

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-511484

(P2015-511484A)

(43) 公表日 平成27年4月20日(2015.4.20)

(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 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 C O 8 4
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-559931 (P2014-559931)
 (86) (22) 出願日 平成25年2月22日 (2013. 2. 22)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年10月27日 (2014. 10. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/027441
 (87) 国際公開番号 W02013/130364
 (87) 国際公開日 平成25年9月6日 (2013. 9. 6)
 (31) 優先権主張番号 61/604, 290
 (32) 優先日 平成24年2月28日 (2012. 2. 28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504389991
 ノバルティス アーゲー
 スイス国 バーゼル リヒトシュトラーセ
 35
 (71) 出願人 503261524
 アイアールエム・リミテッド・ライアビリ
 ティ・カンパニー
 I R M, L L C
 英国領バーミュエダ、エイチエム・エルエ
 ックス、ハミルトン、ポスト・オフィス・
 ボックス・エイチエム2899、フロント
 ・ストリート131番
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 R N F 4 3 変異ステータスを利用したW n t シグナル伝達阻害剤の投与のためのがん患者選択法

(57) 【要約】

W n t 拮抗薬の治療的投与が有益であることが予測されるがん患者を同定するためのバイオマーカー、方法およびアッセイが開示される。バイオマーカーには、R N F 4 3 および Z N R F 3 遺伝子欠失の検出、R N F 4 3 および Z N R F 3 m R N A 発現の減少、R N F 4 3 および Z N R F 3 タンパク質発現の減少、R N F 4 3 および Z N R F 3 不活性化変異、リン酸化 L R P 6、リン酸化 D i s h e v e l l e d、ならびに F r i z z l e d の発現が含まれる。これらのバイオマーカーは、W n t 経路阻害剤で治療したがん患者のより良好な転帰と関連付けることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

W n t 阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法であって、
 (a) 患者からの腫瘍細胞の試料におけるバイオマーカのレベルを検出する段階であって、バイオマーカは、

(i) ヘテロ接合性の消失を決定するための、R N F 4 3 染色体領域および / または Z N R F 3 染色体領域における D N A コピー数、

(i i) R N F 4 3 遺伝子および / または Z N R F 3 遺伝子の不活性化変異を検出するために配列決定されたがん組織からのゲノム D N A、c D N A または R N A ;

(i i i) R N F 4 3 m R N A 発現および / または Z N R F 3 m R N A 発現 ;

(i v) R N F 4 3 タンパク質発現および / または Z N R F 3 タンパク質発現 ;

(v) R N F 4 3 遺伝子欠失および / または Z N R F 3 遺伝子欠失の機能的効果 ; または

(v i) バイオマーカ (i) ~ (v) の組み合わせからなる群から選択される、段階、

(b) 腫瘍細胞試料におけるバイオマーカのレベルを

(i) W n t 阻害剤に対する感受性と相関しているバイオマーカの対照レベル ; および

(i i) W n t 阻害剤に対する耐性と相関しているバイオマーカの対照レベルからなる群から選択されるバイオマーカの対照レベルと比較する段階 ; ならびに

(c) 患者の腫瘍が不活性化 R N F 4 3 もしくは Z N R F 3 変異を有するか、患者の腫瘍が R N F 4 3 もしくは Z N R F 3 のコピー数の減少を有するか、または患者の腫瘍が R N F 4 3 m R N A もしくはタンパク質の発現の減少または Z N R F 3 m R N A もしくはタンパク質の発現の減少を有し、それにより患者の腫瘍が W n t 阻害剤に対して感受性である可能性が高いことが示される場合に、W n t 阻害剤の治療的投与が有益であることが予測されるものとして患者を選択する段階を含む方法。

【請求項 2】

W n t 阻害剤に対する腫瘍細胞の感受性を予測する方法であって、腫瘍細胞を少なくとも 1 つの W n t 阻害剤に接触させる段階および

(a) 腫瘍細胞におけるバイオマーカのレベルを検出する段階であって、バイオマーカは、

(i) ヘテロ接合性の消失を決定するための、R N F 4 3 染色体領域および / または Z N R F 3 3 染色体領域における D N A コピー数、

(i i) R N F 4 3 遺伝子および / または Z N R F 3 遺伝子の不活性化変異を検出するための、腫瘍細胞からのゲノム D N A、c D N A または R N A ;

(i i i) R N F 4 3 m R N A 発現および / または Z N R F 3 m R N A 発現 ;

(i v) R N F 4 3 タンパク質発現および / または Z N R F 3 タンパク質発現

(v) R N F 4 3 遺伝子欠失および / または Z N R F 3 遺伝子欠失の機能的効果 ; あるいは

(v i) バイオマーカ (i) ~ (v) の組み合わせからなる群から選択される、段階 ;

(b) 腫瘍細胞におけるバイオマーカのレベルを対照レベルと比較する段階 ;

(c) 腫瘍細胞におけるバイオマーカレベルと対照レベルの差に基づいて、W n t 阻害剤に対する腫瘍細胞の感受性を決定する段階を含む方法。

【請求項 3】

ステップ 1 (a) (i) の R N F 4 3 染色体領域における D N A コピー数の検出が、配列番号 1 の配列を有するヌクレオチドにハイブリダイズするプローブを用いたハイブリダイゼーションによるものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4】

ステップ 1 (a) (i) の Z N R F 3 染色体領域における D N A コピー数の検出が、配列番号 2 の配列を有するヌクレオチドにハイブリダイズするプローブを用いたハイブリダイゼーションによるものである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ 1 (a) (i) の Z N R F 3 染色体領域における D N A コピー数の検出が、蛍光インサイツハイブリダイゼーション (F I S H) によるものである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ 1 (a) (i i i) の R N F 4 3 m R N A 発現を測定するアッセイが、配列番号 1 の配列を有するヌクレオチドにハイブリダイズするプローブを用いたハイブリダイゼーションによるものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

【請求項 7】

ステップ 1 (a) (i i i) の Z N R F 3 m R N A 発現を測定するアッセイが、配列番号 2 の配列を有するヌクレオチドにハイブリダイズするプローブを用いたハイブリダイゼーションによるものである、請求項 1、2 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ 1 (a) (i v) の R N F 4 3 タンパク質発現を測定するアッセイが、免疫組織化学によるものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ 1 (a) (v) の機能喪失を測定するアッセイが、抗 F r i z z l e d 抗体を用いた F A C S アッセイを使用することによるものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 10】

ステップ 1 (a) (v) の機能喪失を測定するアッセイが、W n t レポーターアッセイを使用することによるものである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 11】

W n t レポーターアッセイが、F r i z z l e d タンパク質レベルの増加、L R P 6 タンパク質レベルの増加、L R P 6 リン酸化の増加、および D i s h e v e l e d リン酸化の増加からなる群から選択されるタンパク質活性を測定するものである、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

比較する段階が、腫瘍細胞におけるバイオマーカーレベルを、W n t 阻害剤に対して耐性である 1 つまたは複数の対照細胞におけるバイオマーカーの対照レベルと比較することを含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

比較する段階が、腫瘍細胞におけるバイオマーカーレベルを、W n t 阻害剤に対して感受性である 1 つまたは複数の対照細胞におけるバイオマーカーの対照レベルと比較することを含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

W n t 阻害剤に対する感受性と相関しているバイオマーカーの対照レベルが予め決定されている、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 15】

W n t 阻害剤に対する耐性と相関しているバイオマーカーの対照レベルが予め決定されている、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

W n t 阻害剤の治療的投与が有益であるかまたは有益でないと予測されるがん患者を選択するためのアッセイキットであって、

(a) 腫瘍細胞の試料において、

(i) R N F 4 3 遺伝子および / または Z N R F 3 遺伝子のヘテロ接合性の消失；

50

(i i) R N F 4 3 遺伝子および / または Z N R F 3 遺伝子の機能喪失のレベル

(i i i) R N F 4 3 m R N A および / または Z N R F 3 m R N A 発現のレベル ;

(i v) R N F 4 3 タンパク質および / または Z N R F 3 タンパク質発現のレベル ; ならびに

(v) R N F 4 3 遺伝子および / または Z N R F 3 遺伝子欠失の機能的効果

からなる群から選択されるバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせのレベルを検出するための手段 ;

(b) 対照

を含むアッセイキット。

【請求項 17】

対照が、

(i) W n t 阻害剤に対する感受性を検出するための対照試料 ;

(i i) W n t 阻害剤に対する耐性を検出するための対照試料 ;

(i i i) W n t 阻害剤に対する感受性と相関しているバイオマーカーの予め決定された対照レベルを含有する情報 ; および

(i v) W n t 阻害剤に対する耐性と相関しているバイオマーカーの予め決定された対照レベルを含有する情報

からなる群から選択される、請求項 16 に記載のアッセイキット。

【請求項 18】

ステップ 15 (a) (i) および 21 (a) (i) のいずれかにおける R N F 4 3 遺伝子を検出するための手段が、配列番号 1 の配列を有するヌクレオチドにハイブリダイズするヌクレオチドプローブを含む、請求項 16 または 17 に記載のアッセイキット。

【請求項 19】

ステップ 15 (a) (i) および 21 (a) (i) のいずれかにおける Z N R F 3 遺伝子を検出するための手段が、配列番号 2 の配列を有するヌクレオチドにハイブリダイズするヌクレオチドプローブを含む、請求項 16 から 18 のいずれか一項に記載のアッセイキット。

【請求項 20】

ステップ 15 (a) (i) における R N F 4 3 遺伝子を検出するための手段が、ゲノム遺伝子座 17 q 22 にハイブリダイズするヌクレオチドプローブを含む、請求項 16 または 17 に記載のアッセイキット。

【請求項 21】

ステップ 16 (a) (i) における Z N R F 3 遺伝子を検出するための手段が、ゲノム遺伝子座 22 q 12 . 1 にハイブリダイズするヌクレオチドプローブを含む、請求項 16 、 17 または 20 に記載のアッセイキット。

【請求項 22】

ステップ 16 (a) (i i i) における R N F 4 3 タンパク質を検出するための手段が、配列番号 3 の配列を有するポリヌクレオチドに選択的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項 16 、 17 または 20 に記載のアッセイキット。

【請求項 23】

ステップ 16 (a) (i i i) における Z N R F 3 タンパク質を検出するための手段が、配列番号 4 の配列を有するポリヌクレオチドに選択的に結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを含む、請求項 16 から 22 のいずれか一項に記載のアッセイキット。

【請求項 24】

検出のための手段が、検出可能な標識を含む、請求項 16 から 23 のいずれか一項に記載のアッセイキット。

【請求項 25】

検出のための手段が基板上に固定化される、請求項 16 から 24 のいずれか一項に記載のアッセイキット。

【請求項 26】

10

20

30

40

50

患者におけるがんの治療において使用するためのW n t阻害剤を含む医薬組成物であって、請求項1に記載のバイオマーカーの患者のレベルが、バイオマーカーの対照レベルに統計学的に類似しているかまたはそれよりも低く、対照バイオマーカーレベルは、W n t阻害剤に対する感受性と相関している、医薬組成物。

【請求項27】

対照レベルが、バイオマーカーの正常またはベースラインレベル、健康な細胞または組織試料におけるバイオマーカーのレベル、またはW n t阻害剤に対する耐性と相関しているバイオマーカーの対照レベルである、請求項26に記載のW n t阻害剤を含む医薬組成物。

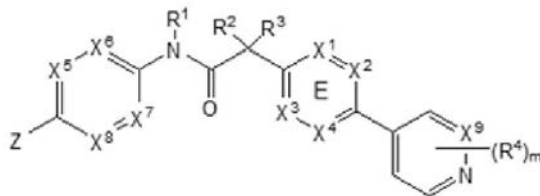
【請求項28】

がんが膵臓がんである、請求項26または27に記載のW n t阻害剤を含む医薬組成物。

【請求項29】

W n t阻害剤が、式(1)：

【化2】



(1)

の化合物またはその生理学的に許容される塩(式中、

X¹、X²、X³およびX⁴はNおよびC R⁷から選択され；

X⁵、X⁶、X⁷およびX⁸の1つはNであり、他はCHであり；

X⁹はNおよびCHから選択され；

Zはフェニル、ピラジニル、ピリジニル、ピリダジニルおよびピペラジニルから選択され、ここで各々のZのフェニル、ピラジニル、ピリジニル、ピリダジニルまたはピペラジニルは場合によってR⁶基で置換されており；

R¹、R²およびR³は水素であり；

mは1であり；

R⁴は水素、ハロ、ジフルオロメチル、トリフルオロメチルおよびメチルから選択され；

R⁶は水素、ハロおよび-C(O)R¹⁰から選択され；ここで、R¹⁰はメチルであり；

R⁷は水素、ハロ、シアノ、メチルおよびトリフルオロメチルから選択される)である、請求項1から15のいずれか一項に記載の方法、または請求項16から25のいずれか一項に記載のアッセイ、または請求項26から28のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項30】

W n t阻害剤が、

N-[5-(3-フルオロフェニル)ピリジン-2-イル]-2-[5-メチル-6-(ピリダジン-4-イル)ピリジン-3-イル]アセトアミド；

2-[5-メチル-6-(2-メチルピリジン-4-イル)ピリジン-3-イル]-N-[5-(ピラジン-2-イル)ピリジン-2-イル]アセトアミド；

N-(2,3'-ビピリジン-6'-イル)-2-(2',3-ジメチル-2,4'-ビピリジン-5-イル)アセトアミド；

N-(5-(4-アセチルピペラジン-1-イル)ピリジン-2-イル)-2-(2'-メチル-3-(トリフルオロメチル)-2,4'-ビピリジン-5-イル)アセトアミド；

；

10

20

30

40

50

N - (5 - (4 - アセチルピペラジン - 1 - イル) ピリジン - 2 - イル) - 2 - (2 ' - フルオロ - 3 - メチル - 2 , 4 ' - ビピリジン - 5 - イル) アセトアミド ; および 2 - (2 ' - フルオロ - 3 - メチル - 2 , 4 ' - ビピリジン - 5 - イル) - N - (5 - (ピラジン - 2 - イル) ピリジン - 2 - イル) アセトアミド ;

の群から選択される化合物またはその医薬的に許容される塩である、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 16 から 25 のいずれか一項に記載のアッセイ、または請求項 26 から 28 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

優先権主張

本出願は 2012 年 2 月 28 日に提出した米国仮特許出願番号 61 / 604290 の優先権を主張するものである。

【0002】

本発明は概して、腫瘍細胞またはがん細胞の検出のための細胞膜結合抗原もしくは細胞膜結合受容体を含む、測定または試験方法および組成物またはそのテストストリップに関し、特に、Wnt 阻害剤療法が有益であることが予測されるがん患者の同定に関する。また、本発明は、特異的に選択された患者における使用のための Wnt 阻害剤または Wnt 阻害剤を含む医薬組成物に関する。

【背景技術】

20

【0003】

生物学および医学において、古典的 (canonical) Wnt / - カテニン経路は、分泌された Wnt リガンド、細胞表面受容体および転写活性化補助因子 - カテニンが含まれるだけでなく、それらのコアタンパク質コンポーネントの他の多くのエフェクターやレギュレーターをも含む一連の細胞内シグナル伝達イベントである。Wnt リガンド非存在下において、- カテニンはポリ - ユビキチン化とプロテアソーム分解を引き起こすマルチタンパク質複合体により定常的にリン酸化されている。Wnt タンパク質がその受容体に結合すると、細胞基質 - カテニンは分解複合体の阻害により安定化し、核へ移行して Wnt ターゲット遺伝子の転写を活性化する。

【0004】

30

Wnt の主な受容体は、Frizzled (FZD) ファミリーのタンパク質であり、Wnt / - カテニンシグナル伝達に重要な共受容体としての LRP5 または LRP6 (LDL 受容体関連タンパク質 5 および 6) を伴う。Nusse R (2005), Cell Research 15(1):28-32。Frizzled 受容体は長いシステインに富むドメインを有する 7 回膜貫通分子である。LRP5 / 6 共受容体は単通過膜貫通タンパク質である。Huang H-C and Klein PS (2004) Genome Biol. 5(7):234。LRP6 は成人の骨恒常性に必要とされるのみである LRP5 に比べて優性である。McDonald BTら (2009) Developmental Cell 17(1):9-26。

【0005】

40

非古典的 (non-canonical) Wnt シグナル伝達は、- カテニンに依存していない。Frizzled 受容体は非古典的 Wnt シグナル伝達に関連しているが、LRP6 共受容体は非古典的経路の活性のためには必須ではない。少なくとも 2 つの非古典的 Wnt シグナル伝達経路、平面内細胞極性 (PCP) 経路および Wnt カルシウム放出経路が存在する。

【0006】

Wnt / - カテニンシグナル伝達は、胚発生の間の細胞増殖および分化を調節するために重要である。成人においては、Wnt シグナル伝達は組織の恒常性を促進させ、その調節不全は様々なヒトの疾病、特にがんに関連している。Nusse R (2005), Cell Research 15(1):28-32。

【0007】

50

W n t 経路の異常な過剰活性化が結腸直腸がんの腫瘍形成に重要であることが多い。その他のタイプのがんについても、異常なW n tシグナル伝達に関連付けられることが示されている。膵臓がん、肝臓がん、乳がんおよび皮膚がんが、これら他のタイプのがんに含まれる。W n t / P C P 非古典的経路における上昇した活性は腫瘍形成にも関与している。

【 0 0 0 8 】

W n tシグナル伝達の拮抗薬が、W n t依存性腫瘍の治療のために開発されてきている。ポーキュパイン (Porcupine) 阻害剤、タンキラーゼ (tankyrase) 阻害剤、F r i z z l e d 抗体、L R P 6 抗体などの多くのW n t阻害剤が、がんの治療のために開発されている。しかし、これらのほとんどのW n t阻害剤は、W n tシグナル伝達経路の上流タンパク質成分を標的としている。これらのW n t阻害剤は、W n t経路の下流の遺伝子に変異を有する腫瘍においてW n tシグナル伝達を阻害しないと思われるので、A P C (大腸腺腫症)、A X I N 1 / 2、および - カテニンなどのような下流W n t経路遺伝子における発癌性変異を有する腫瘍に対しては効果的ではないことが多い。

10

【 0 0 0 9 】

このW n t経路の上流の遺伝子に変異を持つものとして同定された腫瘍の欠如がW n t阻害剤の臨床開発を妨げている。したがって、W n t経路の上流コンポーネントである遺伝子または遺伝子産物におけるがん関連W n t経路の変異を同定するための方法が、当技術分野において必要とされている。

20

【 発明の概要 】

【 0 0 1 0 】

本発明は、いずれもW n t受容体複合体F r i z z l e d / L R P 6のレベルをF r i z z l e dユビキチン化により負に調節する、2つの相同性膜貫通型E3ユビキチンリガーゼ (R N F 4 3 およびZ N R F 3) の診断用途を提供する。一態様において、本発明は、W n t経路の阻害剤によって増殖が低下されることに感受性である腫瘍細胞の選択のためのバイオマーカーとしてのR N F 4 3 遺伝子またはZ N R F 3 遺伝子の不活性化変異の使用を提供する。別の態様において、本発明は、R N F 4 3 またはZ N R F 3 遺伝子における不活性化変異をW n t阻害剤治療に対する腫瘍感受性のバイオマーカーとして使用することによる、W n t阻害剤での治療のためのがん患者の選択法を提供する。特定の態様において、本発明は、ミスセンスやフレームシフト変異などのR N F 4 3 不活性化変異が、原発腫瘍および膵管腺がん (P D A C) の細胞株に存在することを提供する。内因性の野生型R N F 4 3 はP D A C細胞におけるW n tシグナル伝達を調節し、内因性R N F 4 3 をP D A Cにおいて阻害するとF r i z z l e dレベルおよびW n tシグナル伝達を上昇させるため、本発明はがんにおいて変異している上流W n t経路成分 (R N F 4 3) の同定を提供する。

30

【 0 0 1 1 】

本発明はまた、R N F 4 3 遺伝子変異を有するがん細胞はW n t経路の阻害に対してより感受性であることを示す。がん細胞におけるR N F 4 3の阻害は、F r i z z l e dタンパク質の細胞表面レベルの増加をもたらす。したがって、上昇したW n tシグナル伝達および変異R N F 4 3を有するがん細胞、特に膵臓がん細胞は、W n t拮抗薬に対してより感受性である。したがって、本発明は、R N F 4 3変異ステータスは、W n tシグナル伝達阻害剤の治療的投与のためのがん患者選択戦略として用いることができることを提供する。

40

【 0 0 1 2 】

W n t阻害剤は、W n t経路の阻害が示される場合、例えば、腫瘍または異常な細胞増殖の治療において、ヒトにおけるまたは獣医学的な使用のための医薬用組成物として有用である。本発明は、W n t阻害剤に対する感受性を示すバイオマーカーを有することが測定された患者へW n t阻害剤またはW n t阻害剤を含む医薬組成物を投与することを含む、W n t阻害剤を用いてがん患者を治療する方法を提供する。例えば、患者試料は、W n t阻害剤に対する感受性を示すR N F 4 3変異またはZ N R F 3変異の存在についてD N

