

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5055284号
(P5055284)

(45) 発行日 平成24年10月24日(2012.10.24)

(24) 登録日 平成24年8月3日(2012.8.3)

(51) Int.Cl.

F 1

G 0 1 N 33/50 (2006.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
G 0 1 N 33/574 (2006.01)

G 0 1 N 33/50
A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00
G 0 1 N 33/574

請求項の数 12 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-532319 (P2008-532319)
(86) (22) 出願日 平成18年9月19日 (2006.9.19)
(65) 公表番号 特表2009-509168 (P2009-509168A)
(43) 公表日 平成21年3月5日 (2009.3.5)
(86) 國際出願番号 PCT/US2006/036502
(87) 國際公開番号 WO2007/035744
(87) 國際公開日 平成19年3月29日 (2007.3.29)
審査請求日 平成21年9月11日 (2009.9.11)
(31) 優先権主張番号 60/718,643
(32) 優先日 平成17年9月20日 (2005.9.20)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 506330575
オーエスアイ・ファーマシューティカルズ
・エル・エル・シー
アメリカ合衆国、ニューヨーク・1173
5、ファーミングデイル、バイオサイエン
ス・パーク・ドライブ・1
(74) 代理人 100062007
弁理士 川口 義雄
(74) 代理人 100114188
弁理士 小野 誠
(74) 代理人 100140523
弁理士 渡邊 千尋
(74) 代理人 100119253
弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】インシュリン様成長因子-1受容体キナーゼ阻害剤に対する抗癌応答を予測する生物学的マーカー

—

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

腫瘍細胞によって発現された上皮バイオマーカーであるE-カドヘリン又はBrkのレベルを評価すること、および

IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、

腫瘍細胞による前記上皮バイオマーカー発現の高いレベルは、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する、

IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法。

【請求項2】

腫瘍細胞によって発現された間葉バイオマーカーであるビメンチン又はフィプロネクチンのレベルを評価すること、および

IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、

腫瘍細胞による前記間葉バイオマーカー発現の高いレベルは、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する低い感受性と相關する、

IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法。

【請求項3】

10

20

腫瘍細胞によって発現された上皮バイオマーカーであるE-カドヘリンおよびB_rkのレベルを評価すること、および

I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、

評価された前記腫瘍細胞上皮バイオマーカーの同時の高い発現レベルは、I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相関する、

I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法。

【請求項4】

腫瘍細胞によって発現された上皮バイオマーカーであるE-カドヘリンおよび - カテニンのレベルを評価すること、および

I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、

評価された前記腫瘍細胞上皮バイオマーカーの同時の高い発現レベルは、I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相関する、

I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法。

【請求項5】

腫瘍細胞によって発現された間葉バイオマーカーであるビメンチンおよびフィプロネクチンのレベルを評価すること、および

I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、

評価された前記腫瘍細胞間葉バイオマーカーの同時の低い発現レベル又は検出不能な発現レベルが、I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相関する、

I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法。

【請求項6】

腫瘍細胞によって発現される上皮バイオマーカーであるE-カドヘリン又はB_rkのレベルを評価すること、

腫瘍細胞によって発現される間葉バイオマーカーであるビメンチン又はフィプロネクチンのレベルを評価すること、および

I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、

前記上皮バイオマーカー発現レベルと前記間葉バイオマーカー発現レベルとの高い比が、I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相関する、

I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法。

【請求項7】

(a) 新生物症状を有する患者から得た新生物細胞含有試料中の候補上皮バイオマーカーのレベルを測定すること、および

(b) 前記患者から得た前記試料中の前記候補上皮バイオマーカーのレベルと、I GF - 1 R キナーゼ阻害剤による前記新生物症状の治療の有効性との間の相関を特定することを含み、

上皮バイオマーカーの高いレベルとI GF - 1 R キナーゼ阻害剤による新生物症状のさらに有効な治療との相関が、前記上皮バイオマーカーがI GF - 1 R キナーゼ阻害剤による新生物症状のさらに有効な治療に対する診断指標であることを示す、I GF - 1 R キナーゼ阻害剤での新生物症状のさらに有効な治療に対する診断指標である上皮バイオマーカーを同定する方法。

【請求項8】

(a) 新生物症状を有する患者から得た新生物細胞含有試料中の候補間葉バイオマーカー

10

20

30

40

50

ーのレベルを測定すること、および

(b) 前記患者から得た前記試料中の前記候補間葉バイオマーカーのレベルと、 IGF - 1 R キナーゼ阻害剤による前記新生物症状の治療の有効性との間の相関を特定することを含み、

間葉バイオマーカーの高いレベルと IGF - 1 R キナーゼ阻害剤による新生物症状のより低い有効性の治療との相関が、前記間葉バイオマーカーが IGF - 1 R キナーゼ阻害剤による新生物症状のより低い有効性の治療に対する診断指標である、 IGF - 1 R キナーゼ阻害剤での新生物症状のより低い有効性の治療に対する診断指標である間葉バイオマーカーを同定する方法。

【請求項 9】

10

腫瘍細胞が、以前に上皮 - 間葉遷移した腫瘍細胞として特徴づけられ、前記腫瘍細胞の試料を IGF - 1 R キナーゼ阻害剤と接触させること、前記腫瘍細胞の同一試料を試験薬剤の存在下で IGF - 1 R キナーゼ阻害剤と接触させること、 IGF - 1 R キナーゼ阻害剤によって媒介される増殖阻害を試験薬剤の存在下と非存在下で比較すること、並びに試験薬剤が IGF - 1 R キナーゼ阻害剤に対する腫瘍細胞増殖の感受性を高める薬剤であるかどうかを判定することを含む、 IGF - 1 R キナーゼ阻害剤に対する腫瘍細胞増殖の感受性を高める薬剤を同定する方法。

【請求項 10】

IGF - 1 R キナーゼ阻害剤による増殖阻害の感受性が不明な腫瘍細胞によって発現された E - カドヘリンのレベルを評価すること、および

20

前記腫瘍細胞が E - カドヘリンを発現していた場合には、 IGF - 1 R キナーゼ阻害剤による増殖阻害に対する感受性があるとの予測を決定し、該腫瘍細胞が E - カドヘリンを発現していない場合には、 IGF - 1 R キナーゼ阻害剤による増殖阻害に対する感受性がないとの予測を決定する、

IGF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法。

【請求項 11】

腫瘍細胞または腫瘍が、 NSCL 腫瘍細胞または腫瘍、結腸腫瘍細胞または腫瘍、乳房腫瘍細胞または腫瘍、頭頸部腫瘍細胞または腫瘍、肝腫瘍細胞または腫瘍、或いは膵臓腫瘍細胞または腫瘍である、請求項 1 ~ 6 及び 10 の何れか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 12】

腫瘍細胞または腫瘍が、 NSCL 腫瘍細胞または腫瘍である、請求項 11 に記載の方法

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌患者を診断及び治療する方法を対象とする。特に、本発明は、インシュリン様成長因子 - 1 受容体 (IGF - 1 R) キナーゼ阻害剤を用いた治療から最も利点を得る患者を判定する方法を対象とする。

【背景技術】

40

【0002】

癌は、制御されない増殖、分化の欠如、及び局所組織に浸潤し、転移する能力を特徴とする、細胞の広範な悪性腫瘍の一般名である。これらの新生物悪性腫瘍は、体内のあらゆる組織及び器官において多様な罹患率で発症する。

【0003】

種々の癌を治療するために、複数の治療薬が過去数十年にわたって開発してきた。最も一般に使用される抗癌剤タイプとしては、DNA アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、イホスファミド）、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキセート、葉酸塩拮抗物質及び 5 - フルオロウラシル、ピリミジン拮抗物質）、微小管分裂剤（例えば、ビンクリスチン、ビンプラスチン、パクリタキセル）、DNA インターカレーター（例えば、ドキソル

50

ビシン、ダウノマイシン、シスプラチン)及びホルモン療法(例えば、タモキシフェン、フルタミド)などが挙げられる。

【0004】

IGF-1Rは、主としてIGF-1に結合するが、IGF-Iとインシュリンにも、より低い親和性で結合する膜貫通RTKである。IGF-1受容体へのIGF-1の結合は、受容体のオリゴマー化、チロシンキナーゼの活性化、分子間受容体自己リン酸化及び細胞基質のリン酸化をもたらす(主な基質は、IRS1及びShcである。)。リガンドによって活性化されたIGF-1Rは、正常な細胞中で有糸分裂促進活性を誘導し、異常な増殖において重要な役割を果たす。IGF-1系の主要な生理的役割は、正常な増殖と再生を促進することである。過剰発現されたIGF-1R(1型インシュリン様成長因子受容体)は、有糸分裂誘発を開始させ、リガンド依存性新生物形質転換を促進することが可能である。さらに、IGF-1Rは、悪性表現型の確立及び維持において重要な役割を果たしている。上皮成長因子(EGF)受容体とは異なり、IGF-1Rの変異発癌形態は同定されていない。しかしながら、幾つかの発癌遺伝子は、IGF-1及びIGF-1R発現に影響を与えることが示されている。IGF-1R発現の減少と形質転換に対する耐性との間の相関が観察されてきた。IGF-1RRNAに対してアンチセンスであるmRNAに細胞を曝露することによって、幾つかのヒト腫瘍細胞株の軟寒天増殖が抑制される。IGF-1Rは、インビポ及びインビトロの両者で、アポトーシスへの進行を停止させる。野生型レベルを下回るIGF-1Rの減少が、インビポで、腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こすことも示されている。IGF-1R破壊がアポトーシスを引き起こす能力は、正常な非腫瘍原性細胞中では減弱しているようである。10

【0005】

ヒト腫瘍の発育におけるIGF-1経路は、重要な役割を有する。IGF-1R過剰発現は、しばしば、様々な腫瘍(乳癌、結腸癌、肺癌、肉腫)中に見出され、多くの場合、侵襲性の表現型を伴う。高いIGF1循環濃度は、前立腺癌、肺癌及び乳癌のリスクと強く相關している。さらに、形質転換された表現型の確立及び維持のために、インビトロ及びインビポにおいて、IGF-1Rが必要とされる(Baserga R. Exp. Cell Res., 1999, 253, 1-6)。IGF-1Rのキナーゼ活性は、幾つかの発癌遺伝子: EGRFR、PDGFR、SV40T抗原、活性化されたRas、Raf及びv-Srcの形質転換活性にとって不可欠である。正常な纖維芽細胞中でのIGF-1Rの発現は、新生物表現型を誘導し、次いで、インビポにおいて、新生物表現型は腫瘍を形成することができる。IGF-1R発現は、足場非依存性増殖において重要な役割を果たしている。IGF-1Rは、化学療法、放射線照射及びサイトカインによって誘導されるアポトーシスから細胞を保護することも示されている。逆に、ドミナントネガティブ型IGF-1R、三重螺旋形成又はアンチセンス発現ベクターによる内在性IGF-1Rの阻害は、インビトロにおいて形質転換活性を抑制し、動物モデルにおいて腫瘍増殖を抑制することが示されている。30

【0006】

タンパク質チロシンキナーゼの阻害剤は、哺乳動物の癌細胞の増殖の選択的阻害剤として有用であることが認められる。例えば、BCR-ABL融合遺伝子産物のキナーゼ活性を阻害する2-フェニルピリミジンチロシンキナーゼ阻害剤であるGleevecTM(イマチニブメシラートとしても知られている。)が、CMLの治療に対して、アメリカ食品医薬品局によって承認された。4-アニリノキナゾリン化合物であるTarcevaTM(エルロチニブHCl)も、最近、FDAによって承認され、高い効力を有するEGF受容体キナーゼを選択的に阻害する。IGF-1Rのキナーゼ活性を直接的に阻害する化合物及びIGF-1Rの活性化を遮断することによって、IGF-1Rキナーゼ活性を低下させる抗体又はIGF-1R発現を遮断するアンチセンスオリゴヌクレオチドを抗癌剤として使用するための開発は、多大な研究努力が向けられている分野である(例えば、Larsson, O. et al (2005) Brit. J. Cancer 92: 2097-2101; Ibrahim, Y.H. and Yee, D. (20040

5) Clin . Cancer Res . 11 : 944 s - 950 s ; Mitsiadess , C . S . et al . (2004) Cancer Cell 5 : 221 - 230 ; Camirand , A . et al . (2005) Breast Cancer Research 7 : R570 - R579 (DOI 10.1186/bcr1028) ; Camirand , A . and Pollak , M . (2004) Brit . J . Cancer 90 : 1825 - 1829 ; Garcia - Echeverria , C . et al . (2004) Cancer Cell 5 : 231 - 239 参照) 。

【 0007 】

抗新生物薬は、非悪性細胞に対するその毒性に比較して治療指数が広く、癌細胞を選択的に死滅させる理想的薬剤であろう。また、抗新生物薬は、該薬物に長時間曝露した後でも、悪性細胞に対してその効力を保持する。残念ながら、現行の化学療法のいずれも、かかる理想的な特性を持たない。むしろ、大部分は、極めて狭い治療指数を有する。さらに、致死濃度をわずかに下回る化学療法薬に曝露された癌細胞は、かかる薬剤に対して耐性を獲得することが極めて多く、幾つかの他の抗腫瘍薬に対しても交差耐性を獲得することが頻繁にある。さらに、任意の所与の癌タイプに対して、特定の治療に応答する可能性がある患者を予測することは、タンパク質チロシンキナーゼ阻害剤などのより新しい遺伝子標的療法でも不可能であることが多く、したがって、最も有効な療法を見出すためにかなりの試行錯誤を必要とし、患者に対してかなりのリスクと不快感を与えることが多い。

【 0008 】

したがって、新形成及び他の増殖性障害に対するより効果的な治療、及びどの腫瘍がどの治療に応答するかを決定するより有効な手段が求められている。既存薬物の治療効力を高める戦略は、その投与スケジュールの変更が必要であり、他の抗癌剤又は生化学的調節剤との併用も必要である。併用療法は、各薬剤単体の治療上妥当な用量を使用するよりも、効力が大きく、副作用が減少し得る方法としてよく知られている。多剤併用の効力が相加的である（併用の効力が各薬剤単体の効果の合計にほぼ等しい。）場合もあるが、効果が相乗的である（併用の効力が、単体投与された各薬剤の効果の合計よりも大きい。）場合もある。標的特異的な治療アプローチは、一般に、慣用の細胞毒製剤と比べて、減少した毒性を伴い、従って、併用治療計画において、かかるアプローチが使用される。

【 0009 】

幾つかのグループが、タンパク質チロシンキナーゼ阻害剤、例えば、EGFR 阻害剤に対する患者の応答を予測するバイオマーカー候補を検討した（例えば、PCT国際公開第2004/063709号、同2005/017493号、同2004/111273号及び同2004/071572号並びに米国特許出願公開第2005/0019785号及び同2004/0132097号参照）。しかし、このような阻害剤による患者の治療において開業医を手引することができる診断試験又は予後の試験はまだ出現していない。

【 0010 】

したがって、任意の特定の癌患者に対する最適な治療様式を決定するための改善された方法に対して、重大な要望が依然として存在する。本発明は、腫瘍細胞が上皮から間葉への遷移を経たかどうかに基づいて、何れの腫瘍がIGF - 1R キナーゼ阻害剤での治療に対して最も効果的に応答するかを決定する方法（“EMT”； Thiery , J . P . (2002) Nat . Rev . Cancer 2 : 442 - 454 ; Savagner , P . (2001) Bioessays 23 : 912 - 923 ; Kang Y . and Massague , J . (2004) Cell 118 : 277 - 279 ; Julien - Grille , S . , et al . Cancer Research 63 : 2172 - 2178 ; Bates , R . C . et al . (2003) Current Biology 13 : 1721 - 1727 ; Lu Z . , et al . (2003) Cancer Cell . 4 (6) : 499 - 515 ）、及びこのような阻害剤が、単一の薬剤として使用されるかどうか、又は他の抗癌剤と組み合わされて地図されるかどうか、癌患者のためのさらに有効な治療計画にこのような決定を取り込む方法を提供する。

10

20

30

40

50

【発明の開示】**【発明が解決しようとする課題】****【0011】**

本発明は、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による癌患者の治療の有効性を予測する診断方法及び予後の方法を提供する。IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性が、かかる腫瘍細胞がEMTを起こすかどうかに依存するという驚くべき発見に基づいて、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する腫瘍細胞の感受性を予測する上皮及び/又は間葉バイオマーカーを測定する方法を考案した。

【課題を解決するための手段】**【0012】**

10

したがって、本発明は、腫瘍細胞によって発現される上皮バイオマーカーのレベルを評価すること、及びIGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、腫瘍細胞上皮バイオマーカーの高い発現レベルがIGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。

【0013】

本発明は、腫瘍細胞によって発現された間葉バイオマーカーのレベルを評価すること；及びIGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、腫瘍細胞による間葉バイオマーカー発現の高いレベルは、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する低い感受性と相關する、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法も提供する。

20

【0014】

上記方法論を取り込んだ、IGF-1Rキナーゼ阻害剤で癌患者を治療するための改善された方法も提供される。従って、さらに、本発明は、腫瘍細胞が上皮-間葉遷移を経たかどうかを評価することによって、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して患者が応答し得る可能性を診断する段階、及びIGF-1Rキナーゼ阻害剤の治療有効量を前記患者に投与する段階を含む、患者中の腫瘍又は腫瘍転移を治療する方法を提供する。

【0015】

さらに、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する腫瘍の応答性を予測する新規上皮又は間葉バイオマーカーを同定するための方法が提供される。

30

【0016】

従って、例えば、本発明は、新生物症状を有する患者から得た新生物細胞含有試料中の候補上皮バイオマーカーのレベルを測定すること、及び前記患者から得た前記試料中の前記候補上皮バイオマーカーのレベルと、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による、前記新生物症状の治療の有効性との間の相関を明らかにすることを含み、上皮バイオマーカーの高いレベルとIGF-1Rキナーゼ阻害剤による新生物症状のさらに有効な治療との相関は、前記上皮バイオマーカーが、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による新生物症状のさらに有効な治療に対する診断指標である、IGF-1Rキナーゼ阻害剤での新生物症状のさらに有効な治療に対する診断指標である上皮バイオマーカーを明らかにする方法を提供する。

【0017】

40

さらに、本発明は、(a)新生物症状を有する患者から得た新生物細胞含有試料中の候補間葉バイオマーカーのレベルを測定すること、及び(b)前記患者から得た前記試料中の前記候補間葉バイオマーカーのレベルと、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による、前記新生物症状の治療の有効性との間の相関を明らかにすることを含み、間葉バイオマーカーの高いレベルとIGF-1Rキナーゼ阻害剤による新生物症状のより低い有効性の治療との相関は、前記間葉バイオマーカーが、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による新生物症状のより低い有効性の治療に対する診断指標である、IGF-1Rキナーゼ阻害剤での新生物症状のより低い有効性の治療に対する診断指標である間葉バイオマーカーを明らかにする方法を提供する。

【0018】

50

さらに、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する、EMT を経た腫瘍細胞の感受性を回復させる因子を同定するための方法も提供される。従って、例えば、本発明は、腫瘍細胞が、以前に上皮間葉遷移を経た腫瘍細胞として特徴づけられ、前記腫瘍細胞の試料を IGF-1R キナーゼ阻害剤と接触させること、前記腫瘍細胞の同一試料を試験薬剤の存在下で IGF-1R キナーゼ阻害剤と接触させること、IGF-1R キナーゼ阻害剤によって媒介される増殖阻害を試験薬剤の存在下と非存在下で比較すること、並びに試験薬剤が IGF-1R キナーゼ阻害剤に対する腫瘍細胞増殖の感受性を高める薬剤であるかどうかを判定することを含む、IGF-1R キナーゼ阻害剤に対する腫瘍細胞増殖の感受性を高める薬剤を特定する方法を提供する。

【0019】

10

図面の簡単な説明

図1：IGF-1R キナーゼ阻害剤である化合物66に対するNSCLC細胞株の感受性。

図2：IGF-1受容体阻害に対して感受性のNSCLC株は、E-カドヘリンの上昇したレベルを発現し、-カテニン及び-カテニンに対して観察された傾向を有する。2つの異なる抗体を用いて、E-カドヘリンイムノプロットを行い、同様の結果を得た（データは示さず。）。化合物66による増殖阻害に対して比較的非感受性のNSCLC株は、間葉タンパク質であるビメンチン及び/又はフィブロネクチンを発現した。

図3：NSCLC株は、約 500 mm^3 の体積になるまで、SCIDマウス中での皮下異種移植片として増殖され、切り出され、液体窒素中で瞬間凍結された（4匹の動物/細胞株）。凍結された状態で、腫瘍組織を粉末化し、記載されているように、界面活性剤による溶解及びSDS-PAGEに供し、E-カドヘリン、-カテニン、Brk、フィブロネクチン、ビメンチン及びGAPDHに対する抗体で探索するイムノプロットに供した。インビトロでの結果と合致し、E-カドヘリンの発現は、化合物66感受性株に限定され、フィブロネクチンは相対的に非感受性株に限定されていた。

図4：IGF-1R キナーゼ阻害に対して最も感受性であるNSCLC細胞株中でより高いBrk発現レベルを示すイムノプロット。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

30

動物における「癌」という用語は、抑制されない増殖、不死、転移能、急速な成長及び増殖速度、ある種の特徴的な形態など、発癌細胞の典型的な特性を有する細胞の存在を指す。癌細胞は、腫瘍の形態であることが多いが、かかる細胞は、動物内に単独で存在し得、又は白血病細胞などの独立細胞として血流中を循環し得る。

【0021】

本明細書では「異常な細胞増殖」とは、別段の記載がないかぎり、正常な調節機構とは無関係である細胞増殖（例えば、接触阻止の喪失）を指す。「異常な細胞増殖」としては、（1）変異チロシンキナーゼの発現又は受容体チロシンキナーゼの過剰発現によって増殖する腫瘍細胞（腫瘍）、（2）異常なチロシンキナーゼ活性化が起こる他の増殖性疾患の良性及び悪性細胞、（4）受容体チロシンキナーゼによって増殖するあらゆる腫瘍、（5）異常なセリン/トレオニンキナーゼ活性化によって増殖するあらゆる腫瘍並びに（6）異常なセリン/トレオニンキナーゼ活性化が起こる他の増殖性疾患の良性及び悪性細胞、の異常な増殖などが挙げられる。

