

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-524055

(P2015-524055A)

(43) 公表日 平成27年8月20日(2015.8.20)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
G01N 33/68 (2006.01)	G01N 33/68	2 G045
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53	M 4 B063
G01N 33/574 (2006.01)	G01N 33/574	A 4 C084
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4 C085
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395	T

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-513339 (P2015-513339)	(71) 出願人	511025226 ユニヴェルシテ デクス-マルセイユ UNIVERSITE D' AIX-MARSEILLE フランス、エフ-13284 マルセイユ セデックス 07、プールバール シャルル リヴィオン、ジャルダン ドュ フアロ、58 Jardin du Pharo, 58 , Bld Charles Livon , F-13284 Marseille cedex 07, France
(86) (22) 出願日	平成25年5月23日 (2013.5.23)		
(85) 翻訳文提出日	平成27年1月7日 (2015.1.7)		
(86) 國際出願番号	PCT/IB2013/054275		
(87) 國際公開番号	W02013/175429		
(87) 國際公開日	平成25年11月28日 (2013.11.28)		
(31) 優先権主張番号	12305565.9		
(32) 優先日	平成24年5月23日 (2012.5.23)		
(33) 優先権主張國	歐州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ガン患者における抗血管新生療法に対する応答及び該療法後の生存についての予知バイオマーカーとしてのMMP2

(57) 【要約】

本発明は、ガン患者における抗血管新生療法に対する応答及び抗血管新生療法後の生存についての予知バイオマーカーとしてのマトリクスマタロプロティナーゼ-2 (MMP2) の使用、並びにガン患者の抗血管新生治療に対する応答及び該処置後の生存について予知し又はモニターする関連方法に関する。

【選択図】 図4

MMP2 changes

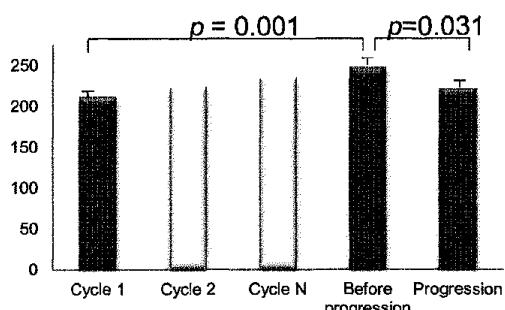


FIGURE 4

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ガン患者における抗血管新生療法に対する応答及び抗血管新生療法後の生存についての予知バイオマーカーとしてのマトリクスメタロプロテイナーゼ-2 (MMP2) の使用。

【請求項 2】

前記抗血管新生療法が血管内皮増殖因子(VEGF)経路を標的する薬剤を用いる請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記薬剤が抗VEGF抗体である請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

前記薬剤がVEGFレセプターチロシンキナーゼインヒビターである請求項 2 に記載の使用。 10

【請求項 5】

前記ガンがVEGF過剰発現に関連する請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 6】

前記ガンが神経膠芽腫、乳ガン、結腸ガン、肺ガン、肝臓ガン、腎臓ガン、胰臓ガン、甲状腺ガン、卵巣ガンからなる群より選択される請求項 5 に記載の使用。 20

【請求項 7】

患者の生物学的サンプルにおける抗血管新生治療前のMMP2レベルを測定する工程を含んでなり、該サンプル中のMMP2レベルが参照値と比較して高いことが、前記患者の前記抗血管新生治療に対する応答及び該治療後の生存を示す、ガン患者の抗血管新生治療に対する応答及び該治療後の生存を予知する方法。

【請求項 8】

前記生物学的サンプルが生物学的流体又は生検による腫瘍細胞若しくは組織である請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記生物学的流体が血清、血漿又は尿である請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記MMP2がMMP2タンパク質である請求項 7 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 11】

前記MMP2がMMP2 mRNAである請求項 7 又は 8 に記載の方法。

【請求項 12】

イムノアッセイを用いてMMP2タンパク質レベルを測定することを含んでなる請求項 7 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

核酸アレイベースのアッセイ、組織マイクロアレイベースのアッセイ又は定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応アッセイを用いてMMP2 mRNAレベルを測定することを含んでなる請求項 7 、 8 又は 11 に記載の方法。

【請求項 14】

測定工程の後に、前記生物学的サンプル中のMMP2レベルに基づいてガン患者を応答性患者又は非応答性患者に選別する更なる工程を含んでなる請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。 40

【請求項 15】

患者の生物学的サンプルにおけるMMP2レベルを抗血管新生治療期間中の 2 以上の時点で測定することを含んでなり、より早期の時点で得られた参照値と比較して、より後期の時点での前記サンプル中のMMP2レベルが等しいか又は高いことが、抗血管新生治療に対する延長した応答を示す一方、MMP2レベルが低いことは前記抗血管新生療法に対する抵抗性を示す、ガン患者の抗血管新生治療に対する応答をモニターする方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

50

本発明は、ガン患者における抗血管新生療法に対する応答及び抗血管新生療法後の生存についての予知バイオマーカーとしてのマトリクスメタロプロテイナーゼ-2 (MMP2) の使用、並びにガン患者の抗血管新生治療に対する応答及び該処置後の生存について予知し又はモニターする関連方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血管新生は、固体腫瘍の腫瘍増殖に関連する決定的かつ普遍的特徴であり、ガン治療の有望な標的である。血管新生を調節する、増殖因子、インテグリン、接合分子(junction molecule)、ケモカイン及びプロテアーゼ(マトリクスメタロプロテイナーゼ又はMMP)を含む多くの血管新生促進因子及び抗血管新生因子の中で、血管内皮増殖因子A(VEGF)は、このプロセスの主要な動作主体として同定されている(Leungら, Science, 1989, 246, 1306-1309)。これまでに、VEGF経路を標的する幾つかの抗血管新生剤の開発に成功し、ガンの大部分について承認されている(P. Carmeliet and R.K. Jain, Nature, 2011, 473, 298-307のレビュー; Perrenら, New England Journal of Medicine, 2011, 365, 2484-2496)。

【0003】

VEGF中和モノクローナル抗体であるベバシズマブ(アバスチン(登録商標))は、進行し且つ転移性のガンを有する患者において、生存に影響を伴って又は伴わずに、無増悪生存(PFS)に対する有益性が証明された最初の抗血管新生剤であった。この抗血管新生剤は、転移性結腸直腸ガン、転移性非扁平非小細胞肺ガン(NSCLC)、転移性腎細胞ガン腫(RCC)、転移性乳ガン、卵巣ガン及び再発性神経膠芽腫を含む多くのガンについて承認されている(Van Meter, M.E. and E.S. Kim, Curr.Opin. Oncol., 2010, 22, 586-591)。神経膠芽腫(GBM)の患者を除き、ベバシズマブの使用は、細胞傷害性療法又はサイトカイン療法と組み合わせた場合にのみ承認されている。

【0004】

加えて、VEGFレセプター(VEGFR)に対する活性を有する幾つかの多標的チロシンキナーゼインヒビター(TKI)が承認されている(転移性RCC及び切除不可能な肝細胞ガンについてソラフェニブ(ネクサバール)、転移性RCCについてスニチニブ(ステント)及びパゾパニブ(ヴォトリエント)、切除不可能な甲状腺臓様ガンについてバンデタニブ(ザクチマ:Zactima)を含む。スニチニブは進行性脾臓神経内分泌腫瘍について承認が勧告されている)。

【0005】

結果として、抗血管新生剤の使用は増加しているが、限定的効力及び耐性が未解決の問題として残され、費用の問題及び有益性の再評価に繋がっている。これら薬剤の腫瘍応答に対する活性及び生存に対する有益性は患者間で大きく変わり、腫瘍タイプ及び試験した薬剤間でも大きく変化する。応答性個体を特定し、療法決定を促し得る効力を有するバイオマーカーは、腫瘍学において未発見である(Dudaら, Journal of Clinical Oncology, 2010, 28, 183-185)。

【0006】

理想的なバイオマーカーは、治療に際して複数点での測定が容易であり、その分析が標準化されているべきである。ベースラインレベル、初期変動及び/又は治療下で観察される増悪時の変化に基づいて、多くの腫瘍内又は循環性の候補バイオマーカーが探索されてきた。しかし、今まで、それらの予知有意性は一般に低く、研究でほとんど確証されていない。更に、これら候補バイオマーカーの幾つかは、抗血管新生剤で治療された患者でのみ分析され、抗血管新生剤を用いずに治療された患者集団との比較は行われていない。

VEGF経路の構成要素に影響する高血圧及び多形性は、ベバシズマブの有益性についての予知値と幾らか関連付けられているが、標準化法の欠如及び腫瘍間での一貫性のない効果に起因して今まで妥当性が立証されていない(A.M. Jubb and A.L. Harris, Lancet Oncol., 2010, 11, 1172-1183)。

【0007】

初期診断のサンプルについて分析した腫瘍組織におけるVEGF、VEGFレセプター2(VEGFR

10

20

30

40

50

-2)又はカルボニックアンヒドラーーゼ9(CA9)発現のような可能性のあるインサイチュバイオマーカーは、ベバシズマブの下での転帰と関連付けられているが、一貫性がない。VEGF高発現はX線写真上の応答と相関づけられたが、生存とは相関づけられていない一方、CA9は腫瘍応答に対する効果なしで生存にやや影響するようである(Sathornsumeteeら, J. Clin. Oncol., 2008, 26, 271-278)。別の研究は、初期診断時に分析された腫瘍VEGF-A/VEGFR-2発現は高率のとき、より短い生存に関係する傾向を示すと報告している(Raizerら, Cancer, 2010, 116, 5297-5305)。不均質な腫瘍組織における免疫組織化学の限界並びに初発腫瘍と再発腫瘍との間に存在し得る生物学上の矛盾が、これら一貫性のない結果を一部説明し得る。腫瘍組織(特に脳腫瘍)への制限されたアクセスに関して、循環性マーカーが、脳腫瘍患者における療法モニターに大変望ましい。

