

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-538708

(P2017-538708A)

(43) 公表日 平成29年12月28日 (2017. 12. 28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 C 0 8 6
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-531248 (P2017-531248)	(71) 出願人	514298139
(86) (22) 出願日	平成27年12月8日 (2015. 12. 8)		バイエル・ファルマ・アクティエンゲゼル
(85) 翻訳文提出日	平成29年8月7日 (2017. 8. 7)		シャフト
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/078919		ドイツ・1 3 3 5 3・ベルリン・ミュラー
(87) 国際公開番号	W02016/091849		シュトラッセ・1 7 8
(87) 国際公開日	平成28年6月16日 (2016. 6. 16)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	14197400.6		弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成26年12月11日 (2014. 12. 11)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 実広 信哉
		(74) 代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
		(72) 発明者	ペーター・エリングハウス
			ドイツ・4 9 3 2 4・メレ・アウフ・デア
			・オーブストヴィーゼ・3
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 pan FGFR阻害剤の使用およびpan FGFR阻害剤を用いる治療に適切な癌を有する患者を同定する方法

(57) 【要約】

本発明は、対象における癌の治療における使用のためのpan FGFR阻害剤に基づいており、ここで、対象は、対象からの腫瘍組織サンプル中のFGFR1、FGFR2および/またはFGFR3 mRNAの合計が過剰発現されていることがわかっている対象である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象における癌の治療における使用のためのpan FGFR阻害剤であって、前記対象が、該対象からの腫瘍組織サンプル中のFGFR1、FGFR2、および / またはFGFR3 mRNAの合計が過剰発現されていることがわかっている対象である、pan FGFR阻害剤。

【請求項 2】

mRNA過剰発現が、腫瘍組織サンプルのFGFR1、FGFR2、および / またはFGFR3 mRNAの合計の、in situハイブリダイゼーションによる少なくとも4のスコアリングによって特徴づけられる、請求項1に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 3】

10

前記癌が、頭頸部の扁平上皮細胞癌である、請求項1または2に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 4】

スコアリングの合計が少なくとも6である、請求項3に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 5】

FGFR1、FGFR2、またはFGFR3のうちの少なくとも1つが、少なくとも3のスコアリングを有する、請求項4に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 6】

前記癌が食道癌である、請求項1または2に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 7】

20

スコアリングの合計が少なくとも5である、請求項6に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 8】

FGFR1、FGFR2、またはFGFR3のうちの少なくとも1つが、少なくとも4のスコアリングを有する、請求項7に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 9】

FGFR1が、少なくとも4のスコアリングを有する、請求項8に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 10】

前記癌が卵巣癌である、請求項1または2に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 11】

前記スコアリングの合計が少なくとも9である、請求項10に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 12】

30

前記癌が肺癌である、請求項1または2に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 13】

前記スコアリングの合計が少なくとも5である、請求項12に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 14】

前記癌が結腸癌である、請求項1または2に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 15】

前記癌が膀胱癌である、請求項1または2に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 16】

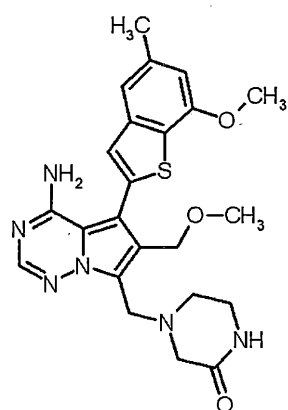
前記スコアリングの合計が少なくとも5である、請求項15に記載のpan FGFR阻害剤。

【請求項 17】

40

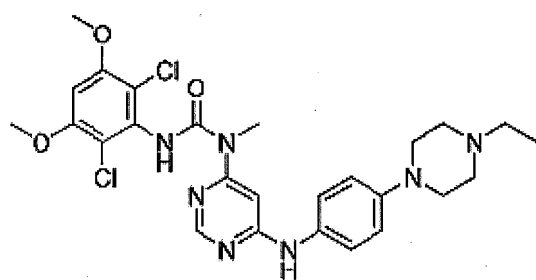
請求項1から16のいずれか一項に記載のpan FGFR阻害剤の使用であって、前記pan FGFR阻害剤が、その塩、溶媒和物および / または前記塩の溶媒和物の形態で存在することができる、式 (I)、(II)、(III)、(IV)、および (V)

【化 1】



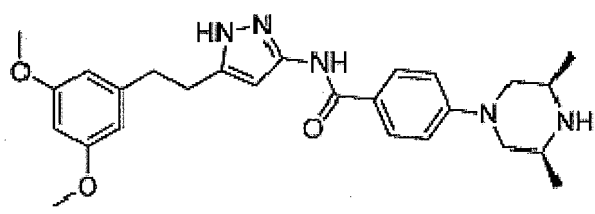
(I)

10



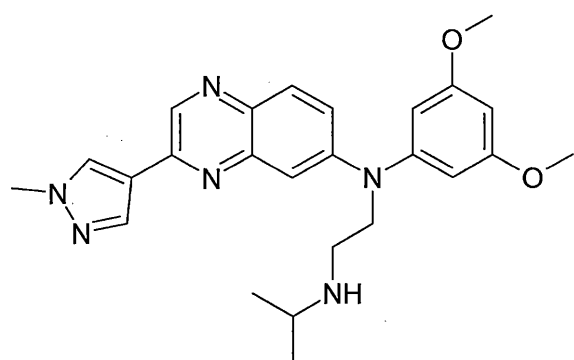
(II)

20



(III)

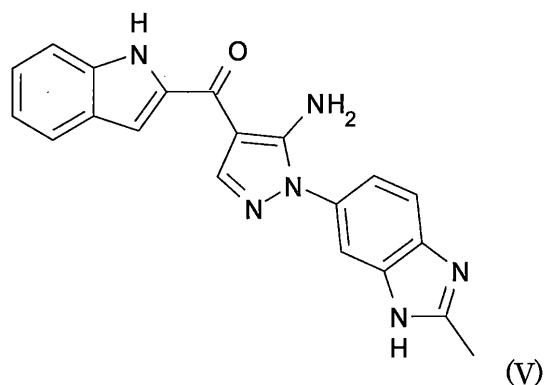
30



(IV)

40

【化 2】



10

の化合物からなる群から選択される、使用。

【請求項 18】

pan FGFR阻害剤を用いる治療に適格な癌を有する患者を同定する方法であって、FGFR1、FGFR2、および / またはFGFR3 mRNA過剰発現の有無について前記患者からの腫瘍組織サンプルを試験するステップを含み、前記患者が、FGFR1、FGFR2、および / またはFGFR3の測定されたmRNA発現の合計が過剰発現されている場合に、pan FGFR阻害剤を用いる治療に適格である、方法。

20

【請求項 19】

前記癌が、頭頸部の扁平上皮細胞癌である、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記癌が食道癌である、請求項18に記載の方法。

【請求項 21】

前記癌が卵巣癌である、請求項18に記載の方法。

【請求項 22】

前記癌が肺癌である、請求項18に記載の方法。

【請求項 23】

前記癌が結腸癌である、請求項18に記載の方法。

30

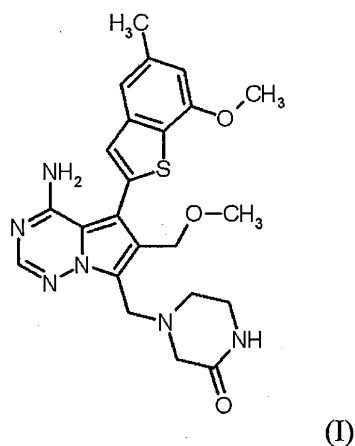
【請求項 24】

前記癌が膀胱癌である、請求項18に記載の方法。

【請求項 25】

前記pan FGFR阻害剤が、その塩、溶媒和物、および / または前記塩の溶媒和物の形態で存在することができる、式I

【化 3】



40

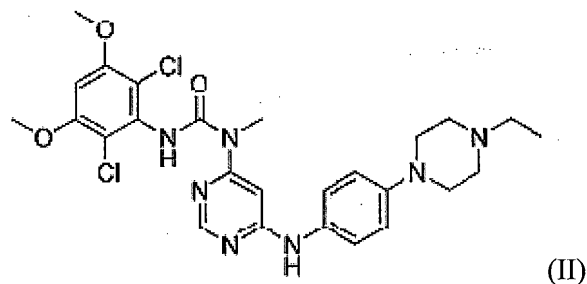
50

の化合物である、請求項18に記載の方法。

【請求項 26】

前記pan FGFR阻害剤が、その塩、溶媒和物、および/または前記塩の溶媒和物の形態で存在することができる、式(II)

【化4】



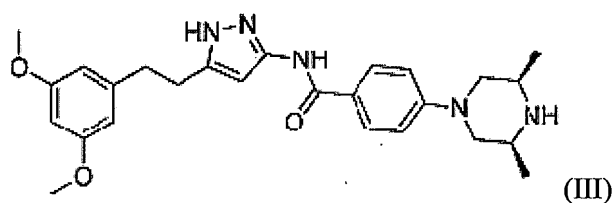
10

の化合物である、請求項18に記載の方法。

【請求項 27】

前記pan FGFR阻害剤が、その塩、溶媒和物、および/または前記塩の溶媒和物の形態で存在することができる、式(III)

【化5】



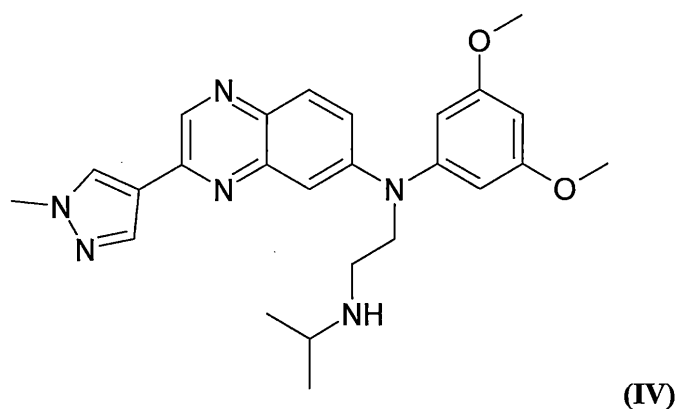
20

の化合物である、請求項18に記載の方法。

【請求項 28】

前記pan FGFR阻害剤が、その塩、溶媒和物、および/または前記塩の溶媒和物の形態で存在することができる、式(IV)

【化6】



30

40

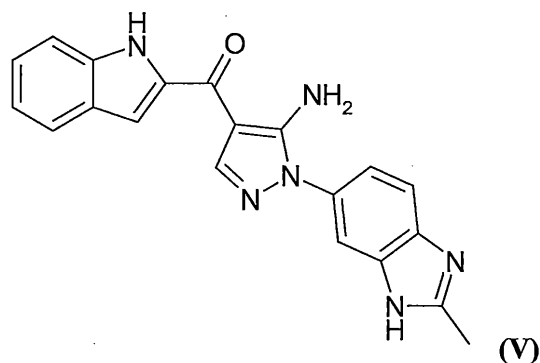
の化合物である、請求項18に記載の方法。

【請求項 29】

50

前記pan FGFR阻害剤が、その塩、溶媒和物、および／または前記塩の溶媒和物の形態で存在することができる、式(V)

【化7】



10

の化合物である、請求項18に記載の方法。

【請求項30】

ホルムアルデヒド固定癌組織サンプルのFGFR1、FGFR2、および／またはFGFR3の合計の、in situハイブリダイゼーションによる少なくとも4のスコアリングを示す患者が、それぞれの前記阻害剤を用いる治療に適格である、請求項18から29のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項31】

有効量のpan FGFR阻害剤を投与することによる対象における癌の治療方法であって、前記対象が、該対象からの腫瘍組織サンプル中のFGFR1、FGFR2、および／またはFGFR3 mRNAの合計が過剰発現されていることがわかっている対象である、治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、対象における癌の治療における使用のためのpan FGFR阻害剤に基づいており、ここで、対象は、対象からの腫瘍組織サンプル中のFGFR1、FGFR2および／またはFGFR3 mRNAの合計が過剰発現されていることがわかっている対象である。

