

(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2006-526420

(P2006-526420A)

(43) 公表日 平成18年11月24日(2006.11.24)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------|
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 Z N A A | 4 B O 2 4 |
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 A | 4 B O 2 9 |
| C 1 2 M 1/00 (2006.01) | C 1 2 M 1/00 A | 4 B O 6 3 |
| A 6 1 K 31/5377 (2006.01) | A 6 1 K 31/5377 | 4 C O 8 5 |
| A 6 1 K 31/517 (2006.01) | A 6 1 K 31/517 | 4 C O 8 6 |
| | 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 | (全 50 頁) 最終頁に続く |

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2006-516368 (P2006-516368) | (71) 出願人 | 502097090 |
| (86) (22) 出願日 | 平成16年6月1日 (2004.6.1) | | アストラゼネカ ユーケー リミテッド |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成18年1月12日 (2006.1.12) | | イギリス国 ダブリュ1ワイ 6エルエヌ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/GB2004/002316 | | ロンドン スタンホープ ゲイト 15 |
| (87) 国際公開番号 | W02005/049829 | (71) 出願人 | 504137912 |
| (87) 国際公開日 | 平成17年6月2日 (2005.6.2) | | 国立大学法人 東京大学 |
| (31) 優先権主張番号 | 0312451.8 | | 東京都文京区本郷七丁目3番1号 |
| (32) 優先日 | 平成15年5月30日 (2003.5.30) | (74) 代理人 | 100091096 |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | | 弁理士 平木 祐輔 |
| (31) 優先権主張番号 | 0322636.2 | (74) 代理人 | 100096183 |
| (32) 優先日 | 平成15年9月26日 (2003.9.26) | | 弁理士 石井 貞次 |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | (74) 代理人 | 100118773 |
| (31) 優先権主張番号 | 0327132.7 | | 弁理士 藤田 節 |
| (32) 優先日 | 平成15年11月21日 (2003.11.21) | (72) 発明者 | 鶴尾 隆 |
| (33) 優先権主張国 | 英国 (GB) | | 日本国東京都世田谷区宮坂3丁目36-6 |
| | | | 最終頁に続く |

(54) 【発明の名称】 プロセス

(57) 【要約】

本発明は、erbB受容体チロシンキナーゼ阻害剤に対して応答者である患者と非応答者である患者との間で発現が異なるものとして同定された少なくとも1個の遺伝子を含む単離マーカー遺伝子セットであって、本明細書に記載された51個の遺伝子に由来する遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを含めて、本明細書に記載された51個の遺伝子からなる群から少なくとも選択される1個または複数の遺伝子を含む遺伝子セット、および診断用途におけるかかるセットの使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

erbB受容体チロシンキナーゼ阻害剤に対して応答者である患者と非応答者である患者との間で発現が異なるものとして同定された少なくとも1個の遺伝子を含む単離マーカ－遺伝子セットであって、本明細書の表4に記載された51個の遺伝子に由来する遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを含めて、前記遺伝子からなる群から少なくとも選択される1個または複数の遺伝子を含む遺伝子セット。

【請求項2】

本明細書の表4に記載された最初の40個の遺伝子の少なくとも1個または複数を含む、請求項1に記載のセット。

10

【請求項3】

本明細書の表4に記載された最初の20個の遺伝子の少なくとも1個または複数を含む、請求項1に記載のセット。

【請求項4】

本明細書の表4に記載された最初の12個の遺伝子の少なくとも1個または複数を含む、請求項1に記載のセット。

【請求項5】

本明細書の表4に記載された最初の5個の遺伝子の少なくとも1個または複数を含む、請求項1に記載のセット。

【請求項6】

本明細書の表4に記載された最初の12個の遺伝子、すなわち、FLJ22622遺伝子(例えば、GenBank NM_024829)、AREG遺伝子(例えば、GenBank BC009799)、COR01C遺伝子(例えば、GenBank NM_014325)、AVEN遺伝子(例えば、GenBank BC010488)、DUSP3遺伝子(例えば、GenBank NM_004090)、DJ473B4遺伝子(例えば、GenBank AI026836)、PHLDA2遺伝子(例えば、GenBank BU500509)、RBM7遺伝子(例えば、GenBank NM_0106090)、EST遺伝子(GenBank BX0952512)、OSMR遺伝子(例えば、GenBank AI436027)、GCLC遺伝子(例えば、GenBank AI971137)、COL4A3BP遺伝子(例えば、GenBank BQ024877)である、請求項1に記載のセット。

20

【請求項7】

前記遺伝子が、表4aに記載された配列を含む、請求項6に記載のセット。

【請求項8】

前記セットが遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを含み、前記オリゴヌクレオチドが表4aに記載された配列の5個～50個のヌクレオチドを含む、請求項6に記載のセット。

30

【請求項9】

前記阻害剤が、ゲフィチニブ、OSI-774、PKI-166、EKB-569、GW2016およびCI-1033から選択される、請求項1～8のいずれか1項に記載のセット。

【請求項10】

薬剤がゲフィチニブである、請求項9に記載のセット。

【請求項11】

前記阻害剤が抗erbB抗体である、請求項1～8のいずれか1項に記載のセット。

【請求項12】

前記抗体がトラスツマブまたはセツキシマブである、請求項11に記載のセット。

40

【請求項13】

erbB受容体キナーゼ阻害剤による治療に対する癌患者または癌患者集団の応答性を予測する方法、あるいはerbB受容体キナーゼ阻害剤に応答する患者または患者集団を選択する方法であって、請求項1～6のいずれか1項に記載の遺伝子セットから選択される1個または複数のマーカ－遺伝子の示差的発現を比較するステップを含む方法。

【請求項14】

前記患者の応答性が、薬物応答スコアを作成することによって示される、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

50

前記比較をマイクロアレイアッセイによって実施する、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】

前記比較を免疫組織化学によって実施する、請求項13または14に記載の方法。

【請求項17】

前記方法が、アンフィレギュリンの示差的発現を検出するステップを含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

前記阻害剤が請求項9～12のいずれか1項に記載されたものである、請求項13～17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

適切な支持媒体上の請求項1～8のいずれか1項に記載の群から選択されるマーカー遺伝子セットを含む、請求項13～18のいずれか1項に記載の方法に使用される診断キット。

【請求項20】

マイクロアレイを含む、請求項19に記載のキット。

【請求項21】

請求項9～12のいずれか1項に記載の阻害剤を投与するステップと、請求項1～8のいずれか1項に記載の群から選択されるマーカー遺伝子セットの示差的発現を試験するステップとを含む、癌患者を治療する方法。

【請求項22】

NSCLC患者から得られた組織試料における遺伝子の発現レベルを測定するための、本明細書の表4に記載された51個の遺伝子に由来する遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを含めて、前記遺伝子からなる群から選択される単離遺伝子配列の使用。

【請求項23】

NSCLC患者から得られた組織試料中の本明細書の表4に記載された51個の遺伝子に由来する遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを含めて、前記遺伝子からなる群から選択される1個または複数の遺伝子の発現レベルを決定する手段を含み、請求項1～8のいずれか1項に記載の単離マーカー遺伝子セットを含む支持材料を含み、その少なくとも1個の遺伝子が支持材料に付着している、診断キット。

【請求項24】

請求項13の方法によって同定されたNSCLC患者の治療における請求項9～12のいずれか1項に定義された阻害剤の使用。

【請求項25】

請求項13～17のいずれか1項に記載の方法によって同定されたNSCLC患者またはNSCLC患者集団を治療する方法であって、前記患者にerbB受容体チロシンキナーゼ阻害剤を投与するステップを含む方法。

【請求項26】

請求項13～17のいずれか1項に記載の方法によって同定されたNSCLC患者またはNSCLC患者集団を治療するための医薬の製造におけるerbB受容体チロシンキナーゼ阻害剤の使用。

【請求項27】

erbBチロシンキナーゼ受容体阻害剤を試験する方法、またはerbBチロシンキナーゼ受容体阻害剤に対する試験を行う方法であって、患者を治療するステップと、化合物が、請求項1～8のいずれか1項に記載のマーカー遺伝子セット由来の遺伝子の少なくとも1個の遺伝子発現をモジュレートするかどうかを関連する対照と比べて評価するステップとを含む方法。

【請求項28】

erbB受容体チロシンキナーゼ阻害または阻害剤の効果または有効性を測定する臨床試験を実施する方法であって、患者または患者集団において請求項1～8のいずれか1項に定義された遺伝子セットの相対発現レベルを測定するステップを含む方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、マーカー遺伝子セットを使用して化学療法剤に患者が応答するかどうかを予測する個別化癌治療法および該方法に使用されるキットに関する。

【0002】

特に、この方法は、erbBチロシンキナーゼ阻害剤に対する患者の応答を予測する。より詳細には、この方法は、erbBチロシンキナーゼのみを介する癌の患者、または部分的にerbBチロシンキナーゼを介する癌の患者に関し、特に進行非小細胞肺癌(NSCLC)患者、例えば、腺癌患者に関し、erbBチロシンキナーゼ阻害剤に対する応答者と非応答者との間の発現が異なるマーカー遺伝子セットのレベルを使用するものである。

10

【背景技術】

【0003】

発明に対する背景

肺癌は癌死の主要原因であり、したがって、世界中で主要な健康問題になっている。この疾患の治療においては、大多数の患者が局所進行のステージ3(44%)または転移のあるステージ4(32%)疾患と診断されるので、化学療法が中心である[1]。それにもかかわらず、大規模なメタアナリシスの知見によって、白金を用いた化学療法が、進行非小細胞肺癌(NSCLC)患者の生存期間中央値を、最良の支持療法よりも約6週間しか延長しないことが明らかになった[2]。

20

【0004】

最近10年間に、パクリタキセル、ドセタキセル、ゲムシタピンおよびビノレルピンを含めて多数の新しい細胞傷害性薬剤が開発され、進行肺癌患者に複数の選択肢が提供されている。しかし、各投薬計画は、シスプラチンに基づく療法よりもほんのわずかの延命効果にしか役立たない[3]、[4]。より最近になって、いくつかの分子標的薬を含めた新しい治療戦略が、従来の細胞傷害性薬剤の限界を克服するために開発された[5][6]。

【0005】

近年、ある種の成長因子チロシンキナーゼ酵素が、細胞複製を引き起こす生化学シグナルの伝達に重要であることが発見された。これらの酵素は、細胞膜にまたがる大きなタンパク質であり、上皮成長因子(EGF)などの成長因子のための細胞外結合ドメインと、タンパク質中のチロシンアミノ酸をリン酸化し、したがって細胞増殖に影響を及ぼすキナーゼとして機能する細胞内部分とを有する。

30

【0006】

異なる受容体チロシンキナーゼに結合する成長因子ファミリーに基づく様々なクラスを受容体チロシンキナーゼが知られている(Wilks, *Advances in Cancer Research*, 1993, 60, 43-73)。この分類には、受容体チロシンキナーゼのEGFファミリーを含むクラスI受容体チロシンキナーゼが含まれる。これには、リガンドEGF、TGF (TGFAとも呼ばれる)、アンフィレギュリン(AREGとも呼ばれる)、ベータセルリン、ヘパリン結合性EGF、エピレグリンおよび(NRG-1、NRG-2、NRG-3およびNRG-4を含めた)ニューレグリン用の受容体が含まれる。より具体的には、これらの受容体には、erbB1(EGFR)、erbB2(Neu、Her2)およびerbB4(Her 4)、ならびにerbB3(her3)と呼ばれる機能的キナーゼドメインを有するもの、インスリン受容体、IGF1受容体、インスリン関連受容体(IRR)などの受容体チロシンキナーゼのインスリンファミリーを含むクラスII受容体チロシンキナーゼ、およびPDGF、PDGF、コロニー刺激因子1(CSF1)受容体などの受容体チロシンキナーゼの血小板由来成長因子(PDGF)ファミリーを含むクラスIII受容体チロシンキナーゼが含まれる。

40

【0007】

EGFR、erbB2、erbB3およびerbB4を含めた受容体チロシンキナーゼのerbBファミリーは、腫瘍細胞の増殖および生存を駆動するのに頻繁に関与することが知られている(Olayioye et al., *EMBO J.*, 2000, 19, 3159に概説されている)。これが起こり得る1つの機序は、一般には遺伝子増幅の結果として、タンパク質レベルにおいて受容体が過剰発現するも

50

のである。これは、腺癌(Cerny et al., Brit. J. Cancer, 1986, 54, 265; Reubi et al., Int. J. Cancer, 1990, 45, 269; Rusch et al., Cancer Research, 1993, 53, 2379; Brabender et al, Clin. Cancer Res., 2001, 7, 1850)を含めた非小細胞肺癌(NSCLC)、他の肺癌(Hendler et al., Cancer Cells, 1989, 7, 347)など多数の一般的なヒトの癌において認められる(Klapper et al., Adv. Cancer Res., 2000, 77, 25に概説されている)。これらの受容体の1個または複数の調節が損なわれた結果として、多数の腫瘍が臨床的により活動的になり、患者の予後不良と相関すると広く考えられている(Brabender et al, Clin. Cancer Res., 2001, 7, 1850; Ross et al, Cancer Investigation, 2001, 19, 554, Yu et al., Bioessays, 2000, 22.7, 673)。これらの臨床の知見に加えて、多数の前臨床情報によって、受容体チロシンキナーゼのerbBファミリーが細胞の形質転換に関与していることが示唆されている。これに加えて、いくつかの前臨床試験によって、小分子阻害剤、ドミナントネガティブまたは阻害抗体を用いて1つもしくは複数のerbB活性をノックアウトすることによって増殖抑制効果を誘導できることが実証された(Mendelsohn et al., Oncogene, 2000, 19, 6550に概説されている)。

10

20

30

40

50

【0008】

したがって、これらの受容体チロシンキナーゼの阻害剤は、哺乳動物の癌細胞増殖の選択的阻害剤として価値があることが認識された(Yaish et al. Science, 1988, 242, 933, Kolibaba et al, Biochimica et Biophysica Acta, 1997, 133, F217-F248; Al-Obeidi et al, 2000, Oncogene, 19, 5690-5701; Mendelsohn et al, 2000, Oncogene, 19, 6550-6565)。この前臨床データに加えて、EGFRおよびerbB2に対する阻害抗体(それぞれ、c-225およびトラスツズマブ)を用いた知見は、選択された固形腫瘍を治療するための診察に有益であることが証明された(Mendelsohn et al, 2000, Oncogene, 19, 6550-6565に概説されている)。

【0009】

受容体チロシンキナーゼのerbBファミリーのいくつかの小分子阻害剤、特にEGFおよびerbB2受容体チロシンキナーゼの阻害剤が知られている。例えば、欧州特許出願第0566226号および国際特許出願WO 96/33980およびWO 97/30034は、アニリノ置換基を4位に有するある種のキナゾリン誘導体が、EGFRチロシンキナーゼ阻害活性を有し、前立腺癌を含めた癌組織の増殖阻害剤であることを開示している。化合物N-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-メトキシ-6-(3-ホルホリノプロポキシ)キナゾリン-4-アミンが強力なEGFRチロシンキナーゼ阻害剤であることが、Proc. Amer. Assoc. Cancer Research, 1997, 38, 633およびPharmacol. Ther., 1999, 82, 241-250においてJ R Woodburn等によって開示された。この化合物は、イレッサ(登録商標)、ゲフィチニブ(米国一般名)、コード番号ZD1839およびChemical Abstracts登録番号184475-35-2としても知られている。以後、この化合物をゲフィチニブと呼ぶ。ゲフィチニブは、最近、日本において手術不能な非小細胞肺癌(NSCLC)または再発性非小細胞肺癌(NSCLC)の治療に認可され、米国において白金化学療法とドセタキセル化学療法の両方に失敗した後の局所進行性転移NSCLC患者を治療する単独療法として認可された。

【0010】

国際特許出願WO 96/30347から、アニリノ置換基を4位に有するある種の構造的に関係したキナゾリン誘導体もEGFRチロシンキナーゼ阻害活性を有することがさらに知られている。WO 99/55683には、(コード番号CP 358774およびOSI-774に関連付けられ、以後、コード番号OSI-774によって識別される)化合物N-(3-エチルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)キナゾリン-4-アミンまたは薬学的に許容されるその塩がEGFR TKIであることが開示された。

【0011】

国際特許出願WO 97/38983から、アニリノ置換基を4位に有する構造的に関係したある種の他のキナゾリン誘導体もEGFRチロシンキナーゼ阻害活性を有することがさらに知られている。(コード番号PD 183805およびCI 1033に関連付けられ、以後、コード番号CI 1033によって識別される)化合物6-アクリルアミド-N-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-(3ホル

ホリノプロボキシ)キナゾリン-4-アミンがEGFR TKIであることが、J. Med. Chem., 1999, 42, 1803-1815およびWO 00/31048に開示された。

