(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2008-502328
(P2008-502328A)
(43)公表日　平成20年1月31日(2008.1.31)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| C12Q 1/68 | (2006.01) | C12Q | 1/68 | ZNAA | 4B024 |
| G01N 33/53 | (2006.01) | G01N | 33/53 | M | 4B063 |
| G01N 33/574 | (2006.01) | G01N | 33/574 | A | |
| C12N 15/09 | (2006.01) | C12N | 15/00 | A | |

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 76 頁）

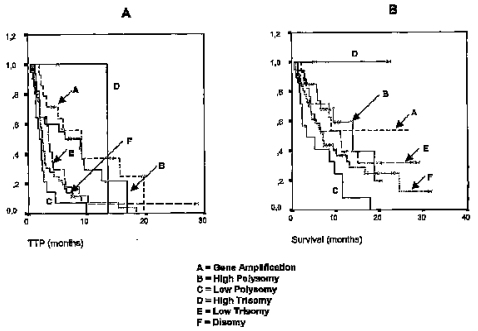
(21)出願番号　特願2007-515430 (P2007-515430)
(86)(22)出願日　平成17年5月26日 (2005.5.26)
(85)翻訳文提出日　平成18年12月27日 (2006.12.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/018879
(87)国際公開番号　WO2005/117553
(87)国際公開日　平成17年12月15日 (2005.12.15)
(31)優先権主張番号　60/575,789
(32)優先日　平成16年5月27日 (2004.5.27)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/677,852
(32)優先日　平成17年5月3日 (2005.5.3)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　303044077
ザ　リージェンツ　オブ　ザ　ユニバーシティ　オブ　コロラド
Ｔｈｅ　Ｒｅｇｅｎｔｓ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｃｏｌｏｒａｄｏ
アメリカ合衆国　８０３０９　コロラド州　ボールダー　３　シス　リージェンツ　アドミニストレイティブ　センター　２０１
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田　博宣
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田　誠

最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌患者による上皮成長因子受容体阻害薬に対する臨床転帰の予測方法

(57)【要約】
上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）阻害薬の治療的投与が有効であるか有効でないことが予測される癌患者を同定するための、生物マーカー、方法、およびアッセイキットを開示する。本発明の生物マーカーには、ＥＧＦＲおよびＨＥＲ２の遺伝子の増幅および多染色体性、ＥＧＦＲタンパク質の発現、ＥＧＦＲの突然変異、リン酸化Ａｋｔタンパク質の発現、ならびにこれらの生物マーカーの様々な組合せ、ならびにこれらの生物マーカーの、ＥＧＦＲ遺伝子のチロシンキナーゼ領域における突然変異との組合せの検出が含まれる。ＥＧＦＲ遺伝子のコピー数の増加、ＨＥＲ２遺伝子のコピー数の増加、ＥＧＦＲタンパク質の発現の増加、活性化ＡＫＴタンパク質の発現（リン酸化Ａｋｔ）、およびＥＧＦＲの突然変異は全て、ＥＧＦＲ阻害薬で処置された癌患者の良好な結果と関連する。本発明は、ＥＧＦＲ阻害薬の治療が有効である癌患者を選択するための、これらの各々の試験およびこれらの試験の組合せに基づいた診断上のパラダイム、ならびにＥＧＦＲ阻害薬の治療が有効でない癌患者を選択するための診断上のパラダイムを提供する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ）ｉ）上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子の増幅のレベル、
ｉｉ）ＥＧＦＲ遺伝子の多染色体性のレベル、
ｉｉｉ）チロシンキナーゼ受容体型受容体（ＨＥＲ２）遺伝子の増幅のレベル、および
ｉｖ）ＨＥＲ２遺伝子の多染色体性のレベルからなる群から選択される生物マーカーのレベルを患者からの腫瘍細胞のサンプルで検出する工程と、
ｂ）ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性に相関しているコントロールレベルの該生物マーカー、および
ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルの該生物マーカーからなる群から選択されるコントロールレベルの該生物マーカーに対する、該腫瘍細胞サンプルにおける該生物マーカーのレベルを比較する工程と、
ｃ）該患者の腫瘍細胞における該生物マーカーのレベルが、該ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関している該生物マーカーの該コントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または該患者の腫瘍細胞における該生物マーカーのレベルが、該ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関している該生物マーカーのレベルを統計学的に超える場合に、該ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測されるとして該患者を選択する工程と、あるいは
ｄ）該患者の腫瘍細胞における該生物マーカーのレベルが該ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関している生物マーカーの該コントロールレベルよりも統計学的に低い場合に、または該患者の腫瘍細胞における該生物マーカーのレベルが、該ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性に相関している該生物マーカーのレベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、該ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効でないことが予測されるとして該患者を選択する工程とを備える、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効である、または有効でないことが予測される癌患者を選択する方法。
【請求項２】
（ａ）（ｉ）、または（ａ）（ｉｉ）における前記検出工程が前記ＥＧＦＲ遺伝子にハイブリダイズするヌクレオチドプローブを用いて行われる請求項１に記載の方法。
【請求項３】
（ａ）（ｉｉｉ）、または（ａ）（ｉｖ）における前記検出工程が前記ＨＥＲ２遺伝子にハイブリダイズするヌクレオチドプローブを用いて行われる請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記検出工程が、第７染色体セントロメア配列とハイブリダイズするヌクレオチドプローブを用いる工程をさらに備える請求項２または請求項３に記載の方法。
【請求項５】
前記検出工程が、第１７染色体セントロメア配列とハイブリダイズするヌクレオチドプローブを用いる工程をさらに備える請求項２または請求項３に記載の方法。
【請求項６】
前記検出工程が、前記ＥＧＦＲ遺伝子および第７染色体セントロメア配列とハイブリダイズするキメラヌクレオチドプローブを用いる工程を備える請求項２に記載の方法。
【請求項７】
前記検出工程が、前記ＨＥＲ２遺伝子および第１７染色体セントロメア配列とハイブリダイズするキメラヌクレオチドプローブを用いる工程を備える請求項３に記載の方法。
【請求項８】
前記検出工程が、前記サンプルにおける１つまたは複数の腫瘍細胞における腫瘍細胞１個当たりの前記ＥＧＦＲ遺伝子またはＨＥＲ２遺伝子のコピー数を検出する工程を備える請求項１に記載の方法。
【請求項９】
（ａ）（ｉ）における前記検出工程が、前記サンプルにおける１つまたは複数の腫瘍細胞における腫瘍細胞１個当たりのＥＧＦＲ遺伝子の増幅を検出する工程を備える請求項１に

記載の方法。
【請求項１０】
（ａ）（ｉｉｉ）における前記検出工程が、前記サンプルにおける１つまたは複数の腫瘍細胞における腫瘍細胞１個当たりのＨＥＲ２遺伝子の増幅を検出する工程を備える請求項１に記載の方法。
【請求項１１】
前記検出工程が、（ａ）（ｉ）、（ａ）（ｉｉ）、（ａ）（ｉｉｉ）、および（ａ）（ｉｖ）の任意の２つの工程を備える請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記検出工程が、（ａ）（ｉ）、（ａ）（ｉｉ）、（ａ）（ｉｉｉ）、および（ａ）（ｉｖ）の任意の３つの工程を備える請求項１に記載の方法。
【請求項１３】
前記検出工程が、（ａ）（ｉ）、（ａ）（ｉｉ）、（ａ）（ｉｉｉ）、および（ａ）（ｉｖ）の４つ全ての工程を備える請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
前記検出工程が工程（ａ）（ｉ）、および工程（ａ）（ｉｉ）の両方を備える請求項１に記載の方法。
【請求項１５】
前記検出工程が工程（ａ）（ｉｉｉ）をさらに備える請求項１３に記載の方法。
【請求項１６】
前記検出工程が工程（ａ）（ｉｖ）をさらに備える請求項１３に記載の方法。
【請求項１７】
前記検出工程が工程（ａ）（ｉｉｉ）、および工程（ａ）（ｉｖ）の両方を備える請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
前記検出工程が工程（ａ）（ｉ）をさらに備える請求項１６に記載の方法。
【請求項１９】
前記検出工程が工程（ａ）（ｉｉ）をさらに備える請求項１６に記載の方法。
【請求項２０】
前記検出工程が工程（ａ）（ｉｉ）、および工程（ａ）（ｉｖ）の両方を備える請求項１に記載の方法。
【請求項２１】
前記検出工程が蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）により行われる請求項１から請求項２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記比較工程が、前記腫瘍細胞における前記生物マーカーレベルと、前記ＥＧＦＲ阻害薬に対して抵抗性である１つまたは複数のコントロール細胞におけるコントロールレベルの前記生物マーカーとを比較する工程を備える請求項１から請求項２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記比較工程が、前記腫瘍細胞における前記生物マーカーレベルと、前記ＥＧＦＲ阻害薬に対して感受性である１つまたは複数のコントロール細胞におけるコントロールレベルの前記生物マーカーとを比較する工程を備える請求項１から請求項２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性および／または抵抗性と相関している、前記コントロールレベルの前記生物マーカーが予め決定されている請求項１から請求項２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
細胞の約４０％未満に３またはそれを超える前記ＥＧＦＲ遺伝子のコピーがある腫瘍サン

プルを有する患者は、前記ＥＧＦＲ阻害薬での処置に対して反応が低い者または無反応者であると予測される請求項１に記載の方法。

【請求項２６】

約４０％を超え、またはそれに等しい細胞に約４またはそれを超える前記ＥＧＦＲ遺伝子のコピーがある腫瘍サンプルを有する患者は、前記ＥＧＦＲ阻害薬での処置が有効であることが予測される請求項１に記載の方法。

【請求項２７】

ＥＧＦＲ遺伝子クラスター、または

ａ）細胞１個当たり約２もしくはそれを超える第７染色体のコピーに対するＥＧＦＲ遺伝子のコピーの割合、または

ｂ）分析が行われた細胞の約１０％を超え、もしくはそれに等しい細胞において、細胞１個当たりの前記ＥＧＦＲ遺伝子のコピーが約１５またはそれを超える平均を有する腫瘍サンプルを患者が有する場合に、前記患者は前記ＥＧＦＲ阻害薬での処置が有効であることが予測される請求項１に記載の方法。

【請求項２８】

約４０％未満の細胞に３またはそれを超える前記ＨＥＲ２遺伝子のコピーがある腫瘍細胞を有する患者は、前記ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応が低い者または無反応者であると予測される請求項１に記載の方法。

【請求項２９】

約４０％を超えまたはそれに等しい細胞に約４またはそれを超える前記ＨＥＲ２遺伝子のコピーがある腫瘍細胞を有する患者は前記ＥＧＦＲ阻害薬での処置が有効であることが予測される請求項１に記載の方法。

【請求項３０】

ＨＥＲ２遺伝子クラスター、または

ａ）細胞１個当たり約２もしくはそれを超える第１７染色体のコピーに対するＨＥＲ２遺伝子のコピーの割合、または

ｂ）分析が行われた細胞の約１０％を超え、もしくはそれに等しい細胞において、細胞１個当たりの前記ＨＥＲ２遺伝子のコピーが約１５またはそれを超える平均を有する腫瘍サンプルを患者が有する場合に、前記患者は前記ＥＧＦＲ阻害薬での処置が有効であることが予測される請求項１に記載の方法。

【請求項３１】

前記患者がＨＥＲ２遺伝子の増幅または多染色体性に基づく前記ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測されるものとして選択される場合に、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅または多染色体性に基づく工程（ｄ）における前記患者の選択が反対になる請求項１に記載の方法。

【請求項３２】

ＥＧＦＲ遺伝子の増幅または多染色体性に基づく工程（ｃ）における前記患者の選択、およびＨＥＲ２遺伝子の増幅または多染色体性に基づく前記患者のポジティブ選択が、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅または多染色体性のみに基づく工程（ｃ）における前記患者の選択に比べて前記ＥＧＦＲ阻害薬での処置に患者が反応する見込みを増大させる請求項１に記載の方法。

【請求項３３】

ａ）前記腫瘍細胞サンプルにおいて、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）タンパク質の発現のレベルを検出する工程と、

ｂ）ｉ）前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベル、および

ｉｉ）前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルからなる群から選択されるＥＧＦＲタンパク質の発現のコントロールレベルと、前記腫瘍細胞サンプルにおけるＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルとを比較する工程と、

ｃ）前記患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルが、前記ＥＧＦ

Ｒ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現の前記コントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または、前記患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルが、前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルを統計学的に超える場合に、前記ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測されるとして前記患者を選択する工程と、または

ｄ）前記患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルが、前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現の該コントロールレベルよりも統計学的に低い場合に、または前記患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルが、前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、前記ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効でないことが予測されるとして前記患者を選択する工程とをさらに備える請求項１から請求項３２のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４】

ＥＧＦＲタンパク質の発現の前記レベルが免疫組織化学（ＩＨＣ）を用いて検出される請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

ａ）前記腫瘍細胞サンプルにおけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルを検出する工程と、

ｂ）ｉ）前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベル、および

ｉｉ）前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルからなる群から選択されるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のコントロールレベルと、前記腫瘍細胞サンプルにおけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルとを比較する工程と、

ｃ）前記患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルが、前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該コントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または前記患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルが、前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルを統計学的に超える場合に、前記ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測されるとして前記患者を選択する工程と、または

ｄ）前記患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルが、前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該コントロールレベルよりも統計学的に低い場合に、または前記患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルが、前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、前記ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効でないことが予測されるとして前記患者を選択する工程とをさらに備える請求項１から請求項３４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３６】

前記リン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルが免疫組織化学（ＩＨＣ）を用いて検出される請求項３５に記載の方法。

【請求項３７】

前記検出工程が、ＥＧＦＲ多染色体性およびリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現を検出する工程を備える請求項３５に記載の方法。

【請求項３８】

前記ＥＧＦＲ遺伝子における突然変異を検出する工程をさらに備え、前記ＥＧＦＲ遺伝子における１つまたは複数の突然変異の検出により前記患者が前記ＥＧＦＲ阻害薬での処置が有効であることがさらに予測される請求項１から請求項３７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３９】
前記ＥＧＦＲ遺伝子のエキソン１８、１９、および２１の任意の１つまたは複数における突然変異を検出する工程を備える請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
前記ＥＧＦＲ遺伝子のチロシンキナーゼ領域における突然変異を検出する工程を備える請求項３８に記載の方法。
【請求項４１】
ａ）患者からの腫瘍細胞のサンプルにおいて上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）タンパク質の発現のレベルを検出する工程と、
ｂ）ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベル、および
ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルからなる群から選択されるＥＧＦＲタンパク質の発現のコントロールレベルと、該腫瘍細胞サンプルにおけるＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルとを比較する工程と、
ｃ）該患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルが、該ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現の該コントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または、該患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルが、該ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルを統計学的に超える場合に、該ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測されるとして該患者を選択する工程と、あるいは
ｄ）該患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルが該ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現の該コントロールレベルよりも統計学的に低い場合に、または該患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルが、該ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現の該レベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、該ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効でないことが予測されるとして該患者を選択する工程とを備える、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であるか有効でないことが予測される癌患者を選択する方法。
【請求項４２】
前記ＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルが免疫組織化学（ＩＨＣ）を用いて検出される請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記ＥＧＦＲ遺伝子における突然変異を検出する工程をさらに備え、前記ＥＧＦＲ遺伝子における１つまたは複数の突然変異の検出により前記患者が前記ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応することがさらに予測される請求項４１または請求項４２に記載の方法。
【請求項４４】
前記ＥＧＦＲ遺伝子のエキソン１８、１９、および２１の任意の１つまたは複数における突然変異を検出する工程を備える請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記ＥＧＦＲ遺伝子のチロシンキナーゼ領域における突然変異を検出する工程を備える請求項４３に記載の方法。
【請求項４６】
ａ）前記腫瘍細胞サンプルにおけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルを検出する工程と、
ｂ）ｉ）前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベル、および
ｉｉ）前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルからなる群から選択されるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のコントロールレベルと、前記腫瘍細胞サンプルにおけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルとを比較する工程と
ｃ）前記患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルが、該ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該コントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または、前記患者の腫

瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルが、前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルを統計学的に超える場合に、前記ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測されるとして前記患者を選択する工程と、または

ｄ）前記患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該コントロールレベルよりも統計学的に低い場合に、または前記患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルが、前記ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の該レベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、前記ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効でないことが予測されるとして前記患者を選択する工程とをさらに備える請求項４１から請求項４５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４７】

前記患者が肺癌を有する請求項１から請求項４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４８】

前記患者が非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）を有する請求項１から請求項４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４９】

前記患者が、細気管支肺胞性癌（ＢＡＣ）またはＢＡＣの特徴のある腺癌を有する請求項１から請求項４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５０】

前記ＥＧＦＲ阻害薬がゲフィチニブである請求項１から請求項４９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１】

前記ＥＧＦＲ阻害薬がエロルチニブ（ｅｒｏｌｔｉｎｉｂ）である請求項１から請求項４９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５２】

前記ＥＧＦＲ阻害薬がセツキシマブである請求項１から請求項４９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５３】

ａ）ｉ）上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子の増幅のレベル、

ｉｉ）ＥＧＦＲ遺伝子の多染色体性のレベル、

ｉｉｉ）ヒトチロシンキナーゼ受容体型受容体（ＨＥＲ２）遺伝子の増幅のレベル、

ｉｖ）ＨＥＲ２遺伝子の多染色体性のレベル、

ｖ）ＥＧＦＲタンパク質の発現のレベル、および

ｖｉ）リン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルからなる群から選択される、生物マーカーのレベル、または生物マーカーの組合せを腫瘍細胞のサンプルで検出するための手段と、

ｂ）ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性を検出するためのコントロールサンプル、

ｉｉ）該ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性を検出するためのコントロールサンプル、

ｉｉｉ）該ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関している該生物マーカーの予め決定されたコントロールレベルを含む情報、および

ｉｖ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関している該生物マーカーの予め決定されたコントロールレベルを含む情報からなる群から選択されるコントロールとを備える、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であるか有効でないことが予測される癌患者を選択するためのアッセイキット。

【請求項５４】

前記ＥＧＦＲ遺伝子における少なくとも１つの突然変異を検出するための少なくとも１つの手段をさらに備える請求項５３に記載のアッセイキット。

【請求項５５】

（ａ）（ｉ）～（ａ）（ｉｖ）のいずれかの検出手段が前記遺伝子の一部分をハイブリダ

イズするヌクレオチドプローブを備える請求項５３に記載のアッセイキット。
【請求項５６】
前記ヌクレオチドプローブが、ヒト第７染色体またはヒト第１７染色体の一部分とハイブリダイズする請求項５５に記載のアッセイキット。
【請求項５７】
（ａ）（ｉ）または（ａ）（ｉｉ）の検出手段が、ＥＧＦＲ遺伝子の一部分、および該ＥＧＦＲ遺伝子以外の前記第７染色体の一部分にハイブリダイズするヌクレオチドプローブを備える請求項５３に記載のアッセイキット。
【請求項５８】
（ａ）（ｉｉｉ）または（ａ）（ｉｖ）の検出手段が、ＨＥＲ２遺伝子の一部分、および該ＨＥＲ２遺伝子以外の前記第１７染色体の一部分にハイブリダイズするヌクレオチドプローブを備える請求項５３に記載のアッセイキット。
【請求項５９】
前記検出手段が、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）において使用されるものである請求項５３から請求項５８のいずれか一項に記載のアッセイキット。
【請求項６０】
（ａ）（ｖ）または（ａ）（ｖｉ）の検出手段が、前記タンパク質に選択的に結合する、抗体またはその抗原結合性フラグメントを備える請求項５３に記載のアッセイキット。
【請求項６１】
前記検出手段が検出可能な標識を備える請求項５３から請求項６０のいずれか一項に記載のアッセイキット。
【請求項６２】
前記検出手段が基質上に固定化されている請求項５３から請求項６０のいずれか一項に記載のアッセイキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は概して、ＥＧＦＲ阻害薬の治療が有効であることが予測される癌患者を同定するための、生物マーカー、方法、およびアッセイキットに関する。
【背景技術】
【０００２】
新生組織形成、すなわち新しい異常な増殖をもたらす急速な細胞の増殖の過程は、重症で、時には生命を脅かすことのある多くの疾患に特有である。一般的に、細胞および組織の腫瘍性増殖は、扇動的な要因（例えば、発癌プロモーター、発癌物質、ウィルス）がすでに存在しなくなった後でも細胞が増殖し続けるという、正常を上回った細胞の増殖によって特徴付けられる。この細胞の増殖は、構造上の組織化の欠如および／または正常な組織との協調の欠如を示す傾向があり、通常、良性のことも悪性のこともある組織の塊（例えば腫瘍）を作り出す。悪性な細胞の増殖、すなわち悪性腫瘍（癌）は、世界中における主な死亡原因であり、腫瘍性疾患に対する効果的な治療の開発は、研究の主題の大部分となっている。癌の処置および予防のために様々な画期的な取組みが提唱されているが、癌の多くは高死亡率をもたらし続け、処置が困難なこともあり、または従来の治療法に対して比較的無反応のこともある。さらに、患者は、様々な癌の治療に対して異なって反応することがあり、このためいくつかの取組みは、ある患者には有用であり他の者には有用ではない。したがって、当技術分野では、さらなる癌の危険因子の同定、癌の初期の診断および治療のための方法、ならびに特定のタイプの治療が有効であることが予想される患者を同定するための方法が引き続き必要とされている。
【０００３】
この点について説明すると、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）は、世界中で癌による死亡の主な原因である。化学療法は、進行期には中程度の生存の利点をもたらしているが、標準の２つの薬物の組合せはかなりの毒性を生成し、静脈投与を必要とする（非小細胞肺癌共

同研究グループ（Ｎｏｎ－ｓｍａｌｌ Ｃｅｌｌ Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｖｅ Ｇｒｏｕｐ）、１９９５年；シラーら（Ｓｃｈｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．）、２００２年；ケリーら（Ｋｅｌｌｙ ｅｔ ａｌ．）２００１年）。肺癌の生物学の分野における進歩は、増殖、アポトーシス、および血管形成に関与する標的タンパク質の小分子阻害物質の開発をもたらした。イマチニブ、およびトラスツズマブなどの目標とされる治療物質は、慢性骨髄性白血病（ドルカー（Ｄｒｕｋｅｒ）、２００１年）、消化管間質腫瘍（ＧＩＳＴ）（デメトリ（Ｄｅｍｅｔｒｉ）、２００２年）、および標的タンパク質を過剰発現する乳癌（スラモン（Ｓｌａｍｏｎ）、２００１年）で一定の生存の利点を生み出している。４つの異なる受容体であるＥＧＦＲ／ｅｒｂＢ－１、ＨＥＲ２／ｅｒｂＢ－２、ＨＥＲ３／ｅｒｂＢ－３、およびＨＥＲ４／ｅｒｂＢ－４を含む上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）スーパーファミリは、固形腫瘍における有力な治療上の目標として初期に同定された。これらの受容体はリガンドと結合した後、ホモ二量体化およびヘテロ二量体化し、チロシンキナーゼ領域が活性化され、細胞周期の進行、アポトーシス、血管形成、および転移に対する作用により癌の発生および進行に結びつけられている一連の事象を開始させる（サロモンら（Ｓａｌｏｍｏｎ ｅｔ ａｌ．）、２００１年；アーテアガ（Ａｒｔｅａｇａ）、２００２年）；ヒルシュら（Ｈｉｒｓｃｈ ｅｔ ａｌ．）、２００３年、Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ；シャルデロおよびトルトラ（Ｃｉａｒｄｅｌｌｏ ａｎｄ Ｔｏｒｔｏｒａ）、２００１年）。ＥＧＦＲは、ＮＳＣＬＣを含むヒトの上皮の悪性腫瘍の多くで過剰に発現される（ヒルシュら（Ｈｉｒｓｃｈ ｅｔ ａｌ．）、２００３年、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ；サロモンら（Ｓａｌｏｍｏｎ ｅｔ ａｌ．）、１９９５年）。

【０００４】

癌腫におけるＥＧＦＲ分子のネットワークが生物学的に重要であることを考慮して、ＥＧＦＲのチロシンキナーゼ領域を阻害するためにいくつかの分子が合成されている（レビツキおよびガジット（Ｌｅｖｉｔｚｋｉ ａｎｄ Ｇａｚｉｔ）、１９９５年；レビットおよびコティ（Ｌｅｖｉｔｔ ａｎｄ Ｋｏｔｙ）、１９９９年）。これらの新しい薬物で最も有望なものは、ゲフィチニブ（ＺＤ １８３９、Ｉｒｅｓｓａ（登録商標）、アストラゼネカ（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、英国所在）、およびエルロチニブ（ＯＳＩ ７７４、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、ジェネンテック（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、米国所在）である。両者とも経口で活性があり、ＥＧＦＲを発現する様々なヒトの癌細胞系に対して抗腫瘍活性を示す選択的ＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害薬（ＥＧＦＲ－ＴＫＩ）である（シャルディエヨら（Ｃｉａｒｄｉｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ．）、２０００年）。同様に、両者には、反応率が約１０％であった化学療法抵抗性のＮＳＣＬＣ患者を含めた第Ｉ相の試験において、単一の物質として十分に立証された活性を有している（クリスら（Ｋｒｉｓ ｅｔ ａｌ．）、２０００年、Ｌｕｎｇ Ｃａｎｃｅｒ；バゼルガら（Ｂａｓｅｌｇａ ｅｔ ａｌ．）、２００２年；ハープストら（Ｈｅｒｂｓｔ ｅｔ ａｌ．）、２００２年；ランソンら（Ｒａｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．）、２００２年；ヒダルゴら（Ｈｉｄａｌｇｏ ｅｔ ａｌ．）、２００１年）。活性は大規模な第ＩＩ相試験で確認され、以前に非処置の、進行したＮＳＣＬＣ患者で１９～２６％の反応率を示し、以前の化学療法の１つまたは複数の組合せで失敗した患者で１２～１８％の反応率を示した（フクオカら（Ｆｕｋｕｏｋａ ｅｔ ａｌ．）、２００３年；クリスら（Ｋｒｉｓ ｅｔ ａｌ．）、２００３年、ＪＡＭＡ；ペレス－ソラーら（Ｐｅｒｅｚ－Ｓｏｌｅｒ ｅｔ ａｌ．）、２００１年；ミラーら（Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．）、２００３年）。より最近では、エルロチニブを、第２のまたは第３の系統の治療としてプラセボと比較した第ＩＩＩ相の試験（ＢＲ２１）でＥＧＦＲ阻害薬に対する生存の利点が報告された（危険率：０．７３）（シェファードら（Ｓｈｅｐｈｅｒｄ ｅｔ ａｌ．）、２００４年）。重要なことに、この生存の利点は目的の反応者に制限されず、単一の性別または組織学にも制限されず、そのため臨床上の特徴および組織病理学的な特徴のみに基づいた選択は困難になっている。

【０００５】

ゲフィチニブを用いた第ＩＩ相の試験では、ＥＧＦＲタンパク質発現と治療に対する反応との間には相関が検出されなかったが、この疑問に直接取り組む研究はほとんどなかった。扁平上皮癌を有する患者は、腺癌を有する患者に比べてＥＧＦＲの発現率が高いが、反応率は低い（シャルディエヨ（Ｃｉａｒｄｉｅｌｌｏ ｅｔ ａｌ．）、２０００年；フクオカら（Ｆｕｋｕｏｋａ ｅｔ ａｌ．）、２００３年；クリスら（Ｋｒｉｓ ｅｔ ａｌ．）、２００３年、ＪＡＭＡ）。最近の報告では、ＥＧＦＲ遺伝子のチロシンキナーゼ領域における特定のミスセンスおよび欠失の突然変異（リンチら（Ｌｙｎｃｈ ｅｔ ａｌ．）、２００４年；パエツら（Ｐａｅｚ ｅｔ ａｌ．）、２００４年）が、ゲフィチニブの感受性に重大に関わることが示された。しかし、目的の反応が最高１８％で報告され、非選択のゲフィチニブ処置のＮＳＣＬＣ患者の４０％に症状の改善が報告されているが（フクオカら（Ｆｕｋｕｏｋａ ｅｔ ａｌ．）、２００３年；クリスら（Ｋｒｉｓ ｅｔ ａｌ．）、２００３年、ＪＡＭＡ）、非選択の米国の患者におけるこれらの突然変異の頻度は低い（パエツ（Ｐａｅｚ ｅｔ ａｌ．）、２００４年）。目的の反応が、ＥＧＦＲ遺伝子の明らかに野生型の対立遺伝子を有する患者で検出できるという、これらの知見および所見（リンチら（Ｌｙｎｃｈ ｅｔ ａｌ．）、パオら（Ｐａｏ ｅｔ ａｌ．）、ハンら（Ｈａｎ ｅｔ ａｌ．）（ＪＣＯ、２３巻：２４９３頁、２００５年）、ミツドミら（Ｍｉｔｓｕｄｏｍｉ ｅｔ ａｌ．）、ＪＣＯ ２３巻、２５１３頁、２００５年、キムら（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．）、Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ、１１巻、２２４４頁、２００５年）は、他の機序もゲフィチニブに対する反応に関与していることを示唆している。さらに、これらの活性化の突然変異は反応率の高い患者を同定するものであるが、ゲフィチニブで処置されたＮＳＣＬＣ患者の約３０％に起こることが報告されている、安定した高い疾患率を説明することはできない（フクオカら（Ｆｕｋｕｏｋａ ｅｔ ａｌ．）、２００３年；クリスら（Ｋｒｉｓ ｅｔ ａｌ．）、２００３年、ＪＡＭＡ）。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

要約すると、ＮＳＣＬＣ患者を含めて、どの癌患者が、それだけには限定されないゲフィチニブにより例示されるＥＧＦＲ阻害薬での処置が有効であるかを決定するための、信頼できる選択基準は存在しない。したがって、ＥＧＦＲ阻害薬が有効である患者、およびそのような治療が有効でないであろう患者の両者を同定すること、ならびに、ＥＧＦＲ阻害薬に抵抗性を有する癌細胞の反応性を改善することができる処置を同定すること、および反応を増強する補助療法を開発することは非常に興味深い。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明の一実施形態は、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効である、または有効でないことが予測される癌患者を選択するための方法に関する。この方法は、（ａ）（ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベルの生物マーカー、および（ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルの生物マーカーからなる群から選択される生物マーカーのレベルを患者からの腫瘍細胞のサンプルで検出する工程と、（ｂ）（ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベルの生物マーカー、および（ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルの生物マーカーからなる群から選択されるコントロールレベルの生物マーカーと、腫瘍細胞サンプルにおける生物マーカーのレベルを比較する工程と、（ｃ）患者の腫瘍細胞における生物マーカーのレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関している生物マーカーのコントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または患者の腫瘍細胞における生物マーカーのレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関している生物マーカーのレベルを統計学的に超える場合に、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測されるとして患者を選択する工程と、あるいは（ｄ）患者の腫瘍細胞における生物マーカーのレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関してい

る生物マーカーのコントロールレベルよりも統計学的に低い場合に、または患者の腫瘍細胞における生物マーカーのレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性に相関している生物マーカーのレベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効でないことが予測されるとして患者を選択する工程とを含む。生物マーカーは、（ｉ）上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子の増幅のレベル、（ｉｉ）ＥＧＦＲ遺伝子の多染色体性のレベル、（ｉｉｉ）ヒトチロシンキナーゼ受容体型受容体（ＨＥＲ２）遺伝子の増幅のレベル、および（ｉｖ）ＨＥＲ２遺伝子の多染色体性のレベルから選択される。検出の工程は、生物マーカー（ｉ）～（ｉｖ）の任意の１、２、３、または４個全てを検出することを含むことができる。特に好ましい組合せには、それだけには限定されないが、（ｉ）および（ｉｉ）を検出することが含まれ、一実施形態では、（ｉｉｉ）または（ｉｖ）を検出すること、（ｉｉｉ）および（ｉｖ）を検出することも含まれ、一実施形態では、（ｉ）または（ｉｉ）を検出すること、ならびに（ｉｉ）および（ｉｖ）を検出することも含まれる。

【０００８】

検出工程には、それだけには限定されないが、ＥＧＦＲ遺伝子もしくはＨＥＲ２遺伝子にハイブリダイズするヌクレオチドプローブを用いる工程、および／または第７染色体セントロメア配列もしくは第１７染色体セントロメア配列にハイブリダイズするヌクレオチドプローブを用いる工程が含まれ得る。一態様では、プローブはキメラプローブ（例えば、ＥＧＦＲ遺伝子および第７染色体セントロメア配列にハイブリダイズするもの、またはＨＥＲ２遺伝子および第１７染色体セントロメア配列にハイブリダイズするもの）である。一態様では、検出工程には、サンプルにおける１つまたは複数の腫瘍細胞における腫瘍細胞１個当たりのＥＧＦＲ遺伝子もしくはＨＥＲ２遺伝子のコピー数を検出する工程、および／またはサンプルにおける１つまたは複数の腫瘍細胞における腫瘍細胞１個当たりのＥＧＦＲもしくはＨＥＲ２遺伝子の増幅を検出する工程が含まれ得る。好ましい一実施形態では、検出工程は蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）により行われる。

【０００９】

この実施形態の一態様では、比較工程は、腫瘍細胞における生物マーカーのレベルをＥＧＦＲ阻害薬に対して抵抗性を有する１つもしくは複数のコントロール細胞における、および／またはＥＧＦＲ阻害薬に感受性である１つもしくは複数のコントロール細胞におけるコントロールレベルの生物マーカーと比較する工程を備える。一態様では、ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性、および／または抵抗性に相関している生物マーカーのコントロールレベルは予め決定されている。

