酸(例えば、ゲノムDNA)に対してPCRを実施すること；および(b) 試料中のB - r a f 突然変異体ポリヌクレオチドの発現を決定することを含む方法を用いて検出される。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体ポリヌクレオチド(例えば、DNA)は、(a) 患者癌試料(FFPE固定された患者癌試料など)からDNA(例えば、ゲノムDNA)を単離すること；(b) 患者癌試料から抽出されたDNAに対してPCRを実施すること；および(c) 試料中のB - r a f 突然変異体ポリヌクレオチドの発現を決定することを含む方法を用いて検出される。

10

【0297】

いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体ポリヌクレオチド発現は、(a) 患者癌試料(FFPE固定された患者癌試料など)からDNA(例えば、ゲノムDNA)を単離すること；(b) 第1のオリゴヌクレオチドが標的配列の1つまたは複数の変異体と少なくとも部分的に相補的であり、第2のオリゴヌクレオチドが標的配列の1つまたは複数の変異体と少なくとも部分的に相補的であり、標的配列の1つの変異体のみと相補的な少なくとも1つの内部選択的ヌクレオチドを有する、前記第1および第2のオリゴヌクレオチドを、DNA中のB - r a f 標的配列の少なくとも1つの変異体にハイブリダイズさせること；(c) 核酸ポリメラーゼが、選択的ヌクレオチドが標的と塩基対を形成する場合には優先的に前記第2のオリゴヌクレオチドを伸長させるが、前記選択的ヌクレオチドが標的と塩基対を形成しない場合、実質的にあまり前記第2のオリゴヌクレオチドを伸長させることができない、前記ポリメラーゼを用いて第2のオリゴヌクレオチドを伸長させること；ならびに(d) 伸長が、オリゴヌクレオチドが相補的選択的ヌクレオチドを有する標的配列の変異体の存在を示す、前記オリゴヌクレオチド伸長の産物を検出することを含む方法を用いて検出される。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体ポリヌクレオチド発現は、(a) 第1のオリゴヌクレオチドが標的配列の1つまたは複数の変異体と少なくとも部分的に相補的であり、第2のオリゴヌクレオチドが標的配列の1つまたは複数の変異体と少なくとも部分的に相補的であり、標的配列の1つの変異体のみと相補的な少なくとも1つの内部選択的ヌクレオチドを有する、前記第1および第2のオリゴヌクレオチドを、B - r a f 標的配列の少なくとも1つの変異体にハイブリダイズさせること；(b) 核酸ポリメラーゼが、選択的ヌクレオチドが標的と塩基対を形成する場合には優先的に前記第2のオリゴヌクレオチドを伸長させるが、前記選択的ヌクレオチドが標的と塩基対を形成しない場合、実質的にあまり前記第2のオリゴヌクレオチドを伸長させることができない、前記ポリメラーゼを用いて第2のオリゴヌクレオチドを伸長させること；ならびに(c) 伸長が、オリゴヌクレオチドが相補的選択的ヌクレオチドを有する標的配列の変異体の存在を示す、前記オリゴヌクレオチド伸長の産物を検出することを含む方法を用いて検出される。

20

30

40

【0298】

いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体ポリヌクレオチド(例えば、DNA)は、(a) 患者癌試料(FFPE固定された患者癌試料など)から抽出された核酸(例えば、ゲノムDNA)に対してPCRを実施すること；(b) PCR増幅された核酸を配列決定することにより、B - r a f 突然変異体ポリヌクレオチドの発現を決定するこ

50

とを含む方法を用いて検出される。いくつかの実施形態においては、B - r a f 突然変異体ポリヌクレオチド（例えば、DNA）は、配列決定（例えば、S a n g e r 配列またはパイロシーケンス法）を用いて検出される。

【0299】

3. 他の核酸突然変異検出法

核酸突然変異（例えば、B - r a f のアミノ酸600位でのグルタミンのバリンへの置換をもたらすヌクレオチド1799位での（G T G > G A A））の存在（または非存在）を、直接配列決定により検出することもできる。方法としては、ジデオキシ配列決定に基づく方法およびオリゴヌクレオチド長産物のPyrosequencing（商標）などの方法が挙げられる。そのような方法は、PCRなどの増幅技術を用いることが多い。配列決定のための別の類似方法は、完全なPCRの使用を必要としないが、典型的には、調査しようとするヌクレオチドと相補的である単一の蛍光標識されたジデオキシリボ核酸分子（ddNTP）によるプライマーの伸長のみを用いる。多型部位でのヌクレオチドを、1塩基により伸長された、蛍光標識されたプライマーの検出により同定することができる（例えば、Kobayashiら、Mol. Cell. Probes、9：175～182頁、1995）。

10

【0300】

増幅反応（例えば、PCR）を用いて生成された増幅産物を、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動の使用により分析することもできる。異なる対立遺伝子を、異なる配列依存的融点特性および溶液中でのDNAの電気泳動移動度に基づいて同定することができる（例えば、Erllich（編）、PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification、W. H. Freeman and Co、New York、1992、第7章を参照されたい）。

20

【0301】

他の実施形態においては、例えば、Orिताら、Proc. Nat. Acad. Sci. 86、2766～2770頁（1989）に記載のような一本鎖PCR産物の電気泳動移動度の変化により塩基の相違を同定する、一本鎖コンフォメーション多型分析を用いて、標的配列の対立遺伝子を区別することができる。増幅されたPCR産物を上記のように生成し、加熱するか、またはさもなければ変性させて、一本鎖増幅産物を形成させることができる。一本鎖核酸は、塩基配列に一部依存する二次構造に再度折畳まれるか、またはそれを形成することができる。一本鎖増幅産物の異なる電気泳動移動度を、標的領域の対立遺伝子間の配列差異と関連付けることができる。

30

【0302】

突然変異（例えば、核酸突然変異）の存在または非存在を、対立遺伝子特異的増幅またはプライマー伸長法を用いて検出することができる。これらの反応は、典型的には、プライマーの3'末端、例えば、3'ヌクレオチドまたは最後から2番目の3'ヌクレオチドでの不一致を介して突然変異（または野生型）部位を特異的に標的化するように設計されたプライマーの使用を含む。不一致の存在は、ポリメラーゼが誤差補正活性を欠く場合にプライマーを伸長するポリメラーゼの能力をもたらす。例えば、対立遺伝子特異的増幅または伸長に基づく方法を用いてV600E突然変異体配列を検出するために、3'末端ヌクレオチドが突然変異位置にハイブリダイズするように、BRAFのコードン600におけるヌクレオチド1799位での突然変異体A対立遺伝子と相補的なプライマーを設計する。対立遺伝子突然変異体の存在を、伸長を開始するプライマーの能力により決定することができる。3'末端が一致しない場合、伸長は妨げられる。かくして、例えば、プライマーが3'末端で対立遺伝子突然変異体ヌクレオチドと一致する場合、プライマーは効率的に伸長されるであろう。また、1799位でBRAF野生型配列から特異的である対立遺伝子特異的プライマーを用いて、増幅を実施することもできる。

40

【0303】

典型的には、プライマーは、増幅反応における第2のプライマーと共に用いられる。第2のプライマーは、突然変異位置とは関連しない部位にハイブリダイズする。増幅は、2

50

つのプライマーから進行し、検出可能な産物をもたらす、特定の対立遺伝子形態が存在することを示す。対立遺伝子特異的増幅または伸長に基づく方法は、例えば、WO 93 / 2 2 4 5 6 ; 米国特許第 5 , 1 3 7 , 8 0 6 号 ; 第 5 , 5 9 5 , 8 9 0 号 ; 第 5 , 6 3 9 , 6 1 1 号 ; および米国特許第 4 , 8 5 1 , 3 3 1 号に記載されている。

【0304】

対立遺伝子特異的増幅に基づく遺伝子型決定を用いる場合、対立遺伝子の同定には、増幅された標的配列の存在または非存在の検出のみが必要である。増幅された標的配列の検出のための方法は、当業界で周知である。例えば、核酸の存在を検出するために、記載されたゲル電気泳動およびプローブハイブリダイゼーションアッセイが用いられることが多い。

10

【0305】

代替的なプローブ法においては、増幅された核酸は、反応混合物中の二本鎖 DNA の総量の増加をモニタリングすることにより検出され、例えば、米国特許第 5 , 9 9 4 , 0 5 6 号 ; ならびに欧州特許公開第 4 8 7 , 2 1 8 号および第 5 1 2 , 3 3 4 号に記載されている。二本鎖標的 DNA の検出は、二本鎖 DNA に結合した場合に様々な DNA 結合染料、例えば、SYBR Green が示す蛍光の増加に依るものである。

【0306】

当業者であれば理解できるように、対立遺伝子特異的増幅法を、特定の対立遺伝子を標的化するために複数の対立遺伝子特異的プライマーを用いる反応において実施することができる。そのような多重適用のためのプライマーは、一般的には識別可能な標識で標識されるか、または対立遺伝子から産生される増幅産物がサイズにより識別可能となるように選択される。かくして、例えば、単一の試料中の野生型および V 6 0 0 E 対立遺伝子突然変異体の両方を、増幅産物のゲル分析による単一の増幅反応を用いて同定することができる。

20

【0307】

対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、ハイブリダイズする領域において対立遺伝子の 1 つと正確に相補的であってもよく、またはオリゴヌクレオチドの 3 ' 末端以外の位置にいくつかの不一致を有してもよい。例えば、最後から 2 番目の 3 ' ヌクレオチドは、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドにおいて一致しなくてもよい。他の実施形態においては、不一致は、両方の対立遺伝子配列中の (非突然変異) 部位で生じてもよい。

30

【0308】

いくつかの実施形態においては、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションは、固定された標的または固定されたプローブを用いるアッセイ形式で実施される。そのような形式は当業界で公知であり、例えば、ドットプロット形式および逆ドットプロットアッセイ形式が挙げられ、米国特許第 5 , 3 1 0 , 8 9 3 号 ; 第 5 , 4 5 1 , 5 1 2 号 ; 第 5 , 4 6 8 , 6 1 3 号 ; および第 5 , 6 0 4 , 0 9 9 号 (それぞれ参照により本明細書に組み込まれる) に記載されている。

【0309】

4 . RNA - Seq

Whole Transcriptome Shotgun Sequencing (W T S S) と呼ばれる RNA - Seq とは、試料の RNA 含量に関する情報を得るために c D N A を配列決定するための高効率配列決定技術の使用を指す。RNA - Seq を記載する刊行物としては、Wang ら、「RNA - Seq : a revolutionary tool for transcriptomics」、Nature Reviews Genetics 10 (1) : 5 7 ~ 6 3 頁 (2 0 0 9 年 1 月) ; Ryan ら、BioTechniques 45 (1) : 8 1 ~ 9 4 頁 (2 0 0 8) ; および Maher ら、「Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer」、Nature 458 (7 2 3 4) : 9 7 ~ 1 0 1 頁 (2 0 0 9 年 1 月) が挙げられる。

40

50

【0310】

5. マイクロアレイ

示差的遺伝子発現を、マイクロアレイ技術を用いて同定または確認することもできる。かくして、乳癌関連遺伝子の発現プロファイルを、マイクロアレイ技術を用いて、新鮮な、またはパラフィン包埋された腫瘍組織のいずれかにおいて測定することができる。この方法では、対象のポリヌクレオチド配列(cDNAおよびオリゴヌクレオチドなど)を、マイクロチップ基質上に塗布するか、または配置する。次いで、配置された配列を、対象の細胞または組織に由来する特異的DNAプローブとハイブリダイズさせる。PCR法と全く同様に、mRNAの供給源は典型的には、ヒト腫瘍または腫瘍細胞系、および対応する正常組織または細胞系から単離された全RNAである。かくして、RNAを、様々な原

10

発腫瘍または腫瘍細胞系から単離することができる。mRNAの供給源が原発腫瘍である場合、mRNAを、例えば、毎日の臨床業務において日常的に調製され、保存される、凍結されたか、または保管されたパラフィン包埋された、および固定された(例えば、ホルマリン固定された)組織試料から抽出することができる。

【0311】

マイクロアレイ技術の特定の実施形態においては、cDNAクローンのPCR増幅された挿入物を、高密度アレイ中の基質にアプライする。好ましくは、少なくとも10,000個のヌクレオチド配列を基質にアプライする。それぞれ10,000個のエLEMENTでマイクロチップ上に固定された、マイクロアレイされた遺伝子が、ストリンジентな条件下でのハイブリダイゼーションにとって好適である。対象の組織から抽出されたRNAの逆転写による蛍光ヌクレオチドの組込みを介して、蛍光標識されたcDNAプローブを作製することができる。チップに印加された標識されたcDNAプローブは、アレイ上のそれぞれのDNAスポットに特異的にハイブリダイズする。非特異的に結合したプローブを除去するためのストリンジентな洗浄の後、共焦点レーザー顕微鏡によるか、またはCCDカメラなどの別の検出方法により、チップをスキャンする。それぞれの配置されたELEMENTのハイブリダイゼーションの定量により、対応するmRNA存在量の評価が可能になる。二色蛍光を用いて、RNAの2つの供給源から作製された別々に標識されたcDNAプローブを、対にしてアレイにハイブリダイズさせる。かくして、それぞれの特定の遺伝子に対応する2つの供給源に由来する転写物の相対的存在量が同時に決定される。小規模のハイブリダイゼーションにより、多数の遺伝子の発現パターンの便利で迅速な評価が得られる。そのような方法は、細胞1個あたり2~3個のコピーで発現される、稀な転写物を検出し、発現レベルの少なくとも約2倍の差異を再現性を以て検出するのに必要とされる感度を有することが示されている(Schenaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(2):106~149頁(1996))。Affymetrix GENCHIP(商標)技術、またはIncyteのマイクロアレイ技術を用いることなどにより、製造業者のプロトコールに従って市販の装備によりマイクロアレイ分析を実施することができる。

20

30

【0312】

遺伝子発現の大規模分析のためのマイクロアレイ方法の開発により、様々な腫瘍型における癌分類および転帰予測の分子マーカーを体系的に検索することができるようになる。

40

【0313】

6. 遺伝子発現の連続分析(SAGE)

遺伝子発現の連続分析(SAGE)は、それぞれの転写物のための個々のハイブリダイゼーションプローブを用意する必要なく、多数の遺伝子転写物の同時的および定量的分析を可能にする方法である。第1に、タグがそれぞれの転写物内の独自の位置から得られるという条件で、転写物を独自に同定するための十分な情報を含む短い配列タグ(約10~14bp)を作製する。次いで、多くの転写物を一緒に連結して長い連続的分子を形成させ、これを配列決定し、複数のタグの同一性を同時に示すことができる。個々のタグの存在量を決定し、それぞれのタグに対応する遺伝子を同定することにより、転写物の任意の集団の発現パターンを定量的に評価することができる。さらなる詳細については、例えば

50

、Velculescuら、Science 270:484~487頁(1995)；
 およびVelculescuら、Cell 88:243~51頁(1997)を参照されたい。

【0314】

7. MassARRAY技術

MassARRAY(Sequenom、San Diego、Calif.)技術は、検出のために質量分析(MS)を用いる遺伝子発現分析の自動化された高効率の方法である。この方法によれば、RNAの単離、逆転写およびPCR増幅の後、cDNAをプライマー伸長にかける。cDNA由来プライマー伸長産物を精製し、MALTI-TOF MS試料調製にとって必要な成分を予め充填したチップアレイ上に分注する。得られた質量スペクトル中のピーク面積を分析することにより、反応中に存在する様々なcDNAを定量する。

10

【0315】

8. 免疫組織化学

免疫組織化学(「IHC」)法も、本発明のバイオマーカーの発現レベルを検出するのに好適である。組織切片の免疫組織化学染色は、試料中のタンパク質の存在を評価または検出する信頼できる方法であることが示されている。免疫組織化学技術は、プローブに対する抗体を利用し、一般的には発色法または蛍光法により、in situで細胞抗原を可視化する。かくして、それぞれのマーカーに特異的な抗体または抗血清、好ましくは、ポリクローナル抗血清、最も好ましくは、モノクローナル抗体を用いて、発現を検出する。以下により詳細に考察されるように、抗体を、抗体自体の直接的標識化により、例えば、放射性標識、蛍光標識、ビオチンなどのハプテン標識、または西洋わさびペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼなどの酵素を用いて検出することができる。あるいは、一次抗体に特異的な抗血清、ポリクローナル抗血清またはモノクローナル抗体を含む、標識された二次抗体と共に未標識の一次抗体を用いる。免疫組織化学プロトコールおよびキットは当業界で周知であり、商業的に利用可能である。

