

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 3 月 3 日(03.03.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/032003 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 31/506 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
A61K 31/502 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 31/5377 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/074660
- (22) 国際出願日: 2015 年 8 月 31 日(31.08.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-176674 2014 年 8 月 30 日(30.08.2014) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人金沢大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KANAZAWA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9201164 石川県金沢市角間町ヌ 7 番地 Ishikawa (JP).
- (72) 発明者: 矢野 聖二(YANO, Seiji); 〒9201164 石川県金沢市角間町ヌ 7 番地 国立大学法人金沢大学内 Ishikawa (JP). 竹内 伸司(TAKEUCHI, Shinji); 〒9201164 石川県金沢市角間町ヌ 7 番地 国立大学法人金沢大学内 Ishikawa (JP).
- (74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目 6 番 1 3 号 御幸ビル 3 0 7 号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: TREATMENT AGENT FOR LUNG CANCER PATIENT, AND METHOD FOR PREDICTING AND TESTING EFFICACY OF TREATMENT FOR LUNG CANCER PATIENT

(54) 発明の名称: 肺癌患者用治療剤及び肺癌患者治療の有効性の予測検査方法

(57) Abstract: Provided is a lung cancer treatment agent for treating lung cancer patients, and particularly EGFR-TKI-resistant NSCLC patients. Also provided is a method for predicting and testing the efficacy of a treatment for lung cancer patients. As a result of painstaking research regarding a treatment agent for lung cancer patients that contains an optimal combination of an HDAC inhibitor and EGFR-TKI, the present invention was perfected based on the discovery that "when the BIM in a sample derived from a EGFR-TKI-resistant NSCLC patient is non-wild, treatment by administering EGFR-TKI alone is minimally effective, whereas treatment involving administering a treatment agent for lung cancer patients containing JNJ-26481585 and EGFR-TKI in combination, or a treatment agent for lung cancer patients containing CUDC-101 and EGFR-TKI in combination is very effective."

(57) 要約: 肺癌患者、特に、EGFR-TKIに耐性を有する NSCLC 患者の治療の肺癌治療剤及び肺癌患者治療の有効性の予測検査方法を提供する。HDAC 阻害剤と EGFR-TKI の最適な組み合わせの肺癌患者用治療剤を鋭意検討した結果、「EGFR-TKIに耐性を有する NSCLC 患者由来のサンプル中の BIM が非野生型である場合には、EGFR-TKI 単独投与は治療の有効性が低いが、JNJ-26481585 と EGFR-TKI を組み合わせた肺癌患者用治療剤又は CUDC-101 と EGFR-TKI を組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与の治療の有効性が高いこと」を見出し、本発明を完成した。



WO 2016/032003 A1

明 細 書

発明の名称：

肺癌患者用治療剤及び肺癌患者治療の有効性の予測検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、肺癌患者用治療剤及び肺癌患者治療の有効性の予測検査方法に関する。特に、BIM非野生型を有する肺癌患者、より詳しくは、上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤に耐性を有する非小細胞肺癌患者の治療剤及び治療の有効性の予測検査方法に関する。

本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願、特願2014-176674号優先権を請求する。

背景技術

[0002] (肺癌)

日本では、毎年約6万人以上が肺癌で死亡しており、その中で非小細胞肺癌(NSCLC)は、約75%以上であると言われている。このような肺癌患者の治療方法として、一般的に上皮成長因子受容体(EGFR)のチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)の投与がある。

[0003] (上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤)

上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)であるゲフィチニブ及びエルロチニブは、エクソン19欠失やL858R点突然変異等のEGFR活性化突然変異を有するNSCLCに対して顕著な治療効果を示すことが知られている(非特許文献1、2)。

しかし、約20～30%の患者では、EGFR-TKIに対する内因性耐性が現れる。また、初期にEGFR-TKI投与による効果を示す患者でも、治療期間中にEGFR-TKIへの耐性が発現していることが報告されている(非特許文献3)。

さらに、EGFR-TKIの薬剤性間質性肺炎等の副作用が問題になっている。

以上により、EGFR-TKIに対する感度又は感受性が低い(耐性がある)患者に対して、投与前に効果を予測できる方法、さらにEGFR-TKI耐性の患者に対

する最適な治療方法の確立が強く望まれている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1 : New Engl J Med 2010;362:2380-8

非特許文献2 : Lancet Oncol 2010;11:121-8

非特許文献3 : Nat Rev Cancer 2010;10:760-74

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明は、前記要望に対して、肺癌患者、特に、EGFR-TKIに耐性を有するNSCLC患者の肺癌治療剤及び肺癌患者治療の有効性の予測検査方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明者等は、上記課題を解決すべく、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤（HDAC阻害剤）とEGFR-TKIの最適な組み合わせの肺癌患者用治療剤を鋭意検討した結果、「EGFR-TKIに耐性を有するNSCLC患者由来のサンプル中のBIMが非野生型である場合には、EGFR-TKI単独投与は治療の有効性が低い、JNJ-26481585とEGFR-TKIを組み合わせた肺癌患者用治療剤又はCUDC-101とEGFR-TKIを組み合わせた肺癌患者用治療剤の有効性が高いこと」を見出し、本発明を完成した。

[0007] すなわち、本発明は以下からなる。

1. 有効成分であるJNJ-26481585、CUDC-101、ボリノスタット及び／又はベリノスタットを、有効成分である上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤と組み合わせたことを特徴とする肺癌患者用治療剤。

2. 前記肺癌患者は、BIMの非野生型を有する前項1に記載の肺癌患者用治療剤。

3. 前記肺癌患者は、上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤に耐性を有する非小細胞肺癌患者である前項1又は2に記載の肺癌患者用治療剤

。

4. JNJ-26481585を上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブと組み合わせた前項1～3のいずれか1に記載の肺癌患者用治療剤。

5. CUDC-101を上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブと組み合わせた前項1～3のいずれか1に記載の肺癌患者用治療剤

。

6. ベリノスタットを上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤であるAZD9291と組み合わせた前項1～3のいずれか1に記載の肺癌患者用治療剤

。

7. ボリノスタットを上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤であるAZD9291と組み合わせた前項1～3のいずれか1に記載の肺癌患者用治療剤

。

8. ベリノスタットを上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブと組み合わせた前項1～3のいずれか1に記載の肺癌患者用治療剤。

9. ベリノスタットを上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤であるアファチニブと組み合わせた前項1～3のいずれか1に記載の肺癌患者用治療剤。

10. ボリノスタットを上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤であるアファチニブと組み合わせた前項1～3のいずれか1に記載の肺癌患者用治療剤。

11. 前記非野生型であることは、以下のいずれか1を有することである前項2～10のいずれか1に記載の肺癌患者用治療剤。

(1) BIM遺伝子の第2イントロンの部分欠失

(2) BIM- γ

(3) mRNA転写産物のエクソン3対エクソン4比が1以上

12. 以下の工程を有する肺癌患者治療の有効性の予測検査方法。

(1) 肺癌患者から取得したサンプル中のBIMが野生型であるか非野生型であるかを判定する工程

(2) 非野生型の場合には、JNJ-26481585、CUDC-101、ボリノスタット及び／又はベリノスタットを上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤と組み合わせた併用投与が有効であると判定する工程

13. 前記非野生型であることは、以下のいずれか1を検出することを含む前項12に記載の予測検査方法。

(1) BIM遺伝子の第2イントロンの部分欠失

(2) BIM- γ

(3) mRNA転写産物のエクソン3対エクソン4比が1以上

14. 前記肺癌患者は、上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤に耐性を有する非小細胞肺癌患者である前項12又は13に記載の予測検査方法。

15. 前記上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤はゲフィチニブである前項12～14のいずれか1に記載の予測検査方法。

16. 前記上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤はAZD9291である前項12～14のいずれか1に記載の予測検査方法。

17. 前記上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤はアファチニブである前項12～14のいずれか1に記載の予測検査方法。

発明の効果

[0008] 本発明は、肺癌患者、特に、EGFR-TKIに耐性を有するNSCLC患者の肺癌治療剤を提供することができる。

さらに、本発明は、肺癌患者、特にEGFR変異NSCLC患者に見られるBIM多型を検出して、肺癌患者治療の有効性の予測検査方法を提供することができる。

これにより、EGFR-TKIの治療効果を投与前に予測することが可能になり、EGFR-TKI投与の効果が期待される患者には早期からEGFR-TKIを投与することにより、治療効果を高めることができる。さらに、EGFR-TKI単独投与の治療の

有効性が期待できない患者には、JNJ-26481585とEGFR-TKIを組み合わせた肺癌患者用治療剤又はCUDC-101とEGFR-TKIを組み合わせた肺癌患者用治療剤を患者に投与することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]BIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株はゲフィチニブ誘発性アポトーシスに対して感受性が低いことを示す結果。(A) 上のパネルは、BIM欠失部に隣接するプライマーによって生成した4種のEGFR変異型NSCLC細胞株由来のPCR生成物を示す。サイズが4.2 kb及び1.3 kbのPCR生成物は、それぞれ、欠失のないアレイ及び欠失のあるアレイに相当し、その両方の生成物が存在することは欠失多型に対してヘテロ接合性があることを示している。下のパネルは、各細胞株のタンパク質であるBIM_{EL}、BIM_L及びBIM_Sの発現レベルを示す。(B) 細胞株を、ゲフィチニブ (1 μ M) 又はDMSOコントロールで48時間処理し、カスパーゼ-3/7の活性をCaspase-Glo3/7アッセイキットで測定した。各バーは平均±SDを示す。(C) BIM又はコントロールであるsiRNA をPC-9 (左) 及びHCC827 (右) 細胞に形質移入し、その後ゲフィチニブ (1 μ M) で48時間処理し、カスパーゼ3/7の活性を上記 (B) と同様に測定した。各バーは平均±SDを示す。溶解物を回収し、ウエスタンブロッティングにてタンパク質を分析した。

[図2]NSCLC細胞株における全BIMの発現とBIMイソ型比を示す結果。(A) アクチンに対して標準化したエクソン2A含有BIM転写産物の量。エクソン2Aは翻訳開始部位を含むことから、エクソン2A含有転写産物はBIMイソ型すべてを表すものである。(B) 各細胞株におけるエクソン4含有転写産物 (E4) に対するエクソン3含有転写産物 (E3) の比率。バーは平均±SDを示す。

[図3]BIM多型を有するEGFR変異細胞株はゲフィチニブ誘発性アポトーシスに感受性が低いことを示すフローサイトメトリー分析の結果。腫瘍細胞 (2x10⁵ 細胞個) を、ゲフィチニブ (1 μ M) 又はDMSOコントロールで72時間培養した。細胞を、PE-アネキシンV及び7-AADで染色した。アポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリーで分析した。

