(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6468838号
(P6468838)
(45)発行日　平成31年2月13日(2019.2.13)　(24)登録日　平成31年1月25日(2019.1.25)

(51)Int.Cl.　　F I
G01N 33/68 (2006.01)　　G01N 33/68
C12Q 1/68 (2018.01)　　C12Q 1/68

請求項の数 13　(全 50 頁)

(21)出願番号　特願2014-511615(P2014-511615)
(86)(22)出願日　平成24年5月21日(2012.5.21)
(65)公表番号　特表2014-515477(P2014-515477A)
(43)公表日　平成26年6月30日(2014.6.30)
(86)国際出願番号　PCT/US2012/038867
(87)国際公開番号　WO2012/159115
(87)国際公開日　平成24年11月22日(2012.11.22)
審査請求日　平成27年3月23日(2015.3.23)
審判番号　不服2017-6625(P2017-6625/J1)
審判請求日　平成29年5月9日(2017.5.9)
(31)優先権主張番号　61/488,028
(32)優先日　平成23年5月19日(2011.5.19)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　511172461
ラボラトリー　コーポレイション　オブ　アメリカ　ホールディングス
アメリカ合衆国　ノース　カロライナ　２７２１５，　バーリントン，　サウス　メイン　ストリート　３５８
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田　貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川　大輔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌患者の生存可能性を決定するためおよび癌患者における転移可能性を予測するための方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体からの生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量を、被験体を脳への転移についてスクリーニングすべきであるか否かの指標とする方法であって、
（ａ）該被験体の癌から得た腫瘍の該生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量を測定するステップと、
（ｂ）該生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量が、ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回るかどうかを決定するステップであって、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフが、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体の参照集団において決定されるＨＥＲ２の量の中央値である、ステップと、
を含み、ここで、該ＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回ることは、該被験体を、脳への転移についてスクリーニングすべきであることを示し、
該被験体が脳への転移を逃れる見込みが、
（ｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回る場合、約１年で約７３％、約２年で約６１％、約３年で約３７％である、または
（ｉｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回る場合、約１年で約８９％、約２年で約７８％、約３年で約６９％である、
のうち少なくとも１つであり、
あるいは、該被験体が、
（ｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフ

を上回る場合、該量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回るときと比較して、脳への転移の約２．６倍増加したリスク、または
（ｉｉ）該被験体の癌のグレードが１または２でありかつ該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回る場合、該被験体の癌がグレード３であったとき、または該被験体の癌がグレード１もしくは２でありかつ該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回ったときと比較して、脳への転移の約５．７分の１に減少したリスク、
のうち少なくとも１つを有する、方法。
【請求項２】
前記ＨＥＲ２タンパク質量が前記ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回ることは、前記被験体は、ＨＥＲ２作用剤を用いる治療および第２の形態の癌治療を受けるべきであることをさらに示す、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体からの生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量を、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体において予想される脳への転移までの時間（ＴＴＢＭ）の指標とする方法であって、
（ａ）該被験体の癌から得た腫瘍の該生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量を測定するステップと、
（ｂ）該生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量が、ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回るかどうかを決定するステップであって、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフが、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体の参照集団において決定されるＨＥＲ２の量の中央値である、ステップと、
を含み、ここで、該生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回るかまたは下回ること、および該ＨＥＲ２タンパク質カットオフと相関させた、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体の参照集団における脳への転移の既知の経時的な発生率に基づいて、該被験体の予想されるＴＴＢＭが示され、
該被験体が脳への転移を逃れる見込みが、
（ｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回る場合、約１年で約７３％、約２年で約６１％、約３年で約３７％である、または
（ｉｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回る場合、約１年で約８９％、約２年で約７８％、約３年で約６９％である、
のうち少なくとも１つであり、
あるいは、該被験体が、
（ｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回る場合、該量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回るときと比較して、脳への転移の約２．６倍増加したリスク、または
（ｉｉ）該被験体の癌のグレードが１または２でありかつ該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回る場合、該被験体の癌がグレード３であったとき、または該被験体の癌がグレード１もしくは２でありかつ該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回ったときと比較して、脳への転移の約５．７分の１に減少したリスク、
のうち少なくとも１つを有する、方法。
【請求項４】
ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体からの生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量を、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体が、脳への転移が発生するリスクを有するかどうかの相対的可能性の指標とする方法であって、
（ａ）該被験体の癌から得た腫瘍の該生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量を測定するステップと、
（ｂ）該生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量が、ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回るかどうかを決定するステップであって、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフが、ＨＥＲ

２陽性癌を有する被験体の参照集団において決定されるＨＥＲ２の量の中央値である、ステップと、
を含み、ここで、該ＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回ることは、該被験体は、脳への転移が発生するリスクを有する可能性がより高いことを示し、
該被験体が脳への転移を逃れる見込みが、
（ｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回る場合、約１年で約７３％、約２年で約６１％、約３年で約３７％である、または
（ｉｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回る場合、約１年で約８９％、約２年で約７８％、約３年で約６９％である、
のうち少なくとも１つであり、
あるいは、該被験体が、
（ｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回る場合、該量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回るときと比較して、脳への転移の約２．６倍増加したリスク、または
（ｉｉ）該被験体の癌のグレードが１または２でありかつ該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回る場合、該被験体の癌がグレード３であったとき、または該被験体の癌がグレード１もしくは２でありかつ該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回ったときと比較して、脳への転移の約５．７分の１に減少したリスク、
のうち少なくとも１つを有する、方法。

【請求項５】

ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体からの生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量を、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体が、脳への転移についてスクリーニングすべきである、ＨＥＲ２陽性癌被験体のサブセットに属するかどうかの指標とする方法であって、
（ａ）該被験体の癌から得た腫瘍の該生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量を測定するステップと、
（ｂ）該生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質量が、ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回るかどうかを決定するステップであって、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフが、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体の参照集団において決定されるＨＥＲ２の量の中央値である、ステップと、
を含み、ここで、該ＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回ることが、該被験体を、脳への転移についてスクリーニングすべきであることを示し、
該被験体が脳への転移を逃れる見込みが、
（ｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回る場合、約１年で約７３％、約２年で約６１％、約３年で約３７％である、または
（ｉｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回る場合、約１年で約８９％、約２年で約７８％、約３年で約６９％である、
のうち少なくとも１つであり、
あるいは、該被験体が、
（ｉ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が、該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回る場合、該量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回るときと比較して、脳への転移の約２．６倍増加したリスク、または
（ｉｉ）該被験体の癌のグレードが１または２でありかつ該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを下回る場合、該被験体の癌がグレード３であったとき、または該被験体の癌がグレード１もしくは２でありかつ該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質量が該ＨＥＲ２タンパク質カットオフを上回ったときと比較して、脳への転移の約５．７分の１に減少したリスク、
のうち少なくとも１つを有する、方法。

【請求項６】

前記被験体の癌が、ＨＥＲ２遺伝子の発現レベルの上昇、ＨＥＲ２タンパク質のレベル

、またはＨＥＲ２遺伝子の増幅に基づいて、ＨＥＲ２陽性であることが特徴付けられている、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記被験体の癌が乳癌を含む、請求項１から６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記被験体の癌が原発性乳癌を含む、請求項１から７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記被験体が、血液脳関門を横断しないＨＥＲ２作用剤を用いる治療を受けている、請求項１から８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＨＥＲ２作用剤が、モノクローナル抗体である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記モノクローナル抗体が、トラスツズマブである、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体の参照集団が、血液脳関門を横断しないＨＥＲ２作用剤を用いる治療を受けている、請求項３または６から１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
前記第２の形態の癌治療が、ＨＥＲ２標的化低分子薬物、化学療法および／または放射線療法を含む、請求項２または６から１２のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の引用
本願は、２０１１年５月１９日に出願した米国仮特許出願第６１／４８８，０２８号からの米国特許法第１１９条（ｅ）項の下での優先権を主張する。米国仮特許出願第６１／４８８，０２８号の開示は、その全体が本明細書において参考としてここで援用される。
【０００２】
発明の分野
本発明は一般に、ＨＥＲ２陽性癌、例として進行した乳癌を有する患者中のＨＥＲ２またはｐ９５の発現総量を正確に定量化する方法、および、そのような患者において、ＨＥＲ２またはｐ９５の発現を脳における再発のリスクと相関させる方法に関する。
【背景技術】
【０００３】
発明の背景
乳癌に伴う脳への転移は、特に芳しくない予後と関連がある。脳への転移は、生活の質に重大な影響を及ぼし、全身療法に対して比較的抵抗性である。乳癌は、脳への転移の、２番目に多い原因である。生物学的根拠はまだ十分に理解されていないが、ＨＥＲ２陽性乳癌を有する患者は、脳への転移の特に高いリスクを有する。しかし現時点では、ＨＥＲ２陽性の進行性乳癌患者において脳における再発をもたらす傾向と一貫して関連があることが示されている臨床的または生物学的な特徴がない。同様に、脳における再発を予測するためのロバストな分子マーカーも開発されていない。
【０００４】
ＨＥＲ２の状態を決定するための現在の方法は、ＨＥＲ２タンパク質の過剰発現を検出するための免疫組織化学的検査（ＩＨＣ）、ＨＥＲ２遺伝子の増幅を検出するための蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）または発色ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションを含む。しかし、依然として、これらのアッセイの方法の精度、信頼性および観察者間の変動性に関して、相当な議論がなされている。例えば、ＨＥＲ２の発現のＩＨＣによる評価は、本質的に主観的であり、半定量的である（０、１＋、２＋、３＋とスコア化される）。ＨＥＲ２遺伝子のコピー数を計数するＦＩＳＨ試験は、より定量分析

的であるが、複数の臨床研究で、ＨＥＲ２遺伝子のコピー数と臨床治療に対する応答との間の関係の実証に失敗している。現時点で入手可能な技法を使用する場合、ＨＥＲ２試験のおよそ２０％が不正確である恐れがあることが推定される。

【０００５】

現時点では、ＨＥＲ２陽性乳癌患者における全身療法の標準的な構成成分は、ＨＥＲ２受容体の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体であるトラスツズマブである。しかし、トラスツズマブは、高分子量（およそ１４５，０００Ｄａ）ならびに物理的および化学的な特性に起因して、血液脳関門を横断せず、脳への転移の予防および治療においては効果がない。さらにまた、ＨＥＲ２を過剰発現する腫瘍のサブグループは、外部ドメインを排出してしまった、ＨＥＲ２のＮ－末端が切断されたバージョンであるｐ９５　ＨＥＲ２（ｐ９５）も有する。トラスツズマブは、ＨＥＲ２の外部ドメインに結合するので、ｐ９５の切断型ＨＥＲ２タンパク質に結合することができず、したがって、トラスツズマブは、ｐ９５の高いレベルを有する患者においては効果がない。

【０００６】

癌は、非常に複雑な疾患であることから、多くの新しい標的療法が、一部の個々の患者において極めて有効でありながら、特定の癌についての一般的な患者集団においては限定的な有効性しか示さない。患者についての適切な知識がなければ、医療提供者は、有効な標的療法を患者のために選択することができない恐れがある。例えば、進行性乳癌を有する一部の患者が、脳への転移の増加したリスクを有する恐れがあるが、それらの患者が受けている治療は、脳への転移を予防または治療するには不適切である場合がある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

したがって、ＨＥＲ２またはｐ９５の発現総量を正確に定量化するための方法、および、進行性乳癌を有する患者において、ＨＥＲ２またはｐ９５のレベルを脳における再発のリスクと相関させるための方法が求められている。また、とりわけＨＥＲ２陽性の進行性乳癌患者の亜集団に合わせて手直しされる治療処置戦略を同定するための方法も求められている。また、ＨＥＲ２陽性癌を有する個体のために治療コースを選択するための方法、および治療コースの進行をモニターするための方法も必要である。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

発明の概要

本発明は一般に、進行性乳癌を有する患者中のＨＥＲ２またはｐ９５の発現総量を正確に定量化する方法、ならびに、そのような患者において、ＨＥＲ２またはｐ９５の発現を脳における再発のリスクおよび脳への転移までの時間（ＴＴＢＭ）と相関させる方法に関する。本明細書に記載する本発明の実施形態は、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）技術を活用して、腫瘍試料中のＨＥＲ２およびｐ９５のタンパク質発現総量を正確に定量化する方法、ならびに、トラスツズマブ等の治療を受けた患者を含めた、ＨＥＲ２陽性の進行性乳癌患者において、ＨＥＲ２レベルと脳における再発のリスクとを相関させる方法を含む。

【０００９】

本発明の実施形態は、生物学的試料中のＨＥＲ２の発現総量（Ｈ２Ｔ）、ｐ９５およびＨＥＲ２ホモダイマー（Ｈ２Ｄ）を正確に定量化する新規のアッセイを含む。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

（項目１）

脳への転移についてスクリーニングすべきである、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体を同定する方法であって、

（ａ）該被験体の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、

（ｂ）該生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステップと、

（ｃ）該被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つ

の量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと、
（ｄ）該ＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量が、該ＨＥＲ２のカットオフまたは該ｐ９５のカットオフを上回る場合、該被験体を、脳への転移についてスクリーニングすべきであることを示すステップと
を含む方法。
（項目２）
ＨＥＲ２作用剤を用いる治療および第２の形態の癌治療を受けるべきである、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体を同定する方法であって、
（ａ）該被験体の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、
（ｂ）該生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステップと、
（ｃ）該被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと、
（ｄ）該ＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量が、該ＨＥＲ２のカットオフまたは該ｐ９５のカットオフを上回る場合、該被験体は、ＨＥＲ２作用剤を用いる治療および第２の形態の癌治療を受けるべきであることを示すステップと
を含む方法。
（項目３）
ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体において予想される脳への転移までの時間（ＴＴＢＭ）を決定するための方法であって、
（ａ）該被験体の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、
（ｂ）該生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステップと、
（ｃ）該被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと、
（ｄ）該ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかまたは下回るＨＥＲ２またはｐ９５のレベルを有する参照集団における脳への転移の経時的な発生率に基づいて、該被験体の予想されるＴＴＢＭを示すステップと
を含む方法。
（項目４）
ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体が、脳への転移が発生するリスクを有するかどうかの相対的可能性を決定するための方法であって、
（ａ）該被験体の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、
（ｂ）該生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステップと、
（ｃ）該被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと、
（ｄ）該生物学的試料中の該ＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の量が、該ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回る場合、該被験体は、脳への転移が発生するリスクを有する可能性がより高いことを示すステップと
を含む方法。
（項目５）
ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体が、脳への転移についてスクリーニングすべきである、ＨＥＲ２陽性癌被験体のサブセットに属するかを決定する方法であって、
（ａ）該被験体の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、
（ｂ）該生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステッ

プと、
（ｃ）該被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと、
（ｄ）該ＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量が、該ＨＥＲ２のカットオフまたは該ｐ９５のカットオフを上回る場合、被験体を、脳への転移についてスクリーニングすべきであることを示すステップと
を含む方法。
（項目６）
前記被験体の癌が、ＨＥＲ２遺伝子の発現レベルの上昇、ＨＥＲ２タンパク質のレベル、またはＨＥＲ２遺伝子の増幅に基づいて、ＨＥＲ２陽性であることが特徴付けられている、項目１から５のいずれか一項に記載の方法。
（項目７）
前記被験体の癌が乳癌を含む、項目１から６のいずれか一項に記載の方法。
（項目８）
前記被験体の癌が原発性乳癌を含む、項目１から７のいずれか一項に記載の方法。
（項目９）
前記被験体が、血液脳関門を横断しないＨＥＲ２作用剤を用いる治療を受けている、項目１から８のいずれか一項に記載の方法。
（項目１０）
前記ＨＥＲ２作用剤が、モノクローナル抗体である、項目９に記載の方法。
（項目１１）
前記モノクローナル抗体が、トラスツズマブである、項目１０に記載の方法。
（項目１２）
前記ＨＥＲ２のカットオフが、
（ｉ）ＨＥＲ２陽性乳癌を有する被験体の参照集団において決定されるＨＥＲ２の量の中央値、または
（ｉｉ）ＨＥＲ２陽性乳癌を有する被験体の参照集団において決定される、ＨＥＲ２の最適化された量
のうちの少なくとも１つを含む、項目１から１１のいずれか一項に記載の方法。
（項目１３）
前記ＨＥＲ２陽性乳癌を有する被験体の参照集団が、血液脳関門を横断しないＨＥＲ２作用剤を用いる治療を受けている、項目１から１２のいずれか一項に記載の方法。
（項目１４）
前記ｐ９５のカットオフが、
（ｉ）ＨＥＲ２陽性乳癌を有する被験体の参照集団において決定されるｐ９５の量の中央値；または
（ｉｉ）ＨＥＲ２陽性乳癌を有する被験体の参照集団において決定される、ｐ９５の最適化された量
のうちの少なくとも１つを含む、項目１から１３のいずれか一項に記載の方法。
（項目１５）
前記ＨＥＲ２陽性乳癌を有する被験体の参照集団が、血液脳関門を横断しないＨＥＲ２作用剤を用いる治療を受けている、項目１４に記載の方法。
（項目１６）
前記第２の形態の癌治療が、ＨＥＲ２標的化低分子薬物、化学療法および／または放射線療法を含む、項目２に記載の方法。
（項目１７）
前記生物学的試料中の前記ＨＥＲ２の量が、前記ＨＥＲ２のカットオフを上回る場合、前記被験体が脳への転移を免れる見込みが、約１年で約７３％、約２年で約６１％、約３年で約３７％である、項目２および１６のいずれか一項に記載の方法。

（項目１８）
前記生物学的試料中の前記ＨＥＲ２の量が、前記ＨＥＲ２のカットオフを下回る場合、前記被験体が脳への転移を免れる見込みが、約１年で約８９％、約２年で約７８％、約３年で約６９％である、項目２、１６および１７のいずれか一項に記載の方法。
（項目１９）
前記生物学的試料中の前記ｐ９５の量が、前記ｐ９５のカットオフを上回る場合、前記被験体が脳への転移を免れる見込みが、約１年で約７７％、約２年で約６３％、約３年で約４０％である、項目２および項目１６から１８のいずれか一項に記載の方法。
（項目２０）
前記生物学的試料中の前記ｐ９５の量が、前記ｐ９５のカットオフを下回る場合、前記被験体が脳への転移を免れる見込みが、約１年で約８５％、約２年で約７７％、約３年で約６７％である、項目２および項目１６から１９のいずれか一項に記載の方法。
（項目２１）
前記生物学的試料中の前記ＨＥＲ２の量が前記ＨＥＲ２のカットオフを下回り、前記ｐ９５の量が前記ｐ９５のカットオフを上回る場合、前記被験体が脳への転移を免れる見込みが、約１年で約８０％、約２年で約６６％、約３年で約５０％である、項目２および項目１６から２０のいずれか一項に記載の方法。
（項目２２）
前記生物学的試料中の前記ＨＥＲ２の量が前記ＨＥＲ２のカットオフを下回り、前記ｐ９５の量が前記ｐ９５のカットオフを下回る場合、前記被験体が脳への転移を免れる見込みが、約１年で約９４％、約２年で約８６％、約３年で約８０％である、項目２および項目１６から２１のいずれか一項に記載の方法。
（項目２３）
前記生物学的試料中の前記ＨＥＲ２の量が、前記ＨＥＲ２のカットオフを上回る場合、該量が前記ＨＥＲ２のカットオフを下回るときと比較して、前記被験体が、脳への転移の約２．６倍増加したリスクを有する、項目２および項目１６から２２のいずれか一項に記載の方法。
（項目２４）
前記生物学的試料中の前記ｐ９５の量が、前記ｐ９５のカットオフを上回る場合、該量が前記ｐ９５のカットオフを下回るときと比較して、前記被験体が、脳への転移の約２倍増加したリスクを有する、項目２５のいずれか一項に記載の方法。
（項目２５）
前記被験体の癌がグレード１または２でありかつ前記生物学的試料中の前記ＨＥＲ２の量が前記ＨＥＲ２のカットオフを下回る場合、該被験体の癌がグレード３であったとき、または該被験体の癌がグレード１もしくは２でありかつ該生物学的試料中の該ＨＥＲ２の量が該ＨＥＲ２のカットオフを上回ったときと比較して、該被験体が、脳への転移の約５．７分の１に減少したリスクを有する、項目２５のいずれか一項に記載の方法。
【００１０】
本発明の方法およびシステムの非限定的な実施形態を、以下の図に例示する。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１】図１は、本発明の実施形態による、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）技術に基づく２つの例示的なアッセイフォーマットを示す。パネルＡは、近接性に基づくアッセイである、標準的なＨｅｒＭａｒｋ（登録商標）アッセイフォーマットを描写し、ＶＴａｇ（登録商標）レポーター分子の切断が、一重項酸素を介して生じる。ハサミの記号は、切断剤に付着する切断部分を表し、一方、「ｈｖ」は、光エネルギーを表す。パネルＢでは、ＶＴａｇ（登録商標）レポーター分子の切断を、還元剤（例えば、ＤＴＴ）により行う。両方のアッセイフォーマットにおいて、放出されたＶＴａｇ（登録商標）レポーター分子を、キャピラリー電気泳動により分離および同定する。Ｘ軸は、切断されたＶＴａｇ（登録商標）レポーター分子が、キャピラリーから溶出した時間を示し、蛍光強度を、Ｙ軸上に示