20

【0316】

IHCの2つの一般的な方法：直接および間接アッセイが利用可能である。第1のアッセイによれば、標的抗原への抗体の結合が直接決定される。この直接アッセイは、さらなる抗体相互作用なしに可視化することができる、蛍光タグまたは酵素標識一次抗体などの標識された試薬を用いる。典型的な間接アッセイにおいては、コンジュゲートされていない一次抗体が抗原に結合し、次いで、標識された二次抗体が一次抗体に結合する。二次抗体を酵素標識にコンジュゲートする場合、発色または蛍光基質を添加して、抗原の可視化を提供する。いくつかの二次抗体は一次抗体上の異なるエピトープと反応し得るため、シグナル増幅が起こる。

30

【0317】

免疫組織化学のために用いられる一次および/または二次抗体は、典型的には、検出可能部分を用いて標識される。いくつかの標識が利用可能であり、一般に、以下のカテゴリーに分類することができる：

(a) ^{35}S 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H および ^{131}I などの放射性同位体。例えば、Current Protocols in Immunology、第1巻および第2巻、Coligenら(編)、Wiley-Interscience、New York、N.Y.、Publ.(1991)に記載の技術を用いて、抗体を放射性同位体で標識し、放射活性をシンチレーション計測を用いて測定することができる。

40

(b) コロイド金粒子。

(c) 限定されるものではないが、希土類キレート(ユーロピウムキレート)、Texas Red、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、リサミン、ウンベリフェロン、フィコエリトリン、フィコシアニン、またはSPECTRUM ORANGE(登録商標)およびSPECTRUM GREEN(登録商標)などの市販のフルオロフォアならびに/または上記のいずれか1つまたは複数の誘導体などの蛍光標識。例えば、Cur

50

ent Protocols in Immunology、上掲に開示された技術を用いて、蛍光標識を抗体にコンジュゲートさせることができる。蛍光を、蛍光光度計を用いて定量することができる。

(d) 様々な酵素 - 基質標識が利用可能であり、米国特許第 4, 275, 149 号はこれらのいくつかの概説を提供する。酵素は一般に、様々な技術を用いて測定することができる発色基質の化学的变化を触媒する。例えば、酵素は、基質中の色の変化を触媒し、これを分光光度計を用いて測定することができる。あるいは、酵素は、基質の蛍光または化学発光を変化させてもよい。蛍光の変化を定量するための技術は上記されている。化学発光基質は、化学反応により電氣的に励起されるようになり、次いで、測定することができる(例えば、化学発光計を用いる)光を放出するか、または蛍光アクセプターにエネルギーを供給することができる。酵素標識の例としては、ルシフェラーゼ(例えば、蛍光ルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ; 米国特許第 4, 737, 456 号)、ルシフェリン、2, 3 - ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRPO)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環オキシダーゼ(ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなど)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが挙げられる。酵素を抗体にコンジュゲートさせるための技術は、O'Sullivanら、Methods for the Preparation of Enzyme - Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay、Methods in Enzym. (J. Langone & H. Van Vunakis (編))、Academic press、New York、73: 147 ~ 166 頁(1981)に記載されている。

10

20

【0318】

酵素 - 基質組合せの例としては、例えば、以下のものが挙げられる：

(i) 水素ペルオキシダーゼが染料前駆体[例えば、オルトフェニレンジアミン(OPD)または3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン塩酸塩(TMB)]を酸化する、水素ペルオキシダーゼを基質として用いる西洋わさびペルオキシダーゼ(HRPO)。3, 3 - ジアミノベンジジン(DAB)を用いて、HRP標識された抗体を可視化することもできる；

30

(ii) 発色基質としてパラ - ニトロフェニルリン酸を用いるアルカリホスファターゼ(AP)；および

(iii) 発色基質(例えば、p - ニトロフェニル - α - D - ガラクトシダーゼ)または蛍光発生基質(例えば、4 - メチルウンベリフェリル - α - D - ガラクトシダーゼ)を用いる α - D - ガラクトシダーゼ(α - D - Gal)。

【0319】

いくつかの他の酵素 - 基質組合せが当業者にとって利用可能である。これらの一般的な概説については、米国特許第 4, 275, 149 号および第 4, 318, 980 号を参照されたい。

40

【0320】

時には、標識は抗体を用いて間接的にコンジュゲートされる。当業者であれば、これを達成するための様々な技術を知っているであろう。例えば、抗体をビオチンとコンジュゲートさせ、上記の4つの広いカテゴリーの標識のうちのいずれかをアビジンとコンジュゲートさせるか、またはその逆を行うことができる。ビオチンはアビジンに選択的に結合し、かくして、標識をこの間接的様式で抗体とコンジュゲートさせることができる。あるいは、標識と抗体との間接的コンジュゲーションを達成するために、抗体を小さいハプテンとコンジュゲートさせ、上記の異なる型の標識の1つを抗ハプテン抗体とコンジュゲートさせる。かくして、標識と抗体との間接的コンジュゲーションを達成することができる。

【0321】

50

上記で考察された試料調製手順とは別に、IHCの前、間、または後の組織切片のさらなる処理が望ましい場合がある。例えば、クエン酸バッファー中での組織試料の加熱などのエピトープ回復方法を実行することができる [例えば、Leongら、Appl. Immunohistochem. 4(3):201頁(1996)を参照されたい]。

【0322】

任意の遮断ステップの後に、組織切片を、一次抗体が組織試料中の標的タンパク質抗原に結合するような十分な期間および好適な条件下で一次抗体に曝露する。これを達成するための適切な条件を、日常的な実験により決定することができる。

【0323】

抗体の試料への結合の程度は、上記で考察された検出可能な標識のいずれか1つを用いることにより決定される。好ましくは、標識は、3,3'-ジアミノベンジジン色原体などの発色基質の化学的变化を触媒する酵素標識(例えば、HRPO)である。好ましくは、酵素標識は、一次抗体に特異的に結合する抗体にコンジュゲートされる(例えば、一次抗体はウサギポリクローナル抗体であり、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体である)。

【0324】

このように調製された標本を載せ、カバースリップすることができる。次いで、例えば、顕微鏡を用いて、スライド評価を決定する。

【0325】

IHCを、その前または後に、形態学的染色と組み合わせることができる。脱パラフィン化の後、スライド上に載せられた切片を、評価のために形態学的染色剤で染色することができる。用いられる形態学的染色剤は、組織切片の正確な形態学的評価を提供する。切片を、それぞれ異なる細胞成分を個別に染色する1つまたは複数の染料で染色することができる。一実施形態においては、ヘマトキシリンが、スライドの細胞核を染色するために用いられる。ヘマトキシリンは広く入手可能である。好適なヘマトキシリンの例は、ヘマトキシリンII(Ventana)である。より明るく青い核を望む場合、ヘマトキシリン染色の後に青味剤を用いてもよい。当業者であれば、スライドが染料中に残存する時間の長さを増加させるか、または減少させることにより、所与の組織について染色を最適化することができることを理解するであろう。

【0326】

スライド調製およびIHCプロセッシングのための自動化システムが市販されている。Ventana(登録商標) BenchMark XTシステムがそのような自動化システムの一例である。

【0327】

染色後、標準的な顕微鏡技術により組織切片を分析することができる。一般に、病理学者等は、異常または正常な細胞または特定の細胞型の存在について組織を評価し、対象の細胞型の位置を提供する。かくして、例えば、病理学者等は、スライドを検査し、正常細胞(正常肺細胞など)および異常細胞(異常細胞または新生物肺細胞)を同定する。対象の細胞の位置を規定する任意の手段を用いることができる(例えば、X-Y軸上の座標)。

【0328】

IHCにおける使用にとって好適な抗c-met抗体は当業界で周知であり、例えば、SP-44(Ventana)、DL-21(Upsstate)、MET4、ab27492(Abcam)、PA1-37483(Pierce Antibodies)が挙げられる。当業者であれば、例えば、本明細書に開示されるIHCプロトコルを用いてc-met抗体と比較することにより、さらなる好適な抗c-met抗体を同定、特性評価することができることを理解できる。抗ホスホ-c-met抗体は当業界で公知であり、例えば、Cell Signaling Technologiesからの抗ホスホ-c-met抗体Y1234/5が挙げられる。IHCにおける使用にとって好適な抗HGF抗体も当業界で周知であり、例えば、ab24865(Abcam)、H00003082-A01(Abnova)、MA1-24767(Thermo Fisher)、

10

20

30

40

50

LS - C 1 2 3 7 4 3 (L i f e S p a n) が挙げられる。本明細書で用いられる場合、患者の腫瘍の試料中でのHGFの検出は、例えば、患者の腫瘍の試料中に存在する腫瘍間質中でのHGFの検出ならびに腫瘍細胞中でのHGFの検出を包含すると理解される。血清中でのHGFの検出のためのアッセイ(ELISAアッセイなど)は市販されており、当業界で公知である。例えば、Catenacciら、Cancer Discovery(2011)1:573頁を参照されたい。

【0329】

いくつかの実施形態においては、様々な染色強度を有する対照細胞ペレットを、IHC分析のための対照ならびにスコアリング対照として用いることができる。例えば、H441(強いc-met染色強度); A549(中程度のc-met染色強度); H1703(弱いc-met染色強度)、HEK-293(293)(弱いc-met染色強度); およびTOV-112D(c-met染色強度なし)またはH1155(c-met染色強度なし)である。

10

【0330】

いくつかの実施形態においては、c-met染色強度基準を、表Aに従って評価することができる。

【表1】

表A

IHCスコア	染色基準
0	試料が陰性もしくは不明瞭な染色を有する、または50%未満の腫瘍細胞が弱い(1+)染色もしくは弱い(1+)染色と中程度(2+)の染色の組合せを有する
1	50%以上の腫瘍細胞が弱い(1+)染色または弱い(1+)染色と中程度(2+)の染色の組合せを有するが、50%未満の腫瘍細胞が中程度(2+)の染色または中程度(2+)の染色と強い(3+)染色の組合せを有する
2	50%以上の腫瘍細胞が中程度(2+)の染色または中程度(2+)の染色と強い(3+)染色の組合せを有するが、50%未満の腫瘍細胞が強い(3+)染色を有する
3	50%以上の腫瘍細胞が強い(3+)染色を有する

20

30

【0331】

いくつかの実施形態においては、「臨床Met診断陽性」および「臨床Met診断陰性」カテゴリーは以下のように定義される：

臨床c-met診断陽性：IHCスコア2または3(表Aに定義される)、および

臨床c-met診断陰性：IHCスコア0または1(表Aに定義される)。

40

いくつかの実施形態においては、関連する高いc-metバイオマーカーは、IHCスコア=2、IHCスコア=3、またはIHCスコア=2もしくは3である。いくつかの実施形態においては、低いc-metバイオマーカーは、IHCスコア=0、IHCスコア=1またはIHCスコア=0もしくは1である。

【0332】

9. プロテオミクス

用語「プロテオーム」は、特定の時点で試料(例えば、組織、生物、または細胞培養物)中に存在するタンパク質の総計と定義される。プロテオミクスは、特に、試料中のタンパク質発現の全体的変化の研究を含む(「発現プロテオミクス」とも呼ばれる)。プロテ

50

オミクスは、典型的には、以下のステップ：(1) 2-Dゲル電気泳動(2-D PAGE)による試料中の個々のタンパク質の分離；(2) 例えば、質量分析またはN末端配列決定による、ゲルから回収された個々のタンパク質の同定、および(3) バイオインフォマティクスを用いるデータの分析を含む。プロテオミクス法は、遺伝子発現プロファイリングの他の方法に対する有用な補完であり、単独で、または他の方法と共に用いて、本発明の予後マーカーの産物を検出することができる。

【0333】

10. 遺伝子増幅

c - m e t 遺伝子の増幅の検出は、当業者には公知の特定の技術を用いて達成される。例えば、比較ゲノムハイブリダイゼーションを用いて、染色体位置の関数としてDNA配列コピー数のマップを作成することができる。例えば、K a l l i o n i e m i ら(1992) S c i e n c e 258:818~821頁を参照されたい。c - m e t 遺伝子の増幅を、例えば、c - m e t 遺伝子に特異的なプローブを用いるサザンハイブリダイゼーションによるか、またはリアルタイム定量的PCRにより検出することもできる。

10

【0334】

特定の実施形態においては、c - m e t 遺伝子の増幅の検出は、例えば、c - m e t 遺伝子にハイブリダイズするプローブを用いることにより、c - m e t 遺伝子のコピー数を直接評価することによって達成される。例えば、F I S Hアッセイを実施することができる。特定の実施形態においては、c - m e t 遺伝子の増幅の検出は、例えば、c - m e t 遺伝子の外側にあるが、c - m e t 遺伝子と共に同時増幅される染色体領域のコピー数を評価することにより、c - m e t 遺伝子のコピー数を間接的に評価することによって達成される。また、i n v i v o 診断アッセイを用いて、例えば、検出しようとする分子に結合し、検出可能な標識(例えば、放射性同位体)でタグ付けられた分子(抗体など)を投与し、標識の局在化について患者を外から走査することにより、バイオマーカー発現を評価することもできる。

20

【0335】

11. 他の例示的方法

バイオマーカーを、様々な免疫アッセイ法(例えば、上記のような本明細書に記載のIHCなど)により検出することができる。免疫学的手順および免疫アッセイ手順の概説については、B a s i c a n d C l i n i c a l I m m u n o l o g y (S t i t e s & T e r r (編)、第7版、1991)を参照されたい。さらに、本発明の免疫アッセイを、いくつかの構成のいずれかにおいて実施することができ、E n z y m e I m m u n o a s s a y (M a g g i o (編)、1980)；およびH a r l o w & L a n e、上掲に広く概説されている。一般的な免疫アッセイの概説については、M e t h o d s i n C e l l B i o l o g y : A n t i b o d i e s i n C e l l B i o l o g y、第37巻(A s a i (編)、1993)；B a s i c a n d C l i n i c a l I m m u n o l o g y (S t i t e s & T e n (編)、第7版、1991)も参照されたい。

30

【0336】

一般的に用いられるアッセイとしては、非競合的アッセイ、例えば、サンドイッチアッセイ、および競合的アッセイが挙げられる。典型的には、E L I S Aアッセイなどのアッセイを用いることができる。E L I S Aアッセイは当業界で公知であり、例えば、様々な組織および試料、例えば、血漿または血清をアッセイするためのものである。血清中のH G FをアッセイするためのE L I S Aアッセイが本明細書に例示される。E L I S Aにおける使用にとって好適な抗H G F抗体は、当業界で公知である。

40

【0337】

そのようなアッセイ形式を用いる様々な免疫アッセイ技術が利用可能であり、例えば、米国特許第4,016,043号、第4,424,279号および第4,018,653号を参照されたい。これらのものは、非競合型の単一部分および2部位または「サンドイッチ」アッセイ、ならびに伝統的な競合結合アッセイの両方を含む。これらのアッセイは

50

また、標識された抗体の標的バイオマーカへの直接結合を含む。サンドイッチアッセイは、一般的に用いられるアッセイである。サンドイッチアッセイ技術のいくつかの変形が存在する。例えば、典型的なフォワードアッセイにおいては、未標識の抗体を固相基質上に固定し、試験しようとする試料を、結合した分子と接触させる。好適なインキュベーション期間の後、抗体-抗原複合体の形成を可能にするのに十分な時間にわたって、検出可能なシグナルを産生することができるリポーター分子で標識された、抗原に特異的な二次抗体を添加し、抗体-抗原標識抗体の別の複合体の形成にとって十分な時間インキュベートする。未反応の材料を洗浄除去し、抗原の存在を、リポーター分子により産生されたシグナルの観察により決定する。その結果は、眼に見えるシグナルの単純な観察による定性的なものであるか、または既知量のバイオマーカ含有する対照試料と比較することにより定量することができる。

10

【0338】

フォワードアッセイ上での変形は、試料と標識された抗体との両方を、結合した抗体に同時に添加する同時的アッセイを含む。これらの技術は当業者には周知であり、例えば、任意の小さい変形が容易に明らかである。典型的なフォワードサンドイッチアッセイにおいては、バイオマーカに対する特異性を有する第1抗体を、固相表面に共有的または受動的に結合させる。固相表面はガラスまたはポリマーであってよく、最も一般的に用いられるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンである。固相支持体は、チューブ、ビーズ、マイクロプレートのディスク、または免疫アッセイを行うのに好適な任意の他の表面の形態であってよい。結合プロセスは当業界で周知であり、一般的には、共有結合を架橋すること、または物理的に吸着することからなり、ポリマー-抗体複合体を、試験試料の調製において洗浄する。次いで、試験しようとする試料のアリコート固相複合体に添加し、抗体中に存在する任意のサブユニットの結合を可能にするのに十分な時間（例えば、2～40分またはより都合の良い場合、一晚）および好適な条件下（例えば、室温～40℃、例えば、25～32℃（包括的））でインキュベートする。インキュベーション期間の後、抗体サブユニット固相を洗浄し、乾燥し、バイオマーカの一部に特異的な第2抗体と共にインキュベートする。第2抗体の分子マーカへの結合を示すために用いられるリポーター分子に、第2抗体を連結する。