10

【0008】

ベースライン血漿バイオマーカー、例えばVEGF、可溶性VEGFRセプター1(VEGFR-1)、胎盤成長因子(PIGF)、間質細胞由来因子-1(SDF1-)、血管細胞接着タンパク質1(VCAM-1)、細胞内接着分子1(ICAM-1)、インターロイキン6(IL-6)、インターロイキン8(IL-8)並びに循環性内皮細胞は、ベバシズマブの下での転帰に相関づけられると報告されている。しかし、これらの予知値は研究間で一貫しておらず、いずれも応答、PFS及び全体生存(OS)に関連付けられていない。循環性VEGFの評価は、ガン患者において、ベバシズマブに結合したVEGF及び活性化血小板から放出されたVEGFにより損なわれると報告されている(Niers, Plos one, 2011, 6(5), e19873)。

20

スニチニブ及びバンデタニブのような他の抗血管新生剤を用いた治療の有益性についての見込みのある循環性バイオマーカーとして、VEGF-C、可溶性VEGFR-3、又はVEGF、ICAM-1及びインターロイキンの血漿濃度の変化が挙げられる(Riniら, J. Clin. Oncol., 2008, 26, 3743-3748; Hanrahanら, J. Clin. Oncol., 2010, 28, 193-201)。しかし、これらバイオマーカーとPFS及び/又は応答との関係性は比較的低く、OSについては調べられていない。

【0009】

MMP2は、その活性が細胞外マトリクスのタンパク質分解、細胞接着及び移動の調節、増殖因子及びサイトカインのプロセシング、並びに血管新生因子の遊離と結び付けられているマトリクスマタロプロテイナーゼ(MMP)ファミリーに属する(Royら, J. Clin. Oncol., 2009, 27, 5287-5297)。血漿、尿又は腫瘍組織におけるMMP(特にMMP2及びMMP9)発現は、種々のガンにおいて、診断、播種及びステージ分け、予後並びに療法の効果を反映し得ると見込まれるバイオマーカーとして考えられている。尿、CSF又は血漿におけるMMP2及びMMP9の発現及び/又は活性は、膀胱ガン及び脳腫瘍における組織発現と相關しているように見える(Papathomēら, Anticancer research, 2000, 20, 2009-2013; Smithら, Clin. Cancer Res., 2008, 14, 2378-2386)。しかし、結腸直腸ガン及び前立腺ガンに限られた極僅かな研究でしか、MMP2血漿レベルの予後値又は予知値について調べられていない。MMP2及びMMP9の高発現は、種々のガンにおいて、腫瘍の攻撃性及び不良な予後と関連付けられている。高悪性度神経膠腫において、MMP2組織発現の予後値は不明である(Jaalinoja, J. Neuro-Oncol., 2000, 46, 81-90; Colinら, Acta Neuropathol., 2009, 118, 745-754; Breitlingら, Brain Tumor Pathol., 2011, 28, 137-144)。

30

【0010】

再発高悪性度神経膠腫(HGG)の患者の幾人かでは、ベバシズマブでの治療は、初期の尿中MMP2活性の減少に続く、尿中での増悪時のアップレギュレーション(Takanoら, Brain Tumor Pathol., 2010, 27, 89-94)又は腫瘍組織での過剰発現(de Grootら, Neuro-Oncol., 2010, 12, 233-242)と関連付けられており、MMP2をベバシズマブからの浸潤性逃避の動作主体とみなすことに対する反論がなされている。しかし、これら症例ではベースラインMMP2は考慮されておらず、ベバシズマブ処置後に他の多くの遺伝子がアップレギュレートされるので、他の候補がベバシズマブの下での腫瘍増悪と関連付けられる侵襲性表現型に関与する可能性もありそうである(Lucio-Eterovicら, Clin. Cancer Res., 2009, 15, 4589-4599)。GBMにおいて他の抗血管新生剤(例えば、セジラニブのようなVEGFRチロシン

40

50

キナーゼインヒビター)を用いて、血漿バイオマーカーの大きなパネル(MMP2、VEGF、可溶性VEGFR-2、胎盤成長因子(PIGF)、SDF1- β 、MMP10及びAng2を含む)が複数の時点で評価された。種々のバイオマーカー(MMP2、VEGF、可溶性VEGFR-2及びPIGFを含む)が処置の間に一過性の変動を示し、増悪又は生存のいずれかに関連付けられた(Batchelorら, J. Clin. Oncol., 2010, 28, 2817-2823)。例えば、セジラニブ治療は血漿におけるMMP-2の減少を誘導した一方、最初のセジラニブ投与後8時間での血漿MMP-2の早期上昇は、無増悪生存(PFS)及び全生存(OS)の減少と相関した。しかし、いずれも、ベースラインで評価したときには、PFSともOSとも相関を示さなかった。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

したがって、抗血管新生療法に先立って、患者の該治療法に対する応答及び生存を推測するために使用することができる予知バイオマーカーは、ガン患者に関して未だ満たされていない医学的ニーズである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは、抗血管新生剤で治療されたガン患者における応答及び生存を予知するための見込みのある血清学的バイオマーカーの価値を調べた。事前選択した11の対象マーカーのセット(VEGF、VEGF-R1、線維芽細胞増殖因子(FGF)、間質細胞由来因子1(SDF1- β)、胎盤成長因子(PIGF)、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベータ(uPA)、プラスミノゲンアクチベータインヒビター-1(PAI1)、マトリクスメタロプロテイナーゼ2(MMP2)、マトリクスメタロプロテイナーゼ7(MMP7)、マトリクスメタロプロテイナーゼ9(MMP9)、及びアドレノメジュリン(AM))を、再発性高悪性度神経膠腫(HGG)についてベバシズマブベースのレジメンで治療して患者からなる第1のコホートにおいて、先を見越して(prospective ly)ベースラインで及び抗血管新生療法開始から2週間離れた時点で分析した。相関関係は、再発性HGGについてベバシズマブで治療された患者の別の遡及的コホートで確認された。マーカー分析を、ベバシズマブを用いずに細胞傷害性薬剤で治療された患者からなる他の3つのコホートで行った。第1のコホートは、新たに診断され、細胞毒単独で治療された患者からなり、第2のコホートは、新たに診断され、細胞毒及び放射線療法で治療されたGBM患者からなり、第3のコホートは、細胞毒で治療された再発性HGG患者からなった。

【0013】

予想外にも、MMP2の高ベースラインレベルは、ベバシズマブの有益性を予知するようである。ベバシズマブで治療し、細胞傷害剤では治療しなかった再発性高悪性度神経膠腫患者の間で、ベバシズマブ投与前のより高い血清MMP2レベルが、客観的応答、延長した腫瘍抑制及び生存と強く関連付けられた。したがって、MMP2は、ガン患者における抗血管新生療法の効力を予知する強力な候補であるようである。

【0014】

本発明は、ガン患者における抗血管新生療法に対する応答及び抗血管新生療法後の生存についての予知バイオマーカーとしてのマトリクスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2)の使用に関する。

本発明はまた、患者の生物学的サンプルにおける抗血管新生治療前のMMP2レベルを測定する工程を含んでなり、該サンプル中のMMP2レベルが参照値と比較して高いことが、前記患者の前記抗血管新生治療に対する応答及び該治療後の生存を示す、ガン患者の抗血管新生治療に対する応答及び該治療後の生存を予知する方法に関する。

同時に、前記サンプル中のMMP2レベルが参照値と比較して低いことは、前記患者の前記抗血管新生治療に対する応答及び該治療後の生存が欠如していることを示す。

本発明に従う予知方法は、抗血管新生治療を受ける予定のガン患者に対し、該患者における抗血管新生治療の効力を評価するために行われる。

【0015】

10

20

30

40

50

本発明は、抗血管新生療法の効力を治療前に予知することができるマーカーを初めて提供する。本発明のMMP2バイオマーカーは、抗血管新生治療に対する応答性患者(高いMMP2ベースラインレベル)と非応答性患者(低いMMP2ベースラインレベル)との間の識別及びその後の応答性患者の選別を、抗血管新生療法の開始前に可能にする唯一のバイオマーカーである。よって、本発明のMMP2バイオマーカーは、抗血管新生治療が有効である患者の選択を可能にするという利点を有する。

本発明によれば、MMP2ベースラインレベルを、ガン患者における抗血管新生療法に対する応答及び抗血管新生療法後の生存を予知するバイオマーカーとして使用する。抗血管新生治療前に高MMP2レベルを有するガン患者は、該治療の恩恵を受け、肯定的な処置成果がもたらされる。結果として、抗血管新生治療前に高MMP2レベルを有するガン患者は、抗血管新生治療前に低MMP2レベルを有する治療患者及び未治療患者と比較して、腫瘍抑制及び生存が延長する。

10 本発明はまた、
患者の生物学的サンプルにおけるMMP2レベルを抗血管新生治療期間中の2以上の時点で測定することを含んでなり、より早期の時点で得られた参照値と比較して、より後期の時点での前記サンプル中のMMP2レベルが等しいか又は高いことが、前記抗血管新生治療に対する延長した応答を示す一方、MMP2レベルが低いことは前記抗血管新生療法に対する抵抗性及びガンの増悪を示す、ガン患者の抗血管新生治療に対する応答をモニターする方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は生存分析を表す。

【図2】図2は生存分析を表す。

【図3】図3は生存分析を表す。

【図4】図4はベバシズマブ処置の間の血漿MMP2レベル変化を表す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