【0022】

40

本明細書では「治療する」という用語は、別段の記載がないかぎり、患者における腫瘍、腫瘍転移又は他の発癌細胞若しくは新生細胞の進行の逆転、緩和、阻害、或いは腫瘍、腫瘍転移又は他の発癌細胞若しくは新生細胞の増殖の部分的又は完全な抑制を意味する。本明細書では「治療」という用語は、別段の記載がないかぎり、治療行為を指す。

【0023】

50

「治療方法」という句又はその等価な句は、例えば、癌に適用するときには、動物における癌細胞数を減少させる、若しくはゼロにするように設計された、又は癌の症候を軽減

するように設計された手順若しくは方針を指す。癌又は別の増殖性障害の「治療方法」は、癌細胞若しくは他の障害が実際に除去されること、細胞数若しくは障害が実際に抑制されること、又は癌若しくは他の障害の症候が実際に軽減することを必ずしも意味しない。癌を治療する方法は、成功の可能性が低い場合でも実施され、動物の病歴及び推定余命を考慮して、それでも全体として有益な方針と考えられるものであることが多い。

【0024】

「治療有効薬剤」という用語は、研究者、獣医師、医師又は他の臨床家によって求められる、組織、系、動物又はヒトの生物学的又は医学的応答を誘発する組成物を意味する。

【0025】

「治療有効量」又は「有効量」という用語は、研究者、獣医師、医師又は他の臨床家によって求められる、組織、系、動物又はヒトの生物学的又は医学的応答を誘発する対象化合物又は組合せの量を意味する。

【0026】

以下の本明細書の実施例に示すデータによれば、細胞培養又はインビボで増殖されたN S C L C 細胞などの腫瘍細胞は、上皮間葉遷移（EMT）を起こしたかどうかによって、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する範囲の感受性を示す。EMT前には、腫瘍細胞は、化合物 66（強力な（約 50 nM の IC₅₀）且つ IGF-1R 選択性的な低分子量 IGF-1R キナーゼ阻害剤）などの IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する感受性が極めて高いが、EMTを起こした腫瘍細胞は、かかる化合物による阻害に対する感受性がかなり低い。このデータは、EMTが、IGF-1R キナーゼ阻害剤に対する腫瘍の感受性レベルを決定する「全般的な生物学的スイッチ」であり得ることを示している。EMT現象の前に、又はそれに続いて、腫瘍細胞によって発現される、細胞に特徴的であるバイオマーカーのレベルを測定することによって、IGF-1R キナーゼ阻害剤に対する腫瘍の感受性レベルを評価できることが実証された。例えば、E-カドヘリンなどの上皮バイオマーカーの腫瘍細胞発現レベルが高いことは、EMTをまだ起こしていない細胞を示し、IGF-1R キナーゼ阻害剤に対する高い感受性と相関する。逆に、ピメンチン又はフィブロネクチンなどの間葉バイオマーカーの腫瘍細胞発現レベルが高いことは、EMTを起こした細胞を示し、IGF-1R キナーゼ阻害剤に対する低い感受性と相関する。さらに、腫瘍細胞の上皮又は間葉状態及びそれに続いて起こる、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する感受性に関する情報を提供するために、形態計測細胞分析を使用することが可能である。したがって、これらの知見は、腫瘍増殖に対する IGF-1R キナーゼ阻害剤の効果を予測する貴重な新しい診断法の基礎を形成し得るものであり、患者に対して最も適切な治療を選択するのに役立つ追加のツールを腫瘍専門医に提供することができる。

【0027】

したがって、本発明は、腫瘍細胞によって発現される上皮バイオマーカーのレベルを評価すること、及び IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、腫瘍細胞上皮バイオマーカーの高い発現レベルは IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相関する、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。上皮バイオマーカーの好ましい例としては E-カドヘリン及び Brk（すなわち PTK-6）が挙げられる（表 1 参照）。本発明による方法に利用することができる上皮バイオマーカーの追加の例としては、-カテニン（すなわち、ジャンクションプラコグロビン）、-カテニン（すなわち 1、2 又は 3 カテニン）、ケラチン 8 及びケラチン 18（表 1 参照）が挙げられる。

【0028】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される間葉バイオマーカーのレベルを評価すること、及び IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、腫瘍細胞間葉バイオマーカーの高い発現レベルは IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する低い感受性と相関する、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対

10

20

30

40

50

する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法も提供する。間葉バイオマーカーの好ましい例としてはビメンチン及びフィブロネクチンが挙げられる(表1参照)。本発明による方法に利用することができる間葉バイオマーカーの追加の例としては、フィブリリン-1、フィブリリン-2、コラーゲンアルファ-2(IV)、コラーゲンアルファ-2(V)、LOXL1、ニドジエン、C11orf9、テネイシン、N-カドヘリン及び胚性EDB⁺フィブロネクチンが挙げられる(表1参照)。

【0029】

本発明の実施においては、好ましい上皮バイオマーカーを用いると、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性が高い腫瘍細胞における発現レベルは、一般に、バイオマーカーを、例えば特異的抗バイオマーカー抗体を検出に用いて、極めて容易に検出することができるような高いレベルである。好ましい上皮バイオマーカーを用いると、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性の比較的低い腫瘍細胞における発現レベルは、一般に、バイオマーカーが、類似の手順を用いて、検出されたとしてもわずかであるような低いレベルである(例えば、以下の本明細書の実施例に記載のデータにおいて、図2及び3中の感受性の高い腫瘍細胞と感受性の比較的低い腫瘍細胞のE-カドヘリンレベルを比較されたい。)。

【0030】

しかし、他のさほど好ましくない上皮バイオマーカーの場合には、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性の比較的低い腫瘍細胞におけるバイオマーカー発現レベルは、容易に検出可能であり得るが、それでも、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性が高い腫瘍細胞よりもかなり低い発現レベルである(例えば、以下の本明細書の実施例に記載のデータにおいて、図2中の感受性の比較的低い腫瘍細胞SW1573と感受性の高い腫瘍細胞H441、H358及びH292の-カテニンレベルを比較されたい。)。

【0031】

同様に、本発明の実施においては、好ましい間葉バイオマーカーを用いると、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性の比較的低い腫瘍細胞における発現レベルは、一般に、バイオマーカーを、例えば特異的抗バイオマーカー抗体を検出に用いて、極めて容易に検出することができるような高いレベルである。好ましい間葉バイオマーカーを用いると、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性の比較的高い腫瘍細胞における発現レベルは、一般に、バイオマーカーが、類似の手順を用いて、検出されたとしてもわずかであるような低いレベルである(例えば、以下の本明細書の実施例に記載のデータにおいて、図2及び3中の感受性の高い腫瘍細胞と感受性の比較的低い腫瘍細胞のフィブロネクチン又はビメンチンレベルを比較されたい。)。

【0032】

また、他のさほど好ましくない間葉バイオマーカーの場合には、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性の比較的高い腫瘍細胞におけるバイオマーカー発現レベルは、容易に検出可能であり得るが、それでも、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性の比較的低い腫瘍細胞よりもかなり低い発現レベルである。

【0033】

任意の所与の上皮又は間葉バイオマーカーの場合、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性の比較的低い腫瘍細胞と感受性の高い腫瘍細胞の発現レベルの範囲は、例えば、本明細書に記載されている腫瘍細胞パネル上で試験することによって(例えば、図2)、又は腫瘍がIGF-1Rキナーゼ阻害剤(例えば、化合物66)に対してある範囲の感受性を示す患者から得られた腫瘍生検の試験によって、当業者によって容易に評価することができる。

【0034】

本発明に関連して、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性の比較的低い腫瘍細胞の割合が比較的小さい場合には、単一のバイオマーカーレベルのみを評価する状況において、腫瘍細胞によって発現される上皮又は間葉バイオマーカーのレベルを評価することを含む、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する

10

20

30

40

50

上記方法は、腫瘍細胞増殖が、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対して感受性が高いことを誤って予測する恐れがある。例えば、以下の本明細書の実施例に記載されているデータにおいて、H460腫瘍細胞中の上皮バイオマーカー - カテニン及び - カテニンのレベル、又はH460細胞中の間葉バイオマーカービメンチンのレベルは、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する高い感受性を誤って予測する（図2参照）。したがって、かかる誤った予測に基づいて、医師は、IGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いて少数の患者を治療する恐れがあり、腫瘍は、阻害剤に対して感受性を示さない恐れがある。しかし、腫瘍細胞の大多数（例えば、以下の本明細書の実施例に記載のデータから、少なくとも90%）では、単一のバイオマーカー発現レベルの評価によって、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する感受性レベルが正確に予測されると期待される。

10

【0035】

また、本発明に関連して最も重要なことには、上記方法によって試験したとき（単一のバイオマーカーレベルのみを評価する場合）、腫瘍細胞増殖がIGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対して低感受性であるという誤った予測を与える、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性が高い腫瘍細胞は見出されなかった。したがって、本明細書に記載の試験方法を利用することによって、患者がIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療から利点を得ることができる場合に、医師がかかる治療を差し控えることはないはずである。

【0036】

また、医薬分野の当業者は、特に診断テスト及び治療用物質による治療の適用に関して、生体系は幾らか可変であり、完全に予測可能では必ずしもなく、したがって多数の良好な診断テスト又は治療用物質が無効である場合もあることを理解している。したがって、試験結果、患者の症状及び病歴並びに主治医の経験に基づいて、個々の患者に最適な治療コースを決定するのは、最終的には主治医の判断による。例えば、診断テスト又は他の判定基準から得られるデータに基づいて、腫瘍がIGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して特に感受性であると予測されないとても、特に、他の明白な治療選択肢の全部若しくは大部分が失敗した場合、又は別の治療と併用したときにある相乗作用が予測される場合には、医師がIGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いて患者を治療することを選択する場合さえある。IGF-1Rキナーゼ阻害剤は、化合物のクラスとして、癌治療に使用されるより伝統的な化学療法又は細胞毒性薬などの多数の他の抗癌薬よりも比較的耐容性が良好であることから、IGF-1Rキナーゼ阻害剤はより実行可能な選択肢になっている。

20

【0037】

E-カドヘリンなどの本発明における使用に適切な上皮バイオマーカーの好ましい例は、上記方法に使用したときに（単一のバイオマーカーレベルのみを評価する場合）、誤った予測をもたらさない。

【0038】

また、本発明は、腫瘍細胞における1種類を超えるバイオマーカーレベルの発現レベルの同時評価を利用する追加の方法も提供する。（以下に記述する）これらの方法の好ましい実施形態において、単一のバイオマーカー発現レベルを評価する上記方法の幾つかの場合と同様に、誤った予測のレベルが存在しない。

【0039】

したがって、本発明は、腫瘍細胞によって発現される1つ又はそれ以上の種（又は1パネルの）上皮バイオマーカーのレベルを評価すること、及びIGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、評価された腫瘍細胞上皮バイオマーカー全部の同時の高い発現レベルはIGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。この方法の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーはE-カドヘリン及びBrkを含み、2種類の腫瘍細胞上皮バイオマーカーの同時の高い発現レベルは、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する。この方法の別の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーはE-カドヘリン及び - カテニンを含み、2種類の腫瘍細胞上皮バイオマーカーの同時の高い

40

50

発現レベルは、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する。後者 2 つの好ましい実施形態において、両方のバイオマーカーの高い発現レベルが、高い感受性を示すのに必要であることに注意されたい。

【0040】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される 1 つ又はそれ以上の（又は 1 パネルの）間葉バイオマーカーのレベルを評価すること、及び IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、評価された腫瘍細胞間葉バイオマーカー全部の同時の低い又は検出不可能な発現レベルは IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法も提供する。この方法の好ましい一実施形態において、間葉バイオマーカーはビメンチン及びフィプロネクチンを含み、2 種類の腫瘍細胞間葉バイオマーカーの同時の低い又は検出不可能な発現レベルは、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する。後半の好ましい実施形態において、両方のバイオマーカーの低い又は検出不可能な発現が、高い感受性を示すのに必要であることに注意されたい。10

【0041】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される上皮バイオマーカーのレベルを評価すること、腫瘍細胞によって発現される間葉バイオマーカーのレベルを評価すること、及び IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測することを含み、上皮バイオマーカー発現レベルと間葉バイオマーカー発現レベルとの高い比は IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法も提供する。この方法の好ましい一実施形態において、上皮バイオマーカーは E - カドヘリンを含み、間葉バイオマーカーはフィプロネクチンを含む。この方法の別の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーは B r k を含み、間葉バイオマーカーはフィプロネクチンを含む。この方法の別の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーは E - カドヘリンを含み、間葉バイオマーカーはビメンチンを含む。この方法の別の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーは - カテニンを含み、間葉バイオマーカーはフィプロネクチンを含む。20

【0042】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される 1 種類又はそれ以上の（又はパネルの）上皮バイオマーカーのレベルを評価すること、及び IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の感受性を予測することを含み、評価された腫瘍細胞上皮バイオマーカー全部の同時の高い発現レベルは IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の感受性を予測する方法も提供する。この方法の好ましい一実施形態において、上皮バイオマーカーは E - カドヘリン及び B r k を含み、2 種類の腫瘍細胞上皮バイオマーカーの同時の高い発現レベルは、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する。この方法の別の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーは E - カドヘリン及び - カテニンを含み、2 種類の腫瘍細胞上皮バイオマーカーの同時の高い発現レベルは、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する。後半の 2 つの好ましい実施形態において、両方のバイオマーカーの高い発現レベルが、高い感受性を示すのに必要であることに注意されたい。3040

【0043】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される 1 種類又はそれ以上の（又はパネルの）間葉バイオマーカーのレベルを評価すること、及び IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の感受性を予測することを含み、評価された腫瘍細胞間葉バイオマーカー全部の同時の低い又は検出不可能な発現レベルは IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の感受性を予測する方法も提供する。この方法の好ましい一実施形態において、間葉バイオマーカーはビメンチン及びフィプロネクチンを含み、2 種類の腫瘍細胞間葉バイオマーカー50

カーオの同時の低い又は検出不可能な発現レベルは、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する。後半の好ましい実施形態において、両方のバイオマーカーの低い又は検出不可能な発現レベルが、高い感受性を示すのに必要であることに注意されたい。

【0044】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される上皮バイオマーカーのレベルを評価すること、腫瘍細胞によって発現される間葉バイオマーカーのレベルを評価すること、及びIGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の感受性を予測することを含み、上皮バイオマーカー発現レベルと間葉バイオマーカー発現レベルとの高い比はIGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する高い感受性と相關する、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の感受性を予測する方法も提供する。この方法の好ましい一実施形態において、上皮バイオマーカーはE-カドヘリンを含み、間葉バイオマーカーはフィプロネクチンを含む。この方法の別の好ましい実施形態においては、上皮バイオマーカーはB_rkを含み、間葉バイオマーカーはフィプロネクチンを含む。この方法の別の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーはE-カドヘリンを含み、間葉バイオマーカーはビメンチンを含む。この方法の別の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーはE-カテニンを含み、間葉バイオマーカーはフィプロネクチンを含む。

10

【0045】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される1種類又はそれ以上の（又はパネルの）上皮バイオマーカーのレベルを評価すること、及び腫瘍がIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答するかどうかを予測することを含み、腫瘍細胞上皮バイオマーカー全部の同時の高い発現レベルはIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍と相關する、癌患者がIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍に罹患しているかどうかを予測する方法も提供する。この方法の好ましい一実施形態において、上皮バイオマーカーはE-カドヘリン及びB_rkを含み、2種類の腫瘍細胞上皮バイオマーカーの同時の高い発現レベルは、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍と相關する。この方法の別の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーはE-カドヘリン及びE-カテニンを含み、2種類の腫瘍細胞上皮バイオマーカーの同時の高い発現レベルは、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍と相關する。後半の2つの好ましい実施形態において、両方のバイオマーカーの高い発現レベルが、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍を示すのに必要であることに注意されたい。

20

【0046】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される1種類又はそれ以上の（又はパネルの）間葉バイオマーカーのレベルを評価すること、及び腫瘍がIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答するかどうかを予測することを含み、腫瘍細胞間葉バイオマーカー全部の同時の低い又は検出不可能な発現レベルはIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍と相關する、癌患者がIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍に罹患しているかどうかを予測する方法も提供する。この方法の好ましい一実施形態において、間葉バイオマーカーはビメンチン及びフィプロネクチンを含み、2種類の腫瘍細胞間葉バイオマーカーの同時の低い又は検出不可能な発現レベルは、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍と相關する。後半の好ましい実施形態において、両方のバイオマーカーの低い又は検出不可能な発現が、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍を示すのに必要であることに注意されたい。

30

【0047】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される上皮バイオマーカーのレベルを評価すること、腫瘍細胞によって発現される間葉バイオマーカーのレベルを評価すること、及び腫瘍がIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答するかどうかを予測することを含み、上皮バイオマーカー発現レベルと間葉バイオマーカー発現レベルとの高い比はIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍と相關する、癌患者がIGF-1Rキ

40

50

ナーゼ阻害剤による治療に有效地に応答する腫瘍に罹患しているかどうかを予測する方法も提供する。この方法の好ましい一実施形態において、上皮バイオマーカーはE-カドヘリンを含み、間葉バイオマーカーはフィブロネクチンを含む。この方法の別の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーはBrkを含み、間葉バイオマーカーはフィブロネクチンを含む。この方法の別の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーはE-カドヘリンを含み、間葉バイオマーカーはビメンチンを含む。この方法の別の好ましい実施形態において、上皮バイオマーカーは γ -カテニンを含み、間葉バイオマーカーはフィブロネクチンを含む。

【0048】

本発明の方法に関連して、腫瘍細胞によって発現されるバイオマーカーは、腫瘍細胞の遷移状態を示す分子マーカー及び細胞マーカーを含むことができる。好ましい実施形態において、バイオマーカーは、腫瘍の特定の遷移状態、すなわち上皮若しくは間葉特性を示す腫瘍に特徴的な個々のマーカータンパク質、又はそれをコードするmRNAである。別の実施形態において、ある種の状況において、バイオマーカーは、上皮状態又は間葉状態に特徴的である細胞の巨大分子によって、腫瘍細胞中に形成される特徴的な形態学的パターンであり得る。従って、腫瘍細胞の上皮又は間葉状態及びそれに続いて起こる、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する感受性に関する情報を提供するために、形態計測的細胞分析を使用することが可能である。

【0049】

【表1】

表1：分子バイオマーカー遺伝子の識別

ヒトバイオマーカー	NCBI Gene ID ¹	NCBI RefSeq ²
E-カドヘリン	999	NP_004351
Brk	5753	NP_005966
γ -カテニン	3728	NP_002221
α 1-カテニン	1495	NP_001894
α 2-カテニン	1496	NP_004380
α 3-カテニン	29119	NP_037398
ケラチン8	3856	NP_002264
ケラチン18	3875	NP_000215
ビメンチン	7431	NP_003371
フィブロネクチン1	2335	NP_002017
フィブリリン-1	2200	NP_000129
フィブリリン-2	2201	NP_001990
コラーゲンアルファ-2(IV)	1284	NP_001837
コラーゲンアルファ-2(V)	1290	NP_000384
LOXL1	4016	NP_005567
ニドジェン	4811	NP_002499
C11orf9	745	NP_037411
テネイシン	3371	NP_002151
N-カドヘリン	1000	NP_001783

¹. NCBI GenelD番号は、NCBI Entrez Geneデータベース記録由来のバイオマーカー遺伝子の一意の識別名である(National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, Building 38A, Bethesda, MD 20894; Internet address <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

². NCBI RefSeq(基準配列)は、バイオマーカー遺伝子によって発現された配列の例である。

【0050】

10

20

30

40

50

表1に、本明細書に記載の本発明の方法の実施に使用することができる分子バイオマーカーの例をコードする遺伝子を列挙する。分子バイオマーカーは、これらの遺伝子の変異体、例えば、発現mRNA又はタンパク質、スプライスバリエント、同時翻訳及び翻訳後修飾タンパク質、多形バリエントなどを含む、これらの遺伝子によって発現される任意の生成物を含むことができる。一実施形態において、バイオマーカーは、フィブロネクチン1遺伝子によって発現されるスプライスバリエントである胚性EDB⁺フィブロネクチンである(Kilian, O. et al. (2004) Bone 35(6): 1334-1345)。フィブロネクチンのこの胎性形態(fetal form)を決定する考えられる利点は、間葉様腫瘍を周囲の間質組織から容易に区別することができる。追加の実施形態において、バイオマーカーは、ヒト遺伝子産物の動物相同体であり得る(例えば、イヌ、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、サル、類人猿由来など)。

【0051】

本明細書に記載の方法において、腫瘍細胞は、典型的には、癌、前癌状態又は異常細胞増殖の別の形態と診断された患者、及び治療を要する患者から得られる。癌は、肺癌(例えば、非小細胞肺癌(NSCLC))、すい癌、頭頸部癌、胃癌、乳癌、結腸癌、卵巣癌、又は本明細書に記載の以下の種々の他の癌のいずれかであり得る。癌は、好ましくは、IGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いて治療可能であることが知られている癌である。

【0052】

本発明の方法において、バイオマーカー発現レベルは、発現レベルがEMTを通して一定である対照分子と比較して評価することができ、又は分子バイオマーカー(例えば、GAPDH、-アクチン、チューブリンなどの「ハウスキーピング」遺伝子)によって示される上皮若しくは間葉遷移状態を発現する腫瘍細胞を比較したときに評価することができる。バイオマーカー発現レベルは、腫瘍細胞バイオマーカーのもう一方のタイプと比較して(すなわち、間葉と比較された上皮)、又は同じ組織の非腫瘍細胞中のバイオマーカーレベルと比較して、又はアッセイ基準として使用される別の細胞若しくは組織源と比較して評価することもできる。

【0053】

本発明の方法において、腫瘍細胞によって発現される上皮又は間葉バイオマーカーのレベルは、以下により詳細に記述するように、例えば、ELISA、RIA、免疫沈降、免疫プロット、免疫蛍光顕微鏡検査、RT-PCR、in situハイブリド形成、cDNAマイクロアレイなどなど、遺伝子の発現レベルを測定するための、当分野では公知の標準的バイオアッセイ手順のいずれかを用いることによって評価することができる。