【0012】

国際特許出願WO 97/02266から、構造的に関係したある種の他の複素環式誘導体もEGFRチロシンキナーゼ阻害活性を有することがさらに知られている。例えば、(コード番号PKI-166、CGP 75166およびCGP 59326に関連付けられ、以後、コード番号PKI-166によって識別される)化合物4-[(1R)-1-フェニルエチルアミノ]-6-(4-ヒドロキシフェニル)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジンはEGFR TKIである。

【0013】

欧州特許出願第0787722号ならびに国際特許出願WO 98/50038、WO 99/09016およびWO 99/24037から、アニリノ置換基を4位に有する構造的に関係したある種の他のキナゾリン誘導体もEGFRチロシンキナーゼ阻害活性を有することがさらに知られている。例えば、(コード番号CL-387785およびEKB-785に関連付けられ、以後、コード番号CL-387785によって識別される)化合物N-[4-(3-プロモアニリノ)キナゾリン-6-イル]ブタ-2-インアミドはEGFR TKIである。

【0014】

Nature Medicine, 2000, 6, 1024-1028および米国特許第6,002,008号から、アニリノ置換基を4位に有する構造的に関係したある種の他のキノリン誘導体もEGFRチロシンキナーゼ阻害活性を有することがさらに知られている。例えば、(以後、コード番号EKB-569によって識別される)化合物4-(3-クロロ-4-フルオロアニリノ)-3-シアノ-6-(4-ジメチルアミノ)ブタ-2(E)-エンアミド)-7-エトキシキノリンは、EGFR TKIである。

【0015】

WO 99/35146およびWO 01/04111から、ある種の他のキナゾリン誘導体が、erbB受容体チロシンキナーゼ阻害剤の1個または複数の阻害剤であることも知られている。例えば、(以後、コードGW2016によって識別されるラパチニブまたはGW2016としても知られる)化合物N-{3-クロロ-4-[(3-フルオロベンジル)オキシ]フェニル}-6-[5-({[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ}メチル)-2-フリル]キナゾリン-4-アミンは、EGF受容体チロシンキナーゼとerbB2受容体チロシンキナーゼの両方の阻害剤であると考えられる。

【0016】

ノバルティスAE788は、別の適切な阻害剤化合物である。

【0017】

erbB受容体チロシンキナーゼの阻害は、受容体に結合している細胞外リガンドを、erbB受容体に対する適切な抗体を用いて阻害することによって実施することもできる。例えば、抗erbB2抗体トラスツツマブ[ハーセプチン(商標)]および抗erbB1抗体セツキシマブ[C225]を用いる。かかる阻害剤の使用は、選択された固形腫瘍を治療するための臨床に有益であることが証明されている(Mendelsohn et al, 2000, Oncogene, 19, 6550-6565に概説されている)。

【0018】

上述したように、ゲフィチニブは、上皮成長因子受容体-チロシンキナーゼ(EGFR-TK)の経口活性阻害剤であり、癌細胞の増殖、浸潤および生存を駆動する役割を担うシグナル伝達経路を遮断する[7]。強力な抗腫瘍効果、ならびにNSCLCに関係する症状および生活の質の迅速な改善が、白金に基づく化学療法に回答しなかった進行NSCLC患者が参加した臨床試験において認められた。無作為化二重盲検第二相単独療法試験(IDEAL 1試験)において、進行NSCLCに対する化学療法の第2選択または第3選択としてゲフィチニブを使用すると、腫瘍応答率が18.4%(95%CI: 11.0~25.9%)に達し、IDEAL 2試験においては、化学療法の第3選択または第4選択として使用すると腫瘍応答率が11.8%(95%CI: 6.2~19.7%)に達した[8]、[27]、[28]。

【0019】

さらに、これらの試験において、この薬物の治療は、高い病勢コントロール率(IDEAL 1において54.4%、IDEAL 2において42.2%)および総合症状改善率(overall symptom improve

ment rate)(IDEAL 1において40.3%、IDEAL 2において43.1%)を達成した。

【0020】

これらの結果は、従来の細胞傷害性薬剤に対する応答と比較すると有望なものであったが、これらの試験に参加した患者の約半分が有効な治療を受けられず、症状が改善しなかった事実が残った。さらに、投薬によって非応答者は間質性肺炎などの生命にかかわるものを含めた有害作用に曝された[11]。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0021】

様々な化学療法治療に対する患者の応答は異なり、したがって、どの治療計画が特定の患者に最適であるかを予測する方法を見出す必要がある。 10

【0022】

多数の薬物に対する患者応答が患者の遺伝的プロファイルに関係することや、影響する遺伝因子、例えば、特定の薬物に対して応答する遺伝因子を決定することによって患者に個別化治療計画を提供できることを示唆する証拠が増加している。かかる個別化治療計画は、治療上の利点を最大にする可能性を患者に提供し、例えば、別のより有効でない治療計画に付随することのある副作用を最小限に抑える。したがって、薬物に対する患者応答を予測することができる方法が求められている。

【課題を解決するための手段】

【0023】

発明の概要

化学療法剤に対するある種の癌の感受性は、遺伝子発現によって予測することができ、したがって、かかる化学療法剤による治療に対する癌患者の適合性は、患者組織における特定の遺伝子の相対レベルを測定することによって判定できることが見出された。 20

【0024】

したがって、本発明は、erbB受容体チロシンキナーゼ阻害剤に対して応答者である患者と非応答者である患者との間で発現が異なるものとして同定された少なくとも1個の遺伝子を含む単離マーカー遺伝子セットを提供する。該遺伝子セットは、本明細書の表4に記載された51個の遺伝子に由来する遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを含めて、本明細書の表4に記載された51個の遺伝子からなる群から少なくとも選択される1個または複数の遺伝子を含む。表4において、登録番号は、GenBankデータベースの遺伝子に対して与えられたものである。当業者には理解されるように、所与の登録番号で利用可能な配列は、表中に示された遺伝子配列のほんの例に過ぎない。配列決定エラー補正、対立遺伝子または他の変異、スプライス突然変異体などを含む配列を含めて別の配列も、使用された名称によって表される遺伝子の定義に含まれる。最も好ましい実施形態においては、参照される配列は、登録番号配列で規定された配列、および表4aに与えられ詳述された具体的配列である。 30

【0025】

別の態様においては、本発明は、erbB受容体チロシンキナーゼ阻害剤に対して応答者である患者と非応答者である患者との間で発現が異なるものとして同定された少なくとも1個の遺伝子を含む単離マーカー遺伝子セットを提供する。該遺伝子セットは、本明細書の表4に記載された51個の遺伝子に由来する遺伝子特異的オリゴヌクレオチドを含めて、本明細書の表4に記載された51個の遺伝子からなる群から選択される。 40

【0026】

本発明は、個々の患者に治療を適合させ、かくして利用可能な薬物のタイプをより有効に使用することによって、予後、したがって癌患者の生活の質を改善することができる。

【0027】

好ましいセットは、本明細書の表4に記載された最初の40個の遺伝子の少なくとも1個または複数である。

【0028】

さらに好ましいセットは、本明細書の表4に記載された最初の20個の遺伝子の少なくとも1個または複数である。

【0029】

さらに好ましいセットは、本明細書の表4に記載された最初の12個の遺伝子の少なくとも1個または複数である。

【0030】

好ましいセットは、本明細書の表4に記載された最初の5個の遺伝子の少なくとも1個または複数である。

【0031】

特に好ましいセットは、本明細書の表4aに記載された最初の12個の遺伝子、すなわち、FLJ22622(例えば、GenBank NM_024829)、AREG(例えば、GenBank BC009799)、COR01C(例えば、GenBank NM_014325)、AVEN(例えば、GenBank BC010488)、DUSP3(例えば、GenBank NM_004090)、DJ473B4(例えば、GenBank AI026836)、PHLDA2(例えば、GenBank BU500509)、RBM7(例えば、GenBank NM_0106090)、EST(GenBank BX0952512)、OSMR(例えば、GenBank AI436027)、GCLC(例えば、GenBank AI971137)、COL4A3BP(例えば、GenBank BQ024877)である。

10

【0032】

阻害剤は、ゲフィチニブ、OSI-774、PKI-166、EKB-569、GW2016、CI-1033およびトラストツマブ、セツキシマブなどの抗erbB抗体から選択されることが好ましい。

【0033】

阻害剤はゲフィチニブであることが最も好ましい。

20

【0034】

本発明は、erbBチロシンキナーゼのみを介する癌の患者もしくは患者集団、または部分的にerbBチロシンキナーゼを介する癌の患者もしくは患者集団において上述の化学療法剤に対する応答の予測に使用するのに特に適切である。かかる癌としては、例えば、白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫などの非固形腫瘍が挙げられ、固形腫瘍、例えば、胆管、骨組織、膀胱、脳/CNS、乳房、結腸直腸、子宮頸部、子宮内膜、胃、頭部および頸部、肝臓、肺、筋肉、ニューロン、食道、卵巣、すい臓、胸膜/腹膜、前立腺、腎臓、皮膚、精巣、甲状腺、子宮および外陰部の腫瘍も挙げられる。

【0035】

本発明は、NSCLC患者、より具体的には先に定義されたerbB受容体チロシンキナーゼ阻害剤などの化学療法剤による治療に応答する進行腺癌を含めた進行NSCLCの患者を同定するのに特に適切である。

30

【0036】

本発明は、NSCLCの「個々の癌プロファイル」を同定し、どの腫瘍がゲフィチニブに応答するかを判定することによって、NSCLC、特に進行NSCLCなどの癌の治療にかなりの利点をもたらす。これには、第一選択治療計画および、例えば、化学療法に失敗した患者などの他の治療計画が含まれる。

【0037】

本発明は、白金に基づく化学療法などの以前の化学療法に失敗した進行NSCLC患者の治療に特に有用である。

40

【0038】

本発明は、白金に基づく化学療法などの以前に化学療法を受けた局所進行(IIIB期)または転移(IV期)NSCLC患者の治療にも特に有用である。

【0039】

本発明は、化学療法剤、特にerbB受容体チロシンキナーゼ阻害剤による治療に対する癌、例えば、肺癌の患者または患者集団の応答性を予測する方法も提供する。この方法は、上で定義された遺伝子セットから選択されるマーカー遺伝子セットの示差的発現を比較するステップを含む。

【0040】

50

発現の評価は、任意のタイプのオリゴヌクレオチドに基づくアレイまたはcDNAに基づくアレイ; RT-PCR(逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法)、リアルタイムPCR、in-situハイブリダイゼーション、ノーザンブロット法、例えばVelculescu et al Science 270 (5235): 484-487に記載の遺伝子発現の連続分析(SAGE)、またはディファレンシャルディスプレイを用いた遺伝子発現プロファイリングによって実施されることが好ましい。これらの方法および他の方法の詳細は、例えば、Sambrook et al, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manualに見出すことができる。評価は、マイクロアレイアッセイを使用することが好ましい。

【0041】

あるいは、またはこれに加えて、評価は免疫組織化学アッセイを使用する。

10

【0042】

さらに別の態様においては、本発明は、適切な支持媒体上の上記で定義されたマーカー遺伝子セットを含む化学療法剤、特にerbB受容体チロシンキナーゼ阻害剤による治療に対する癌患者または癌患者集団の応答性を予測する方法に使用されるキットを提供する。マーカー遺伝子は、ニトロセルロース、あるいはナイロンまたはプラスチックフィルムもしくはスライドなどの支持材料もしくは膜に付着していることが好ましい。

【0043】

キットはマイクロアレイを含むことが好ましい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0044】

好ましい実施形態を含めた詳細な説明

20

本発明をより詳細に記述し、以下の実施例によって説明する。これらの実施例は、当業者が本発明を実施するのを助けるのに役立つものであって、本発明の範囲を決して限定するものではない。本発明の特定の要素も以下に、より詳細に記述する。

【0045】

「単離マーカー遺伝子セット」

これらは、本明細書に記載される実施形態の状況によれば、本発明による患者応答の分類またはカテゴリー化に使用することができる遺伝子群である。

【0046】

「示差的発現」

30

応答者または非応答者の群間でより高レベルまたはより低レベルで発現される遺伝子。

【0047】

「応答者/非応答者」

国際対癌連合/世界保健機関(UICC/WHO)判定基準による客観的腫瘍応答は以下のとおりカテゴリー化される:完全奏効(CR):評価可能な全病変部に残存腫瘍がない;部分奏効(PR):残存腫瘍が、測定可能な全病変部の合計でベースラインよりも50%以上化学療法によって減少し、新しい病変部がない;安定(SD) CRと認められなかった残存腫瘍;および進行(PD):残存腫瘍が、測定可能な全病変部の合計でベースラインよりも25%以上化学療法によって増加し、または新しい病変部が出現。本明細書では非応答者はPDである。

【0048】

40

本発明は、CRまたはPRである患者を判定するのに特に有効である。

【0049】

「ErbB受容体チロシンキナーゼ阻害剤を含めて、ただしこれだけに限定されないErbB受容体阻害剤」

このファミリーとしては、上記発明に対する背景に記載されたEGF、erbB2(HER)、erbB3(erbB3は機能的キナーゼドメインを持たないことに留意されたい)、erbB4などが挙げられる。

【0050】

「遺伝子特異的オリゴヌクレオチド」

これらは、それぞれの遺伝子に特有のものであって、例えば、遺伝子を一義的に特定す

50

る遺伝子断片である。遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、長さが5~50ヌクレオチド、好ましくは約15~30ヌクレオチド、最も好ましくは約23ヌクレオチドであることが有利である。

【0051】

「アレイまたはマイクロアレイ」

アレイ技術、ならびにそれに関連する様々な技術および適用例は、一般に多数の教科書および文書に記載されている。遺伝子アレイ技術は、本発明を実施するのに特に適している。マイクロアレイを調製する方法は、当分野で周知である。これらには、Lemieux et al., (1998), *Molecular Breeding* 4, 277-289, Schena and Davis. *Parallel Analysis with Biological Chips*. in *PCR Methods Manual* (eds. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky), Schena and Davis, (1999), *Genes, Genomes and Chips*. In *DNA Microarrays: A Practical Approach* (ed. M. Schena), Oxford University Press, Oxford, UK, 1999), *The Chipping Forecast* (Nature Genetics special issue; January 1999 Supplement), Mark Schena (Ed.), *Microarray Biochip Technology*, (Eaton Publishing Company), Cortes, 2000, *The Scientist* 14[17]:25, Gwynne and Page, *Microarray analysis: the next revolution in molecular biology*, *Science*, 1999 August 6;およびEakins and Chu, 1999, *Trends in Biotechnology*, 17, 217-218が含まれる。

10

【0052】

この技術は、PCT/US01/10063およびUS 2002 090979ならびにその中の参考文献に記載されている。

20

【0053】

供給業者としては、Affymetrix(California)、Clontech Laboratories(California)などが挙げられる。

【0054】

アレイ技術の主要な適用例としては、配列(ヌクレオチド配列/ヌクレオチド配列突然変異)の特定、ヌクレオチド配列の発現レベル(存在量)の決定などが挙げられる。遺伝子発現プロファイリングは、アレイ技術を利用することができ、プロテオミクス技術と場合によっては組み合わせて利用することができる(Celis et al, 2000, *FEBS Lett*, 480(1):2-16; Lockhart and Winzeler, 2000, *Nature* 405(6788):827-836; Khan et al., 1999, 20(2):223-9)。アレイ技術の他の適用例も当分野で知られており、例えば、ヌクレオチド配列発見、癌研究(Marx, 2000, *Science* 289: 1670-1672; Scherf, et al, 2000, *Nat Genet*;24(3):236-44; Ross et al, 2000, *Nat Genet*. 2000 Mar;24(3):227-35)、SNP分析(Wang et al, 1998, *Science*, 280(5366):1077-82)、創薬、薬理ゲノミクス、疾患診断(例えば、マイクロ流体装置を利用: *Chemical & Engineering News*, February 22, 1999, 77(8):27-36)、毒物学(Rockett and Dix (2000), *Xenobiotica*, 30(2):155-77; Afshari et al., 1999, *Cancer Res*1;59(19):4759-60)およびトキシコゲノミクス(機能ゲノム科学と分子毒物学のハイブリッド)である。トキシコゲノミクスの目標は、毒物に対する毒性反応とかかる毒物に曝された対象のヌクレオチド配列プロファイルの変化との間の相関を見出すことである(Nuwaysir, et al (1999), *Molecular Carcinonucleotide sequences*, 24:153-159)。

30

40

【0055】

一般に、ライブラリーは、ライブラリーのメンバーを空間的に分離することによって、秩序立って配列させてアレイとすることができる。アレイ化に適切なライブラリーの例としては、とりわけ、(DNA、ヌクレオチド配列、オリゴヌクレオチドなどのライブラリーを含めた)核酸ライブラリー、ペプチド、ポリペプチドおよびタンパク質ライブラリー、ならびにリガンドライブラリーなどの任意の分子を含むライブラリーが挙げられる。したがって、「ライブラリー」について記載する場合には、かかる記載はアレイの形のライブラリーについての記載を含む。