30

【0002】

別の実施形態において、本発明は、FGFR1、FGFR2および／またはFGFR3 mRNA過剰発現の有無について患者からの腫瘍組織サンプルを試験するステップを含む、pan FGFR阻害剤を用いる治療に適格な癌を有する患者を同定する方法を対象とし、ここで、患者は、FGFR1、FGFR2およびFGFR3の測定されたmRNA発現の合計が過剰発現されている場合に、pan FGFR阻害剤を用いる治療に適格である。

【背景技術】

【0003】

癌は世界的に主な死因であり、2008年には760万人の死亡（総死亡のおよそ13%）を占めている。癌による死亡は、2030年には世界中で1,100万人以上に増加し続けると予測されている（WHO出典、Fact Sheet No. 297、2011年2月）。

40

【0004】

癌の発生の仕方は多く、これが癌の治療が困難である理由の1つである。細胞の形質転換が起こりうる1つの方法は、遺伝子変化にしたがうものである。ヒトゲノムプロジェクトが完了し、ゲノム不安定性およびヒト癌遺伝子の異質性が明らかになった。これらの遺伝子変化を同定する最近の方策は、癌遺伝子発見のプロセスを加速させた。遺伝子異常は、例えば、タンパク質の過剰発現、ひいてはこれらのタンパク質の非生理的活性化につながる可能性がある。いくつかのオンコプロテインが由来するタンパク質の1つのファミリーは、チロシンキナーゼ、特に受容体チロシンキナーゼ（RTK）である。過去20年間に、

50

多くの研究の道が、癌に至る有害な細胞増殖におけるRTK媒介性シグナル伝達の重要性を示した。近年、新しい種類の抗腫瘍性薬剤としてチロシンキナーゼの選択的小分子阻害剤を用いた診療所において有望な結果が得られた [SwinneyおよびAnthony、Nature Rev. Drug Disc. 10 (7), 507 - 519 (2011)]。

【0005】

線維芽細胞増殖因子 (FGF) およびその受容体 (FGFR) は、胚発生および成人の病態生理のさまざまな態様を包含するさまざまな生物学的過程において重要な役割を果たす独特で多様なシグナル伝達系の一部を成す [ItohおよびOrnitz、J. Bio-chem. 149 (2), 121 - 130 (2011)]。時空間的に、FGFは、FGFR結合を通じて、遊走、増殖、分化および生存を含む広範な細胞機能を刺激する。

10

【0006】

FGFファミリーは、細胞表面で発現される高度に保存された4つの受容体チロシンキナーゼ (FGFR - 1 ~ - 4) に結合する18の分泌型ポリペプチド増殖因子を含む。さらに、FGFR - 5は、FGFに結合することができるが、キナーゼドメインを持たず、したがって、細胞内シグナル伝達はない。選択的転写開始、選択的スプライシングおよびC末端切断によって複数のアイソフォームを生じるいくつかの転写過程および翻訳過程によってリガンド / 受容体相互作用の特異性は増す。さまざまなヘパラン硫酸プロテオグリカン (例えば、シンデカン) は、FGF / FGFR複合体の一部であり、FGFがシグナル伝達反応を誘導する能力に強く影響する [Polanskaら、Developmental Dynamics 238 (2), 277 - 293 (2009)]。FGFRは、3つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン、一回膜貫通ドメインおよび細胞内二量体化チロシンキナーゼドメインからなる細胞表面受容体である。FGFが結合すると、細胞内キナーゼが極めて接近し、互いにトランスリン酸化できるようになる。7つのリン酸化部位が同定されている (例えば、FGFR - 1では、Tyr463、Tyr583、Tyr585、Tyr653、Tyr654、Tyr730およびTyr766)。

20

【0007】

これらのホスホチロシン基のいくつかは、FGFRによってそれ自体も直接リン酸化され得る下流のシグナル伝達分子のドッキング部位として働き、複数のシグナル伝達経路の活性化をもたらす。したがって、MAPKシグナル伝達カスケードは、細胞増殖および分化に関係づけられ、PI3K / Aktシグナル伝達カスケードは、細胞生存および細胞運命決定に関与する一方、PI3KおよびPKCシグナル伝達カスケードは、細胞極性の制御において機能を有する。FGFシグナル伝達のいくつかのフィードバック抑制因子が現在同定されており、Spry (Sprouty) およびSef (FGFと同様の発現) ファミリーのメンバーが含まれる。さらに、特定の条件では、FGFRはプレゴルジ膜からサイトゾル内に放出される。受容体およびそのリガンドであるFGF - 2は、インポーチンを含む機構によって核内に共輸送され、遺伝子活性化ゲート開閉因子として作用する共通の必須転写共役因子であるCREB結合タンパク質 (CBP) 複合体に関与する。FGF - 2、FGFR - 1およびFGFR - 2の免疫組織化学的発現と、その細胞質および核の腫瘍細胞の局在の間には、重相関が観察されている。例えば、肺腺癌において、この関連性が核レベルでも見られ、核での複合体の積極的な役割を強調している [KorcおよびFriesel、Curr. Cancer Drugs Targets 5, 639 - 651 (2009)]。

30

【0008】

FGFは、発育中および成体の組織の両方で広く発現され、組織発生、組織再生、血管新生、腫瘍化、細胞遊走、細胞分化および細胞生存を含むさまざまな正常過程および病理過程において重要な役割を果たす。さらに、血管新生促進因子としてのFGFはまた、血管内皮増殖因子受容体 - 2 (VEGFR - 2) 阻害に対する抵抗性の発生現象に関係づけられた [BergersおよびHanahan、Nat. Rev. Cancer 8, 592 - 603 (2008)]。

40

【0009】

最近のシグナル伝達ネットワークの癌ゲノムプロファイルにより、いくつかの一般的なヒト癌の発生における異常なFGFシグナル伝達の重要な役割が示された [Wescheら、Biochem. J. 437 (2), 199 - 213 (2011)]。リガンド非依存性FGFR構成的シグナル伝達が、脳癌、頭頸部癌、胃癌および卵巣癌などの多くのヒト癌において記述されている。FGFR変

50

異型ならびにFGFR遺伝子内転座が、骨髄増殖性疾患などの悪性病変において同定されている。興味深いことに、多くの発達障害の原因であることが見出された同じ変異が腫瘍細胞でも見出されている（例えば、軟骨形成不全および致死性骨異形成で見られ、FGFR-3の二量体化、したがって、構成的活性化を引き起こす変異は、膀胱癌でもしばしば見出される）。二量体化を促進する変異は、FGFRからのリガンド非依存性シグナル伝達を増加させ得る機構の1つに過ぎない。FGFRのキナーゼドメインの内部または外部に位置する他の変異は、ドメインの高次構造を変化させ、持続的に活性なキナーゼを生じさせ得る。

【0010】

FGFR-1のゲノム位置である染色体領域8p11-12の増幅は、乳癌において一般的な局所的増幅であり、乳癌の約10%で起こり、主にエストロゲン受容体陽性癌で起こる。FGFR-1増幅はまた、非小細胞肺扁平上皮癌においても報告されており、卵巣癌、膀胱癌および横紋筋肉腫において低発生率で見られる。同様に、約10%の胃癌はFGFR-2増幅を示し、これは、予後不良の扁平上皮非小細胞肺癌（sqNSCLC）、びまん性癌に関連する。さらに、FGFR-1~-4に位置する複数の一塩基多型（SNP）は、選択的な癌発症リスクの増大と相関することが分かっているか、または、予後不良に関連することが報告されている（例えば、乳癌、結腸癌および肺腺癌におけるFGFR-4 G388R対立遺伝子）。癌を促進するこれらのSNPの直接的な役割は依然として議論的である。

【0011】

FGFR1 8p12遺伝子座の増幅が、最大20%の対象において観察されている [Dutt A.ら、PLoS One . 2011 ; 6 (6) : e20351]。FGFR1遺伝子増幅はこれまで、sqNSCLCにおいて最も頻繁に観察される分子変化のうちの1つである一方、FGFRをコードする遺伝子における変異は、sqNSCLC対象においてかなりまれである（<2%） [Limら、Future Oncol . 2013 Mar ; 9 (3) : 377 - 86]。FGFR1遺伝子増幅と標的発現レベル（mRNAまたはタンパク質発現）との相関関係を調査した最近の刊行物は、FGFR1遺伝子増幅がない腫瘍組織において高FGFR1 mRNA過剰発現を示す非常に高い割合のsqNSCLC対象（50%）を明らかにした。さらにいっそう重要なことには、FGFR1コピー数の増加が確認された対象の54%において、この増加は、さらに高いFGFR1標的発現レベルをもたらさず、pan-FGFR阻害剤を用いる治療が成功する見込みは非常に薄くなる。さらに、高FGFR1 mRNA発現も22%の肺腺癌（AC）において観察することができたが、FGFR1増幅の事例は、この組織型では1つも見られなかった。インビトロで、肺癌細胞株におけるFGFR1 mRNA発現は、それぞれの細胞株のFGFR1コピー数よりも、FGFR阻害剤ボナチニブに対する抗増殖反応との良い相関を示した [Wynesら]。

【0012】

FGFR1遺伝子増幅は、頭頸部（head & neck）扁平上皮細胞癌（HNSCC）の12,6%の事例で観察される [Boehm D.ら、Virchows Arch . 2014 May ; 464 (5) : 547 - 51] が、一方、文献中のFGFR1腫瘍タンパク質過剰発現の罹患率は12~100%の範囲である。HNSCC患者の腫瘍におけるFGFR1 mRNA過剰発現の罹患率は、これまで文献において調べられていないが、最近の刊行物では、頭頸部領域のSCC（扁平上皮細胞癌）細胞株が、そのFGFR1コピー数、mRNAおよびタンパク質発現状態にしたがって特徴づけられ、続いて、小分子FGFR阻害剤BGJ398に対するその感度が試験された。著者らは、FGFR1遺伝子増幅がmRNA発現とも、タンパク質発現とも相関しないことを見出した。興味深いことに、BGJ398に対する感度は、高いタンパク質レベルおよびmRNAレベルを持つ細胞株でのみ観察された [Maessenhouse nら、Annals of Translational Medicine Vol 1 , No 3 (October 2013)]。原発性HNSCC腫瘍におけるFGFR2 mRNA過剰発現の罹患率およびそのFGFR阻害剤に対する治療に対する反応との相関関係については何も分かっていないが、FGFR2をコードする遺伝子における活性化突然変異は、FGFR阻害剤を用いる治療に対して、患者由来のHNSCC細胞株を感受性にした [Liao、RG Cancer Res . 2013 Aug 15 ; 73 (16) : 5195 - 205]。HNSCCにおけるFGFR3 mRNA発現に関して、最近の刊行物では、HNSCC癌患者の腫瘍において、非腫瘍対照と比べたとき、むしろFGFR3 mRNAの低発現が観察された [Marshall MEら、Clin Cancer Res . 2011 Aug 1 ; 17 (15) : 5016 - 25]。HNSCCにおけるFGFR3 mRNA発現と、FGFR阻害剤を用

いる治療に対する反応との相関関係はこれまで記述されていない。

【 0 0 1 3 】

FGFR1遺伝子は、約21%の食道癌患者において増幅される [Bandlaら、Ann Thorac Surg . 2012 Apr ; 93 (4) : 1101 - 6] が、一方、FGFR2遺伝子は、約4%の食道癌患者において増幅される [Kato Hら、Int J Oncol . 2013 Apr ; 42 (4) : 1151 - 8] 。FGFR1 [De - Chen、L VOLUME 46 | NUMBER 5 | MAY 2014 Nature Genetics] およびFGFR2 [Patersonら、J Pathol . 2013 May ; 230 (1) : 118 - 28] タンパク質は、10～20%の食道癌患者において過剰発現されることが明らかになっている。FGFR1およびFGFR2 mRNA発現レベルは、食道癌患者においてこれまで調査されていない。pan - FGFR阻害剤に対する食道癌の薬剤感受性については何も分かっていない。

