

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4204974号  
(P4204974)

(45) 発行日 平成21年1月7日(2009.1.7)

(24) 登録日 平成20年10月24日(2008.10.24)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>GO 1 N 33/574</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/574	A
<b>C 1 2 Q 1/02</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	
<b>GO 1 N 33/15</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/15	Z
<b>GO 1 N 33/48</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/48	P
<b>GO 1 N 33/50</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/50	Z

請求項の数 36 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-521325 (P2003-521325)  
 (86) (22) 出願日 平成14年8月21日 (2002. 8. 21)  
 (65) 公表番号 特表2005-527781 (P2005-527781A)  
 (43) 公表日 平成17年9月15日 (2005. 9. 15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/026811  
 (87) 国際公開番号 W02003/016867  
 (87) 国際公開日 平成15年2月27日 (2003. 2. 27)  
 審査請求日 平成16年4月16日 (2004. 4. 16)  
 (31) 優先権主張番号 60/314, 188  
 (32) 優先日 平成13年8月21日 (2001. 8. 21)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502331787  
 ベンタナ・メディカル・システムズ・イン  
 コーポレーテッド  
 アメリカ合衆国 85755 アリゾナ州  
 トゥーソンイー・イノベーション パー  
 ク ドライブ 1910  
 (74) 代理人 100083806  
 弁理士 三好 秀和  
 (72) 発明者 バッカス、 サラ エス、  
 アメリカ合衆国 イリノイ州 60521  
 ヒンスデール インディアン トレイル  
 1222

審査官 白形 由美子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 c - k i t / S C F / p A K T の状態を測定するための方法及び定量アッセイ

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

化学療法剤または生物学的治療薬の個体への投与に対する応答を評価するための方法であって、

(a) 個体を化学療法剤または生物学的治療薬に曝す前にその個体から採取された第一組織または細胞試料、及び前記個体を化学療法剤または生物学的治療薬に曝した後にその個体から採取された第二組織または細胞試料において、1つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出することであって、ここで前記生物学的マーカーが、c - k i t、S C F、p A K T、または p c - k i t である；

(b) 前記第一組織または細胞試料と前記第二組織または細胞試料における1つまたは複数の前記生物学的マーカーの量を比較すること；

(c) 前記第二組織または細胞試料における1つまたは複数の生物学的マーカーの量が前記第一組織または細胞試料における1つまたは複数の生物学的マーカーの量よりも少ないとき、前記化学療法剤または生物学的治療薬への曝露に続いて、1つまたは複数の生物学的マーカーの発現または活性化が低下するかどうかを判定すること；

を含み、化学療法剤または生物学的治療薬の個体への投与に対する応答を評価する方法。

## 【請求項 2】

前記の1つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出する方法が、その1つまたは複数の生物学的マーカーに免疫特異的な1つまたは複数の抗体を使用することを含み、請求項1の方法。

10

20

## 【請求項 3】

前記 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量を免疫組織化学的に測定する、請求項 2 の方法。

## 【請求項 4】

前記 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出する請求項 3 の方法が、

( a ) 少なくとも 1 つの抗体が 1 つまたは複数の生物学的マーカーに免疫特異的であり、その生物学的マーカーが c - k i t、S C F、p A K T、または p c - k i t である、光学密度標識で検出可能に標識した 1 つまたは複数の抗体を使用して前記第一及び前記第二組織または細胞試料を染色すること；及び

( b ) ( a ) において染色した前記第一及び前記第二組織または細胞試料の光学密度を測定すること；

を含み、前記光学密度が前記の 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量に対応する方法。

## 【請求項 5】

画像解析を用いて光学密度を測定する、請求項 4 の方法。

## 【請求項 6】

検出可能標識が色原体 ( c h r o m a g e n ) または蛍光標識試薬 ( f l u o r o p h o r e ) である、請求項 5 の方法。

## 【請求項 7】

検出可能標識が D A B である、請求項 6 の方法。

## 【請求項 8】

化学療法剤または生物学的治療薬がチロシンキナーゼ阻害剤である、請求項 1 の方法。

## 【請求項 9】

チロシンキナーゼ阻害剤の個体への投与に対する応答を予測するための方法であって、

( a ) 個体を化学療法剤または生物学的治療薬に曝す前に、その個体から採取された組織または細胞試料において、1 つまたは複数の生物学的マーカーの量または活性化レベルを検出することであって、ここで前記生物学的マーカーが、c - k i t、S C F、p A K T、または p c - k i t である；

( b ) ( a ) で定量した 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量または活性化レベルを、既知の量または活性化レベルの生物学的マーカーを発現する 1 つまたは複数の対照試料からの 1 または複数の生物学的マーカーの量または活性化レベルと比較すること；

を含み、ここで、前記組織または細胞試料中の 1 つまたは複数の生物学的マーカーの発現または活性化レベルを、前記 1 つまたは複数の対照試料からの 1 つまたは複数の生物学的マーカーの発現または活性化レベルと比較して得られた差に基づいて、チロシンキナーゼ阻害剤に対する個体の応答を予測する方法。

## 【請求項 10】

前記の 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出する方法が、前記の 1 つまたは複数の生物学的マーカーに対して免疫特異的な、1 つまたは複数の抗体を使用することを含む、請求項 9 の方法。

## 【請求項 11】

前記 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量が免疫組織化学的に測定される、請求項 10 の方法。

## 【請求項 12】

前記 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出する方法である請求項 11 の方法で、

( a ) 少なくとも 1 つの抗体が 1 つまたは複数の生物学的マーカーに免疫特異的であり、生物学的マーカーが c - k i t、S C F、p A K T、または p c - k i t である、光学密度標識で検出可能に標識した 1 つまたは複数の抗体を使用して組織または細胞試料を染色すること；及び

( b ) ( a ) において染色した組織または細胞試料の光学密度を測定すること；

を含み、前記光学密度が前記の 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量に対応する方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

画像解析を用いて光学密度を測定する、請求項 12 の方法。

## 【請求項 14】

検出可能標識が色原体または蛍光標識試薬である、請求項 13 の方法。

## 【請求項 15】

検出可能標識が D A B である、請求項 14 の方法。

## 【請求項 16】

チロシンキナーゼ阻害剤が c - k i t 阻害剤である、請求項 9 の方法。

## 【請求項 17】

チロシンキナーゼ阻害剤が メシル酸イマチニブ である、請求項 16 の方法。

10

## 【請求項 18】

個体が乳癌を患っており、組織または細胞試料が乳房組織または乳房細胞の試料である、請求項 9 の方法。

## 【請求項 19】

メシル酸イマチニブ の投与に対する、乳癌を患っている個体の応答を予測するための方法であって、

個体が メシル酸イマチニブ に曝露される前の乳癌患者からの乳房組織または乳房細胞の試料中の、c - k i t の発現、活性化、または発現と活性化を検出すること；及び

前記乳房組織または乳房細胞の試料中の、c - k i t の発現、活性化、または発現と活性化を、既知の c - k i t の量または活性化を有する 1 つまたは複数の対照試料中の c - k i t の発現または活性化と比較すること；

20

を含み、ここで、前記乳房組織または乳房細胞の試料中の c - k i t の活性化、または発現と活性化を、1 つまたは複数の対照試料と比較して得られた差異により、メシル酸イマチニブ の投与に対する個体の応答を予測する方法。

## 【請求項 20】

c - k i t の発現、活性化、または発現と活性化を検出する方法が、c - k i t に免疫特異的な抗体または抗体群の使用を含む、請求項 19 の方法。

## 【請求項 21】

請求項 20 の方法であって、c - k i t の発現、活性化、または発現と活性化を検出する方法が、

30

( a ) 前記乳房組織または乳房細胞の試料を、光学密度標識で検出可能に標識した 1 つまたは複数の抗体を使用して染色すること、ここで少なくとも 1 つの抗体が c - k i t に免疫特異的である；及び

( b ) ( a ) の乳房組織または乳房細胞の試料の光学密度を測定すること；  
を含み、ここで前記光学密度が、c - k i t の発現、活性化、または発現と活性化に対応する方法。

## 【請求項 22】

画像解析を用いて光学密度を測定する、請求項 21 の方法。

## 【請求項 23】

検出可能標識が色原体または蛍光標識試薬である、請求項 22 の方法。

40

## 【請求項 24】

検出可能標識が D A B である、請求項 23 の方法。

## 【請求項 25】

チロシンキナーゼ阻害剤が c - k i t 阻害剤である、請求項 8 の方法。

## 【請求項 26】

チロシンキナーゼ阻害剤が メシル酸イマチニブ である、請求項 8 の方法。

## 【請求項 27】

1 つまたは複数の生物学的マーカーが c - k i t である、請求項 1 の方法。

## 【請求項 28】

個体が乳癌または膀胱癌を患っている、請求項 1 の方法。

50

## 【請求項 29】

個体が乳癌を患っており、前記第一の組織または細胞の試料が乳房組織または乳房細胞の試料であり、前記第二の組織または細胞の試料が乳房組織または乳房細胞の試料である、請求項 1 の方法。

## 【請求項 30】

個体が膀胱癌を患っており、前記第一の組織または細胞の試料が膀胱組織または膀胱細胞の試料であり、前記第二の組織または細胞の試料が膀胱組織または膀胱細胞の試料である、請求項 1 の方法。

## 【請求項 31】

メシル酸イマチニブの投与に対する、乳癌を患っている個体の応答を評価するための方法であって、

メシル酸イマチニブを投与される前の乳癌患者からの第一の乳房組織または乳房細胞試料中と、メシル酸イマチニブを投与された後の前記乳癌患者からの第二の乳房組織または乳房細胞試料中との、*c - k i t*の発現、活性化、または発現と活性化の両方を検出すること；及び

前記第二の乳房組織または乳房細胞の試料中の *c - k i t* の発現、活性化、または発現と活性化の両方が、前記第一の乳房組織または乳房細胞の試料中の *c - k i t* の発現、活性化、または発現と活性化の両方と比較して、減少しているかどうかを測定すること；を含み、ここで減少していた *c - k i t* の発現、活性化、または発現と活性化の両方により、メシル酸イマチニブの投与に対する前記乳癌患者の応答を評価する方法。

## 【請求項 32】

*c - k i t* の発現、活性化、または発現と活性化を検出する方法が、*c - k i t* に免疫特異的な抗体または抗体群の使用を含む、請求項 31 の方法。

## 【請求項 33】

請求項 32 の方法であって、*c - k i t* の発現、活性化、または発現と活性化を検出する方法が、

( a ) 前記乳房組織または乳房細胞の試料を、光学密度標識で検出可能に標識した 1 つまたは複数の抗体を使用して染色すること、ここで少なくとも 1 つの抗体が *c - k i t* に免疫特異的である；及び

( b ) ( a ) の乳房組織または乳房細胞の試料の光学密度を測定すること；を含み、ここで前記光学密度が、*c - k i t* の発現、活性化、または発現と活性化に対応する方法。

