

(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2005-506093
(P2005-506093A)

(43) 公表日 **平成17年3月3日(2005.3.3)**

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A Z	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
G O 1 N 27/447	G O 1 N 33/53 M	
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/566	
G O 1 N 33/566	C 1 2 N 15/00 A	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 81 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-538404 (P2003-538404)	(71) 出願人	504154665
(86) (22) 出願日	平成14年10月11日 (2002.10.11)		サントル・オスピタリエ・レジオナル・エ
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月19日 (2004.4.19)		・ユニヴェルシタイル・ドゥ・トゥール
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/011397		CENTRE HOSPITALIER
(87) 国際公開番号	W02003/035904		REGIONAL ET UNIVERS
(87) 国際公開日	平成15年5月1日 (2003.5.1)		ITAIRE DE TOURS
(31) 優先権主張番号	01402718.9		フランス国、エフ-37044 トゥール
(32) 優先日	平成13年10月19日 (2001.10.19)		・セデックス、ブルヴァール・トネル
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		2
		(71) 出願人	504022515
			イネイト・ファーマ
			I NNATE PHARMA
			フランス国、エフ-13009 マルセイユ、
			アンシヤン・シュマン・デ・カシ、イ
			ムーブル・グラン・ブレ 121
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体処置応答を評価するための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、特定の治療的処置に対する被験者の応答を評価または査定するための方法および組成物に関する。より詳細には、本発明は、被験者の応答を決定する方法、または治療用抗体で処置される被験者の治療プロトコルを適合させる方法を提供する。本発明は、被験者の F C G R 3 A 遺伝子型の決定に基づく。本発明は、悪性腫瘍、特にリンパ腫の患者に使用することができ、最高の応答者を選択しかつ/または低応答者向けに処置条件またはプロトコルを調整するのに適する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者の F C G R 3 A 1 5 8 遺伝子型をインビトロで決定することを含む治療用抗体処置に対する被験者の応答を査定する方法。

【請求項 2】

被験者の F C G R 3 A 1 5 8 遺伝子型をインビトロで決定することを含む治療用抗体処置に対する患者を選択する方法。

【請求項 3】

被験者の F C G R 3 A 1 5 8 遺伝子型をインビトロで決定することを含む被験者における治療用抗体処置の効力または処置条件もしくはプロトコルを改良する方法。

10

【請求項 4】

F c R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基を決定することを含み、1 5 8 位のバリンが、処置に対するより良好な応答を示し、1 5 8 位のフェニルアラニンが、処置に対するより低い応答を示す、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

F c R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基の決定が、F c R I I I a 受容体遺伝子もしくは R N A またはアミノ酸残基 1 5 8 をコード化するヌクレオチドを含むそれらの一部を配列決定する工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

F c R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基の決定が、F c R I I I a 受容体遺伝子もしくは R N A またはアミノ酸残基 1 5 8 をコード化するヌクレオチドを含むそれらの一部を増幅する工程を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 7】

増幅を、P C R、R T - P C R およびネステッド P C R のようなポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) で実施する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

F c R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基の決定が、対立遺伝子特異的制限酵素消化の工程を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

F c R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基の決定が、F c R I I I a 受容体遺伝子もしくは R N A またはアミノ酸残基 1 5 8 をコード化するヌクレオチドを含むそれらの一部と、遺伝子型バリンまたはフェニルアラニンに特異的な核酸プローブとのハイブリダイゼーション工程を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

F c R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基の決定が、
 - 生物学的サンプルからゲノム D N A を得ること、
 - F c R I I I a 受容体遺伝子、またはアミノ酸残基 1 5 8 をコード化するヌクレオチドを含むその一部を増幅すること、及び
 - 前記 F c R I I I a 受容体遺伝子の 1 5 8 位のアミノ酸残基を決定すること、
 を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 11】

F c R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基の決定が、
 - 生物学的サンプルからゲノム D N A を得ること、
 - F c R I I I a 受容体遺伝子、またはアミノ酸残基 1 5 8 をコード化するヌクレオチドを含むその一部を増幅すること、
 - 対立遺伝子特異的制限部位を導入すること、
 - 前記制限部位に特異的な酵素で核酸を消化すること、及び
 - 消化産物を分析すること、すなわち、電気泳動で、消化産物の存在が対立遺伝子の存在を示すこと、
 を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 1 2】

Fc R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基の決定が、インビトロまたはエキソピボでの、細胞または生物学的サンプルもしくは流体からの総（またはメッセンジャー）RNA 抽出、場合により c D N A 合成、特異的 F C G R I I I a オリゴヌクレオチドプライマーによる（P C R）増幅、および P C R 産物の分析を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3】

Fc R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基の決定が、Fc R I I I a 受容体ポリペプチドまたはアミノ酸残基 1 5 8 を含むその一部を配列決定する工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

被験者がヒト被験者である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5】

被験者が、腫瘍、ウイルス感染症、または同種もしくは病理学的免疫担当細胞と関連した疾患状態を有する、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

被験者が腫瘍を有し、治療用抗体処置が腫瘍負担の減少を目標とする、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

腫瘍がリンパ腫、特に N H L である、請求項 1 6 に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

抗体が I g G 1 または I g G 3 である、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

抗体が抗 C D 2 0 抗体、特にリツキシマブである、請求項 1 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、特定の治療的処置に対する被験者の応答を評価または査定するための方法および組成物に関する。より詳細には、本発明は、被験者の応答を決定する方法、または治療用抗体で処置される被験者の治療プロトコルを適合させる方法を提供する。本発明は、悪性腫瘍、特にリンパ腫の患者に使用することができ、また最高の応答者を選択しかつ/または低応答者向けに処置条件またはプロトコルを調整するのに適する。

30

【背景技術】

【0 0 0 2】

序文

ヒトにおける様々な治療方針は、治療用抗体の使用を基本とする。これは、たとえば、標的細胞、特に罹患細胞、たとえばウイルス感染細胞、腫瘍細胞または同種異系免疫担当細胞を含む他の病原細胞を著減させるために開発された治療用抗体の使用を含む。一般に、このような抗体は、I g G 種、一般に I g G 1 および I g G 3 の、モノクローナル抗体である。こうした抗体は、様々な種または起源由来の機能ドメインまたは特異性を含む、組換え抗体およびヒト化抗体であってもよい。このような治療用抗体の具体例は、ネズミ可変領域に連結したヒト 1 および 定常領域で作られるキメラ抗 - C D 2 0 I g G 1 モノクローナル抗体である、リツキシマブ（マブテラ（Mabthera）（登録商標）、リツキサン（Rituxan）（登録商標））である¹。数年間にわたって、リツキシマブは、Bリンパ増殖性悪性腫瘍、特に非ホジキンリンパ腫（N H L）に対する治療方針をかなり修正してきた。原型を保ったヒト化 I g G 1 抗体の他の例としては、B細胞悪性腫瘍の処置に使用されるアレムツズマブ（alemtuzumab）（キャンパス 1 H（Campath-1H）（登録商標））、または乳癌の処置に使用されるトラスツズマブ（trastuzumab）（ハーセプチン（Herceptin）（登録商標））などがある。開発中の治療用抗体のさらなる例は、当該技術分野で開示されている。

40

50

【0003】

これらの抗体は、特に腫瘍を処置するためのヒト治療の、新規な効果的な方法を代表するが、常に強力な効果を示すとは限らず、それらの使用は、それらに対する対象の応答を評価することにより改良することができる。たとえば、単独のまたは化学療法と併用したリツキシマブは、低中悪性度 NHL²⁻⁸ および高悪性度 NHL^{6,9} の両者の処置に有効なことが証明されていたが、低悪性度 NHL の患者の 30% ~ 50% は、リツキシマブに対する臨床応答を示さなかった^{4,5}。リンパ腫細胞上での CD20 発現レベル²、処置時における高い腫瘍負担の存在⁶ または低い血清リツキシマブ濃度² が、一部の患者でリツキシマブの効果が欠如している理由であることが示唆されてきた。しかし、処置不成功の実際の原因は、大部分は不明のままである。

10

【0004】

抗体処置に対する患者応答の評価を可能にする方法を利用できることにより、これらの製品の治療効力が大いに高められるであろう。しかし、このような治療用抗体の精確なインビボ (in vivo) 作用様式は、明白に立証されていない。事実、インビトロ (in vitro) 試験から、リツキシマブの様々な可能性のある作用様式 (抗体依存性細胞介在性細胞傷害 (ADCC)^{10,11}、補体依存性細胞傷害^{10,12,13}、アポトーシスにつながる直接情報伝達^{14,15} 等々) が示唆されるが、インビボにおけるこれらの標的細胞著滅抗体の明白な作用は、ヒトで立証されていない。さらに、ADCC は細胞内病原体および腫瘍細胞の根絶における重要なエフェクター機構であるが、ADCC の役割は未だ議論の余地がある^{12,13}。

20

【0005】

本発明は、ここで、治療用抗体に対する対象の治療的応答を査定するための新規な方法および組成物を提示する。本発明は、治療用抗体処置に対して最高の応答プロフィールを有する患者を選択する方法も提示する。本発明は、患者の応答を評価する事前工程を含む、治療用抗体で患者を処置する方法にも関する。本発明は、本発明を実施するのに適した組成物およびキットにも関する。本発明は、対象の応答を査定またはモニタリングするために、または抗体の作用様式を検証するために、臨床試験または実験環境でも使用することが可能である。

【0006】

本発明は、ある程度、対象の遺伝子型と、治療用抗体処置に反応するその能力との間の相関関係の証明に基づく。より具体的には、本発明は、FcγRIIIa 受容体の遺伝子型が、治療用抗体処置に対する対象の応答と直接的な相関関係があることを示す。

30

【0007】

3 種類の FcγR (FcγRI、FcγRII および FcγRIII) およびそれらのサブクラスは、ヒトでは、全て染色体 1 の長腕上に位置する、8 つの遺伝子によりコード化されている。これらの遺伝子の幾つかは、異なる受容体特性を有するアロタイプを生成する機能的対立遺伝子多型を示す。これらの多型は、自己免疫性疾患または感染症¹⁹⁻²¹ に対する罹病性を上昇させる遺伝因子として認定されてきた。これらの遺伝因子の 1 つは、アミノ酸 158 位にフェニルアラニン (F) またはバリン (V) のいずれかを有する FcγRIIIa をコード化する、FCGR3A における遺伝子二型性である^{22,23}。この残基は、IgG1-FcγRIII 共結晶化によって最近証明された²⁴ 通り、IgG1 の下側のヒンジ領域と直接、相互に作用する。ヒト IgG1 は、ホモ接合型 FcγRIIIa-158F 型またはヘテロ接合型ナチュラル・キラー細胞 (NK) よりホモ接合型 FcγRIIIa-158V 型 NK に、より強く結合することが明白に証明されている^{22,23}。

40

【0008】

我々は、FCGR3A 遺伝子型と、治療用抗体処置に対するインビボでの患者応答との間の、可能性がある相関関係の評価に着手した。我々の発明の根幹は、幾分は、上記遺伝子型と上記応答プロフィールとの間に非常に強い相関関係が存在し、158 位にバリン残基が存在することは、高い応答率を示すという、予期せぬ発見に由来する。より具体的には

50

、リツキシマブのみを受けており、応答率が非常に高い特殊な状況にある、以前に処置を受けていなかった濾胞性NHL患者で、FCGR3Aの遺伝子型特定を実施した⁵。FCGR2A-131H/Rは、FCGR3Aと共に染色体1q22上に共局在化し、マクロファージFcRIIa受容体をコード化するので、対照として決定した。

【0009】

以前に処置を受けていなかった濾胞性非ホジキンリンパ腫のためにリツキシマブを受けていた患者47例で、FCGR3A-158V/F遺伝子型が決定された。2ヶ月(M2)および1年(M12)に、臨床応答および分子応答を評価した。陽性の分子応答は、末梢血および骨髄の両者におけるBCL2-JH遺伝子再構成の消失として定義された。FCGR3A-158Vホモ接合型患者は21%であったが、FCGR3A-158Fホモ接合型およびヘテロ接合型患者(FCGR3A-158Fキャリアー)は、それぞれ34%および45%であった。M2およびM12における客観的応答率は、FCGR3A-158Vホモ接合型患者では100%および90%であったのに対して、FCGR3A-158Fキャリアーでは65%($p=0.02$)および51%($p=0.03$)であった。M12で、ホモ接合型FCGR3A-158V患者の5/6に陽性の分子応答が確認されたのに対して、FCGR3A-158Fキャリアーではその5/16であった($p=0.04$)。さらに、ホモ接合型FCGR3A-158V遺伝子型は、臨床応答および分子応答と関連した単一パラメーターであることが多変量解析で立証され、また低率の疾患進行度とも関連していた($p=0.05$)。

10

【0010】

発明の効果

したがって、本発明は、FCGR3A遺伝子型と、治療用抗体に対する臨床応答および分子応答との間の関連を、初めて立証するものである。したがって、本発明は、患者の応答をモニター、評価または選択するために使用することができる第1の独特のマーカーを提供する。したがって、本発明は、悪性腫瘍、ウイルス感染症または病的細胞が対象に存在することに関連した他の疾患、特に非ホジキンリンパ腫の患者の管理に、新しい薬理遺伝学的方法を導入する。

20

【0011】

本発明の目的は、対象のFCGR3A遺伝子型および/または上記被験者のFcRIIa受容体に多型が存在することをインビトロで決定することを含む、治療用抗体処置に対する被験者の応答を査定する方法にある。より具体的には、本方法は、上記対象のFCGR3A158遺伝子型をインビトロで決定することを含む。

30

【0012】

本発明のさらなる目的は、被験者のFCGR3A遺伝子型および/または上記対象のFcRIIa受容体に多型が存在することをインビトロで決定することを含む、治療用抗体処置に対する患者を選択する方法である。より具体的には、本方法は、上記被験者のFCGR3A158遺伝子型をインビトロで決定することを含む。

【0013】

本発明のもう1つの目的は、被験者のFCGR3A遺伝子型および/または上記被験者のFcRIIa受容体に多型が存在することをインビトロで決定することを含む、被験者における治療用抗体処置の効力または処置条件またはプロトコルを改良する方法である。より具体的には、本方法は、上記被験者のFCGR3A158遺伝子型をインビトロで決定することを含む。

40

【0014】

より具体的には、被験者のFCGR3A158遺伝子型をインビトロで決定することは、FcRIIa受容体の158位のアミノ酸残基(またはFCGR3A遺伝子の対応するコドン)を決定することを含み、158位のバリンが上記処置に対するより良い応答を示し、158位のフェニルアラニンが上記処置に対する低い応答を示す。

【0015】

本発明の中で、用語「治療用抗体または抗体」は、より具体的には、患者において、標的

50

細胞を著減させる役目を果たす抗体を示す。このような標的細胞の具体例には、アレルギー、自己免疫疾患、同種異系反応等々に関与する腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、同種異系細胞、病理学的免疫担当細胞（たとえば、Bリンパ球、Tリンパ球、抗原提示細胞等々）、または健康な細胞（たとえば、抗血管形成治療方針における内皮細胞）さえも含まれる。本発明の脈絡の中で最も好ましい標的細胞は、腫瘍細胞およびウイルス感染細胞である。治療用抗体は、たとえば、特に抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）により、細胞障害作用または細胞融解を仲介することが可能である。ADCCは、IgG感作抗原をFcR担持細胞障害性細胞に連結し、細胞活性化機構を始動させる機能を有する、IgGのFc部分（FcR）に対する白血球受容体を必要とする。この作用機序は、ヒトでは、インビボで立証されていないが、このような標的細胞除去治療用抗体の効力の説明となる。治療用抗体は、ポリクローナルによってもよく、好ましくは、モノクローナルによってもよい。治療用抗体は、ハイブリドーマ、または所望の可変領域および定常領域を発現するように操作された組換え細胞により産生することが可能である。抗体は、一本鎖抗体であってもよく、または抗原特異性および下側のヒンジ領域を保持する他の抗体誘導體またはその変異体であってもよい。これらは、多機能抗体、組換え抗体、ScFv、人化抗体、またはそれらの変異体であってもよい。治療用抗体は、表面抗原、たとえば、膜抗原に特異的である。最も好ましい治療用抗体は、腫瘍抗原（たとえば、腫瘍細胞に特異的に発現される分子）、たとえば、CD20、CD52、ErbB2（またはHER2/Neu）、CD33、CD22、CD25、MUC-1、CEA、KDR、aV₃等々、特にリンパ腫抗原（たとえば、CD20）に特異的である。治療用抗体は、好ましくはIgG1またはIgG3であり、より好ましくはIgG1である。

10

20

【0016】

本発明の治療用抗体の代表例は、リツキシマブ、アレムツズマブ（alemtuzumab）およびトラスツズマブ（trastuzumab）である。このような抗体は、ヒト対象での使用に関して認可された臨床プロトコールに従って使用することができる。治療用抗体のさらなる具体例としては、たとえば、下表に記載の通り、エブラツズマブ（epratuzumab）、バシリキシマブ、ダシリツマブ、セツキシマブ、ラベツズマブ（labetuzumab）、セビルマブ（sevirumab）、ツブリマブ（tuvurimab）、パリピズマブ（palivizumab）、インフリキシマブ、オマリズマブ、エファリズマブ、ナタリズマブ（natalizumab）、クレノリキシマブ等々が挙げられる：

30

【0017】

【表1】

Ab特異性	DCI	商用名	代表的な適応症
抗CD20	リツキシマブ	マブテラ (MabThera (登録商標)) リツキサン (Rituxan (登録商標))	LNH B
抗CD52	アレムツズマブ (alemtuzumab)	キャンパス-1H (CAMPATH-1H (登録商標))	LLC, 同種移植片
抗CD33		ザミル (Zamyl (商標))	急性骨髄性白血病
抗HLA-DR		レミトゲン (Remitogen (商標))	LNH B
抗CD22	エプラツズマブ (epratuzumab)	リンフォサイド (LymphoCide (商標))	LNH B
抗erbB2 (HER-2/neu)	トラスツズマブ (trastuzumab)	ハーセプチン (Herceptin (登録商標))	転移性乳癌
抗EGFR (HER-1, erbB1)	セツキシマブ		ORLおよび結腸直腸癌
抗MUC-1		テレックス Therex (登録商標)	乳癌および上皮癌
抗CEA	ラベツズマブ (labetuzumab)	CEAサイド (CEA-Cide (商標))	
抗 $\alpha V \beta 3$		ビタキシン (Vitaxin)	癌(抗血管形成)
抗KDR (VEGFR2)			癌(抗血管形成)
抗-VRS 融合タンパク質	パリビズマブ (palivizumab)	シナジス (Synagis (登録商標))	ウイルス性疾患
Idem		ヌマックス (Numax (商標))	Idem
CMV	セビルマブ (sevirumab)	プロトビル (Protovir)	CMV感染症
HBs	ツビルマブ	オスタビル (Ostavir (商標))	B型肝炎
抗CD25	バシリキシマブ	シムレクト (Simulect (登録商標))	予防/処置 同種移植片拒絶
抗CD25	ダシリツマブ	ゼナパクス (Zenapax (登録商標))	予防/処置 同種移植片拒絶
抗TNF- α	インフリキシマブ	レミケード (Remicade (商標))	クローン病, 多発性関節リウマチ
抗IgE	オマリズマブ	キソレア (Xolair (商標))	喘息
抗インテグリン αL (CD11a, LFA-1)	エファリズマブ	キサリム (Xanelim (商標))	乾癬
抗CD4	ケリキシマブ (keliximab)		
抗CD2	シプリツマブ (siplizumab)		
抗CD64			貧血
抗CD147			GvH
抗インテグリン $\alpha 4$ ($\alpha 4 \beta 1 - \alpha 4 \beta 7$)	ナタリズマブ (natalizumab)	アンテグレン (Antegren (登録商標))	硬化症, クローン
抗インテグリン $\beta 7$			クローン, RCH
抗CD4*	クレノリキシマブ		

