

(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2015-505818  
(P2015-505818A)

(43) 公表日 平成27年2月26日(2015.2.26)

(51) Int.Cl.	F 1			テーマコード (参考)
<b>A61K 38/00</b> (2006.01)	A 61 K	37/02	Z N A	4 C 084
<b>A61K 45/00</b> (2006.01)	A 61 K	45/00		4 C 085
<b>A61P 35/00</b> (2006.01)	A 61 P	35/00		4 C 086
<b>G01N 33/574</b> (2006.01)	G 01 N	33/574	D	4 H 045
<b>G01N 37/00</b> (2006.01)	G 01 N	33/574	A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-541396 (P2014-541396)	(71) 出願人	511025307 ファイブ プライム セラピューティック ス インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ ス サンフランシスコ ツー コーポレイ ト ドライブ
(86) (22) 出願日	平成24年11月13日 (2012.11.13)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成26年6月27日 (2014.6.27)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/064772	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 國際公開番号	W02013/074492	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 國際公開日	平成25年5月23日 (2013.5.23)		
(31) 優先権主張番号	61/559, 259		
(32) 優先日	平成23年11月14日 (2011.11.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	61/616, 761		
(32) 優先日	平成24年3月28日 (2012.3.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌を治療する方法

## (57) 【要約】

F G F R 1 遺伝子増幅を含む癌を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態において、当該方法は、線維芽細胞増殖因子受容体1 (F G F R 1) 細胞外ドメイン (E C D) および / または F G F R 1 E C D 融合分子を投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、当該方法は、線維芽細胞増殖因子受容体1 (F G F R 1) 細胞外ドメイン (E C D) および / または F G F R 1 E C D 融合分子を、少なくとも 1 種のさらなる治療剤と組み合わせて投与する工程を含む。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

対象における、FGFR1遺伝子増幅を有する癌を治療する方法であって、FGFR1遺伝子増幅が、線維芽細胞増殖因子受容体1(FGFR1)細胞外ドメイン(ECD)またはFGFR1-ECD融合分子に対する癌の治療反応性の指標であり、

該方法が、治療有効量のFGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子を該対象に投与する工程を含む、方法。

**【請求項 2】**

対象における癌を治療する方法であって、

治療有効量の線維芽細胞増殖因子受容体1(FGFR1)細胞外ドメイン(ECD)またはFGFR1-ECD融合分子を該対象に投与する工程を含み、

FGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子の投与前に、該癌の細胞の少なくとも一部がFGFR1遺伝子増幅を有することが決定され、かつ

癌におけるFGFR1遺伝子増幅が、FGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子に対する該癌の治療反応性の指標である、方法。

**【請求項 3】**

FGFR1遺伝子増幅を有する前記癌の前記細胞の少なくとも一部が、FGFR1遺伝子を少なくとも3コピー含む、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項 4】**

FGFR1遺伝子増幅を有する前記癌の前記細胞の少なくとも一部が、FGFR1遺伝子を少なくとも4コピー含む、請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

FGFR1遺伝子増幅を有する前記癌の前記細胞の少なくとも一部が、FGFR1遺伝子を少なくとも5コピー含む、請求項3に記載の方法。

**【請求項 6】**

FGFR1遺伝子増幅を有する前記癌の前記細胞の少なくとも一部が、FGFR1遺伝子を少なくとも6コピー含む、請求項3に記載の方法。

**【請求項 7】**

FGFR1遺伝子増幅を有する前記癌の前記細胞の少なくとも一部が、FGFR1遺伝子を少なくとも8コピー含む、請求項3に記載の方法。

**【請求項 8】**

FGFR1遺伝子増幅を有する前記癌の前記細胞の少なくとも一部は、第8染色体セントロメアに対するFGFR1遺伝子の比率が少なくとも1.5である、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項 9】**

第8染色体セントロメアに対するFGFR1遺伝子の比率が少なくとも2である、請求項8に記載の方法。

**【請求項 10】**

第8染色体セントロメアに対するFGFR1遺伝子の比率が少なくとも2.5である、請求項8に記載の方法。

**【請求項 11】**

第8染色体セントロメアに対するFGFR1遺伝子の比率が少なくとも3である、請求項8に記載の方法。

**【請求項 12】**

第8染色体セントロメアに対するFGFR1遺伝子の比率が少なくとも3.5である、請求項8に記載の方法。

**【請求項 13】**

第8染色体セントロメアに対するFGFR1遺伝子の比率が少なくとも4である、請求項8に記載の方法。

**【請求項 14】**

10

20

30

40

50

F G F R 1 遺伝子増幅が、蛍光インサイツハイブリダイゼーション、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション、DNAマイクロアレイ、スペクトル核型決定、定量PCR、サザンプロット法、または配列決定から選択される方法によって決定される、請求項2に記載の方法。

【請求項15】

前記癌が、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 1 8、およびE T V 4 から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、または少なくとも5種のマーカーを過剰発現している、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記癌が、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、およびF G F 1 8 から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、または少なくとも4種のマーカーを過剰発現している、前記請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記癌がE T V 4 を過剰発現している、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

前記癌が、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 1 8、およびE T V 4 から選択される少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、または少なくとも5種のマーカーを過剰発現している、請求項15に記載の方法。

【請求項19】

F G F R 1 がF G F R 1 I I I c である、請求項15、16、および18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

対象における、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 1 8、およびE T V 4 から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、または少なくとも5種のマーカーを過剰発現している癌を治療する方法であって、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 1 8、およびE T V 4 から選択される少なくとも1種のマーカーの過剰発現が、線維芽細胞増殖因子受容体1 (F G F R 1) 細胞外ドメイン (E C D) またはF G F R 1 E C D融合分子に対する該癌の治療反応性の指標であり、

該方法が、治療有効量のF G F R 1 E C D またはF G F R 1 E C D融合分子を該対象に投与する工程を含む、方法。

【請求項21】

対象における癌を治療する方法であって、

治療有効量の線維芽細胞増殖因子受容体1 (F G F R 1) 細胞外ドメイン (E C D) またはF G F R 1 E C D融合分子を該対象に投与する工程を含み、

F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D融合分子の投与前に、該癌の細胞の少なくとも一部が、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 1 8、およびE T V 4 から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、または少なくとも5種のマーカーを過剰発現していることが決定され、かつ

癌におけるF G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 1 8、およびE T V 4 から選択される少なくとも1種のマーカーの過剰発現が、F G F R 1 E C D またはF G F R 1 E C D融合分子に対する該癌の治療反応性の指標である、方法。

【請求項22】

前記癌が、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 1 8、およびE T V 4 から選択される少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、または少なくとも5種のマーカーを過剰発現している、請求項20または請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記癌がE T V 4 を過剰発現している、請求項20～22のいずれか1項に記載の方法

10

20

30

40

50

。

【請求項 2 4】

前記癌が、 F G F R 1、 F G F R 3 I I I c、 F G F 2、 D K K 3、 および F G F 1 8 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、または少なくとも 4 種のマークーを過剰発現している、請求項 2 0 または請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

F G F 2 を過剰発現している癌を治療する方法であって、 F G F 2 の過剰発現が、線維芽細胞増殖因子受容体 1 ( F G F R 1 ) 細胞外ドメイン ( E C D ) または F G F R 1 E C D 融合分子に対する該癌の治療反応性の指標であり、

該方法が、治療有効量の F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子を該対象に投与する工程を含む、方法。 10

【請求項 2 6】

対象における癌を治療する方法であって、

治療有効量の線維芽細胞増殖因子受容体 1 ( F G F R 1 ) 細胞外ドメイン ( E C D ) または F G F R 1 E C D 融合分子を該対象に投与する工程を含み、

F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の投与前に、該癌の細胞の少なくとも一部が F G F 2 を過剰発現していることが決定され、かつ

F G F 2 の過剰発現が、 F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子に対する該癌の治療反応性の指標である、方法。 20

【請求項 2 7】

前記癌が F G F R 1 遺伝子増幅を有しない、請求項 2 5 または請求項 2 6 に記載の方法

。

【請求項 2 8】

前記過剰発現がタンパク質の過剰発現である、請求項 2 0 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 9】

タンパク質の過剰発現が免疫組織化学を用いて決定される、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記過剰発現が m R N A の過剰発現である、請求項 2 0 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。 30

【請求項 3 1】

m R N A の過剰発現が定量 R T - P C R を用いて決定される、請求項 3 0 に記載の方法

。

【請求項 3 2】

前記癌が F G F R 1 遺伝子増幅を有する、請求項 2 0 ~ 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 3】

F G F R 1 遺伝子増幅を有する前記癌の細胞の少なくとも一部が、 F G F R 1 遺伝子を少なくとも 3 コピー、少なくとも 4 コピー、少なくとも 5 コピー、少なくとも 6 コピー、少なくとも 7 コピー、または少なくとも 8 コピー含む、請求項 3 2 に記載の方法。 40

【請求項 3 4】

少なくとも 1 種のさらなる治療剤を投与する工程をさらに含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 5】

少なくとも 1 種のさらなる治療剤が、ドセタキセル、パクリタキセル、ビンクリスチン、カルボプラチニン、シスプラチニン、オキサリプラチニン、ドキソルビシン、5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) 、ロイコボリン、ペメトレキセド、エトポシド、トポテカン、ソラフェニブ、 V E G F アンタゴニスト、 V E G F トラップ、抗 V E G F 抗体、およびベバシズマブから選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

50

F G F R 1 E C D を投与する工程を含む、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記 F G F R 1 E C D が、配列番号 1 ~ 4 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

F G F R 1 E C D 融合分子を投与する工程を含む、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記 F G F R 1 E C D 融合分子が、F G F R 1 E C D および融合パートナーを含み、該融合パートナーが F c である、請求項 3 8 に記載の方法。

10

【請求項 4 0】

前記 F G F R 1 E C D 融合分子が、配列番号 5 および配列番号 6 から選択される配列を含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記癌が、肺癌、腎癌、結腸癌、肝癌、乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、食道癌、頭頸部癌、神経膠芽腫、および前立腺癌から選択される、前記請求項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記癌が、肺癌、乳癌、頭頸部癌、腎癌、または食道癌である、請求項 4 1 に記載の方法。

20

【請求項 4 3】

前記癌が肺癌である、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記肺癌が非小細胞肺癌である、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記肺癌が小細胞肺癌である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の投与から恩恵を受け得る、癌を有する対象を特定する方法であって、該対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部における F G F R 1 遺伝子のコピー数を決定する工程を含み、細胞における F G F R 1 遺伝子が 2 コピーより多いことが、該細胞が F G F R 1 遺伝子增幅を有することを示し、かつ、F G F R 1 遺伝子増幅が、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子に対する該癌の治療反応性の指標である、方法。

30

【請求項 4 7】

F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の投与から恩恵を受け得る、癌を有する対象を特定する方法であって、該対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部における第 8 染色体セントロメアに対する F G F R 1 遺伝子の比率を決定する工程を含み、細胞における比率が 1 より大きいことが、該細胞が F G F R 1 遺伝子増幅を有することを示し、かつ、F G F R 1 遺伝子増幅が、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子に対する該癌の治療反応性の指標である、方法。

40

【請求項 4 8】

F G F R 1 遺伝子のコピー数、または第 8 染色体セントロメアに対する F G F R 1 遺伝子の比率が、蛍光インサイツハイブリダイゼーション、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション、D N A マイクロアレイ、スペクトル核型決定、定量 P C R、サザンプロット法、または配列決定から選択される方法によって決定される、請求項 4 6 または請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部における、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 1 8、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、少なくとも 4 種、または少なくとも 5 種

50

のタンパク質またはmRNAのレベルを決定する工程をさらに含み、FGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択される少なくとも1種のタンパク質またはmRNAの過剰発現が、FGFR1 ECDまたはFGFR1 ECD融合分子に対する前記癌の治療反応性の指標である、請求項46～48のいずれか1項に記載の方法。

【請求項50】

FGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、およびFGF18から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、または少なくとも4種のタンパク質またはmRNAのレベルを決定する工程をさらに含む、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

ETV4のレベルを決定する工程をさらに含む、請求項49に記載の方法。

【請求項52】

FGFR1 ECDまたはFGFR1 ECD融合分子の投与から恩恵を受け得る、癌を有する対象を特定する方法であって、該対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部における、FGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、または少なくとも5種のタンパク質またはmRNAのレベルを決定する工程を含み、FGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択される少なくとも1種のタンパク質またはmRNAの過剰発現が、FGFR1 ECDまたはFGFR1 ECD融合分子に対する該癌の治療反応性の指標である方法。

【請求項53】

FGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、およびFGF18から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、または少なくとも4種のタンパク質またはmRNAのレベルを決定する工程を含む、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

ETV4のレベルを決定する工程を含む、請求項52に記載の方法。

【請求項55】

FGFR1がFGFR1IIIcである、請求項52または請求項53に記載の方法。

【請求項56】

FGFR1 ECDまたはFGFR1 ECD融合分子の投与から恩恵を受け得る、癌を有する対象を特定する方法であって、該対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部におけるFGF2のレベルを決定する工程を含み、FGF2の過剰発現が、FGFR1 ECDまたはFGFR1 ECD融合分子に対する該癌の治療反応性の指標である方法。

【請求項57】

前記癌がFGFR1遺伝子増幅を有しないことを決定する工程をさらに含む、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

1種または複数種のタンパク質のレベルが決定される、請求項49～57のいずれか1項に記載の方法。

【請求項59】

タンパク質のレベルが免疫組織化学を用いて決定される、請求項58に記載の方法。

【請求項60】

1種または複数種のmRNAのレベルが決定される、請求項49～57のいずれか1項に記載の方法。

【請求項61】

mRNAのレベルが定量RT-PCRを用いて決定される、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

前記対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部におけるFGFR1遺伝子の

10

20

30

40

50

コピー数を決定する工程をさらに含み、細胞における F G F R 1 遺伝子が 2 コピーより多いことが、該細胞が F G F R 1 遺伝子増幅を有することを示し、かつ、F G F R 1 遺伝子増幅が、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子に対する前記癌の治療反応性の指標である、請求項 4 9 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部における第 8 染色体セントロメアに対する F G F R 1 遺伝子の比率を決定する工程をさらに含み、細胞における比率が 1 より大きいことが、該細胞が F G F R 1 遺伝子増幅を有することを示し、かつ、F G F R 1 遺伝子増幅が、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子に対する前記癌の治療反応性の指標である、請求項 4 9 ~ 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 6 4】

前記 F G F R 1 E C D が、配列番号 1 ~ 4 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 6 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 F G F R 1 E C D 融合分子が、F G F R 1 E C D および融合パートナーを含み、該融合パートナーが F c である、請求項 4 6 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記 F G F R 1 E C D 融合分子が、配列番号 5 および配列番号 6 から選択される配列を含む、請求項 6 5 に記載の方法。

20

【請求項 6 7】

前記癌が、肺癌、腎癌、結腸癌、肝癌、乳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、食道癌、頭頸部癌、神経膠芽腫、および前立腺癌から選択される、請求項 4 6 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記癌が、肺癌、乳癌、腎癌、頭頸部癌、または食道癌である、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記癌が肺癌である、請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記肺癌が非小細胞肺癌である、請求項 6 9 に記載の方法。

30

【請求項 7 1】

前記肺癌が小細胞肺癌である、請求項 6 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2011年11月14日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 5 5 9 , 2 5 9 号および2012年3月28日に出願された米国仮特許出願第 6 1 / 6 1 6 , 7 6 1 号の利益を主張するものであり、これらは、参照により、その全体があらゆる目的のために本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0 0 0 2】

背景

可溶型の線維芽細胞増殖因子受容体 1 ( F G F R 1 ) は、インビトロおよびインビボで腫瘍細胞の増殖を阻害することが示されている。例えば、米国特許第 7 , 6 7 8 , 8 9 0 号 ( 特許文献1 ) に見出すことができる。抗癌治療の有効性は、場合によっては、標的とされる癌の遺伝子構造に依存する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0 0 0 3】

【特許文献 1】米国特許第 7 , 6 7 8 , 8 9 0 号

40

50

## 【発明の概要】

## 【0004】

本発明者らは、*F G F R 1* 遺伝子増幅を含む特定の癌が、いくつかの実施形態において、*F G F R 1* 遺伝子増幅を含まない癌よりも、線維芽細胞増殖因子受容体1 (*F G F R 1*) 細胞外ドメイン (*E C D*) または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子の投与を含む治療に対する反応性が高いことを証明した。いくつかの実施形態において、*F G F R 1* の過剰発現を有する癌は、*F G F R 1* の過剰発現を有しない癌よりも、*F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子の投与を含む治療に対する反応性が高い。いくつかの実施形態において、*F G F R 1* は、*F G F R 1* I I I c である。いくつかの実施形態において、線維芽細胞増殖因子受容体3 アイソフォーム I I I c (*F G F R 3* I I I c) の過剰発現を有する癌は、*F G F R 3* I I I c の過剰発現を有しない癌よりも、*F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子の投与を含む治療に対する反応性が高い。いくつかの実施形態において、線維芽細胞増殖因子2 (*F G F 2*) の過剰発現を有する癌は、*F G F 2* の過剰発現を有しない癌よりも、*F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子の投与を含む治療に対する反応性が高い。いくつかの実施形態において、*D i c k k o p f* 関連タンパク質3 (*D K K 3*) の過剰発現を有する癌は、*D K K 3* の過剰発現を有しない癌よりも、*F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子の投与を含む治療に対する反応性が高い。いくつかの実施形態において、*E T S* 転座変異体4 (*E T V 4*) の過剰発現を有する癌は、*E T V 4* の過剰発現を有しない癌よりも、*F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子の投与を含む治療に対する反応性が高い。いくつかの実施形態において、*F G F 1* 8 の過剰発現を有する癌は、*F G F 1* 8 の過剰発現を有しない癌よりも、*F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子の投与を含む治療に対する反応性が高い。

10

20

30

40

## 【0005】

いくつかの実施形態において、*F G F R 1* 遺伝子増幅が、線維芽細胞増殖因子受容体1 (*F G F R 1*) 細胞外ドメイン (*E C D*) または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である、*F G F R 1* 遺伝子増幅を有する癌を治療する方法は、治療有効量の *F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における癌を治療する方法は、治療有効量の線維芽細胞増殖因子受容体1 (*F G F R 1*) 細胞外ドメイン (*E C D*) または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子を対象に投与する工程を含み、*F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子の投与前に、癌の細胞の少なくとも一部が *F G F R 1* 遺伝子増幅を有することが決定され、癌における *F G F R 1* 遺伝子増幅は、*F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。

## 【0006】

いくつかの実施形態において、*F G F R 1* 遺伝子増幅が、線維芽細胞増殖因子受容体1 (*F G F R 1*) 細胞外ドメイン (*E C D*) または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子に対する肺癌の治療反応性の指標である、*F G F R 1* 遺伝子増幅を有する肺癌を治療する方法は、治療有効量の *F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における肺癌を治療する方法は、治療有効量の線維芽細胞増殖因子受容体1 (*F G F R 1*) 細胞外ドメイン (*E C D*) または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子を対象に投与する工程を含み、*F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子の投与前に、肺癌の細胞の少なくとも一部が *F G F R 1* 遺伝子増幅を有することが決定され、癌における *F G F R 1* 遺伝子増幅は、*F G F R 1* - *E C D* または *F G F R 1* - *E C D* 融合分子に対する肺癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、肺癌は、小細胞肺癌である。いくつかの実施形態において、肺癌は、非小細胞肺癌である。

40

## 【0007】

いくつかの実施形態において、癌の細胞の少なくとも一部は、*F G F R 1* 遺伝子を少なくとも 3 コピー、少なくとも 4 コピー、少なくとも 5 コピー、少なくとも 6 コピー、少な

50

くとも 8 コピー、または少なくとも 10 コピー含む。いくつかの実施形態において、癌の細胞の少なくとも一部は、第 8 染色体セントロメアに対する F G F R 1 遺伝子の比率が、少なくとも 1.5、少なくとも 2、少なくとも 2.5、少なくとも 3、少なくとも 3.5、または少なくとも 4 である。

#### 【0008】

上記実施形態のうちのいずれかを含むいくつかの実施形態において、癌は、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 18、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、少なくとも 4 種、または少なくとも 5 種のマーカーを過剰発現し得る。いくつかの実施形態において、癌は、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、および F G F 18 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、少なくとも 4 種、または 5 種のマーカーを過剰発現し得る。いくつかの実施形態において、癌は E T V 4 を過剰発現し得る。上記実施形態のうちのいずれかを含むいくつかの実施形態において、癌は、後述する表 10 の任意の列からの遺伝子 1 および遺伝子 2、またはそれらの任意の組み合わせを過剰発現し得る。いくつかの実施形態において、F G F R 1 は、F G F R 1 I I I c である。上記実施形態のうちのいずれかを含むいくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子が増幅され得る。

10

#### 【0009】

いくつかの実施形態において、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 18、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、または少なくとも 4 種のマーカーを過剰発現している癌を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態において、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 18、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、または少なくとも 4 種のマーカーの過剰発現は、線維芽細胞増殖因子受容体 1 (F G F R 1) 細胞外ドメイン (E C D) または F G F R 1 E C D 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、当該方法は、治療有効量の F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子を、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 18、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、または少なくとも 4 種のマーカーを過剰発現している癌に罹患している対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における癌を治療する方法は、治療有効量の F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子を対象に投与する工程を含み、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の投与前に、癌の細胞の少なくとも一部が、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 18、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、または少なくとも 4 種のマーカーを過剰発現していることが決定され、癌における F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 18、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、または少なくとも 4 種のマーカーの過剰発現は、F G F R 1 E C D または F G F R 1

20

E C D 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、癌は、F G F R 1 遺伝子増幅も有する。いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅を有する癌の細胞の少なくとも一部は、F G F R 1 遺伝子を少なくとも 3 コピー、少なくとも 4 コピー、少なくとも 5 コピー、少なくとも 6 コピー、少なくとも 7 コピー、または少なくとも 8 コピー含む。いくつかの実施形態において、過剰発現は、m R N A の過剰発現である。いくつかの実施形態において、m R N A の過剰発現は、定量 R T - P C R によって決定される。いくつかの実施形態において、過剰発現は、タンパク質の過剰発現であるいくつかの実施形態において、タンパク質の過剰発現は、免疫組織化学によって決定される。いくつかの実施形態において、F G F R 1 は、F G F R 1 I I I c である。

30

#### 【0010】

いくつかの実施形態において、F G F R 1 の過剰発現が、線維芽細胞増殖因子受容体 1 (F G F R 1) 細胞外ドメイン (E C D) または F G F R 1 E C D 融合分子に対する癌

40

50

の治療反応性の指標である、 $FGFR1$  の過剰発現を有する癌を治療する方法は、治療有効量の  $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における癌を治療する方法は、治療有効量の  $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子を対象に投与する工程を含み、 $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子の投与前に、癌の細胞の少なくとも一部が  $FGFR1$  の過剰発現を有することが決定され、癌における  $FGFR1$  の過剰発現は、 $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、癌は、 $FGFR1$  遺伝子増幅を有しない。いくつかの実施形態において、 $FGFR1$  の過剰発現は、 $mRNA$  の過剰発現である。いくつかの実施形態において、 $FGFR1$   $mRNA$  の過剰発現は、定量 RT - PCR によって決定される。いくつかの実施形態において、 $FGFR1$  の過剰発現は、タンパク質の過剰発現である。いくつかの実施形態において、 $FGFR1$  タンパク質の過剰発現は、免疫組織化学によって決定される。いくつかの実施形態において、 $FGFR1$  は、 $FGFR1IIc$  である。

10

## 【0011】

いくつかの実施形態において、 $FGFR3IIIC$  の過剰発現が、線維芽細胞増殖因子受容体 1 ( $FGFR1$ ) 細胞外ドメイン (ECD) または  $FGFR1$  ECD 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である、 $FGFR3IIIC$  の過剰発現を有する癌を治療する方法は、治療有効量の  $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における癌を治療する方法は、治療有効量の  $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子を対象に投与する工程を含み、 $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子の投与前に、癌の細胞の少なくとも一部が  $FGFR3IIIC$  の過剰発現を有することが決定され、癌における  $FGFR3IIIC$  の過剰発現は、 $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、癌は、 $FGFR1$  遺伝子増幅を有しない。いくつかの実施形態において、 $FGFR3IIIC$  の過剰発現は、 $mRNA$  の過剰発現である。いくつかの実施形態において、 $FGFR3IIIC$  の過剰発現は、 $mRNA$  の過剰発現は、定量 RT - PCR によって決定される。いくつかの実施形態において、 $FGFR3IIIC$  の過剰発現は、タンパク質の過剰発現である。いくつかの実施形態において、 $FGFR3IIIC$  タンパク質の過剰発現は、免疫組織化学によって決定される。いくつかの実施形態において、 $FGFR3IIIC$  の過剰発現を有する癌は、膀胱癌、腎細胞癌、頭頸部扁平上皮癌、および結腸直腸癌から選択される。

20

## 【0012】

いくつかの実施形態において、 $FGF2$  の過剰発現が、線維芽細胞増殖因子受容体 1 ( $FGFR1$ ) 細胞外ドメイン (ECD) または  $FGFR1$  ECD 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である、 $FGF2$  の過剰発現を有する癌を治療する方法は、治療有効量の  $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における癌を治療する方法は、治療有効量の  $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子を対象に投与する工程を含み、 $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子の投与前に、癌の細胞の少なくとも一部が  $FGF2$  の過剰発現を有することが決定され、癌における  $FGF2$  の過剰発現は、 $FGFR1$  ECD または  $FGFR1$  ECD 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、癌は、 $FGFR1$  遺伝子増幅を有しない。いくつかの実施形態において、 $FGF2$  の過剰発現は、 $mRNA$  の過剰発現である。いくつかの実施形態において、 $FGF2$   $mRNA$  の過剰発現は、定量 RT - PCR によって決定される。いくつかの実施形態において、 $FGF2$  の過剰発現は、タンパク質の過剰発現である。いくつかの実施形態において、 $FGF2$  タンパク質の過剰発現は、免疫組織化学によって決定される。いくつかの実施形態において、 $FGF2$  の過剰発現を有する癌は、神経膠芽腫、腎細胞癌、および肝細胞癌から選択される。

30

## 【0013】

40

50

いくつかの実施形態において、DKK3の過剰発現が、線維芽細胞増殖因子受容体1(FGFR1)細胞外ドメイン(ECD)またはFGFR1-ECD融合分子に対する癌の治療反応性の指標である、DKK3の過剰発現を有する癌を治療する方法は、治療有効量のFGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における癌を治療する方法は、治療有効量のFGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子を対象に投与する工程を含み、FGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子の投与前に、癌の細胞の少なくとも一部がDKK3の過剰発現を有することが決定され、癌におけるDKK3の過剰発現は、FGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、DKK3の過剰発現は、mRNAの過剰発現である。いくつかの実施形態において、DKK3 mRNAの過剰発現は、定量RT-PCRによって決定される。いくつかの実施形態において、DKK3の過剰発現は、タンパク質の過剰発現である。いくつかの実施形態において、DKK3タンパク質の過剰発現は、免疫組織化学によって決定される。いくつかの実施形態において、DKK3の過剰発現を有する癌は、膵癌、前立腺癌、腎細胞癌、肺腺癌、肝細胞癌、および結腸直腸癌から選択される。

#### 【0014】

いくつかの実施形態において、FGF18の過剰発現が、線維芽細胞増殖因子受容体1(FGFR1)細胞外ドメイン(ECD)またはFGFR1-ECD融合分子に対する癌の治療反応性の指標である、FGF18の過剰発現を有する癌を治療する方法は、治療有効量のFGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における癌を治療する方法は、治療有効量のFGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子を対象に投与する工程を含み、FGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子の投与前に、癌の細胞の少なくとも一部がFGF18の過剰発現を有することが決定され、癌におけるFGF18の過剰発現は、FGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、FGF18の過剰発現は、mRNAの過剰発現である。いくつかの実施形態において、FGF18 mRNAの過剰発現は、定量RT-PCRによって決定される。いくつかの実施形態において、FGF18の過剰発現は、タンパク質の過剰発現である。いくつかの実施形態において、FGF18タンパク質の過剰発現は、免疫組織化学によって決定される。

#### 【0015】

いくつかの実施形態において、ETV4の過剰発現が、線維芽細胞増殖因子受容体1(FGFR1)細胞外ドメイン(ECD)またはFGFR1-ECD融合分子に対する癌の治療反応性の指標である、ETV4の過剰発現を有する癌を治療する方法は、治療有効量のFGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における癌を治療する方法は、治療有効量のFGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子を対象に投与する工程を含み、FGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子の投与前に、癌の細胞の少なくとも一部がETV4の過剰発現を有することが決定され、癌におけるETV4の過剰発現は、FGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、ETV4の過剰発現は、mRNAの過剰発現である。いくつかの実施形態において、ETV4 mRNAの過剰発現は、定量RT-PCRによって決定される。いくつかの実施形態において、ETV4の過剰発現は、タンパク質の過剰発現である。いくつかの実施形態において、ETV4タンパク質の過剰発現は、免疫組織化学によって決定される。

#### 【0016】

いくつかの実施形態において、FGFR1の過剰発現が、線維芽細胞増殖因子受容体1(FGFR1)細胞外ドメイン(ECD)またはFGFR1-ECD融合分子に対する肺癌の治療反応性の指標である、FGFR1の過剰発現を有する肺癌を治療する方法は、治療有効量のFGFR1-ECDまたはFGFR1-ECD融合分子を対象に投与する

10

20

30

40

50

工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における肺癌を治療する方法は、治療有効量の F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子を対象に投与する工程を含み、 F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の投与前に、肺癌の細胞の少なくとも一部が F G F R 1 の過剰発現を有することが決定され、癌における F G F R 1 の過剰発現は、 F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子に対する肺癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、癌は、 F G F R 1 遺伝子増幅を有しない。いくつかの実施形態において、肺癌は、小細胞肺癌である。いくつかの実施形態において、肺癌は、非小細胞肺癌である。いくつかの実施形態において、 F G F R 1 は、 F G F R 1 I I I c である。

## 【0017】

10

いくつかの実施形態において、 F G F 2 の過剰発現が、線維芽細胞増殖因子受容体 1 ( F G F R 1 ) 細胞外ドメイン ( E C D ) または F G F R 1 E C D 融合分子に対する肺癌の治療反応性の指標である、 F G F 2 の過剰発現を有する肺癌を治療する方法は、治療有効量の F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における肺癌を治療する方法は、治療有効量の

F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子を対象に投与する工程を含み、 F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の投与前に、肺癌の細胞の少なくとも一部が F G F 2 の過剰発現を有することが決定され、癌における F G F 2 の過剰発現は、 F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子に対する肺癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、癌は、 F G F R 1 遺伝子増幅を有しない。いくつかの実施形態において、肺癌は、小細胞肺癌である。いくつかの実施形態において、肺癌は、非小細胞肺癌である。いくつかの実施形態において、肺癌は、 F G F R 1 遺伝子増幅を有しない。

20

## 【0018】

いくつかの実施形態において、 F G F R 1 遺伝子増幅を有する癌を治療する方法は、 F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子と、少なくとも 1 種のさらなる治療剤とを投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、 F G F R 1 、 F G F R 3 I I I c 、 F G F 2 、 D K K 3 、 F G F 1 8 、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、または少なくとも 4 種のマーカーを過剰発現している癌を治療する方法は、 F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子と、少なくとも 1 種のさらなる治療剤とを投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 種のさらなる治療剤は、ドセタキセル、パクリタキセル、ビンクリスチン、カルボプラチニン、シスプラチニン、オキサリプラチニン、ドキソルビシン、 5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) 、ロイコボリン、ペメトレキセド、エトポシド、トポテカン、ソラフェニブ、 V E G F アンタゴニスト、 V E G F トランプ、抗 V E G F 抗体、およびベバシズマブから選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 種のさらなる治療剤は、ドセタキセルである。いくつかの実施形態において、癌は、非小細胞肺癌である。いくつかの実施形態において、 F G F R 1 は、 F G F R 1 I I I c である。

30

## 【0019】

40

いくつかの実施形態において、 F G F R 1 遺伝子増幅を有する癌を治療する方法は、 F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子と、少なくとも 2 種のさらなる治療剤とを投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、 F G F R 1 、 F G F R 3 I I I c 、 F G F 2 、 D K K 3 、 F G F 1 8 、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、または少なくとも 4 種のマーカーを過剰発現している癌を治療する方法は、 F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子と、少なくとも 2 種のさらなる治療剤とを投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも 2 種のさらなる治療剤は、ドセタキセル、パクリタキセル、ビンクリスチン、カルボプラチニン、シスプラチニン、オキサリプラチニン、ドキソルビシン、 5 - フルオロウラシル ( 5 - F U ) 、ロイコボリン、ペメトレキセド、エトポシド、トポテカン、ソラフェニブ、 V E G F アンタゴニスト、 V E G F トランプ、抗 V E G F 抗体、およびベバシズマブ

50

から選択される。いくつかの実施形態において、2種のさらなる治療剤は、パクリタキセルおよびカルボプラチニンである。いくつかの実施形態において、2種のさらなる治療剤は、ドキソルビシンおよびパクリタキセルである。いくつかの実施形態において、2種のさらなる治療剤は、シスプラチニンおよびエトポシドである。いくつかの実施形態において、2種のさらなる治療剤は、オキサリプラチニンおよび5-FUである。いくつかの実施形態において、2種のさらなる治療剤は、5-FUおよびロイコボリンである。いくつかの実施形態において、2種のさらなる治療剤は、5-FUおよびベバシズマブである。いくつかの実施形態において、2種のさらなる治療剤は、パクリタキセルおよびベバシズマブである。いくつかの実施形態において、癌は、非小細胞肺癌である。

## 【0020】

10

いくつかの実施形態において、FGFR1遺伝子増幅を有する癌を治療する方法は、FGFR1 ECDまたはFGFR1 ECD融合分子と、少なくとも3種のさらなる治療剤とを投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、FGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、または少なくとも4種のマーカーを過剰発現している癌を治療する方法は、FGFR1 ECDまたはFGFR1 ECD融合分子と、少なくとも3種のさらなる治療剤とを投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも3種のさらなる治療剤は、ドセタキセル、パクリタキセル、ビンクリスチン、カルボプラチニン、シスプラチニン、オキサリプラチニン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル(5-FU)、ロイコボリン、ペメトレキセド、エトポシド、トポテカン、ソラフェニブ、VEGFアンタゴニスト、VEGFトラップ、抗VEGF抗体、およびベバシズマブから選択される。いくつかの実施形態において、3種のさらなる治療剤は、オキサリプラチニン、5-FU、およびロイコボリンである。いくつかの実施形態において、3種のさらなる治療剤は、ベバシズマブ、5-FU、およびロイコボリンである。

20

## 【0021】

30

いくつかの実施形態において、FGFR1遺伝子増幅を有し、および/またはFGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、または少なくとも4種のマーカーを有する癌を治療する方法は、FGFR1 ECDを投与する工程を含む。いくつかのそのような実施形態において、FGFR1 ECDは、配列番号1~4から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FGFR1遺伝子増幅および/またはFGFR1の過剰発現および/またはFGF2の過剰発現および/またはDKK3の過剰発現および/またはFGF18の過剰発現および/またはETV4の過剰発現を有する癌を治療する方法は、FGFR1 ECD融合分子を投与する工程を含み、FGFR1 ECD融合分子は、FGFR1 ECDと、少なくとも1つの融合パートナーとを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの融合パートナーは、Fc、アルブミン、およびポリエチレングリコールから選択される。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの融合パートナーは、Fcである。いくつかの実施形態において、Fcは、配列番号8~10から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD融合分子は、配列番号5および配列番号6から選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの融合パートナーは、Fcおよびポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの融合パートナーは、ポリエチレングリコールである。いくつかの実施形態において、融合分子は、FGFR1 ECDと1つまたは複数の融合パートナーとの間にリンカーを含む。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD融合分子は、FGFR1 ECD.339-Fcである。

40

## 【0022】

50

いくつかの実施形態において、FGFR1 ECDまたはFGFR1 ECD融合分子は、グリコシル化および/またはシアル酸付加される。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECDまたはFGFR1 ECD融合分子のポリペプチド部分は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞において発現される。いくつかの実施形態において、F

G F R 1 E C D は、配列番号 1 および配列番号 3 から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子は、約 0.5 mg / 体重 1 kg ~ 約 30 mg / 体重 1 kg の範囲の量、例えば、約 8 ~ 約 16 mg / 体重 1 kg の範囲の量である。いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の治療有効量は、約 8 mg / 体重 1 kg の用量である。いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の治療有効量は、約 16 mg / 体重 1 kg の用量である。いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の治療有効量は、約 20 mg / 体重 1 kg である。いくつかの実施形態において、投与量は、週 2 回、毎週、隔週、毎週と隔週の間の頻度で、3 週毎、4 週毎、または毎月投与されてもよい。

【 0 0 2 4 】

特定の実施形態において、癌は、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、脳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、食道癌、頭頸部癌、喉頭癌、肝癌、腎癌、神経膠芽腫、または膵癌である。特定の実施形態において、癌は、乳癌、食道癌、腎癌、頭頸部癌、または肺癌である。特定の実施形態において、癌は、肺癌である。いくつかの実施形態において、肺癌は、非小細胞肺癌である。いくつかの実施形態において、肺癌は、小細胞肺癌である。いくつかの実施形態において、肺癌は、扁平上皮癌である。いくつかの実施形態において、癌は、頭頸部癌である。いくつかの実施形態において、頭頸部癌は、頭頸部の扁平上皮癌である。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の投与から恩恵を受け得る、癌を有する対象を特定する方法が提供される。いくつかの実施形態において、当該方法は、対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部が F G F R 1 遺伝子増幅を含むかどうかを決定する工程を含み、F G F R 1 遺伝子増幅は、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅は、蛍光インサイツハイブリダイゼーション、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション、DNA マイクロアレイ、スペクトル核型決定、定量 PCR、サザンプロット法、または配列決定によって決定される。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の投与から恩恵を受け得る、癌を有する対象を特定する方法が提供される。いくつかの実施形態において、当該方法は、対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部が、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 1 8、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、少なくとも 4 種、または少なくとも 5 種のマーカーを過剰発現しているかどうかを決定する工程を含み、過剰発現は、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、当該方法は、対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部が、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、および F G F 1 8 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、または少なくとも 4 種のマーカーを過剰発現しているかどうかを決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、当該方法は、対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部が E T V 4 を過剰発現しているかどうかを決定する工程を含む。上記実施形態のうちのいずれかを含むいくつかの実施形態において、当該方法は、対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部が、後述する表 10 の任意の列からの遺伝子 1 および遺伝子 2、またはそれらの任意の組み合わせを過剰発現しているかどうかを決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、F G F R 1 は、F G F R 1 I I I c である。いくつかの実施形態において、過剰発現は、mRNA の過剰発現である。いくつかの実施形態において、mRNA の過剰発現は、定量 RT - PCR によって決定される。いくつかの実施形態において、過剰発現は、タンパク質の過剰発現である。いくつかの実施形態において、タンパク質の過剰発現は、免疫組織化学によって決定される。上記実施形態のうちのいずれかを含

10

20

30

40

50

むいくつかの実施形態において、当該方法は、対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部が F G F R 1 遺伝子増幅を有するかどうかを決定する工程を含む。

【0027】

いくつかの実施形態において、F G F R 1 - E C D または F G F R 1 - E C D 融合分子の投与から恩恵を受け得る、癌を有する対象を特定する方法が提供される。いくつかの実施形態において、当該方法は、対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部が F G F 2 を過剰発現しているかどうかを決定する工程を含み、過剰発現は、F G F R 1 - E C D または F G F R 1 - E C D 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、過剰発現は、m R N A の過剰発現である。いくつかの実施形態において、m R N A の過剰発現は、定量 R T - P C R によって決定される。いくつかの実施形態において、過剰発現は、タンパク質の過剰発現である。いくつかの実施形態において、タンパク質の過剰発現は、免疫組織化学によって決定される。いくつかの実施形態において、癌は、F G F R 1 遺伝子増幅を有しないことが決定される。いくつかの実施形態において、癌は、肺癌である。いくつかの実施形態において、癌は、非小細胞肺癌または小細胞肺癌である。

