

(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2008-538817

(P2008-538817A)

(43) 公表日 平成20年11月6日(2008.11.6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z	4 B O 5 0
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C O 8 4
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	4 C O 8 5

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-508171 (P2008-508171)
 (86) (22) 出願日 平成18年5月10日 (2006. 5. 10)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月24日 (2007. 10. 24)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2006/004370
 (87) 国際公開番号 W02006/119980
 (87) 国際公開日 平成18年11月16日 (2006. 11. 16)
 (31) 優先権主張番号 05010244. 1
 (32) 優先日 平成17年5月11日 (2005. 5. 11)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 05011070. 9
 (32) 優先日 平成17年5月23日 (2005. 5. 23)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

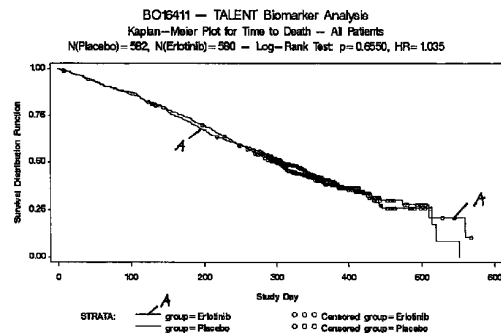
(71) 出願人 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラツセ124
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学療法に対する応答者の決定

(57) 【要約】

本発明は、生物試料中のリン酸化A K Tタンパク質及び/又はリン酸化M A P Kタンパク質の過剰発現を測定することにより、ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が、上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性であるかどうかを決定する方法に関する。本発明は、リン酸化A k tタンパク質及び/又はリン酸化M A P Kタンパク質が用いられる患者中の肺癌の進行を阻害するための、候補薬剤を得るための又は組成物を選択するための方法にも関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性であるかどうかを決定する方法であって、

リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現が、ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性であることの指標である、生物試料中のリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現を測定することを含んで成る前記方法。

【請求項 2】

生物試料中のリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現を、

a) 生物試料中のリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを測定すること、

b) 上皮成長因子阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性でないヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料中の、リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを測定すること、

c) 段階 a) 及び段階 b) において測定したリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異を測定し、それにより、リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現を測定すること、

により測定する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

段階 a) 及び段階 b) において測定したリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異が、少なくとも 10% である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

段階 a) 及び段階 b) において測定したリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異が、少なくとも 25% である、請求項 2 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

生物試料が、原発肺腫瘍又は転移である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

E G F R 阻害剤が、エルロチニブ又は N - (3 - エチニルフェニル) - 6 , 7 - ビス (2 - メトキシエトキシ) キナゾリン - 4 - アミンである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

化学療法剤が、ゲムシタピン又はシスプラチンである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

リン酸化 A k t タンパク質又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現が、リン酸化タンパク質に特異的に結合する試薬を用いて測定される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

抗体、抗体誘導体、又は抗体フラグメントが、リン酸化 A K T タンパク質又はリン酸化 M A P K タンパク質に特異的に結合する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

リン酸化 A K T タンパク質が、A k t 1 タンパク質のアミノ酸位置 473 に対応するアミノ酸位置でリン酸化され、或いは M A P K タンパク質が、M A P K 1 のアミノ酸位置 202 及び 204 に対応するアミノ酸位置でリン酸化される、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

M A P K タンパク質のアミノ酸配列が、アミノ酸配列の配列番号 1 又は 2 であり、A K T タンパク質のアミノ酸配列が、アミノ酸配列の配列番号 6、7 又は 8 である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

発現レベルが、プロテオミクス、フローサイトメトリー、免疫細胞化学、免疫組織化学及び酵素結合免疫測定法から成る群から選択される方法を用いて測定される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現を、

a) 生物試料を免疫組織化学的に染色すること、

b) 生物試料中の細胞の染色の外観検査により、リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルに対して、1、2、3 及び 4 の数から選択されるグレードを割り当て、それにより、発現レベルに対して最も高い検出可能なグレードを割り当てること、

c) 免疫組織化学的に染色した生物試料中で、最も高い検出可能なグレードを有する細胞のパーセンテージを測定すること、

d) 割り当てたグレードに、免疫組織化学的に染色した生物試料中で最も高い検出可能なグレードを有する細胞のパーセンテージ、及び 100 を掛けること、及び

e) 段階 d) における掛け算の結果が 100 超である場合に、生物試料中のリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現を測定すること、

により測定する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が、上皮成長因子阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性であるかどうかを決定するための、リン酸化 A K T タンパク質に結合する抗体又はリン酸化 M A P K タンパク質に結合する抗体の使用。

【請求項 1 5】

a) 複数の試験組成物の存在下で、患者からの E G F R 阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性である肺癌細胞を含んで成る生物試料のアリコート、を、別々に曝露すること；

b) 試験組成物と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベル、及び試験組成物と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを比較すること、

c) 試験組成物と接触させていないアリコートと比べて、試験組成物を含むアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを変化させる試験組成物の 1 つを選択すること、ここで、試験組成物と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルと、試験組成物と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの間の少なくとも 10 % の差異が、試験組成物の選択のための指標である、

を含んで成る、患者における肺癌の進行を阻害するための組成物を選択する方法。

【請求項 1 6】

a) E G F R 阻害剤及び化学療法剤に対して感受性である肺癌細胞を含む生物試料のアリコートを、候補薬剤と接触させること、

b) 候補薬剤と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを測定すること、及び候補薬剤と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを測定すること、

c) 候補薬剤と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベル、及び候補薬剤と接触させていない生物試

10

20

30

40

50

料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを比較することにより、候補薬剤の効果を観察すること、

d) 観察された効果から当該薬剤を得ること、ここで、候補薬剤と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルと、候補薬剤と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの間の少なくとも 10% の差異が、候補薬剤の効果の指標である、

を含んで成る、候補薬剤を得る方法。

【請求項 17】

候補薬剤が候補阻害剤である、請求項 16 に記載の方法。

10

【請求項 18】

候補薬剤が候補増強剤である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法により得られる候補薬剤。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の薬剤を含んで成る、医薬調製物。

【請求項 21】

肺癌の進行の阻害のための組成物の調製のための、請求項 19 に記載の薬剤の使用。

【請求項 22】

請求項 16 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法の段階 ; 及び

20

i) 対象に対して治療有効量の薬剤を供給するのに十分な量で、段階 (c) で同定された候補薬剤又はその類似体若しくは誘導体を合成すること ; 及び / 又は

ii) 段階 (c) で同定された候補薬剤又はその類似体若しくは誘導体を、医薬として許容される担体と混合すること、

を含んで成る、薬剤を製造する方法。

【請求項 23】

患者における肺癌の進行を阻害するための候補薬剤を得るための又は組成物を選択するための、A k t タンパク質、M A P K タンパク質、リン酸化 A k t タンパク質、リン酸化 M A P K タンパク質、リン酸化 A k t タンパク質又はリン酸化 M A P K タンパク質に選択的に結合する抗体の使用。

30

【請求項 24】

リン酸化 M A P K 及び / 又はリン酸化 A k t タンパク質に対する抗体を含んで成るキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物試料中のリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現を測定することにより、ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が、上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性であるかどうかを決定する方法に関する。本発明は、リン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質が用いられる患者中の肺癌の進行を阻害するための候補薬剤を得るための又は組成物を選択するための方法にも関する。

40

【背景技術】

【0002】

e r b B 1 遺伝子によりコードされる E G F R は、ヒト悪性腫瘍において因果的に関係する。特に、E G F R の発現の増加は、乳癌、膀胱癌、肺癌、頭部癌、頸部癌及び胃癌、並びに神経膠芽腫において観察された。上皮成長因子受容体 (E G F R) (170 k D の糖タンパク質) は、N 末端細胞外ドメイン、疎水性膜貫通ドメイン、及びキナーゼドメインを含む C 末端細胞内領域から構成される。E G F R リガンド誘導性二量化は、固有の R T K ドメイン (S r c ホモロジドドメイン 1、S H 1) を活性化し、細胞質ドメインの非

50

触媒尾部中の6個の特異的なEGFRチロシン残基上での自己リン酸化を生じさせる。

【0003】

癌細胞中のEGFR活性化の細胞効果としては、増殖の増大、細胞運動の促進、接着、浸潤、血管新生、及びアポトーシスの阻害による細胞生存性の強化が挙げられる。EGFRの活性化は、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)カスケードの刺激により、腫瘍細胞増殖を誘導する。EGFRに結合するリガンドにおいて、SOSグアニンヌクレオチド交換因子は、Grb2アダプタータンパク質により原形質膜に動員され、これは、小さなGタンパク質であるRas上で、GTPのGDPへの交換を促進し、その後、Raf、MEK、及びERKから成るMAPKカスケードを活性化する。ERK(pMAPK、pERK1/2)の活性化は、順に、ELK-1又はc-Myc(細胞成長を促進する)などの転写因子をリン酸化し、活性化する。

10

【0004】

多くの成長因子経路は、多くのキナーゼの活性化を通して、NSCLC細胞の発達及び生存に寄与する。EGFRは、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ(PI3K)/Akt経路及びSTAT経路を経るシグナル伝達によっても、癌細胞の生存率を強化する。Aktは、他の成長因子、例えばインスリン成長因子1、塩基性線維芽細胞成長因子、及びインターロイキン3及び6によっても刺激される。Akt1~3の3つのアイソフォームは、全て、活性化ドメインにおけるT308残基とCOOH末端ドメインにおけるS473残基において、同様の様式でリン酸化される(pAKT)。

20

【0005】

エルロチニブ(Tarceva(登録商標))は、有力な上皮成長因子受容体(HER1/EGFR)チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)であり、これは、単剤(WO01/34574)として用いた場合に、以前の化学療法が失敗であった非小細胞肺癌(NSCLC)を有する患者に対して、延命効果を提供する。様々な試験においてTarceva(登録商標)の有効性が試験された。その化学名は、N-(3-エチニルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)キナゾリン-4-アミンである。

【0006】

TALENT試験は、一次NSCLC患者におけるプラセボ対照第3相試験であり、患者は、150mg/日でのエルロチニブ(Tarceva(登録商標))又はプラセボと組み合わせてゲムシタピン及びシスプラチン(この併用化学放射線療法は、治療の非US標準であった)を受けた。主要評価項目は、生存期間であり、副次的評価項目は、腫瘍増殖停止時間、奏効率;奏功期間;薬物動態パラメータ及び薬力学的パラメータ、及び生活の質であった。HER1/EGFR及びHER2の発現率も評価した。標準安全性解析を実施した。TALENT試験の全ての結果は、陰性であった。主要評価項目及び副次的評価項目に関して、ゲムシタピン及びシスプラチン単独と比較して、エルロチニブ(Tarceva(登録商標))と化学療法(ゲムシタピン及びシスプラチン)に対する実証できる利点は存在しなかった(Gatzemeier, U., et al., Proc Am Soc Clin Oncol 23(2004)617(abstract7010))。エルロチニブとカルボプラチン及びパクリタキセルを用いた、US基準のTRIBUTE試験において、同一結果が見られた(Herbst, R.S., et al., J Clin Oncol(2004)ASCO Annual Meeting Proceedings, Post-Meeting Edition; 22(July 15 Suppl.)(abstract7011))。非小細胞肺癌(NSCLC)に対する二次又は三次治療としての単剤エルロチニブの無作為プラセボ対照第3相試験(BR.21;NCIC/OSIP)は、プラセボ(4.7ヶ月)と比較して、エルロチニブ(6.7ヶ月)による生存性において、統計学的に顕著な改善を見出した。

