

(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2004-512495  
(P2004-512495A)

(43) 公表日 平成16年4月22日(2004.4.22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D 2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68	GO 1 N 33/53	M 4 B O 2 4
GO 1 N 33/48	C 1 2 Q 1/68	A 4 B O 6 3
GO 1 N 33/483	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 37/00	GO 1 N 33/483	C

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 42 頁) 最終頁に続く

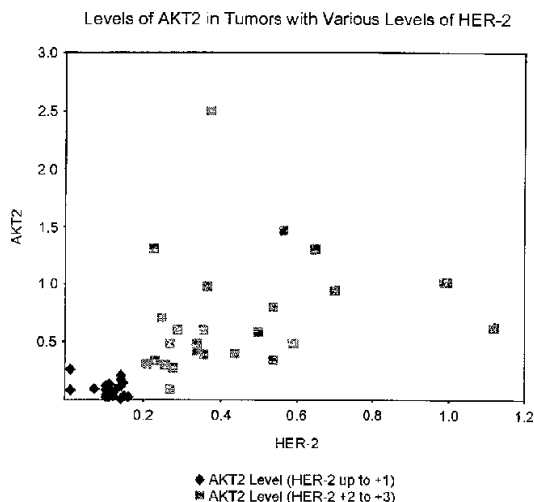
<p>(21) 出願番号 特願2001-576470 (P2001-576470)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成13年4月16日 (2001.4.16)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成14年10月15日 (2002.10.15)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US2001/012288</p> <p>(87) 国際公開番号 W02001/079855</p> <p>(87) 国際公開日 平成13年10月25日 (2001.10.25)</p> <p>(31) 優先権主張番号 60/197,780</p> <p>(32) 優先日 平成12年4月14日 (2000.4.14)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(71) 出願人 500555848 ヴェンタナ メディカル システムズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 アリゾナ州 85737 ツーソン イノベーション パーク ドライブ 1910</p> <p>(71) 出願人 501394136 ボード オブ トラストィーズ オブ ザ ユニヴァースティ オブ イリノイ アメリカ合衆国 61801 イリノイ州 アーバナ サウス ライト ストリート 506 ヘンリー アドミニストレイション ビルディング 352</p> <p>(74) 代理人 100083806 弁理士 三好 秀和</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	--

(54) 【発明の名称】 AKTタンパク質発現の定量方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は細胞または組織サンプルにおけるAKTタンパク質およびその活性化状態の検出および定量方法を提供する。

【解決手段】具体的には本発明は、別の免疫学的、生化学的、または分子生物学的アッセイに関して換算された免疫組織化学アッセイを、これらのタンパク質の発現または活性化レベルを定量するための撮像系と組み合わせた、AKT1またはAKT2タンパク質またはその活性化された誘導体の検出および定量方法を提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

a) 異なる量の A K T タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製した各細胞ペレットの第 1 の部分の A K T タンパク質の量を決定する工程と；

b) 検出用標識が細胞ペレット中の A K T タンパク質の量に比例する染色の光学密度を生じる検出可能な標識抗 A K T 抗体で、各々の前記細胞ペレットの第 2 の部分を染色する工程と；

c) 各々の前記細胞ペレットの第 2 の部分の A K T タンパク質に関する光学密度を決定する工程と；

d) 工程 c) で決定された A K T タンパク質に関する光学密度に対して工程 a) で決定された A K T タンパク質の濃度をプロットすることにより光学密度に対する A K T タンパク質濃度の標準曲線を作成する工程と；

e) 細胞または組織サンプル中の A K T タンパク質の光学密度を決定する工程と；

f) 工程 e) で決定された光学密度および工程 d) でプロットされた標準曲線の比較により細胞または組織サンプル中で発現された A K T タンパク質の量を算出する工程と；

からなる細胞または組織サンプル中の A K T タンパク質発現量または活性化レベルを決定する方法。

10

## 【請求項 2】

異なる量の A K T 2 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量を酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) により決定する請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 3】

異なる量の A K T 2 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量を、高密度オリゴヌクレオチドアレイをそこから調製した細胞性 m R N A または c D N A でハイブリダイズすることにより決定する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

異なる量の A K T 2 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量を細胞性 R N A または m R N A の R T - P C R により決定する請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 5】

異なる量の A K T 2 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量をノーザン・プロットハイブリダイゼーションにより決定する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

異なる量の A K T 2 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量を免疫組織化学検出により決定する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

異なる量の A K T 2 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量をタンパク質マイクロアレイにより決定する請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 8】

異なる量の A K T 1 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量を酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) により決定する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

異なる量の A K T 1 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量を、高密度オリゴヌクレオチドアレイをそこから調製した細胞性 m R N A または c D N A でハイブリダイズすることにより決

50

定する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 0】

異なる量の A K T 1 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量を酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) により決定する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 1】

異なる量の A K T 1 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量をノーザン・ブロットハイブリダイゼーションにより決定する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 2】

異なる量の A K T 1 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量を免疫組織化学検出により決定する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

異なる量の A K T 1 タンパク質を発現する少なくとも 2 つの細胞系から調製された各細胞ペレットの第 1 の部分における A K T タンパク質の量をタンパク質マイクロアレイにより決定する請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本出願は 2000 年 4 月 14 日出願の米国特許仮出願番号第 60 / 197780 号に対する優先権を請求する。

【0002】

(技術分野)

本発明は病態、とりわけ癌の病態の診断および処置に関連する細胞または組織サンプルにおけるタンパク質発現を定量するための方法に関する。具体的には、本発明は撮像系を用いて A K T 1 および A K T 2 タンパク質発現を定量する、A K T 1 および A K T 2 タンパク質発現および活性化状態を定量する方法に関する。

【0003】

(背景技術)

癌診断は従来、患者から取り出した細胞または組織サンプルの組織学的試験により確認される。臨床病理学者は、かかるサンプルが良性または悪性であるかどうかを正確に決定でき、かつ悪性であると考えられる腫瘍サンプルの攻撃性を分類できる必要がある。なぜならばこれらの決定はしばしば患者の処置の適当なコースを選択する基礎になるからである。

【0004】

組織学的試験は従来、サンプルの形態学的特徴を光学顕微鏡下で容易に観察できる組織染色方法を必要とする。病理学者は染色サンプルを試験した後、典型的には腫瘍サンプルが悪性かどうかを定性的に決定する。しかしながら単にサンプルの組織学的試験により腫瘍の攻撃性を確認するのは困難である。

【0005】

当該分野で公知の自動 (コンピューターを使用) 画像分析系によりサンプルの視覚試験が増加し得る。代表的な系では細胞または組織サンプルの拡大画像を特異的生物学的マーカーを検出する試薬に暴露し、画像を電荷結合素子 (CCD) またはカメラ、例えばテレビカメラからの画像を受け取るコンピューターにより加工する。かかる系を用いて例えば特定のサンプル中のエストロゲンレセプター (ER)、プロゲステロンレセプター (PR)、またはオンコジーン HER - 2 / neu の発現レベルを検出および測定できる。この方法を用いてより有効な治療の投与計画を実行することができる。例えばサンプルが ER および PR に関して陽性であるかを試験する場合、ホルモン治療を用いることができ、サンプルが HER - 2 / neu に関して陽性であるかを試験する場合、抗オンコジーンレセプター治療を用いることができる。例えばいくつかの技術が報告されている (非特許文献 1

10

20

30

40

50

～ 7 参照。 ) :

ナショナル・インスティテュート・オブ・ヘルス・コンセンサス・デベロプメント・コン  
フェレンス：「乳癌におけるステロイドレセプター」Breast Cancer (19  
19)、ベテスダ、メリーランド州；

Hancockら、Cancer Res. 51:4574-4580(1991)；

Arteagaら、Cancer Res. 54:3758-3765(1994)；

Bacusら、Anal. Quant. Cytol. Histol. 19:316-32  
8(1997)；

Sliwowskiら、Semin. Oncol. 26:60-70(1999)；

Shak、Semin. Oncol. 26:71-77(1999)；

Cobleighら、J. Clin. Oncol. 17:2639-2648(1999  
)

10

#### 【0006】

正常な哺乳動物の発達の一部として生じるアポトーシス、すなわちプログラム細胞死がほ  
ぼ100年前に最初に観察された。発達上の細胞死の誘導は種々の細胞外刺激により抑制  
され得る高度に制御された過程である。例えば、アポトーシスの成長抑制因子の意味深い  
生物学的な結果は、ニューロンの生存および機能的ニューロン回路の維持における標的由  
来のニューロトロフィンの重大な役割により例示される(PettmannおよびHen  
derson、Neuron 20:633-647(1998))。生存を促進する栄  
養因子の能力は少なくとも部分的にホスファチジルイノシタイド3'-OHキナーゼ(P  
I3K)/c-aktキナーゼカスケードに寄与する。生存を促進し、アポトーシスを妨  
げる制御カスケードの能力の基礎となり得るPI3K/c-aktシグナル発生経路のい  
くつかの標的が同定されている。細胞生存およびアポトーシ回避が癌細胞の無制限な増  
殖特性に必要な部分であるので、この挙動は癌診断に適切である。

20

#### 【0007】

従って、患者から得られる細胞および組織標本を診断、ステージングおよび評価するた  
めの良好な方法の一部として；癌細胞を調節または切除する臨床努力の効果をモニター観  
察するといった最初の癌診断の一部として；または1次腫瘍細胞の再発もしくは転移疾患の  
存在を検出するために；アポトーシスを妨げることができる細胞とりわけ癌細胞を検出  
する技術が必要とされている。

30

特に、疾患の経過中できるだけ早期に改善された診断および正確な診断を行うために、腫  
瘍マーカー遺伝子生成物の発現の改善された検出法が当技術分野において必要とされて  
いる。

#### 【0008】

(発明の開示)

本発明は動物、最も好ましくはヒト癌患者または癌を有していることが疑われる個体から  
得られる細胞または組織サンプル中のAKT1またはAKT2タンパク質発現および活性  
化レベルを定量する方法を提供する。具体的には本発明は撮像系を定量的に用いてAKT  
1およびAKT2タンパク質発現または活性化レベルを定量する方法を提供する。さらに  
具体的には本発明は撮像系を用いてAKTタンパク質特異的色素で染色されている細胞ま  
たは組織サンプルの画像を受け取り、増強し、加工する方法を提供し、かかる動物からの  
細胞または組織サンプルで発現されるAKTタンパク質の量または活性化レベルを決定  
する。