【0056】

ライブラリーメンバーは、一般に、試料の拡散および混合を制限するために固相、好ま

50

しくは固形基体に固定または固定化されている。特に、ライブラリーは、プラスチック、ガラスなどの膜および非多孔質基体を含めて、実質的に平面である固相に固定化することができる。また、試料は、索引付け(すなわち、特定の試料の参照または利用)が容易になるように好ましくは配列される。一般に、試料は、格子構造中のスポットとして割り当てられる。一般のアッセイシステムをこの目的に適合させることができる。例えば、アレイをマイクロプレート表面に固定化し、複数の試料を1個のウェルに、または単一の試料を各ウェルに入れることができる。また、固形基体は、ニトロセルロース膜、ナイロン膜などの膜(例えば、プロッティング実験に使用される膜)とすることができる。別の基体としては、ガラス基体またはシリカ系基体が挙げられる。したがって、試料は、当分野で既知の任意の適切な方法によって、例えば、電荷相互作用によって、あるいはウェルの壁もしくは底部または膜表面への化学結合によって固定化される。他の配列および固定手段、例えば、ピペッティング、ドロップタッチ(drop-touch)、圧電手段、インクジェットおよびバブルジェット(登録商標)技術、静電印加などを使用することができる。シリコン系チップの場合には、フォトリソグラフィを利用してチップ上に試料を配列し、固定することができる。試料は、固形基体上に「配置する」ことによって配列させることができる。これは、手動で、またはロボット工学を利用して、試料を置くことによって実施することができる。一般に、アレイは、マクロアレイまたはマイクロアレイとして記述することができ、その差は試料スポットのサイズである。マクロアレイは、一般に、約300ミクロン以上の試料スポットサイズを含み、既存のゲルおよびプロットスキャナーによって容易に画像化することができる。マイクロアレイ中の試料スポットサイズは、一般に直径200ミクロン未満であり、これらのアレイは、通常、数千のスポットを含む。したがって、マイクロアレイは、特別なロボット工学、および特別仕様で作製する必要がある場合もある画像化装置を必要とすることがある。計測手段は、Cortese, 2000, *The Scientist* 14[11]: 26による総説に概説されている。

10

20

30

40

50

【0057】

DNA分子の固定化ライブラリーを作製する技術は、当分野において記述されている。一般に、ほとんどの従来技術方法は、例えば、固形基体上の様々な離散的な位置において様々な並べ替えられた配列を構築するマスキング技術を用いて一本鎖核酸分子ライブラリーを調製する方法を記述している。US 5,837,832は、超大規模集積技術に基づくケイ素基体に固定化されたDNAアレイを製造する改良方法を記載している。特に、US 5,837,832は、基体上の空間的に画定された場所において特異的プローブセットを調製する「タイリング」と呼ばれる戦略を記載している。この戦略は、本発明の固定化DNAライブラリーを作製するために使用することができる。US 5,837,832は、同様に使用することができる初期の技術の参照も提供している。

【0058】

検出を助けるために、標的およびプローブは、蛍光、生物発光、リン光、放射性レポーターなどの容易に検出可能な任意のレポーターで標識することができる。プローブおよび標的の標識化は、Shalon et al., 1996, *Genome Res* 6(7):639-45に開示されている。

【0059】

本発明の方法に使用される材料は、キットの調製に適していることが理想的である。一般に、1組の説明書が含まれるだろう。

【0060】

一般的な組換えDNA技法

本発明は、別段の記載がないかぎり、従来化学、分子生物学、微生物学、組換えDNAおよび免疫学の技術を使用する。これらは、当業者の能力の範囲内にある。かかる技術は、文献に説明されている。例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Books 1-3*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. et al. (1995 and periodic supplements; *Current Protocols in Molecular Biology*, ch. 9, 13, and 16, John Wiley & Sons, New York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, and A. Kahn, 1996, *DNA Isolation and Sequen*

cing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; M. J. Gait (Editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; およびD. M. J. Lilley and J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Pressを参照されたい。これらの一般的な教科書の各々を参照により本明細書に援用する。

【0061】

本発明の特定の実施形態においては、27,648個の遺伝子を表示するcDNAマイクロアレイシステムを使用して、進行NSCLCの場合のゲフィチニブに対する応答性を予測する遺伝子セットを選択した。発現プロファイルの統計解析によって、ゲフィチニブに対する応答者と非応答者との間で示差的に発現される数十の遺伝子が同定された。これらの遺伝子の発現に基づく薬物応答スコアリング(DRS)システムは、ゲフィチニブ治療に対する応答を予測することに成功した。

10

【0062】

図面の説明

図1: 4つの代表的な肺腺癌のレーザーマイクロビーム顕微解剖を示す画像。上の列は切除前の試料を示し、下の列は切除された癌細胞を示す(H.E.染色 X100)。TBBは経気管支生検を示し、LNはリンパ節を示す。

【0063】

図2: ゲフィチニブ治療の効力を予測するスコアリングシステムの確立。

A. 識別遺伝子の数が変化すると予測スコアが異なるを示す。識別遺伝子セット数(5個~51個)は、表4の順位付けされたリストの上位からの選択された遺伝子数に対応する。分類スコア(CS)が大きいほど、2つの群がより良好に分離されることを示す。

20

B. ゲフィチニブ感受性についての51個の候補遺伝子を用いた17の「ラーニング」症例の階層型クラスタリング(左)、およびGRSに対して最終的に選択された12個の予測遺伝子を用いた17の「ラーニング」症例の階層型クラスタリング(右)。これらの樹状図は、個々の症例間の発現パターンの類似性を示しており、枝が長いほど差は大きいことを示す。2つの群は、12個の遺伝子のセットによって最も明瞭に分離された。

C. 応答者、非応答者およびGRSに基づいて検証された「試験症例」の図式的区別。赤のひし形はラーニングPR症例の予測スコアを示し、青のひし形はラーニングPD症例を示す。淡紅色の三角形は、GRSを確立するのに使用されなかった試験PR症例を示し、青の三角形は試験PD症例を示す。黄色の三角形は、4カ月の観察期間を通してSD状態が維持された試験SD症例を示し、緑の三角形は、試験のある時点においてSDといったん判断されたが治療開始後3カ月または4カ月以内に疾患の進行を示した試験症例を示す。

30

【0064】

図3: 半定量的RT-PCRおよび免疫組織化学分析によるGRSの検証。

A. PRおよびPD群から得られたRNAの半定量的RT-PCR分析の代表的画像。OSMRおよびGCLC遺伝子は非応答者(PD)において過剰発現された。各cDNAテンプレートの完全性は、ACTBの増幅によって制御された。

B. 同じPD患者(No. LC21)から得られたファイバースコープ経気管支生検(TBB)およびリンパ節(LN)生検由来の代表的な試料の抗AREG抗体を用いた免疫組織化学染色(X 200)。

40

C. 他の4種類の予測マーカー(TGFA、ADAM9、CD9およびOSMR)に対する抗体を用いた、PD患者から得られた代表的な試料の免疫組織化学染色(X 200)。

【0065】

図4: 5人のPR、10人のSDおよび20人のPD腺癌症例においてELISAによって測定されたTGFAの血清学的濃度。TGFAの平均血清レベルは黒バーで示されており、PD患者では 19.0 ± 2.8 pg/ml(平均 \pm SE)であり、SD患者では 13.9 ± 1.9 pg/mlであり、PR患者では 12.8 ± 1.4 pg/mlであった。

【0066】

図5: ゲフィチニブ感受性PC-9細胞に対する分泌されたAREGの抗アポトーシス効果。

A. 肺腺癌細胞系PC-9、NCI-H358およびNCI-H522において半定量的RT-PCRによって検討さ

50

れたAREG転写物の発現。

B. 10%FCS補充培地、無血清培地、またはNCI-H358もしくはNCI-H522細胞の培養物から得られた無血清馴化培地(CM)において培養されたPC-9細胞。各培地は、48時間の時点で同じ培地で一度置換され、濃度0.5または1.0 μ Mのゲフィチニブ添加から72時間後に、MTTアッセイによって細胞の生存度を測定した。実験は3重で実施された。Y軸は、異なる培地中でインキュベートした細胞の相対MTT値(0.5または1.0 μ Mゲフィチニブの存在下でのMTT/ゲフィチニブ非存在下でのMTT)を示す。

C. ゲフィチニブに対するNSCLC細胞の耐性に対する、オートクラインで分泌されたAREGの効果。培養の開始時に、1.0 μ Mゲフィチニブおよび組換えAREGタンパク質(最終濃度1~100ng/ml)を含む培地にPC-9細胞を接種し、72時間後に3重のMTTアッセイによって細胞の生存度を測定した(青色バー)。Y軸は、細胞の相対MTT値(個々の濃度のAREGにおけるMTT/AREG不在下でのMTT)を示す。

10

1.0 μ Mゲフィチニブの非存在下におけるNSCLC細胞の生存度に対するAREGの効果も試験された。個々のPC-9細胞を、組換えAREGタンパク質を含むがゲフィチニブを含まない培地に添加し、72時間後に3重のMTTアッセイによって生存度を測定した(赤色バー)。

【0067】

図6: PDおよびPR患者から得られた切片におけるアンフィレギュリン発現の免疫組織化学分析。

【0068】

材料および方法

20

患者および組織試料

第II相臨床試験を、以前に化学療法に失敗した進行非小細胞肺癌患者に毎日250mg投与したZD1839の臨床抗腫瘍効果、薬物有害反応(ADR)および薬物動態の原因となる支配的な生物学的要因を探究するために多施設試験を含めて実施した。主要エンドポイントは、ゲフィチニブの潜在的抗腫瘍効果を予め判定することができる遺伝子発現プロファイルを明らかにすることであった。試験の開始時に、理論的根拠としてこれまでに実施された試験を用いて症例数を推定した^{12,13}。ゲフィチニブの応答率は、肺癌患者において20%未満であったので^{8,10}、上で推定されたラーニング(learning)症例を得るために約50人の患者が必要になると推定された。局所進行(IIIB期)または転移(IV期)NSCLCが従来の化学療法の1つまたは複数の投薬計画に耐性を示す患者がこの試験に参加した。組み入れ基準は、(1)20歳を超える年齢、(2)一般状態(PS)0~2、(3)適切な肝臓および腎臓機能試験であった。日本の徳島大学病院または近畿大学病院において、すべての患者に1日1回ゲフィチニブ250mgを経口投与した。この治療は、患者が、(1)疾患の進行、(2)忍容できない毒性または(3)同意の撤回のために試験から脱落するまで続けられた。

30

【0069】

客観的腫瘍応答は、国際対癌連合/世界保健機関(UICC/WHO)によって大要が述べられた判定基準によって治療開始後4週ごとに評価した。応答カテゴリーは、以下のとおりであった。完全奏効(CR)、評価可能な病変部に残存腫瘍がない;部分奏効(PR)、残存腫瘍が、測定可能な全病変部の合計でベースラインよりも50%以上減少し、新しい病変部がない;進行(PD)、残存腫瘍が、測定可能な全病変部の合計でベースラインよりも25%以上増加し、または新しい病変部が出現;および安定(SD)、CRとも、PRともPDとも認められなかった残存腫瘍。全評価可能病変部は、ベースラインと同じ技術、例えば、単純X線、CTまたはMRIを用いて二次元的に測定した(測定可能病変部の最長直径とその最長垂線の積の合計)。

40

【0070】

4カ月の治療の最後(または離脱時)に、以下の定義に基づいて各患者に対する最良総合応答を評価した。CR、少なくとも28日の間隔が空いた2つの連続した検査ポイントにおいてCRと認められた患者;PR、少なくとも28日の間隔が空いた2つの連続した検査ポイントにおいてPRまたはそれよりも良好と判断された患者;SD、少なくとも28日の間隔が空いた2つの連続した検査ポイントにおいてSDまたはそれよりも良好であったが、CRともPRとも認められなかった患者。SD症例の最初の判断は最初の腫瘍評価ポイント(無作為化から28日後)

50

またはその後に行われなければならない;PD、最初の腫瘍評価ポイント(無作為化から28日後)またはその前にPDと判定された患者;不明、患者が疾患拡大の最適応答に適格でなく、ベースライン(無作為化前)後かつ進行前の全ての客観的状态が不明である。

【0071】

ゲフィチニブ治療前に、各患者から書面でインフォームドコンセントを得て腫瘍検体を、経気管支(TBB)、皮膚またはリンパ節生検によって採取した。倫理承認は、各施設の倫理委員会から得た。生検試料は速やかに凍結し、TissueTek OCT培地(Sakura、Tokyo、Japan)に埋め込み、-80 で保存した。すべての試料を顕微鏡検査し、28人の患者(17個のラーニングおよび11個の試験症例)から得られた発現プロファイル分析に十分な癌細胞を含む試料は、さらなる分析のために最初に選択した。予測システムを検証するために、新たに登録された5症例(PD4例、SD1例)から得た盲検化試料セットも11試験症例に追加した。これらの患者についての臨床情報および組織構造情報を表1~3に要約する。

10

【0072】

顕微解剖

腫瘍ごとに存在する癌細胞と様々なタイプの実質細胞との比率がかなり異なることから、顕微解剖は、cDNAマイクロアレイ上で正確な遺伝子発現プロファイルを得るのに必要な手段である。したがって、本発明者らは、 μ CUTレーザーマイクロビーム顕微解剖システム(Molecular Machines & Industries AG、Glattbrugg、Switzerland)を使用して、厚さ8 μ mの凍結切片をヘマトキシリンとエオシンで染色し、癌細胞を選択的に収集した¹⁴。このシステムでは、組織切片を、標的組織と一緒に切断される薄い支持ポリエチレン膜上に載置し、パルス紫外(UV)ナロービームフォーカスレーザーによって、画面上で観察することができる予め選択した経路に沿って癌細胞を切除する。抽出する材料は、レーザーに直接曝されることは決してなく、レーザーによって周囲に線が引かれるだけである。他のLMシステムとは異なり、このシステムは、放射線なしに、切除された細胞の回収を進めることができる。さらに、膜は、スライド上の組織を相互汚染から保護する。本発明者らは、このシステムを用いて、小面積の組織を迅速に単離することができ、組織切片から単細胞を単離することができた(図1)。

20

【0073】

RNA抽出およびT7に基づくRNA増幅

全RNAは、RNeasyミニキットおよびRNaseフリーDNaseキット(QIAGEN、Hilden、Germany)を用いて製造者の手順にしたがって、癌細胞の個々の顕微解剖集団から抽出した。全RNAは、既報¹⁵のとおり、T7に基づくRNA増幅に供した。2ラウンドの増幅によって、各試料からaRNA(増幅RNA)40~200 μ g(>100,000倍)を得た。対照プローブとして、正常なヒト肺poly(A)⁺RNA(BD Biosciences Clontech、Palo Alto、CAおよびBIOCHAIN、Hayward、CA、USA)を同様に増幅した。個々の試料および対照から一定分量(2.5 μ g)のaRNAを、それぞれCy5-dCTPおよびCy3-dCTPの存在下で逆転写させた。

30

【0074】

cDNAマイクロアレイ

本発明者らの「ゲノムワイド」cDNAマイクロアレイシステムは、全米バイオテクノロジー情報センターのUniGeneデータベースから選択された27,648個のcDNAを含んでいる¹⁵。マイクロアレイの組み立て、ハイブリダイゼーション、洗浄およびシグナル強度検出はすでに記述されている¹⁵。腫瘍と対照のmRNA量を正規化するために、各遺伝子発現のCy5/Cy3比は、52個のハウスキーピング遺伝子の平均Cy5/Cy3比が1になるように調節した。本発明者らは、分散分析によって各マイクロアレイスライドにカットオフ値を割り当て、遺伝子のCy5/Cy3比を以下のとおり計算した。(1)Cy5(癌試料)がカットオフレベルよりも低い場合には、遺伝子のCy5/Cy3比は、そのCy5およびCy3がカットオフレベルよりも高い他の遺伝子のCy5/Cy3比の2.5パーセントイルで置換し、(2)Cy3(対照試料)がカットオフレベルよりも低い場合には、遺伝子のCy5/Cy3比は、そのCy5およびCy3がカットオフレベルよりも高い他の遺伝子のCy5/Cy3比の97.5パーセントイルで置換し、(3)Cy5とCy3の両方がカットオフレベルよりも低い場合には、遺伝子のCy5/Cy3比は空白のままにした。

