



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월28일
(11) 등록번호 10-1943177
(24) 등록일자 2019년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/57484 (2013.01)
C07K 16/2896 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7029131
(22) 출원일자(국제) 2015년04월16일
심사청구일자 2016년10월19일
(85) 번역문제출일자 2016년10월19일
(65) 공개번호 10-2016-0134817
(43) 공개일자 2016년11월23일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2015/052796
(87) 국제공개번호 WO 2015/162532
국제공개일자 2015년10월29일
(30) 우선권주장
61/983,951 2014년04월24일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
B I Rini et al., Diastolic blood pressure as
a biomarker of axitinib efficacy in solid
tumors, Clinical cancer research (2011),
vol.17(11): 3841-3849.
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
화이자 인코포레이티드
미국 뉴욕주 10017 뉴욕 이스트 42번 스트리트
235
(72) 발명자
마티니, 장-프랑수와 앙드레
미국 92009 캘리포니아주 칼스배드 서클로 세쿼이
아 7420
타라지, 자말 크리스토
미국 92124 캘리포니아주 샌디에고 페소스 플레이
스 10867
윌리엄스, 제임스 앤드류
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 사이언스 센터
드라이브 10555 화이자 인크. 내
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 17 항

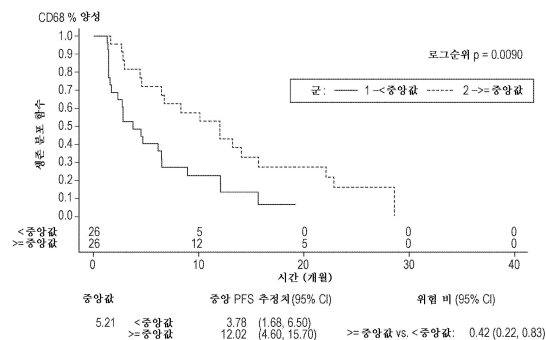
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 암 치료

(57) 요약

인간 종양이 악시티닙으로의 치료에 대해 감수성인지 여부를 예측하는 진단 방법, 및 인간 종양을 치료하는 방법
이 개시되어 있다. 방법은 종양으로부터의 조직 샘플에서의 CD68 폴리펩티드 발현 수준의 측정에 기초한다.
CD68 발현 수준은 면역조직화학을 사용하여 측정될 수 있으며, 여기서 종양 내의 CD68-양성 세포의 백분율 및
CD68-양성 세포의 밀도가 결정될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

G01N 33/57492 (2013.01)
G01N 2333/70596 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Robert J Motzer et al., Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma, Lancet oncology (2013), vol.14: 552-562.

Sumanta K Pal et al., Tivozanib: current status and future directions in the treatment of solid tumors, Expert opinion on investigational drugs (2012), vol.21(12): 1851-1859.

Brian I Rini et al., Axitinib in metastatic renal cell carcinoma: Results of a pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis, The journal of clinical pharmacology (2013), vol.53(5): 491-504.

KR1020120079104 A

US20130216533 A1

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 악시티닙으로의 치료가 고려되는 인간 환자로부터 수득된 전이성 신세포암 (mRCC) 종양으로부터의 조직 샘플에서 CD68 폴리펩티드 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 단계 (a)에서의 CD68 발현 수준을, 이전에 악시티닙으로 처치받고 악시티닙에 대해 저항성인 것으로 나타난 인간 환자 및 이전에 악시티닙으로 처치받고 악시티닙에 대해 감수성인 것으로 나타난 인간 환자로부터 수득된 mRCC 종양의 조직 샘플에서 CD68 폴리펩티드 발현을 측정함으로써 결정된 역치 CD68 발현 수준에 대해 비교하는 단계

를 포함하며, 여기서 역치 수준 초과인 CD68 발현 수준이 mRCC 종양이 악시티닙으로의 치료에 대해 감수성임을 나타내는 것인, 악시티닙으로의 치료에 대해 감수성인 전이성 신세포암 (mRCC) 종양을 확인하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, CD68 폴리펩티드 발현을 측정하는 단계가 면역조직화학에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 면역조직화학에 의해 CD68 폴리펩티드 발현을 측정하는 단계가 샘플에서의 CD68-양성 세포의 백분율이 결정되는 전체 슬라이드 스캔으로부터의 영상 분석에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

샘플에서의 CD68-양성 세포의 밀도를 결정하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 5

악시티닙을 포함하며, 제1항에 따라 악시티닙에 대해 감수성인 mRCC 종양을 갖는 것으로 결정된 환자에서 mRCC 종양을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 6

악시티닙을 포함하며, mRCC 종양 중 CD68-양성 세포의 백분율이 적어도 5%인 것으로 결정된 대상체에서 mRCC 종양을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 7

악시티닙을 포함하며, mRCC 종양 중 CD68-양성 세포의 세포 밀도가 적어도 0.08개 세포/mm²인 것으로 결정된 대상체에서 mRCC 종양을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 8

악시티닙을 포함하며, mRCC 종양 중 세포의 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 4.5%, 적어도 4.6%, 적어도 4.7%, 적어도 4.8%, 적어도 4.9%, 적어도 5.0%, 적어도 5.1%, 적어도 5.2%, 적어도 5.3%, 적어도 5.4%, 적어도 5.5%, 적어도 5.6%, 적어도 5.7%, 적어도 5.8%, 적어도 5.9%, 적어도 6.0%, 적어도 6.5%, 적어도 7.0%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 15%, 또는 적어도 20%가 CD68-양성인 mRCC 종양을 갖는 대상체에서 mRCC 종양을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, mRCC 종양 중 세포의 적어도 5%가 CD68-양성인 제약 조성물.

청구항 10

악시티닙을 포함하며, mRCC 종양 중 CD68-양성 세포의 세포 밀도가 적어도 0.05개 세포/mm², 적어도 0.06개 세포/mm², 적어도 0.07개 세포/mm², 적어도 0.08개 세포/mm², 적어도 0.09개 세포/mm², 적어도 1.0개 세포/mm², 적어도 1.1개 세포/mm², 적어도 1.2개 세포/mm², 적어도 1.3개 세포/mm², 적어도 1.4개 세포/mm², 또는 적어도 1.5개 세포/mm²인 mRCC 종양을 갖는 대상체에서 mRCC 종양을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, mRCC 종양 중 CD68-양성 세포의 세포 밀도가 적어도 0.08개 세포/mm²인 제약 조성물.

청구항 12

제8항 또는 제10항에 있어서, 악시티닙을 포함하며,

mRCC 종양 중 세포의 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 4.5%, 적어도 4.6%, 적어도 4.7%, 적어도 4.8%, 적어도 4.9%, 적어도 5.0%, 적어도 5.1%, 적어도 5.2%, 적어도 5.3%, 적어도 5.4%, 적어도 5.5%, 적어도 5.6%, 적어도 5.7%, 적어도 5.8%, 적어도 5.9%, 적어도 6.0%, 적어도 6.5%, 적어도 7.0%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 15%, 또는 적어도 20%가 CD68-양성이고;

mRCC 종양 중 CD68-양성 세포의 세포 밀도가 적어도 0.05개 세포/mm², 적어도 0.06개 세포/mm², 적어도 0.07개 세포/mm², 적어도 0.08개 세포/mm², 적어도 0.09개 세포/mm², 적어도 1.0개 세포/mm², 적어도 1.1개 세포/mm², 적어도 1.2개 세포/mm², 적어도 1.3개 세포/mm², 적어도 1.4개 세포/mm², 또는 적어도 1.5개 세포/mm²인

제약 조성물.

청구항 13

악시티닙을 포함하며,

mRCC 종양 중 CD68-양성 세포의 백분율이 mRCC 종양 중 세포의 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 4.5%, 적어도 4.6%, 적어도 4.7%, 적어도 4.8%, 적어도 4.9%, 적어도 5.0%, 적어도 5.1%, 적어도 5.2%, 적어도 5.3%, 적어도 5.4%, 적어도 5.5%, 적어도 5.6%, 적어도 5.7%, 적어도 5.8%, 적어도 5.9%, 적어도 6.0%, 적어도 6.5%, 적어도 7.0%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 15%, 또는 적어도 20%가 CD68-양성인 것으로 결정되고,

mRCC 종양 중 CD68-양성 세포의 세포 밀도가 적어도 0.05개 세포/mm², 적어도 0.06개 세포/mm², 적어도 0.07개 세포/mm², 적어도 0.08개 세포/mm², 적어도 0.09개 세포/mm², 적어도 1.0개 세포/mm², 적어도 1.1개 세포/mm², 적어도 1.2개 세포/mm², 적어도 1.3개 세포/mm², 적어도 1.4개 세포/mm², 또는 적어도 1.5개 세포/mm²인 것으로 결정된

대상체에서 mRCC 종양을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서, 백분율이 적어도 5%이고, 세포 밀도가 적어도 0.08개 세포/mm²인 제약 조성물.

청구항 15

악시티닙을 포함하며, mRCC 종양 중 세포의 적어도 5%가 CD68-양성이고, mRCC 종양 중 CD68-양성 세포의 세포 밀도가 적어도 0.08개 세포/mm²인 mRCC 종양을 갖는 대상체에서 mRCC 종양을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 16

제6항, 제7항, 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, CD68 양성 세포의 백분율 또는 세포 밀도를 측정하는 단계가 면역조직화학을 사용하여 수행되는 것인 제약 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, CD68 양성 세포의 백분율 또는 세포 밀도를 측정하는 단계가 면역조직화학을 사용하고 전체 슬라이드 스캔으로부터의 영상 분석을 사용하여 수행되는 것인 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용의 분야는 분자 생물학, 종양학, 및 임상 진단학을 수반한다.

배경 기술

[0002] 대부분의 암 약물은 일부 환자에게 효과적이지만, 다른 환자들에게는 효과적이지 않다. 이는 종양 사이의 유전자 변이 때문일 수 있고, 동일한 환자 내의 종양 사이에서도 관찰될 수 있다. 가변적인 환자 반응이 특히 표적화 치료제에 대해 발표되어 있다. 따라서, 표적화 요법의 전체 잠재력은 어느 환자가 어떤 약물로부터 이익을 얻을지를 결정하기 위한 적합한 시험 없이는 실현될 수 없다. 국립 보건원 (NIH)에 따르면, 용어 "바이오마커"는 "정상적인 생물학적 또는 발병 과정 또는 치료적 개입에 대한 약리학적 반응의 지표로서 객관적으로 측정되고 평가되는 특징"으로서 정의된다.

[0003] 바이오마커의 발견에 기초하여 개선된 진단의 개발은 미리, 주어진 약물에 대해 임상 반응을 보일 가능성이 가장 큰 그러한 환자를 확인함으로써 새로운 약물 개발을 가속시키는 잠재력을 갖는다. 이러한 진단은 임상 시험의 규모, 기간 및 비용을 유의하게 감소시키는 잠재력을 갖는다. 기술, 예컨대 유전체학, 단백체학 및 분자 영상화는 현재 특정 유전자 돌연변이, 특정한 유전자의 발현 수준, 및 다른 분자 바이오마커의 빠른, 민감한 및 신뢰할만한 검출을 가능하게 한다. 종양의 분자 특징화를 위한 다양한 기술의 유용성에 불구하고, 상대적으로 적은 암 바이오마커가 발견되었기 때문에 암 바이오마커의 임상적 사용은 주로 실현되지 않은 채로 남아 있다. 예를 들어, 최근의 검토 논문은 다음을 언급한다:

[0004] 도전과제는 암 바이오마커를 발견하는 것이다. 비록 여러 종양 유형 - 예컨대, 만성 골수성 백혈병, 위장 기질 종양, 폐암 및 다형성 교모세포종 - 의 분자적으로 정의된 하위세트를 분자 표적화 작용제를 사용하여 표적화함에 있어서 임상 성공이 있었지만, 더 넓은 맥락에서 이러한 성공을 적용시키는 능력은 환자에서 표적화 작용제를 평가하기 위한 효율적인 전략의 결여에 의해 매우 제한된다. 문제는 주로 이러한 흥미진진한 새로운 약물을 평가하는 임상 시험을 위해 분자적으로 정의된 암을 갖는 환자를 선택하는 것이 불가능함에 있다. 해결책은 특정한 작용제로부터 이익을 얻을 가능성이 있는 그러한 환자를 확실하게 확인하는 바이오마커를 필요로 한다. (Sawyers, 2008, Nature 452:548-552, at 548.)

[0005] 상기와 같은 논평은 임상적으로 유용한 바이오마커 및 이러한 바이오마커에 기초한 진단 방법의 발견에 대한 필요성의 인식을 설명한다.

[0006] 3가지 특징적인 유형의 암 바이오마커가 존재한다: (1) 예후 바이오마커, (2) 예측 바이오마커, 및 (3) 약역학적 (PD) 바이오마커. 예후 바이오마커는 암, 예를 들어 고형 종양을 공격성, 즉, 성장 및/또는 전이 속도, 및 치료에 대한 굴절성에 따라 분류하는데 사용된다. 이는 때때로 "우수한 결과" 종양을 "불량한 결과" 종양으로부터 구별하는 것으로 불린다. 예측 바이오마커는 특정한 환자가 특정한 약물의 치료로부터 이익을 얻을 확률을 평가하는데 사용된다. 예를 들어, ERBB2 (HER2 또는 NEU) 유전자가 증폭된 유방암을 갖는 환자는 트라스투주맵 (헤르셉틴®)으로의 치료로부터 이익을 얻을 가능성이 있는 반면에, ERBB2 유전자 증폭을 갖지 않는 환자는 트라스투주맵으로의 치료로부터 이익을 얻을 가능성이 없다. PD 바이오마커는 환자가 약물을 복용하는 동안 환자에 대한 약물의 효과(들)의 지표이다. 따라서, PD 바이오마커는 종종 새로운 약물의 임상 개발의 초기 단계 동안 투여량 수준 및 투여 빈도를 안내하는데 사용된다. 암 바이오마커의 논의를 위해, 예를 들어 문헌 [Sawyers, 2008, Nature 452:548-552]을 참조한다.