[図4]各HDAC阻害剤によるPC-3細胞株におけるBIM発現を促進するかどうかの確認結果。PC-3細胞を、様々な濃度で希釈したHDAC阻害剤（ボリノスタット、CUDC-101、Droxinostat、Entinostat）で24時間培養した。細胞溶解物を回収し、被験タンパク質をウエスタンブロッティングで分析した。

[図5]各HDAC阻害剤及びゲフィチニブの併用投与がPC-3細胞株のアポトーシスを誘導するかどうかの確認結果。PC-3細胞を、様々な濃度のHDAC阻害剤及び1 μ Mゲフィチニブ、又は、様々な濃度のHDAC阻害剤単独で24時間培養した。そして、培養後のPC-3細胞のMTTアッセイにより、アポトーシス（cleaved Caspase 3又はcleaved PARPの発現量）を測定した。

[図6]各HDAC阻害剤及びゲフィチニブの併用投与がPC-3細胞株のアポトーシスを誘導するかどうかの確認結果。PC-3細胞を、様々な濃度のHDAC阻害剤及び1 μ Mゲフィチニブ、又は、様々な濃度のHDAC阻害剤単独で24時間培養した。そして、培養後のPC-3細胞のMTTアッセイにより、アポトーシス（細胞生存率）を測定した。

[図7]各HDAC阻害剤及びゲフィチニブの併用投与がHCC2279細胞株のアポトーシスを誘導するかどうかの確認結果。HCC2279細胞を、様々な濃度のHDAC阻害剤及び1 μ Mゲフィチニブ、又は、様々な濃度のHDAC阻害剤単独で24時間培養した。そして、培養後のPC-3細胞のMTTアッセイにより、アポトーシス（細胞生存率）を測定した。

[図8]ヒト末梢血単核細胞（PBMC）及び血清におけるBIM多型の検出を示す結果。（A）BIM欠失部に隣接するプライマーを使用し、5人の健常ボランティアのPBMC由来DNAをPCR増幅した。サイズが4.2 kb及び1.3 kbのPCR生成物は、それぞれ、欠失のないアレイ及び欠失のあるアレイに相当する。（B）5人の健常ボランティアにおける血清DNAのPCR生成物。362 bp及び284 bpのPCR生成物は、それぞれ、野生型（W）及び欠失多型（D）アレイが存在することを示している。PBMCの結果と血清の結果は一致した。

[図9]ボリノスタット又はベリノスタットと各EGFR-TKIの併用投与がBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株のアポトーシスの誘導を示す結果。（A）

各EGFR-TKIの投与がPC-9細胞株及びPC-3細胞株のアポトーシスを誘導するかどうかの確認結果。（B）ボリノスタット及び各EGFR-TKIの併用投与がPC-3細胞株のアポトーシスを誘導するかどうかの確認結果。（C）ベリノスタット及び各EGFR-TKIの併用投与がPC-3細胞株のアポトーシスを誘導するかどうかの確認結果。

[図10]各HDAC阻害剤及びAZD9291若しくはアファチニブの併用投与がPC-3細胞株のアポトーシスを誘導するかどうかの確認結果。PC-3細胞を、様々な濃度のHDAC阻害剤及び0.1 μ M AZD9291若しくは0.01 μ Mアファチニブ、又は、様々な濃度のHDAC阻害剤単独で24時間培養した。そして、培養後のPC-3細胞のMTTアッセイにより、アポトーシス（細胞生存率）を測定した。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明は、「有効成分であるJNJ-26481585、CUDC-101、ボリノスタット及び／又はベリノスタットを、有効成分であるEGFR-TKIと組み合わせたことを特徴とする肺癌患者用治療剤」並びに「肺癌患者から取得したサンプル中のBIMが野生型であるか非野生型であるかを判定し、非野生型の場合には、JNJ-26481585、CUDC-101、ボリノスタット及び／又はベリノスタットを、EGFR-TKIと組み合わせた併用投与が有効であると判定することを特徴とする肺癌患者治療の有効性の予測検査方法」である。

[0011] （肺癌患者治療の有効性の予測検査方法）

本発明の肺癌患者治療の有効性の予測検査方法は、以下の工程を含む。

（1）肺癌患者から取得したサンプル中のBIMが野生型であるか非野生型であるかを判定する工程

（2）非野生型の場合には、JNJ-26481585、CUDC-101、ボリノスタット及び／又はベリノスタットをEGFR-TKIと組み合わせた併用投与が有効であると判定する工程

[0012] （肺癌患者用治療剤）

本発明の肺癌患者用治療剤は、有効成分であるJNJ-26481585及び／又はCUDC-101を有効成分であるEGFR-TKIと組み合わせたことを特徴とする肺癌患者用

治療剤である。

特に、好ましい、EGFR-TKIは、ゲフィチニブ、AZD9291及びアファチニブである。

[0013] (肺癌患者)

本発明の肺癌患者治療の有効性の予測検査方法又は肺癌患者用治療剤における、肺癌患者は、好ましくはEGFR変異肺癌患者であり、より好ましくはEGFR変異NSCLC患者であり、最も好ましくは進行性のEGFR変異NSCLC患者である。また、肺癌患者は、BIM の非野生型 (BIM欠失多型) を有していても良い。

加えて、BIM欠失多型は、比較的東アジア人に多いので、黄色人種、好ましくは東アジア人種、より好ましくは日本人の肺癌患者に有効である。

[0014] (サンプル)

本発明のサンプルは、下記実施例5の結果を示すように、由来は特に限定されないが、例えば血液 (末梢単核球)、血清、肺癌細胞、リンパ液、精液、尿、唾液 (含: 口内粘膜細胞)、その他の体液、及び生体組織 (肺癌組織) 等が挙げられ、特に、末梢単核球、血清等が採取等の取り扱いが容易で、侵襲性が低いという点で最も好ましい。被検者からサンプルを取得する方法は、特に限定されず、自体公知の方法によることができる。

[0015] (サンプルの処理方法)

上記肺癌患者から取得したサンプルは、免疫染色法、RT-PCR法等の自体公知の方法でBIMの多型を検出できる。

また、取得したサンプルは、予め処理することができる。サンプルからのDNA又はmRNAの抽出方法は、特に限定されず、自体公知の方法によることができる。例えばDNAを抽出する場合は、塩析、PCI (フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール抽出) 法、市販のDNA抽出キット等を用いる方法、その他公知の方法によることができる。例えば、mRNAを抽出する場合は、PCI法において溶液を酸性にして水層から抽出する方法、オリゴdTカラム等を利用する方法、市販のRNA抽出キットを用いる方法、その他の公知の方法によることができる。

[0016] サンプルから得られたDNA又はmRNA等のポリヌクレオチドの量が少ない場合には、必要に応じて、公知の方法によってこれらを増幅することができる。ポリヌクレオチドの増幅方法は、特に限定されず自体公知の方法を採用することができ、増幅の対象がDNAの場合は、例えばPCR法やLAMP法を利用することができ、増幅の標的となる対象がmRNAの場合には、RT-PCR法やRT-LAMP法等を利用することができる。

[0017] 上記サンプルから得られたDNA又はmRNAから、BIMを含む領域を増幅することができる。増幅されたヌクレオチド断片は、測定可能なサイズのものであればよい。

上記BIMを含む領域を増幅するためのプライマーは、BIMを含む領域のポリヌクレオチドのアンチセンス鎖及びセンス鎖の3'末端と、それぞれ特異的にハイブリダイズする、フォワード（センス）プライマーとリバース（アンチセンス）プライマーが含まれる。これらのプライマーは、BIMを含む領域の塩基配列に合わせて、適宜デザインすることができる。

[0018] （BIM多型の決定方法）

本発明の肺癌患者治療の有効性の予測検査方法又は肺癌患者用治療剤で使用するBIM多型の決定方法（検出方法）は、サンプルから得られたDNA又はmRNA等のポリヌクレオチド、又は上記増幅により得られたポリヌクレオチド断片により、BIMの多型を決定する工程を含む。BIMの多型を決定する方法は、自体公知の方法を用いることができ、例えば、シーケンサー等を用いて直接塩基配列を決定するdirect sequence法（ジデオキシ法）の他、RELP（制限酵素断片長多型性）を利用するPCR-RELP法、TaqMan法、DigiTag2法、シングルヌクレオチドプライマー伸長法、SnaPshot法（ABI）、ASP-PCR法、PCR-SSO（sequence specific oligonucleotide）法、PCR-SSP（sequence specific primer）法、PCR-SSCP（single-stranded conformational polymorphism analysis）法、電気泳動等による核酸の長さの確認、及びDNAチップ等の遺伝子多型検査用器具等を用いる方法等が挙げられる。

[0019] （BIM）

BCL2L11とも称されるBIMは、プロアポトーシスタンパク質であり、Bcl-2ファミリーのメンバーである。アポトーシス誘導に不可欠なBH3ドメインを有する遺伝子産物（BIM_{EL}、BIM_L及びBIM_S等）は、抗アポトーシスタンパク質（Bcl-2、Bcl-XL及びMcl-1等）に拮抗し、プロアポトーシスタンパク質（BAX及びBAK等）を活性化し、アポトーシスを誘導する。BAX及びBAKを活性化すると、細胞質内にシトクロームCが放出され、カスパーゼのカスケードが活性化される。

BIM欠失多型は、比較的東アジア人に多く（12.9%）、0.5%がこの欠失に対してホモ接合性である。BIM欠失多型は、イントロン2内で2903 bp断片の欠失を含み、これによってエクソン4よりもエクソン3が優先的にスプライスされ、BH3ドメインを欠失したBIMイソ型が生成される（参照：Nat Med 2012;18:521-8）。

また、BIM_{EL}は、E1、E2A、E2B、E2C、E4（BH3ドメインを含む）及びE5を含む転写産物であり、BIM_Lは、E1、E2A、E2C、E4及びE5を含む転写産物であり、BIM_Sは、E1、E2A、E4及びE5を含む転写産物であり、BIM- γ は、E1、E2A、E2C及びE3を含む転写産物である。

[0020] （BIMが野生型であるか非野生型であるかの判定）

本発明の肺癌患者治療の有効性の予測検査方法又は肺癌患者用治療剤において、BIMが野生型であるか非野生型であるかを判定する基準として、BIM多型を検出する。下記のBIM多型を検出することができれば、非野生型と判定する。さらに、本実施例2では、下記のBIM多型がEGFR-TKI抵抗性を有することを確認している。