10

【 0 0 1 4 】

約8%の卵巢癌においてFGFR1増幅が観察されており [Theilletら、Genes Chromosom . Cancer , 7 : 219 - 226] 、FGFR2過剰発現が最近観察された [Taniguchiら、Int J Gynecol Cancer . 2013 Jun ; 23 (5) : 791 - 6] 。FGFR阻害剤に対する薬剤感受性に関して、卵巢癌細胞株A2780は、BGJ398を用いる治療に対してインビトロで感受性であることが判明した [Guagnanoら、Cancer Discov . 2012 Dec ; 2 (12) : 1118 - 33] 。一方、卵巢癌患者において、FGFR2融合は、該患者の循環腫瘍細胞をBGJ398治療に対して感受性にした [Martignettiら、Neoplasia . 2014 Jan ; 16 (1) : 97 - 103] 。したがって、FGFRをコードする遺伝子におけるDNA変化の発癌促進因子機能 (oncogenic driver function) は依然として議論の余地がある。

20

【 0 0 1 5 】

FGFR1増幅は、約18%の骨肉腫患者に観察され [Fernanda - Amaryら、Cancer Med . 2014 Aug ; 3 (4) : 980 - 7] 、それに呼応して、FGFR小分子阻害剤BGJ398の抗増殖作用が、FGFR1増幅骨肉腫細胞株G - 292において観察された [Guagnanoらを参照] 。

【 0 0 1 6 】

要約すると、多数のインビトロおよびインビボ試験が実施され、FGFR - 1 ~ - 4を重要な癌標的として確認しており、包括的な総説は、これらの知見を要約している [例えば、Heinzleら、Expert Opin . Ther . Targets 15 (7) , 829 - 846 (2011) ; Wescheら、Bio - chem . J . 437 (2) , 199 - 213 (2011) ; GreulichおよびPollock、Trends in Molecular Medicine 17 (5) , 283 - 292 (2011) ; Haugstenら、Mol . Cancer Res . 8 (11) , 1439 - 1452 (2010) を参照] 。いくつかの方策は、ヒト腫瘍における異常なFGFR - 1 ~ - 4シグナル伝達減少にしたがうものであり、とりわけ、遮断抗体および小分子阻害剤を含む。いくつかの選択的小分子FGFR阻害剤は現在、AZD - 4547 (Astra - Zeneca、式 (III) の化合物) 、BJG - 398 (Novartis、式 (II) の化合物) 、JNJ - 42756493 (Johnson & Johnson、式 (I V) の化合物) およびCH 5183284 (Chanugi、式 (V) の化合物) など、臨床開発中である。

30

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 7 】

【 非特許文献 1 】 WHO出典、Fact Sheet No . 297、2011年2月

40

【 非特許文献 2 】 SwinneyおよびAnthony著、Nature Rev . Drug Disc . 10 (7) , 507 - 519 (2011)

【 非特許文献 3 】 ItohおよびOrnitz著、J . Bio - chem . 149 (2) , 121 - 130 (2011)

【 非特許文献 4 】 Polanskaら著、Developmental Dynamics 238 (2) , 277 - 293 (2009)

【 非特許文献 5 】 KorcおよびFriesel著、Curr . Cancer Drugs Targets 5 , 639 - 651 (2009)

【 非特許文献 6 】 BergersおよびHanahan著、Nat . Rev . Cancer 8 , 592 - 603 (2008)

【 非特許文献 7 】 Wescheら著、Biochem . J . 437 (2) , 199 - 213 (2011)

【 非特許文献 8 】 Dutt A . ら著、PLoS One . 2011 ; 6 (6) : e20351

【 非特許文献 9 】 Limら著、Future Oncol . 2013 Mar ; 9 (3) : 377 - 86

50

- 【非特許文献 1 0】Boehm D. ら 著、Virchows Arch. 2014 May ; 464 (5) : 547 - 51
 【非特許文献 1 1】Maessenhausen ら 著、Annals of Translational Medicine Vol 1 , No 3 (October 2013)
 【非特許文献 1 2】Liao 著、RG Cancer Res . 2013 Aug 15 ; 73 (16) : 5195 - 205
 【非特許文献 1 3】Marshall ME ら 著、Clin Cancer Res . 2011 Aug 1 ; 17 (15) : 5016 - 25

- 【非特許文献 1 4】Bandla ら 著、Ann Thorac Surg . 2012 Apr ; 93 (4) : 1101 - 6
 【非特許文献 1 5】Kato H ら 著、Int J Oncol . 2013 Apr ; 42 (4) : 1151 - 8
 【非特許文献 1 6】De - Chen 著、L VOLUME 46 , NUMBER 5 , MAY 2014 Nature Genetics
 【非特許文献 1 7】Paterson ら 著、J Pathol . 2013 May ; 230 (1) : 118 - 28 10
 【非特許文献 1 8】Theillet ら 著、Genes Chromosom . Cancer , 7 : 219 - 226
 【非特許文献 1 9】Taniguchi ら 著、Int J Gynecol Cancer . 2013 Jun ; 23 (5) : 791 - 6
 【非特許文献 2 0】Guagnano ら 著、Cancer Discov . 2012 Dec ; 2 (12) : 1118 - 33
 【非特許文献 2 1】Martignetti ら 著、Neoplasia . 2014 Jan ; 16 (1) : 97 - 103
 【非特許文献 2 2】Fernanda - Amary ら 著、Cancer Med . 2014 Aug ; 3 (4) : 980 - 7
 【非特許文献 2 3】Heinzle ら 著、Expert Opin . Ther . Targets 15 (7) , 829 - 846 (2011)
 【非特許文献 2 4】Greulich および Pollock 著、Trends in Molecular Medicine 17 (5) , 283 - 292 (2011)
 【非特許文献 2 5】Haugsten ら 著、Mol . Cancer Res . 8 (11) , 1439 - 1452 (2010) 20
 【非特許文献 2 6】Wynes ら 著、Clin Cancer Res . 2014 Jun 15 ; 20 (12) : 3299 - 309

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 8 】

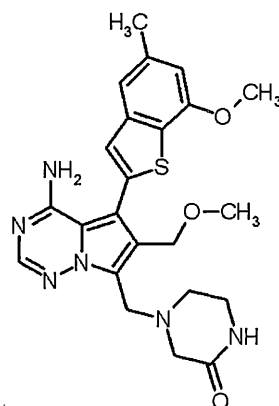
一方、FGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) 臨床試験において、a) FGFR1 または FGFR2 遺伝子コピー数の増加、b) FGFR をコードする遺伝子における活性化突然変異、または c) FGFR 融合タンパク質の出現に基づき、癌患者のみが試験および登録されている [Wynes ら、Clin Cancer Res . 2014 Jun 15 ; 20 (12) : 3299 - 309] 。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 9 】

ここで、本発明者らは、FGFR1、FGFR2 および / または FGFR3 mRNA 発現の合計が、その塩、溶媒和物および / または塩の溶媒和物の形態で存在することができる、式 (I) :

【化 1】



(I)

による pan FGFR 阻害剤に対する治療反応の予測に特に適していることを確認した。

【 0 0 2 0 】

本発明によるさらに好ましい pan FGFR 阻害剤は、例えば、AZD - 4547 (Astra - Zeneca、

10

20

30

40

50

式(III)の化合物)、BJG-398(Novartis、式(II)の化合物)、JNJ-42756493(Johnson & Johnson、式(IV)の化合物)およびCH 5183284(Chanugi、式(V)の化合物)であり、これらはすべて、その塩、溶媒和物および/または塩の溶媒和物の形態で存在することができる。

【発明を実施するための形態】

【0021】

「塩」は、本発明において、好ましくは本発明による化合物の医薬として許容される塩である(例えば、S. M. Bergeら、「Pharmaceutical Salts」, J. Pharm. Sci. 1977, 66, 1-19を参照されたい)。それ自体は医薬品の使用に適していないが、例えば、本発明による化合物の単離または精製に使用できる塩も含まれる。

10

【0022】

「医薬として許容される塩」には、鉱酸、カルボン酸およびスルホン酸の酸付加塩、例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、トルエンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、フマル酸、マレイン酸および安息香酸の塩が含まれる。

【0023】

「医薬として許容される塩」には、例えば、好ましくは、アルカリ金属塩(例えば、ナトリウムおよびカリウム塩)、アルカリ土類金属塩(例えば、カルシウムおよびマグネシウム塩)などの通例の塩基の塩、およびアンモニアまたは有機アミン、例示的に、好ましくは、エチルアミン、ジエチルアミン、トリエチルアミン、N,N-ジイソプロピルエチルアミン、モノエタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジメチルアミノエタノール、ジエチルアミノエタノール、プロカイン、ジシクロヘキシルアミン、ジベンジルアミン、N-メチルモルホリン、N-メチルピペリジン、アルギニン、リシンおよび1,2-エチレンジアミンなどに由来するアンモニウム塩も含まれる。

20

【0024】

本発明の文脈における「溶媒和物」は、固体または液体状態で溶媒分子を伴う化学量論的配位による錯体を形成する本発明による化合物の形態のものとして示している。「水和物」は溶媒和物の特定の形態であり、そのなかで水を伴って配位が起こる。水和物は、本発明の文脈において、好ましい溶媒和物である。

30

【0025】

本発明は、対象における癌の治療における使用のためのpan-FGFR阻害剤に基づいており、ここで、対象は、対象からの腫瘍組織サンプル中のFGFR1、FGFR2および/またはFGFR3 mRNAの合計が過剰発現されていることがわかっている対象である。

【0026】

別の実施形態において、本発明は、FGFR1、FGFR2および/またはFGFR3 mRNA過剰発現の有無について患者からの腫瘍組織サンプルを試験するステップを含む、pan-FGFR阻害剤を用いる治療に適格な癌を有する患者を同定する方法に関し、ここで、患者は、FGFR1、FGFR2およびFGFR3の測定されたmRNA発現の合計が過剰発現されている場合に、pan-FGFR阻害剤を用いる治療に適格である。

40

【0027】

本発明による癌は、癌疾患および腫瘍疾患である。これらは、特に、以下の疾患を意味すると理解されるが、これらに限定されない：乳癌および乳房腫瘍(管状および小葉状、ならびにin situ)、気道の腫瘍(小細胞および非小細胞肺癌(NSCLC)、NSCLCには、肺の肺腺癌、扁平上皮肺癌および肺大細胞癌、小細胞および非小細胞癌、気管支癌、気管支腺腫、胸膜肺芽腫が含まれる。)、脳腫瘍(例えば、脳幹および視床下部の脳腫瘍、星状細胞腫、膠芽腫、髄芽腫、脳室上衣腫ならびに神経外胚葉性および松果体腫瘍)、消化器の腫瘍(食道、胃、胆嚢、小腸、大腸、直腸、肛門)、肝腫瘍(とりわけ、肝細胞癌、胆管細胞癌ならびに混合型肝細胞および胆管細胞癌)、頭頸部領域の腫瘍(喉頭、下咽頭、上咽頭、中咽頭、口唇および口腔)、皮膚腫瘍(扁平上皮癌、カボジ肉腫、悪性黒色腫、

50

メルケル細胞皮膚癌および非黒色腫皮膚癌)、軟組織の腫瘍(とりわけ、軟部組織肉腫、骨肉腫、悪性線維性組織球腫、リンパ肉腫および横紋筋肉腫)、眼の腫瘍(とりわけ、眼球内黒色腫、ぶどう膜黒色腫および網膜芽細胞腫)、内分泌腺および外分泌腺の腫瘍(例えば、甲状腺および副甲状腺、膵臓および唾液腺)、尿路の腫瘍(膀胱、陰茎、腎臓、腎盂および尿管の腫瘍)、生殖器の腫瘍(女性の子宮内膜、子宮頸部、卵巣、膣、外陰部および子宮の癌、ならびに男性の前立腺および精巣の癌)ならびにこれらの遠隔転移。これらの障害には、リンパ腫、白血病および骨髄増殖性疾患など、固形状および循環血液細胞として、増殖性血液疾患も含まれ、例えば、急性骨髄性、急性リンパ性、慢性リンパ性、慢性骨髄性およびヘアリー細胞白血病、ならびにエイズ関連リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫および中枢神経系のリンパ腫も含まれる。