40

#### 【0009】

本発明の方法の好ましい実施形態では、異なる量のAKTタンパク質を発現する少なく  
とも2つの細胞系に関してAKT1およびAKT2タンパク質の標準曲線を作成する。次い  
で標準曲線を用いて細胞または組織サンプル中で発現されたAKTタンパク質の量を定  
量的に決定する。活性化の特徴に特異的な試薬を用いて、活性化されたAKT1またはAK  
T2タンパク質に関して類似の標準曲線を作成できる。これを用いて臨床上の癌処置の前  
後でAKT(AKT1およびAKT2)の量および活性化状態の変化を決定することもで

50

きる。

【0010】

本発明の方法の1つの実施形態では細胞または組織サンプル中のAKT2タンパク質発現を、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を用いて定量し、異なる量のAKT2タンパク質を発現する少なくとも2つの調節細胞系から調製した細胞ペレットの部分のAKT2タンパク質の量を決定し、これを細胞または組織サンプル中のAKT2の発現と比較する。本発明の方法の別の実施形態では、細胞または組織サンプルから単離されるc-akt2 mRNAの高密度オリゴヌクレオチドアレイへのハイブリダイゼーション、またはRT-PCRによるかもしくはノーザンブロットハイブリダイゼーション実験によるc-akt2 mRNA発現の決定により細胞または組織サンプルにおいて発現するAKT2タンパク質の量を間接的に定量する。重要なことに、同一細胞ペレットの別個の部分の次いで抗AKT2抗体で染色し、続いて免疫組織学的分析により、好ましくはAKT2タンパク質を検出するために使用される免疫組織学的染色に特異的な波長でサンプルの光学密度を測定することによりサンプル中のAKT2タンパク質の量を決定する。本発明の好ましい実施形態の実施において、最も好ましくはELISAにより決定されるAKT2タンパク質濃度をAKT2タンパク質に関する光学密度測定に対してプロットする標準曲線を準備する。細胞または組織サンプル中に発現されるAKT2タンパク質の量を決定するために、AKT2タンパク質に関して光学密度を測定し、対照細胞系から作成した標準曲線と比較する。

10

【0011】

本発明の具体的な好ましい実施形態が以下の特定の好ましい実施形態および請求の範囲のより詳細な記載から明らかになる。

20

【0012】

(好ましい形態の説明)

本発明は細胞性タンパク質、AKT1およびAKT2の発現および活性化レベルを定量的に決定する方法を提供し、これは個体からの細胞または組織サンプルにおいて検出される腫瘍細胞、とりわけヒト腫瘍細胞におけるアポトーシスの回避の媒介に参与する。これらの方法は哺乳動物とりわけヒトの正常および腫瘍細胞におけるアポトーシスの重要なメディエーターであるAKTタンパク質の同定に依存する。

【0013】

細胞の生存の重要なレギュレーターであるAKT(c-akt遺伝子により産生されるタンパク質)の同定は腫瘍形成および薬物抵抗に関して重大な意味を有する。例えばヒト腫瘍抑制剤であるPTENの欠如はAKT活性の増加に相関する(Liら、Science 275:1943-1947(1997); Liawら、Nat. Genet. 16:54-67(1997); Nelenら、Hum. Mol. Genet. 6:1383-1387(1997); CantleyおよびNeel、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96:4240-4245(1999); Dattaら、Genes Dev. 13:2905-2927(1999))。加えて、アポトーシスの抑制はAKTが発癌性を助長するときには有し得る機能のみではない。ある環境で、AKTは細胞サイクルの進行をも誘導できる。しかしながら、PTENの削除による活性ラスの過剰発現かまたは活性PI3Kの過剰発現のいずれかにより細胞がアポトーシスに対する抵抗性を付与できるという知見に鑑み、AKTがアポトーシスを抑制し得るという観察はオンコジーンがAKTの過剰活性化により適応性のある細胞性アポトーシスを遮断できることを示唆する。

30

40

【0014】

アポトーシスの機構が複雑であれば、AKTが細胞の生存を促進し、細胞死を阻止するように作用できる多くの経路が存在する。Bcl-2ファミリー遺伝子(これは細胞生存または細胞死において役割を果たすことが知られている)のメンバーの発現または作用を制御することにより、AKTはアポトーシスを遮断できる。また別に、AKTはタンパク質のカパーゼファミリーの発現もしくは活性、または死レセプター経路の機能を制御でき

50

る。A K Tの制御効果は直接的メカニズム、例えばアポトーシスの機構の構成要素のリン酸化によるか、または間接的メカニズム、例えば死機構の構成要素をコードする遺伝子の発現レベルを変化させることによる。最近の研究によりA K Tが複数の部位でアポトーシスを制御することが示唆されている。B A D、カスパーゼ - 9、転写因子のフォークヘッドファミリーおよびN F k BレギュレーターI K Kなどの多くのA K T標的が同定されており、これらは全て細胞死の媒介において重大な役割を果たしている ( D a t t aら、前出 ( 1 9 9 9 ) )。

#### 【 0 0 1 5 】

A K Tによりリン酸化されることが解っているアポトーシスの機構の第1の構成要素はB c l - 2ファミリーのメンバーのB A Dである。B C L - 2に結合するその能力に基づいてB A Dが同定された；B a dの1次構造の分析により、これはB c l - 2に類似することが示された ( Y a n gら、C e l l 8 0 : 2 8 5 - 2 9 1 ( 1 9 9 5 ) )。A K TがB A Dの直接リン酸化によりB A D誘起の細胞死を抑制するという知見は、内因性P I 3 K / A K T経路が最高潮に達してB A Dのリン酸化に至ることを示唆する相関的な証拠に合致する。加えて、セラミド、紫外線 ( U V ) 照射、赤外線放射 ( I R )、およびソルビトールのごとき刺激は未知のメカニズムによりA K T活性を下方制御し、各々はまたB A Dリン酸化を阻止する ( Z u n d e lおよびG i a c c i a、G e n e s D e v . 1 2 : 1 9 4 1 - 1 9 4 6 ( 1 9 9 8 ) )。

10

#### 【 0 0 1 6 】

A K Tはまたカスパーゼ - 9をリン酸化する。A K Tを過剰発現する細胞系からの抽出物はインビトロでチトクロームC媒介カスパーゼ - 9活性化を遮断するので、このリン酸化事象は機能的に作用する。これらの結果はチトクロームC放出の下流でのカスパーゼ - 9の不活性化によりA K Tが細胞生存を促進することを示唆している。カスパーゼ - 9のリン酸化がどのようにその不活性化に至るのかは明らかではないが、カスパーゼ - 9のリン酸化がタンパク質の内在性触媒活性を不活性化するようである。

20

#### 【 0 0 1 7 】

加えて、A K TがE r b Bファミリー遺伝子発現の腫瘍形成効果の媒介に関与するという明白な証拠がある。オンコジーンレセプターのE r b Bファミリー ( H E R ) は4つのメンバー、H E R ( E G F R )、H E R - 2、( E r b B - 2 )、H E R - 3、およびH E R - 4を含有する。このレセプターファミリーにおける興味は、H E R - 2の過剰発現は細胞を形質転換し、ヒト乳癌および卵巣癌の進行および転移の増加に相関するという知見により大いに鼓舞されている。極最近では、H E R - 2のヒト化モノクローナル抗体がH E R - 2が過剰発現されている乳癌患者の処置に関して承認されている。このように乳癌の発達におけるH E R - 2過剰発現の重要性が確立されている ( L i uら、V i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 2 6 1 : 8 9 7 - 9 0 3 ( 1 9 9 9 ) )。

30

#### 【 0 0 1 8 】

H E R - 3 ( E r b B - 3 ) およびH E R - 4 ( E r b B - 4 ) レセプター双方のリガンドであるヘレグリンはヘテロ二量体の形成によりH e r - 2 / n e uを活性化できる。ヘレグリンはまたH E R - 2を発現するM C F - 7細胞においてA K T酵素活性の強力および迅速なアクチベーターでもある。この活性化はP I 3 K経路のH E R - 2またはH E R - 3刺激により媒介される。さらに、B T 4 7 4乳癌細胞中のH E R - 2の過剰発現はA K Tの基礎活性の増加に相関する。最後に、乳癌患者の処置に用いられるH E R - 2のモノクローナル抗体はこれらの細胞における基礎A K T活性を低下させる。これはヘレグリン / H E R - 2の下流標的の1つであるP I 3 K / A K T経路に関与する。このように、P I 3 K / A K Tカスケードは、H E R - 2過剰発現がさらに攻撃的な乳癌表現型を生じる能力において役割を果たし得る。

40

#### 【 0 0 1 9 】

A K T 2はまた放射線または化学療法処置の後の細胞生存において、およびプログラム細胞死において重要な役割を果たす。例えば、A K T 2は膵臓、乳房および卵巣癌において過剰発現されることが見出された。H E R - 2 / n e u過剰発現が検出された患者ではc

50

- a k t 2 遺伝子が転写的に活性化されることが見出されるのみならず、A K T 2 タンパク質もまた過剰発現されることが示されている。基礎レベルの H E R - 2 / n e u を発現する M C F - 7 細胞、および H E R - 2 / n e u 発現構築物でトランスフェクトされた M C F - 7 細胞を比較して、c - a k t 2 m R N A レベルは H E R - 2 / n e u トランスフェクトされた M C F - 7 において 2.7 倍増加した。H E R - 2 / n e u が過剰発現することが見出された腫瘍サンプルでは A K T 2 が上方制御されることが見出された (表 I)。

【 0 0 2 0 】

【 表 1 】

10

(表 I)