[0007] 악시티닙 (인리타(Inlyta)®로도 공지됨)은 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR)에 작용하는 경구로 투여되는 소분자 수용체 티로신 키나제 억제제이다. 악시티닙은 혈관신생을 억제함으로써 종양 성장 및 전이를 감소시키고, 이러한 수용체를 발현하고 이에 의존하는 세포에 직접적으로 작용함으로써 종양 성장을 감소시키고 퇴행을

유발하는 것으로 생각된다. 악시티닙은 시토키인 또는 수니티닙 (수텐트(Sutent)®로도 공지됨) 중에 질환 진행되거나, 또는 이에 대해 저항성이 된 후의 전이성 신세포암 (mRCC)의 치료를 위해 다국적으로 승인되어 있다.

[0008] VEGFR 억제제에 초점을 맞춘 다량의 전-임상 및 임상 연구에도 불구하고, 이러한 억제제의 항종양 활성을 담당하는 메카니즘은 완전히 이해되지 않는다. 특히, mRCC 환자의 예후 및 항혈관신생제에 대한 감수성/저항성에 영향을 미치는데 있어서 종양 침윤 림프구의 역할은 전부 이해되지 않는다 (예를 들어, 문헌 [Polimeno et al., 2013, BJU Int 112:686-696] 참조). 다른 유형의 표적화 요법에 대해, 모두는 아니지만 일부 환자는 악시티닙 요법으로부터 이익을 얻는다. 따라서, 악시티닙으로의 치료에 반응할 가능성이 있는 (또는 가능성이 없는) 종양을 갖는 환자를 확인하는데 사용될 수 있는 예측 바이오마커에 기초한 진단 방법에 대한 필요가 존재한다.

발명의 내용

[0009] 개요

[0010] 본원에서 보다 상세하게 논의될 것과 같이, 본 개시내용은 부분적으로, 포유동물 종양으로부터의 조직 샘플에서의 종양 골수 (즉, 분화 클러스터 68 "CD68") 침윤 (예를 들어, CD68-양성 세포의 백분율 및 CD68-양성 세포의 밀도의 측면에서 상승된 CD68 수준)이 VEGFR 억제제, 예컨대 악시티닙을 사용한 개선된 무진행 생존과 상관관계가 있다는 발견에 관한 것이다. 따라서, 본 개시내용은 VEGFR 억제제, 예컨대 악시티닙으로의 치료에 긍정적으로 반응할 가능성이 더 큰 종양을 확인하는 방법, 및 VEGFR 억제제, 예컨대 악시티닙에 반응할 가능성이 더 클 것으로 확인된 종양을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0011] 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 개시내용은 (a) VEGFR 억제제로의 치료가 고려되는 인간 환자로부터 수득된 종양으로부터의 조직 샘플에서 CD68 폴리펩티드 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 단계 (a)에서의 CD68 발현 수준을, 이전에 VEGFR 억제제로 치료받고 VEGFR 억제제에 대해 저항성인 것으로 나타난 인간 환자 및 이전에 VEGFR 억제제로 치료받고 VEGFR 억제제에 대해 감수성인 것으로 나타난 인간 환자로부터 수득된 종양의 조직 샘플에서 CD68 폴리펩티드 발현을 측정함으로써 결정된 역치 CD68 발현 수준에 대해 비교하는 단계를 포함하며, 여기서 역치 수준 초과인 CD68 발현 수준이 종양이 VEGFR 억제제로의 치료에 대해 감수성임을 나타내는 것인, VEGFR 억제제로의 치료에 대해 감수성인 종양을 확인하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, VEGFR 억제제는 악시티닙이다. 추가 실시양태에서, CD68 폴리펩티드 발현을 측정하는 단계는 면역조직화학에 의해 수행된다. 추가 실시양태에서, 면역조직화학에 의해 CD68 폴리펩티드 발현을 측정하는 단계는 샘플에서의 CD68-양성 세포의 백분율이 결정되는 전체 슬라이드 스캔으로부터의 영상 분석에 의해 수행된다. 추가 실시양태에서, 이러한 방법은 샘플에서의 CD68-양성 세포의 밀도를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서 임의의 이러한 방법에서의 종양은 유방 종양, 폐 종양, 신장 종양, 결장직장 종양, 및 췌장 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0012] 추가 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 VEGFR 억제제에 대해 감수성인 mRCC 종양을 갖는 것으로 결정된 환자에게 VEGFR 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, mRCC를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, VEGFR 억제제는 악시티닙이다.

[0013] 추가 실시양태에서 본 개시내용은 a) 대상체로부터의 종양에서 CD68-양성 세포의 백분율을 결정하는 단계; 및 b) 상기 백분율이 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 4.5%, 적어도 4.6%, 적어도 4.7%, 적어도 4.8%, 적어도 4.9%, 적어도 5.0%, 적어도 5.1%, 적어도 5.2%, 적어도 5.3%, 적어도 5.4%, 적어도 5.5%, 적어도 5.6%, 적어도 5.7%, 적어도 5.8%, 적어도 5.9%, 적어도 6.0%, 적어도 6.5%, 적어도 7.0%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 15%, 또는 적어도 20%인 경우 VEGFR 억제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, VEGFR 억제제는 악시티닙이다.

[0014] 추가 실시양태에서, 본 개시내용은 a) 대상체로부터의 종양에서 CD68-양성 세포의 세포 밀도를 결정하는 단계; 및 b) 상기 세포 밀도가 적어도 0.05개 세포/mm², 적어도 0.06개 세포/mm², 적어도 0.07개 세포/mm², 적어도 0.08개 세포/mm², 적어도 0.09개 세포/mm², 적어도 1.0개 세포/mm², 적어도 1.1개 세포/mm², 적어도 1.2개 세포/mm², 적어도 1.3개 세포/mm², 적어도 1.4개 세포/mm², 또는 적어도 1.5개 세포/mm²인 경우 악시티닙을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, VEGFR 억제제는 악시티닙이다.

[0015] 추가 실시양태에서, 본 개시내용은 VEGFR 억제제를 종양을 갖는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 종양에서의 세포의 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 4.5%, 적어도 4.6%, 적어도 4.7%, 적어도

4.8%, 적어도 4.9%, 적어도 5.0%, 적어도 5.1%, 적어도 5.2%, 적어도 5.3%, 적어도 5.4%, 적어도 5.5%, 적어도 5.6%, 적어도 5.7%, 적어도 5.8%, 적어도 5.9%, 적어도 6.0%, 적어도 6.5%, 적어도 7.0%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 15%, 또는 적어도 20%가 CD68-양성인, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, VEGFR 억제제는 악시티닙이다.

[0016] 추가 실시양태에서, 본 개시내용은 VEGFR 억제제를 종양을 갖는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 종양에서의 CD68-양성 세포의 세포 밀도가 적어도 0.05개 세포/mm², 적어도 0.06개 세포/mm², 적어도 0.07개 세포/mm², 적어도 0.08개 세포/mm², 적어도 0.09개 세포/mm², 적어도 1.0개 세포/mm², 적어도 1.1개 세포/mm², 적어도 1.2개 세포/mm², 적어도 1.3개 세포/mm², 적어도 1.4개 세포/mm², 또는 적어도 1.5개 세포/mm²인, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, VEGFR 억제제는 악시티닙이다.

[0017] 추가 실시양태에서, 본 개시내용은 a) 대상체로부터의 종양에서 CD68-양성 세포의 백분율을 결정하는 단계; b) 종양에서의 CD68-양성 세포의 세포 밀도를 결정하는 단계; 및 c) 상기 백분율이 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 4.5%, 적어도 4.6%, 적어도 4.7%, 적어도 4.8%, 적어도 4.9%, 적어도 5.0%, 적어도 5.1%, 적어도 5.2%, 적어도 5.3%, 적어도 5.4%, 적어도 5.5%, 적어도 5.6%, 적어도 5.7%, 적어도 5.8%, 적어도 5.9%, 적어도 6.0%, 적어도 6.5%, 적어도 7.0%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 15%, 또는 적어도 20%이고; 상기 세포 밀도가 적어도 0.05개 세포/mm², 적어도 0.06개 세포/mm², 적어도 0.07개 세포/mm², 적어도 0.08개 세포/mm², 적어도 0.09개 세포/mm², 적어도 1.0개 세포/mm², 적어도 1.1개 세포/mm², 적어도 1.2개 세포/mm², 적어도 1.3개 세포/mm², 적어도 1.4개 세포/mm², 또는 적어도 1.5개 세포/mm²인 경우 VEGFR 억제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, VEGFR 억제제는 악시티닙이다.

[0018] 추가 실시양태에서, 본 개시내용은 VEGFR 억제제를 종양을 갖는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 종양에서의 세포의 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 4.5%, 적어도 4.6%, 적어도 4.7%, 적어도 4.8%, 적어도 4.9%, 적어도 5.0%, 적어도 5.1%, 적어도 5.2%, 적어도 5.3%, 적어도 5.4%, 적어도 5.5%, 적어도 5.6%, 적어도 5.7%, 적어도 5.8%, 적어도 5.9%, 적어도 6.0%, 적어도 6.5%, 적어도 7.0%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 15%, 또는 적어도 20%가 CD68-양성이고; 여기서 상기 종양에서의 CD68-양성 세포의 세포 밀도가 적어도 0.05개 세포/mm², 적어도 0.06개 세포/mm², 적어도 0.07개 세포/mm², 적어도 0.08개 세포/mm², 적어도 0.09개 세포/mm², 적어도 1.0개 세포/mm², 적어도 1.1개 세포/mm², 적어도 1.2개 세포/mm², 적어도 1.3개 세포/mm², 적어도 1.4개 세포/mm², 또는 적어도 1.5개 세포/mm²인, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, VEGFR 억제제는 악시티닙이다.

[0019] 추가 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 방법을 제공하며, 여기서 상기 종양은 유방 종양, 폐 종양, 신장 종양, 결장직장 종양, 및 췌장 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 방법을 제공하며, 여기서 암 또는 종양은 mRCC이다.

[0020] 추가 실시양태에서, 본원에 개시된 방법이 수행되며, 여기서 CD68 양성 세포의 백분율 또는 세포 밀도를 측정하는 단계가 면역조직화학을 사용하여 수행되고, 추가로 여기서 종양 샘플로부터의 전체 슬라이드 스캔으로부터의 영상 분석의 사용이 사용된다.

[0021] 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 대식세포 함량의 측정은 대식세포 마커 단백질의 존재 또는 양을 측정함으로써 수행된다. 다른 실시양태에서, 대식세포 함량의 측정은 주어진 세포 집단에서 대식세포의 수를 결정함으로써 수행된다. 예를 들어, 대식세포 함량의 측정은 대식세포 마커 단백질의 검출을 수반하는 면역조직화학에 의해 수행될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 대식세포 함량의 측정은 대식세포 마커 단백질을 코딩하는 mRNA의 존재 또는 양을 측정함으로써 수행된다. 대식세포 마커 단백질의 예는 CCR2, CD14, CD68, CD163, CSF1R 및 MSR1을 포함한다. 역시 결정 분석은 수신자 작동 특징 곡선 분석을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 방법은 예를 들어, 유방 종양, 폐 종양, 신장 종양, 결장직장 종양, 및 췌장 종양을 포함하는 다양한 유형의 종양을 시험하는데 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 A4061032 연구에 포함되었던 대상체의 인구통계 및 기준선 특징을 보여준다.

도 2는 A4061032 연구의 일부로서 수집되었던 슬라이드 대 블록에 의한 바이오마커 CD3 및 CD68에 대한 양성 세포의 퍼센트 및 밀도의 개요를 보여준다.

도 3은 바이오마커 CD68에 대한 양성 세포의 중앙값 미만 및 중앙값 이상의 퍼센트 및 밀도의 비교를 위한 PFS의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 플롯을 보여준다.

도 4는 선행 수텐트® 치료를 받은 환자에서의 바이오마커 CD68에 대한 양성 세포의 중앙값 미만 및 중앙값 이상의 퍼센트 및 밀도의 비교를 위한 PFS의 카플란-마이어 플롯을 보여준다.

도 5는 바이오마커 CD3에 대한 양성 세포의 중앙값 미만 및 중앙값 이상의 퍼센트 및 밀도의 비교를 위한 PFS의 카플란-마이어 플롯을 보여준다.

도 6은 선행 수텐트® 치료를 받은 환자에서의 바이오마커 CD3에 대한 양성 세포의 중앙값 미만 및 중앙값 이상의 퍼센트 및 밀도의 비교를 위한 PFS의 카플란-마이어 플롯을 보여준다.

도 7은 양성 세포의 각각의 바이오마커 CD3 및 CD68 퍼센트 및 밀도에 대한 중앙 컷 포인트 미만 및 그 이상의 층에 의한 OS의 개요를 보여준다.

도 8은 선행 수텐트® 치료를 받은 환자에서의 양성 세포의 각각의 바이오마커 CD3 및 CD68 퍼센트 및 밀도에 대한 중앙 컷 포인트 미만 및 그 이상의 층에 의한 OS의 개요를 보여준다.

도 9는 선행 수텐트® 치료를 받은 환자의 양성 세포의 퍼센트 및 밀도에 대해 바이오마커 CD3 및 CD68에 대한 중앙값 미만 및 그 이상의 비교를 위한 OS의 카플란-마이어 플롯을 보여준다.

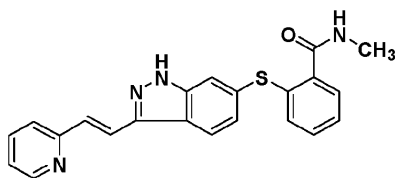
도 10은 반응 카테고리에 의한 양성 세포의 CD3 및 CD68 바이오마커, 퍼센트 및 밀도의 개요를 보여준다.

도 11은 선행 수텐트® 치료를 받은 환자의 반응 카테고리에 의한 양성 세포의 CD3 및 CD68 바이오마커, 퍼센트 및 밀도의 개요를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 정의

[0024] 본원에 사용된 인리타®, "AG-13736" 및 "악시티닙"은 6-[2-(메틸카르바모일)페닐술폰]-3-E-[2-(피리딘-2-일)에테닐]인다졸을 의미하며, 이는 하기 화학 구조를 갖는다 (그의 염 및 다형체 포함).



[0026] 본원에 사용된 "대식세포 마커 단백질"은 대식세포 세포 표면 단백질을 의미하며, 그의 검출은 종양으로부터의 조직 샘플에 존재하는 다른 유형의 세포 사이에서 대식세포를 확인하는데 유용하다. 예시적인 인간 대식세포 마커 단백질은 CCR2, CD14, CD68, CD163, CSF1R 및 MSR1이다. 다른 대식세포 마커 단백질은 본 개시내용을 실시하는데 사용될 수 있다.

[0027] 본원에 사용된 "수신자 작동 특징" (ROC) 곡선은 이원 분류기 시스템에 대한 가양성률 (민감도) 대 진양성률 (특이도)의 플롯을 의미한다. ROC 곡선의 구축에 있어서, 하기 정의가 적용된다:

[0028] 가음성률 "FNR" = 1 - TPR

[0029] 진양성률 "TPR" = 진양성 / (진양성 + 가음성)

[0030] 가양성률 "FPR" = 가양성 / (가양성 + 진음성)

[0031] 본원에 사용된 치료에 대해 "반응" 또는 "반응하는"은 치료된 종양과 관련하여, 종양이: (a) 성장의 둔화, (b) 성장의 중지, 또는 (c) 퇴행을 나타내는 것을 의미한다.

[0032] 본원에 사용된 "역치 결정 분석"은 특정한 종양 유형에 대한 역치 점수를 결정하기 위한 주어진 종양 유형, 예를 들어 인간 신세포 암종을 나타내는 데이터세트의 분석을 의미한다. 주어진 종양 유형을 나타내는 데이터세

트는 이러한 종양의 군으로부터의 각 종양에 대해 다음을 포함할 수 있다: (a) 실제 종양 반응 데이터 (악시티닙과 같은 치료에 대한 반응 및 비-반응), 및 (b) 대식세포 함량 및/또는 CD68 발현 수준.

- [0033] 본원에 사용된 "역치 점수"는 종양이 악시티닙과 같은 치료에 대해 감수성일 가능성이 있는 것으로 분류된 점수보다 높은 점수를 의미한다.
- [0034] 본원에 사용된 "CD68 발현 수준" 또는 "CD68 폴리펩티드 발현 수준"은 종양 샘플에서 발현되는 CD68 단백질의 수준을 의미하고, 임의의 적절한 분석 기술, 예컨대 면역조직화학에 의해 결정될 수 있다. 또한, "CD68 발현 수준"은 "CD68-양성"인 것으로 결정된 주어진 샘플에서의 세포의 백분율 및 "CD68-양성"인 것으로 결정된 주어진 샘플에서의 세포의 밀도를 비롯한 다양한 용어로 나타내어질 수 있다.
- [0035] 본원에 사용된 "CCR2" (CD 192, CKR2, CMKBR2, MCP-1-R, CC-CKR-2, FLJ78302, MGC103828, MGC111760, 및 MGC168006으로도 공지된 케모카인 (C-C 모티프) 수용체 2)는 엔트레즈 유전자식별 번호(Entrez GeneID No.) 729230에 의해 확인된 유전자 및 그의 대립유전자 변이체에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.
- [0036] 본원에 사용된 "CD14"는 엔트레즈 유전자식별 번호 929에 의해 확인된 유전자 및 그의 대립유전자 변이체에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.
- [0037] 본원에 사용된 "CD68" (GP110; SCARD1; 및 DKFZp686M 18236으로도 공지됨)은 엔트레즈 유전자식별 번호 968에 의해 확인된 유전자 및 그의 대립유전자 변이체에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.
- [0038] 본원에 사용된 "CD68-양성" 세포는 CD68의 존재가 임의의 적절한 분석 기술, 예컨대 면역조직화학에 의해 검출되는 세포이다.
- [0039] 본원에 사용된 "CD163" (M130 및 MM 130으로도 공지됨)은 엔트레즈 유전자식별 번호 9332에 의해 확인된 유전자 및 그의 대립유전자 변이체에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.
- [0040] 본원에 사용된 "CSF1R" (CSFR, FMS, FIM2, C-FMS, 및 CD115로도 공지된 콜로니 자극 인자 1 수용체)은 엔트레즈 유전자식별 번호 1436에 의해 확인된 유전자 및 그의 대립유전자 변이체에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.
- [0041] 본원에 사용된 "MSR1" (CD204, SCARA1, SR-A, phSR1 및 phSR2로도 불리는 대식세포 스캐빈저 수용체 1)은 엔트레즈 유전자식별 번호 4481에 의해 확인된 유전자 및 그의 대립유전자 변이체에 의해 코딩되는 인간 단백질을 의미한다.
- [0042] 본원에 사용된 "HR"은 위험 비를 의미한다. 도 3, 4, 5, 6 및 9에서, 비례 위험을 가정할 때, 1 초과 위험 비는 < 중앙값에 유리한 위험 비율에서의 감소를 나타내고; 1 미만의 위험 비는 >= 중앙값에 유리한 위험 비율에서의 감소를 나타내고; 로그순위 p-값은 양쪽 비교 군에서 $N \geq 10$ 인 경우에만 생성되었다. 도 7 및 8에서, 비례 위험을 가정할 때, 1 초과 위험 비는 < 중앙값에 유리한 위험 비율에서의 감소를 나타내고; 1 미만의 위험 비는 >= 중앙값에 유리한 위험 비율에서의 감소를 나타내고; 로그순위 p-값은 양쪽 비교 군에서 $N \geq 10$ 인 경우에만 생성되었고; 위험 비 통계치는 양쪽 비교 군에서 $N \geq 5$ 인 경우에만 생성되었으나; 로그순위 p-값 및 위험 비는 0개 사례가 각 그룹에서 관찰되었을 때 제거되었다.
- [0043] 임상 연구
- [0044] 인리타® (이하 악시티닙으로 지칭됨)는 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR)에 작용하는 경구로 투여되는 소분자 수용체 티로신 키나제 억제제이다. 악시티닙은 혈관신생을 억제함으로써 종양 성장 및 전이를 감소시키고, 이러한 수용체를 발현하고 이에 의존하는 세포에 직접적으로 작용함으로써 종양 성장을 감소시키고 퇴행을 유발하는 것으로 예상된다. 악시티닙은 시토키인 또는 수니티닙 중에 질환 진행되거나, 또는 이에 대해 저항성이 된 후의 전이성 신세포암 (mRCC)의 치료를 위해 다국적으로 승인되어 있다.
- [0045] 연구 A4061032 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00678392)는 "전이성 신세포암을 위한 2차 요법으로서의 악시티닙 (AG-013736): Axis 시험"이라는 제목의 3상 등록 시험이었다. 시험은 악시티닙이 하나의 1차 요법의 실패 이후 mRCC를 갖는 환자에서 종양 진행을 지연시키기에 있어 소라페닙보다 우월함을 입증하도록 설계되었다. 총 650명의 환자를 등록시킬 것으로 계획되었고, 최종적으로 723명의 대상체가 연구에 등록되었다.
- [0046] 실시예에 보다 상세하게 기재된 바와 같이, 포르말린-고정 파라핀 포매 (FFPE) 종양 샘플은 A4061032에 참가하고 종양 샘플의 수집에 구체적 동의를 제공하였던 환자들로부터 수집되었다. 종양 골수 (분화 클러스터 68 "CD68") 또는 림프구 (분화 클러스터 3 "CD3") 침윤은 52명의 악시티닙-치료된 환자로부터의 종양 샘플에서 먼

역조직화학 (IHC)에 의해 평가되었다. 목적은 골수 침윤이 VEGF-VEGFR2 경로를 표적화하는 항혈관신생제에 대한 저항성을 부여한다는 가설에 따라, 효능과 이러한 바이오마커의 잠재적 연관을 조사하는 것이었다 (문헌 [Shojaei et al. (2007) Nat. Biotechnol. 25(8):911-920; 및 Lin et al. (2010) Eur. J. Cancer Suppl. 8(7):191] 참조).

[0047] CD3 및 CD68의 평가는 전체 슬라이드 스캔으로부터의 영상 분석에 의해 수행되었다. 관심 영역을 원으로 표시하고, 영상 분석 알고리즘을 실행하였다. 양성 세포의 백분율 (양성 세포의 수/세포의 총수) 및 양성 세포의 밀도 (예를 들어, 양성 세포의 수/mm²)가 측정되었다. 일부 환자는 FFPE 블록을 공여하였고, 일부는 블록으로부터 절단된 슬라이드를 공여하였다. 모든 환자로부터의 샘플은 슬라이드 또는 블록으로서 제공되었는지에 관계없이 분석되었다.

[0048] IHC 데이터에 대해 52명의 평가가능한 환자가 존재하였으며, 그 중 33명은 이전에 수텐트® (수니티닙)로 치료 받았다. CD3 데이터 및 측정된 종점 중 임의의 것 사이에는 어떠한 상관관계도 존재하지 않았다. 실시예에 보다 상세하게 기재된 바와 같이, CD68의 경우, 양성 세포의 백분율 및 세포 밀도는 밀접한 상관관계가 있었고, 비-반응자 대비 객관적 반응을 갖는 환자에서 2배 더 높았다.

[0049] 선행 치료에 관계없이, \geq 중양 CD68 값 (컷 오프 = 5.21 % 양성 세포 또는 0.08개 세포/mm²의 세포 밀도)을 갖는 환자의 중양 무진행 생존 (PFS)은 양쪽 컷포인트에 대해 12.0개월인 것에 비해, <중양 바이오마커 값을 갖는 환자에서는 각각 3.7 및 3.8개월이었다 (위험 비 [HR]=0.42, 로그순위 p-값 \leq 0.01). 수텐트®로 사전-치료된 환자의 경우 PFS를 갖는 유사한 경향이 미미한 통계적 유의성 (p-값: % 양성 세포 및 세포 밀도에 대해 각각 0.066 및 0.056)으로 관찰되었다. 유리한 효능의 유사한 경향이 비교적 보다 높은 CD68 세포 수를 갖는 환자의 경우에 객관적 반응 및 전체 생존 (OS)에서 관찰되었지만, 이러한 차이는 모든 환자가 함께 평가되거나 수텐트®로만 사전-치료된 환자가 평가된 경우에는 통계적으로 유의하지 않았다.

[0050] 추가의 수신자 작동 특징 (ROC) 분석은 기준선 중양 CD68 수준의 민감도 및 특이도를 보다 잘 이해하고, 초기 선택된 중양 CD68 값으로부터 CD68 컷-포인트의 정의를 최적화하기 위해 수행되었다. 2, 4, 6 및 8개월 PFS의 디폴트 컷-오프 값이 선택되었고, 다시 보다 높은 CD68 양성 세포의 백분율 및 세포 밀도를 갖는 환자는 4개 PFS의 시점 중 각각에서 PFS에 대해 보다 긴 값 (또는 질환 진행 또는 사망의 동등하게 더 적은 기회)을 갖는 것으로 관찰되었다.

[0051] 실시예에 보다 상세하게 기재된 바와 같이, 최고로 높게 관찰된 민감도, 특이도 및 곡선하 면적 (AUC) 값은 2개월 PFS에서 관찰되었으며, 여기서 ROC 곡선의 AUC는 각각 CD68 양성 세포의 백분율 및 세포 밀도에 대해 0.776 및 0.809였으며, 이는 CD68 발현 수준을 사용한 PFS에 대한 강력한 전체 진단 정확도를 나타낸다. 6개월에서의 PFS를 예측하기 위한 최적 컷-오프 포인트는 각각 양성 세포의 CD68 퍼센트 및 밀도에 대해 4.41% 및 0.06개 세포/mm²이었다. 값은 수텐트®로 사전-치료된 환자와 유사하였다.

[0052] ROC 분석은 또한 ORR 대비 CD68의 평가에 사용되었다. 실시예에 보다 상세하게 기재된 바와 같이, AUC는 각각 CD68 양성 세포의 백분율 및 세포 밀도에 대해 0.791 및 0.784였으며, 이는 다시 CD68 발현 수준을 사용한 ORR을 예측하기 위한 강력한 전체 정확도를 나타낸다. ORR을 예측하기 위한 최적 컷 오프 포인트는 각각 CD68 양성 세포의 백분율 및 세포 밀도에 대해 9.42% 및 0.13개 세포/mm²였다. 값은 수텐트®로 사전-치료된 환자와 유사하였다. 21개월에서의 생존 확률, 시험에 대한 중앙값의 경우, ROC 분석은 통계적으로 유의한 연관성을 나타내지 않았다 (0.559의 AUC).

[0053] 결론적으로, 선행 치료에 관계없이, 유리한 PFS는 보다 높은 중양 CD68 수준을 갖는 환자에서 관찰되었다. >중양 CD68 값을 갖는 환자의 중양 PFS는 양쪽 컷포인트에 대해 12.0개월인 것에 비해, <중양 바이오마커 값을 갖는 환자에서는 3.7 및 3.8개월이었다 (HR=0.42, 로그순위 p-값 \leq 0.01). ROC 분석은 2, 4, 6 및 8개월에서의 이 데이터에 대한 강력한 예측 값, 및 정밀화된 컷 오프 포인트 (6개월에서 - CD68 양성 세포의 백분율 및 세포 밀도에 대해 4.41% 및 0.06개 세포/mm²)를 나타내었다.

[0054] 따라서, 본 개시내용은, 보다 높은 CD68 발현이 VEGFR 억제제, 예컨대 악시티닙으로 치료받은 환자에서 보다 높은 ORR 및 보다 긴 PFS와 연관된다는 발견에 관한 것이다. OS와의 연관의 부재는 악시티닙 중의 진행 이후의 진행후 치료를 혼동하는 것 때문일 수 있다. 이러한 관찰은 증가된 VEGF 생산 및 보다 높은 대식세포 침윤과 연관된 혈관신생 상태, 및 이에 따른 악시티닙의 치료 효과에 대한 보다 큰 감수성의 메커니즘과 일치한다.

PFS, 등록 종점의 ROC 분석은 치료 2개월 후 최대 민감도 및 특이도를 나타내었다.

- [0055] CD68 발현은 티보자닙 치료를 받은 mRCC 환자에 대한 결과와 연관이 있는 것으로 이전에 보고되었다 (Lin et al. (2010) Eur. J. Cancer Suppl. 8(7):191). 골수 (CD11b Gr+) 세포는 또한 폐 동물 모델에서 베바시주맙에 대한 저항성을 부여하는 것으로 이전에 밝혀졌다 (Shojaei et al. (2007) *Nat Biotechnol.* 25(8):911-920). 이 데이터는 보다 높은 CD68 종양 수준을 갖는 환자에 대한 불량한 결과와 일치할 것이다. 그러나 이는 본 연구에서 관찰되지 않았다.
- [0056] RCC 환자의 경우, 심각한 진행이 예후 바이오마커의 확인에서 이루어졌지만, 효능의 예측 마커는 표적화 VEGFR 억제제, 예컨대 악시티닙에 대해 확인되지 않았다. 최근 종설논문 (Tonini G et al. (2011) *Exper Rev Anticancer Ther* 11(6):921-930)에 따르면, RCC 환자를 위한 가장 적절한 요법의 선택은 여전히 위험 기준 (MSKCC) 및 다른 예후 기준에 의존한다. 또한, 저자는 이러한 복합적 기준이 RCC 환자 결과에 대한 정보를 제공하고, mRCC를 위한 요법에 대한 반응의 예측 인자가 필요함을 언급한다. 무작위화 임상 시험 (Id.)에서의 잠재적 마커의 검증에 대한 필요가 존재한다. 조직 수집 및 분석의 표준화는 또한 잠재적으로 요법을 안내하도록 분자 바이오마커를 개발함에 있어서 주요 도전과제로서 언급된다 (Sonpavde G and Choueiri T, (2012) *Br J Cancer* 107(7):1009-1016).
- [0057] 본 개시내용을 수행하는데 사용될 수 있는 방법 및 분석 기술은 아래에 추가로 개시된다.
- [0058] 조직 샘플
- [0059] 인간 환자의 종양으로부터의 조직 샘플은 샘플에서의 CD68 발현 수준이 본 개시내용에서 기재된 바와 같이 결정될 수 있도록 RNA의 공급원, 단백질의 공급원, 또는 면역조직화학 (IHC)을 위한 얇은 절편의 공급원으로서 사용될 수 있다. 조직 샘플은 통상적인 종양 생검 기기 및 절차를 사용하여 수득될 수 있다. 내시경 생검, 절제 생검, 절개 생검, 미세 바늘 생검, 펀치 생검, 면도 생검 및 피부 생검은 종양 샘플을 수득하기 위해 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 사용될 수 있는 인식된 의료 절차의 예이다. 종양 조직 샘플은 마커 유전자, 예를 들어 CD68 발현 수준을 측정하거나 IHC, 예를 들어 CD68-양성 세포 발현에 의해 대식세포를 가시화하는데 있어서 충분한 RNA, 단백질, 또는 얇은 절편을 제공하기에 충분히 커야 한다.
- [0060] 종양 조직 샘플은 대식세포 함량, 또는 특히 CD68의 측정을 가능하게 하는 임의의 형태일 수 있다. 다시 말해서, 조직 샘플은 RNA 추출, 단백질 추출, 또는 얇은 절편의 제조를 위해 충분해야 한다. 따라서, 조직 샘플은 신선하거나, 적합한 극저온 기술을 통해 보존되거나, 비-극저온 기술을 통해 보존될 수 있다. 임상 생검 시편 취급을 위한 표준 방법은 조직 샘플을 포르말린으로 고정시킨 후, 이를 파라핀에 포매시키는 것이다. 이러한 형태의 샘플은 통상적으로 포르말린-고정, 파라핀-포매된 (FFPE) 조직으로 공지되어 있다. 후속 분석을 위한 조직 제조의 적합한 기술은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리-공지되어 있다.
- [0061] 대식세포 함량
- [0062] 본 개시내용을 실시하는데 있어서, (예를 들어, 종양으로부터의) 조직 샘플에서의 대식세포 함량 (예를 들어, 대식세포 수 또는 대식세포 마커, 예컨대 CD68의 발현, 예를 들어 대식세포 마커 단백질의 발현 또는 대식세포 마커 단백질, 예컨대 CD68을 코딩하는 mRNA의 발현)의 수준을 결정하는 것은 여러 임의의 적합한 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 대식세포 함량을 간접적으로 측정하는 것은 대식세포 마커, 예컨대 CD68로서 유용한 것으로 공지된 하나 이상의 유전자의 발현을 측정함으로써 이루어질 수 있다. 유전자 발현의 측정을 위한 다양한 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 방법은 대식세포 마커 단백질 또는 대식세포 마커 단백질을 코딩하는 mRNA의 수준을 결정하는데 적용될 수 있다. 예시적인 인간 대식세포 마커 유전자는 CCR2, CD14, CD68, CD163, CSF1R 및 MSR1이다. 다른 대식세포 마커가 또한 사용될 수 있다.
- [0063] RNA 분석
- [0064] 통상적인 마이크로어레이 분석 및 정량적 폴리머라제 연쇄 반응 (QPCR)은 mRNA 수준에서 대식세포 마커 유전자 발현의 수준을 결정하기 위한 방법의 예이다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, RNA는 표준 프로토콜을 사용하여 관심 세포, 종양 또는 조직으로부터 추출된다. 다른 실시양태에서, RNA 분석은 RNA 단리를 필요로 하지 않는 기술을 사용하여 수행된다.
- [0065] RNA 단리
- [0066] 조직 샘플로부터의 진행 mRNA, 즉 폴리(a) RNA의 빠르고 효율적인 추출을 위한 방법은 널리 확립되어 있고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Ausubel et al., 1997, *Current*

Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons]을 참조한다. 조직 샘플은 신선하거나, 동결되거나, 파라핀-포매된 (FFPE) 샘플, 예컨대 임상 연구 종양 시편으로 고정될 수 있다. 일반적으로, 신선한 또는 동결된 조직 샘플로부터 단리된 RNA는 FFPE 샘플로부터의 RNA 보다 덜 단편화되는 경향이 있다. 그러나, 종양 물질의 FFPE 샘플은 보다 용이하게 입수가능하고, FFPE 샘플은 본 개시내용의 방법에서 사용하기 위한 RNA의 적합한 공급원이다. RT-PCR에 의한 유전자 발현 프로파일링을 위한 RNA의 공급원으로서의 FFPE 샘플의 논의를 위해, 예를 들어 문헌 [Clark-Langone et al., 2007, BMC Genomics 8:279]을 참조한다. 또한 문헌 [De Andres et al., 1995, Biotechniques 18:42044]; 및 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0095634 (Baker et al.)를 참조한다. RNA 추출 및 제조를 위한 판매업체의 지침서가 있는 상업적으로 입수가능한 키트의 용도는 광범위하고, 통상적이다. 다양한 RNA 단리 생성물 및 완성된 키트의 상업적인 판매업체는 퀴아젠(Qiagen) (캘리포니아주 발렌시아), 인비트로젠(Invitrogen) (캘리포니아주 칼스배드), 암비온(Ambion) (텍사스주 오스틴) 및 엑시콘(Exiqon) (매사추세츠주 워번)을 포함한다.

[0067] 일반적으로, RNA 단리는 조직/세포 파괴로 시작된다. 조직/세포 파괴 동안 RNase에 의한 RNA 분해를 최소화하는 것이 바람직하다. RNA 단리 과정 동안 RNase 활성을 제한하는 하나의 접근법은 세포가 파괴된 즉시 변성제가 세포 내용물과 접촉하는 것을 확실하게 하는 것이다. 또 다른 통상적인 실시는 RNA 단리 과정에서 하나 이상의 프로테아제를 포함시키는 것이다. 임의로, 신선한 조직 샘플은 수집된 즉시 실온에서 RNA 안정화 용액 중에 침지시킨다. 안정화 용액은 빠르게 세포를 투과하고, 후속적인 단리를 위한 4℃에서의 저장을 위해 RNA를 안정화시킨다.

[0068] 일부 프로토콜에서, 총 RNA는 염화세슘 밀도 구배 원심분리에 의해 파괴된 종양 물질로부터 단리된다. 일반적으로, mRNA는 총 세포 RNA의 대략 1 퍼센트 내지 5 퍼센트를 구성한다. 고정화 올리고(dT), 예를 들어 올리고(dT) 셀룰로스는 통상적으로 mRNA를 리보솜 RNA 및 전달 RNA로부터 분리하는데 사용된다. 단리 후 저장되는 경우, RNA는 RNase-무함유 조건하에 저장되어야 한다. 단리된 RNA의 안정한 저장 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. RNA의 안정한 저장을 위한 다양한 상업용 제품이 입수가능하다.

[0069] 마이크로어레이

[0070] 대식세포 마커 단백질, 예컨대 CD68을 코딩하는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준은 통상적인 DNA 마이크로어레이 발현 프로파일링 기술을 사용하여 측정될 수 있다. DNA 마이크로어레이는 고체 표면 또는 기관, 예컨대 유리, 플라스틱 또는 규소에 부착된 특정한 DNA 절편 또는 프로브의 수집물이며, 각각의 특정한 DNA 절편이 어레이에서 공지된 위치를 차지한다. 표지된 RNA의 샘플과의 혼성화는 일반적으로 엄격한 혼성화 조건하에, 어레이에서 각각의 프로브에 상응하는 RNA 분자의 검출 및 정량화를 가능하게 한다. 비-특이적으로 결합된 샘플 물질을 제거하기 위한 엄격한 세척 후, 마이크로어레이는 공초점 레이저 현미경검사 또는 다른 적합한 검출 방법에 의해 스캐닝된다. DNA 칩으로 종종 공지된 현대의 상업용 DNA 마이크로어레이는 전형적으로 수만 개의 프로브를 함유하고, 따라서 수만 개의 유전자의 발현을 동시에 측정할 수 있다. 이러한 마이크로어레이는 본 개시내용의 실시에서 사용될 수 있다. 대안적으로, 대식세포 마커 단백질, 예컨대 CD68을 코딩하는 하나 이상의 유전자의 발현을 측정하는데 필요한 것만큼의 프로브를 함유하는 맞춤형 칩 이외에, 예를 들어 데이터 정규화를 위해 필요한 대조군 또는 표준물이 본 개시내용을 실시하는데 사용될 수 있다.

[0071] 데이터 정규화를 용이하게 하기 위해, 2-색 마이크로어레이 판독기가 사용될 수 있다. 2-색 (2-채널) 시스템에서, 샘플은 제1 파장에서 방출하는 제1 형광단으로 표지되며, RNA 또는 cDNA 표준물은 상이한 파장에서 방출하는 제2 형광단으로 표지된다. 예를 들어, Cy3 (570 nm) 및 Cy5 (670 nm)는 종종 2-색 마이크로어레이 시스템에서 함께 사용된다.

[0072] DNA 마이크로어레이 기술은 잘 발달되었고, 상업적으로 입수가능하고, 광범위하게 사용된다. 따라서, 본원에 개시된 방법을 수행하는데 있어서, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 마이크로어레이 기술을 사용하여, 과도한 실험 없이 대식세포 마커 단백질, 예컨대 CD68을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있다. DNA 마이크로어레이 칩, 시약 (예컨대, RNA 또는 cDNA 제조, RNA 또는 cDNA 표지, 혼성화 및 세척 용액을 위한 시약), 기기 (예컨대, 마이크로어레이 판독기) 및 프로토콜은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 다양한 상업적 공급원으로부터 입수가능하다. 마이크로어레이 시스템의 상업적 판매업체는 애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies) (캘리포니아주 산타 클라라) 및 아피메트릭스(Affymetrix) (캘리포니아주 산타 클라라)를 포함하지만, 다른 PCR 시스템이 또한 사용될 수 있다.

[0073] 정량적 RT-PCR

- [0074] 대식세포 마커 단백질, 예컨대 CD68을 코딩하는 개별 유전자를 나타내는 mRNA의 수준은 통상적인 정량적 역전사 효소 폴리머라제 연쇄 반응 (qRT-PCR) 기술을 사용하여 측정될 수 있다. qRT-PCR의 이점은 민감도, 유연도, 정량적 정확도 및 밀접하게 연관된 mRNA 사이를 식별하는 능력을 포함한다. 정량적 PCR을 위한 조직 샘플의 프로세싱에 관한 안내는 qRT-PCR에 대한 상업용 제품의 제조업체 및 판매업체 (예를 들어, 퀴아젠 (캘리포니아주 발렌시아) 및 암비온 (텍사스주 오스틴))를 포함하여 다양한 공급원으로부터 입수가 가능하다. qRT-PCR의 자동화 수행을 위한 기기 시스템은 상업적으로 입수가 가능하고, 다수의 실험실에서 상용적으로 사용된다. 널리-공인된 상업용 시스템의 예는 어플라이드 바이오시스템즈 7900HT 패스트 리얼-타임 PCR 시스템(Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System) (어플라이드 바이오시스템즈, 캘리포니아주 포스터 시티)이다.
- [0075] mRNA가 단리되면, RT-PCR에 의한 유전자 발현 프로파일링의 제1 단계는 cDNA로의 mRNA 주형의 역전사이고, 이는 이어서 PCR 반응에서 기하급수적으로 증폭된다. 2개의 통상적으로 사용되는 역전사효소는 아빌로(avilo) 골수 모구증 바이러스 역전사효소 (AMV-RT) 및 몰로니(Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스 역전사효소 (MMLV-RT)이다. 역전사 반응은 전형적으로 특정한 프라이머, 랜덤 육량체, 또는 올리고(dT) 프라이머로 프라이밍된다. 생성된 cDNA 생성물은 후속적인 폴리머라제 연쇄 반응에서 주형으로서 사용될 수 있다.
- [0076] PCR 단계는 열안정성 DNA-의존성 DNA 폴리머라제를 사용하여 수행된다. PCR 시스템에서 가장 통상적으로 사용되는 폴리머라제는 썬머스 아쿠아티쿠스(Thermus aquaticus) (Taq) 폴리머라제이다. PCR의 선택성은 증폭을 위해 표적화된 DNA 영역, 즉, 대식세포 마커 단백질, 예컨대 CD68을 코딩하는 유전자로부터 역전사된 cDNA의 영역에 상보적인 프라이머의 사용으로부터 야기된다. 따라서, qRT-PCR이 본 개시내용에서 사용되는 경우, 각각의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머는 유전자의 cDNA 서열에 기초한다. 상업용 기술, 예컨대 SYBR® 그린 또는 택맨(TaqMan)® (어플라이드 바이오시스템즈, 캘리포니아주 포스터 시티)은 판매업체의 지침서에 따라 사용될 수 있다. 메신저 RNA 수준은 하우스키핑 유전자, 예컨대 베타-액틴 또는 GAPDH의 수준을 비교함으로써 샘플 사이의 부하의 차이에 대해 정규화될 수 있다. mRNA 발현의 수준은 임의의 단일 대조군 샘플, 예컨대 정상, 비-종양 조직 또는 세포로부터의 mRNA에 대하여 표현될 수 있다. 대안적으로, 이는 종양 샘플의 풀 또는 종양 세포주로부터의 mRNA, 또는 상업적으로 입수가 가능한 대조군 mRNA의 세트로부터의 mRNA에 대하여 표현될 수 있다.
- [0077] 대식세포 마커 단백질, 예컨대 CD68을 코딩하는 유전자의 발현 수준의 PCR 분석을 위한 적합한 프라이머 세트는 과도한 실험 없이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 설계 및 합성될 수 있다. 대안적으로, 본 개시내용을 실시하기 위한 PCR 프라이머 세트는 상업적 공급원, 예를 들어 어플라이드 바이오시스템즈로부터 구입될 수 있다. PCR 프라이머는 바람직하게는 약 17 내지 25개 뉴클레오타이드 길이이다. 프라이머는 Tm 추정을 위한 통상적인 알고리즘을 사용하여 특정한 용융 온도 (Tm)를 갖도록 설계될 수 있다. 프라이머 설계 및 Tm 추정을 위한 소프트웨어는 상업적으로 입수가 가능하고 (예를 들어 프라이머 익스프레스(Primer Express)TM (어플라이드 바이오시스템즈)), 또한 인터넷 상에서 입수가 가능하다 (예를 들어, 프라이머3 (매사추세츠 공과 대학교)). PCR 프라이머 설계의 확립된 원리를 적용함으로써, 수많은 상이한 프라이머는 대식세포 마커 유전자, 예컨대 CD14, CD68, MSR1, CSFR1, CD163 및 CCR2를 포함하는 임의의 주어진 유전자의 발현 수준을 측정하는데 사용될 수 있다.
- [0078] 본 개시내용의 일부 실시양태에서, RNA 분석은 RNA 추출 또는 단리를 수반하지 않는 기술을 사용하여 수행된다. 하나의 이러한 기술은 명칭 qNPATM (하이 스루풋 게노믹스, 인크.(High Throughput Genomics, Inc.), 애리조나주 투산) 하에 상업적으로 입수가 가능한 정량적 뉴클레아제 보호 검정이다. 이 기술은 분석될 종양 조직 샘플이 FFPE 물질의 형태인 경우 유리할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Roberts et al., 2007, Laboratory Investigation 87:979-997]을 참조한다.
- [0079] 단백질 분석
- [0080] 본 개시내용의 방법에서, CD68과 같은 대식세포 마커 유전자 발현은 단백질 수준에서 검출될 수 있다. 단백질 수준에서의 대식세포 마커 유전자 발현의 수준을 측정하는 방법의 예는 효소 연결 면역흡착 검정 (ELISA) 및 IHC 분석을 포함한다.
- [0081] ELISA
- [0082] 대식세포 마커 단백질 ELISA, 예를 들어 CD68 ELISA의 수행은 대식세포 마커 단백질에 대한 적어도 하나의 항체, 즉 검출 항체를 필요로 한다. 예시적인 실시양태에서, CD68은 대식세포 마커 단백질이다. 분석될 샘플로부터의 CD68 단백질은 고체 지지체, 예컨대 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트 상에 고정화된다. 이 고정화는 예를 들어, 표면의 흡착을 통한 CD68의 비-특이적 결합에 의한 것일 수 있다. 대안적으로, 고정화는 "샌드위치" ELISA에서, 예를 들어 포획 항체 (검출 항체와 상이한 항-CD68 항체)에 의한 샘플로부터의 CD68 단백

질의 결합을 통한 특이적 결합에 의한 것일 수 있다. CD68이 고정화된 후, 검출 항체가 첨가되고, 검출 항체는 결합된 CD68과 복합체를 형성한다. 검출 항체는 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들어 검출 항체를 특이적으로 인식하는 2차 항체를 통해 효소에 연결된다. 전형적으로 각 단계 사이에서, 결합된 CD68을 갖는 플레이트는 온화한 세제 용액으로 세척된다. 전형적인 ELISA 프로토콜은 또한, 비-특이적 결합 단백질, 예컨대 소 혈청 알부민을 사용하여 단백질 시약의 플레이트로의 원치 않는 비-특이적 결합을 차단하는 것을 수반하는 하나 이상의 차단 단계를 포함한다. 최종 세척 단계 후, 플레이트는 샘플에서의 CD68의 양을 나타내는 가시적 신호를 생성하도록 적절한 효소 기질의 첨가에 의해 발생된다. 기질은 예를 들어, 발색원성 기질 또는 형광원성 기질일 수 있다. ELISA 방법, 시약 및 장비는 관련 기술분야에 널리-공지되어 있고 상업적으로 입수가능하다.

[0083] 다른 대식세포 마커 단백질, 예를 들어 CCR2, CD14, CD163, CSF1R, 및 MSR1뿐만 아니라 다른 대식세포 특이적 마커 단백질의 발현 수준은 각각의 대식세포 마커 단백질에 대해 특이적인 항체의 검출을 사용하여 ELISA에 의해 측정될 수 있음이 이해된다.

[0084] 면역조직화학 (IHC)

[0085] 주어진 세포 집단에서의 대식세포의 수는 면역조직화학에 의해 결정 (예를 들어, 가시화)될 수 있다. 또한, 주어진 바이오마커 단백질, 예컨대 CD68에 대해 양성인 샘플에서의 세포의 백분율 및 밀도는 면역화학에 의해 결정될 수 있다. IHC, 예를 들어 CD68 IHC에 의한 대식세포 마커 단백질의 검정은 대식세포 마커 단백질에 대한 적어도 하나의 항체, 예를 들어 적어도 하나의 항-CD68 항체를 필요로 한다. IHC에 적합한 수많은 항-CD68 항체는 상업적으로 입수가능하다. 예를 들어, 적합한 항체는 다코 노스 아메리카, 인크.(Dako North America, Inc.) (캘리포니아주 카핀테리아), 아브캄(abcam) (매사추세츠주 캠브리지), 아브노바(Abnova) (캘리포니아주 월넛), 알앤디 시스템즈(R and D Systems) (미네소타주 미네아폴리스) 또는 인비트로젠 (캘리포니아주 칼스배드)으로부터 구입될 수 있다. 표준 기술을 사용하여, 항-CD68 항체는 파라핀-포매 및 동결된 종양 절편을 포함하는, 종양으로부터 수득된 절편, 예를 들어 5 마이크론 절편에서의 CD68 단백질의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 전형적으로, 종양 절편은 종양 물질의 수집 및 보존의 초기 절차에서 고정되었던 단백질의 항원성 구조를 회수하기 위한 방식으로 초기에 처리된다. 이어서, 슬라이드는 항-CD68 검출 항체에 의한 비-특이적 결합을 방지하도록 차단된다. 이어서, CD68 단백질의 존재는 CD68 단백질에의 항-CD68 항체의 결합에 의해 검출된다. 검출 (1차) 항체는 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들어 검출 (1차) 항체를 특이적으로 인식하는 2차 항체 또는 중합체를 통해 효소에 연결된다. 전형적으로, 종양 절편은 세척되고, 단계 사이에서 비특이적 단백질, 예컨대 소 혈청 알부민으로 차단된다. 슬라이드는 가시적 신호를 생성하도록 적절한 효소 기질을 사용하여 발색된다. 샘플은 헤마톡실린으로 대조염색될 수 있다.

[0086] 다른 대식세포 마커 단백질, 예를 들어 CCR2, CD14, CD163, CSF1R, 및 MSR1뿐만 아니라 다른 대식세포 특이적 마커 단백질의 발현은 각각의 대식세포 마커 단백질에 대해 특이적인 항체를 사용하여 유사한 방식으로 IHC에 의해 검출될 수 있음이 이해된다.

[0087] 데이터 해석

[0088] 종양에 대한 대식세포 점수는 역치 점수와 관련하여 해석될 수 있다. 역치 점수 이상인 대식세포 점수 또는 특정한 바이오마커, 예컨대 CD68의 발현 수준은 VEGFR 억제제, 예컨대 악시티닙으로의 치료에 대해 감수성 (반응성)일 가능성이 있는 종양의 예측으로 해석될 수 있다. 대안적으로, 역치 점수 이하인 대식세포 점수 또는 특정한 바이오마커, 예컨대 CD68의 발현 수준은 VEGFR 억제제, 예컨대 악시티닙으로의 치료에 대해 저항성 (비-반응성)일 가능성이 있는 종양의 예측으로 해석될 수 있다.

[0089] 최적 역치 대식세포 점수 또는 CD68 발현 수준은 역치 결정 분석을 수행함으로써 실험적으로 결정 (또는 적어도 근사화)될 수 있다. 바람직하게는, 역치 결정 분석은 수신자 작동 특징 (ROC) 곡선 분석을 포함한다. ROC 곡선 분석은 확립된 통계적 기술이며, 그의 적용은 관련 기술분야의 통상의 기술 내에 있다. ROC 곡선 분석의 논의를 위해, 일반적으로 문헌 [Zweig et al., 1993, "Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine," Clin. Chem. 39:561-577; 및 Pepe, 2003, The statistical evaluation of medical tests or classification and prediction, Oxford Press, New York]을 참조한다.

[0090] 대식세포 점수, CD68 발현 수준, 및 최적 역치 점수는 종양 유형에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 역치 결정 분석은 바람직하게는 본 개시내용을 사용하여 시험될 임의의 주어진 종양 유형을 나타내는 하나 이상의 데이터 세트 상에서 수행된다. 역치 결정 분석에 사용되는 데이터세트는 다음을 포함한다: (a) 실제 반응 데이터 (반

응 또는 비-반응), 및 (b) 종양의 군으로부터의 각각의 종양 샘플에 대한 대식세포 점수 또는 CD68 발현 수준. 대식세포 점수 또는 CD68 발현 수준 역치가 주어진 종양 유형과 관련하여 결정되면, 그러한 역치는 그 종양 유형의 종양으로부터 대식세포 점수 또는 CD68 발현 수준을 해석하는데 적용될 수 있다.

[0091] ROC 곡선 분석은 하기와 같이 수행될 수 있다. 역치 이상의 대식세포 점수 또는 CD68 발현 수준을 갖는 임의의 샘플은 반응자로서 확인된다 (감수성). 대안적으로, 역치 이하의 대식세포 점수 또는 CD68 발현 수준을 갖는 임의의 샘플은 비-반응자로서 확인된다 (저항성). 시험된 샘플의 세트로부터의 모든 대식세포 점수 또는 CD68 발현 수준에 대해, "반응자" 및 "비-반응자" (가상 명칭)는 그 점수를 역치로서 사용하여 분류된다. 이 과정은 데이터 세트에 대한 실제 반응 데이터에 대한 가상 명칭의 비교를 통해 각각의 잠재적 역치에 대한 TPR (y 벡터) 및 FPR (x 벡터)의 계산을 가능하게 한다. 이어서, ROC 곡선은 TPR 벡터, 및 FPR 벡터를 사용하여 도트 플롯을 생성함으로써 구축된다. ROC 곡선이 (0, 0) 점에서부터 (1.0, 0.5) 점까지의 대각선 위에 있는 경우, 이는 대식세포 시험 결과가 무작위 시험보다 우수한 시험임을 나타낸다.

[0092] ROC 곡선은 최적 조작점을 확인하는데 사용될 수 있다. 최적 조작점은 가음성의 값과 비교 검토된 가양성의 값 사이에서 최적 균형을 산출하는 점이다. 이러한 값은 동등할 필요는 없다. ROC 공간의 점 x,y에서의 분류의 평균 예상 값은 하기 식에 의해 결정된다.

[0093] $C = (1-p) \text{알파} * x + p * \text{베타}(1-y)$

[0094] 여기서:

[0095] 알파 = 가양성의 값,

[0096] 베타 = 양성을 놓친 것 (가음성)의 값, 및

[0097] p = 양성 경우의 비율이다.

[0098] 가양성 및 가음성은 알파 및 베타에 대해 상이한 값을 부여함으로써 상이하게 가중치가 부과될 수 있다. 예를 들어, 보다 많은 비-반응자인 환자를 치료하는 것을 감수하고 반응자 군의 환자를 보다 많이 포함시키는 것으로 결정된 경우, 알파에 대해 가중치를 더 둘 수 있다. 이 경우, 가양성 및 가음성의 값은 동일한 것으로 추정된다 (알파는 베타와 동등함). 따라서, ROC 공간의 점 x,y에서의 분류의 평균 예상 값은 다음과 같다:

[0099] $C' = (1-p) * x + p * (1-y)$.

[0100] 가장 작은 C'는 가양성 및 가음성의 모든 쌍 (x, y)을 사용한 후에 계산할 수 있다. 최적 점수 역치는 C'에서의 (x, y)의 점수로서 계산된다.

[0101] 종양이 VEGFR 억제제, 예컨대 악시티닙에 대해 감수성 또는 저항성일지 여부를 예상하는 것뿐만 아니라, 대식세포 점수 또는 CD68 발현 수준은 종양이 감수성 또는 저항성일 가능성에 대한 근사치이지만, 유용한 지표를 제공한다.

[0102] 시험 키트

[0103] 본 개시내용은 본 개시내용의 방법을 수행하기 위한 특정 성분을 포함하는 진단 시험 키트를 포함한다. 진단 시험 키트는 진단 검정의 수행에서 편의성, 속도 및 재현성을 증진시킨다. 예를 들어, 본 개시내용의 예시적인 qRT-PCR-기반 실시양태에서, 기본 진단 시험 키트는 대식세포 마커, 예를 들어 CD68의 발현을 분석하기 위한 PCR 프라이머를 포함한다. 다른 실시양태에서, 보다 정교한 시험 키트는 PCR 프라이머뿐만 아니라 PCR 기술을 사용하여 CD68 발현 수준을 측정하기 위한 완충제, 시약 및 상세한 지침서를 함유한다. 일부 실시양태에서, 키트는 시험 프로토콜 및 RNA 샘플(들)을 제외한 시험에 필요한 모든 소모성 성분을 포함한다.

[0104] 본 개시내용의 예시적인 DNA 마이크로어레이-기반 실시양태에서, 시험 키트는 특정한 기기와 함께 사용하기 위해 설계된 마이크로유체 카드 (어레이)를 포함한다. 임의로, 마이크로유체 카드는 대식세포 마커 유전자 발현의 측정을 위해 특이적으로 설계된 맞춤형 장치이다. 이러한 맞춤형 마이크로유체 카드는 상업적으로 입수가능하다. 예를 들어, 텍맨 어레이는 어플라이드 바이오시스템즈 7900HT 패스트 리얼 타임 PCR 시스템 (어플라이드 바이오시스템즈, 캘리포니아주 포스터 시티)과 함께 사용하기 위해 설계된 384-웰 마이크로유체 카드 (어레이)이다. 예시적인 유체 카드는 CCR2, CD14, CD68, CD163, CSF1R 및/또는 MSR1 발현을 측정하기 위한 프로브의 임의의 조합에 더하여, 예를 들어, 데이터 정규화를 위해 필요한 대조군 또는 표준물을 포함할 수 있다. 다른 대식세포 마커 단백질은 또한 본 개시내용을 실시하기 위해 유체 카드 상에 포함될 수 있다.

- [0105] 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 시험 키트는 IHC에 의해 종양 대식세포 함량을 결정하기 위한 물질을 함유한다. IHC 키트는 예를 들어, 인간 대식세포 마커, 예를 들어 마우스 항-인간 CD68 항체에 대한 1차 항체, 및 리포터 효소, 예를 들어 양고추냉이 퍼옥시다제에 접합된 2차 항체를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 2차 항체는 1차 항체를 특이적으로 인식하는 접합된 중합체로 대체된다.
- [0106] 실시예
- [0107] 본 개시내용은 하기 실시예에 의해 추가로 설명되며, 이는 어떠한 방식으로든 본 개시내용의 범주 또는 내용을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0108] 실시예 1 - 슬라이드 대 블록에 의한 CD3 및 CD68 양성 세포의 퍼센트 및 밀도
- [0109] 본 연구는 하기 작용제 중 1종 이상을 함유하는 하나의 선행 전신 1차 요법에 실패한 이후에 전이성 신세포 암종 (mRCC)을 갖는 환자에서의 악시티닙 대 소라페닙의 2-부분, 무작위화, 개방-표지, 다중-중심 3상 연구였다: 수니티닙, 베바시주맙 + IFN α , 템시롤리무스, 또는 시토키인(들). 전체적으로, mRCC를 갖는 723명의 환자를 무작위화하여 본 연구에 등록하였으며, 이 중 52명의 악시티닙-치료된 환자가 면역조직화학 (IHC) 분석에 대해 평가가능하였고; 추가로, 52명의 환자 중 33명은 이전에 수텐트®로 치료받았다.
- [0110] 도 1에 제시된 바와 같이, IHC 분석에 포함된 대부분의 환자는 백인 (환자의 90.4%), 남성 (환자의 69.2%) 및 북아메리카 (환자의 57.7%) 및 유럽 (32.7%) 출신이었다. 전체 평균 (표준 편차) 연령, 신장 및 체중은 각각 58.3 (11.0)세, 173.0 (10.0)cm, 및 84.6 (19.1)kg이었다. 모든 환자는 0 (환자의 51.9%) 또는 1 (환자의 48.1%)의 ECOG 수행 상태를 가지고 있었다. 전체적으로, 생존에 대한 메모리얼 슬론-케터링 캔서 센터 (MSKCC) 예후 그룹 인자 모델에서 환자의 23.1%가 유리한 것으로 분류되었고, 환자의 34.6% 및 42.3%가 각각 중간 및 불량으로 분류되었다. 또한, MSKCC 위험 군을 하기 4개의 위험 인자를 사용하여 유도하였다: 높은 락테이트 데히드로게나제 (>1.5 x 정상 상한치), 낮은 혈청 헤모글로빈 (정상 하한치 미만), 높은 보정된 혈청 칼슘 (>10 mg/dL), 및 선행 신절제술의 부재.
- [0111] 모든 52명의 환자는 CD3 및 CD68 둘 다에 대해 평가가능하였다. 52명의 CD3 및 CD68 평가가능한 환자 중에서, 26명은 포르말린-고정 파라핀 포매 (FFPE) 종양 블록을 공여하고, 26명은 분석을 위한 슬라이드를 공여하였다. 모자이크 래보러토리즈(Mosaic Laboratories)가 인간 정상 및 인간 암을 나타내는 FFPE 물질을 제공하였다. 시편은 임상연구보호센터 사무국 (Office of Human Research Protection)에 의해 규정된 바와 같이 '인간 대상체 연구 편제'를 규정하는 가이드라인 하에 잔류, 미확인된, 또는 익명의 인간 샘플의 시험관내 분석을 위한 사용을 허용하는 IRB-검토된 프로토콜 (MOS001) 하에 입수하였다. CD68 마우스 모노클로날 KP1 항체 (카탈로그# M0814, Lot# 46406, 유효 기간: 2011년 9월)를 다코(Dako) (미국 캘리포니아주 카편테리아)로부터 구입하고, 첨부 문서에 따라 2-8°C에서 저장하였다. 마우스 IgG 이소형 대조군 항체 (Lot# 37211, 유효 기간: 2010년 7월)를 다코로부터 구입하고, 첨부 문서에 따라 2-8°C에서 저장하였다. IHC를 모자이크 래보러토리즈의 SOP에 따라 수행하였다. CD68 IHC 검정을 "홈브루(homebrew)" 클래스 I 시험 검증을 위해 CLIA 가이드라인과 상용가능하도록 설계하고 검증하였다.
- [0112] 염색을 병리학자에 의해 평가하였고, 반응성의 평가는 하기의 조합을 수반하였다: CD68 염색의 세포 국재화; 염색 강도; 세포화 국재화; 및 관심 조직 유형의 주요 성분에서의 세포 염색의 백분율. 현미경사진 (20x 배율)을 니콘 이클립스(Nikon Eclipse) 50i 현미경에 부착된 스팟 인사이트 QE 모델(Spot Insight QE Model) 4.2 냉각 전하-커플링 장치 카메라 (디아그노스틱 인스트루먼트(Diagnostic Instruments), 미국 미시간주 스티어링 하이츠)를 사용하여 취득하였다.
- [0113] CD3 및 CD68 양성 세포의 평균 백분율은 블록에서보다 슬라이드에서 다소 낮았다; CD3의 경우 13.61% 대 17.95% 및 CD68의 경우 5.83% 대 8.21%. 유사하게, 다소 더 낮은 평균 세포 밀도가 블록에서보다 슬라이드에서 관찰되었다; CD3의 경우 489.15개 세포/mm² 대 590.50개 세포/mm², 및 CD68의 경우 0.08개 세포/mm² 대 0.13개 세포/mm² (도 2).
- [0114] 실시예 2 - 보다 높은 CD68 발현 수준은 유리한 ORR 및 PFS와 긍정적인 상관관계가 있으나 OS와는 그렇지 않다
- [0115] IHC 바이오마커 분석을 위해, 바이오마커 분석 세트를 사용하였으며, 이는 적어도 1회 용량의 연구 치료를 받은 모든 환자를 포함하였다. 하기 효능 중점을 분석하였다: PFS, OS, 및 객관적 반응률 (ORR). 요약 통계를 반응 카테고리 (각 마커에 대해 완전 반응 [CR]+부분 반응 [PR] 대 안정 질환 [SD]+진행성 질환 [PD])에 의해 양성 세포의 퍼센트 및 밀도에 대하여 제공하였다. 윌콕슨 순위 합계 검정(Wilcoxon Rank Sum test)을 수행하여 반

응 카테고리 사이의 차이에 대해 검정하였다. 피셔 정확 검정(Fisher's exact test)을 사용하여 컷 오프 포인트로서 중앙값을 사용하여 반응 카테고리 및 바이오마커 층 사이의 연관성을 검정하였다. OS 및 PFS의 분포를 카플란-마이어 방법을 사용하여 컷 오프 포인트로서 바이오마커 중앙값에 의해 바이오마커 층 사이에서 비교하였고; p-값은 어느 하나의 층에서 $N < 10$ 인 경우 나타나지 않았다. 추정 위험 비 (HR) 및 그의 양측 95% 신뢰 구간 (CI), 및 중앙 사례 시간 및 그의 양측 95% CI가 보고되었다. 중앙 부피에서의 최적 반응 퍼센트 변화를 일곱 순위 합계 검정을 사용하여 컷 오프 포인트로서 중앙값을 사용하여 바이오마커 층 사이에서 비교하였다.

[0116] 바이오마커 층 사이의 ORR, PFS, 및 OS 분석에서의 유의한 시험 결과 ($p < 0.05$)를 위해, 수신자 작동 특징 (ROC) 곡선을 생성하여, 환자 선택 마커로서의 유용성에 대한 잠재력을 추가로 평가하였다. ROC 분석을 이원 환자 객관적 반응 (CR+PR vs. SD+PD) 예상에서의 연속적 진단 마커로서 기준선 CD68 값 상에서 수행하였다. 시간-의존성 임상 결과 PFS 및 OS를 위해, 시간-의존성 ROC (ROC(t)로서 표시함, 여기서 t는 관심 시점을 나타냄)를 카플란-마이어 추정기20을 사용하여 생존 결과 예상에서 기준선 CD68 값을 분석하는데 적용하였다. 임상 결과를 예측하기 위한 CD68 값의 최적 컷 오프 포인트를 1의 두 민감도 및 특이도 값을 갖는 점으로부터 최소 거리를 갖는 ROC 곡선 상의 점으로부터 수득하였다. AUC를 사다리꼴 규칙을 사용하여 계산하였다.

[0117] 보다 긴 PFS 및 보다 높은 ORR과 연관된 보다 높은 CD68 발현이 관찰되었으나, 환자에서의 CD68 발현 및 OS 사이에서 어떠한 상관관계도 관찰되지 않았다. 선행 치료에 관계없이, \geq 중앙 CD68 값 (컷 오프 = 5.21% 세포 양성 또는 0.08개 세포/ mm^2)을 갖는 환자의 중앙 PFS는 양측 컷 오프 포인트에 대해 12.0개월인 것에 비해, 모든 환자가 선행 치료에 관계없이 평가되었을 때 <중앙 바이오마커 값을 갖는 환자에서는 각각 3.7 및 3.8개월이었다 (HR=0.42, 로그순위 p -값 ≤ 0.01) (도 3). 그러나, 수텐트®로 사전-치료된 환자의 경우, PFS를 갖는 유사한 (그러나 통계적으로 유의하지 않음) 경향이 관찰되었다 (도 4). 선행 치료에 관계없이 또는 수텐트®-사전-치료된 환자에서, CD3 수준 및 PFS 사이에 통계적으로 유의한 연관성은 존재하지 않았다 (도 5 및 6).

[0118] 추가로, 선행 치료에 관계없이, \geq 중앙 CD68 값 (컷 오프 = 5.21% 세포 양성 또는 0.08개 세포/ mm^2)을 갖는 환자의 중앙 OS는 20.0개월 및 22.6개월인 것에 비해 모든 환자가 선행 치료에 관계없이 평가되었을 때 <중앙 바이오마커 값을 갖는 환자에서는 각각 21.8개월 또는 17.8개월이었다 (모든 경우에서 HR >0.6 , 통계적으로 유의하지 않음) (도 7). 수텐트®로 사전-치료된 환자의 경우 OS와 통계적으로 유의한 연관성은 관찰되지 않았다. 치료에 관계없이, 또는 수텐트®-사전-치료된 환자에서, CD3 수준 및 OS 사이에 통계적으로 유의한 연관성은 존재하지 않았다 (도 8). ROC 분석을 사용하여, 유리한 OS가 보다 높은 CD68 세포 수를 갖는 환자에서 관찰되었지만, 0.559의 AUC 값은 CD68 수준의 예측 값에서 낮은 신뢰도를 나타낸다 (도 9).

[0119] 마지막으로, 선행 치료에 관계없이, 양성 세포 백분율에 의해 측정된 CD68 수준 (p -값=0.0059) 또는 세포 밀도에 의해 측정된 CD68 수준 (p -값=0.0071)은 비-반응자 (SD+PD) 대비 반응자 (CR+PR)에서 2배 더 높았다 (도 10). 이전에 수텐트®로 치료받은 환자의 경우, 양성 세포 백분율에 의해 측정된 CD68 수준 (p -값=0.407) 또는 세포 밀도에 의해 측정된 CD68 수준 (p -값=0.0762)은 비-반응자 대비 반응자에서 2배 더 높았다 (도 11). 바이오마커 평가가능한 환자를 위한 ORR 분석에서, 양성 세포의 보다 높은 CD68 퍼센트 및 밀도를 갖는 환자는 중앙 객관적 반응의 보다 우수한 기회를 갖는 경향이 있다. ROC 분석은 양성 세포의 CD68 백분율 및 밀도에 대해 각각 0.818 및 0.795의 예측 정확도를 나타낸다. 0.791 및 0.784의 AUC는 CD68 바이오마커를 사용하는 ORR에 대한 높은 전체 예측 정확도를 나타낸다. ORR을 예상하기 위한 최적 컷오프 포인트는 CD68 양성 세포의 백분율 및 세포 밀도에 대해 각각 9.42% 및 0.13개 세포/ mm^2 였다.

[0120] 유사한 결과가 선행 수텐트® 치료를 받은 바이오마커 평가가능한 환자에 대한 ORR 분석에서 발견되었다. CD68 양성 세포의 보다 높은 백분율 및 밀도를 갖는 환자는 중앙 객관적 반응의 보다 우수한 기회를 갖는 경향이 있다. ROC 분석은 각각 CD68 양성 세포의 백분율 및 밀도에 대해 0.777 및 0.852의 예측 정확도를 나타낸다. 0.809 및 0.764의 AUC는 CD68 바이오마커를 사용하는 ORR에 대한 높은 전체 진단 정확도를 나타낸다. ORR을 예상하기 위한 최적 컷오프 포인트는 CD68 양성 세포의 백분율 및 밀도에 대해 각각 5.20% 및 0.16개 세포/ mm^2 이다.

도면

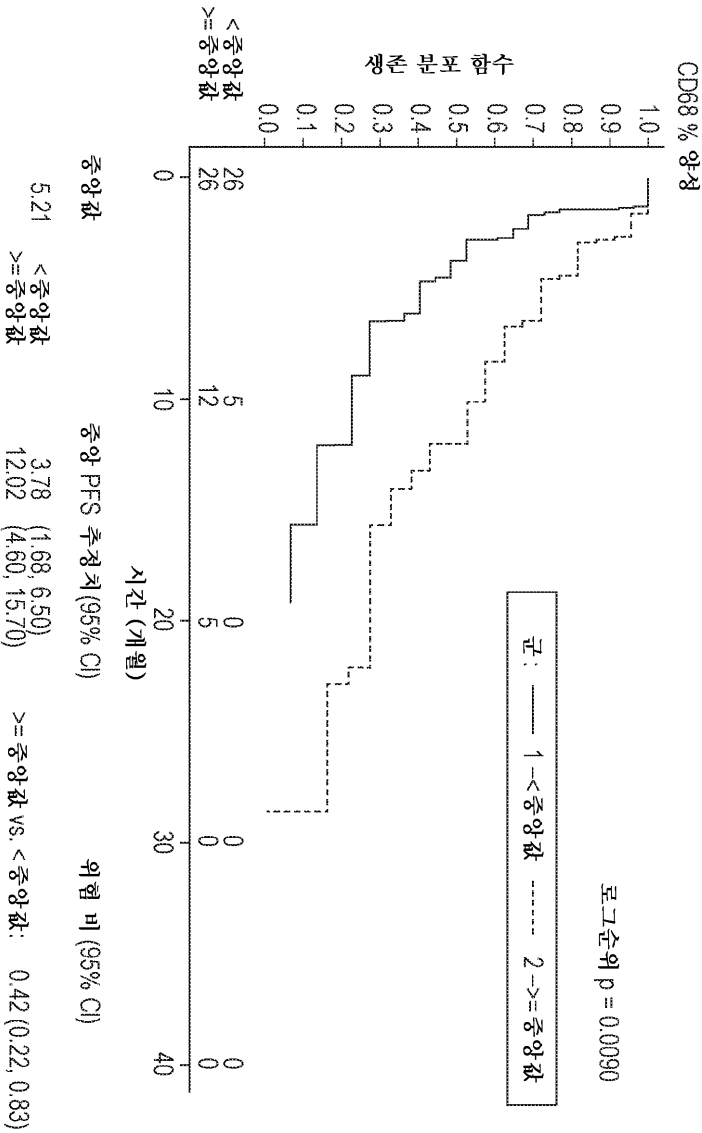
도면1

AG-013736 5.0 mg (BID)						
	남성		여성		총	
대상체의 수 (%)	38		14		52	
나이 (세) :						
<65	25	(65.8)	11	(78.6)	36	(69.2)
>=65	13	(34.2)	3	(21.4)	16	(30.8)
중앙값	61.5		54.0		61.0	
평균	59.2		55.6		58.3	
SD	10.0		13.5		11.0	
범위	39-82		22-78		22-82	
인종:						
백인	35	(92.1)	12	(85.7)	47	(90.4)
아시아인	2	(5.3)	2	(14.3)	4	(7.7)
기타	1	(2.6)	0		1	(1.9)
체중 (kg):						
중앙값	87.5		67.5		84.8	
평균	90.0		69.8		84.6	
SD	15.4		20.8		19.1	
범위	62.4-121.2		41.0-106.2		41.0-121.2	
N	38	(100.0)	14	(100.0)	52	(100.0)
신장 (cm):						
중앙값	177.3		159.0		174.6	
평균	177.9		159.6		173.0	
SD	5.7		5.8		10.0	
범위	169.2-194.0		151.5-174.0		151.5-194.0	
N	38	(100.0)	14	(100.0)	52	(100.0)
ECOG:						
0	20	(52.6)	7	(50.0)	27	(51.9)
1	18	(47.4)	7	(50.0)	25	(48.1)
지리적 영역:						
북아메리카	23	(60.5)	7	(50.0)	30	(57.7)
유럽	13	(34.2)	4	(28.6)	17	(32.7)
아시아	1	(2.6)	2	(14.3)	3	(5.8)
기타	1	(2.6)	1	(7.1)	2	(3.8)
MSKCC:						
유리함	8	(21.1)	4	(28.6)	12	(23.1)
중간	14	(36.8)	4	(28.6)	18	(34.6)
불량	16	(42.1)	6	(42.9)	22	(42.3)

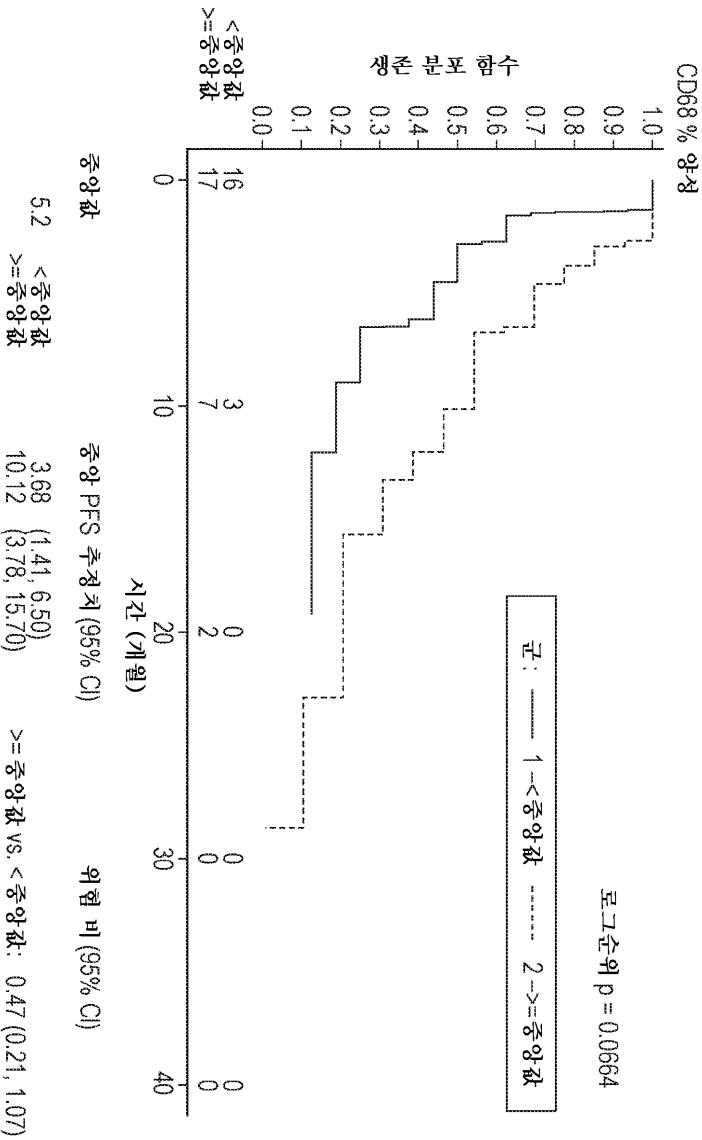
도면2

AG-013736 5.0 mg (BID)			
	슬라이드 N=26	블록 N=26	총 N=52
바이오마커			
CD3 % 양성			
n	26	26	52
평균	13.61	17.95	15.78
Std	10.328	13.031	11.846
%CV	75.9	72.6	75.1
제25 백분위수	5.00	7.00	7.00
중앙값	11.37	15.21	12.66
제75 백분위수	20.50	29.40	24.00
(최소, 최대)	(0.57, 31.1)	(0.08, 44.85)	(0.08, 44.85)
CD3 세포 밀도			
n	26	26	52
평균	489.15	590.50	539.83
Std	516.170	513.747	512.448
%CV	105.5	87.0	94.9
제25 백분위수	77.00	264.00	168.00
중앙값	336.50	414.50	399.50
제75 백분위수	801.00	775.00	781.50
(최소, 최대)	(14,2241)	(1,2056)	(1,2241)
CD68 % 양성			
n	26	26	52
평균	5.83	8.21	7.02
Std	6.456	6.859	6.704
%CV	110.8	83.5	95.5
제25 백분위수	1.00	4.00	2.80
중앙값	3.94	7.08	5.21
제75 백분위수	8.10	10.00	9.70
(최소, 최대)	(0.2, 20.92)	(2.48, 36.89)	(0.2, 36.89)
CD68 세포 밀도			
n	26	26	52
평균	0.08	0.13	0.11
Std	0.087	0.101	0.096
%CV	103.3	80.5	91.2
제25 백분위수	0.00	0.10	0.00
중앙값	0.05	0.10	0.08
제75 백분위수	0.10	0.20	0.20
(최소, 최대)	(0, 0.29)	(0.03, 0.53)	(0, 0.53)

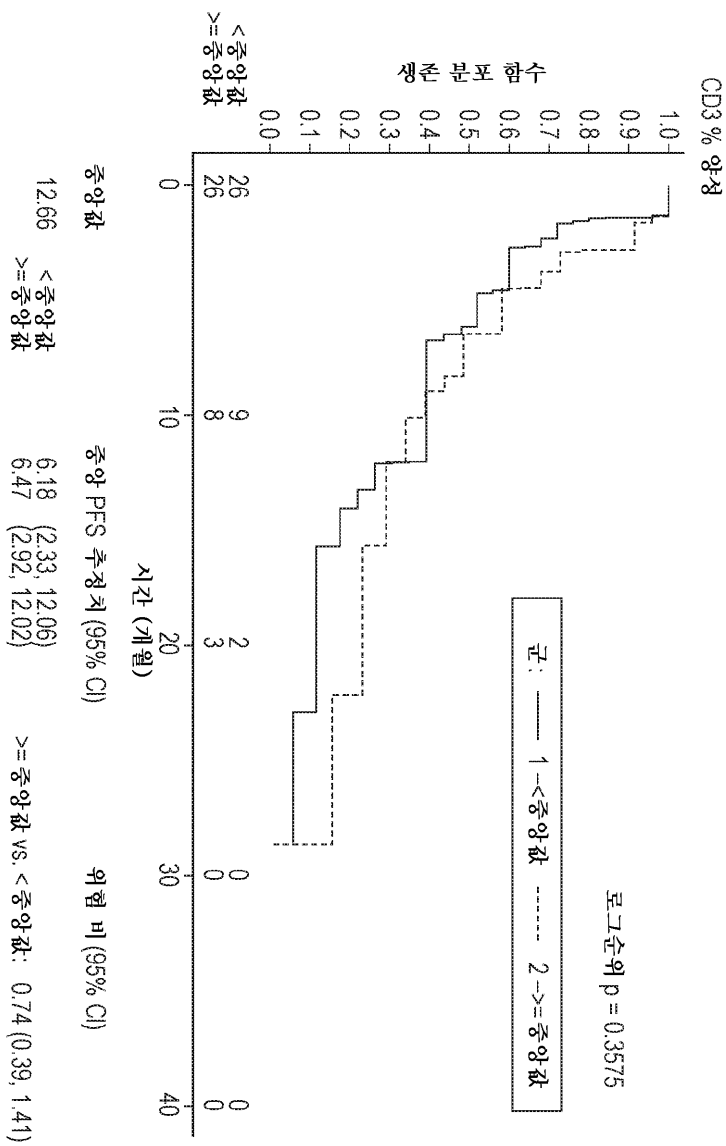
도면3



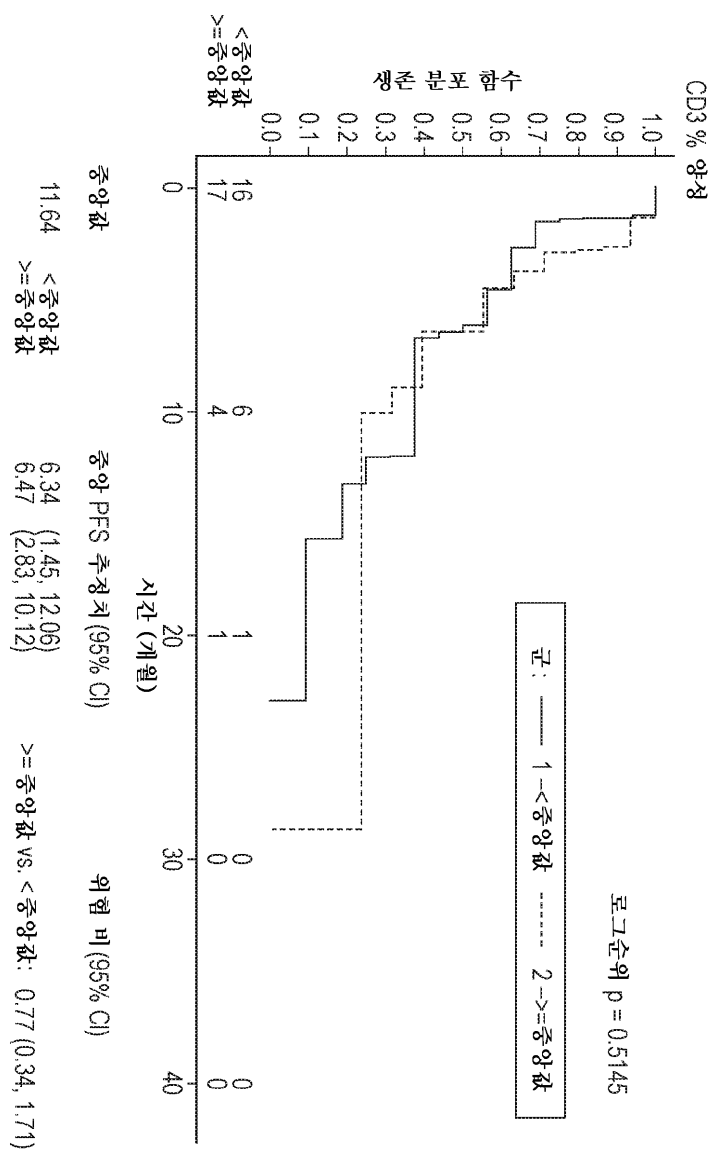
도면4



도면5



도면6



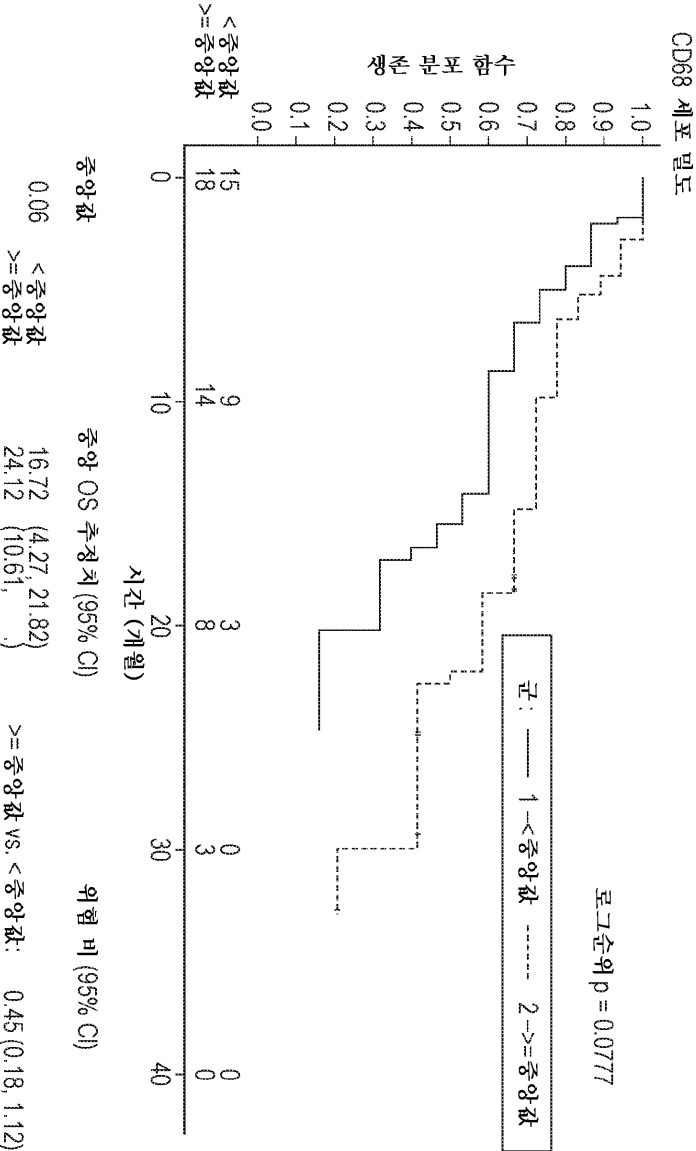
도면7

변수	중앙 BM 값	중앙 OS (개월)				로그순위 p-값	위험 비 (95 % CI)
		< 중앙 BM 값 (95% CI)	N	>= 중앙 BM 값 (95% CI)	N		
CD3 % 양성	12.66	20.0 (11.53, 32.36)	26	21.8 (9.33, 23.82)	26	0.5668	1.222 (0.615, 2.426)
CD3 세포 밀도	399.50	19.2 (10.61, 32.36)	26	22.6 (13.08, 24.41)	26	0.8153	0.922 (0.465, 1.826)
CD68 % 양성	5.21	21.8 (11.53, .)	26	20.0 (10.61, 32.36)	26	0.9901	0.996 (0.497, 1.994)
CD68 세포 밀도	0.08	17.8 (7.03, 24.41)	23	22.6 (13.47, .)	29	0.1733	0.619 (0.308, 1.243)

도면8

변수	중앙 BM 값	중앙 OS (개월)				로그순위 p-값	위험 비 (95% CI)
		< 중앙 BM 값 (95% CI)	N	>= 중앙 BM 값 (95% CI)	N		
CD3 % 양성	11.64	16	21.4 (6.87, 32.36)	17	20.0 (5.65, 23.82)	0.6444	1.225 (0.517, 2.900)
CD3 세포 밀도	334.00	16	19.2 (10.61, 32.36)	17	21.8 (4.73, 24.41)	0.6802	1.198 (0.508, 2.824)
CD68 % 양성	5.20	16	18.2 (7.00, .)	17	23.8 (5.65, 32.36)	0.6576	0.818 (0.337, 1.989)
CD68 세포 밀도	0.06	15	16.7 (4.27, 21.82)	18	24.1 (10.61, .)	0.0777	0.451 (0.182, 1.116)

도면9



도면10

AG-013736 5.0 mg (BID)				
바이오마커	CR+PR N=11	SD+PD N=33	*P-값	총 N=44
CD3 % 양성				
n	11	33	0.1364	44
평균	19.54	12.93		14.58
Std	13.168	10.265		11.274
%CV	67.4	79.4		77.3
제25 백분위수	9.20	5.00		6.00
중앙값	11.20	11.60		11.40
제75 백분위수	30.20	19.20		19.90
(최소, 최대)	(5.01, 44.85)	(0.57, 39.15)		(0.57, 44.85)
CD3 세포 밀도				
n	11	33	0.174	44
평균	683.18	455.39		512.34
Std	635.836	479.921		524.766
%CV	93.1	105.4		102.4
제25 백분위수	223.00	93.00		162.00
중앙값	415.00	295.00		356.00
제75 백분위수	936.00	643.00		715.50
(최소, 최대)	(159, 2241)	(14, 2056)		(14, 2241)
CD68 % 양성				
n	11	33	0.0059	44
평균	10.21	4.58		5.98
Std	6.206	4.235		5.328
%CV	60.8	92.6		89.0
제25 백분위수	4.40	1.30		2.10
중앙값	10.02	3.73		4.34
제75 백분위수	15.50	6.50		8.30
(최소, 최대)	(1.18, 20.66)	(0.2, 20.92)		(0.2, 20.92)
CD68 세포 밀도				
n	11	33	0.0071	44
평균	0.15	0.07		0.09
Std	0.085	0.055		0.072
%CV	58.3	82.0		82.4
제25 백분위수	0.10	0.00		0.00
중앙값	0.16	0.05		0.08
제75 백분위수	0.20	0.10		0.10
(최소, 최대)	(0.02, 0.29)	(0, 0.22)		(0, 0.29)

*윌콕슨 순위 합계 검정 P-값은 양측 t-근사치이다.

도면11

AG-013736 5.0 mg (BID)				
바이오마커	CR+PR N=05	SD+PD N=22	*P-값	총 N=27
CD3 % 양성				
n	5	22	0.1912	27
평균	17.83	11.88		12.98
Std	10.975	9.995		10.235
%CV	61.6	84.1		78.8
제25 백분위수	9.20	4.50		5.00
중앙값	11.20	8.25		9.16
제75 백분위수	29.40	18.60		19.40
(최소, 최대)	(9.15, 30.21)	(0.57, 39.15)		(0.57, 39.15)
CD3 세포 밀도				
n	5	22	0.4071	27
평균	744.20	410.23		472.07
Std	862.342	422.772		525.592
%CV	115.9	103.1		111.3
제25 백분위수	223.00	93.00		111.00
중앙값	401.00	267.50		271.00
제75 백분위수	697.00	643.00		697.00
(최소, 최대)	(159, 2241)	(14, 1744)		(14, 2241)
CD68 % 양성				
n	5	22	0.0407	27
평균	10.15	3.52		4.74
Std	7.429	2.611		4.570
%CV	73.2	74.3		96.4
제25 백분위수	5.40	0.90		1.00
중앙값	10.81	3.47		3.92
제75 백분위수	12.70	5.20		6.50
(최소, 최대)	(1.18, 20.66)	(0.2, 8.71)		(0.2, 20.66)
CD68 세포 밀도				
n	5	22	0.0762	27
평균	0.14	0.06		0.07
Std	0.102	0.045		0.066
%CV	74.0	80.8		92.6
제25 백분위수	0.10	0.00		0.00
중앙값	0.16	0.05		0.05
제75 백분위수	0.20	0.10		0.10
(최소, 최대)	(0.02, 0.28)	(0, 0.16)		(0, 0.28)

*윌콕슨 순위 합계 검정 P-값은 양측 t-근사치이다.