

(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2014-527397

(P2014-527397A)

(43) 公表日 平成26年10月16日 (2014. 10. 16)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	2 G 0 4 5
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 K 31/282 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/282	4 C 0 8 4
<b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b>	G 0 1 N 33/50 P	4 C 2 0 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 67 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-516320 (P2014-516320)	(71) 出願人	511069079
(86) (22) 出願日	平成24年6月20日 (2012. 6. 20)		トラスラショナル、キャンサー、ドラッグ
(85) 翻訳文提出日	平成26年2月20日 (2014. 2. 20)		ス、ファーマ、ソシエダッド、リミターダ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/061790		TRASLATIONAL CANCER
(87) 国際公開番号	W02012/175537		DRUGS PHARMA, S. L.
(87) 国際公開日	平成24年12月27日 (2012. 12. 27)		スペイン国バリャドリッド、ホセ、アント
(31) 優先権主張番号	11382211.8		ニオ、プリモ、デ、リベラ、4、セグンド
(32) 優先日	平成23年6月20日 (2011. 6. 20)		、イスキエルダ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100117787
(31) 優先権主張番号	61/507, 833		弁理士 勝沼 宏仁
(32) 優先日	平成23年7月14日 (2011. 7. 14)	(74) 代理人	100091487
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 中村 行孝
(31) 優先権主張番号	11382294.4	(74) 代理人	100107342
(32) 優先日	平成23年9月16日 (2011. 9. 16)		弁理士 横田 修孝
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 癌患者の化学療法に対する臨床応答を予測する方法

## (57) 【要約】

本発明は、癌に罹っている患者における化学療法治療に対する応答を測定し、詳細には非小細胞肺癌に罹っている患者の白金をベースとした化学療法治療に対する臨床応答を予測するための予測マーカーとしてコリンキナーゼの使用に関する。本発明は、癌、詳細には非小細胞肺癌に罹っている患者について、コリンキナーゼの発現レベルに基づいた個別化療法を設計する方法、並びに患者がコリンキナーゼの発現レベルに基づいて選択されるその患者における白金をベースとした化学療法治療を用いる非小細胞肺癌の治療方法に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

癌に罹っている患者の化学療法治療に対する臨床応答を予測するためのインビトロでの方法であって、該患者からの試料におけるコリンキナーゼ（C h o K）遺伝子の発現レベルの測定を含んでなる、方法。

**【請求項 2】**

C h o K の発現レベルを参照値と比較することを更に含んでなり、前記参照値に対する前記試料における C h o K 遺伝子の発現レベルに対する変化が前記化学療法治療に対する患者の臨床応答が不十分かまたは前記化学療法治療に対する患者の臨床応答が良好であることを示している、請求項 1 に記載の方法。

10

**【請求項 3】**

C h o K の発現レベルの変化が、前記発現レベルの前記参照値に対する増加であり、前記発現レベルの増加が不十分な臨床応答を示しているか、または C h o K の発現レベルの変化が前記参照値に対する前記発現レベルの減少でありかつ前記発現レベルの減少が良好な臨床応答を示している、請求項 2 に記載のインビトロでの方法。

**【請求項 4】**

癌に罹っている患者の個別的療法を設計するためのインビトロでの方法であって、患者由来の試料におけるコリンキナーゼ（C h o K）遺伝子の発現レベルを測定することを含んでなる、方法。

**【請求項 5】**

C h o K の発現レベルの参照値との比較を更に含んでなり、  
前記試料の C h o K 遺伝子の発現レベルの前記参照値に対する変化の減少または欠如が、患者が前記化学療法治療に基づいた療法の候補者であることを示しているか、または前記試料の C h o K 遺伝子の発現レベルの前記参照値に対する増加が、患者が

20

( i ) C h o K 阻害剤、

( i i ) 葉酸代謝拮抗薬、

( i i i ) 微小管阻害剤、

( i v ) E G F R 標的薬、

( v ) 上記 ( i ) ~ ( i v ) の 1 以上の組合せ

からなる群から選択される療法を用いる治療の候補者であることを示している、請求項 4 に記載のインビトロでの方法。

30

**【請求項 6】**

化学療法治療が白金をベースとした化学療法治療である、請求項 5 に記載のインビトロでの方法。

**【請求項 7】**

癌が非小細胞肺癌（N S C L C）である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のインビトロでの方法。

**【請求項 8】**

N S C L C が、肺の扁平上皮癌、肺の大細胞癌および肺の腺癌から選択される、請求項 7 に記載のインビトロでの方法。

40

**【請求項 9】**

N S C L C が進行期 N S C L C であり、好ましくは I I I A、I I I B または I V 期である、請求項 7 または 8 に記載のインビトロでの方法。

**【請求項 10】**

試料が組織試料であり、好ましくは腫瘍組織試料であり、更に好ましくは肺腫瘍組織試料である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載のインビトロでの方法。

**【請求項 11】**

癌に罹っている患者からの試料における C h o K 遺伝子の発現レベルを測定し、化学療法治療に対する前記患者の臨床応答を予測して、前記癌に罹っている患者についての個別的療法を設計することができる試薬の使用。

50

## 【請求項 12】

癌が非小細胞肺癌（NSCLC）である、請求項 11 に記載の使用。

## 【請求項 13】

化学療法治療が白金をベースとした化学療法治療である、請求項 11 または 12 に記載の使用。

## 【請求項 14】

患者の NSCLC の治療に使用するための白金をベースとした化学療法治療であって、前記患者の試料が、参照値に比較して参照値に比較して Chok 遺伝子の低または同等発現レベルを示す、治療。

## 【請求項 15】

NSCLC に罹っている患者の治療に使用するための Chok 阻害剤、葉酸代謝拮抗薬、EGFR 標的薬または前記の 1 種類以上の組合せであって、前記患者の試料が、参照値に比較して Chok 遺伝子の高発現レベルを示す、薬剤。

## 【請求項 16】

- (i) コリンキナーゼ（Chok）阻害剤、
- (ii) 葉酸代謝拮抗薬、
- (iii) 微小管阻害剤、
- (iv) EGFR 標的薬、および
- (v) 上記 (i) ~ (iv) の 1 以上の組合せ

からなる群から選択される療法に应答すると思われる患者を同定するためのインビトロの方法であって、

前記患者の試料における Chok 遺伝子の発現レベルを測定して、前記レベルを参照値と比較し、

前記試料の Chok 遺伝子の発現レベルの前記参照値に対する増加が、患者が前記療法に应答すると思われることを示すか、または

前記試料の Chok 遺伝子の発現レベルの前記参照値に対する変化の減少または欠如が、患者が前記療法に应答するとは思われないことを示す、方法。

## 【請求項 17】

療法が、Chok 阻害剤である、請求項 16 に記載の方法。

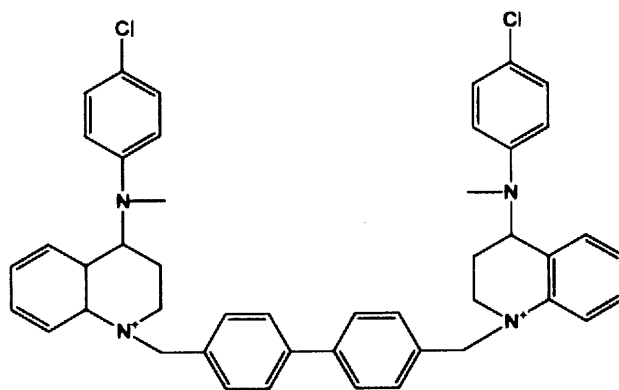
## 【請求項 18】

Chok 阻害剤が、表 2 から選択される化合物である、請求項 17 に記載の方法。

## 【請求項 19】

Chok 阻害剤が、構造

## 【化 1】



を有するか、またはその薬学上許容可能な塩または溶媒和物を有する、請求項 18 に記載の方法。

## 【請求項 20】

患者が癌に罹っている、請求項 16 ~ 19 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

癌が、肺癌、乳癌、結腸癌および膵臓癌からなる群から選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

癌が肺癌である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

肺癌が非小細胞肺癌 (NSCLC) である、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

NSCLC が、肺の扁平上皮癌、肺の大細胞癌および肺の腺癌から選択される、請求項 23 に記載の方法。 10

【請求項 25】

NSCLC が進行期 NSCLC であり、好ましくは I I I A、I I I B または I V 期である、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 26】

試料が組織試料であり、好ましくは腫瘍組織試料であり、更に好ましくは肺腫瘍組織試料である、請求項 16 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

C h o K 遺伝子の発現レベルを、C h o K 遺伝子によってコードされた m R N A のレベルまたは C h o K タンパク質またはその変異体のレベルを測定することによって決定する、請求項 16 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 28】

m R N A 発現レベルを、定量的 P C R、好ましくはリアルタイム P C R によって決定し、および / または C h o K タンパク質またはその変異体の発現レベルを、ウェスタンブロット法または免疫組織化学によって決定する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

患者由来の試料における C h o K 遺伝子の発現レベルを測定し、

( i ) C h o K 阻害剤、

( i i ) 葉酸代謝拮抗薬、

( i i i ) 微小管阻害剤、 30

( i v ) E G F R 標的薬、

( v ) 上記 ( i ) ~ ( i v ) の 1 以上の組合せ

からなる群から選択される療法に対する前記患者の臨床応答または臨床応答の欠如を予測することができる試薬の使用。

【請求項 30】

療法が C h o K 阻害剤である、請求項 29 に記載の使用。

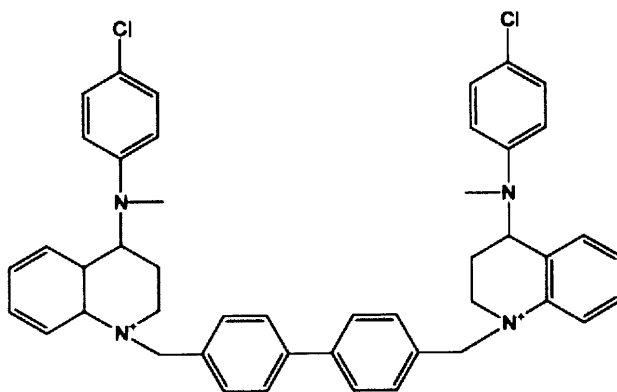
【請求項 31】

C h o K 阻害剤が表 2 から選択される、請求項 30 に記載の使用。

【請求項 32】

C h o K 阻害剤が、構造 40

## 【化 2】



10

を有するか、またはその薬学上許容可能な塩または溶媒和物を有する、請求項 3 1 に記載の使用。

## 【請求項 3 3】

患者が癌に罹っている、請求項 1 9 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 3 4】

癌が、肺癌、乳癌、結腸癌および膵臓癌からなる群から選択される、請求項 3 2 に記載の使用。

20

## 【請求項 3 5】

癌が肺癌である、請求項 3 4 に記載の使用。

## 【請求項 3 6】

癌が非小細胞肺癌 (NSCLC) である、請求項 3 5 に記載の使用。

## 【請求項 3 7】

NSCLC が、肺の扁平上皮癌、肺の大細胞癌および肺の腺癌から選択される、請求項 3 6 に記載の使用。

## 【請求項 3 8】

NSCLC が進行期 NSCLC であり、好ましくは I I I A、I I I B または I V 期である、請求項 3 6 または 3 7 に記載の使用。

30

## 【請求項 3 9】

試料が組織試料であり、好ましくは腫瘍組織試料であり、更に好ましくは肺腫瘍組織試料である、請求項 2 9 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 4 0】

C h o K 遺伝子の発現レベルを、C h o K 遺伝子によってコードされた mRNA のレベルまたは C h o K タンパク質またはその変異体のレベルを測定することによって決定する、請求項 2 9 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項 4 1】

mRNA 発現レベルを、定量的 PCR、好ましくはリアルタイム PCR によって決定し、および / または C h o K タンパク質またはその変異体の発現レベルを、ウェスタンブロット法または免疫組織化学によって決定する、請求項 3 0 に記載の方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【発明の背景】

## 【0001】

## 発明の分野

本発明は、診断薬の分野に関し、更に詳細には癌に罹っている患者の化学療法治療に対する臨床応答を予測し、詳細には、非小細胞肺癌に罹っている患者の白金をベースとした化学療法治療に対する臨床応答を前記患者からの試料における C h o K 遺伝子の発現レベルに基づいて予測する方法に関する。本発明は、前記疾患に罹っている患者について個々の療法を設計する方法並びに所定の療法に応答すると思われる患者を選択する方法にも

50

関する。

【 0 0 0 2 】

#### 発明の背景

決定的であろうとまたは補助的な療法であろうと化学療法を用いる日常的な癌の治療技術は、化学療法以外の制御と比較して患者の絶対的生存を向上させてきた。しかしながら、利用可能な総ての化学療法治療が総ての患者に適しているとは限らない。癌に罹っている患者における化学療法薬の効果は、ある種の遺伝子マーカーの存在によって影響される。腫瘍が化学療法に対して応答する確率が低い患者は、化学療法治療を完全に省くことがあり、または代替治療の志願者となり、不必要な治療上の副作用を避けることもある。

【 0 0 0 3 】

従って、疾患、特に肺癌、結腸癌、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、神経膠腫、膀胱癌、卵巣癌、胆管癌、乳癌およびリンパ腫のような癌の治療のための個別化された方法が必要である。

【 0 0 0 4 】

肺癌は、世界的な主要死亡原因の一つであり、非小細胞肺癌 (NSCLC) は、全肺癌の約 85 % を占めており、世界中で毎年 1 . 2 百万の症例が出ている。NSCLC では、2001 年には世界中で百万人を上回る死者が出ており、男性および女性のいずれにおいても癌関連死亡率 (それぞれ、31 % および 25 %) の主要な原因である。

【 0 0 0 5 】

進行 NSCLC の予後は、惨めなものである。最近のイースタン・コオペレイティブ・オンコロジー・グループ (Eastern Cooperative Oncology Group) の 1155 名の患者の試験は、使用した化学療法、すなわち、シスプラチン / パクリタキセル、シスプラチン / ゲムシタピン、シスプラチン / ドセタキセルおよびカルボプラチン / パクリタキセルの間では差を示さなかった。進行に対する全般的な中位時間は 3 . 6 ヶ月であり、生存期間中央値は 7 . 9 ヶ月であった。

【 0 0 0 6 】

5 年生存率は、悪性腫瘍の TNM 分類によって変化する。TNM は、腫瘍の大きさ (T)、リンパ節への広がり (N) および転移の存在 (M) に基づいて患者の身体における癌の程度を記載する癌進行度分類システムである。Mayo Clinic で行われた研究は、非小細胞肺癌 (NSCLC) の患者の病期 (疾患ステージ) による推定全般的 5 年生存率は、病理学的ステージ (pathologic stage) I A については 66 %、ステージ I B については 53 %、ステージ I I A については 42 %、ステージ I I B については 36 %、ステージ I I I A については 10 %、ステージ I I I B については 12 %、およびステージ I V については 4 % を示した (Yang P., et al. 2005. Chest, 128:452-462)。

【 0 0 0 7 】

NSCLC の症例の約 70 % は、診断が進歩しており、常に化学療法で治療される。より新しい薬剤との白金をベースとした組合せは、進行 NSCLC の第一線治療として広く受け入れられてきたが、白金耐性の頻繁な発生が、目下のこれらの患者の治療に対する大きな障害となっている。更に、利益を得ることがなく、典型的には不必要な毒性と患者の生活品質に負の影響を体験する化学療法を受けている多くの患者が未だにいる。従って、任意の新規なバイオマーカーの予測値の出現は、利用可能な最も効果的な個別化された抗癌治療により NSCLC 患者のフィッティングを支持することによって患者の成果を向上させる上で最も重要である。

【 0 0 0 8 】

肺癌患者の白金をベースとした化学療法の応答に対して信頼できるマーカーを提供する試みは、Lord et al. (Clin. Cancer Res., 2002, 8:2286-2291) および Ceppi P. et al., (Ann. Oncol., 2006, 17:1818-1825) ( E R C C をマーカーとして用いる ) ; Davidson et al., (Cancer Res., 2004, 64:3761-3766) および Rosell et al. (Clin. Cancer Res., 2004, 10:1318-1325) ( リボヌクレオチドレダクターゼの大サブユニット 1 をマーカーとして用いる ) ; Ceppi P. et al. (Ann. Oncol., 2006, 17:1818-1825) ( リボヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドレダクターゼ M1 サブユニットをマーカーとして用いる) ; Ceppi, P. et al. (Clin Cancer Res., 2009, 15:1039-45) (DNA ポリメラーゼ をマーカーとして用いる) および Taron et al. (Hum. Mol. Genetics, 2004, 13:2443 - 2449) (BRCA1 をマーカーとして用いる) によって行われてきた。

【0009】

しかしながら、化学療法治療に対する癌患者の応答を予測し、詳細には白金をベースとした化学療法治療に対する NSCLC 肺癌患者の応答を予測するのに有用な更なるマーカーが未だ必要とされている。

【発明の概要】

【0010】

10

#### 発明の簡単な説明

第一の態様では、本発明は、癌に罹っている患者由来の試料におけるコリンキナーゼ (Chok) 遺伝子の発現レベルを測定することを含んでなる化学療法治療に対する患者の臨床応答を予測するイン・ビトロでの方法に関する。

【0011】

もう一つの態様では、本発明は、癌に罹っている患者由来の試料におけるコリンキナーゼ (Chok) 遺伝子の発現レベルを測定することを含んでなる、患者に対する個々の療法を設計するインビトロでの方法に関する。

【0012】

更にもう一つの態様では、本発明は、化学療法治療に対する癌に罹っている患者の臨床応答を予測しかつ前記癌に罹っている患者に対する個々の療法を設計するための前記患者由来の試料における Chok 遺伝子の発現レベルを測定することができる試薬の使用に関する。

20

【0013】

更にもう一つの態様では、本発明は、患者の NSCLC の治療で使用するための白金をベースとした化学療法治療であって、前記患者の試料が参照値に関して低いまたは実質的に同一の Chok 遺伝子の発現レベルを示すものに関する。

【0014】

更にもう一つの態様では、本発明は、NSCLC に罹っている患者の治療に使用するための Chok 阻害剤、葉酸代謝拮抗薬、EGFR 標的薬、または上記の 1 以上の組合せであって、前記患者の試料が参照値に関して Chok 遺伝子の高発現レベルを示すものに関する。

30

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、白金をベースとした化学療法治療で治療した進行 NSCLC の患者の Chok 発現および無進行生存期間 (progression free survival) の Kaplan - Meier プロット。

【発明の具体的説明】

【0016】

本発明の発明者らは、驚くべきことに、Chok 遺伝子の発現レベルが、癌に罹っている患者における化学療法治療に対する応答を予測し、特に非小細胞肺癌 (NSCLC) に罹っている患者における白金をベースとした化学療法治療に対する応答を予測するのにも有用であることを見いだした。この意味では、Chok 遺伝子の高発現レベルは、NSCLC に罹っている患者の白金をベースとした化学療法に対する応答が低いことと相関している。これらの知見に基づいて、本発明者らは、以下に詳細に説明する様々な実施態様において本発明の方法を開発した。

40

【0017】

本発明の実施例において提供される結果は、明らかに Chok 発現が、白金をベースとした化学療法に対して応答しないことと重要な関連を示している。従って、これらの結果は、NSCLC の治療技術に中心的役割を果たしている白金による化学療法の後には C

50

h o K の高発現を示す患者の予後がよくないことを示唆している。

【0018】

癌患者の臨床結果を予測する方法

一態様では、本発明は、癌に罹っている患者由来の試料におけるコリンキナーゼ (C h o K ) 遺伝子の発現レベルを測定することを含んでなる化学療法治療に対する患者の臨床応答を予測するためのインビトロでの方法 (以後、本発明の第一の方法) に関する。

【0019】

本明細書で用いられる「予測する」という用語は、癌に罹っている患者が所定の療法に対して好都合にまたは不都合に応答する可能性の測定を表す。特に、本明細書で用いられる「予測」という用語は、腫瘍が所定の療法で治療されるかどうかという癌に罹っている患者の予想される応答の個々の評価に関する。好ましい実施態様では、「予測する」という用語は、NSCLCに罹っている患者が所定の療法に好都合にまたは不都合に応答する可能性の測定を表している。

10

【0020】

本明細書で用いられる「臨床応答」という用語は、癌に罹っている患者の化学療法治療に対する応答を表す。好ましい実施態様では、「臨床応答」は、NSCLCに罹っている患者の白金をベースとした化学療法治療による療法に対する応答を表す。化学療法に対する応答を評価する目的で一緒に用いることができる標準的基準(Miller, et al. Cancer, 1981; 47:207-14)としては、応答、安定化および進行が挙げられる。

【0021】

20

本明細書で用いられる「応答」という用語は、総ての検出可能な悪性疾患の消滅である完全応答 (または完全寛解) または1以上の病巣 (腫瘍病巣) の最大垂直直径の積の和が約 $>50\%$ 、新たな病巣なしおよび任意の病巣の進行なしとして定義される部分応答であることができる。完全または部分応答を達成した患者は、「応答者」と見なし、総ての他の患者を「非応答者」と見なした。当業者であれば理解されるように、このような評価は、通常は、確認を行う患者の総て (すなわち、 $100\%$ ) について正確であることを意味するものではない。しかしながら、この用語は、患者の統計学的に有意な部分を確認することができる (例えば、コホート研究におけるコホート) ことが必要である。ある部分が有意であるかどうかは、当業者による更なる労力なしで様々な周知の統計学的評価手段、例えば、信頼区間の測定、p値測定、Studentのt検定、Mann-Whitney検定などを用いて測定することができる。詳細は、DowdyおよびWearden著, Statistics for Research, John Wiley and Sons, New York 1983に記載されている。好ましい信頼区間は、少なくとも $90\%$ 、少なくとも $95\%$ 、少なくとも $97\%$ 、少なくとも $98\%$ または少なくとも $99\%$ である。p値は、好ましくは $0.1$ 、 $0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.005$ または $0.0001$ である。更に好ましくは、ある集団の患者の少なくとも $60\%$ 、少なくとも $70\%$ 、少なくとも $80\%$ または少なくとも $90\%$ は、本発明の方法によって適正に確認することができる。

30

【0022】

本明細書で用いられる「安定化」という用語は、腫瘍サイズの $<50\%$ 減少または $<25\%$ 増加と定義される。

40

【0023】

本明細書で用いられる「進行」という用語は、腫瘍病巣のサイズの $>25\%$ の増加または新たな病巣の出現と定義される。

【0024】

代替治療の効力を比較するのに広く受け入れられている任意の他のパラメーターは、治療に対する応答を測定するのに用いることができ、制限なしに下記のもの挙げられる:

- ・検討の期間中に疾患の再発が見られなかった完全寛解の患者の割合を表す本明細書で用いられる無疾患進行。

- ・患者が疾患の徴候なしに生存する疾患の治療後の時間の長さとして理解される本明細書で用いられる無疾患生存期間 (DFS)。

50



・完全または部分応答が観察される治療した患者の割合を表す、本発明で用いられる客観的応答。

・完全応答、部分応答、小応答または安定病態 6ヶ月が観察される治療した患者の割合に関する本明細書で用いられる腫瘍コントロール。

・癌増殖の最初の測定に対する治療の開始からの時間として定義される、本明細書で用いられる無進行生存期間(progression free survival)。

・無進行期間(time to progression) ( T T P )は、本明細書で用いられるように、疾患を治療した後に疾患が悪化し始めるまでの時間に関する。「進行」という用語は先に定義されている。

・本明細書で用いられるように、治療の開始後の最初の6ヶ月間に進行が見られない患者の割合に関する6ヶ月無進行生存期間または「P F S 6」率、および

・本明細書で用いられるように、検討に登録された患者の半数が未だ生存している時間に関する生存期間中央値(median survival)。

#### 【0025】

本発明の第一の方法の特定の実施態様では、臨床応答は、無進行期間または無進行生存期間として測定される。

#### 【0026】

本明細書で用いられる「患者」という用語は、哺乳類として分類される全ての動物を表し、家畜(domestic)および農場(farm)動物、霊長類およびヒト、例えば、ヒト、ヒト以外の霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコまたは齧歯類が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、患者は、任意の年齢または人種の男性または女性のヒトである。本発明の文脈では、患者は、癌に罹っているまたは以前にがんと診断された患者であり、好ましくは、NSCLCに罹っているまたは以前にNSCLCと診断された患者である。

#### 【0027】

「癌」および「腫瘍」という用語は、無秩序な細胞増殖を特徴とする哺乳類における生理学的状態を表す。本発明の方法は、胸部、心臓、肺、小腸、結腸、脾臓、腎臓、膀胱、頭、首、卵巣、前立腺、脳、膵臓、皮膚、骨、骨髄、血液、胸腺、子宮、睾丸、肝胆道および肝臓腫瘍などの任意の癌または腫瘍に制限なしに有用である。特に、化学療法的応答を本発明の方法によって予測し得る腫瘍としては、腺腫、血管肉腫、星状細胞腫、上皮癌、胚細胞腫、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、血管内皮腫、血管肉腫、血腫、肝芽細胞腫、白血病、リンパ腫、随芽細胞腫、黒色腫、神経芽細胞腫、胆管癌、骨肉腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、肉腫、および奇形腫が挙げられる。詳細には、腫瘍/癌は、末端部黒子黒色腫、紫外線角化症腺癌、腺様嚢胞癌、腺腫、腺肉腫、腺扁平上皮癌、星状細胞腫瘍、バルトリン腺癌、基底細胞癌、気管支腺癌、毛管類癌腫、癌、癌肉腫、胆管癌、嚢胞腺腫、卵黄嚢腫瘍、子宮内膜増殖症、子宮内膜間質部肉腫、類子宮内膜腺癌、上衣肉腫、スウィング肉腫、肝限局性結節性過形成、胚細胞腫瘍、神経膠芽細胞腫、グルカゴノーマ、血管芽細胞腫、血管内皮腫、血管腫、肝細胞腺腫、肝細胞腺腫症、肝細胞癌、胆管癌、インスリノーマ、上皮内腫瘍、上皮間扁平上皮細胞新形成、浸潤性扁平上皮癌、大細胞癌、平滑筋肉腫、黒色腫、悪性黒色腫、悪性中皮腫、髄芽腫、髄様上皮腫、粘液性類表皮癌、神経芽腫、神経上皮腺癌、結節型黒色腫、骨肉腫、乳頭状漿液性腺癌、下垂体腫瘍、形質細胞腫、偽肉腫、肺芽腫、腎細胞癌、網膜芽腫、横紋筋肉腫、肉腫、漿液性癌、小細胞癌、軟部組織癌、ソマトスタチン分泌腫瘍、扁平上皮癌、扁平上皮細胞癌、未分化癌、ぶどう膜黒色腫、イボ状癌、ピポーマ、ウィルムス腫瘍の群から選択される。更に一層好ましくは、腫瘍/癌としては、脳内癌、頭および首癌、直腸癌、星状細胞腫、神経膠芽細胞腫、小細胞癌、および非小細胞癌、好ましくは非小細胞肺癌、転移性黒色腫、アンドロゲン非依存性転移性前立腺癌、アンドロゲン依存性転移性前立腺癌および乳癌が挙げられる。好ましい実施態様では、癌は、肺癌、結腸癌、黒色腫、膵臓癌、前立腺癌、神経膠腫、膀胱癌、卵巣癌、胆管癌、乳癌およびリンパ腫から選択される。更に好ましい態様では、癌は、肺癌、好ましくは非小細胞肺癌(NSCLC)である。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 8 】

本明細書で用いられる非小細胞肺癌（NSCLC）という用語は、それらの予知および治療技術は大まかに言って同一であるため一緒に分類される異質性疾患の群を表し、世界保健機構／肺癌研究国際学会の組織学的分類（Travis WD et al.「肺および胸膜腫瘍の組織学的分類（Histological typing of lung and pleural tumors）、第三版」ベルリン：Springer-Verlag, 1999）によれば、以下のものが挙げられる：

（i） NSCLCの30%～40%を占める扁平上皮癌は、より大きな呼吸管に生じることが、より遅く成長し、これらの腫瘍の大きさが診断時に変化することを意味している。

（ii） 腺癌は、NSCLCの最も一般的なサブタイプであり、NSCLCの50%～60%を占め、肺のガス交換表面付近に生じ、サブタイプ気管支肺胞上皮癌が挙げられ、これは、治療に対して異なる応答を有することがある。

（iii） 大細胞癌は、肺の表面付近で増殖する急速増殖形態である。それは、主として除外の診断であり、一層の調査を行うときには、それは通常は扁平上皮癌または腺癌に再分類される。

（iv） 腺扁平上皮癌は、2種類の細胞、すなわち扁平細胞（ある種の臓器の内側を覆う薄く平坦な細胞）と腺様細胞を含む癌の種類である。

（v） 多形性、肉腫様または肉腫性要素を有する癌。これは、組織学的異質性並びに上皮および間葉性分化における連続性を反映する希少な腫瘍の群である。

（vi） 類癌腫瘍は、遅増殖性の神経内分泌肺腫瘍であり、神経系によって供給される刺激に反応してホルモンを放出することができる細胞で生じる。

（vii） 唾液腺型の癌は、肺の大気道内部にある唾液腺細胞に生じる。

（viii） 未分類癌としては、前記の肺癌の範疇のいずれにも適合しない癌が挙げられる。

## 【 0 0 2 9 】

好ましい実施態様では、NSCLCは、肺の扁平上皮癌、肺の大細胞癌および肺の腺癌から選択される。

## 【 0 0 3 0 】

本発明による予測方法により、I期NSCLC、II期NSCLC、III期NSCLCおよびIV期NSCLCを包含するNSCLCの様々な期を有する患者における化学療法治療に対する癌に罹っている患者の臨床応答の測定が可能になる。肺癌におけるI、II、IIIおよびIV期は、下記のように定義される。

## 【 0 0 3 1 】

本明細書で用いられる「I期NSCLC」という用語は、肺にある腫瘍を表すが、癌は、胸リンパ節または胸以外の他の部位には見出されていない。I期NSCLCは、通常は腫瘍の大きさまたは肺の外側に沿っている内層である胸膜の関与に基づいてIAおよびIB期に再分される。IA期では、腫瘍の大きさは3センチメートル（cm）以下であり、付近の組織を極僅かだけ侵襲している。癌は、リンパ節や任意の離れた部位へは広がっていない。IB期では、腫瘍の大きさは、3cmを上回り、肺の周囲の胸膜内層を侵襲しており、または肺の一部に崩壊を引き起こしている。癌は、リンパ節や任意の離れた部位へは広がっていない。IA期は、TNM分類のT1N0M0期に相当する。IB期は、TNM分類のT2M0N0に相当する。

## 【 0 0 3 2 】

本明細書で用いられる「II期NSCLC」という用語は、胸郭内のリンパ節を含むように生じるかまたは胸郭構造および組織を一層広範囲に侵襲している癌を表す。しかしながら、広がり胸郭の関連側を越えては見られず、癌は未だ局部疾患と考えられる。II期は、IIAおよびIIB期に再分される。IIA期は、3cm以下であり、付近の組織を極僅かだけ侵襲している腫瘍を表す。胸郭の同一側の1以上のリンパ節が侵襲されているが、離れた部位へは広がっていない。IIB期は、付近の組織が幾分か侵襲されかつ胸郭の同一側の1以上のリンパ節の関与を有する3cmを上回る腫瘍があるか、またはリンパ節の関与がないが、肺の外側の胸郭構造を侵襲しているかまたは竜骨（気管、または空

10

20

30

40

50

気を肺に送る管の領域は、分裂して右および左肺に到達する)の2cm以内にある癌についての2つの状況で割り当てられる。IIA期は、TNM分類のT1N1M0またはT2N1M0に相当する。IIB期は、TNM分類によればT3N0M0に相当する。

#### 【0033】

本明細書で用いられる「III期NSCLC」という用語は、胸郭の組織をII期より広範囲に侵襲している腫瘍、および/または癌が隔膜におけるリンパ節に広がっていることを表す。しかしながら、身体他の部分への広がり(転移)は、検出されない。III期は、IIIAおよびIIB期に再分される。IIIA期は、任意の隣接臓器を侵襲しておらずかつ胸の外側を除く腫瘍から離れた1以上のリンパ節を包含する単一腫瘍または塊体を表す。IIB期は、胸の2つ以上の領域に広がっているが、胸の外側には広がっていない癌を表す。IIIA期は、TNM分類によれば、T1N2M0、T2N2M0、T3N1M0、T3N2M0、T4N0M0またはT4N1M0に相当する。IIB期は、TNM分類によれば、T1N3M0、T2N3M0、T3N3M0、T4N2M0、T4N2M0またはT4N2M0に相当する。

10

#### 【0034】

本明細書で用いられる「IV期NSCLC」という用語は、肝臓、脳または他の器官など身体様々な部位へ広がりまたは転移した癌を表す。IV期は、M1を有する任意のTまたは任意のNに相当する。

#### 【0035】

TNM分類は、悪性癌の病期分類システムである。本明細書で用いられる「TNM分類」という用語は、Sobin et al. 著(国際対がん連合(UICC)、悪性腫瘍のTNM病期分類(TNM Classification of Malignant tumors)、第6版、ニューヨーク; Springer, 2002, pp. 191-203)(TNM6)およびAJCC癌病期分類マニュアル第6版、第19章、肺 - 元166~177頁を表し、これにより腫瘍が、幾つかのファクター、すなわち、腫瘍に対するT、節に対するN、転移に対するMによって下記のように分類される。

20

#### 【0036】

T: 原発性腫瘍は評価することができないか、あるいは痰または気管支洗浄中の悪性細胞の存在によって立証されるが、画像化または気管支鏡によっては可視化されない腫瘍:

T0 原発性腫瘍の形跡なし、

Tis インサイチューでの癌、

30

T1: 最大寸法が3cm以下であり、肺または肺胸膜によって囲まれ、葉気管支より近位には侵襲の気管支鏡による証拠がない腫瘍(例えば、主気管支にはなし)、

T2: 3cmを上回るが7cm以下である腫瘍、または下記の特徴のいずれかを有する腫瘍(これらの特徴を有するT2腫瘍は、5cm以下であるときには、T2aと分類される): 竜骨に対して2cm以上遠位の主気管支を含み、肺胸膜(PL1またはPL2)に侵襲し、肺門領域にまで伸長しているが、肺全体は含まない無気肺または閉塞性肺炎に伴う、

T3: 7cmを上回る腫瘍、または下記の特徴のいずれかを直接侵襲する腫瘍: 壁側胸膜(PL3)、胸壁(上肺溝腫瘍を含む)、横隔膜、横隔神経、縦隔胸膜、壁側心膜、または竜骨に対して2cm未満遠位であるが、竜骨の関与はない主気管支の腫瘍、または肺全体または同一葉の(複数の)別々の腫瘍小結節の随伴無気肺または閉塞性肺炎、および

40

T4: 下記の特徴のいずれかを侵襲する任意の大きさの腫瘍: 縦隔、心臓、大血管、気管、半回神経、食道、椎体、竜骨、同側性葉の(複数の)別々の腫瘍小結節。

N(所属リンパ節):

NX 所属リンパ節は、評価できない。

N0 所属リンパ節転移なし。

N1 同側性気管支周囲および/または同側性肺門リンパ節および肺内リンパ節の転移、直接伸張による関与を含む。

N2 同側性縦隔および/または気管分岐部リンパ節における転移。

N3 対側縦隔、対側肺門、同側性または対側不等辺三角形、または鎖骨上リンパ節

50

における転移。

M：遠隔転移

M 0 遠隔転移なし。

M 1 遠隔転移。

#### 【0037】

好ましい実施態様では、NSCLCは、進行期NSCLCである。更にもう一つの実施態様では、NSCLCはIIIA、IIBまたはIV期NSCLCである。

#### 【0038】

以前に説明したように、本発明の第一の方法は、当業者が癌に罹っている患者の化学療法治療に対する臨床応答を予測することを可能にする。

#### 【0039】

「治療する」または「治療」という用語は、治療処置並びに予防または防止方法であって、目的が癌のような望ましくない生理学的変化または疾患を防止しまたは弱めることを表す。有益なまたは所望な臨床結果としては、徴候の開放、疾病の期間の減少、病理学的状態の安定化（具体的には、悪化しない）、疾病の進行の減速、病理学的状態の向上および寛解（いずれも部分的および全体的）、検出可能および検出可能でないものの両方が挙げられるが、これらに限定されない。「治療」は、治療を施さない場合の予想生存に比較して生存期間を延長することも意味することができる。治療を必要とする者としては、癌に罹っている者並びに癌に罹り易い傾向を有する者が挙げられる。好ましい実施態様では、治療を必要とする者としては、NSCLCに罹っている者並びにNSCLCに罹り易い傾向を有する者が挙げられる。

#### 【0040】

本発明の文脈では、「化学療法的治療」は、癌の治療に用いられる抗腫瘍薬または細胞傷害性の標準化した治療療法へのこれらの薬剤の2以上の組合せを用いる治療を表す。本発明の文脈では、「化学療法的治療」という用語は、任意の種類の癌並びに新脈管形成または転移のような関連過程を治療するのに用いられる小さなサイズの有機分子、ペプチド、オリゴヌクレオチドなどを含む任意の抗腫瘍薬を含んでなる。化学療法の定義に含まれる薬は、ナイトロジェンマスタード/オキサザホスホリン（例えば、シクロホスファミド、イホスファミド）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン）、トリアゼン（例えば、テモゾラミド）、およびアルキルスルホネート（例えば、ブスルファン）のようなアルキル化剤、ドキソルビシンおよびダウノルビシンのようなアントラサイクリン系抗生物質、Taxol<sup>®</sup> およびドセタキセルのようなタキサン、ビンクリスチンおよびビンブラスチンのようなビンカルカロイド、5-フルオロウラシル（5-FU）、ロイコボリン、イリノテカン、イダルビシン、マイトマイシンC、オキサリプラチン、ラルチトレキセド、ペメトレキセド、タモキシフェン、シスプラチン、カルボプラチン、メトトレキセート、アクチノマイシンD、ミトキサントロン、ブレノキサ、ミトラマイシン、メトトレキセート、パクリタキセル、2-メトキシエストラジオール、プリノマスタット、バチマスタット、BAY 12-9566、カルボキシアミドトリアゾール、CC-1088、デキストロメトルファン酢酸、ジメチルキサンテノン酢酸、エンドスタチン、IM-862、マリマスタット、ペニシラミン、PTK787/ZK 222584、RPI. 4610、スクワラミンラクテート、SU5416、サリドマイド、コンプレタスタチン、タモキシフェン、COL-3、ネオバスタット、BMS-275291、SU6668、抗VEGF抗体、Med-522（Vitraxin II）、CAI、インターロイキン12、IM862、アミロリド、アンジオスタチン、アンジオスタチンK1-3、アンジオスタチンK1-5、カプトプリル、DL- -ジフルオロメチルオルニチン、DL- -ジフルオロメチルオルニチンHCl、エンドスタチン、フマジリン、ハービマイシンA、4-ヒドロキシフェニルレチンアミド、ジュグロン、ラミニン、ラミニンヘキサペプチド、ラミニンペンタペプチド、ラベンダスチンA、メドロキシプロゲステロン、ミノサイクリン、胎盤リボヌクレアーゼ阻害剤、スラミン、トロンボスポンジン、血管新生促進因子を標的とした抗体（例えば、アバスチン、アービタックス、ベクチビックス、ハーセプチン

10

20

30

40

50

)、トポイソメラーゼ阻害剤、微小管阻害剤、血管新生促進増殖因子の低分子量チロシンキナーゼ阻害剤(例えば、タルセバ、ネクサバル、スーテント、イレッサ)、GTPアーゼ阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、AKTキナーゼまたはATPアーゼ阻害剤、Wint(Wnt)シグナル阻害剤、E2F転写因子の阻害剤、mTOR阻害剤(例えば、トリセル)、およびインターフェロン、IL-12、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤(例えば、COL3、マリマスタット、バチマスタット)、ZD6474、SU11248、ビタキシン、PDGFR阻害剤(例えば、グリベック)、NM3および2-ME2、シレンギチドのような環状ペプチドが挙げられるが、これらに限定されない。適当な他の化学療法剤は、CD-ROM版のThe Merck Index, 第13版に詳細に記載されている。

10

#### 【0041】

本発明において開示される方法は、癌に罹っている患者の化学療法治療に対する応答を予測する上で有用である。癌の治療に用いられる療法は、特定の種類の癌によって変化する。例えば、下表1は、様々な種類の癌とそれらの相当する化学療法治療を示している。

#### 【0042】

#### 【表1】

表1. 癌および第一選択の相当する化学療法治療

癌の種類	化学療法治療
肺癌	白金をベースとした化合物
結腸癌	代謝拮抗薬
黒色腫	サイトカイン
膵臓癌	代謝拮抗薬
前立腺癌	ホルモン療法、および耐性患者には、分裂阻害剤
神経膠腫	DNAアルキル化剤
膀胱癌	代謝拮抗薬および白金をベースとした化合物
卵巣癌	上皮癌の場合には、白金をベースとした化合物
肝胆道癌	代謝拮抗薬またはEGFR標的薬
乳癌	ホルモン療法のみ、細胞増殖抑制カクテル(アントラサイクリン/DNAアルキル化剤/代謝拮抗薬)またはHER2標的薬と組合せたホルモン療法
リンパ腫	CD20標的薬

20

30

40

#### 【0043】

本明細書で用いられる「白金をベースとした化合物」という用語は、DNAを結合および架橋させ、DNA修復の活性化を誘導し、最終的にアポトーシスを誘発することができる白金原子を含む任意の化合物を表す。癌治療のための白金をベースとした化合物としては、カルボプラチン、シスプラチン[シス-ジアンミンジクロロ白金、(CDDP)]、

50

オキサリプラチン、イプロプラチン、ネダプラチン、四硝酸トリプラチン、テトラプラチン、サトラプラチン (JM216)、JM118 [シスアンミンジクロロ (II)]、JM149 [シスアンミンジクロロ (シクロヘキシルアミン) トランスジヒドロキソ白金 (IV)]、JM335 [トランスアンミンジクロロジヒドロキソ白金 (IV)]、トランスプラチン、ZD0473、シス、トランス、シス - Pt (NH<sub>3</sub>) (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NH<sub>2</sub>) (OOC C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>)<sub>2</sub> Cl、マラネート - 1, 2 - ジアミノシクロヘキサノ白金 (II)、5 - スルホサリチル酸 - トランス - (1, 2 - ジアミノシクロヘキサン) 白金 (II) (SSP)、ポリ - [(トランス - 1, 2 - ジアミノシクロヘキサン) 白金] - カルボキシアミロース (POLY - PLAT) および 4 - ヒドロキシスルホニルフェニルアセテート (トランス - 1, 2 - ジアミノシクロヘキサン) 白金 (II) (SAP) などが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の第一の方法の特定の実施態様では、白金をベースとした化合物は、カルボプラチン、シスプラチンおよびオキサリプラチンから選択され、好ましくはシスプラチンである。患者が肺癌または膀胱癌に罹っているときには、第一選択の化学療法治療は、白金をベースとした化合物、好ましくはシスプラチンに基づいている。患者が卵巣癌、詳細には、上皮性卵巣癌に罹っているときには、第一選択の化学療法治療は、白金をベースとした化合物に基づいている。