【0054】

本発明の方法において、腫瘍細胞上皮又は間葉バイオマーカーの発現レベルは、好ましくは腫瘍生検をアッセイすることによって評価される。しかし、別の実施形態において、腫瘍細胞バイオマーカーの発現レベルは、腫瘍又は腫瘍細胞から生じるバイオマーカーの検出可能なレベルを含有する体液又は排せつ物において評価することができる。本発明において有用である体液又は排せつ物としては、血液、尿、唾液、便、胸膜液、リンパ液、痰、腹水、前立腺液、脳脊髄液(CSF)又は任意の他の体分泌物若しくはその誘導体などが挙げられる。血液とは、全血、血しょう、血清又は血液の任意の誘導体を含むものとする。かかる体液又は排せつ物中の腫瘍上皮又は間葉バイオマーカーの評価は、観血的な試料採取方法が不適当又は不都合である状況において好ましいことがある。

【0055】

本発明の方法において、腫瘍細胞は、肺癌腫瘍細胞(例えば、非小細胞肺癌(NSCLC))、すい癌腫瘍細胞、乳癌腫瘍細胞、頭頸部癌腫瘍細胞、胃癌腫瘍細胞、結腸癌腫瘍細胞、卵巣癌腫瘍細胞、又は本明細書に記載の以下の種々の他の癌のいずれかに由来する腫瘍細胞であり得る。腫瘍細胞は、好ましくは、固形腫瘍由来の全腫瘍細胞がそうであるように、IGF-1Rキナーゼを発現することが知られているタイプ又は予想されるタイプである。IGF-1Rキナーゼは、野生型でも変異体でもよい。

【0056】

10

20

30

40

50

本発明の方法において、IGF-1R キナーゼ阻害剤は、本明細書に記載の以下の任意の IGF-1R キナーゼ阻害剤（医薬として許容されるその塩又は多形体を含む。）であり得る。

【0057】

以下の方法は、本発明の方法の追加の具体的実施形態である。

【0058】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される上皮バイオマーカーのレベルを評価すること、及び IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の感受性を予測することを含み、腫瘍細胞上皮バイオマーカーの高い発現レベルは IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の高い感受性と相関する、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の感受性を予測する方法を提供する。10

【0059】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される間葉バイオマーカーのレベルを評価すること、及び IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の感受性を予測することを含み、腫瘍細胞間葉バイオマーカーの高い発現レベルは IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の低い感受性と相関する、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍増殖の感受性を予測する方法を提供する。

【0060】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される上皮バイオマーカーのレベルを評価すること、及び腫瘍が IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に有効に応答するかどうかを予測することを含み、腫瘍細胞上皮バイオマーカーの高い発現レベルは IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍と相関する、癌患者が IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する腫瘍に罹患しているかどうかを予測する方法を提供する。20

【0061】

本発明の方法においては、腫瘍は、肺癌腫瘍（例えば、非小細胞肺癌（NSCLC））、すい癌腫瘍、乳癌腫瘍、頭頸部癌腫瘍、胃癌腫瘍、結腸癌腫瘍、卵巣癌腫瘍、又は本明細書に記載の以下の種々の他の癌のいずれかに由来する腫瘍であり得る。腫瘍は、好ましくは、全固体腫瘍がそうであるように、細胞が IGF-1R キナーゼを発現することが知られているタイプ又は予想されるタイプである。IGF-1R キナーゼは、野生型又は変異体であり得る。30

【0062】

本発明は、腫瘍細胞によって発現される間葉バイオマーカーのレベルを評価すること、及び腫瘍が IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に有効に応答するかどうかを予測することを含み、腫瘍細胞間葉バイオマーカーの高い発現レベルは IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に対してより有効に応答しない腫瘍と相関する、癌患者が IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に対して有効に応答する腫瘍に罹患しているかどうかを予測する方法を提供する。

【0063】

本発明は、少なくとも 1 種類の上皮バイオマーカーポリペプチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも 1 種類の対照ポリペプチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも 1 種類の上皮バイオマーカーポリペプチドの腫瘍細胞レベルを少なくとも 1 種類の対照ポリペプチドの腫瘍細胞レベルと比較することを含み、腫瘍細胞バイオマーカーポリペプチドと腫瘍細胞対照ポリペプチドの高い比は IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の予測される高い感受性を示す、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。この方法に関し、有用である上皮バイオマーカーポリペプチドの例として、E-カドヘリン、-カテニン、ケラチン 8、ケラチン 18 及び Brk が挙げられる。40

【0064】

本発明は、ポリペプチドをコードする少なくとも 1 種類の上皮バイオマーカーポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも 1 種類の対照ポリヌクレオチドの50

腫瘍細胞レベルを測定すること、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルを少なくとも1種類の対照ポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルと比較することを含み、腫瘍細胞バイオマーカーポリヌクレオチドと腫瘍細胞対照ポリヌクレオチドの高い比はIGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の予測される高い感受性を示す、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。この方法に関し、上皮バイオマーカーポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの例として、E-カドヘリン、-カテニン、ケラチン8、ケラチン18及びBtkが挙げられる。

【0065】

本発明は、少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリペプチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも1種類の対照ポリペプチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリペプチドの腫瘍細胞レベルと少なくとも1種類の対照ポリペプチドの腫瘍細胞レベルを比較することを含み、腫瘍細胞バイオマーカーポリペプチドと腫瘍細胞対照ポリペプチドの低い比はIGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の予測された高い感受性を示す、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。この方法に関し、有用である間葉バイオマーカーポリペプチドの例として、ビメンチン及びフィブロネクチンが挙げられる。

【0066】

本発明は、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも1種類の対照ポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルを比較することを含み、腫瘍細胞バイオマーカーポリヌクレオチドと腫瘍細胞対照ポリヌクレオチドの低い比は、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の予測される高い感受性を示す、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。この方法に関し、バイオマーカーポリヌクレオチドによってコードされる有用なポリペプチドの例として、ビメンチン及びフィブロネクチンが挙げられる。

【0067】

本発明は、少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリペプチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリペプチドの非腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリペプチドの腫瘍細胞レベルを少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリペプチドの非腫瘍細胞レベルと比較することを含み、腫瘍細胞バイオマーカーポリペプチドと非腫瘍細胞バイオマーカーポリペプチドの高い比は、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の予測される高い感受性を示す、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。この方法に関し、有用である上皮バイオマーカーポリペプチドの例として、E-カドヘリン、-カテニン、ケラチン8、ケラチン18及びBtkが挙げられる。

【0068】

本発明は、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリヌクレオチドの非腫瘍細胞レベルを測定すること、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルとポリペプチドをコードする少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリヌクレオチドの非腫瘍細胞レベルを比較することを含み、腫瘍細胞バイオマーカーポリヌクレオチドと非腫瘍細胞バイオマーカーポリヌクレオチドの高い比は、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の予測される高い感受性を示す、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。この方法に関

10

20

30

40

50

し、上皮バイオマーカーポリヌクレオチドによってコードされる有用なポリペプチドの例として、E - カドヘリン、- カテニン、ケラチン8、ケラチン18及びB r kが挙げられる。

【0069】

本発明は、少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリペプチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリペプチドの非腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリペプチドの腫瘍細胞レベルと少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリペプチドの非腫瘍細胞レベルを比較することを含み、腫瘍細胞バイオマーカーポリペプチドと非腫瘍細胞バイオマーカーポリペプチドの低い比は、IGF - 1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の予測される高い感受性を示す、IGF - 1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。この方法に関し、有用である間葉バイオマーカーポリペプチドの例として、ビメンチン及びフィブロネクチンが挙げられる。10

【0070】

本発明は、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリヌクレオチドの非腫瘍細胞レベルを測定すること、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルを、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリヌクレオチドの非腫瘍細胞レベルと比較することを含み、腫瘍細胞バイオマーカーポリヌクレオチドと非腫瘍細胞バイオマーカーポリヌクレオチドの低い比は、IGF - 1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の予測される高い感受性を示す、IGF - 1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。この方法に関し、バイオマーカーポリヌクレオチドによってコードされる有用なポリペプチドの例として、ビメンチン及びフィブロネクチンが挙げられる。20

【0071】

本発明は、少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリペプチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリペプチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリペプチドのレベルを少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリペプチドのレベルと比較することを含み、上皮バイオマーカーポリペプチドと間葉バイオマーカーポリペプチドの高い比は、IGF - 1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の予測される高い感受性を示す、IGF - 1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。この方法に関し、有用である上皮バイオマーカーポリペプチドの例として、E - カドヘリン、- カテニン、ケラチン8、ケラチン18及びB r kが挙げられる。この方法に関し、有用である間葉バイオマーカーポリペプチドの例として、ビメンチン及びフィブロネクチンが挙げられる。30

【0072】

本発明は、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、ポリペプチドをコードする少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリヌクレオチドの腫瘍細胞レベルを測定すること、(c)少なくとも1種類の上皮バイオマーカーポリヌクレオチドのレベルを少なくとも1種類の間葉バイオマーカーポリヌクレオチドのレベルと比較することを含み、上皮バイオマーカーポリヌクレオチドと間葉バイオマーカーポリヌクレオチドの高い比は、IGF - 1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の予測される高い感受性を示す、IGF - 1Rキナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性を予測する方法を提供する。この方法に関し、上皮バイオマーカーポリヌクレオチドによってコードされる有用なポリペプチドの例として、E - カドヘリン、- カテニン、ケラチン8、ケラチン18及びB r kが挙げられる。この方法に関し、間葉バイオマーカーポリヌクレオチドによってコードされる有用なポリペプチドの例として、ビメンチン及びフィブロネクチンが挙げられる。40

【 0 0 7 3 】

本発明は、患者試料中の間葉バイオマーカーの発現レベルを対照非癌試料中のバイオマークーの正常発現レベルと比較することを含み、正常レベルに対する患者試料中の間葉バイオマーカーの発現レベルの有意な増加によって、IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する可能性が低い癌に患者が罹患していることが示される、IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する癌に癌患者が罹患しているかどうかを評価する方法を提供する。この方法に関し、有用である間葉バイオマーカーの例として、ビメンチン及びフィプロネクチン並びにこれらのタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

【 0 0 7 4 】

本発明は、患者試料中の上皮バイオマーカーの発現レベルを対照非癌試料中のバイオマークーの正常発現レベルと比較することを含み、正常レベルに対する患者試料中の上皮バイオマーカーの発現レベルの有意な減少によって、IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する可能性が低い癌に患者が罹患していることが示される、IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する癌に癌患者が罹患しているかどうかを評価する方法を提供する。この方法に関し、有用である上皮バイオマーカーの例として、E-カドヘリン、-カテニン、ケラチン8、ケラチン18及びBrk並びにこれらのタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

【 0 0 7 5 】

本発明は、患者試料中の上皮バイオマーカーの発現レベルを患者試料中の間葉バイオマーカーの発現レベルと比較することを含み、上皮バイオマーカーの発現レベルと間葉バイオマーカーの発現レベルの高い比によって、IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する可能性が高い癌に患者が罹患していることが示される、IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する癌に癌患者が罹患しているかどうかを評価する方法を提供する。この方法に関し、有用である上皮バイオマーカーの例として、E-カドヘリン、-カテニン、ケラチン8、ケラチン18及びBrk並びにこれらのタンパク質をコードする核酸が挙げられる。この方法に関し、有用である間葉バイオマーカーの例としては、ビメンチン及びフィプロネクチン並びにこれらのタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

【 0 0 7 6 】

患者試料に関する上記方法のいずれかにおいて、かかる試料の例は腫瘍生検であり得る。

【 0 0 7 7 】

本発明は、(a)ヒト対象の細胞から生じるヒト核酸又はタンパク質を含有する生体物質の試料を採取すること、(b)試料中の1種類若しくはそれ以上の上皮細胞バイオマーカータンパク質又は1種類若しくはそれ以上の上皮細胞バイオマーカータンパク質特異的mRNAの発現レベルを定量的又は半定量的に測定すること、及び(c)(b)における発現レベルを正常対照におけるバイオマーカー発現レベルと、又は試料中の対照ポリペプチド若しくは核酸のレベルと比較することを含み、対照レベルに対する、1種類若しくはそれ以上の上皮細胞バイオマーカータンパク質又は1種類若しくはそれ以上の上皮細胞バイオマーカータンパク質特異的mRNAの発現の低下によって、ヒト対象においてIGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する可能性が低い腫瘍の存在が示される、ヒト対象において腫瘍がIGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に対して応答性であるかどうかを判定する方法を提供する。

【 0 0 7 8 】

本発明は、(a)ヒト対象の細胞から生じるヒト核酸又はタンパク質を含有する生体物質の試料を採取すること、(b)試料中の1種類若しくはそれ以上の間葉細胞バイオマーカータンパク質又は1種類若しくはそれ以上の間葉細胞バイオマーカータンパク質特異的mRNAの発現レベルを定量的又は半定量的に測定すること、及び(c)(b)における発現レベルを正常対照におけるバイオマーカー発現レベルと、又は試料中の対照ポリペプチド若しくは核酸のレベルと比較することを含み、対照レベルに対する、1種類若しくは

10

20

30

40

50

それ以上の間葉細胞バイオマーカータンパク質又は1種類若しくはそれ以上の間葉細胞バイオマーカータンパク質特異的mRNAの発現の増加によって、ヒト対象においてIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に有効に応答する可能性が低い腫瘍の存在が示される、ヒト対象において腫瘍がIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に対して応答性であるかどうかを判定する方法を提供する。

【0079】

本発明は、腫瘍細胞中の1種類又はそれ以上の上皮バイオマーカーのレベルを測定すること、前記レベルを非腫瘍対照における上皮バイオマーカー発現レベルと、又は腫瘍試料中の対照ポリペプチド若しくは核酸のレベルと比較すること、及び腫瘍細胞が1種類又はそれ以上の上皮バイオマーカーの比較的高いレベルを含有するかどうかを判定することを含み、高いレベルによって、腫瘍患者がIGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いた療法によって比較的長い延命効果を示すことが示される、腫瘍患者がIGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いた療法によって比較的長い延命効果を示す可能性を判定する方法を提供する。10

【0080】

本発明は、腫瘍細胞中の1種類又はそれ以上の間葉バイオマーカーのレベルを測定すること、前記レベルを非腫瘍対照における間葉バイオマーカー発現レベルと、又は腫瘍試料中の対照ポリペプチド若しくは核酸のレベルと比較すること、及び腫瘍細胞が1種類又はそれ以上の間葉バイオマーカーの比較的低いレベルを含有するかどうかを判定することを含み、低いレベルによって、腫瘍患者がIGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いた療法によって比較的長い延命効果を示すことが示される、腫瘍患者がIGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いた療法によって比較的長い延命効果を示す可能性を判定する方法を提供する。20

【0081】

本発明は、腫瘍細胞中の1種類又はそれ以上の上皮バイオマーカーのレベルを測定すること、前記レベルを非腫瘍対照における上皮バイオマーカー発現レベルと、又は腫瘍試料中の対照ポリペプチド若しくは核酸のレベルと比較すること、及び腫瘍細胞が1種類又はそれ以上の上皮バイオマーカーの比較的高いレベルを含有するかどうかを判定すること、腫瘍細胞中の1種類又はそれ以上の間葉バイオマーカーのレベルを測定すること、前記レベルを非腫瘍対照における間葉バイオマーカー発現レベルと、又は腫瘍試料中の対照ポリペプチド若しくは核酸のレベルと比較すること、及び腫瘍細胞が1種類又はそれ以上の間葉バイオマーカーの比較的低レベルを含有するかどうかを判定することを含み、1種類又はそれ以上の上皮バイオマーカーの高いレベル及び1種類又はそれ以上の間葉バイオマーカーの低いレベルによって、腫瘍患者がIGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いた療法によって比較的長い延命効果を示すことが示される、腫瘍患者がIGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いた療法によって比較的長い延命効果を示す可能性を判定する方法を提供する。30

【0082】

本発明は、新生細胞に関連する上皮バイオマーカーのレベルを測定すること、及び前記上皮バイオマーカーのレベルを非腫瘍性上皮バイオマーカー基準レベルと、又は新生細胞に関連する対照ポリペプチド若しくは核酸のレベルと比較することを含み、新生細胞に関連する上皮バイオマーカーの減少したレベルが前記患者の減少した生存と相関する、IGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いた療法に対して腫瘍性症状の患者の生存についての予後を判定する方法を提供する。40

【0083】

本発明は、新生細胞に関連する間葉バイオマーカーレベルを測定すること、及び前記間葉バイオマーカーレベルを非腫瘍性間葉バイオマーカー基準レベルと、又は新生細胞に関連する対照ポリペプチド若しくは核酸のレベルと比較することを含み、新生細胞に関連する間葉バイオマーカーレベルの増加が前記患者の生存の低下と相関する、IGF-1Rキナーゼ阻害剤療法に対して腫瘍性症状の患者の生存についての予後を判定する方法を提供する。

【0084】

腫瘍細胞上皮又は間葉バイオマーカー発現の評価では、腫瘍細胞又はこれらの腫瘍細胞50

によって產生されるタンパク質若しくは核酸を含有する患者試料を本発明の方法に使用することができる。これらの実施形態においては、腫瘍細胞試料、例えば、患者から得られた腫瘍生検、又は腫瘍由来の材料を含有する他の患者試料（例えば、血液、血清、尿又は本明細書の上記他の体液若しくは排せつ物）中のマーカーの量（例えば、絶対量又は濃度）を評価することによって、バイオマーカーの発現レベルを評価することができる。細胞試料は、試料中のマーカー量を評価する前に、採取後の種々の周知の調製及び保存技術（例えば、核酸及び／又はタンパク質抽出、固定、保存、凍結、限外ろ過、濃縮、蒸発、遠心分離など）に供することは言うまでもない。同様に、腫瘍生検も、採取後の調製及び保存技術、例えば、固定に供することができる。

【0085】

10

本発明の方法においては、バイオマーカータンパク質を発現する腫瘍細胞の表面に提示される少なくとも1個の部分を有するバイオマーカータンパク質の発現を検出することができる。マーカータンパク質又はその一部が細胞表面に露出しているかどうかを判定することは当業者には簡単なことである。例えば、免疫学的方法を使用して、ホールセル上のかかるタンパク質を検出することができ、又は周知のコンピュータ配列解析法を使用して、少なくとも1個の細胞外ドメイン（すなわち、分泌タンパク質及び少なくとも1個の細胞表面ドメインを有するタンパク質を含む。）の存在を予測することができる。マーカータンパク質を発現する細胞の表面に提示される少なくとも1個の部分を有するマーカータンパク質の発現は、腫瘍細胞を必ずしも溶解せずに（例えば、タンパク質の細胞表面ドメインに特異的に結合する標識抗体を用いて）検出することができる。

【0086】

20

本発明に記載のバイオマーカーの発現は、転写された核酸又はタンパク質の発現を検出する多種多様な周知の方法のいずれかによって評価することができる。かかる方法の非限定的例としては、分泌された、細胞表面タンパク質、細胞質タンパク質又は核タンパク質を検出する免疫学的方法、タンパク質精製方法、タンパク質の機能又は活性アッセイ、核酸ハイブリド形成法、核酸逆転写法及び核酸増幅方法が挙げられる。

【0087】

30

一実施形態において、バイオマーカーの発現は、腫瘍細胞において通常受ける翻訳後修飾（例えばグリコシル化、リン酸化、メチル化など）の全部又は一部を起こすバイオマーカータンパク質など、バイオマーカータンパク質又はその断片と特異的に結合する、抗体（例えば、放射性標識、発色団標識、蛍光団標識又は酵素標識抗体）、抗体誘導体（例えば、基質若しくはタンパク質との複合抗体又はタンパク質・リガンド対〔例えばビオチン・ストレプトアビジン〕のリガンド）又は抗体断片（例えば、単鎖抗体、単離抗体超可変ドメインなど）を用いて評価される。

【0088】

40

別の実施形態において、バイオマーカーの発現は、患者試料中の細胞からmRNA/cDNA（すなわち、転写ポリヌクレオチド）を調製することによって、及び、mRNA/cDNAをバイオマーカー核酸又はその断片の補体である基準ポリヌクレオチドとハイブリド形成することによって、評価される。cDNAは、基準ポリヌクレオチドとのハイブリド形成前に、種々のポリメラーゼ連鎖反応法のいずれかを用いて、場合によって増幅することが可能である。1種類又はそれ以上のバイオマーカーの発現は、同様に、バイオマーカーの発現レベルを評価する定量PCRを用いて検出することができる。或いは、本発明のバイオマーカーの変異体又は変種（例えば、一塩基多形体、欠失体など）を検出する多数の公知の方法のいずれかを使用して、患者におけるバイオマーカーの存在を検出することができる。

【0089】

50

関係する実施形態においては、試料から得られた転写ポリヌクレオチドの混合物を、バイオマーカー核酸の少なくとも一部（例えば、少なくとも7、10、15、20、25、30、40、50、100、500以上のヌクレオチド残基）と相補的又は相同であるポリヌクレオチドが固定された基質と接触させる。相補的又は相同のポリヌクレオチドが、

基質上で異なって検出可能である（例えば、異なる発色団若しくは蛍光団を用いて検出可能である、又は異なる選択位置に固定されている）場合には、複数のバイオマーカーの発現レベルを、単一の基質（例えば、選択位置に固定されたポリヌクレオチドの「遺伝子チップ」マイクロアレイ）を用いて同時に評価することができる。1種類の核酸と別の核酸のハイブリド形成を含むバイオマーカー発現評価方法を使用するときには、厳密なハイブリド形成条件下でハイブリド形成を実施することが好ましい。

【0090】

本発明の方法において本発明の複数のバイオマーカーを使用するときは、患者試料中の各バイオマーカーの発現レベルを、単一反応混合物中（すなわち、各バイオマーカーに対する異なる蛍光プローブなどの試薬を用いて）又はバイオマーカーの1種類又はそれ以上に對応する個々の反応混合物中の、同じタイプの非癌試料中の複数のバイオマーカーの各々の正常発現レベルと比較することができる。10

【0091】

正常（すなわち非癌）ヒト組織におけるバイオマーカー発現レベルは、種々の方法で評価することができる。一実施形態において、この正常発現レベルは、非癌性であると考えられる細胞部分におけるバイオマーカーの発現レベルを評価し、次いでこの正常発現レベルを腫瘍細胞部分における発現レベルと比較することによって評価される。交互に、特に、本明細書に記載の方法を定常的に実施した結果としてさらなる情報が利用可能になるので、本発明のバイオマーカーの正常発現の集団平均値を使用することができる。他の実施形態においては、「正常」バイオマーカー発現レベルは、非癌患者から得られた患者試料中の、患者における癌の発症が疑われる前に患者から得られた患者試料からの、保存された患者試料などからの、バイオマーカーの発現を評価することによって求めることができる。20

【0092】

生体試料中のバイオマーカータンパク質又は核酸の有無を検出する例示的な方法は、生体試料（例えば、腫瘍に関連する体液）を被検者から採取すること、及び生体試料をポリペプチド又は核酸（例えば、mRNA、ゲノムDNA又はcDNA）を検出することができる化合物又は検出剤と接触させることを含む。したがって、本発明の検出方法を使用して、例えば生体試料中の、mRNA、タンパク質、cDNA又はゲノムDNAをインピトロ及びインピボで検出することができる。例えば、mRNAを検出するインピトロ技術としては、ノーザンハイブリド形成及びin situハイブリド形成が挙げられる。バイオマーカータンパク質を検出するインピトロ技術としては、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ウエスタンプロット法、免疫沈降、免疫蛍光などが挙げられる。ゲノムDNAを検出するためのインピトロ技術としては、サザンハイブリド形成が挙げられる。mRNAを検出するためのインピボ技術としては、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）、ノーザンプロットハイブリド形成及びin situハイブリド形成が挙げられる。さらに、バイオマーカータンパク質を検出するためのインピボ技術としては、タンパク質又はその断片に対する標識抗体を対象に導入することが挙げられる。例えば、抗体は、対象における存在及び場所を標準画像化技術によって検出することができる放射性マーカーで標識することができる。30

【0093】

かかる診断及び予後のアッセイの一般的原理は、バイオマーカーとプローブを含有し得る試料又は反応混合物を適切な条件下で、バイオマーカーとプローブが相互作用し、結合して、反応混合物中で除去及び／又は検出することができる複合体を形成するのに十分な時間調製することを含む。これらのアッセイは、種々の方法で実施することができる。40

【0094】

例えば、かかるアッセイを実施する一方法は、バイオマーカー又はプローブを、基質とも称される固相支持体上に固定すること、及び固相に固定された標的バイオマーカー／プローブ複合体を反応の最後に検出することを含む。かかる方法の一実施形態においては、バイオマーカーの存在及び／又は濃度をアッセイする、対象から得られた試料を担体又は50

固相支持体上に固定することができる。別の実施形態においては、逆の状況が考えられ、プローブを固相に固定し、対象から得られた試料をアッセイの非固定成分として反応させることができる。

【0095】

アッセイ成分を固相に固定する、確立された多数の方法が存在する。これらの方法としては、ビオチンとストレプトアビシンの連結によって固定されるバイオマーカー又はプローブ分子などが挙げられるが、これだけに限定されない。かかるビオチン化アッセイ成分は、当分野で公知の技術（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals、Rockford、IL.）を用いて、ビオチン-NHS（N-ヒドロキシ-スクシンイミド）から調製することができ、ストレプトアビシン被覆96ウェルプレート（Pierce Chemical）のウェル中に固定することができる。ある実施形態においては、固定アッセイ成分を含む表面を前もって調製し、保存することができる。10

【0096】

かかるアッセイに適切な他の担体又は固相支持体として、バイオマーカー又はプローブが属する分子クラスに結合することができる任意の材料などが挙げられる。周知の支持体又は担体として、ガラス、ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ナイロン、ポリエチレン、デキストラン、アミラーゼ、天然セルロース及び修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩及び磁鉄鉱が挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0097】

上記アプローチによってアッセイを実施するために、非固定成分を固相に添加し、その後、第2の成分を固定する。反応が完結した後に、形成された任意の複合体が固相上に固定されて残るような条件下で非複合成分を（例えば、洗浄によって）除去することができる。固相に固定されたバイオマーカー／プローブ複合体は、本明細書に概説する幾つかの方法で検出することができる。20

【0098】

一実施形態において、プローブが非固定アッセイ成分であるときには、プローブをアッセイの検出及び読み取り目的で、本明細書で考察する、当業者に周知の検出可能な標識で直接又は間接的に標識することができる。

【0099】

バイオマーカー／プローブ複合体の形成は、例えば蛍光エネルギー移動技術（すなわちFET、例えば、Lakowicz他、米国特許第5,631,169号、Stavrianoopoulos他、米国特許第4,868,103号参照）を利用することによって、何れかの成分（バイオマーカー又はプローブ）をさらに操作又は標識せずに、直接検出することもできる。第1の「供与体」分子上の蛍光団標識は、適切な波長の入射光によって励起されると、その放射蛍光エネルギーが第2の「受容体」分子上の蛍光標識によって吸収され、蛍光標識が、吸収されたエネルギーによって蛍光を発することができるよう選択される。交互に、「供与体」タンパク質分子は、トリプトファン残基の天然蛍光エネルギーを単に利用することもできる。光の異なる波長を発する標識が選択され、その結果、「受容体」分子標識を「供与体」の標識から区別することができる。標識間のエネルギー移動効率は分子間の距離に関係するので、分子間の空間的関係を評価することができる。結合が分子間で起こる状況においては、アッセイにおける「受容体」分子標識の蛍光発光は最大になるはずである。FET結合現象は、当分野で周知の標準的な蛍光定量検出手段（例えば、蛍光光度計を用いて）都合よく測定することができる。3040

【0100】

別の実施形態においては、プローブのバイオマーカー認識能力は、一方のアッセイ成分（プローブ又はバイオマーカー）を標識せずに、リアルタイム生体分子間相互作用解析（BIA）などの技術を利用することによって求めることができる（例えば、Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345及びSzabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705参照）。本50

明細書では「BIA」又は「表面プラズモン共鳴」は、相互作用物のいずれも標識せずに、生体分子特異的相互作用をリアルタイムに研究するための技術である（例えば、BIA core）。（結合現象を示している）結合表面における質量変化は、表面近傍の光の屈折率を変化させ（表面プラズモン共鳴（SPR）の光学現象）、生体分子間のリアルタイム反応の指標として使用することができる検出可能なシグナルを生ずる。

【0101】

或いは、別の実施形態において、バイオマーカー及びプローブを液相中の溶質として用いて、類似の診断及び予後のアッセイを実施することができる。かかるアッセイにおいて、複合化されたバイオマーカーとプローブは、分画遠心分離、クロマトグラフィー、電気泳動及び免疫沈降を含む（ただしこれらだけに限定されない。）、幾つかの標準技術のいずれかによって、非複合成分から分離される。分画遠心分離において、バイオマーカー／プローブ複合体は、異なるサイズ及び密度に基づく複合体の異なる沈降平衡のために、一連の遠心段階によって非複合アッセイ成分から分離することができる（例えば、Rivas, G., and Minton, A.P., 1993, Trends Biochem Sci. 18(8): 284-7参照）。標準クロマトグラフィー技術を利用して、複合分子を非複合分子から分離することもできる。例えば、ゲルろ過クロマトグラフィーは、サイズに基づいて分子を分離し、例えば、カラム形式の適切なゲルろ過樹脂を利用してすることによって、比較的大きい複合体を比較的小さい非複合成分から分離することができる。同様に、非複合成分と比べて、バイオマーカー／プローブ複合体の比較的異なる電荷特性を利用して、例えばイオン交換クロマトグラフィー樹脂を利用して、複合体を非複合成分から区別することもできる。かかる樹脂及びクロマトグラフィー技術は当業者に周知である（例えば、Heegaard, N.H., 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11(1-6): 141-8; Hage, D.S., and Tweed, S.A. J. Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997 Oct 10; 699(1-2): 499-525参照）。ゲル電気泳動を使用して、複合アッセイ成分を非結合成分から分離することもできる（例えば、Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987-1999参照）。この技術において、タンパク質又は核酸複合体は、例えばサイズ又は電荷に基づいて分離される。電気泳動プロセス中の結合相互作用を維持するために、非変性ゲルマトリックス材料及び還元剤の非存在下の条件が典型的には好ましい。特定のアッセイ及びその成分に適切な条件は、当業者に周知である。

【0102】

特定の実施形態において、バイオマーカー-mRNAのレベルは、生体試料中で、当分野で公知の方法を用いて、in situ及びインビトロ形式で測定することができる。「生体試料」という用語は、対象から単離された組織、細胞、体液及びその単離物、並びに対象中に存在する組織、細胞及び体液を含むものとする。多数の発現検出方法が単離されたRNAを使用する。インビトロ方法のために、mRNAの単離に対して選択しない任意のRNA単離技術が、腫瘍細胞からRNAを精製するために利用され得る（例えば、Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987-1999参照）。さらに、多数の組織試料を、例えば、Chomczynskiの1段階RNA単離法（1989、米国特許第4,843,155号）などの当業者に周知の技術を用いて容易に加工することができる。

【0103】

単離されたmRNAは、サザン又はノーザンプロット分析、ポリメラーゼ連鎖反応解析、プローブアレイなど（ただし、これらだけに限定されない。）、ハイブリド形成又は増幅アッセイにおいて使用することができる。mRNAレベルを検出する好ましい診断法は、単離されたmRNAを、検出されている遺伝子によってコードされるmRNAとハイ

10

20

30

40

50

ブリッド形成することができる核酸分子(プローブ)と接触させることを含む。核酸プローブは、例えば、完全長cDNAとすることができる、又は少なくとも7、15、30、50、100、250若しくは500ヌクレオチド長の、また、本発明のバイオマーカーをコードするmRNA若しくはゲノムDNAと厳密な条件下で特異的にハイブリッド形成するのに十分な、オリゴヌクレオチドなどの完全長cDNAの一部とすることができます。本発明の診断アッセイに使用するのに適切な他のプローブを本明細書に記載する。mRNAとプローブのハイブリド形成は、問題のバイオマーカーが発現されていることを示している。

【0104】

一形式において、例えば単離されたmRNAをアガロースゲル上で泳動させ、mRNAをゲルからニトロセルロースなどの膜に転写することによって、mRNAを固体表面に固定し、プローブと接触させる。別の形式において、プローブは固体表面に固定され、mRNAを、例えばAffymetrix遺伝子チップアレイ中で、プローブと接触させる。当業者は、公知のmRNA検出方法を、本発明のバイオマーカーによってコードされるmRNAのレベルの検出に使用するために容易に改作することができる。

【0105】

試料中のmRNAバイオマーカーレベルを測定する代替法は、核酸増幅プロセス、例えば、RT-PCR(Mullis, 1987、米国特許第4,683,202号に記載の実験実施形態)、リガーゼ連鎖反応(Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193)、自立配列複製(Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム(Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-Betaレプリカーゼ(Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6:1197)、ローリングサークル複製(Lizardi他、米国特許第5,854,033号)又は任意の他の核酸増幅方法と、それに続く当業者に周知の技術を用いた増幅分子の検出を含む。これらの検出スキームは、核酸分子が極めて少数しか存在しない場合に、かかる分子の検出に特に有用である。本明細書では、増幅プライマーは、遺伝子の5'又は3'領域にアニールすることができる核酸分子の1対(それぞれプラス及びマイナス鎖又はその逆)として定義され、間に短い領域を含有する。一般に、増幅プライマーは、約10から30ヌクレオチド長であり、約50から200ヌクレオチド長の領域に隣接する。適切な条件下で、適切な試薬を用いて、かかるプライマーによって、プライマーが隣接するヌクレオチド配列を含む核酸分子を増幅することができる。

【0106】

*in situ*方法のために、mRNAを腫瘍細胞から検出前に単離する必要はない。かかる方法においては、細胞又は組織試料を公知の組織学的方法を用いて調製/加工する。次いで、試料を支持体、典型的にはスライドガラス上に固定し、次いでバイオマーカーをコードするmRNAとハイブリッド形成することができるプローブと接触させる。

【0107】

バイオマーカーの絶対発現レベルに基づく測定の代替として、測定は、バイオマーカーの標準化された発現レベルに基づくことができる。バイオマーカーの絶対発現レベルをバイオマーカーでない遺伝子、例えば、恒常に発現されるハウスキーピング遺伝子の発現と比較して、バイオマーカーの絶対発現レベルを補正することによって、発現レベルを標準化する。標準化に適切な遺伝子として、アクチン遺伝子などのハウスキーピング遺伝子、又は上皮細胞特異的遺伝子などが挙げられる。この標準化によって、一試料、例えば患者試料を別の試料、例えば非腫瘍試料と、又は異なる出所からの試料間で、発現レベルを比較することができる。

【0108】

或いは、発現レベルを相対発現レベルとすることができる。バイオマーカーの相対発現

10

20

30

40

50

レベル（例えば、間葉バイオマーカー）を求めるために、問題の試料の発現レベルを測定する前に、バイオマーカー発現レベルを正常対癌細胞単離体の10個又はそれ以上の試料、好ましくは50個又はそれ以上の試料について測定する。より多数の試料においてアッセイされた遺伝子の各々の平均発現レベルを求め、これをバイオマーカーのベースライン発現レベルとして使用する。次いで、試験試料について測定したバイオマーカー発現レベル（絶対発現レベル）をそのバイオマーカーについて得られた平均発現値で除算する。これによって相対発現レベルが得られる。

【0109】

本発明の別の実施形態において、バイオマーカータンパク質を検出する。本発明のバイオマーカータンパク質を検出する好ましい薬剤は、かかるタンパク質又はその断片と結合することができる抗体、好ましくは検出可能な標識を有する抗体である。抗体はポリクローナル、又はより好ましくはモノクローナルであり得る。完全な抗体又はその断片若しくは誘導体（例えば、 Fab 又は $F(ab')_2$ ）を使用することができる。プローブ又は抗体に関する「標識された」という用語は、検出可能な物質をプローブ又は抗体と連結（すなわち、物理的に連結）することによるプローブ又は抗体の直接標識、及び直接標識された別の試薬との反応（reactivity）によるプローブ又は抗体の間接標識を包含するものとする。間接標識の例としては、蛍光標識二次抗体を用いた一次抗体の検出、及び蛍光標識ストレプトアビジンを用いて検出することができるようなビオチンによるDNAプローブの末端標識が挙げられる。

【0110】

腫瘍細胞由来のタンパク質は、当業者に周知の技術を用いて単離することができる。用いられるタンパク質単離方法は、例えば、Harlow and Lane (Harlow and Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) に記載されている方法などである。

【0111】

多様な形式によって、試料が、所与の抗体に結合するタンパク質を含有するかどうかを判定することができる。かかる形式の例としては、酵素免疫測定法（EIA）、放射性免疫測定法（RIA）、ウエスタンプロット分析及び酵素結合免疫吸着（immunoabsorbant）測定法（ELISA）が挙げられるが、これらだけに限定されない。当業者は、公知のタンパク質／抗体検出方法を、腫瘍細胞が本発明のバイオマーカーを発現するかどうかの判定に使用するために容易に改作することができる。

【0112】

一形式において、抗体又は抗体断片若しくは誘導体をウエスタンプロット又は免疫蛍光技術などの方法に使用して、発現されたタンパク質を検出することができる。かかる使用においては、抗体又はタンパク質を固体支持体に固定することが一般に好ましい。適切な固相支持体又は担体として、抗原又は抗体と結合することができる任意の支持体などが挙げられる。周知の支持体又は担体として、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然セルロース及び修飾されたセルロース、ポリアクリルアミド、斑れい岩及び磁鉄鉱が挙げられる。

【0113】

当業者は、抗体又は抗原と結合する多数の他の適切な担体を承知しており、かかる支持体を本発明での使用に改作することができる。例えば、腫瘍細胞から単離されたタンパク質を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって泳動させ、ニトロセルロースなどの固相支持体上に固定することができる。次いで、支持体を適切な緩衝剤で洗浄し、続いて検出可能な標識抗体を用いて処理することができる。次いで、固相支持体を再度緩衝剤で洗浄して非結合抗体を除去することができる。次いで、固体支持体上の結合標識の量を従来手段によって検出することができる。

【0114】

10

20

30

40

50

E L I S A アッセイの場合、特異的結合対は、免疫タイプでもよく、又は非免疫タイプでもよい。免疫特異的結合対は、抗原 - 抗体系又はハプテン / 抗ハプテン系によって例示される。フルオレセイン / 抗フルオレセイン、ジニトロフェニル / 抗ジニトロフェニル、ビオチン / 抗ビオチン、ペプチド / 抗ペプチドなども挙げることができる。特異的結合対の抗体メンバーは、当業者によく知られた通例の方法によって生成することができる。かかる方法は、特異的結合対の抗原メンバーを有する動物を用いた免疫化を含む。特異的結合対の抗原メンバーが免疫原性でない場合、例えば、ハプテンである場合、担体タンパク質と共有結合させて免疫原性にすることができる。非免疫結合対は、2種類の成分が互いに天然の親和性を共有するが、抗体ではない系を含む。例示的な非免疫対は、ビオチン - ストレプトアビシン、内因子 - ビタミン B₁₂、葉酸 - 葉酸塩結合タンパク質などである。

10

【 0 1 1 5 】

種々の方法を利用して、抗体を特異的結合対のメンバーで共有結合標識することができる。この方法は、特異的結合対メンバーの性質、所望の連結のタイプ、及び種々の複合化化学反応に対する抗体の寛容性に基づいて選択される。ビオチンは、市販の活性誘導体を利用して抗体へ共有結合的に連結させることができる。これらの一端は、タンパク質上のアミン基に結合するビオチン - N - ヒドロキシ - スクシンイミド；炭水化物部分、アルデヒド及びカルボキシル基とカルボジイミド連結によって結合するビオチンヒドラジド、並びにスルフヒドリル基と結合するビオチンマレイミド及びヨードアセチルビオチンである。フルオレセインは、フルオレセインイソチオシアナートを用いてタンパク質アミン基と連結させることができる。ジニトロフェニル基は、2,4-ジニトロベンゼンスルファート又は2,4-ジニトロフルオロベンゼンを用いてタンパク質アミン基と連結させることができる。ジアルデヒド、カルボジイミド連結、ホモ官能性架橋及びヘテロ二官能性架橋など、複合化の他の標準方法を使用して、モノクローナル抗体を特異的結合対メンバーと連結させることもできる。カルボジイミド連結は、一物質上のカルボキシル基を別の物質上のアミン基と連結させる有効な方法である。カルボジイミド連結は、市販試薬1-エチル-3-(ジメチル-アミノプロピル)-カルボジイミド(EDAC)を用いることによって促進される。

20

【 0 1 1 6 】

二官能性イミドエステル及び二官能性N-ヒドロキシスクシンイミドエステルなど、ホモ二官能性架橋剤は、市販されており、一物質上のアミン基と別の物質上のアミン基の連結に使用される。ヘテロ二官能性架橋剤は、異なる官能基を有する試薬である。最も一般的な市販ヘテロ二官能性架橋剤は、アミン反応性N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを第1の官能基として有し、スルフヒドリル反応基を第2の官能基として有する。最も一般的なスルフヒドリル反応基は、マレイミド、ピリジルジスルフィド及び活性ハロゲンである。官能基の1つは、照射によって種々の基と反応する光活性アリールニトレンであり得る。

30

【 0 1 1 7 】

検出可能に標識された抗体、又は検出可能に標識された特異的結合対メンバーは、放射性同位体、酵素、蛍光発生材料、化学発光材料又は電気化学材料であり得るレポーターと連結させることによって調製される。一般に使用される2種類の放射性同位体は¹²⁵I及び³Hである。標準放射性同位体標識手順としては、クロラミンT、ラクトペルオキシダーゼ、¹²⁵IのBolton-Hunter方法及び³Hの還元的メチル化などが挙げられる。「検出可能に標識された」という用語は、標識の内因性酵素活性によって、又はそれ自体容易に検出することができる別の成分の標識との結合によって、容易に検出することができるように標識された分子を指す。

40

【 0 1 1 8 】

本発明に使用するのに適切な酵素として、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ホタル及びウミシイタケを含めたルシフェラーゼ、-ラクタマーゼ、ウレアーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)

50

) 及びリゾチームが挙げられるが、これらだけに限定されない。酵素標識は、抗体と特異的結合対メンバーの連結の場合と同様に、上述のようにジアルデヒド、カルボジイミド連結、ホモ二官能性架橋剤及びヘテロ二官能性架橋剤を使用することによって促進される。

【0119】

選択される標識方法は、酵素及び標識される材料に対して利用可能な官能基、並びに連結条件に対する酵素及び標識される材料の耐性によって決まる。本発明に使用される標識方法は、これらだけに限定されないが、Engvall and Pearlmann, Immunochemistry 8, 871 (1971), Avrameas and Ternynck, Immunochemistry 8, 1175 (1975), Ishikawa et al., J. Immunoassay 4 (3) : 209 - 327 (1983) 及び Jablonski, Anal. Biochem. 148 : 199 (1985) に記載の方法など、現在使用されるあらゆる従来法の1つとすることができます。
10

【0120】

標識は、スペーサー又は特異的結合対の他のメンバーの使用などの間接的方法によることができる。間接的方法の例は、逐次又は同時に添加される非標識ストレプトアビシンとビオチン化酵素を用いたビオチン化抗体の検出である。したがって、本発明によれば、検出に使用される抗体は、レポーターによって直接的に、又は第1の特異的結合対メンバーによって間接的に、検出可能に標識することができる。抗体と第1の特異的結合対メンバーとの連結は、検出は、抗体 - 第1の特異的結合メンバー複合体を第2の標識又は非標識結合対メンバーと上述したように反応させることによって行われる。
20

【0121】

さらに、非標識検出抗体は、非標識抗体を非標識抗体に特異的な標識抗体と反応させることによって検出することができる。この場合、上で使用する「検出可能に標識された」は、非標識抗体に特異的な抗体が結合することができるエピトープを含有することを意味する。かかる抗抗体は、上で考察した手法のいずれかを用いて直接的又は間接的に標識することができる。例えば、抗抗体は、上で考察したストレプトアビシン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ系と反応させることによって検出されるビオチンと連結させることができる。
。

