

(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2015-529808

(P2015-529808A)

(43) 公表日 平成27年10月8日(2015.10.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A	4 B O 2 4
GO 1 N 33/573 (2006.01)	GO 1 N 33/573 A	4 B O 6 3
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	4 B O 6 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5	4 B O 6 5
CO 7 K 16/40 (2006.01)	CO 7 K 16/40	4 C O 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-524430 (P2015-524430)
 (86) (22) 出願日 平成25年7月24日 (2013. 7. 24)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年3月4日 (2015. 3. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/051904
 (87) 国際公開番号 W02014/018683
 (87) 国際公開日 平成26年1月30日 (2014. 1. 30)
 (31) 優先権主張番号 61/675, 276
 (32) 優先日 平成24年7月24日 (2012. 7. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

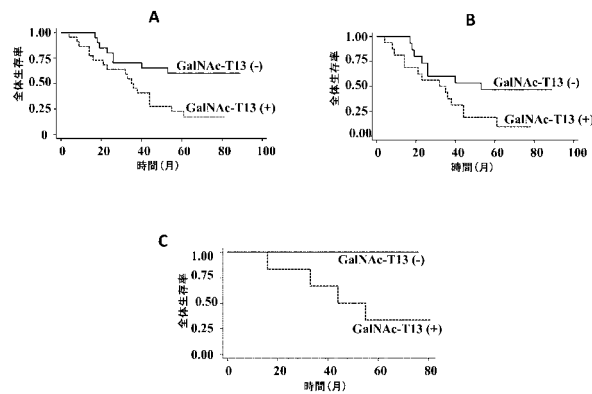
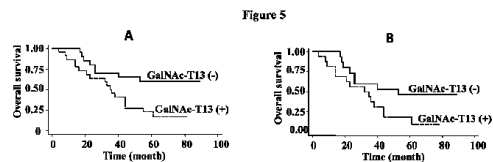
(71) 出願人 514135801
 シーダーズ-サイナイ メディカル センター
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス ビバリー ブールバード 8700
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺癌を有する患者における化学療法に対する耐性を検出するための新規の方法

(57) 【要約】

癌を有する対象において、化学療法耐性の可能性を判定し、化学療法に対する応答を予測するためのプロセス、アッセイ、および方法に関する。一実施形態において、該対象は、肺癌を有している。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 化学療法耐性の可能性を知ることが望んでいる癌患者から腫瘍細胞を含む試料を得ることと、

(ii) GalNac - T13 またはその変異体のレベルを決定するために、前記試料をアッセイすることと、

(iii) 基準試料と比較して GalNac - T13 もしくはその変異体のレベルが増加している場合に、前記対象の化学療法耐性の可能性が増大していると判定すること、または前記基準試料と比較して GalNac - T13 もしくはその変異体のレベルが同じであるか、もしくは減少している場合に、前記対象の化学療法耐性の可能性が減少していると判定することと、

を含む、方法。

【請求項 2】

前記試料をアッセイすることが、GalNac - T13 もしくはその変異体をコードする核酸のレベルを検出すること、GalNac - T13 タンパク質もしくはその変異体のレベルを決定すること、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

GalNac - T13 またはその変異体をコードする核酸のレベルを検出することが、前記試料中に存在する GalNac - T13 またはその変異体をコードする mRNA の量を決定することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

pGalNac - T13 タンパク質またはその変異体のレベルを検出することが、ppGalNac - T13 またはその変異体に特異的な抗体を用いて、GalNac - T13 またはその変異体のレベルを検出することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記モノクローナル抗体が、GalNac - T13 またはその変異体のエピトープ L L P A L R に結合する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記対象がネオアジュバント化学療法を受けたことがある、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記癌が肺癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

肺癌が非小細胞肺癌 (NSCLC) である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

NSCLC が腺癌である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記試料が、組織、血液、血漿、またはそれらの組み合わせである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記試料が、癌治療前、癌治療中、または癌治療後に得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記対象がヒトである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

基準値が、癌を有していない対象の集団における GalNac - T13 またはその変異体の発現レベルの平均または中央値である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

基準値が、癌を有しており、かつ化学療法に応答する対象の集団における GalNac

10

20

30

40

50

- T 1 3 またはその変異体の発現レベルの平均または中央値である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】

基準値が、異なる時点から得られた試料における、前記対象からの G a l N A c - T 1 3 またはその変異体の発現レベルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記対象の化学療法耐性の可能性が減少している場合に、前記対象に第 1 の治療法を処方すること、または前記対象の化学療法耐性の可能性が増大している場合に、前記対象に第 2 の治療法を処方することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記第 1 の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記第 2 の治療法が、外科手術、放射線照射、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちの 1 つ以上、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記第 2 の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上であり、化学療法が、前記対象に、前記対象を治療するためにこれまでに使用されていない 1 種以上の化学療法剤を投与すること、または前記対象にこれまでに投与された化学療法剤を、これまでに投与された用量よりも高い用量で投与することを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

化学療法耐性の可能性の増大の判定を、それを必要とする対象において行うためのアッセイであって、

(i) 癌を有している対象からの生体試料を提供することと、

(i i) G a l N A c - T 1 3 またはその変異体に特異的に結合する抗体を提供することと、

(i i i) 前記生体試料を前記抗体と接触させることと、

(i v) イムノアッセイを使用して、G a l N A c - T 1 3 またはその変異体に結合している抗体のレベルを検出することであって、基準試料と比較して前記対象からの前記生体試料中の結合の存在が、前記対象における化学療法耐性の可能性の増大を示す、ことと、を含む、アッセイ。

【請求項 2 2】

癌を有している対象に対する治療法を選択する、および任意で前記治療法を施行するためのアッセイであって、

(i) 癌を有している対象からの生体試料を提供することと、

(i i) G a l N A c - T 1 3 またはその変異体に特異的に結合する抗体を提供することと、

(i i i) 前記生体試料を前記抗体と接触させることと、

(i v) イムノアッセイを使用して、G a l N A c - T 1 3 またはその変異体に結合している抗体のレベルを検出することであって、基準試料と比較して前記対象からの前記生体試料中の結合の増加が、前記対象における p p G a l N A c の発現の増大および化学療法耐性の可能性の増大を示す、ことと、

(v) 前記対象の化学療法耐性の可能性が減少している場合に、前記対象に第 1 の治療法を処方すること、または前記対象の化学療法耐性の可能性が増大している場合に、前記対象に第 2 の治療法を処方することを含む、治療法を選択することと、を含む、アッセイ。

【請求項 2 3】

前記第 1 の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上である、請求項 2 2 に記載のアッセイ。

10

20

30

40

50

【請求項 2 4】

前記第 2 の治療法が、外科手術、放射線照射、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちの一つ以上、請求項 2 2 に記載のアッセイ。

【請求項 2 5】

前記第 2 の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちの一つ以上であり、化学療法が、前記対象に、前記対象を治療するためにこれまでに使用されていない 1 種以上の化学療法剤を投与すること、または前記対象にこれまでに投与された化学療法剤を、これまでに投与された用量よりも高い用量で投与することを含む、請求項 2 2 に記載のアッセイ。

【請求項 2 6】

G a l N A c - T 1 3 またはその変異体に対して反応性がある抗体のレベルを検出することが、

(i) 前記癌患者からの前記試料を、G a l N A c - T 1 3 またはその変異体に特異的に結合する抗体またはその断片と接触させることと、

(i i) 前記抗体と、前記試料中に存在する G a l N A c - T 1 3 またはその変異体との抗体 - タンパク質複合体を形成することと、

(i i i) 非結合抗体を除去するために前記試料を洗浄することと、

(i v) 前記試料中の G a l N A c - T 1 3 またはその変異体に結合した前記抗体に対して反応性があり、かつ標識された検出抗体を添加することと、

(v) 非結合の標識された検出抗体を除去するために洗浄することと、

(v i) 前記標識を検出可能なシグナルに変換することであって、前記検出可能なシグナルが、前記患者からの前記試料中の G a l N A c - T 1 3 またはその変異体のレベルを示す、ことと、を含む、請求項 2 1 または 2 2 に記載のアッセイ。

【請求項 2 7】

前記試料が、組織、血液、血漿、またはそれらの組み合わせである、請求項 2 1 または 2 2 に記載のアッセイ。

【請求項 2 8】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 2 1 または 2 2 に記載のアッセイ。

【請求項 2 9】

前記抗体が、G a l N A c - T 1 3 またはその変異体のエピトープ L L P A L R に結合する、請求項 2 8 に記載のアッセイ。

【請求項 3 0】

前記対象が、ネオアジュバント化学療法を受けたことがある、請求項 2 1 または 2 2 に記載のアッセイ。

【請求項 3 1】

前記癌が肺癌である、請求項 2 1 または 2 2 に記載のアッセイ。

【請求項 3 2】

前記肺癌が非小細胞肺癌 (N S C L C) である、請求項 3 1 に記載のアッセイ。

【請求項 3 3】

N S C L C が腺癌である、請求項 3 2 に記載のアッセイ。

【請求項 3 4】

前記試料が、癌治療前、癌治療中、または癌治療後に得られる、請求項 2 1 または 2 2 に記載のアッセイ。

【請求項 3 5】

基準値が、癌を有していない対象の集団からの G a l N A c - T 1 3 発現レベルの平均または中央値である、請求項 2 1 または 2 2 に記載のアッセイ。

【請求項 3 6】

基準値が、癌を有しており、かつ化学療法に応答する対象の集団からの G a l N A c - T 1 3 発現レベルの平均または中央値である、請求項 2 1 または 2 2 に記載のアッセイ。

【請求項 3 7】

10

20

30

40

50

前記抗体が、エフェクター成分にさらに結合されている、請求項 21 または 22 に記載のアッセイ。

【請求項 38】

前記エフェクター成分が、蛍光標識、放射性化合物、酵素、基質、エピトープタグ、高電子密度試薬、ビオチン、ジゴニゲニン (digonigenin)、ハプテン、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される検出可能な部分である、請求項 37 に記載のアッセイ。

【請求項 39】

前記検出抗体が、酵素に共有結合することによって標識される、蛍光化合物または金属で標識される、化学発光化合物で標識される、請求項 26 に記載のアッセイ。

10

【請求項 40】

G a l N A c - T 1 3 の前記レベルが、前記試料中の G a l N A c - T 1 3 と前記抗体との反応によって形成される抗体 - タンパク質複合体の形成から生じる光散乱強度を測定することによって得られ、対照の光散乱強度を少なくとも 10 % 上回る光散乱強度が化学療法耐性の可能性を示す、請求項 26 に記載のアッセイ。

【請求項 41】

結合の存在が、G a l N A c - T 1 3 またはその変異体への前記抗体の結合の増加である、請求項 21 または 22 に記載のアッセイ。

【請求項 42】

癌を有している対象を治療する、および任意で前記治療法を施行するための方法であって、

20

(i) 癌を有している対象からの生体試料を提供することと、

(i i) G a l N A c - T 1 3 またはその変異体に結合する抗体を提供することと、

(i i i) 前記生体試料を前記抗体と接触させることと、

(i v) イムノアッセイを使用して、前記抗体が G a l N A c - T 1 3 に結合しているかどうかを検出することであって、基準試料と比較して前記対象からの前記生体試料中の結合の増加が、前記対象における G a l N A c - T 1 3 またはその変異体の発現の増大および化学療法耐性の可能性の増大を示す、ことと、

(v) 前記対象の化学療法耐性の可能性が減少している場合に、前記対象に第 1 の治療法を処方すること、または前記対象の化学療法耐性の可能性が増大している場合に、前記対象に第 2 の治療法を処方することと、を含む、方法。

30

【請求項 43】

前記第 1 の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記第 2 の治療法が、外科手術、放射線照射、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちの 1 つ以上、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 45】

前記第 2 の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上であり、化学療法が、前記対象に、前記対象を治療するためにこれまでに使用されていない 1 種以上の化学療法剤を投与すること、または前記対象にこれまでに投与された化学療法剤を、これまでに投与された用量よりも高い用量で投与することを含む、請求項 42 に記載の方法。

40

【請求項 46】

前記対象が、ネオアジュバント化学療法を受けたことがある、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 47】

前記癌が非小細胞肺癌である、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 48】

前記 N S C L が腺癌である、請求項 47 に記載の方法。

50

【請求項 49】

前記抗体が、GalNAc-T13またはその変異体のエピトープLLPALRに結合する、請求項42に記載の方法。

【請求項 50】

化学療法耐性が、化学療法剤のうちのいずれか1種以上に対する耐性である、請求項42に記載の方法。

【請求項 51】

GalNAc-T13またはその変異体に特異的に結合する抗体。

【請求項 52】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項51に記載の抗体。

10

【請求項 53】

前記抗体が、GalNAc-T13またはその変異体中のエピトープに結合し、前記エピトープが配列LLPALRを含む、請求項51に記載の抗体。

【請求項 54】

GalNAc-T13またはその変異体中のLLPALRエピトープに結合する、請求項51に記載の抗体。

【請求項 55】

化学療法に対する癌細胞の反応性を判定するためのシステムであって、前記癌細胞が癌患者から得られ、前記システムが、

(i) 前記癌患者から得られた前記癌細胞中に存在するGalNAc-T13をコードするmRNAに対するシグナルを生成するように設定されている試料分析器と、

20

(ii) 前記mRNAに基づいて、前記シグナルが基準値よりも大きいかまたは大きいかを計算するようにプログラムされたコンピュータサブシステムと、を備える、システム。

【請求項 56】

化学療法に対する癌細胞の反応性を判定するためのシステムであって、前記癌細胞が癌患者から得られ、前記システムが、

(i) GalNAc-T13に特異的な抗体が、癌患者から得られた前記癌細胞中のGalNAc-T13に結合するときに、シグナルを生成するように設定されている試料分析器と、

30

(ii) 前記抗体結合に基づいて、前記シグナルが基準値よりも大きいかまたは大きいかを計算するようにプログラムされたコンピュータサブシステムと、を備える、システム。

【請求項 57】

前記コンピュータサブシステムが、GalNAc-T13の発現が増大している場合に、化学療法を含む治療法に応答する見込みのある患者として、および前記GalNAc-T13が増大していない場合に、化学療法を含む治療法に応答する見込みのない患者として、前記患者を分類するアルゴリズムに基づいて、前記mRNAを比較して、化学療法に対する前記癌細胞の反応性の可能性を判定するようにプログラムされている、請求項55または56に記載のシステム。

40

【請求項 58】

前記基準値が、癌を有していない対象の集団からのGalNAc-T13発現レベルの平均もしくは中央値であるか、または前記基準値が、癌を有しており、かつ化学療法に反応する対象の集団からのGalNAc-T13発現レベルの平均もしくは中央値である、請求項55または56に記載のシステム。

【請求項 59】

コンピュータで実行されたときに、

(i) 癌患者から得られた癌細胞を含む試料中のGalNAc-T13の発現を検出することと、

(ii) 前記GalNAc-T13の発現を基準値と比較することと、

50

を含むステップを行う、コンピュータ可読媒体において具現化されたコンピュータプログラム製品。

【請求項 60】

前記基準値が、癌を有しており、かつ化学療法に応答する対象の集団からの GalNAc-T13 発現レベルの平均または中央値である、請求項 60 に記載のコンピュータプログラム。

【請求項 61】

化学療法に応答する癌患者の可能性を検出するための診断キットであって、

(i) 検出可能な標識プローブの組み合わせを含む 10 種以下のプローブ、または GalNAc-T13 のためのプライマーと、

(ii) 請求項 59 に記載のコンピュータプログラム製品と、を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、化学療法に対する腫瘍細胞の耐性における Oグリコシル化経路の酵素の役割に関する。具体的には、本発明は、肺腺癌の化学療法耐性の診断マーカーとして、新規の分子標的、すなわち GalNAc-T13 (ppGalNAc-T13 としても知られている) を提供する。