（1）BIM遺伝子の第2イントロンの部分欠失

（2）BIM- γ

（3）mRNA転写産物のエクソン3対エクソン4比が1以上

加えて、下記実施例2～4及び参考例1～2の結果により、BIM多型（H3ドメインを含んでいるBIM多型）では、JNJ-26481585、CUDC-101、ボリノスタット及び／又はベリノスタットをEGFR-TKIと組み合わせた肺癌患者用治療剤が

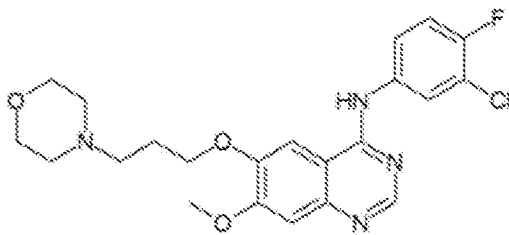
、特に有効であることを確認している。

[0021] (EGFR-TKI)

EGFR-TKIは、EGFRのチロシンキナーゼの活性を阻害する抗癌剤である。EGFR-TKIは、特に制限されないが、例えば、ゲフィチニブ、エルロチニブAZD9291及びアファチニブ等が例示される。

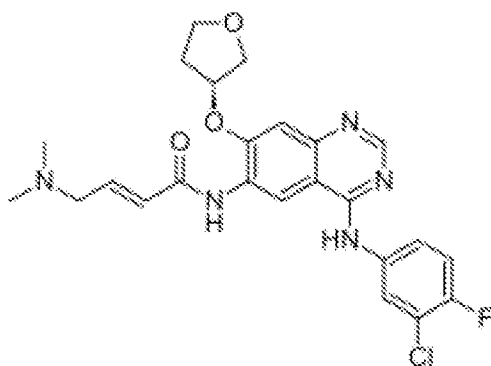
[0022] ゲフィチニブ（参照：下記式）は、他の治療法で効果がなかった進行性NSCLCの治療に使用されている分子標的抗癌剤であり、アストラゼネカ社により商品名「イレッサ」として市販されている。

[0023] [化1]



[0024] アファチニブ（Afatinib：参照：下記式）は、ゲフィチニブより新しい、進行性NSCLCの治療に使用されている分子標的抗癌剤であり、日本ベーリンガーインゲルハイム社より商品名「ジオトリフ」として市販されている。

[0025] [化2]

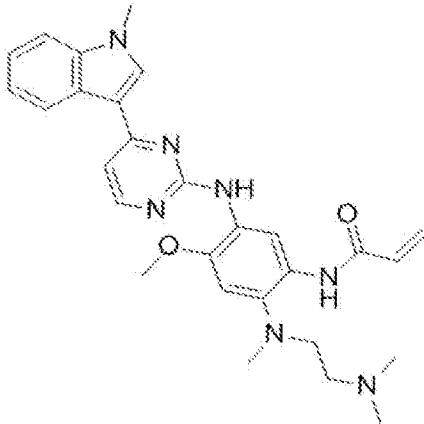


[0026] AZD9291（参照：下記式）は、アファチニブより新しい、進行性NSCLCの治療に有望な分子標的抗癌剤であり、アストラゼネカ社により臨床試験されている。

上記AZD9291は、変異型EGFR選択的TKIに分類される薬剤で、活性型遺伝子

変異のみならずT790M二次的遺伝子変異を有するEGFRを選択的に阻害する（参照：W02013/014448、Cancer Discov 2014;4:1046-61）。また高血糖の可能性を回避するためインスリン受容体及びインスリン様成長因子受容体に対する作用を低減するよう設計されている。

[0027] [化3]



[0028] (ドセタキセル)

ドセタキセルは、タキサン系の抗癌剤であり、細胞の分裂に必要な微小管の働きを阻害し、がん細胞の分裂を防ぐ作用があり、商品名「タキソテール」あるいは「ワンタキソテール」として市販されている。

[0029] (ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤：HDAC阻害剤)

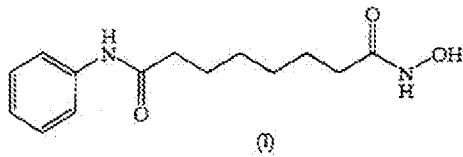
ヒストン脱アセチル化酵素は、クロマチンリモデリングを調節し、様々な遺伝子の後成的調節に極めて重要な酵素である。HDAC阻害剤の例として、ボリノスタット、JNJ-26481585、CUDC-101、PCI-24781、Droxinostat、Entinostat（エンチノスタット）がある。

本発明の肺癌患者用治療剤で使用するHDAC阻害剤は、下記の実施例3、4、参考例1及び参考例2の結果より、JNJ-26481585、CUDC-101、ボリノスタット及び／又はベリノスタットである。

[0030] ボリノスタット（参照：下記式）は、商品名「ゾリンザ」として市販されており、皮膚T細胞性リンパ腫の患者を治療するために、米国食品医薬品局（FDA）に認可されている。

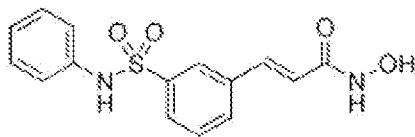
[0031]

[化4]



[0032] ベリノスタット (Belinostat : 下記式) は、末梢T細胞リンパ腫の患者を治療するために、FDAに認可されている。

[0033] [化5]



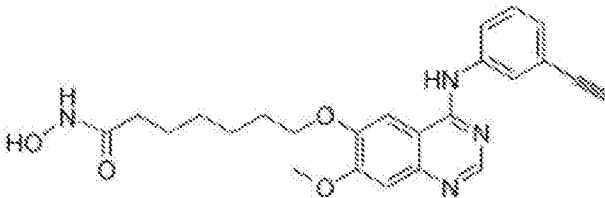
[0034] Droxinostatは、HDAC3、HDAC6及びHDAC8の阻害剤であり、市販されている。

Entinostatは、HDAC1及びHDAC3の阻害剤であり、市販されている。

[0035] (CUDC-101)

CUDC-101 (参照 : 下記式) は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害作用だけでなく、上皮成長因子受容体阻害作用も有し、市販されている。

[0036] [化6]

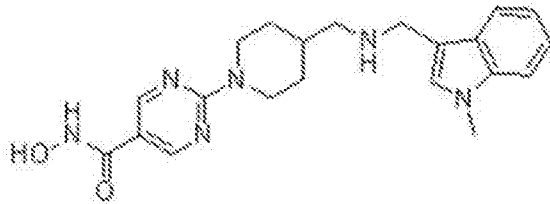


[0037] (JNJ-26481585)

JNJ-26481585 (参照 : 下記式) は、広範囲のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC1、HDAC2、HDAC4、HDAC10及び HDAC11) の阻害剤であり、市販されている。

[0038]

[化7]



[0039] (肺癌患者用治療剤の使用方法)

本発明の肺癌患者用治療剤の好ましい使用方法は、下記の通りであるが特に限定されない。

肺癌患者から得られたサンプルのBIMが非野生型の場合には、実施例3、実施例4、参考例1及び参考例2の結果よりJNJ-26481585、CUDC-101、ボリノスタット及び／又はベリノスタットをEGFR-TKIと組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与が有効であると判定し、さらに、該治療剤を該肺癌患者に投与する。なお、好ましい、EGFR-TKIは、ゲフィチニブ、アファチニブ及びAZD9291である。

さらに、肺癌患者から得られたサンプルのBIMが野生型の場合には、実施例2の結果より、EGFR-TKI単独投与でも有効であると判定し、治療期間中において、必要に応じて、JNJ-26481585、CUDC-101、ボリノスタット及び／又はベリノスタットをEGFR-TKIと組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与を行う。なお、好ましい、EGFR-TKIは、ゲフィチニブ、アファチニブ及びAZD9291である。

[0040] (CUDC-101及びゲフィチニブを組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法)

本発明の有効成分であるCUDC-101及びゲフィチニブを組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法は、以下を例示することができるが特に限定されない。

(1) 1回の投与量

ゲフィチニブ：250mg

CUDC-101：75mg/m²～300mg/m²、好ましくは150mg/m²～275mg/m²、最も好ましくは約275mg/m²

(2) 投与間隔

ゲフィチニブ：1週間1～7回投与、好ましくは2日1～2回投与、最も好ましくは1日1回投与

CUDC-101：2週間1～5回投与、好ましくは2週間3～5回投与、最も好ましくは2週間5回投与

(3) 併用投与：CUDC-101とゲフィチニブは同時投与、数時間の間隔を空けての投与、1日の間隔を空けての投与、数日の間隔を空けての投与のいずれでも良い。

また、CUDC-101とゲフィチニブを、生理学的に許容されうる担体、賦形剤、結合剤等などと混合し、医薬組成物にした後に、該組成物を患者に投与してもよい。さらに、CUDC-101とゲフィチニブを別々に製剤化した場合において、別々に製剤化したものを使用時に希釈剤などを用いて混合して混合物にして後に、該混合物を患者に投与してもよい。

[0041] (JNJ-26481585及びゲフィチニブを組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法)

本発明の有効成分であるJNJ-26481585及びゲフィチニブを組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法は、以下を例示することができるが特に限定されない。

(1) 1回の投与量

ゲフィチニブ：250mg

JNJ-26481585：2mg～19mg、好ましくは8mg～12mg、最も好ましくは約12mg

(2) 投与間隔

ゲフィチニブ：1週間1～7回投与、好ましくは2日1～2回投与、最も好ましくは1日1回投与

JNJ-26481585：1週間2～4回投与、好ましくは1週間2～3回投与、最も好ましくは1週間3回投与

(3) 併用方法：JNJ-26481585とゲフィチニブは同時投与、数時間の間隔を

空けての投与、数日間の間隔を空けての投与、数週間の間隔を空けての投与のいずれでも良い。

また、JNJ-26481585とゲフィチニブを、生理学的に許容されうる担体、賦形剤、結合剤等などと混合し、医薬組成物にした後に、該組成物を患者に投与してもよい。さらに、JNJ-26481585とゲフィチニブを別々に製剤化した場合において、別々に製剤化したものを使用時に希釈剤などを用いて混合して混合物にして後に、該混合物を患者に投与してもよい。

[0042] (ベリノスタット及びAZD9291を組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法)

本発明の有効成分であるベリノスタット及びAZD9291を組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法は、以下を例示することができるが特に限定されない。

(1) 1回の投与量

AZD9291 : 80 mg

ベリノスタット : $100/\text{mg}^2 \sim 2000/\text{mg}^2$ 、好ましくは $500/\text{mg}^2 \sim 1200/\text{mg}^2$ 、最も好ましくは約 $1000/\text{mg}^2$

(2) 投与間隔

AZD9291 : 1週間1～7回投与、好ましくは2日1～2回投与、最も好ましくは1日1回投与

ベリノスタット : 3週間1～10回投与、好ましくは3週間1～5回投与、最も好ましくは3週間5回投与

(3) 併用方法 : ベリノスタットとAZD9291は同時投与、数時間の間隔を空けての投与、数日間の間隔を空けての投与、数週間の間隔を空けての投与のいずれでも良い。

また、ベリノスタットとAZD9291を、生理学的に許容されうる担体、賦形剤、結合剤等などと混合し、医薬組成物にした後に、該組成物を患者に投与してもよい。さらに、ベリノスタットとAZD9291を別々に製剤化した場合において、別々に製剤化したものを使用時に希釈剤などを用いて混合して混合物にして後に、該混合物を患者に投与してもよい。

[0043] (ボリノスタット及びAZD9291を組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法)

本発明の有効成分であるボリノスタット及びAZD9291を組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法は、以下を例示することができるが特に限定されない。

(1) 1回の投与量

AZD9291 : 80 mg

ボリノスタット : 100 mg ~ 400 mg、好ましくは200 mg ~ 400 mg、最も好ましくは約400 mg

(2) 投与間隔

AZD9291 : 1週間1 ~ 7回投与、好ましくは2日1 ~ 2回投与、最も好ましくは1日1回投与

ボリノスタット : 1週間1 ~ 7回投与、好ましくは1週間3 ~ 7回投与、最も好ましくは1週間7回投与

(3) 併用方法 : ボリノスタットとAZD9291は同時投与、数時間の間隔を空けての投与、数日間の間隔を空けての投与、数週間の間隔を空けての投与のいずれでも良い。

また、ボリノスタットとAZD9291を、生理学的に許容されうる担体、賦形剤、結合剤などと混合し、医薬組成物にした後に、該組成物を患者に投与してもよい。さらに、ボリノスタットとAZD9291を別々に製剤化した場合において、別々に製剤化したものを使用時に希釈剤などを用いて混合して混合物にして後に、該混合物を患者に投与してもよい。

[0044] (ベリノスタット及びゲフィチニブを組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法)

本発明の有効成分であるベリノスタット及びゲフィチニブを組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法は、以下を例示することができるが特に限定されない。

(1) 1回の投与量

ゲフィチニブ : 250 mg

ベリノスタット： $100/\text{mg}^2 \sim 2000/\text{mg}^2$ 、好ましくは $500/\text{mg}^2 \sim 1200/\text{mg}^2$ 、最も好ましくは約 $1000/\text{mg}^2$

(2) 投与間隔

ゲフィチニブ：1週間1～7回投与、好ましくは2日1～2回投与、最も好ましくは1日1回投与

ベリノスタット：3週間1～10回投与、好ましくは3週間1～5回投与、最も好ましくは3週間5回投与

(3) 併用方法：ベリノスタットとゲフィチニブは同時投与、数時間の間隔を空けての投与、数日間の間隔を空けての投与、数週間の間隔を空けての投与のいずれでも良い。

また、ベリノスタットとゲフィチニブを、生理学的に許容されうる担体、賦形剤、結合剤などと混合し、医薬組成物にした後に、該組成物を患者に投与してもよい。さらに、ベリノスタットとゲフィチニブを別々に製剤化した場合において、別々に製剤化したものを使用時に希釈剤などを用いて混合して混合物にして後に、該混合物を患者に投与してもよい。

[0045] (ベリノスタット及びアファチニブを組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法)

本発明の有効成分であるベリノスタット及びアファチニブを組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法は、以下を例示することができるが特に限定されない。

(1) 1回の投与量

アファチニブ：40 mg

ベリノスタット： $100/\text{mg}^2 \sim 2000/\text{mg}^2$ 、好ましくは $500/\text{mg}^2 \sim 1200/\text{mg}^2$ 、最も好ましくは約 $1000/\text{mg}^2$

(2) 投与間隔

アファチニブ：1週間1～7回投与、好ましくは2日1～2回投与、最も好ましくは1日1回投与

ベリノスタット：3週間1～10回投与、好ましくは3週間1～5回投与

、最も好ましくは3週間5回投与

(3) 併用方法：ベリノスタットとアフアチニブは同時投与、数時間の間隔を空けての投与、数日間の間隔を空けての投与、数週間の間隔を空けての投与のいずれでも良い。

また、ベリノスタットとアフアチニブを、生理学的に許容されうる担体、賦形剤、結合剤等などと混合し、医薬組成物にした後に、該組成物を患者に投与してもよい。さらに、ベリノスタットとアフアチニブを別々に製剤化した場合において、別々に製剤化したものを使用時に希釈剤などを用いて混合して混合物にして後に、該混合物を患者に投与してもよい。

[0046] (ポリノスタット及びアフアチニブを組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法)

本発明の有効成分であるポリノスタット及びアフアチニブを組み合わせた肺癌患者用治療剤の投与方法は、以下を例示することができるが特に限定されない。

(1) 1回の投与量

アフアチニブ：40mg

ポリノスタット：100mg～400mg、好ましくは200mg～400mg、最も好ましくは約400mg

(2) 投与間隔

アフアチニブ：1週間1～7回投与、好ましくは2日1～2回投与、最も好ましくは1日1回投与

ポリノスタット：1週間1～7回投与、好ましくは1週間3～7回投与、最も好ましくは1週間7回投与

(3) 併用方法：ポリノスタットとアフアチニブは同時投与、数時間の間隔を空けての投与、数日間の間隔を空けての投与、数週間の間隔を空けての投与のいずれでも良い。

また、ポリノスタットとアフアチニブを、生理学的に許容されうる担体、賦形剤、結合剤等などと混合し、医薬組成物にした後に、該組成物を患者に

投与してもよい。さらに、ポリノスタットとアフアチニブを別々に製剤化した場合において、別々に製剤化したものを使用時に希釈剤などを用いて混合して混合物にして後に、該混合物を患者に投与してもよい。

[0047] 以下に示す実施例及び参考例によって本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。さらに、すべての動物実験は、金沢大学学際科学実験センター及び実験動物研究施設（承認番号AP-081088）のガイドラインにしたがった。

実施例 1

[0048] （材料及び方法）

実施例及び参考例で使用了材料及び方法は、以下の通りである。

[0049] （細胞株と試薬）

EGFR変異のあるNSCLC細胞株PC-9、HCC827及びHCC2279を、それぞれ、Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.（日本国、群馬県、藤岡市）、ATCC（バージニア州、Manassas）及びDr. John Minna（テキサス大学南西医療センター、テキサス州、Dallas）から入手した。

NSCLCである日本人女性患者から樹立したPC-3細胞（EGFRエクソン19欠失あり）をヒューマンサイエンス研究資源バンク（JCRB0077: http://cellbank.nibio.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?DB_NUM=1&ID=252）（日本国、大阪府）から購入した。なお、該細胞は、前立腺癌細胞株PC-3（ATCC CRL1435）とは異なる。

PC-3及び他の3種の細胞株は、それぞれ、10%ウシ胎仔血清（FBS）及び抗生物質を添加したD-MEM及び10%ウシ胎仔血清及び抗生物質を添加したRPMI1640培地で保持した。

すべての細胞を3か月まで継代維持し、その後、凍結させた初期継代ストックから再生させた。

細胞を、MycoAlert Mycoplasma Detectionキット（Lonza社、メイン州、Rockland）を使用して、定期的にマイコプラズマスクリーニングをした。

ポリノスタットは、Selleck Chemicals（テキサス州、Houston）から入手

した。

ベリノスタットは、Selleck Chemicalsから入手した。

ゲフィチニブは、AstraZeneca（英国、London）から入手した。

アフアチニブは、Selleck Chemicalsから入手した。

AZD9291は、Selleck Chemicalsから入手した。

CUDC-101は、Selleck Chemicalsから入手した。

JNJ-26481585は、Selleck Chemicalsから入手した。

Droxinostatは、Selleck Chemicalsから入手した。

Entinostatは、Selleck Chemicalsから入手した。

[0050] （BIMの遺伝子型及び発現解析）

DNeasy Blood & Tissueキット（Qiagen社、ドイツ、Hilden）を使用し、メーカーのプロトコールにしたがってゲノムDNAを細胞から抽出した。RNeasy PLUS Miniキット（Qiagen社）を使用し、全RNAを細胞から抽出した。PCR法によって、試料中のBIM欠失多型及びBIMイソ型の発現レベルを検出した（参考文献：Nat Med 2012;18:521-8）。

[0051] （細胞アポトーシス）

細胞（ 3×10^3 ）を96ウェルの白色壁プレートの各ウェルに播種し、一晚培養し、被験化合物又はビヒクル（DMSO）で48時間処理した。

メーカーの説明書に従い、細胞アポトーシスを、Caspase-Glo 3/7アッセイキット（Promega社、ウィスコンシン州、Madison）で測定し、カスパーゼ-3/7活性を、PE-Annexin V Apoptosis Detection Kit（BD Biosciences社、カリフォルニア州、San Jose）で評価した。

MTTアッセイは、公知のキット及び該キットの添付の説明書に従い行った。

[0052] （RNA干渉）

本発明者らが著者である文献「Cancer Res 2008;68:9479-87」の記載に従い、BIMに対してのDiplexed Stealth RNAi（Invitrogen、カリフォルニア州、Carlsbad）、及びStealth RNAi-negative control low GC Duplex #3（Invitrogen）を使用して、RNA干渉（RNAi）分析を行った。

使用したsiRNA標的配列は、以下の通りである。

BIM #1

5' -CAUGAGUUGUGACAAAUAACACAA-3' (配列番号 1)

5' -UUGUGUUGAUUUGUCACAACUCAUG-3' (配列番号 2)

BIM #2

5' -UGAGUGUGACCGAGAAGGUAGACAA-3' (配列番号 3)

5' -UUGUCUACCUUCUCGGUCACACUCA-3' (配列番号 4)

[0053] (ウエスタンブロット分析)

ホスホEGFR (Tyr1068)、ヒストンH3、アセチル化ヒストンH3 (Lys27)、BIM (Cell Signaling Technology、マサチューセッツ州、Beverly) 及びEGFR (R&D Systems、ミネソタ州、Minneapolis) に対する抗体でウエスタンブロットティングを行った。

次に、ブロットを、マウス又はウサギIgGに特異的なHRP共役二次抗体と共に培養し、化学発光の増強 (Pierce Biotechnology) によってシグナルを検出した。

実施例 2

[0054] (BIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株はゲフィチニブ誘導型アポトーシスに対して感受性が低いかどうかの確認)

本実施例では、EGFR-TKIの投与がBIM非野生型 (BIM欠失多型) を有するEGFR変異NSCLC細胞株に対して有効であるかどうかを確認した。詳細は、以下の通りである。

