

(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2011-520456

(P2011-520456A)

(43) 公表日 平成23年7月21日(2011.7.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	N 4 B 0 6 3
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D 4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	G O 1 N 33/574	Z
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-509855 (P2011-509855)
 (86) (22) 出願日 平成21年5月20日 (2009. 5. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成23年1月19日 (2011. 1. 19)
 (86) 国際出願番号 PCT/DK2009/050116
 (87) 国際公開番号 W02009/140973
 (87) 国際公開日 平成21年11月26日 (2009. 11. 26)
 (31) 優先権主張番号 PA200800696
 (32) 優先日 平成20年5月20日 (2008. 5. 20)
 (33) 優先権主張国 デンマーク (DK)
 (31) 優先権主張番号 61/054, 944
 (32) 優先日 平成20年5月21日 (2008. 5. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500297502
 ダコ デンマーク アクティーゼルスカブ
 デンマーク国, デーコー-2600 グロ
 ストルップ, プロダクティオンズバイ
 42
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次
 (74) 代理人 100117019
 弁理士 渡辺 陽一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗癌療法に対する応答を予測するための組み合わせ方法

(57) 【要約】

本発明は、癌を有する個体においてトポイソメラーゼ II インヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、該方法は、TOP2AとHER2とを含む染色体17q21上のTOP2A/HER2アンプリコン中のDNAの異常、又はTOP2AとErbB2タンパク質発現の異常の測定と組合せて、TIMP-1 DNA異常/TIMP-1タンパク質異常を測定する工程を含む。さらに、該トポイソメラーゼII インヒビター療法を使用して、癌を治療する方法が提供される。本発明はまた、癌を有する個体においてトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測する方法の応用のためのキットを含む。

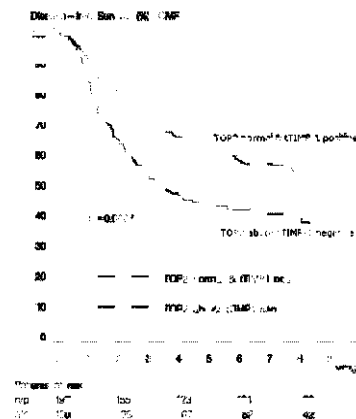


Fig. 3B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌を有する個体においてトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、

a . 該個体から得られた試料で、該試料に含まれる腫瘍細胞中の T I M P - 1 タンパク質の欠如、又は該試料の腫瘍細胞中の T I M P - 1 D N A 異常の存在を測定する工程、

b . 染色体 1 7 q 2 1 上の T O P 2 A / H E R 2 アンプリコン中の染色体 D N A の異常の存在、又は該アンプリコンに含まれる遺伝子の異常タンパク質発現を測定する工程、

c . 染色体 1 7 q 2 1 上の T O P 2 A / H E R 2 アンプリコン中に染色体 D N A 異常が存在する場合、及び / 又は該アンプリコン中に含まれる遺伝子のタンパク質発現が、該腫瘍細胞中で異常な場合、及び / 又は腫瘍細胞に T I M P - 1 タンパク質が欠如している場合、及び / 又は該腫瘍細胞が、 T I M P - 1 遺伝子の対立遺伝子の 1 つ若しくは両方に該 T I M P - 1 D N A 異常を含む場合は、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に
10 応答する可能性が高いと分類する工程、そして

d . T O P 2 A / H E R 2 アンプリコン中に染色体 D N A 異常が存在しないか、又は該アンプリコンに含まれる任意の遺伝子にコードされるどのタンパク質も、腫瘍細胞中で異常に発現されていない場合、及び腫瘍細胞中に T I M P - 1 タンパク質が存在する場合、及び / 又は T I M P - 1 対立遺伝子のいずれも該 T I M P - 1 D N A 異常を含まない場合は、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に
20 応答する可能性が低いと分類する工程、

を含んでなる方法。

【請求項 2】

染色体 1 7 q 2 1 上の T O P 2 A / H E R 2 アンプリコン中の染色体 D N A の異常が、T O P 2 A D N A 異常であり、該アンプリコンに含まれる遺伝子のタンパク質発現が、トポイソメラーゼII 発現であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

染色体 1 7 q 2 1 上の T O P 2 A / H E R 2 アンプリコン中の染色体 D N A の異常が、H E R 2 D N A 異常であり、該アンプリコンに含まれる遺伝子のタンパク質発現が、E r b B 2 発現であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

癌を有する個体のトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、

a . 該個体から得られる試料で、該試料中に含まれる腫瘍細胞中に T I M P - 1 タンパク質が存在しないことを測定する工程、

b . 該試料の腫瘍細胞中に T O P 2 A D N A 異常が存在することを測定する工程、

c . T O P 2 A D N A 異常が存在する場合、及び / 又は腫瘍細胞に T I M P - 1 タンパク質が欠如している場合に、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に
30 応答する可能性が高いと分類する工程、そして

d . T O P 2 A D N A 異常が存在しない場合、及び腫瘍細胞中に T I M P - 1 タンパク質が存在する場合に、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に
40 応答する可能性が低いと分類する工程、

を含んでなる方法。

【請求項 5】

D N A 異常又はタンパク質発現のレベルを測定するために、集団から得られる標準を使用することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

該標準は腫瘍組織間質細胞中に存在する正常な二倍体遺伝子バックグラウンドであることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

T O P 2 A 遺伝子異常は、T O P 2 A D N A 増幅、T O P 2 A D N A 欠失、T O P 2
50

A 遺伝子点突然変異、及びTOP2A DNA 転座、TOP2A DNA の後成的修飾（例えばDNAメチル化）、及びこれらの組合せよりなる群から選択されることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項8】

トポイソメラーゼII タンパク質は、標準試料に対して2倍より多く過剰発現され、例えば標準試料の3倍より多く、例えば4倍より多く、例えば5倍より多く、例えば6倍より多く、例えば7倍より多く、例えば8倍より多く、例えば9倍より多く、例えば10倍より多く、例えば15倍より多く、例えば20倍より多く、例えば30倍より多く、例えば40倍より多く、例えば50倍より多く、例えば100倍より多く過剰発現されることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

10

【請求項9】

TOP2A 遺伝子は、標準試料に対して2倍より多く増幅され、例えば標準試料の3倍より多く、例えば4倍より多く、例えば5倍より多く、例えば6倍より多く、例えば7倍より多く、例えば8倍より多く、例えば9倍より多く、例えば10倍より多く、例えば15倍より多く、例えば20倍より多く、例えば30倍より多く、例えば40倍より多く、例えば50倍より多く、例えば100倍より多く増幅されることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項10】

TOP2A DNA 異常又は腫瘍細胞中のトポイソメラーゼII タンパク質の増加は、該試料の腫瘍細胞中の異常なTOP2A mRNA レベルと相関することを特徴とする、請求項2に記載の方法。

20

【請求項11】

HER2 遺伝子異常は、HER2 遺伝子増幅、HER2 DNA 欠失、HER2 遺伝子点突然変異、及びHER2 DNA 転座、HER2 DNA の後成的修飾（例えばDNAメチル化）、及びこれらの組合せよりなる群から選択されることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

【請求項12】

ErB2 タンパク質は、対照試料に対して2倍より多く過剰発現され、例えば対照試料の3倍より多く、例えば4倍より多く、例えば5倍より多く、例えば6倍より多く、例えば7倍より多く、例えば8倍より多く、例えば9倍より多く、例えば10倍より多く、例えば15倍より多く、例えば20倍より多く、例えば30倍より多く、例えば40倍より多く、例えば50倍より多く、例えば100倍より多く過剰発現されることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

30

【請求項13】

HER2 遺伝子は、対照試料に対して2倍より多く増幅され、例えば対照試料の3倍より多く、例えば4倍より多く、例えば5倍より多く、例えば6倍より多く、例えば7倍より多く、例えば8倍より多く、例えば9倍より多く、例えば10倍より多く、例えば15倍より多く、例えば20倍より多く、例えば30倍より多く、例えば40倍より多く、例えば50倍より多く、例えば100倍より多く増幅されることを特徴とする、請求項3に記載の方法。

40

【請求項14】

TIMP-1 遺伝子は、対照試料に対して2倍より多く増幅され、例えば対照試料の3倍より多く、例えば4倍より多く、例えば5倍より多く、例えば6倍より多く、例えば7倍より多く、例えば8倍より多く、例えば9倍より多く、例えば10倍より多く、例えば15倍より多く、例えば20倍より多く、例えば30倍より多く、例えば40倍より多く、例えば50倍より多く、例えば100倍より多く増幅されることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

HER2 DNA 異常、又は腫瘍細胞中のErB2 タンパク質の増加は、該試料の腫瘍細胞中の異常なHER2 mRNA レベルと相関することを特徴とする、請求項3に記

50

載の方法。

【請求項 16】

前記請求項のいずれかに記載の方法であって、腫瘍細胞は、TIMP-1 対立遺伝子の1つの欠失、TIMP-1 対立遺伝子の両方の欠失、TIMP-1 対立遺伝子の1つの部分的欠失、TIMP-1 対立遺伝子の両方の部分的欠失、TIMP-1 DNA 点突然変異、TIMP-1 DNA 反転、TIMP-1 DNA 転座、TIMP-1 DNA の後成的修飾（例えばDNAメチル化）、及びこれらの組合せからなるリストから選択される、少なくとも1つのTIMP-1 DNA 異常を含むことを特徴とする方法。

【請求項 17】

腫瘍細胞はTIMP-1 タンパク質が欠如していることを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 18】

請求項 1 に記載の方法であって、DNA 遺伝子異常のレベルは、特に限定されないが、インサイチュ-ハイブリダイゼーション、PCR 法、示差的表示、DNA ドットプロット、サザンプロット、又はこれらの組合せのようなDNA 測定手段により測定されることを特徴とする方法。

【請求項 19】

インサイチュ-ハイブリダイゼーションは、FISH（蛍光インサイチュ-ハイブリダイゼーション）手段により測定されることを特徴とする、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の方法であって、FISH は、TOP2A 遺伝子領域の一部、又はHER2 遺伝子領域、又はTIMP-1 遺伝子領域の一部を標的とする標識DNA プローブを含むプローブ混合物、及びそれぞれ染色体 17 及び X 染色体の動原体領域を標的とするフルオレセイン標識プローブを含むプローブ混合物とを使用することを特徴とする方法。

20

【請求項 21】

DNA 異常は、試料に含まれる内部標準配列に対する平均比として測定されることを特徴とする、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

内部標準配列は染色体 X サテライト (Cen X) であることを特徴とする、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 23】

腫瘍細胞は、TIMP-1 / Cen X の平均比が 0.8 未満である場合、TIMP-1 遺伝子欠失を含み、該比が、0.8 より大きく 2.0 未満である場合、正常であることを特徴とする、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

腫瘍細胞は、TOP2A / Cen X の平均比が 0.8 未満である場合、TOP2A 遺伝子欠失を含み、又は TOP2A / Cen X の平均比が 2.0 より大きい場合、増幅を含み、該比が、0.8 より大きく 2.0 未満である場合、正常であることを特徴とする、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 25】

腫瘍細胞は、HER2 / Cen X の平均比が 0.8 未満である場合、HER2 遺伝子欠失を含み、又は HER2 / Cen X の平均比が 2.0 より大きい場合、増幅を含み、該比が、0.8 より大きく 2.0 未満である場合、正常であることを特徴とする、請求項 22 に記載の方法。

40

【請求項 26】

遺伝子発現のレベルは、特に限定されないがノーザンプロット、RNA ドット、及び定量的 PCR 法のような mRNA 測定により測定されることを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 27】

異常タンパク質発現は、ウェスタンプロット、免疫組織化学試験、免疫細胞学試

50

験、E L I S A、又はR I Aのようなタンパク質レベル測定手段により測定されることを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

D N A異常又はタンパク質異常の測定は、個体からの保存物質、例えば腫瘍組織を含むパラフィンブロックについて行われることを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 29】

癌は、乳癌、肉腫、卵巣癌、及び非小細胞肺癌よりなる群から選択されることを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

試料は、腫瘍組織試料、血液試料、血漿試料、血清試料、尿試料、便試料、唾液試料、及び胸腔及び腹腔からの漿液の試料、及びこれらの組合せよりなる群から選択されることを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

トポイソメラーゼII インヒビター療法は、アポトーシス又は有糸分裂破局のインデューサーを含むことを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

トポイソメラーゼII インヒビター療法は、術前補助療法、補助治療法、及び転移疾患の治療よりなる群から選択されることを特徴とする、請求項 1 と 31 のいずれかに記載の方法。

【請求項 33】

トポイソメラーゼII インヒビターはアントラサイクリンであることを特徴とする、請求項 1 及び 31 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

【請求項 34】

アントラサイクリンは、特に限定されないが、4 - エピルプリシン、ダウノルピシン、ダウノルピシン (リボソーム)、ドキソルピシン、ドキソルピシン (リボソーム)、エピルピシン、イダルピシン、及びミトキサントロン、又はこれらの組合せよりなる群から選択されることを特徴とする、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

トポイソメラーゼII インヒビターは、シクロホスファミド、タキサン類、及びノ又は 5 - フルオロウラシルをさらに含む組成物中に含まれることを特徴とする、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

シクロホスファミド、タキサン類、及びノ又は 5 - フルオロウラシルの少なくとも 1 つは、プロドラッグの形であることを特徴とする、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

トポイソメラーゼII インヒビター療法は 4 - エピルプリシンであることを特徴とする、請求項 1 ~ 32 のいずれかに記載の方法。

【請求項 38】

トポイソメラーゼII インヒビター療法に対して応答する可能性は、危険率により測定されることを特徴とする、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 39】

個体の癌を治療する方法であって、

a . 前記請求項のいずれかのトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測し、

b . 該個体が応答する可能性の高いトポイソメラーゼII インヒビター療法を選択し、そして

c . 該個体を該トポイソメラーゼII インヒビター療法に付す、ことを含んでなる方法。

【請求項 40】

10

20

30

40

50

トポイソメラーゼII インヒビターは、特に限定されないが、4 - エピルブリシン、ダウノルピシン、ダウノルピシン(リボソーム)、ドキシソルピシン、ドキシソルピシン(リボソーム)、エピルピシン、イダルピシン、及びミトキサントロン、又はこれらの組合せよりなる群から選択されるアントラサイクリン類であることを特徴とする、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

トポイソメラーゼII インヒビターは、シクロホスファミド、5 - フルオロウラシル、及び/又はタキサンをさらに含む組成物中に含まれることを特徴とする、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

トポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測するためのキットであって、

- a. 生物学的試料中の、TOP2A又はHER2 DNA異常のようなTOP2A/HER2アンプリコン中の染色体DNA異常の測定に適した試薬と、
 - b. 生物学的試料中の、TIMP-1 DNA異常の測定又はTIMP-1タンパク質レベルの測定に適した試薬とを、
- 含んでなるキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗癌療法の分野に関する。特に本発明は、様々な種類の抗癌療法に対する応答を予測するための方法に関する。特に本発明は、癌に罹っている個体の治療法の改良に関する。

【背景技術】

【0002】

メタロプロテアーゼ組織阻害因子-1 (TIMP-1)

メタロプロテアーゼ組織阻害因子-1 (TIMP-1) は、マトリックス金属プロテアーゼ (MMP) の4つの内因性インヒビターの群の1つであり、その遺伝子はX染色体上に存在する。TIMP-1は、ほとんどのMMPに1:1の化学量論比で結合する25 kDaのタンパク質である。TIMP-1は種々の組織や体液中に存在し、血小板の顆粒中に貯蔵され、活性化により放出される。TIMP-1の主要な機能はMMP阻害と考えられているが、TIMP-1のいくつかの代替機能(例えばアポトーシスの阻害と細胞増殖や血管形成の制御)が記載されている。さらにいくつかの研究は、TIMP-1が悪性表現型に至る早期プロセスでも役割を果たしていることを示唆している。

【0003】

本発明者らは、血漿TIMP-1の測定が、早期結腸直腸癌の検出において高い特異性と高い感度を与えることを記載した。さらに本発明者は、術前又は術後試料中の血漿TIMP-1レベルの測定が、早期結腸直腸癌患者において、強くかつステージ非依存性の予後情報を与えることを証明した。原発性乳癌組織中のTIMP-1タンパク質を測定することにより、本発明者らは、腫瘍組織の総TIMP-1の高レベルが、患者生存期間の短さに関連していることを証明した。

【0004】

アポトーシスの制御におけるTIMP-1の役割が報告されており、このうち可能性のある2つの方法が示唆されている。これらの両方とも、TIMP-1がアポトーシスを阻害するという考えを支持している。

【0005】

第1に、細胞外マトリックスのタンパク質分解は、インビトロとインビボの両方で乳房上皮細胞中の分化の喪失とアポトーシスを引き起こす。これは、細胞外マトリックスの完全性と細胞-マトリックス相互作用の防御とが、乳房上皮の生存を確実にするのに決定的に重要な要因であることを示す。MMPの阻害を通して、TIMP-1は細胞外マトリ

10

20

30

40

50

ックスの分解を阻害することができ、こうしておそらくアポトーシスを阻害する。乳腺中に MMP - 3 を過剰発現したマウスと TIMP - 1 トランスジェニックマウスとを交配することにより、Alexander と共同研究者は、MMP - 3 に誘導される乳房上皮のアポトーシスが TIMP - 1 により低下することを観察して、TIMP - 1 のそのようなアポトーシス阻害作用を証明した。単なる基底膜の分解が、タンパク質分解活性で誘導されるアポトーシスの原因である可能性もあるが、インテグリン介在シグナル伝達が一翼を担っていることも推測されている。

【0006】

第2に、MMP 阻害とは独立に起きる TIMP - 1 のアポトーシス阻害作用も証明されている。ヒトの乳房上皮細胞では、細胞接着の排除により誘導されるアポトーシスを阻害する内因性 TIMP - 1 の能力が証明されている。これは TIMP - 1 が、細胞外マトリックスや細胞 - マトリックス相互作用を安定化することなく、アポトーシスから細胞をレスキューできることを示している。アポトーシスの阻害における MMP 阻害の独立性は、低下しアルキル化された TIMP - 1 (これは、すべての MMP 阻害作用を喪失している) が、パーキットリンパ腫細胞株のアポトーシスをまだ有効に阻害するという事実により支持される。このアポトーシス阻害作用の機序は現在不明であるが、おそらく TIMP - 1 により制御されるシグナル伝達経路に関して、異なる考えが提案されている。ヒト乳房上皮細胞中の TIMP - 1 の過剰発現は、接着斑 (focal adhesion) キナーゼ (通常は細胞生存のシグナル伝達に関与しているキナーゼ) のより効率的な活性化と構成性活性に関連している。またパーキットリンパ腫における TIMP - 1 タンパク質発現のアップレギュレーションは、抗アポトーシスタンパク質 Bcl - X_L の発現を上昇させた。パーキットリンパ腫細胞中の TIMP - 1 の抗アポトーシス作用が、分泌された TIMP - 1 のモノクローナル抗体による中和により排除されるため、細胞シグナル伝達の調節が、TIMP - 1 と細胞表面受容体との相互作用を介して仲介されることが推測された。この見解は、乳房上皮細胞の表面に局在化する CD63 への TIMP - 1 の結合を証明する研究により、さらに支持されている。

【0007】

従って TIMP - 1 は、2つの異なる機序によりアポトーシスを阻害することができるようである。MMP を阻害することにより、TIMP - 1 は細胞外マトリックスと細胞 - マトリックス相互作用とを安定化し、こうして細胞外マトリックスの分解により誘導されるアポトーシスを阻害する。しかし TIMP - 1 はまた、細胞外マトリックスのタンパク質分解を阻害する能力には依存しない機序を介してアポトーシスを阻害する。この後者の機序は、アポトーシスに関与する細胞内シグナル伝達経路を制御する、細胞表面上の受容体との TIMP - 1 の相互作用により仲介される可能性がある。

