

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6038128号  
(P6038128)

(45) 発行日 平成28年12月7日(2016.12.7)

(24) 登録日 平成28年11月11日(2016.11.11)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68 A
G 01 N 33/68 (2006.01)	G 01 N 33/68
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00 A

請求項の数 9 (全 62 頁)

(21) 出願番号	特願2014-513691 (P2014-513691)
(86) (22) 出願日	平成24年5月31日 (2012.5.31)
(65) 公表番号	特表2014-521308 (P2014-521308A)
(43) 公表日	平成26年8月28日 (2014.8.28)
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/040183
(87) 国際公開番号	W02012/166899
(87) 国際公開日	平成24年12月6日 (2012.12.6)
審査請求日	平成27年3月12日 (2015.3.12)
(31) 優先権主張番号	61/493,294
(32) 優先日	平成23年6月3日 (2011.6.3)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	506137147 エーザイ・アール・アンド・ティー・マネジメント株式会社 東京都文京区小石川四丁目6番10号
(74) 代理人	100088155 弁理士 長谷川 芳樹
(74) 代理人	100128381 弁理士 清水 義憲
(74) 代理人	100126653 弁理士 木元 克輔
(72) 発明者	船橋 泰博 茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社筑波研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レンバチニブ化合物に対する甲状腺癌対象及び腎臓癌対象の反応性を予測及び評価するためのバイオマーカー

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

甲状腺癌又は腎臓癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象の、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を投与する療法に対する反応を予測する方法であって、

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を投与する療法の前に対象から得られた生物学的試料を用意するステップと、

生物学的試料中の、ANGPT2、VEGFA、IFNG、KDR (可溶性VEGFR2)、FLT4 (可溶性VEGFR3)、IL6、PDGFAB、CSF3 (G-CSF)、CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )、CCL4 (MIP-1 $\beta$ )、FGF2、及びIL13からなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質の濃度を測定するステップと、  
を含み、

ANGPT2、VEGFA、IFNG、若しくは可溶性KDR (可溶性VEGFR2) の濃度が対照と比較して低下していること、及び/又はIL-6、IL-13、PDGFAB、CSF3 (G-CSF)、CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )、CCL4 (MIP-1 $\beta$ )、FGF2 (可溶性VEGFR3)、若しくはFGF2の濃度が対照と比較して上昇していることにより、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を投与する療法に反応することが予測される方法。

## 【請求項 2】

少なくとも2つの遺伝子の濃度を測定する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

少なくとも 2 つの遺伝子が、  
 ( i ) V E G F A 、 A N G P T 2 、及び C S F 3 、又は  
 ( ii ) I L 1 3 、 C C L 3 、及び C C L 4  
 からなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

甲状腺癌又は腎臓癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象の、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を投与する療法に対する反応を予測する方法であって、

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を投与する療法の後で対象から得られた生物学的試料を用意するステップと、

生物学的試料中の、 A N G P T 2 及び I L 1 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つのタンパク質の濃度を測定するステップと、  
 を含み、

A N G P T 2 又は I L 1 3 の濃度が対照と比較して低下していることにより、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を投与する療法に反応することが予測される方法。

**【請求項 5】**

甲状腺癌が、分化型甲状腺癌である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 6】**

分化型甲状腺癌が甲状腺濾胞癌である、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

分化型甲状腺癌が甲状腺乳頭癌である、請求項 5 に記載の方法。

**【請求項 8】**

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩がレンバチニブメシリ酸塩である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 9】**

対象がヒトである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】****【発明の分野】****【0001】**

本発明は、全体として、バイオマーカー並びに甲状腺癌及び腎臓癌に関する。

**【発明の背景】****【0002】**

多数のキナーゼ阻害剤が、抗腫瘍剤として開発されている。例えば、血管内皮細胞増殖因子受容体 ( V E G F R ) などの受容体チロシンキナーゼに対する阻害活性を有する化合物群は、血管新生を阻害することが知られており、新たなクラスの抗腫瘍剤とみなされている。レンバチニブメシリ酸塩（また、 E 7 0 8 0 としても知られている）は、 V E G F R 1 ~ 3 、線維芽細胞増殖因子受容体 ( F G F R ) 1 ~ 4 、 rearranged during transfection 受容体 ( R E T ) 、 K I T 、及び血小板由来増殖因子受容体 ( P D G F R ) を標的とする経口チロシンキナーゼ阻害剤である。レンバチニブメシリ酸塩についての第 I 相の臨床研究では、治療に対する反応が、甲状腺癌、腎臓癌、子宮内膜癌のほか、黒色腫においても認められた。

**【0003】**

残念ながら、大半の抗腫瘍治療は、重篤な恶心、嘔吐、又は重度の疲労など、好ましくない副作用を伴う。また、抗腫瘍治療が成功しながら、それらを施された全ての患者において有意義な臨床反応をもたらすわけではなく、その結果として、有効でない治療に伴う、好ましくない副作用、遅延、及び費用がもたらされる。したがって、投与前に抗腫瘍剤に対する対象の反応を予測するために用い得るバイオマーカーの必要性は大きい。加えて、抗腫瘍剤を含む療法が有効であるのかどうかを評価するために用い得るバイオマーカー

10

20

30

40

50

を有することも有用である。

【発明の概要】

【0004】

本出願は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する甲状腺癌対象又は腎臓癌対象の反応性を予測するバイオマーカーの同定に少なくとも部分的に基づく。1つ又は複数の遺伝子における突然変異の存在は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する反応性の有用な予測因子である。例えば、遺伝子N R A S、K R A S、V H L、B R A F、E R B B 2、P T E N、及びM E T のうちの1つ又は複数における（1つ又は複数の）突然変異は、所与の甲状腺癌対象又は腎臓癌対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に反応することの指標である。加えて、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法による治療前及び治療後におけるサイログロブリンレベルの比も、分化型甲状腺癌を有する対象が、レンバチニブ化合物による継続療法に反応する可能性を決定するのに有用である。さらにはまた、治療前若しくは治療後における特定のタンパク質（例えば、表3に列挙されるタンパク質）の発現レベル、又は治療後／治療前の対照と比較した発現レベル比も、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する反応性の有用な予測因子であり得る。また、これらの2つのクラスのバイオマーカー（突然変異及び血中バイオマーカー）又は3つのクラスのバイオマーカー（突然変異、サイログロブリン、及び血中バイオマーカー）の組合せも、甲状腺癌又は腎臓癌を有する対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に反応する可能性についてのなおより明確な予測をもたらし得る。  
10

【0005】

本出願はまた、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療を、甲状腺癌又は腎臓癌を有する対象に継続すべきかどうかについて評価する方法も提供する。療法による治療前及び／又は治療後における特定のタンパク質（例えば、表3に列挙されるタンパク質）のレベルが低いこと又は高いことは、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療を継続すべきかどうかを評価するのに有用であり得る。例えば、（レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療後／治療前の）サイログロブリンレベルの比が、このような療法に反応しないことが知られる患者の試料に由来する対照の比と比較して低いことは、被験対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む継続療法から利益を得るかどうかを評価する（e v a l u a t e / a s s e s s ）のに有用であり得る。  
30

【0006】

したがって、本明細書で記載されるバイオマーカー及び組成物は、例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療から利益を得る可能性がある、甲状腺癌又は腎臓癌を有する患者又は患者の亜集団を同定すること、及び／又はこれらを選択することにおいて有用である。加えて、本明細書で記載される方法は、例えば、甲状腺癌又は腎臓癌を患うか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象に適切な治療法（例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法）を選択するのに有用である。方法はまた、医療ケア従事者が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を継続するべきか、療法を変更して異なる治療を用いるべきかを決定することも可能とする。  
40

【0007】

一態様では、本開示は、甲状腺癌又は腎臓癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象の、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に対する反応を予測する方法を提供する。方法は、対象から得られた生物学的試料を用意するステップと、生物学的試料中の、R A S、V H L、及びB R A F からなる群から選択  
50

される少なくとも 1 つの遺伝子における突然変異の存在を検出するステップとを伴う。少なくとも 1 つの遺伝子における突然変異の存在により、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応することが予測される。一実施形態では、R A S は、K R A S 又はN R A S である。一実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子における突然変異は、表 1 に列挙される突然変異である。別の実施形態では、少なくとも 1 つの遺伝子における突然変異は、表 2 に列挙される突然変異である。別の実施形態では、R A S における突然変異は、K R A S Q 6 1 R、K R A S G 1 2 R、N R A S Q 6 1 P、及びN R A S Q 6 1 R からなる群から選択される。別の実施形態では、この様の方法は、生物学的試料中の、E R B B 2、P T E N、及びM E T からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子における突然変異の存在を検出するステップをさらに伴い、R A S の突然変異及びE R B B 2、P T E N、及びM E T のうちの少なくとも 1 つにおける突然変異の存在により、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応することがなより明確に予測される。一実施形態では、方法は、A N G P T 2、V E G F A、F L T 4、C C L 3、及びC C L 4 からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを決定するステップをさらに含む。

#### 【 0 0 0 8 】

第 2 の態様では、本出願は、分化型甲状腺癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象の、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に対する反応を予測する別のある方法を提供する。この方法はまた、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法の継続投与の利益を評価する (e v a l u a t e / a s s e s s ) ためにも用いることができる。方法は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法の前に対象から得られた第 1 の血液試料を用意するステップと、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を開始した後で対象から得られた第 2 の血液試料を用意するステップと、第 1 の血液試料及び第 2 の血液試料中のサイログロブリンの濃度を測定するステップと、サイログロブリンの濃度比 ( 第 2 / 第 1 ) を計算するステップとを伴う。血液試料中のサイログロブリンの濃度比が対照と比較して低下していると、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応することが予測され、血液試料中のサイログロブリンの濃度比が対照と比較して上昇していると、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に、血液試料中のサイログロブリンの濃度比が対照と比較して低下した対象ほど有効には反応しないことが予測される。一実施形態では、第 2 の血液試料は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を開始した 1 週間～9 カ月後に対象から得られる。別の実施形態では、第 2 の血液試料は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を開始した 2 週間～9 カ月後に対象から得られる。別の実施形態では、第 2 の血液試料は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を開始した 4 週間～6 カ月後に対象から得られる。さらなる実施形態では、第 2 の血液試料は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を開始した 4 日～2 週間後に対象から得られる。

#### 【 0 0 0 9 】

第 3 の態様では、本開示は、甲状腺癌又は腎臓癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象の、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に対する反応を予測する別のある方法を提供する。この方法は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法の前に対象から得られた生物学的試料を用意するステップと、生物学的試料中の、A N G P T 2、V E G F A、I F N G、K D R ( 可溶性 V E G F R 2 )、F L T 4 ( 可溶性 V E G F R 3 )、I L 6、P D G F A B、C S F 3 ( G - C S F )、C C L 3 ( M I P - 1 )、C C L 4 ( M I P - 1 )、F G F 2、及びI L 1 3 からなる群から選択される少なくとも 1 つのタンパク質の濃度を測定するステップとを伴う。A N G P T 2、V E G F A、I F N G、又は可溶性 K D R ( 可溶性 V E G F R 2 ) の濃度が対照と比較して低下すること、及び / 又は I L - 6、I L - 1 3、P D G F A B、C S F 3 ( G - C S F )、C C L 3 ( M I P - 1 )、C C L 4 ( M I P - 1 )、F L T 4 ( 可溶性 V E G F R 3 )、若しくは F G F 2 の濃度が対照と比較して上昇することに

10

20

30

40

50

より、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応することが示される。一実施形態では、少なくとも2つの遺伝子の濃度を測定する。一実施形態では、2つの遺伝子は、VEGFA、ANGPT2、及びCSF3、又はIL13、CCL3、及びCCL4からなる群から選択される。別の実施形態では、少なくとも3つの遺伝子の濃度を測定する。さらに別の実施形態では、少なくとも4つの遺伝子の濃度を測定する。

#### 【0010】

第4の態様では、本開示は、甲状腺癌又は腎臓癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象の、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に対する反応を予測する別 の方法を提供する。この方法また、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法の継続投与の利益を評価する(evaluate/assess)ためにも用いることができる。方法は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を開始した後で対象から得られた生物学的試料を用意するステップと、生物学的試料中の、ANGPT2、IL13、VEGFA、IL6、PGF、IL10、CXCL12、及びCCL5からなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質の濃度を測定するステップとを伴う。ANGPT2、IL13、VEGFA、IL6、又はPGFの濃度が対照と比較して低下すること、及びIL10、CXCL12、又はCCL5の濃度が対照と比較して上昇することにより、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応することが示される。一実施形態では、試料は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を開始した約15日後に得られる。一実施形態では、試料は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を開始した約29日後に、又は各治療サイクル(1サイクル当たり4週間)のいずれの1日目にも得られる。

10

#### 【0011】

第4の態様では、本開示は、甲状腺癌又は腎臓癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象の、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に対する反応を予測する別 の方法を提供する。この方法はまた、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法の継続投与の利益を評価する(evaluate/assess)ためにも用いることができる。方法は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法の前に対象から得られた第1の生物学的試料を用意するステップと、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を開始した後で対象から得られた第2の生物学的試料を用意するステップと、第1及び第2の生物学的試料中の、CCL5、FLT3LG、IL12(p40)、EGF、PDGF-BB、PDGF-AA、CSF2、FLT1、TEK、HGF、VEGFA、IL6、CSF3、FIGF、IL1RN、CCL11、IL1A、TGFA、PGF、PDGF-AB、IL10、及びFGF2からなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質の濃度を測定するステップと、タンパク質の濃度比(第2/第1)を計算するステップとを伴う。CCL5、FLT3LG、IL12(p40)、EGF、PDGF-BB、PDGF-AA、CSF3、FLT1、TEK、HGF、VEGFA、又はIL6の濃度比が対照と比較して低下すること、及びCSF2、FIGF、IL1RN、CCL11、IL1A、TGFA、PGF、PDGF-AB、IL10、又はFGF2の濃度比が対照と比較して上昇することにより、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応することが予測される。一実施形態では、試料は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を開始した約15日後に得られる。一実施形態では、試料は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を開始した約29日後に得られるか、又は各治療サイクル(1サイクル当たり4週間)のいずれの1日目にも得られる。

20

30

#### 【0012】

第5の態様では、本開示は、甲状腺癌又は腎臓癌を治療する方法であって、それを必要とする対象に有効量のレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を投与するステップを包含し、対象が、この療法に対する反応性と関連する突然変異を有する対象、及び/又はこの療法に対する反応性と関連するバイオマーカーのレベルを発現しているか

40

50

若しくはバイオマーカーの発現比を有している対象、及び／又は、甲状腺癌の場合、この療法に対する反応性と関連するサイログロブリンの発現比を有している対象として同定される方法を提供する。

#### 【0013】

第6の態様では、本開示は、甲状腺癌又は腎臓癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象の反応性を予測する方法を提供する。方法は、N R A S の突然変異状態及び対象から得られた（1つ又は複数の）生物学的試料中の治療前のA N G P T 2 濃度を評価するステップを伴う。一実施形態では、N R A S における突然変異（例えば、表1又は2に列挙されるN R A S の突然変異）の存在と、以下の予測式：（0.000751）×（A n g 2）+（2.69）×D（N R A S , W T ）-（3.92）< 0.716 [式中、関数Dは、詳細な説明の節で定義される]へと代入したときにこの式を満たすA N G P T 2 の濃度とにより、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に反応性である対象が、これらのバイオマーカーのうちのいずれかを個別に示す対象よりなお明確に予測される（異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる）。

#### 【0014】

第7の態様では、本開示は、甲状腺癌又は腎臓癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象の反応性を予測する方法を提供する。方法は、N R A S 又はK R A S の突然変異状態及び対象から得られた（1つ又は複数の）生物学的試料中の治療前のA N G P T 2 濃度を評価するステップを伴う。一実施形態では、N R A S 又はK R A S における突然変異（例えば、表1又は2に列挙されるN R A S の突然変異又はK R A S の突然変異）の存在と、以下の予測式：（0.000869）×（A N G 2 9 0 ）+（2.16）×D（K R A S N R A S , W T ）-（2.24）< 0.508へと代入したときにこの式を満たすA N G P T 2 の濃度とにより、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に反応性である対象が、これらのバイオマーカーのうちのいずれかを個別に示す対象よりなお明確に予測される（異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる）。

#### 【0015】

以下の実施形態は、上記の態様全てに想定される。一実施形態では、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩は、レンバチニブメシル酸塩である。一実施形態では、甲状腺癌は、分化型甲状腺癌である。別の実施形態では、甲状腺癌は、甲状腺髓様癌である。一実施形態では、甲状腺癌は、甲状腺乳頭癌である。別の実施形態では、甲状腺癌は、甲状腺滤胞癌である。別の実施形態では、甲状腺癌は、ヒュルトレ細胞甲状腺癌である。特定の実施形態では、甲状腺癌は、放射性ヨウ素不応性進行性分化型甲状腺癌である。一実施形態では、腎臓癌は、腎細胞癌である。特定の実施形態では、対象はヒトである。一部の実施形態では、生物学的試料は、血液試料、循環腫瘍細胞、循環D N A、血漿試料、血清試料、尿試料、甲状腺試料、甲状腺結節試料、腎臓試料、及び腫瘍試料からなる群から選択される。一部の実施形態では、方法は、検査結果を対象の医療ケア提供者に伝えるステップをさらに包含する。特定の実施形態では、方法は、対象の医療記録を修正して、対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応する可能性が高いか、又はその可能性が高くないかを示すステップをさらに包含する。具体的な実施形態では、記録は、コンピュータで読み取り可能な媒体上でなされる。特定の実施形態では、バイオマーカーの発現プロファイルにより、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応することが予測される場合は、方法は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を対象に処方するステップをさらに包含する。一部の実施形態では、方法は、対象にレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法を投与するステップをさらに包含する。一部の実施形態では、方法は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む治療から利益を得る癌を有するか又は発症する危険性がある対象を選

10

20

30

40

50

択するステップをさらに含む。

**【0016】**

別段に定義しない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。本発明の実施又は試験では、本明細書で記載される方法及び材料と類似又は同等の方法及び材料も用いることができるが、以下では例示的な方法及び材料について記載する。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりそれらの全体において組み込まれる。不一致の場合は、定義を含めて本出願が優先される。材料、方法、及び例は、例示的なものであるに過ぎず、限定的であることを意図するものではない。

本発明の他の特色及び利点は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかとなろう。

10

**【図面の簡単な説明】**

**【0017】**

【図1】N R A S 単独における突然変異又はN R A S 若しくはK R A S における突然変異を伴う患者の無増悪生存（P F S ）についての概略図である。ログランク検定による解析は、N R A S 単独における突然変異、又はN R A S 若しくはK R A S における突然変異を伴う患者が、N R A S 又はK R A S について野生型である患者より良好なP F S を示すことを裏付けた。

【図2】E 7 0 8 0 による治療後におけるサイログロプリンレベルの変化についての概略図である。「P R 」とは、E 7 0 8 0 療法に対して部分寛解を示す患者群における中央値を指す。「その他」とは、E 7 0 8 0 療法後において疾患の安定、又は疾患の進行を示す患者群における中央値を指す。

20

**【詳細な説明】**

**【0018】**

本開示は、甲状腺癌対象又は腎臓癌対象（ヒト患者など）の、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する反応を予測するための方法及び組成物を提供する。本開示は、甲状腺癌（例えば、分化型甲状腺癌）又は腎臓癌（例えば、腎細胞癌）を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象に、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を投与することが有効である可能性が高いのか、有効でない可能性が高いのかを同定するための予測バイオマーカー（例えば、タンパク質の発現レベル及び／又は遺伝子の突然変異）を提供する。加えて、本開示は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法による甲状腺癌対象又は腎臓癌対象の継続治療を評価する（e v a l u a t e / a s s e s s ）ために有用なバイオマーカーを提供する。本明細書で記載されるバイオマーカー、組成物、及び方法は、甲状腺癌又は腎臓癌を患う対象に適切な治療法（例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による療法）を選択するのに有用である。さらに、本出願は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法並びに治療法から利益を得る可能性がある、甲状腺癌又は腎臓癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある患者を選択する方法も提供する。

30

**【0019】**

**定義**

「循環腫瘍細胞」という用語（C T C ）は、原発性腫瘍から脱離して血流中を循環する細胞を指す。C T C は、異なる組織におけるさらなる腫瘍のその後における増殖（転移）の原因を構成し得る（K i t a g o ら、C l i n . C h e m . 、5 5 ( 4 ) : 7 5 7 - 7 6 4 ( 2 0 0 9 ) ）。

**【0020】**

「循環D N A 」という用語は、癌患者の血漿又は血清において増大した量で存在するD N A を指す。癌患者は、健常対照より循環D N A レベルが高い（L e o n ら、C a n c e

40

50

r Res.、37:646~650(1977); Chuangら、Head & Neck、229~234(2010)。

【0021】

「発現レベルの減少／低下」という用語は、発現レベルが対照における発現レベルより低いことを意味する。

【0022】

「発現レベルの上昇」という用語は、発現レベルが対照における発現レベルより高いことを意味する。

【0023】

「レンバチニブ」という用語は、4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキシアミドを指す。この化合物は、米国特許第7,253,286号の実施例368(カラム270を参照されたい)において開示されている。米国特許第7,253,286号は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる。レンバチニブメシリ酸塩はまた、E7080とも称する。10

【0024】

本明細書では、「核酸」という用語と「ポリヌクレオチド」という用語とが、互換的に用いられ、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、及び核酸類似体を含有するDNA(又はRNA)を含めたRNA及びDNAの両方を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有し得る。核酸は、二本鎖の場合もあり、一本鎖の場合もある(すなわち、センス鎖の場合もあり、アンチセンス鎖の場合もある)。ポリヌクレオチドの非限定的な例には、遺伝子、遺伝子断片、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、転移RNA、リボソームRNA、siRNA、マイクロRNA、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意配列の単離DNA、任意配列の単離RNA、核酸プローブ、及びプライマーのほか、核酸類似体が含まれる。20

【0025】

「薬学的に許容される塩」という用語は、塩の種類について特に限定しない。このような塩の例には、塩酸塩、硫酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、臭化水素酸塩、及びヨウ化水素酸塩などの無機酸付加塩；酢酸塩、マレイン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、及びトリフルオロ酢酸塩などの有機カルボン酸付加塩；メタンスルホン酸塩、ヒドロキシメタンスルホン酸塩、ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、及びタウリン塩などの有機スルホン酸付加塩；トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、プロカイン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、トリス(ヒドロキシメチルアミノ)メタン塩、及びフェネチルベンジルアミン塩などのアミン付加塩；並びにアルギニン塩、リシン塩、セリン塩、グリシン塩、アスパラギン酸塩、及びグルタミン酸塩などのアミノ酸付加塩が含まれるがこれらに限定されない。一実施形態では、薬学的に許容される塩は、メタンスルホン酸塩(「メシリ酸塩」)である。4-(3-クロロ-4-(シクロプロピルアミノカルボニル)アミノフェノキシ)-7-メトキシ-6-キノリンカルボキシアミドのメタンスルホン酸塩形態(すなわち、メシリ酸塩)は、参照によりその全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第7,612,208号において開示されている。3040

【0026】

本明細書では、「ポリペプチド」と「タンパク質」とが互換的に用いられ、長さ又は翻訳後修飾に関わらず、ペプチド結合された任意のアミノ酸鎖を意味する。典型的に、調製物中の全タンパク質のうちの重量で少なくとも60%、例えば、試料中の全タンパク質のうちの60%を構成する場合、本明細書で記載されるポリペプチドは「単離」されている。一部の実施形態では、本明細書で記載されるポリペプチドは、調製物中の全タンパク質のうちの重量で少なくとも75%、少なくとも90%、又は少なくとも99%からなる。50

**【 0 0 2 7 】**

「療法に反応する／療法に反応性の」という用語は、療法を投与される対象が、施される療法に対して肯定的な反応を示すことを意味する。このような肯定的な反応の非限定的な例は、腫瘍サイズの縮減、腫瘍転移の軽減、又は治療後における生存期間の延長である。