40

50

【0075】

ゲフィチニブに対する応答性を予測するための遺伝子の抽出

ゲフィチニブに対する感受性に関連する可能性のある遺伝子を発見するために、約27,648個の遺伝子の個々の測定値を、ゲフィチニブに対する応答者(PR)に分類された患者群と他方は非応答者(PD)に分類された患者群の2つの患者群間で比較した。本発明者らは、2つのクラスを区別することができる強力な遺伝子の数の次元を減少させるために、2つの判定基準、すなわち、1)シグナル強度が、どちらか一方の群の少なくとも60%においてカットオフレベルよりも高いこと、および2) $|MED_{PR} - MED_{PD}| > 1$ (式中、MEDは、各群において対数変換された相対発現比から計算される中央値を示すこと)を満たす遺伝子のみを抽出した。次いで、無作為並べ替え試験を利用して、2つのクラス(PRとPD)を区別する個々の遺伝子の能力を推定した。両方の群における各遺伝子の対数変換された相対発現比から平均(μ)および標準偏差(σ)を計算した。各遺伝子の識別スコア(DS)は以下のとおり定義された。

$$DS = (\mu_{PR} - \mu_{PD}) / (\sigma_{PR} + \sigma_{PD}).$$

【0076】

試料は、各群対に対して10,000回無作為に並べ替えられた。各遺伝子のDSデータセットは正規分布を示したので、本発明者らはユーザー定義の群分けに対するp値を計算した。

【0077】

薬物応答スコアの計算

本発明者らは、以前に記述された手順にしたがって予測遺伝子候補の発現レベルを反映するゲフィチニブ応答スコア(GRS)を計算した¹⁶⁻¹⁸。各遺伝子(g_i)は、試料中の発現レベル(x_i)が、参照試料における一方の群の平均発現レベルに近いが、または他方の群の平均発現レベルに近いことによって、応答者(PR)または非応答者(PD)のどちらかに投票する。投票の大きさ(v_i)は、2つのクラスの平均からの試料中の発現レベルの偏差を反映している。

$$v_i = |x_i - (\mu_{PR} + \mu_{PD})/2|$$

【0078】

本発明者らは、投票を合計して応答者(V_{PR})および非応答者(V_{PD})の合計投票を得て、GRS値を以下のとおり計算した。

$GRS = ((V_{PR} - V_{PD}) / (V_{PR} + V_{PD})) \times 100$ (式中、GRS値は、応答者側または非応答者側の勝利の差を示している)。GRS値は-100~100の範囲であり、GRSの絶対値が高いほど予測はより有力である。

【0079】

スコアのクロス確認および予測システムの評価

全試料の予測スコアは、リーブ・ワン・アウト(leave-one-out)手法によって得た。この手法では、一度に1個の試料を試料セットから取り出し、2つのクラスの並べ替えp値および平均値を各遺伝子に対して残りの試料を用いて計算した。取り出した試料の薬物応答は、予測スコアを計算することによって予測した。これらの手順を各試料に対して繰り返した¹⁶⁻¹⁷。

【0080】

予測システムの信頼性を評価するために、本発明者らは、各遺伝子セットにおける応答者および非応答者のGRS値を用いて「分類スコア」(CS)を以下のとおり計算した。

$$CS = (\mu_{GRSpr} - \mu_{GRSpd}) / (\sigma_{GRSpr} + \sigma_{GRSpd})^{17}$$

CS値が大きいほど、予測システムによる2つの群の分離は良好であることを示す。

【0081】

階層型クラスタリング

本発明者らは、ウェブ上で利用可能なM. Eisen(<http://genome-www5.stanford.edu/MicroArray/SMD/restech.html>)によって書かれたソフトウェア(「Cluster」および「TreeView

10

20

30

40

50

w」)を使用して、マイクロアレイデータのグラフを作製し、階層型クラスタリングの樹状図を作成した。クラスター形成アルゴリズムを適用する前に、各スポットの蛍光比をまず対数変換し、次いで、各試料のデータの中心を中央値に合わせて実験の偏りを取り除いた。

【0082】

半定量的RT-PCR分析

個々の試料および正常対照肺からマイクロアレイスライドにハイブリダイズさせた同じaRNAの一定分量(5・0μg)を、オリゴ(dT)₁₂₋₁₈プライマーおよびSuperScript II逆転写酵素(Invitrogen、Carlsbad、CA、USA)を用いて逆転写した。半定量的RT-PCR実験は、GRSを確立するために使用された上位12個の遺伝子に特異的な以下の合成プライマーセット、または内部対照としてベータ-アクチン(ACTB)特異的なプライマーを用いて実施された。FLJ22662, 5'-GCCATAAGTGGTCCCACAGT-3'および5'-GTCTTCTAGTCCGTCATCTCCCT-3';アンフィレグユリン(AREG), 5'-CCATAGCTGCCTTTATGTCTGC-3'および5'-CTTTTTACCTTCGTGCACCTTT-3';コロニン、アクチン結合タンパク質、1C(COR01C)、5'-TAATCTGCTGAGGACCTTTTGTC-3'および5'-TAATTCAGTGCCTCTTCTGGGA-3';アポトーシス、カスパーゼ活性化阻害剤(AVEN), 5'-GCTCACAGCAGTAAATGCCTA-3'および5'-TGCTATGCTGTAAACACTGGCTA-3';二重特異性ホスファターゼ3(DUSP3), 5'-GGATCCTTTATTGGTGGTAGAGC-3'および5'-CCAGAGTGACCCTGAAGATAAAT-3';DJ473B4, 5'-ACCTGATTCTCTAGGTGCAGTTT-3'および5'-GTCGTTTCAACCAGGTAGTTTTG-3';プレクストリン相同様ドメイン(pleckstrin homology-like domain)、ファミリーA、メンバー2(PHLD A2), 5'-GGGCGCCTTAAGTTATTGGA-3'および5'-GGATGGTAGAAAAGCAAACACTGG-3';RNA結合モチーフタンパク質7(RBM7), 5'-TGTAATGGAGATTGTACAGGTTG-3'および5'-AGGAACAGTACAAATGCTGTGGT-3';BX092512(EST), 5'-GCACTCCTTGAAGGTACACTAAC-3'および5'-ATTTGTATTCAGCTCAGCCATGC-3';オンコスタチンM受容体(OSMR), 5'-ACCCAACCTCAAACACTAGGACTC-3'および5'-ACAGCTTGATGTCCTTTCTATGC-3';グルタミン酸-システインリガーゼ、触媒サブユニット(GCLC), 5'-TCATGAAAGGCACTGAGTTTTG-3'および5'-GTTAGCTGAAGCAGCTTTATTGC-3';コラーゲン、タイプIV、アルファ3結合タンパク質(COL4A3BP), 5'-ATATGCACAATCCTGGAAGTGA-3'および5'-TGCCTTACTAGCATTACCACCAT-3';ACTB, 5'-GAGGTGATAGCATTGCTTTTCG-3'および5'-CAAGTCAGTGACAGGTAAGC-3'。PCR反応は、増幅の対数期における生成物強度を確保するためにサイクル数が最適化された。本発明者らは、ホスフォイメージャー定量分析(Molecular Imager FX: Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA、USA)を行い、RT-PCRバンド強度が、マイクロアレイデータから得られる遺伝子発現の正規化Cy5/Cy3比と定量的に比較された。

【0083】

突然変異のホットスポットとして最近報告¹⁸されたEGFRのコドン709~870領域全体(p-ループから活性化ループ)における突然変異をスクリーニングするために、3種類のプライマーセット、すなわち、断片-1, 5'-TCTTACACCCAGTGGAGAAGC-3'および5'-GTCTTTGTGTTCCCGGACAT-3';断片-2, 5'-ACTATGTCCGGGAACACAAA-3'および5'-TTCCGTCATATGGCTTGG-3';断片-3, 5'-CGTCGCTATCAAGGAATTAAGAG-3'および5'-GTAGCTCCAGACATCACTCTGGT-3'を用いてRT-PCRが実施された。ゲフィチニブによる治療を受けた19人のNSCLC患者から得られたRT-PCR産物は、配列を直接決定することによって分析された。

【0084】

免疫組織化学分析

ゲフィチニブに対する応答者対非応答者を予測するAREGタンパク質およびトランスフォーミング成長因子アルファ(TGFA)タンパク質(その両方がEGFRおよび他のERBBメンバーのリガンドをコードする)、ならびにEGFRシグナル伝達に関係することも知られている他の3種類の候補マーカー(ディスインテグリン・メタロプロテイナーゼドメイン9(ADAM9)、CD9抗原(p24)、およびOSMR)の示差的発現を確認するために、本発明者らは、ファイバースコープ経気管支生検(TBB)およびリンパ節生検によって得られた臨床組織切片をENVISION+ Kit/HRP(DakoCytomation、Glostrup Denmark)を用いて染色した。手短に述べると、内因性ペルオキシダーゼおよびタンパク質ブロッキング反応後に、抗ヒトAREGポリクローナル抗体(Neo Markers、Fremont、CA、USA)、抗ヒトTGFAモノクローナル抗体(Calbiochem、Darm

10

20

30

40

50

stadt、Germany)、抗ヒトADAM9モノクローナル抗体(R&D Systems Inc. Minneapolis、MN、USA)、抗ヒトCD9モノクローナル抗体(Novocastra Laboratories Ltd、Newcastle upon Tyne、UK)または抗ヒトOSMRモノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology, Inc.、Santa Cruz、CA、USA)を添加し、次いで、二次抗体としてHRP標識抗ウサギまたは抗マウスIgGを添加した。次いで、基質-色素原を添加し、検体をヘマトキシリンで対比染色した。

【0085】

11人の患者から得た凍結組織試料を免疫組織化学分析用に選択した。免疫染色陽性は、臨床経過観察データの予備知識のない3人の独立した研究者によって強度を非存在または陽性として採点することによって、半定量的に評価した。したがって、症例は、検閲者が独立にそれらを規定した場合にのみ陽性と認められた。

10

【0086】

ELISA

血清は、日本の広島大学病院においてこの臨床試験と同じプロトコルに基づいてゲフィチニブによる治療を受けた35人の肺ADC患者 (PR5人、SD10人およびPD20人)の独立したセットから得た。全患者の血清は、診断時および治療開始後4週ごとにインフォームドコンセントの下に得、-80 で保存した。血清TGFAレベルは、市販酵素試験キット(TGF-アルファELISAキット:Oncogene Research Products、San Diego、CA、USA)を用いたELISAによって測定した。

【0087】

in vitroでのゲフィチニブ治療およびAREGオートクラインアッセイ

ヒトNSCLC(腺癌)細胞系PC-9、NCI-H358およびNCI-H522は、American Type Culture Collection(ATCC; Rockville、MD、USA)から購入した。これらのNSCLC細胞におけるAREGの発現を検出するために、各系統から得られた全RNAを、オリゴ(dT)₁₂₋₁₈プライマーおよびSuperscript II(Invitrogen)を用いて一本鎖cDNA用に逆転写した。半定量的逆転写酵素PCR(RT-PCR)を既報¹⁴のように実施した。ゲフィチニブ(4-(3-クロロ-4-フルオロアニリノ)-7-メトキシ-6-(3-モルホリノプロポキシ)キナゾリン:ZD1839、イレッサ)、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼの阻害剤は、AstraZeneca Pharmaceuticals(Macclesfield、UK)から提供された。この薬物をDMSOに10mMの濃度で溶解し、-20 に維持した。

20

【0088】

本発明者らは、フローサイトメトリーを実施して、ゲフィチニブ治療に対する肺腺癌細胞系の感受性を求めた。細胞を密度 5×10^5 細胞/100mm皿で蒔き、適切な無血清培地中で $1 \cdot 0 \mu\text{M}$ ゲフィチニブで処理した。その処理から72時間後にこの細胞をトリプシン処理し、PBSに回収し、70%冷エタノールで30分間固定した。細胞を、 $100 \mu\text{g/ml}$ RNase(Sigma-Aldrich Co.、St. Louis、MO、USA)で処理後、 $50 \mu\text{g/ml}$ ヨウ化プロピジウム(Sigma-Aldrich Co.)のPBS溶液で染色した。フローサイトメトリーをBecton Dickinson FACScanを用いて実施し、ModFitソフトウェア(Verity Software House, Inc.、Topsham、ME、USA)によって分析した。細胞周期のG0/G1、SおよびG2/M期における核およびsub-G1集団の割合は、ゲートから除外された(ungated)少なくとも20,000個の細胞から求めた。

30

【0089】

本発明者らは、ゲフィチニブで処理した肺腺癌細胞において、AREGがオートクライン抗アポトーシス因子として機能するかどうかを検討するために、以下のアッセイを実施した。まず、AREGを発現しないゲフィチニブ感受性PC-9細胞を、ゲフィチニブ処理前に無血清培地中で少なくとも8時間培養した。次いで、これらの細胞を、無血清培地または10%FCS補充培地、あるいはAREG発現細胞(NCI-H358またはNCI-H522)の72時間培養物から収集された無血清馴化培地中で、 $0 \cdot 5$ または $1 \cdot 0 \mu\text{M}$ ゲフィチニブと一緒に72時間インキュベートした。各培地は、ゲフィチニブを含む同じ培地で48時間目に一度置換した。ゲフィチニブに対する各細胞系の応答を検出するために、Cell Counting Kits(WAKO、Osaka、Japan)を用いたMTTアッセイによって生存度を評価した。

40

【0090】

本発明者らは、NSCLC細胞のゲフィチニブ耐性に対するAREGのオートクライン効果を確

50

認するために、 $1 \cdot 0 \mu\text{M}$ ゲフィチニブおよび最終濃度 $1 \sim 100\text{ng/ml}$ の組換えAREGタンパク質 (Genzyme-Techne、Minneapolis、MN、USA)を含む無血清培地中でPC-9細胞を72時間培養した。細胞生存度は、MTTアッセイによって評価した。NSCLC細胞の生存度に対するAREG自体の可能な効果は、組換えAREGタンパク質のみを含む無血清および無ゲフィチニブ培地中でPC-9細胞を培養することによっても評価した。MTTアッセイは上記のとおり実施した。

【0091】

結果

ゲフィチニブ治療に対する応答

この試験に参加した53人の患者のうち、46人は腺癌と診断された腫瘍に罹患しており(86・8%)、5人は扁平上皮癌であり(9・4%)、2人は大細胞癌であった(3・8%)。15人の患者はPRとなったが、CRとなったものはいなかった。17人の患者はSDに分類され、19人はPDに分類された。患者のうち2人については臨床応答データが利用できなかった。この治療に対する腫瘍応答率(CR+PR/CR+PR+SD+PD)は29・4%であり、病勢コントロール率(CR+PR+SD/CR+PR+SD+PD)は62・8%であった(表1)。

10

【0092】

腫瘍試料は43人の患者から収集した。これら43人のうち32人から得られた試料は、本発明者らのcDNAマイクロアレイによる発現プロファイル分析に十分な数の癌細胞を含んでいた。さらなるマイクロアレイ分析に適切と判断された試料の数は、PRでは8個、SDでは7個、PDでは13個であった(表2)。28個の試料のうち17個はラーニング症例として分析され(PR7個とPD10個)、11個はゲフィチニブ治療の効力に対する予測スコアリングシステムを確立するための試験症例として分析した(PR1個、PD3個およびSD7個)。予測システムをさらに検証するために、新規に参加した5人の試験症例(PD4人とSD1人)から別の盲検化試料セットを得、最初の11人の上記試験症例に最後に追加した。

20

【0093】

ゲフィチニブに対する感受性に関連する遺伝子の同定

本発明者らは、(応答者と定義された)PR群の7人の患者から得られた腫瘍と(非応答者と定義された)PD群の10人の患者から得られた腫瘍との間で発現が異なる遺伝子を、27,648個の遺伝子の発現レベルと比較することによって抽出しようとした(表2、3)。

【0094】

本発明者らは、腫瘍応答によって定義される2つのサブクラスを識別するために無作為並べ替え試験を実施し、並べ替えp値が $0 \cdot 001$ 未満であった51個の遺伝子を同定した(表4)。非応答者においては、40個の遺伝子の発現レベルはより高く、他の11個の遺伝子の発現レベルはより低かった。

30

【0095】

ゲフィチニブ治療の効力に対する予測スコアリングシステムの確立

上で選択された51個の遺伝子の発現プロファイルに基づいて、本発明者らは、ゲフィチニブ治療の効力に対する予測スコアリングシステムを確立しようとして試みた。ゲフィチニブ応答スコア(GRS)と呼ばれる予測スコアが、前記手順にしたがって計算された(方法の項参照)。2つの群を最適に分離する候補数を決定するために、本発明者らは、並べ替えp値の有意性およびリーブ-ワン-アウト試験によって計算された予測スコアに基づいて、順位付けされたリストの最下位から出発して1ずつ減らして51個の遺伝子を順位付けした(51、50、49、48など)。本発明者らは、2つのクラスを識別する能力を評価するために本発明者らが以前に定義した標準である分類スコア(CS)を各遺伝子セットに対して計算した¹⁷。

40

【0096】

図2Aに示すように、識別遺伝子数が変わると異なる予測スコアが得られた。本発明者らの候補リスト中の上位わずか12個の遺伝子を用いてスコアを計算したときに最適なCSが得られ、すなわち、応答者が非応答者から最適に分離された。

【0097】

全51個の遺伝子または上位12個の遺伝子のみを用いた階層型クラスタリング分析によって、全17症例がゲフィチニブに対する応答によって2つの群のどちらかに分類された(図2