30

40

【0007】

様々な試験は、非小細胞肺癌中のバイオマーカー及び特定のEGFR阻害薬剤への関係の調査に関する。Han等(Int J Cancer 113(2005)109-115)は、ゲフィチニブ(Iressa(登録商標))、EGFR TKI)単剤治療によ

50

り65人の患者を調べる。彼らは、化学療法耐性非小細胞肺癌中のゲフィチニブに対する応答予測マーカーとして、EGFRの下流分子を分析する。Cappuzzo, F.等(JNCI 96(2004)1133-1141)は、ゲフィチニブ(Iressa, EGFR TKI)単剤治療により106人の患者を調べる。彼らは、進行性非小細胞肺癌を有する患者におけるAktリン酸化及びゲフィチニブの有効性を調査し、ゲフィチニブを受けたP-Akt-陽性腫瘍を有する患者は、P-Akt-陰性腫瘍を有する患者より、治療からより多く利益を得ることを見出す。Vicent, S.等(Br J Cancer 90(2004)1047-1052)は、111人のNSCLC患者を調べる。彼らは、pERKが非小細胞肺癌中で活性化され、進行性腫瘍に関連することを見出す。Han, S.W.等(J Clin Oncol 23(2005)2493-2501)は、ゲフィチニブ(EGFR TKI)単剤治療により90人の患者を調べる。彼らは、ゲフィチニブで処置した、非小細胞肺癌患者における上皮成長因子受容体変異の予測及び予後影響を分析する。Mukohara, T.等(Lung Cancer 41(2003)123-130)は、ネオアジュバント化学療法又は放射線療法のいずれかを受けた60人の患者(1段階あたり20人の患者)を調べる。EGFRの発現は、pERK及びpAktの発現と相互に関連する。試料サイズは、著者自身により言及されているように過度に低い。Raben, D.等(Int J Radiation Oncology Biol. Phys 59(2004)27-38)は、非小細胞肺癌に対する標的治療を調べる。Ono, M.等(Mol Cancer Ther 3(2004)465-472)は、9個のNSCLC細胞株を試験し、ゲフィチニブで処理した。Hirsch, F.R.等(Curr Opin Oncol 17(2005)118-122)は、ゲフィチニブ耐性に対する有力なマーカーとしてAkt及びMAPKのリン酸化状態を再調査する。Meert等(Clinical Cancer Research (2003)2316-2326)は、EGFR阻害剤活性の側面において、NSCLC細胞株を調べる。EGFRの発現レベルもHer2の発現レベルも、EGFR阻害剤に対する感受性と相互に関連しない。Brognard, J.等(Cell Death and Differentiation 9(2002)893-904)は、19個のNSCLC細胞株を試験し、それにより、17個は、Erk1/2のリン酸化及び恒常的活性を示した。David, O.等(Clinical Cancer Research 10(2004)6865-6871)は、pAktの過剰発現は、NSCLC中の独立した予後因子であることを開示する。Kakiuchi, S.等(Human Molecular Genetics 13(2004)3029-3043)は、33人のNSCLC患者の、ゲノム規模でのcDNAマイクロアレイを調べる。全てには、単剤治療設定においてゲフィチニブが与えられた。Akt/pAktの発現レベル、EGFR遺伝子状態又はpEGFR染色とゲフィチニブ応答の間の相互関係に関して、証拠は見出されなかった。Kim, R.H.等(Cancer Cell 7(2005)263-273)は、DJ-1の発現(癌遺伝子)が、pAktレベルに等しいことを開示した。Balsara, B.R.等(Carcinogenesis 25(2004)2053-2059)は、TMA pAkt発現により、110人のNSCLC患者を調べる。pAkt陰性と陽性の間に、生存率の顕著な差異は存在しない。Hirami, Y.等(Cancer Letters 214(2004)157-164)は、非小細胞肺癌中の上皮成長因子受容体、pAkt及び低酸素誘導因子-1アルファの関係を調べる。Lee, S.H.等(APMIS 110(2002)587-592)は、NSCLC患者の43LN転移について分析する。NSCLC中のAkt活性化は、腫瘍進行よりむしろ、腫瘍発達において役割を果たす。Engelman, J.A.等(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(2004)3788-3793)は、erbB-3がゲフィチニブ感受性非小細胞肺癌細胞株におけるホスホイノシチド3-キナーゼ活性を介在することを分析する。David, O.(J Cell Mol Med 5(2001)430-433)は、肺癌における新規の診断マーカーとしての、Akt及びPTENの役割を論じる。Mantha, A.等(Clin. Cancer Res. 11

(2005)2398-2407)は、上皮成長因子受容体の役割を阻害するメバロン酸経路標的化について調べる。

【0008】

EGFR陽性癌に関連する予後マーカーは、WO2004/046386において調べられている。EGFR阻害薬剤に対する応答に関する遺伝子発現マーカーは、US2004/0157255により開示されている。上皮成長因子受容体モジュレーターに対する感受性を決定するためのバイオマーカー及び方法は、WO2004/063709に開示されている。WO01/00245は、ヒト化抗Erbb2抗体及び抗Erbb2抗体、例えばヒト化抗erbb2抗体を用いて癌を処置するための方法について記載する。

【発明の開示】

10

【0009】

発明の概要

EGFR阻害剤治療、特にEGFR阻害剤の化学療法剤との併用治療に対する感受性を決定するための方法を提供する必要性が未だに存在する。

【0010】

従って、本発明の実施態様において、ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性であるかどうかを決定する方法であって、リン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の過剰発現が、ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性であることの指標である、生物試料中のリン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の過剰発現を測定することを含んで成る前記方法を提供する。

20

【0011】

本発明の別の実施態様において、リン酸化AKTタンパク質に結合する抗体又はリン酸化MAPKタンパク質に結合する抗体は、ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性であるかどうかを決定するために用いられる。

【0012】

本発明の別の実施態様においては、

a) 複数の試験組成物の存在下で、患者からのEGFR阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性である肺癌細胞を含んで成る生物試料のアリコート、別々に曝露すること；

30

b) 試験組成物と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化Aktタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベル、及び試験組成物と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化Aktタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルを比較すること、

c) 試験組成物と接触させていないアリコートと比べて、試験組成物を含むアリコート中のリン酸化Aktタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルを変化させる試験組成物の1つを選択すること、ここで、試験組成物と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化Aktタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルと、試験組成物と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化Aktタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルの間の少なくとも10%の差異が、試験組成物の選択のための指標である、

40

を含んで成る、患者における肺癌の進行を阻害するための組成物を選択する方法が提供される。

【0013】

本発明の更に別の実施態様においては、

a) EGFR阻害剤及び化学療法剤に対して感受性である肺癌細胞を含む生物試料のアリコートを、候補薬剤と接触させること、

(b) 候補薬剤と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化Aktタンパク質及び

50

／又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルを測定すること、及び候補薬剤と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化Aktタンパク質及び／又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルを測定すること、

(c) 候補薬剤と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化Aktタンパク質及び／又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベル、及び候補薬剤と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化Aktタンパク質及び／又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルを比較することにより、候補薬剤の効果を観察すること、

(d) 観察された効果から当該薬剤を得ること、ここで、候補薬剤と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化Aktタンパク質及び／又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルと、候補薬剤と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化Aktタンパク質及び／又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルの間の少なくとも10%の差異が、候補薬剤の効果の指標である、

を含んで成る、候補薬剤を得る方法が提供される。

【0014】

本発明の別の実施態様においては、本発明の方法により得られる候補薬剤、及び本発明の薬剤を含んで成る医薬調製物が提供される。

【0015】

本発明の更に別の実施態様において、本発明の薬剤は、肺癌の進行の阻害のための組成物の調製に用いられる。

【0016】

本発明の更に別の実施態様においては、本発明の方法の段階、及び

(i) 対象に対して治療有効量の薬剤を供給するのに十分な量で、段階(c)で同定された候補薬剤又はその類似体若しくは誘導体を合成すること；及び／又は

(ii) 段階(c)で同定された候補薬剤又はその類似体若しくは誘導体を、医薬として許容される担体と混合すること、

を含んで成る、薬剤を製造するための方法。

【0017】

本発明の別の実施態様においては、Aktタンパク質、MAPKタンパク質、リン酸化Aktタンパク質、リン酸化MAPKタンパク質、リン酸化Aktタンパク質又はリン酸化MAPKタンパク質に対して選択的に結合する抗体が、患者において肺癌の進行を阻害するための候補薬剤を得るために又は組成物を選択するために用いられる。

【0018】

本発明の更に別の実施態様においては、リン酸化MAPK及び／又はリン酸化Aktタンパク質に対する抗体を含んで成るキットが提供される。

【0019】

用語「生物試料」は、一般的に、個々の体液、細部株、組織培養、又は他の起源から得られる任意の生物試料を意味する。体液は、例えばリンパ液、血清、血漿、尿、精液、滑液及び髄液である。本発明によると、生物試料は、肺癌細胞及び非肺癌細胞(他の細胞)を含んで成る。哺乳動物から生検組織及び体液を得るための方法は、当業界で周知である。

【0020】

用語「発現のレベル」又は「発現レベル」は、一般的に、試料中のアミノ酸産物又はタンパク質の量、好ましくは本発明の試料中のリン酸化アミノ酸産物又はリン酸化タンパク質の量を指す。「発現」は、遺伝子コード情報が、細胞中に存在し、作動(例えば、本発明のリン酸化)する構造へと変換される工程を指す。本明細書中で用いる場合、「発現遺伝子」は、mRNAへと転写され、その後タンパク質へと翻訳され、翻訳後に修飾(例えば、リン酸化)されたものを含む。単に完全性のために、この用語は、RNAへと転写されるが、タンパク質へと翻訳されない(例えば、トランスファーRNA及びリボソームRNA)発現遺伝子も含む。用語「過剰発現」及び「過少発現」は、コントロールとして用いる試料中のベースライン発現レベルと比較した場合の、発現レベルにおける上方又は下