乳癌細胞における H E R - 2 / n e u および A K T 2 の画像定量分析

サンプル 番号	HER-2/neu 結果	Akt2 結果
00-98	0.01 (neg)	0.09
00-020	0.01 (neg)	0.08
00-024	0.01 (neg)	0.27
00-074	0.07 (neg)	0.10
00-248	0.10 (+1)	0.12
00-365	0.10 (+1)	0.02
00-373	0.10 (+1)	0.05
00-388	0.10 (+1)	0.05
00-52	0.10 (+1)	0.09
00-302	0.11 (+1)	0.07
00-201	0.11 (+1)	0.14
00-376	0.11 (+1)	0.02
00-392	0.11 (+1)	0.08
00-221	0.11 (+1)	0.09
00-51	0.12 (+1)	0.03
00-319	0.12 (+1)	0.04
00-117	0.13 (+1)	0.10

20

30

40

【 表 2 】

00-49	0.14 (+1)	0.21
00-407	0.14 (+1)	0.01
00-380	0.14 (+1)	0.13
00-79	0.14 (+1)	0.12
00-299	0.15 (+1)	0.04
00-332	0.15 (+1)	0.15
00-250	0.16 (+1)	0.02
00-28	0.16 (+1)	0.04
00-07	0.16 (+1)	0.04
00-202	0.21 (+3)	0.30
00-386	0.23 (+3)	0.34
00-162	0.23 (+3)	1.30
00-163	0.25 (+3)	0.70
00-352	0.26 (+3)	0.29
00-377	0.27 (+3)	0.48
00-04	0.27 (+3)	0.08
00-316	0.28 (+3)	0.26
00-123	0.29 (+3)	0.60
00-411	0.34 (+4)	0.48
00-412	0.34 (+4)	0.42
00-288	0.36 (+4)	0.38
00-278	0.36 (+4)	0.60
00-153	0.37 (+4)	0.97
00-154	0.38 (+4)	2.50
00-308	0.44 (+4)	0.38
00-349	0.50 (+4)	0.58
00-08	0.54 (+4)	0.79
00-314	0.54 (+4)	0.33
99-2415	0.57 (+4)	1.45
00-124	0.59 (+4)	0.48
99-2430	0.65 (+4)	1.29
00-408	0.70 (+4)	0.93
00-25	0.99 (+4)	1.00
00-335	1.00 (+4)	1.00
00-05	1.12 (+4)	0.61

10

20

30

40

表中、A K T 2の結果は光学密度の任意の単位で示し、一方H E R - 2 / n e uの結果は細胞あたりのH E R - 2 / n e uのピコグラムで示す。

【 0 0 2 1 】

これらの結果は、H E R - 2 / n e uを過剰発現する乳癌におけるA K T 2の活性化およ 50

び過剰発現がこれらの癌の攻撃的な生物学的挙動の重要な因子であり得ることを示唆している。A K Tシグナル発生経路の構成要素を指向する治療薬およびA K Tタンパク質のレベルを検出および測定し、並びにかかる活性化状態を検出および測定する診断試験はかかる癌の処置において重要である。当該分野では患者から得られた細胞または組織サンプルにおけるA K Tタンパク質レベルおよびその活性化状態を決定するための信頼性のあるアッセイが必要とされている。また満足できる方法では病理学者が分析から正常組織を排除することが可能でなければならない。

#### 【0022】

本発明の方法の好ましい実施形態の実施において、2成分免疫組織化学的染色系を用いて細胞ペレットまたは組織が1色で対比染色され、一方細胞ペレットまたは組織サンプル中の目的のタンパク質は別の色で染色される。次いで細胞ペレットおよび組織サンプル中の細胞の画像を光学顕微鏡で拡大し、一对の別個の画像に分割する。各々の特定の色素に関して最大吸収を有するように特に適合させた一对の光学フィルターを用いて分割された画像を増強する。光学フィルターの1つは対比染色された組織の吸収波長の波長を有する光を優先的に透過させる。別の狭い帯域光学フィルターは目的のタンパク質を検出するために用いられる色素に関するスペクトル吸収の領域で優先的に透過させる。画像分析フィルターを用いて、種々成分、例えば膜、細胞質および核などにおける異なる細胞性タンパク質を定量できる。いずれかの測定を行う前に最適な結果に関して撮像系を換算する。

10

#### 【0023】

本発明の好ましい実施形態およびその利点は実施例1から5を参考にすると最もよく理解される。これらの実施例は本発明の具体的な実施形態、およびその種々の使用を説明するものである。これらは説明目的でのみ提示するものであり、本発明を限定すると考えるべきではない。

20

#### 【0024】

##### (実施例1)

#### A K T 2タンパク質発現の画像分析

前記するように2成分免疫組織化学的染色系を用い、K A T 2タンパク質の異なる量を発現する少なくとも2つの細胞系を用いて標準曲線を作成する。ヒト癌患者からの細胞または組織サンプルを対照細胞ペレットの第2の部分と同一の様式で染色し、免疫組織化学的染色の程度を測定する光学密度を各被験組織サンプルに関して決定する。本発明の方法の好ましい実施形態では、組織サンプルおよび細胞ペレットの第2部分を同時に染色して、使用した色素のロット間で起こり得るいずれかの差異または染色方法における変化を明らかにする。対照細胞系におけるA K T 2タンパク質の測定値から作成した標準曲線を用いて組織サンプル中の生物学的タンパク質の量を決定する。

30

#### 【0025】

画像分析で換算した画素あたりの平均合計光学密度をA K T 2タンパク質陽性染色された画像の全光学密度を考慮して、対比色素、例えばファスト・グリーンまたはエチル・グリーンを用いて染色された画像全画素数でそれを割り、膜または核部分を含んでなる全画素数を誘導する。各々の染色後に標準曲線を作成する。

#### 【0026】

標準曲線を誘導して、細胞ペレットを標準として用いて組織中のA K T 2タンパク質レベルを定量できるように系を換算する。当該分野で公知のE L I S Aにおける酵素反応により形成される色の強度は、アッセイの動作範囲内でサンプル中のA K T 2タンパク質の濃度に比例する。A K T 2タンパク質濃度(E L I S Aよりフェムトモル/mg)または細胞あたりのレセプターを、これらの3つのペレットの別個の部分からの染色スライドカットの画像分析からの平均O . D . データに対してプロットすることにより曲線が得られる。

40

#### 【0027】

##### (実施例2)

#### H E R - 2 / n e uタンパク質発現の画像分析

50

一例としてHER-2/neuを用いて、ELISAで決定されたタンパク質mgあたりHER-2/neuの量(フェムトモル)が公知である、HER-2/neu発現細胞に対応する4つの凍結細胞キャリアプレートペレットを切断し、染色の各ラウンドで患者の組織切片と共に染色した。各組織に関して2つの部分を試験した：一方は凍結薄切をO.C.T.(オプティマル・カッティング・テンパーチャー、バクスター・サイエンティフィック・プロダクツ、マックグローウ・パーク、イリノイ州)に包埋したものであり、他方はELISAアッセイで使用するために液体窒素中ですりつぶし、ホモジナイゼーションバッファー中に入れたものであった。各組織のELISA部分を、カルビオケムELISAキットを用いてHER-2/neuのために加工した。次いでこれらの染色したスライドを画像分析を用いて定量し、平均O.D.(HER-2/neu)を決定した。ELISAにより決定したキャリアプレート細胞系において発現されたHER-2/neuタンパク質の量および画像分析を表IIに示す。

10

【0028】

【表3】

(表II)

HER-2/neu ELISAおよびHER-2/neu画像分析(IA)

## 4つの細胞プレートに関する定量データ

20

プレート	ELISA fm/μg	IA fm/μg
MCF-7	0.28	0.24
HER-2でトランスフェクトされたMCF-7	0.53	0.55
MDA-MB543	1.31	1.37
SKBR3	>3.07	3.04

30

各キャリアプレートプレートに関する平均O.D.を、同一のキャリアプレートプレートのELISAから誘導したタンパク質mgあたりのHER-2/neuの値に対してプロットした。次いでこのグラフからの等式を用いて、定量値からの平均O.D.を用いて5つの患者組織サンプルのHER-2/neuの量(フェムトモル)を誘導した。組織サンプルの染色の各々のラウンドを1組のキャリアプレートプレートからの切片と組み合わせで行った。一連の組織を試験した各時間での染色の実施にプレートを含め、その定量値(平均O.D.)を用いて標準曲線を作成した。ELISAにより決定される患者組織サンプルにおいて発現されたHER-2/neuタンパク質の量および画像分析を表IIIに示す。

40

【0029】

【表4】

(表 I I I)

HER-2/neu ELISAおよびHER-2/neu画像分析 (IA)

## 5つの乳癌組織における定量

組織サンプル	ELISA fm/μg	IA fm/μg
98-510	0.23	0.30
98-511	1.74	1.12
98-551	0.05	0.08
98-594	0.16	0.76
98-664	0.17	0.20

10

これらの方法の結果は、この方法が腫瘍細胞により発現されるHER-2/neuの量に関する定量値を生じること示している。表Iは正常レベル(+1)HER-2/neuまたは過剰発現HER-2/neuのいずれかを発現する乳房組織におけるAKT2タンパク質のレベルを決定するために抗体単位の光学密度を用いて得られた予備試験の結果を示す。HER-2/neuを過剰発現する癌(+3または+4)では高レベルのAKT2

20

## 【0030】

## (実施例3)

AKT上方制御はHER-2/neu過剰発現に伴い、インビトロでアポトーシスに抵抗性を付与する

空気中に8% CO<sub>2</sub>を伴う加湿インキュベーター中37℃で、MCF7(ミシガン・キャンサー・ファウンデーション、デトロイト、ミシガン州より入手)および、予めMCF7細胞をErbB-2 cDNA発現ベクターで形質導入することにより作製した(Bacusら(1996); Pelesら(1993); Dalyら(1997))、発現が5から8倍増のHER-2/neuを発現するMCF7/HER-2/neu細胞を、10% ウシ胎児血清、ペニシリン(100 μg/ml)を補充したRPMI 1640(ギブコ、グランド・アイランド、ニューヨーク州)中で成長させた。PI3キナーゼ/Aktインヒビターウォルトマニン(カルピオケム、サンディエゴ、カリフォルニア州)の存在下または不在下、低酸素条件を増強させながら細胞にアポトーシスを誘導した。ウォルトマニンで処置した細胞を、細胞をプレートしてから7から48時間後、1から3日間50 μMのインヒビターに暴露した。低酸素条件下、MCF7細胞はアポトーシスに鋭敏であった。ウォルトマニンの存在下でのみ、低酸素下でのMCF7細胞の生存に関して限界有効性を有した。しかしながら、MCF7/HER-2/neu細胞は低酸素下でアポトーシスに抵抗したが、ウォルトマニンに暴露したMCF7/HER-2/neu細胞の生存性は大きく減少した。従って、HER-2/neuを過剰発現する細胞の低酸素に対する細胞の抵抗性はAKT経路の活性化に伴う。低酸素下での細胞生存性におけるPI3キナーゼ/AKTおよびHER-2/neu経路の役割が低酸素条件下の種々細胞系の成長により確認され、生存性とHER-2/neuの発現は相関した。