[0055] PCRによって、EGFR変異NSCLC細胞株のBIM欠失多型を検出した。PC-9及びHC C827は、PCR生成物のサイズが4.2kbである野生型アレルを有していた。HCC2279細胞は、PCR生成物のサイズが4.2kb (野生型) 及び1.3 kb (2.9 kb欠失多型) のサイズのBIM欠失多型であるヘテロ接合性であった。EGFR変異を有する7つの他の細胞株 (参照: 下記表1) において、PC-3はBIM欠失多型であるヘテロ接合性であった (図1A)。

ウエスタンブロット分析は、「プロアポトーシスBIMタンパク質の発現はPC

-9及びHCC827細胞内よりもPC-3及びHCC2279細胞内で顕著に低いこと」を明らかにした。

BIMイソ型転写産物の分析は、「BIM多型を有する細胞は、エクソン4含有転写産物よりもエクソン3含有転写産物を多く発現すること」を明らかにした（図2）。

EGFR-TKIであるゲフィチニブ単独投与は、PC-9及びHCC827細胞のカスパーゼ-3/7及びアポトーシスが顕著に活性化した。しかし、ゲフィチニブ単独投与は、PC-3及びHCC2279細胞のカスパーゼ-3/7及びアポトーシスを活性化しなかった（図1B、図3）。

さらに、ゲフィチニブは、BIM siRNAで処置したPC-9及びHCC827細胞内のカスパーゼ-3/7を増加させなかった（図1C）。この非増加は、「BIMがEGFR-TKIで処置したEGFR変異NSCLC細胞内のアポトーシス誘導において極めて重要な役割を担っていること」を示すものであった。

以上により、BIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞は、アポトーシス誘導から明らかなように、野生型BIMを有する細胞と比較して、EGFR-TKIであるゲフィチニブ感受性が極めて低いことを確認した。

すなわち、EGFR-TKIの単独投与はBIM非野生型（BIM欠失多型）を有するEGFR変異NSCLC細胞に対して有効でないことを確認した。

[0056] [表1]

Status of *EGFR* mutation and *BIM* polymorphism in NSCLC cell lines

	<i>EGFR</i> mutation	<i>BIM</i> polymorphism
PC-9	E746_A750del	wild-type
HCC827	E746_A750del	wild-type
HCC2279	E746_A750del	heterozygous
PC-3	L747_E749del, A750P	heterozygous
HCC4006	E746_A750del	wild-type
HCC2935	E746_T751del, S752I	wild-type
H1650	E746_A750del	wild-type
H1975	L858R/T790M	wild-type
RERF-LC-AI	L858R	wild-type
RERF-Ad-A2	L747_E749del, A750P	wild-type

実施例 3

[0057] (HDAC阻害剤がBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株のBIM発現を促進するかどうかの確認)

本実施例では、各HDAC阻害剤がBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株(PC-3細胞株)のBIM発現を促進するかどうかを確認した。詳細は、以下の通りである。

[0058] ボリノスタットに関し、1 μ Mからヒストンのアセチル化及びBIM発現の上昇を確認した(図4 a)。

CUDC-101に関し、低濃度である0.1 μ Mからヒストンのアセチル化及びBIM発現の上昇を確認した(図4 b)。

Droxinostatに関し、いずれの濃度でもヒストンのアセチル化及びBIM発現は誘導できなかった(図4 c)。

Entinostatに関し、1 μ M程度からヒストンのアセチル化及びBIM発現の上昇を確認できた(図4 d)。

以上により、CUDC-101は、ボリノスタットと比較して、BIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株のBIM発現を強く誘導することを確認した。

実施例 4

[0059] (HDAC阻害剤とゲフィチニブの併用投与がBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株のアポトーシスを誘導するかどうかの確認)

本実施例では、各HDAC阻害剤とゲフィチニブの併用投与がBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株(PC-3細胞株、HCC2279細胞株)のアポトーシスを誘導するかどうかをcleaved Caspase 3及びcleaved PARPの発現量を基にして確認した。詳細は、以下の通りである。

[0060] 各HDAC阻害剤及びゲフィチニブの併用投与がPC-3細胞のアポトーシスを誘導するかどうかの確認結果を図5に示す。

図5 (a)の結果から明らかなように、JNJ-26481585及びゲフィチニブの併用投与は、ボリノスタット及びゲフィチニブの併用投与と比較して、低濃度(ボリノスタット投与量3 μ MとJNJ-26481585投与量0.03 μ M~0.1 μ Mが同程

度)でBIM蛋白質発現を回復させ、さらにBIM遺伝子多型陽性PC-3細胞株のアポトーシス(cleaved PARP及びcleaved caspase-3発現)を誘導した。

図5(b)の結果から明らかなように、EGFRとHDACの両者を阻害するCUDC-101単独投与は、ボリノスタット及びゲフィチニブの併用投与と同程度のアポトーシス(cleaved PARP発現)を誘導した。さらに、CUDC-101及びゲフィチニブの併用投与もアポトーシス(cleaved PARP発現)を誘導していることを確認した。

実施例 5

[0061] (HDAC阻害剤とゲフィチニブの併用投与がBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株のアポトーシスを誘導するかどうかの確認)

本実施例では、各HDAC阻害剤とゲフィチニブの併用投与がBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株(PC-3細胞株、HCC2279細胞株)のアポトーシスを誘導するかどうかを確認した。詳細は、以下の通りである。

[0062] 各HDAC阻害剤及びゲフィチニブの併用投与がPC-3細胞のアポトーシスを誘導するかどうかの確認結果を図6に示す。

ボリノスタット及びゲフィチニブの併用投与に関し、ボリノスタット投与量 $3\mu\text{M}$ で細胞生存率を約0%まで低下させた(図6a)。

CUDC-101及びゲフィチニブの併用投与に関し、低濃度であるCUDC-101投与量 $1\mu\text{M}$ で細胞生存率を約0%まで低下させた(図6b)。

Droxinostat及びゲフィチニブの併用投与に関し、細胞生存率の変化がなかった(図6c)。

Entinostat及びゲフィチニブの併用投与に関し、わずかに細胞生存率の低下があった(図6d)。

JNJ-26481585及びゲフィチニブの併用投与に関し、低濃度であるJNJ-26481585投与量 $0.03\mu\text{M}$ で細胞生存率を約0%まで低下させた(図6e)。

[0063] 各HDAC阻害剤及びゲフィチニブの併用投与がHCC2279細胞のアポトーシスを誘導するかどうかの確認結果を図7に示す。

ボリノスタット及びゲフィチニブの併用投与に関し、ボリノスタット投与

量 $3\mu\text{M}$ で細胞生存率を約30%まで低下させた（図7 a）。

CUDC-101及びゲフィチニブの併用投与に関し、低濃度であるCUDC-101投与量 $3\mu\text{M}$ で細胞生存率を約10%以下まで低下させた（図7 b）。

Droxinostat及びゲフィチニブの併用投与に関し、細胞生存率の変化がなかった（図7 c）。

Entinostat及びゲフィチニブの併用投与に関し、わずかに細胞生存率の低下があった（図7 d）。

JNJ-26481585及びゲフィチニブの併用投与に関し、低濃度であるJNJ-26481585投与量 $0.3\mu\text{M}$ で細胞生存率を約0%まで低下させた（図7 e）。

[0064] 上記PC-3細胞及びHCC2279細胞のアポトーシス誘導結果より、JNJ-26481585及びゲフィチニブの併用投与並びにCUDC-101及びゲフィチニブの併用投与は、ボリノスタット及びゲフィチニブの併用投与と比較して、アポトーシス誘導作用が強いことを確認した。

特に、JNJ-26481585及びゲフィチニブの併用投与は、CUDC-101及びゲフィチニブの併用投与と比較して、低濃度でアポトーシスを誘導した。

さらに、各HDAC阻害剤のBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株のBIM発現促進結果は、各HDAC阻害剤とゲフィチニブの併用投与によるBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株のアポトーシス誘導結果と一致した。

以上により、JNJ-26481585及びゲフィチニブの併用投与並びにCUDC-101及びゲフィチニブの併用投与は、ボリノスタット及びゲフィチニブの併用投与と比較して、BIM多型を有するEGFR変異NSCLC患者の有効な治療方法になることを確認した。すなわち、有効成分であるJNJ-26481585又はCUDC-101を有効成分であるEGFR-TKIと組み合わせた肺癌患者用治療剤は、BIM多型を有するEGFR変異NSCLC患者の優れた肺癌治療剤となる。

実施例 6

[0065] (BIM非野生型の検出)

BIM非野生型であるBIM多型は、末梢血を使用して検出可能であるかどうかを確認した。

[0066] BIM欠失部に隣接するプライマーを使用し、5人の健常ボランティアのPBMC由来DNAをPCR増幅した。増幅して得られたBIMサイズが4.2 kb及び1.3 kbのPCR生成物は、それぞれ、欠失のないアレイ及び欠失のあるアレイに相当した（図8 A）。

また、5人の健常ボランティアにおける血清DNAのPCR生成物である362 bp及び284 bpは、それぞれ、野生型（W）及び欠失多型（D）に相当した（図8 B）。

加えて、PBMCの結果と血清の結果は一致したことを確認した。

以上により、本実施例では、利便性があり簡単に利用できるPCRスクリーニング法を適用し、血清中のDNAでBIM多型を容易に検出できることを確認した（図8 A、B）。さらに、BIM多型は生殖細胞系列の変質であることから、どの時点の血清でも検出が可能である。

参考例 1

[0067] （ボリノスタット又はベリノスタットと各EGFR-TKIの併用投与がBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株のアポトーシスを誘導するかどうかの確認）

本参考例では、ボリノスタット又はベリノスタットと各EGFR-TKIの併用投与がBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株（PC-3細胞株）のアポトーシスを誘導するかどうかをcleaved Caspase 3及びcleaved PARPの発現量を基にして確認した。詳細は、以下の通りである。

[0068] PC-9及びPC-3細胞における各EGFR-TKIによるアポトーシスの誘導率を図9（A）に示した。

図9（A）から明らかなように、EGFR-TKIであるゲフィチニブ、アファチニブおよびAZD9291は、投与量1 μ Mで、実施例2において野生型アレルを示したPC-9細胞のアポトーシスの誘導を顕著に増加した。対して、実施例2においてBIM欠失多型であるヘテロ接合性を示したPC-3については、いずれのEGFR-TKIによってもアポトーシスの誘導を増加しなかった。

ボリノスタット又はベリノスタット並びに各EGFR-TKIの併用投与がPC-3細胞のアポトーシスを誘導するかどうかの確認結果を図9（B）及び（C）に

示す。

図9（B）の結果から明らかなように、ゲフィチニブ、アファチニブ又はAZD9291並びにボリノスタットの併用投与は、BIM遺伝子多型陽性PC-3細胞株のアポトーシス（cleaved PARP及びcleaved caspase-3発現）を誘導した。