10

【0028】

好ましい実施形態において、本発明による癌は、頭頸部、好ましくは、頭頸部の扁平上皮細胞癌、食道癌、卵巣癌、膀胱癌、結腸癌および/または肺癌である。さらにより好ましい実施形態において、本発明による肺癌はNSCLCであり、さらに好ましいのは肺の扁平上皮細胞癌である。

【0029】

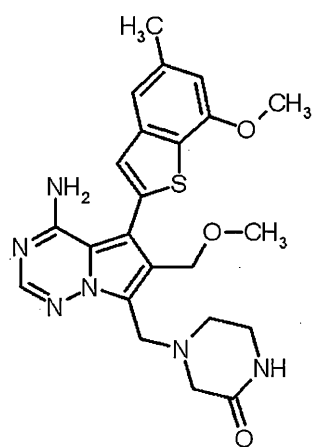
他の好ましい実施形態において、本発明による肉腫は、脂肪肉腫、線維肉腫、平滑筋肉腫、軟骨肉腫、滑膜肉腫、血管肉腫、ユーイング肉腫および明細胞肉腫であり得る。

【0030】

好ましい実施形態において、pan FGFR阻害剤は、その塩、溶媒和物および/または塩の溶媒和物の形態で存在することができる、式(I)、(II)、(III)、(IV)および/または(V)：

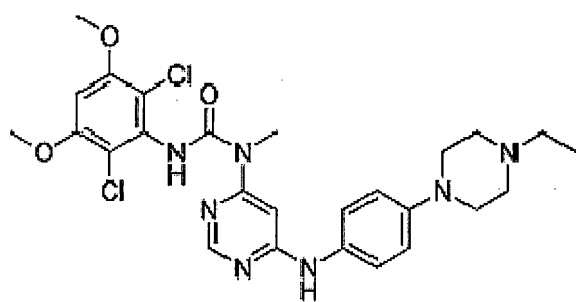
20

【化 2】



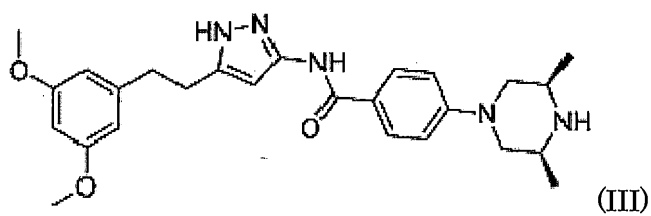
(I)

10



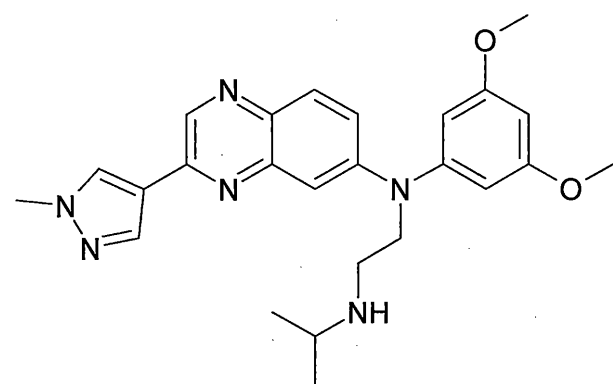
(II)

20



(III)

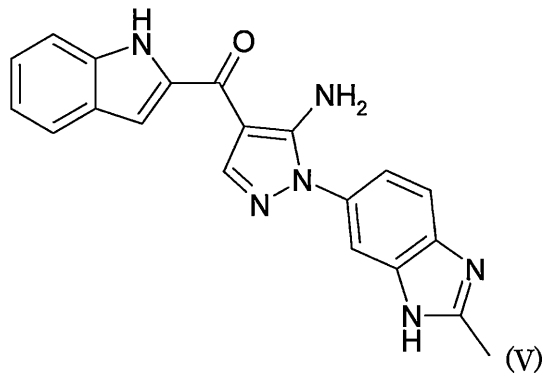
30



(IV)

40

【化 3】



10

の化合物からなる群から選択される。

【0031】

特に好ましい実施形態において、本発明による pan FGFR阻害剤は、式 (I) の阻害剤である。

【0032】

式 (I)、(II)、(III)、(IV) および / または (V) の化合物は、唯一の医薬品として、あるいは組み合わせが望ましくない副作用および / または容認できない副作用を招かない限り、1つまたは複数の別の治療薬と組み合わせて投与されてもよい。このような組み合わせ治療法は、上で定義した式 (I)、(II)、(III)、(IV) および / または (V) の化合物を含む単一の医薬投与製剤および1つまたは複数の別の治療薬の投与、ならびに式 (I)、(II)、(III)、(IV) および / または (V) の化合物、およびそれ自体別個の医薬投与製剤中の別の各治療薬の投与を含む。例えば、式 (I)、(II)、(III)、(IV) および / または (V) の化合物ならびに治療薬は、錠剤またはカプセルなどの単一の (固定の) 経口投与組成物と一緒に患者に投与されてもよく、または、各薬剤は、別個の投与製剤で投与されてもよい。

20

【0033】

別個の投与製剤が用いられる場合、式 (I)、(II)、(III)、(IV) および / または (V) の化合物、ならびに1つまたは複数の別の治療薬は、実質的に同じ時間に (すなわち、同時に) または時間をずらして別々に (すなわち、順次) 投与されてもよい。

30

【0034】

特に、式 (I)、(II)、(III)、(IV) および / または (V) の化合物は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、植物由来の抗腫瘍剤、ホルモン療法剤、トポイソメラーゼ阻害剤、チューブリン阻害剤、キナーゼ阻害剤、標的薬剤、抗体、抗体薬物複合体 (ADC)、免疫剤、生物学的応答調節剤、抗血管新生化合物、ならびに他の抗増殖作用物質、細胞分裂阻害物質および / または細胞障害性物質などの他の抗癌剤との固定化された、または別個の組み合わせで使用されてもよい。この点に関して、以下は、本発明の化合物と組み合わせて使用されてもよい二次剤の例の非限定的なリストである：アバレリックス、アピラテロン、アクリルピシン、アフアチニブ、アフリベルセプト、アルデスロイキン、アテムツズマブ、アリトレチノイン、アルファラディン (alpharadin)、アルトレタミン、アミノグルテチミド、アモナフィド、アムルピシン、アムサクリン、アナストロゾール、アンドロムスチン (andromustine)、アルグラビン、アスパラギナーゼ、アキシチニブ、5 - アザシチジン、パシリキシマブ、ペロテカン、ベンダムスチン、ベバシズマブ、ベキサロテン、ピカルタミド、ピサントレン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、ボスチニブ、プリバニブアラニナート、プセレリン、プスルファン、カバジタキセル、CAL - 101、ホリナートカルシウム、レボホリナートカルシウム、カンプトテシン、カペシタビン、カルボプラチン、カルモフル、カルムスチン、カツマキソマブ、セジラニブ、セルモロイキン、セツキシマブ、クロラムブシル、クロルマジノン、クロルメチン、シドホビル、シスプラチン、ク

40

50

ラドリピン、クロドロン酸、クロファラビン、コンプレタスタチン、クリサントスパーゼ、クリゾチニブ、シクロホスファミド、シプロテロン、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダルベポエチンアルファ、ダリナバルシン、ダサチニブ、ダウノルビシン、デシタピン、デガレリクス、デニロイキンジフチトクス、デノスマブ、デスロレリン、塩化ジブロスビジウム、ドセタキセル、ドビチニブ、ドキシフルリジン、ドキシソルビシン、デュタステリド、エクリズマブ、エドレコロマブ、エフロルニチン、エリブチニウムアセタート、エルトロンボバグ、エンドスタチン、エノシタビン、エピムビシン (epimbicin)、エピルビシン、エピチオスタノール、エポエチンアルファ、エポエチンベータ、エポチロン、エプタブラチン、エリブリン、エルロチニブ、エストラジオール、エストラムスチン、エトボシド、エベロリムス、

10

エクサテカン、エキセメスタン、エクシスリンド、ファドロゾール、フェンレチニド、フィルグラスチム、フィナステリド、フラボピリドール、フルダラビン、5 - フルオロウラシル、フルオキシメステロン、フルタミド、ホレチニブ、ホルメスタン、ホテムスチン、フルベストラント、ガニレリクス、ゲフィチニブ、ゲムシタビン、ゲムツズマブ、ギマテカン、ギメラシル、グルホスファミド、グルトキシム (glutoxim)、ゴセレリン、ヒストレリン、ヒドロキシウレア、イバンドロン酸、イブリットマブチウキセタン、イダルビシン、イホスファミド、イマチニブ、イミキモド、インブロスルファン、ニンテダニブ、インターフェロンアルファ、インターフェロンアルファ - 2a、インターフェロンアルファ - 2b、インターフェロンベータ、インターフェロンガンマ、インターロイキン - 2、イピリムマブ、イリノテカン、イキサベピロン、ランレオチド、ラパチニブ、ラソフォキシフェン、レナリドミド、レノグラスチム、レンチナン、レンバチニブ、レスタウルチニブ、レトロゾール、リユープロレリン、レバミゾール、リニファニブ、リンシチニブ、リスリド、ロパブラチン、ロムスチン、ロニダミン、ルルトテカン、マホスファミド、マパツズマブ、マシチニブ、マソプロコール、メドロキシプロゲステロン、メゲストロール、メラルソプロール、メルファラン、メピチオスタン、メルカプトプリン、メトトレキサート、アミノレブリン酸メチル、メチルテストステロン、ミファムルチド、ミフェプリストン、ミルテホシン、ミリブラチン、ミトブロニトール、ミトグアゾン、ミトラクトール、マイトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、モルグラモスチム、モテサニブ、ナンドロロン、ネダブラチン、ネララビン、ネラチニブ、ニロチニブ、ニルタミド、ニモツズマブ、ニムスチン、ニトラクリン、ノラトレキセド、オフアツマブ、オブレルベキン、オキサリブラチン、パクリタキセル、パリフェルミン、パミドロン酸、パニツマブ、パゾパニブ、ペガスパルガーゼ、PEG - エポエチンベータ、ペグフィルグラスチム (pegfilgastrim)、PEG - インターフェロンアルファ - 2b、ペリトレキサール、ペメトレキセド、ペムツモマブ (pemtumomab)、ペントスタチン、ペプロマイシン、ペルホスファミド、ペリフォシン、ペルツズマブ、ピシバニール、ピラムビシン (pirambicin)、ピラルビシン、プレリキサフォル、プリカマイシン、ポリグルサム、リン酸ポリエストラジオール、ボナチニブ、ポルフィマーナトリウム、プララトレキサート、ブレドニムスチン、プロカルバジン、プロコダゾール、PX - 866、キナゴリド、ラロキシフェン、ラルチトレキセド、ラニビズマブ、ラニムスチン、ラゾキサン、レゴラフェニブ、リセドロン酸、リツキシマブ、ロミデプシン、ロミブロスチム、ルピテカン、サラカチニブ、サルグラモスチム、サトラブラチン、セルメチニブ、シプロイセルT、シロリムス、シゾフィラン、ソブゾキサン、ソラフェニブ、ストレプトゾシン、スニチニブ、タラポルフィン、タミバロテン、タモキシフェン、タンズチニブ、タソネルミン、テセロイキン、テガフル、テラタニブ (telatinitib)、テモボルフィン、テモゾロミド、テムシロリムス、テニボシド、テストラクトン、テストステロン、テトロホスミン、サリドマイド、チオテバ、チマルファシン、チオグアニン、ティピファニブ、チボザニブ、トセラニブ、トシリズマブ、トボテカン、トレミフェン、トシツモマブ、トラベクテジン、トラスツズマブ、トレオスルファン、トレチノイン、トリアピン、トリロスタン、トリメトレキサート、トリプトレリン、トロホスファミド、ウベニメクス、バルルビシン、バンデタニブ、バブレオチド、バルリチニブ (varlitinib)、パタラニブ、ペムラフェニブ、ビダラビン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、