【0008】

本発明者らによる2つの臨床研究は、TIMP - 1 タンパク質測定の予測的価値を示唆している (Schrohl et al., 2006 and Sorensen et al. 2007)。Schrohl et al. による研究では、TIMP - 1 タンパク質は ELISA を使用して乳癌抽出物中で測定された。著者らは、TIMP - 1 タンパク質の高レベルが、転移性乳癌患者における化学療法に対する応答の欠如に関連していることを記載する。Sorensen et al. による研究では、著者らは、ELISA により測定される血漿 TIMP - 1 タンパク質レベルの予測的価値を記載している。この試験の結果は、転移性結腸直腸癌を有し高レベルの血漿 TIMP - 1 を有する患者が、血漿中の TIMP - 1 タンパク質レベルが低い患者と比較して、イノテカンに基づく化学療法後に、客観的応答率が低下し生存率が低下していることを示す。これらの2つの研究は、TIMP - 1 遺伝子を欠乏させた癌細胞での化学療法に対する感受性の上昇を示す本発明者が作成した前臨床データと一致する (Davidsen et al., 2006)。

【0009】

トポイソメラーゼII

TOP2A 遺伝子は、染色体 17q21 上で HER2 と同じアンプリコン中に存在し、ここでトポイソメラーゼII 酵素をコードする。この酵素は、DNA トポロジーの制御に

10

20

30

40

50

関与し、転写、複製、及び組換えプロセス中の遺伝物質の完全性に重要である。これらのプロセス中、トポイソメラーゼII は2本鎖DNAの切断と再結合を触媒する。トポイソメラーゼII の発現は細胞サイクル依存性であり、静止細胞株中より指数増殖している細胞中で顕著に高レベルである。酵素量は細胞増殖に相関することが、証明されている。癌遺伝子活性化の主要な遺伝機構は遺伝子の増幅を介し、これはタンパク質の過剰発現を引き起こし、腫瘍に選択的増殖の利益を与える。TOP2A遺伝子の増幅は、乳癌患者の7～14%で報告され、欠失が同様の頻度で報告されている。比較すると、HER2癌遺伝子は、乳癌患者の20～30%で増幅されている(Harris et al. 2002)。

【0010】

トポイソメラーゼII はアントラサイクリン類の薬理的標的であり、いくつかの研究は、TOP2A遺伝子の異常(特に増幅)が、原発性乳癌患者でアントラサイクリンに基づく化学療法への応答に対して予測的であることを証明している(Park et al. 2003, Press et al. 2005, Tanner et al. 2005, Knoop et al. 2005)。TOP2A欠失を有する患者についてはほとんどデータが無いが、この患者群で良好な治療結果も観察されている。しかしTOP2A増幅又は欠失について分析しても、乳癌患者集団の約20%しかアントラサイクリン感受性であると同定できない。この数値は、補助アントラサイクリン類が有効であるとされる約50%の高リスク乳癌患者を考慮して見るべきである。

10

【0011】

ある試験で、TOP2A増幅とトポイソメラーゼII タンパク質との有意な相関が見られた。TOP2Aの増幅を有する症例の93%で、トポイソメラーゼII タンパク質の過剰発現が存在した。しかし反対に、過剰発現を有する症例のわずかに20%のみが増幅を有した。他の研究は、同様の相関を証明していない(Petit et al. 2004, Mueller et al. 2004, Durbecq et al. 2004)。

20

【0012】

Jorgensenらは、TOP2AとHER-2遺伝子異常の予測的価値を含む乳癌の治療法選択について、薬理診断的可能性の総説を開示している。この総説は、いくつかの臨床研究が、TOP2A遺伝子異常(特に増幅)のある腫瘍を有する患者は、正常なTOP2A遺伝子状態を有する患者より、アントラサイクリンに基づく化学療法から顕著に良好な作用を受けることを証明したと記載している。WO2007/112746は、TOP2A遺伝子異常を使用して、高リスク乳癌患者について予後的評価を行う方法を開示する。予後的評価を行う方法は、TOP2A遺伝子の異常状態を測定し、測定された状態に対応するあらかじめ決められた危険率又はあらかじめ決められたKaplan-Meierプロットに基づいて、後に患者の再発の無い生存又は全生存率の確率を推定することを含んでなる。予後という用語は、未治療患者の疾患の運命を包含し、従って予後的評価は、予測的評価とは同じではなく、後者は、特定の治療から利益を受ける患者の可能性を包含することは公知である。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

すなわち上記より、当該分野には、アントラサイクリン治療から利益を受ける追加の患者を同定できる追加の予測マーカーに対するニーズがある。

40

【0014】

すなわち本発明の目的は、トポイソメラーゼII インヒビター療法(例えば、アントラサイクリンを含むトポイソメラーゼII インヒビター療法)による治療のための、患者選択の改善に関する。

【0015】

特に本発明の目的は、トポイソメラーゼII インヒビター療法から利益を受ける可能性が高い乳癌患者の適切な比率を同定することを含む、先行技術の上記問題を解決する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

50

【0016】

すなわち本発明のある態様は、癌を有する個体においてトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、

【0017】

a. 該個体から得られた試料で、該試料に含まれる腫瘍細胞中のTIMP-1タンパク質の欠如、又は該試料の腫瘍細胞中のTIMP-1 DNA異常の存在を測定する工程、

b. 染色体17q21上のTOP2A/HER2アンプリコン中の染色体DNAの異常の存在、又は該アンプリコンに含まれる遺伝子の異常タンパク質発現を測定する工程、

c. 染色体17q21上のTOP2A/HER2アンプリコン中に染色体DNA異常が存在する場合、及び/又は該アンプリコン中に含まれる遺伝子のタンパク質発現が、該腫瘍細胞中で異常な場合、及び/又は腫瘍細胞にTIMP-1タンパク質が欠如している場合、及び/又は該腫瘍細胞が、TIMP-1遺伝子の対立遺伝子の1つ若しくは両方に該TIMP-1 DNA異常を含む場合は、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に

10

応答する可能性が高いと分類する工程、そして
d. TOP2A/HER2アンプリコン中に染色体DNA異常が存在しないか、又は該アンプリコンに含まれる任意の遺伝子にコードされるどのタンパク質も、腫瘍細胞中で異常に発現されていない場合、及び腫瘍細胞中にTIMP-1タンパク質が存在する場合、及び/又はTIMP-1対立遺伝子のいずれも該TIMP-1 DNA異常を含まない場合は、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に

20

応答する可能性が低いと分類する工程、

を含んでなる方法に関する。

【0018】

第2の態様は、癌を有する個体のトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、

【0019】

a. 該個体から得られる試料で、該試料中に含まれる腫瘍細胞中にTIMP-1タンパク質が存在しないことを測定する工程、

b. 該試料の腫瘍細胞中にTOP2A DNA異常が存在することを測定する工程、

c. TOP2A DNA異常が存在する場合、及び/又は腫瘍細胞にTIMP-1タンパク質が欠如している場合に、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に

30

応答する可能性が高いと分類する工程、そして
d. TOP2A DNA異常が存在しない場合、及び腫瘍細胞中にTIMP-1タンパク質が存在する場合に、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に

応答する可能性が低いと分類する工程、

を含んでなる方法に関する。

【0020】

ある実施態様において癌は、乳癌、肉腫、卵巣癌、及び肺癌よりなる群から選択される。好適な実施態様において、癌は乳癌である。

【0021】

本発明の別の態様は、ある個体の癌を治療する方法であって、

a. 上記請求項のいずれかに従って、トポイソメラーゼII インヒビター療法に対する

40

応答を予測し、

b. 該個体が応答する可能性の高いトポイソメラーゼII インヒビター療法を選択し、

c. 該個体を該トポイソメラーゼII インヒビター療法に付す、

ことを含んでなる方法に関する。

【0022】

ある実施態様において、該治療法で使用されるトポイソメラーゼII インヒビターは、アントラサイクリン類(例えば4-エピルブリシン)であり、これは、さらなる実施態様において、シクロホスファミド及び5-フルオロウラシル又はタキサンと組合せて使用される。

50

【 0 0 2 3 】

本発明のさらに別の態様は、トポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測するためのキットであって、

a . 生物学的試料中の、TOP2A又はHER2 DNA異常のようなTOP2A/HER2アンプリコン中の染色体DNA異常の測定に適した試薬と、

b . 生物学的試料中の、TIMP-1 DNA異常の測定又はTIMP-1タンパク質レベルの測定に適した試薬とを、

含んでなるキットを提供する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 4 】

10

【 図 1 A 】 補助 C E F を受けている患者の無病生存率を示す Kaplan-Meier プロットを示す。患者は、癌細胞中で + 又は - 免疫反応性としてスコア化された腫瘍細胞 TIMP - 1 免疫反応性に従って層別された。選択された時点でリスクのある患者の数が、x 軸の下に示される。

【 図 1 B 】 補助 C M F を受けている患者の無病生存率を示す Kaplan-Meier プロットを示す。患者は、癌細胞中で + 又は - 免疫反応性としてスコア化された腫瘍細胞 TIMP - 1 免疫反応性に従って層別された。選択された時点でリスクのある患者の数が、x 軸の下に示される。

【 図 1 C 】 C E F 又は C M F で治療された癌細胞中に TIMP - 1 免疫反応性の無い患者の無病生存率を示す Kaplan-Meier 曲線を示す。

20

【 0 0 2 5 】

【 図 2 A 】 補助 C E F を受けている患者の無病生存率を示す Kaplan-Meier プロットを示す。患者は、腫瘍細胞 TOP2A DNA 異常の有無に従って層別された。選択された時点でリスクのある患者の数が、x 軸の下に示される。

【 図 2 B 】 補助 C M F を受けている患者の無病生存率を示す Kaplan-Meier プロットを示す。患者は、腫瘍細胞 TOP2A DNA 異常の有無に従って層別された。選択された時点でリスクのある患者の数が、x 軸の下に示される。

【 図 2 C 】 C E F 又は C M F で治療された癌細胞中に TOP2A DNA 異常を有する患者の無病生存率を示す Kaplan-Meier 曲線を示す。

【 0 0 2 6 】

30

【 図 3 A 】 補助 C E F を受けている患者の無病生存率を示す Kaplan-Meier プロットを示す。患者は、癌細胞中で + 又は - 免疫反応性としてスコア化された腫瘍細胞 TIMP - 1 免疫反応性と、TOP2A DNA 異常の有り (A b) 又は無し (正常) に従って層別された。選択された時点でリスクのある患者の数が、x 軸の下に示される。

【 図 3 B 】 補助 C M F を受けている患者の無病生存率を示す Kaplan-Meier プロットを示す。患者は、癌細胞中で + 又は - 免疫反応性としてスコア化された腫瘍細胞 TIMP - 1 免疫反応性と、TOP2A DNA 異常の有り (A b) 又は無し (正常) に従って層別された。選択された時点でリスクのある患者の数が、x 軸の下に示される。

【 図 3 C 】 C E F 又は C M F で治療された癌細胞中に、TIMP - 1 免疫反応性が無いか及び / 又は TOP2A DNA 異常を有する患者の無病生存率を示す Kaplan-Meier 曲線を示す。

40

【 0 0 2 7 】

【 図 4 A 】 C M F 又は C E F による治療と HT (HER2 と TIMP - 1) 状態 (パネル 4 A) 、及び 2 T (TOP2A と TIMP - 1) 状態 (パネル 4 B) の無侵襲性疾患生存率の Kaplan-Meier 曲線。

【 図 4 B 】 C M F 又は C E F による治療と HT (HER2 と TIMP - 1) 状態 (パネル 4 A) 、及び 2 T (TOP2A と TIMP - 1) 状態 (パネル 4 B) の無侵襲性疾患生存率の Kaplan-Meier 曲線。

【 0 0 2 8 】

【 図 5 A 】 HER2 陽性腫瘍と HER2 陰性腫瘍、TOP2A DNA 異常腫瘍と TOP

50

2 A DNA異常ではない(正常)腫瘍、TIMP-1陽性腫瘍とTIMP-1陰性腫瘍、HT応答性腫瘍と非応答性腫瘍、及び2T応答性と非応答性腫瘍との、無侵襲性疾患生存率(パネル5A)と全生存率(パネル5B)比較についての、治療効果の危険率推定を示すフォレストプロット。

【図5B】HER2陽性腫瘍とHER2陰性腫瘍、TOP2A DNA異常腫瘍とTOP2A DNA異常ではない(正常)腫瘍、TIMP-1陽性腫瘍とTIMP-1陰性腫瘍、HT応答性腫瘍と非応答性腫瘍、及び2T応答性と非応答性腫瘍との、無侵襲性疾患生存率(パネル5A)と全生存率(パネル5B)比較についての、治療効果の危険率推定を示すフォレストプロット。

【0029】

【図6】TIMP-1免疫組織化学試験の例を示す。6A:高率の上皮癌細胞がTIMP-1陽性である。6B:上皮癌細胞中の分散した免疫反応性と集中化した免疫反応性。6C:陰性対照。6D:繊維芽細胞中の免疫反応性、しかし上皮癌細胞ではない。

【0030】

【図7A】公知のTIMP-1状態を有する乳癌患者の無侵襲性疾患生存率(IDFS)(図7A)と全生存率(OS)(図7B)の確率。T+とT-は、その乳癌細胞中に、それぞれTIMP-1免疫反応性が有ること及び無いことを意味する。CEFとCMFは、受けた補助化学療法を示す。

【図7B】公知のTIMP-1状態を有する乳癌患者の無侵襲性疾患生存率(IDFS)(図7A)と全生存率(OS)(図7B)の確率。T+とT-は、その乳癌細胞中に、それぞれTIMP-1免疫反応性が有ること及び無いことを意味する。CEFとCMFは、受けた補助化学療法を示す。

【0031】

【図8A】患者のTIMP-1亜集団とER亜集団における、CMFをベースラインとして有するCEFの効果の、多変量モデルからの危険率を示すフォレストプロット。図8A:IDFS;図8B:OS。

【図8B】患者のTIMP-1亜集団とER亜集団における、CMFをベースラインとして有するCEFの効果の、多変量モデルからの危険率を示すフォレストプロット。図8A:IDFS;図8B:OS。

【0032】

【図9】上皮乳癌細胞中のTIMP-1 DNA増幅を示すTIMP-1 FISH解析。

【発明を実施するための形態】

【0033】

乳癌細胞中のTOP2A DNA異常の測定は、化学療法剤処方を含む補助アントラサイクリンからの有効性を予測することができることは公知である(Knoop et al. JCO 2005)。しかし、腫瘍細胞中では原発性乳癌患者の約20%のみしかTOP2A DNA異常を示さないため、この方法は、補助アントラサイクリン治療から利益を受ける可能性が高い、乳癌集団の20%のみしか同定できない。この数値は、原発性乳癌患者の約50%が、アントラサイクリン治療から利益を受けることがわかっていることを考慮して、見るべきである。

【0034】

多くの他の可能性のある予測マーカー(例えばHER2)がTOP2A DNA異常の測定と組合わされているが、同定された亜集団中の無病生存率又は全生存率に関して、これらの2つのバイオマーカーの間に付加的作用は見られない(Knoop et al., JCO 2005)。すなわち、現在TOP2A DNA異常の測定単独よりも、TOP2A DNA異常と組合せた時、アントラサイクリン治療から利益を受けると優れた予測を示すバイオマーカー(DNA、mRNA、又はタンパク質)は存在しない。これは、TOP2AとHER DNA測定を組合せることが、この2つのマーカーのそれぞれにより得られる価値以上に予測価値を改善することは無いことを示す、O'Malley et al. 2009により支持される。

【0035】

10

20

30

40

50

転移性乳癌患者から得られる原発性腫瘍中のTIMP-1タンパク質の高腫瘍抽出タンパク質レベルが、化学療法（アントラサイクリンを含まない場合と、アントラサイクリンを含む薬剤組合せ）に対する客観的応答を得る可能性の低下と関連することが、すでに報告されている。この可能性は、TIMP-1の発現が上昇すると低下する。TIMP-1タンパク質はELISAにより測定された（Schrohl et al., Clin. Cancer Res. 2006）。

【0036】

Sorensen et al. Clin Cancer Res 2007は、転移性結腸直腸癌を有する患者に対する化学療法の効果に関する。この研究では、TIMP-1はCEAと組合わされ、CEAの組合せが付加的効果を与えないことを示している。

10

【0037】

本発明者らは、乳癌細胞におけるTIMP-1免疫反応性の欠如が、補助アントラサイクリン治療から利益を受ける可能性に関連するが、アントラサイクリンを含まない化学療法には関連しないことを、初めて開示する。649人の高リスク乳癌患者を含む後向き研究において本発明者らは、その腫瘍細胞にTIMP-1免疫反応性が欠如しており、アントラサイクリンを含まない化学療法処方（CMF）で補助治療を受けている患者、又はその腫瘍細胞がTIMP-1免疫反応性を示し、アントラサイクリン含有若しくはアントラサイクリンを含まない化学療法で補助治療を受けている患者と比較して、その腫瘍細胞にTIMP-1免疫反応性が欠如している患者が、補助アントラサイクリン治療が最も有益である患者であることを示す。

20

【0038】

すなわち、本発明は、補助アントラサイクリン治療から利益を受ける可能性の高い高リスク乳癌患者の同定を可能にする：乳癌細胞中のTIMP-1免疫反応性の欠如は、補助アントラサイクリン治療から利益を受ける可能性の高い患者の約20%を同定する。実際には、TIMP-1免疫組織化学試験により、治療から利益を受ける可能性の高い、補助治療を計画されている患者の約20%を同定することができる。一方、TIMP-1免疫組織化学試験はまた、はるかに毒性の低いCMFによる治療でも同様に有効と考えられる、補助アントラサイクリンを含む治療を計画されている患者の約80%の同定を可能にする。あるいはこれらの80%の患者は、乳癌の補助治療で使用されるアントラサイクリン類以外の任意の他の活性薬剤（例えば、タキサン類、メソトレキセート、シクロホスファミド、5-フルオロウラシル、及びゲムシタピン（実施例1））により、治療できるであろう。

30

【0039】

本発明者らは、同じ腫瘍細胞中のTIMP-1乳癌細胞の免疫反応性測定とTOP2A DNA異常の測定の組合せが付加的予測値を与えること、すなわち2つの試験のそれぞれが、補助アントラサイクリン含有化学療法から利益を受ける可能性の高い患者の約20%を同定し、この2つの患者集団の間には4%の重複しかないため、組合せアッセイの作用は付加的であることを、初めて報告する。

【0040】

すなわち本発明は、補助アントラサイクリン治療から利益を受ける可能性の高いほとんど2倍の乳癌患者の同定を可能にする：TOP2A DNA異常の測定は、補助アントラサイクリン治療から利益を受ける可能性の高い患者の約20%を同定し、TIMP-1免疫反応性欠如の測定が約20%を同定する。実際には、組合せアッセイにより、治療から利益を受ける可能性の高い、補助治療を計画している患者の約40%を同定することができるであろう。一方、組合せアッセイはまた、はるかに毒性の低いCMFによる治療でも同様に有効と考えられる補助アントラサイクリンを含む治療を計画されている患者の約60%の同定を可能にする。あるいはこれらの60%の患者は、乳癌の補助治療で使用されるアントラサイクリン類以外の任意の他の活性薬剤（例えば、タキサン類、メソトレキセート、シクロホスファミド、5-フルオロウラシル、及びゲムシタピン（実施例3））により、治療できるであろう。

40

50

【 0 0 4 1 】

本発明者らは最近、乳癌細胞中の T I M P - 1 遺伝子異常（欠失と増幅）を見つけた。

【 0 0 4 2 】

本出願は、シクロホスファミド、メソトレキセート、及び 5 - フルオロウラシル（ C M F ）、又はシクロホスファミド、4 - エピルブリシン、及び 5 - フルオロウラシル（ C E F ）を用いる補助治療を受けるように無作為化した 6 4 1 人の乳癌患者における、 T O P 2 A 遺伝子異常と T I M P - 1 タンパク質腫瘍細胞含量の研究を開示する。終点は、無病生存（ D F S ）であった。この患者群についてすでに報告されたように（ Knoop et al. ）、 C E F が有効性（ D F S の延長）について予測的であったが、 C M F はそうではなかった。 V T 7 抗 T I M P - 1 モノクローナル抗体を用いる T I M P - 1 免疫組織化学試験を行うことにより、本発明は、約 8 0 % の患者が腫瘍細胞中で T I M P - 1 免疫反応性を示すことを見いだした。腫瘍の残りの 2 0 % は、 T I M P - 1 腫瘍細胞の免疫反応性がなかった。統計的生存解析を行うと、腫瘍細胞中の T I M P - 1 免疫反応性の欠如は、終点（ D F S : 患者のより長い D F S ）と強く関連していた。これに対して、 C M F を投与されている患者では、 T I M P - 1 免疫反応性に関連して D F S の差は観察されなかった。