**【 0 0 2 8 】**

「対象」という用語は、ヒト、チンパンジー、オランウータン、ゴリラ、ヒヒ、サル、マウス、ラット、ブタ、ウマ、イヌ、及びウシが含まれるがこれらに限定されない哺乳動物を意味する。

**【 0 0 2 9 】**

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に対する反応性と関連する突然変異

N R A S、K R A S、V H L、又はB R A Fなど、特定の遺伝子における突然変異により、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシリ酸塩）を含む療法に対する対象の反応性が予測される。それぞれの遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列上のこのような突然変異の非限定的な例を、表1及び2に列挙する。

**【 0 0 3 0 】**

【表 1 - 1】

表 1: 突然変異バイオマーカー

遺伝子	突然変異	遺伝子	突然変異	遺伝子	突然変異	遺伝子	突然変異
BRAF	V600E	NRAS	Q61H	VHL	H115Y	VHL	P40S
BRAF	V600K	NRAS	G12C	VHL	Y175fs*27	VHL	E41V
BRAF	K601E	NRAS	G13R	VHL	R82P	VHL	E51Q
BRAF	V600R	NRAS	G12V	VHL	L158P	VHL	P95R
BRAF	D594G	NRAS	G13V	VHL	N90I	VHL	V62fs*68
BRAF	V600D	NRAS	G12A	VHL	T157fs*2	VHL	N131fs*28
BRAF	V600M	NRAS	G13C	VHL	D126G	VHL	N131fs*27
BRAF	G469A	NRAS	Q61P	VHL	L89R	VHL	V137fs*22
BRAF	V600A	NRAS	G13A	VHL	P86H	VHL	S139S
BRAF	V600G	NRAS	G12R	VHL	L135fs*24	VHL	P146fs*13
BRAF	G466V	NRAS	A18T	VHL	C162Y	VHL	V166G
BRAF	G469V	NRAS	Q61E	VHL	F148fs*11	VHL	D187_L188de_I
BRAF	V600_K601>E	NRAS	G60E	VHL	G144fs*14	VHL	L188Q
BRAF	L597S	NRAS	G13S	VHL	P61P	VHL	M1fs*20
BRAF	L597V	NRAS	G12G	VHL	F136fs*23	VHL	T157T
BRAF	G464E	NRAS	G13G	VHL	S168fs*2	VHL	S111S
BRAF	G464V	NRAS	Q61Q	VHL	D187fs*27	VHL	W88C
BRAF	D594N	NRAS	S65C	VHL	R107fs*52	VHL	D179fs*23
BRAF	F595L	NRAS	A11T	VHL	T133fs*26	VHL	N150fs*9
BRAF	L597Q	NRAS	T58I	VHL	W117*	VHL	V155fs*4
BRAF	A598_T599insV	NRAS	R68T	VHL	R177*	VHL	N150fs*9
BRAF	G469R	VHL	P81S	VHL	Q73*	VHL	N78S
BRAF	G469S	VHL	S68*	VHL	W88R	VHL	N174fs*28
BRAF	L597R	VHL	L89H	VHL	N141fs*3	VHL	N90fs*69
BRAF	G466E	VHL	F148fs*11	VHL	R161P	VHL	Y98F
BRAF	G469E	VHL	S65L	VHL	E189K	VHL	T124fs*35
BRAF	Y472S	VHL	R161*	VHL	I151T	VHL	V155fs*4
BRAF	T599I	VHL	S80R	VHL	Y98fs*61	VHL	V166D
BRAF	K601N	VHL	V130L	VHL	V137fs*7	VHL	Y175D
BRAF	K601del	VHL	L158V	VHL	F119L	VHL	N193fs*22
BRAF	A598V	VHL	S72fs*87	VHL	C162R	VHL	W88R
BRAF	T599_R603>I	VHL	S65*	VHL	Q164P	VHL	Y98*
BRAF	T599_V600>IAL	VHL	L158Q	VHL	A149fs*26	VHL	A122E
BRAF	Q612*	VHL	I151S	VHL	G144*	VHL	P146P
KRAS	G12D	VHL	Q96*	VHL	L128P	VHL	G104fs*23
KRAS	G12V	VHL	V62fs*5	VHL	S111N	VHL	D121G
KRAS	G13D	VHL	E70*	VHL	G114R	VHL	C162W
KRAS	G12C	VHL	L85P	VHL	S80N	VHL	R200W
KRAS	G12A	VHL	S183*	VHL	V155L	VHL	T157I
KRAS	G12S	VHL	G114C	VHL	N131fs*28	VHL	P86L
KRAS	G12R	VHL	H115N	VHL	R58fs*9	VHL	V142fs*17
KRAS	G13C	VHL	L169P	VHL	W117R	VHL	E160*
KRAS	Q61H	VHL	F76del	VHL	N78I	VHL	N78H
KRAS	G13S	VHL	A56fs*11	VHL	R108fs*51	VHL	V155M
KRAS	Q61L	VHL	A149fs*25	VHL	P172fs*30	VHL	V142fs*17
KRAS	G13R	VHL	E160K	VHL	E10G	VHL	L101P
KRAS	Q61R	VHL	Q132*	VHL	E12K	VHL	P154L
KRAS	A146T	VHL	Q195*	VHL	L153fs*6	VHL	I151N
KRAS	G12F	VHL	P172fs*30	VHL	L101L	VHL	F136V

10

20

30

40

【表 1 - 2】

KRAS	G13V	VHL	L153P	VHL	V87_W88del	VHL	N131fs*2
KRAS	G13A	VHL	Y175fs*27	VHL	L128R	VHL	P86S
KRAS	Q61K	VHL	Q164*	VHL	M1I	VHL	S111G
KRAS	L19F	VHL	G144fs*15	VHL	G39S	VHL	I151M
KRAS	Q61P	VHL	L128fs*31	VHL	E134*	VHL	Y185*
KRAS	G13G	VHL	V74D	VHL	K171N	VHL	R182R
KRAS	Q61E	VHL	Y175*	VHL	P138R	VHL	P59fs*8
KRAS	A146V	VHL	L184P	VHL	G114S	VHL	L169L
KRAS	V14I	VHL	N78K	VHL	G104fs*55	VHL	E186*
KRAS	A59T	VHL	P99fs*60	VHL	G104fs*55	VHL	C162F
KRAS	G12G	VHL	R167Q	VHL	W117*	VHL	L188P
KRAS	G12N	VHL	I180N	VHL	G104fs*55	VHL	K196fs*18
KRAS	K117N	VHL	W88*	VHL	L163fs*7	VHL	N131K
KRAS	G10_A11insG	VHL	Y156fs*3	VHL	I180fs*22	VHL	S68P
KRAS	G12L	VHL	L135fs*24	VHL	P81fs*78	VHL	I109N
KRAS	Q22K	VHL	Y185fs*17	VHL	D121E	VHL	R113*
NRAS	Q61R	VHL	R167W	VHL	S139fs*20	VHL	S65W
NRAS	Q61K	VHL	L118P	VHL	N141fs*18	VHL	D121Y
NRAS	G12D	VHL	C77*	VHL	R167fs*3	VHL	E160fs*10
NRAS	G13D	VHL	Y98*	VHL	H115fs*44		
NRAS	Q61L	VHL	L89P	VHL	S65fs*2		
NRAS	G12S	VHL	L163P	VHL	S38F		

選択された突然変異への注記 : V 6 0 0 \_ K 6 0 1 > E = アミノ酸 V K が E で置換されており ;

A 5 9 8 \_ T 5 9 9 i n s V = A 5 9 8 と T 5 9 9との間への V の挿入であり ;

K 6 0 1 d e l = K 6 0 1 の欠失であり ;

Q 6 1 2 \* = Q 6 1 2 の終止コドンへの置換であり ;

F 1 4 8 f s \* 1 1 = F 1 4 8 において生じたフレームシフト及び 1 1 アミノ酸下流に出現する終止コドンである。

10

【0031】

【表 2】

表2:さらなる突然変異バイオマーカー

遺伝子	突然変異	遺伝子	突然変異	遺伝子	突然変異	遺伝子	突然変異
BRAF	D594V	BRAF	V600R	KRAS	G12C	NRAS	G12V
BRAF	D594G	BRAF	V600L	KRAS	G12D	NRAS	G12A
BRAF	F468C	BRAF	D587A	KRAS	G12F	NRAS	G12D
BRAF	F595L	BRAF	D587E	KRAS	G12R	NRAS	G13C
BRAF	G464R	BRAF	D594E	KRAS	G12S	NRAS	G13R
BRAF	G464V	BRAF	E586K	KRAS	G12V	NRAS	G13S
BRAF	G464E	BRAF	F595S	KRAS	G13V	NRAS	G13V
BRAF	G466R	BRAF	G466V	KRAS	G13D	NRAS	G13A
BRAF	G469S	BRAF	G469A	KRAS	Q61E	NRAS	G13D
BRAF	G469E	BRAF	I592M	KRAS	Q61K	NRAS	Q61E
BRAF	G469A	BRAF	I592V	KRAS	Q61H	NRAS	Q61K
BRAF	G469V	BRAF	K601del	KRAS	Q61L	NRAS	Q61H
BRAF	G469R	BRAF	N581S	KRAS	Q61R	NRAS	Q61L
BRAF	G596R	BRAF	R444W	KRAS	Q61P	NRAS	Q61P
BRAF	K601E	BRAF	S605F	KRAS	A146T	NRAS	A18T
BRAF	K601N	BRAF	S605N	KRAS	G13A	VHL	F148fs*11
BRAF	L597Q	BRAF	T599_V600instT	KRAS	G13R	VHL	L158Q
BRAF	L597V	BRAF	V471F	KRAS	L19F	VHL	L85P
BRAF	L597S	BRAF	V600A	KRAS	Q22K	VHL	L89H
BRAF	L597R	BRAF	V600D	NRAS	A18T	VHL	P81S
BRAF	T599I	BRAF	V600M	NRAS	G12C	VHL	R161*
BRAF	V600E	KRAS	A59T	NRAS	G12R	VHL	R167W
BRAF	V600K	KRAS	G12A	NRAS	G12S		

30

【0032】

表 1 及び / 又は表 2 に列挙される突然変異のうちの任意の 1 つ又は複数が対象において存在することにより、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レン

50

バチニブメシル酸塩)を含む療法に反応することが予測される。本明細書では、簡略のため、表1及び表2に由来する、本発明において用いるのに適するあらゆる可能な突然変異の組合せが明示的に列挙されるわけではない。にもかかわらず、あらゆるこのような組合せが考慮され、本発明の範囲内にあることを理解されたい。対象は、単一の突然変異(例えば、NRAS Q61P)を有する場合もあり、同じ遺伝子における複数の突然変異(例えば、NRAS G12D及びNRAS Q61R)を有する場合もあり;複数の遺伝子における単一の突然変異を有する場合もあり(例えば、BRAF V600E、NRAS Q61R、KRAS G12R、及びVHL P81S);複数の遺伝子における複数の突然変異(例えば、NRAS G12D、NRAS Q61P、KRAS G12R、及びKRAS Q61R)を有する場合もあり;特定の遺伝子における単一の突然変異と他の遺伝子における複数の突然変異との組合せ(例えば、BRAF V600E; NRAS Q61P、NRAS G13V; KRAS G12R、KRAS Q61R; 及びVHL P81S)を有する場合もある。表1又は表2に列挙される1つの突然変異だけでも、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法に対する反応性を予測するのに有用である。特定の実施形態では、(1つ又は複数の)突然変異は、NRASに存在する。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法に対する反応性を予測するNRASにおける突然変異の非限定的な例は、NRAS Q61P及びNRAS Q61Rである。他の実施形態では、(1つ又は複数の)突然変異は、NRAS及び/又はKRASに存在する。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法に対する反応性を予測するKRASにおける突然変異の非限定的な例は、KRAS G12R及びKRAS Q61Rである。他の実施形態では、(1つ又は複数の)突然変異は、NRAS及び/又はKRAS及び/又はVHLに存在する。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法に対する反応性を予測するVHLにおける突然変異の非限定的な例は、P81Sである。さらに他の実施形態では、(1つ又は複数の)突然変異は、NRAS及び/又はKRAS及び/又はBRAFに存在する。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法に対する反応性を予測するBRAFにおける突然変異の非限定的な例は、BRAF V600Eである。他の実施形態では、(1つ又は複数の)突然変異は、NRAS及び/又はKRAS及び/又はBRAF及び/又はVHLに存在する。

#### 【0033】

また、NRAS、KRAS、VHL、及び/若しくはBRAF以外の遺伝子、又はこれらに加えた遺伝子における1つ又は複数の突然変異によっても、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法に対する反応性を予測することができる。このような遺伝子の非限定的な例には、ERBB2、PTEN、及びMETが含まれる。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法に対する反応性を予測し得る遺伝子における突然変異の非限定的な例には、ERBB2 S779\_P780insVGS、PTEN N323fs\*2、及びMET T1010I.T992Iが含まれる。

#### 【0034】

一実施形態では、対象は、甲状腺癌(例えば、甲状腺乳頭癌又は甲状腺濾胞癌などの分化型甲状腺癌)を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性を示す。別の実施形態では、対象は、腎臓癌(例えば、腎細胞癌)を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性を示す。

#### 【0035】

対象から得られた生物学的試料から単離される核酸は、表1及び/又は表2に列挙される突然変異のうちの1つ又は複数の存在について解析することができる。当技術分野では、核酸における突然変異を同定する方法がよく知られている。対象が、対象とする遺伝子のうちのいずれかにおいて突然変異を有するかどうかを評価する1つの方法は、実施例1で記載する方法、とりわけ、Sequenom製のオンコカルタ(Oncocarta)

10

20

30

40

50

(商標)突然変異パネルの使用である。対象とする遺伝子又は核酸が突然変異を含有するかどうかを決定する他の非限定的な方法には、サンガー配列決定法(鎖終結法)、大規模並列処理特徴配列決定法(MPSS)、ポロニー配列決定法、454パイロシークエンス法、イルミナシークエンス法、SOLiD配列決定法、イオン半導体配列決定法、DNAナノポール配列決定法、並びに電気化学アレイチップ及びフェロセン化ナフタレンジイミド(FND)を使用する同時多重突然変異検出(SMMMD)システム(Wakaiら、Nucleic Acids Res.、32(18):e141(2004)を参照されたい)が含まれる。

#### 【0036】

また、対象とするタンパク質を対象に由来する生物学的試料から単離し、上記で開示した突然変異など、突然変異の存在について解析することもできる。当技術分野では、タンパク質を配列決定する方法がよく知られている。このような方法の非限定的な例には、質量分析及びエドマン分解反応が含まれる。タンパク質の配列決定は、全タンパク質解析又は酵素的に生成させたペプチドの質量分析による解析のいずれかの形態で実行することができる(Chait, Science. 314(5796):65~6(2006)を参照されたい)。衝突誘起解離(CID)(4)などのタンデム質量分析(MS/MS)は、タンパク質又はペプチドを配列決定する重要な技法である。この方法では、イオン供給源を介して発生させた気相のペプチド/タンパク質イオンが、希ガス原子との多発的衝突により内部加熱される。これにより、C-N結合によるペプチド骨格のフラグメント化がもたらされる結果として、一連のフラグメントイオンが発生する。配列情報は、一連のフラグメントイオンから読み取ることができる。

10

#### 【0037】

解析のための核酸又はタンパク質を得るために用いられる生物学的試料には、血液試料、血漿試料、血清試料、循環腫瘍細胞、循環DNA、尿試料、甲状腺組織試料、甲状腺結節試料、腎臓組織試料、又は腫瘍試料が含まれるがこれらに限定されない。

20

#### 【0038】

#### レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に対する反応性についてのバイオマーカーとしてのサイログロブリン

上記の突然変異バイオマーカーに加えて、サイログロブリンもまた、有効なバイオマーカーとして用いることができる。サイログロブリンは、甲状腺コロイドにおいて見出される主要なタンパク質であり、甲状腺ホルモンのプロホルモン及び貯蔵部位の両方としての甲状腺の生理、機能にとっての中心である。サイログロブリンの発現レベルを用いて、対象(例えば、分化型甲状腺癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象)が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法に反応する可能性が高いのか、その可能性がそれほど高くないのかを決定することができる。加えて、サイログロブリンの発現レベルはまた、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法を既に投与されている対象に療法を継続させるのか、療法を終了させるのかを評価する(access又はevaluate)ためにも用いることができる。

30

#### 【0039】

対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に対して有効に反応するかどうかを評価するか、又はこの療法による継続治療を評価するために、以下の方法を使用することができる。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)の投与前及び投与後のいずれにおいても、対象から生物学的試料(例えば、血液試料、血清試料、又は血漿試料)を得る。2つの試料中のサイログロブリンの発現レベルの比(レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩の投与後におけるサイログロブリンの濃度/レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩の投与前におけるサイログロブリンの濃度)を計算する。被験対象に由来する試料の比が、対照の場合より小さければ、対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)に反応する可能性が高いと決定されるのに対し、被験対象に由来する試料の比が、対照

40

50

の比より大きいか又はこれとほぼ同じ（少なくとも 90 %であるが 100 %未満）であれば、対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）に反応する可能性がそれほど高くないと決定される。対象が治療に反応すると予測される場合は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩による療法を継続することが推奨される。上記のアッセイにおける「対照」という用語は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩による治療前及び治療後において、被験試料の供給源と同じ供給源（例えば、血液試料、血清試料、又は血漿試料）から得られた試料であって、被験試料と同じ時点又は実質的に同じ時点において、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療に反応しなかった（1つ又は複数の）対象である対照の（1つ又は複数の）対象から採取された試料を意味する。「対照」という用語は、過去に（療法による治療前及び治療後に）得られ、治療反応性が予測される対象から採取される被験試料との将来の比較のための基準として用いられる試料を包含する。例えば、「対照」は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療に反応しなかった1例又は複数例の対象の、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療前及び治療後におけるサイログロブリン発現を解析することによりあらかじめ確立することができる。次いで、このあらかじめ確立された基準比（療法に反応しなかった複数の対象から測定された平均の比の場合もあり、中央値の比の場合もある）を、被験試料と比較される「対照」比として用いることができる。10

## 【0040】

或いは、「対照」は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療に反応した1例又は複数例の対象におけるサイログロブリン発現を解析することによりあらかじめ確立することもできる。次いで、このあらかじめ確立された基準比（療法に反応した複数の対象から測定された平均の比の場合もあり、中央値の比の場合もある）を、被験試料と比較される「対照」比として用いることができる。このような比較では、サイログロブリンレベルの比が、あらかじめ確立された基準比と同等であるか又はこれより小さければ、例えば、これより小さいか、これと同じであるか、又はこれとほぼ同じ（少なくとも 90 %であるが 100 %未満）であれば、対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に反応することが予測される。20

## 【0041】

上記の方法では、第1の生物学的試料を、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療前の任意の時点において採取することができる。例えば、第1の生物学的試料は、療法を開始する数分間、数時間、数日間、数週間、又は数ヶ月前に採取することもでき、療法の開始と実質的に同時に採取することもできる。また、第2の生物学的試料も、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療を開始した後の任意の時点において対象から採取することができる。例えば、第2の生物学的試料は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩による治療の数分間、数時間、数日間、数週間、又は数ヶ月後に採取することができる。第2の生物学的試料を採取する時点の非限定的な例には、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩による治療を開始して1週間～9ヶ月、2週間～9ヶ月、3週間～9ヶ月後、4週間～9ヶ月後、1日～2週間後、2日～2週間後、3日～2週間後、4日～2週間後、5日～2週間後、6日～2週間後、1週間～2週間後、1週間～3週間後、1週間～4週間後、及び1週間～5週間後が含まれる。30

## 【0042】

サイログロブリンレベルは、mRNAレベル又はタンパク質レベルを測定することにより決定することができる。当技術分野では、mRNA及びタンパク質レベルを測定する方法がよく知られている（例えば、Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T編（1989）、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版（Woodbury, NY: Cold Spring

ng Harbor Laboratory Press; 「Real-time PC R applications guide」、Bio-Rad Bulletin 5279 (型番: 170-9799) を参照されたい)。

#### 【0043】

特定の実施形態では、対象は、療法による治療後において部分寛解を示す場合に、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）に反応することが決定される。「部分寛解」とは、ベースライン最長径（LD）和を基準として、標的病変のLD和の少なくとも30%の減少を意味する。一部の実施形態では、対象は、療法による治療後において腫瘍退縮を示す場合に、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）に反応することが決定される。「腫瘍退縮」（TS）とは、ベースライン直径和を基準として、標的病変の直径和の百分率変化を意味する。他の実施形態では、対象は、無増悪生存を示す場合に、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）に反応することが決定される。「無増悪生存」（PFS）とは、治療の開始日から疾患の進行（PD）状態に入る前の最終日までの期間を指す。PDとは、治療を開始してから記録された最小のLD和、又は1つ若しくは複数の新たな病変が出現してから記録された最小のLD和を基準として、標的病変のLD和の少なくとも20%の増大を意味する。10

#### 【0044】

治療後におけるサイログロプリンレベルの治療前のレベルからの、対照（例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に対して反応しない対象から得られた、治療前及び治療後における試料）と比較した大幅な低下により、分化型甲状腺癌患者における、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法による部分寛解が予測される。20

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法による治療の約28日（例えば、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34日）後におけるサイログロプリンレベルの低下により、分化型甲状腺癌患者における無増悪生存が予測される。

#### 【0045】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法による治療の約56日後、約84日後、約112日後、及び約140日後におけるサイログロプリンレベルの低下により、分化型甲状腺癌患者における腫瘍退縮が予測される。30

#### 【0046】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に対する反応性についてのバイオマーカーとしてのサイトカイン、ケモカイン、及び血管新生因子

それらの発現レベル（例えば、mRNA又はタンパク質の発現レベル）がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する対象の反応性を予測するのに有用な、多数の遺伝子が同定されている。Gene ID、関連するURL、タンパク質ID、及びUniProtKB受託番号により同定されるこれらの遺伝子を表3に列挙する。40

#### 【0047】

【表3-1】

表3: 血中バイオマーカーの一覧

公式の遺伝子記号	遺伝子ID	URL	代替記号*	UniProtKB受託番号
ANGPT1	284	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/284">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/284</a>	Ang-1/Ang1 Ang-2/ANG-2/Ang2/ANG2 (90)/ANG290	Q5HYA0
ANGPT2	285	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/285">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/285</a>		O15123
CCL11	6356	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6356">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6356</a>	エオタキシン	P51671
FGF2	2247	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2247">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2247</a>	FGF-2/FGF2(79)/FGF279	P09038
FGF23	8074	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8074">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8074</a>	FGF-23	Q9GZV9
FGF4	2249	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2249">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2249</a>	FGF4 (75)/FGF475	P08620
CSF2	1437	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1437">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1437</a>	GM-CSF/GMCSF	P04141
IFNG	3458	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3458">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3458</a>	IFN- $\gamma$ /IFN- $\gamma$	P01579
IL10	3586	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586</a>	IL-10	P22301
IL12A (p35)	3592	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3592">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3592</a>	IL12A	P29459
IL12B (p40)	3593	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3593">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3593</a>	IL12B/IL12(p40)/IL-12(p40)	P29460
IL13	3596	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3596">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3596</a>	IL-13	P35225
IL17A	3605	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3605">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3605</a>	IL-17	Q16552
IL1A	3552	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3552">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3552</a>	IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\alpha$	P01583
IL1B	3553	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3553">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3553</a>	IL-1 $\beta$ /IL-1 $\beta$	P01584
IL2	3558	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3558">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3558</a>	IL-2	P60568
IL5	3567	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3567">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3567</a>	IL-5	P05113
IL6	3569	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569</a>	IL-6	P05231
IL8	3576	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3576">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3576</a>	IL-8	P10145
CXCL10	3627	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3627">www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3627</a>	IP-10	P02778