【背景技術】

【0002】

背景

非小細胞肺癌 (NSCLC) は、米国および世界中で癌に関連した死亡率の主な原因であり続けている。NSCLC は、組織型によって、腺癌、扁平上皮癌、および大細胞癌に分類される (Beasley et al., 2005)。腺癌は、米国では、NSCLC の最も一般的な型として、扁平上皮細胞の組織型を上回っている。化学療法により治療されたほとんどの癌患者は、抗癌薬による単一療法への反応率が、他の疾患に対する治療法への反応率よりもはるかに低く、また、有効用量レベルの抗癌薬が毒性用量レベルにほぼ近い、またはそれと重なる場合があるため、激しい毒性に苦しむ。それ故に、抗癌薬による治療に反応する見込みのある患者を特定することは重要である。バイオマーカーの開発は、関連標的におけるこれらの薬剤の効果を予測するために必要である。バイオマーカーの開発の目的は、反応率、無増悪生存率 (PFS)、および全体生存率 (OS) を含む分子を標的とする薬剤の有効性を予測するための方法を設計することである。もし、バイオマーカーにより良好な治療応答を示し得る患者集団を選択することができるのであれば、患者および医師の両方に有益であろう (Saijo, 2012)。

【0003】

糖複合体は、癌生物学において関連機能を果たすことが証明されている。グリコシル化改変の検出に基づいたいくつかの診断手順が開発され、ケア医療に組み込まれている (Adamczyk et al., 2012)。Oグリコシル化改変は、ほとんどの癌腫に生じ、診断および予後において (Reis et al., 2010)、ならびに癌ワクチン (Tarp and Clausen, 2008) の開発のために利用され得る有用な標的を構成し得る分子の発現をもたらす。O結合型グリコシル化の合成は、UDP-N-アセチル-D-ガラクトサミン:ポリペプチドN-アシルガラクトサミニルトランスフェラーゼ (ppGalNAc-T, EC 2.4.2.41) により触媒される反応において、Ser/Thr 残基のヒドロキシル基への -N-アセチルガラクトサミン残基 (GalNAc) の共有結合によって、ゴルジ装置内で開始される。ppGalNAc-T は、アイソザイムの複雑なファミリーであり (Ten Hagen et al., 2003)、この中で、20 個のメンバーが、これまでに特徴付けられている (Bennett et al., 2012)。それらは、正常な組織と比較して悪性組織において差別的に発現することが見出されている (Mandel et al., 1999、Bero

10

20

30

40

50

is et al., 2006b)。GALNT3 遺伝子の過剰発現が、膵臓癌細胞の増殖を促進し (Taniuchi et al., 2011)、GALNT12 (正常な結腸細胞において高度に発現する遺伝子) の体細胞および生殖細胞変異体の不活性化は、結腸癌の発症と関連している (Guda et al., 2009) ことを見出した。増大する証拠は、これらの酵素が有用な腫瘍マーカーであり得ることを示唆している。例えば、GalNAc-T3 の発現は、胆嚢癌を有する患者において不良な臨床転帰と関連し (Miyahara et al., 2004)、骨髓試料中の GalNAc-T6 の発現は、リンパ節陰性乳癌患者において不良な臨床転帰と関連する (Freire et al., 2006) ことを示している。肺癌に関しては、GalNAc-T3 の低い発現は、腺癌を有しており、第 1 病期にある患者において不良な予後および早期再発を予測するのにも有用なマーカーであり得る (Guet al., 2004)。本発明者らは、GalNAc-T13 アイソザイムをコードする遺伝子 GALNT13 が、原発腫瘍と比較して転移性神経芽細胞中で最も上方調節された遺伝子であったことをこれまでに示しており、診断での骨髓中の GALNT13 の発現が、神経芽細胞腫患者において、不良な臨床転帰の強力な予測子であったことを見出した (Berois et al., 2006a)。本明細書で、本発明者らは、GalNAc-T13 がヒト肺癌細胞において発現することを示している。

10

【発明の概要】

【0004】

以下の実施形態およびその態様は、範囲を限定することなく、例示および説明であることが意図されるシステム、組成物、および方法と併せて、記載および説明される。

20

【0005】

本明細書では、化学療法耐性の可能性を知ることが望んでいる癌患者から腫瘍細胞を含む試料を得ることと、GalNAc-T13 またはその変異体のレベルを決定するために、試料をアッセイすることと、基準試料と比較して GalNAc-T13 もしくはその変異体のレベルが増加している場合に、対象の化学療法耐性の可能性が増大していると判定すること、または該基準試料と比較して GalNAc-T13 もしくはその変異体のレベルが同じであるか、もしくは減少している場合に、対象の化学療法耐性の可能性が減少していると判定することと、を含む、プロセス、アッセイ、および方法が記載されている。

30

【0006】

本明細書に記載されるプロセス、アッセイ、および方法の様々な実施形態において、対象はヒトである。いくつかの実施形態において、対象は、ネオアジュバント療法を受けたことがある。いくつかの実施形態において、対象から得られた試料中の GalNAc-T13 またはその変異体のレベルの分析は、GalNAc-T13 またはその変異体をコードする核酸レベル、GalNAc-T13 またはその変異体のタンパク質レベルを測定すること、あるいはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、対象からの試料は、癌治療前、癌治療中、または癌治療後に得られる。一実施形態において、対象は、癌、例えば、肺癌を有している。一実施形態において、肺癌は非小細胞肺癌 (NSCLC) である。特定の実施形態において、NSCLC は腺癌である。様々な実施形態において、対象からの試料は、組織、血液、血漿、またはそれらの組み合わせから得られる。

40

【図面の簡単な説明】

【0007】

例示的な実施形態は、参照される図に図示される。本明細書に開示される実施形態および図は、制限的なものではなく例示的なものであるとみなされることが意図される。

【図 1】本発明の一実施形態に従って、GalNAc-T13 に特異的なモノクローナル抗体 (mAb T13.5) の産生および特徴を示す。

【図 2】本発明の一実施形態に従って、ヒト肺癌細胞株における GalNAc-T13 の発現を示す。(A) GALNT13 に対する RT-PCR: (1) 分子量マーカー (100 bp)、(2) 陰性対照、(3) NCI-H1703 細胞株、(4) NCI-H526 細胞株、(5) NCI-H838 細胞株、(6) SK-MES-1 細胞株、(7) H69

50

A R細胞株、(8) H2O陰性対照、(9) NCI-H1755細胞株、(10) A549細胞株、(11) NCI-H1975細胞株、(12) NCI-H1650細胞株、(13) NL-20細胞株、(14) 陽性対照、BM細胞株、(15) 分子量マーカー(100bp)。(B) A549肺癌細胞株におけるmAb T13.5による間接免疫蛍光法。(C) mAb T13.5を用いたウェスタンブロット：(1) 分子量マーカー、(2) BM細胞株、(3) HeLa細胞株、(4) A549細胞株、(5) NCI-H1703細胞株。

【図3】本発明の一実施形態に従って、ppGalNAc-T13のいくつかのスプライス変異体の略図を示す。ppGalNAc-T13の選択的スプライシングによって生成された8つの新規の転写物を見出した。スプライス変異体の配列は、配列番号1~14に記載される。

10

【図4】本発明の一実施形態に従って、モノクローナル抗体T13.5を用いたヒト肺癌の原発腫瘍における免疫組織化学を示す。

【図5】本発明の一実施形態に従って、(A) 原発腫瘍においてGalNAc-T13の発現を有するネオアジュバント療法を受けた肺腺癌を有する患者におけるカプランマイヤー生存推定、(B) 原発腫瘍においてGalNAc-T13の発現を有するネオアジュバント療法を受けた進行性肺腺癌を有する患者におけるカプランマイヤー生存率推定、(C) 原発腫瘍においてGalNAc-T13の発現を有するネオアジュバント療法を受けた早期肺腺癌を有する患者におけるカプランマイヤー生存率推定を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0008】

本明細書に参照される全ての参照文献は、それらの全体が参照により本明細書に完全に記載されているものとして組み込まれる。

【0009】

特に定義されない限り、本明細書に使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する当業者により一般的に理解されるもの同一の意味を有する。Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001)、March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001)、および Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001)は、当業者に、本出願に使用される用語の多くの一般指針を提供する。

30

【0010】

当業者は、本発明の実施に使用され得る、本明細書に記載されているものと類似または同等の多くの方法および材料を認識するであろう。実際には、本発明は、記載される方法および材料にいかようにも限定されない。本発明のために、以下の用語が下記で定義される。

40

【0011】

「有益な結果」には、疾患状態の重症度を減少または軽減すること、疾患状態が悪化するのを防ぐこと、疾患状態を治癒すること、疾患状態が発生するのを防ぐこと、疾患状態が発生する患者の確率を低減すること、および患者の生命または平均余命を延長することが含まれるが、これらに決して限定されない。いくつかの実施形態において、疾患状態は癌である。

【0012】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」は、診断、予後、または治療が望まれるいずれかの対象、特に、哺乳動物対象を意味する。哺乳動物

50

対象には、ヒト、家畜、農場動物、動物園動物、競技用動物、愛玩動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、畜牛、ウシ；霊長類、例えば、類人猿、サル、オランウータン、およびチンパンジー；イヌ科の動物、例えば、イヌおよびオオカミ；ネコ科の動物、例えば、ネコ、ライオン、およびトラ；ウマ科の動物、例えば、ウマ、ロバ、およびシマウマ；食用動物、例えば、ウシ、ブタ、およびヒツジ；有蹄動物、例えば、シカおよびキリン；げっ歯類、例えば、マウス、ラット、ハムスター、およびモルモット等が含まれるが、これらに限定されない。ある実施形態において、哺乳動物はヒト対象である。この用語は、特定の年齢または性別を表さない。それ故に、オスであれメスであれ、成体および新生の対象、ならびに胎児がこの用語の範囲内に包含されることが意図される。

10

【0013】

本明細書に使用される「治療」および「治療すること」は、治療的処置および予防的または防御的な手段の両方を指し、その目的は、標的とする病的状態を予防する、もしくは遅らせる（軽減する）、病的状態を予防する、有益な結果を追求する、もしくは得る、またはその処置が最終的に失敗に終わったとしても状態を発症する個体の確率を低減することである。治療を必要とするものには、既に状態を有しているもの、ならびに状態を有する傾向があるもの、または状態が予防されるべきものが含まれる。癌治療の例には、積極的監視、観察、外科的介入、化学療法、免疫療法、放射線療法（外部ビーム放射線照射、定位放射線手術（ガンマナイフ）、および分画定位的放射線療法（FSR）等）、局所療法、全身療法、ワクチン療法、ウイルス療法、分子標的療法、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0014】

本明細書に使用される「腫瘍」は、悪性または良性に関わらず、全ての新生細胞成長および増殖、ならびに全ての前癌性および癌性の細胞および組織を指す。

【0015】

「癌」および「癌性」は、調節されていない細胞増殖により一般的に特徴付けられる哺乳動物における生理学的状態を指すか、または記載する。癌の例には、B細胞リンパ腫（ホジキンリンパ腫および/または非ホジキンリンパ腫）、脳癌、乳癌、結腸癌、肺癌、肝細胞癌、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路の癌、甲状腺癌、腎臓癌、癌腫、黒色腫、頭頸部癌、脳癌、ならびに、アンドロゲン依存性前立腺癌およびアンドロゲン非依存性前立腺癌を含むがこれらに限定されない前立腺癌が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0016】

本明細書で使用される「化学療法耐性」は、化学療法薬に対して部分的または完全な耐性を指す。例えば、対象は、化学療法薬に応答しないか、または部分的にのみ応答する。当業者は、対象が化学療法に対する耐性を示しているかどうかを判定することができる。

【0017】

本明細書で使用される「化学療法薬」または「化学療法剤」とは、アルブミン結合パクリタキセル（nab-パクリタキセル）、アクチノマイシン、アリトレチノイン、オールトランス型レチノイン酸、アザシチジン、アザチオプリン、ベバシズマブ、ベキサトテン（Bexatene）、プレオマイシン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カペシタピン、セツキシマブ、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シタラピン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキシソルビシン、エビルピシン、エポチロン、エルロチニブ、エトポシド、フルオロウラシル、ゲフィチニブ、ゲムシタピン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イマチニブ、イピリムマブ、イリノテカン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オキサリプラチン、パクリタキセル、パニツマブ、ペメトレキセド、リツキシマブ、タフルボシド、テニボシド、チオグアニン、トボテカン、トレチノイン、バルルピシン、ベムラフェニブ、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルピン、ポリノスタット、ロミデプシン、5-フルオロウラシル（5-F

40

50

U)、6-メルカプトプリン(6-MP)、クラドリピン、クロファラピン、フロクスウリジン、フルダラピン、ペントスタチン、マイトマイシン、イキサベピロン、エストラムスチン、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない、癌を治療するために使用される薬物を指す。

【0018】

「患者の転帰」とは、患者が治療の結果、生存または死亡するかどうかを指す。本発明に提供される患者に対するより正確な予後が、患者の生存の確率を増大させる。

【0019】

「不良な予後」とは、癌(例えば、肺癌)の治療に対して標準的な治療、すなわち、外科手術、放射線照射、化学療法にもかかわらず、生存および疾患の回復の見込みがないことを意味する。不良な予後は、生存率が生存率中央値のものよりも低い患者の分類である。

10

【0020】

「良好な予後」とは、疾患の治療に対して標準的な治療、例えば、外科手術、放射線照射、化学療法により、生存および疾患の回復の見込みがあることを意味する。良好な予後は、生存率が生存率中央値のものよりも低くない患者の分類である。

【0021】

「再発」とは、癌が初期治療後に再来したことを意味する。

【0022】

本明細書で使用される「変異体」とは、突然変異体GalNAc-T13、GalNAc-T13のスプライス変異体、またはそれらの組み合わせを指す。GalNAc-T13の突然変異体は、GalNAc-T13をコードする遺伝子における挿入、欠失、ミスセンス、ナンセンス、および/または切断突然変異の結果であり得る。

20

【0023】

「再発しない」または「無再発」とは、癌が寛解期にあることを意味し、再発は、癌が増殖する、および/または転移することを意味し、死亡率の可能性を低下させるために、いくつかの外科手術、治療的介入、および/または癌治療が必要である。「再発しない対象」は、再発しないまたは無再発の疾患を有する対象であり、再発疾患または再発している再発の対象の対照として使用することができる。

【0024】

Oグリコシル化改変は、ほとんどの癌腫に生じ、診断および治療法のために有用な標的を構成し得る分子の発現をもたらす。GalNAc-T13酵素は、Oグリコシル化の開始時に重要なステップを触媒する。それは、転移性神経芽細胞腫において過剰発現し、この腫瘍を有する患者の予後と相関している。切除した肺癌標本においては、GalNAc-T13の発現についての情報がない。

30

【0025】

本明細書に記載されるように、出願者らは、ネオアジュバント化学療法を受けている(WNA)対象とネオアジュバント化学療法を受けていない(WONA)対象との間に有意な差異がない、NSCLCにおける増大したGalNAc-T13の発現を観察した。GalNAc-T13は、NSCLCにおいて発現し、ネオアジュバント化学療法を受けた腺癌(ADCA)を有する患者における不良な予後と関連がある。出願者らのデータは、GalNAc-T13がNSCLCにおいて化学耐性と関連する新規のマーカーであることを示唆した。

40

【0026】

したがって、本発明は、少なくとも一部がこれらの所見に基づいている。本発明は、癌患者における化学療法耐性を判定するために、および癌患者における治療選択を誘導するために、肺癌等の癌の兆候に対する分子指標の必要性に取り組む。本発明は、癌治療の最適化を、それを必要とする対象において行うために、癌患者における化学療法耐性の可能性を判定するためのプロセス、アッセイ、および方法を提供する。

【0027】

50

具体的には、本発明は、化学療法耐性の可能性を知ることが望んでいる癌患者から癌細胞を含む試料を得ることと、G a l N a c - T 1 3またはその変異体のレベルを決定するために、試料を分析することと、基準試料と比較してG a l N a c - T 1 3もしくはその変異体のレベルが増加している場合に、対象の化学療法耐性が増大していると判定すること、または該基準試料と比較してG a l N a c - T 1 3もしくはその変異体のレベルが同じであるか、もしくは減少している場合に、対象の化学療法耐性の可能性が減少していると判定することと、を含む、方法を提供する。一実施形態において、該対象は、肺癌を有している。

【0028】

いくつかの実施形態において、この方法は、対象の化学療法耐性の可能性が減少している場合に、対象に第1の治療法を処方すること、または対象の化学療法耐性の可能性が増大している場合に、対象に第2の治療法を処方することをさらに含み得る。いくつかの実施形態において、第1の治療法は、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つ以上であり得る。いくつかの実施形態において、第2の治療法は、化学療法を含まない治療法であり得、多くは、外科手術、放射線照射、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つ以上であり得る。さらなる実施形態において、第2の治療法は、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つ以上であり得、化学療法は、対象に、対象を治療するためにこれまでに使用されていない1種以上の化学療法剤を投与すること、または対象にこれまでに投与されたことがあるが、これまでに投与された用量よりも高い用量で、化学療法剤を投与することを含む。