定義

- バイオマーカーとは、プロセス、事象又は状態についての弁別的な生物学的又は生体生物由来の指標をいう。

- 予知バイオマーカーとは、療法の適用に先立って、特定の治療に対する患者の応答及び/又は生存を評価するために使用できるバイオマーカーをいう。

- 状態又は事象を予知するとは、或る個体が所与の状態にある確率又は或る事象を経験した確率が顕著に上昇又は減少していることを見出すことをいう。

- 抗血管新生治療又は抗血管新生療法とは、血管新生を阻害する物質、例えば薬剤での治療をいう。抗血管新生治療は、単独療法であっても、1以上の抗ガン剤(例えば、細胞毒及びサイトカイン)との組合せ療法であってもよい。

- ガンとは、任意の悪性固形腫瘍をいう。

- ガン患者とは、ガンと診断された個体をいう。

【0018】

- ガン患者の抗血管新生治療又は療法に対する応答とは、客観的パラメータ又は基準(例えば、腫瘍サイズ減少のような客観的臨床徵候)で特徴付けられる抗血管新生治療に対する肯定的な医学的応答をいう。抗血管新生治療に対する応答を決定する客観的基準は当該分野で周知である。応答は、一般には、改訂されたRECIST 1.1基準により評価される(Eisenhauerら, Eur. J. Cancer., 2009, 45, 228-247)が、神経膠腫では、応答基準は、最近、RANOとして見直された(Wenら, J. Clin. Oncol., 2010, 28, 1963-1972)。

- 生物学的サンプルとは、MMP2を含有する可能性がある生物学的材料をいう。任意の生物学的供給源に由来し得る生物学的材料が、当業者に周知の標準的方法により、ガン患者から取り出される。

- 生存は、特に断らない限り、無増悪生存(PFS)及び全生存(OS)をいう。OSは、ガン

10

20

30

40

50

との診断後に生存する期間である。PFSは、ガンとの診断後に腫瘍が顕著に増大することなく生存する期間である。

【0019】

- マトリクスメタロプロテイナーゼ-2又はMMP-2は、特に断らない限り、MMP2遺伝子(該遺伝子の全ての対立遺伝子バリエントを含む)によりコードされるタンパク質又はメッセンジャーRNA(mRNA)をいう。マトリクスメタロプロテイナーゼ-2(MMP2、MMP 2、MMP-2、MMP-11)は、マトリクスメタロペプチダーゼ2、72kDaタイプIVコラゲナーゼ、ゼラチナーゼA、CLG4A、MONA及びTBE-1とも呼ばれる。ヒトMMP-2タンパク質及びmRNAの配列は、NCBIデータベースで、GeneBankアクセション番号NM_004530及びNP_004521にそれぞれ相当する。これら配列のバージョンは、好ましくは、2012年5月23日に有効な最終バージョンに相当する。

10

- より高いレベルとは、有意に(すなわち、p値 < 0.1)高いレベルをいう。

- 参照値とは、個体の代表的パネルから得た値の統計分析により確立された値をいう。このパネルは、例えば、サンプルの性質、ガンのタイプに依存してもよい。参照値は、例えば、抗血管新生剤で治療していないガン患者(抗血管新生剤での治療前のガン患者を含む)のパネルにおいてMMP2濃度(MMP2のベースラインレベル)を測定し、参照値として使用するメジアン濃度を決定することにより得ることができる。本発明による方法が患者のモニタリングを目的とするときには、参照値は事前に検査した患者から得てもよい。

20

【0020】

本発明の方法/使用は、他のバイオマーカーの不在下でのMMP2の単独使用を含んでなる。本発明によれば、抗血管新生療法前の單一バイオマーカー(MMP2単独)のレベルは、ガン患者における当該療法の効力及び該療法後の生存を予知するに十分である。比較に使用する参照値は、抗血管新生剤で治療していないガン患者のパネルにおけるMMP2メジアン濃度を決定することにより得られるMMP2ベースラインレベルであってもよい。参照値は、検査する患者と同じタイプの生物学的サンプル及び/又は同じタイプのガンを有する患者のパネルから得てもよい。

20

上記の方法/使用の1つの好適な実施形態において、抗血管新生療法は血管内皮増殖因子(VEGF)経路を標的する薬剤を用いるものである。

1つのより好適な実施形態において、薬剤は抗VEGF抗体、特にベバシズマブ(アバスチン(登録商標))である。

30

別の1つのより好適な実施形態において、薬剤は、VEGFレセプターチロシンキナーゼインヒビター(TKI)(多(汎)標的の又はVEGFレセプター標的のTKIを含む)である。特に、VEGFレセプターチロシンキナーゼインヒビターは、スニチニブ(ステント)、バンデタニブ(ザクチマ)、パゾパニブ(ヴォトリエント)、ソラフェニブ(ネクサバール)及びセジラニブからなる群より選択されてもよい。

40

【0021】

上記の方法/使用の別の1つの好適な実施形態において、ガンはVEGF過剰発現に関連するものである。1つのより好適な実施形態において、ガンは、神経膠芽腫、乳ガン、結腸ガン、肺ガン、肝臓ガン、腎臓ガン、脾臓ガン、甲状腺ガン及び卵巣ガンからなる群より選択される。特に、ガンは、新たに診断されたか又は再発性の神経膠芽腫、転移性乳ガン、転移性結腸直腸ガン、転移性非扁平上皮非小細胞肺ガン(NSCLC)、転移性腎細胞ガン腫(RCC)、卵巣ガン、進行型脾臓神経内分泌ガン、肝細胞ガン腫及び甲状腺髓様ガンからなる群より選択されてもよい。好ましくは、ガンは神経膠芽腫(新たに診断された神経膠芽腫及び再発性神経膠芽腫を含む)である。

40

上記の方法/使用の別の1つの好適な実施形態において、患者はヒト個体である。特に、患者は、新たに診断された個体であって、ガン診断後にいずれの抗ガン薬でも治療されていない個体である。

上記方法の別の1つの好適な実施形態において、生物学的サンプルは体液又は生検腫瘍細胞若しくは組織である。体液は、血清、血漿、血液、リンパ液、滑液、胸水、腹水又は脳脊髄液、粘液、胆汁、尿、唾液、涙及び汗であり得る。好ましくは、生物学的サンプル

50

は体液、特に血漿、血清又は尿である。

【0022】

MMP2レベルは、生物学的サンプルで直接アッセイしてもよいし、当業者に周知の前処理法に従う標準的な前処理の後にアッセイしてもよい。前処理として、例えば、血液から血漿を調製すること、粘性液体を希釈すること、細胞を溶解すること、RNAを抽出し沈降させること及び生検組織をプラスチック又はパラフィン中に包埋することを挙げてもよい。

MMP2レベルは、遺伝子の発現又は遺伝子産物の活性を検出し定量するための当業者に周知の種々の技法を用いて測定することができる。このような技法として、代表的には、転写レベル(すなわち、mRNAの生成量)の測定に基づく方法、MMP2遺伝子がコードするタンパク質の定量に基づく方法、及びMMP2タンパク質の酵素活性の定量に基づく方法が挙げられる。10

上記方法の別の1つの好適な実施形態において、該方法は、生物学的サンプル中、好ましくは生検腫瘍細胞又は組織中のMMP2メッセンジャーRNA(mRNA)レベルを測定することを含んでなる。

MMP2 mRNAレベルは、最終的には検出可能な標識で標識され及び/又は固相支持体(プレート、スライド、ストリップ、ウェル、微粒子、ファイバー、ゲル)の表面に不動化される特異的プローブへのハイブリダイゼーションにより、又は最終的には検出可能な標識で標識される特異的プライマーを用いる増幅により測定してもよい。好ましくは、MMP2 mRNAレベルは、核酸アレイ-又は組織マイクロアレイ-ベースのアッセイ及び定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)アッセイからなる群より選択されるアッセイを用いて測定する。当業者は、これら技法を用いるMMP2 mRNAの検出及び/又は定量を最適化するために操作する必要があるパラメータを理解する。20

【0023】

上記方法の別の1つの好適な実施形態において、該方法は、生物学的サンプル中、好ましくは体液中、より好ましくは血漿、血清又は尿中のMMP2タンパク質レベルを測定することを含んでなる。

MMP2タンパク質レベルの測定は、幾つかの異なる技法(その多くは抗体ベースのものである)を用いて達成してもよい。このような技法の例としては、イムノアッセイ(酵素吸着イムノアッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ、化学発光-及び蛍光-イムノアッセイ)、免疫組織化学アッセイ及び抗体マイクロアレイ-ベースアッセイが挙げられるがこれらに限定されない。好ましくは、MMP2タンパク質レベルは、イムノアッセイ(例えばELISA)を用いて測定する。MMP2抗体は当該分野で周知であり、種々のモノクローナル及びポリクローナル抗体が入手可能であり、これにはマウス、ウサギ及びヒツジポリクローナル抗体及び種々のマウスモノクローナル抗体(クローン4D3、2C1、8B4、42-5D11)が含まれる。当業者は、これら技法を用いるMMP2抗体でのMMP2タンパク質の検出及び/又は定量を最適化するために操作する必要があるパラメータを理解する。30

上記方法の更に別の1つの好適な実施形態において、該方法は、生物学的サンプル中、好ましくは体液中、より好ましくは血漿、血清又は尿中のMMP2酵素活性レベルを測定することを含んでなる。

MMP2酵素活性(ゼラチン分解活性)は、当該分野で周知のプロトコルに従ってゼラチンザイモグラフィーにより測定してもよい(Yamamotoら, Cancer Res., 1996, 56, 384-392; Uemuraら, Circ. ; Res., 2001, 88, 1291-1298)。40

【0024】

本発明による方法は、異なる患者の生物学的サンプルについて同時に又は逐次に行なってもよい。

上記方法は更に、測定工程後に、生物学的サンプル中のMMP2レベルに基づいてガン患者を応答性個体又は非応答性個体に選別する更なる工程を含んでなってもよい。

本発明の特に有利な実施形態は、神経膠芽腫患者、特に再発性神経膠芽腫患者における抗VEGF抗体療法、特にベバシズマブ(アバスチン(登録商標))療法に対する応答および該療法後の生存についての予知バイオマーカーとしてのMMP2タンパク質の使用である。この実50