50

A配列決定法によって試験することができる。あるいは、患者試料は、RNF43遺伝子発現、RNF43タンパク質発現、ZNF3遺伝子発現、ZNF3タンパク質発現または他のバイオマーカーのレベルについて試験することができ、バイオマーカーの患者のレベルは、Wnt阻害剤に対する感受性と相関しているバイオマーカーの対照レベルに統計学的に類似しているかまたはそれよりも低く、または、患者の腫瘍細胞におけるバイオマーカーのレベルは、Wnt阻害剤に対する感受性と相関しているバイオマーカーのレベルに統計学的に類似している。対照レベルは、バイオマーカーの正常またはベースラインレベルであるか、健康な細胞または組織試料におけるバイオマーカーのレベルであるか、またはWnt阻害剤に対する耐性と相関しているバイオマーカーの対照レベルであってもよい。

10

【0013】

Wnt阻害剤またはWnt阻害剤を含む医薬組成物は、患者の治療に使用することができるが、ここでバイオマーカーの患者のレベルはWnt阻害剤に対する感受性と相関している。特定の実施形態では、Wnt阻害剤またはWnt阻害剤を含む組成物は、患者ががんを有している際の使用のために意図されている。

【0014】

ZNF3とRNF43は機能的ホモログであり、ZNF3はまた、特定のタイプの腫瘍において変異している。したがって、ZNF3の変異ステータスもまた、Wnt拮抗薬の治療的投与のためのがん患者を選択するために有益である。

20

【0015】

一実施形態において、本発明は、Wnt阻害剤の治療的投与が有益であるかまたは有益でないことが予測されるがん患者を選択するための方法を提供する。この方法は、

(a)患者からの腫瘍細胞の試料におけるバイオマーカーのレベルを検出する段階であって、バイオマーカーは、(i)ヘテロ接合性の消失を決定するために、RNF43染色体領域もしくはZNF3染色体領域において検出されたDNAコピー数、(ii)RNF43遺伝子もしくはZNF3遺伝子の不活性化変異を検出するために配列決定されたがん組織からのゲノムDNA、cDNAもしくはRNA；(iii)RNF43 mRNA発現もしくはZNF3 mRNA発現を測定するためのアッセイの結果；(iv)RNF43タンパク質発現もしくはZNF3タンパク質発現を測定するためのアッセイの結果；(v)RNF43遺伝子欠失もしくはZNF3遺伝子欠失の機能的効果；または

30

(vi)またはバイオマーカー(i)~(v)の組み合わせであってもよい、段階；
(b)腫瘍細胞試料におけるバイオマーカーのレベルを、(i)Wnt阻害剤に対する感受性と相関しているバイオマーカーの対照レベル；および(ii)Wnt阻害剤に対する耐性と相関しているバイオマーカーの対照レベルからなる群から選択されるバイオマーカーの対照レベルと比較する段階；ならびに

(c)患者の腫瘍がRNF43もしくはZNF3変異を有するか、または患者の腫瘍がRNF43 mRNAもしくはタンパク質の発現の減少またはZNF3 mRNAもしくはタンパク質の発現の減少を有し、それにより患者の腫瘍がWnt阻害剤に対して感受性である可能性が高いことが示される場合に、Wnt阻害剤の治療的投与が有益であることが予測されるものとして患者を選択する段階を含む。

40

【0016】

腫瘍細胞におけるRNF43遺伝子またはZNF3遺伝子の変異ステータスは、次のいずれかの方法、または方法の組み合わせによってアッセイされてもよい。

(i)RNF43遺伝子の一方または両者のコピーが欠失しているか否かを確認するための17番染色体におけるゲノム遺伝子座17q22のRNF43領域のDNAコピー数解析。あるいは、ZNF3遺伝子の一方または両者のコピーが欠失しているか否かを確認するための22番染色体におけるゲノム遺伝子座22q12.1のZNF3領域のDNAコピー数解析。RNF43またはZNF3のヘテロ接合性の消失は、Wnt阻害剤を用いた治療による腫瘍増殖率の低減について選択される腫瘍のためのバイオマーカーで

50

ある。

(i i) R N F 4 3 遺伝子における不活性化変異を検出するための、がん組織からのゲノム DNA、c DNA または R N A の配列決定。R N F 4 3 または Z N R F 3 の不活性化変異は、W n t 阻害剤を用いた治療による腫瘍増殖率の低減について選択される腫瘍のためのバイオマーカーである。不活性化変異は、ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシングバリエーション、または保存された残基のアミノ酸変化をもたらすミスセンス変異であってもよい。

(i i i) タックマン (Taqman) または他の同様の技術を用いた R N F 4 3 m R N A 発現アッセイまたは Z N R F 3 m R N A 発現アッセイ。m R N A のナンセンスまたはフレームシフト変異は、多くの場合、ナンセンス変異依存 m R N A 分解をもたらす。したがって、がん細胞における R N F 4 3 m R N A 発現の喪失は、R N F 4 3 ナンセンスまたはフレームシフト変異のための二次または代替アッセイとして使用することができる。R N F 4 3 m R N A の欠如は、エピジェネティックなサイレンシングが原因である可能性もあり、その場合は、ゲノム DNA には変異が存在しない。

(i v) R N F 4 3 遺伝子欠失または Z N R F 3 遺伝子欠失の機能的効果のアッセイ、例えば腫瘍試料における、F r i z z l e d タンパク質レベルの増加、L R P 6 タンパク質レベルの増加、L R P 6 リン酸化の増加、および D i s h e v e l e d リン酸化の増加などについて、正常対照と比較してアッセイおよび検出することによる。

【 0 0 1 7 】

W n t 阻害剤で治療することによる腫瘍増殖率の低減について選択される腫瘍のバイオマーカーとして、R N F 4 3 遺伝子または Z N R F 3 遺伝子変異ステータスを使用する利点は、薬剤開発の期間の良好な結果である。

【 0 0 1 8 】

一実施形態において、本発明は、R N F 4 3 遺伝子または Z N R F 3 遺伝子変異ステータスを試験するためのアッセイまたはキットを提供する。アッセイまたはキットは、関連する W n t 阻害剤の新薬承認後の使用のためのコンパニオン診断アッセイであってよい。

【 0 0 1 9 】

別の実施形態において、本発明は、患者におけるがんの治療において使用するための W n t 阻害剤を含む医薬組成物を提供するが、(本明細書で定義の)バイオマーカーの患者のレベルはバイオマーカーの対照レベルと統計学的に同様であるかまたはそれよりも低く、対照バイオマーカーレベルは、W n t 阻害剤に対する感受性と相関している。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 0 】

【 図 1 】 L G K 9 7 4 処理によるコロニー形成アッセイを示す写真である。図 1 (a) は、2つの濃度 (3 0 0 n M および 1 μ M) の L G K 9 7 4 の存在下における、H P A F I I 細胞コロニー形成アッセイを示す図である。1 3 0 0 細胞を記載した処理により培地に播種し、培地を 1 4 日目のクリスタルバイオレット染色まで、5 日ごとに交換した。L G K 9 7 4 は R N F 4 3 遺伝子にナンセンス変異を有する H P A F I I 細胞のコロニー形成を阻害する。図 1 (b) は 1 μ M の L G K 9 7 4 単独の存在下または 1 0 % の W n t 3 a ならし培地 (C M) をともに毎日添加した条件での (機能性 R N F 4 3 タンパク質を有する) P K 1 および (非機能性 R N F 4 3 タンパク質を有する) H P A F I I 細胞コロニー形成アッセイを示す図である。R N F 4 3 野生型 P K 1 細胞は、1 0 日間のアッセイの間、L G K 9 7 4 への感受性を示さなかった。R N F 4 3 変異 H P A F I I 細胞は L G K 9 7 4 によって阻害された。この阻害は、外因性の W n t 3 a の添加によって部分的に救出されたので、L G K 9 7 4 による増殖阻害は、W n t シグナル伝達に依存したものである。

【 図 2 - 1 】 保存された残基を示すための R N F 4 3 タンパク質と Z N R F 3 タンパク質のアラインメントを示す図である。この情報は、不活性化変異されたミスセンス変異を予測することに利用することができる。ヒト R N F 4 3 タンパク質の配列は、配列番号 3 においても提供され、ヒト Z N R F 3 の配列はまた、配列番号 4 において提供される。

10

20

30

40

50

【図2-2】保存された残基を示すためのRNFB43タンパク質とZNRFB3タンパク質のアラインメントを示す図である。この情報は、不活性化変異されたミスセンス変異を予測することに利用することができる。ヒトRNFB43タンパク質の配列は、配列番号3においても提供され、ヒトZNRFB3の配列はまた、配列番号4において提供される。

【図3-a】野生型RNFB43を発現する、膵臓がん細胞YAPCにおけるRNFB43によるWntシグナル伝達の負の調節を示す棒グラフのセットを示す図である。図3(a)は、RNFB43の枯渇がYAPC膵臓がん細胞株においてスーパーTOPFLASH(STF)活性を増加させることを示す図である。YAPC-STF細胞を、Wnt3aならし培地(CM)の非存在下または存在下で、示されたsiRNAをトランスフェクトし、STFルシフェラーゼレポーター活性を測定した。pGL2 siRNAは、負の対照として作用する。

10

【図3-b】野生型RNFB43を発現する、膵臓がん細胞YAPCにおけるRNFB43によるWntシグナル伝達の負の調節を示す棒グラフのセットを示す図である。図3(b)は、STF活性のRNFB43 siRNAによる活性化が、内因性のWntに依存することを示す図である。YAPC-STF細胞を、示したsiRNAでトランスフェクトし、次いでDMSOまたはポーキュパイン阻害剤LGK974で処理した。その後、STFレポーター活性を測定した。

【図3-c】野生型RNFB43を発現する、膵臓がん細胞YAPCにおけるRNFB43によるWntシグナル伝達の負の調節を示す棒グラフのセットを示す図である。図3(c)は、RNFB43の枯渇がAXIN2、-カテニン標的遺伝子の発現を増加させることを示す図である。空ベクター(EV)またはsiRNA抵抗性RNFB43を発現するYAPC細胞は、示されたsiRNAでトランスフェクトし、定量的RT-PCRによるAXIN2およびRNFB43の相対的mRNAレベル。

20

【図4-a】いくつかのWnt/-カテニンシグナル伝達関連遺伝子のmRNAレベルの変化を示す棒グラフのセットを示す図である。図4(a)は、-カテニンの枯渇がAXIN2とRNFB43のmRNAレベルを減少させることを示す図である。細胞を、siRNAで処理し、示された遺伝子の相対的mRNAレベルを、定量的RT-PCRにより分析した。

【図4-b】いくつかのWnt/-カテニンシグナル伝達関連遺伝子のmRNAレベルの変化を示す棒グラフのセットを示す図である。図4(b)は、ポーキュパイン阻害剤がRNFB43 mRNAおよびAXIN2 mRNAの発現を減少させたことを示す図である。YAPC細胞は3μMのIWP2または1μMのLGK974で処理し、定量的RT-PCRによる遺伝子発現分析に供した。

30

【発明を実施するための形態】

【0021】

発明の詳細な説明

イントロダクション

本発明者らは、Wntシグナル伝達の2つの負の調節因子、Zinc/RINGフィンガータンパク質3(ZNRFB3、スイスプロットQ9ULT6、配列番号4)およびリングフィンガータンパク質43(RNFB43、スイスプロットQ68DV7、配列番号3)の機能を発見した。Hao HXら(2012) Nature 485(7397):195-200。RNFB43、がん関連RINGフィンガータンパク質は、核タンパク質、HAP95と相互作用するユビキチンリガーゼである。Sugiura Tら(2008) Exp. Cell Res. 314(7):1519-28。ZNRFB3およびRNFB43はどちらもWnt受容体Frizzledのための相同細胞表面膜貫通E3ユビキチンリガーゼである。両者のタンパク質はFrizzledおよびLRP6を含むWnt受容体複合体の細胞表面レベルを阻害する。

40

【0022】

本発明者らはまた、ZNRFB3がWnt経路活性化によって転写的に誘導されることを示した。ZNRFB3 siRNAまたはドミナントネガティブZNRFB3が強力にWntシグナル伝達を増加する一方で、ZNRFB3の過剰発現は、Wntシグナル伝達を減少さ

50

せた。LRP6リン酸化はZNF3阻害により増加した。このことは、ZNF3は、Wnt経路の上流で作用することを示す。したがって、ZNF3は、Wntリガンド刺激に対する細胞応答性を調節する。本発明者らは、ゼブラフィッシュやノックアウトマウスの両者を用いた生体内実験によって、この所見を細胞系において確認した。また、本発明者らは、RNF43がZNF3の機能的ホモログであり、Wntシグナル伝達を調節することを示した。

【0023】

RNF43および膵腫瘍

膵管腺がん(PDAC)は、膵臓がんの最も一般的な形態である。PDACは、非常に攻撃的で予後不良に関連している。Matthaei Hら(2011) Ann. Surg. Oncol. 18(12):349 3-9; Luebke AMら(2012) Pancreatol. 12(1):16-22; Hezel AF(2006) Genes Dev. 20(10)。膵上皮内腫瘍性病変(PanIN; Pancreatic intraepithelial endoplasia)、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN; intraductal papillary mucinous neoplasm)と粘液性嚢胞腫瘍(MCN; mucinous cystic neoplasm)はPDACについての前駆体として考えられている。その管特性にもかかわらず、PDACは必ずしも腺管コンパートメントから生じない。

10

【0024】

Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路は膵臓の発生中に動的に調節され、外分泌膵臓の発生に必要である。Wells JM(2007) BMC Dev. Biol. 7:4。Wnt/β-カテニンシグナル伝達の阻害は、膵臓の腺房発生を妨害するが、膵島発生を妨害しない。成体マウスの膵臓における安定なβ-カテニンの誘導発現は、膵島細胞に最小限の影響で成熟した外分泌細胞の増殖を増加させる。Heiser PWら(2006) Development 133(10):2023-32。Wnt経路の活性化はPDACの維持および/または進行に寄与し得ることを示す証拠が増えている。Morris JPら(2010) Nat. Rev. Cancer 10(10):683-95。β-カテニンの核または細胞質の蓄積がPDACのサブセットで観察される(Pasca di Magliano Mら(2007) PLoS One 2(11):e1155)が、これは経路が活性化されていることを示している。細胞基質および核β-カテニンのレベルは、PanINグレードおよびPDAC(Wang Lら(2009) Cancer Sci. 101(3):700-6)の発生と正に相関しているため、β-カテニンシグナル伝達はPDACの進行を促進させる。β-カテニンの枯渇は、PDAC細胞の増殖を減少させたが、これは表現型の形質転換の維持におけるβ-カテニンの重要性を示している。

20

30

【0025】

IPMNおよびMCNにおいて、RNF43は頻繁に変異している(Furukawa Tら(2011) Sci. Rep. 1:161; Wu Jら(2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(52):21188-93)。IPMNおよびMCNは、浸潤性膵管腺がん(PDAC)の前駆体である。

【0026】

ヒトRNF43の配列は当技術分野で知られている。全長ヒトRNF43 cDNA(NM_017763.4)は、商業的供給源(例えば、オープンバイオシステムズ(Open Biosystems), Glastonbury, CT, USA 06033)から購入することができる。RNF43の詳細については、米国特許第7425612号を参照されたい。TAT179ポリペプチドは、シグナルペプチドの後のRNF43細胞外領域と同一である。ヨーロッパにおいてEP1487877B1として認可された、国際特許出願WO2003/024392を参照されたい。

40

【0027】

近年、RNF43は、嚢胞性膵腫瘍における腫瘍抑制因子であると提案された。Wu Jら(2011) Proc. Natl. Acad. Sci. 108:2188。全エキソーム解析の研究において、8例の膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMNs)のうちの6例、および8例の粘液性嚢胞腫瘍(MCNs)のうちの3例は、RNF43の不活性化変異を保有することが示された。RNF43での不活性化変異が優越していることとその遺伝子座のヘテロ接合性の消失(LOH)は、IPMNsとMCNsの両者における腫瘍抑制因子としてのRNF43を確立する。その報告において、Wuらは、RNF43の機能的な研究を提供していない。

50

【 0 0 2 8 】

より最近では、Znrf3およびRnf43の両者の腸特異的欠失は、腸陰窩の過剰増殖と腸腺腫形成を誘導することがマウスにおいて示された。Koo BKら (2012) Nature 488 (7413):665-9。また、RNF43の変異は、嚢胞性膵腫瘍など、様々な腫瘍で同定されている。これらの研究は、RNF43はZNRF3のようにWnt / -カテニンシグナル伝達の負の調節因子として作用することを示している。

【 0 0 2 9 】

しかし、RNF43が重要である細胞系は同定されておらず、およびRNF43の試験管内での機能喪失研究は可能ではなかった。このように、がんにおけるRNF43変異の生理的関連性は、以前は知られていなかった。

10

【 0 0 3 0 】

Wnt / -カテニン経路

進化的に保存されたWnt / -カテニンシグナル伝達経路は胚発生および成体組織の恒常性に重要である。Logan CY and Nusse R (2004) Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 20:781-810; Clevers H (2006) Cell 127(3):469-80。Wntシグナル伝達は、転写因子 -カテニンの代謝回転を調節し、重要な発生遺伝子の発現プログラムを制御する。MacDonald BTら (2009) Dev. Cell. 17(1):9-26。Wnt経路の活性化がない場合は、細胞基質 -カテニンは、大腸腺腫症 (adenomatous polyposis coli (APC))、AXINおよびグリコーゲン合成酵素キナーゼ3 / (GSK3 /)などの複数のタンパク質を含有する -カテニン分解複合体に関連する。この複合体において、 -カテニンはGSK3によって恒常的にリン酸化されており、リン酸化 -カテニンはユビキチン・プロテアソーム経路によって分解される。2つの受容体、FrizzledとLRP5 / 6、によってWntシグナルが受け取られ、 -カテニン分解複合体の解離をもたらす。安定化 -カテニンは、核に移行し、TCFファミリーの転写因子に結合し、転写を開始させる。

20

【 0 0 3 1 】

Wnt / -カテニンシグナル伝達の異常な活性化は、腫瘍形成に関与しており、がんにおいてWnt経路の多くの下流コンポーネントは変異している。APCのトランケーション変異は結腸直腸がんの80%で発見される。 -カテニンの安定化変異とAXIN1 / 2の機能喪失変異もまた様々ながんにおいて見出されている。精力的な研究にもかかわらず、下流経路変異を有するがんにおける -カテニンシグナル伝達の標的化は、扱いやすい標的が不在のために難しい状況となっている。その一方で、Wntシグナル伝達経路の上流には扱いやすい標的がいくつか存在する。Wntシグナル伝達の上流を標的化する薬剤として、LRP6抗体(Ettenberg Sら (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(35):15473-8)、Frizzled抗体(Gurney Aら (2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109(29):11717-22)、およびポキユパイン阻害剤(Chen Bら (2009) Nat. Chem. Biol. 5(2):100-7)を含む、様々な薬剤が開発されてきている。しかし、これらの分子は下流の変異を有する腫瘍において -カテニンのシグナル伝達を阻害しないと思われるため、これらの薬剤の臨床開発はこれまで困難であった。また、リガンド誘導性Wnt / -カテニンシグナル伝達に依存しているヒトの腫瘍を同定することは、なおも解決の難しい仕事である。

30

40

【 0 0 3 2 】

定義

「がん」とは、米国特許番号第8093011と米国特許番号第8093011(両者とも参照によりその全体が取り込まれる)に記載されるように、制御されていない増殖、分化能の欠如および局部組織に侵入して転移する能力によって特徴付けられる広い範囲の細胞悪性腫瘍の一般名称である。これらの新生物による悪性腫瘍は、様々な程度の有病率で体内のあらゆる組織および器官に影響を与える。したがって、本明細書で使用される用語「がん」は、無制限増殖、不死、転移能、急速な成長と増殖率およびある特定の形態学的特徴など、がんを引き起こす細胞に典型的な特徴を有する細胞の存在の存在を示す。多くの場合、がん細胞は腫瘍の形態となるが、そのような細胞は単独で存在しうるか、また

50

は白血病細胞などの独立した細胞として血流を循環しうる。

【0033】

「異常な細胞増殖」は通常の調節機構（例えば、接触阻害の損失）とは無関係の細胞増殖を指す。これには下記の異常増殖が含まれる：（１）細胞におけるWnt経路の過剰活動により増殖する腫瘍細胞（腫瘍）；（２）細胞においてWnt経路の異常な過剰活動が生じている、他の増殖性疾患の良性および悪性の細胞；（４）細胞におけるWnt経路の過剰活動により増殖する任意の腫瘍；（５）細胞におけるWnt経路の過剰活動により増殖する任意の腫瘍；ならびに（６）Wnt経路の異常な過剰活動が生じている、他の増殖性疾患の良性および悪性の細胞。

【0034】

「バイオマーカー」は、人間などの生物の特定の病気の状態や、他のいくつかの生理学的状態の指標として使用することができる任意のものである。バイオマーカーは、遺伝子の存在、対立する遺伝子、遺伝子発現の測定、タンパク質、測定することができ、生理学的状態と関連させることができるタンパク質活性の機能効果であってよい。バイオマーカーは、医師が診断と治療コースを選択する意思決定支援に使用できる検査値変数として医学において使用される。