10

20

【0029】

いくつかの実施形態において、G a l N A c - T 1 3またはその変異体の発現が増大している癌対象において化学療法が有効でない場合があるという認識に基づいて、基準試料と比較して対象からの試料中のG a l N A c - T 1 3またはその変異体の発現が増大している場合、第2の治療法は、対象に対して化学療法を含まない癌治療法を選択することを含み得る。さらなる実施形態において、G a l N A c - T 1 3またはその変異体の発現が減少している癌対象において化学療法が有効であり得るという認識に基づいて、基準試料と比較して対象からの試料中のG a l N A c - T 1 3またはその変異体の発現が同じであるか、または減少する場合、第2の治療法は、化学療法を含む癌治療法を選択することを含み得る。

30

【0030】

本発明はまた、化学療法耐性の可能性を知ることが望んでいる癌患者から癌細胞を含む試料を得ることと、G a l N a c - T 1 3またはその変異体のレベルを決定するために、試料を分析することと、基準試料と比較してG a l N a c - T 1 3もしくはその変異体のレベルが増加している場合に、対象の化学療法耐性の可能性が増大していると判定すること、または該基準試料と比較してG a l N a c - T 1 3もしくはその変異体のレベルが同じであるか、もしくは減少している場合に、対象の化学療法耐性の可能性が減少していると判定することと、を含む、アッセイも提供する。一実施形態において、該対象は、肺癌を有している。

40

【0031】

本発明は、化学療法耐性の可能性の判定を、それを必要とする対象において行うためのアッセイをさらに提供する。このアッセイは、癌を有している対象からの生体試料を提供することと、G a l N A c - T 1 3またはその変異体に特異的に結合する抗体を提供することと、生体試料を抗体と接触させることと、G a l N A c - T 1 3またはその変異体に結合している抗体のレベルを（例えば、イムノアッセイを使用して）検出することと、を含み、基準試料と比較して対象からの生体試料中の結合の増加が、対象における化学療法耐性の可能性の増大を示す。一実施形態において、癌は肺癌である。一実施形態において、抗体は、G a l N A c - T 1 3またはその変異体において配列L L P A L Rを有するエピトープに結合する本明細書に記載されるT 1 3 . 5抗体である。

50

【0032】

いくつかの実施形態において、対象における化学療法耐性の可能性を判定するためのアッセイは、癌を有している対象からの生体試料を提供することと、GalNAc-T13またはその変異体をコードする対象から得られた試料中に存在するmRNAのレベルを決定することと、を含み得る。基準試料と比較して対象から得られた試料中のmRNAレベルの増加は、対象における化学療法耐性の可能性の増大を示す。一実施形態において、癌は肺癌である。

【0033】

本発明のアッセイは、対象における癌を治療する、減少させる、抑制する、または癌の重症度を減少させるために、治療法を選択すること、および/または施行することをさらに含み得る。治療法を選択は、対象の化学療法耐性の可能性が減少している場合に、対象に第1の治療法を処方すること、または対象の化学療法耐性の可能性が増大している場合に、対象に第2の治療法を処方することを含む。いくつかの実施形態において、第1の治療法は、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちいずれか1つ以上である。いくつかの実施形態において、第2の治療法は、化学療法を含まない治療法であり得、外科手術、放射線照射、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちいずれか1つ以上であり得る。さらなる実施形態において、第2の治療法は、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちいずれか1つ以上であり、化学療法は、対象に、対象を治療するためにこれまでに使用されていない1種以上の化学療法剤を投与すること、または対象にこれまでに投与されたことがあるが、これまでに投与された用量よりも高い用量で、化学療法剤を投与することを含む。いくつかの実施形態において、癌は肺癌である。

10

20

【0034】

いくつかの実施形態において、第2の治療法は、対象における癌の治療のために化学療法を含まない癌治療法を選択することを含み得る。いくつかの実施形態において、アッセイは、さらに、GalNAc-T13またはその変異体の発現が増大している癌対象において化学療法が有効でない場合があるという認識に基づいて、基準試料と比較して対象からの試料中のGalNAc-T13またはその変異体の発現が増大している場合、対象に対して化学療法を含まない癌治療法を選択することを含む。さらなる実施形態において、GalNAc-T13またはその変異体の発現を減少している癌対象において化学療法が有効であり得るという認識に基づいて、基準試料と比較して対象からの試料中のGalNAc-T13またはその変異体の発現が同じであるか、または減少する場合、第2の治療法は、化学療法を含む癌治療法を選択することを含み得る。

30

【0035】

本発明はまた、化学療法耐性の可能性を知ることを望んでいる癌患者から癌細胞を含む試料を得ることと、GalNAc-T13またはその変異体のレベルを決定するために、試料を分析することと、基準試料と比較してGalNAc-T13もしくはその変異体のレベルが増加している場合に、対象の化学療法耐性の可能性が増大していると判定すること、または該基準試料と比較してGalNAc-T13もしくはその変異体のレベルが同じであるか、もしくは減少している場合に、対象の化学療法耐性の可能性が減少していると判定することと、を含む、方法も提供する。一実施形態において、該対象は、肺癌を有している。

40

【0036】

本発明は、さらに、癌を有している対象のための治療を選択するための方法、および任意で治療/治療法を施行するための方法を提供し、本方法は、癌を有している対象からの生体試料を提供することと、GalNAc-T13に特異的に結合する抗体を提供することと、生体試料を抗体と接触させることと、抗体がGalNAc-T13に結合しているかどうかを(例えば、イムノアッセイを使用して)検出することと、治療法を選択することと、を含む。本方法は、さらに、選択された治療法を施行することを含む。方法の一実施形態において、基準試料と比較して対象からの生体試料中のGalNAc-T13への

50

抗体の結合の存在は、対象における G a l N A c - T 1 3 の発現の増大および化学療法耐性の可能性の増大を示す。一実施形態において、癌は肺癌である。一実施形態において、抗体は、G a l N A c - T 1 3 またはその変異体において配列 L L P A L R を有するエピトープに結合する本明細書に記載される T 1 3 . 5 抗体である。

【 0 0 3 7 】

本発明はまた、癌を有している対象のために治療を選択するための方法、および任意で治療 / 治療法を施行するための方法も提供し、本方法は、癌を有している対象からの生体試料を提供することと、G a l N A c - T 1 3 またはその変異体をコードする対象から得られた試料中に存在する m R N A のレベルを決定することと、を含む。基準試料と比較して対象から得られた試料中の m R N A レベルの増加は、対象における化学療法耐性の可能性の増大を示す。一実施形態において、癌は肺癌である。

10

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態において、治療法の選択は、対象の化学療法耐性の可能性が減少している場合に、対象に第 1 の治療法を処方すること、または対象の化学療法耐性の可能性が増大している場合に、対象に第 2 の治療法を処方することを含む。いくつかの実施形態において、第 1 の治療法は、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上である。いくつかの実施形態において、第 2 の治療法は、化学療法を含まない治療法であり得、外科手術、放射線照射、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上であり得る。さらなる実施形態において、第 2 の治療法は、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上であり、化学療法は、対象に、対象を治療するためにこれまでに使用されていない 1 種以上の化学療法剤を投与すること、または対象にこれまでに投与された化学療法剤を、これまでに投与された用量よりも高い用量で投与することを含む。

20

【 0 0 3 9 】

本発明は、異常なレベルの G a l N A c - T 1 3 を含むヒト対象から得られた単離された試料をさらに提供する。いくつかの実施形態において、試料は、組織、血液、血漿、尿、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上である。

【 0 0 4 0 】

本発明はまた、異常なレベルの G a l N A c - T 1 3 を含むヒト対象から得られた単離された試料と G a l N A c - T 1 3 と反応する試薬との組み合わせも提供する。一実施形態において、試薬は、単離された試料中の異常なレベルの G a l N A c - T 1 3 の存在を示すシグナルを生成する標識を含む。いくつかの実施形態において、この標識は、放射性標識、発色団、フルオロフォア、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上である。様々な実施形態において、試薬は、G a l N A c - T 1 3 に特異的な核酸、p p G a l N A c - T 1 3 に特異的なモノクローナル抗体、G a l N A c - T 1 3 酵素に特異的な基質、小分子、脂質、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上である。

30

【 0 0 4 1 】

本発明はまた、異常なレベルの G a l N A c - T 1 3 を含むヒト対象から得られた単離された試料と G a l N A c - T 1 3 と反応する試薬とを含むシステムも提供する。一実施形態において、試薬は、単離された試料中の異常なレベルの G a l N A c - T 1 3 の存在を示すシグナルを生成する標識を含む。いくつかの実施形態において、この標識は、放射性標識、発色団、フルオロフォア、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上である。様々な実施形態において、試薬は、G a l N A c - T 1 3 に特異的な核酸、G a l N A c - T 1 3 に特異的なモノクローナル抗体、G a l N A c - T 1 3 酵素に特異的な基質、小分子、脂質、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか 1 つ以上である。

40

【 0 0 4 2 】

本明細書に記載されるプロセス、アッセイ、および方法の様々な実施形態において、対象はヒトである。いくつかの実施形態において、対象は、ネオアジュバント療法（例えば、カルボプラチン、パクリタキセル、カルボプラチン、シスプラチン、ドセタキセル、ゲ

50

ムシタピン、エトポシド、ペメトレキセド、セツキシマブ、またはそれらの組み合わせのうちいずれか1つ以上を使用するネオアジュバント療法)を受けたことがある。いくつかの実施形態において、対象から得られた試料中のGalNAc-T13またはその変異体のレベルの分析は、GalNAc-T13またはその変異体をコードする核酸レベル、GalNAc-T13またはその変異体のタンパク質レベルを測定すること、あるいはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、対象からの試料は、癌治療前、癌治療中、または癌治療後に得られる。一実施形態において、対象は、癌、例えば、肺癌を有している。一実施形態において、肺癌は非小細胞肺癌(NSCLC)である。特定の実施形態において、NSCLCは腺癌である。様々な実施形態において、対象からの試料は、組織、血液、血漿、またはそれらの組み合わせから得られる。

10

【0043】**GalNAc-T13の発現の分析**

本明細書に記載されるプロセス、アッセイ、および方法の様々な実施形態において、GalNAc-T13またはその変異体のアッセイは、試料中に存在するGalNAc-T13またはその変異体をコードする核酸の量を測定すること、試料中に存在するGalNAc-T13タンパク質またはその変異体のタンパク質の量を測定すること、あるいはそれらの組み合わせを含む。

【0044】

本明細書に記載されるプロセス、アッセイ、および方法の様々な実施形態において、試料の分析は、GalNAc-T13またはその変異体に特異的な抗体を用いてGalNAc-T13またはその変異体のレベルを検出することを含む。様々な実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体またはその断片、ポリクローナル抗体またはその断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、および一本鎖抗体のうちいずれか1つ以上である。一実施形態において、抗体は、モノクローナル抗体である。使用され得るモノクローナル抗体の一例は、GalNAc-T13またはその変異体の配列LLPALRに結合するT13.5モノクローナル抗体である。

20

【0045】

本明細書に記載されるプロセス、アッセイ、および方法のいくつかの実施形態において、試料の分析は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、GalNAc-T13またはその変異体に特異的なmRNAとハイブリダイズすることが可能なポリヌクレオチドを含む試料中に存在するGalNAc-T13またはその変異体をコードするmRNAレベルを測定することを含む。

30

【0046】

試料中に存在するppGalNAc-T13またはその変異体をコードする核酸の量を評価するために使用され得る技術は、原位置ハイブリダイゼーション(例えば、Angerer(1987)Meth.Enzymol 152:649)を含むが、これに限定されない。好ましいハイブリダイゼーションをベースとするアッセイには、サザンプロット法または原位置ハイブリダイゼーション(例えば、FISHおよびFISH+SKY)等の従来の「直接プローブ」法、ならびに比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGHS)、例えば、cDNAをベースとする、またはオリゴヌクレオチドをベースとするCGHS等の「比較プローブ」法が含まれるが、これらに限定されない。方法は、基質(例えば、膜もしくはガラス)結合法またはアレイをベースとするアプローチを含むが、これらに限定されない多種多様のフォーマットにおいて使用することができる。核酸分析のために使用され得るプローブは、典型的には、例えば、放射性同位体または蛍光レポーターを用いて標識される。好ましいプローブは、ストリンジェントな条件下で、標的核酸(複数を含む)と特異的にハイブリダイズするために十分に長い。好ましいサイズ範囲は、約200塩基~約1000塩基である。本発明の方法に使用するのに適したハイブリダイゼーションプロトコルは、例えば、Albertson(1984)EMBO J. 3:1227-1234、Pinkel(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.US A 85:9138-9142、欧州特許庁公開公報(EPO Pub.)第430,4

40

50

02号、Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In situ Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, N. J. (1994)、Pinkel, et al. (1998) Nature Genetics 20:207-211、および/またはKallioniemi (1992) Proc. Natl Acad Sci USA 89:5321-5325 (1992)に記載されている。

【0047】

「定量的」増幅の方法は、当業者によく知られている。例えば、定量的PCRは、同じプライマーを用いて既知量の対照配列を同時に共増殖することに関する。このことは、PCR反応を校正するために使用することができる内部標準を提供する。定量的PCRのための詳細なプロトコルは、Innis, et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N. Y.)に提供されている。定量的PCR分析を用いたマイクロサテライト座でのDNAコピー数の測定は、Ginzonger, et al. (2000) Cancer Research 60:5405-5409に記載されている。遺伝子についての既知の核酸配列は、当業者が日常的にプライマーを選択して、遺伝子のいずれかの部分を増幅するのを可能とするのに十分である。発蛍光性定量的PCRは、本発明の方法で使用することもできる。発蛍光性定量的PCRにおいて、定量は、蛍光シグナル、例えば、TaqManおよびsybrグリーンの量に基づいている。

10

20

【0048】

他の好適な増幅方法は、リガーゼ連鎖反応(LCR)(Wu and Wallace (1989) Genomics 4:560、Landegren, et al. (1988) Science 241:1077、およびBarringer et al. (1990) Gene 89:117を参照のこと)、転写増幅(Kwoh, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173)、自己維持配列複製(Guatelli, et al. (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:1874)、ドットPCR、およびリンカーアダプターPCR等を含むが、これらに限定されない。

【0049】

不均等な変動の下での両側スチューデントt検定は、患者のGalNAc-T13の発現と正常な血液試料、または患者自身の血液(一致対照)、または本明細書に記載される、多くの対照試料をプールするコンピュータアルゴリズムによって生じる参照との間の差異を測定するために使用され得る。有意な差異は、p値が0.05以下であるとき、達成され得る。GalNAc-T13のmRNAの発現はまた、患者の予後および化学療法に対する応答を判定するために使用され得、ここで、GalNAc-T13のmRNAの発現は、2つの群:高いppGalNAc-T13の発現を有するものと、低いまたは検出可能でないGalNAc-T13の発現を有するものとに分けられる。これらの群は、GalNAc-T13の発現の中央値によって分けられ、カプランマイヤー曲線を用いて経時的にプロットされ得る。

30

40

【0050】

GalNAc-T13またはその変異体の発現レベルをアッセイするために好適な方法には、DNA塩基配列決定法、比較ゲノムハイブリダイゼーション(CG H)、アレイCG H(aCG H)、SNP分析、mRNA発現アッセイ、RT-PCR、リアルタイムPCR、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。様々な実施形態において、GalNAc-T13をコードする核酸またはそのタンパク質レベルを検出するためのアッセイは、ノーザンブロット分析、サザンブロット分析、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)、ウェスタンブロット分析、またはそれ

50

らの組み合わせのうちのいずれか1つ以上である。いくつかの実施形態において、対象におけるGalNAc-T13のレベルは、基質がGalNAc-T13に対して代理マーカールとして作用するように、酵素GalNAc-T13が作用する基質を測定することによって確認され得る。

【0051】

ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体はともに、よく知られている方法を用いて当業者自身で生成することができるか、または既知のタンパク質配列に基づいて抗体を作製することを専門とするサービスプロバイダーによって製造することができる。本発明では、タンパク質配列が知られており、そのため、それらの対する抗体の生成は、通常のことである。