10

【0028】

本明細書に記載されるいづれの実施形態またはそれらのいづれの組み合わせも、本明細書に記載される本発明のあらゆる方法に適用される。

【図面の簡単な説明】

【0029】

20

【図1】実施例1に記載されるように、様々な量の血清を用いて、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の存在下または非存在下で増殖させた、(A) N C I - H 1 5 8 1、(B) N C I - H 5 2 0、(C) D M S 5 3、および(D) D M S 1 1 4 腫瘍細胞の培養物中の細胞数を示す。

【図2】実施例1に記載されるように、様々な量の血清を用いて、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の存在下または非存在下で増殖させた、(A) N C I - H 1 5 8 1、(B) N C I - H 5 2 0、(C) D M S 5 3、および(D) D M S 1 1 4 腫瘍細胞によるチミジンの取り込みを示す。

30

【図3】実施例1に記載されるように、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の存在下で増殖させた種々のF G F R 1 遺伝子増幅肺癌細胞株および種々のF G F R 1 遺伝子非増幅肺癌細胞株における細胞数の平均減少率(%)のプロットを示す。

【図4】実施例1に記載されるように、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の存在下で増殖させた種々のF G F R 1 遺伝子増幅肺癌細胞株および種々のF G F R 1 遺伝子非増幅肺癌細胞株における<sup>3</sup> H - チミジン取り込みの平均減少率(%)のプロットを示す。

40

【図5】実施例2に記載されるように、D M S 5 3 細胞を移植し、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c またはアルブミンで処理したマウスにおける、種々の時点での平均腫瘍体積を示す。

【図6】実施例3に記載されるように、D M S 1 1 4 細胞を移植し、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c またはアルブミンで処理したマウスにおける、種々の時点での平均腫瘍体積を示す。

【図7】実施例4に記載されるように、N C I - H 1 5 8 1 細胞を移植し、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c またはアルブミンで処理したマウスにおける、種々の時点での平均腫瘍体積を示す。

【図8】実施例5に記載されるように、N C I - H 5 2 0 細胞を移植し、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c またはアルブミンで処理したマウスにおける、種々の時点での平均腫瘍体積を示す。

【図9】実施例6に記載されるように、F G F R 1 遺伝子増幅を有する腫瘍細胞および非増幅F G F R 1 遺伝子を有する腫瘍細胞のマウス異種移植片における、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c による腫瘍増殖阻害率(%)を示す。

【図10】実施例7に記載されるように、F G F R 1 遺伝子増幅を有するおよび有しない

50

肺癌細胞株における F G F R 1 m R N A の発現の散布図を示す。

【図 1 1】実施例 7 に記載されるように、様々な量の血清を用いて F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の存在下または非存在下で増殖させた N C I - H 2 2 6 細胞において実行された、( A ) C e l l T i t e r G l o ( 登録商標 ) アッセイにおける平均発光量、および( B ) トリチウム標識チミジン取り込みアッセイにおける 1 分当たりのカウントのグラフを示す。

【図 1 2】実施例 7 に記載されるように、F G F R 1 遺伝子増幅を有するおよび有しない肺癌異種移植片における F G F R 1 m R N A の発現の散布図を示す。

【図 1 3】実施例 7 に記載されるように、P D X D 3 5 0 8 7 細胞を移植し、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c またはアルブミンで処理したマウスにおける、種々の時点での平均腫瘍体積を示す。 10

【図 1 4】実施例 8 に記載されるように、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 応答者および非応答者の異種移植片における、( A ) F G F 2 m R N A ( G U S B に対して正規化 ) および( B ) F G F 2 タンパク質の発現 ( 総タンパク質量に対して正規化 ) を示す。

【図 1 5】実施例 9 に記載されるように、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 応答者および非応答者の異種移植片における、D K K 3 m R N A の発現 ( G U S B に対して正規化 ) を示す。 20

【図 1 6】実施例 8 に記載されるように、( A ) C a k i - 1 腎細胞癌異種移植片モデルおよび( B ) M S T O - 2 1 1 H 中皮腫異種移植片モデルにおける、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の抗腫瘍活性を示す。

【図 1 7】実施例 8 に記載されるように、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 反応性および非反応性異種移植片モデルにおける、( A ) F G F R 1 および( B ) F G F R 3 I I I c m R N A の発現を示す。 20

【図 1 8】実施例 1 0 に記載されるように、( A ) F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c を週に 1 回投与したラットにおける経時的な血漿 F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c レベル、ならびに( B ) F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c または F G F R キナーゼ阻害剤 P D 1 7 3 0 7 4 を投与したラットにおける 2 4 時間後および 1 6 8 時間後の血清リン酸塩レベルを示す。

【図 1 9】実施例 1 1 に記載されるように、マトリゲルプラグアッセイにおける、F G F - 2 および V E G F - A によって誘導された血管新生の F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 媒介性阻害を示す。 30

【図 2 0】実施例 1 1 に記載されるように、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c は、V E G F - A によって誘導されるヒト臍帯静脈内皮細胞 ( H U V E C ) の増殖を阻害しないことを示す。

【図 2 1】実施例 1 2 に記載されるように、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c を投与された C a k i - 1 腎細胞癌異種移植片モデルマウスにおける腫瘍血管新生の阻害 ( C D 3 1 の免疫染色によって評価される ) を示す。

【図 2 2】実施例 1 3 に記載されるように、J I M T - 1 乳癌異種移植片における F G F R 1 シグナル伝達の F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 媒介性阻害を示す。 40

【発明を実施するための形態】

【0 0 3 0】

詳細な説明

本明細書において使用される項目の見出しあは、構成上の目的のために過ぎず、記載される主題を限定すると解釈されるべではない。

【0 0 3 1】

定義

別途定義されない限り、本発明に関連して使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈上別途要求されない限り、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含むものとする。

【0 0 3 2】 50

組み換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、組織培養および形質転換（例えば、電気穿孔、リポフェクション）、酵素反応、ならびに精製技術に関する特定の技術は、当該技術分野において既知である。多くのそのような技術および手順は、とりわけ、例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))に記載されている。さらに、化学合成、化学分析、医薬品、処方、および送達、ならびに患者の治療に関する特定の技術も当該技術分野において既知である。

## 【0033】

10

本出願において、別途記載のない限り、「または」の使用は、「および／または」を意味する。複数の従属請求項の文脈において「または」の使用は、選択肢においてのみ、複数の先行する独立請求項または従属請求項を参照することを意味する。また、「要素」または「成分」等の用語は、特に別途指定のない限り、1つのユニットを含む要素および成分と、複数のサブユニットを含む要素および成分の両方を包含する。

## 【0034】

本明細書において使用される場合、全ての数字は、近似値であり、測定誤差および有効数字の丸めを考慮して変動し得る。特定の測定量の前の「約」の使用は、試料の不純物、測定誤差、人的ミス、および統計的変動、ならびに有効数字の丸めによる変動を含む。

## 【0035】

20

本発明の開示に従って用いられる場合、別途指定のない限り、以下の用語は以下の意味を有すると理解されたい。

## 【0036】

「核酸分子」および「ポリヌクレオチド」という用語は、同義で使用されてもよく、ヌクレオチドのポリマーを指す。そのようなヌクレオチドのポリマーは、天然および／または非天然のヌクレオチドを含んでもよく、また限定されないが、DNA、RNA、およびPNAを含む。「核酸配列」は、核酸分子またはポリヌクレオチドを含むヌクレオチドの直鎖配列を指す。

## 【0037】

30

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために同義で使用され、最小長に限定されない。そのようなアミノ酸残基のポリマーは、天然または非天然のアミノ酸残基を含んでもよく、また限定されないが、ペプチド、オリゴペプチド、アミノ酸残基の二量体、三量体、および多量体を含む。完全長タンパク質およびその断片の両方が、この定義に包含される。この用語はまた、ポリペプチドの発現後修飾、例えば、グリコシル化、シアリル化、アセチル化、リン酸化等も含む。さらに、本発明の目的のために、「ポリペプチド」は、タンパク質が所望の活性を維持する限り、天然配列に対する修飾、例えば、欠失、付加、および置換（通常、本質的に保存的である）を含むタンパク質を指す。これらの修飾は、部位特異的変異誘発のように計画的であってもよいか、またはタンパク質を産生する宿主の変異もしくはPCR增幅に起因する誤差のように偶発的であってもよい。ポリペプチドが、特定のアミノ酸配列「からなる」場合、それは翻訳後修飾、例えば、グリコシル化およびシアリル化等をなおも含むことができる。

## 【0038】

40

「FGFR1細胞外ドメイン」（「FGFR1 ECD」）という用語は、完全長FGFR1 ECD、FGFR1 ECD断片、およびFGFR1 ECD変異体を含む。本明細書において使用される場合、「FGFR1 ECD」という用語は、シグナルペプチドを有するかまたは有しない、細胞内および膜貫通ドメインを欠くFGFR1ポリペプチドを指す。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECDは、配列番号1および2から選択されるアミノ酸配列を有するヒト完全長FGFR1 ECDである。本明細書において使用される場合、「完全長FGFR1 ECD」という用語は、細胞外ドメインの

50

最後のアミノ酸まで延在する F G F R 1 E C D を意味し、N 末端シグナルペプチドを含んでもまたは含まなくてもよい。本明細書において定義される場合、完全長 F G F R 1 E C D の最後のアミノ酸は、353 位にある。したがって、ヒト完全長 F G F R 1 E C D は、配列番号 2 (成熟型) または配列番号 1 (シグナルペプチドを有する) に対応するアミノ酸配列から構成されてもよい。本明細書において使用される場合、「F G F R 1 E C D 断片」という用語は、完全長 E C D の N および / または C 末端から 1 つまたは複数の残基が欠失した、F G F - 2 に結合する能力を保持する F G F R 1 E C D を指す。F G F R 1 E C D 断片は、N 末端シグナルペプチドを含んでもまたは含まなくてもよい。いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D 断片は、配列番号 4 (成熟型) または配列番号 3 (シグナルペプチドを有する) に対応するアミノ酸配列を有するヒト F G F R 1 E C D 断片である。

10

## 【0039】

本明細書において使用される場合、「F G F R 1 E C D 変異体」という用語は、アミノ酸付加、欠失、および置換を含み、F G F - 2 に結合し続けることができる F G F R 1 E C D を指す。そのような変異体は、親 F G F R 1 E C D と少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、または 99% 同一であり得る。2 つのポリペプチドの % 同一性は、類似性を決定するためのデフォルト設定で Bestfit プログラムを使用して、2 つのポリペプチドのアミノ酸配列を比較することによって決定される類似度スコアを用いて測定することができる。Bestfit は、Smith and Waterman の Advances in Applied Mathematics 2 : 482 - 489 (1981) の局所相同性アルゴリズムを使用して、2 つの配列間の最良の相同性セグメントを見つけ出す。いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D 変異体は、配列番号 4 の配列と少なくとも 95% 同一である。

20

## 【0040】

F G F R 1 E C D ポリペプチドの参照アミノ酸配列と、少なくとも、例えば 95% 同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドは、ポリペプチド配列が、参照ポリペプチドの各 100 個のアミノ酸当たり最高 5 つのアミノ酸変化を含み得ることを除いて、ポリペプチドのアミノ酸配列が参照配列と同一なポリペプチドである。換言すると、参照アミノ酸配列と少なくとも 95% 同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを得るために、参照配列中のアミノ酸残基の 5% までが欠失していても、もしくは別のアミノ酸で置換されてもよいか、または参照配列中の合計アミノ酸残基の 5% までの数のアミノ酸が参照配列に挿入されてもよい。これらの参照配列の変化は、参照配列中の残基間に個々に散在するか、または参照配列中の 1 つまたは複数の近接するグループとして散在する、参照アミノ酸配列の N もしくは C 末端の位置、またはこれらの末端の位置の間のどこで起こってもよい。

30

## 【0041】

実際に、いずれか特定のポリペプチドが、例えば、配列表に記載される核酸配列によってコードされたアミノ酸配列またはポリペプチド配列と、少なくとも 70%、80%、90%、または 95% 同一であるかどうかは、Bestfit プログラム等の既知のコンピュータプログラムを使用して従来通りに決定することができる。特定の配列が、本発明による参照配列と例えば 95% 同一であるかどうかを決定するために Bestfit または他の配列アライメントプログラムを使用する場合、当然、参照アミノ酸配列の全長にわたって同一性のパーセンテージが算出され、参照配列中のアミノ酸残基の合計数の 5% までの相同性におけるギャップが許容されるパラメータが設定される。

40

## 【0042】

本明細書において使用される場合、「h F G F R 1 - E C D . 353」および「h F G F R 1 . 353」という用語は、配列番号 1 (シグナルペプチドを有する) または配列番号 2 (シグナルペプチドを有しない、成熟型) に対応する完全長ヒト F G F R 1 E C D を指すために同義で使用されてもよい。

## 【0043】

50

本明細書において使用される場合、「h F G F R 1 - E C D . 3 3 9」および「h F G F R 1 . 3 3 9」という用語は、配列番号3（シグナルペプチドを有する）または配列番号4（シグナルペプチドを有しない、成熟型）に対応するヒトF G F R 1 E C Dを指すために同義に使用されてもよい。

【0044】

さらなるh F G F R 1 E C Dは、例えば、米国特許第7,678,890号に記載され、参照により、その全体があらゆる目的のために本明細書に組み込まれる。

【0045】

「F G F R 1 E C D融合分子」という用語は、F G F R 1 E C Dと、1つまたは複数の「融合パートナー」とを含む分子を指す。いくつかの実施形態において、F G F R 1 10

E C Dと融合パートナーとは共有結合（「融合」）している。融合パートナーもポリペプチド（「融合パートナーポリペプチド」）である場合、F G F R 1 E C Dおよび融合パートナーポリペプチドは、連続するアミノ酸配列の一部であってもよく、融合パートナーポリペプチドは、F G F R 1 E C DのN末端またはC末端のいずれかに結合してもよい。そのような場合、F G F R 1 E C Dおよび融合パートナーポリペプチドは、F G F R 1 E C Dおよび融合パートナーポリペプチドの両方をコードするコード配列から単一ポリペプチドとして翻訳されてもよい（「F G F R 1 E C D融合タンパク質」）。いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C Dと融合パートナーとは、例えば、ペプチド結合以外の化学結合等の他の手段によって共有結合される。ポリペプチドを他の分子に共有結合させる多くの既知の方法（例えば、融合パートナー）が使用されてもよい。他の実施形態において、F G F R 1 E C Dと融合パートナーとは、少なくとも1つのアミノ酸または化学部分から構成される「リンカー」を介して融合されてもよい。 20

【0046】

いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C Dポリペプチドと融合パートナーとは、非共有結合している。いくつかのそのような実施形態において、それらは、例えば、結合対を使用して結合することができる。例示的な結合対は、限定されないが、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン、抗体およびその抗原等を含む。

【0047】

例示的な融合パートナーは、限定されないが、免疫グロブリンF cドメイン、アルブミン、およびポリエチレン glycolを含む。いくつかの例示的なF cドメインのアミノ酸配列を配列番号8～10に示す。いくつかの実施形態において、F cと融合したF G F R 1 E C Dは、「h F G F R 1 E C D - F c」と称される。いくつかの実施形態において、F cドメインは、I g G 1 F c、I g G 2 F c、I g G 3 F c、およびI g G 4 F cから選択される。 30

【0048】

本明細書において使用される場合、「h F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c」および「h F G F R 1 . 3 3 9 - F c」という用語は、配列番号6（シグナルペプチドを有しない、成熟型）および配列番号5（シグナルペプチドを有する）から選択されるアミノ酸配列を指すために同義で使用されてもよい。h F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F cを用いて治療することができる非限定的な例示的癌は、限定されないが、肺癌、結腸癌、乳癌、胃癌、頭頸部癌、前立腺癌、子宮内膜癌、肉腫、小細胞肺癌、卵巣癌、カポジ肉腫、ホジキン病、白血病、非ホジキンリンパ腫、神経芽細胞腫（脳癌）、横紋筋肉腫、ウイルムス腫瘍、急性リンパ球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、膀胱癌、精巣癌、リンパ腫、胚細胞性腫瘍、結腸と直腸の癌、消化管癌、甲状腺癌、多発性骨髄腫、膵癌、中皮腫、悪性胸膜中皮腫、血液/リンパ腺癌、悪性腹膜中皮腫、食道癌、腎細胞癌、多形神経膠芽腫、および肝癌を含む。 40

【0049】

「シグナルペプチド」という用語は、哺乳動物細胞からポリペプチドの分泌を促進する、ポリペプチドのN末端に位置するアミノ酸残基の配列を指す。シグナルペプチドは、哺乳動物細胞からポリペプチドを排出する際に切断され得、成熟タンパク質を形成する。シ 50

グナルペプチドは、天然または合成であってもよく、それらが付着するタンパク質に対して異種または相同であってもよい。例示的なシグナルペプチドは、限定されないが、F G F R 1 シグナルペプチド、例えば、配列番号 7 のアミノ酸配列等を含む。例示的なシグナルペプチドはまた、異種タンパク質由来のシグナルペプチドも含む。「シグナル配列」は、シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を指す。いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D は、シグナルペプチドを欠く。いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D は、天然 F G F R 1 シグナルペプチドまたは異種シグナルペプチドであり得る少なくとも 1 つのシグナルペプチドを含む。

## 【0050】

「ベクター」という用語は、宿主細胞中で増殖され得る 1 つまたは複数のクローン化ポリヌクレオチドを含むように遺伝子操作され得るポリヌクレオチドを説明するために使用される。ベクターは、次の要素のうちの 1 つまたは複数を含んでもよい：複製起点、対象とするポリペプチドの発現を調節する 1 つまたは複数の制御配列（例えば、プロモーターおよび／もしくはエンハンサー等）、ならびに／または 1 つまたは複数の選択可能なマークー遺伝子（例えば、抗生物質耐性遺伝子、および比色分析法で使用され得る遺伝子、例えば、β-ガラクトシダーゼ）。「発現ベクター」という用語は、宿主細胞において対象とするポリペプチドを発現させるために使用されるベクターを指す。

10

## 【0051】

「宿主細胞」は、ベクターまたは単離ポリヌクレオチドのレシピエントとなり得るか、またはレシピエントとなった細胞を指す。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であってもよい。例示的な真核細胞は、哺乳動物細胞、例えば、靈長類または非靈長類動物細胞、真菌細胞、植物細胞；および昆虫細胞等を含む。例示的な哺乳動物細胞は、限定されないが、293 および C H O 細胞、ならびにそれらの誘導体、例えば、それぞれ 293 - 6 E および D G 4 4 を含む。

20

## 【0052】

本明細書において使用される「単離された」という用語は、天然において典型的に見出される成分の少なくとも一部から分離された分子を指す。例えば、産生された細胞の成分の少なくとも一部から分離されている場合、ポリペプチドは「単離されている」と称される。発現後の細胞によってポリペプチドが分泌される場合、それを産生した細胞からポリペプチドを含む上清を物理的に分離することは、ポリペプチドの「単離」であると見なされる。同様に、ポリヌクレオチドが、天然において典型的に見出されるより大きなポリヌクレオチド（例えば、D N A ポリヌクレオチドの場合、ゲノム D N A またはミトコンドリア D N A ）の一部ではない場合、またはそれが産生された細胞の成分の少なくとも一部から分離される場合、例えば、R N A ポリヌクレオチドの場合、ポリヌクレオチドは、「単離された」と称される。よって、宿主細胞中のベクターに含まれる D N A ポリヌクレオチドは、そのポリヌクレオチドが天然においてベクター中に見出されない限り、「単離された」と称されてもよい。

30

## 【0053】

「抗悪性腫瘍組成物」という用語は、少なくとも 1 つの活性治療剤、例えば「抗癌剤」を含む、癌の治療に有用な組成物を指す。治療剤（抗癌剤）の例は、限定されないが、例えば、化学療法剤、増殖抑制剤、細胞傷害性薬剤、放射線療法に使用される薬剤、抗血管新生剤、アポトーシス性薬剤、抗チュブリン剤、および他の癌を治療するための薬剤、例えば、抗 V E G F 抗体（例えば、ベバシズマブ、A V A S T I N（登録商標））、抗 H E R - 2 抗体（例えば、トラスツズマブ、H E R C E P T I N（登録商標））、抗 C D 2 0 抗体（例えば、リツキシマブ、R I T U X A N（登録商標））、上皮増殖因子受容体（E G F R ）アンタゴニスト（例えば、チロシンキナーゼ阻害剤）、H E R 1 / E G F R 阻害剤（例えば、エルロチニブ T A R C E V A（登録商標））、血小板由来増殖因子阻害剤（例えば、G L E E V E C（登録商標）、イマチニブメシレート）、C O X - 2 阻害剤（例えば、セレコキシブ）、インターフェロン、サイトカイン、標的 E r b B 2 、E r b B 3 、E r b B 4 、P D G F R - 、B l y S 、A P R I L 、B C M A または V E G F 受容

40

50

体、TRAIL/Apo2のうちの1つまたは複数に結合するアンタゴニスト（例えば、中和抗体）、ならびに他の生理活性および有機の化学薬剤を含む。これらの組み合わせもまた、本発明に含まれる。

## 【0054】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学化合物を指す。化学療法剤の例は、以下を含む：アルキル化剤、例えば、チオテバおよびシクロスホスファミド（CYTOXAN（登録商標））；スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパ；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロメラミンを含むエチレンイミンならびにメチルアメラミン；アセトゲニン（特に、プラタシンおよびプラタシノン）；-9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARIINOL（登録商標））；ラバコン；ラバコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成類似体ポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPOTOSAR（登録商標））；アセチルカンプトテシン、スコポレクチン、および9-アミノカンプトテシン）；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼルシンおよびビセレシン合成類似体を含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エリュテロビン；パンクラティスタチン；サルコジクチイン；スponギスタチン；ナイトロジエンマスター、例えば、クロランブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスター；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン；抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特に、カリケアマイシン1IおよびカリケアマイシンI1（例えば、Nicolaou et al., Angew. Chem. Int'l. (ed. Engl.), 33: 183-186 (1994)を参照）；CDP323、経口-4インテグリン阻害剤；ダイネマイシンAを含むダイネマイシン；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキソルビシン（ADRIMYCIN（登録商標））、モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシン、ドキソルビシン HClリポソーム注射剤（DOXIL（登録商標））、リポソームドキソルビシン TLC D-99（MYOCET（登録商標））、ペグ化リポソームドキソルビシン（CAELYX（登録商標））、およびデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシンC等のマイトイマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；抗代謝物、例えば、メトトレキサート、ゲムシタビン（GEMZAR（登録商標））、ペメトレキセド（ALIMTA（登録商標））；テガフル（UFTORAL（登録商標））、カペシタビン（XELODA（登録商標））、エポチロン、および5-フルオロウラシル（5-FU）；葉酸類似体、例えば、デノブテリン、メトトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサート；ブリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカブトブリン、チアミブリン、チオグアニン；ビリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン；アンドロゲン、例えば、カル

10

20

30

40

50

ステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎物質、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充薬、例えば、フォリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ペストラブシル；ビサントレン；エダトラキセート；デフォファミン；デメコルチン；ジアジコン；エルフォルニチン；エリプチニウム酢酸塩；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；マイタンシノイド、例えば、マイタンシンおよびアンサマイトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK (登録商標) 多糖複合体 (JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2'-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン (特に、T-2 毒素、ベラクリンA、ロリジンAおよびアングイジン)；ウレタン；ビンデシン (ELDISINE (登録商標)、FILDESIN (登録商標))；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド ('Ara-C')；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル (TAXOL (登録商標))、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤 (ABRAXANE<sup>TM</sup>)、およびドセタキセル (TAXOTERE (登録商標))；クロランブシル；6-チオグアニン；メルカブトプリン；メトトレキサート；白金薬剤、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン (例えば、ELOXATIN (登録商標))、およびカルボプラチン；ビンプラスチン (VELBAN (登録商標))、ビンクリスチン (ONCOVIN (登録商標))、ビンデシン (ELDISINE (登録商標)、FILDESIN (登録商標))、およびビノレルビン (NAVELBINE (登録商標)) を含む、チューブリン重合による微小管形成を防止するビンカ；エトポシド (VP-16)；イホスファミド；ミトキサントロン；ロイコボリン；ノバントロン；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノブテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン (DMFO)；ベキサロテン (TARGRETIN (登録商標)) を含むレチノイド、例えばレチノイン酸；ビスホスホネート、例えば、クロドロネート (例えば、BONEFOS (登録商標) または OSTAC (登録商標))、エチドロネート (DIDROCAL (登録商標))、NE-58095、ゾレドロン酸/ゾレドロネート (ZOMETA (登録商標))、アレンドロネート (FOSAMAX (登録商標))、パミドロネート (AREDIA (登録商標))、チルドロネート (SKELID (登録商標))、またはリセドロネート (ACTONEL (登録商標))；トロキサシタビン (1, 3-ジオキソランスクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、PKC-、Raf、H-Ras、および上皮増殖因子受容体 (EGF-R)；ワクチン、例えば、THERATOP E (登録商標) ワクチンおよび遺伝子治療ワクチン、例えば ALLOVECTIN (登録商標) ワクチン、LEUVECTIN (登録商標) ワクチン、およびVAXID (登録商標) ワクチン；トポイソメラーゼ1 阻害剤 (例えば、LURTOTECAN (登録商標))；rmRH (例えば、ABARELIX (登録商標))；BAY439006 (ソラフェニブ、NEXAVAR (登録商標)、Bayer)；SU-11248 (スニチニブ、SUTENT (登録商標)、Pfizer)；ペリホシン、COX-2阻害剤 (例えば、セレコキシブまたはエトリコキシブ)、プロテオソーム阻害剤 (例えば、PS341)；ボルテゾミブ (VELCADE (登録商標))；CCI-779；ティピファニブ (R11577)；オラフェニブ、ABT510；Bcl-2 阻害剤、例えば、オブリメルセンナトリウム (GENASENSE (登録商標))；ピクサントロン；EGFR阻害剤 (後述する定義を参照)；チロシンキナーゼ阻害剤 (後述する定義を参照)；セリン-スレオニンキナーゼ阻害剤、例えば、ラパマイシン (シロリムス、RAPAMUNE (登録商標))；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、例えば、ロナファルニブ (SCH 6636、SARASAR<sup>TM</sup>)；上記のいずれかの薬学的に許

容される塩、酸、または誘導体；またCHOP（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニゾロンの併用療法の略称）ならびにFOLFOX（5-FUおよびロイコボリンと組み合わせたオキサリプラチン（ELOXATIN（登録商標））を用いた治療計画の略称）等の、上記のうちの2つ以上の組み合わせ。

#### 【0055】

本明細書において定義される化学療法剤は、「抗ホルモン剤」または「内分泌治療薬」を含み、これらは、癌の増殖を促進する可能性のあるホルモンの影響を、調節、低下、遮断、または阻害するように作用する。これらは、それら自体がホルモンであってもよく、限定されないが、以下を含む：タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標））、4-ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン（FARESTON（登録商標））、イドキシフェン、ドロロキシフェン、ラロキシフェン（EVISTA（登録商標））、トリオキシフェン、ケオキシフェン、およびSERM3等の選択的エストロゲン受容体調節薬（SERM）を含む、混合アゴニスト／アンタゴニストプロファイルを有する抗エストロゲン剤；アゴニスト特性を有しない純粋な抗エストロゲン、例えば、フルベストラント（FASLODEX（登録商標））、およびEM800（このような薬剤は、エストロゲン受容体（ER）の二量体化を遮断し、DNA結合を阻害し、ER代謝回転を増加させ、かつ／またはERレベルを抑制し得る）；アロマターゼ阻害剤（ホルメスタンおよびエキセメスタン（AROMASIN（登録商標））等のステロイドアロマターゼ阻害剤性、ならびに例えば、アナストロゾール（ARIMIDEX（登録商標））、レトロゾール（FEMARA（登録商標））およびアミノグルテチミ等の非ステロイド性アロマターゼ阻害剤、ならびにボロゾール（RIVISOR（登録商標））、メゲストロール酢酸塩（MEGASE（登録商標））、ファドロゾール、および4（5）-イミダゾール等の他のアロマターゼ阻害剤を含む）；リュープロリド（LUPRON（登録商標）およびELIGARD（登録商標））、ゴセレリン、ブセレリン、およびトリプトレリンを含む、黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト；プロゲスチン、例えば、メゲストロール酢酸塩およびメドロキシプロゲステロン酢酸塩、エストロゲン、例えば、ジエチルスチルベストロールおよびブレマリン、ならびにアンドロゲン／レチノイド、例えば、フルオキシメステロン、全てのトランス-レチノイン酸およびフェンレチニドを含む、性ステロイド；オナプリストン；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体ダウントレーティング（ERD）；抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミドおよびビカルタミド；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびに上記の2つ以上の組み合わせ。

#### 【0056】

「血管新生因子または血管新生剤」は、例えば、血管新生、内皮細胞増殖、血管の安定性、および／または脈管形成等を促進する、血管の発生を刺激する成長因子を指す。例えば、血管新生因子は、限定されないが、例えば、VEGFおよびVEGFファミリーのメンバー（VEGF-B、VEGF-CおよびVEGF-D）、PIGF、PDGFファミリー、線維芽細胞増殖因子ファミリー（FGF）、TIEリガンド（アンジオポエチン）、エフリン、デルタ様リガンド4（DLL4）、delta-1、線維芽細胞増殖因子：酸性（aFGF）および塩基性（bFGF）、フォリスタチン、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、肝細胞増殖因子（HGF）／分散因子（SF）インターロイキン-8（IL-8）、レブチン、ミッドカイン、ニューロピリン、胎盤増殖因子、血小板由来内皮細胞増殖因子（PD-ECGF）、血小板由来増殖因子、特にPDGF-BBまたはPDGF-R-、ブレイオトロフィン（PTN）、プログランニュリン、プロリフェリン、形質転換増殖因子-（TGF-）、形質転換増殖因子-（TGF-）腫瘍壞死因子-（TNF-）等を含む。また、創傷治癒を加速する因子、例えば、成長ホルモン、インスリン様増殖因子-I（IGF-I）、VIGF、上皮増殖因子（EGF）、CTGFおよびそのファミリーのメンバー、ならびにTGF- およびTGF- も含まれる。例えば、Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53: 217-39; Streit and Detmar (2003) On co-gene 22: 3172-3179; Ferrara & Alitalo (1993) Annu. Rev. Physiol. 54: 115-45; Ferrara and Davis-Smyth (1997) Annu. Rev. Physiol. 58: 707-40; Ferrara and Davis-Smyth (1998) Annu. Rev. Physiol. 59: 707-40; Ferrara and Davis-Smyth (1999) Annu. Rev. Physiol. 60: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2000) Annu. Rev. Physiol. 61: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2001) Annu. Rev. Physiol. 62: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2002) Annu. Rev. Physiol. 63: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2003) Annu. Rev. Physiol. 64: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2004) Annu. Rev. Physiol. 65: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2005) Annu. Rev. Physiol. 66: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2006) Annu. Rev. Physiol. 67: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2007) Annu. Rev. Physiol. 68: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2008) Annu. Rev. Physiol. 69: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2009) Annu. Rev. Physiol. 70: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2010) Annu. Rev. Physiol. 71: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2011) Annu. Rev. Physiol. 72: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2012) Annu. Rev. Physiol. 73: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2013) Annu. Rev. Physiol. 74: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2014) Annu. Rev. Physiol. 75: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2015) Annu. Rev. Physiol. 76: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2016) Annu. Rev. Physiol. 77: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2017) Annu. Rev. Physiol. 78: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2018) Annu. Rev. Physiol. 79: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2019) Annu. Rev. Physiol. 80: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2020) Annu. Rev. Physiol. 81: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2021) Annu. Rev. Physiol. 82: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2022) Annu. Rev. Physiol. 83: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2023) Annu. Rev. Physiol. 84: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2024) Annu. Rev. Physiol. 85: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2025) Annu. Rev. Physiol. 86: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2026) Annu. Rev. Physiol. 87: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2027) Annu. Rev. Physiol. 88: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2028) Annu. Rev. Physiol. 89: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2029) Annu. Rev. Physiol. 90: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2030) Annu. Rev. Physiol. 91: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2031) Annu. Rev. Physiol. 92: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2032) Annu. Rev. Physiol. 93: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2033) Annu. Rev. Physiol. 94: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2034) Annu. Rev. Physiol. 95: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2035) Annu. Rev. Physiol. 96: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2036) Annu. Rev. Physiol. 97: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2037) Annu. Rev. Physiol. 98: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2038) Annu. Rev. Physiol. 99: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2039) Annu. Rev. Physiol. 100: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2040) Annu. Rev. Physiol. 101: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2041) Annu. Rev. Physiol. 102: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2042) Annu. Rev. Physiol. 103: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2043) Annu. Rev. Physiol. 104: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2044) Annu. Rev. Physiol. 105: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2045) Annu. Rev. Physiol. 106: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2046) Annu. Rev. Physiol. 107: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2047) Annu. Rev. Physiol. 108: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2048) Annu. Rev. Physiol. 109: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2049) Annu. Rev. Physiol. 110: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2050) Annu. Rev. Physiol. 111: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2051) Annu. Rev. Physiol. 112: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2052) Annu. Rev. Physiol. 113: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2053) Annu. Rev. Physiol. 114: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2054) Annu. Rev. Physiol. 115: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2055) Annu. Rev. Physiol. 116: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2056) Annu. Rev. Physiol. 117: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2057) Annu. Rev. Physiol. 118: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2058) Annu. Rev. Physiol. 119: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2059) Annu. Rev. Physiol. 120: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2060) Annu. Rev. Physiol. 121: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2061) Annu. Rev. Physiol. 122: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2062) Annu. Rev. Physiol. 123: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2063) Annu. Rev. Physiol. 124: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2064) Annu. Rev. Physiol. 125: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2065) Annu. Rev. Physiol. 126: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2066) Annu. Rev. Physiol. 127: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2067) Annu. Rev. Physiol. 128: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2068) Annu. Rev. Physiol. 129: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2069) Annu. Rev. Physiol. 130: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2070) Annu. Rev. Physiol. 131: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2071) Annu. Rev. Physiol. 132: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2072) Annu. Rev. Physiol. 133: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2073) Annu. Rev. Physiol. 134: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2074) Annu. Rev. Physiol. 135: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2075) Annu. Rev. Physiol. 136: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2076) Annu. Rev. Physiol. 137: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2077) Annu. Rev. Physiol. 138: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2078) Annu. Rev. Physiol. 139: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2079) Annu. Rev. Physiol. 140: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2080) Annu. Rev. Physiol. 141: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2081) Annu. Rev. Physiol. 142: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2082) Annu. Rev. Physiol. 143: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2083) Annu. Rev. Physiol. 144: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2084) Annu. Rev. Physiol. 145: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2085) Annu. Rev. Physiol. 146: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2086) Annu. Rev. Physiol. 147: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2087) Annu. Rev. Physiol. 148: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2088) Annu. Rev. Physiol. 149: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2089) Annu. Rev. Physiol. 150: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2090) Annu. Rev. Physiol. 151: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2091) Annu. Rev. Physiol. 152: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2092) Annu. Rev. Physiol. 153: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2093) Annu. Rev. Physiol. 154: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2094) Annu. Rev. Physiol. 155: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2095) Annu. Rev. Physiol. 156: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2096) Annu. Rev. Physiol. 157: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2097) Annu. Rev. Physiol. 158: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2098) Annu. Rev. Physiol. 159: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2099) Annu. Rev. Physiol. 160: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2100) Annu. Rev. Physiol. 161: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2101) Annu. Rev. Physiol. 162: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2102) Annu. Rev. Physiol. 163: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2103) Annu. Rev. Physiol. 164: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2104) Annu. Rev. Physiol. 165: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2105) Annu. Rev. Physiol. 166: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2106) Annu. Rev. Physiol. 167: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2107) Annu. Rev. Physiol. 168: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2108) Annu. Rev. Physiol. 169: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2109) Annu. Rev. Physiol. 170: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2110) Annu. Rev. Physiol. 171: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2111) Annu. Rev. Physiol. 172: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2112) Annu. Rev. Physiol. 173: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2113) Annu. Rev. Physiol. 174: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2114) Annu. Rev. Physiol. 175: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2115) Annu. Rev. Physiol. 176: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2116) Annu. Rev. Physiol. 177: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2117) Annu. Rev. Physiol. 178: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2118) Annu. Rev. Physiol. 179: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2119) Annu. Rev. Physiol. 180: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2120) Annu. Rev. Physiol. 181: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2121) Annu. Rev. Physiol. 182: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2122) Annu. Rev. Physiol. 183: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2123) Annu. Rev. Physiol. 184: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2124) Annu. Rev. Physiol. 185: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2125) Annu. Rev. Physiol. 186: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2126) Annu. Rev. Physiol. 187: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2127) Annu. Rev. Physiol. 188: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2128) Annu. Rev. Physiol. 189: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2129) Annu. Rev. Physiol. 190: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2130) Annu. Rev. Physiol. 191: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2131) Annu. Rev. Physiol. 192: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2132) Annu. Rev. Physiol. 193: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2133) Annu. Rev. Physiol. 194: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2134) Annu. Rev. Physiol. 195: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2135) Annu. Rev. Physiol. 196: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2136) Annu. Rev. Physiol. 197: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2137) Annu. Rev. Physiol. 198: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2138) Annu. Rev. Physiol. 199: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2139) Annu. Rev. Physiol. 200: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2140) Annu. Rev. Physiol. 201: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2141) Annu. Rev. Physiol. 202: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2142) Annu. Rev. Physiol. 203: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2143) Annu. Rev. Physiol. 204: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2144) Annu. Rev. Physiol. 205: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2145) Annu. Rev. Physiol. 206: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2146) Annu. Rev. Physiol. 207: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2147) Annu. Rev. Physiol. 208: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2148) Annu. Rev. Physiol. 209: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2149) Annu. Rev. Physiol. 210: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2150) Annu. Rev. Physiol. 211: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2151) Annu. Rev. Physiol. 212: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2152) Annu. Rev. Physiol. 213: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2153) Annu. Rev. Physiol. 214: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2154) Annu. Rev. Physiol. 215: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2155) Annu. Rev. Physiol. 216: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2156) Annu. Rev. Physiol. 217: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2157) Annu. Rev. Physiol. 218: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2158) Annu. Rev. Physiol. 219: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2159) Annu. Rev. Physiol. 220: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2160) Annu. Rev. Physiol. 221: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2161) Annu. Rev. Physiol. 222: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2162) Annu. Rev. Physiol. 223: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2163) Annu. Rev. Physiol. 224: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2164) Annu. Rev. Physiol. 225: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2165) Annu. Rev. Physiol. 226: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2166) Annu. Rev. Physiol. 227: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2167) Annu. Rev. Physiol. 228: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2168) Annu. Rev. Physiol. 229: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2169) Annu. Rev. Physiol. 230: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2170) Annu. Rev. Physiol. 231: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2171) Annu. Rev. Physiol. 232: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2172) Annu. Rev. Physiol. 233: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2173) Annu. Rev. Physiol. 234: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2174) Annu. Rev. Physiol. 235: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2175) Annu. Rev. Physiol. 236: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2176) Annu. Rev. Physiol. 237: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2177) Annu. Rev. Physiol. 238: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2178) Annu. Rev. Physiol. 239: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2179) Annu. Rev. Physiol. 240: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2180) Annu. Rev. Physiol. 241: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2181) Annu. Rev. Physiol. 242: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2182) Annu. Rev. Physiol. 243: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2183) Annu. Rev. Physiol. 244: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2184) Annu. Rev. Physiol. 245: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2185) Annu. Rev. Physiol. 246: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2186) Annu. Rev. Physiol. 247: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2187) Annu. Rev. Physiol. 248: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2188) Annu. Rev. Physiol. 249: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2189) Annu. Rev. Physiol. 250: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2190) Annu. Rev. Physiol. 251: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2191) Annu. Rev. Physiol. 252: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2192) Annu. Rev. Physiol. 253: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2193) Annu. Rev. Physiol. 254: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2194) Annu. Rev. Physiol. 255: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2195) Annu. Rev. Physiol. 256: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2196) Annu. Rev. Physiol. 257: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2197) Annu. Rev. Physiol. 258: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2198) Annu. Rev. Physiol. 259: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2199) Annu. Rev. Physiol. 260: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2200) Annu. Rev. Physiol. 261: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2201) Annu. Rev. Physiol. 262: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2202) Annu. Rev. Physiol. 263: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2203) Annu. Rev. Physiol. 264: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2204) Annu. Rev. Physiol. 265: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2205) Annu. Rev. Physiol. 266: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2206) Annu. Rev. Physiol. 267: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2207) Annu. Rev. Physiol. 268: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2208) Annu. Rev. Physiol. 269: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2209) Annu. Rev. Physiol. 270: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2210) Annu. Rev. Physiol. 271: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2211) Annu. Rev. Physiol. 272: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2212) Annu. Rev. Physiol. 273: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2213) Annu. Rev. Physiol. 274: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2214) Annu. Rev. Physiol. 275: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2215) Annu. Rev. Physiol. 276: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2216) Annu. Rev. Physiol. 277: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2217) Annu. Rev. Physiol. 278: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2218) Annu. Rev. Physiol. 279: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2219) Annu. Rev. Physiol. 280: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2220) Annu. Rev. Physiol. 281: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2221) Annu. Rev. Physiol. 282: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2222) Annu. Rev. Physiol. 283: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2223) Annu. Rev. Physiol. 284: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2224) Annu. Rev. Physiol. 285: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2225) Annu. Rev. Physiol. 286: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2226) Annu. Rev. Physiol. 287: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2227) Annu. Rev. Physiol. 288: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2228) Annu. Rev. Physiol. 289: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2229) Annu. Rev. Physiol. 290: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2230) Annu. Rev. Physiol. 291: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2231) Annu. Rev. Physiol. 292: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2232) Annu. Rev. Physiol. 293: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2233) Annu. Rev. Physiol. 294: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2234) Annu. Rev. Physiol. 295: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2235) Annu. Rev. Physiol. 296: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2236) Annu. Rev. Physiol. 297: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2237) Annu. Rev. Physiol. 298: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2238) Annu. Rev. Physiol. 299: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2239) Annu. Rev. Physiol. 300: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2240) Annu. Rev. Physiol. 301: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2241) Annu. Rev. Physiol. 302: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2242) Annu. Rev. Physiol. 303: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2243) Annu. Rev. Physiol. 304: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2244) Annu. Rev. Physiol. 305: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2245) Annu. Rev. Physiol. 306: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2246) Annu. Rev. Physiol. 307: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2247) Annu. Rev. Physiol. 308: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2248) Annu. Rev. Physiol. 309: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2249) Annu. Rev. Physiol. 310: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2250) Annu. Rev. Physiol. 311: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2251) Annu. Rev. Physiol. 312: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2252) Annu. Rev. Physiol. 313: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2253) Annu. Rev. Physiol. 314: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2254) Annu. Rev. Physiol. 315: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2255) Annu. Rev. Physiol. 316: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2256) Annu. Rev. Physiol. 317: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2257) Annu. Rev. Physiol. 318: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2258) Annu. Rev. Physiol. 319: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2259) Annu. Rev. Physiol. 320: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2260) Annu. Rev. Physiol. 321: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2261) Annu. Rev. Physiol. 322: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2262) Annu. Rev. Physiol. 323: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2263) Annu. Rev. Physiol. 324: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2264) Annu. Rev. Physiol. 325: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2265) Annu. Rev. Physiol. 326: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2266) Annu. Rev. Physiol. 327: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2267) Annu. Rev. Physiol. 328: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2268) Annu. Rev. Physiol. 329: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2269) Annu. Rev. Physiol. 330: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2270) Annu. Rev. Physiol. 331: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2271) Annu. Rev. Physiol. 332: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2272) Annu. Rev. Physiol. 333: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2273) Annu. Rev. Physiol. 334: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2274) Annu. Rev. Physiol. 335: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2275) Annu. Rev. Physiol. 336: 451-78; Ferrara and Davis-Smyth (2276) Annu. Rev. Physiol. 337:

99) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (例えば、既知の血管新生因子を列挙する表1); および Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 を参照のこと。

【0057】

「抗血管新生剤」または「血管新生阻害剤」は、血管新生、脈管形成、または望ましくない血管透過性を直接的または間接的のいずれかで阻害する、低分子量物質、ポリヌクレオチド (例えば、阻害性 RNA (RNAi または siRNA) を含む)、ポリペプチド、単離されたタンパク質、組換えタンパク質、抗体、またはそれらのコンジュゲートもしくは融合タンパク質を指す。抗血管新生剤は、血管新生因子またはその受容体に結合し、その血管新生活性を遮断する薬剤を含むことを理解されたい。例えば、抗血管新生剤は、例えば、上に定義したような血管新生薬に対する抗体または他のアンタゴニストであり、例えば、VEGF-A に結合する融合タンパク質、例えば、ZALTRAP™ (アフリベルセプト)、VEGF-A に対する抗体、例えば、AVASTIN (登録商標) (ベバシズマブ)、または VEGF-A 受容体 (例えば、KDR 受容体もしくは Flt-1 受容体) に対する抗体、抗 PDGFR 阻害剤、例えば、GLEEVEC (登録商標) (Imatinib Mesylate)、VEGF 受容体シグナル伝達を遮断する小分子 (例えば、PTK787/ZK2284、SU6668、SUTENT (登録商標) / SU11248 (スニチニブリンゴ酸塩)、AMG706、または例えば、国際特許出願第 WO 2004/113304 号に記載されるもの) である。抗血管新生剤はまた、天然の血管新生阻害剤、例えば、アンジオスタチン、エンドスタチン等も含む。例えば、Klagsbrun and D'Amore (1991) *Ann. Rev. Physiol.* 53: 217-39; Streit and Detmar (2003) *Oncogene* 22:3172-3179 (例えば、悪性黒色腫の抗血管新生療法剤を列挙する表3); Ferrara & Alitalo (1999) *Nature Medicine* 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) *Oncogene* 22:6549-6556 (例えば、既知の抗血管新生因子を列挙する表2); および Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (例えば、臨床試験で使用される抗血管新生剤を列挙する表1を参照のこと)。

【0058】

本明細書において使用される「VEGF」または「VEGF-A」という用語は、165-アミノ酸ヒト血管内皮細胞増殖因子ならびに関連する 121-、189-、および 206-アミノ酸ヒト血管内皮細胞増殖因子を指し、これは、Leung et al. (1989) *Science* 246:1306 および Houck et al. (1991) *Mol. Endocrin.* 5:1806 によって、天然の対立遺伝子およびそのプロセシング型と一緒に記載されている。「VEGF」という用語はまた、マウス、ラット、または靈長類等の非ヒト種に由来する VEGF も指す。特定の種に由来する VEGF は、例えば、ヒト VEGF は hVEGF、マウス VEGF は mVEGF 等の用語によって示される場合もある。「VEGF」という用語はまた、165-アミノ酸のヒト血管内皮細胞増殖因子のアミノ酸 8~109 または 1~109 を含むポリペプチドの切断型を指すためにも使用される。いずれかのそのような形態の VEGF への言及は、例えば、「VEGF (8-109)」、「VEGF (1-109)」、「VEGF-A<sub>109</sub>」、または「VEGF 165」によって本出願において特定することができる。「切断型」の天然 VEGF のアミノ酸位置は、天然 VEGF 配列において示されるように番号付けされる。例えば、切断型天然 VEGF のアミノ酸位置 17 (メチオニン) は、天然 VEGF の位置 17 (メチオニン) である。切断型天然 VEGF は、KDR および Flt-1 受容体に対して天然 VEGF に匹敵する結合親和性を有する。

【0059】

「VEGF アンタゴニスト」は、限定されないが、1つまたは複数の VEGF 受容体に対するその結合を含む、VEGF の活性を中和、遮断、阻害、抑止、低減、または妨害す

10

20

30

40

50

ことができる分子を指す。VEGFアンタゴニストは、限定されないが、抗VEGF抗体およびその抗原結合断片、VEGFに特異的に結合し、それによって1つまたは複数の受容体に対するその結合を封鎖する受容体分子および誘導体、抗VEGF受容体抗体、VEGF受容体アンタゴニスト、例えば、VEGFRチロシンキナーゼの小分子阻害剤（例えば、パゾバニブ）、およびVEGFに結合するイムノアドヘシン、例えば、VEGFトラップ（例えば、アフリベルセプト）を含む。「VEGFアンタゴニスト」という用語は、本明細書において使用される場合、特に、VEGFに結合してVEGFの活性を中和、遮断、阻害、抑止、低減、または妨害することができる、抗体、抗体断片、他の結合ポリペプチド、ペプチド、および非ペプチド小分子を含む分子を含む。従って、「VEGFの活性」という用語は、特に、VEGFによって媒介されるVEGFの生物活性を含む。

10

#### 【0060】

本明細書において使用される「VEGFトラップ」という用語は、タンパク質、例えば、VEGFに結合してVEGFの活性を中和、遮断、阻害、抑止、低減、または妨害することができる融合分子を意味する。VEGFトラップの一例は、アフリベルセプトである。

#### 【0061】

「抗VEGF抗体」または「VEGFに結合する抗体」という用語は、十分な親和性および特異性を伴ってVEGFに結合できる抗体を意味し、該抗体は、標的VEGFにおける診断剤および/または治療薬として有用である。抗VEGF中和抗体は、ヌードマウスにおいて様々なヒト腫瘍細胞株の増殖を抑制し（Kim et al., *Nature* 362: 841-844 (1993); Warren et al., *J. Clin. Invest.* 95: 1789-1797 (1995); Borgstrom et al., *Cancer Res.* 56: 4032-4039 (1996); Melnyk et al., *Cancer Res.* 56: 921-924 (1996)）、また、虚血性網膜障害のモデルにおいて眼内血管新生を阻害する。Adamis et al., *Arch. Ophthalmol.* 114: 66-71 (1996)。例えば、抗VEGF抗体は、VEGFの活性が関与する疾患または状態の標的化および介入における治療剤として使用することができる。例えば、米国特許第6,582,959号、同第6,703,020号；国際公開第WO98/45332号；同第WO96/30046号；同第WO94/10202号、同第WO2005/044853号；欧洲特許第EP0666868B1号；米国特許出願第20030206899号、同第20030190317号、同第20030203409号、同第20050112126号、同第20050186208号、および同第20050112126；Popkov et al., *Journal of Immunological Methods* 288: 149-164 (2004)；ならびに国際公開第WO2005012359号を参照のこと。選択された抗体は、通常、VEGFに対して十分に強力な結合親和性を有する。例えば、抗体は、100nM～1pMのK<sub>d</sub>値でhVEGFに結合し得る。抗体親和性は、例えば、表面ラズモン共鳴法に基づくアッセイ（PCT出願公開2005/012359号に記載されるようなBIAcoreアッセイ等）、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、および競合アッセイ（例えば、RIA）によって決定されてもよい。抗体は、例えば、治療薬としての有効性を評価するために、他の生物活性アッセイに供されてもよい。そのようなアッセイは、当該技術分野において既知であり、標的抗原および意図する抗体の用途に依存する。例として、HUVEC抑制アッセイ、腫瘍細胞増殖抑制アッセイ（例えば、国際公開第WO89/06692号に記載されるような）、抗体依存性細胞傷害（ADCC）および補体依存性細胞傷害（CDC）アッセイ（米国特許第5,500,362号）、ならびにアゴニスト活性または造血アッセイ（国際公開第WO95/27062号を参照）が挙げられる。抗VEGF抗体は、通常、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-DまたはVEGF-E等の他のVEGF相同体にも、PIGF、PDGF、またはbFGF等の他の増殖因子にも結合しない。

20

30

40

#### 【0062】

50

一実施形態において、抗 V E G F 抗体は、ハイブリドーマ A T C C H B 1 0 7 0 9 によって產生されるモノクローナル抗 V E G F 抗体 A 4 . 6 . 1 と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体；限定されないが、「r h u M A b V E G F」または「A V A S T I N (登録商標)」としても知られる、「ベバシズマブ」として知られる抗体を含む、組換え型ヒト化抗 V E G F モノクローナル抗体を含む (Presta et al. (1997) Cancer Res. 57 4593 - 4599 を参照のこと)。A V A S T I N (登録商標) は、現在市販されている。ベバシズマブを用いて治療することができる非限定的な例示的癌は、非小細胞肺癌、結腸直腸癌、乳癌、腎癌、卵巣癌、多形神経膠芽腫、小児骨肉腫、胃癌、および胰癌を含む。ベバシズマブは、その受容体に対するヒト V E G F の結合を遮断するマウス抗体 A . 4 . 6 . 1 に由来する、変異したヒト I g G<sub>1</sub> フレームワーク領域と、抗原結合相補性決定領域とを含む。ベバシズマブおよび他のヒト化抗 V E G F 抗体は、米国特許第 6,884,879 号および同第 7,169,901 号にさらに記載される。さらなる抗 V E G F 抗体は、P C T 出願公開第 WO 2005/012359 号および同第 WO 2009/073160 号；米国 Pat. 第 7,060,269 号、同第 6,582,959 号、同第 6,703,020 号；同第 6,054,297 号；国際公開第 WO 98/45332 号；同第 WO 96/30046 号；同第 WO 94/10202 号；欧州特許第 E P 0 6 6 6 8 6 8 B 1 号；米国特許出願公開第 2006009360 号、同第 20050186208 号、同第 20030206899 号、同第 200 30190317 号、同第 20030203409 号、および同第 20050112126；ならびに Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288: 149 - 164 (2004) に記載されている。  
10 20 20

#### 【0063】

「対象」および「患者」という用語は、哺乳動物を指すために本明細書において同義で使用される。いくつかの実施形態において、対象または患者はヒトである。他の実施形態において、限定されないが、げっ歯類、サル、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、哺乳類実験動物、哺乳類家畜、哺乳類競技動物、および哺乳類ペットを含む、他の哺乳動物を治療する方法も提供される。

#### 【0064】

「試料」または「患者試料」という用語は、本明細書において使用される場合、例えば、物理的、生化学的、化学的、および / または生理学的な特徴に基づいて特徴付けられるおよび / または特定される、細胞実体および / または他の分子実体を含む対象とする対象から得られるかまたは対象に由来する組成物を指す。例えば、「疾患試料」という句およびこの変形は、特徴付けられる細胞実体および / または分子実体を含むことが予測されるかまたは分かっている、対象とする対象から得られる任意の試料を指す。「組織または細胞試料」とは、対象または患者の組織から得られた類似する細胞の集合を意味する。組織または細胞試料の源は、新鮮な、凍結された、および / または保存された、臓器もしくは組織試料または生検組織または吸引液由来の固形組織；血液または任意の血液成分；大脳脊髄液、羊水、腹水、または間質液等の体液；対象の妊娠または発達における任意の時期かの細胞であってもよい。組織試料はまた、初代培養細胞または培養細胞または細胞株であってもよい。任意選択的に、組織または細胞試料は、疾患組織 / 臓器から得られる。組織試料は、防腐剤、抗凝血剤、緩衝液、固定液、栄養剤、抗生物質等の、本来の組織には自然に混合されない化合物を含み得る。  
30 40

#### 【0065】

「参照試料」、「参照細胞」、または「参照組織」は、本明細書において使用される場合、特定するために本発明の方法または組成物が使用される疾患または状態に罹患していないかまたは特定しているかまたは考えられる源から得られた試料、細胞、または組織を指す。いくつかの実施形態において、参照試料、参照細胞、または参照組織は、本発明の組成物または方法を使用して疾患または状態が特定される同じ対象または患者の正常な身体部分から得られる。いくつかの実施形態において、参照試料、参照細胞、または参照組織は、本発明の組成物または方法を使用して疾患または状態が特定される対象または患者ではな  
50

い1人以上の個体の正常な身体部分から得られる。

【0066】

「癌」および「腫瘍」は、本明細書において使用される場合、動物における任意の異常な細胞または組織の成長または増殖を指す同義の用語である。本明細書において使用される場合、「癌」および「腫瘍」という用語は、固体癌および血液癌／リンパ腺癌を包含し、また悪性、前癌性、および良性の増殖、例えば異形成等も包含する。癌の例として、限定されないが、細胞腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられる。このような癌のより具体的な非限定的な例として、扁平上皮癌、小細胞肺癌、下垂体癌、食道癌、星状細胞腫、軟部肉腫、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、消化管癌、膀胱癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌、腎癌、肝癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、脳癌、子宮内膜癌、精巣癌、胆管細胞癌、胆囊癌、胃癌、黒色腫、および種々の種類の頭頸部癌が挙げられる。

10

【0067】

「肺癌」という用語は、本明細書において使用される場合、小細胞肺癌と非小細胞肺癌の両方を指す。非小細胞肺癌は、限定されないが、肺扁平上皮癌、腺癌、肺大細胞癌、肉腫様細胞癌、カルチノイド腫瘍、肺多形癌、ならびに腺扁平上皮癌および細気管支肺胞上皮癌を含む。小細胞肺癌は、いくつかの実施形態において、「燕麦細胞癌」と称される場合があり、限定されないが、小細胞癌と非小細胞癌とが混在する混合型小細胞癌を含む。

20

【0068】

「F G F R 1 遺伝子増幅を伴う細胞」は、F G F R 1 遺伝子を2コピーより多く含む細胞を指す。いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅を伴う細胞は、第8染色体セントロメアに対するF G F R 1 遺伝子の比率が1より大きい細胞を指す。いくつかの実施形態において、比率は、蛍光インサイツハイブリダイゼーションによって決定される。「F G F R 1 遺伝子増幅を伴う癌」は、本明細書において使用される場合、癌細胞の少なくとも一部がF G F R 1 遺伝子増幅を有する癌を指す。いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅を伴う癌は、癌細胞の少なくとも一部がF G F R 1 遺伝子を少なくとも4コピー含む癌を指す。いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅を伴う癌は、癌細胞の少なくとも一部におけるF G F R 1 遺伝子：第8染色体セントロメア比が1より大きい、癌を指す。例示的なF G F R 1 遺伝子配列は、例えば、2012年3月25日付のN C B I 参照配列：N G \_ 0 0 7 7 2 9 . 1 に見出すことができる。

30

【0069】

いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅を伴う細胞は、F G F R 1 遺伝子を少なくとも3コピー、少なくとも4コピー、少なくとも5コピー、少なくとも6コピー、少なくとも8コピー、または少なくとも10コピー含む。いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅を伴う細胞は、少なくとも4コピーを含む。いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅を伴う細胞は、F G F R 1 遺伝子：第8染色体セントロメア比が、少なくとも1.5、少なくとも2、少なくとも2.5、少なくとも3、少なくとも3.5、または少なくとも4である。いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅を伴う細胞は、F G F R 1 遺伝子：第8染色体セントロメア比が少なくとも2である。いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅を伴う細胞中のF G F R 1 遺伝子の各コピーは、F G F R 1 遺伝子の完全なコピーである必要はない。いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅を伴う細胞は、高いレベルのF G F R 1 を有する（すなわち、いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅を有する細胞は、F G F R 1 の過剰発現を伴う細胞である）。

40

【0070】

「F G F R 1 の過剰発現を伴う細胞」または「F G F R 1 を過剰発現している細胞」は、参照細胞よりも少なくとも2倍高いレベルのF G F R 1 m R N A またはタンパク質を有する細胞を指す。「F G F R 1 の過剰発現を伴う癌」または「F G F R 1 を過剰発現している癌」は、細胞の少なくとも一部が参照細胞よりも少なくとも2倍高いレベルのF G

50

F R 1 mRNA またはタンパク質を有する癌を指す。いくつかの実施形態において、FGFR 1 の過剰発現を伴う細胞は、参照細胞よりも少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 10 倍高いレベルの FGFR 1 mRNA またはタンパク質を有する。FGFR 1 mRNA またはタンパク質のレベルは、限定されないが、本明細書に記載される方法を含む任意の好適な方法によって決定することができる。いくつかの実施形態において、FGFR 1 は、FGFR 1 IIIc である。例示的なヒト FGFR 1 タンパク質配列は、例えば、2012年3月21日付の UniProtKB / Swiss-Prot 参照配列：P11362 (FGFR1\_HUMAN) に見出すことができる。例示的なヒト FGFR 1 mRNA 配列は、例えば、2012年3月24日付の NCBI 参照配列：NM\_023110.2 に見出すことができる。例示的なヒト FGFR 1 IIIc mRNA 配列は、例えば、2012年3月24日付の NCBI 参照配列：NP\_075598.2 に見出すことができる。例示的なヒト FGFR 1 IIIc mRNA 配列は、例えば、2012年3月24日付の NCBI 参照配列：NM\_023110.2 に見出すことができる。

10

20

30

40

50

## 【0071】

「FGFR 3 IIIc の過剰発現を伴う細胞」または「FGFR 3 IIIc を過剰発現している細胞」は、参照細胞よりも少なくとも 2 倍高いレベルの FGFR 3 IIIc mRNA またはタンパク質を有する細胞を指す。「FGFR 3 IIIc の過剰発現を伴う癌」または「FGFR 3 IIIc を過剰発現している癌」は、細胞の少なくとも一部が参照細胞よりも少なくとも 2 倍高いレベルの FGFR 3 IIIc mRNA またはタンパク質を有する癌を指す。いくつかの実施形態において、FGFR 3 IIIc の過剰発現を伴う細胞は、参照細胞よりも少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 7 倍、または少なくとも 10 倍高いレベルの FGFR 3 IIIc mRNA またはタンパク質を有する。FGFR 3 IIIc mRNA またはタンパク質のレベルは、限定されないが、本明細書に記載される方法を含む任意の好適な方法によって決定することができる。例示的なヒト FGFR 3 IIIc タンパク質配列は、例えば、2012年2月12日付の NCBI 参照配列：NP\_000133.1 に見出すことができる。例示的なヒト FGFR 3 IIIc mRNA 配列は、例えば、2012年2月12日付 NCBI 参照配列：NM\_000142.4 に見出すことができる。

30

## 【0072】

「FGF 2 の過剰発現を伴う細胞」または「FGF 2 を過剰発現している細胞」は、参照細胞よりも少なくとも 2 倍高いレベルの FGF 2 mRNA またはタンパク質を有する細胞を指す。「FGF 2 の過剰発現を伴う癌」または「FGF 2 を過剰発現している癌」は、細胞の少なくとも一部が参照細胞よりも少なくとも 2 倍高いレベルの FGF 2 mRNA またはタンパク質を有する癌を指す。いくつかの実施形態において、FGF 2 の過剰発現を伴う細胞は、参照細胞よりも少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 7 倍、または少なくとも 10 倍高いレベルの FGF 2 mRNA またはタンパク質を有する。FGF 2 mRNA またはタンパク質のレベルは、限定されないが、本明細書に記載される方法を含む任意の好適な方法によって決定することができる。例示的なヒト FGF 2 タンパク質配列は、例えば、2012年2月12日付の NCBI 参照配列：NP\_001997.5 に見出すことができる。例示的なヒト FGF 2 mRNA 配列は、例えば、2012年2月12日付の NCBI 参照配列：NM\_002006.4 に見出すことができる。

40

50

## 【0073】

「DKK 3 の過剰発現を伴う細胞」または「DKK 3 を過剰発現している細胞」は、参照細胞よりも少なくとも 2 倍高いレベルの DKK 3 mRNA またはタンパク質を有する細胞を指す。「DKK 3 の過剰発現を伴う癌」または「DKK 3 を過剰発現している癌」は、細胞の少なくとも一部が参照細胞よりも少なくとも 2 倍高いレベルの DKK 3 mRNA またはタンパク質を有する癌を指す。いくつかの実施形態において、DKK 3 の過剰発現を伴う細胞は、参照細胞よりも少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、

少なくとも 7 倍、または少なくとも 10 倍高いレベルの D K K 3 m R N A またはタンパク質を有する。D K K 3 m R N A またはタンパク質のレベルは、限定されないが、本明細書に記載される方法を含む任意の好適な方法によって決定することができる。例示的なヒト D K K 3 タンパク質配列は、例えば、2012年1月22日付の N C B I 参照配列：N P \_ 0 0 1 0 1 8 0 6 7 . 1 に見出すことができる。例示的なヒト D K K 3 m R N A 配列は、例えば、2012年1月22日付の N C B I 参照配列：N M \_ 0 0 1 0 1 8 0 5 7 . 1 に見出すことができる。

## 【 0 0 7 4 】

「 F G F 1 8 の過剰発現を伴う細胞」または「 F G F 1 8 を過剰発現している細胞」は、参照細胞よりも少なくとも 2 倍高いレベルの F G F 1 8 m R N A またはタンパク質を有する細胞を指す。「 F G F 1 8 の過剰発現を伴う癌」または「 F G F 1 8 を過剰発現している癌」は、細胞の少なくとも一部が参照細胞よりも少なくとも 2 倍高いレベルの F G F 1 8 m R N A またはタンパク質を有する癌を指す。いくつかの実施形態において、F G F 1 8 の過剰発現を伴う細胞は、参照細胞よりも少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 7 倍、または少なくとも 10 倍高いレベルの F G F 1 8 m R N A またはタンパク質を有する。F G F 1 8 m R N A またはタンパク質のレベルは、限定されないが、本明細書に記載される方法を含む任意の好適な方法によって決定することができる。例示的なヒト F G F 1 8 タンパク質配列は、例えば、2012年6月27日付の N C B I 参照配列：N P \_ 0 0 3 8 5 3 に見出すことができる。例示的なヒト F G F 1 8 m R N A 配列は、例えば、2012年6月27日付の N C B I 参照配列：N M \_ 0 0 3 8 6 2 . 2 に見出すことができる。

10

20

30

40

## 【 0 0 7 5 】

「 E T V 4 の過剰発現を伴う細胞」または「 E T V 4 を過剰発現している細胞」は、参照細胞よりも少なくとも 2 倍高いレベルの E T V 4 m R N A またはタンパク質を有する細胞を指す。「 E T V 4 の過剰発現を伴う癌」または「 E T V 4 を過剰発現している癌」は、細胞の少なくとも一部が参照細胞よりも少なくとも 2 倍高いレベルの E T V 4 m R N A またはタンパク質を有する癌を指す。いくつかの実施形態において、E T V 4 の過剰発現を伴う細胞は、参照細胞よりも少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 7 倍、または少なくとも 10 倍高いレベルの E T V 4 m R N A またはタンパク質を有する。E T V 4 m R N A またはタンパク質のレベルは、限定されないが、本明細書に記載される方法を含む任意の好適な方法によって決定することができる。例示的なヒト E T V 4 タンパク質配列は、例えば、2012年9月08日付の N C B I 参照配列：N P \_ 0 0 1 9 7 7 . 1 に見出すことができる。例示的なヒト E T V 4 m R N A 配列は、例えば、2012年9月08日付の N C B I 参照配列：N M \_ 0 0 1 9 8 6 . 2 に見出すことができる。

30

## 【 0 0 7 6 】

「治療」は、本明細書において使用される場合、ヒトを含む哺乳動物の状態に対する治療薬の任意の投与または適用を含み、例えば、退縮を引き起こすことによって、または機能の損失、不足、もしくは低下を回復もしくは修復することによって、または非効率的なプロセスを刺激することによって、状態もしくは状態の進行を阻害すること、状態もしくはその進行を阻害することもしくは遅延させること、その発達を停止すること、状態を部分的にもしくは完全に軽減すること、または状態を治癒することを含む。いくつかの実施形態において、「治療」は、治療される個体または細胞の自然の経過を変更するための臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理学的過程の間に行うことができる。望ましい治療の効果は、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患のいずれの直接的または間接的な病理学的帰結の低減、転移の予防、疾患進行の速度の減速、病態の回復または緩和、および寛解または予後の改善を含む。

40

## 【 0 0 7 7 】

分子または分子の組み合わせの「有効量」または「治療有効量」は、単独で、または他の治療薬と組み合わせて投与された時に、状態を治療するのに十分な量、および / または

50

、少なくとも対象のサブセットにおいて腫瘍細胞の増殖を阻害するのに十分な量を意味する。特定の実施形態において、治療有効量は、投与時および必要な期間の間、所望の治療結果または予防的結果を達成するために有効な量を指す。本発明の F G F R 1 融合タンパク質の治療有効量は、例えば、個体の病態、年齢、性別、および体重、ならびに個体において F G F R 1 融合タンパク質が所望の応答を誘発する能力等の要因に従って変化し得る。治療有効量はまた、治療的に有益な効果が、F G F R 1 融合タンパク質のいずれかの毒性または有害作用を上回る量である。癌の場合、薬物の有効量は、癌細胞の数を減少させる；腫瘍サイズを縮小する；癌細胞の末梢器官への浸潤を阻害する（すなわち、ある程度まで遅らせ、典型的には停止する）；腫瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度まで遅らせ、典型的には停止する）；腫瘍増殖をある程度まで阻害する；腫瘍の治療を可能にする、および／または障害に関連する1つより多くの症状をある程度まで軽減し得る。薬物は、増殖を予防し得るおよび／または既存の癌細胞を死滅させ得る範囲で、細胞増殖抑制性および／または細胞傷害性であってもよい。

10

#### 【0078】

「予防的有効量」は、投与時および必要な期間の間、所望の予防的結果を達成するためには有効な量を指す。必ずではないが典型的には、予防投与は、疾患の前または早期段階で対象に行われるため、予防的有効量は治療有効量よりも少ない。

20

#### 【0079】

「阻害」または「阻害する」という用語は、任意の表現型特性の減少もしくは停止、またはその特性の発生頻度、程度、もしくは可能性の減少もしくは停止を指す。非限定的な例示的阻害は、腫瘍増殖の阻害を含む。

30

#### 【0080】

治療剤の投与の恩恵または治療剤の投与に対する反応の文脈において本明細書において使用される「恩恵」、「治療上の恩恵」、「反応性」、および「治療反応性」という用語は、例えば、疾患進行のある程度の阻害（遅延および完全な停止を含む）；疾患のエピソードおよび／もしくは症状の数の減少；病変サイズの縮小；疾患細胞の隣接する末梢器官および／もしくは組織への浸潤の阻害（すなわち、低減、遅延、および完全な停止）；疾患転移の阻害（すなわち、低減、遅延、および完全な停止）；疾患病変の退縮または消失を必ずではないがもたらし得る自己免疫応答の低下；疾患に関連する1つまたは複数の症状のある程度の軽減；治療後の無病期間の長さ、例えば、無進行生存の増加；全体的な生存期間の増加；より高い奏効率；ならびに／または治療後の所与の時点での死亡率の減少等の種々のエンドポイントを評価することによって、測定することができる。

30

#### 【0081】

1つまたは複数のさらなる治療剤と「組み合わせた」投与は、共投与（同時投与を含む）および任意の順序の連続投与（すなわち、逐次投与）を含む。

40

#### 【0082】

「薬学的に許容される担体」は、対象に投与するための「薬学的組成物」を一緒に含む治療剤とともに使用される、当該技術分野において従来的である無毒性の固体、半固体、もしくは液体の增量剤、希釈剤、封入材料、製剤補助剤、または担体を指す。薬学的に許容される担体は、用いられる投与量および濃度ではレシピエントに非毒性であり、製剤の他の成分と適合する。薬学的に許容される担体は、用いられる製剤に適している。例えば、治療剤が経口投与される場合、担体はゲルカプセルであってもよい。治療薬剤が皮下投与される場合、担体は、理想的には、皮膚に刺激性を示さず、注射部位反応を引き起こさない。

#### 【0083】

治療組成物および方法

F G F R 1 E C D および／または F G F R 1 E C D 融合分子を使用して F G F R 1 遺伝子增幅を有する癌を治療する方法

50

いくつかの実施形態において、本発明は、癌細胞の少なくとも一部が F G F R 1 遺伝子增幅を有する癌を治療する方法を提供する。そのような癌は、いくつかの実施形態におい

て、線維芽細胞増殖因子受容体1(FGFR1)細胞外ドメイン(ECD)またはFGFR1-ECDF融合分子を用いた治療に特に反応することが分かっている。したがって、いくつかの実施形態において、FGFR1遺伝子増幅を有する癌を治療する方法は、治療有効量のFGFR1-ECDFまたはFGFR1-ECDF融合分子を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における癌を治療する方法は、治療有効量の線維芽細胞増殖因子受容体1(FGFR1)細胞外ドメイン(ECD)またはFGFR1-ECDF融合分子を対象に投与する工程を含み、FGFR1-ECDFまたはFGFR1-ECDF融合分子の投与前に、癌の細胞の少なくとも一部がFGFR1遺伝子増幅を有することが決定される。そのような方法において、癌におけるFGFR1遺伝子増幅は、FGFR1-ECDFまたはFGFR1-ECDF融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。

10

#### 【0084】

いくつかの実施形態において、本発明は、癌細胞の少なくとも一部が、FGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、または少なくとも4種のマーカーの過剰発現を有する癌を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態において、FGFR1は、FGFR1IIIcである。いくつかの実施形態において、過剰発現は、mRNAの過剰発現である。いくつかの実施形態において、少なくとも、FGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択されるマーカーを過剰発現している癌を治療する方法は、治療有効量のFGFR1-ECDFまたはFGFR1-ECDF融合分子を対象に投与する工程を含む。いくつかの実施形態において、対象における癌を治療する方法は、治療有効量の線維芽細胞増殖因子受容体1(FGFR1)細胞外ドメイン(ECD)またはFGFR1-ECDF融合分子を対象に投与する工程を含み、FGFR1-ECDFまたはFGFR1-ECDF融合分子の投与前に、癌の細胞の少なくとも一部が、少なくとも、FGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択されるマーカーの過剰発現を有することが決定される。そのような方法において、癌におけるFGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、および/またはETV4の過剰発現は、FGFR1-ECDFまたはFGFR1-ECDF融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、FGFR1は、FGFR1IIIcである。

20

#### 【0085】

いくつかの実施形態において、FGFR1遺伝子増幅を伴う癌において、癌細胞の少なくとも一部は、FGFR1遺伝子を少なくとも4コピー含む。いくつかの実施形態において、FGFR1遺伝子増幅を伴う癌において、癌細胞の少なくとも一部は、FGFR1遺伝子を少なくとも5コピー、少なくとも6コピー、少なくとも8コピー、または少なくとも10コピー含む。FGFR1遺伝子のコピー数の決定は、当該技術分野における任意の好適な方法によって実行することができる。特定の非限定的な例示的方法を本明細書で論じる。いくつかの実施形態において、FGFR1遺伝子増幅を伴う癌において、癌細胞の少なくとも一部は、第8染色体セントロメアに対するFGFR1遺伝子の比率が少なくとも2である。いくつかの実施形態において、FGFR1遺伝子増幅を伴う癌において、癌細胞の少なくとも一部は、第8染色体セントロメアに対するFGFR1遺伝子の比率が、少なくとも2.5、少なくとも3、少なくとも3.5、または少なくとも4である。そのような比率の決定は、当該技術分野における任意の好適な方法によって実行することができる。特定の非限定的な例示的方法を本明細書で論じる。

30

#### 【0086】

いくつかの実施形態において、癌は、前立腺癌、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、脳癌、卵巣癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、喉頭癌、肝癌、腎癌、神経膠芽腫、および胰癌から選択される。特定の実施形態において、癌は、乳癌、食道癌、および肺癌から選択される。いくつかの実施形態において、癌は、肺癌である。いくつかの実施形態において、肺癌は、非小細胞肺癌および小細胞肺癌から選択される。いくつかの実施形態において、肺癌は、扁平

40

50

上皮癌である。いくつかの実施形態において、癌は、頭頸部癌である。いくつかの実施形態において、頭頸部癌は、頭頸部の扁平上皮癌である。

【0087】

いくつかの実施形態において、FGFR1 ECDは、配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECDは、配列番号2および4から選択されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD融合分子は、配列番号5および6から選択されるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD融合分子は、配列番号6のアミノ酸配列を有するFGFR1 ECD.339-Fcである。

【0088】

いくつかの実施形態において、FGFR1 ECDまたはFGFR1 ECD融合分子は、1つまたは複数のさらなる抗癌治療とともに投与される。さらなる抗癌治療の例として、限定されないが、手術、放射線療法（照射療法）、生物学的療法、免疫療法、および化学療法、またはこれらの治療の組み合わせが挙げられる。さらに、細胞傷害性薬剤、抗血管新生剤、および抗増殖性薬剤を、FGFR1 ECDまたはFGFR1 ECD融合分子と組み合わせて使用することができる。任意の方法および使用法の特定の態様において、本発明は、治療有効量のFGFR1 ECDおよび/またはFGFR1 ECD融合分子と、1つまたは複数の化学療法剤とを対象に投与することにより、癌細胞の少なくとも一部が、FGFR1遺伝子增幅を含み、かつ/または、FGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、または少なくとも4種のマーカーを過剰発現している癌を治療することを提供する。いくつかの実施形態において、対象の癌は、以前に治療されていない。様々な化学療法剤が、本発明の併用治療の方法および用途に使用され得る。企図される化学療法剤の例示的かつ非限定的なリストは、本発明の「定義」および「発明の概要」に提供される。いくつかの実施形態において、本発明は、治療有効量のFGFR1 ECDおよび/またはFGFR1 ECD融合分子と、1つまたは複数の抗血管新生剤とを対象に投与することにより、癌を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、治療有効量のFGFR1 ECDおよび/またはFGFR1 ECD融合分子と、1つまたは複数のVEGFアンタゴニストとを対象に投与することにより、癌を治療することを提供する。いくつかの実施形態において、本発明は、治療有効量のFGFR1 ECDおよび/またはFGFR1 ECD融合分子と、1つまたは複数のVEGFアンタゴニストとを、1つまたは複数の化学療法剤と組み合わせて対象に投与することにより、癌を治療することを提供する。いくつかの実施形態において、1つまたは複数のVEGFアンタゴニストは、抗VEGF抗体および/またはVEGFトラップである。

【0089】

いくつかの実施形態において、FGFR1 ECDおよび/またはFGFR1 ECD融合分子を、ドセタキセル、パクリタキセル、ピンクリスチン、カルボプラチニン、オキサリプラチニン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル（5-FU）、ロイコボリン、ペメトレキセド、ソラフェニブ、エトポシド、トポテカン、VEGFアンタゴニスト、抗VEGF抗体、VEGFトラップ、およびベバシズマブから選択される少なくとも1種のさらなる治療剤と組み合わせて対象に投与する工程を含む、癌を治療する方法が提供される。別の例において、FGFR1-ECD.339-Fcを、ドセタキセル、パクリタキセル、ピンクリスチン、カルボプラチニン、シスプラチニン、オキサリプラチニン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル（5-FU）、ロイコボリン、ペメトレキセド、ソラフェニブ、エトポシド、トポテカン、VEGFアンタゴニスト、抗VEGF抗体、VEGFトラップ、およびベバシズマブから選択される少なくとも1種のさらなる治療剤と組み合わせて対象に投与する工程を含む、癌を治療する方法が提供される。いくつかの実施形態において、FGFR1-ECD.339-Fcおよびドセタキセルを対象に投与する工程を含む、癌を治療する方法が提供される。

