

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4693902号
(P4693902)

(45) 発行日 平成23年6月1日(2011.6.1)

(24) 登録日 平成23年3月4日(2011.3.4)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/574	(2006.01)	GO 1 N 33/574	A
GO 1 N 33/577	(2006.01)	GO 1 N 33/577	B
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	U

請求項の数 23 (全 40 頁)

(21) 出願番号	特願2008-518471 (P2008-518471)	(73) 特許権者	506307234
(86) (22) 出願日	平成18年6月23日 (2006.6.23)		バイエル ヘルスケア エルエルシー
(65) 公表番号	特表2008-547027 (P2008-547027A)		BAYER HEALTHCARE
(43) 公表日	平成20年12月25日 (2008.12.25)		アメリカ合衆国 ニューヨーク州 105
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/024647		91-5109 タリータウン ホワイト
(87) 国際公開番号	W02007/002505		ブレインズ ロード 555
(87) 国際公開日	平成19年1月4日 (2007.1.4)	(74) 代理人	100073184
審査請求日	平成20年2月19日 (2008.2.19)		弁理士 柳田 征史
(31) 優先権主張番号	60/694,082	(74) 代理人	100090468
(32) 優先日	平成17年6月23日 (2005.6.23)		弁理士 佐久間 剛
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 復代理人	100116540
			弁理士 河野 香
		(74) 復代理人	100139723
			弁理士 樋口 洋

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体液中の R A S P 2 1 の定量的検定法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性化 r a s 経路に関連する前腫瘍 / 腫瘍疾患を検出する方法であって：

(a) 対照集団の個体から採取された体液試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルを免疫学的に検出および定量する；

(b) 対象から経時的に採取された対応する体液試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質レベルの連続変化を免疫学的に検出および定量する；および

(c) 前記対象の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルを、前記対照試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルと比較する；工程を含み、

前記対照試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルより高い前記対象の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルが、対象における活性化 r a s 経路および前腫瘍 / 腫瘍疾患の存在の指標となり、

前記工程 (a) および (b) における免疫学的検出および定量が、American Type Culture Collection (ATCC) に寄託されたハイブリドーマ HB 10054 から分泌されるモノクローナル抗体 Ras 17 と、ATCC に寄託されたハイブリドーマ HB 9426 から分泌されるモノクローナル抗体 Ras 10 との組合せを使用するサンドイッチイムノアッセイの形式のイムノアッセイによってなされることを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記対照試料中の総 r a s p 2 1 の平均レベルに対する前記対象の試料中の総 r a s p

21 タンパク質のレベルが、前記対象に関するより良好なまたはより悪い予後の指標となることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記対象が前腫瘍/腫瘍疾患を有するヒト患者であり、該患者の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルと前記対照試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルとの差、および該患者の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルの連続的变化が、該患者を治療するために従来の癌治療および/または r a s 指向癌治療を用いるか否かの指標となることを特徴とする請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

前記患者の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルが前記対照試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルを上回る場合、および患者の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質レベルの連続変化が対照試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルを上回る傾向にあるレベルを示す場合、r a s 発癌遺伝子により生じた前腫瘍/腫瘍疾患が存在すること、および r a s 指向治療を用いて治療すべきことが示唆されることを特徴とする請求項3記載の方法。

10

【請求項5】

r a s 指向治療が、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害因子 (F T I)、チロシンキナーゼ阻害因子、ビスアリアル尿素、および r a s のアンチセンス阻害因子より成る群から選択されることを特徴とする請求項3または4記載の方法。

【請求項6】

r a s 指向治療がビスアリアル尿素ソラフェニブ (B A Y 4 3 - 9 0 0 6) であることを特徴とする請求項5記載の方法。

20

【請求項7】

前記工程 (a) の対照集団の個体が、対象と同一の性別の個体であることを特徴とする、請求項1から6いずれか1項記載の方法。

【請求項8】

前記 サンドイッチイムノアッセイ が、サンドイッチ E L I S A であることを特徴とする請求項1から7いずれか1項記載の方法。

【請求項9】

モノクローナル抗体 R a s 1 0 が ビオチン化 されており、検出抗体 として使用されることを特徴とする請求項1から8いずれか1項記載の方法。

30

【請求項10】

前記患者の体液試料が、治療に反応していない癌患者に由来するものであることを特徴とする請求項3記載の方法。

【請求項11】

活性化 r a s 経路に関連する前腫瘍/腫瘍疾患の状態を特定する方法であって：

前腫瘍/腫瘍疾患を有する患者から経時的に採取された体液試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質レベルの連続変化を免疫学的に検出および定量することを含み；

前記患者が治療を受けている患者であり、経時的な総 r a s p 2 1 タンパク質のレベル上昇が、疾患の進行または治療に対するネガティブな反応を示唆し、および総 r a s p 2 1 タンパク質のレベル低下が、疾患の寛解または治療に対するポジティブな反応を示唆し、

40

前記免疫学的検出および定量が、American Type Culture Collection (A T C C) に寄託されたハイブリドーマ H B 1 0 0 5 4 から分泌されるモノクローナル抗体 R a s 1 7 と、A T C C に寄託されたハイブリドーマ H B 9 4 2 6 から分泌されるモノクローナル抗体 R a s 1 0 との組合せを使用するサンドイッチイムノアッセイの形式のイムノアッセイによってなされることを特徴とする方法。

【請求項12】

前記治療が r a s 指向治療であることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】

50

前記患者の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルが、前記患者に関するより良好なまたはより悪い予後の指標となることを特徴とする請求項 1 1 または 1 2 記載の方法。

【請求項 1 4】

前記予後が、奏功率 (R R)、完全奏功臨床効果 (C R)、部分奏功臨床効果 (P R)、病勢安定臨床効果 (S D)、無進行期間 (T T P)、および生存期間 (T T D) より成る群から選択される臨床的結果であることを特徴とする請求項 2 または 1 3 記載の方法。

【請求項 1 5】

前記患者の試料が、治療前の試料であることを特徴とする請求項 2 または 3 記載の方法。

【請求項 1 6】

前記患者の試料中の一または複数の他のタンパク質のレベルを検出または検出および定量するためのイムノアッセイの使用をさらに含むことを特徴とする請求項 1 から 1 5 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 1 7】

前記一または複数の他のタンパク質が、阻害因子、腫瘍性タンパク質、増殖因子受容体、血管新生因子、転移タンパク質、腫瘍マーカーおよび腫瘍抑制因子より成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 6 記載の方法。

【請求項 1 8】

阻害因子がメタロプロテイナーゼ - 1 組織阻害因子 (T I M P - 1) であり、腫瘍性タンパク質が H E R - 2 / n e u であり、増殖因子受容体が上皮増殖因子受容体 (E G F R) および血小板由来増殖因子受容体 (P D G F R) より成る群から選択され、血管新生因子が血管内皮増殖因子 (V E G F) であり、転移タンパク質がウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子 (u P A) であり、腫瘍マーカーが癌胎児性抗原 (C E A) であり、および腫瘍抑制因子が p 5 3 であることを特徴とする請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 1 9】

前記患者の体液試料が、治療に反応していない癌患者に由来するものであることを特徴とする請求項 1 1 記載の方法。

【請求項 2 0】

総 r a s p 2 1 および / または H E R - 2 / n e u のレベルの上昇が、早期再発または転移の高い可能性の指標となることを特徴とする請求項 1 8 記載の方法。

【請求項 2 1】

前記体液が、血液、血清、血漿、尿、唾液、精液、乳房滲出液、脳脊髄液、涙液、痰、粘液、リンパ液、細胞質ゾル、腹水、胸水、羊水、膀胱洗液および気管支肺胞洗浄液より成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 から 2 0 いずれか 1 項記載の方法。

【請求項 2 2】

前記体液が血清または血漿であることを特徴とする請求項 2 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

活性化 r a s 経路と関連する前腫瘍 / 腫瘍疾患が、結腸直腸癌、結腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、急性骨髄性白血病、甲状腺癌、膵臓癌、膀胱癌、腎臓癌、メラノーマ、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸部癌、頭頸部癌、肝細胞癌および血液系腫瘍より成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 から 2 2 いずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1】

本発明は、遺伝医学の一般的分野、および腫瘍学および免疫学の分野に関するものである。より詳細には、本発明は、体液中の総 r a s p 2 1、特に対象の体液中の総 r a s p 2 1 レベルの連続変化の検出および定量に関する。さらに、本発明は、総 r a s p 2 1 を、例えば腫瘍性タンパク質、血管新生因子、腫瘍マーカー、阻害因子、増殖因子受容体、転移タンパク質、および腫瘍抑制因子といった一つ以上の他のタンパク質と併せて検出および定量することに関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

rasファミリーの発癌遺伝子（ラット肉腫ウイルスと相同）は、シグナル伝達に關与する細胞タンパク質のGタンパク質ファミリーに屬する。ras遺伝子は、細胞膜の内表面に位置しおよびGTPアーゼ活性を有するタンパク質をコードする。通常は、細胞膜受容体に結合する増殖因子によって誘起される際、rasタンパク質はGTPと結合し、rasシグナルの活性化を結果として生じる。ras遺伝子ファミリーは、ヒトの癌で見出される最も一般的に活性化される発癌遺伝子に含まれる、三つの主要なメンバー（H-ras、K-ras、およびN-ras）を有する。他のras遺伝子ファミリーメンバーは、Rho/Rac、Rab、ArfおよびRanサブファミリーを含む。

10

【0003】

三つの主要なras遺伝子（H-ras、K-ras、およびN-ras）は、全ての真核細胞で細胞膜の内表面上に見出される、アミノ酸189個の21kDアルファ/ベータシートタンパク質をコードする。三つのras遺伝子にコードされるアイソフォーム（H-Ras、N-RasおよびK-Rasと表示される）は、本分野では集合的に「p21」または「ras p21」として知られ、および高度のホモロジー（>90%）および共通の下流エフェクターおよび上流グアニン-ヌクレオチド交換因子（GEFs）を共有する。ras遺伝子ファミリーのその他のメンバーについてそうであるように、ras p21は細胞シグナル伝達に重要な細胞内GDP/GTP結合Gタンパク質であり、細胞膜中の受容体チロシンキナーゼから核へのシグナルを変換し、正常細胞増殖および分化を調節する[Pruitt and Der (2002)]。12、13、または61位アミノ酸の置換によって活性化されたras p21タンパク質は、高い形質転換能力を有する腫瘍性タンパク質として作用しうる。ras p21の変異形は、GTP加水分解を還元することによって構成的に活性状態に固定され、その結果として細胞増殖のためのシグナルが制御されない。変異または過剰発現された場合、p21タンパク質は発癌性である。Ras p21タンパク質は、乳癌の50~60%で過剰発現されており、および全ての癌の約30%、特に膵臓癌および結腸癌で変異している。

20

【0004】

ras発癌遺伝子の変異性活性化は、さまざまな癌および前駆病変で同定されている。変異性に活性化されたras遺伝子は、胃、食道、卵巣、前立腺および乳房腫瘍ではまれであるが、肺癌の20~40%、急性骨髄性白血病の30%、結腸直腸腫瘍および甲状腺腫瘍の40~50%および膵臓腫瘍の>80%で報告されている。全体として、全てのヒト新生物の約30%がras遺伝子変異を含むことが報告されている。[非特許文献1；非特許文献2] H-ras変異は、膀胱、腎臓、および甲状腺癌で一般的である；K-ras変異は非小細胞肺癌、結腸直腸癌および膵臓癌に存在する；およびH-ras変異はメラノーマ、肝細胞癌、および血液系腫瘍でみられる。[非特許文献1.] 発癌性ras変異体による細胞の形質転換は、ゼラチナーゼおよびストロメライシンといったメタロプロテイナーゼの発現を増大させる可能性があり、それは腫瘍転移を促進しうる。加えて、血管内皮増殖因子（VEGF）の発現は、K-ras-およびH-ras形質転換された上皮細胞においてRaf経路を通じて増大する。

30

40

【0005】

変異ras p21に対して過剰発現ras p21の予後診断的意義について本分野でいくらか議論されている。例えば、非特許文献3は、半定量的ウェスタンブロットによって検出されたp21レベル上昇は初期乳癌患者における重要な予後指標であることを報告した。2001年にはしかし、非特許文献4は、結腸直腸癌におけるp21ras腫瘍性タンパク質発現を免疫組織化学試験を用いて調査し、および、決してras p21でなく、p21rasの遺伝子変化が、結腸直腸癌の生物学的攻撃性を決定するのに重要であると結論した。

【0006】

腫瘍においてrasを検出するためにしばしば用いられる抗体は、ras p21の三

50

種類の型全て (H -、N - および K - r a s)、変異型および野生型の両方に結合する汎反応性抗体である。例えば、非特許文献 5 は、結腸直腸腺癌における r a s p 2 1 の意義を調べるための免疫組織化学試験に汎反応性 M a b R a s 1 1 を使用し、および r a s p 2 1 は増殖活性と明らかに相関し、および独立した予後診断的価値を有することを見出した。

r a s p 2 1 のヒト組織における定量的検定法が利用可能であるが、より以前に記載された r a s p 2 1 のヒト体液における検定法はせいぜい半定量的である。r a s は正常に発現されているため、活性化 (アップレギュレートされたおよび / または変異性に刺激された) r a s 腫瘍性タンパク質経路の指標、例えば、r a s p 2 1 レベルにおける上昇レベルまたは変化が、r a s に導かれる発癌、または r a s に導かれる腫瘍の状態変化を検出するために使用できる、循環 r a s p 2 1 レベルにおける上昇または連続変化の定量的検定法があれば有用である。