同様に、図9（C）の結果から明らかなように、ゲフィチニブ、アファチニブ又はAZD9291並びにベリノスタットの併用投与は、PC-3細胞株のアポトーシスを誘導した。

参考例2

[0069] （ボリノスタット又はベリノスタットとゲフィチニブ、アファチニブ又はAZD9291の併用投与がBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株のアポトーシスを誘導するかどうかの確認）

本参考例では、実施例5と同様な方法により、ボリノスタット又はベリノスタットとゲフィチニブ、アファチニブ又はAZD9291の併用投与がBIM欠失多型を有するEGFR変異NSCLC細胞株（PC-3細胞株）のアポトーシスを誘導するかどうかを確認した（参照：図10）。

[0070] ベリノスタットとAZD9291の併用投与、ボリノスタットとAZD9291の併用投与、ベリノスタットとアファチニブの併用投与、並びにボリノスタットとアファチニブの併用投与は、細胞生存率を顕著に低下させた。

[0071] （総論）

実施例2では、上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤（EGFR-TKI）の単独投与治療方法はBIM非野生型（BIM欠失多型）を有するEGFR変異NSCLC患者に対して有効でないことを確認した。

実施例3－5では、JNJ-26481585及びゲフィチニブを併用した治療方法並びにCUDC-101及びゲフィチニブを併用した治療方法が、BIMタンパク質の発現を修復し、アポトーシスを誘導し、ゲフィチニブ耐性を解消することができた。

実施例6では、BIM多型は、サンプルの由来に影響しないことを確認した。

参考例1－2では、ベリノスタット及びAZD9291を併用した治療方法、ボリ

ノスタット及びAZD9291を併用した治療方法、ベリノスタット及びゲフィチニブを併用した治療方法、ベリノスタット及びアファチニブを併用した治療方法並びにボリノスタット及びアファチニブを併用した治療方法が、BIMタンパク質の発現を修復し、アポトーシスを誘導し、ゲフィチニブ耐性、アファチニブ耐性又はAZD9291耐性を解消することができた。

以上により、すべての実施例及び参考例の結果として、EGFR変異NSCLC患者の最適な治療剤及び肺癌患者治療の有効性の予測検査方法を提供することができる。

産業上の利用可能性

[0072] 肺癌患者、特にEGFR変異NSCLC患者の最適な治療剤及び肺癌患者治療の有効性の予測検査方法を提供することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 有効成分であるJNJ-26481585及び／又はCUDC-101を、有効成分である上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤と組み合わせたことを特徴とする肺癌患者用治療剤。
- [請求項2] 前記肺癌患者は、BIMの非野生型を有する請求項1に記載の肺癌患者用治療剤。
- [請求項3] 前記肺癌患者は、上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤に耐性を有する非小細胞肺癌患者である請求項1又は2に記載の肺癌患者用治療剤。
- [請求項4] JNJ-26481585を上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブと組み合わせた請求項1～3のいずれか1に記載の肺癌患者用治療剤。
- [請求項5] CUDC-101を上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブと組み合わせた請求項1～3のいずれか1に記載の肺癌患者用治療剤。
- [請求項6] 前記非野生型であることは、以下のいずれか1を有することである請求項2～5のいずれか1に記載の肺癌患者用治療剤。
- (1) BIM遺伝子の第2イントロンの部分欠失
 - (2) BIM- γ
 - (3) mRNA転写産物のエクソン3対エクソン4比が1以上
- [請求項7] 以下の工程を有する肺癌患者治療の有効性の予測検査方法。
- (1) 肺癌患者から取得したサンプル中のBIMが野生型であるか非野生型であるかを判定する工程
 - (2) 非野生型の場合には、JNJ-26481585及び／又はCUDC-101を上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤と組み合わせた併用投与が有効であると判定する工程
- [請求項8] 前記非野生型であることは、以下のいずれか1を検出することを含む請求項7に記載の予測検査方法。

(1) BIM遺伝子の第2イントロンの部分欠失

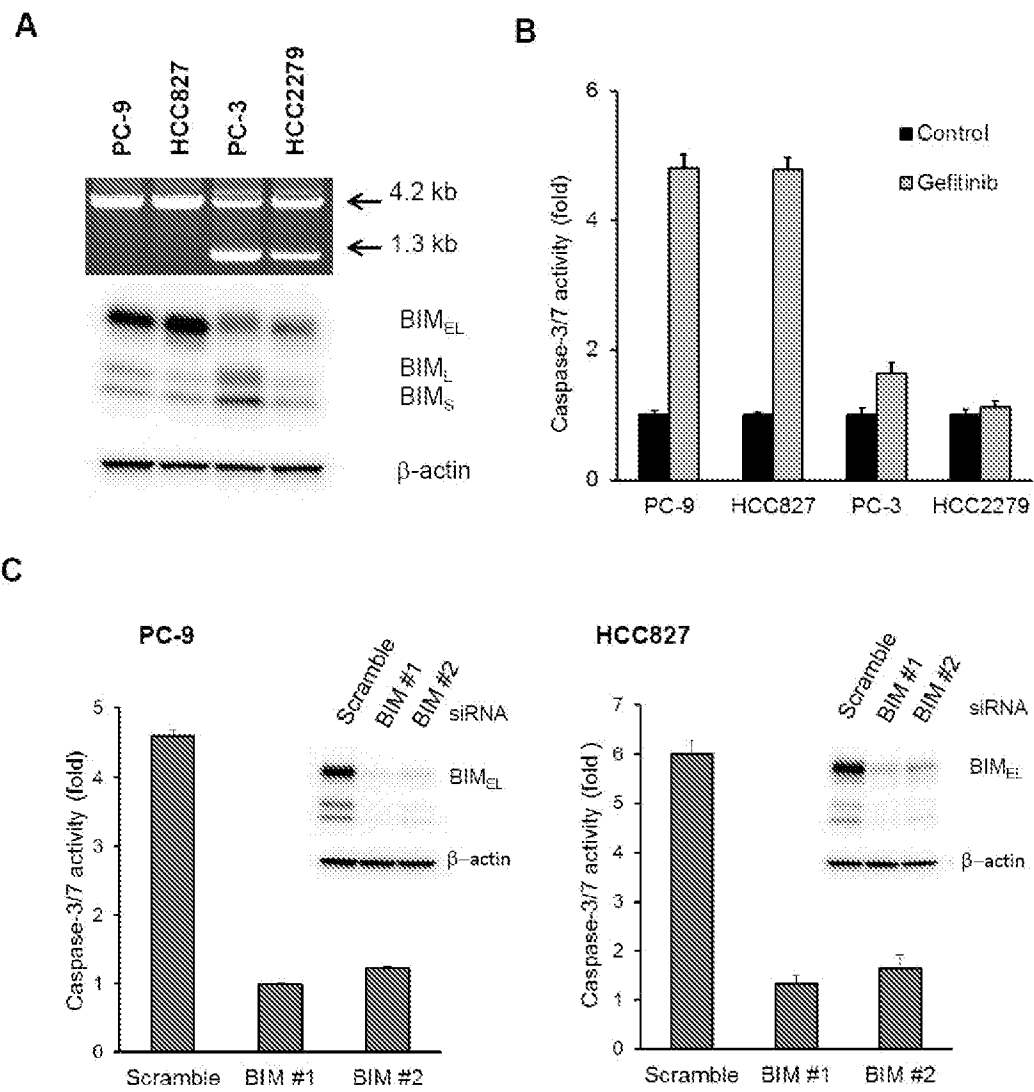
(2) BIM- γ

(3) mRNA転写産物のエクソン3対エクソン4比が1以上

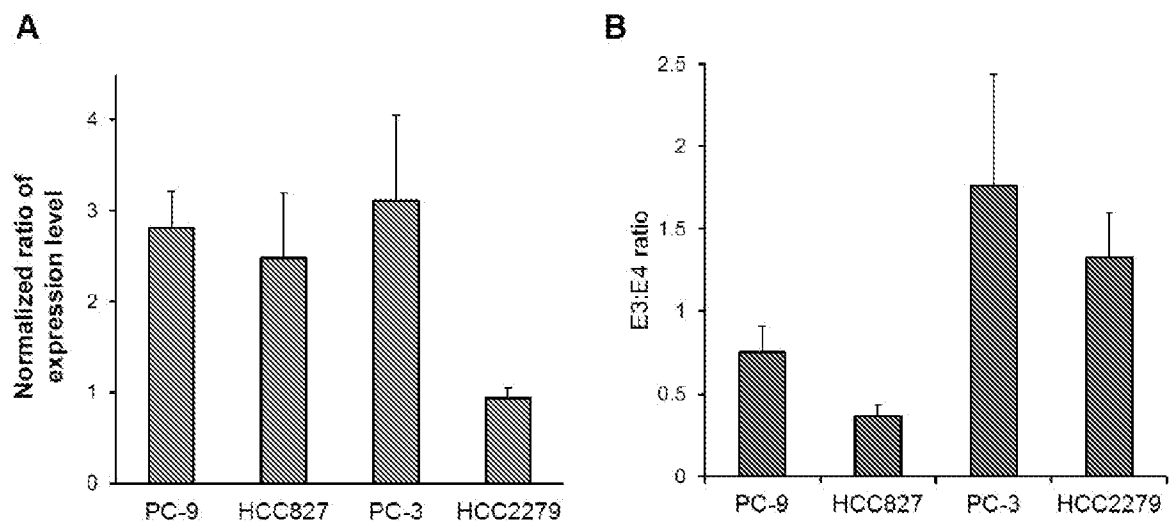
[請求項9] 前記肺癌患者は、上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤に耐性を有する非小細胞肺癌患者である請求項7又は8に記載の予測検査方法。