20

30

40

50

ビンデシン、ビンフルニン、ビノレルビン、ボロシキシマブ、ポリノスタット、ジノスタチン、ゾレドロン酸およびゾルピシン。

【0035】

一般に、式(Ⅰ)、(Ⅱ)、(Ⅲ)、(Ⅳ)および/または(Ⅴ)の化合物と他の抗癌剤との組み合わせを用いて、以下の目的が追求されてもよい：

- ・単一の活性化合物を用いる治療と比較して、腫瘍の増殖の減速、そのサイズの縮小、または、さらにはその完全な消失における改善された活性；
- ・単剤療法よりも低投与量で使用する化学療法剤を用いる可能性；
- ・個々の投与と比較して、少ない副作用で、より許容される治療法の可能性；
- ・より広範囲の癌疾患および腫瘍疾患の治療の可能性；
- ・治療法に対して、より速い反応速度の達成；
- ・標準的な治療法と比較して、より長い患者の生存時間。

10

【0036】

癌治療において、式(Ⅰ)、(Ⅱ)、(Ⅲ)、(Ⅳ)および/または(Ⅴ)の化合物は、放射線療法および/または外科的治療と一緒に使用されてもよい。

【0037】

本明細書において用いられるとき、「FGF受容体」は、FGF受容体ファミリーに属し、かつFGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4および、今後同定されるこのファミリーの他のメンバーを含む受容体型チロシンキナーゼである。FGF受容体は一般に、FGFリガンドに結合し得る細胞外ドメイン；親油性膜貫通ドメイン；保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン；およびリン酸化され得るいくつかのチロシン残基を持つカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを含むことになる。FGF受容体は、天然配列のFGF受容体またはそのアミノ酸配列変異体でもよい。好ましくは、FGF受容体は、天然配列のヒトFGF受容体である。

20

【0038】

本発明による「組織サンプル」により、好ましくは染色体物質を含む有核細胞を含む、対象または患者の組織から得られる類似の細胞の集合を意味する。4つの主なヒト組織は、(1)上皮；(2)結合組織(血管、骨および軟骨を含む。)；(3)筋肉組織；および(4)神経組織である。組織サンプルの源は、新鮮な、冷凍した、および/または保存された臓器あるいは組織サンプルあるいは生検材料からのような固体組織でもよい

30

【0039】

本明細書において、組織サンプルの「切片」は、組織サンプルの単一の部分または片、例えば、組織サンプルから切り取った組織または細胞の薄いスライスを意味する。組織サンプルの複数の切片は、採取され、本発明による分析にかけられてもよいものと理解される。

【0040】

「サンプル調製」

対象からの任意の組織サンプルが使用されてもよい。使用されてもよい組織サンプルの例には、卵巣、肺、子宮内膜、頭部、頸部、食道および膀胱が含まれるが、これらに限定されない。組織サンプルは、外科的切除または生体組織検査を含み、これらに限定されないさまざまな手順により得ることができる。組織は、新鮮な組織でも冷凍した組織でもよい。1つの実施形態では、組織サンプルは固定され、パラフィンなどに包埋される。

40

【0041】

組織サンプルは、従来の手法により固定(すなわち、保存)されてもよい(例えば、Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd Edition Lee G. Luna, HT(ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company: New York; (1960); The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.を参照されたい)。固定剤の選択は、組織が組織学的に染色され、その他の場合は分析される目的によって決定されることを当業者であれば理解するであろう。固定の

50

長さは、組織サンプルのサイズおよび使用される固定剤によって決まることも当業者であれば理解するであろう。例として、中性緩衝ホルマリンが組織サンプルの固定に使用されてもよい。

【0042】

一般に、組織サンプルは、まず固定され、次いで、上昇系列のアルコールにより脱水され、浸潤され、組織サンプルが薄切されるようにパラフィンまたは他の薄切媒体で包埋される。あるいは、組織を薄切して、得られた切片を固定してもよい。例として、組織サンプルは、従来の手法によりパラフィンに包埋されて、処理されてもよい。使用されてもよいパラフィンの例には、Paraplast（登録商標）、BroidoおよびTissuemayが含まれるが、これらに限定されない。組織サンプルを包埋したら、サンプルをマイクロームなどにより切片にしてもよい。この手順の例として、切片は、厚さが約3ミクロンから約5ミクロンの範囲でもよい。切片にしたら、切片は、いくつかの標準的な方法によりスライドに付着させてもよい。スライド接着剤の例には、シラン、ゼラチン、ポリ-L-リジンなどが含まれるが、これらに限定されない。RNA in situハイブリダイゼーション (hybridization) に特に適しているのは、正電荷を帯びたスライド（例えば、ポリ-L-リジンで被覆したスライド）に付着させた、パラフィン包埋した切片である。

10

【0043】

包埋材料としてパラフィンが使用された場合、組織切片は一般に脱パラフィンされ、水に再水和される。組織切片は、いくつかの従来の標準的な手法により脱パラフィンされてもよい。例えば、キシレンおよび徐々に下降する系列のアルコールが使用されてもよい。あるいは、Hemo-De7（CMS（テキサス州ヒューストン））など、市販の非有機性の脱パラフィン剤が使用されてもよい。

20

【0044】

本発明によるmRNA過剰発現は、正常細胞と比べて腫瘍細胞で高レベルで発現される、FGFRタンパク質をコードするメッセンジャーRNAを指す。一般に、比較のための正常細胞は、腫瘍と同じ組織型、特に表現型のもの、または腫瘍が発生した組織型からのものである。

【0045】

腫瘍組織サンプルにおけるFGFR1、2および3 mRNA発現レベルは、FGFR1、2または3プローブを用いるRNA in situハイブリダイゼーションにより定量化される。in situハイブリダイゼーションのための方法は、例えば、WangらによりJ Mol Diagn. 2012 Jan; 14(1): 22-9に記述されている通り、当技術分野において既知である。FGFR1、FGFR2またはFGFR3 mRNA発現を検出するISHプローブは、例えば、JinおよびLloyd (J Clin Lab Anal. 1997; 11(1): 2-9.) にしたがって設計される。本発明によるプローブの設計に用いられる配列は、GenBank配列受入番号NM_023110.2 (FGFR1)、NM_000141.4 (FGFR2) またはNM_000142.4 (FGFR3) を有する配列であるが、上述のGenBank受入番号で提供されているようなポリAテールはプローブ設計に使用されないことを当業者であれば知っている。ホルマリン固定、パラフィン包埋組織標本または凍結標本についての方法は既知である。明視野顕微鏡法のための従来の発色色素または多重分析のための蛍光色素を使用することができる。LevskyおよびSingerは、J Cell Sci. 2003 Jul 15; 116(Pt 14): 2833-8において、蛍光in situハイブリダイゼーションの開発について議論している。

30

40

【0046】

好ましくは、腫瘍組織サンプルにおけるFGFR1、2および3 mRNA発現レベルは、ACD (Advanced Cell Diagnostics, Inc., 3960 Point Eden Way, Hayward, CA 94545, USA) によるRNAscope（登録商標）技術を用いるRNA in situハイブリダイゼーションにより、好ましくは、FGFR1プローブカタログ番号310071、FGFR2プローブカタログ番号311171およびFGFR3プローブカタログ番号310791を使用することにより定量化される。

【0047】

in situハイブリダイゼーション (Hybridization) (ISH)

in situハイブリダイゼーションは一般に、スライドに固定された細胞または組織切片

50

上で行われる。一般に、in situ法では、直接法および間接法が用いられる。

【 0 0 4 8 】

直接法では、ハイブリダイゼーション反応の直後に顕微鏡下でプローブ - 標的ハイブリッドを視覚化できるように、検出可能な分子（例えば、フルオロフォア、すなわち蛍光 in situハイブリダイゼーションまたはFISH）を核酸プローブに直接結合させる。このような方法では、プローブ - レポーター結合が、かなり厳しいハイブリダイゼーション条件および洗浄条件に耐えることが極めて重要である。しかし、おそらくより重要なことは、レポーター分子がハイブリダイゼーション反応を妨げないことである。Baumanら（1980, 1984）によって開発されたRNAプローブの末端蛍光色素標識法、およびRenzおよびKurz（1984）によって記述された核酸の直接酵素標識法は、これらの基準を満たす。Boehringer Mannheimは、DNAまたはRNAプローブの標識および直接検出に使用できるいくつかの蛍光色素標識ヌクレオチドを導入した。あるいは、放射性標識を用いることができる。間接法では、プローブが化学的または酵素的に導入された検出可能な分子を含有することが必要であり、これは、例えばビオチン - ストレプトアビジン系など、親和性細胞化学（affinity cytochemistry）によって検出することができる。

10

【 0 0 4 9 】

例えば、フルオロフォアは、細胞内の標的ヌクレオチド配列に相補的である核酸配列プローブを標識するために使用される。標的ヌクレオチド配列を含む各細胞は、蛍光シグナルを生成する標識プローブに結合する。標的ヌクレオチド配列は、FGFR1、FGFR2またはFGFR3配列である。形態学的染色を含むがこれに限定されない他のアッセイと組み合わせて、ISH分析を使用することができる。

20

【 0 0 5 0 】

ISHアッセイの感度は、さまざまな度合いのハイブリダイゼーションストリンジェンシーを用いることによって適合させることができる。ハイブリダイゼーション条件がより厳しくなるにつれて、安定な二本鎖を形成し、維持するために、プローブと標的との間に、より大きな相補性が必要とされる。ストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション条件を適合させることによって、例えば、アッセイ温度を上げたり、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度を下げたりすることによって増加する。ハイブリダイゼーション後、ハイブリダイゼーション溶液中に見られる試薬と同様の試薬を概して含有する溶液中で、必要なストリンジェンシーに応じて数分から数時間のさまざまな洗浄時間でスライドを洗浄する。（例えば、Darby, Ian A. およびTim D. Hewitson. 2006. In situ hybridization protocols. Totowa, N. J. : Humana Press ; または、Schwarzacher, TrudeおよびJ. Heslop-Harrison. 2000. Practical in situ hybridization. Oxford, UK : BIOS ; または、Buzdin, AntonおよびSergey Lukyanov. 2007. Nucleic acids hybridization modern applications. Dordrecht : Springerを参照されたい）。

30

【 0 0 5 1 】

ISH分析で使用されるプローブは、RNAまたはDNAオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのいずれでもよく、天然に存在するヌクレオチドだけでなく、ジゴキシゲニン標識dCTPまたはビオチン標識誘導体、例えば、ビオチン-dCTP 7 - アザグアノシンのようなその類似体を含んでもよい。

40

【 0 0 5 2 】

プローブは、標的核酸配列とプローブとの間に安定した特異的結合が生じるように、関心のある標的核酸配列に対して十分な相補性を持つべきである。安定なハイブリダイゼーションに必要な相補性の程度は、ハイブリダイゼーションおよび / または洗浄バッファーストリンジェンシーによって変化する。好ましくは、標的配列に対する完全な相補性を有するプローブが本発明において使用される。（例えば、Sambrook, J. ら、Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, (1989) を参照されたい。）

【 0 0 5 3 】

プローブの選択は、関心のある標的遺伝子の特性によって決まることを当業者なら理解するであろう。プローブは、プラスミド、ファージ、コスミド、YAC、細菌人工染色体（B

50

AC)、ウイルスベクターまたはその他の任意の適したベクターにクローン化されたゲノムDNA、cDNAまたはRNAであってもよい。プローブは、従来の方法(例えば、上述のSambrookを参照)によりクローン化または化学的に合成されてもよい。

【0054】

本発明において、プローブは好ましくはフルオロフォアで標識される。フルオロフォアの例には、希土類キレート(ユーロピウムキレート)、Texas Red(登録商標)、ローダミン、フルオレセインまたはダンシルが含まれるが、これらに限定されない。アッセイで使用される複数のプローブは、2つ以上の識別可能な蛍光標識または間接標識で標識されてもよい。

【0055】

ISHを処理した後、標準的な顕微鏡技術によってスライドを分析してもよい。簡潔には、各スライドは、適切な励起フィルター、二色性フィルターおよびバリアフィルターを備えた顕微鏡を用いて観察される。FISHについては、フィルターは、使用されるフルオロフォアの励起および発光スペクトルに基づいて選ばれる。