10

【 0 0 4 3 】

T O P 2 A 分析と T I M P - 1 分析の結果を組合せると、 C E F への応答を予測するのにこれらの 2 つのバイオマーカーは付加的であったが、 C M F 治療患者ではこれらの 2 つのバイオマーカーの組合せの効果は観察されなかった。付加的作用は、 T O P 2 A 遺伝子異常を有する患者とその腫瘍細胞中に T I M P - 1 免疫反応性が欠如している患者との間にほとんど重複がなかった（ 4 % の重複）という事実に基づく。 2 つの群はほとんど同じ大きさであり、これらの 2 つのバイオマーカーの組合せは、それぞれのバイオマーカーの予測的価値の力を失うことなく、 C E F レスポンダーとして予測できる患者の数を 2 倍にした。

20

【 0 0 4 4 】

これは、 T O P 2 A 検査と T I M P - 1 検査の組合せ使用により、補助アントラサイクリン治療が最も有益である患者を同定できることを意味する。一方、組合せ試験はまた、アントラサイクリンを含まない化学療法処方を受けることにより同様に有効と考えられるか、又はおそらく別の薬剤組合せ（例えば、タキサン類を含む組合せ）を受けることによってさらに有効と考えられる約 6 0 % の患者を同定するのに使用することもできる。本発明は、 T O P 2 A と H E R 2 を組合せた時の付加的作用の欠如（ Knoop et al. 2005 ）、及び結腸直腸癌の薬剤予測で T I M P と C E A を組合せた時の付加的作用の欠如（ Sorensen et al. 2007 ）を考慮して見るべきである。

30

【 0 0 4 5 】

当該分野で現在利用可能な方法以外に、乳癌患者について治療有効性の予測を行うための利用可能な方法を拡張するために、そのような予測を行うための新規方法が本明細書で開示され、ここで予測は、腫瘍細胞中の T I M P - 1 タンパク質又は T O P 2 A D N A 異常の測定とともに、 T O P 2 A 遺伝子異常又は T O P 2 A タンパク質の測定された状態 [ここで「状態」は、異常の有無を意味し、異常が存在するなら、異常の種類（増幅又は欠失）を意味する] に基づく。本発明の実施態様は、患者から採った乳癌組織試料中の T I M P - 1 遺伝子又はタンパク質の状態とともに、 T O P 2 A 遺伝子の異常の状態を測定する工程を含んでよく、そのような試験の結果に基づいて、アントラサイクリンを含まない化学療法と比較して、アントラサイクリンを含む化学療法から利益を受ける可能性を、個々の患者について推定することができる。

40

【 0 0 4 6 】

例えば、癌細胞中に T O P 2 A 異常を有するか及び / 又は T I M P - 1 免疫反応性が欠如している患者は、アントラサイクリンを含む化学療法を受けるべきであり、残りの患者は、アントラサイクリンを投与されてもアントラサイクリン以外を投与されても同様に有効であろう。アントラサイクリンの重い毒性を考えると、患者にはアントラサイクリンを含まない化学療法処方を提供することが正しいであろう。

50

【0047】

すなわち本発明の方法は、乳癌患者中のTIMP-1腫瘍細胞の反応性の分析を加えることにより、乳癌患者のTOP2A測定の予測価値をほとんど2倍にすることができるという驚くべき発見に依存する。

【0048】

本発明は、癌患者の抗癌療法の有効性を予測する方法に基づき、ここで該抗癌療法の効率は、癌細胞中のTIMP-1免疫反応性の欠如と組合せた腫瘍細胞中の腫瘍組織TOP2A遺伝子異常に依存し、この方法は、患者の腫瘍組織の細胞がTOP2A遺伝子異常を有するか、又はTIMP-1免疫反応性が欠如しているかを測定し、TOP2ADNA異常又はTIMP-1免疫反応性の欠如が観察される場合は、患者は特定の抗癌療法から利益を受ける可能性が非常に高いと確定することを含んでなる。

10

【0049】

本出願において、抗癌療法は好ましくはトポイソメラーゼIIインヒビター療法を意味する。

【0050】

本発明の予測法は好ましくは、患者の腫瘍組織の細胞がTOP2A遺伝子異常を有するか及び/又はTIMP-1免疫反応性が欠如しているかの測定が、腫瘍組織試料、血液試料、血漿試料、血清試料、尿試料、便試料、唾液試料、及び胸腔及び腹腔からの漿液の試料よりなる群から選択される試料を測定することにより行われることを含む。この測定法は、DNAレベル測定、mRNAレベル測定（例えば、インサイチュールハイブリダイゼーション、ノーザンブロットイング、QRT-PCR、及び示差的表示）、及びタンパク質レベル測定（例えば、ウェスタンブロットイング、免疫組織化学試験、免疫細胞学試験、ELISA、及びRIA）により、便利に行われる。

20

【0051】

個々の患者のトポイソメラーゼIIインヒビター療法に対する耐性/感受性を決定できるように、TIMP-1タンパク質の閾値レベルを確立するために、後向き/前向き臨床試験を行うことができる。

【0052】

後向き研究では、癌の再発を経験した患者で特定の抗癌療法にどのように応答したかわかっている患者から、保存された腫瘍組織、血液、尿、唾液、又は任意の他の体液が得られる。腫瘍組織抽出物の場合は、組織はホモジナイズされ、個々の患者試料についてTIMP-1タンパク質レベルが測定される。体液の場合、試料は希釈され、次に本明細書に記載のいずれかの方法により、TIMP-1タンパク質の濃度が測定される。ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織の場合は、原発性腫瘍又は転移病変から得られる組織について、従来免疫組織化学試験を行うことができる。

30

【0053】

従って本発明のある態様は、癌を有する個体においてトポイソメラーゼIIインヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、

【0054】

a. 該個体から得られた試料で、該試料に含まれる腫瘍細胞中のTIMP-1タンパク質の欠如、又は該試料の腫瘍細胞中のTIMP-1DNA異常の存在を測定する工程、
 b. 染色体17q21上のTOP2A/HER2アンプリコン中の染色体DNAの異常の存在、又は該アンプリコンに含まれる遺伝子の異常タンパク質発現を測定する工程、
 c. 染色体17q21上のTOP2A/HER2アンプリコン中に染色体DNA異常が存在する場合、及び/又は該アンプリコン中に含まれる遺伝子のタンパク質発現が、該腫瘍細胞中で異常な場合、及び/又は腫瘍細胞にTIMP-1タンパク質が欠如している場合、及び/又は該腫瘍細胞が、TIMP-1遺伝子の対立遺伝子の1つ若しくは両方に該TIMP-1DNA異常を含む場合は、個体がトポイソメラーゼIIインヒビター療法に
 応答する可能性が高いと分類する工程、そして

40

d. TOP2A/HER2アンプリコン中に染色体DNA異常が存在しないか、又は該

50

アンブリコンに含まれる任意の遺伝子にコードされるどのタンパク質も、腫瘍細胞中で異常に発現されていない場合、及び腫瘍細胞中にTIMP-1タンパク質が存在する場合、及び/又はTIMP-1対立遺伝子のいずれも該TIMP-1 DNA異常を含まない場合は、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に応答する可能性が低いと分類する工程、

を含んでなる方法に関する。

【0055】

上記の染色体17q21上のTOP2A/HER2アンブリコンは、TOP2A遺伝子とHER2遺伝子とを含む。

【0056】

すなわち本発明のある実施態様は、癌を有する個体のトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、染色体17q21上のTOP2A/HER2アンブリコン中の染色体DNA異常がTOP2A DNA異常であり、該アンブリコン中に含まれる遺伝子のタンパク質発現がトポイソメラーゼII 発現であることを特徴とする方法に関する。

10

【0057】

本発明の別の実施態様は、癌を有する個体のトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、染色体17q21上のTOP2A/HER2アンブリコン中の染色体DNA異常がHER2 DNA異常であり、該アンブリコン中に含まれる遺伝子のタンパク質発現がErbb2発現であることを特徴とする方法に関する。

20

【0058】

好適な実施態様において該方法は、

a. 該個体から得られる試料で、該試料中に含まれる腫瘍細胞中にTIMP-1タンパク質が存在しないことを測定する工程、

b. 該試料の腫瘍細胞中にTOP2A DNA異常が存在することを測定する工程、

c. TOP2A DNA異常が存在する場合、及び/又は腫瘍細胞にTIMP-1タンパク質が欠如している場合に、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に応答する可能性が高いと分類する工程、そして

d. TOP2A DNA異常が存在しない場合、及び腫瘍細胞中にTIMP-1タンパク質が存在する場合に、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に応答する可能性が低いと分類する工程、

30

を含んでなる。

【0059】

本発明のある実施態様は、癌を有する個体のトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、該方法は、

【0060】

a. 該個体から得られる試料で、該試料中に含まれる腫瘍細胞中にTIMP-1タンパク質が存在しないことを測定する工程、

b. 該試料の腫瘍細胞中にHER2 DNA異常が存在することを測定する工程、

c. HER2 DNA異常が存在する場合、及び/又は腫瘍細胞にTIMP-1タンパク質が欠如している場合に、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に応答する可能性が高いと分類する工程、そして

d. HER2 DNA異常が存在しない場合、及び腫瘍細胞中にTIMP-1タンパク質が存在する場合に、個体がトポイソメラーゼII インヒビター療法に応答する可能性が低いと分類する工程、

40

を含んでなる。

【0061】

本発明のある実施態様は、癌を有する個体のトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、該方法は、

【0062】

50

a . 該個体から得られる試料で、該試料の腫瘍細胞中に T I M P - 1 D N A 異常が存在することを測定する工程、

b . 該試料の腫瘍細胞中に T O P 2 A D N A 異常が存在することを測定する工程、

c . T O P 2 A D N A 異常が存在する場合、及び / 又は T I M P - 1 遺伝子の対立遺伝子の 1 つ若しくは両方に該 T I M P - 1 D N A 異常を含む場合は、個体がトポイソメラーゼ II インヒビター療法に応答する可能性が高いと分類する工程、そして

d . T O P 2 A D N A 異常が存在しない場合、及び T I M P - 1 対立遺伝子のいずれも該 T I M P - 1 D N A 異常を含まない場合は、個体がトポイソメラーゼ II インヒビター療法に応答する可能性が低いと分類する工程、

を含んでなる。

10

【 0 0 6 3 】

本発明のある実施態様は、癌を有する個体のトポイソメラーゼ II インヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、該方法は、

【 0 0 6 4 】

a . 該個体から得られる試料で、該試料の腫瘍細胞中に T I M P - 1 D N A 異常が存在することを測定する工程、

b . 該試料の腫瘍細胞中に H E R 2 D N A 異常が存在することを測定する工程、

c . H E R 2 D N A 異常が存在する場合、及び / 又は該腫瘍細胞が、 T I M P - 1 遺伝子の対立遺伝子の 1 つ若しくは両方に該 T I M P - 1 D N A 異常を含む場合は、個体がトポイソメラーゼ II インヒビター療法に応答する可能性が高いと分類する工程、そして

20

d . H E R 2 D N A 異常が存在しない場合、及び T I M P - 1 対立遺伝子のいずれも該 T I M P - 1 D N A 異常を含まない場合は、個体がトポイソメラーゼ II インヒビター療法に応答する可能性が低いと分類する工程、

を含んでなる。

【 0 0 6 5 】

T O P 2 A 遺伝子と H E R 2 遺伝子はいずれも、染色体 1 7 q 2 1 上の T O P 2 A / H E R 2 アンプリコン中に存在し、 T I M P - 1 遺伝子は染色体 X 上に存在する。

【 0 0 6 6 】

本方法は、危険率を低下させることなく、 C E F 治療のような抗癌療法から利益を受ける可能性が高い、従来法と比較してほとんど 2 倍の数の癌患者を同定する手段を提供する。

30

【 0 0 6 7 】

本発明のある実施態様において、バイオマーカー (H E R 2 、 T O P 2 A 、 及び T I M P - 1) を含む試料は、腫瘍組織試料、血液試料、血漿試料、血清試料、尿試料、便試料、唾液試料、及び胸腔及び腹腔からの漿液の試料よりなる群から選択される。

【 0 0 6 8 】

本発明のある実施態様は、乳癌、肉腫、卵巣癌、及び肺癌よりなる群から選択される癌を有する個体の、抗癌療法に対する応答を予測する方法に関する。

【 0 0 6 9 】

ある実施態様において、肉腫は軟組織肉腫である。

別の実施態様において、肺癌は非小細胞肺癌である。

40

【 0 0 7 0 】

ある好適な実施態様において本発明は、乳癌を有する個体の、抗癌療法に対する応答を予測する方法に関する。

【 0 0 7 1 】

D N A 異常を測定する方法

D N A 異常に関する異常は、特に限定されないが、インサイチュールハイブリダイゼーション、 P C R 法、示差的表示、 D N A ドットプロットング、サザンプロットング、又はこれらの組合せのような D N A 測定手段により測定される。

50

【 0 0 7 2 】

すなわちある実施態様において、DNA 遺伝子異常のレベルは、特に限定されないが、インサイチューハイブリダイゼーション、PCR法、示差的表示、DNA ドットプロットティング、サザンプロットティング、又はこれらの組合せのようなDNA 測定手段により測定される。

【 0 0 7 3 】

好適な実施態様において、該インサイチューハイブリダイゼーションは、FISH (蛍光インサイチューハイブリダイゼーション) 手段により測定される。

【 0 0 7 4 】

さらに好適な実施態様において、DNA 異常は、TOP2A 遺伝子領域の一部、及び/又はHER2 遺伝子領域、及び/又はTIMP-1 遺伝子領域の一部を標的とする標識DNA プローブを含むプローブ混合物と、それぞれ染色体17及びX染色体の動原体領域を標的とするフルオレセイン標識プローブを含むプローブ混合物との、使用を含んでなるFISHにより測定される。

10

【 0 0 7 5 】

タンパク質発現異常に関する異常は、ウェスタンプロットティング、免疫組織化学試験、ELISA、又はRIA 手段により測定される。

【 0 0 7 6 】

すなわちある実施態様において、異常タンパク質発現は、ウェスタンプロットティング、免疫組織化学試験、免疫細胞学試験、ELISA、又はRIAのようなタンパク質レベル測定手段により測定される。

20

【 0 0 7 7 】

DNA 異常及び/又は異常タンパク質発現はまた、問題の遺伝子のmRNA 転写体のようなRNA レベル (例えば非機能的転写体を与える一次転写体の異常スプライシング) に反映される。

【 0 0 7 8 】

すなわちRNA 異常を引き起こすDNA 異常は、特に限定されないがノーザンプロットティング、RNA ドット法、及び定量的PCR法のようなmRNA 測定のような、RNA の手段により測定される。

【 0 0 7 9 】

すなわちある実施態様において、腫瘍細胞中のDNA 異常又はタンパク質発現は、該試料の腫瘍細胞中の異常mRNA レベルと相関する。

30

【 0 0 8 0 】

DNA 異常

DNA 異常は、染色体の特定の領域 (例えばアンプリコン) を含む染色体内のDNA 異常、及び遺伝子又は遺伝子領域内のDNA 異常を意味する。DNA 異常は、DNA 増幅、DNA 欠失、遺伝子点突然変異、及び転座、DNA の後成的修飾 (例えばDNA メチル化)、及びこれらの組合せを含む。DNA 異常は、該DNA の下流の異常転写、又は該DNA によりコードされるタンパク質の発現を引き起こすDNA 異常を含む。欠失又は増幅の意味においてDNA 異常は、全遺伝子又は該遺伝子の一部の欠失又は増幅を意味する。後成的異常は、問題の遺伝子のサイレンス化を引き起こし、該遺伝子によりコードされるタンパク質の欠如、又は少なくとも異常タンパク質発現に反映される。

40

【 0 0 8 1 】

すなわちある実施態様は、TOP2A 遺伝子異常の測定を含む、癌を有する個体のトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測する方法に関し、ここで該遺伝子異常は、TOP2A DNA 増幅、TOP2A DNA 欠失、TOP2A 遺伝子点突然変異、及びTOP2A DNA 転座、TOP2A DNA の後成的修飾 (例えばDNA メチル化)、及びこれらの組合せよりなる群から選択される。

【 0 0 8 2 】

具体的な実施態様において、TOP2A DNA 異常又は腫瘍細胞中のトポイソメラー

50

ゼII タンパク質の増加は、該試料の腫瘍細胞中の異常なTOP2A mRNAレベルと相関する。

【0083】

さらなる実施態様は、HER2遺伝子異常の測定を含む、癌を有する個体のトポソメラーゼIIインヒビター療法に対する応答を予測する方法に関し、ここでHER2遺伝子異常は、HER2遺伝子増幅、HER2DNA欠失、HER2遺伝子点突然変異、及びHER2DNA転座、HER2DNAの後成的修飾（例えばDNAメチル化）、及びこれらの組合せよりなる群から選択される。

【0084】

具体的な実施態様において、HER2DNA異常又は腫瘍細胞中のErbb2タンパク質の増加は、該試料の腫瘍細胞中の異常なHER2 mRNAレベルと相関する。

10

【0085】

さらなる実施態様は、TIMP-1遺伝子異常の測定を含む、癌を有する個体のトポソメラーゼIIインヒビター療法に対する応答を予測する方法に関し、ここで腫瘍細胞は、TIMP-1対立遺伝子の1つの欠失、TIMP-1対立遺伝子の両方の欠失、TIMP-1対立遺伝子の1つの部分的欠失、TIMP-1対立遺伝子の両方の部分的欠失、TIMP-1DNA点突然変異、TIMP-1DNA反転、TIMP-1DNA転座、TIMP-1DNAの後成的修飾（例えばDNAメチル化）、及びこれらの組合せからなるリストから選択される、TIMP-1タンパク質発現の欠如を引き起こす少なくとも1個のTIMP-1DNA異常を含む。

20

【0086】

好適な実施態様において、腫瘍細胞中のTIMP-1DNA異常又はTIMP-1タンパク質の欠如は、該試料中のTIMP-1 mRNAの欠如のような、該試料の腫瘍細胞中の異常TIMP-1 mRNAレベルと相関する。

【0087】

本文脈において用語「TIMP-1タンパク質の欠如」は、癌細胞及び/又は腫瘍組織間質細胞中のTIMP-1免疫反応性の完全な欠如であると理解すべきである。しかし、癌細胞及び/又は腫瘍組織間質細胞中に弱いTIMP-1免疫反応性を有する患者は、癌細胞及び/又は腫瘍組織間質細胞中に強いTIMP-1免疫反応性を有する患者より、アントラサイクリン類がより有効であり、一方、弱いTIMP-1免疫反応性を有する患者は、癌細胞及び/又は腫瘍組織間質細胞中のTIMP-1免疫反応性が完全に欠如した患者より、アントラサイクリン治療が有効ではない。TIMP-1免疫反応性（陽性細胞の数及び/又は強度）の評価は、簡単な顕微鏡観察により評価できるが、デジタル化アナライザーにより客観的に評価することもできる。

30

【0088】

細胞は、0、+1、+2、及び+3として分類される。0はTIMP-1免疫反応性が欠如した癌細胞及び/又は腫瘍組織間質細胞であり、+1は弱いTIMP-1免疫反応性を有する癌細胞及び/又は腫瘍組織間質細胞であり、+2は、TIMP-1免疫反応性を有する癌細胞及び/又は腫瘍組織間質細胞であり、+3は強いTIMP-1免疫反応性を有する癌細胞及び/又は腫瘍組織間質細胞であると理解すべきである。

40

【0089】

TIMP-1免疫反応性を分類し区別する方法は、客観的に評価される本発明の実施態様である。評価は、TIMP-1免疫反応性細胞（癌細胞及び/又は腫瘍組織間質細胞）、及び/又は免疫反応性の強さに基づく。TIMP-1免疫反応性（陽性細胞の数及び/又は強度）の評価は、簡単な顕微鏡観察により評価できるが、デジタル化アナライザーにより客観的に評価することもできる。

【0090】

すなわち本発明の好適な実施態様において、免疫反応性が、+1未満、例えば+0.9未満、例えば+0.8未満、例えば+0.7未満、例えば+0.6未満、例えば+0.5未満、例えば+0.4未満、例えば+0.3未満、例えば+0.2未満、例えば+0.1

50

未満である場合、癌細胞及び／又は腫瘍組織間質細胞はTIMP-1が欠如している。

【0091】

すなわち本発明の好適な実施態様において、免疫反応性が0である場合、癌細胞及び／又は腫瘍組織間質細胞はTIMP-1が欠如している。

【0092】

すなわち本発明の好適な実施態様において、TIMP-1免疫反応性のレベルが、+2未満、例えば+1.9未満、例えば+1.8未満、例えば+1.7未満、例えば+1.6未満、例えば+1.5未満、例えば+1.4未満、例えば+1.3未満、例えば+1.2未満、+1未満、例えば+0.9未満、例えば+0.8未満、例えば+0.7未満、例えば+0.6未満、例えば+0.5未満、例えば+0.4未満、例えば+0.3未満、例えば+0.2未満、例えば+0.1未満である場合、患者は、アントラサイクリン類（例えばトポソメラーゼII）から利益を受ける可能性がある。好ましくは、0～+2の範囲、例えば0.1～+1.5の範囲、例えば+0.5～+1.2の範囲、例えば0～+0.5の範囲、例えば0～+1の範囲。

10

【0093】

好適な実施態様において、TIMP-1免疫反応性のレベルが、+1未満、例えば+0.9未満、例えば+0.8未満、例えば+0.7未満、例えば+0.6未満、例えば+0.5未満、例えば+0.4未満、例えば+0.3未満、例えば+0.2未満、例えば+0.1未満である場合、患者は、アントラサイクリン類（例えばトポソメラーゼII）から利益を受ける可能性がある。

20

【0094】

好適な実施態様において、TIMP-1タンパク質のレベルが0である場合、患者は、アントラサイクリン類（例えばトポソメラーゼII）から利益を受ける可能性がある。

【0095】

TIMP-1免疫反応性は、癌細胞及び／又は腫瘍組織間質細胞中に存在するTIMP-1タンパク質の量に似ている。

【0096】

好適な実施態様において、TIMP-1遺伝子は、標準試料に対して、1.1倍より多く増幅され、例えば標準試料の1.2倍より多く、例えば1.3倍より多く、例えば1.4倍より多く、例えば1.5倍より多く、例えば1.6倍より多く、例えば1.7倍より多く、例えば1.8倍より多く、例えば1.9倍より多く、例えば2倍より多く、例えば3倍より多く、例えば4倍より多く、例えば5倍より多く、例えば6倍より多く、例えば7倍より多く、例えば8倍より多く、例えば9倍より多く、例えば10倍より多く、例えば15倍より多く、例えば20倍より多く、例えば30倍より多く、例えば40倍より多く、例えば50倍より多く、例えば100倍より多く増幅される。本発明のある実施態様において、TIMP-1遺伝子は、標準試料に対して1.1～2.0倍増幅され、例えば標準試料に対して、1.2～1.9倍の範囲、例えば1.3～1.8倍の範囲、例えば1.4～1.7倍の範囲、例えば1.5～1.7倍の範囲、例えば1.7～1.9倍の範囲、例えば1.8～1.9倍の範囲で増幅される。

30

【0097】

別の実施態様においてTOP2A遺伝子は、標準試料に対して、1.1倍より多く増幅され、例えば標準試料の1.2倍より多く、例えば1.3倍より多く、例えば1.4倍より多く、例えば1.5倍より多く、例えば1.6倍より多く、例えば1.7倍より多く、例えば1.8倍より多く、例えば1.9倍より多く、例えば2倍より多く、例えば3倍より多く、例えば4倍より多く、例えば5倍より多く、例えば6倍より多く、例えば7倍より多く、例えば8倍より多く、例えば9倍より多く、例えば10倍より多く、例えば15倍より多く、例えば20倍より多く、例えば30倍より多く、例えば40倍より多く、例えば50倍より多く、例えば100倍より多く増幅される。本発明のある実施態様において、TOP2A遺伝子は、標準試料に対して1.1～2.0倍増幅され、例えば標準試料に対して、1.2～1.9倍の範囲、例えば1.3～1.8倍の範囲、例えば1.4～1

40

50

．7倍の範囲、例えば1.5～1.7倍の範囲、例えば1.7～1.9倍の範囲、例えば1.8～1.9倍の範囲で増幅される。

【0098】

別の実施態様においてHER2遺伝子は、標準試料に対して、1.1倍より多く増幅され、例えば標準試料の1.2倍より多く、例えば1.3倍より多く、例えば1.4倍より多く、例えば1.5倍より多く、例えば1.6倍より多く、例えば1.7倍より多く、例えば1.8倍より多く、例えば1.9倍より多く、例えば2倍より多く、例えば3倍より多く、例えば4倍より多く、例えば5倍より多く、例えば6倍より多く、例えば7倍より多く、例えば8倍より多く、例えば9倍より多く、例えば10倍より多く、例えば15倍より多く、例えば20倍より多く、例えば30倍より多く、例えば40倍より多く、例えば50倍より多く、例えば100倍より多く増幅される。本発明のある実施態様において、HER2遺伝子は、標準試料に対して1.1～2.0倍増幅され、例えば標準試料に対して、1.2～1.9倍の範囲、例えば1.3～1.8倍の範囲、例えば1.4～1.7倍の範囲、例えば1.5～1.7倍の範囲、例えば1.7～1.9倍の範囲、例えば1.8～1.9倍の範囲で増幅される。

10

【0099】

異常なタンパク質発現

異常タンパク質発現は、例えば該タンパク質レベル、該タンパク質の欠如、非機能性タンパク質を引き起こす突然変異のような機能不全、該タンパク質の細胞局在化の不全のような、タンパク質発現の異常を意味する。

20

【0100】

欠如は通常、試料中の又は該試料の腫瘍細胞中の検出可能なタンパク質の欠如を意味する。

【0101】

ある実施態様において、異常タンパク質発現は、対照試料の標準レベルに対する倍数として測定される。別の実施態様において異常タンパク質発現は、標準レベルより低い倍数として測定される。

【0102】

異常なトポイソメラーゼIIタンパク質発現に関する第2の実施態様において、トポイソメラーゼIIタンパク質は、標準試料に対して2倍より多く過剰発現され、例えば標準試料の3倍より多く、例えば4倍より多く、例えば5倍より多く、例えば6倍より多く、例えば7倍より多く、例えば8倍より多く、例えば9倍より多く、例えば10倍より多く、例えば15倍より多く、例えば20倍より多く、例えば30倍より多く、例えば40倍より多く、例えば50倍より多く、例えば100倍より多く過剰発現される。

30

【0103】

異常なErbb2タンパク質発現に関する第2の実施態様において、Erbb2タンパク質は、対照試料に対して2倍より多く過剰発現され、例えば対照試料の3倍より多く、例えば4倍より多く、例えば5倍より多く、例えば6倍より多く、例えば7倍より多く、例えば8倍より多く、例えば9倍より多く、例えば10倍より多く、例えば15倍より多く、例えば20倍より多く、例えば30倍より多く、例えば40倍より多く、例えば50倍より多く、例えば100倍より多く過剰発現される。

40

【0104】

好適な実施態様において本発明は、腫瘍細胞にTIMP-1タンパク質が欠如していることを特徴とする、癌を有する個体において、トポイソメラーゼIIインヒビター療法に対する応答を予測する方法である。

【0105】

標準

「標準」は、非癌個体から腫瘍中の非悪性細胞（例えば腫瘍組織間質細胞）までの、対応する生物学的試料のプールについての対応する測定値のような、任意の適切な標準を意味する。

50

【0106】

集団から得られる標準は、DNA異常又はタンパク質発現のレベルを測定するために使用されることを特徴とする、癌を有する個体でトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測する方法。

【0107】

該標準は、TIMP-1、ErbB2、又はトポイソメラーゼII タンパク質が、試料（例えばELISAアッセイに適用された試料）中で異常に発現されているかどうかを測定するために、試料中のTIMP-1、ErbB2、又はトポイソメラーゼII タンパク質免疫反応性のようなシグナルのベースラインを設定するのに使用される。

【0108】

具体的な実施態様において標準は、例えばウェスタンブロットリング、免疫組織化学試験、ELISA、フローサイトメトリー、又はRIAの手段により、TIMP-1タンパク質の有無を測定するように、試料中のTIMP-1タンパク質の有無を測定するための、ベースライン/カットオフ値を設定するために使用される。

【0109】

ある実施態様において標準は、試料内標準、試料間標準、及び内部標準よりなる群から選択される。

【0110】

同じ染色体を標的とする標準が含まれることを特徴とする、問題の遺伝子のDNA異常の測定を含む本発明の方法の1つの例。すなわち染色体17q21上のTOP2A/HER2アンプリコン中のDNA異常（例えば、TOP2A遺伝子又はHER2遺伝子中のDNA異常）について、問題の遺伝子の対立遺伝子が欠失されているか又は増幅されているかを測定するために、染色体17の領域の動原体を標的とする標準が使用される。

【0111】

従ってある実施態様は、DNA異常が、FISH（蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション）のようなインサイチュールハイブリダイゼーション手段により測定されることを特徴とする、本発明のトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測するための方法に関する。

【0112】

別の実施態様において該DNA異常は、該試料中に含まれる内部標準配列との平均比率として測定される。ある実施態様において該内部標準は、腫瘍組織試料のような試料中に含まれる二倍体の非悪性細胞である。本発明の好適な実施態様において、腫瘍組織試料は腫瘍組織間質細胞である。

【0113】

さらなる実施態様において標準は、染色体17又はX染色体の動原体領域を標的とするフルオレセイン標識又はテキサスレッド5標識のような、標識プローブのシグナルである。具体的な実施態様においてプローブは、ペプチド核酸（PNA）に基づくプローブである。この種の標準は、染色体17q21上のTOP2A/HER2アンプリコン中のDNA異常（例えば、TOP2A遺伝子又はHER2遺伝子中のDNA異常）を測定するためのFISHアッセイのようなFISH応用に適している。別の実施態様において、TIMP-1遺伝子中のDNA異常を測定するためのFISHアッセイで、同様の種類の標準が使用される。

【0114】

DNA異常は、該試料中に含まれる標準配列に対する平均比率として測定される。

すなわちある実施態様においてDNA異常は、該試料中に含まれる内部標準配列に対する平均比率として測定される。

【0115】

ある実施態様において内部標準配列は、染色体17の動原体領域上に存在する。

具体的な実施態様において内部標準配列は、染色体X サテライト（CenX）である。

10

20

30

40

50

【0116】

DNA 遺伝子の対立遺伝子の欠失又は遺伝子増幅のようなDNA異常は、遺伝子特異的プローブの結合に対応するシグナルと、標準プローブの動原体領域プローブの結合に対応するシグナルとの比率を使用して測定される。

【0117】

従ってある実施態様において試料の腫瘍細胞は、TIMP-1/CenXの平均比が0.8未満である場合、TIMP-1遺伝子欠失を含み、該比が、0.8より大きく2.0未満である場合、正常である。本発明のある実施態様において、TIMP-1/CenXの平均比は、0.7未満、例えば0.6未満、例えば0.5未満、例えば0.4未満、例えば0.3未満、例えば0.2未満、例えば0.1未満、例えば0.1~0.8の範囲、例えば0.2~0.7の範囲、例えば0.3~0.6の範囲、例えば0.4~0.5の範囲であり、該比が、0.8より大きく2.0未満である場合、正常である。

10

【0118】

別の実施態様において腫瘍細胞は、TOP2A/CenXの平均比が0.8未満である場合、TOP2A遺伝子欠失を含み、又はTOP2A/CenXの平均比が2.0より大きい場合、増幅を含み、該比が、0.8より大きく2.0未満である場合、正常である。本発明のある実施態様において、TOP2A/CenXの平均比は、0.7未満、例えば0.6未満、例えば0.5未満、例えば0.4未満、例えば0.3未満、例えば0.2未満、例えば0.1未満、例えば0.1~0.8の範囲、例えば0.2~0.7の範囲、例えば0.3~0.6の範囲、例えば0.4~0.5の範囲であり、該比が、0.8より大きく2.0未満である場合、正常である。

20

【0119】

第3の実施態様において腫瘍細胞は、TOP2A/CenXの平均比が0.8未満である場合、HER2遺伝子欠失を含み、又はHER2/CenXの平均比が2.0より大きい場合、増幅を含み、該比が、0.8より大きく2.0未満である場合、正常である。本発明のある実施態様において、HER2/CenXの平均比は、0.7未満、例えば0.6未満、例えば0.5未満、例えば0.4未満、例えば0.3未満、例えば0.2未満、例えば0.1未満、例えば0.1~0.8の範囲、例えば0.2~0.7の範囲、例えば0.3~0.6の範囲、例えば0.4~0.5の範囲であり、該比が、0.8より大きく2.0未満である場合、正常である。

30

【0120】

別の実施態様において標準は、DNA異常又はタンパク質発現のレベルを測定するために使用される。該標準は、非癌個体の集団、又は癌個体の組合せ群、例えばCMF治療した癌個体の群のような集団から得られる。

【0121】

さらに別の実施態様において、該標準は正常な二倍体遺伝子バックグラウンドである。

【0122】

例えば、TOP2A DNA 遺伝子増幅又はTOP2A DNA 遺伝子欠失の意味において、TOP2A DNA 異常レベルを測定するのに適した標準は、非癌個体からの対応する生物学的試料中のTOP2A DNA 対立遺伝子からの平均シグナル、又は該腫瘍試料中の非悪性細胞中の平均シグナルである。

40

【0123】

ある実施態様において、DNA異常又はタンパク質異常の測定は、個体からの保存物質、例えば腫瘍組織を含むパラフィンブロックについて行われる。

【0124】

トポイソメラーゼII インヒビター療法

ある実施態様においてトポイソメラーゼII インヒビター療法は、癌を有する個体への、少なくとも1個のトポイソメラーゼII インヒビターを含む組成物の投与を含む。好適な実施態様において、トポイソメラーゼII インヒビター療法に使用される組成物は、4-エピルブリシン、ダウノルピシン、ダウノルピシン(リボソーム)、ドキシソルピシン、

50

ドキソルピシン（リポソーム）、エピルピシン、イダルピシン、及びミトキサントロンよりなる群から選択される少なくとも1個のアントラサイクリンを含む。

【0125】

トポイソメラーゼII インヒビターは、単独で、又は少なくとも1個の他の化学療法剤とともに投与される。本発明のある実施態様において、トポイソメラーゼII インヒビター療法はCEF治療であり、ここでCEFは、シクロホスファミド、4-エピルプリシン、及び5-フルオロウラシルを意味する。さらに別の実施態様において、トポイソメラーゼII インヒビター療法は、トポイソメラーゼII インヒビター以外に、シクロホスファミド、タキサン類、及び/又は5-フルオロウラシルを用いる治療である。

【0126】

トポイソメラーゼII インヒビター療法で使用される任意の化合物が、プロドラッグとして投与される。すなわちある実施態様において、シクロホスファミド、タキサン類、5-フルオロウラシル、トポイソメラーゼII インヒビター（例えばアントラサイクリン）よりなる群から選択される少なくとも1個の薬剤は、該薬剤のプロドラッグの形である。

【0127】

トポイソメラーゼII インヒビター療法は、リポソーム封入してもよい。

【0128】

ある実施態様において、トポイソメラーゼII インヒビター療法は、アポトーシス又は有糸分裂破局のインデューサーを含む。

【0129】

別の実施態様においてトポイソメラーゼII インヒビター療法は、術前補助療法、補助療法、及び転移疾患の治療よりなる群から選択される。

【0130】

癌の治療法

本発明の別の態様は、トポイソメラーゼII インヒビター療法に対して応答する可能性の予測に基づく癌の治療に関する。

【0131】

該態様は、個体の癌を治療する方法であって、

- a. 前記請求項のいずれかのトポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測し、
- b. 該個体が応答する可能性の高いトポイソメラーゼII インヒビター療法を選択し、そして
- c. 該個体を該トポイソメラーゼII インヒビター療法に付す、ことを含んでなる方法に関する。

【0132】

該治療法のある実施態様において、トポイソメラーゼII インヒビターは、特に限定されないが、4-エピルプリシン、ダウノルピシン、ダウノルピシン（リポソーム）、ドキソルピシン、ドキソルピシン（リポソーム）、エピルピシン、イダルピシン、及びミトキサントロン、又はこれらの組合せよりなる群から選択される少なくとも1個のアントラサイクリンである。

【0133】

さらなる実施態様において、トポイソメラーゼII インヒビター療法は、シクロホスファミドと5-フルオロウラシルとをさらに含む組成物中に含まれる。

【0134】

さらなる実施態様において、トポイソメラーゼII インヒビター療法は、タキサンをさらに含む組成物中に含まれる。

【0135】

キット

本発明の第3の態様は、トポイソメラーゼII インヒビター療法に対する応答を予測するためのキットであって、

10

20

30

40

50

a . 生物学的試料中の、TOP2A又はHER2 DNA異常のようなTOP2A/HER2アンプリコン中の染色体DNA異常の測定に適した試薬と、

b . 生物学的試料中の、TIMP-1 DNA異常の測定又はTIMP-1タンパク質レベルの測定に適した試薬とを、
含んでなるキットに関する。

【0136】

本発明の態様の1つの文脈に記載される実施態様と特徴はまた、本発明の他の態様にも適用されることに注意されたい。

【0137】

本出願で引用される特許文献及び非特許文献は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0138】

本発明は、以下の非限定例によりさらに詳細に説明される。

【0139】

危険率

「危険率」(HR)は、トポイソメラーゼIIインヒビター療法のような治療から、無病生存期間の延長のような利益が得られる可能性に関する。

【0140】

本発明のある実施態様において、HRは、標準としてのCMF治療からの有効性ととともに、CEF治療からの有効性を有する可能性を記載する。HRが1であることは、治療を受けている群と標準群との間に差が無いことを意味する。従ってHRが0.5であることは、CEF治療された患者が、CMF治療された患者と比較して、再発を経験するリスクが50%低下していることを意味する。評価の統計的検出力を改善するために、信頼区間が含まれる。

【0141】

実施例1の表1は、トポイソメラーゼIIインヒビター療法のような治療から利益を受ける可能性を評価するための危険率の使用を例示する。標準群のHR(CMF治療患者の場合)は、1に設定される。

【0142】

従って、本発明の好適な実施態様は、癌を有する個体で、トポイソメラーゼIIインヒビター療法に対する応答を予測する方法であって、トポイソメラーゼIIインヒビター療法に対して応答する可能性は、危険率を用いて測定されることを特徴とする方法に関する。

【0143】

定義

本発明を詳細に考察する前に、以下の用語と慣習をまず定義する：

【0144】

「抗癌療法」は、癌を治療し緩和することを目的とする非手術的治療処方について使用される用語である。以下に例を示すが、抗癌療法は、化学療法、及び/又は放射線療法、及び/又は抗ホルモン療法、及び/又は生物学的療法でもよい。

【0145】

「トポイソメラーゼIIインヒビター療法」は、少なくとも1個のトポイソメラーゼIIインヒビターの使用を含む化学療法的抗癌療法を意味する。トポイソメラーゼIIインヒビターは、シクロホスファミド、タキサン類、及び/又は5-フルオロウラシルのような他の化学療法剤と組合せて投与してもよい。

【0146】

「アントラサイクリン」は、4-エピルブリシン、ダウノルピシン、ダウノルピシン(リポソーム)、ドキシルピシン、ドキシルピシン(リポソーム)、エピルピシン、イダルピシン、及びミトキサントロンの群を意味する。

【0147】

10

20

30

40

50

以下で本発明を、非限定的図面と実施例により説明する。

【実施例】

【0148】

本文脈において、以下の略語が使用される：

D B C G : デンマーク乳癌共同研究グループ (Danish Breast Cancer Cooperative Group)

C M F : シクロホスファミド、メソトレキセート、及び5 - フルオロウラシル

C E F : シクロホスファミド、4 . エピ - アドリアマイシン、及び5 - フルオロウラシル

C A F : シクロホスファミド、4 . エピ - アドリアマイシン、及び5 - フルオロウラシル 10

T O P 2 A 正常 : T O P 2 A 遺伝子中にDNA異常は無し

H E R 2 正常 : H E R 2 遺伝子中にDNA異常は無し

H T 感受性 : H E R 2 増幅、又はH e r 2 免疫組織化学試験について3 +、及びT I M P - 1 陰性

2 T 感受性 : T O P 2 A 遺伝子異常、及びT I M P - 1 陰性

T M A : 組織マイクロアレイ

E R 又はE R 免疫染色 : エストロゲン又はプロゲステロン受容体についての免疫染色

F I S H : 蛍光インサイチュールハイブリダイゼーション

I H C : 免疫組織化学試験 20

I D F S : 無侵襲性疾患生存率

O S : 全生存率

【実施例1】

【0149】

原発性乳癌を有する患者 (n = 647) においてT I M P - 1 腫瘍細胞免疫反応性の欠如は、補助アントラサイクリンに基づく化学療法の効果を予測する

【0150】

方法

患者と方法

簡単に説明すると、D B C G (デンマーク乳癌共同研究グループ (Danish Breast Cancer Cooperative Group)) 治験89Dは、C E F (シクロホスファミド、エピルピシン、及びフルオロウラシル) をC M F (シクロホスファミド、メソトレキセート、及びフルオロウラシル) に対して比較した非盲検無作為化第III相治験であった。89D治験の適格患者は、節陽性 (又は腫瘍サイズ 5 cm) でホルモン受容体陰性乳癌の患者と、節陰性で悪性グレードII又はIII腫瘍を有する更年期前患者であった。すべての患者がインフォームドコンセントに同意した。D B C G 89D治験は、節陽性でホルモン受容体陽性腫瘍の患者は含まなかった。これらの患者は、内分泌治療の治験に含まれた。D B C G は、元々のプロトコールとバイオマーカーの追加を準備し、デンマーク国立生物医学研究倫理委員会 (Danish National Committee on Biomedical Research Ethics) は、その実施前に元々のプロトコールとバイオマーカーの追加を認可した。 30 40

【0151】

病理評価

病理的方法は、WHOによる組織型の分類、腫瘍境界の観察、皮膚若しくは深在筋膜への浸潤、肉眼的腫瘍サイズの測定、同定された転移節の数とリンパ節の数の測定を含んだ。すべての浸潤性腺管癌を、悪性度についてグレード分類した。次にすべての切片を、免疫組織化学試験によりERについて中央で分析し、これらの中央で得られたERデータを本解析で使用した。染色された腫瘍細胞が10%以上の腫瘍を、ER陽性で見なした。

【0152】

1990年6月~1998年1月に行った保管腫瘍組織の遡及的採取とT M A の作成において、1224人の患者をD B C G 治験89Dで無作為化し、これらのうちの980人 50

はデンマークで集めた。治験に参加した806人のデンマーク人患者からの保管パラフィン包埋組織ブロックは、2001年9月～2002年8月に試験場所で集め、中央で保存した。Histopathology Ltd (AH-diagnostics, Denmark)のTMA-builderを用いてまだ評価できる797ブロックのうちの707ブロックから、組織マイクロレイ(TMA)がうまく作成された。ヘマトキシリン染色切片上のドナーブロック中で標的部位を確定し、2つの2mm組織コアを、受容TMAブロックに移した。配置決めのために、腎組織のコアを使用して、上の角に印を付けた。本試験用に、全部で659個の腫瘍がTIMP-1分析のために利用できた。腫瘍が無いもの(6549～707)は、他の試験ですでに使用されて、本試験用に残りがなかったためである。表7は、試験中の患者の流れを示す。

【0153】

TIMP-1免疫染色

組換えヒトTIMP-1に対して作成したマウスモノクローナル抗体(クローンVT7)を含めた。本発明者らは、この抗体をすでに免疫染色用に評価してあった。VT7抗体はIgG₁サブタイプであり、0.25µg/mlの濃度で使用した。さらにトリニトロフェノールハプテンに対して作成した無関係のIgG₁モノクローナル抗体(抗TNP)を対照として使用した。各免疫組織化学実験のために、陽性対照(TIMP-1を含むことがわかっているヒト乳癌)を含めた。IHC染色に使用した試薬は、Dako A/Sから得て、製造業者の説明書に従って使用した。

【0154】

簡単に説明すると、パラフィン切片(4µm)からキシレンでパラフィンを除去し、連続濃度勾配のエタノールで再水和した。通常電子レンジで10mMクエン酸緩衝液(pH6.00)中で切片を10分間沸騰させ、次に室温で熱緩衝液中で30分間沸騰して、抗原を採取した。内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止するために、切片を1%過酸化水素で10分間処理した。切片を一次抗体と4で一晩インキュベートした。モノクローナル抗体をAdvance HRP(Code no K4068)を用いて検出し、切片をDAB+(Code No K5007)と5分間インキュベートさせて、反応物を視覚化した。インキュベーションの間に、0.5%トリトンX-100含有TBS(pH7.6)を用いて洗浄を行った。切片をマイヤー・ヘマトキシリンで対比染色し、すべての染色操作は用手法で行った。

【0155】

組織切片の免疫染色は、上皮乳癌細胞中のTIMP-1免疫反応性の尺度として+と-記号を使用して、半定量的に評価した。シグナル強度のスコア化は含めなかった。組織切片のスコア化は、2人の独立した病理学者(GWとEB)によりブラインドで行われた。不一致がある場合は、一緒にスライドを観察して合意に達した。

【0156】

統計的方法

免疫染色結果を、統計解析のためにDBC Gに渡した。

【0157】

追跡調査時間を、可能な追跡調査のカプランマイヤー推定値により定量化した。IDFS(無侵襲性疾患生存率)が一次終点であり、OS(全生存率)が2次終点であった。IDFSは、何らかの原因による局在化、2回目の原発性侵襲癌、又は死亡には無関係に、無作為化から侵襲性乳癌再発までの経過時間として規定した。OSは、無作為化から、何らかの原因による死亡までの経過時間として規定した。IDFSとOSは、カプランマイヤー推定値と対数順位検定とを使用して解析した。IDFSとOSに対する治療処方ならびに中央で評価したTIMP-1の効果は、調整せずに推定した危険率、及びCox比例ハザードモデル(Cox proportional hazard model)を使用して調整した危険率により、定量化した。多変量Cox比例ハザードモデルはまた、ワルド検定(Wald test)を使用して治療法とTIMP-1との交互作用を調べるために応用した。この多変量モデルは、TIMP-1、更年期状態、腫瘍サイズ、陽性リンパ節、組織型とグレード、中央のERホルモン受容体状態、治療処方、及びTIMP-1と治療との相互作用項を含んだ。組織型とグレード、及びER受容体状態については比例ハザード推定を行わず、これらは、層

10

20

30

40

50

別変数としてモデル中に含めた。バイオマーカーについて情報が有る患者と無い患者との差、治療法間の差、及びTIMP-1状態と臨床-病理的変数との相関は、未知数を排除した²検定により検定した。P値は両側検定とした。統計解析は、SAS 9-1プログラムパッケージを使用して行った。

【0158】

結果

調べた腫瘍試料の総数は659であり、このうち12はCMFもCEFも投与されておらず、従って最終的な数647人の患者について以後の解析を行った。これらの患者のうち357人はCMFを投与され、290人の患者はCEFを投与された。表7は、DBC G 89D試験のデンマーク部分に参加した元々の患者と、最終的に647人の患者が最終解析に含まれることになった流れを示す。本解析の時点(2007年8月1日)で、308人(48%)は死亡しており、312人(48%)は、IDFSに対応する症状があった。CEFを投与されている患者については、123人(42%)が死亡しており、129人(44%)はIDFSに対応する症状があった。CMF治療患者では、185人(52%)が死亡しており、183人(51%)がIDFS症状があった。IDFSに関して可能な追跡調査時間中央値は9.8年であり、OSについては13.8年であった。

【0159】

表5は、集団を治療する目的のベースライン特性を示す。明らかのように、本試験に含まれた患者は、残りの患者より有意に大きな腫瘍($p < 0.0001$)と有意に高グレードの悪性腫瘍($p = 0.02$)とを有した。他の古典的ベースライン特性については有意差はなかった。647人の患者を2群(CMF対CEF)に分けると、ベースライン特性に差は観察されず、本試験の患者の3分の1は死亡したが、含まれた患者がバランスの取れた分布を保持した。

【0160】

腫瘍試料の75%は、陽性のTIMP-1免疫反応性を示した。免疫反応性のパターンは、TIMP-1免疫反応性を示すほとんどすべての上皮癌細胞(図6A)から、分散及び集中したTIMP-1免疫反応性(図6B)(TIMP-1陽性)、そしてTIMP-1腫瘍細胞免疫反応性の完全な欠如(示していない)までであった。ある腫瘍では、顕著な腫瘍組織間質細胞TIMP-1免疫反応性が観察されたが、これらの腫瘍に上皮癌細胞TIMP免疫反応性が欠如している場合は、これらはTIMP-1陰性とした(図6D)。図6Cは陰性対照である。図6は、TIMP-1陽性腫瘍細胞を有する患者と、TIMP-1陰性腫瘍細胞を有する患者とのベースライン特性を示す。TIMP-1陽性腫瘍細胞を有する患者は、有意に多い腫瘍陽性腋窩リンパ節($p = 0.02$)と、有意に多いER陽性腫瘍($p = 0.04$)とを有した。TIMP-1陰性腫瘍($n = 160$)のうちで、大半はER陰性であった($n = 107$)。しかしTIMP-1陽性腫瘍($n = 487$)では、高率にER陰性($n = 294$)があった。これは、TIMP-1陰性が主にER陰性腫瘍中にあるが、TIMP-1がERの一般的な代理物ではないことを示す。TIMP-1陰性/陽性患者間のベースライン特性について他の差は、証明されなかった。

【0161】

多変量解析(調整済み)は、治療群、更年期状態、腫瘍サイズ、陽性腋窩リンパ節の数、組織型と悪性度グレード、中央測定したER、及びTIMP-1腫瘍細胞免疫反応性を含んだ。上記したように、組織型とグレード及びER受容体状態については比例ハザード推定を行わず、これらは、層別変数として多変量モデル中に含めた。本発明者らは、まず本試験に含めた647人の患者で、CEF対CMFのIDFSとOSに対する効果を解析した。すなわち癌細胞中のTIMP-1免疫反応性を考慮した。CEFを投与された患者は、CMFを投与された患者(示していない)と比較すると、優れたIDFS(調整済みHR: 0.78(95%CI: 0.62~0.98; $p = 0.03$)と優れたOS(調整済みHR: 0.77(95%CI: 0.61~0.97; $p = 0.03$)を有した。これらの数値は、元々の試験の数値(IDFS: HR = 0.76、及びOS: HR = 0.73)と異ならず、試験した亜集団が全試験群を代表していることを示唆している。

【0162】

次に本発明者らは、試験に含めたすべての患者群 ($n = 647$) について、TIMP-1 癌細胞の免疫反応性と、IDFS 及び OS との関連を解析した。IDFS について TIMP-1 陽性患者と TIMP-1 陰性患者との間で有意差は見られなかった：未調整 HR = 1.18 (95% CI: 0.91 ~ 1.54; $p = 0.22$)、及び調整済み HR = 0.95 (95% CI: 0.72 ~ 1.24; $p = 0.69$)。OS についての数値は：未調整 HR = 1.17 (95% CI: 0.89 ~ 1.53; $p = 0.25$)、及び調整済み HR = 0.97 (95% CI: 0.73 ~ 1.28; $p = 0.82$) であった。

【0163】

次に、2つの異なる治療群と腫瘍細胞 TIMP-1 の免疫反応性を考慮して、亜集団解析を行った。CEF 治療患者 ($n = 290$) では、TIMP-1 陽性腫瘍を有する個体は、TIMP-1 陰性腫瘍の患者より有意に短い IDFS を有した：未調整 HR = 1.56 (95% CI: 1.01 ~ 2.41; $p = 0.047$) (図 7A)。これに対して、CMF 治療患者 ($n = 347$) では、TIMP-1 陽性患者と陰性患者の間で IDFS に差は見られなかった：未調整 HR = 0.97 (95% CI: 0.69 ~ 1.35; $p = 0.84$) (図 7AA)。OS の対応する数値は：CEF：未調整 HR = 1.41 (95% CI: 0.91 ~ 2.18; $p = 0.13$)、及び CMF：未調整 HR = 1.02 (95% CI: 0.72 ~ 1.43; $p = 0.93$) (図 7B)。

【0164】

多変量解析では、CEF で治療した TIMP-1 陽性患者と陰性患者の間で、IDFS について有意差は見られなかった：調整済み HR = 1.30 (95% CI: 0.83 ~ 2.02; $p = 0.25$)、及び OS：調整済み HR = 1.21 (95% CI: 0.77 ~ 1.90; $p = 0.42$)。CMF で治療した患者でも有意差は見られなかった；IDFS：調整済み HR = 0.76 (95% CI: 0.54 ~ 1.07; $p = 0.12$)、及び OS：調整済み HR = 0.84 (95% CI: 0.59 ~ 1.19; $p = 0.32$)。

【0165】

TIMP-1 免疫反応性癌細胞を有する群で CEF 治療患者と CMF 治療患者の IDFS を比較すると、2つの治療群の間の HR は：調整済み HR = 0.88 (95% CI: 0.68 ~ 1.13; $p = 0.32$) (図 8A) であった。OS の対応する数値は：調整済み HR = 0.83 (95% CI: 0.64 ~ 1.08; $p = 0.17$) (図 8B) であった。これに対して、TIMP-1 癌細胞免疫反応性の無い CEF 治療患者と CMF 治療患者の IDFS を比較すると、調整済み HR = 0.51 (95% CI: 0.31 ~ 0.84; $p = 0.0085$) (図 8A)、及び OS 調整済み HR = 0.58 (95% CI: 0.35 ~ 0.96; $p = 0.03$) (図 8B) であり、CEF で治療した患者の方がよかった。IDFS と OS について、治療効果と TIMP-1 の間の交互作用について、非縮小 Cox 比例ハザードモデルを使用して検定した。IDFS ($p = 0.06$) (図 8A) と OS ($p = 0.21$) (図 8B) について、有意ではない TIMP-1 プロフィール (陽性又は陰性免疫反応性) 対治療法 (CEF 又は CMF) 交互作用が検出された。

【0166】

考察

本試験は、TIMP-1 癌細胞の免疫反応性の欠如が、CMF と比較して、原発性乳癌で補助エピルピシン含有補助療法の好適な効果と関連していることを初めて示し、アントラサイクリン類について TIMP-1 免疫反応性の予測価値を示唆する。CMF と比較して、TIMP-1 陰性患者のアントラサイクリンに基づく補助療法は、再発リスクを 49% そして死亡率を 42% 有意に低下させる。

【0167】

免疫染色についてより優れたものとして、抗 TIMP-1 抗体のパネルの中から、VT7 抗 TIMP-1 モノクローナル抗体をあらかじめ選択した。VT7 は、アミノ酸 169 ~ 174 間に存在する線状の TIMP-1 エピトープを認識する。VT7 免疫染色は、感度と特異性について完全に検証 (VT7 は TIMP-2、3、又は 4 に結合しない) され

10

20

30

40

50

、染色条件は、抗原採取プロトコール、抗体濃度、及びインキュベーション時間などについて最適化された。さらに固定時間（24～72時間）の影響の可能性も試験した。各TMAについて、同じIgG1サブタイプの陰性対照抗体（抗TNP）を使用し、既知のTIMP-1陽性乳癌のスライドを、陽性対照として各アッセイに含めた。

【0168】

元々の89D治験に含めた980人のデンマーク人患者と比較して、本解析に含めた647人の患者の特性には、ほんのわずかの差しか見られず、これは、この647人の患者が全DBC89Dデンマーク試験群を代表していることを示す。元々の89D治験で報告された全体的効果が本サブセットでも再現され、これは、647人の患者がDBC89D治験89D中のデンマーク人の全群の代表であることをさらに支持している。

10

【0169】

本発明者らは、TIMP-1遺伝子欠損マウスから得られたマウス線維肉腫細胞が、TIMP-1を発現する野生型マウス線維肉腫細胞より、インビトロでエトポシド（トポイソメラーゼIIインヒビター）に対して、有意に高い感受性を有することをすでに公表した。アポトーシスアッセイを応用して、TIMP-1がアポトーシスに対して線維肉腫細胞を防御することが証明された。TIMP-1が化学療法誘導性アポトーシスを防御できることは、他の研究者によっても証明された。なぜ本試験のTIMP-1が、CMFではなくCEFに対する感受性/耐性を予測するかは現在不明である。TIMP-1により制御される可能性のあるシグナル伝達経路について、提案がされている。MCF10A乳房上皮細胞株ではTIMP-1の過剰発現が、チロシンリン酸化を介して焦点接着キナーゼ（FAK）の構成性活性化を誘導することが証明された。FAKは、ホスファチジルイノシトール-3キナーゼ（PI-3キナーゼ）の上流レギュレーターであり、bc1-2ファミリーメンバーの制御（細胞生存に至る詳細に性状解析されたシグナル伝達経路）を引き起こすことが、すでに証明されている。リン酸化FAKは、PI-3キナーゼと結合しこうしてこれを活性化し、これが次にAktキナーゼを活性化する。Aktはタンパク質Badをリン酸化し、その結果これは、捕捉タンパク質14-3-3により細胞質中に隔離され、従ってもうbc1-2やbc1-X_Lと相互作用して阻害することができない。bc1-2とbc1-X_Lは、ミトコンドリア膜中に存在するタンパク質であり、活性化されるとこれらの抗アポトーシスタンパク質はBaxを阻害し、従ってミトコンドリアからのチトクロームcの放出を妨害する。これは次に、カスパーゼカスケードの活性化を妨害し、従ってアポトーシスを妨害する。次にこれは、カスパーゼカスケードの活性化を阻止し、従ってアポトーシスを阻止する。すなわちTIMP-1は栄養素のように作用して、FAK、PI-3、Akt、及びbc1-2ファミリーメンバーを含む生存経路を開始させ、カスパーゼ活性化の阻害を引き起こしこうしてアポトーシスの阻害を引き起こすことにより、アポトーシスを阻害する。

20

30

【0170】

DBC89D治験に参加した患者から得られた腫瘍組織中のTIMP-1免疫反応性を試験することにより、本発明者らは、その乳癌細胞中のTIMP-1免疫反応性が欠如しアントラサイクリンを含む併用化学療法で治療されている患者が、CMFで治療されている患者より有意に優れた結果を有することを証明した。多変量解析では、TIMP-1陰性腫瘍を有する患者は、CMFで治療するよりCEFで治療すると、49%低い再発リスクと42%低い死亡リスクを有した。従ってこれらの臨床結果は、TIMP-1タンパク質がアントラサイクリン治療に対する感受性/耐性に関連しているという、我々の仮説のさらに別の支持である。しかし、補助療法の場でTIMP-1免疫反応性とアントラサイクリン感受性/耐性の間の有意な相関を確認する、独立にした研究が待たれる。さらに我々は現在、TIMP-1の結果を、HER2とTOP2A遺伝子異常アッセイの結果（両方ともアントラサイクリンに対する感受性と関連している）と比較している。

40

【0171】

本発明者らは、原発性乳癌中のTIMP-1タンパク質のレベルが予知的情報を有することを、すでに公表している。従って、IDFSに対するTIMP-1免疫反応性の観察

50

された作用が予知的又は予測的であると、推測することができる。C M F患者中ではT I M P - 1免疫反応性の作用は観察されず、C E F治療患者中にわずかに観察されたのみであるため、本結果はT I M P - 1免疫反応性が何らかの予測価値を有することを示唆し、本試験は我々の前臨床観察結果と一致する。以前の予知的試験では、T I M P - 1タンパク質は腫瘍全体から抽出され、従って測定されたT I M P - 1タンパク質は、汚染血液、腫瘍組織間質細胞、細胞外マトリックス、及び癌細胞から得られたものかも知れない。これに対して本試験では、上皮癌細胞中の局在化T I M P - 1タンパク質のみが最終解析に含まれ、これが本試験と以前の試験との差のもう一つの理由である。

【0172】

結論として本試験は、上皮癌細胞中でT I M P - 1タンパク質免疫反応性の無い腫瘍が、C M F治療よりアントラサイクリン治療に対してより感受性であることを初めて証明する。将来の試験は、T I M P - 1免疫反応性、H E R 2、T O P 2 Aと、アントラサイクリン類の効果との関係を確立することを目指している。さらに本結果は、独立した患者群で評価されるであろう。

10

【実施例2】

【0173】

T O P 2 A及びT I M P - 1腫瘍細胞遺伝子異常とT I M P - 1腫瘍細胞タンパク質免疫反応性との組合せ予測価値の臨床試験

方法

高リスク乳癌患者をC M F又はC E Fによる補助療法に無作為化した、無作為化試験から647の患者試料を得た。終点は無侵襲性疾患生存率(I D F S)であった。

20

【0174】

患者試料は、患者の原発性腫瘍からのホルマリン固定パラフィン包埋組織から作成した組織マイクロアレイからなった。すべての試料に識別番号があった。

【0175】

T O P 2 A遺伝子異常は、既に記載されているように試験した(Koop et al. 2005)。

【0176】

T I M P - 1遺伝子異常は、標準的F I S H技術を使用して試験した。U C S Cゲノムブラウザー(<http://genome.ucsc.edu>)を使用してT I M P - 1遺伝子の周りの400kb領域を分析することにより、B A C(細菌性人工染色体)クローン(RP11-466C12)を同定した。B A Cクローンは、すでに同定された遺伝子を包含している：A R A F野生型対立遺伝子(A R A F)、ヒトシナプシンI(S Y N 1)、メタロプロテイナーゼ組織阻害因子-1(T I M P - 1)、補体因子プロベルジン(C F P)、E L K 1、遍在発現転写体(U X T)、及びA K 0 9 4 1 0 8。このクローンを、12.5 µg/ml クロラムフェニコール(Sigma-Aldrich, Denmark)を補足したL B培地(Sigma-Aldrich, Denmark)中で培養し、B A C D N Aのアルカリ精製法に従って精製した(Poulsen 2004)(Poulsen TS, 2004)。このクローンをU C S CからのD N A配列のコンピューター内B a m H I消化物を使用して証明し、酵素の製造業者(Invitrogen, Denmark)が薦めるように、精製B A CクローンのB a m H Iエンドヌクレアーゼ消化と比較した。

30

【0177】

プローブB A C D N Aをテキサスレッド-5-d C T P(Millipore Corporation, Temecula, California, USA)を用いて、製造業者(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)が記載したようにニック翻訳により標識した。F I S H用に全部で10ng/mlの標識D N Aを使用し、特異的P N Aオリゴ(Nielsen, KV et al., 2004)を使用して、反復配列から得られる不要なバックグランド染色の抑制を行った。染色体X サテライト配列に特異的なP N Aのフルオレセイン標識混合物(C e n X P N Aプローブ)を、染色体Xのコピー数の標準として使用した。P N AはDako A/Sから供給された。図1は、染色体Xの略図、B A C D N Aに包含される領域X p 1 1の一部の局在化、ならびにC e n X P N Aプローブにより包含される動原体Xの領域を示す。F I S Hは、Histology F I S H accessoryキットを使用して、製造業者(K5599, Dako A/S, Denmark)の記載を若干

40

50

変更して行った。前処理工程は、水浴は使用せず、電子レンジ (Whirlpool, Denmark, model JT356 with 6th sense) を使用して行った。スライドを、十分な 1 × 前処理緩衝液中にスライドが完全に覆われるように沈め、スチーム機能 (6th sense) を使用して 10 分間処理し、次に室温 (RT) で 15 分間処理した後、Histology FISH accessory キットとともに提供されたプロトコールに従って続けた。

【0178】

FISH の評価

100 × 油浸対物レンズ (開口数) を取り付けた Leica 顕微鏡 (Leica, Denmark) を使用して、ハイブリダイゼーションシグナルをスコア化した。二重バンドパス蛍光フィルター (Chromotechnology, Brattleboro, VT) を使用して、FITC とテキサスレッドシグナルを同時に視覚化した。DAPI 対比染色に基づいて、完全な形態を有する 60 個の重複していない中間期核をスコア化して、各 TIMP-1 と Cen X プローブについてハイブリダイゼーションシグナルの数を測定した。TIMP-1 の増幅は、TIMP-1 対 Cen X シグナルの平均比 (= 増幅レベル) が 2 以上 (比 2) として規定した。この比率が 0.8 未満 (比 < 0.8) の場合は、TIMP-1 が欠失していると規定した。従って正常な TIMP-1 遺伝子 / Cen X 比は、この間 (0.8 比 < 2) として規定した。

【0179】

TIMP-1 免疫反応性の評価

TIMP-1 タンパク質の免疫組織化学試験は、VT7 抗 TIMP-1 モノクローナル抗体 (Sorensen et al. 2005) を使用して、すでに公表された方法 (Sorensen et al. 2005) に従って行った。組換えヒト TIMP-1 に対して作成したマウスモノクローナル抗体 (クローン VT7、IgG₁) (Moller Sorensen et al. 2005; Sorensen et al. 2006) を 0.4 µg/ml の濃度で使用した。

【0180】

すべての切片を、患者の病歴を知らされていない 2 人の独立した病理学者が評価した。各試料を腫瘍細胞免疫反応性の有無について評価し、+ 又は - としてスコア化した。

【0181】

次にすべてのデータを、統計解析のためにデンマーク乳癌共同研究グループ (Danish Breast Cancer Cooperative Group) に渡した。

【0182】

結果

290 人の患者が CEF を投与され、357 人が CMF を投与された。これらのうち、216 / 290 と 271 / 357 は TIMP-1 免疫反応性が陽性であり、61 / 290 と 78 / 357 は TOP2A 遺伝子異常 (増幅又は欠失) があった。24 人の患者は、TOP2A DNA 状態が不明であった。

【0183】

TIMP-1 腫瘍細胞免疫反応性に従って層別した患者の無病生存率のカプランマイヤープロットを、図 1 A と B に示す。図 1 B は、CMF を投与されている患者では、TIMP-1 腫瘍細胞反応性は DFS に影響がなかったことを示す ($p = 0.84$)。これに対して、CEF を投与されている患者では、腫瘍細胞 TIMP-1 免疫反応性の欠如は、DFS の有意な上昇と関連していた ($p = 0.047$) (図 1 A)。これに対して、腫瘍細胞中に TIMP-1 免疫反応性を有する患者は、CMF で治療した患者に匹敵する DFS を有した ($p = 0.46$)。

【0184】

CEF で治療した患者の無病生存率を示す図 1 A から明らかなように、腫瘍細胞中に TIMP-1 免疫反応性の無い患者は、無病生存率については有意に良好である。例えば 5 年間の追跡調査で、約 72% の TIMP-1 陰性患者は疾患の再発を経験していないが、TIMP-1 陽性患者の 60% のみが無病であった。

【0185】

図 1 B は、CMF を投与され、腫瘍細胞が TIMP-1 免疫反応性を示すかどうかで層

10

20

30

40

50

別された患者の無病生存率を示す。2つの群間で無病生存率に差はなかった。

【0186】

TOP2A遺伝子異常について測定すると、CMFを投与されている患者では、TOP2A遺伝子異常状態はDFS(図2B)に影響が無いことがわかった(図2AとB)。これに対してCEFを投与されている患者では、TOP2A遺伝子異常(増幅又は欠失)を有する患者は、CMFを投与されたTOP2ADNA異常を有する患者と比較して、DFSが有意に改善された(図2A)。

【0187】

CEFで治療した患者の無病生存率を示す図2Bから明らかなように、TOP2ADNA異常を有する患者は、TOP2ADNA異常の無い患者よりはるかに悪い。しかし、CEFを投与されておりTOP2ADNA異常について層別された患者の無病生存率を示す図2Aを見ると、CMFを投与された患者より曲線(TOP2ADNA異常を有する患者)が良いことがわかる(図2B)。

10

【0188】

その癌細胞中で陰性TIMP-1免疫反応性を有する患者のうちで、わずかに24/160(15%)のみがTOP2A遺伝子異常を有するようであった。従って我々は、TOP2A遺伝子異常を有するか又はTIMP-1免疫反応性が欠如していることの、DFSに対する組合せ影響を分析した。結果は、TOP2A分析単独から確定されるCEF治療(CMF治療と比較して)から利益を受ける可能性が高く、危険率が低下することなく、ほとんど2倍の数の患者を同定することができることを示した。表1は、95%信頼限界を含む個々に調整した危険率を示す。すべての値は、危険率を1に設定したCMF群に基づく。

20

【0189】

HRが1であることは、群間に差が無いことを意味する。我々は、組合せたCMF群を標準として使用した。すなわち表は、亜集団中のCMFを用いる治療と比較して、CEF治療から受ける利益を示す。

【0190】

表1から、CEFで治療されたTOP2ADNA異常を有するかTIMP-1陰性の患者は、HRが1未満であり、95%信頼限界が1を超えないことがわかる。これは、これらの患者(TOP2ADNA異常及び/又はTIMP-1陰性)が、CMFによる治療と比較してCEF治療から有意に優れた利益を受けることを意味する。HRが0.54であることは、これらの患者(TOP2ADNA異常及び/又はTIMP-1陰性)にとって利益の確率が46%であることを意味する。また表から、TOP2ADNA異常(増幅又は欠失)と、その腫瘍細胞がTIMP-1免疫反応性が欠如している患者のHRは、ほとんど同じHRを有することがわかる。本発明では、TOP2ADNA異常を有する患者又はTIMP-1タンパク質免疫反応性が欠如した患者は、必ずしも同じではない。次に、TOP2ADNA異常を有する患者及び/又はTIMP-1免疫反応性が無い患者群についてHRを見ると、この亜集団内の患者の数が、TOP2ADNA異常単独で同定される患者の数のほとんど2倍であるにもかかわらず、HRはほとんど同じである(0.48(95%信頼限界:0.34~0.69))。すなわち、TOP2ADNA異常の測定をTIMP-1タンパク質免疫反応性測定と組合せることにより、TOP2ADNA異常の測定単独と比較して、CEFから利益を受ける可能性の高いほとんど2倍の患者が同定される。

30

40

【0191】

組合せ法により、CMF治療から受ける利益(危険率0.48)と比較して、CEF治療から利益を受ける確率が50%を超えて増加している患者の43%を同定することができ、これは、TOP2ADNA異常単独を分析することにより得られる数のほぼ2倍である。

【0192】

図3AとBは、TOP2ADNA異常とTIMP-1免疫反応性を組合せた時の、D

50

FSのカプランマイヤー曲線を示す。

【0193】

図3Bを見ると、CMFで治療した時、TOP2A DNA異常及び/又は腫瘍細胞TIMP-1タンパク質免疫反応性の欠如を有する患者は、腫瘍細胞中にTOP2A DNA異常が無くTIMP-1タンパク質免疫反応性を有する患者より、悪いことがわかる。しかし患者をCEFで治療すると(図3A)、TOP2A DNA異常を有するか及び/又はTIMP-1タンパク質免疫反応性が欠如した患者は、CMFで治療したものよりはるかに良い。すなわち、TOP2A DNA異常を有するか及び/又はTIMP-1タンパク質免疫反応性が欠如し、CEFで治療した患者は、CMFで治療したTOP2A DNA異常を有するか及び/又はTIMP-1タンパク質免疫反応性が欠如した患者より、

10

【0194】

図9は、上皮乳癌細胞中にTIMP-1 DNA異常を示すTIMP-1 FISH分析を示す。

【0195】

考察

本試験は、TIMP-1タンパク質及び/又はTOP2A遺伝子異常の欠如又は低下した濃度は、ある種類の化学療法に感受性を付与することを示す。

【0196】

本試験は、完全な臨床的追跡調査のある大規模な前向き研究から得られた試料について行われた(Ejlertsen et al., Eur J Cancer 2005)。使用したTOP2A FISH分析とTIMP-1免疫組織化学技術の両方とも、既に記載されている。

20

【0197】

本試験の結果は、原発性の高リスク乳癌患者で、CEFを用いる補助治療から受ける利益(IDFSの延長)を予測するのに、TOP2A遺伝子異常測定とTIMP-1免疫組織化学試験の組合せの付加的効果があるが、CMFで治療された患者では効果が無いことを明瞭に示し、アントラサイクリンを含む化学療法から受ける利益の予測において、組合せ試験の価値を示唆している。

【実施例3】

【0198】

高リスク乳癌患者におけるHER2、TOP2A、及びTIMP-1と、補助アントラサイクリンを含む化学療法に対する応答性

30

方法

DBC G 89D 治験とその生物学的サブ研究は、すでに詳細に記載されている(Ejlertsen et al., 2007、及びKnoop et al. 2005)。簡単に説明すると、DBC G 治験 89D は、CEF (シクロホスファミド 600 mg/m²、エピルピシン 60 mg/m²、及びフルオロウラシル 600 mg/m²) を CMF (シクロホスファミド 600 mg/m²、メソトレキセート 40 mg/m²、及びフルオロウラシル 600 mg/m²) に対して比較する、いずれも静脈内投与して3週間間隔で9サイクル行う非盲検無作為化第III相治験であった。89D 治験の適格患者は、ホルモン受容体陰性で節陽性(又は腫瘍サイズ > 5 cm)の乳癌患者と、節陰性で悪性グレードII又はIII腫瘍を有する更年期前患者であった。高度にホルモン応答性腫瘍の患者を、一致した適格性標準でDBC G 治験(89Bと89C)に含めた。DBC G は、元々のプロトコールとバイオマーカーの追加を準備し、デンマーク国立生物医学研究倫理委員会(Danish National Committee on Biomedical Research Ethics)は、その実施前に元々のプロトコールとバイオマーカーの追加を認可した(V.200.1616/89, KF12295003)。

40

【0199】

HER2、ER、及びTIMP-1免疫反応性の中央評価

ホルマリン固定しパラフィン包埋した腫瘍ブロックから、TMA-builder (Histopathology Ltd, AH-diagnostics)を用いて組織マイクロアレイ(TMA)を作成した。ヘマトキシ

50

リン染色切片上のドナーブロック中で標的部位を確定し、2つの2mm組織コアを、受容TMAブロックに移した。ER免疫染色は、室温で3 μ TMA切片について、ER1D5 (Dako)抗体とTech-mate 500 (Dako)を用いて行った。ER発現は、強度は無視して、染色される腫瘍細胞のパーセントとして記録し、結果を陽性(10%の染色細胞)又は陰性(<10%)として2群に分けた。HER2の発現は、切片全体についてHercepTest (Dako)を使用して測定し、0、1+、2+、又は3+としてスコア化した。TIMP-1免疫染色は、既に記載されているように(Sorensen et al. 2006)行った。簡単に説明すると、切片を抗TIMP-1マウスモノクローナル抗体VT7とともにインキュベートした。VT7はマウス/ウサギEnvision+ (Code No K5007, DAKO A/S)を用いて検出し、切片をDAB+ (Code No K5007, DAKO A/S)と2回3分間インキュベートして、反応物を視覚化した。組織切片の免疫染色は、上皮乳癌細胞中のTIMP-1免疫反応性の尺度として+及び-記号を使用して、半定量的に評価した。シグナル強度のスコア化は含めなかった。組織切片のスコア化は、2人に独立した病理学者(GWとEB)によりブラインドで行われた。不一致がある場合は、一緒にスライドを観察して合意に達した。

10

【0200】

TOP2AとHER2 FISH

TOP2AとHER2コピー数は、FISH (TOP2A pharmDXとHER2 pharmDX, DAKO A/S)により視覚化した。少なくとも60個の遺伝子シグナルがスコア化され、核が含まれていた場合は、すべてのシグナルがスコア化された。さらに同じ核中で動原体17シグナルがスコア化され、動原体17に対する遺伝子の比を計算した。腫瘍は、比率が<0.8、0.8~1.9、及び>2.0に従って、TOP2A/HER2が欠失しているか、正常か、又は増幅されたとしてスコア化した。

20

【0201】

統計的方法

追跡調査時間を、可能な追跡調査のカプランマイヤー推定値により定量化した。無侵襲性疾患生存率(IDFS)が一次終点であり、何らかの原因による局在化、同側若しくは対側の乳房を含む侵襲性乳癌、2回目の原発性非乳房侵襲癌、又は死亡には無関係に、無作為化から侵襲性乳癌再発までの経過時間として規定した。2次終点であるOS(全生存率)は、無作為化から、何らかの原因による死亡までの経過時間として規定した。IDFSとOSは、カプランマイヤー推定値と対数順位検定とを使用して解析した。IDFSとOSに対する、HER2又はTOP2Aバイオマーカー状態と組合せたTIMP-1の効果は、Cox比例ハザードモデル(Cox proportional hazard model)を使用して調整せずに推定した危険率により定量化した。Cox比例ハザードモデルはまた、同じ患者材料についてすでに開発されたモデルに基づいて、多変量解析に応用した。この多変量モデルは、TIMP-1、TOP2A、HER2、ER、腫瘍サイズ、陽性リンパ節、組織型とグレード、更年期状態、およびCMF若しくはCEFを用いる治療を含んだ。IDFSとOSに対するCox比例ハザードモデルは、適合度(goodness-of-fit)法の結果に従って調整し、及びERホルモン受容体状態ならびに組織型とグレードは、層別変数として含めた。バイオマーカー(HT、2T、TIMP-1、TOP2A、及びHER2)と治療処方(CMF又はCEF)との交互作用は別々のモデルで試験し、ワルド検定(Wald test)を応用した。

30

40

【0202】

バイオマーカーについて情報が有る患者と無い患者との差、治療法間の差、及びHT(HER2陽性及び/又はTIMP-1免疫反応性欠如)又は2Tバイオマーカー状態と臨床及び病理学的変数(HER2状態を含む)との相関は、²検定により検定した。P値は両側検定とした。腫瘍は、HER2陽性及び/又はTIMP-1免疫反応性欠如がある場合、HT応答性として分類し、その他の場合はHT非応答性とした。腫瘍は、TOP2A異常及び/又はTIMP-1免疫反応性欠如がある場合、2T応答性と分類し、その他の場合は2T非応答性とした。統計解析は、SAS 9-1プログラムパッケージを使用して行った。

50

【0203】

D B C G は、試験計画と調整、組織採取、バイオマーカー分析、データ採取、解析、及び報告に参与した。ER1D5抗体、HercepTest、HER2 pharmDXとTOP2A pharmDXキット、及び技術援助は、DAKO A/S (Glostrup, Denmark) から無償で提供された。

【0204】

結果

D B C G 8 9 D 治験は、1990年6月～1998年1月の間に1224人の患者を集めた。I D F S に関して推定される可能な追跡調査時間の中央値は9.8年であり、O S については13.8年であった。2001年にD B C G は、デンマークで集めた980人の参加者のうち821人(84%)から入手できたホルマリン固定パラフィン包埋した原発性乳房腫瘍組織ブロックの遡及的採取を完了し、708人(72%)の患者でT M A の作成に成功した。全部で623人の患者について、H E R 2、T O P 2 A、及びT I M P - 1分析が可能であった。評価可能な623人の患者は、更年期状態、腫瘍サイズ、悪性グレード、E R 状態に関して、357人の評価不可能者とは有意に異なった($p < 0.05$)。陽性リンパ節の数と組織型は、評価可能患者と評価不可能患者との間で有意差を示さなかった。治療効果は同様であり、危険率は元々の試験で観察された効果(I D F S : 危険率0.76、及びO S : 危険率0.73) (Ejlertsen et al. 2007) に対して、I D F S (調整済み危険率、0.80 (95%信頼限界(CI)、0.63~1.01; $p = 0.06$) 及びO S (調整済み危険率、0.79; 95%CI, 0.62~1.00; $p = 0.05$) で、C E F がよかった。

10

20

【0205】

評価可能な623人の患者のうちで、188人(30%)はH E R 2 陽性であり、139人(22%)はT O P 2 A 異常であり、154人(25%)はT I M P - 1 陰性腫瘍を有した。T O P 2 A 異常は、435人のH E R 2 陰性患者の33人(8%)にのみ検出された(表2)。これに対してT I M P - 1 免疫反応性は、H E R 陰性の123人(28%)と、484人のT O P 2 A 正常患者の130人(27%)に検出された。表2は、H E R 2、T O P 2 A、及びT I M P - 1 がうまく実施できる623人の患者についての2 T 状態に従うベースライン特性を示す。

【0206】

T I M P - 1 を T O P 2 A 又は H E R 2 と 組 合 せ る

H E R 2 と T I M P - 1 を 用 いて、311人(50%)の患者を、H T アントラサイクリン応答性として、例えばH E R 2 陽性、T I M P - 1 陰性、又はH E R 2 陽性、及びT I M P - 1 陰性腫瘍プロフィールを有するとして分類した。H T 応答性プロフィールを有する患者は、更年期後である頻度が有意に($p < 0.05$)多く、陽性リンパ節、2 cm より大きい腫瘍、及びE R 陰性腫瘍を有した。H T 応答性プロフィールを有する患者は、その腫瘍がH T 非応答性である患者と比較して、同様のI D F S (危険率、1.22; 95%CI、0.97~1.52; $p = 0.09$)、及び劣ったO S (危険率、1.33; 95%CI、1.06~1.67; $p = 0.01$)を有した。多変量解析で更年期状態、腫瘍サイズ、陽性リンパ節の数、組織型とグレード、E R と T O P 2 A 状態について調整すると、I D F S (危険率、1.03; 95%CI、0.80~1.33; $p = 0.81$) と O S (危険率、1.05; 95%CI、0.81~1.36; $p = 0.73$) の危険率が変化した。

30

40

【0207】

T O P 2 A と T I M P - 1 を 組 合 せ て 使 用 して、269人(43%)の患者は、2 T アントラサイクリン応答性、例えばT O P 2 A 異常を有するか及び/又はT I M P - 1 免疫反応性が欠如すると分類された(表2)。2 T 応答性プロフィールは、E R 陰性、H E R 2 陽性、及び大きな腫瘍サイズと相関した(すべて $p < 0.01$)。2 T 応答性プロフィールを有する患者は、2 T 非応答性プロフィール患者と比較して、低いI D F S (危険率、1.26; 95%CI、1.01~1.58; $p = 0.04$) と O S (危険率、1.34; 95%CI、1.07~1.69; $p = 0.01$) を有した。多変量解析で更年期状

50

態、腫瘍サイズ、陽性リンパ節の数、組織型とグレード、ER発現とHER2状態について調整すると、IDFS（危険率、1.19；95%CI、0.93～1.51； $p = 0.71$ ）とOS（危険率、1.18；95%CI、0.927～1.51； $p = 0.18$ ）の危険率が変化した。

【0208】

単一のバイオマーカーとプロフィールに従う治療の不均一性

多変量Cox回帰分析で我々は、HER2状態、TOP2A状態、TIMP-1免疫反応性、HTプロフィール、又は2Tプロフィールに従う治療効果の不均一性を調べた。統計的に有意な交互作用は無く、HER2及びTIMP-1について、CMFと比較してCEFによるIDFSとOSの改善を示した。すでに報告されているように、TOP2A状態と治療効果の間の有意な交互作用が、IDFS（ $p = 0.004$ ）とOS（ $p = 0.03$ ）について観察された。

10

【0209】

CEFで治療すると、HT応答性（HER2陽性又はTIMP-1陰性）と分類される腫瘍を有する患者は、IDFSで境界の有意な改善（図4A、表4）とOSで統計的に有意な改善を有した。これに対して、HT非応答性プロフィールを有する患者では、CMFと比較してCEFから有意な利益は無かった。節状態、腫瘍サイズ、組織学、グレード、ER状態、TOP2A状態、HER2状態、TIMP-1発現、及び更年期状態について調整後、HT応答性プロフィールを有する患者では、CEFの使用によりさらに好適なIDFSとOSが維持された（それぞれ、 p 値 = 0.036と0.047；図5）。

20

【0210】

2T応答性プロフィールを有する患者では、2T非応答性患者とは反対に、CMFと比較してCEFは、IDFSとOSを有意に改善した（図4B、表4）。患者と腫瘍特性について調整する多変量解析は、2T応答性プロフィールを有する患者が、IDFS（図5A）とOS（図5B）に関して、CMFと比較してCEFから利益を受けることを確認した。これに対して、2T非応答性プロフィールを有する患者では、CMFの使用により、さらに好適な結果への有意ではない傾向が存在した（図5）。2Tプロフィールと治療効果との間に高度に統計的に有意な交互作用があり、2T応答性（TOP2A異常、又はTIMP-1陰性）プロフィールを有する269人（43%）の患者は、IDFS（ワルド検定（Wald test）、 $p < 0.0001$ ）とOS（ワルド検定（Wald test）、 $p = 0.004$ ）に関して、CMFと比較してCEFの使用により、さらに好適な結果を経験した（図5）。

30

【0211】

考察

治療法の選択は、可能な場合は、個々の乳癌患者の腫瘍内の特異的標的に対して行われるべきであることは、一般に認められている。しかし、しばしば化学療法の追加が必要であり、化学療法は標的特異性が低いと考えられている。補助療法における有意性が証明されているにもかかわらず、アントラサイクリン類の作用機序はいまだに完全には解明されていない。しかし、提唱された機序のうちで、トポイソメラーゼIIとアポトーシス誘導との相互作用は、臨床的に適切なアントラサイクリン濃度で起きるようである。本発明者らは、TOP2AとTIMP-1プロフィールの組合せの開発に従事し、DBC89D試験内で、すでにその予測性を個々に調べた。

40

【0212】

本研究では、HER2陽性腫瘍を有する188人の患者のうちで、106人（56%）は、HER2陰性腫瘍を有する8%（435人中33人）と比較して、異常TOP2A状態を有した。HER2陽性集団内にはTOP2A異常腫瘍を有する多くの患者が含まれているため、これらの2つのマーカーを組合せることは現実的ではなかった。TOP2A単独を使用して得られる22%と、TIMP-1単独を使用して得られる25%と比較して、2Tプロフィール中にTOP2AとTIMP-1を取り込むことにより、43%の患者がアントラサイクリン応答性と分類された。2T応答性プロフィールを有する43%の患

50

者について、C E Fの使用は、I D F S事象の5 2 %の相対的低下と、死亡率の4 6 %の相対的低下に関連していた。

【0 2 1 3】

これに対して、2 T非応答性プロフィールを有する残りの5 7 %の患者で、C M Fからの有意ではない利益が見られた。2 T応答性プロフィールと非応答性プロフィールを有する患者内の差の大きさと、これらの推定値の正確度は、臨床的に重要な差を強調するのに十分に高い。治療と2 Tプロフィールとの高度に統計的に有意な交互作用の知見は、この記載を支持する。T O P 2 AとT I M P - 1応答性プロフィールとを有する4 %は、異なる結果は無いようであった。

10

【0 2 1 4】

H E R 2は、アントラサイクリン類に対する感受性について、最も頻繁に使用されるバイオマーカーであり、T O P 2 A異常の大半は、H E R 2陽性腫瘍中で観察される。比較のために、本発明者らはH E R 2とT I M P - 1とを組合せて、腫瘍がT I M P - 1免疫反応性を欠如しているか及び/又はH E R 2陽性である場合は、患者はH Tアントラサイクリン応答性であるとして分類した。

【0 2 1 5】

C M Fと比較してC E Fからの利益は、H T応答性プロフィールを有する5 0 %の患者で実質的に大きく、この不均一性は、H Tプロフィールと治療との統計的に有意な交互作用により確認された。本発明者らは、単一のマーカーとしてのT I M P - 1又はH E R 2に従う鑑別治療効果についての証拠は見つけれず、これはバイオマーカーを組合せる

20

【0 2 1 6】

結論として、T O P 2 AとT I M P - 1とに基づく2 Tプロフィールの組合せ解析は、これらの2つのバイオマーカーを組合せると、C M F中でメソトレキサートの代わりにエピルブシンを使用することにより有意に利益を受ける大部分(ほとんどすべてではない)の患者を同定できることを示す。2 Tプロフィールは、H E R 2、T O P 2 A、及びT I M P - 1が単独に行うより、より大きなアントラサイクリン応答性亜集団を区別する。

【0 2 1 7】

表

【0 2 1 8】

【表1】

30

表1

	危険率	9 5 %信頼限界
TOP 2 A DNA欠失	0. 53	0. 28-1. 0
TOP 2 A DNA増幅	0. 38	0. 2-0. 72
TOP 2 A遺伝子異常の無い患者の腫瘍細胞中のT I M P - 1免疫反応性の欠如	0. 54	0. 31-0. 93
癌細胞中のTOP 2 A DNA異常又はT I M P - 1免疫反応性の欠如	0. 48	0. 34-0. 69
癌細胞中のTOP 2 A DNA異常又は陽性T I M P - 1免疫反応性	1. 19	0. 87-1. 61

40

【0 2 1 9】

【表 2】

表 2

HER2とTOP2A状態に従うTIMP-1免疫反応性の分布									
TIMP-1	TOP2A異常				TOP2A異常				合計
	HER2陽性		HER2陰性		HER2陽性		HER2陰性		
	N	%	N	%	N	%	N	%	
陽性	89	14	26	4	68	11	286	46	469
陰性	17	3	7	1	14	2	116	19	154
合計	106	17	33	5	82	13	402	65	623

10

【 0 2 2 0 】

【表 3】

表 3

2 Tプロフィールに従うベースライン特性					
特性	応答プロフィール (N=269)		非応答プロフィール (N=354)		P値
	No.	(%)	No.	(%)	
更年期状態					P=0. 0497
更年期前	174	65	255	72	
更年期後	95	35	99	28	
局所的治療法					P=0. 04
乳房保存	36	13	70	20	
乳房切除	233	87	284	80	
エストロゲン受容体状態					P=0. 004
陽性	69	26	128	36	
陰性	184	68	203	57	
不明	16	6	23	7	
HER2状態					
陽性	120	45	68	19	
陰性	149	55	286	81	
陽性節			陽性節		
無し	89	33	無し	89	
1-3	86	32	1-3	86	
> 3	94	35	> 3	94	
腫瘍サイズ			腫瘍サイズ		
ミリメートル			ミリメートル		
0-20	88	33	0-20	88	
21-50	152	57	21-50	152	
> 50	28	10	> 50	28	
不明	1	0	不明	1	
悪性グレード			悪性グレード		
グレードI	14	5	グレードI	14	
グレードII	124	46	グレードII	124	
グレードIII	113	42	グレードIII	113	
不明	1	0	不明	1	
非腺管性	17	6	非腺管性	17	
治療法			治療法		
CMF	150	56	CMF	150	
CEF	119	44	CEF	119	

10

20

30

40

【 0 2 2 1 】

【表 4】

表 4

HTと2T応答性及び非応答性腫瘍中のIDFSとOSについての治療効果の非調整危険率推定						
	IDFS			OS		
	HR	(95% CI)	P	HR	(95% CI)	P
HTプロフィール	0.73	(0.53-1.00)	0.05	0.69	(0.50-0.95)	0.02
応答性	0.98	(0.71-1.37)	0.92	0.92	(0.66-1.29)	0.64
非応答性						
2Tプロフィール						
応答性	0.59	(0.42-0.83)	0.003	0.63	(0.45-0.88)	0.007
非応答性	1.12	(0.83-1.53)	0.46	0.95	(0.69-1.30)	0.74

10

【 0 2 2 2 】

【表 5】

表 5

デンマークの集団を治療するための目的のベースライン特性 (n=980)				
	排除 N=333 (34%)		含める N=647 (66%)	
	No.	(%)	No.	(%)
参加時の年齢				
≤39才	65	20	99	15
40~49才	165	50	316	49
50~59才	57	17	149	23
60~69才	46	14	83	13
更年期状態				
更年期前	246	74	450	70
更年期後	87	26	197	30
節状態				
陰性	121	36	233	36
1~3 陽性	122	37	206	32
≥ 4 陽性	90	27	208	32
腫瘍サイズ*				
0-20mm	179	55	253	39
21-50mm	130	40	336	52
> 50mm	19	6	56	9
不明	5	2	2	0
組織型				
浸潤性腺管癌	313	94	602	93
他の癌	17	5	44	7
不明	3	1	1	0
悪性度 (腺管癌のみ) **				
グレード I	27	9	43	7
グレード II	177	57	298	50
グレード III	104	33	259	43
不明	5	2	2	0
エストロゲン受容体状態				
陽性	7	2	199	31
陰性	26	8	401	62
不明	300	90	47	7
ホルモン受容体状態				
ER又はPgR陽性	88	26	167	26
ER及びPgR陰性	201	60	431	67
不明	44	13	49	8
化学療法				
CMF	158	47	357	55
CEF	157	47	290	45
無し	18	5	0	0

p < 0.000.1 ; ** p = 0.02

【表 6】

表 6

TIMP-1に関連するベースライン特性	TIMP1陰性 (N=160)		TIMP1陽性 (N=487)	
	No.	(%)	No.	(%)
	参加時の年齢			
≤39才	26	(16)	73	(15)
40~49才	78	(49)	238	(49)
50~59才	36	(23)	113	(23)
60~69才	20	(13)	63	(13)
更年期状態				
更年期前	118	(74)	332	(68)
更年期後	42	(26)	155	(32)
節状態				
陰性	72	(45)	161	(33)
1~3 陽性	44	(28)	162	(33)
≥4 陽性	44	(28)	164	(34)
腫瘍サイズ				
0-20mm	62	(39)	191	(39)
21-50mm	81	(51)	255	(52)
> 50mm	16	(10)	40	(8)
不明	1	(1)	1	(0)
組織型				
浸潤性腺管癌	146	(91)	456	(94)
他の癌	14	(9)	31	(6)
悪性度 (腺管癌のみ)				
グレードI	9	(6)	34	(7)
グレードII	66	(45)	232	(51)
グレードIII	70	(48)	189	(41)
不明	1	(1)	1	(0)
エストロゲン受容体状態				
陽性	38	(24)	161	(33)
陰性	107	(67)	294	(60)
不明	15	(9)	32	(7)
ホルモン受容体状態				
ER又はPgR陽性	36	(23)	131	(27)
ER及びPgR陰性	115	(72)	316	(65)
不明	9	(6)	40	(8)
化学療法				
CMF	86	(54)	271	(56)
CEF	74	(46)	216	(44)

10

20

30

40

【 0 2 2 4 】

【表 7】

表 7 - 患者の流れを示す模式図

	CMF	CEF
累積割り当て	500	480
交差、自己選択CMF	+18	-18
交差、自己選択CEF	-4	+4
化学療法への同意撤回	-5	-13
TIMP-1不明*	-152	-163
分析に含まれる	357	290

* 保存組織が入手できない、組織がTMAに不適、TMA後に組織紛失、又はTIMP-1が評価不可能。

10

20

分析に含まれる

【 0 2 2 5 】

【化 1】

References

Louise Davidsen, Sidse Würtz, Maria Unni Rømer, Nanna M Sørensen, Simon Johansen, Ib Jarle Christensen, Jørgen K Larsen, Hanne Offenber, Nils Brünner and Ulrik Lademann. TIMP-1 gene deficiency increases tumor cell sensitivity to chemotherapy-induced apoptosis.

Br J Cancer, 2006, 95: 1114-1120

10

Durbecq V, Desmed C, Paesmans M, Cardoso F, Di Leo A, Mano M, et al.

"Correlation between topoisomerase-IIalpha gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer." *Int J Oncol* 2004;25(5):1473-9]

Ejlertsen B, Mouridsen HT, Jensen MB et al. Improved outcome from substituting methotrexate with epirubicin: results from a randomised comparison of CMF

versus CEF in patients with primary breast cancer. *Eur J Cancer* 2007; 43(5):877-884

20

Harris et al., op cit; Di Leo A, Gancberg D, Larsimont D, Tanner M, Jar- vinen T, Rouas G, et al. "HER-2 amplification and topoisomerase IIalpha gene aberrations as predictive markers in node-positive breast cancer patients randomly treated either with an anthracycline-based therapy or with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-fluorouracil." *Clin Cancer Res* 2002;8(5):1107-16

30

Jørgensen JT., Nielsen, K.V and Ejlertsen, B, et al. "Pharmacodiagnosics and Targeted Therapies – A Rational Approach for Individualizing Medical Anticancer Therapy in Breast Cancer": *The Oncologist* 2007: 12: 397-405

Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, Rasmussen BB, Oyergaard J, Nielsen KV, et al.

"Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 2005;23(30):7483-90

40

【 0 2 2 6 】

【化 2】

Nanna Møller Sørensen, Barry L Dowell, Kent D Stewart, Vibeke Jensen, Lise Larsen, Ulrik Lademann, Gillian Murphy, Hans Jørgen Nielsen, Nils Brünner and Gerard J Davis. Establishment and Characterization of 7 New Monoclonal Antibodies to Tissue Inhibitor of metalloproteinases -1. *Tumor Biology*, 2005, 26: 71-80

Mueller RE, Parkes RK, Andrulis I, O'Malley FP. "Amplification of the TOP2A gene does not predict high levels of topoisomerase II alpha protein in human breast tumor samples." *Genes Chromosomes Cancer* 2004;39(4):288-97

10

O'Malley FP., Chia S, Tu D, Shepherd et al., *JNCI* 2009, 101:644-650

Park K, Kim J, Lim S, Han S. "Topoisomerase II-alpha (topoII) and HER2 amplification in breast cancers and response to preoperative doxorubicin chemotherapy." *Eur J Cancer* 2003;39(5):631-4

20

Petit T, Wilt M, Velten M, Millon R, Rodier JF, Borel C, et al. "Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy." *Eur J Cancer* 2004;40(2):205-11

Press MF, Mass RD, Zhou JY, Sullivan-Halley J, Villalobos IE, Lieberman G, et al. "Association of topoisomerase II-alpha (TOP2A) gene amplification with responsiveness to anthracycline-containing chemotherapy among women with metastatic breast cancer entered in the Herceptin H0648g pivotal clinical trial." In: *ASCO Annual Meeting; 2005; 2005. Abstract No. 9543*

30

Anne Sofie Schrohl, Marion E Meijer-van Gelder, Mads Holten-Andersen, Ib Jarle Christensen, Maxime P Look, Henning T Mouridsen, Nils Brünner and John Foekens. Primary tumor levels of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 are predictive of resistance to chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2006, 12: 7054-7058

40

Irene Vejgaard Sorensen, Claus Fenger, Henrik Winther, Niels T Foged, Ulrik Lademann, Nils Brünner and Pernille A Usher. Characterization of Anti-TIMP-1

【 0 2 2 7 】

【化3】

Monoclonal Antibodies for Immunohistochemical Localization in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue. *J. Hist. Cytochem*, 2006,54:1075-1086

Sørensen NM, Byström P, Christensen IJ, Berglund Å, Nielsen HJ, Brünner N, Glimelius B. Plasma Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) predicts objective response and survival in patients with metastatic colorectal cancer receiving first line treatment with irinotecan in combination with 5FU and Folinic acid. *Clin Cancer Res*,2007, 13:4117-4122

10

Tanner MM, Isola JJ, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmstrom P, et al. "Topoisomerase Na gene amplification predicts favorable outcome of tailored and dose-escalated anthracyclin-based adjuvant chemotherapy in HER-2 positive breast cancer. Results from the randomized trial SBG 9401." In: ASCO Annual Meeting; 2005; 2005. Abstract No. 9518

20

WO 2005/094863

WO 2007/112746

【 図 1 A 】

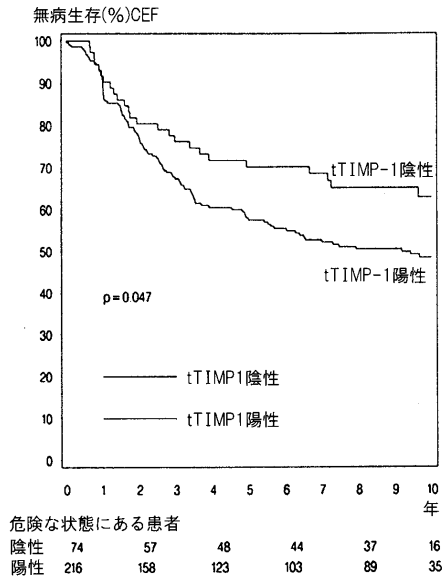


Fig. 1A

【 図 1 B 】

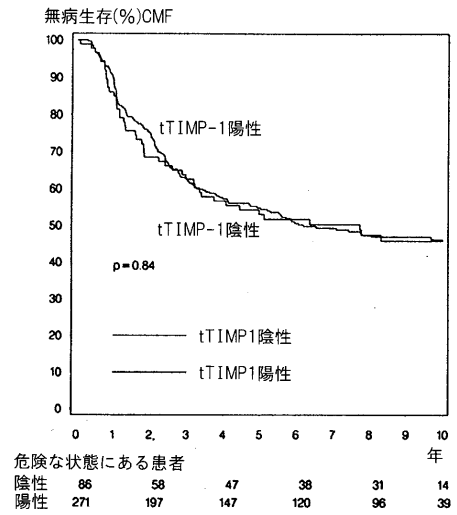


Fig. 1B

【 図 1 C 】

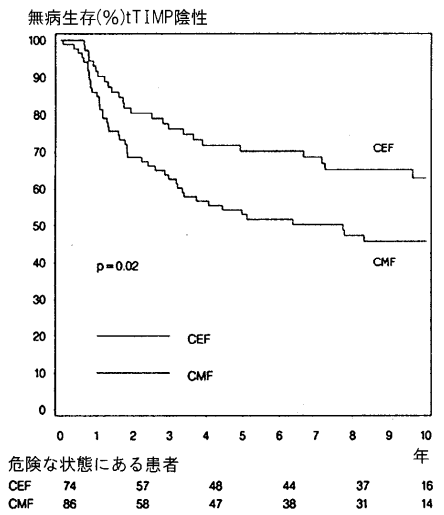


Fig. 1C

【 図 2 A 】

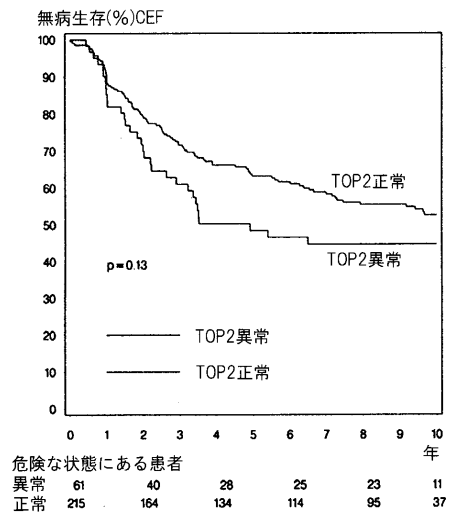


Fig. 2A

【 図 2 B 】

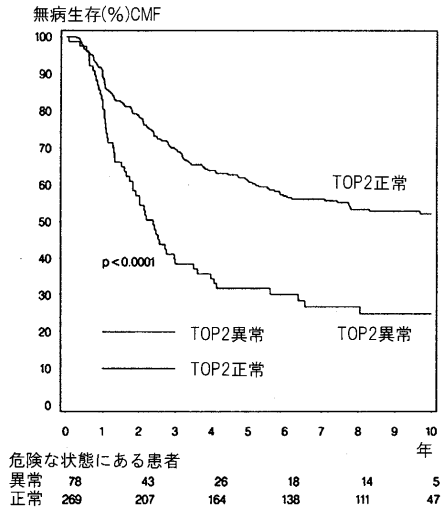


Fig. 2B

【 図 2 C 】

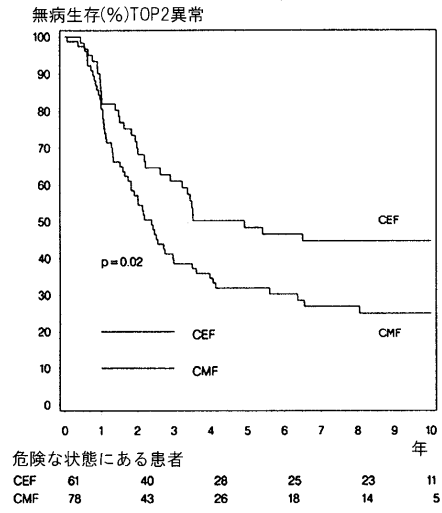


Fig. 2C

【 図 3 A 】

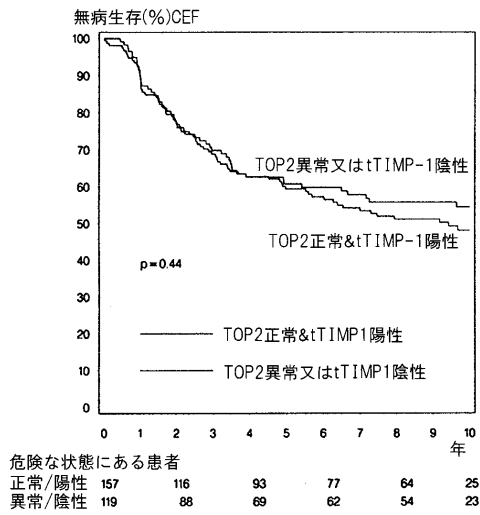


Fig. 3A

【 図 3 B 】

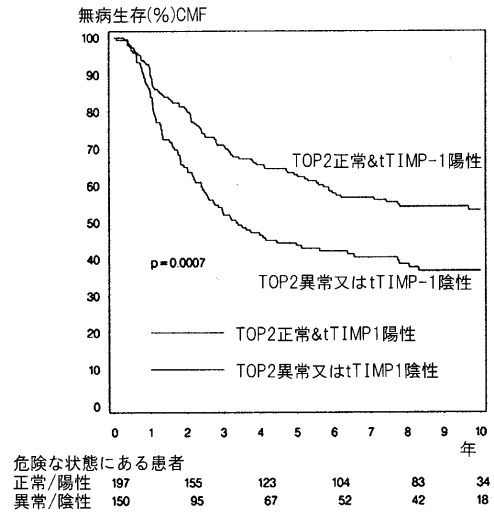


Fig. 3B

【 図 3 C 】

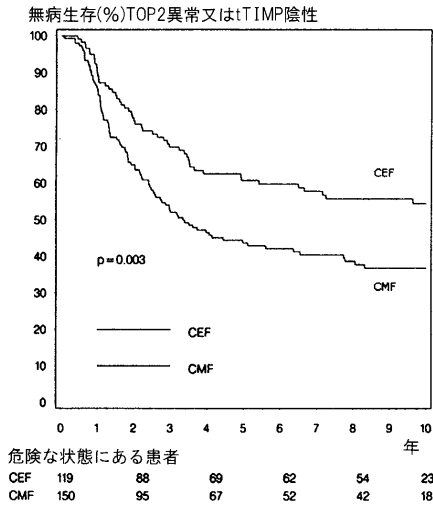


Fig. 3C

【 図 4 A 】

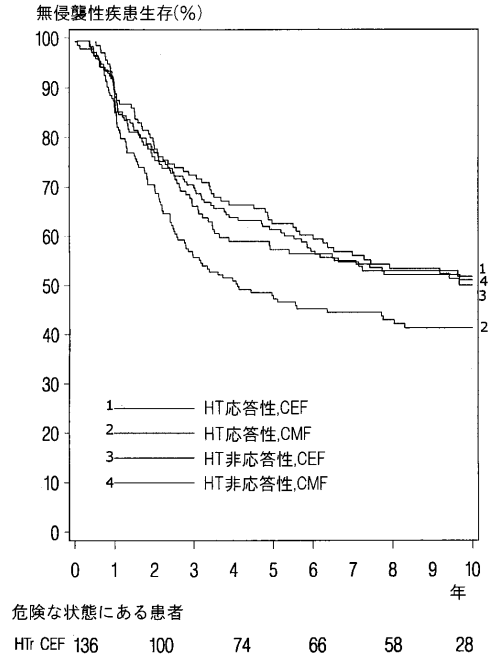


Fig. 4A

【 図 4 B 】

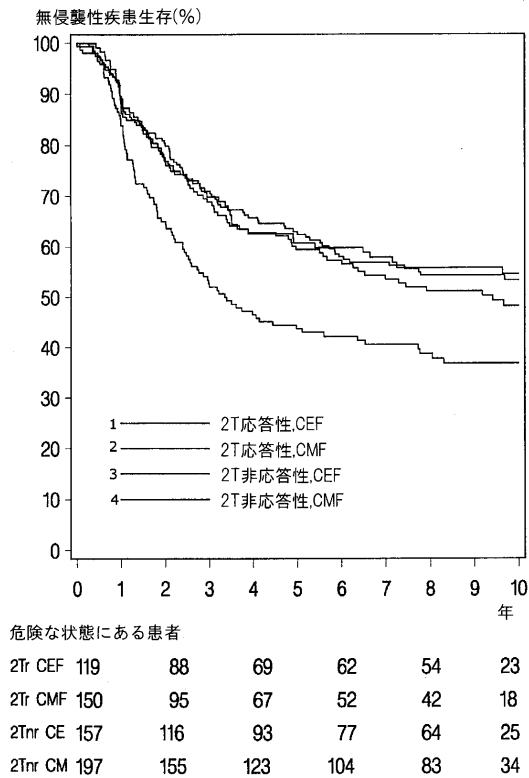


Fig. 4B

【 図 5 A 】

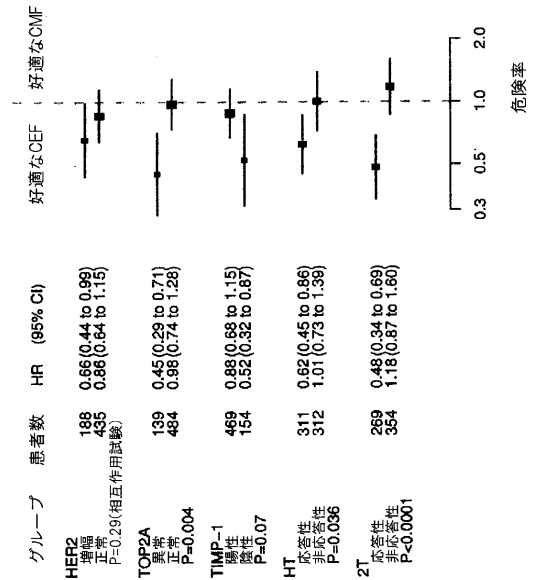


Fig. 5A

【 図 5 B 】

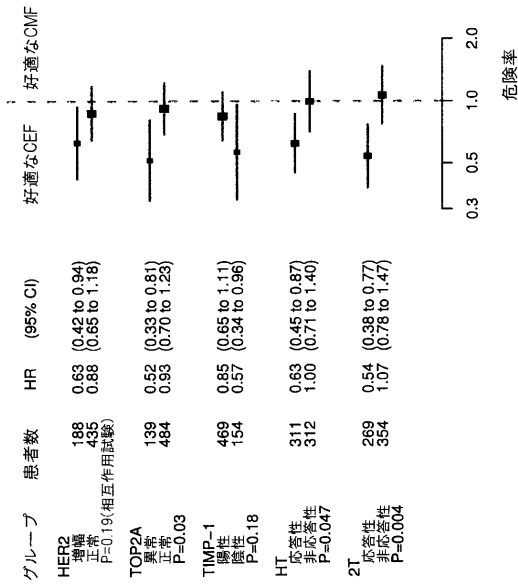


Fig. 5B

【 図 6 A - D 】

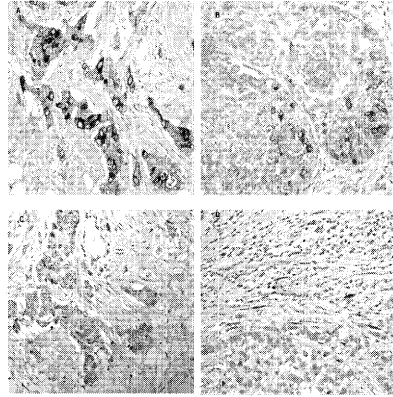


Fig. 6A-D

【 図 7 A 】

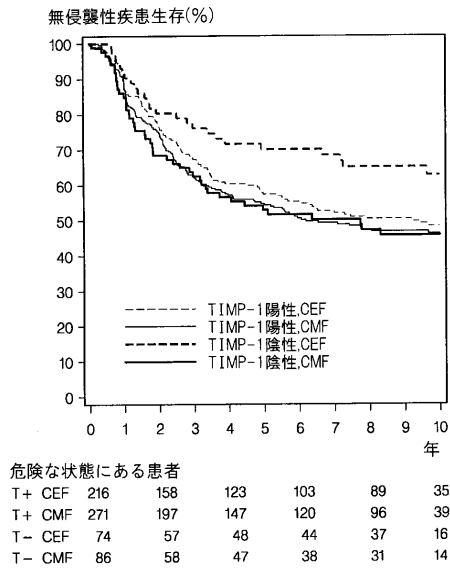


Fig. 7A

【 図 7 B 】

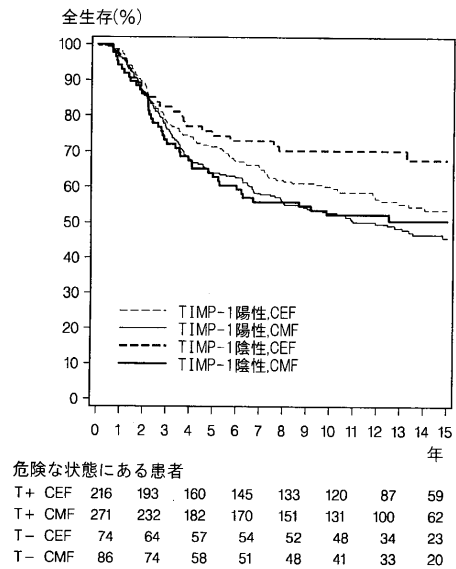


Fig. 7B

【 図 8 A 】

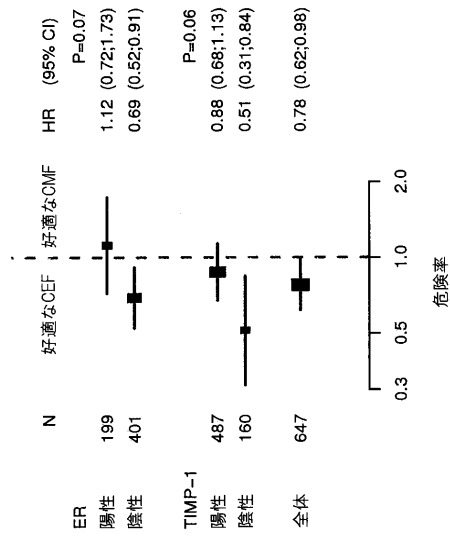


Fig. 8A

【 図 8 B 】

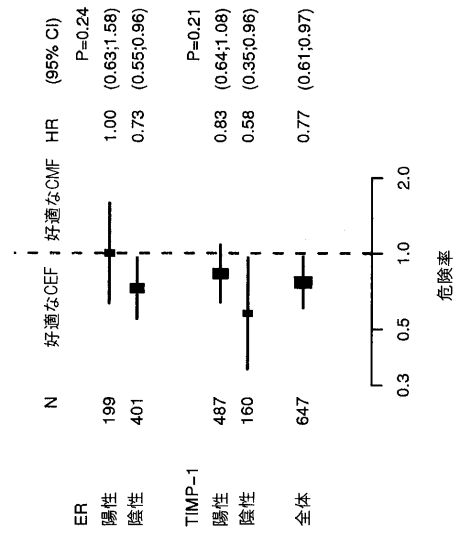


Fig. 8B

【 図 9 】

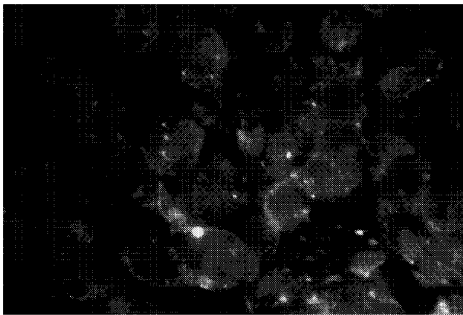


Fig. 9

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/DK2009/050116

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCHROHL ANNE-SOFIE ET AL: "Primary tumor levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are predictive of resistance to chemotherapy in patients with metastatic breast cancer." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH 1 DEC 2006, vol. 12, no. 23, 1 December 2006 (2006-12-01), pages 7054-7058, XP002505722 ISSN: 1078-0432 page 7055, right-hand column, paragraph 5; figure 1; table 1 page 7058, right-hand column, lines 10,11 ----- -/--	1-42
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the international filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. 'A' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 September 2009		Date of mailing of the international search report 24/09/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lanzrein, Markus

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/DK2009/050116

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JORGENSEN J T ET AL: "Pharmacodiagnosics and targeted therapies - a rational approach for individualizing medical anticancer therapy in breast cancer" ONCOLOGIST, ALPHAMED PRESS, US, vol. 12, no. 4, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 397-405, XP002444118 ISSN: 1083-7159 page 401, right-hand column, paragraph 1 - page 403, left-hand column, paragraph 1; figures 5-7	1-42
Y	WO 2007/112746 A (DAKO DENMARK AS [DK]; JOERGENSEN JAN TROEST [DK]; EJLERTSEN BENT [DK];) 11 October 2007 (2007-10-11) example 2	1-42

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/DK2009/050116

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007112746 A	11-10-2007	CA EP	11-10-2007 17-12-2008
<hr/>			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 K 45/00		
		C 1 2 N 15/00	A	

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

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(72)発明者 ブルンナー, ニルス アージェ

デンマーク国, デーコー - 2 9 0 0 ヘルルブ, トラネベンゲト 8, 2 . テホ .

(72)発明者 ニールセン, キルステン バング

デンマーク国, デーコー - 2 7 0 0 プレンシェイ, ルグベイ 7

F ターム(参考) 4B024 AA12 BA38 BA80 CA01 HA12

4B063 QA19 QQ02 QQ43 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR42 QR48 QS25

QS33 QS34 QX02

4C084 AA17 NA05 ZB261 ZB262

专利名称(译)	用于预测对抗癌疗法的反应的组合方法		
公开(公告)号	JP2011520456A	公开(公告)日	2011-07-21
申请号	JP2011509855	申请日	2009-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	丹麦达科有限公司		
申请(专利权)人(译)	丹麦Dako公司洛杉矶ACTY萝卜		
[标]发明人	ブルンナーニルスアージェ ニールセンキルステンバング		
发明人	ブルンナー,ニルス アージェ ニールセン,キルステン バング		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574 A61P35/00 A61K45/00 C12N15/09		
CPC分类号	A61P35/00 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/154 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/574 G01N2333/8146 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.N G01N33/53.D G01N33/574.Z A61P35/00 A61K45/00 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/BA38 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZB261 4C084/ZB262		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 渡边洋一 中岛胜 武井良太郎		
优先权	200800696 2008-05-20 DK 61/054944 2008-05-21 US		
其他公开文献	JP2011520456A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了预测对一个患有癌症个体中拓扑异构酶II α 抑制剂疗法的应答的方法，所述染色体17q21上的方法，其包括在TOP2A DNA的异常/HER2扩增子包括TOP2A和HER2，TOP2A或和ErbB2蛋白表达异常，TIMP-1 DNA异常/TIMP-1蛋白异常。还提供了使用拓扑异构酶II α 抑制剂疗法治疗癌症的方法。本发明还包括用于应用预测癌症个体中对拓扑异构酶II α 抑制剂疗法的反应的的方法的试剂盒。