10

20

30

【表3 - 2】

CCL2	6347	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6347	MCP-1	P13500
CCL3	6348	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6348	MIP-1a/MIP1a/MIP-1 $\alpha$	P10147
CCL4	6351	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6351	MIP-1b/MIP1b/MIP-1 $\beta$	P13236
CCL5	6352	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6352	RANTES	P13501
CD40LG	959	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/959	sCD40L	P29965
CXCL12	6387	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6387	SDF-1a/SDF1a	P48061
KDR	3791	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3791	sVEGFR2	P35968
TEK	7010	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7010	Tie-2	Q02763
TNF	7124	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124	TNF $\alpha$ /TNF- $\alpha$	P01375
FIGF	2277	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2277	VEGFD (78)	O43915
EGF	1950	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1950	EGF (80)	P01133
FLT3LG	2323	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2323	FLT3 LG (89)	P49771
CSF3	1440	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1440	G-CSF/GCSF	P09919
HGF	3082	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3082	HGF (86)	P14210
IL15	3600	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3600	IL-15	P40933
IL1RN	3557	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3557	IL-1ra	P18510
IL4	3565	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3565	IL-4	P05112
IL7	3574	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3574	IL-7	P13232
PDGFA	5154	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5154	PDGFA	P04085
PDGFB	5155	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5155	PDGFB	P01127
PGF	5228	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5228	PGF (91)	P49763
FLT1	2321	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2321	sVEGFR1	P17948
FLT4	2324	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2324	sVEGFR3	P35916
TGFA	7039	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7039	TGF $\alpha$ /TGF- $\alpha$	P01135
VEGFA	7422	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422	VEGF/VEGFA (100)/VEGFA100	P15692

\*他の代替記号

PDGF-AA(代替記号:PDGFAA);PDGFAのホモ二量体

PDGF-AB(代替記号:PDGFAB);PDGFAとPDGFBとのヘテロ二量体

PDGF-BB(代替記号:PDGFBB);PDGFBのホモ二量体

IL-12p70:IL12A(p35)とIL12B(p40)とのヘテロ二量体

【0048】

表3に列挙される特定の遺伝子の発現（例えば、mRNA又はタンパク質の発現）レベルが低ければ（対照と比較して）、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシリル酸塩）を含む療法に反応することが示される／予測される。例えば、療法による治療前の対象から得られた生物学的試料中のANGPT2、VEGFA、IFNG、及びKDRの濃度が低ければ（対照と比較して）、所与の対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシリル酸塩）を含む療法に反応することが予測される。ここで、「対照」という用語は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシリル酸塩）を含む療法に反応しないことが知られている対象から得られた試料（同じ組織に由来する）を包含する。「対照」という用語

10

20

30

40

50

はまた、過去において得られ、治療反応性が予測される対象から採取された被験試料に対する将来の比較のための基準として用いられる試料も包含する。例えば、特定の細胞型又は組織における特定の遺伝子の「対照」の発現レベルは、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療に反応しなかった1例又は複数例の対象における遺伝子発現を解析することによりあらかじめ確立することができる。次いで、このあらかじめ確立された基準値（療法に反応した複数の対象から測定された平均又は中央値の発現レベルであり得る）を、被験試料と比較される「対照」の発現レベルに用いることができる。或いは、特定の細胞型又は組織における特定の遺伝子の「対照」の発現レベルは、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療に反応した1例又は複数例の対象における遺伝子発現を解析することによりあらかじめ確立することができる。次いで、このあらかじめ確立された基準値（療法に反応した複数の対象から測定された平均又は中央値の発現レベルであり得る）を、被験試料と比較される「対照」の発現レベルに用いることができる。このような比較では、解析される遺伝子の発現レベルが、あらかじめ確立された基準と同等であるか又はこれより低ければ、例えば、これより低いか、これと同じであるか、又はこれとほぼ同じ（少なくとも85%であるが100%未満）であれば、対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に反応することが予測される。10

#### 【0049】

表3に列挙される特定の遺伝子の発現（例えば、mRNA又はタンパク質の発現）レベルが高ければ（対照と比較して）、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に反応することが予測される。例えば、療法による治療前の対象から得られた生物学的試料中のPDGF-AB、FGF2、CSF3、IL6、IL13、FLT4、CCL3、及びCCL4の濃度が高ければ（対照と比較して）、所与の対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に反応することが予測される。ここで、「対照」という用語は、特定の細胞型又は組織における特定の遺伝子の「対照」の発現レベルが、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療に反応した1例又は複数例の対象における遺伝子発現を解析することによりあらかじめ確立することができる場合、解析される遺伝子の発現レベルが、あらかじめ確立された基準と同等であるか又はこれより高ければ、例えば、これより高いか、これと同じであるか、又はこれとほぼ同じ（少なくとも85%であるが100%未満）であれば、対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に反応することが予測されることを除き、上記の段落で記載した「対照」という用語と同一である。2030

#### 【0050】

また、短い期間にわたり対象にレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を投与して、投与される療法が対象に有効であるかどうかを決定すべきことも想定される。療法の有効性の決定は、治療後の異なる時点におけるこれらの対象から得られた生物学的試料中の特定の遺伝子の発現（例えば、mRNA又はタンパク質の発現）レベルに基づき行う。これらの遺伝子の発現レベルに基づき、対象が継続治療に反応するかどうかを予測することができる。したがって、これらの方法は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）の投与を継続することが妥当であるかどうかを評価する（assessing又はevaluating）のに有用である。例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5日～約18日後に、特定の遺伝子、例えば、ANGPT2及び/又はIL13の濃度が（対照と比較して）低ければ、レンバチニブ化合物による継続療法時に対象が有益な臨床転帰（例えば、腫瘍反応及び/又は腫瘍退縮）を示すことが予測される。同様にまた、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5日～約18日後に、特定4050

の遺伝子、例えば、IL 10 及び / 又は CXCL12 の濃度が（対照と比較して）高ければ、レンバチニブ化合物による継続療法時に対象が有益な臨床転帰（例えば、腫瘍反応及び / 又は腫瘍退縮）を示すことが予測される。

#### 【0051】

加えて、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5週間（例えば、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間）後において、特定の遺伝子、例えば、VEGFR、IL 6、及び / 又はPGFの濃度が（対照と比較して）低ければ、レンバチニブ化合物による継続療法時に対象が有益な臨床転帰（例えば、腫瘍反応及び / 又は腫瘍退縮）を示すことが予測される。また、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5週間（例えば、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間）後において、特定の遺伝子、例えば、CCL5 の濃度が（対照と比較して）高ければ、レンバチニブ化合物による継続療法時に対象が有益な臨床転帰（例えば、腫瘍反応及び / 又は腫瘍退縮）を示すことが予測される。10

#### 【0052】

また、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩による治療後における特定の遺伝子の発現（例えば、mRNA 又はタンパク質の発現）レベルを、治療前のレベルで除した比（対照と比較）も、レンバチニブ化合物による継続療法時に対象が有益な臨床転帰（例えば、最良総合効果、腫瘍退縮、無増悪生存）を示すかどうかを予測するのに有用である。例えば、特定の遺伝子、例えば、CCL5、FLT3LG、IL 12 (p40)、EGF、PDGF-BB、PDGF-AA、CSF3、FLT1、TEK、HGF、VEGFA、又はIL 6 の発現レベル比が対照と比較して低下していれば、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応することが示される。加えて、特定の遺伝子、例えば、CSF2、FIGF、IL1RN、CCL11、IL1A、TGFα、PGF、PDGF-AB、IL10、又はFGF2 の濃度比が対照と比較して上昇していれば、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応することが予測される。20

#### 【0053】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5日～約18日後における発現に基づく特定の遺伝子、例えば、CCL5、FLT3LG の発現レベルと、この療法の開始前における同じ遺伝子の発現レベルとの比が（対照と比較して）低下していれば、対象が無増悪生存を示すことが示される。30

#### 【0054】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5日～約18日後における発現に基づく特定の遺伝子、例えば、CSF3 又はFGF2 の発現レベルと、この療法の開始前における同じ遺伝子の発現レベルとの比が（対照と比較して）上昇していれば、対象が腫瘍反応を示すことが示される。

#### 【0055】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5日～約18日後における発現に基づく特定の遺伝子、例えば、CSF3、IL10、又はFGF2 の発現レベルと、この療法の開始前における同じ遺伝子の発現レベルとの比が（対照と比較して）上昇していれば、対象が腫瘍退縮を示すことが示される。40

#### 【0056】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5日～約18日後における発現に基づく特定の遺伝子、例えば、FIGF、IL1RN、PDGFAB、又はIL10 の発現レベルと、この療法の開始前における同じ遺伝子の発現レベルとの比が（対照と比較して）上昇していれば、対象が無増悪生存を示すことが示される。

#### 【0057】

50

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5週間（例えば、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間）後における発現に基づく特定の遺伝子、例えば、F L T 3 L G、I L 1 2、E G F、P D G F B B、P D G F A A、C S F 3、又はF L T 1 の発現レベルと、この療法の開始前における同じ遺伝子の発現レベルとの比が低下していれば、対象が無増悪生存を示すことが示される。

#### 【0058】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5週間（例えば、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間）後における発現に基づく特定の遺伝子、例えば、C C L 1 1 の発現レベルと、この療法の開始前ににおける同じ遺伝子の発現レベルとの比が上昇していれば、対象が腫瘍反応を呈示することが示される。10

#### 【0059】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5週間（例えば、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間）後における発現に基づく特定の遺伝子、例えば、I L 1 A 又はT G F A の発現レベルと、この療法の開始前における同じ遺伝子の発現レベルとの比が上昇していれば、対象が腫瘍退縮を呈示することが示される。

#### 【0060】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5週間（例えば、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間）後における発現に基づく特定の遺伝子、例えば、F L T 1、T E K、V E G F R、又はI L 6 の発現レベルと、この療法を開始して約5日～約18日後における同じ遺伝子の発現レベルとの比が低下していれば、対象が腫瘍退縮を呈示することが示される。20

#### 【0061】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5週間（例えば、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間）後における発現に基づく特定の遺伝子、例えば、T E K、H G F、又はV E G F R の発現レベルと、この療法を開始して約5日～約18日後における同じ遺伝子の発現レベルとの比が低下していれば、対象が最良総合効果を示すことが示される。30

#### 【0062】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を開始して約5週間（例えば、3週間、4週間、5週間、6週間、7週間）後における発現に基づく特定の遺伝子、例えば、P G F の発現レベルと、この療法を開始して約5日～約18日後における同じ遺伝子の発現レベルとの比が上昇していれば、対象が腫瘍退縮を呈示することが示されるのに対し、同じ条件下における、例えば、F G F 2 の比が上昇していれば、対象が腫瘍反応を呈示することが予測される。

#### 【0063】

上記で観察された無増悪生存は、例えば、4カ月間、5カ月間、6カ月間、7カ月間、8カ月間、9カ月間、10カ月間、11カ月間、12カ月間、13カ月間、14カ月間、15カ月間、16カ月間、17カ月間、18カ月間、19カ月間、20カ月間、21カ月間、22カ月間、23カ月間、又は24カ月間の場合もあり、約4カ月間、約5カ月間、約6カ月間、約7カ月間、約8カ月間、約9カ月間、約10カ月間、約11カ月間、約12カ月間、約13カ月間、約14カ月間、約15カ月間、約15カ月間、約17カ月間、約18カ月間、約19カ月間、約20カ月間、約21カ月間、約22カ月間、約23カ月間、又は約24カ月間の場合もある。40

#### 【0064】

比が上昇しているか低下しているかを決定する際は、対照と比較する。ここで、「対照」という用語は、被験試料の供給源と同じ供給源（例えば、血液試料、血清試料、又は血漿試料）から得られ、被験試料と同じ時点又は実質的に同じ時点において、レンバチニブ

又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療に対して反応しなかった（1つ又は複数の）対象から採取される試料を包含する。「対照」という用語は、過去において（療法による治療前及び治療後において）得られた試料であって、治療反応性が予測される対象から採取される被験試料との将来の比較のための基準として用いられる試料を包含する。例えば、「対照」は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療に反応しなかった1例又は複数例の対象における、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療前、及び治療後の対象とする遺伝子のあらかじめ確立された発現比であり得る。次いで、このあらかじめ確立された基準比（療法に反応しなかった複数の対象から測定された平均の比の場合もあり、中央値の比の場合もある）を、被験試料と比較される「対照」比として用いることができる。10

#### 【0065】

或いは、「対照」は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療に反応した1例又は複数例の対象における対象とする遺伝子の発現を解析することにより、あらかじめ確立することもできる。次いで、このあらかじめ確立された基準比（療法に反応した複数の対象から測定された平均の比の場合もあり、中央値の比の場合もある）を、被験試料と比較される「対照」比として用いることができる。このような比較では、遺伝子の発現レベル比が、あらかじめ確立された基準比と同等である、例えば、これと同じであるか、又はこれとほぼ同じ（少なくとも90%であるが100%未満）であれば、対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に反応することが予測される。20

#### 【0066】

##### 組合せ法

上記のバイオマーカーのうちのいずれかを組み合わせて評価して、対象がレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法の継続投与に反応するかどうか、又はこれから利益を得るかどうかを決定する。例えば、突然変異バイオマーカーのうちの任意の1つ又は複数を、サイログロブリンの発現比、及び／又はサイトカイン、ケモカイン、若しくは血管新生因子の発現レベル若しくは発現比、及び／又は組織学的解析と組み合わせて評価することができる。ある場合には、（1つ又は複数の）突然変異バイオマーカーを、組織学的解析と組み合わせて評価する。他の場合には、（1つ又は複数の）突然変異バイオマーカーを、サイログロブリンの発現比と組み合わせて評価する。ある場合には、（1つ又は複数の）突然変異バイオマーカーを、1つ又は複数のサイトカイン、ケモカイン、又は血管新生因子の発現レベル又は発現比と組み合わせて評価する。一実施形態では、N R A S の突然変異状態を、対象から得られた生物学的試料中で評価し、治療前のA N G P T 2 濃度と組み合わせて考慮する。別の実施形態では、N R A S 又はK R A S の突然変異状態を、対象から得られた生物学的試料中で評価し、治療前のA N G P T 2 濃度と組み合わせて考慮する。このような組合せによるバイオマーカー解析は、個別のバイオマーカーを研究するよりさらに明確な予測値をもたらし、例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する対象の反応性を予測するのに有用である。30

#### 【0067】

統計学的解析は、組み合わせて用いる場合、どのマーカーが個別のマーカーより良好に所望の臨床転帰と関連するのかを決定するのに用いることができる。本出願の実施例4では、このような解析の非限定的な例を呈示する。

#### 【0068】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法の開始前における（「治療前の」）V E G F A の発現レベルとA N G P T 2 の発現レベルとの組合せは、療法反応についての、これらの個別の血中バイオマーカーの各々より良好な予測因子であり得る。例えば、対象における治療前のV E G F A 及びA N G P T 2 の濃度が、以下の予測式：40

10

20

30

40

50

$(0.000261) \times (\text{Ang}2) + (0.00126) \times (\text{VEGFA100}) - (1.09) < -0.24$

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合（すなわち、値が -0.24 未満（例えば、-1.0）となる場合）、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を施された後でこれらの因子の濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰（例えば、無増悪生存）を示すと予測される（異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる）。別の例として述べると、対象における治療前の VEGFA、ANGPT2、及び GCSF の濃度が、以下の予測式：

$(0.000591) \times (\text{ANG290}) + (-0.0178) \times (\text{GCSF}) + (0.00142) \times (\text{VEGFA100}) - (-0.671) < 0.651$  10

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合（すなわち、値が 0.651 未満となる場合）、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を施された後で、治療前のこれらの因子の濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰（例えば、無増悪生存）を示すと予測される（異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる）。

#### 【0069】

さらなる例として述べると、対象における治療前の IL13 及び MIP1a の濃度が、以下の予測式：

$(-0.0459) \times (\text{IL13}) + (0.0459) \times (\text{MIP1a}) - (0.0395) < 0.268$  20

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合（すなわち、値が 0.268 未満となる場合）、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を施された後でこれらの因子の濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰（例えば、無増悪生存）を示すと予測される（異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる）。

#### 【0070】

さらなる例として述べると、対象における治療前の IL13、MIP1a、及び MIP1b の濃度が、以下の予測式：

$(-0.0353) \times (\text{IL13}) + (0.0713) \times (\text{MIP1a}) + (-0.0154) \times (\text{MIP1b}) - (0.188) < 0.222$  30

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合（すなわち、値が 0.222 未満となる場合）、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を施された後で、治療前のこれらの因子の濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰（例えば、無増悪生存）を示すと予測される（異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる）。

#### 【0071】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法の開始前における（「治療前の」） VEGFR の（1つ又は複数の）突然変異及び発現レベルと MIP1b の（1つ又は複数の）突然変異及び発現レベルとの組合せは、これらの個別の突然変異及び血中バイオマーカーの各々より良好な療法反応についての予測因子であり得る。例えば、対象に由来する試料が、NRAS における突然変異（例えば、表 1 又は 2 に列挙される突然変異のうちの 1 つ）を有し、対象における治療前の VEGFA 及び MIP1b の濃度が、以下の予測式：

$(-0.025) \times (\text{MIP1b}) + (-0.00616) \times (\text{VEGFA100}) + (3.32) \times D(\text{NRAS}, \text{WT}) - (-0.52) < 1.81$  40

（式中、関数 D(g, s) は、（1つ又は複数の）遺伝子の突然変異状態 g が状態 s であ

50

るときは1であり、gがsでないときは0である。状態は、「WT」(野生型)の場合もあり、「MU」(突然変異)の場合もある。複数遺伝子の場合、突然変異状態は、1つ又は複数の遺伝子が突然変異を有する場合は「MU」であり、「WT」は、全ての遺伝子が野生型である場合に限られる)

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合(すなわち、値が1.81未満(例えば、1.0)となる場合)、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法により、野生型NRASを有し、その治療前のVEGFA及びMIP1bの濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰(例えば、無増悪生存)を示すと予測される(異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる)。

10

#### 【0072】

別の例として述べると、対象に由来する試料が、NRASにおける突然変異(例えば、表1又は2に列挙される突然変異のうちの1つ)を有し、対象における治療前のVEGFA、MIP1b、及びsVEGFR3の濃度が、以下の予測式:

$$(-0.0494) \times (MIP1b) + (-0.000472) \times (sVEGFR3) + (-0.0119) \times (VEGFA100) + (4.66) \times D(NRAS, WT) - (-5.9) < 3.55$$

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合(すなわち、値が3.55未満(例えば、3.0)となる場合)、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法により、野生型NRASを有し、その治療前のVEGFA、MIP1b、及びsVEGFR3の濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰(例えば、無増悪生存)を示すと予測される(異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる)。

20

#### 【0073】

さらなる例として述べると、対象に由来する試料が、NRASにおける突然変異(例えば、表1又は2に列挙される突然変異のうちの1つ)を有し、対象における治療前のVEGFA、MIP1b、sVEGFR3、及びAng2の濃度が、以下の予測式:

$$(0.00148) \times (Ang2) + (-0.0606) \times (MIP1b) + (-0.00917) \times (sVEGFR3) + (-0.0177) \times (VEGFA100) + (6.58) \times D(NRAS, WT) - (-5.78) < 3.97$$

30

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合(すなわち、値が3.97未満(例えば、3.0)となる場合)、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法により、野生型NRASを有し、その治療前のVEGFA、MIP1b、sVEGFR3、及びAng2の濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰(例えば、無増悪生存)を示すと予測される(異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる)。

#### 【0074】

さらなる例として述べると、対象に由来する試料が、NRASにおける突然変異(例えば、表1又は2に列挙される突然変異のうちの1つ)を有し、対象における治療前のAng2の濃度が、以下の予測式:

$$(0.000751) \times (Ang2) + (2.69) \times D(NRAS, WT) - (3.92) < 0.716$$

40

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合(すなわち、値が0.716未満(例えば、0.5)となる場合)、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩(例えば、レンバチニブメシル酸塩)を含む療法により、野生型NRASを有し、その治療前のAng2の濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰(例えば、無増悪生存)を示すと予測される(異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる)。

#### 【0075】

50

さらなる例として述べると、対象に由来する試料が、N R A Sにおける突然変異（例えば、表1又は2に列挙される突然変異のうちの1つ）を有し、対象における治療前のA N G 2 ( 9 0 )の濃度が、以下の予測式：

$$( 0 . 0 0 0 9 7 2 ) \times ( A N G 2 9 0 ) + ( 2 . 7 5 ) \times D ( N R A S , W T ) - ( 2 . 9 6 ) < 0 . 6 3 3$$

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合（すなわち、値が0.633未満（例えば、0.5）となる場合）、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法により、野生型N R A Sを有し、その治療前のA N G 2 ( 9 0 )の濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰（例えば、無増悪生存）を示すと予測される（異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる）。 10

#### 【 0 0 7 6 】

別の例として述べると、対象に由来する試料が、N R A S又はK R A Sにおける突然変異（例えば、表1又は2に列挙される突然変異のうちの1つ）を有し、対象における治療前のA N G 2 ( 9 0 )の濃度が、以下の予測式：

$$( 0 . 0 0 0 8 6 9 ) \times ( A N G 2 9 0 ) + ( 2 . 1 6 ) \times D ( K R A S N R A S , W T ) - ( 2 . 2 4 ) < 0 . 5 0 8$$

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合（すなわち、値が0.508未満（例えば、0.4）となる場合）、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法により、野生型N R A S又は野生型K R A Sを有し、その治療前のA N G 2 ( 9 0 )の濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰（例えば、無増悪生存）を示すと予測される（異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる）。 20

#### 【 0 0 7 7 】

別の例として述べると、対象に由来する試料が、N R A S、K R A S、又はB R A Fにおける突然変異（例えば、表1又は2に列挙される突然変異のうちの1つ）を有し、対象における治療前のM I P 1 aの濃度が、以下の予測式：

$$( - 0 . 0 2 8 1 ) \times ( M I P 1 a ) + ( 2 . 1 9 ) \times D ( B R A F K R A S N R A S , W T ) - ( - 0 . 4 1 ) < - 0 . 0 3 4 8$$

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合（すなわち、値が-0.0348未満（例えば、-1.0）となる場合）、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法により、野生型N R A S又は野生型K R A S又は野生型B R A Fを有し、その治療前のM I P 1 aの濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰（例えば、無増悪生存）を示すと予測される（異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を異なる形で最適化させることができる）。 30

#### 【 0 0 7 8 】

別の例として述べると、対象に由来する試料が、N R A S、K R A S、又はB R A Fにおける突然変異（例えば、表1又は2に列挙される突然変異のうちの1つ）を有し、対象における治療前のI L 6、V E G F A、M I P 1 a、及びM I P 1 bの濃度が、以下の予測式：

$$( 0 . 1 2 6 ) \times ( I L 6 ) + ( - 0 . 1 9 3 ) \times ( M I P 1 a ) + ( - 0 . 0 7 7 5 ) \times ( M I P 1 b ) + ( - 0 . 0 5 1 4 ) \times ( V E G F A 1 0 0 ) + ( 7 . 9 4 ) \times D ( B R A F K R A S N R A S , W T ) - ( - 1 4 . 4 ) < 4 . 6 9$$

へと代入したときにこの式を成り立たせる場合（すなわち、値が4.69未満（例えば、3.0）となる場合）、この対象は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法により、野生型N R A S又は野生型K R A S又は野生型B R A Fを有し、その治療前のI L 6、V E G F A、M I P 1 a、及びM I P 1 bの濃度がこの式を満たさない対象より良好な臨床転帰（例えば、無増悪生存）を示すと予測される（異なる試料集団を解析する場合は、式中の傾き、切片、及びカットオフ値を 40

異なる形で最適化させることができる)。

#### 【0079】

##### 生物学的試料

本明細書で記載される方法に適する生物学的試料には、核酸(例えば、DNA又はmRNA)又はタンパク質など、対象とする解析物である生体分子を包含する、任意の生物学的流体、細胞、組織、又はこれらの画分が含まれる。生物学的試料は、例えば、対象(例えば、ヒトなどの哺乳動物)から得られた検体の場合もあり、このような対象に由来する場合もある。例えば、試料は、生検により得られる組織切片の場合もあり、組織培養物中に置くか、又はこれに適応させた細胞の場合もある。生物学的試料はまた、尿、血液、血漿、血清、唾液、精液、痰、脳脊髄液、涙液、又は粘液の場合もあり、基質(例えば、ガラス、ポリマー、紙)へと吸収させた試料などの生物学的流体の場合もある。生物学的試料にはまた、甲状腺組織試料、腎臓組織試料、腫瘍試料、循環腫瘍細胞、及び循環DNAも含まれ得る。具体的な実施形態では、生物学的試料は、腫瘍又は前癌性病変を含有することが疑われる対象の領域から得られた(1つ又は複数の)腫瘍細胞又は(1つ又は複数の)細胞である。例えば、生物学的試料は、甲状腺腫瘍試料の場合もあり、腎臓腫瘍試料の場合もある。所望の場合、生物学的試料は、特定の細胞型を含有する画分へとさらに画分化することができる。例えば、血液試料は、血清へと画分化することもでき、赤血球又は白血球(white blood cells(leukocytes))など、特定の血液細胞型を含有する画分へと画分化することもできる。所望の場合、試料は、組織試料と体液試料との組合せなど、対象に由来する試料の組合せであり得る。