施形態は、好ましくは、前記応答/生存についての予知バイオマーカーとしての、体液中、より好ましくは血漿、血清又は尿中のMMP2タンパク質レベルの使用を含んでなる。

本発明の別の1つの特に有利な実施形態は、神経膠芽腫患者、特に再発性神経膠芽腫患者の抗VEGF抗体治療、特にベバシズマブ(アバスチン(登録商標))治療に対する応答及び該治療後の生存を予知する方法であって、該患者の血清又は血漿サンプルにおける抗VEGF抗体理療前のMMP2タンパク質レベルを測定する工程を含んでなり、該サンプル中のMMP2レベルが、抗血管新生剤で治療していないガン患者のパネルにおけるベースライン時のメジアン血清MMP2濃度と比較して高いことが、該患者における抗VEGF抗体治療に対する応答及び該治療後の生存を示す方法である。

【0025】

本発明はまた、患者の生物学的サンプルにおけるMMP2レベルを抗血管新生治療期間中の2以上の時点で測定することを含んでなり、より早期の時点で得られた参照値と比較して、より後期の時点での前記サンプル中のMMP2レベルが等しいか又は高いことが、抗血管新生治療に対する延長した応答を示す一方、MMP2レベルが低いことは前記抗血管新生療法に対する抵抗性を示す、ガン患者の抗血管新生治療に対する応答をモニターする方法に関する。

モニタリング方法の1つの好適な実施形態において、より早期の時点及びより後期の時点は、抗血管新生治療のそれぞれより早期のサイクル(n 回目のサイクル； $n=1$)及びより後期のサイクル(($n+x$)回目のサイクル； $x=1$)の時点又はその直前である。抗血管新生治療サイクルは、当該治療に使用する抗血管新生剤のタイプに依存して、1回の抗血管新生剤投与又は数回の逐次投与に相当し得る。例えば、ベバシズマブの場合、1サイクルは、2週間間隔での2回の逐次投与である。

モニタリング方法の別の1つの好適な実施形態において、ガンは神経膠芽腫、特に再発性神経膠芽腫である。

モニタリング方法の更に別の1つの好適な実施形態において、治療は抗VEGF抗体治療、特にベバシズマブ(アバスチン(登録商標))治療である。

本発明に従う方法/使用は、インビボで行うものではなく、インビトロ及び/又はエキソビボで行うものである。

【0026】

本発明の実施には、特に示さなければ、当該技術の範囲内である従来の技法を用いる。そのような技法は文献に十分に説明されている。例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. Ausubel, 2003, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA) ; Molecular Cloning: A Laboratory Manual , 第3版 (Sambrookら, 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) ; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編, 1984) ; Mullisら, 米国特許第4,683,195号 ; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Harries及びS. J. Higgins編 1984) ; Transcription And Translation (B. D. Hames及びS. J. Higgins編 1984) ; Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, A Ian R. Liss, Inc., 1987) ; Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986) ; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984) ; Methods In ENZYMOLOGYシリーズ (J. Abelson及びM. Simon編集主任, Academic Press, Inc., New York)、具体的には第154巻及び第155巻(Wuら編)及び第185巻「Gene Expression Technology」(D. Goeddel編) ; Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller及びM. P. Calos編, 1987, Cold Spring Harbor Laboratory) ; Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer及びWalker編, Academic Press, London, 1987) ; Handbook Of Experimental Immunology , 第I巻～第IV巻 (D. M. Weir及びC. C. Blackwell編, 1986) ; The immunoassay Handbook (D. Wild編, Elsevier LTD, Oxford, 第3版, 2005年5月)を参照。

【0027】

前記特徴に加えて、本発明は更に、本発明に従う方法及び使用を例示する実施例及び添付の図面に言及する下記の説明から明らかになる他の特徴を含む。添付図において、

- 図1は生存分析を表す。A及びB：血漿MMP2ベースラインレベルに応じたシリーズ

10

20

30

40

50

1 患者の無増悪生存(PFS)及び全生存(OS)。C 及び D : 血漿VEGFレベルの進展に応じたシリーズ1患者のPFS及びOS。E 及び F : シリーズ1のMMP2メジアンで二分した血漿MMP2ベースラインレベルに応じたシリーズ2患者のPFS及びOS。G 及び H : シリーズ1のMMP2メジアン(メジアン1)で二分した血漿MMP2ベースラインレベルに応じたシリーズ3患者のPFS及びOS。A、B、E、F、G、H : - (実線) : MMP2 > メジアン1 ; ... (破線) : MMP2 < メジアン1。C、D : - (実線) : VEGFレベル減少 ; ... (破線) : VEGFレベル増加。

- 図2は生存分析を表す：シリーズ1のMMP2メジアンで二分した血漿MMP2ベースラインレベルに応じたシリーズ4患者の無増悪生存(A)及び全生存(B)。A、B : - (実線) : MMP2 > メジアン1 ; ... (破線) : MMP2 < メジアン1。

- 図3は生存分析を表す。A 及び B : 血漿MMP2ベースラインレベルに応じたシリーズ1患者の無増悪生存(PFS)及び全生存(OS)。C 及び D : シリーズ1のMMP2メジアンで二分した血漿MMP2ベースラインレベルに応じたシリーズ2患者のPFS及びOS。E 及び F : シリーズ1のMMP2メジアン(メジアン1)で二分した血漿MMP2ベースラインレベルに応じたシリーズ5患者のPFS及びOS。A、B、C、D、E : - (実線) : MMP2 > メジアン1 ; ... (破線) : MMP2 < メジアン1。C、D。

- 図4はベバシズマブ治療期間中の血漿MMP2レベルの変化を表す。

【実施例】

【0028】

実施例1：材料及び方法

患者

全ての患者は、2007年7月～2010年3月(コホート1及び2)、2003年6月～2007年2月(コホート3)及び2004年9月～2007年5月(コホート4)にティモンヌ大学病院(マルセイユ)で募った。参加した患者の特徴を表I及びIIに記載する。適格患者には、放射線療法の終時から少なくとも3ヶ月間隔を開けてベバシズマブで治療された18歳以上の再発性高悪性度神経膠腫患者が含まれていた。治療レジメン、評価及びフォローアップは、コホート1及び2について同様であった。疾患の再発又は増悪のためのベバシズマブ投与の開始時に、この試験に参加するように患者に提案した。血漿はベバシズマブ投与前に集めた。所内及び国内ガイドラインに従って、本研究の治験的性質を説明し、全ての患者から書面によるインフォームドコンセントを得た。このプロトコルは所内の審査委員会により承認された。

【0029】

当初コホート(コホート1)

コホート1には、少なくとも2回の量を入手できた26人の再発性HGG患者が含まれていた：ベースライン時点は1回目のベバシズマブ投与前に集め、別の時点は2回目の投与直前である15日目に集めた。全ての患者をベバシズマブ10mg/kgとイリノテカン340mg/m²(酵素誘導抗てんかん薬を服用している場合)又は125mg/m²(酵素誘導抗てんかん薬を服用していない場合)との組合せで隔週で治療された。参加した26人の患者の特徴を表Iに記載する。ベバシズマブ治療を動機付ける増悪の診断は、臨床データ及び磁気共鳴画像(MRI)データに基づいたが、主任医師が必要と判断した場合にはフルオロデオキシグルコースポジトロンエミッショントモグラフィー(FDG-PET)画像データによった。偽増悪を回避するため、放射線療法後からベバシズマブ開始前まで3ヶ月の間隔が必要であった。いずれの患者も再発の組織学的確定はなされていなかったので、本研究の組織学報告が、各患者について最初の詳細な組織学的所見である。最初の詳細な組織学的所見は、20人(76.9%)の患者については神経膠芽腫であった；これら患者は全て、以前に放射線療法及びテモゾロマイドで治療されていた。ベバシズマブ及びイリノテカンは、13人、6人及び1人の患者について、ギリアデル又はBCNU(カルムスチン)の後の第2選択、第3選択及び第4選択で適用した。6人の患者は、当初の組織学的所見が混合星状細胞腫グレードIIIであった。以前に受けた治療は、プロカルバジン、ロムスチン(CCNU)及びビンクリスチン(PCV)並びに放射線療法(n=4)又はBCNU、テモゾロマイド及び放射線療法(n=2)であった。ベバシズマブ及びイリノテカンは、テモゾロマイド、ギリアデル又はカルボプラスチンエトポ

10

20

30

40

50

シドの後の第3選択又は第4選択で適用した。フォローアップの期間は、24.6及び39であった。最後のフォローアップ時点(2012年4月15日)で、24人の患者が疾患で死亡していた。

【0030】

コホート2

ベースライン時点でのみ入手できた患者が第2コホートを構成する。類似の特徴を有する50人の患者が含まれていたが、40%はベバシズマブ開始時に低いパフォーマンススコア(カルノフスキーパフォーマンススコア(KPS) 60)を示す(第1コホートでは15.4%であるのに対して)。31人(62%)の患者は最初の詳細な組織学的所見がGBMであり、以前に放射線療法及びテモゾロマイドで治療されていた。ベバシズマブ及びイリノテカンは、19人で第2選択治療として、11人で第3選択治療として、1人の患者で第4選択治療として投与された。当初グレードII又はIIIの腫瘍を有していた患者のうち、19人は、11%(n = 2)が第2選択治療として、68%(n = 13)が第3選択治療として、21%(n = 4)が第4選択治療としてベバシズマブベースの治療レジメンを受けた。最後のフォローアップ時点(2012年4月15日)で、全ての患者が疾患で死亡していた。

【0031】

コホート3

観察された結果を考慮して、アルキル化剤ベースの化学療法レジメンで治療された(その前の治療でも後の治療でもベバシズマブが投与されていない)新たに診断されたGBM患者からなる第3のコホートを、血漿コレクションから遡及的に同定した。再発時には血清は稀にしか入手可能でなかったので、事前に又は専ら化学療法で治療された患者を選択した。すなわち、BCNU及びテモゾロマイドの組合せで治療された巨大腫瘍を有する患者(n = 18)又は唯一の治療としてテモゾロマイドで治療された手術不能腫瘍及び低いKPSを有する老齢患者(n = 2)を選択した。全ての症例で、血漿は化学療法の初回施術前に集めた。全ての患者が治療開始時に測定可能な疾患を有していた。フォローアップ期間は93.4ヶ月であった。最後のフォローアップ時点(2012年4月15日)で、19人の患者が疾患で死亡していた。

【0032】

コホート4

観察された結果を考慮して、第1選択治療で化学療法(テモゾロマイド)と放射線療法とを組み合わせた標準レジメンで治療された(その前の治療でも後の治療でもベバシズマブが投与されていない)新たに診断されたGBM患者からなる第4のコホートを、血漿コレクションから遡及的に同定した。全ての症例で、血漿は化学療法の初回施術前に集めた。全ての患者がPFS及びOSについて評価可能である。

【0033】

コホート5

観察された結果を考慮して、化学療法レジメンで処置された(以前又は以後に選択された治療としてベバシズマブ投与がなされていない)再発性HGG患者からなる第5のコホートを、血漿コレクションから遡及的に同定した。全ての症例で、血漿は化学療法の最初の施行前に集めた。全ての患者がPFS及びOSについて評価可能である。

【0034】

臨床フォローアップ

患者の臨床フォローアップを4週間ごとに行った。地元のガイドラインに従ってMRIを8週間ごとに行なった。応答は、抗血管新生剤で観察される浸潤性増悪を考慮するために評価の一部としてFLAIRシーケンスに組み込まれているRANO基準に従って評価した。全ての応答が、2ヶ月の間隔を開けて行われた後のMRIで確認された。コホート1及び2で観察された全ての応答を検討した。

【0035】

血漿マーカーアッセイ

血漿サンプルは、患者からサイクル1の前、サイクル1の終了後及び可能な場合には増

10

20

30

40

50

悪時に集めた。末梢血をクエン酸添加Vacutainer(登録商標)チューブ中に採取し、直後に混合し、採取30分以内に遠心分離した。血漿を取り出し、凍結貯蔵チューブに移した。直ぐにサンプルを-80℃で貯蔵した。

サンプルは、血管内皮増殖因子(VEGF)、血管内皮増殖因子レセプター1(VEGF R1)、胎盤成長因子(PIGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、間質細胞由来因子1(SDF 1)、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベータ(u-PA)、プラスミノゲンアクチベータインヒビター-1(PAI-1)、マトリクスメタロプロテイナーゼ2(MMP2)、マトリクスメタロプロテイナーゼ7(MMP7)、マトリクスメタロプロテイナーゼ9(MMP9)及びアドレノメジュリン(AM)のレベルについて、市販の酵素免疫測定法(ELISA)キット(R&D Systems)を用いて分析した。サンプルは二連で用い、その平均を記録した。

10

【0036】

統計分析

カテゴリ変数は、頻度及び対応するパーセンテージとしてまとめ、連続変数はメジアン及び範囲としてまとめた。全生存(OS)は、無作為化から(いずれの原因であっても)死亡までの期間と規定した(最後に連絡がとれた日付けを期末とした)。無増悪生存(PFS)は、無作為化からRANO基準による増悪の記録又は死亡までの期間であった(PFS事象が報告されなかつた患者については最後の疾患評価記録の日付を期末とした)。カプラン-メイヤー法を用いて生存及びPFSの分布について評価した。OS及びPFSの終点についての一変量比較にはログランク検定を用いた。コックス比例ハザードモデルを多変量分析に用い、回帰モデルにおける危険率を評価した。報告したp値は両側検定のものであり、p < 0.05を統計学的有意とみなした。応答は、応答性個体(RANO基準による部分的又は完全な応答である最良応答)及び非応答性個体(疾患安定又は増悪)に分けた。被検者は、カットオフとしてメジアン値を用い、バイオマーカーのベースラインレベルに基づいて2群に分けた。バイオマーカー群の各々で、フィッシャーの正確検定を両側5%タイプIエラー率で用いて応答と治療との間の関連性を検出した。マン-ホイットニーU検定を用いて応答とバイオマーカー連続値との間の関連性を検出した。受信者動作特性(ROC)曲線分析を用いて、応答決定についてのMMP2カットオフの感度及び特異性を計算した。生存状況は2012年4月に更新した。

20

【0037】

実施例2：高い血清MMP2ベースラインレベルは、再発性高悪性度神経膠腫についてベバシズマブで治療した患者における応答及び生存と相関する

30

特に神経膠芽腫における、ベバシズマブの顕著で異質な活性を考慮して、本発明者らは、再発性高悪性度神経膠腫(HGG)についてベバシズマブで治療された患者における応答及び生存を予知するための潜在的血清学的バイオマーカーの価値を調べた。

ティモンヌ大学病院(フランス、マルセイユ)で再発性HGGについて2007年7月～2010年3月にベバシズマブベースのレジメンで治療された26人の患者からなる第1のコホート(コホート1)において、ベースライン時、及びベバシズマブ開始から2週間の間隔を開けて、ELISAを用いて、対象の11マーカーのセット(VEGF、VEGF-R1、FGF、SDF1- α 、PIGF、u-PA、PAI1、MMP2、MMP7、MMP9及びアドレノメジュリン(AM))を分析した；最後のフォローアップの日付は2012年4月であった。相関関係は、再発性HGGについてベバシズマブで治療された、同じ機関の50人の患者からなる別個のコホート(コホート2)で妥当と立証された。その後、他の3つの患者コホートで試験した：神経毒で治療された20人の患者からなる第3コホート(コホート3)、神経毒及び放射線療法で治療された24人の患者からなる第4コホート(コホート4)及び神経毒で治療された34人の患者からなる第5コホート(コホート5)；3つのコホート全てでベバシズマブは使用されていなかった。本研究に参加した患者の特徴を表I及びIIに記載する。

40

【0038】

【表1】

表I：患者集団(シリーズ1~4)の特徴

	シリーズ1 (n=26) 患者数 %	シリーズ2 (n=50) 患者数 %	シリーズ3 (n=20) 患者数 %	シリーズ4 (n=24) 患者数 %
メジアン MMP2 血漿レベル	227.5 ng/ml	185.2 ng/ml		
年齢	56.1 (22.3-73.2)	59.7 (18.3-76.7)	56.1 (44.4-76.8)	62.2 (37.7-72.6)
性別	16 男性 / 10 女性	34 男性 / 16 女性	14 男性 / 6 女性	12 男性 / 12 女性
組織学 グレード II	0 3.8	5 10	0 0	0
未分化	6 19.2	14 28	0 0	0
膠芽細胞腫	20 76.9	31 62	20 100	24 100
応答	12 48	18 36.7	5 25	
完全応答	3 12	1 2	1 5	
部分的応答	9 36	17 34.3	4 20	
応答なし	13 52	31 63.3	15 75	
安定疾患	2 8	15 30.6	5 25	
増悪	11 44	16 32.7	10 50	
評価不能	1	1	0	
治療の次数				
1	0 0	0 0	20 100	24 100
2	15 57.5	21 46		
3	7 26.9	24 48		
4	3 11.5	4 4		
5	0	1 2		
6	1 3.8			
KPS				
50	0	2 4	1 5	0
60	4 15.4	18 36	7 35	2
70	15 57.7	18 26	7 35	6
80	7 26.9	12 24	5 25	14
90				2
OS(月)	8.7	7.1	6.2	13.5 (8.7-17.9)
応答個体	13	14.6	20.6	
非応答個体	4.5	5.8	5.4	
PFS(月)	4.4	5.3	4.2	9.1 (8.7-9.5)
応答個体	8.2	8	17.9	
非応答個体	2.8	3	2.7	

【0039】

10

20

30

40

【表2】

表II：患者集団(シリーズ5)の特徴

シリーズ5 (n=34) 患者数 %		
メジアン MMP2 血漿レベル		178.5 ng/ml
年齢 性別		57.7 (36 ;2-73.9) 22 男性 / 12 女性
当初の組織学 グレード II		0 0
未分化		2 6
膠芽細胞腫		32 94
応答		3.2
完全応答		- -
部分的応答		1 3.2
応答なし		30 86.8
安定疾患		3 9.7
増悪		27 87.1
治療の次数 2		8 23.5
≥ 3		26 76.5
KPS 50-60		
70		
≥ 80		
OS(月) 応答個体		6.1
非応答個体		
PFS(月) 応答個体		1.9
非応答個体		

血漿マーカー量は、RANO基準で分析したときの客観的応答、無増悪生存(PFS)及び全生存(OS)と相關した。

【0040】

1) 結果

当初コホート(コホート1)

当初の患者データセット(n = 26人の患者)において、25人の患者について応答を評価できた(表I)。12人(48%)の患者が完全な(n = 3)又は部分的な(n = 9)客観的応答を示した一方、13人(52%)の患者は少なくとも2ヶ月間安定であった(n = 2)か又は増悪を示した(n = 11)。メジアンPFSが応答性患者での8.2ヶ月(IC95 : 2.3-14.0)に対し非応答性患者について2.8ヶ月(IC95:1.6-4.1)であった(p < 0.001)ので、応答は持続性であった；応答は生存に相關し、メジアン全生存は応答性患者での13ヶ月(IC95 : 5.8-20.1)に対し非応答性患者について4.5ヶ月(IC95 : 2.7-6.2)であった(p < 0.001)。この集団のメジアンPFSは

10

20

30

40

50

4.4ヶ月であり(IC95 : 2.1-5.5)、メジアン全生存は8.7ヶ月であった(IC95 : 5.3-11.7)。

初回ベバシズマブ投与後のバイオマーカー動態は、試験した全ての患者におけるPIGFレベルの減少により特徴付けられた一方、他のマーカーは15日目で異質な変動を示した。VEGFは25人中16人の患者で減少した一方、VEGFRは26人中18人の患者で増加した。MMP2及びMMP9は25人中それぞれ10人及び6人の患者で増加する。

バイオマーカーとベバシズマブ治療成果との関連を、先ず、ベースラインレベルについて分析した。単変量分析で、強い相関が、MMP2及びMMP9レベルと客観的応答、無増悪生存及び全生存との間について観察された。MMP2レベルが高い12人の患者のうち10人(83.3%)で応答が観察された一方、MMP2レベルが低い13人の患者のうち2人(15.4%)の患者しか客観的応答を示さなかった($p = 0.001$; 表III)。

10

【 0 0 4 1 】

【表3】

表III：患者コホート及び血漿MMP2レベルによる応答率

	シリーズ 1			シリーズ 2			シリーズ 3		
	応答個体 (R)	非応答個体 (NR)	応答率 (RR)	R	NR	RR	R	NR	RR
MMP2 < メジアンシリーズ 1	2	11	15.4%	6	28	17.6%	4	13	24%
MMP2 > メジアンシリーズ 1	10	2	83.3%	12	3	80%	1	2	33.3%
P 値			0.001			< 0.0001			0.601

20

【 0 0 4 2 】

MMP2と応答との間のこの相関は、MMP2レベル値を連続変量とみなしても有意なままである($p = 0.005$)。逆に、低いMMP9レベルはより高い応答確率と関連付けられ、11人の患者のうち8人(72.7%)でORが観察されたのに対し、MMP9レベルが高い13人の患者では4人(30.8%)にORが観察された($p = 0.041$)。しかし、MMP9を連続変量とみなすと、MMP9と応答との間の相関は確認されない($p = 0.094$)。反応性個体と非反応性個体との弁別における血漿MMP2レベルの成績を評価するため、ROC曲線分析を行った。血漿MMP2レベルは高い弁別値を有していた(曲線下面積0.827(IC95% : 0.624-0.947 ; $p = 0.0017$))。カットオフ値227.5ng/mlで、感度は83.3%(IC95% 50.9-97.1)であり、特異性は84.6%(IC95% 53.7-97.3)であった。

30

単変量分析において、MMP2は、PFS($p = 0.004$)及びOS($p = 0.001$)の両方に有意に影響する(表IV；図1及び図3)。MMP9も同様であった(PFSについて $p = 0.007$; OSについて $p = 0.015$; 表IV)。

【 0 0 4 3 】

【表4】

表IV：メジアン血漿バイオマーカーによる無増悪生存(PFS)及び全生存(OS)の単変量分析及び多変量分析

血漿 バイオマーカー	PFS			OS			
	单变量		多变量	单变量		多变量	
	p 値	p 値	危険率	p 值	p 值	危険率	
VEGF	0.255			0.263			10
VEGF 進化	0.047	0.033*	2.822 (1.088-7.321)	0.028	0.021*	3.170 (1.193-8.422)	
VEGF R1	0.789			0.6			
VEGF R1 進化	0.191			0.447			
PIGF	0.195			0.475			
FGF	0.841			0.904			
FGF 進化	0.692			0.543			
SDF1	0.046	0.068*	2.267 (0.942-5.456)	0.101			20
SDF1 進化	0.951			0.966			
uPA	0.063			0.016	0.004*	4.289 (1.598-11.516)	
uPA 進化	0.612			0.982			
PAI1	0.408			0.389			
PAI1 進化	0.627			0.565			
MMP2	0.004	0.007*	3.925 (1.465-10.517)	0.001	0.005*	4.618 (1.577-13.527)	
MMP2 進化	0.672			0.621			
MMP7	0.121			0.259			30
MMP7 進化	0.754			0.493			
MMP9	0.007	0.016*	4.290 (1.306-14.084)	0.015	0.025*	3.487 (1.170-10.390)	
MMP9 進化	0.303			0.42			
AM	0.429			0.401			
AM 進化	0.748			0.763			

* 年齢及びカルノフスキーチャートにより調整

【0044】

当初のMMP2レベルが高い患者は、7.3ヶ月のメジアンPFS(IC95 : 5.2-9.4)及び12.8ヶ月のメジアンOS(IC95 : 10.4-15.2)を示したのに対し、当初のMMP2レベルが低い症例では、メジアンPFSは3.0ヶ月であり(IC95 : 2.5-3.5)、メジアンOSは5.9ヶ月であった(IC95 : 4.0-7.8)。当初のMMP9レベルが低い患者は、メジアンPFSが8.2ヶ月(IC95 : 1.4-15.0)であり、メジアンOSが12.3ヶ月(IC95 : 0-26.1)であったのに対し、当初のMMP9レベルが高い症例では、メジアンPFSは3.7ヶ月(IC95 : 2.9-4.6)であり、メジアンOSが6.9ヶ月(IC95 : 4.6-9.3)であった。uPA及びSDF1はそれぞれ全生存(p = 0.016)又はPFS(p = 0.046)にのみ相關した。他のマーカーのベースラインレベルはいずれも、応答、PFS及びOSに対して統計学的に有意な関連はなかった(表IV)。他の因子(年齢、KPS、組織学及び以前の治療タイプの数を含む)も、コホート1における転帰に有意な影響を及ぼさなかった。バイオマーカーのベースラインレベル及び潜在的な予後因子(年齢及びKPS)を含む多変量コックス回帰モ

40

50

デルにおいて、MMP2及びMMP9のベースラインレベルは、PFS(MMP2は危険率3.925 ; 95 % CI 1.465-10.517 ; p = 0.007、MMP9は危険率4.290 ; 95 % CI 1.306-14.084 ; p = 0.016)及びOS(MMP2は危険率4.618 ; 95 % CI 1.577-13.527 ; p = 0.005、MMP9は危険率3.487 ; 95 % CI 1.170-10.390 ; p = 0.025)について有意なままであった。

【 0 0 4 5 】

次に、最初の1月のバイオマーカー動態とベバシズマブ治療成果との関係を分析した。単変量分析において、VEGFの初期動態のみがPFS(p = 0.047)及びOS(p = 0.021)の両方について成果に有意に相關した。VEGFが当初減少する患者は、メジアンPFSが5.4ヶ月(IC95 : 2.5-8.2)であったのに対し、VEGFが当初減少する症例ではメジアンPFSは2.8ヶ月(IC95 : 2.7-3.0)であった。VEGFレベルが当初減少した患者及び当初増大した患者のメジアンOSは、それぞれ10.7ヶ月(IC95 : 7.5-13.9)及び4.4ヶ月(IC95 : 1.0-7.7)であった。他のバイオマーカーはいずれも、初期変化と転帰との間に相關を示さなかった。バイオマーカーレベルの初期動態、年齢及びKPSを含む多変量コックス回帰モデルにおいて、VEGFの初期変化は、PFS(危険率2.822 ; 95 % IC95 : 1.088-7.321 ; p = 0.033)及びOS(危険率3.170 ; 95 % CI 1.193-8.422 ; p = 0.021)について有意なままである(表IV；図1及び図3)。

10

【 0 0 4 6 】

コホート2

当初コホートの結果を考慮して、再発性HGGについてベバシズマブ及びイリノテカンで処置した50人の患者からなる第2コホートを特定した。これら患者の血漿はベバシズマブ投与前のベースライン時のみで入手できた。患者を選択したこの集団における客観的応答率は36.7%であり、そのうち完全な応答は2%であり部分的な応答は34.3%であった。応答性患者で観察されたPFS及びOSは、コホート1で観察されたPFS及びOSに類似するものであった(それぞれ8ヶ月及び14.6ヶ月)。コホート2のメジアンPFSは5.3ヶ月(IC95 : 3.4-6.7)であり、メジアンOSは7.1ヶ月(IC95 : 5.9-8.2)であった(表I)。

20

ベースラインMMP2及びMMP9は、このコホートで評価した唯2つのバイオマーカーであった。コホート1で規定されたMMP2及びMMP9のカットオフを以後の分析に適用した。このコホートにおいて、16人(32%)の患者が高いMMP2レベルを示し、27人(54%)の患者が低いMMP9レベルを示す。応答は49人の患者について評価することができた。MMP2は、この集団において応答率に同様に影響し、MMP2レベルが高い15人の患者のうち12人で客観的応答(RR : 80%)が観察され、MMP2レベルが低い患者のうち6人で客観的応答(RR : 17.6%)が観察された(p < 0.0001 ; 表III)。高い血漿MMP2レベルはPFS及びOSと関連付けられ、メジアンPFS及びOSがそれぞれ7.1ヶ月(IC95% : 5.3-8.9)及び11.8ヶ月(IC95% : 7.6-16.1)であったのに対し、MMP2レベルが低い症例ではそれぞれ4.2ヶ月(IC95% : 2.9-5.5)及び5.9ヶ月(IC95% : 5.4-6.4)であった(PFSについて p = 0.009、OSについて p = 0.009 ; 図1及び図3)。コホート2において、MMP9レベルとPFS又はOSとの間に相関は観察されなかった。

30

【 0 0 4 7 】

コホート3

この集団における客観的応答率は25%であり、5%の完全な応答及び20%の部分的な応答を含んでいた。コホート3のメジアンPFSは4.2ヶ月(IC95 : 1.7-6.6)であり、メジアンOSは6.2ヶ月(IC95 : 3.7-7.9)であった(表I)。応答性患者において観察されたPFS及びOSは、非応答性患者より有意に高かった(OSについては p = 0.002、PFSについては p = 0.005)。ベースラインのMMP2及びMMP9は、このコホートにおいて評価した唯2つのバイオマーであった。コホート1で規定したMMP2及びMMP9のカットオフを以後の分析に適用した。このコホートでは、3人(15%)の患者が高いMMP2レベルを示し、12人(60%)の患者が低いMMP9レベルを示す。MMP2はこの集団において応答率に影響しなかった。MMP2レベルが高い症例及びMMP2レベルが低い症例では、それぞれ1人及び4人に客観応答が観察された(p = 0.601)。MMP2ベースラインレベルとPFS(p = 0.278)又はOS(p = 0.726)との間に関連はなかった(図1)。コホート3において、MMP9レベルとPFS(p = 0.335)、OS(p = 0.490)又は応答(p = 0.601)のいずれの間とも相関は観察されなかった。