【0090】

10

20

30

40

50

FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子（例えば、FGFR1 - ECD . 339 - Fc）を含む薬学的組成物が、特定の適応症のための治療有効量で投与される。治療有効量は、典型的には、治療を受ける対象の体重、対象の身体的状態もしくは健康状態、治療される状態の広範さ、および / または治療を受ける対象の年齢に依存する。一般に、FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子（例えば、FGFR1 - ECD . 339 - Fc）は、1 用量当たり約 50 μg / 体重 1 kg ~ 約 100 mg / 体重 1 kg の範囲の量で投与されるべきである。任意選択的に、FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子（例えば、FGFR1 - ECD . 339 - Fc）は、1 用量当たり約 100 μg / 体重 1 kg ~ 約 300 mg / 体重 1 kg の範囲の量で投与することができる。さらに任意選択的に、FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子（例えば、FGFR1 - ECD . 339 - Fc）は、1 用量当たり約 0.5 mg / 体重 1 kg ~ 約 20 mg / 体重 1 kg の範囲の量で投与することができる。特定の実施形態において、FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子（例えば、FGFR1 - ECD . 339 - Fc）は、約 8 mg / 体重 1 kg ~ 約 20 mg / 体重 1 kg の用量で投与される。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子（例えば、FGFR1 - ECD . 339 - Fc）は、約 8 mg / 体重 1 kg ~ 約 16 mg / 体重 1 kg（または減衰係数 1.11 mL / mg \* cm を用いて計算した場合、約 10 mg / 体重 1 kg ~ 約 20 mg / 体重 1 kg）の用量で投与される。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子（例えば、FGFR1 - ECD . 339 - Fc）は、約 8 mg / 体重 1 kg、約 10 mg / 体重 1 kg、約 11 mg / 体重 1 kg、約 12 mg / 体重 1 kg、約 13 mg / 体重 1 kg、約 14 mg / 体重 1 kg、約 15 mg / 体重 1 kg、約 16 mg / 体重 1 kg、約 17 mg / 体重 1 kg、約 18 mg / 体重 1 kg、約 19 mg / 体重 1 kg、または約 20 mg / 体重 1 kg の用量で投与される。いくつかの実施形態において、FGFR1 融合タンパク質は、減衰係数 1.11 mL / mg \* cm を用いて計算された約 10 mg / 体重 1 kg の用量で投与される。他の実施形態において、FGFR1 融合タンパク質は、減衰係数 1.11 mL / mg \* cm を用いて計算された約 20 mg / 体重 1 kg の用量で投与される。FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子はまた、上記用量のうちの 1 つから別の用量の範囲で投与されてもよい。いくつかの実施形態において、投与量は、週 2 回、毎週、隔週、毎週と隔週の間の頻度で、3 週毎、4 週毎、または毎月投与されてもよい。

#### 【0091】

特定の実施形態において、FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子の投与量は、用いられる減衰係数 (EC) に依存して二通りに計算することができる。減衰係数は、タンパク質のグリコシル化が考慮されているかどうかに依存して異なる。一実施形態において、FGFR1 - ECD . 339 - Fc のアミノ酸組成に基づく減衰係数は、例えば、1.42 mL / mg \* cm である。別の実施形態において、FGFR1 - ECD . 339 - Fc のアミノ酸部分に基づく減衰係数は、例えば、1.11 mL / mg \* cm である。表 1 に示すように、1.11 mL / mg \* cm の EC を用いた FGFR1 - ECD . 339 - Fc の用量の計算は、計算用量を 28 % 増加させる。2 つの減衰係数を用いて計算される用量は異なるが、モル濃度、または投与される薬物の実際の量は同一である。別途記載のない限り、本明細書において開示される用量は、それぞれ、グリコシル化を考慮に入れない減衰係数を用いて計算される。これらの投与量を、FGFR1 - ECD . 339 - Fc のグリコシル化を考慮に入れた減衰係数を用いて計算された投与量と比較したものを表 1 に示す。表 1 から分かるように、ここで 1.42 mL / mg \* cm の EC を用いた約 8 mg / kg（例えば、7.8 および 8.0）の投与量は、1.11 mL / mg \* cm の EC を用いて計算した場合の約 10 mg / kg（例えば、10.0 および 10.2）の投与量に相当する。ここで 1.42 mL / mg \* cm の EC を用いた約 16 mg / kg（例えば、15.6 および 16.0 mg / kg）投与量は、1.11 mL / mg \* cm の EC を用いて計算した場合の約 20 mg / kg（例えば、20.0 および 50

20.5) 投与量に相当する。上記「定義」の項目で述べたように、本明細書において提供される測定された数値は近似値であり、丸められたさらなる有効数字を有する値を含む。例えば、8 mg / kg は、7.6、7.8、8.0、8.2、8.4、および8.45等の有効桁数が2桁の値を含む、これらの各々は8に丸められる。同様に、16 mg / kg 等の値は、例えば、15.6および16.0等の、16に丸められる有効桁数が3桁の値を含む。

【0092】

(表1) FGFR1 - ECD . 339 - FC 用量の変換

用量 <sup>a</sup> EC = 1.42 mL/mg*cm	用量 <sup>a</sup> EC = 1.11 mL/mg*cm
0.5	0.6
0.75	1.0
1.0	1.3
2.0	2.6
3.0	3.8
4.0	5.1
5.0	6.4
6.0	7.7
7.0	9.0
7.8	10.0
8.0	10.2
9.0	11.5
10.0	12.8
11.0	14.1
12.0	15.4
13.0	16.6
14.0	17.9
15.0	19.2
15.6	20.0
16.0	20.5
17.0	21.8
18.0	23.0
19.0	24.3
20.0	25.6
30.0	38.4

<sup>a</sup>用量は、mg/kgで示されている。

【0093】

FGFR1 ECD、FGFR1 ECD融合分子、および/または少なくとも1種のさらなる治療剤を含む薬学的組成物は、必要に応じて対象に投与することができる。特定の実施形態において、有効量の治療用分子は、1回以上対象に投与される。種々の実施形態において、有効量の治療用分子は、少なくとも2ヶ月に1回、少なくとも1ヶ月に1回、少なくとも1ヶ月に2回、週1回、週2回、または週3回、対象に投与される。種々の実施形態において、有効量の治療用分子は、少なくとも1週間、少なくとも1ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、または少なくとも1年間、対象に投与される。

【0094】

特定の実施形態において、FGFR1 ECD、FGFR1 ECD融合分子、および少なくとも1種のさらなる治療剤の併用投与は、別々の製剤または単一の薬学的製剤を用いた同時投与を含む共投与、および任意の順序の連続投与を含む。任意選択的に、両方の(または全ての)活性薬剤が、同時にそれらの生物活性を発揮する時期が存在する。FGFR1 ECDおよび/またはFGFR1 ECD融合分子(例えば、FGFR1 - ECD . 339 - FC)と組み合わせて投与される治療剤の治療有効量は、医師または獣医師の判断に委ねられる。投与量の投与および調整は、治療される状態の最大管理を達成する。

10

20

30

40

50

ために行われる。用量は、使用される治療剤の種類、治療を受ける特定の患者、疾患の段階、および治療計画の所望の積極性等の要因にさらに依存する。

【0095】

特定の実施形態において、患者は、FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子（例えば、FGFR1 - ECD . 339 - Fc）と VEGF アンタゴニストとの組み合わせを用いて治療される。いくつかの実施形態において、VEGF アンタゴニストは VEGF トラップ（例えば、アフリベルセプト）である。いくつかの実施形態において、VEGF アンタゴニストはチロシンキナーゼ阻害剤（例えば、パゾパニブ）である。いくつかの実施形態において、VEGF アンタゴニストは抗 VEGF 抗体である。いくつかの実施形態において、VEGF 抗体はベバシズマブである。ベバシズマブの例示的な 1 つの投与量は、約 0.05 mg / kg ~ 約 20 mg / kg の範囲である。したがって、約 0.5 mg / kg、2.0 mg / kg、4.0 mg / kg、7.5 mg / kg、10 mg / kg、もしくは 15 mg / kg（またはそれらの任意の組み合わせ）のうちの 1 つまたは複数の用量が患者に投与されてもよい。そのような量は、間欠的に、例えば、毎週、2 週毎、または 3 週毎に投与されてもよい。

10

【0096】

いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子（例えば、FGFR1 - ECD . 339 - Fc）は、化学療法剤または抗血管新生剤等の別の治療剤と組み合わせて、該治療剤の推奨または処方される投与量および / または頻度で投与される。

20

【0097】

いくつかの実施形態において、さらなる治療剤は、食品医薬品局等の治療処置の認可に責任のある機関によって承認された投与量で、または製造者の推奨する投与量で投与される。

【0098】

投与経路および担体

いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子は、静脈内および / または皮下に投与することができる。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD および / または FGFR1 ECD 融合分子は、別の経路、例えば、動脈内、非経口、鼻腔内、筋肉内、心臓内、心室内、気管内、頬側、直腸内、腹腔内、皮内、局所的、経皮的、もしくはくも膜下腔内経路により、またはさもなければ移植もしくは吸入により、投与することができる。種々の実施形態において、少なくとも 1 種のさらなる治療剤を、静脈内、動脈内、皮下、非経口、鼻腔内、筋肉内、心臓内、心室内、気管内、頬側、直腸内、腹腔内の、皮内、局所的、経皮的、およびくも膜下腔内を含む種々の経路により、またはさもなければ移植もしくは吸入によりインビボで投与することができる。対象組成物の各々は、単独で、または組み合わせて、錠剤、カプセル剤、散剤、粒剤、軟膏、溶剤、坐剤、浣腸剤、注射剤、吸入剤、およびエアロゾル剤等の、固体、半固体、液体、または気体形態の調製物に処方することができる。

30

【0099】

種々の実施形態において、FGFR1 ECD、FGFR1 ECD 融合分子、および / または少なくとも 1 種のさらなる治療剤を含む組成物は、薬学的に許容される担体とともに製剤中に提供され、多種多様な担体が当該技術分野において既知である（例えば、Genaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons: Drug facts Plus, 20th ed. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7<sup>th</sup> ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3<sup>rd</sup> ed., Pharmaceutical Press (2000) を参照のこと）。ビヒク

40

50

ル、アジュバント、担体、および希釈剤を含む種々の薬学的に許容される担体が公的に利用可能である。さらに、種々の薬学的に供される補助物質、例えば、pH調整剤および緩衝剤、浸透圧調整剤、安定剤、湿潤剤等も、公的に利用可能である。特定の非限定的な例示的担体は、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、およびこれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、治療剤は、定義の項目において上に示したブランド薬として、またはジェネリックの均等物として処方される。いくつかの実施形態において、ドセタキセルは、Taxotere(登録商標)(Sanofi Aventis)、またはジェネリックの均等物として処方される。

## 【0100】

種々の実施形態において、FGFR1 ECD、FGFR1 ECD融合分子および/または少なくとも1種のさらなる治療剤を含む組成物は、植物油もしくは他の油、合成脂肪族酸グリセリド、より高級な脂肪酸のエステル、またはプロピレングリコール等の水性または非水性溶媒中に、溶解、懸濁、または乳化することによって、あるいは所望の場合、可溶化剤、等張剤、懸濁剤、乳化剤、安定剤および防腐剤等の従来の添加物とともに、注射用に処方することができる。種々の実施形態において、組成物は、例えば、加圧された許容される噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等を使用して、吸入用に処方されてもよい。組成物はまた、種々の実施形態において、生分解性または非生分解性のポリマーとともに徐放性マイクロカプセルに処方されてもよい。非限定的な例示的生分解性製剤は、ポリ乳酸-グリコール酸ポリマーを含む。非限定的な例示的非生分解性製剤は、ポリグリセリン脂肪酸エステルを含む。そのような製剤を作製する方法は、例えば、 European Patent Application No. EP 1 125 584 A 1号に記載されている。

10

20

30

## 【0101】

各々が1つまたは複数の用量のFGFR1 ECD、FGFR1 ECD融合分子および/または少なくとも1種のさらなる治療剤を収容する1つまたは複数の容器を含む薬学的投薬パックも提供される。特定の実施形態において、単位投与量が提供され、単位投与量は、FGFR1 ECD、FGFR1 ECD融合分子、および/または1種または複数種のさらなる薬剤を含むもしくは含まない少なくとも1種のさらなる治療剤を含む、所定量の組成物を含む。特定の実施形態において、そのような単位投与量は、単回使用の注射用プレフィルドシリンジ内に供給される。種々の実施形態において、単位投与量に含まれる組成物は、生理食塩水、ショ糖等、緩衝液、例えば、リン酸塩等を含み得、かつ/または安定した有効なpH範囲内で処方することができる。代替として、特定の実施形態において、組成物は、適切な液体、例えば滅菌水の添加によって再構成することができる凍結乾燥粉末として提供されてもよい。特定の実施形態において、組成物は、限定されないが、ショ糖およびアルギニンを含む、タンパク質凝集を阻害する1種または複数種の物質を含む。特定の実施形態において、本発明の組成物は、ヘパリンおよび/またはプロテオグリカンを含む。

30

## 【0102】

いくつかの実施形態において、投薬パックは、FGFR1 ECDおよび/またはFGFR1 ECD融合分子を投与する前に、癌が、FGFR1遺伝子増幅を含むかどうか、ならびに/またはFGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、もしくは少なくとも4種のマーカーを過剰発現しているかどうかを決定するための説明書を含む。いくつかの実施形態において、FGFR1は、FGFR1IIIcである。いくつかのそのような実施形態において、説明書は、癌細胞の少なくとも一部におけるFGFR1遺伝子増幅の存在、ならびに/またはFGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、もしくは少なくとも4種のマーカーの過剰発現が、FGFR1 ECDおよび/またはFGFR1 ECD融合分子に対する治療反応性の指標であることを示す。いくつかの実施形態において、説明書は、癌細胞の少なくとも一部においてFGFR1遺伝子が少なくとも4コピー存在することが、FGFR1 ECDおよび/またはFGFR

40

50

1 E C D 融合分子に対する治療反応性の指標であることを示す。いくつかの実施形態において、説明書は、癌細胞の少なくとも一部において F G F R 1 遺伝子が少なくとも 4 コピー、少なくとも 6 コピー、少なくとも 8 コピー、または少なくとも 10 コピー存在することが、F G F R 1 E C D および / または F G F R 1 E C D 融合分子に対する治療反応性の指標であることを示す。いくつかの実施形態において、説明書は、癌細胞の少なくとも一部における第 8 染色体セントロメアに対する F G F R 1 遺伝子の比率が少なくとも 2 であることが、F G F R 1 E C D および / または F G F R 1 E C D 融合分子に対する治療反応性の指標であることを示す。いくつかの実施形態において、説明書は、肺癌細胞の少なくとも一部における第 8 染色体セントロメアに対する F G F R 1 遺伝子の比率が少なくとも 2 . 5 、少なくとも 3 、少なくとも 3 . 5 、または少なくとも 4 であることが、F G F R 1 E C D および / または F G F R 1 E C D 融合分子に対する治療反応性の指標であることを示す。

10

## 【0103】

いくつかの実施形態において、投与量パックは、F G F R 1 E C D および / または F G F R 1 E C D 融合分子を投与する前に、肺癌が、F G F R 1 遺伝子増幅を含むかどうか、ならびに / または F G F R 1 、F G F R 3 I I I c 、F G F 2 、D K K 3 、F G F 1 8 、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、もしくは少なくとも 4 種のマーカーを過剰発現しているかどうかを決定するための説明書を含む。いくつかの実施形態において、F G F R 1 は、F G F R 1 I I I c である。いくつかのそのような実施形態において、説明書は、肺癌細胞の少なくとも一部における F G F R 1 遺伝子増幅の存在、ならびに / または F G F R 1 、F G F R 3 I I I c 、F G F 2 、D K K 3 、F G F 1 8 、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、もしくは少なくとも 4 種のマーカーの過剰発現が、F G F R 1 E C D および / または F G F R 1 E C D 融合分子に対する治療反応性の指標であることを示す。いくつかの実施形態において、説明書は、肺癌細胞の少なくとも一部において F G F R 1 遺伝子が少なくとも 4 コピー存在することが、F G F R 1 E C D および / または F G F R 1 E C D 融合分子に対する治療反応性の指標であることを示す。いくつかの実施形態において、説明書は、肺癌細胞の少なくとも一部において F G F R 1 遺伝子が少なくとも 4 コピー、少なくとも 6 コピー、少なくとも 8 コピー、または少なくとも 10 コピー存在することが、F G F R 1 E C D および / または F G F R 1 E C D 融合分子に対する治療反応性の指標であることを示す。いくつかの実施形態において、説明書は、肺癌細胞の少なくとも一部における第 8 染色体セントロメアに対する F G F R 1 遺伝子の比率が少なくとも 2 であることが、F G F R 1 E C D および / または F G F R 1 E C D 融合分子に対する治療反応性の指標であることを示す。いくつかの実施形態において、説明書は、肺癌細胞の少なくとも一部における第 8 染色体セントロメアに対する F G F R 1 遺伝子の比率が少なくとも 2 . 5 、少なくとも 3 、少なくとも 3 . 5 、または少なくとも 4 であることが、F G F R 1 E C D および / または F G F R 1 E C D 融合分子に対する治療反応性の指標であることを示す。

20

## 【0104】

「説明書」という用語は、本明細書において使用される場合、限定されないが、ラベル、添付文書、コンピュータ可読媒体（例えば、ディスクケット、コンパクトディスク、または D V D ）等の電子形態で利用可能な説明書、インターネット等を経由して遠隔で利用可能な説明書を含む。投薬パックが、説明書へのアクセス、説明書へのリンク（例えば、ユニフォームリソースロケータ、つまり u r l ）、または説明書のコピーを入手するための他の機構（例えば、返信はがき、そこから説明書を要求することができる物理的住所、そこから説明書を要求することができる電子メールアドレス、説明書を入手するためにかけることができる電話番号等）を提供する場合、投薬パックは説明書を含むと見なされる。

30

## 【0105】

F G F R 1 E C D および F G F R 1 E C D 融合分子

非限定的な例示的 F G F R 1 E C D は、完全長 F G F R 1 E C D 、F G F R 1 E

40

50

CD断片、およびFGFR1 ECD変異体を含む。FGFR1 ECDは、シグナルペプチドを含んでもよい、または欠いてもよい。例示的なFGFR1 ECDは、限定されないが、配列番号1、2、3、および4から選択されるアミノ酸配列を有するFGFR1 ECDを含む。

【0106】

非限定的な例示的なFGFR1 ECD断片は、(シグナルペプチドを有しない成熟型の第1のアミノ酸から数えて)アミノ酸339で終端するヒトFGFR1 ECDを含む。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD断片は、(シグナルペプチドを有しない成熟型の第1のアミノ酸から数えて)アミノ酸339とアミノ酸360の間で終端する。例示的なFGFR1 ECD断片は、限定されないが、配列番号3および4から選択されるアミノ酸配列を有するFGFR1 ECDを含む。

10

【0107】

いくつかの実施形態において、FGFR1 ECDは、配列番号1～4から選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECDは、配列番号1～4から選択される配列からなる。FGFR1 ECDが、配列番号1～4から選択される配列「からなる」場合、FGFR1 ECDは、グリコシル化およびシアリル化等の種々の翻訳後修飾を含んでもまたは含まなくてよい。換言すると、FGFR1 ECDが特定のアミノ酸配列からなる場合、近接するアミノ酸配列中にさらなるアミノ酸を含まないが、アミノ酸側鎖、N末端アミノ基、および/またはC末端カルボキシ基に対する修飾を含み得る。

20

【0108】

いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD融合分子は、シグナルペプチドを含む。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD融合分子は、シグナルペプチドを欠く。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD融合分子のFGFR1 ECD部分は、配列番号1～4から選択される配列を含む。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD融合分子のFGFR1 ECD部分は、配列番号1～4から選択される配列からなる。FGFR1 ECD融合分子のFGFR1 ECD部分が、配列番号1～4から選択される配列「からなる」場合、FGFR1 ECD融合分子のFGFR1 ECD部分は、グリコシル化およびシアリル化等の種々の翻訳後修飾を含んでもまたは含まなくてよい。換言すると、FGFR1 ECD融合分子のFGFR1 ECD部分が特定のアミノ酸配列からなる場合、近接するアミノ酸配列中にFGFR1由来のさらなるアミノ酸を含まないが、アミノ酸側鎖、N末端アミノ基、および/またはC末端カルボキシ基に対する修飾を含み得る。さらに、FGFR1 ECDは融合分子に結合しているため、FGFR1 ECDのN末端および/またはC末端にさらなるアミノ酸が存在し得るが、それらのアミノ酸はFGFR1配列に由来するものではなく、例えば、リンカー配列または融合パートナー配列に由来し得る。

30

【0109】

いくつかの実施形態において、FGFR1 ECD融合分子の融合パートナー部分は、Fc、アルブミン、およびポリエチレングリコールから選択される。非限定的な例示的融合パートナーを本明細書で論じる。

40

【0110】

本発明者らは、FGFR1 ECDおよび/またはFGFR1 ECD融合分子と、ドセタキセル、パクリタキセル、ビンクリスチン、カルボプラチニン、シスプラチニン、オキサリプラチニン、ドキソルビシン、5-フルオロウラシル(5-FU)、ロイコボリン、ペメトレキセド、ソラフェニブ、エトポシド、トポテカン、VEGFアンタゴニスト、バゾニブ、抗VEGF抗体、VEGFトラップ、およびベバシズマブから選択される少なくとも1種のさらなる治療剤との投与が、癌細胞の少なくとも一部がFGFR1遺伝子増幅を有し、かつ/またはFGFR1、FGFR3 I I I c、FGF2、DKK3、FGF18、およびETV4から選択される少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、または少なくとも4種のマーカーを過剰発現している癌を治療するのに有用であることを発

50

見した。いくつかの実施形態において、FGFR1は、FGFR1 IIICである。いくつかの実施形態において、FGFR1 ECDおよび/またはFGFR1 ECD融合分子は、ドセタキセルとともに投与される。

#### 【0111】

##### 融合パートナーおよびコンジュゲート

本明細書で論じられるように、FGFR1 ECDは、少なくとも1つの融合パートナーと組み合わされてもよく、その結果としてFGFR1 ECD融合分子を生じる。これらの融合パートナーは、精製を促進し得、FGFR1 ECD融合分子は、インビボ半減期の増加を示し得る。FGFR1 ECDの好適な融合パートナーは、例えば、水溶性ポリマー等のポリマー、免疫グロブリンの定常ドメイン；ヒト血清アルブミン(HSA)の全部または一部；フェチュインA；フェチュインB；ロイシンジッパードメイン；テトラネクチン三量体形成ドメイン；マンノース結合タンパク質(マンノース結合レクチンとしても知られる)、例えば、マンノース結合タンパク質1；および本明細書に記載され、また米国特許第6,686,179号に記載されているFc領域を含む。非限定的な例示的FGFR1 ECD融合分子は、例えば、米国特許第7,678,890号に見出すことができる。

#### 【0112】

FGFR1 ECD融合分子は、ポリアミノ酸または分岐点アミノ酸をFGFR1 ECDに付着させることによって調製することができる。例えば、ポリアミノ酸は、(融合分子によって達成される利点に加えて)FGFR1 ECDの循環半減期を延長する役割を果たす担体タンパク質であってもよい。本発明の治療目的のために、このようなポリアミノ酸は、理想的には、中和抗原反応または他の有害な反応を有しないまたは生じないものであるべきである。そのようなポリアミノ酸は、血清アルブミン(HSA等)、さらなる抗体もしくはその一部、例えば、Fc領域、フェチュインA、フェチュインB、ロイシンジッパー核因子赤血球誘導体-2(NFE2)、神経網膜ロイシンジッパー、テトラネクチン、または他のポリアミノ酸、例えば、リジンから選択されてもよい。本明細書に記載されるように、ポリアミノ酸の付着位置は、N末端もしくはC末端、またはその間の他の場所であってもよく、選択された分子に化学リンカー部分を介して接続されてもよい。

#### 【0113】

##### ポリマー

ポリマー、例えば、水溶性ポリマーは、生理学的環境において典型的に見られるような水性環境において、FGFR1 ECD融合分子の沈殿を減少させるための融合パートナーとして有用であり得る。本発明において用いられるポリマーは、治療用の生成物または組成物の調製に薬学的に許容される。

#### 【0114】

好適な、臨床的に許容される水溶性ポリマーは、限定されないが、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、モノメトキシ-ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレインコポリマー、ポリ(-アミノ酸)(ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、ポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー(PPG)および他のポリアルキレンオキシド、ポリプロピレノキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(POG)(例えば、グリセロール)および他のポリオキシエチル化ポリオール、ポリオキシエチル化ソルビトール、またはポリオキシエチル化グルコース、コラン酸または他の炭水化物ポリマー、Ficoll、またはデキストラン、ならびにこれらの混合物を含む。

#### 【0115】

本明細書において使用される場合、ポリエチレングリコール(PEG)は、他のタンパク質を誘導体化するために使用されてきた形態のいずれか、例えば、モノ-(C<sub>1</sub>-C<sub>1</sub>

10

20

30

40

50

。) アルコキシ - アリールオキシ - ポリエチレングリコール等を包含することが意図される。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中におけるその安定性のために、製造における利点を有し得る。

#### 【0116】

本明細書で用いられるポリマー、例えば、水溶性ポリマーは、いずれの分子量であってもよく、分岐もしくは非分岐であってもよい。いくつかの実施形態において、ポリマーは、約2kDa～約100kDaの平均分子量を有する(「約」という用語は、ポリマーの調製中に、ある分子は所定の分子量よりも多く計量され、ある分子は少なく計量されることを示す)。各ポリマーの平均分子量は、約5kDa～約50kDa、または約12kDa～約25kDaであってもよい。一般に、分子量が高いほど、または分岐が多いほど、ポリマー：タンパク質の比率が大きい。所望の治療プロファイル、例えば、持続放出の期間、もしある場合には、生物活性に及ぼす影響、取り扱い易さ、抗原性の程度または欠如、およびポリマーがFGFR1 ECDに与える他の既知の影響に依存して、他のサイズが用いられてもよい。

10

#### 【0117】

本発明において用いられるポリマーは、典型的には、ポリペプチドの機能的ドメインまたは抗原ドメインに与える影響を考慮してFGFR1 ECDに付着される。一般に、化学的誘導体化は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるために用いられる任意の好適な条件下で行われ得る。ポリマーを活性成分に結合させるために使用できる活性化基は、スルホン、マレイミド、スルフヒドリル、チオール、トリフレート、トレシレート、アジリジン、オキシラン、および5-ピリジルを含む。

20

#### 【0118】

本発明のポリマーは、典型的には、アミノ酸のアルファ( )もしくはイプシロン( )アミノ基または反応性チオール基で異種ポリペプチドに付着されるが、好適な反応条件下でポリマー基に付着するのに充分に反応性であるタンパク質のいずれかの反応基にポリマー基が付着され得ることも企図される。したがって、ポリマーは、遊離アミノ基またはカルボキシル基等の反応基を介してFGFR1 ECDに共有結合されてもよい。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基は、リジン残基およびN末端アミノ酸残基を含んでもよい。遊離カルボキシル基を有する残基は、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、およびC末端アミノ酸残基を含んでもよい。反応性チオール基を有する残基は、システイン残基を含む。

30

#### 【0119】

ポリマー、例えば、水溶性ポリマーとコンジュゲートされた融合分子を調製するための方法は、通常、(a) ポリペプチドが1つまたは複数のポリマーに付着する条件下でFGFR1 ECDをポリマーと反応させることと、(b) 反応生成物を得ることとを含む。各コンジュゲーションの反応条件は、現在既知である条件または後に開発される条件のいずれから選択されてもよいが、修飾されるべきタンパク質を不活性化させる温度、溶媒、およびpH等の条件は回避するべきである。一般に、反応に最適な反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて臨機応変に決定される。例えば、ポリマー：ポリペプチドコンジュゲートの比率が大きいほど、コンジュゲートされた生成物の割合が大きい。(過剰な未反応ポリペプチドまたはポリマーが存在しない反応の効率という観点において) 最適な比率は、例えば、所望の誘導体化の程度(例えば、モノ-、ジ-、トリ-等)、選択されるポリマーの分子量、ポリマーが分岐または非分岐であるかどうか、および用いられる反応条件等の要因によって決定されてもよい。ポリペプチドに対するポリマー(例えば、PEG)の比率は、通常、1:1～100:1の範囲である。1つまたは複数の精製されたコンジュゲートが、とりわけ、透析、塩析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、および電気泳動を含む標準的な精製技術によって、各混合物から調製されてもよい。

40

#### 【0120】

N末端を化学修飾したFGFR1 ECDが特に所望されてもよい。分子量、分岐等、

50

反応混合物中の F G F R 1 E C D 分子に対するポリマーの割合、行われる反応の種類、および選択された N 末端を化学修飾した F G F R 1 E C D を得る方法によって、ポリマーが選択されてもよい。N 末端を化学修飾した F G F R 1 E C D 調製物を得る方法（必要に応じて、他のモノ誘導体化部分からこの部分を分離する）は、化学修飾したタンパク質分子の集団からの、N 末端を化学修飾した F G F R 1 E C D 材料の精製によるものであってもよい。

#### 【 0 1 2 1 】

選択的な N 末端化学修飾は、特定のタンパク質における誘導体化に利用可能な異なる種類の 1 級アミノ基の異なる反応性（リジン対 N 末端）を利用した還元的アルキル化によって達成することができる。適切な反応条件下で、カルボニル基含有ポリマーを用いて、N 末端のタンパク質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。例えば、タンパク質のリジン残基の - アミノ基と N 末端残基の - アミノ基との間の  $pK_a$  の差を利用することを可能にする pH で反応を行うことによって、タンパク質の N 末端にポリマーを選択的に付着させることができる。このような選択的誘導体化によって、タンパク質へのポリマーの付着が制御される：タンパク質の N 末端でポリマーとのコンジュゲーションが優勢的に起こり、リジン側鎖アミノ基等の他の反応基の著しい修飾が起こらない。還元的アルキル化を用いると、ポリマーは、上述の種類のものであってもよく、タンパク質へのカップリングのために単一の反応性アルデヒド有するべきである。単一の反応性アルデヒドを含むポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドも使用され得る。

#### 【 0 1 2 2 】

一実施形態において、本発明は、化学的に誘導体化した F G F R 1 E C D がモノ - またはポリ - （例えば、2 ~ 4 個の） P E G 部分を含むことを企図する。ペグ化は、利用可能なペグ化反応のいずれかによって実行することができる。ペグ化したタンパク質生成物を調製する方法は、通常、（ a ）タンパク質が 1 つまたは複数の P E G 基に付着する条件下で、ポリペプチドをポリエチレングリコール（ P E G の反応性エステルまたはアルデヒド誘導体等）と反応させることと、（ b ）反応生成物を得ることとを含む。一般に、最適な反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて臨機応変に決定される。

#### 【 0 1 2 3 】

当該技術分野において既知の多くの P E G 付着方法が存在する。例えば、欧州特許第 E P 0 4 0 1 3 8 4 号； M a l i k e t a l . , E x p . H e m a t o l . , 2 0 : 1 0 2 8 - 1 0 3 5 ( 1 9 9 2 ) ; F r a n c i s , F o c u s o n G r o w t h F a c t o r s , 3 ( 2 ) : 4 - 1 0 ( 1 9 9 2 ) ; 欧州特許第 E P 0 1 5 4 3 1 6 号；欧州特許第 E P 0 4 0 1 3 8 4 号；国際公開第 W O 9 2 / 1 6 2 2 1 号；国際公開第 W O 9 5 / 3 4 3 2 6 号；および本明細書に列挙されるペグ化に関連する他の刊行物を参照のこと。

#### 【 0 1 2 4 】

ペグ化は、例えば、反応性ポリエチレングリコール分子とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実行されてもよい。したがって、本発明によるタンパク質生成物は、アシル基またはアルキル基を介して P E G 基を付着させたペグ化タンパク質を含む。このような生成物は、モノペグ化またはポリペグ化されてもよい（例えば、2 ~ 6 もしくは 2 ~ 5 個の P E G 基を含むもの）。 P E G 基は、通常、アミノ酸の - または - アミノ基でタンパク質に付着されるが、好適な反応条件下で P E G 基に付着するのに充分に反応性であるタンパク質に付着したいずれかのアミノ基に P E G 基が付着され得ることも企図される。

#### 【 0 1 2 5 】

アシル化によるペグ化は、通常、ポリエチレングリコール（ P E G ）の活性エステル誘導体を、 F G F R 1 E C D と反応させることを含む。アシル化反応の場合、選択されたポリマーは、典型的には単一の反応性エステル基を有する。いずれの既知のまたは後に発見される反応性 P E G 分子が、ペグ化反応を実行するために使用されてもよい。好適な活性化 P E G エステルの一例は、 N - ヒドロキシスクシンイミド（ N H S ）にエステル化し

10

20

30

40

50

たPEGである。本明細書において使用される場合、アシル化は、限定されないが、治療用タンパク質と、ポリマー、例えば、PEG：アミド、カルバメート、ウレタン等との間に以下の種類の結合を含むことが意図される（例えば、Chamow, Bioconjigate Chem., 5: 133-140 (1994) を参照のこと）。反応条件は、現在既知である条件または後に開発される条件のいずれから選択されてもよいが、修飾されるべきポリペプチドを不活性化させる温度、溶媒、およびpH等の条件は回避するべきである。

【0126】

アシル化によるペグ化は、通常、ポリ-ペグ化タンパク質を生じる。接続する結合部はアミドであってもよい。結果として得られる生成物は、実質的に（例えば、>95%）モノ-、ジ-、またはトリ-ペグ化のみであり得る。しかしながら、ペグ化の程度がより高い特定の種が、用いられる特定の反応条件に応じた量で形成される場合がある。所望の場合、さらに精製されたペグ化種が、とりわけ、透析、塩析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、および電気泳動を含む標準的な精製技術によって、混合物（特に未反応種）から分離されてもよい。

10

【0127】

アルキル化によるペグ化は、通常、還元剤の存在下で、PEGの末端アルデヒド誘導体をポリペプチドと反応させることを含む。還元的アルキル化反応の場合、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有するべきである。例示的な反応性PEGアルデヒドは、水に安定性のポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、またはモノC<sub>1</sub>~C<sub>10</sub>アルコキシもしくはそのアリールオキシ誘導体である（例えば、米国特許第5,252,714号を参照のこと）。

20

【0128】

マーカー

さらに、本発明のFGFR1 ECDは、融合ポリペプチドの精製を促進するペプチド等のマーカー配列に融合されてもよい。マーカーアミノ酸配列は、とりわけ、pQEベクター（Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada）中に提供されるタグ等のヘキサヒスチジンペプチドであってもよく、これらの多くは市販されている。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 821-824 (1989) に記載されるように、例えば、ヘキサヒスチジンは、融合タンパク質の都合のよい精製を提供する。精製に有用な別のペプチドタグである赤血球凝集素（HA）タグは、インフルエンザHAタンパク質由来のエピトープに対応する。（Wilson et al., Cell 37: 767 (1984)）。これらの上記融合体のいずれも、本明細書に記載されるFGFR1 ECDを用いて遺伝子操作することができる。

30

【0129】

オリゴマー化ドメイン融合パートナー

種々の実施形態において、オリゴマー化は、限定されないが、多価性、結合強度の増加、および異なるドメインの組み合わせた機能を含む、いくつかの機能的利点を融合タンパク質に供給する。したがって、いくつかの実施形態において、融合パートナーは、オリゴマー化ドメイン、例えば、二量体化ドメインを含む。例示的なオリゴマー化ドメインは、限定されないが、-ヘリックスコイルドコイルドドメインを含むコイルドコイルドドメイン、コラーゲンドメイン、コラーゲン様ドメイン、および特定の免疫グロブリンドメインを含む。例示的なコイルドコイルポリペプチド融合パートナーは、限定されないが、テトラネクチンコイルドコイルドドメイン、軟骨オリゴマーマトリックスタンパク質のコイルドコイルドドメイン、アンジオポエチンコイルドコイルドドメイン、およびロイシンジッパードドメインを含む。例示的なコラーゲンまたはコラーゲン様オリゴマー化ドメインは、限定されないが、コラーゲン中に見出されるもの、マンノース結合レクチン、肺界面活性剤タンパク質AおよびD、アディポネクチン、フィコリン、コングルチニン、マクロファージスカベンジャー受容体、ならびにエミリン（emilin）を含む。

40

50

## 【0130】

抗体Fc免疫グロブリンドメイン融合パートナー

融合パートナーとして使用されてもよい多くのFcドメインが、当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態において、融合パートナーは、Fc免疫グロブリンドメインである。Fc融合パートナーは、天然に存在する抗体に見出される野生型Fc、その変異体、またはその断片であってもよい。非限定的な例示的Fc融合パートナーは、ヒトIgG、例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4の、ヒンジならびにCH2およびCH3定常ドメインを含むFcを含む。さらなる例示的Fc融合パートナーは、限定されないが、ヒトIgAおよびIgMを含む。いくつかの実施形態において、Fc融合パートナーは、例えば、IgG1中にC237S突然変異を含む(例えば、配列番号8を参照)。いくつかの実施形態において、Fc融合パートナーは、米国特許第6,900,292号に記載されるように、P331S突然変異を有するヒトIgG2のヒンジ、CH2、およびCH3ドメインを含む。特定の例示的なFcドメイン融合パートナーは、配列番号8~10に示される。

10

## 【0131】

アルブミン融合パートナーおよびアルブミン結合分子融合パートナー

いくつかの実施形態において、融合パートナーはアルブミンである。例示的なアルブミンは、限定されないが、それらが融合するポリペプチドの血清半減期またはバイオアベイラビリティを増加させることができるヒト血清アルブミン(HSA)およびHSAの断片を含む。いくつかの実施形態において、融合パートナーは、アルブミン結合分子、例えば、脂質、またはアルブミンに結合する他の分子とコンジュゲートするアルブミンまたは分子に結合するペプチドである。いくつかの実施形態において、HSAを含む融合分子は、例えば、米国特許第6,686,179号に記載されている。

20

## 【0132】

融合パートナーの例示的な付着

融合パートナーは、FGFR1 ECDのN末端またはC末端に共有結合的にまたは非共有結合的に付着させることができる。付着は、例えば、アミノ酸側鎖(例えば、システイン、リジン、セリン、またはスレオニンの側鎖等)を介して、N末端またはC末端以外のFGFR1 ECD内の場所でも起こり得る。

30

## 【0133】

共有結合的な付着または非共有結合的な付着のいずれかの実施形態において、融合パートナーとFGFR1 ECDとの間にリンカーが含まれてもよい。そのようなリンカーは、少なくとも1つのアミノ酸または化学部分から構成されてもよい。融合パートナーをFGFR1 ECDに共有結合的に付着させる例示的な方法は、限定されないが、融合パートナーとFGFR1 ECDを単一のアミノ酸配列として翻訳すること、および融合パートナーをFGFR1 ECDに化学付加することを含む。融合パートナーとFGFR1 ECDが単一のアミノ酸配列として翻訳される場合、さらなるアミノ酸が、融合パートナーとFGFR1 ECDとの間にリンカーとして含まれてもよい。いくつかの実施形態において、融合パートナーおよび/またはFGFR1 ECDの単一発現構築物へのクローニングを促進するために、リンカーは、それをコードするポリヌクレオチド配列に基づいて選択される(例えば、特定の制限酵素部位を含むポリヌクレオチドが、融合パートナーをコードするポリヌクレオチドとFGFR1 ECDをコードするポリヌクレオチドとの間に配置されてもよく、制限酵素部位を含むポリヌクレオチドが、短いアミノ酸リンカー配列をコードする)。融合パートナーとFGFR1 ECDとが、化学的手段によって共有結合的にカップリングされる場合、典型的には、カップリング反応の間に種々のサイズのリンカーが含まれてもよい。

40

## 【0134】

融合パートナーをFGFR1 ECDに非共有結合的に付着させる例示的な方法は、限定されないが、結合対を介した付着を含む。例示的な結合対は、限定されないが、ビオチンおよびアビジンまたはストレプトアビジン、抗体およびその抗原等を含む。

50

## 【0135】

## 共翻訳修飾および翻訳後修飾

本発明は、例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、または抗体分子もしくは他の細胞リガンドへの結合によって、翻訳の間または後に特異的に修飾される F G F R 1 E C D および F G F R 1 E C D 融合分子の投与を包含する。多くの化学的修飾のいずれも、限定されないが、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、V 8 プロテアーゼによる特異的な化学切断；N A B H<sub>4</sub>；アセチル化；ホルミル化；酸化；還元；および/またはチュニカマイシンの存在下における代謝合成を含む既知の技術によって実行することができる。

10

## 【0136】

本発明に包含されるさらなる翻訳後修飾は、例えば、N 結合またはO 結合炭水化物鎖、N 末端またはC 末端終端のプロセシング、アミノ酸骨格への化学部分の付着、N 結合またはO 結合炭水化物鎖の化学修飾、および原核生物宿主細胞の発現の結果としてのN 末端メチオニン残基の付加または欠失を含む。F G F R 1 E C D および F G F R 1 E C D 融合分子の種々の翻訳後修飾の非限定的な考察は、例えば、米国特許第7,678,890号に見出すことができる。

## 【0137】

## F G F R 1 E C D および F G F R 1 E C D 融合分子の発現と産生ベクター

F G F R 1 E C D をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。また、F G F R 1 E C D 融合分子をコードするポリヌクレオチドを含むベクターも提供される。そのようなベクターは、限定されないが、D N A ベクター、ファージベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクター等を含む。

20

## 【0138】

いくつかの実施形態において、C H O またはC H O 由来細胞におけるポリペプチドの発現のために最適化されるベクターが選択される。例示的なこのようなベクターは、例えば、Running Deer et al., Biotechnol. Prog. 20: 880-889 (2004) に記載されている。

## 【0139】

いくつかの実施形態において、ベクターは、ヒトを含む動物における F G F R 1 E C D および/または F G F R 1 E C D 融合分子のインビオ発現のために選択される。いくつかのそのような実施形態において、ポリペプチドの発現は、組織特異的な様式で機能するプロモーターの制御下にある。例えば、肝臓特異的プロモーターは、例えば、PCT国際公開第W O 2 0 0 6 / 0 7 6 2 8 8 号に記載されている。種々の発現ベクターの非限定的な考察は、例えば、米国特許第7,678,890号に見出すことができる。

30

## 【0140】

## 宿主細胞

種々の実施形態において、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子は、原核細胞、例えば、細菌細胞中で、または真核細胞、例えば、真菌細胞、植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞中で発現させることができる。そのような発現は、例えば、当該技術分野において既知の手順に従って実行されてもよい。ポリペプチドを発現させるために使用することができる例示的な真核細胞は、限定されないが、C O S 7 細胞を含むC O S 細胞、2 9 3 - 6 E 細胞を含む2 9 3 細胞、C H O - S および D G 4 4 細胞を含むC H O 細胞、ならびにN S O 細胞を含む。いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子に対して特定の所望の翻訳後修飾を行う能力に基づいて、特定の真核生物宿主細胞が選択される。例えば、いくつかの実施形態において、C H O 細胞は、2 9 3 細胞で產生される同じポリペプチドよりもより高いレベルのシアリル化を有する F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子を產生する。

40

## 【0141】

所望の宿主細胞への核酸の導入は、限定されないが、リン酸カルシウム形質移入、D E

50

A E - デキストラン媒介形質移入、カチオン性脂質媒介形質移入、電気穿孔、形質導入、感染等を含む、当該技術分野において既知の任意の方法によって達成することができる。非限定的な例示的方法は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) に記載されている。核酸は、当該技術分野において既知の方法に従って、所望の宿主細胞中に過渡的にまたは安定に形質移入することができる。宿主細胞および宿主細胞中のポリペプチドの方法に関する非限定的な考察は、例えば、米国特許第7,678,890号に見出すことができる。

## 【0142】

10

いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、当該技術分野において既知の方法に従って、遺伝子操作したかまたはポリペプチドをコードする核酸分子で形質移入した動物においてインビボで產生させることができる。

## 【0143】

## F G F R 1 E C D ポリペプチドの精製

F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子は、当該技術分野において既知の種々の方法によって精製することができる。そのような方法は、限定されないが、親和性マトリックスまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーの使用を含む。好適な親和性リガンドは、F G F R 1 E C D または融合パートナーの任意のリガンドを含む。F G F R 1 に結合する抗体の場合の好適な親和性リガンドは、限定されないが、F G F R 1 自体およびその断片を含む。さらに、プロテインA、プロテインG、プロテインA/G、または抗体親和性カラムを用いて F c 融合パートナーに結合させ、F G F R 1 E C D 融合分子を精製することもできる。また、F G F R 1 E C D に対する抗体を用いて F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子を精製してもよい。疎水性相互作用クロマトグラフィー、例えば、ブチルまたはフェニルカラムも、特定のポリペプチドを精製するのに好適であるかもしれない。ポリペプチドを精製する多くの方法が、当該技術分野において既知である。ポリペプチドを精製する種々の方法の非限定的な考察は、例えば、米国特許第7,678,890号に見出すことができる。

## 【0144】

20

F G F R 1 E C D および / または F G F R 1 E C D 融合分子の恩恵を受ける患者を特定する方法

30

いくつかの実施形態において、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子の投与から恩恵を受け得る癌に罹患している患者を特定する方法が提供される。いくつかのそのような実施形態において、当該方法は、対象から採取された試料中の癌細胞の少なくとも一部が F G F R 1 遺伝子増幅を含むかどうかを決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、F G F R 1 遺伝子増幅は、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子に対する癌の治療反応性の指標である。いくつかの実施形態において、試料は、癌を有するかまたは有することが疑われる患者から採取される。癌細胞の少なくとも一部における F G F R 1 遺伝子増幅の発見は、癌を有するかまたは有することが疑われる患者が、F G F R 1 E C D または F G F R 1 E C D 融合分子療法の恩恵を受け得ることを示唆する。いくつかの実施形態において、患者は、肺癌を有するかまたは有することが疑われる。

40

## 【0145】

いくつかの実施形態において、方法は、癌細胞の少なくとも一部が、対象から採取された試料中に、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 1 8、および E T V 4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、または少なくとも 4 種のマーカーの過剰発現を含むかどうかを決定する工程を含む。いくつかの実施形態において、過剰発現は、mRNA の過剰発現である。いくつかの実施形態において、過剰発現は、タンパク質の過剰発現であるいくつかの実施形態において、F G F R 1、F G F R 3 I I I c、F G F 2、D K K 3、F G F 1 8、および / または E T V 4 の過剰

50

発現は、FGFR1 ECD または FGFR1 ECD 融合分子に対する癌の治療反応性的指標である。いくつかの実施形態において、試料は、癌を有するかまたは有することが疑われる患者から採取される。癌細胞の少なくとも一部における FGFR1、FGFR3 IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、および / または ETv4 の過剰発現の発見は、癌を有するかまたは有することが疑われる患者が、FGFR1 ECD または FGFR1 ECD 融合分子療法の恩恵を受け得ることを示唆する。いくつかの実施形態において、FGFR1 は、FGFR1 IIIc である。いくつかの実施形態において、患者は、肺癌を有するかまたは有することが疑われる。

#### 【0146】

いくつかの実施形態において、FGFR1 遺伝子増幅、ならびに / または FGFR1、FGFR3 IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、および ETv4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、もしくは少なくとも 4 種のマーカーの過剰発現は、研究施設によって決定される。研究施設は、病院の研究室または病院とは独立した研究室であり得る。いくつかの実施形態において、FGFR1 遺伝子増幅、ならびに / または FGFR1、FGFR3 IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、および ETv4 から選択される少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、もしくは少なくとも 4 種のマーカーの過剰発現の決定後、決定の結果が医療従事者に伝えられる。いくつかのそのような実施形態において、患者が FGFR1 ECD または FGFR1 ECD 融合分子療法の恩恵を受けるかどうか、または該療法に反応を示すかどうかを判定する目的のために結果が伝えられる。いくつかの実施形態において、医療従事者は、限定されないが、医師、看護師、病院の運営者およびスタッフ等を含む。いくつかの実施形態において、FGFR1 は、FGFR1 IIIc である。

#### 【0147】

FGFR1 遺伝子増幅を決定する任意の好適な方法が使用され得る。非限定的な例示的なそのような方法は、蛍光インサイツハイブリダイゼーション (FISH；例えば、Monni et al. (2001) PNAS 98 : 5711 - 5716 を参照)、アレイ比較ゲノムハイブリダイゼーション (aCGH)、DNAマイクロアレイ (例えば、Carter et al. (2007) Nat. Genet. 39 : S16 - 21 を参照)、スペクトル核型決定、(SKY；例えば、Liyanage et al. (2007) Nat. Genet. 14 : 312 - 5 を参照)、リアルタイム定量PCR (例えば、Dhaene et al. (2010) Methods 50 : 262 - 270 を参照)、サザンプロット法、ならびに、限定されないが、ハイスループットシーケンシング (HTS；例えば、Medvedev et al. (2010) Genome Res. 20 : 1613 - 22 を参照) および次世代シーケンシング技術、例えば、「全トランスクリプトームショットガンシーケンシング」(「WTSS」)とも称される RNA シーケンス、Applied Biosystems SOLiD™ System、Illumina (Solexa) シーケンシング、イオン半導体シーケンシング、DNA ナノボールシーケンシング、Helioscope (TM) 单一分子シーケンシング、单一分子 SMRT (TM) シーケンシング、单一分子リアルタイム (RNAP) シーケンシング、ナノポア DNA シーケンシング、Visigen Biotechnologies の手法、および 454 ピロシーケンシングを含む配列決定を含む。

#### 【0148】

蛍光インサイツハイブリダイゼーション (FISH) は、染色体上の特定の DNA 配列の有無を検出して位置を特定するための細胞遺伝学的技術である。いくつかの実施形態において、FISH は、蛍光プローブを使用して、配列特異的な様式で染色体上の特定の領域を検出する。したがって、いくつかの実施形態において、FISH を用いて癌における遺伝子増幅を検出するため、いくつかの実施形態において、FGFR1 遺伝子等の対象とする遺伝子に特異的に結合する蛍光プローブが開発される。いくつかのそのような実施形態において、この遺伝子特異的プローブを癌試料とハイブリダイズさせ、蛍光顕微鏡を使用して細胞当たりに存在する蛍光シグナルの数を数えることによりコピー数を決定する

10

20

30

30

40

50

。通常の二倍体細胞の場合、遺伝子の大半はコピー数が2である（遺伝子が常染色体ではなく性染色体のうちの1つに存在する場合、または細胞が分裂中でありゲノムが複製中される場合を除く）。1つの細胞に2つより多いシグナルが検出された場合、特定の場合において、遺伝子が増幅している可能性がある。

【0149】

癌における遺伝子増幅を評価するために、二色FISHも用いることができる。いくつかの実施形態において、対象とする遺伝子が位置する染色体のセントロメア領域に結合する参照プローブを、対照として使用することができる。場合によっては、染色体のセントロメア（CEN）領域はゲノム的に安定であると見なされ、したがって染色体全体を代表するものであると考えられる。したがって、CENのコピー数は、いくつかの実施形態において、染色体の多染色体性（染色体のセントロメアが3コピー以上）に起因する遺伝子コピー数の増加と局所的な遺伝子増幅を区別するのに役立つ。いくつかの実施形態において、対象とする遺伝子プローブからのシグナル／セントロメアプローブからのシグナルの比率を計算することによって、遺伝子増幅を多染色体性と区別することができる。対象とする遺伝子が常染色体に位置する通常の二倍体細胞の場合、この比率は典型的には1である。いくつかの実施形態において、この比率が1より大きいことが遺伝子増幅の指標である。いくつかの実施形態において、セントロメアプローブの代わりに、またはそれに加えて、染色体の参照遺伝子に対するプローブを使用することができる（例えば、Tsetal. (2011) J. Clin. Oncol. 29: 4168-74を参照）。いくつかの実施形態において、選択される参照遺伝子も第8染色体上に存在する。いくつかの実施形態において、参照遺伝子は、第8染色体のセントロメアの近くに位置する。いくつかの実施形態において、参照配列は、第8染色体上に非コードDNAを含む。

10

20

30

40

【0150】

いくつかの実施形態において、FISHは、限定されないが、増幅された遺伝子を含む細胞の画分、細胞の種々の亜集団内の増幅レベル、および細胞内の増幅パターン（例えば、密集シグナル対複数の散乱シグナル）を含む、遺伝子増幅の複数のパラメータの決定を可能にする。いくつかの実施形態において、各癌細胞ごとに、セントロメア参照に対する対照となる遺伝子のコピー数の比率が決定される。いくつかのそのような実施形態において、特定の試料または試料中の細胞のサブセットの平均比率が次いで計算される。一般に、平均比率が2より大きいことが遺伝子増幅を示唆すると見なされるのに対し、1.5～2のシグナルは、低レベルの増幅を示唆し得る。いくつかの実施形態において、参照対照プローブよりも多い対象とする遺伝子のコピー数を有する細胞は、増幅したと見なされる（例えば、Kobayashi et al. (2002) Hum. Pathol. 33: 21-8; and Kunimoto et al. (2002) Pathol. Int. 52: 451-7を参照）。いくつかの実施形態において、染色体参照プローブ対照を用いずに、単色FISHを用いて対象とする遺伝子のコピー数を決定する。いくつかのそのような実施形態において、1つの核当たりの遺伝子が4コピー以上であることは、遺伝子増幅であると見なされる（例えば、Couturier et al. (2000) Mod. Pathol. 13: 1238-43; Jacobs et al. (1999) J. Clin. Oncol. 17: 1974-82; Wang et al. (2000) J. Clin. Pathol. 53: 374-81を参照）。

【0151】

タンパク質の過剰発現（FGFR1、FGFR3IIIc、FGF2、DKK3、FGF18、および/またはETV4の過剰発現）を決定する任意の好適な方法が使用され得る。特定の実施形態において、試料中のタンパク質の発現は、免疫組織化学（「IHC」）および染色プロトコルを使用して調べられる。組織片の免疫組織化学的染色は、試料中のタンパク質の存在を評価または検出する信頼性のある方法であることが示されている。免疫組織化学技術は、通常、発色法または蛍光法によって、細胞抗原をインサイツでプローブおよび可視化するための抗体を用いる。

【0152】

50

組織試料は、従来の方法によって固定する（すなわち保存する）ことができる（例えば、"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," 3<sup>rd</sup> edition (1960) Lee G. Luna, HT (ASC P) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D. C. を参照）。当業者は、固定液の選択が、試料を組織学的に染色する目的または別様に分析する目的によって決定されることを理解するであろう。当業者はまた、固定の長さは、組織試料のサイズおよび使用される固定液に依存することも理解するであろう。例として、試料を固定するために、中性緩衝ホルマリン、Bouin固定液、またはパラホルムアルデヒドが使用され得る。

10

#### 【0153】

通常、試料を最初に固定し、次いで、上昇アルコール系列で脱水し、組織試料が切斷され得るようにパラフィンまたは他の切片化媒体に浸潤させ、包埋する。代替として、組織を切片化し、得られた切片を固定してもよい。例として、従来の方法によって組織試料をパラフィンに包埋して処理してもよい（例えば、"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," supraを参照）。使用され得るパラフィンの例は、限定されないが、Paraplast、Brololoid、およびTissueemayを含む。組織試料を包埋してから、該試料をミクロトーム等により切片化することができる（例えば、,"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," supraを参照）。この手順の例として、切片は、約3ミクロン～約5ミクロンの範囲の厚さを有し得る。切片化してから、いくつかの標準的な方法により切片をスライドに付着させることができる。スライド接着剤の例は、限定されないが、シラン、ゼラチン、ポリ-L-リジン等を含む。例として、パラフィン包埋切片は、正電荷を帯びたスライドおよび/またはポリ-L-リジンで被覆したスライドに付着させることができる。

20

#### 【0154】

パラフィンが包埋材料として使用される場合、組織片は、通常、脱パラフィンして水に再水和させる。組織片は、いくつかの標準的な従来方法によって脱パラフィンすることができる。例えば、キシレンおよび段階的な下降アルコール系列が使用されてもよい（例えば、"Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," supraを参照）。代替として、Hemo-De7 (CMS, Houston, Tex.) 等の市販の脱パラフィン化非有機剤が使用されてもよい。

30

#### 【0155】

いくつかの実施形態において、試料の調製後、IHCを用いて組織片を分析することができる。IHCは、形態学的染色および/または蛍光インサイトハイブリダイゼーション等のさらなる技術と組み合わせて行われてもよい。直接法および間接法の2つの一般的なIHCの方法が利用可能である。第1のアッセイによると、標的抗原に対する抗体の結合が直接決定される。この直接法は、抗体をさらに相互作用させることなく可視化することができる蛍光タグまたは酵素標識一次抗体等の標識化試薬を使用する。典型的な間接法では、コンジュゲートしていない一次抗体が抗原に結合し、次いで、標識された二次抗体が一次抗体に結合する。二次抗体が酵素標識にコンジュゲートする場合、抗原の可視化を提

40

50

供するために発色性基質または蛍光発生基質が加えられる。いくつかの二次抗体が一次抗体上の異なるエピトープと反応し得るため、シグナルの増幅が起こる。

【0156】

免疫組織化学に使用される一次および／または二次抗体は、典型的には、検出可能な部分で標識される。多数の標識が利用可能であり、それらは通常、次のカテゴリーに分類することができる：(a) 放射性同位体、例えば、<sup>35</sup>S、<sup>14</sup>C、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、および<sup>131</sup>I。抗体は、例えば、Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligan et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, N.Y., Pubs. (1991) に記載される技術を用いて放射性同位体で標識することができ、放射活性は、シンチレーション測定を用いて測定することができる。(b) コロイド金粒子。(c) 限定されないが、希土類キレート(ユウロピウムキレート)、Texas Red、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、リサミン、ウンベリフェロン、フィコクリセリン、フィコシアニン、または市販の蛍光団、例えば、SPECTRUM ORANGE 7 および SPECTRUM GREEN 7、ならびに／または上記のうちのいずれか1つまたは複数の誘導体を含む、蛍光標識。蛍光標識は、例えば、上記の Current Protocols in Immunology に開示される技術を用いて抗体にコンジュゲートさせることができる。蛍光は、蛍光光度計を使用して定量化することができる。(d) 種々の酵素基質標識が利用可能であり、米国特許第4,275,149号は、これらのうちのいくつかに関する考察を提供している。酵素は、通常、種々の技術を用いて測定することができる、発色性基質の化学的变化を触媒する。例えば、酵素は、基質における色の変化を触媒することができ、それは、分光測光法で測定することができる。代替として、酵素は、基質の蛍光または化学発光を変化させることができる。蛍光の変化を定量化するための技術は上に記載されている。化学発光基質は、化学反応によって電気的に励起され、次いで、(例えば、ケミルミノメーターを用いて)測定することができる光を放出し得るか、または蛍光受容体にエネルギーを付与する。酵素標識の例は、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ；米国特許第4,737,456号)ルシフェリン、2,3-ジヒドロフラジンジオン、リンゴ酸脱水素酵素、ウレアーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRPO)等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖質酸化酵素(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環式オキシダーゼ(例えば、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼ等を含む。酵素を抗体にコンジュゲートさせる技術は、O'Sullivan et al., Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed. J. Langone & H. Van Nunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981) に記載されている。

【0157】

酵素-基質の組み合わせの例は、例えば、以下を含む：(i) 色素前駆体(例えば、オルソフェニレンジアミン(OPD)または3,3',5,5'-テトラメチルベンジン塩酸(TMB))を酸化する、水素ペルオキシダーゼを基質とする西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRPO)、(ii) パラ-ニトロフェニルリン酸を発色性基質とするアルカリホスファターゼ(AP)、および(iii) 発色性基質(例えば、p-ニトロフェニル-D-ガラクトシダーゼ)または蛍光発生基質(例えば、4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトシダーゼ)を有する-D-ガラクトシダーゼ(-D-Gal)。

【0158】

多数の他の酵素-基質の組み合わせが当業者に利用可能である。これらの概説については、米国特許第4,275,149号および同第4,318,980号を参照のこと。時

10

20

30

40

50

として、標識は、抗体と間接的にコンジュゲートする。当業者は、これを達成するための種々の技術を認識するであろう。例えば、抗体は、ビオチンとコンジュゲートさせることができ、上述した4つの広義のカテゴリーの標識のいずれもアビジンとコンジュゲートさせることができるか、またはその逆の場合も同じである。ビオチンはアビジンに選択的に結合し、したがって、この間接的な様式で標識を抗体とコンジュゲートさせることができる。代替として、抗体と標識との間接的なコンジュゲーションを達成するために、抗体を小さなハプテンとコンジュゲートさせ、上述の異なる種類の標識のうちの1つを抗ハプテン抗体とコンジュゲートさせる。このように、抗体と標識との間接的なコンジュゲーションを達成することができる。

## 【0159】

10

上述の試料調製手順とは別に、IHCの前、間、または後の、さらなる組織片の処理が望ましい場合がある。例えば、クエン酸緩衝液中で組織試料を加熱する等のエピトープ回収方法が実行され得る（例えば、Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4 (3) : 201 (1996) を参照）。

## 【0160】

20

任意選択的なブロッキングステップの後、一次抗体が組織試料中の標的タンパク質抗原に結合するように、十分な時間および好適な条件下で組織片を一次抗体に曝露する。これを達成するための適切な条件は、日常的実験により決定することができる。試料に対する抗体の結合の程度は、上述の検出可能な標識のうちのいずれか1つを用いて決定される。いくつかの実施形態において、標識は、3, 3'-ジアミノベンジン発色体等の発色性基質の化学的变化を触媒する酵素標識（例えば、HRPO）である。一実施形態において、酵素標識は、一次抗体に特異的に結合する抗体にコンジュゲートされる（例えば、一次抗体はウサギポリクローナル抗体であり、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体である）。

## 【0161】

このように調製された検体を、マウントしてカバースリップで覆ってもよい。次いで、例えば顕微鏡を使用してスライドの評価を行い、当該技術分野で日常的に使用される染色強度基準を用いてもよい。

## 【0162】

30

いくつかの実施形態において、IHCが用いられる場合、細胞または細胞の集合がFGFR1タンパク質を過剰発現しているかどうかを判定するために段階的染色システムが使用される。例えば、いくつかの実施形態において、無染色、1+、2+、および3+の4段階システムが使用され、1+、2+、および3+は、それぞれ増加する染色レベルを示唆する。いくつかのそのような実施形態において、FGFR1タンパク質の過剰発現を示唆するために1+超、2+超、または3+超を用いてもよい。非限定的な例として、IHCアッセイにおいて特定の細胞型が典型的にFGFR1に対する染色を示さない場合、そのIHCアッセイにおけるいずれの染色（すなわち、1+、2+、または3+）も、タンパク質の過剰発現を示唆し得る。さらなる非限定的な例として、IHCアッセイにおいて特定の細胞型が典型的にFGFR1に対する染色をほとんどまたは全く示さない場合、そのIHCアッセイにおける1+より高いいずれの染色（すなわち、2+または3+）も、タンパク質の過剰発現を示唆し得る。当業者は、特定のIHCアッセイ（特定の抗体を含む）、細胞型等に応じて、タンパク質の過剰発現を示唆する染色レベルを決定することができる。

40

## 【0163】

mRNAの過剰発現（FGFR1の過剰発現、および/またはFGF2の過剰発現、および/またはDkk3の過剰発現、および/またはFGF18の過剰発現、および/またはETV4の過剰発現等）を決定する任意の好適な方法が使用され得る。細胞中のmRNAを評価するための方法は周知であり、例えば、相補的なDNAプローブ（FGFR1、FGF2、Dkk3、FGF18、またはETV4に特異的な標識リボプローブを使用するインサイツハイブリダイゼーション、ノーザンプロット法、および関連する技術等）を使用するハイブリダイゼーションアッセイ、ならびに種々の核酸增幅アッセイ（FGFR

50

1、*F G F R 1 I I I c*、*F G F R 3 I I I c*、*F G F 2*、*D K K 3*、*F G F 1 8*、または*E T V 4*に特異的な相補的プライマーを使用する*R T - P C R*、および他の増幅型検出法、例えば、分岐*D N A*、*S I S B A*、*T M A*等)を含む。

【0164】

哺乳動物からの組織または細胞試料は、ノーザン、ドットプロット法、または*P C R*分析を用いて、*m R N A*について都合よくアッセイすることができる。例えば、定量*P C R*アッセイ等の*R T - P C R*アッセイが、当該技術分野で周知である。いくつかの実施形態において、*m R N A*の発現レベルは、リアルタイム*q R T - P C R*を用いて定量化されるレベルである。本発明のいくつかの実施形態において、生体試料中の標的*m R N A*を検出するための方法は、少なくとも1つのプライマーを用いて、逆転写により試料から*c D N A*を生成することと、標的ポリヌクレオチドをセンスおよびアンチセンスプライマーとして用いて、そのように生成された*c D N A*を増幅し、その中の標的*c D N A*を増幅することと、増幅された標的*c D N A*の存在を検出することとを含む。さらに、そのような方法は、生体試料中の標的*m R N A*のレベルの決定を可能にする1つまたは複数のステップを含むことができる(例えば、アクチンファミリーのメンバー等の「ハウスキーピング」遺伝子の比較対照*m R N A*配列のレベルを同時に調べることによる)。任意選択的に、増幅された標的*c D N A*の配列を決定することができる。

10

【0165】

本発明の任意選択的な方法は、マイクロアレイ技術によって組織または細胞試料中の標的*m R N A*等の*m R N A*を検査または検出するプロトコルを含む。核酸マイクロアレイを使用して、試験および対照組織試料からの試験および対照*m R N A*試料を逆転写し、標識して*c D N A*プローブを作製する。次いで、固体支持体に固定された核酸のアレイにプローブをハイブリダイズさせる。アレイは、アレイの各メンバーの配列および位置が分かるように構成される。特定のアレイメンバーを有する標識プローブのハイブリダイゼーションは、プローブが由来する試料がその遺伝子を発現することを示唆する。疾患組織の差次の遺伝子発現分析は、貴重な情報を提供することができる。マイクロアレイ技術は、核酸ハイブリダイゼーション技術およびコンピューティング技術を用いて、単一の実験において数千個の遺伝子の*m R N A*発現プロファイルを評価する。(例えば、2001年10月11日に公開された国際公開第WO01/75166を参照;(アレイの製造に関する考察については、例えば、米国特許第5,700,637号、米国特許第5,445,934号および米国特許第5,807,522号、Lockhart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680(1996); Cheung, V. G. et al., Nature Genetics 21(Suppl):15-19(1999)を参照)。DNAマイクロアレイは、ガラスもしくは他の基板上に直接合成されたまたはスポットされた遺伝子断片を含む小型アレイである。通常、数千個の遺伝子が单一のアレイ内に提示される。典型的なマイクロアレイ実験は以下のステップを含む:1)試料から単離されたRNA由来の蛍光標識標的の調製、2)標識標的のマイクロアレイへのハイブリダイゼーション、3)アレイの洗浄、染色、および走査、4)走査画像の分析、ならびに5)遺伝子発現プロファイルの作成。現在、オリゴヌクレオチド(通常、25塩基長~70塩基長)アレイと、*c D N A*から調製される*P C R*産物を含む遺伝子発現アレイの、2つの主な種類のDNAマイクロアレイが用いられている。アレイを形成する際には、オリゴヌクレオチドを事前に作製して表面にスポットするか、または表面上で直接合成する(インサイト)ことができる。いくつかの実施形態において、DNAマイクロアレイは、一塩基多型(SNP)マイクロアレイ、例えば、Affymetrix(登録商標)SNP Array 6.0である。

20

30

40

【0166】

The Affymetrix GeneChip(登録商標)システムは、ガラス表面上のオリゴヌクレオチドの直接合成によって製造されたアレイを含む市販のマイクロアレイシステムである。プローブ/遺伝子アレイ:オリゴヌクレオチド(通常、25塩基長)は、半導体ベースのフォトリソグラフィーおよび固相化学合成技術の組合せによって、

50

ガラスウェハ上に直接合成される。各アレイは、最高で 4 0 0 , 0 0 0 個の異なるオリゴを含み、各オリゴは数百万個のコピーで存在する。オリゴスクレオチドプローブがアレイ上の既知の場所で合成されるため、Affymetrix Microarray Suite ソフトウェアを用いて、ハイブリダイゼーションパターンおよびシグナル強度を遺伝子同一性および相対発現レベルの観点で解釈することができる。各遺伝子は、一連の異なるオリゴスクレオチドプローブによってアレイ上に提示される。各プローブ対は、完全にマッチしたオリゴスクレオチドおよびミスマッチしたオリゴスクレオチドからなる。完全マッチプローブは、特定の遺伝子に正確に相補的な配列を有し、したがって遺伝子の発現の尺度となる。ミスマッチプローブは、中心の塩基位置の単一の塩基置換によって完全マッチプローブとは異なり、標的遺伝子転写物の結合を妨げる。これは、バックグラウンド、および完全マッチオリゴについて測定されるシグナルに寄与する非特異的なハイブリダイゼーションを決定するのに役立つ。Microarray Suite ソフトウェアは、ミスマッチプローブのハイブリダイゼーション強度を完全マッチプローブのそれらから差し引いて、各プローブセットの絶対的または特異的強度値を決定する。プローブは、Genbank および他のスクレオチドリポジトリからの最新情報に基づいて選択される。配列は、遺伝子の 3' 末端の特有の領域を認識すると考えられる。GeneChip Hybridization Oven (「回転式」オープン) は、一度に最高 6 4 個のアレイのハイブリダイゼーションを実行するために使用される。流体工学ステーションは、プローブアレイの洗浄および染色を行う。これは、完全に自動化されており、各モジュールが 1 つのプローブアレイを保持する 4 つのモジュールを含む。各モジュールは、プログラムされた流体工学プロトコルを使用して、Microarray Suite ソフトウェアによって独立して制御される。スキャナは、プローブアレイに結合した標識 c RNA によって放射される蛍光強度を測定する、共焦点レーザー蛍光スキャナである。Microarray Suite ソフトウェアを備えたコンピュータワークステーションは、流体工学ステーションおよびスキャナを制御する。Microarray Suite ソフトウェアは、プログラムされたプローブアレイに関するハイブリダイゼーション、洗浄、染色プロトコルを使用して、最高で 8 つの流体工学ステーションを制御することができる。このソフトウェアはまた、ハイブリダイゼーション強度データを取得し、適切なアルゴリズムを使用してデータを各遺伝子の存在 / 非存在コールに変換する。最後に、このソフトウェアは、比較分析によって実験間の遺伝子発現の変化を検出し、出力をテキストファイルにフォーマット化する：それは、さらなるデータ分析のために他のソフトウェアプログラムとともに用いることができる。

10

20

30

40

#### 【実施例】

#### 【0167】

以下に論じる実施例は、純粹に本発明の例示であることを意図するものであって、決して本明細書を限定するものであると見なされるべきではない。実施例は、以下の実験が、行われた全てのまたは唯一の実験であることを意味することを意図するものではない。上に提供した概要を前提として、種々の他の実施形態が実施され得ることを理解されたい。使用される数値（例えば、量、温度等）に関して正確さを確保するための努力がなされているが、ある程度の実験誤差および偏差を考慮に入れるべきである。別途示されない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏であり、圧力は大気圧またはほぼ大気圧である。

#### 【0168】

実施例 1 : F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c は、組織培養中の F G F R 1 増幅肺癌細胞株の増殖を阻害する

F G F R 1 遺伝子の潜在的な増幅を示す肺癌細胞株のパネルを、CONAN (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/genetics/CGP/conan/search.cgi) および Tumorscape (http://www.broadinstitute.org/tumorscape/pages/portalHome.jsf) を用いて同定した。CONAN および Tumorscap

50

e は、癌の S N P 6 . 0 データセットにわたって所定のまたはユーザ定義の遺伝子座に関する遺伝子コピー数情報を抽出するための公的なデータマイニングツールを意味する。肺癌細胞株 D M S 5 3 、 D M S 1 1 4 、 N C I - H 1 5 8 1 、および N C I - H 5 2 0 が、 F G F R 1 遺伝子の潜在的な増幅 ( > 4 コピー / 細胞 ) を有すると同定され、さらなる分析のために選択された。ヒト小細胞肺癌 ( S C L C ) 細胞株 D M S 5 3 および D M S 1 1 4 は、 A T C C から購入した ( マナサス、ヴァージニア州、それぞれ、カタログ番号 C R L - 2 0 6 2 、カタログ番号 C R L - 2 0 6 6 ) 。 5 % C O 2 を含む加湿霧囲気下、 3 7 ° で、 W a y m o u t h の M B 7 5 2 / 1 培地 + 1 0 % F B S + 2 m M L - グルタミン中で細胞を培養した。ヒト非小細胞肺癌 ( N S C L C ) 細胞株 N C I - H 1 5 8 1 は、 A T C C から購入し ( マナサス、ヴァージニア州、カタログ番号 C R L - 5 8 7 8 ) 、 A C L - 4 培地 ( 無血清 ) で培養した。 N C I - H 1 5 8 1 の基本培地は D M E M : F 1 2 ( 5 0 / 5 0 で混合 ) であり、以下の成分を基本培地に加えた : 0 . 0 2 m g / m l インスリン、 0 . 0 1 m g / m l トランスフェリン、 2 5 n M 亜セレン酸ナトリウム ( 最終濃度 ) 、 5 0 n M ヒドロコルチゾン ( 最終濃度 ) 、 1 n g / m l 上皮増殖因子 ( 最終濃度 ) 、 0 . 0 1 m M エタノールアミン ( 最終濃度 ) 、 0 . 0 1 m M ホスホリルエタノールアミン ( 最終濃度 ) 、 1 0 0 p M トリヨードチロニン ( 最終濃度 ) 、 0 . 5 % ( w / v ) ウシ血清アルブミン ( 最終濃度 ) 、 0 . 5 m M ピルビン酸ナトリウム ( 最終濃度 ) 、および 4 . 5 m M L - グルタミン。 5 % C O 2 を含む加湿霧囲気下、 3 7 ° で細胞を増殖させた。ヒト非小細胞肺癌 ( N S C L C ) 細胞株 N C I - H 5 2 0 は、 A T C C ( マナサス、ヴァージニア州、カタログ番号 H T B - 1 8 2 ) 。 5 % C O 2 を含む加湿霧囲気下、 3 7 ° で、 R P M I - 1 6 4 0 培地 + 1 0 % F B S + 2 m M L - グルタミン中で細胞を培養した。

## 【 0 1 6 9 】

細胞株中の F G F R 1 遺伝子の増幅状態を、 Q u a n t i G e n e ( 登録商標 ) P l e x D N A A s s a y ( P a n o m i c s ) により確認した。 Q u a n t i G e n e P l e x D N A A s s a y は、 x M A P ( 登録商標 ) L u m i n e x ( 登録商標 ) 磁気ビーズを使用するハイブリダイゼーションに基づくアッセイである。 F G F R 1 ( N M \_ 0 2 3 1 1 0 ) 、 A L B ( N M \_ 0 0 0 4 7 7 ) 、および D C K ( N M \_ 0 0 0 7 8 8 ) 遺伝子に特異的な個々のビーズに基づくオリゴヌクレオチドプローブセット ( キャプチャーチャー、キャプチャーエクステンダー、プロッカー、および標識プローブを含む ) を、交差反応を回避するように設計した ( P a n o m i c s / A f f y m e t r i x 、 S a n t a C l a r a , C A ) 。 A L B および D C K を、 F G F R 1 のコピー数を正規化するための参照遺伝子として用いた。細胞試料を溶解して D N A を放出させ、 F G F R 1 標的特異的プローブセットとともに一晩インキュベートした。 2 日目に、前置増幅器 ( P r e A m p ) 、増幅器 ( A m p ) 、およびビオチン標識プローブ ( L P ) の連続的ハイブリダイゼーションによってシグナル増幅ツリーを構築した。フィコエリトリンストレプトアビジン ( S A P E ) 基質を加えることによりシグナルを検出した。 L u m i n e x 2 0 0 フローサイトメーター機器 ( L u m i n e x 、オースチン、テキサス州 ) を使用して、各キャプチャビーズごとに 5 7 5 n m で S A P E 蛍光を検出した。全てのデータを参照遺伝子に対して正規化し、比率 ( F G F R 1 / A L B ) として表した。 4 種の細胞株のデータを表 2 に示す。

## 【 0 1 7 0 】

( 表2 ) 肺癌細胞株における F G F R 1 遺伝子増幅

細胞株 (肺腫瘍サブタイプ)	FGFR1 遺伝子の状態 (コピー数)	FGFR1-ECD.339-Fc による増殖の阻害	
		インビトロ	インビボ(%TGI)*
DMS53 (SCLC)	増幅(5コピー/細胞)	+	+(64%)
DMS114 (SCLC)	増幅(10コピー/細胞)	+	+(64%)
NCI-H1581 (NSCLC)	増幅(6コピー/細胞)	+	+(74%)
NCI-H520 (NSCLC)	増幅(8コピー/細胞)	+	+(47%)

\* T G I = 腫瘍増殖の阻害

【0171】

FGFR1-ECD.339-Fc が組織培養中の肺癌細胞株に与える影響を決定するために、15 μg/ml FGFR1-ECD.339-Fc (配列番号6) または無関係なECD-Fc融合タンパク質(陰性対照として)の存在下または非存在下で、10%、1%、または0.1% FBS を含む培地中  $5 \times 10^3$  細胞/ウェルの密度で、Microtest (商標) 96-ウェル組織培養プレート (Becton Dickinson、フランクリンレイク、ニュージャージー州) に細胞を播種した。37、5% CO<sub>2</sub> で4日間プレートをインキュベートし、次いで、FGFR1-ECD.339-Fc が細胞数および増殖に与える影響を決定するためにアッセイした。

【0172】

細胞数を決定するために、CellTiter-Glo (登録商標) Lumincent Cell Viability Assay (Promega、マディソン、ウイスコンシン州) を用いた。CellTiter-Glo (登録商標) は、代謝的に活性な細胞の指標であるATPの存在の定量化に基づいて、培養中の生細胞の数を決定する均質な方法である。端的に述べると、CellTiter-Glo (登録商標) Reagent を、各ウェルに存在する細胞培養培地の体積 (100 μl) と等しい体積で組織培養プレートの各ウェルに加え、内容物をオービタルシェーカー上で2分間混合して細胞溶解を誘導し、次いで、プレートを室温で10分間インキュベートした。次いで、EnVision<sup>TM</sup> Multilabel Plate Reader (PerkinElmer、ボストン、マサチューセッツ州) で、0.2秒の積分時間で蛍光を測定した。結果を、相対発光量 (RLU) /ウェルとして表した。

【0173】

CellTiter-Glo (登録商標) アッセイの結果から、FGFR1 増幅を伴う4種全ての細胞株において、FGFR1-ECD.339-Fc のインキュベーションにより細胞数が有意 ( $P = > 0.01$ ) に減少したことが実証された (図1A~D は、それぞれ、NCI-H1581、NCI-H520、DMS53、およびDMS114を示す)。P値は、独立t検定を用いて決定した。Mathematical Statistics and Data Analysis, 1988, Wadsworth & Brooks, パシフィックグループ、カリフォルニア州を参照のこと。

【0174】

FGFR1-ECD.339-Fc が細胞増殖に与える影響を決定するために、トリチウム標識チミジン ([<sup>3</sup>H]-TdR) 取り込みアッセイを用いた。FGFR1-ECD.339-Fc または無関係なECD-Fc陰性対照とともに肺癌細胞株をインキュベーションした後、トリチウム標識チミジン ([<sup>3</sup>H]-TdR; PerkinElmer、ボストン、マサチューセッツ州) を1 μCi/ウェルの活性で加えた。16-時間曝露した後、トリチウム標識チミジンの取り込みを評価した。細胞をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (DPBS; Mediatech, Inc.) で洗浄し、トリプシン-EDTA (Mediatech, Inc.) とのインキュベーションにより細胞培養表面から除去した。次いで、FilterMateハーベスター (PerkinElmer) を使用して細胞懸濁液 (200 μl) を組織培養プレートから除去し、UniFilter-96 GF/B (PerkinElmer) プレートを通して濾過した。95%エタノールを用

10

20

30

40

50

いて細胞を溶解し、ウェル当たり  $40 \mu l$  の Microscint 40 (Perkin Elmer) 液体シンチラントを加えた。チミジンの取り込みは、(cpm) Top count NXT (Perkin Elmer) シンチレーションカウンターで 1 分当たりのカウントとして測定した。結果を cpm / ウェルとして表した。

【0175】

トリチウム標識チミジン取り込みアッセイにおいて、FGFR1 - ECD. 339 - Fc は、NCI - H1581、NCI - H520、DMS53、およびDMS114 細胞の増殖を、それぞれ 85、33、52、および 81% 減少させた（それぞれ、図 2A ~ D）。対照 ECD - Fc は、いずれの細胞株においても細胞増殖に影響を与えないことが実証された。追加の胚腫瘍細胞株 NCI - H1703 (NSCLC; FGFR1 遺伝子コピー数：6 コピー / 細胞）についても、上述のように、FGFR1 - ECD. 339 - Fc とのインキュベーション後にトリチウム標識チミジン取り込みアッセイにおいて調べた。FGFR1 - ECD. 339 - Fc は、NCI - H1703 の増殖を 15% 減少させた。

10

【0176】

トリチウム標識チミジン取り込みアッセイの結果から、FGFR1 遺伝子増幅を伴う 4 種全ての細胞株において、FGFR1 - ECD. 339 - Fc のインキュベーションにより細胞増殖が有意に減少したことが実証された（\* は  $P = > 0.05$  を示す）。（図 2）  
. P 値は、独立 t 検定を用いて決定した。Mathematical Statistics and Data Analysis, 1988, Wadsworth & Brooks, パシフィックグローブ, カリフォルニア州を参照のこと。対照 ECD - Fc は、いずれの細胞株においても細胞増殖にほとんどまたは全く影響を与えたなかった。

20

【0177】

FGFR1 - ECD. 339 - Fc の存在下における Cell Titer Glo 相対発光量 (RLU) の減少率を、4 種の FGFR1 遺伝子増幅肺癌細胞株の各々について調べた全ての FBS 濃度にわたって平均化し、FGFR1 遺伝子増幅を伴わない肺癌細胞株のパネルと比較した（図 3）。この実験で調べた FGFR1 遺伝子増幅を伴わない肺癌細胞株は、NCI - H838、NCI - H1793、A549、Calu - 1、NCI - H226、NCI - H441、NCI - H460、NCI - H522、および NCI - H2126 を含んでいた。非増幅細胞株を ATTC (マナサス、ヴァージニア州) から購入し、供給者の指示に従って培養した。Cell Titer Glo によって評価したところ、FGFR1 遺伝子増幅を伴う肺癌細胞株は、FGFR1 - ECD. 339 - Fc を付加した場合、対照 ECD - Fc の付加と比較して平均で 46.25% の細胞数の減少を示した。比較すると、FGFR1 遺伝子増幅を伴わない肺癌細胞株は、Cell Titer Glo によって評価したところ、FGFR1 - ECD. 339 - Fc を付加した場合、対照 ECD - Fc の付加と比較して平均で 9.33% の細胞数の減少を示した。FGFR1 遺伝子増幅肺癌細胞株と非増幅肺癌細胞株との間に見られた、この FGFR1 - ECD. 339 - Fc が細胞数に与えた影響の差は、統計的に有意であった ( $P = 0.0039$ )。

30

【0178】

トリチウム標識チミジンの取り込みによって評価される FGFR1 - ECD. 339 - Fc が細胞増殖に与える影響についても、FGFR1 遺伝子増幅肺癌細胞株と非増幅肺癌細胞株との間で比較した（図 4）。FGFR1 - ECD. 339 - Fc を付加した場合の細胞増殖における平均減少率を、各 FGFR1 遺伝子増幅細胞株について調べた全ての FBS 濃度にわたって決定し、非 FGFR1 遺伝子増幅細胞株のパネルを上に示した。FGFR1 遺伝子増幅を伴う肺癌細胞株は、FGFR1 - ECD. 339 - Fc を付加した場合、対照 ECD - Fc の負荷と比較して平均で 62.75% の CPM の減少を示した。比較すると、FGFR1 遺伝子増幅を伴わない肺癌細胞株は、FGFR1 - ECD. 339 - Fc を付加した場合、対照 ECD - Fc の付加と比較して平均で 17.0% の CPM の減少を示した。この FGFR1 遺伝子増幅肺癌細胞株と非増幅肺癌細胞株との間の差は、統計的に有意であった ( $P = 0.0088$ )。

40

【0179】

50

実施例2：F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の投与は、DMS53小細胞肺癌 (SCLC) 異種移植片モデルにおいて腫瘍増殖を阻害する

6週齢のメスS C I DマウスをCharles River Laboratories (ウィルミントン、マサチューセッツ州) から購入し、試験の開始前に1週間順化させた。ヒト小細胞肺癌 (SCLC) 細胞株D M S 5 3を腫瘍モデルとして使用し、A T C C から購入した (マナサス、ヴァージニア州; カタログ番号C R L - 2 0 6 2)。5%CO<sub>2</sub>を含む加湿霧囲気下、37度で、W a y m o u t hのM B 7 5 2 / 1培地 + 10%F B S + 2 mM L-グルタミン中で細胞を3世代継代培養した。培養細胞が85~90%コンフルエンスに達した時に細胞を採取し、50%マトリゲルを含む、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まない冷リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中に1ミリリットル当たり5×10<sup>7</sup>細胞で再懸濁した。マウスの右側腹部に、5×10<sup>6</sup>細胞 / 100 μl / マウスで細胞を皮下移植した。細胞移植後1日目に、マウスを分別および無作為化し (n = 10)、下の表3に従って処理を開始した。

【0180】

F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F cをP B S中3 mg / mlで配合し、15 mg / kg (300 μg / 100 μl / マウス)を週2回、4週間腹腔内 (i. p.) 投与した。ヒトアルブミンをG r i f f o l s U S A (ロサンゼルス、カリフォルニア州; カタログ番号N D C 6 1 9 5 3 - 0 0 0 2 - 1) から購入し、0.9%塩化ナトリウムで作業溶液 (3 mg / ml) に希釈し、300 μg / 100 μl / マウス (15 mg / kg) で陰性对照として使用し、週2回、4週間投与した。

【0181】

(表3) 投与群

群	動物の数	被験物質および用量 (マウス体重当たりの 被験物質mg)	投与経路および 投与計画
1	10	アルブミン	腹腔内、2X/週
2	10	FGFR1-ECD.339-Fc, 15 mg/kg	腹腔内、2X/週

【0182】

腫瘍細胞接種の日から7、14、21、28、35、および39日目に、各マウスにおいて腫瘍サイズを測定した。ノギスを使用して各腫瘍の長さおよび幅を測定し、以下の式に従って腫瘍サイズを算出した。

$$\text{腫瘍サイズ (mm}^3\text{)} = (\text{幅 (mm}) \times \text{長さ (mm)})^2 / 2$$

皮下腫瘍体積が2000 mm<sup>3</sup>を超えるか、または腫瘍が過剰に壊死性になった時に、「癌による死亡」としてマウスを安楽死させた。

【0183】

図5は、この実験の結果を示す。F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F cを投与されたマウスは、アルブミン処理動物と比較して64%の腫瘍増殖の減少を示した。37日目のF G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c処理群とビヒクル処理群とのD M S 5 3腫瘍体積の比較から、この結果が統計的に有意であることが示唆された (P = 0.003)。P値は、A N O V A分析を用いて算出した。例えば、Mathematical Statistics and Data Analysis, 1988, Wadsworth & Brooks, パシフィックグローブ, カリフォルニア州を参照のこと。この分析により、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F cが、F G F R 1受容体をコードする遺伝子の増幅を有する肺癌細胞株D M S 5 3において腫瘍増殖を有意に減少させたことが実証された。

【0184】

実施例3：F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F cの投与は、D M S 1 1 4小細胞肺癌 (S C L C) 異種移植片モデルにおいて腫瘍増殖を阻害する

10

20

30

40

50

6週齢のメスSCIDマウスをCharles River Laboratories（ウィルミントン、マサチューセッツ州）から購入し、試験の開始前に1週間順化させた。ヒト小細胞肺癌（SCLC）細胞株DMS114を腫瘍モデルとして使用し、ATCCから購入した（マナサス、ヴァージニア州；カタログ番号CRL-2066）。5%CO<sub>2</sub>を含む加湿雰囲気下、37で、WaymouthのMB752/1培地+10%FBS+2mM-L-グルタミン中で細胞を3世代継代培養した。培養細胞が85~90%コンフルエンスに達した時に細胞を採取し、50%マトリゲルを含む、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まない冷リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に1ミリリットル当たり5×10<sup>7</sup>細胞で再懸濁した。マウスの右側腹部に、5×10<sup>6</sup>細胞/100μl/マウスで細胞を皮下移植した。細胞移植後1日目に、マウスを分別および無作為化し（n=10）、上記実施例2に記載されるように処理を開始した。  
10

#### 【0185】

腫瘍細胞接種の日から3、10、16、19、24、27、および31日目に、各マウスにおいて腫瘍サイズを測定した。ノギスを使用して各腫瘍の長さおよび幅を測定し、以下の式に従って腫瘍サイズを算出した。

腫瘍サイズ（mm<sup>3</sup>）=（幅（mm）×長さ（mm））<sup>2</sup>/2  
皮下腫瘍体積が2000mm<sup>3</sup>を超えるか、または腫瘍が過剰に壊死性になった時に、「癌による死亡」としてマウスを安楽死させた。

#### 【0186】

図6は、この実験の結果を示す。FGFR1-ECD.339-Fcを投与されたマウスは、アルブミン処理動物と比較して64%の腫瘍増殖の減少を示した。31日目のFGFR1-ECD.339-Fc処理群とビヒクリ処理群とのDMS114腫瘍体積の比較から、この結果が統計的に有意であることが示唆された（P=0.002）。P値は、ANOVA分析を用いて算出した。例えば、Mathematical Statistics and Data Analysis, 1988, Wadsworth & Brooks, パシフィックグループ, カリフォルニア州を参照のこと。この分析により、FGFR1-ECD.339-Fcが、FGFR1受容体をコードする遺伝子の増幅を有する肺癌細胞株DMS114において腫瘍増殖を有意に減少させたことが実証された。  
20

#### 【0187】

実施例4：FGFR1-ECD.339-Fcの投与は、NCI-H1581非小細胞肺癌（NSCLC）異種移植片モデルにおいて腫瘍増殖を阻害する  
30

6週齢のメスSCIDマウスをCharles River Laboratories（ウィルミントン、マサチューセッツ州）から購入し、試験の開始前に1週間順化させた。ヒト非小細胞肺癌（NSCLC）細胞株NCI-H1581を腫瘍モデルとして使用し、ATCCから購入した（マナサス、ヴァージニア州；カタログ番号CRL-5878）。ACL-4培地（無血清）中で細胞を3世代継代培養した。この細胞株の基本培地はDMEM:F12（50/50で混合）であり、以下の成分を基本培地に加えた：0.02mg/mlインスリン、0.01mg/mlトランスフェリン、25nM亜セレン酸ナトリウム（最終濃度）、50nMヒドロコルチゾン（最終濃度）、1ng/ml上皮増殖因子（最終濃度）、0.01mMエタノールアミン（最終濃度）、0.01mMホスホリルエタノールアミン（最終濃度）、100pMトリヨードチロニン（最終濃度）、0.5%（w/v）ウシ血清アルブミン（最終濃度）、0.5mMピルビン酸ナトリウム（最終濃度）、および4.5mM-L-グルタミン。5%CO<sub>2</sub>を含む加湿雰囲気中、37  
40

で細胞を培養した。培養細胞が85~90%コンフルエンスに達した時に細胞を採取し、50%マトリゲルを含む、Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まない冷リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中に1ミリリットル当たり5×10<sup>7</sup>細胞で再懸濁した。マウスの右側腹部に、5×10<sup>6</sup>細胞/100μl/マウスで細胞を皮下移植した。細胞移植後1日目に、マウスを分別および無作為化し（n=10）、上記実施例2に記載されるように処理を開始した。

#### 【0188】

10

20

30

40

50

腫瘍細胞接種の日から 7、10、14、17、21、25、および 31 日目に、各マウスにおいて腫瘍サイズを測定した。ノギスを使用して各腫瘍の長さおよび幅を測定し、以下の式に従って腫瘍サイズを算出した。

$$\text{腫瘍サイズ (mm}^3\text{)} = (\text{幅 (mm}) \times \text{長さ (mm}}) ^2 / 2$$

皮下腫瘍体積が 2000 mm<sup>3</sup> を超えるか、または腫瘍が過剰に壊死性になった時に、「癌による死亡」としてマウスを安楽死させた。

#### 【0189】

図 7 は、この実験の結果を示す。FGFR1 - ECD. 339 - Fc を投与されたマウスは、アルブミン処理動物と比較して 74 % の腫瘍増殖の減少を示した。31 日目の FGFR1 - ECD. 339 - Fc 処理群とビヒクル処理群との NCI - H1581 腫瘍体積の比較から、この結果が統計的に有意であることが示唆された ( $P < 0.001$ )。P 値は、ANOVA 分析を用いて算出した。例えば、Mathematical Statistics and Data Analysis, 1988, Wadsworth & Brooks, Pacific Grove, CA を参照のこと。この分析により、FGFR1 - ECD. 339 - Fc が、FGFR1 受容体をコードする遺伝子の増幅を有する肺癌細胞株 NCI - H1581 において腫瘍増殖を有意に減少させたことが実証された。

10

#### 【0190】

実施例 5 : FGFR1 - ECD. 339 - Fc の投与は、NCI - H520 非小細胞肺癌 (NSCLC) 異種移植片モデルにおいて腫瘍増殖を阻害する

6 週齢のメス SCID マウスを Charles River Laboratories ( ウィルミントン、マサチューセッツ州 ) から購入し、試験の開始前に 1 週間順化させた。ヒト非小細胞肺癌 (NSCLC) 細胞株 NCI - H520 を腫瘍モデルとして使用し、ATCC から購入した ( マナサス、ヴァージニア州 ; カタログ番号 HTB - 182 )。5 % CO<sub>2</sub> を含む加湿雰囲気下、37 °C で、 RPMI - 1640 培地 + 10 % FBS + 2 mM L - グルタミン中で細胞を 3 世代継代培養した。培養細胞が 85 ~ 90 % コンフルエンスに達した時に細胞を採取し、50 % マトリゲルを含む、Ca<sup>2+</sup> および Mg<sup>2+</sup> を含まない冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に 1 ミリリットル当たり  $5 \times 10^7$  細胞で再懸濁した。マウスの右側腹部に、 $5 \times 10^6$  細胞 / 100 μl / マウスで細胞を皮下移植した。細胞移植後 1 日目に、マウスを分別および無作為化し ( $n = 10$ ) 、後に記載されるように処理を開始した。

20

#### 【0191】

FGFR1 - ECD. 339 - Fc を PBS 中 3 mg / ml で配合し、20 mg / kg (400 μg / 125 μl / マウス) を週 2 回、4 週間腹腔内 (i. p.) 投与した。ヒトアルブミンを Grifols USA ( ロサンゼルス、カリフォルニア州 ; カタログ番号 NDC 61953 - 0002 - 1 ) から購入し、0.9 % 塩化ナトリウムで作業溶液 (3 mg / ml) に希釈し、400 μg / 125 μl / マウス (20 mg / kg) で陰性対照として使用し、週 2 回、6 週間投与した。

30

#### 【0192】

腫瘍細胞接種の日から 11、18、25、32、39、および 46 日目に、各マウスにおいて腫瘍サイズを測定した。ノギスを使用して各腫瘍の長さおよび幅を測定し、以下の式に従って腫瘍サイズを算出した。

40

$$\text{腫瘍サイズ (mm}^3\text{)} = (\text{幅 (mm}) \times \text{長さ (mm}}) ^2 / 2$$

皮下腫瘍体積が 2000 mm<sup>3</sup> を超えるか、または腫瘍が過剰に壊死性になった時に、「癌による死亡」としてマウスを安楽死させた。

#### 【0193】

図 8 は、この実験の結果を示す。FGFR1 - ECD. 339 - Fc を投与されたマウスは、アルブミン処理動物と比較して 47 % の腫瘍増殖の減少を示した。46 日目の FGFR1 - ECD. 339 - Fc 処理群とビヒクル処理群との NCI - H520 腫瘍体積の比較から、この結果が統計的に有意であることが示唆された ( $P < 0.01$ )。P 値は、ANOVA 分析を用いて算出した。例えば、Mathematical Statistics

50

t i c s a n d D a t a A n a l y s i s , 1 9 8 8 , W a d s w o r t h & B r o o k s , パシフィックグループ, カリフォルニア州を参照のこと。この分析により、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c が、F G F R 1 受容体をコードする遺伝子の増幅を有する肺癌細胞株 N C I - H 5 2 0 において腫瘍増殖を有意に減少させたことが実証された。

#### 【 0 1 9 4 】

非小細胞肺癌 ( N S C L C ) 細胞株 N C I - H 1 7 0 3 を使用したもう 1 つの異種移植片モデルにおける F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 処理の有効性を、上述の S C L C および N S C L C 細胞株と同様の様式で調べた。F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c を投与されたマウスは、アルブミン処理動物と比較して 3 1 % の腫瘍増殖の減少を示した。N C I - H 1 7 0 3 細胞株は、F G F R 1 増幅に加えて、薬剤感受性 P D G F R A / P D G F C ゲノム増幅を含んでおり、それが低い有効性が観察される原因であり得ることに留意されたい。

10

#### 【 0 1 9 5 】

実施例 6 : F G F R 1 遺伝子増幅を伴う特定の肺癌異種移植片モデルは、特定の非 F G F R 1 遺伝子増幅肺癌異種移植片モデルよりも、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 媒介性阻害に対する感受性が高い

F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c が腫瘍増殖に与える影響を、F G F R 1 遺伝子増幅肺癌異種移植片モデルと非増幅肺癌異種移植片モデルとの間で比較した。この実験で調べた F G F R 1 増幅を伴わない肺細胞株は次の通りであった : A 5 4 9 、 N C I - H 4 6 0 、 N C I - H 2 2 6 、 N C I - H 2 1 2 6 、 N C I - H 4 4 1 、 N C I - H 3 5 8 、 N C I - H 5 2 2 、および C o l o 6 9 9 。非増幅細胞株を A T T C ( マナサス、ヴァージニア州 ) から購入し、供給者の指示に従って培養した。非 F G F R 1 遺伝子増幅細胞株を使用した肺癌異種移植片モデルを、実質的に実施例 2 に記載されるように実行した。

20

#### 【 0 1 9 6 】

F G F R 1 増幅を伴わない肺癌の患者由来異種移植片 ( P D X ) モデルのパネルも、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c に対する感受性について調べた。P D X 異種移植片は、インビトロ組織培養を行わずに、癌患者からヌードマウスに直接移植した。腫瘍異種移植片は、組織構造および抗癌剤に対する感受性を含む患者の親腫瘍のほとんどを保持する。調べた肺 P D X モデルは次の通りであった : P D X D 3 5 0 8 7 、 P D X D 3 7 6 3 8 、 P D X D 3 5 3 7 6 、 L X F L - 4 3 0 、 L X F E - 9 3 7 、 L X F E - 3 9 7 、 L X F A - 7 3 7 、および L X F A - 6 2 9 。調べた肺 P D X に関する予備的な病理および患者の特徴を表 4 に要約する。

30

#### 【 0 1 9 7 】

( 表4 ) 肺癌患者由来の異種移植片 ( P D X ) モデルの特徴

腫瘍番号	組織の種類	起源	分化	患者の年齢	性別	病期
LXFE_937	扁平上皮	肺	ある程度分化している	37	女性	T3N1M0
LXFE_397	扁平上皮	肺	あまり分化していない	56	男性	T1N0Mx
LXFL_430	大細胞	肺	あまり分化していない	53	男性	T2N1M0
LXFA_629	腺	肺	あまり分化していない	59	男性	T3N2Mx
LXFA_737	腺	肺	ある程度分化している	56	男性	T3N2Mx
PDX D35087	扁平上皮	肺	ある程度分化している	-	-	T3N0M0
PDX D37638	扁平上皮	肺	あまり分化していない	-	-	T3N2M0
PDX D35376	扁平上皮	肺	ある程度分化している	-	-	T2N0M0

## 【0198】

6週齢のメスSCIDマウスをCharles River Laboratories（ウィルミントン、マサチューセッツ州）から購入し、試験の開始前に1週間順化させた。PDX腫瘍断片は、ドナーSCIDマウスの連続継代における異種移植片から得た。ドナーマウスから腫瘍を除去した後、それらを断片（直径1～2mm、約25mg/s）に切断し、皮下移植まで RPMI 1640 培養培地に置いた。イソフルランの吸入によりレシピエントマウスを麻酔した。鈍鉗子を用いて小さなポケットを形成し、一塊の腫瘍PDXをそのポケットに入れた。Dermabond接着剤を使用して創傷を閉鎖し、切開部に一滴のブピバカインを用いた。PDX移植後1日目に、マウスを分別および無作為化し（n=10）、後に記載されるように処理を開始した。

## 【0199】

FGFR1 - ECD.339 - FcをPBS中3mg/mlで配合し、移植したPDX腫瘍の増殖速度に応じて、15mg/kg（300μg/100μlマウス）を週2回、4～8週間腹腔内（i.p.）投与した。ヒトアルブミンをGrifols USA（口サンゼルス、カリフォルニア州；カタログ番号NDC 61953-0002-1）から購入し、0.9%塩化ナトリウムで作業溶液（3mg/ml）に希釈し、300μg/100μl/マウス（15mg/kg）で陰性対照として使用し、移植したPDX腫瘍の増殖速度に応じて週2回、4～8週間投与した。

## 【0200】

腫瘍細胞接種の日から11、18、25、32、39、および46日目に、各マウスにおいて腫瘍サイズを測定した。ノギスを使用して各腫瘍の長さおよび幅を測定し、以下の式に従って腫瘍サイズを算出した。

$$\text{腫瘍サイズ (mm}^3) = (\text{幅 (mm}) \times \text{長さ (mm)})^2 / 2$$

皮下腫瘍体積が2000mm<sup>3</sup>を超えるか、または腫瘍が過剰に壊死性になった時に、「癌による死亡」としてマウスを安楽死させた。

## 【0201】

FGFR1 - ECD.339 - Fcによる腫瘍増殖阻害率は、アルブミン対照と比較し、FGFR1 - ECD.339 - Fcで処理した異種移植片増殖曲線の曲線下面積（AUC）分析によって決定した。図9は、この分析の結果の散布図を示す。FGFR1遺伝子増幅を伴う肺癌異種移植片は、FGFR1 - ECD.339 - Fcで処理した場合、平均で56%の腫瘍増殖の減少を示した。比較すると、FGFR1遺伝子増幅を伴わない肺癌異種移植片は、FGFR1 - ECD.339 - Fcで処理した場合、対象と比較して平均で22%の異種移植片増殖の減少を示した。FGFR1遺伝子増幅肺癌異種移植片モ

ルと非増幅肺癌異種移植片モデルとの間に見られた、FGFR1 - ECD . 339 - Fc媒介性の異種移植片の阻害における差は、統計的に有意であった（P = 0 . 0333）。

#### 【0202】

したがって、FGFR1 遺伝子増幅腫瘍細胞は、非増幅FGFR1 遺伝子を伴う腫瘍細胞よりもFGFR1 - ECD . 339 - Fc の投与に対する感受性が高いことが分かった。

#### 【0203】

実施例7：FGFR1 遺伝子増幅肺癌細胞株および非増幅肺癌細胞株ならびに異種移植片におけるFGFR1 の過剰発現

RNA レベルでのFGFR1 の発現を、FGFR1 遺伝子増幅および非増幅肺癌細胞株、異種移植片モデル、およびPDX モデル間で比較した。この実験で調べたFGFR1 遺伝子増幅を伴わない肺癌細胞株は次の通りであった：A549 、NCI - H460 、NCI - H226 、NCI - H2126 、NCI - H441 、NCI - H358 、NCI - H522 、MSTO - 211H 、およびCo10699 。非増幅細胞株をATTCA (マナサス、ヴァージニア州) から購入し、供給者の指示に従って培養した。FGFR1 遺伝子増幅を伴わない肺癌の患者由来異種移植片 (PDX) モデルのパネルも、FGFR1 mRNA の発現について調べた。調べた肺PDX モデルは次の通りであった：PDX D35087 、PDX D37638 、PDX D35376 、LXFL - 430 、LXF E - 937 、LXF E - 397 、LXF A - 737 、およびLXF A - 629 。調べた肺PDX に関する予備的な病理および患者の特徴は、上の表4 に要約されている。

10

20

30

40

#### 【0204】

RNAeasy (登録商標) Mini Kit (カタログ番号74104 、Qiagen, Germany) を使用して、インビトロで増殖させた細胞株、またはインビトロで増殖させた腫瘍異種移植片からRNA を抽出した。QuantiTect Reverse Transcription Kit (カタログ番号205311 、キアゲン、ドイツ) を使用したランダム6量体プライミングおよび逆転写酵素によりcDNA を作製する前に、抽出したRNA をDNase I で処理した。ヒトFGFR1 RNA の発現は、FGFR1 QuantiTect Primer Assay (Hs\_FGFR1\_1\_SG 、カタログ番号QT00102837 , Qiagen, Germany) 、およびヒトGUSB 対照参照QuantiTect Primer Assay (Hs\_GUSB\_1\_SG 、カタログ番号QT00046046 , Qiagen, Germany) を用いて決定した。QuantiTect SYBR Green PCR Kits (カタログ番号204145 、キアゲン、ドイツ) は、リアルタイムqRT - PCR およびABI Prism 7 Real - Time PCR System (Applied Biosystems、フォスター・シティ、カリフォルニア) を用いてmRNA 発現レベルを定量化するために使用した。遺伝子発現の相対定量は、基準物質としてのヒトGUSB および市販のRNA 対照 (Stratagene, ラホヤ、カリフォルニア) を使用して、比較Ct 法に従って算出した。相対定量は、次の式に従って決定した：2<sup>- (Ct sample - Ct calibrator)</sup> 。

50

#### 【0205】

GUSB に対して正規化したFGFR1 RNA の発現を、FGFR1 遺伝子増幅を伴うおよび伴わない肺癌細胞株 (図10) と異種移植片モデル (図12) との間で比較した。

#### 【0206】

図10は、FGFR1 遺伝子増幅を伴うおよび伴わない細胞株におけるFGFR1 RNA の発現の散布図を示す。FGFR1 遺伝子増幅を伴う肺癌細胞株は、FGFR1 遺伝子増幅を伴わない細胞株と比較して、FGFR1 mRNA の発現に統計的に有意な増加 (P = 0 . 0114) を示す。図10はまた、肺癌細胞株の亜集団が、FGFR1 遺伝子増幅の非存在下で高いFGFR1 mRNA の発現を有することも示している。GUSB に対して正規化した1 . 48 のFGFR1 の遺伝子発現を有するNCI - H226 、

50

およびG U S B に対して正規化した1 . 2 6のF G F R 1の遺伝子発現を有するN C I - H 5 2 2は、非増幅肺癌細胞株集団における最も高い2つの外れ値の点を表す。

【0 2 0 7】

N C I - H 2 2 6 およびN C I - H 5 2 2 はまた、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c に対してインビトロ感受性を示し、それぞれ、トリチウム標識チミジン([<sup>3</sup>H]-T d R)取り込みアッセイおよびCell Titer - Glo(登録商標)Luminescent Cell Viability Assay(Promega、マディソン、ウィスコンシン州)を用いると細胞増殖および細胞数の減少を示した。図11Aは、N C I - H 2 2 6 細胞株のCell Titer - Glo(登録商標)アッセイの結果を示しており、F G F R 1 増幅を有しないN C I - H 2 2 6 細胞株におけるF G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c のインキュベーションにより細胞数が有意に減少したことを示している(\*はP = > 0 . 0 5を示す)。P値は、独立t検定を用いて決定した。例えば、Mathematical Statistics and Data Analysis, 1988, Wadsworth & Brooks, パシフィックグループ、カリフォルニアを参照のこと。

10

【0 2 0 8】

図11Bは、N C I - H 2 2 6 細胞株のトリチウム標識チミジン取り込みアッセイの結果を示しており、F G F R 1 遺伝子増幅を有しないN C I - H 2 2 6 細胞株におけるF G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c のインキュベーションにより細胞数が有意に減少したことを示している(\*はP = > 0 . 0 5を示す)。P値は、独立t検定を用いて決定した。対照E C D F cは、N C I - H 2 2 6 の細胞増殖にほとんどまたは全く影響を与えたかった。

20

【0 2 0 9】

したがって、F G F R 1 遺伝子増幅は有しないがF G F R 1 の過剰発現を有する特定の肺癌細胞株は、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 処理に対して感受性を示す。

【0 2 1 0】

図12は、F G F R 1 遺伝子増幅肺癌異種移植片を非増幅肺癌異種移植片と比較した、F G F R 1 m R N A の発現の散布図を示す。F G F R 1 遺伝子増幅を伴う異種移植片モデルは、非増幅細胞株と比較して、F G F R 1 R N A レベルに統計的に有意な増加(P = 0 . 0 1 4 6)を示した。さらに、インビトロのデータと一致して、肺癌異種移植片モデルの亜集団は、F G F R 1 遺伝子増幅の非存在下で高いF G F R 1 R N A の発現を有する。異種移植片モデルN C I - H 2 2 6 、N C I - H 5 2 2 、およびP D X D 3 5 0 8 7 は、非増幅肺モデルにおけるF G F R 1 R N A 発現の3つの外れ値の点を表し(図12)、G U S B に対して正規化した遺伝子発現レベルは、それぞれ、3 . 7 0 、3 . 7 5 、および4 . 3 0 であった。

30

【0 2 1 1】

N C I - H 2 2 6 、N C I - H 5 2 2 、およびP D X D 3 5 0 8 7 はまた、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c に対してインビトロ感受性を示し、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c で処理すると、腫瘍増殖においてそれぞれ、5 5 、4 2 、および5 7 %の統計的に有意な減少を示した(P < 0 . 0 5)。P D X D 3 5 0 8 7 の場合、実質的に実施例6に記載されるように実験を行った。

40

【0 2 1 2】

P D X D 3 5 0 8 7 移植の日から2 6 、3 5 、4 1 、および4 5 日目に、各マウスにおいて腫瘍サイズを測定した。ノギスを使用して各腫瘍の長さおよび幅を測定し、以下の式に従って腫瘍サイズを算出した。

$$\text{腫瘍サイズ} (\text{mm}^3) = (\text{幅} (\text{mm}) \times \text{長さ} (\text{mm}))^2 / 2$$

【0 2 1 3】

図13は、この実験の結果を示す。F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c を投与されたマウスは、アルブミン処理動物と比較して腫瘍増殖の阻害を示した。4 5 日目のF G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 処理群とビヒクリ処理群とのP D X D 3 5 0 8 7 腫瘍体積の比較

50

から、この結果が統計的に有意であることが示唆された（ $P < 0.01$ ）。 $P$ 値は、ANOVA分析を用いて算出した。例えば、Mathematical Statistics and Data Analysis, 1988, Wadsworth & Brooks, Pacific Grove, CAを参照のこと。この分析により、FGFR1-ECD.339-Fcが、FGFR1遺伝子の増幅は有しないが比較的高いレベルのFGFR1 mRNAを発現するPDX肺腫瘍モデルD35087において腫瘍増殖を有意に減少させたことが実証された。

#### 【0214】

したがって、FGFR1遺伝子増幅は有しないがFGFR1の過剰発現を有する特定の肺癌異種移植片モデルは、FGFR1-ECD.339-Fc処理に対して感受性を示す。

10

#### 【0215】

実施例8：FGFR1-ECD.339-Fcによる反応の予測因子

FGFリガンド、FGF受容体、FGF結合タンパク質、FGFシグナル伝達分子、および一群の血管新生関連標的を含むFGFR1関連遺伝子のパネルのRNA発現を、一組の35個の腫瘍細胞株および異種移植片においてqRT-PCRを用いて決定した。RNAeasy（登録商標）mini kit（キヤゲン、ドイツ）を使用して、インビトロで増殖させた細胞株またはインビボで増殖させた腫瘍異種移植片からRNAを抽出した。QuantiTect Reverse Transcription Kit（キヤゲン、ドイツ）を使用したランダム6量体プライミングおよび逆転写酵素によりcDNAを作製する前に、抽出したRNAをDNase Iで処理した。ヒトおよびマウスRNAの発現は、ヒトGUSB対照参照QuantiTect Primer Assay（キヤゲン、ドイツ）を利用して、QuantiTect Primer Assays（キヤゲン、ドイツ）を用いて決定した。QuantiTect SYBR Green PCR Kit（キヤゲン、ドイツ）は、リアルタイムqRT-PCRおよびABI Prism 7 Real-Time PCR System（Applied Biosystems、フォスター・シティ、カリフォルニア州）を用いてmRNA発現レベルを定量化するために使用した。遺伝子発現の相対定量は、基準物質としてのヒトGUSBおよび市販のRNA対照（Stratagene, ラホヤ, カリフォルニア州）を使用して、比較Ct法に従って算出した。相対定量は、次の式に従って決定した： $2^{-(Ct_{sample} - Ct_{calibrator})}$ 。

20

30

#### 【0216】

この実験で使用した腫瘍細胞株および異種移植片を表5に示す。また、マウス異種移植片モデルにおけるFGFR1-ECD.339-Fcの投与計画、腫瘍増殖阻害率（TGI（%））、および腫瘍増殖阻害の統計的有意性（ $P$ 値）、ならびに細胞株においてFGFR1遺伝子が増幅しているかどうかを表5に示す。

#### 【0217】

（表5）異種移植片モデルのパネルにおけるFGFR1-ECD.339-Fcの抗腫瘍活性

腫瘍の種類	異種移植片モデル	細胞株/PDX	投与経路	用量	投与計画	TGI(%)	P値	FGFR1の增幅状態
結腸	HCT116	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	非増幅
	Colo205	細胞株	IV	5 mg/kg	BIW	38%	P < 0.001	非増幅
	Colo201	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	非増幅
腎臓	G-401	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	36%	P < 0.05	非増幅
	A498	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	7%	ns	非増幅
	Caki-1	細胞株	IV	10 mg/kg	BIW	81%	P < 0.001	非増幅
肺	A549	細胞株	IP	10 mg/kg	BIW	38%	P < 0.05	非増幅
	NCI-H460	細胞株	IP	10 mg/kg	BIW	35%	P < 0.05	非増幅
	NCI-H226	細胞株	IP	15 mg/kg	3x/w	55%	P < 0.001	非増幅
	NCI-H520	細胞株	IP	20 mg/kg	BIW	47%	P < 0.05	増幅
	NCI-H1703	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	31%	P < 0.05	増幅
	NCI-H2126	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	非増幅
	NCI-H441	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	非増幅
	NCI-H358	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	非増幅
	NCI-H522	細胞株	IP	10 mg/kg	BIW	42%	P < 0.05	非増幅
	NCI-H1581	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	74%	P = 0.002	増幅
	DMS53	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	64%	0.003	増幅
	DMS114	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	64%	P < 0.001	増幅
	Calu-1	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	非増幅
	D35087	PDX	IP	15 mg/kg	BIW	57%	P < 0.01	非増幅

10

20

30

D37638	PDX	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	非増幅
D35376	PDX	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	非増幅
LXFA-737	PDX	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns	非増幅
LXFA-629	PDX	IP	15 mg/kg	BIW	65%	$P = 0.007$	非増幅
中皮腫	MSTO-211H	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	$P < 0.0001$	非増幅
神経膠芽腫	U-87	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns
	U-118	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	36%	ns
	U-251	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	$P = 0.0078$	非増幅
網膜芽細胞腫	Y79	細胞株	IP	10 mg/kg	BIW	0%	ns
前立腺	Du145	細胞株	IP	0.15 mg/kg	3x/w	31%	ns
子宮内膜	MFE-280	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	96%	$P < 0.001$
	HEC-1B	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	30%	$P < 0.05$
	MFE-319	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns
胸部	MDA-MB-231	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns
	JIMT1	細胞株	IP	1 mg/kg	BIW	28%	$P < 0.05$

## 【 0 2 1 8 】

例示的な異種移植片実験は次の通りである。C a k i - 1 および M S T O - 2 1 1 H の場合、S C I D マウス（群当たり  $N = 10$  ）の右側腹部に 5 0 0 万個の細胞を皮下移植した。F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c またはアルブミンを表 5 に示される用量で週 2 回腹腔内投与した。図 1 6 は、選択された異種移植片モデルにおける F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の抗腫瘍活性を示す。腎癌 C a k i - 1 ( A ) および中皮腫 M S T O - 2 1 1 H ( B ) の異種移植片癌モデルの代表的な腫瘍増殖曲線を示す。腎細胞癌 ( R C C ) C a k i - 1 モデルにおいて、1 0 m g / k g の F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c を週 2 回、6 週間投与した結果、8 1 % (  $P < 0 . 0 0 1$  ) の腫瘍増殖阻害が生じた ( T G I 、図 1 6 a )。M S T O - 2 1 1 H 中皮腫モデルでは、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の投与により腫瘍増殖が 6 4 % (  $P < 0 . 0 0 0 1$  ) 減少した ( 図 1 6 b )。対応する腫瘍において、曲線下面積 ( A U C ) 分析によって評価したところ、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c は腫瘍体積を有意に減少させた。調べたモデルの 1 9 / 3 5 ( 5 4 % ) に、2 5 ~ 9 6 % の範囲の阻害を伴う反応が観察された ( 表 5 を参照 )。

## 【 0 2 1 9 】

異種移植片モデルを F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c による処理に対して感受性にする潜在的な分子決定因子をさらに理解するために、表 5 中の特定の異種移植片モデルにおいて、F G F リガンド、F G F 受容体、F G F 結合タンパク質、および F G F シグナル伝達分子を含む遺伝子のパネルの R N A 発現を q R T - P C R を用いて調べた。その結果を下の表 7 に示す。

## 【 0 2 2 0 】

次いで、遺伝子発現を F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c による反応と相關させ、抗腫瘍活性と正および負に相關する R N A の発現特性を決定した。表 8 は、その分析の結果を示す。F G F 2 に加えて、F G F 1 8 の R N A 発現 (  $P = 0 . 0 2 2 2 7$  ) も、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の抗腫瘍活性と正に相關 ( 6 . 9 倍 ) していた。F G F の下流標的遺伝子である e t s 変異体 4 ( E T V 4 ) は、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c

10

20

30

40

50

の活性との正の関連（2.897倍）に関する最も有意な遺伝子（P = 0.01639）であった。FGFR1IIIcスプライス変異体（P = 0.01603）を含むFGFR1の発現（P = 0.01276）は、FGFR1-ECDF339-Fcによる反応の正の予測因子であった。FGFR1IIIbスプライス変異体の発現は、その実験ではFGFR1-ECDF339-Fcによる反応と相関していなかった。FGFR1に加えてFGFR3IIIc受容体の発現（P = 0.02488）も、FGFR1-ECDF339-Fcによる反応と正に相関しており、FGFR1およびFGFR3受容体のIIIc-スプライシングアイソフォーム間のFGFRリガンド結合親和性における潜在的な重複を反映している。FGFR1-ECDF339-Fcの活性と負の関連を有する有意な遺伝子は、この分析では見つからなかった。

10

20

30

40

50

## 【0221】

（表8）異種移植片モデルにおけるFGFR1-ECDF339-Fcによる抗腫瘍反応との関連におけるFGFR関連遺伝子発現の統計分析

遺伝子	比率 <sup>§</sup>	P値 <sup>†</sup>	遺伝子	比率 <sup>§</sup>	P値 <sup>†</sup>
ETV4	2.897	0.01639	SPRY3	1.665	0.4944
FGFR1	2.447	0.01669	SPRY1	1.394	0.5008
FGFR3IIIc	9.863	0.01944	DUSP6	0.6418	0.507
FGF18	6.915	0.02227	FGF19	1.203	0.5338
FGF2	247.7	0.03569	FLRT1	1.158	0.5676
FGFR1IIIc	3.647	0.0431	FGF3	1.431	0.5699
DUSP4	0.09578	0.08166	FGFR4	1.347	0.5755
TNC	0.0345	0.1212	FGF9	0.5356	0.6102
VIM	5.155	0.1448	FGFR3	1.767	0.6165
ETV5	1.447	0.1567	SPRY2	0.3142	0.6313
FGFBP3	1.84	0.1592	SERPINE1	0.333	0.6642
PLAU	0.3842	0.1781	FGF21	1.935	0.6744
PLAUR	0.3805	0.2408	FLRT2	0.2276	0.693
FGF7	1.991	0.243	FGFR2b	0.9266	0.7897
FGF5	24.79	0.2691	FGF6	0	0.8316
KDR	0.5892	0.2742	FGFBP1	0.5	0.8372
FGF11	2.153	0.2944	SOX9	1.181	0.8372
MET	0.4225	0.2962	SPRY4	0.9028	0.8372
FGF2	5.48	0.3015	NCAM1	1.661	0.8731
DUSP5	0.4765	0.3238	FGF8	1.052	0.9552
FGF22	1.604	0.3484	ELK4	1.062	0.9815
FGF10	1.91	0.3518	CDH1	0.1158	0.9818
FGFR2	1.402	0.3587	ELK3	1.157	0.9818
FGF1	0.09845	0.398	FGFBP2	0.7737	0.9818
FGFR2IIIc	5.546	0.4195	FGF16	1.076	1
FGF17	1.334	0.4361	FLRT3	0.7523	1
FGFR3IIIb	1.08	0.451			
FGF20	5.967	0.4729			
FGFR1IIIb	0.6493	0.486			

§ F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 応答者 / 非応答者における遺伝子発現の中央値によって決定される遺伝子発現の比率

† P 値は、表 5 の全てのモデルを使用して、各遺伝子の応答者対非応答者において P C R による遺伝子発現のマンホイットニーの検定によって決定される。

【 0 2 2 2 】

F G F R 1 - 遺伝子増幅の非存在下で何の R N A 要因が肺異種移植片の反応を決定し得るかを決定するために、肺モデルの非 F G F R 1 増幅サブセットにおける F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c による反応の相関を調べた ( N = 1 3 ) 。その分析の結果を表 9 に示す。 F G F 2 の発現は、反応性対非反応性の F G F R 1 非増幅肺モデルにおいて、 3 , 0 0 0 倍を超えて上方制御された ( P = 0 . 0 2 9 ) 。 F G F R 1 I I I c および F G F R 3 I I I c の発現も、この実験の非 F G F R 1 増幅肺サブセットにおいて F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c による反応を伴う正の傾向を示した。

【 0 2 2 3 】

( 表 9 ) 非 F G F R 1 増幅肺異種移植片モデルにおける F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c による抗腫瘍反応との関連における F G F 関連遺伝子発現の統計分析

遺伝子	比率 §	P 値 †	遺伝子	比率 §	P 値 †
FGF2	3437	0.02857	FGF8	0.3268	0.5338
SPRY2	0.1395	0.05714	FGF20	0.4803	0.6573
FGFR3IIIc	3.765	0.1375	ELK4	1.019	0.6857
DUSP5	0.3241	0.2	FGFBP2	0.6526	0.6857
FGFR1IIIc	3.688	0.2343	FLRT3	0.2211	0.6857
FGF21	6.868	0.2454	FGF11	2.039	0.7308
FGFR2	8.793	0.2949	FGF5	44.05	0.8294
FGFR1	3.72	0.2949	FGFR2IIIc	2.029	0.8357
FGF19	20.79	0.3094	FGF1	1.45	0.8357
FGFR1IIIb	0.553	0.3429	FGFR3	1.285	0.8357
ELK3	0.5091	0.3429	FGFR4	0.8265	0.8357
SPRY4	0.3532	0.3429	FGF10	0.4615	0.8357
FGFBP1	0.1836	0.3429	FGF17	0.4268	0.8357
DUSP6	0.1254	0.3429	ETV5	0.8563	0.8857
DKK3	46.5	0.366	FLRT2	0.828	0.8857
FGF18	2.455	0.366	FLRT1	0.8212	0.8857
FGF22	1.373	0.3836	PLAUR	0.716	0.8857
FGF2	30.92	0.4452	FGFR3IIIb	0.7137	0.8857
VIM	4.122	0.4452	FGFR2b	0.5752	0.8857
ETV4	1.665	0.4452	FGF16	1.786	0.9452
FGFBP3	4.424	0.4857	SPRY3	1.051	0.9452
SOX9	0.3956	0.4857	FGF9	2.07	1
SERPINE1	0.3155	0.4857	NCAM1	1.391	1
SPRY1	0.1799	0.4857	DUSP4	0.9031	1
			FGF3	0.8571	1
			FGF7	0.738	1

§ F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 応答者における遺伝子発現の中央値 / 非応答者にお

10

20

30

40

50

ける遺伝子発現の中央値によって決定される遺伝子発現の比率

<sup>†</sup> P 値は、表 5 の非 F G F R 1 増幅肺モデルを使用して、各遺伝子の応答者対非応答者において P C R による遺伝子発現のマンホイットニーの検定によって決定される。

【 0 2 2 4 】

全てのモデルにおいて F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c による反応と関連すると同定された重要な遺伝子マーカー間に遺伝子発現における相関が存在するかどうかを調べた。その分析の結果を表 10 に示す。この実験では、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 異種移植片反応の予測因子として同定された大部分の個々の R N A マーカー間に、有意な正の相関が存在した。例えば、異種移植片 F G F 2 の R N A 発現は、F G F R 3 I I I c 、F G F R 1 I I I c 、および F G F R 1 の発現と正に相関しており ( P < 0 . 0 5 ) 、F G F R 1 の R N A 発現は、F G F R 3 I I I c 、F G F 2 、および F G F 1 8 と正に相関している。E T V 4 の発現は、他の F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 反応性遺伝子と関連していなかった。

【 0 2 2 5 】

( 表 10 ) 異種移植片モデルにおける F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の有効性を予測する遺伝子発現マーカーのスピアマンの相関

遺伝子1	遺伝子2	相関	P 値 <sup>§</sup>
FGF18	FGFR1	0.47	0.0083
FGF18	FGFR1IIc	0.57	0.0008
FGF2	FGFR3IIc	0.49	0.0139
FGFR1	FGFR3IIc	0.41	0.0244
FGF2	FGFR1IIc	0.43	0.0336
FGF2	FGFR1	0.39	0.0447

<sup>§</sup> 2 - モンテカルロシミュレーションを用いた両側 p 値

【 0 2 2 6 】

図 14 は、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 応答者および非応答者の異種移植片における ( A ) F G F 2 m R N A ( G U S B に対して正規化 ) および ( B ) F G F 2 タンパク質の発現を示す。F G F 2 の発現 ( P = 0 . 0 3 5 6 9 ) は、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c による反応と正に関連していた。F G F 2 は、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 応答者の異種移植片と非応答者の異種移植片との間で高い比率 ( 2 4 7 . 7 倍 ) の m R N A 遺伝子発現を示した。F G F 2 タンパク質レベルも、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c による反応と相関していることが確認された。

【 0 2 2 7 】

図 17 は、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c 応答者および非応答者の異種移植片における、( A ) F G F R 1 m R N A の発現 ( G U S B に対して正規化 ) および ( B ) F G F R 3 I I I c m R N A の発現 ( G U S B に対して正規化 ) を示す。F G F R 1 ( P = 0 . 0 1 6 6 9 、図 17 a ) 、および F G F R 1 I I I c スプライス変異体 ( P = 0 . 0 4 3 1 、表 8 ) の発現は、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c の抗腫瘍活性と正に相関していた。F G F R 1 に加えて、F G F R 3 I I I c 受容体の発現 ( P = 0 . 0 1 9 4 4 、表 8 ) も、F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c による抗腫瘍反応と正に相関しており ( 図 5 b ) 、F G F R 1 および F G F R 3 受容体の C スプライシングアイソフォーム間の F G F リガンド結合特異性における重複を反映している。( 例えば、Zhang, et al . J . Biol . Chem . 2 8 1 , 1 5 6 9 4 - 1 5 7 0 0 ( 2 0 0 6 ) ; Ornitz, et al . J . Biol . Chem . 2 7 1 , 1 5 2 9 2 - 1 5 2 9 7 ( 1 9 9 6 ) を参照のこと ) 。

【 0 2 2 8 】

実施例 9 : F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c による反応の予測因子

D K K 3 m R N A の発現を、一組の 2 5 個の異種移植片において q R T - P C R を用

10

20

30

40

50

いて決定した。RNAeasy (登録商標) mini kit (キアゲン、ドイツ) を使用して、インビボで増殖させた腫瘍異種移植片からRNAを抽出した。Quantitect Reverse Transcription Kit (キアゲン、ドイツ) を使用したランダム6量体プライミングおよび逆転写酵素によりcDNAを作製する前に、抽出したRNAをDNase Iで処理した。ヒトDKK3 RNAの発現は、ヒトGUS B対照参照Quantitect Primer Assay (キアゲン、ドイツ) を利用して、Quantitect Primer Assays (キアゲン、ドイツ) を用いて決定した。Quantitect SYBR Green PCR Kit (キアゲン、ドイツ) は、リアルタイムqRT-PCRおよびABI Prism Viia<sup>TM</sup> 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems、フォスター・シティ、カリフォルニア州) を用いてmRNA発現レベルを定量化するために使用した。遺伝子発現の相対定量は、基準物質としてのヒトGUS Bおよび市販のRNA対照 (Stratagene, ラホヤ, カリフォルニア州) を使用して、比較Ct法に従って算出した。相対定量は、次の式に従って決定した:  $2^{-(Ct_{sample} - Ct_{calibrator})}$ 。

#### 【0229】

この実験で使用した腫瘍異種移植片を表11に示す。また、マウス異種移植片モデルにおけるFGFR1-ECDF339-Fcの投与計画、腫瘍増殖阻害率(TGI(%))、および腫瘍増殖阻害の統計的有意性(P値)も表11に示す。

#### 【0230】

(表11)マイクロアレイデータを含む異種移植片モデルのパネル

腫瘍の種類	異種移植片 モデル	細胞株 / PDX	投与 経路	用量	投与 計画	TGI (%)	P 値
結腸	HCT116	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns
	Colo205	細胞株	IV	5 mg/kg	BIW	38%	$P < 0.001$
	Colo201	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns
腎臓	A498	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	7%	ns
	Caki-1	細胞株	IV	10 mg/kg	BIW	81%	$P < 0.001$
肺	A549	細胞株	IP	10 mg/kg	BIW	38%	$P < 0.05$
	NCI-H460	細胞株	IP	10 mg/kg	BIW	35%	$P < 0.05$
	NCI-H226	細胞株	IP	15 mg/kg	3x/w	55%	$P < 0.001$
	NCI-H520	細胞株	IP	20 mg/kg	BIW	47%	$P < 0.05$
	NCI-H1703	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	31%	$P < 0.05$
	NCI-H2126	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns
	NCI-H441	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns
	NCI-H358	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns
	NCI-H522	細胞株	IP	10 mg/kg	BIW	42%	$P < 0.05$
	NCI-H1581	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	74%	$P = 0.002$
	Calu-1	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns
中皮腫	MSTO-211H	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	64%	$P < 0.0001$
神経膠芽腫	U-87	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns
	U-118	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	36%	ns
	U-251	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	48%	$P = 0.0078$
網膜芽細胞腫	Y79	細胞株	IP	10 mg/kg	BIW	0%	ns
前立腺	Du145	細胞株	IP	0.15 mg/kg	3x/w	31%	ns
子宮内膜	HEC-1B	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	30%	$P < 0.05$
胸部	MDA-MB-231	細胞株	IP	15 mg/kg	BIW	0%	ns
	JIMT1	細胞株	IP	1 mg/kg	BIW	28%	$P < 0.05$

## 【0231】

次いで、遺伝子発現を  $\text{F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c}$  による反応と相關させ、抗腫瘍活性と正におよび負に相關する RNA の発現特性を決定した。  $\text{D K K 3 m R N A}$  の発現は、 $\text{F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c}$  に感受性を示さない腫瘍においてよりも、 $\text{F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c}$  に対して感受性を示す腫瘍において高かった ( $P = 0.069$ )。

## 【0232】

図 15 は、 $\text{F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c}$  応答者および非応答者の異種移植片における  $\text{D K K 3 m R N A}$  レベル (GUSB に対して正規化) を示す。水平線は、その群の発現レベルの中央値を示す。

## 【0233】

実施例 10 :  $\text{F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c}$  は、ラットにおける高用量投与後に血清リン酸塩を増加させない

$\text{F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c}$  は、 $\text{F G F}$  よりも 10 ~ 100 倍高い親和性で分裂促進性  $\text{F G F - 2 3}$  に結合する。SPR 分析によると、 $\text{F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c}$  のげっ歯類  $\text{F G F - 2 3}$  に対する結合親和性は、ヒト  $\text{F G F - 2 3}$  のそれに匹敵する ( $6.0 \times 10^{-8}$  対  $6.7 \times 10^{-8}$  M)。この比較的弱い  $\text{F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c}$  /  $\text{F G F - 2 3}$  の結合の潜在的な生物学的影響を、 $\text{F G F R 1 - E C D . 3 3 9 - F c}$  を 10 ~ 200 mg / kg / qwk の用量範囲で週 1 回、4 週間投与した後、ラットにおいて調査した。

10

20

30

40

50

## 【0234】

最初の実験では、スプラーグドーリーラット (Charles River Labs、N = 5 / 群) に、ビヒクル、10、50、または 200 mg / kg / qwk の FGFR 1 - ECD . 339 - Fc を週 1 回、4 週間投与し、試験を通して ELISA ベースの検出方法により FGFR 1 - ECD . 339 - Fc の血漿濃度を決定した。

## 【0235】

定量 ELISA を用いて FGFR 1 - ECD . 339 - Fc の血漿中濃度を決定した。端的に述べると、組換えヒト FGFR - 2 (R & D Systems) を、ハーフウェル ELISA マイクロタイプレート上に固定し、プロッキングし、試験試料とともにインキュベートした (プロッキング緩衝液 / 20 μg / mL へパリンで 1 : 10 に希釈)。続いてプレートを洗浄し、希釈ヤギ抗ヒト IgG - Fc HRP 抗体溶液 (Sigma) を加え、インキュベートした。最終洗浄ステップ後、テトラメチルベンジジンペルオキシダーゼ基質溶液を加え、確かに振盪しながら周囲温度でインキュベートした。リン酸溶液で反応を停止した。プレートリーダー上でプレートを読み取った (450 nm)。FGFR 1 - ECD . 339 - Fc 濃度は、光学密度 (OD) を濃度に対してプロットすることにより得られた標準曲線上で決定した。

10

## 【0236】

第 2 の実験では、スプラーグドーリーラット (Charles River Labs、N = 5 / 群) に、FGFR キナーゼ阻害剤 PD173074 (Chemdea、リッジウッド、ニュージャージー州; 50 mg / kg / 日) もしくはビヒクル対照を経口胃管栄養により 7 日間投与するか、または FGFR 1 - ECD . 339 - Fc (200 mg / kg) もしくは適切なビヒクルを静脈内投与により投与した。指示された時点で血液試料を採取し、投薬開始後 24 および 168 時間目に血清リン酸塩を測定した (Idexx Laboratories、ウェストブルック、マサチューセッツ州)。

20

## 【0237】

これらの実験の結果を図 18 に示す。200 mg / kg / qwk の用量では、薬物の最大血漿濃度は、メスおよびオスのラットでそれぞれ 3.6 および 4.2 mg / mL であった (図 18 A)。これらの持続的高レベルの薬物にもかかわらず、ビヒクルを投与された動物と比較して、いずれの用量の FGFR 1 - ECD . 339 - Fc でも血漿リン酸塩に有意な変化は観察されなかった (ビヒクルおよび 200 mg / kg / qwk の FGFR 1 - ECD . 339 - Fc で、それぞれ 9.61 対 10.19 mg / dL)。対照的に、ラットに小分子 FGFR キナーゼ阻害剤 PD173043 を毎日投薬することにより、毎日投薬の 24 時間または 1 週間目のいずれかに、著しい血漿リン酸塩の上昇がもたらされた (図 18 B)。さらに、高用量 FGFR 1 - ECD . 339 - Fc で処理した動物における 55 個の組織の組織学的分析は、FGFR 1 キナーゼ活性の小分子阻害剤の投与後に高リン血症および種々の臓器におけるカルシウム - リンの沈着を観察した Brown et al. (Toxicol. Pathol. 33, 449 - 455 (2005)) によって報告されたものに一致するいずれの変化も明らかにすることはできなかった。

30

## 【0238】

さらに、FGFR 1 - ECD . 339 - Fc により、 固形腫瘍を有する患者において最高 16 mg / kg / qwk の第 1 相用量漸増試験 (N = 39) を完了した。調べた用量レベルのいずれにおいても、FGFR 1 - ECD . 339 - Fc が血清リン酸塩に与える影響は観察されなかった (例えば、Tolcher, et al. Proceedings of the 22nd EORTC - NCI - AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics (2010) を参照のこと)。要約すると、これらの結果は、FGFR 1 - ECD . 339 - Fc が、FGF - 23 に高い親和性で結合せず、FGFR 経路の他の広範な阻害剤について示されるような高リン血症を誘発しないという生物物理学的データを支持するものである。

40

## 【0239】

50

実施例 11：マトリゲルプラグアッセイにおける FGF-2 および VEGF-A によって誘導される血管新生の FGF-R1-ECD.339-Fc 媒介性阻害

組換えヒト FGF-2 (最終濃度 250 ng/ml、Peprotech) および / または組換えヒト VEGF-A (最終濃度 100 ng/ml、Peprotech) を、ヘパリンナトリウム (2ユニット/ml、Sigma) を含むマトリゲル (BD Biosciences、フランクリンレイク、ニュージャージー州) に加えた。マトリゲルプラグ (動物 1匹当たり 1つ) を含む FGF-2 および / または VEGF-A を、C57BL/6マウス (Charles River、ウィルミントン、マサチューセッツ州) の腹部領域に皮下移植した。マトリゲル移植後 1、4、および 7 日目に、尾静脈注射により FGF-R1-ECD.339-Fc を投与した。9 日目に、プラグを切除し、ヘマトキシリンおよびエオシン (H & E) 染色のために処理した。Retiga 2000R デジタルカメラ (Q Imaging、バーナビー、ブリティッシュコロンビア州) を使用して、染色したマトリゲル切片のデジタル画像を作成した。Image-Plus 5.1 (Media Cybernetics Inc.、シルバースプリング、メリーランド州) を使用して画像分析を行った。脈絡膜新生血管を、新たに形成された血管および遊走細胞からなる、マトリゲルにおける細胞応答として定義した。

#### 【0240】

その実験の結果を図 19 に示す。5 mg/kg 以上の FGF-R1-ECD.339-Fc の投与は、FGF-2 を含浸させたマトリゲルプラグによって誘導されたインビボ 血管新生を完全にブロックした。15 または 45 mg/kg の FGF-R1-ECD.339-Fc の投与も、VEGF-A のみまたは FGF-2 および VEGF-A を含浸させたマトリゲルプラグに反応したインビボ血管新生を完全にブロックした。SPR 分析によって、FGF-R1-ECD.339-Fc は VEGF-A と直接相互作用しないことが示されているため、このモデル系において VEGF によって誘導される血管新生に対する抗血管新生活性は、プラグ中の VEGF とマウス由来間質 FGF との間の相乗活性の阻害を反映している可能性がある。

#### 【0241】

FGF-R1-ECD.339-Fc が内皮細胞の VEGF 誘導性増殖をブロックするかどうかを決定するために、HUVEC 細胞 (Life Technologies、グランドアイランド、ニューヨーク州) を  $4 \times 10^3$  細胞 / ウェルの密度で基本培地 (Medium 200 (Life Technologies) 2% の熱失活した FBS と共に) に播種し、10  $\mu$ g/ml FGF-R1-ECD.339-Fc の存在下または非存在下のいずれかで、10 ng/ml FGF2 (R&D Systems、ミネアポリス、ミネソタ州) または 15 ng/ml VEGF-A 165 (R&D Systems、ミネアポリス、ミネソタ州) のいずれかで刺激した。刺激後 3 日目に、CellTiter-Glo (登録商標) Luminescent Cell Viability Assay を用いて HUVEC 細胞の増殖を測定した。

#### 【0242】

その実験の結果を図 20 に示す。FGF-R1-ECD.339-Fc は、HUVEC の VEGF 誘導性増殖をブロックしなかったが、FGF-2 によって誘導される HUVEC の増殖をブロックすることができる。

#### 【0243】

実施例 12：FGF-R1-ECD.339-Fc は、Caki-1 腎細胞癌異種移植片モデルにおいて腫瘍血管新生を阻害する

ヒト腎癌 Caki-1 細胞 ( $1.5 \times 10^7$  細胞 / マウス) 細胞を CB17-SCID マウスの右側腹部に皮下移植した。腫瘍移植後 1 日目に、マウスを無作為化し、ビヒクルまたは FGF-R1-ECD.339-Fc (5 mg/kg) のいずれかで週 2 回皮下処理した。試験終了時 (57 日目) に、腫瘍を切除し (N = 3 / group)、組織学的分析に使用した。凍結切片を抗マウス CD31 モノクローナル抗体 (BD Biosciences、フランクリンレイク、ニュージャージー州) でプローブし、HRP コンジュゲートコン

10

20

30

40

50

ジュゲート二次抗体をジアミノベンジジン染色（褐色）と併せて使用して可視化した。スライドをヘマトキシリソで対比染色し、細胞核を同定した（青色）。代表的な切片を示す（5×倍率）。

#### 【0244】

その実験の結果を図21に示す。FGFR1-ECD.339-Fcによる処理後にCD31染色の低下が観察されることから、この実験において、FGFR1-ECD.339-Fcの投与により腫瘍血管新生が阻害されたことが示唆される。

#### 【0245】

実施例13：JIMT-1乳癌異種移植片モデルにおけるFGFR1シグナル伝達のFGFR1-ECD.339-Fc媒介性阻害

確立された（200mm<sup>3</sup>）ヒト乳癌JIMT-1腫瘍を有する動物に、単回（24および72時間の時点）または週3回（複数回投与）のいずれかで、15mg/kgのFGFR1-ECD.339-Fcを腹腔内投与した。単回投与群の場合は投与後24および72時間目に、複数回投与群では最終投与後48時間目に腫瘍試料を採取し、液体窒素中で瞬間凍結し、RIPA緩衝液（Sigma Aldrich、セントルイス、ミズーリ州）に溶解した。SDS-PAGEにより腫瘍溶解物を分離し、モノクローナル抗体FGFR1、pFGFR1、FRS2、pFRS2、Akt、pAkt、およびAktin（Cell Signaling Technology, Inc.）を使用してウエスタンプロットを行った。抗ヒトFcモノクローナル抗体（Jackson Immuno Research）を使用してFGFR1-ECD.339-Fcを検出した。

10

20

#### 【0246】

その実験の結果を図22に示す。FGFR1-ECD.339-Fcは、投与後24時間までにリン酸化されたFGFR1のレベルを減少させ、投与後72時間目までにはFGFR1のリン酸化が完全に消失した。投与後24時間目には、リン酸化されたFRSおよびAktのレベルが減少し、2日後にはさらに減少した。したがって、FGFR1-ECD.339-Fcは、JIMT-1乳癌異種移植片モデルにおいてFGFR1のシグナル伝達を阻害した。

#### 【0247】

表6には、本明細書で論じられる特定の配列が記載される。別途指定のない限り、FGFR1配列はシグナルペプチドを含まずに示される。

30

#### 【0248】

（表6）配列および説明

配列番号	説明	配列
1	全長ヒト FGFR1 ECD (シグナルペプチドあり); SP-hFGFR1-ECD.353	MWSWKCLLFW AVLVTATLCT ARPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVD ALPSSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EERPAVMTSP LYLE
2	全長ヒト FGFR1 ECD (シグナルペプチドなし); hFGFR1-ECD.353	RPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVD ALPSSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EERPAVMTSP LYLE
3	SP-hFGFR1-ECD.339	MWSWKCLLFW AVLVTATLCT ARPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVD ALPSSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL
4	hFGFR1-ECD.339	RPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVD ALPSSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL
5	SP-hFGFR1-ECD.339-Fc	MWSWKCLLFW AVLVTATLCT ARPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLRDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEVEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVD ALPSSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PYWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNTTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EPKSSDKTH CPCCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDEPEVKF NWYVVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS

10

20

30

40

		DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
6	hFGFR1-ECD.339-Fc	RPSPTLPEQ AQPWGAPVEV ESFLVHPGDL LQLRCRLDD VQSINWLRDG VQLAESNRTR ITGEEEVQD SVPADSGLYA CVTSSPSGSD TTYFSVNVD ALPSSEDDDD DDDSSSEEKE TDNTKPNPVA PWTSPEKME KKLHAVPAAK TVKFKCPSSG TPNPTLRWLK NGKEFKPDHR IGGYKVRYAT WSIIMDSVVP SDKGNYTCIV ENEYGSINHT YQLDVVERSP HRPILQAGLP ANKTVALGSN VEFMCKVYSD PQPHIQWLKH IEVNGSKIGP DNLPYVQILK TAGVNNTDKE MEVLHLRNVS FEDAGEYTCL AGNSIGLSHH SAWLTVLEAL EPKSSDKHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
7	hFGFR1 シグナルペプチド	MWSWKCLLFWAVLVTATLCTA
8	Fc C237S	EPKSSDKHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
9	代表的な Fc #1	ERKCCVECPP CPAPPVAGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPE TCVVVDSHE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST FRVVSVLTVV HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP APIEKTISK KGQPREPVY TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWEESNGOPEN NYKTTPPMLD SDGSFFFLYS LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
10	代表的な Fc #2	ESKYGPPCPS CPAPEFLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDSQ EDPEVQFNWYV DGVEVHNAK TKPREEQFNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKGL PSSIIEKTISK AKGQPREPVY YTLPPSQEEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTPPVVL DSDGSFFFLYS RLTVDKSRWQ EGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK

10

20

30

【 0 2 4 9 】

(表7) 表5の特定の異種移植片モデルの遺伝子発現値

遺伝子	A498	A549	Caki-1	Calu-1	Colo201	Colo205	D35087
AREG	0.007391	0.188156	1.24833	0.141611	1.1487	0.5	5.41702
CA12	6.49802	1.46409	1.00696	0.064257	0.003826	0.011924	NA
CDH1	0.001253	1.79005	0.269807	0.071298	3.94493	11.7942	NA
DKK3	0.128514	0.028557	1.01396	2	0.000157	0	3.50594
DUSP4	0.000171	0.066064	0.007977	0.028956	0.085378	0.171943	NA
DUSP5	0.026645	0.102238	0.68302	0.697372	0.125869	0.07966	NA
DUSP6	0.083043	0.203063	3.27161	1.18921	3.11666	0.570382	NA
EGF	0.004072	0.010525	0.036398	0.065607	0.000162	4.11E-05	NA
EGFR	0.646176	0.353553	0.450625	0.97942	0.558644	0.438303	NA
ELK3	0.04095	0.307786	0.76313	1.44393	0.085378	0.065607	NA
ELK4	0.000015	6.28E-05	0.000265	7.67E-05	0.000513	0.000322	NA
ERBB2	0.096723	0.185565	0.712025	0.271684	0.528509	0.566442	NA
ERBB3	0.456916	0.50698	0.22688	0.001677	1.23114	0.757858	2.53696
EREG	0	0.080772	2.11404	0.673617	1.03526	0.129408	0.03438
ETV4	0.010672	0.697372	0.346277	0.351111	0.297302	0.624165	3.77951
ETV5	0.034674	0.200267	0.784584	0.528509	0.303549	0.389582	NA
FGF1	0.037421	0.00357	0.001186	0.043889	0.04095	0.021051	0.681223
FGF10	0	1.17E-05	3.73E-05	0.000147	2.69E-05	2.19E-05	1.73E-05
FGF11	0.076947	0.003173	0.01937	0.000644	0.003696	0.002182	0.753929
FGF16	0	0.000348	0.000804	0.000649	0.002372	0.00143	0.011209
FGF17	4.72E-05	0.000148	4.14E-05	0.000156	0.001391	0.00093	0.000251
FGF18	0.000735	0.00194	0.004129	0.107321	0.006801	0.015303	0.012216
FGF19	0	0.000207	0	0	0.358489	0.721965	NA
FGF2	0.035158	0.166086	0.524858	0.000581	0	0	NA
FGF20	0.000159	0.000246	0.018841	0.005799	0.000115	0	NA
FGF21	4.29E-05	3.58E-05	0	2.55E-05	0.000918	0.000561	NA
FGF22	0.003002	0.004581	0.002879	0.004581	0.003285	0.002244	NA
FGF3	1.09E-05	0	0	0	0.021945	0.036147	NA
FGF4	0	0	0	0	0	0	NA
FGF5	0.020054	1.01E-05	0.033262	0.248273	0	2.83E-05	0.005164
FGF6	0	0	0	0	0	0	NA
FGF7	4.23E-05	0	9.3E-06	0.000143	0	3.01E-05	0
FGF8	0.000116	3.12E-05	0.000338	3.63E-05	0.00296	0.000918	0.000517
FGF9	0.000672	0.000735	0.001994	0.003545	0.037682	0.035649	NA
FGFBP1	0.001245	0.111878	2.01391	0.002405	0.006434	0.0017	NA
FGFBP2	7.46E-05	0.001253	0.005839	0.002137	0.00148	0.000355	NA

10

20

30

40

遺伝子	A498	A549	Caki-1	Calu-1	Colo201	Colo205	D35087
FGFBP3	0.000203	0.001861	0.003217	0.000868	0.001642	0.002438	NA
FGFR1	0.356012	0.535887	1.1487	1.53688	0.664343	0.126745	4.30765
FGFR1IIIb	0.000152	0.000309	0.000288	0.000282	0.000963	0.000456	NA
FGFR1IIIc	0.119908	0.131215	0.193446	0.646176	0.114229	0.009753	0.381142
FGFR2	0.166086	0.001186	0.00072	0.001554	0.092142	0.003401	2.3227
FGFR2IIIb	0.009163	0.000334	8.63E-05	0.000169	0.045753	0.001797	NA
FGFR2IIIc	0.196146	0.000175	0.000133	0.000804	0.000275	8.51E-05	0.00162
FGFR3	0.327598	0.044811	0.456916	0.033493	0.148651	0.038741	4.50554
FGFR3IIIb	0.006661	0.006003	0.006524	0.00014	0.023036	0.010167	NA
FGFR3IIIc	0.039555	0.001576	0.063813	0.005048	0	0	0.001059
FGFR4	0.167241	0.111105	0.558644	0.000399	0.184284	0.107321	0.041146
FLRT1	0.002489	0.02352	0.01209	0.007867	0.040107	0.076415	NA
FLRT2	4.03E-05	0.042986	0.003879	1.12506	0	5.24E-05	NA
FLRT3	0.001586	0.051474	0.042986	0.000052	0.000186	0.001773	NA
HGF	0	0.007977	0.033961	0.000725	0	0	0
IGF1	0.000405	0.002613	0	0.000381	3.25E-05	0	NA
IGF1R	0.02977	0.598739	0.071794	0.469761	1.10957	1.01396	NA
IGF2	0.004129	0.05954	0.060371	0.043285	0.002438	0.000299	NA
KDR	0.000502	8.34E-05	0.000238	0.01418	0.000478	0.000122	0.000281
MET	1.28343	0.503478	7.26015	1.50525	0.790041	0.366021	NA
MMP1	2.51E-05	0.018841	0.007599	0.303549	0.000413	0.000899	NA
MMP2	1.54E-05	0.030186	0.888843	2.39496	0	0	12.3138
NCAM1	0.05366	5.85E-05	0.000485	0.000394	0.000159	2.44E-05	NA
PDGFRa	0.000627	0.00095	0.173139	0.219151	0	0	0.023016
PDGFRb	0.001887	0.000735	0.021793	0.952638	0.002405	0.001114	NA
PLAU	0.013888	0.267943	5.20537	0.456916	0.271684	0.289172	NA
PLAUR	0.228458	0.97942	0.920188	1.94531	0.582367	0.248273	NA
SERPINE1	0.61132	0.230047	1.94531	9.00047	0.077482	0.105843	NA
SOX9	0.602904	1.26576	2.82843	1.72907	1.87905	4.85678	NA
SPRY1	0.013415	0.022718	0.160428	0.198884	0.119908	0.186856	NA
SPRY2	0.028756	0.136787	0.5	0.301452	0.395021	0.50698	NA
SPRY3	0.002668	0.003086	0.014579	0.001491	0.002668	0.003521	0.003134
SPRY4	0.002372	0.001565	0.005336	0.022876	0.009163	0.020905	NA
TGFa	0.456916	0.051833	0.258816	0.009552	0.271684	0.127626	NA
TNC	0.002542	0.007139	0.222211	1.67018	0.50698	0.123279	NA
VIM	27.0958	13.8326	122.786	60.9688	0.336808	0.166086	43.9259

10

20

30

40

遺伝子	D35376	D37638	DMS114	DMS53	Du145	G-401	HCT116
AREG	0.004051	1.51362	0.000292	0.008144	0.166086	0.0019	2.18859
CA12	NA	NA	NA	NA	0.015303	0.02936	0.026278
CDH1	NA	NA	NA	NA	0.933033	0.003262	1.09429
DKK3	0.000737	3.12315	NA	NA	0.010237	0.018073	5.43E-05
DUSP4	NA	NA	NA	NA	0.01468	0.000155	0.052193
DUSP5	NA	NA	NA	NA	0.028956	0.011281	0.316439
DUSP6	NA	NA	NA	NA	0.692555	2.63902	4.08405
EGF	NA	NA	0	0.000918	0.065607	1.09E-05	0.008609
EGFR	NA	NA	NA	NA	0.594604	0.000399	1.42405
ELK3	NA	NA	NA	NA	0.041521	0.156041	0.234881
ELK4	NA	NA	NA	NA	0.000023	6.28E-05	0.000104
ERBB2	NA	NA	NA	NA	0.389582	0.121582	0.217638
ERBB3	0.000903	0.108909	0.001913	0.012691	0.260616	0.031686	0.231647
EREG	0	0.002591	0	9.93E-06	0.034197	0.003853	5.65685
ETV4	0.151082	1.54928	NA	NA	0.014579	1.20581	0.15822
ETV5	NA	NA	NA	NA	0.046071	0.426317	0.371131
FGF1	0.000328	0.050036	NA	NA	0.001631	0.000176	0.034674
FGF10	0.000157	0.00023	NA	NA	3.39E-05	0.5	0.000192
FGF11	0.012728	0.101173	NA	NA	0.008669	0.251739	0.022876
FGF16	0.026669	0.026479	NA	NA	0.000585	0.000311	0.000918
FGF17	0.000632	0.006306	NA	NA	0.006801	0.000681	0.011359
FGF18	0.000445	0.002484	NA	NA	0.00286	0.003826	0.03082
FGF19	NA	NA	NA	NA	0.000128	0.000937	0.035897
FGF2	NA	NA	NA	NA	0.107321	0.008373	0.10083
FGF20	NA	NA	NA	NA	0.00145	0.30566	0.00613
FGF21	NA	NA	NA	NA	0.000193	4.59E-05	0.000231
FGF22	NA	NA	NA	NA	0.008373	0.002668	0.01937
FGF3	NA	NA	NA	NA	0	6.23E-05	0.000331
FGF4	NA	NA	NA	NA	0	0	0
FGF5	5.91E-05	0.000808	NA	NA	0	1.84E-05	0
FGF6	NA	NA	NA	NA	0.000052	0	0.00015
FGF7	0	0	NA	NA	7.11E-05	0.000233	0.000045
FGF8	0.000961	0.001714	NA	NA	0.000301	0.01541	0.006003
FGF9	NA	NA	NA	NA	0.003065	0.001137	0.009227
FGFBP1	NA	NA	NA	NA	0.050067	0	0.248273
FGFBP2	NA	NA	NA	NA	0.001211	0.00029	0.005048

10

20

30

40

遺伝子	D35376	D37638	DMS114	DMS53	Du145	G-401	HCT116
FGFBP3	NA	NA	NA	NA	0.000618	0.060371	0.00588
FGFR1	0.581641	0.709808	0.678302	0.078563	0.220676	1.32869	0.517632
FGFR1IIIb	NA	NA	0	0	0.001665	5.62E-05	0.085378
FGFR1IIIc	0.069464	0.386462	0.027585	0.01698	0.057512	0.473029	0.063373
FGFR2	0.000917	1.05416	0.008974	0.001084	0.033032	1.22264	0.137738
FGFR2IIIb	NA	NA	NA	NA	0.023036	0.049721	0.118257
FGFR2IIIc	0.000498	0.012137	NA	NA	0.00075	0.972655	0.000294
FGFR3	0.009346	0.580312	0.009163	0.002093	0.033262	0.025559	0.329877
FGFR3IIIb	NA	NA	NA	NA	0.005799	0.000844	0.030607
FGFR3IIIc	9.87E-05	0.00035	NA	NA	0.000135	0.003747	6.36E-05
FGFR4	0.000564	0.009061	0.002879	0.000168	0.004395	0.015953	0.042394
FLRT1	NA	NA	NA	NA	0.01698	0.005839	0.034197
FLRT2	NA	NA	NA	NA	0.009889	0.010027	0
FLRT3	NA	NA	NA	NA	0.007867	0.000886	0.002372
HGF	0.044508	0.009057	NA	NA	6.2E-06	2.23457	0
IGF1	NA	NA	NA	NA	0.002036	0.000294	0
IGF1R	NA	NA	NA	NA	0.297302	0.065154	0.088388
IGF2	NA	NA	NA	NA	0.006754	0.104386	0.20166
KDR	0.000377	0.009784	NA	NA	0.00294	0.000142	0.000557
MET	NA	NA	NA	NA	0.119908	0.003747	1.1487
MMP1	NA	NA	NA	NA	0.044502	0.000184	0.002339
MMP2	0.000158	0.138658	NA	NA	0	0.325336	0
NCAM1	NA	NA	NA	NA	0.000061	0.562529	0.003401
PDGFRa	0.005323	0.038353	NA	NA	0.000208	0.001748	0
PDGFRb	NA	NA	NA	NA	0.001381	0.007443	0.00294
PLAU	NA	NA	NA	NA	0.289172	0.00324	0.297302
PLAUR	NA	NA	NA	NA	0.194791	0.035403	0.429283
SERPINE1	NA	NA	NA	NA	0.03983	0.001153	0.45376
SOX9	NA	NA	NA	NA	0.063813	0.012174	1.94531
SPRY1	NA	NA	NA	NA	0.004876	0.088388	0.030396
SPRY2	NA	NA	NA	NA	0.027017	0.721965	0.055553
SPRY3	0.00269	0.006099	7.89E-05	0.000644	0.007599	0.007922	0.020054
SPRY4	NA	NA	NA	NA	0.000162	0.00162	0.003773
TGFa	NA	NA	NA	NA	0.05954	0.000428	0.121582
TNC	NA	NA	NA	NA	0.014579	0.000162	0.000118
VIM	16.4293	3.26549	NA	NA	2.15846	38.5858	0.051119