10

20

#### 【0080】

生物学的試料は、対象、例えば、癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある対象から得ることができる。特定の実施形態では、対象は甲状腺癌を有する。一部の実施形態では、対象は分化型甲状腺癌(例えば、甲状腺乳頭癌、甲状腺濾胞癌)を有する。他の実施形態では、対象は甲状腺髄様癌を有する。特定の実施形態では、対象は腎臓癌を有する。一部の実施形態では、対象は腎細胞癌を有する。例示的な方法には、例えば、静脈切開手順、スワブ(例えば、口腔内スワブ)手順、又は微細針吸引生検手順が含まれるが、生物学的試料を得るために適する任意の方法を使用することができる。微細針吸引を施しやすい組織の非限定的な例には、リンパ節、肺、甲状腺、乳房、皮膚、及び肝臓が含まれる。試料はまた、例えば、顕微解剖(例えば、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)又はレーザーマイクロダイセクション(LMD))により収集することもできる。

30

#### 【0081】

当業者には、試料を得る方法及び/又はこれを保管する方法であって、試料中の分子(例えば、核酸又はタンパク質)の活性又は完全性を保全する方法がよく知られている。例えば、生物学的試料は、試料中の分子(例えば、核酸又はタンパク質)を変化から保全するか又は試料中の分子の変化を最小化する、ヌクレアーゼ阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、及びホスファターゼ阻害剤を含めた、適切な緩衝剤及び/又は阻害剤など、1つ又は複数のさらなる薬剤とさらに接触させることができる。このような阻害剤には、例えば、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、エチレングリコールビス(P-アミノエチルエーテル)N,N,N1,N1-テトラ酢酸(EGTA)などのキレート化剤、フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)、アプロチニン、ロイペプチド、アンチパインなどのプロテアーゼ阻害剤、及びリン酸、フッ化ナトリウム、バナジウム酸などのホスファターゼ阻害剤が含まれる。当業者には、分子を単離するのに適切な緩衝剤及び条件がよく知られており、例えば、特徴づけられる試料中の分子の種類に応じて変化させができる(例えば、Ausubelら、「Current Protocols in Molecular Biology」、(補遺47)、John Wiley & Sons、New York(1999); Harlow及びLane、「Antibody: A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988); Harlow及びLane、「Usin

40

50

g Antibody : A Laboratory Manual」、Cold Spring Harbor Press (1999) ; Tietz、「Textbook of Clinical Chemistry」、第3版、Burtis 及び Ashwood 編、W. B. Saunders、Philadelphia、(1999) を参照されたい)。また、試料を処理して、干渉物質を消失させるか又はこれらの存在を最小化することもできる。例えば、生物学的試料を画分化又は精製して、対象でない1つ又は複数の物質を除去することができる。生物学的試料を画分化又は精製する方法には、液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、サイズ除外クロマトグラフィー、又はアフィニティーコロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー法が含まれるがこれらに限定されない。

10

#### 【0082】

本明細書で記載される方法で用いられる試料は、多様な物理的状態に置くことができる。例えば、試料は、液体の場合もあり、固体の場合もあり、液体中に溶解させることもでき、懸濁させることもでき、エマルジョン又はゲル中に存在させることもでき、物質へと吸収させることもできる。

#### 【0083】

##### バイオマーカーの発現の評価

遺伝子の発現は、例えば、標的遺伝子のタンパク質又はmRNAへの発現として検出することができる。すなわち、遺伝子の存在又は発現レベル(量)は、遺伝子のmRNA若しくはタンパク質への発現を検出すること、及び/又はその発現レベルを測定することにより決定することができる。一部の実施形態では、遺伝子発現を、表3に示される遺伝子などの遺伝子によりコードされるタンパク質の活性として検出することができる。

20

#### 【0084】

遺伝子のmRNAへの発現レベルを検出及び/又は測定するのに適する多様な方法を使用することができる。例えば、mRNAの発現は、ノーザンプロット解析又はドットプロット解析、逆転写酵素PCR(RT-PCR; 例えば、定量的RT-PCR)、in situハイブリダイゼーション(例えば、定量的in situハイブリダイゼーション)、又は核酸アレイ(例えば、オリゴヌクレオチドアレイ又は遺伝子チップ)解析を用いて決定することができる。このような方法の詳細は、以下、及び、例えば、それらの各々の開示が参考によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、Sambrookら、「Molecular Cloning : A Laboratory Manual」、第2版、1、2、及び3巻、Cold Spring Harbor Laboratory Press : Cold Spring Harbor, New York, USA、1989年11月；Gibsonら(1999) Genome Res.、6(10) : 995～1001；並びにZhangら(2005) Environ. Sci. Technol.、39(8) : 2777～2785；米国特許出願公開第2004086915号；欧州特許出願公開第0543942号；及び米国特許第7,101,663号において記載されている。

30

#### 【0085】

一例では、全mRNAを生物学的試料から単離し、単離されたmRNAをアガロースゲル電気泳動にかけて、mRNAをサイズで分離することにより、生物学的試料中の1つ又は複数の個別のmRNA集団の存在又は量を決定することができる(例えば、Sambrookら(前出)及び米国特許第6,812,341号を参照されたい)。次いで、サイズで分離されたmRNAを、ニトロセルロース膜などの固体支持体に移す(例えば、拡散により)。次いで、対象とするmRNA配列と相補的な、1つ又は複数の検出可能に標識したポリヌクレオチドプローブであって、それらの対応するmRNA集団に結合し、したがって、これらを検出可能とするプローブを用いて、生物学的試料中の1つ又は複数のmRNA集団の存在又は量を決定することができる。検出可能な標識には、例えば、蛍光標識(例えば、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアニン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、アロフィコ

40

50

シアニン( A P C )、又はフィコエリトリン)、発光標識(例えば、ユーロピウム、テルビウム、Quantum Dot Corporation、Palo Alto、CA 製のキュードット( Q d o t )(商標)ナノ粒子)、放射性標識(例えば、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>35</sup>S、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、又は<sup>3</sup>H)、及び酵素標識(西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンステラーゼ)標識が含まれる。

#### 【 0 0 8 6 】

別の例では、核酸(又はオリゴヌクレオチド)アレイ(例えば、以下の「アレイ及びキット」の下に記載されているアレイ)を用いて、生物学的試料中の個別のm R N A(例えば、表3に示される1つ又は複数の遺伝子によりコードされるm R N A)集団の存在又は量を決定することができる。例えば、生物学的試料から単離されたm R N Aは、例えば、ランダムヘキサマー又はオリゴ( d T )プライマーを介する第1鎖の合成を伴うR T - P C Rを用いて増幅することができる。単位複製配列は、短いセグメントへと断片化することができる。R T - P C Rステップを用いて、単位複製配列を検出可能に標識することもできる、場合によって、単位複製配列を、R T - P C Rステップの後で検出可能に標識することもできる。例えば、検出可能な標識は、多様で適切な技法(例えば、S a m b r o o kら、前出を参照されたい)のうちのいずれかを用いて、単位複製配列に酵素的に(例えば、ニック翻訳又はT 4 ポリヌクレオチドキナーゼなどのキナーゼを介して)結合させることもでき、単位複製配列に化学的に結合させることもできる。次いで、検出可能に標識した単位複製配列を、各セットが対応する単位複製配列に特異的な(及びこれに結合することが可能な)ポリヌクレオチド(例えば、オリゴヌクレオチド)プローブのうちの1つ又は複数を含有し、各々が異なる単位複製配列に対応する多くのプローブセットを含有する複数のポリヌクレオチドプローブセットと接触させる。一般に、プローブセットは固体支持体へと結合させ、固体支持体上の各プローブセットの位置は、あらかじめ決定されている。検出可能に標識された単位複製配列のプローブセットの対応するプローブへの結合は、生物学的試料中の標的m R N Aの存在又は量を示す。核酸アレイを用いてm R N Aの発現を検出するさらなる方法は、例えば、それらの各々の開示が参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、米国特許第5,445,934号；同第6,027,880号；同第6,057,100号；同第6,156,501号；同第6,261,776号；及び同第6,576,424号において記載されている。

#### 【 0 0 8 7 】

検出可能な標識を検出及び/又は定量化する方法は、標識の性質に依存する。適切な酵素により触媒される反応産物(検出可能な標識が酵素である場合；上記を参照されたい)は、限定なしに述べると、蛍光反応産物、発光反応産物、又は放射性反応産物の場合もあり、可視光又は紫外光を吸収する場合もある。このような検出可能な標識を検出するのに適する検出器の例には、限定なしに述べると、X線フィルム、放射能力ウンター、シンチレーションカウンター、分光光度計、比色計、蛍光光度計、照度計、及び濃度計が含まれる。

#### 【 0 0 8 8 】

遺伝子の発現はまた、遺伝子によりコードされるタンパク質の発現を検出及び/又は測定することにより決定することもできる。当技術分野では、タンパク質の発現を決定する方法がよく知られている。一般に用いられる方法は、対象とする標的タンパク質に特異的な抗体の使用を伴う。例えば、タンパク質の発現を決定する方法には、ウェスタンプロット解析若しくはドットプロット解析、免疫組織化学(例えば、定量的免疫組織化学)、免疫細胞化学、酵素免疫測定アッセイ( E L I S A )、酵素免疫測定スポット法( E L I S P O T ; Coligan , J . E . ら編( 1995 )、「 Current Protocols in Immunology 」、W i l e y 、N e w Y o r k )、又は抗体アレイ解析(それらの各々の開示が参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる、例えば、米国特許出願公開第20030013208号及び同第2004171068号を参照されたい)が含まれるがこれらに限定されない。タンパク質の発現を検出する

10

20

30

40

50

上記の方法及びさらなる方法のうちの多くについてのさらなる記載は、例えば、Sambrookら(前出)において見出すことができる。

#### 【0089】

一例では、遺伝子のタンパク質への発現の存在又は量(例えば、表3に示される遺伝子)は、ウェスタンプロット法を用いて決定することができる。例えば、溶解物は、生物学的試料から調製する場合もあり、生物学的試料自体の場合もあり、レムリ緩衝液と接触させて、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にかけることもできる。次いで、サイズで分離された、SDS-PAGEにより分解されたタンパク質を、フィルター膜(例えば、ニトロセルロース)へと移し、対象とするタンパク質に特異的な、検出可能に標識された抗体を用いる免疫プロット法にかけた。結合した、検出可能に標識された抗体の存在又は量は、生物学的試料中のタンパク質の存在又は量を示す。  
10

#### 【0090】

別の例では、遺伝子(例えば、表3に示される遺伝子)のタンパク質への発現を検出及び/又は測定するのにイムノアッセイを用いることができる。上記の通り、検出を目的として、検出部分(例えば、蛍光剤又は酵素)を保有する抗体によりイムノアッセイを実施することができる。生物学的試料に由来するタンパク質は、固相マトリックス(例えば、マルチウェルアッセイプレート、ニトロセルロース、アガロース、セファロース、コード粒子、又は磁気ビーズ)へと直接結合させることもでき、特異的結合対の第1のメンバー(例えば、ビオチン又はストレプトアビシン)であって、特異的結合対の第2のメンバー(例えば、ストレプトアビシン又はビオチン)に結合すると固相マトリックスへと接合される第1のメンバーに結合させることもできる。このような固相マトリックスへの接合は、タンパク質を、検出抗体と接触させる前に、生物学的試料の他の干渉成分又は非関与成分から精製することを可能とし、また、その後の結合しなかった抗体の洗浄も可能とする。上記の通り、ここで、結合した、検出可能に標識された抗体の存在又は量は、生物学的試料中のタンパク質の存在又は量を示す。  
20

#### 【0091】

抗体の形態について特に制約はなく、本開示は、ポリクローナル抗体のほか、モノクローナル抗体も包含する。ウサギなどの動物を本発明のタンパク質で免疫化することにより得られる抗血清のほか、また、全てのクラスのポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体、ヒト抗体、及び遺伝子組換えにより生成させたヒト化抗体も包含される。  
30

#### 【0092】

完全タンパク質又はその部分ペプチドは、免疫化のための抗原として用いることができる。タンパク質の部分ペプチド、例えば、タンパク質のアミノ(N)末端断片及びカルボキシ(C)末端断片を施すことができる。

#### 【0093】

対象とするタンパク質又はその断片をコードする遺伝子を、既知の発現ベクターへと挿入し、標準的な方法を用いて、宿主細胞を本明細書で記載されるベクターで形質転換することにより、所望のタンパク質又はその断片を宿主細胞の外部又は内部から収集する。このタンパク質は、感作抗原として用いることができる。また、タンパク質を発現させる細胞、細胞溶解物、又は本発明の化学合成されたタンパク質も、感作抗原として用いることができる。  
40

#### 【0094】

感作抗原により免疫化される哺乳動物は制約されないが、細胞融合で用いられる親細胞との適合性を考慮することにより動物を選択することが好ましい。一般に、ネズミ目、ウサギ目、又はサル目に属する動物を用いる。用い得るネズミ目に属する動物の例には、例えば、マウス、ラット、及びハムスターが含まれる。用い得るウサギ目に属する動物の例には、例えば、ウサギが含まれる。用い得るサル目に属する動物の例には、例えば、サルが含まれる。用いられるサルの例には、狭鼻下目(旧世界ザル)、例えば、カニクイザル(Macaca fascicularis)、アカゲザル、マントヒヒ、及びチンパン  
50

ジーが含まれる。

**【0095】**

感作抗原で動物を免疫化するには、よく知られている方法を用いることができる。例えば、感作抗原を、哺乳動物へと腹腔内注射又は皮下注射する。とりわけ、感作抗原は、生理食塩液中、リン酸緩衝生理食塩液（P B S）中などで適切に希釈し、懸濁させ、所望の場合は、適量の一般的なアジュバント、例えば、フロイントの完全アジュバントと共に混合する。次いで、溶液を乳化させ、哺乳動物へと注射する。その後、フロイントの不完全アジュバントと共に適切に混合した感作抗原を、好ましくは4～21日ごとに複数回にわたり施す。動物を感作抗原で免疫化する場合はまた、適切な担体も用いることができる。免疫化の後、血清抗体レベルの上昇を、通常の方法により検出する。

10

**【0096】**

本開示のタンパク質に対するポリクローナル抗体は、以下の通りに調製することができる。所望の血清抗体レベルに達したことを検証した後で、抗原で感作した哺乳動物から血液を抜き取った。従来の方法を用いてこの血液から血清を単離する。ポリクローナル抗体を含有する血清は、ポリクローナル抗体として用いることもでき、必要に応じて、ポリクローナル抗体を含有する画分を血清からさらに単離することもできる。例えば、とりわけ本発明のタンパク質を認識する抗体の画分は、タンパク質が連結されるアフィニティーカラムを用いることにより調製することができる。次いで、免疫グロブリンG又はMを調製するために、プロテインAカラム又はプロテインGカラムを用いることによりこの画分をさらに精製する。

20

**【0097】**

モノクローナル抗体を得るためにには、上記の抗原で感作した哺乳動物において所望の血清抗体レベルが達せられたことを検証した後で、この哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に用いる。この目的では、脾臓細胞が好ましい免疫細胞であることができる。上記の免疫細胞と融合させる親細胞としては、哺乳動物の骨髄腫細胞を用いることが好ましい。より好まくは、薬剤により融合細胞を識別するのに用い得る特色を獲得した骨髄腫細胞を親細胞として用いる。

**【0098】**

上記の免疫細胞と骨髄腫細胞との細胞融合は、既知の方法、例えば、M i l s t e i nら（G a l f r e ら、M e t h o d s E n z y m o l . 7 3 : 3 ~ 4 6 , 1 9 8 1 ）による方法に従い実施することができる。

30

**【0099】**

細胞融合から得られたハイブリドーマは、標準的な選択培地、例えば、H A T 培養培地（ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジンを含有する培地）中で細胞を培養することにより選択する。このH A T 培地中の培養は、目的のハイブリドーマ以外の細胞（融合しなかった細胞）が死滅するのに十分な期間、通常は数日～数週間にわたり継続する。次いで、通常の限界希釈法を実行し、目的の抗体をもたらすハイブリドーマをスクリーニング及びクローニングする。

**【0100】**

ヒト以外の動物を抗原で免疫化することによりハイブリドーマを得る上記の方法以外に、ヒトリンパ球を感作し、例えば、i n v i t r o において、ヒトリンパ球をE Bウイルス、タンパク質、タンパク質を発現させる細胞、又はこれらの溶解物で感染させ、感作されたリンパ球を、恒久的な細胞分裂能を有する、ヒトに由来する骨髄腫細胞、例えば、U 2 6 6 細胞と融合させる方法によっても、タンパク質に結合する活性を有する目的のヒト抗体を生成させるハイブリドーマを得ることができる。

40

**【0101】**

ハイブリドーマをマウスの腹腔内に移植し、腹水を抽出することにより得られたモノクローナル抗体は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAカラム又はプロテインGカラム、D E A E イオン交換クロマトグラフィー、本開示のタンパク質が連結されたアフィニティーカラムなどにより精製することができる。

50

## 【0102】

モノクローナル抗体はまた、遺伝子操作法（例えば、Borrrebaeck C.A.K. 及び Larrick, J.W.、「THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES」、MACMILLAN PUBLISHERS LTDにより英国で刊行（1990）を参照されたい）を用いることにより生成させた組換え抗体としても得ることができる。コードDNAを、ハイブリドーマ又は抗体生成用感作リンパ球などの免疫細胞からクローニングし、適切なベクターへと組み込み、このベクターを宿主へと導入して抗体を生成させることにより、組換え抗体を生成させる。本開示は、このような組換え抗体も包摂する。

## 【0103】

1つ又は複数のバイオマーカーによりコードされるタンパク質に特異的な抗体又は抗体断片はまた、ファージディスプレイなど、*in vitro*における方法によっても生成させることができる。

## 【0104】

さらに、本開示の抗体は、本発明のバイオマーカーによりコードされるタンパク質に結合する限りにおいて、抗体断片の場合もあり、修飾抗体の場合もある。例えば、Fab、F(ab')2、Fv、又はH鎖によるFvとL鎖によるFvとをリンカーにより適切に連結した単鎖Fv(scFv) (Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879~5883、(1988))を抗体断片として施すことができる。とりわけ、抗体断片は、抗体を酵素、例えば、パパイン又はペプシンで処理することにより生成させる。或いは、抗体断片は、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターへと導入し、このベクターを適切な宿主細胞において発現させることによつて生成させることもできる（例えば、Coら、J. Immunol. 152: 2968~2976、1994；Betterら、Methods Enzymol. 178: 476~496、1989；Pluckthunら、Methods Enzymol. 178: 497~515、1989；Lamoyi、Methods Enzymol. 121: 652~663、1986；Rousseauxら、Methods Enzymol. 121: 663~669、1986；Birdら、Trends Biotechnol. 9: 132~137、1991を参照されたい）。

## 【0105】

抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)、蛍光物質、放射性物質、及び発光物質など、多様な分子へと結合させることができる。このような部分を抗体に結合する方法は既に確立されており、当技術分野で常套的である（例えば、米国特許第5,057,313号及び同第5,156,840号を参照されたい）。

## 【0106】

抗体の抗原結合活性をアッセイする方法の例には、例えば、吸光度の測定、酵素免疫測定アッセイ(ELISA)、酵素イムノアッセイ(EIA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、及び／又は免疫蛍光法が含まれる。例えば、ELISAを用いる場合は、本発明のバイオマーカーによりコードされるタンパク質を、本開示の抗体でコーティングしたプレートへと添加し、次いで、抗体試料、例えば、抗体生成細胞の培養物上清、又は精製された抗体を添加する。次いで、一次抗体を認識する二次抗体であって、アルカリホスファターゼ及びこのような酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベート及び洗浄し、p-ニトロフェニルホスフェートなどの酵素基質を添加した後で、吸光度を測定して、抗原結合活性を評価する。タンパク質、タンパク質断片、例えば、C末端を含む断片、又はN末端を含む断片を用いることができる。本発明の抗体の活性を評価するには、BIAcore(Pharmacia)を用いることができる。

## 【0107】

これらの方針を用いることにより、本発明の抗体と、本発明のタンパク質を含有することが推定される試料と接触させ、上述の抗体とタンパク質との間で形成される免疫複合体を検出又はアッセイすることにより、本発明のバイオマーカーによりコードされるタンパ

10

20

30

40

50

ク質を検出又はアッセイする。

**【0108】**

例えば、これらに限定されないが、安定的な同位元素で標識した内部基準物質と組み合わせた多重反応モニタリング（M R M）ベースの手法などの質量分析ベースの定量化アッセイ法は、タンパク質を定量的に測定するためのイムノアッセイの代替法である。これらの手法は、抗体の使用を要求せず、このため、解析は、費用効率的及び時間効率的な形で実施することができる（例えば、Addonaら、Nat. Biotechnol.、27：633～641、2009；Kuzykら、Mol. Cell Proteomics、8：1860～1877、2009；Paulovichら、Proteomics Clin. Appl.、2：1386～1402、2008を参照されたい）。加えて、M R Mは、優れたマルチプレックス処理能をもたらし、多数のタンパク質の同時並行的な定量化を可能とする。これらの方法の基本理論は、十分に確立されており、低分子の薬物代謝及び薬物動態解析で広く用いられている。10

**【0109】**

場合によって、遺伝子の発現（例えば、mRNA又はタンパク質の発現）を検出又は測定する方法は、複数試料の迅速な調製、処理、及び解析を可能とするフォーマットでも実施することができる。これは、例えば、マルチウェルアッセイプレート（例えば、96ウェル又は384ウェル）の場合もあり、アレイ（例えば、核酸チップ又はタンパク質チップ）の場合もある。多様な試薬の原液は、手作業で供給することもでき、ロボット操作で供給することもでき、その後の試料調製（例えば、RT - PCR、標識化、又は細胞の固定）、ピッティング、希釈、混合、分配、洗浄、インキュベート処理（例えば、ハイブリダイゼーション）、試料のリードアウト、データの収集（光学データ）、及び／又は解析（コンピュータ支援の画像解析）は、アッセイから発生したシグナルを検出することができる市販の解析ソフトウェア、ロボット装置、及び検出測定装置を用いてロボット操作で行うことができる。このような検出器の例には、分光光度計、照度計、蛍光光度計、及び放射性同位元素の崩壊を測定するデバイスが含まれるがこれらに限定されない。例示的なハイスクループレットの細胞ベースアッセイ（例えば、細胞における標的タンパク質の存在又はレベルを検出するアッセイ）では、アレイスキャン（Array Scan）（登録商標）VTI HCS Reader法、又はキネティックスキャン（Kinetic Scan）（登録商標）HCS Reader法（Cellomics Inc.、Pittsburgh、PA）を用い得る。20