【0122】

本発明の一実施形態において、ビオチンが利用される。ビオチン化抗体は、次いで、ストレプトアビシン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体と反応する。オルトフェニレンジアミン、4 - クロロ - ナフトール、テトラメチルベンジン (TMB) 、ABTS、BT
S 又は ASA を色素検出に使用することができる。
30

【0123】

本発明を実施するための一免疫測定法形式において、捕捉試薬が従来技術を用いて支持体表面に固定されたフォワード (forward) サンドイッチ測定法が使用される。アッセイに使用される適切な支持体として、ポリプロピレン、ポリスチレン、置換ポリスチレン、例えばアミノ化又はカルボキシル化ポリスチレン、ポリアクリルアミド、ポリアミド、ポリ塩化ビニル、ガラスビーズ、アガロース又はニトロセルロースなどの合成高分子支持体が挙げられる。
40

【0124】

本発明は、生体試料中のバイオマーカータンパク質又は核酸の存在を検出するキットも包含する。かかるキットを使用して、被検者が、IGF - 1R キナーゼ阻害剤による阻害に対して影響されにくい腫瘍に罹患しているかどうか、又はその発症リスクが高いかどうかを判定することができる。例えば、キットは、生体試料中のバイオマーカータンパク質又は核酸を検出することができる標識化合物又は標識剤、及び試料中のタンパク質又はmRNA の量を測定する手段 (例えば、タンパク質若しくはその断片に結合する抗体、又はタンパク質をコードするDNA 若しくはmRNA に結合するオリゴヌクレオチドプローブ) を含むことができる。キットは、キットを用いて得られた結果を解釈する説明書を含む
50

こともできる。

【0125】

抗体を用いたキットの場合、キットは、例えば、(1)バイオマーカータンパク質と結合する(例えば、固体支持体に付着した)第1の抗体を含むことができ、(2)タンパク質又は第1の抗体と結合し、検出可能な標識に連結された第2の異なる抗体を場合によっては含んでいてもよい。

【0126】

オリゴヌクレオチドを用いたキットの場合、キットは、例えば、(1)バイオマーカータンパク質をコードする核酸配列とハイブリッド形成するオリゴヌクレオチド、例えば、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド、又は(2)バイオマーカー核酸分子の増幅に有用である1対のプライマーを含むことができる。キットは、例えば、緩衝剤、防腐剤又はタンパク質安定剤を含むこともできる。キットは、検出可能な標識の検出に必要な構成要素(例えば、酵素又は基質)をさらに含むこともできる。キットは、アッセイし、試験試料と比較することができる对照試料又は一連の対照試料を含有することもできる。キットの各構成要素は、個々の容器に封入することができ、種々の容器のすべてを、キットを用いて実施したアッセイの結果を解釈する説明書と一緒に、単一パッケージに入れることができる。

10

【0127】

本発明は、さらに、腫瘍細胞が上皮間葉遷移を起こしたかどうかを評価することによって、例えば、腫瘍細胞上皮及び/又は間葉バイオマーカーの発現レベルを測定する本明細書に記載の方法のいずれかによって、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する患者の想定される応答性を診断する段階と、IGF-1Rキナーゼ阻害剤の治療有効量を前記患者に投与する段階とを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する方法も提供する。この方法に関し、好ましいIGF-1Rキナーゼ阻害剤の例は、薬理学的に許容されるその塩又は多形体を含む、化合物66と類似の特性(例えば、選択性、効力)を有するものである。この方法において、個々の患者に関する任意の追加の状況と組み合わせて、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する患者の考えられる応答性の予測を考慮して、投与医師によって適切であると判断されたときに、1種類又はそれ以上の追加の抗癌剤又は治療をIGF-1Rキナーゼ阻害剤と同時又は逐次投与することができる。

20

【0128】

30

IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する患者の想定される応答性の診断後に、IGF-1Rキナーゼ阻害剤の治療有効量を前記患者に投与する具体的な方法は、主治医の判断によることを医薬分野の当業者は理解する。投与量、他の抗癌剤との組合せ、投与のタイミング及び頻度などを含めた投与の様式は、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する患者の想定される応答性の診断、並びに患者の症状及び病歴によって左右され得る。したがって、腫瘍がIGF-1Rキナーゼ阻害剤に対して感受性が比較的低いと予測されると診断された患者でも、かかる阻害剤、特に他の抗癌剤と組み合わせた阻害剤による、又はIGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する腫瘍の感受性を変化させ得る薬剤による治療の利点が依然として得られ得る。

【0129】

40

本発明は、さらに、腫瘍細胞が上皮間葉遷移を起こしたかどうかを評価することによって、例えば、腫瘍細胞上皮及び/又は間葉バイオマーカーの発現レベルを測定する本明細書に記載の方法のいずれかによって、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する患者の想定される応答性を診断する段階と、患者を、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療に対する有効な応答を示す可能性が高い患者として確認する段階と、IGF-1Rキナーゼ阻害剤の治療有効量を前記患者に投与する段階とを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する方法も提供する。

【0130】

本発明は、さらに、腫瘍細胞が上皮間葉遷移を起こしたかどうかを評価することによって、例えば、腫瘍細胞上皮及び/又は間葉バイオマーカーの発現レベルを測定する本明細

50

書に記載の方法のいずれかによって、IGF-1R キナーゼ阻害剤に対する患者の想定される応答性を診断する段階と、患者を、IGF-1R キナーゼ阻害剤による治療に対する有効な応答を示す可能性が低い、又は可能性がない患者として確認する段階と、前記患者を IGF-1R キナーゼ阻害剤以外の抗癌療法によって治療する段階とを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する方法も提供する。

【0131】

本発明は、さらに、(a) IGF-1R キナーゼ阻害剤に対してある範囲の感受性を示す腫瘍細胞パネル中の上皮バイオマーカー候補の発現レベルを測定すること、及び(b) 腫瘍細胞中の前記上皮バイオマーカー候補の発現レベルと IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性との相関を明らかにすることを含み、上皮バイオマーカーの高いレベルと IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の高い感受性との相関によって、前記上皮バイオマーカーの発現レベルが、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性がその発現レベルによって予示される上皮バイオマーカーを特定する方法も提供する。この方法の一実施形態において、腫瘍細胞パネルは腫瘍細胞系パネルである。別の実施形態において、腫瘍細胞パネルは、患者又は実験動物モデルに由来する腫瘍試料から調製される原発腫瘍細胞パネルである。さらに別の実施形態において、腫瘍細胞パネルは、マウス異種移植片中の腫瘍細胞系パネルであり、腫瘍細胞増殖は、例えば、増殖の分子マーカー又は腫瘍増殖全体の測定、例えば、腫瘍寸法若しくは重量をモニタリングすることによって測定することができる。10

【0132】

本発明は、さらに、(a) IGF-1R キナーゼ阻害剤に対してある範囲の感受性を示す腫瘍細胞パネル中の間葉バイオマーカー候補の発現レベルを測定すること、及び(b) 腫瘍細胞中の前記間葉バイオマーカー候補の発現レベルと IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性との相関を明らかにすることを含み、間葉バイオマーカーの高いレベルと IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の低い感受性との相関によって、前記間葉バイオマーカーの発現レベルが、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性の欠如を予示することが示される、IGF-1R キナーゼ阻害剤による阻害に対する腫瘍細胞増殖の感受性がその発現レベルによって予示される間葉バイオマーカーを特定する方法も提供する。この方法の一実施形態において、腫瘍細胞パネルは腫瘍細胞系パネルである。別の実施形態において、腫瘍細胞パネルは、患者モデルに由来する腫瘍試料から調製される原発腫瘍細胞パネルである。さらに別の実施形態において、腫瘍細胞パネルは、マウス異種移植片中の腫瘍細胞系パネルであり、腫瘍細胞増殖は、例えば、増殖の分子マーカー又は腫瘍増殖全体の測定、例えば、腫瘍寸法若しくは重量をモニタリングすることによって測定することができる。30

【0133】

本発明は、さらに、(a) 腫瘍性症状の患者から得られた新生細胞含有試料中の上皮バイオマーカー候補のレベルを測定すること、及び(b) 患者から得られた試料中の前記上皮バイオマーカー候補のレベルと IGF-1R キナーゼ阻害剤による腫瘍性症状の治療の有効性との相関を求めることが含まれ、上皮バイオマーカーの高いレベルと IGF-1R キナーゼ阻害剤による腫瘍性症状のより有効な治療との相関によって、前記上皮バイオマーカーが、IGF-1R キナーゼ阻害剤による腫瘍性症状のより有効な治療との相関による診断指標になることが示される、IGF-1R キナーゼ阻害剤を用いた腫瘍性症状のより有効な治療の診断指標になる上皮バイオマーカーを特定する方法も提供する。40

【0134】

本発明は、さらに、(a) 腫瘍性症状の患者から得られた新生細胞含有試料中の間葉バイオマーカー候補のレベルを測定すること、及び(b) 患者から得られた試料中の前記間葉バイオマーカー候補のレベルと IGF-1R キナーゼ阻害剤による腫瘍性症状の治療の有効性との相関を求めることが含まれ、間葉バイオマーカーの高いレベルと IGF-1R キ50

ナーゼ阻害剤による腫瘍性症状のさほど有効でない治療との相関によって、前記間葉バイオマーカーが、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による腫瘍性症状のさほど有効でない治療の診断指標になることが示される、IGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いた腫瘍性症状のさほど有効でない治療の診断指標になる間葉バイオマーカーを特定する方法も提供する。

【0135】

上記方法における治療の有効性は、例えば、腫瘍性症状を有する患者における腫瘍サイズの減少を測定することによって、又は腫瘍細胞の増殖度の分子決定要因をアッセイすることによって、求めることができる。

【0136】

本発明は、(a)腫瘍性症状を有する患者から得られた新生細胞含有試料中の上皮バイオマーカー候補のレベルを測定すること、及び(b)患者から得られた試料中の前記上皮バイオマーカー候補のレベルとIGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いて治療したときの患者の生存との相関を求めることを含み、上皮バイオマーカーと前記患者の生存との相関によって、前記上皮バイオマーカーが、IGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いて治療したときの、前記腫瘍性症状を有する患者の延命の診断指標になる、IGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いて治療したときに、腫瘍性症状を有する患者の延命の診断指標になる上皮バイオマーカーを特定する方法を提供する。10

【0137】

本発明は、(a)腫瘍性症状を有する患者から得られた新生細胞含有試料中の間葉バイオマーカー候補のレベルを測定すること、及び(b)患者から得られた試料中の前記間葉バイオマーカー候補のレベルとIGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いて治療したときの患者の生存との逆相関を求めることを含み、間葉バイオマーカーと前記患者の生存との逆相関によって、前記間葉バイオマーカーが、IGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いて治療したときの、前記腫瘍性症状を有する患者の生存短縮の診断指標になる、IGF-1Rキナーゼ阻害剤を用いて治療したときに、腫瘍性症状を有する患者の生存短縮の診断指標になる間葉バイオマーカーを特定する方法を提供する。20

【0138】

本発明は、腫瘍細胞が、以前に上皮間葉遷移した腫瘍細胞として特徴づけられ、前記腫瘍細胞の試料をIGF-1Rキナーゼ阻害剤と接触させること、前記腫瘍細胞の同一試料を試験薬剤の存在下でIGF-1Rキナーゼ阻害剤と接触させること、IGF-1Rキナーゼ阻害剤によって媒介される増殖阻害を試験薬剤の存在下と非存在下で比較すること、並びに試験薬剤がIGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する腫瘍細胞増殖の感受性を高める薬剤であるかどうかを判定することを含む、IGF-1Rキナーゼ阻害剤に対する腫瘍細胞増殖の感受性を高める薬剤を特定する方法を提供する。この方法に関し、好ましいIGF-1Rキナーゼ阻害剤の例は、薬理学的に許容されるその塩又は多形体を含む化合物66と類似の特性を有する化合物である。この方法の一実施形態において、腫瘍細胞試料は、腫瘍細胞系、原発腫瘍細胞培養物などのインビトロでの細胞であり得る。別の実施形態において、腫瘍細胞試料は、マウス異種移植片中の腫瘍細胞などのインビトロでの細胞であり得る。後者の実施形態において、腫瘍細胞増殖は、例えば、増殖の分子マーカー又は腫瘍増殖全体の測定、例えば、腫瘍寸法若しくは重量をモニタリングすることによって測定することができる。30

【0139】

上記方法において試験することができる適切な試験薬剤として、コンピナトリアルライブラリー、特定の化学物質、ペプチド及びペプチド模倣物、オリゴヌクレオチド、及びデイスプレイ（例えばファージディスプレイライブラリー）などの天然物ライブラリー及び抗体産物などが挙げられる。試験薬剤は、例えば1つの反応当たり10種類の物質の初期スクリーニングに使用することができ、阻害又は活性化を示すこれらのバッチの物質を個々に試験することができる。試験薬剤は、1nMから1000μM、好ましくは1μMから100μM、より好ましくは1μMから10μMの濃度で使用することができる。40

【0140】

上記方法によって特定された IGF - 1 R キナーゼ阻害剤に対する腫瘍細胞増殖の感受性を高める薬剤は、（肺癌、又は本明細書に記載の他の癌タイプのいずれかなど）IGF - 1 R キナーゼ阻害剤による阻害に対する応答性が低いことが予測される癌の患者の治療に使用することができ、本発明の追加の実施形態である。したがって、本発明は、さらに、IGF - 1 R キナーゼ阻害剤に関する本明細書に記載する方法など、当分野で公知の方法のいずれかによって処方及び投与することができるかかる薬剤を含む組成物も提供する。IGF - 1 R キナーゼ阻害剤に対する腫瘍細胞増殖の感受性を高めるかかる薬剤は、例えば、間葉上皮遷移（MET）を誘発する薬剤、又はIGF - 1 R キナーゼ阻害剤に対する低感受性の原因である特定の細胞活性を阻害する薬剤、又はIGF - 1 R キナーゼ阻害剤に対する感受性を高める特定の細胞活性を誘導する薬剤であり得る。適切な薬剤の例として、EMT誘発剤の拮抗物質が挙げられる。10

【0141】

本発明は、さらに、IGF - 1 R キナーゼ阻害剤の治療有効量と、さらに、1つ又はそれ以上の他の細胞傷害剤、化学療法剤若しくは抗癌剤又はこのような薬剤の効果を高める化合物とを同時又は逐次的に患者に投与することを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する前記方法も提供する。

【0142】

本発明に関する追加の他の細胞傷害剤、化学療法剤若しくは抗癌剤、又はかかる薬剤の効果を高める化合物として、例えば、シクロホスファミド（CTX；例えば、CYTOXAN（登録商標））、クロランプシル（CHL；例えば、LEUKERAN（登録商標））、シスプラチニン（CisP；例えば、PLATINOL（登録商標））ブルファン（例えば、MYLERAN（登録商標））、メルファラン、カルムスチン（BCNU）、ストレプトゾシン、トリエチレンメラミン（TEM）、マイトイシンCなどのアルキル化剤又はアルキル化作用を有する薬剤；メトレキセート（MTX）、エトポシド（VP16；例えば、VEPESID（登録商標））、6-メルカプトプリン（6MP）、6-チオcグアニン（6TG）、シタラビン（Ara-C）、5-フルオロウラシル（5-FU）、カペシタビン（例えば、XELODA（登録商標））、ダカルバジン（DTIC）などの抗代謝産物；アクチノマイシンD、ドキソルビシン（DXR；例えば、ADRAMYCIN（登録商標））、ダウノルビシン（ダウノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンなどの抗生素質；ビンクリスチン（VCR）、ビンプラスチンなどのビンカアルカロイドなどのアルカロイド、並びにパクリタキセル（例えば、TAXOL（登録商標））及びパクリタキセル（paclitaxel）誘導体、細胞分裂阻害剤、デキサメタゾン（DEX；例えば、DECADRON（登録商標））などのグルココルチコイド及びプレドニゾンなどのコルチコステロイド、ヒドロキシ尿素などのヌクレオシド酵素阻害剤、アスピラギナーゼなどのアミノ酸枯渇酵素、ロイコボリン及び他の葉酸誘導体、類似の多様な制癌剤などの他の制癌剤が挙げられる。以下の薬剤も追加の薬剤として使用することができる：アミフィオスチン（arnifostine）（例えば、ETHYOL（登録商標））、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスター）、ストレプトゾシン、シクロホスファミド、ロムスチン（CCNU）、ドキソルビシンリポ（liposome）（例えば、DOXIL（登録商標））、ゲムシタビン（例えば、GEMZAR（登録商標））、ダウノルビシンリポ（liposome）（例えば、DAUNOXOME（登録商標））、プロカルバジン、マイトイシン、ドセタキセル（例えば、TAXOTERE（登録商標））、アルデスロイキン、カルボプラチニン、オキサリプラチニン、クラドリビン、カンプトセシン、CPT11（イリノテカン）、10-ヒドロキシ7-エチル-カンプトセシン（SN38）、フロクスウリジン、フルダラビン、イホスファミド、イダルビシン、メスナ、インターフェロンベータ、インターフェロンアルファ、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパルガーゼ、ペントスタチン、ピポブロマン、プリカマイシン、タモキシフェン、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテバ、ウラシルマスター、ビノレルビン、クロランプシル。304050

【0143】

本発明は、さらに、IGF-1Rキナーゼ阻害剤の治療有効量と、1種類又はそれ以上の抗ホルモン剤とを同時又は逐次的に患者に投与することを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する上記方法も提供する。ここで用いられているように、「抗ホルモン剤」という用語は、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するよう作用する天然又は合成の有機又はペプチド化合物を含む。

【0144】

抗ホルモン剤として、例えば、ステロイド受容体拮抗物質、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害4(5)-イミダゾール、他のアロマターゼ阻害剤、42-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン(keoxifene)、LY 117018、オナプリストン及びトレミフェン(例えば、FARESTON(登録商標))などの抗エストロゲン；フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド及びゴセレリンなどの抗アンドロゲン；並びに薬剤として許容される、上記いずれかの塩、酸又は誘導体；卵胞刺激ホルモン(FSH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)並びに黄体形成ホルモン(LH)及びLHRH(黄体形成(Leuteinizing)ホルモン放出ホルモン)などの糖タンパク質ホルモンの作動物質及び/又は拮抗物質；ZOLADEX(登録商標)(astrazeneca)として市販されているLHRH作動物質である酢酸ゴセレリン；LHRH拮抗物質D-アラニンアミドN-アセチル-3-(2-ナフタレンイル)-D-アラニル-4-クロロ-D-フェニルアラニル-3-(3-ピリジニル)-D-アラニル-L-セリル-N6-(3-ピリジニルカルボニル)-L-リシリル-N6-(3-ピリジニルカルボニル)-D-リシリル-L-ロイシリル-N6-(1-メチルエチル)-L-リシリル-L-プロリン(例えば、ANTIIDE(登録商標)、Ares-Serono)；LHRH拮抗物質ガニレリクス酢酸塩；ステロイド性抗アンドロゲン酢酸シプロテロン(CPA)及びMEGACE(登録商標)(Bristol-Meyers Oncology)として市販されている酢酸メゲストロール；EULEXIN(登録商標)(Scherling Corp.)として市販されている非ステロイド性抗アンドロゲンであるフルタミド(2-メチル-N-[4,20-ニトロ-3-(トリフルオロメチル)フェニルプロパンアミド)；非ステロイド性抗アンドロゲンであるニルタミド、(5,5-ジメチル-3-[4-ニトロ-3-(トリフルオロメチル-4'-ニトロフェニル)-4,4-ジメチル-イミダゾリジン-ジオン)；並びにRAR、RXR、TR、VDRなどの拮抗物質などの他の非許容受容体拮抗物質が挙げられる。

【0145】

化学療法計画における上記細胞傷害剤及び他の抗癌剤の使用は、癌治療分野において一般特徴が明らかにされており、ここにおけるその使用も、耐性及び有効性のモニタリング並びに投与経路及び投与量の制御について、幾らかの調節の上、同様に考慮される。例えば、細胞毒性薬の実際の投与量は、組織培養法を使用することによって求められる、患者の培養細胞応答に応じて変化し得る。一般に、投与量は、追加の他の薬剤の非存在下で使用される量よりも減少する。

【0146】

有効な細胞毒性薬の典型的な投与量は、製造者によって推奨される範囲内であり得、インビトロでの応答又は動物モデルにおける応答によって示される場合に、最高で約1桁の濃度又は量減少させ得る。したがって、実際の投与量は、医師の判断、患者の状態、及び悪性細胞の初代培養若しくは組織試料の組織培養のインビトロでの応答性に基づく、又は適切な動物モデルにおいて観察される応答に基づく治療方法の有効性によって決まる。

【0147】

本発明は、さらに、IGF-1Rキナーゼ阻害剤の治療有効量と、さらに、1種類又はそれ以上の血管新生阻害剤とを同時又は逐次的に患者に投与することを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する上記方法も提供する。

【0148】

抗血管新生剤として、例えば、SU-5416及びSU-6668(Sugen Inc.