10

【0052】

例えば、モノクローナル抗体の生成は、従来のハイブリドーマ方法を用いて、まず、最適な単離されたタンパク質またはその断片（例えば、GalNAc-T13またはその断片もしくはその変異体）であり得る抗原を用いてマウスを免疫化し、それぞれが特異的なモノクローナル抗体を生成するハイブリドーマ細胞株を作製することによって行うことができる。次いで、異なるクローンによって分泌された抗体は、例えば、ELISAまたは抗原マイクロアレイアッセイ、またはイムノドットプロット技術を用いて、抗原に結合するそれらの能力についてアッセイする。対象となるタンパク質の検出に最も特異的な抗体は、常法を使用して、ならびに免疫化に使用される抗原および対照として他の抗原を使用して選択することができる。所望の抗原およびタンパク質を最も特異的に検出する抗体が本明細書に記載されるプロセス、アッセイ、および方法のために選択され、それ以外の抗原またはタンパク質は選択されない。

20

【0053】

次いで、最良のクローンが、好適な細胞培養培地中で無限に増殖され得る。それらはまた、抗体リッチな腹水を生成する（腸を取り囲む腹腔内に）マウスに注入され得、これにより、抗体が単離され、精製され得る。抗体は、当業者によく知られている技術を使用して精製され得る。

【0054】

本発明の方法およびアッセイにおいて、任意のGalNAc-T13またはその断片の存在は、GalNAc-T13タンパク質またはその断片もしくはその変異体に特異的な抗体を使用し、それぞれの同族マーカールに対する各抗体の免疫特異的な結合を検出して、判定する。

30

【0055】

本発明に従って測定されたGalNAc-T13またはその変異体のレベルを決定するために市販されているものを含む任意の好適なイムノアッセイ法が、利用され得る。知られているイムノアッセイの広範囲にわたる考察は、当業者には、これらが知られているため、ここでは必要ない。一般的な好適なイムノアッセイ法には、サンドイッチ酵素結合イムノアッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、競合的結合アッセイ、同種アッセイ、異種アッセイ等が含まれる。様々な既知のイムノアッセイは、例えば、Methods in Enzymology, 70, pp. 30-70および166-198（1980）に概説されている。

40

【0056】

本発明のアッセイにおいて、「サンドイッチ型」アッセイフォーマットが使用され得る。そのようなサンドイッチ型アッセイのいくつかの例は、Grubbらの米国特許第4,168,146号およびTomらの米国特許第4,366,241号に記載されている。代替の技術は、「競合型」アッセイである。競合的アッセイにおいて、標識プローブは、一般に、検体と同一である分子または検体の類似体に結合される。それ故に、標識プローブは、利用可能な受容材料に関して対象となる検体と競合する。競合的アッセイは、一般的に、ハプテンのような検体を検出するのに使用され、各ハプテンは一価であり、かつ1つの抗体分子とのみ結合することができる。競合的イムノアッセイデバイスの例は、De

50

ut schらの米国特許第4,235,601号、Liottaの米国特許第4,442,204号、Buechlerらの米国特許第5,208,535号に記載されている。

【0057】

抗体を標識することができる。いくつかの実施形態において、検出抗体は、酵素に共有結合的に連結させること、蛍光化合物もしくは金属による標識、または化学発光化合物による標識によって標識される。例えば、検出抗体をカタラーゼにより標識することができ、変換は、ヨウ化カリウム、過酸化水素、およびチオ硫酸ナトリウムを含む比色基質組成物を使用し、酵素は、アルコールデヒドロゲナーゼであり得、変換は、アルコール、pH指示薬、およびpH緩衝液を含む比色基質組成物を使用し、pH指示薬は、ニュートラルレッドであり、pH緩衝液は、グリシン-水酸化ナトリウムであり、酵素はまた、ヒポキサンチンオキシダーゼであり得、変換は、キサンチン、テトラゾリウム塩、および4,5-ジヒドロキシ-1,3-ベンゼンジスルホン酸を含む比色基質組成物を使用する。一実施形態において、検出抗体は、酵素に共有結合的に連結させること、蛍光化合物もしくは金属による標識、または化学発光化合物による標識によって標識される。

10

【0058】

直接および間接標識をイムノアッセイで使用することができる。直接標識は、天然状態で、裸眼または光学フィルターの補助でおよび/または蛍光を促進する刺激、例えば、紫外線の適用で可視である実体と定義することができる。使用することができる着色標識の例には、金属ゾル粒子、金ゾル粒子、色素ゾル粒子、染色ラテックス粒子、またはリポゾーム中に封入された色素が含まれる。他の直接標識には、放射性核種および蛍光または発光部分が含まれる。また、酵素等の非直接標識を、本発明に従って使用することもできる。例えば、アルカリ性ホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、リゾチーム、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、およびウレアーゼ等の標識として使用するための様々な酵素が、知られている。イムノアッセイにおける酵素の詳細な考察に関しては、Engvall, *Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT, Methods of Enzymology*, 70, 419-439 (1980)を参照のこと。

20

【0059】

抗体を表面に結合させることができる。所望の抗原を検出するために、抗体を結合させることができる有用な表面の例には、ニトロセルロース、PVDF、ポリスチレン、およびナイロンが含まれる。表面または支持体はまた、多孔性支持体であってもよい(例えば、米国特許第7,939,342号を参照のこと)。PB Diagnostic Systems, Incの米国特許第4,906,439号、第5,051,237号、および第5,147,609号に記載されるものを含む様々なアッセイデバイスのフォーマットで、アッセイを行うことができる。

30

【0060】

本明細書に記載されるプロセス、アッセイ、および方法のいくつかの実施形態において、GalNAc-T13またはその変異体に対して応答性がある抗体のレベルの検出には、癌患者からの試料をGalNAc-T13またはその変異体に特異的に結合する抗体またはその断片と接触させることと、抗体と試料中に存在するGalNAc-T13またはその変異体との抗体-タンパク質複合体を形成することと、非結合抗体を除去するために試料を洗浄することと、試料中のGalNAc-T13またはその変異体に結合した抗体に対して反応性があり、かつ標識された検出抗体を添加することと、非結合の標識された検出抗体を除去するために洗浄することと、標識を検出可能なシグナルに変換することと、を含み、検出可能なシグナルは、患者からの試料中のGalNAc-T13またはその変異体のレベルを示す。いくつかの実施形態において、エフェクター成分は、蛍光標識、放射性化合物、酵素、基質、エピトープタグ、高電子密度試薬、ピオチン、ジゴニゲニン(digonigenin)、ハプテン、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される検出可能な部分である。いくつかの実施形態において、検出抗体は、酵素に共有結合的に連結させること、蛍光化合物もしくは金属による標識、または化学発光化合物による標識によ

40

50

って標識される。GalNAc-T13のレベルは、抗体との試料中のGalNAc-T13の反応により形成された抗体-タンパク質複合体の形成から生じる光散乱強度を測定することによって得られ得、対照の光散乱強度を少なくとも10%上回る光散乱強度が化学療法耐性の可能性を示す。

【0061】

本発明のプロセス、アッセイ、および方法の様々な実施形態において、化学療法耐性の可能性の増大は、不良な予後をもたらし得、この不良な予後は、生存の可能性の減少、平均余命の短縮、または腫瘍の幹性の強化を含む。

【0062】

本発明のプロセス、アッセイ、および方法の様々な実施形態において、本明細書に記載される方法は、対象が良好な予後を有する場合に、対象に第1の治療法を処方すること、または対象が不良な予後を有する場合に、対象に、第2の治療法、あるいは第1の治療法および第2の治療法の両方を処方することをさらに含む。

10

【0063】

基準値

本明細書に記載されるプロセス、アッセイ、および方法の様々な実施形態において、基準値は、GalNAc-T13またはその変異体の発現レベルに基づいている。一実施形態において、発現レベルは、癌細胞中にある。別の実施形態において、発現レベルは、非癌細胞中にある。さらなる一実施形態において、発現レベルは、あらゆる細胞中にある。いくつかの実施形態において、基準値は、癌を有していない対象集団におけるGalNAc-T13またはその変異体の発現レベルの平均または中央値である。他の実施形態において、基準値は、癌を有しており、かつ化学療法に応答する対象の集団におけるGalNAc-T13またはその変異体の発現レベルの平均または中央値である。いくつかの実施形態において、癌を有しており、かつ化学療法に応答する対象の集団を含む基準値は、GalNAc-T13の検出不能な発現を示すか、またはGalNAc-T13の減少した発現を示す。さらなる実施形態において、基準値は、異なる（例えば、早期）時点から、例えば、診断中、治療前、治療後、またはそれらの組み合わせからの対象から得られた試料におけるGalNAc-T13またはその変異体の発現レベルである。いくつかの実施形態において、癌は肺癌である。

20

【0064】

様々な実施形態において、基準値と比較して癌対象におけるGalNAc-T13またはその変異体の発現レベルは、少なくともまたは約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%増加する。様々な実施形態において、基準値と比較して癌対象におけるGalNAc-T13またはその変異体の発現レベルは、少なくともまたは約1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、またはそれらの組み合わせで増加する。

30

【0065】

治療法

本発明の様々な実施形態に従って、癌患者（例えば、肺癌患者）を治療するために、本明細書に記載される治療法が、選択、使用、および/または施行され得る。様々な実施形態において、第1の治療法は、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つ以上であり得る。様々な実施形態において、GalNAc-T13もしくはその変異体が対象中に存在するか、またはGalNAc-T13もしくはその変異体のレベルが対象において増大している場合、第2の治療法が施行され、癌（例えば、NSCLC）患者における化学療法耐性を示す。第2の治療法には、外科手術、放射線照射、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせが含まれる。いくつかの実施形態において、化学療法は、第2の治療法において、より高い投与量の化学療法薬を投与すること、化学療法薬の組み合わせを投与すること、およびそれらの

40

50

組み合わせを含み得る。

【0066】

いくつかの実施形態において、化学療法剤は、細胞毒性抗生物質、代謝拮抗物質、抗有糸分裂剤、アルキル化剤、ヒ素化合物、DNAトポイソメラーゼ阻害剤、タキサン、ヌクレオチド類似体、植物アルカロイド、および毒素、ならびにそれらの誘導体のうちのいずれか1つ以上から選択され得る。例示的な化合物には、アルキル化剤：トレオスルファンおよびトロフォスファミド；植物アルカロイド：ビンブラスチン、パクリタキセル、ドセタキセル；DNAトポイソメラーゼ阻害剤：ドキシソルピシン、エピルピシン、エトポシド、カンプトセシン、トポテカン、イリノテカン、テニポシド、クリスナトール、およびマイトマイシン；抗葉酸：メトトレキサート、ミコフェノール酸、およびヒドロキシウレア；ピリミジン類似体：5-フルオロウラシル、ドキシフルリジン、およびシトシンアラビノシド；プリン類似体：メルカプトプリンおよびチオグアニン；DNA代謝拮抗物質：2'-デオキシ-5-フルオロウリジン、アフィジコリングリシナート、およびピラゾロイミダゾール；ならびに抗有糸分裂剤：ハリコンドリノ、コルヒチン、およびリゾキシシンが含まれるが、これらに限定されない。1種以上の化学療法剤（例えば、FLAG、CHOP）を含む組成物も使用され得る。FLAGには、フルダラビン、シトシンアラビノシド（Ara-C）、およびG-CSFが含まれる。CHOPには、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキシソルピシン、およびプレドニゾンが含まれる。別の実施形態において、PARP（例えば、PARP-1および/またはPARP-2）阻害剤が使用され、そのような阻害剤は、当技術分野でよく知られている（例えば、Olaparib、ABT-888、BSI-201、BGP-15（N-Gene Research Laboratories, Inc.）；INO-1001（Inotek Pharmaceuticals Inc.）；PJ34（Soriano et al., 2001, Pacher et al., 2002b）；3-アミノベンズアミド（Trevigen）；4-アミノ-1,8-ナフタルイミド；（Trevigen）；6（5H）-フェナントリジノン（Trevigen）；ベンズアミド（米国特許再発行第36,397号）；ならびにNU1025（Bowman et al.）。

10

20

【0067】

様々な実施形態において、第1および/または第2の治療法には、肺癌を治療するための化学療法剤の使用が含まれる。そのような薬剤には、アビトレキサート（Abitrexaate）、アブラキサン（パクリタキセルアルブミン安定化ナノ粒子製剤）、アフアチニブ、アフアチニブ、アリムタ（ペメトレキセド二ナトリウム）、アバスチン（ベバシズマブ）、ベバシズマブ、カルボプラチン、シスプラチン、クリゾチニブ、エルロチニブ塩酸塩、フォレックス（Folex）（メトトレキサート）、フォレックスPFS（Folex PFS）（メトトレキサート）、ゲフィチニブ、ギロトリフ（Gilotrif）（アフアチニブ）、ゲムシタピン塩酸塩、ジェムザール（ゲムシタピン塩酸塩）、イレッサ（ゲフィチニブ）、メトトレキサート、メトトレキサートLPF、メキサート（Mexate）、メキサート-AQ（Mexate-AQ）、ニボルマブ、ネシツムマブ、パクリタキセル、パクリタキセルアルブミン安定化ナノ粒子製剤、パラプラット（Paraplat）（カルボプラチン）、パラプラチン（カルボプラチン）、ペメトレキセド二ナトリウム、プラチノール（シスプラチン）、プラチノール-AQ（シスプラチン）、タルセバ（エルロチニブ塩酸塩）、タクソール（パクリタキセル）、ザーコリ（クリゾチニブ）、またはそれらの組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。

30

40

【0068】

様々な実施形態において、治療法には、例えば、放射線療法が含まれる。放射線療法に使用される放射線は、イオン化放射線であり得る。放射線療法はまた、ガンマ線、X線、または陽子ビームであり得る。放射線療法の例には、外部ビーム放射線療法、放射性同位体（I-125、パラジウム、イリジウム）の組織内移植、ストロンチウム-89等の放射性同位体、胸部放射線療法、腹腔内P-32放射線療法、ならびに/または全腹腔および骨盤放射線療法が含まれるが、これらに限定されない。放射線療法の総括については、

50

Hellman, Chapter 16: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy, 6th edition, 2001, DeVita et al., eds., J. B. Lippencott Company, Philadelphiaを参照のこと。放射線療法を、外部ビーム放射線照射または遠隔療法として施行され得、放射線を遠隔光源から向ける。放射線治療はまた、内部治療法または近接照射療法として施行され得、放射性活性供給源を癌細胞または腫瘍の近くの体内に入れる。ヘマトポルフィリンおよびその誘導体、ベルトポルフィン(BPD-MA)、フタロシアニン、光増感剤Pc4、デメトキシ-ハイポクレリンA、および2BA-2-DMHAのような光増感剤の投与を含む光線力学療法の使用も含まれる。

10

【0069】

様々な実施形態において、治療法には、例えば、免疫療法が含まれる。免疫療法には、例えば、癌ワクチンおよび/または感作抗原提示細胞の使用を含み得る。免疫療法は、癌抗原または疾患抗原に指向される予め形成された抗体の投与(例えば、腫瘍抗原への、化学療法剤または毒素に結合していてもよいモノクローナル抗体の投与)によって達成される、宿主の短期防御に対して受動免疫を含むことができる。免疫療法はまた、癌細胞株の細胞傷害性リンパ球により認識されるエピトープを使用することに焦点を合わせることもできる。

【0070】

様々な実施形態において、治療法には、例えば、ホルモン療法が含まれ、ホルモン治療的処置には、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト(例えば、フルタミド、ピカルタミド、タモキシフェン、ラロキシフェン、ロイプロリド酢酸塩(LUPRON)、LH-RHアンタゴニスト)、ホルモン生合成およびプロセッシングの阻害剤、およびステロイド(例えば、デキサメタゾン、レチノイド、デルトイド、ベタメタゾン、コルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、鉱質コルチコイド、エストロゲン、テストステロン、プロゲステロン)、ビタミンA誘導体(例えば、オールトランスレチノイン酸(ATRA)); ビタミンD3類似体; 抗ゲスターゲン(例えば、ミフェプリストン、オナプリストン)、または抗アンドロゲン(例えば、シプロテロン酢酸塩)を含むことができる。

20

【0071】

抗癌剤治療法による治療の継続期間および/または用量は、特定の抗癌剤またはそれらの組み合わせにより変化し得る。特定の癌治療剤に対する適切な治療時間は、当業者によって理解されよう。本発明は、各癌治療剤に対する最適な治療スケジュールの継続した評価を企図し、本発明の方法によって判定される、対象の癌の遺伝子シグネチャーは、最適な治療用量およびスケジュールを決定する際の一要素である。