**【0110】**

一部の実施形態では、2つの遺伝子、3つの遺伝子、4つの遺伝子、5つの遺伝子、6つの遺伝子、7つの遺伝子、8つの遺伝子、9つの遺伝子、10つの遺伝子、11つの遺伝子、12つの遺伝子、13つの遺伝子、14つの遺伝子、15つの遺伝子、16つの遺伝子、17つの遺伝子、18つの遺伝子、19つの遺伝子、20つの遺伝子、21つの遺伝子、22つの遺伝子、23つの遺伝子、少なくとも24つの遺伝子、少なくとも25以上の遺伝子、又は少なくとも2つの遺伝子、少なくとも3つの遺伝子、少なくとも4つの遺伝子、少なくとも5つの遺伝子、少なくとも6つの遺伝子、少なくとも7つの遺伝子、少なくとも8つの遺伝子、少なくとも9つの遺伝子、少なくとも10つの遺伝子、少なくとも11つの遺伝子、少なくとも12つの遺伝子、少なくとも13つの遺伝子、少なくとも14つの遺伝子、少なくとも15つの遺伝子、少なくとも16つの遺伝子、少なくとも17つの遺伝子、少なくとも18つの遺伝子、少なくとも19つの遺伝子、少なくとも20つの遺伝子、少なくとも21つの遺伝子、少なくとも22つの遺伝子、少なくとも23つの遺伝子、少なくとも24つの遺伝子、又は少なくとも25以上の遺伝子の発現レベルを評価及び／又は測定することができる。40

**【0111】**

表3に示される遺伝子のうちの1つ又は複数の存在又は発現レベルを検出する一助とするために、遺伝子の核酸配列の任意の部分を、例えば、ハイブリダイゼーション用のポリヌクレオチドプローブ又はポリヌクレオチドプライマー（例えば、增幅又は逆転写のための）として用いることができる。プローブ及びプライマーは、生物学的試料に由来するR50

N A、D N A、c D N A、又はこれらの断片に対する特異的なハイブリダイゼーションをもたらすのに十分な長さのオリゴヌクレオチドであり得る。特定の適用に応じて、ハイブリダイゼーション条件の変化を使用して、標的配列に対するプローブ又はプライマーの選択性の程度の変化を達成することができる。プライマー及びプローブは、検出を容易とする試薬（例えば、蛍光標識、化学標識（例えば、米国特許第4,582,789号及び同第4,563,417号を参照されたい）、又は塩基の修飾）で検出可能に標識することができる。

#### 【0112】

標準的なストリンジエンシーの条件は、S a m b r o o k ら（前出）及びH a y m e s ら、「N u c l e i c A c i d H y b r i d i z a t i o n , A P r a c t i c a l A p p r o a c h」、I R L P r e s s 、W a s h i n g t o n , D . C . ( 1 9 8 5 )により記載されている。核酸分子がプライマー又はプローブとして用いられるためには、使用される特定のハイブリダイゼーション条件（例えば、溶媒及び塩濃度）下において安定的な二本鎖構造を形成することを可能とするのに十分な程度に配列が相補的でありさえすればよい。

#### 【0113】

ハイブリダイゼーションを用いて、2つの核酸配列の間の相同性を評価することができる。本明細書で記載される核酸配列又はその断片は、標準的なハイブリダイゼーション法に従うハイブリダイゼーションプローブとして用いることができる。対象とするプローブ（例えば、本明細書で記載されるヌクレオチド配列又はその相補体の部分を含有するプローブ）の、被験供給源に由来するD N A、R N A、c D N A、又はこれらの断片とのハイブリダイゼーションは、プローブに対応するD N A又はR N Aが被験供給源に存在することの現れである。ハイブリダイゼーション条件は、当業者に知られており、「C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y」、J o h n W i l e y & S o n s 、N . Y . 、6 . 3 . 1 ~ 6 . 3 . 6 、1 9 9 1 において見出すことができる。中程度のハイブリダイゼーション条件は、2倍濃度の塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（S S C）中、30°でのハイブリダイゼーション後における、1倍濃度のS S C、0.1%のS D S中、50°での洗浄として規定される。高度に厳密な条件は、6倍濃度のS S C中、45°でのハイブリダイゼーション後における、0.2倍濃度のS S C、0.1%のS D S中、65°での洗浄として規定される。

#### 【0114】

プライマーは、多様なP C R型の方法において用いることができる。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）法を用いて、全ゲノムD N A又は全細胞内R N Aに由来する配列を含め、D N A及びR N Aに由来する特異的な配列を増幅することができる。P C Rプライマーは、増幅の対象となる領域を挟むようにデザインされる。プライマーは、増幅されるヌクレオチド配列内の、5'端近傍に位置する場合もあり、3'端近傍に位置する場合もあり、いずれかの場所に位置する場合もある。単位複製配列の長さは、実験目的により決定される。q P C Rでは、標的の長さが1 0 0 b pに近く、標準的なP C Rでは、標的の長さが5 0 0 b pほどである。一般に、対象とする領域の端部又はそれらを越えた領域に由来する配列情報を使用して、増幅される錆型の対向鎖と配列が同一であるか又は類似するオリゴヌクレオチドプライマーをデザインする。P C Rプライマーは、単一の核酸分子として化学合成することもでき（例えば、ホスホロアミダイト法を用いる、3' ~ 5'方向における自動式D N A合成を用いて）、一連のオリゴヌクレオチドとして化学合成することもできる。例えば、所望の配列を含有し、オリゴヌクレオチド対がアニールするときに二重鎖が形成されるように、各対が相補性の短い（例えば、約15ヌクレオチド）セグメントを含有する長鎖オリゴヌクレオチド（例えば、1 0 0 ヌクレオチド超）の1つ又は複数の対を合成することができる。D N Aポリメラーゼを用いてオリゴヌクレオチドを伸長させる結果として、オリゴヌクレオチド対1つ当たり1つずつの二本鎖核酸分子がもたらされる。

#### 【0115】

10

20

30

40

50

加えて、核酸配列又はこれらの断片（例えば、オリゴヌクレオチドプローブ）は、遺伝子発現を検出及び／又は定量化するための核酸アレイ（以下の「アレイ」の下に記載されている核酸アレイなど）においても用いることができる。

#### 【0116】

##### カットオフ値

上記で言及した通り、本明細書で記載される方法は、1つ又は複数の遺伝子（例えば、表3に示される1つ又は複数の遺伝子）の発現レベル（例えば、mRNA又はタンパク質の発現レベル）を評価するステップを伴うことが可能であり、遺伝子のうちの1つ又は複数の発現レベルにより、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する対象の反応が予測される。「評価すること」は、例えば、被験生物学的試料中の1つ又は複数の遺伝子の発現を、特定の（1つ又は複数の）対象とする遺伝子の既知の発現レベル又は対照の発現レベル（例えば、基準の生物学的試料中の発現レベル）と比較することを包含し得る。例えば、被験生物学的試料中の1つ又は複数の遺伝子の発現レベルは、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）に反応したか、又はこれに反応しなかった対象における対応する発現レベルと比較することもでき、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）に反応したか、又はこれに反応しなかった、同じ種の複数（例えば、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ、10、15、20、25、30、35、又は40以上）の対象の平均又は中央値の発現レベルと比較することもできる。評価することはまた、1つ又は複数の遺伝子（例えば、表3に示される1つ又は複数の遺伝子）の発現レベルが、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する対象の反応性を予測するものとしてあらかじめ決定された値の範囲内に収まるかどうかを決定することも包含し得る。一部の実施形態では、評価することが、1つ又は複数の遺伝子（例えば、表3に示される1つ又は複数の遺伝子）の発現が、あらかじめ決定されたカットオフ値を上回るのか、下回るのかを決定することの場合もあり、これを包含する場合もある。カットオフ値は典型的に、遺伝子の発現レベルであって、それを上回るか又は下回れば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する対象の反応性が予測されると考えられる遺伝子の発現レベルであるか、又はこの遺伝子の発現レベルの別の遺伝子の発現レベルとの比である。こうして、本明細書で記載される方法（及び組成物）に従い、遺伝子（例えば、表3に示される遺伝子）の基準発現レベルが、カットオフ値であって、それを上回るか又は下回れば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する反応性が予測されるカットオフ値として同定されている。一部のカットオフ値は、臨床的相関がカットオフのいずれの側の値の範囲にもわたってやはり有意性を維持し得る点で絶対的なものではないが、特定の試料種類の遺伝子の発現レベルに最適のカットオフ値を選択する（例えば、Hスコアを変化させながら）ことは可能である。本明細書で記載される方法において用いるために決定されるカットオフ値は、例えば、公表された発現レベルの範囲と比較し得るが、用いられる方法及び患者集団に対して個別化することもできる。最適のカットオフ値の改良は、用いられる統計学的方法の洗練、並びに異なる遺伝子及び試料種類の基準レベル値を決定するために用いられる試料の数及び供給源に応じて決定し得ることが理解される。したがって、確立されたカットオフ値は、定期的な再評価又は方法若しくは集団分布の変化に基づき、上方に調整することもでき、下方に調整することもできる。

#### 【0117】

1つ又は複数の遺伝子の基準発現レベルは、多様な方法により決定することができる。基準レベルは、例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に反応性であるか、又はレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に対して反応しない対象（例えば、患者）の集団における対象とする遺伝子の発現レベルを比較することにより決定することができる。これは、例えば、患者コホートの全体がグラフ表示されるヒストグラム解析であって、第1の軸が遺伝子の発現

10

20

30

40

50

レベルを表し、第2の軸がコホートにおける対象の数であり、その試料が所与の量において1つ又は複数の発現レベルを含有するコホートにおける対象の数を表すヒストグラム解析により達成することができる。次いで、これらの個別の群を最もよく識別する量に基づき、遺伝子の基準発現レベルを決定することができる。基準レベルは、あらゆる対象に同等に適用可能な单一の数の場合もあり、対象の特定の亜集団に応じて変化する場合もある。例えば、老齢の対象は、同じ代謝性障害について、若齢の対象とは異なる基準レベルを有し得る。加えて、疾患が進行した（例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療可能な疾患のより進行した形態を伴う）対象も、疾患の軽度の形態を伴う対象とは異なる基準値を有し得る。

## 【0118】

10

反応プロファイルの作成

本明細書で記載される方法はまた、レンバチニブ（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による療法に対する対象の反応プロファイルを作成するためにも用いることができる。プロファイルは、表1及び2に列挙される突然変異など、突然変異のうちの1つ又は複数が、対象に由来する試料中に存在するかどうかを示す情報；並びに／或いは1つ若しくは複数の遺伝子（例えば、表3に示される1つ又は複数の遺伝子）の発現レベル；及び／又は対象の試料（例えば、血漿、血清）中の、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩による治療後／治療前におけるサイログロブリンの発現比；及び／又は任意の腫瘍についての組織学的解析（例えば、甲状腺癌がFTCであるのか、PTCであるのか）を示す情報を包含し得る。レンバチニブ療法に対する反応プロファイルは、1つ若しくは複数のさらなる遺伝子及び／又は他のプロテオミクスによるマーカー、血清マーカー、若しくは臨床マーカーの発現レベルも包含し得る。本明細書で記載される反応プロファイルは、表3に列挙される少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10つ、少なくとも11つ、少なくとも12つ、少なくとも13つ、少なくとも14つ、少なくとも15つ、少なくとも16つ、少なくとも17つ、少なくとも18つ、少なくとも19つ、少なくとも20つ、少なくとも21つ、少なくとも22つ、少なくとも23つ、少なくとも24つ、又は少なくとも25つの遺伝子の発現又は発現レベルについての情報を有し得る。本明細書で記載される反応プロファイルはまた、以下の遺伝子：NRAS、KRAS、VHL、BRAF、ERBB2、PTEN、及びMETのうちの任意の1つ又は複数における突然変異（存在する場合）の存在、及びこれらにおける（1つ又は複数の）突然変異の性質についての情報を有する。結果として得られる情報（レンバチニブ療法に対する反応プロファイル）は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む治療に対する対象（例えば、ヒト患者）の反応を予測するのに用いることができる。加えて、例えば、障害の生理学的症状又は行動学的症状が明らかであろうとなからうと、遺伝子（例えば、表3に示される遺伝子のうちの1つ又は複数）のうちの1つ若しくは複数の発現レベル、突然変異、サイログロブリンレベル、及び／又は検討された組織学的データは、このような反応又は障害を示し得るので、反応プロファイルは、多様な療法及び／又は多様な疾患状態に対する対象の反応を予測するのにも用いることができる。

## 【0119】

40

レンバチニブ（例えば、レンバチニブメシル酸塩）に対する反応プロファイルは、電子形式（例えば、コンピュータ又は他の電子（DVD、CD、又はフロッピーディスクなど、コンピュータ読み取り可能な）媒体上に保存した患者の電子記録）の場合もあり、書面形式の場合もあることが理解される。レンバチニブ（例えば、レンバチニブメシル酸塩）に対する反応プロファイルはまた、複数例の（例えば、2例、3例、4例、5例、10例、20例、30例、50例、又は100例以上の）対象（例えば、ヒト患者）の情報を包含し得る。このような多重対象反応プロファイルは、例えば、対象コホートの特定の特徴についての解析（例えば、統計学的解析）において用いることができる。

## 【0120】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含

50

む療法に対する対象の反応性は、複数のやり方で分類することができ、分類は、対象の疾患（例えば、甲状腺癌、腎臓癌、又はレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法により治療可能な他の任意の疾患）、疾患の重症度、及び対象が投与される特定の薬物に依存する。最も単純な意味において、反応性とは、疾患状態の、治療前と比較した任意の軽減であり、非反応性とは、疾患状態の、治療前と比較した変化の欠如である。癌を伴う対象（例えば、ヒト）の反応性は、これらに限定されないが、腫瘍サイズ、臨床利益（C B）、全生存（O S）、無増悪生存（P F S）、疾患コントロール率（D C R）、反応までの時間（T T R）、腫瘍退縮（T S）、又は腫瘍反応（T R）などの目的となる多数の臨床指標のうちの1つ又は複数に基づき分類することができる。

10

#### 【0121】

「臨床利益」とは、以下の状態：完全寛解（C R）、部分寛解（P R）；又は6カ月以上の無増悪生存（P F S）を伴う疾患の安定（S D）のうちの1つを示すことを指す。「完全寛解」とは、全ての標的病変の完全消失を意味する。「部分寛解」とは、ベースライン最長径（L D）和を基準として、標的病変のL D和の少なくとも30%の減少を意味する。「疾患の進行」（P D）とは、治療を開始してから記録された最小のL D和、又は1つ若しくは複数の新たな病変が出現してから記録された最小のL D和を基準として、標的病変のL D和の少なくとも20%の増大を意味する。「疾患の安定」とは、治療を開始してからの最小のL D和を基準として、P Rと見なされる標的病変の十分な退縮でもなく、疾患の進行（P D）と見なされる十分な増大でもないことを意味する。

20

#### 【0122】

「全生存」（O S）とは、無作為化から任意の原因による死亡までの期間として定義される。「無作為化」とは、患者の療法計画を決定するときに患者を被験群又は対照群へと無作為化することを意味する。

「無増悪生存」（P F S）とは、治療の開始日からP D状態に入る前の最終日までの期間を指す。

「疾患コントロール率」（D C R）とは、7週間にわたるC R又はP R又はS Dとして定義される。

「反応までの時間」（T T R）とは、治療の開始日から奏効（C R又はP R）の基準が最初に満たされる日までの期間として定義される。

30

「腫瘍退縮」（T S）とは、ベースライン直径和を基準として、標的病変の直径和の百分率変化を意味する。

「腫瘍反応」（T R）は、「部分寛解」（P R）を示す対象を、疾患の安定（S D）又は疾患の進行（P D）を示す対象と比較する。

#### 【0123】

##### 治療法

本明細書で開示される方法は、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）に対する反応性についての対象の評価を可能とする。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）に反応する可能性が高い対象には、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を投与することができる。

40

#### 【0124】

本開示の方法はまた、対象の、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療から利益を得る可能性が高い対象群、及びレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療から利益を得る可能性がそれほど高くない対象群への分類も可能とする。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療について考慮されている対象のプールからこのような対象を選択する能力は、有効な治療に有益である。

#### 【0125】

本開示の方法はまた、短い期間にわたりこの療法を投与し、治療後における、又は治療

50

前と対比した治療後における、上記のバイオマーカーのうちの1つ又は複数の発現プロファイルに基づき、この療法が患者に利益をもたらす可能性は高いのか、その可能性はあまり高くないのかを決定した後で、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療を継続するのかどうかを決定するために用いることができる。

#### 【0126】

レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）は、血管新生を阻害することにより、多様な腫瘍の異種移植モデルにおいて強力な抗腫瘍効果を示す。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による治療について考慮される対象には、甲状腺癌又は腎臓癌（例えば、腎細胞癌）を有するか、有することが疑われるか、又は発症する可能性が高い対象が含まれるがこれらに限定されない。10

#### 【0127】

一実施形態では、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療される対象は、甲状腺癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する可能性が高い。甲状腺癌とは、甲状腺内に位置する癌性の腫瘍又は増殖である。甲状腺癌は、最も一般的な内分泌癌であり、近年において発症率を増大させている少數の癌のうちの1つである。甲状腺癌は、小児から老齢者まで全ての年齢群において生じる。American Cancer Societyは、2010年に米国で約44,670例の甲状腺癌の新たな症例が認められたと推定している。これらの新たな症例のうち、約33,930例が女性であり、約10,740は男性であった。2010年には、約1,690名（女性960名及び男性730名）が甲状腺癌で死亡した。多くの患者、とりわけ、甲状腺癌の早期段階にある患者は、症状を感じない。しかし、癌が進行するにつれ、症状には、頸部前面におけるしこり又は結節、嘔声又は発話困難、リンパ節の腫脹、嚥下又は呼吸の困難、及び咽喉又は頸部における疼痛が含まれ得る。甲状腺癌には複数の種類：乳頭癌、濾胞癌、髄様癌、未分化癌、及び変異型がある。乳頭癌は、全ての甲状腺癌のうちの約85%を占める最も一般的な種類であり、通常出産年齢の女性が罹患する。乳頭癌は、ゆっくりと拡大し、危険性が最も小さい種類の甲状腺癌である。濾胞癌は、全症例のうちの約10%を占め、再発及び拡大する可能性が高い。髄様癌は、通常甲状腺内に存在する甲状腺以外の細胞による癌である。この甲状腺癌の形態は、家族において生じる傾向がある。髄様癌は、他の種類の甲状腺癌とは異なる治療を要求する。未分化癌（また、巨細胞紡錘形細胞癌とも称する）は、甲状腺癌の最も危険な形態である。未分化癌は、まれであり、放射性ヨウ素療法に反応しない。未分化癌は、急速に拡大し、気管（windpipe (trachea)）など、近傍の構造に浸潤し、呼吸困難を引き起こす。変異型には、高細胞型、島状型、円柱細胞型、及びヒュルトレ細胞型が含まれる。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を用いて、上記の甲状腺癌のうちのいずれかを有するか、有することが疑われるか、又は発症する可能性が高い対象を治療することができる。特定の実施形態では、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療される対象は、分化型甲状腺癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する可能性が高い。他の実施形態では、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療される対象は、甲状腺髄様癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する可能性が高い。一実施形態では、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療される対象は、甲状腺乳頭癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する可能性が高い。別の実施形態では、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療される対象は、甲状腺濾胞癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する可能性が高い。別の実施形態では、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療される対象は、甲状腺ヒュルトレ細胞癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する可能性が高い。304050

## 【0128】

一実施形態では、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療される対象は、腎臓癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する可能性が高い。腎臓癌は、通常腎臓に由来する癌として定義される。腎臓内のそれらの場所を反映する、2つの最も一般的な種類の腎臓癌は、腎細胞癌（RCC、また、副腎腫としても知られている）及び腎孟の尿路上皮細胞癌（UCC）である。他の、それほど一般的でない種類の腎臓癌には、扁平上皮細胞癌、傍糸球体細胞腫瘍（腎腫）、血管筋脂肪腫、腎好酸性顆粒細胞腫、ベリーニ管癌、腎明細胞肉腫、中胚葉性腎腫、ウィルムス腫瘍、及び上皮間質混合型腫瘍が含まれる。RCCとは、血液を濾過し、老廃物を除去する腎臓における極細管である、近位尿細管の内壁に由来する腎臓癌である。RCCとは、成人で最も一般的な種類の腎臓癌であり、症例の約80%を占めている。RCCはまた、全ての泌尿生殖器腫瘍のうちで最も致死的であることも知られている。初期治療は、根治的腎摘出術又は腎部分切除術であることが最も一般的であり、なおも根治治療の主柱である。腫瘍が腎実質に限定される場合、5年間の生存率は60～70%であるが、転移が拡大した場合、これは大幅に低下する。RCCは、放射線療法及び化学療法に対して抵抗性であるが、一部の症例は、免疫療法に反応する。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を用いて、上記の腎臓癌のうちのいずれかを有するか、有することが疑われるか、又は発症する可能性が高い対象を治療することができる。特定の実施形態では、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療される対象は、腎細胞癌を有するか、有することが疑われるか、又は発症する可能性が高い。

## 【0129】

対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応する可能性が高ければ（突然変異性バイオマーカーの存在及び／又は上記のバイオマーカーの発現レベル／比に基づき）、有効量のレンバチニブ化合物（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を対象に投与することができる。化合物の有効量は、例えば、患者の特徴（年齢、性別、体重、人種など）、疾患の進行、及び既往の薬物への曝露を考慮に入れる医療ケア従事者により適切に決定され得る。対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩を含む療法に反応する可能性がそれほど高くなければ、場合によって、レンバチニブを含まない療法を対象に投与するもできる。これらの療法には、放射性ヨウ素、ドキソルビシン、カルボプラチニン、シスプラチニン、パクリタキセル、ソラフェニブ、ドセタキセル、トラスツマブ、インターロイキン2、インターフェロン、エベロリムス、スニチニブ、パゾパニブ、バンデタニブ、及び「標準ケア」治療（すなわち、医療ケア従事者により決定されるか、又は、治験薬及び治験化学療法など、臨床研究で指定される、現行の標準ケア）が含まれるがこれらに限定されない。

## 【0130】

全ての年齢の対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療可能な障害に罹患し得る。したがって、本明細書で記載される方法において用いられる生物学的試料は、小児、若年者、又はレンバチニブ若しくはその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療可能な疾患（例えば、甲状腺乳頭癌、腎細胞癌）を有するか、若しくは有することが疑われる成人などの成人を含めた任意の年齢の対象（例えば、ヒト）から得ることができる。

## 【0131】

方法はまた、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）により治療可能な癌を発症する危険性がある個体に適用することもできる。このような個体には、（i）このような障害の家族歴（遺伝的素因）、又は（ii）このような障害を発症する1つ若しくは複数の危険因子を有する個体が含まれる。

## 【0132】

対象が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）に反応する可能性が高いのか、その可能性がそれほど高くないのかに基づき対象を分

類又は選択した後、医療従事者（例えば、医師）は、適切な治療法を対象に投与することができる。当技術分野では、レンバチニブ療法を投与する方法がよく知られている。

#### 【0133】

本明細書で記載される任意の療法（例えば、レンバチニブを含む療法又はレンバチニブを含まない療法）は、1つ又は複数のさらなる治療剤を包含し得ることが理解される。すなわち、本明細書で記載される任意の療法は、これらに限定されないが、ドキソルビシン、カルボプラチニン、シスプラチニン、パクリタキセル、ドセタキセル、トラスツマブ、インターロイキン2、インターフェロン、及びエベロリムスなどの1つ又は複数のさらなる治療剤と共に投与する（組み合わせて投与する）ことができる。さらに、本明細書で記載される任意の療法は、例えば、疼痛、恶心、及び／又はレンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法の1つ若しくは複数の副作用を治療するための1つ又は複数の薬剤も包含し得る。

10

#### 【0134】

組合せ療法（例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法と1つ又は複数のさらなる治療剤との共投与）は、例えば、同時的な場合もあり、逐次的な場合もある。例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）と1つ又は複数のさらなる治療剤とを同時に投与することもでき、レンバチニブ化合物（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を第1の期間に投与し、1つ又は複数のさらなる治療剤を第2の期間に投与することもできる。一部の実施形態では、1つ又は複数のさらなる治療剤を第1の期間に投与し、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を第2の期間に投与することもできる。

20

#### 【0135】

レンバチニブ（例えば、レンバチニブメシル酸塩）による療法に反応することが予測される対象が、1つ又は複数のレンバチニブ以外の療法を既に投与されている場合、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法は、既に投与された療法又は現在投与されている療法を置換することもでき、これを増強することもできる。例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法で治療したら、1つのレンバチニブ以外の療法の投与を中止又は減量する、例えば、低レベルで投与することができる。レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法を投与しながら、かつての療法の投与を維持することもできる。一部の実施形態では、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法のレベルが治療効果をもたらすのに十分なレベルに達するまで、かつての療法を維持することができる。

30

#### 【0136】

##### アレイ

本明細書で開示される核酸バイオマーカーを包含する核酸アレイは、例えば、遺伝子発現の検出及び／又は遺伝子発現レベルの測定に有用である。アレイはまた、例えば、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する対象の反応を予測するにも有用であり、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法から利益を得る対象を同定するにも有用であり、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法から利益を得る可能性が高くない対象を、他の癌療法へと誘導するにも有用である。

40

#### 【0137】

アレイとは、秩序だった試料の配列であって、既知のDNA試料と未知のDNA試料とのマッチングが塩基の対合規則（例えば、アデノシンはチミン又はウラシルと対合し、グアノシンはシトシンと対合する）に基づいてなされる配列である。典型的なマイクロアレイ実験は、mRNA分子、cDNA分子、又はその断片の、それが由来する（original又はderived）DNA鑄型とのハイブリダイゼーションを伴う。アレイ

50

を構築するには、多くのDNA試料が用いられる。アレイ実験では、マイクロプレート又は標準的なプロット膜など、一般的なアッセイ系を用いる。試料スポットのサイズは、典型的に直径200ミクロン未満であり、アレイは通常、数千個のスポットを含有する。スポットされたプローブとして既知の数千個の試料（内容が既知である）を、基質（例えば、顕微鏡用のスライドガラス、シリコンチップ、ナイロン膜）へと固定化する。スポットは、DNAの場合もあり、cDNAの場合もあり、オリゴヌクレオチドの場合もある。これらを用いて、未知の配列の相補的な結合を決定し、したがって、遺伝子発現及び遺伝子発見のための並行解析を可能とする。単一のDNAチップによる実験で、数千の遺伝子についての情報を同時にたらし得る。アレイ上の各スポットの位置を、遺伝子を同定するために用いるので、支持体上のプローブの秩序だった配列は重要である。アレイ上の各位置に結合したmRNAの量は、アレイ上に包含される多様な遺伝子の発現レベルを示す。多くのDNA試料を含有するアレイを用いて、アレイ上の各位置に結合したmRNAの量を測定することにより、単一の実験において、数百又は数千の遺伝子の発現レベルを決定することができる。コンピュータの支援により、マイクロアレイ上のスポットに結合したmRNAの量を正確に測定することができ、細胞における遺伝子発現のプロファイルを作成することができる。10

#### 【0138】

一般に用いられる2つの主要なDNAマイクロアレイプラットフォームは、cDNAマイクロアレイ及びオリゴヌクレオチドマイクロアレイである。cDNAマイクロアレイが、PCR (Schena, M.ら、Science, 270: 467-470 (1995))などの酵素反応を介して生成する長鎖の二本鎖DNA分子により作製されるのに対し、オリゴヌクレオチドマイクロアレイは、ロボット操作による沈着又はin situにおける基質上の合成を介してスポットされたオリゴヌクレオチドプローブを使用する (Lockhart, D. J.ら、Nat. Biotechnol., 14, 1675-1680 (1996))。20

#### 【0139】

##### キット

本出願はまた、キットも提供する。一部の実施形態では、キットは、表3のバイオマークーのうちのいずれかを同定又は検出するのに用い得るプローブを包含する。一部の実施形態では、キットは、表1及び/又は表2に列挙される突然変異のうちのいずれかを含むする領域を増幅するために用い得るプライマーを包含する。一部の実施形態では、キットは、本明細書で記載される核酸アレイのうちのいずれかを包含する。特定の実施形態では、キットは、サイログロブリンを検出するか、或いは表3のバイオマークーのうちのいずれか又はそれらの発現若しくは発現レベルを検出するのに用い得る抗体を包含する。一部の実施形態では、キットは、表3のバイオマークーのうちのいずれか又はそれらの発現若しくは発現レベルを同定又は検出するのに用い得るプローブ及び抗体を包含する。場合によって、キットは、生物学的試料中の1つ又は複数の遺伝子のレベルを検出及び/又は測定するための指示書も含有し得る。30

#### 【0140】

場合によって、キットは、例えば、対照の生物学的試料、又は対照の標識した単位複製配列セットであって、アレイの核酸プローブにより認識される、既知量の1つ若しくは複数の単位複製配列を含有する、対照の単位複製配列セットも包含し得る。場合によっては、対照が、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法に対する反応を予測する1つ又は複数の遺伝子の発現レベルの範囲を含有する添付文書（例えば、紙の添付文書又はCD、DVD、若しくはフロッピーディスクなどの電子媒体）でもあり得る。40

#### 【0141】

一部の実施形態では、キットは、生物学的試料を処理するための1つ又は複数の試薬を包含し得る。例えば、キットは、タンパク質を生物学的試料から単離するための試薬、並びに/又は生物学的試料中のタンパク質の存在及び/若しくは量を検出するための試薬（50

例えば、検出アッセイの対象であるタンパク質に結合する抗体、及び／又はタンパク質に結合する抗体に結合する抗体）を包含し得る。

#### 【0142】

一部の実施形態では、キットは、結果、例えば、マイクロアレイ解析の結果又は発現プロファイルの結果を解析するためのソフトウェアパッケージを包含し得る。

#### 【0143】

キットはまた、本明細書で記載される遺伝子のうちのいずれかの、タンパク質への発現を検出するための1つ又は複数の抗体も包含する。例えば、キットは、表3に示される遺伝子のうちのいずれかによりコードされる1つ又は複数のタンパク質に特異的に結合することが可能な複数の抗体、並びに、場合によって、1つ若しくは複数のタンパク質を検出するための指示書、及び／又は複数の抗体のうちの少なくとも1つに結合することが可能な、検出可能に標識された抗体を含む検出抗体も包含し得る（又は場合によってはこれらからなり得る）。一部の実施形態では、キットは、表3に示される遺伝子によりコードされる1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、又は46のタンパク質を認識する抗体を包含し得る。10

#### 【0144】

場合によって、本明細書で記載されるキットはまた、レンバチニブ又はその薬学的に許容される塩（例えば、レンバチニブメシル酸塩）を含む療法であって、アレイを介して検出可能な1つ又は複数の遺伝子の発現レベルにより、対象がそれに反応することが予測される療法を投与するための指示書も包含する。20

#### 【0145】

以下は、本発明の実施例である。これらは、いかなる形であれ、本発明の範囲を限定するものとみなされるべきではない。

#### 【実施例】

#### 【0146】

実施例1：E7080を含む療法に対する反応性についての予測バイオマーカーとしての突然変異状態30

目的：E7080（レンバチニブ）による第II相研究で治療された分化型甲状腺癌患者において、腫瘍反応及び疾患安定化の長期化が観察された。この実験は、3つの反応基準：最良総合効果、腫瘍退縮、及び無増悪生存を用いて、対象がE7080による治療に対して反応するかどうかを予測するのに有用なアミノ酸の突然変異を同定することを指向した。

#### 【0147】

材料及び方法：組織試料は、患者がE7080を含む任意の療法を施される前の手術時に得、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織のためのプロトコールにより日常通りに処理した。用いるプロトコールには、治験審査委員会の承認を得、各対象からは説明同意文書を得た。組織が入手可能な27例の患者に由来する腫瘍組織試料を、突然変異解析に用いた。DNAは、試験に参加する患者から収集したFFPE腫瘍ブロックから単離した。ゲノムDNAは、脱パラフィン化及びわずかな改変を伴うQiagen DNA Mini Kit Tissue Protocolを介して、10ミクロンの染色していない切片2～5例から抽出した。突然変異を検出するには、シーケノム（SEQUENOM）（登録商標）（San Diego, CA）プラットフォーム、並びにオンコカルタ（商標）Panel v1.0、及びオンコカルタ（商標）Panel v3.0を用いた（www.Sequenom.com/Files/Genetic-Analysis---Graphics/All-Application---PDFs/Application Explorer 2010\_1110-Web/を参照されたい）。Sequen40

Mini Kit Tissue Protocolを介して、10ミクロンの染色していない切片2～5例から抽出した。突然変異を検出するには、シーケノム（SEQUENOM）（登録商標）（San Diego, CA）プラットフォーム、並びにオンコカルタ（商標）Panel v1.0、及びオンコカルタ（商標）Panel v3.0を用いた（www.Sequenom.com/Files/Genetic-Analysis---Graphics/All-Application---PDFs/Application Explorer 2010\_1110-Web/を参照されたい）。Sequen50

o m製のオンコカルタ（商標）Panelsとは、突然変異の効率的なスクリーニングのためにあらかじめデザインされてあらかじめ検証されたアッセイのセットである。オンコカルタ（商標）Panel v1.0の遺伝子及び突然変異の数（カッコ内）は、ABL1(14)；AKT1(7)；AKT2(2)；BRAF(25)；CDK4(2)；EGFR(40)；ERBB2(9)；FGFR1(2)；FGFR3(7)；FLT3(3)；HRAS(10)；JAK2(1)；KIT(32)；KRAS(16)；MET(5)；NRAS(19)；PDGFRA(11)；PIK3CA(14)；及びRET(6)である。オンコカルタ（商標）Panel v3.0の遺伝子及び突然変異の数（カッコ内）は、ABL1(2)AKT1(1)；APC(12)；BRAF(19)；CDKN2A(7)；CSF1R(6)；CTTNB1(28)；EGFR(32)；ERBB2(2)；FLT3(3)；HRAS(2)；JAK3(3)；KIT(3)；KRAS(5)；MET(6)；MLH1(1)；MYC(6)；PDGFRA(11)；PIK3CA(4)；PTEN(14)；RB1(11)；RET(13)；SRC(1)；STK11(12)；P53(7)；及びVH1(7)である。オンコカルタ（商標）Panel v3.0の遺伝子及び突然変異の数（カッコ内）は、ABL1(2)AKT1(1)；APC(12)；BRAF(19)；CDKN2A(7)；CSF1R(6)；CTTNB1(28)；EGFR(32)；ERBB2(2)；FLT3(3)；HRAS(2)；JAK3(3)；KIT(3)；KRAS(5)；MET(6)；MLH1(1)；MYC(6)；PDGFRA(11)；PIK3CA(4)；PTEN(14)；RB1(11)；RET(13)；SRC(1)；STK11(12)；P53(7)；及びVH1(7)である。

#### 【0148】

オンコカルタ（商標）PCRプライマープールを用いてDNAを増幅し、組み込まれなかったヌクレオチドは、エビアルカリホスファターゼ(SAP)により不活化し、突然変異のすぐの隣接部でハイブリダイズする伸長プライマー、及び特製のヌクレオチドの組合せを用いて、単一塩基による伸長反応を実施した。カチオン交換樹脂を添加することにより塩を除去した。マルチプレックス反応をSpectrochip IIへとスポットし、突然変異が存在する場合は、これを、Compact Mass Spectrometer(シーケノム(登録商標)、San Diego、CA)上のMALDI-TOFにより分解した。オンコカルタ（商標）Panel v1.0(シーケノム(登録商標)、San Diego、CA)は、24のプライマー対のプール及び24の伸長プライマーのプールからなり、19遺伝子における225の突然変異を検出する能力を有する。オンコカルタ（商標）Panel v3.0は、24のプライマー対のプール及び24の伸長プライマーのプールからなり、26遺伝子における218の突然変異を検出する能力を有する。各プールは、PCR反応における5~9ずつのプライマー対からなる。オンコカルタパネルでは、単一型及び複合型と称する2つの種類のアッセイがデザインされている。単一型アッセイとは、单一のアッセイによりそのコドンにおけるアミノ酸の変化を検出することが可能なアッセイである。複合型アッセイとは、コドンの変化又は欠失及び挿入を同定するために複数のアッセイを要求するアッセイであり、したがって、複数の異なるアミノ酸の置換又は欠失を検出することが可能である。複合型アッセイの例には、コドン12内の2つの異なるヌクレオチド位置を探査し、コドン12における全てのアミノ酸変化を併せて同定する、KRAS\_1アッセイ及びKRAS\_2アッセイの使用が含まれる。KRAS\_G12R突然変異では、GGT(グリシン)コドンを有する野生型の対立遺伝子に対して、突然変異体の対立遺伝子が、コドンCGT(アルギニン)を有する。このため、コドン12の1番目のヌクレオチドは、「C」であることが必要であり、2番目のヌクレオチドは、「G」であることが必要である。KRAS\_2アッセイは、どのヌクレオチドがコドン12の1番目のヌクレオチドへと組み込まれるのかを明らかにし、KRAS\_1アッセイは、2番目のヌクレオチドについてのアッセイである。併せて、これらの2つのアッセイに由来するデータはG12R置換を検出する。BRAF\_V600E突然変異(GTGからGAGへの突然変異)では、BRAF\_16アッセイ(コドン600の

10

20

30

40

50

1番目のヌクレオチドについてのアッセイ)により「G」を同定し、B R A F \_ 1 5 (2番目のヌクレオチドについてのアッセイ)により「A」を同定する。V H L \_ P 8 1 S 突然変異では、突然変異体の対立遺伝子が、T C G (セリン)を有するのに対し、野生型の対立遺伝子は、C C G (プロリン)を有する。V H L \_ 4 9 8 は、どのヌクレオチドがコドン81の1番目のヌクレオチドへと組み込まれるのかを明らかにする。K R A S \_ Q 6 1 R 突然変異では、K R A S \_ 7 アッセイでコドンの2番目の位置におけるヌクレオチド変化を検討することにより、突然変異体の対立遺伝子(C G A、アルギニン)を、野生型の対立遺伝子(C A A、グルタミン)から識別する。N R A S コドン61の場合、3つの突然変異であるQ 6 1 L (C A AからC T Aへ)、Q 6 1 R (C A AからC G Aへ)、及びQ 6 1 P (C A AからC C Aへ)が知られている。N R A S \_ 6 アッセイでは、コドンの2番目の位置におけるヌクレオチド変化が検出される。オンコカルタ(商標)には、E G F R 遺伝子内の挿入及び欠失を探査する、なお複合度の高いアッセイもまた包含される。  
。

#### 【0149】

データ解析は、データパターン及び生スペクトルの視覚化を容易とする、Mass Array Type Analyzerソフトウェア(シーケノム(登録商標))を用いて実施した。Onc oによる突然変異報告に由来する全ての突然変異を手作業で点検して、塩ピーク又は他のバックグラウンドピークから「真の」突然変異体ピークを同定した。

患者がE 7 0 8 0 を服用する期間は、評価及び追跡を容易するために、異なるサイクルへと人為的に分割した。患者には、28日のサイクルにおいて毎日1回、経口、24mgの用量でE 7 0 8 0 を施した。解析を目的として、9カ月後及び14カ月後の最小限の追跡時に、臨床転帰の評価を実施した。E 7 0 8 0 の甲状腺癌試験では、各サイクルが28日間(4週間)で、このため、1~28日目がサイクル1であり；29日目がサイクル2の1日目であり；57日目がサイクル3の1日目である。サイクル1の1日目及び8日目、サイクル2の1日目、及びサイクル3の1日目における薬物動態(P K)解析のために血液試料を収集した。患者1人当たり合計9例ずつの試料を、以下の通りに収集した：サイクル1の1日目：E 7 0 8 0 を投与する直前、並びにE 7 0 8 0 の初回投与の0.5時間後及び2時間後(投与後)；サイクル1の8日目：E 7 0 8 0 を投与する直前；サイクル2の1日目：E 7 0 8 0 を投与する直前、並びにE 7 0 8 0 の初回投与の0.5時間後及び2時間後(投与後)；サイクル3の1日目：E 7 0 8 0 を投与する直前及び投与の2時間後。無増悪生存を解析するために、P Kパラメータをコックス比例ハザードモデルにおける共変量として用いる。  
。

#### 【0150】

反応の3つの基準：最良総合効果、腫瘍退縮、及び無増悪生存について、以下に定義する。

「最良総合効果」(B O R)とは、以下の状態：完全寛解(C R)、部分寛解(P R)、疾患の安定(S D)又は疾患の進行(P D)のうちの1つを示すことを指す。

「臨床利益」(C B)とは、以下の状態：完全寛解(C R)、部分寛解(P R)；又は6カ月間以上の無増悪生存(P F S)を伴う疾患の安定(S D)のうちの1つを示すことを指す。  
。

「完全寛解」とは、全ての標的病変の完全消失を意味する。

「部分寛解」とは、ベースライン最長径(L D)和を基準として、標的病変のL D和の少なくとも30%の減少を意味する。

「疾患の進行」(P D)とは、治療を開始してから記録された最小のL D和、又は1つ若しくは複数の新たな病変が出現してから記録された最小のL D和を基準として、標的病変のL D和の少なくとも20%の増大を意味する。

「疾患の安定」とは、治療を開始してからの最小のL D和を基準として、P Rと見なされる標的病変の十分な退縮でもなく、疾患の進行(P D)と見なされる十分な増大でもないことを意味する。

「無増悪生存」(P F S)とは、治療の開始日からP D状態に入る前の最終日までの期  
。

10

20

30

40

50

間を指す。

「腫瘍退縮」(T S)とは、ベースライン直径和を基準として、標的病変の直径和の百分率変化を意味する。

#### 【0151】

結果：オンコカルタ（商標）Panel v1.0 突然変異パネル及びオンコカルタ（商標）Panel v3.0 突然変異パネルを用いて、33の遺伝子中の、のべ443の突然変異について調べ、本発明者らが検討した対象23例中16例において突然変異を見出した。オンコカルタ（商標）Panel v1.0 を用いて患者27例に由来する23の患者試料を解析し、オンコカルタ（商標）Panel v3.0も用いてこれらを解析した。10の遺伝子中に12の突然変異を同定したが、これらを表4に列挙する。7例の患者は、全ての被験遺伝子について野生型であった。

#### 【0152】

##### 【表4】

表4:DTC患者において見出される突然変異の概要

患者数	突然変異				
	BRAF	NRAS	KRAS	VHL	他の突然変異
1	WT	Q61P	WT	P81S	ERBB2(S779_P780insVGS)
2	WT	Q61R	WT	P81S	PTEN(N323fs*2)
3	WT	Q61R	WT	WT	
4	WT	Q61R	WT	WT	
5	WT	Q61R	WT	WT	
6	WT	Q61R	WT	P81S	
7	V600E	WT	WT	WT	
8	V600E	WT	WT	WT	myc(A59V)
9	V600E	WT	WT	WT	
10	V600E	WT	WT	WT	
11	WT	WT	WT	P81S	
12	WT	WT	G61R	WT	
13	WT	WT	G12R	WT	
14	WT	WT	WT	WT	PI3KCA(E545A.E545G)
15	WT	WT	WT	WT	TP53(R248W)
16	WT	WT	WT	WT	MET(T1010I.T992I)

#### 【0153】

BRAFのジエンバンク（Genbank）（登録商標）受託番号はNM\_004333.3であり；NRASのジエンバンク（登録商標）受託番号はNM\_002524.2であり；KRASのジエンバンク（登録商標）受託番号はNM\_033360.2（変異体A）及びNM\_004985.3（変異体B）であり；VHLのジエンバンク（登録商標）受託番号はNM\_000551.2（変異体1）及びNM\_198156.1（変異体2）である。

#### 【0154】

表5に示す通り、その腫瘍が、KRAS遺伝子、NRAS遺伝子、BRAF遺伝子、VHL-1遺伝子のうちのいずれかにおいて突然変異を有する患者では、最良総合効果が有意に良好であった（フィッシャーの正確検定）。例えば、NRASの突然変異又はKRASの突然変異を伴う患者8例中8例が部分寛解（PR）を示したのに対し、NRAS及びKRASにおける突然変異を伴わない患者でPRを示したのは、14例中5例だけであった。

#### 【0155】

10

20

30

40

## 【表5】

表5:突然変異及び最良総合効果(BOR)

突然変異 (いずれかの遺伝子)	BORについてのp値 (フィッシャーの正確検定)
BRAF.NRAS	0.038
KRAS.NRAS	0.007
BRAF.KRAS.NRAS	0.010
BRAF.VHL	0.042
BRAF.KRAS.VHL	0.034
KRAS.NRAS.VHL	0.020
BRAF.KRAS.NRAS.VHL	0.012

10

突然変異 (いずれかの遺伝子)	BOR	WT	MU
BRAF.NRAS	PR	5	8
	SD	6	1
	PD	2	0
KRAS.NRAS	PR	5	8
	SD	7	0
	PD	2	0
BRAF.KRAS.NRAS	PR	3	10
	SD	6	1
	PD	2	0
BRAF.VHL	PR	10	6
	SD	5	0
	PD	0	2
BRAF.KRAS.VHL	PR	8	8
	SD	5	0
	PD	0	2
KRAS.NRAS.VHL	PR	5	8
	SD	7	0
	PD	1	1
BRAF.KRAS.NRAS.VHL	PR	3	10
	SD	6	1
	PD	1	1

20

30

\*野生型患者1例の腫瘍サイズが評価不可能であった。

## 【0156】

NRAS ; NRAS若しくはKRAS ; 又はBRAF、KRAS、若しくはNRASにおいて突然変異を伴う患者は、NRAS、KRAS、及びBRAFについて野生型の患者と比較して、腫瘍退縮の百分率変化として示される腫瘍サイズの縮減が大きかった（表6を参照されたい）。

## 【0157】

40

## 【表6】

表6:突然変異及び最大腫瘍退縮の%

遺伝子 (いずれかの遺伝子)	野生型*	突然変異	腫瘍退縮の%(中央値)		p 値
			野生型	突然変異	
NRAS	16	6	-35.5	-45.5	0.042
KRAS,NRAS	14	8	-31.0	-44.5	0.022

\*野生型患者1例の腫瘍サイズが評価不可能であった。

## 【0158】

まず、ログランク検定を実施し、次いで、共変量を伴うか又は伴わないコックス比例ハ

50

ザードモデルを用いて、治療された患者の遺伝子突然変異の無増悪生存との関連を解析した。用いられた共変量は、以下のPKパラメータ：サイクル1の1日目のC<sub>max</sub>（サイクル1の1日目の投与2時間後におけるE7080濃度：MAX1）；サイクル1の1日目のC<sub>rough</sub>（サイクル1の8日目の投与前におけるE7080濃度：MIN1）；サイクル2の1日目のC<sub>max</sub>（サイクル2の1日目の投与2時間後におけるE7080濃度：MAX2）；サイクル2の1日目のC<sub>rough</sub>（サイクル2の1日目の投与前におけるE7080濃度：MIN2）である。ログランク検定は、NRASにおける突然変異単独、又はNRAS若しくはKRASにおける突然変異を伴う患者が、NRAS又はKRASについて野生型の患者より良好な無増悪生存を示すことを裏付けた（図1）。また、コックス比例ハザードモデルは、サイクル1の1日目のC<sub>rough</sub>（MIN1）を共変量とするコックス比例ハザード検定に基づき、野生型を1とし、突然変異を0とし、0未満の係数では突然変異のときのハザードを小さくすることから、NRAS、KRAS、又はVHLにおける突然変異、及びNRAS、KRAS、又はBRAFにおける突然変異を伴う患者が、突然変異を有さない患者より良好な無増悪生存を示すことも裏付けた（表7を参照されたい）。

【0159】

【表7】

表7:遺伝子突然変異及び無増悪生存

遺伝子 (いずれかの遺伝子)	例数	係数	p 値	PK
				MIN1
KRAS.NRAS	23	-1.586	0.043	
NRAS	23	-2.091	0.047	
BRAF.KRAS.NRAS	23	-1.428	0.032	0.037
KRAS.NRAS	23	-2.629	0.021	0.007
KRAS.NRAS.VHL	23	-1.700	0.043	0.018

【0160】

結論：甲状腺腫瘍におけるNRAS、KRAS、BRAF、及びVHLのうちのいずれか1つ又はこれらの組合せなど、少数の遺伝子セットにおける突然変異は、甲状腺癌を提示するか、有することが疑われるか、又は発症する危険性がある患者の、E7080を含む療法に対する臨床反応を予測するのに有用である。