[請求項10] 前記上皮成長因子受容体のチロシンキナーゼ阻害剤はゲフィチニブである請求項7～9のいずれか1に記載の予測検査方法。

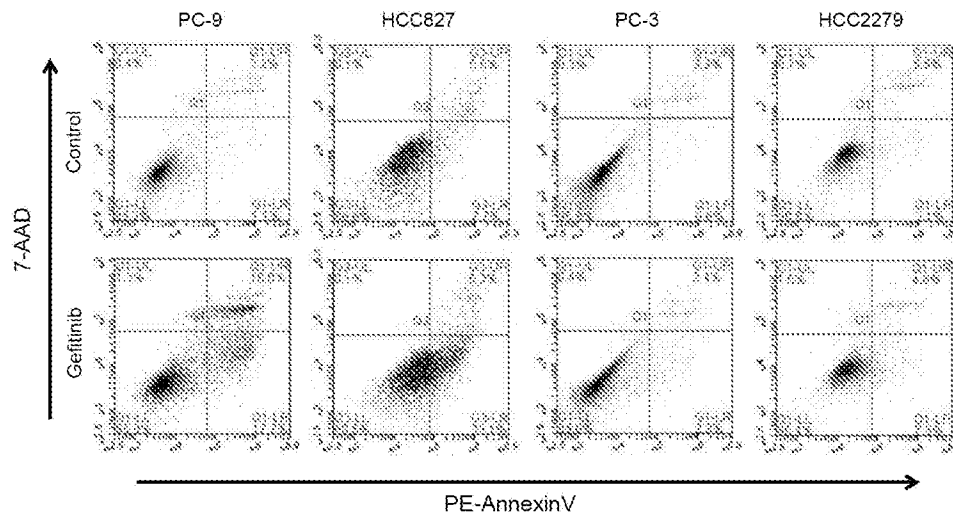
[図1]



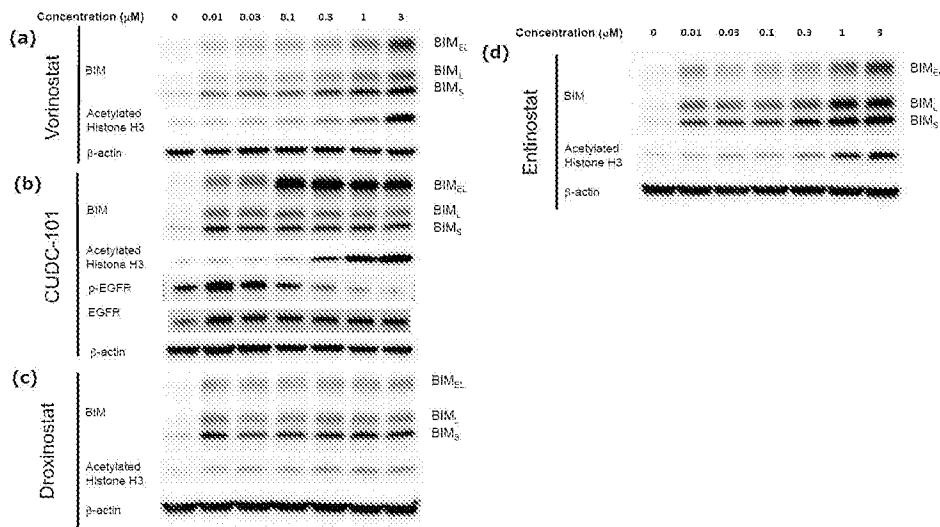
[図2]



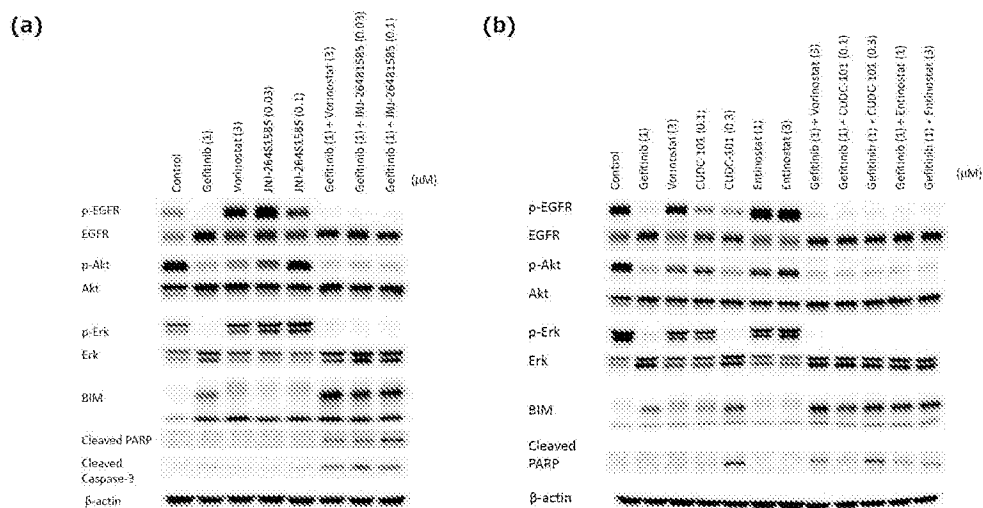
[圖3]



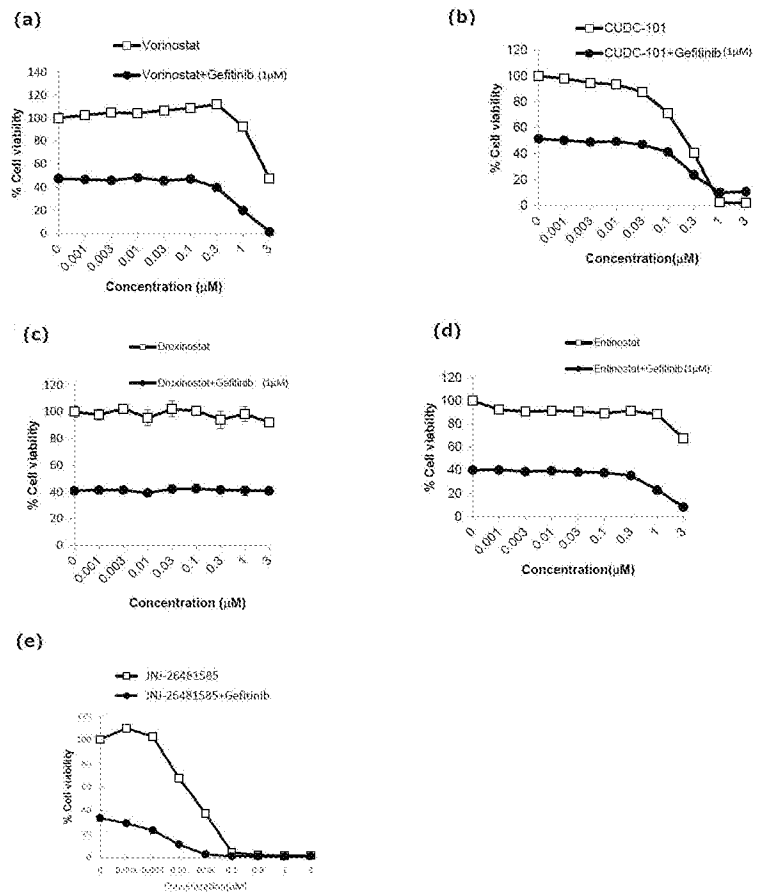
[圖4]



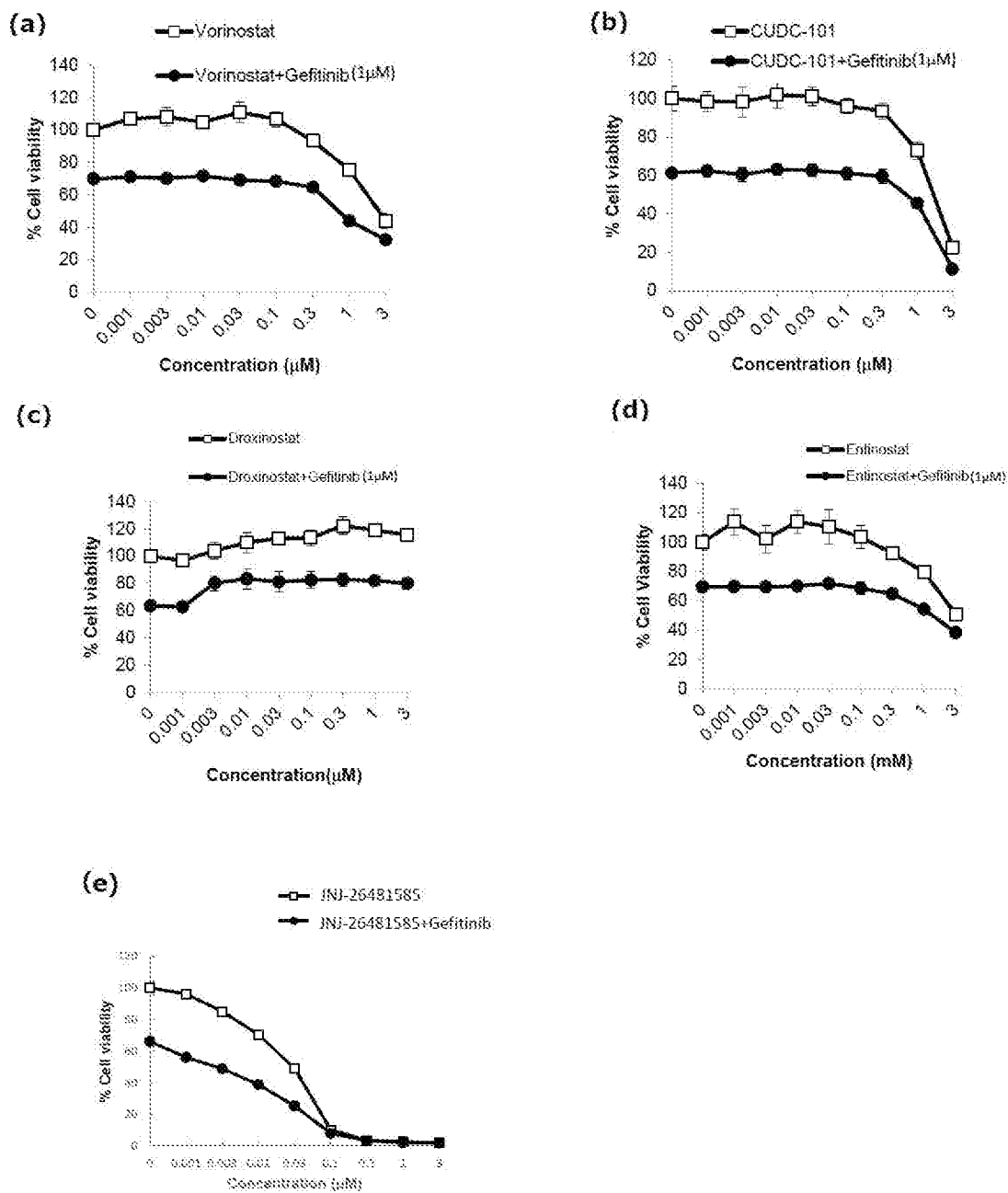
[圖5]