20

【0339】

代替的な方法は、試料中の標的バイオマーカを固定すること、次いで、リポーター分子で標識されていても、または標識されていなくてもよい特異的抗体に、固定された標的を曝露することを含む。標的の量およびリポーター分子シグナルの強度に応じて、結合した標的は、抗体を用いて直接標識することにより検出可能であってよい。あるいは、第1抗体に特異的な、第2標識抗体を、標的-第1抗体複合体に曝露して、標的-第1抗体-第2抗体三次複合体を形成させる。この複合体を、標識されたりポーター分子により放出されるシグナルによって検出する。

30

【0340】

酵素免疫アッセイの場合、酵素を、一般的にはグルタルアルデヒドまたはペリオダートを用いて第2抗体にコンジュゲートさせる。しかしながら、容易に認識されるように、様々な異なるコンジュゲーション技術が存在し、当業者には容易に利用可能である。一般的に用いられる酵素としては、西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ペーサー-ガラクトシダーゼ、およびアルカリホスファターゼが挙げられ、その他は本明細書で考察されている。特定の酵素と共に用いられる基質は、一般的には、対応する酵素による加水分解時に、検出可能な色の変化の産生について選択される。好適な酵素の例としては、アルカリホスファターゼおよびペルオキシダーゼが挙げられる。また、上記の発色基質よりもむしろ蛍光産物をもたらす蛍光発生基質を用いることもできる。全ての事例において、酵素-標識抗体を第1抗体-分子マーカ複合体に添加し、結合させた後、過剰の試薬を洗浄除去する。次いで、適切な基質を含有する溶液を、抗体-抗原-抗体の複合体に添加する。基質は、第2抗体に連結された酵素と反応し、定性的な眼に見えるシグナル

40

50

を与え、これを通常は分光光度分析によりさらに定量して、試料中に存在したバイオマーカーの量の指標を得ることができる。あるいは、フルオレセインおよびロダミンなどの蛍光化合物を、その結合能力を変えことなく抗体に化学的にカップリングさせることができる。特定の波長の光を照射することにより活性化された場合、蛍光色素で標識された抗体は光エネルギーを吸着し、分子中で励起状態を誘導した後、光学顕微鏡で視覚的に検出可能な特徴的な色の光を放出する。E I Aと同様、蛍光標識された抗体を、第1抗体-分子マーカー複合体に結合させる。未結合の試薬を洗浄除去した後、残存する三次複合体を適切な波長の光に曝露すると、観察される蛍光は対象の分子マーカーの存在を示す。免疫蛍光およびE I A技術は両方とも、当業界で非常に定着しており、本明細書で考察される。

10

【0341】

他の検出技術、例えば、MALDIを用いて、試料中のバイオマーカー、例えば、B r a f 突然変異体の存在を直接検出することができる。

【0342】**V. 製品**

本発明の別の実施形態においては、癌（メラノーマまたは甲状腺乳頭癌など）の処置における使用のための製品が提供される。製品は、容器と、容器上の、または容器に関連するラベルもしくは添付文書とを含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどが挙げられる。容器を、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成することができる。容器は、活性薬剤としての癌薬剤を含む組成物を保持または含有し、滅菌アクセスポート（例えば、容器は静脈内溶液バッグまたは皮下注射針により貫通可能なストッパを有するバイアルであってもよい）を有してもよい。

20

【0343】

製品は、無菌注射用水（B W F I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液およびデキストロース溶液などの薬学的に許容される希釈バッファーを含む第2の容器をさらに含んでもよい。製品は、他のバッファー、希釈剤、フィルタ、針、およびシリンジなどの、商業的見地およびユーザの見地から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

【0344】

また、本発明の製品は、組成物が本明細書に記載の（1つまたは複数の）バイオマーカーの発現レベルに基づいて癌を処置するために用いられることを示す、例えば、添付文書の形態の情報を含む。添付文書またはラベルは、紙または磁気的に記録された媒体（例えば、フロッピーディスク）もしくはC D - R O Mなどの電氣的媒体上などの、任意の形態を取ってもよい。ラベルまたは添付文書はまた、キットまたは製品中の医薬組成物および剤形に関する他の情報を含んでもよい。方法は、本明細書に記載の任意の処置および診断方法を含む。

30

【0345】

本発明の一実施形態によれば、一緒に包装された、薬学的に許容される担体中のc - m e t アントゴニスト（例えば、抗c - m e t 抗体）と、c - m e t アントゴニストがc - m e t バイオマーカーの発現に基づいて癌（メラノーマなど）を有する患者を処置するためのものであることを示す添付文書とを含む製品が提供される。いくつかの実施形態においては、処置は、B - r a f アントゴニストと組み合わせられる。いくつかの実施形態においては、添付文書は、c - m e t アントゴニストが、c - m e t バイオマーカーおよびB - r a f バイオマーカーの発現に基づいて癌（メラノーマなど）を有する患者を処置するためにB - r a f アントゴニストと組み合わせられることを示す。いくつかの実施形態においては、B - r a f バイオマーカーは、B - r a f V 6 0 0 Eである。

40

【0346】

本発明はまた、包装中で、c - m e t アントゴニスト（例えば、抗c - m e t 抗体）を含む医薬組成物と、医薬組成物がc - m e t バイオマーカーの発現に基づいて癌（N S C L C など）を有する患者を処置するためのものであることを示す添付文書とを組み合わせることを含む、製品を製造するための方法に関する。いくつかの実施形態においては、処

50

置は、B - r a f アンタゴニストと組み合わせられる。いくつかの実施形態においては、添付文書は、c - m e t アンタゴニストが、c - m e t バイオマーカーおよび B - r a f バイオマーカーの発現に基づいて癌（メラノーマなど）を有する患者を処置するために B - r a f アンタゴニストと組み合わせられることを示す。いくつかの実施形態においては、B - r a f バイオマーカーは、B - r a f V 6 0 0 である。いくつかの実施形態においては、B - r a f バイオマーカーは、B - r a f V 6 0 0 E である。

【0347】

製品は、無菌注射用水（B W F I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液および/またはデキストロス溶液などの薬学的に許容される希釈バッファーを含むさらなる容器をさらに含んでもよい。製品は、他のバッファー、希釈剤、フィルタ、針、およびシリンジなどの、商業的見地およびユーザの見地から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

10

【0348】

V I . 診断キット

本発明はまた、本明細書で定義される任意の1つまたは複数のバイオマーカーを検出するのに有用な診断キットに関する。したがって、癌患者に由来する試料中の1つまたは複数のc - m e t、およびB - r a f、例えば、B - r a f V 6 0 0 バイオマーカーの発現を決定するための1つまたは複数の試薬を含む診断キットが提供される。場合により、キットは、患者がc - m e t バイオマーカーを発現する場合、および/または患者がB - r a f バイオマーカーを発現する場合、癌患者を処置するための癌薬剤（例えば、B - r a f アンタゴニストと組み合わせ、c - m e t アンタゴニスト、例えば、抗c - m e t 抗体）を選択するためにキットを使用するための指示書をさらに含む。いくつかの実施形態においては、B - r a f バイオマーカーは、B - r a f V 6 0 0 である。いくつかの実施形態においては、B - r a f バイオマーカーは、(a) 患者のメラノーマの試料から抽出された核酸（例えば、D N A）上でP C Rまたは配列決定を実施すること；および(b) 試料中のB R A F^{V600}の発現を決定することを含む方法を用いて決定される。いくつかの実施形態においては、メラノーマ試料は、ホルマリン固定、パラフィン包埋される。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカーはH G Fであり、発現はI H Cを用いて患者のメラノーマ（またはメラノーマ間質）の試料中で検出される。いくつかの実施形態においては、c - m e t バイオマーカーはH G Fであり、発現はE L I S Aを用いて患者の血清の試料中で検出される。診断方法は、本明細書に記載の任意の診断方法を含む。

20

30

【0349】

V I I . 宣伝方法

本発明はまた、標的聴衆に、c - m e t バイオマーカーおよび/またはB - r a f バイオマーカーの発現に基づいて癌を有する患者を処置するための癌薬剤（例えば、抗c - m e t 抗体）の使用を奨励することを含む、癌薬剤を宣伝するための方法に関する。

【0350】

宣伝は一般に、出資者が同定され、メッセージが制御される非個人媒体を介する通信に支払われる。本明細書の目的のための宣伝は、広報、広報活動、プロダクトプレイズメント、資金提供、引受業務、および販売奨励を含む。この用語はまた、大衆に、説得する、情報提供する、奨励する、動機付ける、またはさもなければ本発明を購入、支援、もしくは認可する好ましいパターンに向かって挙動を改変させるように訴えるように設計された、任意の印刷通信媒体中に出現する資金提供された情報公示も含む。

40

【0351】

本明細書に記載の診断方法の宣伝および奨励を、任意の手段により達成することができる。これらのメッセージを送達するために用いられる宣伝媒体の例としては、テレビジョン、ラジオ、映画、雑誌、新聞、インターネット、および掲示板、例えば、放送媒体に出現するメッセージであるコマーシャルが挙げられる。宣伝はまた、カートのシート、空港の歩道の壁、およびバスの側面上のもの、または電話に保持されたメッセージもしくは店内P Aシステム中で聞かれるものが挙げられ、または視覚的もしくは聴覚的通信をどこに

50

でも置くことができる。

【0352】

奨励または宣伝手段のより具体的な例としては、テレビジョン、ラジオ、映画、ウェブ放送およびオンラインセミナーなどのインターネット、同時にユーザに届くように意図された双方向コンピュータネットワーク、固定掲示板または電子掲示板および他の公共用サイン、ポスター、雑誌および新聞などの伝統的文献または電子文献、例えば、電子メール、電話、インスタントメッセージ、郵便、国際宅配便、集団、または配達郵便、来店などによる他の媒体出力、プレゼンテーションもしくは個別コンタクトが挙げられる。

【0353】

用いられる宣伝の種類は、多くの因子、例えば、届けようとする標的聴衆の性質、例えば、病院、保険会社、診療所、医師、看護師、および患者、ならびに薬剤および診断の宣伝を左右する費用の考慮および関連する管轄の法律および規則に依存する。宣伝は、サービス相互作用により規定されるユーザ特性ならびに/またはユーザの人口動態および地理的位置などの他のデータに基づいて個別化またはカスタマイズすることができる。

10

【実施例1】

【0354】

抗癌キナーゼ阻害剤に対する増殖因子誘導性耐性方法

RTKリガンドマトリックススクリーニング。核酸染料 Syto 60 (Invitrogen) を用いて、細胞生存能力を評価した。細胞 (3000 ~ 5000 個/ウェル) を 96 穴プレートに播種し、一晚附着させた。次の日、細胞を 50 ng/mL の RTK リガンドで処理し (または処理せず)、増加する濃度範囲の関連キナーゼ阻害剤に同時に曝露した。72 時間の薬剤曝露後、細胞を 4% ホルムアルデヒド中に固定し、Syto 60 で染色し、細胞数を Odyssey スキャナ (Li-Cor) を用いて評価した。薬剤処理された細胞から得られた蛍光を、対照 (薬剤なし) 処理された細胞から得られた蛍光で除算することにより、細胞生存能力を算出した。

20

【0355】

細胞系。以前に記載されたような自動化プラットフォームを用いて、ヒト癌細胞系を取得し、感受性について試験した (Johannessen, C. M. ら、「COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation」、Nature 468、968 ~ 972 頁、doi: 10.1038/nature09627 (2010))。細胞系を、5% CO₂ で加湿雰囲気中 37 °C で維持し、10% ウシ胎仔血清 (GIBCO)、50 ユニット/mL のペニシリンおよび 50 μg/mL のストレプトマイシン (GIBCO) を添加した RPMI 1640 または DMEM/F12 増殖培地 (GIBCO) 中で増殖させた。

30

【0356】

試薬。ラパチニブ、スニチニブおよびエルロチニブを、LC Laboratories から購入した。クリゾチニブ、TAE684、AZD6244 および BEZ235 を、Selleck Chemicals から購入した。PD173074 を、Tocris Bioscience から購入した。PLX4032 を、Active Biochem から購入した。組換えヒト (rh) HGF、EGF、FGF - 塩基性、IGF - 1 および PDGF - AB を、Peprotech から購入した。rhNRG1 - 1 を、R&D Systems から購入した。in vivo 試験のために、3D6 抗 MET アゴニスト抗体、RG7204 (PLX4032) および GDC - 0712 は、Genentech で作製された。GDC - 0712 はクリゾチニブと類似するキナーゼプロファイルを有するため、それを異種移植実験において用いた (Liederer, B. M. ら、Xenobiotica 41、327 ~ 339 頁、doi: 10.3109/00498254.2010.542500 (2011)) (図 25 および 図 26)。

40

【0357】

50

免疫ブロッティング。Haltプロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤カクテル (Thermo Scientific) を添加した Nonidet - P40 溶解バッファーを用いて、細胞溶解物を収獲し、標準的なプロトコルを用いてタンパク質の免疫検出を実行した。ホスホ - HER2 (Y1248 ; #2247)、HER2 (#2242)、ホスホ - HER3 (Y1289 ; #4791)、ホスホ - MET (Y1234 / 5 ; #3126)、PDGFR (#5241)、ホスホ - FRS2 (Y196 ; #3864)、IGF - 1R (#3027)、ホスホ - ALK (Y1604 ; #3341)、AKT (#9272)、ホスホ - ERK (T202 / Y204 ; #9101)、ERK (#9102)、GAPDH (#2118) および - チューブリン (#2146) 抗体を、Cell Signaling Technologies から購入した。HER3 (SC - 285)、MET (SC - 10)、ホスホ - PDGFR (SC - 12911)、FRS2 (SC - 8318)、FGFR1 (SC - 7945)、FGFR2 (SC - 122)、FGFR3 (SC - 13121) および ALK (SC - 25447) に対する抗体を、Santa Cruz Biotechnologies から購入した。ホスホ - AKT (S473 ; #44 - 621G) 抗体を、Invitrogen から購入した。ホスホ - EGFR (Y1068 ; ab5644) 抗体を、Abcam から購入した。EGFR (#610017) 抗体を、BD Biosciences から購入した。PARP (#14 - 6666 - 92) 抗体を、eBioscience から購入した。密度測定を、ImageJ ソフトウェアを用いて実行した。

10

20

【0358】

組織試料。IRB に適切に認可され、患者のインフォームドコンセントを得た原発乳房腫瘍試料を、以下の供給源から取得した : Cureline (South San Francisco, CA)、ILSbio (Chester town, MD) および Cooperative Human Tissue Network of the National Cancer Institute。転移性メラノーマ腫瘍試料を、BRIM2 試験から取得した。試験において用いられたヒト組織試料を、その使用の前に脱同定 (二重暗号化) したので、これらの試料を用いる試験は US Department of Human and Health Services の規則および関連する指針の下でのヒト対象研究ではないと考えられる。MET に関する免疫組織化学分析を、正に荷電したガラススライド上で 4 μm の厚さに切断されたホルマリン固定パラフィン包埋切片上で実施した。MET ウサギモノクローナル抗体 SP44 (Spring Bioscience, Pleasanton, CA ; #M3441) および CC1 標準抗原回復を用いて、Ultraview 検出を含む Discovery XT 自動染色装置 (VMSI, Tucson, AZ) 上で染色を実施した。切片をヘマトキシリンで対抗染色し、c - MET に関する特異的染色 (例えば、膜染色) を、0 (染色なし) ~ 3 + (強い染色) のスケールでスコア化した。

30

40

【0359】

スコアリングスキームは、共同所有された米国特許出願公開第 US 20120089541A1 号 (この内容はその全体が参照により本明細書に組込まれる) に記載されている。簡単に述べると、腫瘍細胞を、c - Met 染色についてスコア化した。染色を、対照細胞ペレットと比較した強い (3+)、中程度の (2+)、弱い (1+)、不明瞭な (+ / -) または陰性 (-) 染色強度と分類したが、様々な染色強度を IHC 分析のための対照として、ならびにスコアリング対照として用いてもよい。H441 (強い c - met 染色強度) ; A549 (中程度の c - met 染色強度) ; H1703 (弱い c - met 染色強度)、HEK - 293 (293) (弱い c - met 染色強度) ; および TOV - 112D (陰性の c - met 染色強度) または H1155 (陰性の c - met 染色強度) を用いた。染色強度の評価に加えて、様々な染色強度 / パターンのパーセンテージを、異種シグナルを用いて試料中で視覚的に見積もった。