【0035】

「ヘテロ接合性の消失」（LOH）は、正常細胞と比較してほぼすべて種類のがんが受ける遺伝物質（DNA）の削除である。米国特許番号第7718364を参照のこと（参照によりその全体が組み込まれる）。がん細胞からの遺伝物質の消失は、染色体上の特定の遺伝子座における、細胞の増殖に影響を与える可能性がある遺伝子の対立遺伝子について、2つ以上あるうちの1つの選択的消失をもたらすことがある。遺伝的多様性やDNA多型により、対立遺伝子の組の多くが互いに異なっている。2つの対立遺伝子が同一である場合、その個体はその特定の遺伝子座での対立遺伝子の組がホモ接合体であると言われる。あるいは、2つの対立遺伝子が異なる場合、その個体はその遺伝子座でヘテロ接合体である。通常は、両者の対立遺伝子が転写され、ホモ接合体の場合、同一のタンパク質に、ヘテロ接合体の場合は、異なったタンパク質に最終的に翻訳される。ヘテロ接合型の対立遺伝子の組の1つが、ペアの染色体の1つからDNAが削除されることにより失われた場合、残りの対立遺伝子が発現され、影響を受けた細胞は機能的にホモ接合体となる。このような状況は「ヘテロ接合性の消失」（LOH）またはホモ接合性の減少と呼ばれる。DNAプローブを使用することにより、個体の正常な細胞からのDNAを同じ個体の腫瘍細胞から抽出したDNAと比較することができ、技術分野でよく知られている実験技術を使用してLOHを同定できる。あるいは、LOHは、正常のヘテロ接合体細胞においては2つの多形性の形態のタンパク質であって、対立遺伝子の削除が発生したがん細胞においては1つだけの形態であることを示すことによってアッセイすることができる。例えば、Laskoら（1991）Annu. Rev. Genet. 25:281-314を参照されたい。特定の染色体領域上における高頻度LOHが、多くの種類の悪性腫瘍において報告されているが、これはこれらの遺伝子座上またはその近くに推定上の腫瘍抑制遺伝子または腫瘍関連遺伝子が存在していることを示している。したがって、LOH分析は、推定遺伝子が存在する領域を狭め、同定することによる腫瘍抑制遺伝子を検索するための強力なツールである。Vogelsteinら（1988）New Engl. J. Med. 319(9):525-532; Fearonら（1990）Cell 61:759-767; およびFriendら、Nature 323:643-646（1986）を参照のこと。多くの種類の腫瘍抑制因子候補または腫瘍関連遺伝子が分析により同定された。Callら（1990）Cell 60:509-520; Kinzlerら（1991）Science 253:661-665; およびBakerら（1989）Science 244:217-221を参照のこと。

【0036】

「機能喪失」（LOF）変異は、遺伝子の変異または対立遺伝子であり、その結果、細胞または生物（ヒト細胞またはヒトを含む）において遺伝子産物（例えば、コードされたタンパク質など）が正常未満または機能しないようになる。対立遺伝子が完全な機能喪失（ヌル対立遺伝子）を有しているとき、それは多くの場合、無形質の変異と呼ばれる。機

10

20

30

40

50

能喪失変異に関連した表現型は、多くの場合、劣性である。

【0037】

「置換」とは、1つの塩基を他に交換する変異（すなわち、AをGに替えるような単一の「化学的文字」の変化）である。このような置換は、（1）異なるアミノ酸をコードするものにコドンを変更して、生産されるタンパク質に小さな変化を引き起こすもの（例えば、鎌状赤血球貧血は、 β -ヘモグロビン遺伝子の置換によって引き起こされるが、これは産生されるタンパク質中の単一のアミノ酸が改変されるものである）；（2）同じアミノ酸をコードするものにコドンを変更して、産生されるタンパク質に変化が生じないもの（「サイレント変異」）、または（3）単一の「停止」コドンにアミノ酸をコードするコドンを変更して、不完全なタンパク質を生じさせるもの（不完全なタンパク質は、通常は機能をもたない）、でありうる。

10

【0038】

「挿入」とは、追加の塩基対が、DNA内の場所に挿入された変異である。

【0039】

「欠失」とは、DNAのセクションが欠失した、または削除された変異である。

【0040】

「フレームシフト」とは、DNA配列から3で割り切れない数のヌクレオチドの挿入または欠失）によって引き起こされる変異である。コドンによる遺伝子発現のトリプレットの特質により、挿入または欠失は、リーディングフレーム（コドンのグループ）を変更することができ、オリジナルとは全く異なる翻訳結果をもたらす。これは多くの場合、機能喪失をもたらすトランケートしたタンパク質を生成する。

20

【0041】

（その発明者フレデリック・サンガーにちなんで名付けられた）「サンガー配列決定法」とは、ポリヌクレオチドの配列決定の鎖伸長停止法（chain-terminator method）である。サンガー配列決定法の特徴は、DNAの鎖伸長ターミネーターとしてのジデオキシヌクレオチド三リン酸（ddNTP）の使用である。サンガー配列決定法は、多くの場合、自動化された方法である。

【0042】

「次世代シーケンシング」法は、シーケンシング処理を並列化し、一度に数千から数百万の配列を生成する、最近開発されたハイスループット配列決定法のグループである。この技術は、生成されたデータの増加、ならびにこれらのデータを生成するために必要なコストの低下により、扱いやすい、汎用ツールとして当業者によって認識されてきている。

30

【0043】

特に明記しない限り、本明細書で使用される用語「治療する」は、患者における、腫瘍の増殖、腫瘍転移または他の発癌または新生物細胞を部分的にまたは完全に、逆進、緩和、その進行を阻害、または予防することを意味する。用語「治療」とは、本明細書では、特に明記しない限り、治療する行為を指す。

【0044】

語句「治療する方法」またはその等価の語句は、がん治療に適用された場合、がん細胞の数を減少もしくは消滅するように、またはがんの症状を緩和するように設計された手順または行動方針を指す。がんまたは他の増殖性疾患を「治療する方法」は、必ずしもがん細胞または他の疾患の細胞が実際に消滅すること、細胞の数または疾患が実際に減少すること、またはがんまたは他の疾患の症状が実際に緩和されることを意味しない。しばしば、がんを治療する方法は成功のみこみが低くとも行われるが、それにもかかわらず、その病歴および推定余命の条件によっては、全体的に有益な行動方針とみなされる。

40

【0045】

「治療的に有効な薬剤」とは、研究者、獣医、医師または他の臨床医によって求められている、組織、系、動物またはヒトの生物学的または医学的応答を誘発する組成物である。

【0046】

50

「治療有効量」または「有効量」とは、研究者、獣医師、医師または他の臨床医によって求められている、組織、系、動物またはヒトの生物学的または医学的応答を誘発する、対象化合物または組み合わせの量である。

【0047】

「阻害剤」(inhibitor)とは、上述したような天然に存在するまたは参照化合物の効果を阻害する(例えば、拮抗する、低減させる、減少させる、遮断する、逆進させる、または変化させる)化合物である。そのような阻害剤は、任意の化合物、タンパク質、ペプチド、もしくは(リボザイムおよびアンチセンスを含む)核酸、または拮抗的效果を提供する薬物/化合物/ペプチドの設計物または選択物の製品を含むことができる。

【0048】

「単離された」ポリヌクレオチド、または単離された核酸分子は、その天然の環境から取り出された(すなわち、ヒトの操作に供せられた)核酸分子のことであり、その天然の環境は核酸分子が天然に見出されるゲノムまたは染色体である。このように、語句「単離された」は核酸分子が精製された程度を必ずしも反映しないが、核酸分子が天然に見出されるゲノム全体または染色体全体を、この分子が含まないことを示している。遺伝子を検出するために(例えば、遺伝子へのハイブリダイゼーションによって)本発明の方法で使用されるようなポリヌクレオチドは、典型的には与えられた試料(例えば、細胞試料)中の全長遺伝子(またはその一部)の同定のためのハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプライマーとして使用するのに適した標的遺伝子の一部である。単離された核酸分子は、遺伝子または遺伝子の一部(例えば、調節領域またはプロモーター)を含むことができる。遺伝子を含む単離された核酸分子は、そのような遺伝子を含む染色体の断片ではなく、むしろその遺伝子に関連するが同じ染色体上に天然に見出される追加の遺伝子とは関連しないコード領域および調節領域を含む。単離された核酸分子はまた、天然においては特定の核酸配列に通常隣接されない付加的な核酸(すなわち、異種配列)により隣接(すなわち、配列の5'末端または3'末端に、またはその両方に)された特定の核酸配列を含むことができる。単離された核酸分子は、DNA、RNA(例えば、mRNA)、またはDNAもしくはRNA(例えば、cDNA)のいずれかの誘導体を含むことができる。語句「核酸分子」は、主として物理的な核酸分子を示し、語句「核酸配列」は、主として核酸分子上のヌクレオチドの配列を示すが、2つの語句は、特にタンパク質をコードする能力を有する核酸分子、または核酸配列に関して、交換可能に使用することができる。単離された核酸分子は、組換えDNA技術(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅、クローニング)または化学合成を用いて作製することができる。

【0049】

「プローブ」(オリゴヌクレオチドプローブ)とは、典型的には長さ約50から100ヌクレオチドから数百ヌクレオチド、数千ヌクレオチドのサイズの範囲である核酸分子である。したがって、プローブは、整数の増分で、50から数千ヌクレオチドの範囲内の任意の長さを含む、本明細書に記載のアッセイでの使用に適した任意の長さであることができる。このような分子は、典型的には、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件下で、標的核酸配列にハイブリダイズすることにより、試料中の標的核酸配列を同定するために使用される。ハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野において公知である。例えば、Sambrookら(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Labs Pressを参照されたい。

【0050】

「プライマー」もまた、核酸配列のことであり、PCRプライマーは、典型的には、ポリメラーゼ連鎖反応において使用されるかなり短い長さのオリゴヌクレオチド(例えば、8から30ヌクレオチド)である。PCRプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブは、標的配列からの配列情報を使用して、当業者によって容易に開発および製造することができる。Sambrookら(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Labs Pressを参照されたい。

【0051】

10

20

30

40

50

用語「試験試料」または「患者試料」は、本発明の方法によって評価される細胞から分泌された細胞または製品を含有する任意のタイプの試料を指すために一般的に用いることができ、単離された細胞の試料、組織試料または体液試料を含むがこれらに限定されない。単離された細胞の試料は、典型的には、懸濁液中または生体内の組織内で細胞を結合させた結合組織から分離した細胞の標本であり、それは本発明の方法による評価のために適切な数の細胞を収集できるような任意の適切な方法によって、臓器、組織または流体から収集されたものである。細胞試料中の細胞は、同じタイプである必要はない一方で、精製方法は、好ましくは評価される細胞のタイプを濃縮するように用いることができる。細胞は、例えば、組織をこすることによって、個々の細胞を分離するように組織試料を処理することによって、または体液から単離することによって、取得することができる。

10

【0052】

「組織試料」は、単離された細胞の試料に類似しているが、身体の臓器または組織の一部として本明細書において定義され、典型的には、いくつかの細胞タイプを含み、場合によって、細胞を保持する細胞骨格構造をととも含む。用語「組織試料」は、「細胞試料」と、いくつかの例において、互換的に使用されてもよい一方で、用語「組織試料」は、細胞試料よりもより複雑な構造を指定するためにより多く使用され得る。組織試料は生検によって得ることができ、例えば、切断、スライシング、またはパンチによって得ることができるものを含む。

【0053】

「体液試料」は、組織試料のように、評価する細胞を含有し、サンプリングされる特定の体液に適した任意の方法によって得られた液体である。サンプリングのための適切な体液としては、血液、粘液、精液、唾液、痰、気管支洗浄液、母乳、胆汁および尿を含むがこれらに限定されない。

20

【0054】

「対照レベル」は、Wnt阻害剤に対する感受性と相関するレベルまたはWnt阻害剤に対する耐性と相関するレベルを含むことができる、ヘテロ接合の対照レベルである。したがって、ヘテロ接合性の消失の対照またはベースラインレベルと比較して、患者試料がWnt阻害剤療法への感受性または耐性である可能性が高いかどうか、（例えば、良好な応答者または応答者（治療が有益である患者）であるか、あるいは、貧弱な応答者または非応答者（治療が有益でない患者かまたはあまり有益でない患者）であるか）を決定することができる。より具体的には、「対照レベル」はヘテロ接合性の対照レベル；野生型、正常またはベースラインステータスを示すDNA、cDNAまたはRNA配列；RNFB43 mRNAの対照レベルまたは活性；ZNRFB3 mRNAの対照レベルまたは活性、RNFB43 遺伝子欠失やZNRFB3 遺伝子欠失の機能的効果を表すことができ、Wnt阻害剤への感受性と相関しているレベル、配列もしくは効果またはWnt阻害剤に対する耐性と相関しているレベルを含めることができる。したがって、患者試料、がん細胞または細胞がWnt阻害剤に対して感受性または耐性である可能性が高いかどうかについて、対照ヘテロ接合；野生型、正常もしくはベースラインステータスを示すDNA、cDNAもしくはRNA配列；正常もしくはベースラインRNFB43 mRNAもしくは活性；正常もしくはベースラインZNRFB3 mRNAもしくは活性、またはRNFB43もしくはZNRFB3 遺伝子の正常もしくはベースライン機能的効果と比較して、決定することができる。「対照レベル」とは、非がん性、健康、野生型の組織または細胞、あるいは特定の実施形態においては、プラセボ処理した腫瘍細胞における比較のために測定された配列、パラメーターまたはレベルを指すことができる。

30

40

【0055】

用語「一致した個体」は、評価されるべき細胞または腫瘍増殖のタイプに適した1つまたは複数の特性に基づいた、対照個体の一致を示す。対照個体は、性別、年齢、人種、または対照個体と患者のベースラインに影響を与える可能性のある関連の生物学的もしくは社会学的要因に基づいて、評価される患者に一致させることができる（例えば、既存の条件、特定の物質の消費、他の生物学的または生理学的因子のレベル）。

50

【 0 0 5 6 】

「医薬組成物」は、活性剤と他の担体、例えば、化合物または組成物、不活性物質（例えば、検出可能な薬剤または標識）またはアジュバント、希釈剤、結合剤、安定剤、緩衝剤、塩、親油性溶媒、保存剤、アジュバント等の活性物質の組み合わせである。担体はまた、例えば；タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、および炭水化物（例えば、単糖およびオリゴ糖を含む糖；アルジトール、アルドン酸、エステル化糖などの誘導体化糖；および多糖または糖ポリマー等）のような薬学的賦形剤および添加剤を含み、単独または組み合わせで1から99.99パーセント重量または容量を含む、単独または組み合わせで存在することができる。炭水化物賦形剤には、例えば；フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボースなどの単糖類；ラクトース、スクロース、トレハロース、セロピオースなどの二糖類；ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプンなどの多糖類；ならびに、マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトールソルビトール（グルシトール）およびミオイノシトールなどのアルジトールが挙げられる。これは、固体または液体形態であり得る。

10

【 0 0 5 7 】

方法

一実施形態において、本発明は、Wnt阻害剤の治療的投与が有益であるかまたは有益でないことが予測されるがん患者を選択する方法を提供する。この方法は、

(a) 患者からの腫瘍細胞の試料におけるバイオマーカーのレベルを検出する段階であって、バイオマーカーは、(i) ヘテロ接合性の消失を決定するために、RNF43の染色体領域もしくはZNF3染色体領域において検出されたDNAコピー数、(ii) RNF43遺伝子もしくはZNF3遺伝子の不活性化変異を検出するために配列決定されたがん組織からのゲノムDNA、cDNAもしくはRNA；(iii) RNF43 mRNA発現もしくはZNF3 mRNA発現を測定するためのアッセイの結果；(iv) RNF43 mRNA発現もしくはZNF3 mRNA発現を測定するためのアッセイの結果；(v) RNF43遺伝子欠失もしくはZNF3遺伝子欠失の機能的効果；または(vi) またはバイオマーカー(i)~(v)の組み合わせであってもよい、段階；

20

(b) 腫瘍細胞試料におけるバイオマーカーのレベルを、(i) Wnt阻害剤に対する感受性と相関しているバイオマーカーの対照レベル；および(ii) Wnt阻害剤に対する耐性と相関しているバイオマーカーの対照レベルからなる群から選択されるバイオマーカーの対照レベルと比較する段階；ならびに

30

(c) 患者の腫瘍がRNF43もしくはZNF3変異を有するか、または患者の腫瘍がRNF43 mRNAもしくはタンパク質の発現の減少またはZNF3 mRNAもしくはタンパク質の発現の減少を有し、それにより患者の腫瘍がWnt阻害剤に対して感受性である可能性が高いことが示される場合に、Wnt阻害剤の治療的投与が有益であることが予測されるものとして患者を選択する段階を含む。

【 0 0 5 8 】

腫瘍細胞におけるRNF43遺伝子またはZNF3遺伝子の変異ステータスは、次のいずれかの方法、または方法の組み合わせによりアッセイされることができる。

40

(i) RNF43遺伝子の一方または両者のコピーが欠失しているか否かを確認するための17番染色体におけるゲノム遺伝子座17q22のRNF43領域のDNAコピー数解析。あるいは、ZNF3遺伝子の一方または両者のコピーが欠失しているか否かを確認するための22番染色体におけるゲノム遺伝子座22q12.1のZNF3領域のDNAコピー数解析。RNF43またはZNF3のヘテロ接合性の消失は、Wnt阻害剤を用いた治療による腫瘍増殖率の低減について選択される腫瘍のためのバイオマーカーである。

(ii) RNF43遺伝子における不活性化変異を検出するための、がん組織からのゲノムDNA、cDNAまたはRNAの配列決定。RNF43またはZNF3の不活性化

50

変異は、Wnt阻害剤を用いた治療による腫瘍増殖率の低減について選択される腫瘍のためのバイオマーカーである。不活性化変異は、ナンセンス変異、フレームシフト変異、スプライシングバリエーション、または保存された残基のアミノ酸変化をもたらすミスセンス変異であり得る。

(iii) タクマン (Taqman) または他の同様の技術を用いた RNF43 mRNA 発現アッセイまたは ZNRF3 mRNA 発現アッセイ。mRNA のナンセンスまたはフレームシフト変異は、多くの場合、ナンセンス変異依存 mRNA 分解をもたらす。したがって、がん細胞における RNF43 mRNA 発現の喪失は、RNF43 ナンセンスまたはフレームシフト変異のための二次または代替アッセイとして使用することができる。RNF43 mRNA の欠如は、エピジェネティックなサイレンシングが原因である可能性もあり、その場合は、ゲノム DNA には変異が存在しない。

(iv) RNF43 遺伝子欠失または ZNRF3 遺伝子欠失の機能的効果のアッセイ、例えば腫瘍試料における、Frizzled タンパク質レベルの増加、LRP6 タンパク質レベルの増加、LRP6 リン酸化の増加、および Dishevelled リン酸化の増加などについて、正常対照と比較してアッセイおよび検出することなどによる (この場合、腫瘍試料における Frizzled タンパク質レベルの増加、LRP6 タンパク質レベルの増加、LRP6 リン酸化の増加、および Dishevelled リン酸化の増加が、RNF43 遺伝子バイオマーカーまたは ZNRF3 遺伝子バイオマーカーの対照レベルよりも低いことが指標である)。

【0059】

検出段階は、(RNF43 について) 配列番号 1 または (ZNRF3 について) 配列番号 2 で提供される配列にハイブリダイズするヌクレオチドプローブを使用することによってなされる。

【0060】

不活性化変異は、ナンセンス変異 (表 1 および表 2 を参照)、フレームシフト変異 (表 1 および表 2 を参照)、スプライス部位変異または保存された残基でのアミノ酸変化をもたらすミスセンス変異であり得る。図 2 は、タンパク質中のどのアミノ酸が保存されているかについての指針を提供する、ヒト RNF43 と ZNRF3 タンパク質のアラインメントを示す。

【0061】

スプライス部位変異は、前駆体メッセンジャー RNA が成熟したメッセンジャー RNA へプロセッシングされる段階で、イントロンのスプライシングが行われる特定の部位に、いくつかのヌクレオチドを挿入または削除する遺伝的変異である。スプライシング部位の消滅は、1 つまたは複数のイントロンが成熟 mRNA 中に残ることとなり、異常なタンパク質の産生をもたらす得る。

【0062】

mRNA におけるナンセンスまたはフレームシフト変異は、多くの場合、ナンセンス変異依存 mRNA 分解をもたらす。したがって、がん細胞における RNF43 mRNA 発現の喪失は、RNF43 ナンセンスまたはフレームシフト変異のための二次または代替アッセイとして使用することができる。RNF43 mRNA の欠如はまた、エピジェネティックなサイレンシングが原因である可能性があり、その場合は、ゲノム DNA には変異が存在しない。

【0063】

比較する段階は、Wnt 阻害剤に対して耐性である 1 つまたは複数の対照細胞または Wnt 阻害剤に対して感受性である 1 つまたは複数の対照細胞、またはその両者におけるバイオマーカーの対照レベルと腫瘍細胞におけるバイオマーカーのレベルを比較することによって行うことができる。一態様において、Wnt 阻害剤に対する感受性または耐性と関係しているバイオマーカーの対照レベルは、予め決定されている。

【0064】

Wnt 阻害剤療法が有益であるかまたは有益でないと予測される患者を選択する段階の

ために、試験される大多数の患者について、ほとんどの患者はW n t阻害剤による治療に耐性である腫瘍を有することが企図される。これは、W n tシグナル伝達に対する腫瘍の依存性は、増殖因子シグナル伝達に対する腫瘍の依存ほど高頻度ではないことが予想される。さらに、W n t依存性腫瘍がW n t経路における下流遺伝子変異を有する場合、その腫瘍は最新のW n t阻害剤に応答しないであろう。したがって、当技術分野において、治療のためにW n t阻害剤治療に対して良好な応答者であるがん患者群を選択する必要がある。良好な応答者を予測する能力は、がん患者からの腫瘍におけるR N F 4 3変異ステータスまたはZ N R F 3変異ステータスを決定する主な有用性である。