10

20

30

40

【0018】

本発明の脈絡の中で、対象または患者は、哺乳動物対象または患者、より好ましくはヒト対象または患者を含む。

【0019】

50

本発明によれば、用語 F C G R 3 A 遺伝子は、対象における、F c R I I I a ポリペプチドをコードする核酸分子を指す。この用語は、特に、ゲノム DNA、c DNA、RNA (プレ-r RNA、メッセンジャー RNA 等々) 等々、またはそれらの配列の全部または一部を含む合成核酸を含む。合成核酸は、RNA から調製され、たとえば 1 つ以上のイントロン、または 1 つ以上の突然変異を含む部分として、F C G R 3 A ゲノム DNA の配列の少なくとも一部を含む、c DNA を含む。最も好ましくは、用語 F C G R 3 A 遺伝子は、ゲノム DNA、c DNA または mRNA、一般に、ゲノム DNA または mRNA を指す。F C G R 3 A 遺伝子は、好ましくは、ヒト F C G R I I I a 遺伝子または核酸である、すなわち、ヒト F c R I I I a ポリペプチドの配列を有する F c R I I I a ポリペプチドの全部または一部をコードする核酸の配列を含む。このような核酸は、既知の技術により単離または調製することができる。たとえば、このような核酸は、ハイブリダイゼーション技術で、遺伝子ライブラリーまたは遺伝子バンクから単離することが可能である。また、このような核酸は、遺伝学的または化学的に合成することもできる。ヒト F C G R I I I a 遺伝子の遺伝子編成を図 2 に示す。ヒト F c R I I I a のアミノ酸配列は、図 3 に示す。アミノ酸 158 位は、成熟タンパク質の残基 1 から番号が付けられている。アミノ酸 158 位は、シグナルペプチドを有するプレタンパク質の残基 176 に対応する。野生型 F C G R 3 A 遺伝子の配列を、図 4 に示す (部分配列については、ジーンバンク (Genbank) 寄託番号 A L 5 9 0 3 8 5 または N M _ 0 0 0 5 6 9 を参照されたい)。

10

【0020】

本発明の脈絡の中で、一部または部分は、少なくとも 3 ヌクレオチド (たとえば、コドン)、好ましくは少なくとも 9 ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも 15 ヌクレオチドを意味し、1000 ヌクレオチドも含むことができる。このような部分は、当該技術分野で周知の技術、たとえば、酵素的および/または化学的切断、化学合成またはそれらの組合せによって得ることができる。明確にするために、アミノ酸 158 位をコード化する F C G R 3 A 遺伝子の一部の配列を以下に示す：

20

【0021】

【表 2】

cDNA	540	550	560	570	580
ゲノム DNA	4970	4980	4990	5000.	
158F 対立遺伝子	tcctacttctgcagggggcttttttgggagtaaaaatgtgtcttca				
	S Y F C R G L <u>F</u> G S K N V S S				
158V 対立遺伝子	tcctacttctgcagggggcttgggagtaaaaatgtgtcttca				
	S Y F C R G L <u>V</u> G S K N V S S				

30

【0022】

上述の通り、本発明は、上記対象の F C G R 3 A 158 遺伝子型をインビトロで決定する方法を含む。これは、より詳細には、F c R I I I a ポリペプチドの 158 位に存在する (またはコード化される) アミノ酸残基の性質を決定することを含む。

【0023】

上記対象における F C G R 3 A 遺伝子または対応するポリペプチドの遺伝子型特定は、コーディング核酸分子またはコード化されたポリペプチドの分析を含む、様々な技術で達成することが可能である。分析は、配列決定、移動、電気泳動、免疫技術、増幅、特異的消化またはハイブリダイゼーション等々を含んでも良い。

40

【0024】

ある特定の実施形態において、F c R I I I a 受容体の 158 位のアミノ酸残基の決定は、F C G R 3 A 受容体遺伝子または RNA またはアミノ酸残基 158 をコード化するヌクレオチドを含むその一部を配列決定する工程を含む。

【0025】

他の特定の実施形態において、F c R I I I a 受容体の 158 位のアミノ酸残基決定は、F C G R 3 A 受容体遺伝子または RNA またはアミノ酸残基 158 をコード化するヌク

50

レオチドを含むその一部を増幅する工程を含む。増幅は、たとえば、従来の方法およびプライマーを使用して、単純PCR、RT-PCRまたはネステッドPCRのようなポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で、実施することが可能である。

【0026】

この点に関して、本発明で使用するための増幅プライマーは、より好ましくは、約50未満のヌクレオチド、さらにより好ましくは、30未満のヌクレオチド、一般に約25未満または20未満のヌクレオチドを含む。また、好ましいプライマーは、特異性を確実にするために、通常は少なくとも5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも8ヌクレオチドを含む。プライマーの配列は、FCGR3A遺伝子の配列に基づいて、好ましくは、それと共に完全な補足性を与えるように調製することができる。放射能、蛍光、酵素的、化学的等々の既知の技術を使用して、プローブを標識することが可能である。この標識は、たとえばホスファ-32(Phosphor 32)、ビオチン(16-dUTP)、ジゴキシゲニン(11-dUTP)を使用することができる。当然のことながら、本発明は、特定の検出または標識技術に束縛または限定されるものではない。以下に開示する通り、プライマーは、増幅された核酸に対立遺伝子特異的制限部位を導入するための、制限部位をさらに含むことができる。

10

【0027】

このような増幅プライマーの具体例は、たとえば、配列番号1~4である。

【0028】

当然のことながら、当業者は、他のプライマー、たとえば増幅工程で使用するためのFCGR3A遺伝子の断片、および特に順方向配列および逆方向配列を含む1対のプライマーであって、FCGR3A遺伝子のある領域とハイブリダイズし、コドン158を含むFCGR3A遺伝子の少なくとも一部の増幅を可能にする上記対の上記プライマーをデザインすることができる。好ましい実施形態において、各対のプライマーは、コドン158と相補的であり、コドン158と重複し、かつ158V(gtt)と158F(ttt)との間の判別を可能にする、少なくとも1つのプライマーを含む。当業者は、周知の一般知識および明細書に記載の指針に基づいて、増幅条件も調節することができる。

20

【0029】

ある特定の実施形態において、本発明の方法は、このように、細胞または生物学的サンプル中の、特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使用したFCGR3a mRNAまたはgDNAの一部のPCR増幅であって、上記部分がコドン158を含むPCR増幅と、たとえば、電気泳動、特に変性剤ゲル濃度勾配電気泳動(Denaturing Gel Gradient Electrophoresis(DGGE))によるPCR産物の直接または間接的分析とを含む。

30

【0030】

他の特定の実施形態において、FcRIIIa受容体の158位のアミノ酸残基の決定は、対立遺伝子特異的制限酵素消化の工程を含む。これは、ある特定の対立遺伝子(たとえば、158V対立遺伝子)のコード配列を切断し、他の対立遺伝子(たとえば、158F対立遺伝子、またはその逆)を切断しない制限酵素を使用することにより実施できる。このような対立遺伝子特異的制限酵素部位が配列中に天然に存在しない場合、このような部位を配列中に含む対立遺伝子特異的増幅プライマーを用いて核酸を増幅することにより、人工的にその中に導入することができる。増幅時の、対立遺伝子の存在の決定は、たとえば、電気泳動で、消化産物を分析することにより実行することが可能である。この技術は、選択された対立遺伝子に関して、ホモ接合型またはヘテロ接合型である対象の判別を可能にする。

40

【0031】

対立遺伝子特異的増幅プライマーの例としては、たとえば、配列番号3などが挙げられる。配列番号3は、N1am部位の第1の3ヌクレオチドを導入する。(5'-CATG-3')。Gの後ろで切断が起きる。このプライマーは、増幅産物の電気泳動分析を容易にするために、プライマーを伸長する、FCGR3Aとハイブリダイズしない11塩基と、制限部位をもたらすヌクレオチド31(A)を除き、FCGR3Aにハイブリダイズする21塩基とを含む。

50

【0032】

さらなる特定の実施形態において、Fc RIIIIa受容体の158位のアミノ酸残基の決定は、FCGR3A受容体遺伝子またはRNAまたはアミノ酸残基158をコード化するヌクレオチドを含むその一部と、遺伝子型バリンまたはフェニルアラニンに特異的な核酸プローブとのハイブリダイゼーション工程、およびハイブリッドの有無の決定を含む。

【0033】

当然のことながら、上記の方法は、単独または様々な組合せのいずれでも使用することができる。さらに、FCGR3A158遺伝子型を決定するための、当業者に周知の他の技術、たとえば増幅（たとえばPCR）、特異的プライマー、特異的プローブ、移動等々を使用する方法、一般的な定量的RT-PCR、LCR（リガーゼ連鎖反応）、TMA（転写介在増幅）、PCE（酵素増幅イムノアッセイ）およびbDNA（分岐DNAシグナル増幅）アッセイを使用することが可能である。

10

【0034】

本発明の好ましい実施形態において、Fc RIIIIa受容体の158位のアミノ酸残基の決定は、以下を含む：

- 生体サンプルからゲノムDNAを得ること、
- Fc RIIIIa受容体遺伝子、またはアミノ酸残基158をコード化するヌクレオチドを含むその一部を増幅すること、および
- 上記Fc RIIIIa受容体遺伝子の158位のアミノ酸残基を決定すること。

【0035】

増幅は、上述の特異的プライマーを使用して、ネステッド（nested）PCRを含むPCRのような特定の技術で遂行することができる。最も好ましい実施形態において、158位のアミノ酸残基の決定は、対立遺伝子特異的制限酵素消化により実施される。その場合、本方法は以下を含む。

20

- 生体サンプルからゲノムDNAを得ること、
- Fc RIIIIa受容体遺伝子、またはアミノ酸残基158をコード化するヌクレオチドを含むその一部を増幅すること、
- 対立遺伝子特異的制限部位を導入すること、
- 上記制限部位に特異的な酵素で核酸を消化すること、および
- 消化産物を分析すること、すなわち、電気泳動で、消化産物の存在は対立遺伝子の存在を示す分析。

30

【0036】

他の特定の実施形態において、遺伝子型は以下を含む方法で決定される：インビトロまたはエキソビボ（ex vivo）での、細胞または生物学的サンプルまたは流体からの総（またはメッセンジャー）RNA抽出、場合によりcDNA合成、FCGR3A-特異的オリゴヌクレオチドプライマーによる（PCR）増幅、およびPCR産物の分析。

【0037】

本発明の方法は、Fc RIIIIa受容体ポリペプチド、またはアミノ酸残基158を含むその一部を配列決定することによって、またはFc RIIIIaポリペプチドの各対立遺伝子に特異的な試薬を使用することによって、Fc RIIIIa受容体の158位のアミノ酸残基を直接決定することも含んでもよい。これは、イムノアッセイ（ELISA、EIA、RIA等々）を含む、当業者に周知の適当な技術で決定することができる。これは、Fc RIIIIa 158ポリペプチドに特異的な親和性試薬、より好ましくは抗体またはその断片または誘導体を使用して、成すことができる。ある特定の実施形態において、Fc RIIIIa 158ポリペプチドは、Fc RIIIIa 158VとFc RIIIIa 158Fとを判別する抗Fc RIIIIa 158抗体（またはその断片）で、より好ましくはモノクローナル抗体で、検出される。抗体（または親和性試薬）は、任意の適当な方法（放射能、蛍光、酵素的、化学的等々）で標識することが可能である。あるいは、たとえば、抗Fc RIIIIa 158抗体に結合する、標識された、第2の試薬（たとえば、抗体）を使用して、Fc RIIIIa 158抗体免疫複合体を明らかに

40

50

(かつ/または定量化)してもよい。

【0038】

上記の方法は、被験者の生体サンプル中のFCGR3A158遺伝子型特定に基づく。生体サンプルは、FCGR3A遺伝子または対応するポリペプチドを含む任意のサンプル、特に血液、骨髄、リンパ節または流体、特に血液またはFCGR3A158遺伝子またはポリペプチドを含む尿であってもよい。さらに、FCGR3A158遺伝子は一般に上述の細胞、組織または流体の中に存在するため、本発明の方法は通常、遺伝子またはポリペプチドを検出または分析に使用できるように処理したサンプルを使用する。処理は、従来の固定技術、細胞融解(機械的または化学的または物理的)、または、たとえば、免疫組織学または生物学で使用される他の従来の方法を含んでもよい。

10

【0039】

本方法は、抗腫瘍治療用抗体処置に対する対象の応答を決定するのに特に適する。この点に関して、ある特定の実施形態において、対象は腫瘍を有し、治療用抗体処置は腫瘍負担の減少を目標とし、特に腫瘍細胞の著減を目標とする。より好ましくは、腫瘍はリンパ腫、たとえば、より好ましくはBリンパ腫、特にNHLである。上述の通り、抗体は好ましくはIgG1またはIgG3、特に抗CD20 IgG1またはIgG3であり、さらに好ましくはヒト化抗体、たとえば、リツキシマブである。

【0040】

本発明は、二重特異性抗体にも関し、上記二重特異性抗体がCD16および腫瘍抗原、たとえば、CD20抗原を特異的に結合することを特徴とする。本発明は、このような二重特異性抗体および薬学的に許容し得る賦形剤またはアジュバントを含む医薬組成物も包含する。

20

【0041】

本発明のさらなる態様および利点は、本願を説明するものとみなすべきであり、本願をの範囲を限定するものとみなしてはならない、以下の実施例で開示する。

【実施例】

【0042】

材料および方法

患者および処置

臨床治験デザイン、適格基準およびエンドポイント査定は、既報の通りである⁵。簡単に記載すると、REAL分類²⁶による、以前に処置を受けていない濾胞性CD20陽性NHLを有していた場合、患者は、本試験に含めるのに適格であった。患者は、Ann-Arbor分類による、ステージII~IVの疾患および少なくとも1つの測定可能な疾患部位を呈することが必要であった。全ての患者が、GELF基準²⁷による低い腫瘍負担を有することが必要であった。合計4回の、用量375 mg/m²のリツキシマブ(フランスのヌイにあるロシュ(Roche, Neuilly, France))を静脈内注入で投与した(1、8、15、22日)。注入および有害事象の管理は、既報の通りである⁵。試験プロトコールは倫理委員会に承認され、全ての患者がインフォームドコンセントを与えた。

30

【0043】

モニタリングおよびエンドポイント

ベースライン評価は、臨床検査、胸部X線、胸部、腹部および骨盤のコンピューター断層撮影(CT)、および片側の骨髄生検を含んでいた。含まれた患者の全CTスキャンを再吟味した、独立した放射線医師団が、応答を査定した。一次効力エンドポイントは、客観的応答率、すなわち、国際専門委員会が最近提唱した基準による、完全寛解(CR)、未確認のCR(CRu)または部分的応答(PR)のいずれかを達成している患者の比率であった²⁸。臨床応答は、50日および78日に評価した。最大の応答のみを考慮に入れ、その査定時点をM2と名づけた。1年(M12)における進行について、全患者を評価した。M2に骨髄浸潤が消失し、かつM12に、骨髄にリンパ腫細胞が再発したCRまたはCRuの患者を、「進行性」と考え; M2に骨髄生検陰性であり、かつM12に生検陽性であったPRの患者を、PR状態であると考えた。診断時に得たリンパ節、および診断時

40

50

、M2およびM12の、末梢血および骨髄の両者に対して、BCL2-JH遺伝子再構成の分子分析を、前述⁵の通りに、PCRにより実施した。

【0044】

FCGR3A-158V/F遺伝子型特定

臨床治験に含まれた患者50例のうち1例を、組織学的再吟味後に除外し、他の2例について、DNAを入手できなかった。したがって、患者47例を、FCGR3A遺伝子型分析に使用できた。全サンプルを同一試験室で分析し、交差汚染を回避するための予防措置を含む標準手順を使用して、DNAを抽出した。DNAを、末梢血(n=43)、骨髄(n=3)またはリンパ節(n=1)から単離した。Koeneら²²による記載通りに、ネステッドPCRに続いて対立遺伝子特異的制限酵素消化を用いて、FCGR3A-158V/F多型の遺伝子型特定を実施した。簡単に記載すると、2種のFCGR3A特異的プライマー(5'-ATATTTACAGAATGGCACAGG-3'、配列番号1; 5'-GACTTGGTACCCAGGTGAA-3'、配列番号2)(フランスのLesUlisにあるユーロバイオ(Eurobio, Les Ulis, France))を使用して、多型部位を含む1.2kbの断片を増幅した。製造会社の推奨通り、ゲノムDNA 1.25μg、各プライマー200ng、200μmol/Lの各dNTP(リトアニアのピリニウスにあるMBI・ファーマentas(MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania))および1UのTaq DNAポリメラーゼ(フランスのシャルボニエールにあるプロメガ(Promega, Charbonniere, France))を用いて、PCRアッセイを実施した。この第1のPCRは、95℃にて10分、次いで35サイクル(それぞれ、95℃ 1分間、57℃ 1.5分間、72℃ 1.5分間の3工程からなる)および完全な伸張を達成するための72℃にて8分で構成されていた。第2のPCRは、94bpの断片を増幅し、FCGR3A-158V対立遺伝子のみをNlaIII制限部位を作るプライマー(5'-ATCAGATTTCGATCCTACTTCTGCAGGGGGCAT-3'、配列番号3; 5'-ACGTGCTGAGCTTGAGTGATGGTGATGTTTCCAC-3'、配列番号4)(ユーロバイオ(Eurobio))を使用した。このネステッドPCRは、増幅されたDNA 1μl、各プライマー150ng、200μmol/Lの各dNTPおよび1UのTaq DNAポリメラーゼで実施した。第1のサイクルは、95℃にて5分、次いで35サイクル(それぞれ、95℃ 1分間、64℃ 1分間、72℃ 1分間の3工程からなる)および完全な伸張を達成するための72℃にて9.5分で構成されていた。次いで、増幅されたDNA(10μl)を、10UのNlaIII(イギリスのヒッチンにあるニュー・イングランド・バイオラブズ(New England Biolabs, Hitchin, England))で、37℃にて12時間消化し、8%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で分離した。臭化エチジウムで染色した後、DNAバンドをUV光で可視化した。ホモ接合型FCGR3A-158F患者の場合、唯一の未消化バンド(94bp)が見られた。ヘテロ接合型患者では3つのバンド(94bp、61bpおよび33bp)が見られたが、ホモ接合型FCGR3A-158V患者では、2つの消化されたバンド(61bpおよび33bp)が得られただけであった。

【0045】

FCGR2A-131H/R遺伝子型特定

Liangら²⁸に従って、PCRに続く対立遺伝子特異的制限酵素消化により、FCGR2A-131H/Rの遺伝子型特定を実施した。R対立遺伝子の場合には、BstUI制限部位を作るために、センスプライマー(5'-GGAAAATCCCAAGAAATTCCTCGC-3'、配列番号5)(ユーロバイオ(Eurobio))を修飾しておき、内部コントロールの役目をする第2のBstUI制限部位を担持するために、アンチセンスプライマー(5'-CAACAGCCTGACTACCTATTACGCGGG-3'、配列ID番号6)(ユーロバイオ(Eurobio))を修飾しておいた。PCR増幅は、ゲノムDNA 1.25μg、各プライマー170ng、200μmol/Lの各dNTP、0.5UのTaq DNAポリメラーゼ、および製造会社の緩衝液を用いて、50μl反応で実施した。第1のサイクルは、94℃にて3分に続いて35サイクル(それぞれ、94℃にて15秒間、55℃ 30秒間、72℃ 40秒間の3工程からなる)および伸張を完成するための

72にて7分で構成されていた。次いで、増幅されたDNA(7 μ l)を、20UのBstUI(ニュー・イングランド・バイオラブズ(MewEnglandBiolabs))で、60にて12時間消化した。FCGR3A遺伝子型特定に関する記載の通りに、さらなる分析を実施した。FCGR2A-131Hおよび-131R対立遺伝子は、それぞれ337bpおよび316bpのDNA断片として、可視化された。

【0046】

統計解析

適切な場合、二乗検定またはフィッシャーの正確確率検定(Fisher's exact test)を使用して、異なる遺伝子型群の患者の、臨床上的特徴および生物学的特徴ならびに臨床応答および分子応答を比較した。診断時の性別、年齢、(>または60才)、冒された節外部位数(2または<2)、骨髓関与、BCL2-JH構成状態およびFCGR3A遺伝子型を含むロジスティック回帰分析を使用して、臨床応答および分子応答に影響する予後の独立変数を同定した。 Kaplan及マイヤー(Kaplan and Meier)²⁹の方法に従って無進行性生存率を算出し、処置開始から進行/再発または死亡までを測定した。ログランク(log-rank)検定を使用して、FCGR3A遺伝子型による無進行性生存率の比較を実施した。P<0.05を、統計学的に有意であると考えた。