30

40

## 【0031】

MDA-MB-435およびMDA-MB-435/HER-2細胞をATMD アンダーソン癌センター、ヒューストン、テキサス州のDr. Yuより入手した。8% CO<sub>2</sub>中37℃で、前記のように補充したRPMI 1640中細胞を成長させた。以下のとおり

50

ウェスタン・ブロットを行った。溶解バッファー（50 mM トリス - HCl、pH 7.4、150 mM 塩化ナトリウム、1 mM EDTA、1% ノンダイエット P-40、1 mM オルトバナジン酸ナトリウム、1 mM フッ化ナトリウム、1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル、1 μg/ml ペプスタチン、2 μg/ml ロイペプチン、2 μg/ml アプロチニン）中細胞を溶解し、6500 g、4 で5分間遠心し、バイオラッド・プロテイン・アッセイキット（バイオラッド、ヘルクレス、カリフォルニア州）でタンパク質濃度を決定した。ビス・トリス NuPAGE システムを用いて 1×MOP S ランニングバッファー（ノベックス、サンディエゴ、カリフォルニア州）で電気泳動してタンパク質を分離し、ハイボンド C エクストラ・メンブラン（アメルシヤム・ファルマシア・バイオテック、ピスカッタウェイ、ニュージャージー州）に移した。膜を脱脂粉乳で遮断し、適当な抗体と共にインキュベートし、PBS（リン酸塩緩衝生理食塩水）で洗浄し、西洋ワサビペルオキシダーゼコンジュゲート2次抗体と共にインキュベートした。ルネサンス・ケミルミネセンス・リジェント・プラス（NEN ライフ・サイエンス、ボストン、マサチューセッツ州）で検出を実施した。HER-2/neu を10倍過剰に発現する MDA-MB-435/HER-2 細胞を、ウェスタン・ブロット分析により決定した親の MDA-MB-435 細胞系と比較した。これらの細胞からのライゼートを収集し、2つの異なる AKT-2 に対する抗体、ポリクローナル抗体（サンタ・クルーズ、カリフォルニア州）およびモノクローナル抗体（dr. Testa、フォックス・チェース癌センター、フィラデルフィア、ペンシルバニア州）を用いるウェスタン・ブロット分析により AKT-2 発現を試験した。HER-2/neu を過剰発現する細胞において AKT-2 レベルの増加が観察された。

#### 【0032】

##### （実施例4）

AKT-2 上方制御は癌における HER-2/neu の過剰発現に相関する  
42人の患者からの腫瘍サンプルを c-akt1 および c-akt-2 発現に関して試験した。組織を2群：正常レベル（+1まで）の HER-2/neu を発現する群および HER-2/neu を過剰発現する（+2から+3まで）群に分けた。組織を AKT-1 および AKT-2 に関して染色した。AKT-1 レベルは双方の群で類似したが、画像分析により HER-2/neu 過剰発現組織では AKT-2 が10倍まで上方制御されたことが示された（図1）。図2は免疫組織化学分析により、乳癌腫瘍のパラフィン切片で AKT-2 の高発現が HER-2/neu の過剰発現と相関することを示している。

#### 【0033】

##### （実施例5）

HER-2/neu を過剰発現する細胞における c-akt の活性化  
HER-2/neu を過剰発現する細胞における全 AKT（AKT-1 プラス AKT-2）の活性化（リン酸化）状態を測定し、HER-2/neu 過剰発現細胞および癌における c-akt の機能的な重要性を研究した。全て HER-2/neu を過剰発現する SKBR3、BR474、および AU565 細胞（セル・カルチャー・ラボラトリー・ネービー・バイオサイエンス・ラボラトリー、ネービー・サプライ・センター、オークランド、カリフォルニア州）を、プレート後7から48時間に1から3日間、公知の c-akt アクチベーター、NDF/ヘレグリン（10 ng/ml；Y. Yarden、レオボット、イスラエルより贈呈）、または HER-2/neu に対するモノクローナル抗体、ヘルセプチン（20 mg/ml）で処理した。SKBR3、BR474、および AU565 細胞からの細胞ライゼートを前記のようにウェスタン・ブロットにより試験した。AKT タンパク質のリン酸化状態を特異的に認識する抗体により活性化された AKT を測定した。細胞を前記のように溶解し、抗 AKT-1 および抗 AKT-2 抗体を用いる免疫沈澱に供した。以下のとおり免疫沈澱を実施した。細胞ライゼート（バッファー 500 μl あたりタンパク質 250 μg）をプロテイン A + プロテイン G アガロース・ビーズ（ギブコ BR L ライフ テクノロジーズ、ロックビル、メリーランド州）と共にプレインキュベートし、抗 AKT-1 または抗 AKT-2 抗体（アップステート・バイオテクノロジー、レー

ク・ブラシッド、ニューヨーク州) 0.5 µgと共に4で一晚インキュベートし、続いてプロテインA + プロテインGアガロース・ビーズ40 µlと共に1時間インキュベートした。免疫複合体を冷溶解バッファーで洗浄し、抗ホスホ-Aktを用いるウェスタン・ブロットにより試験して、AKT-1またはAKT-2のリン酸化形態を検出した(図3)。

#### 【0034】

AKTの全量およびAKT-1のリン酸化はヘレグリンで処理した細胞において増加した。ヘルセプチンでの処理により全AKTおよびAKT-1のリン酸化が低減した。AKT-2リン酸化の基礎レベルは高く、ヘレグリンまたはヘルセプチンでの処理の後高いままであった。ヘルセプチンおよびヘレグリンに3日間暴露することによりAKT-1のリン酸化状態が下方制御されたが、AKT-2には影響しなかった。従って、NDF/ヘレグリンによるHER-2/Her-3レセプターの活性化によりAKTおよびAKT-1の活性化に至る。HER-2/neuの下方制御に導くヘルセプチンでの処理によっても、AKT-1の下方制御に至るが、AKT-2では至らなかった。HER-2およびHER-3のヘテロ二量体形成がAKT-1の活性化において役割を果たすかどうかを決定するために、未処理NDFおよびヘルセプチン処理MDA-MB-474細胞からHER-3を免疫沈澱させた。免疫沈澱物を抗HER-2抗体を用いるウェスタン・ブロットにより分析した。AKT活性化の下方制御はHER-2/Her-3ヘテロ二量体の下方制御に相関する。ヘルセプチンでの処理はこれらのヘテロ二量体の下方制御を随伴し、これはAKT-1活性の下方制御に至る。リン酸化AKT-2の基礎レベルはヘレグリンまたはヘルセプチンでの処理により影響を受けなかった。

#### 【0035】

前記の開示は本発明の特定の具体的な実施形態を強調するものであって、それらに等価な全ての修飾または変更は添付の請求の範囲に示す発明の精神および範囲内であることを理解すべきである。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は腫瘍切片の乳癌細胞の画像分析によるHER-2/neuおよびAKT-2定量的の結果を示すチャートである。AKT-2の結果は光学密度の任意の単位を示し、一方HER-2/neuの結果は細胞あたりのHER-2/neuタンパク質をピコグラムで表現する。HER-2/neuを過剰発現しない細胞(+1および陰性)を黒く塗りつぶした四角で示し、+2および+3に対応するレベルでHER-2/neuを発現する細胞を灰色の四角で示す。

##### 【図2】

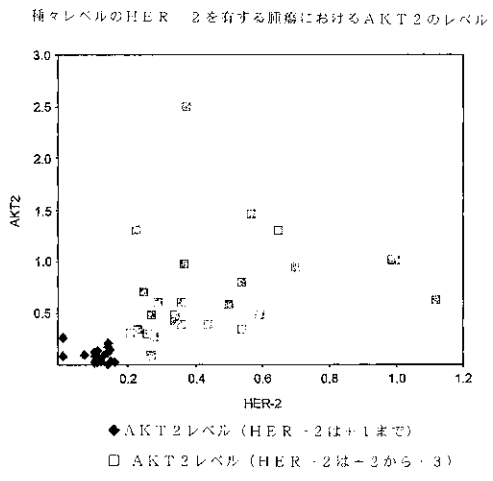
図2はHER-2/neuに関して(2114 Her-2 IHC)、AKT-2に関して(2114 AKT2 IHC)、またはアルカリ性ホスファターゼ技術により染色し、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)分析(2114 HER-2 FISH)を提供するフォイルゲン法により対比染色した乳癌組織のパラフィン切片の免疫組織学的分析である。

##### 【図3】

図3はリン酸化および非リン酸化形態のAKT1およびAKT2のレベルを示すウェスタン・ブロットである。レーン1: 負制御、レーン2: AKT活性NDF/ヘレグリン使用の治療、レーン3: ヘルセプチン使用の治療。

【 図 1 】

FIG. 1



## 【国際公開パンフレット】

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

(18) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
25 October 2001 (25.10.2001)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/79855 A2

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68  
GUIDKOV, Andrei (US/US); 700 Summit Lane, Glencoe, IL 60022 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US91/12288
- (22) International Filing Date: 16 April 2001 (16.04.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/197,780 14 April 2000 (14.04.2000) US  
(74) Agent: NOONAN, Kevin, E., McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, 300 South Wacker Drive, Suite 3200, Chicago, IL 60606 (US).
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:  
US 60/197,780 (CON) Filed on 14 April 2000 (14.04.2000)
- (71) Applicants (for all designated States except US): VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (US/US); 3367 North Business Center Drive, Tucson, AZ 85705 (US); BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLINOIS (US/US); 352 Henry Administration Building, 506 South Wright Street, Urbana, IL 61801 (US).
- (72) Inventors and  
(73) Inventors/Applicants (for US only): BACHIN, Sarah, S. (US/US); 925 S. Route 83, Elmhurst, IL 60126 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, 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, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, NG, SN, TD, TG).
- 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 01/79855 A2

(54) Title: METHOD FOR QUANTIFICATION OF AKT PROTEIN EXPRESSION

(57) Abstract: The invention provides methods for the detection and quantification of AKT proteins and their activation status in cells or tissue samples. Specifically, the invention provides methods for the detection and quantification of AKT1 or AKT2 proteins or their activated derivatives by combining immunohistochemical assays, calibrated by reference to other immunological, biochemical, or molecular biological assays, with an imaging system to quantify expression or activation levels of these proteins.