30

【0072】

様々な実施形態において、抗癌剤治療法の予測される有効性が判定される対象は、哺乳動物(例えば、マウス、ラット、霊長類、非ヒト哺乳動物、家畜、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ)であり、好ましくは、ヒトである。本発明の方法の別の実施形態において、対象は、化学療法も放射線療法も受けたことがない。代替の実施形態において、対象は、化学療法または放射線療法(例えば、シスプラチン、カルボプラチン、および/またはタキサン等を用いた)を受けたことがある。関連した実施形態において、対象は、一種の対象によって、概してまたは平均して遭遇するものを上回る放射線または化学毒性薬のレベルまで曝露されたことがない。ある実施形態において、対象は、癌または前癌組織を除去するための外科手術を受けたことがある。他の実施形態において、癌組織は、除去されていない、例えば、癌組織は、身体の手術不可能な領域内、例えば、生命に不可欠な組織中、または外科的処置が患者に有害になるかなりの危険を生じる領域内に位置する場合があります、または例えば、対象は、癌組織の除去前に抗癌治療を与えられる。

40

【0073】

試料

50

試料、例えば、癌細胞、癌組織、血漿、および/または血液は、好ましくは、癌の診断のための生検時に回収され得る。これは、患者に最良の待遇であり得る治療コースを設計するための絶好の機会を与え得る。例えば、GalNAc-T13またはその変異体の発現が増大している場合、この患者は、GalNAc-T13の発現が増大していない癌を有する別の患者と比較してより積極的な治療コースを必要とし得る。癌治療（例えば、外科手術）後、または癌治療（例えば、放射線照射、化学療法）中に、癌組織、血漿、および/または血液を得ることも可能である。これにより、再発を見込んだ治療コースの変更、または治療コースの決定が可能である。様々な実施形態において、癌は肺癌である。いくつかの実施形態において、肺癌は、非小細胞肺癌である。一実施形態において、NSCLCは、腺癌である。

10

【0074】

本発明に關与するステップは、外科的生検または外科的切除のいずれかによって、患者の肺腫瘍の試料を得ることと、患者からの血液試料を適合することと、を含む。代替として、試料は、一次患者から採取した肺腫瘍幹細胞、一次患者の肺腫瘍由来の細胞株、またはFFPE（ホルマリンで固定したパラフィン包埋した）の形態の保管された患者試料、または新鮮な冷凍された肺腫瘍試料を通して得られ得る。本発明はまた、本発明の上記の部分を通じて評価する可能性（すなわち、生存の可能性、推定平均余命、および将来この突然変異体を獲得する潜在力）を計算に入れる。

【0075】

次いで、患者の腫瘍試料を使用して、「QIAamp DNA Mini and Blood Miniキット」と表記される標準プロトコル、またはFFPE試料については、Qiagen（登録商標）から市販されている「QIAamp DNA FFPE Tissueキット」を使用して、デオキシリボ核酸（DNA）を抽出する。上記および以下の手順は、患者からのインフォームドコンセントを必要とする。

20

【0076】

本発明は、化学療法に対する癌細胞の反応性を判定するためのシステムを提供し、この癌細胞は癌患者から得られる。このシステムは、癌患者から得られた癌細胞中に存在するGalNAc-T13をコードするmRNAに対するシグナルを生成するように設定されている試料分析器と、mRNAに基づいて、このシグナルが基準値よりも大きいかまたは大きくないかを計算するようにプログラムされたコンピュータサブシステムと、を備える。

30

【0077】

本発明はまた、化学療法に対する癌細胞の反応性を判定するためのシステムも提供し、この癌細胞は癌患者から得られる。システムは、GalNAc-T13に特異的な抗体が、癌患者から得られた癌細胞中のGalNAc-T13に結合するとき、シグナルを生成するように設定されている試料分析器と、抗体結合に基づいて、このシグナルが基準値よりも大きいかまたは大きくないかを計算するようにプログラムされたコンピュータサブシステムと、を備える。

【0078】

いくつかの実施形態において、コンピュータサブシステムは、GalNAc-T13の発現が増大している場合に、化学療法を含む療法に応答する見込みのある患者として、およびGalNAc-T13が増大していない場合に、化学療法を含む療法に応答する見込みのない患者として、患者を分類するアルゴリズムに基づいて、mRNAを比較して、化学療法に対する前記癌細胞の反応性の可能性を判定するようにプログラムされる。

40

【0079】

本発明は、さらに、コンピュータで実行されたときに、癌患者から得られた癌細胞を含む試料中のGalNAc-T13の発現を検出することと、GalNAc-T13の発現を基準値と比較することと、を含むステップを行う、コンピュータ可読媒体において具現化されたコンピュータプログラム製品を提供する。検出可能な標識プローブの組み合わせを含む10種以下のプローブ、またはGalNAc-T13のためのプライマーと、本明

50

細書に記載されるコンピュータプログラム製品とを含む、化学療法に応答する癌患者の可能性を検出するための診断キット。

【実施例】

【0080】

以下の実施例は、本請求の発明をより良好に説明するために提供され、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。特定の材料が言及される限り、それは単に説明を目的とし、本発明を限定することを意図するものではない。当業者は、本発明の能力を行使することなく、および本発明の範囲から逸脱することなく等価の手段または反応物を開発してよい。

【0081】

Oグリコシル化改変体は、ほとんどの癌腫に生じ、診断および治療法のために有用な標的を構成し得る分子の発現をもたらす。GalNAc-T13酵素は、Oグリコシル化の開始時に重要なステップを触媒する。それは、転移性神経芽細胞腫において過剰発現し、この腫瘍を有する患者の予後と関連している。切除した肺癌標本においては、GalNAc-T13の発現についての情報がない。

【0082】

以下に詳述されるように、出願者らは、249個の腺癌(ADCA)および122個の扁平上皮癌(SCC)を含む443個のNSCLCを含む腫瘍組織マイクロアレイを使用した。GalNAc-T13に対して特異的なモノクローナル抗体を使用して、免疫組織化学を行った。酵素の細胞質発現は、4つの値の強度スコア(0、1+、2+、および3+)および各組織コアにおける反応性の程度のパーセンテージ(0~100%)を用いて定量化した。次いで、強度と反応性の拡張値(範囲、0~300)を乗算することによって、最終スコアを得た。患者を、ネオアジュバント化学療法を受けている(n=72、WNA)、およびネオアジュバント化学療法を受けていない(n=371、WONA)、2つの群に分けた。

【0083】

下記のように、出願者らは、WNA群とWONA(p=0.20)群との間に有意な差異がなく、NSCLCにおいて頻繁なGalNAc-T13の発現を見出した。ADCAは、両群(WNA、p=0.02、およびWONA、p<0.0001)において、SCCよりもより高いレベルの酵素を発現した。ネオアジュバントを受けている、または受けていないADCA患者において、組織学的パターン(WNA:p=0.002およびWONA:p=0.044)により、GalNAc-T13の発現が異なり、充実型組織学的パターンの存在下でより高い値を示し、鱗状組織学的パターンにおいてより低いことを示した。Spearman相関試験を使用して、GalNAc-T13は、EpCAM(p<0.001)およびTTF-1(p<0.01)の発現と有意に相関し、ADCAでは、GalNAc-T13の発現とEGFRおよびKRAS突然変異状態とEML4-ALK融合遺伝子の存在との間に相関関係がないことを見出した。ADCA-WNAサブセットにおいて、高いGalNAc-T13の発現レベルが、より不良なOS(p<0.01、HR=5.2)と関連し、RFS(p=0.15、HR=1.8)においては、有意でなかった。対照的には、患者のADCAWONAサブセットにおいて、GalNAc-T13の発現と転帰との間の関連性は見出されなかった。GalNAc-T13は、NSCLCにおいて頻繁に発現し、ネオアジュバント化学療法を受けたADCAを有する患者において、不良な予後と関連がある。本明細書中のデータは、GalNAc-T13がNSCLCにおいて化学耐性と関連する新規のマーカーであることを示唆する。

【0084】

実施例1

実験方法

細胞株

疾患の異なる組織型、段階および状態を提示するヒト肺癌細胞株(SK-MES-1、A549、NCI-H1703、NCI-H838、NCI-H1755、NCI-H5

10

20

30

40

50

26、NCI-H1650、NCI-H1975、H69AR、およびNL-20)は、ATCCから購入し、供給業者の取扱説明書に従って、インビトロで培養した。

【0085】

抗GalNAc-T13モノクローナル抗体の産生(T13.5ハイブリドーマ産生プロトコル)

免疫化

GalNAc-Tファミリーメンバーの中で極めて高い変動性を示す領域内のGalNAc-T13の合成ペプチド(

RSLLPALRAVISRNQE

、受託番号BAC54545)(Biosynthesis)を、選択した。Division of Veterinary Laboratories(DI.LA.VE., Montevideo, Uruguay)からの8週齢の4匹のBalb/c雌マウスを使用した。

【0086】

2週間間隔で(0日目、腹腔内、および14日目、21日目、皮下注射)、マウスを免疫化した。免疫混合物は、100 μ lの総体積中に、PBS中のKLHによって担持される50% v/v 100 μ gの合成ペプチドおよびフロイントアジュバント(第1の免疫化については完全、以下については不完全)を含んだ。

【0087】

第1の免疫化前、および24日目および31日目に、血清収集のためにマウスを採血した(約100 μ l)。血清抗体力価は、31日目の試料採取後、ELISAによって決定した。この力価は、1/3000に達した。同様の混合物(100 μ gのPBS中のKLH合成ペプチドおよび不完全フロイントアジュバント)により、選ばれたマウスを、融合前の3日間、皮下注射によりブーストした。

【0088】

融合プロトコル

骨髄腫細胞

SP2/O骨髄腫細胞株を、融合する10日前に解凍し、5%CO₂の加湿した雰囲気中で、DMEM 2mMのグルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、10%SBF中で、37 $^{\circ}$ Cで培養した。融合する前日、骨髄腫細胞を、20%SBFを添加した培養培地が入った未使用の瓶に分けた。全ての培地(2mMのグルタミンおよび1mMのピルビン酸ナトリウムを添加し、SBF20%を含む、およびそれを含まないDMEM)ならびにPEG1,450(Sigma)を、使用前に、37 $^{\circ}$ Cまで予め温めた。骨髄腫細胞をプールし、計数し、次いで、脾臓細胞回復中、インキュベーター内のSBFを含まない完全DMEMにおいて、50mlの管中に残留させた。

【0089】

脾臓細胞

マウスを頸椎脱臼により殺処分し、70%エタノールが入ったビーカー内に置いた。無菌法を使用して、層流フード内で脾臓を取り出し、これを3mlの血清を含まない完全DMEMが入ったPotter-Elvehjem(Sigma)に移した。脾臓を均質化し、脾細胞を、SBFを含まない完全DMEMにおいて、50mlの管に移し、計数した。脾細胞および骨髄腫細胞を、1000rpmで5分間遠心分離し、次いで、10mlのSBFを含まない完全培地中で再懸濁した。骨髄腫細胞および脾細胞を、1/2の割合で、未使用の50mlの管中にプールし、同じ条件下で遠心分離した。

【0090】

融合

細胞混合物から上清を捨て、残りの液体中で、指で弾くことによりペレットを緩やかに再懸濁した。1.5mlの37 $^{\circ}$ Cで予め温めたPEGを、管を1分30秒間緩やかに回転させることによって、ゆっくりと添加し、次いで、20mlの血清を含まない培地を、3分間ゆっくりと添加した。細胞を1000rpmで5分間遠心分離し、96ウェル培養ブ

10

20

30

40

50

レート (200 μ l / ウェル) 中で H A T 培地 20% S B F 中で蒔種し、次いで、5% C O₂ の加湿した雰囲気下で、37 °C でインキュベーター中に置いた。4日目および7日目に、培地を、新たに予め温めた H A T 培地で50%置き換えた。

【0091】

クローン試験

10 ~ 14日後、クローンが裸眼で可視されたとき、試験されるべきウェルを選択するために、倒立顕微鏡によって、プレートをスクリーニングした。B S Aによって担持される特定のペプチドでコーティングしたマイクロタイタープレートを用いて、E L I S Aによりスクリーニングを行った。E L I S A陽性ウェルからの細胞を、24ウェル培養プレートに移し、計数し、直前に、B a l b / c 脾細胞で調製した支持細胞層を含む96ウェル培養プレートに限界希釈法によってクローン化した。10 ~ 15日後、固有のクローンを有する全てのウェルを、E L I S Aにより再試験し、陽性クローンを24ウェルプレート、次いで、25 cm² の瓶中に拡張させ、液体窒素中 S B F 10% D M S O 中に保存した。

10

【0092】

表面プラズモン共鳴によるモノクローナル抗体の特異性の分析

m A b 13.5 と合成ペプチドの間の相互作用を、B I A c o r e 3000 装置 (G E H e a l t h c a r e , S w e d e n) にて表面プラズモン共鳴実験を行うことによって分析した。精製した m A b を、活性カルボキシメチル化デキストラン C M - 5 センサー表面 (S A センサーチップ、G E H e a l t h c a r e , S w e d e n) と結合した。ペプチドを H B S - E P 緩衝液 (10 m M H E P E S , 150 m M N a C l , 3 m M E D T A , および 0.005% 界面活性剤 P 20 , p H 7.4) 中で希釈し、センサーチップ上を通過させた。全ての実験を、25 °C で自動調温されたバイオセンサー装置を用いて、30 μ l / 分の流速、180秒の接触時間、360秒の解離時間で二重に行った。解離後、各実験の終了時に、10 m M グリシン - H C l (p H 2.5) を注入することによって、センサーチップを再生した。全てのデータ処理は、B I A c o r e によって提供される B I A e v a l u a t i o n 4.1 ソフトウェアを用いて行った。

20

【0093】

R T - P C R

総 R N A を、製造業者の取扱説明書に従って、T r i - R e a g e n t (S i g m a) を用いて、肺癌細胞株から抽出した。20 μ l の総反応体積中 2 μ l の 10 m M の各デオキシヌクレオチド三リン酸塩 (d N T P) および 200 n g のランダム六量体 (F e r m e n t a s I n c , M a r y l a n d) の存在下で 200 単位の M - M L V 逆転写酵素 (A m e r s h a m , P i s c a t a w a y , N J) を使用することによる第一鎖 c D N A 合成のために、2 μ g の総 R N A を含んだ。37 °C で1時間インキュベートした後、混合物を 70 °C まで加熱し、急速冷却し、- 20 °C で保存した。特定のプライマー：

30

5'-ACATCTATCCGGACTCCC-3' および 5'-

TCATGTGCCCAAGGTCATGTTCC-3'

(受託番号 A J 505991) を用いて、425 b p の G A L N T 13 転写物の増幅を行った。P C R 混合物 (25 μ l の総反応体積) は、20 m M T r i s - H C l (p H 8.4)、50 m M K C l、2.5 m M M g C l₂、200 μ M d N T P、300 n M 各プライマー、および1単位の T a q D N A ポリメラーゼ (F e r m e n t a s I n c , M a r y l a n d) を含む。95 °C で45秒間、62 °C で1分、および72 °C で1分という条件下で、35サイクルの増幅を行った。P C R 産物 (15 μ l) を、2% アガロースゲル上で電気泳動し、エチジウムブロマイドの染色後、直接可視化によって分析した。

40

【0094】

免疫蛍光顕微鏡検査法

ガラスカバースリップ上に蒔種した細胞を、P B S で洗浄し、メタノール - アセトン 5

50

0%で10分間固定し、使用するまで-20℃で保存した。次いで、カバースリップを解凍し、PBS中で再水和し、30%ヤギ血清中で20分間遮断した。次いで、一次抗体T13.5を室温で1時間インキュベートし、それぞれ、PBS中で5分間3回洗浄した後、Alexa Fluor (登録商標) 488 Dyeと結合した二次抗体を室温で1時間インキュベートした。単層をDAPIで対比染色し、PBS-グリセロール50%中でマウントし、通常の落射蛍光顕微鏡法によって、またはZeiss LSM 510共焦点顕微鏡を使用する共焦点免疫蛍光顕微鏡法によって分析した。

【0095】

患者および免疫組織化学的分析

University of Texas MD Anderson Cancer Center (Houston, Texas)で、2003年から2005年の間に治療目的のため、外科的切除術を受けた患者からの外科的に切除された原発性肺腺癌の腫瘍組織を回収した。臨床病理情報は、全ての症例において電子カルテから検索され、それには、年齢、性別、喫煙歴および喫煙状態(現在、以前、もしくは一度もなし)、国際肺癌学会(IASLC) [Detterbeck, 2009 分類系]による腫瘍のサイズ、腫瘍段階、ネオアジュバントおよびアジュバント治療、RFSおよびOS率についての追加情報が含まれる。

【0096】

組織マイクロアレイ(TMA)は、外科的に切除された443人のNSCLC患者からのホルマリン固定パラフィン包埋組織で構築された。5μM厚のTMAの切片上にppGalNAc-T13に特異的なモノクローナル抗体(mAb T13.5)を用いて免疫組織化学を行った。組織切片を脱パラフィン処理し、水和し、デクロッキング(decloaking)チャンパ内のpH6.0のクエン酸塩緩衝液中で抗原回復を行い(121×30分、90×10分)、トリス緩衝液で洗浄した。メタノール中3% H₂O₂で、室温で15分間ペルオキシダーゼのブロッキングを行った。Dako無血清タンパク質ブロックで30分間タンパク質のブロッキングを行った。スライドを、一次抗体で、室温で90分間インキュベートし、トリス緩衝液で洗浄し、続いて、Envision Dual-Link系西洋ワサビペルオキシダーゼ(Dako)で30分間インキュベートした。

【0097】

過酸化水素および抗菌剤(Dako)を含有する新たにイミダゾールHCl緩衝液、pH7.5で調製した、0.5% 3,3'-ジアミノベンジジンを用いて、染色を5分間顕色化し、次いで、ヘマトキシリンと対比染色し、脱水し、マウントした。

【0098】

GalNAc-T13に対する細胞質免疫染色を、4つの値の強度スコア(0、1+、2+、および3+)および各コアにおける反応性の程度のパーセンテージ(0~100%)を用いて定量化した。次いで、強度と反応性の拡張値(範囲、0~300)を乗算し、定量化することによって、最終スコアを得た。本発明者らの集団中の分布により、中央値がカットオフ値40と見なされた。この集団を、ネオアジュバント療法を受けたか、または受けなかったかで、ネオアジュバントを受けた(WNA)72人の患者およびネオアジュバントを受けなかった(WONA)371人の患者の2つの群に分け、個々の群として、腺癌(ADCA)および扁平上皮(SQM)を分析した。

【0099】

実施例2

パラフィン包埋組織における免疫組織化学的研究に有用なGalNAc-T13に特異的なモノクローナル抗体の生成。

GalNAc-T13がGalNAc-T1と比較して84%の相同性を示すことを考慮して、GalNAc-T1配列を有する相同性のないGalNAc-T13のKLHを結合させた特異的モチーフ

(RSLLPALRAVISRNQE)

10

20

30

40

50

を有するマウスを免疫化した(図1A)。ELISAによって特定のハイブリドーマの選択を行い、BSAを結合させたGalNAc-T13ペプチドに対してスクリーニングを行った。合成ペプチドに対して強く反応する、mAbのうちの一つであるT13.5を、さらなる特徴付けのために使用した。パキウロウイルスに発現したGalNAc-T1および-T13を使用して、ウェスタンブロットにおけるmAbのT13.5反応性を評価した。抗体がGalNAc-T13と反応するが、GalNAc-T1とは反応せず(図1B)、GalNAc-T13に対するこの抗体の特異性を確認し、変形型のタンパク質と結合することを見出した。どのアミノ酸残基がmAb T13.5結合に不可欠であるのかを判定するために、配列

RSLLPALRAVISRNQE

を網羅する重複ペプチドを使用して、エピトープをマップした。固定化抗体へのペプチド結合を、BIACoreを用いて評価した(図1C)。得られた結果は、mAb T13.5のエピトープが残基LLPLARにマッピングされ得ることを示す。ppGalNAc-T13の発現が神経芽細胞腫においてこれまでに報告されたことを考慮して(Berois et al., 2006a)、IMR-32細胞株にmAb T13.5を使用する免疫細胞化学的分析を行った(図1D)。ゴルジ装置に局在化されたグリコシルトランスフェラーゼに対して期待されるように、強力な染色が、核周辺領域内に優勢に検出することを見出した。神経芽細胞腫腫瘍における免疫組織化学的評価(図1E)は、mAb T13.5が病理学的な日常の診断に使用されるパラフィン包埋組織においてGalNAc-T13を検出することができることを示す。

【0100】

実施例3

GalNAc-T13が、ヒト肺癌細胞中に発現される。

局所進行性疾患を示す72人の肺癌患者は、術前にネオアジュバント療法を受けた。カルボプラチンおよびパクリタキセル、またはカルボプラチンおよびドセタキセル、またはカルボプラチンおよびゲムシタピン、またはカルボプラチンおよびペメトレキセド、またはカルボプラチンおよびエトポシド、またはシスプラチンおよびドセタキセル、またはシスプラチンおよびエトポシド、またはシスプラチンおよびゲムシタピン、またはパクリタキセルおよびセツキシマブのうちの一つにより患者を治療した。

【0101】

GalNAc-T13は、神経組織で特異的に発現するグリコシルトランスフェラーゼであることが、報告された(Zhang et al., 2003)。ここで、RT-PCRによりヒト肺癌細胞株のパネルを評価して、A549、NCI-H1703、NCI-H1755、NCI-H526、NCI-H1650、H69AR、およびNL-20細胞株でGalNAc-T13をコードするmRNAを見出した(図2A)。対照的に、RT-PCR分析は、SK-MES-1、NCI-H838、およびNCI-H1975細胞株において陰性であった。免疫蛍光顕微鏡検査法(図2B)およびウェスタンブロット(図2C)を使用して、タンパク質レベルでのヒト肺癌細胞中のGalNAc-T13の発現を確認する。RT-PCR(図2A)およびウェスタンブロット(図2C)により得られた結果は、GalNAc-T13のスプライス変異体がヒト肺癌で発現することを示唆している。

【0102】

コロニーPCRおよびヌクレオチド配列決定に基づいた戦略を用いて、初めて、GalNAc-T13のスプライス変異体の大きなファミリーを示す(図3)。GalNAc-T13野生型は、配列番号1および2に記載される配列によってコードされる。GalNAc-T13のエクソン9の欠失を有するスプライス変異体GalNAc-T13 Ex9は、配列番号3および4に記載される配列によってコードされる。GalNAc-T13のエクソン9の39ヌクレオチドの欠失を有するスプライス変異体GalNAc-T13 39bp Ex9は、配列番号5および6に記載される配列によってコードされる。GalNAc-T13のエクソン10Bの欠失を有するスプライス変異体GalNAc-T

10

20

30

40

50

13 Ex 10 B は、配列番号 7 および 8 に記載される配列によってコードされる。G a l N A c - T 1 3 のエクソン 2 ~ 7 の欠失を有するスプライス変異体 G a l N A c - T 1 3 Ex 2 ~ 7 は、配列番号 9 および 10 に記載される配列によってコードされる。G a l N A c - T 1 3 のエクソン 6 の欠失を有するスプライス変異体 G a l N A c - T 1 3 Ex 6 は、配列番号 11 および 12 に記載される配列によってコードされる。G a l N A c - T 1 3 のエクソン 8 の欠失を有するスプライス変異体 G a l N A c - T 1 3 Ex 8 は、配列番号 13 および 14 に記載される配列によってコードされる。G a l N A c - T 1 3 のエクソン 6 およびエクソン 8 の欠失を有するスプライス変異体 G a l N A c - T 1 3 Ex 6 Ex 8 は、配列番号 15 および 16 に記載される配列によってコードされる。G a l N A c - T 1 3 のエクソン 6、エクソン 8、エクソン 9 の 39 ヌクレオチド、およびエクソン 10 B の欠失を有するスプライス変異体 G a l N A c - T 1 3 Ex 6 Ex 8 39 b p Ex 9 Ex 10 B は、配列番号 17 および 18 に記載される配列によってコードされる。

10

【0103】

実施例 4

N S C L C において化学耐性と関連する新規の免疫組織化学マーカーとしての G a l N A c - T 1 3

M A b T 1 3 . 5 の免疫染色は、肺癌患者からの 443 個の原発腫瘍において評価された。患者および腫瘍の特徴を、表 1 に示す。m A b T 1 3 . 5 は、常に、びまん性細胞質染色パターンを示した (図 4)。G a l N A c - T 1 3 の発現が扁平上皮細胞腫瘍における発現よりも腺癌において有意に高いことを見出した ($p < 0.001$)。G a l N A c - T 1 3 の発現と E G F R および K R A S 突然変異状態と E M L 4 - A L K 融合遺伝子の存在との間に相関関係がないことを見出した。ネオアジュバント治療を受けている腺癌を有する患者において、G a l N A c - T 1 3 の高い発現レベルは、より不良な全体生存率と関連した ($p < 0.01$ 、 $H R = 5.2$) (図 5 A)。同様の結果が、進行性腫瘍を有する患者 (図 5 B)、ならびに早期腺癌患者 (図 5 C) において観察された。対照的に、ネオアジュバント治療を受けていない腺癌患者において、G a l N A c - T 1 3 の発現と転帰との間にいかなる関連性も見出さなかった。これらのデータは、G a l N A c - T 1 3 が肺腺癌患者において化学耐性と関連する新規のマーカーであることを強く示唆している。

20

30

【0104】

(表 1) 肺癌原発腫瘍における G a l N A c T 1 3 の発現に伴う研究対象集団の特徴

	T13-H ¹	T13-L ²	合計	
	n (%)	n (%)	n (%)	
性別				
男性	107 (49)	111 (51)	218 (100)	
女性	97 (43.1)	128 (56.9)	225 (100)	
年齢 (中央値66±10.3歳)				
<66	95 (48)	103 (52)	198 (100)	10
≥66	109 (44.5)	136 (55.5)	245 (100)	
喫煙 現在 過去 一度もなし				
現在	86 (45.5)	103 (54.5)	189 (100)	
過去	97 (47.5)	107 (52.5)	204 (100)	
一度もなし	21 (42)	29 (58)	50 (100)	
病期				
I	106 (47)	120 (53)	226 (100)	20
II	43 (39.8)	65 (60.2)	108 (100)	
III	46 (47.9)	50 (52.1)	96 (100)	
IV	9 (69.2)	4 (30.8)	13 (100)	
組織病理				
腺癌	160 (54.2)	135 (45.8)	295 (100)	
腺房型	30 (51.7)	28 (48.3)	58 (100)	
充実型	76 (64.4)	42 (35.6)	118 (100)	
乳頭型	19 (47.5)	21 (52.5)	40 (100)	30
鱗状	27 (39.7)	41 (60.3)	68 (100)	
NA	8 (72.7)	3 (27.3)	11 (100)	
扁平上皮癌	44 (29.7)	104 (70.3)	148 (100)	
グレード				
高分化型	16 (32)	34 (68)	50 (100)	
中分化型	101 (43.3)	132 (56.7)	233 (100)	
低分化型	82 (53.9)	70 (46.1)	152 (100)	
NA	5 (62.5)	3 (37.5)	8 (100)	40

¹ GaINAcT13の高い発現

² GaINAcT13の低い発現または非発現

【0105】

参考文献

1. Adameczyk B, Tharmalingam T, Rudd PM. Glycans as cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1820:1347-53.
2. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. National Cancer Institute; 2010. Available at: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/.
3. Azzoli CG, Baker S Jr, Temin S, Pao W, Aliff T, Brahmer J, Johnson DH, Laskin JL, Masters G, Milton D, Nordquist L, Pfister DG, Piantadosi S, Schiller JH, Smith R, Smith TJ, Strawn JR, Trent D, Giaccone G; American Society of Clinical Oncology. Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009; 27:6251-6266. 10
4. Beasley MB, Brambilla E, Travis WD. The 2004 World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol* 2005; 40:90-7. 20
5. Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, Tabak LA. Control of Mucin-Type O-Glycosylation - A Classification of the Polypeptide GalNAc-transferase Gene Family. *Glycobiology*. 2012; 22:736-56.
6. Berois N, Blanc E, Ripoché H, Mergui X, Trajtenberg F, Cantais S, Barrois M, Dessen P, Kågedal B, Bénard J, Osinaga E, Raguénez G. ppGalNAc-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma. *Clin Chem* 2006; 52:1701-12. 30
7. Berois N, Mazal D, Ubbillos L, Trajtenberg F, Nicolas A, Sastre-Garau X, Magdelenat H, Osinaga E. UDP-N-Acetyl-D-Galactosamine: Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase-6 as a new immunohistochemical breast cancer marker. *J Histochem Cytochem* 2006;54:317-28. 40
8. Freire T, Berois N, Sónora C, Varangot M, Barrios E, Osinaga E. UDP- N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (ppGalNAc-T6) mRNA as a potential new marker for detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells. *Int J Cancer* 2006; 119:1383-8.

9. Gu C, Oyama T, Osaki T, Li J, Takenoyama M, Izumi H, Sugio K, Kohno K, Yasumoto K. Low expression of polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in lung adenocarcinoma: impact on poor prognosis and early recurrence. *Br J Cancer*. 2004; 90:436-42.
10. Guda K, Moinova H, He J, Jamison O, Ravi L, Natale L, Lutterbaugh J, Lawrence E, Lewis S, Willson JK, Lowe JB, Wiesner GL, Parmigiani G, Barnholtz-Sloan J, Dawson DW, Velculescu VE, Kinzler KW, Papadopoulos N, Vogelstein B, Willis J, Gerken TA, Markowitz SD. Inactivating germ-line and somatic mutations in polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 in human colon cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:12921-5. 10
11. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60:277- 300. 20
12. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med*. 2004; 350:2129– 2139. 30
13. Mandel U, Hassan H, Therkildsen MH, Rygaard J, Jakobsen MH, Juhl BR, Dabelsteen E, Clausen H. Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified epithelia and squamous cell carcinomas: immunohistological evaluation using monoclonal antibodies to three members of the GalNAc-transferase family. *Glycobiology* 1999; 9:43-52.
14. Mok TS. Personalized medicine in lung cancer: what we need to know. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011; 8:661-8. 40
15. Miyahara N, Shoda J, Kawamoto T, Furukawa M, Ueda T, Todoroki T, Tanaka N, Matsuo K, Yamada Y, Kohno K, Irimura T. Expression of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase isozyme 3 in the

subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2090-9.

16. Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004; 304:1497–1500. 10

17. Reis CA, Osorio H, Silva L, Gomes C, David L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol.* 2010; 63:322-9.

18. Saijo N. Critical comments for roles of biomarkers in the diagnosis and treatment of cancer. *Cancer Treatment Reviews* 2012; 38:63–67. 20

19. Taniuchi K, Cerny RL, Tanouchi A, Kohno K, Kotani N, Honke K, Saibara T, Hollingsworth MA. Overexpression of GalNAc-transferase GalNAc-T3 promotes pancreatic cancer cell growth. *Oncogene.* 2011; 30:4843-54.