【００１０】

この実施形態の一態様では、約４０％未満の細胞で３またはそれを超えるＥＧＦＲ遺伝子のコピーがある腫瘍サンプルを有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に対して反応が低い者または無反応者であると予測される。別の一態様では約４０％を超え、またはそれに等しい細胞に約４またはそれを超えるＥＧＦＲ遺伝子のコピーがある腫瘍サンプルを有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置が有効であることが予測される。別の一態様では、ＥＧＦＲ遺伝子クラスター、または（ａ）細胞１個当たり約２もしくはそれを超える第７染色体のコピーに対するＥＧＦＲ遺伝子のコピーの割合、または（ｂ）分析が行われた細胞の約１０％を超え、もしくはそれに等しい細胞において細胞１個当たりのＥＧＦＲ遺伝子のコピーが約１５またはそれを超える平均を有する腫瘍サンプルを患者が有する場合に、患者はＥＧＦＲ阻害薬での処置が有効であることが予測される。別の一態様では、約４０％未満の細胞に３またはそれを超えるコピーのＨＥＲ２遺伝子を備える腫瘍サンプルを有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応が低い者または無反応者であると予測される。さらに別の一態様では、約４０％を超え、またはそれに等しい細胞に約４またはそれを超えるＨＥＲ２遺伝子のコピーがある腫瘍サンプルを有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置が有効であることが予測される。別の一態様では、ＨＥＲ２遺伝子クラスター、または（ａ）細胞１個当たり約２もしくはそれを超える第１７染色体のコピーに対するＨＥ

Ｒ２遺伝子のコピーの割合、または（ｂ）分析が行われた細胞の約１０％を超え、もしくはそれに等しい細胞において細胞１個当たりのＨＥＲ２遺伝子のコピーが約１５もしくはそれを超える平均を有する腫瘍サンプルを患者が有する場合に、患者がＥＧＦＲ阻害薬での処置が有効であることが予測される。

【００１１】

この実施形態の一態様では、患者がＨＥＲ２遺伝子の増幅または多染色体性に基づくＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測されるものとして選択される場合に、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅または多染色体性に基づく工程（ｄ）における患者の選択が反対になる。この実施形態の別の一態様では、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅または多染色体性に基づく工程（ｃ）における患者の選択、およびＨＥＲ２遺伝子の増幅または多染色体性に基づく患者のポジティブ選択が、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅または多染色体性のみに基づいた工程（ｃ）における患者の選択に比べて、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に患者が反応する見込みが増大する。

【００１２】

この実施形態の別の一態様では、この方法は、（ａ）腫瘍細胞サンプルにおける上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）タンパク質の発現のレベルを検出する工程と、（ｂ）（ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベル、および（ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルからなる群から選択されるＥＧＦＲタンパク質の発現のコントロールレベルと、腫瘍細胞サンプルにおけるＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルを比較する工程と、（ｃ）患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルが、ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現のコントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または、患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルを統計学的に超える場合に、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測されるとして患者を選択する工程と、あるいは（ｄ）患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現のコントロールレベルよりも統計学的に低い場合に、または患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効でないことが予測されるとして患者を選択するさらなる工程とをさらに含む。好ましい実施形態では、ＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルは免疫組織化学（ＩＨＣ）を用いて検出される。

【００１３】

上記の方法のあらゆる実施形態の別の一態様では、この方法はまた、以下の工程：（ａ）腫瘍細胞サンプルにおけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルを検出する工程と、（ｂ）（ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベル、および（ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルからなる群から選択されるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のコントロールレベル、および腫瘍細胞サンプルにおけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルを比較する工程と、（ｃ）患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のコントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルを統計学的に超える場合に、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測される患者を選択する工程と、あるいは（ｄ）患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のコントロールレベルよりも統計学的に低い場合に、または患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルと統計

学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効でないことが予測されるとして患者を選択する工程とをさらに含む。好ましい一実施形態では、リン酸化Ａｋｔタンパク質の発現レベルは免疫組織化学（ＩＨＣ）を用いて検出される。一態様では、この方法は、ＥＧＦＲの多染色体性およびリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現を検出する工程を備える検出工程を含む。

【００１４】

上記に記載した、本発明のあらゆる実施形態は、ＥＧＦＲ遺伝子における突然変異を検出する工程をさらに含むことができ、ＥＧＦＲ遺伝子における１つまたは複数の突然変異を検出することにより、患者がＥＧＦＲ阻害薬での処置が有効であることがさらに予測され得る。例えば、ＥＧＦＲ遺伝子のエキソン１８、１９、および２１の任意の１つまたは複数における突然変異、またはＥＧＦＲ遺伝子のチロシンキナーゼ領域における突然変異を検出することができる。

【００１５】

本発明の別の実施形態は、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効である、または有効でないことが予測される癌患者を選択するための方法に関する。この方法は、（ａ）患者からの腫瘍細胞のサンプルにおいて上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）タンパク質の発現のレベルを検出する工程と、（ｂ）（ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベル、および（ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルからなる群から選択されるコントロールレベルのＥＧＦＲタンパク質の発現、および腫瘍細胞サンプルにおけるＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルを比較する工程と、（ｃ）患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現のコントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルを統計学的に超える場合に、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測されるとして患者を選択する工程と、あるいは（ｄ）患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現のコントロールレベルよりも統計学的に低い場合に、または患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効でないことが予測されるとして患者を選択する工程とを備える。好ましい一実施形態では、ＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルは免疫組織化学（ＩＨＣ）を用いて検出される。

【００１６】

この実施形態の一態様では、この方法は、ＥＧＦＲ遺伝子における突然変異を検出する工程をさらに含み、ＥＧＦＲ遺伝子における１つまたは複数の突然変異の検出により、患者がＥＧＦＲ阻害薬での処置に対して反応することがさらに予測され得る。例えば、ＥＧＦＲ遺伝子のエキソン１８、１９、および２１の任意の１つもしくは複数における突然変異、またはＥＧＦＲ遺伝子のチロシンキナーゼ領域における突然変異を検出することができる。

【００１７】

この実施形態の別の態様では、この方法は、（ａ）腫瘍細胞サンプルにおいてリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルを検出する工程と、（ｂ）ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベル、および（ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルからなる群から選択されるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のコントロールレベル、ならびに腫瘍細胞サンプルにおけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルを比較する工程と、（ｃ）患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のコントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルがＥＧＦ

Ｒ阻害薬に対する抵抗性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルを統計学的に超える場合に、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効であることが予測されるとして患者を選択する工程と、あるいは（ｄ）患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のコントロールレベルよりも統計学的に低い場合に、または患者の腫瘍細胞におけるリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効でないことが予測されるとして患者を選択する工程をさらに含む。

【００１８】

上記に記載された本発明のあらゆる実施形態における方法は、あらゆるタイプの癌を有する患者に用いられ得る。好ましい一実施形態では、患者は、それだけには限定されないが、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、細気管支肺胞性癌（ＢＡＣ）、またはＢＡＣの特徴のある腺癌を含む肺癌を有する。

【００１９】

上記に記載された本発明のあらゆる実施形態では、それだけには限定されないが、ゲフィチニブ、エロルチニブ、およびセツキシマブを含めた任意のＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性を評価することができる。

【００２０】

本発明のさらに別の実施形態は、ＥＧＦＲ阻害薬の治療的投与が有効である、または有効でないことが予測される癌患者を選択するためのアッセイキットに関する。アッセイキットは、（ａ）（ｉ）上皮成長因子（ＥＧＦＲ）遺伝子の増幅のレベル、（ｉｉ）ＥＧＦＲ遺伝子の多染色体性のレベル、（ｉｉｉ）ヒトチロシンキナーゼ受容体型受容体（ＨＥＲ２）遺伝子の増幅のレベル、（ｉｖ）ＨＥＲ２遺伝子の多染色体性のレベル、（ｖ）ＥＧＦＲタンパク質の発現のレベル、および／または（ｖｉ）リン酸化Ａｋｔタンパク質の発現のレベルから選択される、生物マーカーのレベルまたは生物マーカーの組合せを、腫瘍細胞のサンプルで検出するための手段を含む。キットは、（ｂ）（ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性を検出するためのコントロールサンプル、（ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性を検出するためのコントロールサンプル、（ｉｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関している生物マーカーの予め決定されたコントロールレベルを含む情報、および／または（ｉｖ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関している生物マーカーの予め決定されたコントロールレベルを含む情報から選択されるコントロールも含む。一態様では、キットはＥＧＦＲ遺伝子における少なくとも１つの突然変異を検出するための少なくとも１つの手段をさらに含むことができる。

【００２１】

この実施形態の一態様では、任意の（ａ）（ｉ）～（ａ）（ｉｖ）で検出する手段は、それだけには限定されないが、ヒト第７染色体またはヒト第１７染色体の一部分とハイブリダイズするヌクレオチドプローブ、ＥＧＦＲ遺伝子の一部分およびＥＧＦＲ遺伝子以外の第７染色体の一部分にハイブリダイズするヌクレオチドプローブ、ならびにＨＥＲ２遺伝子の一部分およびＨＥＲ２遺伝子以外の第１７染色体の一部分にハイブリダイズするヌクレオチドプローブを含む、遺伝子の一部分をハイブリダイズするヌクレオチドプローブを備える。好ましい実施形態では、検出するための手段は、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）において使用されるためのものである。この実施形態の別の態様では、（ａ）（ｖ）または（ａ）（ｖｉ）における検出のための手段は、タンパク質に選択的に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントを備える。好ましくは、あらゆる上記に記載された検出のための手段は検出可能な標識を備え、かつ／または基質上に固定化されている。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２２】

第ＩＩ相臨床試験の有望な結果をもとに、ゲフィチニブは２００３年に、エルロチニブ

は２００４年に、前処置されたＮＳＣＬＣ患者においてプラセボに比べて著しい生存の利点を実証した後、進行した化学療法抵抗性のＮＳＣＬＣの処置に米国食品医薬品局によって認可された（シェファードら（Ｓｈｅｐｈｅｒｄ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年）。これらのＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害薬（ＥＧＦＲ－ＴＫＩ）の臨床上の有効性は意義深いが、残念なことに患者のサブグループに限られている。カナダのＢＲ－２１試験（エルロチニブ対プラセボ）では、処置開始後３カ月以内に約３０％の患者が死亡し、このことはこの患者のサブグループで臨床上の利点が達成されなかったことを指摘していた。臨床上、有効な患者は女性で腺癌の病歴があり、喫煙の経験がない傾向が強い（フクオカら（Ｆｕｋｕｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年；クリスら（Ｋｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、ＪＡＭＡ；ミラーら（Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ）。しかし、臨床上の特徴だけで患者を選別するのは十分ではない。というのは、個々の特徴を欠く患者も依然として恩恵を受けることがあるからである。これらの所見には、ＮＳＣＬＣ、およびＥＧＦＲの発現に関連する他の癌における患者の利点を予測することができる生物学的特徴を提供する必要性が残されていた。本発明は、この問題に取り組む強力な生物マーカーおよびプロトコールを提供するものである。

【００２３】

本発明は概して、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）阻害薬の治療的投与が有効であることが予測される癌患者の同定に関する。

本発明は概して、ＥＧＦＲ阻害薬抵抗性の癌細胞の処置に対する反応性を改善することができる処置を同定するための方法、およびＥＧＦＲ阻害薬の反応を増強する補助療法の開発にも関する。

【００２４】

したがって、本発明の一実施形態は、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）阻害薬、その作用薬、または基準のＥＧＦＲ阻害薬と実質的に同様の生物学的活性を有する薬物の治療的投与が有効であることが予測される癌患者を選択するために使用するための方法および対応するアッセイキットに関する。この方法は概して、本発明者らがＥＧＦＲ阻害薬感受性または抵抗性の腫瘍細胞の検出で非常に貴重であることを見出したＥＧＦＲに関する生物マーカーおよびその組合せを患者からの腫瘍細胞のサンプルで検出し、したがってＥＧＦＲ阻害薬を用いた処置に対する患者の臨床上の利点を予測することを含む。本発明者らの発見に基づき、様々な試験および生物マーカーの検出の戦略の組合せが提唱されており、以下で詳しく論じられる。しかし、最初に、本発明は生物マーカーを検出するための以下の戦略：（１）の上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子（すなわち、ＥＧＦＲをコードする遺伝子）の増幅のレベルの検出、（２）上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子の多染色体性のレベルの検出、（３）のＨＥＲ２遺伝子の遺伝子の増幅のレベルの検出、（４）ＨＥＲ２遺伝子の多染色体性のレベルの検出、（５）ＥＧＦＲ遺伝子における突然変異の検出、（６）ＥＧＦＲタンパク質の発現の検出、および（７）リン酸化Ａｋｔの発現の検出、の単独のまたは様々な組合せの使用を含む。本発明は、これらの検出のプロトコールの使用を、個々に、または様々な組合せで含み、本発明は、ＥＧＦＲ阻害薬に感受性および抵抗性を有する腫瘍を同定するための本方法の能力をさらに増強し、ＥＧＦＲ阻害薬に対する患者の臨床上の利点（例えば、反応および結果）を予測するための、様々な組合せの１つまたは複数の生物マーカーの検出技術の使用をさらに含む。

【００２５】

本発明者らはまた、本明細書に記載される試験の組合せを用いて、ＥＧＦＲ阻害薬の臨床上が有効でないであろう、ＮＳＣＬＣを含む癌を有する患者（例えば、２つまたはそれを超える試験に陰性である腫瘍を有する患者）を選択することができることも見出した。

【００２６】

本発明者らは、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅、および／またはＥＧＦＲ遺伝子に関する高多染色体性（本願では一般的に、ＥＧＦＲ遺伝子のコピー数の増加、もしくはＥＧＦＲコピー数の獲得と言う）、および／またはＨＥＲ２遺伝子の増幅、および／またはＨＥＲ２遺伝子に関する高多染色体性（本願では一般的に、ＨＥＲ２遺伝子のコピー数の増加、もしく

はＨＥＲ２コピー数の獲得と言う）を示す腫瘍細胞を有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に特に反応性であり、したがってこの系統の治療の使用に対する最良の候補者であることを見出した。これとは対照的に、ＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ２遺伝子のコピー数にほとんどまたは全く獲得のない腫瘍を有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に対し結果が劣ることが予測される。

【００２７】

興味深いことに、本発明者らは、ＥＧＦＲ陰性の（すなわち、ＥＧＦＲの結果のみに基づいてＥＧＦＲ阻害薬に反応することが予測されない）患者について、そのような患者の腫瘍にＨＥＲ２遺伝子の増幅および／またはＨＥＲ２遺伝子の多染色体性（例えば、高三染色体性、または低もしくは高多染色体性）がある場合、その患者の結果は、ＨＥＲ２遺伝子の増幅のない患者に比べて良好であることも見出した。さらに、ＥＧＦＲの結果のみに基づいてＥＧＦＲ阻害薬に反応することが予測される患者については、これらの患者の腫瘍におけるＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または高多染色体性は、ＨＥＲ２遺伝子の増幅の非存在におけるよりも、ＥＧＦＲ阻害薬処置に対してさらに感受性が高いことが予測される。

【００２８】

本発明者らは、ＥＧＦＲタンパク質の発現と治療に対する反応との相関を検出しなかった以前の研究とは対照的に、ＥＧＦＲ阻害薬で処置された患者の結果を予測するＥＧＦＲタンパク質の発現を用いることができることも見出している。特に本発明者らは、発現強度も、サンプルにおける発現陽性の細胞の分画も説明する評価基準を使用し、スコアプロトコールの上部の５０％に腫瘍細胞を有する患者（すなわち、陽性／高ＥＧＦＲ発現者と表される）は、ＥＧＦＲ阻害薬で処置された場合に、発現のより低い群における者よりも格段に結果が良好である（例えば、反応期間が良好で、進行速度が遅く、生存期間が長い）ことを今や実証した。さらに、本発明者らは、ＥＧＦＲタンパク質の発現の検出と、ＨＥＲ２もしくはＥＧＦＲ遺伝子の増幅、または多染色体性との組合せは、マーカーを１つ検出し、または全く検出しないよりも、ＥＧＦＲ阻害薬の処置に対する患者の結果が大幅に予測できることを実証している。

【００２９】

本発明者らは、ＥＧＦＲ遺伝子の獲得が低く／なく（例えば、「ＦＩＳＨ陰性の」）、かつＥＧＦＲタンパク質の発現が低い／ない（例えば、「ＩＨＣ陰性の」）癌患者のグループは全ＮＳＣＬＣ集団の約３０％を構成し、ＥＧＦＲ阻害薬が全く臨床上有効ではない（奏功率がない／大変低く、無進行期間が短く、生存期間が短い）様子であることも見出した。

【００３０】

本発明者らは、２つの他の生物マーカー、すなわち突然変異したＥＧＦＲ遺伝子またはリン酸化Ａｋｔの発現が、上記で論じたあらゆるこれらの生物マーカーおよびプロトコールと組み合わされ、ＥＧＦＲ阻害薬の処置に反応することが予測される患者を検出する能力を改善することができることも示した。例えば、本発明者らは、ＥＧＦＲ遺伝子における突然変異の検出と、ＥＧＦＲタンパク質の発現、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅、および／もしくは多染色体性、ならびに／またはＨＥＲ２遺伝子の増幅、および／もしくは多染色体性との組合せを用いて、ＥＧＦＲ阻害薬の治療が臨床上有効である患者を選択することができることを本願において実証している。本発明者らは、リン酸化Ａｋｔ（すなわち、活性化Ａｋｔ）の検出と、ＥＧＦＲタンパク質発現の検出、ならびに／またはＥＧＦＲ遺伝子の増幅、および／もしくは多染色体性の検出との組合せを用いて、ＥＧＦＲ阻害薬の治療に臨床上有効である患者を選択することができることも本願で実証している。

【００３１】

本発明者らは、本方法において、特定の検出技術、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）、および免疫組織化学（ＩＨＣ）を用いる能力も本願で実証しているが、本発明の方法は、これらの技術の使用に限定されない。

【００３２】

最後に、本願に提供される多くの実施例はＥＧＦＲ阻害薬であるゲフィチニブを指示するものであるが、本発明の方法は、この特定のＥＧＦＲ阻害薬に反応し、または反応しない患者の予測に限定されるものではなく、むしろ小分子（薬物）、ペプチド、抗体、核酸、または他のタイプの阻害薬である阻害薬を含めたあらゆるＥＧＦＲ阻害薬に対する患者の結果を予測するために用いられ得る。例えば、本発明者らは、ＥＧＦＲ阻害薬であり、ＥＧＦＲに結合するとともに受容体に対する天然のリガンドの結合を防ぐモノクローナル抗体であるセツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標））に対する腫瘍の抵抗性または感受性を予測するために本方法を使用することも実証した。

【００３３】

より詳しく述べると、本発明者らは、ＩＨＣによるＦＩＳＨおよびＥＧＦＲタンパク質の発現により検出されるＥＧＦＲ遺伝子のコピー数（多染色体性および／または遺伝子の増幅により決定される）はゲフィチニブの活性と大幅に相関しており、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅、および／もしくは多染色体性（特に高多染色体性）、ならびに／または高いＥＧＦＲタンパク質の発現を有するこれらの患者は、反応、無進行期間、および生存において大幅な改善があったことを実証した。本発明者らは、ＨＥＲ２遺伝子の増幅、および／または多染色体性（特に高多染色体性）も同様の効果をもたらすことも実証した。最も強力な利点は遺伝子の増幅を有する患者で観察され、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅とＨＥＲ２遺伝子との増幅の組合せが特に強力であった。多変量解析により、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および多染色体性（特に高多染色体性）、ならびにＥＧＦＲタンパク質の発現はゲフィチニブを投与されている患者で死の危険性が大幅に減少することが確認された。臨床上の特徴（性別、喫煙歴、一般状態、および組織学）の中では、モデルをＥＧＦＲの状態に調節した場合、組織学およびＰＳのみが死の危険性と著しく関係する結果となった。死の危険性は、腺癌または細気管支肺胞性癌を有する患者では著しく低く、一般状態２の患者では著しく高かった。

【００３４】

本発明より以前には、ＥＧＦＲタンパク質の発現、またはＮＳＣＬＣにおける遺伝子の状態の予後の役割は文献に様々な報告があったので、良くても不明瞭であった。本発明者らは、ＥＧＦＲタンパク質の発現および遺伝子のコピー数の予後の役割を研究し、ＥＧＦＲタンパク質の発現は、遺伝子のコピー数の増加と相関し、細胞１個当たりの遺伝子コピー数が高いと予後が悪くなる傾向を示すことを見出した（ヒルシュら（Ｈｉｒｓｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、ＪＣＯ）。同様に、本発明者らは、２８３人のＮＳＣＬＣ患者におけるＨＥＲ２遺伝子のコピー数およびタンパク質の発現を研究し、ＨＥＲ２タンパク質の発現が高いと生存が短くなる傾向を示すことを見出した（ヒルシュら（Ｈｉｒｓｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年、ＢＪＣ）。しかし、免疫組織学的アッセイにより評価したＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルが、前臨床（シロトナクら（Ｓｉｒｏｔｎａｋ　ｅｔ　ａｌ．）、Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ、２０００年、６巻、４８８５～９２頁）および臨床試験（クリスら（Ｋｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、ＪＡＭＡ；ジャコンヌら（Ｇｉａｃｃｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年）における治療に対する反応と相関することは以前には実証されていなかった。ゲフィチニブは、タンパク質レベルでその作用を行い、したがって、免疫組織学的研究との相関を欠くことを考慮すると、細胞１個当たりのＥＧＦＲ遺伝子のコピー数は臨床上の反応を予測するものであり得るとは全く予想されなかった。

【００３５】

実施例１に示される試験では、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅または高多染色体性のある同齢集団において、より良好な結果が観察され、したがって、この患者群に薬物の正の影響があったことを確かにしている。さらに、ＦＩＳＨ陽性の患者（下記実施例１における群２）における患者の１年生存は、本発明者らの試験では、以前のゲフィチニブでの第ＩＩ相臨床試験で報告されたよりも明らかに高かった。

【００３６】

ゲフィチニブの臨床試験に対する主な欠点は、ＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルと処

置に対する反応との間の相関を欠くことであった。ＨＥＲ２、および乳癌におけるトラスツズマブに対する反応に焦点を当てた他の試験では、ゲノムの分析は、ＨｅｒｃｅｐｔＴｅｓｔで２＋とスコアしたタンパク質の発現よりも良好な反応と相関することが確認された（ボーゲルら（Ｖｏｇｅｌ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２年；バートレットら（Ｂａｒｔｌｅｔｔ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年）。ゲフィチニブ感受性の患者における特定のＥＧＦＲ遺伝子の突然変異の同定により、ゲノムレベルでの分析の妥当性が確認された（リンチら（Ｌｙｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年；パエツら（Ｐａｅｚ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年）。しかし、これらの試験は、本発明で提唱する技術とは完全に異なる分析技術を伴うものであった。

【００３７】

本願に示される試験では、ＥＧＦＲおよびＨＥＲ２遺伝子のコピー数をＦＩＳＨで試験した。というのは、この方法はいくつかの利点を示すからであるが、本発明の実施はこの技術に限定されるものではない。ＦＩＳＨはＤＮＡをベースとするものであり、新鮮な、または保存のパラフィン包埋された腫瘍サンプルで首尾よく行うことができる。この技術は十分に確立されており、臨床的な細胞遺伝学および分子病理学の実験室で回転が速く、ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨプローブはすでに市販されている。さらに、疾患の進行した患者、特に標準的な治療後に進行している患者では、疾患の安定および症状の改善が重要なエンドポイントであり、ゲフィチニブは約４０％の症例でこの目標に到達している（フクオカら（Ｆｕｋｕｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年；クリスら（Ｋｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、ＪＡＭＡ）。ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および高多染色体性を有する患者では、反応だけではなく疾患の制御率にも著しい意義深い有利があったことを結果は実証していた。これらの知見は、アッセイの単純性および結果の再現性と結びついて、ＥＧＦＲ－ＦＩＳＨ分析のルーチンの使用およびＮＳＣＬＣ患者のゲフィチニブ治療に対する選択のための関連技術を支持している。

【００３８】

実施例１および３に記載された試験で評価された集団の臨床的特徴は、イタリアの臨床の実践で一般的に観察されることを反映しており、この同齢集団の結果はＩＤＥＡＬ１および２の試験と同じ範囲にある（フクオカら（Ｆｕｋｕｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年；クリスら（Ｋｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、ＪＡＭＡ）。ＥＧＦＲ遺伝子の状態は肺癌でわずかに試験されているにすぎない。現在の試験では、１２．７％の腫瘍に遺伝子の増幅があり、１９．７％に高レベルの多染色体性があった。遺伝子の増幅は、サザンブロット分析を用いて２８６検体中６．２％に報告されており（ライスマンら（Ｒｅｉｓｓｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９９年）、多染色体性および増幅は、腫瘍マイクロアレイで調査したＮＳＣＬＣ１８３人の、それぞれ１３％および９％に観察された（ヒルシュら（Ｈｉｒｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、ＪＣＯ）。他の集団の試験により、この変異性がＮＳＣＬＣ患者における実際の不均一性を表しているか否かが検証されるであろう。

【００３９】

ＥＧＦＲのタンパク質発現のレベルは免疫組織学によっても評価され、以下の実施例で記載されるように、高レベルが、良好な反応、疾患の制御率、無進行期間、および生存と統計学的に有意に関連していた。本願に記載された試験では、ゲフィチニブの感受性はＥＧＦＲタンパク質の高発現に関連しており、ＥＧＦＲ発現のスコアの低い（＜２００）患者における結果は、遺伝子コピー数の低い患者、または突然変異を欠く患者と同程度に悪かった。以前の報告と比べて本発明からの結果に違いがあった理由は、複合的であることかもしれない。例えば、本発明者らは、以前の発明者らと異なるスコアシステムを使用し、ＥＧＦＲ発現細胞の分画（０～１００％）および発現強度（１～４）の両者を考慮に入れ、このことにより、発現における違いを検出し分析する発明者らの能力を改善した可能性がある。しかし、本発明の適用は、このスコア基準に限定されるものではなく、本発明を実行する上では他の評価方法も有用であることがある。ＥＧＦＲタンパク質の発現に対する免疫組織学的分析は、容易かる臨床的に適用可能なアッセイであり、本発明で用いら

れる抗体は市販の抗体をベースにしている（ザイムド（Ｚｙｍｅｄ）、実施例を参照されたい）。しかし、本発明の適用は特定の抗体に限定されない。

【００４０】

本願に記載される試験の別の重要な知見は、安定した疾患を有する患者にはＥＧＦＲの突然変異は実質的に存在しないということであった。ＥＧＦＲの突然変異が評価された安定した疾患を有する２１人の患者の中では、ＥＧＦＲの突然変異があったのは１人の患者にすぎなかった。安定した疾患を有する患者で突然変異が少数であることは臨床的に関連性がある。というのは、ある臨床試験からのデータは、ゲフィチニブの生存の利点は反応性の患者に限定されないことを示しているからである（シェファードら（Ｓｈｅｐｈｅｒｄ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年）。ゲフィチニブで処置した患者で生存が改善したのは、全体的に、患者を選択するためのえり抜きの試験として突然変異の分析が確立された場合にチロシンキナーゼ阻害薬の処置から除外されるであろう、安定した疾患を有する者などの、中程度の処置が有効である患者の群が存在したことによる可能性がある。さらに、以前の研究では、大多数の反応性の患者にＥＧＦＲ突然変異が存在することが示唆されていたが（リンチら（Ｌｙｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年；パエツら（Ｐａｅｚ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年；パオら（Ｐａｏ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年）この試験では、本発明者らは、ＥＧＦＲの突然変異のある患者の４０％が進行性の疾患を有していたことを観察した。

【００４１】

本願に示される研究では、本発明者らは、他者も記載して論じた関連であるＡｋｔ経路の活性化（例えば、リン酸化Ａｋｔの発現）とゲフィチニブ感受性との間の関連も見出した。（ソルデラら（Ｓｏｒｄｅｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年；カプッツォら（Ｃａｐｐｕｚｚｏ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．）。ＥＧＦＲおよびＰ－Ａｋｔの状態のコンビナトリアル分析は、ＥＧＦＲ評価の方法とは独立して、ＥＧＦＲの状態が陽性の場合には、Ａｋｔのリン酸化の存在は、より良好な反応、疾患制御率、無進行期間、および生存に著しく関連していたことを指摘していた。重要なことに、ＥＧＦＲ＋／Ｐ－Ａｋｔ＋の患者の部分群を、全ての結合した他の群と比べた場合だけではなく、この部分群をＥＧＦＲ陽性であるがＰ－Ａｋｔ陰性である患者と比べた場合にも、より良好な結果が観察された。これらの知見は、ゲフィチニブの標的が存在するが抗－アポトーシス経路が活性化しない場合には患者はゲフィチニブの阻害効果に感受性ではない、という仮説を支持するものである。予想通り、ＥＧＦＲ＋／Ｐ－Ａｋｔ＋群はまた、ＥＧＦＲ陰性かつＰ－Ａｋｔ陽性群に比べて結果は著しく良好であり、異常なＥＧＦＲ依存性Ａｋｔ活性化はゲフィチニブ抵抗性をもたらすことがあることを指摘する前臨床のデータを確かなものにしている（ビアンコら（Ｂｉａｎｃｏ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年；ジャンマートら（Ｊａｎｍａａｔ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年）。これらのデータは、薬物に特に感受性である部分群の患者を同定するためには、ＥＧＦＲ陽性の患者ではＰ－Ａｋｔ陽性の状態が関連することを指摘している。ＥＧＦＲ陰性の患者では、Ｐ－Ａｋｔ陽性の状態で、ゲフィチニブ処置が有効である見込みのほとんどない患者の群を同定することができる。

【００４２】

ＥＧＦＲタンパク質の発現とＡｋｔ経路の活性化との関係に関する情報は、ゲフィチニブ感受性の機序についての理解を大きく進めるであろう。本発明者らは、患者のサブグループで、ＥＧＦＲタンパク質とＰ－Ａｋｔ発現とを比べ、一般に、本発明者らは、同じ細胞集団でＥＧＦＲおよびＰ－Ａｋｔタンパク質の発現を見出し（データは示さず）、観察されたＰ－ＡｋｔはＥＧＦＲ活性の結果であったことを示した。

【００４３】

本発明が提供する方法および試験キットは、ＮＳＣＬＣなど、ＥＧＦＲ阻害薬で処置することができるあらゆる癌の患者に特に有用である。このような患者は、本願に提供される方法の結果として、副作用がなく、ＥＧＦＲ遺伝子座に影響を及ぼす遺伝子の獲得を持たずＥＧＦＲタンパク質の発現が低いまたはない場合に効果のない治療の財務コストがな

いことがある。第２に、その腫瘍の分子上の特徴に関する情報に基づいて特定の患者にこの特定の処置（すなわち、ＥＧＦＲ阻害薬治療）を推薦することができ、または推薦することができない医師にとって、これは有用である。第３に、入手可能、かつ未だ開発されていないＥＧＦＲプローブでのＦＩＳＨアッセイに対する需要は高まるであろう。

【００４４】

本発明のより詳しい実施形態を以下に記載する。一実施形態では、この方法は、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子（すなわち、ＥＧＦＲをコードする遺伝子）のレベル増幅（以下に詳しく記載する）のレベルからの腫瘍細胞のサンプルにおける検出を含む。ＥＧＦＲ遺伝子の増幅を示す腫瘍細胞のある患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応性であることが予測され、したがって、この系統の治療の使用の最良の候補者である。それとは対照的に、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅の獲得がほとんどまたは全くない腫瘍を有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応が低い者、または無反応者であると予測され、したがって、このような患者には異なる治療的処置を用いることができる。別の関連する実施形態では、この方法は、患者からの腫瘍細胞のサンプルにおいて、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子の多染色体性（以下に詳しく述べる）のレベルの検出を含む。この実施形態では、ＥＧＦＲ遺伝子に関してより高多染色体性を示す腫瘍細胞のある患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応性であり、したがって、この系統の治療法の使用の最良の候補者である。それとは対照的に、ＥＧＦＲ遺伝子に関してコピー数の少ない腫瘍を有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応が低い者、または無反応者であると予測される。一実施形態では、多染色体性を検出するこの方法を、腫瘍細胞におけるＥＧＦＲ遺伝子の増幅の検出と組み合わせることができる。まとめると、遺伝子の増幅および多染色体性は、ＥＧＦＲ遺伝子のコピー数における獲得、またはＥＧＦＲ遺伝子のコピー数の増加と言及することができる。さらに、本発明者らは、ＦＩＳＨにより検出したＥＧＦＲ遺伝子のコピー数の増加は、その根底を成す生物学的特徴によりＥＧＦＲ経路の試験のモデルとして働くことができるＮＳＣＬＣのサブセットである、進行期の細気管支肺胞性癌（ＢＡＣ）またはＢＡＣの特徴を有する腺癌患者におけるゲフィチニブ治療後の生存の改善と関連することを本願で実証している。

【００４５】

本発明の別の実施形態では、この方法は、患者からの腫瘍細胞のサンプルにおける、ＨＥＲ２遺伝子（すなわちＨＥＲ２をコードする遺伝子）の遺伝子増幅のレベルの検出を含む。ＨＥＲ２遺伝子の増幅を示す腫瘍細胞のある患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応性であることが予測され、したがって、この系統の治療の使用の最良の候補者である。これとは対照的に、ＨＥＲ２遺伝子の増幅が低く、またはない腫瘍を有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に対して反応が低い者または無反応者であることが予測され、したがって、このような患者に異なる治療上の処置を用いることができる。別の実施形態では、この方法は、患者からの腫瘍細胞のサンプルにおける、ＨＥＲ２遺伝子の多染色体性のレベルの検出を含む。この実施形態では、ＨＥＲ２遺伝子に関してより高多染色体性を示す腫瘍細胞のある患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応性であることが予測され、したがって、この系統の治療の使用の最良の候補者である。これとは対照的に、ＨＥＲ２遺伝子に関してコピー数の少ない腫瘍を有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に対して反応が低い者または無反応者であることが予測される。一実施形態では、多染色体性を検出するこの方法を、腫瘍細胞におけるＨＥＲ２遺伝子の増幅の検出と組み合わせてもよい。まとめると、遺伝子の増幅および多染色体性は、ＨＥＲ２遺伝子のコピー数における獲得、またはＨＥＲ２遺伝子のコピー数の増加と言及することができる。これらの方法は、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／またはＥＧＦＲの多染色体性の検出と組み合わされてもよい。ＥＧＦＲのコピー数の増大とＨＥＲ２遺伝子のコピー数だけの増大の両方を示す腫瘍のある患者は、ＥＧＦＥ遺伝子のコピー数の増大だけを示す腫瘍を有する患者よりも、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に対する反応性についてさらに良好な候補者であることが予測される。さらに、獲得の低いまたはないＥＧＦＲ遺伝子のコピー数を示す腫瘍を有するが、ＨＥＲ２遺伝子のコピー数の増大を有する患者は、低いまたは獲得のないＨＥＲ２遺伝子のコピー数