50

、B)。2つの群は、上位12個の遺伝子をクラスター分析に用いたときに、最も明確に分離された。最後に、本発明者らは、12個の選択遺伝子の発現レベルに基づいて、ゲフィチニブに対する個々のNSCLCの感受性を予測するために臨床的に適用することができる数値的な薬物応答スコアリングアルゴリズムを確立した。

【0098】

本発明者らは、この予測システムを検証するために、このシステムを確立するために使用された17の「ラーニング」症例とはまったく無関係である8つの追加の(「試験」)NSCLC症例(PRが1個とPDが7個)を検討した。本発明者らは、これらの試料の各々における遺伝子発現プロファイルを調べ、次いで12個の識別遺伝子の発現レベルに基づいてGRSを計算した。図2Cに示すように、GRSシステムによって得られたスコアは、全8つの「試験」症例においてゲフィチニブに対する臨床応答と一致した。

【0099】

腫瘍応答がSDである患者のGRS値

8人の試験SD患者のGRS値を、上で確立された予測スコアリングシステムによって計算した。これらの値は、(非応答者として予測された)-83・0から61・6(応答者)まで広く分布したが、観察期間を通してSD状態を維持した患者のスコアは、試験のある時点においてSDと判断されたが治療開始後3または4カ月以内に疾患が進行した患者のスコアよりも高い可能性があった(図2、C)。GRSシステムは、腫瘍応答がPRである患者とPDである(SDでない)患者を識別する遺伝子発現プロファイルに基づいて確立されたが、これらの結果は、ゲフィチニブに対する応答によってSD患者を群分けするのにGRSが役立つことを示唆している。

【0100】

半定量的RT-PCR分析によるGRSの検証

上位12個の予測遺伝子の発現がPR症例とPD症例との間で異なることを確認するために、マイクロアレイデータから得られる発現値と、同じ患者(5人のPRおよび7人のPD)由来のRNAの半定量的RT-PCRから得られる値との相関を取った(図3、A、表5、A)。スピアマンの順位相関は、12個の遺伝子のすべてが正であり、12個の遺伝子のうち7個が有意に正であった。

【0101】

GRSの免疫組織化学的検証

予測的なタンパク質マーカーの発現がPR症例とPD症例との間で異なることを確認するために、本発明者らは、AREG、TGFA、ADAM9、CD9およびOSMRに対する5種類の異なる抗体を用いて免疫組織化学染色を実施した。これらの分子はすべてリガンド-EGFRシグナル伝達に関与していることが知られており、その並べ替えp値は0・01未満であった。本発明者らは、まず、同じ患者からTBBおよびリンパ節生検によって得られた腫瘍組織切片対をこれら5種類の抗体を用いて染色した。これら5種類のマーカーのタンパク質発現についての患者内の差は、3人の異なる患者において認められなかった(図3、B)。本発明者らは、11個のNSCLC試料(PRが5個とPDが6個)において5種類のマーカーを用いてマイクロアレイデータも検証した。結果は、マイクロアレイデータと一致した(図3、C、表5、B)。

【0102】

TGFAの血清レベル

日常的な臨床状況においてこの予測システムの有用性をさらに評価するために、本発明者らは、血清学的試験のために独立に集められ、マイクロアレイ分析には参加しなかった5人のPR、10人のSDおよび20人のPD患者から得た血清試料中のTGFAタンパク質をELISAによって検出した。TGFAの血清レベルは、PD患者では $19 \cdot 0 \pm 2 \cdot 8$ pg/ml(平均 \pm SE)であり、SD患者では $13 \cdot 9 \pm 1 \cdot 9$ pg/mlであり、PR患者では $12 \cdot 8 \pm 1 \cdot 4$ pg/mlであった(図4)。カットオフとして $16 \cdot 0$ pg/mlを使用すると、PD患者から得られた20個の血清試料のうち12個はTGFAに対して陽性であり、PR患者から得られた全試料は陰性であった。

【0103】

in vitroでのゲフィチニブ治療およびAREGオートクラインアッセイ

10

20

30

40

50

EGFRおよび他のERBBメンバーのリガンドであるAREGは、非応答者においてかなり過剰発現されたが、応答者においては検出不可能(または困難)であった。AREGタンパク質がオートクラインで分泌されたときにゲフィチニブ治療に対するNSCLCの耐性をもたらすかどうかを検討するために、本発明者らは以下の生物学的分析を実施した。本発明者らは、最初に、RT-PCR実験によって肺腺癌細胞系NCI-H358および-H522におけるAREG mRNAの発現を同定したが、PC-9では同定されなかった(図5、A)。次に、本発明者らは、PC-9細胞を $1.0\mu\text{M}$ ゲフィチニブで処理してから72時間後にフローサイトメトリー分析を実施し、ゲフィチニブによって、sub-G1における核の割合(24%)が未処理細胞(6%)よりも増加したことを見出した(データ示さず)。この結果は、ゲフィチニブがPC-9細胞においてアポトーシスを誘導しうることを示唆した。

10

【0104】

次いで、本発明者らは、ゲフィチニブ感受性でありAREGを発現しないPC-9細胞の生存度を、無血清培地中または 0.5 もしくは $1.0\mu\text{M}$ ゲフィチニブの存在下もしくは非存在下において増殖されたNCI-H358もしくは-H522細胞から得られた無血清馴化培地中で培養した後分析した。図5Bに示すように、ゲフィチニブを含む無血清馴化培地中でインキュベートされたPC-9細胞の生存度は、同じ濃度のゲフィチニブを含む無血清培地中で増殖されたPC-9細胞よりも高かった。ゲフィチニブの供給者が以前に報告したように、ゲフィチニブの抗腫瘍効果は10%FCSの存在下で低下し、このアッセイがゲフィチニブ投与量および活性の定量測定に適切であることが示唆された。

【0105】

本発明者らは、オートクラインで分泌されたAREGが、ゲフィチニブによって処理されたNSCLC細胞のアポトーシスを阻害するかどうかを検討するために、 $1.0\mu\text{M}$ ゲフィチニブの存在または非存在下で、最終濃度 $1\sim 100\text{ng/ml}$ の組換えAREGタンパク質を含む無血清培地中でPC-9細胞を培養した。AREGと $1.0\mu\text{M}$ ゲフィチニブの両方と一緒にインキュベートしたPC-9細胞の生存度は、 $1.0\mu\text{M}$ ゲフィチニブのみと一緒にインキュベートした細胞よりもAREG用量依存的に増加した(図5、C)。一方、組換えAREGのみでは、PC-9細胞の生存度に効果がなかった(図5、C)。この観察は、AREGが、ゲフィチニブによって誘導されるアポトーシスを阻害するが、それ自体では細胞の生存度に影響を及ぼさないことを示していると考えられた。AREGの免疫染色を図6に示す。

20

【0106】

考察

多数の証拠によって、EGFRオートクライン経路中の分子が、細胞増殖、血管形成および転移性分布を含めて、癌の形成および進行に重要ないくつかのプロセスに関与しているという見解が支持されている⁵。したがって、特定のシグナル伝達を治療によって遮断することは、有望な癌治療戦略となり得る。合成アニリノキナゾリンであるゲフィチニブは、受容体の細胞内ドメイン上の結合部位をアデノシン三リン酸と競合することによって、EGFRのチロシンキナーゼ活性を阻害する⁷。第二相試験(IDEAL 1およびIDEAL 2)において、進行NSCLC用の第2選択、第3選択または第4選択単独療法としてゲフィチニブを使用すると腫瘍応答率はほぼ20%に達した⁸⁻¹⁰。これは、従来の細胞傷害性薬剤によって達成される腫瘍応答率よりも優れていた。IDEAL 1試験における患者の多変量解析によれば、女性の応答率は男性よりも高く、腺癌患者の応答率は扁平上皮癌患者よりも高いことが示唆された(それぞれ、オッズ比 2.7 および 3.5)⁹。最近の試験によれば、ゲフィチニブが効果的である個体は、細気管支肺胞性サブタイプの腺癌に罹っている可能性が高く、これまで一度も喫煙者になっていない可能性が高いことが示唆された(それぞれ、オッズ比 13.5 および 4.2)¹⁹。本明細書で報告する臨床試験に記載されたより高い腫瘍応答率(29.4%)は、腺癌患者の比率が(46人の腺癌、5人の扁平上皮癌および2人の大細胞癌)他の試験の場合よりも高いことを反映しているのかも知れない。細気管支肺胞上皮癌(BAC)の特徴を含めて、ゲフィチニブ感受性の臨床病理学的決定要因はある程度予測的であるが^{9,10,19,20}、既報および本発明者らの観察は、ゲフィチニブ治療に対するNSCLCの応答を完全に予測できる要因がないことを明白に示唆している。したがって、応答者を非応答者から予め識別す

30

40

50

る新規方法によって、臨床現場においてより焦点を合わせてゲフィチニブを使用することが可能になる。

【0107】

本発明者らは、cDNAマイクロアレイにおいて得られた進行NSCLCの遺伝子発現プロファイルを統計解析することによって、ゲフィチニブに対する感受性に関連する数十の遺伝子を同定した。本発明者らは、応答者(PR)群と非応答者(PD)群との間で発現レベルが最も有意差を示す12個の遺伝子の発現に基づく予測スコアリングシステムを導入した。この遺伝子セットは、肺腺癌の発現プロファイルから選択された。しかし、GRSシステムは、本発明者らの「試験」PR症例およびPD症例の全8例を、ゲフィチニブに対するそれらの臨床応答によって分類することに成功し、そのうちの1例は扁平上皮癌であった。さらに、このシステムは、中間の腫瘍応答(SD)を、腫瘍静的効果を長期間維持することに成功した一方の患者群とそれに失敗したもう一方の患者群の2つの群に分離する可能性があった。

10

【0108】

実際には、進行NSCLC患者は、その腫瘍の外科的切除候補にはめったにならないので、本発明者らは、すべての病院において利用可能な侵襲性が最小の技術を用いて個々の腫瘍の化学感受性を予測する必要がある。したがって、本発明者らは、例えば、柔軟な気管支ファイバースコープ検査によって得ることができる癌組織の量しか必要としない予測システムを確立しようと試みた。本発明者らは、本方法の個々のステップを検証することによって、わずか1mmの生検材料において遺伝子発現を正確にプロファイルすることができた。関連するマイクロアレイ結果は、GRSシステムを確立するために、最大の有意差を示す12個の遺伝子の半定量的RT-PCRによって確認された。また、本発明者らは、TBB生検試料とリンパ節生検試料の両方において、応答者候補を非応答者から識別するために、そのすべてがリガンド-EGFRシグナル伝達に関与すると報告された5種類の異なる生物マーカー(AREG、TGFA、ADAM9、CD9およびOSMR)に対する抗体の有効性を検証した。さらに、本発明者らは、肺ADC患者において血清TGFAタンパク質をELISAによって検出することができた。これらの臨床用マーカーはさらに評価する必要がある。しかし、予測に必要な遺伝子数が限られているため、血液の血清学的検査、PCR実験または生検材料の免疫組織化学分析などの定常的な手順によって、NSCLC患者に対するゲフィチニブ治療の効力を研究室が最終的に予め診断できるようにすべきである。

20

【0109】

本発明者らの知る限りでは、外科的に切除された「初期」肺癌の検体のプロファイルは報告されているが、本願は切除不能な「進行」肺癌の遺伝子発現プロファイルについての最初の報告である^{21, 22}。しかし、NSCLCと診断された患者における腫瘍の約70%は、すでに局所進行または転移性であり、従来の治療様式に一般に抵抗性になっている。したがって、本明細書に記載された遺伝子は、肺癌進行の分子機構を明らかにするのに有用なはずであり、薬剤開発の標的候補となり得る。

30

【0110】

ゲフィチニブは、EGFR-TKの「選択的」阻害剤として開発された。しかし、EGFR活性化レベルとゲフィチニブに対する応答との間の明確な関連性は、in vitroでもin vivoでも見出されていない^{7, 23}。臨床試験においては、ゲフィチニブは、扁平上皮癌に対するよりも腺癌に対して有効であるが^{9, 10}、腺癌におけるEGFRの過剰発現はより少ない²⁴。したがって、この治療の良好な標的となる個々の腫瘍を同定することが重要である。臨床試料を用いた本発明者らの分析においては、応答者と非応答者との間のEGFRタンパク質発現の差は統計的に有意ではなかった。一方、どちらもEGFRおよび他のERBBメンバーのリガンドをコードするアンフィレギュリン(AREG)およびトランスフォーミング成長因子アルファ(TGFA)は、非応答者においてかなり過剰発現されたが、応答者においては検出不可能(または困難)であった(それぞれ、 $p=0.000000000093$ および 0.0095 ;表4)。

40

【0111】

肺癌細胞の増殖および生存におけるリガンドおよびEGFRオートクラインループの重要性に議論の余地はないが²⁴⁻²⁶、癌の形成および進行におけるAREGの役割はあまり理解され

50

ていない。しかし、いくつかの証拠によれば、AREGの過剰発現は、NSCLC患者の短命と関連があることが示唆される²⁴。さらに、ヒト肺腺癌細胞におけるAREGの抗アポトーシス活性が最近報告された²⁵。本発明者らは、AREGの抗アポトーシス活性が、ゲフィチニブ治療に対するNSCLC細胞の耐性をもたらすかどうかを検討するために、ゲフィチニブ感受性であるがAREGを発現しないNSCLC細胞系PC-9を用いて、生物学的アッセイを実施した。本発明者らは、PC-9細胞に対するゲフィチニブの抗腫瘍活性が、AREGのオートクライン分泌によって劇的に低下することを見出した。この証拠によれば、EGFRによる成長因子シグナル伝達は、リガンド、二量体化の相手、エフェクターおよび下流経路の多様性のためにすべての段階において著しく複雑であるが²⁶、AREGが、癌の進行およびゲフィチニブに対する耐性をもたらすリガンド-受容体オートクライン成長経路の主要な活性化因子でありうる

10

【0112】

EGFR-TK経路に関連するいくつかの要素が本発明者らの示差的発現遺伝子リスト上に存在する。例えば、二重特異性ホスファターゼ3(DUSP3)、ADAM9、CD9およびOSMRをコードする遺伝子は、主として非応答者において発現された(それぞれ、 $p=0.00000000094$ 、 0.01 、 0.000022 および 0.0000011)。DUSP3遺伝子は、シグナル伝達の重要なメディエーターである分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)を脱リン酸化することによってEGFRシグナル伝達をモジュレートし²⁷、ADAM9は、proHB-EGF(プロヘパリン結合性上皮成長因子様成長因子(pro Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor))の細胞外ドメイン(ectodomain)を分断することによってEGFRシグナル伝達の活性化に

20

【0113】

ゲフィチニブは、いくつかの癌細胞のアポトーシスをin vivoで誘導することができるので、抗アポトーシス活性を有する他の分子およびAREGは、この薬物に対する腫瘍の耐性の一因になり得る。AVEN(アポトーシス、カスパーゼ活性化阻害剤)は、本発明者らの非

30

【0114】

要約すると、本発明者らは、ヒト肺癌の中でゲフィチニブに対する応答者と非応答者との間で発現が有意に異なる51個の遺伝子を同定し、この薬物に対する個々の腫瘍の応答を予測するために、これらの遺伝子のうち12個の発現パターンに基づいて数値スコアリングシステムを確立した。より大きな臨床例セットを用いたさらなる検証が必要であろうが、本明細書に示すデータは、シグナル抑制戦略の根底にある分子事象に貴重な洞察を与え、遺伝子セットを高い予測価で試験することによって個々のNSCLC患者に対するゲフィチニブ治療についての重要な情報を提供することができる。

【0115】

50

参考文献

- 1: Fossella, F.V., et al., *Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. The TAX 320 Non-Small Cell Lung Cancer Study Group.* J Clin Oncol, 2000. 18(12): p. 2354-62.
2. *Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials.* Bmj, 1995. 311(7010): p. 899-909. 10
3. Schiller, J.H., et al., *Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer.* N Engl J Med, 2002. 346(2): p. 92-8.
4. Kelly, K., et al., *Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial.* J Clin Oncol, 2001. 19(13): p. 3210-8.
- 5: Baselga, J., *Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy.* Oncologist, 2002. 7 Suppl 4: p. 2-8. 20
6. Traxler, P., *Tyrosine kinases as targets in cancer therapy - successes and failures.* Expert Opin Ther Targets, 2003. 7(2): p. 215-34.
7. Wakeling, A.E., et al., *ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy.* Cancer Res, 2002. 62(20): p. 5749-54.
8. Herbst, R.S., *Dose-comparative monotherapy trials of ZD1839 in previously treated non-small cell lung cancer patients.* Semin Oncol, 2003. 30(1 Suppl 1): p. 30-8. 30
9. Fukuoka, M., et al., *Final results from a phase II trial of ZD1839 ('Iressa') for patients with advanced non-small cell lung cancer (IDEAL 1).* Pro Am Soc Clin Oncol 2002. 21;298a(A1188).
10. Kris, MG., et al., *A phase II trial of ZD1839 ('Iressa') in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients who had failed platinum- and docetaxel-based regimens (IDEAL 2).* Pro Am Soc Clin Oncol 2002. 21;292a(A1166). 40

11. Inoue, A., et al., *Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib*. Lancet, 2003. 361(9352): p. 137-9.
12. Bohm, M., et al., *Microbeam MOMeNT: non-contact laser microdissection of membrane-mounted native tissue*. Am J Pathol, 1997. 151(1): p. 63-7.
13. Okabe, H., et al., *Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression*. Cancer Res, 2001. 61(5): p. 2129-37. 10
14. Kitahara, O., et al., *Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia*. Cancer Res, 2001. 61(9): p. 3544-9.
15. Golub, T.R., et al., *Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring*. Science, 1999. 286(5439): p. 531-7.
16. MacDonald, T.J., et al., *Expression profiling of medulloblastoma: PDGFRA and the RAS/MAPK pathway as therapeutic targets for metastatic disease*. Nat Genet, 2001. 29(2): p. 143-52. 20
17. Kaneta, Y., et al., *Prediction of sensitivity to STI571 among chronic myeloid leukemia patients by genome-wide cDNA microarray analysis*. Jpn J Cancer Res 2002. 93, p. 849-856.
18. Pavelic, K., et al., *Evidence for a role of EGF receptor in the progression of human lung carcinoma*. Anticancer Res, 1993. 13(4): p. 1133-7.
19. Kikuchi, T., et al., *Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: Identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs*. Oncogene, 2003. 22(14): p. 2192-205. 30
20. Heighway, J., et al., *Expression profiling of primary non-small cell lung cancer for target identification*. Oncogene, 2002. 21(50): p. 7749-63.
21. Beer, D.G., et al., *Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma*. Nat Med, 2002. 8(8): p. 816-24.
22. Miura, K., et al., *Laser capture microdissection and microarray expression analysis of lung adenocarcinoma reveals tobacco smoking- and prognosis-related molecular profiles*. Cancer Res, 2002. 62(11): p. 3244-50. 40
23. Moasser, M.M., et al., *The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells*. Cancer Res, 2001. 61(19): p. 7184-8.