【 0 0 6 5 】

上に記載した本発明の方法の実施形態はいずれも、任意のタイプのがんを有する患者に使用することができる。一実施形態において、患者は、乳管癌、腺癌またはメラノーマを有する（表1を参照のこと）。別の実施形態において、患者は、膵臓がん、結腸がん、食道がんまたは皮膚がんを有する（表1、表2、表3、表4、および表5を参照のこと）。本発明のさらに別の方法において、患者は、R N F 4 3変異を有する胃腫瘍を有している。

10

【 0 0 6 6 】

上に記載した本発明の実施形態のいずれにおいても、任意のW n t阻害剤に対する応答性を評価することができる。試験管内においては、W n t阻害剤の応答性は、標準的な細胞増殖、分化、およびアポトーシスアッセイにおいて決定することができる。腫瘍細胞におけるW n tシグナル伝達の状態に関するW n t阻害剤の効果は、 α -カテニン、 β -カテニン標的遺伝子A X I N 2のm R N A発現、およびL R P 6のリン酸化のレベルを調べることにより評価することができる。診療所において、固形腫瘍または腫瘍ステータスのバイオマーカーの評価は、イメージング、例えば、P E Tスキャンによる腫瘍の縮小量に基づいている。

20

【 0 0 6 7 】

腫瘍体積の測定方法は、当技術分野において公知である。Therasse P.ら（2000）J. Natl. Cancer Inst. 92(3): 205-216を参照されたい。追跡期間の間に各々同定され、報告されたベースラインの病変を特徴付けるために、同じ評価法と同じ技術を利用するべきである。治療の抗腫瘍効果を評価するために使用される場合、臨床検査による評価よりもイメージングに基づいた評価のほうが好ましい。

30

【 0 0 6 8 】

臨床検査。臨床的に検出された病変は、表面的である場合（例えば、皮膚結節および触知リンパ節）にのみ測定可能であるとみなされる。皮膚病変の場合には、カラー写真-病変のサイズを見積もるための定規を含めて-による文書化が推奨される。

【 0 0 6 9 】

胸部X線。胸部X線での病変は、明確に区別され、含気肺によって囲まれている場合に、測定可能な病変として許容される。しかし、C Tが好ましい。客観的な腫瘍応答の評価のための、この評価方法の使用に関するさらなる詳細については、Therasse P.ら（2000）J. Natl. Cancer Inst. 92 (3): 205-216によって提供される。

40

【 0 0 7 0 】

C TおよびM R I。X線コンピュータ断層撮影（C T）および磁気共鳴イメージング（M R I）は、応答評価のために選択された標的病変を測定するための、現在利用可能な最良の、最も再現性のある方法である。従来法によるC TおよびM R Iは、スライス厚が10 mm以下の連続した切片で行われるべきである。スパイラルC Tは、5 mmの連続的な再構成アルゴリズムを用いて行うべきである；この仕様は、胸部、腹部、骨盤の腫瘍に適用される。一方、頭頸部腫瘍および四肢の腫瘍は通常、特定のプロトコルを必要とする。Therasse P.ら（2000）J. Natl. Cancer Inst. 92 (3): 205-216を参照されたい。

【 0 0 7 1 】

超音波。検査の主要エンドポイントが客観的な応答評価である場合、臨床的に簡単にアクセスすることができない腫瘍病変を測定するために超音波を使用すべきではない。それ

50

は、表在触知可能なリンパ節、皮下病変および甲状腺結節の臨床測定についての、可能な代替方法として使用することができる。超音波はまた、通常、臨床検査によって評価される表在性病変の完全消失を確認するときにも有用であるかもしれない。客観的応答評価の目的で腫瘍病変を測定するために超音波を使用しないことを正当化する理由は、付録 I (Appendix I) において提供される。

【0072】

内視鏡検査や腹腔鏡。客観的な腫瘍評価のためにこれらの技術を利用することは、まだ完全にまたは広く確証されていない。この特定の状況においてそれらを使用する場合には、一部の施設でのみ利用可能である精巧な装置や高度な専門知識を必要とする。したがって、客観的な腫瘍応答のためのそのような技術の利用は、専門施設での検証目的に制限する必要がある。しかし、このような技術は、生検標本が得られる場合、完全な組織病理学的応答を確認するのに有用であり得る。

10

【0073】

腫瘍マーカー。腫瘍体積の測定との相関に使用される腫瘍マーカー（すなわち、本発明のマーカーではない）のみでは、応答を評価するために使用することができない。しかし、マーカーが最初に正常上限を超えている場合は、完全臨床応答したと考えられる患者については、すべての腫瘍病変が消失した際に、それらは通常のレベルに戻らなければならない。臨床試験を支援するための前立腺特異抗原および CA（がん抗原）125 応答の標準用法について、特定の付加的基準が検証されている。

【0074】

細胞診と組織学。細胞学および組織学的技法は、部分的応答と完全応答を区別するために、まれなケースにおいて使用することができる（例えば、治療後に、胚細胞腫瘍のような腫瘍タイプにおいて残存良性病変と残存悪性病変とを区別するために）。測定可能な腫瘍が応答または安定疾患の基準を満たしている場合に、治療中に現れるか、悪化した任意の浸出液について腫瘍的性質の細胞学的確認が必要となる。このような状況下では、収集した液体を細胞診することにより、応答または安定な疾患（浸出液が治療の副作用かもしれない）と進行性疾患（流体が新生物起源であることが確認された場合）とを区別することが可能である。客観的な腫瘍応答をよりよく確立するための新しい技術は、それらが腫瘍応答評価の状況において使用されるように十分に確証された場合に、これらの基準に統合される。

20

30

【0075】

ヘテロ接合性の消失

本発明の一実施形態では、RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子のヘテロ接合性の消失を有する腫瘍は、応答する可能性がより高い（すなわち、Wnt 阻害剤によって増殖が、遅くなっている。したがって、RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子のヘテロ接合性の消失を有する腫瘍を持つがん患者は、Wnt 阻害剤療法に対して応答速度がより高く、進行性疾患の速度がより低く、進行への時間がより長く、長期生存率がより高い可能性が高い。一実施形態では、RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子のコピーを持つ腫瘍試料を有する患者は、Wnt 阻害剤による治療に対する良好な応答者であると予測される。

40

【0076】

ヘテロ接合性の消失の対照レベルを設定するための方法は、試料タイプ、試料が得られた組織または器官、および評価される患者のステータスに基づいて選択される。方法は、患者の試料を評価するために使用されるものと同じ方法であることができる。一実施形態において、対照レベルは、細胞が評価されるのと同じ細胞タイプを使用して設定される。別の実施形態において、対照レベルは、Wnt 阻害剤に対して耐性または感受性であることが知られている患者または細胞株に由来する対照試料から設定される。一態様において、対照試料は、一致した個体の集団から得られた。

【0077】

対照レベルを設定するために、一致した個体数から試料が得られ、試験試料と同様の方

50

法で評価される。一致した個体の数は当業者によって決定することができるが、対照試料はそこから適切な対照レベル（例えば、集団）を設定するために取得しなければならず、評価される患者（すなわち、試験患者）と比較するための適切なベースラインを設定するために統計学的に適切であるべきである。対照試料から得られた値は、そのような値を設定するために当技術分野において標準的な方法を用いて、適切なベースラインレベルを設定するように統計分析の任意の適切な方法を用いて統計学的に処理される。

【0078】

腫瘍細胞あたりのRNF43遺伝子またはZNF3遺伝子のコピー数は、蛍光インサイブハイブリダイゼーション法（FISH）により検出することができる。FISHはDNAベースの技術であり、新鮮なまたは保存したパラフィン包埋腫瘍試料において首尾よく行うことができる。この技術は十分に確立されており、プローブは、臨床細胞遺伝学および分子病理学の研究室において短いターンアラウンドで、容易に構築することができる。マウスRNF43のためのFISHプローブは市販されているので、当業者は、容易にヒトRNF43のための対応するFISHプローブを構築することができるであろう。Rogan Pら(2001) Genome Res. 11(6): 1086-1094を参照されたい。あるいは、ヒトRNF43またはヒトZNF3などのヒト遺伝子に対するFISHプローブのカスタム設計のサービスは、Empire Genomics, Buffalo, NY, USAからのFISHプローブによるものなど、市販されている。

【0079】

ハイブリダイゼーション

遺伝子の検出は、ハイブリダイゼーションアッセイを使用して達成することができる。核酸ハイブリダイゼーションは、（例えば、オリゴヌクレオチドまたはより大きなポリヌクレオチド）プローブと標的核酸を、プローブとその相補的標的が相補的塩基対形成を介して安定したハイブリッド二重鎖を形成できる条件下で接触させることを単純に含む。本明細書で使用する場合、ハイブリダイゼーション条件は、核酸分子が類似の核酸分子を同定するために用いられる標準的なハイブリダイゼーション条件のことを言う。そのような標準的な条件は、例えば、Sambrookら（1989）Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Labs Press（その全体が参照により組み入れられる、特に9.31~9.62ページを参照）に開示されている。さらに、ヌクレオチドのミスマッチの程度を変え、ハイブリダイゼーションを達成するための適切なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を計算する式は、例えば、Meinkothら（1984）Anal. Biochem. 138, 267-284（その全体が参照により取り込まれる）に開示されている。ハイブリッド二重鎖を形成しない核酸は、ハイブリダイズした核酸から洗い流され、ハイブリダイズした核酸はその後、典型的には、結合させた検出可能な標識の検出により検出することができる。核酸は、温度の上昇または核酸を含有する緩衝液の塩濃度を減少させることによって変性される。低ストリンジェンシー条件下（例えば、低温または高塩濃度またはその両者）においては、アニールした配列が完全に相補的でない場合であってもハイブリッド二重鎖（例えば、DNA:DNA、RNA:RNA、またはRNA:DNA）を形成するであろう。したがって、ハイブリダイゼーションの特異性は、より低いストリンジェンシーで低減する。逆に、より高いストリンジェンシー（例えば、より高い温度またはより低い塩濃度）においては、ハイブリダイゼーションを成功させるにはより少ないミスマッチが必要である。

【0080】

高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件は、本明細書で言及されるように、ハイブリダイゼーション反応において探索するために使用される核酸分子と少なくとも約90%の核酸配列同一性を有する核酸分子の単離を可能にする条件（すなわち、約10%以下のヌクレオチドのミスマッチを許容する条件）のことを言う。当業者は、特定のレベルのヌクレオチドミスマッチを達成する適切なハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を計算するためにMeinkothら（1984）Anal. Biochem. 138, 267-284の式を使用することができる。そのような条件は、DNA:RNAまたはDNA:DNAハイブリ

10

20

30

40

50

ッドが形成されているか否かに依存して変化する。あるいは、 T_m は Sambrook ら (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Labs Press., 9.31 から 9.62 ページに記載されるように、経験的に計算することができる。

【0081】

ハイブリダイズした核酸は、核酸試料に結合した1つまたは複数の標識を検出することによって検出される。当業者に周知の多数の手段のいずれかによって、標識を組み込むことができる。本発明で使用するのに適した検出可能な標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段により検出可能な任意の組成物を含む。本発明において有用な標識は、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、アレクサフルオル (Alexa fluor)、スペクトラムダイ (Spectrum dyes) など)、量子ドット、放射性標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^{32}P ）、および比色標識を含む。そのような標識を検出する手段は当業者によく知られている。したがって、例えば、放射標識は、写真フィルムまたはシンチレーションカウンターを用いて検出することができ、蛍光マーカは、放出された光と蛍光顕微鏡を検出するための光検出器を用いて検出することができる。比色標識は、単に着色標識を可視化することによって検出される。好ましくは、ハイブリダイズする核酸は、蛍光標識によって、最も好ましくは蛍光インサイツハイブリダイゼーション (FISH) アッセイの条件によって検出される。FISH アッセイは、当該技術分野においてよく知られている。

10

【0082】

本発明の方法において、腫瘍細胞試料中の RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子ヘテロ接合性の消失のレベルは、(i) Wnt 阻害剤に対する感受性と相関している対照レベル；および (ii) Wnt 阻害剤に対する耐性と相関している対照レベルから選択される RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子ヘテロ接合性の消失の対照レベルと比較される。患者の腫瘍細胞における RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子ヘテロ接合性の消失のレベルが、Wnt 阻害剤に対する感受性と相関している RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子ヘテロ接合性の消失の対照レベルに統計学的に類似しているかまたはそれよりも高い場合、または、患者の腫瘍細胞における RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子ヘテロ接合性の消失のレベルが、Wnt 阻害剤に対する耐性と相関している RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子ヘテロ接合性の消失のレベルよりも統計学的に高い場合、患者は、Wnt 阻害剤、そのアゴニスト、または Wnt 阻害剤と実質的に同様の生物学的活性を有する薬物の治療的投与が有益であることが予測されるものとして選択される。患者の腫瘍細胞における RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子ヘテロ接合性の消失のレベルが、Wnt 阻害剤に対する感受性と相関している RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子ヘテロ接合性の消失の対照レベルよりも統計学的に低い場合、または、患者の腫瘍細胞における RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子ヘテロ接合性の消失のレベルが、Wnt 阻害剤に対する耐性と相関している RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子ヘテロ接合性の消失のレベルに統計学的に類似しているかまたはそれよりも低い場合、患者は、Wnt 阻害剤、そのアゴニスト、または Wnt 阻害剤と実質的に同様の生物学的活性を有する薬物の治療的投与が有益でないことが予測されるものとして選択される。

20

30

【0083】

不活性化変異

本発明の一実施形態では、RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子における不活性化変異を有する腫瘍は、Wnt 阻害剤に応答性（つまり、その増殖が遅くなること）である可能性が高い。RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子の1つまたは複数の変異が検出されると、Wnt 阻害剤を用いた治療が患者に有益であることが予測される。RNF43 遺伝子における1つまたは複数の変異の検出のための指針は、実施例に提供される。

40

【0084】

RNF43 遺伝子または ZNRF3 遺伝子の1つまたは複数の変異が検出されると、Wnt 阻害剤療法に患者が応答するかまたは Wnt 阻害剤療法が患者に有益である可能性が高いと予測される。変異が検出されない場合は、Wnt 阻害剤療法に患者が応答する可能

50

性が低いかまたはそれが患者に有益である可能性が低いと予測される。遺伝子変異をスクリーニングするための方法は、当技術分野で周知であり、Sambrookら (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Labs Pressに記載されており、ハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応、ポリアクリルアミドゲル解析、クロマトグラフィー、または分光法を含む。「次世代シーケンシング」でなされている最近の進歩により、ポリヌクレオチドの直接塩基配列決定は、RNF43 遺伝子の変異ステータスまたはZNF3 遺伝子の変異ステータスをアッセイするための最も安価で信頼性のある方法になりつつあると期待される。

【0085】

遺伝子変異をスクリーニングするための方法には、遺伝子によってコードされる改変タンパク質産物のスクリーニングをさらに含むことができる（例えば、免疫ブロット法（例えば、ウエスタンブロット）、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、免疫沈降、免疫組織化学、免疫蛍光法、蛍光活性化細胞ソーティング（FACS）および免疫蛍光顕微鏡を介して）。

10

【0086】

腫瘍試料は腫瘍細胞から均一に構成されていないため、RNF43 mRNAの消失またはZNF3 mRNAの消失について、mRNA中の少なくとも50%の低下は、機能喪失を表すと考えることができる。

【0087】

患者試料

患者試料を得る適切な方法は当業者に知られている。患者試料は、患者からの任意の体液または組織を含むことができ、それには腫瘍細胞または腫瘍細胞のタンパク質が含まれていてもよい。

20

【0088】

一般に、試料のタイプ（すなわち、細胞、組織または体液）は、腫瘍細胞増殖について評価される器官または組織への接近性および構造に基づいて、あるいはどのようながんのタイプが評価されるかに基づいて選択される。本発明は、腺管がん、腺がんまたはメラノーマ（表1参照）などの腫瘍または膵臓がん、結腸がん、食道または皮膚がんを有する患者からの腫瘍（表1、表2、表3、表4および表5を参照）を評価するために特に有用である。これらの場合、典型的な試料は、それぞれ、腫瘍試料または患者からの膵臓組織試料からの切片である。

30

【0089】

試料が患者から得られた後、試料は本明細書に記載のいずれかのバイオマーカーの1つまたは複数の検出について評価される。本発明のいくつかの態様において、組織、細胞またはその一部（例えば、組織の切片、核酸などの細胞の成分など）は、1つまたは複数の核酸と接触させる。そのようなプロトコルは、例えば、遺伝子発現またはヘテロ接合性の消失を検出するために使用される。そのような方法は、細胞ベースのアッセイまたは非細胞ベースのアッセイを含むことができる。標的遺伝子を発現する組織または細胞は、典型的には、混合、ハイブリダイゼーション、または適切な技術により標的遺伝子の検出を可能にするように組み合わせることによるような、任意の適切な方法によって、検出試薬（例えば、プローブ、プライマー、または他の検出可能なマーカー）と接触させる。

40

【0090】

患者試料は、利用される検出技術のための任意の適切な方法によって調製される。一実施形態において、患者試料は、新鮮なまま、凍結して、固定してまたはその他の保存状態で使用することができる。例えば、患者腫瘍細胞はパラフィン中に患者の組織を固定化することによって調製することができる。固定化された組織は、切片化し、次いで、プローブが標的遺伝子（例えば、RNF43 遺伝子またはZNF3 遺伝子）へハイブリダイゼーションすることを検出するために、プローブと接触させることができる。

【0091】

対照群

50

対照レベルは、アッセイが行われるたびに、各アッセイのために設定される必要はない。むしろ、ベースラインまたは対照は、感受性および耐性の患者（応答者および非応答者）について以前に決定された対照レベルに関して蓄積された情報のフォームを参照することによって設定することができる。対応する検出法を用いた場合、対照レベルは、上に記載したいずれかの検出方法のために設定することができる。このような蓄積された情報のフォームは、感受性および耐性の腫瘍/患者の集団または個別のデータの基準チャート、リストまたは電子ファイル、あるいは評価する患者にとって有用な対照レベル遺伝子ヘテロ接合性の消失に関する任意の他のデータ源を含むことができる。

【0092】

比較のための対照レベルは、情報のフォームとして提供される予め確立された対照を含む、任意のタイプの対照であってよい。他のスコアリングシステムは、対照との比較に基づいて考案することができ、カットオフの近くにある患者は、診断を確定するために、他の基準、バイオマーカー、または技術により評価することができる。また、カットオフは、臨床医または研究者が望むように、患者集団に応じて変化させることができる。

10

【0093】

Wnt阻害剤に対する耐性と相関する対照については、バイオマーカーがRNF43遺伝子またはZNF3遺伝子の不活性化変異である場合には、対照はRNF43遺伝子またはZNF3遺伝子の野生型配列であってもよい。このような配列は公的に入手可能であり、明確に定義されている。一実施形態では、RNF43遺伝子の配列は配列番号1によって提供される。別の実施形態において、ZNF3遺伝子の配列は配列番号2によって提供される。

20

【0094】

RNF43 mRNAの喪失については、腫瘍試料中のmRNA発現の少なくとも50%の減少が観察される。

【0095】

Wnt阻害剤に対する耐性のための別の対照は、同じ患者からの非腫瘍試料であろう。このような非腫瘍試料が入手できない場合には、ほとんどの患者は、Wnt阻害剤に反応しないため、他の患者または健康な被験者からの平均値を比較することができる。

【0096】

統計分析

上に記載したように、本発明に記載のバイオマーカーの検出の段階は、異なる組み合わせで組み合わせることができる。この段階は、任意の順序で実行されるか、実質的に同時に実行されることができる。対照と患者試料との間の差を決定する統計分析は、質的変数についてのピアソンのカイ二乗検定のフィッシャーの直接確率法を含む当該技術分野で公知の任意の方法を用いて、および連続変数についてのスチューデントのt検定または分散分析を用いて、行うことができる。統計学的有意性は、典型的には $p < 0.05$ として定義される。

30

【0097】

Wnt阻害剤

本発明の方法は、Wnt阻害剤またはWnt阻害剤と実質的に同様の生物学的活性を有する薬物を使用した治療に反応する（例えば、治療上有益であること）可能性が非常に高い患者を決定または予測するために有用であるだけでなく、Wnt阻害剤を用いた治療に反応しない可能性が非常に高い患者を決定または予測するためにも有用である。本発明はまた、RNF43遺伝子変異を有するがん細胞は、Wnt経路の阻害に対してより感受性であることを提供する。がん細胞においてRNF43を阻害すると、細胞表面Frizzledレベルの増加をもたらす。したがって、変異RNF43を有する増強されたWntシグナル伝達とがん細胞、特に膵臓がん細胞は、Wnt拮抗薬に対してより感受性である。非機能性RNF43タンパク質を有する細胞株であるHPAFIIに関する図3および図4を参照されたい。本発明者らはまた、同じく非機能性RNF43タンパク質を有する、細胞株Panc10.05もポーキュバイン阻害剤に感受性であることを観察した。

40

50

【 0 0 9 8 】

一実施形態では、W n t 阻害剤はヒトでの使用に適したポーキュバイン阻害剤である。W n t 阻害剤は、I W P - 2、I W P - 3またはI W P - 4など公知のポーキュバイン阻害剤と同様の機能を有するポーキュバイン阻害剤であってよく、それらはChen Bら (2009) Nature Chem. Biol. 5: 100-107によって記載され、M i l t e n y i B i o t e c h からステモレキュール (Stemolecule; 商標) W n t 阻害剤 I W P - 2 (# 1 3 0 - 0 9 5 - 5 8 4)、ステモレキュール (商標) W n t 阻害剤 I W P - 3 (# 1 3 0 - 0 9 5 - 5 8 5) およびステモレキュール (商標) W n t 阻害剤 I W P - 4として市販されている。ステモレキュール (商標) I W P - 2、ステモレキュール (商標) I W P - 3およびステモレキュール (商標) I W P - 4は、ポーキュバイン (P O R C N)、膜結合型 O - アシルトランスフェラーゼによってW n t タンパク質のパルミチル化を防ぐ。

10

【 0 0 9 9 】

また、W n t 阻害剤はドラッグデザインの生産物であってよく、当該技術分野で知られている様々な方法で生産することができる。2010年9月10日に公開された国際特許出願W O 2 0 1 0 / 1 0 1 8 4 9を参照のこと。模倣薬または本発明に有用な他の化合物を設計するために有用なドラッグデザインの様々な方法は、Maulikら (1997) Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies. Wiley-Liss, Inc.に記載されている (その全体が参照により取り込まれる)。W n t 阻害剤は、分子多様性ストラテジー (大規模で化学的に多様な分子ライブラリを迅速に構築することを可能にする関連するストラテジーの組み合わせ)、天然または合成化合物のライブラリ、特に化学またはコンビナトリアルライブラリ (すなわち、配列またはサイズが異なるが類似のビルディングブロックを有する化合物のライブラリ)、あるいは合理的、指向的または無作為のドラッグデザインによるものから入手できる。例えば、Maulikら (1997) Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies. Wiley-Liss, Inc.を参照のこと。分子多様性ストラテジーにおいて、大規模な化合物ライブラリは、例えば、ペプチド、オリゴヌクレオチド、天然または合成ステロイド化合物、炭水化物または天然または合成有機と非ステロイド系分子から、生物学的、酵素または化学的アプローチを利用して合成される。分子多様性ストラテジーの開発に重要なパラメーターとしては、サブユニット多様性、分子サイズ、ライブラリの多様性などが含まれる。このようなライブラリのスクリーニングの一般的な目標は、組み合わせの選択の逐次適用を利用することにより所望の標的高親和性リガンドを取得し、無作為または指向的な設計ストラテジーによりリード分子を最適化することである。分子多様性の方法はMaulikら (1997) Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies. Wiley-Liss, Inc.に詳しく記載されている。

20

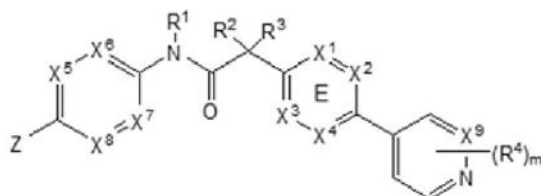
30

【 0 1 0 0 】

好ましい実施形態において、W n t 阻害剤は、式 (1) :

【 0 1 0 1 】

【 化 1 】



(1)

40

の化合物または、生理学的に許容される塩である (式中、
 X^1 、 X^2 、 X^3 および X^4 は N および C R⁷ から選択され ;
 X^5 、 X^6 、 X^7 および X^8 の 1 つは N であり、他は C H であり ;
 X^9 は、N および C H から選択され ;

50

Zはフェニル、ピラジニル、ピリジニル、ピリダジニルおよびピペラジニルから選択され、ここで各々のZのフェニル、ピラジニル、ピリジニル、ピリダジニルまたはピペラジニルは場合によってR⁶基で置換されており；

R¹、R²およびR³は水素であり；

mは1であり；

R⁴は水素、ハロ、ジフルオロメチル、トリフルオロメチルおよびメチルから選択され；

R⁶は水素、ハロおよび-C(O)R¹⁰であり；ここで、R¹⁰はメチルであり；

R⁷は水素、ハロ、シアノ、メチルおよびトリフルオロメチルから選択される)。

【0102】

Wnt阻害剤は、

N-[5-(3-フルオロフェニル)ピリジン-2-イル]-2-[5-メチル-6-(ピリダジン-4-イル)ピリジン-3-イル]アセトアミド；

2-[5-メチル-6-(2-メチルピリジン-4-イル)ピリジン-3-イル]-N-[5-(ピラジン-2-イル)ピリジン-2-イル]アセトアミド(LGK974)；

N-(2,3'-ビピリジン-6'-イル)-2-(2',3-ジメチル-2,4'-ビピリジン-5-イル)アセトアミド；

N-(5-(4-アセチルピペラジン-1-イル)ピリジン-2-イル)-2-(2'-メチル-3-(トリフルオロメチル)-2,4'-ビピリジン-5-イル)アセトアミド；

N-(5-(4-アセチルピペラジン-1-イル)ピリジン-2-イル)-2-(2'-フルオロ-3-メチル-2,4'-ビピリジン-5-イル)アセトアミド；および

2-(2'-フルオロ-3-メチル-2,4'-ビピリジン-5-イル)-N-(5-(ピラジン-2-イル)ピリジン-2-イル)アセトアミド；

の群から選択される化合物またはその医薬的に許容される塩であることができる。

【0103】

最も好ましくは、Wnt阻害剤は、2-[5-メチル-6-(2-メチルピリジン-4-イル)ピリジン-3-イル]-N-[5-(ピラジン-2-イル)ピリジン-2-イル]アセトアミド(LGK974)である。

【0104】

Wnt阻害剤と実質的に同様の生物学的活性を有する薬剤は、参照化合物により実質的に同じ機能を示すかまたは発揮する薬剤を指し、生体内または試験管内において測定されるかまたは観測される参照化合物に帰する。例えば、ポーキュパイン阻害剤と実質的に同様の生物学的活性を有する薬剤は、IWP-2、IWP-3またはIWP-4のような参照化合物により示されるか発揮されるものと実質的に同じ機能を有する薬剤を指す。

【0105】

別の実施形態では、Wnt阻害剤は、Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USAおよび他の市販元から入手できるタンキラーゼ阻害剤XAV939(C9289)である。Hung SMら(2009)Nature 461(7264):614-20を参照されたい。

【0106】

その他のタイプのWnt阻害剤としては、アプタマー、RNAi、リボザイムが含まれるが、それらに限定されない。アプタマーは、高い親和性と特異性で所定の特定ターゲット分子に結合する能力に基づいて無作為コンビナトリアル核酸ライブラリから選択される短鎖の合成核酸(通常はRNAであるがDNAでもよい)である。アプタマーは定義された三次元構造を想定して、構造に非常にわずかな相違を持つ化合物を区別することができる。RNA干渉(RNAi)は、二本鎖RNAが、哺乳類システムにおいては短い干渉RNA(siRNA)が、相補的な遺伝子の発現阻害または抑制に使用されるプロセスである。リボザイムは生体触媒(例えば、共有結合の切断または形成によって)を実行することができるRNAセグメントである。より具体的には、リボザイムは、標的RNA部分に結合して、リン酸ジエステルバックボーンを特定の切断部位で切断して不活性化することにより機能するアンチセンスRNA分子である。

10

20

30

40

50

【0107】

その他のタイプの阻害剤は、天然のWnt阻害剤と類似性があってもよい。Wntシグナル伝達の既知の天然の拮抗薬には、Dickkopfタンパク質、分泌されたFrizzled関連タンパク質(sFRP)、Wnt阻害因子1(WIF-1)、およびSoggyが含まれる。Dickkopf関連タンパク質ファミリー(Dkk-1から-4)のメンバーは、リンカー領域で区切られた2つのシステインリッチなドメインを有する分泌タンパク質である。Dkkファミリーには、Dkk-3に相同であるが他のファミリーメンバーとは相同ではない、Soggyも含まれる。

【0108】

sFRPは、膜結合型Frizzledに類似した5つのWnt結合糖タンパク質のファミリーである。Wnt阻害剤の最大のファミリーには、sFRP-1、2、および5からなる第1グループと、sFRP-3および4を含む第2グループの2つのグループが含まれている。

10

【0109】

一実施形態では、Wntシグナル伝達の拮抗薬は、生体内において、テラトカルシノーマの増殖を阻害したと報告されるFrizzled8CRD-hFcなどの、可溶Wnt受容体であってよい。DeAlmeida VIら(2007) Cancer Res. 67(11):5371-9。

【0110】

Wntシグナル伝達の他の天然の拮抗薬には、WIF-1(Wnt阻害因子1)、Wntタンパク質に結合してその活性を阻害する分泌タンパク質が含まれる。

20

【0111】

Wnt阻害剤のさらに別のタイプとしては、抗体、その抗原結合フラグメント、または抗原結合ペプチドもしくは「結合パートナー」であってよい。抗体は、免疫グロブリンドメインを含むことにより特徴付けられ、したがって、抗体は免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質のメンバーである。抗体は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、2価と1価の抗体、二重または多重特異性抗体、そのような抗体を含有する血清、様々な程度に精製されている抗体、ならびに全抗体の任意の機能的等価物を含めることができる。Wnt阻害剤として有用な単離した抗体としては、そのような抗体を含有する血清、または様々な程度に精製されている抗体を含めることができる。本発明の全抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナルであってよい。あるいは、1つまたは複数の抗体ドメインがトランケートしているまたは欠損している抗原結合フラグメント(例えば、Fv、Fab、Fab'、またはF(ab)₂フラグメント)などの全抗体の機能的等価物、さらには一本鎖抗体または複数のエピトープに結合できる抗体(例えば、二重特異性抗体)を含む遺伝子組み換え抗体またはその抗原結合フラグメント、または、1つまたは複数の異なる抗原に結合できる抗体(例えば、二重または多重特異性抗体)は、Wnt阻害剤として用いることもできる。

30

【0112】

LRP6抗体(Ettenberg Sら(2010) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107(35):15473-8)およびFrizzled抗体(Gurney Aら(2012) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109(29):11717-22)を含む、上流のWntシグナル伝達を標的とした様々な抗体が開発されている。

40

【0113】

アッセイおよびキット

アッセイキットおよび本発明の方法は、特定のWnt阻害剤に応答すると予測された患者、細胞、または組織を同定するために使用してもよい。このようなコンビオン診断キットの使用は、承認薬との使用として政府の薬剤登録機関によって承認された他のコンビオン診断試験と同様であろう。例えば、ALK4変異した肺がんの治療のためのクリゾチニブ(crizotinib)およびBRAF変異したメラノーマのためのベムラフェニブ(vemurafenib)の2011年における食品医薬局による承認を参照されたい。

【0114】

50

アッセイキットおよび本発明の方法は、Wnt阻害剤に耐性であるがん細胞の応答性を向上することができる治療を同定するため、およびWnt阻害剤の応答を高める補助治療法を開発するために有用であるかもしれない。

【0115】

アッセイキットおよび本発明の方法は、膵臓がん(表2を参照)など、Wnt阻害剤で治療できる任意のがん、あるいは腺管がん、腺がんまたはメラノーマ(表1を参照)などのWnt阻害剤により増殖を減速することができる任意の腫瘍を有する患者に有用である。このような患者は、RNF43またはZNF3遺伝子発現の減少を有していない場合には、本明細書で提供される方法の結果として、非効果的な療法による副作用と金銭的費用から免れるかもしれない。アッセイキットおよび本発明の方法は、特定の患者に対して腫瘍の分子特性に関する情報に基づいてWnt阻害剤療法を勧めることができるかできない医師に有用である。アッセイキットおよび本発明の方法は、効率的なヒトRNF43 FISHアッセイの開発のための需要も有用に増加させ、未開発のヌクレオチドプローブを使用可能にする。

10

【0116】

一実施形態では、本発明は、Wnt阻害剤の治療的投与が有益であるか有益でないと予測されるがん患者を選択するためのアッセイキットを提供する。アッセイキットとしては以下のものが含まれる：

(a) 腫瘍細胞の試料において(i) RNF43遺伝子もしくはZNF3遺伝子の増幅レベル；または(ii) RNF43遺伝子もしくはZNF3遺伝子のヘテロ接合性の消失のレベルから選択されたバイオマーカーまたはバイオマーカーの組み合わせのレベルを検出するための手段。

20

(b) (i) Wnt阻害剤への感受性を検出するための対照試料；(ii) Wnt阻害剤への耐性を検出するための対照試料；(iii) Wnt阻害剤への感受性と相関しているバイオマーカーの前もって決定された対照レベルを含有する情報；または(iv) Wnt阻害剤耐性と相関しているバイオマーカーの前もって決定された対照レベルを含有する情報から選択される対照。

【0117】

一実施形態では、キットはさらに、RNF43遺伝子またはZNF3遺伝子における変異を検出するための手段を含むことができる。

30

【0118】

一実施形態では、変異を検出するための手段は、RNF43遺伝子またはZNF3遺伝子の一部にハイブリダイズするヌクレオチドプローブである。特定の実施形態では、検出するための手段は、蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)プローブである。検出のための手段はいずれも、検出可能な標識を含有することができる。検出のための手段のいずれも、基板上に固定することができる。

【0119】

一実施形態では、RNF43遺伝子またはZNF3遺伝子ヘテロ接合性の消失を検出する手段は、一般に、本発明の方法に使用できる任意のタイプの試薬であってよい。このような検出のための手段は、RNF43遺伝子またはZNF3にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするプローブまたはプライマーを含む。RNF43遺伝子またはZNF3のための核酸配列は、当技術分野で知られており、このような検出用試薬を製造するために使用することができる。そのような検出手段を用いたアッセイを実施するのに有用な付加的な試薬もまた、インサイツハイブリダイゼーションを実施するための試薬、蛍光マーカーを検出するための試薬、ポリメラーゼ連鎖反応を実施するための試薬などとして、含むことができる。

40

【0120】

本発明のアッセイキットを検出するための手段は、検出可能なタグまたは検出可能な標識にコンジュゲートさせることができる。そのようなタグは、目的の遺伝子またはタンパク質を検出するために使用される試薬の検出を可能にする、任意の適切なタグであり得る

50

ものであり、分光学的、光化学的、電気的、光学的または化学的手段により検出可能な任意の組成物または標識が含まれるが、これらに限定されない。本発明において有用な標識としては：標識されたストレプトアビジンコンジュゲートで染色するためのビオチン、磁気ビーズ（例えば、ダイナビーズ（Dynabeads；商標））、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など）、放射標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^{32}P ）、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびELISAにおいて一般的に使用される他のもの）、およびコロイド金または着色ガラスまたはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズのような比色標識、が含まれる。

【0121】

さらに、本発明のアッセイキットの検出手段は、基板上に固定化することができる。このような基板は、以前、記載した検出方法のいずれかにおいて使用されるような検出試薬の固定化のための任意の適切な基板を含むことができる。簡単に述べると、検出手段の固定化に適した基板は、所望の標的分子を検出するため検出手段の活性または能力に著しく影響を与えることなく検出手段と結合を形成することができる任意の固体有機、生体高分子または無機支持体のような任意の固体支持体を含む。例示的な有機固体支持体は、ポリスチレン、ナイロン、フェノール-ホルムアルデヒド樹脂、およびアクリルコポリマー（例えば、ポリアクリルアミド）のようなポリマーが挙げられる。キットは、試薬の検出のために、または陽性または陰性対照、洗浄溶液、希釈緩衝液などの標識のために適した試薬を含んでもよい。キットは、キットを使用して、結果を解釈するための取扱説明書のセットを含んでもよい。

【0122】

アッセイキットはまた、1つまたは複数の対照を含むことができる。対照としては：(i)患者における使用のために評価されたWnt阻害剤に対する感受性を検出するための対照試料；(ii)Wnt阻害剤に対する耐性を検出するための対照試料；(iii)Wnt阻害剤感受性または耐性に関して測定される特定のバイオマーカーの予め決定された対照レベルを含有する情報（例えば、Wnt阻害剤に対する感受性またはWnt阻害剤に対する耐性と相関しているRNF43遺伝子またはZNF3遺伝子ヘテロ接合性の消失の予め決定された対照レベル）を含むことができる。

【0123】

キットはまた、サンプリングされた細胞タイプに特徴的である対照マーカーを検出するための手段を含むことができ、本明細書において以前記載したバイオマーカーの存在を検出するための方法によるような、試料における公知のマーカーの存在を検出する（核酸またはタンパク質レベルにおいて）方法において使用することができる任意のタイプの試薬であって、一般的にはよい。具体的には、手段は、ポジティブに細胞タイプを同定する、分析される細胞タイプの特異的マーカーを同定することを特徴とする。例えば、肺腫瘍アッセイにおいては、バイオマーカー発現または生物活性のレベルについて肺上皮細胞をスクリーニングすることが望ましい。したがって、対照マーカーを検出する手段は、細胞が結合組織または炎症細胞などの他の細胞型と区別されるように、上皮細胞および好ましくは、肺上皮細胞に特徴的であるマーカーを同定する。このような手段は、本発明のアッセイの正確度と特異性を上昇させる。このような対照マーカーの検出手段としては：ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でタンパク質マーカーをコードする核酸分子にハイブリダイズするプローブ；そのような核酸分子を増幅するPCRプライマー；標的分子上のコンホメーション的に異なる部位に特異的に結合するアプタマー；または抗体、その抗原結合断片、または試料中の対照マーカーに選択的に結合する抗原結合ペプチドが含まれるが、これらに限定されない。多くの細胞マーカーについての核酸配列およびアミノ酸配列は、当技術分野で知られており、このような検出用試薬を製造するために使用することができる。

【0124】

以下の実施例は、本発明の特定の実施形態、およびそれらの各種用途の例示である。こ

10

20

30

40

50

れらは説明の目的のみに記載されるものであり、本発明を限定するものとして解釈されるべきではない。

実施例

【実施例 1】

【0125】

表 1 に示されるように、RNF43 遺伝子は、原発性膵管腺がんおよび他の腫瘍において変異している。膵臓、大腸、食道および皮膚の原発性腫瘍からの 9 つのゲノム DNA におけるナンセンスおよびフレームシフト変異。それらのうち、5 つは膵腫瘍であり、検査した膵腫瘍の合計数は 19 である（ダメージによるミスセンス変異の可能性のあるものを除き、試料の 25% 超における変異）。

【0126】

【表 1】

表1						
変異	AA変化	ID	病態	原発部位	組織診断 (サブタイプ)	年齢
ナンセンス	p.R337X	X-1633	原発性	膵臓	カルシノーマ (腺管がん)	44
フレームシフト	不明	X-1948	原発性	膵臓	カルシノーマ (腺管がん)	データなし
フレームシフト	不明	X-2406	原発性	膵臓	カルシノーマ (腺管がん)	データなし
フレームシフト	不明	X-3184	原発性	膵臓	カルシノーマ (腺管がん)	55
フレームシフト	不明	X-3268	原発性	膵臓	カルシノーマ (腺管がん)	78
フレームシフト	不明	X-2239	原発性	大腸	カルシノーマ (腺管がん)	76
フレームシフト	不明	X-3205	原発性	大腸	カルシノーマ (腺がん)	78
フレームシフト	不明	X-1433	転移	食道	カルシノーマ (腺がん)	78
ナンセンス	p.W302X	X-2163	転移	皮膚	メラノーマ (NS(言及なし))	54

【実施例 2】

【0127】

表 2 に示すように、RNF43 遺伝子は複数の膵臓がん細胞株における変異である。コピー数解析に基づいて、サンガー配列決定法で同定される 10 例の膵臓がん細胞株におけるゲノム変異は、潜在的に RNF43 遺伝子の 1 つだけのコピーが残った。RNF43 不活性化変異を有する 3 つの特有な細胞株が同定された：HPAFII（ナンセンス変異）、Panc 10.05（フレームシフト変異、PL45 細胞と関連）、PaTu-8988S（有害突然変異、PaTu-8988T 細胞と関連）。

【0128】

10

20

30

40

【表 2】

表2						
細胞株	遺伝子名	cDNA変異	エクソン	AA変異	保存	コメント
PK-1	RNF43	<i>c.g350a</i>	2	p.R117H	いいえ (No)	
HPAFII	RNF43	<i>c.g520t</i>	4	p.E174X	はい (Yes)	非機能的
Panc 10.05	RNF43	<i>c.54insatca</i>	1	p.M18fs	~	非機能的
PL45	RNF43	<i>c.54insatca</i>	1	p.M18fs	~	非機能的
PaTu-8988S	RNF43	<i>c.t206g</i>	1	p.F69C	はい	非機能的
PaTu-8988T	RNF43	<i>c.t206g</i>	1	p.F69C	はい	非機能的
KLM-1	RNF43	<i>c.g350a</i>	2	p.R117H	いいえ	
Capan-1	RNF43	<i>c.c692t</i>	6	p.P231L	いいえ	非極性および疎水性の両方
KP1N	RNF43	<i>c.c692t</i>	6	p.P231L	いいえ	非極性および疎水性の両方
PANC-1	RNF43	<i>c.c692t</i>	6	p.P231L	いいえ	非極性および疎水性の両方

10

20

【 0 1 2 9 】

RNF43不活性化変異を有する他の細胞株（例えば、Capan-2）と共に、HPAFII、Panc 10.05、PaTu-8988S細胞株に関する追加情報が下記の実施例3および実施例4において提供される。

30

【 実施例 3 】

【 0 1 3 0 】

L GK 9 7 4による古典的Wnt経路阻害

膵臓細胞のL GK 9 7 4処理に対する感受性を試験管内における細胞増殖アッセイで試験した。24例のヒト膵臓がん細胞株をL GK 9 7 4にて処理または未処理とした。