を有する腫瘍を有する患者よりもＥＧＦＲでの処置に対する反応が良好であることが予測される。

【００４６】

本発明の別の実施形態では、この方法は、患者からの腫瘍細胞のサンプルにおける、ＥＧＦＲタンパク質の発現のレベルの検出（例えば、免疫組織化学技術を用いることによる）を含む。より高いレベルのＥＧＦＲタンパク質を示す腫瘍細胞のある患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応性であることが予測され、したがって、この系統の治療の使用に対する最良の候補者である。特に、ＥＧＦＲを発現するより高い分画の細胞、および細胞によるＥＧＦＲの発現の、より高い強度の両者のある腫瘍細胞を有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応性であることが予測される。分画および強度のスコアに基づく０～４００のスコアシステムを用いる一実施形態では（以下に詳しく記載する）、２００を超えるＥＧＦＲタンパク質の発現スコアを受ける腫瘍細胞のある患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置の結果が良好であることが予測される。さらなる実施形態では、この方法を、ＨＥＲ２遺伝子の増幅および／もしくは多染色体性の検出；ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／もしくは多染色体性；ＥＧＦＲにおける突然変異の検出（以下に記載する）ならびに／またはリン酸化Ａｋｔタンパク質のレベルの検出（以下に記載する）と組み合わせることができる。ＨＥＲ２遺伝子の増幅および／もしくはＨＥＲ２の多染色体性、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／もしくはＥＧＦＲの多染色体性、ＥＧＦＲ遺伝子における突然変異、ならびに／またはリン酸化Ａｋｔの発現と組み合わせて、ＥＧＦＲタンパク質の発現の高い腫瘍を有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応性であることが予測される。

【００４７】

本発明の一実施形態では、この方法は、患者からの腫瘍細胞のサンプルにおけるＥＧＦＲ遺伝子における突然変異の検出を含む。ＥＧＦＲ遺伝子に突然変異を示す腫瘍細胞のある患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応性であることが予測され、したがって、この系統の治療の使用の最良の候補者である。突然変異の活性化は、受容体チロシンキナーゼのリガンド非依存性の活性を引き起こし、最近の報告では、ＥＧＦＲ遺伝子のチロシンキナーゼ領域における特異的なミスセンスおよび欠失の突然変異（リンチら（Ｌｙｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年；パエツら（Ｐａｅｚ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年；パオら（Ｐａｏ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年）は、ＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害薬の感受性に、また女性に、腺癌の病歴に、および喫煙したことがないという状態に、チロシンキナーゼ阻害薬の感受性に関連することが知られている全ての臨床上の特徴に関連があることが示されている（フクオカら（Ｆｕｋｕｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年；クリスら（Ｋｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、ＪＡＭＡ；ペレス－ソラーら（Ｐｅｒｅｚ－Ｓｏｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、２００１年；ミラーら（Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３年、Ｐｒｏｃ．Ａｍ　Ｓｏｃ　Ｃｌｉｎ　Ｏｎｃｏｌ．；ミラーら（Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４年、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．）。これらのＥＧＦＲの突然変異は、チロシンキナーゼ阻害薬で得られた大多数の他覚的な反応を説明することができるが、これらの薬物で観察された臨床上の利点、および以前の臨床試験で同定された生存上の利点を突然変異の存在だけで説明することはできない。

【００４８】

あらゆるＥＧＦＲの突然変異が検出され得る一方で、複数の突然変異がヒトで、特にエキソン１８、１９、および２１上で起こることはすでに知られている。上記で論じたように、この方法は、ＥＧＦＲタンパク質発現の検出と；ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性の検出と；ＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性の検出と；ならびに／あるいはリン酸化Ａｋｔタンパク質レベルの検出（以下に記載する）と組み合わされ得る。高ＥＧＦＲタンパク質の発現、ＨＥＲ２遺伝子の増幅および／またはＨＥＲ２の多染色体性、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／またはＥＧＦＲの多染色体性、ならびに／あるいはリン酸化Ａｋｔの発現と組み合わされた、ＥＧＲ遺伝子における１つまたは複数の突然変異のある腫瘍を有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応性であることが予測される。

【００４９】
本発明の別の実施形態では、この方法は、患者からの腫瘍細胞のサンプルにおけるリン酸化Ａｋｔタンパク質のレベルの検出を含む。Ａｋｔタンパク質の活性化の状態は、前臨床および臨床試験において、ＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害薬の感受性において重要な演者として強調されている（ソルデラら（Ｓｏｒｄｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．）、２００４年；カプッツォら（Ｃａｐｐｕｚｚｏ ｅｔ ａｌ．）、２００４年、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ）。Ａｋｔは、ＥＧＦＲの下流で、細胞の生存、増殖、および成長を含む多くの細胞の工程を調節するように働くセリン／スレオニンキナーゼであり、アミノ酸Ｔｈｒ３０８およびＳｅｒ４７３でリン酸化により活性化される（ダタら（Ｄａｔｔａ ｅｔ ａｌ．）。ソルデラら（Ｓｏｒｄｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．）は、ゲフィチニブ感作性のＥＧＦＲの突然変異が肺癌の細胞系でＡｋｔに伴う抗アポトーシスの経路を活性化することを示し、カプッツォら（Ｃａｐｐｕｚｚｏ ｅｔ ａｌ．）は、Ａｋｔの活性化状態が反応および無進行期間に関してＮＳＣＬＣ患者のゲフィチニブ感受性に関連するが、生存に関しては関連しないことを示した。生存との関連を欠くことは、非ＥＧＦＲ依存性の機序によるＡｋｔ活性化の結果としてゲフィチニブ治療に抵抗性である、リン酸化した（Ｐ）－Ａｋｔ－陽性の患者のサブセットが存在することにより説明され得る。

【００５０】
リン酸化Ａｋｔタンパク質を発現する腫瘍細胞を有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応性であることが予測され、したがってこの系統の治療の使用の最良の候補者である。上述したように、この方法は、ＥＧＦＲ阻害薬の治療に反応することが予測される腫瘍を有する患者を同定する能力を増強するために、ＥＧＦＲタンパク質の発現の検出、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性の検出；ＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性の検出；ならびに／あるいはＥＧＦＲ遺伝子における突然変異の検出のあらゆる１つまたは複数と組み合わされ得るとされている。ＥＧＦＲ遺伝子における１つまたは複数の突然変異、ＥＧＦＲタンパク質の高発現、ＨＥＲ２遺伝子の増幅および／またはＨＥＲ２の多染色体性、ならびに／あるいはＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／またはＥＧＦＲの多染色体性と組み合わせてリン酸化Ａｋｔを発現する腫瘍を有する患者は、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に反応性であることが予測される。

【００５１】
本発明の一実施形態では、この方法には、蛍光ｉｎ ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）を用いたＥＧＦＲおよびＨＥＲ２遺伝子の増幅、ならびに／または多染色体性の検出が含まれる。

【００５２】
本発明の一実施形態では、この方法には、免疫組織化学（ＩＨＣ）技術を用いたＥＧＦＲタンパク質またはリン酸化Ａｋｔタンパク質の検出が含まれる。

当業者であれば、本願における本発明の記載から明らかであろうが、上述した生物マーカーおよび検出プロトコールの様々な組合せにより、ＥＧＦＲ阻害薬での治療に反応性であることが予測される患者（および、反応が低い者であることが予測される患者）を同定する能力を増強し、または改善することができる。したがって、生物マーカー、検出プロトコール、および検出技術の使用のあらゆる組合せが本発明に包含される。さらに、同じ結果を達成するために他の技術を用いてもよいので、本発明は、本願に記載される検出技術（例えば、ＦＩＳＨおよびＩＨＣ）に限定されるものではない。例示として、本発明者らは、以下の特定の組合せがＥＧＦＲ阻害薬の反応性を予測するのに特に有用であることを実証した：（１）ＦＩＳＨを用いたＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性の検出と、ＦＩＳＨを用いたＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体の検出との組合せ、（２）ＩＨＣを用いたＥＧＦＲタンパク質の発現の検出と、ＦＩＳＨを用いたＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性の検出との組合せ、（３）ＦＩＳＨを用いた、ＥＧＦＲ遺伝子における突然変異の検出と、ＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性の検出との組合せ、（４）ＦＩＳＨを用いたＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性の検出と、ＩＨＣを用いたＥＧＦＲタンパク質の発現の検出との組合せ、（５）

ＩＨＣを用いたＥＧＦＲタンパク質の発現の検出と、ＥＧＦＲ遺伝子における突然変異の検出との組合せ、（６）ＩＨＣを用いた、ＥＧＦＲタンパク質の発現の検出と、リン酸化Ａｋｔタンパク質の検出との組合せ、（７）ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性の検出と、ＥＧＦＲ遺伝子における突然変異の検出と、（８）ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性の検出と、ＩＨＣを用いたＥＧＦＲタンパク質の検出と、ＥＧＦＲ遺伝子における突然変異の検出と、ならびに（９）ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性の検出と、ＩＨＣを用いたＥＧＦＲタンパク質の発現の検出と、ＩＨＣを用いたリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現の検出。

【００５３】

本発明の方法を用いて、ＥＧＦＲ阻害薬での処置に対する患者の腫瘍の反応性および臨床上の結果を効果的に予測することができる。本願に提供されたデータのほとんどは、よく知られているＥＧＦＲ阻害薬であるゲフィチニブ（ＺＤ　１８３９、Ｉｒｅｓｓａ（登録商標）、アストラゼネカ（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、英国所在）を投与されている患者で作成されたが、あらゆるタイプのあらゆるＥＧＦＲ阻害薬に対する患者の腫瘍の反応性の評価が本発明に包含されることを理解されたい。

【００５４】

本発明によると、ＥＧＦＲ阻害薬は、あらゆるＥＧＦＲを含む、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）の発現および／または生物学的活性を阻害する（阻止する、低下させる、拮抗する、減少させる、逆転させる）あらゆる物質である。したがって、阻害薬は、それだけには限定されないが、薬物／化合物／ペプチドの製品のデザインまたは選択、抗体またはその抗原結合性フラグメント、タンパク質、ペプチド、核酸（リボザイム、アンチセンス、ＲＮＡｉ、およびアプタマーを含む）、あるいは、ＥＧＦＲの発現および／または生物学的活性を阻害するあらゆる他の製品を含むことができる。例えば、ＥＧＦＲの周知の阻害薬には、薬物であるゲフィチニブ（ＺＤ　１８３９、Ｉｒｅｓｓａ（登録商標）、アストラゼネカ（ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、英国所在）およびエルロチニブ（ＯＳＩ　７７４、Ｔａｒｃｅｖａ（登録商標）、ジェネンテック（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、米国所在）、ならびにモノクローナル抗体であるセツキシマブ（Ｅｒｂｉｔｕｘ（登録商標）、Ｉｍｃｌｏｎｅ、ブリストルマイヤーズスクイブ（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ））が含まれる。しかし、本発明は、これらの特定の物質に限定されず、このような物質の作用薬（下記に記載する）、またはこれらの物質と実質的に同様の生物学的活性を有する物質を含むことができる。ＥＧＦＲなどのタンパク質の生物学的活性または生物学的作用は、ｉｎ　ｖｉｖｏ（すなわち、タンパク質の天然の生理学的環境）またはｉｎ　ｖｉｔｒｏ（すなわち、実験室の条件下）で測定または観察される、天然に存在する形態のタンパク質が表し、または実行するあらゆる機能を意味する。ＥＧＦＲの生物学的活性には、それだけには限定されないが、ＥＧＦへの結合、受容体のホモ２量体化またはヘテロ２量体化、チロシンキナーゼ活性、ならびに細胞の恒常性および発生に関連する下流の活性が含まれる。

【００５５】

本発明の様々な定義および態様を以下に記載するが、本発明は、説明の、または例示の目的で用いることがあるあらゆる特定の実施形態に限定されるものではない。ゲフィチニブが本願に記載される範囲では、ゲフィチニブは例示的なＥＧＦＲ阻害薬であり、上記で論じたように、本発明の方法は、あらゆるＥＧＦＲ阻害薬に対する患者の腫瘍の感受性または抵抗性の評価に適用可能である。

【００５６】

本発明の方法は、試験すべき患者からの腫瘍細胞のサンプルにおける以下の生物マーカーの任意の１つもしくは２、３、４、５、６、または７つ全ての任意の組合せ、およびこのような生物マーカーのあらゆる検出タイプを検出することを含む：（１）上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子（すなわちＥＧＦＲをコードする遺伝子）のレベル、（２）上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子の多染色体性のレベル、（３）ＨＥＲ２遺伝子の遺伝子増幅のレベル、（４）ＨＥＲ２遺伝子の多染色体性のレベル、（５）ＥＧＦＲ遺伝子

における突然変異、（６）ＥＧＦＲタンパク質の発現、および／または（７）リン酸化Ａｋｔ発現。（１）と（２）との一緒の検出、および／または（３）と（４）との一緒の検出は一般的に、遺伝子コピー数における獲得または増加の検出と言及することができる。本発明によると、生物マーカーは検出、測定、または他の方法で評価されることができ、本発明ではＥＧＦＲ阻害薬に対する患者の腫瘍の反応性（または無反応性）である特定の効果を同定、測定、または予測するために用いられるあらゆる遺伝子またはタンパク質またはその部分を含む。本発明に有用な生物マーカーには、ＥＧＦＲ遺伝子、ＥＧＦＲタンパク質、ＨＥＲ２遺伝子、およびリン酸化Ａｋｔタンパク質が含まれる。本発明による生物マーカーの使用には、生物マーカーを検出または測定するための特定のプロトコールまたは技術の使用（検出のタイプ、例えば、ＦＩＳＨまたはＩＨＣ）、あるいは生物マーカーに付随する特別の特徴の同定（例えば、遺伝子の増幅、遺伝子の多染色体性、遺伝子またはタンパク質の発現レベル、突然変異の同定など）が含まれる。特に好ましい組合せには、以下の生物マーカーの組合せ、および上記に記載したその検出のタイプが含まれる：（１）および（２）、（３）および（４）、（１）および（２）および（３）および（４）、（２）および（４）、（１）および／または（２）および（６）、（１）および／または（２）および（７）、ならびに（６）および（７）。本発明はこれらの組合せに限定されない。

【００５７】

患者のサンプルを得る適切な方法は当業者に知られている。患者のサンプルには、腫瘍細胞または腫瘍細胞のタンパク質を含んでいることがある患者からのあらゆる体液または組織が含まれ得る。より詳しくは、本発明による「試験サンプル」または「患者サンプル」は、それだけには限定されないが、単離された細胞のサンプル、組織サンプル、および／または体液サンプルを含めた、本発明の方法により評価される細胞から分泌された細胞または生成物を含むあらゆるタイプのサンプルを一般的に意味するために用いられ得る。本発明では、サンプルが組織サンプルであるのが最も典型的である。本発明によると、単離された細胞のサンプルは、典型的には、本発明の方法により評価されるための適切な数の細胞の収集物をもたらすあらゆる適切な方法により器官、組織、または液体から回収された、ｉｎ　ｖｉｖｏで組織内の細胞を結合していた可能性のある結合組織から分離された、懸濁液の細胞の検体である。細胞サンプル中の細胞は、必ずしも同じタイプである必要はないが、精製方法を用いて、評価するのが好ましいタイプの細胞に濃縮され得る。例えば、組織を摩擦し、組織サンプルを加工して個々の細胞を放出させ、または体液から単離することにより、細胞を得ることができる。

【００５８】

組織サンプルは単離された細胞のサンプルと類似しているが、本願では、いくつかの細胞のタイプおよび／または細胞を結束する細胞骨格構造を通常含む、身体の器官または組織の切片と定義される。当業者であれば、「組織サンプル」は、ある場合には「細胞サンプル」と交換可能に用いられることができ、細胞サンプルよりもより複雑な構造を意味するのに用いられることが好ましいことを理解するであろう。生検により、例えば、切断、スライス、または穿孔されることにより組織サンプルを得ることができる。

【００５９】

組織サンプルのような体液のサンプルは評価すべき細胞を含んでおり、サンプリングすべき特定の体液に適するあらゆる方法により得られる液体である。サンプリングに適する体液には、それだけには限定されないが、血液、粘液、精液、唾液、痰、気管支洗浄、母乳、胆汁、および尿が含まれる。

【００６０】

一般的に、サンプルのタイプ（すなわち、細胞、組織、または体液）は、腫瘍細胞の成長を評価するための器官または組織の接触性および構造、および／または評価すべき癌のタイプが何であるかに基づいて選択される。例えば、評価すべき器官／組織が乳房である場合、サンプルは生検からの上皮細胞のサンプル（すなわち、細胞サンプル）、または生検からの乳房組織サンプル（組織サンプル）でもよい。本発明は、癌の患者、特に非小細

胞肺癌を評価するのに特に有用であり、この場合、典型的なサンプルは患者からの肺の腫瘍の切片である。

【００６１】

本発明による腫瘍細胞における遺伝子のコピー数は、例えば核でＦＩＳＨアッセイにより測定されることができ、タンパク質の発現は、例えば腫瘍細胞の核、細胞質、および／または膜で免疫組織化学アッセイにより測定され得る。両方の試験、例えば、ＦＩＳＨおよび免疫組織化学、ならびに他の検出方法は、原発腫瘍、転移の腫瘍、局所再発性の腫瘍、痰、気管支洗浄、腹水、髄液、または他の腫瘍の設定で行われ得る。マーカーは、新鮮、凍結、固定、または他の方法で保存された腫瘍の検体で測定され得る。

【００６２】

患者からサンプルを得たら、本願に記載された１つまたは複数の任意の生物マーカーの検出についてサンプルを評価する。本発明のいくつかの実施形態では、組織、細胞、またはそれらの一部分（例えば、組織の切片、核酸などの細胞の構成成分、など）を、１つまたは複数の核酸と接触させる。このようなプロトコールを用いて、例えば、遺伝子の発現、遺伝子の増幅、および／または遺伝子の多染色体性を検出する。このような方法には、細胞ベースのアッセイ、または非細胞ベースのアッセイが含まれ得る。標的の遺伝子を発現する組織または細胞をあらゆる適切な方法により、例えば適切な技術による標的の遺伝子の検出を可能にするやり方で、混合、ハイブリダイズ、または結合することにより、典型的には検出用物質（例えば、プローブ、プライマー、または他の検出可能なマーカー）と接触させる。

【００６３】

患者のサンプルが、利用される検出技術に適するあらゆる方法により調製される。一実施形態では、患者のサンプルは、新鮮、凍結、固定、または他の方法で保存されて用いられ得る。例えば、患者の腫瘍細胞は、患者の組織を例えばパラフィン中に固定することにより調製され得る。固定化された組織から薄片が作成され、次いで標的遺伝子（例えば、ＥＧＦＲ、またはＨＥＲ２）に対するプローブのハイブリダイゼーションの検出のためのプローブと接触され得る。

【００６４】

好ましい実施形態では、本発明による遺伝子の検出が、ハイブリダイゼーションアッセイを用いて実現される。核酸のハイブリダイゼーションは、プローブとその相補的な標的とが相補的な塩基対により安定なハイブリッドの２本鎖を形成することができる条件下で、プローブ（例えば、オリゴヌクレオチド、またはより大型のポリヌクレオチド）と標的の核酸とを接触させることを含むにすぎない。本願で用いられるハイブリダイゼーション条件は、そのもとで類似の核酸分子を同定するために核酸分子を用いる標準のハイブリダイゼーション条件を意味する。このような標準の条件は、例えば、サムブルックら（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．）、「分子クローニング：実験室マニュアル（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ）」コールドスプリングハーバーラボラトリーズ出版（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｓ　Ｐｒｅｓｓ）、１９８９年に開示されている。サムブルックら（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．）は、その全文を参照として本願に援用される（詳しくは、９．３１～９．６２頁を参照されたい）。さらに、様々な程度のヌクレオチドのミスマッチを許すハイブリダイゼーションを実現する好適なハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を計算するための式は、例えば、その全文を参照として本願に援用されるメインコスら（Ｍｅｉｎｋｏｔｈ　ｅｔ　ａｌ．）、１９８４年、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１３８巻、２６７～２８４頁；（Ｍｅｉｎｋｏｔｈ　ｅｔ　ａｌ．）に開示されている。ハイブリッドの２本鎖を形成しない核酸は、ハイブリダイズした核酸から洗い流され、次いで、典型的には、付着している検出可能の標識を検出することにより、ハイブリダイズした核酸を検出することができる。温度を上昇させ、または核酸を含むバッファーの塩濃度を低下させることにより、核酸を変性させることは一般的に認められている。厳密性の低い条件下（例えば、低温度、および／または高塩分）では、アニールした配列が完全に相補的ではない場合で

も、ハイブリッドの２本鎖（例えば、ＤＮＡ：ＤＮＡ、ＲＮＡ：ＲＮＡ、またはＲＮＡ：ＤＮＡ）が形成される。このように、ハイブリダイゼーションの特異性は、厳密性が低下すると低くなる。それとは反対に、厳密性が高くなる（例えば、高温度または低塩分）と、ハイブリダイゼーションが成功するには、ミスマッチがより少ないことが必要とされる。

【００６５】

本願で言及される、厳密性の高いハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件は、ハイブリダイゼーション反応でプローブするために用いられる核酸分子と少なくとも約９０％の核酸配列の同一性を有する核酸分子を単離させる条件（すなわち、約１０％またはそれ未満のヌクレオチドのミスマッチを許す条件）を意味する。当業者であれば、メインコスら（Ｍｅｉｎｋｏｔｈ　ｅｔ　ａｌ．）、１９８４年、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．、１３８巻、２６７～２８４頁（その全文を参照として本明細書に援用する）における処方を用いて、好適なハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を計算して、これらの特定のレベルのヌクレオチドのミスマッチの実現することができる。このような条件は、ＤＮＡ：ＲＮＡまたはＤＮＡ：ＤＮＡのハイブリッドのどちらが形成されるかに応じて変化する。ＤＮＡ：ＤＮＡハイブリッドに対して計算された融解温度は、ＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドに対する温度よりも１０℃低い。特定の実施形態では、ＤＮＡ：ＤＮＡハイブリッドに対する厳密なハイブリダイゼーション条件には、６×ＳＳＣ（０．９ＭＮａ$^{+}$）のイオン強度で、約２０℃と約３５℃の間の温度での、より好ましくは約２８℃と約４０℃の間での、さらにより好ましくは約３５℃と約４５℃の間でのハイブリダイゼーションが含まれる。特定の実施形態では、ＤＮＡ：ＲＮＡハイブリッドに対する厳密なハイブリダイゼーション条件には、６ＸＳＳＣ（０．９ＭＮａ$^{+}$）のイオン強度で、約３０℃と約４５℃の間での、より好ましくは約３８℃と約５０℃の間での、さらにより好ましくは約４５℃と約５５℃の間の温度でのハイブリダイゼーションが含まれる。これらの値は、約１００ヌクレオチド、０％ホルムアミド、および約４０％のＧ＋Ｃ含量よりも大きい分子に対する融解温度の計算に基づくものである。あるいは、サムブルックら（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．）９．３１～９．６２頁に述べてあるように、経験的に$T_m$を計算することができる。

【００６６】

サンプルの核酸に付着している１つまたは複数の標識を検出することにより、ハイブリダイズされた核酸を検出する。標識を、当業者にはよく知られている、あらゆる数々の手段により組み込むことができる。本発明での使用に適する検出可能な標識には、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的な手段により検出可能なあらゆる組成物が含まれる。本発明における有用な標識には、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、Ａｌｅｘａ　ｆｌｕｏｒｓ、Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　ｄｙｅ、など）、量子ドット、放射標識（例えば、$^{3}$Ｈ、$^{125}$Ｉ、$^{35}$Ｓ、$^{14}$Ｃ、または$^{32}$Ｐ）、および比色標識が含まれる。このような標識を検出する方法は当業者によく知られている。したがって、例えば、放射標識は写真フィルムまたはシンチレーションカウンターを用いて検出されることができ、蛍光マーカーは、放射された光を検出するための光検出器および蛍光顕微鏡を用いて検出されることができる。比色標識は、着色された標識を単に可視化することにより検出される。ハイブリダイズした核酸を蛍光標識により検出することが好ましく、蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）アッセイのコンテキストで検出することが最も好ましい。ＦＩＳＨアッセイは当技術分野でよく知られており、例えば実施例の節で記載されている。

【００６７】

本発明によると、単離されたポリヌクレオチド、または単離された核酸分子は、その天然の環境から除去されている（すなわち、ヒトの操作に曝されている）核酸分子であり、その天然の環境とは、核酸分子が自然界で見られるゲノムまたは染色体である。このように「単離された」とは、核酸分子が精製されている程度を必ずしも反映するものではないが、核酸分子が自然界で見られる全ゲノムまたは全染色体を分子が含んでいないことを示

している。（例えば、遺伝子に対するハイブリダイゼーションにより）遺伝子を検出するために、本発明の方法で用いられるものなどのポリヌクレオチドは、典型的には、所与のサンプル（例えば、細胞サンプル）中で全長の遺伝子（またはその部分）を同定するためのハイブリダイゼーションプローブ、またはＰＣＲプライマーとして使用されるのに適する標的遺伝子の一部分である。単離された核酸分子には、遺伝子または遺伝子の一部分（例えば、調節領域、またはプロモーター）が含まれ得る。遺伝子を含む単離された核酸分子は、そのような遺伝子を含む染色体のフラグメントではなく、むしろ遺伝子に関連するコード領域および調節領域を含むが、同じ染色体上にさらなる遺伝子は天然には見られない。単離された核酸分子には、本来、特定された核酸配列に通常隣接しないさらなる核酸（すなわち、異種性の配列）が隣接する（すなわち、配列の５’および／または３’末端の）特定された核酸配列も含まれ得る。単離された核酸分子には、ＤＮＡ、ＲＮＡ（例えば、ｍＲＮＡ）、またはＤＮＡもしくはＲＮＡのいずれかの誘導体（例えば、ｃＤＮＡ）が含まれ得る。「核酸分子」は主に物理的な核酸分子を意味し、「核酸配列」は主に核酸分子上のヌクレオチドの配列を意味するが、特に、核酸分子、またはタンパク質をコードすることができる核酸配列に関して、２つの語句を交換可能に用いることができる。本発明の単離された核酸分子は、リコンビナントのＤＮＡ技術（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅、クローニング）、または化学合成を用いて生成されることが好ましい。

【００６８】

本発明によると、プローブ（オリゴヌクレオチドプローブ）は、典型的には長さ約５０～１００ヌクレオチドから数百ヌクレオチドから数千ヌクレオチドのサイズの範囲の核酸分子である。したがって、プローブは、整数で増加して５０から数千ヌクレオチドの範囲の任意の長さを含む、本願に記載されたアッセイで使用されるのに適するあらゆる長さでよい。このような分子は、厳密なハイブリダイゼーションの条件下でそのような標的の核酸配列とハイブリダイズすることにより、サンプル中の標的の核酸配列を同定するのに典型的に用いられる。ハイブリダイゼーション条件は上記に詳しく記載されている。

【００６９】

ＰＣＲプライマーは、典型的には、ポリメラーゼ連鎖反応に用いられる、かなり長さの短い（例えば、８～３０ヌクレオチド）のオリゴヌクレオチドであるが、ＰＣＲプライマーは核酸配列でもある。当業者であれば、標的の配列からの配列情報を用いて、ＰＣＲプライマーおよびハイブリダイゼーションプローブを容易に開発して生成することができる（例えば、サムブルックら（Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．）、またはグリックら（Ｇｌｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．）を参照されたい）。

【００７０】

ヒト上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子のヌクレオチド配列は当技術分野で知られており、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受諾番号ＡＹ５８８２４６（本願に参照として援用される）のもとに見ることができる。ヒトチロシンキナーゼ受容体型受容体（ＨＥＲ２）遺伝子のヌクレオチド配列も当技術分野で知られており、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受諾番号Ｍ１６７８９、Ｍ１６７９０、Ｍ１６７９１、Ｍ１６７９２、およびＭ１１７３０（全て本願に参照として援用される）のもとに見ることができる。ヌクレオチドプローブも当技術分野で知られており、ＥＧＦＲ遺伝子またはＨＥＲ２遺伝子を検出するためのようなプローブとして用いるために入手可能である。例えば、ＥＧＦＲおよび第７染色体セントロメア配列の両方を検出するためのプローブは入手可能である（例えば、ＬＳＩ　ＥＧＦＲ　Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｏｒａｎｇｅ／ＣＥＰ　７　Ｓｐｅｃｔｒｕｍ　Ｇｒｅｅｎプローブ（バイシス（Ｖｙｓｉｓ）、アボット・ラボラトリーズ（Ａｂｂｏｔｔ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）社製）。

【００７１】

本発明の方法では、腫瘍細胞サンプルにおけるＥＧＦＲ遺伝子の増幅のレベルおよび／または多染色体性を：（ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベル、および（ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベ

ルから選択されるコントロールレベルのＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性と比較する。患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性のレベルが、ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性のコントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性のレベルが、ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性のレベルを統計学的に超えている場合に、患者は、ＥＧＦＲ阻害薬、その作用薬、またはＥＧＦＲ阻害薬と実質的に同様の生物学的活性を有する薬物の治療的投与が有効であることが予測されるとして選択される。患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲ遺伝子の増幅および多染色体性のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性のコントロールレベルよりも統計学的に低い場合、または患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性のレベルが、ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性のレベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、患者は、ＥＧＦＲ阻害薬、その作用薬、またはＥＧＦＲ阻害薬と実質的に同様の生物学的活性を有する薬物の治療的投与が有効でないことが予測されるとして選択される。

【００７２】

同様に、ＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性を評価する場合には、腫瘍細胞サンプルにおけるＨＥＲ２遺伝子の増殖および／または多染色体性のレベルを、（ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベル、および（ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルから選択されるコントロールレベルのＨＥＲ２遺伝子の増殖および／または多染色体性と比較する。患者の腫瘍細胞におけるＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性のコントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または患者の腫瘍細胞におけるＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性のレベルが、ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性のレベルを統計学的に超える場合に、患者は、ＥＧＦＲ阻害薬、その作用薬、またはＥＧＦＲ阻害薬と実質的に同様の生物学的活性を有する薬物の治療的投与が有効であることが予測されるとして選択される。患者の腫瘍細胞におけるＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性のコントロールレベルより統計学的に低い場合に、または患者の腫瘍細胞におけるＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性のレベルが、ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性のレベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、患者は、ＥＧＦＲ阻害薬、その作用薬、またはＥＧＦＲ阻害薬と実質的に同様の生物学的活性を有する薬物の治療的投与が有効でないことが予測されるとして選択される。

【００７３】

より詳しく述べると、本発明によると、「コントロールレベル」は、ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているレベル、またはＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているレベルを含むことができる遺伝子増幅および／または多染色体性の、あるコントロールレベルである。したがって、遺伝子の増幅および／または多染色体性のコントロールレベルまたはベースラインレベルと比較して、患者のサンプルがＥＧＦＲ阻害薬の治療に対して、より感受性の傾向があるか、それともより抵抗性の傾向があるか（例えば、反応の良好な者または反応者（治療が有効であるであろう者）であるか、それとも反応が低い者または無反応者（治療が有効でない者またはほとんど有効でないであろう者）を決定することができる。

【００７４】

遺伝子のコピー数を評価する（すなわち、遺伝子の増幅、および／または遺伝子の多染色体性により）本発明の一実施形態では、細胞１個当たりのコピー数の増加で患者を６つ

のカテゴリーに分類する：（１）２染色体（＞９０％の細胞で両標的の≦２コピー）、（２）低い３染色体性（≧４０％の細胞で遺伝子の≦２コピー、および１０～４０％の細胞で３コピー）、（３）高い３染色体性（≧４０％の細胞で遺伝子の≦２コピー、および≧４０％の細胞で３コピー）、（４）低い多染色体性（１０～４０％の細胞で遺伝子の≧４コピー）、（５）高多染色体性（≧４０％の細胞で遺伝子の≧４コピー）、および（６）密接なＥＧＦＲ遺伝子クラスターが存在し、細胞１個当たりの遺伝子／染色体比が≧２であり、または分析した細胞≧１０％で細胞１個当たりのＥＧＦＲのコピーの平均が≧１５であることにより定義される遺伝子増幅（ＧＡ）。本発明者らは、ＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ２の遺伝子のコピー数またはコピー数における獲得が高い（例えば、遺伝子の増幅、および／または、高い３染色体性、低い多染色体性、もしくは高多染色体性を含む多染色体性）患者は、ＥＧＦＲ阻害薬治療に対する反応率が高くなり、進行性の疾患の割合が低くなり、進行により時間がかかるようになり、長期生存率が高くなる傾向が強くなることを見出している。多染色体性または遺伝子コピー数の全体の獲得が大きくなるほど良好な結果が予測される。本発明者らは、患者の腫瘍細胞にＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性が存在すると、ＥＧＦＲ陽性の患者（例えば、ＥＧＦＲ遺伝子コピー数における獲得を示す患者）に対してより感受性の表現型を与え、ＥＧＦＲ陰性の患者（例えば、ＥＧＦＲ遺伝子コピー数における獲得が全くない、または低い患者）に対してより良好な結果を与えることを見出した。

【００７５】

コントロールレベルの遺伝子の増幅または多染色体性を確立するための方法は、サンプルのタイプ、サンプルが得られる組織または器官、および評価すべき患者の状態に基づいて選択される。この方法は、患者におけるサンプルを評価するために用いられるのと同じ方法であることが好ましい。好ましい実施形態では、コントロールレベルは、評価すべき細胞と同じ細胞のタイプを用いて確立される。好ましい実施形態では、ゲフィチニブに対して抵抗性または感受性であることが知られている患者または細胞系からのコントロールサンプルからコントロールレベル確立される。一態様では、適合された個体の集団からコントロールサンプルが得られた。本発明によると、「適合された個体」は、評価すべき細胞のタイプまたは腫瘍の成長に適する１つまたは複数の特徴に基づいたコントロールの個体の適合を意味する。例えば、コントロールの個体は、性別、年齢、人種、またはコントロールの個体および患者のベースラインに影響を及ぼすことがあるあらゆる関連性のある生物学的または社会学的要因（例えば、既存の条件、特別な物質の消費、他の生物学的もしくは生理学的要因のレベル）に基づいて評価すべき患者と適合され得る。コントロールレベルを確立するために、数々の適合させた個体からのサンプルを試験サンプルに関するのと同じやり方で入手されて評価される。適切なコントロールレベル（例えば、集団）を確立するためにその個体からコントロールサンプルを得なければならない適合された個体の数は、当業者であれば決定することができるが、評価すべき患者（すなわち、試験患者）との比較に適するベースラインを確立するのに統計学的に好適でなければならない。コントロールのサンプルから得られた値は、そのような値を確立するための当技術分野では標準の方法を用いて適切なベースラインのレベルを確立するためのあらゆる適切な統計学的分析の方法を用いて統計学的に処理される。実施例の節で、このような統計学的方法を記載する。

【００７６】

アッセイが行われるときにコントロールレベルが各アッセイで確立される必要はないが、ベースラインまたはコントロールは、上記に記載されたあらゆる方法により確立されたコントロールレベルなど、感受性の患者および抵抗性の患者（反応者および無反応者）に対して以前に決定されたコントロールレベルに関するある形態の蓄えられた情報を参照することにより確立されることが当業者によって認識されるだろう。このようなある形態の蓄えられた情報には、例えば、それだけには限定されないが、参照図、感受性および抵抗性の腫瘍／患者に関する集団もしくは個体のデータの一覧表もしくは電子ファイル、または、評価すべき患者に有用な、コントロールレベルの遺伝子増幅もしくは多染色体性に関

する他のデータの供給源が含まれ得る。例えば、所与の患者のサンプルを評価するためにＥＧＦＲ阻害薬に対する反応性とすでに相関している、上記で確立され、多染色体性を確立して遺伝子の増幅を検出するための実施例でさらに記載されるガイドラインが使用され得る。

【００７７】

本発明の一実施形態では、この方法は、ＥＧＦＲまたはリン酸化Ａｋｔを含むタンパク質の発現を検出する工程を含む。タンパク質の発現は、生検で得られた腫瘍組織および細胞材料などの適切な組織で検出することができる。例えば、固定化され得る患者の腫瘍の生検サンプルを、検出すべきタンパク質と選択的に結合する抗体、抗体フラグメント、またはアプタマーと接触させることができ、抗体、そのフラグメント、またはアプタマーがタンパク質に結合したか否かを検出する。タンパク質の発現を、それだけには限定されないが、ウェスタンブロット、免疫ブロット、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、免疫沈降、表面プラズモン共鳴、化学発光、蛍光偏光、りん光、免疫組織化学分析、マトリックス支援レーザ脱離／イオン化法飛行時間型（ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ）質量分析計、マイクロサイトメトリー（ｍｉｃｒｏｃｙｔｏｍｅｔｒｙ）、マイクロアレイ、顕微鏡、蛍光標示式細胞分取（ＦＡＣＳ）、およびフローサイトメトリーを含む、当技術分野では標準の様々な方法を用いて測定することができる。好ましい実施形態では、タンパク質の発現を検出するために免疫組織化学（ＩＨＣ）分析が用いられる。ＩＨＣ法、およびタンパク質の発現を検出するための好ましい評価基準は、例えば、ヒルシュら（Ｈｉｒｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ、２００３年、２１巻、３７９８～３８０７頁に詳しく記載されており、実施例にも記載されている。

【００７８】

タンパク質の発現を評価するための好ましいが非限定的な方法では、免疫組織化学の結果の評価として、以下のプロトコールが用いられる。本発明の一態様では、強度および陽性の細胞の分画に基づいてＰ－Ａｋｔの発現およびＥＧＦＲの発現をスコアすることができるが、本願に提供されるガイドラインを考慮すれば、当業者には他のスコアシステムは明らかであろう。強度のスコアを以下のように定義する：０＝腫瘍細胞にはっきりと感知できる染色がない、１＝細胞質および／または核に、間質の成分に比べてわずかに検出可能な染色、２＝腫瘍細胞の細胞質および／または核をはっきり目立たせる容易に認識できる褐色の染色、３＝腫瘍細胞に細胞質および／または核を不明瞭にする暗褐色の染色、あるいは４＝核および／または細胞質に非常に濃い染色。スコアは陽性細胞の分画をもとになっている（０％～１００％）。全スコアは、強度のスコアと分画のスコアとを掛け合わせて、全範囲を０から４００とすることにより計算される。統計学的な分析では、０～２００のスコアは陰性／低発現とみなされ、２０１～４００のスコアは陽性／高発現とみなされる。このカットオフレベルは、本発明者らからの以前の研究に基づくもので、この研究ではＥＧＦＲタンパク質の発現の増大と遺伝子コピー数の増加との間の相関が見出された（ヒルシュら（Ｈｉｒｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．、２００３年、２１巻、３７９８～３８０７頁）。これらのカットオフのレベルは、アッセイを行うのに都合の良いレベルであるが絶対的なレベルではない。例えば、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、またはそれを超えるポイントによってカットオフスコアを低くまたは高くすることなどにより、このスコアシステムは修正または操作され得る。

【００７９】

本発明の方法では、腫瘍細胞サンプルにおけるＥＧＦＲタンパク質の発現、および／またはリン酸化Ａｋｔの発現のレベルは、（ｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているコントロールレベル、および（ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているコントロールレベルから選択されるコントロールレベルのＥＧＦＲタンパク質の発現、および／またはリン酸化Ａｋｔの発現と比較される。患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現および／またはリン酸化Ａｋｔの発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現および／またはリン酸化Ａｋｔの発現のコ

ントロールレベルと統計学的に類似し、もしくはそれを超える場合に、または患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現および／またはリン酸化Ａｋｔの発現のレベルが、ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現および／またはリン酸化Ａｋｔの発現のレベルを統計学的に超える場合に、患者は、ＥＧＦＲ阻害薬、その作用薬、またはＥＧＦＲ阻害薬と実質的に同様の生物学的活性を有する薬物の治療的投与が有効であることが予測されるとして選択される。患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現および／もしくはリン酸化Ａｋｔの発現のレベルがＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現および／もしくはリン酸化Ａｋｔの発現のコントロールレベルよりも統計学的に低い場合に、または患者の腫瘍細胞におけるＥＧＦＲタンパク質の発現および／もしくはリン酸化Ａｋｔの発現のレベルが、ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関しているＥＧＦＲタンパク質の発現および／もしくはリン酸化Ａｋｔの発現のレベルと統計学的に類似し、もしくはそれより低い場合に、患者は、ＥＧＦＲ阻害薬、その作用薬、またはＥＧＦＲ阻害薬と実質的に同様の生物学的活性を有する薬物の治療的投与が有効でないことが予測されるとして選択される。

【００８０】

遺伝子の増幅および多染色体性の検出に関して好適なコントロールを上記で論じたが、このような考察を、タンパク質の発現に対するコントロールに容易に当てはめて推定することができる。上記で論じたように、比較のためのコントロールレベルは、ある形態の情報として提供される予め確立されたコントロールを含めた、あらゆるタイプのコントロールでもよい。例えば、ＥＧＦＲタンパク質の発現に関して、上記に記載されたＥＧＦＲの発現に対するスコアシステムを用いて、約２００を超える（２０１～４００）スコアを高発現（ＥＧＦＲ発現に対し陽性）の患者であるとみなされ、約０～２００のスコアを低発現（ＥＧＦＲ発現に対し陰性）の患者であるとみなされる。コントロールとの比較に基づいて他のスコアシステムを考案することができ、カットオフ付近にあたる患者を、診断を確認するために、他の基準、生物マーカー、または技術により評価することができる。また、カットオフは、患者の集団に従って、臨床医または研究者の望み通りに変化させてもよい。上記に記載したカットオフレベルはアッセイを行うのに都合の良いレベルであり、現在のデータを考慮して本発明者らが最適化したものであり、絶対的なレベルではない。例えば、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、またはそれを超えたポイントによってカットオフスコアを低くまたは高くするなどにより、このスコアシステムを修正または操作してもよいことが企図される。リン酸化Ａｋｔに関して同様の方法論が用いられた。

【００８１】

本発明の一実施形態では、この方法は、ＥＧＦＲ遺伝子のチロシンキナーゼ領域における突然変異を検出するさらなる工程を含む。特に、ＥＧＦＲ遺伝子のエキソン１８、１９、および２１は、現在までに報告されているＮＳＣＬＳにおける５６のＥＧＦＲ突然変異の約９８％を含むので、これらのエキソンは突然変異を評価するための良い目標である。リンチら（Ｌｙｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、またはパエツら（Ｐａｅｚ　ｅｔ　ａｌ．）（２６、２７）は、反応のない患者にはなかったことと比べて、ゲフィチニブに反応性の肺癌患者の大多数に、ＥＧＦＲ遺伝子のチロシンキナーゼ領域において体細胞突然変異を同定した（Ｐ＜０．００１）。突然変異は、チロシンキナーゼ領域のＡＴＰ結合性ポケットの周辺に密集した小さいインフレームの欠失またはアミノ酸置換のいずれかであった。同様の突然変異を、ゲフィチニブに曝されていなかった原発性の非小細胞肺癌の患者の８％からの腫瘍で検出した。突然変異は全てヘテロ接合性であり、複数の患者で同一の突然変異が観察され、付加的で特異的な機能の獲得を示唆していた。ｉｎ　ｖｉｔｒｏでは、ＥＧＦＲの突然変異体は、上皮成長因子に反応してチロシンキナーゼ活性の増強、およびゲフィチニブによる阻害に対する感受性の増大を実証していた。したがって、本発明は、ＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性のためのスクリーニング、ならびに／あるいはＨＥＲ２遺伝子の増幅のためのスクリーニング、と組み合わせて使用するための、あるいはその後の第２のスクリーニングとして使用するための、腫瘍細胞サンプルにおけるこのような突然変異の検出を企図するものである。ＥＧＦＲ遺伝子において１つまたは複

数の突然変異を検出することは、患者がＥＧＦＲ阻害薬治療に反応し、またはそが有効である傾向が強いという予測となる。突然変異を検出しないことは、患者がＥＧＦＲ阻害薬治療に反応し、またはそが有効である傾向があまりないという予測となる。遺伝子の突然変異をスクリーニングするための方法は当技術分野ではよく知られており、リンチら（Ｌｕｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、およびパエツら（Ｐａｅｚ　ｅｔ　ａｌ．）に記載されており、それだけには限定されないが、ハイブリダイゼーション、ポリメラーゼ連鎖反応、ポリアクリルアミドゲル分析、クロマトグラフィー、または分光法が含まれ、遺伝子がコードするタンパク質生成物の変更に対するスクリーニング（例えば、免疫ブロット（例えば、ウェスタンブロット、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、免疫沈降、免疫組織化学、免疫蛍光、蛍光標示式細胞分取（ＦＡＣＳ）、および免疫蛍光顕微鏡による）をさらに含むことができる。

【００８２】

本願で用いられる「に対して選択的に結合する」は、あるタンパク質の、別のタンパク質（例えば、抗体、そのフラグメント、またはタンパク質に対する結合パートナー）に対する特異的な結合を意味し、結合のレベルは、あらゆる標準のアッセイ（例えば、免疫アッセイ）で測定されるとアッセイに対するバックグラウンドのコントロールよりも統計学的に有意に高い。例えば、免疫アッセイが行われる場合に、コントロールは、典型的には抗体または抗原結合性フラグメントのみを含む（すなわち、抗原の非存在で）反応ウェル／チューブを含み、抗原の非存在下での抗体またはその抗原結合性フラグメントによる反応性の量（例えば、ウェルに対する非特異的な結合）をバックグラウンドとみなす。

【００８３】

本発明による生物マーカーの検出の工程を、本願に記載する多くの様々な組合せで組み合わせてもよく、この工程を任意の順番で、または実質上同時に行うことができる。コントロールと患者のサンプルとの間の差を決定するための統計学的な分析を、それだけには限定されないが、定性的変数を求めるピアソンのカイ二乗検定のフィッシャーの正確確率検定、および連続変数を求めるスチューデントのｔ検定または分散分析を用いたものを含めた当技術分野では周知のあらゆる方法を用いて実行することができる。統計学的有意性は、典型的にはｐ＜０．０５と定義される。統計学的な方法は、実施例でより詳しく記載される。

【００８４】

本発明の方法は、ＥＧＦＲ阻害薬、その作用薬、または、ＥＧＦＲ阻害薬と実質的に同様の生物学的活性を有する薬物を用いた治療に反応する（例えば、治療的利点をもって）傾向が最も強い患者を決定し、または予測するのに、また、ＥＧＦＲ阻害薬を用いた治療に反応しない傾向が最も強い患者を決定し、または予測するのに有用である。本願で用いられる作用薬は、天然に存在する、または基準タンパク質もしくは化合物の生物学的活性をアゴナイズ（ａｇｏｎｉｚｅ）する（例えば、刺激し、誘発し、増大させ、増強し、または模倣する）能力を特徴とする化合物である。より詳しくは、作用薬は、それだけには限定されないが、天然または基準化合物の活性を模倣し、または増強する化合物、タンパク質、ペプチド、抗体、または核酸を含むことができ、あらゆるホモログ、ミメティック、または天然に存在し、または基準化合物の生物学的活性をアゴナイズする（例えば、刺激し、誘発し、増大させ、増強する）能力を特徴とする薬物／化合物／ペプチドのデザインもしくはセレクションのあらゆる適切な生成物を含む。それとは対照的に、拮抗薬は、上記に記載した天然に存在する化合物、または基準化合物の効果を阻害する（例えば、拮抗し、低下させ、減少させ、阻止し、逆転させ、または変更する）あらゆる化合物を意味する。より詳しくは、拮抗薬は、基準化合物の活性に関連するやり方で作用することができ、その結果、天然の化合物、または基準化合物の生物学的活性が、基準化合物の天然の作用に拮抗的な（例えば、逆らって、逆に、または反対して）やり方で低下する。このような拮抗薬には、それだけには限定されないが、あらゆる化合物、タンパク質、ペプチド、または核酸（リボザイムおよびアンチセンスを含む）、または拮抗的な作用をもたらす薬物／化合物／ペプチドのデザインもしくはセレクションの生成物が含まれ得る。

【００８５】
薬物デザインの生成物である作用薬および拮抗薬を当技術分野では周知の様々な方法を用いて生成することができる。本発明に有用なミメティックまたは他の化合物をデザインするのに有用な薬物デザインの様々な方法は、モーリクら（Ｍａｕｌｉｋ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９７年、「分子生物工学：治療的応用と戦略（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ａｎｄ　Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ）」、ワイリーリス社（Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ　Ｉｎｃ．）に発表されており、その全文を参照として本願に援用する。作用薬または拮抗薬は、例えば、分子多様性の戦略（広範な、化学的に多様な分子ライブラリーの迅速な構築を可能にする関連する戦略の組合せ）から、天然のまたは合成の化合物のライブラリーから、特に化学的またはコンビナトリアルのライブラリー（すなわち、配列またはサイズが異なるが、同様の構成単位を有する化合物のライブラリー）から、または合理的な、定方向もしくはランダムな薬物デザインにより得ることができる。例えば、モーリクら（Ｍａｕｌｉｋ　ｅｔ　ａｌ．）を参照されたい。

【００８６】
分子多様性の戦略では、広範な化合物ライブラリーが、例えば、ペプチド、オリゴヌクレオチド、天然もしくは合成のステロイド化合物、炭水化物、および／または天然もしくは合成の有機の非ステロイド分子から、生物学的な、酵素的な、および／または化学的な取組みを用いて合成される。分子多様性の戦略を開発する決定的なパラメータには、サブユニットの多様性、分子サイズ、およびライブラリーの多様性が含まれる。このようなライブラリーをスクリーニングする一般的な目標は、コンビナトリアルのセレクションの逐次適用を利用して、望ましい標的に対する高親和性のリガンドを得た後、ランダムまたは定方向のデザイン戦略のいずれかにより主要な分子を最適化することである。分子多様性の方法は、モーリクら（Ｍａｕｌｉｋ　ｅｔ　ａｌ．）に詳しく記載されている。

【００８７】
ゲフィチニブと実質的に同様の生物学的活性を有する薬物は、ｉｎ　ｖｉｖｏ（すなわち、生理学的条件下で）またはｉｎ　ｖｉｔｒｏで（すなわち、実験室条件下で）測定され、または観察された基準化合物とされている基準化合物で表され、または行われた実質的にあらゆる機能を有する薬物を意味する。

【００８８】
他のタイプのＥＧＦＲ阻害薬には、それだけには限定されないが、アプタマー、ＲＮＡｉ、およびリボザイムが含まれ得る。アプタマーは、予め決定された特定の標的分子に高い親和性および特異性で結合するその能力によって、ランダム化したコンビナトリアルの核酸ライブラリーから選択された短鎖の合成の核酸（通常ＲＮＡであるが、ＤＮＡもある）である。アプタマーは、規定された３次元構造を想定し、構造上の相違が非常に小さい化合物間の識別をすることができる。ＲＮＡ干渉（ＲＮＡｉ）は、二重鎖のＲＮＡ、哺乳類の系統では短い干渉ＲＮＡ（ｓｉＲＮＡ）を用いて相補的な遺伝子の発現を阻害し、またはサイレンシングする工程である。標的の細胞ではｓｉＲＮＡはほどけており、ＲＮＡ誘導サイレンシング複合体（ＲＩＳＣ）と関連し、ＲＩＳＣは、次いでｓｉＲＮＡに相補的であるｍＲＮＡ配列に導かれ、そこでＲＩＳＣがｍＲＮＡを切断する。リボザイムは、生物学的触媒作用を実行することができる（例えば、共有結合を切断し、または形成することにより）ＲＮＡセグメントである。より詳しく述べると、リボザイムは、標的のＲＮＡ部分に結合することにより機能し、特定の切断部位でホスホジエステルのバックボーンを切断することによりそれを不活性化するアンチセンスのＲＮＡ分子である。

【００８９】
別のタイプのＥＧＦＲ阻害薬には、抗体、その抗原結合性フラグメント、または抗原結合性ペプチドすなわち「結合パートナー」が含まれ得る。抗体は免疫グロブリン領域からなり、それ自体はタンパク質の免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであることを特徴とする。抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、２価抗体および１価抗体、双特異性抗体または多特異性抗体、このような抗体を含む血清、様々な程度

に精製されている抗体、ならびに抗体全体のあらゆる機能上の同等物が含まれ得る。ＥＧＦＲ阻害薬として有用な単離された抗体には、このような抗体を含む血清、または様々な程度に精製されている抗体が含まれ得る。本発明の抗体全体は、ポリクローナルでもよいしモノクローナルでもよい。あるいは、１つまたは複数の抗体領域が切断され、または存在しない（例えば、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、またはＦ（ａｂ）$^{2}$フラグメント）抗原結合性フラグメントなどの抗体全体の機能上の同等物、および１つを超えるエピトープ（例えば、双特異性抗体）に結合することができる単鎖抗体もしくは抗体、または１つもしくは複数の異なる抗原に結合することができる抗体（例えば、双特異性抗体もしくは多特異性抗体）を含めた、遺伝子操作された抗体またはその抗原結合性フラグメントも、ＥＧＦＲ阻害薬として使用され得る。ＥＧＦＲに特異的に結合するようにデザインされ、ＥＧＦＲを阻害する結合パートナーも評価され得る。処方されたリガンドの特異性を所有するこのようなポリペプチドのデザインの例は、ベステら（Ｂｅｓｔｅ　ｅｔ　ａｌ．）（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、９６巻、１８９８～１９０３頁、１９９９年）に挙げられている。

【００９０】

本発明の別の実施形態には、本発明のあらゆる方法を行うためのアッセイキットが含まれる。アッセイキットには、任意の１つまたは複数の以下の構成要素が含まれ得る：（ａ）腫瘍細胞のサンプルで、上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子の増幅のレベルおよび／または上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）遺伝子の多染色体性のレベルを検出するための手段、（ｂ）腫瘍細胞のサンプルでＨＥＲ２遺伝子の増幅のレベルを検出するための手段、（ｃ）腫瘍細胞のサンプルでＥＧＦＲタンパク質の発現を検出するための手段、（ｄ）腫瘍細胞のサンプルで、リン酸化Ａｋｔタンパク質の発現を検出するための手段、および／または（ｅ）腫瘍細胞のサンプルで、ＥＧＦＲ遺伝子における少なくとも１つの（しかし、１つを超えて含むことができる）突然変異を検出するための手段。アッセイキットは、１つまたは複数のコントロールも含むことが好ましい。コントロールには、（ｉ）患者で使用するために評価されているＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性を検出するためのコントロールのサンプル、（ｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性を検出するためのコントロールサンプル、（ｉｉｉ）ＥＧＦＲ阻害薬の感受性または抵抗性に関して測定すべき、特別な生物マーカーの予め決定したコントロールレベルを含む情報（例えば、ＥＧＦＲ阻害薬に対する感受性またはＥＧＦＲ阻害薬に対する抵抗性と相関している、予め決定したコントロールレベルのＥＧＦＲ遺伝子の増幅および／または多染色体性）が含まれ得る。

【００９１】

一実施形態では、ＥＧＦＲまたはＨＥＲ２遺伝子の増幅および／または多染色体性を検出するための手段は概して、本発明の方法で用いられ得るあらゆるタイプの試薬でよい。検出のためのこのような手段には、それだけには限定されないが、厳密なハイブリダイゼーション条件下でＥＧＦＲ遺伝子、またはＨＥＲ２遺伝子、または第７染色体（その上にＥＧＦＲが位置する染色体）もしくは第１７染色体（その上にＨＥＲ２が位置する染色体）の一部分にハイブリダイズするプローブまたはプライマーが含まれる。ＥＧＦＲおよびＨＥＲ２の遺伝子に対する核酸配列は当技術分野で知られており、検出のためのこのような試薬を生成するために用いられ得る。検出のためにこのような手段を用いてアッセイを行うのに有用なさらなる試薬には、また、ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションを行うための試薬、蛍光マーカーを検出するための試薬、ポリメラーゼ連鎖反応を行うための試薬などが含まれ得る。

【００９２】

別の実施形態では、ＥＧＦＲまたはリン酸化Ａｋｔタンパク質の発現を検出するための手段は概して、本発明の方法で用いられ得るあらゆるタイプの試薬でよい。検出のためのこのような手段には、それだけには限定されないが、抗体およびその抗原結合性フラグメント、ペプチド、結合性パートナー、アプタマー、酵素、および小分子が含まれる。検出のためのこのような手段を用いてアッセイを行うのに有用なさらなる試薬には、免疫組織化学または別の結合性アッセイを行うための試薬なども含まれ得る。

【００９３】
本発明のアッセイキットの検出のための手段を、検出可能なタグまたは検出可能な標識と組み合わせることができる。このようなタグは、重要な遺伝子またはタンパク質を検出するために用いられる試薬の検出を可能にするあらゆる適切なタグであってよく、それだけには限定されないが、分光学的な、光化学的な、電気的な、肉眼的な、または化学的な手段により検出可能なあらゆる構成物または標識であってよい。本発明で有用な標識には、標識されたストレプトアビジン複合体で染色するためのビオチン、磁気ビーズ（例えば、Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（登録商標））、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質、など）、放射標識（例えば、$^{3}$Ｈ、$^{125}$Ｉ、$^{35}$Ｓ、$^{14}$Ｃ、または$^{32}$Ｐ）、酵素（例えば、ホースラディッシュのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、およびＥＬＩＳＡで通常用いられるその他のもの）、金コロイド、または着色ガラスもしくはプラスチックの（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス、などの）ビーズなどの比色標識が含まれる。

【００９４】
さらに、本発明のアッセイキットを検出するための手段を基質上に固定化してもよい。このような基質には、先に記載したあらゆる検出の方法で用いるものなど、検出試薬を固定化するのに適するあらゆる基質が含まれ得る。手短に述べると、検出のための手段の固定化に適する基質には、あらゆる固体の有機の、２元重合体、または無機の支持体など、望ましい標的分子を検出するための検出手段の活性および／または能力に著しく影響を与えずに、検出するための手段と結合を形成することができるあらゆる固体の支持体が含まれる。例示的な有機の固体支持体には、ポリスチレン、ナイロン、フェノール－ホルムアルデヒド樹脂、およびアクリル共重合体（例えば、ポリアクリルアミド）などのポリマーが含まれる。キットには、試薬を検出するのに、かつ／または陽性もしくは陰性のコントロールを標識するのに適する試薬、洗浄溶液、希釈バッファーなども含むことができる。キットには、該キットを使用して結果を解釈するための書面の指示書のセットも含まれ得る。

【００９５】
キットは、本願で先に記載した生物マーカーの存在を検出するための方法などにより、サンプルにおける既知のマーカーの存在を検出する方法（核酸またはタンパク質のレベルで）で使用することができる、一般的にあらゆるタイプの試薬であることができるサンプリングされる細胞タイプの特性を示しているコントロールのマーカーを検出するための手段も含むことができる。特に、その方法は、それが細胞のタイプを確実に同定する、分析される細胞タイプの特定のマーカーを同定することを特徴としている。例えば、肺腫瘍のアッセイでは、肺の上皮細胞を、生物マーカーの発現のレベルおよび／または生物学的活性についてスクリーニングすることが望ましい。したがって、コントロールのマーカーを検出するための手段は、細胞を結合組織または炎症細胞などの他の細胞型から区別するために、上皮細胞、および好ましくは肺の上皮細胞に特徴的なマーカーを同定するものである。このような手段は、本発明のアッセイの正確さおよび特異性を増大させる。コントロールのマーカーを検出するためのこのような手段には、それだけには限定されないが、厳密なハイブリダイゼーションの条件下でタンパク質のマーカーをコードする核酸分子とハイブリダイズするプローブ、このような核酸分子を増幅するＰＣＲプライマー、標的分子の高次構造上特徴的な部位に特異的に結合するアプタマー、および／または、抗体、その抗原結合フラグメント、もしくはサンプルにおけるコントロールマーカーに選択的に結合する抗原結合性ペプチドが含まれる。多くの細胞マーカーに対する核酸配列およびアミノ酸配列は当技術分野で知られており、検出のためのそのような試薬を生成するために使用され得る。

【００９６】
本発明のアッセイキットおよび方法は、特別なＥＧＦＲ阻害薬に反応性であることが予測される患者を同定するためだけに用いるのではなく、ＥＧＦＲ阻害薬に対して抵抗性である癌細胞の反応性を改善することができる処置を同定し、ＥＧＦＲ阻害薬の反応を増強

する補助療法を開発するためにも用いられ得る。

【００９７】

以下の実施例は、本発明の特定の実施形態、およびその様々な使用を説明するものである。これらは、説明の目的で述べるにすぎず、本発明を限定するものとして理解すべきではない。

【実施例】

【００９８】

実施例１

以下の実施例では、（イタリア調査団の調査に基づいて）ＥＧＦＲ阻害剤に対するＮＳＣＬＣ腫瘍の治療結果を予測するためにＥＧＦＲ遺伝子増幅および多染色体性の検出を用いることを実証する。

【００９９】

方法

患者の選択および調査設計

ベラリア・ホスピタル（Ｂｅｌｌａｒｉａ Ｈｏｓｐｉｔａｌ）（Ｂｏｌｏｇｎａ）、サイエンティフィック・インスティチュート・ユニバーシティ・ホスピタル・サン・ラッファエル（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｈｏｓｐｉｔａｌ Ｓａｎ Ｒａｆｆａｅｌｅ（Ｍｉｌａｎｏ）、およびポリクリニコ・モンテルーセ（Ｐｏｌｉｃｌｉｎｉｃｏ Ｍｏｎｔｅｌｕｃｅ）（Ｐｅｒｕｇｉａ）の３つのイタリアの施設に調査対象患者を集めた。参加資格は、測定可能な局所的進行性または転移性疾病を有する組織学的に確認されたＮＳＣＬＣ患者を含み、高齢であるために化学療法に適さない患者は、低い機能状態、または同時罹患状態を有していた。試験的封入に先立って、喫煙状況を評価し、患者を未喫煙者、元喫煙者（試験的封入前の禁煙期間が６カ月を上回る患者）または現行喫煙者（試験的封入前の禁煙期間が６カ月未満、または喫煙中）に分類した。調査は、適切な論理検討委員会によって承認され、通知同意書を試験参加前の各患者から得た。

【０１００】

２００１年５月から２００４年１月までに、１０８人の患者が、疾病進行、許容不可能な毒性または拒絶が発生するまで、２５０ｍｇの毎日経口投与にてゲフィチニブを投与された。何人かの患者についての効果結果は既に報告されている（２８、２９）。ＲＥＣＩＳＴ基準に従って患者を評価した（３０）。２カ月毎にコンピュータ・トモグラフィ走査によって腫瘍応答を評価し、最初の応答の確認後少なくとも４週間目に応答患者において確認評価を繰り返した。ゲフィチニブ治療の開始日から進行疾病または最終接触の検出日までの無進行期間（ＴＴＰ）を計算した。治療開始の日から死亡または最終接触日までの全生存期間（ＯＳ）を計算した。

【０１０１】

組織調製およびＦＩＳＨ分析

癌治療前の診断時に腫瘍献体を得た。患者毎に、代表的な悪性腫瘍細胞を含むパラフィン埋込みブロックから一連の５μｍ厚の組織断片を薄く切り取った。世界保健機構（ＷＨＯ）基準に基づいて、ヘマトキシリン・エオシン（ＨＥ）着色断片に関する組織学的分類を実施した（３１）。他の個所に記載されたプロトコールに従って、ＬＳＩ ＥＧＦＲスペクトルオレンジ／ＣＥＰ７スペクトルグリーン／プローブ（ビシス（Ｖｙｓｉｓ）、アボット・ラボラトリーズ（Ａｂｂｏｔ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を使用してデュアル・ターゲット、デュアル・カラーＦＩＳＨ検定を行った（１０）。支配的な腫瘍病巣が識別された近隣断片の対照ＨＥ着色スライドを使用して、そのままの形態の少なくとも１００の非重複核において、ＥＧＦＲ遺伝子および第７染色体プローブのコピー数を独立的に評価して記録した。分析は、厳密な採点指針に従って、患者の臨床特性を知らされていない２人の観察者（ＦＣ、ＭＶＧ）によって独立的に実施された。２人の観察者によって識別されたＦＩＳＨパターンの間に高い相関性（ｒ＝０．９６、ｐ＜０．０１）があり、採点に対する選択された基準は再現性があることを示唆していた。非調和ＦＩＳＨパターン

を再評価し、２人の検査者によるコンセンサスが得られた。

【０１０２】

特定のコピー数のＥＧＦＲ遺伝子および第７染色体中心体を有する腫瘍細胞の頻度に従って、細胞毎コピー数の小さい順に、患者を６つのＦＩＳＨ範疇、すなわち（１）二染色体性（９０％を上回る細胞における両方の目標のコピー数が２以上）、（２）低三染色体性（４０％以上の細胞における遺伝子のコピー数が２以上で、１０～４０％の細胞におけるコピー数が３以上）、（３）高三染色体性（４０％以上の細胞における遺伝子のコピー数が２以上で、４０％以上の細胞におけるコピー数が３以上）、（４）低多染色体性（１０～４０％の細胞における遺伝子のコピー数が４以上）、（５）高多染色体性（４０％以上の細胞における遺伝子のコピー数が４以上）、および（６）緻密なＥＧＦＲ集団が存在すること、および細胞毎の遺伝子／染色体の比率が２以上であること、または１０％以上の分析細胞における細胞毎にＥＧＦＲのコピー数の平均が１５以上であることによって定義づけられる遺伝子増幅に分類した。

【０１０３】

ＲＮＡ抽出および定量的ＲＴ－ＰＣＲ

ＲＮＡを単離してｃＤＮＡを転写し、先述したように定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応を実施した（ロセルら（Ｒｏｓｅｌｌ　ｅｔ　ａｌ．）Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　２００４；１０：１３１８－２５）。マニュアル、または製造元のガイドラインに従い、ＰＡＬＭ機器（Ｐ．Ａ．Ｌ．Ｍ．マイクロレーザ・テクノロジーズＡＧコーポレイティッド社（Ｐ．Ａ．Ｌ．Ｍ．Ｍｉｃｒｏｌａｓｅｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　ＡＧ　Ｉｎｃ．）［ドイツベルンリート（Ｂｅｒｎｒｉｅｄ）所在］）を使用するレーザ捕捉技術によって腫瘍細胞の顕微解剖を行った。プライマーおよびプローブは、フォワードＥＧＦＲプライマー：５’－ＴＣＣＧＴＣＴＣＴＴＧＣＣＧＧＧＡＡＴ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：１）、リバースＥＧＦＲプライマー：５’－ＧＧＣＴＣＡＣＣＣＴＣＣＡＧＡＡＣＣＴＴ－３’（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２）、ＥＧＦＲタクマン・プローブ：５’－ＡＣＧＣＡＴＴＣＣＣＴＧＣＣＴＣＧＧＣＴＧ－３’とした（Ｇｅｎ　Ｂａｎｋ受託番号：ＮＭ＿００５２２８）。

【０１０４】

統計分析

定性変数に対するフィッシャーの正確確率検定または$\chi^2$検定、および連続変数に対するスチューデントのｔ検定またはＡＮＯＶＡによってＦＩＳＨ群間の差を比較した。コルモゴロフ－スミルノフ検定によって分布の正規性を評価した。対数ランク検定によりＦＩＳＨグループを比較するカプラン－マイヤー法（３２）によって、無進行期間（ＴＴＰ）、全生存期間（ＯＳ）および９５％信頼区間を評価した。ステップ・ダウン手順によるコックスの比例ハザード回帰モデル（３３）を用いて、生存に伴うリスク要因を評価した。一変数分析における有意な結果を伴うそれらの変数のみを多変数分析に含めた。変数除去に対する基準は、推定された最大部分尤度に基づく尤度比統計とした（モデルからの除去に対してデフォルトｐ値＝０．１０）。

【０１０５】

結果

臨床特性

合計１０８人の患者が試験に参加し、１０２人が完全に分析された。３人の患者が引き続きの試験から離脱し、３つの検体では腫瘍壊死または組織保存不良によりＦＩＳＨ結果が得られなかった。９人（８．８％）の患者が、第一線の治療としてゲフィチニブを受けた（そのうちの１人が８０歳を超えており、１人が化学療法に対する拒絶を示し、７人の患者が化学療法を禁忌する同時罹患を示していた）。残りの患者は、ゲフィチニブに先だって化学療法を受け、これらのうちの７８．４％が白金剤を受けた。ゲフィチニブ治療期間中央値は、２．８カ月（０．６～２０カ月の範囲）であった。試験的封入時は、大半の患者が現行喫煙者（５２．９％）または元喫煙者（３２．４％）であった。