24. Rusch, V., et al., *Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression.* Clin Cancer Res, 1997. 3(4): p. 515-22.

25. Fontanini, G., et al., *Evaluation of epidermal growth factor-related growth factors and receptors and of neoangiogenesis in completely resected stage I-IIIa non-small-cell lung cancer: amphiregulin and microvessel count are independent prognostic indicators of survival.* Clin Cancer Res, 1998. 4(1): p. 241-9.

10

26. Brundage, M.D., D. Davies, and W.J. Mackillop, *Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress.* Chest, 2002. 122(3): p. 1037-57.

27. Hurbin, A., et al., *Inhibition of apoptosis by amphiregulin via an insulin-like growth factor-1 receptor-dependent pathway in non-small cell lung cancer cell lines.* J Biol Chem, 2002. 277(51): p. 49127-33.

28. Yarden, Y. and M.X. Sliwkowski, *Untangling the ErbB signalling network.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(2): p. 127-37.

20

29. Prenzel, N., et al., *EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF.* Nature 1999. 402(6764):884-8

30. Nelson, Chau, et al., *Aven, a novel inhibitor of caspase activation, binds Bcl-xL and Apaf-1.* Molec Cell 2000. 6: p. 31-41.

31. Tipnis, SR., et al., *Overexpression of the regulatory subunit of r-glutamylcysteine synthetase in HeLa cells increases r-glutamylcysteine synthetase activity and confers drug resistance.* Biochem J 1999. 337, p. 559-566.

30

【表 1】

表1: ベースライン患者特性及び応答の概要

| 特性 | 割合(%) | 患者数 |
|--|-------|------|
| 性別 | | |
| 男性 | 58.5 | (31) |
| 女性 | 41.5 | (22) |
| 年齢 | | |
| 中央値 | 59 | |
| 範囲 | 35-80 | |
| 組織構造 | | 10 |
| 腺癌 | 86.8 | (46) |
| 扁平上皮癌 | 9.4 | (5) |
| 大細胞癌 | 3.8 | (2) |
| ステージ | | |
| IIIA | 1.9 | (1) |
| IIIB | 7.5 | (4) |
| IV | 90.6 | (48) |
| 一般状態 | | |
| 0 | 26.4 | (14) |
| 1 | 60.4 | (32) |
| 2 | 13.2 | (7) |
| 事前の投薬計画数 | | |
| 1 | 24.5 | (13) |
| 2 | 35.9 | (19) |
| 3 | 28.3 | (15) |
| 4 | 0 | (0) |
| 5 | 7.5 | (4) |
| 6 | 3.8 | (2) |
| ゲフィチニブ療法に対する応答 | | |
| CR | 0 | (0) |
| PR | 28.3 | (15) |
| SD | 32.1 | (17) |
| PD | 35.8 | (19) |
| 未知 | 3.8 | (2) |
| 腫瘍応答率(%) (CR+PR/CR+PR+SD+PD) | 29.4 | (15) |
| 病勢コントロール率(%) (CR+PR+SD/CR+PR+SD+PD) | 62.8 | (32) |

10

20

30

【 0 1 1 7 】

【表 2】

表2:分析に適した症例数およびそれらの最良総合応答

| 症例数 | 最良総合応答 | | | | | 合計 |
|------------|--------|----|----|----|----|----|
| | PR | SD | PD | 未知 | | |
| 全参加症例 | 15 | 17 | 19 | 2 | 53 | |
| 試験に同意した症例 | 15 | 14 | 13 | 1 | 43 | |
| 分析に適した症例 | 8 | 10 | 13 | 1 | 32 | |
| ラーニング症例(1) | 7 | 0 | 10 | 0 | 17 | |
| 試験症例(1,2) | 1 | 7 | 3 | 0 | 11 | |

(1)ラーニング症例は、GRSを
開発するために使用したのに対して、
試験症例はGRSの検証に使用した。

(2)5人の新たに参加した症例
(4人のPDと1人のSD)からの
別の盲検化試験セットも、
これら11の試験症例にその後追加された。

【 0 1 1 8 】

10

20

30

40

【表 3】

表3:患者の臨床病理学的特徴

| 症例番号(*) | 性別 | 年齢 | 組織構造 タイプ(1) | TNM | 病期分類 (2) | 以前の 化学療法数 | EGFR染色 腫瘍細胞 (%) | EGFR突然変異(3) | ゲフィチニブ濃度 (ng/ml) | ゲフィチニブに対する応答(4) | | | | 最良総合 応答(5) | 予別に 使用(6) | GRS(7) |
|---------|----|-----------|----------------|-------|-------------|--------------|-----------------------|--|---------------------|-----------------|---------|---------|---------|---------------|--------------|--------|
| | | | | | | | | | | 1 カ月 | 2 カ月 | 3 カ月 | 4 カ月 | | | |
| LC01 | 女性 | 36 | ADC | 1 0 1 | IV | 1 | 80 | 検出されず | 258.9 | PR | PR | PR | PR | PR | ラーニング | 100 |
| LC02 | 男性 | 64 | ADC | 2 3 1 | IV | 3 | 80 | | 140.3 | PR | PR | PR | PR | PR | ラーニング | 100 |
| LC03 | 女性 | 54 | ADC | 2 0 1 | IV | 3 | 20 | | 167.0 | PR | PR | PR | PR | PR | ラーニング | 100 |
| LC04 | 女性 | 75 | ADC | 2 1 1 | IV | 1 | 30 | 検出されず | 169.7 | PR | PR | PR | PR | PR | ラーニング | 100 |
| LC05 | 女性 | 73 | ADC | 0 2 1 | IV | 5 | 80 | 46 A750del(2481_2495c) | 300.6 | PR | PR | PR | PR | PR | ラーニング | 100 |
| LC06 | 女性 | 75 | ADC | 4 1 1 | IV | 3 | 80 | 検出されず | 874.0 | SD | PR | PR | PR | PR | ラーニング | 100 |
| LC07 | 女性 | 70 | ADC | 2 1 1 | IV | 3 | 95 | 17_A750del(2485_2496d) L858R(2819T>G) | 460.8 | SD | PR | PR | PR | PR | ラーニング | 100 |
| LC08 | 女性 | 47 | ADC | 4 3 1 | IV | 2 | 64(20-95) | | 306.5 | PR | PR | PR | PR | PR | ラーニング | 100 |
| 平均(範囲) | | 62(36-75) | | | | 2:6(1-5) | 64(20-95) | | 334.7(140.3-874.0) | | | | | | 試験 | 54.8 |
| LC09 | 女性 | 63 | ADC | 4 0 1 | IV | 3 | 90 | | 743.4 | SD | SD | SD | SD | SD | 試験 | 61.6 |
| LC10 | 女性 | 56 | ADC | 2 0 1 | IV | 6 | 70 | | 511.8 | SD | SD | SD | SD | SD | 試験 | -9.8 |
| LC11 | 男性 | 67 | ADC | 4 0 1 | IV | 2 | 0 | | 631.3 | SD | SD | SD | SD | SD | 試験 | -5.3 |
| LC12 | 男性 | 53 | ADC | 4 3 1 | IV | 2 | 40 | 検出されず | 306.1 | SD | SD | SD | SD | SD | 試験 | -23.8 |
| LC13 | 女性 | 56 | ADC | 4 2 0 | IIIb | 2 | 60 | | 364.8 | SD | SD | SD | SD | SD | 試験 | -58.5 |
| LC14 | 女性 | 62 | ADC | 4 2 1 | IV | 3 | 60 | | 322.4 | SD | SD | SD | SD | SD | 試験 | -83 |
| LC15 | 男性 | 61 | ADC | 0 0 1 | IV | 5 | 60 | | 278.9 | SD | SD | SD | SD | SD | 試験 | -40.5 |
| 平均(範囲) | | 60(53-67) | | | | 3:3(2-6) | 53(0-90) | | 451.2(278.9-631.3) | | | | | | 試験 | |
| LC16 | 男性 | 42 | ADC | 4 3 1 | IV | 5 | 90 | 検出されず | 212.6 | SD | PD | | | | ラーニング | -63.9 |
| LC17 | 女性 | 54 | ADC | 2 3 1 | IV | 2 | 50 | 検出されず | 320.6 | SD | PD | | | | ラーニング | -86 |
| LC18 | 女性 | 61 | ADC | 1 3 0 | IIIb | 2 | 30 | 検出されず | 229.3 | SD | PD | | | | ラーニング | -67.8 |
| LC19 | 男性 | 59 | ADC | 0 2 1 | IV | 2 | 80 | W817C(2697G>T) | 150.7 | SD | PD | | | | ラーニング | -57.1 |
| LC20 | 男性 | 65 | ADC | 0 3 1 | IV | 3 | 80 | 検出されず | 167.8 | SD | PD | | | | ラーニング | -59.1 |
| LC21 | 男性 | 55 | ADC | 4 3 1 | IV | 3 | 80 | 検出されず | | PD | PD | | | | ラーニング | -73.1 |
| LC22 | 男性 | 80 | ADC | 4 3 1 | IV | 2 | 80 | Q787Q(2607G>A) | | PD | PD | | | | ラーニング | -55.5 |
| LC23 | 男性 | 35 | ADC | 4 0 1 | IV | 5 | 0 | 検出されず | 356.3 | PD | PD | | | | ラーニング | -100 |
| LC24 | 男性 | 57 | ADC | 4 3 1 | IV | 1 | 0 | 検出されず | 405.6 | PD | PD | | | | ラーニング | -46.7 |
| LC25 | 女性 | 65 | ADC | 2 0 1 | IV | 1 | 0 | 検出されず | | PD | PD | | | | ラーニング | -86.1 |
| LC26 | 男性 | 64 | SCC | 3 3 1 | IV | 2 | 10 | 検出されず | | PD | PD | | | | ラーニング | -67.7 |
| LC27 | 女性 | 65 | ADC | 4 2 1 | IV | 1 | 10 | 検出されず | | SD | PD | | | | 試験 | -69.4 |
| LC28 | 男性 | 74 | ADC | 2 1 1 | IV | 1 | 49(0-90) | L858R(2819T>G) | | PD | PD | | | | 試験 | -64.8 |
| 平均(範囲) | | 60(35-80) | | | | 2:3(1-5) | 49(0-90) | | 263.2(150.7-405.6) | | | | | | 試験 | |

(1)ADC、腺癌;SCC、扁平上皮癌
(2)TNM臨床分類および病期群分けは、UICC/AJCC分類に基づいて評価された。
(3)EGFR(GenBank登録番号NM005228)のコンド位置709~870(p-ループから活性化ループまで)における突然変異
(4)ゲフィチニブに対する客観的腫瘍応答は、治療開始後4週ごとにUICC/AJCC判定基準を用いて評価された。
(5)最良総合応答は、材料および方法において述べられた定義に基づいて評価された。
(6)ラーニング、GRSを開発するために使用された試験;試験、GRSの検証に使用された試験。
(7)GRS:予測システムによって求められたゲフィチニブ応答スコア
(*)GRSをさらに検証するために、5人の新たに参加した症例(4人のPDと1人のSD)からの別の盲検化試験セットも、これら28の症例にその後追加された。

【表4】

表4. ゲフィチニブに対する応答者(PR)を非応答者(PD)から識別する51個の遺伝子候補リスト(*)

| 順位 | GenBank 記号 | 遺伝子名 | 主として発現されるクラス | 並べ替えp値 | 中央値-倍率差 (Median-fold difference)(log2) |
|----|------------|--|--------------|---------|--|
| 1 | NM_0248 | FLJ226G: 仮想タンパク質FLJ226G2 | PD | 8.1E-12 | 2.0 |
| 2 | BC00979E | AREG アンフィレギュリン(神経鞘腫由来成長因子) | PD | 9.3E-12 | 8.0 |
| 3 | NM_0143 | CORO1C コロニン、アクチン結合タンパク質、1C | PD | 2.3E-10 | 4.6 |
| 4 | BC01048E | AVEN アポトーシス、カスパーゼ活性化阻害剤 | PD | 4.2E-10 | 4.3 |
| 5 | NM_0040 | DUSP3 二重特異性ホスファターゼ3(ワクシニアウイルスホスファターゼVH1関連) | PD | 9.4E-10 | 4.4 |
| 6 | AJ026836 | DJ473B4 仮想タンパク質dJ473B4 | PD | 1.7E-09 | 8.0 |
| 7 | BU50050E | PHLDA2 プレクストリン相同様ドメイン、ファミリーA、メンバー2 | PD | 1.8E-09 | 8.0 |
| 8 | NM_0160 | RBM7 RNA結合モチーフタンパク質7 | PD | 1.8E-08 | 2.9 |
| 9 | BX092512 | EST | PD | 7.7E-08 | 3.0 |
| 10 | AI436027 | OSMR オンコスタチンM受容体 | PD | 1.1E-07 | 3.7 |
| 11 | AI971137 | GCLC グルタミン酸-システインリガーゼ、触媒サブユニット | PD | 1.2E-07 | 3.9 |
| 12 | BQ02487 | COL4A3E コラーゲン、タイプIV、アルファ3(グッドパスチャー抗原)結合タンパク質 | PD | 2.0E-07 | 3.6 |
| 13 | U52522 | ARFIP2 ADP-リポシル化因子相互作用タンパク質2(アルファブチン(arfaptin)2) | PD | 2.6E-07 | 2.8 |
| 14 | BM99605 | C10orf9 染色体10オープンリーディングフレーム9 | PD | 4.2E-07 | 2.5 |
| 15 | AK025452 | NIP30 NEFA相互作用核タンパク質NIP30 | PD | 5.1E-07 | 3.7 |
| 16 | N52048 | KIAA0776 KIAA0776 タンパク質 | PD | 5.4E-07 | 7.2 |
| 17 | AA50700E | SLC35F2 溶質キャリアファミリー35、メンバーF2 | PD | 6.0E-07 | 5.8 |
| 18 | AA22624E | GAMLG カルシウム調節リガンド | PD | 6.8E-07 | 5.0 |
| 19 | AF005888 | NOG4 COX4の仲間(neighbor) | PD | 1.1E-06 | 4.0 |
| 20 | AF012281 | PDZK1 PDZドメイン含有1 | PD | 1.3E-06 | 4.5 |
| 21 | AI188190 | DIS3 有糸分裂制御タンパク質dis3ホモログ | PD | 1.7E-06 | 3.8 |
| 22 | BC00153E | CGI-4B CGI-4B タンパク質 | PD | 2.0E-06 | 3.5 |
| 23 | NM_0070 | CPSF6 切断およびポリアデニル化特異因子6、68kDa | PD | 2.2E-06 | 3.4 |
| 24 | NM_0022 | KIF3C キネシンファミリーメンバー3C | PD | 2.2E-06 | 3.5 |
| 25 | BQ13523E | CD9 CD9抗原(p24) | PD | 2.2E-06 | 1.7 |
| 26 | BC06132E | LRRC8 ロイシンリッチリピート含有8 | PD | 2.5E-06 | 3.4 |
| 27 | BC03850E | SNF1LK SNF1様キナーゼ | PD | 2.6E-06 | 2.8 |
| 28 | U78556 | CRA シスプラチン耐性関連 | PD | 2.7E-06 | 3.7 |
| 29 | BC03562E | EGR2 初期成長応答2(Krox-20ホモログ、ショウジョウバエ) | PD | 3.4E-06 | 3.0 |
| 30 | X52426 | KRT13 ケラチン13 | PD | 1.9E-05 | 3.4 |
| 31 | NM_0055 | BCAT1 分岐鎖アミノトランスフェラーゼ1、サイトゾル | PD | 2.3E-05 | 1.7 |
| 32 | NM_0066 | SDCCAG 血清学的規定結腸癌抗原3 | PR | 2.6E-05 | 3.7 |
| 33 | AA46409E | PIGK ホスファチジルイノシトールグリカン、クラスK | PD | 3.2E-05 | 1.1 |
| 34 | AA96118E | MRPS9 ミトコンドリアリボソームタンパク質S9 | PD | 9.8E-05 | 2.3 |
| 35 | NM_0181 | ASPM asp(異常紡錘体)様、小頭症関連(ショウジョウバエ) | PR | 2.3E-04 | 2.8 |
| 36 | NM_0227 | ACBD3 アシルコエンザイムA結合ドメイン含有3 | PD | 2.4E-04 | 3.8 |
| 37 | AA160544 | ZNF325 ジンクフィンガータンパク質325 | PR | 2.7E-04 | 4.5 |
| 38 | AK05765E | LOC285513 仮想タンパク質LOC285513 | PD | 2.7E-04 | 3.8 |
| 39 | NM_0033 | TSSC1 腫瘍抑制サブトランスフェラブル(subtransferable)候補1 | PD | 2.9E-04 | 4.7 |
| 40 | BC007451 | XAB1 XPA結合タンパク質1 | PD | 3.0E-04 | 1.3 |
| 41 | BC035467 | HMLF 推定NFkB活性化タンパク質HMLF | PR | 3.5E-04 | 1.1 |
| 42 | CK004097 | EIF4EBP 真核細胞翻訳開始因子4E結合タンパク質2 | PR | 3.6E-04 | 1.4 |
| 43 | NM_1446 | MGC232E 仮想タンパク質MGC23280 | PR | 4.2E-04 | 2.3 |
| 44 | NM_0046 | SSA2 シェーグレン症候群抗原A2(60kDa、リボ核タンパク質自己抗原) | PR | 4.2E-04 | 1.2 |
| 45 | NM_0027 | PRKACA タンパク質キナーゼ、cAMP依存性、触媒、アルファ | PR | 5.0E-04 | 1.2 |
| 46 | NM_0051 | FEZ2 束形成および伸長タンパク質ゼータ2(fasciculation and elongation protein zeta2)(zygln II) | PD | 6.1E-04 | 3.3 |
| 47 | NM_005B | SRRM1 セリン/アルギニン反復マトリックス1 | PR | 7.0E-04 | 1.4 |
| 48 | NM_0062 | PDGFRL 血小板由来成長因子受容体様 | PD | 7.0E-04 | 2.4 |
| 49 | AI09693E | SNX13 ソーティングネキシン13 | PR | 8.4E-04 | 1.6 |
| 50 | NM_0147 | KIAA025E KIAA0258 遺伝子産物 | PD | 8.9E-04 | 2.5 |
| 51 | BF979104 | TCM7 Tom7のホモログ(S.セレビシエ(cerevisiae)) | PR | 1.0E-03 | 1.5 |