す。ピークは、異なるＶＴａｇ（登録商標）レポーター分子の溶出を表す。
【図２】図２は、本発明の実施形態による、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）技術に基づく例示的なアッセイフォーマットを示す。パネルＡは、標準的なＨｅｒＭＡＲＫ（登録商標）アッセイフォーマットを描写し、このフォーマットは、標的タンパク質（例えば、ＨＥＲ２）の総量の定量化を、標的タンパク質に特異的な２つの結合性の薬剤（例えば、抗体）を使用して可能にする。パネルＢは、ホモダイマーの同定を、ＶＴａｇ（登録商標）レポーター分子または切断剤のいずれかに示差的にコンジュゲートさせてある単一の抗体を使用して可能にするアッセイフォーマットを描写する。両方のアッセイフォーマットが近接性に基づくアッセイであり、ＶＴａｇ（登録商標）レポーター分子の切断が、光による切断剤の光誘導（すなわち、一重項酸素）を介して生じる。「Ｓ」は、ビオチン分子を介して、抗体のうちの１つに付着するストレプトアビジン（streptavidn）分子を表す。パネルＣは、例示的なＶＴａｇ（登録商標）レポーター分子（Ｐｒｏ１１）の、切断可能なリンカーを介して抗体（例えば、Ａｂ８）に付着している形態および切断の後の放出された形態を示す。
【図３】図３は、ＨＥＲｍａｒｋ（登録商標）アッセイにおいてＨ２Ｔにより測定した場合の定量的ＨＥＲ２タンパク質（ＲＦ／ｍｍ^{2}腫瘍）と、ＨＥＲ２のＦＩＳＨにより測定した場合の、ＨＥＲ２遺伝子のコピー数／セントロメア１７との関係を示すグラフである。
【図４】図４は、本発明の実施形態による異なるタンパク質マーカーのカテゴリーに基づいて、脳への転移までの時間を月数で示すカプラン－マイヤープロットを示す。パネルＡは、定量的ＨＥＲ２レベルに基づくデータを示し、中央値を上回る（灰色の線）Ｈ２Ｔのレベルを有する被験体と、中央値を下回る（黒色の線）Ｈ２Ｔのレベルを有する被験体とを比較する。パネルＢは、Ｈ２Ｔの最適なカットオフを上回るＨＥＲ２のレベルを有する被験体（黒色の線）、およびＨ２Ｔの最適なカットオフを下回るＨＥＲ２のレベルを有する被験体（灰色の線）における、定量的ＨＥＲ２レベルに基づくデータを示す。パネルＣは、ＨＥＲ２のＦＩＳＨ解析に基づくデータを示し、中央値を上回るレベルを有する被験体（黒色の線）と、中央値を下回るレベルを有する被験体（灰色の線）とを比較する。パネルＤは、定量的ｐ９５レベルに基づくデータを示し、最適なｐ９５のカットオフを上回るｐ９５のレベルを有する被験体（灰色の線）と、最適なｐ９５のカットオフを下回るｐ９５のレベルを有する被験体（黒色の線）とを比較する。パネルＥは、有意なバイオマーカーとしてのＨ２Ｔおよびｐ９５の独立性を示すために、パネルＢで同定された低いＨＥＲ２群内の、定量的ｐ９５レベルに基づくデータを示す。
【図５】図５は、本発明の実施形態による、脳への転移までの時間に対する、腫瘍のグレードに照らした定量的ＨＥＲ２レベルの作用を示す。パネルＡは、定量的ＨＥＲ２レベルおよび腫瘍のグレードに基づいて決定したハザード比を示すフォレストプロットを示す。パネルＢは、異なる腫瘍のグレードにおけるＨＥＲ２レベルを比較する場合の、脳への転移までの時間を月数で示すカプラン－マイヤープロットである。
【図６】図６は、本発明の実施形態による、脳への転移までの時間に対する、腫瘍のグレードに照らした定量的ＨＥＲ２レベルの作用を示す。パネルＡは、定量的な連続的ＨＥＲ２レベル（カットオフなし）および腫瘍のグレードに基づくハザード比を示すフォレストプロットである。パネルＢは、ＨＥＲ２のＦＩＳＨ陽性の被験体のサブセット内の、定量的な連続的ＨＥＲ２レベルおよび腫瘍のグレードに基づくハザード比を示すフォレストプロットである。
【図７】図７は、研究の初めに医師により決定された転移の優性の部位、および優性の転移部位のそれぞれについてのＨ２Ｔのレベルを示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００１２】
発明の詳細な説明
定義および略語
本明細書で使用される場合、用語「実施形態」および「態様」は、互換的に使用される

。
【００１３】
用語「約」は、本明細書で使用する場合、別段の記載がない限り、この用語が修飾している値を１０％上回る値～１０％下回る値を指す。例えば、用語「約５μｇ／ｋｇ」は、４．５μｇ／ｋｇ～５．５μｇ／ｋｇの範囲を意味する。別の例として、「約１時間」は、４８分～７２分の範囲を意味する。
【００１４】
「抗体」は、別の分子に特異的に結合し、それにより、別の分子の特定の構成と空間的にも極性に関しても相補的であると定義される免疫グロブリンを意味する。抗体は、モノクローナル、ポリクローナルまたは組換えであり得、当技術分野で周知である技法、例として、宿主の免疫化および血清の収集（ポリクローナル）によって、または連続的なハイブリッド細胞系を調製し、分泌タンパク質を収集すること（モノクローナル）によって、または少なくとも自然の抗体の特異的な結合に必要なアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列もしくはそれらの突然変異誘発バージョンをクローニングし、発現させることによって調製することができる。抗体は、完全な免疫グロブリンまたはその断片を含むことができ、これらの免疫グロブリンは、種々のクラスおよびアイソタイプ、例として、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２ａ、ＩｇＧ２ｂ、ＩｇＧ３、ＩｇＭ等を含む。それらの断片は、Ｆａｂ、Ｆｖ、およびＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’等を含むことができる。また、抗体は、単鎖抗体もしくはそれらの抗原結合性断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、または特定の結合部位に特異的である結合活性を保持する当業者に公知の任意のその他の抗体の誘導体であり得る。さらに、免疫グロブリンまたはそれらの断片の凝集体、ポリマーおよびコンジュゲートも、適切な場合には、特定の結合部位に対する結合親和性が維持される限り使用することができる。（下記に記載する）放出可能な分子タグを利用するようなアッセイを含めた、イムノアッセイにおいて使用するための抗体および抗体の誘導体の生成および選択の手引きを、容易に入手可能な文書およびマニュアル、例えば、HarlowおよびLane、１９８８年、Antibodies:A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York；HowardおよびBethell、２００１年、Basic Methods in Antibody Production and Characterization、CRC Press；Wild編、１９９４年、The Immunoassay Handbook、Stockton Press、New Yorkに見出すことができる。
【００１５】
「結合性抗体組成物」は、１つまたは複数の抗体または抗原結合性断片を含む分子または分子の複合体を意味し、この分子または分子の複合体は、分子に結合し、その結合特異性を、そのような抗体または抗体結合性断片から得る。結合性抗体組成物は、これらに限定されないが、（ｉ）第１の抗体が標的分子に特異的に結合し、第２の抗体が第１の抗体の定常領域に特異的に結合する抗体の対；標的分子およびストレプトアビジンタンパク質に特異的に結合するビオチン化抗体であって、このタンパク質は、ビオチン部分を介して、部分、例として分子タグまたは光感受性物質等を用いて誘導体化される、ビオチン化抗体；（ｉｉ）標的分子に特異的であり、ポリマー、例としてデキストランにコンジュゲートされ、続いて、部分、例として分子タグまたは光感受性物質を用いて、共有結合により直接的にかまたはストレプトアビジン－ビオチンの連結を介して間接的に誘導体化される抗体；（ｉｉｉ）標的分子に特異的であり、ビーズもしくはマイクロビーズまたはその他の固相の支持体にコンジュゲートされ、続いて、部分、例として分子タグまたは光感受性物質、またはそれらを含有するポリマーを用いて、直接的または間接的に誘導体化される抗体を含む。
【００１６】
「抗原決定基」または「エピトープ」は、単一の抗体分子が結合する、分子、通常、タンパク質の表面上の部位を意味する。一般に、タンパク質は、いくつかまたは多くの異なる抗原決定基を有し、異なる特異性の抗体と反応する。好ましい抗原決定基は、タンパク質のリン酸化部位である。
【００１７】

「結合性化合物」は、結合性抗体組成物、抗体、ペプチド、細胞表面受容体に対するペプチドもしくは非ペプチドのリガンド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド類似体、例として、ペプチド核酸、レクチン、あるいは標的のタンパク質もしくは分子に特異的に結合することまたは目的の分析対象、例として、タンパク質の複合体と安定な複合体を形成することが可能である任意のその他の分子実体を指すものとする。一態様では、下記の式により表すことができる結合性化合物は、結合性部分に付着する１つまたは複数の分子タグを含む。

【００１８】

本明細書で使用する場合、「血液脳関門」は、中枢神経系（ＣＮＳ）中の脳の細胞外液（ＢＥＣＦ）からの循環血液の分離を指す。血液脳関門は、物理的バリアおよび細胞輸送機構の系の両方である。内皮細胞が、微小物体（例えば、細菌）および大きなまたは親水性分子の脳脊髄液中への拡散を制限し、一方、小さな疎水性分子の拡散を可能にする。

【００１９】

「結合性部分」は、分子タグを直接的または間接的につなぐことができ、分析対象に特異的に結合することが可能である任意の分子を意味する。結合性部分は、これらに限定されないが、抗体、結合性抗体組成物、抗体断片、ペプチドおよびタンパク質を含む。好ましくは、結合性部分は、抗体または結合性抗体組成物である。

【００２０】

「癌」および「癌性」は、無秩序な細胞の増殖により典型的に特徴付けられる、生物体、例として哺乳動物中の生理的状態を指すまたは説明する。癌の例として、これらに限定されないが、細胞癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫および白血病が挙げられる。そのような癌のより特定の例には、扁平上皮細胞癌、肺癌、例えば、小細胞肺癌または非小細胞肺癌；消化器癌、膵臓癌、神経膠芽腫、子宮頚部癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎臓癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝細胞癌、および種々のタイプの頭頚部癌がある。

【００２１】

「化学療法剤」は、状態、特に、癌を治療するために使用される化学物質、主として、細胞傷害剤または細胞分裂阻害剤を意味する。本明細書の記載に従って、化学療法剤は、パクリタキセル等の化合物を含むものとする。

【００２２】

「切断可能な連結」は、本明細書で使用する場合、結合性部分に切断可能な連結を用いて接続される分子タグの構造を分解することも、分子タグの検出の特徴に影響を及ぼすこともない条件下で切断され得る化学的連結基を指す。

【００２３】

「切断誘導部分」または「切断剤」は、本明細書で使用する場合、切断可能な連結を、例えば、酸化により切断することが可能である活性種をもたらす基である。好ましくは、活性種は、短命の活性を示す化学種であり、したがって、その切断誘導作用が、それが発生した部位の付近のみに留まる。

【００２４】

「切断性プローブ」は、本明細書で使用する場合、本明細書で定義される切断誘導部分、および結合性抗体組成物、抗体、抗体断片、細胞表面受容体に対するペプチドもしくは非ペプチドのリガンド、またはタンパク質、例として、ビオチンもしくはストレプトアビジン、オリゴヌクレオチド、レクチン、あるいは標的のタンパク質もしくは分子に特異的に結合することまたは目的の分析対象（例えば、タンパク質もしくはタンパク質複合体）と安定な複合体を形成することが可能である任意のその他の分子実体を含む試薬を指す。

【００２５】

本明細書で使用する場合、「カットオフ」は、対象集団中の試料を２つの明確に異なる患者のサブグループに分割することができる、生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の量の測定値に基づいて数学的に決定される点、例えば、中央値のカットオフ、または最適なカットオフ、または所定のカットオフ等を指す。この量は、当技

術分野で公知の任意の方法、例として、蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）、生物発光共鳴エネルギー移動（ＢＲＥＴ）、近接ライゲーションアッセイ（ＰＬＡ）、二量体特異的抗体もしくはＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイ、または当業者に周知である任意のその他の方法により測定することができる。

【００２６】

「ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイ」および「ＶＥＲＡＴＡＧ（登録商標）アッセイ」を、互換的に使用し、これらは、単一かつ多重化かつ多重標識のアッセイ、そのようなアッセイを実施し、活用するための材料、方法および技法を指し、それらには、これらに限定されないが、それらのアッセイに関連する試薬、分析手順およびソフトウエアが含まれる。そのようなアッセイは、本出願、さらに、米国特許第７，１０５，３０８号ならびに米国特許公開第２００９／０１９１５５９号、第２０１０／０１４３９２７号、第２０１０／０２１００３４号および第２０１０／０２３３７３２号に開示されており、これらは、あらゆる図面を含めて、参照により本明細書に組み込まれる。

【００２７】

本明細書で使用する場合、「ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）レポーター分子」または「ｖＴａｇ」もしくは「ｖＴａｇ（登録商標）」は、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイ中で使用される抗体に付着する分子タグを指す。

【００２８】

本明細書で使用する場合、「～以上」（すなわち、≧または＞＝）は、特定の代替の実施形態では、～超（＞）を意味することができる。また、本明細書で使用する場合、「～以下」（すなわち、≦または＜＝）も、特定の代替の実施形態では、～未満（＜）を意味することができる。

【００２９】

「ＦＦＰＥ」は、固定されている一群の細胞またはある量の組織、特に、従来のホルマリン固定パラフィン包埋試料を指すものとする。そのような試料が典型的には、これに限定されないが、受容体複合体についてのアッセイ中で、顕微鏡スライドまたは同等の表面上にマウントされる、固定組織の薄い切片、例えば、３～１０μｍの厚さの形態で使用される。また、そのような試料は、典型的には、従来の再水和手順を経、場合により、アッセイの測定の一部としてまたはアッセイの測定の前に、抗原回収手順も経る。

【００３０】

「ハザード比」または「ＨＲ」は、本明細書で使用する場合、生存解析として公知の統計学的技法を使用して計算される特定のタイプの相対リスクを指す（例えば、目的の何らかの事象または転帰までに異なる時間を有する１つまたは複数の被験体群の解析）。生存解析では、何人の被験体が、所与の時点でまたは所与の時間間隔の間に、事象を経験するに至っていないかを追跡する。次いで、データを、研究時間全体にわたりプロットし、結果を、減少する曲線としてグラフに描く。「ハザード比」は、１つの群対別の群の予測されるハザードの比である。次いで、ハザード比を、独立した尺度と比較することができる（例えば、試料中に存在する１つまたは複数のバイオマーカーの量；腫瘍のグレード）。１超のハザード比は、目的の事象が、第１の群において、第２の群においてよりも速く起きていることを示す。１未満のハザード比は、目的の事象が、第１の群において、第２の群においてよりも緩慢に起きていることを示す。ＨＲが１に近い場合には、２つの変数の間で関連があるリスクに統計学的な差がない。これらの比は２つの群の間の比較であり、いずれかの群中の平均的な被験体にとってどれだけ時間がかかるかの指標にはならないことに留意されたい。ハザード比は、第２の群と比較した第１の群における、目的の事象のリスクの増加または減少の倍率を指す。

【００３１】

「Ｈｅｒ－２」、「ＥｒｂＢ２」、「ｃ－Ｅｒｂ－Ｂ２」、「ＨＥＲ２」、「Ｈｅｒ２」および「ｎｅｕ」を、本明細書においては互換的に使用し、これらは、例えば、Sembaら、１９８５年、P.N.A.S. USA、８２巻：６４９７～６５０頁、およびYamamotoら、１９８６年、Nature、３１９巻：２３０～２３４頁、ならびにＧｅｎｅｂａｎｋ受託番号Ｘ

０３３６３の記載に従って、本来のＨＥＲ２およびその対立遺伝子バリアントを指す。別段の記載がない限り、用語「ＨＥＲ２」、「ＥｒｂＢ２」、「ｃ－Ｅｒｂ－Ｂ２」、「ＨＥＲ２」および「Ｈｅｒ２」は、本明細書で使用する場合、ヒトタンパク質を指す。本明細書では、「ｅｒｂＢ２」は、Ｈｅｒ２をコードする遺伝子を指す。本明細書で使用する場合、Ｈ２Ｔは、例えば、これに限定されないが、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイにより決定されるＨＥＲ２の発現総量を指すものとする。

【００３２】

「ＨＥＲ２作用剤」は、本明細書で使用する場合、ＨＥＲ２またはＨＥＲ２発現細胞もしくはＨＥＲ２陽性癌細胞の生物学的活性を阻害することができる化合物を指す。そのような生物学的活性は、これらに限定されないが、二量体化、自己リン酸化、別の受容体のリン酸化、シグナル伝達等を含む。生物学的活性は、これらに限定的されないが、細胞の生存および細胞の増殖を含むことができ、そのような活性のＨＥＲ２作用剤による阻害は、直接的もしくは間接的な細胞死滅（例えば、ＡＤＣＣ）、タンパク質複合体もしくは複合体形成の破壊、タンパク質輸送の調節、酵素の阻害、またはＨＥＲ２の下方制御であり得る。また、生物学的活性は、本出願に記載するように、患者の応答も含むことができる。例示的なＨＥＲ２作用剤として、これらに限定されないが、抗体であるペルツズマブ、エルツマキソマブおよびトラスツズマブ、ならびに、低分子、例として、１７－ＡＡＧ、ＩＰＩ－５０４、ネラチニブ、ＡＺＤ８９３１、ＡＲＲＹ－３８０、ＰＦ２９９、アファチニブ、ペリチニブ、Ｓ－２２２６１１、ＡＥＥ－７８８およびラパチニブが挙げられる。抗体および関連の分子は一般に、大き過ぎて、血液脳関門を通過しない。

【００３３】

細胞表面のＨＥＲ２膜受容体に関する「ＨＥＲ２ホモダイマー」は、２つ以上の膜結合ＨＥＲ２タンパク質の複合体を意味する。二量体は通常、相互に接触している２つの受容体からなる。二量体は、細胞表面膜において、受動的なプロセス、例として、ファンデルワールス相互作用等により生み出され得、または二量体は、能動的なプロセス、例として、リガンド誘導性の二量体化、共有結合性の連結、細胞内構成成分との相互作用等により生み出され得る。例えば、Schlessinger、２０００年、Cell、１０３巻：２１１～２２５頁を参照されたい。本明細書で使用する場合、用語「二量体」は、「細胞表面膜受容体の二量体」を、文脈からそうでないことが理解されない限り指すことが理解される。本明細書で使用する場合、「Ｈ２Ｄ」は、例えば、これに限定されないが、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイにより決定される、定量化された二量体を指すものとする。

【００３４】

「ＨＥＲ２陽性」の癌、癌細胞、被験体または患者は、本明細書で使用する場合、ＨｅｒｃｅｐＴｅｓｔ（登録商標）（ＤａｋｏＣｙｔｏｍａｔｉｏｎ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ Ｉｎｃ．、Ｃａｒｐｅｎｔｅｒｉａ、ＣＡ）を使用する場合に、少なくとも２のスコアを示す癌、癌細胞、被験体もしくは患者、またはＦＩＳＨにより、セントロメア１７補正ＨＥＲ２遺伝子のコピー数が２超であり（ＨＥＲ２ ＦＩＳＨ／ＣＥＰ１７＞２；ＦＩＳＨ陽性）、そのように同定されている癌、癌細胞、被験体もしくは患者を指す。特定の実施形態では、ＨＥＲ２陽性細胞は、ＨｅｒｃｅｐＴｅｓｔ（登録商標）免疫組織化学アッセイを使用して、少なくとも２＋または３＋のスコアを示す。

【００３５】

「高い」は、正常よりも高い計測値、標準（例えば、所定の計測値もしくはサブグループの計測値）よりも高い計測値、または別のサブグループの計測値よりも比較的高い計測値を指す。例えば、高いＨＥＲ２は、ＨＥＲ２の正常計測値よりも高いＨＥＲ２の計測値を指す。ＨＥＲ２の正常計測値は、当業者に利用可能な任意の方法に従って決定することができる。また、高いＨＥＲ２は、所定の計測値、例として、所定のカットオフ以上の計測値を指すこともできる。また、高いＨＥＲ２は、高いＨＥＲ２のサブグループが、別のサブグループよりも、ＨＥＲ２の比較的高いレベルを有する場合のＨＥＲ２の計測値を指すこともできる。例えば、これに限定されないが、本発明によれば、２つの明確に異なる患者のサブグループを、数学的に決定される点、例として、これに限定されないが、中央

値に関して、試料を分割することによって生み出すことができ、したがって、計測値が高い（すなわち、中央値よりも高い）サブグループと計測値が低い別のサブグループとが生み出される。当業者に公知の任意の方法により、具体的には、例えば、これに限定されないが、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイを使用するか、または任意の標準的な免疫組織化学的（ＩＨＣ）方法、例として、ＨｅｒｃｅｐＴｅｓｔ（登録商標）を使用して、ＨＥＲ２を測定することができる。別の例として、高いＨＥＲ２は、ＨＥＲ２陽性である試料または患者の特定のセットにおいて、ＨＥＲ２の正常計測値よりも高いＨＥＲ２の計測値を指すことができる。ＨＥＲ２の正常計測値は、当業者に利用可能な任意の方法に従って決定することができる。別の例として、また、ＨＥＲ２の高いレベルは、所定の計測値、例として、所定のカットオフよりも高い計測値を指すこともできる。また、高いＨＥＲ２は、高いＨＥＲ２ホモダイマーのサブグループが、別のサブグループよりも、ＨＥＲ２ホモダイマーの比較的高いレベルを有する場合のＨＥＲ２の計測値を指すこともできる。一部の状況では、「高い」は、参照群における測定値の中央値よりも高い量を指す。

【００３６】

「可能性がかなり高い」は、本明細書で使用する場合、品目、物体、物事または事象が生じる確率が増加していることを指す。

【００３７】

「長い」は、本明細書で使用する場合、正常よりも長い時間の計測値、標準、例として、所定の計測値よりも長い時間の計測値、または別のサブグループの計測値よりも比較的長いサブグループの計測値を指す。例えば、患者の寿命の延長に関して、長い時間的進行は、正常な時間的進行よりも長い時間的進行、または別の群と比較した場合に、進行までのより長い時間を指す。時間的進行が長いか否かは、当業者に利用可能な任意の方法に従って決定することができる。長いは、例えば、進行がないことを含むことができる。一部の状況では、「長い」は、疾患の顕著な事象が生じるのに必要な時間的経過の中央値よりも長い時間を指す。