c. of South San Francisco, Calif., USA) 又は例えば、国際公開第99/244440号、同99/62890号、同95/21613号、同99/61422号、同98/50356号、同99/10349号、同97/32856号、同97/22596号、同98/54093号、同98/02438号、同99/16755号及び同98/02437号並びに米国特許第5,883,113号、同5,886,020号、同5,792,783号、同5,834,504号及び同6,235,764号に記載のものなどのVEGFR阻害剤；IM862(Cytran Inc. of Kirkland, Wash., USA)などのVEGF阻害剤；angiomye、Ribozyme社(Boulder, Colo.)とChiron社(Emeryville, Calif.)製の合成リボザイム；及びベバシズマブ(例えば、AVASTIN(商標)、Genentech、South San Francisco、CA)、VEGFに対する組み換えヒト化抗体などのVEGFに対する抗体；¹⁰
^v₃、^v₅及び^v₆インテグリン並びにそのサブタイプ、例えば、シレンギチド(cilengitide)(EMD 121974)などのインテグリン受容体拮抗物質及びインテグリン拮抗物質又は例えば、^v₃特異的ヒト化抗体(例えば、VITAXIN(登録商標))などの抗インテグリン抗体；IFN-アルファ(米国特許第41530,901号、同4,503,035号及び同5,231,176号)などの因子；アンギオスタチン及びプラスミノゲン断片(例えば、クリングル1-4、クリングル5、クリングル1-3(O'Reilly, M.S. et al. (1994) Cell 79:315-328; Cao et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:29461-29467; Cao et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:22924-22928)；エンドスタチン(O'Reilly, M.S. et al. (1997) Cell 88:277及び²⁰
³⁰国際公開第97/15666号)；トロンボスポンジン(TSP-1; Frazier, (1991) Curr. Opin. Cell Biol. 3:792)；血小板因子4(PF4)；プラスミノゲンアクチベーター／ウロキナーゼ阻害剤；ウロキナーゼ受容体拮抗物質；ヘパリナーゼ；TNF-4701などのフマギリン類似体；スラミン及びスラミン類似体；血管新生抑制(angiotensin)ステロイド；bFGF拮抗物質；flik-1及びf1t-1拮抗物質；MMP-2(マトリックス-メタロプロテイナーゼ2)阻害剤及びMMP-9(マトリックス-メタロプロテイナーゼ9)阻害剤などの抗血管新生剤が挙げられる。有用なマトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤の例は、国際公開第96/33172号、同96/27583号、同98/07697号、同98/03516号、同98/34918号、同98/34915号、同98/33768号、同98/30566号、同90/05719号、同99/52910号、同99/52889号、同99/29667号及び同99/07675号、欧州特許公報第818,442号、同780,386号、同1,004,578号、同606,046号及び同931,788号；英国特許公報第9912961号及び米国特許第5,863,949号及び同5,861,510号である。好みいMMP-2及びMMP-9阻害剤は、MMP-1を阻害する活性をほとんど又は全く持たない阻害剤である。他のマトリックス-メタロプロテイナーゼ(すなわちMMP-1、MMP-3、MMP-4、MMP-5、MMP-6、MMP-7、MMP-8、MMP-10、MMP-11、MMP-12及びMMP-13)に対して、MMP-2及び/又はMMP-9を選択的に阻害する阻害剤がより好みい。⁴⁰

【0149】

本発明は、さらに、IGF-1Rキナーゼ阻害剤の治療有効量と、及び、さらに、1種類又はそれ以上の腫瘍細胞アポトーシス促進剤又はアポトーシス刺激剤とを同時又は逐次的に患者に投与することを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する上記方法も提供する。

【0150】

本発明は、さらに、IGF-1Rキナーゼ阻害剤の治療有効量と、及び、さらに、1種

類又はそれ以上のシグナル伝達阻害剤とを同時又は逐次的に患者に投与することを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する上記方法も提供する。

【0151】

シグナル伝達阻害剤として、有機分子、例えば、エルロチニブHCL(TARCEVA(登録商標))又はEGF受容体に結合する抗体などのEGFRキナーゼ阻害剤、例えば、有機分子などのerbB2受容体阻害剤又はerbB2受容体に結合する抗体、例えば、トラスツヅマブ(例えば、HERCEPTIN(登録商標))；他のタンパク質チロシン-キナーゼ阻害剤、例えば、イマチニブ(imatinib)(例えば、GLEEVEC(登録商標))；ras阻害剤；raf阻害剤(例えば、BAY 43-9006、Onyx Pharmaceuticals/Bayer Pharmaceuticals)；MEK阻害剤；mTOR阻害剤；サイクリン依存性キナーゼ阻害剤；プロテインキナーゼC阻害剤；及びPDK-1阻害剤(かかる阻害剤の幾つかの例の記述、及び癌治療の臨床試験におけるその使用については、Dancey, J. and Sausville, E.A. (2003) Nature Rev. Drug Discovery 2: 92-313を参照されたい。)が挙げられる。
10

【0152】

EGFR阻害剤には、例えば、[6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)-4-キナゾリン-4-イル]-(3-エチルフェニル)アミン(OSI-774、エルロチニブ又はTARCEVATM(エルロチニブHCl)としても知られる；OSI Pharmaceuticals/Genentech/Roche)(米国特許第5,747,498号；国際特許公報WO01/34574及びMoyer, J. D. et al. (1997) Cancer Res. 57: 4838-4848)；CI-1033(従来、PD 183805として知られていた。；Pfizer)(Sherwood et al., 1999, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 40: 723)；PD-158780(Pfizer)；AG-1478(University of California)；CGP-59326(Novartis)；PKI-166(Novartis)；EKB-569(Wyeth)；GW-2016(GW-572016又はニトシリ酸ラバチニブとしても知られる；GSK)；ゲフィチニブ(ZD1839又はIRESSATMとしても知られる；Astrazeneca)(Woodburn et al., 1997, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 38: 633)；及び抗体をベースとしたEGFRキナーゼ阻害剤が含まれる。本発明において使用することができる特に好ましい小分子量EGFRキナーゼ阻害剤は、[6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)-4-キナゾリン-4-イル]-(3-エチルフェニル)アミン(すなわち、エルロチニブ)、その塩酸塩(すなわち、エルロチニブHCl、TARCEVATM)又はその他の塩形態(例えば、メシル酸エルロチニブ)である。抗体をベースとしたEGFRキナーゼ阻害剤には、その天然リガンドによって、EGFRの活性化を部分的又は完全に遮断することができる全ての抗EGFR抗体又は抗体断片が含まれる。抗体をベースとするEGFRキナーゼ阻害剤の非限定的な例には、「Modjtahedi, H., et al., 1993, Br. J. Cancer 67: 247-253; Teramoto, T., et al., 1996, Cancer 77: 639-645; Goldstein et al., 1995, Clin. Cancer Res. 1: 1311-1318; Huang, S. M., et al., 1999, Cancer Res. 15: 59(8): 1935-40; and Yang, X., et al., 1999, Cancer Res. 59: 1236-1243」に記載されているものが含まれる。従って、EGFRキナーゼ阻害剤は、モノクローナル抗体Mab E7.6.3(Yang, X. D. et al. (1999) Cancer Res. 59: 1236-43)又はMab C225(ATCC受託番号HB-8508)又は抗体若しくは結合特異性を有するその抗体断片であり得る。適切なモノクローナル抗体EGFRキナーゼ阻害剤には、IMC-C225(セツキシマブ又はERBITUXTMとしても知られる；Imclone Systems)、ABX-EGF(Abgenix)、EM
20
30
40
50

D 7 2 0 0 0 (Merck KgaA、Darmstadt)、R H 3 (York Medical Bioscience Inc.) 及びMDX - 4 4 7 (Medarex/Merck KgaA) が含まれるが、これらに限定されない。

【0153】

ErbB2受容体阻害剤として、例えば、GW - 2 8 2 9 7 4 (Glaxo Wellcome plc)などのErbB2受容体阻害剤、AR - 2 0 9 (Aronex Pharmaceuticals Inc. of Woodlands, Tex.、USA)及び2B - 1 (Chiron)などのモノクローナル抗体、並びに国際公開第98/02434号、同99/35146号、同99/35132号、同98/02437号、同97/13760号及び同95/19970号並びに米国特許第5,587,458号、同5,877,305号、同6,465,449号及び同6,541,481号に記載のものなどのerbB2阻害剤が挙げられる。10

【0154】

本発明は、さらに、IGF - 1 R キナーゼ阻害剤の治療有効量と、さらに、抗HER2抗体又は免疫療法的に活性なその断片とを同時又は逐次的に患者に投与することを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する上記方法も提供する。

【0155】

本発明は、さらに、IGF - 1 R キナーゼ阻害剤の治療有効量と、さらに、1種類又はそれ以上の追加の抗増殖剤とを同時又は逐次的に患者に投与することを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する上記方法も提供する。20

【0156】

追加の抗増殖剤として、例えば、米国特許第6,080,769号、同6,194,438号、同6,258,824号、同6,586,447号、同6,071,935号、同6,495,564号、同6,150,377号、同6,596,735号及び同6,479,513号並びに国際公開第01/40217号に開示及び特許請求されている化合物など、酵素ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼの阻害剤及び受容体チロシンキナーゼPDGFRの阻害剤が挙げられる。

【0157】

本発明は、さらに、IGF - 1 R キナーゼ阻害剤の治療有効量と、さらに、COX II (シクロオキシゲナーゼII) 阻害剤とを同時又は逐次的に患者に投与することを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する上記方法も提供する。有用なCOX - II 阻害剤の例として、アレコキシブ (alecoxib) (例えば、CELEBREX (商標))、バルデコキシブ及びロフェコキシブが挙げられる。30

【0158】

本発明は、さらに、IGF - 1 R キナーゼ阻害剤の治療有効量と、さらに、放射線治療又は放射性医薬品とを同時又は逐次的に患者に投与することを含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する上記方法も提供する。

【0159】

放射線源は、治療する患者の外部でも内部でもよい。放射線源が患者の外部にあるときは、療法は外照射療法 (EBRT) として知られている。放射線源が患者の内部にあるときは、治療は近接照射療法 (BT) と称される。本発明に関連して使用される放射性原子は、ラジウム、セシウム - 137、イリジウム - 192、アメリシウム - 241、金 - 198、コバルト - 57、銅 - 67、テクネチウム - 99、ヨウ素 - 123、ヨウ素 - 131及びインジウム - 111など(ただし、これらだけに限定されない。)の群から選択することができる。本発明によるIGF - 1 R キナーゼ阻害剤が抗体である場合、抗体をかかる放射性同位体で標識することもできる。40

【0160】

放射線療法は、切除不能又は手術不能な腫瘍及び/又は腫瘍転移を制御する標準的な治療である。放射線療法を化学療法と組み合わせたときに、結果が改善される。放射線療法は、標的領域に対して与えられた高線量照射によって、腫瘍組織と正常組織の両方におけ50

る生殖細胞が死滅するという原理に基づく。照射投与計画は、一般に、放射線吸收線量 (Gy)、時間及び分割法の点から規定され、腫瘍専門医によって慎重に規定されなければならない。患者が受ける照射量は、種々考慮して決まるが、2つの最も重要なことは、体の他の重要な構造又は器官に対する腫瘍の場所と腫瘍の拡散度である。放射線療法を受けている患者の典型的な治療コースは、1から6週間の治療スケジュールであり、総線量10から80 Gyを患者に約1.8から2.0 Gyで1日1回、週5日分割投与する。本発明の好ましい実施形態において、ヒト患者における腫瘍を本発明と放射線の併用治療によって治療したときに相乗作用がある。換言すれば、本発明の組合せを構成する薬剤による腫瘍増殖阻害は、放射線と併用したときに、場合によってはさらに化学療法剤又は抗癌剤と併用したときに増強される。補助放射線療法のパラメータは、例えば、国際公開第99/60023号に記載されている。

【0161】

本発明は、さらに、IGF-1Rキナーゼ阻害剤の治療有効量を患者に投与すること、及び、さらに、抗腫瘍免疫応答を増強することができる1種類又はそれ以上の薬剤による同時又は逐次的治療を含む、患者における腫瘍又は腫瘍転移を治療する方法も提供する。

【0162】

抗腫瘍免疫応答を増強することができる薬剤として、例えば、CTLA4（細胞傷害性リンパ球抗原4）抗体（例えば、MDX-CTLA4）、及びCTLA4を遮断することができる他の薬剤が挙げられる。本発明に使用することができる特異的CTLA4抗体として、米国特許第6,682,736号に記載の抗体などが挙げられる。

【0163】

本発明に関連して、薬剤又は療法の「有効量」は上で定義した通りである。薬剤又は療法の「治療量未満」は、薬剤又は療法の有効量未満の量であるが、別の薬剤又は療法の有効量又は治療量未満と組み合わせたときに、例えば、得られる有効な効果における相乗作用のために、又は副作用が減少するために、医師が望む結果をもたらすことができる。

【0164】

本明細書では「患者」という用語は、好ましくは、あらゆる目的でIGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療を要するヒトを指し、より好ましくは、癌又は前癌状態若しくは病変の治療を要するヒトを指す。しかし、「患者」という用語は、非ヒト動物、好ましくはイヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ及び非ヒト靈長目などのほ乳動物、とりわけ、IGF-1Rキナーゼ阻害剤による治療を要するほ乳動物も表し得る。

【0165】

好ましい実施形態において、患者は、癌、前癌状態若しくは病変又は他の異常細胞増殖形態の治療を要するヒトである。癌は、好ましくは、IGF-1Rキナーゼ阻害剤の投与によってある程度又は完全に治療可能である任意の癌である。癌は、例えば、下記癌のいずれかの難治性癌など、肺癌、非小細胞肺（NSCLC）癌、細気管支肺胞（bronchial oval violar）癌、骨癌、すい癌、皮膚癌、頭部又は頸部癌、皮膚黒色腫又は眼内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌（stomach cancer）、胃癌（gastric cancer）、結腸癌、乳癌、子宮癌、ファロビウス管の癌腫、子宮内膜の癌腫、頸部の癌腫、臍の癌腫、外陰部の癌腫、ホジキン病、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟部組織の肉腫、尿道癌、陰茎癌、前立腺癌、ぼうこう癌、腎癌又は尿管癌、腎細胞癌、腎うの癌腫、中皮腫、肝細胞癌、胆道癌、慢性若しくは急性白血病、リンパ球性リンパ腫、中枢神経系（CNS）の新生物、脊髄軸腫瘍、脳幹神経こう腫、多形性こう芽腫、星状細胞腫、シュワン腫、上衣細胞腫、髓芽腫、髓膜腫、へん平上皮癌、下垂体腺腫、又は上記癌の1つ若しくはそれ以上の組合せであり得る。前癌状態又は病変として、例えば、口腔白板症、光線性角化症（日光性角化症）、結腸又は直腸の前癌ポリープ、胃上皮形成異常、腺腫性異形成、遺伝性非腺腫性大腸癌症候群（HNPCC）、バレット食道、ぼうこう異形成及び頸部前癌状態からなる群が挙げられる。

【0166】

10

20

30

40

50

本明細書において使用される「難治性」という用語は、治療（例えば、化学療法薬、生物剤及び／又は放射線療法）が無効であることが証明された癌を定義するために使用される。難治性の癌腫瘍は、縮小し得るが、治療が有効であると決定された点までは縮小しない。しかしながら、典型的には、この腫瘍は、治療前と同じサイズに留まり（安定な疾病）又は増大する（進行性の疾病）。

【0167】

本発明では IGF - 1R キナーゼ阻害剤と追加の抗癌剤（両方の成分を以下では「2種類の活性薬剤」と称する。）「の同時投与」及び「を同時投与する」とは、2種類の活性薬剤の別個又は一緒の任意の投与を指す。2種類の活性薬剤は、併用療法の利点が得られるように設計された適切な投薬計画の一部として投与される。したがって、2種類の活性薬剤は、同じ薬剤組成物の一部として、又は別個の薬剤組成物として、投与することができる。追加の薬剤は、IGF - 1R キナーゼ阻害剤の投与前に、投与と同時に、若しくは投与に続いて投与することができ、又はそれらの組合せとして投与することができる。IGF - 1R キナーゼ阻害剤を、例えば標準治療コース中に、患者に繰り返して投与する場合、追加の薬剤を、IGF - 1R キナーゼ阻害剤又はそれらの何らかの組合せの各投与前に、投与と同時に、若しくは投与に続いて、又は IGF - 1R キナーゼ阻害剤治療に対して異なる間隔で投与することができ、又は IGF - 1R キナーゼ阻害剤を用いた治療コースの前に、治療コース中の任意の時間に、若しくは治療コースに続いて単回投与することができる。10

【0168】

IGF - 1R キナーゼ阻害剤は、典型的に、当分野で公知の、また、例えば国際公開第 01 / 34574 号に開示された、患者が治療を受ける癌の（効力と安全性の両方の観点から）最も有効な治療をもたらす投薬計画で患者に投与される。本発明による治療方法を実施する際、IGF - 1R キナーゼ阻害剤は、治療する癌のタイプ、使用する IGF - 1R キナーゼ阻害剤のタイプ（例えば、小分子、抗体、RNAi、リボザイム又はアンチセンス構築体）及び、例えば公開された臨床試験の結果に基づく、処方医師の医学的判断に応じて、経口、局所、静脈内、腹膜内、筋肉内、関節内、皮下、鼻腔内、眼球内、膣、直腸又は皮内経路などの、当分野で公知の任意の有効な様式で投与することができる。20

【0169】

投与される IGF - 1R キナーゼ阻害剤の量及び IGF - 1R キナーゼ阻害剤投与のタイミングは、治療されている患者のタイプ（人種、性別、年齢、重量など）及び状態、治療されている疾患又は症状の重症度、並びに投与経路に応じて決まる。例えば、小分子 IGF - 1R キナーゼ阻害剤は、患者に 0.001 から 100 mg / kg 体重 / 日若しくは週の用量で単回若しくは分割投与することができ、又は連続注入することができる（例えば、国際公開第 01 / 34574 号参照）。特に、化合物 66 などの化合物又は類似の化合物は、患者に 5 - 200 mg / 日若しくは 100 - 1600 mg / 週の範囲の用量で単回若しくは分割投与することができ、又は連続注入することができる。好みの用量は 150 mg / 日である。抗体を用いた IGF - 1R キナーゼ阻害剤又はアンチセンス、RNAi 若しくはリボザイム構築体は、患者に 0.1 から 100 mg / kg 体重 / 日若しくは週の範囲の用量で単回若しくは分割投与することができ、又は連続注入することができる。前記範囲の下限未満の投与量レベルが十二分である場合もあるが、さらに多い用量が、1 日を通して幾つかの小投与用量にまず分割すれば、有害な副作用を何ら起こさずに使用できる場合もある。30

【0170】

IGF - 1R キナーゼ阻害剤と他の追加の薬剤は、同じ又は異なる経路によって、別個に又は一緒に、また、多種多様な剤形で、投与することができる。例えば、IGF - 1R キナーゼ阻害剤は、好みの、経口又は非経口投与される。IGF - 1R キナーゼ阻害剤が化合物 66 又は類似のこののような化合物である場合には、経口投与が好み。IGF - 1R キナーゼ阻害剤と他の追加の薬剤の両方を単回又は複数回投与することができる。40

【0171】

I G F - 1 R キナーゼ阻害剤は、薬剤として許容される種々の不活性担体と一緒に、錠剤、カプセル剤、舐剤、トローチ剤、ハードキャンデー剤、散剤、噴霧剤、クリーム剤、軟膏剤(salve)、坐剤、ゼリー剤、ゲル剤、ペースト剤、ローション剤、軟膏剤(ointment)、エリキシル剤、シロップ剤などの形で投与することができる。かかる剤形の投与は、単回又は複数回用量で実施することができる。担体として、固体希釈剤又は充填剤、無菌水性媒体及び種々の無毒有機溶媒などが挙げられる。経口薬剤組成物は、適切に甘くし、及び／又は香味づけすることができる。

【0172】

I G F - 1 R キナーゼ阻害剤は、噴霧剤、クリーム剤、軟膏剤(salve)、坐剤、ゼリー剤、ゲル剤、ペースト剤、ローション剤、軟膏剤(ointment)などの形で、薬剤として許容される種々の不活性担体と組み合わせることができる。かかる剤形の投与は、単回又は複数回用量で実施することができる。担体としては、固体希釈剤又は充填剤、無菌水性媒体及び種々の無毒有機溶媒などが挙げられる。10

【0173】

タンパク質性 I G F - 1 R キナーゼ阻害剤を含む全製剤は、阻害剤の変性及び／又は分解及び生物活性喪失を回避するように選択すべきである。

【0174】

I G F - 1 R キナーゼ阻害剤を含む薬剤組成物の調製方法は当分野で公知であり、例えば国際公開第01/34574号に記載されている。本発明の教示を考慮して、I G F - 1 R キナーゼ阻害剤を含む薬剤組成物の調製方法は、上記刊行物及びRemington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 18th edition (1990)などの他の公知参考文献から明らかである。20

【0175】

I G F - 1 R キナーゼ阻害剤の経口投与のために、活性薬剤の一方又は両方を含有する錠剤を、例えば、微結晶セルロース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸二カルシウム及びグリシンなどの種々の賦形剤のいずれか、デンプン(好ましくは、トウモロコシ、ジャガイモ又はタピオカデンプン)、アルギン酸及びある種の複合シリカートなどの種々の崩壊剤、ポリビニルピロリドン、スクロース、ゼラチン及びアラビアゴムのような造粒結合剤と組み合わせる。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウム及びタルクなどの潤滑剤は、錠剤化目的に極めて有用であることが多い。類似のタイプの固体組成物は、ゼラチンカプセル中の充填剤として使用することもできる。これに関連して好ましい材料として、ラクトース又は乳糖並びに高分子量ポリエチレングリコールなども挙げられる。水性懸濁液剤及び／又はエリキシル剤が経口投与に対して望ましいとき、I G F - 1 R キナーゼ阻害剤を種々の甘味剤又は香味料、着色剤又は色素と組み合わせることができ、所望の場合には、同様に乳化剤及び／又は懸濁剤と、水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン及びこれらの種々の類似の組み合せなどの希釈剤と一緒に組み合わせることができる。30

【0176】

活性薬剤の一方又は両方の非経口投与の場合、ゴマ若しくは落花生油溶液又はプロピレングリコール水溶液、並びに活性薬剤又は対応するその水溶性塩を含む無菌水溶液を使用することができる。かかる無菌水溶液は、好ましくは適切に緩衝され、また、好ましくは例えば十分な食塩水又はグルコースによって等張性にされている。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下及び腹腔内注射用に特に適切である。油状溶液は、関節内、筋肉内及び皮下注射用に適切である。これらの全溶液の無菌条件下での調製は、当業者に周知の標準製薬技術によって容易に実施することができる。タンパク質 I G F - 1 R キナーゼ阻害剤の投与に選択される任意の非経口製剤は、阻害剤の変性及び生物活性の喪失を回避するように選択すべきである。

【0177】

50

30

40

50

さらに、活性薬剤の一方又は両方を、標準製薬実務に従って、例えば、クリーム剤、ローション剤、ゼリー剤、ゲル剤、ペースト剤、軟膏剤（ointment）、軟膏剤（salve）などとして、局所投与することができる。例えば、濃度約0.1%（w/v）から約5%（w/v）のIGF-1Rキナーゼ阻害剤を含む局所製剤を調製することができる。