(*)12個および51個の遺伝子セットは、0.001未満である並べ替えp値の順位として列挙された。

【 0 1 2 0 】

10

20

30

40

【表 4 A】

表4A: ゲノム子ニブに対する応答者(PR)を非応答者(PD)から識別する132個の候補遺伝子リスト

| 順位 | GenBank ID | 遺伝子記号 | 遺伝子名 | ヌクレオチド |
|----|------------|----------|-----------------|--|
| 1 | NM_024829 | FLJ22662 | 仮想タンパク質FLJ22662 | ATACGGCATCCATGAAATATAT CATGGATACAACAATTATAAG AAGGATCCCTACAGTAGAGGTG ACCCTGTAATACCAICTGCTG CCGTAGGACCTGAACCTCAGCT AACCCAAAGTCTGGAGGTGTT ATGACACAAAGGTGGCAGATAT CTACCTAGCATCTCAGTACACA TCCTATGCCATAAGTGGTCCCA CAGTACAAGTGGCCCTCCCTGT TTTTCGGCTGGACCCGTTCAAC AAAACTCTACATCAGGGCATGC CAGAGGTCTACAACITTTGATTT TATTACCATGAACCAATTTTG AAACCTTGATATAAAATGAAGGA GGGAGATCACGGACTAGAAGAC |

10

20

30

40

CTCACTCGCTCTCCAAACG
 CGCTCGTTTTGCGGAGCTGGT
 GTCCCAGAGACCGAGTTGCCCC
 AGAGACCGAGACGCGCGCGCTG
 CGAAGGACCAATGAGAGCCCGG
 CTGCTACCGCGCGCGCGGTTGG
 TGCTGTGCTCTTTGATACTCGG
 CTCAGGCCAATTATGCTGTGGA
 TTGGACCTCAATGACACCTACT
 CTGGGAGCGTGAACCATTTTC
 TGGGACCACAGTGTGATGGA
 TTTGAGGTTACCTCAAGAAGTG
 AGATGCTTTCAGGGAGTGAGAT
 TTCCCTGTGAGTGAATGCTCT
 TCTAGTAGTGAACCGTCCCTGG
 GAGCGGACTATGACTACTCAGA
 AGACTATGATAACGAACCAAAA
 ATACCTGGCTATATTGTCGATG
 ATTCAGTCAGAGTTGAACAGGT
 AGTTAAGCCCCCCCCAAAACAAG
 ACGGAAAGTGAAAATACTTCAG
 ATAAACCCAAAAGAAGAAAAA
 GGGAGGCAAAAATGGAAAAAAT
 AGAAGAAACAGAAAGAAGAAAA
 ATCCATGTAATGCAGAAATTCA
 AAATTTCTGCATTCACGGAGAA
 TGCAAAATATAAGAGCACCTGG
 AAGCAGTAAACATGCAAAATGCA
 GCAAGAATATTTCCGTGAACGG
 TGTGGGAAAAGTCCATGAAAA
 CTCACAGCATGATTGACAGTAG
 TTTATCAAAAATTGCCATTAGCA
 GCCATAGCTGCCTTTATGTCTG
 CTCATGCTCTCACAGCTGTTC

アンブレグユリン(神経鞘腫由来成長因子)

AREG

2 BC009799

10

20

30

40

GATAGGCCACATCCAGTAAGA
ACTCAAAATTGCTCCCAAATTT
GCAGAAACAACACGTGATTTAA
AAGCTGAGCTTTTATCAGAAA
GCTTTTGGATGTTTTAAGTGT
TATGTGACTTGTGAACTTTT
AAAAAGTGTACTTTTAAATC
CCAGATACTCTGAATTTAGAA
AACAAACTAAATCTGATTTGT
CGTGCCCAACTACCCTTTTTT
TTAAATGAGTAGGGACCAATGC
CACATTGCTTTTATATTTCTT
TCTTTTTAAATGTTGCCAAAC
CAAAAGTAGCTTTGTTTTCCCTT
TGTATTTGCTACTTTGCAGTA
TTTGTGTGTGGTTTTTTTTTC
CTTAATTTGAAAGGGACAGCAC
TGTGATGTTTA

ヨロニン、アクチン結合タンパク質、1C

COR01C

3 NM_014325

10

20

30

40

AGGAGACCATTGGGAAGAAGAA
 CTAGATCTGTTGCTTAATTTAG
 ATGCACCTATAAAAGAGGGAGA
 TAACATCTTACCAGATCAGACG
 TCTCAGGACCTGAAATCCAAGG
 AAGATGGGGAGGTGGTCCAAGA
 GGAAGAAGTTTGCAAAAACCA
 TCTGTGACTGAAGAAAAAACA
 TGGAACTGAGCAACCAAGTAC
 CTCCAAAAATGTTACCGAGGAA
 GAGCTGGAAGACTGGTTGGACA
 GCATGATTTCCATAAAAAGGGGA
 AAAAAAGTGCCTGAAGCAATC
 TTGTTGCCTTCTAACGGCAGG
 TGGGCATAAGGCTGTCCTTCAG
 GACCAGCCAGTTACAAGCATG
 TCTCAAGCTAGTGTGTTCCATT
 ATGCTCACAGCAGTAAATGCCT
 ACCTCTGTGTTGACATCTGAA
 AGAATACATTGAAGCAGCTTGT
 TGCATTTGTTTTCTGGCTTAG
 TAATCTAATAGATTTCCCTAAG
 GGCAGGAGATAGACTCTGGCCC
 TTGTTCTAGCCCTCCTTCCTTG
 CAGTGTTTACAACATAGCCAGT
 GTTACAGCATAGCA

アポトーシス、カスパーゼ活性化阻害剤

AVEN

4 BC010488

10

20

30

40

| | | | | |
|-------------|---------|--|---|----|
| 5 NM_004090 | DUSP3 | 二重特異性ホスファターゼ3 (ワクシニアウイルスホスファターゼVH1関連) | GGATCCCTTTATGGTGGTAGAG CAAAAAACCCAAACACGATAA ACCTTTCAAAAGACTTTCTAAG GATGATATTGGAATGCCACCAGC CCTCACATGTGTATGCCACATTT GCCAGAAATAAGAGTTTGTGT TTAAATACAGCTTTGTIAGGAT TTTACGTTATTGTTATTATGGA AAGTGATTCATGATGCTAATTTAT CTTCAGGGTCACTCTGG | 10 |
| 6 AI026836 | DJ473B4 | 仮想タンパク質dJ473B4 | GCAGTCGTTCAACCAGGTAGT FTTGGTGTGTTTTAAAGCCCT TTTGAGGTCTTACACATTTATTA ACTTAAAAATAATCAGGCAGCT AAGAATAATTACTAGAAAAATC ATCTACCACCTCAAAACATGGTC AACTACTTCAAAACTGCACCTA GAGAATCAGGTACCTGAAGTAG ACAAGAAGCCCTGGAGGTGGAC TTTGAGAGGAGGGAAATACCC | 20 |
| | | | | 30 |
| | | | | 40 |

TAGGTACTTCACCATCGTCA
 CCACCGACCACAGGAGATCGA
 CTTCGGCTGGCGGGGGAGAGC
 TGCTGGAACGGGGCCATCGCGC
 TGGGCTCATCGATTTCCAGAA
 CCGCCGGCCCTGCAGGACTTT
 CCGAGCCCGCAGGAACCCACCG
 CACCCGGCACCCGGCGAGGA
 CCGCGTGGCTGGCGGGCCCGCC
 GCACCTCCGAGCCCTGGGAGC
 CCTCCAGGCCATCCCGCAGCC
 CAAACCCCGCAGCCATGAGCC
 CGCCGGGGCCATACGCTGGAC
 GAGTCGGACCGAGGCTAGGACG
 TGGCCGGGCTCTCCAGCCCTG
 CAGCAGAAGAACTTCCCGTGCG
 CCGGGATCCCTCGCTCCGTTGCA
 CCGCGCCCTAAGTTATTGGAC
 TATCTAATACTATGTATTAT
 TTGGCTGGTCTTTGTAGTCAC
 ATATTTTATAGTCTTAAATCT
 TGTFTTTGGCATCACTGGCCCA
 TTGCAATAAATCACCTGGCCA
 GTTTGCTTTTCTACCATCC

7 BU500509 *PHLDA2* プレクストリン相同様ドメイン、ファミリーA、メンバー2

10

20

30

40

CTGTGACATGCTCTTGACCTTT
 ACCCTAGTTGACACATACATGTG
 TAGATTTACACATACIGTTTCA
 TTNNNAATTTAGAAATGTTC
 ATTAATCCCATTTGAGGTATA
 ACTCACTCAGGAAGTTAAAATA
 TCTCTACACGTATATTTTACA
 TTAAAAATACAGTGTACGATA
 ANNNCCCTTNNNNNGAAGAA
 CAAAAATGTCAGTGCATAGTTA
 GATAAAATGGTAAATGTTTTA
 CTGAAAGCATACTTTTTTGGAA
 AATAGATTTCATGAAGCCTTTAA
 GTGCTGCTTCTGTCAAGTCAAAAC
 GTTAAAAACTTTAACATTTTCA
 AAGTGCCAGACTGTGTACAAA
 GACACATGTAATGGAGATTGTA
 CAGGTGTTTTTTTTGTTGAAC
 CTTTGAAGAGTTTTAATCTTAA
 CGTTTTCTAAATTTTAAAAATTTT
 AAAATCTTGTTTAACAAAAGCT
 TGTATTAAGATACTGTTTTTCAT
 TTCATTACAGAAATGTTTATAA
 AAGTTCAATTTGTTGAAAAANNA
 GGATCCCTTTTTAATACCACAGC
 ATTTGTACTGTTCCCT

RNA結合モチーフタンパク質7

RB#7

8 NM_016090

10

20

30

40

ATATGTGCACACACACTCAC
 ACCCACCCATAAAGATTTTG
 CACTCCTTGAAGGTACACTAAC
 TCACCATTTTTATCATACTTAT
 CCCAGTGGCCACAGTACTGG
 CTTATATGGCTGTCTGTGCTAT
 CTTATTTTATCTGTCTCCACAA
 CACAGCAAACACTACCTGGCCCTC
 AATAAGGGCTTATGAATTAIT
 CATGAATCCATTTTGGCAGGTG
 CCTAGCCCTGTGTCTGGCTTGA
 AGCAGGTGTTCCCAAGGTGTGG
 CATGGCTGAGTGAATACAAAT

9 BX092512

EST

CACCAATCAGCTTACTACCCAA
 CTTCAAAACTAGGACTCTAACA
 ATAACCTTCTGTATATCTCATC
 CTGTACGGCCCCCACCCTCGCT
 CCTTCCGCCAAGATAATTATCA
 CTTTAAATGTGTGGCTGTGTA
 TTCTCAITTTCTTATGTGATGGT
 AAAATGCCCTTATTTTGTGTTG
 GTTTTAAATGCATAGAAAGGACA
 TCAAGCTGT

10 AI436027

OSMR

オンコスタチンM受容体

10

20

30

40

CTCTAAAGCCATTCACTCCAG
 ATTTTACCCTGGGAATATTCTA
 CATACTGCTTACTTTCTCTATA
 AAACTCATCAATAAATCATGAA
 AGGCACTGAGTTTGTAAATCA
 GGACCCATAAATGTTTAAATTGTA
 AATAAGTTTCAGATAAATTAATA
 TAGCTTTGGCTTGAAGTTNNNN
 NNNNNTTTTCTCAACTAGTTA
 AGTCAACTGCTTCTGAAATAAC
 TCTGTATTGTAGATTATGCAGA
 TCTTTACAGCCATAAATAATTA
 AACTGTAATATGCTAACTTGAA
 GAGATTGCAATAAAGCTGCTTC
 AGCTAAC

11-A1971137 GCLC グルタミン酸システインリガーゼ、触媒サブユニット

10

20

30

40

CTCACCTGAAGTTGAAATGACTG
 CCCACTTCAAAAATCTTCATTGT
 GTTACACACACCAGTGTATTAT
 ACAAAATCAGAGGCATTTTGTAG
 ATGCTTTGCTGACTTGTTCAGC
 TCTGTAAAAACACAGAAATCAG
 ACCCATTTTGTAAAGCGGAAA
 TCATGTTACATGGAACATGTCC
 TGTATATATCACATACATGGTA
 ATGGAGTCTTAATGATAAGTGC
 AAGATAATAATTTAATGATGGG
 ATTAGTCTGATCGCTTAATATG
 CACAATCCTGGAAGTGAATTAC
 TTGCATCAGATATAGTGATATT
 TATTATTCTGTACAGAGAGAAA
 AATACATATAAACATATGCTT
 ACATTACATGCACGGGATTTCC
 ATGCTCCATAATCTTTCTATT
 TTTTAAATTTACCTTTCTGTAAA
 TGATGTGCATGGAATATGCCCTT
 ATAGAAAAATGCTGTTTCATAAT
 TTGACTACGTGGAAAAGTGCCCT
 ATATGGTGGTAATGCTAGTAAG
 GCA