【 0 0 0 7 】

特許文献 1 (C a r n e y , W . P . , 1 9 9 5) は、正常ヒト血漿中の総 r a s p 2 1 の半定量的イムノアッセイを記載するが対応する血清ではない。その特許文献 1 はまた、正常ヒト血漿の E L I S A 検定において総 r a s p 2 1 を検出するための、汎反応性 M a b R a s 1 7 の使用を記載する。

【 0 0 0 8 】

2 0 0 0 年までに、少なくとも 2 名の研究者が、肺癌患者の血清中の r a s タンパク質の存在を報告している。1 9 9 1 年には、非特許文献 6 が、肺癌患者 1 1 名中 5 名および非悪性肺疾患患者 2 1 名中 2 名の血清中に r a s をイムノプロットを用いて検出し、および呼吸器癌の早期検出のためのマーカーとしての r a s の使用を示唆した。A n d e r s o n 他もまた、ヒト肺癌患者の血漿中の r a s レベルをウェスタンプロットを用いて分析した。[非特許文献 7 - 9] A n d e r s o n 他 1 9 9 6 年の試験では、r a s レベルは患者のうち 4 5 % に対して正常対照のうち 6 % で上昇した。A n d e r s o n 他 1 9 9 6 年の試験の一部では、総 r a s タンパク質 (正常および変異体 r a s と反応する) を検出する一次抗体 R a s 1 0 が使用された。R a s レベルは B r a n d t - R a u f (1 9 9 1) の試験または A n d e r s o n 他 1 9 9 6 年の試験のどちらでも定量 (ピコグラムで) されなかった。

【 0 0 0 9 】

非特許文献 1 0 は、r a s p 2 1 は肺癌患者血清にも、またはどの試験群由来の血清からも検出できなかったこと、およびしたがって r a s は肺癌の早期検出のためのマーカーとして有用と考えることはできないと報告した。S c h n e i d e r e t a l . (2 0 0 0) は、男性肺癌患者 6 5 名、2 9 非悪性肺疾患患者 2 9 名、および対照 4 4 名の血清を、H、K および N - r a s と反応する A b - 1 (クローン Y 1 3 - 2 5 9 由来汎反応性抗 r a s p 2 1 ラット M a b) を用いて、三つの異なるウェスタンプロット法で検定した。しかし、標準において 1 n g の r a s タンパク質が測定可能であったにもかかわらず、彼は r a s をそれらの血清試料中に検出できなかった。

【 0 0 1 0 】

非特許文献 1 1 は、乳癌患者由来の血漿中の r a s p 2 1 レベルを、ウェスタンプロット、コンピューターを利用した画像分析 (統合ピクセルユニット)、および汎反応性抗 r a s 抗体を用いて調べた。R u n d l e e t a l . (2 0 0 2) は、乳癌患者の 5 3 % において検出可能レベルの野生型 r a s を見出した ; 乳癌患者における平均レベルは、陽性対照 (良性乳房疾患患者の 2 7 % および健康対照の 2 6 %) において見出された平均野生型 r a s レベルよりも定性的に高かった。非特許文献 1 2 は、化学療法の前および経過全体にわたっての両方で、r a s を含む 9 つの異なる発癌遺伝子 タンパク質産物の血清レベルにおける連続変化を調べた。ここでも、R u n d l e e t a l . (2 0 0 2)

および P e r e r a e t a l . (1 9 9 0) の検定の両方の r a s 測定は半定量的なだけであった。

【 0 0 1 1 】

過剰発現された r a s もまた活性化 r a s 経路を示しうるため、変異 r a s と関連して

10

20

30

40

50

いない癌においてさえ、変異および過剰発現 *ras* p21 の両方を測定することが非常に重要でありうる。例えば、*ras* は乳癌の 50 ~ 60 % で過剰発現されおよび 5 % 未満で変異しているが、おそらく *HER-2/neu* または他の発癌遺伝子の活性化のため、変異性に活性化された *ras* が乳癌増殖および進行を促進するという多数の実験的証拠がある。[非特許文献 13 .]

発明者らは、体液中の総 *ras* p21 レベルにおける連続変化を測定するために使用できる定量的イムノアッセイを発見しており、その変化は活性化（アップレギュレートおよび/または変異性に刺激された）*ras* 経路の指標として有用である。その新規のイムノアッセイは、汎反応性モノクローナル抗体（*Mabs*）*Ras* 17 および *Ras* 10 または *Ras* 10 . 2 の使用を含み、そのそれぞれが総 *ras* p21 タンパク質（正常および変異活性化 *ras* p21 の両方）と結合する。*Mabs Ras* 17 および *Ras* 10 は以前に記載されている [*Carney, W. P.* , 特許文献 2 , 特許文献 1 , 特許文献 3 および 特許文献 4] ; しかし、イムノアッセイにおける *Mabs Ras* 17 および *Ras* 10 の組み合わせの使用は以前に記載されていない。

【 0 0 1 2 】

本発明は、アップレギュレートされたかまたは変異性に刺激された活性化 *ras* 経路を検出するために、体液試料中の総 *ras* p21 レベルの変化を検出するための定量的検出法を開示する。そのような検定法は、単独でまたは、*ras* の上流（*TIMP-1*）の癌マーカーのレベル、またはレベル他のタンパク質のレベルと組み合わせて、*ras* 経路を標的とする患者治療を選択するために使用されうる。腫瘍形成における *ras* の重要性のために、例えば *ras* タンパク質発現の阻害（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）、*ras* 活性化に必須の膜局在化の妨害（例えば *Ras* ファルネシル化阻害因子を用いて）[非特許文献 14 および 15]、または *ras* の下流エフェクターの阻害（例えば、*Raf* セリン/スレオニンキナーゼ）によって *MAPK* シグナルカスケードの構成的活性化を阻害 [非特許文献 16] といった、*ras* を標的とする抗癌治療を開発するためにいくつかの方法が取られている。*ras* 経路を標的とする治療の一つの有望な候補は、*raf* キナーゼおよび *VEGFR* の両方を阻害することが知られている、ビスアリアル尿素ソラフェニブ（*BAY-43-9006*）である。[非特許文献 17]

本発明まで、癌患者が *ras* p21 に導かれる腫瘍を有するか否かを決定する高感度な、定量的および定型的な血清検査は存在しなかった。本発明の検定法は、定型的に、血清だけでなく血漿および他の体液にも使用されうる、そうした高感度なおよび定量的な検定法を提供する。

【特許文献 1】米国特許第 5, 443, 956 号明細書

【特許文献 2】米国特許第 5, 262, 523 号明細書

【特許文献 3】米国特許第 5, 081, 230 号明細書

【特許文献 4】米国特許第 6, 200, 764 号明細書

【非特許文献 1】*Adjei, A. A.* , *Journal of National Cancer Institute* , 93 (14) : 1062 - 1074 (July 18 , 2001)

【非特許文献 2】*Bos, J. L.* , *Cancer Research* , 49 : 4682 - 4689 (1989)

【非特許文献 3】*Watson, D. M.* , *Breast Cancer Res. Treat.* 17 (3) : 161 - 169 (Jan - Feb 1991)

【非特許文献 4】*Karelia et al.* *Int. J. Biol. Marker* , 16 (2) : 97 - 104 (2001)

【非特許文献 5】*Sun et al.* , *Eur. J. Cancer* . 27 (12) : 1646 - 1649 (1991)

【非特許文献 6】*Brandt - Rauf, P. W.* , *J. Occup. Med.* , 33 (9) : 951 - 955 (Sept. 1991)

【非特許文献 7】*Anderson et al.* , *Mutat. Res* , 349 : 12

10

20

30

40

50

1 - 126 (1996)

【非特許文献8】Anderson et al., *Mutat. Res*, 403 (1-2): 229-235 (1998)

【非特許文献9】Anderson et al., *Int. J. Hyq. Environ. Health*, 204 (1): 55-60 (Oct. 2001)

【非特許文献10】Schneider et al. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 38 (4): 301-305 (2000)

【非特許文献11】Rundle et al. *Cancer Lett*, 185 (1): 71-78 (Nov. 8, 2002)

【非特許文献12】Perera et al. *Arch. Toxicol.*, 64 (5): 401-406 (1990) 10

【非特許文献13】Eckert et al., *Cancer Research*, 64: 4585-4592 (2004)

【非特許文献14】Kohl et al., *J Cell Biochem (Suppl.)*, 22: 145-150 (1995)

【非特許文献15】Lerner et al., *J Biol Chem.*, 270 (45): 26802-26806 (Nov. 10, 1995)

【非特許文献16】Pruitt and Der, *Cancer Letters*, 171: 1-10 (2002)

【非特許文献17】Wilhelm et al., *Cancer Research*, 64: 7099-7109 (Oct. 1, 2004) 20

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、ヒト体液中の総ras p21タンパク質のレベルにおける連続変化を測定するための、定量的イムノアッセイの使用に関する。前記連続変化は、rasシグナル伝達経路の活性化状態の指標として特に有用であり、ここで「活性化」はアップレギュレーションおよび変異性活性化の両方を含むと定義される。本発明の方法の基礎となる理論によると、総ras p21タンパク質の上昇（総ras p21レベルにおける連続変化によって検出される）は、ヒト対象における前腫瘍/腫瘍疾患の存在を示す、活性化rasシグナル伝達経路の指標と考えられている。本発明のイムノアッセイは、臨床的に - 診断的におよび/または予後的に、前癌および/または癌（前腫瘍/腫瘍疾患）を検出するために、および患者治療選択のための治療的補助として、患者における前腫瘍/腫瘍疾患の状態の監視、または前腫瘍/腫瘍疾患を有する患者がどのように治療に反応するかの監視に使用されうる。本発明のイムノアッセイに好ましい使用は、患者の状態を監視すること、および患者治療のための最適な方法についての決断を行うことである。

30

【0014】

総ras p21における連続変化をイムノアッセイによって検定するための好ましい試料は、ヒト体液の試料であり、体液のうち特に：血液、血清、血漿、尿、唾液、精液、乳房滲出液、脳脊髄液、涙液、痰、粘液、リンパ液、細胞質ゾル、腹水、胸水、羊水、膀胱洗液および気管支肺胞洗浄液を含みうる。検定のために好ましい体液は、血液、血清、および血漿、より好ましくは、血清または血漿である。特に好ましい体液試料は、治療前試料、および治療に反応していない患者から採取された試料を含む。

40

【0015】

一態様では、本発明は活性化ras経路に関連する前腫瘍/腫瘍疾患を検出するための診断/予後診断（予測）法に関する。ヒト対象において活性化ras経路に関連する前腫瘍/腫瘍疾患を検出する一つの方法は下記の工程を含む：

(a) 対照集団の個体から採取された体液の試料中の総ras p21タンパク質の平均レベルを免疫学的に検出および定量する；

(b) 経時的に対象から採取された対応する体液試料中の総ras p21タンパク質レ

50

ベルの連続変化を免疫学的に検出および定量する；および

(c) 対象の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルを、対照試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルと比較する；

ここで対照試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルを上回る、対象の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルは、対象における活性化 r a s 経路および前腫瘍 / 腫瘍疾患の存在を示唆する。工程 (a) の対照集団の個体は、性別はどちらでもよく、または対象と同じ性別でよい。

【 0 0 1 6 】

ヒト対象において活性化 r a s 経路に関連する前腫瘍 / 腫瘍疾患を検出する前記方法は、前腫瘍 / 腫瘍疾患の予後診断的なものであり、対照試料中の総 r a s p 2 1 の平均レ 10
ベルと相対的な対象の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルが前記対象についてより良好なまたはより悪い予後を示唆する。好ましくは、前記予後は、奏功率 (R R)、完全奏功臨床効果 (C R)、部分奏功臨床効果 (P R)、病勢安定臨床効果 (S D)、無進行期間 (T T P)、および生存期間 (T T D) より成る群から選択される臨床的結果である。

【 0 0 1 7 】

前記方法は、例えば、サンドイッチイムノアッセイ、好ましくはサンドイッチ酵素結合免疫吸着法 (E L I S A) または同等の検定法の形のイムノアッセイによるような、標準形式でありうる。好ましい形式は、モノクローナル抗体、好ましくは抗 p 2 1 汎反応性モノクローナル抗体の使用を含むサンドイッチ E L I S A、好ましくは捕捉モノクローナル 20
抗体が American Type Culture Collection (A T C C) に寄託されたハイブリドーマ H B 1 0 0 5 4 から分泌される R a s 1 7 が指定されることを特徴としおよび検出モノクローナル抗体が A T C C に寄託されたハイブリドーマ H B 9 4 2 6 から分泌される R a s 1 0、または R a s 1 0 ハイブリドーマ H B 9 4 2 6 のサブクローンから分泌される R a s 1 0 . 2 が指定されることを特徴とするサンドイッチ E L I S A である。より好ましくは、検出モノクローナル抗体 R a s 1 0 または R a s 1 0 . 2 はビオチン化されている。

前記方法は、疾患が活性化 r a s 経路と関連する、癌疾患または前癌疾患を診断および / または予後診断 (予測) できる。そのような癌疾患または前癌疾患のうち典型的なのは、結腸直腸癌、結腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、急性骨髄性白血病、甲状腺癌 30
、膵臓癌、膀胱癌、腎臓癌、メラノーマ、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸部癌、頭頸部癌、肝細胞癌および血液系腫瘍、およびそのような癌に繋がる前癌より成る群から選択されるものである。結腸、結腸直腸、肺癌および乳癌、およびそれに繋がる前癌は、ヒト体液中の総 r a s p 2 1 の連続変化を検出する診断 / 予後診断 (予測) 検定方法の特に標的と考えられる。

【 0 0 1 8 】

本発明の別の態様は、前腫瘍 / 腫瘍疾患を有するヒト患者のための治療選択の方法として、ヒト体液中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルの変化を測定するための定量的イムノアッセイに関する。一つのそのような治療選択の方法は下記の工程を含む：

(a) 対照集団の個体から採取された体液の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均 40
レベルを免疫学的に検出および定量する；

(b) 経時的に患者から採取された対応する体液試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質レベルの連続変化を免疫学的に検出および定量する；

(c) 患者の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルを、対照試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルと比較する；および

(d) 患者の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルと対照試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルとの差に基づき、および患者の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルの連続変化を考慮して、患者を治療するために従来の癌治療および / または r a s を標的とする癌治療を用いるか否かを決定する。例えば、患者の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルが対照試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルを 50

上回るとわかった場合、および患者の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質レベルの連続変化が対照試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質の平均レベルを上回る傾向にあるレベルを示す場合、その患者は r a s 発癌遺伝子に導かれる前腫瘍 / 腫瘍疾患を有するという結論付けがなされ、および、単独でまたは一つ以上の他の抗癌治療と併せて、r a s 指向治療を用いて患者を治療することが決定される。

【 0 0 1 9 】

好ましくは、前記 r a s 指向治療は、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害因子 (F T I)、チロシンキナーゼ阻害因子、ビスアリアル尿素および r a s のアンチセンス阻害因子より成る群から選択される。より好ましくは、前記 r a s 指向治療は、ビスアリアル尿素ソラフェニブ (B A Y 4 3 - 9 0 0 6) である。

10

【 0 0 2 0 】

本発明の別の一態様は、患者における前腫瘍 / 腫瘍疾患の状態を監視、および / または前腫瘍 / 腫瘍疾患を有する患者が治療にどう反応するかを監視する方法としてのイムノアッセイの使用に関するものであり、経時的に患者から採取された体液の試料中の総 r a s p 2 1 タンパク質レベルの連続変化を免疫学的に検出および定量することを含み、経時的な総 r a s p 2 1 タンパク質のレベル上昇が疾患進行または治療に対するネガティブな反応を示唆し、および総 r a s p 2 1 タンパク質のレベル低下が疾患寛解または治療に対するポジティブな反応を示唆する。前記治療は、従来の抗癌治療、非慣習的な抗癌治療、および / または r a s 指向治療でありうる。好ましい体液試料は、試料の種類のうちでも特に、治療前試料、または治療に反応していない癌患者由来の試料でありうる。

20

【 0 0 2 1 】

本発明のさらに別の一態様は、診断 / 予後診断 (予測) 方法、前腫瘍 / 腫瘍疾患を有する患者のための治療選択の方法、患者において前腫瘍 / 腫瘍疾患の状態を監視、および前腫瘍 / 腫瘍疾患を有する患者が r a s 指向治療または他の治療にどのように反応するかを監視する方法のような、本発明の方法において、一つ以上の他のタンパク質のレベルと組み合わせて、総 r a s p 2 1 レベルの変化を検出するために定量的イムノアッセイを使用することに関する。好ましくは、本発明の検定法において r a s p 2 1 と共に定量するのが有用な前記の他のタンパク質は、阻害因子、腫瘍性タンパク質、増殖因子受容体、血管新生因子、転移タンパク質、腫瘍マーカーおよび腫瘍抑制因子である。好ましくは、前記阻害因子はメタロプロテイナーゼ - 1 組織阻害因子 (T I M P - 1) であり、前記腫瘍性タンパク質は H E R - 2 / n e u であり、前記増殖因子受容体は上皮増殖因子受容体 (E G F R) および血小板由来増殖因子受容体 (P D G F R) より成る群から選択され、前記血管新生因子は血管内皮増殖因子 (V E G F) であり、前記転移タンパク質はウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子 (u P A) であり、前記腫瘍マーカーは癌胎児性抗原 (C E A) であり、および前記腫瘍抑制因子は p 5 3 である。

30

【 0 0 2 2 】

非常に好ましくは、前記の他のタンパク質は、例えば T I M P - 1 および H E R - 2 / n e u / c - e r b B - 2 (「 H E R - 2 / n e u 」) のような、r a s 経路を活性化するタンパク質である。例えば、総 r a s p 2 1 および / または H E R - 2 / n e u のレベル上昇は、腫瘍または腫瘍転移の早期の再発のより高い確率を示しうる。最も有望な治療結果のための最適な治療の組み合わせを選択するために、臨床的展望、治療上の資源および診断 / 予後診断 (予測) パラメーターを広げることは、癌患者を、総 r a s p 2 1 およびそのような他のタンパク質、特に r a s 経路を活性化するタンパク質の両方について連続変化を検査することは有用である。

40

【 0 0 2 3 】

参照文献

- ・ A d j e i , A . A . , J o u r n a l o f N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e , 9 3 (1 4) : 1 0 6 2 - 1 0 7 4 (J u l y 1 8 , 2 0 0 1)
- ・ A g a r w a l e t a l . , O n c o g e n e , 2 0 (2 0) : 2 5 2 7 - 2 5 3 6 (M a y 3 , 2 0 0 1)

50

- Anderson et al., *Mutat Res.* 445 (2): 167 - 173 (Sep. 30, 1999)
- Anderson et al., *Mutat. Res.*, 349 (1): 121 - 126 (Jan. 17, 1996)
- Anderson et al., *Mutat. Res.*, 403 (1-2): 229 - 235 (July 17, 1998)
- Anderson, P., *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 204 (1 V 55 - 60 (Oct. 2001)
- Bos, J. L., *Cancer Research*, 49: 4682 - 4689 (1989) 10
- Bos, J. L., *Mutation Research*, 195: 255 - 271 (1988)
- Brandt - Rauf, P. W., *J. Occup. Med.*, 33 (9): 951 - 955 (Sep. 1991)
- Brtva et al., *J Biol Chem.*, 270 (17 V. 9809 - 9812 (April 28, 1995)
- Brunner et al., *Cancer Research*, 63: 5656 - 5668 (Sep. 15, 2003)
- Carney et al., "Monoclonal Antibodies for Detection of Normal and Oncogenic Ras p21," *in Human Tumor Antigens and Specific Tumor Therapy*, Alan R. Liss, Pub., pp. 53 - 62 (1989) 20
- Carney, W. P., *The Cancer Journal*, 4: 156 - 161 (1991)
- Carney, W. P., U. S. Patent No. 4,898,932 (Feb. 6, 1990)
- Carney, W. P., U. S. Patent No. 5,028,527 (July 2, 1991)
- Carney, W. P., U. S. Patent No. 5,081,230 (Jan. 14, 1992) 30
- Carney, W. P., U. S. Patent No. 5,084,380 (Jan. 28, 1992)
- Carney, W. P., U. S. Patent No. 5,112,737 (May 12, 1992)
- Carney, W. P., U. S. Patent No. 5,262,523 (Nov. 16, 1993)
- Carney, W. P., U. S. Patent No. 5,443,956 (August 22, 1995)
- Carney, W. P., U. S. Patent No. 6,200,764 B1 (March 13, 2001) 40
- Carney et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 83: 7485 - 7489 (1986)
- Cebulska - Wasilewska A, et al., *Mutat Res.* 431 (1): 123 - 131 (Dec. 16, 1999)
- Chang et al., *Leukemia*, 17 (7): 1263 - 1293 (July 2003)
- Chie et al., *Cancer Chemother Pharmacol.* 45: 441 - 449 (2000)
- Choi et al., *Oncogene*. 23 (1): 9 - 20 (2004)
- Collisson et al., *Cancer Research*, 63: 566 50

9 - 5673 (Sep. 15, 2003)

• Cox and Der, *Cancer Biol Ther.* 1(6): 599: 606 (Nov - Dec 2002) Dancev J.E., *Curr Pharm Pe s.*, 8(25): 2259 - 2267 (2002)

• Dent et al., *Oncogene*, 22: 5885 - 5896 (2003)

• Eckert et al., *Cancer Research*, 64: 4585 - 4892 (July 1, 2004)

• Epelbaum et al., *J Clin Lab Anal.*, 3(4): 209 - 214 (1989)

• Fischbach and Settleman, *Cancer Research*, 63: 4089 - 4094 (July 15, 2003)

• Fridman et al., *J Biol Chem.*, 269(48): 30105 - 30108 (Dec. 2, 1994)

• Ghosh and Bell, *J Bio Chem.*, 269(49): 30785 - 30788 (Dec. 9, 1994)

• Gibbs et al., *Breast Cancer Res Treat.*, 38(1): 75 - 83 (1996)

• Hamer et al., *Oncogene*, 6(9): 1609 - 1615 (Sep. 1991)

• Holten-Andersen et al., *Int J Cancer*, 113(2): 198 - 206 (Jan 10, 2005)

• Jin et al., *British Journal of Cancer*. 89.1 85 - 191 (2003)

• Jones et al., *Semin Radiat Oncol.* 11(4): 328 - 337 (Oct. 2001)

• Karelia et al., *Int. J. Biol. Markers*, 16(2): 97 - 104 (April - June 2001)

• Kohl et al., *J Cell Biochem (Suppl.)*, 22: 145 - 150 (1995)

• Lee C.S., *Eur J Surg Oncol.*, 23(3): 233: 237 (June 1997)

• Leever et al., *Nature*, 369(6479): 411 - 414 (June 2, 1994)

• Lerner et al., *J Biol Chem.*, 270(45): 26802 - 26806 (Nov. 10, 1995)

• Li et al., *Development*. 125(24): 4999 - 5008 (Dec. 1998)

• Liang et al., *MoI Cancer Then.* 2(4): 353 - 360 (April 2003)

• Luo et al., *J Occup Environ Med.*, 40(12): 1053 - 1058 (Dec. 1998)

• Mallon et al., *Anal Biochem*, 294(1): 48 - 54 (July 1, 2001)

• Manzur et al., *Cell MoI Neurobiol*, 21(1): 39 - 52 (Feb. 2001)

• Marais et al., *EMBO J.*, 14(1): 3136 - 3145 (July 3, 1995)

• Marshall, M., *MoI Reprod Dev.* 42(4): 493 - 499 (Dec. 1995)

10

20

30

40

50

- Meadows et al., *Oncogene*, 23(1): 192 - 200 (2004)
- Needleman et al., *Pathology*, 22(2): 77 - 81 (April 1990)
- Perera et al., *Arch. Toxicol.*, 64(5): 401 - 406 (1990)
- Perera et al., *Nature*, 35: 256 - 258 (1992)
- Pitarque et al., *Mutat Res.*, 440(2): 195 - 204 (April 6, 1999)
- Prior and Hancock. *Journal of Cell Science*, 114: 1603 - 1608 (2001) 10
- Pruitt and Der, *Cancer Letters*, 171: 1 - 10 (2002)
- Rundle et al.. *Cancer Lett*, 185(1): 71 - 78 (Nov. 8, 2002)
- Schneider et al., *Clin. Chem. Lab. Med.*, 38(4): 301 - 305 (April 2000)
- Singh et al., *Cancer Res.*, 57(2): 253 - 258 (Jan. 15, 1997)
- Solanas and Escrich, *Rev Esp Fisiol.*, 52(3): 173 - 192 (Sep. 1996) 20
- Sommer et al., *Oncogene*, 22, 4266 - 4280 (2003)
- Sreelekha et al., *J Esp Clin Cancer Res.*, 18(3): 337 - 341 (Sep. 1999)
- Sun et al., *Eur. J. Cancer*, 27(12): 1646 - 1649 (1991)
- Takahashi et al., *Clin Cancer Res.*, 1(10): 1071 - 1077 (Oct. 1995)
- Ulku et al., *MoI Cancer Res.*: 1(14): 1077 - 1088 (2003)
- Wang et al., *J Cell Bio.*, 129(4): 1103 - 1114 (May 1995) 30
- Watson, D.M., *Breast Cancer Res. Treat.* 17(3): 161 - 169 (Jan - Feb 1991)
- Weissfeld et al., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 3(1): 57 - 62 (Jan - Feb 1994)
- Wilhelm et al., *Cancer Research*, 64: 7099 - 7109 (Oct. 1, 2004)
- Wittinghofer et al., *FEBS Letters*, 410: 63 - 67 (1997)
- Yan et al., *Jour. Biol Chem.*, 273(37): 24052 - 24056 (Sep. 11, 1998) 40

略語

下記の略語がここで用いられる：

ATCC：American Type Culture Collection

BSA：ウシ血清アルブミン

：摂氏

CEA：癌胎児性抗原

CV：変動係数

EDTA：エチレンジアミンテトラ酢酸

EGFR：上皮増殖因子受容体

E L I S A : 酵素結合免疫吸着検定法	
F T I : ファルネシルトランスフェラーゼ阻害因子	
G D P : グアノシンニリン酸	
G E F S : グアニン - ニクレオチド交換因子	
G T P : グアノシン三リン酸	
Gタンパク質 : グアニルヌクレオチド依存性タンパク質	
H R P : ホースラディッシュペルオキシダーゼ	
k D : キロダルトン	
M : モル濃度	
M a b : モノクローナル抗体	10
M A P : 分裂促進因子活性化タンパク質	
m l : ミリリットル	
m M : ミリモル濃度	
N : 正常または数 (文脈に応じて)	
N D : 検出されず	
N E D : 疾患徴候無し	
N g : ナノグラム	
n m : ナノメートル	
O D : 光学密度	
p g : プロテオグリカン	20
P D G F R : 血小板由来増殖因子 受容体	
P . R e s p : 患者の反応	
P r o g : 増悪	
R e c u r : 再発	
S D : 標準偏差	
S t a b : 安定	
S t g : ステージ	
T I M P - 1 : メタロプロテイナーゼ - 1 組織阻害因子	
T M B : テトラメチルベンジジン	
μ g : マイクログラム	30
μ l : マイクロリットル	
U n k : 不明	
u P A : ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子	
V E G F : 血管内皮増殖因子	
V E G F R : 血管内皮増殖因子受容体	
【発明を実施するための最良の形態】	
【 0 0 2 4 】	
本発明は、ヒト体液中の総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルの連続変化を測定する定量的イムノアッセイに関するものであり、そのアッセイは、診断的に / 予後診断 (予測) 的にヒトにおいて、活性化 r a s 経路と関連している前腫瘍 / 腫瘍疾患を検出または監視するのに、または前記前腫瘍 / 腫瘍疾患を有する患者のための治療を選択するのに有用である。ここでは、「活性化 r a s 経路」は r a s p 2 1 タンパク質の過剰発現または変異のどちらかによって活性化された r a s 経路と定義され、およびしたがってアップレギュレートされたおよび / または変異性に刺激された r a s 経路を包含する。さらに、ここでは、「総 r a s p 2 1 タンパク質」は、変異活性化および正常 (野生型) p 2 1 タンパク質 (H - r a s 、 K - r a s 、 および N - r a s タンパク質を含む) の両方を含む。	40
【 0 0 2 5 】	
活性化 r a s 経路と関連する前腫瘍 / 腫瘍疾患の典型は下記の通りであり、および書きに繋がる前癌である : 結腸直腸癌、結腸癌、肺癌、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、急性骨髄性白血病、甲状腺癌、膵臓癌、膀胱癌、腎臓癌、メラノーマ、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、	50

子宮頸部癌、頭頸部癌、肝細胞癌および血液系腫瘍。特に、総 r a s p 2 1 タンパク質のレベルは、単独でまたは他のタンパク質、特に他の腫瘍性タンパク質のレベルと組み合わせて、臨床的結果を予測するためにおよび/または治療選択における補助として使用されうる。

【 0 0 2 6 】

本発明の検定法は、診断および/または予後診断(予測)、すなわち、診断法/予後診断(予測)法でありうる。「診断/予後診断(予測)」の語はここでは下記の過程を、臨床的背景に応じて個別にまたは累積的に包含すると定義される:疾患の存在を判定、疾患の性質を判定、疾患を識別、疾患状態の可能な結果に関して予測、症例の性質および症状によって示される通りの疾患からの回復に関する見込みを判定、患者の疾患状態を監視、疾患の再発について患者を監視、および/または患者にとって好ましい治療計画を決定。本発明の診断/予後診断(予測)方法は、例えば、腫瘍または前腫瘍疾患の存在について集団をスクリーニング、腫瘍疾患を発症するリスクを判定、腫瘍および/または前腫瘍疾患の存在を診断、腫瘍疾患を有する患者の疾患状態を監視、および/または腫瘍疾患の経過についての予測を判定するために有用である。

10

【 0 0 2 7 】

本発明は、上記に示す通りのさまざまな前腫瘍/腫瘍疾患の存在についてスクリーニングするのに有用である。そのような検定法は、腫瘍を検出、腫瘍の増殖を監視、および疾患の診断および予後診断(予測)を助けるのに使用されうる。本検定法はまた、癌転移の存在を検出、および癌化学療法および/または放射線療法後の腫瘍組織の非存在を確認するために使用されうる。本検定法はさらに、癌化学療法および腫瘍再出現を監視するために使用されうる。

20

【 0 0 2 8 】

本方法は、前腫瘍/腫瘍疾患を診断されたかまたはその疑いのあるヒト対象から採取された連続体液試料中に存在する総 r a s p 2 1 タンパク質がもしあればそれを定量することを含む。定量された総 r a s p 2 1 タンパク質レベルは、対照集団の個体から採取された体液試料における平均レベルと比較され、ここで平均レベルを上回る総 r a s p 2 1 タンパク質は活性化 r a s 経路を示す。ここでは、「平均を上回る」レベルの総 r a s p 2 1 タンパク質は、対照試料でみられる平均レベルより2標準偏差(SD)高いレベルを指す。対照集団の個体はどちらの性別でもよく、または対象と同じ性別の人に限定されうる。

30

【 0 0 2 9 】

ここでは、「癌」および「腫瘍」は等価の意味を有し、および「前癌」および「前腫瘍」は等価の意味を有する。前腫瘍/腫瘍疾患の診断/予後診断(予測)の指標としての発癌遺伝子の遺伝子発現産物の検出の使用は、当業者によって通常と見なされる。しかし、活性化 r a s と関連する前腫瘍/腫瘍疾患を検出または監視するための、体液中の r a s レベル、特に循環 r a s レベルの連続変化を定量的に測定するような手法の使用は新規である。

【 0 0 3 0 】

体液の連続試料

40

本発明の好ましい一実施形態では、総 r a s p 2 1 タンパク質は、連続して経時的に採取されたヒト体液試料で定量される。そのような体液試料は、体液試料の中でも特に、血液、血清、血漿、尿、唾液、精液、乳房滲出液、脳脊髄液、涙液、痰、粘液、リンパ液、細胞質ゾル、腹水、胸水、羊水、膀胱洗液および気管支肺胞洗浄液でありうる。好ましい体液は、体液試料の中でも特に、例えば、血清またはヘパリン、クエン酸またはEDTAで処理された血漿試料を含み、および新鮮または冷凍でありうる。そのような体液標本は、治療前、治療中、または治療後に採取でき、または治療に反応しない患者から採取されうる。ここでは、「経時的連続変化」または「連続試料」は、背景および状況に応じて、対象にとって適切と考えられる期間にわたって採取された試料の連続検査を意味する。例えば、癌患者スクリーニングのためには、連続試料は患者の初診、診断後、手術前およ

50

び/または手術後に採取されうる；一方、前腫瘍疾患のための集団スクリーニングのためには、連続試料は年一回ペースで採取されうる。

【0031】

イムノアッセイ

本発明の方法に記載の典型的なおよび好ましいイムノアッセイは、材料および方法の項で後述されおよび実施例1から8のデータを得るために用いられたサンドイッチELISAである。ここに開示される方法に加えて、代替の方法がヒト体液中の総ras p21タンパク質を定量するために使用されることが理解できる。他の好ましいサンドイッチアッセイが、例えば発光標識といった他の視覚化方法と共に使用されうる。他の標識は、下記の標識化標識の項で詳述される。

10

【0032】

多数の形式が、本発明の方法との使用のために適用されうる。ヒト体液中の総ras p21タンパク質の検出および定量は、本分野で一般に知られる検定法の中でも特に、例えば、by酵素結合免疫吸着検定法、ラジオイムノアッセイ、二重抗体サンドイッチアッセイ、凝集検定法、蛍光イムノアッセイ、免疫金を用いる免疫走査電子顕微鏡法によって実施されうる。そのような検定法での総ras p21タンパク質の定量は、本分野で公知の従来の方法によって適応されうる。好ましい実施形態である、循環総ras p21タンパク質レベル、または他の体液中のそのようなレベルにおける連続変化は、従来の方法を用いて担体表面上に捕捉抗体が固定化されているサンドイッチアッセイによって検出および定量される。

20

【0033】

検定法に用いられる適当な担体は、担体の中でも特に、ポリプロピレン、ポリスチレン、置換ポリスチレン、ポリアクリルアミド（例えばポリアミドおよびポリ塩化ビニル）、ガラスビーズ、アガロース、およびニトロセルロースを特に含む。

【0034】

典型的なイムノアッセイ

典型的なおよび好ましいELISAサンドイッチイムノアッセイが、材料および方法の項に、および実施例1～8に記載される。その典型的なELISAは、Mab Ras 17を捕捉抗体として、およびビオチン化Mab 10.2（ハイブリドーマRas 10のサブクローンによって産生される）を検出抗体として使用する。捕捉Mab Ras 17はマイクロータイタープレートウェル上に固定化され；希釈ヒト血清/血漿試料またはras p21標準（組み換え野生型H-rasタンパク質）が3時間37℃にてウェル中でインキュベートされ、総ras p21抗原をMab 17によって結合させる。ウェルの洗浄後、固定化されたras p21抗原はビオチン化検出抗体Mab Ras 10.2に30分間室温にて（20～27℃）曝露され、その後ウェルは再び洗浄される。ストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体が次いで添加される（30分間室温にて）。最後の洗浄後、結合ペルオキシダーゼ活性を検出するためにTMBブルー基質がウェルに添加される（および30分間室温にてインキュベートされる）。反応は2.5N硫酸の添加によって停止され、および吸収が450nmにて測定される。試料の吸収値のras標準との相関が、総ras p21の定量値をpg/ml血清または血漿として決定可能にする。

30

40

【0035】

組み合わせ検定法：Rasおよび他のタンパク質のレベル

対象前腫瘍/腫瘍疾患に応じて、例えば阻害因子、腫瘍性タンパク質、増殖因子受容体、血管新生因子、転移タンパク質、腫瘍マーカー、および腫瘍抑制因子、特にras経路に随伴するものといった他のタンパク質が、ras p21と同時の検出および定量に適していることが理解できる。ras p21との同時検査に適する典型的なおよび好ましい他のタンパク質は、メタロプロテイナーゼ-1組織阻害因子（TIMP-1）、HER-2/neu、上皮増殖因子受容体（EGFR）、血小板由来増殖因子受容体（PDGFR）、血管内皮増殖因子（VEGF）、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子（uPA

50

)、癌胎児性抗原 (C E A)、および p 5 3 を含む。本発明の方法に適した好ましい他のタンパク質を検出するための検定法は当業者に公知である。例えば、ヒト体液中の H E R - 2 / n e u および T I M P - 1 の定量のためのイムノアッセイは、ヒト血清または血漿中の T I M P - 1 の n g / m l 値を測定できる O n c o g e n e S c i e n c e T I M P - 1 E L I S A [O n c o g e n e S c i e n c e , C a m b r i d g e , M A (U S A) , w w w . o n c o g e n e . c o m] のように市販されている。実施例 8 に記載される通り、連続結腸直腸癌血清試料および正常血清試料が、総 r a s p 2 1 および T I M P - 1 レベルの療法について検定された。

【 0 0 3 6 】

予後診断

r a s p 2 1 および / または他のタンパク質のレベルの監視は、前腫瘍 / 腫瘍疾患の臨床的結果を示しうる。臨床的結果を評価する好ましい方法は、奏功率 (R R)、臨床効果 [完全奏功 (C R)、部分奏功 (P R)、および病勢安定 (S D) を含む]、無進行期間 (T T P)、および生存期間 (T T D) に基づく方法である。予後を評価する他の方法が本分野で公知でありおよび使用されうる。

【 0 0 3 7 】

抗体

「抗体」の語はここでは、もっとも広義で用いられおよび具体的にはモノクローナル抗体 (完全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体 (例えば、二重特異性抗体)、および目的の生物活性を示す限り抗体断片を包含する。本発明の方法に記載の有用な抗体は、従来の方法論によっておよび / または遺伝子工学によって調製されうる。本発明に記載の好ましい抗体は、「汎反応性」であるもの、すなわち総 r a s p 2 1 (野生型および変異活性化 r a s p 2 1 の両方)、および H a r v e y、K i r s t e n および N - r a s p 2 1 の三つのファミリーと結合する抗体である。非常に好ましいのは、本発明の典型的なイムノアッセイに使用される抗体である R a s 1 7 および R a s 1 0 抗体、または目的の生物活性を示す限り R a s 1 7 および R a s 1 0 ハイブリドーマのサブクローンによって産生される抗体である (例えば親 R a s 1 0 ハイブリドーマのサブクローン由来の R a s 1 0 . 2 M a b)。

【 0 0 3 8 】

「抗体断片」は、完全長抗体の一部、一般的にはその抗原結合または可変ドメインを含む。抗体断片の例は、F a b、F a b '、F (a b ') 2、および F v 断片、二重特異性抗体、線形抗体、および 1 本鎖抗体分子、および抗体断片から形成された二重特異性抗体を含む多重特異性抗体を含む。

【 0 0 3 9 】

「モノクローナル抗体」の語はここでは、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体をいい、すなわち、その集団を構成する各抗体は少量存在しうる可能な天然に存在する変異以外は同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一の抗原部位を対象とする。さらに、典型的にはさまざまな決定基 (エピトープ) を対象とする異なる抗体を含む従来の (ポリクローナル) 抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原上の単一の決定基を対象とする。修飾語「モノクローナル」は、i n d i c a t e s 抗体の実質的に均一な集団から得られているという抗体の性質を示し、および何らかの特定の方法による抗体の産生を必要とするとは解釈されない。例えば、本発明にしたがって使用されるべきモノクローナル抗体は、K o h l e r e t a l . , N a t u r e 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5) によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって作製が可能であり、または組み換え D N A 法 (例えば、米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号明細書) によって作製されうる。「モノクローナル抗体」はまた、ファージ抗体ライブラリから、例えば C l a c k s o n e t a l . , N a t u r e , 3 5 2 : 6 2 4 - 6 2 8 (1 9 9 1) および M a r k s e t a l . , J . M o l . B i o l . , 2 2 2 : 5 8 1 - 5 9 7 (1 9 9 1) に記載の方法を用いて単離されうる。

【 0 0 4 0 】

モノクローナル抗体はここでは特に、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一かまたは相同であり、一方で鎖の残りが別の種に由来するかまたは別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一かまたは相同である、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、および目的の生物活性を示す限りそのような抗体の断片を含む [米国特許第 4, 816, 567 号明細書 ; および Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)]。

【0041】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。大部分は、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、そこではレシピエントの超可変領域残基が、目的の特異性、親和性、および容量を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類といった非ヒト種由来の超可変領域残基（ドナー抗体）で置換されている。一部の場合では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基が、対応する非ヒト残基で置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体にはみられない残基を含みうる。そのような改変は、抗体性能をさらに改良するために実施される。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンのものと対応する全てまたは実質的に全ての超可変領域、および全てまたは実質的に全てのFRがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも一個、および典型的には二個の可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体はまた随意的に、典型的にはヒト免疫グロブリンの、少なくとも一部の免疫グロブリン定常領域（Fc）を含む。さらなる詳細については、Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988); および Presta, Curr. Opin. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992) を参照。

【0042】

「1本鎖Fv」または「sFv」抗体断片は、抗体のVHおよびVLドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般的に、Fvポリペプチドはさらに、VHおよびVLドメイン間に、sFvが抗原結合のための目的の構造をとることを可能にするポリペプチドリンカーを含む。sFvの総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) を参照。

【0043】

「二重特異性抗体」の語は、二個の抗原結合部位を有する小さい抗体断片をいい、その断片は、同一ポリペプチド鎖内に軽鎖可変ドメイン（VL）と連結した重鎖可変ドメイン（VH）を含む（VH-VL）。短すぎて同一鎖上の二つのドメイン間の対形成ができないリンカーを使用することによって、それらのドメインは別の鎖の相補ドメインと対形成するよう強制され、および二個の抗原結合部位を生じる。二重特異性抗体は、例えば、欧州特許第 404, 097 号明細書 ; 国際公開第 93/11161 号パンフレット ; および Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993) により完全に記載される。

【0044】

「線形抗体」の表現は、Zapata et al., Protein Eng., 8 (10): 1057-1062 (1995) に記載された抗体をいう。要約すると、そのような抗体は、一对の抗原結合領域を形成する一对のタンデムFd区域（VH-CHI-VH-CHI）を含む。線形抗体は二重特異性または単特異性でありうる。

【0045】

本発明に記載の有用な代表的なモノクローナル抗体は、以前のCarney他の特許 [米国特許第 5, 081, 230 号明細書 ; 米国特許第 5, 443, 956 号明細書 ; 米国特許第 6, 200, 764 号明細書] に記載された Mabs Ras 17 および Ras 10

10

20

30

40

50

を含む。本発明に記載の有用なモノクローナル抗体は、例えば臨床試料中で、さまざまな予後診断的臨床検査において総ras p21タンパク質を特定するのに役立つ。

【0046】

抗体の調製を含む、ここで有用な他の分子生物学的方法を記載する一般的テキストは、Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, Inc., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, N.Y.; 1989) Vol. 1-3; Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausabel et al. [Eds.], Current Protocols, a joint venture between Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (supplemented through 2000), Harlow et al., Monoclonal Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988), Paul [Ed.]; Fundamental Immunology. Uppincott Williams & Wilkins (1998), および Harlow et al., Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998) を含む。

【0047】

標識

総ras p21タンパク質を特定するための本発明に記載の有用な抗体は、任意の従来の方法によって標識化されうる。本発明に記載の好ましい標識はホースラディッシュペルオキシダーゼであり、および抗体を標識化する好ましい方法は、ビオチン-ストربتアビジン複合体を用いることによる。

【0048】

必要に応じて、トレーサーとして用いられる本発明のイムノアッセイに使用される抗体は、可視シグナルまたは可視化されうるシグナルを結果として生じる任意の方法で直接にまたは間接に標識化されうる。検出可能なマーカー物質は、³H、¹²⁵I、および¹³¹Iといった放射性核種；蛍光物質、例えばフルオレセインイソチオシアネートおよび他の蛍光色素、フィコピリンタンパク質、フィコエリトリン、希土類キレート、テキサスレッド、ダンシルおよびローダミン；比色試薬（色素原）；電子不透明物質、例えば金コロイド；生物発光物質；化学発光物質；色素；酵素、特に例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アルファ-、ベータ-ガラクトシダーゼ；補酵素；酵素基質；酵素補助因子；酵素阻害因子；酵素サブユニット；金属イオン；フリーラジカル；または形成された免疫複合体の存在または量を検出または測定する手段を提供する任意の他の免疫学的に活性または不活性な物質を含む。典型的な酵素基質の組み合わせは、ホースラディッシュペルオキシダーゼおよびテトラメチルベンジジン（TMB）、およびアルカリホスファターゼおよびパラニトロフェニルリン酸（pNPP）である。

【0049】

本発明に記載のもう一つの好ましい検出、または検出および定量系は、発光シグナル、生物発光（BL）または化学発光（CL）を生じる。化学発光（CL）または生物発光（BL）検定法では、強度または総発光が測定されおよび未知分析物の濃度と関連づけられる。光は、ルミノメーター（検出器として光電子増倍管）または電荷結合素子を用いて定量的に、または写真フィルムまたはX線フィルムによって定性的に測定されうる。そのよ

10

20

30

40

50

うな検定法を用いることの主な利点は、その単純さおよび、非常に少量の分析物の検出および/または定量を可能にする分析感度である。

【0050】

典型的な発光標識は、アクリジニウムエステル、アクリジニウムスルホニルカルボキサミド、ルミノール、ウンベリフェロン、イソルミノール誘導体、光タンパク質、例えばエクオリン、およびホタル、海産細菌、VargulillaおよびRenilla由来ルシフェラーゼである。ルミノールは随意的に、好ましくは4-ヨードフェノールまたは4-ヒドロキシ桂皮酸より成る群から選択されるエンハンサー分子と使用されうる。アクリジニウムエステルは、本発明に記載のCL標識の好ましい種類の一つである。典型的には、CLシグナルは塩基性条件下で酸化剤との処理によって生じる。

10

【0051】

また好ましい発光検出系は、シグナル(検出可能なマーカー)が基質との酵素反応によって生じる系である。CLおよびBL検出系が、特にアルカリホスファターゼ(AP)、グルコースオキシダーゼ、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、およびキサンチン-オキシダーゼ標識を検定するために開発されている。APおよびHRPは、さまざまなCLおよびBL反応によって定量される二種類の好ましい酵素標識である。例えば、APは、アダマンチル1,2-ジオキセタンアリアルリン酸基質(例えばAMP PDまたはCSPD; [Kricka, L. J., "Chemiluminescence and Bioluminescence, Analysis by," at p. 167, Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (ed. R. A. Meyers) (VCH Publishers; N. Y., N. Y.; 1995)]; 好ましくは4-メトキシ-4-(3-リン酸フェニル)スピロ[1,2-ジオキセタン-3,2'-アダマンタン]の二ナトリウム塩とエンハンサー分子ありまたは無しで、好ましくは二塩化1-(トリオクチルホスホニウムメチル)-4-(トリブチルホスホニウムメチル)ベンゼンといった基質と共に使用されうる。HRPは好ましくは、2',3',6'-トリフルオロフェニルS-メトキシ-10-メチルアクリダン-9-カルボキシラートといった基質と共に使用される。

20

【0052】

CLおよびBL反応は、酵素のだけでなく、他の基質、補助因子、阻害因子、金属イオンなどの分析にも適用されうる。例えば、ルミノール、ホタルルシフェラーゼ、および海産細菌ルシフェラーゼ反応は、それぞれ過酸化、ATP、およびNADPHの産生または消費の指標反応である。それらは、オキシダーゼ、キナーゼ、およびデヒドロゲナーゼを含む他の反応とカップリングでき、およびカップリングされた反応の任意の成分(酵素、基質、補助因子)を測定するために使用されうる。

30

【0053】

検出可能なマーカーは、本発明の検定法に使用される抗体と、直接的にまたは間接的に結合されうる。検出可能な標識の典型的な間接的結合は、抗体とマーカーとの間の結合対の使用、またはシグナル増幅系の使用である。

【0054】

本発明の検定法の抗体を検出可能なマーカーと結合するために使用されうる典型的な結合対は、ビオチン/アビジン、ストレプトアビジン、または抗ビオチン;アビジン/抗アビジン;チロキシン/チロキシン結合グロブリン;抗原/抗体;抗体/抗抗体;糖/レクチン;ハプテン/抗ハプテン抗体;色素および疎水性分子/疎水性タンパク質結合部位;酵素阻害因子、補酵素または補助因子/酵素;ポリ核酸/相同なポリ核酸配列;フルオレセイン/抗フルオレセイン;ジニトロフェノール/抗ジニトロフェノール;ビタミンB12/内因子;コルチゾン、コルチゾール/コルチゾール結合タンパク質;および特異的受容体タンパク質のリガンド/膜結合特異的受容体タンパク質である。本発明に記載の好ましい結合対は、ビオチン/アビジンまたはストレプトアビジン、より好ましくはビオチン/ストレプトアビジンである。

40

50

【 0 0 5 5 】

標識を直接的にまたは間接的に抗体へ結合するためのさまざまな手段が本分野で公知である。例えば、標識は共有的にまたは非共有的に結合されうる。典型的な抗体複合体化方法は： A v a r m e a s e t a l . , S c a n . J . I m m u n o l . , 8 (S u p p l . 7) : 7 (1 9 7 8) ; B a y e r e t a l . , M e t h . E n z y m o l . , 6 2 : 3 0 8 (1 9 7 9) ; C h a n d l e r e t a l . . J . I m m u n o l . M e t h . , 5 3 : 1 8 7 (1 9 8 2) ; E k e k e a n d A b u k n e s h a , J . S t e r o i d B i o c h e m . . 1 1 : 1 5 7 9 (1 9 7 9) ; E n g v a l l a n d P e r l m a n n , J . I m m u n o l . , 1 0 9 : 1 2 9 (1 9 7 2) ; G e o g h e g a n e t a l . , I m m u n o l . C o m m . , 7 : 1 (1 9 7 8) ; および W i l s o n a n d N a k a n e , I m m u n o f l u o r e s c e n c e a n d R e l a t e d T e c h n i q u e s , p . 2 1 5 [E l s e v i e r / N o r t h H o l l a n d B i o m e d i c a l P r e s s ; A m s t e r d a m (1 9 7 8)] に記載されている。

10

標識の性質に応じて、標識を検出および定量するためにはさまざまな方法が使用される。蛍光物質については、多数の蛍光光度計が利用可能である。化学発光物質については、ルミノメーターまたはフィルムが利用可能である。酵素については、蛍光、化学発光、または着色産物が、蛍光光度計、ルミノメーター、分光光度計、または目視によって判定または測定されうる。

【 0 0 5 6 】

20

アクリジニウム、ベンズアクリジニウム、またはアクリダン型のヘテロ環系を有するさまざまな種類の化学発光化合物が好ましい標識である。アクリジニウムおよびベンズアクリジニウムエステルは現在より好ましい化学発光化合物であり、好ましいアクリジニウムエステルは、ヘテロ環または、本分野でよく知られている通り、アクリジニウム、ベンズ [a] アクリジニウム、ベンズ [b] アクリジニウム、ベンズ [c] アクリジニウム、ベンズイミダゾールカチオン、キノリニウム、イソキノリニウム、キノリジニウム、環置換キノリニウム、フェナントリジニウム、およびキノキサリニウムといった環系を含む正の酸化状態にあるヘテロ原子を含む環系を有する化合物を含む。

【 0 0 5 7 】

トレーサーは、例えば W e e k s e t a l . , C l i n i c a l C h e m i s t r y , 2 9 (8) , 1 4 7 4 - 1 4 7 9 , (1 9 8 3) のように当業者によく知られている通り、アクリジニウムまたはベンズアクリジニウムエステル上に存在する反応性官能基を、選択された抗体へ直接的または間接的に結合することによって調製されうる。特に好ましい化合物は、アリール環脱離基およびアリール環のパラまたはメタ位に存在する反応性官能基を有するアクリジニウムおよびベンズアクリジニウムエステルである。[米国特許第 4 , 7 4 5 , 1 8 1 号明細書および国際公開第 9 4 / 2 1 8 2 3 号パンフレットを参照。]

30

R a s 指向治療

ここでは、「 r a s 指向治療」は、 r a s 経路を標的とする任意の治療を含み、 r a s タンパク質発現の阻害（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）、 r a s 活性化に必須の膜局在化の妨害（ r a s ファルネシル化阻害因子）、または r a s の下流エフェクターの阻害（例えば、 R a f セリン / スレオニンキナーゼ）を含む。好ましい r a s 指向治療は、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害因子（ F T I ）、チロシンキナーゼ阻害因子、またはビスアリール尿素を含む。典型的な F T I は、 B M S - 2 1 4 6 6 2 [イミダゾール含有非ペプチドミメティック F T I ; C o r t e s e t a l . , J . C l i n . O n c o l , 2 3 (1 2) : 2 8 0 5 - 2 8 1 2 (A p r i l 2 0 , 2 0 0 5) ; B r i s t o l - M y e r s S q u i b b , P r i n c e t o n , N J (U S A)] 、 F T I - 2 1 5 3 および F T I - 2 7 7 [E M D B i o s c i e n c e s , w w w . e m d b i o s c i e n c e s . c o m (C a t . N o . 3 4 4 4 5 5 5) ; L e r n e r e t a l . (1 9 9 5) ; S u n e t a l . , C a n c e r R e s . . 5 9 :

40

50

4919-4926 (1999)]、R115777 [メチルキノロン; Janssen Research Foundation, Titusville, NJ (USA)]、および Sch66336 [Sarasar (登録商標) または Lonafami b (登録商標); ベンゾシクロヘプタピリジルFTI; Taveras et al., Curr. Topics Med. Chem., 3(10): 1103-1114 (June 2003); Schering Plough, Kenilworth, NJ (USA)]である。

【0058】

典型的なチロシンキナーゼ阻害因子はAZD3049である [プレニルトランスフェラーゼ阻害因子; AstraZeneca, www.astrazeneca.com]。rasの典型的なアンチセンス阻害因子はISIS2503である [ISIS Pharmaceuticals, Inc., Carlsbad, CA (USA)]。[rasを、またはrasから下流の関連するエフェクターを標的とする他のras指向治療については、例えば、http://www.webtie.org/sots/html/LungAgents.htmも参照。]

本発明に記載の好ましいras指向治療は、酵素Rafキナーゼを阻害する低分子であるビスアリアル尿素ソラフェニブ (BAY43-9006) である [Onyx Pharmaceuticals, Richmond, CA (USA), および Bayer Corporation, West Haven, CT (USA); Lyons et al., Endocrine-Related Cancer, 8:219-225 (2001) および Wilhelm et al. (2004)]。ソラフェニブは、細胞増殖を阻害するRAF/MEK/ERK [MEK:MAP/ERKキナーゼ; ERK:細胞外シグナル関連キナーゼ]シグナル伝達経路、および腫瘍血管新生を阻害するVEGFR-2/PDGFR-シグナル伝達経路の両方を標的とする。ソラフェニブはそのため、活性化ras経路および活性化VEGFR-2/PDGFR-シグナル伝達経路を有することがわかった患者のための、特に好ましい抗癌治療となる。

【実施例】

【0059】

下記の実施例は説明のみを目的とし、およびいかなる方法でも本発明を限定しないことが意図される。

【0060】

材料および方法

ヒト血清および血漿のための固相サンドイッチマイクロタイターELISA

試料調製 ras p21 ELISAによる分析に適した試料は、ヘパリン、クエン酸、またはEDTAで処理されたヒト血漿、およびヒト血清を含む。可能な干渉因子のため、ヒト血清および血漿の調製および検定には特別の注意を払わなければならない。希釈前に微量遠心分離によって、いかなる凝集物質も試料から除去されるべきである。試験すべき血清または血漿標本の初濃度は濃度50% (標本の試料希釈剤での1:2希釈)を超えない。例えば、試料0.150mlは試料希釈剤0.150mlで希釈でき、および100μlをマイクロプレートウェルへ加える。

【0061】

典型的な検定手順

精製 Ras 17 Mabs [ATCCへHB10054として寄託されたRas 17ハイブリドーマから分泌された]は1μg/mlヘコーティング緩衝液 (0.03M無水炭酸ナトリウムおよび0.07M炭酸水素ナトリウム、pH9.6)で希釈され、および96ウェルマイクロプレート [Nunc MaxiSorp (商標) F8 Immuno Module, Part #1001; Nalge Nunc International Corp., Naperville, IL (USA)]のウェルへ吸着される (ウェル当たり100μlにて)。吸着は一夜 (少なくとも12時間) 室温にて (20 ~ 27) 実施される。インキュベーション期間の終了時に、ブロッキング溶液をウェルに加え (0.

10

20

30

40

50

0.02 Mリン酸二水素ナトリウム、0.008 Mリン酸水素二ナトリウム七水和物、0.15 M塩化ナトリウム、0.29 MベータD-ラクトースおよび2% BSA試薬グレード; pH7.45) およびOyster Bayマイクロプレートコーター (Model MPC S-3) [Oyster Bay Pump Works, Hicksville, N.Y. (USA)] を用いて吸引した。コーティングされたマイクロプレートはLyostar (登録商標) Freeze-Dryer [FTS Systems, Stone Ridge, N.Y. (USA)] を用いて22 ℃にて乾燥しおよび2~8 ℃にて保存した。

【0062】

ヒト血清試料およびras p21標準 [Invitrogen Corporation, Catalog # P2138; Carlsbad, CA (USA)] は試料希釈剤 [4% BSAプロテアーゼフリー (Serologicals Product # 82-045; www.serologicals.com)、10 µg/ml精製マウスIgG (Scantibody Laboratories Product # 3BM222; Santel, CA, USA) および0.09%アジ化ナトリウム] を用いて連続希釈する。ヘパリン、クエン酸、またはEDTAで処理した血漿試料を血清の代わりに使用しうる。希釈試料を次いでマイクロプレートウェルに加え(ウェル当たり100 µl)、および密閉したプレートを3時間37 ℃にてインキュベートする。各ウェルをウェル当たり300 µlのプレート洗浄液pH7.4 [0.137 M塩化ナトリウム、2.7 mM塩化カリウム、1.45 mMリン酸二水素カリウム、0.08 Mリン酸水素二ナトリウム七水和物、および0.05% Tween 20] で6回洗浄する。各ウェルへ次いで、検出希釈剤 [0.4% カゼイン、1.7 mMリン酸二水素ナトリウム、8.1 mMリン酸水素二ナトリウム七水和物、0.15 M塩化ナトリウム、および0.1%アジ化ナトリウム、pH7.15 ± 0.1] で希釈された100 µlのビオチン化Ras10.2 Mab [その親ハイブリドーマRas10はATCCにHB9426として寄託されている] を添加する (Mab終濃度0.5~3.5 µg/ml; 検出Mabの力価測定および機能試験によって決定された最適濃度)。

【0063】

プレートを30分間室温にてインキュベートする。各ウェルを上記の通り6回洗浄し、および複合体希釈剤 [1.7 mMリン酸二水素ナトリウム、8.1 mMリン酸水素二ナトリウム七水和物、0.145 M塩化ナトリウム、0.1% 2-クロロアセトアミド、1% BSAプロテアーゼフリー、および0.05% Tween 20; pH7.3] で1 µg/ml以下に希釈された100 µlのストレプトアビジン-HRP [Zymed Laboratories, Inc., Catalog # 43-8323; www.zymed.com] を各ウェルに加える。プレートを室温にて30分間インキュベートする。各ウェルを再び上記の通り6回洗浄し、および100 µlの発色基質溶液 [TMBブルー基質、DakoCytomation, Catalog # S1601; www.dakocytomation.com] を各ウェルに加えて、結合したペルオキシダーゼ活性を検出する。プレートを30分間室温にてインキュベートし、および反応を2.5 N硫酸100 µlの添加によって停止する。吸収は450 nmにてMolecular Devices分光光度プレートリーダー (Model # Vmax; www.moleculardevices.com) を用いて測定し、およびSoftmax Pro (商標) (Molecular Devices Corporation; www.moleculardevices.com) ソフトウェアプログラムを用いて分析する。

【0064】

ヒト血清および血漿試料正常ヒトおよび癌患者由来の冷凍血漿および血清試料はBioclinical Partners, Inc. [Franklin, MA (USA)]; 現在はZeptomatrix (www.zeptomatrix.com) から入手した。

【0065】

10

20

30

40

50

実施例 1

R a s 標準曲線

定量的分析は、H a r a s p 2 1 [組み換え野生型 r a s p 2 1、Invitrogen Corporation, Catalog # P 2 1 3 8] を用いて標準曲線を作成することによって行った。図 1 は、さまざまな濃度の H a - r a s p 2 1 タンパク質を固定化抗 p 2 1 汎反応性モノクローナル抗体 R a s 1 7 と反応させることによって、および捕捉された r a s p 2 1 タンパク質をビオチン化抗総 p 2 1 モノクローナル抗体 R a s 1 0 . 2 を用いて検出することによって作成された標準曲線を示す。イムノアッセイ手順は材料および方法で上述した通りであった。

【 0 0 6 6 】

10

実施例 2

正常ヒト血清

マイクロプレートウェルを、上記の通り、抗総 r a s p 2 1 捕捉抗体 (M a b R a s 1 7) でコーティングした。計 8 2 検体の正常ヒト血清 (女性 4 2 名、男性 4 0 名 ; B i o c l i n i c a l P a r t n e r s , I n c . から入手) を個別に、コーティングされたマイクロプレートで E L I S A によって検査し、および血清中に存在する r a s p 2 1 をビオチン化 R a s 1 0 . 2 モノクローナル抗体を用いて検出した。4 5 0 n m での吸収度を用いて、血清試料中の総 r a s p 2 1 のレベルを測定した。結果は、一般的に、正常男性よりも正常女性でより高いレベルの総 r a s p 2 1 タンパク質がみられたことを示した (平均は女性で 1 2 2 . 4 p g / m l に対して男性で 3 3 . 1 p g / m l) 。

20

【表 1 - 1】

表 1 : 正常者由来一点血清試料

正常女性 血清試料		正常男性 血清試料	
試料	Ras p21 (pg/mL)	試料	Ras p21 (pg/mL)
3666	204.4	3552	54.3
3668	148.4	3553	54.5
3669	119.7	3554	73.9
3670	137.5	3555	40.6
3671	235.6	3556	36.2
3672	134.8	3557	46.3
3673	223.0	3558	41.9
3674	146.8	3559	37.0
3675	91.6	3560	2.2
3676	75.2	3561	7.0
3677	100.7	3562	5.0
3678	337.9	3563	5.6
3679	99.7	3564	0.8
3680	303.8	3565	1.5
3681	136.5	3566	5.4
3682	76.1	3567	2.0
3683	64.6	3568	4.6
3684	80.6	3569	6.4
3685	168.1	3570	4.0
3686	85.9	3571	10.3
3687	120.2	3572	1.1
3688	138.9	3573	98.8
3689	127.0	3574	3.7
3690	57.6	3575	4.8
3691	68.0	3576	35.9
3692	49.4	3577	37.6
3693	183.1	3578	5.4
3694	50.1	3579	10.8
3695	62.5	3580	5.0
3696	49.2	3581	5.1
3697	48.6	3582	4.7
3698	59.1	3583	3.5
3699	68.8	3584	4.4
3700	63.6	3585	8.9
3701	395.1	3586	10.6
3702	49.7	3587	16.5
3703	47.6	3588	6.6
3704	60.8	3589	19.3
3705	56.4	3590	453.1
3706	62.8	3591	150.5
3707	228.0		

10

20

30

40

【表 1 - 2】

表 1 の要約

正常者血清中 RAS レベル (pg/ml)					
性別	N	範囲	平均	平均+2SD	95% が下記の値未満
男性	40	ND - 453.1	33.1	182.5	101.4
女性	41	ND - 395.1	122.4	289.7	303.8

10

実施例 3

血漿対血清

16 検体の対応する正常ヒト血清および血漿試料について、材料および方法は上述の通りで、総 r a s p 2 1 タンパク質レベルを E L I S A によって測定した。血漿レベルは、下記の表 2 で示す通り、血清レベルより平均して約 24% 高かった。

【表 2】

表 2

対応する正常者血清/血漿 (pg/ml)			
試料番号	血漿	血清	%差
1602	166.659	146.964	11.8
1603	131.963	121.974	7.6
1604	111.289	87.124	21.7
1605	116.629	87.124	25.3
1606	171.328	102.398	40.2
1607	167.74	102.398	39.0
1608	178.863	106.667	40.4
1609	477.954	147.325	69.2
1610	147.328	140.53	4.6
1611	149.834	85.351	43.0
1612	154.124	127.678	17.2
1613	73.658	79.324	-7.7
1614	116.634	110.937	4.9
1615	125.182	117.341	6.3
4029	256.486	160.924	37.3
4031	132.319	98.486	25.6
平均	167.37	113.91	24.14
SD	91.9	25.0	19.8

20

30

40

【0067】

実施例 4

検定法の特徴

ヒト血清または血漿中の総 r a s p 2 1 についての E L I S A アッセイ法の感度、特異性、精度および並列性が特徴づけられた（全ての場合で、M a b R a s 1 7 を捕捉抗体として、および M a b R a s 1 0 . 2 を検出抗体として使用）。

【0068】

1. 分析感度

分析物の最小検出可能濃度を、ゼロ用量試料（標準レベル 1）の反復測定および平均 + 2 標準偏差の計算によって決定した。r a s E L I S A アッセイ法は総 r a s p 2 1 タ

50

ンパク質 4.6 ピコグラム / ml を検出する。

【0069】

2. 特異性

交差反応性：Rab3A、Rac-1、およびRanは、Gタンパク質ファミリーの他のメンバーである。Oncogene Science RAS p21 ELISAを、高レベルの各分析物で検証した。Rab-3Aだけが最小限の1.22%にていくらかの交差反応性を示した。

【0070】

3. 精度

分析間精度：ヒト試料中の総ras p21タンパク質を測定するための本ELISA検査の再現性を、別の時での同一血清の反復検査によって確認した(表3)。正常ヒト血清および血漿に組み換え野生型ras p21 [Invitrogen]を三つの異なる濃度で添加し、および8回の分析で、各回当たり8連で試験した。分析間変動は10.0%以下であった。

【表3】

表3
分析間精度

	高	中	低
n	64	64	64
血清平均 (pg/ml)	472.9	320.0	115.7
血漿平均 (pg/ml)	371.3	167.8	71.5
血清分析間 %CV	7.1	8.6	10.0
血漿分析間 %CV	8.7	7.5	8.0

【0071】

分析内精度：正常ヒト血清および血漿にras p21タンパク質を三つの異なる濃度で添加し、および8回の分析で、各回当たり8連で試験した。平均分析内変動は7%未満であった(表4)。

【表4】

表4
分析間精度

	高	中	低
n	64	64	64
血清平均 (pg/ml)	472.9	320.0	115.7
血漿平均 (pg/ml)	371.3	167.8	71.5
血清分析間 %CV	5.8	6.6	6.9
血漿分析間 %CV	6.5	6.0	6.6

【 0 0 7 2 】

4 . 並列性

添加血清および血漿試料を最初に 1 : 2 希釈し、続いて 2 倍希釈を作製し、および全ての希釈を r a s p 2 1 E L I S A で試験した。各希釈についての回収率 (p g / m l) は適当な希釈係数で補正して計算した。結果は、試料希釈剤で希釈した添加血漿および血清試料は r a s p 2 1 タンパク質の正確な回収を結果として生じることを示す (表 5)

【 表 5 】

表 5
並列性

希釈	血漿 (EDTA)		血清	
	OD	pg/ml	OD	pg/ml
1:2	1.516	485.909	1.707	549.869
1:4	0.869	538.608	0.937	554.674
1:8	0.496	577.219	0.470	564.503
1:16	0.264	534.753	0.237	524.047
希釈	血漿 (クエン酸)		血漿 (ヘパリン)	
	OD	pg/ml	OD	pg/ml
1:2	1.728	556.734	1.689	543.841
1:4	0.932	580.448	0.883	547.645
1:8	0.475	549.780	0.455	522.341
1:16	0.279	573.564	0.262	529.400

【 0 0 7 3 】

実施例 5

正常血清由来連続試料中の r a s レベル

正常者 15 名 (男性 13 名、女性 2 名) 由来の連続血清試料について、材料および方法は上述の通りで、E L I S A によって総 r a s p 2 1 レベルを測定した。一般的に、試料は少なくとも 3 週間間隔で採取された。

10

20

30

【表 6 - 1】

表 6

正常者由来連続試料 (Ras レベル)

試料	Ras p21 (pg/mL)	採血日	性別
3651-1	159.0	5/20/2001	男性
3651-2	221.1	6/12/2001	
3651-3	141.3	7/14/2001	
3652-1	50.6	3/20/2001	男性
3652-2	56.0	5/8/2001	
3652-3	58.8	6/19/2001	
3653-1	246.7	1/12/2001	男性
3653-2	560.0	4/4/2001	
3653-3	244.4	9/17/2001	
3654-1	113.9	1/5/2001	男性
3654-2	127.9	1/31/2001	
3654-3	170.2	2/21/2001	
3654-4	126.7	9/6/2001	
3655-1	101.0	3/22/2001	男性
3655-2	99.6	5/9/2001	
3655-3	132.3	6/7/2001	
3656-1	150.3	5/30/2001	男性
3656-2	109.4	8/29/2001	
3656-3	109.7	9/12/2001	
3657-1	153.8	5/7/2001	男性
3657-2	122.3	6/6/2001	
3657-3	100.7	7/10/2001	
3658-1	75.8	4/17/2001	男性
3658-2	74.0	5/18/2001	
3658-3	70.8	6/21/2001	
3658-4	79.0	9/13/2001	
3659-1	82.7	7/6/2001	男性
3659-2	109.2	8/19/2001	
3659-3	99.7	9/24/2001	
3660-1	96.3	9/23/2001	男性
3660-2	146.3	10/16/2001	
3660-3	115.0	11/21/2001	
3661-1	172.0	8/7/2001	男性
3661-2	179.1	8/30/2001	
3661-3	149.5	10/10/2001	
3662-1	130.6	9/11/2001	男性
3662-2	116.7	10/1/2001	
3662-3	154.3	12/3/2001	

10

20

30

40

【表 6 - 2】

試料	Ras p21 (pg/mL)	採血日	性別
3663-1	75.5	8/22/2001	男性
3663-2	167.4	9/20/2001	
3663-3	124.2	10/24/2001	
3664-1	67.6	5/9/2000	女性
3664-2	69.7	7/11/2000	
3664-3	40.2	8/9/2000	
3664-4	105.5	7/11/2001	
3665-1	86.4	3/13/2001	女性
3665-2	121.4	4/25/2001	
3665-3	86.1	6/20/2001	

10

実施例 6

結腸癌患者における一点および連続 R a s レベル

R a s は全ての癌の約 20%、特に結腸および膵臓癌で変異している。変異または過剰発現によって活性化された r a s 経路は総 r a s p 2 1 タンパク質のレベル上昇を結果として生じるといふ本発明の仮説に基づき、結腸癌患者由来の血清 48 検体について、総 r a s p 2 1 レベルを測定した(表 7)。結腸癌患者由来の少なくとも 4 検体の血清(試料 # 2004、# 2065、# 2784 および # 2785)が極めて高い総 r a s p 2 1 レベルを示した。

20

【表7】

表7
結腸直腸癌患者一点血清試料 (Ras レベル)

試料	ステージ	グレード	状態	Ras p21 (pg/mL)
2000	C2	G3	Prog	135.09
2001	C1	3	Stab	62.86
2002	D	G4	Recur	57.86
2003	C1	3	Prog	75.80
2004	C2	G2	Recur	1147.18
2005	B2	G1	NED	24.00
2006	B2	G1	Prog	38.39
2007	C1	4	P. Resp	39.44
2008	C2	G3	Prog	121.38
2010	C2	3	Prog	65.14
2011	C2	3	Prog	105.74
2012	C2	3	Stab	40.04
2013	D	4	Prog	118.44
2014	C1	4	P. Resp	57.85
2015	C2	3	P. Resp	98.02
2016	D	G3	Prog	53.02
2017	D	4	Prog	113.46
2019	C2	3	Prog	61.04
2020	C1	G1	Prog	49.69
2021	D	G3	Prog	43.51
2022	C1	G1	Prog	84.97
2025	D	G4	Prog	96.02
2026	C2	G2	P. Resp	54.98
2027	D	G3	Recur	47.42
2028	B2	G2	Stab	73.05
2030	C1	G1	P. Resp	70.46
2034	D	G3	P. Resp	76.25
2035	C1	G1	Prog	64.53
2036	III	2	NED	38.24
2038	III	2	NED	38.24
2052	III	2	NED	69.24
2054	IV	2	Prog	150.49
2055	IV	3	Stab	56.65
2056	III	2	NED	158.35
2057	III	2	Prog	137.91
2058	IV	3	Prog	90.18
2059	IV	3	Stab	48.03
2061	IV	Unk	Stab	198.64
2064	IV	4	Prog	107.74
2065	IV	4	Prog	319.91
2066	IV	4	Prog	138.55
2772	III	Unk	Unk	62.2
2773	III	Unk	Unk	157.8
2778	III	Unk	Unk	92.8
2781	III	Unk	Unk	209.4
2784	III	Unk	Unk	664.9
2785	III	Unk	Unk	1032.2
2786	III	Unk	Unk	137.5

10

20

30

40

【0074】

しかし、総ras p21タンパク質における連続変化は、一点検定法よりも、前腫瘍 / 腫瘍疾患のより有用な指標でありうる。ras p21のレベル上昇は、結腸直腸癌再

50

発または進行を示す可能性があり、および従来の治療または r a s 経路を標的とする治療のどちらかで治療されるべき患者を特定しうる。r a s 腫瘍性タンパク質のレベル上昇は、他の腫瘍学検査、例えば癌胎児性抗原 (C E A) と併用されうる。

【 0 0 7 5 】

表 8 に示す通り、結腸癌患者 7 名に由来する連続血清試料について、材料および方法に記載の E L I S A イムノアッセイ形式を用いて、総 r a s p 2 1 レベルを測定した。ステージ I V 結腸癌を有する特定の患者 1 名において、発明者らは下記の観察を行った： r a s レベルは最初は相対的に安定に留まったが (表 8 、 試料 # 3 7 6 6 - 2 から # 3 7 6 6 - 4) 、しかし癌が進行するにつれ、 r a s レベルは 6 9 p g / m l へ、および次いで 1 2 4 p g / m l へ上昇した。その患者は従来の治療を受けていた一方、癌の進行を示した。本発明のイムノアッセイはしたがって、 r a s 発癌遺伝子経路またはその経路の成分を特異的に阻害することを標的とする治療に反応しうる、従来の治療に反応していない患者を特定するために使用されうる。本発明のイムノアッセイはまた、 r a s 経路を標的とする治療に対する反応または反応の欠如を監視するために使用されうる。

10

【 0 0 7 6 】

別の一例は、 r a s p 2 1 レベルが最初は相対的に安定に留まったステージ I I 結腸癌患者のものである (表 8 、 試料 # 3 7 6 7 - 1 から # 3 7 6 7 - 4) 。癌が進行するにつれ、しかし (試料 # 3 7 6 7 - 5 および # 3 7 6 7 - 6) 、 r a s レベルは 1 4 2 p g / m l へ上昇し、および 9 5 p g / m l で高値に留まった一方、患者の C E A レベルは正常の 1 . 8 n g / m l へ低下した。この患者の例で示される通り、 C E A は増悪に直面して減少した一方、 r a s レベルは上昇し、そのパターンは増悪と合致する。 r a s のレベル上昇はしたがって、 r a s 阻害因子治療に適する患者、または r a s 発癌遺伝子経路を阻害するように特に標的化された治療に反応しうる従来の治療に反応していない患者を特定するために使用されうる。

20

【表 8】

表 8

結腸癌患者由来連続血清試料 (Ras p21 レベル)

試料	Ras p21(pg/mL)	CEA (ng/mL)
3766-2	59.4	
3766-3	43.7	
3766-4	52.8	
3766-5	69.3	
3766-6	124.8	
3767-1	39.1	9.1
3767-2	46.5	6.5
3767-3	51.2	8.7
3767-4	38.5	6.4
3767-5	142.1	1.8
3767-6	95.6	1.8
3768-1	50.1	3.8
3768-2	76.8	4.5
3768-3	53.4	2.9
3768-4	62.7	2.5
3768-5	63.3	2.7
3768-6	103.3	2.8
3769-1	133.3	
3769-2	100.1	< 0.7
3769-3	83.4	< 0.7
3769-4	81.6	0.8
3769-5	75.4	
3769-6	87.1	< 0.7
3770-1	81.6	6.8
3770-2	97.5	7.4
3770-3	92.7	7.5
3770-4	61.5	9.2
3770-5	93.1	10.0
3770-6	117.0	10.0
3771-1	43.5	26.7
3771-2	70.8	50.1
3771-3	50.9	81.0
3771-4	44.5	171.6
3771-5	41.3	368.7
3771-6	94.7	699.6
3772-1	74.0	1.8
3772-2	50.8	5.8
3772-3	154.8	7.1
3772-4	50.2	
3772-5	83.4	
3772-6	158.0	20.0

10

20

30

40

【 0 0 7 7 】

実施例 7

ステージ I / ステージ II 乳癌における Ras p21 血清レベル

50

R a s p 2 1 は乳癌の 5 0 ~ 6 0 % で過剰発現されている。転移性乳癌 (M B C) 患者における循環 r a s 腫瘍性タンパク質の治療前の上昇したレベルは、従来の治療または標的化抗 r a s 治療に適した患者を示しうる。

【 0 0 7 8 】

加えて、乳癌患者における r a s p 2 1 単独のレベル上昇または低下は、または H E R - 2 / n e u のレベルと併せて、再発乳癌の早期指標でありうる。転移性乳癌 (M B C) 患者における r a s または H E R - 2 / n e u 腫瘍性タンパク質の、治療前の上昇した循環レベルは、抗 r a s および / または抗 H E R - 2 / n e u 治療、従来の治療または標的化治療に適した患者を示しうる。

【 0 0 7 9 】

表 9 は、ステージ I またはステージ II 乳癌患者由来の単一血清試料のイムノアッセイ (材料および方法で記載の通り) でみられる総 r a s p 2 1 レベルを示す。個別の乳癌患者は、 1 0 0 ~ 2 0 0 p g / m l 範囲にある正常レベルと比較して高い総 r a s p 2 1 レベルを示す。数名の患者は 2 6 0 0 ~ 2 8 0 0 p g / m l 範囲の極めて高い r a s p 2 1 レベルを示す (例えば、試料 # 1 3 2 3、 # 1 3 5 7 および # 1 4 3 2 を参照)、

【表 9】

表 9

ステージ I / II 乳癌患者一点血清試料 (Ras p21 レベル)

ステージ I 乳癌血清		ステージ II 乳癌血清	
試料	Ras p21 (pg/mL)	試料	Ras p21 (pg/mL)
1318	312.9	1406	99.6
1320	471.8	1407	113.3
1321	2642.0	1408	171.0
1322	53.0	1409	82.6
1323	2646.0	1410	76.2
1324	2648.0	1411	140.2
1325	45.2	1412	53.5
1326	60.0	1413	83.6
1327	45.2	1414	207.6
1328	324.6	1415	76.7
1330	2660.0	1416	291.3
1332	66.9	1417	0.0
1333	74.5	1418	50.5
1334	106.8	1419	114.7
1335	89.6	1420	2840.0
1336	2672.0	1421	2842.0
1337	2674.0	1422	59.2
1338	90.4	1423	59.0
1339	56.3	1424	106.3
1340	97.7	1425	110.4
1341	66.9	1426	51.0
1342	54.2	1427	51.0
1343	50.3	1428	2856.0
1344	65.1	1429	138.5
1345	295.9	1430	52.9
1346	77.2	1431	2862.0
1348	61.5	1432	2864.0
1349	261.6	1433	44.9
1350	40.3	1434	63.0
1351	2702.0	1435	159.4
1352	62.8	1436	111.7
1353	56.8	1437	52.8
1354	2708.0	1438	77.5
1355	50.5	1439	74.5
1356	44.3		
1357	2714.0		
1358	2716.0		
1359	2718.0		
1362	101.6		
1365	232.4		
1366	181.0		
1367	85.1		

【 0 0 8 0 】

実施例 8

ヒト血清における R a s および T I M P - 1 の同時発現

r a s p 2 1 レベルを他の腫瘍関連タンパク質と組み合わせて測定することは、特定の癌についての治療の選択を支援しうる。例えば、r a s および r a s の上流のタンパク質の両方のレベルを測定することによって、活性化 r a s 経路に関連する腫瘍疾患に最も

10

20

30

40

50

適した治療を決定しうる。

【0081】

一つのそのような上流タンパク質がTIMP-1(メタロプロテイナーゼ-1組織阻害因子)である。TIMP-1は大部分の組織および体液でみられる多機能タンパク質である;TIMP-1はマトリクスメタロプロテアーゼのタンパク質分解活性を阻害し、およびそれによって癌浸潤を妨げる。しかし、TIMP-1はまた、アポトーシスの阻害、悪性形質転換の誘導および細胞増殖の刺激といった他の機能を有し、および見かけ上rasを活性化する。TIMP-1は結腸直腸癌患者由来の血液中で上昇しており、および高いTIMP-1レベルは悪い予後を予測する[38]。rasおよびTIMP-1の両方のレベルを監視することは、癌患者のための治療選択、治療に対する応答または応答の欠如、および腫瘍進行が起こっているか否か判定するための貴重な情報を提供する。

10

【0082】

結腸直腸癌患者におけるras p21およびTIMP-1の連続試料は、標的化治療(rasおよび/またはTIMP-1への)に対する反応を予測または監視するために有用でありうる。また、従来抗癌治療に対する反応を予測するためにrasおよびTIMP-1を測定する有用性もありうる。

【0083】

治療前の上昇したras p21およびTIMP-1レベルは、rasおよび/またはTIMP-1タンパク質を阻害することを意図する医薬を用いた治療のために患者を選択するのに、またはそのような医薬での治療に対する患者反応を予測するのに使用されうる。そのような治療は、例えばrafキナーゼといったras発癌遺伝子経路のさまざまな成分を阻害する医薬を含み、およびrafキナーゼ阻害因子薬にまたはファルネシルトランスフェラーゼ阻害因子(FTI)に適用されうる。そのような治療はまた、rasに導かれる腫瘍に対する従来治療、またはTIMP-1機能を阻害することを意図する医薬を含む。

20

【0084】

連続正常試料中のRasおよびTIMP-1レベル

正常者対照15名(男性13名、女性2名)由来の連続正常試料について、材料および方法で上述の通り、ELISAによって総ras p21およびTIMP-1レベルを測定した(表10に示す)。一般的に、試料は少なくとも3週間間隔で採取された。正常血清では、総ras p21レベルは50.6 pg/mlないし560 pg/mlで変動した;TIMP-1の正常レベルは167.8 ng/mlないし614.4 ng/mlの範囲であった。

30

【表 10】

表 10

ras p21 および TIMP-1 レベルについて評価した連続正常血清試料

連続正常試料					
試料	Ras p21 (pg/mL)	TIMP-1 (ng/mL)	試料	Ras p21 (pg/mL)	TIMP-1 (ng/mL)
3651-1	159.0	342.9	3659-1	82.7	218.7
3651-2	221.1	368.5	3659-2	109.2	167.8
3651-3	141.3	214.4	3659-3	99.7	247.4
3652-1	50.6	330.7	3660-1	96.3	563.5
3652-2	56.0	395.0	3660-2	146.3	532.1
3652-3	58.8	279.8	3660-3	115.0	614.4
3653-1	246.7	201.4	3661-1	172.0	481.5
3653-2	560.0	192.9	3661-2	179.1	349.5
3653-3	244.4	269.0	3661-3	149.5	309.7
3654-1	113.9	354.7	3662-1	130.6	258.5
3654-2	127.9	324.1	3662-2	116.7	446.4
3654-3	170.2	399.2	3662-3	154.3	261.8
3654-4	126.7	471.9			
3655-1	101.0	465.0	3663-1	75.5	219.6
3655-2	99.6	445.9	3663-2	167.4	195.7
3655-3	132.3	430.8	3663-3	124.2	343.2
3656-1	150.3	368.6	3664-1	67.6	270.3
3656-2	109.4	398.3	3664-2	69.7	279.3
3656-3	109.7	336.2	3664-3	40.2	239.4
			3664-4	105.5	326.3
3657-1	153.8	351.5			
3657-2	122.3	375.3	3665-1	86.4	318.8
3657-3	100.7	238.4	3665-2	121.4	357.0
			3665-3	86.1	411.1
3658-1	75.8	282.3	3665-4		369.5
3658-2	74.0	390.5			
3658-3	70.8	348.0			
3658-4	79.0	346.9			

10

20

30

【0085】

連続結腸癌試料中の Ras p21、TIMP-1 および CEA レベル

表 11 に示す通り、結腸癌患者 7 名から連続的に採取された血清について、材料および方法で上述の通り、ELISA によって総 ras p21 および TIMP-1 レベルを測定した。それらの患者のうち 6 名に由来する血清をまた、CEA についても検定した。

40

【0086】

特定の 1 名のステージ IV 結腸直腸癌患者では (表 11、患者 # 3766)、ras レベルは 59 pg/mL から 125 pg/mL へ上昇し、一方で TIMP-1 レベルは 263 から 703 ng/mL へ上昇した。その患者は従来の治療を受けている一方で増悪を示した。そのデータは、総 ras p21 および TIMP-1 レベルが、そのような結腸直腸癌患者の管理に使用されうることを示唆する。

【表 1 1】

表 1 1

2) ras p21 および TIMP-1 レベルについて評価した連続結腸直腸癌血清試料

試料	Ras p21 (pg/mL)	CEA (ng/mL)	TIMP-1 (ng/mL)	ステージ	グレード	状態
3766-2	59.4		263.2	IV	3	Prog
3766-3	43.7		258.6	IV	3	Prog
3766-4	52.8		323.3	IV	3	Prog
3766-5	69.3		439.1	IV	3	Prog
3766-6	124.8		702.7	IV	3	Prog
3767-1	39.1	9.1	383.4	II	1	Prog
3767-2	46.5	6.5	415.3	II	1	Prog
3767-3	51.2	8.7	423.6	II	1	Prog
3767-4	38.5	6.4	438.2	II	1	Prog
3767-5	142.1	1.8	430.1	II	1	Prog
3767-6	95.6	1.8	534.5	II	1	Prog
3768-1	50.1	3.8	390.2	III	2	Stab
3768-2	76.8	4.5	311.8	III	2	Stab
3768-3	53.4	2.9	409.5	III	2	Stab
3768-4	62.7	2.5	262.7	III	2	Stab
3768-5	63.3	2.7	302.1	III	2	Stab
3768-6	103.3	2.8	290.0	III	2	Stab
3769-1	133.3		212.7	III	1	Stab
3769-2	100.1	< 0.7	197.6	III	1	Stab
3769-3	83.4	< 0.7	219.6	III	1	Stab
3769-4	81.6	0.8	181.5	III	1	Stab
3769-5	75.4		181.8	III	1	Stab
3769-6	87.1	< 0.7	188.6	III	1	Stab
3770-1	81.6	6.8	488.4	III	3	Prog
3770-2	97.5	7.4	527.7	III	3	Prog
3770-3	92.7	7.5	609.9	III	3	Prog
3770-4	61.5	9.2	724.9	III	3	Prog
3770-5	93.1	10.0	1210.8	III	3	Prog
3770-6	117.0	10.0	959.9	III	3	Prog
3771-1	43.5	26.7	208.7	III	3	Prog
3771-2	70.8	50.1	282.2	III	3	Prog
3771-3	50.9	81.0	261.5	III	3	Prog
3771-4	44.5	171.6	322.6	III	3	Prog
3771-5	41.3	368.7	415.3	III	3	Prog
3771-6	94.7	699.6	468.8	III	3	Prog
3772-1	74.0	1.8	265.8	III	2	Prog
3772-2	50.8	5.8	323.5	III	2	Prog
3772-3	154.8	7.1	471.1	III	2	Prog
3772-4	50.2		460.5	III	2	Prog
3772-5	83.4		491.5	III	2	Prog
3772-6	158.0	20.0	490.2	III	2	Prog

ハイブリドーマ細胞株の寄託

A T C C 寄託。下記の材料は現在 1 0 8 0 1 University Boulevard, Manassas, Va., 2 0 1 1 0 - 2 2 0 9 (USA) の American Type Culture Collection (A T C C) に寄託された。寄託は Budapest Treaty on the International Recognition of Deposited Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure and Regulation s thereunder (ブダペスト条約) の規定に基づいて実施した。生存可能な培養の維持は寄託日から 3 0 年間保証されている。該ハイブリドーマおよびプラスミドは、A T C C によってブダペスト条約の条項に基づいて利用可能にされ、および、関連する米国特許の発行に際して一般に対し、寄託されたハイブリドーマおよびその子孫の無制限の利用可能性を保証する、出願者および A T C C の間の合意に支配される。

10

【 0 0 8 8 】

本出願の代理人は、適当な条件下で培養された際に寄託されている材料の培養が死滅または亡失または破棄された場合、通知に際して直ちに別の同一物で材料を差し替えることに合意している：

i. ハイブリドーマ	寄託日	A T C C #
ii. Ras 1 0	1 9 8 7 年 5 月 1 2 日	H B 9 4 2 6
iii. Ras 1 7	1 9 8 9 年 5 月 2 9 日	H B 1 0 0 5 4

20

本発明の前記の実施形態の記載は、説明および記載の目的で提示されている。それらは網羅的であることまたは本発明を開示された正確な形に限定することを意図せず、および上記の教示に照らして明らかに多数の改変および変形が可能である。実施形態は本発明の原理およびその実際の応用を説明し、それによって当業者が本発明をさまざまな実施形態でおよび考えられる特定の使用に適するさまざまな改変と共に利用することが可能になるように選択および記載された。

【 0 0 8 9 】

引用された全ての参考文献は参照により本開示に含まれる。

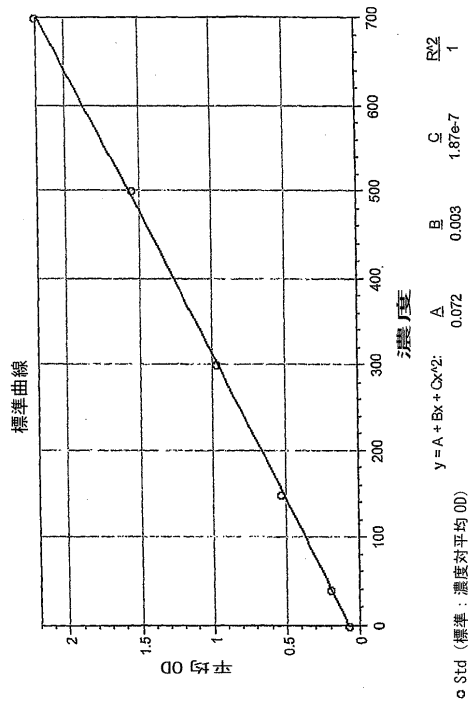
【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 9 0 】

30

【 図 1 】 図 1 は、材料および方法で、および実施例 1 で詳細に記載される r a s p 2 1 E L I S A 1 の、本発明の検定法の好ましい一実施形態において、野生型組み換え r a s p 2 1 標準を 0、4 0、1 5 0、3 0 0、5 0 0 および 7 0 0 p g / m l の 6 種類異なる濃度で反応させることによって作製された標準曲線例である。

【 図 1 】



フロントページの続き

- (72)発明者 カーニー, ウォルター ピー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01845 ノース アンドーヴァー ベイ ステイト
ロード 14
- (72)発明者 ハマー, ピーター ジェイ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01867 リーディング ダドリー ストリート 25
- (72)発明者 ピアース, カレン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01720 アクトン ヒールド ロード 3
- (72)発明者 ブラウン - シマー, シェリル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02188 ボストン ラトランド ストリート 14

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特表平03 - 505250 (JP, A)
特表2003 - 515535 (JP, A)
欧州特許出願公開第00214520 (EP, A1)
国際公開第2005 / 037273 (WO, A1)
特表2002 - 530676 (JP, A)
特表2003 - 520964 (JP, A)
特表2005 - 505303 (JP, A)
特開2005 - 010177 (JP, A)
国際公開第2005 / 013804 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/574
G01N 33/53
G01N 33/577

专利名称(译)	RASP21在体液中的定量测定		
公开(公告)号	JP4693902B2	公开(公告)日	2011-06-01
申请号	JP2008518471	申请日	2006-06-23
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔健康护理有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳医药保健有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	拜耳医药保健有限责任公司		
[标]发明人	カーニーウォルターピー ハマーピータージェイ ピアースカレン ブラウンシマーシェリル		
发明人	カーニー,ウォルター ピー ハマー,ピーター ジェイ ピアース,カレン ブラウン-シマー,シェリル		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/577 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/5748 G01N2333/82 G01N2800/44		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/577.B G01N33/53.U		
代理人(译)	佐久间刚 河野 香 樋口浩		
审查员(译)	三木隆		
优先权	60/694082 2005-06-23 US		
其他公开文献	JP2008547027A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及体液中总ras p21的检测和定量，特别是对照体液中总ras p21水平的连续变化。此外，本发明涉及制备ras的方法它旨在检测和量化p21与一种或多种其他蛋白质，如肿瘤蛋白，血管生成因子，肿瘤标志物，抑制剂，生长因子受体，转移蛋白和肿瘤抑制因子。到。所公开的方法可用于诊断/预测癌前/肿瘤疾病并为患有肿瘤前/肿瘤疾病的患者选择治疗。为了监控肿瘤发生前/肿瘤疾病的状态中的患者，和/或患者所公开的方法进一步处理，以便是有用以监视是否响应如何抗癌疗法。

正常女性 血清試料		正常男性 血清試料	
試料	Ras p21 (pg/ml)	試料	Ras p21 (pg/ml)
3656	204.4	3552	54.3
3658	148.4	3553	54.5
3659	119.7	3554	73.9
3670	137.5	3555	40.6
3671	235.6	3556	36.2
3672	134.8	3557	46.3
3673	223.0	3558	41.9
3674	146.8	3559	37.0
3675	91.6	3560	2.2
3676	75.2	3561	7.0
3677	100.7	3562	5.0
3678	337.9	3563	5.6
3679	99.7	3564	0.8
3680	303.8	3565	1.5
3681	136.5	3566	5.4
3682	76.1	3567	2.0
3683	64.6	3568	4.6
3684	80.8	3569	5.4
3685	168.1	3570	4.0
3686	85.9	3571	10.3
3687	120.2	3572	1.1
3688	138.9	3573	88.8
3689	127.0	3574	3.7
3690	57.6	3575	4.8
3691	68.0	3576	38.9
3692	49.4	3577	37.6
3693	183.1	3578	5.4
3694	59.1	3579	10.6
3695	62.5	3580	5.0
3696	49.2	3581	5.1
3697	49.6	3582	4.7
3698	59.1	3583	3.5
3699	65.8	3584	4.4
3700	53.6	3585	8.9
3701	395.1	3586	10.6
3702	49.7	3587	16.5
3703	47.6	3588	6.6
3704	69.8	3589	19.3
3705	56.4	3590	453.1
3706	62.8	3591	150.5
3707	228.0		