【0178】

獣医学目的のために、活性薬剤は、上記剤形のいずれかを用いて、また、上記経路のいずれかによって、別個に又は一緒に動物に投与することができる。好ましい実施形態において、IGF-1Rキナーゼ阻害剤をカプセル剤、ボーラス、錠剤、水薬（liquid drench）の形で、注射によって、又は移植片として、投与する。別法として、IGF-1Rキナーゼ阻害剤を動物飼料と一緒に投与することができる。このために、濃厚飼料添加剤又は混合飼料を、正常な動物飼料用に調製することができる。かかる製剤は、標準獣医実務に従って従来の様式で調製される。

【0179】

本明細書では「IGF-1Rキナーゼ阻害剤」という用語は、当分野で現在公知である、又は将来確認される、任意のIGF-1Rキナーゼ阻害剤を指し、患者に投与すると、さもなければその天然リガンドがIGF-1Rと結合することによって生じる下流の生物学的効果のいずれかなど、患者におけるIGF-1受容体の活性化に関連した生物活性を、阻害する任意の化学物質を含む。かかるIGF-1Rキナーゼ阻害剤として、IGF-1Rの活性化を遮断することができる、又は患者における癌治療に関連する、IGF-1R活性化の下流の生物学的効果のいずれかを遮断することができる、任意の薬剤などが挙げられる。かかる阻害剤は、受容体の細胞内ドメインに直接結合し、そのキナーゼ活性を阻害することによって作用することができる。或いは、かかる阻害剤は、IGF-1受容体のリガンド結合部位又はその一部を占め、それによってその天然リガンドを受容体に近づきにくくして、その正常な生物活性を阻止又は抑制することによって作用することができる。或いは、かかる阻害剤は、IGF-1Rポリペプチドの2量体化、若しくはIGF-1Rポリペプチドと他のタンパク質の相互作用を調節することによって作用することができ、又はIGF-1Rのユビキチン化及びエンドサイトーシス分解を増強することができる。IGF-1Rキナーゼの阻害は、IGF-1Rを活性化するために利用可能なIGF-1の量を低下させることによって、例えば、IGF-1のIGF-1受容体への結合を拮抗することによって、IGF-1のレベルを低下させることによって、又はIGF結合タンパク質などのIGF-1R以外のタンパク質（例えば、IGFBP3）とのIGF-1の会合を促進することによって作用することも可能である。IGF-1Rキナーゼ阻害剤として、低分子量阻害剤、抗体又は抗体断片、アンチセンス構築体、短い抑制性RNA（すなわち、dsRNAによるRNA干渉；RNAi）及びリボザイムなどが挙げられるが、これらだけに限定されない。好ましい実施形態において、IGF-1Rキナーゼ阻害剤は、ヒトIGF-1Rに特異的に結合する小さい有機分子又は抗体である。

【0180】

IGF-1Rキナーゼ阻害剤には、例えば、イミダゾピラジンIGF-1Rキナーゼ阻害剤、キナゾリンIGF-1Rキナーゼ阻害剤、ピリド-ピリミジンIGF-1Rキナーゼ阻害剤、ピリミド-ピリミジンIGF-1Rキナーゼ阻害剤、ピロロ-ピリミジンIGF-1Rキナーゼ阻害剤、ピラゾロ-ピリミジンIGF-1Rキナーゼ阻害剤、フェニルアミノ-ピリミジンIGF-1Rキナーゼ阻害剤、オキシインドールIGF-1Rキナーゼ阻害剤、インドロカルバゾールIGF-1Rキナーゼ阻害剤、フタラジンIGF-1Rキナーゼ阻害剤、イソフラボンIGF-1Rキナーゼ阻害剤、キナロン（quinalone）IGF-1Rキナーゼ阻害剤及びチロホスチンIGF-1Rキナーゼ阻害剤並びにこのようなIGF-1Rキナーゼ阻害剤の医薬として許容される全ての塩及び溶媒和物が挙げられる。

【0181】

IGF-1Rキナーゼ阻害剤のさらなる例としては、イミダゾピラジンIGF-1Rキ

10

20

30

40

50

ナーゼ阻害剤を記載している国際特許公報WO05/037836、IGF-1R関連疾患を治療するためのピリミジンを記載している国際特許公報WO03/018021及びWO03/018022、シクロリグナン及びIGF-1R阻害剤としてのシクロリグナンを記載している国際特許公報WO02/102804及びWO02/102805、IGF-1Rチロシンキナーゼの阻害に対して応答する疾病を治療するためのピロロピリミジンを記載している国際特許公報WO02/092599、チロシンキナーゼ阻害剤としてピロロピリミジンを記載している国際特許公報WO01/72751、及びキナーゼのピロロトリアジン阻害剤を記載している国際特許公報WO00/71129並びにピロロ[2,3-d]ピリミジン及びチロシンキナーゼ阻害剤としてのそれらの使用を記載している国際特許公報WO97/28161、インビトロ及びインビボでIGF-1R阻害活性を有するチロホスチンを記載しているParrizasら(Endocrinology, 138: 1427-1433 (1997))、IGF-1R阻害剤としてのヘテロアリール-アリール尿素を記載している国際特許公報WO00/35455、IGF-1Rの調節物質として、ピリミジン誘導体を記載している国際特許公報WO03/048133、キナーゼタンパク質に対する阻害的効果を有する化学的化合物を記載している国際特許公報WO03/024967、WO03/035614、WO03/035615、WO03/035616及びWO03/035619、過剰増殖症状を治療するための方法及び組成物を記載している国際特許公報WO03/068265、タンパク質キナーゼ阻害剤としてのピロロピリミジンを記載している国際特許公報WO00/17203、セフエム化合物、その產生及び抗微生物組成物を記載している日本国特許公開JP07/133280、ブテリジン研究及び4位が置換されていないブテリジンを記載するAlbert, A. et al., Journal of the Chemical Society, 11: 1540-1547 (1970)、並びに3,4-ジヒドロブテリジンを介して、ピラジンからブテリジン(4位が置換されていない)の合成を記載するAlbert et al., Chem. Biol. Pteridines Proc. Int. Symp., 4th, 4: 1-5 (1969)中のものが含まれる。

【0182】

本発明において使用することができるIGF-1Rキナーゼ阻害剤の具体例は、h7C10(Centre de Recherche Pierre Fabre)、IGF-1アンタゴニスト；EM-164(ImmunoGen Inc.)、IGF-1R調節物質；CP-751871(Pfizer Inc.)、IGF-1アンタゴニスト；ランレオチド(Ipsen)、IGF-Iアンタゴニスト；IGF-1Rオリゴヌクレオチド(Lynx Therapeutics Inc.)；IGF-1オリゴヌクレオチド(National Cancer Institute)；Novartisによって開発されているIGF-1Rタンパク質-チロシンキナーゼ阻害剤(例えば、NVP-AEW541, Garcia-Echeverria, C et al. (2004) Cancer Cell 5: 231-239; 又はNVP-ADW742, Mitsiades, CS. et al. (2004) Cancer Cell 5: 221-230); IGF-1Rタンパク質-チロシンキナーゼ阻害剤(Ontogen Corp); AG-1024(Camirand, A. et al. (2005) Breast Cancer Research 7: R570-R579(DOI 10.1186/bcr1028); Camirand, A. and Pollak, M. (2004) Brit. J. Cancer 90: 1825-1829; Pfizer Inc.)及びIGF-1アンタゴニスト；チルフォスチンAG-538及びI-OMe-AG538; BMS-536924、IGF-1Rの小分子阻害剤；及びPNU-145156E(Pharmacia & Upjohn SpA)、IGF-1アンタゴニストが挙げられる。

【0183】

抗体を用いたIGF-1Rキナーゼ阻害剤として、その天然リガンドによるIGF-1R活性化をある程度又は完全に遮断することができるあらゆる抗IGF-1R抗体又は抗

10

20

30

40

50

体断片などが挙げられる。抗体を用いたIGF-1Rキナーゼ阻害剤として、IGF-1Rの活性化をある程度又は完全に遮断することができる全ての抗IGF-1抗体又は抗体断片も挙げられる。抗体を用いたIGF-1Rキナーゼ阻害剤の非限定的例としては、Larsson, O. et al (2005) Brit. J. Cancer 92: 2097-2101及びIbrahim, Y.H. and Yee, D. (2005) Clin. Cancer Res. 11: 944s-950sに記載されているもの、又はImclone(例えば、A12)若しくはScherling-Plough Research Instituteによって開発されているもの(例えば、19D12; 又は米国特許出願公開US2005/0136063A1及び同2004/0018191A1に記載されている)が挙げられる。IGF-1Rキナーゼ阻害剤は10、モノクローナル抗体、又は抗体若しくは結合特異性を有する抗体断片であり得る。

【0184】

抗体を用いたさらに別のIGF-1Rキナーゼ阻害剤は、公知の方法に従って、例えば、とりわけ、ブタ、ウシ、ウマ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ及びマウスから選択される宿主動物に、適切な抗原又はエピトープを投与することによって、生産することができる。当分野で公知の種々のアジュvantを使用して、抗体産生を増加させることができる。

【0185】

本発明の実施に有用である抗体はポリクローナルとすることもできるが、モノクローナル抗体が好ましい。IGF-1Rに対するモノクローナル抗体は、培養中の連続細胞系によって抗体分子を產生する任意の技術を用いて、調製し、単離することができる。產生及び単離技術として、Kohler及びMilsteinによって最初に記述されたハイブリドーマ技術(Nature, 1975, 256: 495-497); ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72; Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 2026-2030)及びEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)などが挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0186】

或いは、単鎖抗体の產生について記述された技術(例えば、米国特許第4,946,778号参照)を改作して、抗IGF-1R単鎖抗体を生産することができる。本発明の実施に有用である、抗体を用いたIGF-1Rキナーゼ阻害剤として、完全な抗体分子のペプシン消化によって生成し得るF(ab')₂断片、及びF(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成し得るFab断片など(ただし、これらだけに限定されない。)、抗IGF-1R抗体断片なども挙げられる。或いは、Fab及び/又はscFv発現ライブラリーを構築して(例えば、Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281参照)、IGF-1Rに対して所望の特異性を有する断片を迅速に特定することができる。

【0187】

モノクローナル抗体及び抗体断片の產生及び単離技術は当分野で周知であり、Harlow and Lane, 1988, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory及びJ.W. Godding, 1986, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, Londonに記載されている。ヒト化抗IGF-1R抗体及び抗体断片も、Vaughn, T.J. et al., 1998, Nature Biotech. 16: 535-539及びその中で引用されている参考文献に記載の技術などの公知技術によって調製することができ、かかる抗体又はその断片も本発明の実施に有用である。

【0188】

10

20

30

40

50

或いは、本発明に使用する IGF - 1 R キナーゼ阻害剤は、アンチセンスオリゴヌクレオチド構築体に基づくことができる。アンチセンス RNA 分子及びアンチセンス DNA 分子など、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、細胞中で IGF - 1 R mRNA に結合して、タンパク質翻訳を阻止し、又は mRNA 分解を増加させて、IGF - 1 R キナーゼタンパク質のレベルを減少させ、従って活性を減少させることによって、IGF - 1 R mRNA の翻訳を直接遮断するように作用する。例えば、少なくとも約 15 塩基からなり、IGF - 1 R をコードする mRNA 転写配列特有の領域に相補的であるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば従来のリン酸ジエステル技術によって合成することができ、例えば静脈内注射又は注入によって投与することができる。配列が既知である遺伝子の遺伝子発現を特異的に阻害するアンチセンス技術を使用する方法は当分野で周知である（例えば、米国特許第 6,566,135 号、同 6,566,131 号、同 6,365,354 号、同 6,410,323 号、同 6,107,091 号、同 6,046,321 号及び同 5,981,732 号参照）。

【0189】

短い抑制性 RNA (siRNA) も、本発明に使用される IGF - 1 R キナーゼ阻害剤として機能し得る。腫瘍、対象又は細胞を短い二本鎖 RNA (dsRNA) 、又は短い二本鎖 RNA を産生するベクター若しくは構築体と接触させることによって IGF - 1 R 遺伝子発現を減少させることができ、それによって IGF - 1 R の発現が特異的に阻害される（すなわち、RNA 干渉又は RNAi）。適切な dsRNA 又は dsRNA をコードするベクターを選択する方法は、配列が既知である遺伝子について当分野で周知である（例えば、Tuschl, T., et al. (1999) Genes Dev. 13(24):3191-3197; Elbashir, S.M. et al. (2001) Nature 411:494-498; Hannon, G.J. (2002) Nature 418:244-251; McManus, M.T. and Sharp, P.A. (2002) Nature Reviews Genetics 3:737-747; Bremmelmamp, T.R. et al. (2002) Science 296:550-553；米国特許第 6,573,099 号及び同 6,506,559 号並びに国際公開第 01/36646 号、同 99/32619 号及び同 01/68836 号参照）。

【0190】

リボザイムも、本発明に使用される IGF - 1 R キナーゼ阻害剤として機能し得る。リボザイムは、RNA の特異的切断を触媒することができる酵素 RNA 分子である。リボザイムの作用機序は、リボザイム分子と相補的標的 RNA の配列特異的ハイブリド形成と、それに続くエンドヌクレオチド鎖切断を含む。IGF - 1 R mRNA 配列のエンドヌクレオチド鎖切断を特異的かつ効率的に触媒する、操作されたヘアピン又はハンマー・ヘッドモチーフリボザイム分子は、それによって本発明の範囲内で有用である。任意の RNA 標的候補内の特異的リボザイム切断部位は、リボザイム切断部位について標的分子を走査することによって最初に特定され、典型的には以下の配列、すなわち、GUA、GUU 及び GUC を含む。特定された後、切断部位を含有する標的遺伝子領域に対応する約 15 から 20 リボヌクレオチドの短い RNA 配列を、オリゴヌクレオチド配列を不適当なものにし得る、二次構造などの構造上の予測される特徴について評価することができる。候補標的の適合性は、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリド形成に対する到達性を、例えばリボヌクレオチド保護アッセイを用いて、試験することによって評価することもできる。

【0191】

IGF - 1 R キナーゼ阻害剤として有用であるアンチセンスオリゴヌクレオチドとリボザイムの両方は、公知の方法によって調製することができる。その方法として、例えば固相ホスホルアミダイト (phosphoramidite) 化学合成などによる化学合成技術などが挙げられる。或いは、アンチセンス RNA 分子は、RNA 分子をコードする DNA 配列のインビトロ又はインビボでの転写によって、作製することができる。かかる DNA 配列は、T7 又は SP6 ポリメラーゼプロモーターなどの適切な RNA ポリメラーゼ

プロモーターを取り込む多種多様なベクター中に組み込むことができる。本発明のオリゴヌクレオチドに、細胞内の安定性を高め、半減期を延長する手段として、種々の改変を導入することができる。考えられる改変として、リボヌクレオチド又はデオキシリボヌクレオチドのフランキング配列を分子の 5' 及び / 又は 3' 末端に付加すること、或いはオリゴヌクレオチド骨格内のホスホジエステラーゼ結合ではなく、ホスホロチオアート又は 2'-O-メチル結合を使用することなどが挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0192】

本発明の治療方法に関連して、IGF-1R キナーゼ阻害剤は、薬剤として許容される担体と、(薬剤として許容されるその塩を含めた) IGF-1R キナーゼ阻害剤化合物の無毒の治療有効量とを含む組成物として使用される。

10

【0193】

「薬剤として許容される塩」という用語は、薬剤として許容される無毒の塩基又は酸から調製される塩を指す。本発明の化合物が酸性であるとき、その対応する塩は、無機塩基及び有機塩基など、薬剤として許容される無毒の塩基から都合良く調製することができる。かかる無機塩基から誘導される塩として、アルミニウム、アンモニウム、カルシウム、銅(銅(II)及び銅(I))、鉄(III)、鉄(II)、リチウム、マグネシウム、マンガン(マンガン(II)及びマンガン(I))、カリウム、ナトリウム、亜鉛などの塩が挙げられる。特に好ましい塩は、アンモニウム、カルシウム、マグネシウム、カリウム及びナトリウム塩である。薬剤として許容される無毒の有機塩基から誘導される塩として、第一級アミン、第二級アミン及び第三級アミン並びに環式アミン及び天然置換アミン及び合成置換アミンなどの置換アミンの塩などが挙げられる。塩を形成することができる、他の薬剤として許容される無毒の有機塩基として、例えば、アルギニン、ベタイン、カフェイン、コリン、N', N' -ジベンジルエチレンジアミン、ジエチルアミン、2 -ジエチルアミノエタノール、2 -ジメチルアミノエタノール、エタノールアミン、エチレンジアミン、N -エチルモルホリン、N -エチルピペリジン、グルカミン、グルコサミン、ヒスチジン、ヒドラバミン、イソプロピルアミン、リジン、メチルグルカミン、モルホリン、ピペラジン、ピペリジン、ポリアミン樹脂、プロカイン、プリン、テオプロミン、トリエチルアミン(triethylamine)、トリメチルアミン、トリプロピルアミン、トロメタミンなどのイオン交換樹脂が挙げられる。

20

【0194】

本発明に使用する化合物が塩基であるとき、その対応する塩は、無機酸及び有機酸など、薬剤として許容される無毒の酸から都合良く調製することができる。かかる酸として、例えば、酢酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、カンファースルホン酸、クエン酸、エタンスルホン酸、フマル酸、グルコン酸、グルタミン酸、臭化水素酸、塩化水素酸、イセチオニ酸、乳酸、マレイン酸、リンゴ酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、粘液酸、硝酸、パモン酸、パントテン酸、リン酸、コハク酸、硫酸、酒石酸、p -トルエンスルホン酸などが挙げられる。特に好ましい酸は、クエン酸、臭化水素酸、塩化水素酸、マレイン酸、リン酸、硫酸及び酒石酸である。

30

【0195】

(薬剤として許容されるその塩を含めた) IGF-1R キナーゼ阻害剤化合物を活性成分として含む、本発明に使用される薬剤組成物は、薬剤として許容される担体を含むことができ、他の治療成分又はアジュvantを含んでいてもよい。他の治療薬として、上記の細胞傷害剤、化学療法剤若しくは抗癌剤又はかかる薬剤の効果を高める薬剤などが挙げられる。本組成物は、経口、直腸、局所及び(皮下、筋肉内及び静脈内を含めた) 非経口投与に適切な組成物を含むが、任意の所与の症例において最も適切な経路は、個々の宿主並びに活性成分を投与する症状の性質及び重症度に応じて決まる。薬剤組成物は、好都合には単位剤形とることができ、薬学分野で周知の方法のいずれかによって調製することができる。

40

【0196】

実際には、本発明の(薬剤として許容されるその塩を含めた) IGF-1R キナーゼ阻

50

害剤化合物は、均質混合物中の活性成分として従来の薬剤配合技術によって薬剤担体と混合することができる。担体は、投与、例えば、経口又は（静脈内を含めた）非経口投与に望ましい調製の形態に応じて多種多様な形をとり得る。したがって、本発明の薬剤組成物は、活性成分の所定量を各々が含有するカプセル剤、カシェ剤又は錠剤などの経口投与に適切な分離単位として提供することができる。また、本組成物は、散剤、顆粒剤、溶液剤、水系懸濁液剤、非水系液剤、水中油型乳剤又は油中水型液体乳剤として提供することができる。上記一般的剤形に加えて、（薬剤として許容される、その各成分の塩を含めた）IGF-1Rキナーゼ阻害剤化合物は、制御放出手段及び／又は送達装置によって投与することができる。組合せ組成物は、調剤方法のいずれかによって調製することができる。一般に、かかる方法は、活性成分を1種類又はそれ以上の必要な成分を構成する担体と会合させる段階を含む。一般に、本組成物は、活性成分を液体担体、微粉固体担体又はその両方と均一に十分混合することによって調製される。次いで、生成物を所望の形（presentation）に都合良く成形することができる。

【0197】

本発明に使用する（薬剤として許容されるその塩を含めた）IGF-1Rキナーゼ阻害剤化合物は、1種類又はそれ以上の他の治療有効化合物と組み合わせた薬剤組成物に含めることもできる。他の治療有効化合物として、上記の細胞傷害剤、化学療法剤若しくは抗癌剤又はかかる薬剤の効果を高める薬剤などが挙げられる。

【0198】

したがって、本発明の一実施形態において、薬剤組成物は、抗癌剤と組み合わせたIGF-1Rキナーゼ阻害剤化合物を含むことができ、前記抗癌剤は、アルキル化薬、代謝拮抗剤、微小管阻害剤、ポドフィロトキシン、抗生物質、ニトロソ尿素、ホルモン療法、キナーゼ阻害剤、腫瘍細胞アポトーシスの活性化剤及び血管新生阻害剤からなる群から選択される剤である。

【0199】

使用する薬剤担体は、例えば、固体、液体又は気体とすることができます。固体担体の例としては、ラクトース、白土、スクロース、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、ステアリン酸マグネシウム及びステアリン酸が挙げられる。液体担体の例は、糖シロップ、落花生油、オリーブ油及び水である。気体担体の例としては二酸化炭素及び窒素が挙げられる。

【0200】

経口剤形用組成物を調製する際には、任意の好都合な薬剤媒体を使用することができる。例えば、水、グリコール、油、アルコール、香味剤、防腐剤、着色剤などを使用して懸濁液剤、エリキシル剤及び溶液剤などの経口液体製剤を形成することができる。また、デンプン、糖、微結晶セルロース、希釈剤、造粒剤、潤滑剤、結合剤、崩壊剤などの担体を使用して、散剤、カプセル剤及び錠剤などの経口固体製剤を形成することができる。錠剤及びカプセル剤は、投与が容易なので好ましい経口投与単位であり、それによって固体薬剤担体が使用される。場合によって、錠剤は、標準の水系又は非水系技術によって被覆してもよい。

【0201】

本発明に使用される組成物を含有する錠剤は、1種類又はそれ以上の副成分又はアジュバントと場合によって一緒に、圧縮又はモールディングによって調製することができる。圧縮錠剤は、場合によって結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、界面活性剤又は分散剤と混合されていてもよい、散剤又は顆粒剤などの易流動性の活性成分を適切な機械で圧縮することによって調製することができる。モールディングされた錠剤は、不活性希釈液で湿らせた粉末化合物の混合物を適切な機械でモールディングすることによって製造することができる。各錠剤は活性成分約0.05mgから約5gを好ましくは含有し、各カシェ剤又はカプセル剤は活性成分約0.05mgから約5gを好ましくは含有する。