10

コラーゲン、タイプIV、アルプア3(グッドパスチャー抗原)
 結合タンパク質

20

COL4A3BP

30

12 BQ024877

40

【表 5 A】

表5A: cDNAマイクロアレイデータと半定量的RT-PCRとの相関

| 順位 | 遺伝子記号 | スピアマンの順位相関 | |
|----|---------------|------------|------|
| | | ρ | p値 |
| 1 | FLJ22662 | 0.69 | 0.02 |
| 2 | AREG | 0.53 | 0.08 |
| 3 | CORO1C | 0.35 | 0.24 |
| 4 | AVEN | 0.63 | 0.04 |
| 5 | DUSP3 | 0.63 | 0.04 |
| 6 | DJ473B4 | 0.45 | 0.14 |
| 7 | PHLDA2 | 0.84 | 0.01 |
| 8 | RBM7 | 0.83 | 0.01 |
| 9 | EST(BX092512) | 0.63 | 0.04 |
| 10 | OSMR | 0.67 | 0.03 |
| 11 | GCLC | 0.46 | 0.13 |
| 12 | COL4A3BP | 0.27 | 0.24 |

12個の全遺伝子が正の相関および12個の遺伝子のうち7個が有意な正の相関

10

【 0 1 2 2】

【表 5 B】

表5B: 免疫組織化学染色の結果

| | PR | PD |
|-------|-----|-----|
| AREG | 1/5 | 5/6 |
| TGFA | 2/5 | 6/6 |
| ADAM9 | 1/5 | 4/6 |
| CD9 | 2/5 | 5/6 |
| OSMR | 2/5 | 6/6 |

20

【図面の簡単な説明】

【 0 1 2 3】

【図 1】図 1 は、4つの代表的な肺腺癌のレーザーマイクロビーム顕微解剖を示す画像を示す。

30

【図 2 - 1】図 2 - 1 は、ゲフィチニブ治療の効力を予測するスコアリングシステムの確立を示す。

【図 2 - 2】図 2 - 2 は、ゲフィチニブ治療の効力を予測するスコアリングシステムの確立を示す。

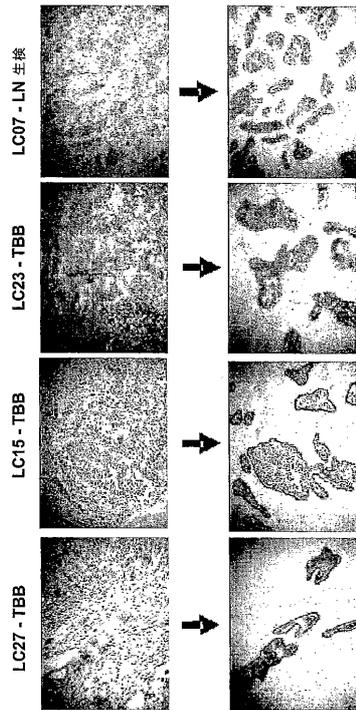
【図 3】図 3 は、半定量的RT-PCRおよび免疫組織化学分析によるGRSの検証を示す。

【図 4】図 4 は、5人のPR、10人のSDおよび20人のPD腺癌症例においてELISAによって測定されたTGFAの血清学的濃度を示す。

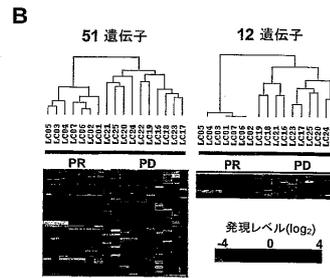
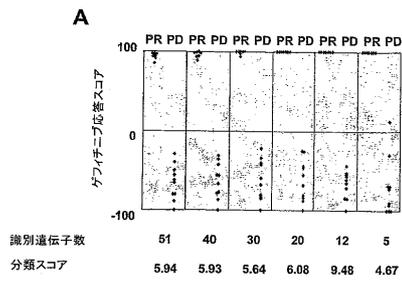
【図 5】図 5 は、ゲフィチニブ感受性PC-9細胞に対する分泌されたAREGの抗アポトーシス効果を示す。

40

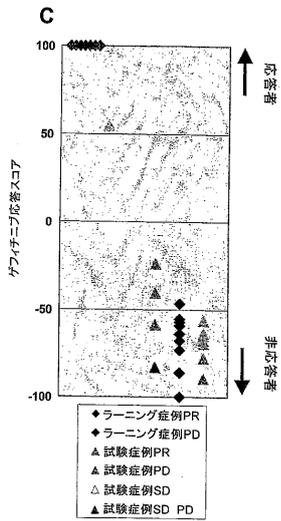
【 図 1 】



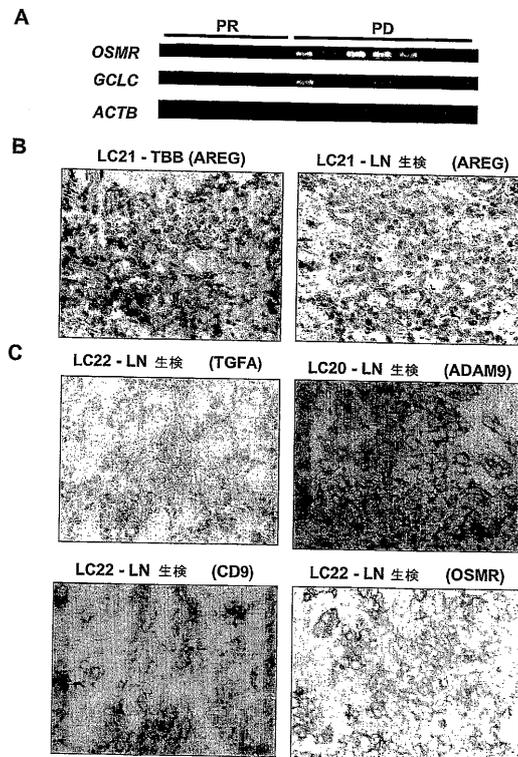
【 図 2 - 1 】



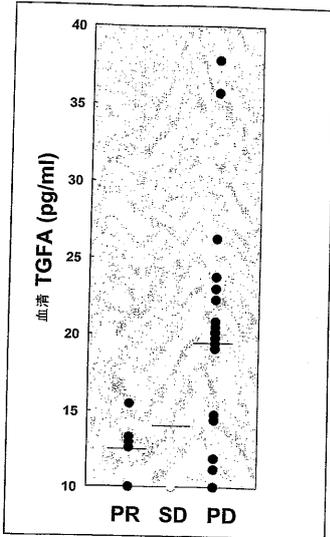
【 図 2 - 2 】



【 図 3 】

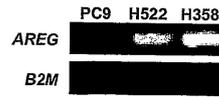


【 図 4 】

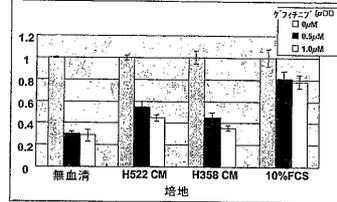


【 図 5 】

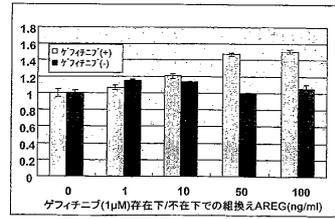
A



B



C



【 國際調查報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No PCT/GB2004/002316 |
|---|---|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/11 C12Q1/68 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12Q | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | DATABASE GENE BANK 'Online! 18 March 2001 (2001-03-18), XP002290893 retrieved from GENE BANK Database accession no. NM_024829 cited in the application | 1-12,19, 20,22,23 |
| A | Invention 1 abstract | 1-28 |
| X | DATABASE GENE BANK 'Online! 5 July 2001 (2001-07-05), XP002304184 retrieved from GENE BANK Database accession no. BC009799 cited in the application | 1-12,19, 20,22,23 |
| A | Invention 2 abstract | 1-28 |
| ----- -/-- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "G" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 5 November 2004 | | Date of mailing of the international search report 03. 01. 05 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Sprinks, M |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International Application No PCT/GB2004/002316 |
|---|

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|------------------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | <p>DATABASE GENE BANK 'Online! 26 April 2000 (2000-04-26), XP002304185 retrieved from GENE BANK Database accession no. NM_014325 cited in the application</p> | 1-12,19, 20,22,23 |
| A | <p>Invention 3 abstract</p> | 1-28 |
| X | <p>DATABASE GENE BANK 'Online! 12 July 2001 (2001-07-12), XP002304186 retrieved from GENE BANK Database accession no. BC010488 cited in the application</p> | 1-12,19, 20,22,23 |
| A | <p>Invention 4 abstract</p> | 1-28 |
| X | <p>DATABASE GENE BANK 'Online! 7 May 1999 (1999-05-07), XP002304187 retrieved from GENE BANK Database accession no. NM_004090 cited in the application</p> | 1-12,19, 20,22,23 |
| A | <p>Invention 5 abstract</p> | 1-28 |
| X | <p>DATABASE GENE BANK 'Online! 20 May 1998 (1998-05-20), XP002304188 retrieved from GENE BANK Database accession no. AI026836 cited in the application</p> | 1-4, 6-12,19, 20,22,23 |
| A | <p>Invention 6 abstract</p> | 1-4,6-28 |
| X | <p>DATABASE GENE BANK 'Online! 11 September 2002 (2002-09-11), XP002304189 retrieved from GENE BANK Database accession no. BU500509 cited in the application</p> | 1-4, 6-12,19, 20,22,23 |
| A | <p>Invention 7 abstract</p> | 1-4,6-28 |
| X | <p>DATABASE GENE BANK 'Online! 8 September 2000 (2000-09-08), XP002304190 retrieved from GENE BANK Database accession no. NM_016090 cited in the application</p> | 1-4, 6-12,19, 20,22,23 |
| A | <p>Invention 8 abstract</p> | 1-4,6-28 |

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/GB2004/002316

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|------------------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | DATABASE GENE BANK 'Online! 22 January 2003 (2003-01-22), XP002304191 retrieved from GENE BANK Database accession no. BX092512 cited in the application | 1-4, 6-12,19, 20,22,23 |
| A | Invention 9 abstract | 1-4,6-28 |
| X | ----- DATABASE GENE BANK 'Online! 12 February 1999 (1999-02-12), XP002304192 retrieved from GENE BANK Database accession no. AI436027 cited in the application | 1-4, 6-12,19, 20,22,23 |
| A | Invention 10 abstract | 1-4,6-28 |
| X | ----- DATABASE GENE BANK 'Online! 25 August 1999 (1999-08-25), XP002304193 retrieved from GENE BANK Database accession no. AI971137 cited in the application | 1-4, 6-12,19, 20,22,23 |
| A | Invention 11 abstract | 1-4,6-28 |
| X | ----- DATABASE GENE BANK 'Online! 27 March 2002 (2002-03-27), XP002304194 retrieved from GENE BANK Database accession no. BQ024877 cited in the application | 1-4, 6-12,19, 20,22,23 |
| A | Invention 12 abstract | 1-4,6-28 |
| X | ----- DE BONO JOHANN S ET AL: "The ErbB receptor family: a therapeutic target for cancer." TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE. 2002, vol. 8, no. 4 Suppl, 2002, pages S19-S26, XP002290892 ISSN: 1471-4914 | 24-26 |
| A | the whole document | 1-28 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2004/002316**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 21, 24, 25, 27 and 29 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB2004 /002316

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 21, 24, 25, 27 and 29 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.2

Claims 1-6 and 9-28 refer to genes defined only by their names. However, the application clearly indicates that prior art sequences of said genes are not to be considered as concrete structural features defining the scope of protection sought, as evidenced by the use of "e.g." when referring to the GenBank accession numbers in claim 6 and particularly by the description at lines 2-7 on page 7 which states that "alternative sequences...are also included in the definition of the gene represented by the name used?".

The gene names used in claims 1-6 and 9-28 must therefore be considered as non-limiting arbitrary terms, making the claims so unclear in scope and meaning that no meaningful search of their subject-matter is possible.

Consequently, the search has been carried out on those parts of the application that do appear to be clear, namely the genes clearly defined by their sequence in Table 4a, and their use as drug response markers.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB2004/002316

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-28 partially

The first nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

2. claims: 1-28 partially

The second nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

3. claims: 1-28 partially

The third nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

4. claims: 1-28 partially

The fourth nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

5. claims: 1-28 partially

The fifth nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

6. claims: 1-4 and 6-28 partially

The sixth nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

7. claims: 1-4 and 6-28 partially

The seventh nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

8. claims: 1-4 and 6-28 partially

The eighth nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

9. claims: 1-4 and 6-28 partially

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/GB2004/00231 6

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The ninth nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

10. claims: 1-4 and 6-28 partially

The tenth nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

11. claims: 1-4 and 6-28 partially

The eleventh nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

12. claims: 1-4 and 6-28 partially

The twelfth nucleic acid set forth in Table 4a and its use in assessing an erbB receptor kinase inhibitor drug response.

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 K 31/519 (2006.01) | A 6 1 K 31/519 | |
| A 6 1 K 31/435 (2006.01) | A 6 1 K 31/435 | |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | P |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 43/00 (2006.01) | A 6 1 P 43/00 | 1 1 1 |
| G 0 1 N 33/53 (2006.01) | G 0 1 N 33/53 | M |
| G 0 1 N 37/00 (2006.01) | G 0 1 N 37/00 | 1 0 2 |
| | C 1 2 N 15/00 | F |

(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, IT, 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, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 中村 祐輔
日本国神奈川県横浜市青葉区あざみ野 1 丁目 1 7 - 3 3

(72) 発明者 曽根 三郎
日本国徳島県徳島市南佐古七番町 9 - 5

(72) 発明者 福岡 正博
日本国奈良県奈良市松陽台 2 丁目 2 5 - 2 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA09 CA11 CA20 HA14
4B029 AA07 BB11 CC02 CC03 CC08 FA15
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62
QS25 QS34 QX02
4C085 AA13 AA14 BB22 CC22 CC23 EE01
4C086 AA01 AA02 BC28 BC46 BC73 CB05 GA01 GA02 GA07 GA12
NA14 ZB26

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 过程 | | |
| 公开(公告)号 | JP2006526420A | 公开(公告)日 | 2006-11-24 |
| 申请号 | JP2006516368 | 申请日 | 2004-06-01 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 阿斯利康英国有限公司 国立大学法人 东京大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 阿斯利康英国有限公司 东京大学 | | |
| [标]发明人 | 鹤尾隆 中村祐輔 曾根三郎 福岡正博 | | |
| 发明人 | 鹤尾隆 中村祐輔 曾根三郎 福岡正博 | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 C12Q1/68 C12M1/00 A61K31/5377 A61K31/517 A61K31/519 A61K31/435 A61K39/395 A61P35/00 A61P43/00 G01N33/53 G01N37/00 C07K14/47 | | |
| CPC分类号 | A61P11/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C12M1/00.A A61K31/5377 A61K31/517 A61K31/519 A61K31/435 A61K39/395.P A61P35/00 A61P43/00.111 G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.F | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/HA14 4B029 /AA07 4B029/BB11 4B029/CC02 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063 /QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB22 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC28 4C086/BC46 4C086/BC73 4C086 /CB05 4C086/GA01 4C086/GA02 4C086/GA07 4C086/GA12 4C086/NA14 4C086/ZB26 | | |
| 优先权 | 2003012451 2003-05-30 GB 2003022636 2003-09-26 GB 2003027132 2003-11-21 GB | | |
| 其他公开文献 | JP4724657B2 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明涉及一组分离的标记基因，其包括至少一个被鉴定为对erbB受体酪氨酸激酶抑制剂有反应者和无反应者之间具有差异表达的基因；所述基因组包含一个或多个选自至少一个选自本文所列的(51)个基因的基因的基因，所述基因包括衍生自所述基因的基因特异性寡核苷酸；以及Sauch Set在诊断应用中的用途。

表 1: ベースライン患者特性及び応答の概要

| 特性 | 割合(%) | 患者数 |
|--|-------|------|
| 性別 | | |
| 男性 | 58.5 | (31) |
| 女性 | 41.5 | (22) |
| 年齢 | | |
| 中央値 | 59 | |
| 範囲 | 35-80 | |
| 組織構造 | | |
| 腺癌 | 86.9 | (46) |
| 扁平上皮癌 | 9.4 | (5) |
| 大細胞癌 | 3.8 | (2) |
| ステージ | | |
| IIIA | 1.9 | (1) |
| IIIB | 7.5 | (4) |
| IV | 90.6 | (48) |
| 一般状態 | | |
| 0 | 26.4 | (14) |
| 1 | 60.4 | (32) |
| 2 | 13.2 | (7) |
| 事前の投薬計画数 | | |
| 1 | 24.5 | (13) |
| 2 | 35.9 | (19) |
| 3 | 28.3 | (15) |
| 4 | 9 | (5) |
| 5 | 7.5 | (4) |
| 6 | 3.8 | (2) |
| ゲフィチニブ療法に対する応答 | | |
| CR | 0 | (0) |
| PR | 28.3 | (15) |
| SD | 32.1 | (17) |
| PD | 35.8 | (19) |
| 未知 | 3.8 | (2) |
| 腫瘍応答率(%) (CR+PR/CR+PR+SD+PD) | 29.4 | (15) |
| 病勢コントロール率(%) (CR+PR+SD/CR+PR+SD+PD) | 62.8 | (32) |