10

【0047】

結果

臨床応答

FCGR3A-158V/F多型について試験した患者49例のうち10例(20%)および17例(35%)が、それぞれ、ホモ接合型FCGR3A-158Vおよびホモ接合型FCGR3A-158Fであり、22例(45%)がヘテロ接合型であった。診断時の、性別、病期、骨髓関与、冒された節外部位数または末梢血および骨髓におけるBCL2-JH再構成の存在に関して、3つのグループに差はなかった(表1)。ホモ接合型FCGR3A-158V患者を、FCGR3A-158Fキャリアー(FCGR3A-158Fホモ接合型およびヘテロ接合型患者)と比較したとき、またはホモ接合型FCGR3A-158F患者を、FCGR3A-158Vキャリアー(FCGR3A-158Vホモ接合型およびヘテロ接合型患者)と比較したとき、差は認められなかった。FCGR3A-158Vホモ接合型、FCGR3A-158Fホモ接合型およびヘテロ接合型患者の、M2における客観的応答率は、それぞれ100%(CR+CRu=40%)、70%(CR+CRu=29%)および64%(CR+CRu=18%)であった(P=0.09)。FCGR3A-158Vホモ接合型患者とFCGR3A-158Fキャリアーとの間で、客観的応答率に有意差が認められ、この後者のグループの客観的応答率は67%(CR+CRu=23%)であった(相対危険度=1.5;95%CI、1.2~1.9;P=0.03)(表2)。FCGR3A-158Fホモ接合型患者とFCGR3A-158Vキャリアーとの間に、差は認められなかった。M12における、FCGR3A-158Vホモ接合型、FCGR3A-158Fホモ接合型およびヘテロ接合型患者の客観的応答率は、それぞれ、90%(CR+CRu=70%)、59%(CR+CRu=35%)および45%(CR+CRu=32%)であった(P=0.06)。処置後1年に、FCGR3A-158Vホモ接合型群とFCGR3A-158Fキャリアーとの間で、客観的応答率に依然として差が存在し、この後者のグループでは、客観的応答率は51%(CR+CRu=33%)であった(相対危険度=1.7;95%CI、1.2~2.5;P=0.03)。ロジスティック回帰分析から、ホモ接合型FCGR3A-158V遺伝子型は、M2(P=0.02)でもM12(P=0.01)でも、臨床応答に関する唯一の予測因子であることが分かった。3年における無進行性生存率(平均フォローアップ:35ヵ月;31-41)(図1)は、FCGR3A-158Vホモ接合型患者で56%であり、FCGR3A-158Fキャリアー(ns)では35%であった。FCGR2A-131H/R多型に関して分析した患者45例のうち、9例(20%)および13例(29%)が、それぞれFCGR2A-131RおよびFCGR2A-131Hに関してホモ接合型であり、23(51%)例がヘテロ接合型であった。これらの3グループで、またはホモ接合型F

20

30

40

50

CGR2A-131H患者とFCGR2A-131Rキャリアーで、またはホモ接合型FCGR2A-131R患者とFCGR2A-131Hキャリアーで、包含時の特徴またはリツキシマブ処置に対する臨床応答に、差はなかった(データ示さず)。

【0048】

分子応答

診断時に、患者30例(64%)で、BCL2-JH再構成が末梢血および骨髄の両者で検出されたため、さらなるフォローアップが可能になった。M2およびM12において、患者25例(FCGR3A-158Vホモ接合型患者6例およびFCGR3A-158Fキャリアー19例)および患者23例(FCGR3A-158Vホモ接合型患者6例およびFCGR3A-158Fキャリアー17例)を、末梢血および骨髄の両者におけるBCL2-JH再構成について分析した(表3)。M2において、FCGR3A-158Vホモ接合型患者の3/6、およびFCGR3A-158Fキャリアー(ns)の5/19で、BCL2-JH再構成の浄化が確認された。対照的に、M12におけるBCL2-JH再構成浄化率は、FCGR3A-158Fキャリアー(5/17)よりFCGR3A-158Vホモ接合型患者(5/6)で高かった(相対危険度=2.8; 95%CI、1.2~6.4; P=0.03)。FCGR3A-158Vホモ接合型遺伝子型は、M12における、BCL2-JH再構成浄化を示すより大きい確率と関連した唯一の因子である(P=0.04)ことが、ロジスティック回帰分析から分かった。M12において、末梢血および骨髄で、依然としてBCL2-JH再構成を呈していたこのホモ接合型FCGR3A-158V患者1例は、リツキシマブ処置の23ヵ月後にCRであった。対照的に、M2およびM12における分子応答は、FCGR2A-131H/R多型による影響を受けなかった(データ示さず)。

10

20

【0049】

考察

B細胞リンパ増殖性悪性腫瘍でリツキシマブの使用が増加しているため、処置不成功およびリツキシマブの作用様式について理解を深めることが必要である。この点に関して、我々は、明確な臨床上的および検査室的特徴を有する濾胞性NHL患者でFCGR3Aを遺伝子型特定し、リツキシマブのみを投与した⁵。特に、診断時およびフォローアップの間に、この試験に含まれた全ての患者が、低い腫瘍負担NHLおよびBCL2-JH a tの分子分析を示した。この集団におけるFCGR3A対立遺伝子頻度は、一般的な白人集団のものに似ていた^{23,24}。我々の結果から、FCGR3A遺伝子型と、リツキシマブに対する応答との間の関連が分かる。事実、集団の5分の1を占めるホモ接合型FCGR3A-158V患者は臨床応答を経験する確率が大きく、M2およびM12に、それぞれ、100%および90%の客観的応答率を示した。さらに、BCL2-JH再構成について分析を実施したFCGR3A-158Vホモ接合型患者6例中5例が、M12に分子応答を示したのに対して、FCGR3A-158Fキャリアーでは17例中5例であった。FCGR3A-158Vホモ接合性は、臨床応答および分子応答と関連した唯一の因子であった。しかし、これらのより高い臨床応答および分子応答は、ホモ接合型FCGR3A-158V患者の無進行性生存率を有意に改善するためには、未だ不十分であった。

30

40

【0050】

これは、リツキシマブに対する臨床応答および分子応答の両者に関する、容易に査定できる遺伝学的予測因子の第1報である。しかし、遺伝学的関連では、FcRIIIaを含むリツキシマブの作用様式が証明されていない。FCGR3A遺伝子型と、リツキシマブに対する応答との間で認められた関連は、連鎖不平衡にある別の遺伝子多型に起因するのかもしれない。FCGR3Aは、3つのFCGR2遺伝子およびFCGR3Bを含む染色体1の長腕上に位置する³²ため、これらの多型は、3対立遺伝子FCGR3A-48L/H/R多型³¹のようにFCGR3Aそれ自体に位置することも、他のFcR-コード化遺伝子に位置することもあり得る。FCGR2AとFCGR3Bとの間で連鎖不平衡が報告されている³³。しかし、FCGR2A-131H/R多型はリツキシマブに対するより良好な応答と関連していなかったことにより、FCGR3Aに非常に近い遺伝子またはFCG

50

R3A それ自体が、直接関与することが強く裏付けられる。

【0051】

幾つかの *in vitro* 試験は、FCGR3A-158V/F多型の直接関与を支持して論じている。第1に、Koeneら²³は、先に報告した、3つのFcRIIIa-48L/H/Rアイソフォーム³¹間のIgG結合の差は、連結したFcRIIIa-158V/F多型の結果であることを示し、幾つかのチームは、FCGR3A-158Vアロタイプに関して個々のホモ接合型に由来するNK細胞は、ヒト複合IgG1に対してより高いアフィニティを有し、IgG1感作標的に対して、より細胞障害性であることを証明した^{23,24,34}。我々の今回の結果は、FCGR3A-158Vホモ接合型患者は、たぶん、そのキメラ・ヒトIgG1がFcRIIIaにより良くインビボ結合するため、リツキシマブに対して、より良好な応答を示すことを実証するものである。第2に、NK細胞-およびマクロファージ介在ADCCは、インビトロ^{8,11,12}ならびにネズミ・モデルのインビボにおいて¹⁷⁻¹⁹抗CD20抗体により誘発される機構の1つであり、リツキシマブ介在アポトーシスは、FcR発現細胞により増幅される^{15,16}。全てのFcRの中で、FcRIIIaはNK細胞およびマクロファージに共有される唯一の受容体である。そこで我々は、FCGR3A-158V患者は、リンパ腫細胞に対してより良好なADCC活性を有するため、リツキシマブに対してより良好な応答を示すという仮説を立てた。FCGR3A-158Fキャリアーの50%より多くが、それでもなおリツキシマブに対して臨床応答を示すという事実は、低いものの、それでも十分なADCC活性によって、または、より公算が高い、*in vivo*で機能する他の機構、たとえば、補体依存性細胞傷害、補体依存性細胞介在性細胞傷害^{11,13,14}および/またはアポトーシス^{15,16}によって、説明されるであろう。ADCCは、FCGR3A-158Vホモ接合型患者で特に有効なリツキシマブに対する応答における、補足的な機構と考えられる。

10

20

30

【0052】

FCGR3Aヘテロ接合型ドナー由来のNK細胞へのIgG1結合レベルを有する「遺伝子用量」効果は、FCGR3A-158VおよびFCGR3A-158Fホモ接合体²³からのNK細胞で見られたものの中にあることがインビトロ試験から示唆される。しかし、ヘテロ接合型患者の臨床応答は、FCGR3A-158Fホモ接合型患者のものに似ているようである。より大きい患者群で実施されるさらなる試験は、インビボ「遺伝子用量」効果に不利な結論を下さなければならないであろう。

【0053】

FcRIIIaは、リツキシマブに対するより良好な応答と強く関連しているため、CD20抗原を標的とする新薬を開発する際に、考慮に入れる必要がある。たとえば、B細胞リンパ腫に罹ったFCGR3A-158F-キャリアー患者を処置するために、遺伝子操作されたリツキシマブを使用できる可能性がある。事実、IgG1の下側のヒンジ領域の様々な残基を修飾することによって、Shieldsらは、最近、天然のIgG1より強力にFcRIIIa-158Fに結合するIgG1突然変異体を得た³⁴。

【0054】

総合すると、これらの結果から、患者FCGR3A遺伝子型の事前決定に基づいて、Bリンパ増殖性疾患に対する新たな治療方針を設定することが可能になる。この多型は、黒人および日本人を含む様々な民族集団で同一分布を有するため、このような方針は、世界的に応用することが可能である^{23,35,36}。さらに、このような薬理遺伝学的方法は、B細胞悪性腫瘍の処置に使用される他の原型を保ったヒト化IgG1抗体、たとえば、キャンパス1H (Campath-1H)、または他の悪性腫瘍の処置に使用されるもの、たとえば、トラスツマブ (trastuzumab) (ハーセプチン (Herceptin) (登録商標)) にも応用することができる。さらに一般的には、この方法は、標的細胞を激減させるために開発された、他の原型を保った(ヒト化)治療用(IgG1)抗体に応用することが可能である。

40

【0055】

【表3】

表1. FCGR3A-158V/F多型による患者の特徴

		FCGR3A- 158VV	FCGR3A- 158VF	FCGR3A- 158FF	p*	
n (%)		10 (20%)	22 (45%)	17 (35%)		
性別						
	M	3	12	10	ns	10
	F	7	10	7		
病期						
	II-III	3	6	6	ns	
	IV	7	16	11		
骨髄関与						
	あり	7	16	9	ns	
	なし	3	6	8		
冒された節外部位						
	< 2	8	20	13	ns	20
	≥ 2	2	2	4		
末梢血におけるBCL2-JH再構成		8	12	11	ns	
骨髄におけるBCL2-JH再構成		7	12	11	ns	

*ホモ接合型FCGR3A-158V患者対FCGR3A-158Fキャリアーの3グループおよび
ホモ接合型FCGR3A-158F患者対FCGR3A-158Vキャリアーの3グループの統計学的比較

【 0 0 5 6 】

【 表 4 】

30

表2. FCGR3A-158V/F多型による、リツキシマブに対する臨床応答

	<i>FCGR3A-158VV</i>	<i>FCGR3A-158F</i> キャリアー	<i>p</i> *
M2における臨床応答			
客観的応答	10 (100%)	26 (67%)	0.03
完全寛解	3	7	
未確定の完全寛解	1	2	10
部分的応答	6	17	
無応答	0 (0%)	13 (33%)	
無変化	0	10	
進行性疾患	0	3	
M12における臨床応答			
客観的応答	9 (90%)	20 (51%)	0.03
完全寛解	6	11	20
未確定の完全寛解	1	2	
部分的応答	2	7	
無応答	1 (10%)	19 (49%)	
無変化	0	2	
進行性疾患	1	17	

* ホモ接合型FCGR3A-158V患者対FCGR3A-158Fキャリアーの統計学的比較。
3つの遺伝子型サブグループに関するデータは、本文中に記載されている。

30

【 0 0 5 7 】

【 表 5 】

表3. M2およびM12における、FCGR3A-158V/F多型によるリツキシマブに対する分子応答

	<i>FCGR3A-158VV</i>	<i>FCGR3A-158F</i> キャリアー	<i>p</i>
M2における分子応答			
BCL2-JH再構成の浄化	3	5	ns
持続性BCL2-JH再構成	3	14	
M12における分子応答			
BCL2-JH再構成の浄化	5	5	0.03
持続性BCL2-JH再構成	1	12	

40

【 0 0 5 8 】

50

【表 6】

参考文献

1. Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, et al.: Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood*. 1994;84:2457-2466.
2. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al.: Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16:2825-2833.
3. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al.: IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90:2188-2195.
4. Hainsworth JD, Burris HA, 3rd, Morrissey LH, et al.: Rituximab monoclonal antibody as initial systemic therapy for patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2000;95:3052-3056.
5. Colombat P, Salles G, Brousse N, et al.: Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as first-line therapy of follicular lymphoma patients with low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood*. 2001;97:101-106.
6. Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, et al.: Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood*. 1998;92:1927-1932.
7. Foran JM, Rohatiner AZ, Cunningham D, et al.: European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol*. 2000;18:317-324.
8. Anderson DR, Grillo-Lopez A, Varns C, Chambers KS, Hanna N: Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans*. 1997;25:705-708.
9. Vose J, Link B, Grossbard M, et al.: Phase II study of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated intermediate or high-grade non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Ann Oncol*. 1999;10:58.
10. Berinstein NL, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al.: Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 1998;9:995-1001.
11. Harjunpaa A, Junnikkala S, Meri S: Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol*. 2000;51:634-641.
12. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al.: Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83:435-445.

10

20

30

40

13. Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, et al.: Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol.* 2000;164:4178-4184.
14. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, et al.: Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood.* 2000;95:3900-3908.
15. Shan D, Ledbetter JA, Press OW: Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood.* 1998;91:1644-1652.
16. Shan D, Ledbetter JA, Press OW: Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2000;48:673-683. 10
17. Hooijberg E, Sein JJ, van den Berk PC, et al.: Eradication of large human B cell tumors in nude mice with unconjugated CD20 monoclonal antibodies and interleukin 2. *Cancer Res.* 1995;55:2627-2634.
18. Funakoshi S, Longo DL, Murphy WJ: Differential in vitro and in vivo antitumor effects mediated by anti-CD40 and anti-CD20 monoclonal antibodies against human B-cell lymphomas. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1996;19:93-101.
19. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV: Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000;6:443-446.
20. Fijen CA, Bredius RG, Kuijper EJ, et al.: The role of Fcγ receptor polymorphisms and C3 in the immune defence against *Neisseria meningitidis* in complement-deficient individuals. *Clin Exp Immunol.* 2000;120:338-345. 20
21. Dijkstra-Hoeve HM, Scheepers RH, Oost WW, et al.: Fcγ receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis: risk factors for disease relapse. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1823-1827.
22. Myhr KM, Raknes G, Nyland H, Vedeler C: Immunoglobulin G Fc-receptor (FcγR) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS. *Neurology.* 1999;52:1771-1776.
23. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M: Fc γRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc γRIIIa, independently of the Fc γRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* 1997;90:1109-1114.
24. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, et al.: A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest.* 1997;100:1059-1070. 30
25. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U: The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γRIII complex. *Nature.* 2000;406:267-273.
26. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994;84:1361-1392.
27. Brice P, Bastion Y, Lepage E, et al.: Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol.* 1997;15:1110-1117.

28. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al.: Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working. *J Clin Oncol.* 1999;17:1244.
29. Jiang XM, Arepally G, Poncz M, McKenzie SE: Rapid detection of the Fc γ RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods.* 1996;199:55-59.
30. Kaplan E, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457-481.
31. de Haas M, Koene HR, Kleijer M, et al.: A triallelic Fc γ receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc γ RIIIa. *J Immunol.* 1996;156:3948-3955. 10
32. Peltz GA, Grundy HO, Lebo RV, Yssel H, Barsh GS, Moore KW: Human Fc γ RIII: cloning, expression, and identification of the chromosomal locus of two Fc receptors for IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:1013-1017.
33. Schnackenberg L, Flesch BK, Neppert J: Linkage disequilibria between Duffy blood groups, Fc γ IIa and Fc γ IIIb allotypes. *Exp Clin Immunogenet.* 1997;14:235-242.
34. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al.: High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ R. *J Biol Chem.* 2001;276:6591-6604. 20
35. Leppers-van de Straat FG, van der Pol W, Jansen MD, et al.: A novel PCR-based method for direct Fc γ receptor IIIa (CD16) allotyping. *J Immunol Methods.* 2000;242:127-132.
36. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, et al.: Variant genotypes of the low-affinity Fc γ receptors in two control populations and a review of low-affinity Fc γ receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood.* 1999;94:4220-4232.

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】Fc R3a-158V/F遺伝子型による、リツキシマブ処置後の無進行性生存率の調整済 Kaplan-Meier 推定量 ($p = 0.05$) を示す図である。 30

【図2】ヒトFCGR3A遺伝子の遺伝子編成を示す図である。

【図3】ヒトFcRIIIa158F(配列番号7)のアミノ酸配列を示す図である。

【図4】ヒトFCGR3A158F(配列番号8)の核酸配列を示す図である。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/035904 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/EP02/11397
- (22) International Filing Date: 11 October 2002 (11.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
01402718.9 19 October 2001 (19.10.2001) EP
- (71) Applicants (for all designated States except US):
CENTRE HOSPITALIER REGIONAL ET UNIVERSITAIRE DE TOURS [FR/FR]; 2, boulevard Tonnelé, F-37044 Tours Cedex (FR). INNATE PHARMA [FR/FR]; Immeuble Grand Pré, 121, ancien Chemin de Cassis, F-13009 Marseille (FR).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WATIER, Hervé [FR/FR]; 58, rue du Maréchal Foch, F-37510 Ballan-Miré (FR). CARTRON, Guillaume [FR/FR]; 68, route du Petit Bois, F-37510 Savonnières (FR). COLOMBAT, Philippe [FR/FR]; Rochecave, F-37270 Larcay (FR).
- (74) Agents: BECKER, Philippe et al.; Cabinet Becker et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, 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, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:
of inventorship (Rule 4.17(v)) for US only
- Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/035904 A2

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS TO EVALUATE ANTIBODY TREATMENT RESPONSE

(57) Abstract: The present invention relates to methods and compositions to evaluate or assess the response of a subject to particular therapeutic treatment. More particularly, the invention provides methods to determine the response of subjects, or to adapt the treatment protocol of subjects treated with therapeutic antibodies. The invention is based on a determination of the FCGR3A genotype of a subject. The invention can be used for patients with malignancies, particularly lymphoma, and is suited to select best responders and/or adjust treatment condition or protocol for low responders.

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

METHODS AND COMPOSITIONS TO EVALUATE ANTIBODY
TREATMENT RESPONSE

5 The present invention relates to methods and compositions to evaluate or assess the response of a subject to particular therapeutic treatment. More particularly, the invention provides methods to determine the response of subjects, or to adapt the treatment protocol of subjects treated with therapeutic antibodies. The invention can be used for patients with malignancies, particularly lymphoma, and is suited to select best responders and/or adjust treatment condition or protocol for low responders.

10

INTRODUCTION

Various therapeutic strategies in human beings are based on the use of therapeutic antibodies. This includes, for instance, the use of therapeutic antibodies developed to deplete target cells, particularly diseased cells such as virally-infected cells, tumor cells or other pathogenic cells, including allogenic immunocompetent cells. Such antibodies are typically monoclonal antibodies, of IgG species, typically IgG1 and IgG3. These antibodies can be recombinant antibodies and humanized antibodies, comprising functional domains from various species or origin or specificity. A particular example of such therapeutic antibodies is rituximab (Mabthera[®], Rituxan[®]), which is a chimeric anti-CD20 IgG1 monoclonal antibody made with human γ 1 and κ constant regions linked to murine variable domains¹. For a few years, rituximab has been considerably modifying the therapeutical strategy against B lymphoproliferative malignancies, particularly non-Hodgkin's lymphomas (NHL). Other examples of intact humanized IgG1 antibodies include alemtuzumab (Campath-1H[®]), which is used in the treatment of B cell malignancies or trastuzumab (Herceptin[®]), which is used in the treatment of breast cancer. Additional examples of therapeutic antibodies under development are disclosed in the art.

30 While these antibodies represent a novel efficient approach to human therapy, particularly for treatment of tumors, they do not always exhibit a strong efficacy and their use could be

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

2

improved by evaluating the response of subjects thereto. For instance, while rituximab, alone or in combination with chemotherapy was shown to be effective in the treatment of both low-intermediate²⁻⁸ and high-grade NHL^{6, 9}, 30% to 50% of patients with low grade NHL have no clinical response to rituximab^{4, 5}. It has been suggested that the level of CD20 expression on lymphoma cells², the presence of high tumor burden at the time of treatment⁶ or low serum rituximab concentrations² may explain the lack of efficacy of rituximab in some patients. Nevertheless, the actual causes of treatment failure remain largely unknown.

The availability of methods allowing the evaluation of patient response to antibody treatment would greatly enhance the therapeutic efficacy of these products. However, the precise mode of action in vivo of such therapeutic antibodies is not clearly documented. Indeed, while *in vitro* studies suggest various possible modes of action of rituximab (antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity (ADCC)^{10, 11}, complement-dependant cytotoxicity^{10, 12, 13}, direct signalling leading to apoptosis^{14, 15}, etc.), the clear action of these target cell-depleting antibodies in vivo is not documented in humans. Furthermore, while ADCC is an important effector mechanism in the eradication of intracellular pathogens and tumor cells, the role of an ADCC is still controversial^{12, 13}.

The present invention now proposes novel methods and compositions to assess the therapeutic response of a subject to a therapeutic antibody. The invention also proposes methods to select patients having best responding profile to therapeutic antibody treatment. The invention also relates to methods of treating patients with therapeutic antibodies, comprising a prior step of evaluating the patient's response. The invention also relates to compositions and kits suitable to perform the invention. The invention may as well be used in clinical trials or experimental settings, to assess or monitor a subject's response, or to verify the mode of action of an antibody.

The invention is based, in part, on the demonstration of a correlation between the genotype of a subject and its ability to respond to therapeutic antibody treatment. More specifically, the

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

3

invention shows that the genotype of the FcγRIIIa receptor directly correlates with the subject's response to therapeutic antibody treatment.

- 5 Three classes of FcγR (FcγRI, FcγRII and FcγRIII) and their subclasses are encoded by eight genes in humans, all located on the long arm of chromosome 1. Some of these genes display a functional allelic polymorphism generating allotypes with different receptor properties. These polymorphisms have been identified as genetic factors increasing the susceptibility to autoimmune or infectious diseases¹⁹⁻²¹. One of these genetic factors is a gene dimorphism in *FCGR3A*, which encodes FcγRIIIa with either a phenylalanine (F) or a valine (V) at amino-
10 acid position 158^{22, 23}. This residue directly interacts with the lower hinge region of IgG1 as recently shown by IgG1-FcγRIII co-crystallization²⁴. It has been clearly demonstrated that human IgG1 binds more strongly to homozygous FcγRIIIa-158V natural killer cells (NK) than to homozygous FcγRIIIa-158F or heterozygous NK cells^{22, 23}.
- 15 We undertook to evaluate a possible correlation between the *FCGR3A* genotype and a patient response to therapeutic antibody treatment in vivo. Our invention stems in part from the unexpected discovery that a very strong correlation exists between said genotype and said response profile, the presence of a valine residue at position 158 being indicative of a high response rate. More specifically, the genotyping of *FCGR3A* was performed in patients with
20 previously untreated follicular NHL who had received rituximab alone, a particular situation in which the response rate is very high⁵. The *FCGR2A*-131H/R was also determined as control since this gene co-localizes with *FCGR3A* on chromosome 1q22 and encodes the macrophage FcγRIIIa receptor.
- 25 The *FCGR3A*-158V/F genotype was determined in 47 patients having received rituximab for a previously untreated follicular non-Hodgkin's lymphoma. Clinical and molecular response were evaluated at two months (M2) and at one year (M12). Positive molecular response was defined as a disappearance of the *BCL2/IGH* gene rearrangement in both peripheral blood and bone marrow. *FCGR3A*-158V homozygous patients were 21% whereas *FCGR3A*-158F

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

4

homozygous and heterozygous patients (*FCGR3A*-158F carriers) were 34% and 45%, respectively. The objective response rates at M2 and M12 were 100% and 90% in *FCGR3A*-158V homozygous patients compared with 65% ($p=0.02$) and 51% ($p=0.03$) in *FCGR3A*-158F carriers. A positive molecular response was observed at M12 in 5/6 of homozygous *FCGR3A*-158V patients compared with 5/16 of *FCGR3A*-158F carriers ($p=0.04$). Furthermore, the homozygous *FCGR3A*-158V genotype was confirmed to be the single parameters associated with clinical and molecular responses in multivariate analysis and was also associated with a lower rate of disease progression ($p=0.05$).

10 Accordingly, the present invention establishes, for the first time, an association between the *FCGR3A* genotype and clinical and molecular responses to therapeutic antibodies. The invention thus provides a first unique marker that can be used to monitor, evaluate or select a patient's response. This invention thus introduces new pharmacogenetical approaches in the management of patients with malignancies, viral infections or other diseases related to the presence of pathological cells in a subject, particularly non-Hodgkin's lymphoma.

20 An object of this invention resides in a method of assessing the response of a subject to a therapeutic antibody treatment, comprising determining in vitro the *FCGR3A* genotype and/or the presence of a polymorphism in the FcγRIIIa receptor of said subject. More specifically, the method comprises determining in vitro the *FCGR3A*158 genotype of said subject.

25 A further object of this invention is a method of selecting patients for therapeutic antibody treatment, the method comprising determining in vitro the *FCGR3A* genotype and/or the presence of a polymorphism in the FcγRIIIa receptor of said subject. More specifically, the method comprises determining in vitro the *FCGR3A*158 genotype of said subject.

30 An other object of this invention is a method of improving the efficacy or treatment condition or protocol of a therapeutic antibody treatment in a subject, comprising determining in vitro the *FCGR3A* genotype and/or the presence of a polymorphism in the FcγRIIIa receptor of

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

5

said subject. More specifically, the method comprises determining in vitro the *FCGR3A158* genotype of said subject.

5 More specifically, determining in vitro the *FCGR3A158* genotype of a subject comprises determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor (or corresponding codon in the *FCGR3A* gene), a valine at position 158 being indicative of a better response to said treatment and a phenylalanine at position 158 being indicative of a lower response to said treatment.

10

Within the context of this invention, the term "therapeutic antibody or antibodies" designates more specifically any antibody that functions to deplete target cells in a patient. Specific examples of such target cells include tumor cells, virus-infected cells, allogenic cells, pathological immunocompetent cells (e.g., B lymphocytes, T lymphocytes, antigen-presenting cells, etc.) involved in allergies, autoimmune diseases, allogenic reactions, etc., or even healthy cells (e.g., endothelial cells in an anti-angiogenic therapeutic strategy). Most preferred target cells within the context of this invention are tumor cells and virus-infected cells. The therapeutic antibodies may, for instance, mediate a cytotoxic effect or a cell lysis, particularly by antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity (ADCC). ADCC requires leukocyte receptors for the Fc portion of IgG (FcγR) whose function is to link the IgG-sensitized antigens to FcγR-bearing cytotoxic cells and to trigger the cell activation machinery. While this mechanism of action has not been evidenced in vivo in humans, it may account for the efficacy of such target cell-depleting therapeutic antibodies. The therapeutic antibodies may be polyclonal or, preferably, monoclonal. They may be produced by hybridomas or by recombinant cells engineered to express the desired variable and constant domains. The antibodies may be single chain antibodies or other antibody derivatives retaining the antigen specificity and the lower hinge region or a variant thereof. These may be polyfunctional antibodies, recombinant antibodies, ScFv, humanized antibodies, or variants thereof. Therapeutic antibodies are specific for surface antigens, e.g., membrane antigens. Most preferred therapeutic antibodies are specific for tumor antigens (e.g., molecules specifically

15
20
25
30

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

6

expressed by tumor cells), such as CD20, CD52, ErbB2 (or HER2/Neu), CD33, CD22, CD25, MUC-1, CEA, KDR, α V β 3, etc., particularly lymphoma antigens (e.g., CD20). The therapeutic antibodies are preferably IgG1 or IgG3, more preferably IgG1.

- 5 Typical examples of therapeutic antibodies of this invention are rituximab, alemtuzumab and trastuzumab. Such antibodies may be used according to clinical protocols that have been authorized for use in human subjects. Additional specific examples of therapeutic antibodies include, for instance, epratuzumab, basiliximab, daclizumab, cetuximab, labetuzumab, sevirumab, tuvirumab, palivizumab, infliximab, omalizumab, efalizumab, natalizumab, 10 clenoliximab, etc., as listed in the following table:

Ab specificity	DCI	Commercial name	Typical Indications
Anti-CD20	rituximab	MabThera®, Rituxan®	LNH B
Anti-CD52	alemtuzumab	CAMPATH-1H®	LLC, allograft
Anti-CD33		Zamyl™	Acute myeloid Leukemia
Anti-HLA-DR		Remitogen™	LNH B
Anti-CD22	epratuzumab	LymphoCide™	LNH B
Anti-erbB2 (HER-2/neu)	trastuzumab	Herceptin®	Metastatic breast cancer
Anti-EGFR (HER-1, erbB1)	cetuximab		ORL and colorectal Cancers
Anti-MUC-1		Therex®	Breast and epithelial cancers
Anti-CEA	labetuzumab	CEA-Cide™	
Anti- α V β 3		Vitaxin	Cancers (anti-angiogenic)
Anti-KDR (VEGFR2)			Cancers (anti-angiogenic)
anti-VRS fusion protein	palivizumab	Synagis®	Viral diseases
Idem		Numax™	Idem
CMV	sevirumab	Protovir	CMV infection
HBs	tuvirumab	Ostavir™	Hepatitis B
Anti-CD25	basiliximab	Simulect®	Prevention/treatment allograft rejection
Anti-CD25	daclizumab	Zénapax®	Prevention/treatment allograft

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

7

anti-TNF- α	infliximab	Remicade™	rejection Crohn disease, polyarthrite rhumatoïd
anti-IgE	omalizumab	Xolair™	Asthma
anti-integrin α L (CD11a, LFA-1)	efalizumab	Xanelim™	psoriasis
anti-CD4	keliximab		
anti-CD2	sipilizumab		
Anti-CD64			anemia
anti-CD147			GvH
anti-integrin α 4 (α 4 β 1- α 4 β 7)	natalizumab	Antegren®	Sclerosis, Crohn
Anti-integrin β 7			Crohn, RCH
anti-CD4*	clenoliximab		

Within the context of the present invention, a subject or patient includes any mammalian subject or patient, more preferably a human subject or patient.

5

According to the invention the term *FCGR3A* gene refers to any nucleic acid molecule encoding a Fc γ RIIIa polypeptide in a subject. This term includes, in particular, genomic DNA, cDNA, RNA (pre-rRNA, messenger RNA, etc.), etc. or any synthetic nucleic acid comprising all or part of the sequence thereof. Synthetic nucleic acid includes cDNA, prepared from

- 10 RNAs, and containing at least a portion of a sequence of the *FCGR3A* genomic DNA as for example one or more introns or a portion containing one or more mutations. Most preferably, the term *FCGR3A* gene refers to genomic DNA, cDNA or mRNA, typically genomic DNA or mRNA. The *FCGR3A* gene is preferably a human *FCGR3A* gene or nucleic acid, i.e., comprises the sequence of a nucleic acid encoding all or part of a Fc γ RIIIa polypeptide having
- 15 the sequence of human Fc γ RIIIa polypeptide. Such nucleic acids can be isolated or prepared according to known techniques. For instance, they may be isolated from gene libraries or banks, by hybridization techniques. They can also be genetically or chemically synthesized. The genetic organization of a human *FCGR3A* gene is depicted on Figure 2. The amino acid sequence of human Fc γ RIIIa is represented figure 3. Amino acid position 158 is numbered

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

8

from residue 1 of the mature protein. It corresponds to residue 176 of the pre-protein having a signal peptide. The sequence of a wild type *FCGR3A* gene is represented on figure 4 (see also Genbank accession Number AL590385 or NM_000569 for partial sequence).

5 Within the context of this invention, a portion or part means at least 3 nucleotides (e.g., a codon), preferably at least 9 nucleotides, even more preferably at least 15 nucleotides, and can contain as much as 1000 nucleotides. Such a portion can be obtained by any technique well known in the art, e.g., enzymatic and/or chemical cleavage, chemical synthesis or a combination thereof. The sequence of a portion of a *FCGR3A* gene encoding amino acid
10 position 158 is represented below, for sake of clarity:

	cDNA	540	550	560	570	580
15	genomic DNA	4970	4980	4990	5000.	
	158F allele	tcctacttctgcaggggctttttgggagtaaaaatgtgtcttca				
		S Y F C R G L F G S K N V S S				
20	158V allele	tcctacttctgcaggggctttttgggagtaaaaatgtgtcttca				
		S Y F C R G L V G S K N V S S				

As indicated above, the invention comprises a method of determining in vitro the *FCGR3A158* genotype of said subject. This more particularly comprises determining the
25 nature of amino acid residue present (or encoded) at position 158 of the FcγRIIIa polypeptide.

Genotyping the *FCGR3A* gene or corresponding polypeptide in said subject may be achieved by various techniques, comprising analysing the coding nucleic acid molecules or the encoded polypeptide. Analysis may comprise sequencing, migration, electrophoresis, immuno-
30 techniques, amplifications, specific digestions or hybridisations, etc.

In a particular embodiment, determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises a step of sequencing the *FCGR3A* receptor gene or RNA or a portion thereof comprising the nucleotides encoding amino acid residue 158.

35

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

9

In an other particular embodiment, determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises a step of amplifying the *FCGR3A* receptor gene or RNA or a portion thereof comprising the nucleotides encoding amino acid residue 158. Amplification may be performed by polymerase chain reaction (PCR), such as simple PCR, RT-PCR or
5 nested PCR, for instance, using conventional methods and primers.

In this regard, amplification primers for use in this invention more preferably contain less than about 50 nucleotides even more preferably less than 30 nucleotides, typically less than about 25 or 20 nucleotides. Also, preferred primers usually contain at least 5, preferably at least 8
10 nucleotides, to ensure specificity. The sequence of the primer can be prepared based on the sequence of the *FCGR3A* gene, to allow full complementarity therewith, preferably. The probe may be labelled using any known techniques such as radioactivity, fluorescence, enzymatic, chemical, etc. This labeling can use for example Phosphor 32, biotin (16-dUTP), digoxigenin (11-dUTP). It should be understood that the present invention shall not be bound or limited
15 by particular detection or labelling techniques. The primers may further comprise restriction sites to introduce allele-specific restriction sites in the amplified nucleic acids, as disclosed below.

Specific examples of such amplification primers are, for instance, SEQ ID NO: 1-4.
20

It should be understood that other primers can be designed by the skilled artisan, such as any fragment of the *FCGR3A* gene, for use in the amplification step and especially a pair of primers comprising a forward sequence and a reverse sequence wherein said primers of said pair hybridize with a region of a *FCGR3A* gene and allow amplification of at least a portion of
25 the *FCGR3A* gene containing codon 158. In a preferred embodiment, each pair of primers comprises at least one primer that is complementary, and overlaps with codon 158, and allows to discriminate between 158V (gt) and 158F (tt). The amplification conditions may also be adjusted by the skilled person, based on common general knowledge and the guidance contained in the specification.

30

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

10

In a particular embodiment, the method of the present invention thus comprises a PCR amplification of a portion of the FCGR3a mRNA or gDNA with specific oligonucleotide primers, in the cell or in the biological sample, said portion comprising codon 158, and a direct or indirect analysis of PCR products, e.g., by electrophoresis, particularly Denaturing Gel
5 Gradient Electrophoresis (DGGE).

In an other particular embodiment, determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises a step of allele-specific restriction enzyme digestion. This can be done by using restriction enzymes that cleave the coding sequence of a particular allele (e.g.,
10 the 158V allele) and that do not cleave the other allele (e.g., the 158F allele, or vice versa). Where such allele-specific restriction enzyme sites are not present naturally in the sequence, they may be introduced therein artificially, by amplifying the nucleic acid with allele-specific amplification primers containing such a site in their sequence. Upon amplification, determining
15 the presence of an allele may be carried out by analyzing the digestion products, for instance by electrophoresis. This technique also allows to discriminate subjects that are homozygous or heterozygous for the selected allele.

Examples of allele-specific amplification primers include for instance SEQ ID NO: 3. SEQ ID
20 NO:3 introduces the first 3 nucleotides of the NlaIII site (5'-CATG-3'). Cleavage occurs after G. This primer comprises 11 bases that do not hybridise with FCGR3A, that extend the primer in order to facilitate electrophoretic analysis of the amplification products) and 21 bases that hybridise to FCGR3A, except for nucleotide 31 (A) which creates the restriction site.

In a further particular embodiment, determining amino acid residue at position 158 of
25 FcγRIIIa receptor comprises a step of hybridization of the FCGR3A receptor gene or RNA or a portion thereof comprising the nucleotides encoding amino acid residue 158, with a nucleic acid probe specific for the genotype Valine or Phenylalanine, and determining the presence or absence of hybrids.

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

11

It should be understood that the above methods can be used either alone or in various combinations. Furthermore, other techniques known to the skilled person may be used as well to determine the FCGR3A158 genotype, such as any method employing amplification (e.g. PCR), specific primers, specific probes, migration, etc., typically quantitative RT-PCR, LCR (Ligase Chain Reaction), TMA (Transcription Mediated Amplification), PCE (an enzyme amplified immunoassay) and bDNA (branched DNA signal amplification) assays.

In a preferred embodiment of this invention, determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises:

- 10 - Obtaining genomic DNA from a biological sample,
- Amplifying the FcγRIIIa receptor gene or a portion thereof comprising the nucleotides encoding amino acid residue 158, and
- determining amino acid residue at position 158 of said FcγRIIIa receptor gene.

15 Amplification can be accomplished with any specific technique such as PCR, including nested PCR, using specific primers as described above. In a most preferred embodiment, determining amino acid residue at position 158 is performed by allele-specific restriction enzyme digestion.

In that case, the method comprises:

- 20 - Obtaining genomic DNA from a biological sample,
- Amplifying the FcγRIIIa receptor gene or a portion thereof comprising the nucleotides encoding amino acid residue 158,
- Introducing an allele-specific restriction site,
- Digesting the nucleic acids with the enzyme specific for said restriction site and,
- 25 - Analysing the digestion products, i.e., by electrophoresis, the presence of digestion products being indicative of the presence of the allele.

In another particular embodiment, the genotype is determined by a method comprising: total (or messenger) RNA extraction from cell or biological sample or biological fluid *in vitro* or *ex*

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

12

in vivo, optionally cDNA synthesis, (PCR) amplification with *FCGR3A*-specific oligonucleotide primers, and analysis of PCR products.

The method of this invention may also comprise determining amino acid residue at position 5 158 of FcγRIIIa receptor directly by sequencing the FcγRIIIa receptor polypeptide or a portion thereof comprising amino acid residue 158 or by using reagents specific for each allele of the FcγRIIIa polypeptide. This can be determined by any suitable technique known to the skilled artisan, including by immuno-assay (ELISA, EIA, RIA, etc.). This can be made using any affinity reagent specific for a FcγRIIIa158 polypeptide, more preferably any antibody or 10 fragment or derivative thereof. In a particular embodiment, the FcγRIIIa158 polypeptide is detected with an anti-FcγRIIIa158 antibody (or a fragment thereof) that discriminates between FcγRIIIa158V and FcγRIIIa158F, more preferably a monoclonal antibody. The antibody (or affinity reagent) may be labelled by any suitable method (radioactivity, fluorescence, enzymatic, chemical, etc.). Alternatively, FcγRIIIa158 antibody immune complexes may be revealed 15 (and/or quantified) using a second reagent (e.g., antibody), labelled, that binds to the anti-FcγRIIIa158 antibody, for instance.

The above methods are based on the genotyping of *FCGR3A158* in a biological sample of the subject. The biological sample may be any sample containing a *FCGR3A* gene or 20 corresponding polypeptide, particularly blood, bone marrow, lymph node or a fluid, particularly blood or urine, that contains a *FCGR3A158* gene or polypeptide. Furthermore, because the *FCGR3A158* gene is generally present within the cells, tissues or fluids mentioned above, the method of this invention usually uses a sample treated to render the gene or polypeptide available for detection or analysis. Treatment may comprise any conventional 25 fixation techniques, cell lysis (mechanical or chemical or physical), or any other conventional method used in immunohistology or biology, for instance.

The method is particularly suited to determine the response of a subject to an anti-tumor therapeutic antibody treatment. In this regard, in a particular embodiment, the subject has a 30 tumor and the therapeutic antibody treatment aims at reducing the tumor burden, particularly

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

13

at depleting the tumor cells. More preferably, the tumor is a lymphoma, such as more preferably a B lymphoma, particularly a NHL. As indicated above, the antibody is preferably an IgG1 or an IgG3, particularly an anti-CD20 IgG1 or IgG3, further preferably a humanized antibody, for instance rituximab.

5

The invention also relates to a bispecific antibody, wherein said bispecific antibody specifically binds CD16 and a tumor antigen, for instance a CD20 antigen. The invention also encompasses pharmaceutical compositions comprising such a bispecific antibody and a pharmaceutically acceptable excipient or adjuvant.

10

Further aspects and advantages of this invention will be disclosed in the following examples, which should be regarded as illustrative and not limiting the scope of this application.

FIGURE LEGENDS

15

FIGURE 1: Adjusted KAPLAN-MEIER estimates of progression-free survival after rituximab treatment according to *FcγR3a*-158V/F genotype ($p=0.05$).

FIGURE 2: Genetic organization of the human FCGR3A gene

FIGURE 3: Amino acid sequences of human *FcγR3A*158F (SEQ ID NO:7)

20

FIGURE 4: Nucleic acid sequence of human FCGR3A158F (SEQ ID NO:8)

MATERIALS AND METHODS

Patients and treatment

25

Clinical trial design, eligibility criteria and end-point assessment have been previously reported.⁵ In brief, patients were eligible for inclusion in this study if they had previously untreated follicular CD20 positive NHL according to the REAL classification.²⁶ Patients were required to present with stage II to IV disease according to Ann-Arbor classification and at least one measurable disease site. All patients were required to have low tumor burden

30

according to the GELF criteria.²⁷ A total of four 375 mg/m² doses of rituximab (Roche,

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

14

Neully, France) were administered by intravenous infusion (days 1, 8, 15, 22). The management of infusion and adverse events has already been reported.⁵ The study protocol was approved by an ethics committee, and all patients gave their informed consent.

5 Monitoring and endpoints

Baseline evaluation included clinical examination, chest X-ray, computed tomography (CT) of the chest, abdomen and pelvis, and unilateral bone marrow biopsy. Response was assessed by an independent panel of radiologists who reviewed all the CT scans of the included patients. The primary efficacy endpoint was the objective response rate, *i.e.* the proportion of patients achieving either complete remission (CR), unconfirmed CR (CRu) or partial response (PR) according to the criteria recently proposed by an international expert committee.²⁸ Clinical response was evaluated at days 50 and 78. Only the maximum response was taken into account and that assessment time point named M2. All patients were evaluated for progression at one year (M12). Patients in CR or CRu with disappearance of bone marrow infiltration at M2 and reappearance of lymphoma cells in bone marrow at M12 were considered "progressive"; patients in PR with negative bone marrow biopsy at M2 and positive biopsy at M12 were considered in PR.

Molecular analysis of *BCL2/IGH* gene rearrangement was performed by PCR, as previously described,⁵ on a lymph node obtained at diagnosis and on both peripheral blood and bone marrow at diagnosis, M2 and M12.

FCGR3A-158V/F genotyping

Out of the 50 patients included in the clinical trial, one patient was excluded after histological review and DNA was not available for two other patients. Forty seven patients were therefore available for *FCGR3A* genotype analysis. All samples were analysed in the same laboratory and DNA was extracted using standard procedures including precautions to avoid cross-contamination. DNA was isolated from peripheral blood (n=43), bone marrow (n=3) or lymph node (n=1). Genotyping of *FCGR3A-158V/F* polymorphism was performed as described by Koene *et al*²² with a nested PCR followed by an allele-specific restriction enzyme digestion. Briefly, two *FCGR3A* specific primers (5'-ATATTTACAGAATGGCACAGG-3',

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

15

SEQ ID NO: 1; 5'-GACTTGGTACCCAGGTTGAA-3'; SEQ ID NO: 2) (Eurobio, Les Ulis, France) were used to amplify a 1.2 kb fragment containing the polymorphic site. The PCR assay was performed with 1.25 µg of genomic DNA, 200 ng of each primer, 200 µmol/L of each dNTP (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania) and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Charbonnière, France) as recommended by the manufacturer. This first PCR consisted in 10 min at 95°C, then 35 cycles (each consisting in 3 steps at 95°C for 1 min, 57°C for 1.5 min, 72°C for 1.5 min) and 8 min at 72°C to achieve complete extension. The second PCR used primers (5'-ATCAGATTTCGATCCTACTTCTGCAGGGGCAT-3' SEQ ID NO: 3; 5'-ACGTGCTGAGCTTGAGTGATGGTGATGTTTAC-3' SEQ ID NO: 4) (Eurobio) amplifying a 94 bp fragment and creating a *Nla*III restriction site only in the *FCGR3A-158V* allele. This nested PCR was performed with 1 µL of the amplified DNA, 150 ng of each primer, 200 µmol/L of each dNTP and 1 U of *Taq* DNA polymerase. The first cycle consisted in 5 min at 95°C then 35 cycles (each consisting in 3 steps at 95°C for 1 min, 64°C for 1 min, 72°C for 1 min) and 9.5 min at 72°C to complete extension. The amplified DNA (10 µL) was then digested with 10 U of *Nla*III (New England Biolabs, Hitchin, England) for 12 h at 37°C and separated by electrophoresis on a 8% polyacrylamide gel. After staining with ethidium bromide, DNA bands were visualized with UV light. For homozygous *FCGR3A-158F* patients, only one undigested band (94 bp) was visible. Three bands (94 bp, 61 bp and 33 bp) were seen in heterozygous individuals whereas for homozygous *FCGR3A-158V* patients, only two digested bands (61 bp and 33 bp) were obtained.

***FCGR2A-131H/R* genotyping**

Genotyping of *FCGR2A-131H/R* was done by PCR followed by an allele-specific restriction enzyme digestion according to Liang *et al*²⁸. The sense primer (5'-GGAAAATCCCAGAAATTCGCGC-3' SEQ ID NO: 5) (Eurobio) has been modified to create a *Bst*UI restriction site in case of R allele whereas the antisense primer (5'-CAACAGCCTGACTACCTATTACGCGGG-3' SEQ ID NO: 6) (Eurobio) has been modified to carry a second *Bst*UI restriction site that served as an internal control. PCR amplification was performed in a 50 µL reaction with 1.25 µg genomic DNA, 170 ng of each primer, 200 µmol/L of each dNTP, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase, and the manufacturer's

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

16

buffer. The first cycle consisted of 3 minutes at 94°C followed by 35 cycles (each consisting in 3 steps at 94°C for 15 seconds, 55°C for 30 seconds, 72°C for 40 seconds) and 7 min at 72°C to complete extension. The amplified DNA (7 µL) were then digested with 20 U of *Bst*UI (New England Biolabs) for 12 h at 60°C. Further analysis was performed as described for *FCGR3A* genotyping. The *FCGR2A*-131H and -131R alleles were visualized as a 337 bp and 316 bp DNA fragments, respectively.

Statistical analysis

Clinical and biological characteristics as well as clinical and molecular responses of the patients in the different genotypic groups were compared using a Chi-squared test or by Fisher's exact test when appropriated. A logistic regression analysis including: sex, age (> or ≤ 60 years), number of extra-nodal sites involved (≥ or < 2), bone marrow involvement, *BCL2/JH* rearrangement status at diagnosis and *FCGR3A* genotype was used to identify independent prognostic variables influencing clinical and molecular responses. Progression-free survival was calculated according to the method of Kaplan and Meier²⁹ and was measured from the start of treatment until progression/relapse or death. Comparison of the progression-free survival by *FCGR3A* genotype was performed using the log-rank test. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

20

RESULTS

Clinical response

Out of the 49 patients tested for the *FCGR3A*-158V/F polymorphism, 10 (20%) and 17 (35%) were homozygous for *FCGR3A*-158V and *FCGR3A*-158F, respectively, and 22 (45%) were heterozygous. The three groups were not different in terms of sex, disease stage, bone marrow involvement, number of extra-nodal sites involved or presence of *BCL2/JH* rearrangement in peripheral blood and bone marrow at diagnosis (Table 1). No difference was found when homozygous *FCGR3A*-158V patients were compared with *FCGR3A*-158F carriers (*FCGR3A*-158F homozygous and heterozygous patients) or when homozygous *FCGR3A*-158F patients were compared with *FCGR3A*-158V carriers (*FCGR3A*-158V homozygous and heterozygous

30

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

17

patients). The objective response rate at M2 was 100% (CR+CRu=40%), 70% (CR+CRu=29%) and 64% (CR+CRu=18%) in *FCGR3A*-158V homozygous, *FCGR3A*-158F homozygous and heterozygous patients respectively ($P=0.09$). A significant difference in objective response rate was observed between *FCGR3A*-158V homozygous patients and *FCGR3A*-158F carriers with 67% (CR+CRu=23%) objective response rate for this latter group (relative risk=1.5; 95% CI, 1.2-1.9; $P=0.03$) (Table 2). No difference was observed between *FCGR3A*-158F homozygous patients and *FCGR3A*-158V carriers. At M12, the objective response rate was 90% (CR+CRu=70%), 59% (CR+CRu=35%) and 45% (CR+CRu=32%) in *FCGR3A*-158V homozygous, *FCGR3A*-158F homozygous and heterozygous patients respectively ($P=0.06$). The difference in objective response rate was still present one year after treatment between *FCGR3A*-158V homozygous group and *FCGR3A*-158F carriers with 51% (CR+CRu=33%) objective response rate for this latter group (relative risk=1.7; 95% CI, 1.2-2.5; $P=0.03$). The logistic regression analysis showed that the homozygous *FCGR3A*-158V genotype was the only predictive factor for clinical response both at M2 ($P=0.02$) and at M12 ($P=0.01$). The progression-free survival at 3 years (median follow-up: 35 months; 31-41)(Figure 1) was 56% in *FCGR3A*-158V homozygous patients and 35% in *FCGR3A*-158F carriers (ns). Out of the 45 patients analyzed for *FCGR2A*-131H/R polymorphism, 9 (20%) and 13 (29%) were homozygous for *FCGR2A*-131R and *FCGR2A*-131H, respectively, while 23 (51%) were heterozygous. There was no difference in the characteristics at inclusion or clinical response to rituximab treatment for these three groups or for homozygous *FCGR2A*-131H patients and *FCGR2A*-131R carriers, or for homozygous *FCGR2A*-131R patients and *FCGR2A*-131H carriers (data not shown).

Molecular response

At diagnosis, *BCL2/JH* rearrangement was detected in both peripheral blood and in bone marrow in 30 (64%) patients, enabling further follow-up. Twenty-five patients (six *FCGR3A*-158V homozygous patients and 19 *FCGR3A*-158F carriers) and 23 patients (six *FCGR3A*-158V homozygous patients and 17 *FCGR3A*-158F carriers) were analysed for *BCL2/JH* rearrangement in both peripheral blood and bone marrow at M2 and at M12 (Table 3). At M2, a clonality of *BCL2/JH* rearrangement was observed in 3/6 of the *FCGR3A*-158V homozygous patients and in 5/19 of the *FCGR3A*-158F carriers (ns). In contrast, the rate of

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

18

BCL2-JH rearrangement cleaving at M12 was higher (5/6) in the *FCGR3A*-158V homozygous patients than in the *FCGR3A*-158F carriers (5/17) (relative risk = 2.8; 95% CI, 1.2-6.4; $P=0.03$). The logistic regression analysis showed that the *FCGR3A*-158V homozygous genotype was the only factor associated with a greater probability of exhibiting *BCL2-JH* rearrangement cleaving at M12 ($P=0.04$). The single homozygous *FCGR3A*-158V patient still presenting with *BCL2-JH* rearrangement in peripheral blood and bone marrow at M12 was in CR 23 months after rituximab treatment. In contrast, the molecular responses at M2 and M12 were not influenced by the *FCGR2A*-131H/R polymorphism (data not shown).

10

DISCUSSION

Because of the increasing use of rituximab in B cell lymphoproliferative malignancies, enhanced understanding of treatment failures and of the mode of action of rituximab is required. In this regard, we genotyped *FCGR3A* in follicular NHL patients with well-defined clinical and laboratory characteristics and treated with rituximab alone.⁵ In particular, all the patients included in this study had a low tumor burden NHL and a molecular analysis of *BCL2-JH* at diagnosis and during follow-up. The *FCGR3A* allele frequencies in this population were similar to those of a general caucasian population.^{23,24} Our results show an association between the *FCGR3A* genotype and the response to rituximab. Indeed, homozygous *FCGR3A*-158V patients, who account for one fifth of the population, had a greater probability of experiencing clinical response, with 100% and 90% objective response rates at M2 and M12, respectively. Moreover, five of the six *FCGR3A*-158V homozygous patients analysed for *BCL2-JH* rearrangement showed molecular response at M12, compared to 5 of the 17 *FCGR3A*-158F carriers. *FCGR3A*-158V homozygosity was the only factor associated with the clinical and molecular responses. However, these higher clinical and molecular responses were still insufficient to significantly improve the progression-free survival in homozygous *FCGR3A*-158V patients.

This is the first report of an easily assessable genetic predictive factor for both clinical and molecular responses to rituximab. However, the genetic association does not demonstrate the mode of action of rituximab involves $Fc\gamma RIIIa$. The association observed between *FCGR3A* genotype and response to rituximab might be due to another genetic polymorphism

30

in linkage disequilibrium. Those polymorphisms could be located in *FCGR3A* itself like the triallelic *FCGR3A*-48L/H/R polymorphism³¹ or in other FcγR-coding genes, since *FCGR3A* is located on the long arm of chromosome 1, which includes the three *FCGR2* genes and *FCGR3B*.³² A linkage disequilibrium has been reported between *FCGR2A* and *FCGR3B*.³³

5 However, the fact that *FCGR2A*-131H/R polymorphism was not associated with a better response to rituximab strongly supports the fact that a gene very close to *FCGR3A* or *FCGR3A* itself is directly involved.

Several *in vitro* studies argue in favor of direct involvement of *FCGR3A*-158V/F polymorphism. First, Koene *et al*.²³ have shown that the previously reported differences in IgG binding among the three FcγRIIIa-48L/H/R isoforms³¹ are a consequence of the linked

10 FcγRIIIa-158V/F polymorphism and several teams have demonstrated that NK cells from individuals homozygous for the *FCGR3A*-158V allotype have a higher affinity for human complexed IgG1 and are more cytotoxic towards IgG1-sensitized targets.^{23,24,34} Our present results establish that *FCGR3A*-158V homozygous patients have a better response to

15 rituximab, which is probably due to a better *in vivo* binding of that chimeric human IgG1 to FcγRIIIa. Secondly, NK cell- and macrophage-mediated ADCC is one of the mechanisms triggered by anti-CD20 antibodies *in vitro*^{8,11,12} as well as in murine models *in vivo*,¹⁷⁻¹⁹ and rituximab-mediated apoptosis is amplified by FcγR-expressing cells.^{15,16} Out of all FcγR, FcγRIIIa is the only receptor shared by NK cells and macrophages. We thus postulate that

20 *FCGR3A*-158V patients show a better response to rituximab because they have better ADCC activity against lymphoma cells. The fact that more than 50% of the *FCGR3A*-158F carriers nonetheless present a clinical response to rituximab could be explained by lower, but still sufficient, ADCC activity or, more likely, by other mechanisms operating *in vivo* such as complement-dependent cytotoxicity, complement-dependent cell-mediated

25 cytotoxicity^{11,13,14} and/or apoptosis.^{15,16} ADCC could then be viewed as an additional mechanism in the response to rituximab that is particularly effective in *FCGR3A*-158V homozygous patients.

The *in vitro* studies suggest a "gene-dose" effect with a level of IgG1 binding to NK cells from *FCGR3A* heterozygous donors intermediate between that observed with NK cells

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

20

from *FCGR3A*-158V and *FCGR3A*-158F homozygotes²³. However, the clinical response of heterozygous patients appears similar to that of *FCGR3A*-158F homozygous patients. Further studies with larger groups of patients will be required to conclude against a "gene-dose" effect *in vivo*.

5 Since FcγRIIIa is strongly associated with a better response to rituximab, it needs to be taken into account in the development of new drugs targeting the CD20 antigen. For example, it may be possible to use engineered rituximab to treat *FCGR3A*-158F-carrier patients with B cell lymphomas. Indeed, by modifying various residues in the IgG1 lower hinge region, Shields *et al* have recently obtained IgG1 mutants which bind more strongly to FcγRIIIa-158F than
10 native IgG1³⁴.

 Taken together, these results allow to set up new therapeutic strategies against B lymphoproliferative disorders based upon prior determination of the patients *FCGR3A* genotype. Since this polymorphism has the same distribution in various ethnic population, including blacks and Japanese, such a strategy may be applied worldwide.^{23,35,36}
15 Furthermore, such a pharmacogenetic approach may also be applied to other intact humanized IgG1 antibodies used in the treatment of B cell malignancies, such as Campath-1H, or those used in the treatment of other malignancies, such as trastuzumab (Herceptin[®]). Even more generally, this approach may apply to other intact (humanized) therapeutic (IgG1) antibodies developed to deplete target cells.

20

REFERENCES

1. Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, et al.: Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood*. 1994;84:2457-2466.
- 5 2. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al.: Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16:2825-2833.
3. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al.: IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20
10 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90:2188-2195.
4. Hainsworth JD, Burris HA, 3rd, Morrissey LH, et al.: Rituximab monoclonal antibody as initial systemic therapy for patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2000;95:3052-3056.
5. Colombat P, Salles G, Brousse N, et al.: Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as first-
15 line therapy of follicular lymphoma patients with low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood*. 2001;97:101-106.
6. Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, et al.: Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood*. 1998;92:1927-1932.
- 20 7. Foran JM, Rohatiner AZ, Cunningham D, et al.: European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol*. 2000;18:317-324.
8. Anderson DR, Grillo-Lopez A, Varns C, Chambers KS, Hanna N: Targeted anti-cancer therapy
25 using rituximab, a chimeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans*. 1997;25:705-708.
9. Vose J, Link B, Grossbard M, et al.: Phase II study of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated intermediate or high-grade non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Ann Oncol*. 1999;10:58.
- 30 10. Berinstein NL, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al.: Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 1998;9:995-1001.
11. Harjunpaa A, Junnikkala S, Meri S: Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol*. 2000;51:634-641.
- 35 12. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al.: Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83:435-445.

13. Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, et al.: Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol.* 2000;164:4178-4184.
14. Golay J, Zaffaroni I, Vaccari T, et al.: Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood.* 2000;95:3900-3908.
15. Shan D, Ledbetter JA, Press OW: Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood.* 1998;91:1644-1652.
16. Shan D, Ledbetter JA, Press OW: Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2000;48:673-683.
17. Hooijberg E, Sein JJ, van den Berk PC, et al.: Eradication of large human B cell tumors in nude mice with unconjugated CD20 monoclonal antibodies and interleukin 2. *Cancer Res.* 1995;55:2627-2634.
18. Funakoshi S, Longo DL, Murphy WJ: Differential in vitro and in vivo antitumor effects mediated by anti-CD40 and anti-CD20 monoclonal antibodies against human B-cell lymphomas. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1996;19:93-101.
19. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV: Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000;6:443-446.
20. Fijen CA, Bredius RG, Kuijper EJ, et al.: The role of Fcγ receptor polymorphisms and C3 in the immune defence against *Neisseria meningitidis* in complement-deficient individuals. *Clin Exp Immunol.* 2000;120:338-345.
21. Dijkstra Bloem HM, Scheepers RH, Oost WW, et al.: Fcγ receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis: risk factors for disease relapse. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1823-1827.
22. Myhr KM, Raknes G, Nyland H, Vedeler C: Immunoglobulin G Fc-receptor (FcγR) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS. *Neurology.* 1999;52:1771-1776.
23. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M: Fc γRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc γRIIIa, independently of the Fc γRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* 1997;90:1109-1114.
24. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, et al.: A novel polymorphism of FcγRIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest.* 1997;100:1059-1070.
25. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U: The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γRIII complex. *Nature.* 2000;406:267-273.
26. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994;84:1361-1392.
27. Brice P, Bastion Y, Lepage E, et al.: Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. J Clin Oncol.* 1997;15:1110-1117.

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

23

28. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al.: Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working. *J Clin Oncol.* 1999;17:1244.
29. Jiang XM, Arepally G, Poncz M, McKenzie SE: Rapid detection of the Fc γ RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods.* 1996;199:55-59.
30. Kaplan E, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457-481.
31. de Haas M, Koene HR, Kleijer M, et al.: A triallelic Fc γ receptor type IIIa polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc γ RIIIa. *J Immunol.* 1996;156:3948-3955.
32. Peltz GA, Grundy HO, Lebo RV, Yssel H, Barsh GS, Moore KW: Human Fc γ RIII: cloning, expression, and identification of the chromosomal locus of two Fc receptors for IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:1013-1017.
33. Schnackenberg L, Flesch BK, Neppert J: Linkage disequilibria between Duffy blood groups, Fc γ IIa and Fc γ IIIb allotypes. *Exp Clin Immunogenet.* 1997;14:235-242.
34. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al.: High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ R. *J Biol Chem.* 2001;276:6591-6604.
35. Leppers-van de Straat FG, van der Pol W, Jansen MD, et al.: A novel PCR-based method for direct Fc γ receptor IIIa (CD16) allotyping. *J Immunol Methods.* 2000;242:127-132.
36. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, et al.: Variant genotypes of the low-affinity Fc γ receptors in two control populations and a review of low-affinity Fc γ receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood.* 1999;94:4220-4232.

25

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF PATIENTS ACCORDING TO THE *FCGR3A*-158V/F POLYMORPHISM.

		<i>FCGR3A</i> - 158VV	<i>FCGR3A</i> - 158VF	<i>FCGR3A</i> - 158FF	p*
n (%)		10 (20%)	22 (45%)	17 (35%)	
Sex					
	M	3	12	10	ns
	F	7	10	7	
Disease stage					
	II-III	3	6	6	ns
	IV	7	16	11	
Bone marrow involvement					
	yes	7	16	9	ns
	no	3	6	8	
Extra-nodal sites involved					
	< 2	8	20	13	ns
	≥ 2	2	2	4	
<i>BCL2</i> - <i>JH</i> rearrangement in peripheral blood		8	12	11	ns
<i>BCL2</i> - <i>JH</i> rearrangement in bone marrow		7	12	11	ns

* Statistical comparisons of the three groups of homozygous *FCGR3A*-158V patients vs *FCGR3A*-158F carriers and of homozygous *FCGR3A*-158F patients against *FCGR3A*-158V carriers.

TABLE 2. CLINICAL RESPONSE TO RITUXIMAB BY *FCGR3A*-158V/F POLYMORPHISM.

	<i>FCGR3A</i> -158VV	<i>FCGR3A</i> -158F carriers	p*
<i>Clinical response at M2</i>			
Objective response	10 (100%)	26 (67%)	0.03
complete remission	3	7	
complete remission unconfirmed	1	2	
partial response	6	17	
No response	0 (0%)	13 (33%)	
no change	0	10	
progressive disease	0	3	
<i>Clinical response at M12</i>			
Objective response	9 (90%)	20 (51%)	0.03
complete remission	6	11	
complete remission unconfirmed	1	2	
partial response	2	7	
No response	1 (10%)	19 (49%)	
no change	0	2	
progressive disease	1	17	

* Statistical comparison of homozygous *FCGR3A*-158V patients against *FCGR3A*-158F carriers. Data concerning the three genotype subgroups are given in the text.

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

26

TABLE 3. MOLECULAR RESPONSE TO RITUXIMAB AT M2 AND AT M12 BY THE FCGR3A-158V/F POLYMORPHISM.

	<i>FCGR3A-158VV</i>	<i>FCGR3A-158F</i>	p
Molecular response at M2			ns
<i>Cleaving of BCL2-JH</i> rearrangement	3	5	
Persistent <i>BCL2-JH</i> rearrangement	3	14	
Molecular response at M12			0.03
<i>Cleaving of BCL2-JH</i> rearrangement	5	5	
Persistent <i>BCL2-JH</i> rearrangement	1	12	

5

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

27

CLAIMS

1. A method of assessing the response of a subject to a therapeutic antibody treatment, comprising determining in vitro the *FCGR3A158* genotype of said subject.
5
2. A method of selecting patients for therapeutic antibody treatment, the method comprising determining in vitro the *FCGR3A158* genotype of said subject.
3. A method of improving the efficacy or treatment condition or protocol of a therapeutic antibody treatment in a subject, comprising determining in vitro the *FCGR3A158* genotype of said subject.
10
4. The method of any one of claims 1 to 3, comprising determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor, a Valine at position 158 being indicative of a better response to said treatment and a phenylalanine at position 158 being indicative of a lower response to said treatment.
15
5. The method of any one of claims 1 to 4, wherein determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises a step of sequencing the FcγRIIIa receptor gene or RNA or a portion thereof comprising the nucleotides encoding amino acid residue 158.
20
6. The method of any one of claims 1 to 5, wherein determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises a step of amplifying the FcγRIIIa receptor gene or RNA or a portion thereof comprising the nucleotides encoding amino acid residue 158.
25
7. The method of claim 6, wherein amplification is performed by polymerase chain reaction (PCR), such as PCR, RT-PCR and nested PCR.
8. The method of any one of claims 1 to 7, wherein determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises a step of allele-specific restriction enzyme digestion.
30

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

28

9. The method of any one of claims 1 to 8, wherein determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises a step of hybridization of the FcγRIIIa receptor gene or RNA or a portion thereof comprising the nucleotides encoding amino acid residue 158, with a nucleic acid probe specific for the genotype Valine or Phenylalanine.

10. The method of any one of claims 1 to 9, wherein determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises:

- Obtaining genomic DNA from a biological sample,
- 10 - Amplifying the FcγRIIIa receptor gene or a portion thereof comprising the nucleotides encoding amino acid residue 158, and
- determining amino acid residue at position 158 of said FcγRIIIa receptor gene.

15 11. The method of any one of claims 1 to 9, wherein determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises:

- Obtaining genomic DNA from a biological sample,
- Amplifying the FcγRIIIa receptor gene or a portion thereof comprising the nucleotides encoding amino acid residue 158,
- 20 - Introducing an allele-specific restriction site,
- Digesting the nucleic acids with the enzyme specific for said restriction site and,
- Analysing the digestion products, i.e., by electrophoresis, the presence of digestion products being indicative of the presence of the allele.

25 12. The method of any one of claims 1 to 9, wherein determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises: total (or messenger) RNA extraction from cell or biological sample or biological fluid *in vitro* or *ex vivo*, optionally cDNA synthesis, (PCR) amplification with specific FCGR3a oligonucleotide primers, and analysis of PCR products.

30

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

29

13. The method of any one of claims 1 to 4, wherein determining amino acid residue at position 158 of FcγRIIIa receptor comprises a step of sequencing the FcγRIIIa receptor polypeptide or a portion thereof comprising amino acid residue 158.
- 5
14. The method of any one of the preceding claims, wherein the subject is a human subject.
15. The method of claim 14, wherein the subject has a tumor, a viral infection, or a disease condition associated with allogenic or pathological immunocompetent cells.
- 10
16. The method of claim 15, wherein the subject has a tumor and the therapeutic antibody treatment aims at reducing the tumor burden.
17. The method of claim 16, wherein the tumor is a lymphoma, particularly a NHL.
- 15
18. The method of any one of the preceding claims, wherein the antibody is an IgG1 or an IgG3.
19. The method of claim 18, wherein the antibody is an anti-CD20 antibody, particularly rituximab.
- 20

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

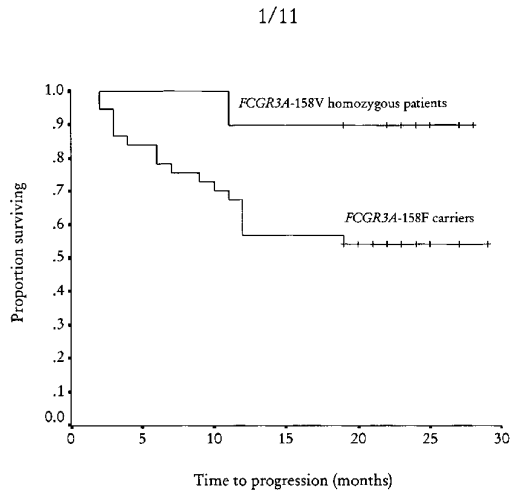


FIGURE 1

2/11

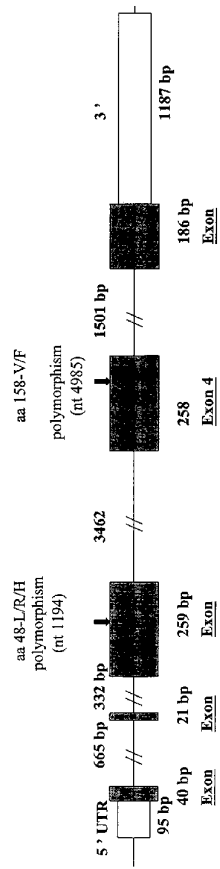


FIGURE 2

FcγRIIIa protein sequence (GenBank RefSeq NP_000560), 158-F allotype

```

protein      1   10   20   30   40   50   60   70   80   90  100
mature protein
NP_000560 (FcγRIIIa) MWQLLPTALLLVSNAGMTEPLKRAVLELPQWRVLEKISVYLKQAGVSEKDSNTOIWHNES LISSQASSYFIDAAVTDSGEYFCCTNLSLSDPV
protein     101  110  120  130  140  150  160  170  180  190  200
mature protein
NP_000560 (FcγRIIIa) QLEVLHGMLLQAFRWVFEEDFHLKCHSMKMTALKVTLQNGEKRRKPFHHN SDFTFRATLKGSSYFCRGLGSRNVSFTVNTITQGLAVSTIS
protein     201  210  220  230  240  250
mature protein
NP_000560 (FcγRIIIa) SFFPFQVNSFCVLMWLLFANVTGLVFSYKTNRS STREDKGSHFRKRGDPQDK
    
```

FIGURE 3

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

SEQUENCE LISTING

<110> CHRU de Tours

<120> Methods and compositions to evaluate antibody treatment response.

<130> B0095W0

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: FCGR3A specific primer.

<400> 1

atatttacag aatggcacag g

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: FCGR3A specific primer.

<400> 2

gacttggtac ccaggttgaa

20

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

<223> Description of Artificial Sequence: Amplification primer.

<400> 3

atcagattcg atcctacttc tgcagggggc at

32

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amplification primer.

<400> 4

acgtgctgag ottgagtgat ggtgatgttc ac

32

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amplification sense primer.

<400> 5

ggaaatccc agaaattctc gc

22

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amplification antisens primer.

<400> 6

caacagcctg actacctatt acgctggg

27

<210> 7

<211> 254

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amino acid sequence of human FCGR3A158F.

<400> 7

```

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
 1           5           10           15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
 20           25           30

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
 35           40           45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
 50           55           60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr
 65           70           75           80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu
 85           90           95

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
 100          105          110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
 115          120          125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
 130          135          140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
 145          150          155          160

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe
 165          170          175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
 180          185          190

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln
 195          200          205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
 3

```

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
 225 230 235 240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
 245 250

<210> 8
 <211> 22685
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Nucleic acid
 sequence of human FCGR3A158F.

<400> 8
 cagcctggct gacacagfga gacctcatct ctaaaaaaaaa aagcaagcag aatattttct 60
 taaaaggcaa ttatattcct tcttggccag gccacagtgcc tcacacctgt aatcccagca 120
 ctttgggagg cagagatggg tggatcaacct gaggtcagga gttcgagacc agcctggcca 180
 acatggcgaa aaccctgtgc tactaaaaat acaaaaaatta gctgggcatg gggccatag 240
 cctgtaatcc cagctacttg ggaggctgag acaggagaat cgcttgtacc cgggagcgag 300
 agattgcagt gagccgagat catgccactg cactccagcc ttggcgacag agtgaggctt 360
 tgtctaaaaa aaaaaaggta tttttgctct ctctgttggg accaattgtt aaattctttg 420
 tggaccactg atgcttacca aaaaaaaaaa aaaaaaaagt gggggcatca tatttcctct 480
 agttgacatt aagacacagt aatttagcca gaggagatct tagcaaacat acagtccaca 540
 ctccactttc tcatttcatg atgtagagca ctgagatcta gacaatttaa tcggtggtca 600
 cccctgggtg catagctagg tctagagctc ctggtctcca ggtcagcatt tcittcttct 660
 tcattaaaag tcaagtttcc tcccctgttc attattagct ccttccagaa agagagtttc 720
 ttatcttttt agtaggtact cagtaaatca caaggtattc actaggatgc ctttggatga 780
 aggtacaagc cctgactta aattggctta aecagcaggg aaatttactt gaaattgtaa 840
 gaaatctggg ttggttgctt tagaagctca gtgatgtcac caagaccata ttctatccct 900
 ccactctgtc ctccctggct atttggcatt gacctcagac tggctgcctt caaaatctta 960
 ggttttgcca gcagaacctc ggacaaaatg agcccttgtt catgtacagt gggagagaga 1020
 gatcatctct cccaacatg gcactccctc ctaccagatt ggccctatct aggcacaaagt 1080
 tccgtcttct cccactaac caataaaagc caggggaatg ctacaccctg agtggcttag 1140
 atcagtcagg atccacctct gcataagagg gtgattectg aatagaatca aggttatatt 1200
 agaaggaggg gagagggatg gatctcaggc tagtacatca tattctattt gttgagttaa 1260
 ctgagtcata goaattgttg agttggaaaa aactcagaac ctactgtgga tccaagttca 1320
 agaaatcatt ctttcttaca tacaacagca ttgctctgta gccctgagct aagagagcat 1380
 cacgaaatca agtctcttgg ctgtttataa tegtgaagcaa actcttggac ctgggagggg 1440
 atgaatggat aatgtctgtc tgacttgcct ctttctagtt agtaccactc acctcccttc 1500
 ttctctgtat tgttctctaga ataggataaa aaattctccc ttccctagat cttacagctc 1560
 ccccttcccc caggcctttc ttttttccag gattttactc taatcacacc accgagaagt 1620
 caagaaatct ttaaagtgtg ttagagttag tagttgtggc agcactaaaa cacggctgca 1680
 aattcttga cactctctcc atcaagaagt gaggcctaca tctctacccc ttgaatctgg 1740

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

gtgggcttat aacttctggt gattagacta cagcagaag agaagctgta tagcttcta 1800
aatgttataa agtcttaag atagctgcca gcaagacctt aggacaaaat gaggccttgt 1860
tcaagctccag tgggagagag agagagagac cctctctccc aaatatgcca atcctcteta 1920
cctataacat ttacataaat gttataggtt aaacgttcca caacaaacta agtactattt 1980
aacatcaaga ggaaaaaag acaggagaaa gggtaataa cctctgtgat gaggatctaa 2040
gaagaacaaa ggaagcctgg tttggcctg gctaccggtt ggtcttgcaa agaagagtct 2100
gaggtggcag agccttcagt ggcagatgcc aaattatcat catgagtac tcgaagacag 2160
tgtcagctaa gatagccatt tcaagctgct gaagccttc tcttttagtc gtggagtctt 2220
gtgataagaa ctgaaaagtg gaagagtgtg cttgtctgtg gccttatttg gtcggatgca 2280
gtctttatca ttttaattt gtttcttaga acattttatc ttgttgcca aatgcctac 2340
gaaataataa atggagtctt tttctaagt ggagttagtt atgtcaaggg tcccttatac 2400
agtcttcatc cttttctctg gcatacaact cctaaaatcc ttagaatctc caaagtgatg 2460
tcttttggtg tgctaatgag gtaactgatg gctggcagct cttagtagc ttcataacag 2520
gggctgggca caagaagat catggcaagg tcagaggatt ggggcttca gctccacct 2580
ccaaactccc tctgggaagt gggagggggc tgaaggtga atgtacc aatagccaat 2640
gacttaatta atcattccta agtaataaag ctcccataaa aaccctaaag gacagggttt 2700
ggagatcctc cagagagccg aacacagaga ggttcttggg ggttagtgca ccagaggca 2760
tggagctcc aagcccttc ccacaggtct tgccctatgt actctttact tgtctcttt 2820
gtaataattt ttatcacaaa ctgataaagt taaatgttcc cctgagtact gagaccact 2880
ctagcaaat aattgaacc aagatgcagg tgggggaaac cccctttat aactggttgg 2940
tcaaaagcac aggttaaaaca acctggggct tcatcctgga gtatcagaag tgtcttgg 3000
gactgagccc ttaacttctg tcaactgatg ctatttccag ttatagatgtg ttggaaatca 3060
attgaatttg agcagaagt ccaatcccga gacctgagt tgcagtgc ccttaggaa 3120
ctgggctgca cagcaggaag tgaggggcag gtggggagca aagctttatc tgtattaca 3180
gtagatcccc atggctcaca tcaccgctg agctctctct cctatcagat cagctgtggc 3240
atataattat cacaggagca tgaacctat tgtgaagtac gcattgcaag gatctaggtt 3300
gactctctct tatgagaatc taatgcctga tgacctggca ttgtctccca tcacctaga 3360
tgggactgtc tagttgcaag aaaacaagct cggggctccc cctgattcta cattatgta 3420
agttgtataa ttacttcatt aaatatcaca ctgtaataa aatagaatg aagtgcaca 3480
taaatgtaat gcactgaaat catcctgaaa ccacccccca cccccctacc cctgtccag 3540
gaaaaattgt cttccatgaa gccaatccct ggtgcaaaa atttggaga ccactggatt 3600
agaagacacc cagttggtgc ccaactgctga attgcttctt tctgtctgt cttgcttgc 3660
agtgagagaga aatccccaca tatctgtgt cagaatgtg ttgtgagagc atagtgagg 3720
gaactgagtt tgtttttct acagttacag caataggtaa ctggaattca actgctggac 3780
tataccaaag actgccagc cagcctacct ttctcacagc cttcttgaact acctgcttg 3840
gatgagctca ctgaaagccc acataccttc attctagcat ttctctagtc tggttgagct 3900
gctttggagg taatacaggt tgtaggactt cctccactc ctgctcaggga cgttttccag 3960
caggctaact agacagcagt tggcactgag tacaactgga gaaatgttat cagcactgaa 4020
gactgctcca gctacaaatg cacagcgacc cacctcagct ggaaccttgg cattgcttg 4080
caatcctbac aactgtttgg aattcttggg aattcttcta cacaacaaca gtggctctc 4140
tctccctgc accacaatgg ccattctcaa ctctgtgtt ctcaaacccc caccacaact 4200
gttaccact cttctcgac aagtgtcttt gactctctct taaccaagaa aatcaggacc 4260
agcagatgtg gatgtcact caacatctga aaatggatt gcataatgac cccctcagct 4320
cctgcttca gctcagagcg agaggtaatc cgtatccagt tcacagccaa ctccctgtcc 4380
atgctccatt cctctctct caggaccac acttctctct ctagggttcc cgtccctgtt 4440
aggtatccaa cttctccacc cctgctggct tcttccaaa gactataac caagctctga 4500
tcttccactt aaaaagaaac aaaaactccc attctctgt aactacctt gcagaattgt 4560
gtctgaaaca gtgagagaga tctaacttaa ttgactccat cttgcttcta acctcaagc 4620