【０１０６】

１つの完全寛解（ＣＲ：１％）、１３の部分寛解（ＰＲ：１２．７％）および２６の安定（ＳＤ：２５．５％）が観察され、奏功率（ＯＲ＝ＣＲ＋ＰＲ）が１３．７％、全疾病抑制率（ＤＣＲ：ＣＲ＋ＰＲ＋ＳＤ）が３９．２％であった。最後の患者が参加してから少なくとも３カ月経過した２００４年４月にＴＴＰおよびＯＳに対する最終分析を行った。７．０カ月の中央値追跡によると、全患者に対するＴＴＰ中央値は２．９カ月（標準偏差：５．１カ月）であり、ＯＳ中央値は７．０カ月（標準偏差７．２カ月）であり、１年間生存期間は４５．１％であった。

【０１０７】

表１は、患者特性と応答の関係、無進行期間および生存期間を示す。女性は、男性と比較して、より高い奏功率（２８．６％対６．０％、ｐ＝０．００４）、より長いＴＴＰ（中央値４．５対２．７カ月、ｐ＝０．０２）、およびわずかに良好な生存期間（中央値９．０対６．９カ月、ｐ＝０．０５９）を有していた。また、元喫煙者および現行喫煙者と比較して、非喫煙者ではより良好な奏功率が確認されたが（４０．０％対２０．８％、ｐ＝０．００６）、ＴＴＰおよび生存期間の差はなかった。腺癌および細気管支肺胞癌の患者では、他の組織状態を有する患者と比べて、奏功率およびＴＴＰの差は大きくなかったが、中央値生存期間はより高かった（ｐ＝０．０２）。ＰＳ　０および１（ｐ＝０．０１）の患者では、ＰＳ　２の患者と比べてより良好な生存期間が確認された。年齢および疾病段階は、ゲフィチニブ活性と相関性がなかった。

【０１０８】

【表１】

表1．非小細胞肺癌患者の特性およびゲフィチニブ結果*

| 患者特性* | 患者数/% | 客観的奏功総数/%† | 進行総数/% | 無進行期間中央値(月) | 生存期間中央値(月) | 1年累積生存率%±SD% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 合計 | 102/100 | 14/14 | 62/60 | 2.9 | 9.4 | 41±5 |
| 性別 | | | | | | |
| 男性 | 67/66 | 4/6 | 46/69 | 2.7 | 8.3 | 37±6 |
| 女性 | 35/34 | 10/29 | 16/46 | 5.2 | 11.3 | 48±9 |
| P | | .004¶ | .03‖ | .004§ | .03§ | .22§ |
| 段階 | | | | | | |
| III | 14/13 | 1/7 | 6/43 | 6.0 | 8.3 | 36±13 |
| IV | 88/87 | 13/15 | 56/64 | 2.7 | 9.5 | 42±5 |
| P | | .7¶ | .15‖ | .3§ | .9§ | .77§ |
| 組織 | | | | | | |
| 腺癌[A] | 54/53 | 8/15 | 34/63 | 3.2 | 11.3 | 45±7 |
| 細気管支肺胞癌[A] | 9/9 | 3/33 | 5/56 | 3.0 | 16.5 | 67±16 |
| 扁平細胞[B] | 26/25 | 2/8 | 14/54 | 2.2 | 6.5 | 22±9 |
| 大細胞[B] | 2/2 | 0 | 2/100 | 0.8 | 0.8 | 0±0 |
| 未分化[B] | 11/11 | 1/9 | 7/64 | 2.1 | 9.0 | 45±15 |
| P([A]対[B]) | | .2¶ | .7‖ | .3§ | .03§ | .04§ |
| 一般状態‡ | | | | | | |
| 0 | 49/48. | 5/10 | 32/65 | 2.6 | 10.1 | 40±7 |
| 1 | 41/40 | 7/17 | 22/54 | 4.2 | 10.9 | 47±8 |
| 2 | 12/12 | 2/17 | 8/67 | 2.1 | 2.7 | 22±13 |
| P(0+1対2) | | .7¶ | .7‖ | .2§ | .004§ | .007§ |
| 喫煙状態 | | | | | | |
| 非喫煙者 | 15/15 | 6/40 | 6/40 | 5.3 | 10.9 | 47±14 |
| 元喫煙者 | 33/32 | 5/15 | 17/51 | 3.6 | 13.8 | 55±9 |
| 現行喫煙者 | 54/53 | 3/6 | 39/72 | 2.3 | 4.5 | 30±6 |
| P(非喫煙者対他の喫煙者) | | .006¶ | .7‖ | .07§ | .25§ | .35§ |

*続いて毎日250mgのゲフィチニブで治療された、化学療法後に進行または再発する測定可能な局所的進行性または転移性疾病を伴う組織病理的に確認された非小細胞肺癌、または化学療法に対する医学的禁忌を有する102人の患者の特性。

†客観的奏功＝部分寛解および完全寛解。

‡一般状態は以下のように定められた：0＝十分に社会活動ができ、制限を受けることなく、疾病前のあらゆる能力を発揮できる；1＝肉体的に激しい活動は制限を受けるが、歩行可能で、軽労働または坐業、例えば軽い家事および事務を行うことができる；2＝歩行可能で、あらゆるセルフケアが可能であるが、作業活動を行うのは不可能であり、日中の約50%は起居している(東部31共同腫瘍臨床試験グループ基準、34)。

§P対数ランク検定を用いて計算されたP値(両面)。

‖Pピアソンχ平方試験を用いて計算されたP値(両面)。

¶Pフィッシャーの正確確率検定を用いて計算されたP値(両面)。

ＦＩＳＨおよび定量的ＲＴ－ＰＣＲ

６３の検体における定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応によってＥＧＦＲ遺伝子発現の評価も行った。相対遺伝子発現は、低ＥＧＦＲ遺伝子コピー数（二染色体性から低多染色体性まで）を有する４０の検体では２．９０（範囲＝０．１７から２８．０）、高ＥＧＦＲ遺伝子コピー数（高多染色体性および遺伝子増幅）を有する２３の検体では７．１５（範囲＝０．１９から２８．３）であり、遺伝子増幅を有する９つの腫瘍の間では特に高かった（平均＝８．４６、範囲＝１．７から２１．５）。相対的発現と遺伝子コピー数との間には有意な性の相関性（ピアソンｒ＝０．３３、Ｐ＝０．００７）があり、それは、コピー数が増加した検体は遺伝子発現がより高いことを示唆するものであった。

【０１０９】

ＦＩＳＨおよび臨床変数

二染色体性は３５．３％の症例に存在し、低三染色体性は１６．７％の症例に存在し、高三染色体性は２％の症例に存在し、低多染色体性は１３．７％の症例に存在し、高多染色体性は１９．６％の症例に存在し、遺伝子増幅は１２．７％の症例に存在した。

【０１１０】

ＦＩＳＨ結果と、ゲフィチニブに対する応答と、ゲフィチニブ後の疾病無進行期間と、ゲフィチニブ後の生存期間との関係を表２に示す。二染色体性範疇では反答者は存在せず、７５％が進行し、ＴＴＰ中央値および１年生存率は低かった（図１）。同様に、反答者が存在せず、７１％および８６％が進行性疾病を有し、無進行期間が短く、長期間生存者がほとんどいない低三染色体性および低多染色体性の群では劣った結果が示された。対照的に、高三染色体性および高多染色体性の患者では、反答者が確認され、進行性疾病を有する患者はほとんど存在せず、無進行期間がより長く、生存期間がより長かった。遺伝子増幅を有する患者は、奏功率が高く（５３．８％）、進行性疾病の割合が低く（２３．１％）、無進行期間が長く、長期間生存者の割合が高かった（表２、図１）。

【０１１１】

表２に示されるように、遺伝子増幅または高多染色体性によりＥＧＦＲ遺伝子のコピー数が多い患者を統合し（群２）、２または３の遺伝子コピーを有する統合ＦＩＳＨ範疇（群１）と比較した。奏功を有する患者のうち、８５．７％（１２／１４）が群２に含まれていた。安定性を有する患者のうち、３８．５％（１０／２６）が群２に含まれていた。ＯＲ率は、高染色体範疇では２５％、増幅範疇では５４％、統合群２では３６％であり、群１（２．９％、ｐ＜０．００１）に比較して有意に高かった。疾病抑制率も群１に比較して群２の方が有意に高かった（６６．７％対２６．１％、ｐ＜０．００１）。高三染色体性の群は、いずれも良好な結果を有する２人の患者しか含んでいなかったことに留意されたい。これらの患者を群２の患者と統合すると、それらの差はより顕著になるであろう。しかし、分子的な観点からとらえると、ＥＧＦＲ遺伝子コピーがより少ないこれらの患者は、二染色体性および低三染色体性患者とより近い関係にあるように思われた。

【０１１２】

【表２】

表2. 表皮成長因子受容体遺伝子のコピー数が少ない順に、NSCLC患者の群による客観的奏功率、病勢コントロール、無進行期間および生存期間の分析

| 特性 | 全患者数 | FISH群 | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 群1 | | | | | 群2 | | |
| | | 二染色体性 | 低三染色体性 | 高三染色体性 | 低多染色体性 | 合計 | 高多染色体性 | 遺伝子増幅 | 合計 |
| 合計 | No. 102 | 36 | 17 | 2 | 14 | 69 | 20 | 13 | 33 |
| | % 100 | 35.3 | 16.7 | 2.0 | 13.7 | 67.6 | 19.6 | 12.7 | 32.4 |
| 完全寛解および部分寛解 | No. 14 | | | 2 | | 2 | 5 | 7 | 12 |
| | % 13.7 | | | 100 | | 2.9 | 25 | 53.8 | 36.4 |
| 安定 | No. 26 | 9 | 5 | | 2 | 16 | 7 | 3 | 10 |
| | % 25.5 | 25.0 | 29.4 | | 14.3 | 23.2 | 35 | 23.1 | 30.3 |
| 進行 | No. 62 | 27 | 12 | | 12 | 51 | 8 | 3 | 11 |
| | % 60.8 | 75.0 | 70.6 | | 85.7 | 73.9 | 40 | 23.1 | 33.3 |
| 病勢コントロール | 39.2 | 25.0 | 29.4 | 100 | 14.3 | 26.1 | 60.0 | 76.9 | 66.7 |
| 無進行期間中央値(月) | 2.9 | 2.5 | 3.6 | 9.3 | 2.1 | 2.5 | 6.6 | 6.0 | 6.3 |
| 12カ月間に疾病の進行がない患者の割合(%) | 18.6 | 8.3 | 5.9 | 100 | 0 | 8.7 | 35.0 | 46.2 | 39.4 |
| 全生存期間中央値(月) | 7.0 | 6.9 | 10.2 | 13.7 | 3.0 | 6.5 | 8.3 | 9.0 | 9.0 |
| 1年生存率 | 45.1 | 38.9 | 41.2 | 100 | 14.3 | 36.2 | 65.0 | 61.5 | 63.6 |

無進行期間に関しても、群２の患者は群１より良好であった。１２カ月で群２の患者の

６１％が進行したのに比べて、群１の患者の９１％が進行した。対数ランク検定によるＴＴＰの差は有意であった（ｐ＜０．００１）（図２Ａ）。生存期間についても、群２の患者は群１と比較して良好であった（図２Ｂ）。１年および２年生存率は、群１の３６．２％および１７％と比較して、群２では６３．６％および４０％であった。対数ランク検定によるこれらの群の差は統計的に有意であった（ｐ＝０．０３）。

【０１１３】

表３は、ＥＧＦＲ遺伝子状態と患者特性の関係を示している。ＥＧＦＲ遺伝子増幅および高多染色体性を有する患者は、女性（ｐ＝０．０３７）および非喫煙者（ｐ＝０．００１）である可能性が高いが、組織病理との関連性は有意なものではなかった。死亡のリスクは、群２の患者（ＨＲ：０．４０、９５％ＣＩ：０．２１～０．７６、ｐ＝０．００５）および腺癌または細気管支肺胞癌の患者（ＨＲ：０．５８、９５％ＣＩ：０．３５～０．９７、ｐ＝０．０３）の患者の方が有意に低いことが多変数分析によって示された。逆に、能力状態の劣った（ＰＳ２）患者の方が死亡のリスクが有意に高かった（ＨＲ：３．８６、９５％ＣＩ：１．７６～８．４６、ｐ＝０．００１）。

【０１１４】

【表３】

表3. FISHおよび患者の特性によって特徴づけられる表皮成長因子受容体遺伝子状態

| 特性 | | 患者数 | | FISHパターン[1] 群1 | FISHパターン[1] 群2 | P値 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FISHにより評価された患者の合計 | | No. | 102 | 69 | 33 | |
| | | % | 100 | 67.6 | 32.4 | |
| 性別 | 男性 | No. | 67 | 50 | 17 | 0.037* |
| | | % | 100 | 74.6 | 25.4 | |
| | 女性 | No. | 35 | 19 | 16 | |
| | | % | 100 | 54.3 | 45.7 | |
| 組織病理 | 腺癌 | No. | 54 | 36 | 18 | 0.788[2] |
| | | No. | 100 | 66.7 | 33.3 | |
| | 細気管支肺胞癌 | No. | 9 | 6 | 3 | |
| | | % | 100 | 66.7 | 33.3 | |
| | 扁平上皮癌 | No. | 26 | 17 | 9 | |
| | | % | 100 | 65.4 | 34.6 | |
| | 大細胞癌 | No. | 2 | 1 | 1 | |
| | | % | 100 | 50.0 | 50.0 | |
| | 非分化癌 | No. | 11 | 9 | 2 | |
| | | % | 100 | 81.8 | 18.2 | |
| 喫煙履歴 | 非喫煙者 | No. | 15 | 4 | 11 | 0.001*[3] |
| | | % | 100 | 26.7 | 73.3 | |
| | 元喫煙者 | No. | 33 | 25 | 8 | |
| | | % | 100 | 75.8 | 24.2 | |
| | 現行喫煙者 | No. | 54 | 40 | 14 | |
| | | % | 100 | 74.1 | 25.9 | |

* 統計的に有意

[1] FISH群1は、二染色体性、低三染色体性、高三染色体性および低多染色体性を有する腫瘍を含み、FISH群2は、高多染色体性および遺伝子増幅を有する腫瘍を含む。

[2] 腺癌＋細気管支肺胞癌対他の癌。

[3] 非喫煙者対元喫煙者＋現行喫煙者。

要約すると、これらの調査により、化学療法を受けて進行または再発し、毎日２５０ｍｇのゲフィチニブの経口投与で治療された１０２人のＮＳＣＬＣ患者における得ＣＦＲ遺伝子の細胞毎コピー数とＮＳＣＬＣにおけるゲフィチニブとの相関性を調べた。これらの患者の大半（６７％）は、ＥＣＯＧ能力状態が０／１（８８％）の男性であり、年齢中央値は６２歳（範囲は２５～８３最）であった。腺癌（５２％）が主な組織病理で、次に扁平上皮癌（２６％）、非分化癌（１１％）、そして細気管支肺胞癌（９％）がそれに続いた。患者の大半が現行喫煙者（５３％）および元喫煙者（３２％）であった。発明人は、

１４％の奏功率（ＯＲ＝ＣＲ＋ＰＲ）および３９％の疾病抑制率（ＤＣＲ＝ＣＲ＋ＰＲ＋ＳＤ）に対して１つの完全寛解（ＣＲ）、１３の部分寛解（ＰＲ）、および２６の安定（ＳＤ）を確認した。全患者について、中央値無進行期間（ＴＴＰ）は２．９カ月であり、中央値生存期間は７．０カ月であった。癌治療前の疾病診断時に集められた組織検体を蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）による細胞毎ＥＧＦＲ遺伝子のコピー数の測定に使用した。ＬＳＩ　ＥＧＦＲスペクトルオレンジ／ＣＥＦ７スペクトルグリーン・デュアル・カラー・プローブ（ビシス／アボット（Ｖｙｓｉｓ／Ａｂｂｏｔｔ）を使用し、検体当たり約１００の腫瘍細胞を採点した。ＥＧＦＲ遺伝子および第７染色体中心体の細胞毎コピー数に従って、患者を２つの大きな群に分類した。群１は、遺伝子増加がないか、または非常に小さい（二染色体性、三染色体性および低多染色体性の）６９人（６８％）の患者を含んでいた。群２は、高多染色体性および遺伝子増幅を有する３３人（３２％）の患者を含んでいた。群２の患者の方が、群１（ＯＲ＝２．９％、ＤＣＲ＝２６．１％；両方の比較についてｐ＜０．００１）より有意に良好な奏功率（ＯＲ）および病勢コントロール率（ＤＣＲ）（ＯＲ＝３６．４％、ＤＣＲ＝６６．７％）を有していた。遺伝子増幅を有する患者では、５３．８％に奏功が見られ、７６％に病勢コントロールが見られた。中央値無進行期間および全生存期間は、群２（６．３および９．０カ月）の方が群１（２．５および６．５カ月；それぞれｐ＜０．００１および０．０３）より有意に長かった。多変数分析において、群２の方が、死亡のリスクが有意に低かった（危険の割合：０．４４、９５％ＣＩ＝０．２３から０．８２）。結論として、ＦＩＳＨにより確認された遺伝子増幅および高多染色体性は、進行性ＮＳＣＬＣにおけるゲフィチニブ活性に対する極めて効果的な分子的予知手段である。

【０１１５】

本願に記載されている調査の結果は、ゲフィチニブは、ＥＧＦＲ遺伝子増幅または高レベルの多染色体性を有する進行性ＮＳＣＬＣ患者において高い活性を有し、チロシンキナーゼ阻害剤治療についてＮＳＣＬＣ患者を選択するためのＥＧＦＲ－ＦＩＳＨの利用を支えることを実証している。ゲフィチニブに対する応答とＦＩＳＨによって検出されたＥＧＦＲ遺伝子増加との間の強い相関性は、この薬物に対する患者適格性を規定するための強力な要因になることが期待される。臨床結果と染色体性多染色体性との間の正の相関性は、第７染色体中心体配列を評価することが応答予測のための一団の複数の検定に貢献できることも示唆する。ゲノムの増加がないか、または小さい患者の間に相関性がないことは、治療はこの特定患者の集合体には有効でないことを示すものであるため、この治療手法の恐らくは臨床的および確実に経済的負担を最小限にする。

【０１１６】

本発明人らは、ＥＧＦＲ遺伝子をリアルタイムＰＣＲの如き他の分子技術によって識別することができ、その結果は、有意なポジティブなパターンにおいてＦＩＳＨの結果と相関することも実証した。

【０１１７】

ＥＧＦＲコピー数の増加は、治療とは無関係に、予後に対してポジティブな影響をもたらすかどうかという疑問が生じうる。本発明人らは、ＥＧＦＲ遺伝子コピー数の高い切除腫瘍を有するＮＳＣＬＣ患者は生存期間が短い傾向にあることをすでに報告している（ヒルシュら（Ｈｉｒｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．）。したがって、ＨＥＲ２およびトラスツズマブ（ｔｒａｓｔｕｚｕｍａｂ）（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標）、ゲネンテック／ロッシュ（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ／Ｒｏｃｈｅ）に対する乳癌における知見と同様に、ＮＳＣＬＣは、予後特徴が劣るがＥＧＦＲ阻害剤に対する感度についての良好な予知手段になるものと思われる。

【０１１８】

実施例２

以下の実施例は、（ＳＷＯＧ集団に基づいて）ＥＧＦＲ阻害剤に対するＢＡＣ腫瘍患者の治療結果を予測するためにＥＧＦＲ遺伝子増幅および多染色体性の検出を用いることを実証するものである。

【０１１９】
ＮＳＣＬＣの細気管支肺胞癌（ＢＡＣ）サブタイプは、固有の組織病理的、Ｘ線撮影および臨床的特徴によって特徴づけられ（トラビスら（Ｔｒａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９９）、特に若年の女性の非喫煙者において発生が増えつつあるように思われる（バルスキーら（Ｂａｒｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９４；フラクら（Ｆｕｒａｋ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３）。ＢＡＣおよびＢＡＣの特徴を有する腺癌は、ＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害剤に対して特に敏感で、奏功率は２５～３０％であり（ミラーら（Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３）、患者の部分集合体において生存期間が長いことが報告されている。本発明人および共同研究者は、南西部腫瘍臨床試験グループ（Ｓｏｕｔｈｗｅｓｔ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　Ｇｒｏｕｐ）（Ｓ０１２６）の有望な臨床試験で治療された進行段階のＢＡＣ患者の大集団におけるゲフィチニブの効果をすでに報告している。保存腫瘍組織を登録された大人数の患者から収集したため、Ｓ０１２６試験はＥＧＦＲ経路の調査に対する独自の組織病理学的資源になる。ＮＳＣＬＣ患者をゲフィチニブで治療した本発明人等の先の経験に基づき、ＦＩＳＨにより検出されたＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ２遺伝子コピー数の増加は、ＢＡＣ、またはＢＡＣの特徴を有する腺癌を有するＮＳＣＬＣ患者の部分集合体におけるゲフィチニブの効果の向上に対応づけられるであろうという仮説を立てた。本実施例は、臨床結果と相関づけられるＳ０１２６調査の患者腫瘍組織の分析の結果を報告するものである。

【０１２０】
材料および方法
登録されたすべての患者は、ＩＩＩＢ段階（胸水による）またはＩＶ　ＢＡＣ、もしくはＢＡＣの特徴を有するＢＡＣであることが組織学的に証明されている必要があった。組織学的資格はＢＡＣの制度上の定義に基づいたものであったが、後に世界保健分類を用いて集中的審査が実施された（トラビスら（Ｔｒａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９９）。この報告における組織病理学的サブタイプは、この集中的な組織学的審議に基づいている。細胞懸対はＢＡＣ診断では受け入れられず、細胞診断のみの患者はＳ０１２６の参加資格が与えられなかった。

【０１２１】
患者は、０～２のＳＷＯＧ能力状態を有している必要があった。調査前評価には、履歴および身体検査、差分および血小板、アルカリ性リン酸塩の血清化学現象、ＳＧＯＴまたはＳＧＰＴ、ＬＤＨおよびアルブミンによる全血液検査、胸部Ｘ線写真、ならびに胸部、肝臓および副腎のＣＴが含まれていた。骨スキャンおよび／または脳ＣＴまたはＭＲＩは、症状および医師の判断に基づいて臨床的に指示された場合にのみ必要とされた。脳転移の履歴を有する患者は本調査への参加資格が与えられなかった。妊娠中または育児中の女性は資格がなく、生殖能力を有する女性および男性は、有効な避妊法を用いることに同意しなければ参加することができなかった。資格のある患者は、十分に治療された基底細胞または扁平細胞皮膚癌、ｉｎ　ｓｉｔｕ子宮頸癌、患者が完全にそれらから鎮静されている、十分に治療された段階ＩまたはＩＩの癌、患者が少なくとも５年間にわたって発病していない任意の他の癌を除いて他の先行腫瘍を有さないものとした。

【０１２２】
すべての患者はこの調査の調査的性質を知らされ、地域的な制度審査委員会および連邦指針に従って通知同意書に署名した。すべての患者は測定可能または評価可能な疾病を有していた。

【０１２３】
調査は、化学療法が初めての患者（Ｎ＝１０１）とすでに化学療法を経験している患者（Ｎ＝３６）との２つの集団に分けられた１３７人の適格患者で構成された。治療開始前に１人の患者が死亡した。患者は、進行または禁止的毒性が認められるまで５００ｍｇ／日のゲフィチニブを毎日経口投与することによって治療された。患者特性は、年齢中央値が６８歳（範囲は３４～８８歳）、男性／女性分布が４５％／５１％、能力状態が０～１／２、８９％／１１％、および段階ＩＩＩＢ／ＩＶが１１％／８９％であった。

【０１２４】
ＷＨＯ基準を用いて、著者のうちの２人（ＷＡＦおよびＦＲＨ）による一致した示度により、ヘマトキシリン－エオシン着色断片に対してＢＡＣの診断およびサブタイプ分類を行った（トラビスら（Ｔｒａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９９）。患者毎に、代表的な悪性腫瘍細胞を含む連続的な４μｍパラフィン埋込み組織を薄く切り取った。他の個所に記載されているプロトコールに従って、ＬＳＩ　ＥＧＦＲ　スペクトルオレンジ／ＣＥＰ７スペクトルグリーン・プローブを使用して、細胞コピー数をＦＩＳＨにより調べた（Ｈｉｒｓｃｈら（Ｈｉｒｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ；ヒルシュら（Ｈｉｒｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００２、Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ）。支配的な腫瘍病巣が識別された近隣断片の対照ＨＥ着色スライドを使用して、そのままの形態の少なくとも１００の非重複核において、ＥＧＦＲおよびＨＥＲ２遺伝子ならびに第７染色体および１７プローブのコピー数を独立的に評価して記録した。ＦＩＳＨ分析は、患者の臨床特性を知らされていない２人の観察者（ＭＶＧ、ＡＣＸ）によって独立的に実施された。特定のコピー数のＥＧＦＲ遺伝子および第７染色体中心体を有する腫瘍細胞の頻度に従って、患者を２つの層、すなわち遺伝子増加がない、または低い（４０％を上回る細胞における遺伝子のコピー数が４以下）ＦＩＳＨ陰性と、緻密な遺伝子集合の存在、および細胞毎遺伝子／染色体比が２以上、または分析された細胞のうちの１０％以上の細胞における細胞毎遺伝子のコピー数が１５以上であることによって定められる、高レベルの多染色体性（４０％以上の細胞における遺伝子のコピー数が４以上）または遺伝子増幅を有するＦＩＳＨ陽性とに分類した。

【０１２５】
統計的方法
結果の定義
応答評価を標準的な基準によって実施した（ＲＥＣＩＳＴ）（セラセら（Ｔｈｅｒａｓｓｅ　ｅｔ　ａｌ．）、２０００）。測定可能な疾病を有する患者のみを応答評価に含め、生存分析にはすべての患者を含めた。患者がゲフィチニブ治療を開始した日から死亡するまでの生存データを分析した。全生存期間（ＯＳ）を、Ｓ０１２６への登録から何らかの原因による死亡または最後の接触までの時間として計算した。進行のない生存期間（ＰＦＳ）を、Ｓ０１２６への登録から疾病の進行、あるいは何らかの原因による死亡または最後の接触までの時間として計算した。

【０１２６】
分析方法
生存曲線をプロダクト・リミット法（カプランおよびメイヤー（Ｋａｐｌａｎ　ａｎｄ　Ｍｅｉｅｒ）、１９５８）によって推定し、対数ランク検定（マンテル（Ｍａｎｔｅｌ）、１９６６）を用いて比較した。コクス比例危険回帰を用いて、生存結果に対するＥＧＦＲ　ＦＩＳＨおよび標準的な予後要因の影響を評価するとともに、危険率を推定した（コクス（Ｃｏｘ）、１９７２）。逆方向段階的回帰法を用いて多変数モデルを構成した。すべての一変数的に有意な共変数を段階的選択に含めた。

【０１２７】
結果
プロトコールＳ０１２６には１４５人の患者が登録されたが、そのうちの８人が不適格で、１人がプロトコール治療を受けなかったため、分析に適格な患者は１３６人であった。そのうち、８１人の患者がＦＩＳＨ分析によるＥＧＦＲ遺伝子分析に利用可能な腫瘍組織を有し（表４）、５６人がＦＩＳＨによるＨＥＲ２遺伝子分析に利用可能な組織を有していた。

【０１２８】

【表４】

表4. 全SWOG S0126集団と比較したFISH集団の個体群統計データ

| 特性 | S0126集団 (N=136) | EGFR/FISH (N=81) | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 陽性 | 陰性 | 合計 |
| 女性<br>男性 | 69(51%)<br>67(49%) | 13(50%)<br>13(50%) | 28(51%)<br>27(49%) | 41(51%)<br>40(49%) |
| 喫煙者<br>非喫煙者 | 97(71%)<br>39(29%) | 20(77%)<br>6(27%) | 39(71%)<br>16(29%) | 59(73%)<br>22(27%) |
| PS=0<br>PS=1<br>PS=2 | 62(46%)<br>59(43%)<br>15(11%) | 13(50%)<br>11(42%)<br>2(8%) | 22(40%)<br>23(42%)<br>10(18%) | 35(43%)<br>34(42%)<br>12(15%) |
| ADC<br>BACを有するADC<br>粘液性BAC<br>非粘液性BAC | 11(11%)<br>34(34%)<br>17(17%)<br>37(37%) | 5(20%)<br>8(32%)<br>1(4%)<br>11(44%) | 2(4%)<br>16(29%)<br>13(24%)<br>24(44%) | 7(9%)<br>24(30%)<br>14(18%)<br>35(44%) |

全Ｓ０１２６集団と、ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ分析を受けた８１人の患者の小集団との間には、性別、喫煙状態、能力状態および組織状態に統計的な差が存在しなかった（表４）。同様に、全Ｓ０１２６集団とＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ小集団との間には生存結果の統計的な差が存在しなかった（図４Ａ）。したがって、ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ小集団は全Ｓ０１２６集団を代表するものと思われた。

【０１２９】

各ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ範疇における患者の数を表５に示す。全部で２６／８１の患者（３２％）がＥＧＦＲ　ＦＩＳＨに対して陽性であり、ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ陽性群と陰性群の間には、性別、組織状態、喫煙状態または能力状態に関する差が存在しなかった（表４）。応答分析では、８１人のＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ患者のうちの５５人が測定可能な疾病を有していた。ＦＩＳＨ陽性群では、１９人の患者のうちの５人（２６％）が奏功を示し、１２人（６３％）が疾病抑制（奏功または安定）を示したのに対して、ＦＩＳＨ陰性群では、３６人の患者のうちの４人（１１％）が奏功を示し（ｐ＝０．１４）、１４人（３９％）が疾病抑制を示した（ｐ＝０．０８７）（表５）。

【０１３０】

【表５】

表5. EGFR FISH層による治療結果

| EGFR FISH 結果 | No. pts. | RSP(%)[1] | DCR(%)[1] | TTP(月) (95% CI) | 生存期間 中央値(月) | 1年生存率 (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FISH 陰性 | 55 | 4/36(11%) | 14/36 (39%) | 4(2-5) | 4(2-5) | 42% (29%-55%) |
| FISH 陽性 | 26 | 5/19(26%)* | 12/19(63%)** | 9(3-20) | >18*** | 81% (65%-96%) |
| 合計 | 81 | 9/55(16%) | 26/55 (47%) | 4(2-6) | 14(8-19) | 54% (43%-65%) |

[1]測定可能な疾病を有する患者の部分群に限定される。
*p=0.15、**p=0.087
***まだ到達されていない生存期間中央値

ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ分析に対する評価可能な腫瘍組織を有する適格患者を生存分析に含めた。ＦＩＳＨ陽性および陰性の腫瘍を有する患者についての無進行生存および全生存曲線をそれぞれ図４Ｂおよび４Ｃに示す。ＦＩＳＨ陰性患者に対する無進行生存期間中央値は４カ月（９５％ＣＩ．：２、５）であったのに対して、危険率が１．６７のＦＩＳＨ陽性患者に対しては９カ月（９５％ＣＩ．：３、２０）であった（ｐ＝０．０７２）（９５％ＣＩ：０．９６、２．９１、ｐ＝０．０７２）（図４Ｂ）。ＦＩＳＨ陰性患者に対する中央値生存期間は８カ月であった（９５％　Ｃ．Ｉ．：６、１５）。ＦＩＳＨ陰性患者に対する中央値生存期間はまだ到達されていないが、１８カ月に近づいており、危険率は２．０２である（９５％ＣＩ：１．０３、３．９９、ｐ＝０．０４２）（図４Ｃ）。

【０１３１】

組織学的サブタイプに関しても奏功率および生存期間を分析した。８人の腺癌患者のうち、反答者は確認されなかったが２人の患者が安定を示した（ＤＣＲ　２／８＝２５％）。しかし、ＢＡＣ特徴を有する２７人の腺癌患者のうち、５人（１９％）が応答を達成し、１２人の患者（４４％）が安定を達成した（ＤＣＲ　１７／２７＝６３％）。ＢＡＣ非粘液性群では、２０人の患者のうちの６人（３０％）が応答を示し、８人の患者（４０％）が安定を示した（ＤＣＲ　１４／２０＝７０％）のに対して、ＢＡＣ粘液性群では、１１人の患者のうち応答または安定を示した患者は存在しなかった（χ平方　ｐ＝０．０００４）。

【０１３２】

多変数コックス回帰モデル（表６）を用いて、ＦＩＳＨによるＥＧＦＲコピー数の生存に対する影響を他の予後要因によって説明できる可能性を評価した。ＦＩＳＨによるＦＧＦＲコピー数は、喫煙状態、性別、組織状態および能力状態を考慮した後も、全生存期間（ｐ＝０．０２６１）および無進行生存期間（ｐ＝０．０３４）の双方に対して依然として有意な予後要因であった。

【０１３３】

【表６】

表6. すべての変数に対するデータによる患者における全生存期間の多変数分析(N=80pts)

| 変数 | No. Pts(%) | 危険率 (95% CI) | P値 |
|---|---|---|---|
| 現行喫煙者／元喫煙者 | 58(73%) | 3.72(1.67-8.30) | 0.0013 |
| 腺癌 | 7(9%) | 4.86(1.69-14.01) | 0.0034 |
| 一般状態2 | 12(15%) | 4.24(1.95-9.25) | 0.0003 |
| 粘液性BAC | 14(18%) | 2.86(1.43-5.73) | 0.0030 |
| EGFR FISH陰性 | 55(69%) | 2.50(1.12-5.62) | 0.0261 |

考察

この調査は、ＦＩＳＨによって検出されたＥＧＦＲ遺伝子コピー数の増加は、進行段階のＢＡＣ、およびＢＡＣ特徴を有する腺癌を有する患者、すなわちその基礎的な生物学的特性によりＥＧＦＲ経路の調査のためのモデルとして機能することができるＮＳＣＬＣの部分集合体におけるゲフィチニブ治療の後の生存期間の向上に対応づけられることを証明するものである（ガンダラら（Ｇａｎｄａｒａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４）。現行の調査において、患者の約３分の１のＥＧＦＲ遺伝子コピー数が増加し、これらの患者はゲフィチニブ治療の後に奏功率が高くなり、無進行期間が長くなる傾向を有していた。拡散性肺湿潤を測定することができないため、ＢＡＣを有する患者では、一般的にはＲＥＣＩＳＴ応答評価は適用可能ではないが、理論に制約されることなく、本発明人らは、ＥＧＦＲ

ＦＩＳＨ溶性腫瘍と陰性腫瘍の間の生存期間の有意な差は、遺伝子コピー数の増加がゲフィチニブの効果の向上と関係するという仮説を強く裏づけるものであると考える。進行ＢＡＣを有する患者に対する生存に関する文献の情報は極めて少ない。ブレスナシュら（Ｂｒｅａｔｈｎａｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）による調査（ブレスナシュら（Ｂｒｅａｔｈｎａ

ｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９９）では、化学療法または放射線治療が施された進行ＢＡＣの２８人の患者の分析が行われた。最初の治療の開始からの中央値生存期間は１１．７カ月であった（９５ＣＩ　８．７～１６．７）。進行ＢＡＣにおけるパクリタキセルを評価する先のＳＷＯＧ試験（Ｓ９７１４）では、中央値生存期間は１２カ月であった（ウェストら（Ｗｅｓｔ　ｅｔ　ａｌ．）、２００５）。現行の調査では、ＦＩＳＨ陽性群についての中央値生存期間は、まだ到達されていないが１８カ月に近づいているのに対して、ＦＩＳＨ陰性群については８カ月であった。本発明人らおよび共同研究者は、ＥＧＦＲ遺伝子コピーの増加は、外科切開されたＮＳＣＬＣの患者における劣った予後に対応づけられることをすでに報告している（ヒルシュら（Ｈｉｒｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．）。この調査において、本発明人らは、ＥＧＦＲ遺伝子コピー数の増加は、ゲフィチニブ治療の影響による生存期間の向上に対するポジティブな予測マーカーであることを確認する。これらの所見は、予後が劣っているが、トラスツズマブ（Ｈｅｒｃｅｐｔｉｎ（登録商標））が有効である可能性がより高いＨＥＲ２遺伝子増幅を有する乳癌患者について報告されたデータに類似している（スラモンら（Ｓｌａｍｏｎ　ｅｔ　ａｌ．）、２００１）。

【０１３４】

ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ陽性分集団と全調査集団との間で個体群統計および生存データを比較したところ、性別、喫煙状態、能力状態または組織状態の如き知られている予後要因に関する差は確認されなかった。加えて、全集団とＦＩＳＨ試験集団との間に全生存期間の差は存在しなかった。

【０１３５】

本実施例の焦点は、進行段階のＢＡＣを有する患者における生存期間に対するＥＧＦＲＦＩＳＨの予測値である。ＥＧＦＲタンパク質レベルの如きＥＧＦＲおよび関連するシグナル伝達経路の生物学的存在度の評価、ＥＧＦＲ変異分析、ならびにＡＫＴおよびＭＡＰＫのような下流マーカーの測定についての他の方法との相関性は本願の他の個所で論述されており、進行ＢＡＣに関してさらに説明することが可能である。免疫組織化学（ＩＨＣ）により評価されるＭＡＰＫレベルは、ＢＡＣ腫瘍におけるゲフィチニブに対する感度を予測するものであり（ガンダラら（Ｇａｎｄａｒａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４）、本願の方法におけるさらなる生物マーカーとして含めることができる。

【０１３６】

ＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害剤（ＥＧＦＲ　ＴＫＩｓ）による治療についての患者選択に関して、これらの知見の臨床的意味は大きい。ＢＡＣは、発生が増えつつあると思われる病気である（バルスキーら（Ｂａｒｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９４；フラクら（Ｆｕｒａｋ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３）。予備調査では、ＢＡＣおよびその組織学的サブタイプを有する患者におけるＥＧＦＲ阻害剤に対する奏功率は比較的高いことが実証された（ウェストら（Ｗｅｓｔ　ｅｔ　ａｌ．）、２００５；パテルら（Ｐａｔｅｌ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３；ミラーら（Ｍｉｌｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４）が、この患者集団においてこれらの薬剤の生存に関する利点を実証した調査はまだ存在しない。現行の調査は、ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ陽性患者における有意な生存に関する利点を実証し、ＦＩＳＨによって検出されるＥＧＦＲ遺伝子コピー数の増加をＥＧＦＲ　ＴＫＩで治療される患者の生存潜在性を評価するのに利用できることを示した。分析が通常のパラフィン埋込み材料上で行われるため、ＦＩＳＨ技術は臨床用途に適用可能である。

【０１３７】

実施例３

以下の実施例では、ＮＳＣＬＣ患者におけるＥＧＦＲ阻害剤に対する結果（イタリア調査団）を予測するためにＥＧＦＲタンパク質発現、リン酸化ＡＫＴ発現、ならびにこれらのマーカーとＥＧＦＲ遺伝子コピー数およびＥＧＦＲ変異との組合せを用いることを実証する。

【０１３８】

方法

患者の選択および調査設計

この調査に含められる患者は、ベラリア・ホスピタル（Ｂｅｌｌａｒｉａ Ｈｏｓｐｉｔａｌ）（Ｂｏｌｏｇｎａ）、サイエンティフィック・インスティチュート・ユニバーシティ・ホスピタル・サン・ラッファエル（Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｈｏｓｐｉｔａｌ Ｓａｎ Ｒａｆｆａｅｌｅ（Ｍｉｌａｎｏ）、およびポリクリニコ・モンテルーセ（Ｐｏｌｉｃｌｉｎｉｃｏ Ｍｏｎｔｅｌｕｃｅ）（Ｐｅｒｕｇｉａ）で実施されたゲフィチニブの予測調査（カップゾら（Ｃａｐｐｕｚｚｏ ｅｔ ａｌ．）、２００４、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．）およびゲフィチニブのアクセス拡張調査から集められた。総合的な臨床情報および組織ブロックは、Ａｋｔ臨床試験（カップゾら（Ｃａｐｐｕｚｚｏ ｅｔ ａｌ．）、ｉｂｉｄ．）に登録された１０６人の患者のうちの８０人、およびＡｋｔ調査の最後に続いて治療が施され、Ａｋｔ試験の患者と同様に追跡されたアクセス拡張調査のさらなる２２人の患者から入手可能であった。これらの調査はベラリア・ホスピタル制度倫理審議委員会によって承認され、登録前に各患者から通知同意書を得た。ゲフィチニブのアクセス拡張調査に参加する患者の部分群において、臨床実施基準（Ｇｏｏｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｐｒａｃｔｉｃｅ）に従って制度審議委員会の承認を得るとともに、各患者から具体的な通知同意書（アクセス拡張調査同意書式、イタリア版）を得た。

【０１３９】

両調査に対する参加資格は、化学療法後に進行または再発する測定可能な局所的進行性または転移性疾病、あるいは化学療法に対する医学的禁忌を有する組織学的に確認されたＮＳＣＬＣを含むものであった。患者は０級から２級までの範囲の能力状態を有していた。能力状態は、東部共同腫瘍臨床試験グループ（Ｅａｓｔｅｒｎ Ｃｏｏｐｅｒａｔｉｖｅ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ Ｇｒｏｕｐ （オーケンら（Ｏｋｅｎ ｅｔ ａｌ．）、１９８２）に従って定められ、患者が十分に社会活動をすることができ、制限を受けることなく疾病前のあらゆる能力を発揮できる場合は０級とみなされ、患者が肉体的に激しい活動は制限されるが歩行可能であり、軽労働または坐業を行うことができる場合は１級とみなされ、患者が歩行可能であり、あらゆるセルフケアが可能であるが作業活動を行うことができない場合は２級とみなされた。

【０１４０】

患者はゲフィチニブ（２５０ｍｇ毎日）を受け、固体腫瘍における応答評価基準（セラセら（Ｔｈｅｒａｓｓｅ ｅｔ ａｌ．）、２０００）に従って応答について評価された。２カ月後にコンピュータ断層撮影走査法により腫瘍応答を評価し、応答を最初に確認してから少なくとも４週間後に、反答者および安定した疾病の患者において確認評価を繰り返した。疾病無進行期間は、ゲフィチニブ治療の開始日から進行性疾病の検出日、または最終接触日までの期間として計算された。生存期間は、治療開始日から死亡日、または最終接触日までの期間として計算された。

【０１４１】

組織の調製およびタンパク質分析

腫瘍検体を癌治療の前に入手してパラフィンに埋めた。代表的な悪性腫瘍細胞を含む連続的な断片（４μｍ）をヘマトキシリン・エオシンで着色し、世界保健機構基準（トラビスら（Ｔｒａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．）、１９９９）に従って分類した。

【０１４２】

マウス抗ヒトＥＧＦＲ、クローン３１Ｇ７モノクローナル抗体（ザイメド・ラボラトリーズ・インコーポレイティッド社（Ｚｙｍｅｄ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｉｎｃ．）［カリフォルニア州サンフランシスコ（Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ）所在］により、他の個所に記載されている方法および評価基準（ヒルシュら（Ｈｉｒｓｃｈ ｅｔ ａｌ．）、２００３、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．）を用いた免疫組織化学によってＥＧＦＲタンパク質発現を評価した。また、製造元のプロトコールに従って、ウサギ抗マウスＰ－Ａｋｔ（Ｓｅｒ４７３）ポリクローナル抗体（セル・シグナリング・テクノロジー社（Ｃｅｌｌ Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ［米国マサチューセッツ州ベバリー（

Ｂｅｖｅｒｌｙ）所在］を使用する免疫組織化学によってＰ－Ａｋｔを検出した。Ｐ－Ａｋｔ発現およびＥＧＦＲ発現を陽性細胞の強度および割合に基づいて採点した。強度採点は、０＝腫瘍細胞に着色が認められない、１＝間質要素と比較して細胞質および／または核にわずかに着色が検出される、２＝腫瘍細胞の細胞質および／または核を明瞭に印す褐色の着色が容易に認められる、３＝細胞質および／または核をぼかす腫瘍細胞における暗褐色の着色、または４＝核および／または細胞質の極めて強い着色として定められた。得点は、陽性細胞の比率（０％～１００％）に基づくものであった。合計得点は、強度得点と比率得点を掛け合わせて、０から４００の合計範囲を求めることによって計算された。統計分析では、０～２００の得点を陰性／低発現とし、２０１～４００の得点を陽性／高発現とした。この境界レベルは、ＥＧＦＲタンパク質発現の増加と遺伝子コピー数との間に相関性が認められた我々のグループによる先の調査との一貫性に基づくものであった（ヒルシュら（Ｈｉｒｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３、ｉｂｉｄ．）。免疫組織化学検定は、臨床のＦＩＳＨおよびＥＧＦＲ変異結果を知らされていない２人の検査者によって共同で採点され、相違が生じた場合は、スライドについての議論の後に、調和した得点がつけられた。

【０１４３】

統計分析

定性変数に対するフィッシャーの正確確率検定またはピアルソンのχ二乗検定を用い、また連続変数に対するスチューデントのｔ検定または変動分析を用いて群間の差を比較した。コルモゴロフ－スミルノフ検定によって分布の正規性を評価した（クリエルら（Ｃｕｒｉｅｌ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９０）。カプラン－マイヤー法によって、無進行期間、全生存期間および９５％信頼区間を評価した（ドンら（Ｄｏｎ　ｅｔ　ａｌ．）、１９９１）。対数ランク検定を用いて異なる群を比較した。ステップ・ダウン手順によるコックスの比例ハザード回帰モデルを用いて生存リスク要因と生存との関連を評価した（アーミテージおよびベリー（Ａｒｍｉｔａｇｅ　ａｎｄ　Ｂｅｒｒｙ）、１９９４）。一変数分析における有意な結果を伴うそれらの変数のみを多変数分析に含めた。変数除去に対する基準は、推定された最大部分尤度に基づく尤度比統計とした（モデルからの除去に対してデフォルトｐ値＝０．１０）。調査設計は観察の独立性を保証するものである。比例ハザード予測を対数生存関数分析によって試験し、有効であることを確認した。すべての統計的試験を両側から実施し、統計的有意をＰ＜０．０５と定めた。すべての分析は、統計的パッケージＳＰＳＳバージョン１１．５（ＳＰＳＳイタリアｓｒｌ．［イタリアボログナ（Ｂｏｌｏｇｎａ）所在］を用いて行われた。

【０１４４】

結果

臨床的特徴

その大半が先の出版（カップゾら（Ｃａｐｐｕｚｚｏ　ｅｔ　ａｌ．）、ＪＮＣＩ、２００４）において報告された性別、段階、組織状態、能力状態および喫煙状態に基づく臨床結果を表１に示す（実施例１参照）。群全体では奏功率は１４％であり、進行率は６０％であり、中央値無進行期間は２．９カ月であり、中央値生存期間は９．４カ月であり、１年生存率は４０．７％であった。女性（平均差２２．６％、９５％ＣＩ：６．６から３８．６、Ｐ＝０．００４）および非喫煙状態（平均差３０．８％、９５％ＣＩ：５．３から５６．３、Ｐ＝０．００６）は、統計的に有意により良好な応答に対応づけられ、女性（平均差３．０カ月、９５％ＣＩ：４．５から１０．５カ月、Ｐ＝０．０３）、腺癌および細器官支肺胞癌組織状態（平均差５．０カ月、９５％ＣＩ：２．８から７．２カ月、Ｐ＝０．０３）および能力状態０～１（平均差７．４カ月、９５％ＣＩ：５．６から９．１カ月、Ｐ＝０．００４）は、統計的に有意により長い生存期間に対応づけられた。

【０１４５】

疾病無進行期間は、ゲフィチニブ治療の開始日から進行疾病の検出日、または最終接触日までの期間として計算された。生存期間は、治療開始日から死亡日、または最終接触日までの期間として計算された。群間の統計的有意差を対数ランク検定によって評価した。

【０１４６】

ＥＧＦＲタンパク質発現および臨床結果

９８人の患者におけるＥＧＦＲタンパク質発現を免疫組織化学によって評価し（データは示されず）、タンパク質得点による患者の結果を表７ａおよび図３Ａ～３Ｂに示す。最低得点（０～９９）の患者は応答を示さず、１人だけが安定を示した。これらの患者は、無進行期間が短く（中央値２．１カ月）、中央値生存期間が短く（４．５カ月）、２７％が１年の生存を示した。１００～１９９の得点の患者も結果が劣っており、進行疾病率は６５％で無進行期間が短く（中央値２．３カ月）、生存期間も劣っていた（１年間生存したのは患者のわずか３５％であった）。彼らの結果も同様に劣っていたため、１００未満の得点の患者と１００～１９９の得点の患者の４０人の患者（４１％）を一緒にした（ＥＧＦＲ　ＩＨＣ－）。ＥＧＦＲ免疫組織化学得点が２００～２９９および３００～３９９の患者は、ＥＧＦＲ　ＩＨＣ－群の患者よりはるかに良好な結果を示し、彼らは類似した奏功率、無進行期間および生存期間を有するため、彼らも一緒にした（ＥＧＦＲ　ＩＨＣ＋）。ＥＧＦＲ　ＩＨＣ＋患者は、ＩＨＣ－患者と比較して、有意に高い奏功率（２１％対５％、Ｐ＝０．０３）、低い進行率（４４．８％対８０％）、Ｐ＜０．００１）、長い無進行期間（５．２対２．３カ月、Ｐ＝０．００１）および長い生存期間（１１．５対５．０カ月、Ｐ＝０．０１）を有していた。タンパク質状態は、臨床的特徴に対応づけられなかったが（表８）、遺伝子コピー数と統計的に有意に関連づけられた（ピアソンｒ＝０．２８、Ｐ＝０．００６）。

【０１４７】

【表７】

表7a. ゲフィチニブで治療された進行NSCLCの98人の患者におけるEGFR－タンパク質発現および臨床結果

| IHC得点 | N | OR | PD | TTP(月) | MS(月) | 1年 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 合計: | 98(100%) | 14(14%) | 58(59%) | 2.9 | 9.5 | 41±5 |
| 0-99 | 20(20%) | 0(0%) | 19(95%) | 2.1 | 4.5 | 27±10 |
| 100-199 | 20(20%) | 2(10%) | 13(65%) | 2.3 | 5.3 | 35±10 |
| 200-299 | 15(15%) | 4(26%) | 5(33%) | 8.6 | 15.2 | 71±12 |
| 300-400 | 43(44%) | 8(19%) | 21(49%) | 4.5 | 11.3 | 41±8 |
| EGFR IHC ÷(<200) | 40(41%) | 2(5%) | 32(80%) | 2.3 | 5.0 | 31±7 |
| EGFR IHC +(≥200) | 58(59%) | 12(21%) | 26(45%) | 5.2 | 11.5 | 48±7 |
| P(IHC÷対IHC+) | | 0.03 | <0.001 | 0.001 | 0.01 | 0.01 |

* 続いて毎日250mgのゲフィチニブで治療された、化学療法後に進行または再発する測定可能な局所的進行性または転移性疾病を伴う組織病理的に確認された非小細胞肺癌、または化学療法に対する医学的禁忌を有する102人の患者の特性。OR＝客観的奏功、PD＝進行、TTP＝無進行期間、MS＝全生存期間中央値。免疫組織化学(IHC)によるタンパク質状態は、陽性細胞の比率0～100%、および1～4のスケールの着色強度に基づいて定められた。合計得点は、強度得点と比率得点を掛け合わせることによって計算され、全範囲を0～400とした。

† 対数ランク検定を用いて計算されたP値(両面)。

‡ピアソンχ平方試験を用いて計算されたP値(両面)。

§ フィッシャーの正確確率検定を用いて計算されたP値(両面)。

ＥＧＦＲ変異および臨床結果

合計８９例の患者（６０の顕微切開検体および２９の非顕微切開検体）においてＥＧＦＲエキソン１８、１９および２１に対する変異分析を行った。１５人の患者にＥＧＦＲ変異が認められ（ＥＧＦＲ変異陽性＝１７％）、そのうち１２が顕微切開検体で、３が被顕微切開検体であり（Ｐ＝０．３０）、エキソン２１におけるミスセンス変異（ｎ＝８）またはエキソン１９におけるコドン７４６～７５３での小インフレーム欠失（ｎ＝７）からなっていた（表７ｂおよび９）。これらの変異は、進行疾病を経験した男性患者に生じたエキソン２１におけるミスセンス変異（バリン８５１からイソロイシン、Ｖ８５１Ｉ）を除いて、いずれもすでに記載されている（１１～１３）。ＥＧＦＲ変異の存在は非喫煙履

歴に対応づけられた（Ｐ＝０．００７）。性別および組織状態との関連は統計的に有意ではないが（双方に対してＰ＝０．１０）、変異は女性および腺癌の患者の方が頻度が高かった（表８）。

【０１４８】

【表８】

表7b. ゲフィチニブで治療された進行NSCLCの89人の患者における変異および臨床結果

| EGFR変異 | N | OR | PD | TTP(月) | MS(月) | 1年 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 合計: | 89(100%) | 12(13%) | 56(63%) | 2.9 | 9.4 | 41±5 |
| 変異なし | 74(83%) | 4(5%) | 50(68%) | 2.6 | 8.4 | 38±8 |
| 変異あり | 15(17%) | 8(53%) | 6(40%) | 9.9 | 20.8 | 57±13 |
| P(変異なし対変異あり) | | 0.001 | 0.04 | 0.02 | 0.09 | 0.22 |

【０１４９】

【表９】

表8. 表皮成長因子受容体(EGFR)、およびFISH、タンパク質状態および遺伝子変異状態による非小細胞肺癌患者の特性*

| 患者特性 | EGFR FISH状態 | | EGFRタンパク質状態 | | EGFR遺伝子変異 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 陽性 N/% | 陰性 N/% | 陽性 N/% | 陰性 N/% | あり N/% | なし N/% |
| 合計 | 33/32 | 69/68 | 58/59 | 40/41 | 15/17 | 74/83 |
| 性別 | | | | | | |
| 男性 | 17/51 | 50/72 | 37/64 | 27/67 | 7/47 | 51/69 |
| 女性 | 16/48 | 19/28 | 21/36 | 13/32 | 8/53 | 23/31 |
| P | .04† | | .70† | | .10† | |
| 組織状態 | | | | | | |
| 腺癌[A] | 18/54 | 36/52 | 29/50 | 22/55 | 10/67 | 40/54 |
| 細気管支肺胞癌[A] | 3/9 | 6/9 | 4/7 | 5/12 | 2/13 | 6/8 |
| 扁平細胞[B] | 9/27 | 17/25 | 18/31 | 8/20 | 1/7 | 20/27 |
| 大細胞[B] | 1/3 | 1/1 | 1/2 | 1/2 | 0 | 1/1 |
| 未分化[B] | 2/8 | 9/13 | 6/10 | 4/10 | 2/13 | 7/9 |
| P([A]対[B]) | .78† | | .29† | | .10† | |
| 一般状態‡ | | | | | | |
| 0 | 13/39 | 36/52 | 27/47 | 20/50 | 8/53 | 35/47 |
| 1 | 13/39 | 28/40 | 27/47 | 12/30 | 5/33 | 31/42 |
| 2 | 7/21 | 5/7 | 4/7 | 8/20 | 2/13 | 8/11 |
| P(0+1対2) | .053‡ | | .06‡ | | .60‡ | |
| 喫煙状態 | | | | | | |
| 非喫煙者 | 11/33 | 4/6 | 10/17 | 5/12 | 6/40 | 7/9 |
| 元喫煙者 | 8/24 | 25/36 | 21/36 | 11/27 | 5/33 | 24/32 |
| 現行喫煙者 | 14/42 | 40/58 | 27/47 | 24/60 | 4/26 | 43/58 |
| P(非喫煙者対他の喫煙者) | .001‡ | | .52† | | .007‡ | |

* 続いて毎日250mgのゲフィチニブで治療された、化学療法後に進行または再発する測定可能な局所的進行性または転移性疾病を伴う組織病理的に確認された非小細胞肺癌、または化学療法に対する医学的禁忌を有する102人の患者の特性。一般状態は、以下のように定められた:0＝十分に社会活動ができ、制限を受けることなく、疾病前のあらゆる能力を発揮できる;1＝肉体的に激しい活動は制限を受けるが、歩行可能で、軽労働または坐業、例えば軽い家事および事務を行うことができる;2＝歩行可能で、あらゆるセルフケアが可能であるが、作業活動を行うのは不可能であり、日中の約50%超は起居している(東部共同腫瘍臨床試験グループ基準、34)。FISH＝蛍光in situハイブリダイゼーション。

†ピアソンχ平方試験を用いて計算されたP値(両面)。

‡フィッシャーの正確確率検定を用いて計算されたP値(両面)。

【０１５０】

表9.

| | | |
|---|---|---|
| エキソン19欠失 | | |
| EGFRタンパク質 | 739 K I P V A I K E L R E A T S P K A N 756 | 配列番号4 |
| EGFR遺伝子 | 2215 AAA ATT CCC GTC GCT ATC AAG GAA TTA AGA GAA GCA ACA TCT CCG AAA GCC AAC 2268 | 配列番号5 |
| 患者15 | AAA ATT CCC GTC GCT ATC AAG – – – – – – TCT CCG AAA GCC AAC | 配列番号6 |
| 患者19、30、41および53* | AAA ATT CCC GTC GCT ATC AA. – – – – .A ACA TCT CCG AAA GCC AAC | 配列番号7 |
| 患者57 | AAA ATT CCC GTC GCT ATC AAG GAA T.. – – – – .CT CCG AAA GCC AAC | 配列番号8 |
| 患者75† | AAA ATT CCC GTC GCT ATC AAG – – – – – ACA TCT CCG AAA GCC AAC | 配列番号9 |
| 注 | *(11)の患者1と類似している。<br>†Del-1b(12)と類似している。 | |
| エキソン21変異 | | |
| EGFRタンパク質 | 850 H V K I T D F G L A K L L G 863 | 配列番号10 |
| EGFR遺伝子 | 2538 CAT GTC AAG ATC ACA GAT TTT GGG CTG GCC AAA CTG CTG GGT 2589 | 配列番号11 |
| 患者1、2、16、26、31、38、100(置換2573 T>G)‡ | H V K I T D F G R A K L L G<br>CAT GTC AAG ATC ACA GAT TTT GGG CGG GCC AAA CTG CTG GGT | 配列番号12<br>配列番号13 |
| 患者3(置換2541G>A)# | H I K I T D F G L A K L L G<br>CAT ATC AAG ATC ACA GAT TTT GGG CTG GCC AAA CTG CTG GGT | 配列番号14<br>配列番号15 |
| 注 | ‡ 患者38は優性変異体である。<br># 患者3の変異はSNPデータベースに報告されていなかった。 | |
| 変異分析に使用したプライマー | | |
| エキソン18順方向 | GACCCTTGTCTCTGTGTTCTTGT | 配列番号16 |
| エキソン18外側逆方向 | TATACAGCTTGCAAGGACTCTGG | 配列番号17 |
| エキソン18内側逆方向 | CCAGACCATGAGAGGCCCTG | 配列番号18 |
| エキソン19順方向 | CACAATTGCCAGTTAACGTCTTC | 配列番号19 |
| エキソン19外側逆方向 | AGGGTCTAGAGCAGAGCAGC | 配列番号20 |
| エキソン19内側逆方向 | GCCTGAGGTTCAGAGCCAT | 配列番号21 |
| エキソン21順方向 | CATGATGATCTGTCCCTCACAG | 配列番号22 |
| エキソン21外側逆方向 | CTGGTCCCTGGTGTCAGGAA | 配列番号23 |
| エキソン21内側逆方向 | GCTGGCTGACCTAAAGCCACC | 配列番号24 |

本発明人らは、また、ＥＧＦＲ変異状態と、ＦＩＳＨ状態と、各腫瘍におけるタンパク質発現のレベルとの間の関連性を患者の結果と比較した。ＥＧＦＲ変異は統計的に有意に

ＦＩＳＨ＋状態に対応づけられたが（Ｐ＝０．０１）、高いタンパク質発現に対応づけられなかった（Ｐ＝０．１０）。遺伝子変異は、統計的に有意により良好な応答（５４％対５％、平均差４７．９％、９５％ＣＩ：２２．２から７３．７、Ｐ＜０．００１）およびより長い無進行期間（９．９対２．６カ月、平均差７．３カ月、９５％ＣＩ：２．１から１６．７カ月、Ｐ＝０．０２）に対応づけられた（表７）。ＥＧＦＲ変異を有する患者は、生存期間がより良好であったが、それは統計的に有意なものではなかった（中央値２０．８対８．４カ月、平均差１２．４カ月、９５％ＣＩ：１．７から２６．４カ月、Ｐ＝０．０９）。しかし、変異を有する１５人の患者のうちの６人の患者であって、そのうちの５人（患者１、２、３、１６および１０；表９および１０）がエキソン２１における点変異を有し、そのうちの１人（患者４１、表９および１０）がエキソン１９欠失を有していた患者では疾病が進行していた。治療に応答したＥＧＦＲ変異を有する８人の患者のうち、７人がＦＩＳＨ＋であったのに対して、変異を有する６人の進行患者のうちの４人は、ＦＩＳＨ－であった（二染色体性、表１０）。さらに、疾病が安定している２１人の患者のうち、ＥＧＦＲ変異を示したのは１人だけであった。

【０１５１】

【表１１】

表10．表皮成長因子受容体(EGFR)およびリン酸化(P)－Aktタンパク質、およびEGFR変異または遺伝子増幅を示す非小細胞肺癌患者についての結果*

| 患者 | EGFR遺伝子増幅 | EGFR遺伝子変異 | EGFR IHC | p-Akt | 奏功 | 無進行期間（月） | 全生存期間（月） |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | － | L858R | － | ＋ | PD | 2.11 | 2.11 |
| 2 | － | L858R | ＋ | － | PD | 2.18 | +5.3 |
| 3 | － | V852I | ＋ | ＋ | PD | 4.05 | 4.05 |
| 4 | ＋ | ND | － | ＋ | PD | 2.2 | 2.73 |
| 12 | ＋ | なし | － | ＋ | SD | 5.99 | 8.32 |
| 15 | ＋ | エキソン19欠失 | ＋ | ＋ | PR | +5.33 | +5.33 |
| 16 | － | L858R | ＋ | － | PD | 1.61 | 3.16 |
| 19 | ＋ | エキソン19欠失 | － | ＋ | PR | 9.18 | +18.9 |
| 26 | － | L858R | ＋ | ＋ | PR | 13.6 | +26.2 |
| 30 | － | エキソン19欠失 | ＋ | ＋ | SD | 9.87 | 11.5 |
| 31 | ＋ | L858R | ＋ | ＋ | PR | +17.4 | +17.4 |
| 37 | ＋ | なし | ＋ | ＋ | PD | 2.66 | 4.05 |
| 38 | ＋ | L858R | ＋ | ＋ | CR | 19.7 | 20.8 |
| 41 | － | エキソン19欠失 | － | ＋ | PD | 2.89 | 5.72 |
| 51 | ＋ | ND | ＋ | ＋ | SD | 7.7 | +8.75 |
| 53 | ＋ | エキソン19欠失 | ＋ | ＋ | PR | +20.7 | +20.7 |
| 57 | － | エキソン19欠失 | ＋ | ＋ | PR | 11.3 | +12.2 |
| 75 | ＋ | エキソン19欠失 | ＋ | ＋ | PR | 15.6 | +30.2 |
| 91 | ＋ | ND | ＋ | ＋ | SD | 5.16 | 8.098 |
| 100 | － | L858R | － | ND | PD | 1.55 | 2.86 |
| 101 | ＋ | ND | ＋ | ＋ | PR | 9.05 | 10.3 |
| 102 | ＋ | なし | ＋ | ＋ | PD | 3.22 | 3.95 |

*続いて毎日250mgのゲフィチニブで治療された、化学療法後に進行または再発する測定可能な局所的進行性または転移性疾病を伴う組織病理的に確認された非小細胞肺癌、または化学療法に対する医学的禁忌を有する102人の患者の特性。ND：未決定、PD＝進行、SD＝安定、PR＝部分寛解、CR＝完全寛解。IHC＝免疫組織化学。EGFR遺伝子増幅＋＝遺伝子増幅が存在する。EGFR遺伝子増幅－＝増幅が存在しない。EGFR IHC＋＝陽性。EGFR IHC－＝陰性。P－Akt＋＝陽性。P－Akt－＝陰性。無進行期間および生存期間＋＝検定

ＥＧＦＲ多変数分析

どの変数が生存期間に対する予測変数になるかを定めるために、一変数分析おいて有意である要因（性別、組織状態、能力状態、ＦＩＳＨおよびタンパク質状態）を多変数モデルに含めた。変異および喫煙状態は、一変数分析において生存期間に対応づけられなかったため（それぞれＰ＝０．０９およびＰ＝０．０２０）含められなかった。劣った能力状態（ＰＳ２）は、死亡リスクの上昇（危険率［ＨＲ］＝３．２７、９５％ＣＩ＝１．４９から７．１７、Ｐ＝０．００３）に対応づけられていたのに対して、腺癌／細気管支肺胞

癌組織状態（ＨＲ＝０．５８、９５％ＣＩ＝０．３５から０．９６、Ｐ＝０．０３５）およびＦＩＳＨ状態（ＨＲ＝０．４４、９５％ＣＩ＝０．２３から０．２８、Ｐ＝０．０１）は、統計的に有意により良好な生存期間に対応づけられた。タンパク質状態（ＨＲ＝０．６０、９５％ＣＩ＝０．３６から１．０１、Ｐ＝０．０５６）および性別（ＨＲ＝１．４３、９５％ＣＩ＝０．７９から２．６、Ｐ＝０．２０）は、生存期間に統計的に有意に対応づけられなかった。

【０１５２】

ＥＧＦＲとＰ－Ａｋｔの関連性

Ｐ－Ａｋｔタンパク質の評価は９８人の患者において順調であった。Ｐ－Ａｋｔ陽性状態は、より良好な奏功率（２１％対０％、平均差２０．６％、９５％ＣＩ：１１．０から３０．２、Ｐ＝０．００４）、疾病抑制率（５０％対２２％、平均差２８．１％、９５％ＣＩ：９．５から４６．７、Ｐ＝０．００８）、およびより長い無進行期間（４．２対２．１カ月、平均差２．１カ月、９５％ＣＩ：０．７から３．４カ月、Ｐ＝０．０１）に有意に対応づけられたが、生存期間（１１．４対９．４カ月、平均差２．０カ月、９５％ＣＩ：１．３から５．３カ月、Ｐ＝０．２０）に有意に対応づけられなかった。Ｐ－Ａｋｔ陽性状態もＥＧＦＲ遺伝子増加（ＦＩＳＨ＋ピアソンｒ＝０．３０、Ｐ＝０．０１）および高レベルのタンパク質発現（ＥＧＦＲ　ＩＨＣ＋ピアソンｒ＝０．２７、Ｐ＝０．０１）に有意に対応づけられたが、ＥＧＦＲ変異（Ｐ＝０．０８）に有意に対応づけられなかった。

【０１５３】

ＦＩＳＨデータとＰ－Ａｋｔデータ（表１１）を合わせて、本発明人らは、二重陽性患者（ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ＋／Ｐ－Ａｋｔ＋）はＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ－患者および／またはＰ－Ａｋｔ患者と比較して有意に高い奏功率（４１％対３％、平均差３８．５％、９５％ＣＩ：２０．１から５６．８、Ｐ＜０．００１）および疾病抑制率（７２％対２８％、平均差４４．９％、９５％ＣＩ：２６．６から６５．３、Ｐ＜０．００１）、長い無進行期間（９．０対２．５カ月、平均差６．５カ月、９５％ＣＩ：３．３から９．８カ月、Ｐ＜０．００１）および生存期間（１８．７対９．４カ月、平均差９．３カ月、９５％ＣＩ：４．７から１３．９カ月、Ｐ＝０．０４）を有することを確認した。ＥＧＦＲ免疫組織化学および変異データをＰ－Ａｋｔデータと合わせても同様の結果が確認された。ＥＧＦＲＩＨＣ＋／Ｐ－Ａｋｔ＋患者は、ＥＧＦＲ－および／またはＰ－Ａｋｔ－患者と比較すると有意に良好な奏功率（２９％対４％、平均差２５．８％、９５％ＣＩ：１０．９から４０．４、Ｐ＜０．００１）、疾病抑制率（６６％対２３％、平均差４３．１％、９５％ＣＩ：２３．９から６０．６、Ｐ＜０．００１）、長い無進行期間（６．２対２．３カ月、平均差３．９カ月、９５％ＣＩ：１．５から６．３カ月、Ｐ＝０．００１）および長い生存期間（１４．９対８．３カ月、平均差６．６カ月、９５％ＣＩ：４．０から９．２カ月、Ｐ＝０．０３）を有していた。ＥＧＦＲ変異＋／Ｐ－Ａｋｔ＋患者は、ＥＧＦＲ変異－および／またはＰ－Ａｋｔ－患者より統計的に有意に良好な奏功率（６７％対６％、平均差６１．２％、９５％ＣＩ：３４．０から８８．４、Ｐ＜０．００１）、疾病抑制率（７５％対３２％、平均差４３．５％、９５％ＣＩ：１６．８から７０．２、Ｐ＜０．００８）、長い無進行期間（１１．２対２．６カ月、平均差８．６カ月、９５％ＣＩ：３．３から１４．０カ月、Ｐ＝０．００４）および長い生存期間（２０．８対９．３カ月、平均差１１．５カ月、９５％ＣＩ：１．１から２４．２カ月、Ｐ＝０．０４４）を有していた。