**METHOD FOR QUANTIFICATION OF AKT PROTEIN EXPRESSION**

This application claims priority to U.S. provisional application Serial no. 60/197,780, filed April 14, 2000.

5

**BACKGROUND OF THE INVENTION****1. Field of the Invention**

The invention relates to methods for the quantification of protein expression in cells or tissue samples related to diagnosis and treatment of disease states, particularly cancer disease states. Specifically, the invention relates to methods for the quantification of AKT1 and AKT2 protein expression as well as their activation state in which an imaging system is used to quantify AKT1 and AKT2 protein expression.

**2. Background of the Invention**

A cancer diagnosis is conventionally confirmed through histological examination of cell or tissue samples removed from a patient. Clinical pathologists need to be able to accurately determine whether such samples are benign or malignant and to classify the aggressiveness of tumor samples deemed to be malignant, because these determinations often form the basis for selecting a suitable course of patient treatment.

Histological examination traditionally entails tissue-staining procedures that permit the morphological features of a sample to be readily observed under a light microscope. A pathologist, after examining the stained sample, typically makes a qualitative determination of whether the tumor sample is malignant. It is difficult, however, to ascertain a tumor's aggressiveness merely through histological examination of the sample.

Automated (computer-aided) image analysis systems known in the art can augment visual examination of samples. In a representative system, the magnified image of a cell or tissue sample is exposed to reagents that detect a specific biological marker, and the images processed by a computer that receives the image from a charge-coupled device (CCD) or camera such as a television camera. Such a system can be used, for example, to detect and measure expression levels of the estrogen receptor (ER), the progesterone receptor (PR), or the oncogene HER-

WO 01/79855

PCT/US01/12288

2/neu in a particular sample. Using this methodology, a more effective regimen of therapy can be administered; for example, hormone therapy can be used where samples test positive for ER and PR, and anti-oncogene receptor therapy can be used where samples test positive for HER-2/neu (National Institute of Health  
5 Consensus Development Conference: Steroid Receptors in Breast Cancer, 1919, Bethesda, MD; Hancock *et al.*, 1991, *Cancer Res.* 51:4575-80; Arteaga *et al.*, 1994, *Cancer Res.* 54:3758-65; Bacus *et al.*, 1997, *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 19:316-28; Shiwkowski *et al.*, 1999, *Semin. Oncol.* 26:60-70; Shak, 1999, *Semin. Oncol.* 26:71-77; Cobleigh *et al.*, 1999, *J. Clin. Oncol.* 17:2639-48).

10 Apoptosis, or programmed cell death that occurs as part of normal mammalian development, was first observed nearly a century ago. The induction of developmental cell death is a highly regulated process that can be suppressed by a variety of extracellular stimuli. For example, the profound biological consequences of growth factor suppression of apoptosis are exemplified by the  
15 critical role of target-derived neurotrophins in the survival of neurons and the maintenance of functional neuronal circuits (Pettmann and Henderson, 1998, *Neuron* 20:633-47). The ability of trophic factors to promote survival is attributed, at least in part, to the phosphatidylinositol 3'-OH kinase (PI3K)/*c-akt* kinase cascade. Several targets of the PI3K/*c-akt* signaling pathway have been identified  
20 that may underlie the ability of the regulatory cascade to promote survival and forestall apoptosis. This behavior is relevant to cancer diagnosis because cell survival and apoptosis avoidance is a necessary part of the uncontrolled proliferation characteristic of cancer cells.

Thus, there exists a need in the art to detect cells, particularly cancer cells,  
25 that are capable of forestalling apoptosis, as a part of better methods for diagnosing, staging and evaluating cell and tissue specimens obtained from patients, either as part of an initial diagnosis of cancer, in monitoring the efficacy of clinical efforts to control or ablate cancer cells, or for detecting recurrence of a primary tumor or the existence of metastatic disease in a cancer patient. There is  
30 specifically a need in the art for improved detection of expression of the products of tumor marker genes for improving diagnoses and making accurate diagnoses as early as possible in the course of the disease.

## SUMMARY OF THE INVENTION

The invention provides methods for quantifying AKT1 or AKT2 protein expression and activation levels in cells or tissue samples obtained from an animal, most preferably a human cancer patient or an individual suspected of having cancer. Specifically, the invention provides methods for quantifying AKT1 and AKT2 protein expression or activation levels using an imaging system quantitatively. More specifically, the invention provides methods in which an imaging system is used to receive, enhance, and process images of cells or tissue samples, that have been stained with AKT protein-specific stains, in order to determine the amount or activation level of AKT protein expressed in the cells or tissue samples from such an animal. In preferred embodiments of the methods of the invention, a calibration curve of AKT1 and AKT2 protein expression is generated for at least two cell lines expressing differing amounts of AKT protein. The calibration curve is then used to quantitatively determine the amount of AKT protein that is expressed in a cell or tissue sample. Analogous calibration curves can be made for activated AKT1 or AKT2 proteins using reagents specific for the activation features. It can also be used to determine changes in amounts and activation state of AKT (AKT1 and AKT2) before and after clinical cancer treatment.

In one embodiment of the methods of the invention, AKT2 protein expression in a cell or tissue sample is quantified using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to determine the amount of AKT2 protein in a portion of a cell pellet prepared from at least two control cell lines expressing differing amounts of AKT2 protein, to which the expression of AKT2 in the cell or tissue sample is compared. In other embodiments of the methods of the invention, the amount of AKT2 protein expressed in a cell or tissue sample is indirectly quantified by hybridization of *c-akt2* mRNA isolated from the cell or tissue sample to high density oligonucleotide arrays, or determination of *c-akt2* mRNA expression by RT-PCR or by Northern blot hybridization experiments. Importantly, a separate portion of the same cell pellet is then stained with an anti-AKT2 antibody followed by immunohistochemical analysis to determine the amount of AKT2 protein in the sample, preferably by measuring the optical density of the sample at a wavelength specific for the immunohistochemical stain used to detect AKT-2 protein. In the practice of a preferred embodiment of the invention,

WO 01/79855

PCT/US01/12288

a calibration curve is prepared in which the concentration of AKT2 protein, most preferably determined by ELISA, is plotted against the optical density measurement for AKT2 protein. In order to determine the amount of AKT2 protein expressed in a cell or tissue sample, the optical density for AKT2 protein is measured and compared with the calibration curve generated from the control cell lines.

Specific preferred embodiments of the present invention will become evident from the following more detailed description of certain preferred embodiments and the claims.

10

#### DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is a chart showing the results of HER-2/*neu* and AKT-2 quantitation by image analysis of breast cancer cells in tumor sections. AKT-2 results are shown in arbitrary units of optical density whereas HER-2/*neu* results are expressed in picograms of HER-2/*neu* protein per cell. Cells that do not over-express HER-2/*neu* (+1 and negative) are indicated by solid black squares and cells expressing HER-2/*neu* at levels corresponding to +2 and +3 are indicated by gray squares.

20

Figure 2 is an immunohistochemical analysis of paraffin sections of breast cancer tissues stained for HER-2/*neu* (2114 HER-2 IHC), for AKT-2 (2114 AKT2 IHC), or by the alkaline phosphatase technique and counterstained by the Feulgen method to provide fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis (2114 HER-2 FISH).

25

Figure 3 is a Western blot showing levels of AKT1 and AKT2 in phosphorylated and non-phosphorylated forms. Lane 1: negative control; Lane 2: treatment with AKT activator NDR/Heregulin; Lane 3: treatment with herceptin.

30

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

This invention provides methods for quantitatively determining expression and activation levels for cellular proteins, AKT1 and AKT2, that are involved in mediating avoidance of apoptosis in tumor cells, particularly human tumor cells as

WO 01/79855

PCT/US01/12288

detected in cell or tissue samples from an individual. These methods depend on the identification of AKT proteins as important mediators of apoptosis in normal and tumor cells in mammals, particularly humans

The identification of AKT (the protein product of the *c-akt* gene) as a key regulator of cellular survival has significant implications for oncogenesis and drug resistance. For example, the loss of a human tumor suppressor, PTEN, correlates with increased AKT activity (Li *et al.*, 1997, *Science* 275:1943-47; Liaw *et al.*, 1997, *Nat. Genet.* 16:64-67; Nelen *et al.*, 1997, *Hum. Mol. Genet.* 6:1383-87; Cantley and Neel, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:4240-45; Datta *et al.*, 10 1999, *Genes Dev.* 13:2905-27). In addition, suppression of apoptosis is not the only function that AKT may have in promoting oncogenesis. In some circumstances, AKT can also induce cell cycle progression. However, the observation that AKT can suppress apoptosis, considered in light of the finding that cells can be rendered resistant to apoptosis through either the deletion of 15 PTEN, the overexpression of active Ras, or the overexpression of active PI3K, suggests that oncogenes may block adaptive cellular apoptosis by hyperactivating AKT.

Given the complexity of the apoptotic machinery, there are a number of pathways by which AKT might act to promote cell survival and inhibit cell death. 20 AKT may block apoptosis by regulating expression or activity of members of *Bcl-2* family genes (that are known to play a role in cell survival or cell death). Alternatively, AKT may regulate expression or activity of the caspase family of proteins, or the function of death receptor pathways. The regulatory effect of AKT may be through a direct mechanism – the phosphorylation of components of the 25 apoptotic machinery, *for example* – or an indirect mechanism – such as by altering the expression level of genes that encode components of the death machinery. Recent studies suggest that AKT regulates apoptosis at multiple sites. A number of AKT targets, all playing critical roles in the mediation of cell death, have been identified, including BAX, caspase-9, the Forkhead family of transcription factors, 30 and the NF $\kappa$ B regulator IKK (Datta *et al.*, 1999, *supra*).

The first component of the apoptotic machinery found to be phosphorylated by AKT was the *Bcl-2* family member BAD. BAD was identified on the basis of its ability to bind to BCL-2; analysis of the primary structure of *Bad* revealed that it is similar to *Bcl-2* (Yang *et al.*, 1995, *Cell* 80:285-91). The finding that AKT

WO 01/79855

PCT/US01/12288

suppresses BAD-induced death by direct phosphorylation of BAD is consistent with correlative evidence suggesting that the endogenous PI3K/AKT pathway culminates in the phosphorylation of endogenous BAD. In addition, stimuli such as ceramide, ultraviolet (UV) irradiation, infrared radiation (IR), and sorbitol, that  
5 downregulate AKT activity through as-yet-uncharacterized mechanisms, each also inhibit BAD phosphorylation (Zundel and Giaccia, 1998, *Genes Dev.* 12:1941-46).

AKT also phosphorylates caspase-9. This phosphorylation event has functional consequences, as extracts from cell lines overexpressing AKT block cytochrome C-mediated caspase-9 activation *in vitro*. These results suggest that  
10 AKT promotes cell survival through the inactivation of caspase-9 downstream of cytochrome C release. It is not clear how phosphorylation of caspase-9 results in its inactivation, although phosphorylation of caspase-9 appears to inactivate the intrinsic catalytic activity of the protein.

In addition, there is evidence that AKT is involved in mediating the  
15 tumorigenic effects of ErbB family gene expression. The ErbB family (HER) of oncogene receptors contains four members: HER (EGFR), HER-2, (ErbB-2), HER-3, and HER-4. Interest in this family of receptors has been greatly stimulated by the finding that overexpression of HER-2 transforms cells, and correlates with an increase in the progression and metastasis of human breast and ovarian cancers.  
20 Most recently, a humanized monoclonal antibody to HER-2 has been approved for treatment of breast cancer patients with overexpressed HER-2. Thus the significance of HER-2 overexpression in breast cancer development has been established (Liu *et al.*, 1999, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261:897-903).

Heregulin, which is a ligand for both the HER-3 (ErbB-3) and HER-4  
25 (ErbB-4) receptors, can activate HER-2/*neu* through the formation of a heterodimer. Heregulin is also a potent and rapid activator of AKT enzymatic activity in MCF-7 cells that express HFR-2. This activation is mediated by HER-2 or HER-3 stimulation of the PI3K pathway. Moreover, overexpression of HER-2 in BT474 breast cancer cells correlates with an increase in the basal activity of  
30 AKT. Finally, a monoclonal antibody to HFR-2, which is used to treat breast cancer patients, lowers the basal AKT activity in these cells. This implicates the PI3K/AKT pathway as one of the downstream targets of heregulin/HER-2 signaling. Thus, the PI3K/AKT cascade may play a role in the ability of HER-2 overexpression to generate a more aggressive breast cancer phenotype.

WO 01/79855

PCT/US01/12288

AKT2 also plays an important role in cell survival and in blocking programmed cell death following radiation or chemotherapy treatment. For example, AKT2 was found to be overexpressed in pancreatic, breast, and ovarian cancers. In patients where HER-2/*neu* overexpression has been detected, not only is the *c-akt2* gene found to be transcriptionally activated, but the AKT2 protein has also been shown to be overexpressed. In a comparison of MCF-7 cells, which express a basal level of HER-2/*neu*, and MCF-7 cells transfected with a HER-2/*neu* expression construct, *c-akt2* mRNA levels increased 27-fold in the HER-2/*neu* transfected MCF-7 cells. In tumor samples in which HER-2/*neu* was found to be overexpressed, AKT2 was found to be upregulated (Table I).

Table I

Image analysis quantification of HER-2/*neu* and AKT2 in Breast Cancer Cells

Sample Number	HER-2/ <i>neu</i> Results	Akt2 Results
00-98	0.01 (neg)	0.09
00-020	0.01 (neg)	0.08
00-024	0.01 (neg)	0.27
00-074	0.07 (neg)	0.10
00-248	0.10 (+1)	0.12
00-365	0.10 (+1)	0.02
00-373	0.10 (+1)	0.05
00-388	0.10 (+1)	0.05
00-52	0.10 (+1)	0.09
00-302	0.11 (+1)	0.07
00-201	0.11 (+1)	0.14
00-376	0.11 (+1)	0.02
00-392	0.11 (+1)	0.08
00-221	0.11 (+1)	0.09
00-51	0.12 (+1)	0.03
00-319	0.12 (+1)	0.04
00-117	0.13 (+1)	0.10

WO 01/79855

PCT/US01/12288

00-49	0.14 (+1)	0.21
00-407	0.14 (+1)	0.01
00-380	0.14 (+1)	0.18
00-79	0.14 (+1)	0.12
00-299	0.15 (+1)	0.04
00-332	0.15 (+1)	0.15
00-250	0.16 (+1)	0.02
00-28	0.16 (+1)	0.04
00-07	0.16 (+1)	0.04
00-202	0.21 (+3)	0.30
00-386	0.23 (+3)	0.34
00-162	0.23 (+3)	1.30
00-163	0.25 (+3)	0.70
00-352	0.26 (+3)	0.29
00-377	0.27 (+3)	0.48
00-04	0.27 (+3)	0.08
00-316	0.28 (+3)	0.26
00-123	0.29 (+3)	0.60
00-411	0.34 (+4)	0.48
00-412	0.34 (+4)	0.42
00-268	0.36 (+4)	0.38
00-278	0.36 (+4)	0.60
00-153	0.37 (+4)	0.97
00-154	0.38 (+4)	2.50
00-308	0.44 (+4)	0.38
00-349	0.50 (+4)	0.58
00-08	0.54 (+4)	0.79
00-314	0.54 (+4)	0.33
99-2415	0.57 (+4)	1.45
00-124	0.59 (+4)	0.48
99-2430	0.65 (+4)	1.29
00-408	0.70 (+4)	0.93

WO 01/79855

PCT/US01/12288

00-25	0.99 (+4)	1.00
00-335	1.00 (+4)	1.00
00-05	1.12 (+4)	0.61

AKT2 results are shown in arbitrary units of optical density, whereas HER-2/*neu* results are expressed in picograms of HER-2/*neu* protein per cell.

5 These results suggest that the activation and overexpression of AKT2 in breast cancers that overexpress HER-2/*neu* may be a significant factor in the aggressive biological behavior of these cancers. Therapeutic agents directed at components of the AKT signaling pathways and diagnostic tests for detecting and measuring the level of AKT proteins and detecting and measuring their activation states are important in the treatment of such cancers. There is a need in the art for a reliable assay for determining AKT protein levels and their activation state in cells or tissue samples obtained from patients. A satisfactory method must also allow the pathologist to exclude normal tissue from the analysis.

10 In the practice of a preferred embodiment of the methods of this invention, a two-component immunohistochemical staining system is used so that the cell pellets or tissue are counterstained with one color while the proteins of interest in the cell pellet or tissue sample are stained with a different color. The image of the cells in the cell pellet and tissue sample is then magnified in a light microscope and split into a pair of separated images. A pair of optical filters that are specifically matched to have a maximum absorption for each specific stain is used to enhance the separated images. One of the optical filters preferentially transmits light having a wavelength at the absorption wavelength of the counterstained tissue. The other narrow bandpass optical filter preferentially transmits in the regions of spectral absorption for the stain used to detect the protein of interest. Using image analysis filters, different cellular proteins in various components, such as the membrane, cytoplasm and nucleus, can be quantified. For optimal results, the imaging system is calibrated prior to taking any measurements.

15 The preferred embodiment of the present invention and its advantages are best understood by referring to Examples 1-5. These Examples are illustrative of

WO 01/79855

PCT/US01/12288

specific embodiments of the invention, and various uses thereof. They are set forth for explanatory purposes only, and are not to be taken as limiting the invention.

5

**Example I****Image analysis of AKT2 protein expression**

Using a two component immunohistochemical staining system as described above, a calibration curve is generated using at least two cell lines expressing differing amounts of AKT2 protein. Cell or tissue samples from human cancer patients are stained in the same manner as the second portion of the control cell pellet and optical densities measuring the extent of immunohistochemical staining are determined for each tissue sample tested. In the preferred embodiment of the method of the present invention, the tissue sample and the second portion of the cell pellet are stained simultaneously to account for any potential differences between the lots of the stains used or variations in the staining process. The amount of biological protein in the tissue sample is determined using the calibration curve generated from measurements of AKT2 protein in the control cell lines.

The average sum optical density per pixel, as calculated in image analysis, takes into account the total optical density of the AKT2 protein positive stained image and divides it by the total number of pixels of the image stained using counterstains such as Fast Green or ethyl green to derive the total pixels comprising the membrane or nuclear area. A calibration curve is generated after each staining.

A calibration curve is derived in order to calibrate the system so that cell pellets can be used as standards to quantify AKT2 protein levels in tissues. The intensity of the color formed by the enzyme reaction in the ELISA as known in the art is proportional to the concentration of the AKT2 protein in the sample, within the working range of the assay. A curve can be obtained by plotting the AKT2 protein concentration ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$  from ELISA) or receptors per cell versus the average O.D. data from the image analysis of the stained slides cut from a separate portion of these same three pellets.

WO 01/79855

PCT/US01/12288

**Example 2****Image analysis of HER-2/neu protein expression**

Using HER-2/neu as an example, four frozen cell calibrator pellets corresponding to HER-2/neu expressing cells, for which the ELISA-determined amount (fmol) of HER-2/neu per mg protein was known, were cut and stained along with patient's tissue sections in each round of staining. For each tissue, two portions were examined – one embedded in O.C.T. (Optimal Cutting Temperature, Baxter Scientific Products, McGraw Park, IL) for frozen sectioning and another that was ground in liquid nitrogen and placed in homogenization buffer to be used in an ELISA assay. The ELISA portion of each tissue was processed for HER-2/neu using the CalBiochem ELISA Kit. These stained slides were then quantitated using image analysis to determine the average O.D. (HER-2/neu). The amount of HER-2/neu protein expressed in the calibrator cell lines as determined by ELISA and image analysis are shown in Table II.