10

#### 【0044】

本明細書で用いられる「代謝拮抗薬」は、広義には、正常な代謝を妨げる物質および生存生物にとって重要な代謝物 (ビタミン、補酵素、アミノ酸および糖など) に対するそれらの構造的または機能的類似性により電子伝達系を阻害してエネルギーリッチな中間体の産生を妨げる物質に関する。

20

#### 【0045】

本発明での使用に適当な代謝拮抗薬としては、葉酸代謝拮抗薬 (アミノプテリン、デノプテリン、メトトレキセート、エダトレキセート、トリメトトレキセート、ノラトレキセド、ロメトトレキソール、ペメトトレキセド、ラルチトレキセド、ピリトレキシム、プテロプテリン、ロイコボリン、10 - プロバルギル - 5, 8 - ジデアザホレート (PDDF、CB3717))、プリン類似体 (クラドリビン、クロファラビン、フルダラビン、メルカプトプリン、ペントスタチン、チオグアニン) およびピリミジン類似体 (カペシタビン、シタラビンまたはアラ - C、デシタビン、フルオロウラシル、5 - フルオロウラシル、ドキシフルリジン、フロクスウリジンおよびゲムシタビン) が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、代謝拮抗薬は、5 - フルオロウラシルおよびゲムシタビンから選択される。患者が結腸癌に罹っているときには、第一選択の化学療法治療は、代謝拮抗薬、好ましくは 5 - フルオロウラシルである。患者が膵臓癌、膀胱癌または胆嚢癌に罹っているときには、第一選択の化学療法治療は、代謝拮抗薬、好ましくはゲムシタビンである。患者が胆管癌に罹っているときには、第一選択の化学療法治療は、代謝拮抗薬に基づいており、好ましくはフルオロピリミジンに基づいている。胆管癌の治療に有用なフルオロピリミジンの例は、5 - フルオロウラシル、テガフルおよびカペシタビンである。

30

#### 【0046】

「サイトカイン」という用語は、インターロイキンおよびインターフェロンのような免疫調節剤を表し、これは免疫系の特定の細胞によって分泌され、シグナルを細胞間に局所的に運ぶポリペプチドである。本発明で用いるのに適当なサイトカインは、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、インターロイキン2、インターロイキン12、腫瘍壊死因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM - CSF)、顆粒球コロニー刺激因子 (G - CSF)、インターロイキン4 (IL - 4)、インターロイキン6 (IL - 6)、インターロイキン18 (IL - 18) およびインターフェロン 2b であるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、用いられるサイトカインはインターフェロンである。患者が黒色腫に罹っているときには、III 期における第一選択の化学療法治療はサイトカインであり、好ましくはインターフェロンである。

40

#### 【0047】

50

「ホルモン療法」という用語は、主として（複数の）特定の細胞に特異的または相対的に特異的なホルモン経路と相互作用（例えば、干渉）することによって作用する抗腫瘍剤の投与を表す。前記の治療は、ホルモンの効果をブロックし、阻害または減少させ、具体的にはエストロゲンまたはプロゲステロンの効果をブロックする、あるいはエストロゲンまたはプロゲステロンレベルを低くする目的を有し、抗エストロゲンまたは抗プロゲステロン療法およびエストロゲンまたはプロゲステロン除去療法を含む。ホルモン療法としては、タモキシフェン、トレミフェン、アナストロゾール、アルゾキシフェン、ラソフォキシフェン、ラロキシフェン、ナフォキシジン、フルベストラント、アミノグルテチミド、テストラクトン、アタメスタン、エキセメスタン、ファドロゾール、フォルメスタン、レトロゾール、ゴセレリン、ロイプロレリンまたはロイプロリド、ブセレリン、ヒストレリン、メゲストロールおよびフルオキシメステロンが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、ホルモン療法はアンドロゲン除去療法である。「アンドロゲン除去療法」または「アンドロゲン抑制療法」という用語は、身体の男性ホルモンであるアンドロゲンのレベルを減少させる治療を表す。アンドロゲン除去療法としては、ロイプロリド、ブセレリン、ゴセレリンおよびヒストレリンのようなGnRH作動薬が挙げられるが、これらに限定されない。患者が前立腺癌に罹っているときには、第一選択の化学療法治療はホルモン療法であり、好ましくはアンドロゲン除去療法である。患者が乳癌に罹っているときには、第一選択の化学療法治療はホルモン療法のみまたは細胞増殖抑制カクテルと組み合わせたホルモン療法である。本発明の文脈におけるおよび乳癌の治療に関する「細胞増殖抑制カクテル」という用語は、アントラサイクリン、DNAアルキル化剤および代謝拮抗薬の組合せを表す。本発明による「細胞増殖抑制カクテル」の例は、FAC（アドリアマイシン/シクロホスファミド/5-フルオロウラシル）、FEC（5-フルオロウラシル/エピルビシン/シクロホスファミド）およびCNF（シクロホスファミド/ミトキサントロン/5-フルオロウラシル）であるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、細胞増殖抑制カクテルは、FAC、FECおよびCNFから選択される。

10

20

30

40

50

#### 【0048】

「細胞分裂阻害剤」という用語は、微小管を崩壊させることによって有糸分裂または細胞分裂を阻害する化合物を表す。細胞分裂阻害剤の例としては、ビンデシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビンのようなビンカルカロイド、パクリタキセル（Taxol<sup>®</sup>）、ドセタキセル（Taxotere<sup>®</sup>）、コルチシン（NSC757）、チオコルチシン（NSC361792）、コルチシン誘導体（例えば、NSC33410）およびアコルチシン（NSC406042）のようなタキサン、ハリコンドリニンB（NSC609395）、ドラスタチン10（NSC376128）、メイタンシン（NSC153858）、リゾキシシン（NSC332598）、エポチロンA、エポチロンB、ディスコデルモリド、エストラムスチン、ノコダゾールが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、細胞分裂阻害剤はドセタキセルである。患者が前立腺癌に罹っているときには、ホルモン療法に耐性の癌に対する第二選択の化学療法治療は、細胞分裂阻害剤、好ましくはドセタキセルを用いる治療である。

#### 【0049】

本明細書で用いられる「DNAアルキル化剤」は、速やかに分裂する細胞のDNAにアルキル基を付加し、複製の阻止および細胞死を生じることができるとされる癌治療に用いられるアルキル化剤である。DNA-アルキル化剤は、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホネートおよびトリアゼンであり、シクロホスファミド（Cytoxan<sup>®</sup>）、ブスルファン、インプロスルファン、ピボスルファン、ピボプロマン、メルファラン（L-サルコリシン）、クロラムブシル、メクロレタミンまたはムスチン、ウラムスチンまたはウラシルマスタード、ノベンピチン、フェネステリン、トロホスファミド、イホスファミド、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、クロロゾトシン、フォテムスチン、ニムスチン、ラニムスチン（ranimustine）、セムスチン（メチル-CCNU）、ストレプトゾシン、チオテバ、トリエチレンメラミ

ン、トリエチレンチオホスホルアミン、プロカルバジン、アルトレタミン、ダカルバジン、ミトゾロミド、およびテモゾロミドを含むが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、DNA - アルキル化剤は、テモゾロミド、ニトロソウレアおよびプロカルバジンから選択される。患者が神経膠腫に罹っているときには、第一選択の化学療法治療は、DNAアルキル化剤であり、好ましくはテモゾロミド、ニトロソウレア、プロカルバジンおよびそれらの組合せから選択される。

#### 【0050】

本明細書で用いられる「EGFR 標的薬」という用語は、受容体の細胞外ドメインを標的とすることによって、リガンドの受容体への結合をブロックすることによるか、または細胞質ドメインのチロシンキナーゼ活性を阻害することによって、EGFRを介してシグナルを完全にまたは部分的に阻害することができる任意の分子を表す。このような薬剤の例としては、EGFRに結合する抗体および小分子が挙げられる。EGFRに結合する抗体の例としては、MAb 579 (ATCC CRL HB 8506)、MAb 455 (ATCC CRL HB 8507)、MAb 225 (ATCC CRL 8508)、MAb 528 (ATCC CRL 8509) (米国特許第4,943,533号明細書、Mendelsohn et al.を参照)、およびキメラ化225 (C225) および再形状化したヒト225 (H225) (WO 96/40210号、Imclone Systems Inc.を参照)のようなそれらの変異体、II型突然変異体EGFRを結合する抗体、(米国特許第5,212,290号明細書)、米国特許第5,891,996号明細書に記載のEGFRを結合するヒト化およびキメラ抗体、およびEGFRを結合するヒト抗体 (WO 98/50433号、Abgenix参照)、ペバシツマブ (アバステチン)、2C3、HuMV833、セツキシマブ (Erbix 商標)、パニツムマブ (Vectibix 商標)、ニモツズマブ (TheraCim 商標)、マツズマブ、ザルツズマブ、mAb 806、またはIMC-11F8が挙げられる。EGFRのチロシンキナーゼ活性の阻害剤の例としては、ZD1839またはゲフィチニブ (IRESSA 商標、Astra Zeneca)、CP-358774 (TARCEVA 商標、Genentech/OSI) およびAG1478、AG1571 (SU5271、Sugen)、エルロチニブ (タルセバ)、ステント (スニチニブ)、ラパチニブ、イマチニブ、ソラフェニブ (ネクサパール)、バンデタニブ、アキシチニブ、ボスチニブ、セジバニブ、ダサチニブ (スプリセル)、レスタウルチニブ、パゾパニブおよび/またはARQ197が挙げられる。好ましい実施態様では、EGFR 標的薬はソラフェニブである。患者が肝細胞癌に罹っているときには、第一選択の化学療法治療はEGFR 標的薬であり、好ましくはソラフェニブである。

#### 【0051】

「HER2 標的薬」という用語は、乳癌 (HER2+) の特定のサブタイプで過剰発現するタンパク質ヒト上皮増殖因子受容体2 (HER2) に対して指定された薬剤を表す。HER2 標的薬としては、トラスツズマブ、ラパチニブ、ペルツズマブ、ネラチニブ、トラスツズマブ - DM1 およびエベロリムスまたはテムシロリムスのようなmTOR 阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、HER2 標的薬はトラスツズマブである。患者がホルモン受容体について乳癌HER2+に罹っているときには、第一選択の治療はHER2 標的薬であり、好ましくはトラスツズマブである。

#### 【0052】

「CD20 標的薬」という用語は、Bリンパ球上のCD20 抗原に指示された薬剤を表す。CD20 標的薬としては、リツキシマブ、オクレリズマブ、PRO70769、rh uH27、オフアツムマブ、ベルツズマブ、hA20、IMMU-106、AME-133、LY2469298、PRO131921、GA-101、トシツモマブおよびRO5072759のような抗CD20 抗体が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、CD20 標的薬はリツキシマブである。患者がホジキンリンパ腫に罹っているときには、第一選択の治療は、組み合わせ化学療法、リツキシマブおよびそれらの組合せから選択される。「組み合わせ化学療法」は、様々な細胞傷害性機構を介して作用する抗がん薬の組合せを意味する。ホジキンリンパ腫に対する組み合わせ化学療法は、A

10

20

30

40

50



B V D ( アドリアマイシン / ブレオマイシン / ビンブラスチン / ダカルバジン )、M O P P ( メクロレタミン / ピンクリスチン / プロカルバジン / プレドニソン )、B E A C O P P ( ブレオマイシン / エトポシド / アドリアマイシン / シクロホスファミド / ピンクリスチン / プロカルバジン / プレドニソン )、スタンフォード V ( シクロホスファミド、メクロレタミンまたはイホスファミド / ドキソルビシン / ビンブラスチン / ピンクリスチン / ブレオマイシン / エトポシド / プレドニソン )、C h I V P P / E V A ( クロラムブシル、ピンクリスチン、プロカルバジン、プレドニソン、エトポシド、ビンブラスチン、アドリアマイシン ) および V A P E C - B ( ピンクリスチン / アドリアマイシン / プレドニソン / エトポシド / シクロホスファミド / ブレオマイシン ) であるが、これらに限定されない。患者が非ホジキンリンパ腫に罹っているときには、第一選択の化学療法治療は、C H O P ( シクロホスファミド / ドキソルビシン / ピンクリスチン / プレドニソン )、C H O P - R または R - C H O P ( C H O P + リツキシマブ )、C O P または C V P ( シクロホスファミド / ピンクリスチン / プレドニソン )、C O P P ( シクロホスファミド / ピンクリスチン / プロカルバジン / プレドニソン )、m - B A C O D ( メトトレキセート / ブレオマイシン / アドリアマイシン / シクロホスファミド / ピンクリスチン / デキサメタゾン )、M A C O P - B ( メトトレキセート / ロイコボリン / アドリアマイシン / シクロホスファミド / ピンクリスチン / プレドニソン / ブレオマイシン )、P r o M A C E - M O P P ( メトトレキセート / アドリアマイシン / シクロホスファミド / エトポシド + M O P P )、P r o M A C E - C y t a B O M ( プレドニソン / アドリアマイシン / シクロホスファミド / エトポシド / シタラビン / ブレオマイシン / ピンクリスチン / メトトレキセート / ロイコボリン ) および R - F C M ( リツキシマブ / フルダラビン / シクロホスファミド / ミトキサントロン ) から選択される組み合わせ化学療法であるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 5 3 】

従って、好ましい実施態様では、本発明による予測する方法は、更に C h o K の発現レベルを参照値と比較することを含んでなり、前記試料における C h o K の発現レベルの前記参照値に対する変化は、前記化学療法治療に対する患者の臨床応答が不十分であることを示している。更にもう一つの実施態様では、C h o K の発現レベルの変化は、前記参照値に対する前記発現レベルの増加である。

#### 【 0 0 5 4 】

以前に説明したように、本発明の第一の方法は、当業者が癌に罹っている患者の化学療法治療に対する臨床応答を予測することを可能にする。好ましい実施態様では、癌は N S C L C であり、化学療法治療は白金をベースとした化学療法治療である。

#### 【 0 0 5 5 】

本発明の文脈では、「白金をベースとした化学療法」または「白金をベースとした化学療法治療」は、少なくとも白金をベースとした化合物を含む任意の治療と理解される。

#### 【 0 0 5 6 】

「白金をベースとした化合物」という用語は、上記に詳細に定義されており、本明細書では同じ意味に用いられる。

#### 【 0 0 5 7 】

当業者が理解しているように、本発明の文脈では、白金をベースとした化学療法治療は、白金をベースとした化合物と白金をベースとした化合物とは異なる 1 以上の化学療法剤との組合せをも含む。前記の「白金をベースとした化合物とは異なる化学療法剤」は、「白金をベースとした化合物」の前記定義には含まれない N S C L C の治療に用いられる任意の薬剤でよく、DNA アルキル化剤、代謝拮抗薬、細胞分裂阻害剤、アントラサイクリン、トポイソメラーゼ I および II 阻害剤などが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【 0 0 5 8 】

「DNA アルキル化剤」、「代謝拮抗薬」および「細胞分裂阻害剤」という用語は、上記で詳細に説明されており、本発明の方法では同じ意味に用いられる。

#### 【 0 0 5 9 】

10

20

30

40

50

「アントラサイクリン」という用語は、ドキソルビシン（アドリアマイシン<sup>商標</sup>）、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、エピルビシン、イダルビシン、バルルビシン、ピラルビシンおよびミトキサントロンのようなストレプトマイセス細菌由来の癌化学療法で用いられる抗生物質を表す。

【0060】

「トポイソメラーゼⅠおよびⅡ阻害剤」は、トポイソメラーゼ酵素ⅠおよびⅡの作用を干渉するように設計された薬剤である。トポイソメラーゼⅠ阻害剤としては、イリノテカン、トポテカン、カンプトテシン、アセチルカンプトテシン、9-アミノカンプトテシン、ラメラリンDおよびベツリン酸が挙げられるが、これらに限定されない。トポイソメラーゼⅡ阻害剤としては、アムサクリン、エトポシド、テニポシドおよびドキソルビシンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0061】

NSCLCの治療に適する組合せは、シスプラチン-パクリタキセル、シスプラチン-ゲムシタピン、シスプラチン-ドセタキセル、カルボプラチン-パクリタキセル、シスプラチン-エトポシド、カルボプラチン-エトポシド、カルボプラチン-ゲムシタピン、カルボプラチン-ドセタキセル、シスプラチン-ビノレルビン、カルボプラチン-ビノレルビン、シスプラチン-ビンデシン、シスプラチン-テニポシド、シスプラチン-ビンデシン、シスプラチン-チラパザミン、オキサリプラチン-ゲムシタピン、オキサリプラチン-パクリタキセル、オキサリプラチン-ビノレルビン、ZD0473-ビノレルビン、ZD0473-パクリタキセル、ZD0473-ゲムシタピン、シスプラチン-エトポシド-マイトマイシンC、シスプラチン-パクリタキセル-ゲムシタピン、シスプラチン-ドキソルビシン-5-フルオロウラシル（AFP）、シスプラチン-シクロホスファミド-ブレオマイシン（CBP）、シスプラチン-ビンデシン-マイトマイシンC（MVP）、シクロホスファミド-ドキソルビシン-シスプラチン（CISCA）、シスプラチン-アドリアマイシン（CA）、シスプラチン-フルオロウラシル（CF）、シスプラチン-ゲムシタピン-ビノレルビンおよびパクリタキセルに続いてシスプラチン-ゲムシタピン-ビノレルビンであることができるが、これらに限定されない。

20

【0062】

従って、特定の実施態様では、白金をベースとした化学療法治療は、シスプラチン-ドセタキセル、シスプラチン-ゲムシタピン-ビノレルビンまたはパクリタキセルに続いてシスプラチン-ゲムシタピン-ビノレルビンから選択される。

30

【0063】

本発明の第一の方法の第一工程は、検討を行っている患者由来の試料中のコリンキナーゼ（ChoK）遺伝子の発現レベルの決定を含んでいる。

【0064】

本明細書で用いられる「コリンキナーゼ」という用語は、ATPの存在下にてコリンのリン酸化を触媒してホスホリルコリン（PCho）（EC2.7.1.32）を産生する酵素のアイソフォームを表す。本発明によって発現を測定することができるコリンキナーゼの典型的なアイソフォームとしては、ヒトオルソログ（UniProt受入番号P35790）、マウスオルソログ（UniProt受入番号O54804）およびラットオルソログ（UniProt受入番号Q01134）が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、本発明の方法は、ChoK<sub>a</sub>アイソフォームの発現レベルの決定を含んでなる。もう一つの好ましい実施態様では、本発明の方法は、ChoK<sub>a</sub>およびbアイソフォームの発現レベルの決定を含んでなる。もう一つの好ましい実施態様では、本発明の方法は、ChoK<sub>b</sub>アイソフォームの発現レベルの決定を含んでなる。好ましい実施態様では、本発明の方法は、ChoK<sub>a</sub>アイソフォームの発現レベルの決定を含んでなるが、bアイソフォームの発現レベルの決定を含まない。もう一つの好ましい実施態様では、本発明の方法は、ChoK<sub>b</sub>の発現レベルの決定を含んでなるが、ChoK<sub>a</sub>アイソフォームの発現レベルの決定を含まない。

40

【0065】

50

「Ch o K aアイソフォーム」、「Ch o K アイソフォーム 1」または「Ch o K 長アイソフォーム」という用語は、受入番号NP\_\_001268(2012年6月17日公開)でNCBIデータベースに提供されている457アミノ酸のポリペプチドを表すために、本明細書では互換的に用いられる。ポリペプチドは、CHKA遺伝子から選択的スプライシングによって形成される2733bpの転写体によってコードされる。aアイソフォームをコードする転写体のcDNA配列は、受入番号NM\_\_001277(2012年6月17日公開)でNCBIデータベースに提供される。

【0066】

「Ch o K bアイソフォーム」、「Ch o K アイソフォーム 2」または「Ch o K 短アイソフォーム」という用語は、本明細書では受入番号NP\_\_997634(2012年6月17日公開)でNCBIデータベースに提供される439アミノ酸のポリペプチドを表すために互換的に用いられる。ポリペプチドは、CHKA遺伝子から選択的スプライシングによって形成される2679bpの転写体によってコードされる。bアイソフォームをコードする転写体のcDNA配列は、受入番号NM\_\_NM\_\_212469(2012年6月17日公開)でNCBIデータベースに提供される。

10

【0067】

本明細書で用いられる「試料」という用語は、患者から得ることができる任意の試料に関する。本発明の方法は、生験試料、組織、細胞または流体(血清、唾液、精液、痰、脳脊髄液(CSF)、涙、粘液、汗、乳)、脳抽出液、気管支洗浄、気管支鏡、穿刺吸引生験(FNAB)などによって得られる試料のような患者の任意の種類の生物学的試料に応用することができる。特定の実施態様では、前記試料は組織試料であり、好ましくは腫瘍組織試料であり、更に好ましくは癌に罹っている患者、好ましくはNSCLCに罹っている患者由来の肺腫瘍組織試料である。前記試料は、通常の方法、例えば、生験によって、関連の医学技術分野における通常の方法を有する者に周知の方法を用いることによって得ることができる。生験から試料を得る方法としては、塊体を肉眼での分配、または顕微解剖または他の技術分野で知られている細胞分離法が挙げられる。腫瘍細胞は、穿刺吸引細胞学によって得ることもできる。好ましい実施態様では、試料は、気管支洗浄によって得られる。もう一つの好ましい実施態様では、試料は、穿刺吸引生験(FNAB)によって得られる。試料の保存および取扱いを簡略化するため、試料の保存および取扱いを簡略化するため、これらをホルマリン固定およびパラフィン包埋するか、または最初に冷凍した後、急速冷凍できる極低温媒体に浸漬することで、OCT化合物のような低温固化性媒体に包埋することができる(OCT包埋した冷凍組織)。

20

30

【0068】

本発明の特定の実施態様では、Ch o K 遺伝子の発現レベルは、前記遺伝子によってコードされるmRNAのレベルを測定することによって、または前記遺伝子によってコードされるタンパク質、すなわちCh o K タンパク質またはその変異体のレベルを測定することによって決定することができる。

【0069】

Ch o K 遺伝子のmRNAレベルを測定するため、生物学的試料を処理して、物理的、機械的または化学的に組織または細胞構造を破壊して、細胞内成分を水性または有機溶液に放出して、更なる分析のための核酸を調製することができる。核酸は、当業者に知られている手順によって試料から抽出され、市販されている。次に、RNAを、当該技術分野で典型的な方法のいずれか、例えば、Sambrook, j., et al., 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3によって冷凍または新鮮な試料から抽出される。好ましくは、抽出工程中にRNAの分解を避けるように注意する。

40

【0070】

発現レベルは、ホルマリン固定してパラフィン包埋した組織試料から得られるmRNAを用いて測定することができる。mRNAは、保存記録の病理学的試料または生験試料から、これを最初に脱パラフィン処理して単離することができる。典型的な脱パラフィン法

50

としては、パラフィン処理した試料をキシレンのような有機溶媒による洗浄することが挙げられる。脱パラフィン処理した試料は、低級アルコールの水溶液で再水和することができる。好適な低級アルコールとしては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノールおよびブタノールが挙げられる。脱パラフィン処理した試料は、例えば、減少濃度の低級アルコール溶液で連続洗浄により再水和することができる。あるいは、試料を同時に脱パラフィン処理して再水和する。次いで、試料を溶解し、RNAを試料から抽出する。試料は、新鮮な腫瘍組織から得ることもできる。

#### 【0071】

好ましい実施態様では、試料は、新鮮な腫瘍組織からまたはOCT包埋した冷凍組織から得ることができる。もう一つの好ましい実施態様では、試料は、気管支鏡によって得て、次いでパラフィン包埋することができる。

10

#### 【0072】

Chok mRNAのレベルの測定は、qPCR、ノーザンブロット法、RNAドットブロット法、TaqMan、LongSAGEおよびSuperSAGEのような変数を含む遺伝子発現の逐次分析法(SAGE)のようなタグ・ベース法、マイクロアレイなど当該技術分野で知られている任意の方法によって行うことができる。Chok mRNAのレベルの測定は、WO2010030818号、Femino et al. (Science, 1998, 280:585-590)、Levsky et al. (Science, 2002, 297:836-840)またはRaj et al. (PLoS Biology, 2006, 4:e309)に記載されているようなFlow-FISH、qFISHおよびダブル・フュージョン・フィッシュ(D-FISH)のような変数を含む蛍光インサイチュアハイブリダイゼーションによって行うこともできる。Chok mRNAのレベルは、核酸配列に基づく増幅(NASBA)技術によって測定することもできる。

20

#### 【0073】

好ましい実施態様では、遺伝子mRNA発現レベルは、しばしば逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって決定される。検出は、個々の試料または組織マイクロアレイで行うことができる。

#### 【0074】

従って、特定の実施態様では、Chok 遺伝子のmRNA発現レベルは、定量的PCR、好ましくはリアルタイム(Real-time)PCRによって決定される。検出は、個々の試料または組織マイクロアレイで行うことができる。

30

#### 【0075】

様々な試料中でのmRNA発現の値を規格化するため、試験試料における目的のmRNAの発現レベルをコントロールRNAの発現と比較することができる。本明細書で用いられる「コントロールRNA」は、発現レベルが変化しないかまたは非腫瘍化細胞に対して腫瘍細胞中で限定された量だけ変化するRNAに関する。好ましくは、コントロールRNAは、ハウスキーピング遺伝子に由来しかつ構成的に発現して本質的な細胞機能を行うタンパク質をコードするmRNAである。本発明で用いられる好ましいハウスキーピング遺伝子としては、 $\alpha$ -2-ミクログロブリン、ユビキチン、18-Sリボソームタンパク質、シクロフィリン、GAPDH、PSMB4、チューブリンおよび $\alpha$ -アクチンが挙げられる。好ましい実施態様では、コントロールRNAは、GAPDH、 $\alpha$ -アクチン、18-Sリボソームタンパク質またはPSMB4 mRNAである。

40

#### 【0076】

一実施態様では、相対的遺伝子発現定量化は、内生コントロールとしてGAPDH、 $\alpha$ -アクチンまたはPSMB4を、およびキャリブレーターとして市販RNAコントロールを用いる比較Ct法によって計算される。最終結果は、式 2 - ( $Ct_{試料} - Ct_{キャリブレーター}$ )に従って決定され、キャリブレーターおよび試料のCt値は、標的遺伝子のCt値をコントロール遺伝子の値から差し引くことによって決定される。

#### 【0077】

あるいは、本発明の第一の方法のもう一つの実施態様では、Chok 遺伝子の発現レベルは、Chok タンパク質またはその変異体の発現を測定することによって決定され

50

る。好ましい実施態様では、Chok タンパク質またはその変異体の発現レベルは、ウェスタンブロット法によってまたは免疫組織化学によって決定される。

【0078】

Chok タンパク質の発現レベルは、例えば、Chok タンパク質（または抗原決定基を含むその断片）に特異的に結合する能力を有する抗体を用いる通常の方法によって、次いで生成する抗体-抗原複合体を定量することによって定量することができる。

【0079】

これらのアッセイに用いられる抗体は、例えば、ポリクローナル血清、ハイブリドーマ上清またはモノクローナル抗体、抗体断片、Fv、Fab、Fab' および F(ab')<sub>2</sub>、ScFv、ジアボディー、トリアボディー、テトラボディーおよびヒト化抗体であることができる。同時に、抗体は標識することもまたはしないこともできる。用いることができるマーカーの例示的ではあるが非独占的例としては、放射性同位体、酵素、蛍光体、化学発光試薬、酵索性物質またはコファクター、酵索性阻害剤、粒子、着色料などが挙げられる。本発明で用いることができる多種多様の周知の方法があり、これは非標識抗体（一次抗体）および標識抗体（二次抗体）を用いており、これらの手法には、ウェスタンブロットまたはウェスタン転写、ELISA（酵素結合免疫吸着法）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、競合的 EIA（酵素イムノアッセイ）、DAS-ELISA（二重抗体サンドイッチ ELISA）、免疫細胞化学的および免疫組織化学的手法、特異抗体を含むバイオチップまたはタンパク質マイクロアレイの使用に基づく手法またはディップスティックのようなフォーマットにおけるコロイド沈澱に基づくアッセイが含まれる。Chok タンパク質を検出し、定量する他の方法としては、アフィニティークロマトグラフィー、結合リガンドアッセイなどが挙げられる。

【0080】

一方、Chok タンパク質発現レベルの測定は、収集した患者試料を含む組織マイクロアレイ（TMA）を構築し、Chok タンパク質の発現レベルを免疫組織化学的手法によって測定することによって行うことができる。免疫染色強度は、2名の異なる病理学者によって評価され、均一かつ明瞭なカットオフ基準を用いて得点を付け、その方法の再現性を保持することができる。不一致は、同時再評価によって解決することができる。簡単に言えば、免疫染色の結果は、腫瘍細胞における発現およびそれぞれのマーカーについての特定のカットオフを考慮に入れて、ネガティブ発現（0）対ポジティブ発現、および低発現（1+）対中（2+）および高（3+）発現として記録することができる。一般的基準として、カットオフを選択して、再現性を良くし、可能な場合には生物学的事象を翻訳した。あるいは、免疫染色強度は、Rojo, M.G. et al. (Folia Histochem. Cytobiol. 2009; 47(3): 349-54) または Mulrane, L. et al. (Expert Rev. Mol. Diagn. 2008; 8(6): 707-25) に開示されているような画像化法および自動化法を用いて評価することができる。

【0081】

あるいは、もう一つの特の実施態様では、Chok タンパク質またはその変異体の発現レベルは、ウェスタンブロット法によって測定される。ウェスタンブロット法は、変性条件下でゲル電気泳動によって以前に分離され、特異的な抗体および展開系（例えば、化学発光体）と共にインキュベートすることによって膜、一般的にはニトロセルロース上に固定したタンパク質の検出に基づいている。

【0082】

以前に述べたように、Chok タンパク質の変異体を用いて、Chok 遺伝子の発現レベルを測定して、本発明の第一の方法を実施することができる

【0083】

ヒト Chok 遺伝子は、選択的スプライシングによって産生した Chok タンパク質の2つのアイソフォームをコードする。アイソフォーム1は457アミノ酸を有し、アイソフォーム2は439アミノ酸を有しており、155～172位が欠けているからである。更に、幾つかの天然変異体が報告されている。

## 【 0 0 8 4 】

例えば、C h o K タンパク質の変異体は、( i ) アミノ酸残基の 1 以上が保存または非保存アミノ酸残基（好ましくは、保存アミノ酸残基）で置換され、このような置換アミノ酸残基は遺伝子コードによってコードされたものでよくあるいはそうでないこともあるもの、( i i ) 1 以上の修飾アミノ酸残基、例えば、置換基の接着によって修飾されている残基があるもの、( i i i ) タンパク質が本発明のタンパク質の選択的スプライス変異体であるもの、および/または( i v ) タンパク質の断片であることがある。断片としては、元の配列のタンパク質分解開裂（多部位タンパク質分解を含む）によって生成したタンパク質が挙げられる。変異体は、本明細書の教示から当業者の範囲内にあると考えられる。

10

## 【 0 0 8 5 】

本発明による変異体としては、元のアミノ酸配列と少なくとも 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % または 9 6 % 類似または同一であるアミノ酸配列が挙げられる。当該技術分野で知られているように、2 つのタンパク質の間の「類似性」は、一方のタンパク質のアミノ酸配列およびその保存されたアミノ酸代替物を第二のタンパク質の配列と比較することによって決定される。2 つのタンパク質の間の同一性の程度は、当業者に広く知られているコンピューターアルゴリズムおよび方法を用いて決定される。2 つのアミノ酸配列の間の同一性は、好ましくは B L A S T P アルゴリズムを用いることによって決定される [BLASTManual, Altschul, S., et al., NCB I NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S.k et al., J. Mol. Biol. 215: 403 - 410 (1990)]。

20

## 【 0 0 8 6 】

タンパク質は、翻訳後修飾することができる。例えば、本発明の範囲内にある翻訳後修飾としては、シグナルペプチド開裂、グリコシル化、アセチル化、イソプレニル化、タンパク質分解、ミリストイル化、タンパク質フォールディングおよびタンパク質分解処理などが挙げられる。更に、タンパク質は、翻訳後修飾によってまたは翻訳の際の非天然アミノ酸の導入によって形成される非天然アミノ酸を含むことがある。

## 【 0 0 8 7 】

特定の実施態様では、前記変異体は、哺乳類変異体であり、好ましくはヒト変異体であり、更に好ましくは、元のアミノ酸配列に 6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 % または 9 6 % の類似性または同一性を有する。

30

## 【 0 0 8 8 】

好ましい実施態様では、本発明の第一の方法は、更に C h o K の発現レベルを参照値と比較することを含んでなり、前記参照値に対する前記試料における C h o K 遺伝子の発現レベルの変化は、前記化学療法治療に対する患者の臨床応答が不十分かまたは前記化学療法治療に対する患者の臨床応答が良好であることを示している。

## 【 0 0 8 9 】

好ましい実施態様では、一端コリンキナーゼ ( C h o K ) 遺伝子の発現レベルが一つの試料で測定されてしまうと、本発明の第一の方法は、更に前記発現レベルを参照値と比較することを含んでなり、前記参照値に対する前記試料における C h o K 遺伝子の発現レベルに対する変化は、前記化学療法治療に対する患者の臨床応答が不十分かまたは前記化学療法治療に対する患者の臨床応答が良好であることを示している。

40

## 【 0 0 9 0 】

参照値は、当該技術分野の状態において周知の手法、例えば、化学療法治療を受けたことがあるまたはない癌に罹っている患者または正常組織の生検試料における腫瘍組織の集合で測定した C h o K 遺伝子の発現レベルの中央値を測定することによって決定することができる。好ましい実施態様では、C h o K 遺伝子の発現レベルは、白金をベースとした化学療法治療を受けたことがあるまたはない N S C L C に罹っている患者または正常な肺組織の生検試料における腫瘍組織の集団で測定される。この中央値が確立されると、患者由来の腫瘍組織で発現したこのマーカーのレベルをこの中央値と比較し、このようにして「減少した」（低）または「増加した」（高）発現レベルを割り振ることができる。

50

参照レベルを誘導する試料の集団は、好ましくは同じ種類の癌、すなわちNSCLCに罹っている患者または肺癌に罹っていない正常な個人からの肺組織の混合物から構成される。あるいは、遺伝子の発現レベルが「増加」しているかまたは「減少」しているかを決定するのに用いられる参照値の使用は、化学療法治療を受けたことがあるまたはない癌に罹っている患者、好ましくは白金をベースとした化学療法治療を受けたことがあるまたはないNSCLCに罹っている患者から生検によって得た腫瘍試料のそれぞれから等量のRNAをプールすることによって得られたRNA試料において測定したChoK 遺伝子の発現レベルの中央値に相当する。この中央値が確立されると、患者由来の腫瘍組織で発現したこのマーカーのレベルをこの中央値と比較することによって、「増加」、「減少」または「変化の欠如」のレベルを割り振ることができる。例えば、参照値と比較して少なくとも1.1倍、1.5倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍以上の参照値を上回る発現レベルの増加は、「増加」発現レベルと考えられる。一方、参照値と比較して少なくとも0.9倍、0.75倍、0.2倍、0.1倍、0.05倍、0.025倍、0.02倍、0.01倍、0.005倍以下の参照値を下回る発現レベルの減少は、「減少」発現レベルと考えられる。参照値に対する発現レベルの「変化の欠如」は、参照値と比較して実質的に変化しない発現レベルを表す。例えば、レベルが、0.1%以下、0.2%以下、0.3%以下、0.4%以下、0.5%以下、0.6%以下、0.7%以下、0.8%以下、0.9%以下、1%以下、2%以下、3%以下、4%以下、5%以下、6%以下、7%以下、8%以下、9%以下、10%以下または測定に用いた実験法に伴う誤差と同じ百分率の値以下だけ異なるときには、検討中の試料における発現の変化の欠如が考えられる。

10

20

#### 【0091】

ChoK 遺伝子の発現レベルの増加または減少は、ChoK 遺伝子の発現レベルの変化と考えられる。本発明の第一の方法の好ましい実施態様では、ChoK の発現レベルの変化は、前記参照値に対する前記発現レベルの増加である。本発明の第一の方法のもう一つの実施態様では、ChoK の発現レベルの変化は、前記参照値に対する発現レベルの減少である。

#### 【0092】

本発明において、「参照値」は、ROC方法論によって確立された任意のカットオフ点である。このカットオフ点が確立されると、患者由来の腫瘍組織で発現したこのマーカーのレベルをこのカットオフ点と比較することによって、これがカットオフを下回るときには「低」発現のレベルを、またはそれがこのカットオフを上回るときには「高」発現のレベルを割り振ることができる。

30

#### 【0093】

ChoK 遺伝子の発現レベルと参照値とを比較してしまうと、本発明の方法は、患者が化学療法治療、好ましくは白金をベースとした化学療法治療に対して不十分または良好な臨床応答を示すかどうかについて予測が可能になる。詳細には、前記発現レベルの増加は不十分な臨床応答を示しており、または前記発現レベルの減少は良好な臨床応答を示している。

#### 【0094】

臨床応答を表す目的で本明細書で用いられる「不十分」または「良好」という用語は、患者が化学療法、好ましくは白金をベースとした化学療法に対して好都合または不都合な応答を示すことを表す。当業者であれば理解されるように、確率の評価は、診断を受ける患者の100%にとって正確であることが好ましいが、通常は正確ではないことがある。しかしながら、この用語は、患者の統計学的に有意な部分を、化学療法治療、好ましくは白金をベースとした化学療法治療に対してある傾向を有し、従って、またはこれに応答しないものとして確認できることが必要である。ある部分が統計学的に有意であるかどうかは、当業者による更なる労力なしで様々な周知の統計学的評価手段、例えば、信頼区間の測定、p値測定、Studentのt検定、Mann-Whitney検定などを用いて測定することができる。詳細は、DowdyおよびWearden著、Statistics for Research, Joh

40

50

n Wiley and Sons, New York 1983に記載されている。好ましい信頼区間は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%である。p値は、好ましくは0.1、0.05、0.01、0.005または0.0001である。更に好ましくは、ある集団の患者の少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%は、本発明の方法によって適正に確認することができる。

【0095】

癌患者に対する個別化した療法の設計方法

本発明の知見は、Chok 遺伝子の発現レベルに基づいて癌、好ましくはNSCLCに罹っている患者の個別的療法の設計に用いることもできる。本発明の実験の部に示されているように、高発現レベルのChok 遺伝子を有するNSCLCに罹っている患者は、白金をベースとした化学療法治療に余り応答しない。従って、これらの患者は、白金をベースとした化学療法に応答しない患者で一般に第二選択で用いられる療法と共に第一選択の療法の候補者である。この方法では、患者は、白金をベースとした療法に伴う二次的影響を避けながら、適切な療法に直接移ることができる。

【0096】

従って、もう一つの態様では、本発明は、癌に罹っている患者について個別的療法を設計するインビトロでの方法（以後、本発明の第二の方法）であって、患者由来の試料中のコリンキナーゼ（Chok）遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなる、方法に関する。好ましい実施態様では、本発明の方法は、Chok aアイソフォームの発現レベルの決定を含んでなる。もう一つの好ましい実施態様では、本発明の方法は、Chok aおよびbアイソフォームの発現レベルの決定を含んでなる。もう一つの好ましい実施態様では、本発明の方法は、Chok bアイソフォームの発現レベルの決定を含んでなる。好ましい実施態様では、本発明の方法は、Chok aアイソフォームの発現レベルの決定を含んでなるが、bアイソフォームの発現レベルの決定を含まない。もう一つの好ましい実施態様では、本発明の方法は、Chok bアイソフォームの発現レベルの決定を含んでなるが、aアイソフォームの発現レベルの決定を含まない。

【0097】

「患者」、「癌」、「コリンキナーゼ」および「患者」という用語は、本発明の第一の方法に関して上記で詳細に記載されており、本発明の第二の方法でも同じ意味に用いられる。

【0098】

好ましい実施態様では、本発明の第二の方法は、更にChok の発現レベルを参照値と比較することを含んでなり、

前記試料のChok 遺伝子の発現レベルの前記参照値に対する減少または変化の欠如は、患者が前記化学療法治療に基づいた療法の候補者であることを示しており、または

前記試料のChok 遺伝子の発現レベルの前記参照値に対する増加は、患者が

(i) Chok 阻害剤、

(ii) 葉酸代謝拮抗薬、

(iii) 微小管阻害剤、

(iv) EGFR 標的薬、

(v) 上記(i)～(iv)の1以上の組合せ

からなる群から選択される療法を用いる治療の候補者であることを示している。

【0099】

本発明の第二の方法の好ましい実施態様では、癌はNSCLCである。

【0100】

更にもう一つの実施態様では、化学療法治療は、白金をベースとした化学療法治療である。「NSCLC」、「化学療法」および「白金をベースとした化学療法治療」という用語は、本発明の予測方法に関して詳細に記載されており、本発明の第二の方法に関して同じ意味に用いられる。

10

20

30

40

50



## 【0101】

もう一つの実施態様では、コリンキナーゼ（Ch o K）遺伝子の高発現レベルを示す患者は、

- ( i ) Ch o K 阻害剤、
- ( i i ) 葉酸代謝拮抗薬、
- ( i i i ) 微小管阻害剤、
- ( i v ) E G F R 標的薬、
- ( v ) 上記 ( i ) ~ ( i i i ) の 1 以上の組合せ

のような、非応答者で第二選択として用いられる他の療法による治療の候補者である。

## 【0102】

本明細書で用いられる「Ch o K 阻害剤」という用語は、Ch o K 活性を減少させることができる任意の化合物と理解され、Ch o K 遺伝子の発現を防止し、mRNA または Ch o K タンパク質のレベルを減少させる化合物、並びに Ch o K を阻害し、この酵素の活性を減少させる化合物が含まれる。

## 【0103】

Ch o K 遺伝子の発現を防止することができる化合物は、RT - PCR、RNA 保護分析、ノーザンブロット法、インサイチュハイブリダイゼーション、マイクロアレイ法などのような mRNA 発現レベルを決定するための標準的分析法を用いて確認することができる。

## 【0104】

Ch o K タンパク質のレベルを減少させる化合物は、イムノブロット法またはウェスタンブロット法、ELISA（吸着酵素免疫分析）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、競合的 EIA（競合的酵素イムノアッセイ）、DAS - ELISA（二重抗体サンドイッチ ELISA）、免疫細胞化学的および免疫組織化学的手法、特定の抗体を含むタンパク質マイクロアレイまたはバイオチップの使用に基づく手法または試薬ストリップのようなフォーマットでのコロイド沈澱に基づくアッセイのようなタンパク質発現レベル決定のための標準的アッセイを用いて確認することができる。

## 【0105】

コリンキナーゼの生物学的活性に対する阻害能力の測定は、EP 1 7 1 0 2 3 6 号明細書に記載されているように、精製した組換えコリンキナーゼまたはコリンキナーゼリッチな画分の存在下で [ 1 4 C ] で標識したコリンの ATP によるリン酸化の検出の後、標準的分析手法（例えば、TLC）を用いるリン酸化コリンの検出のようなコリンキナーゼの活性を測定するための標準的アッセイを用いて検出される。

## 【0106】

白金をベースとした化学療法に対する非応答者で用いることができる典型的なコリンキナーゼ 阻害剤を、表 2 の I ~ X V I I に記載する。

## 【0107】

10

20

30

【表 2】

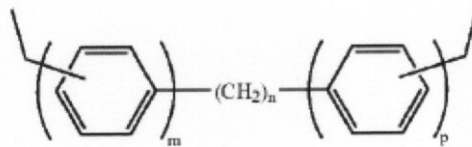
	表 2:Ch o Kα 阻害剤
I	<p data-bbox="411 349 1332 510">下記の一般式を有する米国特許出願US 2 0 0 7 0 1 8 5 1 7 0 号明細書 (US 7 7 8 1 4 5 8 号明細書として許可) に記載の化合物:</p> <div data-bbox="620 633 1129 875"> </div> <p data-bbox="533 925 1332 1951">(式中、  <math>Q^-</math>は、薬学上好適な有機または無機酸の共役塩基を表し、  <math>R_1</math>および<math>R'_1</math>は、互いに独立して、ハロゲン、トリフルオロメチル、ヒドロキシル、<math>C_{1-6}</math>アルキル、アミノまたはアルコキシルで置換されていてもよいアリール基を表し、  <math>R_2</math>および<math>R'_2</math>は、互いに独立して、ハロゲン、トリフルオロメチル、ヒドロキシル、<math>C_{1-6}</math>アルキル、アミノまたはアルコキシルで置換されていてもよいアリール基を表し、  <math>R_3</math>および<math>R'_3</math>は、互いに独立して、H、ハロゲン、トリフルオロメチル、ヒドロキシル、アミノ、アルコキシル、およびトリフルオロメチル、ヒドロキシル、アミノまたはアルコキシルで置換されていてもよい<math>C_{1-6}</math>アルキル、またはそれぞれ<math>R_4</math>および<math>R'_4</math>と共にかつ互いに独立して、ハロゲン、トリフルオロメチル、ヒドロ</p>

表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

キシル、C<sub>1-6</sub>アルキル、アミノまたはアルコキシルで置換されていてもよい-CH=CH-CH=CH-基からなる群から選択される基を表し、

R<sub>4</sub>およびR'<sub>4</sub>は、互いに独立して、H、およびハロゲン、トリフルオロメチル、ヒドロキシル、アミノまたはアルコキシルで置換されていてもよいC<sub>1-6</sub>アルキルからなる群から選択される基、またはそれぞれR<sub>3</sub>およびR'<sub>3</sub>と共にかつ互いに独立して、ハロゲン、トリフルオロメチル、ヒドロキシル、C<sub>1-6</sub>アルキル、アミノまたはアルコキシルで置換されていてもよい-CH=CH-CH=CH-基を表し、

Aは、式Iによって定義される構造に含まれる2つのピリジニウム基の間の結合として作用する任意の二価有機構造を含んでなるスペーサー基、および、詳細には



(式中、m、nおよびpは、m、nおよびpが同時に0の値をとらないという条件でm=0, 1、n=0, 1~10、p=0, 1という値を採ることができる)

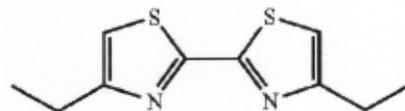
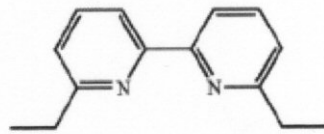
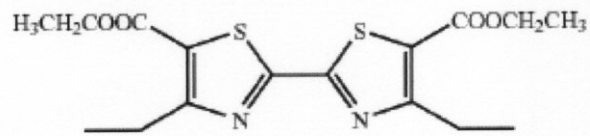
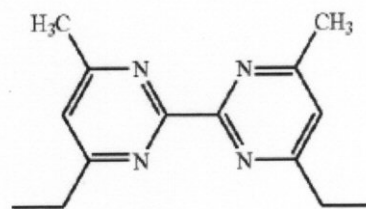


表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

および

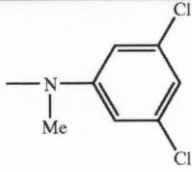
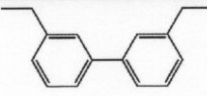
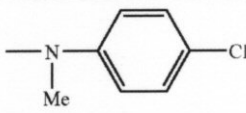
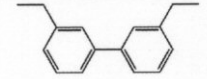
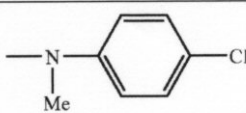

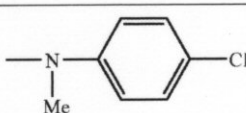
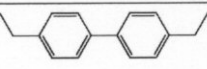
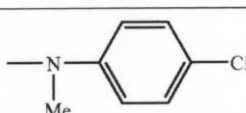
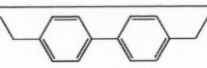
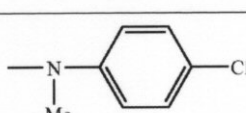
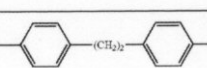
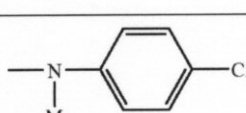
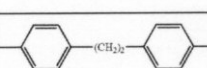
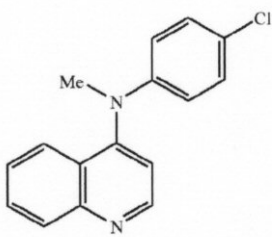


の群から選択される構造を有する二価分子を表す。

この群における好ましい化合物としては、置換基  $\text{NR}_1$   $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$  および  $\text{A}$  が下記の通りであるものが挙げられる。

化合物	$\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$	$\text{NR}_1 \text{R}_2$	$\text{A}$
1	H、H		
2	H、H		
3	H、H		

表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

	4	H、H		
	5	$-(CH=CH)_2-$		
	6	$\begin{matrix} -C^5H=C^6H- \\ C^7Cl=C^8H- \end{matrix}$		
	7 RSM932-A	$-(CH=CH)_2-$		
	8	$\begin{matrix} -C^5H=C^6H- \\ C^7Cl=C^8H- \end{matrix}$		
	9	$-(CH=CH)_2-$		
	10	$\begin{matrix} -C^5H=C^6H- \\ C^7Cl=C^8H- \end{matrix}$		
<p>この群における好ましい化合物としては、それぞれ、構造</p>  <p>および</p>				

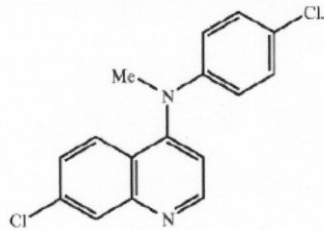
10

20

30

40

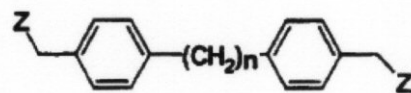
表2:Ch o Kα 阻害剤



を有する4-(4-クロロ-N-メチルアニリン)キノリンおよび7-クロロ-4-(4-クロロ-N-メチルアミノ)キノリンが挙げられる。

II

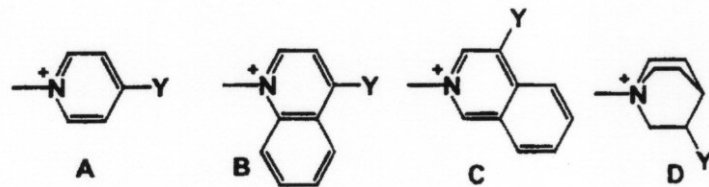
一般構造式を有する国際特許出願WO 9 8 0 5 6 4 4号に記載の化合物：



(式中、

nは、0、1、2または3であり、

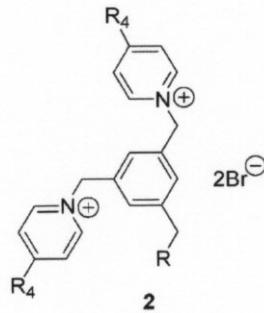
Zは、群



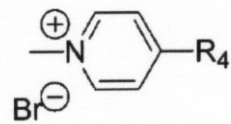
(式中、Yは、-H、-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>-OH、-CO-CH<sub>3</sub>、-CN、-NH<sub>2</sub>、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、ピロリジン、ピペリジン、ペルヒドロアゼピン、-OH、-O-CO-C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>などの群から選択される) から選択される任意の構造基である)。

表 2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

前記で定義された式を有する好ましいCh o K阻害剤は、下記の構造

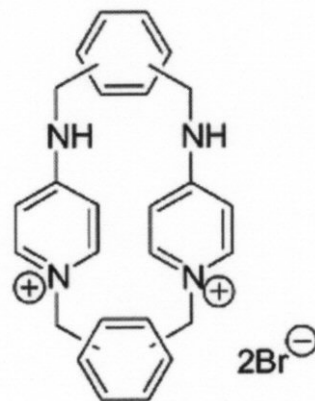


(式中、Rは、Hであるか、または



である)

および



化合物

3

4

5

6

異性体

p,p

m,m

p,m

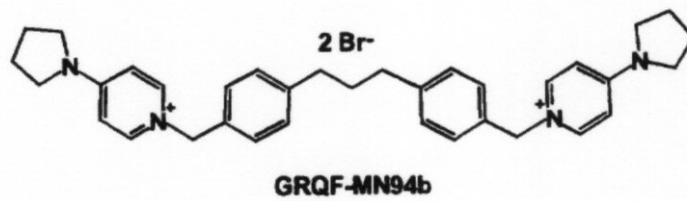
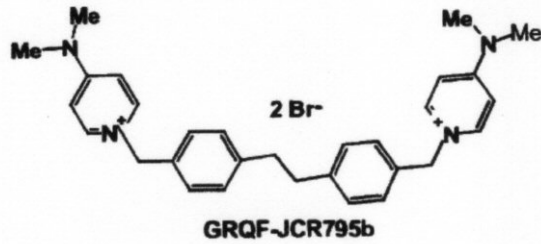
m,p

を有する Conejo-García *et al.* (J.Med.Chem., 2003, 46:3754-3757)によって記載された化合物 1～6 である。

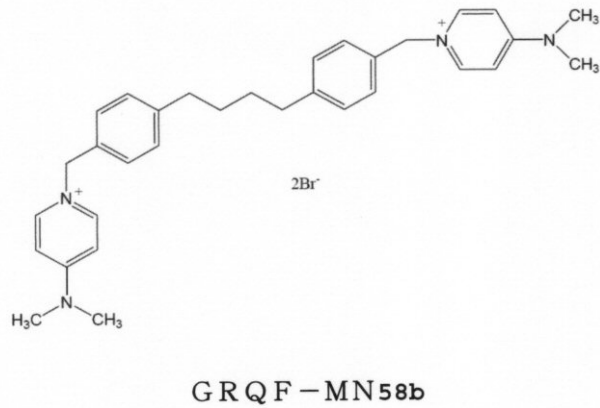


表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

前記の一般式にある化合物は、構造



および



を有するGRQF-JCR795b、GRQF-MN94bおよびGRQF-MN58bの群から選択される。

**III**

一般構造式を有する国際特許出願WO 9805644号に記載の化合物：

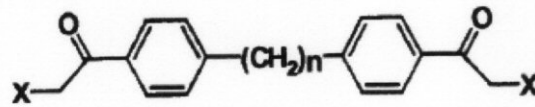
10

20

30

40

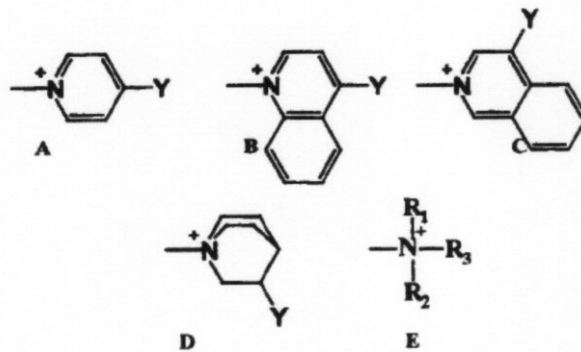


表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

(式中、

nは、0、1、2、3などであり、

Xは、下記のようなA、B、C、DおよびEの群



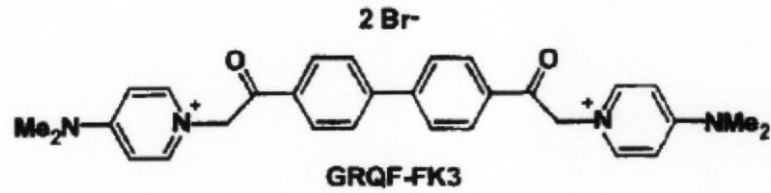
(式中、Yは、 $-H$ 、 $-CH_3$ 、 $-CH_2-OH$ 、 $-CO-CH_3$ 、 $-CN$ 、 $-NH_2$ 、 $-N(CH_3)_2$ 、ピロリジン、ピペリジン、ペルヒドロアゼピン、 $-OH$ 、 $-O-CO-C_{15}H_{31}$ から選択され、

$R_1$ 、 $R_2$ および $R_3$ は、 $-Me$ および $-Et$ などのようなアルキル基であるが、幾つかの場合には、 $R_2$ および $R_3$ は、 $-CH_2-CH(OMe)_2$ および $-CH_2-CH(OEt)_2$ のような更に複雑な基であることができる)

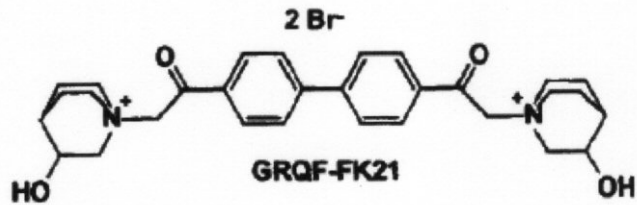
から選択される構造要素である)。

表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

前記の一般構造を有する好ましい化合物は、下記の構造



10

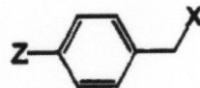


を有するGRQF-FK3およびGRQF-FK21である。

20

IV

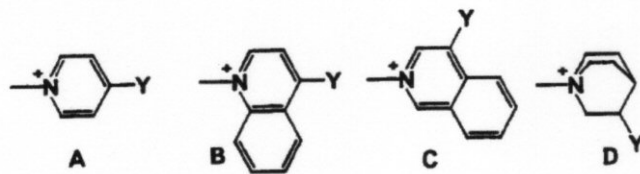
一般構造式を有する国際特許出願WO 9 8 0 5 6 4 4号に記載の化合物：



30

(式中、

Xは、下記のようなA、B、CおよびD



40

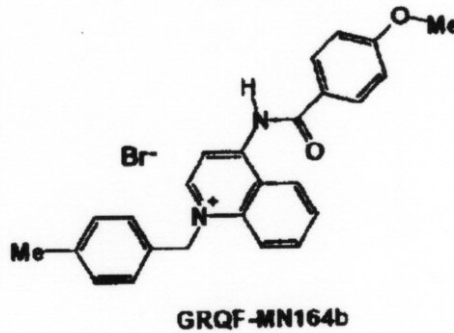
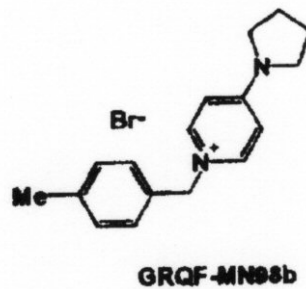
(式中、Yは、-H、-CH<sub>3</sub>、-CH<sub>2</sub>OH、-CN、-NH<sub>2</sub>、-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>、ピロリジニル、ピペリジニル、ペルヒドロアゼピン、-OH、-O-CO-C<sub>15</sub>H

表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

<sub>31</sub> などのような置換基である) の群から選択される基であり、

Zは、アルキル (−Me、−Et など)、アリール、フェニル基であるか、または−OMe、−NH<sub>2</sub>、−NMe<sub>2</sub>などのような電子供与基である)。

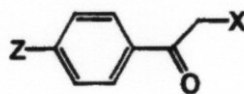
前記の一般構造を有する好ましい化合物は、下記の構造



を有するGRQF-MN98bおよびGRQF-MN164bである。

**V**

一般構造式を有する国際特許出願WO9805644号に記載の化合物：



10

20

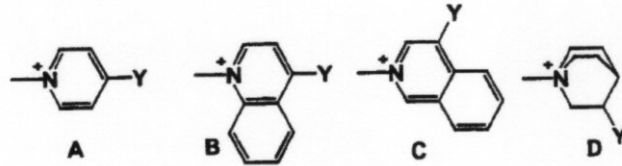
30

40

表2:Ch o K $\alpha$ 阻害剤

(式中、

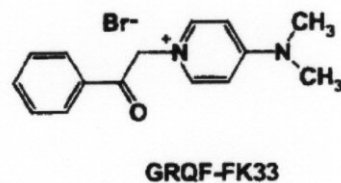
Xは、下記のようなA、B、CおよびD



(式中、Yは、 $-\text{H}$ 、 $-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CO}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ のような置換基である)の群から選択される基であり、

Zは、アルキル( $-\text{Me}$ 、 $-\text{Et}$ など)、アリール(フェニルなど)基であるか、または $-\text{OMe}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NMe}_2$ などのような電子供与基である)。

前記の構造を有する好ましい化合物は、下記の構造

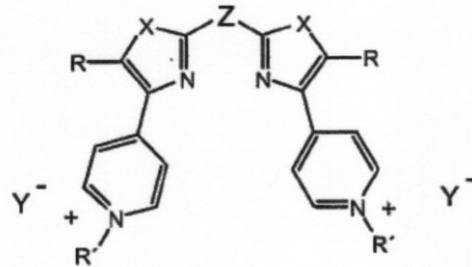


を有するGRQF-FK29およびGRQF-FK33である。

表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

VI

一般構造式を有する国際特許出願WO 2 0 0 4 0 1 6 6 2 2 号に記載の化合物：



(式中、

Xは酸素または硫黄であり、

Zは、単結合、1, 2-エチリデン、イソプロピリデン、*p*, *p*'-ビフェニル、*p*-フェニル、*m*-フェニル、2, 6-ピリジレン、*p*, *p*'-オキシジフェニルまたは*p*, *p*'-ヘキサフルオロイソプロピリデンジフェニルであり、

Rは、H、アルキル、アルキリデン、アルキン、アリール、ハロゲン、アルコール、チオール、エーテル、チオエーテル、スルホキシド、スルホン、置換または第一アミン、ニトロ、アルデヒド、ケトン、ニトリル、カルボン酸、その誘導体およびサルフェート、メタンサルホネート、塩酸塩、ホスフェート、ナイトレート、アセタート、プロピオネート、ブチレート、パルミテート、オキサレート、マロネート、マレアート、マレート、フマレート、シトレート、ベンソエートであり、

R' は、Hまたはアルキルであり、

表2:Ch o K $\alpha$ 阻害剤

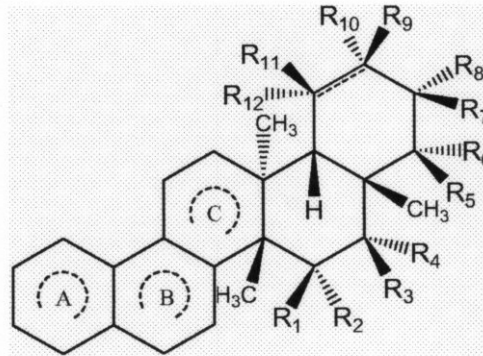
	<p>Yは、H、サルフェート、メタンスルホネート、塩酸塩、ホスフェート、ナイトレート、アセタート、プロピオネート、ブチレート、パルミテート、オキサレート、マロネート、マレアート、マレート、フマレート、シトレートまたはベンソエートである)。</p> <p>好ましい実施態様では、前記で定義した構造を有する化合物は、2, 2-ビス [(5-メチル-4-(4-ピリジル)-2-オキサゾリル)] プロパン、2, 2-ビス [(5-トリフルオロメチル-4-(4-ピリジル)-2-オキサゾリル)] プロパン、4, 4'-ビス [(5-トリフルオロメチル-4-(1-メチル-4-(ピリジニウム)-2-オキサゾリル)] ビフェニル、4, 4'-ビス [(5-ペンタフルオロエチル-4-(1-メチル-4-(ピリジニウム)-2-オキサゾリル)] ビフェニル、4, 4'-ビス [(5-トリフルオロメチル-4-(1-メチル-4-(ピリジニウム)-2-オキサゾリル)] ヘキサフルオロイソプロピリデンジフェニル、2, 2-ビス [(5-トリフルオロメチル-4-(4-ピリジル)-2-チアゾリル)] プロパンおよび4, 4'-ビス [(5-トリフルオロメチル-4-(1-メチル-4-(ピリジニウム)-2-チアゾリル)] -1, 1'-オキシビスベンゼンの群から選択される。</p>	10
VII	<p>Cuadrado <i>et al.</i> (Oncogene, 1993, 8:2959-2968)および Jimenez <i>et al.</i> (J.Cell Biochem., 57:141-149) および Hernandez-Alcoceba, <i>et al.</i> (Oncogene, 1997, 15:2289-2301)に記載のヘミコリニウム-3。</p>	40



表2:Ch o K $\alpha$ 阻害剤

VIII

式の一般構造を有する国際特許出願WO2007077203号に記載の化合物：



(式中、

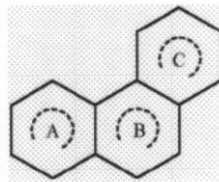
$R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_{11}$ および $R_{12}$ は、独立して、水素、ヒドロキシル、ハロゲン、置換または非置換 $C_1-C_{12}$ アルキル、置換または非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、 $N(R')(R'')$ アミノ基（式中、 $R'$ および $R''$ は、独立して、水素または $C_1-C_{12}$ アルキル基である）、 $OCOR$ 基（式中、 $R$ は、 $(CH_2)_2-COOH$ または $(CH_2)_2CO_2CH_2CH_3$ である）であるか、またはそれぞれの対が、それらが結合している炭素と共に $(C=O)$ 基を形成することができ、

$R_9$ および $R_{10}$ は、独立して、水素、置換または非置換 $C_1-C_{12}$ アルキル、 $C_6-C_{10}$ アリール、 $COR'''$ 基（式中、 $R'''$ は、水素、ヒドロキシル、置換または非置換 $C_1-C_{12}$ アルキル、置換または非置換 $C_6-C_{10}$ アリール、 $O-C_1-C_{12}$ アルキル、または $N(R^{IV})(R^V)$ アミノ（式中、 $R^{IV}$ および $R^V$ は、独立して、水素また

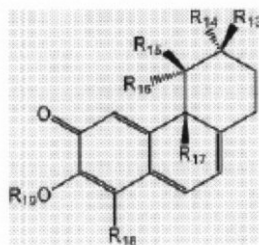
表2:Ch o K $\alpha$ 阻害剤

は $C_1-C_{12}$ アルキル基である)、 $(CH_2)_n-OH$ カルビノール基(式中、 $n$ は、1~10の整数である)であるか、または一緒になってメチレン基を形成し、

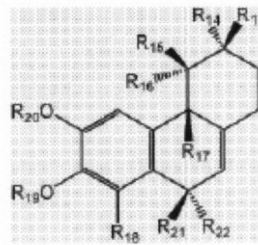
結合  $\text{---}$  は、二重結合または単結合を意味し、三環性構造



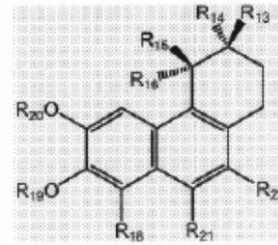
は、下記の構造



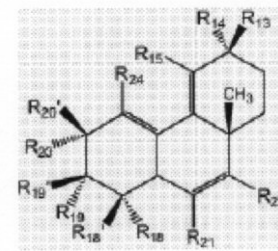
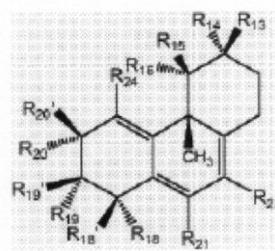
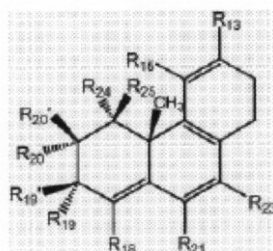
(a)



(b)



(c)



(式中、

$R_{13}$ 、 $R_{14}$ 、 $R_{15}$ 、 $R_{16}$ 、 $R_{21}$ 、 $R_{22}$ および $R_{23}$ は、独立して、水素、ヒドロキシル、ハロゲン、置換または非置換 $C_1-C_{12}$ アルキル、置換または非置換 $C_6-C_{10}$



表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

	<p>アリール、N (R<sup>VI</sup>) (R<sup>VII</sup>) アミノ基 (式中、R<sup>VI</sup> およびR<sup>VII</sup>は、独立して、水素またはC<sub>1</sub>–C<sub>12</sub>アルキル基である)、OCOR<sup>VIII</sup>基 (式中、R<sup>VIII</sup>は、(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOHまたは(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>である) であるか、またはそれぞれの対が、それらが結合している炭素と一緒に (C=O) 基を形成することができるか、またはそれぞれの対が、それらが結合している炭素と一緒に (C=O) 基を形成することができ、</p> <p>R<sub>17</sub>は、水素またはメチルであり、</p> <p>R<sub>18</sub>およびR<sub>18</sub>' は、独立して、水素、ヒドロキシル、ハロゲン、C<sub>1</sub>–C<sub>12</sub>アルキル、C<sub>6</sub>–C<sub>10</sub>アリール、COR<sup>IX</sup> (式中、R<sup>IX</sup>は、水素、ヒドロキシル、C<sub>1</sub>–C<sub>12</sub>アルキル、N (R<sup>X</sup>) (R<sup>XI</sup>) アミノ (式中、R<sup>X</sup>およびR<sup>XI</sup>は、独立して、水素またはC<sub>1</sub>–C<sub>12</sub>アルキル基である) またはC<sub>1</sub>–C<sub>12</sub>アルコキシルである)、またはトリフルオロメチルであり、</p> <p>R<sub>19</sub>、R<sub>19</sub>'、R<sub>20</sub>およびR<sub>20</sub>' は、独立して、水素、置換または非置換C<sub>1</sub>–C<sub>12</sub>アルキル、COR<sup>XII</sup>基 (式中、R<sup>XII</sup>は、水素、ヒドロキシル、置換または非置換C<sub>1</sub>–C<sub>12</sub>アルキル、置換または非置換C<sub>6</sub>–C<sub>10</sub>アリール、またはN (R<sup>XIII</sup>) (R<sup>XIV</sup>) アミノ、(式中、R<sup>XIII</sup>およびR<sup>XIV</sup>は、独立して、水素またはC<sub>1</sub>–C<sub>12</sub>アルキル基である)、[(C<sub>1</sub>–C<sub>12</sub>) アルキル–O–(C<sub>1</sub>–C<sub>12</sub>) アルキル–]<sub>n</sub>基 (式中、nは、1～3で</p>
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

10

20

30

40

表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

	<p>ある)、トリフルオロメチルであるか、またはそれぞれの対19-19'または20-20'が、それらが結合している炭素と一緒に(C=O)基を形成することができ、</p> <p>R<sub>24</sub>およびR<sub>25</sub>は、独立して、水素、ヒドロキシルまたはハロゲンである)</p> <p>から選択される)。</p> <p>前記の構造をしている好ましい化合物は、</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・3, 9-ジヒドロキシ-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-ヘキサメチル-7, 8, 8a, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-デカヒドロ-6bH, 9H-ピセン-2, 10-ジオン、</li> <li>・酢酸 9-ヒドロキシ-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-ヘキサメチル-2, 10-ジオキソ-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-テトラデカヒドロ-ピセン-3-イルエステル、</li> <li>・プロピオン酸 9-ヒドロキシ-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-ヘキサメチル-2, 10-ジオキソ-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-テトラデカヒドロ-ピセン-3-イルエステル、</li> <li>・ドデカン酸 9-ヒドロキシ-4, 6b, 8a, 11, 12b, 14a-ヘキサメチル-2, 10-ジオキソ-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12,</li> </ul>
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

10

20

30

40

表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

	<p>1 2 a, 1 2 b, 1 3, 1 4, 1 4 a-テトラデカヒドロピセン-3-イルエステル、</p> <p>・カルバミン酸ジメチル 9-ヒドロキシ-4, 6 b, 8 a, 1 1, 1 2 b, 1 4 a-ヘキサメチル-2, 1 0-ジオキソ-2, 6 b, 7, 8, 8 a, 9, 1 0, 1 1, 1 2, 1 2 a, 1 2 b, 1 3, 1 4, 1 4 a-テトラデカヒドロピセン-3-イルエステル、</p> <p>・ニコチン酸 9-ヒドロキシ-4, 6 b, 8 a, 1 1, 1 2 b, 1 4 a-ヘキサメチル-2, 1 0-ジオキソ-2, 6 b, 7, 8, 8 a, 9, 1 0, 1 1, 1 2, 1 2 a, 1 2 b, 1 3, 1 4, 1 4 a-テトラデカヒドロピセン-3-イルエステル、</p> <p>・安息香酸 4-ブロモ-(9-ヒドロキシ-6 b, 8 a, 1 1, 1 2 b, 1 4 a-ヘキサメチル-2, 1 0-ジオキソ-2, 6 b, 7, 8, 8 a, 9, 1 0, 1 1, 1 2, 1 2 a, 1 2 b, 1 3, 1 4, 1 4 a-テトラデカヒドロピセン-3-イル) エステル、</p> <p>・1 4-ブロモ-3, 7, 9-トリヒドロキシ-4, 6 b, 8 a, 1 1, 1 2 b, 1 4 a-ヘキサメチル-7, 8, 8 a, 1 1, 1 2, 1 2 a, 1 2 b, 1 3, 1 4, 1 4 a-デカヒドロ-6 bH, 9H-ピセン-2, 1 0-ジオン、</p> <p>・カルバミン酸ジメチル 1 2-ブロモ-9-ヒドロキシ-6 b, 8 a, 1 1, 1 2 b, 1 4 a-ヘキサメチル-2, 1 0-ジオキソ-2, 6 b, 7, 8, 8 a, 9, 1 0, 1 1, 1 2, 1 2 a r 1 2 b r 1 3, 1 4, 1 4 a-テトラデカヒドロピセン-3-イルエステル、</p>	
--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

10

20

30

40

表2:Ch o K $\alpha$ 阻害剤

	<p>・安息香酸 4-ブロモ- (12-ブロモ-9-ヒドロキシ-6b, 8a, 11, 12b, 14a-ヘキサメチル-2, 10-ジオキソ-2, 6b, 7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-テトラデカヒドロ-ピセン-3-イル) エステル、</p> <p>・12-ブロモ-3, 9-ジヒドロキシ-6b, 8a, 11, 12b, 14a-ヘキサメチル-7, 8, 8a, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-デカヒドロ-6bHr 9H-ピセン-2, 10-ジオン、</p> <p>・3, 9, 10-トリヒドロキシ-6b, 8a, 11, 12b, 14a-ヘキサメチル-7, 8, 8a, 9, 10, 11, 12, 12a, 12b, 13, 14, 14a-ドデカヒドロ-6bH-ピセン-2-オン、</p> <p>・コハク酸 モノ- (10-ヒドロキシ-2, 4a r 6a r, 9, 12b, 14a-ヘキサメチル-3, 11-ジオキソ-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 11, 12b, 13, 14, 14a, 14b-テトラデカヒドロピセン-4-イル) エステル、</p> <p>・コハク酸 10-ヒドロキシ-2, 4a, 6a, 9, 12b, 14a-ヘキサメチル-3, 11-ジオキソ-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 11, 12b, 13, 14, 14a, 14b-テトラデカヒドロピセン-4-イルエステルエチルエステル、</p> <p>・カルボン酸 7, 10, 11-トリヒドロキシ-2, 4a, 6a, 9, 12b, 14a-ヘキサメチル-8-オキソ-1, 2, 3, 4, 4a, 5, 6, 6a, 8, 1</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------

表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

	<p>2 b, 1 3, 1 4, 1 4 a, 1 4 b-テトラデカヒドロ ーピセン-2-メチルエステル、</p> <p>・カルボン酸 9-ホルミル-1 0, 1 1-ジヒドロ キシ-2, 4 a, 6 a, 9, 1 2 b, 1 4 a-ペン タメチル-8-オキソ-1, 2, 3, 4, 4 a, 5, 6, 6 a, 8, 1 2 b, 1 3, 1 4, 1 4 a, 1 4 b-テトラデカヒドロ-ピセン-2-メチルエ ステル、</p> <p>・カルボン酸 1 1-ヒドロキシ-1 0-(2-メトキ シーエトキシメトキシ)-2, 4 a, 6 a, 9, 1 2 b, 1 4 a-ヘキサメチル-8-オキソ-1, 2, 3, 4, 4 a, 5, 6, 6 a, 8, 1 2 b, 1 3, 1 4, 1 4 a, 1 4 b-テトラデカヒドロ-ピセン-2-メチル エステル</p> <p>からなる群から選択される。</p>	<p>10</p> <p>20</p>
I X	<p>下記式の一般構造を有する国際特許出願WO 2 0 0 7 0 7 7 2 0 3号に定義されている化合物：</p> <div data-bbox="571 1384 1168 1720" data-label="Chemical-Block"> </div> <p>(式中、</p> <p>R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>9</sub>、R<sub>10</sub>、R<sub>11</sub>、R<sub>12</sub>、R<sub>13</sub>、R<sub>14</sub>、R<sub>15</sub>、R<sub>16</sub>、R<sub>17</sub>、R<sub>18</sub>、R<sub>19</sub>およ</p>	<p>30</p> <p>40</p>



表2:Ch o K $\alpha$ 阻害剤

	<p>び<math>R_{20}</math>は、独立して、水素、ヒドロキシル、ハロゲン、置換または非置換<math>C_1-C_{12}</math>アルキル、置換または非置換<math>C_6-C_{10}</math>アリール、<math>N(R^{XV})(R^{XVI})</math>アミノ基（式中、<math>R^{XV}</math>および<math>R^{XVI}</math>は、独立して、水素または<math>C_1-C_{12}</math>アルキル基である）であるか、またはそれぞれの対が、それらが結合している炭素と一緒に（<math>C=O</math>）カルボキシ基を形成することができ、</p> <p><math>R_7</math>および<math>R_8</math>は、独立して、水素、置換または非置換<math>C_1-C_{12}</math>アルキル、<math>C_6-C_{10}</math>アリール、<math>COR^{XVII}</math>基（式中、<math>R^{XVII}</math>は、水素、ヒドロキシル、置換または非置換<math>C_1-C_{12}</math>アルキル、置換または非置換<math>C_6-C_{10}</math>アリール、<math>O-C_1-C_{12}</math>アルキル、または<math>N(R^{XVIII})(R^{XIX})</math>アミノ（式中、<math>R^{XVIII}</math>および<math>R^{XIX}</math>は、独立して、水素または<math>C_1-C_{12}</math>アルキル基である）、<math>(CH_2)_n-OH</math>カルピノール基（式中、<math>n</math>は、1～10の整数である）、または一緒にメチレン基を形成し、</p> <p><math>R_{21}</math>および<math>R_{24}</math>は、独立して、置換または非置換<math>C_1-C_{12}</math>アルキル、<math>COR^{XX}</math>基（式中、<math>R^{XX}</math>は、水素、ヒドロキシル、置換または非置換<math>C_1-C_{12}</math>アルキル、置換または非置換<math>C_6-C_{10}</math>アリール、または<math>N(R^{XXI})(R^{XXII})</math>アミノ（式中、<math>R^{XXI}</math>および<math>R^{XXII}</math>は、独立して、水素または<math>C_1-C_{12}</math>アルキル基である）、<math>[(C_1-C_{12})アルキル-O-(C_1-C_{12a})アルキル]_n</math>基（式中、<math>n</math>は、1～3である）、またはトリフ</p>
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

10

20

30

40

表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

	<p>ルオロメチルであり、</p> <p><math>R_{22}</math> および <math>R_{23}</math> は、</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・水素、置換または非置換 <math>C_1-C_{12}</math> アルキル、<math>COR^{XXIII}</math> 基（式中、<math>R^{XXIII}</math> は、水素、ヒドロキシル、置換または非置換 <math>C_1-C_{12}</math> アルキル、置換または非置換 <math>C_6-C_{10}</math> アリール、または <math>N(R^{XXIV})(R^{XXV})</math> アミノ（式中、<math>R^{XXIV}</math> および <math>R^{XXV}</math> は、独立して、水素または <math>C_1-C_{12}</math> アルキル基である）、<math>[(C_1-C_{12})</math> アルキル-<math>O-(C_1-C_{12a})</math> アルキル-]<math>_n</math> 基（式中、<math>n</math> は、1～3である）、または <math>R_{24}</math> が <math>R_{20}</math> に対してパラ位にあるときには、トリフルオロメチルであるか、または</li> <li>・それぞれ、<math>OR_{22}'</math> および <math>OR_{23}'</math> (<math>R_{22}'</math> および <math>R_{23}'</math> は、独立して、水素、置換または非置換 <math>C_1-C_{12}</math> アルキル、<math>COR^{XXVI}</math> 基（式中、<math>R^{XXVI}</math> は、水素、ヒドロキシル、置換または非置換 <math>C_1-C_{12}</math> アルキル、置換または非置換 <math>C_6-C_{10}</math> アリール、または <math>N(R^{XXVII})(R^{XXVIII})</math> アミノ（式中、<math>R^{XXVII}</math> および <math>R^{XXVIII}</math> は、独立して、水素または <math>C_1-C_{12}</math> アルキル基である）である）、<math>[(C_1-C_{12})</math> アルキル-<math>O-(C_1-C_{12a})</math> アルキル-]<math>_n</math> 基（式中、<math>n</math> は1～3である）、または <math>R_{24}</math> が <math>R_{20}</math> に対してメタ位にあるときには、トリフルオロメチルである）。</li> </ul> <p>前記の構造内にある好ましい化合物は、</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・14-ブromo-3-ヒドロキシ-4, 6b, 8a, 1</li> </ul>
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

10

20

30

40

表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

	<p>1, 12 b, 14 a-ヘキサメチル-7, 8, 8 a, 1 1, 12, 12 a, 12 b, 13, 14, 14 a-デカ ヒドロ-6 bH, 9H-ピセン-2, 10-ジオン、 ・酢酸 4, 6 b, 8 a, 11, 12 b, 14 a-ヘキ サメチル-2, 10-ジオキソ-2, 6 b, 7, 8, 8 a, 9, 10, 11, 12, 12 a, 12 b, 13, 1 4, 14 a-テトラデカヒドロピセン-3-イルエステ ル、 ・ニコチン酸 4, 6 b, 8 a, 11, 12 b, 14 a -ヘキサメチル-2, 10-ジオキソ-2, 6 b, 7, 8, 8 a, 9, 10, 11, 12, 12 a, 12 b, 1 3, 14, 14 a-テトラデカヒドロピセン-3-イル エステル、 ・3, 10-ジヒドロキシ-4, 6 b, 8 a, 11, 1 2 b, 14 a-ヘキサメチル-7, 8, 8 a, 9, 1 0, 11, 12, 12 a, 12 b, 13, 14, 14 a -ドデカヒドロ-6 bH-ピセン-2-オン、 ・3-ヒドロキシ-4, 6 b, 8 a, 11, 12 b, 1 4 a-ヘキサメチル-7, 8, 8 a, 12 a, 12 b, 13, 14, 14 a-オクタヒドロ-6 bH, 9H-ピ セン-2, 10-ジオン、 ・10, 11-ジヒドロキシ-2, 4 a, 6 a, 9, 1 4 a-ペンタメチル-1, 4, 4 a, 5, 6, 6 a, 1 3, 14, 14 a, 14 b-デカヒドロ-2H-ピセン -3-オン、 ・10, 11-ジヒドロキシ-2, 4 a, 6 a, 9, 1 4 a-ペンタメチル-4 a, 5, 6, 6 a, 13, 1</p>
--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

10

20

30

40



表2:Ch o K $\alpha$ 阻害剤

	4, 14 a, 14 b-オクタヒドロ-4H-ピセン-3-オン の群から選択される。
X	AMP-PCH <sub>2</sub> P、アデニリルイミドジホスフェート (AMP-PNP)、AMP-PSPおよびAMP (式中、ATPアナログの第二および第三のホスフェートを結合している酸素は、それぞれCH <sub>2</sub> 、S (ATP $\gamma$ S、ATP $\beta$ およびATP $\alpha$ Sなど) およびNHに代えられている) など非加水分解性ATPアナログ、並びに5'-(p-フルオロスルホニルベンゾイル) アデノシン (FSBA)、N <sup>6</sup> -ジエチル- $\beta$ 、 $\gamma$ -ジブromoメチレン-ATP、2-メチルチオ-ATP (APM)、 $\alpha$ 、 $\beta$ -メチレン-ATP、 $\beta$ 、 $\gamma$ -メチレン-ATP、ジ-アデノシンペンタホスフェート (Ap5A)、1, N <sup>6</sup> -エテノアデノシントリホスフェート、アデノシン1-オキシドトリホスフェート、2', 3'-O-(ベンゾイル-4-ベンゾイル)-ATP (B-ZATP)、US 2004204420号明細書に記載のATPアナログのファミリー、2', 3'-O-(2, 4, 6-トリニトロフェニル)-ATP (TNP-ATP)、1-N <sup>6</sup> (メトキシ) ATP、7-N <sup>6</sup> -(ピロリジン) ATP、2-N <sup>6</sup> (エトキシ) ATP、8-N <sup>6</sup> (シクロペンチル) ATP、3-N <sup>6</sup> (アセチル) ATP、9-N <sup>6</sup> (シクロペンチルオキシ) ATP、4-N <sup>6</sup> (i-プロポキシ) ATP、10-N <sup>6</sup> -(ピペリジン) ATP、5-N <sup>6</sup> -(ベンジル) ATP、11-N <sup>6</sup> -(シクロヘキシル) ATP などのような自殺基質を含むATPアナログ。

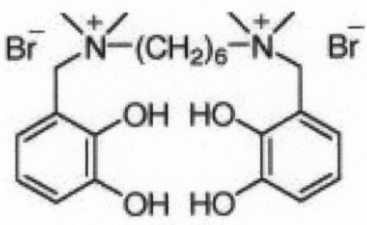
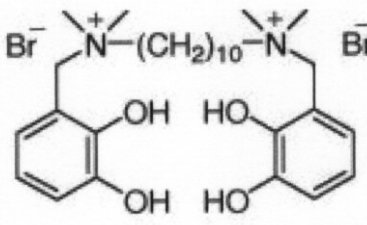
10

20

30

40

表2:Ch o K $\alpha$ 阻害剤

X I	<p>N-n-アルキルニコチニウムのアナログ、HC-3ヘミコリニウム、デカメトニウム、スクサメトニウム、D-ツボクラリン、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、ヘキサメトニウム、N-アルキルアナログ（N-エチルコリン、N-メチルコリン）、モノ-、ジ-およびトリエチルコリン、N-ヒドロキシエチルピロリジニウムメチオジド（ピロールコリン）、および Barker, L.A. and Mittag, T.W. (J Pharmacol Exp Ther. 1975; 192: 86-94) に記載のDL-<math>\alpha</math>-メチルコリン、ジメチル-n-ペンチル（2-ヒドロキシエチル）アンモニウムイオン、デカメトニウム、ビス-カテコールで置換したヘキサメトニウムおよび構造</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>1</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>2</p> </div> </div> <p>を有する Cai <i>et al.</i> (Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry, 2007, 15: 7042-7047)に記載のデカメトニウムアナログのようなコリン輸送体の阻害剤。</p>
X I I	<p>コリンキナーゼに特異的に結合し、活性を阻害することができる阻害剤抗体、および詳細には触媒ドメインまたはCh o K<math>\alpha</math>二量体化ドメインを認識することによってCh o K<math>\alpha</math>活性を阻害するモノクローナル抗体。阻害剤抗体の例は、WO 2 0 0 7 1 3 8 1 4 3号に定義されているモノクローナル抗体である。阻害剤抗体の他の例は、WO 2 0 0 7 1 3 8 1 4 3号に定義されているAD 3、AD 8およびAD 1 1抗体である。</p>

10

20

30

40

表2:Ch o K $\alpha$  阻害剤

X I I I	<p>ホスファチジルエタノールアミン N-メチルトランスフェラーゼ (PEMTまたはEC 2. 1. 1. 17) 阻害剤。細胞をCh o K<math>\alpha</math> 阻害剤で処理すると、PEMT発現が増加する(本願と同時係属出願のスペイン国特許出願P 2 0 0 8 0 2 0 0 7号明細書)。更に、細胞でのCh o K<math>\beta</math> の過剰発現により、PEMT発現が増加し(本願と同時係属出願のスペイン国特許出願P 2 0 0 8 0 2 0 0 7号明細書)、PEMT活性化が、Ch o K<math>\alpha</math> 阻害に対応するホスファチジルコリンレベルの減少を相殺するために、Ch o K<math>\beta</math> によって用いられる経路となり得ることを示唆している。その使用に好適なPEMTとしては、3-デアザアデノシン (D Z A) (Vance <i>et al.</i>, 1986, Biochem.Biophys.Acta, 875: 501-509)、3-デアザアリステロマイシン(Smith and Ledoux, Biochim Biophys Acta. 1990, 1047: 290-3)、ベザフィブレートおよびクロフィブリン酸(Nishimaki-Mogami T <i>et al.</i>, Biochim. Biophys. Acta, 1996, 1304:11-20)が挙げられる。</p>
X I V	<p>コリンキナーゼ配列に特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド。</p>
X V	<p>コリンキナーゼ配列に特異的なDNA酵素またはリボザイム。</p>
X V I	<p>Glunde <i>et al.</i> (Cancer Res., 2005, 65:11034-11043)によって定義されている短ヘアピンRNA (s h RNA) またはs i RNAのようなコリンキナーゼ配列に特異的な干渉RNA。</p>
X V I I	<p>化学阻害剤MN 5 8 bのような国際特許出願P C T / I B 2 0 0 9 / 0 5 2 9 3 6号に定義されているPEMTまたはCh o K<math>\beta</math> タンパク質の発現レベルを増加させることができるCh o K<math>\alpha</math> の阻害剤。</p>

10

20

30

40

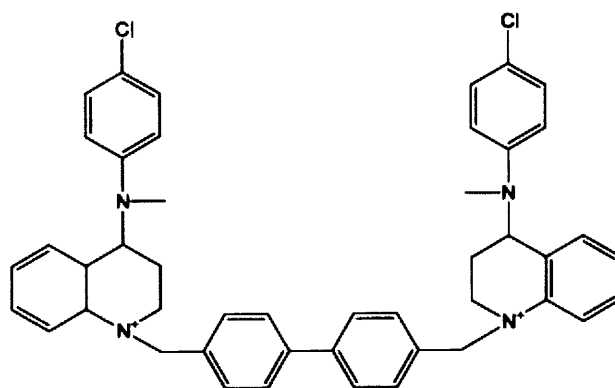
【 0 1 0 8 】

好ましい実施態様では、療法はCh o K 阻害剤である。更に好ましい実施態様では、

50

C h o K 阻害剤は、表 2 から選択される。更に一層好ましい実施態様では、C h o K 阻害剤は、構造

【化 1】



10

を有するか、またはその薬学上許容可能な塩または溶媒和物を有する。

【0109】

本明細書で用いられる「薬学上許容可能な塩」という用語は、指定した化合物の遊離酸および塩基の生物学的有効性を保持しかつ生物学的にまたはその他の望ましくないものでない塩を表す。

20

【0110】

薬学上許容可能な塩の例としては、本明細書に記載の化合物と無機酸または有機酸との反応によって調製される塩が挙げられ、このような塩としては、酢酸塩、アクリル酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、重硫酸塩、重亜硫酸塩、臭化物、酪酸塩、ブチン - 1, 4 - ジオエート、カンホレート、カンファースルホネート、カプロン酸塩、カプリル酸塩、クロロ安息香酸塩、塩化物、クエン酸塩、シクロペンタンプロピオン酸塩、デカン酸塩、ジグルコン酸塩、二水素リン酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ドデシル硫酸塩、エタンスルホン酸塩、ギ酸塩、フマル酸塩、グルコヘプタン酸塩、グリセロリン酸塩、グリコール酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、ヘキシン - 1, 6 - ジオエート、ヒドロキシ安息香酸塩、? - ヒドロキシ酪酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、2 - ヒドロキシアタンスルホン酸塩、ヨウ化物、イソ酪酸塩、乳酸塩、マレイン酸塩、リンゴ酸塩、メタンスルホン酸塩、マンデル酸塩、メタリン酸塩、メタンスルホン酸塩、メトキシ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、一水素リン酸塩、1 - ナフタレンスルホン酸塩、2 - ナフタレンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、硝酸塩、パルモエート (palmoate)、ペクチネート、過硫酸塩、3 - フェニルプロピオン酸塩、リン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、ピロ硫酸塩、ピロリン酸塩、プロピオール酸塩、フタル酸塩、フェニル酢酸塩、フェニル酪酸塩、プロパンスルホン酸塩、サリチル酸塩、コハク酸塩、硫酸塩、亜硫酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、スルホン酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸塩、トシレートウンデコネートおよびキシレンスルホン酸塩を含む。

30

40

【0111】

「溶媒和物」という用語は、化合物を含んでなり、かつ非共有結合性の分子間力によって結合した水、アセトン、エタノール、メタノール、ジクロロメタン、2 - プロパノールなどのような溶媒の化学量論的または非化学量論的量をも含んでいる分子複合体を表す。特別な場合には、溶媒は水であり、この場合には、溶媒和物は「水和物」として知られている。

【0112】

本明細書で用いられる「薬学上許容可能な」という用語は、本明細書に記載の化合物の生物学的活性または特性を排除せずかつ比較的非毒性であるキャリアーまたは希釈剤のような材料を表し、すなわち、この材料は、望ましくない生物学的効果を引き起こしたりま

50

たはそれが含まれている組成物の成分のいずれかと有害なやり方で相互作用することなく、個人に投与することができる。

【0113】

「葉酸代謝拮抗薬」という表現は、本明細書では「葉酸拮抗薬」と互換的に用いられ、少なくとも1種類の葉酸依存性酵素の活性を阻害する化合物を表す。「葉酸依存性酵素」は、その触媒活性の少なくとも1つを行うには葉酸または葉酸代謝物を必要とする酵素を意味する。幾つかの実施態様では、葉酸拮抗薬は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (EC 1.5.1.3)、フォリルポリグルタメートシンターゼ (EC 6.3.2.17)、グリシンアミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ (EC 2.1.2.2)、アミノイミダゾールカルボキサミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ (EC 5.3.1.16)、およびチミジレートシンターゼ (EC 2.1.1.45) から選択される少なくとも1種類の葉酸依存性酵素の活性を阻害する。

10

【0114】

好適な葉酸拮抗薬としては、メトトレキセート、トリメトレキセートおよびエダトレキセートのようなDHFR阻害剤、ラルチトレキセド、ペメトレキセド、GW1843、OSI-7904L、ノラトレキセドおよびZD9331のようなTS阻害剤、およびGART阻害剤であるロモトレキソールおよびLY309887 (Purcell and Ettinger (2003) Current Oncology Reports 4:114-25) が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい実施態様では、葉酸拮抗薬はペメトレキセドである。

20

【0115】

本明細書で用いられる「EGFR標的薬」という用語は、上記で詳細に記載しており、本発明の方法では同じ意味で用いられる。

【0116】

本明細書で用いられる「微小管阻害剤」という用語は、細胞微小管の正常な機能性を中断させることによって細胞分裂を干渉する薬剤を表す。典型的な微小管阻害剤としては、タキソールおよびタキソテルのようなタキサン、ビンクリスチンおよびビンブラスチンのようなピンカルカロイドが挙げられるが、これらに限定されない。

【0117】

本発明の第二の方法の文脈では、「患者」という用語は、化学療法治療を受けたことがなくまたは受けていない癌に罹っている患者と理解される。好ましい実施態様では、患者は、例えば、白金をベースとした化学療法治療を受けたことがなくまたは受けていないNSCLCに罹っている患者である。

30

【0118】

当業者であれば、本発明の第一の方法で展開された特定の実施態様は、(i) NSCLCの種類(肺の扁平上皮癌、肺の大細胞癌または肺の腺癌)、(ii) NSCLCのステージ(III A、III BまたはIV期)、(iii) 患者から得た試料の種類(組織試料、好ましくは腫瘍組織試料、更に好ましくは肺腫瘍組織試料)、(iv) ChoK 遺伝子の発現レベルの決定のための様々な手順(前記遺伝子によってコードされたmRNAまたはタンパク質またはその変異体のレベルの決定)、(v) 好ましくは定量的PCRによる、更に好ましくはリアルタイムPCRによるmRNA発現レベルの決定方法、(vi) 好ましくはウェスタンブロット法または免疫組織化学によるChoK 発現レベルの決定方法、または(vii) 化学療法で用いられる白金をベースとした化学療法治療(カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチンおよび組合せTCGV、CGVおよびCI-TA)のような本発明の第二の方法にも応用可能であることを認めるであろう。更に、当業者であれば、タンパク質およびmRNA発現レベルの決定のために以前に引用した総ての方法および技術は、本発明の第二の方法においても用いることができることも理解されるであろう。

40

【0119】

本発明のキットおよびその使用

もう一つの面では、本発明は、癌に罹っている患者のChoK 遺伝子の発現レベルを

50

測定して、化学療法治療に対する前記患者の臨床応答を予測することができる試薬の使用に関する。

【0120】

もう一つの面では、本発明は、患者の試料におけるChok 遺伝子の発現レベルを測定して、

- (i) Chok 阻害剤、
- (ii) 葉酸代謝拮抗薬、
- (iii) 微小管阻害剤、
- (iv) EGFR 標的薬、
- (v) 前記(i)～(iv)の1以上の組合せ

からなる群から選択される療法に対する前記患者の臨床応答または臨床応答の欠如を予測することができる試薬の使用に関する。

【0121】

好ましい実施態様では、この試薬は、NSCLCに罹っている患者由来の試料におけるChok 遺伝子の発現レベルを測定して、白金をベースとした化学療法治療に対する前記患者の臨床応答を予測することができる試薬である。

【0122】

好ましい実施態様では、この試薬は、Chok aアイソフォームの発現レベルの決定に適切である。もう一つの好ましい実施態様では、この試薬は、Chok aおよびbアイソフォーム両方の発現レベルの決定に適切である。もう一つの好ましい実施態様では、この試薬は、Chok bアイソフォームの発現レベルの決定に適切である。好ましい実施態様では、この試薬は、Chok aアイソフォームの発現レベルの決定に適切であるが、bアイソフォームの発現レベルの決定には適切ではない。もう一つの好ましい実施態様では、この試薬は、Chok bアイソフォームの発現レベルの決定に適切であるが、Chok aアイソフォームの発現レベルの決定には適切でない。

【0123】

もう一つの面では、本発明は、癌に罹っている患者のChok 遺伝子の発現レベルを測定し、前記癌に罹っている患者の個別的療法を設計することができる試薬の使用に関する。好ましい実施態様では、患者は、NSCLCに罹っている。好ましい実施態様では、この試薬は、Chok aアイソフォームの発現レベルの決定に適切である。もう一つの好ましい実施態様では、この試薬は、Chok aおよびbアイソフォーム両方の発現レベルの決定に適切である。もう一つの好ましい実施態様では、この試薬は、Chok bアイソフォームの発現レベルの決定に適切である。好ましい実施態様では、この試薬は、Chok aアイソフォームの発現レベルの決定に適切であるが、bアイソフォームの発現レベルの決定には適切でない。もう一つの好ましい実施態様では、この試薬は、Chok bアイソフォームの発現レベルの決定に適切であるが、Chok aアイソフォームの発現レベルの決定には適切でない。

【0124】

好ましい実施態様では、臨床応答は、無進行期間または無進行生存期間として測定される。

【0125】

本明細書で用いられる「試薬」という用語は、Chok 遺伝子の検出またはChok タンパク質またはその変異体の検出に用いることができる任意の化合物または組成物、および場合によっては、1以上のハウスキーピング遺伝子または(複数の)ハウスキーピング遺伝子によってコードされたタンパク質を検出するための試薬を表す。この試薬のセットとしては、Chok 遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができる核酸、および/またはChok タンパク質またはその変異体(抗原決定基を含むその断片を包含する)に特異的に結合することができる抗体またはその断片が挙げられるが、これらに限定されない。

【0126】

本発明の方法で用いられる試薬は、「キット」として処方することができ、従って1以上の他の種類の要素または成分（例えば、他の種類の生化学試薬、容器、商業販売を目的とした包みのような包装、試薬を取り付ける基剤、電子ハードウェア成分など）と組み合わせることができる。

【0127】

好ましい実施態様では、試薬は、Ch o K 遺伝子の発現レベルを決定するための試薬は、プローブ、プライマーおよび/または抗体である。

【0128】

Ch o K 遺伝子と特異的にハイブリダイズすることができる核酸は、例えば、前記遺伝子のmRNAの断片（またはそれらの対応するcDNA）の特異的増幅のための1対以上のプライマーオリゴヌクレオチドおよび/またはこの遺伝子の同定のための1以上のプローブである。

【0129】

当業者であれば理解されるように、本発明のキットのオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブは、遺伝子発現プロファイリングの総ての手法（RT-PCR、SAGE、TaqMan、リアルタイム-PCR、FISH、NASBAなど）で用いることができる。

【0130】

Ch o K タンパク質またはその変異体に特異的に結合することができる抗原を検出することができる抗体またはその断片は、例えば、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、抗体断片、Fv、Fab、Fab'およびF(ab')<sub>2</sub>、ScFv、ジアボディー、トリアボディー、テトラボディーおよびヒト化抗体である。本発明のキットの抗体は、ウェスタンブロット法またはウェスタン転写、ELISA（酵素結合免疫吸着法）、RIA（ラジオイムノアッセイ）、競合的EIA（酵素イムノアッセイ）、DAS-ELISA（二重抗体サンドイッチELISA）、免疫細胞化学的および免疫組織化学的手法、特異抗体を含むバイオチップまたはタンパク質マイクロアレイの使用に基づく手法またはディップスティックのようなフォーマットにおけるコロイド沈澱に基づくアッセイなどのようなタンパク質発現レベルを検出するための通常の方法で用いることができる。

【0131】

前記試薬、具体的にはプローブおよび抗体は、膜、プラスチックまたはガラスのような固形支持体、場合によっては前記プローブまたは抗体の支持体上への固定を促進するために処理を施したものに固定することができる。少なくともCh o K タンパク質またはその変異体に特異的に結合することができる抗体の組、および/またはCh o K 遺伝子と特異的にハイブリダイズしたプローブを含んでなる前記固形支持体を用いて、アレイ法によって発現レベルを検出することができる。

【0132】

本発明のキットは、場合によっては、ハウスキーピング遺伝子によってコードされるポリペプチドまたは前記ハウスキーピング遺伝子によってコードされるmRNAを検出する追加試薬を含んでなる。前記追加試薬が利用可能であることにより、異なる試料（例えば、試験試料とコントロール試料）で行った測定を規格化して、バイオマーカーの発現の差は相対的発現レベルの真の差よりもむしろ試料の総タンパク質の異なる量によるということを除外することが可能になる。本明細書で用いられるハウスキーピング遺伝子は、構成的に発現して、本質的な細胞機能を行うタンパク質をコードする遺伝子に関する。本発明で用いられる好ましいハウスキーピング遺伝子としては、 $\alpha$ -2-ミクログロブリン、ユビキチン、18-Sリボソームタンパク質、シクロフィリン、PSMB4、GAPDH、チューブリンおよび $\alpha$ -アクチンが挙げられる。

【0133】

「Ch o K 阻害剤」、「葉酸代謝拮抗薬」、「微小管阻害剤」および「EGFR標的薬」という用語は、癌患者の個別化療法を設計する方法に関して前記に説明されており、本発明の面でも同様に応用される。

10

20

30

40

50



## 【 0 1 3 4 】

本発明の方法について開示した総ての特定の実施態様は、本発明のキットおよびその使用に応用可能である。

## 【 0 1 3 5 】

## 本発明の治療方法

本発明で得られた結果は、進行NSCLC腫瘍におけるChokの発現レベルが高いことが、シスプラチンを基剤とした治療による化学療法治療が不成功の確率が高いことを示している。一方、Chokのレベルが低いかまたは同等であることは、前記治療に一層良好な応答の確率がより高いことを示しており、これは、このような患者にとって利用可能な最善の治療となることがあることを示している。Chok阻害剤は、Chokの発現が高レベルである患者に対する第一選択の治療の選択となるであろう。これらのNSCLC患者におけるシスプラチンを基剤とした療法の代替治療としては、ペメトレキセドまたはタルセバまたはイレッサのようなチロシンキナーゼ阻害剤が挙げられる。従って、Chokの発現が高レベルであることは、これらの確立された代替治療または将来において開発される他の治療が第一選択の治療であることを示している。

10

## 【 0 1 3 6 】

もう一つの面では、本発明は、患者のNSCLCの治療に使用する白金をベースとした化学療法治療であって、前記患者の試料が、Chok遺伝子の発現レベルが参照値に比較して低いかまたは同等であることを特徴とする、治療に関する。

## 【 0 1 3 7 】

20

あるいは、本発明は、NSCLCに罹っている患者の治療用の薬剤の製造を目的とする白金をベースとした化学療法治療の使用であって、患者が、Chok遺伝子の発現レベルが参照値に比較して低いかまたは同等であることを特徴とする、使用に関する。

## 【 0 1 3 8 】

もう一つの面では、本発明は、患者に白金をベースとした化学療法治療を投与することを含んでなる前記患者のNSCLCの治療方法であって、患者が、参照値に比較してChok遺伝子の低または同等発現レベルを示すことを特徴とする、方法に関する。

## 【 0 1 3 9 】

好ましい実施態様では、患者は、Chokaアイソフォームの低または同等発現レベルを示す。もう一つの好ましい実施態様では、患者は、Chokのaおよびbアイソフォーム両方の低または同等発現レベルを示す。もう一つの好ましい実施態様では、患者は、Chokbアイソフォームの低または同等発現レベルを示す。