10

20

30

遺伝子	HEC-1B	JIMT1	LXFA-629	LXFA-737	MDA-MB-231	MFE-280	MFE-319
AREG	0.000804	0.0625	0.794269	0.941087	1.37554	0.001511	0.001271
CA12	2.8481	0.010672	NA	NA	0.119908	0.02683	0.035403
CDH1	0.033493	3.20428	NA	NA	0.000139	0.602904	0.895025
DKK3	0.646176	0.118257	0.039949	0.067093	0.000516	0.188156	0.000761
DUSP4	0.000446	0.023683	NA	NA	0.070805	0.001511	6.87E-05
DUSP5	0.203063	0.050067	NA	NA	0.432269	0.039282	0.02936
DUSP6	2.36199	0.183011	NA	NA	3.68075	1.3566	0.084202
EGF	0.00588	0.023196	NA	NA	0.011125	0.001061	0.00362
EGFR	0.432269	3.03143	NA	NA	1.86607	0.092783	0.307786
ELK3	0.628507	0.154963	NA	NA	0.539614	0.03983	0.037163
ELK4	0.000032	0.00143	NA	NA	8.28E-05	0	8.3E-06
ERBB2	0.535887	5.06303	NA	NA	0.11744	1.31039	0.48971
ERBB3	0.072293	0.271684	0.152936	1.94598	0.046071	0.309927	0.080214
EREG	2.08E-05	0.06164	0.067803	0.041083	0.25349	1.78E-05	0.000119
ETV4	0.528509	0.493116	0.185141	0.889459	0.210224	0.888843	0.011598
ETV5	0.371131	0.179244	NA	NA	0.248273	0.05672	0.017824
FGF1	0.003354	0.036398	0.0984	0.004799	0.077482	0.000462	0.001032
FGF10	3.03E-05	0	3.2E-05	2.51E-05	3.23E-05	0.000168	4.9E-06
FGF11	0.009552	0.017948	0.173307	0.554631	0.003086	0.057115	0.009037
FGF16	9.78E-05	0.002137	0.016327	0.025879	0.000341	0.000485	0.000147
FGF17	0.000821	0.024349	0.000633	0.003234	0.000391	0.034197	0.013139
FGF18	1.45397	0.057115	0.00032	0.001085	0.001362	0.049378	0.043586
FGF19	0	0	NA	NA	7.26E-05	0.008432	7.3E-06
FGF2	0.021793	0	NA	NA	0	0.009889	0.001598
FGF20	0.006896	0	NA	NA	0.001785	0.001004	0.000016
FGF21	2.66E-05	0.000452	NA	NA	1.25E-05	0.000084	7.1E-06
FGF22	0.00519	0.019237	NA	NA	0.003401	0.012691	0.049037
FGF3	0.000011	0.001289	NA	NA	0	0.000735	0
FGF4	0	0	NA	NA	0	0.000437	0
FGF5	0.001011	0.004364	0.006428	5.47E-05	0.181747	2.23E-05	7.8E-06
FGF6	0	0	NA	NA	9.5E-06	0	3.09E-05
FGF7	2.14E-05	0	0	0	4.14E-05	9.85E-05	0.003173
FGF8	0.001325	0.00064	7.08E-05	0.000522	8.11E-05	0.000331	0.000368
FGF9	0.001011	0.008549	NA	NA	0.000495	0.001245	0.013697
FGFBP1	0.20733	0.664343	NA	NA	0.002244	0.002355	0.002065
FGFBP2	0.003195	0.000428	NA	NA	0.000127	0.001887	0.003961

10

20

30

40

遺伝子	HEC-1B	JIMT1	LXFA-629	LXFA-737	MDA-MB-231	MFE-280	MFE-319
FGFBP3	0.000267	0.003065	NA	NA	0.00734	0.001047	0.00162
FGFR1	0.479632	5.89708	0.6208	0.448755	0.524858	1.22264	0.554785
FGFR1IIIb	0.000475	0.204476	NA	NA	0.00097	0.00734	0.000509
FGFR1IIIc	0.236514	1.86607	0.114633	0.108525	0.204476	1.02101	0.267943
FGFR2	0.050067	1.21419	0.121945	0.001513	0.003065	0.027394	0.211686
FGFR2IIIb	0.012344	0.602904	NA	NA	0.001169	0.014279	0.160428
FGFR2IIIc	0.016289	0.005448	2.79E-05	0.000266	0.000137	0.001178	0.009486
FGFR3	0.200267	0.840896	1.05256	1.51215	0.005154	0.094732	0.062935
FGFR3IIIb	0.023196	0.148651	NA	NA	0.00147	0.007391	0.005486
FGFR3IIIc	0.013139	0.000194	0.000669	0.000864	0.000132	0.000144	0.000152
FGFR4	0.225313	0.094732	0.005931	0.111491	0.000523	0.013985	0.004581
FLRT1	0.00362	0.018711	NA	NA	0.031034	0.041521	0.040667
FLRT2	0.001677	0	NA	NA	0.069348	0.00362	0.089003
FLRT3	0.041521	0	NA	NA	2.87E-05	0.002228	0.034197
HGF	2.62E-05	0	4.75E-05	0	0	5.13E-05	2.36E-05
IGF1	0	0.000581	NA	NA	0.000045	0.030186	0.000653
IGF1R	0.125869	0.61132	NA	NA	0.200267	0.063373	0.004743
IGF2	0.137738	0.196146	NA	NA	0.034197	0.0625	0.11744
KDR	0.000375	0.000233	0.000274	0.000304	0.01038	0.000686	0.001532
MET	4.46915	0.920188	NA	NA	0.450625	0.019915	0.057115
MMP1	0.021642	0.00162	NA	NA	0.45376	0.00093	0.002981
MMP2	0.162668	0.038741	0.67301	0.009119	0.000419	0.001381	0.000509
NCAM1	0.000104	9.58E-05	NA	NA	9.7E-06	0.039555	0.010027
PDGFRa	8.51E-05	0.001011	4.55E-06	0.001835	0.004016	0.018581	0.001253
PDGFRb	0.000862	0.002559	NA	NA	0.019915	0.003521	0.001025
PLAU	1.34723	1.40444	NA	NA	2.32947	0.007139	0.004581
PLAUR	0.316439	0.632878	NA	NA	0.757858	0.080772	0.008201
SERPINE1	0.096723	7.51618	NA	NA	2.82843	0.008432	0.001069
SOX9	0.858565	0.000145	NA	NA	0.429283	0.149685	0.004395
SPRY1	0.234881	0.00982	NA	NA	0.061214	0.039282	0.014989
SPRY2	0.271684	0.035403	NA	NA	0.297302	0.017098	0.029157
SPRY3	0.008432	0.012604	0.001365	0.045286	0.004518	0.006087	0.015843
SPRY4	0.020334	0.002981	NA	NA	0.018581	0.001861	0.000821
TGFa	0.118257	0.120742	NA	NA	0.034915	0.027776	0.087172
TNC	0.01541	0.737135	NA	NA	0.146604	0.020617	0.00613
VIM	69.551	5.54044	0.091157	0.065954	44.3235	2.39496	0.463294

10

20

30

40

遺伝子	MSTO-211H	NCI-H1581	NCI-H1703	NCI-H2126	NCI-H226	NCI-H358	NCI-H441
AREG	0.0017	0.000868	1.87E-05	0.064704	0.013048	5.73582	2.44528
CA12	0.084788	0.084202	0.000012	0.003645	0.015734	0	0
CDH1	0.009618	0.073302	0.000772	1.81504	0.042986	12.7286	9.84916
DKK3	4.11246	0.127626	0.094732	0.000255	0.161544	0	3.71E-05
DUSP4	0.000309	0.000219	0.0007	0.045123	0.003496	0.040386	0.013508
DUSP5	0.186856	0.02797	0.02977	0.02836	0.174343	0.223756	0.190782
DUSP6	0.255253	1.47427	0.149685	0.062935	0.063813	4.34694	2.86791
EGF	0.003595	0.000997	0.00011	0.000542	0.00982	0.07966	0.049721
EGFR	1.56917	0.108819	0.34151	0.460094	3.05252	0.628507	0.895025
ELK3	0.473029	0.214641	0.376312	0.063813	0.435275	0.463294	0.329877
ELK4	3.97E-05	3.55E-05	0.000788	2.85E-05	4.44E-05	2.64E-05	0.00181
ERBB2	0.189465	0.368567	0.246558	0.20733	0.156041	0.641713	0.482968
ERBB3	0.011125	0.208772	0.00942	0.099442	0.073812	0.721965	0.447513
EREG	0	0.000157	1.41E-05	2.93E-05	0.000145	0.907519	1.18099
ETV4	0.063813	0.408951	0.466516	0.019641	0.166086	0.230047	0.148651
ETV5	0.15932	0.271684	0.907519	0.03125	0.293209	0.183011	0.20733
FGF1	0.007813	0.00564	0.002668	0.000158	0.016289	0.0819	0.006849
FGF10	0.000194	0.000546	9.58E-05	1.35E-05	0.000343	7.31E-05	3.58E-05
FGF11	0.022876	0.301452	0.001543	0.00282	0.005486	0.042394	0.019641
FGF16	0.002079	0.000523	7.46E-05	0.000239	0.002372	0.00029	0.001099
FGF17	4.32E-05	0.00879	0.001887	0.000117	0.001091	0.002307	1.46E-05
FGF18	0.005373	0.119908	0.005154	0.000549	0.619854	0.000686	0.000816
FGF19	9.25E-05	0.01038	2.25E-05	5.7E-06	3.63E-05	0.000804	0
FGF2	3.07375	0.528509	0.069348	7.26E-05	2.12874	0.000273	4.63E-05
FGF20	0.008432	0.121582	0.000174	0	0	0.000478	3.36E-05
FGF21	0	2.01E-05	6.28E-05	0.000003	7.94E-05	0	9.9E-06
FGF22	0.004158	0.009685	0.003173	0.00162	0.014082	0.00292	0.004843
FGF3	0	0.000109	0	1.12E-05	6.28E-05	3.48E-05	0
FGF4	0	0	0	0	0	0	0
FGF5	0.939523	0.00181	0.514057	0	0.148651	0.002595	0
FGF6	0	1.11E-05	2.68E-05	4.1E-06	3.03E-05	0	0
FGF7	0.013322	0.001609	0.000378	2.87E-05	4.11E-05	0.000112	2.08E-05
FGF8	0.000472	0.10083	0.000495	1.39E-05	0.000193	0.000397	0.000695
FGF9	0.002008	0.001253	0.000146	0.000234	0.028164	0.070316	0.010599
FGFBP1	0.111105	0.000782	2.77E-05	0.007239	0.469761	2.88786	0.607097
FGFBP2	0.000109	0.000478	4.03E-05	0.002743	0.000318	0.00128	0.000296

10

20

30

40

遺伝子	MSTO-211H	NCI-H1581	NCI-H1703	NCI-H2126	NCI-H226	NCI-H358	NCI-H441
FGFBP3	0.004187	3.20428	0.001797	0.000597	0.00012	0.002405	0.001773
FGFR1	3.75809	2.05623	1.76541	0.146604	3.70635	0.607097	0.397768
FGFR1IIIb	0.000593	5.54E-05	0.000228	0.000589	0.00141	0.000362	0.001654
FGFR1IIIc	1.33793	1.17283	0.521233	0.011842	1.12506	0.045437	0.048027
FGFR2	0.002152	4.85678	0.02936	0.00071	0.023196	0.033726	0.001861
FGFR2IIIb	0.000644	0.303549	0.001773	0.000277	0.009355	0.020054	0.001106
FGFR2IIIc	0.000345	3.78423	0.008974	4.35E-05	0.006302	0.000531	0.000173
FGFR3	0.008315	0.043586	0.277392	0.051119	0.086569	0.156041	0.00367
FGFR3IIIb	7.57E-05	0.001835	0.01278	0.00849	0.005719	0.009889	2.23E-05
FGFR3IIIc	0.00088	0.006615	0.035403	0.000026	0.003377	0.000443	0
FGFR4	0.001343	0.004645	0.010309	0.005048	0.001642	0.004581	0.004334
FLRT1	0.004044	0.029564	0.036906	0.027017	0.002743	0.016863	0.033961
FLRT2	0.028164	0.008729	0.41466	0.013048	0.11908	0.118257	0.077482
FLRT3	2.77E-05	0.002559	0.001114	0.190782	0.001665	0.005226	0.005563
HGF	6.59E-05	0.005524	2.44E-05	0.00013	0	0	0
IGF1	0	0.006801	9.71E-05	0.000005	3.97E-05	0.030186	0.008729
IGF1R	0.275476	0.965936	0.021793	0.179244	0.840896	0.737135	0.211686
IGF2	2.36199	0.047366	0.005448	0.048361	0.023357	0.214641	3.94E-05
KDR	0.001253	0.004044	4.03E-05	8.63E-05	0.036398	0.5	0.271684
MET	1.75321	0.017337	0.128514	0.173139	2.53151	0.558644	4.82323
MMP1	0.035403	0.022718	0.307786	0.002542	0.058315	0.503478	0.001797
MMP2	3.11666	0.004809	0.003906	0.001099	0.078563	0	0
NCAM1	0.002524	0.000174	5.13E-05	0.000413	0.000856	0.000264	0.000169
PDGFRa	0.005962	0.486327	6.45313	0.000142	0.001926	0.001253	6.73E-05
PDGFRb	0.392292	0.178006	0.000627	0	0.267943	0.004518	0.001654
PLAU	1.6358	0.641713	0.00471	0.054788	0.021793	1.43396	3.53081
PLAUR	0.646176	0.11908	0.143587	0.447513	2.23457	0.773782	0.732043
SERPINE1	37.7918	0.275476	1.07923	0.06983	18.1261	0.316439	0.554785
SOX9	0.417544	0.450625	0.006087	0.214641	0.124137	1.45397	0.103665
SPRY1	0.012344	0.50698	0.185565	0.010525	0.00879	0.119908	0.0625
SPRY2	0.044502	0.030186	0.021642	0.062068	0.019641	0.186856	0.161544
SPRY3	0.001522	0.007289	0.01278	0.004016	0.003472	0.00296	0.001797
SPRY4	0.002323	0.009291	0.015093	0.000288	0.001091	0.004843	0.00471
TGFa	0.001161	0.008088	0.000581	0.01937	0.010097	0.320857	0.521233
TNC	0.02352	0.003262	3.76E-05	0.007546	0.100134	2.14355	1.07923
VIM	78.249	21.8566	32.6724	0.110338	19.8353	5.38893	0.479632

10

20

30

40

遺伝子	NCI-H460	NCI-H520	NCI-H522	U-118	U-251	U-87	Y79
AREG	0.052556	0.05329	0.111878	0.000605	0.000065	4.3E-06	9.9E-06
CA12	0.082469	0.003906	0.010237	0.659754	0.087172	1.02811	0.358489
CDH1	0.004809	0.111105	0.005839	6.02E-05	0.007867	0.000181	0.000121
DKK3	0.017824	0.091505	0.017098	5.20537	1.51572	0.089003	0.00026
DUSP4	0.059129	0.002668	3.73E-05	0.000343	0.005448	0.01468	0.001785
DUSP5	0.032129	0.013697	0.016863	0.021642	0.094732	0.06164	0.046391
DUSP6	0.30566	1.49485	0.946058	0.273573	0.63728	0.476319	0.001491
EGF	0.07966	0.01176	5.35E-05	0.014885	0.15822	0.005083	2.14E-05
EGFR	0.11344	0.017948	0.473029	0.673617	0.993092	0.48971	0
ELK3	0.055169	0.006302	0.096055	0.368567	0.25349	0.084788	0.008669
ELK4	7.62E-05	7.41E-05	0	1.49E-05	4.89E-05	0.000129	4.1E-06
ERBB2	0.04181	0.049378	0.348686	0.169575	0.111878	0.005013	0.005962
ERBB3	0.001773	0.018841	0.011518	0.002275	0.019641	0.000416	0.001913
EREG	0.01698	3.03E-05	0.089622	0.034435	0.004216	0.395021	1.44E-05
ETV4	0.5	0.312083	0.266093	0.003424	0.085971	0.026278	0.00015
ETV5	0.133972	0.858565	0.056328	0.156041	1.09429	0.271684	0.003065
FGF1	0.000192	0.002137	0.001511	0.035649	0.120742	NA	0.000388
FGF10	3.55E-05	0.000233	0.02683	0.000236	0.000482	NA	0
FGF11	0.007289	0.010672	0.072796	0.00176	0.025033	0.003401	0.005759
FGF16	0.001554	0.00176	0.000383	0.000163	0.000225	NA	0.000112
FGF17	0.000176	0.006615	0.000288	4.14E-05	0.002421	NA	0.000681
FGF18	0.001665	0.055939	0.002065	0.039282	0.014378	NA	0.004487
FGF19	8.22E-05	0.447513	2.79E-05	0	0.000167	NA	0.000231
FGF2	0.162668	0.125	1.02101	0.325336	0.456916	NA	0.021493
FGF20	0	0.070805	0.000892	0.000104	0.001362	NA	1.27E-05
FGF21	5.28E-05	0.002022	0	6.28E-05	0.00012	NA	0.00002
FGF22	0.001913	0.028164	0.005719	0.001848	0.006708	NA	0.018073
FGF3	0	3.29436	9.6E-06	0	0	NA	7.2E-06
FGF4	0	0.000147	0	0	0	NA	0
FGF5	0	0.00052	0.000042	0.230047	0.032577	NA	5.7E-06
FGF6	4.5E-06	4.32E-05	0	4.4E-06	1.81E-05	NA	6.9E-06
FGF7	0.00143	0.001106	3.07E-05	0.00294	0.001554	NA	7.5E-06
FGF8	0.000148	0.002197	0.001236	8.94E-05	0	NA	0.006172
FGF9	0.001106	0.217638	0.03983	0.000886	0.001289	NA	0.000341
FGFBP1	0.000943	0.02352	6.32E-05	0.000113	0.000475	7.78E-05	0.000019
FGFBP2	0.002307	0.000943	0.000977	0.001271	0.002079	0.000502	0.000411

10

20

30

40

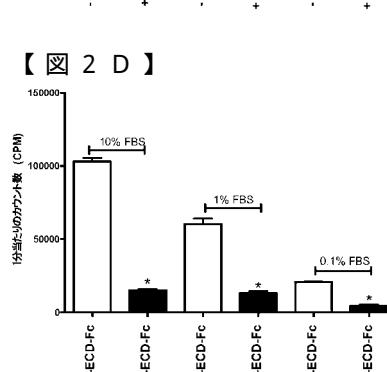
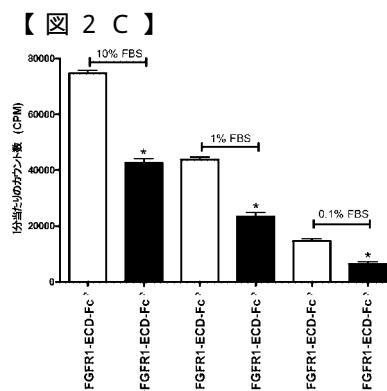
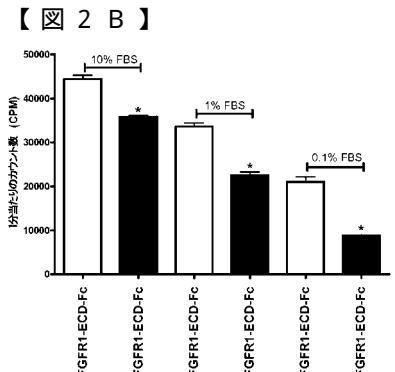
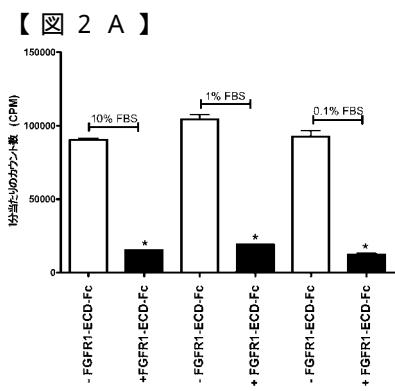
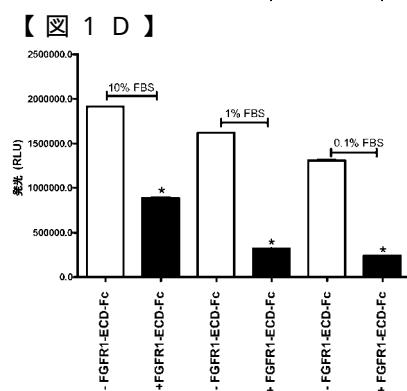
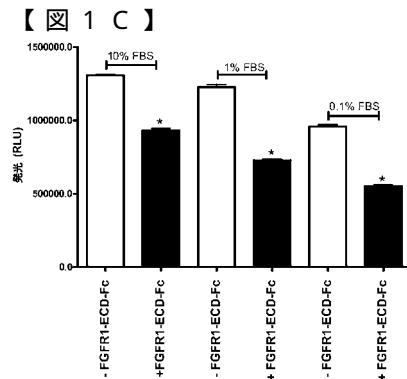
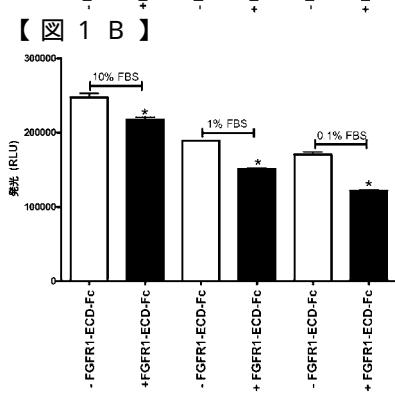
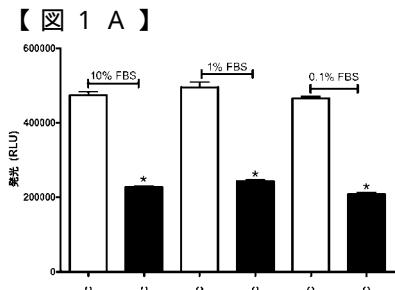
遺伝子	NCI-H460	NCI-H520	NCI-H522	U-118	U-251	U-87	Y79
FGFBP3	0.017824	0.008549	0.00982	0.00639	0.007239	0.005263	0.00128
FGFR1	0.101531	7.46426	4.16986	1.25701	1.81504	NA	0.10083
FGFR1IIIb	1.47E-05	0.11744	0.000217	0.000104	0.000527	NA	1.02E-05
FGFR1IIIc	0.020054	2.17347	3.83706	0.952638	0.231647	NA	0.032804
FGFR2	0.001631	0.006003	0.004129	0.00088	0.082469	NA	0.044502
FGFR2IIIb	7.57E-05	0.001848	0.000462	0.000103	0.007189	NA	0.004876
FGFR2IIIc	0.000402	0.000109	0.003853	0.000488	0.023036	NA	0.016516
FGFR3	0.004016	0.291183	0.01937	0.002291	0.373712	NA	0.029977
FGFR3IIIb	5.35E-05	0.049378	0.00044	1.12E-05	0.010672	NA	0.000756
FGFR3IIIc	0.000136	0.000299	0.002981	1.55E-05	0.021051	NA	0.000899
FGFR4	0.000715	0.007041	0.001047	7.16E-05	0.001748	NA	0.006003
FLRT1	0.0625	0.020475	0.012517	0.001848	0.016747	0.006434	0.015625
FLRT2	0.395021	0.001381	0.006944	0.329877	0.033262	0.084788	0.007239
FLRT3	0.000618	0.00074	0.00072	0.000108	0	0.002108	0.000223
HGF	2.87E-05	0.007391	0.011679	1.19748	0.000411	1.32869	2.01E-05
IGF1	0	5.02805	0.001689	0.070805	0.015303	0.00471	0.000226
IGF1R	0.368567	0.028956	1.34723	0.041521	0.668964	0.052193	0.142595
IGF2	0.008258	0.00357	0.05872	0.097396	0.000459	0.000197	0.035649
KDR	0.007705	0.001145	0.000196	0.001228	0.003308	0.000108	0.00004
MET	0.262429	0.066064	0.089622	1.3566	0.366021	0.697372	0.00088
MMP1	0.00639	0.000125	0.033493	0.104386	0.003906	0.049378	5.4E-06
MMP2	0.006708	0.139661	0.003545	5.61778	2.37841	10.9283	0.001289
NCAM1	0.022251	0.02836	8.7E-06	0.000446	0.125	0.004016	0.030186
PDGFRa	0	0.001325	0.005759	1.07177	0.650671	0.120742	0.000121
PDGFRb	0.021945	0.00148	0.002152	3.50642	0	1.28343	0.000338
PLAU	0.011598	0.000226	0.021493	1.46409	0.933033	2.56685	8.57E-05
PLAUR	0.098755	0.022718	0.003826	0.190782	0.939523	0.933033	0.041235
SERPINE1	0.044811	0.010027	0.003002	1.54756	3.53081	2.2974	2.46E-05
SOX9	0.535887	0.496546	0.02797	0.119908	3.34035	0.30566	0.000983
SPRY1	0.010097	0.001532	0.334482	0.070316	0.092783	0.003496	0.019505
SPRY2	0.028956	0.115024	0.008851	0.092783	0.432269	0.351111	0.017458
SPRY3	0.046391	0.015517	0.001785	0.001598	0.009291	0.007813	0.004425
SPRY4	0.00181	0.007239	0.002668	0.002065	0.002879	0.002197	0.00012
TGFa	0.001665	0.099442	0.021793	0.002259	0.266093	0.024689	0.000296
TNC	0	0.000531	0.001609	2.62079	2.32947	4.02782	0.000341
VIM	13.0864	2.71321	5.1337	31.3414	48.1679	22.4711	0.790041

10

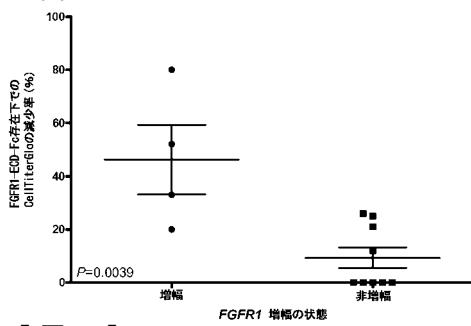
20

30

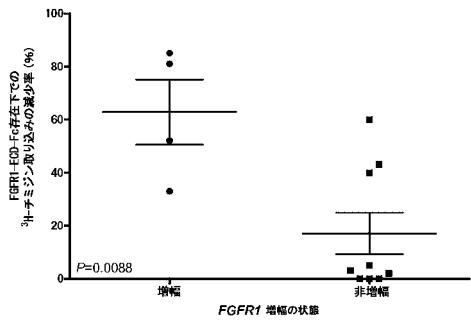
40



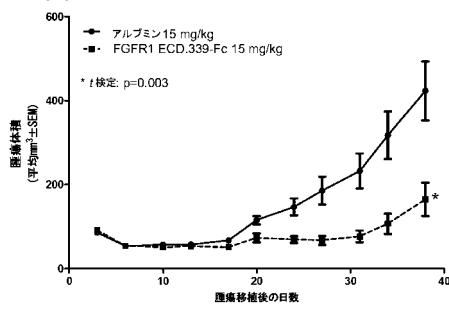
【図3】



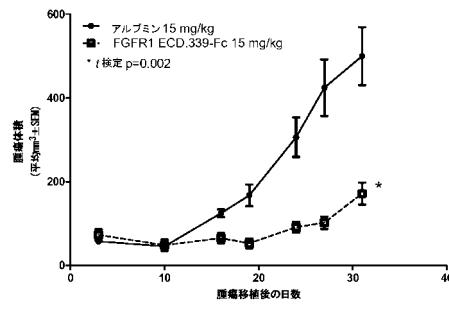
【図4】



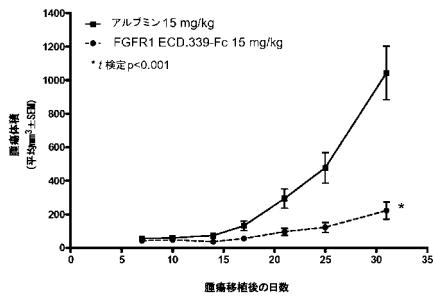
【図5】



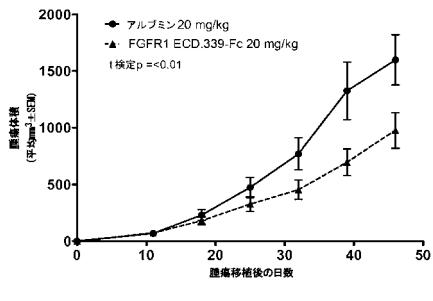
【図6】



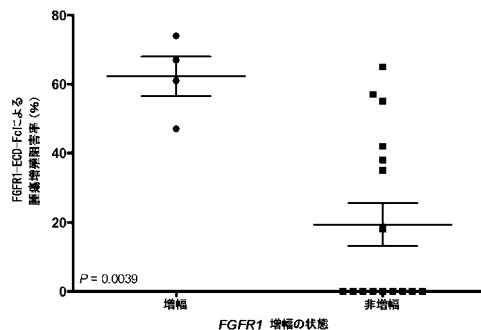
【図7】



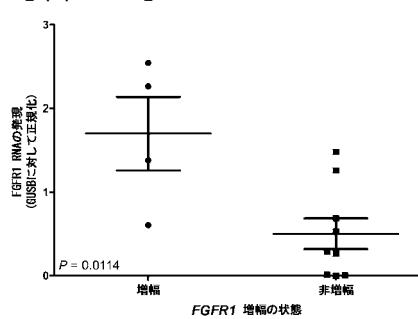
【図8】

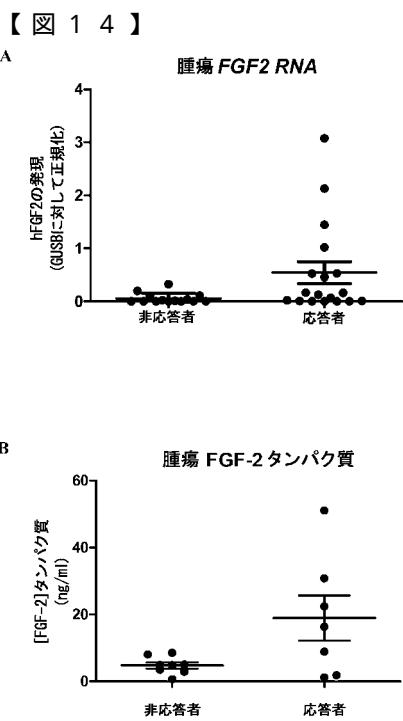
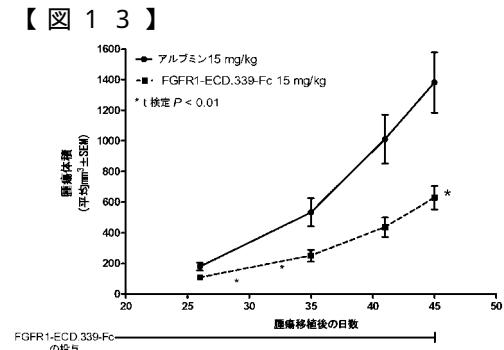
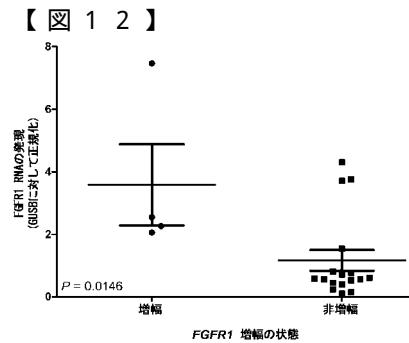
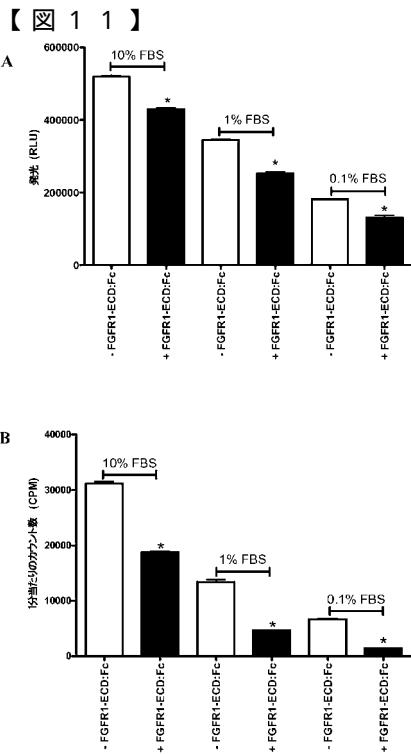


【図9】

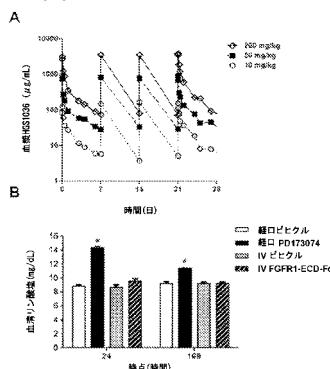


【図10】

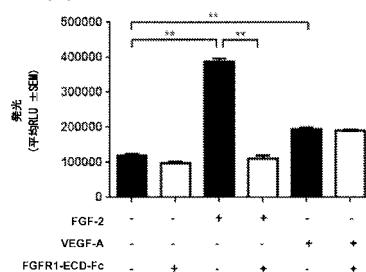




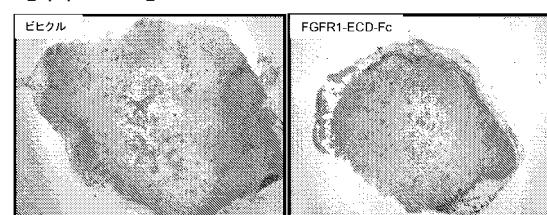
【図18】



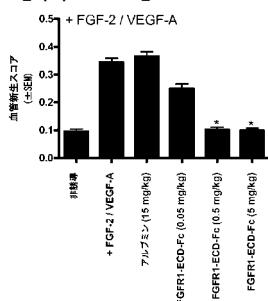
【図20】



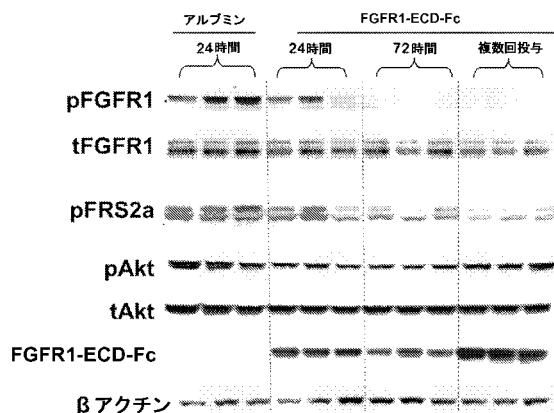
【図21】



【図19】



【図22】



【配列表】

2015505818000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/64772
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/00; C12P 21/08; C07K 1/00; C07H 21/04 (2013.01) USPC - 424/134.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 39/00; C12P 21/08; C07K 1/00; C07H 21/04 (2013.01) USPC: 424/134.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 530/387.3, 350; 536/23.4 (text search)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic data bases: PatBase; Google Scholar Search terms: fibroblast growth factor 1 (FGFR1), extracellular domain (ECD), immunoglobulin Fc fusion protein, FGFR1 gene amplification, copy number, FGFR1 ratio to chromosome 8 centromere (FGFR1/CEN8)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2010/0158911 A1 (WILLIAMS et al.) 24 June 2010 (24.06.2010). Especially para [0008], [0018], [0187], [0197], [0206-0208].	1, 2, 20, 21, 24, 52, 53, 55 3-14, 46-48
Y	DUTT et al., Inhibitor-sensitive FGFR1 amplification in human non-small cell lung cancer. Plos One, 2011 (published online 7 June 2011), Vol 6, No 6, Pages e20351. (07.06.2011). Especially pg 3 fig 1C, pg 4 col 2 para 5.	3-7, 14, 46
Y	ZYTOVISION. Catalogue 2011, February 2011 [online]. [Retrieved 21 February 2013]. Retrieved from the internet: <URL: http://www.lifesciences.sourcebioscience.com/media/294364/ztyovision%20product%20%20catalog%202011-resolution%20low.pdf>. Especially pg 20.	8-13, 47, 48
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 21 February 2013 (21.02.2013)	Date of mailing of the international search report 01 APR 2013	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/64772						
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>								
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</li> <li>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</li> <li>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 15-19, 23, 28-45, 49-51 and 58-71 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>								
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>								
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>- Please see extra sheet for continuation -</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</li> <li>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-14, 20-21, 24, 46-48, 52-53 and 55 limited to FGFR1 biomarker.</li> </ol>								
<p><b>Remark on Protest</b></p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/64772

Continuation of:  
Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

Group I+: claims 1-18, 20-22, 24, 46-48 and 52-55, drawn to a method of treating cancer having an FGFR1 gene amplification in a subject, wherein an FGFR1 gene amplification is indicative of therapeutic responsiveness by the cancer to a fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) extracellular domain (ECD) or an FGFR1 ECD fusion molecule, comprising: administering a therapeutically effective amount of an FGFR1 ECD or an FGFR1 ECD fusion molecule to the subject. The first invention is restricted to the first biomarker mentioned in claim 15, FGFR1 (Claims 1-14, 20-21, 24, 46-48 and 52-53, 55). Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional biomarker(s) to be searched. The exact claims searched will depend on Applicant's election.

Group II: claims 25-27 and 56-57 drawn to a method of treating cancer that overexpresses FGF2, wherein FGF2 overexpression is indicative of therapeutic responsiveness by the cancer to a fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) extracellular domain (ECD) or an FGFR1 ECD fusion molecule, comprising: administering a therapeutically effective amount of an FGFR1 ECD or an FGFR1 ECD fusion molecule to the subject, that does not have an FGFR1 gene amplification.

The inventions listed as Groups I+ and II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The inventions of Groups I+ do not include the inventive concept of FGF2 overexpression, as required by Group II.

The inventions of Groups II do not include the inventive concept of FGFR1 gene amplification, as required by Group I+.

The inventions of Groups I+ and II share the technical feature of a method of treating cancer with a fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) extracellular domain (ECD) or an FGFR1 ECD fusion molecule, comprising: administering a therapeutically effective amount of an FGFR1 ECD or an FGFR1 ECD fusion molecule to the subject. Further, the inventions of Groups I+ and II share the technical feature of a biomarker, FGF2, as an indicative of therapeutic responsiveness by the cancer to FGFR1 ECD or an FGFR1 ECD fusion molecule. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art as being anticipated by US 2010/0158911 A1 to Williams et al. (hereinafter 'Williams'). Williams discloses Claim 1, a method of treating cancer having an FGFR1 gene amplification in a subject (para [0206], the finding that the FGFR1 gene was amplified in 10%-15% of breast cancer patients), wherein an FGFR1 gene amplification is indicative of therapeutic responsiveness by the cancer (para [0187]). The FGFR fusion proteins can function as decoy receptors for trapping FGF ligands and inhibiting their interaction with FGFR on cell surfaces. They compete with wild-type receptors for ligand-binding to a fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) extracellular domain (ECD) or an FGFR1 ECD fusion molecule, comprising: administering a therapeutically effective amount of an FGFR1 ECD or an FGFR1 ECD fusion molecule to the subject. (para [0007]-[0008] and [0018], breast cancer). Williams discloses a biomarker, FGF2, as an indicative of therapeutic responsiveness by the cancer to FGFR1 ECD or an FGFR1 ECD fusion molecule (para [0197]). As said composition was known in the art at the time of the invention, this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another special technical feature of the inventions listed as Group I+ is the specific biomarker recited therein. The inventions do not share a special technical feature, because these biomarkers represent distinctive mechanisms leading to tumor development. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ and II therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 31/7048 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	
A 6 1 K 31/7068 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 31/475 (2006.01)	A 6 1 K 31/7048	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	A 6 1 K 31/7068	
	A 6 1 K 31/475	
	C 0 7 K 14/705	

(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,ID,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

(74) 代理人 100142929	弁理士 井上 隆一
(74) 代理人 100148699	弁理士 佐藤 利光
(74) 代理人 100128048	弁理士 新見 浩一
(74) 代理人 100129506	弁理士 小林 智彦
(74) 代理人 100130845	弁理士 渡邊 伸一
(74) 代理人 100114340	弁理士 大関 雅人
(74) 代理人 100114889	弁理士 五十嵐 義弘
(74) 代理人 100121072	弁理士 川本 和弥
(72) 発明者 ハーディング トーマス	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ツー コーポレイト ドライブ
(72) 発明者 パレンシア セルバンド	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ツー コーポレイト ドライブ
(72) 発明者 ロング リー	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ツー コーポレイト ドライブ
(72) 発明者 ヘスター ケビン	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ツー コーポレイト ドライブ
F ターム(参考) 4C084 AA02 AA19 BA01 BA22 BA41 BA44 DB63 NA14 ZB261 ZB262	
	4C085 AA13 AA14 BB11 CC22 CC23 EE03
	4C086 AA01 AA02 BA02 BC43 CB05 CB09 CB14 CB22 EA11 HA12

MA02 MA04 ZB26 ZC75  
4H045 BA10 CA40 DA50 EA20 EA50