**Table II****HER-2/neu ELISA and HER-2/neu Image Analysis (IA)  
Quantitation Data on Four Cell Pellets**

Pellet	ELISA fmol/μg	IA fmol/μg
MCF-7	0.28	0.24
MCF-7 transfected with HER-2	0.53	0.55
MDA-MB543	1.31	1.37
SKBR3	>3.07	3.04

The average O.D. for each of the calibrator pellets was plotted against the value of HER-2/neu per mg protein as derived from the ELISA of the same calibrator pellets. The equation from this graph was then used to derive the amount (fmol) of HER-2/neu in five patient tissue samples using the average O.D. from the quantitation. Each round of staining of tissue samples was done in conjunction with sections from a set of calibrator pellets. Each time a series of tissues was tested, sections of the pellets were included in the staining run and their quantitated values (average O.D.) used to generate a calibration curve. The

WO 01/79855

PCT/US01/12288

amount of HER-2/*neu* protein expressed in the patient tissue samples as determined by ELISA and image analysis are shown in Table III.

5 **Table III**  
**HER-2/*neu* ELISA and HER-2/*neu* Image Analysis (IA)**  
**Quantitation on Five Breast Cancer Tissues**

Tissue Sample	ELISA fm/μg	IA fm/μg
98-510	0.23	0.30
98-511	1.74	1.12
98-551	0.05	0.08
98-594	0.16	0.76
98-664	0.17	0.20

The results of these procedures indicated that this method yields  
 10 quantitative values for the amounts of HER-2/*neu* expressed by tumor cells. Table I shows preliminary results obtained using antibody units of optical density to determine the levels of AKT2 protein in breast tissue which either express normal (+1) levels HER-2/*neu* or overexpress HER-2/*neu*. A high level of AKT2 protein expression has been detected in HER-2/*neu* overexpressing cancers (+3 or +4).  
 15 Thus, an automated (computer-aided) image analysis system combined with a series of cell pellets to be used as calibrators presents an accurate method for quantification of AKT2 protein expression levels in cell or tissue samples. The same method can be applied to measuring the amount of AKT activation before and after treatment with a specific drug that blocks AKT activity.

20

#### Example 3

**AKT up-regulation is associated with HER-2/*neu* over-expression and confers resistance to apoptosis *in vitro***

25 MCF7 (obtained from the Michigan Cancer Foundation, Detroit, MI) and MCF7/HER-2/*neu* cells expressing 5-8 fold elevated expression of HER-2/*neu*, which were generated previously by transduction of MCF7 cells with an ErbB-2 cDNA expression vector (Bacus *et al.*, 1996; Peles *et al.*, 1993; Daly *et al.*, 1997), were grown in RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10%

WO 01/79855

PCT/US01/12288

fetal bovine serum, penicillin (100 µg/ml), in a humidified incubator with 8% CO<sub>2</sub> in air at 37°C. The cells were induced to undergo apoptosis under increasing hypoxic conditions in the presence or absence of the PI3 kinase/Akt inhibitor Wortmannin (Calbiochem, San Diego, CA). Cells treated with Wortmannin were exposed to 50 µM of the inhibitor 7-48 hours after cell plating and for 1-3 days thereafter. Under hypoxic conditions, the MCF7 cells were sensitive to apoptosis. The presence of Wortmannin had only a marginal effect on the survival of MCF7 cells under hypoxia. However, the MCF7/HER-2/*neu* cells resisted apoptosis under hypoxia, while the viability of the MCF7/HER-2/*neu* cells exposed to Wortmannin was greatly reduced. Cellular resistance to hypoxia in cells over-expressing HER-2/*neu* is therefore associated with activation of the AKT pathways. The role of PI3 kinase/AKT and HER-2/*neu* pathways in cell survival under hypoxia was confirmed by growing various cell lines in hypoxic conditions and correlating survival with expression of HER-2/*neu*.

MDA-MB-435 and MDA-MB-435/HER-2 cells were obtained from Dr. Yu at the UTMD Anderson Cancer Center, Houston, TX. Cells were grown in RPMI 1640 supplemented as above in 8% CO<sub>2</sub> at 37°C. Western blotting was done as follows. Cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM sodium chloride, 1 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml pepstatin, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin), centrifuged at 4°C for 5 min at 6500g, and protein concentration was determined with a BioRad Protein Assay Kit (BioRad, Hercules, CA). Proteins were separated by electrophoresis using a Bis-Tris NuPAGE system with 1x MOPS running buffer (Novex, San Diego, CA) and transferred to Hybond C-extra membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Membranes were blocked with non-fat dry milk, incubated with the appropriate antibodies, washed with PBS (phosphate buffered saline) and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Detection was carried out with Renaissance Chemiluminescence Reagent Plus (NEN Life Science, Boston, MA). The MDA-MB-435/HER-2 cells over-express HER-2/*neu* 10-fold compared with the parental MDA-MB-435 cell line as determined by Western blot analysis. Lysates from these cells were collected and AKT-2 expression was examined by Western blot analysis with two different antibodies

WO 01/79855

PCT/US01/12288

against AKT-2, a polyclonal antibody (Santa Cruz, CA) and a monoclonal antibody (Dr. Testa, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA). An increase in the levels of AKT-2 was observed in the cells over-expressing *HER-2/neu*.

5

**Example 4****AKT-2 up-regulation correlates with over-expression of HER-2/neu in cancer**

Tumor samples from 42 patients were examined for *c-akt-1* and *c-akt-2* expression. The tissues were divided into two groups: those expressing normal levels (up to +1) of *HER-2/neu* and those over-expressing (from +2 to +3) *HER-2/neu*. Tissues were stained for AKT-1 and AKT-2. While levels of AKT-1 were similar in both groups, image analysis revealed that AKT-2 was up-regulated up to 10-fold in the *HER-2/neu* over-expressing tissues (Figure 1). Figure 2 shows by immunohistochemical analysis that high expression of AKT-2 correlates with over-expression of *HER-2/neu* in a paraffin section of a breast cancer tumor.

10  
15**Example 5****Activation of *c-akt* in cells over-expressing *HER-2/neu***

The activated (phosphorylated) state of total AKT (AKT-1 plus AKT-2) in cells over-expressing *HER-2/neu* was measured to study the functional significance of *c-akt* in *HER-2/neu* over-expressing cells and cancers. SKBR3, BR474, and AU565 cells (Cell Culture Laboratory Navy Biosciences Laboratory, Navy Supply Center, Oakland, CA), all of which over-express *HER-2/neu*, were treated with the known *c-akt* activator, NDF/Heregulin (10 ng/ml; a gift of Y. Yarden, Rehovot, Israel), or the monoclonal antibody against *HER-2/neu*, Herceptin (20 mg/ml), 7-48 hours after plating and continued for 1-3 days. Cell lysates from the SKBR3, BR474, and AU565 cells were examined by Western blot analysis as described above. Activated AKT was determined by antibodies that specifically recognize the phosphorylated state of AKT protein. Cells were lysed as above and subjected to immunoprecipitation with anti-AKT-1 and anti-AKT-2 antibodies. Immunoprecipitation was carried out as follows. Cell lysates (250 ug protein per 500 ul buffer) were pre-incubated with protein A + protein G agarose beads (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD), incubated with 0.5 ug of anti-AKT-1 or anti-AKT-2 antibodies (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY)

20  
25  
30

WO 01/79855

PCT/US01/12288

overnight at 4°C, followed by incubation for 1 hour with 40 µl of protein A + protein G agarose beads. Immune complexes were washed with cold lysis buffer and examined by Western blotting with anti-phospho-Akt to detect phosphorylated forms of AKT-1 or AKT-2 (Figure 3).

5 The total amount of AKT as well as AKT-1 phosphorylation was increased in cells treated with Heregulin. Treatment with Herceptin decreased the phosphorylation of total AKT and AKT-1. The basal level of AKT-2 phosphorylation was high and remained high after treatment with either Heregulin or Herceptin. Exposure to Herceptin and Heregulin for 3 days resulted in down-  
10 regulation of the phosphorylated state of AKT-1 but did not affect AKT-2. Therefore, activation of the HER-2/Her-3 receptor by NDF/Heregulin leads to activation of AKT and AKT-1. Treatment with Herceptin, which leads to down-regulation of HER-2/*neu*, also leads to down-regulation of AKT-1, but not AKT-2. To determine if hetero-dimerization of HER-2 and HER-3 plays a role in AKT-1  
15 activation, HER-3 was immunoprecipitated from untreated NDF and Herceptin treated MDA-MB-474 cells. Immunoprecipitates were analyzed by Western blot with anti-HER-2 antibodies. Down-regulation of AKT activation correlated with down-regulation of HER-2/Her-3 heterodimers. Treatment with Herceptin was associated with down-regulation of these heterodimers, which resulted in down-  
20 regulation of AKT-1 activity. Basal levels of phosphorylated AKT-2 were unaffected by treatment with Heregulin or Herceptin.

It should be understood that the foregoing disclosure emphasizes certain specific embodiments of the invention and that all modifications or alternatives  
25 equivalent thereto are within the spirit and scope of the invention as set forth in the appended claims.

WO 01/79855

PCT/US01/12288

**WHAT WE CLAIM IS:**

1. A method for determining AKT protein expression amounts or activation levels in a cell or tissue sample, comprising the steps of:
  - 5 a) determining the amount of AKT protein in a first portion of each cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT protein,
  - b) staining a second portion of each said cell pellet with a detectably-labeled anti-AKT antibody wherein the detectable label produces an optical density  
10 of staining proportional to the amount of AKT protein in the cell pellet,
  - c) determining the optical density for the AKT protein in the second portion of each said cell pellet,
  - d) producing a calibration curve of AKT protein concentration to optical density by plotting the concentration of AKT protein as determined in step  
15 a) versus the optical density for AKT protein as determined in step c),
  - e) determining an optical density for AKT protein in the cell or tissue sample,
  - f) calculating the amount of AKT protein expressed in the cell or tissue sample by comparison of the optical density as determined in step e) and the  
20 calibration curve plotted in step d).
2. The method of Claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of each cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT2 protein is determined by enzyme-linked  
25 immunoabsorbent assay (ELISA).
3. The method of Claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of each cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT2 protein is determined by hybridization of high density  
30 oligonucleotide arrays with cellular mRNA or cDNA prepared therefrom.
4. The method of claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of each cell pellet prepared from at least two cell lines expressing

WO 01/79855

PCT/US01/12288

differing amounts of AKT2 protein is determined by RT-PCR of cellular RNA or mRNA.