【0161】

実施例2：甲状腺腫瘍におけるE7080を含む療法のバイオマーカーとしてのサイログロプリン

目的：この実験は、臨床反応の3つの基準：腫瘍反応、腫瘍退縮、及び無増悪生存を用いて、サイログロプリンレベルの変化により、患者がE7080による治療に反応するかどうかが予測されるかどうかを決定することを指向した。

【0162】

材料及び方法：全てのサイクルの1日目の72時間前以内に、サイログロプリンアッセイのための血清を収集した。24mgのE7080を、28日間のサイクルにおいて毎日継続的に経口投与した。患者58例に由来する血清試料をサイログロプリンの測定に用いた。6mLの血液を、レッドトップの試験管へと引き入れ、室温で少なくとも30分間にわたり凝固させた。試料収集後60分間以内に、20~25、1000×gで15分間にわたり試験管を遠心分離した。ペレットを攪乱せずに上清を吸い上げ、血清フィルターを伴う試料用試験管へと入れ、収集日に試験にかけるために、凍結させて中央研究室へと送付した。サイログロプリンレベルは、標準的な操作手順に従う固相の化学発光免疫測定アッセイ（IMMULITE 2000 Thyroglobulin Assay System、Siemens）により検出した。略述すると、抗サイログロプリン抗体で

コーティングしたビーズにより血清サイログロブリンを捕捉し、アルカリホスファターゼに連結した抗サイログロブリン抗体を用いてこれを検出した。血清サイログロブリンレベルは、凍結乾燥させたサイログロブリンにより作成した検量線から計算した。アッセイ用に凍結させて保管したところ、血清サイログロブリンは、最長2カ月間にわたり安定であった。このアッセイの感度は、0.2 ng/ml であった。

#### 【0163】

結果：58例の患者試料から、治療前及び治療後における最大で50例の血液試料をこれらの解析に用いた。E7080による治療を開始して29日後に、サイログロブリンレベルの劇的な変化が観察された。サイログロブリンレベルは、E7080による治療の48日後（2サイクル以内）に有意に低下し、この低下はサイクル8まで持続した。

10

#### 【0164】

E7080による部分寛解（PR）を示す患者群におけるサイログロブリンレベルの変化は、疾患の安定（SD）又は疾患の進行（PD）を有する患者群におけるサイログロブリンレベルの変化より有意に小さかった（マンホイットニーのU検定：図2；白丸：PR群の中央値、黒丸：その他（SD又はPD）の中央値；及び表8の上方）。サイログロブリンレベルの変化はまた、サイクル2の完了後（治療の56日後）における腫瘍退縮とも関連した（スピアマンの順位相関検定：表8の中央）。コックス比例ハザード検定により、患者の無増悪生存が、E7080による治療の28日後におけるサイログロブリンレベルの変化と関連することが裏付けられたことから、大幅な低下はPFSの延長を予測することが示される（表8の下方）。

20

#### 【0165】

## 【表8】

表8:E7080による治療後におけるサイログロブリンレベルの変化

(a)PRを示す患者群におけるサイログロブリンレベルの大幅な低下

因子	時点	例数	PR群		他の群		p値
			中央値	四分位範囲	中央値	四分位範囲	
サイログロブリン	サイクル2の1日目/サイクル1の1日目	49	0.195	0.233	0.288	0.460	0.154
	サイクル3の1日目/サイクル1の1日目	44	0.109	0.144	0.221	0.243	0.034
	サイクル4の1日目/サイクル1の1日目	44	0.079	0.112	0.227	0.390	0.007
	サイクル5の1日目/サイクル1の1日目	42	0.106	0.119	0.332	0.403	0.019
	サイクル6の1日目/サイクル1の1日目	40	0.078	0.133	0.198	0.235	0.044

(b)サイログロブリンレベルの大幅な低下の腫瘍退縮%との関連

因子	時点	最大の腫瘍退縮	
		相関(r)	p値
サイログロブリン	サイクル2の1日目/サイクル1の1日目	0.163	0.280
	サイクル3の1日目/サイクル1の1日目	0.342	0.026
	サイクル4の1日目/サイクル1の1日目	0.467	0.002
	サイクル5の1日目/サイクル1の1日目	0.443	0.004
	サイクル6の1日目/サイクル1の1日目	0.358	0.023

(c)1サイクルのE7080による治療後におけるサイログロブリンレベルの変化のPFSとの関連

因子	時点及び類型	例数	Coef	p値
サイログロブリン	サイクル2の1日目/サイクル1の1日目	49	0.995	0.039

## 【0166】

結論：E7080療法後におけるサイログロブリンレベルの変化は、腫瘍反応、腫瘍サイズの縮減、及び無増悪生存と関連し、E7080による治療の4週間後までの臨床反応を予測するのに用いることができる。したがって、サイログロブリンレベルは、E7080を含む療法を継続すべきかどうかを評価する一助となる。

## 【0167】

実施例3：E7080の予測バイオマーカー及び反応バイオマーカーとしてのサイトカイン、ケモカイン、及び血管新生因子（血中バイオマーカー）

目的：血管新生は、VEGF受容体及びFGF受容体など、複数の増殖因子受容体を介するシグナル伝達により制御される。VEGF受容体によるシグナル伝達はまた、免疫細胞機能とも関連する。この解析の目的は、臨床試験のE7080による治療前及び治療後の両方において患者から得られる血清試料中のサイトカイン、ケモカイン、及び血管新生因子（本明細書では、まとめて「血中バイオマーカー」と称する）を測定し、患者がE7080による治療に反応するかどうかを予測するのに用い得る血中バイオマーカーを同定することであった。これらの解析では、3つの反応基準、すなわち：腫瘍反応、腫瘍退縮の%、及び無増悪生存を使用した。

「腫瘍反応」（TR）は、「部分寛解」（PR）を示す対象を、疾患の安定（SD）又は疾患の進行（PD）を示す対象と比較する。

## 【0168】

10

20

30

40

50

材料及び方法：患者にE7080を、28日間のサイクルにより毎日1回経口、24mgの用量で施した。血清試料は、サイクル1の1日目（治療前）、サイクル1の8日目、及びサイクル2の8日目（すなわち、治療の36日後）に収集した。7.5mLの血液をステンレス鋼製の血清用試験管（SST）へと引き入れ、室温で少なくとも30分間にわたり凝固させた。試料収集後60分間以内に、20～25、1400×gで10分間にわたり試験管を遠心分離した。ペレットを攪乱せずに上清を吸い上げ、血清を混合し、2つの試料用試験管へと分割し、解析のためのさらなる治療まで直立の位置で凍結させて（-70）保管した。58例の患者に由来する血清試料を血中バイオマーカー解析に用いた。この解析では、サイクル1の1日目（ベースライン）、サイクル1の8日目、及びサイクル2の8日目に由来する血清を用いた。無増悪生存の共変量との関連又は非関連を解析した。用いられた共変量は、以下のPKパラメータ：サイクル1の1日目のC<sub>max</sub>（サイクル1の1日目の投与2時間後におけるE7080濃度：MAX1）；サイクル1の1日目のC<sub>rough</sub>（サイクル1の8日目の投与前におけるE7080濃度：MIN1）；サイクル2の1日目のC<sub>max</sub>（サイクル2の1日目の投与2時間後におけるE7080濃度：MAX2）；サイクル2の1日目のC<sub>rough</sub>（サイクル2の1日目の投与前におけるE7080濃度：MIN2）である。血清試料は、同じ対象に由来する全ての時点が同じ日にアッセイされるバッチフォーマットで調べた。アッセイ日には、試料を-80から取り出して、融解させ、室温に到達させた。製造元の指示書に従い、以下の市販のアッセイキット：Human Soluble Tie-2 ELISA（R&D Systems型番：DTE200）、Human Angiopoietin-1 ELISA（R&D Systems型番：DANG10）、Human FGF23 ELISA、Human SDF-1a ELISA、Human Angiopoietin-2 ELISA（R&D Systems型番：DANG20）、Human Soluble Receptor Multiplex（Millipore型番：HSCR-32K；sVEGFR1、sVEGFR2、及びsVEGFR3に限る）、Human Cytokine/Chemokine Panel I Multiplex（Millipore型番：MPXHCYTO-60K；IL-1、IL-1、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-17、sCD40L、EGF、エオタキシン、FGF-2、G-CSF、GM-CSF、IFN-、IP-10、MCP-1、MIP-1、MIP-1、PDGF-AA、RANTES、TGF-、TNF-、及びVEGFに限る）、及びHuman Growth Factor Multiplex（Origene TruPLEX型番：AM100096；PDGF-AB、PDGF-BB、FGF4、VEGFD、FGF2、EGF、HGF、FLT3LG、ANGPT2、PGF、及びVEGFA）を用いて、血清試料について調べた。

#### 【0169】

SoftMax Pro 5.2 ソフトウェアを伴うMolecular Devices UVmax kineticマイクロプレートリーダーを用いて、ELISAプレートを測定した。マルチプレックスアッセイは、Bio-Plex Manager 4.1 ソフトウェアを伴うBio-Rad Bio-Plexシステムを用いて実施した。最終タンパク質濃度（pg/mL）は、各アッセイの検量線から計算した。アッセイに応じて、試験前に血清試料をアッセイ緩衝液中で希釈しておくことができる。これらの場合は、タンパク質濃度に希釈倍率を乗じる。

#### 【0170】

結果及び考察：58例の患者試料に由来する、治療前及び治療後における27～49例の血液試料を解析に用いた。50のアッセイにおいて調べた46因子中23因子のレベルの有意な変化を、E7080により治療された患者に由来する血清中で、サイクル1の8日目及び/又はサイクル2の8日目の両方又は一方において、治療前のレベル（サイクル1の1日目（ベースライン））と比較して観察した（表9）。

【0 1 7 1】  
【表9】

表9:E7080による治療の後における血中バイオマーカーレベルの変化

因子	時点		例数		ベースライン		治療後		倍数変化		
	治療前	治療後	治療前	治療後	中央値	四分位範囲	中央値	四分位範囲	中央値	四分位範囲	p 値
EGF	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	42	44	119.9	128.5	75.9	76.6	0.808	0.735	3.7E-02
	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	49	49	128.2	75.9	154.7	117.5	1.171	0.313	3.2E-05
	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	44	44	128.2	75.9	177.0	123.9	1.363	0.540	1.1E-06
G-CSF	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	49	49	51.2	34.5	67.1	46.3	1.250	0.570	3.8E-04
	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	44	44	51.2	34.5	61.3	53.8	1.215	1.011	8.8E-03
	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	37	49	9.9	23.3	17.3	34.9	1.824	2.759	2.1E-03
IL-6	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	34	44	9.9	23.3	15.0	34.4	1.299	2.069	1.9E-02
	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	27	49	3.3	15.7	6.4	14.5	1.000	0.507	3.8E-02
	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	48	49	26.1	24.9	31.7	28.4	1.164	0.660	1.2E-02
IL-8	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	43	44	26.1	24.9	31.4	20.3	1.205	0.799	7.8E-03
	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	39	49	9.3	30.7	14.4	52.2	1.025	0.378	4.7E-02
	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	49	49	387.7	313.0	474.3	443.1	1.249	0.410	2.7E-05
IP-10	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	44	44	387.7	313.0	602.8	538.5	1.382	0.719	9.4E-04
	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	44	44	582.7	323.3	618.0	342.1	1.086	0.431	4.1E-03
	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	45	49	12.2	12.0	14.6	9.9	1.157	0.706	2.8E-02
TGF $\alpha$	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目									

【表9-2】

VEGF	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	48	49	622.0	1845.3	741.4	1918.7	1.290	0.517	1.2E-04
Ang-2	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	49	49	2717.0	1697.8	1812.0	1150.0	0.665	0.298	3.1E-13
Tie-2	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	44	44	2717.0	1697.8	1533.0	729.0	0.618	0.379	1.6E-11
sVEGFR1	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	49	49	33675.0	10817.5	31685.0	11800.0	0.917	0.166	9.4E-06
sVEGFR2	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	44	44	33675.0	10817.5	26220.0	6845.0	0.766	0.143	9.1E-09
sVEGFR3	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	43	49	345.2	539.7	300.0	341.0	0.920	0.361	6.0E-03
EGF (80)	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	49	49	26778.4	9033.4	18823.1	6482.8	0.676	0.230	7.4E-13
HGF (86)	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	44	44	26778.4	9033.4	13352.1	4041.9	0.499	0.167	5.7E-13
FLT3 LG (89)	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	39	44	6226.6	4858.8	4030.9	6017.5	0.843	0.327	1.8E-03
ANG2 (90)	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	38	41	879.6	753.5	875.8	823.7	1.170	0.653	4.7E-02
PGF (91)	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	46	48	1201.8	651.4	1339.3	1335.9	1.096	0.572	2.7E-02
VEGFA (100)	サイクル1の1日目	サイクル1の8日目	48	48	928.2	748.9	688.6	442.3	0.671	0.218	3.2E-12
SDF-1a	サイクル1の1日目	サイクル2の8日目	43	43	957.7	3529.5	970.0	1.345	0.246	6.8E-13	

【0172】

次に、これらの因子の発現レベルの変化が、臨床転帰と関連するかどうかを評価した（腫瘍反応；PR及びその他（SD又はPD）、腫瘍退縮、並びにPFS）。

【0173】

## 【表10】

表10: 血中バイオマーカーの濃度及び比並びに腫瘍反応

因子	時点	PR		その他		p 値
		中央値	四分位範囲	中央値	四分位範囲	
IFN-g	サイクル1の1日目	7.9	14.1	21.2	60.2	0.013
Ang-2		2530.5	914.5	3399.0	2288.0	0.032
ANG2 (90)		829.5	541.3	1032.9	1113.4	0.032
ANG2 (90)	サイクル1の8日目	591.7	329.3	799.3	505.6	0.043
SDF-1a		3294.0	1271.3	2915.0	866.2	0.042
IL-6	サイクル2の8日目	8.2	17.8	33.9	33.7	0.026
FGF-2	サイクル1の8日目/サイクル1の1日目	1.189	0.821	0.952	0.397	0.021
GM-CSF		1.037	0.641	0.945	0.459	0.044
エオタキシン	サイクル2の8日目/サイクル1の1日目	1.541	0.464	1.242	0.411	0.008
IP-10		1.547	0.616	1.151	0.606	0.039
Tie-2	サイクル2の8日目/サイクル1の8日目	0.791	0.159	0.852	0.206	0.023
FGF2 (79)		1.132	1.051	0.978	0.391	0.043
GM-CSF		1.051	0.547	0.876	0.439	0.070
HGF (86)		0.789	0.318	1.087	0.491	0.004
VEGFA (100)		0.899	0.521	1.172	0.422	0.011

## 【0174】

5つのアッセイのE7080による治療前又は治療の1週間後若しくは5週間後における4つの因子(IFN-g、ANG-2、SDF-1a、及びIL-6)の中央値濃度は、E7080による治療に反応した患者(PR群)における場合が、「その他」群(SD又はPDを示す患者)における場合と比較して有意に異なった(表10:マン-ホイットニーのU検定)。例えば、治療前のIFN-g濃度及びANG-2濃度が、SD又はPDを示した患者において見られるIFN-g濃度及びANG-2濃度より有意に低かったことから、E7080による治療を開始する前のIFN-g濃度及びANG-2濃度が低ければ、E7080に対する有益な腫瘍反応が予測されることが示される。PR群では、3つの因子(FGF2、エオタキシン、IP-10)の発現レベルが、サイクル1の8日目又はサイクル2の8日目に上昇したのに対し、「その他」群では、これらの3つの因子の発現レベルが低下した。興味深いことに、GM-CSFの発現レベルは、サイクル2の8日目の他の群だけにおいて、サイクル1の1日目又はサイクル1の8日目と比較して低下した。加えて、サイクル2の8日目のPR群では、Tie-2、HGF、及びVEGFAのサイクル1の8日目と比較した発現レベルが、「その他」群より有意に低下した。これらの結果は、血中バイオマーカーの発現レベルの変化が、E7080を含む療法に対する腫瘍反応と関連し、これを予測し得ることを裏付けた。

## 【0175】

次に、腫瘍退縮と関連する因子を探査した(ピアソンの相関係数検定:表11)。

10

20

30

40

## 【表 11】

表 11: 血中バイオマーカーの濃度及び比並びに最大腫瘍退縮の%

因子	時点	相関(r)	p 値
ANG2(90)	サイクル 1 の 1 日目	0.309	0.033
PDGF		-0.420	0.011
AB(68)		0.341	0.012
Ang-2		0.289	0.036
sVEGFR2		0.276	0.048
VEGF		-0.315	0.035
IL-10	サイクル 1 の 8 日目	-0.354	0.009
SDF-1a		0.399	0.048
IL-13		0.305	0.040
PGF(91)	サイクル 2 の 8 日目	0.300	0.043
VEGFA(100)		-0.311	0.045
RANTES		0.292	0.047
VEGF		-0.347	0.021
FGF-2	サイクル 1 の 8 日目/サイクル 1 の 1 日目	-0.38	0.020
IL-10		-0.369	0.032
GM-CSF		-0.468	0.028
IL-1a	サイクル 2 の 8 日目/サイクル 1 の 1 日目	-0.348	0.030
TGF $\alpha$		0.392	0.017
IL-6	サイクル 2 の 8 日目/サイクル 1 の 8 日目	0.352	0.019
Tie-2		-0.314	0.046
PGF(91)		0.332	0.032
sVEGFR1		0.319	0.035
VEGFA(100)			

## 【0176】

5つのアッセイにおける4つの因子（ANG-2、PDGF-AB、sVEGFR2、及びVEGF）の濃度は、治療前の腫瘍退縮と有意に関連した。これらの研究は、これらの4つの因子の濃度の低下が、腫瘍退縮の増大を予測し得る一方で、PDGF-ABの濃度の上昇も、腫瘍退縮の増大を予測し得ることを示した。E7080による治療の1週間又は5週間後の4つのアッセイにおける3つの因子（IL-13、PGF、及びVEGF）の濃度は、腫瘍退縮と有意に関連した。これらの研究は、これらのIL-13、PGF、及びVEGFの濃度の低下が、表示される時点における腫瘍退縮の増大を予測し得ることを示した。E7080による治療の1週間又は5週間後の3つのアッセイにおける3つの因子（IL-10、SDF1a、及びRANTES）の濃度の上昇により、腫瘍退縮の増大が予測される。サイクル1の8日目におけるFGF2、IL10、GMCSFの発現レベルの、サイクル1の1日目と比較した上昇（比の増大を示す）は、腫瘍退縮と有意に関連したが、これにより腫瘍退縮の増大が予測される。サイクル2の8日目における、IL1a及びTGF $\alpha$ の比の、サイクル1の1日目と比較した増大により、腫瘍退縮の増大が予測される。サイクル2の8日目における4つの因子（IL-6、Tie-2、sVEGFR1、及びVEGF）の発現比の、サイクル1の8日目と比較した減少は、腫瘍退縮の増大と関連した。サイクル2の8日目におけるPGFの発現比の、サイクル1の8日目と比較した減少は、腫瘍退縮の増大と関連した。

## 【0177】

コックス比例ハザードモデルを実施して、因子の濃度又は比（発現レベルの変化）により無増悪生存を予測する血中バイオマーカーを同定した。薬物動態（PK）パラメータを、コックス比例ハザードモデルにおける共変量として用いた。サイクル1の1日目にANG-2及びVEGFの濃度が低いか、又はサイクル2の8日目におけるIL-12（p40）の、サイクル1の1日目と比較した比が減少することは、PFSの延長と有意に関連したことから、これらの因子を、E7080療法に対する反応を予測するためのバイオマーカーとして用い得ることが示される（表12）。PKパラメータを伴うコックス比例ハ

10

20

30

40

50

ザードモデルは、治療前において7つの因子（GCSF、MIP1b、FGF2、MIP1a、IL6、IL13、及びsVEGFR3）の濃度が高ければ、PFSの延長が予測され得る一方で、治療前においてANG-2の濃度が低くても、PFSの延長が予測され得ることを裏付けた。PKパラメータを伴うコックス比例ハザードモデルは、7つの因子（FLT3LG、RANTES、GCSF、sVEGFR1、EGF、PDGF-BB、PDGF-AA）の比が小さければ、良好なPFSが予測されるが、4つの因子（VEGFD、IL10、IL1RA、PDGF-AB）の比が高くて良好なPFSが予測されることを裏付けた。

## 【0178】

【表12】

表12:血中バイオマーカーの濃度及び比並びに無増悪生存

因子	時点	係数	p 値	共変量(p 値)			
				MAX1	MAX2	MIN1	MIN2
Ang-2 VEGFA (100)	サイクル1の1日目	2.7E-04	0.017				
		1.4E-03	0.020				
IL-12(p40)	サイクル2の8日目/サイクル1の1日目	1.9E-01	0.046				
Ang-2	サイクル1の1日目	3.3E-04	0.004	0.006	0.006		
G-CSF		-1.6E-02	0.045	0.01	0.007		
ANG2 (90)		6.5E-04	0.021	0.003	0.01		
MIP-1b		-1.1E-02	0.048	0.007	0.006		
FGF-2		-1.1E-02	0.049	0.003	0.004		
MIP-1a		-2.6E-02	0.033	0.003	0.009		
IL-6		-3.0E-02	0.018	0.002	0.002		
IL-13		-3.0E-02	0.033	0.047			0.049
sVEGFR3		-1.0E-04	0.045	0.001	0.003	0.023	
FLT3 LG (89)	サイクル1の8日目/サイクル1の1日目	1.7E+00	0.022			0.049	
VEGFD (78)		-1.2E+00	0.043	0.006	0.006		
RANTES		2.5E+00	0.018	0.006	0.014		
IL-10		-8.6E-01	0.050	0.014	0.019		
IL-1ra		-8.3E-01	0.033	0.028	0.008		
PDGF AB (68)		-2.0E+00	0.043			0.018	0.031
G-CSF		2.2E-01	0.021	0.025			
FLT3 LG (89)	サイクル2の8日目/サイクル1の1日目	6.4E-01	0.029	0.002	0.008		
sVEGFR1		9.3E-01	0.038			0.042	
EGF (80)		1.1E+00	0.036	0.006	0.01		
PDGF BB (73)		4.4E-01	0.044			0.018	
PDGF-AA		2.3E+00	0.014	0.011	0.003		

## 【0179】

結論：サイトカイン、ケモカイン、及び血管新生因子の濃度及び発現レベルの変化は、腫瘍反応、腫瘍退縮、及び無増悪生存と関連し、E7080による治療に対する臨床反応を予測するのに用いることができる。

## 【0180】

実施例4：臨床転帰を予測するために2つ又は3つ以上の因子を組み合わせてバイオマー

10

20

30

40

50

### カ-を開発するための多変量解析

目的：この解析の目的は、突然変異、サイログロブリン、血中バイオマーカーなどの因子の組合せであって、単一の因子より良好に無増悪生存（PFS）などの臨床転帰と関連する組合せを同定し、これらの臨床転帰を予測することであった。

#### 【0181】

材料及び方法：全ての因子（すなわち、突然変異、サイログロブリン、サイトカイン、ケモカイン、及び血管新生因子）は、対象とする独立変数として、すなわち、バイオマーカー候補物質として用いた。PFSは、従属変数、すなわち、この解析における臨床転帰のうちの1つとして用いた。第1に、全ての因子を、単一の因子を伴うコックス比例ハザードモデルにより計算したp値に従いスクリーニングした。第2に、スクリーニングされた因子の全ての組合せを、コックス比例ハザードモデルで調べて、因子の全ての組合せにおいて有意な因子を見出した。全ての因子が有意な組合せを、さらなる解析のために選択した。それらの係数により定義される因子の組合せについてのハザード関数は、この解析から得られた。モデルにハザードの閾値を与えれば、患者を2つの群に割り当て得るように、各患者は、各モデルの彼／彼女自身のハザード値を有する。患者を群分けした後で、無増悪生存についてのログランク検定を実施して、2つの群（低ハザード群及び高ハザード群）間における生存曲線の差違を検定した。因子の組合せの各モデルについて最良のハザード閾値は、閾値をくまなく調べてログランク検定のp値を計算し、p値から構築された滑らかな曲線を最小化する閾値を見出すことにより同定したが、これは、U. Abel、J. Berger、及びH. Wiebelt、「CRIT LEVEL: An Exploratory Procedure for the Evaluation of Quantitative Prognostic Factors」、Methods Inf. Medicine, 23(3):154~6(1984)において記載されている手法と同様であった。モデルの最良の閾値は、患者を高ハザード群と低ハザード群とに分割する。それらのハザード値が、閾値より小さい場合、患者は、PFSが延長されると予測される。