40

【 0 0 4 8 】

50

コホート4

腫瘍の外科的切除を受けた患者からなるこのコホートでは応答を評価できなかった。メジアンPFS及びOSはそれぞれ9.1ヶ月(95%CI:8.7-9.5)及び13.5ヶ月(95%CI:8.7-17.9)であった。

ベースラインのMMP2及びMMP9は、このコホートにおいて評価した唯2つのバイオマーカーであった。コホート1で規定したMMP2及びMMP9のカットオフを以後の分析に適用した。このコホート(n=24)において、11人(46%)の患者が高いMMP2レベルを示した。コホート1及び2における観察とは反対に、多変量分析において、高いMMP2レベルがより短いPFS($p=0.008$)及びOS($p=0.047$)と相関付けられた。

【0049】

10

【表5】

表V: メジアン血漿バイオマーカーによる無増悪生存(PFS)及び全生存(OS)の
単変量分析及び多変量分析

	PFS	単変量	多変量	HR	OS	単変量	多変量	HR
MMP2		0.006	0.008	3.821 (1.417-10.305)		0.094	0.047	2.479 (1.014-6.062)
低	10.0 (6.7-13.2)				15.7 (9.4-22.1)			
高	8.2 (5.3-11.1)				10.9 (7.7-14.2)			
MMP9		0.214				0.251		
低	8.8 (7.7-9.9)				11.2 (8.2-14.1)			
高	9.1 (8.5-9.7)							

コホート4において、MMP2ベースラインレベルと、PFS($p=0.006$)との間にもOS($p=0.094$)との間にも関連性はなかった(表V及び図2)。コホート4において、MMP9レベルと、PFS($p=0.214$)との間にもOS($p=0.251$)との間にも相関は観察されなかった(表V)。

【0050】

20

コホート5

この患者コホートでは応答を評価できなかった。コホート5において、MMP2ベースラインレベルと、PFS($p=0.757$)との間にもOS($p=0.066$)との間にも関連性はなかった(表VI及び図3)。

【表6】

30

表VI: メジアン血漿バイオマーカーによる無増悪生存(PFS)及び
全生存(OS)の分析

	コホート3:細胞毒	
	PFS	OS
低 MMP2	1.9	9.2
高 MMP2	2.0	4.2
p 値	0.757	0.066

40

【0051】

2)結論

ベバシズマブベースの治療レジメンで治療され、同じ機関で評価された再発性高悪性度神経膠腫患者からなる2つのコホートにおいて、より高いベースライン血漿MMP2レベルは、年齢及びKPSスコアで調整後、増大した応答率、無増悪生存及び全生存に関連付けられた。これら2つのコホートでは小数の患者を評価したにもかかわらず、この効果の大きさは高度に有意であり、RR、PFS及びOSの全てについて、試験したコホートの各々で、そし

50

て 2 つのコホートの間でも類似していた。

特にKPSに関して選択された患者が含まれるコホート 2 (36.7%) より高い比率(48%)の客観的応答がコホート 1 で観察された(コホート 1 及び 2 ではそれぞれ84.6% 及び50% の患者が70以上のKPSを有していた)。しかし、ベバシズマブで治療された患者からなるこれら 2 つのコホートでは、客観的応答に関連付けられた生存は、2 つのコホートの間で類似しており(13ヶ月及び14.6ヶ月)、非応答性患者で観察された生存(4.5ヶ月及び5.8ヶ月)より明らかに優れていた。応答強度の評価は、MMP2レベルとベバシズマブに対する応答との間に観察される強い相関を補強し得る。

MMP2と応答、無増悪生存及び生存との間の関連性の度合いが類似することを考慮してまとめるに、これら結果は、MMP2血漿レベルが高悪性度神経膠腫についてベバシズマブで治療された患者の転帰を予知する強力な候補でありそうであるという事実を支持する。

【 0 0 5 2 】

この関連性は、ベバシズマブなしで、放射線療法と組み合わせて又は組み合わせずに細胞毒で治療された患者からなる 2 つのコホートでは観察されなかった。このことは、抗血管新生療法の効力の予知バイオマーカーとしてのMMP2の特異性を証明する。

試験した他の見込みのあるバイオマーカーについて、MMP9ベースラインレベルは 2 つのコホートの間で一貫性のない結果を示した一方、コホート 1 でPFS及びOSに影響したVEGFの動態は、コホート 2 で評価できなかった。以前の研究と一致して、分析した全ての患者においてPIGFの増加が観察された一方、試験した他の見込みのあるバイオマーカーの変化は不均一であった。しかし、これら変化のいずれも、ベバシズマブを用いるほとんどの研究において観察されているように、転帰に影響するようである。

本研究は、高いMMP2血漿レベルが抗血管新生療法の有益性についての予知バイオマーカーであることを最初に証明するものであり、MMP2血漿レベルが低い患者は、あたたとしてもほとんど恩恵を受けないようであるので、ベバシズマブ治療の恩恵を受ける確率が高い患者の選択を可能にし得る。MMP2血漿レベルが低い患者は、ベバシズマブに対して客観的応答を示す確率が15%であり、予測されるメジアンPFS及びOSは3.0ヶ月及び5.9ヶ月である。これら患者は、疾患の経過中の早期に新たな治験薬を提案され得る。ベバシズマブは、現在、大規模なプラシーボコントロール第III相臨床試験において、新たに診断されたGBMを有する患者について最新セッティングで試験中であるので、MMP2、MMP9及びVEGFの初期動態の評価がこの知見を補強するために必要である。

【 0 0 5 3 】

実施例 3：ベバシズマブ治療期間中のMMP2レベルの変化

拡大コホート 1 において、増悪までの複数の時点でMMP2血漿レベルを分析した。実験手順は実施例 1 及び 2 に記載したとおりであった。実施例 1 及び 2 に記載した当初コホート 1 に由来する拡大コホート 1 には、複数時点でサンプル採取ができた41人の再発性HGG患者が含まれていた：ベースライン時点はベバシズマブの初回投薬前に、別の 1 つの時点は 2 回目のベバシズマブ投与(サイクル 1)の直前の15日目に、別の 1 つの時点は30日目(サイクル 2)に、別の 1 つの時点は或る更なる回のベバシズマブ投与(サイクル N)時に、別の 1 つの時点は増悪の前に、更に別の 1 つの時点は増悪時に集めた。

MMP2は、ベバシズマブ治療開始後に増加し($p = 0.001$)、増悪時に減少した($p = 0.033$ ；図 4)。これら結果は、ベバシズマブ治療期間中のMMP2血漿レベルを使用して、治療に対する応答をモニターし、治療された患者が延長した応答(無増悪)を示すか又は治療への抵抗性(増悪)を示すかを決定することが可能であることを証明する。