【0360】

肝細胞増殖因子 (HGF) ELISA。血漿を、投与前サイクル 1 の転移性メラノーマ

50

患者から取得し、患者由来血漿中のHGFの濃度を、サンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を用いて定量的に測定した。NUNC MaxiSorpマイクロタイタープレートのウェルを、100 μ Lの被覆バッファー(0.05M炭酸ナトリウムバッファー、pH9.6)中の0.5 μ g/mLの親和性精製されたヤギ抗ヒト肝細胞増殖因子ポリクローナル抗体で被覆(ON、4)した後、アッセイバッファー(PBS、0.5%BSA、0.05%P20、0.25%CHAPS、0.35M NaCl、5mM EDTA、10ppm Proclin300、pH7.4)中の0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)で室温で1時間遮断した。アッセイバッファー中の希釈したヒト肝細胞増殖因子対照および血漿試料(100 μ L)を2回ロードし、室温で2時間インキュベートした後、100 μ Lの親和性精製されたヤギ抗ヒト肝細胞増殖因子ビオチン(150ng/mL)を室温でさらに1時間添加した。PBS、0.5%BSA、0.05%P20、10ppm Proclin300、pH7.4中のアビジンコンジュゲート化西洋わさびペルオキシダーゼ(40ng/mL)を添加し(1時間、室温)、100 μ Lの発色基質(TMB)を15分間添加することにより反応を可視化した。1Mリン酸を用いて反応を停止させ、ELISAプレートリーダーを用いて630nmでの還元を用いて450nmでの吸光度を測定した。各ステップの後、プレートを、洗浄バッファー(0.05%Tween 20/PBS)を用いて3回洗浄した。定量のための参照として、ヒト肝細胞増殖因子(CritRS CR67; 2000-15.625pg/mL)の連続希釈により、標準曲線を確認した。

10

【0361】

20

異種移植試験。全ての手順は、Institutional Animal Care and Use Committee of Genentechにより設定された指針および原則に従い、AAALAC(Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal care)認可施設にて実行された。1000万個の928MELまたは624MEL BRAF突然変異体メラノーマ細胞(HBSS/Matrigel中に懸濁(例えば、1:1混合物))を、CRL C.B-17 SCID.bgマウス(Charles River Laboratories)の右脇腹に接種した。腫瘍が200mm³の平均体積に達した時、マウス(1群あたり10匹)を、4週間にわたって、示されたように対照抗体(抗gp120; 10mg/kg、週1回; 腹腔内)、3D6(抗METアゴニスト抗体; 10mg/kg、週1回; 腹腔内)、RG7204(PLX4032; 50mg/kg、1日2回、眼周囲)、GDC-0712(MET小分子阻害剤、100mg/kg、毎日、眼周囲)で処置した。デジタルカリパス(Fred V. Fowler Company, Inc.)を用いて週2回、腫瘍を測定した。式(Lx(WxW))/2を用いて、腫瘍体積を算出した。本実施例における部分的応答(PR)は、50%を超えるが、100%未満である腫瘍体積の減少と定義された。本実施例における完全な応答(CR)は、腫瘍体積の100%の減少と定義された。PLX4032処置された対照抗体群と、PLX4032-およびGDC-0712-処置された対照抗体群との差異を、二元配置分散分析(*=0.0008)を用いて決定した。

30

【0362】

40

分泌因子スクリーニング。組換え精製された分泌因子を、必要に応じてPeprotechおよびR&D Systemsから購入し、PBS/0.1%BSA中で再構成させた。分泌因子を、1 μ g/mLの濃度で96穴プレート中に移した後、薬剤を含まないか、または5 μ MのPLX4032を含む培地中で100ng/mLに希釈した。等量の希釈因子(最終濃度50ng/mL)を、Oasis液体ハンドラーを用いてSK-MEL-28細胞を予め播種した(前日に播種されたウェルあたり500個の細胞)384穴プレート中に配置した。72hのインキュベーションの後、Cell Titer Glo(Promega)を用いて、細胞生存能力を決定した。

【0363】

統計分析。細胞生存能力アッセイにおけるエラーバーは、平均+/-平均の標準誤差(

50

s . e . m .) を表す。受容体とリガンドとの相関付けのために、以下の群：受容体陽性、レスキューされた R T K リガンド；受容体陽性、レスキューされていない R T K リガンド；受容体陰性、レスキューされた R T K リガンド；受容体陰性、レスキューされていない R T K リガンドに関する 2 x 2 の分割表を用いてレスキューを実行した。両側 F i s h e r 直接確率検定を用いて、有意差を決定した。

【0364】

B R I M 2 臨床試料の統計分析。H G F レベルを対数変換し、K o l m o g o r o v - S m i r n o f f 検定を用いて、ガウス分布からの逸脱について得られた分布を検定した。C o x 比例モデルを用いて、無進行生存 (P F S) および全生存 (O S) との関連について対数変換された H G F レベルを検定した。W i l c o x o n の順位和検定を用いて、10 応答と H G F レベルとの関係を検定した。K a p l a n - M e i e r (K M) 曲線を用いて、H G F レベルと時間事象結果 (P F S および O S) との関係を示した。事象 / 患者数および中央時間事象を、各群について示す。連続的 H G F レベルの関数としての結果の C o x 比例モデルを用いて、ハザード比および対応する p 値を算出した。

【0365】

結果

以前に定義されたキナーゼ依存性⁷⁻⁹を有する 41 種の異なるヒト腫瘍由来細胞系を用いて、本発明者らは、癌細胞および腫瘍間質中に広く発現されることが知られる¹⁰、6 つの異なる R T K リガンド (H G F 、 E G F 、 F G F 、 P D G F 、 N R G 1 、 I G F) の、20 薬剤応答に対する効果を試験するための「マトリックス分析」を行った。具体的には、本発明者らは、さもなければ 72 時間以内にその増殖を強力に抑制するキナーゼ阻害剤 (例えば、ラパチニブ) の I C 5 0 に対する、各リガンドへのこれらの癌細胞系 (例えば、A U 5 6 5 (H E R 2 a m p)) の曝露の効果を定量した (図 1 a) 。試験したほぼ全てのキナーゼ依存的癌細胞系は、複数の組織型から誘導され、異なるキナーゼ依存性 (E G F R 、 H E R 2 、 B R A F 、 M E T 、 A L K 、 P D G F R 、 および F G F R) を有する細胞を含み、1 つまたは複数の R T K リガンドによる薬剤誘導性増殖阻害からレスキューすることができ、これは、キナーゼ依存的腫瘍細胞における選択的キナーゼ阻害剤に対する、応答に対するこれらのリガンドの潜在的に広い寄与を強調している (図 1 b) 。

【0366】

薬剤応答に対するリガンド曝露の結果を、3 つのクラスに分類することができる (図 1 c) ; 「レスキューなし」: リガンドの添加は薬剤応答に検出可能に影響しなかった; 「部分的レスキュー」: リガンドは部分的に処置応答を無効化した、または「完全なレスキュー」: リガンドは I C 5 0 値を 10 倍を超えて「右にシフトさせた」、もしくは薬剤応答を完全に抑制した。H G F 、 F G F および N R G 1 は薬剤耐性の付与に関して最も広く活性なりガンドであり、次いで E G F であったが、I G F および P D G F はその対応する受容体を活性化するその能力にも拘らず、比較的小さい効果を有していた (図 5 a および 図 7 a) 。注目すべきことに、試験した細胞系の多くは、2 つ、またはさらには 3 つの異なるリガンドへの曝露により処置感受性からレスキューすることができ、これは、様々な R T K リガンドへの曝露時に冗長な生存経路に關与するそのような細胞の見かけの能力を強調している。有意には、試験した R T K リガンドはいずれも、いくつかの試験した細胞系における化学療法剤シスプラチンの増殖抑制効果から細胞をレスキューすることができなかつたが、これは、観察されたリガンドレスキュー効果が全身毒性薬剤からの広い保護を反映せず、むしろ、経路特異的シグナル破壊に限定されることを示唆している (図 5 b) 。

【0367】

キナーゼ依存性からのリガンド媒介性レスキューと関連するシグナリング力学をさらに探索するために、本発明者らは、R T K により一般的に關与される 2 つの重要な下流生存シグナリング経路 - P I 3 K / A K T および M A P K / E R K 経路¹¹を評価した。リガンド媒介性レスキューが達成された場合、R T K リガンドは、キナーゼ阻害剤の存在にも拘らずこれらの経路の少なくとも 1 つを効率的に「再活性化」することができた (図 2 a)

。依存的キナーゼの自己リン酸化がR T Kリガンド同時処置後に抑制されたままであったため、経路再活性化は腫瘍形成性キナーゼの再活性化に起因するものではなかった。様々な試験したモデルにおいて、H G FはP I 3 KとM A P K経路の両方を再活性化し、I G FおよびN R G 1はP I 3 Kのみを再活性化し、F G FとE G FはM A P K経路のみを再活性化した。

【0368】

「冗長なR T K」の活性化および結果として生じる下流の生存シグナリングは、ラパチニブおよびH G Fで同時処置されたA U 5 6 5細胞を用いて証明されたように少なくとも48時間持続した(図9b)。P I 3 KとM A P K経路の両方の再活性化に関する「付加的」役割は、N R G 1、F G Fまたは組合せの存在下で、ラパチニブ処置されたA U 5 6 5細胞において観察された(図14a)。しかしながら、P I 3 K経路(M A P Kではない)の特異的阻害は、H G Fにより促進される薬剤耐性を弱め、両生存経路の関与と関連していた(図14b)。

10

【0369】

予想通り、細胞生存および経路シグナリングの観察されたR T Kリガンド誘導性レスキューを、二次活性化キナーゼを同時標的化することにより逆転させることができたが、これは、有効なリガンドがその同族R T Kを介して作用していたことを確認するものである(図2b、c、図5c、d、図22)。有意には、様々な試験したモデルにおいてリガンド誘導性レスキューを媒介した「二次」R T Kの阻害剤は、これらの細胞系において単一薬剤処置としてほとんど効果がないか、または全く効果がなかったが、これは、キナーゼ依存的細胞が利用可能なリガンドの非存在下では複数の異なるR T Kに最初から依存しないことを示している。同様に、R T Kリガンド刺激は、キナーゼ阻害剤の非存在下で細胞増殖に対してほとんど効果がないか、または全く効果がなかった(図1cおよび図2b)。

20

【0370】

細胞系パネルにわたるベースラインR T K発現の分析により、これらのキナーゼ依存的癌細胞が全て、複数のR T Kを発現することが確認され、これは、多くの癌細胞が細胞外リガンドからの生存シグナルを受容するように「プライミング」されることを示唆している。注目すべきことに、リガンド誘導性レスキューは、いくつかの事例においては特定のR T Kの発現と良好に相関した(例えば、M E T / H G F、E G F R / E G FおよびH E R 3 / N R G 1)($p < 0.01$; 図6)が、これは、処置前の腫瘍のR T Kプロファイルが腫瘍微小環境における対応するリガンドの利用可能性に応じて、癌細胞生存に寄与し得る2つ以上のキナーゼを同時標的化する必要性を予測する最適な処置戦略を知らせることができることを示唆している。

30

【0371】

いくつかの事例においては、リガンドは、リガンドに会合したR T Kの発現にも拘らず、薬剤感受性から細胞をレスキューすることができなかった。本発明者らは、この文脈におけるリガンド誘導性レスキューの失敗と関連する2つの異なる生化学的シナリオを同定した(図7)。いくつかの事例においては、R T KリガンドはR T Kリン酸化により証明されるように、その受容体を活性化することができたが、その結果として生じるP I 3 KまたはM A P Kを介する下流のシグナリングは観察されなかった。これは、例えば、I G Fを用いる処置の際にC O L O - 2 0 1およびB T 4 7 4細胞系において見られた(図7a)。他の事例においては、R T Kリガンドはその受容体ならびに少なくとも1つの下流の生存エフェクターを活性化したが、それはキナーゼ阻害から細胞をレスキューするには十分ではなかった。これは、例えば、H G Fへの曝露時にH 2 2 2 8およびH 3 5 8細胞について、またはN R G 1への曝露時にC O L O - 2 0 1細胞について観察された(図7b)。しかしながら、H 2 2 2 8およびH 3 5 8細胞は、より長期にわたる処置の後にH G Fにより「レスキュー」されるが、これは、H G Fに応答することができ、以下に詳述されるように、阻害的キナーゼの存在下で時間と共に選択することができる細胞のサブ集団の存在をおそらく示している(図8c、d)。

40

50

【0372】

細胞系の分析により、潜在的に重要な臨床的意義を持ついくつかの知見が得られた。例えば、ALK関連染色体転座(NCI-H3122)を担持し、ALKキナーゼ依存を示す2つの試験したNSCLC細胞系のうちの1つを、HGFへの簡単な曝露によりALK阻害から効率的にレスキューすることができる(図8)。これらの細胞においては、HGF受容体METが発現され、HGFはALK選択的阻害剤TAE684の存在下でもERKおよびAKT活性化を促進する。しかしながら、有意には、これらの細胞の生存は、ALKが転座したNSCLCにおける印象的な臨床活性が最近示された¹²、二重ALK/METキナーゼ阻害剤であるクリゾチニブを用いる処置によってHGFの存在下でも効率的に抑制された。HGFに応答するこれらの細胞の観察された能力を考慮すると、多くのALK転座NSCLC患者において観察された比較的持続的な臨床応答は、ALKおよびMET媒介性生存シグナルの両方を効率的に抑制することができるクリゾチニブの二重阻害的性質の一部起因し得る。興味深いことに、第2のALK転座NSCLC系であるNCI-H2228もまた検出可能なMETを発現するが、試験した72時間の時点でHGFによるALK阻害からレスキューされなかった。しかしながら、HGF処置は、TAE684の存在下でAKTおよびERK活性を再活性化することができ(図7b)、HGFの存在下でのより長期的なTAE684処置はこれらの細胞におけるTAE684に対する耐性獲得を防止した(図8c)。この知見は、以前に記載された元々存在するMET発現腫瘍細胞サブ集団がいくつかのEGFR突然変異体NSCLC患者中に存在することが示されたことを連想させる¹³。

10

20

【0373】

HER2キナーゼ阻害剤ラパチニブによる増殖阻害から9種の試験したHER2増幅乳癌細胞系のうちの3種をレスキューするHGFの能力も予想外であった(図3a)。これらの3種の細胞系は全てMETを発現し、その発現はラパチニブ応答を弱めるHGFの能力と良好に相関していた(図3b)。NCI-H228細胞系と同様、部分的にHGFでレスキューされたAU565 MET発現細胞のより長期的な同時処置(12日)は、HGFが、おそらくMET発現細胞のサブ集団の選択を誘導することにより、ラパチニブに対する耐性を迅速に促進することを示していた(図3c、9b)。実際、AU565細胞の9日間のラパチニブおよびHGFの同時処置により、MET発現が増加した細胞集団が得られたが、これはHGF曝露がMET発現細胞のサブ集団を選択したことを示唆している(図3f)。生化学的分析により、HGFが、MET陽性細胞においては特異的にPI3KおよびMAPKシグナリング経路を再活性化するが、MET陰性細胞においては再活性化しないことを示していた(図3d)。

30

【0374】

本発明者らは次に、HER2陽性原発乳房腫瘍がMETタンパク質を検出可能に発現するかどうかを決定した(図3e)。分析した10個の試料のうち、1個の試料が腫瘍細胞の約30%において中程度および高いMET発現を示し、5個の試料が腫瘍細胞の約10%においてMET発現を示した。1つのHER2増幅乳癌細胞系(HCC1954)は、外因性HGFの非存在下でホスホ-METの上昇を示したが、これは、自己分泌機構を示し(図3b)、これらの細胞におけるMETキナーゼ阻害はラパチニブ耐性の出現を遅延させた(図3g)。まとめると、これらの結果は、METを発現するHER2陽性乳房腫瘍が、METを「プライミング」された腫瘍細胞のサブ集団に関与させることによりHER2キナーゼ阻害を潜在的に回避し、標的化療法に対する耐性をもたらすことができること、およびMET依存性へのこの切替えがHGFの利用可能性により誘導され得ることを示唆している。この可能性と一致して、SKBR3およびAU565細胞は同じ患者から誘導されたが、これは患者腫瘍内のMET発現の相応しい異種性を強調している。本発明者らはまた、9種の試験したHER2増幅乳癌細胞系のうちの8種を、HER3リガンドNRG1への曝露によりラパチニブ感受性からレスキューすることができ、HER2標的化処置に対する可変的応答における腫瘍微小環境におけるNRG1発現にとって潜在的に重要な役割を含むことを見出した(図23)。