5        5.     The method of claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of each cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT2 protein is determined by Northern blot hybridization.

10       6.     The method of Claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of each cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT2 protein is determined by immunohistochemical detection.

15       7.     The method of Claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of each cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT2 protein is determined by protein microarray

20       8.     The method of Claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of each cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT1 protein is determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

25       9.     The method of Claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of a cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT1 protein is determined by hybridization of high density oligonucleotide arrays with cellular mRNA or cDNA prepared therefrom.

30       10.    The method of claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of a cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT1 protein is determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

11.    The method of claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of each cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT1 protein is determined by Northern blot hybridization.

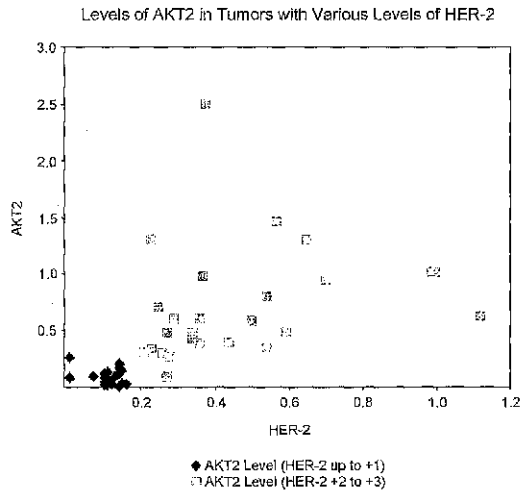
WO 01/79855

PCT/US01/12288

12. The method of Claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of each cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT1 protein is determined by immunohistochemical  
5 detection.

13. The method of Claim 1, wherein the amount of AKT protein in a first portion of each cell pellet prepared from at least two cell lines expressing differing amounts of AKT1 protein is determined by protein microarray.  
10

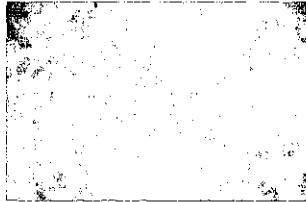
FIG. 1



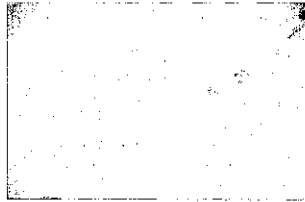
WO 01/79855

PCT/US01/12288

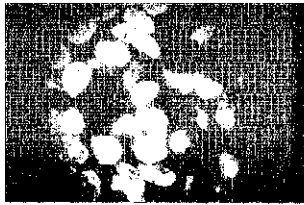
FIG. 2



2114 HER-2 IHC

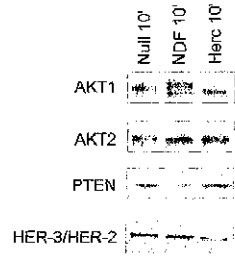


2114 AKT2 IHC



2114 HER-2 FISH

FIG. 3



【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



(43) International Publication Date  
25 October 2001 (25.10.2001)

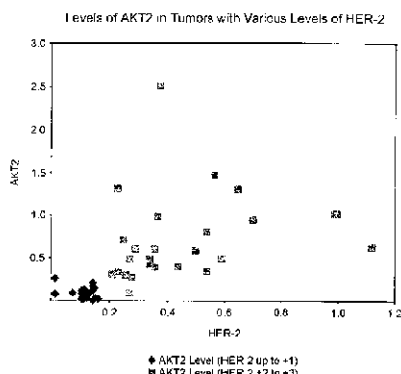
PCT

(10) International Publication Number  
WO 01/079855 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68 ILLINOIS (US/US): 352 Henry Administration Building, 506 South Wright Street, Urbana, IL 61801 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/12288
- (22) International Filing Date: 16 April 2001 (16.04.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/197,780 14 April 2000 (14.04.2000) US
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): RACUS, Sarah, S. (US/US); 925 S. Route 84, Elmhurst, IL 60120 (US); GUDKOV, Andrei (US/US); 700 Sarve Lane, Glencoe, IL 60022 (US).
- (74) Agent: NOONAN, Kevin, E., McDonnell Boehlen Hulbert & Berghoff, 300 South Wacker Drive, Suite 5700, Chicago, IL 60606 (US).
- (81) Designated States (national): AU, AT, AM, AR, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD FOR QUANTIFICATION OF AKT PROTEIN EXPRESSION



(57) Abstract: The invention provides methods for the detection and quantification of AKT proteins and their activation states in cells or tissue samples. Specifically, the invention provides methods for the detection and quantification of AKT1 or AKT2 proteins or their activated derivatives by combining immunohistochemical assays, calibrated by reference to other immunological, biochemical, or molecular biological assays, with an imaging system to quantify expression or activation levels of these proteins.

WO 01/079855 A3

WO 01/079855 A3



patent: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM; European patent: AL, DE, CH, CY, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR; OAPI patent: BE, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG.

(88) Date of publication of the international search report: 6 February 2003

**Published:**  
with international search report

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidelines Concerning Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/12288
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 G01N33/68 G01N33/574 According to International Patent Classification (IPC) and to other national classifications and IPC		
<b>B. FIELD OF SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q 301K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	BACUS SARAH S ET AL: "AKT2 is frequently upregulated in HER-2/neu-positive breast cancers and may contribute to tumor aggressiveness by enhancing cell survival." ONCOGENE, ENGLAND 16 MAY 2002, vol. 21, no. 22, 16 May 2002 (2002-05-16), pages 3532-3540, XP008005733 ISSN: 0950-9232 Late published document showing use of application method --- -/--	1-13
<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 (as published or after the international filing date) *L* document which may throw doubt on priority, validity or which is cited to establish the prior art of another claim or other special reason (as specified) *O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means *N* 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 a priority date and not in conflict with the application but cited to understand the progress of the art underlying the invention *X* document in which the invention is claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of prior art 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:	Date of mailing of this international search report	
15 July 2002	26/07/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 1, 2011 Luxembourg 2 L-2280 HV PSTRICH Tel (+352) 460 4343 Fax (+352) 460 4331	Authorized officer Routledge, B	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Patent Application No.  
PC/US 01/12288

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
P, X	BACUS SARAH S ET AL: "Akt2 upregulation in HER-2/neu overexpressing breast cancers: Implications to their clinical and biological behavior." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL, vol. 42, March 2001 (2001-03), page 243 XP000005731 92nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; New Orleans, LA, USA; March 24-28, 2001, March, 2001 ISSN: 0197-016X the whole document	1-13
E	US 2002/037541 A1 (OBATA YUICHI) 28 March 2002 (2002-03-28) claims 1,6-8,18-26,29-32 table 1 page 3, para.'0019! - para.'0021!	1-13
E	US 2001/044124 A1 (BACUS SARAH S) 22 November 2001 (2001-11-22) claims 1,2,4-6 page 3, para.'0026!	1-13
E	WO 01 79587 A (UROGENESYS INC) 25 October 2001 (2001-10-25) claims 1,19 page 70, line 7 - line 10	1-13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/US 01/12288

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2602637541	A1	28-03-2002	US 6213521 B1 17-04-2001
			AU 8571598 A 10-02-1999
			EP 0996857 A2 03-05-2000
			JP 2001516009 I 25-09-2001
			WO 9904265 A2 28-01-1999
US 2001044124	A1	22-11-2001	AU 2788701 A 24-07-2001
			AU 2951801 A 24-07-2001
			WO 0151924 A2 19-07-2001
			WO 0151928 A1 19-07-2001
			US 2001049114 A1 06-12-2001
WO 0179557	A	25-10-2001	AU 516210 A 30-10-2001
			WO 0179557 A2 25-10-2001
			US 2002055478 A1 09-05-2002

Form PCT/AS/210 (patent form) revised July 1992

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> F I テーマコード(参考)  
 // C 1 2 N 15/00 G 0 1 N 37/00 1 0 2  
 C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, 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, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, T, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(74) 代理人 100068342

弁理士 三好 保男

(72) 発明者 バッカス、 サラ エス .

アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 1 2 6 エルムハースト エス . ルート 8 3 9 2 5

(72) 発明者 グドコフ、 アンドレイ

アメリカ合衆国 イリノイ州 6 0 0 2 2 グレンコー サンセット レーン 7 0 0

F ターム(参考) 2G045 BB24 CB01 CB02 DA13 DA36 FB01 FB02 FB03 FB12 GC15  
 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 CA10 CA12 GA18 HA08 HA12  
 HA14  
 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR07 QR08 QR14 QR20  
 QR32 QR41 QR42 QR55 QR62 QR66 QR82 QS12 QS25 QS34  
 QS36 QS39 QX02

专利名称(译)	定量测定AKT蛋白表达的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004512495A</a>	公开(公告)日	2004-04-22
申请号	JP2001576470	申请日	2001-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	文塔纳医疗系统公司		
申请(专利权)人(译)	本塔纳医疗系统公司 伊利诺伊州的盐湖研究所董事会		
[标]发明人	バックスサラエス グドコフアンドレイ		
发明人	バックス、サラ エス. グドコフ、アンドレイ		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/483 G01N33/574 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N33/5008 G01N33/5011 G01N33/5091 G01N33/57484 G01N33/68 G01N33/6845 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M C12Q1/68.A G01N33/48.P G01N33/483.C G01N37/00.102 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/CA10 4B024/CA12 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR14 4B063/QR20 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	三好秀 三好康夫		
优先权	60/197780 2000-04-14 US		
其他公开文献	JP4317913B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测和定量细胞或组织样本中AKT蛋白及其活化状态的方法。具体地，本发明涉及免疫组织化学测定，其被翻译用于另一种免疫学，生物化学或分子生物学测定以量化这些蛋白质的表达或活化水平。与用于检测AKT1或AKT2蛋白或其活化衍生物的成像系统组合。