10

20

30

40

50

方の偏差それぞれを指す。従って、「過剰発現」は「増大した発現」でもあり、「過少発現」は「減少した発現」である。

【0021】

本明細書中の用語「抗体」は、最も広い意味において用いられ、具体的には、所望の生物活性を示す限り、インタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つのインタクトな抗体から形成される多特異的抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体フラグメントに及ぶ。

【0022】

本明細書中で用いる場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に同質な抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、その集団を組んで成る個々の抗体は、少量で存在し得る自然に生じる可能性のある変異を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に向けられる。更に、異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に向けられる。特異性に加えて、モノクローナル抗体は、それらが他の抗体により汚染されずに合成することができる点で有利である。修飾語句「モノクローナル」は、実質的に同質な抗体の集団から得られる抗体の性質を示し、抗体の生成を必要とする場合、任意の特定の方法により構築されない。例えば、本発明で用いられるモノクローナル抗体は、Kohler, G.等（Nature 256（1975）495）により最初に説明されたハイブリドーマ法により生成することができ、或いは組み換えDNA法により生成することができる（例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと）。「抗体フラグメント」は、インタクトな抗体の一部を含んで成る。

【0023】

本発明の着目の抗原（すなわち、リン酸化MAPK又はリン酸化pAKTタンパク質）に「結合する」抗体は、抗体が抗原の存在を検出するのに有用であるように十分な親和性で抗原に結合することができるものである。本発明の抗体は、リン酸化MAPK又はリン酸化pAKTタンパク質に結合するものであり、これは、通常、非リン酸化MAPK又は非リン酸化pAKTタンパク質とは対照的に、リン酸化MAPK又はリン酸化pAKTタンパク質に選択的に結合し、或いは非リン酸化MAPK又は非リン酸化pAKTタンパク質とは顕著に交差反応しない。このような実施態様において、非リン酸化タンパク質への抗体の結合の程度は、蛍光活性化細胞分類（FACS）分析又は放射性免疫沈降法（RIA）により測定した場合に、10%未満であるだろう。言い換えれば、それは、リン酸化MAPK又はリン酸化pAKTタンパク質に特異的に結合し、非リン酸化MAPK又は非リン酸化pAKTタンパク質に特異的に結合しないか又は全く結合しない。

【0024】

「化学療法剤」は、癌の処置に有用な化合物である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えばチオテパ及びシクロスホスファミド（CYTOXAN（登録商標））、スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファン；アジリジン、例えばベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メトレドーパ（meturedopa）、及びウレドーパ（uredopa）；エチレンイミン及びメチラメラミン（methylamelamin）、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスファオラミド（triethylenethiophosphoramid）及びトリメチロロメラミン（trimethylolomelamine）；ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、クロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピシン（novembichin）、フェネステリン（phenesterine）、プレドニムスチン（prednimustine）、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質、例えばアクラシノマイシン、アクチノマイシン、オウストラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケア

10

20

30

40

50

マイシン、カラビシン (carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン、
 クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 -
 オキソ - L - ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシ
 ン、マルセロマイシン (marcellomycin)、マイトマイシン、ミコフェノ
 ル酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポフィロマイシン (pof
 firomycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン (quelamycin)、ロ
 ドルピシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベ
 ルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗物質、例えばメトトレキ
 サート及び 5 - フルオロウラシル (5 - FU)；葉酸類似体、例えばデノプテリン、メト
 トレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサート；プリン類似体、例えばフルダラビ
 ン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン (thiamiprine)、チオグアニン；
 ピリミジン類似体、例えばアンシタピン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル
 ル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリ
 ジン、5 - FU；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、
 エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤、例えばアミノグルテ
 チミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充物質 (replenisher)、例えばフ
 ロリニン酸 (frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミド配糖体
 ；アミノレプリン酸；アムサクリン；ベストラブシル (bestrabucil)；ピス
 アントレン；エダトラキサート (edatraxate)；デフォファミン (defof
 amine)；デメコルチン；ジアジコン；エルホルミチン (elformithine)
 ；エリプチニム酢酸塩 (elliptinium)；エトグルシド (etoglucid)
 ；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン (mi
 toguazone)；ミトキサントロン；モピダモル (mopidamol)；ニトラ
 クリン (nitracrine)；ペントスタチン；フェナメト (phenamet)；
 ピラルピシン；ポドフィリン酸 (podophyllinic acid)；2 - エチル
 ヒドラジド；プロカルバジン；PSK (登録商標)；ラゾキサラン (razoxane)；
 シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン (triaziqu
 one)；2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ビンデシン；ダ
 カルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール (mitolacto
 l)；ピポプロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド (「Ara
 C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキサン、例えばバクリタキセル (TAXOL
 (登録商標)、Bristol - Myers Squibb Oncology, Pri
 nceton, N.J.) 及びドセタキセル (TAXOTERE (登録商標)、Rhone
 - Poulenc Rorer, Antony, France)；クロラムブシル；ゲム
 シタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金類似体、例え
 ばシスプラチン及びカルボプラチン；ピンブラスチン；白金；エトボシド (VP - 16)
 ；イホスファミド；マイトマイシン C；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルピ
 ン；ナベルピン；ノバントロン；テニボシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼロー
 ダ；イバンドロネート；CPT - 11；トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000；ジフル
 オロメチルオルニチン (DMFO)；レチノイン酸；エスペラミシン；カペシタピン；及
 び任意の上記のものの医薬として許容される塩、酸又は誘導体が挙げられる。また、この
 定義の中に、腫瘍においてホルモン作用を調節又は阻害するように作用する抗ホルモン剤
 、例えば抗エストロゲン剤、例えばタモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害
 4 (5) - イミダゾール、4 - ヒドロキシタモキシフェン、トリゾキシム、ケオキシフェ
 ン (keoxifen)、LY 117018、オナプリストン、及びトレミフェン (F
 areston)；及び、抗アンドロゲン剤、例えばフルタミド、ニルタミド、ピカルタ
 ミド、ロイプロリド、及びゴセレリン；及び、任意の上記のものの医薬として許容される
 塩、酸又は誘導体も含まれる。「化学療法剤」自体は、上記の癌の組み合わせの処置に有
 用である化合物の組み合わせであることができる。すなわち、当該組み合わせは、ゲムシ
 タピン / シスプラチンだけでなく、例えばシスプラチン / バクリタキセル、シスプラチン

10

20

30

40

50

ノドセタキセル、シスプラチン/ピノレルピン、ゲムシタピン/カルボプラチン、又はカルボプラチン/ドセタキセルであることができる。

【0025】

用語「EGFR阻害剤」は、EGFRに結合し、任意にEGFR活性を阻害する治療剤を指す。このような薬剤の例としては、EGFRに結合する抗体及び小分子が挙げられる。EGFRに結合する抗体の例としては、MAb579(ATCC CRL HB 8506)、MAb455(ATCC CRL HB8507)、MAb225(ATCC CRL 8508)、MAb528(ATCC CRL 8509)(US4,943,533、Mendelsohn et al.を参照のこと)、及びその変異体、例えばキメラ化225(C225又はCetuximab; ERBUTIX(登録商標))及び再形成ヒト225(H225)(WO96/40210、Imclone Systems Inc.を参照のこと);タイプ11変異体EGFRに結合する抗体(US5,212,290);US5,891,996に記載されたEGFRに結合するヒト化及びキメラ化抗体;及びEGFRに結合するヒト抗体、例えばABX-EGF(WO98/50433、Abgenixを参照のこと)が挙げられる。抗EGFR抗体は、細胞毒性剤により抱合して、免疫抱合体を生成することができる(例えば、EP0659439A2、Merck Patent GmbHを参照のこと)。EGFRに結合する小分子の例としては、ZD1839又はゲフィチニブ(IRESSA(登録商標); AstraZeneca)、CP-358774(Tarceva(登録商標); Genentech/OSSI)及びAG1478、AG1571(SU5271; Sugen)が挙げられる。本出願において特に好ましいのは、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤、特に小分子EGFRチロシンキナーゼ阻害剤、例えばTarceva(登録商標)である。「小分子」は、例えば、約10,000グラム/モル未満、好ましくは約5,000グラム/モル未満の分子量を有するペプチド又はペプチド模倣体であることができる。好ましくは、「小分子」は、約5,000グラム/モル未満、好ましくは約1,000グラム/モル未満、より好ましくは500グラム/モル未満の分子量を有する化合物、すなわち有機化合物又は無機化合物、並びにそのような化合物の塩、エステル、及び他の医薬として許容される形態である。従って、本発明の好ましい実施態様において、EGFR阻害剤は、約5,000グラム/モル未満、好ましくは約1,000グラム/モル未満の分子量を有する化合物であるEGFRチロシンキナーゼ阻害剤、並びにそのような化合物の塩、エステル、及び他の医薬として許容される形態である。言い換えると、EGFR阻害剤は、EGFRチロシンキナーゼ活性を阻害し、約5,000グラム/モル未満、好ましくは約1,000グラム/モル未満、より好ましくは500グラム/モル未満の分子量を有する化合物、並びにそのような化合物の塩、エステル、及び他の医薬として許容される形態である。

【0026】

「ゲムシタピン」は、デオキシリボース部分が2位において2個のフッ素原子を含む、デオキシシチジンのピリミジン類似体である、化学療法剤2',2'-ジフルオロデオキシシチジン(dFdC)である(Heinemann, V.等、Cancer Res 48(1988)4024を参照のこと)。それは、Gemzar(登録商標)として、Eli Lilly and Company(Indianapolis, Indiana, USA)から市販されている。

【0027】

本出願において用いる場合、「シスプラチン」は、Platinol(登録商標)として、Bristol-Myers Squibb Company(New York, NY, USA)から市販されている、化学療法剤シス-ジアンミンジクロロ白金(US5,562,925を参照のこと)である。「シスプラチン」は、シス位の2個の塩素原子及び2個のアンモニア分子により囲まれた白金の中心原子を含む重金属複合体である。

【0028】

本発明によると、「ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性である」という表現は、ヒト肺癌細胞を含んで成

10

20

30

40

50

る生物試料が、上皮成長因子受容体阻害剤単独での処理とは対照的に、上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせによる処置に対して感受性であることを意味する。「感受性である」とは、「に対して反応する」又は「に対して反応を示す」と理解されることもでき、特に肺癌患者に対して有効な反応である。それにより、肺癌患者が、上皮成長因子受容体阻害剤単独での処理とは対照的に、上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせによる処置に対して感受性であるかどうかを決定することができる。これは、患者がそのような処置から利益を享受するだろうことを意味する。

【0029】

「MAPK」タンパク質は、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)又は細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)として知られる、高度に保存された細胞質セリン/スレオニンタンパク質キナーゼファミリーのメンバーである。このタンパク質ファミリーは、いくつかのサブグループを有する。ERKは、様々な細胞外シグナル、例えば浸透圧ストレス、熱ショック、炎症誘発性サイトカイン、ホルモン、及びマイトジェンに応答して、活性化及びチロシン-又はスレオニン-リン酸化される。本発明で用いる場合、用語「MAPKタンパク質」は、好ましくは、MAPK1及びMAPK3を含んで成る、或いは、好ましくは、MAPK1及びMAPK3から成るMAPKタンパク質ファミリーのメンバーを指す。MAPK1(ERK2)のアミノ酸配列は、配列番号1であり、MAPK3(ERK1)(配列番号2)。これらのアミノ酸配列は、mRNA配列、すなわちMAPK1に関してはcDNA配列の配列番号3及び4、MAPK3に関しては配列番号5によりコードされている。MAPK1における主なリン酸化部位は、Thr185及びTyr185であり、MAPK3における主なリン酸化は、Thr202及びTyr204である。これらのリン酸化部位は、本発明において用いられる抗体、すなわち好ましくはMAPK1及びMAPK3のリン酸化形態に対するポリクローナル抗体血清によっても認識される。

【0030】

用語「Akt」タンパク質は、それぞれAkt1/PKBアルファ、Akt2/PKBベータ(Staal, S. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 5034-5037)、及びAkt3/PKBガンマ(Nakatani, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 257 (1999) 906-910; US 6, 881, 555)と呼ばれている3つのメンバーを有する、二次メッセンジャー調節セリン/スレオニンタンパク質キナーゼのAkt/PKBサブファミリーのタンパク質を指す。アイソフォームは相同であり、ホスファチジルイノシトール3'-OHキナーゼ(PI3K)シグナル伝達に応答してリン酸化により活性化される。PI3K/Akt/PKB経路は、腫瘍形成においても、細胞生存/細胞死を調節するのに重要であるようである(Dudek, H. et al., Science 275 (1997) 661-665)。本発明において用いる場合、用語「Aktタンパク質」は、好ましくは、Akt1、Akt2及びAkt3を含んで成る、或いは、好ましくは、Akt1、Akt2及びAkt3から成るAktタンパク質ファミリーのメンバーを指す。Akt/PKBのリン酸化は、2つの部位Thr³⁰⁸及びSer⁴⁷³において生じる(Meier, R., et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 30491-30497)。同等のリン酸化部位は、Akt2/PKBベータ(Thr³⁰⁹及びSer⁴⁷⁴)及びAkt3/PKBガンマ(Thr³⁰⁵及びSer⁴⁷²)中に生じる。用語「リン酸化Akt」タンパク質は、リン酸化された、好ましくは上記の部位においてリン酸化された「Akt」タンパク質を指す。本発明において用いる場合、用語「MAPKタンパク質」は、好ましくは、MAPK1及びMAPK3を含んで成る、或いは、好ましくは、MAPK1及びMAPK3から成るMAPKタンパク質ファミリーのメンバーを指す。Akt1は、ヒトRAC-アルファセリン/スレオニン-タンパク質キナーゼ(EC2.7.1.37)(RAC-PK-アルファ)、タンパク質キナーゼB(PKB)(C-AKT)としても知られており、Akt1のアミノ酸配列は、配列番号6である。AKT2は、ヒトRAC-ベータセリン/スレオニン-タンパク質キナーゼ(EC2.7.

10

20

30

40

50

1.37) (RAC-PK-ベータ)、タンパク質キナーゼAkt-2、又はタンパク質キナーゼB、ベータ(PKBベータ)としても知られており、Akt2のアミノ酸配列は、配列番号7である。Akt3は、ヒトRAC-ガンマセリン/スレオニン-タンパク質キナーゼ(EC2.7.1.37)(RAC-PK-ガンマ)、タンパク質キナーゼAkt-3又はタンパク質キナーゼB、ガンマ(PKBガンマ)(STK-2)としても知られており、Akt3のアミノ酸配列は、配列番号8である。

【0031】

発明の詳細な説明

当業界の技術の範囲内である分子生物学及び核酸化学の通常の技術は、文献中で説明される。例えば、Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; Gait, M.J. (ed.), *Oligonucleotide Synthesis - A Practical Approach*, IRL Press, 1984; Hames, B.D., and Higgins, S.J. (eds.), *Nucleic Acid Hybridisation - A Practical Approach*, IRL Press, 1985; 及び、シリーズ、*Methods in Enzymology*, Academic Press, Inc. を参照のこと。これらの全ては、引用文献により本明細書中に組み込まれる。上記及び下記の、全ての特許、特許出願、及び本明細書中で言及される刊行物は、引用文献により本明細書中に組み込まれる。

10

20

【0032】

本発明の実施態様において、ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性であるかどうかを決定する方法であって、リン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の過剰発現が、ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性であることの指標である、生物試料中のリン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の過剰発現を測定することを含んで成る前記方法を提供する。

30

【0033】

好ましくは、本発明の方法において、生物試料中のリン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の過剰発現を、

a) 生物試料中のリン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルを測定すること、

b) 上皮成長因子阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性でないヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料中の、リン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルを測定すること、

c) 段階a)及び段階b)において測定したリン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルの差異を測定し、それにより、リン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の過剰発現を測定すること、

40

により測定する。

【0034】

好ましくは、段階a)及び段階b)において測定したリン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルの差異は、少なくとも10%である。より好ましくは、段階a)及び段階b)において測定したリン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルの差異は、少なくとも25%である。別の実施態様において、段階a)及び段階b)において測定したリン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルの差異は、少なくとも50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、300%、400%、500%又は1,000%である。段階a)及び段階b)において測定したリン酸化AKTタンパク

50

質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルの差異は、最大で10,000%又は50,000%であることができる。段階a)及び段階b)において測定したリン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化MAPKタンパク質の発現レベルの差異は、好ましくは10%~10,000%、より好ましくは25%~10,000%、50%~10,000%、100%~10,000%、更により好ましくは25%~5,000%、50%~5,000%、100%~5,000%である。

【0035】

本発明の好ましい実施態様において、生物試料は、例えば肺生検により、或いは生検により他の器官から得ることができる原発肺腫瘍又は転移(局所又は遠隔)である。転移は、例えば肝臓又はリンパ節からの遠隔転移であることもできる。このような遠隔転移は、転移が肺に由来する場合、肺癌細胞も含むことに注意する必要がある。

10

【0036】

別の好ましい実施態様において、癌は、膵臓癌のような肺癌以外の別の癌である。しかし、固形腫瘍を有する他の癌も適しており、例えば卵巣、結腸直腸、頭部及び頸部、腎臓細胞癌、神経膠腫及び消化管癌、特に胃癌である。

【0037】

別の好ましい実施態様において、EGFR阻害剤は、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤、特に小分子EGFRチロシンキナーゼ阻害剤、例えばTarceva(登録商標)である。従って、言い換えれば、本発明の特に好ましい実施態様において、EGFR阻害剤は、エルロチニブ又はN-(3-エチニルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)キナゾリン-4-アミンである。

20

【0038】

本発明の更に別の好ましい実施態様において、化学療法剤は、ゲムシタピン及び/又はシスプラチンである。

【0039】

本発明の別の好ましい実施態様において、リン酸化Aktタンパク質又はリン酸化MAPKタンパク質の過剰発現は、リン酸化タンパク質に特異的に結合し、好ましくは非リン酸化タンパク質に特異的に結合しないか又は全く結合しない試薬を用いて測定する。好ましくは、抗体、抗体誘導体、又は抗体フラグメントは、リン酸化AKTタンパク質又はリン酸化MAPKタンパク質に特異的に結合し、好ましくは非リン酸化AKTタンパク質又は非リン酸化MAPKタンパク質に特異的に結合しないか又は全く結合しない。

30

【0040】

本発明の更に別の好ましい実施態様において、リン酸化AKTタンパク質は、Akt1タンパク質のアミノ酸位置473に対応するアミノ酸位置でリン酸化され、或いはMAPKタンパク質は、MAPK1のアミノ酸位置202及び204に対応するアミノ酸位置でリン酸化される。好ましくは、MAPKタンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸配列の配列番号1又は2であり、AKTタンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸配列の配列番号6、7又は8である。

【0041】

本発明の方法で用いることができる多くの異なるタイプの免疫測定法が存在し、例えば酵素結合免疫測定法(ELISA)、蛍光免疫吸着法(FIA)、化学発光免疫吸着法(CLIA)、放射免疫測定法(RIA)、及び免疫プロット法である。用いることのできる異なる免疫測定法の概説に関しては、以下を参照のこと: Lottspeich and Zorbas(eds.), Bioanalytik, 1st edition 1998, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany。従って、本発明の更に別の好ましい実施態様において、発現レベルは、プロテオミクス、フローサイトメトリー、免疫細胞化学、免疫組織化学及び酵素結合免疫測定法から成る群から選択される方法を用いて測定される。

40

【0042】

本発明の好ましい実施態様において、リン酸化AKTタンパク質及び/又はリン酸化M

50

A P K タンパク質の過剰発現は、以下の段階により測定することができる

- a) 生物試料を免疫組織化学的に染色すること、
- b) 生物試料中の細胞の染色の外観検査により、リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルに対して、1、2、3 及び 4 の数から選択されるグレードを割り当て、それにより、発現レベルに対して最も高い検出可能なグレードを割り当てること、
- c) 免疫組織化学的に染色した生物試料中で、最も高い検出可能なグレードを有する細胞のパーセンテージを測定すること、
- d) 割り当てたグレードに、免疫組織化学的に染色した生物試料中で最も高い検出可能なグレードを有する細胞のパーセンテージ、及び 100 を掛けること、及び
- e) 段階 d) における掛け算の結果が 100 超である場合に、生物試料中のリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現を測定すること。

10

【0043】

本発明の別の実施態様において、肺癌患者が、上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせから利益を得るかどうかを決定するための方法であって、リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現が、患者が上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせから利益を得ることの指標である、患者からの試料中のリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現を測定することを含んでなる前記方法が提供される。上記の全ての他の好ましい実施態様は、等しくこの実施態様に適用する。好ましくは、本発明の方法において、患者からの試料中のリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現は、以下の段階により測定される、

20

- a) 患者からの試料中のリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現レベルを測定すること、
- b) 上皮成長因子阻害剤と化学療法剤の組み合わせから利益を得ない肺癌患者からの試料中の、リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現レベルを測定すること、
- c) 段階 a) 及び段階 b) において測定されたリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異を測定すること、それにより、リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の過剰発現を測定する。用語「利益を得る」は、上皮成長因子受容体阻害剤単独での処置とは対照的に、上皮成長因子受容体阻害剤と化学療法剤の組み合わせの処置から患者が利益を得ないことを意味する。

30

【0044】

本発明の別の好ましい実施態様において、リン酸化 A K T タンパク質に結合する抗体又はリン酸化 M A P K タンパク質に結合する抗体を、ヒト肺癌細胞を含んで成る生物試料が、上皮成長因子阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性であるかどうかを決定するのに用いる。

【0045】

本発明の更に別の実施態様において、

- a) 複数の試験組成物の存在下で、患者からの E G F R 阻害剤と化学療法剤の組み合わせに対して感受性である肺癌細胞を含んで成る生物試料のアリコート、別々に曝露すること、
- b) 試験組成物と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベル、及び試験組成物と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを比較すること、
- c) 試験組成物と接触させていないアリコートと比べて、試験組成物を含むアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを変化させる試験組成物の 1 つを選択すること、ここで、試験組成物と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現

40

50

レベルと、試験組成物と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの間の少なくとも 10 % の差異が、試験組成物の選択のための指標である、

を含んで成る、患者における肺癌の進行を阻害するための組成物を選択する方法が提供される。

【 0 0 4 6 】

好ましくは、段階 c) における、リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異は、少なくとも 25 % である。より好ましくは、段階 c) における、リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異は、少なくとも 50 % である。別の実施態様において、段階 c) における、リン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異は、少なくとも 75 %、100 %、125 %、150 %、175 %、200 %、300 %、400 %、500 % 又は 1,000 % である。段階 c) において測定したリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異は、最大で 10,000 % 又は 50,000 % であることができる。段階 c) において測定したリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異は、好ましくは 10 % ~ 10,000 %、より好ましくは 25 % ~ 10,000 %、50 % ~ 10,000 %、100 % ~ 10,000 %、更により好ましくは 25 % ~ 5,000 %、50 % ~ 5,000 %、100 % ~ 5,000 % である。

10

【 0 0 4 7 】

本発明の更に別の実施態様においては、

a) E G F R 阻害剤及び化学療法剤に対して感受性である肺癌細胞を含む生物試料のアリコートを、候補薬剤と接触させること、

(b) 候補薬剤と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを測定すること、及び候補薬剤と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを測定すること、

(c) 候補薬剤と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベル、及び候補薬剤と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルを比較することにより、候補薬剤の効果を観察すること、

30

(d) 観察された効果から当該薬剤を得ること、ここで、候補薬剤と接触させた生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルと、候補薬剤と接触させていない生物試料のアリコート中のリン酸化 A k t タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの間の少なくとも 10 % の差異が、候補薬剤の効果の指標である、

を含んで成る、候補薬剤を得る方法が提供される。

【 0 0 4 8 】

好ましくは、段階 d) におけるリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異は、少なくとも 25 % である。より好ましくは、段階 d) におけるリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異は、少なくとも 50 % である。別の実施態様において、段階 d) におけるリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異は、少なくとも 75 %、100 %、125 %、150 %、175 %、200 %、300 %、400 %、500 % 又は 1,000 % である。段階 d) において測定したリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異は、最大で 10,000 % 又は 50,000 % であることができる。段階 d) において測定したリン酸化 A K T タンパク質及び / 又はリン酸化 M A P K タンパク質の発現レベルの差異は、好ましくは 10 % ~ 10,000 %、より好ましくは 25 % ~ 10,000 %、50 % ~ 10,000 %、100 % ~ 10,000 %、更により好ましくは 25 % ~ 5,000 %、50 % ~ 5,000 %、100 % ~ 5,000 % である。

40

50

00%、100%～5,000%である。

【0049】

好ましい実施態様において、候補薬剤は、候補阻害剤又は候補増強剤である。

【0050】

本発明の別の実施態様において、本発明の方法により得られる候補薬剤が提供される。

【0051】

更に別の実施態様において、本発明の薬剤を含んで成る医薬調製物が提供される。

【0052】

更に別の実施態様において、本発明の薬剤は、肺癌の進行を阻害するための組成物の調製のために用いられる。

【0053】

本発明の更に別の実施態様において、本発明の方法の段階、及び

(i) 対象に対して治療有効量の薬剤を提供するのに十分な量で、段階(c)で同定された候補薬剤、或いはその類似体又は誘導体を合成すること；及び/又は

(ii) 段階(c)で同定された候補薬剤、或いはその類似体又は誘導体を、医薬として許容される担体と混合すること、

を含んで成る薬剤を製造する方法が提供される。

【0054】

更に別の実施態様において、Aktタンパク質、MAPKタンパク質、リン酸化Aktタンパク質、リン酸化MAPKタンパク質、リン酸化Aktタンパク質又はリン酸化MAPKタンパク質に選択的に結合する抗体を、患者における肺癌の進行を阻害するための候補薬剤を得るため又は組成物を選択するのに用いる。

【0055】

本発明の別の実施態様において、キットは、リン酸化MAPK及び/又はリン酸化Aktタンパク質に対する抗体を含んで成ることが意図される。当業界で知られたこのようなキットは、本発明の方法、好ましくは免疫測定法、例えば酵素結合免疫測定法(ELISA)、蛍光免疫吸着法(FIA)、化学発光免疫吸着法(CLIA)、放射免疫測定法(RIA)、及び免疫プロット法を実施するための、増幅手順の間に用いることのできるプラスチック用品、例えば96又は384ウエル形式のマイクロタイタープレート、又は例えばEppendorf(Hamburg, Germany)により製造された通常の反応チューブ、及び全ての他の試薬を更に含んで成る。用いることのできる異なる免疫測定法及び試薬の概説に関しては、以下のものを参照のこと：Lottspeich and Zorbass(ed.s.), Bioanalytik, 1st edition 1998, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Germany。

【0056】

以下の実施例、引用文献、配列表及び図面は、本発明の理解を助けるために提供され、その真の範囲は、添付した特許請求の範囲において示される。本発明の精神から逸脱することなく、示した方法において変更が可能であることが理解される。

【実施例】

【0057】

実施例1

腫瘍組織飼料におけるバイオマーカー試験

臨床試験に関する探索腫瘍バイオマーカー試験の目的は、Tarceva(登録商標)処置の陽性又は陰性臨床転帰を最も良く予測するそれらのマーカー又はマーカーの組み合わせの同定であった。試験の臨床結果が、Tarceva(登録商標)による処置からより利益を得る患者集団をどのように選択するかについて仮説を生み出さなかったので、特別な重点が、Tarceva(登録商標)の組み合わせ対化学療法単独の対照治療群において特異的に利益を得る患者(サブグループ)を区別するマーカーの同定に置かれた。更に、Tarceva(登録商標)対化学療法単独の対照治療群との具体的な組み合わせか

10

20

30

40

50

らの有害な作用を有する患者（サブグループ）を区別するマーカーの同定が、調べられた。

【0058】

この試験の目的は、EGFRシグナル伝達経路に関連する腫瘍特異的なバイオマーカー、例えばEGFR、HER2、pAKT、及びpMAPKを試験することである。

【0059】

バイオマーカーデータは、臨床データと相互に関連した（全体的及び治療特異的試験）。

【0060】

材料及び方法：

臨床試料：

バイオマーカー試験は、141人の患者の試料サブセットについて実施した。このために、最初の診断からのホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織ブロックを得た。

【0061】

IHC試験のための抗体：

【表1】

抗体	標的タンパク質	スライド前処理	希釈
Abcam ab8932 (Abcam (Cambridge, United Kingdom) から入手可能)	pAKT (Aktのリン酸化 Ser 473に対する抗体)	圧力釜120℃/5分, クエン酸緩衝液pH9	1:450
Zymed 36-8800 (Zytomed GmbH (Berlin, Germany) 又はInvitrogen (Carlsbad, CA, USA) から入手可能)	pMAPK (ERK1+2 Thr202/Tyr204)	圧力釜120℃/5分, クエン酸緩衝液pH6	1:150

【0062】

pMAPK IHCプロトコル：

1. パラフィン-アレイ-ブロックから約3~4nmの厚さの切片を切り取る。
2. スライド・ガラス上に切片を載せ、それらを一晩乾燥させる。
3. キシレン、その後低下するエタノール系において、スライドを脱パラフィンする：
 - キシレン 一晩
 - キシレン 2×10分間
 - 無水エタノール 2×10分間
 - 96%のエタノール 2×5分間
 - 80%のエタノール 1×5分間
 - 70%のエタノール 2×5分間
 - PBS緩衝液 10分間（1又は2回緩衝液を交換する）

4. 抗原回復/試料前処理

圧力釜 pH6の1×クエン酸緩衝液中で120において5分間（Biocyc GmbH、注文番号400300692）。TBS/PBS（1:10）緩衝液中で5分間洗浄する。

5. ペルオキシダーゼブロッキング

- スライドを、3%のH₂O₂中で10分間インキュベートする。
- TBS/PBS緩衝液中で2×5分間洗浄する。

6. 抗体インキュベーション

- トリス緩衝液又は他のブロッキング溶液中に希釈した正常血清（1.5%）中にスライドを置く。

- 1:150希釈した一次抗体（Zymed ウサギ抗ホスホ-ERK1+2 ca

t no. 36 - 8800) をスライド上に置き、腐植化 (humified) チャンバー中で30 において2時間それをインキュベートする。

- TBS / PBS 緩衝液中で2 × 5 分間洗浄する。

- スライド上に Envision Polymer HRP (Dako) を置き、腐植化チャンバー中で30 において30分間インキュベートする。

- TBS / PBS 緩衝液中で2 × 5 分間洗浄する。

7. 検出

- pH 7.6 の 0.05 M の トリス 緩衝液 で 20 分間 スライド を 洗浄 する

- 5 分間 DAB - Chromogen (Liquid DAB Dako code no. K3467) でスライドをカバーし、それを5 ~ 10分間インキュベートする。

- 脱塩水で5分間スライドを洗浄し、呈色反応を止める。

- ヘマトキシリン (Harris Hamatoxylin HTX 31000、Mediate GmbH) で対比染色する

- 水ですすぐ

- HCL - エタノール中で識別する

- 5 分間水中で「青」

- 漸増するエタノール系

- キシレン

- カバー

【0063】

pAKT IHC プロトコル:

以下のことを除いて、pMAPK と同様のプロトコル

- 比較4: pH 9 のクエン酸緩衝液中での試料の前処理 (Dako code no. S2367)

- 比較6: 1:450 希釈した一次抗体 (abcam AKT ホスホ S473) (比較6.)

【0064】

IHC データ報告:

一人の病理学者が、全ての免疫染色を評価した。核染色強度 (pAKT、pMAPK) を、4段階スケール (0、1、2、3) で、外観検査により評価した。核染色強度に加えて、陽性細胞のパーセンテージ、及び分析の失敗の理由 (すなわち、組織スポット中の腫瘍細胞の欠如、又はTMAスライド上の組織スポットの欠如) を記録した。

【0065】

調査統計分析:

バイオマーカーデータの統計分析は、各マーカーにより別々に及び/又は適切な組み合わせにより、臨床上的利益及び/又は毒性を予測する潜在的能力を調査することを目的とした。

【0066】

経験によると、多くのバイオマーカーは、患者を超えて及び患者内で、傾斜統計分布を示す。しばしば、変動プロセスが乗法構造を有している点で、このゆがみのいくつかの生化学的バックグラウンドも存在する。線形統計アプローチ (例えば、回帰) を用いる場合、傾斜分布は問題を示す。統計モデルにおいて共変量として用いる場合、ゆがみも結果を曖昧にし得る。従って、これらの測定結果をおよそガウス型の分布へと変換する適切な変換が見出される必要がある。バイオマーカー領域における典型的な選択は、式 $\log(x + c)$ の変換である。これらの変換は、値の順序は変えず、ランク又はカットオフに基づくノンパラメトリック分析は、変換により不変のままである。線形多変量法、例えば判別分析及び主成分分析を用いる場合、このような変換は必須でもある。

【0067】

異なるマーカーの基礎統計及び相互依存性を、記述的に調べた。例えばIHCのための異なる測定アプローチを比較する方法論的分析を、信頼性及び妥当性に関して実施した。

Tarceva (登録商標)の利益を、臨床的エンドポイント生存期間(又は死亡までの時間、TTD)、PFS時間(進行までの時間、TTP/D)、客観的反応、最良反応(CR/PR/SD/PD)により規定される。

【0068】

これらの分析から現れるp値は、確認的意味に解釈されない；それらは、効率的な候補予測ルールへの調査を導くための特別な記述ツールとして理解される。マーカーは、臨床的エンドポイントの予測(例えば、カットオフのためのサーチ)の可能性に関する一変量レベルについて評価した。更なる多変量法(例えば、線形判別分析、多重ロジスティック回帰、回転による主成分分析、クラスタ分析、CART方法論)を用いて、マーカーの組み合わせを試験した。バイオマーカー及び臨床的共変量による応答補正を調べた。バイオマーカーから得た候補分類は、イベントまでの時間変数によりチェックした(カプラン-マイヤー曲線、Cox比例ハザードモデル、ログランク検定)。

【0069】

結果：

全ての試験集団と比較したTMA試料サブセットの分析

バイオマーカー分析のための試料を用いた患者サブセットを、ベースライン患者特性及び臨床転帰パラメータに関して、全体の試験集団と比較した。概要を、以下の表に示す。

【0070】

【表2】

	主な臨床集団		IHC/FISHバイオマーカーデータを有する患者サブセット	
	プラセボ (N=582)	Tarceva® (N=580)	プラセボ (N=70)	Tarceva® (N=71)
年齢(年)	59.1	59.9	57.5	59.1
男性(%)	75.3	78.6	80.0	74.6
病期IV(%)	67.2	64.8	74.3	80.3
腺癌(%)	37.6	37.9	41.4	46.5
転移部(#)	3.7	3.7	3.4	4.0
罹患器官(#)	2.5	2.5	2.1	2.4
長径和	92.8	95.4	80.1	93.5
平均症状負荷	26.5	26.7	24.3	25.3
応答者(%)	38.3 (N=418)	42.4 (N=396)	42.3 (N=52)	43.5 (N=46)
危険率TTD	1.035		1.217	
危険率TTP	0.980		1.262	

【0071】

結果：

バイオマーカーデータを有する患者サブセットは、BO16411試験集団に関する代表ではない。主な集団とバイオマーカーサブグループの間で、TTDとTTPに関する危険率における差異が存在する。バイオマーカーサブグループのTarceva(登録商標)処置患者は、主な臨床集団と比較して、より悪い予後を有する。いくつかのベースライン共変量は、バイオマーカーサブグループ-及びこのサブグループ内、特にTarceva(登録商標)-関連患者は、主な試験集団と比較して、より病的な場合の混合を示したことを示す。KMプロット(図1~4)も、考慮されるべきである。

【0072】

pMAPK IHC分析の結果

- ・ p M A P K I H C データは、更なる統計分析にふさわしい十分な分散を示した。
 - ・ p M A P K 発現及び臨床転帰の間の相互関係を測定するために、記述的統計分析により、カットオフ値を確立した：フランクリン H - スコアを、染色強度と染色腫瘍細胞のパーセンテージを組み合わせることにより決定した ($p M A P K_h s c o = (p M A P K_核_染色 + 1) * p M A P K_核_P o s_細胞$; 範囲 : 0 ~ 4 0 0)。「陽性」p M A P K 染色を、H - スコアの $= / > 1 0 0$ により規定し、さもなければ、染色は「陰性」であった。
 - ・ カプラン - マイヤープロットを、図 5 ~ 8 に示す。
- 【 0 0 7 3 】

【表 3】

pMAPK ハースコア (カットポイント100) ---共変量を用いないCOXモデル						
変数	パラメーター 推定値	標準誤差	カイ二乗	Pr>Chisq	危険率	95%の危険率信頼限界
進行/死亡までの時間						
trtgr のみ	0.27747	0.21560	1.6562	0.1981	1.320	0.865 2.014
trtgr	0.12352	0.22058	0.3136	0.5755	1.131	0.734 1.743
pMAPK (≥100)	0.90942	0.23706	14.7164	0.0001	2.483	1.560 3.951
trtgr pMAPK<100	0.49122	0.30087	2.6656	0.1025	1.634	0.906 2.947
trtgr pMAPK≥100	-0.25703	0.30706	0.7007	0.4026	0.773	0.424 1.412
死亡までの時間						
trtgr のみ	0.15228	0.27818	0.2997	0.5841	1.164	0.675 2.009
trtgr	-0.02494	0.28668	0.0076	0.9307	0.975	0.556 1.711
pMAPK (≥100)	0.73352	0.29272	6.2797	0.0122	2.082	1.173 3.696
trtgr pMAPK<100	0.98292	0.45017	4.7674	0.0290	2.672	1.106 6.457
trtgr pMAPK≥100	-0.70524	0.36205	3.7943	0.0514	0.494	0.243 1.004

10

20

30

40

【0074】

結果：

・化学療法/プラセボで処置した患者に関して、「陽性」pMAPK発現は、より悪い予後に関連し(TTD:HR 4.882、p=0.0001)、一方、「陰性」pAKT発現は、より長い生存に関連するようである。

50

・傾向：「陽性 pMAPK」患者は、化学療法 / Tarceva (登録商標) の組み合わせから利益を受け得る (HR 0.500、p: 0.0516) (- - - -)

【0075】

pAKT IHC分析の結果

・ pAKT IHCデータは、更なる統計分析にふさわしい十分な分散を示した。
・ pAKT発現及び臨床転帰の間の相互関係を測定するために、記述的統計分析により、カットオフ値を確立した：フランクリン H - スコアを、核染色強度と染色腫瘍細胞のパーセンテージを組み合わせることにより決定した (pAKT__h s c o = (pAKT__核__染色 + 1) * pAKT__核__P o s __細胞 ; 範囲 : 0 ~ 400)。「陽性」pAKT染色を、H - スコアの = / > 300により規定し、さもなければ、染色は「陰性」であった。

10

・ Kaplan - Myerプロットを、図9 ~ 11に示す。

【0076】

IHCと臨床データの相互関係

【表 4】

pAKT1 Hースコア (カットポイント300) ---共変量を用いないCOXモデル						
変数	パラメーター 推定値	標準誤差	カイ二乗	Pr>Chisq	危険率	95%の危険率信頼限界
進行/死亡までの時間						
trtgr のみ	0.23796	0.20820	1.3064	0.2530	1.269	0.844 1.908
trtgr	0.19809	0.20973	0.8921	0.3449	1.219	0.808 1.839
pAKT1 (≥300)	0.66669	0.23379	8.1320	0.0043	1.948	1.232 3.080
trtgr pAKT1<300	0.12333	0.37441	0.1085	0.7419	1.131	0.543 2.356
trtgr pAKT1≥300	0.23300	0.25463	0.8373	0.3602	1.262	0.766 2.079
死亡までの時間						
trtgr のみ	0.14794	0.27012	0.3000	0.5839	1.159	0.683 1.969
trtgr	0.10118	0.27209	0.1383	0.7100	1.106	0.649 1.886
pAKT1 (≥300)	0.39280	0.29959	1.7191	0.1898	1.481	0.823 2.664
trtgr pAKT1<300	0.69986	0.50449	1.9244	0.1654	2.013	0.749 5.412
trtgr pAKT1≥300	-0.14277	0.32063	0.1983	0.6561	0.867	0.462 1.625

10

20

30

40

【0077】

結果：

・化学療法/プラセボで処置した患者に関して、「陽性」pAKT発現は、より悪い予後に関連し(TTD:HR 2.258、p=0.0573)、一方、「陰性」pAKT発現は、より長い生存に関連するようである。

50

・より小さな差異は、化学療法 / T a r c e v a (登録商標) の組み合わせで処置した患者に対して見出された。

【図面の簡単な説明】

【0078】

【図1】エルロチニブ / ゲムシタピン / シスプラチン (A) 又はプラセボ / ゲムシタピン / シスプラチン処置に無作為に割り当てられた全ての患者の間での、死亡までの時間 (OS) 試験に関する Kaplan-Meier 曲線 (円は、事象が生じる前に観測が終了された場合の、打ち切り観測時間を示す)。

【図2】エルロチニブ / ゲムシタピン / シスプラチン (A) 又はプラセボ / ゲムシタピン / シスプラチン処置に無作為に割り当てられた、バイオマーカーのデータを含む全ての患者の間での、死亡までの時間 (OS) 試験に関する Kaplan-Meier 曲線 (円は、イベントが起こる前に観測が終了された場合の、打ち切り観測時間を示す)。

【図3】エルロチニブ / ゲムシタピン / シスプラチン (A) 又はプラセボ / ゲムシタピン / シスプラチン処置に無作為に割り当てられた全ての患者の間での、進行 / 死亡までの時間 (PFS) 試験に関する Kaplan-Meier 曲線 (円は、イベントが起こる前に観測が終了された場合の、打ち切り観測時間を示す)。

【図4】エルロチニブ / ゲムシタピン / シスプラチン (A) 又はプラセボ / ゲムシタピン / シスプラチン処置に無作為に割り当てられた、バイオマーカーのデータを含む全ての患者の間での、進行 / 死亡までの時間 (PFS) 試験に関する Kaplan-Meier 曲線 (円は、イベントが起こる前に観測が終了された場合の、打ち切り観測時間を示す)。

【図5】pMAPK H - スコア 100 (H) を有する患者を、pMAPK H - スコア < 100 を有する患者と比較する、プラセボ / ゲムシタピン / シスプラチンで処置した全てのバイオマーカー患者の間での、死亡までの時間 (OS) 試験に関する Kaplan-Meier 曲線 (円は、イベントが起こる前に観測が終了された場合の、打ち切り観測時間を示す)。

【図6】エルロチニブ / ゲムシタピン / シスプラチン (A) をプラセボ / ゲムシタピン / シスプラチン処置と比較する、pMAPK H - スコア < 100 を有する全てのバイオマーカー患者の間での、死亡までの時間 (OS) 試験に関する Kaplan-Meier 曲線 (円は、イベントが起こる前に観測が終了された場合の、打ち切り観測時間を示す)。

【図7】それぞれ、エルロチニブ / ゲムシタピン / シスプラチン (LA, HA) をプラセボ / ゲムシタピン / シスプラチン (H) 処置と比較する、pMAPK H - スコア < 100 及び pMAPK H - スコア 100 を有する全てのバイオマーカー患者の間での、死亡までの時間 (OS) 試験に関する Kaplan-Meier 曲線 (円は、イベントが起こる前に観測が終了された場合の、打ち切り観測時間を示す)。

【図8】それぞれ、エルロチニブ / ゲムシタピン / シスプラチン (LA, HA) をプラセボ / ゲムシタピン / シスプラチン (H) 処置と比較する、pMAPK H - スコア < 100 及び pMAPK H - スコア 100 を有する全てのバイオマーカー患者の間での、進行 / 死亡までの時間 (PFS) 試験に関する Kaplan-Meier 曲線 (円は、イベントが起こる前に観測が終了された場合の、打ち切り観測時間を示す)。

【図9】pAKT1 H - スコア < 300 (L) 及び pAKT1 H - スコア 300 (H) を比較する、全てのプラセボ / ゲムシタピン / シスプラチン処置したバイオマーカー患者の間での、死亡までの時間 (OS) 試験に関する Kaplan-Meier 曲線 (円は、イベントが起こる前に観測が終了された場合の、打ち切り観測時間を示す)。

【図10】pAKT1 H - スコア < 300 (L) 及び pAKT1 H - スコア 300 (H) を比較する、全てのエルロチニブ / ゲムシタピン / シスプラチン処置したバイオマーカー患者の間での、死亡までの時間 (OS) 試験に関する Kaplan-Meier 曲線 (円は、イベントが起こる前に観測が終了された場合の、打ち切り観測時間を示す)。

【図11】それぞれ、エルロチニブ / ゲムシタピン / シスプラチン (LA, HA) をプラセボ / ゲムシタピン / シスプラチン (H) 処置と比較する、pAKT1 H - スコア < 300 (L) 及び pAKT1 H - スコア 300 を有する全てのバイオマーカー患者の間

10

20

30

40

50

での、死亡までの時間（OS）試験に関する Kaplan-Meier 曲線（円は、イベントが起こる前に観測が終了された場合の、打ち切り観測時間を示す）。

【 図 1 】

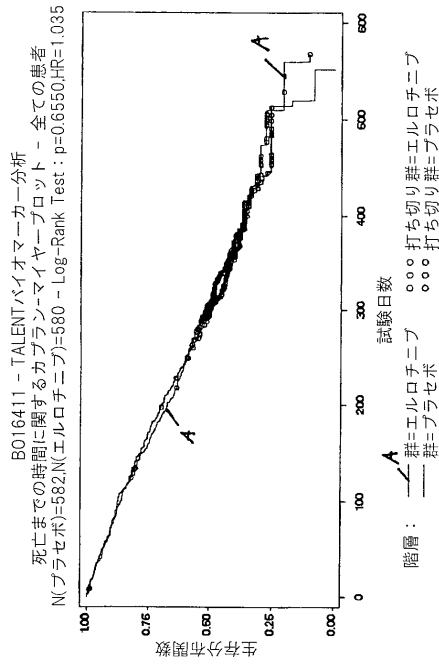


Fig. 1

【 図 2 】

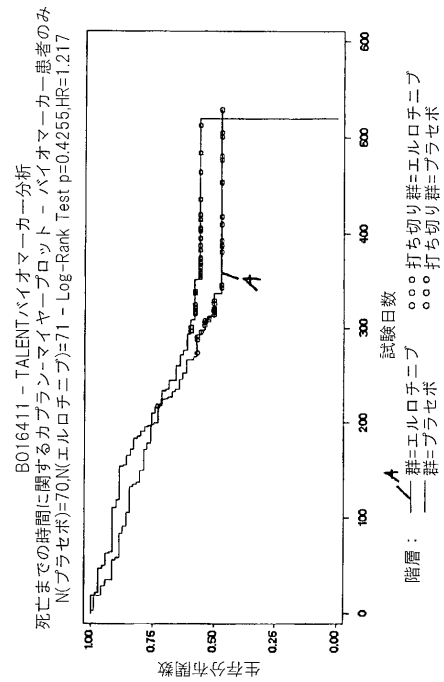


Fig. 2

【 図 3 】

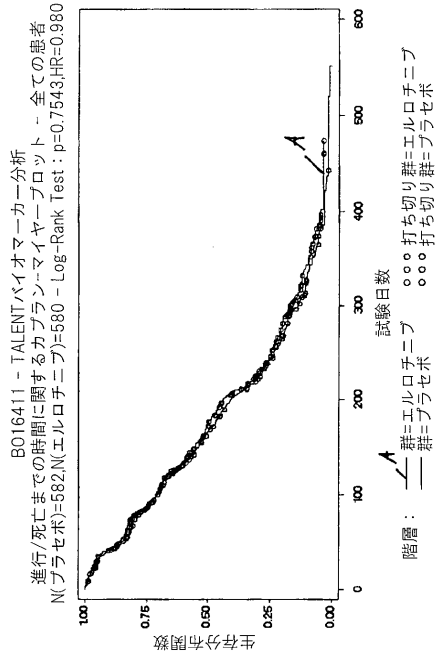


Fig. 3

【 図 4 】

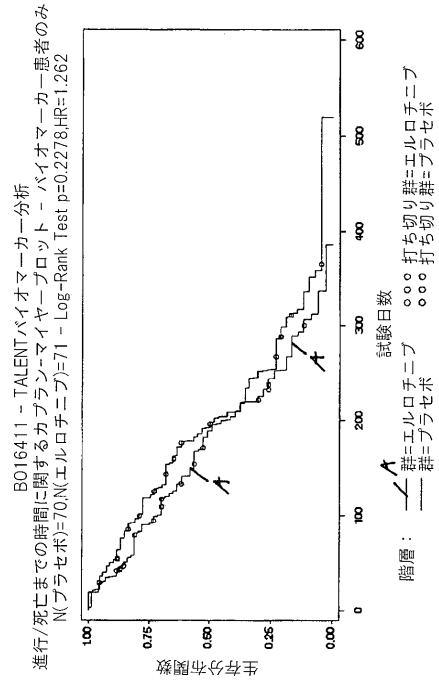


Fig. 4

【 図 5 】

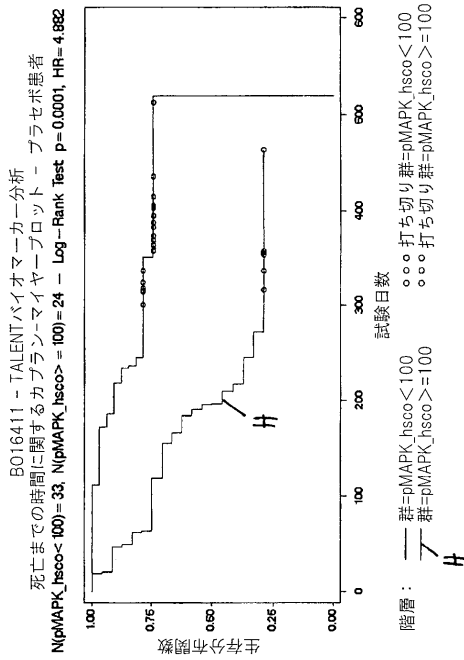


Fig. 5

【 図 6 】

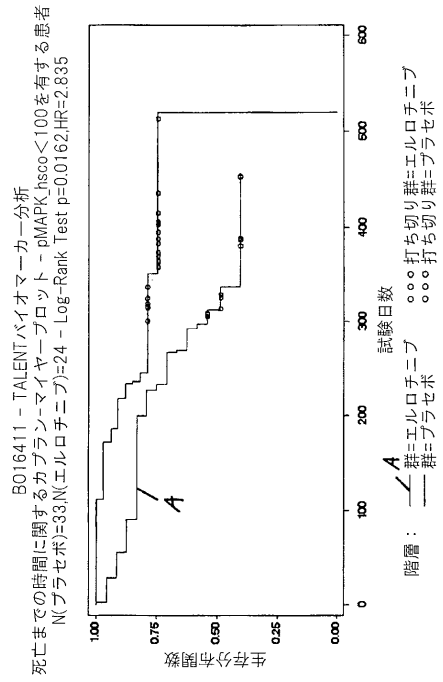
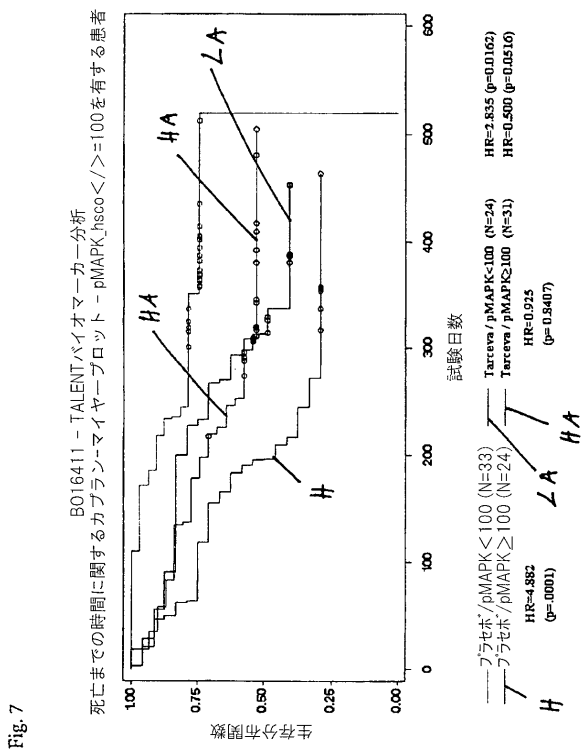
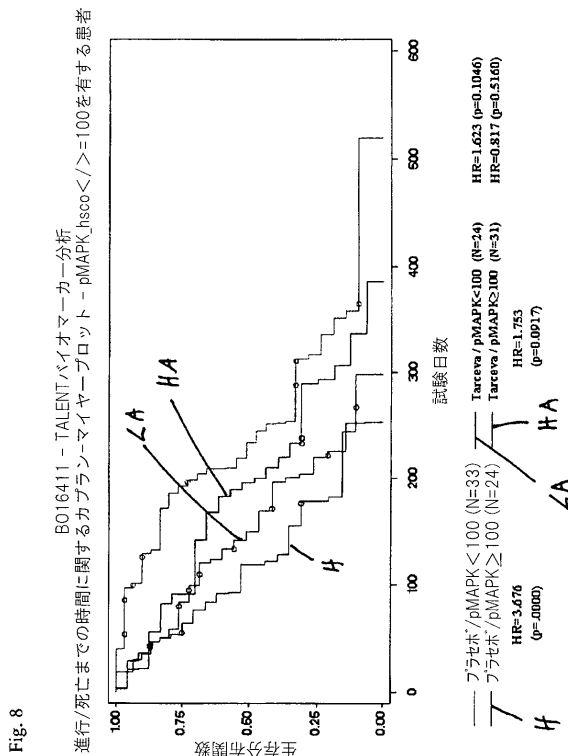


Fig. 6

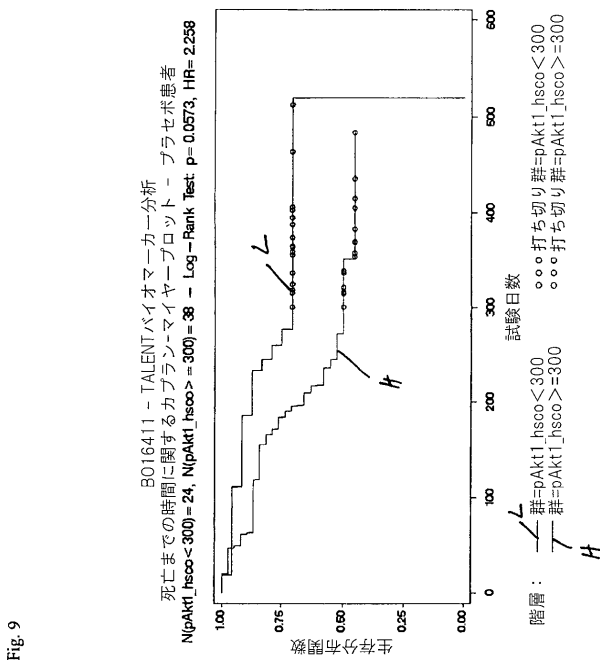
【 図 7 】



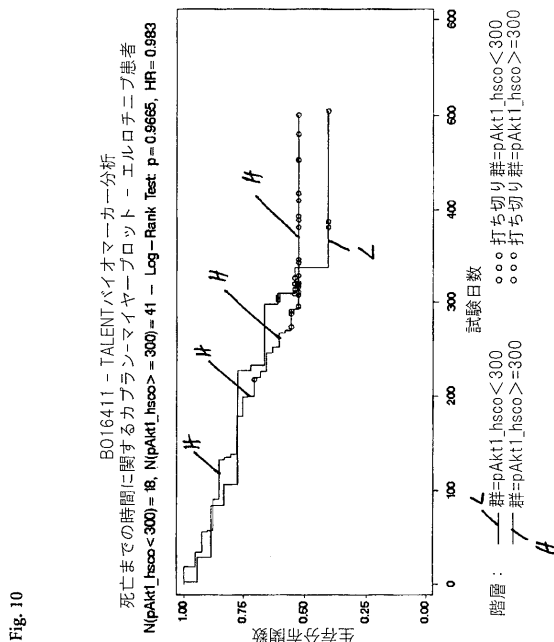
【 図 8 】



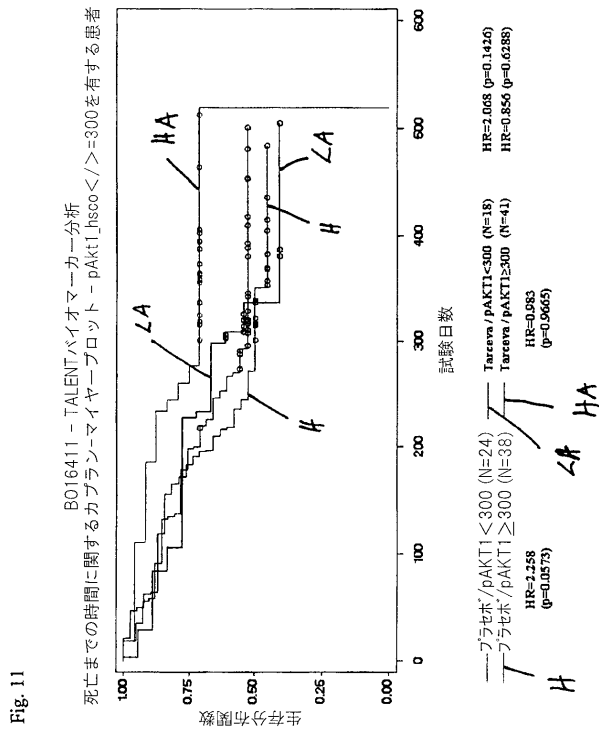
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 1 1 】



【 配列表 】

2008538817000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2006/004370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/00245 A (GENENTECH, INC) 4 January 2001 (2001-01-04) abstract page 57, paragraph 2 - paragraph 5; example 12	1-18, 22, 23
A	WO 01/72721 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY; LEE, FRANCIS, Y) 4 October 2001 (2001-10-04)	1-18, 23, 24
A	WO 02/39117 A (ONCOLYTICS BIOTECH, INC; COFFEY, MATTHEW, C) 16 May 2002 (2002-05-16)	1-18, 23, 24
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 8 August 2006		Date of mailing of the international search report 08/09/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Weijland, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/004370

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WARSHAMANA-GREENE & SAKUNTALA ET AL: "The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. 15 FEB 2005, vol. 11, no. 4, 15 February 2005 (2005-02-15), pages 1563-1571, XP002393843 ISSN: 1078-0432 abstract page 57, paragraph 2 - paragraph 5; example 12</p>	1-18, 23, 24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2006/004370**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2006/004370

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

The present claims 19-22 encompass compounds defined only by their desired function, contrary to the requirements of clarity of Article 6 PCT, because the result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, except for the compounds disclosed in the description.. Undue experimentation would be required to screen compounds randomly. This non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search for claims 19-22.

The search was consequently restricted to those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely claims 1-18 and 23, 24.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/004370

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0100245	A	04-01-2001	AT 500848 A1 15-04-2006
			AU 784045 B2 19-01-2006
			AU 5763200 A 31-01-2001
			BR 0012198 A 02-04-2002
			CA 2376596 A1 04-01-2001
			CH 694589 A5 15-04-2005
			CN 1370082 A 18-09-2002
			CZ 20014596 A3 12-02-2003
			DE 10084743 T0 14-08-2002
			EP 1189641 A2 27-03-2002
			GB 2368796 A 15-05-2002
			HU 0201695 A2 28-09-2002
			JP 2003503366 T 28-01-2003
			MX PA01013458 A 30-07-2002
			NO 20016329 A 25-02-2002
			NZ 516830 A 30-07-2004
			NZ 531426 A 28-10-2005
			PL 352321 A1 11-08-2003
			TR 200103756 T2 21-06-2002
			ZA 200109786 A 28-11-2002
ZA 200110263 A 13-12-2002			
WO 0172721	A	04-10-2001	AU 4768301 A 08-10-2001
			CA 2404712 A1 04-10-2001
			CN 1419452 A 21-05-2003
			CZ 20023220 A3 12-11-2003
			EP 1272193 A2 08-01-2003
			HU 0301690 A2 28-08-2003
			JP 2003528864 T 30-09-2003
			MX PA02009463 A 10-04-2003
			NO 20024610 A 25-11-2002
			ZA 200207766 A 20-01-2003
WO 0239117	A	16-05-2002	AU 1202202 A 21-05-2002
			BR 0115235 A 14-10-2003
			CA 2428206 A1 16-05-2002
			EP 1332366 A1 06-08-2003
			JP 2004512385 T 22-04-2004
			MX PA03004029 A 12-02-2004
			NZ 524937 A 29-10-2004
			ZA 200302086 A 15-03-2004

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 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068	4 C 0 8 6
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 Y	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/48 P	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
C 1 2 N 9/12 (2006.01)	C 1 2 N 9/12	

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

(74)代理人 100145436

弁理士 小池 慎太郎

(72)発明者 ヘラー, アストリート

ドイツ連邦共和国, 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ルーエ アム バッハ 5 ベー

(72)発明者 ルッツ, フェレナ

ドイツ連邦共和国, 8 1 4 7 5 ミュンヒェン, ウンターブルンナーシュトラッセ 1 4

(72)発明者 メクス, ヨアヒム

ドイツ連邦共和国, 6 8 1 6 7 マンハイム, マックス - ヨゼフ - シュトラッセ 9

(72)発明者 ワード, カロル

フランス国, エフ - 6 8 5 1 0 エルフランツキルヒ, リュ デ ビグーヌ 3 0

Fターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BB24 CB02 DA20 DA36 FA16 FB03

4B050 CC10 DD11 LL03

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ27 QR07 QR48 QX01

4C084 AA02 AA03 AA20 AA24 BA32 BA34 BA44 BA50

4C085 AA14 BB01 BB11 CC21 CC23 EE03

4C086 AA01 AA02 BC46 EA17 HA12 HA28 MA02 MA03 MA04 NA05

ZA59 ZB26 ZC51

专利名称(译)	确定化疗的反应者		
公开(公告)号	JP2008538817A	公开(公告)日	2008-11-06
申请号	JP2008508171	申请日	2006-05-10
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ヘラーアストリート ルッツフェレナ メクスヨアヒム ワードカロール		
发明人	ヘラー,アストリート ルッツ,フェレナ メクス,ヨアヒム ワード,カロール		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/48 A61K45/00 A61K39/395 A61K31/517 A61K31/7068 A61K33/24 A61P11/00 A61P35/00 A61P43/00 G01N33/53 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/15 C12N9/12		
CPC分类号	A61P11/00 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 G01N33/573 G01N33/574 G01N33/57423 G01N2333 /9121 G01N2500/00 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A C12Q1/48.Z A61K45/00 A61K39/395.N A61K31/517 A61K31/7068 A61K33/24 A61P11/00 A61P35/00 A61P43/00.121 G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12N9 /12		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BB24 2G045/CB02 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045 /FB03 4B050/CC10 4B050/DD11 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ27 4B063/QR07 4B063/QR48 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA20 4C084 /AA24 4C084/BA32 4C084/BA34 4C084/BA44 4C084/BA50 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE03 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC46 4C086/EA17 4C086 /HA12 4C086/HA28 4C086/MA02 4C086/MA03 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/ZA59 4C086/ZB26 4C086/ZC51		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 小池晋太郎		
优先权	2005010244 2005-05-11 EP 2005011070 2005-05-23 EP		
其他公开文献	JP4847518B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种通过确定磷酸化的AKT蛋白和/或磷酸化的MAPK蛋白的过表达来确定包含人肺癌细胞的生物样品是否对表皮生长因子受体抑制剂和化学治疗剂的组合敏感的方法。在生物样品中。本发明还涉及在使用磷酸化AKT蛋白和/或磷酸化MAPK蛋白的患者中获得候选试剂或选择用于抑制肺癌进展的组合物的方法。

BO16411 - TALENT Biomarker Analysis

Kaplan-Meier Plot for Time to Death - All Patients

N(Placebo)=582, N(Erlotinib)=580 - Log-Rank Test: p=0.6550, HR=1.035