【００３８】

「低い」は、正常よりも低い計測値、標準（例えば、所定の計測値もしくはサブグループの計測値）よりも低い計測値、または別のサブグループの計測値よりも比較的低い計測値を指す用語である。例えば、低いＨＥＲ２は、ＨＥＲ２陽性である患者の試料の特定のセットにおいて、ＨＥＲ２の正常計測値よりも低いＨＥＲ２の計測値を意味する。ＨＥＲ２の正常計測値は、当業者に利用可能な任意の方法に従って決定することができる。また、低いＨＥＲ２は、所定の計測値、例として、所定のカットオフよりも低い方法を意味することもできる。また、低いＨＥＲ２は、低いＨＥＲ２のサブグループが、別のサブグループよりも比較的低い場合の計測値を意味することもできる。例えば、これに限定されないが、本明細書によれば、２つの明確に異なる患者のサブグループを、数学的に決定される点、例として、これに限定されないが、中央値に関して、試料を分割することによって生み出すことができ、したがって、計測値が高い別の群に比して計測値が低い（すなわち、中央値よりも低い）群が生み出される。別の例として、低いＨＥＲ２は、ＨＥＲ２陽性である試料または患者の特定のセットにおいて、ＨＥＲ２の正常計測値よりも低いＨＥＲ２ホモダイマーの計測値を意味する。また、低いＨＥＲ２は、所定の計測値、例として、所定のカットオフよりも低い計測値を意味することもできる。また、低いＨＥＲ２は、低いＨＥＲ２のサブグループが、別のサブグループよりも比較的低い場合の計測値を意味することもできる。

【００３９】

「分子タグ」は、本明細書で使用する場合、分離される分子の間の１つまたは複数の物理的、化学的または光学的な差に基づいて、その他の分子と区別され得る分子を指し、それらの差は、これらに限定されないが、電気泳動移動度、分子量、形状、溶解性、ｐＫａ、疎水性、電荷、電荷／質量の比、極性等を含む。一態様では、複数またはセットの分子タグは、電気泳動移動度および光学的な検出の特徴の点で異なり、電気泳動により分離することができる。別の態様では、複数またはセットの分子タグは、分子量、形状、溶解性

、ｐＫａ、疎水性、電荷または極性の点で異なる場合があり、順相もしくは逆相のＨＰＬＣ、イオン交換ＨＰＬＣ、キャピラリー電気クロマトグラフィー、質量分析、気相クロマトグラフィー、または同類の技法により分離することができる。本明細書に記載するように、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）レポーター分子は、分子タグの１つのタイプである。

【００４０】

「最適なカットオフ」または「最適化されたカットオフ」は、本明細書で使用する場合、属性の２つのカテゴリーの間の最良の識別を可能にする特定の属性を示す、被験体における所定の計測値を指す。例えば、最適なカットオフの値を見出すことにより、例えば、全生存（ＯＳ）を決定するための２つのカテゴリー（例えば、高いＨ２Ｔ発現と低いＨ２Ｔ発現）の間で最良に識別するのが可能になる。最適なカットオフを使用して、予測モデルを最適化するため（例えば、これらに限定されないが、モデルの特異性を最大化するため、モデルの感度を最大化するため、転帰の差を最大化するため、またはハザード比もしくは応答の差から得られるｐ値を最小化するため等）に、最適なカットオフよりも低いまたは高い値を有する被験体を分離する。

【００４１】

「全生存」または「ＯＳ」は、治療の開始から、死亡または打ち切りまでに測定される時間を指す。打ち切りは、研究の終点または治療の変更から生じ得る。全生存は、確率、例えば、期間を、治療の開始から、死亡または打ち切りまでの時間として、特定の時点における生存を示すカプラン－マイヤープロットとして示す場合の確率を指すことができる。

【００４２】

本明細書で使用する場合、「ｐ９５」は、Ｎ－末端が切断されたＨＥＲ－２のＣ－末端部分を指す。また、「ｐ９５」は、「切断型ＥｒｂＢ２受容体」、「$p95^{ErbB2}$」、「ｐ９５ＨＥＲ２」と呼ばれ、より一般には、「NH_2－末端切断型ＨＥＲ－２／ｎｅｕ」および「ＨＥＲ２のＣ－末端断片」と呼ばれ、「ｐ９５」は、９５キロダルトンの見かけの分子量を有すると当初同定されたものに類似するがサイズに関しては同一でない切断型ＨＥＲ２タンパク質の一群を表すという事実を反映している。ｐ９５は少なくとも２つの明確に異なる機構により生じると考えられている。ｐ９５は、完全長のＨＥＲ－２のタンパク質切断の結果生じる場合がある。また、ｐ９５は、これらに限定されないが、Ｍ６１１およびＭ６８７を含めた、標準的な第１メチオニンより下流からの、代替の翻訳の開始の結果生じる場合もある。

【００４３】

本明細書で使用する場合、「光感受性物質」は、光により活性化された場合に、分子酸素を一重項酸素に変換する、光を吸着する分子を指す。

【００４４】

「ＲＥＣＩＳＴ」は、「固形腫瘍における応答の評価の判断基準（Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｃｒｉｔｅｒｉａ ｉｎ Ｓｏｌｉｄ Ｔｕｍｏｕｒｓ）」を表す頭字語を意味するものとし、治療の間に、癌患者が、改善する場合（「応答する」）、同じに留まる場合（「安定」）、または悪化する場合（「進行」）を定義する一連の公開されている規則である。ＲＥＣＩＳＴ判断基準により定義される応答が公開されている（例えば、Therasse、２０００年、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ.、９２巻（３号）：２０５～２１６頁を参照されたい）。ＲＥＣＩＳＴ判断基準に、その他の類似の公開されている定義および規則のセットを含めることができる。当業者であれば、本明細書で使用するような、部分的な応答（ＰＲ）、完全な応答（ＣＲ）、安定な疾患（ＳＤ）および進行性の疾患（ＰＤ）等の、ＲＥＣＩＳＴ判断基準と調和する定義を理解できる。

【００４５】

「相対蛍光単位」または「ＲＦＵ」を、互換的に使用し、これらは、特定のキャピラリー電気泳動ピークの時間の積分を、標準物質と比較した恣意的な蛍光単位を使用して指すものとする。ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイのフォーマットに関しては、ＲＦＵは、キャピラリー電気泳動に注入されるＶｅｒａＴａｇ（登録商標）レポーター分子の濃度

に比例し、何らかの変動性が、例えば、注入およびキャピラリーの差により導入されることが予想される。ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイの読取りは一般に、１ｍｍ^{2}の腫瘍当たりの相対蛍光単位（ＲＦ／ｍｍ^2）で示される。

【００４６】

「相対ピーク面積」または「ＲＰＡ」は、互換的に使用され、これらは、特定のＶｅｒａＴａｇ（登録商標）レポーター分子のＲＦＵと、既知かつ一定の濃度の既知の内部蛍光標準物質のＲＦＵとの間の比を指すものとする。

【００４７】

治療に対する「応答性」、治療に対して「応答する」およびこの動詞のその他の形態は、本明細書で使用する場合、被験体の、ＨＥＲ２作用剤を用いる治療に対する反応を指す。例として、被験体中の腫瘍の増殖が、約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％または９０％以上遅延する場合、被験体は、ＨＥＲ２作用剤を用いる治療に対して応答する。別の例では、被験体中の腫瘍が、任意の適切な尺度により（例えば、質量または体積により）決定するとき、約５％、１０％、２０％、３０％、４０％または５０％以上だけ収縮する場合、被験体は、ＨＥＲ２作用剤を用いる治療に対して応答する。別の例では、被験体が、治療が投与されないときに予測される平均余命を約５％、１０％、２０％、３０％、４０％または５０％以上だけ上回る平均余命の延長を経験する場合、被験体は、ＨＥＲ２作用剤を用いる治療に対して応答する。別の例では、被験体が、無病生存期間の増加、全生存の増加または進行までの時間の増加を示す場合、被験体は、ＨＥＲ２作用剤を用いる治療に対して応答する。上記に記載したＲＥＣＩＳＴ判断基準を含めて、いくつかの方法を使用して、患者が治療に対して応答するかを決定することができる。

【００４８】

「試料」、「組織試料」、「生物学的試料」、「患者試料」、「患者の細胞もしくは組織の試料」または「検体」はそれぞれ、被験体または患者の組織から得られた類似する細胞のコレクションを指す。組織試料の供給源は、新鮮な、凍結されたおよび／もしくは保存された臓器もしくは組織の試料または生検もしくは吸引物；血液または任意の血液構成要素；体液、例として、脳脊髄液、羊水、腹腔液または間質液；あるいは被験体の妊娠または発達中の任意の時間から得られた細胞からのような固体組織であり得る。組織試料は、自然界において組織と自然には混ざらない化合物、例として、保存剤、抗凝固薬、緩衝剤、固定液、栄養素、抗生物質等を含有することができる。細胞を、従来からある様式、例として、ＦＦＰＥの様式で固定することができる。

【００４９】

「短い」は、本明細書で使用する場合、正常よりも短い時間の計測値、標準、例として、所定の計測値よりも短い時間の計測値、または別のサブグループの計測値よりも比較的短いサブグループの計測値を指す。例えば、患者の寿命の延長に関して、短い時間的進行は、正常な時間的進行よりも短い時間的進行を指す。時間的進行が短いか否かは、当業者に利用可能な任意の方法に従って決定することができる。一部の状況では、「短い」は、疾患の顕著な事象が生じるのに必要な時間的経過の中央値よりも短い時間を指す。

【００５０】

本明細書で使用する場合、「顕著な事象」は、当業者によって重要であると決定される、患者の疾患における事象を指すものとする。顕著な事象の例として、例えば、これらに限定されないが、原発性の診断、死亡、再出現、患者の疾患が転移性であるという決定、患者の疾患の再発、または患者の疾患の、上記の段階のうちのいずれか１つから別の段階への進行が挙げられる。顕著な事象は、ＯＳ、進行までの時間（ＴＴＰ）、および／またはＲＥＣＩＳＴの使用もしくはその他の応答の判断基準を評価するために使用される、当業者によって決定される任意の重要な事象であり得る。

【００５１】

本明細書で使用する場合、「低分子薬物」は、定義によれば、ポリマーではない、低分子量の有機化合物を指す。とりわけ、薬理学の分野内では、低分子という用語は通常、ま

た、生体ポリマー、例として、タンパク質、核酸または多糖に高い親和性で結合し、さらに、生体ポリマーの活性または機能を変化させる分子に制限される。低分子についての分子量の上限は、およそ１０００ダルトンであり、この大きさは、細胞膜を越えて急速に拡散することを可能にし得、その結果、低分子は、細胞内の作用部位に達することができる。

【００５２】

本明細書で使用する場合、用語「被験体」および「患者」を、互換的に使用する。本明細書で使用する場合、用語「被験体（複数可）」は、動物、好ましくは、哺乳動物を指し、哺乳動物には、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ロバ、ヤギ、ラクダ、ネコ、イヌ、モルモット、ラット、マウス、ヒツジ）、ならびに霊長類（例えば、サル、例として、カニクイザル、ゴリラ、チンパンジーおよびヒト）が含まれる。

【００５３】

本明細書で使用する場合、「時間的経過」は、最初の事象から、１つまたは複数のその後の事象までの時間の量を指すものとする。例えば、被験体の癌に関して、時間的経過は、患者の疾患に関係があり得、疾患の経過における顕著な事象を判断することによって測定することができ、第１の事象は、診断であり得、その後の事象は、例えば、これらに限定されないが、後の段階への進行、再発、転移、手術または死亡であり得る。

【００５４】

「進行までの時間」または「ＴＴＰ」は、治療の開始から、進行または癌または打ち切りまでに測定される時間を指す。打ち切りは、研究の終点または治療の変更から生じ得る。また、進行までの時間は、確率として、例えば、カプラン－マイヤープロットとして表すこともでき、この場合、進行までの時間は、特定の時間にわたり無進行である確率を表すことができ、期間は、治療の開始から、進行または打ち切りまでの時間である。

【００５５】

「脳への転移までの時間」または「ＴＴＢＭ」は、治療の開始から脳への転移の発生または打ち切りまでに測定される時間を指す。打ち切りは、研究の終点または治療の変更から生じ得る。また、脳への転移までの時間は、脳への転移の確率として、例えば、カプラン－マイヤープロットとして表すこともでき、この場合、脳への転移までの時間は、特定の時間にわたり脳への転移がない確率を表すことができ、期間は、治療の開始から、脳への転移または打ち切りまでの時間である。脳への転移は、被験体の癌の時間的経過における顕著な事象であり得るので、ＴＴＢＭは、ＴＴＰの１つのタイプである。

【００５６】

「治療する」、「治療」およびこの語のその他の形態は、癌の増殖を妨げること、癌を重量もしくは体積に関して収縮させること、ならびに／または被験体の予想される生存時間および／もしくは腫瘍の進行までの時間を延長すること等のための、Ｈｅｒ作用剤ならびに／または化学療法剤および／もしくはその他の癌治療の投与を指す。

【００５７】

「可能性がかなり低い」は、参照に比して、事象、品目、物体、物事または人が生じる確率が減少していることを指す。

【００５８】

本発明の特定の実施形態の詳細な説明

本発明は一般に、ＨＥＲ２陽性の癌、例として、進行性乳癌を有する患者中のＨＥＲ２またはｐ９５の発現総量を正確に定量化する方法、およびそのような患者において、ＨＥＲ２またはｐ９５の発現を脳への転移のリスクと相関させる方法に関する。本発明の方法により、被験体から得られた生物学的試料中のＨＥＲ２および／またはｐ９５の量に基づいて、被験体をリスクのサブグループに分類することを可能にするための定量的なＨＥＲ２およびｐ９５のカットオフの同定が可能になる。またその上、本発明の方法により、全体としての被験体集団に関する被験体のリスクの、ＨＥＲ２および／またはｐ９５の定量的測定による特徴付けも可能になる。

【００５９】

特定の実施形態では、本発明は、臨床データをバイオマーカーの測定値と組み合わせて使用して、患者の転帰を予測する。臨床データは、全生存、脳への転移までの時間、および転移性疾患への進行を含むことができる。例えば、臨床データは、死亡の日または患者の最後の経過観察の予約の日を含むことができる。または、臨床データのその他の態様（例えば、転移までの時間、寛解までの時間、特定の治療剤に対する抵抗性の発生）を使用してもよい。特定の実施形態では、臨床データは、特定の抗ＨＥＲ作用剤、または化学療法剤を用いる治療を開始する日を含むことができる。その他の実施形態では、本発明は、臨床データを、患者、特に、再発／転移の高リスクを有する患者のための治療作用または治療のコースを決定するために使用する。

【００６０】

一実施形態は、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体が、脳への転移が発生するリスクを有するかどうかの相対的可能性を決定するための方法であり、この方法は、（ａ）被験体の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、（ｂ）生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステップと、（ｃ）被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと、（ｄ）生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回る場合、被験体は、脳への転移が発生するリスクを有する可能性がより高いことを示すステップとを含む。

【００６１】

さらに別の実施形態は、ＨＥＲ２－２陽性癌を有する被験体のための治療コースを選択するための方法であり、この方法は、（ａ）被験体の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、（ｂ）生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステップと、（ｃ）被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと、（ｄ）生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回ることに基づいて、被験体にとって適切な治療コースを示すステップとを含む。

【００６２】

一実施形態では、本発明は、脳への転移についてスクリーニングすべきである、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体を同定する方法を含み、この方法は、（ａ）被験体の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、（ｂ）生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステップと、（ｃ）被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと、（ｄ）ＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回る場合、被験体を、脳への転移についてスクリーニングすべきであることを示すステップとを含む。

【００６３】

別の実施形態では、本発明は、ＨＥＲ２作用剤を用いる治療および第２の形態の癌治療を受けるべきである、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体を同定する方法を含み、この方法は、（ａ）被験体の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、（ｂ）生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステップと、（ｃ）被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと、（ｄ）ＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回る場合、被験体は、ＨＥＲ２作用剤を用いる治療および第２の形態の癌治療を受けるべきであることを示すステップとを含む。

【００６４】

別の実施形態では、本発明は、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体において予想される脳への転移までの時間（ＴＴＢＭ）を決定するための方法を含み、この方法は、（ａ）被験体

の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、（ｂ）生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステップと、（ｃ）被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと、（ｄ）ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかまたは下回るＨＥＲ２またはｐ９５のレベルを有する参照集団における脳への転移の経時的な発生率に基づいて、被験体の予想されるＴＴＢＭを示すステップとを含む。

【００６５】

ある実施形態では、本発明は、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体が、脳への転移についてスクリーニングすべきである、ＨＥＲ２陽性癌被験体のサブセットに属するかを決定する方法を含み、この方法は、（ａ）被験体の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、（ｂ）生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステップと、（ｃ）被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと（ｄ）ＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回る場合、被験体を、脳への転移についてスクリーニングすべきであることを示すステップとを含む。

【００６６】

別の実施形態は、ＨＥＲ２陽性癌を有する被験体における脳への転移までの時間（ＴＴＢＭ）を予測するための方法であり、この方法は、（ａ）被験体の癌から腫瘍の生物学的試料を得るステップと、（ｂ）生物学的試料中のＨＥＲ２またはｐ９５の少なくとも１つの量を測定するステップと、（ｃ）被験体の試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の少なくとも１つの量が、ＨＥＲ２のカットオフまたはｐ９５のカットオフを上回るかどうかを決定するステップと、（ｄ）生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質の量に基づいて、ＴＴＢＭを同定するステップとを含む。いくつかの実施形態では、生物学的試料中のＨＥＲ２の量が、ＨＥＲ２のカットオフを上回る場合、被験体が脳への転移を免れる見込みは、約１年で約７３％、約２年で約６１％、約３年で約３７％である。いくつかの実施形態では、生物学的試料中のＨＥＲ２の量が、ＨＥＲ２のカットオフを下回る場合、被験体が脳への転移を免れる見込みは、約１年で約８９％、約２年で約７８％、約３年で約６９％である。特定の実施形態では、生物学的試料中のｐ９５の量が、ｐ９５のカットオフを上回る場合、被験体が脳への転移を免れる見込みは、約１年で約７７％、約２年で約６３％、約３年で約４０％である。いくつかの実施形態では、生物学的試料中のｐ９５の量が、ｐ９５のカットオフを下回る場合、被験体が脳への転移を免れる見込みは、約１年で約８５％、約２年で約７７％、約３年で約６７％である。特定の実施形態では、生物学的試料中のＨＥＲ２の量が、ＨＥＲ２のカットオフを下回り、ｐ９５の量が、ｐ９５のカットオフを上回り、被験体が脳への転移を免れる見込みは、約１年で約８０％、約２年で約６６％、約３年で約５０％である。特定の実施形態では、生物学的試料中のＨＥＲ２の量が、ＨＥＲ２のカットオフを下回り、ｐ９５の量が、ｐ９５のカットオフを下回る場合、被験体が脳への転移を免れる見込みは、約１年で約９４％、約２年で約８６％、約３年で約８０％である。いくつかの実施形態では、生物学的試料中のＨＥＲ２の量が、ＨＥＲ２のカットオフを上回る場合、ＨＥＲ２のカットオフを下回るときと比較して、被験体は、脳への転移の約２．６倍増加したリスクを有する。特定の実施形態では、生物学的試料中のｐ９５の量が、ｐ９５のカットオフを上回る場合、ｐ９５のカットオフを下回るときと比較して、被験体は、脳への転移の約２倍増加したリスクを有する。いくつかの実施形態では、被験体の癌がグレード１または２でありかつ生物学的試料中のＨＥＲ２の量がＨＥＲ２のカットオフを下回る場合、被験体の癌がグレード３であったとき、または被験体の癌がグレード１もしくは２でありかつ生物学的試料中のＨＥＲ２の量がＨＥＲ２のカットオフを上回ったときと比較して、被験体は、脳への転移の約５．７分の１に減少したリスクを有する。

【００６７】

下記に記載する実施形態は、本明細書に記載する方法のそれぞれの態様である。

【００６８】

いくつかの実施形態では、被験体の癌は、ＨＥＲ２遺伝子の発現レベルの上昇、ＨＥＲ２タンパク質のレベル、またはＨＥＲ２遺伝子の増幅に基づいて、ＨＥＲ２陽性であることが特徴付けられている。いくつかの実施形態では、被験体の癌は、乳癌を含む。特定の実施形態では、被験体の癌は、原発性乳癌を含む。いくつかの実施形態では、ＨＥＲ２遺伝子の増幅を、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）により決定する。特定の実施形態では、ＨＥＲ２タンパク質のレベルを、イムノアッセイにより決定する。特定の実施形態では、ＨＥＲ２タンパク質のレベルを、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイにより決定する。いくつかの実施形態では、ＨＥＲ２遺伝子の増幅を、ＨＥＲ２のｍＲＮＡレベルの定量化により決定する。

【００６９】

特定の実施形態では、被験体は、血液脳関門を横断しないＨＥＲ２作用剤を用いる治療を受けている。いくつかの実施形態では、ＨＥＲ２作用剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、トラスツズマブ、ペルツズマブ、エルツマキソマブ、トラスツズマブエムタンシン（tratuzumab　emtansine）および／またはＭＭ－１１１である。いくつかの実施形態では、ＨＥＲ２作用剤は、単鎖抗体、抗体断片（例えば、Ｆａｂ断片）、または抗原に結合することができる遺伝子工学的に作製されたタンパク質（例えば、Ａｆｆｙｂｏｄｙ（商標）、Ａｄｎｅｃｔｉｎ（商標）、モノボディ、改変されたＦｃ領域断片、イムノアドヘシン分子、もしくはその他のそのような分子）を含む。

【００７０】

いくつかの実施形態では、第２の形態の癌治療は、ＨＥＲ２標的化低分子薬物、化学療法および／または放射線療法を含む。特定の実施形態では、ＨＥＲ２標的化低分子薬物は、例えば、ラパチニブ、ネラチニブ、ＡＺＤ８９３１、ＡＲＲＹ－３８０、ＰＦ２９９、アファチニブ、ペリチニブ、Ｓ－２２２６１１またはＡＥＥ－７８８等の疎水性分子を含む。いくつかの実施形態では、その他の疎水性低分子薬物が適切である。いくつかの実施形態では、第２の形態の癌治療は、ＨＥＲ２に結合するタンパク質に結合する低分子薬物を含む。例えば、いくつかの実施形態では、低分子薬物は、例えば、１７－ＡＡＧまたはＩＰＩ－５０４等のＨＳＰ９０に結合する薬物を含む。

【００７１】

本発明の方法により、被験体から得られた生物学的試料中のＨＥＲ２および／またはｐ９５の量に基づいて、被験体をリスクのサブグループに分類することを可能にするための定量的なＨＥＲ２およびｐ９５のカットオフの同定が可能になる。またその上、本発明の方法により、全体としての被験体集団に関する被験体のリスクの、ＨＥＲ２および／またはｐ９５の定量的測定による特徴付けも可能になる。

【００７２】

本明細書において開示する方法のそれぞれについて、そうした方法は、ＨＥＲ２のカットオフおよび／またはｐ９５のカットオフを決定するステップさらに含むことができる。いくつかの実施形態では、ＨＥＲ２のカットオフおよび／またはｐ９５のカットオフを、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイを使用して決定する。特定の実施形態では、ＨＥＲ２のカットオフおよび／またはｐ９５のカットオフを、当技術分野で公知の定量化のその他の方法（例えば、本明細書に開示するようなｍＲＮＡの定量化、イムノアッセイ等）を使用して決定する。本発明の態様では、生物学的試料中のＨＥＲ２タンパク質の量を測定するステップおよびＨＥＲ２のカットオフを決定するステップの両方が、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイの使用を含む場合、ＨＥＲ２のカットオフは、明確に異なる計測値であって、被験体の癌を、ＨＥＲ２陽性であると特徴付けるために使用される計測値よりも高い計測値を含む。

【００７３】

いくつかの実施形態では、ＨＥＲ２のカットオフは、（ｉ）ＨＥＲ２陽性乳癌を有する

被験体の参照集団において決定されるＨＥＲ２の量の中央値、または（ｉｉ）ＨＥＲ２陽性乳癌を有する被験体の参照集団において決定される、ＨＥＲ２の最適化された量の少なくとも１つを含む。いくつかの実施形態では、ＨＥＲ２のカットオフを、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイにより決定する。特定の実施形態では、ＨＥＲ２の最適化された量（最適化されたカットオフ）は、５０ＲＦ／ｍｍ^{2}である。特定の実施形態では、ＨＥＲ２のカットオフは、５８ＲＦ／ｍｍ^{2}である。いくつかの実施形態では、ｐ９５のカットオフは、（ｉ）ＨＥＲ２陽性乳癌を有する被験体の参照集団において決定されるｐ９５の量の中央値、または（ｉｉ）ＨＥＲ２陽性乳癌を有する被験体の参照集団において決定される、ｐ９５の最適化された量の少なくとも１つを含む。いくつかの実施形態では、ｐ９５のカットオフを、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイにより決定する。特定の実施形態では、ｐ９５の最適化された量（最適化されたカットオフ）は、２．８ＲＦ／ｍｍ^{2}である。いくつかの実施形態では、ＨＥＲ２陽性乳癌を有する被験体の参照集団は、血液脳関門を横断しないＨＥＲ２作用剤を用いる治療を受けている。

【００７４】

特定の実施形態では、癌を有する被験体から得られた生物学的試料を、切断可能な連結により結合性化合物に付着する分子タグ、および切断誘導部分を有する切断性プローブを有する結合性化合物と接触させ、分子タグが放出されるかどうか、およびどのような分子タグが放出されるかを検出することによって、存在するＨＥＲ２タンパク質の量を決定する。いくつかの実施形態を、ＨＥＲｍａｒｋ（登録商標）アッセイと呼ぶことができる（例えば、図１Ａおよび２Ａを参照されたい）。ＨＥＲｍａｒｋ（登録商標）アッセイは、ＨＥＲ２タンパク質上の異なる特有のエピトープに特異的な２つのモノクローナル抗体を使用する。このことにより、両方の抗体が同じＨＥＲ２受容体に密接に近接して結合することが可能になる。蛍光ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）レポーター分子（「タグ」）を、ＨＥＲ２に特異的なモノクローナル抗体にコンジュゲートする。第２のＨＥＲ２特異的モノクローナル抗体を、ビオチンにコンジュゲートし、次いで、これを、光感受性物質分子（ＰＭ）に連結する。特定の波長において試料を光活性化すると、ＰＭが活性化されて、一重項酸素を発生させる。一重項酸素は、密接に近接しているＶｅｒａＴａｇ（登録商標）レポーターを切断することができる。例えば、図２Ｃを参照されたい。放出されたＶｅｒａＴａｇ（登録商標）レポーターを、収集し、続いて、標準的なキャピラリー電気泳動を使用して定量化する。切断されたＶｅｒａＴａｇ（登録商標）レポーターの量は、試料中のＨＥＲ２の濃度に比例する。

【００７５】

特定の実施形態では、結合性化合物および切断性プローブがそれぞれ、ＨＥＲ２に特異的に結合する。特定の実施形態では、切断性プローブおよび結合性プローブの両方が、同じエピトープに結合することはない。例えば、図１Ａおよび２Ａを参照されたい。いくつかの実施形態では、切断性プローブおよび結合性プローブの両方が、同じエピトープに結合する。例えば、図２Ｂを参照されたい。特定の実施形態では、結合性化合物が、切断性プローブの切断誘導部分の有効近接度の範囲内にある場合、切断誘導部分により、切断可能なリンカーが切断され、その結果、分子タグが放出される。いくつかの実施形態では、試料中のＨＥＲ２の量を、ＨＥＲ２に特異的な第１の結合性化合物および第１の結合性化合物に特異的な第２の結合性化合物を使用して決定し、第２の結合性化合物は、それに付着する１つまたは複数の分子プローブを含む。特定の実施形態では、分子プローブは、切断可能な連結を介して付着する。いくつかの実施形態では、切断可能な連結は、還元剤により切断される。例えば、いくつかの実施形態では、還元剤は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）を含む。例えば、図１Ｂを参照されたい。ＨＥＲ２および／またはＨＥＲ２ホモダイマーの総量を検出するためのアッセイによるＨＥＲ２の検出の例が、共同所有の米国特許出願公開第２００９／０１９１５５９号、第２０１０／０１４３９２７号、第２０１０／０２１００３４号および第２０１０／０２３３７３２号に提供されており、それらの全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【００７６】

特定の実施形態では、試料中のｐ９５の量を、ｐ９５、またはｐ９５もしくはｐ９５複合体に結合する分析対象に結合することが可能である近接プローブを使用して決定し、近接プローブは、有効近接度を有し、１つまたは複数の分子プローブが付着しており、近接プローブが、有効近接度の範囲内にある結合性化合物に結合すると、分子プローブからシグナルが発生し、このシグナルは、ｐ９５またはｐ９５複合体の存在および／または分量と相関する。近接プローブおよび／または結合性化合物は、抗体をさらに含むことができる。

【００７７】

いくつかの実施形態では、試料中のｐ９５の量を、完全長のＨＥＲ２ではなく、ｐ９５に特異的な第１の結合性化合物および第１の結合性化合物に特異的な第２の結合性化合物を使用して決定し、第２の結合性化合物は、それに付着する１つまたは複数の分子プローブを含む。特定の実施形態では、分子プローブは、切断可能な連結を介して付着する。いくつかの実施形態では、切断可能な連結は、還元剤により切断される。例えば、いくつかの実施形態では、還元剤は、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）を含む。例えば、図１Ｂを参照されたい。ｐ９５の検出の例が、共同所有の米国特許出願公開第２０１０／０１４３９２７号および第２０１０／０２１００３４号に提供されている。

【００７８】

近接アッセイは、分子複合体の生物学的役割を理解するためにも、バイオマーカーの研究においても、有用性を増している。例えば、標的タンパク質に特異的に結合する結合性化合物を、多くの異なる検出系とカップリングさせて、標的タンパク質の存在および／または分量を測定することができる。標的タンパク質の量を決定するのに有用である、当業者に公知の任意の方法を、本発明に従って使用することができる。そのような方法として、これらに限定されないが、フェルスター共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）、生物発光共鳴エネルギー移動（ＢＲＥＴ）、生体分子蛍光補完、近接ライゲーションアッセイ（ＰＬＡ）、シンチレーション近接アッセイ（ＳＰＡ）、および、例えばＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイを含めた、標的タンパク質特異的抗体を用いるイムノアッセイ、または当業者に周知である任意のその他の方法が挙げられる。

【００７９】

放出可能な分子タグを使用してＨＥＲ２およびｐ９５を測定することによって、多くの利点がもたらされ、それらには、バックグラウンドの大幅な低下および感度の顕著な向上をもたらす、アッセイ混合物から放出された分子タグの分離、ならびに好都合な多重化能力をもたらし、その結果、複数の受容体複合体構成成分を、同じアッセイ中で同時に容易に測定することができる、分離および検出が含まれる。そのようなタグを利用するアッセイは、多様な形態を有し得、以下の参考文献、すなわち、米国特許第７，１０５，３０８号；第６，６２７，４００号；第７，４０２，３９７号；第７，４０２，３９８号および第７，４０２，３９９号、ならびに国際公開第２００４／０１１９００号に開示されており、それらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。分離される分子の間の１つまたは複数の物理的、化学的または光学的な差に基づいて、分子を区別することができる、多種多様な分離技法を利用することができ、それらの差は、電気泳動移動度、分子量、形状、溶解性、ｐＫａ、疎水性、電荷、電荷／質量の比、または極性を含む。一実施形態では、複数またはセットの分子タグは、電気泳動移動度および光学的な検出の特徴の点で異なり、電気泳動により分離される。別の実施形態では、複数またはセットの分子タグは、分子量、形状、溶解性、ｐＫａ、疎水性、電荷、極性の点で異なる場合があり、順相もしくは逆相のＨＰＬＣ、イオン交換ＨＰＬＣ、キャピラリー電気クロマトグラフィー、質量分析または気相クロマトグラフィーにより分離される。

【００８０】

結合性化合物から放出された後に、分離の技法により、明確に異なるバンドまたはピークに分離され得る分子タグのセットを用意する。そのようなピークの同定および定量化により、ｐ９５の存在および／または量の尺度またはプロファイルが得られる。セット内の分子タグは、化学的に多種多様であり得る。しかし、好都合には、分子タグのセットは通

常、化学的に関連する。例えば、分子タグは全て、ペプチドであってもよく、または分子タグは、基本的に同じ構成ブロックもしくは単量体の異なる組合せからなってもよく、または分子タグを、異なる置換基を有する、基本的に同じ骨格を使用して合成して、異なる分離の特徴をもたらしてもよい。複数の分子タグの数を、利用する分離モード、検出のために分子タグ上で使用する標識、結合性部分の感度、および切断可能な連結が切断される効率を含めた、いくつかの要因に応じて変化させることができる。

【００８１】

本発明は、ＨＥＲ作用剤に関する。例えば、ＨＥＲ２作用剤は、当業者に公知の任意のそのような薬剤であり得る。特定の実施形態では、ＨＥＲ２作用剤は、ペルツズマブ、トラスツズマブ、エルツマキソマブ、１７－ＡＡＧ、ＩＰＩ－５０４、ネラチニブ、ＡＺＤ８９３１、ＡＲＲＹ－３８０、ＰＦ２９９、アファチニブ、ペリチニブ、Ｓ－２２２６１１、ＡＥＥ－７８８およびラパチニブからなる群から選択される。好ましい実施形態では、ＨＥＲ２作用剤は、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））である。例えば、Goldenberg、１９９９年、Clin Ther.２１巻：３０９～１８頁；およびShak、１９９９年、Semin Oncol.２６巻：７１～７頁を参照されたい。また、その他のＨＥＲ２作用剤を、本明細書に記載する方法を使用して評価することもできる。

【００８２】

バイオマーカーとして使用するのに適しているＨＥＲ２および／またはＨＥＲ２ホモダイマーを含有する試料は、細胞培養、動物または植物の組織、患者の生検等を含めた、多種多様な供給源から得ることができる。好ましくは、試料は、ヒト患者の試料である。本発明のアッセイのために、従来の技法を使用して試料を調製し、使用する方法は、試料を採取する供給源に依存する場合がある。生検および医学的検体については、手引きが、以下の参考文献から得られる：Theory and Practice of Histological Techniques、１９７７年（Bancroft JD & Stevens A、編）、Churchill Livingstone、Edinburgh；Pearse、１９８０年、Histochemistry、Theory and applied.４版、Churchill Livingstone、Edinburgh。

【００８３】

癌性疾患の状態の領域中の使用することができる患者の組織試料の例には、これらに限定されないが、乳房、前立腺、卵巣、結腸、肺、子宮内膜、胃、唾液腺または膵臓がある。組織試料を、外科的切除、吸引または生検を含めた、多様な手順により得ることができる。組織は、新鮮組織または凍結組織であり得る。一実施形態では、本発明のアッセイを、パラフィン中に固定し、包埋してある組織試料に対して実施し、脱パラフィンのステップを実施する。組織試料を、従来の方法により固定する（すなわち、保存する）ことができる。例えば、Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology、１９６０年、３版（Lee G. Luna、HT(ASCP)編）、The Blakston Division McGraw-Hill Book Company、New York；The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology、１９９４年（Ulreka V. Mikel編）、Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology、Washington, D.C.を参照されたい。当業者であれば、組織を組織学的に染色するまたは別の方法により解析する目的により、固定液の選択が決定されることを理解できる。また、当業者であれば、固定する長さが組織試料のサイズおよび使用する固定液に依存することも理解できる。

【００８４】

一般に、組織試料を最初に、固定し、次いで、アルコールを、濃度を上げて用いて脱水し、組織試料を切片化することができるように、パラフィンまたはその他の切片作製媒体を用いて、浸透および包埋を行う。それに代わって、組織を切片化し、得られた切片を固定してもよい。例として、上記に示した参考文献に記載されている従来の技法に従って、従来の方法により、組織試料を、パラフィン中に包埋し、処理することができる。使用することができるパラフィンの例として、これらに限定されないが、Ｐａｒａｐｌａｓｔ（登録商標）、Ｂｒｏｌｏｉｄ（登録商標）およびＴｉｓｓｕｅｍａｙ（登録商標）が挙げ

られる。組織試料を包埋したら、試料は、従来の技法に従ってミクロトームにより切片化することができる。切片は、約３ミクロン～約１２ミクロンの範囲の厚さ、好ましくは、約５ミクロン～約１０ミクロンの範囲の厚さを有し得る。一態様では、切片は、約１０ｍｍ^2～約１ｃｍ^{2}の表面積を有し得る。切片を、切断したら、いくつかの標準的な方法によりスライドに付着させることができる。スライドへの接着剤の例として、これらに限定されないが、シラン、ゼラチンおよびポリ－Ｌ－リジンが挙げられる。パラフィン包埋切片を、正に荷電しているスライドおよび／またはポリ－Ｌ－リジンでコーティングされているスライドに付着させることができる。

【００８５】

パラフィンを包埋材料として使用している場合、一般に、組織切片を、脱パラフィンし、再水和してから、バイオマーカーを検出する。いくつかの従来の標準的な方法により、組織切片を脱パラフィンすることができる。例えば、上記に示した参考文献に記載されている従来の技法に従って、キシレン、およびアルコールを、濃度を徐々に下げて使用することができる。それに代わって、商業的に入手可能な脱パラフィン用の非有機薬剤、例として、Ｈｅｍｏ－Ｄｅ（登録商標）（ＣＭＳ、Ｈｏｕｓｔｏｎ、ＴＸ）を使用してもよい。

【００８６】

哺乳動物の組織培養細胞または新鮮組織もしくは凍結組織を、従来の細胞溶解の技法（例えば、０．１４Ｍ ＮａＣｌ、１．５ｍＭ $MgCl_2$、１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－Ｃｌ（ｐＨ８．６）、０．５％Ｎｏｎｉｄｅｔ Ｐ－４０、ならびに必要に応じて、プロテアーゼ阻害剤および／またはホスファターゼ阻害剤）により調製することができる。新鮮な哺乳動物組織については、試料調製はまた、組織を脱凝集させる、例として、破砕する、刻む、挽く、または超音波処理するステップも含むことができる。

【００８７】

二量体集団を、放出可能な分子タグを使用して測定することによって、多くの利点がもたらされ、それらには、（１）アッセイ混合物から放出された分子タグの分離により、バックグラウンドの大幅な低下および感度の顕著な向上がもたらされること；ならびに（２）分離および検出の簡便性のために特別に設計されている分子タグの使用により、好都合な多重化能力がもたらされ、その結果、複数の受容体複合体構成成分を、同じアッセイ中で同時に容易に測定することができることが含まれる。そのようなタグを利用するアッセイは、多様な形態を有し得、以下の参考文献、すなわち、米国特許第６，６２７，４００号、第６，６７３，５５０号、第６，９４９，３４７号、第７，１０５，３０８号；米国特許出願公開第２００９／０１９１５５９号；および国際公開第２００４／０１１９００号に開示されており、それらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。例えば、分離される分子の間の１つまたは複数の物理的、化学的または光学的な差に基づいて、分子を区別することができる、多種多様な分離技法を利用することができ、それらの差は、電気泳動移動度、分子量、形状、溶解性、ｐＫａ、疎水性、電荷、電荷／質量の比、または極性を含む。一態様では、複数またはセットの分子タグは、電気泳動移動度および光学的な検出の特徴の点で異なり、電気泳動により分離される。別の態様では、複数またはセットの分子タグは、分子量、形状、溶解性、ｐＫａ、疎水性、電荷または極性の点で異なる場合があり、順相もしくは逆相のＨＰＬＣ、イオン交換ＨＰＬＣ、キャピラリー電気クロマトグラフィー、質量分析または気相クロマトグラフィーにより分離される。

【００８８】

結合性化合物から放出された後に、分離の技法により、明確に異なるバンドまたはピークに分離され得る分子タグのセットを提供する。そのようなピークの同定および定量化により、受容体の二量体の存在および／または量の尺度またはプロファイルが得られる。セット内の分子タグは、化学的に多種多様であり得る。しかし、好都合には、分子タグのセットは通常、化学的に関連する。例えば、分子タグは全て、ペプチドであってもよく、または分子タグは、基本的に同じ構成ブロックもしくは単量体の異なる組合せからなっても

よく、または分子タグを、異なる置換基を有する、基本的に同じ骨格を使用して合成して、異なる分離の特徴をもたらしてもよい。複数の分子タグの数を、利用する分離モード、検出のために分子タグ上で使用する標識、結合性部分の感度、および切断可能な連結が切断される効率を含めた、いくつかの要因に応じて変化させることができる。

【００８９】

組織試料から直接得た測定値を、試料中の細胞の総数、および／または試料中の特定のサブタイプの細胞の数を代表する細胞標的または組織標的からの測定値を含めることによって正規化することができる。かなりの画分の正常細胞を含む場合がある患者試料、特に、腫瘍試料中の、細胞および組織の不均一性に起因して、追加の測定値が、好ましい場合があり、または必要である場合もある。

【００９０】

上記で言及したように、複数の異なる結合性化合物を含有する混合物を提供することができ、それぞれの異なる結合性化合物が、切断可能な連結を通して付着する１つまたは複数の分子タグを有する。結合性化合物、切断可能な連結および分子タグの性質を、広く変化させることができる。結合性化合物は、結合性抗体組成物、抗体、ペプチド、細胞表面受容体に対するペプチドもしくは非ペプチドのリガンド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、オリゴヌクレオチド類似体、例として、ペプチド核酸、レクチン、あるいは標的のタンパク質または分子に特異的に結合することまたは目的の分析対象、例として、ＨＥＲ２ホモダイマーと安定な複合体を形成することが可能である任意のその他の分子実体を含むことができる。一態様では、結合性化合物を、以下の式により表すことができる。

$$B-(L-E)_k$$

【００９１】

式中、Ｂは、結合性部分であり、Ｌは、切断可能な連結であり、Ｅは、分子タグである。均一アッセイでは、切断可能な連結Ｌは、酸化に不安定な連結であり得、より好ましくは、一重項酸素により切断され得る連結である。部分「$-(L-E)_k$」は、単一の結合性化合物が、切断可能な連結を介して付着する複数の分子タグを有し得ることを示す。一態様では、ｋは、１以上の整数であるが、その他の実施形態では、ｋは、数百超、例えば、１００～５００であってよく、またはｋは、数百超から数千程度まで、例えば、５００～５０００である。通常、複数の異なるタイプの結合性化合物のそれぞれが、異なる分子タグＥを有する。切断可能な連結、例えば、酸化に不安定な連結、および分子タグＥが、従来の化学的様式により、Ｂに付着する。

【００９２】

好ましくは、Ｂは、標的、例として、ＨＥＲ２上の抗原決定基に特異的に結合する結合性抗体組成物である。ＨＥＲ２エピトープに特異的な抗体を、本明細書に記載する例に示す。抗体組成物は、モノクローナルまたはポリクローナルのいずれかの、多種多様な市販されている抗体から容易に形成される。特に、上皮増殖因子受容体に特異的な抗体は、米国特許第５，６７７，１７１号；第５，７７２，９９７号；第５，９６８，５１１号；第５，４８０，９６８号；および第５，８１１，０９８号に開示されており、それらはそれぞれ、その全体が参照により組み込まれる。全体がまた、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第５，５９９，６８１号は、タンパク質のリン酸化部位に特異的な抗体を開示している。また、市販供給元、例として、Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ）、Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ（Ｃａｍａｒｉｌｌｏ、ＣＡ）、およびＵｐｓｔａｔｅ（Ｃｈａｒｌｏｔｔｅｓｖｉｌｌｅ、ＶＡ）が、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を提供している。

【００９３】

切断可能な連結Ｌは事実上、放出される分子タグＥの構造を分解せず、放出される分子タグＥの検出の特徴に影響を及ぼさない条件下で切断され得る、いずれの化学的連結基であってもよい。切断性プローブを均一アッセイフォーマットで使用する場合は常に、切断性プローブに極めて近接する切断可能な連結のみが切断されるような短い距離にわたり作用する切断性プローブが生成する切断剤により、切断可能な連結Ｌが切断される。典型的

には、そのような薬剤を、反応混合物に物理的または化学的な変化をもたらすことによって活性化しなければならず、その結果、薬剤が、切断可能な連結まで拡散して、切断をもたらす短命の活性種を発生させる。均一フォーマットでは、切断剤を、好ましくは、結合性部分、例として、抗体に付着させ、この結合性部分は、活性化の前に、切断剤を、放出可能な分子タグを有する結合性化合物の付近の、標的である特定の部位に差し向ける。そのような実施形態において、切断剤を、本明細書では「切断誘導部分」と呼ぶ。例示的な連結の切断を、図２Ｃに示す。

【００９４】

非均一フォーマットでは、特異的に結合している結合性化合物を、未結合の結合性化合物から分離するので、切断可能な連結および切断剤をより広くから選択して、使用し得る。切断可能な連結は、局所に作用する反応性の種、例として、過酸化水素、一重項酸素等との反応に対して不安定である連結のみならず、また、反応混合物全体に働く薬剤に対して不安定である連結、例として、塩基に不安定な連結、光により切断可能な連結、還元により切断可能な連結、酸化により切断される連結、酸に不安定な連結、および特定のプロテアーゼにより切断可能なペプチド連結も含むことができる。多くのそのような連結について記載している参考文献として、GreeneおよびWuts、１９９１年、Protective Groups in Organic Synthesis、Second Edition、John Wiley & Sons、New York；Hermanson、１９９６年、Bioconjugate Techniques、Academic Press、New York；および米国特許第５，５６５，３２４号が挙げられる。

【００９５】

一態様では、商業的に入手可能な、切断可能な試薬系を、本発明に関して利用することができる。例えば、Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）等の供給元から入手可能なヘテロ官能性の薬剤、例として、Ｎ－サクシニミジル３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート（ＳＰＤＰ）、サクシニミジルオキシカルボニル－α－メチル－α－（２－ピリジルジチオ）トルエン（ＳＭＰＴ）等を使用して、ジスルフィド連結を、結合性抗体組成物と分子タグとの間に導入することができる。そのような連結により導入されたジスルフィド結合は、還元剤、例として、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）、ジチオエリスリトール（ＤＴＥ）、２－メルカプトエタノールまたは水素化ホウ素ナトリウムを用いて処理することによって壊すことができる。ジスルフィド結合の切断をもたらすための、還元剤の典型的な濃度は、１０～１００ｍＭの範囲である。酸化的に不安定な連結を、結合性抗体組成物と分子タグとの間に、ホモ二官能性ＮＨＳエステル架橋結合試薬である酒石酸ジサクシニミジル（ＤＳＴ）（Ｐｉｅｒｃｅから入手可能）を使用して導入することができ、この試薬は、過ヨウ素酸ナトリウム（例えば、生理的ｐＨの１５ｍＭ過ヨウ素酸塩、４時間）により切断されやすいシス－ジオール中心を含有する。エステル化されたスペーサー構成成分を含有する連結を、強力な求核性の薬剤、例として、ヒドロキシルアミンを用いて、例えば、０．１Ｎヒドロキシルアミン、ｐＨ８．５、３～６時間、３７℃で切断することができる。そのようなスペーサーを、ホモ二官能性の架橋結合剤、例として、Ｐｉｅｒｃｅ（Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ）から入手可能なエチレングリコールビス（サクシニミジルサクシネート）（ＥＧＳ）により導入することができる。塩基に不安定な連結を、スルホン基を用いて導入することができる。切断可能な連結中にスルホン基を導入するために使用することができるホモ二官能性の架橋結合剤は、ビス［２－（サクシニミジルオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（ＢＳＯＣＯＥＳ）、および４，４－ジフルオロ－３，３－ジニトロフェニルスルホン（ＤＦＤＮＰＳ）を含む。切断のための例示的な塩基性条件は、６Ｍ尿素、０．１％ＳＤＳおよび２ｍＭＤＴＴを含有するＴｒｉｓ塩基の添加によりｐＨ１１．６に調節した０．１Ｍリン酸ナトリウムの、３７℃での２時間のインキュベーションを含む。また、光により切断可能な連結は、米国特許第５，９８６，０７６号に開示されているものを含む。

【００９６】

Ｌが、酸化に不安定である場合、Ｌは、チオエーテルもしくはそのセレニウム類似体；または炭素間の二重結合を含有するオレフィンであり得、二重結合がオキソ基に切断され

ると、分子タグＥが放出される。例示的な、酸化に不安定な連結が、米国特許第５，６２２，９２９号、第６，６２７，４００号および第６，９４９，３４７号に開示されており、それらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００９７】

本発明における分子タグＥは、複数の分子タグの分離を、ガスクロマトグラフィーまたは質量分析により実施する場合の、以下の参考文献に記載されているような電気泳動タグを含むことができる：例えば、Zhangら、２００２年、Bioconjugate Chem.、１３巻：１００２～１０１２頁；Giese、１９８３年、Anal. Chem.、２巻：１６５～１６８頁；ならびに米国特許第４，６５０，７５０号；第５，３６０，８１９号；第５，５１６，９３１号；および第５，６０２，２７３号を参照されたい。それらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【００９８】

分子タグＥは、好ましくは、活性種、とりわけ、一重項酸素に関して安定であり、検出基またはレポーター基を含む水溶性の有機化合物である。これ以外には、Ｅは、サイズおよび構造において広く変化させることができる。一態様では、Ｅは、約５０～約２５００ダルトン、より好ましくは、約５０～約１５００ダルトンの範囲の分子量を有する。Ｅは、電気化学的シグナル、蛍光シグナルまたは発色性シグナルを発生させるための検出基を含むことができる。質量による検出を利用する実施形態では、Ｅは、検出の目的の別個の部分を有さない場合がある。好ましくは、検出基は、蛍光シグナルを発生させる。例示的な分子タグ（Ｐｒｏ１１）を、図２に示す。

【００９９】

複数ある分子タグを、それぞれが、その他の同種複数のメンバーに比して特有の分離の特徴および／または特有の光学的特性を有するように選択する。一態様では、クロマトグラフィーまたは電気泳動の分離の特徴は、当技術分野に従来からある一連の標準的な分離条件、例えば、電圧、カラムの圧力、カラムのタイプ、移動相または電気泳動の分離媒体の下での保持時間である。別の態様では、光学的特性は、蛍光特性、例として、発光スペクトル、蛍光寿命、または所与の波長もしくは波長帯における蛍光強度である。好ましくは、蛍光特性は、蛍光強度である。例えば、複数の分子タグのそれぞれが、同じ蛍光の発光特性を有する場合があるが、それぞれ、特有の保持時間によって相互に異なる。他方、複数のうちの１つまたは２つ以上の分子タグが、同一の遊走時間または保持時間を有する場合があるが、特有の蛍光特性、例えば、スペクトルにより分解可能な発光スペクトルを有し、したがって、複数のメンバーの全てが、分子分離および蛍光の測定値の組合せにより区別可能である。

【０１００】

好ましくは、放出された分子タグを、電気泳動による分離および検出基の蛍光により検出する。そのような実施形態では、実質的に同一の蛍光特性を有する分子タグが、異なる電気泳動移動度を有し、したがって、電気泳動図中に、明確に異なるピークを、分離条件下で形成する。好ましくは、本発明の複数の分子タグを、従来からあるキャピラリー電気泳動装置より、従来のふるいマトリックスを存在させてまたは存在させずに分離する。電気泳動による分離の間または後に、分離される化合物の蛍光シグナルおよび遊走時間（または遊走距離）を記録するか、または分子タグの相対的な蛍光および遊走の順番のチャートを（例えば、電気泳動図として）構築することによって、分子タグを検出または同定する。好ましくは、分子タグの存在、不在および／または量を、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２００３／０１７０７３４号が開示しているような１つまたは複数の標準物質を使用することによって測定する。

【０１０１】

また、複数の分子タグは、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第２００３／０２３５８３２号に開示されているような、分子量、形状、溶解性、ｐＫａ、疎水性、電荷、極性等を含む、１つまたは複数の物理学的特徴に基づくクロマトグラフィーにより分離するために設計することもできる。クロマトグラフィーによ

る分離の技法を、パラメータ、例として、カラムのタイプ、固相、移動相等に基づいて選択し、続いて、単回の運転中に、分離されて、明確に異なるピークまたはバンドを形成することができる複数の分子タグを選択する。いくつかの要因により、どのＨＰＬＣ技法を選択して、本発明において使用するかが決定され、それらの要因には、検出しようとする分子タグの数（すなわち、多さの程度）、アッセイで生成される各分子タグの推定分量、多重化アッセイで使用しようとするセットのための候補となる分子タグの合成の利用可能性および簡便性、利用する検出のモダリティ、ならびにＨＰＬＣ機器装備の運転、カラムおよび溶媒の利用可能性、ロバスト性、コストおよび簡便性が含まれる。一般に、一定限度の量の試料を分析するのに適しており、最も高い分解能での分離をもたらすカラムおよび技法が好まれる。そのような選択を行うための手引きを、文献、例えば、Snyderら、１９８８年、Practical HPLC Method Development、John Wiley & Sons、New York；Millner、１９９９年、High Resolution Chromatography: A Practical Approach、Oxford University Press、New York；Chi-San Wu、１９９９年、Column Handbook for Size Exclusion Chromatography、Academic Press、San Diego；およびOliver、１９８９年、HPLC of Macromolecules: A Practical Approach、Oxford University Press、Oxford、England等に見出すことができる。

一態様では、分子タグＥは、（Ｍ、Ｄ）であり、ここで、Ｍは移動度改変部分であり、Ｄは検出部分である。表記法「（Ｍ、Ｄ）」を使用して、Ｍの部分およびＤの部分の順番が、どちらの部分も、切断可能な連結Ｌに隣接し得る順番として表示することができることを示す。すなわち、「Ｂ－Ｌ－（Ｍ、Ｄ）」により、「Ｂ－Ｌ－Ｍ－Ｄ」または「Ｂ－Ｌ－Ｄ－Ｍ」の２つの形態の結合性化合物のどちらもが指定される。

【０１０２】

検出部分Ｄは、蛍光標識または蛍光染料、発色性標識もしくは発色性染料、または電気化学的標識であり得る。好ましくは、Ｄは、蛍光染料である。本発明に関して使用するための例示的な蛍光染料として、以下の参考文献に開示されているような水溶性のローダミン染料、フルオレセイン、４，７－ジクロロフルオレセイン、ベンゾキサンテン染料、およびエネルギー移動染料が挙げられる：Handbook of Molecular Probes and Research Reagents、８版、２００２年、Molecular Probes、Eugene、OR；米国特許第４，３１８，８４６号、第４，９９７，９２８号、第５，９４５，５２６号、第６，０９６，７２３号、第６，１９１，２７８号および第６，３７２，９０７号、ならびにLeeら、１９９７年、Nucleic Acids Research、２５巻：２８１６～２８２２頁。好ましくは、Ｄは、フルオレセインまたはフルオレセイン誘導体である。

【０１０３】

結合性化合物のそれぞれを、異なる分子タグにより別個に誘導体化したら、その他の結合性化合物と共にプールして、複数の結合性化合物を形成する。通常、結合性化合物の異なる種類がそれぞれ、組成物中に同じ比率で存在する。しかし、比率を、設計の選択として変化させることができ、したがって、１つまたはサブセットの特定の結合性化合物が、特定の実施形態またはアッセイについての望ましさまたは要件に応じて、より高いまたはより低い比率で存在する。そのような設計の選択に影響を及ぼし得る要因として、これらに限定されないが、特定の標的に対する抗体の親和性およびアビディティー、標的の相対的な存在率、分子タグの検出部分の蛍光の特徴等が挙げられる。

【０１０４】

切断誘導部分または切断剤は、切断可能な連結を、好ましくは、酸化により切断することが可能である活性種を発生させる基である。好ましくは、活性種は、短命の活性を示す化学種であり、したがって、その切断誘導作用が、それが発生した部位の付近のみに留まる。活性種が、本質的に短命であり、したがって、その創出に近接するバックグラウンドを上回る顕著なバックグラウンドが生み出されることもなく、活性種を効率的に捕捉する捕捉剤が利用され、したがって、活性種が利用可能になって、それが発生した部位から短い距離を超えて切断可能な連結と反応することもない。例示的な活性種として、一重項酸素、過酸化水素、ＮＡＤＨ、およびヒドロキシルラジカル、フェノキシラジカル、スーパ

ーオキシド等が挙げられる。酸化を引き起こす活性種のための例示的なクエンチャーとして、ポリエン、カロテノイド、ビタミンＥ、ビタミンＣ、チロシンの、アミノ酸－ピロールのＮ－コンジュゲート、ヒスチジン、およびグルタチオンが挙げられる。例えば、Beutnerら、２０００年、Meth. Enzymol.、３１９巻：２２６～２４１頁を参照されたい。

【０１０５】

切断誘導部分および切断可能な連結を利用するアッセイを設計する際の１つの検討事項は、それらが、受容体複合体に結合した場合、相互に十分に近く、切断誘導部分が発生させる活性種が、切断可能な連結を効率的に切断することができることである。一態様では、切断可能な連結は、好ましくは、結合している切断誘導部分から約１０００ｎｍの範囲内、好ましくは、約２０～２００ｎｍの範囲内にある。より好ましくは、一重項酸素を発生させる光感受性物質の切断誘導部分については、切断可能な連結が、受容体複合体中の光感受性物質から約２０～１００ｎｍの範囲内にある。切断誘導部分が、切断可能な連結を有効に切断する（すなわち、検出可能なシグナルを発生させるのに十分な分子タグを切断する）ことができる範囲を、本明細書では、その「有効近接度」と呼ぶ。当業者であれば、特定の感受性物質の有効近接度は、アッセイの特定の設計の詳細に依存する場合があり、日常的な実験により決定または改変することができることを認識できる。

【０１０６】

感受性物質は、反応性の中間体または種、通常、一重項酸素を発生させるように誘導することができる化合物である。好ましくは、本発明に従って使用する感受性物質は、光感受性物質である。本発明の範囲内に含まれるその他の感受性物質は、熱、光、電離放射線または化学的活性化により励起すると、一重項酸素の分子を放出する化合物である。このクラスの化合物の最も公知のメンバーには、エンドパーオキサイド、例として、１，４－ビスカルボキシエチル－１，４－ナフタレンエンドパーオキサイド、９，１０－ジフェニルアントラセン－９，１０－エンドパーオキサイド、および５，６，１１，１２－テトラフェニルナフタレン５，１２－エンドパーオキサイドがある。これらの化合物による、加熱によるまたは直接的な光の吸収によって、一重項酸素が放出される。さらなる感受性物質が、Di Mascioら、１９９４年、FEBS Lett.、３５５巻：２８７頁；およびKanofsky、１９８３年、J.Biol.Chem.、２５８巻：５９９１～５９９３頁；Pierlotら、２０００年、Meth. Enzymol.、３１９巻：３～２０頁により開示されている。

【０１０７】

光感受性物質を、共有結合性または非共有結合性の連結を介して、クラス特異的試薬の結合性の薬剤に直接的または間接的に付着することができる。そのような組成物を構築するため、特に、結合性の薬剤としての抗体についての手引きが、例えば、光線力学的療法、免疫診断等の分野における文献から入手可能である。例示的な手引きを、Ullmanら、１９９４年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、９１巻、５４２６～５４３０頁；Strongら、１９９４年、Ann. New York Acad. Sci.、７４５巻：２９７～３２０頁；Yarmushら、１９９３年、Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst.１０巻：１９７～２５２頁；ならびに米国特許第５，３４０，７１６号、第５，５１６，６３６号、第５，７０９，９９４号および第６，２５１，５８１号に見出すことができる。

【０１０８】

非常に多様な光源が、光感受性物質を光活性化させて、一重項酸素を発生させるために利用可能である。供給源が、実用的な持続時間の一重項酸素を十分に発生させるのに十分に強い限り、供給源は、多色性および単色性の両方を使用することができる。照射の長さは、光感受性物質の性質、切断可能な連結の性質、照射の供給源の出力、および試料から供給源までの距離に依存する。一般に、照射のための期間は、約１マイクロ秒未満～約１０分程度の長さ、通常、約１ミリ秒～約６０秒の範囲であり得る。照射の強度および長さは、少なくとも約０．１％の光感受性物質分子、通常、少なくとも約３０％の光感受性物質分子、好ましくは、実質的に全ての光感受性物質分子を励起するのに十分であるべきである。例示的な光源として、例えば、ヘリウム－ネオンレーザー、アルゴンレーザー、ＹＡＧレーザー、Ｈｅ／Ｃｄレーザー、およびルビーレーザー等のレーザー；光ダイオード

；水銀、ナトリウムおよびキセノンの蒸気ランプ；例えば、タングステン、およびタングステン／ハロゲン等の白熱灯、ならびに閃光灯が挙げられる。本発明の方法において使用するのに適している例示的な光活性化デバイスが、国際公開第０３／０５１６６９号に開示されている。そのような実施形態では、光活性化デバイスは、９６ウェルの平板中の全てのウェルの同時の照明が可能である筐体中にマウントされた発光ダイオード（ＬＥＤ）のアレイである。

【０１０９】

本発明において活用することができる光感受性物質の例は、上記の特性を有するものや、米国特許第５，５３６，８３４号、第５，７６３，６０２号、第５，５６５，５５２号、第５，７０９，９９４号、第５，３４０，７１６号、第５，５１６，６３６号、第６，２５１，５８１号および第６，００１，６７３号；公開欧州特許出願第０４８４０２７号；Martinら、１９９０年、Methods Enzymol.、１８６巻：６３５～６４５頁；ならびにYarmushら、１９９３年、Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst.１０巻：１９７～２５２頁により開示されているものである。感受性物質と同様、特定の実施形態では、光感受性物質も、支持体の表面に共有結合性もしくは非共有結合性に付着させるかまたは支持体の本体中に組み込むことによって、固相の支持体と結び付けることができる。一般に、光感受性物質を、必要な量の一重項酸素を達成するのに必要な量で、支持体と結び付ける。一般に、光感受性物質の量は、日常的な方法に従って実験的に決定される。

【０１１０】

一実施形態では、例えば、米国特許第５，７０９，９９４号および第６，３４６，３８４号；ならびに国際公開第０１／８４１５７号に開示されているように、光感受性物質をラテックス粒子中に組み込んで、光感受性物質のビーズを形成する。それに代わって、J. Amer. Chem. Soc.、９７巻：３７４１頁（１９７５年）に記載されているように、光感受性物質、例として、ローズベンガルを、０．５ミクロンのラテックスビーズに、エステル連結基をもたらすための、ラテックス上のクロロメチル基により共有結合性に付着させることによって、光感受性物質のビーズを調製することもできる。この反応は、例えば、ウェルの１つの壁、例えば、底部を形成するフィルターメンブレンを有する、従来からある９６ウェルまたは３８４ウェルのマイクロタイタープレート等中で実施することができ、フィルターメンブレンにより、真空の適用による試薬の除去が可能になる。結合性化合物の特異的な結合に必要な緩衝液が、一重項酸素の発生または分離のいずれかに必要な緩衝液とは異なる場合に、これにより、緩衝液の好都合な交換が可能になる。例えば、抗体に基づく結合性化合物の場合には、高い塩の緩衝液が必要である。放出されたタグの電気泳動による分離を利用する場合、次いで、緩衝液を、電気泳動に適しているより低い塩濃度を有する緩衝液で交換することによって、より良好な性能が達成される。

【０１１１】

例として、切断性プローブは、一次のハプテン化抗体、および複数の光感受性物質分子を用いて誘導体化した、二次の抗ハプテン結合性タンパク質を含むことができる。好ましい一次のハプテン化抗体は、ビオチン化抗体であり、好ましい二次の抗ハプテン結合性タンパク質は、抗ビオチン抗体またはストレプトアビジンのいずれかであり得る。そのような一次および二次の試薬のその他の組合せが、当技術分野で周知である。そのような試薬の例示的な組合せが、Haugland、２００２年、Handbook of Fluorescent Probes and Research Reagents、９版、Molecular Probes、Eugene、ORにより教示されている。そのような試薬の例示的な組合せを、下記に記載する。結合性化合物であって、放出可能なタグ（「mT_1」および「mT_2」）ならびにビオチンを用いて誘導体化した一次抗体を有する結合性化合物が、膜中の受容体の二量体の異なるエピトープに特異的に結合する。ビオチンに特異的な結合性タンパク質、例えば、ストレプトアビジンをビオチンに付着させると、複数の光感受性物質を、結合性化合物の有効近接度内にもってくる。また、ビオチンに特異的な結合性タンパク質は、抗ビオチン抗体であってもよく、光感受性物質を、従来からあるカップリング化学、例えば、Hermanson（上記）により、タンパク質上の遊離のアミン基を介して付着させてもよい。そのように使用するための例示的な光感受性

物質が、公開欧州特許出願第０５１０６８８号の開示に従って調製されるメチレンブルーのＮＨＳエステルである。

【０１１２】

方法ならびに特定の条件および材料についての以下の一般的な論述は、例証のためであり、制限するものではない。当業者であれば、どのように本明細書に記載する方法を、その他の適用例、特に、異なる試料、細胞型および標的複合体を使用する場合に適応させることができるかを理解できる。

【０１１３】

本発明の方法を実施する場合、試験される試料、結合性化合物、および場合により、切断性プローブを含めた、アッセイの構成成分の組合せを作製する。一般に、アッセイの構成成分は、任意の順番で組み合わせてよい。しかし、特定の適用例では、添加の順番に関連性がある場合がある。例えば、競合的結合を、例として、定量的アッセイにおいてモニターするのを望む場合がある。または、集合した複合体の安定性をモニターするのを望む場合がある。そのような適用例では、反応を、段階的に組み立てることができる。

【０１１４】

各試薬の量は一般に、実験的に決定することができる。存在する標的複合体の予測される数、ならびにアッセイのシグナルをモニターするために使用する分離および検出の手段により、アッセイにおいて使用する試料の量を決定する。一般に、結合性化合物および切断性プローブの量を、試料中の標的分子の予想される量に関して、モル過剰量、一般に、少なくとも約１．５、より望ましくは、約１０倍以上過剰なモル過剰量で提供することができる。特定の適用例では、使用する濃度は、結合性の薬剤の親和性および単一の細胞上に存在する標的分子の予想される数に応じて、より高くてもまたはより低くてもよい。化合物の、オリゴマー性の細胞表面複合体の形成に対する作用を決定する場合、モニターされる作用に応じて、プローブの添加の前に、それと同時に、またはその後に、化合物を細胞に添加することができる。

【０１１５】

アッセイ混合物を、プローブの、細胞表面分子に対する結合をもたらす条件下で、組み合わせ、インキュベートすることができ、通常、そうした条件は、一般に、約１０～２００ｍＭの範囲の濃度の緩衝液により維持される生理的ｐＨ（細胞を培養するｐＨに匹敵する）の水性媒体中である。従来からある緩衝液、および必要に応じて、その他の従来からある添加剤、例として、塩、増殖培地、安定化剤等を使用することができる。生理的なかつ一定の温度を通常利用する。インキュベーションの温度は、通例、約４°～７０℃、通常、約１５°～４５℃、より一般的に、約２５°～３７℃の範囲に及ぶ。

【０１１６】

アッセイ混合物の組立て、およびプローブを細胞表面分子に結合させるためのインキュベーションの後、切断剤を活性化させ、切断剤の有効近接度の範囲内にある結合性化合物から、タグを切断して、細胞表面から、対応するタグを溶液中に放出させるために、混合物を処理することができる。この処理の性質は、切断剤の作用機構に依存する。例えば、光感受性物質を、切断剤として利用する場合、切断の活性化は、使用する特定の感受性物質に適切な光の波長において、混合物に照射することを含むことができる。

【０１１７】

切断に続き、次いで、試料を分析して、放出されているタグの身元を決定することができる。複数の結合性化合物を利用するアッセイを利用する場合、放出されたタグの分離が一般に、それらの検出に先行する。分離のための方法および検出のための方法の両方が、アッセイのためのタグの設計のプロセス中に決定される。好ましい分離モードでは、電気泳動を利用し、この場合、種々のタグを、それらの電気泳動移動度の既知の差に基づいて分離する。

【０１１８】

上記で言及したように、いくつかの実施形態では、アッセイの反応条件が、利用する分離の技法を妨げることがある場合、分子タグの切断および分離の前に、アッセイの反応緩

衝液を除去または交換することが必要になる場合がある。例えば、アッセイの条件として、分子タグを電気泳動移動度に基づいて分離する場合の、分離性能を低下させる塩濃度（例えば、特異的な結合に必要な塩濃度）を挙げることができる。したがって、そのような高い塩の緩衝液を、例えば、分子タグの切断の前に、ろ過、吸引、希釈またはその他の手段を通して、除去し、電気泳動による分離に適している別の緩衝液で交換することができる。

【０１１９】

特定の実施形態では、被験体に、ＨＥＲ２作用剤を含む組合せ療法を投与することができる。いくつかの実施形態では、ＨＥＲ２作用剤は、トラスツズマブであり得る。組合せ療法は、トラスツズマブを、これらに限定されないが、当業者に公知の任意の化学療法剤のうちの１つまたは複数と組み合わせて含むことができる。好ましくは、化学療法剤は、トラスツズマブとは異なる作用機構を有する。例えば、化学療法剤は、抗代謝剤（例えば、５－フルオロウラシル（5-flourouricil）（５－ＦＵ）、メトトレキサート（ＭＴＸ）、フルダラビン等）、抗微小管剤（例えば、ビンクリスチン；ビンブラスチン；タキサン、例として、パクリタキセルおよびドセタキセル；等）、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、メルファラン、ビスクロロエチルニトロソウレア（bischloroethylnitrosurea）等）、白金剤（例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ＪＭ－２１６、ＣＩ－９７３等）、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン等）、抗生物質薬剤（例えば、マイトマイシン－Ｃ、アクチノマイシンＤ等）、トポイソメラーゼ阻害剤（例えば、エトポシド、カンプトセシン等）、または当業者に公知の任意のその他の化学療法剤であり得る。

【０１２０】

本発明の医薬組成物、投与剤形およびキットを含めた、本発明の種々の実施形態で使用することができる化学療法剤の特定の例として、これらに限定されないが、シタラビン、メルファラン、トポテカン、フルダラビン、エトポシド、イダルビシン、ダウノルビシン、ミトキサントロン、シスプラチン、パクリタキセルおよびシクロホスファミドが挙げられる。

【０１２１】

使用することができるその他の化学療法剤には、アバレリックス、アルデスロイキン、アレムツズマブ、アリトレチノイン、アロプリノール、アルトレタミン、アミホスチン、アナストロゾール、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、生存ＢＣＧ、ベバシズマブ（bevacizumab）、ベキサロテン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カルステロン、カンプトセシン、カペシタビン、カルボプラチン、カルムスチン、セレコキシブ、セツキシマブ、クロラムブシル、シナカルセト、シスプラチン、クラドリビン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダルベポエチンアルファ、ダウノルビシン、デニロイキンジフチトクス、デクスラゾキサン、ドセタキセル、ドキソルビシン、ドロモスタノロン、Ｅｌｌｉｏｔｔｓ　Ｂ溶液（Elliott's B solution）、エピルビシン、エポエチンアルファ、エストラムスチン、エトポシド、エキセメスタン、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、フルベストラント、ゲムシタビン、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、ゲフィチニブ、ゴセレリン、ヒドロキシ尿素、イブリツモマブチウキセタン、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、インターフェロンアルファ－２ａ、インターフェロンアルファ－２ｂ、イリノテカン、レトロゾール、ロイコボリン、レバミソール、ロムスチン、メクロレタミン（mechlorethamine）、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メトトレキサート、メトキサレン、メチルプレドニゾロン、マイトマイシンＣ、ミトタン、ミトキサントロン、ナンドロロン、ノフェツモマブ、オブリメルセン、オプレルベキン、オキサリプラチン、パクリタキセル、パミドロネート、ペガデマーゼ、ペグアスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、ペメトレキセド、ペントスタチン、ピポブロマン、プリカマイシン、ポリフェプロサン、ポルフィマー、プロカルバジン、キナクリン、ラスブリカーゼ、リツキシマブ、サルグラモスチム、ストレプトゾシン、タルク、タモキシフェン、タルセバ、テモゾロミ

ド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、トポテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレチノイン、ウラシルマスタード、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビンおよびゾレドロネートがある。

【０１２２】

特定の実施形態では、生物学的試料は、ＦＦＰＥを含む。特定の実施形態では、被験体の癌は、乳癌である。特定の実施形態では、乳癌は、転移性である。いくつかの実施形態では、乳癌は、早期乳癌である。いくつかの実施形態では、ＨＥＲ２作用剤に対して感受性を示し得る任意の癌をモニターすることができる。ＨＥＲ２作用剤は、任意のＨＥＲ２作用剤であり得る。特定の実施形態では、ＨＥＲ２作用剤は、本明細書に記載する薬剤のうちの１つである。例えば、特定の実施形態では、ＨＥＲ２作用剤は、トラスツズマブである。特定の実施形態では、化学療法剤は、パクリタキセルである。

【０１２３】

乳癌における、ＨＥＲ２およびｐ９５の重要性

乳癌は、脳における再発の目覚ましく高いリスクを有する悪性腫瘍に属する。Tsukada, Y.ら、Central nervous system metastasis from breast carcinoma、Autopsy study、Cancer５２巻：２３４９～２３５４頁（１９８３年）；Schouten, L.J.ら、Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma、Cancer９４巻：２６９８～２６７０５頁（２００２年）。乳癌に伴う脳への転移は、芳しくない予後と関連があり、生活の質に重大な影響を及ぼし、全身療法に対して比較的耐性である。脳における再発の特に高いリスクは、ＨＥＲ２遺伝子の過剰発現または増幅と関連がある。Hicks, D.G.ら、Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR、Am J Surg Pathol.３０巻：１０９７～１１０４頁（２００６年）；Gabos, Z.ら、Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer、J Clin Oncol.、２４巻：５６５８～５６６３頁（２００６年）；Gonzalez-Angulo, A.M.ら、Central nervous system metastases in patients with high-risk breast carcinoma after multimodality treatment、Cancer１０１巻：１７６０～１７６６頁（２００４年）。

【０１２４】

現時点では、ＨＥＲ２陽性乳癌患者における全身療法の標準的な構成成分は、ＨＥＲ２受容体の細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体であるトラスツズマブである。平均して、トラスツズマブの使用には、相当な無進行および全生存の利益が付随するが、わずかなＨＥＲ２陽性の転移性乳癌患者のみが、この薬剤に応答するに過ぎず、顕著な比率の応答者が、１年以内に再発する。Slamon, D.J.ら、Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2、N Engl J Med.、３４４巻：７８３～７９２頁（２００１年）；Burstein, H.J.ら、Trastuzumab plus vinorelbine or taxane chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: the trastuzumab and vinorelbine or taxane study、Cancer１１０巻：９６５～９７２頁（２００７年）；Marty, M.ら、Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: The M77001 Study Group、J Clin Oncol.、２３巻：４２６５～４２７４頁（２００５年）；Schaller, G.ら、Phase II study of capecitabine plus trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing metastatic breast cancer pretreated with anthracyclines or taxanes、J Clin Oncol.、２５巻：３２４６～３２５０頁（２００７年）；Robert, N.ら、Randomized phase III study of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin comp

ared with trastuzumab and paclitaxel in women with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer、J Clin Oncol.、２４巻：２７８６～２７９２頁（２００６年）。進行性乳癌患者において、ＨＥＲ２総量（Ｈ２Ｔ）レベルの増加が、トラスツズマブに対するより良好な応答、および進行までの時間の延長と関連があることが示されている。Lipton, A.ら、Quantitative HER2 protein levels predict outcome in fluorescence in situ hybridization-positive patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab、Cancer、１１６巻：５１６８～７８頁（２０１０年）；Toi, M.ら、Differential survival following trastuzumab treatment based on quantitative HER2 expression and HER2 homodimers in a clinic-based cohort of patients with metastatic breast cancer、BMC Cancer １０巻：５６頁（２０１０年）。

【０１２５】

重要なことには、トラスツズマブは、高分子量（１４５，０００Ｄａ）、ならびにその他の物理的および化学的な特性に起因して、血液脳関門を横断せず、脳への転移の予防および治療においては効果がない。Pestalozzi, B.C.およびBrignoli, S.、Trastuzumab in CSF、J. Clin. Oncol.１８巻：２３４９～２３５１頁（２０００年）；Stemmler, J.ら、V. Brain metastases in HER2-overexpressing metastatic breast cancer: comparative analysis of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid、J Clin Oncol.、２４巻：１５２５頁（２００６年）。

【０１２６】

しかし、ｐ９５は、トラスツズマブ結合部位を欠き、したがって、トラスツズマブ（tratuzumab）治療に対する抵抗性を付与すると考えられている、ＨＥＲ２の切断された形態である。Sperinde, J.ら、Clin. Cancer. Res.１６巻（１６号）：４２２６～４２３５頁（２０１０年）。早期のデータから、ｐ９５の存在が、リンパ節の関与の程度に相関することが示唆されており、因果関係、すなわち、ｐ９５のレベルが、腫瘍の汎発の結果であるのか、または腫瘍の汎発に好ましい環境に寄与するのかが問われている。Molinaら、Clin. Can. Res.、８巻：３４７～３５３頁（２００２年）を参照されたい。ＨＥＲ２の細胞内ドメイン（ＩＣＤ）の細胞下の局在化の間接的な測定を使用して、ＨＥＲ２のＩＣＤの細胞内分布が、トラスツズマブを含有する治療に対するＲＥＣＩＳＴ応答の低下と相関する傾向を示す（フィッシャー検定、ｐ＝０．０５７）ことが実証されており、ＨＥＲ２のＩＣＤの細胞内分布は、ｐ９５の発現と相関することも別個に示されている。Scaltritiら、J. Natl Cancer Inst.、９９巻：６２８～６３８頁（２００７年）。ｐ９５の抗体による直接的な検出を使用して、ｐ９５の発現が、無進行生存期間の低下（ＨＲ＝１．９；ｐ＝０．０１７）および全生存の低下（ＨＲ＝２．２；ｐ＝０．０１２）と相関することが見出された。Sperindeら、Clin. Cancer. Res.、１６巻（１６号）：４２２６～４２３５頁（２０１０年）。

【０１２７】

研究から、ＨＥＲ２陽性の進行性乳癌患者の３０～５０％において、脳における再発が発生し、年間リスクは、およそ１０％であることが示されている。例えば、Bendell, J.C.ら、Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma、Cancer、９７巻：２９７２～２９７７頁（２００３年）；Shmueli, E.ら、Central nervous system progression among patients with metastatic breast cancer responding to trastuzumab treatment、Eur J Cancer、４０巻：３７９～３８２頁（２００４年）；Clayton, A.J.ら、Incidence of cerebral metastases in patients treated with trastuzumab with trastuzumab for metastatic breast cancer、Br J Cancer、９１巻：６３９～６４３頁（２００４年）；Lai, R.ら、The risk of central nervous system metastases after trastuzumab therapy in patients with breast carcinoma、Cancer、１５巻：８１０～８１６頁（２００４年）；Lower, E.E.ら、Increased rate of brain metastases with trastuzumab therapy not associated with

impaired survival、Clin Breast Cancer、４巻：１１４～１１９頁（２００３年）；Burstein, H.J.ら、Isolated central nervous system metastases in patients with HER2 overexpressing advanced breast cancer treated with first-line trastuzumab based therapy、Ann Oncol.１６巻：１７７２～１７７７頁（２００５年）；Stemmler, H.J.ら、V. Characteristics of patients with brain metastases receiving trastuzumab for HER2 overexpressing metastatic breast cancer、Breast、１５巻：２１９～２２５頁（２００６年）；Gori, S.ら、Central nervous system metastases in HER-2 positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab: incidence, survival, and risk factors、Oncologist、１２巻：７６６～７７３頁（２００７年）；Duchnowska, R.ら、Risk factors for brain relapse in HER2-positive metastatic breast cancer patients、Breast Cancer Res Treat.、１１７巻：２９７～３０３頁（２００９年）を参照されたい。

【０１２８】

トラスツズマブの血液脳関門を通る貫通が損なわれることに起因して、脳への転移が、転移性の頭蓋外部位において応答性または安定な疾患を有する患者に頻繁に生じる。Nam, B.H.ら、Breast cancer subtypes and survival in patients with brain metastases、Breast Cancer Res.、１０巻：Ｒ２０頁（２００８年）；Eichler, A.F.ら、Survival in patients with brain metastases from breast cancer: the importance of HER-2 status、Cancer、１１２巻：２３５９～２３６７頁（２００８年）。他方、トラスツズマブ療法は、頭蓋外の転移性疾患のより良好な制御に起因して、脳における再発の発生を遅延させることが見出された。Dawood, S.ら、Defining prognosis for women with breast cancer and CNS metastases by HER2 status、Ann Oncol.、１９巻：１２４２～１２４８頁（２００８年）；Park, I.H.ら、Trastuzumab treatment beyond brain progression in HER2-positive metastatic breast cancer、Ann Oncol.２０巻：５６～６２頁（２００９年）。また、脳への進行の後にも継続したトラスツズマブを用いる治療の結果、生存期間の延長が生じる。Church, D.N.ら、Extended survival in women with brain metastases from HER2 overexpressing breast cancer、Am J Clin Oncol.、３１巻：２５０～２５４頁（２００８年）；Metro, G.ら、Clinical utility of continuing trastuzumab beyond brain progression in HER-2-positive metastatic breast cancer、Oncologist、１２巻：１４６７～１４６９頁（２００７年）。

【０１２９】

いくつかの遡及的研究では、ＨＥＲ２陽性の進行性乳癌患者において、脳における再発をもたらす傾向と関連がある臨床的および生物学的な特徴が探索されている。報告されている有害な要因は、内臓性疾患の存在、より若い年齢、閉経前状態、一次療法の後の短い無病間隔、および望ましくないホルモン受容体の状態を含んだ。しかし、特定の研究の結果は、一貫性がなく、これらの要因のいずれかにしろ、それらの組合せにしろ、脳における再発についての積極的な監視または潜在的な予防戦略から利益を得ることができる可能性があるＨＥＲ２陽性の進行性乳癌患者のサブセットの選択を可能にし得なかった。最近になって、乳癌患者の一般集団においても（Bos, P.D.ら、Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain、Nature、４５９巻：１００５～１００９頁（２００９年））、ＨＥＲ２陽性のサブセットにおいても（Duchnowska, R.ら、Gene expression analysis for prediction of early brain metastasis in HER2-positive breast cancer patients、J Clin Oncol.、２６巻（Ｓｕｐｐｌ．）：４５ｓ頁（２００８年））、いくつかの遺伝子の発現が、脳における再発の増加したリスクと関連があることが見出された。しかし、脳における再発を予測するためのロバストな分子サインが開発されるに至っていない。

【０１３０】

特許請求される本明細書に記載する方法を使用して、ＨＥＲ２またはｐ９５の比較的高

いレベルを有する被験体の同定を可能にすることによって、トラスツズマブ療法の間に、原発性腫瘍中のＨＥＲ２タンパク質またはｐ９５タンパク質を定量的に評価することにより、脳への転移が発生するリスクが特に高い、ＨＥＲ２陽性の進行性乳癌患者を同定することができることを初めて示すに至った。本明細書に記載する方法を使用して、ＨＥＲ２またはｐ９５の比較的高いレベルが、より短い、脳への転移までの時間（ＴＴＢＭ）と関連があることを決定するに至った。とりわけ、多変量モデルにおいては、ＨＥＲ２およびｐ９５の定量的測定、腫瘍のグレード、ならびに遠隔性の進行までの時間だけが、脳における再発の予測因子であり、Ｈ２Ｔ、および遠隔性の進行までの時間のみが、ＦＩＳＨにより評価した場合の最も厳密に選択したサブセットのＨＥＲ－２＿患者における、この事象の統計学的に有意な予測因子であった。全てのその他の分子的および臨床的な要因、例として、ＨＥＲ－２／ＣＥＰ１７の比、ＨＥＲ－２の増幅、ホルモン受容体の状態、閉経期の状態、および年齢は、ＴＴＢＭの統計学的に有意な相関要因ではなかった。Ｈ２Ｔレベルまたはｐ９５レベルのそのような示差的な生物学的作用は、脳への転移の予防および闘いにおいてはトラスツズマブに効能がないことに起因する恐れがある。しかし、また、この化合物を用いる頭蓋外疾患のより良好な制御は、脳における再発の臨床所見に、単により長い時間を提供することができるに過ぎない可能性もある（「脱マスキング」の作用）。この可能性は、競合する事象が（連続型変数とみなされる）Ｈ２Ｔレベルの上昇とＴＴＢＭとの間の顕著な相関性を裏付けているため、その他の部位における進行を考慮すると、本明細書に記載する解析により支持される。

【０１３１】

また、癌患者の高リスク集団のための治療コースを決定する方法も、本明細書に記載する。例えば、トラスツズマブを投与する進行性のＨＥＲ２陽性乳癌患者における、ＨＥＲ２タンパク質の発現の定量的測定値と脳への転移のリスクとの間の相関性から、Ｈ２Ｔを評価することによって、より個人化した予防および治療のための戦略を、そうした戦略をとらなければ高リスクのこの集団の患者を選択して行うことが可能となり得る可能性があることが示唆されており、そうした戦略とは、例えば、低分子薬物、化学療法および／または放射線療法等である。現在、脳への転移に関して潜在的な予防的または治療的な活性を有する、いくつかの新しい化合物が、臨床調査の対象となっている。トラスツズマブとは対照的に、低分子薬物は、脳への転移への接近が依然として妨げられる場合もあるが、血液腫瘍関門を横切る可能性がより高い。Lockman, P.R.ら、Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer、Clin Cancer Res.、１６巻：５６６４～５６７８頁（２０１０年）。例えば、ラパチニブは、前臨床モデルでは、予防において有望であり、脳への転移の治療に関して、何らかの臨床有効性を示している（Gril, B.ら、Effect of lapatinib on the outgrowth of metastatic breast cancer cells to the brain、J Natl Cancer Inst.、１００巻：１０９２～１１０３頁（２００８年）；Lin, N.U.ら、Phase II trial of lapatinib for brain metastases in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer、J Clin Oncol.、２６巻：１９９３～１９９９頁（２００８年））。無作為化第三相研究では、トラスツズマブ療法の後に進行した患者において、カペシタビンに、ラパチニブを添加すると、脳における症候性の再発率の減少が生じた。Cameron, D.ら、A phase III randomized comparison of lapatinib plus capecitabine versus capecitabine alone in women with advanced breast cancer that has progressed on trastuzumab: updated efficacy and biomarker analyses、Breast Cancer Res Treat.、１１２巻：５３３～５４３頁（２００８年）。さらに、パゾパニブも、ＨＥＲ２細胞系を注入したマウスにおいて、脳への転移の予防に関する活性を示している。Gril, B.ら、Pazopanib reveals a role for tumor cell B-Raf in the prevention of HER2+ breast cancer brain metastasis、Clin Cancer Res.、１７巻：１４２～１５３頁（２０１１年）。

【０１３２】

低分子の、ＨＥＲ２を対象とする薬剤が、乳癌の進行のより早期に使用するための承認を得るにつれて、本明細書において開示する方法を使用する、定量的なＨＥＲ２の測定が、患者の治療看護を導くのに有用になる。

【実施例】

【０１３３】

（実施例１）

被験体の試料の解析

【０１３４】

研究群：この研究は、Ｍｅｄｉｃａｌ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｉｎ Ｇｄａｎｓｋの連係センターの倫理委員会から承認を得た。患者を、コンピュータ処理された病院のシステム、プロトコールの登録リストを通して、または手作業の検索により同定した。研究群には、９つのポーランドの施設からの、一貫した一連のＨＥＲ２陽性（ＩＨＣ３＋、またはＩＨＣ２＋かつＦＩＳＨ陽性）の、病理学的に確認された進行性乳癌患者を含めた。全ての患者が、２０００年１２月～２０１０年７月の間に、化学療法（典型的には、タキサン、ビノレルビンまたはカペシタビン）の併用がある場合もない場合も、トラスツズマブの少なくとも１回の投与を受けた。トラスツズマブが最初に投与された間の療法の選択順位の記録はなかったが、転移性疾患の診断からトラスツズマブの開始までの時間の中央値は、３．４ヵ月（０～４９ヵ月の範囲）であった。この遅延は、かなりの比率の患者が、トラスツズマブを、転移性の状況における第二選択または次の選択順位の療法として投与されたという事実の結果であった。転移性疾患の診断からトラスツズマブの開始までの時間は、脳への転移までの時間（ＴＴＢＭ）と相関しなかった（ｐ＝０．７）ので、この要因は、階層化のために使用しなかった。患者の大半が、トラスツズマブ治療を進行まで続け、３人の患者は、過剰な毒性の発生または個人の決定の結果として、トラスツズマブ投与をより早期に止め、２０人の患者は、進行の後も、トラスツズマブ療法を継続した。

【０１３５】

総数１６４人のＨＥＲ２陽性の進行性乳癌患者を、最初に同定し、続いて、それらのうちの２２人を、先在する脳への転移（ｎ＝６）、またはトラスツズマブの投与がアジュバントの状況であること（ｎ＝１６）に起因して、解析から除去して、１４２人の患者の研究コホートが残った（表１）。

【０１３６】

以下の情報を、医学的記録から抽出した：乳癌の診断の日、以前の局所療法および全身療法、最初の進行の日およびタイプ（局所性、領域性、遠隔性）、転移性疾患の診断の日、転移性疾患の優性の部位（軟部組織、骨、内臓）、脳への転移の診断の日、トラスツズマブを投与された日、トラスツズマブ療法を受けている間の最初の進行の日、ならびに死亡の日または最後の経過観察の来診。２つ以上のカテゴリーに関与する腫瘍については、遠隔性疾患の優性の部位を、最悪の予後と関連があるカテゴリーにより、関与の程度にかかわりなく、重みが増加する以下、すなわち、軟部組織、骨、内臓の順番で分類した。この研究が遡及的な性質を有するため、腫瘍の段階付けを、１９９７年のＡｍｅｒｉｃａｎ Ｊｏｉｎｔ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ ｏｎ Ｃａｎｃｅｒ／Ｕｎｉｏｎ ｆｏｒ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｏｎｔｒｏｌ ｃｌａｓｓｉｆｉｃａｔｉｏｎを使用して実施した。脳への転移は、エックス線撮影（コンピュータ断層撮影法または磁気共鳴画像法）で確認した実質性の脳病変を含んだ。潜在性の脳病変についてのスクリーニングは実施しなかった。したがって、全ての転移が、症候性であるか、または偶発的に検出された。経過観察の情報を、医学的記録および腫瘍登録簿から抽出した。データを、Ｍｉｃｒｏｓｏｆｔ Ｅｘｃｅｌを使用して、収集および保存した。

【０１３７】

経過観察時間の中央値は、乳癌の最初の診断から６８ヵ月（７～１４４ヵ月の範囲）、転移性疾患の最初の発生から３４ヵ月（４～１２１ヵ月の範囲）、およびトラスツズマブを含有する療法の開始から２９ヵ月（１～１１５ヵ月の範囲）であった。最初の診断から最初の遠隔性の再発までの時間の中央値は、２２ヵ月（０～１０３ヵ月の範囲）であり、

トラスツズマブ療法の時間の中央値は、１０ヵ月（１～１１５ヵ月の範囲）であった。

【０１３８】

【表１】

表1. 被験体の特徴

特徴	カテゴリー	全ての被験体 (N=142)		BMなし (N=93)		BMあり (N=49)	
		N	%	N	%	N	%
閉経期の状態	閉経後	78	55	52	56	26	53
	閉経前	64	45	41	44	23	47
優性の転移部位	内臓	89	63	20	22	8	16
	軟部組織	28	20	20	22	4	8
	骨	24	17	52	56	37	76
	不明	1	1	1	1	0	0
転移のタイプ	診断時	14	10	9	10	5	10
	再発	18	18	84	90	44	90
ER	陽性	55	39	40	43	15	31
	陰性	87	61	53	57	34	69
PgR	陽性	43	30	29	31	14	29
	陰性	95	67	63	68	32	65
	不明	4	3	1	1	3	6
グレード	G3	85	60	49	53	36	73
	G1 + G2	57	40	44	47	13	27
病理学的タイプ	管	127	89	84	90	43	88
	小葉	4	3	2	2	2	4
	その他	3	2	2	2	1	2
	不明	8	6	5	5	3	6
HER2タンパク質 (HERmark H2T)[a]	陽性	109	77	62	67	47	96
	不確実	7	5	7	8	0	0
	陰性	26	18	24	26	2	4
FISH/CEP17	＞2.0	117	82	73	78	44	90
	≦2.0	21	15	18	19	3	6
	不明	4	3	2	2	2	4
進行時の年齢（歳）	中央値	53		54		50	
	範囲	25 - 79		25 - 79		33 - 72	

【０１３９】

ＨＥＲ２＋の分類：ＨＥＲ２陽性の状態を、研究に参加している施設において、半定量的な免疫組織化学的検査（ＩＨＣ）を使用して決定した。ＦＩＳＨを使用する、ＨＥＲ２遺伝子のコピー数の評価を、ポーランドのＭｅｄｉｃａｌ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｇｄａｎｓｋ、Ｄｅｐａｒｔｍｅｎｔ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｇｅｎｅｔｉｃｓのセンターで実施した。遺伝子の増幅を、２．０超のＦＩＳＨの比（ＨＥＲ２／１７番染色体についてのセントロメアのプローブ［ＣＥＰ１７］の比）と定義した。被験体を、ＨＥＲ２のＦＩＳＨ陽性、ＨＥＲ２のＦＩＳＨ不確実、およびＨＥＲ２のＦＩＳＨ陰性としてカテゴリーに分けるために使用するカットオフはそれぞれ、１．８および２．２であった。エストロゲン受容体（ＥＲ）およびプロゲステロン受容体（ＰＲ）の発現を、ＩＨＣを使用して決定し、１０％の核染色を陽性の結果とみなした。

【０１４０】

ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイ：Liptonら、Quantitative HER2 protein levels predict outcome in fluorescence in situ hybridization-positive patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab、Cancer、１１

６巻：５１６８～７８頁（２０１０年）、およびLarson, J.S.ら、Analytical validation of a highly quantitative, sensitive, accurate, and reproducible assay (HERmark(R)) for the measurement of HER2 total protein and HER2 homodimers in FFPE breast cancer tumor specimens、Patholog Res Int.、２０１０巻：８１４１７６頁（２０１０年）による記載に従って、ＨＥＲｍａｒｋ（登録商標）アッセイを使用して、定量的なＨＥＲ２タンパク質のレベル（１ｍｍ^{2}の腫瘍当たりの相対蛍光単位（ＲＦ／ｍｍ^{2}腫瘍））を測定した。図１Ａを参照されたい。ＨＥＲｍａｒｋ（登録商標）アッセイを使用して、被験体を、ＨＥＲ２陽性、ＨＥＲ２不確実、およびＨＥＲ２陰性としてカテゴリーに分けるために使用するカットオフはそれぞれ、１０．５および１７．８であった。定量的なｐ９５タンパク質のレベル（ＲＦ／ｍｍ^2）を、図１Ｂに示す、ＶｅｒａＴａｇアッセイフォーマットを使用して測定した。このフォーマットは、Sperinde, J.ら、Clin. Cancer. Res.１６巻（１６号）：４２２６～４２３５頁（２０１０年）に記載されている。

【０１４１】

腫瘍の段階付け：この研究が遡及的な性質を有するため、腫瘍の段階付けを、１９９７年のＡＪＣＣ／ＵＩＣＣ分類を使用して実施した。転移性の病変を、３つのカテゴリー、すなわち、軟部組織、骨および内臓にグループ分けした。２つ以上のカテゴリーに関与する腫瘍については、遠隔性疾患の優性の部位を、最悪の予後と関連があるカテゴリーにより、関与の程度にかかわりなく、重みが増加する以下、すなわち、軟部組織、骨、内臓の順番で分類した。潜在性の脳病変についてのスクリーニングは実施しなかった；したがって、全ての転移が、症候性であるか、または偶発的に検出された。

【０１４２】

脳への転移までの時間：トラスツズマブを含有する治療の開始から、（任意の原因による）死亡、または経過観察の終わりにおける打ち切りまでのＯＳ時間を計算した。カプラン－マイヤー法を使用して、脳への転移の長期にわたる確率を推定した。必要であれば、ｐ値を計算して、階層化ログランク検定を使用する一変量解析を行った。必要であれば、コックスモデルを使用して、階層化を用いる多変量解析を行った。また、コックスモデルを使用して、ハザード比（ＨＲ）およびその信頼区間（ＣＩ）も推定した。脳外での進行までの時間を時間依存性の変数として使用して、多変量コックスモデル、およびこの特定の変数を評価する一変量コックスモデルにおいて、脳への転移についてのリスクに対する、その他のタイプの進行の作用を調べた。（脳における再発、および全てのその他の部位における疾患の再出現に対する）死亡の競合リスクについて制御する解析を、Fine, J.P.およびGray, R.J.、A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk、JASA、９４巻：４９６～５０９頁（１９９９年）による記載に従って、競合リスクのサブ分布の方法により実施した。０．０５超のｐ値を、有意とみなした。統計学的解析は、統計学的解析を計画する際に、可能な限りにおいてあらかじめ特定し、Ｍｏｎｏｇｒａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｓｏｕｔｈ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）、およびＩｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｄｒｕｇ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ（ＩＤＤＩ）、Ｉｎｃ．（Ｌｏｕｖａｉｎ－ｌａ－Ｎｅｕｖｅ、ベルギー）において、独立に別個のチームにより実施された。相違はいずれも、ポーランドの臨床チームおよびＭｏｎｏｇｒａｍの統計学チームおよびＩＤＤＩの統計学チームの間での合意により解消された。

【０１４３】

脳への転移およびＨＥＲ２の上昇：全部で、１４２人の患者のうちの４９人（３５％）から、脳における症候性の再発が発生した。それら４９人の患者の間で、ＴＴＢＭの中央値は、１３ヵ月（９５％ＣＩ、９～１８ヵ月）であった。トラスツズマブ治療の開始の後に、脳への転移が、転移性の最初の進行の時点で、２０人の患者において発生し、これらの患者には、トラスツズマブ治療の間に脳における再発が発生した１７人の患者が含まれた。残りの２９人の患者においては、トラスツズマブ治療の中断の後に、脳における再発が発生した。脳における再発が発生する１年、２年および３年の累積リスクはそれぞれ、

１９％、３０％および４６％であった（９５％ＣＩはそれぞれ、１２％～２５％、２２％～３９％および３４％～５８％であった）。疾患の汎発から脳における再発までの時間の中央値は、３８ヵ月（１～５０ヵ月の範囲）であった。集団全体における、乳癌の最初の診断からの全生存の中央値は、３２ヵ月（１～６７ヵ月の範囲）であった。集団全体における、トラスツズマブ療法の開始からのＯＳ時間の中央値は、３２ヵ月（９５％ＣＩ、２８～４３ヵ月）であり、脳への転移が発生した患者および脳への転移が発生しなかった患者のサブグループにおけるＯＳの中央値はそれぞれ、２８ヵ月（９５％ＣＩ、１６～３２ヵ月）および４０ヵ月（９５％ＣＩ、２８～６６ヵ月）であった。どの文を含めるべきか示してください。

【０１４４】

ＨＥＲ２の増幅が、ＦＩＳＨを使用して解析可能な１３８症例のうちの１１７症例において見出された（８５％）。ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイにより決定した、定量的なＨＥＲ２タンパク質のレベル（Ｈ２Ｔ）は、ＨＥＲ２／ＣＥＰ１７の比と８６％の一致（κ＝０．５５）を示した（Ｈ２ＴおよびＦＩＳＨの両方について、陰性、不確実および陽性のカテゴリーを検討した）（図３を参照されたい；ｎ＝１３８）。したがって、これら２つのアッセイは、ＨＥＲ２の状態に関して、腫瘍を同様に分類した。

【０１４５】

（実施例２）

ＨＥＲ２レベルは、ＴＴＢＭと相関する

【０１４６】

ＴＴＢＭの相関要因１２個を、全ての被験体、およびＨＥＲ２－ＦＩＳＨ陽性であることが決定された被験体について探索し（それぞれ、表２および３）、これらの相関要因には、（ａ）一般に使用されている臨床変数（年齢、閉経期の状態、転移性疾患の優性の部位、エストロゲン受容体［ＥＲ］およびプロゲステロン受容体［ＰｇＲ］のレベル、腫瘍のグレード、従来からあるＨＥＲ２のＦＩＳＨ測定によるＨＥＲ２の状態）、（ｂ）脳外での進行までの時間、（ｃ）特定のカットオフを使用するカテゴリー変数とも、また、連続型変数ともみなされる、連続的なＨＥＲ２タンパク質のレベル（Ｈ２Ｔ）の新規の測定、ならびに（ｄ）所定のカットオフを使用する、ｐ９５タンパク質レベルの新規の測定を含めた。

【０１４７】

（連続型変数、または定義されたカットオフを使用するカテゴリー変数のいずれかとして評価した）より高いＨ２Ｔの測定値が、ＨＥＲ－２陽性の（ＩＨＣ３＋、または＞２．０のＦＩＳＨの比のいずれかにより、ＨＥＲ－２陽性と定義された）患者集団の全体において、より短いＴＴＢＭと有意に相関した。同様にＴＴＢＭと相関した、２つのその他の変数は、腫瘍のグレード、およびトラスツズマブ療法の開始から脳外での最初の進行までの時間である。前もって定義されたＨ２Ｔ陽性群とＨ２Ｔ陰性群との間のハザード比（ＨＲ）（表２の表記を参照されたい）は、５．６であった（ｐ＝０．００７）。しかし、研究群中において、そのように定義されたＨ２Ｔ陰性群は小さかった（ｎ＝２６）。最もよく識別する、Ｈ２Ｔのカットオフの値は、５０ＲＦ／ｍｍ^2、ＨＲ＝２．６（ｐ＝０．００１）であることが見出された。注目すべきことには、この値は、５８ＲＦ／ｍｍ^{2}の、Ｈ２Ｔの中央値に近かった。また、連続的なＨ２Ｔも、ＴＴＢＭと有意に相関し（ｐ＝０．０１３）、このことは、Ｈ２Ｔの範囲の全体にわたる、脳への転移のリスクの比例的な上昇を示している。これとは対照的に、ＦＩＳＨ／ＣＥＰ１７＝２．０におけるカットオフも、連続的なＦＩＳＨ／ＣＥＰ１７も、ＴＴＢＭと相関しなかった（それぞれ、ｐ＝０．２８、および０．１５）。

【０１４８】

上記に示したように、Ｈ２Ｔおよび腫瘍のグレードの両方が、ＴＴＢＭの一変量の相関要因であった。Ｈ２Ｔが、グレードから独立して、ＴＴＢＭに影響を及ぼすことを確認するために、解析を、腫瘍のグレードを階層化の要因として用いて繰り返した。グレードについて階層化した場合、５０ＲＦ／ｍｍ^{2}のカットオフにおける、Ｈ２ＴについてのＨＲ

は、依然として有意であった（ＨＲ＝２．２；ｐ＝０．０１３）が、集団全体における連続的なＨ２ＴのＴＴＢＭとの相関性は、傾向を示すに過ぎなかった（ｐ＝０．０７０）。

【０１４９】

競合リスクの解析を実施して、死亡の発生が、Ｈ２ＴのＴＴＢＭとの相関性を正確に測定する能力を妨げていないことを確認した。死亡について制御した場合、Ｈ２Ｔ＝５０ＲＦ／ｍｍ^{2}のカットオフ（ＨＲ、２．７；ｐ＝０．０００９）を使用しても、ＨＲに関して連続的なＨ２Ｔ（ＨＲ、２．７；ｐ＝０．００６６）を使用しても、Ｈ２Ｔは依然として、ＴＴＢＭの有意な相関要因であり、これらの結果は、死亡について制御せずに計算した結果に類似するかまたは死亡について制御せずに計算した結果よりもやや高かった（表２）（それぞれ、２．６および２．３のＨＲ）。連続型変数、または定義されたカットオフを使用するカテゴリー変数のいずれかとして評価したＨ２Ｔは、この患者集団において、ＯＳとは相関しなかった。この観察結果は、ＨＥＲ２陰性のサブグループの小さなサイズに起因する可能性がある。

【０１５０】

下記の表２および３に記載する記号は、以下を指す：

ａ．内臓、骨および軟部組織の３つのカテゴリーのうちのいずれかの間の有意な差についての検定。

ｂ．脳への転移のリスクに対する、その他の進行の作用を調べるために、時間依存性の変数として使用した、脳外での進行までの時間。

ｃ．グレード１の症例が３つしかなかったので、グレード１と２とを組み合わせた。

ｄ．ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）ＨＥＲ２陽性の状態を、＞１７．８のＨ２Ｔと定義し、ＶｅｒａＴａｇ（登録商標）ＨＥＲ２陰性を、≦１０．５のＨ２Ｔと定義し、不確実は、これら２つの限界の間とする。これらのカットオフは、センターの研究室が決定したＨＥＲ２陰性の９５パーセンタイルおよびＨＥＲ２陽性の５パーセンタイルと一致することが以前に見出された。Huangら、Amer. J. Clin. Pathol.、１３４巻：３０３～３１１頁（２０１０年）を参照されたい。

ｅ．ハザード比を推定するのに不十分な数の事象。

－４つの症例は、ＰｇＲについて不明であり、４つの症例は、ＦＩＳＨについて不明であり、７つの症例は、ＦＩＳＨのスポットの数が多過ぎて、クラスターをなし、信頼できるカウントが得られなかった。

【０１５１】

【表２】

表2. 脳への転移までの時間の一変量解析 － 全ての被験体

変数	カテゴリー	事象/N (%)	無階層化		グレードにより階層化	
			HR	p値	HR	p値
年齢	連続的	49/142 (35%)	0.99	0.6	0.99	0.7
閉経期(MP)の状態	MP後 MP 前	26/78 (33%) 23/64 (36%)	0.97	0.9	0.94	0.8
優性の転移部位	複数[a]	49/141 (35%)	--	0.095[a]	--	0.088[a]
ER	陽性 陰性	15/55 (27%) 34/87 (39%)	0.75	0.4	0.86	0.6
PgR	陽性 陰性	14/43 (33%) 32/95 (34%)	1.1	0.7	1.3	0.4
グレード	G3 G1 + G2[c]	36/85 (42%) 13/57 (23%)	2.4	0.007	--	--
HER2タンパク質(HERmark® H2T)	陽性[d] 陰性[d]	47/109 (43%) 2/26 (8%)	5.6	0.007	4.4	0.029
FISH/CEP17	> 2.0 ≤ 2.0	44/117 (38%) 3/21 (14%)	1.9	0.28	1.4	0.6
ログ(H2T)	連続的	49/142 (35%)	2.3	0.013	1.9	0.070
ログ(FISH/CEP17)	連続的	45/131 (34%)	1.7	0.25	1.4	0.5
HER2タンパク質(H2T)	H2T > 50 H2T ≤ 50	32/65 (49%) 17/77 (22%)	2.6	0.001	2.2	0.013
HER2タンパク質(H2T)	H2T > 中央値 (44) H2T ≤ 中央値 (44)	33/71 (46%) 16/71 (23%)	2.3	0.005	1.9	0.044
脳外での進行までの時間[b]	連続的	49/142 (35%)	2.5	0.006	2.4	0.010

【０１５２】

【表３】

表3. 脳への転移までの時間の一変量解析 －HER2 FISH陽性

変数	カテゴリー	事象/N (%)	無階層化		グレードにより階層化	
			HR	p値	HR	p値
年齢	連続的	44/117 (38%)	1.0	0.9	1.0	1.0
閉経期(MP)の状態	MP後 MP前	23/63 (37%) 21/54 (39%)	0.94	0.8	0.93	0.8
優性の転移部位	複数[a]	44/116 (38%)	--	0.10[a]	--	0.12[a]
ER	陽性 陰性	14/40 (35%) 30/77 (39%)	1.0	0.9	1.1	0.9
PgR	陽性 陰性	13/35 (37%) 28/79 (35%)	1.4	0.4	1.5	0.22
グレード	G3 G1 + G2[c]	33/73 (45%) 11/44 (25%)	2.2	0.022	--	--
HER2タンパク質(HERmark H2T)	陽性[d] 陰性[d]	44/103 (43%) 0/11 (0%)	--[e]	--[e]	--[e]	--[e]
FISH/CEP17	> 2.0 ≤ 2.0	--	--	--	--	--
ログ(H2T)	連続的	44/117 (38%)	3.0	0.008	2.8	0.022
ログ(FISH/CEP17)	連続的	42/110 (38%)	1.4	0.6	1.2	0.7
HER2タンパク質(H2T)	H2T > 50 H2T ≤ 50	31/63 (49%) 13/54 (24%)	2.6	0.003	2.3	0.014
HER2タンパク質(H2T)	H2T ≥中央値(58) H2T <中央値(58)	30/59 (51%) 14/58 (24%)	2.4	0.006	2.1	0.021
p95タンパク質	p95 > 2.8 p95 ≤ 2.8	30/69 (43%) 14/48 (29%)	2.0	0.037	1.7	0.12
脳外での進行までの時間[b]	連続的	44/117 (38%)	2.4	0.015	2.2	0.025

【０１５３】

（実施例３）

Ｈ２Ｔおよびｐ９５のレベルは、ＦＩＳＨ陽性の集団において、ＴＴＢＭと相関する

【０１５４】

ＩＨＣ　ＨＥＲ２擬陽性に起因するデータの歪みを阻止するために、平行解析を、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ陽性の状態がセンターで決定された１１７人の被験体のサブセットにおいて実施した（表３）。この群において、（腫瘍のグレードによる階層化がある場合もない場合も、連続型変数として、および定義されたカットオフを使用して評価した）Ｈ２Ｔは、ＴＴＢＭと有意に相関し、一方、連続的なＦＩＳＨ／ＣＥＰ１７は、相関しなかった（ｐ≧０．６）。ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ陽性の集団内で、中央値（Ｈ２Ｔ＝５８ＲＦ／ｍｍ^2）を上回るＨＥＲ２タンパク質のレベルを有することが決定された、腫瘍を有する患者は、グレードによる階層化がない場合（ＨＲ、２．４；ｐ＝０．００６）もある場合（ＨＲ、２．１；ｐ＝０．０２１）も、中央値を下回るＨＥＲ２タンパク質を有する患者よりも、脳への転移が発生する可能性が２倍超高かった（図４Ａを参照されたい）。若干より大きな差が、５０ＲＦ／ｍｍ^{2}のカットオフの値について、グレードによる階層化がない場合（ＨＲ＝２．６；ｐ＝０．００３）もある場合（ＨＲ＝２．３；ｐ＝０．０１４）も認

められた（図４Ｂを参照されたい）。対照的に、中央値（ＨＥＲ２／ＣＥＰ１７＝６．９）を上回るまたは下回るＨＥＲ２遺伝子の増幅を有することが決定された、腫瘍を有する患者は、グレードによる階層化がある場合（ＨＲ＝１．３；ｐ＝０．４）もない場合（ＨＲ＝１．３；ｐ＝０．５）も共に、脳への転移が発生する、類似の可能性を示した（図４Ｃを参照されたい）。また、類似の結果が、その他のＦＩＳＨ　ＨＥＲ２／ＣＥＰ１７のカットオフを用いた場合にも観察された（データ未公開）。

【０１５５】

ｐ９５の高いレベルの発現は、トラスツズマブ治療乳癌において、芳しくない転帰と相関することが以前に示されたことがある。Sperinde, J.ら、Clin. Cancer. Res.、１６巻（１６号）：４２２６～４２３５頁（２０１０年）。Ｓｐｅｒｉｎｄｅらは、図１Ｂに記載するＶｅｒａＴａｇ（登録商標）アッセイフォーマットのために、２．８ＲＦ／ｍｍ^{2}のｐ９５のカットオフを使用して、被験体を、高いｐ９５発現群と低いｐ９５発現群とに階層化した。現在のコホートにおいては、２．８ＲＦ／ｍｍ^{2}のｐ９５のカットオフを上回るｐ９５の発現が、脳への転移までのより短い時間と相関することが見出された（表３および図４Ｄ）。また、２．８ＲＦ／ｍｍ^{2}のカットオフは、このセットにおいて脳への転移の高いリスクと低いリスクとを見分けるための最適なカットオフであることも見出された。ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ陽性の集団内では、カットオフ（＞２．８ＲＦ／ｍｍ^{2}のｐ９５）を上回るｐ９５タンパク質のレベルを有することが決定された、腫瘍を有する患者は、グレードによる階層化がない場合（ＨＲ、２．０；ｐ＝０．０３７）もある場合も（ＨＲ、１．７；ｐ＝０．１２）、カットオフを下回るｐ９５タンパク質を有する患者よりも、脳への転移が発生する可能性が約２倍高かった（図４Ｄを参照されたい）。この解析は以前に、非腫瘍性の混入物を除去するためのマイクロダイセクションを達成することが可能になる前にも、この同じセットの被験体の試料に対して実施されたことがあり、脳への転移までの時間との相関性には一貫性があることを見出した。米国仮出願第６１／４８８，０２８号の図２Ｄを参照されたい。

【０１５６】

Ｈ２Ｔのカットオフおよびｐ９５のカットオフが独立変数であるかを決定するために、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ陽性の状態、および５０ＲＦ／ｍｍ^{2}のカットオフを下回るＨ２Ｔ発現を有することが決定された患者のサブセットを、ｐ９５の発現レベルに基づいてさらに評価した。図４Ｅに示すように、ｐ９５のカットオフを下回るｐ９５のレベルを有する被験体は、ｐ９５のカットオフを上回るｐ９５のレベルを有する被験体よりも長いＴＴＢＭを有した（ＨＲ＝２．５、ｐ＝０．１０）。したがって、ｐ９５を変数として使用することによって、Ｈ２Ｔの測定のみと比較して、脳への転移についてのリスクを有する追加の患者の同定が可能になった。評価した患者の数が少ないことが、ｐ値に負の影響を及ぼした可能性がある。

【０１５７】

競合リスクの解析を実施して、死亡の発生が、Ｈ２ＴのＴＴＢＭとの相関性を正確に測定する能力を妨げていないことを確認した。死亡について制御した場合、Ｈ２Ｔは、Ｈ２Ｔ＝５０ＲＦ／ｍｍ^{2}のカットオフ（ＨＲ＝２．７；ｐ＝０．０００９）および連続的なＨ２Ｔ（ＨＲ＝２．７；ｐ＝０．００６６）の両方について、ＴＴＢＭの有意な相関要因であることが依然として見出され、ＨＲは、死亡について制御せずに計算したＨＲに類似するかまたは死亡について制御せずに計算したＨＲよりもやや高かった（それぞれ、表２：ＨＲ＝２．６およびＨＲ＝２．３）。さらに、ｐ９５のカットオフも、死亡について制御した場合、ＴＴＢＭと相関することが依然として見出された（ＨＲ＝１．７、ｐ＝０．０８９）。

【０１５８】

（実施例４）

腫瘍のグレードの、脳への転移までの時間とのＨ２Ｔの相関性に対する作用

【０１５９】

腫瘍のグレードは、一変量解析における、ＴＴＢＭの有意な相関要因であるであること

が見出され、階層化の要因として使用する場合に、Ｈ２ＴについてのＨＲのＣＩに対して何らかの作用を有したことから、我々は、グレード１～２およびグレード３の腫瘍を有する患者のサブセットにおいて、Ｈ２ＴのＴＴＢＭとの相関性を別個に調べた。Ｈ２Ｔ＝５０ＲＦ／ｍｍ^{2}のカットオフでの、グレードのサブグループのそれぞれについての、ハザード比に関するフォレストプロットを、図５Ａに示す。Ｈ２ＴとＴＴＢＭとの間の相関性は、グレード１～２のサブセットにおいて、より強力であり、このことは、Ｈ２Ｔと腫瘍のグレードとの間の相互作用と一致した（ｐ＝０．０２５）。Ｈ２Ｔ＝５０ＲＦ／ｍｍ^{2}のカットオフおよび２つのグレードのカテゴリーにより定義された４つのサブグループについてのカプラン－マイヤープロットを、図５Ｂに示す。５０ＲＦ／ｍｍ２のＨ２Ｔのカットオフおよび２つのグレードのカテゴリー（グレード１～２の組合せ対グレード３）により定義された４つのサブグループについてのＴＴＢＭは、これらの群のうちの３つ（低いＨ２Ｔ－グレード３、高いＨ２Ｔ－グレード１～２、高いＨ２Ｔ－グレード３）が、低いＨ２Ｔ－グレード１～２のサブセットの群と比較して、類似の転帰を示し、後者は、脳への転移が発生する有意により低い可能性を示した（４つのサブグループの比較について、ログランクｐ＝０．００１２；［＞５０ＲＦ／ｍｍ^{2}のＨ２Ｔまたはグレード３］対［＜５０ＲＦ／ｍｍ^{2}のＨ２Ｔおよび＜３のグレード］について、ＨＲ＝５．７；ｐ＝０．０００１）。一変量コックスモデルから、低いＨ２Ｔ－グレード１～２の患者について、３つのその他の群の患者と比較して、０．１７のＨＲが推定された（ｐ＝０．０００１）。また、ログランクによる、（３の自由度での）４つのサブグループの比較も有意であった（ｐ＝０．００１２）が、この結果は、これら４つのサブセットの間で可能である複数の比較を考慮して、慎重に解釈すべきである。

【０１６０】

これが、Ｈ２Ｔの範囲の全体にわたる一般的な現象であるかどうかを調べるために、類似の解析を実施して、グレード１＋２またはグレード３の２つのサブグループ内における連続的なＨ２ＴのＴＴＢＭとの相関性を調べた。図６Ａに示すように、異なるグレードの群については、連続的なＨ２ＴとＴＴＢＭとの間の相関性に関する統計学的な差はなかった（相互作用のｐ値＝０．６）。しかし、図６Ｂに示すように、ＦＩＳＨによりＨＥＲ－２陽性であることがセンターで確認された患者のサブセットの場合、連続的なＨ２ＴとＴＴＢＭとの間には、グレード３の患者のサブグループにおいてよりも、グレード１～２の患者のサブグループにおいて強力な相関性がある傾向が観察された（相互作用のｐ＝０．１０）。

【０１６１】

（実施例５）

脳への転移以外の進行の影響

【０１６２】

ＨＥＲ２陽性の進行性乳癌患者における、任意の遠隔性の再発までのより短い時間が、脳への転移が発生するリスクの増加と関連があることが以前に実証されたことがある。同様に、現在の発明の方法を使用しても、一変量解析において、時間依存性の変数として処理した進行が、ＴＴＢＭと有意に関連があることが見出された（表２および３）。その他の部位の進行／転移とＴＴＢＭとの間の相関性をさらに調べるために、時間依存性の変数としての、Ｈ２Ｔ、ＦＩＳＨ／ＣＥＰ１７、エストロゲン受容体（ＥＲ）、プロゲステロン受容体（ＰｇＲ）、腫瘍のグレードおよび脳への転移以外の進行とのＴＴＢＭの独立した相関性について、多変量モデルで検定した。転帰としてのＴＴＢＭ、ベースライン変数としてのＨ２Ｔ、およびＨＥＲ－２／ＣＥＰ１７の比、ならびに時間依存性の変数としての脳への転移以外の進行を、多変量モデルに適合させた。モデルを、腫瘍のグレード、ならびにＥＲおよびＰｇＲの状態により階層化した。特定のカットオフと関連がある潜在的な過剰適合を回避するために、Ｈ２ＴおよびＦＩＳＨ／ＣＥＰ１７を、定義されたカットオフを使用するのではなく、連続型変数として検定した。

【０１６３】

Ｈ２ＴおよびＦＩＳＨを、多変量解析によりさらに評価すると、表４に示すように、こ

こでも、脳外での進行までの時間が、その他の指定した変数について制御した場合、ＴＴＢＭと有意に関連があることが見出された。ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ陽性である患者のサブセットにおいては、連続的なＨ２Ｔレベル（ＨＲ＝３．３；ｐ＝０．０２４）および脳外での進行までの時間（ＨＲ＝２．９；ｐ＝０．００５６）は独立に、ＴＴＢＭと相関することが見出され、一方、ＨＥＲ２／ＣＥＰ１７は相関しなかった。グレードによる階層化を用いても、類似の結果が見出された。

【０１６４】

【表４】

表4. 脳への転移までの時間の多変量解析

	全ての被験体		HER2+ by FISH	
変数	HR	p値	HR	p値
ログ(H2T)	2.3	0.071	3.3	0.024
ログ(FISH/CEP17)	0.61	0.46	0.45	0.32
脳外での進行までの時間[a]	3.0	0.0035	2.9	0.0056

【０１６５】

また、表２および３に記載したＨ２ＴおよびＴＴＢＭと有意に関連があることが見出された。ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ陽性のサブセットにおいては、連続的なＨ２Ｔ（ＨＲ＝３．２；ｐ＝０．０２１）および脳外での進行までの時間（ＨＲ＝３．０；ｐ＝０．００４４）は独立に、ＴＴＢＭと相関することが見出された。グレードによる階層化を用いても、類似の結果が見出された。

【０１６６】

【表５】

表5. 脳への転移までの時間の多変量解析 － 全ての被験体

	無階層化		グレードにより階層化	
変数	HR	p値	HR	p値
ER	0.60	0.25	0.62	0.28
PgR	1.7	0.24	1.6	0.28
グレード	1.7	0.14	--	--
ログ(H2T)	2.3	0.068	2.3	0.071
ログ(FISH/CEP17)	0.75	0.67	0.75	0.65
脳外での進行までの時間[a]	3.2	0.0019	3.2	0.0019

【０１６７】

【表６】

表6. 脳への転移までの時間の多変量解析 － HER2 FISH陽性				
	無階層化		グレードにより階層化	
変数	HR	p値	HR	p値
ER	0.7	0.44	0.74	0.51
PgR	1.7	0.25	1.6	0.28
グレード	1.7	0.17	--	--
ログ(H2T)	3.2	0.021	3.3	0.021
ログ(FISH/CEP17)	0.64	0.56	0.64	0.56
脳外での進行までの時間[a]	3.0	0.0044	3.0	0.0042

【０１６８】

（実施例６）

優性の転移部位による、ＨＥＲ２タンパク質のレベル

【０１６９】

Ｈ２ＴがＴＴＢＭと相関することを見出したのに続いて、さらなる解析を実施して、その他の部位における転移の発生もまた、Ｈ２Ｔと相関するかを決定した。その他の転移部位については、部位特異的な詳細な経過観察が入手可能でなかったが、転移の優性の部位が、１４２人の患者のうちの１４１人について分かっていた。図７に示すように、優性の転移部位（軟部組織、骨および頭蓋外の内臓）に基づくＨ２Ｔの測定値の分布は、統計学的に異ならなかった（ｐ＝０．９）。さらに、優性の転移部位とＴＴＢＭとの間の相関性も観察されなかった（ｐ＝０．１）。

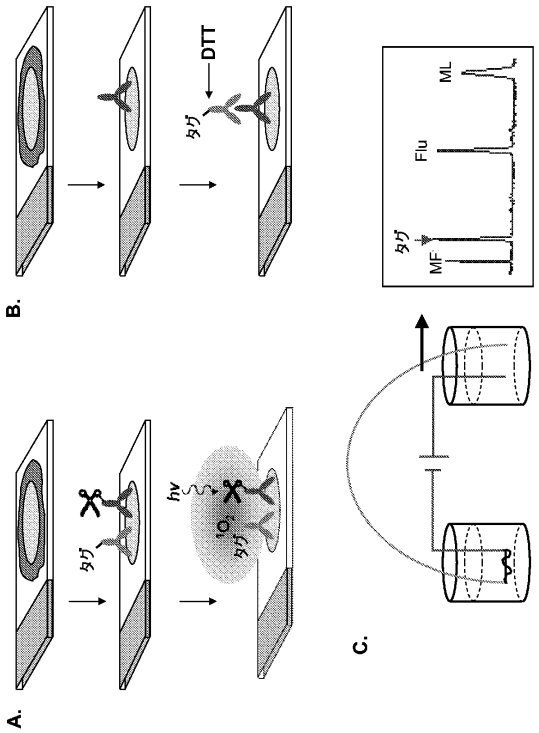
【０１７０】

本発明の好ましい実施形態を、例証し、説明してきたが、それらの中から、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、種々の変化形態を作製することができることが理解されるであろう。

【０１７１】

本出願において参照する、印刷された特許および公開は全てその全体が、こうして参照することにより本明細書に組み込まれる。

【図１】



【図２】

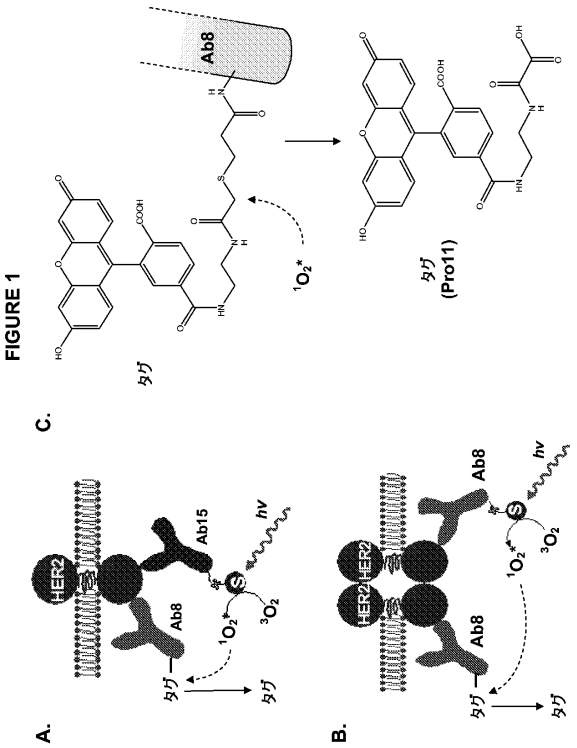


FIGURE 1

FIGURE 2

【図３】

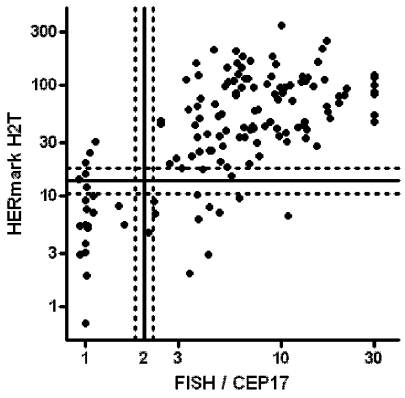


FIGURE 3

【図４】

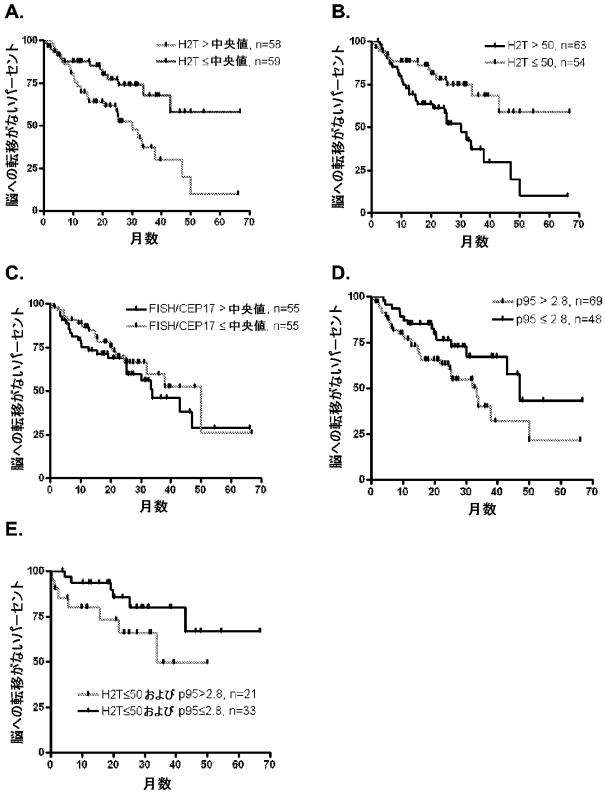


FIGURE 4

【図５】

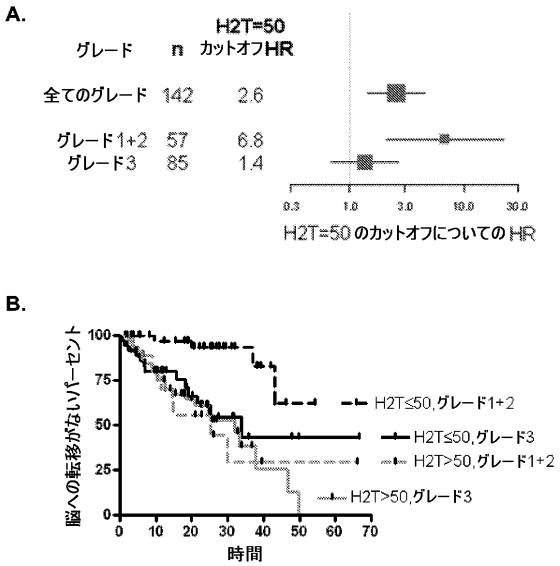


FIGURE 5

【図６】

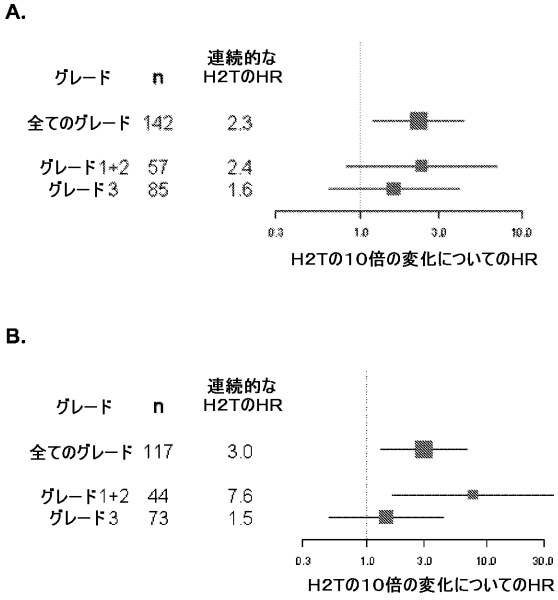


FIGURE 6

【図７】

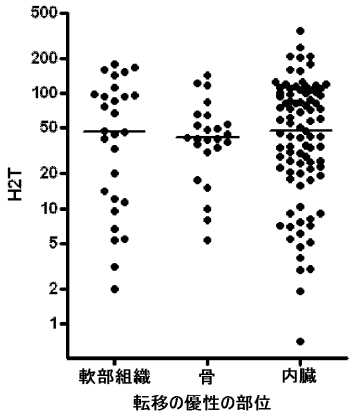


FIGURE 7

フロントページの続き

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 ファン, ウェイドン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５８８, プレザントン, リンブルック コート ５０４９
(72)発明者 ウェイドラー, ジョディ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４４０４, フォスター シティ, ジュノ レーン ８２７
(72)発明者 スペリンド, ジェフ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０１８, エル グラナダ, イサベラ ロード ６２３
(72)発明者 ハダッド, モーガン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４５６３, オリンダ, マス ドライブ ８０
(72)発明者 ベイツ, マイケル
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０７０, サン カルロス, オレンジ アベニュー ７５５

合議体
審判長 三崎 仁
審判官 福島 浩司
審判官 渡戸 正義

(56)参考文献 Loussouarn D et al., Prognostic value of HER 2 expression in meningiomas: an immunohistochemical and fluorescence in in situ hybridization study, Hum Pathol, 2006年 4月, 37(4), 415−421
Z Gabos et al., Prognostic Significance of Human Epidermal Growth Factor Receptor positivity for the Development of Brain Metastasis after newly diagnosed breast cancer, Journal of Clinical Oncology, 2006年12月20日, vol. 24, No. 36, 5658−5663

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
IPC G01N 33/53-33/577