【0056】

通常、数百の細胞が組織サンプル中でスキャンされ、特定の標的核酸配列の定量が蛍光スポットの形で決定され、この蛍光スポットが細胞の数に対して計数される。本明細書に記載の通り、FGFR1、FGFR2およびFGFR3の過剰発現の測定は、pan FGFR阻害剤療法、好ましくは式(I)、(II)、(III)、(IV)および/または(V)の化合物、最も好ましくは式(I)の化合物(これらすべてが、その塩、溶媒和物および/または塩の溶媒和物の形態で存在することができる。)を用いる治療法が有効となる可能性について、はるかに有効な指標を提供する。

【0057】

スコアリングは以下の通り定義される：

【0058】

【表1】

染色スコア	顕微鏡対物スコアリング
0	染色がないか、または10細胞ごとに1ドット未満(倍率40倍)
1	1~3ドット/細胞(倍率20~40倍で見える。)
2	4~10ドット/細胞。非常に少数のドットのクラスター(倍率20~40倍で見える。)
3	>10ドット/細胞。10%未満の陽性細胞がドットのクラスター(倍率20倍で見える。)を有する
4	>10ドット/細胞。10%を超える陽性細胞がドットのクラスター(倍率20倍で見える。)を有する

【0059】

本発明によるpan FGFR阻害剤を用いる治療に適格であるのは、いずれか1つのFGFRアイ

ソフォーム（FGFR1、FGFR2またはFGFR3）の3のスコアリング、または3つすべてのFGFRアイソフォームの合計として3のスコアリングを示すものであり、好ましい適格なものは、腫瘍組織サンプルが少なくとも4のスコアを示すものであり、特に好ましいのは、4を超えるスコアを有するものである。

【0060】

本発明による癌は、好ましくは頭頸部癌であり、特に好ましいのは頭頸部の扁平上皮細胞癌である。さらにより好ましいのは、スコアリングの合計が少なくとも6である頭頸部の扁平上皮細胞癌であり、さらにより好ましいのは、FGFR1、FGFR2またはFGFR3のうちの少なくとも1つが、少なくとも3のスコアリングを有するものである。

【0061】

別の実施形態において、癌は食道癌であり、好ましくは、スコアリングの合計として少なくとも5を示す。さらにより好ましくは、FGFR1、FGFR2またはFGFR3のうちの少なくとも1つが、少なくとも4のスコアリングを有する。

【0062】

別の好ましい実施形態は、スコアリングの合計が少なくとも9であるときに特に好ましい卵巣癌である。

【0063】

別の実施形態において、癌は肺癌、好ましくはNSCLC、さらにより好ましくは扁平上皮肺癌である。スコアリングの合計は、好ましくは少なくとも5、さらにより好ましくは少なくとも7、最も好ましくは少なくとも9である。

【0064】

別の実施形態において、癌は結腸癌であり、好ましくは少なくとも4のスコアリングの合計を示す。

【0065】

別の実施形態において、癌は膀胱癌であり、好ましくは、スコアリングの合計として少なくとも5を示す。

【0066】

別の実施形態において、本発明は、有効量のpan FGFR阻害剤を投与することによる対象における癌の治療方法を対象とし、ここで、対象は、対象からの腫瘍組織サンプル中のFGFR1、FGFR2および/またはFGFR3 mRNAの合計が過剰発現されていることがわかっている対象である。

【実施例】

【0067】

材料および方法

RNA抽出および定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）

腫瘍異種移植片をドライアイス上で直ちに急速凍結し、Trizol法を用いて全RNAを抽出した。得られたRNAの完全性をBioanalyzer（Agilent）で確認した。逆転写のために、1 μ gの全RNAをまずRNaseフリーのDNase Iを用いて室温で15分間消化し、次にPromiscryptを用いて、キット供給者の標準プロトコルにしたがって40 μ lの総反応容量で逆転写した。65℃まで15分間加熱して酵素を失活させた後、得られたcDNAを再蒸留水（二回蒸留水）で最終容量150 μ lに希釈し、標準的なサイクラー条件下、TaqMan Universal Master Mix（2×）（詳細については、TaqMan User Guide, Applied Biosystemsを参照）およびABI PRISM 9600配列検出システムを用いて、20 μ lの最終容量反応容量でPCR反応あたり4 μ lを選んだ。PCRプライマーおよびFAM標識プローブのDNA配列は、Primer Express 1.5ソフトウェア（Applied Biosystems）により設計され、表1にまとめた。プライマーの濃度は300nMであり、標識プローブの濃度はそれぞれ150nMであった。すべてのプライマー/プローブセットについて、同等の増幅効率を標準希釈曲線によって確認した。発現は、LivakおよびSchmittgen（Methods, 2001 Dec; 25（4）: 402-8.）により記述されたddCt法を用いて計算した。ただし、各FGFR mRNAの正規化された発現レベルを次式を用いて計算したことを除く：発現 = $2^{(20 - dCt)}$ （式中、dCtは、関心のある遺伝子と参照遺伝子のCt値の差

10

20

30

40

50

である)。Ct値は、リボソームタンパク質L32、 β 2ミクログロブリン、細胞質 β アクチンおよびグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼmRNAレベルについて補正され、異なる開始量の全RNAを除いた。本発明者らは、計算された発現レベルが、使用したハウスキーピング遺伝子とは無関係であることを観察した。したがって、本発明者らは、すべてのFGFR mRNA発現データをL32リボソームタンパク質に対して正規化することに決めた。表2および表3に示す得られた発現レベルは、3つの独立した実験の平均(+/−)SDであり、任意の単位で与えられる。

【0068】

FGFR1遺伝子コピー数の増加の定量化。

Qiagen製DNeasyゲノムDNA抽出キットを用いて、腫瘍異種移植片由来のゲノムDNAを単離した。Life Technologies製FGFR1 TaqMan Gene Copy Number Assayを用いて、FGFR遺伝子コピー数の増加について、サンプルあたり0.5ngのゲノム(genomic)DNAを分析した。FGFRの結果を、供給業者のプロトコルに記載の通り、単一コピー参照遺伝子RNase Pに対して正規化した。表2にしたがって増幅されたFGFR1であると考えられるすべての異種移植モデルは、単一コピー遺伝子について予想されたものよりも高いシグナル強度を示した。

【0069】

インビボ

「HN9897」

患者由来のHN9798頭頸部扁平上皮細胞癌の調査には、Harlan-Winkelmann(ドイツ)の6~8週齢の雌の免疫不全nu/nuマウス(19~27g)を用いた。

【0070】

6日間の最小限の順化期間の後に実験を開始した。マウスを12時間の明/暗サイクルに保ち、飼料および水は自由に利用でき、住居温度は20~26であった。群あたり10匹のマウスの2つの実験群にマウスをランダムに割り当てた。治療の開始時に、イヤークォーディング(ear-coding)で動物に印を付け、各ケージの識別ラベルは以下の情報が含まれていた：動物数、性別、系統、受付日、治療、試験番号、群番号および治療の開始日。

【0071】

選択された原発性ヒト頭頸部癌組織(HN9798)を接種したストックマウスからの腫瘍断片を採取し、雌のnu/nuヌードマウスへの接種に使用した。各マウスの右側腹部に1つの腫瘍断片(2×2mm)を皮下接種した。平均腫瘍サイズが約0.075cm³に達した移植後6日目に治療を開始した。対照群のマウスが屠殺基準に達したときに腫瘍をサンプリングし、接種後50日目に最終腫瘍重量を測定した。

【0072】

カリパスを用いて二次元の腫瘍サイズを毎週2回測定し、式： $V = 0.5a \times b^2$ (式中、aおよびbはそれぞれ腫瘍の長径および短径である。)を用いて、体積をmm³で表した。次いで、腫瘍サイズをT/C値のために使用した。T-Cは、治療群の平均腫瘍サイズが所定のサイズ(例えば、1000mm³)に達するのに必要な時間(日数)としてTを用いて計算し、Cは、対照群の平均腫瘍サイズが同じサイズに達する時間(日数)であった。T/C値は、抗腫瘍有効性の指標であった；TおよびCは、それぞれ所与の日の治療群および対照群の平均体積であった。

【0073】

最終的な腫瘍面積および剖検当日の腫瘍重量について、すべての群における記述統計を行った。統計解析は、SigmaStatソフトウェアを用いて評価した。一元配置分散分析を実施し、対照との差異をDunn法を用いた多重比較により比較した。

【0074】

「ES204」

患者由来のES204食道扁平上皮細胞癌の調査には、Vital River(中国)の6~8週齢の雌の免疫不全nu/nuマウス(18~24g)を用いた。

【0075】

6日間の最小限の順化期間の後に実験を開始した。マウスを12時間の明/暗サイクルに

10

20

30

40

50

保ち、飼料および水は自由に利用でき、住居温度は20～26℃であった。この検討における動物の取り扱い、管理および治療に関連するすべての手順は、Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) のガイドンスにしたがって、CrownBioのInstitutional Animal Care and Use Committee (IACUC) により承認されたガイドラインにしたがって実施された。

【0076】

群あたり10匹のマウスの4つの実験群にマウスをランダムに割り当てた。治療の開始時に、イヤークォーディングで動物に印を付け、各ケージの識別ラベルは以下の情報が含まれていた：動物数、性別、系統、受付日、治療、試験番号、群番号および治療の開始日。

【0077】

選択された原発性ヒト食道癌組織 (ES204) を接種したストックマウスからの腫瘍断片を採取し、雌のnu/nuヌードマウスへの接種に使用した。各マウスの右側腹部に1つの腫瘍断片 (直径2～3mm) を皮下接種した。平均腫瘍サイズが約100～150mm³に達した移植後25日目に治療を開始した。対照群のマウスが屠殺基準に達したときに腫瘍をサンプリングし、治療開始後23日目に最終腫瘍重量を測定した。

【0078】

カリパスを用いて二次元の腫瘍サイズを毎週2回測定し、式： $V = 0.5a \times b^2$ (式中、aおよびbはそれぞれ腫瘍の長径および短径である。) を用いて、体積をmm³で表した。次いで、腫瘍サイズをT/C値の計算のために使用した。T-Cは、治療群の平均腫瘍サイズが所定のサイズ (例えば、1000mm³) に達するのに必要な時間 (日数) としてTを用いて計算し、Cは、対照群の平均腫瘍サイズが同じサイズに達する時間 (日数) であった。T/C値は、抗腫瘍有効性の指標であった；TおよびCは、それぞれ所与の日の治療群および対照群の平均体積であった。

【0079】

最終的な腫瘍面積および剖検当日の腫瘍重量について、すべての群における記述統計を行った。統計解析は、SigmaStatソフトウェアを用いて評価した。一元配置分散分析を実施し、対照との差異をDunn法を用いた多重比較により比較した。

【0080】

「OVX1023」

患者由来のOVX1023卵巣癌の調査には、Janvier (フランス) の5～7週齢の雌の免疫不全nu/nuマウス (18～24g) を用いた。

【0081】

個々に換気したケージ (TECNIPLAST Sealsafe (商標) - IVC - System、TECNIPLAST (ホーエンパイセンベルク、ドイツ)) に動物を収容し、14L:10D人工光サイクル下で飼育した。動物を1日2回モニターした。群サイズに応じて、タイプIIIケージまたはタイプIIロングケージを使用した。およその寸法が5×5×1mmのアスペン材チップ (ABEDD (登録商標) - LAB & VET Service GmbH (ウィーン、オーストリア)、製品コード: LTE E - 001) からなる防塵床を使用した。追加の巣材が定期的に加えられた。床材および巣材を含むケージは毎週交換した。ケージ内の温度は25±1℃、相対湿度は45～65%に保たれた。ケージ内の換気 (AC) 回数は60AC/hに保たれた。すべての材料は、使用前にオートクレーブ処理した。動物にAutoclavable Teklad Global 19% Protein Extruded Diet (T. 2019S. 12, Harlan Laboratories) を与えた。すべての動物は、滅菌濾過し、酸性化 (pH2.5) した水道水を手に入れることができた。瓶は使用前にオートクレーブ処理し、週に2回交換した。飼料および水は自由に与えられた。すべての材料は、使用前にオートクレーブ処理した。

