

(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2006-509503

(P2006-509503A)

(43) 公表日 平成18年3月23日(2006.3.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04 ZNA	4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 D	
	GO1N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2004-558213 (P2004-558213)	(71) 出願人	502331787
(86) (22) 出願日	平成15年12月11日 (2003.12.11)		ベンタナ・メディカル・システムズ・イン コーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年8月4日 (2005.8.4)		アメリカ合衆国・アリゾナ・85737・ トウソン・イノベーション・パーク・ド ライブ・1910
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/039770	(71) 出願人	501087490
(87) 国際公開番号	W02004/053497		セル・シグナリング・テクノロジー・イン コーポレイテッド
(87) 国際公開日	平成16年6月24日 (2004.6.24)		アメリカ合衆国、マサチューセッツ・01 915、ピバリー、カミングズ・センター ・166・ビー
(31) 優先権主張番号	60/432, 942	(74) 代理人	100102668
(32) 優先日	平成14年12月11日 (2002.12.11)		弁理士 佐伯 憲生
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HER-2 指向性治療に対する応答を予測する方法

(57) 【要約】

本発明は個々の患者における HER-2 指向性治療に対する応答を測定又は予測する方法を提供するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

HER2 指向性治療に応答する、HER2 を過剰発現する哺乳動物の腫瘍を同定する方法であって、(a) IGF R ポリペプチド、(b) EGF R ポリペプチド、(c) NDF ポリペプチド、(d) リン酸化された S6 リボソームポリペプチド、(e) リン酸化された AKT ポリペプチド、及び (f) リン酸化された ERK ポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化又はその両方のパターンを検出するために、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルを解析する工程を含み、ここで発現、リン酸化、又はその両方の検出されたパターンが、HER2 指向性治療に応答する哺乳動物の腫瘍を同定するものである方法。

10

【請求項 2】

(a) IGF R ポリペプチド、並びに、(b) EGF R ポリペプチド、(c) NDF ポリペプチド、(d) リン酸化された S6 リボソームポリペプチド、(e) リン酸化された AKT ポリペプチド、及び (f) リン酸化された ERK ポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化、又はその両方を検出するために、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルを解析する工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

検出されるパターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍における IGF R ポリペプチドの発現の減少である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

検出されるパターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍における AKT ポリペプチドのリン酸化の減少、S6 リボソームポリペプチドのリン酸化の減少、又はその両方を伴った、IGF R ポリペプチドの正常な発現又は増加である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

検出されるパターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍における ERK ポリペプチドのリン酸化の減少を伴った、EGF R ポリペプチドの正常な発現又は増加である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

検出されるパターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍における S6 リボソームポリペプチドのリン酸化の増加を伴った、IGF R ポリペプチドの発現の減少である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 7】

検出されるパターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍における NDF ポリペプチドの発現の増加を伴った、IGF R ポリペプチドの発現の減少である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

検出されるパターンが、さらに S6 リボソームポリペプチドのリン酸化の増加を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

HER2 指向性治療に応答しない、HER2 を過剰発現する哺乳動物の腫瘍を同定する方法であって、(a) IGF R ポリペプチド、(b) EGF R ポリペプチド、(c) NDF ポリペプチド、(d) リン酸化された S6 リボソームポリペプチド、(e) リン酸化された AKT ポリペプチド、及び (f) リン酸化された ERK ポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化又はその両方のパターンを検出するために、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルを解析する工程を含み、ここで発現、リン酸化、又はその両方の検出されるパターンが、HER2 指向性治療に応答しない哺乳動物の腫瘍を同定するものである方法。

40

【請求項 10】

(a) IGF R ポリペプチド、並びに、(b) EGF R ポリペプチド、(c) NDF ポ

50

リペプチド、(d)リン酸化されたS6リボソームポリペプチド、(e)リン酸化されたAKTポリペプチド、及び(f)リン酸化されたERKポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化、又はその両方を検出するために、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルを解析する工程を含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

検出されるパターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍におけるAKTポリペプチドのリン酸化の増加、S6リボソームポリペプチドのリン酸化の増加、又はその両方を伴った、IGFRポリペプチドの正常な発現又は増加である、請求項9に記載の方法。

【請求項12】

検出されるパターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍におけるEGFRポリペプチド及びNDFポリペプチドの発現の減少である、請求項9に記載の方法。

【請求項13】

検出されるパターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍におけるEGFRポリペプチドの発現の減少である、請求項9に記載の方法。

【請求項14】

検出されるパターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍におけるNDFポリペプチドの発現の減少である、請求項9に記載の方法。

【請求項15】

検出されるパターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍におけるEGFRポリペプチドの発現の減少及びERKポリペプチドのリン酸化の増加である、請求項9に記載の方法。

【請求項16】

検出されるパターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍におけるIGFRポリペプチドの正常な発現又は増加を伴った、NDFの発現の減少である、請求項9に記載の方法。

【請求項17】

AKTポリペプチドのリン酸化、S6リボソームポリペプチドのリン酸化又はその両方の検出が、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルがHER2指向性治療を受けた後に測定されたものである、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

AKTポリペプチドのリン酸化、S6リボソームポリペプチドのリン酸化又はその両方の検出が、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルがHER2指向性治療を受けた後に測定されたものである、請求項4に記載の方法。

【請求項19】

AKTポリペプチドのリン酸化、S6リボソームポリペプチドのリン酸化又はその両方の検出が、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルがHER2指向性治療を受けた後に測定されたものである、請求項9に記載の方法。

【請求項20】

AKTポリペプチドのリン酸化、S6リボソームポリペプチドのリン酸化又はその両方の検出が、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルがHER2指向性治療を受けた後に測定されたものである、請求項11に記載の方法。

【請求項21】

HER2指向性治療がrhUMA b HER2(ハーセプチン(登録商標))を含むものである、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

HER2指向性治療がrhUMA b HER2(ハーセプチン(登録商標))を含むものである、請求項9に記載の方法。

【請求項23】

10

20

30

40

50

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルが、少なくとも一つの化学療法剤を受けたものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルが、少なくとも一つの化学療法剤を受けたものである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 5】

(a) から (f) のポリペプチドのうち一つ又は複数の発現、リン酸化又はその両方の検出パターンが、生物学的検出試薬を用いて測定されたものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 6】

生物学的検出試薬が抗体である、請求項 2 5 に記載の方法。

10

【請求項 2 7】

生物学的検出試薬が核酸プローブである、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

(a) から (f) のポリペプチドのうち一つ又は複数の発現、リン酸化又はその両方の検出パターンが、生物学的検出試薬を用いて測定されたものである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 2 9】

生物学的検出試薬が抗体である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

生物学的検出試薬が核酸プローブである、請求項 2 8 に記載の方法。

20

【請求項 3 1】

リン酸化された A K T ポリペプチドの検出パターンが、配列番号 1 の 4 7 3 位のリン酸化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 2】

リン酸化された A K T ポリペプチドの検出パターンが、配列番号 1 の 4 7 3 位のリン酸化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

リン酸化された S 6 リボソームポリペプチドの検出パターンが、配列番号 2 の 2 3 5 位のリン酸化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 3 4】

リン酸化された S 6 リボソームポリペプチドの検出パターンが、配列番号 2 の 2 3 5 位のリン酸化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 3 5】

リン酸化された E R K ポリペプチドの検出パターンが、配列番号 3 の 2 0 2 位のリン酸化スレオニン残基又は 2 0 4 位のリン酸化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 3 6】

リン酸化された E R K ポリペプチドの検出パターンが、配列番号 3 の 2 0 2 位のリン酸化スレオニン残基又は 2 0 4 位のリン酸化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 3 7】

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルがパラフィン包埋された生検サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 8】

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルがパラフィン包埋された生検サンプルである、請

50

求項 9 に記載の方法。

【請求項 39】

哺乳動物の腫瘍が H E R 2 ポリペプチドに結合する抗体を用いて H E R 2 を過剰発現していると同定されたものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 40】

哺乳動物の腫瘍が H E R 2 ポリペプチドに結合する抗体を用いて H E R 2 を過剰発現していると同定されたものである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 41】

H E R 2 を標的とする分子で治療する H E R 2 を過剰発現するがん患者を選択する方法であって、(a) 患者から得られた細胞又は組織サンプルにおいて (i) I G F R ポリペプチド、(i i) E G F R ポリペプチド、(i i i) N D F ポリペプチド、(i v) リン酸化された S 6 リボソームポリペプチド、(v) リン酸化された A K T ポリペプチド、及び (v i) リン酸化された E R K ポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化、又はその両方のパターンを測定し、(b) 発現、リン酸化、又は発現及びリン酸化の両方の検出パターンに基づいて患者を選択する工程を含む方法。

10

【請求項 42】

工程 (a) が、患者から得られた細胞又は組織サンプルにおいて (a) I G F R ポリペプチド並びに、(b) E G F R ポリペプチド、(c) N D F ポリペプチド、(d) リン酸化された S 6 リボソームポリペプチド、(e) リン酸化された A K T ポリペプチド、及び (f) リン酸化された E R K ポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化、又は発現とリン酸化の両方のパターンを測定することを含むものである、請求項 41 に記載の方法。

20

【請求項 43】

検出パターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍における I G F R ポリペプチドの発現の減少である場合に患者が選択されるものである、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 44】

検出パターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍において A K T ポリペプチドのリン酸化の減少、S 6 リボソームポリペプチドのリン酸化の減少又はその両方を伴った、I G F R ポリペプチドの正常な発現又は増加である場合に患者が選択されるものである、請求項 41 に記載の方法。

30

【請求項 45】

検出パターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍において E R K ポリペプチドのリン酸化の減少を伴った、E G F R ポリペプチドの正常な発現又は増加である場合に患者が選択されるものである、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 46】

検出パターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍における増加した S 6 リボソームポリペプチドのリン酸化の増加を伴った、I G F R ポリペプチドの発現の減少である場合に患者が選択されるものである、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 47】

検出パターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍における N D F ポリペプチドの発現の増加を伴った、I G F R ポリペプチドの発現の減少である場合に患者が選択されるものである、請求項 41 に記載の方法。

40

【請求項 48】

検出パターンが、さらに、S 6 リボソームポリペプチドのリン酸化の増加を含む場合に患者が選択されるものである、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルが H E R 2 指向性治療を受けた後に、A K T ポリペプチドのリン酸化、S 6 リボソームポリペプチドのリン酸化又はその両方が測定されたものである、請求項 41 に記載の方法。

50

【請求項 5 0】

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルが H E R 2 指向性治療を受けた後に、A K T ポリペプチドのリン酸化、S 6 リボソームポリペプチドのリン酸化又はその両方が測定されたものである、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 5 1】

H E R 2 指向性治療が r h u M A b H E R 2 (ハーセプチン(登録商標))を含むものである、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 2】

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルが、少なくとも一つの化学療法剤を受けたものである、請求項 4 1 に記載の方法。

10

【請求項 5 3】

(i) から (v i) のうち一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化又はその両方の検出パターンが、生物学的検出試薬を用いて測定されたものである、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

生物学的検出試薬が抗体である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

生物学的検出試薬が核酸プローブである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

リン酸化された A K T ポリペプチドの検出パターンが、配列番号 1 の 4 7 3 位のリン酸化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 4 1 に記載の方法。

20

【請求項 5 7】

リン酸化された S 6 リボソームポリペプチドの検出パターンが、配列番号 2 の 2 3 5 位のリン酸化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 5 8】

リン酸化された E R K ポリペプチドの検出パターンが、配列番号 3 の 2 0 2 位のリン酸化スレオニン残基又は 2 0 4 位のリン酸化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 4 1 に記載の方法。

30

【請求項 5 9】

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルがパラフィン包埋された生検サンプルである、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 6 0】

哺乳動物の腫瘍が H E R 2 ポリペプチドに結合する抗体を用いて H E R 2 を過剰発現していると同定されたものである、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 6 1】

H E R 2 を標的とする分子で治療しない H E R 2 を過剰発現するがん患者を選択する方法であって、(a) 患者から得られた細胞又は組織サンプルにおいて (i) I G F R ポリペプチド、(i i) E G F R ポリペプチド、(i i i) N D F ポリペプチド、(i v) リン酸化された S 6 リボソームポリペプチド、(v) リン酸化された A K T ポリペプチド、及び (v i) リン酸化された E R K ポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化、又はその両方のパターンを測定し、(b) 発現、リン酸化、又は発現及びリン酸化の両方の検出パターンに基づいて患者を選択する工程を含む方法。

40

【請求項 6 2】

工程 (a) が、患者から得られた細胞又は組織サンプルにおいて (a) I G F R ポリペプチド並びに、(b) E G F R ポリペプチド、(c) N D F ポリペプチド、(d) リン酸化された S 6 リボソームポリペプチド、(e) リン酸化された A K T ポリペプチド、及び (f) リン酸化された E R K ポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化、又は発現とリン酸化の両方のパターンを測定することを含むものである、請求

50

項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

検出パターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍における A K T ポリペプチドのリン酸化の減少、S 6 リボソームポリペプチドのリン酸化の減少又はその両方を伴った、I G F R ポリペプチドの正常な発現又は増加である場合に患者が選択されるものである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 4】

検出パターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍における E G F R ポリペプチド及び N D F ポリペプチドの発現の減少である場合に患者が選択されるものである、請求項 6 1 に記載の方法。

10

【請求項 6 5】

検出パターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍において E G F R ポリペプチドの発現の減少である場合に患者が選択されるものである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 6】

検出パターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍において N D F ポリペプチドの発現の減少である場合に患者が選択されるものである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 7】

検出パターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍において E G F R ポリペプチドの発現の減少を伴った、E R K ポリペプチドのリン酸化の増加である場合に患者が選択されるものである、請求項 6 1 に記載の方法。

20

【請求項 6 8】

検出パターンが、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍において I G F R ポリペプチドの正常な発現又は増加を伴った、N D F の発現の減少である場合に患者が選択されるものである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 9】

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルが H E R 2 指向性治療を受けた後に、A K T ポリペプチドのリン酸化、S 6 リボソームポリペプチドのリン酸化又はその両方が測定されたものである、請求項 6 1 に記載の方法。

30

【請求項 7 0】

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルが H E R 2 指向性治療を受けた後に、A K T ポリペプチドのリン酸化、S 6 リボソームポリペプチドのリン酸化又はその両方が測定されたものである、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 7 1】

H E R 2 指向性治療が r h u M A b H E R 2 (ハーセプチン(登録商標))を含むものである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 2】

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルが、少なくとも一つの化学療法剤を受けたものである、請求項 6 1 に記載の方法。

40

【請求項 7 3】

(i) から (v i) のうち一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化又はその両方の検出パターンが、生物学的検出試薬を用いて測定されたものである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 4】

生物学的検出試薬が抗体である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

生物学的検出試薬が核酸プローブである、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

リン酸化された A K T ポリペプチドの検出パターンが、配列番号 1 の 4 7 3 位のリン酸

50

化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 7】

リン酸化された S 6 リボソームポリペプチドの検出パターンが、配列番号 2 の 2 3 5 位のリン酸化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 7 8】

リン酸化された E R K ポリペプチドの検出パターンが、配列番号 3 の 2 0 2 位のリン酸化スレオニン残基又は 2 0 4 位のリン酸化セリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 6 1 に記載の方法。

10

【請求項 7 9】

哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルがパラフィン包埋された生検サンプルである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 8 0】

哺乳動物の腫瘍が H E R 2 ポリペプチドに結合する抗体を用いて、H E R 2 を過剰発現していると同定されるものである、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 8 1】

哺乳動物の腫瘍の H E R 2 指向性治療に対する応答性を性状解析するためのキットであって、(a) I G F R ポリペプチドに結合する抗体、並びに、(b) リン酸化された A K T ポリペプチドに結合する抗体、(c) リン酸化された S 6 リボソームポリペプチドに結合する抗体、(d) E G F R ポリペプチドに結合する抗体、(e) H E R 2 ポリペプチドに結合する抗体、(f) N D F ポリペプチドに結合する抗体、及び (g) リン酸化 E R K ポリペプチドに結合する抗体のうち一つ又はそれ以上を含むキット。

20

【請求項 8 2】

(b) の抗体が免疫学的に配列番号 1 の 4 7 3 位にリン酸化セリン残基を持つ A K T ポリペプチドに特異的であり、(c) の抗体が免疫学的に配列番号 2 の 2 3 5 位にリン酸化セリン残基を持つ S 6 リボソームポリペプチドに特異的であり、及び / 又は、(f) の抗体が免疫学的に配列番号 3 の 2 0 2 位にリン酸化スレオニン残基及び 2 0 4 位にリン酸化チロシンを持つ E K T ポリペプチドに特異的である、請求項 8 1 に記載のキット。

【請求項 8 3】

キットがさらに (a) から (g) の一部の抗体に結合する少なくとも一つの 2 次抗体を含むものである、請求項 8 1 に記載のキット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2002年12月11日に出願された、米国仮出願第 6 0 / 4 3 2 9 4 2 号の優先権を主張するものである。

【0 0 0 2】

本発明は、H E R - 2 指向性治療に対する個別の応答を予測する方法に関するものである。

40

【背景技術】

【0 0 0 3】

細胞増殖と分化の過程には、反応性細胞の表面に発現する特異的な受容体を介して作用する増殖因子が関与している。固有のチロシンキナーゼ活性を有するような表面受容体に結合するリガンドは、最終的には細胞の増殖や分化を引き起こす多くの事象を誘発する (Carpenterら, 1979, Biochem., 48: 193-216; Sachsら, 1987, Cancer Res., 47: 1981-1986)。チロシンキナーゼ受容体は配列の類似性及び際だった特徴に基づいて、いくつかのグループに分類される。これらのグループの一つは、e r b B - 1 (E G F R 又は H E R - 1 と称される) (上記の Carpenterら)、e r b B 2 (H e r - 2 / n e u) (Sembaら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 6497-6501; Coussensら, 1985, Science,

50

230: 1130-1139; Bargmannら, 1986, Cell, Vol. 45, 649-657)、*erbB 3* (HER-3) (Krausら, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci., 86: 9193-9197; Carrawayら, 1994, J. Biol. Chem., 269: 14303-14306)、及び*erbB 4* (HER-4) (Plowmanら, 1993, Nature, 366: 473-475; Tzaharら, 1994, J. Biol. Chem., 269: 25226-25233)を含む上皮増殖因子受容体ファミリーを包含する。

【0004】

上皮に由来する多くの腫瘍は、多様な*erbB* (HER) 受容体を発現しており、自己分泌受容体の活性化が腫瘍細胞の増殖において役割を果たすことを示唆する1つ又はそれ以上のEGF関連リガンドを共発現している。これらのリガンドは、異なる*erbB* / HER受容体を活性化することから、多様な*erbB* 受容体の組み合わせが腫瘍において10
 活性状態にある可能性があり、これは*erbB* を標的とした治療に対する応答に影響を与える特徴である。*erbB* 受容体は、下流の情報伝達系につながる様々なリガンドによって刺激されるホモ二量体及びヘテロ二量体を形成し、その程度及び性質は特定の二量体とリガンドとの組み合わせに依存する。例えば、HER2/neuは、上皮増殖因子受容体ファミリーの他の構成員と共にヘテロ二量体を形成する好ましいパートナーとみられるが、最終的に形成される二量体は、リガンド及び細胞に発現した*erbB* 受容体によって20
 決定される。リガンドは、二量体形成のパートナーを選択するだけでなく、受容体の膜部位間移動(トランスロケーション)、活性化、及び内包化の時間経過にも影響するものである。例えば、NDF/Heregulinは*erbB 3* 又は*erbB 4* 受容体の一方とヘテロ二量体を形成することによって*erbB 2* のチロシンリン酸化を促進させる20
 ものである(Pelesら, 1992, Cell 69, 205-216, Pelesら, 1993, EMBO J. 3, 961-971, Holmesら, 1992, Science 256, 1205-1210; Tzaharら, 1994, J. Biol. Chem., 269, 25226-25223; Plowmanら, 1993, Nature 366, 473-475; Pinkas-Kramarskiら, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 9387-9391; Pinkas-Kramarskiら, 1996, J. Biol. Chem., 271, 19029-19032; Pinkas-Kramarskiら, 1998, Oncogene, 16, 1249-1258)。研究対象の細胞株によって、NDF/Heregulinは、結果として、形態変化、脂質の誘導、及び細胞内接着因子-1の発現をもたらす増殖停止と分化のフェノタイプを誘発するか、又は細胞分裂誘起反応を誘導する(Holmesら, 1992, Science, 256: 1205-1210; Pelesら, 1992, Cell, 69: 205-216; Bacusら, 1993, Cancer Res., 53: 5251-5261)。

【0005】

リガンド結合後の下流情報伝達は、活性化された受容体に結合可能な一連の結合(ドッキング)タンパク質によって決定される。例えば、*erbB* 受容体ヘテロ二量体の活性化は、下流におけるMAPK Erk1/2及びPI3K-AKTの増殖及び生存経路に結合して、それを活性化するものである。腫瘍に於いてその経路が制御不可能になると疾病が進行し難治性となる(Tzaharら, 1996, Mol. Cell. Biol. 16, 5276-5287; Fukazawaら, 1996, J. Biol. Chem. 271, 14554-14559, Olayioyeら, 1998, Mol. Cell. Biol. 18, 5042-5051; Langeら, 1998, J. Biol. Chem. 273, 31308-31316; Hackelら, 1999, Curr. Opin. Cell Biol. 11, 184-189)。HER-3はホスホイノシチド-3-キナーゼ(PI3K)の主要な結合(ドッキング)部位である。加えて、NDF/Heregulinの刺激はPI3K経路の活性化及びAKTのリン酸化を引き起こす(Altiokら, 1999, J. 40
 Biol. Chem. 274, 32274-32278; Liuら, 1999, Biochem. Biophys. Res. Comm. 261 897-903; Xingら, 2000 Nature, Med. 6 189-195)。これらの所見は、HER 3と胸部腫瘍細胞に過剰発現されたHER 2/neu受容体とのヘテロ二量体の結果として起こる情報伝達カスケードにおけるPI3K/AKTを示唆しており、PI3K/AKTの活性化は細胞の生存を促進し、腫瘍の攻撃性(aggressiveness)を増大させる(Bacusら, 2002, Oncogene 21, 3532-3540)。加えて、AKT2はHER 2/neuを過剰発現している胸部腫瘍内に過剰発現され活性化されていると報告されている(出典同じ)。

【0006】

erbB 2 / HER 2は、あらゆる胸部腫瘍の20~30%に過剰発現しており、またその過剰発現は予後の不良と関連している。このことは、*erbB 2* / HER 2 50

は抗がん剤の標的としての使用が可能であることを示唆している (Slamonら, 1987; Hudziakら, 1989; Tagliabueら, 1991)。*erbB-2* を過剰発現している胸部腫瘍細胞に、*HER-2/neu* に特異的な抗体を化学療法剤 (シスプラチン、ドキソルビシン、又はタキソールのような) とともに処理すると、化学療法剤単独での処理に比べて高い細胞障害性反応を引き出した (Hancockら, 1991; Arteagaら, 1994; Pietrasら, 1994)。抗 *HER-2/neu* 抗体が化学療法剤に対して細胞障害性を増大させる一つの可能なメカニズムは、*HER-2/neu* タンパク質の発現を調節すること (Bacusら, 1992&1993; Stancovskiら, 1991; Klapperら, 1997&2000)、又は DNA 修復を遮断することである (Arteagaら, 1994&2001; Pietrasら, 1994)。

【0007】

細胞増殖に対する抗 *HER-2/neu* 抗体の有効性により、*HER-2/neu* 又は *EGFR* を過剰発現した腫瘍を治療の標的とする多くの方法が用いられてきた。臨床応用として、一つの方法は *HER-2/neu* 又は *EGFR* のヌクレオチド結合部位を遮断する阻害剤を用いることによって受容体のキナーゼ活性を阻害することである (Brunsら, 2000; Christensenら, 2001, Erlichmanら, 2001, Herbstら, 2002; Hidalgoら, 2001; Moasserら, 2001; Fujimuraら, 2002; Normannoら, 2002)。二つ目の方法は、*HER-2/neu* 受容体の安定性に影響を与えるアンサマイシンを用いることである (Munsterら, 2002; Bassoら, 2002)。他の方法は、様々な *erbB* 受容体、特に *EGFR* 又は *HER-2/neu* に対する抗体の使用である (Alaoui-Jamaliら, 1997; Albaneliら, 2001(a); Baselgaら, 1994&2002; Mendelsohn, 1990)。20 *HER-2/neu* に対する様々な抗体の解析は、マウスモノクローナル抗体 4D5 の同定へと導いた。この抗体は、膜貫通領域のすぐ近くに位置するシステイン過剰ドメイン II にある細胞外のエピトープ (アミノ酸 529 番から 627 番まで) を認識する。胸部腫瘍細胞に 4D5 を処理し、受容体リン酸化試験によって測定すると、*HER-2/HER-3* 複合体の *NDF/heregulin* 活性化が部分的に阻害される。ヒトへの慢性投与を可能にするために、マウス 4D5 は完全にヒト化され、トラスツズマブ/ハーセプチン (登録商標) を生み出した。(Sliwkowskiら, 1999, Yeら, 1999; Carterら, 1992; Fujimoto-Uuchiら, 2002; Vogelら, 2001&2002)。

【0008】

多くのモノクローナル抗体又は低分子物質など、*EGFR* 又は *erbB-2* を標的にしたチロシンキナーゼ阻害剤が開発されてきた。例えば、ハーセプチン (登録商標) は、胸部腫瘍が *erbB-2* タンパク質を過剰発現している、又は *erbB-2* 遺伝子の増幅を示している女性の 25% に対する治療が承認されている (Cobleighら, 1999, J. Clin. Oncol. 17, 2639-2648)。加えて、いくつかの *EGFR* を標的とした治療は目下、臨床研究 30 中である (Mendelsohn & Baselga, 2000, Oncogene 19, 6550-6565; Xiaら, 2002, Oncogene 21, 6255-6263)。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

フェーズ I、II 及び III の臨床試験等の確立された評価の過程に基づいて抗腫瘍薬の開発がなされてきた。フェーズ I の研究は、その薬の最大耐用量、最適な投与スケジュール及び投与量を制限する毒性を判定することを目的としている。細胞障害性のがん治療は従来、起こり得る応答についての腫瘍プロファイルを理解することなしに、患者に投与する最大耐用量 (MTD) をベースとした開発がなされてきた。それゆえ、患者はしばしば、治療効果に限りがある毒性治療を施されてきた。近年になって、腫瘍増殖及び生存経路の解明により、腫瘍を標的化する治療の開発が促進されてきた。重篤な副作用を生じさせない標的化療法に於いて、MTD に依存することは適切なことではない。患者サンプルの細胞情報伝達を阻害するのに十分な、最適用量及び投与スケジュールを確定することのほうがよほどの確なことである。情報伝達生体マーカーのための生物学的試験法が、このようなプロトコル (治療計画) の確立のために必要とされる。 40

【0010】

前臨床的には、*erbB*受容体を標的化した治療の多くは、まず細胞増殖を抑制する抗腫瘍効果を発揮するが、治療上はそれらの常習的な投与が必要である。用量を超えた投与は効果がなく、むしろ毒となるので、所定の標的を最大限に阻害する投与量又は用量範囲である生物学的有効量（BED）の同定は極めて重要なことである。なおその上に、これらの薬剤の多くは、細胞障害性の治療と組み合わせて使用されるものであって、そこで投与された毒性は許容範囲を超えるものであるかもしれないので、BEDに基づいた用量を守らなければならない。「標的化治療（targeted-therapy）」とは、起こり得る一連の応答が存在し、またそれを同定できること含んでいる。

【0011】

ヒトがん患者に対して不適切又は効果のない治療を施したことによる重篤且つ悪化した結果を鑑みると、当該技術分野に於いて、腫瘍治療に対する応答を個別に予測する必要性がある。さらに、ハーセプチン（登録商標）の様な、新規なHER2標的化療法を効果的に開発し、临床上の承認を受けるには、患者の応答性を予測することができる診断方法を開発する必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

（発明の要約）

本発明は、HER2指向性治療に対する個別の応答性を予測するための方法を提供するものである。

【0013】

まず第一に、本発明は、HER2指向性治療に応答する、HER2を過剰発現する哺乳動物の腫瘍を同定する方法であって、（a）IGFRポリペプチド、（b）EGFRポリペプチド、（c）NDFポリペプチド、（d）リン酸化されたS6リボソームポリペプチド、（e）リン酸化されたAKTポリペプチド、及び（f）リン酸化されたERKポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化又はその両方のパターンを検出するために、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルを解析する工程を含み、ここでポリペプチド、発現、リン酸化、又はその両方の検出されたパターンの特定の組み合わせが、HER2指向性治療に応答する哺乳動物の腫瘍を同定するものである方法、を提供する。

【0014】

特定の態様に於いては、哺乳動物の腫瘍が応答していることを同定するパターンとは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではIGFRポリペプチドの発現が減少しているものである。別の態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではAKTポリペプチドのリン酸化の減少、S6リボソームポリペプチドのリン酸化の減少又はその両方を伴い、IGFRポリペプチドの発現が正常又は増加しているものである。更なる態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではERKポリペプチドのリン酸化の減少を伴い、EGFRポリペプチドの発現が正常又は増加しているものである。さらなる態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではS6リボソームポリペプチドのリン酸化の増加を伴い、IGFRポリペプチドの発現が減少しているものである。別の態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではNDFポリペプチドの発現の増加を伴い、IGFRポリペプチドの発現が減少しているものである；ここにおいて更に検出パターンは、S6リボソームポリペプチドのリン酸化の増加を包含することができる。

【0015】

第二に、本発明は、HER2指向性治療に応答しない、HER2を過剰発現する哺乳動物の腫瘍を同定する方法であって、（a）IGFRポリペプチド、（b）EGFRポリペプチド、（c）NDFポリペプチド、（d）リン酸化されたS6リボソームポリペプチド、（e）リン酸化されたAKTポリペプチド、及び（f）リン酸化されたERKポリペ

10

20

30

40

50

チドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化又はその両方のパターンを検出するために、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルを解析する工程を含み、ここでポリペプチド、発現、リン酸化、又はその両方の検出されたパターンの特定の組み合わせが、HER2 指向性治療に応答しない哺乳動物の腫瘍を同定するものである方法、を提供する。

【0016】

特定の態様に於いては、応答しない哺乳動物腫瘍を同定するパターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して哺乳動物の腫瘍ではAKTポリペプチドのリン酸化の増加、S6リボソームポリペプチドのリン酸化の増加又はその両方を伴い、IGFRポリペプチドの発現が正常又は増加しているものである。別の態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではEGFRポリペプチドの発現が減少及びNDFポリペプチドの発現が増加しているものである。更なる態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではEGFRポリペプチドの発現が減少しているものである。別の態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではNDFポリペプチドの発現が減少しているものである。更なる態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではEGFRポリペプチドが減少及びERKポリペプチドのリン酸化が増加しているものである。更なる態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではIGFRポリペプチドの発現が正常又は増加しており、NDFの発現が減少しているものである。

10

20

【0017】

第三に、本発明は、HER2を過剰発現するがん患者を、HER2を標的とする分子で治療するために選択する方法であって、(a)患者から得られた細胞又は組織サンプルにおける(i)IGFRポリペプチド、(ii)EGFRポリペプチド、(iii)NDFポリペプチド、(iv)リン酸化されたS6リボソームポリペプチド、(v)リン酸化されたAKTポリペプチド、及び(vi)リン酸化されたERKポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化、又は発現とリン酸化の両方のパターンを決定し、(b)発現、リン酸化、又は発現とリン酸化の両方の検出パターンに基づいて患者を選択する工程を含む方法、を提供する。ポリペプチド、発現、リン酸化、又は発現及びリン酸化のパターンの特定の組み合わせは、HER2を標的とする分子による治療をするがん患者を選択することに用いられる。

30

【0018】

特定の態様に於いては、HER2を標的とする分子で治療する患者を選択する検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではIGFRポリペプチドの発現が減少しているものである。別の態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではAKTポリペプチドのリン酸化の減少、S6リボソームポリペプチドのリン酸化の減少又はその両方を伴い、IGFRポリペプチドの発現が正常又は増加しているものである。更なる態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではERKポリペプチドのリン酸化の減少を伴い、EGFRポリペプチドの発現が正常又は増加しているものである。更なる態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではS6リボソームポリペプチドのリン酸化の増加を伴い、IGFRポリペプチドの発現が減少しているものである。別の態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではNDFポリペプチドの発現の増加を伴い、IGFRポリペプチドの発現が減少しているものである；ここでさらには、検出パターンは、S6リボソームポリペプチドのリン酸化の増加を包含することができる。

40

【0019】

第四に、本発明は、HER2を過剰発現するがんを有し、HER2を標的とする分子で治療しない患者を選択する方法であって、(a)患者から得られた細胞又は組織サンプルにおける(i)IGFRポリペプチド、(ii)EGFRポリペプチド、(iii)ND

50

Fポリペプチド、(iv)リン酸化されたS6リボソームポリペプチド、(v)リン酸化されたAKTポリペプチド、及び(vi)リン酸化されたERKポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化、又はその両方のパターンを決定し、(b)発現、リン酸化、又は発現とリン酸化の両方の検出パターンに基づいて患者を選択する工程を含む方法、を提供する。ポリペプチド、発現、リン酸化、又は発現とリン酸化のパターンの特定の組み合わせは、HER2を標的とする分子で治療しないがん患者を選択することに用いられる。

【0020】

特定の態様に於いては、HER2を標的とする分子で治療しない患者を選択する検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではAKTポリペプチドのリン酸化の増加、S6リボソームポリペプチドのリン酸化の増加又はその両方を伴い、IGFRポリペプチドの発現が正常又は増加しているものである。別の態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではEGFRポリペプチドの発現が減少及びNDFポリペプチドの発現が増加しているものである。更なる態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではEGFRポリペプチドの発現が減少しているものである。別の態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではNDFポリペプチドの発現が減少しているものである。更なる態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではEGFRポリペプチドの発現が減少及びERKポリペプチドのリン酸化が増加しているものである。更なる態様では、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、哺乳動物の腫瘍ではIGFRポリペプチドの発現が正常又は増加しており、NDFの発現が減少しているものである。

【0021】

上述したものを含む本発明の様々な局面では、AKTポリペプチドのリン酸化、S6リボソームポリペプチドのリン酸化、又はその両方の検出は、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルがHER2指向性治療を受けた後に測定することができる。さらに、HER2指向性治療とは、rhuma b HER2(ハーセプチン(登録商標))による又はrhuma b HER2(ハーセプチン(登録商標))治療を包含した治療である。加えて、サンプルを少なくとも一つの化学療法剤と接触させるものである。さらには、(a)から(f)のうち一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化、又はその両方の検出パターンは、生物学的検出試薬を使うことによって測定することができる。その生物学的検出試薬は、抗体又は核酸プローブであってもよい。さらには、リン酸化AKTポリペプチドの検出パターンは、473位のリン酸化されたセリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定され、リン酸化S6リボソームポリペプチドの検出パターンは、235位のリン酸化されたセリン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定され、及び/又は、リン酸化ERKポリペプチドの検出パターンは、202位のリン酸化スレオニン残基及び204位のリン酸化チロシン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定することができる。さらには、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルは、パラフィン包埋された生検サンプルであってもよい。また、哺乳動物の腫瘍は、HER2ポリペプチドに結合する抗体を用いてHER2の過剰発現を同定することができる。

【0022】

第五に、本発明は、哺乳動物の腫瘍のHER2指向性治療に対する応答性を特徴付けるためのキットであって、(a)IGFRポリペプチドに結合する抗体、並びに(b)リン酸化されたAKTポリペプチドに結合する抗体、(c)リン酸化されたS6リボソームポリペプチドに結合する抗体、(d)EGFRポリペプチドに結合する抗体、(e)HER2ポリペプチドに結合する抗体、(f)NDFポリペプチドに結合する抗体、及び(g)リン酸化ERKポリペプチドに結合する抗体のうち一つ又はそれ以上を含むキット、を提供する。ある態様では、(b)の抗体は免疫学的に473位にリン酸化セリン残基を持つAKTポリペプチドに特異的であり、(c)の抗体は免疫学的に235位にリン酸化セリン残基を持つS6リボソームポリペプチドに特異的であり、及び/又は、(f)の抗体は

10

20

30

40

50

免疫学的に202位にリン酸化スレオニン残基及び204位にリン酸化チロシンを持つEKTポリペプチドに特異的である。別の態様では、キットはさらに(a)から(g)の一部の抗体に結合する少なくとも一つの2次抗体を含む。

【0023】

本発明の特定の態様は、後述の「特定の好ましい態様の更なる詳細な説明」及び上述の「特許請求の範囲」より明らかになるものである。

【0024】

(好ましい態様の詳細な説明)

本発明は、ヒトのがん患者を含む腫瘍を有する対象における腫瘍治療に対する応答を予測するための方法を提供する。加えて、本発明は、胸部腫瘍を処理するための治療薬を含む治療薬の投与が最も効果的になるがん患者を同定するための予測的生体マーカーを提供する。特に、ハーセプチン(登録商標)のような薬剤を含むHer2/neuを標的化する治療薬の効果を評価するための予測的生体マーカーを提供する。

10

【0025】

化学療法剤が外科的な処置に加えて又は外科的な処置の後に用いられる、伝統的な抗がん治療法と比較して、術前(neoadjuvant)化学療法(又は1次的化学療法)は、特定のがん患者の初期処置として薬剤を投与することからなる。3センチ以上の初期がんに対する、この手法の利点の1つは、化学療法による腫瘍の縮小効果により、大多数の患者において保守的な外科的措置(胸部がん患者における根治的な乳房切除のようなものとは反対に)を後に又は同時に適用することができるということである。他の利点は、様々な腫瘍をもつ患者全体の約3分の2において、部分的又は完全な応答が達成されることである。結果的に、大多数の患者は、化学療法の2、3サイクル後に応答することから、腫瘍が化学療法剤に対して無応答である患者を同定するのに、施された化学療法のインビボにおける効果をモニターすることが可能である。非応答性の腫瘍を適時同定することによって、臨床医は、がん患者が治療によって被る不必要な副作用を制限したり、代替治療を施すことが可能となる。残念ながら、組織学的検査を含む当該技術分野に於ける現行の方法は、正確に適時同定するには不十分である。本発明は、がん患者に施すことによって効果的な結果(すなわち腫瘍の縮小又は消失)を高い可能性で期待できる、より情報に富み効果的な治療(法)を開発する方法を提供する。

20

【0026】

腫瘍診断は従来、疾病の初期診断及び疾病経過(処置前、処置中、処置後)のその後の観察の両面から、患者から切除された細胞又は組織サンプルを組織学的に検討することにより確立されている。臨床病理学者は、そのようなサンプルが良性か悪性かを正確に判定することができ、悪性とみなされる腫瘍サンプルの攻撃性を見極める必要がある。なぜならこの様な判定結果は、患者にとっての適切な治療を選択するうえでの基準となるからである。同様に、病理学者としては処置、特に化学療法剤や生物学的薬剤を用いた処置の結果、どの程度腫瘍が進行しているのか又は縮小しているのかを見極める必要がある。

30

【0027】

従来より組織学的な検討には、サンプルの形態学的特徴を光学顕微鏡での観察を容易にするため、組織染色の手法が必要となる。病理学者は通常、染色されたサンプルを検討して、腫瘍サンプルが悪性であるかどうか性質上の判定する。しかしながら、腫瘍の攻撃性を単にサンプルの組織学的検討からのみ確定することは困難である。なぜなら腫瘍の攻撃性はしばしば、タンパク質の発現、発現抑制、及びタンパク質のリン酸化のような、腫瘍内の細胞における生化学的結果であり、それはサンプルの形態が反映される場合もあれば、されない場合もあるからである。それゆえ、腫瘍サンプル内の細胞の生化学を評価できることが重要なのである。さらに、腫瘍関連遺伝子の遺伝子発現及び関連タンパク質のタンパク質リン酸化、又はより特異的には腫瘍関連情報経路の細胞構成成分を観察して定量できることが望ましい。

40

【0028】

腫瘍治療は、単に腫瘍の組織観察あるいは疾病部位よりもむしろ腫瘍の分子プロファイ

50

リングに基づいたものである。腫瘍組織に標的化した治療の生物学的効果を明瞭にすること、及びこれらの効果を臨床応答と関連付けることは、腫瘍内で制御されている支配的な増殖及び生存の経路を同定する助けとなる。それによって起こり得る応答パターンを確立させ、そして逆に耐性を克服する戦略をデザインする理論を提供することができる。成長因子受容体の効果的な診断標的化は、腫瘍の成長又は生存が、標的化された受容体又はその受容体ファミリーによって促進されているのか、その治療で標的化されていない他の受容体によって促進されているのかどうか、また下流の情報伝達が他の発癌経路の関連を示唆するものであるかどうかを見極めなければならない。

【0029】

ハーセプチン（登録商標）治療が考慮されている患者のために、標的のHER 2 / neuの他に、更なる生体マーカーを考慮する必要がある。それは少なくともEGFR及びerbBリガンドのNDF及びTGFの状態が、胸部がん患者におけるハーセプチン（登録商標）治療応答に影響を与えるからである。それゆえ必ずしも、HER 2 / neu発現だけを考慮して包括的なerbBの発癌活性又はerbB阻害剤に対して見込まれる応答を予測することはできないのである。加えて、これまでの研究から、EGFR及び/又はHER 2 / neuの異常な発現があるにもかかわらず、必ずしもすべての腫瘍細胞がEr b B受容体の阻害に応答するわけではないことが示されてきた。例として、MKN7及びBT474 erbB受容体を過剰発現している癌種細胞株が挙げられる：BT474細胞はハーセプチン（登録商標）に応答するが、MKN7細胞は応答しない（Motoyamaら, Cancer Research, 62, 3151-3158 (2002)）。更に、erbB阻害剤の活性によるEGFR又はHER 2受容体活性が減少したことによって引き起こされる増殖阻害は、EGF又はNDF / HeregulinのようなEGF関連リガンドの存在によって、解消されるかもしれない（出典同じ）。この事象は、二重特異性Er b B - 1 / Er b B 2阻害剤を使うことによって減弱化することができ、それによって多様なEr b B受容体を同時に阻害し、抗腫瘍活性を増加させるものである。

【0030】

加えて、多くの腫瘍では、NDF / Heregulin又はTGFの発現がHER 2 / EGFRのヘテロ二量体化の自己分泌ループを形成する。HER 2 / neuの発現を抑制すること（ダウンレギュレーション）は、これらのヘテロ二量体によって生み出される情報伝達を阻害する重要な方法である。発現の抑制は、受容体の細胞内取り込みを引き起こすハーセプチン（登録商標）処理によって達成される。さらには、高度にリン酸化されたERK（あるいはpAKT）は、EGFRの発現及びNDFの存在と共に観察されるとき、肯定的な治療効果にとっての否定的な予測因子となりうる。これは、腫瘍細胞の増殖を促進する他の経路の存在を示唆するものである。高度のpERKはまた、p27の抑制を通してハーセプチン（登録商標）に対する耐性にも関連している。これは高度のpERKすなわち腫瘍細胞増殖に貢献するかもしれない、（エストロゲン受容体のMAPK及びAKT経路の相互（クロス）活性化のような）他の情報伝達を意味する。加えて、リン酸化されたAKTは、高pAKT陽性患者がハーセプチン（登録商標）に対して低い応答性を示すといったような、ハーセプチン（登録商標）に対する応答の重要な部分を示してきた。高度にリン酸化されたAKTは、PDGFR同様インスリン様成長因子受容体（IGFR - 1）の高発現と関連し、その結果としてハーセプチン（登録商標）に耐性になることが示されてきた。興味深いことに、臨床試験のデータは、2重阻害剤（即ち、HER - 1 / neu及びHer 2 / neuに特異的な）の使用は、処置によってpERK及びpAKTの抑制がみられた患者には臨床効果があるが、処置後にpERK及びpAKTレベルが減少しない患者には有効でないことを示した。このように、pERK及びpAKTと同様HER - 1及びHER - 2を過剰発現した患者においては、抗腫瘍活性はHER - 1及びHER - 2受容体の活性化に依存し、臨床応答がみられた。これに対して、2重阻害剤の処置の後でもpERK及びpAKTの活性が高く保たれている患者においては、臨床応答が起らなかった。組み合わせ療法は、臨床上重要な意味を持つものである。Er b B - 1指向性のモノクローナル抗体mAb 225及びmAb 4D5の組み合わせは、卵

巣腫瘍細胞株の増殖を、いずれかの m A b だけのときに比べて強く阻害した (Yeら, 1999, *Oncogene* 18: 731-8)。E r b B 指向性モノクローナル抗体に加えて、G W 5 7 2 0 1 6 及び P K I 1 6 6 といった両性 E G F R / e r b B 2 キナーゼ阻害剤とも称される多数の別種の E r b B - 1 / E r b B 2 二重特異性阻害剤が最近報告されているが、それらは目下臨床試験中のものである。(Motoyamaら, 2002, *Cancer Research* 62: 3151-3158)。それゆえ、ハーセプチン(登録商標)に対する応答は、腫瘍における多様な e r b B 受容体及びそれらのリガンドの発現によって影響を受ける。

【0031】

このように、H E R - 2 / n e u の過剰発現だけでは、ハーセプチン(登録商標)のような分子に対する応答を予測することはできない。H E R - 2 / n e u はオーファン(リガンドがない)受容体であり、その活性を発揮するためには、パートナーとして E G F R (H E R - 1) 及び H E R 3 が必要である。H E R - 1 及び H E R 3 の H E R - 2 とのヘテロ二量体化は、E G F 又は N D F の存在によって促進される (Trazerら, 1996, *EMBO J.* 15: 254-64, Graus-Porta, 1997, *EMBO J.*, 16: 1647-55)。そしてこのように H E R - 2 活性は H E R - 1 又は H E R 3 に依存する。他の受容体もまた e r b B 受容体を活性化する可能性がある。これらの受容体は、下流の増殖及び生存経路への情報伝達を介して発癌の介在をしているのかもしれない。例えば、I G F R 受容体は、H E R 2 / n e u を指向した胸部がん治療に対する患者応答に介在しているのかもしれない。S 6 リボソームタンパク質の高度リン酸化を伴った I G F R の高発現は、e r b B の発現に関わらず、患者の低応答性と相関している。このことは、I G F R は e r b B 受容体のトランス活性化を介してというよりもむしろ e r b B 受容体の下流の情報伝達を直接活性化することを示している。細胞株を用いた研究はまた、患者応答における I G F R の役割を示唆してきた。ハーセプチン(登録商標)耐性 I G F R の活性化により起こることが示されてきた (Luら, 2001, *J. National Cancer Institute* 93: 1852)。加えて、H E R 2 / n e u と同様 I G F R を共標的化することは、胸部がん細胞の相乗的成長阻害を生み出すことが示されてきた (Camirandら, 2002, *Med Sci Monit.* 8: (12): BR521-6)。それゆえ、I G F R 発現及び下流情報伝達の解析は、胸部がん患者に起こり得るハーセプチン(登録商標)応答を正確に評価するのに重要である。

【0032】

このように、多様な上流の情報を統合して応答を予測するといった、下流の情報伝達タンパク質活性化のマーカーは、一つも存在しない。しかしながら、p E R K 及び p A K T の解析は、E G F R を過剰に発現している患者においては予測可能であることが分かってきた。それゆえ、活性な e r b B 受容体の存在下、高度な E R K 及び A K T の情報伝達は、ハーセプチン(登録商標)治療の有効性が低いことを示している。A K T 活性化は胸部がん細胞株におけるハーセプチン(登録商標)耐性となることが示されてきた (Yakesら, 2002, *Cancer Res.* 62: 4132-41; Clarkら, 2002, *Mol. Cancer Ther.* 1: 707-17)。加えて、S 6 リボソームタンパク質のリン酸化の解析は、I G F R 発現の予測力を大いに増大させた。S 6 が高度にリン酸化された患者においては、I G F R の発現に基づいて陽性反応は 8% ~ 67% の幅であった。S 6 リン酸化の低い患者のおおよそ 30% は、I G F R 発現に関わらず応答した。これらの結果はまた、ハーセプチン(登録商標)治療に 40 応答する活性な I G F R 情報伝達を欠いていた患者のみにおいて、臨床サンプルの解析に反映された。胸部がんにおける I G F 情報伝達は、A K T の活性化を介して起こり (Ohら, 2002, *Neoplasia* 4: 204-17; Dufournyら, 1997, *J Biol Chem.* 272: 31163-71)、このことは S 6 リボソームタンパク質のリン酸化を誘発する。それゆえ、S 6 リン酸化はそれらの I G F R を過剰発現している腫瘍における活性な I G F 情報伝達の指標となりうる。

【0033】

ハーセプチン(登録商標)処置に加えて、化学療法及び放射線治療が含まれると、下流情報伝達と患者応答の解析は複雑なものになる。例えば、A K T 及び M A P キナーゼ経路の活性化は、D N A 傷害性試薬に 50 応答して働くことが知られている (Clarkら, 2002, *Mol*

. Cancer Ther. 1:707-17; Bacusら, 2001, Oncogene 20: 147-155)。組み合わせ治療を行っている患者における下流情報伝達を考慮することは、単なる受容体又はリガンドの発現レベルの解析からは得ることのできない付加的な予測情報を提供するものである。ハーセプチン（登録商標）を単一の治療薬として投与されている患者を解析することによって、他の治療に対する応答を介在する生体マーカーとは対照的に、同定されたどのマーカーがハーセプチン（登録商標）に対する応答を介在したかを判定するのに用いることができる。それにもかかわらず、一般のハーセプチン（登録商標）組み合わせ療法を行っている胸部がん患者の診断法をデザインする上で、同定された生体マーカーは、その他のものの中では有用である。

【0034】

さらに、Herregulin/NDFによるAKT/mTOR経路のアップレギュレーションは、応答を予測するのに重要である。pAKTは、高レベルのサイクリンE及び低レベルのサイクリン阻害剤p27と関連している。

【0035】

HER2を指向した治療の適用の前に、それぞれの治療に最適な候補を見出すために、それぞれの腫瘍に対して本発明の方法に従った診断がなされた。本発明の方法に従えば、ハーセプチン（登録商標）のようなHER2指向性治療は、患者の腫瘍成長がインスリン様成長因子受容体（IGFR）のような他のチロシンリンキナーゼによって引き起こされるのではなく、erbB受容体によって引き起こされるAKT/mTORのような細胞内経路に依存するときには有効である。これらの下流情報伝達の高レベルの活性化がerbB受容体に依存することなく引き起こされる場合には、ハーセプチン（登録商標）治療は有効ではない。本発明の方法を用いることによって臨床医は、がん患者の指向性治療の、より効果的な組み合わせを選択することができる。

【0036】

本発明のHER2指向性治療として、例えば、別名ハーセプチン（登録商標）としても知られるrhumaHER2が挙げられる。哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルは、例えば、シスプラチン、ドキシソルピシン、又はタキソールのような少なくとも一つの化学療法剤と接触可能である。