#### 【0182】

結果及び考察：治療前にPFSを予測するためのバイオマーカーを見出すために、本発明者らは、治療前に入手可能なデータを解析した。コックス比例ハザードモデルは、2つのバイオマーカー群による4種類の組合せを示した。1つの群は、ANG-2、VEGF、GCSFであり、別の群は、IL13、MIP1a、及びMIP1bである。予測モデルにより決定されたハザード比は、VEGFとANG-2との組合せ（ハザード比 = 0.386）により、PFSが各単一の因子（VEGF；0.552、ANG-2；ハザード比 = 0.545）より良好に予測されることを示した。GCSFをVEGF及びANG-2に追加しても、ハザード比（0.413）のさらなる減少がもたらされることはなかった。IL13とMIP1aとの組合せは、本発明者らの予測モデルにおいて小さなハザード比（ $1.0 \times 10^{-9}$ ）を示したが、MIP1bを追加してもハザード比にさらに影響を及ぼすことはなかった（表13）。

#### 【0183】

## 【表13】

表13: 治療前において血中バイオマーカーの組合せを用いる予測バイオマーカー

コックス比例ハザードモデル(p値)						ログランク検定			
						例数	p値	ハザード比	予測モデル
VEGFA	ANG-2	GCSF	IL13	MIP1a	MIP1b	低 ハ ザ ー ド 群			
0.020						15	36	0.198	0.552
	0.017					27	26	0.108	0.545
0.037	0.026					23	28	0.021	0.386
0.016	0.028	0.034				25	26	0.027	0.413
			0.009	0.005		7	18	0.015	1.0E-09
			0.031	0.001	0.049	12	13	0.002	0.121

## 【0184】

次に、本発明者らは、遺伝子突然変異と血中バイオマーカーとの組合せにより、遺伝子突然変異単独の場合より良好にPFSが予測されるかどうかを検討した。コックス比例ハザードモデルは、

群(1) : NRASの突然変異( $\mu_u$ )に

- a. ANG-2を加えること；
- b. VEGF、MIP1bを加えること；
- c. VEGF、MIP1b、sVEGFR3を加えること；
- d. NRASの $\mu_u$ にANG-2、VEGF、MIP1b、sVEGFR3を加えること；

など、3つの遺伝子突然変異間の組合せによる3つの群を示した(表14)。

## 【0185】

例えば、予測モデルにより決定されたハザード比は、NRASの $\mu_u$ とANG-2との組合せ(ハザード比 = 0.085)により、PFSが突然変異単独(NRAS; ハザード比 = 0.124)より良好に予測されることを示した。また、NRASの $\mu_u$ 又はKRASの $\mu_u$ 及びANG-2のうちのいずれかの組合せ(ハザード比 = 0.083)でも、突然変異だけ(KRASの $\mu_u$ 又はNRASの $\mu_u$ ; ハザード比 = 0.205)よりハザード比が小さかった。BRAFの $\mu_u$ 又はNRASの $\mu_u$ 又はKRASの $\mu_u$ 及びIL6、VEGF、MIP1a、MIP1bのうちのいずれかによる組合せ(ハザード比 = 1.9 × 10⁻¹⁰)でも、突然変異だけ(ハザード比 = 0.086)よりハザード比が小さかった(表14)。

## 【0186】

10

20

30

40

【表 1 4】

コックス比例ハザードモデル(p 値)									ログランク検定		
突然変異 (いずれかの遺伝子)			血中バイオマーカー						例数	ハザード比	予測モデル
NRAS	BRAF, KRAS, NRAS	VEGFA, KRAS, NRAS	MIP1a	MIP1b	sVEGFR3	IL-6	低ハザード群	高ハザード群	p 値		
0.047							6	17	1.9E-02	0.124	D(NRAS,MU)
0.011		0.044			0.035		14	6	1.7E-04	0.097	$0.025)^{*}\log_{10}(\text{MIP1b}) + (0.00616)^{*}\log_{10}(\text{VEGFA100}) + (3.32)^{*}D(\text{NRAS},\text{WT}) - (0.52) < 1.81$
0.003		0.010		0.004	0.016		14	6	8.7E-06	0.054	$0.0119)^{*}\log_{10}(\text{sVEGFR3}) + (-0.0494)^{*}\log_{10}(\text{MIP1b}) + (-0.00472)^{*}\log_{10}(\text{sVEGFR3}) + (-0.00472)^{*}\log_{10}(\text{VEGFA100}) + (4.66)^{*}D(\text{NRAS},\text{WT}) - (5.9) < 3.55$
0.003		0.006	0.017	0.007	0.005		12	8	2.0E-06	2.6E-10	$(0.00148)^{*}\log_{10}(\text{Ang2}) + (-0.0606)^{*}\log_{10}(\text{MIP1b}) + (-0.000917)^{*}\log_{10}(\text{VEGFR3}) + (-0.0177)^{*}\log_{10}(\text{VEGFA100}) + (6.58)^{*}D(\text{NRAS},\text{WT}) - (5.78) < 3.97$
0.015		0.049					13	8	5.1E-04	0.115	$(0.00075)^{*}\log_{10}(\text{Ang2}) + (2.69)^{*}D(\text{NRAS},\text{WT}) - (3.92) < 0.716$
0.013		0.028					14	7	2.8E-04	0.085	$(0.000972)^{*}\log_{10}(\text{Ang290}) + (2.75)^{*}D(\text{NRAS},\text{WT}) - (2.96) < 0.633$
0.043							8	15	2.7E-02	0.205	D(KRASNRAS,MU)
0.010		0.044					13	8	2.2E-04	0.083	$(0.000869)^{*}\log_{10}(\text{ANG290}) + (2.16)^{*}D(\text{KRASNRAS},\text{WT}) - (2.24) < 0.508$
		0.004		0.044			11	9	2.6E-04	0.086	$0.0281)^{*}\log_{10}(\text{MIP1a}) + (2.19)^{*}D(\text{BRAFKRAS},\text{WT}) - (0.41) < 0.0348$
											$(0.126)^{*}\log_{10}(\text{IL6}) + (0.193)^{*}\log_{10}(\text{MIP1a}) + (0.0775)^{*}\log_{10}(\text{MIP1b}) + (0.0514)^{*}\log_{10}(\text{VEGFA100}) + (7.94)^{*}D(\text{BRAFKRAS},\text{WT}) - (14.4) < 4.69$
0.010	0.017		0.015	0.016			10	5	3.3E-05	1.9E-10	

表 14:治療前において遺伝子突然変異と血中バイオマーカーとの組合せを用いる予測バイオマーカー

## 【0 1 8 7】

結論：コックス比例ハザードモデルを用いてそれらの組合せを決定した後の予測モデルに基づくと、遺伝子突然変異若しくは血中バイオマーカーによるバイオマーカーの組合せ、又は血中バイオマーカー間の組合せにより、単一のバイオマーカーより良好に PFS が予測された。この解析により見出されたバイオマーカーの組合せは、E7080によるPFS 及び E7080による治療に対する反応などの臨床転帰を予測するのに用いることができる。

## 【0188】

実施例5：E7080を含む療法単独又はエペロリムスと組み合わせたE7080に対するRCC患者の反応性についての予測バイオマーカーとしての突然変異状態

目的：第ⅠⅠ相研究で、E7080（レンバチニブのメタンスルホン酸塩）単独又はエペロリムスと組み合わせたE7080を治療された腎細胞癌患者（RCC）における腫瘍反応及び疾患安定化の長期化が観察される。この実験は、3つの反応基準：最良総合効果、腫瘍退縮、及び無増悪生存を用いて、RCC対象がE7080による治療に対して反応するか、反応しないかを予測するのに有用なアミノ酸の突然変異を同定することを指向する。

## 【0189】

材料及び方法：組織試料は、患者がE7080を含む任意の療法を施される前の手術時に得、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織のためのプロトコールにより日常通りに処理した。用いるプロトコールには、治験審査委員会の承認を得、各対象からは説明同意文書を得る。組織が入手可能なX例の患者に由来する腫瘍組織試料を、突然変異解析に用いる。DNAは、試験に参加する患者から収集したFFPE腫瘍ブロックから単離する。ゲノムDNAは、脱パラフィン化及びわずかな改変を伴うQiagen DNA Mini Kit Tissue Protocolを介して、10ミクロンの染色していない切片2～5例から抽出する。突然変異を検出するには、実施例1に記載したシーケノム（登録商標）（San Diego、CA）プラットフォーム、並びにオンコカルタ（商標）Panel v1.0、及びオンコカルタ（商標）Panel v3.0などの配列決定法、Ion Torrent PGM、High Resolution Melting Analysis、又は古典的なサンガーパターン決定法などの半導体による配列決定法を用いる。

## 【0190】

患者がE7080を服用する期間は、評価及び追跡を容易するために、異なるサイクルへと人为的に分割する。患者には、28日間のサイクルにおいて毎日1回、経口、24mgの用量、単独又はエペロリムスとの組合せ（E7080及び/又はエペロリムス）でE7080を施す。E7080の腎細胞癌試験では、各サイクルが28日間（4週間）で、1～28日目がサイクル1であり；29日目がサイクル2の1日目であり；57日目がサイクル3の1日目である。サイクル1の1日目、サイクル2の1日目、及びサイクル3の1日目における薬物動態（PK）解析のために血液試料を収集した。患者1人当たり合計6例ずつの試料を、以下の通りに収集した：サイクル1の1日目：E7080を投与する直前、及びE7080の初回投与の2～8時間後（投与後）；サイクル2の1日目：E7080を投与する直前、及びE7080の初回投与の2～8時間後（投与後）；サイクル3の1日目：E7080を投与する直前、及びE7080の初回投与の2～8時間後（投与後）。無増悪生存を解析するために、PKパラメータをコックス比例ハザードモデルにおける共変量として用いる。

## 【0191】

4つの反応基準：最良総合効果、腫瘍反応、腫瘍退縮、及び無増悪生存を以下に定義する。

「最良総合効果」（BOR）とは、以下の状態：完全寛解（CR）、部分寛解（PR）、疾患の安定（SD）又は疾患の進行（PD）のうちの1つを有することを指し、BORの遺伝子突然変異との関連は、フィッシャーの正確検定により解析する。

「臨床利益」（CB）とは、以下の状態：完全寛解（CR）、部分寛解（PR）；又は6カ月以上の無増悪生存（PFS）を伴う疾患の安定（SD）のうちの1つを示すことを指す。

「完全寛解」とは、全ての標的病変の完全消失を意味する。

「部分寛解」とは、ベースライン最長径（LD）和を基準として、標的病変のLD和の少なくとも30%の減少を意味する。

「疾患の進行」（PD）とは、治療を開始してから記録された最小のLD和、又は1つ

10

20

30

40

50

若しくは複数の新たな病変が出現してから記録された最小のLD和を基準として、標的病変のLD和の少なくとも20%の増大を意味する。

「疾患の安定」とは、治療を開始してからの最小のLD和を基準として、PRと見なされる標的病変の十分な退縮でもなく、疾患の進行(PD)と見なされる十分な増大でもないことを意味する。

「無増悪生存」(PFS)とは、治療の開始日からPD状態に入る前の最終日までの期間を指し、遺伝子突然変異のPFSとの相関は、ログランク検定及びコックス比例ハザードモデルにより解析する。

「腫瘍退縮」(TS)とは、ベースライン直径和を基準として、標的病変の直径和の百分率変化を意味し、遺伝子突然変異のTSとの相関は、ピアソンの積率相関係数検定及びスピアマンの順位相関係数検定により解析する。  
10

「腫瘍反応」(TR)は、「部分寛解」(PR)を示す対象を、疾患の安定(SD)又は疾患の進行(PD)を示す対象と比較するものであり、突然変異解析のためのものではなく、TG及び血中バイオマーカーのためのものである。

#### 【0192】

#### 実施例6：RCC対象におけるE7080単独又はエベロリムスと組み合わせたE7080についての予測バイオマーカー及び反応バイオマーカーとしての血中バイオマーカー

目的：この解析の目的は、臨床試験のE7080及び/又はエベロリムスによる治療前及び治療後の両方において患者から得られた血液試料中のサイトカイン、ケモカイン、及び血管新生因子（本明細書では、まとめて「血中バイオマーカー」と称する）を測定し、腎細胞癌患者がE7080による治療に反応するのか、反応しないのかを予測するのに用い得る血中バイオマーカーを同定することである。これらの解析のために、4つの反応基準、すなわち：最良総合効果、腫瘍反応、腫瘍退縮の%、及び無増悪生存を使用する。  
20

#### 【0193】

材料及び方法：患者にE7080単独又はエベロリムスと組み合わせたE7080を、28日間のサイクルにより毎日1回経口、24mgの用量で施す。血清試料は、サイクル1の1日目（治療前）、サイクル1の15日目、及びその後の各サイクルの1日目の投与直前、並びに患者が治療を休止する期間に収集する。7.5mLの血液をステンレス鋼製の血清用試験管(SST)へと引き入れ、室温で少なくとも30分間にわたり凝固させる。試料収集後60分以内に、20~25、1400×gで10分間にわたり試験管を遠心分離する。ペレットを攪乱せずに上清を吸い上げ、血清を混合し、2つの試料用試験管へと分割し、解析のためのさらなる治療まで直立の位置で凍結させて(-70)保管する。患者に由来する血清試料を血中バイオマーカー解析に用いる。この解析では、サイクル1の1日目（ベースライン）、サイクル1の15日目に由来する血清、その後の各サイクルの1日目の投与前の試料、及び患者が治療を休止するときの血清試料を用いる。無増悪生存の共変量との関連又は非関連を解析する。用いられる共変量は、以下のPKパラメータ：サイクル1の1日目のC<sub>max</sub>（サイクル1の1日目の投与2時間～8時間後におけるE7080濃度：MAX1）；サイクル2の1日目のC<sub>max</sub>（サイクル2の1日目の投与2時間～8時間後におけるE7080濃度：MAX2）；サイクル2の1日目のC<sub>rough</sub>（サイクル2の1日目の投与前におけるE7080濃度：MIN2）である。血清試料は、同じ対象に由来する全ての時点が同じ日にアッセイされるバッチフォーマットで調べる。アッセイ日には、試料を-80から取り出して、融解させ、室温に到達させる。製造元の指示書に従い、以下の市販のアッセイキット：Human Soluble Tie-2 ELISA(R&D Systems型番：DTE200)、Human Angiopoietin-1 ELISA(R&D Systems型番：DANG10)、Human Angiopoietin-2 ELISA(R&D Systems型番：DANG20)、Human Soluble Receptor Multiple(Millipore型番：HSCR-32K；sVEGFR1、sVEGFR2、及びsVEGFR3に限る)、Human Cytokine/Chemokine Panel I Multiplex(Millipore型番：MPXHC  
30  
40  
50

YTO-60K; IL-1、IL-1<sub>r</sub>a、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-13、IL-15、IL-17、SCD40L、EGF、エオタキシン、FGF-2、G-CSF、GM-CSF、IFN-、IP-10、MCP-1、MIP-1、MIP-1<sub>c</sub>、PDGF-AA、RANTES、TGF-、TNF-、及びVEGFに限る)、及びHuman Growth Factor Multiplex (Origene TruPLEX型番: AM100096; PDGF-AB、PDGF-BB、FGF4、VEGFD、FGF2、EGF、HGF、FLT3LG、ANGPT2、PGF、及びVEGFA)を用いて、血清試料について調べる。

## 【0194】

10

SoftMax Pro 5.2 ソフトウェアを伴うMolecular Devices UVmax kineticマイクロプレートリーダーを用いて、ELISA プレートを測定する。マルチプレックスアッセイは、Bio-Plex Manager 4.1 ソフトウェアを伴うBio-Rad Bio-Plexシステムを用いて実施する。最終タンパク質濃度 (pg/mL) は、各アッセイの検量線から計算する。アッセイに応じて、試験前に血清試料をアッセイ緩衝液中で希釈しておくことができる。これらの場合は、タンパク質濃度に希釈倍率を乗じる。

## 【0195】

4つの反応基準：最良総合効果、腫瘍反応、腫瘍退縮、及び無増悪生存を以下に定義し、表示される方法により解析する。

20

「最良総合効果」(BOR)とは、以下の状態：完全寛解(CR)、部分寛解(PR)、疾患の安定(SD)又は疾患の進行(PD)のうちの1つを有することを指し、BORの遺伝子突然変異との関連は、フィッシャーの正確検定により解析する。

「臨床利益」(CB)とは、以下の状態：完全寛解(CR)、部分寛解(PR)；又は6カ月以上の無増悪生存(PFS)を伴う疾患の安定(SD)のうちの1つを示すことを指し、CBの遺伝子突然変異との関連は、スチュードントのt検定及びマン・ホイットニーのU検定により解析する。

「完全寛解」とは、全ての標的病変の完全消失を意味する。

「部分寛解」とは、ベースライン最長径(LD)和を基準として、標的病変のLD和の少なくとも30%の減少を意味する。

30

「疾患の進行」(PD)とは、治療を開始してから記録された最小のLD和、又は1つ若しくは複数の新たな病変が出現してから記録された最小のLD和を基準として、標的病変のLD和の少なくとも20%の増大を意味する。

「疾患の安定」とは、治療を開始してからの最小のLD和を基準として、PRと見なされる標的病変の十分な退縮でもなく、疾患の進行(PD)と見なされる十分な増大でもないことを意味する。

「無増悪生存」(PFS)とは、治療の開始日からPD状態に入る前の最終日までの期間を指し、遺伝子突然変異のPFSとの相関は、ログランク検定及びコックス比例ハザードモデルにより解析する。

「腫瘍退縮」(TS)とは、ベースライン直径和を基準として、標的病変の直径和の百分率変化を意味し、遺伝子突然変異のTSとの相関は、ピアソンの積率相関係数検定及びスピアマンの順位相関係数検定により解析する。

40

「腫瘍反応」(TR)は、「部分寛解」(PR)を示す対象を、疾患の安定(SD)又は疾患の進行(PD)を示す対象と比較するものであり、血中バイオマーカーの関連をスチュードントのt検定及びマン・ホイットニーのU検定により解析する。

## 【0196】

実施例7：RCC患者における臨床転帰を予測するために2つ又は3つ以上の因子を組み合わせてバイオマーカーを開発するための多変量解析

目的：この解析の目的は、突然変異、並びにサイトカイン、ケモカイン、及び血管新生因子のレベル又は発現比などの因子の組合せであって、単一の因子より良好に無増悪生存

50

(PFS)と関連する組合せを同定し、RCC患者におけるPFS及びTSなどの臨床転帰を予測することである。

#### 【0197】

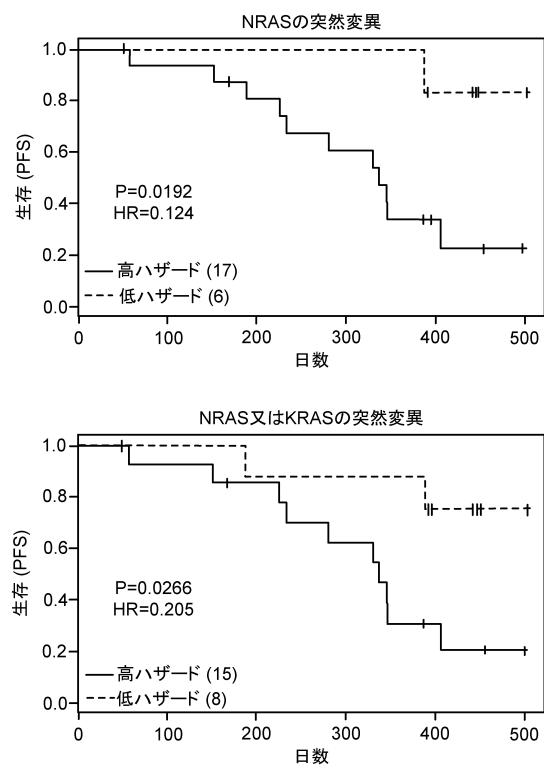
材料及び方法：全ての因子（すなわち、突然変異、サイトカイン、ケモカイン、及び血管新生因子）は、対象とする独立変数として、すなわち、バイオマーカー候補物質として用いる。PFSは、従属変数、すなわち、この解析における臨床転帰として用いる。第1に、全ての因子を、単一の因子を伴うコックス比例ハザードモデルにより計算したp値に従いスクリーニングする。第2に、スクリーニングされた因子の全ての組合せを、コックス比例ハザードモデルにより調べて、因子の全ての組合せにおいて有意な因子を見出す。全ての因子が有意な組合せを、さらなる解析のために選択する。それらの係数により定義される因子の組合せについてのハザード関数は、この解析から得られる。モデルにハザードの閾値を与えれば、患者を2つの群に割り当て得るように、各患者は、各モデルの彼／彼女自身のハザード値を有する。患者を群分けした後で、無増悪生存についてのログランク検定を実施して、2つの群（低ハザード群及び高ハザード群）間における生存曲線の差違を検定する。因子の組合せの各モデルについて最良のハザード閾値は、閾値をくまなく調べてログランク検定のp値を計算し、p値から構築された滑らかな曲線を最小化する閾値を見出すことにより同定するが、これは、U. Abel、J. Berger、及びH. Wiebelt、「CRIT LEVEL: An Exploratory Procedure for the Evaluation of Quantitative Prognostic Factors」、Methods Inf. Medicine, 23(3):154~6(1984)において記載されている手法に類似する。モデルの最良の閾値は、患者を高ハザード群と低ハザード群とに分割する。PFS延長についての患者予測の基準は、この閾値より低いハザード関数により計算されるハザード値として定義される。10

#### 【0198】

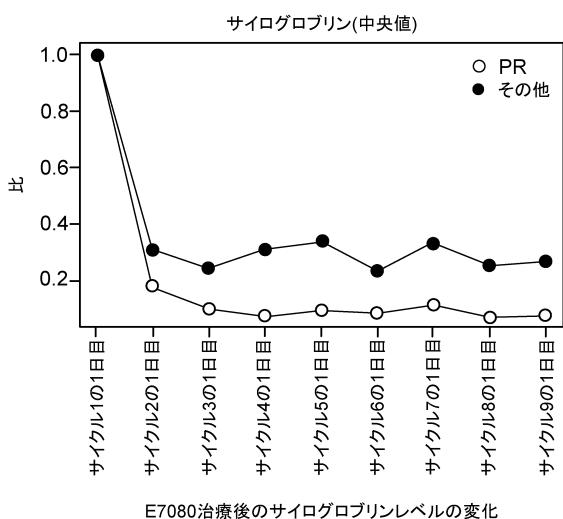
##### 他の実施形態

本発明をその詳細な説明と共に記載してきたが、前出の記載は、本発明の範囲を例示することを意図するものであり、これを限定することを意図するものではなく、本発明の範囲は、付属の特許請求の範囲により規定されている。他の態様、利点、及び改変は、以下の特許請求の範囲内にある。20

【図1】



【図2】



---

フロントページの続き

(72)発明者 門脇 正史

茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社筑波研究所内

(72)発明者 松井 順二

茨城県つくば市東光台5丁目1番地3 エーザイ株式会社筑波研究所内

(72)発明者 シモン ジェーソン エス.

アメリカ合衆国， ニュー ジャージー州， ウッドクリフ レイク， ティース ブルーヴァード 155 エーザイ インコーポレイテッド内

(72)発明者 シュ， ルーシー

アメリカ合衆国， ニュー ジャージー州， ウッドクリフ レイク， ティース ブルーヴァード 155 エーザイ インコーポレイテッド内

審査官 小石 真弓

(56)参考文献 國際公開第2010/048304 (WO, A1)

Clin. Cancer Res., 2011年 4月, Vol.17, No.8, , p2528-2537

Annals of Oncology, 2011年 4月, Vol.23, p46-52

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 12 N 15 / 09

C 12 Q 1 / 68

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )