

(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2015-517662

(P2015-517662A)

(43) 公表日 平成27年6月22日 (2015.6.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/50 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/50 Z	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 33/15 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/15 Z	2 G O 5 9
<b>GO 1 N 33/48 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/48 M	4 C O 8 4
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 Y	
<b>GO 1 N 21/59 (2006.01)</b>	GO 1 N 21/59 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-512640 (P2015-512640)	(71) 出願人	514291392
(86) (22) 出願日	平成25年3月14日 (2013.3.14)		ダイアテック・オンコロジー
(85) 翻訳文提出日	平成27年1月7日 (2015.1.7)		アメリカ合衆国テネシー州37027ブレ
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/031300		ントウッド・ヘリテイジドライブ9208
(87) 国際公開番号	W02013/172955	(74) 代理人	110000741
(87) 国際公開日	平成25年11月21日 (2013.11.21)		特許業務法人小田島特許事務所
(31) 優先権主張番号	61/647, 248	(72) 発明者	プレザント, キヤリー
(32) 優先日	平成24年5月15日 (2012.5.15)		アメリカ合衆国カリフォルニア州9110
(33) 優先権主張国	米国 (US)		8サンマリノ・カンバーランドロード23
			45
		(72) 発明者	ペレ, マシユー
			カナダ・エイチ4イー 2エイ1・モント
			リオール・ホーリークロスストリート16
			20
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 腫瘍細胞単離／精製方法およびその使用方法

## (57) 【要約】

本明細書では様々な検定および手順で用いるに有用な血液系もしくは非血液系腫瘍細胞を単離精製する方法を開示し、それには抗腫瘍薬効力スクリーニング、例えばミクロ培養速度論的検定などが含まれる。更にまた特許抗ガン剤に対するジェネリック抗ガン剤の相対的効力を比較する時に用いるに適したミクロ培養速度論的検定および方法も開示する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

抗ガン剤候補品の相対的アポトーシス誘導活性を評価する方法であって、

- a) 腫瘍標本からガン細胞を得、
  - b) 前記標本の細刻み、消化および濾過を実施し、
  - c) 場合により、生育不能細胞を密度勾配遠心分離法で除去してもよく、
  - d) 前記細胞の懸濁液をインキュベートしてマクロファージを付着によって除去し、
  - e) 興味を持たれる細胞を単離する目的で陽性、陰性および/または枯渇単離を実施し、
  - f) 必要ならば、CD14抗体接合電磁ビーズを用いて、いくらか残存するマクロファージを除去し、
  - g) 最終的懸濁液をプレートに塗布し、
  - h) 前記プレートをインキュベートし、
  - i) プレートに塗布した最終的懸濁液の少なくとも1個のウェルを少なくとも1種の1番目の抗ガン剤候補品または前記1番目の候補品と他の物質の混合物に接触させ、
  - j) プレートに塗布した最終的懸濁液の少なくとも1個のウェルを少なくとも1種の2番目の抗ガン剤候補品または前記2番目の候補品と他の物質の混合物に接触させ、
  - k) 前記少なくとも1種の1番目および2番目の抗ガン剤候補品に接触させた前記ウェルまたは少なくとも1種の1番目または少なくとも1種の2番目の抗ガン剤候補品と他の物質の混合物を入れたウェルの光学密度の測定を実施するが、前記光学密度の測定を選択した時間に渡って選択した間隔で連続的に実施し、
  - l) 前記少なくとも1種の1番目および2番目の抗ガン剤候補品が示す速度論的単位値を前記光学密度および時間測定値から決定し、
  - m) 各薬剤候補品が示す前記速度論的単位値を、
    - a) 前記速度論的単位値が前以て決めておいた閾値より大きいならば前記抗ガン剤候補品がガン細胞にアポトーシスを誘導する能力を持つこと、
    - b) 前記速度論的単位値が前以て決めておいた閾値より小さいならば前記抗ガン剤候補品がガン細胞にアポトーシスを誘導する能力を持たないこと、と相互に関係付け、
  - n) 各薬剤候補品が示した測定速度論的単位値を比較し、そして
  - o) 段階(n)で行った比較を基にして、ガン細胞にアポトーシスを誘導する相対的能力が大きい方の薬剤候補品を決定する、
- ことを含んで成る方法。

**【請求項 2】**

前記少なくとも1種の1番目および2番目の抗ガン剤候補品に少なくとも1種のジェネリック薬剤候補品および1種の特許薬剤候補品を含める請求項1記載の方法。

**【請求項 3】**

更に、

- p) ジェネリックまたは特許薬剤候補品のいずれかを選択する結果としてもたらされる金銭的結果を決定しかつ最も高い相対的速度論的単位値を示した薬剤候補品を選択する、
- 段階も含んで成る請求項2記載の方法。

**【請求項 4】**

前記金銭的結果が速度論的単位値が高い方の選択した薬剤を用いた一人の患者の治療を速度論的単位値が低い方の薬剤候補品に基づいて発生するであろう費用と対比することを基にして決定したものである請求項3記載の方法。

**【請求項 5】**

更に、

- q) 段階q)で決定した前記金銭的結果を目標母集団に当てはめる、
- 段階も含んで成る請求項3記載の方法。

**【請求項 6】**

前記目標母集団が米国の全人口である請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

段階 p) の前記金銭的結果が

i) 速度論的単位値が高い方の選択した抗ガン剤およびまた速度論的単位値が低い方の薬剤に関してメディケア費用支払い計画を得、

ii) 相対的速度論的単位値が高い方の薬剤候補品を用いた前記患者の治療を速度論的単位値が低い方の薬剤候補品を用いた前記患者の治療と対比させることを基にして一人の患者に対して発生するであろう相対的金銭的費用節減または相対的金銭的支出を決定するが、前記治療に前記選択した抗ガン剤候補品を用いた治療の少なくとも 1 サイクルを含め、そして

iii) 段階 ii) で得た費用節減または相対的金銭的支出を興味を持たれる目標母集団に当てはめる、

ことを含んで成る方法で決定したものである請求項 3 記載の方法。

【請求項 8】

前記腫瘍標本が固形腫瘍標本または血液標本または骨髓標本または滲出液由来標本である請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

前記 1 番目または 2 番目の抗ガン剤候補品の少なくとも一方が前記抗ガン剤候補品および少なくとも 1 種の追加的抗ガン剤候補品を含有して成る組み合わせである請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】

前記プレートの各ウェルに異なる抗ガン剤候補品を入れる請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

前記プレートの各ウェルに前記抗ガン剤候補品を様々な濃度で入れる請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

前記抗ガン剤候補品の濃度を 0.01 から 10,000  $\mu$ M にする請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】

前記光学密度を約 48 時間に渡って約 5 分毎に連続的に測定して記録する請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

前記光学密度の測定を分光光度計を用いて 550 から 650 ナノメートルの波長で実施する請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】

前記少なくとも 1 種の抗ガン剤候補品をアブラキサン、アリムタ、アムサクリン、アスパラギナーゼ、ベンダムスチン、プレオマイシン、ボスチニブ、カエリクス (ドキシル)、カルボプラチン、カルムスチン、CCNU、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、シトキサン (4HC)、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダサチニブ、ダウノルビシン、デシタビン、デキサメタゾン、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エリブリン、エルロチニブ、エストラムスチン、エトポシド、エベロリムス、フルダラビン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、グリベク (イマチニブ)、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イフォスファミド (4HI)、インターフェロン-2a、イリノテカン、イキサベピロン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトマイシン、ミトキサントロン、ニロチニブ、窒素マスタード、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペントスタチン、プロカルバジン、レゴラフェニブ、ソラフェニブ、ストレプトゾシン、スニチニブ、テモゾロミド、テムシロリムス、テニボシド、タリドミド、チオグアニン、トボテカン、ベルケイド、ビダザ、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン、ポリノスタット、エベロリムス、ラパチニブ、レナリドミド、ラパマイシンおよびヴォトリエント (バゾパニブ) から成る群より選択する請求項 1 記

10

20

30

40

50

載の方法。

【請求項 16】

前記少なくとも 1 種のジェネリック抗ガン剤候補品をシクロホスファミド、ドキソルビシン、エピルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、イリノテカン、トポテカン、ビンOREルビンおよびビンORラスチンから成る群より選択する請求項 2 記載の方法。

【請求項 17】

前記少なくとも 1 種の特許抗ガン剤候補品をナブ - パクリタキセル、ゲムシタビン、オキサリプラチン、カペシタビン (capcitabine)、イキサベピロン、エルピリン、リボソームドキソルビシンおよびペメトレキセドから成る群より選択する請求項 2 記載の方法。

10

【請求項 18】

腫瘍細胞を単離精製する方法であって、

- a) 腫瘍標本を得、
- b) 前記標本の細刻み、消化および濾過を実施し、
- c) 場合により、生育不能細胞を密度勾配遠心分離法で除去してもよく、
- d) 前記細胞の懸濁液をインキュベートしてマクロファージを付着によって除去し、
- e) 興味を持たれる細胞を単離する目的で陽性、陰性および / または枯渇単離を実施し

f) 必要ならば、CD14 抗体接合電磁ビーズを用いて、いくらか残存するマクロファージを除去し、

20

g) 最終的懸濁液をプレートに塗布し、そして

h) 前記プレートをインキュベートする、

ことを含んで成る方法。

【請求項 19】

抗ガン剤候補品が腫瘍標本に由来するガン細胞株にアポトーシスを誘導する能力を評価する方法であって、

- a) 腫瘍標本を得、
- b) 前記標本の細刻み、消化および濾過を実施し、
- c) 場合により、生育不能細胞を密度勾配遠心分離法で除去してもよく、
- d) 前記細胞の懸濁液をインキュベートしてマクロファージを付着によって除去し、
- e) 興味を持たれる細胞を単離する目的で陽性、陰性および / または枯渇単離を実施し

30

f) 必要ならば、CD14 抗体接合電磁ビーズを用いて、いくらか残存するマクロファージを除去し、

g) 最終的懸濁液をプレートに塗布し、

h) 前記プレートをインキュベートし、

i) プレートに塗布した最終的懸濁液の少なくとも 1 個のウェルを少なくとも 1 種の抗ガン剤候補品または前記候補品と他の物質の混合物に接触させ、

j) 前記少なくとも 1 種の抗ガン剤候補品に接触させたウェルまたは少なくとも 1 種の抗ガン剤候補品と他の物質の混合物を入れたウェルの光学密度の測定を実施するが、前記光学密度の測定を選択した時間に渡って選択した間隔で連続的に実施し、

40

k) 前記少なくとも 1 種の抗ガン剤候補品が示す速度論的単位値を前記光学密度および時間測定値から決定し、そして

l) 各薬剤候補品が示す前記速度論的単位値を、

a) 前記速度論的単位値が前以て決めておいた閾値より大きいならば前記抗ガン剤候補品がガン細胞にアポトーシスを誘導する能力を持つこと、

b) 前記速度論的単位値が前以て決めておいた閾値より小さいならば前記抗ガン剤候補品がガン細胞にアポトーシスを誘導する能力を持たないこと、

と相互に関係付ける、

50

ことを含んで成る方法。

【請求項 20】

前記プレートの各ウエルに異なる抗ガン剤候補品を入れる請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

前記プレートの各ウエルに前記抗ガン剤候補品を様々な濃度で入れる請求項 19 記載の方法。

【請求項 22】

前記抗ガン剤候補品の濃度を 0.01 から 10,000  $\mu$ M にする請求項 19 記載の方法。

【請求項 23】

前記光学密度を約 48 時間に渡って約 5 分毎に連続的に測定して記録する請求項 19 記載の方法。

【請求項 24】

前記光学密度の測定を分光光度計を用いて 550 から 650 ナノメートルの波長で実施する請求項 19 記載の方法。

【請求項 25】

前記腫瘍標本が固形腫瘍標本または血液標本または骨髓標本または滲出液由来標本である請求項 19 記載の方法。

【請求項 26】

前記抗ガン剤候補品をアブラキサン、アリムタ、アムサクリン、アスパラギナーゼ、ベングラムスチン、ブレオマイシン、ボスチニブ、カエリクス（ドキシル）、カルボプラチン、カルムスチン、CCNU、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、シトキサン（4HC）、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダサチニブ、ダウノルビシン、デシタビン、デキサメタゾン、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エリブリン、エルロチニブ、エストラムスチン、エトポシド、エベロリムス、フルダラビン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、グリベク（イマチニブ）、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イフォスファミド（4HI）、インターフェロン-2a、イリノテカン、イキサベピロン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトマイシン、ミトキサントロン、ニロチニブ、窒素マスタード、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペントスタチン、プロカルバジン、レゴラフェニブ、ソラフェニブ、ストレプトゾシン、スニチニブ、テモゾロミド、テムシロリムス、テニポシド、タリドミド、チオグアニン、トポテカン、ベルケイド、ビダザ、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ビノレルビン、ポリノスタット、エベロリムス、ラパチニブ、レナリドミド、ラパマイシンおよびヴォトリエント（パゾパニブ）から成る群より選択する請求項 19 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願に対する相互参照】

【0001】

本出願は、2012年5月15日付けで出願した米国仮特許出願番号 61/647,248（これは引用することによって全体が本明細書に組み入れられる）の国際段階のものである。

【技術分野】

【0002】

本開示は、少なくとも1種のジェネリックおよび/または特許抗ガン剤候補品がガン細胞にアポトーシスを誘導する能力を評価する方法に向けたものである。より具体的には、本開示は、腫瘍細胞の精製および単離に関する方法を提供するものであり、それらは特に所定標本の原発組織に最適である。更にその上、本開示では、少なくとも1種のジェネリックおよび特許薬剤がガン細胞にアポトーシスを誘発する相対的能力を正確かつ着実に比較することを可能にする検定および方法も提供する。

【背景技術】

【0003】

10

20

30

40

50

細胞死は様々な様式で起こり得るが、最も効果のある抗ガン剤は非常に特異的なアポトーシス過程でガン細胞の死をもたらす傾向がある。アポトーシスは、体が細胞を秩序だてて除去することができるようにそれ自身を解体して一括する機構である。アポトーシスは一般に細胞がもはや必要でなくなるか、老化し過ぎるか或は損傷を受けるかまたは病気になった時に体がそれらを除去しようとする時に用いられる。実際、ガンをもたらす可能性のある危険な変異を起こしたある種の細胞およびある種の初期段階のガン性細胞でさえ自然なプロセスの結果としてアポトーシスを起こし得る。

#### 【 0 0 0 4 】

アポトーシス中の細胞はDNAを切断して貯蔵し、核を凝縮し、余分な水を排除しそして細胞膜に様々な変化、例えば細胞膜内にブレブ形成および不規則な膨れ形成などをもたらす(図1参照)。アポトーシスは一般にいくつかの引き金の中の1つが細胞にアポトーシスを起こすべきであるといったシグナルを送った後に起こる。多くのガン細胞では、その細胞がその引き金を検出することができないか、その引き金を受け取った後にシグナルを適切に送ることができないか、或はそのシグナルに反応することができないか、或はその細胞がそのような問題の組み合わせを持つことさえあり得ることから、そのメッセージシステムが正確には働かない。全体的な影響はある種のガン細胞がアポトーシスを引き起こすことに抵抗を示すことである。

10

#### 【 0 0 0 5 】

本明細書で用いる如きガンには血液系および非血液系両方のあらゆるガンまたは悪性腫瘍ばかりでなく骨髓異形成症候群(MDS)も含まれる。ここではあらゆる血液/骨髓のガン、固形腫瘍および滲出液に関する4種類の主要な分類:白血病、リンパ腫、上皮悪性腫瘍および間葉悪性腫瘍を検討する。

20

#### 【 0 0 0 6 】

数多くの有効な抗ガン剤はガン性細胞がアポトーシスプロセスに抵抗を示すにも拘らずアポトーシスを起こすように誘導する能力を有するが、あらゆる種類のガン細胞に対してうまく作用する薬剤はなくかつアポトーシスの速度論的単位測定を基にしてそのような薬剤の相対的効力を予測する試験も存在しない。従って、特定の薬剤候補品が様々な種類のガン細胞にアポトーシスを引き起こす能力を有するか否かを検出しかつまたその薬剤候補品が特に個々の患者に関して他の薬剤もしくは薬剤候補品に比べて有効であることを決定する必要性が存在する。

30

#### 【 0 0 0 7 】

1種以上の白血病に対して有効であることが知られている特定の薬剤に患者から採取した白血病細胞が反応してアポトーシスを引き起こすか否かを検出しようとする時に現在の特許文献1および2に記述されているマイクロ培養速度論的検定(Microculture Kinetic Assay(MiCK検定))が用いられている。MiCK検定では、患者から採取したガン細胞を所定濃度の単一細胞もしくは小細胞集団を入れておいた懸濁液に入れた後にマイクロタイタープレートの複数のウエル内の条件に適応させる。対照溶液、即ち公知抗ガン剤、典型的には患者のガンの種類に適すると推奨される薬剤を様々な濃度で入れておいた溶液を前記ウエルにウエル1個当たりの試験サンプルが1個になるように導入する。次に、各ウエルの光学密度を数時間から数日間に渡って定期的、典型的には数分毎に測定する。細胞がアポトーシスに関連したブレブ形成(blebbing)を起こすにつれて、その光学密度が検出可能な特定の様式で高くなる。もし細胞がアポトーシスを起こすことも他の原因で死滅することもない場合、その光学密度はそのような様式では変化しない。このように、もしウエル1個当たりの光学密度(OD)を時間に対してプロットした時に経時的に正の傾きを有する直線カーブに続いて高原および/または負の傾きが生じるならば、その抗ガン剤は患者のガン細胞にアポトーシスを十分に誘導する点でその患者にとって適切な療法であり得る可能性がある。また、時間に対するODデータを用いて速度論的単位を計算することも可能であり、その単位を用いてアポトーシスを測定することができ、それも同様に当該患者にとって治療が適切であることと相互に関係付ける。当業者は上述したMiCK検定の一般的記述を周知しているであろう。そ

40

50

の上、特許文献 1 および 2 の内容は引用することによって全体があらゆる目的で本明細書に組み入れられかつ M i C K 検定のより詳細な説明を与えるものである。

【 0 0 0 8 】

公知抗ガン剤が個々の患者の白血病ガン細胞に対して示す効果を検出する目的で M i C K 検定が用いられてきたが、特に様々な腫瘍細胞標本源に適合した前記検定の変法を開発する必要性が存在したままである。この上で言及した M i C K 検定は血液のガン、特に白血病のみを考慮したものであった。現在の M i C K 検定の範囲は限定されていることから、当該技術分野では血液のガンばかりでなくまた他の腫瘍源に由来する標本で直面する如きアポトーシスに関連した細胞 / 化学薬品相互作用の検出に特に適していて鋭敏な M i C K 検定が必要とされている。個々の源の標本に合わせるように改良した M i C K 検定および方法を開発することができれば、研究者は M i C K 検定を用いることで得ることができる個別的な治療プロトコルにさらなる正確さと着実さをもたらすことができるであろう。その上、どんなスクリーニング検定にも重要な面は、標本に入っているガン細胞をガンではない他の細胞および物質から単離することそして化合物または薬剤の試験を受けさせる細胞の純度である。

10

【 0 0 0 9 】

また、当該技術分野では、特許薬学的化学療法薬とジェネリック同等物の間の比較解析で用いるに適した M i C K 検定を開発するといった大きな必要性も存在する。用語 “ 特許 ” には単一の薬剤および / またはブランド名の薬剤もしくは化学薬品が含まれ、用語 “ ジェネリック ” にはマルチソースの薬剤および / またはブランド名のない薬剤もしくは化学薬品が含まれる。そのような検定およびプロトコルを開発することができれば、医者は特許薬品をジェネリック同等品と対比させた相対的反応を基にして費用効果的な治療前決定を行うことができるであろう。このような個々のガンの治療に特許薬品またはジェネリック薬品を用いるか否かの決定は、膨大な治療費に直面する個々の患者ばかりでなくまた全体として医療産業にとって大きな意味を持つ。

20

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 0 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 6 , 0 7 7 , 6 8 4 号

【 特許文献 2 】 米国特許第 6 , 2 5 8 , 5 5 3 号

30

【 発明の概要 】

【 0 0 1 1 】

従って、本開示の目的は、M i C K 検定で用いるべき標本から腫瘍細胞を単離および精製する改良方法を提供することにある。その上また、より鋭敏で着実な検定を創出できるように M i C K 検定自身に対する改良も開示する。これらの方法および検定を用いると白血病に限らずあらゆる種類のガン細胞におけるアポトーシスを測定することができる。

【 0 0 1 2 】

本発明の態様に従う方法は、今まで知られていた M i C K 検定プロトコルに比べてかなり改善されていることから、専門家は腫瘍細胞の精製および単離プロトコルを腫瘍細胞の源に応じて注文に合わせることができる。

40

【 0 0 1 3 】

M i C K 検定に対する改善には、例えば K U 値の計算および導出および前記 K U 値の決定で用いられる係数に対する微調整などが含まれる。このような改善によって専門家はこの開示するより鋭敏な係数および K U 値を導出する方法を用いることで個々の患者の病気に合うように化学療法計画を調整することができる。

【 0 0 1 4 】

本出願に開示する方法を用いるとより着実に正確な M i C K 検定を行うことが可能になることは容易に理解されるであろう。この開示する方法によって M i C K 検定プロトコルを改良すると相当して検定能力の向上がもたらされることで、医師は患者の治療方策を立てる時に補助になる価値あるデータを得ることになる。化学療法薬はそれらが治療すべき

50

ガンの種類に対して有効であるか否かに拘わらず重大な副作用をもたらすことから、当業者は、個々の患者のガンに対して最も有効である化学療法薬 1 種または 2 種以上を治療開始前に識別することは不可避であることを認識している。しかしながら、このような目標を達成する有効かつ信頼できる方法は存在しない。

【 0 0 1 5 】

本開示のさらなる目的は、特許化学療法薬をジェネリック薬と対比させた相対的効果を比較することを可能にする M i C K 検定および方法を提供することにある。興味を持たれる特許薬品が個々の種類のガンにアポトーシスを誘導する相対的能力をジェネリック薬品と比較することができることは最新技術に対するすこぶる有益な改善である。本明細書に開示する検定および方法によって示された結果を基にしてジェネリック薬品と特許薬品の間の選択を行うことができるようになると、そのような医者は彼らの患者に対して最良の治療方策を提供するのに極めてふさわしい医者になるであろう。患者の治療におけるそのような小規模な効率の良さは全体としての医療産業全体に効力をもたらす大規模な効率の良さに平行するものである。本開示は医療産業全体に対して大規模な潜在的費用節減をもたらすものであり得る、と言うのは、医者は本方法を用いることで商業的影響または不確定な論文審査のある学術専門誌ではなく個別化した患者の M i C K 検定結果を基にして最も有効な薬剤を識別する目的でジェネリック化学療法薬と特許薬の間の選択を行うことができるようになるであろう。

【 0 0 1 6 】

1 つの態様として、本発明の資料および方法は、固形腫瘍、血液、骨髓および滲出液標本に由来する腫瘍細胞を単離および精製（およびまた濃縮）する免疫学的手順で用いるためのものである。混入物が入っていないガン細胞サンプルを得ることができるかどうかは腫瘍増殖、ガン生物学および薬剤スクリーニングの研究における主要な障害の 1 つである。ガン患者および動物腫瘍モデルから入手した腫瘍生体組織にはしばしば異種細胞集団が入っており、それには正常な組織、血液およびガン細胞が含まれる。このように混ざり合った集団であると診断が困難になりかつ有効な実験結論を得ることと解釈することが困難になる。本方法は個々の組織サンプルの生理学的源に合わせることができる特定のプロトコルを提供することによってそのような問題を軽減するものである。

【 0 0 1 7 】

本発明の別の態様は腫瘍細胞を単離および精製する方法に関し、この方法は a ) 腫瘍標本を得、 b ) その標本を抗生物質混合物で 2 4 - 4 8 時間処理し、 c ) その標本の細刻み、消化および濾過を実施し、 d ) 場合により、生育不能細胞を密度勾配遠心分離法で除去してもよく、 e ) その細胞の懸濁液をインキュベートしてマクロファージを付着によって除去し、 f ) 興味を持たれる細胞を単離する目的で陽性 ( p o s i t i v e ) 、陰性 ( n e g a t i v e ) および / または枯渇単離 ( d e p l e t i o n i s o l a t i o n ) を実施し、 g ) 必要ならば、C D 1 4 抗体接合電磁ビーズを用いて、いくらか残存するマクロファージを除去し、 h ) 最終的懸濁液をプレートに塗布し（例えば最終的懸濁液を 3 8 4 ウエルプレートのウェルに加え）、そして i ) プレートを 3 7 °C において 5 % の二酸化炭素 ( C O <sub>2</sub> ) が入っている湿った雰囲気で一晩インキュベートする段階を含んで成る。

【 0 0 1 8 】

従って、1 つの態様として、本方法は、抗ガン剤候補品の相対的アポトーシス誘導活性を評価する方法に関し、この方法は、

- a ) 腫瘍標本からガン細胞を得、
- b ) 前記標本の細刻み、消化および濾過を実施し、
- c ) 場合により、生育不能細胞を密度勾配遠心分離法で除去してもよく、
- d ) 前記細胞の懸濁液をインキュベートしてマクロファージを付着によって除去し、
- e ) 興味を持たれる細胞を単離する目的で陽性、陰性および / または枯渇単離を実施し、
- f ) 必要ならば、C D 1 4 抗体接合電磁ビーズを用いて、いくらか残存するマクロファ



ージを除去し、

g) 最終的懸濁液をプレートに塗布し、

h) 前記プレートをインキュベートし、

i) プレートに塗布した最終的懸濁液の少なくとも1個のウェルを少なくとも1種の1番目の抗ガン剤候補品または前記1番目の候補品と他の物質の混合物に接触させ、

j) プレートに塗布した最終的懸濁液の少なくとも1個のウェルを少なくとも1種の2番目の抗ガン剤候補品または前記2番目の候補品と他の物質の混合物に接触させ、

k) 前記少なくとも1種の1番目および2番目の抗ガン剤候補品に接触させた前記ウェルまたは少なくとも1種の1番目または少なくとも1種の2番目の抗ガン剤候補品と他の物質の混合物を入れたウェルの光学密度の測定を実施するが、前記光学密度の測定を選択した時間に渡って選択した間隔で連続的に実施し、

l) 前記少なくとも1種の1番目および2番目の抗ガン剤候補品が示す速度論的単位値を前記光学密度および時間測定値から決定し、

m) 各薬剤候補品が示す前記速度論的単位値を、

a) 前記速度論的単位値が前以て決めておいた閾値より大きいならば前記抗ガン剤候補品がガン細胞にアポトーシスを誘導する能力を持つこと、

b) 前記速度論的単位値が前以て決めておいた閾値より小さいならば前記抗ガン剤候補品がガン細胞にアポトーシスを誘導する能力を持たないこと、  
と相互に関係付け、

n) 各薬剤候補品が示した測定速度論的単位値を比較し、そして

o) 段階(n)で行った比較を基にして、ガン細胞にアポトーシスを誘導する相対的能力が大きい方の薬剤候補品を決定する、  
ことを含んで成る。

#### 【0019】

本発明の1つの態様は、また、前記少なくとも1種の1番目および2番目の抗ガン剤候補品に少なくとも1種のジェネリック薬剤候補品および1種の特許薬剤候補品を含める上述した段階a) - o) にも関する。

#### 【0020】

本発明はまたp) ジェネリックまたは特許薬剤候補品のいずれかを選択する結果としてもたらされる金銭的結果を決定しかつ最も高い相対的速度論的単位値を示した薬剤候補品を選択することを含んで成る段階を存在させる態様も包含する。特定の態様では、前記金銭的結果を速度論的単位値が高い方の選択した薬剤を用いた一人の患者の治療を速度論的単位値が低い方の薬剤候補品に基づいて発生するであろう費用と対比することを基にして決定する。ジェネリック薬剤は一般に複数の製造業者源から入手可能な薬剤であると定義する一方、特許薬剤はただ1つの製造業者から入手可能な薬剤であると定義する。

#### 【0021】

本発明のさらなる態様は、段階p) で決定した前記金銭的結果を目標母集団に当てはめることを包含する段階q) も含んで成る。そのような目標母集団に含める人口の数は如何なる数であってもよいが、患者数を少なくとも2にする。特に、本発明の態様は、コミュニティ規模(2から10人、10から20人、20から50人、50から100人、100から300人、300から1000人など)、地域規模(1000から2000人、2000から10000人など)、州規模(10,000から20,000人、20,000から50,000人など、またはある州の中に住む試験薬剤の治療を受けさせることができる候補者である人々の数であると定義)および全国規模(ある国の中に住む試験薬剤に可能な候補者であるあらゆる人々であると定義)である集団に関する。本発明の特別な態様における目標母集団は米国の全人口である。そのような外挿は適切にプログラムしたコンピューターを用いて実施可能である。

#### 【0022】

本発明の方法では様々な源に由来する腫瘍標本を用いることができ、例えば固形腫瘍標本、血液標本、骨髓標本および滲出液由来標本がこの開示する方法に適した特定の腫瘍標

10

20

30

40

50

本の種類のほんの数例である。

【0023】

本発明の態様は幅広く多様な悪性腫瘍の検査で使用可能である。例えば、本開示は下記のガンの検査で使用可能である：

卵巣ガン（漿液性嚢胞腺ガン、ムチン性嚢胞腺ガン、類内膜ガン）、卵巣顆粒膜細胞腫、卵管腺ガン、腹膜ガン、子宮（内膜）腺ガン、肉腫様ガン、子宮頸部扁平上皮細胞ガン、子宮頸管腺ガン、外陰ガン、乳ガン、原発性および転移性（腺管ガン、粘液ガン、小葉ガン、悪性葉状腫瘍）、頭部および頸部ガン、口腔ガン（舌、原発性および転移性を包含）、食道ガン、扁平上皮細胞ガンおよび腺ガン、胃腺ガン、悪性リンパ腫、GIST、原発性小腸ガン、結腸腺ガン、原発性および転移性（腺ガン、粘液ガン、大細胞神経内分泌ガン、膠様ガン）、虫垂腺ガン、結腸直腸ガン、直腸ガン、肛門ガン（扁平上皮、基底細胞）、カルチノイド腫瘍、原発性および転移性（虫垂、小腸、結腸）、膵臓ガン、肝臓ガン（肝細胞ガン、胆管ガン）、肝臓に転移したガン、肺ガン、原発性および転移性（扁平上皮細胞、腺ガン、腺扁平上皮ガン、巨細胞ガン、非小細胞ガン、NSCLC、小細胞ガン神経内分泌ガン、大細胞ガン、気管支肺泡ガン）、腎臓細胞（腎臓）ガン、原発性および転移性、膀胱ガン、原発性および転移性、前立腺腺ガン、原発性および転移性、脳腫瘍、原発性および転移性（膠芽細胞腫、多形性、脳神経外胚葉悪性腫瘍、神経外胚葉腫瘍、希突起膠腫、悪性星状細胞腫）、皮膚腫瘍（悪性黒色腫、皮脂腺細胞ガン）、甲状腺ガン（乳頭および濾胞）、胸腺ガン、蝶形骨ガン（Shenoidal carcinoma）、原発未知のガン、神経内分泌ガン、精巣悪性腫瘍（精上皮腫、胚性ガン、悪性混合腫瘍）など。

10

20

【0024】

本開示は下記の悪性リンパ腫の検査で使用可能である：例えば大細胞悪性リンパ腫、小細胞リンパ腫、混合大および小細胞リンパ腫、粘膜関連リンパ組織リンパ腫、非ホジキンズ悪性リンパ腫、T細胞悪性リンパ腫、慢性骨髄性（または骨髄）白血病（CML）、骨髄腫、他の白血病、中皮腫、マントル細胞リンパ腫、周辺細胞リンパ腫、種類として特定不能のリンパ腫など。

【0025】

更にその上、本開示は下記の白血病の検査でも使用可能である：例えばAML - 急性骨髄性白血病、ALL - 急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群 - MDS、骨髄線維症を伴うMDS、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症など。

30

【0026】

また、本開示を用いて下記の如き肉腫の検査を行うことも可能である：平滑筋肉腫（子宮肉腫）、GIST - 消化管間質腫瘍、原発性および転移性（胃、小腸、結腸）、脂肪肉腫、粘液性肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、ユーイング肉腫/PNET、神経芽細胞腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、紡錘細胞ガン、胎児性横紋筋肉腫、中皮腫など。

【0027】

このように、この開示するMiCK検定および方法は単に白血病に向けたものである以前から当該技術分野で公知のMiCK検定に対する劇的な改善に相当することは容易に認識され得るであろう。

40

【0028】

別の態様として、本方法は抗ガン剤候補品が腫瘍標本に由来するガン細胞株にアポトーシスを誘導する能力を評価する方法に関し、この方法は、

- a) 腫瘍標本を得、
- b) 前記標本の細刻み、消化および濾過を実施し、
- c) 場合により、生育不能細胞を密度勾配遠心分離法で除去してもよく、
- d) 前記細胞の懸濁液をインキュベートしてマクロファージを付着によって除去し、
- e) 興味の持たれる細胞を単離する目的で陽性、陰性および/または枯渇単離を実施し

50

f) 必要ならば、C D 1 4 抗体接合電磁ビーズを用いて、いくらか残存するマクロファージを除去し、

g) 最終的懸濁液をプレートに塗布し、

h) 前記プレートをインキュベートし、

i) プレートに塗布した最終的懸濁液の少なくとも 1 個のウエルを少なくとも 1 種の抗ガン剤候補品または前記候補品と他の物質の混合物に接触させ、

j) 前記少なくとも 1 種の抗ガン剤候補品に接触させたウエルまたは少なくとも 1 種の抗ガン剤候補品と他の物質の混合物を入れたウエルの光学密度の測定を実施するが、前記光学密度の測定を選択した時間に渡って選択した間隔で連続的に実施し、

k) 前記少なくとも 1 種の抗ガン剤候補品が示す速度論的単位値を前記光学密度および時間測定値から決定し、そして

10

l) 各薬剤候補品が示す前記速度論的単位値を、

a) 前記速度論的単位値が前以て決めておいた閾値より大きいならば前記抗ガン剤候補品がガン細胞にアポトーシスを誘導する能力を持つこと、

b) 前記速度論的単位値が前以て決めておいた閾値より小さいならば前記抗ガン剤候補品がガン細胞にアポトーシスを誘導する能力を持たないこと、

と相互に関係付ける、

ことを含んで成る。

#### 【0029】

いくつかの態様では、前記プレートの各ウエルに異なる抗ガン剤候補品を入れる。更に、本方法はまた前記抗ガン剤候補品を様々な濃度で各ウエルに入れる態様も検討する。従って、本開示は複数の潜在的薬剤候補品を複数の可能性のある濃度で同時に検査することが可能な高性能検定に関係し得る。本発明の態様が有するこのような高性能は単一の薬剤候補品を検査することに比べて有意に有利であり、検査費用を軽減しかつ時間を大きく節約することを約束するものである。

20

#### 【0030】

本検定の各ウエルに入れることができる潜在的抗ガン剤候補品の濃度は、製造業者が推奨する投薬量およびその投薬量に相当するであろうウエル中の濃度を達成するに必要な相当する希釈度に応じて変わるであろう。例えば、各ウエルに入れる目標薬剤濃度をモル規定で決定し、その範囲は例えば 0.01 から 10,000  $\mu\text{M}$  または 0.001 から 10,000  $\mu\text{M}$  または 0.1 から 10,000  $\mu\text{M}$  であり得るが、またこの開示した範囲の例から逸脱するか或はその範囲内に含まれる如何なる整数も包含し得る。当業者は、製造業者が推奨する血中濃度を用いて目標の薬剤濃度を達成する方法を理解するであろうが、標本細胞が十分に存在する場合には  $\pm 1$  の連続希釈法で変えてもよい。

30

#### 【0031】

本発明の態様は抗ガン剤候補品をあらゆる様式で検査することを可能にするものである。例えば、この開示する方法を用いて下記の抗ガン剤候補品に試験を受けさせることができる：アブラキサン、アリムタ、アムサクリン、アスバラギナーゼ、BCNU、ベンダムスチン、ブレオマイシン、カエリクス（ドキシル）、カルボプラチン、カルムスチン、CCNU、クロラムブシル、シスプラチン、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、シトキサン（4HC）、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダサチニブ、ダウノルビシン、デシタビン、デキサメタゾン、ドキソルビシン、エピルビシン、エストラムスチン、エトポシド、フルダラビン、5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、グリベク（イマチニブ）、ヘキサメチルメラミン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イフォスファミド（4HI）、インターフェロン-2a、イリノテカン、イキサベピロン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキセート、ミトマイシン、ミトキサントロン、窒素マスタード、オキサリプラチン、ペントスタチン、ソラフェニブ、ストレプトゾシン、スニチニブ、タルセバ、タキソール、タキソテール、テモゾロミド、テムシロリムス、タリドミド、チオグアニン、トポテカン、トレチノイン、ベルケイド、ビダザ、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピノレルビン、ポリノスタット、キセロダ（5DFUR）、エベロリムス、ラパチニ

40

50

ブ、レナリドミド、ラパマイシンおよびヴォトリエント（パゾパニブ）。

【0032】

しかしながら、また、この開示する方法を用いて他の数多くの抗ガン剤候補品にも試験を受けさせることができ、それらには、これらに限定するものでないが、アポトーシスをもたらす得るか或はアポトーシスをもたらす能力に関して試験を受けさせる他の非化学療法薬および/または化学品が含まれる。更にその上、本発明の方法の適用を厳格に抗ガン剤候補品に限定するものではなく、むしろ、この開示する方法の態様を用いて数多くの病気の無数の可能な薬剤候補品を試験することができる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

10

以下の説明、添付請求項および添付図に関係させることで本発明の態様の前記および他の特徴、面および利点がより良好に理解されると思われる。

【図1】図1に、アポトーシス段階を通して動くガン細胞の時系列顕微鏡写真を示す。左側の1番目のパネル(1)にアポトーシスを起こす前の細胞を示す。中央のパネル(2)にアポトーシス中の細胞を示し、ブレブ形成が明らかである。右側の最後のパネル(3)にアポトーシスが完了またはほぼ完了した後の細胞を示す。

【図2】図2に、患者の全体的生存率を示す。赤線はM i C K 検定の結果を用いることを基とした治療を受けさせた患者である。青線はM i C K 検定の結果を用いることを基にできなかった治療を受けさせた患者である。曲線中のクロスハッチは打ち切った患者を示す。横座表上の小さな数は患者が各時間点で危険状態であることを示す。ログランク解析により、これらの曲線は統計学的に差がある ( $p = 0.04$ )。 20

【図3】図3に、患者の無再発間隔を示す。赤線はM i C K 検定の結果を用いることを基とした治療を受けさせた患者である。青線はM i C K 検定の結果を用いることを基にできなかった治療を受けさせた患者である。曲線中のクロスハッチは打ち切った患者を示す。横座表上の小さな数は患者が各時間点で危険状態であることを示す。ログランク解析により、これらの曲線は統計学的に差がある ( $p < 0.01$ )。 20

【図4】図4に、乳標本と肺標本の間の比較を示しかつある種類にとってジェネリックまたは特許薬剤のどちらが他方よりも有効であるか否かに関する組織標本の種類の間に差があるかどうかを示すものである。注：乳ガンの場合にはI D ジェネリックおよび特許品に対して1種類のみの薬剤を用いる一方、肺および結腸の場合には複数の薬剤を考慮した。カイ二乗 ( $\chi^2$ ) 解析は、乳の場合の  $\% g \geq p$  (97.7%) は肺の場合のフィッシャー直接確率検定を用いた  $\% (93.8\%)$  ( $p$  値 = 0.57) に比べて統計学的に有意な差はないことを示している。 30

【図5】図5に、乳標本と結腸標本の間の比較を示しかつある種類にとってジェネリックまたは特許薬剤のどちらが他方よりも有効であるか否かに関する組織標本の種類の間に差があるかどうかを示すものである。カイ二乗 ( $\chi^2$ ) 解析は、乳の場合の  $\% g \geq p$  (97.7%) は結腸の場合のフィッシャー直接確率検定を用いた  $\% (71.4\%)$  ( $p$  値 < 0.05) に比べて統計学的に有意な差があることを示している。

【図6】図6に、乳標本と結腸+肺標本の間の比較を示しかつある種類にとってジェネリックまたは特許薬剤のどちらが他方よりも有効であるか否かに関する組織標本の種類の間に差があるかどうかを示すものである。カイ二乗 ( $\chi^2$ ) 解析は、乳の場合の  $\% g \geq p$  (97.7%) は結腸+肺の場合のフィッシャー直接確率検定を用いた  $\% (89.7\%)$  ( $p$  値 = 0.19) に比べて統計学的に有意な差がないことを示している。 40

【図7】図7に、結腸標本と肺標本の間の比較を示しかつある種類にとってジェネリックまたは特許薬剤のどちらが他方よりも有効であるか否かに関する組織標本の種類の間に差があるかどうかを示すものである。最良の特許品 ( $p = 0.16$ ) および最良のジェネリック品 ( $p = 0.45$ ) に関する結腸に対する肺の分布は、肺と結腸に差があることを結論付けるエビデンスは充分ではないことを示している。結腸群の場合にはサンプルサイズが小さかったことからノンパラメトリックウイルクソン検定を用いた。

【図8】図8に、一晚インキュベートする前のウエルプレート内の細胞の顕微鏡写真を示 50

す。

【図 9】図 9 に、15 時間インキュベートした後のウエルプレート内の細胞の顕微鏡写真を示す。

【図 10】図 10 に、37 種類の試験抗ガン剤候補品を様々な濃度で用いた時にそれらに対してガン細胞が示したアポトーシス反応を示す。

【詳細な記述】

【0034】

一般的な M i C K 検定プロトコル

本開示は、分光光度検定を用いて経時的光学密度 (OD) を測定することでガン細胞にアポトーシスを引き起こす抗ガン剤候補品が示す効果を評価することに関する。1 つの態様として、本開示は、この上で引用した米国特許第 6,077,684 号および 6,258,553 号 (両方とも引用することによって全体が本明細書に組み入れられる) に開示されている如きミクロ培養速度論的 (M i C K) 検定と同様な検定で薬剤候補品をガン細胞に加えることを通してそのような抗ガン剤候補品を評価する方法を包含する。

【0035】

1 つの特定態様に従い、抗ガン剤候補品を選択しかつ得た腫瘍標本に由来する少なくとも 1 種のガン細胞 (これを用いて当該薬剤に試験を受けさせる) を選択することでこの検定を進行させることができる。

【0036】

1 つの態様では、当該ガン細胞を培養培地、例えば R P M I などに入れた単細胞懸濁液として懸濁させてもよい。本明細書で用いる如き “単細胞懸濁液” は、細胞が個別または 10 個以下の細胞の塊として分離している状態で 1 種以上の細胞が液体の中に懸濁している懸濁液である。その培養培地に他の成分、例えばウシ胎仔血清またはガン細胞が特異的に必要とする成分などを入れてもよい。このような成分を細胞を検定中、典型的には少なくとも 24 時間から 120 時間以内の間維持するに必要な成分に限定してもよい。

【0037】

懸濁状態の細胞に試験を受けさせる時、サンプルを分光光度用プレートのウエルに入れてもよい。その細胞を光学密度 (OD) の分光光度測定を行っている時に通常はプレート読み器の光線が一度に 1 個のみの細胞層を通過するようないずれかの濃度で懸濁させてもよい。大部分の細胞で用いる濃度は  $2 \times 10^5$  および  $1 \times 10^6$  個の細胞 / mL であり得る。小細胞の場合には濃度を高くしてもよくそして大細胞の場合には濃度を低くしてもよい。適切な細胞濃度をより正確に決定するには、薬剤候補品試験サンプルで用いるべき体積の細胞懸濁液を当該プレートの少なくとも 1 個の濃度試験用ウエルに加えてもよい。そのウエルに追加的培地を薬剤候補品試験中に前以て入れておく場合には、その濃度試験用ウエルに同様に追加的培地を前以て入れておいてもよい。その濃度試験用ウエルを満たした後、そのプレートを遠心分離 (例えば 500 R P M で 30 - 120 秒) にかけることで細胞をウエルの底に沈降させてもよい。その細胞濃度が検定にとって適切であるならば、その細胞は重なり合うことなく単層を形成するはずである。このような結果が達成されるまで細胞濃度を適宜調整してもよい。様々な濃度試験用ウエルを用いることで一度に複数の濃度の細胞に試験を受けさせることができる。

【0038】

細胞が一晩または細胞をプレートに入れてから薬剤候補品検定を始めるまでの間の別の時間中に有意に増殖する可能性のある態様では、それに応じて、薬剤候補品検定を開始する時に細胞が単層を形成するに十分なほど存在するように、最初に細胞濃度を増殖して単層を形成する濃度以下に調整しておいてもよい。

【0039】

適切な細胞濃度を決定した後、プレート内の試験ウエルおよび対照ウエルに適切な体積の培地および適切な数の細胞を充填することを通して薬剤候補品検定を進行させてもよい。他の態様では、ウエルに培地のみを前以てある程度入れておいてもよい。

【0040】

10

20

30

40

50

充填後、細胞をプレート条件に決めた時間、例えば少なくとも12時間、少なくとも16時間、少なくとも24時間または12 - 16時間、12 - 24時間または16 - 24時間適応させてもよい。ある種の細胞の場合には適応期間を省くことも可能であり、例えば白血病/リンパ腫細胞株または他の種類の細胞は一般に個別の細胞として存在させる。適応期間を典型的にはその時間の間に細胞が有意な増殖を経験しないほどの短い時間にする。適応期間は薬剤候補品検定で用いるガン細胞の種類に応じて変わる可能性がある。細胞が生存しかつ健康なままであるに適した条件下で適応を行ってもよい。例えば、当該プレートをCO<sub>2</sub>が5%の雰囲気下の湿ったインキュベーターの中に37℃で入れておいてもよい。ある種の細胞、特に適応期間を設けない種類の細胞、例えば白血病またはリンパ腫細胞株の場合には、プレートを遠心分離（例えば500RPMで2分）にかけることで細胞をウエルの底に沈降させてもよい。

10

#### 【0041】

適応期間の後のウエルに薬剤候補品およびいずれかの対照薬剤または他の対照サンプルを加えてもよい。典型的には、薬剤候補品を当該ウエルに入れる液体の総体積に比べて少ない体積の培地または他の液体に入れて加える。例えば、加える薬剤の体積はウエルに入れる液体の総体積の10%未満であってもよい。いくらか起こる濃度の影響を測定することができるように薬剤候補品を数多くの希釈度で加えてもよい。多くの薬剤候補品は水溶性であり得るが、また、水に容易には溶解しない薬剤候補品に試験を受けさせることも可能である。そのような候補品は適切ないずれかの担体と混合してもよい。好適には、そのような候補品を実際の臨床で用いることが予想される担体と混合してもよい。粘性のある薬剤候補品に試験を受けさせる場合には実質的に希釈する必要がある。強い色を持つ薬剤候補品の場合には、その薬剤候補品だけを入れた試験ウエルのODを監視しそしてこのODを試験サンプルウエルの測定値から差し引くのが有益であり得る。

20

#### 【0042】

薬剤候補品を加えた後の細胞にさらなる短い適応期間、例えば15分から30分間の適応期間を与えてもよい。その細胞を細胞が生存しかつ健康な状態のままであるに適切な条件下に置いてもよい。例えば、当該プレートをCO<sub>2</sub>が5%の雰囲気下の湿ったインキュベーターの中に37℃で入れておいてもよい。この短い適応期間が終了した後の各ウエルの上部に鉱油の層を置くことで培地中のCO<sub>2</sub>を維持しかつ蒸発が起こらないようにしてもよい。

30

#### 【0043】

次に、そのプレートを限定した波長のODを測定するように配置した分光光度計の中に置いてもよい。その分光光度計をODを例えば550から650nmまたは600から650nmの波長で測定するように配置してもよい。或はより特別には分光光度計をODを600nmの波長で読み取るように配置し、各ウエルを所定時間全体に渡って所定の間隔で測定する。例えば、各ウエルが示すODの測定を約24時間から120時間、約24時間から72時間または約24時間から48時間に渡って数秒、数分または数時間の時間枠で定期的（即ち連続的）に行ってもよい。さもなくば、特定の細胞の場合、12時間の如き短い時間の測定で充分であるかもしれない。特定の態様では、測定を5分から10分毎に行ってもよい。細胞の自然発生的死滅を回避する目的でその分光光度計にインキュベーションチャンバを持たせてもよい。

40

#### 【0044】

分光光度データを速度論的単位に変えてもよい。細胞のブレブ形成によって引き起こされるODの変化（測定波長、例えば600nmにおける）を時間の関数としてプロットした時に生じる曲線の傾きを用いて速度論的単位を決定する。速度論的単位の計算に関する具体的情報はKravtsov、Vladimir D. 他、Use of the Microculture Kinetic Assay of Apoptosis to Determine Chemosensitivities of Leukemias, Blood 92:968-980 (1998)（引用することによってあらゆる目的で全体が本明細書に組み入れられる）に示されている。速度論的単位の測定をまた

50

以下により詳細に考察する。所定薬剤候補品が所定濃度で示した光学密度を時間と対比させてプロットしてもよい。このプロットはもし細胞がアポトーシスを起こすならば明確な曲線の上昇を示す。比較として、もし薬剤候補品が当該細胞に対して効果を示さない（例えばそれらが耐性を示す）場合の曲線は薬剤も薬剤候補品も入れなかった対照サンプルに関して得た曲線と同じである。また、アポトーシス以外の理由で起こった細胞死も本検定で測定することができ、これは薬剤候補品スクリーニングによる誤検出をなくするのに有用である。例えば、細胞が壊死するとアポトーシスに関連した曲線とは容易に区別可能な明確な下方に傾く曲線が生じる。その上、一般的な細胞死によってもまた下方に向かう曲線が生じる。

#### 【 0 0 4 5 】

アポトーシス ( K U ) の速度論的単位

薬剤候補品の有効性はそれが改良 M i C K 検定でもたらず速度論的単位の値で決定可能である。K U はアポトーシスを量化するための計算値である。速度論的単位は下記の如く決定可能である：

$$\text{アポトーシス ( K U )} = ( V_{\text{max Drug Candidate Treated}} - V_{\text{max Control}} ) \times 60 \times X / ( O D_{\text{control}} - O D_{\text{blank}} )$$

#### 【 0 0 4 6 】

K U はアポトーシスを量化するための計算値である。各ウェルで得た光学密度 ( O D ) を時間と対比させてプロットする。アポトーシス曲線 ( V m a x ) の最大傾斜度を薬剤で処理したマイクロ培養体の各プロット毎に計算する。次に、それを薬剤を入れなかった対照ウェルの V m a x と比較する ( 薬剤に接触させた細胞の V m a x と同じ時間の時に計算 ) 。便利さの目的で、V m a x に 6 0 を掛けることで m O D / 分による単位を m O D / 時に変換する。そのデータを係数 ( 係数 = X / ( O D<sub>control</sub> - O D<sub>blank</sub> ) ) に対して正規化するが、それを以下に考察する。

#### 【 0 0 4 7 】

係数

この上で述べたように、この係数は、アポトーシスを測定しそして前記アポトーシスを速度論的単位で量化した時に各ウェル毎の細胞の量を正規化するための計算値である。この係数の計算を下記の如く行う：

$$\text{係数} : X / ( O D_{\text{control}} - O D_{\text{blank}} )$$

X = 試験を受けさせた種類の細胞に最適な光学密度値 ( 実験的に決定 )

O D<sub>control</sub> = 全ての対照ウェルの平均光学密度

O D<sub>blank</sub> = 全てのブランクウェルの平均光学密度

#### 【 0 0 4 8 】

係数が 1 . 0 0 0 であることは、ウェル中の細胞濃度が最適であることを意味する。係数値が 1 . 0 0 0 未満であることは、細胞濃度が最適濃度より高いことを意味する。もし係数値が 1 . 0 0 0 より高いならば、それはウェル中の細胞濃度が最適以下であることを意味する。最適な M i C K 検定を行うのに許容される係数値は 0 . 8 から 1 . 5 の範囲である。その値が 0 . 8 以下であるならば、その係数は計算 K U の値を誤って低くするであろう。その値が 1 . 5 以上であると、アポトーシスのシグナルを検出するにはウェル 1 個当たりの細胞の数が充分でないであろう。前記式中の “ X ” は細胞の種類に応じて変わるであろう。固形腫瘍標本の場合のその値は 0 . 0 9 である。大部分の白血病の場合の値は 0 . 1 5 である。C L L ( 慢性リンパ性白血病 ) およびリンパ腫の場合の値は 0 . 2 1 である。

#### 【 0 0 4 9 】

この “ X ” 値を腫瘍の種類に当てはめて実験的に決定する。このように、この係数を様々な濃度の細胞を用いかつそれらを顕微鏡下でウェルが完全に適切に覆われていることを期待しながら検査することで試行錯誤的に生じさせる。適切なウェルを読み取り器で読み取りそして O D が新しい X 値になる。この式に関するさらなる情報を K r a v t s o v 他 ( B l o o d 、 9 2 : 9 6 8 - 9 8 0 ) ( これはこの上で引用することによって本明細書

10

20

30

40

50

に組み入れた)に見ることができる。

【0050】

薬剤候補品がアポトーシスを引き起こすか否かを決定することができることに加えて、本検定を用いて生じさせた速度論的単位値を比較することで、個々の薬剤候補品が同様または現在の薬剤より良好または同じような性能を示すかを決定することができる。また、薬剤候補品を様々な濃度で比較することも可能であり、それによって適切な投薬量の一般的な目安を得ることができる。時には、ある種の薬剤はある種のガンで濃度が低い時よりも濃度が高い時の方があまり良好な性能を示さない可能性がある。薬剤候補品が様々な濃度で示す速度論的単位値を比較することで同様なプロファイルを示す薬剤候補品を識別することができる。

10

【0051】

全体として、抗ガン剤候補品の評価に当該薬剤候補品がガン細胞のアポトーシスに対して示す効果を測定することのいずれかを含めてもよい。効果には、これらに限定するものでないが、アポトーシスの誘導、公知抗ガン剤と比較した時のアポトーシス誘導度合、様々な薬剤候補品濃度におけるアポトーシス誘導度合およびアポトーシスを誘導することができないことが含まれ得る。この抗ガン剤評価検定を用いてまたガン細胞における薬剤に関係しないか或はアポトーシスではないイベント、例えば検定中のガン細胞増殖または細胞壊死などを検出することも可能である。

【0052】

いずれかの速度論的単位値が統計学的に有意な正であることは、薬剤候補品がガン細胞のアポトーシスを誘導する傾向がいくらかあることを示している可能性がある。しかしながら、数多くの臨床目的で、アポトーシスを誘導し得る度合が非常に僅かのみ薬剤候補品または薬剤濃度はあまり興味を持たれない。従って、本開示の特定の態様では、ガン細胞にアポトーシスを臨床的に関連した度合で誘導し得る薬剤候補品を区別する目的で速度論的単位値の閾値を設定してもよい。例えば、その閾値量は1.5、2または3の速度論的単位であってもよい。個々の薬剤候補品または薬剤候補品の濃度で選択する実際の閾値は数多くの要因に依存し得る。例えば、他の薬剤に反応しないか或は有意な否定的副作用を有する薬剤にのみ反応する種類のガンにアポトーシスを誘導し得る薬剤候補品の場合には、低い方の閾値、例えば1.5または2などが受け入れられる可能性がある。また、濃度が高い時に低い効力を示すか或は自身が有意な否定的副作用を有する可能性のある薬剤候補品の場合にも低い方の閾値が受け入れられる可能性がある。既に適切な処置を受けている種類のガンにアポトーシスを誘導し得る薬剤候補品の場合には高い方の閾値、例えば3などが受け入れられる可能性がある。

20

30

【0053】

別の態様では、下記の閾値範囲を用いることができる：

- 0 - 1 KU：非感受性
- 1 - 2 KU：低感受性
- 2 - 3 KU：低 / 中感受性
- 3 - 5 KU：中感受性
- > 5 KU：感受性。

40

好適には、下記の閾値範囲を用いることができる：

- 0 - 1 KU：非感受性、
- 1 - 2.6 KU：低感受性、
- 2.6 - 4.2 KU：低 / 中感受性、
- 4.2 - 5.8 KU：中感受性、
- > 5.8 KU：感受性。

好適にはKU値を  $\geq 7$  にし、より好適にはKU値を  $\geq 8$  にし、更により好適にはKU値を  $\geq 9$  にし、最も好適にはKU値を  $\geq 10$  にする。

【0054】

これらの範囲はガン細胞の統計学的解析を基にして確立したものである。これらの範囲

50



によって特定の種類の細胞に対して試験すべき化学療法薬の相対的比較のベースラインを確立する。試験の結果は酌量すべき要因、例えば：

- ・試験を受けさせるべきサンプルを得てから経過した時間、
- ・試験に利用できる生存可能細胞の量、
- ・標本の微生物混入、
- ・試験を受けさせるべき細胞の品質または生存能力、
- ・細胞の種類、および
- ・最近の治療、例えば化学療法または放射線療法、

などの影響を受け得る。

#### 【0055】

これらの要因は報告すべき速度論的反応の予測値にある程度の融通性があることを示唆している。化学療法薬に対する臨床的感受性はこの上に示した範囲として予測した結果に完全に限定されるものではない。医者は本検定における薬剤誘導アポトーシスのKU測定値を他の重要な要因、例えば患者の病歴、先行する治療の結果、全体的な患者の健康度合、患者の併存疾患、患者の好みばかりでなく他の臨床的要因も用いて個々の患者の治療計画を開発することができるであろう。

#### 【0056】

従って、用いるKU値の個々の範囲は事情、即ち、試験を受けさせるべき腫瘍細胞の個々の種類に応じて、利用すべき個々の薬剤および解析下の個々の患者または患者集団などに依存するであろう。従って、KU値は信頼できる柔軟性のある解析変数に相当し、この開示する方法を実施する人は所定薬剤の効果を評価する適切な測定基準を作り出すことでそれを注文に合わせることができるであろう。

#### 【0057】

##### 薬剤候補品

特定の態様に従う抗ガン剤候補品は、ガン細胞にアポトーシスを誘導する能力に関して評価を受けさせるべきいずれかの化学品1種または2種以上、化合物1種または2種以上または組成物1種または2種以上であり得る。このような候補品には様々な化学的もしくは生物学的実体、例えば化学療法薬、他の低分子、蛋白質もしくはペプチドが基になった薬剤候補品が含まれ、それには化学療法用分子に結合させた抗体もしくは抗体フラグメント、核酸が基になった治療薬、他の生物製剤、ナノ粒子が基になった候補品などが含まれ得る。薬剤候補品は現存薬剤と同じ化学族に入るか或はそれらは新規な化学的もしくは生物学的実体であってもよい。

#### 【0058】

薬剤候補品を単一の化学的、生物学的または他の実体に限定するものでない。それらには様々な化学的もしくは生物学的実体の組み合わせ、例えば提案される組み合わせ治療薬などが含まれ得る。その上、本明細書に示す数多くの例は単一の薬剤候補品を適用する検定に関係しているが、検定をまた複数の薬剤候補品を組み合わせるように実施することも可能である。また、本発明の態様では、様々な薬剤候補品の代謝産物を記述する如き方法で用いることができることを理解することも重要である。

#### 【0059】

2種以上の薬剤候補品、薬剤候補品の2種以上の濃度または薬剤もしくは薬剤候補品の2種以上の組み合わせを単一のプレートを用いた単一の検定で評価することも可能である。様々な試験サンプルを異なるウェルに入れてもよい。個々の態様における試験を受けさせる薬剤候補品の濃度は例えば0.1から10,000  $\mu\text{M}$ の範囲の如何なる濃度であってもよい、或は0.01から10,000  $\mu\text{M}$ の範囲の如何なる濃度であってもよい、或は0.001から100,000  $\mu\text{M}$ の範囲の如何なる濃度であってもよい。試験すべき濃度は薬剤の種類によって変わる可能性があり、上述した例の濃度は限定として解釈されるべきでない、と言うのは、当業者は試験を受けさせるべき個々の抗ガン剤に応じてこの教示した方法および検定を用いる時に適切な濃度を構築する方法を認識するであろうからである。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 0 】

## プレートおよび分光光度計装置

特定の態様では、プレートおよび分光光度計の選択を分光光度計でプレートを読み取ることができるように行ってもよい。例えば、旧式の分光光度計を用いる場合には大型のウエルが備わっているプレートを用いてもよい、と言うのは、そのような装置はウエルが小さいプレートを読み取ることができないからである。より新しい分光光度計はウエルがより小さいプレートを読み取ることができる可能性がある。1つの態様では、各ウエルの底の直径の方が分光光度計の光線の直径よりも小さくないようにする。より具体的な態様では、各ウエルの底の直径が分光光度計の光線の直径の2倍以下になるようにする。このことは各ウエルに入っている細胞の代表的な部分が測定波長、例えば600nmなどで示すODの読みが正確になることを確保するのに役立つ。分光光度計を用いて600nm以外の波長で測定を行うことも可能である。例えば、波長は+/-5または+/-10であってもよい。しかしながら、プレブ形成を区別することができるように他の波長を選択することも可能である。

10

## 【 0 0 6 1 】

分光光度計に装置を操作するか或は結果を記録するためのコンピューターもしくはプログラムを1つ以上含めてもよい。1つの態様では、分光光度計を測定プロセスを制御し、その結果を記録しかつ光学密度を各ウエル毎の時間の関数としてプロットしたグラフを表示または送信する能力を有する1個以上のコンピューターと機能的に連結してもよい。

20

## 【 0 0 6 2 】

組織培養液に適するように考案されたプレートを用いてもよい、或は他のプレートを滅菌または処理してそれらが組織培養液に適合することにも可能である。分光光度計に利用することができない領域、例えば隅などに細胞が凝集するようなプレートはそのような凝集が起こらないようにするプレートに比べてあまりうまく働かない可能性がある。別法として、そのようなプレートの場合にはより多くのガン細胞を加えることで検定中に分光光度計に利用される単層が存在することを確保してもよい。また、底が狭いプレート、例えば面積が半分のCorning Costar（登録商標）96ウエルプレートなども不便にサンプル体積を小さくする必要なくウエルの底に単層が生じるのを促すのに役立つ可能性がある。また、他のプレート、例えば他の96ウエルプレートまたはより小さなウエルプレート、例えば384ウエルプレートなども使用可能である。

30

## 【 0 0 6 3 】

## 改良MICK検定プロトコル

以前に米国特許第6,077,684号および米国特許第6,258,553号に記述されたMICK検定プロトコルとここに開示するMICK検定プロトコルの間には違いが数多く存在し、例えば下記が存在する：

- a. 固形腫瘍サンプル標本の一晩インキュベーション、
- b. 低体積のウエル（固形腫瘍がもたらす細胞の数は血液サンプルのそれより少ないから）、
- c. 細胞濃度を視覚的解釈で調整する、
- d. 細胞がウエルの底に粘着しそして一晩で分散/拡張する、
- e. 熱をむらなく拡散させるために特殊なインキュベーションチャンバを使用、
- f. 細胞をウエルに充填する時にプレートの縁を回避、
- g. 細胞、培地（RPMI + 10%のウシ胎仔血清 + Penstrep）および薬剤をプレートに塗布する時に自動ピペッターを使用、
- h. テンプレートをロボットが認識し得るフォーマットで翻訳するように作り出された専用コードを使用、
- i. プレートに塗布する準備ができていいる高純度の細胞懸濁液を得た時点で細胞単離が終了する、
- j. 細胞濃度を調整する時に細胞カウント数を用いる、
- k. 細胞の濃度を1ml当たり $1 \times 10^6$ 個に調整する、

40

50

- l . 細胞分布を観察するために試験ウエルを完成させる、
- m . 細胞の形状が良好でない場合には各ウエルに細胞をもっと加える、
- n . 試験ウエルが充分（全ての領域を覆う均一に分布した細胞の単層）であると思われる場合には次の段階（プレート塗布）に進む、
- o . 試験ウエルが充分でない場合には細胞の濃度を調整し（細胞を希釈するか或は細胞を濃縮し）そしてウエル内の細胞の分布が満足されるまで新しいウエルを再び試験する、
- p . この時点（上述した段階の後）で、細胞が使い果たされるまでストック溶液を当該プレート内の追加的ウエルに塗布する準備ができています、
- q . 選択した細胞濃度を用いて、プレート内の細胞懸濁液を細胞が少なくとも1サイトスピンおよび可能ならばICC（免疫細胞化学）を行うに十分な数で細胞が維持されるほど多くのウエルの中に分布させる、 10
- r . 自動ピペッターを用いることでプレートの端ウエルを回避しながら細胞を分布させる、
- s . 端ウエルに培地を充填する、
- t . 構成ファイルを作成することで自動ピペッターを用いた時に遭遇する泡問題をなくした（スポッティング（s p o t t i n g））。この特徴は、顕著に高いKU値がもたらされるように傾き値を人工的に高くする検定中に培地内に泡が発生しないようにすることから重要である、
- u . このプレート（上述した段階を受けさせておいた）はこの時点で一晚のインキュベーション（約15時間）を行う準備ができています、 20
- v . そのインキュベーションによって細胞がウエルの底に付着するばかりでなく代謝的に安定になる時間が得られる、
- w . インキュベーションプレートをインキュベーターから取り出した後、そのプレートを倒立顕微鏡で観察することで細胞の分布および生存度を評価する。代表的ウエルの顕微鏡写真を撮る、
- x . 次に、そのプレートは薬剤（例えば可能な抗ガン剤）を自動ピペッターで添加する準備ができています、
- y . 処置するガン専門医（例えば）およびNCCN委員会が薬剤そして次に委員会に認可されていない薬剤（承認適応症外）を選択する、
- z . pHを平衡状態にする目的でインキュベーションを37 および5%のCO<sub>2</sub>下で 30  
30分間行う、
- a a . 空気の交換および蒸発を防止する目的で油を全てのウエルに加える、
- b b . そのプレートを読み取り器の中に置いて検定を開始する、
- c c . その検定は576個の読み取り（48時間、5分間隔）後に自動的に終了し、その設定を必要に応じて調整してもよい、
- d d . もし全ての反応が48時間前に完了したと思われる場合、その検定を手動で停止させることも可能である、
- e e . 係数は下記の如く定義可能である： $X / (OD \text{ 対照} - OD \text{ ブランク})$  [ここで、Xは所定細胞株の最適な値であり、ODは光学密度である]。この係数を生じさせる時、細胞の様々な濃度を用いかつ細胞をウエル内の被覆が完全に適切であることを観察しながら顕微鏡下で検査することで試行錯誤的に係数を生じさせる。適切なウエルを読み取り器で読み取ると、そのODが新しいX値になった、 40
- f f . 訓練を受けた観察者が精製のあらゆる段階で細胞の細胞学的特徴を評価してもよい、
- g g . 訓練を受けた観察者が薬剤の等級付けを解析してもよい、
- h h . 訓練を受けた観察者が最良の薬剤または組み合わせを解析してもよい、そして
- i i . 訓練を受けた観察者が最も有効な薬剤候補品を解析してもよく（また薬剤の代謝を解析することも含めてもよい）そして他の開発薬剤または作用剤を解析してもよい。
- 【0064】
- この上に記述した最新技術に対する違いを従来技術には教示も示唆もなされておらず、 50

この上に開示した技術を実施する如何なる人にも自明のことではない。

【0065】

オリジナルのMICK検定と本バージョンの間の別の差は、オリジナルのMICK検定では細胞がプレートのウェルに付着しないようにしていたが本バージョンではプレートのウェルの壁に付着させることを用いた点である。源が血液でも骨髄でもないガンおよび肉腫の場合には細胞をウェルの壁に付着させる必要がある。白血病およびリンパ腫（源が血液または骨髄のガン）を試験する場合には細胞をウェルの壁に付着させる必要はない。この差の理由は、白血病およびリンパ腫の細胞はインビトロで懸濁液の形態で増殖するからである。それらの細胞を互いに永久的に密接に接触させる必要はない。反対に、固形腫瘍標本が源の細胞では細胞と細胞を接触させかつ細胞をウェルの表面に付着させる必要がある。これによって細胞の生存、時には増殖が刺激される。

10

【0066】

ここに、本開示のMICK検定プロトコルと以前のMICK検定プロトコルの間の差のいくつかを一般的に挙げてきたが、例示として本発明のプロトコルの態様の実施例を示す。本実施例は単に典型的態様を説明する目的で含めるものであり、本発明の幅全体を包含すると解釈されるべきではない。

【実施例】

【0067】

ガン専門医の治療決定による薬剤誘導アポトーシス検定の結果と患者の反応および生存率の相関関係

20

実験プロトコルおよび結果の概要

ガン専門医が計画した治療に対する薬剤誘導アポトーシス検定結果の効果を決定する目的で前向き観察非盲検臨床試験を実施した。患者の生体組織から精製したガン細胞をマイクロ培養速度論的（MICK）検定に入れ、短時間培養することで、単一の薬剤または薬剤の組み合わせが腫瘍細胞のアポトーシスに対して示す効果を測定した。治療計画を最終的に決定するに先立って、その検定の結果をガン専門医に渡した。

【0068】

本発明の1つの態様に従うMICK検定の使用を評価して患者の経過および結果と相互に関係付けた。結果：乳ガン（16）、非小細胞肺ガン（6）、非ホジキンリンパ腫（4）などでMICK検定を達成した44人の患者を評価した。4人の患者にMICK後にアジュバント化学療法を受けさせそして40人に2の治療の中線を用いて苦痛緩和化学療法を受けさせた。ガン専門医は本開示のMICK検定を用いて28人（64%）の患者に化学療法を行い（使用者）そして16人（36%）の患者に化学療法を行わない（非使用者）ことを決定した。苦痛緩和化学療法を受けさせた使用者の場合の完全反応と部分反応の率は44%であるのに対して非使用者の場合には6.7%であった（ $p < 0.02$ ）。全体的生存率の中央値は使用者の場合には10.1ヶ月であるのに対して非使用者の場合には4.1ヶ月であった（ $p = 0.02$ ）。無再発期間は使用者の場合には8.6ヶ月であるのに対比して非使用者の場合には4.0ヶ月であった（ $p < 0.01$ ）。結論：ガン専門医は本発明に従うMICK検定を頻繁に用いる。ガン専門医が本発明のMICK検定の結果を基にして化学療法を用いた時の方がその検定の結果を用いなかった時に比べて経過および結果が統計学的に優れていると思われる。本発明に従うMICK検定およびその結果をガン専門医が入手することができるようになれば、それは患者の治療計画の決定に役立つ。

30

40

【0069】

具体的実験プロトコルおよび詳細な結果

医者が化学療法を計画して開始する前に本開示の態様のMICK検定の結果を知っている場合にその結果を用いる頻度を測定する目的で、観察に基づいた非無作為化多施設前向き試験を実施した。

【0070】

原発性または再発性のあらゆる病期のガンにかかっている患者が実験の対象であった。

50

患者から  $1.0 \text{ cm}^3$  の生存可能腫瘍組織または  $1000 \text{ ml}$  の悪性滲出液または  $5 \text{ ml}$  の白血病性骨髓穿刺液に匹敵する無菌腫瘍標本を採取した。次に、その腫瘍標本に下記の実験プロトコルを受けさせた。

#### 【実施例 1】

##### 【0071】

#### 一般的細胞単離プロトコル

採取してから 24 - 48 時間以内に標本の細刻み、0.25% のトリプシンおよび 0.08% のデオキシリボヌクレアーゼを用いた消化を 37 で 1 - 2 時間実施した後、100 ミクロメートルの細胞濾過器を用いた濾過を実施した。必要ならば、生育不能細胞を密度勾配遠心分離法で除去した。次に、その細胞懸濁液を組織培養フラスコに入れて 37 で 30 分間インキュベートすることでマクロファージを付着によって除去した。上皮腫瘍の場合、T リンパ球用の CD 2 抗体接合電磁ビーズおよび B リンパ球用の CD 19 抗体接合電磁ビーズと一緒にして 30 分間インキュベートすることでリンパ球を除去した。必要ならば、CD 14 抗体接合電磁ビーズを用いて、残存するマクロファージを除去した。最終的細胞懸濁液をウエル 1 個当たり 120 ミクロリットルの一定分量で面積が半分の 96 ウエルプレートに塗布した。そのプレートを二酸化炭素が 5% の湿った雰囲気を用いて 37 で一晩インキュベートした。ウエルの底が十分に覆われるように細胞体積に応じてウエル 1 個当たり  $5 \times 10^4$  から  $1.5 \times 10^5$  個の細胞を植え付けた。

##### 【0072】

急性転化細胞株におけるヒト JURK - MK 2 慢性白血病 (DSMZ、ドイツ) を患者の腫瘍細胞を用いて実施する MICK 検定の陽性対照として用いた。フェノールレッドが入っていない RPMI - 1640 培地をあらゆる培養液で用いた。それにウシ胎仔血清を 10%、ペニシリンを 100 単位 / ml およびストレプトマイシンを 100 ミクログラム / ml 補充した。細胞数および生存率をトリパンブルー色素排除試験法で評価した。

##### 【0073】

混入細胞および壊死細胞を精製で除去した後の各腫瘍細胞調製液に分析を受けさせることで悪性腫瘍の存在を細胞学的に実証した。細胞を十分な数で利用できる場合には、また、免疫細胞化学的染色も実施することで腫瘍表現型のより良好な特徴付けも実施した。あらゆる標本が経験豊かな病理学者による目測によって純度が少なくとも 90% の腫瘍細胞含有量を達成しかつトリパンブルー排除試験法によって 90% の生存率を達成した。

##### 【0074】

以下に記述する標本特異的単離プロトコルを用いて、上述した一般的単離プロトコルを改良することも可能である。

#### 【実施例 2】

##### 【0075】

#### 固形腫瘍細胞特異的単離プロトコル

採取してから 24 - 48 時間以内に標本に下記の如き処理を受けさせることで固形腫瘍から細胞を精製単離した：

- ・ 輸送管から標本を取り出す、
- ・ 13 ml の PBS + 高濃度の抗生物質 (200 単位 / ml のペニシリン + 200  $\mu\text{g}$  / ml のストレプトマイシン) を入れておいたペトリ皿に入れて標本の測定および画像を撮る。前記 PBS + 抗生物質溶液は実験室内で専用プロトコルを用いて一緒に混合しておいた溶液から作成したものである。
- ・ ペトリ皿 (3 個の異なるペトリ皿) の中を 13 ml の PBS + 高濃度の抗生物質 (200 単位 / ml のペニシリン + 200  $\mu\text{g}$  / ml のストレプトマイシン) で 3 回洗う。
- ・ 混入が疑われる場合には、管内で PBS + 高濃度の抗生物質を用いたインキュベーションを 20 分間行う。
- ・ 標本を別のペトリ皿に 1 から 3 ml (標本のサイズに応じて) の RPMI 50% ウシ胎仔血清 (FBS) と一緒に移して細刻みを行う。

1) 次に、標本を細刻みしそして 0.25% のトリプシン (酵素は用いるべき組織に応じ

て変わり得る)および0.08%のデオキシリボヌクレアーゼを用いて37℃で1-2時間消化させる。

- ・ 酵素は研究者が様々な組織を用いた経験によって開発したプロトコルに従って腫瘍の種類に伴って変わるであろう。

- ・ 標本に非腫瘍組織が混入していることが識別された場合には、その部分を外科用メスで除去する。

- ・ サイズが10または21の外科用メスを用いて細刻みを1mmの片になるように行う。

- ・ これらの片を鉗子で集め、15mlの管+10-12mlの酵素(酵素は腫瘍の種類に依存する、表1を参照)に入れ、37℃のインキュベーターに入れて“回転子”上で45-60分間インキュベートする。

- ・ 細刻みで用いたペトリ皿をRPMI(4-5ml)で2-3回洗浄する。

- ・ その洗浄液を15mlの管に入れて、2-3分間沈降させる。

- ・ その上澄み液を取り出して新しい15mlの管に入れ、細胞の生存率を血球計およびトリパンブルー色素で検査する(これによって行うべき処理の困難さおよび/または容易さの初期の指標が得られる)。

- ・ その沈澱物を15mlの管の中に酵素と一緒に入れて回転子上37℃で45-60分間インキュベートする。

- ・ インキュベーション後、上澄み液を集めそして残りの片を37℃の新鮮な酵素の中に戻して更に45-60分間入れたままにする。

2)次に、その標本の濾過を100ミクロメートルの細胞濾過器を用いて実施した。

- ・ 腫瘍の種類および残存する“非ガン細胞組織”の量に応じて、また、40および70μMの濾過器またはフィルコンを用いることも可能である。

- ・ その上澄み液の粘性が高いか或はそれに破片が数多くの含まれていると、それによって細胞濾過器が詰まるであろう。その場合には、50mlの管の上に無菌のガーゼを置くことを利用して“予備濾過”を行うことを決断することも可能である。次に、この上に示した細胞濾過器を用いた濾過過程を進行させる。

- ・ その濾過した細胞懸濁液を1500RPMで5分間遠心分離する。

- ・ その上澄み液を廃棄する。沈澱物に5mlの赤血球細胞溶解溶液( $\text{NH}_4\text{Cl}$ が入っている標準的溶解溶液: $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.15M +  $\text{KHCO}_3$  10mM + EDTA - 4Na 0.1mM、pH7.2)を加え、2-3分間インキュベートした後、5mlのRPMI 10% FBSを加える。

- ・ 1500RPMの遠心分離を5分間行う。その沈澱物をRPMI 10% FBS(沈澱物のサイズに応じて1-10ml)に入れて再懸濁させる。

- ・ 2番目の画分を集めて酵素に入れそしてこの上に示した段階を繰り返す。

- ・ あらゆる画分の生存率を検査しそしてプールする。Wright Giemsaを用いたサイトスピン染色を行うことでその集団の細胞含有量を確かめる。注:これを精製過程中に数多く行う。

3)必要ならば、生育不能細胞を密度勾配遠心分離法で除去する。

- ・ 密度勾配遠心分離法(オブティブレップ):1番目の層=2mlの細胞+4.45mlのオブティブレップ(RPMI中40%)、2番目の層=オブティブレップ(RPMI中22.5%)、3番目の層=0.5mlのRPMI。2000RPMで20分間遠心分離。

- ・ 生存可能細胞層を集め、10mlのRPMI 10% FBSを加え、遠心分離を1500RPMで5分間行う。

- ・ その沈澱物をRPMI 10% FBS(体積は沈澱物のサイズおよび必要な次の段階に依存する)に入れて再懸濁させる。

- ・ ムチンが標本に存在する場合:前記沈澱物を10mlのPBS+20mM DTTに入れて再び懸濁させそしてインキュベーションを4℃で30分間行うことで前記ムチンを崩壊させる。RPMIを用いて1500rpmで5分間洗浄する。その沈澱物をRPMI

10

20

30

40

50

10% FBSに入れて再び懸濁させる。

・ その標本が高度に壊死を示して破片が存在する場合：HBSS中20%のパーコール、遠心分離を800Xgで10分間。

4) 次に、細胞懸濁液を組織培養フラスコに入れて37℃で20分間インキュベートすることでマクロファージを付着によって除去する。

・ 用いるフラスコのサイズおよび量および体積は細胞の量に依存する。例えば：

\* 1 - 5 × 10<sup>6</sup>個の細胞：25cm<sup>2</sup>のフラスコ、各々3 - 4ml

\* 1 × 10<sup>7</sup>個の細胞：75cm<sup>2</sup>のフラスコ、各々8ml

\* 1 × 10<sup>8</sup>個の細胞：175cm<sup>2</sup>のフラスコ、各々20ml

・ インキュベーション後に細胞懸濁液を集め、フラスコをRPMI 10% FBSで3回洗浄し、あらゆる洗浄画分をプールし、遠心分離を1500RPMで5分間行う。

5) 上皮腫瘍の場合、Tリンパ球用のCD2抗体接合電磁ビーズおよびBリンパ球用のCD19抗体接合電磁ビーズを用いて30分間インキュベートすることでリンパ球を除去した。

・ 使用すべきビーズ：Tリンパ球 = CD2、Bリンパ球 = CD19、好中球 = CD15、単球/マクロファージ = CD14、あらゆる白血球 = CD45（塊が存在しない場合にはCD45を使用）。

・ マクロファージの除去を通常はビーズを用いないで付着によって行う。その理由は、もし腫瘍細胞の塊が存在するとそれにはまたマクロファージも含まれている可能性があるからである。マクロファージを除去する目的でビーズを用いると、それによってまた腫瘍細胞も同時に除去される可能性がある。

・ その沈澱物を小体積のPBS 2% FBS（0.2から2ml）に入れて再懸濁させる。

・ そのビーズ懸濁液をPBS 2% FBSで3回洗浄する。

・ そのビーズを細胞懸濁液に加えて室温のインキュベーションを回転子上で30分間行う。

・ その管を磁石の上に置き、1分間待つ。

・ 細胞懸濁液を集め、15mlの管に5mlのRPMI 10% FBSと一緒に入れる。

・ その細胞懸濁液が入っている管を再び磁石の上に置くことで残存するビーズを除去し、細胞懸濁液を集めた後、新しい15mlの管に入れる。

・ 遠心分離を1500RPMで5分間行う。

・ RPMI 10% FBSに入れて再懸濁させるが、その体積は沈澱物のサイズに依存する。細胞数を数え、生存率を測定し、サイトスピンを行うことで細胞含有量を決定する。

6) 必要ならば、CD14抗体接合電磁ビーズを用いて、残存するマクロファージを除去した。

・ この段階を他のビーズをこの上の段階5で概略を示したように処理すると同時に実施することになるであろう。

・ 細胞生存率を確かめる。生存率が80 - 85%未満の場合には追加的段階が必要になり得る。その場合には、段階3に記述した如き密度勾配遠心分離法（オブティブレップ）を繰り返す。これによって死滅した細胞を除去する。

7) 最終的細胞懸濁液を面積が半分の96ウエルプレートまたは384ウエルプレートにウエル1個当たり62.5マイクロリットルの一定分量で塗布するか或は384ウエルプレートにはウエル1個当たり20マイクロリットルの一定分量で塗布する（表2に示すように）。

・ 細胞濃度を1ml当たり1 × 10<sup>6</sup>個の細胞になるように調整する。

・ 試験ウエルを作る。Corning 384の場合 = 15μlのRPMI 10% FBS + 45μlの細胞懸濁液 遠心分離を500rpmで1分間。Greinerの場合 = 2.5μlまたはRPMI 10% FBS + 15μlの細胞懸濁液 遠心分離を5

10

20

30

40

50

0 0 r p mで3 0 秒間。

・ ウエルを倒立顕微鏡で検査。細胞は互いに接触しているべきであり、重なっているべきではない。必要に応じて細胞濃度を濃縮（遠心分離を行って培地を除去）または希釈（培地を添加）で調整する。

・ 最適な細胞濃度になるまで繰り返す。

・ その細胞をウエルプレートに入れる。

8 ) そのプレートを二酸化炭素が5 %の湿った雰囲気を用いて3 7 で一晩インキュベートした。細胞の体積に応じてウエル1 個当たり $5 \times 10^4$ から $1.5 \times 10^5$ 個の細胞を植え付けることでウエルの底が十分に覆われるようにした。

・ そのプレートを湿度室の中でインキュベートしたが、その中の熱分布および湿度を“周縁効果”（ウエル内の細胞分布度が悪い）が低くなるように最適にする。

9 ) 急性転化細胞株におけるヒトJ U R L - M K 2 慢性白血病（D S M Z、ドイツ）を患者の腫瘍細胞を用いて実施するM i C K 検定の陽性対照として用いた。

・ 面積が半分の9 6 ウエルプレートを用いる場合、ウエル1 個当たりの総体積を1 2 0  $\mu$  l にする。

1 0 ) フェノールレッドが入っていないR P M I - 1 6 4 0 培地をあらゆる培養液で用いた。

1 1 ) それにウシ胎仔血清を1 0 %、ペニシリンを1 0 0 単位 / m l およびストレプトマイシンを1 0 0 ミクログラム / m l 補充した。

1 2 ) 細胞数および生存率をトリパンブルー色素排除試験法で評価した。

注：細胞数および生存率の検査を細胞をプレートのウエルに加える前の精製手順中に数回実施する。

1 3 ) 混入細胞および壊死細胞を精製で除去した後の各腫瘍細胞調製液をディフクイックまたはパプ（P a p）染色で分析した。これは興味の持たれる細胞集団を識別しかつ残存する混入細胞の数を少なくすることを可能にするずっと改良された方法である。

1 4 ) 細胞を十分な数で利用できる場合にはまた免疫細胞化学的染色も実施することで腫瘍表現型の特徴付けをより良好にした。

1 5 ) あらゆる標本が経験豊かな病理学者による目測によって純度が少なくとも9 0 %の腫瘍細胞含有量を達成しかつトリパンブルー排除試験法によって9 0 %の生存率を達成した。

### 【実施例3】

### 【0 0 7 6】

#### 血液 / 骨髓細胞特異的単離プロトコル

採取してから2 4 - 4 8 時間以内の標本に下記の如き処理を受けさせた：

- ・ 血液を5 0 m l の管にプールし、
- ・ 染色用として一定分量を取り出し、
- ・ 2 . 8 6 %の酢酸に入れて血球計で細胞数を数え、
- ・ フローサイトメトリー用として一定分量を取り出し、
- ・ その血液を等体積のR P M I で希釈し、
- ・ リンホブレップ遠心分離（2 0 0 0 R P Mで3 0 分間）を行い、4 m l のリンホブレップが8 m l 以下の血液 / R P M I 混合物で覆われており、
- ・ 単核細胞層を集め、1 0 m l のR P M I 1 0 % F B Sを加えそして遠心分離を1 5 0 0 R P Mで5 分間行い、
- ・ その沈澱物を5 m l のR B C 溶解溶液に入れて再懸濁させ、インキュベーションを2 - 3 分間実施しそして5 m l のR P M I 1 0 % F B Sを加え、遠心分離を1 5 0 0 で5 分間行い、
- ・ その沈澱物をR P M I 1 0 % F B Sに入れて再懸濁させ、細胞計数 + サイトスピンを行い、
- ・ フローサイトメトリーの結果に応じて、望ましくない細胞を電磁ビーズ（単球 = C D 1 4、T リンパ球 = C D 2、B リンパ球 = C D 1 9、好中球 = C D 1 5）で除去し、



- ・ その沈澱物を小体積の P B S 2 % F B S ( 0 . 2 から 2 m l ) に入れて再懸濁させ、
- ・ 前記ビーズの懸濁液を P B S 2 % F B S で 3 回洗浄し、
- ・ 前記ビーズを前記細胞の懸濁液に加えて回転子上でインキュベーションを室温で 3 0 分間実施し、
- ・ 前記管を磁石の上に置いて 1 分間待ち、
- ・ 細胞懸濁液を集め、 1 5 m l の管に 5 m l の R P M I 1 0 % F B S と一緒に入れ、
- ・ 前記細胞懸濁液を入れた管を再び磁石の上に置いて残存するビーズを除去し、細胞懸濁液を集めそして新しい 1 5 m l の管に入れ、
- ・ 遠心分離を 1 5 0 0 R P M で 5 分間行い、
- ・ R P M I 1 0 % F B S に入れて再懸濁させるが、その体積は沈澱物のサイズに依存する。細胞計数を行いそして生存率を測定し、サイトスピンを行って細胞含有量を測定し、
- ・ フローサイトメトリー用として一定分量を取り出す。その結果によって興味の持たれる細胞集団の純度が高いことが立証されたならば、細胞濃度を 1 m l 当たり約  $2 \times 10^6$  個の細胞になるように調整しそして係数の試験をマイクロプレート読み取り器を用いて行う。その係数の目標値を 0 . 8 および 1 . 0 の範囲にすべきである。
- ・ 細胞濃度の調整を前記懸濁液の濃縮または希釈で実施する。再び係数の試験を満足される値が得られるまで行う。
- ・ その細胞をプレートに入れて直ちに M i C K 検定手順を始める。

10

20

30

40

50

#### 【実施例 4】

#### 【0077】

#### 滲出液特異的単離プロトコル

採取してから 2 4 - 4 8 時間以内の標本に下記の如き処理を受けさせた：

- ・ 標本を 5 0 m l の管に移しそしてまた 1 0 m l の一定分量も 1 5 m l の管に入れ（その一定分量を 2 0 0 0 R P M の遠心分離に 5 分間かけ、細胞計数を行いそしてサイトスピンを調製することで標本の細胞含有量および数のアイデアを得る）、
- ・ 前記管を 2 0 0 0 R P M の遠心分離に 1 5 分間かけ、
- ・ 上澄み液を除去するが、管の中に ~ 5 m l 残す。前記管を全部一緒にして、必要に応じてほぼ 5 0 m l の管の中で P B S で 1 : 1 に希釈する。遠心分離を 2 0 0 0 R P M で 1 0 分間行う。
- ・ R B C 溶解を 2 - 3 分間行う。その体積は沈澱物のサイズに依存する。R P M I 1 0 % F B S を等体積加える。
- ・ 遠心分離を 1 5 0 0 R P M で 5 分間行い、
- ・ その沈澱物を R P M I 1 0 % F B S に入れて再懸濁させるが、その体積は沈澱物のサイズに依存し、
- ・ 細胞計数を行いそしてそして生存率を測定し、
- ・ 生存率はプロセス全体に重要である。生存率が ~ 7 0 % 未満であるかを測定すべきである。その場合にはオプティブレップ遠心分離を行う。
- ・ 生存率が許容される基準に合致しかつ混入している主要な細胞がマクロファージであるならば、そのような細胞を付着によって除去し、
- ・ 主要な細胞種が高度に混入しておりかつ総細胞数が高い（ $5 \times 10^7$  個以上の細胞数）場合には、1 番目の精製段階を C D 4 5 ビーズ（細胞 1 個当たり 1 個のビーズ）を用いて行う。次に、必要ならばそのビーズを用いた精製を 2 回および 3 回繰り返して行う。
- ・ 細胞計数を行いそして生存率を測定し、
- ・ 必要ならばオプティブレップを病理学者が推奨するように繰り返し、
- ・ 係数調整 - 固形腫瘍標本に関する係数を病理学者の推奨を基にして調整し、
- ・ 最適な細胞濃度が達成されたならば、その細胞をプレートに入れてインキュベーターのインキュベーション用チャンバ（3 7 ）内で一晩インキュベートする。

## 【実施例 5】

## 【0078】

抗ガン剤候補品が介在するアポトーシスを評価するための改良 M i C K 検定

M i C K 検定手順を米国特許第 6, 077, 684 号および米国特許第 6, 258, 553 号（両方の特許とも引用することによって全体が本明細書に組み入れられる）に記述されている方法から脚色した。また、K r a v t s o v V. 他、U s e o f t h e M i c r o c u l t u r e K i n e t i c A s s a y o f a p o p t o s i s t o d e t e r m i n e c h e m o s e n s i t i v i t i e s o f l e u k e m i a s . B l o o d 1998、92:968-980 に記述されている M i C K 検定も引用することによってあらゆる目的で全体が本明細書に組み入れられる。用いる具体的 M i C K 検定プロトコルは実施例 1 - 4 に記述したプロトコルである。

10

## 【0079】

インキュベーションを一晩実施した後、自動ピペッターを用いて化学療法薬を 96 ウエルプレートのウエルに 5 ミクロリットルの一定分量または 384 - ウエルプレートのウエルに 2.5 ミクロリットルの一定分量で加えた。試験を受けさせる薬剤または薬剤組み合わせの数および濃度の数は、腫瘍標本から単離した生存可能悪性細胞の数に依存する。モル規定で測定する薬剤濃度を、細胞を十分に利用できる場合には、所望血液濃度 ± 1 連続希釈として製造業者が示すそれらにした。

## 【0080】

薬剤を添加した後のプレートを二酸化炭素が 5 % の湿った雰囲気 of インキュベーターに入れて 37 °C で 30 分間インキュベートした。次に、各ウエルを無菌の鉱油で覆った後のプレートをマイクロプレート分光光度読み取り器のインキュベーターチャンバの中に入れた。600 ナノメートルの所の光学密度を 48 時間に渡って 5 分毎に読み取って記録した。光学密度の増大（これはアポトーシスと相互に関連する）をアポトーシスの速度論的単位（K U）に変換したが、この変換を専用のソフトウェア P r o A p o を用いることに加えてこの上で引用することによって組み入れた K r a v t s o v 文献（即ち K r a v t s o v V. 他、U s e o f t h e M i c r o c u l t u r e K i n e t i c A s s a y o f a p o p t o s i s t o d e t e r m i n e c h e m o s e n s i t i v i t i e s o f l e u k e m i a s . B l o o d 1998、92:968-980）に記述されている式を用いて行いそしてそれを患者の経過および結果と相互に関連付けた。有効アポトーシスは  $> 1.0$  K U として示した。 $\leq 1$  K U をもたらした薬剤は無効 [即ち以前に実験室で行った K U と薬剤誘導細胞毒性の他のマーカー（培養液中の増殖、チミジン吸収）の相関関係を基にして腫瘍が当該薬剤に耐性を示した] として記述した。

20

30

## 【0081】

本開示の M i C K 検定で得たデータを用いた患者の治療

上述した試験および関連した M i C K プロトコルは有望な多施設非盲検試験であった。いずれかの治療を始める前に得た M i C K 検定結果を常に医者に伝えた。医者は臨床的に望ましいと思われる場合に医者自身が選択した薬剤を用いて患者を治療しそして M i C K 検定で得られたデータのいずれかを用いるか或は用いないのは自由選択であった。腫瘍反応の測定を R E C I S T または他の臨床的判断基準で実施した。検定後の再発までの時間および検査後の生存率に関して患者を評価した。

40

## 【0082】

M i C K 検定結果の使用方法については規則を設けることも指示を行うことも行わなかった。この試験ではガン専門医が検定の結果を用いたか否か、また他のデータ（例えば、エストロゲン受容体解析または H e r 2 試験結果または他の薬剤添加）を用いたか否か或は検定の結果を用いなかったか否かを評価した。検定を用いることに関して指示を行うことも規則を設けることも行わなかったことから、これはガン専門医が治療を計画する時に自由な判断を決定する“現実の世界”においてこの検定がどのように用いられるであろうかに関するより有効な試験であると感じられた。

50

## 【 0 0 8 3 】

## 統計学的評価

この試験の目標の1つは、医者が患者の治療を決定する時に役立たせる目的でM i C K 検定の結果を用いる頻度を識別してM i C K 検定の使用を寛解率、無再発期間および全体的生存率と相互に関係付けることであった。医者に、本検定のデータが返送される前に意図した治療はどんな治療であったか、本検定の報告を受けた後にどんな治療を用いたかそして患者に施す最終的治療を考案する時に本検定を用いたか否かに関する質問書への記述を完了してもらった。データをS A S ソフトウェアにインポートして解析を実施した。同じ薬剤を複数回投与したサンプルの場合、K U 値が最も高い濃度をその薬剤に割り当てた。生存率の解析および無再発期間の解析ではノンパラメトリックカプラン・マイヤー積極限方法を用いた。この解析ではログランク検定を用いて生存率曲線を比較しそしてウイルコクソン検定を用いて中央値を比較した。寛解率の比較では分割表およびフィッシャーの直接確率検定を用いた。

10

## 【 0 0 8 4 】

## 治験審査委員会認可

調査委員はI R B による認可をW e s t e r n I R B (シアトル、ワシントン州) から得た後にこの試験を実施そしてその委員会によって監視されていた。各患者にM i C K 解析の目的で腫瘍標本を提供してもらう前に書面で任意のインフォームドコンセントを提出してもらった。臨床試験をc l i n i c a l t r i a l s . g o v N C T 0 0 9 0 1 2 6 4 で登録した。

20

## 【 0 0 8 5 】

## 結果

患者の特徴を表3に記述する。平均年齢は65歳以上でありそして29人の患者は女性であった。乳ガン(16)、非小細胞肺ガン(6)、非ホジキンリンパ腫(4)などを包含する様々な腫瘍を試験した。医者は苦痛緩和化学療法を受けさせるに適すると思われる患者を極めて頻繁に参加させた。アジュバント化学療法に適すると思われる患者の参加数は4人のみであった。M i C K 検定後の苦痛緩和で用いるように計画された治療の選択中央値は、一次治療から8次治療の範囲の中の二次治療であった。患者経過観察時間の中央値は4.5カ月であった(医者がM i C K 検定を用いなかった患者では4.0カ月であるのに対比して、医者が治療計画の目的でM i C K 検定を用いた患者の場合には5.6カ月であった)。

30

## 【 0 0 8 6 】

医者は頻繁にM i C K 検定の結果を用いた(表4)。少なくともある程度M i C K 検定が基になった化学療法を受けた患者は64%であった。18人(41%)がM i C K 検定のみを用いた。10人の患者(23%)では、医者がM i C K 結果を用いたが、また、この検定で試験を受けさせなかった他の薬剤を用いた情報と組み合わせるか、或は個々の患者の特徴、例えば器官の機能を基にしかつ腫瘍の生物学的特徴を基にしてこの検定の結果に変更を加えた。ガン専門医は最終的治療計画を立てる時にこれらの様々な腫瘍の生物学的特徴を考慮した。例えば、乳ガンの場合、ホルモン受容体陽性の患者には化学療法に加えてホルモン剤も与え、そしてH e r 2 陽性患者には化学療法に加えてトラスツズマブも与えた。e g f r 変異陽性である非小細胞肺ガン患者には薬剤誘導アポトーシス検定の実施を考慮する前にエルロチニブを与えた。C D 2 0 陽性の非ホジキンリンパ腫の患者には化学療法に加えてリツキシマブを与えた。22人の患者(50%)では、M i C K 検定結果を用いることを基に結果として化学療法を変えた。

40

## 【 0 0 8 7 】

この検定を得る目的で患者に署名による同意を得たが、医者が患者の治療を決定する時にこの検定を用いなかった例は16症例であった。1つの例では、患者を臨床試験に参加させた。この検定の結果およびこの検定を基にして提案された治療の報告を受けた後の7人の患者は別の治療を受ける方を好んだ(通常はM i C K 検定で最良であると識別された治療の毒性が理由で)。他の8人の患者の場合、医者は文献または医者個人の経験を基に

50

した別の治療を用いることを好んだ。

【 0 0 8 8 】

乳ガンの場合、治療を受けた患者の最大の小集団、即ち患者の 9 / 1 6 [ 5 6 % ] は M i C K 検定が基になった治療を受けた。3 / 9 では、試験を行わなかった他の薬剤と一緒に M i C K 検定を用い、3 / 9 では M i C K の結果を目標の生物学的療法と組み合わせ、2 / 9 では、M i C K の結果をホルモン療法と組み合わせ、そして M i C K 検定で有効であった薬剤を用いたのは 1 / 9 のみであった。

【 0 0 8 9 】

ジェネリック品の特許品と対比させた化学療法の選択に対する効果

1 6 人の患者 ( 3 6 % ) で、ガン専門医は M i C K 検定を認識する前の特許品を用いた化学療法の意図した使用から検定結果を再吟味した後にジェネリック薬剤の実際の使用に変更した。3 人 ( 7 % ) の患者で、医者はジェネリック薬剤の意図した使用から特許薬剤の実際の使用に変更した。9 人の患者 ( 2 0 % ) では、医者は M i C K 検定の結果を知る前の組み合わせ療法の意図した使用と対比して M i C K 検定後には単一の薬剤療法を用いた。4 人の患者 ( 9 % ) で、ガン専門医は M i C K 検定の結果を知る前の単一薬剤の意図した使用と対比して M i C K 検定結果後に組み合わせ療法を用いた。

【 0 0 9 0 】

医者が M i C K 検定を用いる場合、彼らは 1 6 人の患者で最も高い K U 値をもたらした化学療法を用いた。医者は 2 3 人の患者でアボトースス度合がより高かった ( 2 K U 以上の ) 治療を用いた。

【 0 0 9 1 】

患者の経過および結果に対する効果

苦痛緩和化学療法を受けている患者の場合、完全 + 部分寛解率を M i C K 検定の使用または非使用と比較した ( 表 5 )。医者が M i C K 検定の結果を用いた場合の完全 + 部分寛解率は 4 4 % であった。医者が M i C K 検定を用いなかった場合のそれを完全 + 部分寛解率 ( C R p l u s P R r a t e ) が 6 . 7 % のみであることと対比させた (  $p < 0 . 0 2$  )。

【 0 0 9 2 】

全体的生存率を M i C K 検定結果の使用または非使用と対比させた ( 図 2 )。医者が患者の療法を決定する時に M i C K 検定を用いた場合の全体的生存率中央値は 1 0 . 1 カ月であるのに対比して医者が M i C K 検定結果を用いなかった場合のそれは 4 . 1 カ月のみであった (  $p = 0 . 0 2$  )。

【 0 0 9 3 】

医者が療法を決定する時に M i C K 検定を用いた患者の無再発期間を医者が M i C K 検定結果を用いなかった患者のそれと比較した ( 図 3 )。無再発期間中央値は医者が M i C K 検定を用いた患者の場合の 8 . 6 カ月であったのに対比して医者が M i C K 検定を用いなかった患者の場合のそれは 4 . 0 カ月であった (  $p < 0 . 0 1$  )。

【 0 0 9 4 】

ガン専門医が M i C K 検定を用いた時に観察された有利さが M i C K 検定を基にして選択した化学療法に他の薬剤を追加したことが理由である可能性を排除する目的で、我々は、ガン専門医が M i C K 検定のみを用いた患者の結果をガン専門医が M i C K 検定を用いなかった患者の結果と比較した。完全および部分寛解率は M i C K 検定のみを基にした治療を受けた患者のそれ ( 4 3 . 8 % ) の方が M i C K 検定を用いないで治療を受けた患者のそれ ( 6 . 7 %、 $p = 0 . 0 4$  ) よりも高かった。全体的生存率は M i C K 検定のみを基にした治療を受けた患者のそれ ( 1 0 . 1 カ月の中央値 ) の方が M i C K 検定を用いないで治療を受けた患者のそれ ( 4 . 1 カ月の中央値、 $p = 0 . 0 2$  ) に比べて長かった。無再発期間は M i C K 検定のみを基にした治療を受けた患者のそれ ( 8 . 0 カ月の中央値 ) の方が M i C K 検定を用いないで治療を受けた患者のそれ ( 4 . 0 カ月の中央値、 $p = 0 . 0 3$  ) に比べて長かった。従って、我々は、M i C K 検定の使用 ( および他の薬剤の追加なし ) は観察された向上した経過および結果と関連付けられたと結論付ける。

## 【 0 0 9 5 】

## 考察

この有用性試験は非盲検であることから、ガン専門医に生検から72時間以内に薬剤誘導アポトーシスの結果およびインビトロではどの療法が最良であったかといった実験室の解釈および試験を行った各単一の薬剤もしくは組み合わせが示したアポトーシスの実際のKUを渡した。

## 【 0 0 9 6 】

結果は医者が患者の治療を決定する時にMICK検定を頻繁に用いたことを示している。ガン専門医が化学療法による治療計画を立てる時にこのような予測的生物学的検定を用いた比率が64%であることは臨床的有用性（医者が患者のケアで結果を用いるであろう）の証拠であると見なした。

10

## 【 0 0 9 7 】

この試験の結果は、ガン専門医がこの検定の結果を好んで用いるばかりでなく彼らがそれを用いた時の経過および結果の方が医者がこの検定を用いなかった時の結果よりも優れている可能性があることを示している。このような患者の改善の大きさは統計学的に有意であるに十分なほど大きい。

## 【 0 0 9 8 】

このように経過および結果が改善することを見いだしたことでまたあまり有効ではない治療の使用を回避することができることで治療費の削減ももたらされる可能性がある。ジェネリック薬剤が少なくとも特許薬剤と同じほど有効である可能性がある時には、医者が費用が低いジェネリック薬剤を頻繁に用いた観察結果を提案することはガン専門医にとって重要であり得る。

20

## 【 0 0 9 9 】

このように、医者がMICK検定の結果の情報を得た時には、彼らは患者の治療を計画する時にその結果を頻繁に用いる。医者がその結果を用いると患者の経過および結果がより良好になると思われる。

## 【 実施例 6 】

## 【 0 1 0 0 】

再発性 / 転移性乳ガン（CA）におけるインビトロ化学療法（CT）誘導アポトーシス（APOP）のパターン：一般的マルチソース薬剤（ジェネリック品）と特許単一源薬剤（特許品）の比較

30

## 実験の背景

転移性乳ガンの療法にジェネリック品と特許品の間の選択および組み合わせ化学療法（コンボ）および単一薬剤化学療法の間の比較を含める。この実験によって特許品と対比させたジェネリック品の相対的インビトロ化学療法誘導アポトーシスおよびコンボを単一薬剤と対比させたそれを決定した。

## 【 0 1 0 1 】

## 方法

67人の患者の生体組織から精製した乳ガン細胞を実施例1 - 4に記述したミクロ培養速度論的（MICK）検定を利用した化学療法で用いる短期培養液に入れた。アポトーシスを48時間に渡って5分毎に分析した。アポトーシスをアポトーシスの速度論的単位（KU）で定義した。 $> 1.0$  KUである場合にアポトーシスが有意であるとした。反復分析を基にして $> 0.57$  KUの場合に個々の検定の間の差が有意であるとした。

40

## 【 0 1 0 2 】

薬剤を下記のスキームを基にしてジェネリック品（g）または特許品（p）と分類した：

ジェネリック品 = 5 - フルオロウラシル、カルボプラチン（carboplatin）、シスプラチン、シトキサン、ドキソルビシン、エトポシド、エピルビシン、イホスファミド、メトトレキセート、ミトキサントロン、タキソール、タキソテール、ビンクリスチン、ビノレルビン、ビンブラスチン。

50

特許品＝アブラキサン、ドキシル、エリブリン、ジェムザール、イキサベピロン、オキサリプラチン、ゼロダ。

#### 【0103】

##### 結果

43人の患者はジェネリック品と特許品の比較に関して評価可能であった。ジェネリック品がもたらしたアポトーシス>特許品[36/43人の患者(84%)]および=特許品[6人の患者(14%)]。特許品がもたらしたアポトーシス>ジェネリック品[1人の患者(2%)]。これらの結果を表6および16に示す。また、表7に更に乳ガン標本の患者の特性も示す。

#### 【0104】

分類内比較(In-class comparisons)により、エピルピシンがもたらした平均アポトーシス>ドキソルピシン( $P=0.01$ )、シスプラチンがもたらしたアポトーシス>カルボプラチン( $P<0.01$ )、ピノレルピンがもたらしたアポトーシス>ピンクリスチン( $P=0.02$ )、ドセタキセルがもたらしたアポトーシス>ナブ-パクリタキセル( $P=0.01$ )であったが、ドセタキセルおよびパクリタキセルによるアポトーシスは差がなかった( $P=0.85$ )。前記および他の詳細な比較を表8-33に見ることができる。

#### 【0105】

しかしながら、個々の患者の場合、患者の中の37%ではドセタキセルがもたらしたアポトーシス>パクリタキセルであったが、31%ではパクリタキセルの方がドセタキセルよりも良好であった。コンボの場合、25%でシクロホスファミド+ドキソルピシンがもたらしたアポトーシス>単一の薬剤であったが、67%では単一の薬剤がもたらしたアポトーシス=または>シクロホスファミド+ドキソルピシンであった。33%ではシクロホスファミド+ドセタキセルがもたらしたアポトーシス>単一の薬剤であったが、66%では単一の薬剤がもたらしたアポトーシス=または>シクロホスファミド+ドセタキセルであった。前記および他の詳細な比較を表8-33に見ることができる。

#### 【0106】

##### 結論

ジェネリック品がもたらしたアポトーシスはしばしば特許品がもたらしたアポトーシスに等しいか或はそれよりも良好である。個々の患者の場合、単一の薬剤がもたらしたアポトーシスの方がしばしばコンボのそれよりも高かった。この開示するMICKによるアポトーシス検定によって、ジェネリック品または単一の薬剤の方が特許品またはコンボより高いアポトーシスをもたらず転移性乳ガンにかかった個々の患者を識別することができる。このような差を用いると結果として医療費を有意に削減することができる可能性がある。

#### 【実施例7】

#### 【0107】

一般的マルチソース(ジェネリック品)化学療法(CT)薬剤が特許単一源(特許品)薬剤と同じほど有効か? 非小細胞肺癌(NSCLC)、結腸直腸ガン(結腸ガン)におけるインビトロCT-誘導アポトーシス(APOP)を再発性/転移性乳ガン(乳ガン)のそれと比較した時のエビデンス

##### 実験の背景

我々は、再発性または転移性乳ガンにかかった患者から採取したガン細胞が示すジェネリック品によるアポトーシスがしばしば特許品によるそれと同じまたは良好であることを実証した(この上で考察した実施例6)。我々は、NSCLCにかかっている患者および結腸ガンにかかっている患者におけるインビトロアポトーシスに対して行ったそのような観察を比較した。

#### 【0108】

##### 方法

患者の生体組織から精製した腫瘍細胞を実施例1-4に記述したミクロ培養速度論的(

10

20

30

40

50

M i C K ) 検定で短期培養液に入れた。アポトーシスを 48 時間に渡って 5 分毎に分析した。アポトーシスをアポトーシスの速度論的単位 ( K U ) で定義した。  $> 1.0$  K U の場合にアポトーシスが有意であるとし、反復分析を基にして  $> 0.57$  K U の場合に個々の検定の間の差が有意であると定義した。乳ガン、結腸ガンおよび N S C L C の結果を比較した。

#### 【 0 1 0 9 】

薬剤を下記のスキームを基にしてジェネリック品 ( g ) または特許品 ( p ) と分類した：

ジェネリック品 = シトキサン、5 - フルオロウラシル、シタラビン、カルボプラチン、カルボプラチン / タキソール、カルボプラチン / タキソテル、シスプラチン、シスプラチン / タキソール、シスプラチン / タキソテル、エピルビシン / エトポシド、エトポシド、イダルビシン、イホスファミド、イリノテカン、メルファラン、メトトレキセート、ミトマイシン、ミトキサントロン、トポテカン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンノレルビン。

特許品 = 5 - フルオロウラシル / イリノテカン / オキサリプラチン、5 - フルオロウラシル / オキサリプラチン、アリムタ、アリムタ / タキソール、アリムタ / カルボプラチン、アリムタ / シスプラチン、シスプラチン / ジェムザール、イリノテカン / ゼローダ、アリムタ / ジェムザール、グリベク、オキサリプラチン / ゼローダ、ソラフェニブ、スニチニブ、タルセバ、ゼローダ、アブラキサン、ジェムザール、オキサリプラチン。

#### 【 0 1 1 0 】

結果

N S C L C にかかっている 41 人の患者、結腸ガンにかかっている 8 人の患者および乳ガンにかかっている 67 人の患者から成功裏に培養液を得た。N S C L C の 25 / 32 人 ( 78 % ) の患者、結腸ガンの 4 / 7 人 ( 57 % ) の患者および乳ガンの 36 / 43 人 ( 84 % ) の患者でジェネリック品がもたらしたアポトーシスの方が特許品のそれよりも大きかった。N S C L C の 5 人 ( 16 % ) の患者、結腸ガンの 1 人 ( 14 % ) の患者および乳ガンの 6 人 ( 14 % ) の患者でジェネリック品がもたらしたアポトーシス = 特許品であった。N S C L C の 2 人 ( 6 % ) の患者、結腸ガンの 2 人 ( 29 % ) の患者および乳ガンの 1 人 ( 2 % ) の患者で特許品がもたらしたアポトーシスの方がジェネリック品よりも大きかった。薬剤が有意なアポトーシスをもたらさなかった ( K U が 1.0 未満 ) の N S C L C 、結腸ガン、乳ガンの患者数は 0 であった。特許品がもたらしたアポトーシスは乳ガンの場合よりも結腸ガンの場合の方が大きかった (  $p < 0.05$  )。これらの結果を表 6 ( あらゆる病気の標本 )、表 16 ( 乳ガン標本 )、表 34 ( 肺ガン標本 )、および表 35 ( 結腸ガン標本 ) に見ることができる。ジェネリック薬剤または特許薬剤のいずれの方がより有効であるかに関する試験を受けさせた組織標本の種類の間の統計学的有意さの比較を図 4 - 7 に見ることができる。

#### 【 0 1 1 1 】

結論

インビトロでは N S C L C 、結腸ガンおよび乳ガンの患者の大部分でジェネリック薬剤は特許薬剤に等しいか或はそれより良好なアポトーシスをもたらし能力を有している。ジェネリック薬剤が少なくとも特許薬剤と同じほど有効である頻度は病気によって変わり、乳ガンの場合の方が結腸ガンよりも高かった。しかしながら、M i C K アポトーシス検定によってどの個別の患者に特許薬剤の使用が必要であり得るかを識別することができる。このような結論は、これらのインビトロ結果を立証する予測的な臨床試験は正当であることを証明するものである。このアポトーシス検定を基にしてジェネリック薬剤の使用が増加することは医療費の制御に役立つ可能性がある。

#### 【 実施例 8 】

#### 【 0 1 1 2 】

乳ガン、結腸ガンおよび非小細胞肺ガンにおいて化学療法誘導アポトーシス検定を用いることによる費用節減

## 実験の背景

米国では化学療法の費用が劇的に高くなってきている。我々は、改良化学療法誘導アポトーシス検定（ミクロ培養速度論的またはM i C K検定）を開発したことをこの上に示した実施例1 - 7で実証した。化学療法による治療を計画する時にこの検定を用いるとそれに伴って臨床的経過および結果が改善すること、即ち寛解率が改善すること、再発までの時間が長くなることおよび生存期間が長くなることが分かった（実施例5）。この上に示した実験ではまたこの検定では一般的マルチソース薬剤を用いた時の薬剤誘導アポトーシスの方がしばしば特許単一源薬剤を用いた時のアポトーシスより大きいまたはそれに相当することも示された（実施例5 - 7）。従って、乳ガン、結腸ガンおよび非小細胞肺ガンの患者を治療する時にM i C K検定を用いて特許単一源薬剤を一般的マルチソース薬剤に置き換えることによってもたらされる得る費用節減を推定する目的でこの実験を実施した。我々は、1つの薬剤候補品を用いた時に結果としてもたらされるであろう金銭的差（別の薬剤と対比した時の）を示す目的で一般的用語である金銭的結果を用いる。もし例えば選択した薬剤（しばしばジェネリック品）の方が比較特許同等品に比べて相対的に安価であるならばこのような金銭的結果は患者または医療制度にとって有益であり得る。選択したジェネリック薬剤の方が特許同等品よりも安価であるシナリオでは、そのような金銭的結果（例えばジェネリック品を用いた時の費用と特許品を用いた時の費用の差）を費用節減と称することができるであろう。しかしながら、そのような金銭的結果は結果として費用節減をもたらす必要はない、と言うのは、K U値が高い方の薬剤は相対的に費用が高い薬剤候補品であり得るからである。そのような場合にはより高価な薬剤が選択されるであろうことから、M i C K検定を基にして患者に用いるように当該薬剤候補品を選択した時の金銭的結果は相対的に費用の損失をもたらすであろう。一般的な金銭的結果の用語はまた更に以下に詳細に示す平均薬剤節減、検定で調整した平均薬剤節減および正味の平均薬剤節減の統計学を用いることでも記述可能である。

## 【0113】

## 方法

患者の生体組織から精製した腫瘍細胞を実施例1 - 4に記述したミクロ培養速度論的（M i C K）検定で用いる短期培養液に入れた。即ち、少なくとも生存可能腫瘍組織が0.5 cm<sup>3</sup>、針生検が5個または悪性滲出液が1000 ml入っている無菌の腫瘍標本を得た。採取から24 - 48時間以内に標本の細刻み、0.25%のトリプシンおよび0.08%のデオキシリボヌクレアーゼを用いた消化を37℃で1 - 2時間行った後に100ミクロメートルの細胞濾過器に通す濾過を実施した。必要ならば、生育不能細胞を密度勾配遠心分離法で除去した。次に、その細胞の懸濁液を組織培養フラスコに入れて37℃で30分間インキュベートすることでマクロファージを付着によって除去した。上皮腫瘍の場合には、Tリンパ球用のCD2抗体接合電磁ビーズおよびBリンパ球用のCD19抗体接合電磁ビーズと一緒にしてインキュベーションを30分間行うことでリンパ球を除去した。必要ならば、CD14抗体接合電磁ビーズを用いて、残存するマクロファージを除去した。最終的細胞懸濁液をウエル1個当たり120ミクロリットルの一定分量で96ウエルまたは面積が半分の384ウエルプレートに塗布した。そのプレートを二酸化炭素が5%の湿った雰囲気を用いて37℃で一晩インキュベートした。ウエルの底が完全に覆われるように細胞体積に応じてウエル1個当たり $5 \times 10^4$ から $1.5 \times 10^5$ 個の細胞を植え付けた。急性転化細胞株におけるヒトJ U R L - M K 2慢性白血病（D S M Z、ドイツ）を患者の腫瘍細胞を用いて実施するM i C K検定の陽性対照として用いた。フェノールレッドが入っていないR P M I - 1640培地をあらゆる培養液で用いた。それにウシ胎仔血清を10%、ペニシリンを100単位/mlおよびストレプトマイシンを100ミクログラム/ml補充した。細胞数および生存率をトリパンブルー色素排除試験法で評価した。混入細胞および壊死細胞を精製で除去した後の各腫瘍細胞調製液を病理学者がヘマトキシリン/エオシン染色サイトスピン調製液を用いて分析することで悪性腫瘍の存在を細胞学的に実証した。細胞を十分な数で利用できる場合には、また、免疫細胞化学的染色も実施することで腫瘍表現型のより良好な特徴付けも実施した。病理学的評価によって腫瘍標本



に含まれている腫瘍細胞含有量は少なくとも90%でありかつトリパンブルー排除試験法による生存率は90%であることで評価可能であった。

【0114】

インキュベーションを一晚実施した後、化学療法薬を96ウエルプレートのウエルに5マイクロリットルの一定分量で加えた。試験を受けさせる薬剤または薬剤組み合わせの数および濃度の数は、腫瘍標本から単離した生存可能悪性細胞の数に依存する。モル規定で測定する薬剤濃度を、細胞を十分に利用できる場合には、所望血液濃度 $\pm 1$ 連続希釈として製造業者が示すそれらにした。薬剤を添加した後のプレートを二酸化炭素が5%の湿った雰囲気インキュベーターに入れて37℃で30分間インキュベートした。次に、各ウエルを無菌の鉱油で覆った後のプレートをマイクロプレート分光光度読み取り器(BioTek装置)のインキュベーターチャンパの中に入れた。600ナノメートルの所の光学密度を48時間に渡って5分毎に読み取って記録した。光学密度の増大(これはアポトーシスと相互に関連する)をアポトーシスの速度論的単位(KU)に変換したが、この変換を専用のソフトウェアProApoを用いることに加えてこの上に記述したフォーマットを用いて行った。有効アポトーシスは $> 1.0$  KUとして示した。 $\leq 1$  KUをもたらしした薬剤は無効[即ち以前に実験室で得たKUと薬剤誘導細胞毒性の他のマーカー(培養液中の増殖、チミジン吸収)の相関関係を基にして腫瘍が当該薬剤に耐性を示した]として記述した。

10

【0115】

研究期限までに完了した再発性病の乳ガン、結腸ガンまたは非小細胞肺ガンの患者から得たあらゆる検定の結果を分析した。研究が評価可能であったのは、この検定で特許単一源薬剤および一般的マルチソース薬剤の両方を試験した場合のみであった。アポトーシスが比較薬剤のそれよりも0.57 KU以上高い時に薬剤が優れていると定義した。ある薬剤によるアポトーシスが2番目の薬剤の0.57 KU以内の場合に同等であると定義した。ある薬剤によるアポトーシスが2番目の薬剤よりも0.57単位以上低い場合に劣ると定義した。

20

【0116】

化学療法の費用の評価を6サイクルの治療に要したメディケア支払い金を用いて行った(2011年の第四四半期の支払い計画を基に)。1化学療法サイクルを3または4週間の治療で構成させた(当該薬剤または組み合わせに応じて)。患者の表面積は $1.8 \text{ m}^2$ であると推定した、と言うのは、それがヒトの平均的な大きさであるからである。この測定を用いて当該薬剤の投薬量を計算した。

30

【0117】

特許単一薬剤源はナブ-パクリタキセル、ゲムシタビン、オキサリプラチン、カペシタビン(capcitabine)、イキサベピロン、エルビリン、リボソームドキソルビシンおよびベメトレキセドであった。

【0118】

一般的マルチソース薬剤はシクロホスファミド、ドキソルビシン、エピルビシン、パクリタキセル、ドセタキセル、シスプラチン、カルボプラチン、イリノテカン、トポテカン、ビノレルビンおよびビンブラスチンであった。

40

【0119】

乳ガン用の特許薬剤または組み合わせはナブ-パクリタキセル、カペシタビン(capcitabine)およびゲムシタビンであり、結腸ガンの場合は5-フルオロウラシルとロイコボリンとオキサリプラチンそして非小細胞肺ガンの場合はベメトレキセドとシスプラチンおよびゲムシタビンとシスプラチンであった。

【0120】

乳ガンの場合のジェネリック薬剤または組み合わせはビノレルビン、ドセタキセルとシクロホスファミドおよびエピルビシンとシクロホスファミドであり、結腸ガンの場合は5-フルオロウラシルとロイコボリンとイリノテカンであり、そして非小細胞肺ガンの場合はカルボプラチンとパクリタキセル、ビノレルビンまたはドセタキセルであった。

50

## 【 0 1 2 1 】

各薬剤または組み合わせの 6 サイクルの医療支払い高を計算した後、各ガンに関する特許薬剤の平均およびジェネリック薬剤の平均を比較した。

## 【 0 1 2 2 】

平均薬剤節減は平均特許薬剤費用から平均ジェネリック薬剤費用を引いた差であると定義した。検定で調整した時の平均薬剤節減は薬剤節減に特許薬剤よりもジェネリック薬剤が優れているか或は等しい ( M i C K 検定で決定した時に ) 頻度を掛けた値として定義した。正味平均薬剤節減は検定で調整した時の平均薬剤節減から \$ 5 0 0 0 ( M i C K 検定の推定費用 ) を引いた値であると定義した。費用節減パーセントは正味の薬剤節減を平均特許薬剤費用で割った値であると定義した。下記の式にこれらの関係を例示する：

平均薬剤節減 = 平均特許薬剤費用 - 平均ジェネリック薬剤費用

検定で調整した時の平均薬剤節減 = ( 平均特許薬剤費用 - 平均ジェネリック薬剤費用 ) × ジェネリック薬剤が特許薬剤より優れているか或は等しい頻度

正味の平均薬剤節減 = ( 平均特許薬剤費用 - 平均ジェネリック薬剤費用 ) × ジェネリック薬剤が特許薬剤より優れているか或は等しい頻度 - M i C K 検定の費用

## 【 0 1 2 3 】

統計学的分析

各ガン毎に最も幅広く用いられている 3 種類の治療プログラムに関して決定を行った。次に、各治療の標準的な平均投薬量に加えて個々の患者当たりの各ガンの医療的に許容される費用を決定した。次に、M i C K 検定を実施し、そしてその結果によって様々なガンの種類を基にした最良の治療計画を確認することができた。次に、これらの M i C K 検定によって、通常の治療費用に比べた時の最良の治療計画を推定した。この比較を行った後の結果および M i C K 検定結果を基にして選択した最良の治療計画を国家承認ガン費用コンサルタントに再吟味してもらった。

## 【 0 1 2 4 】

結果

結腸ガンの 7 人の患者、非小細胞肺ガンの 3 2 人の患者および乳ガンの 4 3 人の患者が評価可能であった ( 表 6 および実施例 7 に示すように ) 。この表は結腸ガンの 7 1 % 、乳ガンの 9 8 % および非小細胞肺ガンの 9 4 % において一般的マルチソース薬剤が特許単一源薬剤に等しいか或はそれよりも優れていたことを示している。特許薬剤の方がより大きな薬剤誘導アボーションをもたらしたのは結腸ガン患者の 2 9 % 、乳ガン患者の 2 % および非小細胞肺ガン患者の 6 % であった。

## 【 0 1 2 5 】

次に、薬剤毎の治療費用を前記方法に記述したようにしてモデル化した。その結果は表 3 6 および表 3 7 に示すように薬剤単独 ( 化学療法処方、対症療法薬、腫瘍検査、入院費、緊急医療を除く ) の場合の 6 カ月間の治療費に差があることを示していた。

## 【 0 1 2 6 】

3 種類のガン全部においてジェネリック薬剤を特許薬剤に置き換えることによって実質的な節減がなされた。

## 【 0 1 2 7 】

検定で調整した時の平均薬剤節減は前記ガンの各々で高いままであった ( 表 3 6 ) 。患者一人当たりの推定正味節減は \$ 8 , 3 2 1 から \$ 2 0 , 3 3 8 に及んで多様であった。費用節減パーセントは 4 2 . 8 % から 5 4 % であった。本発明の方法を基にすると、乳ガンの治療は 4 3 % の節減であることが証明され、結腸ガンの治療は 5 4 % の節減であることが証明され、そして非小細胞肺ガンの治療は 4 7 % の節減であることが証明されたことになる。

## 【 0 1 2 8 】

考察

この試験は、本発明の 1 つの態様の薬剤誘導アボーション検定を用いると結果として実質的な費用節減がもたらされ得ることを示している ( 表 3 6 ) 。これにより、本検定が存

10

20

30

40

50

在しない時には全ての医者が特許薬剤または組み合わせを用いそして医者が本検定の結果を知った時にはその医者は本検定の指針に従いそしてそれらが特許薬剤および組み合わせよりも良好または等しい場合にはジェネリック薬剤または組み合わせを用いそして特許薬剤または組み合わせが本検定で優れている場合にはそれらを用いるであろうと推定する。

#### 【0129】

この試験により、全ての医者は本薬剤誘導アポトーシス検定で最良であった薬剤を用いるだろうと推定する。この上に示した実施例（実施例5）において、医者は64%の確率で本薬剤誘導アポトーシス検定の最良の結果を用いることを見いだした。従って、正味の費用節減（表36で推定）はほぼ36%だけ低下する可能性がある。しかしながら、実施例5に示した以前の試験を進めるにつれて、本検定の指針に従う医者の数が増加し、このことは、本薬剤誘導アポトーシス検定の結果の利用率64%は恐らく最低限の推定値であることを示している。

10

#### 【0130】

また、潜在的な費用節減は本検定で試験を受けさせた化学療法薬に関してのみであることも認識されるべきである。より多くの特許薬剤が特定の病気（例えば乳ガン）で利用可能になるにつれて、特許薬剤により大きく反応する患者のパーセントが増える可能性があり、従って正味の費用節減が少なくであろう。また、ある種の特許薬剤はジェネリック品（例えば結腸ガン）になる可能性があり、従って本検定を用いることによる費用の差が小さくなりかつ潜在的費用節減の影響が小さくなる可能性もある。

20

#### 【0131】

それにも拘らず、この試験は、本発明の1つの態様の薬剤誘導アポトーシス検定が腫瘍学団体で幅広く実施されるようになればその使用がより幅広くなる結果として患者および医療制度に対する費用が実質的に節減される可能性が高いことを示唆している。より重要なことは、費用が低くなることばかりでなく、実施例5に示したように、医者が患者の治療を計画する時にここに開示した態様のM i C K検定を用いると患者の経過および結果がより良好になったことである。本発明の1つの態様に従うM i C K検定を用いるとそれに伴って完全および部分寛解率が統計学的に有意に高くなり、再発までの時間がより長くなりかつ生存期間がより長くなったことである（実施例5）。

#### 【0132】

従って、ここに開示したM i C K薬剤誘導アポトーシス検定を用いると乳ガン、結腸ガンおよび肺ガンの各患者に有力な治療を識別することが可能になる。この開示する検定を用いることで選択した治療はより良好な経過および結果をもたらしかつまた費用を低くする。この記述するM i C K検定は医療改革および患者に合わせた医療において重要なツールになるであろう。

30

#### 【実施例9】

#### 【0133】

##### 顕微鏡実験

請求する如き方法で顕微鏡を用いることが有効であることを示す実験を実施した。顕微鏡写真（図8および9）はそれぞれ一晚インキュベートする前および一晚インキュベートした後の細胞の分布および細胞の生存度を示している。従って、顕微鏡写真を用いて細胞の生存率を評価することができそしてそれは細胞を単離/精製する方法の最終段階であるとなすことができるか或はM i C K検定の開始であるとなすことができるであろう。

40

#### 【0134】

図8は、一晚インキュベートする前のプレートの1つのウェルに入っている細胞の顕微鏡写真である。図9はインキュベーションを一晚15時間行った後の同じウェルの顕微鏡写真である。図9に示した細胞の方が楕円形で若干平らであるように見える、と言うのは、それらはその時点でウェルの底に付着しているからである。図9は本方法における1時点のウェル内の細胞の状態を示しており、その時点の抗ガン剤候補品はその時点でウェルに添加する準備ができている。

#### 【実施例10】

50

## 【 0 1 3 5 】

患者に特有のガン細胞の試験

ある特定の患者にとって最も有効である潜在的抗ガン剤候補品はどれであることを確かめるための実験を実施した。このように、この実験ではこの開示する方法および検定が個人のガン治療のプロトコルを作り出すに有効なツールであることを立証する。

## 【 0 1 3 6 】

この実験を55歳の女性の脾臓および腹部腫瘍生検標本から採取した腫瘍細胞に対して実施した。この腫瘍標本の原発は未知であった。この実験を37種類の可能性のある抗ガン剤、前記薬剤の組み合わせおよび前記薬剤の様々な濃度の有効性を試験する目的で本開示に従うM i C K検定を用いることで構成させた。

10

## 【 0 1 3 7 】

その結果を基にすると前記患者に最も有効な単一薬剤はシスプラチンである。シスプラチンが示したK U値は10 K U以上であった(表38)。しかしながら、この白金が基になった薬剤のいずれかを単一薬剤として用いることは非常に有効であろう。また、白金が基になっていない薬剤としてのスニチニブまたはシトキサンも非常に有効な結果を与え、もしその患者が白金に耐えることができないならばそれらも良好な代替品であろう。

## 【 0 1 3 8 】

M i C K検定におけるアポトーシス読み取り値が5 . 0 K U以上であることは非常に感受性が高いことに伴って良好な臨床反応をもたらされると見なされる。全ての薬剤および薬剤組み合わせに生存可能対照細胞株に対する対照試験を受けさせた結果、それらは適切な度合のアポトーシスを誘導することが分かった。アルキル化剤であるシクロホスファミドおよびイフォスファミドはそれぞれ肝臓で代謝による変換を受けてそれらの有効な代謝産物である4 H Cおよび4 H Iになる必要があり、従ってそれらをインビトロで直接試験するのは不可能であることを注目すべきである。M i C K検定ではそれらの有効な代謝産物である4 H Cおよび4 H Iのそれぞれを用いた。

20

## 【 0 1 3 9 】

この実験ではまた37種類の抗ガン剤候補品の様々な濃度も試験し、このデータを図10に見ることができる。この試験を受けさせた抗ガン剤のいくつかは濃度に応じてアポトーシスに対して異種反応をもたらす一方で他の薬剤候補品は濃度を変えても反応を示さないことを観察することができた。

30

## 【 0 1 4 0 】

【表 1】

表 1. 標本の腫瘍の種類に対する酵素利用の依存性

腫瘍の種類	第一選択の酵素 + デオキシリボヌクレアーゼ 0.008%	他の酵素の可能性 + デオキシリボヌクレアーゼ 0.008%
膀胱	コラゲナーゼ IV 300 U/ml	
乳	コラゲナーゼ IV 300 U/ml	コラゲナーゼ III 200 U/ml
頸	トリプシン 0.25%	
結腸	コラゲナーゼ I 300 U/ml + ディスパーゼ 1 U/ml	トリプシン 0.25%
子宮内膜	トリプシン 0.25%	---
腎臓	コラゲナーゼ IV 300 U/ml	---
胃	トリプシン 0.25%	---
平滑筋肉腫	トリプシン 0.25%	コラゲナーゼ IV 300 U/ml
肝臓	コラゲナーゼ IV 300 U/ml	
肺	コラゲナーゼ IV 300 U/ml	---
黒色腫	コラゲナーゼ IV 300 U/ml	
卵巣	トリプシン 0.25%	---
脾臓	コラゲナーゼ IV 300 U/ml + ヒアルロニダーゼ 0.1 U/ml	---
前立腺	コラゲナーゼ I 300 U/ml	---
軟組織肉腫	トリプシン 0.25%	---
胸腺	コラゲナーゼ I 300 U/ml	---

10

20

30

【 0 1 4 1 】

【表 2】

表 2. 最終的細胞懸濁液塗布プロトコル

	96 ウエルプレート <i>Corning# 3696</i>	384 透明プレート/ <i>Corning# 3701</i>	384 黒色プレート/ <i>Greiner # 788091</i>
予備充填培地	30 $\mu$ l	15 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l
細胞懸濁液	90 $\mu$ l	45 $\mu$ l	15 $\mu$ l
薬剤	5 $\mu$ l (25X)	2.5 $\mu$ l (25X)	2.5 $\mu$ l (8X)
油	30 $\mu$ l	15 $\mu$ l	7 $\mu$ l

40

【 0 1 4 2 】

【表 3】

表 3. 患者の特徴

患者数	44
年齢(平均)	65.1 歳
性別	29 人の女性
腫瘍の種類	
乳	16
非小細胞肺	6
非ホジキンリンパ腫	4
脾臓	3
卵巣	2
皮膚	3
他	10
一般状態(ECOG 平均)	1.3
治療の選択	
アジュバント	4
一次	16
二次	9
三次	5
四次	1
五次またはそれ以上	5

10

20

30

【 0 1 4 3 】

【表 4】

表 4. MiCK 検定使用のパターン

医者が MiCK 検定を使用	28
検定結果のみを使用	18
検定および他データを使用	8
検定と他の薬剤を使用	9
検定を使用した器官の機能が理由で改変	2
医者が MiCK 検定の結果を使用しなかった	16
患者が薬剤の使用を好まなかった	7
患者が臨床試験に入った	1
医者が単に結果を使用しなかった	8

10

【0 1 4 4】

【表 5】

20

表 5. 反応と MiCK 検定使用の相関関係

	CR	PR	安定	進行
医者が検定結果を使用	3	8	8	6
医者が検定結果を使用しなかった	0	1	3	11

【0 1 4 5】

30

【表 6】

表 6. MiCK 薬剤誘導アポトーシス検定における一般的マルチソース薬剤と  
特許単一源薬剤の比較

病気	検定の 数	ジェネリック薬剤に よるアポトーシスの 方が特許薬剤よりも 良好	ジェネリック薬剤に よるアポトーシスと 特許薬剤のそれが 同じ	特許薬剤による アポトーシスの方が ジェネリック薬剤より 良好
結腸	7	57%	14%	29%
乳	43	84%	14%	2%
非小細胞肺	32	78%	16%	6%

40

【0 1 4 6】

【表 7】

表 7. 患者の特徴 (n=72)

年齢	56 歳 (中央値)
腫瘍転移に関する検定	54%がいいえ 46%がはい
転移節に関する検定	69%がいいえ 31%がはい
原発性腫瘍に関する検定	78%がいいえ 22%がはい
転移の場所	33%がリンパ節 18%がなし 16%が他 15%が胸水 12%が肝臓 6%が胸壁

10

20

(乳ガン患者から得た N = 67 組織サンプルに MiCK 検定による分析を受けさせた。  
患者の特徴を以下に示す)

【 0 1 4 7 】



【表 8】

表 8. 様々な薬剤が示した KU の要約統計学  
 サンプルが少なくとも 9 個あった時の薬剤のみを考慮した。

薬剤	N	平均値	中央値	標準偏差	% > 1	% > 3
5FU	29	0.7	0.6	0.65	31%	0%
5FU/メトトレキセート	10	1.1	1.0	0.91	40%	10%
アブラキサン	13	1.2	1.0	0.73	46%	0%
カルボ	39	1.6	1.6	1.08	67%	13%
カルボ／タキソール	13	3.3	3.1	1.83	92%	54%
カルボ／タキソテール	13	2.6	2.4	1.55	85%	38%
シスプラチン	36	2.2	2.3	1.47	78%	22%
シトキサン	39	2.8	2.6	2.07	85%	31%
シトキサン／ドキシ	13	3.5	3.2	1.85	92%	54%
シトキサン／エピ	11	3.2	3.4	1.43	100%	55%
シトキサン／タキソール	10	2.6	2.7	1.62	80%	50%
シトキサン／タキソテール	9	4.3	4.1	2.33	100%	67%
ドキシル	14	1.1	1.1	0.63	64%	0%
ドキシ	38	1.9	1.6	0.89	84%	11%
エピ	54	2.5	2.1	1.31	94%	22%
エリブリン	11	1.0	1.0	0.54	45%	0%
エトポシド	22	1.3	1.3	0.92	55%	5%
ジェムザール	40	1.0	0.8	0.91	43%	3%
イホスファミド	11	1.7	1.5	1.42	64%	27%
イキサベピロン	23	1.3	1.2	0.84	65%	4%
メトトレキセート	30	0.9	0.9	0.60	33%	0%
ミトキサ	22	1.2	1.2	0.81	64%	0%
オクサリ	11	1.9	1.8	1.10	82%	9%
タキソール	41	2.1	1.9	1.78	71%	15%
タキソテール	43	2.1	1.9	1.35	77%	26%
ビンクリスチン	12	1.1	1.0	0.76	50%	0%
ビノル	42	1.8	1.5	1.55	64%	14%
ビノル／キセロダ	10	2.1	1.6	1.69	80%	20.0%
ビンブラスチン	10	1.8	1.5	1.08	80%	10.0%
キセロダ	19	0.7	0.7	0.68	21%	0.0%

10

20

30

40

【0148】

以下の表 9 - 15 では、2 種類の薬剤を比較する目的で、対応のある t 検定を用いて患者の度合に関する KU 値を分析した。

【0149】

## 【表 9】

表 9. KU の患者対比較: エピルビシン対ドキソルビシン対ミトキサントロン

薬剤比較	平均差 (95% CI)	統計学的有意さ
エピ - ドキソ (n = 34)	0.37 (0.08 から 0.66)	0.01
エピ - ミトキサ (n = 21)	0.83 (0.38 から 1.28)	< 0.01
ドキソ - ミトキサ (n = 18)	0.63 (0.11 から 1.15)	0.02

(これらの薬剤には互いに差があると思われ、最大の差はエピとミトキサの間であった)。

10

## 【 0 1 5 0 】

## 【表 1 0】

表 10. KU の患者対比較: シトキサン対イホスファミド

薬剤比較	平均差 (95% CI)	統計学的有意さ
シトキサン - イホスファミド (n = 11)	0.34 (-0.07 から 0.76)	0.10

(シトキサンとイホスファミドの間にはぎりぎりの統計学的有意さがある)。

20

## 【 0 1 5 1 】

## 【表 1 1】

表 11. KU の患者対比較: カルボプラチン対シスプラチン対オキサリプラチン

薬剤比較	平均差(95% CI)	統計学的有意さ
シスプラチン - カルボ (n = 24)	0.88 (0.37 から 1.39)	< 0.01
オキサリ - カルボ (n = 11)	0.34 (-0.14 から 0.82)	0.15
シスプラチン - オキサリ (n = 10)	0.33 (-0.07 から 0.73)	0.09

(シスプラチンの方がカルボより統計学的に高い (p<0.01)。

それはオキサリよりも統計学的にぎりぎり高い (p=0.09))。

30

## 【 0 1 5 2 】

【表 1 2】

表 12. KU の患者対比較: ビンブラスチン対ビンクリスチン対ビノレルビン

薬剤比較	平均差(95% CI)	統計学的有意さ
ビンブラスチン - ビンクリスチン(n=7)	0.14(-0.26 から 0.54)	0.43
ビノレ - ビンクリスチン(n=11)	0.63(0.10 から 1.16)	0.02
ビノレ - ビンブラスチン(n=10)	0.14(-0.20 から 0.49)	0.37

(唯一の統計学的に有意な差はビノレルビンの方が平均でビンクリスチンよりも高いことである ( $p = 0.02$ ))。

10

【0 1 5 3】

【表 1 3】

表 13. KU の患者対比較:タキソール対タキソテル対アブラキサン

薬剤比較	平均差(95% CI)	統計学的有意さ
タキソテル - タキソール (n = 35)	0.05 (-0.54 から 0.65)	0.85
タキソテル - アブラキサン (n = 12)	0.98 (0.26 から 1.69)	0.01
タキソール - アブラキサン (n = 12)	1.20 (0.26 から 2.14)	0.02

(タキソールおよびタキソテルの両方ともがアブラキサンよりも統計学的に有意に大きい)。

20

30

【0 1 5 4】

【表 1 4】

表 14. KU の患者対比較:ドキシル対ドキソルビシン

薬剤比較	平均差(95% CI)	統計学的有意さ
ドキソ - ドキシル (n = 9)	0.56 (-0.07 から 1.18)	0.08

(ドキシルとドキソルビシンの差は統計学的にぎりぎりの有意さである ( $p = 0.08$ ))。

40

【0 1 5 5】

【表 15】

表 15. KU の患者対比較:ゼローダ対 5fu:

薬剤比較	平均差 (95% CI)	統計学的有意さ
ゼローダ - 5FU (n = 13)	0.26 (-0.26 から 0.77)	0.30

(ゼローダと 5FU の間に差があると結論付ける統計学的証拠は不十分である)。

10

【0156】

【表 16】

表 16. 単一薬剤について、乳ガン標本において最良の特許品よりも最良のジェネリック品の方が有効である症例の数はいくつか

条件	数
最良のジェネリック品>最良の特許品 (0.57 以上かつ最良のジェネリック品>1.0)	36/43 (84%)
= (+/- 0.57 の範囲内)の数はいくつか	6/43 (14%)
最良の特許品> 最良のジェネリック品 (0.57 以上かつ最良の特許品>1.0)	1/43 (2%)
全ての KU < 1.0 の数はいくつか	0/67 (0%)

20

【0157】

【表 17】

表 17. シトキサ対イフォスの比較

条件	数
シトキサ > イフォス (0.57 以上かつシトキサ > 1)	2/11 (18%)
シトキサ = イフォス (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	6/11 (55%)
イフォス > シトキサ(+0.57)	0/11 (0%)
シトキサおよびイフォスの両方とも < 1	3/11 (27%)

30

40

【0158】

【表 18】

表 18. カルボ対シスプラチの比較

条件	数
カルボ > シスプラチン (0.57 以上かつカルボ > 1)	2/24 (8%)
カルボ = シスプラチン (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	4/24 (17%)
シスプラチン > カルボ(+0.57)	14/24 (58%)
シスプラチンおよびカルボの両方とも < 1	4/24 (17%)

10

【0159】

【表 19】

表 19. カルボまたはシスプラチ対オキサリの比較

条件	数
マックス(カルボまたはシスプラチン)> オキサリ (0.57 以上かつマックス(カルボまたはシスプラチン)> 1)	4/11 (36%)
マックス(カルボまたはシスプラチン)= オキサリ (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	4/11 (36%)
オキサリ > マックス(カルボまたはシスプラチン) (+ 0.57)	1/11 (9%)
カルボおよびシスプラチンおよびオキサリ < 1	1/11 (9%)

20

30

【0160】

【表 20】

表 20. ビンロエル(ビノレ)対ビンクリスチン(Vcr)およびビンブラスチンの比較

条件	数
ビノレ > マックス(Vcr またはビンブラスチン) (0.57 以上かつビンロエル > 1)	4/14 (29%)
ビノレ = マックス(Vcr またはビンブラスチン) (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	5/14 (36%)
マックス(Vcr またはビンブラスチン)> ビノレ(+0.57)	0/14 (0%)
Vcr およびビンブラスチンおよびビノレ < 1	2/14 (14%)

40

【0161】

【表 2 1】

表 21. アブラキサン対タキソールおよびタキソテールの比較

条件	数
アブラキサン > マックス(タキソール、タキソテール) (0.57 以上かつアブラキサン > 1)	0/13 (0%)
アブラキサン = マックス(タキソール、タキソテール) (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	2/13 (15%)
マックス(タキソール、タキソテール) > アブラキサン(+0.57)	10/13 (77%)
アブラキサンおよびタキソールおよびタキソテール < 1	1/13 (8%)

10

【0 1 6 2】

【表 2 2】

表 22. タキソテール対タキソールの比較

条件	数
タキソテール > タキソール (0.57 以上かつタキソテール > 1)	13/35 (37%)
タキソテール = タキソール (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	6/35 (17%)
タキソール > タキソテール(+0.57)	11/35 (31%)
タキソールおよびタキソテール < 1	5/35 (14%)

20

30

【0 1 6 3】

【表 2 3】

表 23. ドキシル対ドキソの比較

条件	数
ドキシル > ドキソ (0.57 以上かつドキシル > 1)	0/9 (0%)
ドキシル = ドキソ (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	2/9 (22%)
ドキソ > ドキシル(+0.57)	4/9 (44%)
ドキソおよびドキシル < 1	2/9 (22%)

40

【0 1 6 4】

【表 2 4】

表 24. ゼローダ対 5fu の比較

条件	数
ゼローダ > 5fu (0.57 以上かつゼローダ > 1)	2/13 (15%)
ゼローダ = 5fu (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	0/13 (0%)
5fu > ゼローダ(+0.57)	2/13 (15%)
5fu およびゼローダ < 1	8/13 (62%)

10

【0 1 6 5】

【表 2 5】

表 25. エピルビシン対ドキソルビシンの比較

条件	数
エピ > ドキソ (0.57 以上かつエピ > 1)	6/34 (18%)
エピ = ドキソ(+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	22/34 (65%)
ドキソ > エピ(+0.57)	3/34 (9%)
ドキソおよびエピ < 1	1/34 (3%)

20

【0 1 6 6】

【表 2 6】

30

表 26. 薬剤の組み合わせに関して、5fu/メト> 5fu およびメトおよび  
>1.0、5fu/メト=5fu またはメト、5fu またはメト>5fu/メト、全て  
<1.0 の症例の数はいくつか

条件	数
5fu/メト > マックス( 5fu、メト)(0.57 以上かつ 5fu/メト > 1)	2/10 (20%)
5fu/メト = マックス(5fu、メト)(+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	2/10 (20%)
マックス(5fu、メト)> 5fu/メト(+0.57)	1/10 (10%)
5fu/メト、5fu およびメトの全て< 1	4/10 (40%)

40

【0 1 6 7】

## 【表 2 7】

表 27. 薬剤の組み合わせに関して、カルボ/タキソール>カルボおよび  
タキソールおよび>1.0、 $c/t=c$  または  $t, c$  または  $t>c/t$ 、全て<1.0 の  
症例の数はいくつか

条件	数
カルボ/タキソール > マックス(カルボ、タキソール) (0.57 以上かつカルボ/タキソール > 1)	4/12 (33%)
カルボ/タキソール = マックス(カルボ、タキソール) (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	6/12 (50%)
マックス(カルボ、タキソール)> カルボ/タキソール(+0.57)	1/12 (8%)
カルボ、タキソール、カルボ/タキソールの全て< 1	1/12 (8%)

10

## 【 0 1 6 8】

## 【表 2 8】

20

表 28. 薬剤の組み合わせに関して、カルボ/タキソテール>カルボおよび  
タキソテールおよび>1.0、 $c/\text{タキソテール}=c$  またはタキソテール、 $c$   
またはタキソテール> $c/\text{タキソテール}$ 、全て<1.0 の症例の数はいくつか

条件	数
カルボ/タキソテール (taxotere) > マックス(カルボ、タキソテール) (0.57 以上かつカルボ/タキソテール > 1)	2/13 (15%)
カルボ/タキソテール = マックス(カルボ、タキソテール) (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	5/13 (38%)
マックス(カルボ、タキソテール)> カルボ/タキソテール(+0.57)	5/13 (38%)
カルボ、タキソテール、カルボ/タキソテールの全て< 1	1/13 (8%)

30

## 【 0 1 6 9】



## 【表 29】

表 29. 薬剤の組み合わせに関して、シトキサ/ドキソ>シトキサおよびドキソ  
および>1.0、シトキサ/ドキソ=シトキサまたはドキソ、シトキサまたは  
ドキソ>シトキサ/ドキソ、全て<1.0 の症例の数はいくつか

条件	数
シトキサ/ドキソル > マックス(シトキサ、ドキソ) (0.57 以上かつシトキサ/ドキソル > 1)	3/12 (25%)
シトキサ/ドキソル = マックス(シトキサ、ドキソ) (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	3/12 (25%)
マックス(シトキサ、ドキソル)> シトキサ/ドキソル(+0.57)	5/12 (42%)
シトキサ、ドキソル、シトキサ/ドキソルの全て< 1	1/12 (8%)

10

## 【0170】

## 【表 30】

20

表 30. 薬剤の組み合わせに関して、シトキサ/エピ>シトキサおよびエピおよび>1.0、  
シトキサ/エピ = シトキサまたはエピ、シトキサまたはエピ>シトキサ/エピ、  
全て<1.0 の症例の数はいくつか

条件	数
シトキサ/エピ > マックス(シトキサ、エピ) (0.57 以上かつシトキサ/エピ > 1)	4/11 (36%)
シトキサ/エピ = マックス(シトキサ、エピ) (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	3/11 (27%)
マックス(シトキサ、エピ)> シトキサ/エピ(+0.57)	4/11 (36%)
シトキサ、エピ、シトキサ/エピの全て< 1	0/11 (0%)

30

## 【0171】

## 【表 3 1】

表 31. 薬剤の組み合わせに関して、シトキサ/タキソール>シトキサおよび  
タキソールおよび>1.0、シトキサ/タキソール= シトキサまたは  
タキソール、シトキサまたはタキソール>シトキサ/タキソール、  
全て<1.0 の症例の数はいくつか

条件	数
シトキサ/タキソール > マックス(シトキサ、タキソール) (0.57 以上かつシトキサ/タキソール > 1)	2/10 (20%)
シトキサ/タキソール = マックス(シトキサ、タキソール) (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	2/10 (20%)
マックス(シトキサ、タキソール)> シトキサ/タキソール(+0.57)	6/10 (60%)
シトキサ、タキソール、シトキサ/タキソールの全て< 1	0/10 (0%)

10

## 【 0 1 7 2】

## 【表 3 2】

20

表 32. 薬剤の組み合わせに関して、シトキサ/タキソテール>シトキサおよび  
タキソテールおよび>1.0、シトキサ/タキソテール=シトキサまたは  
タキソテール、シトキサまたはタキソテール>シトキサ/タキソテール、  
全て<1.0 の症例の数はいくつか

条件	数
シトキサ/タキソテール > マックス(シトキサ、タキソテール) (0.57 以上かつシトキサ/タキソテール > 1)	3/9 (33%)
シトキサ/タキソテール = マックス(シトキサ、タキソテール) (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	2/9 (22%)
マックス(シトキサ、タキソテール)> シトキサ/タキソテール(+0.57)	4/9 (44%)
シトキサ、タキソテール、シトキサ/タキソテールの全て< 1	0/9 (0%)

30

## 【 0 1 7 3】

## 【表 3 3】

表 33. 薬剤の組み合わせに関して、ビノレ/キセロ> ビノレおよびキセロおよび  
>1.0、ビノレ/キセロ=ビノレまたはキセロ、ビノレまたはキセロ>ビノレ/  
キセロ、全て<1.0 の症例の数はいくつか

条件	数
ビノレ/キセロ > マックス(ビノレ、キセロ) (0.57 以上かつビノレ/キセロ > 1)	0/10 (0%)
ビノレ/キセロ = マックス(ビノレ、キセロ) (+/- 0.57 かつ両方とも > 1)	4/10 (40%)
マックス(ビノレ、キセロ)> ビノレ/キセロ(+0.57)	4/10 (40%)
ビノレ、キセロおよびビノレ/キセロの全て< 1	2/10 (20%)

10

## 【 0 1 7 4 】

## 【表 3 4】

20

表 34. 肺ガン標本において最良の特許品より最良のジェネリック品の方が  
有効な症例の数はいくつか

条件	数
最良のジェネリック品> 最良の特許品 (0.57 以上でありかつ最良のジェネリック品>1.0)	25/32 (78%)
=(+/- 0.57 の範囲内)の数はいくつか	5/32 (16%)
最良の特許品> 最良のジェネリック品 (0.57 以上かつ最良の特許品> 1.0)	2/32 (6%)
全ての KU < 1.0 の数はいくつか	0/41 (0%)

30

## 【 0 1 7 5 】

## 【表 3 5】

表 35. 結腸ガン標本において最良の特許品より最良のジェネリック品の方が有効な症例の数はいくつか

条件	数
最良のジェネリック品> 最良の特許品 (0.57 以上でありかつ最良のジェネリック品>1.0) =(+/- 0.57 の範囲内)の数はいくつか	4/7 (57%)
最良の特許品> 最良のジェネリック品 (0.57 以上かつ最良の特許品> 1.0)	2/7 (29%)
全ての KU < 1.0 の数はいくつか	0/8 (0%)

10

## 【0 1 7 6】

## 【表 3 6】

表 36. MiCK 薬剤誘導アポトーシス検定を基にして特許単一源薬剤の使用と対比した一般的マルチソース薬剤の使用による薬剤費用節減

20

病気	患者一人 当たりの 薬剤節減 (平均)	ジェネリック薬剤が 優れているか或は 同等な患者の比率	検定で調整した時の 患者一人当たりの 薬剤節減(平均)	患者一人 当たりの 正味の 薬剤節減 (平均)	費用節減 パーセント
結腸	\$35,668	71%	\$25,338	\$20,338	54.0%
乳	\$13,593	98%	\$13,321	\$8,321	42.8%
非小細胞肺	\$15,774	94%	\$14,827	\$9,827	47.0%

30

## 【0 1 7 7】

【表 3 7】

表 37. MiCK 薬剤誘導アポトーシス検定を基にして特許単一源薬剤の使用と  
対比させた一般的マルチソース薬剤の使用による薬剤費用節減

ガン	特許品 単一源	PMT/6	一般的 マルチソー	PMT/6	平均節減	% MSD	患者一人 当たりの 節減
乳	ナブ-パクリ	\$26704	ビノレ	\$2242			
	ゲムシタ	\$12609	エピ/CTX	\$1355			
	カペシタ	\$18976	CTX/ドセタ	\$13913			
	平均	\$19430		\$5837	\$13593	98%	\$8321/PT
結腸	フォルフォックス	\$37670	フォルフィリ	\$1982	\$35688	71%	\$20338/PT
NSCLC	PEM/CIS	\$29217	カルボ/パクリ	\$806			
	GEM/CIS	\$12609	ビノレ	\$1601			
			ドセタ	\$13009			
	平均	\$20913		\$5138	\$15774	94%	\$9827/PT

10

20

【 0 1 7 8 】

【表 3 8】

表 38. 様々な濃度で試験した 37 種類の抗ガン剤候補品に対する  
ガン細胞のアポトーシス反応

試験した薬剤	最大 反応 (KU)	反応 レベル	試験した薬剤	最大 反応 (KU)	反応 レベル
シスプラチン	>10.0	感受性	ゲムシタビン+ タキソテール	2.4	低から中
4HC(シトキサン)	8.4		タキソテール (Taxolere)	2.3	
スニチニブ (Sunifinib)	7.9		メトトレキセート+ ビンブラスチン	2.2	
オキサリプラチン	6.7		タキソール	1.6	低
カルボプラチン	6.0		テモゾロミド	1.5	
メルファラン	5.3		グリベク (イマチニブ)	1.5	
ビダザ	4.3	中	プロカルバジン	1.3	
ダクチノマイシン	4.0		ビンブラスチン	1.2	
ベルケイド	3.8		ドキシル	1.2	
ソラフェニブ	3.8		ブレオマイシン	1.1	
エピルビシン	3.8		ビンクリスチン	0.9	非感受性
ドキソルビシン	3.5		CCNU	0.8	
4HI(イホスファミド)+ エピルビシン	3.2		エトポシド	0.8	
ダウノルビシン (Danorubicin)	3.1		ゲムシタビン	0.8	
ビノレルビン (Vincrelbine)	3.1		メトトレキセート	0.8	
イリノテカン	2.6	低から中	タルセバ	0.7	
4HI(イホスファミド)	2.6		アリムタ	0.6	
4HI(イホスファミド)+ ドキソルビシン+	2.5		ダカルバジン	0.6	
ダカルバジン			5-フルオロウラシル	0.3	

10

20

30

40

【図 2】

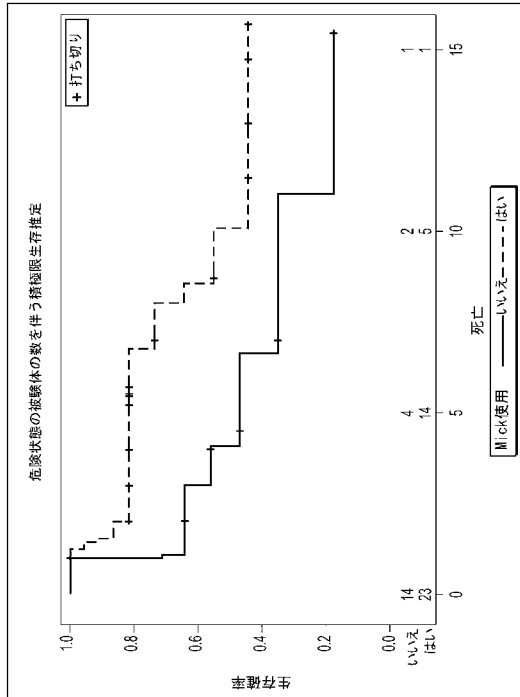


FIG. 2

【図 3】

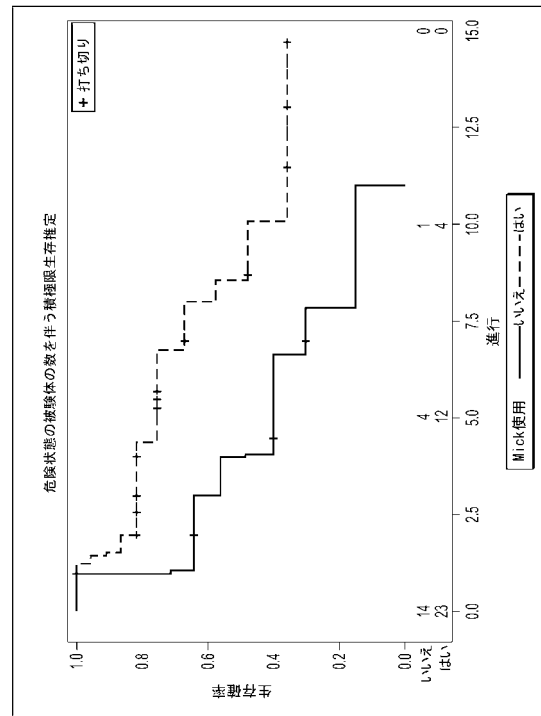


FIG. 3

【図 7】

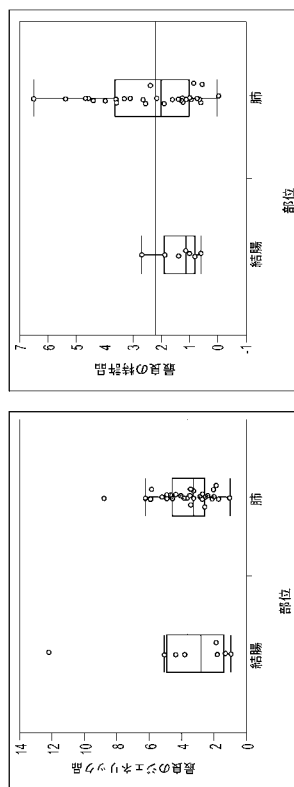


FIG. 7

【図 10】

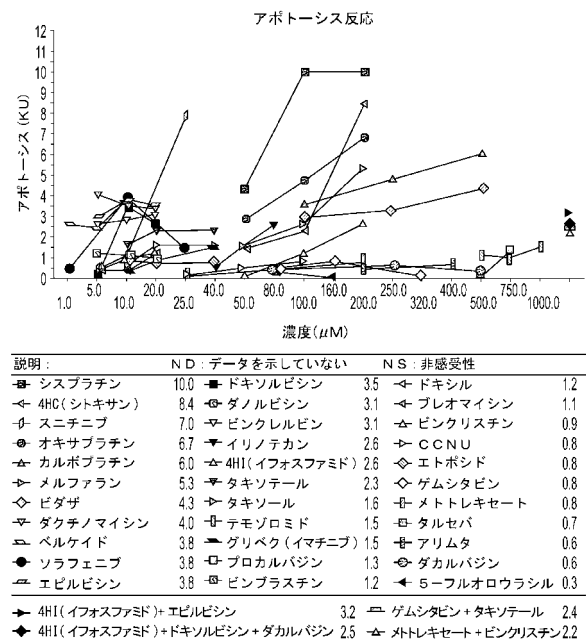
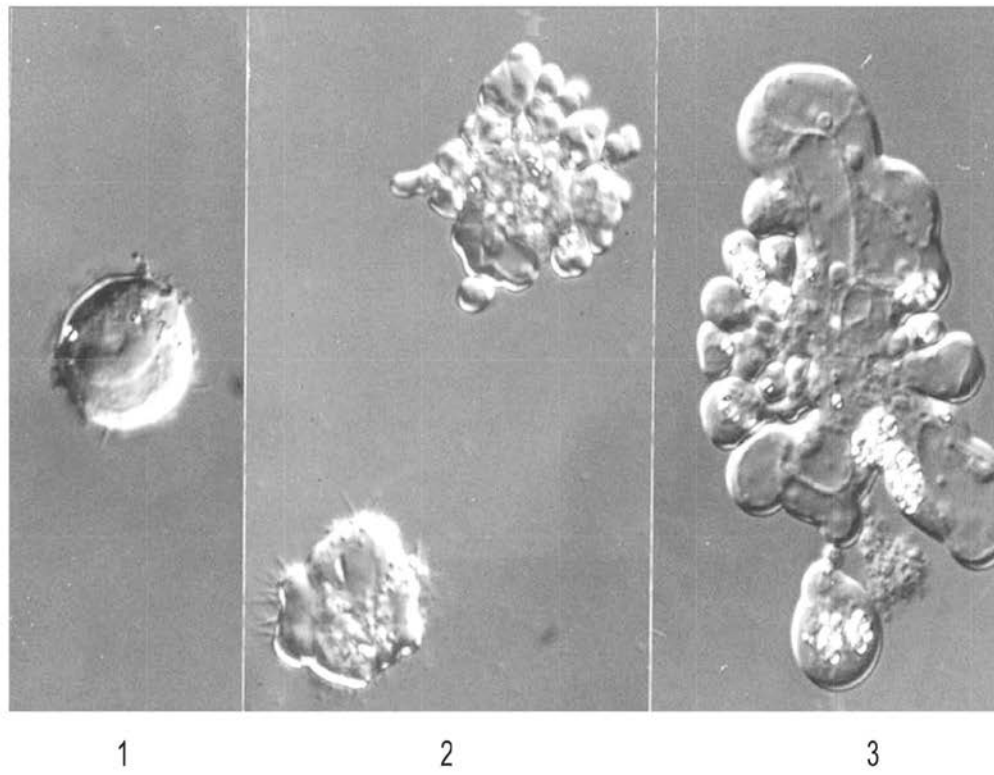


FIG. 10

【図 1】

**FIG. 1**



【 図 4 】

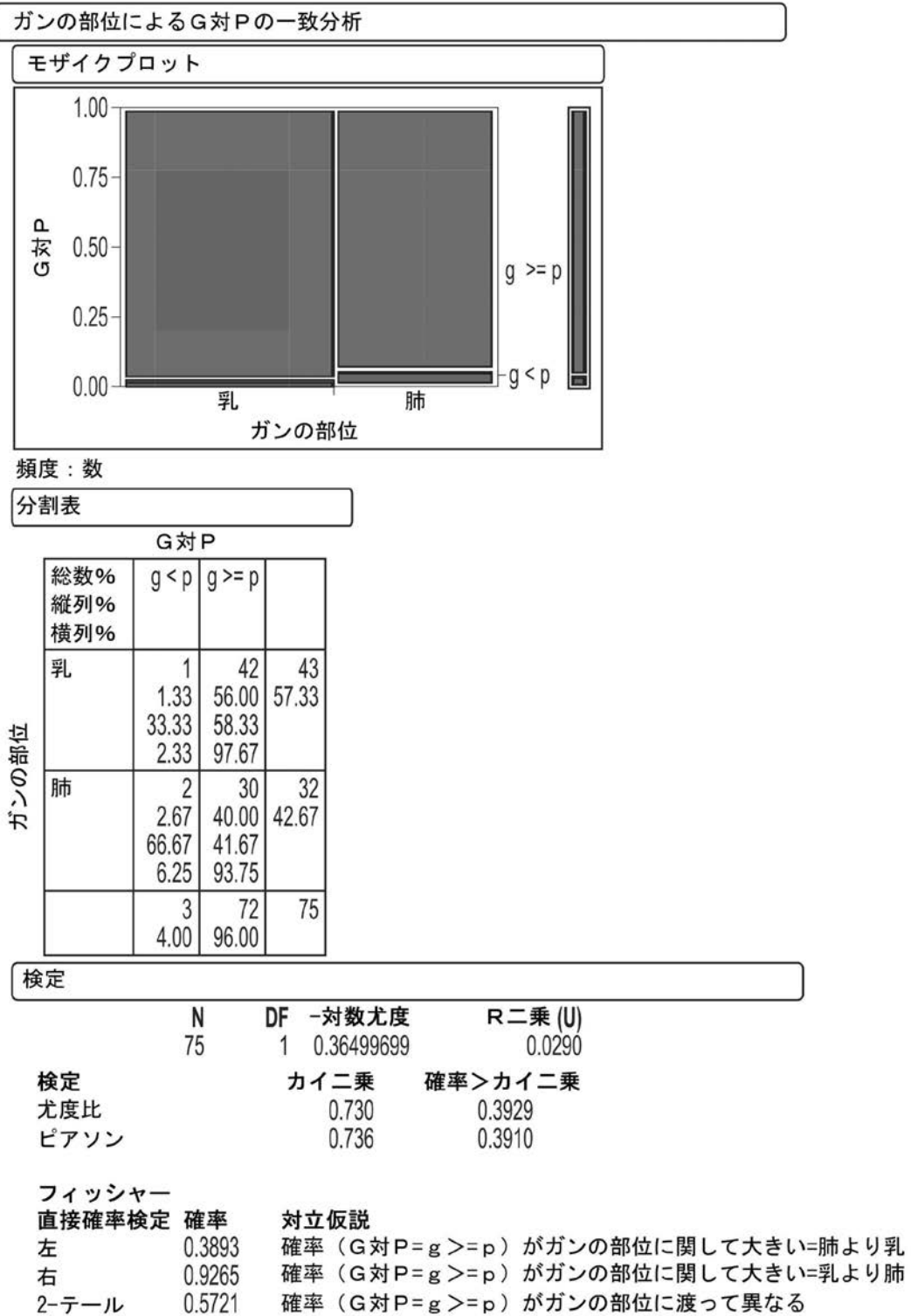


FIG. 4

【 図 5 】

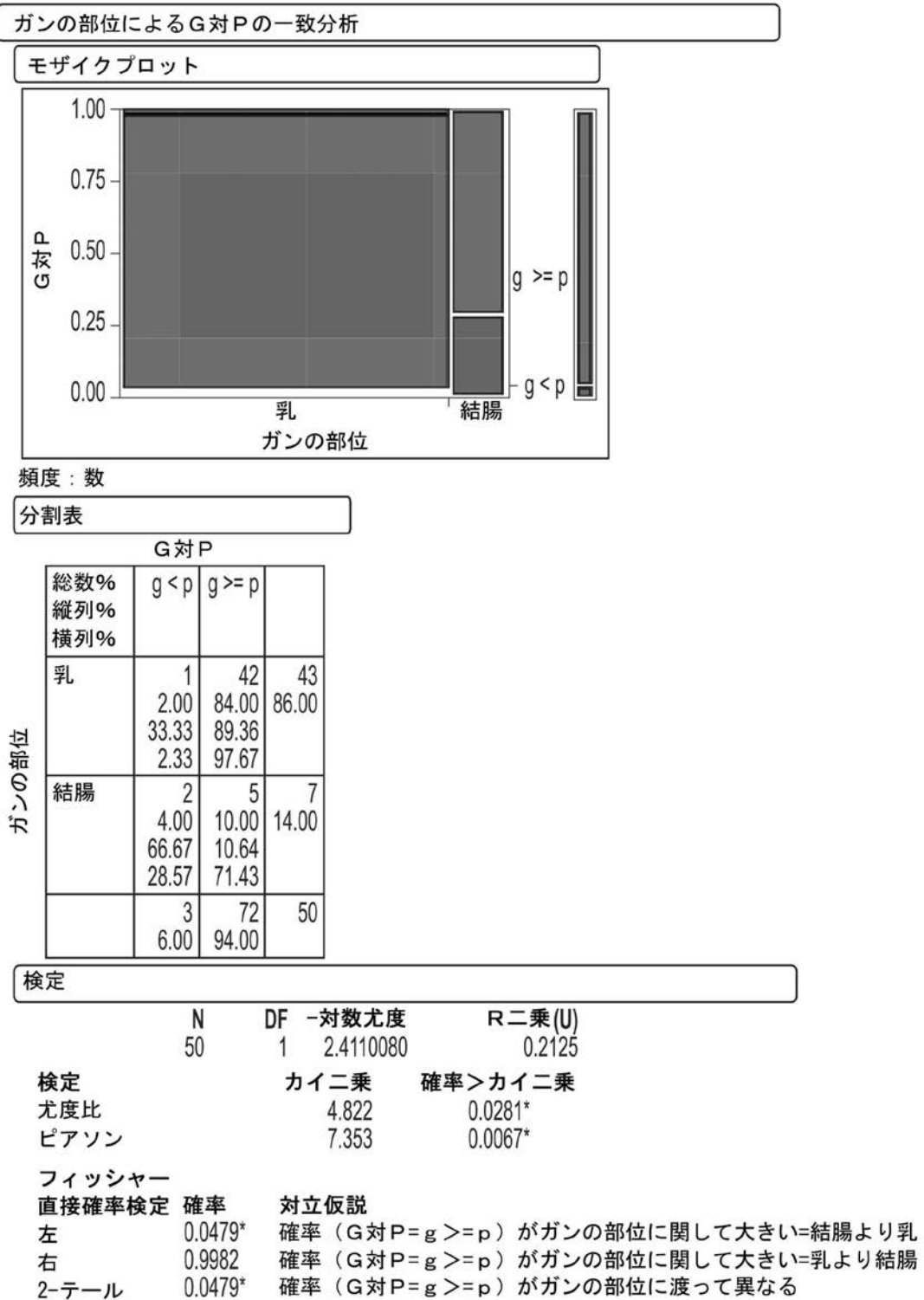
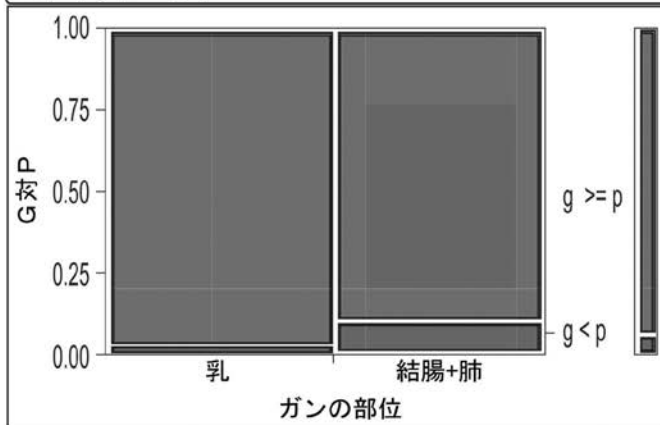


FIG. 5

【 図 6 】

## ガンの部位による G 対 P の一致分析

## モザイクプロット



頻度：数

## 分割表

G 対 P			
総数%	g < p	g >= p	
縦列%			
横列%			
乳	1	42	43
	1.22	51.22	52.44
	20.00	54.55	
	2.33	97.67	
結腸+肺	4	35	39
	4.88	42.68	47.56
	80.00	45.45	
	10.26	89.74	
	5	77	82
	6.10	93.90	

## 検定

	N	DF	-対数尤度	R二乗 (U)
	82	1	1.1847456	0.0629
検定		カイ二乗	確率>カイ二乗	
尤度比		2.369	0.1237	
ピアソン		2.247	0.1339	

## フィッシャー

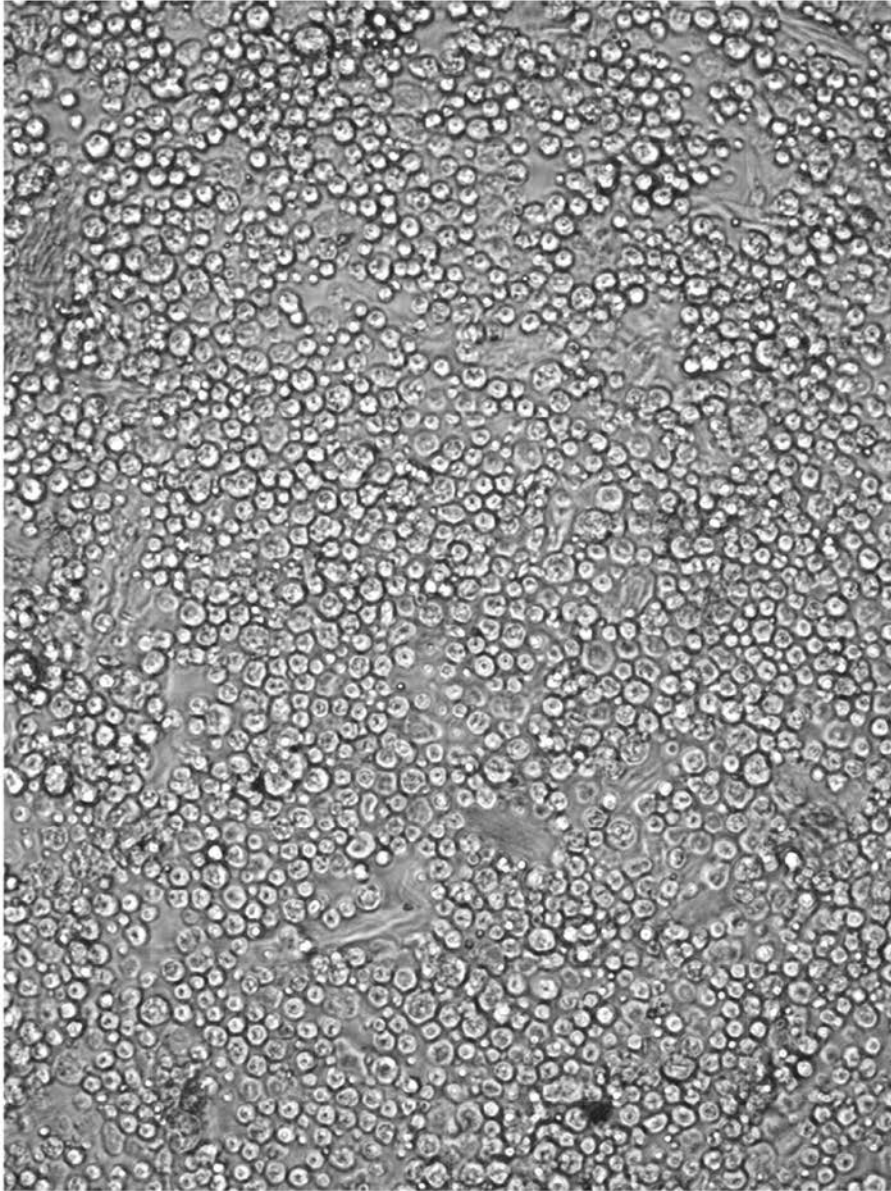
直接確率検定	確率
左	0.1507
右	0.9789
2-テール	0.1860

## 対立仮説

確率 (G 対 P = g >= p) がガンの部位に関して大きい=結腸+肺より乳  
 確率 (G 対 P = g >= p) がガンの部位に関して大きい=乳より結腸+肺  
 確率 (G 対 P = g >= p) がガンの部位に渡って異なる

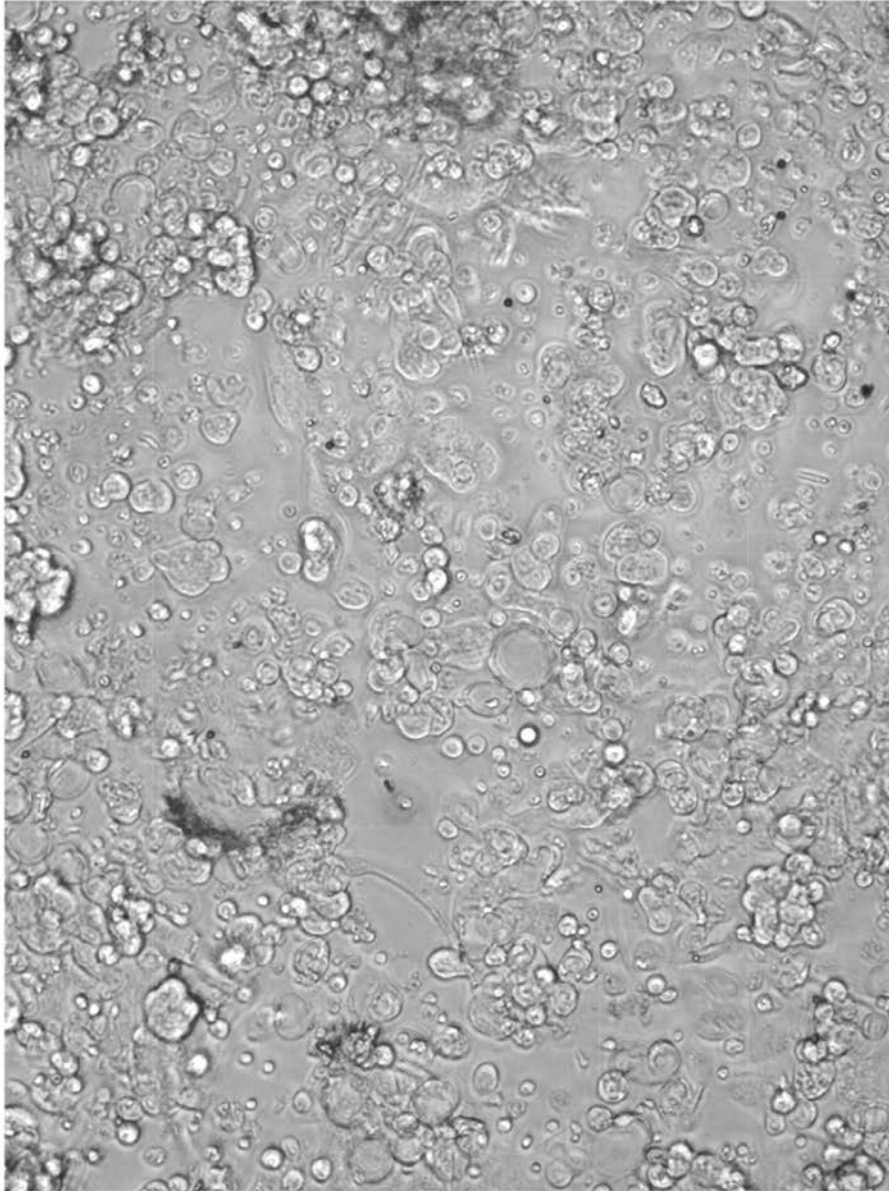
FIG. 6

【 図 8 】





**FIG. 8**

【図 9】



**FIG. 9**

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/US2013/031300</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>G01N 33/574(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i, C12N 5/07(2010.01)i</b>		
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) G01N 33/574; C12Q 1/02; C12N 5/09; C12Q 1/24; G01N 33/15; C12N 5/07		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: anti-cancer drug candidate, apoptosis-inducing activity, kinetic unit value, tumor cell, isolation		
<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	BALLARD et al., 'Endometrial carcinoma in vitro chemosensitivity testing of single and combination chemotherapy regimens using the novel microculture kinetic apoptosis assay: implications for endometrial cancer treatment', Journal of Gynecologic Oncology, Vol. 21, No. 1, pp. 45-49 (March 2010) See pages 46-48.	1-26
A	US 6258553 B1 (KRAVTSOV) 10 July 2001 See the whole document.	1-26
A	US 2011-0244503 A1 (PERREE et al.) 06 October 2011 See the whole document.	1-26
A	KR 10-0721927 B1 (ISU ABXIS CO., LTD.) 28 May 2007 See the whole document.	1-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 26 June 2013 (26.06.2013)		Date of mailing of the international search report <b>28 June 2013 (28.06.2013)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer  KIM, Seung Beom  Telephone No. 82-42-481-3371 

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2013/031300**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6258553 B1	10.07.2001	US 6077684 A	20.06.2000
US 2011-0244503 A1	06.10.2011	None	
KR 10-0721927 B1	28.05.2007	None	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

(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, RS, 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

(72) 発明者 ホールキスト, アラン

アメリカ合衆国ケンタッキー州 4 1 0 6 3 モーニングビュー・ローズホークドライブ 1 3 3 5 1

F ターム(参考) 2G045 AA24 FA11

2G059 AA05 AA06 BB06 BB13 BB14 CC16 DD04 DD17 EE01 FF04

HH02 HH06 JJ01 MM01 MM02 MM05

4C084 AA16 NA05 ZB262