【 0 1 3 1 】

細胞増殖データは384ウェルフォーマットで生成した。細胞を採取し、 1.5×10^4 細胞/mLの密度でその適切な増殖培地中に再懸濁させた。その後、細胞は384ウェル組織培養プレート（Greiner-BioOne 789163）に、最終容量1ウェルあたり50 μ LにてプレATINGし、パイオテックマイクロフィル（BioTek μ Fill）ディスペンサー（シリアル番号000-3586）を使用して、ウェルあたりの密度を750細胞/ウェルとした。その後、プレートは、ACP-1システム（37 $^{\circ}$ C、5% CO₂）上のインキュベーターに移し、細胞をオーバーナイトで取り付けたままとした。L GK 9 7 4についての12ポイント用量反応曲線は、384ウェルECHO互換性ソースプレート（Labcyte P-05525）中、2mMの最高濃度および 1.13×10^{-5} mMの最低濃度で整えた。プレATINGの約18時間後、Labcyte ECHO555を用い、50nLのL GK 9 7 4を細胞に投与した。プレート内にIC₅₀曲線を複製し、細胞株ごとにプレートを複製した。化合物の添加に続いて、プレートは

40

50

120時間、インキュベーターに返却した。アッセイプレートは、製造業者の取扱説明書に従い、10 μ Lの1xCell Titer Glo (Promega G7573)を添加して読み取った。次いで、プレートを10分間室温でインキュベートし、組み込まれたPerkin Elmer ViewLux (2秒露光、2xbin、高感度)で読み取った。生データは、プレートごとにDMSO対照ウェルを用いて正規化し、IC₅₀決定のためにカーブフィッティングを行った。

【0132】

細胞増殖は、Cell Titer Glo (Promega)を用いて5日後に測定した。表3に示されるように、LGK974は、Capan-2、PA-TU-8988SおよびHPAFIIを含む膵臓がん細胞株のサブセットにおいて、nM IC₅₀'sでの細胞増殖を阻害した。表4および実施例4に示すように、4つの細胞株すべてはRNF43の機能喪失(LOF)変異を保有している。

10

【0133】

【表3】

細胞株	細胞株増殖アッセイにおけるLGK974 IC50	阻害変化倍率(Inhibition fold change) (1-治療/対照)
Capan-2	0.0018	0.40
PA-TU-8988S	0.0116	0.40
HPAFII	0.0336	0.50
TCC-PAN2	>1.7	0.02
BXPC3	>2.0	0.01
HUP-T3	>2.0	0.07
KP-1N	>2.0	0.01
KP-1NL	>2.0	0.00
KP-2	>2.0	0.06
KP-3	>2.0	0.02
Panc 03.27	>2.0	0.06
Panc 05.04	>2.0	0.09
Panc 10.05	>2.0	0.02
Panc1	>2.0	0.00
PA-TU-8902	>2.0	0.02
PA-TU-8988T	>2.0	0.00
PK-1	>2.0	0.00
PK-59	>2.0	0.06
PSN-1	>2.0	0.06
SU8686	>2.0	0.03
SUIT-2	>2.0	0.00
SW1990	>2.0	0.03
YAPC	>2.0	0.20

20

30

40

【0134】

表4は、膵臓細胞株のリスト、細胞株におけるRNF43変異およびLGK974による経路阻害を示す表である。

【0135】

50

【表 4】

表4			
試料ID (細胞株)	可能性のあるLOF変異	増殖 IC _{50s}	経路阻害
Capan-2	p.R330fs	0.0018	はい (Yes)
HPAFII	p. E174X	0.0336	はい
PA-Tu-8988S	F69C	0.0116	はい
PA-TU-8988T	F69C	>2.0	はい
Panc 10.05	p. M18fs	>2.0	はい
PL45	p. M18fs	データなし	いいえ (No)
BXPC3	p. S495Y	>2.0	はい
KP1N	なし	>2.0	はい
PK-1	なし	>2.0	はい
PANC-1	なし	>2.0	はい
Panc03.27	なし	>2.0	はい
SUIT-2	なし	>2.0	はい
YAPC	なし	>2.0	はい
PANC-05-04	なし	>2.0	はい
KP-2	なし	>2.0	はい
KP-3	なし	>2.0	はい
PA-TU-8902	なし	>2.0	はい
PK-59	なし	>2.0	はい
SW1990	なし	>2.0	はい
Tcc-Pan2	なし	>2.0	はい
HUP-T3	なし	>2.0	はい
PA-TU-8902	なし	>2.0	はい
SU8686	なし	>2.0	はい
KP-1NL	なし	>2.0	はい
SW1990	なし	>2.0	はい
PK-59	なし	>2.0	はい
PSN-1	なし	>2.0	はい
HUP-T3	なし	>2.0	はい
Capan-1	なし	データなし	いいえ
KLM-1	なし	データなし	データなし
HuCCT1	なし	データなし	データなし
MiaPaca	なし	データなし	いいえ
PK-45H	なし	データなし	いいえ
DANG	なし	データなし	いいえ
Panc-04-03	なし	データなし	いいえ
QGP-1	なし	データなし	いいえ

【実施例 4】

【 0 1 3 6 】

RNF43の不活性化変異は、膵臓がんにおけるWnt依存性を付与する

この実施例においては、RNF43はWnt / カテニンシグナル伝達を阻害し、負の

10

20

30

40

50

フィードバック機構として膵臓がん細胞における F r i z z l e d の膜レベルを減少させることを示す。内因性 W n t シグナル伝達の阻害は、 F r i z z l e d の細胞表面レベルを増加させた。

【 0 1 3 7 】

L G K 9 7 4、 W n t 分泌を遮断するポーキュパイン阻害剤を用い、複数の膵臓がん細胞株を W n t 依存性について試験した。膵臓がん細胞を、 1 0 % F B S を補充した A T C C によって推奨される培地中で増殖させた。

【 0 1 3 8 】

著しいことに、すべてのポーキュパイン阻害剤に感受性な株は、 R N F 4 3 の不活性化変異を保持している。 W n t 分泌の阻害または - カテニンの枯渇は、 R N F 4 3 W T 膵腫瘍細胞ではなく、 R N F 4 3 変異体の増殖を阻害する。野生型 R N F 4 3 を R N F 4 3 変異株へ再導入しても、それらの増殖を阻害する。 L G K 9 7 4 は、生体内で R N F 4 3 変異膵腫瘍の増殖を阻害する。本発明者らのデータは、膵臓がんにおける R N F 4 3 の変異は、 W n t シグナル依存性を付与し、 R N F 4 3 変異は、 W n t 阻害剤の開発のための患者の選択のためのバイオマーカーとして使用すべきであることを示している。

10

【 0 1 3 9 】

3 つの W n t 依存性の膵臓がん細胞株は、ポーキュパイン阻害剤 L G K 9 7 4 を使用して同定され、著しいことに、これらすべての細胞株は、 R N F 4 3 の機能喪失変異を保有する。これらの R N F 4 3 変異細胞株の増殖は、 - カテニンの枯渇または R N F 4 3 の再発現により阻害され、そしてそれらの増殖は L G K 9 7 4 によって阻害される。本発明者らのデータは、膵臓がんにおいて腫瘍抑制因子としての R N F 4 3 を確立し、 R N F 4 3 変異は、 W n t シグナル伝達経路を標的とする薬剤の有効性を予測するためのバイオマーカーとして使用できることを示している。

20

【 0 1 4 0 】

本発明者らは、 L G K 9 7 4、現在診療所で検査されているポーキュパイン阻害剤を用いた W n t 依存性のため 3 9 の膵臓がん細胞株のパネルを試験した。著しいことに、すべての L G K 9 7 4 感受性株が R N F 4 3 の不活性化変異を有している。 W n t 分泌の阻害、 - カテニンの枯渇、または野生型 R N F 4 3 の発現は、 R N F 4 3 変異体の増殖を遮断したが、 R N F 4 3 野生型膵臓がん細胞は遮断しなかった。 L G K 9 7 4 は、マウス異種移植モデルにおける R N F 4 3 変異した膵腫瘍の増殖を阻害した。

30

【 0 1 4 1 】

【表5】

表5		
	病巣形成アッセイにおける増殖阻害	Axin2 qPCRアッセイにおける経路阻害
BxPC3	いいえ (No)	はい (Yes)
Capan-1	いいえ	いいえ
Capan-2*	はい	はい
CFPAC-1	いいえ	いいえ
DanG	いいえ	いいえ
HPAFII*	はい	はい
Hs766T	いいえ	ND
HuPT3	いいえ	はい
HuPT4	いいえ	いいえ
KCI-MOH1	いいえ	ND
KLM1	いいえ	ND
KP1-N	いいえ	はい
KP-1NL	いいえ	はい
KP2	いいえ	はい
KP3	いいえ	はい
KP4	いいえ	いいえ
L3.3	いいえ	いいえ
MIA CaPa-2	いいえ	いいえ
PANC-1	いいえ	はい
Pan02.03	いいえ	ND
Panc03.27	いいえ	はい
Panc04.03	いいえ	いいえ
Panc05.04	いいえ	はい
Panc08.13	いいえ	ND
Panc10.05*	いいえ	はい
PaTu-8902	いいえ	はい
PaTu-8988S*	はい	はい
PaTu-8988T*	いいえ	はい
PK45H	いいえ	いいえ
PK1	いいえ	はい
PK59	いいえ	はい
PL45*	いいえ	いいえ
PSN-1	いいえ	はい
QGP-1	いいえ	いいえ
SU86.86	いいえ	はい
SUIT-2	いいえ	はい
SW1990	いいえ	はい
T3M4	いいえ	いいえ
YAPC	いいえ	はい
*RNF43の不活性化変異を有する細胞株		
ND:未決定		

10

20

30

40

病巣形成をアッセイするため、示された細胞株の6000~12000細胞を2mlの増殖培地中、6ウェル組織培養プレートに播種した。細胞付着のためのオーバーナイト培養後、培地を組換えWnt3aの存在下および非存在下で1 μ M LGK974を含有する新鮮な増殖培地と交換した。DOX誘導性 - カテニンのshRNA実験のために、細胞を5ng/mlのドキシサイクリンにて処理した。細胞コロニーが所望のサイズに達したとき、PBS中の4%ホルマリンで細胞を固定し、クリスタルバイオレット溶液で染色した。数回洗浄の後、プレートを乾燥し、画像化した。

【0143】

逆転写および定量的PCR(qPCR)のために、RNeasyプラスミニキット(Qiagen)を用いて細胞または腫瘍から全RNAを抽出した。タックマン逆転写試薬(Applied Biosystems)を用いて、製造業者の取扱説明書に従って1 μ gのRNAを逆転写した。定量的PCRは、0.6 μ lの20 \times タックマンプロンプおよびPCRプライマーミックス、6 μ lの2 \times タックマンファーストアドバンスドマスターミックス(Taqman FAST Advanced Master Mix; Applied Biosystems)、および5.4 μ lの希釈されたcDNAテンプレートからなる12 μ lの反応液において実施した。用いたサーモサイクリング条件は、95 $^{\circ}$ Cで20秒、続いて95 $^{\circ}$ Cで1秒、60 $^{\circ}$ Cで20秒間を40サイクルであった。すべての実験を4重に行った。遺伝子発現分析は、比較CT法を用いて実施し、ハウスキーピング遺伝子GUSBまたは18Sで正規化した。タックマンプロンプはApplied Biosystems社から購入した。

10

20

【0144】

膵臓がん細胞におけるRNF43によるWntシグナル伝達の負の調節。

RNF43の枯渇は、Wnt誘導性のSTFを向上させる。RNF43は頻りに嚢胞性膵腫瘍において変異している(Furukawa Tら(2011) Sci. Rep. 1:161; Wu Jら (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(52):21188-93)ため、RNF43は膵臓がん細胞におけるWnt/ カテニンシグナル伝達の重要な調節因子である可能性がある。したがって、発明者らはYAPC、膵臓がん細胞株における機能喪失実験を行った。別個のsiRNAを用いて、RNF43を枯渇させると、外因性Wnt3aならし培地の非存在下または存在下のいずれかで、スーパーTOPFLASH(STF)Wntレポーター活性が、著しく増加した。図3(a)を参照のこと。

30

【0145】

ルシフェラーゼレポーターアッセイについては、YAPC-STFレポーター細胞を、siRNAでトランスフェクトし、Wnt3aならし培地または適用可能な場合、化合物で処理した。STFルシフェラーゼアッセイは、製造業者の取扱説明書に従ってBrightGloルシフェラーゼアッセイキット(Promega)を用いて行った。

【0146】

STFレポーターを発現する膵臓細胞株を構築するために、HEK293細胞を、10%FBSを補充したATCCによって推奨される培地中で増殖させた。レトロウイルスまたはレンチウイルスは、FuGENE 6(Roche)トランスフェクション試薬を用いた標準的なウイルスパッケージング手順により、HEK293細胞から作製した。STFレポーター、RNF43構築物、またはDOX誘導性 - カテニンshRNAを発現する膵臓細胞株は、ウイルス感染および薬剤選択により生成した。

40

【0147】

siRNAトランスフェクションは、製造業者の取扱説明書に従ってDharmafect 1トランスフェクション試薬(Dharmacon)を用いて行った。siRNAの配列は下記に記載されたものである: pGL2(Dharmacon D-001100-01), 標的配列, 5'-CGTACGCGGAATACTTCGA-3'; RNF43-1(Dharmacon J-007004-12), 標的配列, 5'-GGUGGAGUCUGAAAGAUCA-3'; RNF43-2(Dharmacon J-007004-11), 標的配列, 5'-GGAGAAAGCUAUUGCACAG-3'

50

; CTNNB1-1 (Dharmacon J-003482-10), 標的配列, 5' - U A A U G A G G A C C U A U A C U U A - 3'; および CTNNB1-2 (Dharmacon J-003482-12), 標的配列, 5' - G G U A C G A G C U G C U A U G U U C - 3'。

【0148】

RNF43の枯渴はDvlのリン酸化およびβ-カテニンの安定化を誘導する。LGK974は、Wnt分泌を強力に阻害するポークュバイン阻害剤であり、現在、臨床評価中である。外因性Wnt3aの非存在下でのRNF43 siRNAによって誘導されたSTF活性は、LGK974および以前から知られているポークュバイン阻害剤IWP-2によって阻害される。Chen Bら (2009) Nat. Chem. Biol. 5(2):100-7。この活性が内因性Wntタンパク質の発現に依存することを示す、図3(b)を参照されたい。これらの結果は、RNF43がYAPC細胞における自己分泌Wnt/β-カテニンシグナル伝達を積極的に抑制することを示している。

10

【0149】

RNF43の枯渴はFACSによりFZDレベルを増加する。本発明者らは、次に、YAPC細胞におけるRNF43の機能を特徴付けるために生化学アッセイを行った。RNF43の枯渴はSTFレポーター活性の上昇と一致して、細胞基質β-カテニンのレベルを増加させた。

【0150】

Dishevelled (DVL)は、Frizzledの下流の細胞内シグナル伝達タンパク質であり、そのリン酸化はFrizzledによって刺激される。RNF43の枯渴は、免疫組織化学アッセイにおいて、DVL2のリン酸化を増加させた。抗DVL抗体は、Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USAから入手した。

20

【0151】

pan-Frizzled抗体18R5を用いたフローサイトメトリーによりアッセイされたように、実際、RNF43の枯渴が、Frizzledの細胞表面レベルを大幅に増加させた。表6は、RNF43の枯渴がFrizzled (FZD)の細胞表面レベルを増加させることを示している。YAPC細胞は、示されたsiRNAでトランスフェクションし、Frizzledの膜レベルは、pan-Frizzled抗体18R5を用いたフローサイトメトリーによって分析した。

30

【0152】

【表6】

表6	
膵臓がん細胞におけるRNF43によるWntシグナル伝達のネガティブレギュレーション	
siRNA	FACSにおけるメジアンFZD強度
pGL2 siRNA	237
RNF43 siRNA#1	1498
RNF43 siRNA#2	1751
未染色	33

40

【0153】

フローサイトメトリー分析のために、トリプシンを含まない細胞解離緩衝液 (Invitrogen) を用いて、細胞を採取し、FACS緩衝液 (1% BSA および 0.02% アジ化ナトリウムを含む PBS) に再懸濁した。ブロッキング後、細胞を抗pan-Frizzled (18R5) 抗体と共に4℃で1時間インキュベートし、続いて、アロフィコシアニン (Allophycocyanin; APC) をコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG二次抗

50

体とインキュベーションした。FACS緩衝液を用いて十分に洗浄した後、細胞をヨウ化プロピジウム (PI) で染色し、BD LSR IIフローサイトメーターを用いたマルチチャンネル分析に供した。PI陰性細胞からの蛍光シグナルは、ヒストグラムプロットにおいて表示した。

【0154】

野生型RNF43の過剰発現は、膜FZDを減少させる。RNF43 siRNAの効果はオフターゲット活性によって媒介されるという可能性を除外するために、YAPC細胞においてsiRNA耐性RNF43 cDNAを安定的に発現させることによる、cDNAのレスキュー実験を行った。

【0155】

siRNA耐性RNF43の発現は、RNF43 siRNAのFrizzledのレベルにおける効果を大きく消失させたので、RNF43 siRNAの活性は、オンターゲットである。

【0156】

RNF43 RINGの過剰発現は、膜FZDを向上させる。RNF43の枯渇は、AXIN2、 β -カテニン標的遺伝子の発現も増加させ、この効果はまた、siRNA耐性RNF43の発現によって消失する。図3(c)を参照されたい。

【0157】

RNF43 siRNAに耐性のRNF43 cDNA、RNF43 RING (アミノ酸の272から312が欠損している)、およびF69C変異体は、2段階の変異誘発PCRによって生成し、様々な哺乳動物発現ベクターにクローニングした。pLenti6-STFレポータープラスミドおよび β -カテニンshRNAウイルスプラスミドは、以前にHao H-Xら (2012) Nature 485(7397):195-200により記載されている。

【0158】

閾値サイクル (Ct) 値に基づいて、本発明者らは、YAPC細胞においてRNF43がZNF3と比較して優位に発現していることを、定量的PCRアッセイにおいて観察した。本発明者らの結果は、RNF43が、膵臓細胞内のFrizzledの膜発現を減少させることによりWntシグナル伝達を負に調節していることを示している。

【0159】

RNF43は膵臓がんYAPC中でZNF3よりもqPCRによる高いレベルで発現されており、Wntシグナル伝達の調節におけるその重要性と一致している。Wnt/ β -カテニンシグナル伝達は、膵臓の外分泌コンパートメントの発生および腺房細胞の安定した β -カテニン増殖の異所性発現を促進させる。Heiser PWら (2006) Development 133(10):2023-32。本発明者らは、以前、R-スポンジタンパク質が、ZNF3とRNF43を阻害し、Frizzledを安定化させることにより、Wntシグナル伝達を刺激することを示した。Hao HXら (2012) Nature 485(7397):195-200。

【0160】

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達は、Frizzledの膜発現を抑制する。

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達はFZD膜発現を負に調節する。ポーキュパイン阻害剤LGK974はFZDの膜レベルを上昇させる。RNF43とZNF3は、 β -カテニン標的遺伝子であることが示されている。Hao HXら (2012) Nature 485(7397):195-200; Koo BKら (2012) Nature 488(7413):665-9。しかし、Frizzled発現における内因性Wnt/ β -カテニンシグナル伝達の効果は試験されていない。

【0161】

本発明者らは、独立的な β -カテニンsiRNAがYAPC細胞においてFrizzledの細胞表面レベルを著しく増加させることをフローサイトメトリーにより見出した。

β -カテニンの枯渇はまた、 β -カテニン標的遺伝子AXIN2およびRNF43のmRNAレベルを減少させた。図4(a)を参照されたい。表7は、 β -カテニンの枯渇がFrizzledの細胞表面レベルを増加させることを示している。YAPC細胞は、示されたsiRNAによりトランスフェクションし、Frizzledの膜レベルは、フロー

10

20

30

40

50

サイトメトリーによって分析された。

【0162】

【表7】

siRNA	FACSにおけるメジアンFZD強度
pGL2 siRNA	137
β -カテニンsiRNA#1	530
β -カテニンsiRNA#2	561
未染色	37

10

【0163】

この観察と一致して、ポーキュパイン阻害剤IWP2またはLGK974の処理は、Frizzledの細胞表面レベルを増加し、AXIN2およびRNF43のmRNAレベルを減少させた。図4(b)を参照されたい。表8は、ポーキュパイン阻害剤がFrizzledの細胞表面レベルを増加させることを示している。YAPC細胞は3 μ MのIWP-2または1 μ MのLGK974で処理し、膜Frizzled発現についてのフローサイトメトリー分析に供した。

20

【0164】

【表8】

化合物	FACSにおけるメジアンFZD強度
DMSO	721
IWP-2	1754
LGK974	1373
未染色	64

30

【0165】

これらの結果は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達がFrizzledの膜レベルを強く阻害することを示している。

【0166】

膵腫瘍におけるRNF43の変異の特徴付け

RNF43の不活性化変異を含有する膵臓がん株の同定。ポーキュパインの強力な選択的阻害剤、LGK974の発見は、がん細胞株の大規模パネルにおいてWnt依存性を全身的に検討する類のない化学物質ツールを我々に提供した。本発明者らは、LGK974を膵臓がん細胞株の大規模パネルにおいて、病巣形成アッセイを使用して試験した。病巣形成アッセイを利用したのは、CellTiter-Gloのような通常の増殖アッセイよりも感受性であり、様々な細胞株の異なる増殖率により影響を受けにくいという理由のためである。39膵臓細胞株をスクリーニングしたうち、LGK974は3つの細胞株、PaTu-8988S、HPAFIIおよびCapan-2において、強い増殖阻害活性を示すのみであった。

40

【0167】

本発明者らは次にWnt依存関係を付与し得る遺伝的病変を決定することとした。RN

50

F43はがんにおいて変異したWnt経路の上流において唯一の知られている負のレギュレーターである。この理由により、本発明者らはすべての膵臓がん細胞株において、RNF43エクソンの塩基配列決定を行った。著しいことに、すべての3つのLGK974感受性細胞株は、RNF43のホモ接合変異を有している(HPAFII、E174X; PaTu-8988S、F69C; Capan-2、R330fs)。E174XおよびR330fs変異は、RNF43タンパク質の大半をトランケートし、最もおそらくはタンパク質を不活性化する。RNF43の細胞外ドメインに追加のシステインを導入するF69C変異の結果はあまり明確になっていない。

【0168】

細胞株における変異は、ゲノム塩基配列決定分析により決定した。塩基配列決定分析のために概して、製造業者の取扱説明書に従って、ゲノムDNAをQIAamp DNAミニキット(Qiagen)を用いて抽出した。RNF43のエクソンはPCRによって増幅し、Applied Biosystems社のプラットフォームにて塩基配列決定した。

10

【0169】

F69C変異の機能を定義するために、C末端HAタグ化野生型RNF43、RNF43RING、およびRNF43F69CをYAPC細胞中で安定的に発現させた。

【0170】

全長ヒトRNF43 cDNA(NM_017763.4)は、Open Biosystems社から購入し、PCRによりC末端HAエピトープでタグ付けした。RNF43 cDNA耐性RNF43 siRNA、RNF43RING(アミノ酸272~312の欠損)、およびF69C変異体は、2段階の変異誘発PCRによって生成し、様々な哺乳動物発現ベクターにクローニングした。pLenti6-STFレポータープラスミドおよび-カテニンshRNAウイルスプラスミドは、以前、Hao H-Xら(2012) Nature 485(7397):195-200において記載した。

20

【0171】

Frizzledターンオーバーの調節におけるRNF43の機能と一致していることに、RNF43RINGの過剰発現はドミナントネガティブ活性を示し、Frizzledの膜レベルを増加させる一方で、野生型RNF43の過剰発現は、Frizzledの膜レベルを低下させた。RNF43F69Cの過剰発現は、Frizzledの膜レベルを中程度に増加させたので、F69Cは機能喪失変異体であり、過剰発現の際に部分的なドミナントネガティブ活性を有する。

30

【0172】

表9は、空のベクター(EV)、野生型(WT)RNF43、または変異(RINGまたはF69C)RNF43を安定的に発現する、YAPC細胞における膜のFrizzledのフローサイトメトリー分析を示す表である。

【0173】

【表9】

表9	
細胞	RNF43再発現
EV	1040
野生型	686
ΔRING	2004
F69C	1501
未染色	64

40

【0174】

さらに、RNF43RINGの過剰発現は、DVL2リン酸化を増加させ、Wnt3

50

a 誘導性 STF レポーター活性を増強するが、RNF43 F69C についてはより少ない程度であった。これらのデータは、F69C は RNF43 についての不活性化ミスセンス変異であることを示している。

【0175】

RNF43 の枯渇は、野生型の RNF43 における FZD 膜発現を増加させるが、RNF43 の変異細胞においては増加させない。本発明者らは次に、これらの膵臓がん細胞株における RNF43 の機能を調べた。RNF43 の枯渇は YAPC および PK1 において、DVL2 リン酸化を増加したが、野生型 RNF43 を有する 2 つの膵臓がん細胞株、HPAFII、PaTu-8988S、および Capan-2 細胞における RNF43 の枯渇は、DVL2 リン酸化を増加させなかった。同様に、RNF43 の枯渇は、RNF43 野生型 (YAPC と PK1) における Frizzled の細胞表面レベルを増加させたが、RNF43 変異 (HPAFII、PaTu-8988S、および Capan-2) 膵臓がん細胞株については、増加させなかった。まとめると、これらの結果は、RNF43 変異を有する膵臓がん細胞株において、Frizzled レベルはもはや RNF43 によって阻害されないことを示している。

10

【0176】

表10は、RNF43 siRNA で処理した膵臓がん細胞株における膜 Frizzled のフローサイトメトリー分析を示す。

【0177】

【表10】

20

細胞	pGL2 siRNA	RNF43 siRNA	未染色
YAPC	353	1224	32
PK1	473	923	32
HPAFII	375	402	23
PaTu-8988S	293	245	34
Capan-2	2437	2643	23

30

【0178】

RNF43 変異は、膵腫瘍における Wnt 阻害に対する感受性を予測する。

L GK974 は、すべての細胞株において細胞基質 - カテニンを減少させる。本発明者らは、次に、膵臓がん細胞株における Wnt 依存性の特性を調べた。病巣形成アッセイでは、L GK974 は PK1 と YAPC に大きな影響を与えることなく (表6参照)、PaTu-8988S、HPAFII、および Capan-2 の増殖を強く阻害した。重要なことに、RNF43 変異細胞における L GK974 の増殖阻害効果は、外因性 Wnt3a によって救出されるので、L GK974 の効果は、Wnt 分泌の遮断によって媒介される。(病巣形成アッセイにおいて、膵臓がん細胞株は、DMSO、1 μM の L GK974、または組換え Wnt3a を加えた L GK974 で処理した。) イムノプロットおよび qPCR アッセイは、L GK974 が MYC、- カテニン標的遺伝子の発現を減少させ、およびサイクリン依存性キナーゼ阻害剤 p21 の発現を RNF43 変異体においては増加させたが、RNF43 野生型細胞株においては増加させないことを示した。L GK974 は細胞基質 - カテニンを減少させ、RNF43 変異体および RNF43 野生型細胞株の両者において、- カテニン標的遺伝子 AXIN2 の発現を減少させたため、これらのすべての細胞株は、活性な自己分泌 Wnt シグナル伝達を有している。

40

【0179】

さらに、L GK974 は RNF43 変異細胞における分化マーカー MUC2、MUC5

50

A/Cの発現を誘導した。LGK974は、RNF43変異細胞株においてEDUの取り込みを遮断したため、これらの細胞におけるWnt阻害は細胞周期停止をもたらす。LGK974誘導性増殖阻害およびRNF43変異細胞の細胞分化はまた、Ki67染色(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA 94010からの抗Ki67(SP6))およびアルシアンブルー染色を用いることで明らかである。さらに、軟寒天アッセイにおいて、LGK974はPaTu-8988SおよびHPAFIIの増殖を強く阻害したが、PK1は阻害しなかった。軟寒天アッセイでは増殖しないため、Capan-2は試験することができない。まとめると、これらの結果は、RNF43変異細胞における自己分泌Wntシグナル伝達の阻害が、増殖停止および細胞分化を誘導することを示している。

10

【0180】

軟寒天アッセイのため、細胞を10%のFBSを含有するDMEM中、0.3%の低融点アガロース(Lonza)250 μ l中に懸濁させ、ウェルあたり5000から10000細胞の密度で48ウェル培養プレートに、DMEMを含有する固化した0.8%アガロース250 μ lの上にプレーティングした。プレートを室温で30分間冷却した後、250 μ lの増殖培地を細胞の上に添加した。次いで、プレートを、5%のCO₂を含有する加湿雰囲気中、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。細胞は、3~4日毎に、DMSOまたは1 μ MのLGK974を含有する新鮮な増殖培地で処理した。コロニーが所望のサイズに達した時点で写真を撮影し、コロニーを製造業者の取扱説明書(Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY, USA 14072から)に従ってアラマーブルで染色した。これらの実験は3回繰り返し、少なくとも4つのウェルを各条件について毎回反復した。

20

【0181】

EdUの増殖アッセイのため、細胞をウェルあたり6000~12000細胞の密度で96ウェルプレート中の増殖培地にプレーティングし、そしてDMSOまたは1 μ MのLGK974で処理した。3日後、細胞をClick-iT EdUアレクサフルオル488 HCSアッセイキット(Invitrogen)に含まれていた20 μ M EdUを含有する新鮮な増殖培地で処理し、プレートを5%のCO₂を含有する加湿雰囲気中37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。細胞は、最終4%パラホルムアルデヒドで30分間固定し、PBSで洗浄し、透過処理し、PBS中0.75%のTriton X-100および50 μ g/mlのHoechstで30分間染色した。洗浄後、細胞をClick-iT EdUのアッセイキットの取扱説明書に従って、EdUの検出に進めた。3連のウェルを各条件について行った。

30

【0182】

ムチンについてのアルシアンブルー染色の手順は次のように行った：臍臓がん細胞株は、様々な密度で2.25 $\times 10^5$ 組織培養フラスコ上にプレーティングし、DMSOまたはLGK974(100nM)を用いて72時間処理した。培地を除去することにより細胞ペレットを採取し、1 \times PBSで洗浄し、10mlの10%緩衝液ホルマリンを添加した。次いで、細胞をフラスコの底から掻き取り、50mlのコニカルチューブに入れ、10%緩衝液ホルマリンで約50mlまで満たし、1~2時間固定させた。次いで、固定した細胞を含有するコニカルチューブを5分間1200rpmで遠心分離し、ペレット化した細胞をレンズペーパーに包み、組織診断カセットに入れ、処理し、パラフィンに包埋した。FFPE切片を5 μ mに切断し、スライド上に載せ、少なくとも30分間、60 $^{\circ}$ Cで焼成し、脱パラフィン化した。次にスライドをH₂Oで2回すすぎ、酢酸の3%水溶液に3分間、移し、直接、3%酢酸pH1中のアルシアンブルー1%に30分間、移した。次いで、スライドを10分間流水中に置き、その後、Nuclear Fast Red 0.1%(Kernechtrot)に5分間置かれる前に蒸留したH₂Oで、すすいだ。スライドは、再度流水で洗浄し、次いで脱水した。最後に、スライドは、パルマスリップ(Permaslip; 登録商標)でカバーガラスを施した。

40

【0183】

50

イムノブロッティングのために、全細胞のライセートをプロテアーゼ阻害剤およびホスファターゼ阻害剤を補充したRIP A緩衝液(50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、1 mM EDTA)を用いて細胞を溶解することによって調製し、その後、4において10分間14000 rpmで遠心分離した。細胞基質 - カテニンの抽出のために、細胞ペレットを低張緩衝液(プロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤を補充した10 mM Tris-HCl、pH 7.5および10 mM KCl)中に再懸濁し、3回の凍結融解サイクルによって溶解した。等量のタンパク質をSDS-PAGEによって分離し、ニトロセルロース膜に移し、そして一次抗体と共に4 オーバーナイトでインキュベートした。HRPまたは赤外色素のいずれかとコンジュゲートした二次抗体を、それぞれ、ECLフィルムまたはLI-CORオデッセイキャナを用いたシグナル可視化のために使用した。

【0184】

L GK 974はMYCを阻害し、p21タンパク質の発現をRNF43変異体において誘導したが、RNF43野生型膵臓がん株においては誘導しなかった。Frizzledタンパク質は古典的Wnt/ - カテニンシグナル伝達および非古典的Wntシグナル伝達の両者を増強するため、RNF43の変異による不活性化は、おそらく、古典的および非古典的Wntシグナル伝達の両者を増加させるであろう。研究している膵臓株の細胞増殖におけるWnt/ - カテニンシグナル伝達の寄与を決定するために、 - カテニンのshRNAを使用した。以前に検証した - カテニンのshRNA (Scholer-Dahirel Aら (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108(41):17135-40)の誘導発現は、RNF43変異体(PaTu-8988S、HPAFII、およびCapan-2)の増殖を強く阻害したが、RNF43野生型(PK1およびYAPC)膵臓がん株は阻害しなかった。 - カテニンの枯渇はまた、 - カテニン標的遺伝子AXIN2およびMYC(抗MYCはAbcam, Cambridge, MA, USA 02139から入手可能である)の発現を減少させ、p21(抗p21はMillipore, Bedford, MA, USA 01730から入手可能である)、MUC2、およびMUC5A/Csの発現をRNF43変異細胞株内で増加させた。これらの結果は、細胞増殖におけるL GK 974の効果は古典的Wnt/ - カテニンシグナル伝達によって媒介される可能性が高いことを示している。

【0185】

本発明者らは、次に、RNF43変異はRNF43変異細胞の増殖に必要であるかどうかを調べた。本発明者らは、LacZやRNF43 RINGではなく、野生型RNF43の発現が、RNF43変異したPaTu-8988SとCapan-2細胞の増殖を顕著に阻害する一方で、RNF43野生型YAPC細胞には影響がなかったことを見出した。野生型RNF43が過剰発現すると、おそらくPaTu-8988S細胞内で内因的に発現しているRNF43 F69Cの小規模なドミナント活性に打ち勝つのだろう。HPAFII細胞株のウイルス感染効率は低すぎて、LacZまたはRNF43 RINGを発現するレトロウイルスを用いて、安定的に感染した細胞を得ることができなかつたため、HPAFIIはこのアッセイで試験することができない。

【0186】

同じく、本発明者らの結果は、RNF43変異によって強化されたWnt/ - カテニンシグナル伝達がRNF43変異型膵臓がん細胞の増殖に必要とされることを示し、これらの細胞におけるWnt/ - カテニンシグナル伝達の抑制が、細胞周期の停止および分化マーカーの誘導を誘導することを示す。

【0187】

Wnt分泌を遮断すると、生体内におけるRNF43変異膵腫瘍の増殖が阻害される。生体内でのRNF43変異膵腫瘍の維持におけるWnt経路の活性化の役割を分析するために、本発明者らは、2つのPDAC異種移植モデル(HPAFIIおよびCapan-2)を利用した。

【0188】

10

20

30

40

50

生体内での有効性および薬力学的研究のために、95～110%の培養密度で細胞を採取した。BDマトリゲルマトリックス基底膜 (Matrigel) (BD Biosciences) と50:50に混合した1000万個の細胞 (HPAFII) または300万個の細胞 (Capan-2) を nu/nu (Harlan) (HPAFII) または scid.bg (Harlan) (Capan-2) マウスの上部右腋窩上の領域に皮下移植した。腫瘍は週2回、キャリパー測定によってモニターされ、腫瘍体積 (TV) は楕円体の数式を使用して計算した: $TV (mm^3) = ((l \times w^2) \times 3.14159) / 6$ 。異種移植腫瘍を有するマウスは、腫瘍移植 (Capan-2) の14日後、平均腫瘍体積が $223 mm^3$ に達したとき (範囲 $200 \sim 250 mm^3$) または移植 (HPAFII) の11日後、平均腫瘍容積 $341 mm^3$ に達したとき (範囲 $272 \sim 418 mm^3$) のいずれかに、治療群 (グループあたり $n = 8$) に無作為に割り付けられた。マウスは、(0.5%メチルセルロース (MC) / 0.5% Tween 80) または 0.5% MC / 0.5% Tween 80 中のフマル酸塩の形態の L GK 974 (L GK 974 - AE - 4、遊離塩基分子量換算係数 1.293) の $0.65 mg / mL$ 懸濁液のいずれかの媒体で、強制経口投与 (p.o.) により1日2回 (BID)、 $10 mL / kg$ の投与量で治療された。生体内用量は遊離塩基当量として報告される。14日間 (HPAFII) または35日間 (Capan-2) の治療後、抗腫瘍活性がパーセント治療/対照 (%T/C) または%リグレーション (%REG) 値として報告された。抗腫瘍活性は、次の数式を使用して算出された: $T_t = 0$ の場合には、 $\%T/C = 100 \times (T_t / C_t)$; または $T_t < 0$ の場合には、 $\%REG = 100 \times (T_t / T_0)$; ここで: T_0 = 無作為化の日における薬剤治療群の平均腫瘍体積 (TV); T_t = 調査終了時での薬剤治療群の平均TV; $T_t = T_0 - T_t$; C_t = 調査終了日時での対照群の平均TV; C_0 = 無作為化の日における対照群の平均TV; および $C_t = C_0 - C_t \times \%T/C$ 値が100から42%の範囲の場合抗腫瘍活性が無いものと解釈される; %T/C値42%および>10%は抗腫瘍活性が有るものと解釈し、%T/C値10%または%REG-10%は腫瘍停滞と解釈される。%Reg値<-10%はリグレーションと解釈される。動物の独立、並列コホート (治療および時間ポイントあたり $n = 3$) を媒体または上述の L GK 974 により治療し、薬力学マーカーの生体外解析のために腫瘍組織を取得した。

【0189】

HPAFII 異種移植片を有するマウスの $5 mg / kg$ の L GK 974 の強制経口投与、1日2回、14日間の投与での治療の結果、媒体治療と比較して腫瘍増殖が有意に阻害された ($T/C = 33\%$)。さらに、Capan-2 異種移植片を有するマウスを $5 mg / kg$ の L GK 974 で1日2回、35日間の強制経口投与にて処置することにより、腫瘍停滞 ($T/C = 5\%$) を達成した。L GK 974 の作用機構と符合して、 α -カテニン標的遺伝子、AXIN2の発現は治療したHPAFIIおよびCapan-2 異種移植片において減少した。RNF43変異PDAC細胞における試験管内の知見と同様に、L GK 974 による治療により、異種移植腫瘍中での細胞周期の停止と分化が誘導される。

【0190】

免疫組織化学および画像解析のために、異種移植腫瘍試料は、6から24時間、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、処理し、パラフィンに包埋した。免疫組織化学的染色は、ベンタナディスカバリーシステム (Ventana Discovery System) 上で実施した。画像はアペリオスキャンスコープ (Aperio Scanscope) を使用して撮影した。マウスの脾臓および異種移植腫瘍の切片全体の画像は、ビジオフィアム (Visiopharm) を用いて分析した。異種移植腫瘍において、間質組織はセクションアSEMBラー (Section Assembler) モジュールを使用して自動的に除外した。壊死領域は解析ソフトウェアによって提供される描画ツールを使用して手動で除外した。組織をTissue morph DPモジュールを使用してセグメント化し、DAB強度を核タンパク質についてはパーセント正の核または核に限定されないタンパク質についてはパーセント正のピクセルのいずれかとして定量した。

【0191】

議論。

本実施例において、本発明者らは、RNF43がFrizzledの膜発現を抑制することにより、膵臓細胞におけるWnt経路の負のフィードバック調節因子として機能することを実証した。本発明者らは、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達が、おそらくRNF43の誘導を介して、Frizzled膜発現を強力に阻害することを示した。この知見は、膵臓がん細胞が、RNF43を変異させて、この強力な負のフィードバック調節から逃れ、高いレベルのWnt/ β -カテニンシグナル伝達を達成することを選択する理由の説明を提供する。本発明者らのデータは、膵臓がんにおける腫瘍抑制因子としてのRNF43を確立し、RNF43変異が、Wntシグナル伝達経路を標的とする薬剤の有効性を予測するためのバイオマーカーとして使用できることを示している。

【0192】

本発明者らは、LGK974が29例のうち22例(76%)の膵臓がん細胞株においてAXIN2の発現を減少させることを見出した。したがって、高いパーセンテージの膵臓がん細胞株が自己分泌Wntシグナル伝達を有する。しかしながら、これらの細胞株のほとんどの増殖は、病巣形成アッセイにおいてLGK974によって影響されない。著しいことに、増殖アッセイにおいてLGK974に対して明らかな感受性を示すすべての3つの膵臓がん株はRNF43機能喪失変異を有する。これらの結果は、RNF43変異した腫瘍は、Wnt依存的となる確率がRNF43野生型腫瘍と比較してはるかに高いことを示している。

【0193】

興味深いことに、RNF43変異を有するすべての細胞株が、LGK974に対して感受性であるわけではない。本発明者らは、RNF43、Patu-8988T(F69C)、Panc10.05(M18fs)、およびPL45(M18fs)のホモ接合変異を持つ3つの膵臓がん株を発見したが、これらの細胞株の増殖はLGK974に対して感受性ではない。Patu-8988SとPatu-8988Tは、同じ患者に由来し、Panc10.05およびPL45も同じ患者に由来していることに留意されたい。これらの結果は、他のメカニズムがRNF43変異した腫瘍をWntシグナル伝達に無関係とすることができることを示している。

【0194】

薬剤の毒性と腫瘍の分子病変レベルでの不均一性のため、臨床試験において治療に応答する可能性が最も高い患者を高めることは、分子的標的がん治療薬の開発の成功のために有益である。しかしながら、Wnt-依存性腫瘍を同定するための優れた戦略が利用できないため、これらの薬剤の臨床開発は困難である。Wntタンパク質の過剰発現またはWnt阻害剤の過小発現に基づいた戦略は、患者選択のために十分に堅牢ではない。実際に、明らかに自己分泌Wnt/ β -カテニンシグナル伝達を有する多くのPDAC株は、試験管内増殖についてWntに依存しない。さらに、 β -カテニンシグナル伝達は、リガンド非依存的に活性化させることができるため、 β -カテニンの核蓄積に基づいた戦略も信頼性がないであろう。

【0195】

本発明者らの研究は、膵臓がんにおける上流Wntシグナル伝達を阻害する腫瘍抑制因子としてのRNF43を確立した。試験管内においてWnt阻害剤に対して感受性なすべてのWnt阻害剤膵臓がん細胞株がRNF43変異を保持するという本発明者らの知見は、RNF43変異はWnt阻害剤の有効性を試験する臨床試験のために膵腫瘍を選択するための断定的なバイオマーカーとして使用することができることを示している。

【0196】

本明細書で引用した特許および刊行物のそれぞれの内容は、参照によりその全体が取り込まれる。

【0197】

本明細書において提供される詳細な説明は、本発明を例示するが、その範囲を限定するものではない。本発明の他の異なる形態は、当業者にとって容易に明らかであり、添付の特許請求の範囲によって包含される。

10

20

30

40

50

【 図 1 】

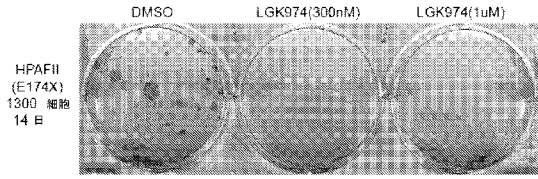


FIG. 1(a)

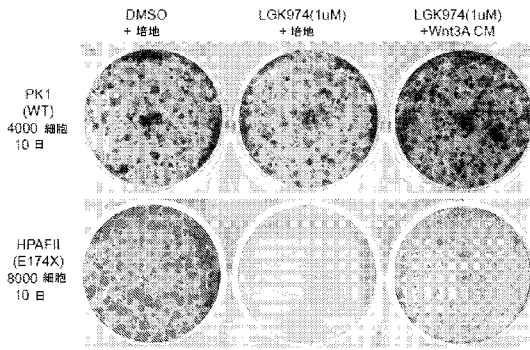


FIG. 1(b)

【 図 2 - 1 】

```

hRNF43 ---HSGGHQLQALNPHLLMATLOAGFGPT-----GLVLAAVESERSAEQKAI
mRNF43 ---HSGGHQLQALNPHLLMATLHAGFGHT-----GRVLAAVESERSAEQKAV
hZNRFP3 MRPRSGGPGATGRRRRRLRRRPPGLRCSRPLPPPPPLLLGLLLAAGPGAARAKCAF
mZNRFP3 MRPRSGGPGATGRRRRRLRRRPPR-----GRRLPPFPPLLLGLLLAAGPGAARAKCAF
          * * * * *
hRNF43 IRVILPKMDPTG---KMLNLTLEQVAGVAEITPAEGLKMGSHPLVLCNASDD-DNLEPGF
mRNF43 IRVILPKMDPTG---KMLNLTLEQVAGVAEITPAEGLKMGSHPLVLCNASDD-DNLEPGF
hZNRFP3 VEVVLFESSPSGELYTTTGLTGFPSRAGATLSAEGLVQMHPLGLCNNDDELDYEGM
mZNRFP3 VEVVLFESSPSGELYTTTGLTGFPSRAGATLSAEGLVQMHPLGLCNNDDELDYEGM
          : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :
hRNF43 ISIVKLESPPRAFPKCLSLASTARMAGRGASAVLFDITEDRAAEQLOQ--FGGLTTPV
mRNF43 ISIVKLESPPRAFPKCLSLASTARMAGRGASAVLFDITEDRAAEQLOQ--FGGLTTPV
hZNRFP3 VGVVLEQPELDKPKCLTVLGGAKRAVQPGATAVIFDVENPEATDQLNQSDEPLRRFPV
mZNRFP3 VGVVLEQPELDKPKCLTVLGGAKRAVQPGATAVIFDVENPEATDQLNQSDEPLRRFPV
          : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *
hRNF43 VLIWGNDAEKLAHFVYANQKRAVRIEAK---EPFAMPDYDVMILMTVGTTFVILASVL
mRNF43 VLIWGNDAEKLAHFVYANQKRAVRIEAK---EPFAMPDYDVMILMTVGTTFVILASVL
hZNRFP3 VYVVGADAIKLNHIVNKRVAARAIQHLPFRQPTLYDQGLFAFVYVSLVCLLLVKI
mZNRFP3 VYVVGADAIKLNHIVNKRVAARAIQHLPFRQPTLYDQGLFAFVYVSLVCLLLVKI
          * : * * * * * * : * * * * * * : * * * * * * : * * * * *
hRNF43 RIRCRPRRSPDPLQOQTAWAISOLATRNQVQASCRQAGEVPSGSSCSAPVCAICLEE
mRNF43 RIRCRPRRSPDPLQOQTAWAISOLATRNQVQASCRQAGEVPSGSSCSAPVCAICLEE
hZNRFP3 XIKQRSSQNSMRLVAQLEKMETKFNFSKSKGRREGSCGALDTLSS-SSTSDCAICLEK
mZNRFP3 XIKQRSSQNSMRLVAQLEKMETKFNFSKSKGRREGSCGALDTLSS-SSTSDCAICLEK
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
hRNF43 FSEGGELRVISCLHEFHRCVDPKLLQHRTPCLPCMFIITEGDSFSQSLGSPRSYQEPGR
mRNF43 FSEGGELRVISCLHEFHRCVDPKLLQHRTPCLPCMFIITEGDSFSQSLGSPRSYQEPGR
hZNRFP3 YIDGELRVISCLHEFHRCVDPKLLQHRTPCLPCMFIITEGDSFSQSLGSPRSYQEPGR
mZNRFP3 YIDGELRVISCLHEFHRCVDPKLLQHRTPCLPCMFIITEGDSFSQSLGSPRSYQEPGR
          : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *
hRNF43 LHLIKRHPGHAHYHLPAAYLLGSPRSVAVRPRFEGFPFSPQEPG-----
mRNF43 LHLIKRHPGHAHYHLPAAYLLGSPRSVAVRPRFEGFPFSPQEPG-----
hZNRFP3 GRVTLFVHYVGRVHTNATPATPTCSALSHGVNELLDRHGGQSLISFQTPATIRSY
mZNRFP3 GRVTLFVHYVGRVHTNATPATPTCSALSHGVNELLDRHGGQSLISFQTPATIRSY
          : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *
hRNF43 -----MGRHRRPRAHPRAPGQQRLAGAQHPIYAGGWL
mRNF43 -----MGRHRRPRAHPRAPGQQRLAGAQHPIYAGGWL
hZNRFP3 PFLHLDELAHRCGLERATSPAHFPRFRKLSGKFSKACCFSCYETMRYHTYFGGLSY
mZNRFP3 PFLHLDELAHRCGLERATSPAHFPRFRKLSGKFSKACCFSCYETMRYHTYFGGLSY
          : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * * : : * * * * *

```

FIG. 2

【 図 2 - 2 】

```

hRNF43 SHLQSTQHPAACPVPLRRARPP-----DSSGSGESYCTER
mRNF43 NRLRCLQCHPAACPVPLRRARPH-----ESSGSGESYCTER
hZNRFP3 PEQEGQSPPSLATRGPAPAFPPSGSGSLLEPTVVEVAPPVHLESGSTSFSPCYHGHSVC
mZNRFP3 PEQEGQITPSVTFRGQSRAPPPSGSASSLLEPTVVEVAPPVHLESGSTSFSPCYHGHSVC
          * * * * *
hRNF43 SGYLAZSPASDSS---SGPCSSSSDVSUVCITDLSLQVHGSSSTFCSLSLSDPDLVY
mRNF43 SGYLAZSPASDSS---SGPCSSSSDVSUVCITDLSLQVHGSSSTFCSLSLSDPDLVY
hZNRFP3 SGYLAZCPGSDSSSSSGQCHCSSSDVSUVCITDLSLQVHGSSSTFCSLSLSDYDFFIY
mZNRFP3 SGYLAZCPGSDSSSSSS---GQCRSSSDVSUVCITDLSLQVHGSSSTFCSLSLSDYDFFIY
          * * * * *
hRNF43 CSP-----KGDPCRVDMQSEVTSRFRSLGSLVYVTRGEOV
mRNF43 CSP-----EGDLQCKGIQSVTSRFRSLGSLVYVTRGEOV
hZNRFP3 RSRSPCRASEAGGSSSGPAPALCPGSPPELPAVHSHGAGRGEPPSPDASPSGDOVS
mZNRFP3 RSP-----GPAVHLEGSPPELPAVHSHGAGRGEPPSPDASPSGDOVS
          * * * * *
hRNF43 SSEVHVRHRRHHYKRFQVHGRKPGFETGVQSEFPPIRPTQ-----QPEPP
mRNF43 SSEVHVRHRRHHYKRFQVHGRKPGFETGVQSEFPPIRPTQ-----QPEPP
hZNRFP3 TCSLENNYSNLSLEHRRNSSTSEVGLASRFPPLDRTHKGGHLEPSCACCEQSP
mZNRFP3 TCSLENNYSNLSLEHRRNSSTSEVGLASRFPPLDRTHKGGHLEPSCACCEQSP
          : : : : :
hRNF43 SPDQVTRSNASAEPSGLSNPCCPRALPEPAPGVDASSICPST---SSLFNLQKSSLS
mRNF43 J---QQLITPNTASSMIPNQRPRALTEPAPGLAEASSPSPKPNPSSLNLQKSSLT
hZNRFP3 P-AGFAGAGSSTLPLGPHLYKSGVAGGEPGSGSSQGLVGFHFDHLPTDQVRYEGLP
mZNRFP3 PFGGTTSEAGSSFLGPRLLBDCVPPGEPDQSSQGLVGFHFDHLPTDQVRYEGLP
          : : * * * * *
hRNF43 AREPQRRRCGPSEPTPCSRPQDATVHPACQIFPEYTPSVAV?#SPEAHILICPPCLDK
mRNF43 VREPHRRRCGPSELEPTELEPDLTVHITACVPFPEYSRLAY?#VPEVHLMFRPFGDR
hZNRFP3 CCFYEAKVARGGGGSGCYTEDYSVQVTLTEEPFPCYFGARDLSQRIFIIPEVDVC
mZNRFP3 CCFYEAKVARGGGGSGCYTEDYSVQVTLTEEPFPCYFGARDLSQRIFIIPEVDVC
          : : * * * * *
hRNF43 RLLPETPGPCYSNSQVVLCLTFRQPLEPHFPGGFSEWSDTAEGRPCVPHCVLSAQ
mRNF43 RLLHEVPGPCYSSQVWLVYLNFCPLGFLPGBGHSXVTFDSEGRRCFVSHCQVLSAQ
hZNRFP3 DLGLPSCQCTHSLGSGTTRGPDTPRDRHGLGATREERALLCCARALLRFGCPTBAG
mZNRFP3 DLGLPQDCHGHHNSPWGALSLEVPRLHWSLGTREER--QAPCYQAEVQPCSPPEAG
          : : * * * * *
hRNF43 PGSEEELELCEQAV-----
mRNF43 PGSEEELELCEQAV-----
hZNRFP3 AVRAN?PSALQDTQESSTTAT?AAGPRSHSADSSPGA
mZNRFP3 ASKASLSSAPQDQESHALAASAGPGSGIGTGA--

```

FIG. 2 (続き)

【 図 3 - a 】

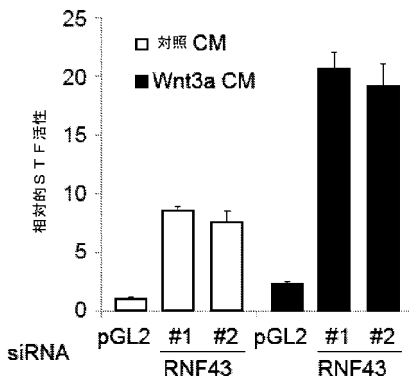


FIG. 3(a)

【 図 3 - b 】

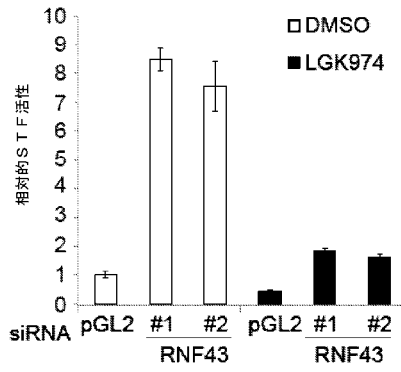


FIG. 3(b)

【 図 3 - c 】

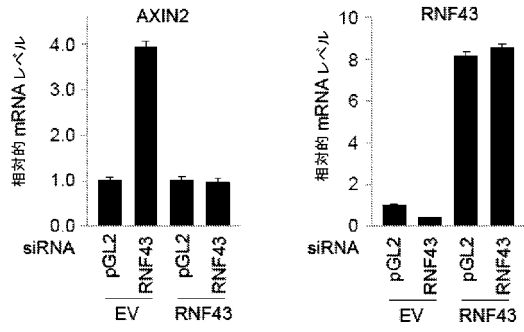


FIG. 3(c)

【 図 4 - a 】

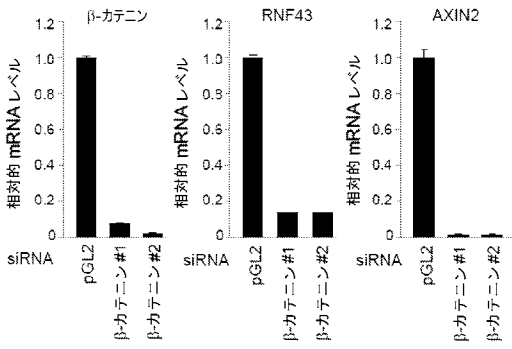


FIG. 4(a)

【 図 4 - b 】

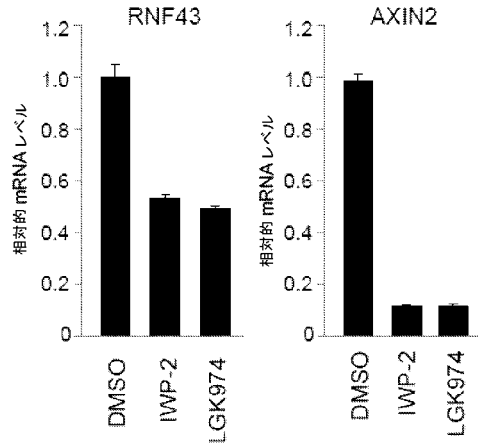


FIG. 4(b)

【配列表】

2015511484000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2013/027441

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD. 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/017318 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; YOU LIANG [US]; HE BIAO [US]; XU ZHIDONG [US]; J) 16 February 2006 (2006-02-16)	1,4,5,7, 26-30
Y	claims 35, 40, 41, 43; example 12	1,2, 9-15, 26-30
Y	----- WO 2011/004379 A1 (TEL HASHOMER MEDICAL RES INFRA [IL]; DEKEL BENJAMIN [IL]; PODE-SHAKKED) 13 January 2011 (2011-01-13)	1,2, 9-15, 26-30
Y	----- WO 2004/032838 A2 (UNIV CALIFORNIA [US]; HE BIAO [US]; YOU LIANG [US]; XU ZHIDONG [US]; J) 22 April 2004 (2004-04-22)	1,2, 9-15, 26-30
	claim 24; examples 2, 5 ----- -/--	
<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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
29 April 2013		14/05/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Santagati, Fabio

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2013/027441

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 275 544 A2 (ONCOTHERAPY SCIENCE INC [JP]) 19 January 2011 (2011-01-19) paragraphs [0194], [0245], [0246]; sequence 6 -----	16-18, 20,22, 24,25
X	J. LIU ET AL: "PD08-11: Targeting Porcupine, a Critical Node for Wnt Signalling in Cancer.", CANCER RESEARCH, vol. 71, no. 24 Supplement, 15 December 2011 (2011-12-15), pages PD08-11, XP055061279, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.SABCS11-PD08-11 the whole document -----	26-30
X,P	HUAI-XIANG HAO ET AL: "ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner", NATURE, vol. 485, no. 7397, 29 April 2012 (2012-04-29), pages 195-200, XP055061275, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature11019 the whole document -----	1-30
X,P	BON-KYOUNG KOO ET AL: "Tumour suppressor RNF43 is a stem-cell E3 ligase that induces endocytosis of Wnt receptors", NATURE, vol. 488, no. 7413, 15 August 2012 (2012-08-15), pages 665-669, XP055061276, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature11308 the whole document -----	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/027441

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/027441

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 2006017318	A2	16-02-2006	AU 2005271763 A1	16-02-2006
			CA 2571955 A1	16-02-2006
			CN 101687005 A	31-03-2010
			EP 1771207 A2	11-04-2007
			JP 2008505933 A	28-02-2008
			US 2008267951 A1	30-10-2008
			WO 2006017318 A2	16-02-2006

WO 2011004379	A1	13-01-2011	NONE	

WO 2004032838	A2	22-04-2004	CA 2501235 A1	22-04-2004
			EP 1549144 A2	06-07-2005
			US 2004247593 A1	09-12-2004
			US 2009304695 A1	10-12-2009
			WO 2004032838 A2	22-04-2004

EP 2275544	A2	19-01-2011	AT 500326 T	15-03-2011
			AU 2003241179 A1	22-12-2003
			AU 2009243506 A1	24-12-2009
			BR 0311822 A	29-03-2005
			CA 2488404 A1	18-12-2003
			CN 1675361 A	28-09-2005
			DK 1513934 T3	02-05-2011
			EP 1513934 A2	16-03-2005
			EP 2233572 A2	29-09-2010
			EP 2275544 A2	19-01-2011
			HK 1083521 A1	14-01-2011
			JP 4594085 B2	08-12-2010
			JP 5069268 B2	07-11-2012
			JP 2006507802 A	09-03-2006
			JP 2009183293 A	20-08-2009
			JP 2012019791 A	02-02-2012
			KR 20050053530 A	08-06-2005
			KR 20100123761 A	24-11-2010
			MX PA04012225 A	25-07-2005
			PT 1513934 E	11-05-2011
			SG 145559 A1	29-09-2008
			US 2005069930 A1	31-03-2005
			US 2009012032 A1	08-01-2009
US 2010016220 A1	21-01-2010			
US 2012190628 A1	26-07-2012			
WO 03104275 A2	18-12-2003			

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 1/18 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/501 (2006.01)	A 6 1 P 1/18	
A 6 1 K 31/497 (2006.01)	A 6 1 K 31/501	
A 6 1 K 31/444 (2006.01)	A 6 1 K 31/497	
A 6 1 K 31/496 (2006.01)	A 6 1 K 31/444	
	A 6 1 K 31/496	

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

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 コン, フェン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー
ー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコ
ーポレイテッド

(72)発明者 ハオ, ファイシャン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー
ー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコ
ーポレイテッド

(72)発明者 シェイ, シン-イー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス
ドライブ 1 0 6 7 5, ジェノミクス インスティテューツ オブ ザ ノバルティス リサー
チ ファウンデーション

(72)発明者 ジャン, シャアモ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, マサチューセッツ アベニュー
ー 2 5 0, ノバルティス インスティテューツ フォー バイオメディカル リサーチ, インコ
ーポレイテッド

(72)発明者 リュウ, ジュン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス
ドライブ 1 0 6 7 5, ジェノミクス インスティテューツ オブ ザ ノバルティス リサー
チ ファウンデーション

(72)発明者 エヌジー, ニコラス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 2 1, サン ディエゴ, ジョン ジェイ ホプキンス
ドライブ 1 0 6 7 5, ジェノミクス インスティテューツ オブ ザ ノバルティス リサー
チ ファウンデーション

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA01 CA03 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04 GA11

	HA01	HA12								
4B029	AA07	AA08	BB11	CC02	CC03	CC08	FA15			
4B063	QA01	QA13	QA18	QA19	QQ02	QQ03	QQ08	QQ42	QQ52	QR32
	QR35	QR55	QR62	QS03	QX01					
4C084	AA17	NA14	ZB261	ZC411						
4C086	AA01	AA02	BC17	BC36	BC47	GA07	GA08	GA12	MA01	MA04
	NA14	ZB26	ZC41							

专利名称(译)	使用RNF43突变状态施用Wnt信号传导抑制剂的癌症患者选择方法		
公开(公告)号	JP2015511484A	公开(公告)日	2015-04-20
申请号	JP2014559931	申请日	2013-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司 IRM责任有限公司		
申请(专利权)人(译)	诺华公司 艾伯爵M.有限责任公司		
[标]发明人	コンフェン ハオファイシャン シェイシンイー ジャンシャアモ リュウジュン エヌジーニコラス		
发明人	コン,フェン ハオ,ファイシャン シェイ,シン-イー ジャン,シャアモ リュウ,ジュン エヌジー,ニコラス		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12M1/00 G01N33/53 G01N33/574 A61K45/00 A61P43/00 A61P35/00 A61P1/18 A61K31/501 A61K31/497 A61K31/444 A61K31/496		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 A61K31/497 A61P1/18 A61P35/00 A61P43/00 C12Q1/68 C12Q2600/156 G01N33/57438 G01N33/57492 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.F C12M1/00.A G01N33/53.M G01N33/574.A A61K45/00 A61P43/00.111 A61P35/00 A61P1/18 A61K31/501 A61K31/497 A61K31/444 A61K31/496		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA01 4B024/CA03 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA08 4B029/BB11 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS03 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZC411 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC17 4C086/BC36 4C086/BC47 4C086/GA07 4C086/GA08 4C086/GA12 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZC41		
代理人(译)	小林 浩 铃木康仁		
优先权	61/604290 2012-02-28 US		
其他公开文献	JP6397335B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于鉴定预计将受益于Wnt拮抗剂的治疗性施用的癌症患者的生物标志物，方法和测定。生物标记物包括RNF43和ZNR3基因缺失的检测，RNF43和ZNR3 mRNA表达的减少，RNF43和ZNR3蛋白质表达的减少，RNF43和ZNR3失活突变的检测，磷酸化的LRP6，磷酸化的Dishevelleds和卷曲蛋白的表达。这些生物标志物可以与用Wnt途径抑制剂治疗的癌症患者的更好结果相关联。