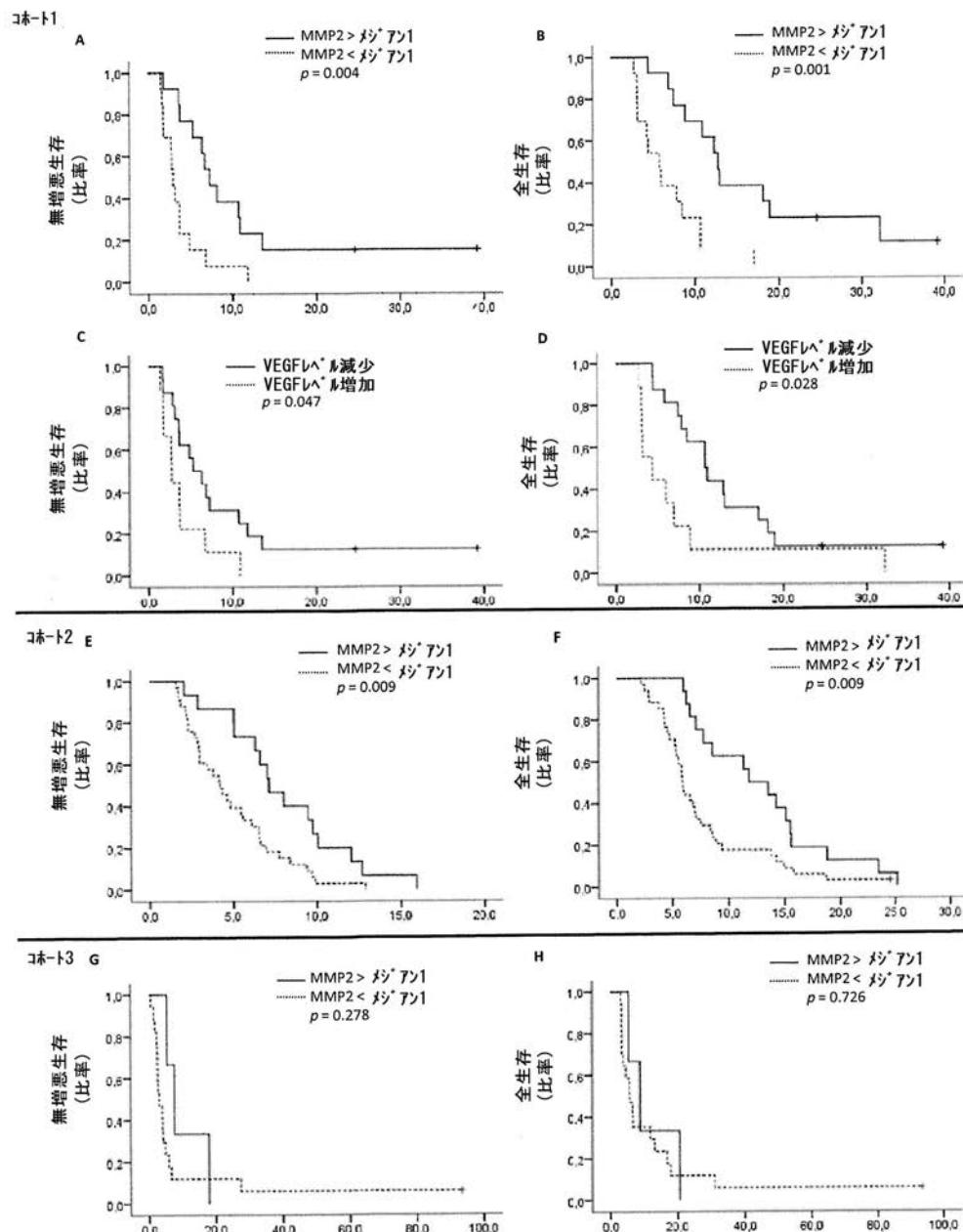
10

20

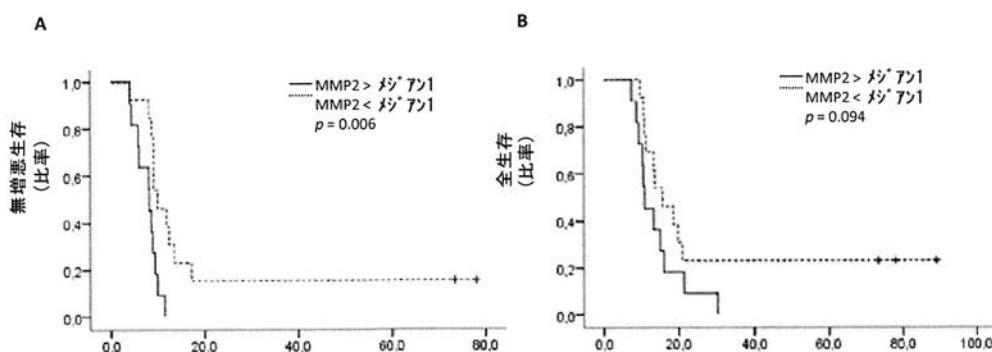
30

40

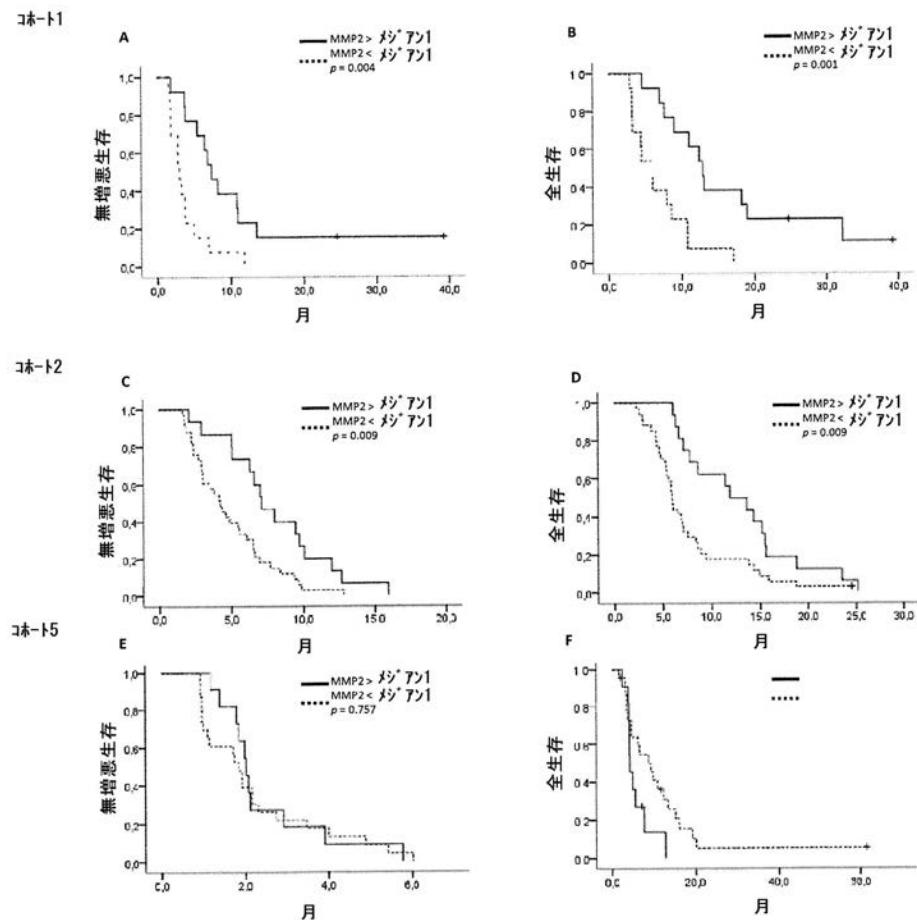
【図1】



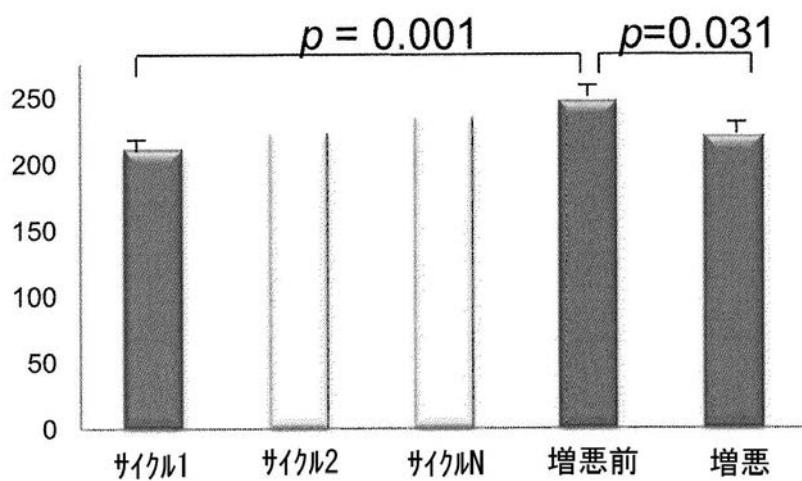
【図2】



【図3】



【図4】

MMP2 変化

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2013/054275

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 ADD.
--

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BATCHELOR TRACY T ET AL: "Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, USA, vol. 28, no. 17, 10 June 2010 (2010-06-10), pages 2817-2823, XP008156728, ISSN: 1527-7755, DOI: 10.1200/JCO.2009.26.3988 [retrieved on 2010-05-10] abstract page 2820, column 2, paragraph 1 page 2821, column 1, paragraph 1 page 2822, column 1, paragraph 4 - paragraph 5; table 5 ----- -/-	1-15

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> 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

Date of mailing of the international search report
--

30 August 2013

09/09/2013

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Gundlach, Björn

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2013/054275

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	S. DEPRIMO ET AL: "Surrogate biomarkers in evaluating response to anti-angiogenic agents: focus on sunitinib", ANNALS OF ONCOLOGY, vol. 18, no. Supplement 10, 1 September 2007 (2007-09-01), pages x11-x19, XP055039277, ISSN: 0923-7534, DOI: 10.1093/annonc/mdm409 page X14 - page X17; table 1 ----- COX G ET AL: "A biological staging model for operable non-small cell lung cancer", THORAX, BMJ PUBLISHING GROUP, vol. 56, no. 7, 1 July 2001 (2001-07-01), pages 561-566, XP008156726, ISSN: 0040-6376, DOI: 10.1136/THORAX.56.7.561 the whole document ----- MILLER J C ET AL: "Imaging angiogenesis: Application and potential for drug development", JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB , vol. 97, no. 3 2 February 2005 (2005-02-02), pages 172-187, XP008156756, ISSN: 0027-8874, DOI: DOI:10.1093/jnci/dj1023 Retrieved from the Internet: URL: http://jncicancerspectrum.oxfordjournals.org/ the whole document ----- ROY R ET AL: "Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer", 20091101, vol. 27, no. 31, 1 November 2009 (2009-11-01), pages 5287-5297, XP008156700, DOI: 10.1200/JCO.2009.23.5556 the whole document ----- WO 2012/167278 A1 (ALMAC DIAGNOSTICS LTD [GB]; HARKIN DENNIS PAUL [GB]; MCDYER FIONNUALA) 6 December 2012 (2012-12-06) claims 1-3,13 -----	1-15 1-15 1-15 1-15 1-15 1-15
X,P		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2013/054275

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2012167278	A1 06-12-2012	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
C 1 2 Q 1/37 (2006.01)	C 1 2 Q 1/37	

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

(71)出願人 511025248

アシスタンス ピュブリック - オピトー ド マルセイユ
ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE MARSEILLE
フランス、エフ - 13354 マルセイユ セデックス、リュ プロシエ 80
80 rue Brochier, F-13354 Marseille Cedex, France

(74)代理人 100065248

弁理士 野河 信太郎

(74)代理人 100159385

弁理士 甲斐 伸二

(74)代理人 100163407

弁理士 金子 裕輔

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(74)代理人 100174883

弁理士 富田 雅己

(72)発明者 シノ,オリヴィエ

フランス、エフ - 13100 エクサン - プロヴァンス、ルート デ パンシナ 4300、シェーヌ

(72)発明者 タブレ,エメリ

フランス、エフ - 13009 マルセイユ、ブルバール ギュスタヴ ガネ 13、バット ジー

-

F ターム(参考) 2G045 AA26 CA26 CB03 DA14 DA36

4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ36 QR48 QR72 QR77 QS28

QS33 QS36 QS39 QX02

4C084 AA17 NA20 ZA36 ZB26 ZC20

4C085 AA15 EE01