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

tgtcttctct cattcttggg cataggttga actaaccttg ggagaaactt agttttatgt 4680
 ttgtgggtta aagcaaaagt gataacagcc ctttcccagg gcagacctcc tttttttctg 4740
 aagactagat tgcctttgta ggactaacat tagccacaag attggaattt atggtttagg 4800
 aatcatgcag gtggaggota caagattctg acccttccba agcaactgac ctaagatcgg 4860
 tgccttagat attttgaga ccctgcactt gatggatcac ctggcaaac ccagatcaat 4920
 aaactggctc atctgatctt gtgggtccca ccaggaact gactcagaac aagaagacag 4980
 cttcaacttc ctgtgatttc atccctgacc aatcaacact cctggctcac tggcttcccc 5040
 tccaccaacc aagtgtctct taaaaactct gctccccgaa tgcctlggaa gactgatttg 5100
 agtaataata aaactccagt ctctggctca gtcagctctg catgaattac tctttctcta 5160
 ttgcaattcc cctgtcttga tgaatcagct ctgtctagt accatcctcc acttctcctt 5220
 tcttattgtg tcacttaggg ctctgggtta taaacaactt taccagaac cagatctttt 5280
 aagttagagg aaaagattta ttggatggaa actagaggag gtgagcccat cccactgctg 5340
 tgatgactgg gaccacaaca tctcctctct ctagaagtga atctccctta tgaagtaaca 5400
 agtgcactt attcaggatt catctcagaa gagactctaa tgggccaac ctcagttata 5460
 tgcctgtcct ctgtctgctt gatacagtta gctagcactt ttataacaaa gtaccacaga 5520
 ctgggtggct taaacaacaa aaatgtattt tcttacagtt ctggaggctg caagtccaag 5580
 atcaaggtgt tgacaggggt ggtttctttt aatttttttt ttaaaaattt tatttttagt 5640
 tttaggggat gctgacaggt ttgctacata ggtaaacctc taccacgggg gtttgttga 5700
 cacatttttt catcacccat gtaactaacg tagttactca atagttattt tttccagatc 5760
 tctccctctt cctaccctcc accctcaagt aggcctcagt gtgtctgttg ttcttctctt 5820
 gactccatag ggttgggttc tctctaggcc tctctccttg gctttaggtt gtccatcttc 5880
 tccctgtatg ggtctgtgct ccaactaaca aggcacatcag tcatattgga ctgagacca 5940
 cctaatgatt ttattttaac ttaattacct ctttaaagcc tctatatcca catatagtca 6000
 cactctgagg tatagggggt tccacatgtg gacttcaaca tatgaactgg gagagacaaa 6060
 atttagtctt taatagtgc ccaaatgggg gaaaagggaag atctggaccc tgggtttccc 6120
 atagttagaa gcaatcactg cttctatta agtactcaca gtggggcttc tccagaaaga 6180
 atgatatgct aataagaagg gggaggaggaa gtgatcctgg acagccagat gatatgtgca 6240
 ctattctctc ataattggaga ttctgaagag gagaagcact tgaactaaca ctttttcatt 6300
 cctactccgt cttcaaccaa aagctgtcaa acttctgtll ctgagcccca gccctgaaa 6360
 ttgtcagga aaaggtcatt aatagtctct tgattgcaat atttcaatca aactcttgtt 6420
 tgaattcttt tctacaacat taatactgtt actgttgact actcctctct tgaagatcgt 6480
 ttcccactaa acttctctgt tccctcctct tcaagccctc ctatacaaac tctcttgtca 6540
 gctatttttc ctgtgcacgc ttcaaaaatg ttgcatgtc aagtttctgt cactgactct 6600
 ctctctctct cctctccctc tcaatccctc ctctctctcc ctcaactgtt ccttttaatt 6660
 ctctctcaat actcttacag ttccagagat cttatcctta ctttatctta acctaggatc 6720
 tctggatgga ttcaaataga gcttcttaaa ttaaaggaaa cataatgtgt atatttgcac 6780
 ccttctcttg gagaaaggcc aaaggttttt atcagaggtt tgaaacctca accgtgttgg 6840
 tgcctctcaa atgtgtctt ttgtcaagac ctgtctctct agttccaggg ccatgtgtct 6900
 cactgcctac tggaaactct cacctgaaac cttcacagct acctcaaac caataacatc 6960
 aaaagctgaa atcattgtct ctccctccca aagcctgctc atcttcccat tttcttttgg 7020
 tccatgaaag ctactgccc ctctcttctc acccaaatg gaaatccggc catcaccocg 7080
 acctctcccc ctctcaacc cctcagccaa tcaactacca agtcttctcc atcctctctt 7140
 cctaactctc ctctggatg ctctcattgc atactccact ttaaacaga gtggctcttg 7200
 tctcaactag actgttgaaa taactctcca acttttccct ccaacttcca tctctctccc 7260
 ctctaacctc tctctggac tgcgtctcag gtactttca taaaatataa aacagatctt 7320
 gtgatccccc agtctaaagc ctttttata gtcccatca ccttttagaa taaaatagt 7380
 actgttctac ctgacacaca aaactctctg tgataaatac taattgagtg cctagtatgt 7440
 gctgcctctt gtgctaaatg ttgagggtcc aggggtaaac aaggtgaaca gcttccctgc 7500

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

tctccaagac ctttcagtc acaaatgcaa tgagtttaca gaggagaagc acaagctcct 7560
 aaaggagttg ggggtggggt gggggtcaga acctaattha gaaaattgag gaaggctcca 7620
 acctcccata tgcattttac aatagtaatc agcagggtgtg gtaccaataa tggaaaccaac 7680
 aatttttatc gcattatctc atttaagcca tgagtgccat tattgttagc ctccactttac 7740
 agataaaggaa actgagggct agaaggttaa ataagtgcca gagggtggat ttccctcaga 7800
 ttctctgtgag acccagacat cttaatcctt ttggaacctg tgcttctcct ttgtagtact 7860
 cactacactt gtggaactac atccaaactac acttggtgaa ctacagccag ctctgcaaac 7920
 atgacagctc acttccactcc aagtcctttgc tcatgtctgc cctcttgctt ggaatgccta 7980
 ttctctcaca aaatcttctc gctgaatatt ttgcgatcta attaaagtgt tctctcttcc 8040
 atgtacactc ctccctcaga tagaattagc cactgtcttc ttgtgcata cacagcattt 8100
 cataaatact gtcacagctc ctctagcact tcaataactt atctgatgtt ctcccctaa 8160
 gaaactgtaa gtcctagagg atgacaatca actgaattcc atagtcagaa actctgctg 8220
 tgccctggct tccaatgaga aaaggagaga agaggagggg aaggaaagaa aagggaagga 8280
 gaagaaagaa aagcaaacat gaagataaac acttcaatat atgatalccc aagaccatct 8340
 acctttttg aaaaattttg cttttttttt ttcccccca agagtcaggg tctcactctg 8400
 tcgcccagc tagagtcag tgccatgaac ataactcact gtgacctata actccggggc 8460
 tcaagcaact ctccctgctc agcctctctg gttagctggg ctacagccat gcaccaccac 8520
 atctggctat tattattatt actatattag tagagatggg gtctttctat gttgcctagg 8580
 ctggtctcaa atctctggcc tcaagaactt ctcccaactc acattggcct tccaaagtgc 8640
 tgggattaca ataagccacc ataggccaaa attttgcatt ttatccatta ctgtaaaatt 8700
 aacctttaga aatccaacaa cactcaattt gagaattgtt caacaaccac ttaatgaaa 8760
 cccccgaaa gcttccatc ctgttgcagt ccttttctct cctctctgtc tctctctctc 8820
 tcttctatc tagcccaacc ttttggcagc taagaattcc tccctccatt ggagagccac 8880
 agaccaaaaga ggggtcaaat aagaaaataa gacctcaag aaggaaaaca aagtgaagcc 8940
 ctgtcatcag aagtcacgtg gcagaaagcc acctggatat ctgaaaagaa gaaagaattg 9000
 agggatatac gctttttgcc tcagagacca tctttagccc tgaaggcttt gtttctgctt 9060
 taggtttccc agataagcat ccgaagtgtc acagcaagga actttaagtt tccagatact 9120
 tgtctggatt ttgcaaggcg tagatgagtc acttgagaag gagaactgga atggctgctt 9180
 gggttcattt ccatgttcca atccaaggcc ctgtgagaaa ggggctgctg caagactctg 9240
 tgtgtggcgg ggggaggggt gggtagctgg atggcaatgg gaggatcaat taactccacc 9300
 caggagccaa atgaaacaca caaataaaaa acaaaacctg agtagtggtt tttaggtcat 9360
 tctggagtag aaagagcatt cttttatagc aaaggttggc gggcaccctg gtcagccctc 9420
 gcttccactc caccctaac aagtatcagg tgcccacacg ggcctgctgc tgcctctcctg 9480
 ggcttttcta agccaggtga gacctgtccc agatgtccc gaatccactg gggagtggc 9540
 actataaagc agagtcactt gattttctgc ctgggacctg gaccattgtg agagtaacca 9600
 acgtgggggt acgggggaga atctggagag aagagaagag gttaaacaacc ctcccacttc 9660
 ctggccacc cctccacct tttctgtaa ggagccctgg agccccggct cctaggctga 9720
 cagaccagcc cagatccagt gggccggagg ggcctgagct aaatcccgag gacctgggta 9780
 acagaggaag ggtaaagagt tctgtctct gccctccccc acccccacct tttctgtgat 9840
 cttttcagcc tttctgctgt gactgtttct tccagggccc atttctctac cctactctgg 9900
 tttctctaa cctgaaatc taatgatcaa atcacactaa aaagtcagta gctcctgtgg 9960
 attacatc ctaggagcat atagattttg aattttgaa tttgaaagaa atctctgctg 10020
 gagataatat tgagcagag acactgctag tggctgaa atttgaaag accactttct 10080
 gtgtgcagc agggcctcag ctggagatag atgggtctgg gcgaggcagg agagtgacaa 10140
 gttctgaggt gaaatgaagg aagccctcag agaatgctcc tcccacctg aatctatcc 10200
 ccaggtctc actgtccat tcttggctc ggggtgatcc aaatccagga gatggggcaa 10260
 gcactctggg atggctgagg gcacactctg gcagattctg tgtgtctct cagatgctca 10320
 gccacagacc tttgagggag taaaaggggc agaccaccac acctgtctc caggctctt 10380

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

ccttcotggt cctgttctat ggtggggctc ccttgccaga cttcagaactg agaagtcaga 10440
 tgaagtttca agaaaaggaa attggtgggt gacagagatg ggtggagggg ctggggaaag 10500
 gctgtttact tctcctgtc tagtcggttt ggtcccttta gggctccgga tatctttggt 10560
 gacttgtcca ctccagtggt goatcagggg ctggggaaag gctgtttact tctcctgtc 10620
 tagtcggttt ggtcccttta gggctccgga tatctttggt gacttgtcca ctccagtggt 10680
 goatcagtggt gcagctgtct cttcccaactg ctctgctact tctaggttag tccaggtctc 10740
 cctggttgag ggagaagttt gagatgcctt gggttcagca gagaccctt ttcaggctac 10800
 gaatgagact cccacgaagg gatgggaccc ctccaccat ctatagctgt ggttaggact 10860
 cttaggacaa gccaaagtgg ggttagaaat gaggagaatg ctggttccaa ttggggcata 10920
 ctcatgagtg agggcagtca cttcaccctc ctgggtccca gaatcactct gtggaacca 10980
 agagcttcca ctagalgttc cctaggytct gtctcttcca gtttgacatt ccaggyttct 11040
 cctctatgat ttccaatttc taccctttct tgtggggata tgggttgagg ctctttctgt 11100
 agcttggttc agggaaattc aacctgtacc cttaattgtt gactttgca caggagcaag 11160
 gggtaaggga gcaggttga aaatagggat ttgtgttgac agtgggcaa gaggcatgaa 11220
 cagttggagc cagagagcag gttagcaagt ttccaccaga aacatcctga ttcttgggaa 11280
 aattgggctc ctggggcaga ggaggcagg gtagttttaa actcactcta tggttcaatc 11340
 actctgatct ctgcccctac tcaattttg atttatcttt ttcttgcag ttccagctgc 11400
 catgoggact ggtgagtcag cttcatggtc ttggattgac ccagtggggc acatagggg 11460
 acaaaggcca taagatattg ggaatgctt gttgaatggg aaaatgctga tgtggggtta 11520
 gcagggatag ttctcccaac acagcagaac ttggccctgt gcttctctgg ccagctttcc 11580
 ttaagatact gaacaggcca aaaatggggc caagatgctc taagactgag ccaaccaaga 11640
 tgggtttgca atgagctcat tctggctttg aggtccctg ggaatggcag tgtagagcct 11700
 gctcctctcc ctgtctcac cccacattat ctggctcct cagaagatct cccaaggct 11760
 tgggtgttcc tggagcttca atggtcacag gtgctcgaga aggcacagtg gactctgaa 11820
 tggcaggag cctactcccc tgaggacaat tccacacagt ggtttccaa tgagagcctc 11880
 atctcaagcc agggctcgag ctacttcat gacgctgcca cagtcgacga cagtggagag 11940
 tacaggtgcc agacaaacct ctccaccctc agtgaaccgg tgcagctaga agtccatctc 12000
 ggtgagttga tgaaggggaa gaggaaaatc accaataaag ggtgaaacaa aggtctctga 12060
 aatacttggt aagagccaga gatgatattc tttagataa aagctaagat gagatgatgt 12120
 tgggtccca c tgaatggtat cagagttgta gtcctagctc taagttagtc ttgggcaaaa 12180
 tgtcaaaagg tgtcagacag tagatatagg actgctgcat tgcacaattc caagaatccc 12240
 catatggagt gcatacaatg tgaatgtgct atgtgaaggt taggcccagg catagatgct 12300
 caataatagt tatttatata tttatttca tttttttta ttttttttt tgagacagag 12360
 tatcactctg tcaccocaggc tggagtgcaa tgcggcaatc tcagctcact gcaacttctg 12420
 cccccctggg ttgtagtgat tctcctgctc cagcctcccg agtagctgag attacagga 12480
 cccgccacca cgcocagcta atttttgtat ttttagtaga gacagggttt caccatggtg 12540
 gtcagctcgg tctcaaacctc ctgacctcag gtgattcaacc agccttggct tcccaaaagt 12600
 ctgggactac aggcgtgagc caccacaact gccaataat atttattgaa taaataatg 12660
 aatttgggt taggacctca atctcctctc cgctctcaga catgtaatgc cctaagcca 12720
 ctccccaaag aatcctagtg gcctagcctc atatctttct gtctcctcat caatgctata 12780
 ctcaaaccta taattaagca taaatttggg aatgtgatag ctcttccaat agaggcagat 12840
 acatgttccag cctgcacatt aatcatgaca tgaagttct tgtgtactat taacagaata 12900
 tagacgtcag acacaggtag gagaatatt ttgaaggcag aggtctttcc tgggtctcct 12960
 acaacttacc cacatagget ggtccctgca gtgtcgccct gcaaacctaa ctctacttcc 13020
 acggctgttc cacttataca atgtttatgg gtggaacaag ctttggggga agaaggcat 13080
 aaggaggtgg atctgcaaga gagctccatg gaattgggccc tctgaaactg attttgtgg 13140
 ctcttggcc tctgacagta ccactcaact gacatggtct tcaacttcca gagctacaag 13200
 aagatgtctc ctttttagc tagttagag atgtccacct acaaccaat aaaaaggggg 13260

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

```

aattaccaag agaagcaat agaaaaatca agtctaagag ttactagttt gcottgaact 13320
tggctctaga aactggcttt agaagtctag ccaatcaagg ctatattaaa ctgtgaacct 13380
gagaattagc ttcaccagggt aaacttctga gcataccttta atccttttagg acccatttca 13440
cttatgtcct cctctgagaa gcatttttta ctctcttttt tgtttgtttg tttgtgtttg 13500
tttttgtttt tgtttttgag acagagtctc tctctgtcac ccaagctgga gtgcagtggc 13560
gcaatcttg ctcactgcaa cctccaectc cogggttcaa gcaattctcc tgccctoaagg 13620
tcccagtag ctgggactac aggtgcatgc caccacgccc ggctaatttt ttgtattttt 13680
agttagagaca gggtttgcga gcgttagcca ggatggcttt gatctcctga cttcatgac 13740
tgcccactc ggctcccaa agtactagga ttacagatgt gagccaccgc gcccaagcctg 13800
cattttttac tcttctcagg cagaatttct ttattccaat ctagtacgcc ccgcagtctc 13860
ttattcttag cctgtttag cactgtcat attgtattgt gattatttct gaatatttat 13920
gtttctatgt ctgactgta gattctttga ggctgagaac tatatgtccc atcatctggg 13980
tatctccagt ccacagtgtg tcatacatag tgagtgtctg atgaatatc acttgaagga 14040
atatacatat ggacattcac tgggtccatg acaggataga ttogaacaag aatgttctcc 14100
caaaggccac cagactatata actaacatg actttatgct aataatgatt cactctctg 14160
ctgaaaaagt aagtgatag ataggacat ggctctcttt gataaatgat atctcttaat 14220
aggtaatgaa gattacttct tgtttggcaa atctttgtgg tagagaatca tgacaacac 14280
acgtctacc aattttgttt agcatcagggt agtagathtt taaattata gtaattcaag 14340
ctgagaatgt agatttaaaa aataaaatta ttgtaatttt tgtttgttc ttattacaaa 14400
agtcatttgg ggctcaattc aaaaatata aaaaagtaaac aggagaaatt taaaatgtcc 14460
ttcagtcoca ctctctca gaaaaccct gttaatatgt aagtgcata cctctctttt 14520
tctgtgcata atactttta aatatttga agtattatgc ttttttaact taaaattgtc 14580
tcatgaatat ttcttatgc cattataata cttaactata acatcattat tttttaatta 14640
ttcaggccct ttcccgaca tgacctatgt ttctctcttt gtgaagtctg attacttgg 14700
gacatgatcg tgagaataag ctctggcat ataagaattt cctctcttga aggccatgct 14760
cagtaaatca cttgtgaca tgatcgtgag aataagctct ggcgatacaa gaatttctc 14820
tcttgaaggc catgctcagt aataaagggt gtctcaccga ggcctgtga cactttaga 14880
accacgaatt gccaggctga gcaataccag tccgcocctt cccctccctg gtgtttacat 14940
tgagtctccc ttcacaattt ctgcagccac tccgtggcca ccgtcacctt attcctgact 15000
gccacaagag tctttcaata ttctttgat tgcctattcc ttctgaaatc taactttctc 15060
tctaataagg caattcatca ttttcaaatg caatttttac tctgatctag aacttaactg 15120
gaatcctctg cactgcccac agcaaatcta agtctagcac ttaaggatcc tgcaagatag 15180
ctcatcgttg cttctcactt acctattgc ttagtccctc tgccttaacc ctgtgtgttg 15240
atcacatgtg tgtgtctccc tcttccocat tagacaaaag tcttggtagt acttcagtcc 15300
tcttgagggt ccccatcagc tcttcccaa agggagctat gcagggttga ctcccaatct 15360
ggctttccct tatgtctcag gatctgggtg gtaactggcc ccttcacaaa gctctgcact 15420
gagagctgag gcctccggg cctgggtgt ctgtgtcttt caggctggct gttgctccag 15480
gcccctgggt ggtgttcaa ggaggaagac cctattcacc tgaggtgtca cagctggaag 15540
aacactgtc tgcataaggc cacatattta cagaatggca aaggcaggaa gtattttcat 15600
cataatctgt acttctacat tccaaaagcc acactcaagc acagcggctc ctactctgc 15660
aggggcttt ttggagtaa aatgtgtct tcagagactg tgaacatcac catcactcaa 15720
ggtgagacat gtcccacct ggaatgccc aaggacgctg tgtgtggaac ctgcaatcac 15780
actgggaagt tgagtggga ggagatctct gattcttaca cgcacttctt catatgtgt 15840
tccctcctgg tgatcccaag gaggtcccca aaagtccctg attgcagggt aggtttgca 15900
ctctgttca gtcattctt ttgggttagc taggaggtgt cattcaactc gcagcatgat 15960
ggcaggagca gaagccacat ctctcccca ataaatcct ctgtcttcc ttacgctaat 16020
cacaccacg gtgtcatatg ttctatctgt gctggcctcc tcttatcca agccttttag 16080
ccacgatcca aactggcagg agcccctcat cccctcacag aaagagccca gaacctgggt 16140