## 【請求項 34】

画像解析を用いて光学密度を測定する、請求項 33 の方法。

## 【請求項 35】

検出可能標識が色原体または蛍光標識試薬である、請求項 34 の方法。

## 【請求項 36】

検出可能標識が D A B である、請求項 35 の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本出願は、2001年8月21日に出願された米国特許仮出願番号第60/314,188号による優先権を主張するものである。

## 【0002】

発明の背景

## 1. 技術分野

本発明は、個体において癌治療に対する応答を測定するまたは予測するための方法に関する。本発明はまた、*c - k i t* / S C F / p A K T の発現及び活性化を定量するため及び有効な抗癌性化合物を同定するために、免疫組織化学的に染色した組織生検の画像解析を利用する方法に関する。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0003】

## 2. 背景技術

癌治療の第一のゴールは、正常細胞に有害な影響を及ぼすことなく、悪性細胞を選択的に死滅させること若しくは悪性細胞の制御されない増殖を阻止することである。伝統的な化学療法剤は、好ましくは正常細胞よりも悪性細胞に対してより大きな親和性を有する、若しくは悪性細胞の速い増殖速度と代謝活性に基づいて少なくとも優先的に悪性細胞に作用する、高度細胞傷害性物質である。しかし、これらの薬剤はしばしば正常細胞を損傷する。

## 【0004】

一般に、抗癌薬、モノクローナル抗体、化学療法剤または化学予防剤は、癌細胞または前癌細胞の増殖停止、最終分化及び細胞死を生じさせるために使用される (Mendelsohn, 1990年, *Semin. Cancer Biol.* 1: 339~44; Hancockら, 1991年, *Cancer Res.* 51: 4575~80; Arteagaら, 1994年, *Cancer Res.*, 54: 3758~65; Pietrasら, 1994年, *Oncogene* 9: 1829~38; Bacusら, 1997年, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 19: 316~28; Bacusら, 1999年, *Breast J.*; Baselgaら, 1999年, *Proceedings of AACR NCI EORTC International Conference, Abstract* 98; Cobleighら, 1999年, *J. Clin. Oncol.* 17: 2639~48; DiGiiovanna, 1999年, *PPO Updates: Princ. Practice Oncol.* 13: 1~9; Hortobagyi, 1999年, *J. Clin. Oncol.* 17: 25~29; Shak, 1999年, *Semin. Oncol.* 26: 71~77; Sliwkowskiら, 1999年, *Semin. Oncol.* 26: 60~70; Vincentら, 2000年, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 45: 231~38)。薬剤が誘導する増殖停止または細胞死は、しばしばプログラム細胞死または最終分化に結びつく形態的及び生化学的变化を特徴とする (有糸分裂細胞死に相反して)。

## 【0005】

化学療法剤は細胞死を引き起こすのに十分な高さの用量で投与しうるが、そのような用量は、典型的には腫瘍細胞と同様に正常細胞にも有害作用をもたらす。分化誘導薬、及び低用量の化学療法剤の使用は、しばしば細胞死よりもむしろ増殖停止を生じさせる。そのような増殖停止のあとには、アポトーシス及び細胞死が続くか、若しくはひとたび化学療法剤を中止すると増殖が継続することがある。細胞傷害性薬剤及び化学療法剤の投与または電離放射線はまた、主としてp53及びp53調節サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (p16、p27及びp19など) または増殖阻害因子 (TGF- $\beta$ 、IL-4及びIL-6など) の機能に依存する状態である、一過性の増殖停止を誘導しうる。化学療法剤を取り除くと、薬剤治療を受けた細胞は最終的に再び分裂を始め、増殖し続けるかまたは死滅する。一部の薬剤処置腫瘍細胞は、長期的な増殖停止を受け、薬剤から解放されたときに細胞分裂を再開することができない。

## 【0006】

アポトーシスは、一般に様々な生理的または病的刺激に対する積極的な自殺応答とみなされる。最近の試験は、X線照射及びいくつかの化学療法剤 (例えばアルキル化剤及びトポイソメラーゼII阻害因子) を含む多様なDNA損傷剤が、アポトーシスを導く経路を開始させることを明らかにした。これらの薬剤によってアポトーシスが誘導される正確な機序はまだ不明である。しかし、癌抑制遺伝子p53の発現がこの過程に関係付けられてきた (KwokとSutherland, 1989年, *J. Natl. Cancer Inst.* 81: 1020~24; KwokとSutherland, 1991年, *Int. J. Cancer* 49: 73~76; Lane, 1992年, *Nature* 358: 15~16; Kuerbitzら, 1992年, *Proc. Natl. Acad. Sc*

10

20

30

40

50

i . U . S . A . 8 9 : 7 4 9 1 ~ 9 5 ; L u o ら、1 9 9 5 年、N a t u r e 3 7 5 : 1 5 9 ~ 6 1 ; L i u ら、1 9 9 6 年、C a n c e r R e s . 5 6 : 3 1 ~ 3 5 ; M e l l i n g h o f f と S a w y e r s , 2 0 0 0 年、P P O U p d a t e s 1 4 : 1 ~ 1 1 ) 。 さ ら に、カスパーゼ ( 例 えばカスパーゼ 9 またはカスパーゼ 3 ) またはそれらのシャペロン分子 ( 例 えば熱ショックタンパク質 6 0 ) の上方調節がアポトーシスに結びついてきた。

【 0 0 0 7 】

細胞は、癌抑制遺伝子 P T E N などの細胞遺伝子の欠失、活性型 R a s の過剰発現、及び活性型 P I 3 K の過剰発現を含む様々な方法でアポトーシスに対して抵抗性となりうる。特定細胞タンパク質、A K T ( c - a k t 遺伝子のタンパク質産物) が、腫瘍形成及び薬剤耐性にとって重要な意味を持つ、細胞生存の鍵となる調節因子及びアポトーシスの阻害因子として同定された。例 えば、P T E N の喪失は A K T 活性の上昇と相関する ( L i ら、1 9 9 7 年、S c i e n c e 2 7 5 : 1 9 4 3 ~ 4 7 ; L i a w ら、1 9 9 7 年、N a t . G e n e t . 1 6 : 6 4 ~ 6 7 ; N e l e n ら、1 9 9 7 年、H u m . M o l . G e n e t . 6 : 1 3 8 3 ~ 8 7 ; C a n t l e y と N e e l , 1 9 9 9 年、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 9 6 : 4 2 4 0 ~ 4 5 ; D a t t a ら、1 9 9 9 年、G e n e s D e v . 1 3 : 2 9 0 5 ~ 2 7 ) 。 さ ら に、アポトーシスの抑制は、腫瘍形成を促進する上で A K T が有しうる唯一の機能ではない。A K T は同時に、細胞周期の進行を誘導することができる。しかし、A K T がアポトーシスを抑制しうるという所見は、癌遺伝子が、A K T を過度に活性化することによって適応細胞アポトーシスを遮断しうることを示唆する。

【 0 0 0 8 】

アポトーシス機構の複雑さを考慮して、A K T が細胞の生存を促進し、細胞死を阻害するために作用すると考えられるいくつかの経路が存在する。A K T は、B c l - 2 遺伝子ファミリーの成員 ( 細胞生存または細胞死において役割を果たすことが知られている) の発現または活性を調節することによってアポトーシスを遮断しうる。選択的に、A K T はカスパーゼファミリーのタンパク質の発現または活性、若しくは細胞死受容体経路の機能を調節しうる。A K T の調節作用は、直接機序 例 えばアポトーシス機構の成分のリン酸化 または間接機序 細胞死機構の成分をコードする遺伝子の発現レベルを変化させることなどによって を通してでありうる。最近の試験は、A K T が多部位でアポトーシスを調節することを示唆している。そのすべてが細胞死を仲介する上で重要な役割を果たす、いくつかの A K T 標的が同定されており、B A D、カスパーゼ 9、フォークヘッドファミリーの転写因子及び N F B 調節因子 I K K ( D a t t a ら、1 9 9 9 年、前出) が含まれる。

【 0 0 0 9 】

c - k i t 原癌遺伝子は、それらの類似する免疫グロブリン様細胞外ドメイン及び親水性インサートによる細胞質チロシンキナーゼドメインの中断により、P D G F 及び C S F - 1 についての受容体と同じクラスに位置づけられる、膜貫通チロシンキナーゼ増殖因子受容体をコードする ( Y a r d e n ら、1 9 8 7 年、E M B O J . 6 : 3 3 4 1 ~ 3 3 5 1 ) 。 代 替 的 に 幹 細 胞 増 殖 因 子 ( 「 S C F 」 ) 、 マ ス ト 細 胞 増 殖 因 子、k i t リガンド または S l 因子としても知られるそのリガンドは、他の増殖因子と共に、多くの造血系統の増殖と分化を支える初期造血細胞増殖因子である ( 同上 ) 。

【 0 0 1 0 】

いくつかの小細胞肺癌細胞系及び乳癌細胞系において、c - k i t と S C F の同時発現が起こることが明らかにされており、自己分泌増殖刺激が非造血系腫瘍において役割を果たしうることを示唆している。自己分泌増殖は c - k i t と S C F の同時発現を必要とする。2 つの独立した試験において、c - k i t のカルボキシル末端に対するポリクローナル抗血清を用いた凍結切片の免疫染色は、正常乳房管上皮細胞の均一な強い染色を明らかにした。これらの試験はまた、同じ方法を用いて、乳癌の少なくとも 1 0 ~ 2 0 % が c - k i t の発現を持続することを示した。これらの試験のいずれも、しかしながら、乳癌に

10

20

30

40

50

おけるSCFの発現は取り上げなかった。それ故、c-kitとSCFの同時発現が一部の乳癌の増殖調節において役割を果たす可能性がある(Hinesら、1995年、Cell Growth & Differentiation, 6:769~779; Nataliら、1992年、Int. J. Cancer, 52:713~717; Chuiら、1996年、British J. of Cancer, 73:1233~1236)。加えて、乳癌におけるc-kitと他の増殖因子の同時発現は、EGFファミリーの増殖因子に対する高い感受性を生じさせる(Hinesら、1999年、Breast Cancer Research and Treatment 58:1~10)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0011】

それ故、AKTの発現または活性化の直接または間接的な責任を担うタンパク質及びリガンドの発現と活性化の改善された検出がこの技術分野において求められている。また、c-kitの発現と活性化及びそのリガンドであるSCFの発現の改善された検出も必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、癌患者からの細胞及び組織試料において腫瘍形成の生物学的マーカーの発現または活性化を、同定及び検出するための試薬及び方法を提供する。ここで提供する方法は、特定治療プログラムに対する個々の癌患者の応答を予測するまたは評価するために有用であり、また有効な抗癌性化合物を同定するために有用である。

20

【0013】

第一の局面では、本発明は、

(a) 個体を化学療法剤または生物学的治療薬に曝す前に、その個体から第一組織または細胞試料を採取すること；

(b) 前記個体を化学療法剤または生物学的治療薬に曝したあと、その個体から第二組織または細胞試料を採取すること；

(c) 第一組織または細胞試料と第二組織または細胞試料において1つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出すること；

(d) 前記第一組織または細胞試料における1つまたは複数の前記生物学的マーカーの量を第二組織または細胞試料における量と比較すること；

30

(e) 第二組織試料における1つまたは複数の生物学的マーカーの量が第一組織試料における1つまたは複数の生物学的マーカーの量よりも少ないとき、前記化学療法剤または生物学的治療薬への曝露に続いて、1つまたは複数の生物学的マーカーの発現または活性化が低下するかどうかを判定すること；

を含み、その中で化学療法剤または生物学的治療薬の個体への投与に対する応答を評価する、化学療法剤または化学予防剤の個体への投与に対する応答を評価するための方法を提供する。

【0014】

一部の実施形態では、上記の1つまたは複数の生物学的マーカーは腫瘍関連遺伝子から発現される。他の実施形態では、上記の1つまたは複数の生物学的マーカーは、腫瘍関連シグナル伝達経路の細胞成分である。さらなる他の実施形態では、生物学的マーカーは、c-kit、SCF、pAKT、またはpc-kitである。一部の実施形態では、上記の1つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出する方法は、その1つまたは複数の生物学的マーカーに免疫特異的な1つまたは複数の抗体を使用することを含む。他の実施形態では、1つまたは複数の生物学的マーカーの量を免疫組織化学的に測定する。

40

【0015】

さらなる他の実施形態では、1つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出する方法は、

(a) 少なくとも1つの抗体が1つまたは複数の生物学的マーカーに免疫特異的であり

50

、その生物学的マーカーが c - k i t、S C F、p A K T、または p c - k i t である、光学密度標識で検出可能に標識した 1 つまたは複数の抗体を使用して第一及び第二組織または細胞試料を染色すること；及び

( b ) ( a ) において染色した第一及び第二組織試料の光学密度を測定すること；を含み、前記光学密度は前記の 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量に対応する。

【 0 0 1 6 】

他の実施形態では、画像解析を用いて光学密度を測定する。さらなる実施形態では、検出可能標識は色原体 ( c h r o m a g e n ) または蛍光標識試薬 ( f l u o r o p h o r e ) である。さらなる実施形態では、検出可能標識は D A B である。他の実施形態では、前記薬剤は G l i v a c ( 登録商標 ) である。

10

【 0 0 1 7 】

第二の局面では、本発明は、

( a ) 個体を化学療法剤または生物学的治療薬に曝す前に、その個体から組織または細胞試料を採取すること；

( b ) 前記組織または細胞試料において 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出すること；

( c ) ( b ) で定量した 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量を、1 つまたは複数の対照試料において既知量のマーカーを発現する 1 つまたは複数の試料の量と比較すること；及び

( e ) 1 つまたは複数の対照試料におけるマーカーの発現または活性化レベルと比較して 1 つまたは複数の生物学的マーカーの発現または活性化のレベルを測定すること；を含み、その中で 1 つまたは複数の生物学的マーカーの発現または活性化レベルの低下の測定に基づいて、化学療法剤または生物学的治療薬の個体への投与に対する応答を予測する、化学療法剤または化学予防剤の個体への投与に対する応答を予測するための方法を提供する。

20

【 0 0 1 8 】

一部の実施形態では、上記の 1 つまたは複数の生物学的マーカーは腫瘍関連遺伝子から発現される。他の実施形態では、上記の 1 つまたは複数の生物学的マーカーは、腫瘍関連シグナル伝達経路の細胞成分である。さらなる他の実施形態では、生物学的マーカーは、c - k i t、S C F、p A K T、または p c - k i t である。一部の実施形態では、上記の 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出する方法は、その 1 つまたは複数の生物学的マーカーに免疫特異的な 1 つまたは複数の抗体を使用することを含む。他の実施形態では、1 つまたは複数の生物学的マーカーの量を免疫組織化学的に測定する。

30

【 0 0 1 9 】

さらなる他の実施形態では、1 つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出する方法は、

( a ) 少なくとも 1 つの抗体が 1 つまたは複数の生物学的マーカーに免疫特異的であり、その生物学的マーカーが c - k i t、S C F、p A K T、または p c - k i t である、光学密度標識で検出可能に標識した 1 つまたは複数の抗体を使用して第一及び第二組織または細胞試料を染色すること；及び

40

( b ) ( a ) において染色した第一及び第二組織試料の光学密度を測定すること；を含み、前記光学密度は前記の 1 つまたは複数の生物学的マーカーの量に対応する。

【 0 0 2 0 】

他の実施形態では、画像解析を用いて光学密度を測定する。さらなる実施形態では、検出可能標識は色原体または蛍光標識試薬である。さらなる実施形態では、検出可能標識は D A B である。他の実施形態では、前記薬剤は G l i v a c ( 登録商標 ) である。

【 0 0 2 1 】

第三の局面では、本発明は、

( a ) 第一組織または細胞試料を得ること；

( b ) 第二組織または細胞試料を得ること；

50

(c) 第二組織または細胞試料を化合物に曝すこと；

(d) 第一組織または細胞試料と第二組織または細胞試料において1つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出すること；

(e) 前記第一組織または細胞試料と第二組織または細胞試料における1つまたは複数の生物学的マーカーの量を比較すること；

(d) (f) 第二組織または細胞試料における1つまたは複数の生物学的マーカーの量が第一組織または細胞試料における1つまたは複数の生物学的マーカーの量よりも少ないとき、前記化合物への曝露に続いて、1つまたは複数の生物学的マーカーの発現または活性化が低下するかどうかを判定すること；

を含み、その中で前記化合物を化学療法剤または生物学的治療薬として同定する、化合物を化学療法剤または生物学的治療薬として同定するための方法を提供する。

10

#### 【0022】

一部の実施形態では、上記の1つまたは複数の生物学的マーカーは腫瘍関連遺伝子から発現される。他の実施形態では、上記の1つまたは複数の生物学的マーカーは、腫瘍関連シグナル伝達経路の細胞成分である。さらなる他の実施形態では、生物学的マーカーは、c - k i t、S C F、p A K T、またはp c - k i tである。一部の実施形態では、上記の1つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出する方法は、その1つまたは複数の生物学的マーカーに免疫特異的な1つまたは複数の抗体を使用することを含む。他の実施形態では、1つまたは複数の生物学的マーカーの量を免疫組織化学的に測定する。

#### 【0023】

さらなる他の実施形態では、1つまたは複数の生物学的マーカーの量を検出する方法は、

20

(a) 少なくとも1つの抗体が1つまたは複数の生物学的マーカーに免疫特異的であり、その生物学的マーカーがc - k i t、S C F、p A K T、またはp c - k i tである、光学密度標識で検出可能に標識した1つまたは複数の抗体を使用して第一及び第二組織または細胞試料を染色すること；及び

(b) (a) において染色した第一及び第二組織試料の光学密度を測定すること；  
を含み、前記光学密度は前記の1つまたは複数の生物学的マーカーの量に対応する。

#### 【0024】

他の実施形態では、画像解析を用いて光学密度を測定する。さらなる実施形態では、検出可能標識は色原体または蛍光標識試薬である。さらなる実施形態では、検出可能標識はD A Bである。

30

#### 【0025】

本発明は、c - a k t 遺伝子の発現を誘導する及び/またはA K Tタンパク質を活性化することの直接の責任を担うタンパク質及びリガンドの発現と活性化を検出するための試薬及び方法を提供する。c - k i t 原癌遺伝子及びそのリガンドである幹細胞増殖因子(「S C F」または「S C G F」)が乳癌において様々な量で同時発現されること及びc - k i tの活性化がリン酸化A K T (p A K T)の産生をもたらすという発見をここで開示する。

#### 【0026】

本発明はまた、腫瘍の治療のために、c - k i t、S C F、p c - k i t及びp A K Tの発現及びタンパク質レベルを検出し、測定すること及びそれらの活性化状態を検出し、測定することのための診断方法を提供する。本発明は、病理学者が正常細胞を解析から除外することも可能にする、患者から採取した細胞または組織試料においてc - k i t、S C F、p c - k i t及びp A K Tタンパク質レベル及びそれらの活性化状態を測定するための信頼しうるアッセイを提供する。さらに、本発明は、癌患者が、c - k i tシグナル伝達経路の成分を対象とした治療薬を使用する治療経過から恩恵を受けるかどうかを判定するための方法を提供する。本発明はさらに、c - k i tシグナル伝達経路の成分を対象とした治療薬を使用する治療の経過を監視するための方法を提供する。本発明はまた、本発明の方法によって同定される治療薬を提供する。

40

50

## 【0027】

本発明の個々の実施形態は、一部の好ましい実施形態についての下記の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかになるであろう。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0028】

本発明は、腫瘍関連遺伝子の発現及び活性化レベルを定量的に測定するための方法を提供する。本発明は特に、個体からの細胞または組織試料において検出されるような、ヒト腫瘍細胞を含む腫瘍細胞において、*c-kit*、*SCF*及び*AKT*によってコードされる細胞タンパク質についての発現及び活性化レベルを定量的に測定するための方法を提供する。

10

## 【0029】

*c-kit*及びそのリガンドである*SCF*は、乳癌及び膀胱癌において様々な量で同時発現され、*SCF*による*c-kit*活性化に関連するその下流シグナルは、基質*AKT*のリン酸化*AKT* (*pAKT*) へのリン酸化である。本発明によれば、化学療法剤または生物学的治療薬による治療から恩恵を得ることができる患者を同定するため、そのような薬剤で治療した患者を監視するため、または化学療法剤または生物学的治療薬を同定するために、*c-kit*、*SCF*及び*AKT*の発現と活性化を分析し、監視する。例えば、チロシンキナーゼ阻害因子を含むがこれらに限定されない化学療法剤または生物学的治療薬による治療から恩恵を得ることができる患者を同定するために、定量的画像解析を免疫組織化学と共に本発明に従って使用して、これら3つの腫瘍マーカーの発現を解析する。特定実施形態では、そのようなチロシンキナーゼ阻害因子は、*c-kit*キナーゼを阻害することが知られている *STI-571* (メシル酸イマチニブ) を含むが、これに限定されない。(Drucker, 2001年、Am. Soc. Of Clinical Oncology, 2001 Educational Book 37<sup>th</sup> Annual Meeting, San Francisco, カリフォルニア州)。

20

## 【0030】

手術処置の補助として及び手術処置後に化学療法剤治療を実施する伝統的な制癌法に対して、ネオアジュバント(または一次)化学療法は、癌患者において初期治療として薬剤を投与することから成る。そのようなアプローチの1つの利点は、3cm以上の原発腫瘍に関して、患者の大部分に対して保存的手術手技(例えば乳癌患者における定型的乳房切除術と異なって)の使用を可能にすることである。もう1つの利点は、多くの癌に関して、全症例の約3分の2において部分的及び/または完全な応答が達成されることである。最後に、患者の大部分が2~3サイクルの化学療法治療後に応答性であるので、使用される化学療法プログラムのインビボでの効果を監視することが可能であり、これは化学療法治療に対して非応答性である癌の適時の同定のために重要である。非応答性腫瘍の適時の同定によって、臨床医は、癌患者を必要のない治療副作用に暴露することを制限し、代替治療を開始することができる。しかし、組織学的検査を含む、当技術分野において存在する方法は、そのような適時の正確な同定のためには不十分である。本発明は、より情報に富みかつ有効な治療領域を管理することができる方法を提供する。さらに、本発明は、治療計画の応答性または非応答性を評価することができ、それによって患者の化学療法剤への暴露を制限する方法を提供する。

30

40

## 【0031】

癌の診断は、疾患の初期診断及びその後の治療前、治療中または治療後の疾患経過の監視の両方が、患者から切除した細胞または組織試料の組織学的検査を通して好都合に確認される。臨床病理学者は、そのような試料が良性であるかまたは悪性であるかを正確に判定し、悪性と判断された腫瘍試料の進行性を分類できることを必要とする。これらの判定がしばしば、患者の適切な治療コースを選択するための基礎となるからである。同様に、病理学者は、特に治療の結果としてまたは治療に関連して、最も殊更には化学療法剤または生物学的薬剤による治療の結果としてまたは治療に関連して、癌が増殖したまたは寛解に向かった度合を検出できることを必要とする。

50

## 【 0 0 3 2 】

組織学的検査は伝統的に、試料の形態的特徴を光学顕微鏡下で容易に観察することを可能にする組織染色手順が必要である。病理学者は、染色した試料を検査した後、典型的には腫瘍試料が悪性であるかどうかの定性的判定を行う。しかし、腫瘍の進行性はしばしば、試料の形態に反映されうるまたは反映されない、タンパク質の発現または抑制及びタンパク質の活性化のような腫瘍内の細胞の生化学の結果であるので、腫瘍の進行性を単に試料の組織学的検査だけを通して確認することは困難である。それ故、腫瘍試料内の細胞の生化学を評価できることが重要である。さらに、腫瘍関連遺伝子またはタンパク質の遺伝子発現とタンパク質活性化の両方を、より明細には腫瘍関連シグナル伝達経路の細胞成分を観察し、定量できることが望ましい。

10

## 【 0 0 3 3 】

当技術分野において知られる自動（コンピュータ援用）画像解析システムは、試料の視覚的検査を高めることができる。代表的なシステムでは、細胞または組織試料を、特定生化学的マーカーに特異的な検出可能標識試薬に曝し、その後細胞の拡大画像を、電荷結合素子カメラ（CCD）またはテレビカメラなどのカメラから画像を受け取るコンピュータによって処理する。そのようなシステムは、例えば、試料中の c - k i t、S C F、p c - k i t、及び p A K T の発現及び活性化レベルを検出し、測定するために使用できる。この方法は、癌のより正確な診断と、組織学的に同定された癌細胞における遺伝子発現のより良好な特徴づけ、最も殊更には腫瘍マーカー遺伝子または特定の型及び亜型（すなわち種々の悪性度）の癌において発現されることが知られている遺伝子の発現に関してより良好な特性付けを提供する。この情報は、ある種の腫瘍型または亜型に対して臨床効果を有する薬剤を、細胞がそのように同定された患者に対して投与することができるので、より情報に富みかつ有効な治療法を管理することを可能にする。非制限的な一例は、c - k i t、S C F、p c - k i t 及び p A K T に関して試験陽性である腫瘍生検または他の試験試料を有する患者へのチロシンキナーゼ阻害因子の投与である。

20

## 【 0 0 3 4 】

従来の抗癌治療のもう一つの欠点は、個々のヒト患者において特定の癌を治療する場合に特定の化学療法剤の効果が予測できないことである。この予測不能性の故に、当技術分野では、治療を開始する前に、一つまたはそれ以上の選択薬剤が抗癌剤として活性であるかどうかを判定すること、または個々の患者において治療経過の正確な予後を示すことができない。同じ臨床的癌が、いずれの措置が特定個人にとって最も有効であるかを評価する現行の方法がないにもかかわらず、臨床医に治療措置の選択を迫ることがあるため、これは特に重要である。個々の患者において提案されている治療薬（または薬剤の組合せ）の予想される効果をより良好に評価できることが、本発明の方法の一つの利点である。化学療法措置の効果を評価するための、特許請求されている方法のさらなる特徴は、それらが時間効果的及びコスト効果的であり、癌患者への損傷を最小限に抑えることである。

30

## 【 0 0 3 5 】

本発明の方法の一つの実施形態を実施する場合、二成分免疫組織化学的染色システムを使用する。この実施形態では、細胞ペレットまたは組織を、第一の色を生じる染料、染色剤または検出可能標識で対比染色し、一方、前記細胞ペレットまたは組織試料中の対象タンパク質を、第二の異なる色を生じる染料、染色剤または検出可能標識で染色する。次に、細胞ペレットまたは組織試料中の細胞の画像を光学顕微鏡で拡大し、別々の画像の対に分割する。各々の特異染色について最大吸収を有するように特異的に適合させた一对の光学フィルターを使用して、分割画像を増強する。光学フィルターの一つは、対比染色した組織の吸収波長の波長を有する光を選択的に透過する。他方の、好ましくは狭い帯域の光学フィルターは、対象タンパク質を検出するために使用する染料、染色剤または検出可能標識に関するスペクトル吸収の領域内の光を選択的に透過する。画像解析フィルターを使用して、細胞膜、細胞質及び核などの様々な成分中の異なる細胞タンパク質を定量することができる。最良の結果を得るためには、測定を行う前に画像システムを検定する。

40

## 【 0 0 3 6 】

50

二成分免疫組織化学的染色法を利用した本発明の方法を使用することの利点の1つは、対象タンパク質の細胞内局在を測定できることである。

【0037】

本発明の方法のもう1つの実施形態を実施する場合、標的タンパク質特異的染色の量と度合を生物学的試料中の標的タンパク質の量に関係付ける検量線を使用して、生物学的試料中の標的タンパク質の量を定量する(すなわち、標的タンパク質の量を測定する)。これは、最も一般的には、実験試料または患者の試料を、細胞を用いて、最も好ましくは高度の正確さと精度で測定することができる一貫した量の標的タンパク質を生産する培養細胞系を用いて調製した細胞試料と比較することによって実施される。一部の好ましい実施形態では、各々異なる量の標的タンパク質を発現する複数の細胞個体群を検定して、染色強度を試料中のタンパク質の量に関係付ける検量線を作成することができる。そのような細胞個体群を使用して、異なる細胞個体群中の異なる量の標的タンパク質に結びつく標的タンパク質特異的染色の量を測定する。一部の好ましい実施形態では、細胞数の測定が実際的ではないかまたは信頼できない場合に、標的タンパク質特異的染色の量を基準化するかまたは総細胞タンパク質の量に対する比率で表わして、生物学的組織、好ましくは腫瘍組織、最も好ましくは悪性腫瘍組織を分析するために都合のよい測定値を提供する。本発明を実施する場合、標的タンパク質特異的染色と細胞内で発現される標的タンパク質の量との相関は、標的タンパク質の量を、標的タンパク質特異的染色に結びつく物理的パラメータ、最も好ましくは光学密度に関係付ける検量線として表わされる。本発明の方法に従い、本発明の方法を使用して作成される検量線はまた、アルゴリズムとして、最も好ましくは線形または対数方程式の形態で都合に表わされ、好ましくは、例えばコンピュータなどの装置を、試料の染色強度を試料中の標的タンパク質の量に変換するようにプログラムすることによって、自動化される。

【0038】

本発明の方法のもう1つの実施形態を実施する場合、対象タンパク質の細胞内局在を測定することができる。エストロゲン受容体などの一部のタンパク質は、活性化されるまでは細胞質内に局在し、活性化された時点で核内へと移行して、そこで、例えば遺伝子発現に関与することができるので、これは有益である。

【0039】

組織試料の定量的免疫組織化学画像解析についての手順例の説明は、一般に、いずれも2001年1月12日に出願された共同係属中の米国特許出願番号第09/760,120号及び第09/760,121号、及び、いずれも2001年1月12日に出願されたWO01/51924号及びWO01/51928号の中に認めることができ、それらはすべて、その全体が参照してここに組み込まれる。一例として、Becton Dickinson Company, Mountain View, カリフォルニア州より入手可能な、Cell Analysis Systems Model 200上で定量的画像解析を実施した。本発明に包含される定量的画像解析は、Chroma Vision Medical Systems (San Juan Capistrano, カリフォルニア州)などの、但しこれに限定されない、他の販売者からのシステムでも実施することができる。

【0040】

本発明の方法の実施において、c-kit、SCF、pc-kit及びpAKTを含むがこれらに限定されない標的タンパク質は、特異試薬、最も好ましくはそれ自体が検出可能に標識されている抗体を用いて、若しくは標識されていない標的タンパク質特異的抗体と、検出可能に標識されており、標的タンパク質特異的抗体を認識する第二抗体を使用して、検出することができる。選択的に、検出可能に標識することができ、標的タンパク質に特異的に結合するいかなる分子も、本発明の方法を実施する場合に使用できる。本発明の方法の好ましい実施形態では、染色した標的タンパク質を対比染色した組織または細胞試料からより容易に識別できるように、二成分免疫組織化学的染色システムを使用して、標的タンパク質と組織または細胞試料を区別して染色する。免疫組織化学的染色後、好ま

10

20

30

40

50

しくはコンピュータ援用画像解析システムによって作成した組織または細胞試料の光学画像を光学顕微鏡の下で拡大し、一对の画像に分離する。分離した画像を一对の光学フィルターを用いて増強し、それらの光学フィルターの1つは染色に対応する最大吸収を有し、他方は対比染色に対応する最大吸収を有しており、それによって2つの染色間の最適の識別が提供される。本発明の方法の他の実施形態では、複数の画像解析フィルターを使用して、様々な成分（例えば膜、細胞質及び核）において異なる細胞タンパク質の染色レベルを検出し、識別し、及び定量することができる。非制限的な例では、ジアミノベンジジン（DAB）を用いて標的を染色し、エチルグリーンまたはメチレンブルーを用いて組織または細胞試料を対比染色することができる。

#### 【0041】

相対湿度のようなある種の環境条件における染料ロットの変動性及び変異性が、本発明の方法を用いて種々の時点で得られる結果に影響を及ぼしうることは、免疫組織化学技術分野における当業者には認識されよう。本発明の方法の一部の実施形態では、染色及び対比染色ロットの変異性は、試料細胞と第一及び第二対照細胞ペレットを染色するのに同じ試薬を使用することによって制御される。本発明の方法の他の一部の実施形態では、染色手順における環境の相違及び変異性は、同じ時点で試料細胞と第一及び第二対照細胞ペレットを染色することによって制御される。

#### 【0042】

一部の実施形態では、ここでは光学または蛍光顕微鏡、画像伝達カメラ（image-transmitting camera）及び映像スクリーンを含む、最も好ましくは、装置の作動を指令し、同時に、最も好ましくは染色組織標本の特定領域の光学密度の形態で、収集した情報を保存して操作するために使用できるコンピュータを同時に含むと定義される、画像解析装置を用いて標的タンパク質特異的染色を検出し、測定して、定量する。本発明の実施において有用な画像解析装置は、CAS200システム（Becton Dickinson, Mountain View, カリフォルニア州）を含むが、これに限定されない。

#### 【0043】

一部の実施形態では、次のような画像解析システムを使用して本発明の方法を実施する。上述したような免疫組織化学的染色後、染色試料の顕微鏡画像をデジタル化し、デジタル化画像の各々の画素（ピクセル）での光の強さの値を、染色細胞成分（例えば核）のパーセンテージに対応する光学密度値に変換することにより、発現細胞パーセンテージの数量化測定を得ることができる。より具体的には、デジタルグレースケール画像を用いて特定染色を有する細胞の量を測定するためにコンピュータ画像解析を使用することができる。グレースケール画像は、試験下にある特異的標識に結合し、それによって光学的増幅と標的の視覚化を可能にする、色原体などの光学的増強因子の量を表わす。

#### 【0044】

本発明の方法の実施において使用するとき、コンピュータ画像解析装置は、顕微鏡スライド上の領域から標本の細胞群の画像を拡大し、表示するためのレンズなどの手段を含む。前記標本細胞群は、酵素染色法及び化学的染色法などの、免疫組織化学技術分野において既知の染色及び対比染色手法を用いて調製する。適切な染色剤及び対比染色剤は、コンピュータ画像解析システムと共に使用するカメラを通して、細胞を識別することができる能力によって選択され、中でも特に、特異的酵素またはマーカーを含む抗体サンドイッチ複合体を含むもの及びそのような複合体を含まないものが挙げられる。染色後、画像領域を前記装置によってデジタル化し、前記システムによって提供されるメモリーに保存する。デジタル化画像から、画像を形成するための赤色波長または緑色光学フィルターなどの1つの波長の光を使用することによって核または細胞質画像マスクを形成する。組織マスクを保存し、第二フィルターを使用して、光学的増強因子と同じ領域のもう1つの濾過画像を形成する。第一画像を第二画像と比較して、光学的増強因子で染色した物質の数量化を得ること、従って試験下にある特異的標的の量の測定を得ることにより、細胞特徴の識別を行うことができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 5 】

最初の段階では、標的タンパク質に特異的な検出可能標識一次抗体、または選択的に非標識一次抗体と一次抗体に特異的な検出可能標識二次抗体を加えることによって、細胞中の発現された標的タンパク質を同定する。前記抗体を、もしこれらの抗原が存在すれば複合体を形成するだけの時間、試料と共にインキュベートする。次にその複合体を、直接標識を検出することによって、若しくは検出可能標識が酵素である場合は、切片を適切な条件下に色原体などの化合物と共にインキュベートすることによって、視覚化する。一例として、一次抗体をペルオキシダーゼで標識し、その後色原体 D A B を使用することができる。第二段階では、エチルグリーンなどの、但しこれに限定されない、もう1つの光学的増強因子で組織を対比染色する。ペルオキシダーゼ及びエチルグリーンを使用する染色手法は例示であるが、他の染料及び光学的増強因子も適切である。例えば、赤色を生じる3-アミノ-9-エチルカルバゾール ( A E C ) 及び4-クロロ-1-ナフトールを含むがこれらに限定されない、他の色原体をペルオキシダーゼと共に使用することができる。さらに、アルカリホスファターゼを含むがこれに限定されない、一次抗体を標識するために使用できる他の酵素は、本発明に包含される。アルカリホスファターゼと共に使用できる色原体の例は、ファストレッド、ファストグリーン、及び5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウム ( B C I P / N B T ) を含むが、これらに限定されない。蛍光染料の非制限的例として、フルオレセイン (フルオロイソチオシアネートまたは F I T C ) 及びローダミンが使用できる。

10

## 【 0 0 4 6 】

さらに、エチルグリーンの使用は対比染色剤の例であるが、他の対比染色剤の使用も本発明の方法に包含される。例えば、さらなる対比染色剤の非制限的リストは、ヘマトキシリン、ファストレッド、メチルグリーンを含む。対比染色剤は、2つの別個の波長での濾過を達成しうるように、実施しうるスペクトル分離に基づいて個々の染色に関して選択される。例えば、エチルグリーンは、下記でより詳細に述べるように、D A B 沈殿物からの良好なスペクトル分離を提供する。良好なスペクトル分離を提供する染色剤/対比染色剤の対の他の例は、ファストレッドとヘマトキシリン、A E C とヘマトキシリン、及び F I T C とテキサスレッドを含むが、これらに限定されない。当業者は、染色剤と対比染色剤のこのリストが単なる例示であり、それ故、本発明を限定する働きをしないことを認識するであろう。

20

30

## 【 0 0 4 7 】

本発明の方法の実施形態の一例として、スペクトル試験は、エチルグリーン染色が、免疫ペルオキシダーゼによって生成された D A B 沈殿物からの良好なスペクトル分離を提供し、2つの異なる波長で画像を濾過することによって画像の異なる特徴を容易に分離できることを示した。これは、画像を2つの別々の画像にデジタル化すること、例えば、1つはすべての核が光学的に増強されている画像 (例えば、エチルグリーンまたはファストグリーンを用いて)、及び1つは受容体染色 ( D A B ) を有する組織領域だけが光学的に増強されている画像へとデジタル化することを可能にする。その結果得られる、エチルグリーンで染色された組織標本は、マーカータンパク質の発現レベルに比例して、細胞質または核に局在する様々な度合の褐色 D A B 沈殿物と共に緑色の核を有するであろう。ペルオキシダーゼとエチルグリーンを用いた染色手法を述べるが、他の染色剤及び光学的増強因子も適切である (ファストレッドまたはファストグリーン対比染色剤などの特異的な色原体と組み合わせたアルカリホスファターゼなど)。スペクトル試験は、エチルグリーンが免疫ペルオキシダーゼ手法の D A B 沈殿物からの良好なスペクトル分離を提供し、その結果2つの異なる波長での濾過が画像の異なる特徴を容易に分離できることを示した。これは、画像を2つの別々の画像、すなわち1つはすべての細胞核が光学的に増強されている画像であり (エチルグリーンまたはファストグリーン)、1つは受容体染色 ( D A B ) を有する組織領域だけが光学的に増強されている画像へとデジタル化することを可能にする。特定実施形態では、対比染色領域の画像を作製するための600ナノメートル (レッド) フィルター及び D A B 沈殿物で染色されている組織領域の画像を作製するための500ナ

40

50

ノメートル（グリーン）フィルターによって画像を分離することができる。

【0048】

染色領域をさらに識別するために、画像を視覚化するオペレーターが、検討下にある領域に関して境界を設定することができる、相互作用閾値設定手法（*interactive threshold setting technique*）が使用できる。そのような境界を設定するとき、光学密度の閾値以下である画像のすべての部分を排除することによって画像が形成される。ここに含まれる教示に従って実施されるように、第一画像に関して閾値を好都合に設定し、第二画像について第二の閾値を設定する。

【0049】

さらに、好ましくは本発明の画像解析システムを用いて実施される画像処理方法は、最初に、例えばレッドフィルターで検討下の組織のマスク画像を形成することを含む。このマスク画像を、好ましくはシステムのコンピュータメモリーに保存し、発現タンパク質定量についてのもう1つの画像を、例えば同じ画像のグリーンで濾過したバージョンを使用することによって獲得する。組合せフィルターの効果は、組織成分がDABで染色されている組織マスクの領域を光学的に増強すること（すなわちより濃くすること）及びグリーン対比染色剤でのみ染色された組織成分をより明るくすることである。その後、染色されている、マスク内にある画像の領域だけを使用して画像解析を実施することができる。

【0050】

レッドとグリーンの光学フィルター及びDABとエチルグリーンまたは他のグリーン対比染色剤の組合せは、本発明の方法の実施において好都合に使用される。この組合せは、2つの対比染色領域を識別するための便利で好都合な方法を提供する。当業者は、ファストグリーン、エオシンなどの、ある特定領域を光学的に増強するためまたはもう1つ別の細胞特徴に比べて際立たせるために使用できる多数の他の染色剤、フィルター、染色法または光学的増強法及び濾過方法が存在することを認識するであろう。

【0051】

例えば、腫瘍関連遺伝子から発現されるタンパク質の発現と活性化を、本発明の方法を用いて検出し、定量することができる。さらに、腫瘍関連シグナル伝達経路の細胞成分であるタンパク質の発現と活性化を、本発明の方法を用いて検出し、定量することができる。さらに、乳癌に結びつくタンパク質を、Her-1、Her-2、p-Her-1、p-Her-2、p-ERK、c-kit、p-AKT、またはSCF、若しくはそれらのリン酸化形態に対する適切な一次抗体、及び二次抗体（マウス一次抗体を使用するときはウサギ抗マウスIgGなど）及び/または三次アビジン（またはストレプトアビジン）ピオチン複合体（「ABC」）を使用した画像解析によって定量することができる。試薬の例は、Cell Signaling Technology（Beverly, マサチューセッツ州、カタログ番号9277）から入手される、pAKTに特異的なウサギポリクローナル抗体；Santa Cruz Biotechnology（Santa Cruz, カリフォルニア州、カタログ番号SC-9132）から入手される抗SCF抗体；及びNeomarkers, Inc.（Fremont, カリフォルニア州、カタログ番号RB-1518）から入手されるポリクローナル抗c-kit抗体を含む。

【0052】

本発明の方法を実施する場合、染色手順は検査室の技術者によって実施されうる。選択的に、染色手順は自動化システムを使用して実施されうる。

【0053】

次に、染色された抗原の平均光学密度によって標的タンパク質の量を定量することができる。また、染色された総組織面積の割合またはパーセンテージを、第二画像において抗体閾値レベル以上に染色された面積として、容易に算定しうる。c-kit、SCF及びpAKTを含む核を視覚化した後、治療後の患者に由来する組織におけるそのような細胞のパーセンテージまたは量を、未処置組織におけるそのような細胞のパーセンテージまたは量と比較することができる。

【0054】

これらの比較から、腫瘍に対する推定上の治療薬または化学的予防剤の潜在的有効性を判定することができる。特に、試料の未処置部分において腫瘍関連遺伝子から発現されるタンパク質の発現及び活性化の量が試料の処置部分におけるよりも大きい場合は、処置に使用した治療薬が癌を治療するために有効な薬剤であることが予測される。さらに、試料の未処置部分において腫瘍関連シグナル伝達経路の細胞成分であるタンパク質の発現及び活性化の量が試料の処置部分におけるよりも大きい場合は、処置に使用した治療薬が癌を治療するために有効な薬剤であることが予測される。さらに、試料の未処置部分において c - k i t、S C F 及び p A K T の発現及び活性化の量が試料の処置部分におけるよりも大きい場合は、処置に使用した治療薬が癌を治療するために有効な薬剤であることが予測される。逆に、試料の処置部分と未処置部分において c - k i t、S C F 及び p A K T を発現する細胞のパーセンテージが実質的に等しい場合、若しくは試料の未処置部分においてタンパク質発現がより少ない場合、推定上の治療薬は癌の治療のために有効ではないと予測される。例えば、この手順を使用して、c - k i t チロシンキナーゼ阻害因子である Novartis の薬剤 S T I - 5 7 1 ( G L I V E C (登録商標) ; メシル酸イマチニブ) が癌試料を治療するために潜在的に有効な薬剤であると予測されることを確認できる。

10

#### 【 0 0 5 5 】

実施例 1 ~ 7 を参照することにより、本発明の特に有用な実施形態及びその利点を罹患することができる。これらの実施例は、本発明の具体的な実施形態、及びそれらの様々な使用の例示である。それらは説明のためにのみ提示するものであり、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

20

#### 【実施例 1】

#### 【 0 0 5 6 】

##### c - k i t についての染色手順

c - k i t に対するポリクローナル抗体 ( N e o M a r k e r s , F r e m o n t , カリフォルニア州 ) を使用して、B e n c h m a r k (登録商標) 自動染色モジュール ( V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s , I n c . , T u c s o n , アリゾナ州 ) で c - k i t についての染色を実施した。試料の 1 0 % 中性緩衝ホルマリン固定 4 ミクロンパラフィン切片を被覆スライド上に置いた。c - k i t 染色プロトコールに特異的な B e n c h m a r k バーコードをスライド上に置き、そのスライドを B e n c h m a r k 上に置いた。その後のすべての段階、すなわち乾燥、脱パラフィン化、抗原回収 ( 細胞順化、E D T A 1 m M )、及び検出は、B e n c h m a r k によって自動的に実施された。すべての試験試薬は、特に異なる記載がない限り、I - V i e w D A B D e t e c t i o n K i t を含めて、V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s より入手可能である。自動システムを使用する際に実施したプロトコールを表 1 に示す。1 滴と記載されている場合は、1 つの試薬の配薬である。その後、試料を手操作により、4 % エチルグリーン 0 . 1 M p H 4 酢酸緩衝液で 1 0 分間対比染色した。c - k i t についての染色の結果は下記の実施例 5 で述べる。

30

#### 【 0 0 5 7 】

##### 表 1

40

【表 1】

1	****EZプレップを選択する****	
2	****時間を決めて工程を開始	
3	****混合機停止****	
4	スライドを75°Cに温め、4分間インキュベートする	
5	EZプレップを適用し、容量を調節する	
6	4分間インキュベートする	
7	スライド+をすすぐ	
8	EZプレップ容量調節を適用する	10
9	4分間インキュベートする	
10	スライド+をすすぐ	
11	EZプレップ容量調節を適用する	
12	カバーガラスをのせる	
13	スライドを76°Cに温め、4分間インキュベートする	
14	スライド+をすすぐ	
15	Deparを適用し、容量を調節する	
16	カバーガラスをのせる	20
17	スライドを42°Cに温め、2分間インキュベートする	
18	****混合機作動****	
19	スライド+をすすぐ	
20	培地細胞コンディショナーNo. 1を適用する	
21	CC長カバーガラスをのせる	
22	スライドを95°Cに温め、8分間インキュベートする	
23	培地細胞コンディショナーNo. 1を適用する	
24	カバーガラスをのせる	
25	スライドを100°Cに温め、4分間インキュベートする	30
26	カバーガラスをのせる	
27	培地細胞コンディショナーNo. 1を適用する	
28	4分間インキュベートする	
29	カバーガラスをのせる	
30	EZプレップCC容量調節を適用する	
31	4分間インキュベートする	
32	カバーガラスをのせる	
33	培地細胞コンディショナーNo. 1を適用する	
34	4分間インキュベートする	40
35	カバーガラスをのせる	
36	培地細胞コンディショナーNo. 1を適用する	
37	4分間インキュベートする	
38	スライド加熱器を無効にする	
39	8分間インキュベートする	

【 0 0 5 8 】

40	スライド+をすすぐ	
41	スライド容量を調節する	
42	カバーガラスをのせる	
43	****反応緩衝液を選択****	
44	スライドを42°Cに温め、2分間インキュベートする	
45	スライド+をすすぐ	
46	スライド容量を調節する	
47	I-VIEW INHIBITOR 1滴を適用し、カバーガラスをのせて、4分間インキュベートする	10
48	スライド+をすすぐ	
49	スライド容量を調節する	
50	c-kit一次抗体[PREP KIT 4]1滴を適用し、カバーガラスをのせて、32分間インキュベートする	
51	スライド+をすすぐ	
52	スライド容量を調節する	
53	I-VIEW BIOTIN Ig 1滴を適用し、カバーガラスをのせて、8分間インキュベートする	
54	スライド+をすすぐ	
55	スライド容量を調節する	20
56	I-VIEW SA-HRP 1滴を適用し、カバーガラスをのせて、8分間インキュベートする	
57	スライド+をすすぐ	
58	スライド容量を調節する	
59	カバーガラスをのせる	
60	スライド+をすすぐ	
61	スライド容量を調節する	
62	I-VIEW DAB 1滴及びI-VIEW H2O2 1滴を適用し、カバーガラスをのせて、8分間インキュベートする	30
63	スライド+をすすぐ	
64	スライド容量を調節する	
65	I-VIEW COPEER 1滴を適用し、カバーガラスをのせて、4分間インキュベートする	
66	スライド+をすすぐ	

## 【実施例2】

【0059】

SCFについての染色手順

SCFに対するポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, カリフォルニア州) を使用してSCF染色を実施した。ピオチニル化抗ウサギ二次抗体 (Jackson Research Labs, West Lake, ペンシルヴェニア州)、「StreptABC complex - HRP」(ストレプトアビジン/ピオチンのホースラディッシュペルオキシダーゼとの複合体) 標識キット (DAKO Corporation, Carpinteria, カリフォルニア州) 及びDAB色原体 (Dako) をSCFについての検出系として使用した。試料の10%中性緩衝ホルマリン固定4ミクロンパラフィン切片を被覆スライド上に置いた。染色用の試料を調製するために、最初に試料を脱パラフィン化し、水に水和した。フィシン消化溶液、Digest-All 1 (Zymed Labs) により、酵素的に抗原回収を実施した。前記製品の即時使用溶液1~2滴を切片に加え、37°Cで20分間インキュベートした。次に切片を脱イオン水で十分に洗い、TBSで洗浄した。切片を3%過酸化水素/メタノール溶液と共に10分間インキュベートし、その後脱イオン水で洗浄するこ

40

50

とにより、内因性ペルオキシダーゼを遮断した。次に0.1% BSA / 0.1% Triton X中の10%遮断ヤギ血清を10分間使用して切片を遮断した。その後ヤギ血清を除去した。

#### 【0060】

前記切片をSCF一次抗体の1:20希釈と共に37で45分間インキュベートした。一次抗体を切片と共にインキュベートしている間に、50mM Tris-HCl緩衝液、pH7.6 1ml中のビオチン4μl溶液と共にストレプトアビジン溶液4μlを加えて、StreptABC標識を調製した。SCF一次抗体のインキュベーション後、切片をTBSで十分に洗い、ビオチニル化ヤギ抗ウサギIgGの1:300希釈と共に37で20分間インキュベートした。切片をTBSで十分に洗った後、StreptABC標識と共に37で20分間インキュベートした。切片をTBSで十分に洗い、DAB液体色原体を室温で5分間適用した。次に切片を脱イオン水で十分に洗った。スライドを4%エチルグリーンで対比染色した。SCFについての染色の結果は下記の実施例5で述べる。

#### 【実施例3】

#### 【0061】

##### ホスホ-AKTについての染色手順

Dako AutostainerをLSAB2キット(上述)と共に使用して、p-AKT染色を実施した。試料の10%中性緩衝ホルマリン固定4ミクロンパラフィン切片を被覆スライド上に置いた。染色用の試料を調製するために、最初に試料を脱パラフィン化し、水に水和した。製造者に指示に従ってDecloaker Chanmer (Biocare Medical, Walnut Grove, カリフォルニア州)中0.1Mクエン酸回収緩衝液、pH6.0で抗原回収を実施した。切片を15分間放置して冷却し、その後脱イオン水で十分に洗った。切片を3%過酸化水素/メタノール溶液と共に10分間インキュベートし、その後脱イオン水で洗浄することにより、内因性ペルオキシダーゼを遮断した。次に0.1% BSA / 0.1% Triton X中の10%遮断ヤギ血清を10分間使用して切片を遮断した。その後ヤギ血清を除去した。

#### 【0062】

次に、前記切片をp-AKT一次抗体の1:75希釈(Cell Signaling Technology, Beverly, マサチューセッツ州)と共に4で一晚インキュベートした。翌朝、切片を冷蔵庫から取り出し、約30分間室温に置いた。スライドをTBSで十分に洗い、Dako Autostainerに充填した。Autostainerは、ビオチニル化リンクを30分間、ストレプトアビジン-HRP試薬を30分間、及びDAB色原体を5分間適用するようにプログラムした。抗体結合、標識及びDAB色原体適用の間にオートステイナーによってスライドをTBS/Tweenで洗浄した。DAB色原体適用後、オートステイナーからスライドを取り出し、脱イオン水で十分に洗った。スライドを4%エチルグリーンで対比染色した。SCFについての染色の結果は下記の実施例5で述べる。

#### 【実施例4】

#### 【0063】

##### ホスホ-KITについての染色手順

DAKO Corp.より入手した試薬キット(ホスラディッシュペルオキシダーゼ標識を含むLSAB2キット(標識ストレプトアビジン-ビオチン))と共にDako Autostainerをと共に使用して、pc-kit染色を実施した。試料の10%中性緩衝ホルマリン固定4ミクロンパラフィン切片を被覆スライド上に置いた。染色用の試料を調製するために、最初に試料を脱パラフィン化し、水に水和した。製造者の指示に従って、熱誘導エピトープ回収(HIER)手順に使用できる電気圧力調理器(electric pressure cooker)、Decloaker Chanmer (Biocare Medical, Walnut Grove, カリフォルニア州)中1mM EDTAで抗原回収を実施した。切片を15分間放置して冷却し、その後脱イオン

10

20

30

40

50

水で十分に洗った。切片を3%過酸化水素/メタノール溶液と共に10分間インキュベートし、その後脱イオン水で洗浄することにより、内因性ペルオキシダーゼを遮断した。次に0.1%BSA/0.1%Triton X中の10%遮断ヤギ血清を10分間使用して切片を遮断した。その後ヤギ血清を除去した。

【0064】

次に、前記切片をp-kit (Try 719) 一次抗体の1:50希釈 (Cell Signaling Technology, Beverly, マサチューセッツ州) と共に4で一晚インキュベートした。翌朝、切片を冷蔵庫から取り出し、約30分間放置して室温にした。スライドをTBSで十分に洗い、Dako Autostainerに充填した。Autostainerは、ビオチニル化リンクを30分間、ストレプトアビジン-HRP試薬を30分間、及びDAB色原体を5分間適用するようにプログラムした。抗体結合、標識及びDAB色原体適用の間にオートステイナーによってスライドをTBS/Tweenで洗浄した。DAB色原体適用後、オートステイナーからスライドを取り出し、脱イオン水で十分に洗った。スライドを4%エチルグリーンで対比染色した。その結果は、試料中のp-kitの発現または活性化のレベルを検出することができた(データは示していない)。

【実施例5】

【0065】

c-kit、SCF及びpAKTについての腫瘍試料の免疫組織化学的染色

NovartisのGlivec(登録商標)などの、c-kit阻害因子についての候補である患者を同定するために、腫瘍試料をc-kit及びSCFの発現に関して検査した。腫瘍試料のパラフィンブロックを4~5ミクロンの切片にし、それらの切片を被覆スライド上に置いた。次にスライドをc-kit、SCFまたはpAKTのいずれかについて上述したように染色した。これらの実験の結果を図1Aから1Dまでに示す。これらの図は1名の個人の乳癌試料の顕微鏡写真である。2枚の顕微鏡写真(図1A及び1C)はSCFに対する抗体で染色した領域であり、2枚の顕微鏡写真(図1B及び1D)はc-kitに対する抗体で染色した領域である。すべての写真が染色を示し、従って、同じ腫瘍がc-kitとSCFの両方を発現することを示している。それ故、この乳癌試料は、この患者がc-kit阻害因子についての良好な候補であると同定された。

【0066】

c-kit阻害因子についての候補であると判定された腫瘍試料のさらなる例として、図2A~2Eは、上述したように、c-kit、SCF及びpAKTに対する抗体で染色した膀胱癌試料(2A、2D及び2E)または乳癌試料(2B及び2C)のいずれかを示す。図2Bは、c-kitについて染色した乳癌試料747を示す。図2Cは、SCFに関して染色した乳癌試料848を示す。図2D及び2Eは、c-kit(図2D)及びSCF(図2E)の両方について染色した膀胱癌試料920を示しており、この患者がc-kit阻害因子についての良好な候補であることを示唆している。図2Aは、pAKTに関して染色した同じ膀胱癌試料920を示す。

【実施例6】

【0067】

c-kit、SCF及びpAKTタンパク質発現の画像解析

腫瘍試料をc-kit、SCF及びpAKTに対する抗体で染色し、画像解析を使用してこれら3つのタンパク質の発現レベルを測定した。解析した個々の腫瘍試料は、乳癌(747、848、864、895)及び膀胱癌(920)の両方の試料を含んだ。Bacusら(その全体が参照してここに組み込まれる、1997年、Anal. Quant. Cytol. Histol. 19:316~28)に述べられているようにCASシステムを使用して測定を行った。ピクセル当りの光学密度の単位で表わした、c-kit、SCF及びpAKTタンパク質のレベルを表IIに示す。図3は、これら5つの腫瘍において画像解析とIHC染色によって測定したc-kit、SCF及びpAKTのレベルを示す棒グラフであり、3つのタンパク質すべてが発現されたこと、3つのタンパク質すべて

が測定できたこと、及び3つのタンパク質の発現レベルにかなりの変動があったことを示している。おそらく、これらの変動が癌の薬剤感受性に影響を及ぼすのであろう。

【0068】

表2

ピクセル当りの光学密度として表わした、腫瘍試料におけるc-kit、pAKT及びSCFの画像解析定量

【表2】

試料	c-kit	PAKT	SCF
“747”	0.3	0.15	0.07
“848”	0.32	0.13	0.1
“864”	0.14	0.06	0.25
“895”	0.13	0.04	0.1
“920”	0.29	0.4	0.07

10

【実施例7】

【0069】

乳癌細胞系におけるSTI-571(メシル酸イマチニブ)に対する応答

20

乳癌細胞系MDA-MB-361を使用して、c-kitチロシンキナーゼ阻害因子、特にNovartisの薬剤STI-571(GLIVEC(登録商標);メシル酸イマチニブ)に対する乳癌細胞系の応答を測定した。図4は、細胞培養においてSTI-571(メシル酸イマチニブ)の存在下または不存在下にSCFリガンドで処置した乳癌細胞におけるc-kit活性を示すウエスタンブロットの表示である。前記細胞系を、3日間の細胞培養中に、1 $\mu$ M~40 $\mu$ MまでのSTI-571(メシル酸イマチニブ)に曝した。次に、この培養細胞系と対照の未処置細胞系を溶解し、総タンパク質50 $\mu$ gを含む細胞溶解産物を、Neomarkers CD117/c-Kit抗体クローンAb-6及びDAKO CD117/c-Kit抗体クローンA4502の両方で免疫沈降させた。図5は、この実験においてc-kitを免疫沈降させるのに使用した同じ抗体でプローブしたHeLa細胞におけるc-kit発現のウエスタンブロットの表示であり、両方の抗体がc-Kitを単離できたことを明らかに示している。図4、レーン1は、活性化c-kitが、そのリガンドであるSCFの不在下では発現されないことを示している。レーン2は、細胞培養をSCFに曝したときの活性化c-kitの単離を示唆する、145kDaの異なるバンドを示す。残りのレーン(3~6)は145kDaのバンドを有さず、1 $\mu$ Mという低いSTI-571(メシル酸イマチニブ)の存在下ではc-kitの発現が起こらないことを明らかにしている。この結果は、STI-571(GLIVEC(登録商標);メシル酸イマチニブ)が、そのリガンドであるSCFの存在下でc-kitの発現または活性化の量を低下させることを示している。それ故、STI-571(GLIVEC(登録商標);メシル酸イマチニブ)は、c-kitの発現または活性化を低下させるため、そしてそれに対応して、AKTの活性化を低下させるために有用な化合物であると同定される。

30

40

【0070】

上記の開示は本発明の一部の具体的な実施形態を強調していること、及びそれに等価のすべての修正または選択肢は、添付の特許請求の範囲に述べられている本発明の精神と範囲内であることは明白であらう。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】図1Aから1Dまでは、No.12669b9によって同定されたヒト乳房組織試料の免疫組織化学的分析を示す。図1Aは、実施例2に記述のようにSCFに免疫特異

50

的な抗体で免疫組織化学的に染色した、実施例 5 に記述の技術を用いた 400x の倍率での、試料組織の顕微鏡写真を示す。図 1 B は、実施例 1 に記述のように、c - k i t に対する抗体で染色した同じ乳癌試料を示す (400x)。図 1 C は、S C F に関して染色した同じ癌組織の異なる領域を示す (400x)。図 1 D は、c - k i t に関して染色したもう一つ別の領域を示す (400x)。

【図 2】図 2 A から 2 E までは、腫瘍試料の免疫組織化学的分析の結果を示す。図 2 A は、p A K T に関して染色した腫瘍である。図 2 B は、c - k i t に関して染色した腫瘍試料 7 4 7 を示す。図 2 C は、S C F に関して染色した試料 8 4 8 を示す。図 2 D 及び 2 E は、c - k i t (図 2 D) または S C F (図 2 E) に関して染色した腫瘍試料 9 2 0 の異なる領域である。

10

【図 3】図 3 は、画像解析と組み合わせて、免疫組織化学によって測定した c - k i t、S C F 及び p A K T のレベルを示す棒グラフである。この棒グラフは光学密度 / ピクセルの単位で表わしている。

【図 4】図 4 は、S T I - 5 7 1 (G l i v e c、N o v a r t i s P h a r m a c e u t i c a l s より入手した; メシル酸イマチニブ) の存在下または不在下に S C F リガンドで処理した乳癌細胞における c - k i t の活性化を示すウエスタンプロットの写真である。p c - k i t を M D A - M B - 3 6 1 細胞溶解産物 (総タンパク質 50 μg) から免疫沈降させ、ゲル電気泳動によって分離して、活性 c - k i t 受容体を検出するために抗ホスホチロシン抗体でスクリーニングした。予想されたように、c - k i t 受容体は S C F 処理によって活性化されたが、わずかに 1 μM の S T I - 5 7 1 (メシル酸イマチニブ) で阻害された。

20

【図 5】図 5 は、H e L a 細胞から調製した c - k i t のウエスタンプロットの写真である。c - k i t に対するウサギポリクローナル抗体を、N e o M a r k e r s (1 : 200 希釈) 及び D A K O (1 : 400 希釈) から入手し、ウサギ I g G に対する H P R 複合抗体 (A m e r s h a m) 及び化学発光基質 (N E N) を用いて検出した。

【図 1 A】

【図 1 B】

試料 12669b9 における、C-KIT 及びそのリガンド、SCGF に対する免疫組織化学

SCGF



Figure 1A

試料 12669b9 における、C-KIT 及びそのリガンド、SCGF に対する免疫組織化学

C-KIT

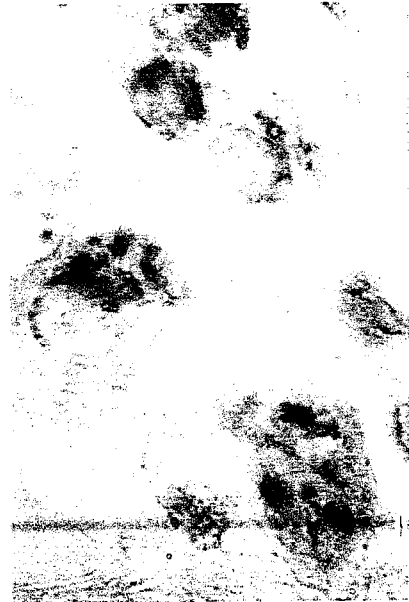


Figure 1B

【 図 1 C 】

試料 12669b9 における、C-KIT 及びそのリガンド、SCGF に対する免疫組織化学  
SCGF



Figure 1C

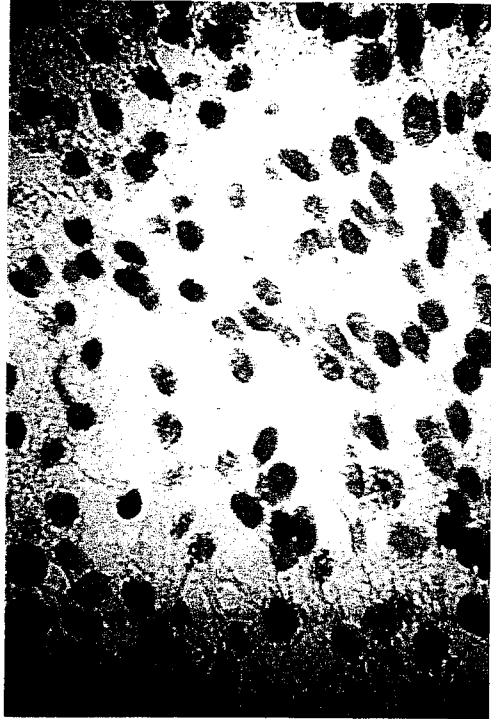
【 図 1 D 】

試料 12669b9 における、C-KIT 及びそのリガンド、SCGF に対する免疫組織化学  
C-KIT



Figure 1D

【 図 2 A 】



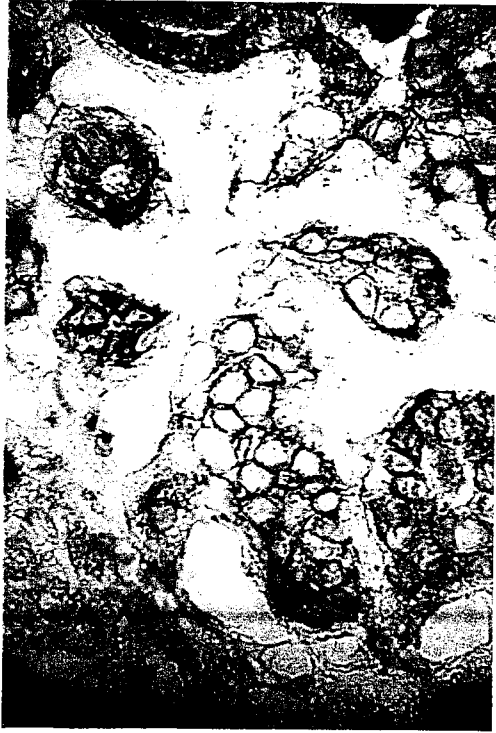
pAKT920  
Figure 2A

【 図 2 B 】



C-kit 747  
乳癌  
Figure 2B

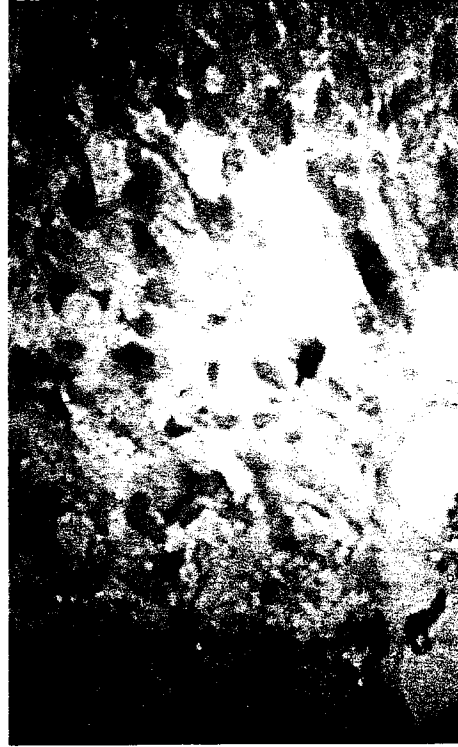
【図 2 C】



SCF 848 乳癌

Figure 2C

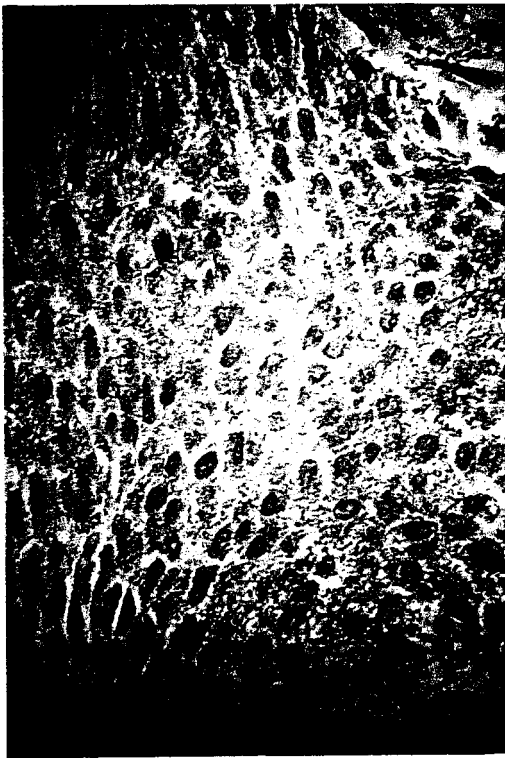
【図 2 D】



C-kit 920 膀胱癌

Figure 2D

【図 2 E】



SCF 920 膀胱癌

Figure 2E

【図 3】

5つの異なる腫瘍試料におけるC-kit、SCF及びpAKTレベル

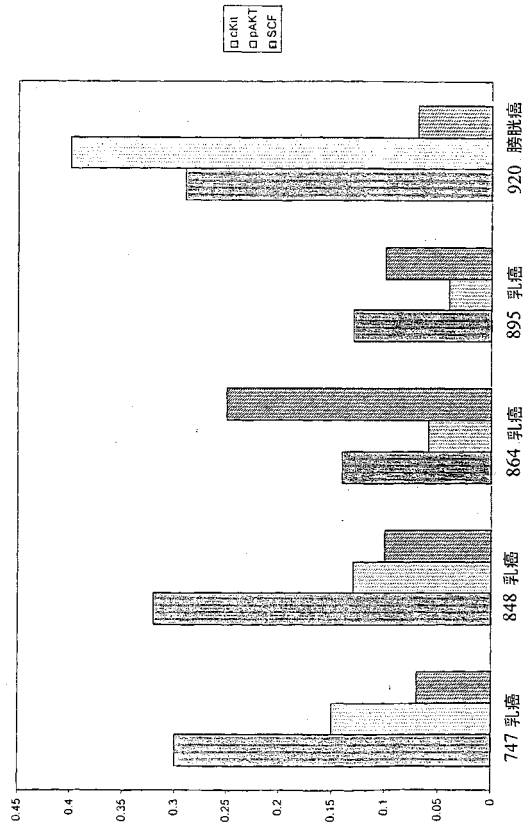
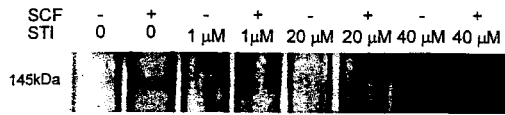


Figure 3

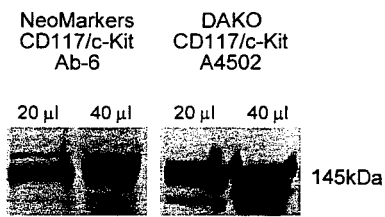
【 図 4 】



SCF リガンド及び/又は STI 阻害因子で処置した乳癌細胞における c-Kit 活性。  
c-Kit を MDA-MB-361 細胞溶解産物 (総タンパク質 50 μg) から免疫沈降させ、ウエスタンブロット分析して、活性 c-Kit 受容体を検出するために抗ホスホチロシン抗体でスクリーニングした。予想されたように、c-Kit 受容体は SCF 処置によって活性化されたが、1 μM という低い STI では阻害された。

Figure 4

【 図 5 】



HeLa 細胞における c-Kit のウエスタンブロット。ウサギ IgG に対する HPR 複合抗体 (Amersham) 及び化学発光基質 (NEN) で検出した、NeoMarkers からのヒト c-Kit に対するウサギポリクローナル抗体 (1:200 希釈) 及び DAKO (1:400 希釈)。

Figure 5

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 Y

(56)参考文献 国際公開第 9 9 / 0 5 3 9 5 3 ( W O , A 1 )  
特表 2 0 0 0 - 5 1 5 9 6 4 ( J P , A )  
国際公開第 9 9 / 0 4 1 6 1 3 ( W O , A 1 )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
G01N 33/48-G01N 33/98  
C12Q 1/02  
JSTPlus(JDreamII)  
JMEDPlus(JDreamII)  
PubMed

专利名称(译)	测量c-kit / SCF / pAKT状态的方法和定量分析		
公开(公告)号	<a href="#">JP4204974B2</a>	公开(公告)日	2009-01-07
申请号	JP2003521325	申请日	2002-08-21
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	本塔纳医疗系统公司		
当前申请(专利权)人(译)	本塔纳医疗系统公司		
[标]发明人	バツカスサラエス		
发明人	バツカス、 サラ エス.		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/53 A61K31/00 C12N5/08		
CPC分类号	G01N33/5011 G01N33/57484 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/574.A C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/48.P G01N33/50.Z G01N33/53.Y		
代理人(译)	三好秀		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	60/314188 2001-08-21 US		
其他公开文献	JP2005527781A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及预测对由个体组成的由酪氨酸激酶抑制剂组成的化学治疗剂或生物治疗剂给药的反应的方法，包括检测源自该组织或细胞样品的一种或多种生物学标记物的量。个体，其中生物标志物是c-kit途径的细胞成分，并将子部分(a)中检测到的一种或多种生物学标志物的量与一种或多种对照组织或细胞样品中检测到的量进行比较，其中，基于来自一个或多个对照组织或细胞样品的一种或多种生物学标记物的量的比较，预测对个体施用化学治疗剂或生物治疗剂的响应。

1	****E2プレップを選択する****
2	****時間を決めて工程を開始
3	****混合機停止****
4	スライドを76℃に温め、4分間インキュベートする
5	E2プレップを適用し、容量を調節する
6	4分間インキュベートする
7	スライド+をすすぐ
8	E2プレップ容量調節を適用する
9	4分間インキュベートする
10	スライド+をすすぐ
11	E2プレップ容量調節を適用する
12	カバーガラスをのせる
13	スライドを76℃に温め、4分間インキュベートする
14	スライド+をすすぐ
15	DnaAを適用し、容量を調節する
16	カバーガラスをのせる
17	スライドを42℃に温め、2分間インキュベートする
18	****混合機作動****
19	スライド+をすすぐ
20	培地細胞コンディショナーNo. 1を適用する
21	CG長カバーガラスをのせる
22	スライドを95℃に温め、8分間インキュベートする
23	培地細胞コンディショナーNo. 1を適用する
24	カバーガラスをのせる
25	スライドを100℃に温め、4分間インキュベートする
26	カバーガラスをのせる
27	培地細胞コンディショナーNo. 1を適用する
28	4分間インキュベートする
29	カバーガラスをのせる
30	E2プレップCG容量調節を適用する
31	4分間インキュベートする
32	カバーガラスをのせる
33	培地細胞コンディショナーNo. 1を適用する
34	4分間インキュベートする
35	カバーガラスをのせる
36	培地細胞コンディショナーNo. 1を適用する
37	4分間インキュベートする
38	スライド加熱器を無効にする
39	8分間インキュベートする