20. Tarp MA and Clausen H. Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochim. Biophys. Acta* 2008, 1780:546-563. 30

21. Ten Hagen K, Fritz T, Tabak, L. All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 2003; 13:1R-16R.

22 Zhang Y, Iwasaki H, Wang H, Kudo T, Kalka TB, Hennet T, et al. Cloning and characterization of a new human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc alpha-serine/threonine antigen. *J Biol Chem* 2003; 278:573-84. 40

【 0 1 0 6 】

上記の様々な方法および技法は、本出願を実行するための多くの方法を提供する。もちろん、必ずしも記載される目的または利点の全てを、本明細書に記載される任意の特定の実施形態に従って達成され得るわけではないことは理解されよう。したがって、例えば、当業者は、本明細書で教示された1つまたは1群の利点を本明細書で教示または提示された他の目的および利点を必ずしも達成することなく達成または最適化するように、本方法を実行することができることを認識できるであろう。様々な代替物が、本明細書中で記述されている。いくつかの好ましい実施形態は、具体的には、1つの、別のまたはいくつかの特徴を包含するが、一方、他の実施形態は、具体的には、1つの、別のまたはいくつか

の特徴を除外し、一方、さらに他の実施形態は、1つの、別のまたはいくつかの特徴の包含により特定の特徴を軽減することは理解されよう。

【0107】

さらに、当業者は、異なる実施形態から様々な特徴の適用可能性を認識するであろう。同様に、上記の様々な要素、特徴、およびステップ、ならびに各々のこのような要素、特徴、およびステップに関するその他の既知の等価物は、本明細書に記載される原理に従って方法を実施し得るように当業者に様々な組み合わせで使用される。様々な要素、特徴、およびステップの中で、多様な実施形態に特定の包含されるものもあれば、特定の除外されるものもある。

【0108】

ある実施形態および実施例に関連して本出願を開示してきたが、本出願の実施形態は具体的に開示された実施形態を越えて他の代替的实施形態および/またはその使用、修正、および等価物にまで広がるのが当業者に理解されよう。

【0109】

いくつかの実施形態において、「a」および「an」および「the」という用語、ならびに本出願の特定の実施形態を記述する文脈で（特に、以下の特許請求の範囲のうちの一部の文脈で）使用される同様の言及は、単数および複数の両方を包含するように解釈され得る。本明細書中の値の範囲の列挙は、単に、その範囲内に入る各々の別個の値に個別に言及することの略記法として役立つよう意図される。本明細書中で別途指示されていない限り、各々の個々の値は、それが本明細書中で個別に列挙されるかのように、本明細書中に組み込まれる。本明細書中で記載される方法は全て、本明細書中で別途指示されていない限り、または文脈により明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施され得る。本明細書中のある実施形態に関連して提供される任意のおよび全ての実施例、または例示的言語（例えば「等」）の使用は、単に、本出願をより明らかにすることを意図し、別途特許請求される本出願の範囲に限定を課すものではない。本明細書中のいかなる言語も、本出願の実施に不可欠ないかなる非特許請求要素を示すものとして解釈されるべきでない。

【0110】

本出願の好ましい実施形態は、本出願を実行するために本発明者らに知られている最良の方式を含めて、本明細書中に記載されている。それらの好ましい実施形態における変形例は、前述の説明を読めば、当業者には明らかであろう。当業者は、適宜、このような変形例を用い得、本出願は、本明細書中に具体的に記載されたものとは別の方法で実行され得ることが企図される。したがって、本出願の多数の実施形態は、適用可能な規則により許される場合、本明細書に添付される特許請求の範囲で列挙される対象の全ての修正および等価物を包含する。さらに、その全ての可能な変形例における上記の要素の任意の組み合わせは、本明細書中に別記しない限り、あるいはそうでない場合は、文脈により明らかに矛盾しない限り、本出願に包含される。

【0111】

本明細書中で参照される特許、特許出願、特許出願の刊行物、および他の資料、例えば、論文、書物、仕様書、刊行物、文書、事柄等および/またはその他は全て、全ての目的のために、それらの全体が本参照により本明細書中で組み込まれるが、但し、それらに関連した任意の審査履歴、本発明の文書と一致しないかまたは矛盾するそれらのいずれか、あるいは本発明の文書にここでまたは後に関連する特許請求の最も広い範囲に関して限定的影響を及ぼし得るそれらのいずれかは除外する。例として、組み込まれたもののいずれかと関連する記述、定義、および/または用語の使用と、本発明の文書と関連するものとの間に何らかの不一致または矛盾が存在する場合、本発明の文書における記述、定義、および/または用語の使用が優位に立つ。

【0112】

本明細書中に開示される本出願の実施形態は、本出願の実施形態の原理の例証であることが理解されよう。用いられ得る他の修正は、本出願の範囲内であり得る。したがって、

10

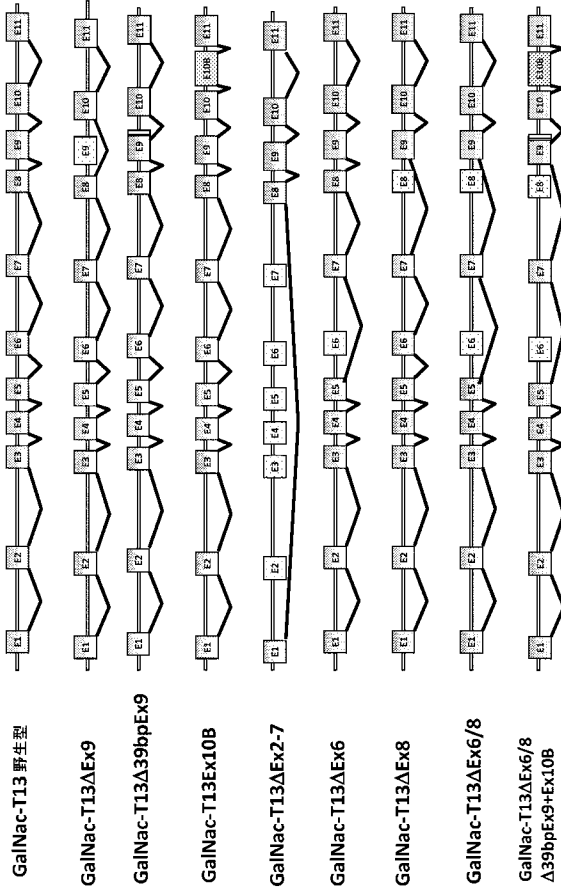
20

30

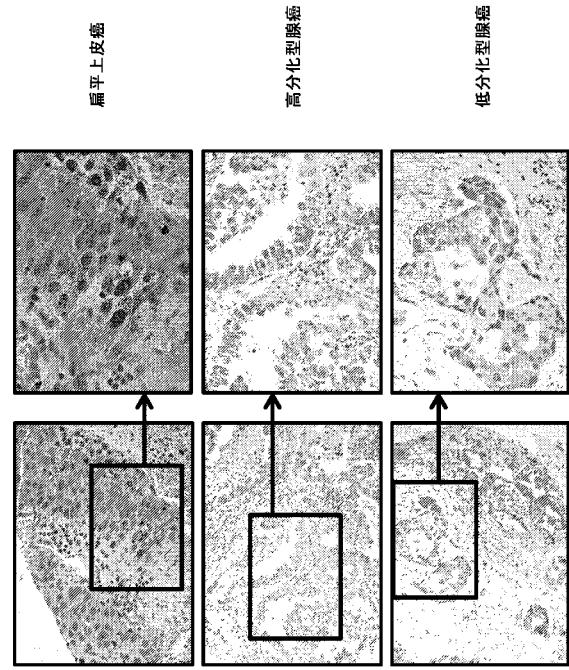
40

50

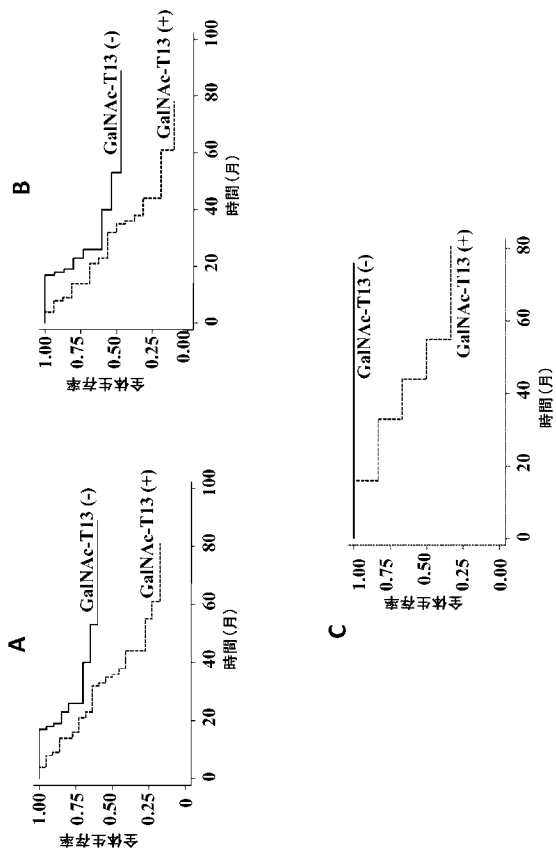
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【配列表】

2015529808000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年7月28日(2015.7.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

実施例2

パラフィン包埋組織における免疫組織化学的研究に有用なGalNAc-T13に特異的なモノクローナル抗体の生成。

GalNAc-T13がGalNAc-T1と比較して84%の相同性を示すことを考慮して、GalNAc-T1配列を有する相同性のないGalNAc-T13のK_LHを結合させた特異的モチーフ

(RSLLPALRAVISRNQE)

を有するマウスを免疫化した(図1A)。ELISAによって特定のハイブリドーマの選択を行い、BSAを結合させたGalNAc-T13ペプチドに対してスクリーニングを行った。合成ペプチドに対して強く反応する、mAbのうちの一つであるT13.5を、さらなる特徴付けのために使用した。パキユロウイルスに発現したGalNAc-T1および-T13を使用して、ウェスタンブロットにおけるmAbのT13.5反応性を評価した。抗体がGalNAc-T13と反応するが、GalNAc-T1とは反応せず(図1B)、GalNAc-T13に対するこの抗体の特異性を確認し、変形型のタンパク質と結合することを見出した。どのアミノ酸残基がmAb T13.5結合に不可欠であるのかを判定するために、配列

RSLLPALRAVISRNQE

を網羅する重複ペプチドを使用して、エピトープをマップした。固定化抗体へのペプチド結合を、BIACoreを用いて評価した(図1C)。得られた結果は、mAb T13.5のエピトープが残基L L P A L Rにマッピングされ得ることを示す。ppGalNAc-T13の発現が神経芽細胞腫においてこれまでに報告されたことを考慮して(Berouis et al., 2006a)、IMR-32細胞株にmAb T13.5を使用する免疫細胞化学的分析を行った(図1D)。ゴルジ装置に局在化されたグリコシルトランスフェラーゼに対して期待されるように、強力な染色が、核周辺領域内に優勢に検出することを見出した。神経芽細胞腫腫瘍における免疫組織化学的評価(図1E)は、mAb T13.5が病理学的な日常の診断に使用されるパラフィン包埋組織においてGalNAc-T13を検出することができることを示す。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

本明細書に記載されるプロセス、アッセイ、および方法の様々な実施形態において、対象はヒトである。いくつかの実施形態において、対象は、ネオアジュバント療法を受けたことがある。いくつかの実施形態において、対象から得られた試料中のGalNAc-T13またはその変異体のレベルの分析は、GalNAc-T13またはその変異体をコードする核酸レベル、GalNAc-T13またはその変異体のタンパク質レベルを測定すること、あるいはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、対象からの試料は、癌治療前、癌治療中、または癌治療後に得られる。一実施形態において、対象は

、癌、例えば、肺癌を有している。一実施形態において、肺癌は非小細胞肺癌（NSCLC）である。特定の実施形態において、NSCLCは腺癌である。様々な実施形態において、対象からの試料は、組織、血液、血漿、またはそれらの組み合わせから得られる。

[本発明1001]

(i) 化学療法耐性の可能性を知ることを望んでいる癌患者から腫瘍細胞を含む試料を得ることと、

(ii) GalNac - T13またはその変異体のレベルを決定するために、前記試料をアッセイすることと、

(iii) 基準試料と比較してGalNac - T13もしくはその変異体のレベルが増加している場合に、前記対象の化学療法耐性の可能性が増大していると判定すること、または前記基準試料と比較してGalNac - T13もしくはその変異体のレベルが同じであるか、もしくは減少している場合に、前記対象の化学療法耐性の可能性が減少していると判定することと、

を含む、方法。

[本発明1002]

前記試料をアッセイすることが、GalNac - T13もしくはその変異体をコードする核酸のレベルを検出すること、GalNac - T13タンパク質もしくはその変異体のレベルを決定すること、またはそれらの組み合わせを含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

GalNac - T13またはその変異体をコードする核酸のレベルを検出することが、前記試料中に存在するGalNac - T13またはその変異体をコードするmRNAの量を決定することを含む、本発明1002の方法。

[本発明1004]

pGalNac - T13タンパク質またはその変異体のレベルを検出することが、ppGalNac - T13またはその変異体に特異的な抗体を用いて、GalNac - T13またはその変異体のレベルを検出することを含む、本発明1002の方法。

[本発明1005]

前記抗体がモノクローナル抗体である、本発明1004の方法。

[本発明1006]

前記モノクローナル抗体が、GalNac - T13またはその変異体のエピトープLLPALRに結合する、本発明1005の方法。

[本発明1007]

前記対象がネオアジュバント化学療法を受けたことがある、本発明1001の方法。

[本発明1008]

前記癌が肺癌である、本発明1001の方法。

[本発明1009]

肺癌が非小細胞肺癌（NSCLC）である、本発明1008の方法。

[本発明1010]

NSCLCが腺癌である、本発明1009の方法。

[本発明1011]

前記試料が、組織、血液、血漿、またはそれらの組み合わせである、本発明1001の方法。

[本発明1012]

前記試料が、癌治療前、癌治療中、または癌治療後に得られる、本発明1001の方法。

[本発明1013]

前記対象がヒトである、本発明1001の方法。

[本発明1014]

基準値が、癌を有していない対象の集団におけるGalNac - T13またはその変異体の発現レベルの平均または中央値である、本発明1001の方法。

[本発明1015]

基準値が、癌を有しており、かつ化学療法に応答する対象の集団における G a l N A c - T 13 またはその変異体の発現レベルの平均または中央値である、本発明1001の方法。

[本発明1016]

基準値が、異なる時点から得られた試料における、前記対象からの G a l N A c - T 13 またはその変異体の発現レベルである、本発明1001の方法。

[本発明1017]

前記対象の化学療法耐性の可能性が減少している場合に、前記対象に第1の治療法を処方すること、または前記対象の化学療法耐性の可能性が増大している場合に、前記対象に第2の治療法を処方することをさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1018]

前記第1の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つ以上である、本発明1017の方法。

[本発明1019]

前記第2の治療法が、外科手術、放射線照射、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちの1つ以上、本発明1017の方法。

[本発明1020]

前記第2の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つ以上であり、化学療法が、前記対象に、前記対象を治療するためにこれまでに使用されていない1種以上の化学療法剤を投与すること、または前記対象にこれまでに投与された化学療法剤を、これまでに投与された用量よりも高い用量で投与することを含む、本発明1017の方法。

[本発明1021]

化学療法耐性の可能性の増大の判定を、それを必要とする対象において行うためのアッセイであって、

(i) 癌を有している対象からの生体試料を提供することと、

(i i) G a l N A c - T 13 またはその変異体に特異的に結合する抗体を提供することと、

(i i i) 前記生体試料を前記抗体と接触させることと、

(i v) イムノアッセイを使用して、G a l N A c - T 13 またはその変異体に結合している抗体のレベルを検出することであって、基準試料と比較して前記対象からの前記生体試料中の結合の存在が、前記対象における化学療法耐性の可能性の増大を示す、ことと、を含む、アッセイ。

[本発明1022]

癌を有している対象に対する治療法を選択する、および任意で前記治療法を施行するためのアッセイであって、

(i) 癌を有している対象からの生体試料を提供することと、

(i i) G a l N A c - T 13 またはその変異体に特異的に結合する抗体を提供することと、

(i i i) 前記生体試料を前記抗体と接触させることと、

(i v) イムノアッセイを使用して、G a l N A c - T 13 またはその変異体に結合している抗体のレベルを検出することであって、基準試料と比較して前記対象からの前記生体試料中の結合の増加が、前記対象における p p G a l N A c の発現の増大および化学療法耐性の可能性の増大を示す、ことと、

(v) 前記対象の化学療法耐性の可能性が減少している場合に、前記対象に第1の治療法を処方すること、または前記対象の化学療法耐性の可能性が増大している場合に、前記対象に第2の治療法を処方することを含む、治療法を選択することと、を含む、アッセイ。

[本発明1023]

前記第1の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つ以上である、本発明1022のアッセイ。

[本発明1024]

前記第2の治療法が、外科手術、放射線照射、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちの1つ以上、本発明1022のアッセイ。

[本発明1025]

前記第2の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つ以上であり、化学療法が、前記対象に、前記対象を治療するためにこれまでに使用されていない1種以上の化学療法剤を投与すること、または前記対象にこれまでに投与された化学療法剤を、これまでに投与された用量よりも高い用量で投与することを含む、本発明1022のアッセイ。

[本発明1026]

G a l N A c - T 13またはその変異体に対して反応性がある抗体のレベルを検出することが、

(i) 前記癌患者からの前記試料を、G a l N A c - T 13またはその変異体に特異的に結合する抗体またはその断片と接触させることと、

(i i) 前記抗体と、前記試料中に存在するG a l N A c - T 13またはその変異体との抗体 - タンパク質複合体を形成することと、

(i i i) 非結合抗体を除去するために前記試料を洗浄することと、

(i v) 前記試料中のG a l N A c - T 13またはその変異体に結合した前記抗体に対して反応性があり、かつ標識された検出抗体を添加することと、

(v) 非結合の標識された検出抗体を除去するために洗浄することと、

(v i) 前記標識を検出可能なシグナルに変換することであって、前記検出可能なシグナルが、前記患者からの前記試料中のG a l N A c - T 13またはその変異体のレベルを示す、ことと、を含む、本発明1021または1022のアッセイ。