40

50

【0375】

直接の潜在的な臨床的意義を持つ別の観察は、HGF曝露が、いくつかの試験したBRRAF突然変異体PLX4032感受性メラノーマおよび結腸直腸細胞系においてBRRAFキナーゼ阻害剤PLX4032に対する応答を有意に弱めるという予想外の知見であった。PLX4032はBRRAF突然変異体メラノーマにおける顕著な臨床効果を最近示したが、これによって臨床的使用のためのその最近の認可が得られた¹⁴。

【0376】

PLX4032感受性に同様に影響するHGF以外の増殖因子および他のサイトカインの潜在的な役割を決定するために、本発明者らは、446種の異なる組換え精製された分泌因子のそれぞれの存在下でのPLX4032に対するSK-MEL-28細胞の感受性を比較した。この分析により、HGFを含む非常に少数の因子がPLX4032感受性を弱めることができることが示された(図17)。

10

【0377】

本発明者らは、PLX4032に応答するHGF-METシグナリングの潜在的により広い役割を探索するために、さらに12種のBRRAF突然変異体メラノーマ細胞系を試験した(図4a)。HGFは、12種の細胞系のうちの5種においてPLX4032感受性を有意に弱めた。10種のHGFでレスキューされた細胞系のうちの8種が検出可能なMET発現を示したが、レスキューされなかった細胞においてはMETは検出不可能であるか、またはわずかに検出可能であった。注目すべきことに、MET発現はHGFでレスキュー可能な細胞系においてPLX4032感受性と逆相関し、HGFはHGFによりレスキューされた細胞系においてはMAPKシグナリングを再活性化することができたが、MET陰性HGF非レスキュー細胞においては再活性化することができなかった(図4b)。予測された通り、HGFによる生存レスキューは、METがクリゾチニブにより阻害された場合、逆転した(図4bおよび図9a)。1つのBRRAF突然変異細胞系(624MEL)は、外因性HGFの非存在下でホスホ-METの上昇を示し、自己分泌機構(図4a)と一致し、これらの細胞におけるMETキナーゼ阻害はPLX4032耐性の出現を遅延させた(図4c)。

20

【0378】

クリゾチニブ同時処置はまた、検出不可能なホスホ-METと共に2つの細胞系(A375および928MEL)におけるPLX4032に対する耐性も防止し、これはPLX4032に対する耐性の媒介におけるHGF活性化METの潜在的な役割をさらに支持している(図18)。

30

【0379】

*in vivo*でのBRRAF阻害に対する耐性におけるHGF-METシグナリングの潜在的な役割を検証するために、本発明者らはBRRAF突然変異体928MELメラノーマ細胞を用いる異種移植試験を実施した。有意には、作動抗体3D6を用いるこれらの腫瘍におけるMETの活性化はPLX4032の増殖抑制効果を無効化した(図4d)。PLX4032に対する応答を弱める際の3D6によるMET活性化の関連を、MET小分子キナーゼ阻害剤を用いる同時処置により証明した。まとめると、これらの結果は、METキナーゼが、HGF活性化を介して、BRRAF突然変異体メラノーマのサブセットにおけるPLX4032に対する臨床応答に寄与し得ることを示唆する。

40

【0380】

知見全体は、多くの腫瘍細胞中で同時に発現され得るRTK間のシグナルクロストークの広範な性質、および癌治療剤としての選択的キナーゼ阻害剤に対する先天的および後天的耐性に寄与する際のRTKリガンドの潜在的に広い役割を強調する。そのようなリガンドを、自己分泌生存機構を誘導するために腫瘍細胞自体により産生させることができるか、または生存シグナリングに対する傍分泌効果により腫瘍細胞における薬剤応答に影響を与えるために腫瘍間質により産生させることができる¹⁵、¹⁶。

【0381】

ヒト腫瘍のますます理解される異種性は、薬剤耐性機構の解明を著しく困難にする¹⁷ ~

50

19。R T Kリガンドの潜在的に広い役割を強調する本発明者らの知見の文脈において、本発明者らは、そのような異種性が耐性獲得に寄与し得る異なる機構を推測している。かくして、腫瘍細胞のサブ集団が生存促進性R T Kリガンドに応答することができる療法の前に存在し、そのようなリガンドが腫瘍微小環境内で利用可能となる場合、このサブ集団を薬剤処置の選択圧を介して拡張することが可能である。実際、B R A F突然変異体メラノーマ細胞におけるM E T発現のI H C分析により、細胞の異種集団が示された(図21)。E G F R突然変異体N S C L Cの場合、M E T誘導性腫瘍細胞のサブ集団は、E G F Rキナーゼ阻害剤による処置の間のH G Fに曝露時に出現し得る¹³。注目すべきことに、複数のR T Kの活性化がグリア芽腫において報告されており、前生存シグナルおよび細胞死の抑制は、複数の活性化受容体を同時標的化した後にのみ観察された(Stommel, J. M.ら、Science 318、287~290頁、doi:10.1126/science.1142946(2007))。また、R T Kリガンドを産生する能力を獲得する理由で腫瘍細胞のサブ集団を選択することも可能である。選択的キナーゼ阻害剤に対する耐性獲得の様々な前臨床モデルにおいて、観察された耐性機構は新しいR T K依存性への「切替え」を含み^{20~25}、いくつかの事例においては、それはR T Kリガンドの産生の増加に起因し得る。そのようなリガンド産生の増加は、突然変異またはエピジェネティックな機構により潜在的に達成され得る。B R A FおよびE G F R突然変異などのゲノムバイオマーカーは療法から利益を得る可能性が最も高い患者を同定する際に重要であったが、応答の規模および持続期間の両方に関して、そのような患者間でキナーゼ阻害剤に対する未だ説明されない広範囲の初期臨床応答が存在する^{12、14}。腫瘍細胞により分泌され、腫瘍微小環境において発現されるか、またはさらには全身的に提供されるR T Kリガンドの潜在的な役割は、今までのところ大きく探索されていない。腫瘍由来細胞系は突然変異的に定義されるサブセットにおける選択的キナーゼ阻害剤に対する遺伝子型関連感受性を捕捉するための強固なモデルであることが示されているため^{7、8}、このマトリックス分析からの知見は、そのような療法からの全体的な臨床利益におけるR T Kリガンドの潜在的に広い役割を支持し、R T Kおよびその関連するリガンドの発現に基づくバイオマーカーの使用のための基礎を提供し、多くの広く発現されるR T Kに共通する重要なエフェクターを介する冗長な生存シグナリングと関連する先天的および後天的耐性機構の両方を予測する処置戦略を知らせる。

【実施例2】

【0382】

B R A F V 6 0 0 Eを有する細胞における様々なP T Kリガンドのレスキュー結果

ここで用いられる方法は、実施例1に記載のものと同様である。本発明者らは、B R A F V 6 0 0 Eを有する細胞における薬剤応答(PLX4032)に対する6つの異なるR T Kリガンド(H G F、E G F、F G F、P D G F、N R G 1、I G F)の効果を検査した。図10は、PLX4032で処理した細胞における様々なP T Kリガンドによるレスキューの結果を示す。

【実施例3】

【0383】

ラパチニブ耐性を遅延させる際のM E Tキナーゼ阻害の効果

ここで用いられる方法は、実施例1に記載のものと同様である。H C C 1 9 5 4細胞におけるラパチニブ耐性を遅延させるM E Tキナーゼ阻害の効果を検査した。H C C 1 9 5 4 H E R 2増幅乳癌細胞を、ラパチニブ(5 μ M)および/またはクリゾチニブ(1 μ M)で処理し、S y t o 6 0で染色した。図11は、H C C 1 9 5 4細胞におけるM E Tキナーゼ阻害がラパチニブ耐性の出現を遅延させたことを示す。

【実施例4】

【0384】

P L X 4 0 3 2に対する細胞応答におけるH G F - M E Tシグナリングの役割

ここで用いられる方法は、実施例1に記載のものと同様である。本発明者らは、P L X 4 0 3 2に対する細胞応答におけるH G F - M E Tシグナリングの役割を検査した。本発

10

20

30

40

50

明者らは、HGFがHGFによりレスキューされた細胞系においてはMAPKシグナリングを再活性化させることができるが、MET陰性HGF非レスキュー細胞においては再活性化することができないことを観察した(図4a、図12a)。in vivoでのBRAf阻害に対する耐性におけるHGF-METシグナリングの潜在的な役割を検証するために、本発明者らは、BRAf突然変異体928MELおよび624MELメラノーマ細胞を用いて異種移植試験を実施した。有意には、MET作動抗体3D6を用いるこれらの腫瘍におけるMETの活性化は、PLX4032の増殖抑制効果を強く無効化した(図12b)。PLX4032に対する応答を弱める際の3D6によるMET活性化の関連を、MET小分子キナーゼ阻害剤を用いる同時処置により検証した。in vitroでの知見と同様、本発明者らは、METキナーゼ活性の阻害がPLX4032で処置された異種移植片における腫瘍退縮に対するより大きい効果を有することを観察し、より部分的な応答が観察された(928MEL:1対8;図12bおよび図19)。まとめると、これらの結果は、METキナーゼが、HGF活性化を介して、BRAf突然変異体メラノーマのサブセットにおけるPLX4032に対する臨床応答に寄与することができることを示唆する。

10

【実施例5】

【0385】

臨床状況におけるHGF-METシグナリングの役割

ここで用いられる方法は、実施例1に記載のものと同様である。臨床状況におけるHGF-METシグナリングの潜在的な役割を検査するために、本発明者らは、BRAf突然変異体メラノーマ患者における循環HGFが臨床転帰に寄与することができるという仮説を試験した。かくして、予備処置された血漿HGFレベルを、BRIM2臨床試験に登録した132人の転移性メラノーマ患者(PLX4032で処置されたBRAf突然変異体転移性メラノーマ患者)のうちの126人から測定した。HGFレベルは33pg/mL~7200pg/mLの範囲であり、中央レベルは334pg/mLであった(図20)。中央を超えるHGFレベルを有するPLX4032処置された患者は、中央より低いHGFレベルを有する患者よりも実質的に低下した無進行生存($p=0.005$)および全生存($p<0.001$)を示した(図13)。HGFの増加は、無進行生存(PFS、ハザード比は1.42であり、 $p<0.005$ である)および全生存(OS、ハザード比は1.8であり、 $p<0.001$ である)により測定された場合、より悪い転帰と関連していた。患者を三分位に分離したところ、閾値効果よりもむしろ、HGFレベルと転帰との連続的關係が示された(図24B)。これらの試験は、疾患進行および全生存におけるHGF-METシグナリング、ならびにおそらく、BRAf突然変異体メラノーマにおけるBRAf阻害に対する臨床応答を暗示するものである。

20

30

【実施例6】

【0386】

細胞におけるリガンド誘導性レスキュー

ここで用いられる方法は、実施例1に記載のものと同様である。本発明者らは、細胞におけるRTKの発現およびリガンド誘導性レスキューを分析した。その結果を図15に示す。リガンド誘導性レスキューは、いくつかの事例(例えば、MET/HGF、EGFR/EGFおよびHER3/NRG1)において特定のRTKの発現と良好に相関したが($p<0.01$;図15)、これは、処置前の腫瘍のRTKプロファイルが、腫瘍微小環境における対応するリガンドの利用可能性に応じて、癌細胞生存に寄与し得る2つ以上のキナーゼを同時標的化する必要性を予測する最適な処置戦略を知らせることができることを示唆している。

40

【実施例7】

【0387】

TAE684に対する耐性獲得の防止におけるHGFの効果

ここで用いられる方法は、実施例1に記載のものと同様である。本発明者らは、TAE684で処理されたH2228細胞におけるHGFの効果を検査した。図16は、HGF

50

の存在下でのより長期間の T A E 6 8 4 処理が、これらの細胞において T A E 6 8 4 に対する耐性獲得を防止したことを示す。

【 0 3 8 8 】

部分参考文献一覧

- 1 Sharma, S. V. & Settleman, J. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev* 21, 3214-3231, doi:10.1101/gad.1609907 (2007).
- 2 Sequist, L. V. et al. Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Sci Transl Med* 3, 75ra26, doi:10.1126/scitranslmed.3002003 (2011). 10
- 3 Garrett, J. T. & Arteaga, C. L. Resistance to HER2-directed antibodies and tyrosine kinase inhibitors: mechanisms and clinical implications. *Cancer Biol Ther* 11, 793-800 (2011).
- 4 Engelman, J. A. & Settleman, J. Acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors during cancer therapy. *Curr Opin Genet Dev* 18, 73-79, doi:10.1016/j.gde.2008.01.004 (2008).
- 5 Moritz, A. et al. Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases. *Sci Signal* 3, ra64, doi:10.1126/scisignal.2000998 (2010).
- 6 Zhang, W. & Huang, P. Cancer-stromal interactions: role in cell survival, metabolism and drug sensitivity. *Cancer Biol Ther* 11, 150-156 (2011). 20
- 7 McDermott, U. et al. Identification of genotype-correlated sensitivity to selective kinase inhibitors by using high-throughput tumor cell line profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19936-19941, doi:10.1073/pnas.0707498104 (2007).
- 8 Wilson, T. R., Lee, D. Y., Berry, L., Shames, D. S. & Settleman, J. Neuregulin-1-Mediated Autocrine Signaling Underlies Sensitivity to HER2 Kinase Inhibitors in a Subset of Human Cancers. *Cancer Cell* 20, 158-172, doi:10.1016/j.ccr.2011.07.011 (2011).
- 9 Yonesaka, K. et al. Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers. *Clin Cancer Res* 14, 6963-6973, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0957 (2008). 30
- 10 Mueller, M. M. & Fusenig, N. E. Friends or foes - bipolar effects of the tumor stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 839-849, doi:10.1038/nrc1477 (2004).
- 11 Grant, S., Qiao, L. & Dent, P. Roles of ERBB family receptor tyrosine kinases, and downstream signaling pathways, in the control of cell growth and survival. *Front Biosci* 7, d376-389 (2002).
- 12 Kwak, E. L. et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 363, 1693-1703, doi:10.1056/NEJMoa1006448 (2010).
- 13 Turke, A. B. et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell* 17, 77-88, doi:10.1016/j.ccr.2009.11.022 (2010). 40
- 14 Chapman, P. B. et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364, 2507-2516, doi:10.1056/NEJMoa1103782 (2011).
- 15 Gilbert, L. A. & Hemann, M. T. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell* 143, 355-366, doi:10.1016/j.cell.2010.09.043 (2010).
- 16 Liang, K. et al. Recombinant human erythropoietin antagonizes trastuzumab treatment of breast cancer cells via Jak2-mediated Src activation and PTEN inactivation. *Cancer Cell* 18, 423-435, doi:10.1016/j.ccr.2010.10.025 (2010).
- 17 Quintana, E. et al. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell* 18, 510-523, doi:10.1016/j.ccr.2010.10.012 (2010). 50

- 18 Calbo, J. et al. A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small cell lung cancer. *Cancer Cell* 19, 244-256, doi:10.1016/j.ccr.2010.12.021 (2011).
- 19 Sharma, S. V. et al. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell* 141, 69-80, doi:10.1016/j.cell.2010.02.027 (2010).
- 20 Nazarian, R. et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* 468, 973-977, doi:10.1038/nature09626 (2010).
- 21 Guix, M. et al. Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins. *J Clin Invest* 118, 2609-2619, doi:10.1172/JCI34588 (2008).
- 22 McDermott, U., Pusapati, R. V., Christensen, J. G., Gray, N. S. & Settleman, J. Acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to MET kinase inhibition is mediated by a switch to epidermal growth factor receptor dependency. *Cancer Res* 70, 1625-1634, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3620 (2010).
- 23 Johannessen, C. M. et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 468, 968-972, doi:10.1038/nature09627 (2010).
- 24 Liu, L. et al. Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res* 69, 6871-6878, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4490 (2009).
- 25 Engelman, J. A. et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316, 1039-1043, doi:10.1126/science.1141478 (2007).
- 26 Stommel, J. M. et al. Coactivation of receptor tyrosine kinase affects the response of tumor cells to targeted therapies. *Science* 318, 287-290, doi:10.1126/science.1142946 (2007).
- 26 Liederer, B. M. et al. Preclinical absorption, distribution, metabolism, excretion, and pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of N-(4-(3-((3S,4R)-1-ethyl-3-fluoropiperidine-4-ylamino)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-4-yloxy)-3-fluorophenyl)-2-(4-fluorophenyl)-3-oxo-2,3-dihydropyridazine-4-carboxamide, a novel MET kinase inhibitor. *Xenobiotica* 41, 327-339, doi:10.3109/00498254.2010.542500 (2011).
- 27 Catenacci, D. V. T. et al. Durable Complete Response of Metastatic Gastric Cancer with Anti-Met Therapy Followed by Resistance at Recurrence. *Cancer Discovery* 1, 573-579, doi:10.1158/2159-8290 (2011).

10

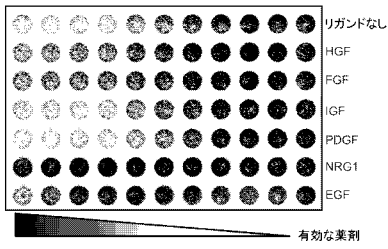
20

30

【 0 3 8 9 】

明確な理解のために例示および実施例によって前記発明をいくらか詳細に説明してきたが、説明および実施例は本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用される全ての特許および科学的文献の開示は、その全体が参照により本明細書に明示的に組込まれる。

【図 1 A】

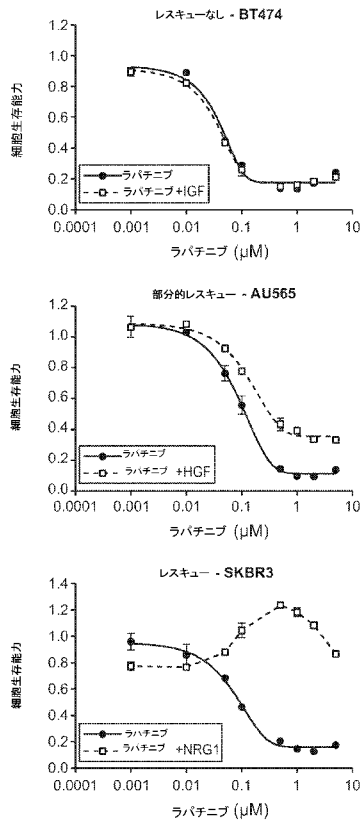


【図 1 B】

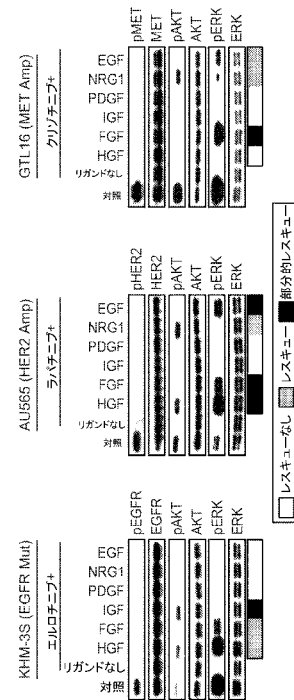
キナーゼ依存 (有効な薬剤)	細胞系	HGF	FGF	IGF	PDGF	NRG1	EGF
HER2 増幅 (ラパチニブ)	KPL4	P	P	NR	NR	R	NR
	EFM192A	NR	NR	NR	NR	R	NR
	SKBR3	NR	NR	NR	NR	R	R
	BT474	NR	NR	NR	NR	R	P
	AU565	P	P	NR	NR	R	P
	HCC1419	NR	NR	NR	NR	R	NR
	UACC893	NR	P	NR	NR	R	R
NRG1 自己分泌 (ラパチニブ)	HCC1654	P	NR	NR	NR	NR	P
	HCC202	NR	P	NR	NR	R	NR
	CHL-1	R	R	P	NR	NR	NR
EGFR 変異変異 (エルロチニブ)	SAT	R	R	NR	NR	NR	R
	F30U	R	R	NR	NR	NR	P
	PC1-6A	R	R	NR	NR	NR	R
EGF 様リガンド自己分泌 (エルロチニブ)	PC9	R	R	P	NR	NR	NR
	HCC827	R	P	NR	NR	NR	NR
	HCC4006	R	R	NR	NR	P	NR
MET 増幅 (クリゾチニブ)	KHM-3S	R	R	P	NR	NR	NR
	CAU-3	P	NR	NR	NR	NR	NR
	H358	NR	NR	NR	NR	NR	NR
PDGFR 増幅 (スニチニブ)	H1648	NR	NR	NR	NR	NR	NR
	H1666	R	R	NR	NR	R	NR
	KATO-11	NR	R	NR	NR	R	R
FGFR 増幅 (PD173074)	GTL16	NR	P	NR	NR	R	R
	EBC-1	NR	NR	NR	NR	P	P
	NCI-H1703	R	R	NR	NR	NR	R
ALK 転座/変異変異 (TAE684)	A-254	NR	R	NR	NR	NR	NR
	MFM273	NR	P	NR	NR	R	P
	K562	NR	NR	NR	NR	NR	NR
BRAF V600E (PLX4032)	R1112	R	NR	NR	NR	R	R
	RT4	NR	NR	NR	NR	R	R
	KELLY	NR	P	NR	NR	NR	R
リガンドなし	SH-SY5Y	NR	P	NR	NR	NR	NR
	NCI-H3122	R	NR	NR	NR	R	R
	NCI-H2228	NR	NR	NR	NR	NR	NR
対照	M14	NR	P	NR	NR	P	NR
	NAE	R	NR	NR	NR	R	P
	A-375	P	R	NR	NR	P	NR
部分リスキュー	SK-MEL-28	P	NR	NR	NR	R	NR
	Malmig-SM	P	P	NR	NR	P	P
	COLO-201	P	NR	NR	NR	NR	NR
レスキューなし	COLO-218	P	NR	NR	NR	NR	NR
	COLO-218	P	NR	NR	NR	NR	NR

NR: レスキューなし; P: 部分的レスキュー; R: レスキュー

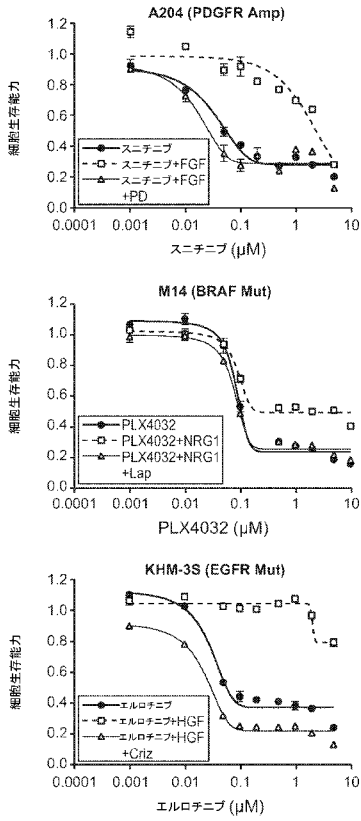
【図 1 C】



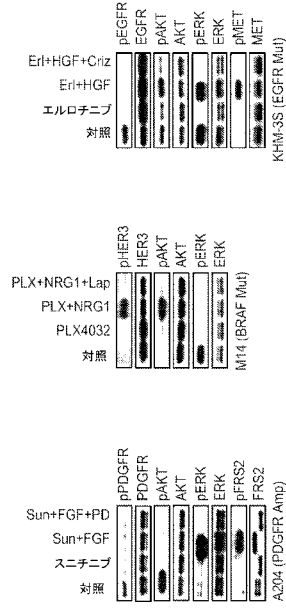
【図 2 A】



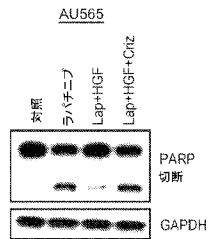
【 図 2 B 】



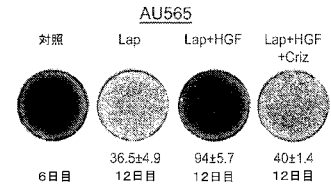
【 図 2 C 】



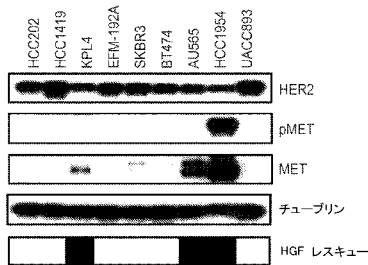
【 図 3 A 】



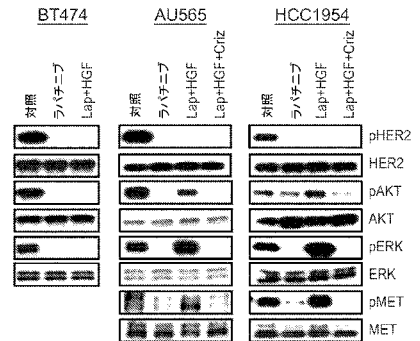
【 図 3 C 】



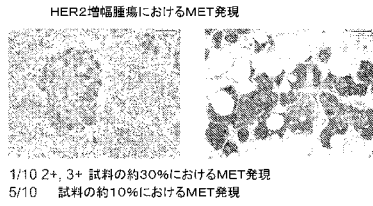
【 図 3 B 】



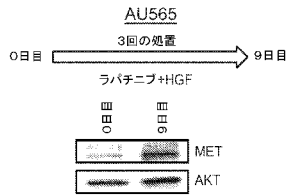
【 図 3 D 】



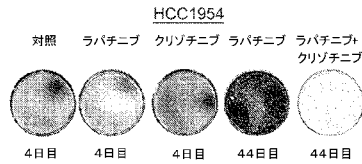
【 図 3 E 】



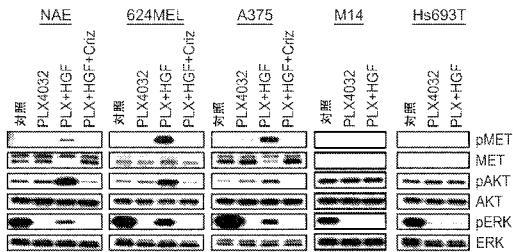
【 図 3 F 】



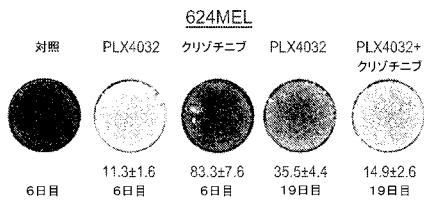
【 図 3 G 】



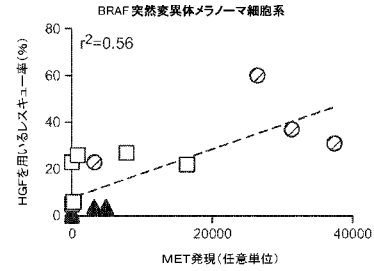
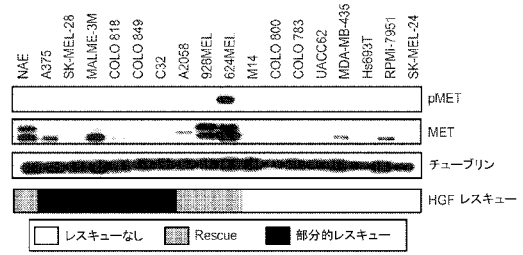
【 図 4 B 】



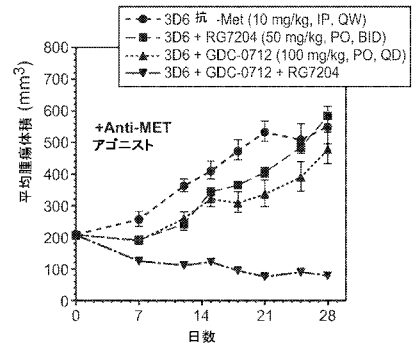
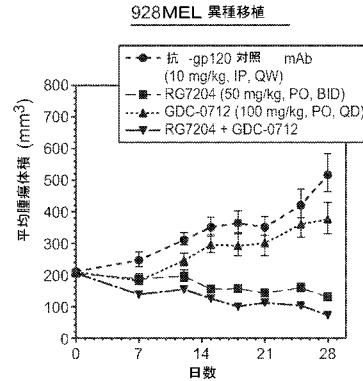
【 図 4 C 】



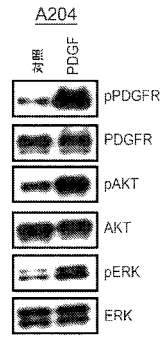
【 図 4 A 】



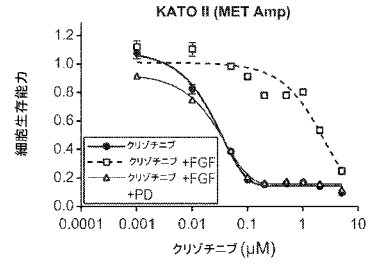
【 図 4 D 】



【 図 5 A 】



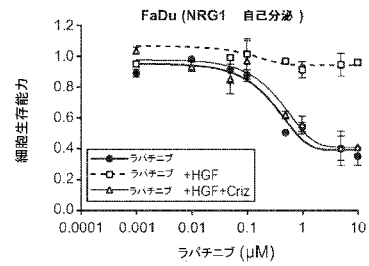
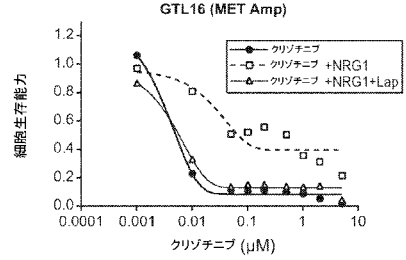
【 図 5 C 】



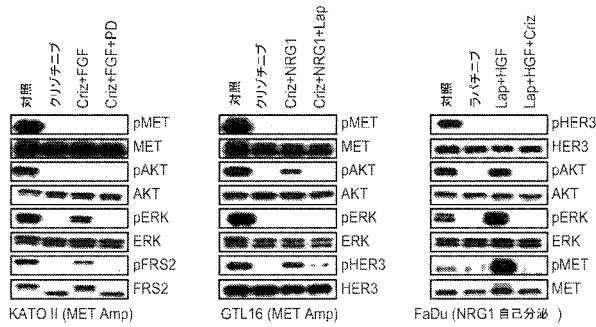
【 図 5 B 】

シスプラチン

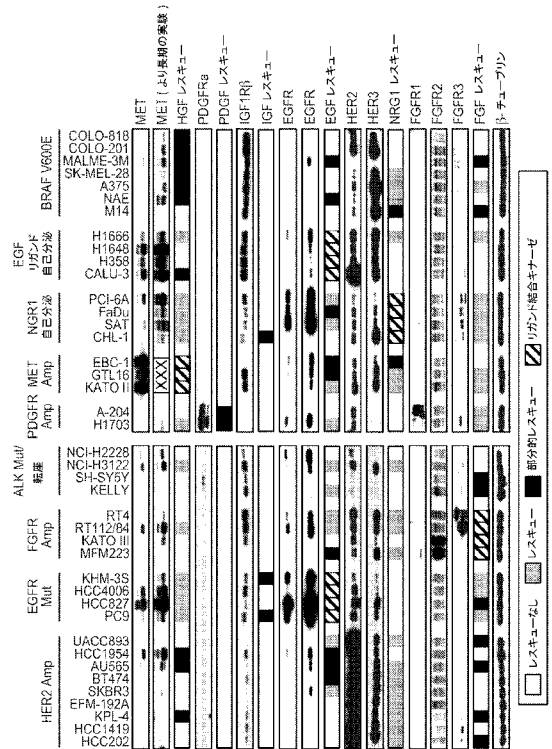
キナーゼ依存	細胞系	HGF	FGF	IGF	PDGF	NRG1	EGF
HER2 増幅	AU565	NR	NR	NR	NR	NR	NR
MET 増幅	GTL16	NR	NR	NR	NR	NR	NR
ALK 突然変異	SHSY5Y	NR	NR	NR	NR	NR	NR
NRG1 誘導	CHL-1	NR	NR	NR	NR	NR	NR
EGF様リガンド誘導	H1648	NR	NR	NR	NR	NR	NR
BRAF 突然変異	SK MEL 28	NR	NR	NR	NR	NR	NR



【 図 5 D 】



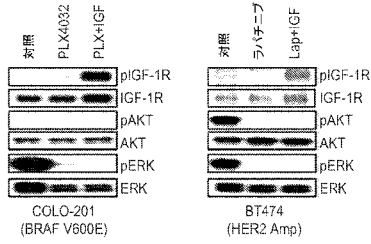
【 図 6 A 】



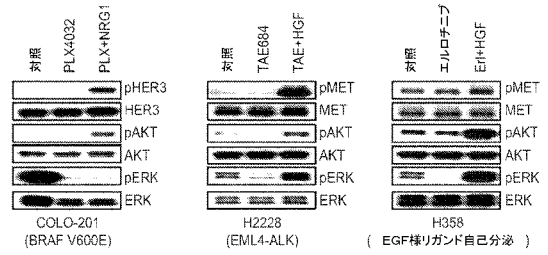
【 図 6 B 】

RTK/リガンド	p値
MET+HGF	p<0.001
PDGFR/PDGF	p=1
IGF-1R/IGF	p=1
EGFR/EGF	p<0.001
HER3/HRG1	p=0.005
FGFR/FGF	p=1

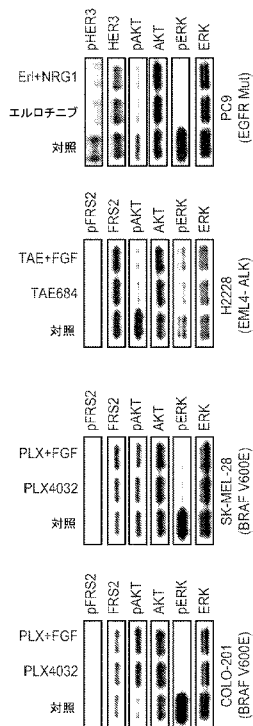
【 図 7 A 】



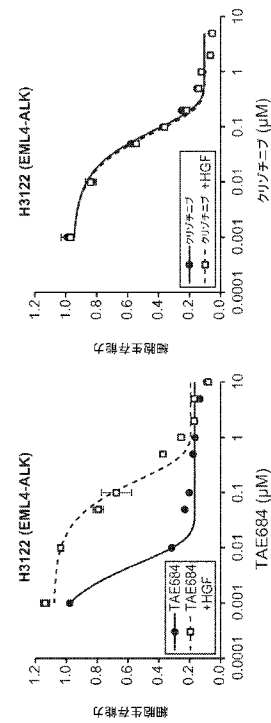
【 図 7 B 】



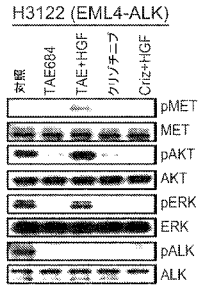
【 図 7 C 】



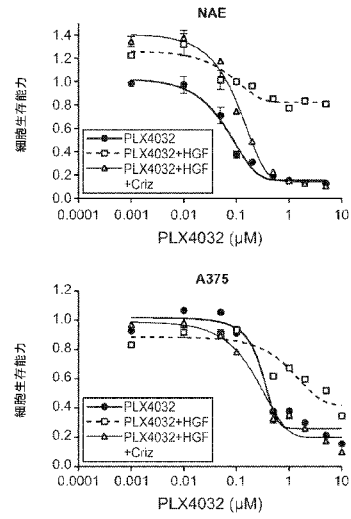
【 図 8 A 】



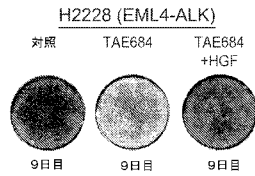
【 図 8 B 】



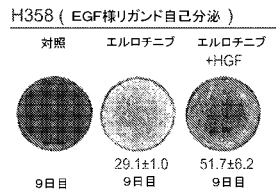
【 図 9 A 】



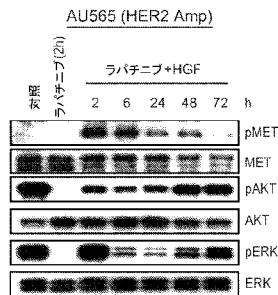
【 図 8 C 】



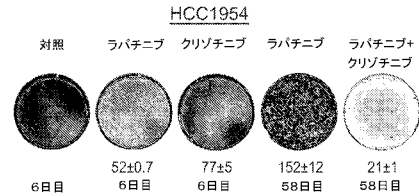
【 図 8 D 】



【 図 9 B 】



【 図 1 1 】

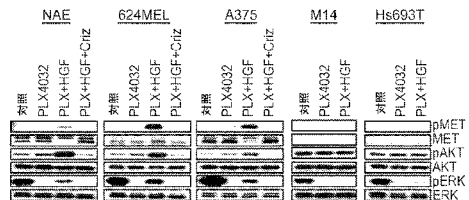


【 図 1 0 】

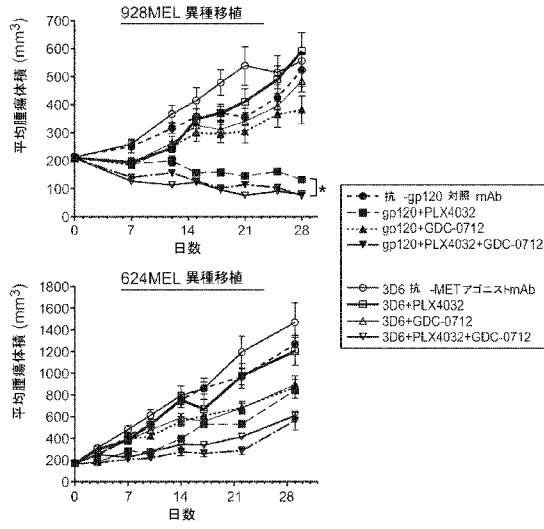
キナーゼ依存 (有効な薬剤)	細胞系	HGF	FGF	IGF	PDGF	NRG1	EGF
BRAF V600E (PLX4032)	M14	NR	P	NR	NR	P	NR
	NAE	R	NR	NR	NR	R	P
	A-375	P	R	NR	NR	P	NR
	SK-MEL-28	P	NR	NR	NR	R	NR
	Malme-3M	P	R	NR	NR	NR	P
	COLO-201	P	NR	NR	NR	NR	NR
COLO-818	P	NR	NR	NR	NR	NR	

NR:レスキューなし; P: 部分的レスキュー; R: レスキュー

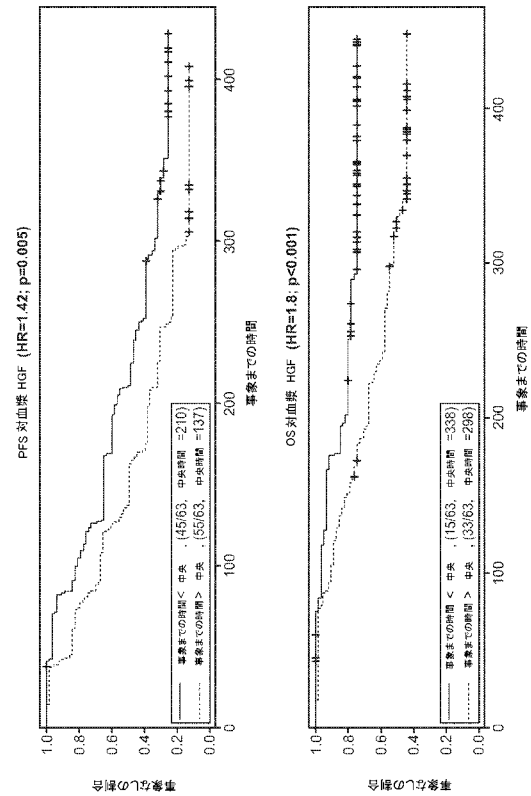
【 図 1 2 A 】



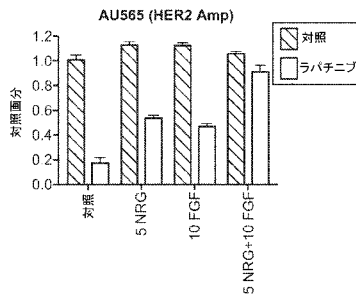
【 図 1 2 B 】



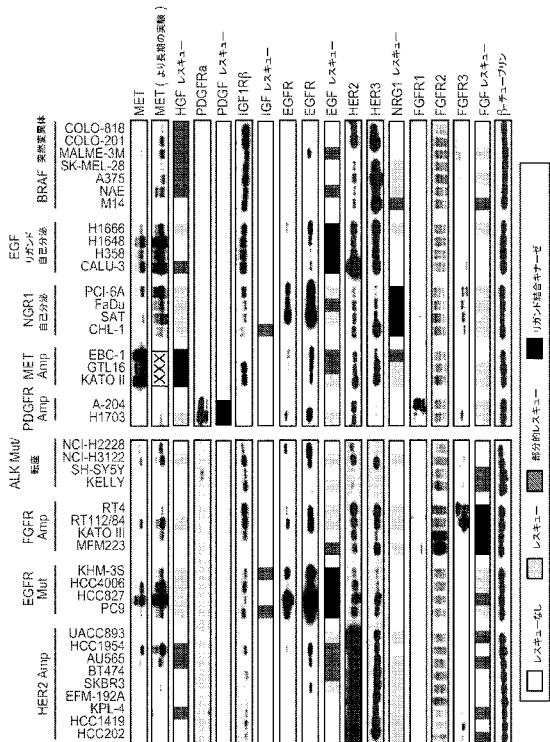
【 図 1 3 】



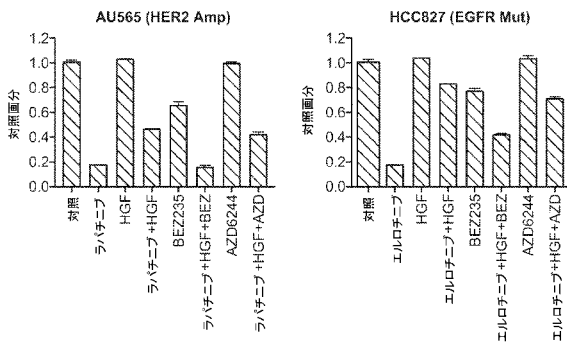
【 図 1 4 A 】



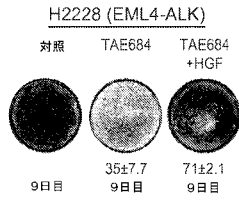
【 図 1 5 】



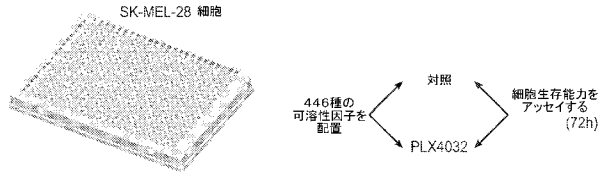
【 図 1 4 B 】



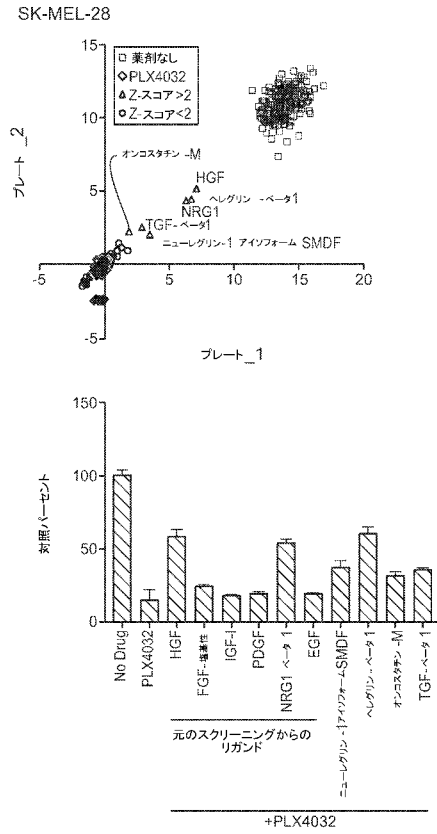
【 図 1 6 】



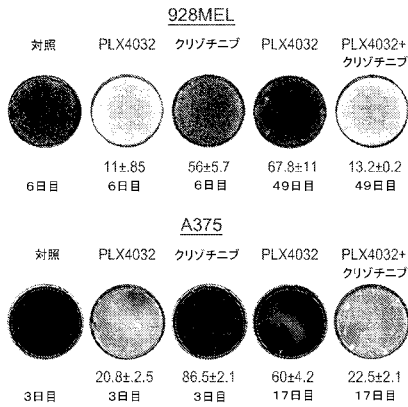
【 図 1 7 A 】



【 図 1 7 B 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 A 】

928MEL 対照抗体を用いる試験データ

群番号	抗体	処置	用量 (mg/kg)	SMI Treatment	レジメン	%TGI (AUC/Day)	上限 CI	下限 CI	PR	CR	最大 %BW
1	抗 gp120	アインクワ対照 Ab	10	-	QW	28	0	0	0	0	-13.2
2	抗 gp120	アインクワ対照 Ab	10 + 50	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID)	QW, BID	28	131	103	172	1	-5.48
3	抗 gp120	アインクワ対照 Ab	10 + 100	GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	QW, QD	28	53	-3	92	0	-8.36
4	抗 gp120	アインクワ対照 Ab	10 + 50 + 100	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID) + GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	QW, BID, QD	28	164	132	216	8	-5.36

928MEL 対照抗体を用いる試験データ

群番号	抗体	処置	用量 (mg/kg)	SMI Treatment	レジメン	%TGI (AUC/Day)	上限 CI	下限 CI	PR	CR	最大 %BW
5	3D6-16.6 (MET:1590)	(10 mg/kg, IP, QW)	10 + 50	-	QD	28	0	0	0	0	-16
6	3D6-16.6 (MET:1590)	(10 mg/kg, IP, QW)	10 + 100	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID)	QD	28	39	-14	70	0	-14.9
7	3D6-16.6 (MET:1590)	(10 mg/kg, IP, QW)	10 + 50 + 100	GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	BID, QD	28	56	13	82	0	-12.5
8	3D6-16.6 (MET:1590)	(10 mg/kg, IP, QW)	10 + 50	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID) + GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	BID, QD	28	147	129	176	10	-10.6

【 図 1 9 B 】

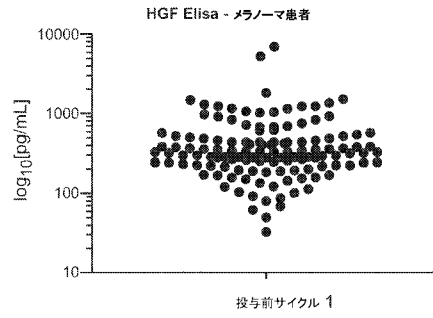
624MEL
対照抗体を用いる試験データ

群番号 #	抗体	処置	SMI Treatment	用量 (mg/kg)	レジメン	%TGI 日数	%TGI (AUC/Day)	下限 CI	上限 CI	最大 PR CR %BW
1	A抗 gp20, アインタク特異 Ab (10 mg/kg, IP, QW)	-	-	10	QW	29	0	0	0	0 -12.4
2	A抗 gp20, アインタク特異 Ab (10 mg/kg, IP, QW)	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID)	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID)	10+50	QW, BID	29	51	29	67	0 4.05
3	A抗 gp20, アインタク特異 Ab (10 mg/kg, IP, QW)	GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	10+100	QW, QD	29	37	10	57	0 0 -116
4	A抗 gp20, アインタク特異 Ab (10 mg/kg, IP, QW)	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID) + GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID) + GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	10+50+100	QW, BID, QD	29	81	72	89	0 0 -3.94

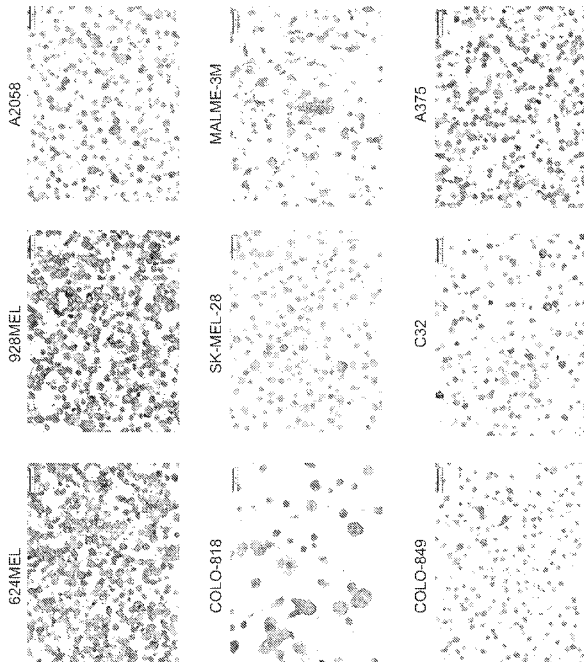
抗METアゴニスト抗体を用いる試験データ

群番号 #	抗体	処置	SMI Treatment	用量 (mg/kg)	レジメン	%TGI 日数	%TGI (AUC/Day)	下限 CI	上限 CI	最大 PR CR %BW
5	3D6:16.6 (MET:1560) (10 mg/kg, IP, QW)	-	-	10+50	QD	29	0	0	0	0 0 -9.14
6	3D6:16.6 (MET:1560) (10 mg/kg, IP, QW)	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID)	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID)	10+100	QD	29	27	-7	50	0 0 -8.99
7	3D6:16.6 (MET:1560) (10 mg/kg, IP, QW)	GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	10+50+100	BID, QD	29	38	10	56	0 0 -10.4
8	3D6:16.6 (MET:1560) (10 mg/kg, IP, QW)	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID) + GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	PLX4032 (50 mg/kg, PO, BID) + GDC-0712 (100 mg/kg, PO, QD)	10+50	BID, QD	29	73	58	88	0 0 -5.5

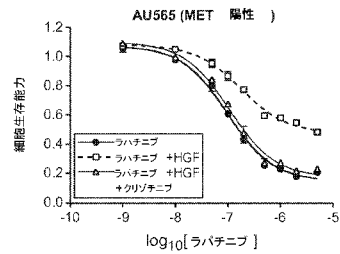
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】

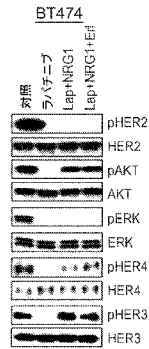


【 図 2 2 】

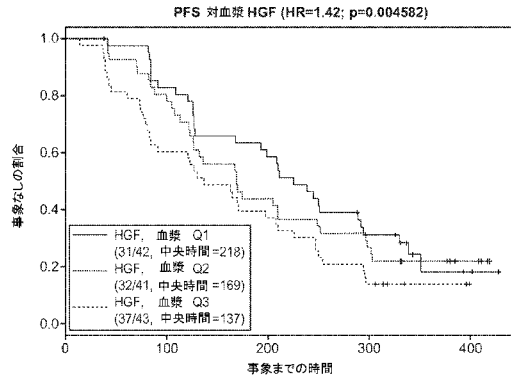


72h Syto 60 アッセイ
ラバチニブ用量応答 (EGFR/HER2 TKI)
50ng/mL HGF; 0.5µM クリゾチニブ (MET TKI)

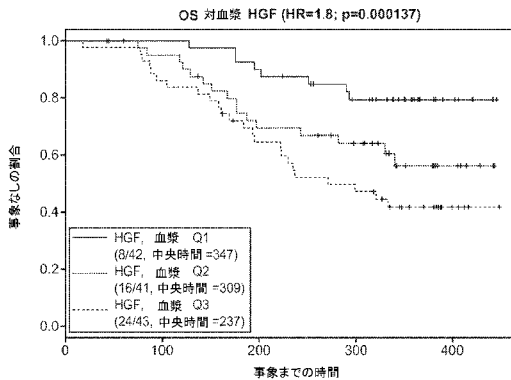
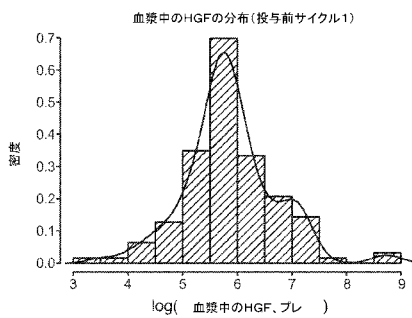
【 図 2 3 】



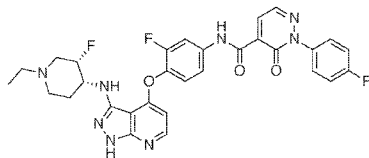
【 図 2 4 B 】



【 図 2 4 A 】



【 図 2 5 A 】



【 図 2 5 D 】

キナーゼ	@ 0.1 μM での阻害率
Mer	96
HIPK4	93
Met	92.75
Axl	90
Flt3	88
Ros	82
TrkC	80
TrkA	71.75
Rse	70
Lck	66
Mel(1250T)	66
MuSK	65
TrkB	64
Ron	56
B-Raf	52.5

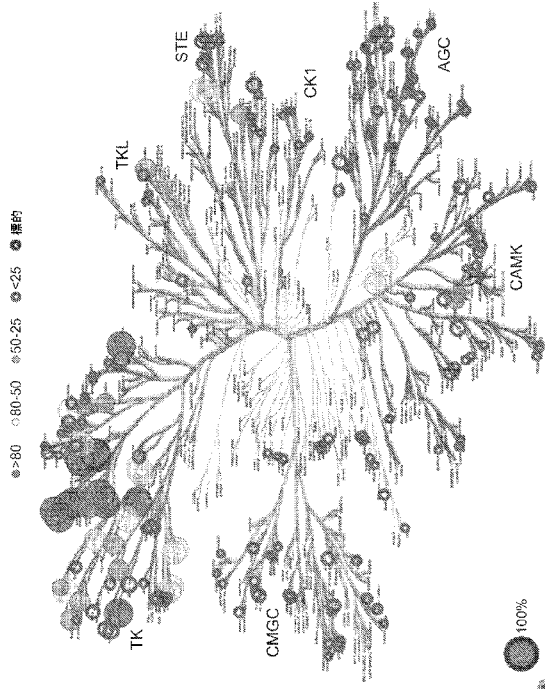
【 図 2 5 B 】

キナーゼ	IC ₅₀ (μM)
cMet	0.005
Mer	0.004
HIPK4	0.005
Rse	0.017
MuSK	0.036

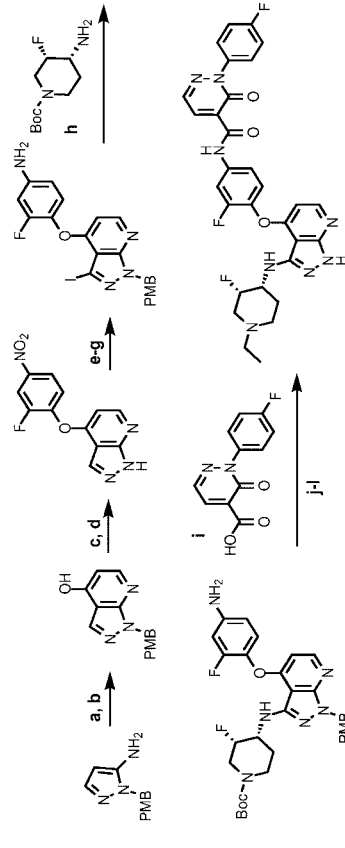
【 図 2 5 C 】

キナーゼ	アッセイ(細胞系)	IC ₅₀ (μM)
cMet	自己リン酸化 ELISA (MKN45)	0.014
KDR	自己リン酸化 ELISA (CHO-KDR)	0.43
Axl	自己リン酸化 MSD (A172)	0.0017
TrkA	自己リン酸化 MSD (CHO-TrkA)	0.034
TrkB	自己リン酸化 ELISA (CHO-TrkB)	0.07

【 図 2 5 E 】



【 図 2 6 】



【 配 列 表 】

2014534949000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2012/056106

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/437 A61K31/4439 A61K39/395 A61K45/06 ADD.		
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) A61K		
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) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/093789 A2 (ARQUE INC [US]; CHAN THOMAS C K [US]; FRANCE DENNIS S [US]; ISHII KEN) 19 August 2010 (2010-08-19) paragraph [00288] - paragraph [00308]; claims 1-5 -----	1-32, 41-43
X	WO 2009/140549 A1 (AMGEN INC [US]; BURGESS THERESA L [US]; COXON ANGELA [US]; DUSSAULT IS) 19 November 2009 (2009-11-19) page 32, line 33 - line 34 page 34, line 8 - line 20; claims 1, 6-8, 12, 15 -----	1-32, 41-43
X	WO 2011/028540 A1 (GENENTECH INC [US]; HATZIVASSILIOU GEORGIA [US]; MALEK SHIVA [US]) 10 March 2011 (2011-03-10) paragraphs [0052] - [0055], [0061], [0072], [0073]; claims ----- -/--	1-32, 41-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* 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
15 February 2013		21/02/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Leherte, Chantal

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/056106

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/045344 A1 (GENENTECH INC [US]; FILVAROFF ELLEN [US]; MERCHANT MARK [US]) 22 April 2010 (2010-04-22) page 64, paragraph 3 page 66, paragraph 3 -----	1-32, 41-43
X	HUYNH ET AL: "Molecularly targeted therapy in hepatocellular carcinoma", BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 80, no. 5, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 550-560, XP027117540, ISSN: 0006-2952 [retrieved on 2010-07-02] page 555, column 1, paragraph 2 - paragraph 3 page 556, column 1, paragraph 2 - page 557, column 1 -----	1-32, 41-43
X	MATRANA M R ET AL: "Emerging targeted therapies in metastatic renal cell carcinoma", CURRENT CLINICAL PHARMACOLOGY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS LTD, NL, vol. 6, no. 3, 1 August 2011 (2011-08-01), pages 189-198, XP008158055, ISSN: 1574-8847, DOI: 10.2174/157488411797189398 page 190, column 2, paragraph 3 - page 191, column 1, paragraph 2 page 196, column 2, paragraph 2 - paragraph 3 -----	1-32, 41-43
X	HUYNH HUNG ET AL: "Targeting receptor tyrosine kinase pathways in hepatocellular carcinoma", ANTI-CANCER AGENTS IN MEDICINAL CHEMISTRY, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS LTD, NL, vol. 11, no. 6, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 560-575, XP009150399, ISSN: 1871-5206 page 569, column 1, paragraph 2 - column 2 ----- -/--	1-32, 41-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/056106

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>TOSCHI LUCA ET AL: "Single-agent and combination therapeutic strategies to inhibit hepatocyte growth factor/MET signaling in cancer", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 14, no. 19, 1 October 2008 (2008-10-01), pages 5941-5946, XP002588857, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0071 [retrieved on 2008-10-14] page 5943, column 2, paragraph 4 - page 5945, column 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-32, 41-43
X	<p>W. WICK ET AL: "Pathway inhibition: emerging molecular targets for treating glioblastoma", NEURO-ONCOLOGY, vol. 13, no. 6, 1 June 2011 (2011-06-01), pages 566-579, XP055045631, ISSN: 1522-8517, DOI: 10.1093/neuonc/nor039 abstract page 575, column 1, paragraph 2 - column 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-32, 41-43
X	<p>XIANGDONG LIU ET AL: "Development of c-MET pathway inhibitors", EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS, ASHLEY PUBLICATIONS LTD., LONDON, GB, vol. 20, no. 9, 11 June 2011 (2011-06-11), pages 1225-1241, XP008158374, ISSN: 1354-3784 [retrieved on 2011-07-11] abstract page 1234, column 1, paragraph 2 - page 1235</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-32, 41-43
X,P	<p>WILSON TIMOTHY R ET AL: "Widespread potential for growth-factor-driven resistance to anticancer kinase inhibitors", NATURE: INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 487, no. 7408, 26 July 2012 (2012-07-26), pages 505-510, XP008158459, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE11249 [retrieved on 2012-07-04] the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-32, 41-43

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/056106

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LAM E T ET AL: "Phase II clinical trial of sorafenib in metastatic medullary thyroid cancer", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY 20100510 AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY USA, vol. 28, no. 14, 10 May 2010 (2010-05-10), pages 2323-2330, XP008159710, ISSN: 0732-183X abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>6-32, 41-43</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/056106**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.:
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:

see additional sheet

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 an 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-5(completely); 7-32, 41-43(partially)

A method for treating a patient with cancer comprising administering an effective amount of B-raf antagonist and c-met antagonist.

2. claims: 6(completely); 7-32, 41-43(partially)

A method for extending duration of response to B-raf antagonist comprising administering an effect amount of B-raf antagonist and c-met antagonist.

3. claims: 33-40

A method for determining c-met biomarker expression, comprising the step of determining whether a patient's cancer expresses c-met biomarker, wherein c-met biomarker expression indicates that the patient is a candidate for treatment with c-met antagonist and B-raf antagonist: to increase sensitivity of the patient's cancer to B-raf antagonist, restore sensitivity of the patient's cancer to B-raf antagonist, to extend the period of sensitivity of the patient's cancer to B-raf antagonist, and/or to prevent development of HGF-mediated B-raf antagonist resistance in the patient's cancer.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/056106

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010093789 A2	19-08-2010	AU 2010213696 A1	18-08-2011
		CA 2752232 A1	19-08-2010
		CN 102481299 A	30-05-2012
		EP 2396003 A2	21-12-2011
		JP 2012517477 A	02-08-2012
		KR 20110118817 A	01-11-2011
		TW 201043626 A	16-12-2010
		US 2010297075 A1	25-11-2010
		WO 2010093789 A2	19-08-2010
WO 2009140549 A1	19-11-2009	AU 2009246263 A1	19-11-2009
		CA 2723617 A1	19-11-2009
		EP 2288383 A1	02-03-2011
		JP 2011520908 A	21-07-2011
		US 2011104161 A1	05-05-2011
		WO 2009140549 A1	19-11-2009
WO 2011028540 A1	10-03-2011	AU 2010289794 A1	05-04-2012
		CA 2771369 A1	10-03-2011
		CN 102859355 A	02-01-2013
		EP 2470898 A1	04-07-2012
		KR 20120050493 A	18-05-2012
		SG 178866 A1	27-04-2012
		US 2012214828 A1	23-08-2012
		WO 2011028540 A1	10-03-2011
WO 2010045344 A1	22-04-2010	AR 073852 A1	09-12-2010
		TW 201019961 A	01-06-2010
		WO 2010045344 A1	22-04-2010

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	G 0 1 N 37/00 1 0 2	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/48 P	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
A 6 1 K 31/437 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/437	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
C 0 7 K 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
	C 1 2 N 15/00 A	
	C 0 7 K 11/00	
	C 0 7 K 16/30	

(31) 優先権主張番号 61/641,139

(32) 優先日 平成24年5月1日(2012.5.1)

(33) 優先権主張国 米国(US)

(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, RU, TJ, T M), 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, R S, 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, BN, 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, PA, 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

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. UNIX

(72) 発明者 ケッペン, ハルトムート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72) 発明者 マーチャント, マーク

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック, インコーポレイテッド

(72) 発明者 セットルマン, ジェフリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1, シーノオー ジェネンテック, インコーポレイテッド

F ターム(参考) 2G045 AA01 AA24 AA26 AA40 BA13 BB20 BB22 BB24 CA25 CA26
CB01 CB02 CB09 CB13 CB26 DA14 DA36 FB01 FB02 FB03
FB08 FB12 GC12 GC15 JA01
4B024 AA01 AA12 CA04 CA09 CA12 HA12
4B063 QA01 QA19 QQ53 QR56 QR62 QS25 QS34 QX02
4C084 AA20 AA22 MA02 NA05 NA14 ZA661 ZA891 ZB261 ZC751
4C085 AA14 CC23 EE03
4C086 AA01 CB05 MA02 MA04 NA05 NA14 ZA66 ZA89 ZB26 ZC41
4H045 AA30 BA10 BA14 BA15 BA16 BA17 DA76 EA28 EA51 FA20

FA74

专利名称(译)	联合治疗包括C-MET拮抗剂和B-RAF拮抗剂		
公开(公告)号	JP2014534949A	公开(公告)日	2014-12-25
申请号	JP2014530956	申请日	2012-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	ウィルソンティモシーアール ケッペンハルトムート マーチャントマーク セトルマンジェフリー		
发明人	ウィルソン, ティモシー アール. ケッペン, ハルトムート マーチャント, マーク セトルマン, ジェフリー		
IPC分类号	A61K45/06 G01N33/574 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/48 C12Q1/68 A61P35/00 A61K39/395 A61K31/437 A61P1/04 A61P17/00 A61P15/00 C12N15/09 C07K11/00 C07K16/30		
CPC分类号	A61K31/437 A61K31/4439 A61K31/4545 A61K45/06 A61P1/04 A61P15/00 A61P17/00 A61P35/00 C07K16/2863 C07K16/3053 C07K2317/75 G01N33/5091 G01N33/6872 A61K2300/00 A61K39/39558 A61K39/3955 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/573 G01N33/5748 G01N33/57488 G01N33/57496 G01N33/74 G01N2800/52		
FI分类号	A61K45/06.ZNA G01N33/574.A G01N33/574.D G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N37/00.102 G01N33 /48.P C12Q1/68.A A61P35/00 A61K39/395.T A61K39/395.N A61K31/437 A61P1/04 A61P17/00 A61P15/00 C12N15/00.A C07K11/00 C07K16/30		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/BB22 2G045 /BB24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB09 2G045/CB13 2G045/CB26 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045 /GC12 2G045/GC15 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063 /QS34 4B063/QX02 4C084/AA20 4C084/AA22 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA661 4C084/ZA891 4C084/ZB261 4C084/ZC751 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/CB05 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/NA14 4C086/ZA66 4C086/ZA89 4C086 /ZB26 4C086/ZC41 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA20 4H045/FA74		
优先权	61/536436 2011-09-19 US 61/551328 2011-10-25 US 61/598783 2012-02-14 US 61/641139 2012-05-01 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明一般涉及分子生物学和生长因子调节领域。更具体地，本发明涉及用于治疗病理状况（例如癌症）的疗法。