30

## 【 0 1 4 0 】

NSCLCに罹っている患者の治療に用いられる白金をベースとした化学療法治療は、当該技術分野の状態から広く知られており、本明細書に以前に記載されている。化学療法治療としては、単一の白金をベースとした化合物並びにパクリタキセルに続いてシスプラチン-ゲムシタピン-ピノレルピン、シスプラチン-ゲムシタピン-ピノレルピン、およびシスプラチンとドセタキセルのような白金化合物を含んでなる組合せを挙げることができる。好ましい実施態様では、白金をベースとした化学療法治療はTaxol<sup>®</sup>（パクリタキセル）に続いてシスプラチン-ゲムシタピン-ピノレルピン（TCGV療法）、シスプラチン-ゲムシタピン-ピノレルピン（CGV療法）、およびシスプラチン-Taxotere<sup>®</sup>（ドセタキセル）（CI-TA療法）である。

40

## 【 0 1 4 1 】

もう一つの面では、本発明は、Chok阻害剤、葉酸代謝拮抗薬、微小管阻害剤、EGFR標的薬、またはNSCLCに罹っている患者の治療に用いられる前記薬剤の1種類以上の組合せであって、前記患者の試料が、Chok遺伝子が参照値に比較して高発現レベルを示すものに関する。

## 【 0 1 4 2 】

あるいは、本発明は、Chok阻害剤、葉酸阻害剤、微小管阻害剤薬、EGFR標的薬、またはNSCLCの治療用の薬剤の製造のための前記薬剤の1種類以上の組合せの使

50



用であって、患者が、C h o K 遺伝子が参照値に比較して高発現レベルを示す、使用に関する。

【0143】

あるいは、本発明は、患者にC h o K 阻害剤、葉酸代謝拮抗薬、微小管阻害剤、E G F R 標的薬、または前記薬剤の1種類以上の組合せを投与することを含んでなる、前記患者のN S C L C の治療方法であって、患者が、C h o K 遺伝子が参照値に比較して高発現レベルを示す、方法に関する。

【0144】

「化学療法的治療」、「患者」、「N S C L C」、「参照値」、「C h o K 阻害剤」、「葉酸阻害剤」、「微小管阻害剤」、および「E G F R 標的薬」という用語は、本発明の他の方法に関する記載の部分で既に説明されている。

10

【0145】

療法に応答すると思われる患者の同定方法

本発明の発明者らは、驚くべきことには、C h o K 遺伝子の発現レベルが療法に応答すると思われる患者の同定に有用であることを見いだした。

【0146】

従って、一つの面では、本発明は、

( i ) コリンキナーゼ ( C h o K ) 阻害剤、

( i i ) 葉酸代謝拮抗薬、

( i i i ) 微小管阻害剤、

( i v ) E G F R 標的薬、および

( v ) 上記( i ) ~ ( i v ) の1以上の組合せ

からなる群から選択される療法に応答すると思われる患者の試料におけるC h o K 遺伝子の発現レベルを測定し、前記レベルを参照値と比較することを含んでなる、前記患者のインビトロ同定方法であって、

20

前記試料のC h o K 遺伝子の発現レベルの前記参照値に対する増加は、患者が前記療法に応答すると思われることを示すか、または前記試料のC h o K 遺伝子の発現レベルの前記参照値に対する変化の減少または欠如は、患者が前記療法に応答するとは思われないことを示す、方法に関する。

【0147】

30

「患者」、「癌」、「コリンキナーゼ」、「コリンキナーゼ ( C h o K ) 阻害剤」、「葉酸代謝拮抗薬」、「微小管阻害剤」、「E G F R 標的薬」、「C h o K 遺伝子の発現レベル」、「試料」、「患者」、「応答」、「参照値」、「増加発現レベル」、「減少発現レベル」、「発現の変化の欠如」という用語は、前記で詳細に定義されており、本発明の本態様でも同様に用いられる。

【0148】

本発明による方法は、第一段階では、癌患者の試料におけるC h o K 遺伝子の発現レベルの決定と、発現レベルを参照値と比較することを含んでなる。好ましい実施態様では、本発明の方法は、C h o K a アイソフォームの発現レベルの決定を含んでなる。もう一つの好ましい実施態様では、本発明の方法は、C h o K a およびb アイソフォーム両方の発現レベルの決定を含んでなる。もう一つの好ましい実施態様では、本発明の方法は、C h o K b アイソフォームの発現レベルの決定を含んでなる。好ましい実施態様では、本発明の方法は、C h o K a アイソフォームの発現レベルの決定を含んでなるが、b アイソフォームの発現レベルの決定を含まない。もう一つの好ましい実施態様では、本発明の方法は、C h o K b アイソフォームの発現レベルの決定を含んでなるが、a アイソフォームの発現レベルの決定を含まない。

40

【0149】

好ましい実施態様では、C h o k 遺伝子 ( またはアイソフォーム ) の発現レベルは、C h o K 遺伝子によってコードされたm R N A ( またはそれぞれのアイソフォームの転写体 ) のレベルを測定することによって決定される。更に好ましい実施態様では、C H O

50

K 遺伝子（またはアイソフォーム）の mRNA 発現レベルは、定量的 PCR、好ましくは、リアルタイム PCR によって決定される。

【0150】

もう一つの実施態様では、ChoK 遺伝子の発現レベルは、ChoK タンパク質またはその変異体のレベルを決定することによって決定される。更に好ましい実施態様では、ChoK タンパク質またはその変異体の発現レベルは、ウェスタンブロット法または免疫組織化学によって決定される。

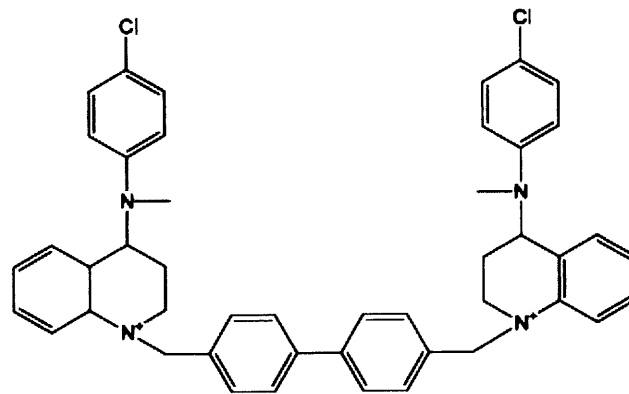
【0151】

「参照値」という用語は、前記で詳細に説明されており、本発明の方法では同じ意味で用いられる。

【0152】

好ましい実施態様では、療法は ChoK 阻害剤である。更に好ましい実施態様では、ChoK 阻害剤は表 2 から選択される。更に一層好ましい実施態様では、ChoK 阻害剤は、構造

【化 2】



またはそのアナログ、塩または溶媒和物を有する。

【0153】

一実施態様では、患者は癌に罹っている。好ましい実施態様では、癌は、肺癌、乳癌、結腸癌、膀胱癌および膵臓癌からなる群から選択される。更にもう一つの実施態様では、肺癌は、非小細胞肺癌（NSCLC）である。更に一層好ましい実施態様では、NSCLC は、肺の扁平上皮癌、肺の大細胞癌および肺の腺癌から選択される。もう一つの実施態様では、NSCLC は、進行期 NSCLC であり、好ましくは IIIA、IIIB または IV 期である。

【0154】

好ましい実施態様では、試料は、組織試料であり、好ましくは腫瘍組織試料であり、更に好ましくは肺腫瘍組織試料である。

【0155】

下記の実施例は、単なる実例として提供されるものであり、本発明の範囲を制限するものと解釈すべきではない。

【実施例】

【0156】

I. 材料および方法

患者

患者は、マドリード（スペイン）の La Paz Hospital で 2001 ~ 2008 年の間に遡及的に集めた。この予備実験のための算入基準は、原発性 NSCLC の III ~ IV 期、18 歳以上、および初期治療モダリティとして白金をベースとした化学療法を受けた患者であった。除外基準は、化学療法または放射線療法による先行治療を受けている患者および応答について評価することができなかった患者であった。パラフィン

10

20

30

40

50

包埋組織において腫瘍の少なくとも80%を含む病理学的分析を有する標本のみを検討に含めた。全体で、前記基準を満たした30名の患者のパラフィン包埋した腫瘍肺組織標本を、遡及的に調査した。

【0157】

シス-ジアミンジクロロ白金(CDDP)を用いる全身化学療法を、総ての患者で行った。用いた化学療法的療法に関しては、Taxol<sup>®</sup> (パクリタキセル)に続いてシスプラチン-ゲムシタビン-ビノレルビン(T-CGV療法)またはシスプラチン-ゲムシタビン-ビノレルビンのみ(CGV療法)が、最も一般的な選択肢であった(73%)。幾人かの患者は、シスプラチン-Taxotere<sup>®</sup> (ドセタキセル)(CI-TA療法)を取り、患者の26%に投与された。

10

【0158】

#### 検討設計

この検討は、進行NSCLCの患者における白金をベースとした化学療法に対する応答を予測するための、Chok mRNA発現の値の遡及的分析であった。

【0159】

標準的応答基準を用いて、化学療法に対する応答を評価した。応答は、総ての腫瘍局在の最大垂直直径の積の和が>50%減少し、新たな腫瘍病巣なしによって定義された。安定化は、腫瘍サイズの<50%減少または<25%増加によって定義された。進行は、腫瘍病巣のサイズの>25%の増加または新たな病巣の出現として定義された。

20

【0160】

患者の応答は、臨床的有用性(応答および安定化を含む)および進行の二群に分類された。追跡調査は、Lapaz大学病院、胸部外科で用いた基準に従って行い、3ヶ月毎に臨床評価および胸部のCTを含めた。

【0161】

#### 遺伝子発現分析

組織試料から抽出したmRNA濃度は、定量的RT-PCRを用いて測定した。

【0162】

遺伝子発現(AQ)の定量は、 $2^{-C_t}$ 法で計算し、 $AQ^{-10}$ として示した。遺伝子発現分析は、規格化のため3種類の異なる内在性遺伝子(GAPDH、 $\beta$ -アクチンおよびPSMB4)を用いて行い、同様の結果を得た。ここで示したデータを、規格化のための確立されたGAPDHを用いて分析したが、他の内在性遺伝子を用いても同様の結果が得られた。

30

【0163】

#### 統計学的分析

無進行期間を、無進行生存期間の分析に用いた。

【0164】

受診者動作特性(ROC)曲線を得て、無進行期間についてのChok 発現の様々なカットオフ値における感受性と偽陽性率との関係を示し、カットオフ値を、ROC曲線に基づいて感受性と偽陽性率(1-特異性)の最善の組合せに従って確立した。

40

【0165】

Kaplan-Meier法を用いて、無進行生存期間を予測した。

【0166】

腫瘍進行に対する様々な要因の効果を、単変量解析のため対数順位検定によって評価した。ハザード比(HR)および95%信頼区間(95%CI)を、COX回帰モデルから計算した。

【0167】

総ての記録したp値は、両側検定のものであった。統計学的有意性は、 $p < 0.05$ と定義した。統計学的分析は、SPSSソフトウェア(14.0版)を用いて行った。

【0168】

#### II. 結果

50

患者の特徴および臨床結果

I I I および I V 期の N S C L C の 3 0 名の患者をこの検討に含め、肺癌特異的生存期間中央値を 1 1 ヶ月 ( 9 5 % C I : 6 . 7 ~ 1 5 . 3 ) とした。腫瘍進行が 1 1 名の患者 ( 3 7 % ) で確認され、彼らは全員が肺癌で死亡した。総臨床的有用性率は、1 9 / 3 0 ( 6 3 % ) であり、それからの応答率は 1 4 / 3 0 ( 4 7 % ) であり、5 名の患者 ( 1 7 % ) は安定病態を示した。検討に用いた患者の病理学的および臨床パラメーターを、表 3 にまとめる。

【 0 1 6 9 】

【表 3】

表 3

患者	個体数 (%)
性別	
男	30 (100)
腫瘍の種類	
扁平上皮癌	17 (56.7)
腺癌	4 (13.3)
大細胞	9 (30)
腫瘍期	
I I I B	10 (33.3)
I V	20 (66.7)
化学療法	
C G V	9 (30)
C I - T A	8 (26.7)
T - C G V	13 (43.3)
応答	
応答	14 (46.7)
安定化	5 (16.7)
進行	11 (36.7)
転帰	
なし	5 (16.7)
有り	25 (83.3)

【 0 1 7 0 】

遺伝子発現および治療に対する応答

C h o K m R N A 濃度は、受入番号 H s 0 0 6 0 8 0 4 5 \_ m l の T a q m a n プローブおよび / または受入番号 H s 0 3 6 8 2 7 9 8 \_ m l の T a q m a n プローブを用いる定量的 R T - P C R を用いて測定した。遺伝子発現分析は、C h o K 発現が腫瘍に差別的に分布しており、m R N A コピーの規格化 A Q 値は 0 . 0 7 ~ 1 5 . 4 4 の間で振動することを示した。R O C 法により、任意カットオフ点 1 . 7 8 4 A Q が確立された ( 6 4 % 感受性、6 8 % 特異性 ) 。これらの条件下では、C h o K 過剰発現について分析した 3 0 の腫瘍試料の中 1 3 ( 4 3 % ) が、このカットオフを上回った。治療から臨床的有用性を得た 1 9 名の患者の中、1 3 名 ( 6 8 . 4 % ) は、C h o K レベルは低かった。対照的に、進行性疾患の 1 1 名の患者の中 7 名 ( 6 3 . 6 % ) は、カットオフレベルを上

回る C h o K のレベルを示した。従って、C h o K レベルが増加したこれらの患者では、この酵素の濃度が低い患者より無進行生存期間が更に悪化した。無進行生存期間中央値は、C h o K 発現がカットオフレベルを上回った患者では5ヶ月であったが、C h o K 発現がカットオフレベル ( $p = 0.05$ ) を下回った患者では評価の時間に届かなかった (図1)。

#### 【0171】

C h o K 発現の予後徴候の有意性の一変量分析は、より高濃度の酵素では、より低濃度の C h o K 発現と比較して治療不成功の危険性増加と相関することを示した ( $p < 0.05$ 、HR 2.57 [95% IC: 0.69 ~ 9.56])。

#### 【0172】

### III. 討論

本発明は、白金をベースとした化学療法を受けた進行 NSCLC の患者の腫瘍試料における C h o K 発現の予測値を調査した。この検討は、C h o K 過剰発現が、進行 NSCLC の患者における白金をベースとした化学療法に対する不十分な応答に伴うことを強く示唆している。更に、これらの結果は、NSCLC における C h o K の生物学的特性と臨床的関連性について新たな識見を提供し、更に疾患の発病および進行におけるこの酵素の多機能効果についての証拠を与える。

#### 【0173】

C h o K 発現と治療不成功の有意な関連が見出されており、進行 NSCLC の患者の治療後の展開の分析にこのマーカーの値が有望であることを示唆している。従って、これらの結果は、NSCLC の治療技術における中心的役割を果たしている白金を用いる化学療法後には、C h o K 発現が高い患者の予後は、不十分となるであろうことを示唆している。

#### 【0174】

白金を用いる同時化学療法は、通常は重大な毒性を伴っている。従って、この酵素を高発現する患者にとっては、代替治療法が適当かつ望ましいと考えることが合理的である。C h o K 特異的阻害剤がインビトロおよびインビボのいずれにおいても効率的な抗腫瘍活性を示した (Ramirez de Molina A, et al. 2007, Lancet Oncol. vol. 8(10): 889-97; Lacal JC. 2001, IDrugs. vol. 4(4):419-26; Hernandez-Alcoceba R, et al. 1999, Cancer Res vol. 59: 3112-8; Ramirez de Molina A, et al. 2004, Cancer Res. vol. 64: 6732-9) ことを考慮すれば、これらの結果は、それらの臨床上的実行に関して更に一層有望であると思われる。更に、肺腫瘍由来の腫瘍細胞において C h o K 阻害剤をシスプラチンと組み合わせると、多様な実験条件下で相乗効果が観察されている (WO 2010031825 号として公表された国際特許出願)。従って、シスプラチン耐性の患者を、C h o K 阻害剤とシスプラチンとの組合せで治療することができた。

#### 【0175】

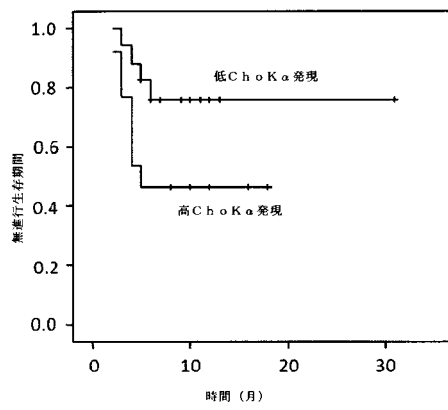
従って、本発明は、進行 NSCLC の患者における白金をベースとした化学療法に対する応答についての C h o K 発現の予測値および臨床結果を向上させるため代替治療が可能な患者の同定について明らかな可能性を示している。

10

20

30

【図 1】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/061790

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68

ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RACHEL CAVILL ET AL: "Consensus-Phenotype Integration of Transcriptomic and Metabolomic Data Implies a Role for Metabolism in the Chemosensitivity of Tumour Cells", PLOS COMPUTATIONAL BIOLOGY, vol. 7, no. 3, 1 January 2011 (2011-01-01) , page E1001113, XP055009387, ISSN: 1553-734X, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1001113	1-13
Y	page 9, left-hand column, line 4 - line 6; table 2  ----- -/--	14,15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 July 2012

Date of mailing of the international search report

26/07/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Santagati, Fabio

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/061790

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>GLUNDE KRISTINE ET AL: "Drug resistance in chronic myeloid leukemia increases cellular choline kinase and phosphocholine levels",  PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US,  vol. 49, 1 April 2008 (2008-04-01), page 164, XP001539286,  ISSN: 0197-016X  abstract</p> <p>-----</p>	1-5,7-12
X	<p>TARIQ SHAH ET AL: "Choline kinase overexpression increases invasiveness and drug resistance of human breast cancer cells",  NMR IN BIOMEDICINE,  vol. 23, no. 6, 1 July 2010 (2010-07-01), pages 633-642, XP055009383,  ISSN: 0952-3480, DOI: 10.1002/nbm.1510  page 640, right-hand column, last paragraph; figure 7</p> <p>-----</p>	1-5,7-12
Y	<p>WO 2010/031825 A2 (TRANSLATIONAL CANCER DRUGS PHA [ES]; RAMIREZ DE MOLINA ANA [ES]; GARCI) 25 March 2010 (2010-03-25)  cited in the application  examples 1,4,6,7</p> <p>-----</p>	4,14-41
Y	<p>DE MOLINA ET AL: "Expression of choline kinase alpha to predict outcome in patients with early-stage non-small-cell lung cancer: a retrospective study",  LANCET ONCOLOGY, LANCET PUBLISHING GROUP, LONDON, GB,  vol. 8, no. 10,  1 October 2007 (2007-10-01), pages 889-897, XP02282579,  ISSN: 1470-2045, DOI:  10.1016/S1470-2045(07)70279-6  cited in the application</p> <p>-----</p>	4,15-41
A	<p>page 896, right-hand column, last paragraph</p> <p>-----</p>	7-9,12
A	<p>WO 2007/034221 A2 (UNIV ABERDEEN [GB]; GRAMPIAN HEALTH BOARD [GB]; COLLIE-DUGUID ELAINA S) 29 March 2007 (2007-03-29)  the whole document</p> <p>-----</p>	1-14
A	<p>EP 2 316 970 A2 (TRASLATIONAL CANCER DRUGS PHARMA S L [ES]) 4 May 2011 (2011-05-04)  figures 2, 13, 14; example 2</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	15



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/061790

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MORI NORIKO ET AL: "Choline kinase down-regulation increases the effect of 5-fluorouracil in breast cancer cells", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 67, no. 23, 1 December 2007 (2007-12-01), pages 11284-11290, XP002517954, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2728 the whole document</p> <p>-----</p>	1-15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/061790

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010031825 A2	25-03-2010	AU 2009294618 A1	25-03-2010
		CA 2737551 A1	25-03-2010
		CN 102215872 A	12-10-2011
		EP 2340042 A2	06-07-2011
		JP 2012502954 A	02-02-2012
		KR 20110067041 A	20-06-2011
		US 2010068302 A1	18-03-2010
		US 2011256241 A1	20-10-2011
		US 2012040021 A1	16-02-2012
		WO 2010031825 A2	25-03-2010
WO 2007034221 A2	29-03-2007	EP 1934370 A2	25-06-2008
		US 2009123925 A1	14-05-2009
		WO 2007034221 A2	29-03-2007
EP 2316970 A2	04-05-2011	AU 2009265121 A1	07-01-2010
		CA 2729857 A1	07-01-2010
		EP 2316970 A2	04-05-2011
		US 2011250179 A1	13-10-2011
		WO 2010001369 A2	07-01-2010

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 33/68 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/68		
<b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53	D	
<b>G 0 1 N 33/48 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/53	Y	
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/48	P	
		C 1 2 N 15/00	A	

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

(74) 代理人 100176083

弁理士 松山 祐子

(72) 発明者 フアン、カルロス、ラカル、サンファン

スペイン国マドリッド、アルトゥーロ、ドゥペリエル、4

F ターム(参考) 2G045 AA26 AA40 BB24 CB02 DA14 DA36 FB03 FB05  
 4B024 AA11 CA09 HA12  
 4B063 QA01 QA19 QQ53 QR32 QR62 QS25  
 4C084 AA17 NA05 ZB262  
 4C206 AA01 AA02 JB14 JB17 MA01 MA04 NA05 ZB26