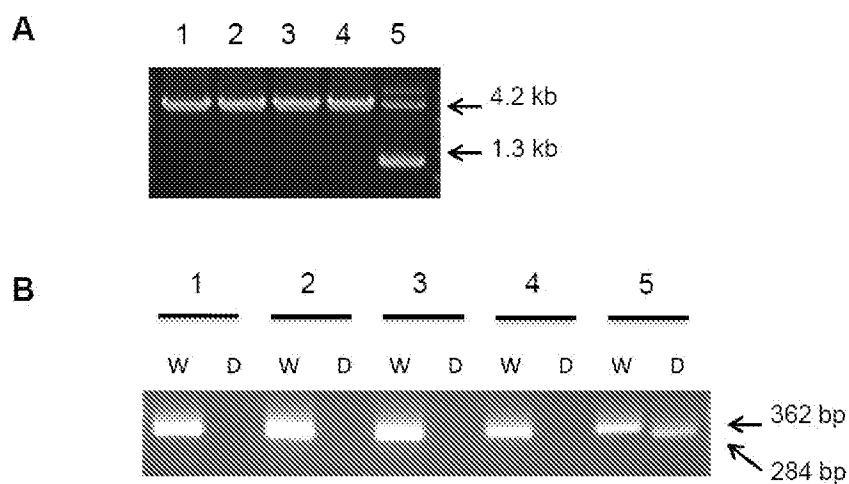
[図6]



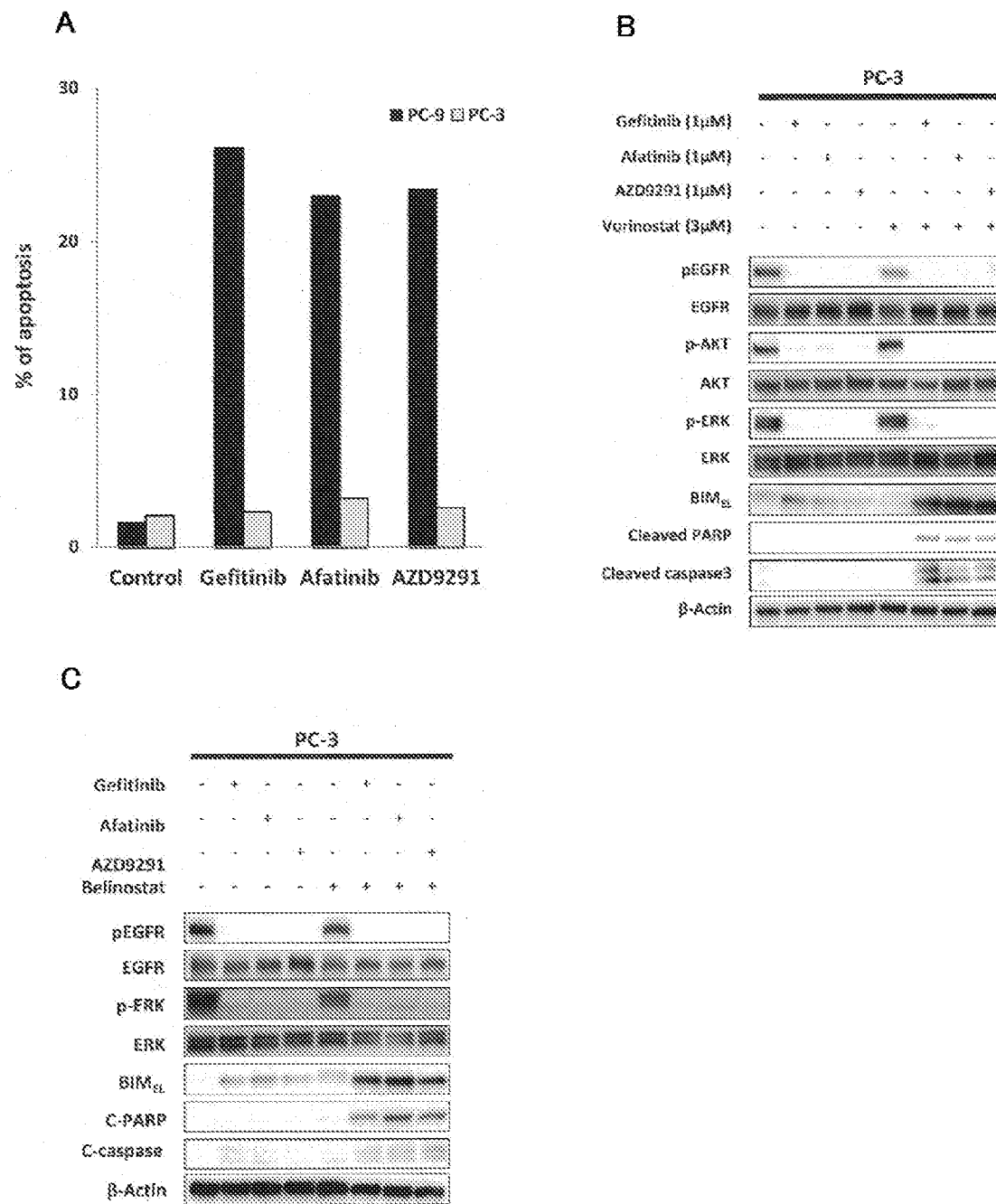
[図7]



[図8]

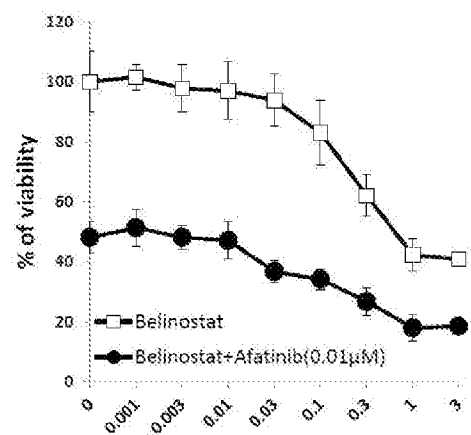
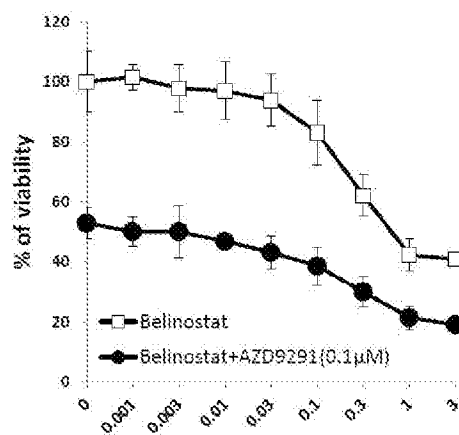
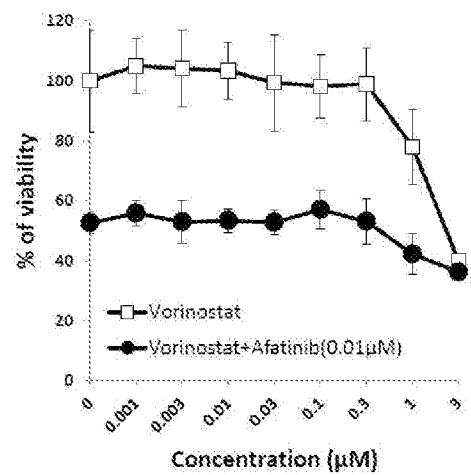
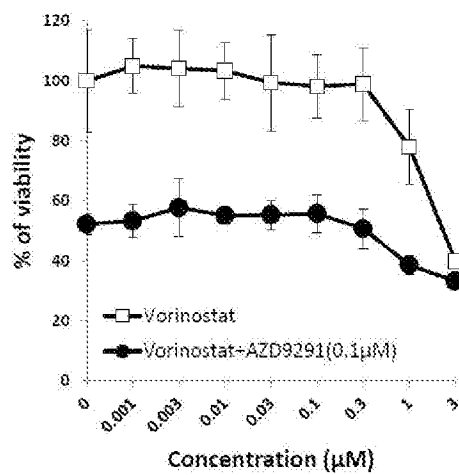


[図9]



[図10]

PC-3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/074660

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/506(2006.01)i, A61K31/502(2006.01)i, A61K31/5377(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

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)

A61K31/506, A61K31/502, A61K31/5377, A61K45/00, A61P11/00, A61P35/00, A61P43/00

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

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

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDREAMIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	NAKAGAWA T. et al., EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism can be circumvented in combination with HDAC inhibition., CANCER RESEARCH, 2013, Vol.73, No.8, p.2428-2434	7-10 1-6
X Y	Shinji TAKEUCHI et al., "BIM Idenshi Takei to EGFR-TKI Taisei", Respiratory Molecular Medicine, 01 March 2014 (01.03.2014), vol.18, no.1, pages 66 to 69	7-10 1-6
Y	ARTS J. et al., "JNJ-26481585, a Novel "Second-Generation" Oral Histone Deacetylase Inhibitor, Shows Broad-Spectrum Preclinical Antitumoral Activity", Clinical Cancer Research, 2009, Vol.15, No.22, p.6841-6851	1-6

☒ 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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 October 2015 (27.10.15)

Date of mailing of the international search report
10 November 2015 (10.11.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/074660

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WANG J. et al., Potential advantages of CUDC-101, a multitargeted HDAC, EGFR, and HER2 inhibitor, in treating drug resistance and preventing cancer cell migration and invasion., Molecular Cancer Therapeutics, 2013, Vol.12, No.6, p.925-936	1-6
A	KING PM, A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer, Nature Medicine, 2012, Vol.18, p.521-528	1-10

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K31/506(2006.01)i, A61K31/502(2006.01)i, A61K31/5377(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K31/506, A61K31/502, A61K31/5377, A61K45/00, A61P11/00, A61P35/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)、JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	NAKAGAWA T. et al., EGFR-TKI resistance due to BIM polymorphism can be circumvented in combination with HDAC inhibition., CANCER RESEARCH, 2013, Vol.73, No.8, p.2428-2434	7-10 1-6
X Y	竹内伸司他, BIM 遺伝子多型と EGFR-TKI 耐性, 分子呼吸器病, 2014.03.01, Vol.18, No.1, p.66-69	7-10 1-6

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 7 . 1 0 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

1 0 . 1 1 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

山村 祥子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

4 U

9 2 1 7

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	ARTS J. et al., "JNJ-26481585, a Novel "Second-Generation" Oral Histone Deacetylase Inhibitor, Shows Broad-Spectrum Preclinical Antitumoral Activity", Clinical Cancer Research, 2009, Vol.15, No. 22, p. 6841-6851	1-6
Y	WANG J. et al., Potential advantages of CUDC-101, a multitargeted HDAC, EGFR, and HER2 inhibitor, in treating drug resistance and preventing cancer cell migration and invasion., Molecular Cancer Therapeutics, 2013, Vol.12, No.6, p. 925-936	1-6
A	KING PM, A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer, Nature Medicine, 2012, Vol.18, p. 521-528	1-10