【0037】

当該技術分野において公知の自動化された（コンピュータ支援）イメージ解析システムにより、腫瘍サンプルの目視検査（visual examination）を拡大することができる。代表的な態様においては、細胞又は組織サンプルは、特定の生物学的マーカーに特異的な検出可能に標識れた試薬に曝され、次いで細胞の拡大画像は、電荷結合素子（CCD）又はテレビカメラのようなカメラから画像を受けたコンピュータによって加工される。このようなシステムは、例えば、サンプル中のEGFR、HER2、HER3、pERK、NDF、TGF、IGFR、pS6、及びpAKT、又は他の付加的な診断用生体マーカーの発現及び活性化レベルを検出及び測定するために用いられる。このように、本発明の方法は、組織学的に同定された腫瘍細胞におけるより正確な腫瘍診断、及び遺伝子発現のより優れた特徴づけ、特に腫瘍マーカー遺伝子又は特定のがんの型及び亜型（例えば、異なる悪性度を持っているなど）に発現していることが知られている遺伝子の発現の特徴づけを提供する。この知見により、患者に、同定された腫瘍細胞の型又はその亜型に臨床効果のある薬剤を投与することができるので、より情報に基づいた、より効果的な治療法の適用が可能となる。

【0038】

従来の抗がん治療のもう一つの欠点は、個別のヒト患者における特定のがん治療に特異的な化学療法剤の有効性が予測できないことである。このように予測不可能なことから、当該技術に於いては、治療開始前に、一つ又はそれ以上の選択された薬剤が抗がん剤として機能するかどうか判断できないし、又は個々の患者の一連の治療の予後を確かなものに行うことができない。特定の個人にとってどの治療法が最も効果的であるか判断する現行の方法はないので、臨床上の特定の腫瘍が臨床医に治療法の選択を提示できるといった、

10

20

30

40

50

この方法は特に重要である。患者個人に提示された治療薬（あるいは薬剤の組み合わせ）の予則される効果がよく見極められるということが、本発明の方法の利点である。本発明でクレームされている方法は、化学療法の有効性を評価するにあたって、時間及び費用の面で効果的であること、そしてがん患者の侵襲を最小にするという、付加的な理由から好都合なものとなっている。

【0039】

本発明の方法は、HER2指向性治療に応答する哺乳動物の腫瘍を同定するために用いることができる。さらに、本発明の方法は、HER分子を標的とする治療に際して、腫瘍を持つ患者を選択するのに利用することができる。さらには、本発明の方法は、HER2指向性治療に応答しない哺乳動物の腫瘍を同定することに用いることができる。さらに、本発明の方法は、HER2を分子標的とする治療を受けない腫瘍を持つ患者を選択するのに利用することができる。

10

【0040】

ポリペプチドの発現及びリン酸化のパターンは、本発明の方法を用いて、検出及び定量化される。特に、腫瘍関連情報伝達経路の細胞構成成分であるポリペプチドの発現とリン酸化のパターンが本発明の方法によって検出され、定量化される。例えば、ポリペプチドの発現とリン酸化のパターンは、そのポリペプチドに特異的な生物検出用試薬を用いることによって検出される。例えば、その生物検出用試薬は抗体であってもよい。他には、その生物検出用試薬は核酸プローブであってもよい。核酸プローブはサンプルへのハイブリダイズが検出できる一つ又はそれ以上の核酸断片の集合体であると定義される。そのプローブは、標的又はサンプルへの結合が検出できれば、標識されていなくても標識されていてもよい。そのプローブは、例えば、一つ又はそれ以上のクローン、単離された全染色体又は染色体断片、又はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅産物である、ゲノムの一つ又はそれ以上の特定の（前もって選択された）領域の核酸から産生される。その核酸プローブはまた、アレイにおけるように固層表面（例えば、ニトロセルロース、ガラス、石英、溶融シリカスライド）に固定化された単離された核酸であってもよい。そのプローブは例えば、WO96/17958に記載されるような核酸のアレイのメンバーであってもよい。このために、高密度アレイを産生できる技術を用いることができる（例えば、Fodor (1991) Science 767-773; Johnston (1998) Curr. Biol. 8: R171-R174; Schummer (1997) Biotechniques 23: 1087-1092; Kern (1997) Biotechniques 23: 120-124; 米国特許第5, 143, 854号を参照のこと）。特定のプローブの配列は、「実質的に相同である」プローブを産生するためには、同じ由来の標的又はサンプルに特異的に結合する（すなわち特異的にハイブリダイズする）プローブとしての能力を保持しているという前提で、ある程度の修飾ができることは、当業者には認識されている。その「核酸」という用語は、1本鎖又は2本鎖のデオキシリボ核酸又はリボ核酸を意味する。この用語は、参照用の核酸として、所望の目的のための、同様又は改良された結合能を有する天然の核酸の公知のアナログを含む核酸、即ちオリゴヌクレオチドを包含する。本用語はまた、天然のヌクレオチドと同様の方法で、又は所望の目的に応じて改良された速度で代謝される核酸を含む。本用語はまた、合成骨格をもつ核酸様の構造を包含する。当業者は、例えば結腸腫瘍細胞のスクリーニングを指向した米国特許第6, 326, 148号を参照することによって、サンプル中の腫瘍細胞をスクリーニングするための核酸プローブの使い方を認識できるものである。

20

30

40

【0041】

胸部がんに関連するポリペプチドは、これらに限定されるものではないがEGFR、HER-2、HER3、IGFR、NDF、TGF- α 、pERK、pS6、又はpAKTを含む生体マーカーに対する適当な1次抗体を用いることで、直接的あるいは適切な2次抗体（マウスの1次抗体を用いるときには、ウサギの抗マウスIgGのような）及び/又は3次アビジン（すなわちストレプトアビジン）ビオチン複合体（“ABC”）を用いることで、画像解析により定量化される。

【0042】

50

本明細書に示される本発明の方法の実施において有用な試薬の例は、ペンタナメディカルサイエンス社（VMSI, Tucson, AZ）より得られるマウスモノクローナル抗体CB11を含むHER2/neuに特異的な抗体を包含するがこれらに限定されるものではない。加えて、本発明の方法の実施において有用な試薬は、473位のリン酸化されたセリン残基に特異的な抗体を含むリン酸化AKTに特異的な抗体を包含するがこれらに限定されるものではない。ここでAKTの配列は、配列番号1（表8）に表されている。さらには、本発明の方法の実施において有用な試薬は、235位のリン酸化されたセリン残基に特異的な抗体を含むリン酸化S6に特異的な抗体を包含するがこれに限定されるものではない。ここでS6の配列は、配列番号2（表8）に表されている。また、本発明の方法の実施において有用な試薬は、202位のリン酸化されたスレオニン残基と204位のリン酸化されたチロシン残基に特異的な抗体を含むリン酸化ERKに特異的な抗体を包含するがこれらに限定されるものではない。ここでERKの配列は、配列番号3（表8）に表されている。

10

20

30

40

50

【0043】

さらに、予測されるポリペプチドの発現、リン酸化、又は発現とリン酸化の両方のパターンは、非腫瘍組織あるいは細胞サンプルと比較することができる。その非腫瘍組織又は細胞サンプルは、同じ個体の又はさもなければ異なる個体に由来する非腫瘍組織又は細胞サンプルから得られる。ポリペプチドの検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルに比べて、ポリペプチドが少なく検出された場合、哺乳動物の腫瘍、組織、又は細胞サンプルにおいて減少したとみなされる。ポリペプチドの検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルに比べて、ポリペプチドが多く検出された場合、哺乳動物の腫瘍、組織、又は細胞サンプルにおいて増加したとみなされる。ポリペプチドの検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルに比べて、ポリペプチドが全く同じか又はほとんど同じに検出された場合、哺乳動物の腫瘍、組織、又は細胞サンプルにおいて正常であるとみなされる。

【0044】

HER2指向性治療に対して応答する、又は応答しない哺乳動物の腫瘍を同定するための本発明の方法は、(a)IGFRポリペプチド；(b)EGFRポリペプチド；(c)NDFポリペプチド；(d)リン酸化S6リボソームポリペプチド；(e)リン酸化AKTポリペプチド；(f)リン酸化EKTポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化、又は両者のパターンを検出するために、哺乳動物の腫瘍から得られたサンプルを評価する段階を含む。ポリペプチドの組み合わせ、及び発現、リン酸化又は発現とリン酸化の両方は、HER2指向性治療に応答する、又は応答しない哺乳動物の腫瘍を同定する。当該方法は、これらのポリペプチドの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つすべての発現、リン酸化又は発現とリン酸化の両方のパターンの検出を含む。さらに、当該方法は、別のポリペプチドの発現、リン酸化、又はその両方からなる両者のパターンの検出のような他の工程を必要ではないが、含む可能性がある。

【0045】

ハーセプチン（登録商標）処置に限らないがそのようなHER2指向性分子を処置する、又は処置を施さない腫瘍を有する患者を選択する本発明の方法は、(a)IGFRポリペプチド；(b)EGFRポリペプチド；(c)NDFポリペプチド；(d)リン酸化S6リボソームポリペプチド；(e)リン酸化AKTポリペプチド；(f)リン酸化EKTポリペプチドからなる一つ又は複数のポリペプチドの発現、リン酸化、あるいは両者のパターンを、その患者から得られた細胞又は組織サンプルにおいて測定する工程からなる。ポリペプチド及び発現、リン酸化、又は発現とリン酸化の両方のパターンとの組み合わせは、HER2を指向した分子を処置する腫瘍を有する患者又は処置を施さない患者を選択するために用いられる。当該方法は、これらのポリペプチドの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つすべての発現、リン酸化又は発現とリン酸化の両方のパターンの検出を含むことができる。さらに当該方法は、別のポリペプチドの発現、リン酸化、又はその両方のパターンの検出のような他の工程を必要ではないが、含む可能性がある。

【0046】

例えば、応答しているとして哺乳動物の腫瘍を同定するパターン又はHER2を指向した分子で処置する腫瘍を持った患者を選択するために用いられるパターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルに比べてIGFRポリペプチドの発現が低下している。あるいは、その検出されたパターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比べたときにAKTポリペプチドのリン酸化の減少、S6リボソームたんぱく質のリン酸化の減少、又はその両方を伴う。他の可能性のある検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較してERKポリペプチドのリン酸化の低下を伴う、EGFRポリペプチドの発現が正常又は増加しているものである。更なる検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較してS6リボソームポリペプチドのリン酸化の増加を伴う、IGFRポリペプチドの発現が低下しているものが含まれる。他の態様においては、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して哺乳動物の腫瘍におけるNDFポリペプチドの発現増加を伴う、IGFRポリペプチドの発現が低下しているものである。ここにおける、更なる検出パターンはS6リボソームポリペプチドのリン酸化が増加しているものが含まれる。これらの同定されたパターンは限定されるものではないと理解される。

10

20

30

40

50

【0047】

例えば、哺乳動物の腫瘍を応答しないものとして同定するパターン又はHER2を標的化した分子の治療を施さないことをがん患者に選ばせるために用いることができるパターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較してAKTポリペプチドのリン酸化の増加、S6リボソームポリペプチドのリン酸化の増加、又はそれらの両方を伴う、IGFRポリペプチドの発現が正常又は増加しているものである。他に、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較して、NDFポリペプチドの発現が増加しており、EGFRポリペプチドの発現が低下しているものである。又は、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較してEGFRポリペプチドの発現が低下しているものである。さらに、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較してNDFポリペプチドの発現が低下しているものである。又は、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較してEGFRポリペプチドの発現が低下しており、ERKポリペプチドのリン酸化が増加しているものである。さらに、検出パターンは、非腫瘍組織又は細胞サンプルと比較してIGFRポリペプチドの発現が正常又は増加しており、NDFの発現が低下しているものである。これらの同定されたパターンは限定されるものではないと理解される。

【0048】

本発明の方法の実施において、染色過程は研究室の技師のような人によって実施される。又は、その染色過程は自動化されたシステムを用いて行うこともできる。どちらの場合にも、本発明の方法に従って用いられる染色技術は、当該分野において十分確立された標準的な技術とプロトコールに従って行われる。

【0049】

「細胞又は組織サンプル」とは、細胞、より好ましくは腫瘍細胞を含み、塗抹標本、痰、生検、分泌物、脳脊髄液、胆汁、血液、リンパ液、尿及び糞、又はこれらに限定はされないが、胸部、肺、腸、皮膚、頸、前立腺、及び胃のような器官から採取した組織のような、生体サンプルから単離される細胞を含む生物学的サンプルを意味する。例えば、組織サンプルは、機能的に関連した細胞又は近隣の細胞の領域を含む。

【0050】

標的タンパク質の量は、染色された抗原の平均的な光学密度を測定することによって有利に定量化される。同様に、染色された全組織領域に対する比率又は割合は、例えば、2枚目の画像における（抗体の閾値レベルのような）対照レベルを超えて染色された領域として、容易に計算できる。生体マーカールを含んでいる核の可視化の後に、処置後の患者に由来する組織の染色された細胞の割合又は量は、未処置の組織にある細胞の割合又は量と比較される。本発明の目的のため、ポリペプチドの発現、リン酸化、又は発現とリン酸化の両方のパターンを「測定する（determining）こと」は、直接的な検討又は、例えば、契約診断サービスからの間接的な検討のどちらかを通して、そのようなポリペプチドについての情報を単に取得することを意味するものとして広く理解されている。

【0051】

ハーセプチン（登録商標）及び化学療法剤を処置された患者から採取された胸部がん組織の切片は、本発明の方法に従って、erbBリガンド、受容体、下流情報伝達たんぱく質の発現、リン酸化又は発現およびリン酸化の両方、又はそれらの内、陽性処置応答を示すと予想される組み合わせに対する免疫組織学的手法によって解析される。これらの測定は、例えば、組織マイクロアレイを用いることによって、達成できる。組織マイクロアレイは、均一な染色及びスコア化の条件下、多様な組織サンプルを迅速にスクリーニングするための良好な方法（Hoosら、2001、Am J Pathol. 158: 1245-1251）であって、本発明の方法において有利に用いられている。染色されたアレイのスコア化は、観察された染色を正確に定量化する自動化されたシステムによって達成できる。この解析の結果は、ハーセプチン（登録商標）治療等で患者を治療した後の結果を最も良好に予測する生体マーカーを同定するものである。患者の「応答の見込み」の0から100%の範囲は、少数のリガンド、受容体、情報伝達タンパク質又はそれらの予測される組み合わせの発現、リン酸化、又はその両方に基づいて予測される。胸部がん患者由来の更なるサンプルは、組織マイクロアレイの結果に加えて又は代替として解析される。例えば、胸部がん患者に由来するサンプルの解析は、もしその患者の応答が受容体発現及び/又は下流情報伝達の特異的パターンと相関していれば、組織アレイの結論を支持するものである。

10

【0052】

本発明は、一部には、本発明の方法を実行するためのキットを提供するものである。例えば、当該方法は、IGFRポリペプチド、並びに、リン酸化AKTポリペプチドに結合する抗体、リン酸化S6リボソームポリペプチドに結合する抗体、EGFRポリペプチドに結合する抗体、HER2ポリペプチドに結合する抗体、NDFポリペプチドに結合する抗体及びリン酸化ERKポリペプチドに結合する抗体のうち一つ又はそれ以上を結合する抗体を含む、HER2を標的化した治療に対する哺乳動物の腫瘍の応答性を特徴付けるキットを提供する。IGFRポリペプチドに結合する抗体に加えて、そのキットは、リン酸化AKTポリペプチドに結合する抗体、リン酸化S6リボソームポリペプチドに結合する抗体、EGFRポリペプチドに結合する抗体、HER2ポリペプチドに結合する抗体、NDFポリペプチドに結合する抗体、及びリン酸化ERKポリペプチドに結合する抗体のうち、1つか、2つか、3つか、4つか、又は5つすべてを含みうる。さらには、このキットは、限定はされないが付加的な抗体を含み、上記に同定した抗体のほかの付加的な構成成分を含むことができる。例えばそのようなキットは、HER2指向性治療を考慮中の、例えば、胸部がん患者のような特定の患者の適切な治療法を選択するための助けとして臨床家又は内科医によって用いられる。

20

30

【0053】

本発明の特に有用な態様及び利点は、実施例1~5により理解できるものである。これらの実施例は、本発明の特定の態様の例示、及びそれらの様々な利用である。これらは説明の目的のみに示されているものであって、発明をなんら限定するものではない。

【実施例1】

【0054】

生体マーカーの染色手順

ヒトの腫瘍組織切片は、以下のような本発明の方法に従って予測生体マーカーについて染色された。10%の中性緩衝化されたホルマリンパラフィンブロックは、4ミクロンで切断された。そしてその切片は被覆されたスライド上に置かれた。EGFR及びHER2の免疫染色は、ベンタナメディカルインスツルメント社（VMSI, Tucson, AZ）の、前もって希釈されたEGFR及びHER2に対する抗体を用いて行われた。HER3、Herregulin（NDF）、及びIGFR抗体は、ネオマーカーズ社（Fremont, CA）から得られた。TGFに対する抗体は、オンコジーンサイエンス社（San Diego, CA）から得られた。EGFR、HER2/neu、HER3、IGFR、Herregulin、及びTGFは、検出化学物質のI V I E W（VMSI）を附属した“Benchmark”（VMSI）を用いて免疫染色された。pERK（1

40

50

: 100)、pAKT(1:75)及びリン酸化S6リボソームタンパク質に対する特異的な抗体は、セルシグナリングテクノロジー社(Beverly, MA)から得られ、標識化されたストレプトアビジンパーオキシダーゼ技術(Vector Elite ABC Kit, Burlingame, CA)を用いて免疫染色された。染色に先立ち、pS6リボソームタンパク質、pERK及びpAKT用のスライドは、「デクローカー」(Biocare Corp.)の0.1Mのクエン酸緩衝液pH6.0を用いて抗原回復され、切片は1次抗体とともに4で一晩インキュベートされた。その翌日、スライドは“LSAB2”キット(Dako)を検出試薬として用いて自動染色機(Dako Corp.)で処理した。DAB(Dako)はクロモゲン色素として用いられた。免疫染色の後、すべてのスライドは、4%のエチルグリーン(シグマ)によって、手動で対比染色した。

10

【実施例2】

【0055】

ウェスタンブロット解析の手順

予測マーカーの発現を検出するためのウェスタンブロット解析は、次のように実施された。細胞は、氷冷した緩衝液中で溶解された(50mMのトリス塩酸(pH7.5), 137mMの塩化ナトリウム, 1mMのEDTA, 1%ノニドットP-40, 0.2%のトリトンX-100, 10%のグリセロール, 0.1mMのオルトバナジン酸ナトリウム, 10mMのピロリン酸ナトリウム, 20mMのグリセロリン酸, 50mMのフッ化ナトリウム, 1mMのフェニルメチルスルホニルフルオリド, 2µMのロイペプチン, 2µg/mlのアプロチニン)。タンパク質濃度は、バイオラッドタンパク質アッセイキット(バイオラッドラボラトリーズ、Hercules, CA)によって測定された。同量のタンパク質、通常1レーンに15µgのタンパク質は、ゲル電気泳動、例えば、プレキャストの4~12%のピストリスNuPage勾配ゲル(インビトロジェン)又は7.5%若しくは4~15%の勾配を持つ還元条件のSDS-PAGEを用いたゲル電気泳動によって分離された。そしてHyBond-Cニトロセルロース膜(アマシャムライフサイエンス)又はイモビロンP膜のような膜へ転写された。膜は、ブロックされ、例えば、p-AKT及びp-ERKに対する抗体(セルシグナルテクノロジー)のような、1次抗体とインキュベートされた。抗体のインキュベートは、3%のウシ血清アルブミン及び0.1%のTween20を含むトリス緩衝液生理食塩水の中で、4で一晩行われた。シグナルは、化学発光(パーキンエルマーライフサイエンス)、又は(Xiaら, 2002, Oncogene 21: 6255-6263)に記載されている様なピアス社(Rockford, IL)のスーパーシグナルウェストフェムトマキシマム感受性基質キットを用いることによって、検出された。

20

30

【実施例3】

【0056】

免疫組織化学法の手順

予測生体マーカーの発現、活性化又はその両方を検出及び測定するための免疫組織化学法は、以下のように行われた。HER2/neu、EGFR、HER3、IGFR、TGF、Heregulin(NDF)、p-ERK、p-AKT、及びp-S6リボソームタンパク質又はリン酸化レベルは、アルカリホスファターゼ技術若しくはパーオキシダーゼ技術及び免疫組織化学的に染色されたスライドの顕微鏡に基づく画像解析を用いて、(Bacusら, 1997, Analyt. Quant. Cytol. Histol. 19: 316-328に記載されているようにして)定量化された。定量化は前述(Bacus & Ruby, 1993, Pathol Annu, 28: 179-204)されているように、CAS200画像分析装置を用いて行われた。解析のために、腫瘍は染色レベルに基づいてそれぞれの抗体に対して陽性か陰性かに分類された。統計的解析は、頻度を定量化し、変数の間の相関の重要性を検定するピアソンのカイ二乗を計算するSystatを用いて行われた。すべての場合において、p値は、全体の母集団分布に基づいて期待されるものに対するサンプルの分布のばらつき的重要性を示す。比較は、関連データがすべて有効であるサンプルに対してのみ行われた。結果として、殆どの比較に含まれる患者数は、有効サンプルの総数に比べてわずかに少なかった。

40

50

定量的な免疫組織化学法は (I H C) は、前述 (Bacusら, 1997, *Analyt. Quant. Cytol. Histol.* 19: 316-328) の通り実施された。E G F R、及び e r b B 2 (H E R 2) の免疫染色は、ペンタナメディカルサイエンス社 (V M S I , T u c s o n , A Z) の、前もって希釈された E G F R 及び e r b B 2 (H E R 2) 抗体を用いて、前述の V M S I 社の自動免疫染色モジュール “ B e n c h M a r k ” で実施した。V S M I 社製の “ I - V i e w ” 検出キットは、会社の説明書に従って、V M S I 社のあらかじめ希釈された 1 次抗体の 3 つすべてに対して行われた。e r b B 3 (1 : 1 0)、H e r e g u l i n (1 : 2 5)、及び T G F (1 : 2 0) の抗体もまた、“ B e n c h M a r k ” で I - V i e w 検出試薬を用いて免疫染色した。ホスホ E r k (1 : 1 0 0) 及び p - A K T (1 : 7 5) 抗体は、製造業者によって記載されている標識化されたストレプトアビジン 10
パーオキシデース技術を用いて免疫染色した。ホスホ E r k 及び p - A K T のスライドは、B a c u s ら (1997, *Analyt. Quant. Cytol. Histol.* 19: 316-328) に記載されているようにして抗原回復された。スライドは、検出試薬として “ L S A B 2 ” キットを用いて、自動染色装置 (D a k o 社製) で免疫染色された。染色後、すべてのスライドは 4 % エチルグリーン (シグマ) を用いて手動で対比染色された。組織切片を調製し、解析する研究者には、患者の腫瘍の型及び治療への応答性については知らされていなかった。

【 0 0 5 7 】

I H C 用に、E G F R 及び e r b B - 2 抗体は、ペンタナメディカルサイエンティフィックインスツルメント社 (V M S I) から、抗 p - A K T (S e r 4 3 7) 及び p - E r k 1 / 2 抗体は、セルシグナリングテクノロジー社 (B e v e r l y , M A) から、T G F 20
、e r b B 3、h e r e g u l i n、及び I G F R - 1 に対する抗体は、ネオマーカー社から得た。

【 実施例 4 】

【 0 0 5 8 】

胸部がん組織のマイクロアレイ解析

ハーセプチン (登録商標) を用いた従来の化学療法を受けた 2 5 0 人の胸部がん患者由来の組織のマイクロアレイは、クリノミクスバイオサイエンス社 (P i t t s f i e l d , M A) から得た。腫瘍そのものは、最も一般的な浸潤性の腺管がん腫を伴ったものであるが、その組織学的解析は多様なものであった。すべての患者は、外科治療の後に放射線治療を受けていた。アレイの組織サンプルは、処置の前に取られたものである。H E R 2 30
/ n e u の発現は、全患者のオリジナルの生体サンプルに対して、ハーセプテストシステム (D A K O , C a p r i n t e r a , C A) を用いて測定された。患者応答はクリノミクスからの各々の病理学者により決定されたものに最終的に追従する既往歴に基づいていた。

【 0 0 5 9 】

これらの患者の人口統計データは、表 1 に報告されている。患者の大多数は、腺管がん腫を浸潤しており、アントラサイクリン + シクロホスファミドを処方されていた。患者の 5 7 人は、転移を併発していた。すべての患者は、初期容量 4 m g / k g のハーセプチン (登録商標) 及び週に 2 m g / k g の維持容量を服用していた。

【 0 0 6 0 】

2 5 0 人の患者のオリジナル組織アレイのうち、7 5 サンプルは、臨床データの欠如のため、又は切片が使用可能な腫瘍組織を含んでいなかったため、解析に用いられなかった。全体的に見て、残りの患者の内 1 5 % は、疾病がなかったか、又は治療後に安定した病状を呈したが、8 5 % は、再発した。残りの患者 1 7 5 人のうち、2 8 人のサンプルについてはハーセプテストの結果が欠損していたので、更なる解析からは除外された。ハーセプテストの結果が得られたサンプルのうち 7 7 サンプルについては、ハーセプテストのスコアが + 3 であり、7 0 サンプルについては + 2 又はそれ以下の染色強度であった (表 1) 。

【 0 0 6 1 】

ハーセプテストの染色スコアは、マイクロアレイを使い、H E R 2 / n e u 発現レベル 50

を解析することによって確認された(データ未提示)。HER2/neu発現は、患者応答と強く相関していた。HER2/neuが0又は+1の患者の100%は再発したが、+3の患者は77%だけが再発した。この応答率は、以前に報告されたものと類似している。(Baselga, 2002, Annuals of Oncology 13: 8-9参照)。これらの結果に基づいて、生体マーカーの更なる解析が、HER2を最も高いレベル(+3)で発現している患者に集中的になされた。ハーセプチンの結果が最も高かった(+3)サンプルのうちの74は、原発腫瘍から採取されたもので、2つはリンパ節から、1つは副腎転移からのものであった。

【0062】

p-ERK及びp-AKT(ERK及びAKTのリン酸化体)の活性化された下流のシグナル、並びにmTOR及びp-S6(リン酸化されたS6リボソームタンパク質)の下流のシグナルと同様に、HER2/neuを過剰発現している(ハーセプチンの染色スコアが+3)77人の患者は、EGFR、HER3、IGFR、及びNDF/Herregulin、及びTGF- α の発現について解析された。受容体キナーゼの解析は、HER2/neuと同様に、EGFR発現がまた患者応答と有意に相関していることを明らかにした(表2)。HER2/neuを過剰発現しているハーセプチン(登録商標)を処置した患者の中で、EGFR陽性患者の30%については病状が安定していた、又は疾病がみられなかったが、EGFR陰性患者については疾病の進行がみられなかったのは9%のみであった。+3HER2/neuの患者77人のうち、70人はHER3を発現していた。しかしながら、HER3の発現は、患者応答と有意には相関していなかった(HER3陰性の患者が少ないことから、データセットの中での比較は限られたものとなっている)。成長因子受容体HER3は、PI3キナーゼ結合部位を持っており、他のerbB受容体と活性なヘテロ二量体を形成するので、erbB情報伝達の下流で重要な役割を示すと考えられる。他の成長因子受容体の発現はまた、下流の経路の直接的な刺激を介して、又はerbB受容体のトランス活性化を介して、患者応答を仲介するかもしれない。

【0063】

NDF及びTGF- α を含むerbBリガンドの発現は、また、患者によって多様なものとなっている(表3を参照のこと)。患者のおおよそ70%は、NDFを高いレベルで発現していたが、おおよそ57%はTGF- α を高いレベルで発現していた。NDFレベルと患者の応答の間に有意な相関が観測された。HER2/neuを過剰発現しているNDF陰性患者に於いてはかなり高い割合で再発がみられた(91%)。ところが、HER2/neuを過剰発現しているNDF陽性患者のうち62%にのみ再発がみられた。一方、TGF- α レベルのみの場合と患者応答の間には、予測的な相関は見られなかった(表3を参照のこと)。しかしながら、患者におけるTGF- α 又はNDFの発現と、EGFRの過剰発現との組み合わせは、HER2/neuを過剰発現する患者における患者応答と正の相関を示した(それぞれ $p = 0.02$ 及び $p = 0.03$)(データ未提示)。

【0064】

HER2と、HER3又はEGFRとのヘテロ二量体の活性化は、MAPK及びPI3K/AKT経路の活性化をもたらす。そのMAPK経路は、ERKの活性化又はリン酸化(pERK)のレベルを解析することによって測定される。HER2/neuを過剰発現している、病状が安定している又は再発した患者に於いて、活性化されたERKのみのレベルの解析及び比較は、pERKレベルが上昇していることが患者応答の因子として劇的な効果を発揮していることを証明することはできなかった(表4を参照のこと)。同様に、この解析に基づいて、AKTの活性化(pAKT)だけでは、ハーセプチン(登録商標)を処置したHER2陽性患者の応答の予測マーカーにはなりそうもない(表4を参照のこと)。また、S6リボソームタンパク質のリン酸化の解析は、mTOR及びp70S6キナーゼを介した多様な情報を統合するものであるが、HER2/neuを過剰発現する患者の患者応答と、有意な相関を示さなかった(表4を参照のこと)。しかしながら、pERK及びpAKTの発現の検討がEGFR及びHER2/neuを発現した患者に限られるならば、これらの情報伝達分子のいずれかの低発現は、ハーセプチン(登録商標)に対す

る陽性応答を有意に予測する判断材料となった(表5)。

【0065】

解析の予測率を高めるために、腫瘍を特徴付ける多変量解析において、2つ又はそれ以上の生体マーカーを組み合わせることが想起される。この解析において、ERK活性化を伴うHER2/neu及びEGFR発現の組み合わせの観察は、応答を有意に予測した(表5を参照のこと)。例えば、EGFR発現が低く、ERKリン酸化レベルが高い患者は、応答しなかった(0%応答)が、EGFR発現が高く、ERKリン酸化レベルが低い患者は、高い応答率を示した(42%応答)。同様に、NDFの高発現とEGFR及びHER2/neuの高発現の組み合わせ、又はTGF- β の高発現とEGFR及びHER2/neuの高発現の組み合わせは、EGFR及びNDFリガンドの低発現を示した患者と比較して、よりよい応答を予測した(データ未提示)。この比較はしばしば劇的であった。例えば、EGFR、HER2/neu及びNDFの高発現を示した患者の、39%は、治療に応答したが、HER2/neuの高発現でEGFR及びNDFの低発現を示した患者は、一人も応答しなかった(データ未提示)。

【0066】

HER2/neuの高発現、IGFRの低発現、及びS6リボソームタンパク質の高リン酸化の組み合わせは、患者応答率が高かった(67%、表5)。これは、治療に応答しない率が高かった、HER2/neu及びIGFRの高発現及びS6リボソームタンパク質の高リン酸化を示す患者と逆である。HER2/neuを過剰発現する患者がハーセプチン(登録商標)治療に応答するかどうかを予測するマーカーとして最良の組み合わせは、NDFの高発現、IGFRの低発現、及びS6の高リン酸化である(表6)。逆に、HER2/neuを過剰発現し、NDFの低発現及びIGFRの高発現を示す患者は、S6の状態とは無関係に、一人も治療に応答しなかった(表6)。しかしながら、これらの結果は、これらの患者サンプルの少ない母集団を用いることによって得られた。NDF、HER2/neu、及びEGFRの高発現レベルを示す患者において、ERKのリン酸化は、28%(高p-ERK)から54%(低p-ERK)までの応答の違いと相関していた(表6)。同様に、HER2/neu及びNDFの発現を含む生体マーカーのほかのいかなる組み合わせをもちあわせ、低レベルのp-AKTを示す患者は、このタンパク質を過剰発現する患者と比べて、よりよく応答した(結果未提示)。あわせて考えると、このデータは、HER2/neuは、そのリガンド、他のerbB受容体及びリガンドとともに、他の成長因子受容体と同様、ハーセプチン(登録商標)応答において役割を果たすことを示している。重要なことに、これらのタンパク質の選択された組み合わせの解析は、0から100%までの変化に富む応答率と相関していた。

【実施例5】

【0067】

胸部がんサンプルの解析

7名の胸部がん患者由来のサンプルは、エール大学から得られた。これら7名の患者の臨床歴は、はじめての治療として化学療法との組み合わせでハーセプチン(登録商標)を処置されたものから、補助剤療法としてハーセプチン(登録商標)を処置されたものまで、変化に富んでいた。これらの7名のサンプルは、受容体、リガンド、及び情報伝達タンパク質の発現及びリン酸化について解析され、その結果は、組織マイクロアレイ解析の結果と比較された。

【0068】

7名すべての患者は、HER2/neuでないポリペプチドに免疫学的に特異的なほかの抗体を用いた解析で測定されたように、HER2/neuを過剰発現していた。患者の既往歴は、変化に富んでいた。例えば、初期発症から4年後に転移性の疾病を再発した患者#1は、ハーセプチン(登録商標)とドセタキセルを処方された。この患者は、組み合わせ治療開始から1年以上安定した疾病状態にあった。最初の放射線治療の後7ヵ月に単一の転移が発見された患者#7は、ハーセプチン(登録商標)とビノレルピンを処方された。8週間の組み合わせ治療の後で疾病の悪化が見られた。7名の患者のうち、3名は、

ハーセプチン（登録商標）応答を示した。一方他の4名は、応答しなかった（表7）。応答したもののうち1名は、IGFRを発現していなかったが、EGFRを発現しており、また下流の情報伝達タンパク質は陽性を示した。これらの応答したもののうち他の1名は、IGFR及びEGFRを発現したが、S6及びERKにおいて活性化下流情報伝達を示さなかった。すべての非応答者は、IGFRを発現し、S6のリン酸化は陽性であった。非応答者のうち2名は、また、EGFRを発現していた。これらの結果は、マイクロアレイ解析から得られた結果と一致している。IGFR発現とS6リン酸化によって示される活性化IGFR受容体をもつ患者は、ハーセプチン（登録商標）に応答する可能性は低い。一方IGFRを欠損している患者、又はIGFRを持っているが下流の情報伝達がない患者は、応答の可能性が高そうである。

10

【0069】

上記の開示は、本発明のある特別な態様を強調するものであり、全ての修飾、等価の代替は、添付の請求の範囲に詳しく説明される発明の精神及び範囲内であることは理解されるものである。

【0070】

【表 1】

人口統計データ

	患者数	疾病のない又は 安定した病状	再発
研究に含まれる全患者	175	15%	85%
組織像			
浸潤性の腺管がん腫	109	17%	83%
小葉のがん腫	7	43%	57%
髄質のがん腫	3	33%	67%
転移性の胸部がん腫	19	5%	95%
乳頭のがん腫	3	0%	100%
硬性がん腫	3	100%	0%
管状腺がん腫	3	0%	100%
術後の治療（引き続いてハーセプチン（登録商標）投与）			
ドキソルビシン	44	2%	98%
アントラサイクリン+シクロホスファミド	100	23%	77%
パクリタキセル	3	100%	0%
HER 2/neu発現腫瘍			
0又は1	17	0%	100%
2	53	8%	92%
3	77	30%	70%

10

20

胸部がん患者サンプルの人口統計データである。

30

【0071】

【表 2】

患者集団	n	応答者 (%)	再発 (%)	P 値
EGFR 陽性	43	30%	70%	0.002
EGFR 陰性	23	9%	91%	
HER3 陽性	70	29%	71%	0.43
HER3 陰性	7	43%	57%	
IGFR 陽性	33	24%	76%	0.16
IGFR 陰性	35	40%	60%	

10

受容体チロシンキナーゼ発現に対する患者応答。臨床データ及びハーセプトテストのデータが入手可能であり、HER2/neuを過剰発現しているヒトの組織アレイサンプルの解析。

【0072】

20

【表 3】

患者集団	N	応答者 (%)	再発 (%)	P 値
NDF 陽性	55	39%	62%	0.01
NDF 陰性	22	9%	91%	
TGF- α 陽性	38	34%	66%	0.56
TGF- α 陰性	29	28%	72%	

30

受容体チロシンキナーゼのリガンド発現に対する治療後の患者応答。臨床データ及びハーセプトテストのデータが入手可能であり、HER2/neuを過剰発現しているヒトの組織アレイサンプルの解析。

【0073】

【表 4】

患者集団	n	応答者 (%)	再発 (%)	P 値
p-ERK陽性	36	25%	75%	0.43
p-ERK陰性	39	33%	67%	
p-AKT陽性	24	25%	75%	0.53
p-AKT陰性	53	32%	68%	
p-S6陽性	27	33%	67%	0.74
p-S6陰性	44	30%	70%	

10

下流タンパク質の活性化に対する治療後の患者応答。臨床データ及びハーセプトテストのデータが入手可能であり、HER2/neuを過剰発現しているヒトの組織アレイサンプルの解析。

【0074】

20

【表 5】

患者集団	n	応答者 (%)	再発 (%)	P 値
EGFR陽性/p-ERK陽性	21	14%	86%	0.04
EGFR陽性/p-ERK陰性	19	42%	58%	
EGFR陰性/p-ERK陽性	9	0%	100%	
EGFR陰性/p-ERK陰性	14	14%	86%	
EGFR陽性/p-AKT陽性	17	18%	82%	0.07
EGFR陽性/p-AKT陰性	26	38%	62%	
EGFR陰性/p-AKT陽性	5	20%	80%	
EGFR陰性/p-AKT陰性	18	6%	94%	
IGFR陽性/p-S6陽性	13	8%	92%	0.01
IGFR陽性/p-S6陰性	20	35%	65%	
IGFR陰性/p-S6陽性	12	67%	33%	
IGFR陰性/p-S6陰性	23	26%	74%	

30

受容体及び下流タンパク質の活性化の解析に対する治療後の患者応答。臨床データ及びハーセプトテストのデータが入手可能であり、HER2/neuを過剰発現しているヒトの組織アレイサンプルの解析。

40

【0075】

【表 6】

患者集団	n	応答者 (%)	再発 (%)	P 値
NDF 陰性 / p-S6 陽性 / IGF1R 陰性	2	50%	50%	0.003
NDF 陰性 / p-S6 陰性 / IGF1R 陰性	9	11%	89%	
NDF 陰性 / p-S6 陽性 / IGF1R 陽性	4	0%	100%	
NDF 陰性 / p-S6 陽性 / IGF1R 陽性	4	0%	100%	
NDF 陽性 / p-S6 陽性 / IGF1R 陰性	7	100%	0%	
NDF 陽性 / p-S6 陰性 / IGF1R 陽性	16	44%	56%	
NDF 陽性 / p-S6 陰性 / IGF1R 陰性	14	36%	64%	
NDF 陰性 / p-ERK 陽性 / EGFR 陰性	3	0%	100%	0.08
NDF 陰性 / p-ERK 陰性 / EGFR 陰性	4	0%	100%	
NDF 陰性 / p-ERK 陰性 / EGFR 陽性	10	20%	80%	
NDF 陰性 / p-ERK 陽性 / EGFR 陽性	6	0%	100%	
NDF 陽性 / p-ERK 陽性 / EGFR 陰性	5	0%	100%	
NDF 陽性 / p-ERK 陰性 / EGFR 陽性	13	54%	46%	
NDF 陽性 / p-ERK 陰性 / EGFR 陰性	6	17%	83%	
NDF 陽性 / p-ERK 陽性 / EGFR 陽性	18	28%	72%	

10

20

リガンド及び受容体発現並びに下流タンパク質の活性化の解析に対する治療後の患者における患者応答。臨床データ及びハーセプトテストのデータが入手可能であり、HER2/neuを過剰発現しているヒトの組織アレイサンプルの解析。

【0076】

30

【表 7】

患者	IGF1R	EGFR	p-S6	p-AKT	p-ERK	応答
#1	+	+	-	-	-	あり
#2	-	+	+	+	+	あり
#3	+	+	-	+	-	あり
#4	+	-	+	+	+	なし
#5	+	+	+	+	-	なし
#6	+	-	+	+	-	なし
#7	+	+	+	+	+	なし

40

7名の胸部がん患者における受容体チロシンキナーゼ発現、下流タンパク質の活性化及び治療後の患者応答。解析は、全組織切片について行われた。

【0077】

【表 8】

AKT (NP 005154 GI:4885061) 480 AMINO ACIDS (SEQ ID NO:1)

See, e.g., Staal, S.P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84 (14), 5034-5037 (1987).

MSDVAIVKEGWLHKRGEYIKTWRPRYFLLKNDGTFIGYKERPQDQDREAPLNNFSVAQ
 CQLMKTERPRPNTFIIRCLQWTTVIERTFHVETPEEREWTTAIQTVADGLKKQEEEEEM
 DFRSGSPSDNSGAEEMEVSLAKPKHRVTMNEFEYLKLLGKGTFGKVLVKEKATGRYYA
 MKILKKEVIVAKDEVAHTLTENRVLQNSRHPFLTALKYSFQTHDRLCFVMEYANGGELF
 FHLSRERVFSEDRARFYGAEIVSALDYHSEKNVVYRDLKLENLMLDKDGHIKITDFGL
 CKEGIKDGATMKTFCGTPPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWWGLGVVMEYMMCGRLPFYNQDH
 EKLFELILMEEIRFPRTLGPPEAKSLLSGLLKKDPKQRLGGGSEDAKEIMQHRFFAGI
 VVQHVYEEKLSPFPKQVTSETDTRYFDEEFTAQMITITPPDQDDSMCEVDSERRPHFPQF
 SYSASSTA (SEQ ID NO:1)

10

S6 (NP 001001, GI:17158044) 249 AMINO ACIDS (SEQ ID NO:2)

See, e.g., Pata et al., (1992) Gene 121 (2), 387-392.

MKLNISFPATGCQKLIQVDDERKLRTFYEKRMATEVAADALGEEWKGYVVRISGGNDKQ
 GFPMKQGVLTHTGRVRLLLSKGHSCYRPRRTGERKRKSVRGCIVDANLSVLNLVIVKKGE
 KDIPGLTDTTVPRLGPKRASRIRKLFNLSKEDDVRQYVVRKPLNKEGKKPRTKAPKIQ
 RLVTPRVLQHKRRRIALKKQRTKKNKEEAAEYAKLLAKRMKEAKEKROEQIAKRRRLSS
 LRASTSKSESSQK (SEQ ID NO: 2)

20

ERK (XP 055766, GI:20562757) 379 AMINO ACIDS (SEQ ID NO:3)

See, e.g., Butch et al., J Biol Chem., 1996., 271(8):4230-5.

30

MAAAAQGGGGGEPRTGEGVGPVGEVEMVKGQPFVGVPRYTQLQYIGEGAYGMVSSA
 YDHVRKTRVAIKKISPFEHQTYCQRTLREIQILLRFRHENVIGIRDILRASTLEAMRDV
 YIVQDLMETDLYKLLKSQQLSNDHICYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLINTT
 CDLKICDFGLARIADPEHDHTGFLTEYVATRWRAPPEIMLNSKGYTKSIDIWSVGCILA
 EMLSNRPIFPKGHYLDQLNHILGILGSPSQEDLNCIINMKARNYLQSLPSKTKVAWAKL
 FPKSDSKALDLLDRMLTFNPNKRITVEEALAHPLYEQYDPTDEPVAEPEPFTFAMELDD
 LPKERLKELIQETARFQPGVLEAP (SEQ ID NO:3)

【配列表】

2006509503000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成17年9月6日(2005.9.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項35

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項35】

リン酸化されたERKポリペプチドの検出パターンが、配列番号3の202位のリン酸化スレオニン残基又は204位のリン酸化チロシン残基を含むエピトープに特異的な抗体

を用いて測定されたものである、請求項 1 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 3 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 3 6】

リン酸化された E R K ポリペプチドの検出パターンが、配列番号 3 の 2 0 2 位のリン酸化スレオニン残基又は 2 0 4 位のリン酸化チロシン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 9 に記載の方法。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 5 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 5 8】

リン酸化された E R K ポリペプチドの検出パターンが、配列番号 3 の 2 0 2 位のリン酸化スレオニン残基又は 2 0 4 位のリン酸化チロシン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 4 1 に記載の方法。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 7 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 7 8】

リン酸化された E R K ポリペプチドの検出パターンが、配列番号 3 の 2 0 2 位のリン酸化スレオニン残基又は 2 0 4 位のリン酸化チロシン残基を含むエピトープに特異的な抗体を用いて測定されたものである、請求項 6 1 に記載の方法。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項 8 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項 8 2】

(b) の抗体が免疫学的に配列番号 1 の 4 7 3 位にリン酸化セリン残基を持つ A K T ポリペプチドに特異的であり、(c) の抗体が免疫学的に配列番号 2 の 2 3 5 位にリン酸化セリン残基を持つ S 6 リボソームポリペプチドに特異的であり、及び / 又は、(f) の抗体が免疫学的に配列番号 3 の 2 0 2 位にリン酸化スレオニン残基及び 2 0 4 位にリン酸化チロシンを持つ E R K ポリペプチドに特異的である、請求項 8 1 に記載のキット。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/US 03/39770

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/574		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BACUS S S ET AL: "HER-2/NEU ONCOGENE EXPRESSION AND PROLIFERATION IN BREAST CANCERS" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 137, no. 1, July 1990 (1990-07), pages 103-111, XP000998483 ISSN: 0002-9440 the whole document	1-83
A	EP 0 656 367 A (BECTON-DICKINSON) 7 June 1995 (1995-06-07) the whole document	1-83
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 16 August 2004		Date of mailing of the international search report 24. 11. 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Moreno de Vega, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 03/39770

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>GUILLERNARD V ET AL: "SELECTIVE DELIVERY OF CHEMOTHERAPEUTICS TO CANCER CELLS VIA GROWTH FACTOR RECEPTORS: TOWARDS THE DEVELOPMENT OF SMART CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS" March 2002 (2002-03), PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, NEW YORK, NY, US, PAGE(S) 76 , XP001180581 ISSN: 0197-016X the whole document</p>	1-83
P,X	<p>BACUS, S. ET AL: "Differences in response of breast cancer molecular profiles of patients likely to respond either to erbB tyrosine kinase inhibitors or to erbB targeted antibodies." BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, vol. 82, no. supplem 1, 2003, pages S72-S73, XP009034953 USA the whole document</p>	1-83
P,X	<p>LEITZEL, K. ET AL: "Increased serum IGF receptor (IGF-IR) in patients with elevated serum HER-2/neu" BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, vol. 82, no. supplem 1, 2003, page S94, XP009034954 USA the whole document</p>	1-83

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 03/39770**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.:

1(part), 2, 3-9(all part), 10, 11-41(all part), 42, 43-61(all part), 62
63-80(all part), 81-83**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

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(part), 2, 3-9 (all part), 10, 11-41 (all part), 42, 43-61(all part), 62, 63-80 (all part), 81-83

Method for identifying a mammalian tumor that responds to a HER-2 directed therapy wherein the mammalian tumor overexpresses HER-2, comprising assaying a sample from the mammalian tumor to detect a pattern of expression, phosphorylation or both of IGFR polypeptide alone or in combination with one or a plurality of polypeptides consisting of EGFR polypeptide, NDF polypeptide, phosphorylated S6 ribosomal polypeptide, phosphorylated AKT polypeptide and phosphorylated ERK polypeptide, and kit therefor.

2. claims: 1, 9, 13, 21-30, 37-41, 51-55, 59-61, 65, 71-75, 79-80 (all part)

Method for identifying a mammalian tumor that responds to a HER-2 directed therapy wherein the mammalian tumor overexpresses HER-2, comprising assaying a sample from the mammalian tumor to detect a pattern of expression, phosphorylation or both of EGFR polypeptide.

3. claims: 1, 9, 14, 21-30, 37-41, 51-55, 59-61, 66, 71-75, 79, 80 (all part)

Method for identifying a mammalian tumor that responds to a HER-2 directed therapy wherein the mammalian tumor overexpresses HER-2, comprising assaying a sample from the mammalian tumor to detect a pattern of expression, phosphorylation or both of NDF polypeptide.

4. claims: 1, 9, 17, 19, 21-30, 33, 34, 37-41, 49, 51-55, 57, 59-61, 69, 71-75, 77, 79, 80 (all part)

Method for identifying a mammalian tumor that responds to a HER-2 directed therapy wherein the mammalian tumor overexpresses HER-2, comprising assaying a sample from the mammalian tumor to detect a pattern of expression, phosphorylation or both of phosphorylated S6 ribosomal polypeptide.

5. claims: 1, 9, 17, 19, 21-32, 37-41, 49, 51-56, 59-61, 69, 71-76, 79, 80 (all part)

International Application No. PCT/ US 03/39770

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Method for identifying a mammalian tumor that responds to a HER-2 directed therapy wherein the mammalian tumor overexpresses HER-2, comprising assaying a sample from the mammalian tumor to detect a pattern of expression, phosphorylation or both of phosphorylated AKT polypeptide.

6. claims: 1, 9, 21-30, 35-41, 51-55, 58-61, 71-75, 78-80 (all part)

Method for identifying a mammalian tumor that responds to a HER-2 directed therapy wherein the mammalian tumor overexpresses HER-2, comprising assaying a sample from the mammalian tumor to detect a pattern of expression, phosphorylation or both of phosphorylated ERK polypeptide.

7. claims: 1, 5, 9, 12, 15, 17, 19, 21-30, 37-41, 45, 49, 51-55, 59-61, 64, 67, 69, 71-75, 79, 80 (all part)

Method for identifying a mammalian tumor that responds to a HER-2 directed therapy wherein the mammalian tumor overexpresses HER-2, comprising assaying a sample from the mammalian tumor to detect a pattern of expression, phosphorylation or both of a plurality of polypeptides consisting of EGFR polypeptide, NDF polypeptide, phosphorylated S6 ribosomal polypeptide, phosphorylated AKT polypeptide and phosphorylated ERK polypeptide

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 03/39770

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0656367	A	07-06-1995	EP 0656367 A1
			AT 176328 T
			AU 1147595 A
			AU 663727 B2
			AU 2518292 A
			CA 2096417 A1
			CA 2145382 A1
			DE 69228300 D1
			DE 69228300 T2
			EP 0554441 A1
			ES 2129454 T3
			US 5514554 A
			WO 9303741 A1
			IL 103250 A
			US 5288477 A

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72)発明者 サラ エス パーカス

アメリカ合衆国 イリノイ州 60521 ヒンズデール インディアン・トレール 1222

(72)発明者 ブラッドリー エル スミス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01945 マーブルヘッド ウィロー・ロード 25

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QR32 QR48 QR51 QR77 QS33

QS34 QS36 QX01 QX02

专利名称(译)	预测对HER-2定向治疗的反应的方法		
公开(公告)号	JP2006509503A	公开(公告)日	2006-03-23
申请号	JP2004558213	申请日	2003-12-11
[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 细胞信号传导科技股份有限公司莱特每次		
[标]发明人	サラ エス パーカス ブラッドリー エル スミス		
发明人	サラ エス パーカス ブラッドリー エル スミス		
IPC分类号	C12Q1/04 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/574 G01N2333/4703 G01N2333/4756 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/04.ZNA C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02		
代理人(译)	佐伯 宪生		
优先权	60/432942 2002-12-11 US		
其他公开文献	JP4609930B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种用于测量或预测个体患者对HER-2定向治疗的反应的方法。

	患者数	疾病のない又は安定した病状	再発
研究に含まれる全患者	175	15%	85%
組織像			
浸潤性の腺管がん腫	109	17%	83%
小葉のがん腫	7	43%	57%
髄質のがん腫	3	33%	67%
転移性の胸部がん腫	19	5%	95%
乳頭のがん腫	3	0%	100%
硬性がん腫	3	100%	0%
管状腺がん腫	3	0%	100%
術後の治療 (引き続いてハーセプチン (登録商標) 投与)			
ドキシソルビシン	44	2%	98%
アントラサイクリン+シクロホスファミド	100	23%	77%
パクリタキセル	3	100%	0%
HER 2/neu発現腫瘍			
0又は1	17	0%	100%
2	53	8%	92%
3	77	30%	70%