```

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

totggccctg cagctaatta accatctgac cagagggtgag ccaacttagtc tctctgaacc 16200
 ccaatttctt ctcccgtaac aaaaataaagc tgacattttat tgggcaacctt tcagtgtgct 16260
 agactctgtg cttaaaacaatt ctttaacatgc acctgggttg actatcacag tagaccttca 16320
 caacatgaga taggtaatat tccattttac agatgaagta accyaggtgc aaaaataaat 16380
 aataaagttt cctaagggtc acatcaaaaga cttcaaaagcc tgtatattta accagtaagt 16440
 aaaaagattg aacaagcact aatatoctat gatccatta agtcatccac aaaaatcttc 16500
 taggttctgt agcaccagcc tccagaatca gagctctaga gtggtgtgcc tggactttcc 16560
 agtttcacag aacttctatc tgtaactagc ccaagacata aattgtaaac aattgcatg 16620
 tagaaaaggca gcaaaaaccc ttttgagatt ttgacactac aatgccataa tttgtacaaa 16680
 aataattca tgacacttta aactgaaagt aaatactccc aagtggttag ggaagagag 16740
 caaataaagc aaatgggta acatgtaaac aatgagtga tctgggtaaa ggatatacga 16800
 gattaaacta ttctggatc tttttttta agtttggaaa tatatcaaaa tcaagagttt 16860
 aaaaattgga aatgcaaaat caacaattt gtcccagttt ctgaccataa gcaattgtctg 16920
 acaatttctt aactgtcaca caaaacccag cttacaacct aacttgtaa cgtccctctg 16980
 cacatctctg tcaaaacaagc aggagccttt gctcagttt tggtagctg tcctctgctc 17040
 agatagcact aagatcagga accaatggga ggaagcaata ctttcccaca gacttcccaca 17100
 ccaattccac caactgacctg ttggctgttg tcaagaactt tctactggtg acctcaactg 17160
 ttgttccaaa tatctgcctt agtgactgtc attttttttc atctctccac ttctctaact 17220
 aggtttggca gtgtcaacca tctcatcatt ctttccacct gggtaaccaag tctcttctg 17280
 ctgggtgatg gtaactcctt ttgcagtga cacaggaacta tattctctg tgaagacaaa 17340
 cattcgaagc tcaacaagag actggaagga ccaataattt aatggagaa aggacctca 17400
 agacaaatga cccccatccc atgggggtaa taagagcagt agcagcagca tctctgaaca 17460
 tttctctgga ttgcaaaccc catcatcctc aggcctctct acaagcagca ggaacatag 17520
 aactcagagc cagatccctt atccaactct cgaactttcc ttggtctcca gtggaaggga 17580
 aaaaaccatg atcttcaagc aggggaagccc cagtgaagt ctgcttctc agaattgaa 17640
 gtttcagagc tacacaaaca cttttctgt cccaaccgtt ccttcacagc aaagcaacaa 17700
 tacaggctag ggatggtaat cttttaaaca tacaataatt gctcgtgtta taaattacc 17760
 agtttagagg ggaaaaaaaa acaattatc ctaataaat ggataagtag aattaatggt 17820
 tgaggcagga ccaatcagag tgtgggaact gctgggac tagggaattc agtgggacca 17880
 atgaaagcat ggctgagaaa tagcaggtag tccaggatag tctaaggag gtgttccat 17940
 ctgagccagc agataagggt gtcttctag aacattagcc gtatggaaat taacaggaaa 18000
 tcatgagggt gactagaaat tgagtcttcc aggggactct atcagaactg gacctctcc 18060
 aagtatataa cgatgagctc tcttaagtct aggagtagaa aatggtccta ggaaggggac 18120
 tgaggattgc ggtgggggtt ggggtggaaa agaaagtaca gaacaaaccc tfgtctactg 18180
 tcccaagttg ctaagtgaac agaactatct cagcatcaga atgagaagc ctgagaagaa 18240
 agaaccaacc acaagcaaac aggaaggaaa gcgcaggagg tgaaaatgct ttcttgcca 18300
 ggttagtaag aattagaggt taatgcaggc actgtaaac caccttttct gcttcaatat 18360
 ctaattcctg ttagctttg ttcatgcat ttatataaca aatgttgtat aaccaatct 18420
 aaatgacta ctgactctg ctgagttaag ttatgaaact ttcaaatct tcaatctgct 18480
 agttccaatg aggtgggat ggagaagaca attgttctt atgaaagaaa gctttagctg 18540
 tctctgtttt gtaagcttta agcgcacat ttcttggtt caataaagca ttttacaaga 18600
 tcttgcctg tactcttaga tagaagatgg gaaaaccatg gtaataaaat atgaatgata 18660
 aaattcttct ttcttccctt tgtccaacat tgtaacagag attggttgg attggtaga 18720
 aacacccccct cctcccagca accatctcac cacactcat ataaattagc cagcttctt 18780
 tccaatctt gctgagacaa ttgggctaag gaggattctt atgggaagta tgggatagga 18840
 gggtagaata gcattagaga tctgtttaga gcattggggc agataggaga aggcacagct 18900
 acacaggagg tagaggctg ggcagaggtg gagggtcagc ctgattgtat gaattatgag 18960
 ctatatacca agacgattca agctagattg catacataa tattacataa gattccgaca 19020

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

cgcacacaggt goatttggaa accttggaca ttcaactcac atttatttac tacctacaat 19080
 gtgcaagcctt gagttcaggt gctgaagata ccagatgaac aacacaaggt cattccctgg 19140
 agaagcttta ttcttagtga gaaaaacagt taaataggaa gagaatgaag aaagggctgc 19200
 agaaaagagg cttgatttgg ggggtgtggt catgaaggat gagtaggagt tcgccaggca 19260
 aagaagagaa gaaaagccca aggttcatag gcaaaagatto aaaaaccaga gtgtgagttc 19320
 aagaagcag tttggttctg tgtcggtagg ggagagggaaa gagtttcaagg gccagatcat 19380
 gaagggcatt accttccaaa ctaaggagat cgtatcagac cctgcaatac attgagagag 19440
 tllaagcaga ccagggttgt accgtatagt attttagaag gattctctcg caactactgt 19500
 atggatggac gggacaggag agttgaagac cagaagccaa atagggcagc aaggcaggat 19560
 gcagtaacc aaagggagca atgaggaagt aactggcgtt gaggctggag aggaaggtgc 19620
 ttaatcaaca aggtatttag gaggccgact ctccaagaat tggcagccag cagtacacgg 19680
 cgtgactaag gaccaggttc cacacatagt gcccgtttct tgagttagga aatagaaagg 19740
 caaggcaggt acagggttgg tggaaagaca aacaattctg tttgtatta ttagtactta 19800
 ctctcttgg tcaagtaatt ttcttaagt gtcagtttcc ataactgaat tgcctgtgtt 19860
 aagcagctaa gagttatcac tacaacccta gtccgaaaaa ccaaatacct caaaattacc 19920
 cgtacagcac taaggcagaa gaggccattg ggaaccacac aacgcggagg tctgctacca 19980
 gagctccctg cggtttagcac cggcgtggt ttgagccgc aagcctccag cgtcccagc 20040
 ggatagcacc gcacgcagtt ttttcagtca aagtttcaaa aaccaggtt tcacaaaatg 20100
 cgacttccgt cctgggttgg gatcgaacca ccaacctttc ggttaacagc cgaacgcgct 20160
 aaccgattgc gccacagaga cgggcgttgg cgtatttggc tgccaagtca ctctactgaa 20220
 gaaaaaatgc tcagcactca cgtctccaaa aaaattgagg ttgattgaa accagtgaca 20280
 caattagctt tccgtgcttc agggcggcgc tcatagccct gaggcagca ggtctttttt 20340
 ctggcctagc acttgcttag atctggagca ggaactcagct tccagcagaa gaggttgaga 20400
 aaagagagac agaagagaat gcaggaacga aggtctctcg gggaaatcaa aatggatgct 20460
 ctctgtgggt tgggggttc cgttgatttt ggtcagagaa gtacgacgat aagctttttt 20520
 tgctgatgta gacaacttat gtagcatgt gcacacgltt agtctgact cataataagc 20580
 ttattatcgt gagcaataaa aatattttct ttcaggtcca atcagctcca gcaaaatgtg 20640
 atgctcaagt aagttagttt lgtgttacia aattagtctt caaccacgc tgttttgaaa 20700
 ggtttctacc ggcattattg acatgcagac agaacacgga gcttaaaaag cctgtaacat 20760
 tccaattaet ggtattcagc ttggaaataa aaaatatttt ttaaaaaatg cgtgcaactt 20820
 aaggactttc atgctgacat atccagatcc aaatatctga ggacagagac cctaattccc 20880
 eccaccatcg acctagggaa cctcgtcagt gctgggtcta aaaaggcttt tttttttctc 20940
 ttaattcata tgtatatata ctttattcat atatatatat actttaagtt ctaggctaca 21000
 tgtgcacaag gtgcaagttc gttacatata catgtgccat gttggtgtgc tgcaccattt 21060
 aactcgtcat ctacattagg tgtttctcct aatgttatec ctccctcctt ccccccca 21120
 cgacaggtcc cgggtgtgta tgttccctac catgcacacg tatgtttatt gtggaactat 21180
 tcacaatagc aaagacttgg aaccaacca aatgtccatc aatgatagac tggattaaga 21240
 aaatgtggca catatacact atggaatact atgcagccat aaaaaagat gagttcatgt 21300
 cctttgtagg gacatagatg aagctggaaa ccatcagttc gaacaaacta tcacaaggac 21360
 agaaaatcag acaccgcatg ttctactca taggtgggaa ttgaaacata agaacacttg 21420
 gacgaaagcc attttctata ttgccccaaa accaggtctc ctccatagcc tccacacaga 21480
 atctccttct tttctgccct gccatcctct gtcacagtg ggcctcagtt tagggcaggt 21540
 tggaaagttt caatgatgtt cagtgaatg agaagacatg caaacataga tatgtatatg 21600
 cagaatttat atatgcatat atgtttatat gtacacagta tcatatgtat aataaataag 21660
 taataaata aataaattg ccaaatgato tttaaactag agtcatttat tttttttatt 21720
 aattttttt ttgagatgg agcttctctc tgtcgcctag gctggagtc agtggcgcaa 21780
 tcttggctca ctgcaacctc caactcccac atccaagcaa ttctcctgtc tcagcctcct 21840
 gagtactgca gattacagtc atgggcccac atgcccggct aatttttcta tttttttttt 21900

WO 03/035904

PCT/EP02/11397

```
ttttttttg agacagagtc tcgctgtcgc ccaggttgga gtgcagtgcc gcgatctcgg 21960
ctcactgcag gctccgcccc ccgggattca cgcattcttc ctgcctcagc ctccctgagta 22020
gctgggacta caggcacctg ccacctcgcc cggotaattt ttttgtatt ttggtagaga 22080
tgggctttcg ctatgttggc caggctggtc tcaaacctct gacctcaggt gatcctcctg 22140
ctcagcctc ccaaacctgct gggattacag gtgagagcca ctgtaccagg cctagagtca 22200
ttcttttat actttaaatt tttgtctctg ttcttttctc cagacctgtg gagctggcaa 22260
tatgggcaag tgtcatggac tgtctactgc caggaagctc cattgtcacc gacaggatca 22320
gaagtggcat ggtaaatggt acaagaaaac ccattcgggc acagtctga agaccagcct 22380
ttttggaggt gcttctcatg caaagggaat tgggctggaa aaagttagga ttggagccaa 22440
atagcccagc totgccaactg agsagtgtgc cagggccaaag ctgatcatcc agcataagct 22500
agatgctgtg gtctccaactg gcacagctga tctcttgyt acaggatgga ggctgtgagg 22560
cagatgagag aacagcaaga aatcacagc ctttgtacct gatgatgatt gcttgaattt 22620
tattgaaaaa aatgatgaag ttctgtatca ggggaaccag caccacaat tccaatgtag 22680
gttct 22685
```

【 国際公開パンフレット (コレクション) 】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 May 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/035904 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/EP02/11397
- (22) International Filing Date: 11 October 2002 (11.10.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
01402718.9 19 October 2001 (19.10.2001) EP
- (71) Applicants (for all designated States except US):
CENTRE HOSPITALIER REGIONAL ET UNIVERSITAIRE DE TOURS (FR/FR); 2, boulevard Tonnelé, F-37044 Tours Cedex (FR); INNATE PHARMA (FR/FR); Immeuble Grand Préd, 121, ancien Chemin de Cassis, F-13009 Marseille (FR).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WATIER, Hervé (FR/FR); 58, rue du Maréchal Foch, F-37510 Ballan-Miré (FR); CARTRON, Guillaume (FR/FR); 68, route du Petit Bois, F-37510 Savennières (FR); COLOMBAT, Philippe (FR/FR); Rocheceave, F-37270 Larceny (FR).
- (74) Agents: BECKER, Philippe et al.; Cabinet Becker et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, GR, GU, HD, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaration under Rule 4.17:
of inventorship (Rule 4.17(v)) for US only
- Published:
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
16 October 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/035904 A3

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS TO EVALUATE ANTIBODY TREATMENT RESPONSE

(57) Abstract: The present invention relates to methods and compositions to evaluate or assess the response of a subject to particular therapeutic treatment. More particularly, the invention provides methods to determine the response of subjects, or to adapt the treatment protocol of subjects treated with therapeutic antibodies. The invention is based on a determination of the FCGR3A genotype of a subject. The invention can be used for patients with malignancies, particularly lymphoma, and is suited to select best responders and/or adjust treatment condition or protocol for low responders.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International No. PCT/EP 02/11397
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
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 C12Q		
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, BIOSIS, PAJ, WPI Data, LIFESCIENCES, CANCERLIT		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 12848 A (UNIV LEEDS ;ISAACS JOHN DUDLEY (GB); MORGAN ANN WENDY (GB)) 22 February 2001 (2001-02-22) the whole document	1-3,5-15
A	COLOMBAT: "Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as first-line therapy of follicular lymphoma patients with low tumor burden: clinical and molecular evaluation" BLOOD, vol. 97, pages 101-106, XP002201492 the whole document	1-19

	-/--	
<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 claims 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 principles 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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 April 2003		Date of mailing of the international search report 22/04/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentrein 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2000, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010		Authorized officer Bort, S

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information	Location No
PCT/EP	02/11397

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>CALTZ R ET AL: "ASSOCIATION OF FCγMMMA RIIIA-158F ALLELE WITH RHEUMATOID ARTHRITIS"</p> <p>ARTHRITIS AND RHEUMATISM, LIPPINCOTT, PHILADELPHIA, US, vol. 42, September 1999 (1999-09), page S245 XP000990708 ISSN: 0004-3591 the whole document</p>	1-19
A	<p>LEPPERS-VAN DE STRAAT F G J ET AL: "A novel PCR-based method for direct Fcγmmma receptor IIa (CD16) allotyping"</p> <p>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 242, no. 1-2, 28 August 2000 (2000-08-28), pages 127-132, XP004210716 ISSN: 0022-1759 cited in the application the whole document</p>	1-19

Form PCT/ISA/W210 (continuation of second sheet) (July 1982)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International application No
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	PCT/EP 02/11397
WO 0112848	A	22-02-2001	AU 6580200 A WO 0112848 A2	13-03-2001 22-02-2001

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 27/26 3 0 1 A

(81)指定国 AP(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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,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,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100078662

弁理士 津国 肇

(74)代理人 100075225

弁理士 篠田 文雄

(72)発明者 ワティエ,エルヴェ

フランス国、エフ - 3 7 5 1 0 バラン - ミール、リュ・デュ・マレシャル・フォッシュ 5 8

(72)発明者 カルトロン,ギョーム

フランス国、エフ - 3 7 5 1 0 サヴォニエール、ルート・デュ・プティ・ブワ 6 8

(72)発明者 コロンバ,フィリップ

フランス国、エフ - 3 7 2 7 0 ラルケ、ロシュカーヴ

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA63 CA02 HA08 HA11 HA19

4B063 QA01 QA13 QA17 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ12 QQ43 QR08

QR32 QR35 QR42 QR55 QR62 QR77 QS25 QS28 QS34 QS36

QS39 QX01

專利名称(译)	用于评估抗体治疗反应的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2005506093A	公开(公告)日	2005-03-03
申请号	JP2003538404	申请日	2002-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	CENT HOSPITALER区域和UNIV DE TOURS 伊纳特医药公司		
申请(专利权)人(译)	中心 - Osupitarie , 商业中心菜等技术的Uni威赛瓷去旅游 Ineito制药		
[标]发明人	ワテイエエルヴェ カルトロンギョーム コロンバフィリップ		
发明人	ワテイエ,エルヴェ カルトロン,ギョーム コロンバ,フィリップ		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/6886 G01N27/447 G01N33/566		
CPC分类号	C12Q1/6881 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/156		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.Z C12Q1/68.A G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A G01N27/26.301.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/HA08 4B024/HA11 4B024/HA19 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ12 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
优先权	2001402718 2001-10-19 EP		
其他公开文献	JP4216720B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于评估或评估受试者对特定治疗性治疗的反应的方法和组合物。更具体地,本发明提供了确定受试者反应的方法,或适应待治疗抗体治疗对象的治疗方案的方法。本发明基于受试者的FCGR3A基因型的确定。本发明可用于患有恶性肿瘤,特别是淋巴瘤的患者,并且适用于选择最佳应答者和/或调整低应答者的治疗条件或方案。

Ab特异性	DCI	商用品	代表的な適応症
抗CD20	リネキシマブ	マブテラ (MabThera (登録商標)) リツキサン (Rituxan (登録商標))	LNH B
抗CD52	アレムツズマブ (alemtuzumab)	キャンパス-1H (CAMPATH-1H (登録商標))	LLC, 同種移植片
抗CD33		ザミル (Zamy1 (商標))	急性骨髄性白血病
抗HLA-DR		レミトゲン (Remicagon (商標))	LNH B
抗CD22	エブラツズマブ (epratuzumab)	リンフォサイド (LymphoSide (商標))	LNH B
抗erbB2 (HER-2/neu)	トラスタズマブ (trastuzumab)	ハーセプチン (Herceptin (登録商標))	転移性乳癌
抗FCGR (HER-1, erbB1)	セツキシマブ		ORLおよび結腸直腸癌
抗MUC-1		テレスタ Theres (登録商標)	乳癌および上皮癌
抗CEA	ラベツズマブ (labetuzumab)	CEAサイド (CEA-Side (商標))	癌(抗血管形成)
抗αVβ3		ビタキシン (Vitraxin)	癌(抗血管形成)
抗KDR (VEGFR2)			
抗-VRS 融合タンパク質 (idem)	パリビズマブ (palivizumab)	シナジス (Synagis (登録商標))	ウイルス性疾患
CMV	セビルマブ (sevelumab)	ヌマックス (Numax (商標))	Idem
Hbs	ツピルマブ	プロトセル (Protopar)	CMV感染症
抗CD25	バシキシマブ	オスタセル (Ostacel (商標))	B型肝炎
抗CD25	ダシリツマブ	シムレク (Simulec (登録商標))	予防/処置 同種移植片拒絶
抗TNF-α	インフリキシマブ	ゼナパックス (Zenapax (登録商標))	予防/処置 同種移植片拒絶
抗IgE	オマリズマブ	レミケド (Remicade (商標))	クローン病, 多発性関節炎, アトピー
抗インテグリンα1 (CD11a, LFA-1)	エファリズマブ	キソレフ (Cosair (商標))	喘息
抗CD4	ケリキシマブ (keliximab)	キサンリム (Xanelim (商標))	乾癬
抗CD2	エリツマブ (elilumab)		
抗CD64			貧血
抗CD147			GVH
抗インテグリンα4 (α4β1-α4β7)	ナタリズマブ (natalizumab)	アンテグレン (Antegren (登録商標))	硬化症, クローン
抗インテグリンβ7			クローン, RCH
抗CD4*	クレノキシマブ		