【0082】

すべての実験は地元当局の承認を受け、適用されるすべての国際法、国内法および地域法およびガイドラインにしたがって実施された。健康に問題のない動物のみが試験手順に入るよう選択された。動物は、作業日には1日2回、週末および祝日には1日1回定期的にモニターした。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 3 】

群あたり10匹のマウスの4つの実験群にマウスをランダムに割り当てた。動物は、腫瘍移植中または無線周波数識別（RFID）トランスポンダを用いた用量調査実験の開始時に任意に番号を付けた。各ケージには、動物種、系統、供給源、性別、受渡日、実験番号、腫瘍移植の日付、ランダム化の日付、腫瘍の組織型、腫瘍の数および継代、群の同一性、試験化合物、用量、スケジュールおよび投与経路を示す記録カードを付けた。

【 0 0 8 4 】

選択された原発性ヒト食道癌組織（OVX1023）を接種したストックマウスからの腫瘍断片を採取し、雌のnu/nuヌードマウスへの接種に使用した。各マウスの右側腹部に1つの腫瘍断片（直径4～5mm）を皮下接種した。移植片の最大数が固形腫瘍増殖の開始の明確な徴候を示すまで動物および腫瘍移植片を1日1回モニターした。

10

【 0 0 8 5 】

平均腫瘍サイズが約100～150mm³に達した移植後49日目に治療を開始した。対照群のマウスが屠殺基準に達したときに腫瘍をサンプリングし、治療開始後50日目に最終腫瘍重量を測定した。

【 0 0 8 6 】

カリパスを用いて二次元の腫瘍サイズを毎週2回測定し、式： $V = 0.5a \times b^2$ （式中、aおよびbはそれぞれ腫瘍の長径および短径である。）を用いて、体積をmm³で表した。次いで、腫瘍サイズをT/C値の計算のために使用した。T-Cは、治療群の平均腫瘍サイズが所定のサイズ（例えば、1000mm³）に達するのに必要な時間（日数）としてTを用いて計算し、Cは、対照群の平均腫瘍サイズが同じサイズに達する時間（日数）であった。T/C値は、抗腫瘍有効性の指標であった；TおよびCは、それぞれ所与の日の治療群および対照群の平均体積であった。

20

【 0 0 8 7 】

最終的な腫瘍面積および剖検当日の腫瘍重量について、すべての群における記述統計を行った。統計解析は、SigmaStatソフトウェアを用いて評価した。一元配置分散分析を実施し、対照との差異をDunn法を用いた多重比較により比較した。

【 0 0 8 8 】

表2および表3に一覧にした他のすべての腫瘍について、上記と同様の方法で実験を行った。

30

【 0 0 8 9 】

表1：mRNA定量化（すべて5' - 3'）オリエンテーションに使用されるRT-PCRプライマー/プローブの配列。

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体 - 1：

順方向 GGCCAGACAACCTGCCTTA

プローブ CCACCGACAAAGAGATGGAGGTGCTT

逆方向 TCGTCTCTCAAAGGAGACAT

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体 - 2：

順方向 GCTGCTGAAGGAAGGACACA

プローブ AGCCAGCCAACTGCACCAACGAA

逆方向 GCATGCCAACAGTCCCTCA

ヒト線維芽細胞増殖因子受容体 - 3：

順方向 CTCGGGAGATGACGAAGAC

プローブ CTGTGTCCACACCTGTGTCCTCA

逆方向 CGGGCCGTGTCCAGTAA

ヒト細胞質βアクチン

順方向 TCCACCTTCCAGCAGATGTG

プローブ ATCAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCCG

逆方向 CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC

ヒトβ2ミクログロブリン：

40

50

順方向 GTCTCGCTCCGTGGCCTTA
 プローブ TGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGC
 逆方向 TGGAGTACGCTGGATAGCCTC
 ヒトL32リボソームタンパク質：
 順方向 CTGGTCCACAACGTCAAGGA
 プローブ TGGAAAGTGCTGCTGATGTGCAA
 逆方向 AGCGATCTCGGCACAGTAAGA
 ヒトグリセルアルデヒド3 - リン酸デヒドロゲナーゼ：
 順方向 CTGGGCTACACTGAGCACCA
 プローブ TGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACAC
 逆方向 CAGCGTCAAAGGTGGAGGAG

10

【 0 0 9 0 】

【 表 2 】

モデル	癌型	FGFR1 mRNA	FGFR1 増幅	インビボでの有効性
ES204	食道	72914	なし	あり
H520	肺	30407	あり	なし
LXFL1121	肺	18937	あり	あり
LU1901	肺	16633	あり	なし
MFE280	子宮内膜	15018	なし	あり
OVXF1023	卵巣	12632	なし	あり
H1581	肺	11135	あり	あり
H1703	肺	8667	あり	なし
Colo699	肺	8227	あり	なし
LXFE211	肺	7817	なし	あり
A2780	卵巣	5565	なし	あり
LXFA1584	肺	5442	あり	なし
DMS114	肺	5346	あり	あり

20

30

【 0 0 9 1 】

表2：インビボでの式(1)の化合物に対するFGFR mRNA発現レベル、FGFR1コピー数の増加と治療有効性との相関関係。材料および方法に記載の通り、腫瘍異種移植片由来の全RNAを単離し、FGFR1 mRNAについて、リアルタイムPCRにより定量化した。並行して、ゲノムDNAを単離し、TaqManコピー数アッセイを用いてFGFR1遺伝子コピー数の増加を定量化した。すべてのモデルは、FGFR1シグナル強度が単一コピー遺伝子(RNase P)よりも強い遺伝子増幅であると考えられた。式(1)の化合物を用いる治療により腫瘍重量が少なくとも50%減少したすべてのモデルは有効であると考えられた。

【 0 0 9 2 】

【表 3】

モデル	癌型	FGFR1 mRNA	FGFR2 mRNA	FGFR3 mRNA	FGFR mRNA 合計	インビボでの 有効性
SNU16	胃	83	89184	126	89393	あり
H716	結腸	12	78179	143	78335	あり
ES204	食道	72914	2140	114	75167	あり
HN9897	頭頸部	277	960	51495	52732	あり
RT112	膀胱	99	1127	41267	42493	あり
H520	肺	30407	9	401	30817	なし
H1581	肺	11135	12817	397	24348	あり
MFM223	乳房	1062	17770	24	18855	あり
LXFL 1121	肺	18937	28	134	19099	あり
LU1901	肺	16633	1	2	16636	なし
MFE280	子宮内膜	15018	381	230	15629	あり
OVXF1023	卵巣	12632	2346	224	15202	あり
OMP2	骨髄腫	25	0	13066	13092	なし
HepG2	肝臓	704	916	6778	8398	なし
LU299	肺	3615	4742	1150	9507	あり
LXFE211	肺	7817	11	474	8302	あり
LU0697	肺	1884	980	6156	9020	あり
H1703	肺	8667	68	187	8923	なし
Colo699	肺	8227	360	77	8664	あり
HN366	頭頸部	214	599	7297	8110	あり
KYSE-140	食道	1520	4802	1366	7688	なし
LXFA1584	肺	5442	248	1627	7318	なし
HNXF908	頭頸部	643	4311	1201	6155	あり
DMS114	肺	5346	187	47	5580	あり
A2780	卵巣	5565	0	13	5578	あり

10

20

30

【 0 0 9 3 】

表3：インビボでの式(1)の化合物に対するFGFR1、2および3 mRNA発現レベルと治療有効性との相関。材料および方法に記載の通り、腫瘍RNAを単離し、FGFR1～3 mRNAレベルをRT-PCRにより定量化した。式(1)の化合物を用いる治療により腫瘍重量が少なくとも50%減少したすべてのモデルは有効であると考えられた。

【 0 0 9 4 】

【表 4】

HN9897	治療開始後 44 日目の T/C ²
媒体 ¹ 10ml/kg 2QD po	1
式 (I) の Cpd 50mg/kg 2QD po	0.08

40

¹ 10% エタノール。40% Solutol HS15、50% NaCl 0.9%

² T/C：式 (I) の化合物を用いて治療した腫瘍の平均/媒体で処置した腫瘍の平均（体積）

50

【 0 0 9 5 】

単剤療法における式 (I) の化合物を用いる治療時のインビボでの有効性について試験したとき、極めて強いFGFR1 mRNA過剰発現 [表2のES204] を有する患者由来の食道扁平上皮細胞腫瘍に同じ知見を適用した：

【 0 0 9 6 】

【 表 5 】

ES204	治療開始後 23 日目の T/C ² .
媒体 ¹ 10ml/kg 2QD po	1
式 (I) の Cpd 50mg/kg 2QD po	0.1

10

1. 10% エタノール。40% Solutol HS15、50% H₂O

2. T/C：式 (I) の化合物を用いて治療した腫瘍の平均/媒体で処置した腫瘍の平均 (体積)

【 0 0 9 7 】

高いFGFR1 mRNA過剰発現の患者由来の卵巢癌モデル [表2のOVXF1023] も非常に高いインビボでの有効性を示した：

【 0 0 9 8 】

【 表 6 】

OVXF1023	治療開始後 38 日目の T/C ² .
媒体 ¹ 10ml/kg 2QD 5 日投与・2 日非投与 po	1
式 (I) の Cpd 35mg/kg 2QD 5 日投与・2 日非投与 po	0.2

20

1. 10% エタノール。40% Solutol HS15、50% H₂O

2. T/C：式 (I) の化合物を用いて治療した腫瘍の平均/媒体で処置した腫瘍の平均 (体積)

30

【 0 0 9 9 】

腫瘍FGFR1~3 RNA発現の量をよりよく定量するために、本発明者らは、表3から選択したモデルを用いてRNA in situハイブリダイゼーションを実施した。FGFR1 - 、FGFR2 - またはFGFR3 - 特異的プローブを用いて、RNAをホルマリン固定、パラフィン包埋腫瘍異種移植片の5μmスライド中で染色し、光学顕微鏡を用いてスコアリング制 (詳細については材料および方法のセクションを参照。) により定量化する。

【 0 1 0 0 】

【表 7】

モデル	癌型	FGFR1 RNA-ISH スコア	FGFR2 RNA-ISH スコア	FGFR3 RNA-ISH スコア	インビボで の有効性
H716	結腸	0	4	0	あり
ES204	食道	4	1	0	あり
HN9897	頭頸部	1	1	4	あり
RT112	膀胱	0	1	4	あり
H520	肺	4	1	2	なし
H1581	肺	4	4	1	あり
LXFL1121	肺	4	0	1	あり
LU1901	肺	4	1	2	なし
OVXF1023	卵巣	4	3	2	あり
LU299	肺	4	3	3	あり
LXFE211	肺	4	1	2	あり
LU0697	肺	3	2	3	あり
H1703	肺	4	1	1	なし
Colo699	肺	4	3	3	あり
HN366	頭頸部	2	3	4	あり
LXFA1584	肺	4	2	3	なし
HNXF908	頭頸部	1	2	3	あり
DMS114	肺	4	1	1	あり

10

20

【 0 1 0 1 】

表4：FFPEスライド、およびFGFR1、FGFR2またはFGFR3のいずれかに特異的なプローブを用いた、選択した腫瘍異種移植片モデルのFGFR1～3 RNA in situハイブリダイゼーションのスコアリング。

30

【 0 1 0 2 】

腫瘍組織サンプル中のFGFR1、2および3 mRNA発現レベルを、ACD (Advanced Cell Diagnostics, Inc., 3960 Point Eden Way, Hayward, CA 94545, USA) によるRNAscope (登録商標) 技術を用いるRNA in situハイブリダイゼーションにより、供給業者のマニュアルにしたがって定量化した。FGFR1～3プローブはACDから市販されてもいる：

RNAscope (登録商標) 2.0 HD Reagent Kit (RED) # 310036、

プローブ - Hs - FGFR1 # 310071

プローブ - Hs - FGFR2 # 311171

プローブ - Hs - FGFR3 # 310791

【 0 1 0 3 】

40

スコアリングは以下にしたがって実施した：

【 0 1 0 4 】

【表 8】

染色スコア	顕微鏡対物スコアリング	
0	染色がないか、または 10 細胞ごとに 1 ドット未満 (倍率 40 倍)	
1	1~3 ドット/細胞 (倍率 20~40 倍で見える。)	
2	4~10 ドット/細胞。非常に少数のドットのクラスター (倍率 20~40 倍で見える。)	10
3	>10 ドット/細胞。10%未満の陽性細胞がドットのクラスター (倍率 20 倍で見える。) を有する	
4	>10 ドット/細胞。10%を超える陽性細胞がドットのクラスター (倍率 20 倍で見える。) を有する	20

【0105】

高いFGFR発現スコアリングにも関わらず薬剤感受性が欠如していることは、耐性機序により説明することができて、例えば、LU1901はc-MET過剰発現腫瘍であり、H520はkras変異型腫瘍であり、いずれの機序もFGFR阻害剤に非感受性を付与することが記述されている。

【0106】

表5：ホルマリン固定、パラフィン包埋 (FFPE) スライド、およびFGFR1、FGFR2またはFGFR3のいずれかに特異的なプローブを用いた、臨床試験NCT01976741から選択した患者のFGFR1~3 RNA in situハイブリダイゼーションのスコアリングデータ。FGFR1、FGFR2またはFGFR3のうちの少なくとも1つが、少なくとも3のスコアリングを有する場合、試験に患者を含めた。表5に示す通り、このようなスコアリング結果を有する9人の患者のうち8人は、RECIST (固形癌効果判定基準) - 治療中に癌患者が改善する (「反応する」) とき、留まる (「安定な」) とき、または悪化する (「進行」) ときを定義する1組の公開された規則 - にしたがって安定な疾患 (SD) を示した。新しい固形癌効果判定基準：改訂RECISTガイドライン (第1.1版) (European Journal of Cancer 45 (2009) 228 - 247) 式 (I) の化合物を800mg BID (「bis in die」=1日2回) で用いる、2サイクル (C2=6週間)、さらには5サイクル (C5=15週間) の治療後のCTスキャン評価基準。ただ1人のFGFR mRNA陽性患者が進行性の疾患 (PD) を有しており、試験から除いた。

【0107】

【表 9】

患者 ID	腫瘍型	FGFR mRNA			RECIST 反応	RECIST 反応
		RNA-ISH スコア			C2 後	C5 後
		FGFR1	FGFR2	FGFR3	(腫瘍の変 化%)	(腫瘍の変 化%)
100010010	sqNSCLC	1	2	3	SD (0)	SD (+ 8)
580010016	sqNSCLC	1	3	4	SD (-5)	SD (- 6)
580010012	sqNSCLC	2	3	3	SD (-10)	SD (-10)
580010022	膀胱	1	1	3	SD (- 3)	SD (-2)
100020012	sqNSCLC	2	3	3	SD (-10)	
560020029	sqNSCLC	3	3	3	SD (+4)	SD (+5)
580010038	未知の原発性	0	3	4	PD (+26)	
560020064	SCLC	4	0	0	SD (- 2)	
100010018	中皮腫	3	3	2	SD (+ 14)	

10

【配列表】

20

2017538708000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2015/078919

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K31/4184 A61K31/4965 A61K31/498 A61K31/506 A61K31/53
A61P35/00

ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H ZHANG ET AL: "Enhanced FGFR signalling predisposes pancreatic cancer to the effect of a potent FGFR inhibitor in preclinical models", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 110, no. 2, 21 January 2014 (2014-01-21), pages 320-329, XP055246574, GB ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/bjc.2013.754 page 327 ----- -/--	1-5, 17-19, 25-31

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

17 February 2016

Date of mailing of the international search report

10/06/2016

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Büttner, Ulf

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/078919

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	"Suppl. data to Enhanced FGFR signalling predisposes pancreatic cancer to the effect of a potent FGFR inhibitor in preclinical models", 21 January 2014 (2014-01-21), XP055247082, Retrieved from the Internet: URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3899776/bin/bjc2013754x1.ppt [retrieved on 2016-02-03] figure S2	1-5, 17-19, 25-31
X	----- NILS C LEHNEN ET AL: "Fibroblast growth factor receptor 1 gene amplification in pancreatic ductal adenocarcinoma", HISTOPATHOLOGY., vol. 63, no. 2, 28 June 2013 (2013-06-28), pages 157-166, XP055246591, GB ISSN: 0309-0167, DOI: 10.1111/his.12115 figure 4	1-5, 17-19, 25-31
X	----- M. W. WYNES ET AL: "FGFR1 mRNA and Protein Expression, not Gene Copy Number, Predict FGFR TKI Sensitivity across All Lung Cancer Histologies", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 20, no. 12, 15 June 2014 (2014-06-15), pages 3299-3309, XP055246497, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3060 cited in the application page 3302, last paragraph - page 3303	1-5, 18, 19, 25-31
X	----- M. E. MARSHALL ET AL: "Fibroblast Growth Factor Receptors Are Components of Autocrine Signaling Networks in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 17, no. 15, 14 June 2011 (2011-06-14), pages 5016-5025, XP055180409, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0050 cited in the application figure 1c page 5020, column 1 ----- -/--	1-5, 17-19, 25-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2015/078919

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	R. GYANCHANDANI ET AL: "A Proangiogenic Signature Is Revealed in FGF-Mediated Bevacizumab-Resistant Head and Neck Squamous Cell Carcinoma", MOLECULAR CANCER RESEARCH, vol. 11, no. 12, 3 October 2013 (2013-10-03), pages 1585-1596, XP055246944, US ISSN: 1541-7786, DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-13-0358 page 1592, column 1 -----	1-5, 18, 19, 30, 31
A	P T NGUYEN ET AL: "The FGFR1 inhibitor PD173074 induces mesenchymal-epithelial transition through the transcription factor AP-1", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 109, no. 8, 17 September 2013 (2013-09-17), pages 2248-2258, XP055247675, GB ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/bjc.2013.550 figure 5 -----	1-5, 17-19, 25-31
X	WO 2011/128701 A2 (IMP INNOVATIONS LTD [GB]; GABRA HANI [GB]) 20 October 2011 (2011-10-20) claims 1, 20 -----	1-5, 17-19, 25-31
A	US 2013/158000 A1 (BROHM DIRK [DE] ET AL) 20 June 2013 (2013-06-20) cited in the application claims -----	1-5, 17-19, 25-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2015/078919**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

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

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
3-5, 19(completely); 1, 2, 17, 18, 25-31(partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ EP2015/ 078919

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 3-5, 19(completely); 1, 2, 17, 18, 25-31(partially)

A pan FGFR inhibitor for use in the treatment of cancer in a subject, wherein the subject is one for whom the sum of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA in a tumor tissue sample from the subject has been found to be overexpressed, wherein the cancer is squameous cell carcinoma of head and neck.
A method of identifying patients with cancer eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor comprising testing a tumor tissue sample from the patient for the presence of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA overexpression, wherein the patient is eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor if the sum of the measured mRNA expression of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 is overexpressed, wherein the cancer is squameous cell carcinoma of head and neck.

2. claims: 6-9, 20(completely); 1, 2, 17, 18, 25-31(partially)

A pan FGFR inhibitor for use in the treatment of cancer in a subject, wherein the subject is one for whom the sum of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA in a tumor tissue sample from the subject has been found to be overexpressed, wherein the cancer is esophageal cancer.
A method of identifying patients with cancer eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor comprising testing a tumor tissue sample from the patient for the presence of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA overexpression, wherein the patient is eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor if the sum of the measured mRNA expression of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 is overexpressed, wherein the cancer is esophageal cancer.

3. claims: 10, 11, 21(completely); 1, 2, 17, 18, 25-31(partially)

A pan FGFR inhibitor for use in the treatment of cancer in a subject, wherein the subject is one for whom the sum of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA in a tumor tissue sample from the subject has been found to be overexpressed, wherein the cancer is ovarian cancer.
A method of identifying patients with cancer eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor comprising testing a tumor tissue sample from the patient for the presence of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA overexpression, wherein the patient is eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor if the sum of the measured mRNA expression of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 is overexpressed, wherein the cancer is ovarian cancer.

4. claims: 12, 13, 22(completely); 1, 2, 17, 18, 25-31(partially)

International Application No. PCT/ EP2015/ 078919

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

A pan FGFR inhibitor for use in the treatment of cancer in a subject, wherein the subject is one for whom the sum of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA in a tumor tissue sample from the subject has been found to be overexpressed, wherein the cancer is lung cancer.

A method of identifying patients with cancer eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor comprising testing a tumor tissue sample from the patient for the presence of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA overexpression, wherein the patient is eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor if the sum of the measured mRNA expression of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 is overexpressed, wherein the cancer lung cancer.

5. claims: 14, 23(completely); 1, 2, 17, 18, 25-31(partially)

A pan FGFR inhibitor for use in the treatment of cancer in a subject, wherein the subject is one for whom the sum of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA in a tumor tissue sample from the subject has been found to be overexpressed, wherein the cancer is colon cancer.

A method of identifying patients with cancer eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor comprising testing a tumor tissue sample from the patient for the presence of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA overexpression, wherein the patient is eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor if the sum of the measured mRNA expression of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 is overexpressed, wherein the cancer colon cancer.

6. claims: 15, 16, 24(completely); 1, 2, 17, 18, 25-31(partially)

A pan FGFR inhibitor for use in the treatment of cancer in a subject, wherein the subject is one for whom the sum of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA in a tumor tissue sample from the subject has been found to be overexpressed, wherein the cancer is bladder cancer.

A method of identifying patients with cancer eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor comprising testing a tumor tissue sample from the patient for the presence of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 mRNA overexpression, wherein the patient is eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor if the sum of the measured mRNA expression of FGFR1, FGFR2 and/ or FGFR3 is overexpressed, wherein the cancer bladder cancer.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2015/078919

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011128701 A2	20-10-2011	EP 2558114 A2	20-02-2013
		US 2013171133 A1	04-07-2013
		WO 2011128701 A2	20-10-2011

US 2013158000 A1	20-06-2013	AR 089207 A1	06-08-2014
		AU 2012350750 A1	12-06-2014
		CA 2859133 A1	20-06-2013
		CL 2014001547 A1	24-10-2014
		CN 104245700 A	24-12-2014
		CO 7030961 A2	21-08-2014
		CR 20140288 A	14-07-2014
		CU 20140065 A7	27-11-2014
		DO P2014000127 A	15-08-2014
		EA 201400707 A1	28-11-2014
		EP 2791140 A1	22-10-2014
		GT 201400113 A	25-08-2015
		HK 1205123 A1	11-12-2015
		JP 2015500307 A	05-01-2015
		KR 20140103328 A	26-08-2014
		PE 18552014 A1	26-11-2014
		PH 12014501355 A1	22-09-2014
		SG 11201402325Q A	26-09-2014
		US 2013158000 A1	20-06-2013
		US 2014336173 A1	13-11-2014
		UY 34484 A	31-07-2013
		WO 2013087578 A1	20-06-2013

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 13/10 (2006.01)		A 6 1 P 11/00	
A 6 1 K 31/53 (2006.01)		A 6 1 P 13/10	
A 6 1 K 31/506 (2006.01)		A 6 1 K 31/53	
A 6 1 K 31/496 (2006.01)		A 6 1 K 31/506	
A 6 1 K 31/498 (2006.01)		A 6 1 K 31/496	
A 6 1 K 31/4184 (2006.01)		A 6 1 K 31/498	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		A 6 1 K 31/4184	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A
		C 1 2 Q 1/68	A

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

(72)発明者 メラニー・エルー

ドイツ・4 0 2 2 3・デュッセルドルフ・ウレンベルク・シュトラッセ・3 デー

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR72 QR77
 QS34 QX01
 4C084 AA17 NA14 ZA591 ZA661 ZA811 ZB211 ZB261 ZC411 ZC421 ZC422
 4C086 AA01 AA02 BC39 BC50 BC52 CB05 GA07 GA12 MA01 MA04
 NA14 ZA59 ZA66 ZA81 ZB21 ZB26 ZC41 ZC42