【０１５４】

【表１２】

表11．表皮成長因子受容体(EGFR)蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)と、免疫組織化学(IHC)と、非小細胞肺癌患者におけるリン酸化(P)－Aktによる変異との相関性*

| マーカー | 患者数/% | 客観的奏功N/% | 病勢コントロールN/% | 無進行期間中央値(月) | 生存期間中央値(月) | 1年累積生存率±SD(%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| EGFR FISH/P- Akt | 98/100 | 14/14 | 40/40 | 4.5 | 11.5 | 47±6 |
| EGFR FISH+/P- Akt+ | 29/30 | 12/41 | 21/72 | 9.0 | 18.7 | 33±9 |
| EGFR FISH+/P- Akt- | 4/4 | 0 | 1/25 | 1.1 | 13.8 | 75±22 |
| EGFR FISH-/P-Akt+ | 38/39 | 2/5 | 12/32 | 2.6 | 8.4 | 38±8 |
| EGFR FISH-/P-Akt- | 27/28 | 0 | 6/22 | 2.4 | 6.0 | 57±9 |
| いずれか陰性 | 69/70 | 2/3 | 19/27 | 2.5 | 9.4 | 37±6 |
| P(任意-対+/+) | | <.001§ | <.001‡ | <.001† | .041† | .075† |
| EGFR IHC/P-Akt | 98/100 | 14/14 | 40/40 | 3.2 | 11.3 | 45±6 |
| EGFR IHC+/P-Akt+ | 41/42 | 12/29 | 27/66 | 6.2 | 14.9 | 29±14 |
| EGFR IHC+/P-Akt- | 17/17 | 0 | 5/29 | 1.8 | 9.4 | 35±12 |
| EGFR IHC-/P-Akt+ | 26/27 | 2/8 | 7/27 | 2.3 | 6.4 | 38±10 |
| EGFR IHC-/P-Akt- | 14/14 | 0 | 1/7 | 2.0 | 4.2 | 54±8 |
| いずれか陰性 | 57/58 | 2/3 | 13/23 | 2.3 | 8.3 | 35±7 |
| P(任意-対+/+) | | <.001‡ | <.001‡ | .001† | .029† | .032† |
| EGFR変異/P-Akt | 85/100 | 12/14 | 32/36 | 2.9 | 10.1 | 43±5 |
| EGFR変異+/P-Akt+ | 12/14 | 8/67 | 9/75 | 11.2 | 20.8 | 38±10 |
| EGFR変異+/P-Akt- | 2/2 | 0 | 0 | 1.1 | 3.1 | 40±7 |
| EGFR変異-/P-Akt+ | 44/52 | 4/9 | 17/39 | 2.7 | 8.4 | 50±35 |
| EGFR変異-/P-Akt- | 27/32 | 0 | 6/22 | 2.4 | 9.4 | 65±14 |
| いずれか陰性 | 73/86 | 4/5 | 23/31 | 2.6 | 9.3 | 39±6 |
| P(任意-対+/+) | | <.001§ | .008§ | .004§ | .044† | .116† |

* 続いて毎日250mgのゲフィチニブで治療された、化学療法後に進行または再発する測定可能な局所的進行性または転移性疾病を伴う組織病理的に確認された非小細胞肺癌、または化学療法に対する医学的禁忌を有する102人の患者の特性。
† 対数ランク検定を用いて計算されたP値(両面)。
‡ ピアソンχ平方試験を用いて計算されたP値(両面)。
§ フィッシャーの正確確率検定を用いて計算されたP値(両面)。

ＥＧＦＲ評価の方法とは無関係に、ＥＧＦＲ陽性およびＡ－Ａｋｔ陰性である患者はゲフィチニブ治療に応答しなかった（表１１）。ＥＧＦＲ　ＩＨＣ＋／Ｐ－Ａｋｔ－の患者の群は、奏功率（０％対２９％、平均差２９．３％、９５％ＣＩ：１５．３から４３．２、Ｐ＝０．０１２）、疾病抑制率（２９％対６６％、平均差３６．５％、９５％ＣＩ：１０．４から６２．５、Ｐ＝０．０１１）に関して、両タンパク質に対して陽性の群より有意に劣る結果を示し、有意性のない短い無進行期間（１．８対６．２カ月、平均差４．４カ月、９５％ＣＩ：２．３から６．４カ月、Ｐ＝０．０８）および生存期間（９．４対１４．９カ月、平均差５．５カ月、９５％ＣＩ：１．６から９．３カ月、Ｐ＝０．２１）に向かう傾向を有していた。ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨおよびＥＧＦＲ変異との比較は、ＥＧＦＲに対して陽性で、Ｐ－Ａｋｔに対して陰性の群の患者の数が少ないため（すなわち、それぞれ４人および２人であるため）行われなかった。

【０１５５】

ＥＧＦＲに対して陰性であるが、Ｐ－Ａｋｔに対して陽性である群においても好ましくない結果が確認された（表１１）。ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ－／Ｐ－Ａｋｔ＋の群は、二重陽性群と比較して統計的に有意に劣った奏功率（５％対４１％、平均差３６．１％、９５％ＣＩ：１６．８から５５．４、Ｐ＜０．０１１）、疾病抑制率（３２％対７２％、平均差

４０．８％、９５％ＣＩ：１８．９から６２．８、Ｐ＝０．０１１）および無進行期間（２．６対９．０カ月、平均差６．４カ月、９５％ＣＩ：３．７から９．１カ月、Ｐ＝０．００１）、および統計的に有意性のない短い生存期間（８．４対１８．７カ月、平均差１０．３カ月、９５％ＣＩ：７．２から１３．４カ月、Ｐ＝０．０８３）を有していた。ＥＧＦＲを免疫組織化学により、または変異について評価した場合も同様の結果が確認された。いずれの場合も、ＥＧＦＲ－／Ｐ－Ａｋｔ＋の群は、二重陽性群と比較して統計的に有意に劣った奏功率（タンパク質および変異に対してそれぞれＰ＝０．０３４およびＰ＜０．００１）、疾病抑制率（Ｐ＝０．００２およびＰ＜０．０２５）および無進行期間（Ｐ＝０．０１０およびＰ＝０．００９）を有し、統計的に有意性のない劣った生存期間（Ｐ＝０．０８０およびＰ＝０．０７０）を有していた。

【０１５６】

考察

この調査において、本発明人らは、ＥＧＦＲタンパク質発現は奏功率の向上、ならびに無進行期間および生存期間の統計的に有意な延びに対応づけられたことを示した。ＩＨＣ得点の低い（＜２００）患者は、遺伝子コピー数が小さい患者または変異が欠如した患者と同じくらい劣った結果を有していた。加えて、陽性のＥＧＦＲ状態を有する患者においては、いずれの場合も、Ａｋｔリン酸化の存在は、より良好な応答、疾病抑制率、無進行期間および生存期間に有意に関連づけられた。それらの結果は、高いＥＧＦＲタンパク質発現は、進行ＮＳＣＬＣの患者において、ゲフィチニブ感度に対する有効な分子的予測マーカーであることを示している。

【０１５７】

ＥＧＦＲ遺伝子変異の存在は良好なゲフィチニブに対する応答および無進行期間にも関連づけられたが、生存期間の差は統計的な有意性に達しなかった。興味深い結果は、ＥＧＦＲと遺伝子コピー数の増加との間の関連性、すなわちヒト肺癌細胞系Ｈ３２５５において最近記述され（トレーシーら（Ｔｒａｃｙ　ｅｔ　ａｌ．）、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ、２００４；６４：７２４１－４４）、おそらくはゲフィチニブ感度に関連する現象であった。実際、ゲフィチニブ治療に応答したＥＧＦＲ変異を有する８人の患者のうち７人はＦＩＳＨ＋であり、ＥＧＦＲ変異を有する６人の非応答患者のうち４人が二染色体性パターンを示した。この観察結果は、遺伝子増加の影響はゲフィチニブ感度を予測するためのＥＧＦＲ変異に対して極めて重要であることを示唆している。

【０１５８】

これらの調査の他の重要な結果は、安定の患者にはＥＧＦＲ変異が実質的に存在しないことであった。ＥＧＦＲ変異について評価された安定の２１人の患者のうち、ＥＧＦＲ変異を有していたのは１人だけであった。安定とは、ここでは、４週間以上の間隔をおいて連続的に２回観察することによって確認した場合に、部分寛解に即するほど十分に縮小せず、また疾病の進行に即するほど十分に拡大しないものとして定義づけられた。ＢＲ２１（シェファードら（Ｓｈｅｐｈｅｒｄ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４）のデータにより、ゲフィチニブの生存に関する利点は応答患者に限定されないことが示されているため、安定の患者では変異が少ないことは重要な臨床的意義を有する。ゲフィチニブ治療患者における生存期間の向上は全体的に、変異分析が患者選択の格好の試験として確率されればチロシンキナーゼ阻害剤治療から除外されることになる安定の患者の如き、治療が中間的に有効であった患者の群の存在によるものである可能性がある。さらに、以前の調査はＥＧＦＲ変異が応答患者の大多数に存在することを示唆していたが（リンチら（Ｌｙｎｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４；パイツら（Ｐａｉｅｚ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４；パオら（Ｐａｏ　ｅｔ　ａｌ．）、２００４）、この調査において、本発明人らは、ＥＧＦＲ変異を有する患者の４０％が進行疾病を有していることを確認した。これらの結果は、これは臨床結果がゲフィチニブによる大規模な臨床試験で得られた結果と類似しているゲフィチニブ治療患者の大規模かつ未選択の集団において実施された最初の調査であるという事実によって説明することが可能であった（フクオカら（Ｆｕｋｕｏｋａ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３；クリスら（Ｋｒｉｓ　ｅｔ　ａｌ．）、２００３、ＪＡＭＡ）。

【０１５９】
この調査では、ゲフィチニブ感度は、高いＥＧＦＲタンパク質発現に対応づけられ、低いＥＧＦＲ発現得点（＜２００）を有する患者における結果は、遺伝子コピー数が小さい、または変異が欠如した患者における結果と同じくらい劣っていたが、それは、以前の調査で確認されたこと（カップゾら（Ｃａｐｐｕｚｏ ｅｔ ａｌ．）、２００３、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．；バイレイら（Ｂａｉｌｅｙ ｅｔ ａｌ．）、２００３；パラら（Ｐａｒｒａ ｅｔ ａｌ．）、２００４）と異なっている。着色手順およびＥＧＦＲ評価の解釈のためのガイドラインの相違が、調査間の結果の矛盾の主な原因でありうる。サンプリング・サイズ、および免疫組織化学的着色のための組織材料の選択も調査間の結果の相違に寄与しうる。例えば、わずか４３人および５０人の患者が、それぞれカップゾら（Ｃａｐｐｕｚｚｏ ｅｔ ａｌ．）、２００３、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．）（カップゾら（Ｃａｐｐｕｚｏ ｅｔ ａｌ．）、２００３、Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．）およびパラら（Ｐａｒｒａ ｅｔ ａｌ．）（パラら（Ｐａｒｒａ ｅｔ ａｌ．）、２００４）によって評価された。ＩＤＥＡＬ試験による腫瘍組織の回想的な免疫組織化学分析では、全患者集団のうちの４０％未満が調査されたのに対して（バイレイら（Ｂａｉｌｅｙ ｅｔ ａｌ．）、本調査では、９０％を上回る患者が免疫組織化学的着色に利用可能な組織を有していた。

【０１６０】
この調査において、本発明人らは、他の研究者（ソルデラら（Ｓｏｒｄｅｌｌａ ｅｔ ａｌ．）、２００４；カップゾら（Ｃａｐｐｕｚｚｏ ｅｔ ａｌ．）、２００４、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ）によっても記載及び論述された関連性である、活性化されたＡｋｔ経路（例えばリン酸化Ａｋｔの発現）とゲフィチニブ感度との関連性をも見いだした。ＥＧＦＲおよびＰ－Ａｋｔ状態の組合せ分析により、ＥＧＦＲ評価の方法とは無関係に、ＥＧＦＲ状態が陽性である場合は、Ａｋｔリン酸化の存在は、より良好な応答、疾病抑制率、無進行期間および生存期間に有意に関連づけられることが示された。重要なことは、ＥＧＦＲ＋／Ｐ－Ａｋｔ＋患者の部分集合体を統合した他のすべての群と比較した場合のみならず、この集合体を、ＥＧＦＲ陽性であるがＰ－Ａｋｔ陰性である患者と比較した場合にもより良好な結果が確認されたことである。これらの結果は、ゲフィチニブ目標が存在するが抗アポプトーシス経路が活性化されない場合には、すでに示唆されているように（カップゾら（Ｃａｐｐｕｚｚｏ ｅｔ ａｌ．）、２００４、Ｊ．Ｎａｔｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ）、また臨床前モデルで実証されているように（オノら（Ｏｎｏ ｅｔ ａｌ．）、２００４；ビアンコら（Ｂｉａｎｃｏ ｅｔ ａｌ．）、２００３）、患者は、ゲフィチニブの阻害効果に敏感ではないという仮説を裏づけるものである。期待されたように、ＥＧＦＲ＋／Ｐ－Ａｋｔ＋群もＥＧＦＲ陰性およびＰ－Ａｋｔ陽性群と比較して有意に良好な結果を有しており、異常ＥＧＦＲ依存性Ａｋｔ活性はゲフィチニブ抵抗性をもたらしうることを示す臨床前データ（ビアンコら（Ｂｉａｎｃｏ ｅｔ ａｌ。）、２００３；ジャンマートら（Ｊａｎｍａａｔ ｅｔ ａｌ．）、２００３）を裏づけるものである。これらのデータは、Ｐ－Ａｋｔ陽性状態は、ＥＧＦＲ陽性患者において薬物に対して特に敏感な患者の部分群を識別するために重要である。ＥＧＦＲ陰性患者において、Ｐ－Ａｋｔ陽性状態は、ゲフィチニブ治療が有効であるチャンスが極めて低い患者の群を識別することができる。

【０１６１】
ＥＧＦＲタンパク質発現とＡｋｔ経路活性の関係に関する情報は、ゲフィチニブ感度のメカニズムの理解を著しく深めることになる。本発明人らは、患者の部分群におけるＥＧＦＲタンパク質発現とＰ－Ａｋｔ発現を比較し、概して、ＥＧＦＲおよびＰ－Ａｋｔタンパク質の発現は同じ細胞集団に見いだされ（データは示されず）、確認されたＰ－ＡｋｔはＥＧＦＲ活性の結果であることが示された。しかし、場合によっては、生物学的原因または技術的原因によるものでありうる差異が発現に見いだされた（すなわち、ある細胞はＥＧＦＲを発現し、Ｐ－Ａｋｔを発現せず、逆もまた同じであった）。

【０１６２】

結論として、この調査の結果は、ゲフィチニブは抗ＥＧＦＲタンパク質発現およびＥＧＦＲタンパク質／変異、ＥＧＦＲタンパク質／ＦＩＳＨの組合せを有する進行ＮＳＣＬＣ患者に有効であることを実証している。ＩＨＣは、ゲフィチニブ治療の候補となるＮＳＣＬＣ患者を選択するのに理想的な試験である。高いＥＧＦＲ発現またはＰ－Ａｋｔを有する患者は、より良好な応答、疾病抑制率、無進行期間および生存期間を有していたため、Ａｋｔタンパク質の活性化状態の分析も適正な患者選択に関係するものと考えられる。

【０１６３】

実施例４

以下の実施例では、ＮＳＣＬＣ患者におけるＥＧＦＲ阻害剤に対する結果（イタリア調査団）を予測するためにＨＥＲ２遺伝子増幅およびＨＥＲ２多染色体性を使用することを実証する調査の結果を要約する。

【０１６４】

これらの実験では、ゲフィチニブで治療された１０２人の進行段階ＮＳＣＬＣ患者の集団において、ＦＩＳＨにより細胞毎のＨＥＲ２遺伝子コピー数を測定し、免疫組織化学によりＨＥＲ２タンパク質レベルを測定し、ＨＥＲ２エキソン２０における変異を評価した。

【０１６５】

結果および結論

ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ分析を１０２人の患者で実施した。ＨＥＲ２の高いコピー数（高多染色体性および遺伝子増幅：ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋）を有する患者は、症例の２２．８％を占め、遺伝子増加がないか、または低い患者（ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－）と比較して有意に良好な奏功率（ＯＲ：３４．８％対６．４％、ｐ＝０．００１）、疾病抑制率（ＤＣＲ：５６．５％対３３．３％、ｐ＝０．０４）および無進行期間（ＴＴＰ：９．０５対２．７カ月、ｐ＝０．０２）、およびより長い生存期間に向かう傾向（ＯＳ：２０．８対８．４カ月、ｐ＝０．０５６）を有していた。

【０１６６】

７２人の患者においてＨＥＲ２タンパク質発現を調べたところ、５人（７％）の患者が高レベルのＨＥＲ２発現に対して陽性であった。この集団では応答または生存との有意な関連性は検出されなかったが、チロシンキナーゼ阻害剤に関連するＨＥＲ２タンパク質発現の究極的な臨床的役割をより大きい調査集団で調べる必要がある。

【０１６７】

８９人の患者においてＨＥＲ２遺伝子のエキソン２０を配列したところ、すべての患者が変異に対して陰性であった。したがって、ＨＥＲ２遺伝子のチロシンキナーゼ領域における変異は頻度が低く、臨床的に意味がないように思われる。

【０１６８】

結論として、この調査は、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋　ＮＳＣＬＣを有する患者は、より高い奏功率および疾病抑制率、およびより長い無進行期間によって示されるＴＫＩゲフィチニブ治療が臨床上有効であることを示した。

【０１６９】

実施例５

以下の実施例では、ＮＳＣＬＣ患者（イタリア調査団）におけるＥＧＦＲ阻害剤に対する結果を予測するために、ＥＧＦＲ遺伝子増幅および多染色体性とともにＨＥＲ２遺伝子増幅および多染色体性を使用することを実証する調査の結果を要約する。

【０１７０】

この調査では、本明細書において先述した手法を用いて、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨパターン分析をＥＧＦＲ　ＦＩＳＨパターン分析と組み合わせた。

結果は、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ＋腫瘍を有する患者は両受容体に対して陰性の患者より有意に良好なＯＲおよびＤＣＲを有することを示した。高いコピー数の両遺伝子（ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ＋）を有する患者は、最も高いＯＲ（５３．８％）およびＤＣＲ（７６．９％）を有しており、これらの結果は、ＨＥ

Ｒ２　ＦＩＳＨ－および／またはＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ－腫瘍を有する患者（ＯＲ：６．８％　、ｐ＜０．００１；ＤＣＲ：３３．０％、ｐ＝０．００２）において確認された結果より有意に良好であった。ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ－患者は、二重陽性患者よりＯＲが低かったが、その差は統計的に有意なものではなかった（ＯＲ：２１．０％。ｐ＝０．０７）。ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ＋患者と二重陰性ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－／ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ－患者の間に応答差は確認されなかったが（ＯＲ：１０．０％対１．６％、ｐ＝０．２７；ＤＣＲ：３０．０％対２５．４％、ｐ＝０．７１）、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋および／またはＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ＋と比較した場合に後者の群の方が有意に劣った結果を示した（ＯＲ：１．６％対２８．６％、ｐ＜０．００１；ＤＣＲ：２５．４対５７．１％、ｐ＝０．００１）。

【０１７１】

ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ＋腫瘍を有する患者は、両受容体に対して陰性の患者より有意に長い無進行期間および全生存期間を有していた。二重陽性ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ＋患者では、ＴＴＰ中央値およびＯＳは、それぞれ９．８および２０．８カ月で、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－および／またはＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ－群において確認された期間（ＴＴＰ：２．６カ月、ｐ＝０．００７；ＯＳ：８．３カ月、ｐ＝０．０４）より有意に長く、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－／ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ＋患者（ＴＴＰ：５．３カ月、ｐ＝０．２０；ＯＳ：９．３カ月、ｐ＝０．１３）と比較した場合に有意な傾向は示されなかった。ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ－腫瘍を有する患者は、二重陰性群と同様の劣った結果を示した（ＴＴＰ：２．３対２．６カ月、ｐ＝０．４、ＯＳ：６．０対７．３カ月、ｐ＝０．４）。

【０１７２】

実施例６

以下の実施例では、ＮＳＣＬＣ腫瘍を有する患者におけるＥＧＦＲ阻害剤に対する結果を予測するために、ＥＧＦＲタンパク質レベルの検出とともにＨＥＲ２遺伝子増幅およびＨＥＲ２多染色体性を使用することを実証する調査の結果を要約する。

【０１７３】

これらの調査では、本明細書において先述した手法を用いて、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨパターンを免疫組織化学（ＩＨＣ）によって測定されたＥＧＦＲタンパク質発現と組み合わせた。

【０１７４】

ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＩＨＣ＋腫瘍を有する患者は、両受容体に対して陰性の患者より有意に良好なＯＲおよびＤＣＲを有していた。二重陽性ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＩＨＣ＋患者では、他のすべての患者の群と比較した場合にＯＲおよびＤＣＲが有意に良好であった（ＯＲ：５３．８％対７．１％、ｐ＜０．００１；ＤＣＲ：７６．９対３４．５、ｐ＝０．００４）。二重陽性患者とＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－／ＥＧＦＲ　ＩＨＣ＋患者との間にはＯＲに有意な差が確認された（ＯＲ：１１．１％、ｐ＝０．００３）。ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＩＨＣ－と、ＯＲおよびＤＣＲが他の３つの群を合わせたものより有意に劣っていた二重陰性ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－／ＥＧＦＲ　ＩＨＣ－との間に差が見られなかった（ＯＲ：０％対１９．１％、ｐ＝０．００９；ＤＣＲ；１３．７％対５１．５％、ｐ＝０．００１）。

【０１７５】

ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＩＨＣ＋腫瘍を有する患者は、また、両受容体に対して陰性の患者より有意に長い無進行期間および全生存期間を有していた。二重陽性患者（ＨＥＲ　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＩＨＣ＋）では、他の３つの患者群と合わせたものと比較した場合にＴＴＰおよび生存期間が有意に長く（ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－および／またはＥＧＦＲ　ＩＨＣ－；ＴＴＰ：１２．３対２．６カ月、ｐ＝０．００６；ＯＳ：２０．８対８．４カ月、ｐ＝０．０３０）、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－／ＥＧＦＲ　ＩＨＣ＋腫瘍を有する患者（ＴＴＰ：４．２カ月、ｐ＝０．０４６；ＯＳ：１１．３、ｐ＝０．１２）と比較した場合に、ＴＴＰが有意に長く、より良好な生存期間へ向かう傾向があった。ＨＥ

Ｒ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ　ＩＨＣ－腫瘍を有する患者は二重陰性群より同様の劣った結果を示した（ＴＴＰ：２．３対２．１カ月、ｐ＝０．０６；ＯＳ：３．３対５．０カ月、ｐ＝０．３９）。

【０１７６】

実施例７

以下の実施例では、ＮＳＣＬＣ腫瘍を有するＥＧＦＲ阻害剤に対する結果を予測するために、ＥＧＦＲ遺伝子における変異の検出とともにＨＥＲ２遺伝子増幅およびＨＥＲ２多染色体性を使用することを実証する調査の結果を要約する。

【０１７７】

本実施例では、本明細書において先述した手法を用いて、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨパターンをＤＮＡ配列により決定したＥＧＦＲ遺伝子における変異の存在と組み合わせた。

ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ変異＋腫瘍を有する患者は、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－および／またはＥＧＦＲ変異－の患者（ＯＲ：５．０％、ｐ＜０．００１；ＤＣＲ：３１．３％、ｐ＝０．００３）より有意に高い最良のＯＲおよびＤＣＲ（ともに８７．５％）を有していた。７人のＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－／ＥＧＦＲ変異＋患者のうち１人の患者が応答し（ＯＲ：１４．２％）、１人の患者が安定性を有していた（ＤＣＲ：２８．５％）。ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ変異－群では誰も応答せず、ＤＣＲは２７．２％であった。これらの結果は、ＯＲが他の群を合わせたもの（ＯＲ：３０．８％、ｐ＝０．００２）より有意に劣っていた二重陰性ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－／ＥＧＦＲ変異－患者（ＯＲ：４．８％、ｐ＝１．０；ＤＣＲ：３２．２％、ｐ＝１．０）において確認された結果と差がなかった。

【０１７８】

ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋／ＥＧＦＲ変異＋腫瘍を有する患者は、他の患者を合わせたもの（ＴＴＰ：１５．５対２．６カ月、ｐ＝０．００３；ＯＳ：未到達対８．３、ｐ＝０．００１）と比較した場合も、ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ－／ＥＧＦＲ変異＋の患者（ＴＴＰ：２．８カ月、ｐ＝０．００４；ＯＳ：５．７、ｐ＝０．０３０）と比較した場合も有意に長いＴＴＰおよびＯＳを有していた。ＥＧＦＲ変異－／ＨＥＲ２　ＦＩＳＨ＋の患者の群は、ＴＴＰ（２．３カ月）およびＯＳ（６．５カ月）に関して、結果が最も劣っていた。

【０１７９】

実施例８

イタリア調査団と南西部腫瘍臨床試験グループ調査０１２６を組み合わせた調査に基づいて、個別試験ならびに試験の組合せの予測的役割に対するさらなる裏付けを行う。

【０１８０】

（１）ＮＳＣＬＣ患者におけるＥＧＦＲ阻害剤の臨床効果に対する予測マーカーとしてのＥＧＦＲ遺伝子コピー数の増加の裏付け

コロラド大学癌センターは２つの臨床試験の実験室的分析を行った。本発明人らは、より実質的な統計分析および裏付けを行うために、全部で２０４人のＮＳＣＬＣ患者を含む統合データ集合を分析した。１つは、少なくとも１つの先行化学療法が失敗した後に、進行非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）の患者を毎日２５０ｍｇのゲフィチニブで治療したイタリアの試験（患者数１０２人）である。他の臨床試験は、細気管支肺胞癌（ＢＡＣ）またはＢＡＣの特徴を有する腺癌の１３６人の患者において、南西部腫瘍臨床試験グループ（ＳＷＯＧ）が行ったものである。表１２および１３は、統合的な患者およびＥＧＦＲ　ＩＨＣ、ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ、ＥＧＦＲ変異、リン酸化ＡｋｔおよびＫＰａｓ状態を示す。

【０１８１】

【表１３】

表12

| | イタリア調査団 | S0126集団 | 合計 |
|---|---|---|---|
| 男性 | 68(65%) | 48(48%)* | 116(57%) |
| 女性 | 36(35%) | 52(52%) | 88(43%) |
| 現行/元喫煙者 | 89(86%) | 73(73%)* | 162(79%) |
| 非喫煙者 | 15(14%) | 27(27%) | 42(21%) |
| 一般状態0～1 | 91(87%) | 86(86%) | 177(87%) |
| 一般状態2 | 13(13%) | 14(14%) | 27(13%) |
| 腺癌 | 55(53%) | 44(45%) | 99(49%) |
| BAC | 9(9%) | 54(55%) | 63(31%) |
| 大細胞 | 2(2%) | | 2(1%) |
| 扁平細胞 | 26(25%) | | 26(13%) |
| 未分化 | 12(12%) | | 12(6%) |
| 段階IIIの疾病 | 14(13%) | 7(7%) | 21(11%) |
| 段階IVの疾病 | 90(87%) | 89(93%) | 179(89%) |
| 全奏功 | 13% | 17% | 15% |
| 病勢コントロール | 39% | 48% | 43% |
| 無進行期間中央値 | 3(2-4) | 4(3-6)* | 3(3-4) |
| 生存期間中央値 | 9(6-11) | 14(10-18)* | 11(8-14) |
| 1年生存率 | 41%(31-51) | 55%(45-64) | 48%(41-55) |

*p＜0.05

【０１８２】

【表１４】

表13

| | EGFR IHC + | EGFR IHC − | EGFR FISH + | EGFR FISH − | EGFR M+ | EGFR M− | PAKT+ | PAKT− | KRAS+ | KRAS− |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 男性 | 68/121 (56%) | 45/79 (57%) | 30/59 (51%) | 77/124 (62%) | 18/43 (42%) | 72/113 (64%) | 72/127 (57%) | 30/57 (53%) | 25/36 (69%) | 58/102 (57%) |
| 女性 | 53/121 (44%) | 34/79 (43%) | 29/59 (49%) | 47/124 (38%) | 25/43 (58%) | 41/113 (36%) | 55/127 (43%) | 27/57 (47%) | 11/36 (31%) | 44/102 (43%) |
| | χ平方 p値=0.915 | | χ平方 p値=0.149 | | χ平方 p値=0.014 | | χ平方 p値=0.608 | | χ平方 p値=0.185 | |
| 現行/元喫煙者 | 99/121 (82%) | 59/79 (75%) | 42/59 (71%) | 104/124 (84%) | 30/43 (70%) | 96/114 (84%) | 26/127 (20%) | 12/57 (21%) | 33/36 (92%) | 80/102 (78%) |
| 非喫煙者 | 22/121 (18%) | 20/79 (25%) | 17/59 (29%) | 20/124 (16%) | 13/43 (30%) | 18/114 (16%) | 101/127 (80%) | 45/57 (79%) | 3/36 (8%) | 22/102 (22%) |
| | χ平方 p値=0.226 | | χ平方 p値=0.046 | | χ平方 p値=0.045 | | χ平方 p値=0.928 | | χ平方 p値=0.076 | |
| 腺癌 | 58/120 (48%) | 38/78 (49%) | 31/58 (53%) | 54/124 (44%) | 24/42 (57%) | 58/112 (52%) | 59/126 (47%) | 26/57 (46%) | 21/36 (58%) | 45/101 (45%) |
| BAC | 36/120 (30%) | 27/78 (35%) | 15/58 (26%) | 43/124 (35%) | 13/42 (31%) | 27/112 (24%) | 43/126 (34%) | 19/57 (33%) | 14/36 (39%) | 29/101 (29%) |
| 大細胞 | 1/120 (1%) | 1/78 (1%) | 1/58 (2%) | 1/124 (1%) | 0/42 (0%) | 1/112 (1%) | 1/126 (1%) | 1/57 (2%) | 0/36 (0%) | 1/101 (1%) |
| 扁平細胞 | 18/120 (15%) | 8/78 (10%) | 9/58 (16%) | 17/124 (14%) | 2/42 (5%) | 19/112 (17%) | 17/126 (13%) | 8/57 (14%) | 1/36 (3%) | 18/101 (18%) |
| 未分化 | 7/120 (6%) | 4/78 (5%) | 2/58 (3%) | 9/124 (7%) | 3/42 (7%) | 7/112 (6%) | 6/126 (5%) | 3/57 (5%) | 0/36 (0%) | 8/101 (8%) |
| | χ平方 p値=0.867 | | χ平方 p値=0.536 | | χ平方 p値=0.347 | | χ平方 p値=0.984 | | χ平方 p値=0.051 | |

表１４（以下参照）に示されるように、調査では１８３人の患者がＦＩＳＨ分析を施され、５２人（３２％）の患者がＥＧＦＲ「ＦＩＳＨ陽性」であった（高多染色体性または遺伝子増幅を有していた）、「全奏功」率は、ＦＩＳＨ陽性群では３３％であったのに対して、ＦＩＳＨ陰性（二染色体性、三染色体性および低多染色体性）群では６％であった（ｐ＜０．００１）。「病勢コントロール」率（奏功＋安定）は、ＦＩＳＨ陽性群では６５％であったのに対して、ＦＩＳＨ陰性群では３０％であった（ｐ＜０．００１）。無進行期間（ＴＴＰ）は、ＦＩＳＨ陽性群では９カ月（９５％ＣＩ：５～１０）であったのに対して、ＦＩＳＨ陰性群では３カ月（９５％ＣＩ：２～３）であった（ｐ＜０．００１）

。中央値生存期間は、ＦＩＳＨ陽性群では１８カ月（９５％ＣＩ：１４～２１）であったのに対して、ＦＩＳＨ陰性群では8カ月（９５％ＣＩ：６～１１）であり（ｐ＝０．００２）、１年生存率は、ＦＩＳＨ陽性群では６８％（９５％ＣＩ：５６～８０％）であったのに対して、ＦＩＳＨ陰性群では３７％（９５％ＣＩ：２９～４６％）であった。

【０１８３】

結論として、この統合データ分析により、ＥＧＦＲ遺伝子コピー数が増加した患者（「ＦＩＳＨ－陽性」では、ＦＩＳＨ陰性患者と比較して、応答、疾病抑制率、無進行期間および生存期間が統計的に有意に良好であることが実証された。現在１８３人の患者を含むこれらの分析は、イタリア調査団（カップゾら（Ｃａｐｐｕｚｚｏ　ｅｔ　ａｌ．）、２００５　ＪＮＣＩ）および南西部腫瘍臨床試験グループ調査（ヒルシュら（Ｈｉｒｓｃｈ　ｅｔ　ａｌ．）、ＪＣＯ　ｉｎ　ｐｒｅｓｓ　２００５）による個々の結果を裏づけるものである。

【０１８４】

（２）ＮＳＣＬＣ患者におけるＥＧＦＲ阻害剤の臨床効果に対する予測マーカーとしての、免疫組織化学によって検出されたＥＧＦＲタンパク質発現の裏付け

表１４に示されるように、免疫組織化学により、２０３人の患者におけるＥＧＦＲタンパク質発現を測定した。１２１人（６１％）の患者においてＥＧＦＲタンパク質が陽性とみなされた。ＥＧＦＲ陽性患者における全奏功は２２％であったのに対して、ＥＧＦＲ陰性群では５％であり（ｐ＝０．００２）、疾病抑制率は前者が５６％であったのに対して後者は２７％であった（ｐ＜０．００１）。ＥＧＦＲ陽性患者では無進行期間が５カ月（９５％ＣＩ：３～７）であったのに対して、ＥＧＦＲ陰性患者では3カ月であり（ｐ＝０．００６）、前者では中央値生存期間が１４カ月（９５％ＣＩ：１１～２１）であったのに対して、後者では7カ月（５～１０）であった（ｐ＝０．００３）。１年生存率は、ＥＧＦＲ陽性群では５６％（９５％ＣＩ：４７～６５％）であったのに対して、ＥＧＦＲ陰性群では３７％（２６～４８％）であった。

【０１８５】

結論として、免疫組織化学によって測定されたＥＧＦＲタンパク質発現は、ＥＧＦＲ陰性患者群と比較して、ＥＧＦＲ阻害剤による治療後における有意に良好な応答、疾病抑制率、中央値生存期間および１年生存率をもたらした。

【０１８６】

【表１５】

表14

| | No. pts | OR | DC | TTP | MS | 1年OS |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FISH + | 59(32%) | 33% | 65% | 9(5-10) | 18(14-21) | 68%(56%-80%) |
| FISH - | 124(68%) | 6% | 30% | 3(2-3) | 8(6-11) | 37%(29%-46%) |
| | | p値<0.001 | p値<0.001 | p値<0.001 | p値=0.002 | |
| IHC + | 121(61%) | 22% | 56% | 5(3-7) | 14(11-21) | 56%(47%-65%) |
| IHC- | 79(40%) | 5% | 27% | 3(2-3) | 7(5-10) | 37%(26%-48%) |
| | | p値=0.002 | p値<0.001 | p値=0.006 | p値=0.003 | |
| EGFR変異+ | 43(28%) | 39% | 52% | 3(2-11) | 13(6-21) | 52%(37%-68%) |
| EGFR変異- | 113(72%) | 7% | 37% | 3(2-4) | 11(7-13) | 46%(37%55%) |
| | | p値<0.001 | p値=0.151 | p値=0.180 | p値=0.210 | |
| P-AKT + | 127(69%) | 20% | 49% | 4(3-5) | 13(10-16) | 52%(43%-61%) |
| P-AKT - | 57(31%) | 2% | 33% | 3(2-5) | 8(6-14) | 41%(28%-54%) |
| | | p値=0.005 | p値=0.10 | p値=0.09 | p値=0.34 | |
| KRAS変異+ | 36(26%) | 7% | 39% | 3(2-4) | 11(6-23) | 49%(33%-66%) |
| KRAS変異- | 102(74%) | 19% | 40% | 3(2-4) | 12(8-15) | 50%(40%-60%) |
| | | p値=0.237 | p値=0.99 | p値=0.890 | p値=0.890 | |

（３）免疫組織化学によるＥＧＦＲタンパク質評価とＦＩＳＨによるＥＧＦＲ遺伝子コピー数とを組み合わせると、ＥＧＦＲ阻害剤治療後に良好な結果が得られることが確実に予測され、ＥＧＦＲタンパク質とＦＩＳＨによる遺伝子コピー数との双方に対して「陰性」結果を有する患者を利用して、ＮＳＣＬＣ患者の中でＥＧＦＲ阻害剤が臨床的に有効でない肺癌患者を選択することが可能である。

【０１８７】

統合データ分析から２つの明確な結果が得られた。

表１５に示されるように、「ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ陽性」かつ「ＥＧＦＲ　ＩＨＣ陽性」である４２人の患者では、奏功率は４１％と高く、７６％が疾病抑制を示した。「二重陽性」患者群の無進行期間は９カ月（９５％ＣＩ：６～１７カ月）、中央値生存期間は２１カ月（９５％ＣＩ：１５～２１）、１年生存率は７７％（９５％ＣＩ：６３～９０）であった。対照的に、「二重陰性」患者群（「ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ陰性」かつ「ＥＧＦＲ　ＩＨＣ陰性」の患者）の対応値は、奏功率が２％、疾病抑制率が１７％であり、無進行期間が２カ月であり、中央値生存期間が６カ月であり、１年生存率が３０％であった。すべて

のパラメータにおいて統計的有意差（ｐ＜０．００１）が存在した。

【０１８８】

【表１６】

表15. FISHおよびIHCの結果の統合(n＝179患者)

| | No. pts | RSP | DCR | TTP(月) | MS(月) | 1年 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FISH+/IHC+ | 42 | 41%<br>p値*< 0.001 | 76%<br>p値*< 0.001 | 9(6-16)<br>p値*< 0.001 | 21(15-21)<br>p値*< 0.001 | 77%(63-90) |
| FISH+またはIHC+ | 83 | 10% | 43% | 3(2-5) | 11(7-15) | 44%(33-55) |
| FISH-/IHC- | 54 | 2% | 17% | 2(2-3) | 6(4-8) | 30%(18-43) |

*FISH＋／IHC＋対他の2つの群のp値

結論として、腫瘍が（免疫化学により検出される）ＥＧＦＲタンパク質と（ＦＩＳＨにより検出される）高いＥＧＦＲ遺伝子コピー数を強く発現する肺癌患者は、「二重陰性」査定の患者と比較して、ＥＧＦＲ阻害剤治療後に、高い奏功率および疾病抑制率、有意に長い生存期間を有する。

【０１８９】

「二重陰性」（ＥＧＦＲタンパク質過剰発現がないか低い、かつＥＧＦＲ遺伝子の増加がないか低い）と判断されたＮＳＣＬＣの患者は、ＥＧＦＲ阻害剤治療が有効である可能性は極めて低く、この治療を受けるべきではない。

【０１９０】

したがって、ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ－とＩＨＣ検定の組合せを用いて、ＥＧＦＲ治療が有効であるＮＳＣＬＣ患者と期待される臨床的恩恵を受けない患者とを選別する必要がある。

【０１９１】

（４）ＥＧＦＲ変異とＥＧＦＲタンパク質発現の組合せ

表１６に示されるように、ＥＧＦＲ変異とＥＧＦＲタンパク質発現の双方に対して陽性判定を受けた２８人の患者では、二重陽性判定を受けた患者の奏功率は５０％であり、疾病抑制率は６０％であり、無進行期間は１０カ月であり、中央値生存期間は２１カ月であり、１年生存率は６３％であった。二重陰性判定を受けた患者の対応値は、１２％、２５％、２カ月、７カ月および３７％であった。

【０１９２】

【表１７】

表16. EGFR変異およびIHCの結果の統合(n＝152患者)

| | No. pts | RSP | DCR | TTP(月) | MS(月) | 1年 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| EGFR+/IHC+ | 28 | 50%<br>p値*<0.001 | 60%<br>p値*=0.086 | 10(2-16)<br>p値*=0.04 | 21(10-21)<br>p値*=0.06 | 63%(45-81) |
| EGFR+/またはIHC+ | 77 | 12% | 47% | 3(2-5) | 12(8-15) | 50%(39-61) |
| EGFR-/IHC- | 47 | 2% | 25% | 2(2-3) | 7(5-12) | 37%(23-51) |

*EGFR＋／IHC＋対他の2つの群のp値

結論として、ＥＧＦＲ変異とＥＧＦＲタンパク質発現との組合せを用いて、ＥＧＦＲ阻害剤治療が有効である可能性が極めて低い肺癌患者から、そが有効である患者を選別することが可能である。

【０１９３】

（５）ＮＳＣＬＣ患者におけるＥＧＦＲ阻害剤に対する結果に対する予測手段としてのＥＧＦＲタンパク質発現と活性（リン酸化）ＡＫＴタンパク質発現との組合せ

表１７に示されるように、１８２人の患者が、（ＩＨＣにより検出される）ＥＧＦＲタンパク質発現および（ＩＨＣにより検出される）リン酸化ＡＫＴ発現に対する陽性判定を受けた。７８人の患者に要請判定が認められ、彼らは、３０％の奏功率、６４％の疾病抑制率、６カ月の無進行期間、１６カ月の中央値生存期間、および６３％の１年生存率を有していた。

【０１９４】

【表１８】

表17. P－AKTおよびIHCの結果の統合（n＝182患者）

| | No. pts | RSP | DCR | TTP(月) | MS(月) | 1年 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| P-AKT+/IHC+ | 78 | 30%<br>p値*<0.001 | 64%<br>p値*=0.003 | 6(4-10)<br>p値*<0.001 | 16(12-21)<br>p値*=0.004 | 63%(51-74) |
| P-AKT +<br>または<br>IHC + | 84 | 6% | 34% | 3(2-3) | 8(6-14) | 43%(32-54) |
| P-AKT-/<br>IHC- | 23 | 0% | 21% | 2(2-4) | 6(5-9) | 30%(12-49) |

*P－AKT＋／IHC＋対他の2つの群のp値

対照的に、二重陽性判定を受けた２３人の患者では、誰も奏功を示さず、２１％が疾病抑制を示し、無進行期間は２カ月であり、中央値生存期間は６カ月であり、１年生存率は３０％であった。言及したすべての臨床結果パラメータにおいて、二重陽性群と二重陰性群の間に統計的な差（ｐ＜０．０５）が存在した。

【０１９５】

結論として、ＩＨＣにより検出されるＥＧＦＲとＩＨＣにより検出されるリン酸化ＡＫＴとの組合せを用いて、ＥＧＦＲ阻害剤治療が臨床上有効である可能性が極めて高い肺癌患者と、当該治療が臨床上有効である可能性が極めて低い患者とを選別することが可能である。

【０１９６】

（６）ＮＳＣＬＣ患者におけるＥＧＦＲ阻害剤に対する結果に対する予測手段としての、ＦＩＳＨにより検出される遺伝子コピー数の増加とＥＧＦＲ変異との組合せ

表１８に示されるように、ＥＧＦＲ遺伝子コピー数およびＥＧＦＲ変異の双方について、合計１４３人の患者を調査した。

【０１９７】

【表１９】

表18. FISHおよびEGFR変異の結果の統合（n＝143患者）

| | No. Pts | RSP | DCR | TTP(月) | MS(月) | 1年 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| FISH+/<br>EGFR+ | 17 | 69%<br>p値*<0.001 | 69%<br>p値*=0.031 | 16(3-20)<br>p値*=0.004 | NR<br>p値*=0.003 | 67%(71-100) |
| FISH+<br>または<br>EGFR + | 46 | 15% | 45% | 3(2-5) | 10(5-14) | 45%(30-59) |
| FISH-/<br>EGFR- | 80 | 3% | 29% | 3(2-3) | 10(6-13) | 42%(31-53) |

*FISH＋／EGFR＋対他の2つの群のp値

二重陽性判定を受けた１７人の患者では、奏功率は６９％であり、疾病抑制率は６９％であり、無進行期間は１６カ月であり、中央値生存期間はまだ到達されていないが、２０カ月を超え、１年生存率は６７％であった。これらのすべてのパラメータは、二重陰性判定を受けた患者の結果より統計的に有意に良好であった。二重陰性患者は、奏功率が３％であり、疾病抑制率が２９％であり、無進行期間が３カ月であり、中央値生存期間が１０カ月であり、１年生存率が４２％であった。

【０１９８】

結論として、ＦＩＳＨにより検出される遺伝子コピー数の増加とＥＧＦＲ変異との組合せを用いて、ＥＧＦＲ阻害剤治療が臨床上有効である患者を選択することが可能である。

（７）ＥＧＦＲ遺伝子コピー数の増加と、ＥＧＦＲタンパク質発現とＥＧＦＲ変異との組合せは、ＮＳＣＬＣ患者におけるＥＧＦＲ阻害剤治療に対する優れた結果をもたらす。

【０１９９】

表１９に示されるように、イタリア調査団および南西部腫瘍臨床試験グループによる統合データ分析により、三重陽性判定を受けた１２人の患者では、７８％の極めて高い奏功率、７８％の疾病抑制率、２０カ月の無進行期間、まだ到達されていないが、２０カ月を超える中央値生存期間、および１００％の１年生存率を示すことが実証された。

【０２００】

【表２０】

表19

| FISH | IHC | EGFR | n | OR | DCR | TTP | OS | 1年生存率 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + | + | + | 12 | 78% | 78% | 20(11-20) | NR | 100% |
| + | + | - | 20 | 22% | 61% | 5(3-12) | 15(6-16) | 64%(42-86) |
| + | - | + | 5 | 50% | 50% | 3(2-9) | NR | 60%(17-100) |
| - | + | + | 12 | 22% | 44% | 4(2-7) | 11(3-11) | 42%(1470) |
| + | - | - | 8 | 0% | 39% | 2(1-6) | 9(1-9) | 38%(7-66) |
| - | + | - | 39 | 3% | 41% | 3(2-5) | 11(8-18) | 49%(33-64) |
| - | - | + | 6 | 0% | 0% | 2(1-2) | 3(1-3) | 0%(0-30) |
| - | - | - | 37 | 3% | 21% | 2(2-3) | 6(4-12) | 37%(21-52) |

結論として、ＦＩＳＨにより検出されるＥＧＦＲ遺伝子コピー数の増加と、ＩＨＣにより検出されるＥＧＦＲタンパク質発現と、ＥＧＦＲ変異との組合せを用いて、ＥＧＦＲ阻害剤治療後に良好な臨床結果を有する患者を選択することが可能である。

【０２０１】

（８）ＥＧＦＲ遺伝子コピー数と、ＥＧＦＲタンパク質発現と、リン酸化ＡＫＴ発現との組合せは、ＮＳＣＬＣ患者に対するＥＧＦＲ阻害剤治療後の優れた臨床結果をもたらす。

【０２０２】

表２０に示されるように、イタリア調査団および南西部腫瘍臨床試験グループ調査による統合データ分析において、我々は、三重陽性判定を受けた患者は、４３％の高い奏功率、８０％の疾病抑制率、１２カ月の無進行期間、まだ到達されていないが、２０カ月を超える中央値生存期間、および８４％の１年生存率を有することを実証した。

【０２０３】

【表２１】

表20

| FISH | IHC | P-AKT | N | OR | DCR | TTP | OS | 1年生存率 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + | + | + | 34 | 43% | 80% | 12(6-19) | NR | 84%(70-97) |
| + | + | - | 4 | 0% | 67% | 9(2-9) | 18(5-18) | 75%(33-100) |
| + | - | + | 15 | 15% | 46% | 3(2-6) | 14(3-19) | 53%(28-79) |
| - | + | + | 35 | 13% | 47% | 4(2-6) | 11(6-15) | 43%(26-59) |
| + | - | - | 2 | 0% | 0% | 2(NA) | 9(NA) | 0%(0-69) |
| - | + | - | 23 | 6% | 50% | 4(2-7) | 9(7-9) | 47%(27-68) |
| - | - | + | 32 | 4% | 18% | 2(2-3) | 6(4-10) | 29%(13-44) |
| - | - | - | 17 | 0% | 14% | 2(2-5) | 6(4-12) | 29%(8-51) |

（９）多変数分析により、ＥＧＦＲ遺伝子コピー数の増加とＥＧＦＲタンパク質発現の増加の双方は、ともに、ＥＧＦＲ阻害剤で治療されたＮＳＣＬＣ患者における生存に関する結果に対する独立した予後予測因子であることが実証される。

【０２０４】

イタリア調査団および南西部腫瘍臨床試験グループ臨床試験０１２６によるデータを含む多変数分析により、ＦＩＳＨによって検出されるＥＧＦＲ遺伝子コピー数の増加と、ＩＨＣによって検出されるＥＧＦＲタンパク質発現の増加は、ともに、生存についての独立した予後／予測因子になることが実証された（表２１）。多変数分析は、後方段階的回帰法を用いることによる臨床および生物マーカーを含む最初の一変数分析に基づく。すべての一変数的に有意な共変数を段階的選択に含めた。

【０２０５】

【表２２】

表21．ゲフィチニブで治療された179人のNSCLC患者における予測／予後因子の多変数分析

| 変数 | 患者数 | HR | p値 |
|---|---|---|---|
| 現行/元喫煙者 | 142 | 2.68 | 0.0005 |
| 一般状態2 | 24 | 3.64 | 0.0001 |
| FISH- | 120 | 1.87 | 0.006 |
| IHC- | 71 | 1.70 | 0.007 |

結論として、ＦＩＳＨにより検出されるＥＧＦＲ遺伝子コピー数、ＩＨＣにより検出されるＥＧＦＲタンパク質発現、および活性（リン酸化）ＡＫＴのマーカーの各々を、ＥＧＦＲ阻害剤治療後に良好な臨床結果を有する肺癌患者の選択に用いることが可能である。２つの調査に基づいて実施された統合データ分析により、試験の組合せは、どの患者がＥＧＦＲ阻害剤が有効であり、どの患者がそうでないかについての極めて高度な予測を与えることが示された。ＦＩＳＨによるＥＧＦＲ遺伝子コピー数と、ＩＨＣによるＥＧＦＲタンパク質発現との分析の組合せは、未選択患者の結果と比較して、高い応答、長い無進行期間および有意に長い生存期間（中央値２１カ月）に対する極めて確実な予測を実証した。それらのデータにより、ＥＧＦＲ遺伝子コピー数がゼロまたは小さい患者（ＦＩＳＨ陰性）およびＥＧＦＲタンパク質発現がない、または低い患者は、反答者が存在せず、安定疾患を有するものとして分類されたのは１人しかいなかったため、ＥＧＦＲ阻害剤治療が有効でないことも示された。しかし、無進行期間は非常に短く、この群における中央値生存期間は６カ月であった。「二重陰性」の判定を受けた患者の群は、少なくとも１つの先の化学療法においてすでに失敗した類似群の進行ＮＳＣＬＣ患者に偽薬またはエルロチニブが無作為に割り当てられたカナダの調査における偽薬治療患者と類似の結果を有していた（タオら（Ｔｓａｏ　ｅｔ　ａｌ．）、ＪＣＯ　２３：１６Ｓ：６２２Ｓ　＃７００７

）。したがって、２つの確立された臨床適用可能試験（ＦＩＳＨおよびＩＨＣ）の組合せは、本発明人らの調査において、ＥＧＦＲ阻害剤に対する癌患者の選択のための有意な値を有することが実証された。

【０２０６】

実施例９

以下の実施例では、ＦＩＳＨにより検出されるＥＧＦＲおよびＨＥＲ２遺伝子コピー数は、ＮＳＣＬＣ細胞系におけるセツキシマブ（Ｃｅｔｕｘｉｍａｂ）（Ｃ２２５、Ｅｒｂｉｔｕｘ（商標）ＢＭＳ／Ｉｍｃｌｏｎｅ）に対する感度に対応づけられることを実証する。

【０２０７】

２５のＮＳＣＬＣ細胞系において実施された調査により、５つの細胞系はセツキシマブに対して感度を有し（ＩＣ５０＜１μＭ）、２０の細胞系は抵抗を有する（ＩＣ５０＞１μＭ）ことが示された。感度を有する５つのすべての細胞系、すなわちＨ８２７、Ｈ３２５５、Ｈ３５８、Ｈ２２７９およびＣａｌｕ３は、ＦＩＳＨによるＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ２遺伝子増幅を示した。逆に、セツキシマブに対して抵抗を有する２０のＮＳＣＬＣ細胞系のうち、ＥＧＦＲまたはＨＥＲ２遺伝子増幅を有するものはなく、６つの細胞系のみが、ＥＧＦＲおよび／またはＨＥＲ２に対する高多染色体性を有していた。高レベルの遺伝子増加およびゼロ／低レベルの遺伝子増加を示すＮＳＣＬＣ細胞系の分布は、セツキシマブ敏感細胞系とセツキシマブ抵抗性細胞系とで有意に異なっていた（χ平方１０．８４、＜０．００１）。これらの結果は、ＥＧＦＲおよびＨＥＲ２遺伝子のコピー数状態が抗体治療に対する感度の予測手段になるという結論を裏づけるものである。

【０２０８】

本願に引用されている各参考文献の全体を参照により援用する。２００４年５月２７日に出願された米国仮特許出願第６０／５７５，７８９号の全体を参照により本願に具体的に援用する。

【０２０９】

参照

Arteaga, Sem Oncol 2002;29:3-9.
Andrecheck et al. Proc Natl Acad Sc USA 2000;97:3444-49.
Armitage and Berry, Statistical Methods in Medical Research. Blackwell Scientific Publication Limited, Oxford, 1994.
Bailey et al., Lung Cancer 2003;41:s71(abstr).
Barsky et al., Cafacer 73: 1163-1170, 1994
Bartlett et al., J Pathol 2003;199:411-7.
Baselga et al., J Clin Oncol. 2002;20:4292-302.
Bianco et al. , Oncogene 2003;22:2812-22
Breathnach et al., Cancer 86: 1165-1173,1999
Cappuzzo et al., J Clin Oncol 2003;21:2658-63.
Cappuzzo et al., Proc Am Soc Clin Oncol 2004;23:3004.
Cappuzzo et al., Natl Cancer Inst 2004;96:1133-41.
Cappuzzo et al., J Natl Cancer Inst, in press.
Ciardello and Tortora, Clin Cancer Res 2001;7:2958-70.
Ciardiello et al., ClinCancer Res 2000;6:2053-63.
Cox, J R Stat Soc B 1972;34:187-220.
Datta SR, Genes andDevelopment 1999;13:2905-27.
Demetri et al., N Engl J Med 2002;347:472-80.
Druker et al., N Engl J Med 2001;344:1031-7.
Frederick et al., Cancer Res 2000;60,1383-87.
Fukuoka et al., J Clin Oncol. 2003;21:2237-46.
Furak et al., European J Cardio-Thoracic Surgery 23:818-823, 2003.

Gandara et al., Clin Cancer Res 10:4205-4209,2004.
Giaccone et al., J Clin Oncol 2004;22:777-84
Herbst et al., J Clin Oncol. 2002;20:3815-25.
Herbst et al., Proc Am Soc Clin Oncol 23;617,2004.
Hidalgo et al., J Clin Oncol. 2001;19:3267-79.
Hirsch et al., Lung Cancer 2003;41 Suppl 1: S29-42.
Hirsch et al., Br J Cancer 86:1449-1456, 2002
Hirsch et al., J Clin Oncol 2003;21:3798-807.
Hirsch et al., Lung Cancer 2003;41 Suppl 1:S29-42.
Janmaat et al., Clin Cancer Res 2003;9:2316-26.
Kaplan and Meier, J Am Stat Assoc 1985;53:457-81.
Kelly et al., J Clin Oncol. 2001;19:3210-8.
Kris et al., JAMA 2003;290:2149-58.
Kris et al., Lung Cartcer 2000;Suppl 1;29:233 abstract.
Levitt and Koty, Investig New Drugs 1999;7:213-26.
Levitzki and Gazit, Science 1995;267:1782-8.
Lynch et al., N Engl J Med 2004; 350:2129-39
Mantel N, Cancer Chemother Rep 50:163-170,1966.
Miller et al., J Clin Oncol. 2004;22:1103-9.
Miller et al., Proc Am Soc Clin Oncol 2003;22 (abstract 2491).
Non-small cell Lung Cancer Collaborative Group. BMJ 1995;311:899-909.
Oken et al., Am J Clin Oncol 1982;5:649-655.
Ono et al., Mol Cancer Tiler 2004;3:465-72
Paez et al., Science 2004;304:1497-1500.
Pao et al., PNAS 2004;101:13306-11.
Parkin, Lancet Oncology 2001,2:533-43.
Parra et al., Brit J Cancer, 91:208-212,2004.
Patel et al., Lung Cancer 41:S56, 2003 (suppl 2).
Perez-Soler et al., J Clin Oncol 2004;22:3238-47.
Perez-Soler et al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 20:310a 2001.
Ranson et al., J Clin Oncol. 2002;20:2240-50.
Reissmann et al., J Cancer Res Clin Oncol 1999;125:61-70.
Rosell et al., Clin Cancer Res 2004;10:1318-25.
Salomon et al., Crit Rev Oncol Heniatol 1995;19:183-232.
Salomon et al., Signal 2001;2:4-11.
Schiller et al., NEngl JMed 2002;346:92-8.
Shepherd et al., Proc Am SocClin Oncol 2004; 23 (abstract).
Slamon et al., N Engl JMed 2001; 344:783-92.
Slamon et al., Science 235:177-182, 1987.
Sordella et al., Science 2004;305:1163-7
Therasse, J Nat Cancer Inst 2000;92:205-16.
Tracy et al., Cancer Res 2004; 64:7241-44.
Travis et al., Histological typing of lung and pleural tumors. Third edition, Berlin: Springer, 1999.
Vogel et al., J Clin Oncol 2002;20:719-26.
West et al., Advanced bronchioloalveolar carcinoma: a phase II trial of paclitaxel by 96-h infusion (SWOG 9714) : a Southwest Oncology Group study. Ann Oncol, in press

本発明の様々な実施形態を詳細に説明したが、それらの実施形態の変更および改造が行われることは当業者にとって明らかである。しかし、当該変更および改造は、特許請求の

範囲に記載される本発明の範囲内に含まれることがはっきりと理解される。

【図面の簡単な説明】

【０２１０】

【図１Ａ】実施例１における二染色体性、低三染色体性、高三染色体性、低多染色体性、高多染色体性および遺伝子増幅の６つのＦＩＳＨ範疇における疾病無進行期間のカプラン・マイヤー曲線を示す図。

【図１Ｂ】実施例１における二染色体性、低三染色体性、高三染色体性、低多染色体性、高多染色体性および遺伝子増幅の６つのＦＩＳＨ範疇における生存期間のカプラン・マイヤー曲線を示す図。

【図２Ａ】実施例１におけるＦＩＳＨ群１および２における疾病無進行期間のカプラン・マイヤー曲線を示す図。

【図２Ｂ】実施例１におけるＦＩＳＨ群１および２における生存期間のカプラン・マイヤー曲線を示す図。

【図３Ａ】遺伝子コピー数に従って分析された疾病無進行期間のカプラン・マイヤー曲線を示す図。

【図３Ｂ】遺伝子コピー数に従って分析された生存期間のカプラン・マイヤー曲線を示す図。

【図３Ｃ】タンパク質発現のレベルに従って分析された疾病無進行期間のカプラン・マイヤー曲線を示す図。

【図３Ｄ】タンパク質発現のレベルに従って分析された生存期間のカプラン・マイヤー曲線を示す図。

【図３Ｅ】突然変異体の存在に従って分析された疾病無進行期間のカプラン・マイヤー曲線を示す図。

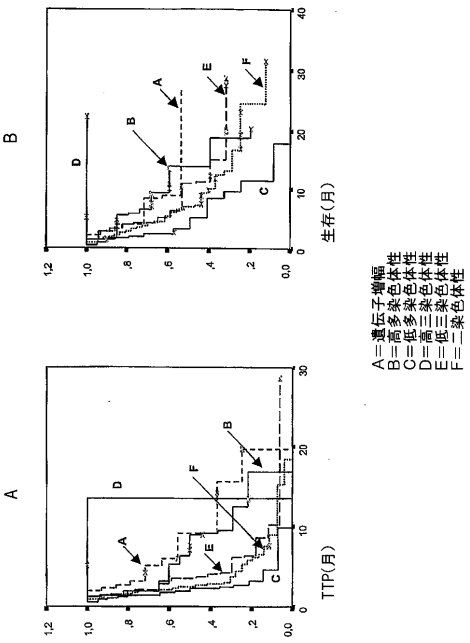
【図３Ｆ】突然変異体の存在に従って分析された生存期間のカプラン・マイヤー曲線を示す図。

【図４Ａ】ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ部分集団（Ｎ＝８１（患者数））と比較した全Ｓ　０１２６集団（Ｎ＝１３６（患者数））の生存曲線を示す図。

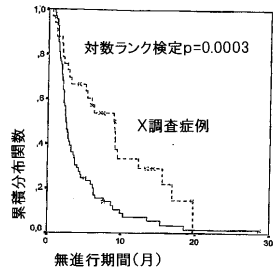
【図４Ｂ】ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ陽性およびＦＩＳＨ陰性群についての無進行生存期間を示す図。

【図４Ｃ】ＥＧＦＲ　ＦＩＳＨ陽性およびＦＩＳＨ陰性群についての総合的生存曲線を示す図。

【図１】

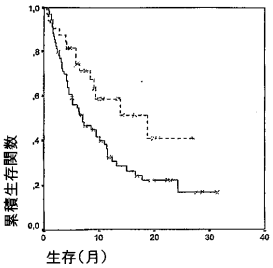



【図２Ａ】



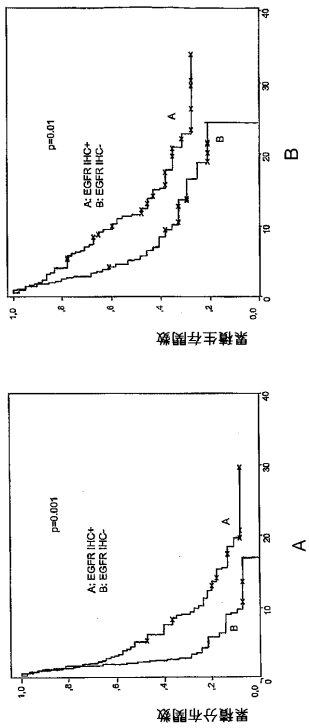

| FISH群 | 合計 | TTP中央値 | 12カ月間進行のない患者 |
|---|---|---|---|
| ― 群1 | 69 | 2.47 月 | 8.7% |
| --- 群2 | 33 | 6.25 月 | 39.4% |

【図２Ｂ】

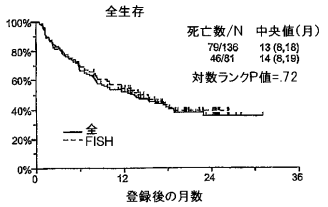



| FISH群 | 合計 | OR中央値 | 1年(%) | 2年(%) | 危険率 |
|---|---|---|---|---|---|
| ― 群1 | 69 | 6.5 月 | 36.2% | 17.0 | 0.40 |
| --- 群2 | 33 | 9.0 月 | 61.5% | 40.0 | |

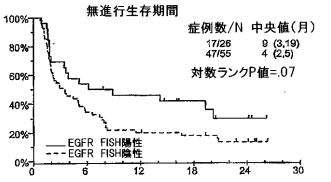
【図３】



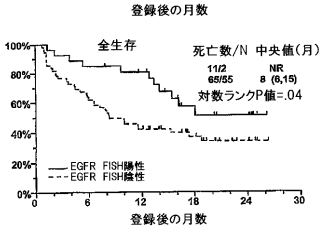

【図４Ａ】




【図４Ｂ】




【図４Ｃ】



【配列表】
2008502328000001.app

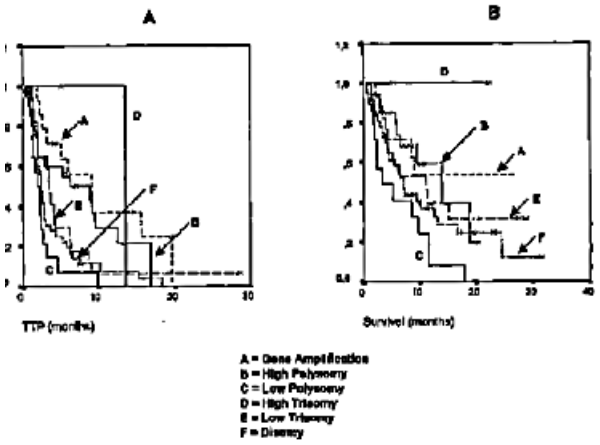
フロントページの続き

(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,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,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,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

(72)発明者 ガルシア、マリレイラ バレーラ
アメリカ合衆国 ８０１１１ コロラド州 グリーンウッド ビレッジ イースト シェナンゴ アベニュー ９０４５
(72)発明者 バン、ポール エイ. ジュニア
アメリカ合衆国 ８０４３９ コロラド州 エバーグリーン サンダウン レーン ６３０
(72)発明者 カプーゾ、フェデリコ
イタリア国 Ｉ－４００６８ サン ラッツァロ ディ サベナ ビア ポッジ １４
(72)発明者 フランクリン、ウィルバー エイ.
アメリカ合衆国 ８０２０９－２６３４ コロラド州 デンバー エス. ウィリアムズ ストリート ２４５
(72)発明者 ヒルシュ、フレッド アール.
アメリカ合衆国 ８０２２４ コロラド州 デンバー イースト シダー アベニュー ６７８４ ナンバー６０２

Ｆターム(参考) 4B024 AA12 CA04 CA09 CA20 HA14
4B063 QA19 QQ08 QR08 QR55 QR62 QS33 QS34

| | | | |
|---|---|---|---|
| 专利名称(译) | 预测癌症患者表皮生长因子受体抑制剂临床结果的方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2008502328A | 公开(公告)日 | 2008-01-31 |
| 申请号 | JP2007515430 | 申请日 | 2005-05-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 科罗拉多州立大学董事会 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 科罗拉多大学董事会 | | |
| [标]发明人 | ガルシアマリレイラバレーラ<br>バンポールエイジュニア<br>カプーゾフェデリコ<br>フランクリンウィルバーエイ<br>ヒルシュフレッドアール | | |
| 发明人 | ガルシア、マリレイラ バレーラ<br>バン、ポール エイ. ジュニア<br>カプーゾ、フェデリコ<br>フランクリン、ウィルバー エイ.<br>ヒルシュ、フレッド アール. | | |
| IPC分类号 | C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/09 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/156 C12Q2600/158 | | |
| FI分类号 | C12Q1/68.ZNA.A G01N33/53.M G01N33/574.A C12N15/00.A | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA12 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA14 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS33 4B063/QS34 | | |
| 代理人(译) | 昂达诚 | | |
| 优先权 | 60/575789 2004-05-27 US<br>60/677852 2005-05-03 US | | |
| 其他公开文献 | JP5422120B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |


摘要(译)

本发明涉及获得表达评分以评估从患有或怀疑患有癌症的人获得的组织样本中的基因表达的方法，包括：a）通过免疫组织化学确定分数分数，其中分数分数对应于百分比组织标本中的细胞，其对生物标记物染色呈阳性; b）确定对应于肿瘤细胞样品中生物标记物的染色强度的强度分数; c）计算表达分数，该分数是分数分数和强度分数的乘积的数值评估。