[本発明1027]

前記試料が、組織、血液、血漿、またはそれらの組み合わせである、本発明1021または1022のアッセイ。

[本発明1028]

前記抗体がモノクローナル抗体である、本発明1021または1022のアッセイ。

[本発明1029]

前記抗体が、G a l N A c - T 13またはその変異体のエピトープL L P A L Rに結合する、本発明1028のアッセイ。

[本発明1030]

前記対象が、ネオアジュバント化学療法を受けたことがある、本発明1021または1022のアッセイ。

[本発明1031]

前記癌が肺癌である、本発明1021または1022のアッセイ。

[本発明1032]

前記肺癌が非小細胞肺癌 (N S C L C) である、本発明1031のアッセイ。

[本発明1033]

N S C L C が腺癌である、本発明1032のアッセイ。

[本発明1034]

前記試料が、癌治療前、癌治療中、または癌治療後に得られる、本発明1021または1022のアッセイ。

[本発明1035]

基準値が、癌を有していない対象の集団からのG a l N A c - T 13発現レベルの平均または中央値である、本発明1021または1022のアッセイ。

[本発明1036]

基準値が、癌を有しており、かつ化学療法に应答する対象の集団からのG a l N A c - T 13発現レベルの平均または中央値である、本発明1021または1022のアッセイ。

[本発明1037]

前記抗体が、エフェクター成分にさらに結合されている、本発明1021または1022のアッセイ。

[本発明1038]

前記エフェクター成分が、蛍光標識、放射性化合物、酵素、基質、エピトープタグ、高電子密度試薬、ビオチン、ジゴニゲニン (digonigenin)、ハプテン、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される検出可能な部分である、本発明1037のアッセイ。

[本発明1039]

前記検出抗体が、酵素に共有結合することによって標識される、蛍光化合物または金属で標識される、化学発光化合物で標識される、本発明1026のアッセイ。

[本発明1040]

G a l N A c - T 13の前記レベルが、前記試料中の G a l N A c - T 13と前記抗体との反応によって形成される抗体 - タンパク質複合体の形成から生じる光散乱強度を測定することによって得られ、対照の光散乱強度を少なくとも10%上回る光散乱強度が化学療法耐性の可能性を示す、本発明1026のアッセイ。

[本発明1041]

結合の存在が、G a l N A c - T 13またはその変異体への前記抗体の結合の増加である、本発明1021または1022のアッセイ。

[本発明1042]

癌を有している対象を治療する、および任意で前記治療法を施行するための方法であって、

(i) 癌を有している対象からの生体試料を提供することと、

(i i) G a l N A c - T 13またはその変異体に結合する抗体を提供することと、

(i i i) 前記生体試料を前記抗体と接触させることと、

(i v) イムノアッセイを使用して、前記抗体が G a l N A c - T 13に結合しているかどうかを検出することであって、基準試料と比較して前記対象からの前記生体試料中の結合の増加が、前記対象における G a l N A c - T 13またはその変異体の発現の増大および化学療法耐性の可能性の増大を示す、ことと、

(v) 前記対象の化学療法耐性の可能性が減少している場合に、前記対象に第1の治療法を処方すること、または前記対象の化学療法耐性の可能性が増大している場合に、前記対象に第2の治療法を処方することと、を含む、方法。

[本発明1043]

前記第1の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つ以上である、本発明1042の方法。

[本発明1044]

前記第2の治療法が、外科手術、放射線照射、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちの1つ以上、本発明1042の方法。

[本発明1045]

前記第2の治療法が、外科手術、放射線照射、化学療法、免疫療法、ワクチン、またはそれらの組み合わせのうちのいずれか1つ以上であり、化学療法が、前記対象に、前記対象を治療するためにこれまでに使用されていない1種以上の化学療法剤を投与すること、または前記対象にこれまでに投与された化学療法剤を、これまでに投与された用量よりも高い用量で投与することを含む、本発明1042の方法。

[本発明1046]

前記対象が、ネオアジュバント化学療法を受けたことがある、本発明1042の方法。

[本発明1047]

前記癌が非小細胞肺癌である、本発明1042の方法。

[本発明1048]

前記 N S C L が腺癌である、本発明1047の方法。

[本発明1049]

前記抗体が、G a l N A c - T 13またはその変異体のエピトープ L L P A L R に結合す

る、本発明1042の方法。

[本発明1050]

化学療法耐性が、化学療法剤のうちのいずれか1種以上に対する耐性である、本発明1042の方法。

[本発明1051]

G a l N A c - T 13またはその変異体に特異的に結合する抗体。

[本発明1052]

前記抗体がモノクローナル抗体である、本発明1051の抗体。

[本発明1053]

前記抗体が、G a l N A c - T 13またはその変異体中のエピトープに結合し、前記エピトープが配列 L L P A L Rを含む、本発明1051の抗体。

[本発明1054]

G a l N A c - T 13またはその変異体中の L L P A L R エピトープに結合する、本発明1051の抗体。

[本発明1055]

化学療法に対する癌細胞の反応性を判定するためのシステムであって、前記癌細胞が癌患者から得られ、前記システムが、

(i) 前記癌患者から得られた前記癌細胞中に存在する G a l N A c - T 13をコードする m R N A に対するシグナルを生成するように設定されている試料分析器と、

(i i) 前記 m R N A に基づいて、前記シグナルが基準値よりも大きいかまたは大きくないかを計算するようにプログラムされたコンピュータサブシステムと、を備える、システム。

[本発明1056]

化学療法に対する癌細胞の反応性を判定するためのシステムであって、前記癌細胞が癌患者から得られ、前記システムが、

(i) G a l N A c - T 13に特異的な抗体が、癌患者から得られた前記癌細胞中の G a l N A c - T 13に結合するときに、シグナルを生成するように設定されている試料分析器と、

(i i) 前記抗体結合に基づいて、前記シグナルが基準値よりも大きいかまたは大きくないかを計算するようにプログラムされたコンピュータサブシステムと、を備える、システム。

[本発明1057]

前記コンピュータサブシステムが、G a l N A c - T 13の発現が増大している場合に、化学療法を含む治療法に応答する見込みのある患者として、および前記 G a l N A c - T 13が増大していない場合に、化学療法を含む治療法に応答する見込みのない患者として、前記患者を分類するアルゴリズムに基づいて、前記 m R N A を比較して、化学療法に対する前記癌細胞の反応性の可能性を判定するようにプログラムされている、本発明1055または1056のシステム。

[本発明1058]

前記基準値が、癌を有していない対象の集団からの G a l N A c - T 13発現レベルの平均もしくは中央値であるか、または前記基準値が、癌を有しており、かつ化学療法に応答する対象の集団からの G a l N A c - T 13発現レベルの平均もしくは中央値である、本発明1055または1056のシステム。

[本発明1059]

コンピュータで実行されたときに、

(i) 癌患者から得られた癌細胞を含む試料中の G a l N A c - T 13の発現を検出することと、

(i i) 前記 G a l N A c - T 13の発現を基準値と比較することと、

を含むステップを行う、コンピュータ可読媒体において具現化されたコンピュータプログラム製品。

[本発明1060]

前記基準値が、癌を有しており、かつ化学療法に应答する対象の集団からの G a l N A c - T 13発現レベルの平均または中央値である、本発明1060のコンピュータプログラム。

[本発明1061]

化学療法に应答する癌患者の可能性を検出するための診断キットであって、

(i) 検出可能な標識プローブの組み合わせを含む10種以下のプローブ、または G a l N A c - T 13のためのプライマーと、

(i i) 本発明1059のコンピュータプログラム製品と、を含む、キット。

【手続補正3】**【補正対象書類名】**明細書**【補正対象項目名】**配列表**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【配列表】**2015529808000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 13/51904
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 39/395, 39/00; C12Q 1/68, 1/48 (2013.01) USPC - 424/130.1, 178.1; 435/6.1, 6.14, 7.1, 15 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) USPC: 424/130.1, 178.1; 435/6.1, 6.14, 7.1, 15 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched 424/130.1, 178.1; 435/6.1, 6.14, 7.1, 15 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PatBase, Google Patents, Google Scholar Search terms: N-acetylgalactosaminyltransferase 13 (GalNAc-T13; GALNT13, pp-GaNTase 13), antibody, monoclonal, epitope, mRNA, expression, chemoresistance, diagnostic, chemotherapy, lung cancer, NSCLC, neuroblastoma, neoadjuvant therapy		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	BEROIS et al. ppGalNAc-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma. Clin Chem September 2008 Vol 52 No 9 Pages 1701-1712. Especially pg 1702 col 2 para 2, pg 1703 col 1 para 1, pg 1705 col 1 para 2, pg 1708 col 1 para 2, pg 1709 fig 2C	1-4, 11-13, 21, 27/21, 34/21, 41/21, 51, 53, 54 5-10, 14-20, 22-26, 27/2, 28-33, 34/22, 35-40, 41/22, 42-50, 52
Y	US 2008/0038809 A1 (CLAUSEN et al.) 14 February 2008 (14.02.2008). Especially para [0034], [0091].	5, 6, 28, 29, 52
Y	Children's Neuroblastoma Cancer Foundation. Neuroblastoma Chemotherapy. [online] 24 June 2012 [retrieved 15 January 2014]. Available on the internet: <URL:https://web.archive.org/web/20120624035955/http://www.cnchhope.org/Neuroblastoma_Chemotherapy?>. Especially pg 2.	7, 30, 46
Y	MATSUMOTO et al. pp-GalNAc-T13 induces high metastatic potential of murine Lewis lung cancer by generating trimeric Tn antigen. Biochem Biophys Res Comm 2 March 2012 Vol 419 No 1 Pages 7-13. Especially abstract.	8, 9, 10, 31, 32, 33, 47, 48
Y	WO 2010/040083 A2 (GREEN et al.) 8 April 2010 (08.04.2010). Especially pg 45 ln 17-24, pg 46 ln 25-26	14-20, 22-25, 26/22, 27/22, (28-34)/22, 35, 36, (37-41)/22, 42-50
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 January 2014 (14.01.2014)		Date of mailing of the international search report 07 FEB 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 13/51904
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2006/013474 A2 (OSINAGA et al.) 9 February 2006 (09.02.2006). Especially pg 22 ln 17-25	26, 37-40
Y	MAGESH et al. Ocimum sanctum induces apoptosis in A549 lung cancer cells and suppresses the in vivo growth of Lewis lung carcinoma cells. Phytother Res October 2009 Vol 23 No 10 Pages 1385-1391. Abstract only.	9, 10, 32, 33, 47, 48
Y	LIU et al. A one-step homogeneous Immunoassay for cancer biomarker detection using gold nanoparticle probes coupled with dynamic light scattering. J Am Chem Soc 5 March 2008 Vol 130 No 9 Pages 2780-2782. Especially abstract.	40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 13/51904

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
-----please go to extra sheet for continuation-----

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-54

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/51904

Continuation of Box III (Lack of Unity of Invention)

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid

Group I: Claims 1-54, drawn to a process/method for determining whether a subject has increased likelihood of chemotherapy resistance involving measurement of the level of GalNac-T13 in a tumor cell sample.

Group II: Claims 55-61, drawn to a system/composition that involves the use of a computer program to calculate and compare the level of GalNac-T13 to a reference value.

The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features:

Group II requires the special technical feature of a computer program to calculate and compare the level of GalNac-T13 to a reference value, not required in Group I.

Common Technical Feature:

The inventions of Groups I-II share the common technical feature of determining the level of GalNac-T13 in a cancer cell. However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is anticipated by the publication titled "ppGalNac-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma" by BEROIS et al. (hereinafter "Berois") [Cln Chem 2006 Sep;52(9): 1701-12]. Berois discloses (i) obtaining a sample comprising a tumor cell from a cancer patient [pg 1702 col 2 para 2; "BM [bone marrow] aspirates were obtained from 42 patients with a histologic diagnosis of various stages of neuroblastoma, the majority of which were stage 4 (29 of 42)."] desiring to know the likelihood of chemotherapy resistance (pg 1705 col 1 para 2); (ii) assaying the sample to determine the level of GalNac-T13 or a variant thereof (pg 1703 col 1 para 1; "ppGalNac-T13 transcripts were quantified by QRT-PCR"); and (iii) determining the subject has increased likelihood of chemotherapy resistance if the level of GalNac-T13 or a variant thereof is increased relative to a reference sample (pg 1705 col 1 para 2; "These data show that GALNT13 (ppGalNac-T13) is the most strongly up-regulated gene and confirm that ABCB1, whose higher expression has been previously described is the second most strongly up-regulated gene, which highlights the fact that acquired drug resistance is an important cause of neuroblastoma treatment failure"). Berois also indicates the availability of an antibody directed against GalNac-T13 that could have been utilized to measure said protein molecule in an immunoassay (pg 1704 col 2 para 3; "Immunoblots, which have been previously described in detail were probed with ppGalNac-T13 antibody at a dilution of 1:500").

Therefore, Groups I-II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A 4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N 5/09 (2010.01)	C 1 2 N	5/00	2 0 2 U
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	C

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ベロイス ノラ

ウルグアイ東方共和国 モンテビデオ プラザ デ ロス オリンピコス

(72)発明者 トウヤ ディエゴ

ウルグアイ東方共和国 ローマス ソリマール ソラール 6 マンサナ 3 3 1 レスティンガ
シーピー 1 5 0 0 6

(72)発明者 バランゴット マリオ

ウルグアイ東方共和国 モンテビデオ 2 1 デ セプティエンブレ 3 1 2 2 アパルトメント
3 0 1

(72)発明者 オシナガ エドアルド

ウルグアイ東方共和国 モンテビデオ プラザ デ ロス オリンピコス 4 4 3 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA09 CA11 CA20 HA12

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79

QR32 QR35 QR48 QR55 QR62 QR72 QR77 QS16 QS25 QS32

QS36 QX01 QX02

4B064 AG27 CA19 CC24 DA13 DA14
4B065 AA90X AC20 BD39 CA46
4C084 AA17 NA05 ZB261
4C085 AA03 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA50

专利名称(译)	检测肺癌患者化疗耐药性的新方法		
公开(公告)号	JP2015529808A	公开(公告)日	2015-10-08
申请号	JP2015524430	申请日	2013-07-24
[标]申请(专利权)人(译)	雪松-西奈医学中心		
申请(专利权)人(译)	雪松 - 西奈医疗中心		
[标]发明人	ペロイスノラ トウヤディエゴ バラングットマリオ オシナガエドアルド		
发明人	ペロイス ノラ トウヤ ディエゴ バラングット マリオ オシナガ エドアルド		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/573 G01N33/536 G01N33/543 C07K16/40 C12Q1/02 C12Q1/68 A61P35/00 A61K45/00 A61K39/00 G01N33/53 C12N15/09 C12P21/08 C12N5/09 C12N15/02		
CPC分类号	G01N33/57423 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 C12Q2600/16 G01N33/577 G01N2333 /91097 G01N2333/91142 G01N2440/38 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/573.A G01N33/536.D G01N33/543.545 C07K16/40 C12Q1/02 C12Q1/68. A A61P35/00 A61K45/00 A61K39/00.Z G01N33/53.M C12N15/00.A C12P21/08 C12N5/00.202.U C12N15/00.C		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA12 4B063 /QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063 /QR72 4B063/QR77 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B064/DA14 4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065 /BD39 4B065/CA46 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZB261 4C085/AA03 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/675276 2012-07-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

技术领域本发明涉及用于确定患有癌症的受试者中化学疗法抗性的可能性并预测对化学疗法的响应的过程，测定法和方法。在一实施方案中，所述受试者患有肺癌。

(21) 出願番号	特願2015-524430 (P2015-524430)	(71) 出願人	514135801
(86) (22) 出願日	平成25年7月24日 (2013. 7. 24)		シーダース-サイナイ メディカル センター
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月4日 (2015. 3. 4)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス ビバリー ブールバード 8700
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/051904		
(87) 国際公開番号	WO2014/018683	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成26年1月30日 (2014. 1. 30)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	61/675, 276	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成24年7月24日 (2012. 7. 24)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕幸
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く