【0202】

例えば、ヒトへの経口投与が予定されている製剤は、全組成物の約5から約95パーセ

10

20

30

40

50

ントで変動し得る担体材料の適切で好都合な量と配合された活性薬剤の約0.5mgから約5gを含有し得る。単位剤形は、活性成分を一般に約1mgから約2g、典型的には25mg、50mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、800mg又は1000mg含有する。

【0203】

非経口投与に適切である、本発明に使用される薬剤組成物は、活性化合物の水溶液又は水懸濁液として調製することができる。例えばヒドロキシプロピルセルロースなどの適切な界面活性剤を含むことができる。分散剤は、グリセリン中で、液状ポリエチレングリコール中で、オイル中のそれらの混合物中で調製することもできる。また、防腐剤は、微生物の有害な増殖を防止するために含めることができる。

10

【0204】

注射用に適切である、本発明に使用される薬剤組成物として、無菌水溶液又は分散液が挙げられる。また、本組成物は、かかる無菌注射用溶液又は分散液を即座に調製するための無菌散剤の形とすることができます。すべての場合において、最終注射用剤形は無菌でなければならず、注射を容易にするために効果的に流動性でなければならない。本薬剤組成物は、製造及び貯蔵条件下で安定でなければならず、したがって、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用に対して好ましくは保護されるべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコール及び液状ポリエチレングリコール）、植物油及びこれらの適切な混合物を含有する溶媒又は分散媒とすることができます。

20

【0205】

本発明の薬剤組成物は、例えば、エアゾール剤、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、散布粉剤など局所用に適切な剤形とすることができます。また、本組成物は、経皮装置に使用するのに適切な剤形とすることができます。これらの製剤は、（薬剤として許容されるその塩を含めた）IGF-1Rキナーゼ阻害剤化合物を利用して、従来の加工方法によって調製することができます。例として、クリーム剤又は軟膏剤は、親水性材料と水を本化合物の約5重量%から約10重量%と一緒に混合して、所望の粘ちゅう性を有するクリーム剤又は軟膏剤を製造することによって調製される。

【0206】

本発明の薬剤組成物は、担体が固体である直腸投与に適切な形とすることができます。混合物は単位用量坐剤を形成することが好ましい。適切な担体として、カカオ脂及び当分野で通常使用される他の材料などが挙げられる。坐剤は、本組成物を軟化又は溶融担体とまず混合し、続いて型の中で冷却及び成形することによって都合良く形成することができる。

30

【0207】

上記医薬製剤は、上述の担体成分に加えて、希釈剤、緩衝剤、香味剤、結合剤、界面活性剤、増粘剤、潤滑剤、（抗酸化剤を含めた）防腐剤などの1種類又はそれ以上の追加の担体成分を適宜含むことができる。また、製剤を対象レシピエントの血液と等張性にするために他のアジュバントを含むことができる。（薬剤として許容されるその塩を含めた）IGF-1Rキナーゼ阻害剤化合物を含有する組成物は、粉体又は濃縮液体の形で調製することもできる。

40

【0208】

本発明を実施するために使用される化合物の投与量レベルは、およそ、本明細書に記載の通りであり、又はこれらの化合物について当分野で記載されている通りである。しかし、任意の特定の患者に対する具体的用量レベルは、年齢、体重、全般的健康状態、性別、食餌、投与時間、投与経路、排出速度、薬物組合せ及び治療を受ける特定の疾患の重篤度など種々の要因に応じて決まるこことを理解されたい。

【0209】

例えば、本発明に関連する技術領域において利用可能な優れた手引書及び教科書の多くに記載されている（例えば、Using Antibodies, A Laboratory

50

ory Manual, edited by Harlow, E. and Lane, D., 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (例えば、ISBN 0-87969-544-7); Roe B. A. et al. 1996, DNA Isolation and Sequencing (Essential Techniques Series), John Wiley & Sons. (例えば、ISBN 0-471-97324-0); Methods in Enzymology: Chimeric Genes and Proteins", 2000, ed. J. Abelson, M. Simon, S. Emr, J. Thorner. Academic Press; Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2001, 3rd Edition, by Joseph Sambrook and Peter MacCallum, (以前のManiatis Cloning manual) (例えば、ISBN 0-87969-577-3); Current Protocols in Molecular Biology, Ed. Fred M. Ausubel, et al. John Wiley & Sons (例えば、ISBN 0-471-50338-X); Current Protocols in Protein Science, Ed. John E. Coligan, John Wiley & Sons (例えば、ISBN 0-471-11184-8)及びMethods in Enzymology: Guide to protein Purification, 1990, Vol. 182, Ed. Deutscher, M.P., Academic Press, Inc. (例えば、ISBN 0-12-213585-7))、又は分子生物学における実験法を記載した多数の大学及び商用のウェブサイトに記載されている、当分野で公知の多数の代替実験法によって、本発明の実施において本明細書に具体的に記載されている実験法を首尾良く置換することができる。

【0210】

本発明は、以下の実験の詳細によってより良く理解される。しかし、当業者は、考査する特定の方法及び結果は、以下の特許請求の範囲に詳述されている本発明を単に例示するためのものにすぎず、これらの方法及び結果に限定されるものでは決してないことを容易に理解される。

30

【実施例】

【0211】

実験の詳細：

序論

IGF-1受容体機能の阻害剤は臨床上有用であり、治療の利点を得る可能性が最も高い患者の部分集合を記述する重要なIGF-1受容体シグナル伝達経路の定義は、重要な検討領域になった。腫瘍細胞が、細胞外マトリックス又は細胞-細胞接触の不存在下で増殖及び生存シグナルを維持する能力は、細胞の遊走及び転移において重要であるだけでなく、細胞外マトリックスが再構築され、細胞接触阻害が減弱している創傷様腫瘍環境中で細胞増殖及び生存を維持する上でも重要である。ここで、本発明者らは、IGF-1受容体阻害に対するNSCLC細胞の感受性が、E-カドヘリン上皮細胞表現型によって付与されることを示す。逆に、IGF-1受容体阻害に対する非感受性は、ビメンチン及び/又はフィブロネクチンの発現に伴う上皮-間葉遷移(EMT)を通じて媒介された。

40

【0212】

材料及び方法

【0213】

細胞培養及び細胞抽出物の調製

IGF-1Rを有するNSCLC系、H292、H358、H322、H441、A549、Calu6、H460、H1703及びSW1573を適切なATCC推奨補足培地中で培養した。細胞抽出物を、プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤を含有する洗浄

50

剤溶解((50 mM Tris-HCl、pH 8、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% デオキシコール酸Na、0.1% SDS)によって調製した。可溶タンパク質濃度をmicro-BSAアッセイ(Pierce、Rockford IL)によって測定した。

【0214】

IGF-1R阻害剤化合物原溶液

IGF-1R阻害剤である化合物66の原濃度は、100%DMSO(ジメチルスルホキシド)中で10mMであった。IGF-1R阻害剤の50%阻害用量を確立するために、段階希釈(1:3又は1:4)を使用した。投薬の前に、阻害剤を100%DMSO中に希釈し、次いで、2つ組みにて、所望の最終濃度で細胞に添加した。最終DMSO濃度は、0.3から0.5%の間であった。
10

【0215】

N S C L C 細胞系抽出物の免疫プロット分析

SDS-PAGEによって分離されたタンパク質からニトロセルロースへの電気泳動的転写、抗体との温置及び化学発光第2段階検出(chemiluminescent second step detection)(Pico West; Pierce、Rockford、IL)によってタンパク質免疫検出を実施した。抗体は、E-カドヘリン(Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA; sc21791)、-カテニン(sc9988)、-カテニン(sc7963)、-カテニン(sc8415)及びBrk(sc1188); ビメンチン(BD Bio sciences、San Jose、CA; BD550513)及びフィブロネクチン(BD610077); GAPDH(AbCam、Cambridge、UK); Phospho-Akt(Cell Signaling、Beverly、MA #9271)、Akt(CS、#9272)、Phospho-p44/42 Mapキナーゼ^{T202/Y204}(Erk1/2; CS #9101)、Phospho-Srcファミリー-Y416(CS #2101)、Phospho-STAT3^{Y705}(CS #9131)及びPhospho-S6^{S235/Y236}(CS #2211); -アクチン(Sigma、Saint Louis、MO #A5441)であった。抗体は、さらに、Phospho-Shc(Cell Signaling、#2434、Beverly、MA)、Phospho-パキシリン(Cell Signaling、#2541)、Phospho-Akt(Ser473及びThr308)(Cell Signaling、#9271及び9275)、Phospho-HER2/ErbB2(Cell Signaling、#2245)、Phospho-Her3(Tyr1289)(Cell Signaling #4791)、Phospho-p44/42 Mapキナーゼ(Cell Signaling、#9101)、Phospho-IGF-1R(Tyr845)(Cell Signaling、#2231)、Phospho-EGFR(Tyr992)(Cell Signaling、#2235)、Phospho-EGFR(Tyr1045)(Cell Signaling、#2237)、EGFR(Cell Signaling、#2232)、Phospho-p70S6キナーゼ(Cell Signaling、#9205)、Phospho-GSK-3アルファ/ベータ(Cell Signaling、#9331)、Phospho-EGFR(Tyr1068)(Cell Signaling、#2236)、Phospho-Srcファミリー-Tyr416(Cell Signaling #2101)、Phospho-SAPK/JNK(Tyr183/Tyr185)(Cell Signaling #9251)、Phospho-STAT3(Tyr705)(Cell Signaling #9131)、ErbB2(Cell Signaling #2242); ErbB4(Cell Signaling 4795)、PY20(Exalpha Biologicals Inc.)、Brk(Santa Cruz Biochemicals)であった。
20
30
40

【0216】

インビトロ薬理学

細胞の生存性を測定するために、Promegaからキットとして購入可能なCell-Titer Gloを使用した。アッセイの基礎は、細胞培養プレートウェル中に存在するATPの発光の定量である。要約すれば、ウェル中に存在する生きた細胞の数が多いほど、存在するATPのレベルが高くなる。本アッセイは、ATPを結合して発光シグナルを発する基質を使用し、発光シグナルは、ルミノメータ上で読み取ることができる。別段の記載が無ければ、製造業者の指示書に正確に従った。簡潔に述べれば、第一日目に、白いポリスチレン96ウェルアッセイプレート中に、4000細胞/ウェルの密度で10%血清含有増殖培地120μL中に細胞を播種した。第二日目に、150μLの最終ウェル容量になるように、IGF-1R阻害剤である化合物66の10倍濃度15μL又はDMSOのみで細胞を処理した。阻害剤とともに72時間温置した後、細胞のアッセイを行った。結果は、DMSO対照細胞の割合として計算した。

【0217】

インビオ薬理学

メスのCD-1 nu/nuマウス(Charles River Laboratories)の側腹部えきか領域の単一皮下部位に、収集したNSCLC腫瘍細胞を移植した。腫瘍を $200 \pm 50 \text{ mm}^3$ まで増殖させた。腫瘍体積及び体重を毎週2回測定した。ノギスを用いて2方向を測定し、腫瘍体積 = (長さ × 幅²) / 2の式を用いて計算することによって、腫瘍体積を求めた。動物から腫瘍を採取し、液体窒素中に瞬間凍結した。

【0218】

結果

wt IGF-1受容体を含有するNSCLC株は、化合物66に対して幅広い感受性を示す

幅広いヒトNSCLC細胞株での化合物66感受性の分析によって、広範な感受性が示された。従って、本発明者らは、これらの細胞株を、比較的非感受性である細胞株(SW1573及びH460)、中間の感受性を示す細胞株(A549)及び化合物66媒介性増殖阻害に対して感受性である細胞株(H441、H358及びH292)に広く分類した。このように、最も感受性のもの(H358)から最も感受性が低いもの(SW1573)にわたって、化合物66に対する細胞の幅広い感受性が観察された。

【0219】

上皮及び間葉細胞マーカーの変化は、化合物66に対するNSCLC細胞株の感受性と相關している

本発明者らは、異常発現ビメンチン及び/又はフィプロネクチンにおける、化合物66感受性NSCLC株と比較的非感受性のNSCLC株の間の顕著な差を観察した(図2)。典型的には、ビメンチン及びフィプロネクチン発現は、間葉細胞に特徴的であり、上皮細胞系統では弱く、又は発現されない。ビメンチン発現は、主に、SW1573、H1703及びCalu6中に見出されたが、フィプロネクチン発現はH460細胞中で観察された。SW1573細胞は、インビトロにおいて、化合物66による増殖阻害に対して比較的非感受性であり、10μM阻害剤では10%未満の阻害であった。化合物66感受性NSCLC株であるH292、H441及びH358又は中間感受性株A549では、ビメンチン又はフィプロネクチン発現は、殆ど又は全く見出されなかった。

【0220】

相対的に化合物66に対して非感受性であるNSCLC株中の間葉タンパク質の発現に基づいて、本発明者らは、上皮又は間葉表現型の何れかに特徴的なマーカーの存在又は不存在に関して、相対的に非感受性及び感受性のNSCLC細胞株の同一パネルから得たタンパク質抽出物を分析した(図2)。注目すべきことに、感受性細胞株(H441、H358及びH292)中にはE-カドヘリンが検出されたが、相対的に非感受性の細胞株中には存在しなかった(SW1573及びH460)。中間感受性細胞株A549は、低いが、検出可能な発現を示した。H460を除き、化合物66に対して相対的に非感受性の細胞中で、-カテニンの類似の喪失が観察された。従って、相対的に非感受性の細胞

10

20

30

40

50

株は、上皮細胞マーカータンパク質の発現を喪失したようである。次に、本発明者らは、これらの細胞株が、間葉マーカーフィプロネクチン及び／又はビメンチンを発現したかどうかについて疑問を抱いた。相対的に非感受性の細胞株は、フィプロネクチン及び／又はビメンチンの一方又は両方を明確に発現したのに対して（図2）、化合物66に対して感受性の細胞株中では、何れのタンパク質も検出されなかった。興味深いことに、中間感受性細胞株A549は、同じく、両タンパク質の低いが、検出可能なレベルを示した。しかしながら、細胞の二重染色は観察されなかったので、E-カドヘリン及びビメンチンに対して特異的な抗体による免疫染色を用いた共焦点顕微鏡実験（結果は示さず。）は、用いたA549細胞培養は、細胞の混合された集団であるように見受けられることが示された。これは、この細胞株を用いて得られた結果が若干変動することを説明し、化合物66に対する中間感受性と合致する。

【0221】

化合物66感受性は、インビボでの腫瘍増殖時の上皮マーカーの維持と相關する

本発明者らは、インビトロで同定された化合物66感受性を予測するタンパク質マーカーがインビボでも観察可能であるかどうかを調べようと考えた。H460、Calu6、A549、H441及びH292細胞から増殖された3つの独立した腫瘍異種移植片からタンパク質抽出物を調製した。抽出物のイムノプロッティングによって、E-カドヘリンは、化合物66に対して比較的非感受性であるH460細胞に由来した異種移植片中では検出可能に発現されず、中間感受性のA549細胞に由来する異種移植片中では低いレベルで発現され、化合物66に対して感受性であるH441及びH292細胞株中では高いレベル発現されることが示された（図3）。-カテニンレベルの分析に対して、同様の結果が観察された。これに対して、H460から得られた異種移植片試料はフィプロネクチンのみを発現し、インビトロ細胞培養から得られた結果と合致していた（図2）。H441及びH292から得られた異種移植片抽出物は、フィプロネクチン又はビメンチンをほとんど又は全く発現しなかった。これらのインビボでの結果は、インビトロデータをさらに裏づけ、これらのタンパク質マーカーの存在が、細胞培養の人為的影響によるものではないことを示す。さらに、これらの結果は、化合物66感受性が上皮表現型を有する細胞に限定されること、並びにEMTを経た細胞は、細胞増殖及び生存に対するIGF-1Rシグナル伝達に依存する程度がより低くなるという仮説を支持する。

【0222】

IGF-1受容体阻害に対して比較的非感受性であり、又は感受性であるNSCLC細胞株中のBrkの発現

興味深いことに、高いBrk発現が、より高い66感受性に相当し、Brkの不存在又はより低い発現が非感受性株を特徴付ける傾向がある限り、Brkレベルと化合物66感受性との間に極めて優れた相関が存在する。

【0223】

結論

E-カドヘリン発現の喪失、及びより間葉性の表現型の獲得は、複数の上皮由来の固形腫瘍における予後不良と相關することが示された。E-カドヘリンの喪失は、IGF-1受容体阻害に対する細胞の非感受性と相關し、-カテニン及びBrkの喪失も、E-カドヘリンよりも低度に相關した。逆に、細胞の間葉マーカー、ビメンチン、フィプロネクチン又はフィブリリンの獲得は、IGF-1受容体阻害剤に対する感受性の喪失と相關する。本発明者らは、部分的又は完全な上皮間葉遷移が、IGF-1受容体阻害剤に対する細胞応答にネガティブに影響し、抗IGF-1受容体キナーゼ阻害剤及び抗IGF-1受容体抗体療法の利点を得る可能性が最も高い患者に対する診断指標になることを明確に示した。

【0224】

略語

EGF、上皮成長因子；EMT、上皮間葉遷移；NSCLC、非小細胞肺癌；HNSCC、頭頸部へん平上皮癌；CRC、結腸直腸癌；MBC、転移性乳癌；EGFR、上皮成

10

20

30

40

50

長因子受容体；B r k、(タンパク質チロシンキナーゼ6(P T K 6)としても知られる)乳房腫瘍キナーゼ；L C、液体クロマトグラフィー；M S、質量分析法；I G F - 1、インスリン様成長因子-1；I G F - 1 R又はI G F R、インシュリン様成長因子-1受容体；T G F 、トランスフォーミング成長因子アルファ；H B - E G F 、ヘパリン結合性上皮成長因子；L P A、リゾホスファチジン酸；T G F 、トランスフォーミング成長因子アルファ；I C₅₀、最大半減の抑制濃度；p Y、ホスホチロシン；w t、野生型；P I 3 K、ホスファチジルイノシトール-3キナーゼ；G A P D H、グリセルアルデヒド3-ホスファートデヒドロゲナーゼ。

【0225】

参照による組み込み

10

本明細書に開示するすべての特許、公開特許出願及び他の参考文献を参照により本明細書に組み込む。

【0226】

均等物

当業者は、本明細書に具体的に記載された本発明の具体的実施形態の多数の均等物を、定型的な実験法に過ぎない実験法を用いて認識し、又は確認することができる。かかる均等物は以下の特許請求の範囲に包含されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【0227】

【図1】図1は、野生型I G F - 1受容体を含有するN S C L C株がI G F - 1受容体阻害剤である化合物66に対して幅広い示すことを示す。

20

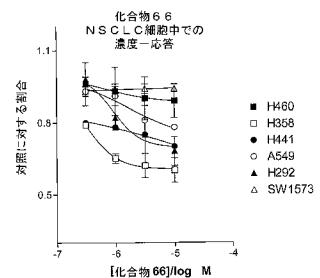
【図2】図2は、上皮及び間葉細胞マーカーの変化が化合物66に対するN S C L C細胞株の感受性と相關していることを示す。

【図3】図3は、インビトロの結果と一致して、E-カドヘリンのインビボ発現は化合物66感受性株に限定され、フィブロネクチンのインビボ発現は非感受性株に限定されていることを示す。

【図4】図4は、B r k発現レベルと化合物66感受性との間に極めて強れた相関が存在することを示す。

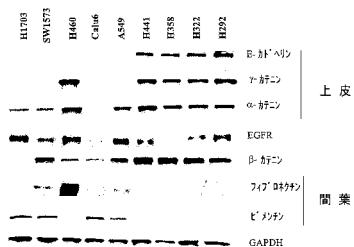
【図1】

FIGURE 1



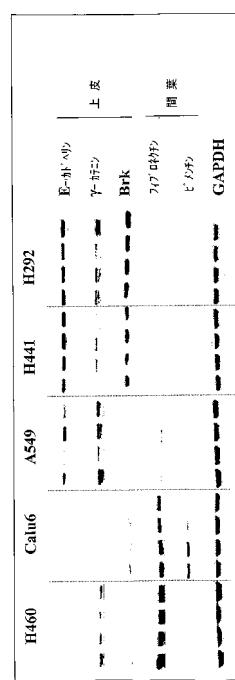
【図2】

FIGURE 2



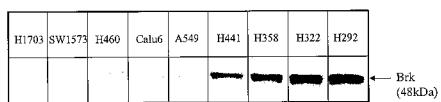
【図3】

FIGURE 3



【図4】

FIGURE 4



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/15 (2006.01) G 0 1 N 33/15 Z

(74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855
弁理士 塚倉 道明

(72)発明者 ヘイリー, ジヨン・ディー
アメリカ合衆国、ニューヨーク・11735、ファーミングデール、バイオサイエンス・パーク
・ドライブ・1

審査官 三木 隆

(56)参考文献 国際公開第2005/009373 (WO, A1)
特表2008-533490 (JP, A)
特開2001-218599 (JP, A)
国際公開第2004/046386 (WO, A1)
Morali, O.G. et al., IGF-II induces rapid beta-catenin relocation to the nucleus during epithelium to mesenchyme transition., *Oncogene*, 2001年, Vol.20(36), p.4942-4950
Maloney, E.K. et al., An anti-insulin-like growth factor I receptor antibody that is a potent inhibitor of cancer cell proliferation., *Cancer Res.*, 2003年, Vol.63(16), p.5073-83.
Min, Y. et al., Genetic blockade of the insulin-like growth factor-I receptor: a promising strategy for human pancreatic cancer., *Cancer Res.*, 2003年, Vol.63(19), p.6432-41
Warshamana-Greene, G.S. et al., The insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor kinase inhibitor NVP-ADW742, in combination with ST1571, delineates a spectrum of dependence of small cell lung cancer on IGF-I and stem cell factor signaling., *Mol. Cancer Ther.*, 2004年, Vol.3(5), p.527-35

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/50
A61K 45/00
A61P 35/00
A61P 43/00
G01N 33/15
G01N 33/574
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed