

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6675300号
(P6675300)

(45) 発行日 令和2年4月1日 (2020. 4. 1)

(24) 登録日 令和2年3月12日 (2020. 3. 12)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006. 01)
 A 6 1 P 35/00 (2006. 01)
 A 6 1 P 1/00 (2006. 01)
 G O 1 N 33/50 (2006. 01)
 G O 1 N 33/68 (2006. 01)

A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 1/00
 G O 1 N 33/50 P
 G O 1 N 33/68

請求項の数 14 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-502876 (P2016-502876)
 (86) (22) 出願日 平成26年3月14日 (2014. 3. 14)
 (65) 公表番号 特表2016-515141 (P2016-515141A)
 (43) 公表日 平成28年5月26日 (2016. 5. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/028714
 (87) 国際公開番号 W02014/153018
 (87) 国際公開日 平成26年9月25日 (2014. 9. 25)
 審査請求日 平成29年3月6日 (2017. 3. 6)
 (31) 優先権主張番号 PCT/CN2013/072638
 (32) 優先日 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国 (CN)

前置審査

(73) 特許権者 515208197
 クラウン バイオサイエンス インコーポ
 レイテッド (タイカン)
 中華人民共和国 江蘇省 タイカン エコ
 ノミック ディベロップメント エリア
 ペキン ウェスト ロード 6
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 E G F R 薬を用いた胃癌の処置のための、E G F R バイオマーカーの使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

胃腫瘍の処置を必要とする患者における胃腫瘍を処置する方法において使用するための、単独の活性剤として有効量の抗 E G F R 抗体を含む医薬組成物であって、

前記医薬組成物が、E G F R 遺伝子増幅を有する患者のみに投与するためのものであり、前記 E G F R 遺伝子増幅が、リアルタイム定量 P C R によって決定された場合に、1 つの核あたり 4 コピーを超える E G F R 遺伝子コピー数であるか、A f f y m e t r i x 社の genome - w i d e h u m a n S N P 6 . 0 a r r a y 及び P I C N I C (P r e d i c t i n g I n t e g r a l C o p y N u m b e r s I n C a n c e r ; 癌における全体的なコピー数の予測) アルゴリズムによって決定された場合に、少なくとも 7 コピーの E G F R 遺伝子コピー数であるか、または蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (F I S H) によって決定された場合に、少なくとも 2 . 8 コピーの E G F R 遺伝子コピー数であり、かつ前記抗 E G F R 抗体がセツキシマブである、前記医薬組成物。

【請求項 2】

前記胃腫瘍が胃腺癌である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 3】

前記患者が、E G F R 遺伝子増幅を有し、H E R 2 バイオマーカーを有しないと判定されている、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

E G F R 遺伝子増幅の存在または非存在を胃腫瘍を有する患者の試料において検出する工程を含む、前記患者が抗 E G F R 抗体単独療法の処置に好適かどうか判定するための方法であって、

E G F R 遺伝子増幅の存在が、前記患者が抗 E G F R 抗体単独療法の処置に適していることを示し、E G F R 遺伝子増幅の非存在が、前記患者が抗 E G F R 抗体単独療法の処置に適していないことを示し、前記 E G F R 遺伝子増幅が、リアルタイム定量 P C R によって決定された場合に、1つの核あたり4コピーを超える E G F R 遺伝子コピー数であるか、A f f y m e t r i x 社の genome - w i d e h u m a n S N P 6 . 0 a r r a y 及び P I C N I C (P r e d i c t i n g I n t e g r a l C o p y N u m b e r s I n C a n c e r ; 癌における全体的なコピー数の予測) アルゴリズムによって決定された場合に、少なくとも7コピーの E G F R 遺伝子コピー数であるか、または蛍光インサイチュウハイブリダイゼーション (F I S H) によって決定された場合に、少なくとも2.8コピーの E G F R 遺伝子コピー数であり、かつ前記抗 E G F R 抗体がセツキシマブである、前記方法。

10

【請求項5】

胃腫瘍を有する患者の試料を受け取る工程、E G F R 遺伝子増幅の存在または非存在を前記試料において検出するための試験を行う工程、及び前記患者の医療提供者に試験結果を提供する工程を含む、ラボサービスを提供するための方法であって、

前記方法が、前記医療提供者が E G F R 遺伝子増幅の存在を検出された患者のみに胃腫瘍を処置するために単独の活性剤として抗 E G F R 抗体を処方することを補助するためのものであり、前記 E G F R 遺伝子増幅が、リアルタイム定量 P C R によって決定された場合に、1つの核あたり4コピーを超える E G F R 遺伝子コピー数であるか、A f f y m e t r i x 社の genome - w i d e h u m a n S N P 6 . 0 a r r a y 及び P I C N I C (P r e d i c t i n g I n t e g r a l C o p y N u m b e r s I n C a n c e r ; 癌における全体的なコピー数の予測) アルゴリズムによって決定された場合に、少なくとも7コピーの E G F R 遺伝子コピー数であるか、または蛍光インサイチュウハイブリダイゼーション (F I S H) によって決定された場合に、少なくとも2.8コピーの E G F R 遺伝子コピー数であり、かつ前記抗 E G F R 抗体がセツキシマブである、前記方法。

20

【請求項6】

胃腫瘍に罹患している対象からの生体試料における E G F R 遺伝子増幅の存在または非存在を検出する工程を含む、前記胃腫瘍に罹患している対象における抗 E G F R 抗体単独療法の処置の応答性または有効性をモニターするための方法であって、

E G F R 遺伝子増幅の存在が、抗 E G F R 抗体単独療法の処置を用いた処置の有効性を示し、前記 E G F R 遺伝子増幅が、リアルタイム定量 P C R によって決定された場合に、1つの核あたり4コピーを超える E G F R 遺伝子コピー数であるか、A f f y m e t r i x 社の genome - w i d e h u m a n S N P 6 . 0 a r r a y 及び P I C N I C (P r e d i c t i n g I n t e g r a l C o p y N u m b e r s I n C a n c e r ; 癌における全体的なコピー数の予測) アルゴリズムによって決定された場合に、少なくとも7コピーの E G F R 遺伝子コピー数であるか、または蛍光インサイチュウハイブリダイゼーション (F I S H) によって決定された場合に、少なくとも2.8コピーの E G F R 遺伝子コピー数であり、かつ前記抗 E G F R 抗体がセツキシマブである、前記方法。

30

40

【請求項7】

E G F R 遺伝子増幅の存在または非存在を検出する工程を含む、胃腫瘍に罹患している対象を処置するための処置レジメンを決定することを補助するための方法であって、

前記処置レジメンが、E G F R 遺伝子増幅の存在を検出された対象のみに与えられるものであり、前記処置が、対象への単独の活性剤としての抗 E G F R 抗体の投与からなり、前記 E G F R 遺伝子増幅が、リアルタイム定量 P C R によって決定された場合に、1つの核あたり4コピーを超える E G F R 遺伝子コピー数であるか、A f f y m e t r i x 社の

50

genome-wide human SNP6.0 array及びPICNIC (Predicting Integral Copy Numbers In Cancer ; 癌における全体的なコピー数の予測) アルゴリズムによって決定された場合に、少なくとも7コピーのEGFR遺伝子コピー数であるか、または蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)によって決定された場合に、少なくとも2.8コピーのEGFR遺伝子コピー数であり、かつ前記抗EGFR抗体がセツキシマブである、前記方法。

【請求項8】

EGFR遺伝子増幅の存在または非存在を検出する工程を含む、胃腫瘍に罹患している対象についての処置有効性を予測するための方法であって、

EGFR遺伝子増幅の存在が、肯定的な処置有効性を示し、前記処置が、対象への単独の活性剤としての抗EGFR抗体の投与からなり、前記EGFR遺伝子増幅が、リアルタイム定量PCRによって決定された場合に、1つの核あたり4コピーを超えるEGFR遺伝子コピー数であるか、Affymetrix社のgenome-wide human SNP6.0 array及びPICNIC (Predicting Integral Copy Numbers In Cancer ; 癌における全体的なコピー数の予測) アルゴリズムによって決定された場合に、少なくとも7コピーのEGFR遺伝子コピー数であるか、または蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)によって決定された場合に、少なくとも2.8コピーのEGFR遺伝子コピー数であり、かつ前記抗EGFR抗体がセツキシマブである、前記方法。

【請求項9】

(a) 胃腫瘍に罹患している対象からの生体試料においてEGFR遺伝子増幅の存在または非存在を検出する工程、及び

(b) EGFR遺伝子増幅の存在または非存在に関する情報を、前記対象の診断または処置のために医療提供者に提供する工程を含む、データを提供するための方法であって、

前記方法が、前記医療提供者がEGFR遺伝子増幅の存在を検出された対象のみに胃腫瘍を処置するために単独の活性剤として抗EGFR抗体を処方することを補助するためのものであり、前記EGFR遺伝子増幅が、リアルタイム定量PCRによって決定された場合に、1つの核あたり4コピーを超えるEGFR遺伝子コピー数であるか、Affymetrix社のgenome-wide human SNP6.0 array及びPICNIC (Predicting Integral Copy Numbers In Cancer ; 癌における全体的なコピー数の予測) アルゴリズムによって決定された場合に、少なくとも7コピーのEGFR遺伝子コピー数であるか、または蛍光インサイチューハイブリダイゼーション(FISH)によって決定された場合に、少なくとも2.8コピーのEGFR遺伝子コピー数であり、かつ前記抗EGFR抗体がセツキシマブである、前記方法。

【請求項10】

前記検出工程の前に前記医療提供者から前記生体試料を受け取る工程をさらに含む、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

(a) 胃腫瘍に罹患している対象からの生体試料においてEGFR遺伝子増幅の存在または非存在を検出する工程、及び

(b) EGFR遺伝子増幅の存在または非存在に関する情報を、抗EGFR抗体単独療法の処置の胃腫瘍の処置有効性の予測または判定を提供する実体に提供する工程を含む、抗EGFR抗体単独療法の処置の胃腫瘍の処置有効性をモニターする、予測する、または決定するために有用な情報を提供する方法であって、

前記実体が、EGFR遺伝子増幅を有する対象のみが抗EGFR抗体単独療法の処置に応答性であることを予測または判定し、前記EGFR遺伝子増幅が、リアルタイム定量PCRによって決定された場合に、1つの核あたり4コピーを超えるEGFR遺伝子コピー数であるか、Affymetrix社のgenome-wide human SNP6

. 0 array及びPICNIC (Predicting Integral Copy Numbers In Cancer ; 癌における全体的なコピー数の予測) アルゴリズムによって決定された場合に、少なくとも7コピーのEGFR遺伝子コピー数であるか、または蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) によって決定された場合に、少なくとも2.8コピーのEGFR遺伝子コピー数であり、かつ前記抗EGFR抗体がセツキシマブである、前記方法。

【請求項12】

前記試料が、血液、皮膚、毛髪、毛包、唾液、口腔粘膜、膣粘膜、汗、涙、上皮組織、尿、精液 (semen)、精液 (seminal fluid)、精漿、前立腺液、尿道球腺液 (カウパー液)、排泄物、生検材料、腹水、脳脊髄液、リンパ液、および組織抽出試料または生検試料から選択される、請求項4～6および9～11のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項13】

前記EGFR遺伝子増幅が、前記患者の試料において検出され、前記試料が、血液、皮膚、毛髪、毛包、唾液、口腔粘膜、膣粘膜、汗、涙、上皮組織、尿、精液 (semen)、精液 (seminal fluid)、精漿、前立腺液、尿道球腺液 (カウパー液)、排泄物、生検材料、腹水、脳脊髄液、リンパ液、および組織抽出試料または生検試料から選択される、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項14】

胃腫瘍の処置のためのEGFR遺伝子増幅の検出に好適な試薬を含むキットであって、
前記胃腫瘍の処置が、胃腫瘍の処置を必要とする患者への単独の活性剤としての有効量の抗EGFR抗体の投与を含む胃腫瘍を処置するための方法に従って行われ、前記患者が、EGFR遺伝子増幅を有すると判定されており、前記EGFR遺伝子増幅が、リアルタイム定量PCRによって決定された場合に、1つの核あたり4コピーを超えるEGFR遺伝子コピー数であるか、Affymetrix社のgenome-wide human SNP6.0 array及びPICNIC (Predicting Integral Copy Numbers In Cancer ; 癌における全体的なコピー数の予測) アルゴリズムによって決定された場合に、少なくとも7コピーのEGFR遺伝子コピー数であるか、または蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (FISH) によって決定された場合に、少なくとも2.8コピーのEGFR遺伝子コピー数であり、かつ前記抗EGFR抗体がセツキシマブである、前記キット。

20

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、全ての目的のためにその全体において参照により本明細書に組み入れられる、2013年3月14日に出願された、国際特許出願PCT/CN2013/072638号の恩典を主張する。

【0002】

発明の分野

40

本発明は、概して胃腫瘍を処置するための方法に関し、具体的には、特定の上皮成長因子受容体 (EGFR) バイオマーカーを有すると以前に判定されている患者を処置するための方法に関する。

【背景技術】

【0003】

胃癌腫 (GC) は、全世界で年間約100万件の診断及び約70万件の死亡例¹があり、東アジアでの発生率が高い²、最も一般的及び死に至る癌の一つである。しかしながら、GC患者の大半に関して、外科手術よりほかに利用できる有効な処置選択肢は非常に少ない。HER2を標的とするモノクローナル抗体である、トラスツズマブ (Herceptin (登録商標)) のみが承認された標的療法であるが、より高いHER2 (EGFR

50

2) 遺伝子の発現³及び増幅を有するGC患者のごく一部に限られている。GCに有意な利益を実証することができる最近承認された薬剤は、かかる緊急の必要性を満たすのに特に魅力的であり得る。ERBB1/HER1とも呼ばれる、EGFRは、HER2と同じファミリーに属し、大腸癌腫(CRC)、GC及び非小細胞肺癌(NSCLC)などを含む上皮癌において発現される受容体チロシンキナーゼ(RTK)である。セツキシマブはモノクローナル抗体であり、EGFRに結合し、そのリガンドに誘導される下流のシグナル伝達をブロックし、ゆえに細胞増殖を阻害する。セツキシマブは食品医薬品局(FDA)によって、KRAS変異をコドン12/13で活性化することなくEGFR発現性転移性大腸癌(mCRC)を処置する⁴、及び頭頸部扁平上皮癌(SCCHN)を処置する⁵ことについては承認されたが、セツキシマブはいまだGCの処置については承認されていない。進行性GCについてのセツキシマブ/化学療法剤の併用処置におけるいくつかの第II相臨床試験があるが、それらの研究はまだ現在の基準治療(SOC)を超える有意に優れた臨床的な利益を実証していない⁶⁻⁸。Merck Serono社による無作為化比較第III相試験は、その主要評価項目を満たせなかったと最近報告している(NCT00678535: 進行食道胃、癌におけるゼロードおよびシスプラチンと組み合わせたエルピタックス、またはEXPAND)。

10

【0004】

それゆえ、新規の有効な標的療法が緊急に必要とされている。本発明は、新規の有効な標的療法及び他の利点を提供する。

【発明の概要】

20

【0005】

本発明の一態様は、胃腫瘍を処置するための方法であって、かかる処置を必要とする患者に有効量の薬剤を投与する工程を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、薬剤は、上皮成長因子受容体(EGFR)に対するものである。いくつかの実施形態では、薬剤は、EGFRの下流のシグナル伝達経路に対するものである。いくつかの実施形態では、薬剤は、EGFRのリガンドのアンタゴニストまたは抗体であり、例えば、上皮成長因子(EGF)、形質転換成長因子(TGF)、HB-EGF、アンフィレギュリン、ベータセルリン、エピゲン(epigen)、及び/またはエピレグリンのアンタゴニストまたは抗体である。いくつかの実施形態では、薬剤は、小分子である。いくつかの実施形態では、薬剤は、EGFR及びErbB2/Her2/neuなどのErbB受容体ファミリーの別のメンバーによって形成されたヘテロ二量体に対するものである。いくつかの実施形態では、薬剤は、EGFRによって形成されたホモ二量体に対するものである。いくつかの実施形態では、薬剤は、EGFRに対する抗体または抗体様治療的実体(抗EGFR抗体処置)、例えばセツキシマブである。いくつかの実施形態では、患者はEGFRバイオマーカーを有すると判定されている。本方法の一実施形態では、胃腫瘍は胃腺癌である。本方法の別の実施形態では、抗EGFR薬は抗EGFR抗体である。別の実施形態では、抗EGFR薬はセツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、抗体806、Sym004、またはMM-151である。ある特定の実施形態では、抗EGFR薬は二つ以上の抗EGFR薬の組み合わせである。別の実施形態では、本方法は、抗EGFR薬を胃腫瘍のための標準的処置と組み合わせて投与する工程をさらに含む。一実施形態では、本方法は、抗EGFR薬を化学療法または放射線療法と組み合わせて投与する工程をさらに含む。なおもさらなる実施形態では、本方法は、抗EGFR薬を、シスプラチン及びカペシタビン、5-フルオロウラシル、オキサリプラチン、イリノテカン、ドセタキセル、パクリタキセル、ドキシソルビンマイトマイシンC、エトポシド、ゲムシタビンまたはカルボプラチンの一つ以上と組み合わせて投与する工程を含む。さらに本明細書で概説するように、一実施形態では、EGFRバイオマーカーは、EGFR遺伝子増幅またはEGFR過剰発現である。この点について、EGFR遺伝子増幅は、所定の数より多いEGFR遺伝子コピー数を含み得る。EGFR過剰発現は、所定のレベルより高いEGFR RNA、タンパク質、または活性のレベルを含み得る。本方法のある特定の実施形態では、患者はEGFRバイオマーカーを有し、HER2バイオマーカーを有しないと判定されてい

30

40

50

る。ゆえに、一実施形態では、患者は抗HER2薬を伴わずに抗EGFR薬を投与される。

【0006】

本発明の別の態様は、EGFRバイオマーカの存在または非存在を患者の試料において検出する工程を含み、EGFRバイオマーカの存在が、患者が抗EGFR処置に好適であることを示すことを特徴とする、患者が抗EGFR処置に好適かどうか判定するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、処置は、一つ以上の、EGFRに対する薬剤、EGFRの下流のシグナル伝達経路に対する薬剤、EGFRのリガンドに対する薬剤、EGFRによって形成されるホモ二量体またはEGFR及びErbb受容体ファミリーの別のメンバーによって形成されるヘテロ二量体に対する薬剤を含む。いくつかの実施形態では、薬剤は、抗EGFR薬である。いくつかの実施形態では、抗EGFR薬は、抗EGFR抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗EGFR抗体は、セツキシマブを含む。

10

【0007】

本発明のさらなる態様は、胃腫瘍を有する患者の試料を受け取る工程、EGFRバイオマーカの存在または非存在を試料において検出するための試験を行う工程、及び患者の医療提供者に試験結果を提供する工程を含む、ラボサービスを提供するための方法を提供する。

【0008】

本発明のさらに別の態様は、EGFRバイオマーカの検出に好適な試薬と、本明細書に記載の方法に従って胃腫瘍を処置するためにEGFRバイオマーカを使用するための説明書とを含むキットを提供する。

20

【0009】

なおも別の実施形態では、本発明は、抗EGFR薬、例えばセツキシマブを用いた胃腫瘍の処置または処置の有効性を予測する、判定する、評価するまたはモニターするために有用な情報を提供するための方法を提供する。本方法は、患者がEGFRバイオマーカを有するかどうか判定する工程も含む。

【0010】

なおも別の実施形態では、本発明は、胃腫瘍に罹患している対象における抗EGFR処置の応答性または有効性をモニターするための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、対象からの生体試料におけるEGFRバイオマーカの存在または非存在を検出する方法を含む。いくつかの実施形態では、EGFRバイオマーカは、所定の基準レベルと比較したEGFR遺伝子増幅及び/またはEGFR過剰発現である。いくつかの実施形態では、EGFRバイオマーカの存在は、患者が処置に対して応答者であること、及び抗EGFR処置が患者において有効性を有し得ることを示し、一方でEGFRバイオマーカの非存在は、患者が処置に対して応答者でなく、抗EGFR処置が患者において有効性を有さない可能性があることを示す。

30

【0011】

なおも別の実施形態では、本発明は、胃腫瘍に罹患している対象を処置するための処置レジメンを決定するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、対象からの生体試料におけるEGFRバイオマーカの存在または非存在を検出する工程を含む。いくつかの実施形態では、EGFRバイオマーカは、所定の基準レベルと比較したEGFR遺伝子増幅及び/またはEGFR過剰発現である。いくつかの実施形態では、処置レジメンは、生体試料におけるEGFRバイオマーカの存在または非存在に基づいて決定される。

40

【0012】

なおも別の実施形態では、本発明は、胃腫瘍に罹患している対象についての処置有効性を予測するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、対象からの生体試料におけるEGFRバイオマーカの存在または非存在を検出する工程を含む。いくつかの実施形態では、EGFRバイオマーカは、所定の基準レベルと比較したEGFR遺伝子増幅及び/またはEGFR過剰発現である。いくつかの実施形態では、EGFRバイ

50

バイオマーカの存在は、肯定的な処置有効性を示す。

【0013】

なおも別の実施形態では、本発明は、データを提供するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、胃腫瘍に罹患している対象からの生体試料におけるEGFRバイオマーカの存在または非存在を検出する工程を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、EGFRバイオマーカの存在または非存在に関する情報を医療提供者に対象の診断または処置のために提供する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、本方法は、検出工程の前に医療提供者から生体試料を受け取る工程をさらに含む。

【0014】

なおも別の実施形態では、本発明は、抗EGFR処置の処置有効性をモニター、予測または判定するために有用な情報を提供する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法は、胃腫瘍に罹患している対象からの生体試料における、所定の基準レベルと比較したEGFRバイオマーカの存在または非存在を検出する方法を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、EGFRバイオマーカの存在または非存在に関する情報を、処置有効性の予測または判定を提供する実体に提供する工程をさらに含む。

【0015】

本明細書に記載の全ての方法について、いくつかの実施形態では、患者におけるEGFR活性のベースラインレベルは、抗EGFR処置の前に検出される。EGFR活性のかかるベースラインレベルは、EGFR遺伝子コピー数、転写産物量、転写産物の安定性、転写速度、翻訳速度、翻訳後修飾、タンパク質量、タンパク質安定性、及び/またはタンパク質酵素活性、などを含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、所定の基準レベルと比較したときの、患者のEGFR活性のベースラインレベルにおける増加は、EGFRバイオマーカの存在を示す。

【0016】

本明細書に記載の全ての方法について、いくつかの実施形態では、生体試料は、血液、皮膚、毛髪、毛包、唾液、口腔粘膜、膣粘膜、汗、涙、上皮組織、尿、精液(semen)、精液(seminal fluid)、精漿、前立腺液、尿道球腺液(カウパー液)、排泄物、生検材料、腹水、脳脊髄液、リンパ液、組織抽出試料または生検試料から選択される。

[本発明1001]

処置を必要とする患者に有効量の抗EGFR薬を投与する工程を含む、胃腫瘍を処置するための方法であって、前記患者がEGFRバイオマーカを有すると判定されている、前記方法。

[本発明1002]

前記胃腫瘍が胃腺癌である、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記抗EGFR薬が抗EGFR抗体である、本発明1001の方法。

[本発明1004]

前記抗EGFR薬が、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、抗体806、Sym004、またはMM-151である、本発明1001の方法。

[本発明1005]

前記抗EGFR薬が、2種以上の抗EGFR薬の組み合わせである、本発明1001の方法。

[本発明1006]

胃腫瘍の標準的処置と組み合わせて前記抗EGFR薬を投与する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1007]

化学療法または放射線療法と組み合わせて前記抗EGFR薬を投与する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1008]

シスプラチン及びカペシタビン、または5 - フルオロウラシル、オキサリプラチン、イリノテカン、ドセタキセル、パクリタキセル、ドキシソルピシンマイトマイシンC、エトボシド、ゲムシタビン、カルボプラチンと組み合わせて前記抗EGFR薬を投与する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1009]

前記EGFRバイオマーカーが、EGFR遺伝子増幅またはEGFR過剰発現である、本発明1001の方法。

[本発明1010]

前記EGFR遺伝子増幅が、所定の数より多いEGFR遺伝子コピー数を含む、本発明1009の方法。

10

[本発明1011]

前記EGFR過剰発現が、所定のレベルより高いEGFR RNA、タンパク質、または活性のレベルを含む、本発明1009の方法。

[本発明1012]

前記患者が、EGFRバイオマーカーを有し、HER2バイオマーカーを有しないと判定されている、本発明1001の方法。

[本発明1013]

前記患者が、抗HER2薬を伴わずに抗EGFR薬を投与される、本発明1012の方法。

[本発明1014]

EGFRバイオマーカーの存在または非存在を患者の試料において検出する工程を含む、患者が抗EGFR処置に好適かどうか判定するための方法であって、EGFRバイオマーカーの存在が、前記患者が前記抗EGFR処置に好適であることを示す、前記方法。

20

[本発明1015]

胃腫瘍を有する患者の試料を受け取る工程、EGFRバイオマーカーの存在または非存在を前記試料において検出するための試験を行う工程、及び前記患者の医療提供者に試験結果を提供する工程を含む、ラボサービスを提供するための方法。

[本発明1016]

対象からの生体試料におけるEGFRバイオマーカーの存在または非存在を検出する工程を含む、胃腫瘍に罹患している対象における抗EGFR処置の応答性または有効性をモニターするための方法であって、前記EGFRバイオマーカーが、所定の基準レベルと比較してのEGFR遺伝子増幅またはEGFR過剰発現であり、前記EGFRバイオマーカーの存在が、前記抗EGFR処置を用いた処置の有効性を示す、前記方法。

30

[本発明1017]

対象からの生体試料におけるEGFRバイオマーカーの存在または非存在を検出する工程を含む、胃腫瘍に罹患している対象を処置するための処置レジメンを決定するための方法であって、前記EGFRバイオマーカーが、所定の基準レベルと比較してのEGFR遺伝子増幅またはEGFR過剰発現であり、処置レジメンが、前記生体試料における前記EGFRバイオマーカーの存在または非存在に基づいて決定される、前記方法。

[本発明1018]

対象からの生体試料におけるEGFRバイオマーカーの存在または非存在を検出する工程を含む、胃腫瘍に罹患している対象についての処置有効性を予測するための方法であって、前記EGFRバイオマーカーが、所定の基準レベルと比較してのEGFR遺伝子増幅またはEGFR過剰発現であり、EGFRバイオマーカーの存在が、肯定的な処置有効性を示す、前記方法。

40

[本発明1019]

(a)胃腫瘍に罹患している対象からの生体試料におけるEGFRバイオマーカーの存在または非存在を検出する工程、及び(b)EGFRバイオマーカーの存在または非存在に関する情報を前記対象の診断または処置のために医療提供者に提供する工程を含む、データを提供するための方法。

[本発明1020]

50

前記検出工程の前に前記医療提供者から前記生体試料を受け取る工程をさらに含む、本発明1020の方法。

[本発明1021]

(a) 胃腫瘍に罹患している対象からの生体試料において、所定の基準レベルと比較してEGFRバイオマーカーの存在または非存在を検出する工程、及び(b) EGFRバイオマーカーの存在または非存在に関する情報を、前記処置有効性の予測または判定を提供する実体に提供する工程を含む、抗EGFR処置の処置有効性をモニターする、予測する、または決定するために有用な情報を提供する方法。

[本発明1022]

EGFR活性のベースラインレベルが抗EGFR処置の前に検出され、所定の基準レベルと比較したときのEGFR活性の前記ベースラインレベルにおける増加が、EGFRバイオマーカーの存在を示す、本発明1001～1021のいずれかの方法。

10

[本発明1023]

生体試料が、血液、皮膚、毛髪、毛包、唾液、口腔粘膜、膣粘膜、汗、涙、上皮組織、尿、精液(semen)、精液(seminal fluid)、精漿、前立腺液、尿道球腺液(カウパー液)、排泄物、生検材料、腹水、脳脊髄液、リンパ液、および組織抽出試料または生検試料から選択される、本発明1001～1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

EGFRバイオマーカーの検出に好適な試薬と、本発明1001の方法に従って胃腫瘍を処置するために前記EGFRバイオマーカーを使用するための説明書とを含む、キット。

20

【図面の簡単な説明】

【0017】

本発明は、添付の図面と併せて以下の詳細な説明に関連してより完全に理解される。

【0018】

【図1】セツキシマブに対するGC-ADC HuPrime(登録商標)モデル応答：パネルA(図1A)：応答者(上位3モデル)及び非応答者(8モデルの下位3列)のセツキシマブによる代表的な腫瘍増殖阻害。パネルB(図1B)：モデルGA0022の薬力学的分析。セツキシマブ処置後0、6、24及び72時間の時点でのモデルGA0022腫瘍のpERK-IHC解析。IHC画像及びスコアの両方を示す。パネルC(図1C)：PDX-GCモデルをセツキシマブに対する腫瘍応答によって分類する(DT/DC)。

30

右部の応答者はより高いEGFRのmRNAレベル及びIHC染色強度、及び2ケースのみ(GA0075及びGA0152、CN>5)の遺伝子増幅を表示する。

【図2】抗腫瘍活性とEGFR遺伝子増幅及び過剰発現の相関関係。(四角内のアイテムはEGFR遺伝子増幅を伴うモデルを表す)。パネルA(図2A)：セツキシマブに対するGC-ADC腫瘍応答の滝グラフ；パネルB(図2B)。Affymetrix社のSNP6チップ解析を使用したGCモデルのEGFR遺伝子コピー数解析。パネルC(図2C)。Affymetrix社のGeneChip HG-U219で測定される相対的なmRNAレベル。DpPCRによって測定されるEGFRのmRNA発現。

【図3】LobodaのRAS経路シグネチャースコア(pathway signature scores)を継時的に腫瘍サイズに対してプロットした。LobodaのRAS経路シグネチャースコアは、腫瘍応答に相関性がほぼ無いことが見出された。

40

【図4】EGFR過剰発現/遺伝子増幅を伴うGC-ADC HuPrime(登録商標)モデルは、HER2過剰発現/遺伝子増幅を有さない。パネルA：EGFR及びHER2発現レベル；パネルB：EGFR及びHER2遺伝子コピー数。

【図5】応答者及び非応答者の代表的な画像。応答者GA0152及びGA0075は、IHCスコア3+、及び遺伝子増幅(GA0075、CN=5.8；GA0152、CN>15)を表示し、一方で非応答者GA0119及びGA0139は、IHCの低発現を伴い、遺伝子増幅を伴わない。左：応答者及び非応答者の代表的な腫瘍成長曲線。真ん中：腫瘍モデルのIHC解析；右：胃癌腫における2色FISHアッセイ。

【発明を実施するための形態】

50

【 0 0 1 9 】

発明の詳細な説明

本発明は、概して抗 E G F R 薬を用いた胃腫瘍を処置するための方法、具体的には、特定の E G F R バイオマーカーを有すると以前に判定されている患者を処置するための方法に関する。本発明は、治療薬、つまり抗 E G F R 抗体を、E G F R タンパク質をコードする遺伝子の増幅または E G F R の過剰発現 (m R N A 発現、タンパク質発現、または活性レベルによって測定される) を有すると見出された患者に投与することによる処置に対して応答する可能性が高い患者の処置を可能にする。本発明は、一部には、例えば蛍光インサイチューハイブリダイゼーション (F I S H) によって、マイクロアレイ分析によって、または当該分野で周知の他の方法によって検出される、E G F R 遺伝子増幅、または E G F R 過剰発現が、E G F R 遺伝子増幅または E G F R 過剰発現が処置に対する応答に相関するために、処置する患者を選択するための基盤を提供するという発見に基づく。

10

【 0 0 2 0 】

一態様では、本発明は、患者の試料において E G F R バイオマーカーの存在または非存在を検出することを含み、E G F R バイオマーカーの存在が、患者が抗 E G F R 処置に好適であると示すことを特徴とする、患者が抗 E G F R 処置に好適かどうか判定するための方法を提供する。

【 0 0 2 1 】

薬剤は、上皮成長因子受容体 (E G F R) に対する任意の薬剤であることができる。本明細書で用いるとき、E G F R に対する薬剤は、E G F R の活性を改変することができる組成物、例えば、E G F R の活性を増加、低減、除去、増強、遅延、減少、またはブロックすることができる組成物を指す。いくつかの実施形態では、組成物は、転写レベル、翻訳レベル、翻訳後レベル、及び / またはタンパク質レベルで E G F R に対する。組成物は、特異的に E G F R を標的とすることができる、または少なくとも E G F R を標的とすることができる。いくつかの実施形態では、組成物は、E G F R の遺伝子抑圧及び / または遺伝子サイレンシング、例えば、E G F R のノックダウンまたはノックアウトを引き起こすことができる。いくつかの実施形態では、組成物は、例えば E G F R のそのリガンドに対する結合活性及び / または下流シグナル伝達経路を誘導するその能力を改変するなど、E G F R タンパク質の活性を改変することができる。いくつかの実施形態では、薬剤は E G F R のリガンドのアンタゴニストまたは抗体であり、例えば、上皮成長因子 (E G F) 、形質転換成長因子 (T G F) 、H B - E G F 、アンフィレギュリン、ベータセルリン、エピゲン、及び / またはエピレグリンのアンタゴニストまたは抗体である。いくつかの実施形態では、薬剤は E G F R 及び / またはリガンドを標的とし、リガンド - 受容体結合をブロックすることができる。いくつかの実施形態では、薬剤は、受容体及び / またはリガンドにおける立体構造変化を引き起こす及び E G F R 媒介細胞シグナル伝達を減少させるまたは不活性化させることができる。

20

30

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態では、薬剤は、E G F R 及び E r b B 2 / H e r 2 / n e u などの E r b B 受容体ファミリーの別のメンバーによって形成されたヘテロ二量体、または二つの E G F R 分子によって形成されたホモ二量体に対するものである。

40

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、薬剤は、E G F R の下流のシグナル伝達経路に対するものである。本明細書で用いるとき、用語「E G F R の下流のシグナル伝達経路に対する薬剤」は、E G F R の一つ以上の下流標的など、E G F R のシグナル伝達経路下流の活性を改変することができる薬剤を含む組成物を指す。E G F R シグナル伝達経路は、S e c h a c h a r y u l u ら、(T a r g e t i n g t h e E G F R s i g n a l i n g p a t h w a y i n c a n c e r t h e r a p y , E x p e r t O p i n T h e r T a r g e t s , 2 0 1 2 年 1 月 ; 1 6 (1) : 1 5 - 3 1 .) 、O d a ら、(A c o m p r e h e n s i v e p a t h w a y m a p o f e p i d e r m a l g r o w t h f a c t o r r e c e p t o r s i g n a l i n g , M o l e c u l a

50

r Systems Biology 1: 2005.0010)、及びDevelopment EGFR Signaling Pathway (Pathway Maps, Thomson Reuters, 2012)にて記載されており、そのそれぞれが全ての目的のためにその全体において本明細書に組み込まれる。

【0024】

いくつかの実施形態では、薬剤は小分子を含む。本明細書で用いるとき、用語「小分子」は、500 MW未満の分子量を有する分子を指し、ここで該薬剤は非ペプチジルまたはペプチド薬剤である。いくつかの実施形態では、薬剤は、タンパク質またはポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、薬剤は、ハイブリッド分子を含む。いくつかの実施形態では、薬剤は抗体である。いくつかの実施形態では、薬剤は、抗EGFR抗体である。いくつかの実施形態では、薬剤は、抗EGFRリガンド抗体である。いくつかの実施形態では、薬剤は、ヒト化抗EGFRリガンド抗体である。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナル抗体である。

10

【0025】

いくつかの実施形態では、薬剤は抗EGFR抗体である。いくつかの実施形態では、薬剤は、セツキシマブまたはその機能的変異体または誘導体である。抗EGFR抗体の非限定的な例は、そのそれぞれが全ての目的のためにその全体において参照により本明細書に組み込まれる、PCT公開番号WO/2011/140151、WO/2007/058823、WO/2011/080209、WO/2010/080463、WO/2012/020059、WO/2011/080209、WO/2011/059762、WO/2011/152525、WO/2011/140254、WO/2010/034441、WO/2011/156617、WO/2005/090407、WO/2013/006547、WO/2008/140493、WO/2011/156617、米国特許第5942602号、6129915号、7723484号、7618631号、7598350号、及び米国特許出願公開第20100166755号、20080274114号、20130142812号、20110158987号、20120107234号、20110117110号、20110287002号、20120149879号、20120282633号、20100009390号、20050238640号、20060154334号、20120231021号及び20130149299号、に記載されている。

20

30

【0026】

本明細書で用いるとき、用語「上皮成長因子受容体」(「EGFR」)は、上皮成長因子(EGF)に結合し、それによって活性化される、膜ポリペプチドをコードする遺伝子を指す。EGFRは、ERBB、ERBB1及びHER1としても文献で知られている。例示的なEGFRは、ヒト上皮成長因子受容体である(Ullrichら、(1984) Nature 309: 418-425; Genbank 受託番号NP-005219.2; 完全長コード配列AY588246.1を参照)。EGFリガンドの結合はEGFRを活性化する(例えば、細胞内の分裂促進的なシグナル伝達、EGFRの自己リン酸化の活性化をもたらす)。当業者は、EGFに加えて、他のリガンドがEGFRに結合でき、活性化できることを理解するだろう。かかるリガンドの例には、アンフィレギュリン、エピレギュリン、TGF- β 、ベータセルリン、及びヘパリン結合EGF(HB-EGF)が含まれるが、これに限定されない。ヒト、EGFRの細胞内ドメインは、EGFRの膜貫通ドメインに隣接するアミノ酸からCOOH末端までのポリペプチド配列を含む。細胞内ドメインは、特に、チロシンキナーゼドメインを含む。

40

【0027】

本明細書で用いるとき、「EGFR遺伝子」は、EGFR遺伝子産物、例えばEGFR mRNA、EGFRポリペプチドなどをコードする核酸を指す。

【0028】

本明細書で用いるとき、「抗EGFR薬」は、直接的または間接的にEGFRに結合し、EGFRの活性化を阻害する、またはEGFRの下流のシグナル伝達経路の活性を変調

50

することが可能な任意の薬剤を指す。抗EGFR薬は、EGFRに結合してEGFRの活性化を阻害する抗体、ならびにEGFRの活性化を阻害する小分子チロシンキナーゼ阻害剤または「キナーゼ阻害剤」を含む。EGFRに対する抗体は、IgG；IgM；IgA；EGFR結合能を保持する抗体断片、例えばFv、Fab、F(ab)₂、一本鎖抗体など；キメラ抗体；などを含む。EGFRの小分子チロシンキナーゼ阻害剤は、EGFR選択的チロシンキナーゼ阻害剤を含む。EGFRの小分子チロシンキナーゼ阻害剤は、約50Daから約10,000Daの範囲の分子量を有することができる。

【0029】

本発明によれば、「抗EGFR薬」または「EGFR阻害剤」は、任意のEGFRを含む、上皮成長因子受容体(EGFR)の発現及び/または生物学的活性を阻害する(ブロックする、減少させる、拮抗する、低減させる、逆行させる)任意の薬剤であることができる。従って、抗EGFR薬は、薬剤/化合物/ペプチドの設計物または選択物、抗体またはその抗原結合断片、タンパク質、ペプチド、核酸(リボザイム、アンチセンス、RNAi及びアプタマーを含む)、またはEGFRの発現及び/または生物学的活性を阻害する任意の他の薬剤を含むことができるが、これに限定されない。例えば、EGFRの周知阻害剤には、薬剤である、ゲフィチニブ(ZD1839、Iressa(登録商標)、AstraZeneca、英国)及びエルロチニブ(OSI774、Tarceva(登録商標)、Genentech、米国)、及びモノクローナル抗体であるセツキシマブ(Erbibitux(登録商標)、Imclone、Bristol-Myers Squibb社)が含まれる。しかしながら、本発明は、これらの特定の薬剤に限定されず、このような薬剤またはこれらの薬剤と実質的に同様の生物学的活性を有する薬剤のアゴニストを含むことができる。EGFRなどのタンパク質の生物学的活性または生物学的作用は、インビボ(つまり、タンパク質の天然の生理学的環境下)またはインビトロ(つまり、実験室条件下)で測定されるまたは観察されるように、天然に存在する形態のタンパク質によって呈されるまたは行われる任意の機能(複数可)を指す。EGFRの生物学的活性としては、EGFへの結合、受容体ホモ二量体化またはヘテロ二量体化、チロシンキナーゼ活性、及び細胞のホメオスタシス及び発達に関連する下流活性が挙げられるが、これに限定されない。

【0030】

チロシンキナーゼ阻害剤は、腫瘍細胞などの細胞内の受容型及び/または非受容型チロシンキナーゼを標的とする治療薬または薬剤のクラスを表す。ある特定の例では、チロシンキナーゼ阻害剤は、抗体ベース(例えば、抗チロシンキナーゼモノクローナル抗体など)またはポリヌクレオチドベース(例えば、チロシンキナーゼアンチセンスオリゴヌクレオチド、低分子干渉リボ核酸など)形態の標的療法である。好ましくは、チロシンキナーゼ阻害剤は、酵素のATP結合部位に結合することにより標的チロシンキナーゼを阻害する小分子である。小分子チロシンキナーゼ阻害剤の例としては、ゲフィチニブ(Iressa(登録商標))、スニチニブ(Sutent(登録商標)；SU11248)、エルロチニブ(Tarceva(登録商標)；OSI-1774)、ラバチニブ(GW572016；GW2016)、カネルチニブ(CI1033)、セマクサニブ(SU5416)、パタラニブ(PTK787/ZK222584)、ソラフェニブ(BAY43-9006)、イマチニブ(Gleevec(登録商標)；ST1571)、ダサチニブ(BMS-354825)、レフルノミド(SU10)、パンデタニブ(Zactima(登録商標)；ZD6474)、その薬学的に許容され得る塩、その誘導体、その類似体、及びそれらの組み合わせが含まれるが、これに限定されない。本発明での使用に好適なチロシンキナーゼ阻害剤のさらなる例としては、キナゾリン(例えば、PD153035、4-(3-クロロアニリノ)キナゾリン、など)、ピリドピリミジン、ピリミドピリミジン、ピロロピリミジン(例えば、CGP59326、CGP60261、CGP62706、など)、ピラゾロピリミジン、4-(フェニルアミノ)-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン、クルクミン(ジフェルロイルメタン)、4,5-ビス(4-フルオロアニリノ)フタルイミド、ニトロチオフエン部分を含有するチルホスチン、キノキサリン(例えば

、米国特許第5,804,396号を参照)、トリホスチン(trypHostin)(例えば、米国特許第5,804,396号を参照)、PD0183805、PKI-166、EKB-569、IMC-1C11、Affinitac(登録商標)(LY900003;ISIS3521)、及びPCT公開番号、WO99/09016、WO98/43960、WO97/38983、WO99/06378、WO99/06396、WO96/30347、WO96/33978、WO96/33979、及びWO96/33980に記載のチロシンキナーゼ阻害剤が挙げられる。

【0031】

例示的な抗EGFR薬は抗EGFR抗体であり、抗EGFR抗体：免疫学的に有効な断片(Fab、Fv)及び免疫コンジュゲート、特に免疫サイトカインを含む、マウス、キメラまたはヒト化バージョンの、セツキシマブ(ERBITUX(商標))、パニツムマブ(VECTIBIX(商標))、マツズマブ、ニモツズマブ、抗体806、Sym004、及びMM-151を含むが、これに限定されない。EGFRの細胞外ドメインに特異的な他の抗体(または他の結合分子)は、当該分野で周知であり、本明細書での使用が企図される(例えば、米国特許第5,459,061号、5,558,864号、5,891,996号、6,217,866号、6,235,883号、6,699,473号、及び7,060,808号；欧州特許第EP0359282号及びEP0667165号を参照)。

【0032】

本明細書で用いる用語「腫瘍試料」は、癌患者から得られた腫瘍材料を含む試料を意味する。この用語は、臨床試料、例えば外科的切除によって得られた組織、及びコア生検または細針生検などの生検によって得られた組織を包含する。この用語は、原発腫瘍以外の部位から得られた腫瘍細胞、例えば末梢循環腫瘍細胞を含む試料も包含する。この用語は、患者の腫瘍細胞の後代となる細胞、例えば、原発腫瘍細胞または抹消循環腫瘍細胞に由来する細胞培養試料を包含する。この用語は、インビボで腫瘍細胞から流出したタンパク質または核酸物質を含む可能性のある試料、例えば骨髓、血液、血漿、血清などを包含する。この用語は、この用語はまた、調達した後に、腫瘍細胞を濃縮したか、さもなければ操作した試料、及び患者の腫瘍材料から得られるポリヌクレオチド及び/またはポリペプチドを含む試料を包含する。

【0033】

本明細書で用いるとき、用語「マーカー」または「バイオマーカー」は、広範囲の細胞内及び細胞外事象ならびに生体全体の生理学的変化を包含する。マーカーは、本質的に細胞機能の任意の側面、例えば、これに限定されないが、シグナル伝達分子、転写因子、代謝物、遺伝子転写物ならびにタンパク質の翻訳後修飾の産生のレベルまたは速度を表し得る。マーカーは、転写レベル、速度、及び/または安定性の一部及び/または全体のゲノム解析、及びタンパク質レベル、活性及び/または修飾の一部及び/または全体のプロテオーム解析を含み得る。シグネチャーは、臨床的に正常な対象と比較して、処置される対象における上方制御または下方制御された遺伝子または遺伝子産物を指し得る。シグネチャーは、処置されていない対象と比べて、疾患を有する処置された対象の上方制御または下方制御された遺伝子または遺伝子産物も意味し得る。すなわち、この遺伝子または遺伝子産物は、処置された細胞に対し十分に特異的であるため、小分子の有効性を同定、予測、または検出するために、任意選択的に他の遺伝子または遺伝子産物とともに使用され得る。ゆえに、いくつかの実施形態では、シグネチャーは、疾患細胞における化合物の有効性または化合物による処置に対する疾患細胞の応答性に特徴的な、遺伝子または遺伝子産物である。

【0034】

本明細書で用いるとき「EGFRバイオマーカー」は、EGFR遺伝子増幅及び/またはEGFRの過剰発現を指す。EGFRの過剰発現は、転写産物量、転写産物の安定性、転写速度、翻訳速度、翻訳後修飾、タンパク質量、タンパク質安定性、及び/またはタンパク質酵素活性、mRNA、タンパク質及び/またはタンパク質活性、などによって測定

10

20

30

40

50

される過剰発現に関し得る。本明細書で用いるとき、用語「遺伝子活性」は、遺伝子発現レベル、RNA活性レベル、またはタンパク質活性レベルを指す。本明細書で用いるとき、用語「RNA活性レベル」は、mRNA量、合成速度、及び/または安定性などを指す。本明細書で用いるとき、用語「タンパク質活性レベル」は、タンパク質量、合成速度、安定性、酵素活性、リン酸化速度、などを指す。

【0035】

いくつかの実施形態では、バイオマーカーに関する情報は、一つ以上の試験から得られる。試験は、対象自身、医師、看護師、試験機関、医療提供者、または試験をすることが可能な任意の他の当事者によって実行されることができる。バイオマーカー情報を含有する試験結果は、次いで、同じ当事者または第二の当事者、例えば、対象自身、医師、看護師、試験機関、医療提供者、内科医、臨床試験の担当者、病院、研究室、研究機関、または対象が薬剤に応答性を有するかどうかを判定するための試験を分析することが可能な任意の他の当事者によって分析されることができる。

【0036】

ある特定の実施形態では、EGFR遺伝子コピー数またはEGFRの過剰発現の閾値（複数可）は確立されることができ、患者の腫瘍試料におけるEGFR遺伝子コピー数またはEGFR mRNAまたはタンパク質の発現レベルは、「所定の閾値」（「所定のレベル」または「所定のカットオフ値」とも呼ぶ）と比較されることができる。

【0037】

EGFRコピー数または発現レベルの、所定のカットオフとも呼ばれることのある、所定のレベルは、当該分野で周知の方法、具体的には受信者動作特性曲線または「ROC」曲線を使用して確立され得る。実際に、ROC曲線は、一般的に、変数の値を「正常」及び「疾患」集団におけるその相対的頻度に対してプロットすることによって、及び/または処置前、処置中/処置後の対象からの結果の比較によって計算される。ある特定の実施形態では、正常試料対試験試料におけるEGFR発現または遺伝子コピー数、またはその両方が比較される。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子コピー数は、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上である。いくつかの実施形態では、増加は、一つ以上の基準レベルと比較することによって、または基準レベルとして当該分野で周知であるレベルと比較することによって判定される。遺伝子増幅、発現の増加、RNAまたはDNAレベルの増加を測定する方法、ならびに、タンパク質が恒常的に活性であるかどうか判定する方法は、当該分野で周知であり、本発明では任意のかかる方法が採用されることができる。

【0038】

EGFRバイオマーカー、またはHER2などの対象となる他のバイオマーカー、の存在または非存在を判定するために、特定の試験またはアッセイで使用されるレポーター基から検出されるシグナルは、通常、所定のカットオフ値または所定の閾値に対応するシグナルと比較される。一実施形態では、バイオマーカーの検出のための所定の閾値は、疾患を有さない、例えば胃癌を有さない患者からの試料から得られる平均レベルである。一般に、所定の閾値を3つの基準偏差超えるシグナルを生成する試料は、癌に陽性であると考えられる。代替の好ましい実施形態では、カットオフ値は、ROCを使用して決定され、Sackettら、Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine, Little Brown and Co., 1985, p. 106-7の方法に従う。簡潔には、この実施形態では、カットオフ値は、診断試験結果に対するそれぞれの可能なカットオフ値に相当する真の陽性率（すなわち、感受性）及び偽陽性率（100%特異性）のペアのプロットから決定されることができる。左上の角に最も近い（つまり、最も大きい領域を囲む値）プロットのカットオフ値は、最も精密なカットオフ値であり、この方法によって決定されるカットオフ値より高いシグナルを生成する試料は陽性であると考えられ得る。あるいは、偽陽性率を最小にするためにカットオフ値はプロットに沿って左に移行されてよく、または偽陰性率を最小にするために右に移行されてよい。一般に、この方法によって決定されるカ

ットオフ値より高いシグナルを生成する試料は、癌に陽性であると考えられる。

【 0 0 3 9 】

いくつかの実施形態では、抗 E G F R 薬を用いた処置に対する患者の応答を表す R O C 曲線は、目的関数を規定するために使用され得る。例えば、目的関数は、R O C 曲線下面積を反映し得る。抗 E G F R 薬を用いて処置される患者における E G F R 遺伝子コピー数（例えば、E G F R 遺伝子増幅）または E G F R の過剰発現のレベルに関して曲線下面積を最大化させることによって、癌に罹患している患者が抗 E G F R 薬を用いた処置に応答するか否かを最大化させ得る。いくつかの他の実施形態では、R O C 曲線は、特定の値より大きい曲線下面積を提供するように制約され得る。0 . 5 の曲線下面積を有する R O C 曲線は、完全な不確定性を示し、一方で 1 . 0 の曲線下面積は、二つのセットが完全に分離されることを反映する。ゆえに、ある特定の実施形態では、0 . 7 5 などの、最小の許容値が制約として使用され得る。

10

【 0 0 4 0 】

他の実施形態では、R O C 曲線の勾配が 1 に等しい点の使用；感度と特異度の積が最大になる点の使用などの他の特性；またはこれらの R O C 曲線の特性の二つ以上の組み合わせが、目的関数を規定するために使用され得る。

【 0 0 4 1 】

ある特定の実施形態では、E G F R 過剰発現（例えば、m R N A またはタンパク質発現）は、腫瘍が生じたのと同じタイプの正常組織内に比べ、腫瘍組織内で少なくとも約 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍またはより高いレベルで存在する。

20

【 0 0 4 2 】

いくつかの実施形態では、所定の閾値と比べて、腫瘍試料中の E G F R 遺伝子コピー数のレベルの増加または E G F R の過剰発現、またはその両方は、癌に罹患している患者が抗 E G F R 薬を用いた処置に対して応答性であるだろうことを示す。いくつかの実施形態では、所定の閾値と比較して、腫瘍試料中の E G F R 遺伝子コピー数レベルの低減は、癌に罹患している患者が E G F R 阻害剤を用いた処置に応答性でないだろうことを示す。

【 0 0 4 3 】

本発明は、一部には、E G F R バイオマーカー（過剰発現及び／または遺伝子増幅）を有する H u P r i m e モデルは H E R 2 バイオマーカー（過剰発現及び／または遺伝子増幅）をさらに有さないことの観察に関し、逆も同様、すなわち単一モデルにおいて E G F R 及び H E R 2 両方の過剰発現（遺伝子増幅）が観察されないことにも関する（実施例を参照）。従って、一実施形態では、所定の閾値と比較して腫瘍試料における E G F R 遺伝子コピー数のレベルの増加または E G F R の過剰発現及び H E R 2 バイオマーカーの欠如は、抗 E G F R 薬を用いた処置をする患者を選択するための指標として使用される。この点について、ヒトチロシンキナーゼ受容体型受容体（H E R 2）遺伝子のヌクレオチド配列も、当該分野で周知であり、G e n B a n k 受託番号 M 1 6 7 8 9、M 1 6 7 9 0、M 1 6 7 9 1、M 1 6 7 9 2 及び M 1 1 7 3 0（参照により全て本明細書に組み込まれる）に見出される。ヌクレオチドプローブ及び抗 H E R 2 抗体も当該分野で周知であり、H E R 2 遺伝子及びタンパク質に対するプローブとして、その発現レベル／活性を決定するために利用可能である。

30

40

【 0 0 4 4 】

用語「遺伝子コピー数」（G C N）は、通常、ゲノムあたりの遺伝子の数として定義される。用語「E G F R 遺伝子コピー数」は、1 つの核に対する E G F R 遺伝子の数の比率を意味する。非腫瘍形成性細胞または非腫瘍性細胞では、E G F R 遺伝子コピー数は 2 と同様かまたは 2 未満である。インサイチュハイブリダイゼーションを用いて検出された場合、非腫瘍形成性起源または非腫瘍性起源の組織切片では、G C N は 2 と同様かまたは 2 未満である。

【 0 0 4 5 】

用語「E G F R 遺伝子コピー数の増加」、「E G F R 遺伝子コピー数の増幅」または「E G F R 遺伝子増幅」は、患者に関連する腫瘍の細胞における上述で規定した比率が、同

50

一起源の非腫瘍性細胞に関連する腫瘍の細胞における特定の比率または閾値と比較して、高いまたは増幅していることを意味する。一実施形態では、この比率、または閾値（E G F R 遺伝子数 / 核）は、2 または 3 または 4 または 5 または 6 または 7 より大きい。別の実施形態では、当該比率または閾値は 4 と同様か、4 より大きい。ある特定の実施形態では、用語、E G F R 遺伝子コピー数の増加または増幅は、非腫瘍形成性または非腫瘍性細胞の E G F R 遺伝子コピー数よりも大きい G C N を意味する。ある特定の実施形態では、E G F R G C N、または閾値は、4 超であり得、例えば、4 . 5、5、5 . 5、6、6 . 5、7、7 . 5、8、8 . 5、9、9 . 5、10、10 . 5、11、11 . 5、12、12 . 5、13、30 . 5、14、14 . 5、15、50 . 5、16 またはそれ以上である。ある特定の実施形態では、E G F R G C N、または閾値は 4 未満、例えば 3 . 5、3、または 2 . 5 であり得る。

10

【0046】

いくつかの実施形態では、4 と同様または 4 より大きい E G F R 遺伝子コピー数により、抗 E G F R 薬剤を用いた処置に対して応答する可能性が高い、癌に罹患している患者が同定される。

【0047】

E G F R 遺伝子コピー数の「増加」または「増幅」に当てはまるこれらの前述の値によれば、E G F R 阻害剤または抗 E G F R 抗体を用いた処置に対して、応答しない、または有効にまたは正に反応しない、または非反応である、患者の腫瘍細胞によって表される相対的に低減または低いまたは非増幅のコピー数についての比率値は 2 未満である。一実施形態では、当該比率、または閾値は 4 未満である。いくつかの実施形態では、4 未満の E G F R 遺伝子コピー数により、癌に罹患し、かつ抗 E G F R 薬を用いた処置に対して非反応である可能性が高い患者が同定される。

20

【0048】

E G F R バイオマーカー、例えば、遺伝子増幅または E G F R の過剰発現、または対象となる他のバイオマーカー（例えば、H E R 2 バイオマーカー）の存在を判定するための方法は、遺伝子発現プロファイリングを含む。かかる方法は、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション解析に基づく方法、ポリヌクレオチドの配列決定に基づく方法、及びプロテオミクスをベースとする方法を含む。試料における m R N A 発現の定量化のための当該分野で周知である例示的な方法として、ノーザンブロットング及びインサイチュハイブリダイゼーション（P a r k e r & B a r n e s , M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y 106:247-283 (1999)）；R N A s e プロテクションアッセイ（H o d , B i o t e c h n i q u e s 13:852-854 (1992)）；及び逆転写 P C T (R T - P C R) などの P C R をベースとする方法（W e i s s , T r e n d s i n G e n e t i c s 8:263-264 (1992)）が挙げられる。D N A 二本鎖、R N A 二本鎖、及び D N A - R N A ハイブリッド二本鎖または D N A - タンパク質二本鎖を含む、配列特異的二本鎖を認識することができる抗体が採用され得る。次世代シーケンシング、q P C R、q c P C R、及びデジタル P C R も E G F R 発現レベルを判定するために使用されてよい。

30

【0049】

R N A または D N A などの核酸のレベルを検出するための方法は、十分に説明されてきており当業者に周知である。R N A を検出するための方法には、限定されないが、R T - P C R、ノーザンブロット解析、遺伝子発現解析、マイクロアレイ解析、遺伝子発現チップ解析、ハイブリダイゼーション技術（F I S H を含む）、E x p r e s s i o n B e a d C h i p アレイ、及びクロマトグラフィーならびに当該分野で周知の任意の他の技術を含むことができる。D N A を検出するための方法には、限定されないが、P C R、リアルタイム P C R、デジタル P C R、ハイブリダイゼーション（F I S H を含む）、マイクロアレイ解析、S N P 検出アッセイ、S N P 遺伝子型決定アッセイ及びクロマトグラフィーならびに当該分野で周知の任意の他の技術を含むことができる。

40

【0050】

50

タンパク質及びポリペプチドを検出するための方法には、限定されないが、タンパク質濃度の分光光度定量法、定量的アミノ酸分析、タンパク質濃度アッセイ、クロマトグラフィーアッセイ、ウェスタンブロット解析、ゲル電気泳動、(クマシーブルー、シルバーステイン、サイバークリーン、サイバークゴールドを含むがこれに限定されない染色手順が続く)、ハイブリダイゼーション、多重サイトカインアッセイ、イムノアッセイ、ELISA、ピシンコニン酸(BCA)タンパク質アッセイ、ブラッドフォードタンパク質アッセイ、及びローリータンパク質アッセイならびに当該分野で周知の任意の他の技術を含むことができる。タンパク質検出は、安定または活性なタンパク質のレベルを検出することも含むことができ、カインेटリックアッセイ、キナーゼアッセイ、酵素アッセイ及び翻訳後修飾アッセイ(例えば、リン酸化及びグリコシル化状態を判定するためのアッセイ)などの方法も採用されることができる。

10

【0051】

本明細書で用いるとき、用語「所定の基準レベル」または「所定の活性プロファイル」は、特定の集団における一つ以上のバイオマーカーの平均、代表的な特性、または特徴を表す基準化されたデータまたはデータセットを指す。かかる特性または特徴は、転写産物量、転写産物の安定性、転写速度、翻訳速度、翻訳後修飾、タンパク質量、タンパク質安定性、及び/またはタンパク質酵素活性、などを含むがこれに限定されない。いくつかの実施形態では、対象の特定の集団は、約5、約10、約20、約50、約100、約200、約300、約400、約500、約1000、約5000、約10,000、またはそれ以上の個別の対象からなる。所定の活性プロファイルは、対象の特定の集団が全て薬剤に曝される前、最中、後に収集された基準化されたデータまたはデータセットであることができる。いくつかの実施形態では、特定の集団は、臨床的に正常な対象からなる。本明細書で用いるとき、用語「臨床的に正常な対象」は、胃腫瘍に関連する症状を有さない、または実質的に有さない対象を指す。所定の基準レベルは、当業者に周知の様々な方法を使用して規定することができる。一般に、バイオマーカーについての基準レベルは、正常、健常対照対象から得た十分に大きい数の試料においてEGFRバイオマーカーのレベルを決定することによって決定される。いくつかの実施形態では、基準レベル情報は、公に利用可能なデータベース、並びに他の情報源から得ることができる(例えば、Bunk, D.M., Clin. Biochem. Rev., 28(4): 131-137 (2007); Suraj Perilら, Genome Res. 13: 2363-2371 (2003); Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Twenty First Edition (2005)を参照)。

20

30

【0052】

バイオマーカーレベルの検出、定量及び比較に関する方法について、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ed. Ausubel, Frederick M. (2010); Current Protocols in Protein Science Last, Ed. Coligan, John E., ら (2010); Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Ed. Egli, Martin (2010); Current Protocols in Bioinformatics, Ed. Baxevanis, Andreas D. (2010); 及びMolecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版, Sambrook, Joseph (2001) (その全てがその全体において参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

40

【0053】

EGFR発現レベルはまた、任意の様々な利用可能なマイクロアレイを使用して評価されることができる。この方法では、対象のポリヌクレオチド配列(cDNA及びオリゴヌクレオチドを含む)を基板上に配置する。次いで、配置された配列を、検査試料のmRNAから生成した、検出可能に標識したcDNAと特異的ハイブリダイゼーションに好適な

50

条件下で接触させる。mRNAの供給源は、典型的には、腫瘍試料から、場合によっては、内部対照として同じ患者の正常組織または細胞株から単離した全RNAである。mRNAは、例えば、凍結した組織試料またはアーカイブ保管パラフィン包埋及び固定（例えば、ホルマリン固定）の組織試料から抽出されることができる。本明細書で使用するための例示的なマイクロアレイは、Affymetrix社のHG-U219 GeneChipまたはAffymetrix社のSNP6アレイ（Affymetrix、カリフォルニア州サンタクララ）を含むがこれに限定されない。

【0054】

ある特定の実施形態では、EGFR遺伝子コピー数またはmRNA発現レベルの検出は、ハイブリダイゼーションアッセイを使用して達成される。核酸ハイブリダイゼーションは、単純に、プローブ及びその相補的標的が相補的塩基対合を通して安定したハイブリッド二本鎖を形成できる条件下で、プローブ（例えば、オリゴヌクレオチドまたはより大きなポリヌクレオチド）と標的核酸を接触させることを含む。本明細書で用いるとき、ハイブリダイゼーション条件は、核酸分子を使用して類似の核酸分子を同定する標準ハイブリダイゼーション条件を指す。かかる標準条件は、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989において開示されている。Sambrookらの同書は、その全体において参照により本明細書に組み込まれる（具体的には、9.31~9.62頁を参照）。加えて、ヌクレオチドの様々なミスマッチ度を許容するハイブリダイゼーションを達成するために適切なハイブリダイゼーション及び洗浄の条件を計算する式が当業者に周知である。

【0055】

低いストリンジェンシー条件（例えば、低温及び/または高塩濃度）下では、アニーリングした配列が完全に相補的ではない場合でも、ハイブリッド二本鎖（例えば、DNA:DNA、RNA:RNAまたはRNA:DNA）が形成するだろう。したがって、ハイブリダイゼーションの特異性は、低いストリンジェンシーでは低下する。逆に、高いストリンジェンシー（例えば、高温またはより低い塩濃度）では、ハイブリダイゼーションの成功には、ミスマッチがより少ないことが必要である。

【0056】

ハイブリダイズした核酸は、試料核酸に結合した一つ以上の標識を検出することによって検出される。標識は、当業者に周知の多くの手法のうちのいずれによって組み込まれてよい。

【0057】

一実施形態では、EGFR遺伝子コピー数はFISH解析を使用して検出される。FISH（2色）の手順は、本明細書の実施例に記載のものなどの市販の試薬及び方法を使用して行われることができる（例えば、Abbott社のPathVision EGFR DNA Probe Kit（Abbott、イリノイ州ダウナーズ・グループ）を参照）。ある特定の実施形態では、かかるFISH解析に使用される標識プローブは、染色体7p12上のEGFR遺伝子座に特異的なスペクトラムオレンジ蛍光標識EGFR（303kb）及び/または染色体7のセントロメア領域（CEP7; 7p11.1~q11.1）に配置された - サテライトDNA配列を標的としたスペクトラムグリーン蛍光標識染色体エニユメレータープローブ（5.4kb）を含む。

【0058】

多くの従来の検出方法は、酵素を活用する。高感度な検出のために一般に使用される酵素基質のタイプは、一般的には比色性、放射性、または蛍光性である。従来の比色基質は、発色基質に対する酵素作用で新しい色（またはスペクトル吸収の変化）を生成する。このタイプの検出は、生成される色素原が、光学顕微鏡検査によってまたは分光装置を用いて容易に検出されるという点で有利である。検出にかかる設備費用も、他の方法より一般的に少なく、例えば病理学では、西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素が3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）基質に作用することによって生成される褐色は、生検切片の観察の

ために単純な明視野光学顕微鏡のみを必要とする。西洋ワサビペルオキシダーゼと併せて使用することができる他の色素原には、3 - アミノ - 9 - エチルカルバゾール (AEC) 及びBajoran Purpleが含まれるが、これに限定されない。アルカリホスファターゼと併せて使用することができる他の色素原には、Fast Red及びFeringi Blueが含まれるが、これに限定されない。多くの色素原が当業者に利用可能であり、Thermo Fisher Scientificなどの会社が提供するカタログを通して商業的に入手可能である。

【0059】

検出方法において使用される様々な標識は、蛍光色素 (例えば、フルオレセインイソチオシアネート、テキサスレッド、ローダミン、など)、及び酵素 (例えば、LacZ、CAT、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、及びグルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ及び一般に検出可能な酵素として使用される他の酵素)、またはストレプトアビジン/ビオチン、アビジン/ビオチンまたは、例えば、ウサギIgG及び抗ウサギIgGを含む抗原/抗原複合体など、複合体を形成することが可能な結合対のメンバー; フルオロフォア; 金や銀の粒子または量子ドットなどの光散乱物質またはプラズモン共鳴物質; または放射性標識; 及び例えば、6^{sup}.th Edition of the Molecular Probe Handbook by Richard P. Hoaglandにおいて記載されるような当業者に周知の任意の他のシグナル生成標識で標識されたプローブを含む。ある特定の実施形態では、標識プローブは、染色体7p12上のEGFR遺伝子座に特異的なスペクトラムオレンジ蛍光標識EGFR (303kb) 及び/または染色体7のセントロメア領域 (CEP7; 7p11.1~q11.1) に配置された α -サテライトDNA配列を標的としたスペクトラムグリーン蛍光標識染色体エニュメレータープローブ (5.4kb) を含む。

【0060】

ある特定の実施形態では、EGFR遺伝子またはその断片などのハイブリダイズする核酸は、金属標識または「酵素的金属組織学」によって検出され、最も好ましくは、銀インサイチューハイブリダイゼーション (SISH) アッセイによって検出される (例えば、特許公開US20080299555A1を参照)。具体的には、酵素的金属組織学は、油浸を必要とすることなく従来の明視野顕微鏡によって染色体中の標的遺伝子の1コピーの検出を可能にする。SISHは、個々の遺伝子コピーに対する別個の金属沈着ドットなどのシグナルを個々に数え上げることができる解像度で遺伝子コピーの検出も可能にする。一実施形態では、本発明は、核内ヒト染色体7のEGFR遺伝子の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15またはそれ以上のコピーを、別個の金属沈着ドットとして検出することを可能にする。

【0061】

本発明による腫瘍細胞の遺伝子及び染色体のコピー数を、例えばFISHまたはSISHアッセイで核において測定することができ、タンパク質発現を、例えば免疫組織化学アッセイで腫瘍細胞の核、細胞質及び/または膜において評価することができる。これらの検査、例えば、FISHまたはSISH及び免疫組織化学、ならびに他の検出方法は、原発腫瘍、転移性腫瘍、局所再発腫瘍または他の腫瘍状態において実施することができる。腫瘍検体は、新鮮、凍結、固定または他の保存状態であってもよい。

【0062】

ヒト上皮増殖因子受容体 (EGFR) 遺伝子のヌクレオチド配列は、当技術分野で周知であり、例えばGenBank受託番号AY588246 (参照によって本明細書に組み込まれる) に見つめることができる。ヌクレオチドプローブも、当技術分野で周知であり、EGFR遺伝子の検出用プローブとして使用するために入手することができる。例えば、EGFR及び染色体7動原体の配列を検出するためのそのようなプローブが入手可能である (例えば、LSI EGFR SpectrumOrange/CEP7 SpectrumGreenプローブ (Vysis, Abbott Laboratories))

。

【0063】

タンパク質発現は、生検により得られた腫瘍組織及び腫瘍細胞材料などの好適な組織において検出されることができる。例えば、患者の固定化可能な腫瘍生検試料を、検出すべきタンパク質に選択的に結合する抗体、抗体断片またはアプタマーと接触させて、抗体、その断片またはアプタマーがそのタンパク質に結合したか否かを判定することができる。タンパク質発現は、当技術分野で標準の様々な方法を使用して測定することができ、それらの方法としては、限定されないが、ウェスタンブロット法、免疫ブロット法、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、ラジオリガンドアッセイ（RIA）、免疫沈降、表面プラズモン共鳴、化学発光、蛍光偏光、リン光、免疫組織化学的分析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型（MALDI-TOF）質量分析、マイクロサイトメトリ、マイクロアレイ、顕微鏡検査、蛍光活性化細胞選別（FACS）及びフローサイトメトリが挙げられる。一実施形態では、免疫組織化学的（IHC）分析をタンパク質発現の検出のために使用する。タンパク質発現を検出するためのIHC法及び好ましい評価基準は、例えば、Hirschら、J. Clin. Oncol. 2003, 21: 3798-3807に詳細に記載されている。

10

【0064】

EGFR遺伝子増幅または過剰発現は、EGFR活性の増加をもたらす。異常に高いEGFRの活性化は、いくつかの細胞内基質のリン酸化をもたらす、それが分裂促進シグナル伝達ならびに他の腫瘍誘導活性を生じさせる。従って、ある特定の実施形態では、EGFRバイオマーカーの存在を判定することは、細胞増殖アッセイ、アポトーシスアッセイ、受容体結合アッセイ、受容体リン酸化アッセイなどを使用して判定されるEGFRの生物学的活性の一つ以上の指標を測定することを含み得る。

20

【0065】

バイオマーカーレベルの検出、定量及び比較に関する方法について、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ed. Ausubel, Frederick M. (2010); Current Protocols in Protein Science Last, Ed. Coligan, John E. ら, (2010); Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Ed. Egli, Martin (2010); Current Protocols in Bioinformatics, Ed. Baxevanis, Andreas D. (2010); 及びMolecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Sambrook, Joseph (2001)、(その全てがその全体において参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

30

【0066】

本発明の別の態様は、胃腫瘍を有する患者の試料を受け取る工程、EGFRバイオマーカーの存在または非存在を試料において検出するための本明細書に記載の試験を行う工程、及び患者の医療提供者に試験結果を提供する工程を含む、ラボサービスを提供するための方法を提供する。

40

【0067】

本発明は、EGFRバイオマーカーの検出に好適な試薬と、本明細書に記載の方法に従って胃腫瘍を有する患者への処置選択肢を決定するためにEGFRバイオマーカーを使用するための説明書とを含むキットも提供する。かかるキットは一般的に、診断アッセイを行うのに必要な二つ以上の構成要素を含む。構成要素は、化合物、試薬、容器及び/または装置であってよい。例えば、キット内の一つの容器は、EGFR（及び/またはある特定の実施形態では、HER2タンパク質）に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその断片を含有し得る。かかる抗体または断片は、上述のように保持体材料に結合されて提供され得る。一つ以上のさらなる容器は、試薬または緩衝剤などの、アッセイにて使用される要素を封入し得る。かかるキットは、抗体結合の直接または間接検出に好適なレポ

50

ーター基を含有する上述の検出試薬をさらに、または代替的に含有する。

【0068】

あるいは、キットは、生体試料におけるEGFR（及び/またはHER2）タンパク質をコードするmRNAのレベルを検出するように、またはEGFR遺伝子増幅の検出用に設計され得る。かかるキットは、通常、上述のように、EGFRタンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはEGFR DNAへとハイブリダイズする少なくとも一つのオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを含む。かかるオリゴヌクレオチドは、例えば、PCRまたはハイブリダイゼーションアッセイにて使用され得る。かかるキット内に存在し得るさらなる構成要素には、EGFRまたはHER2タンパク質をコードするポリヌクレオチドの検出を促進するために第二オリゴヌクレオチド及び/または診断試薬または

10

【0069】

生体試料を得るための手段は当該分野で周知であり、生体試料を得るための任意の標準的な方法が採用されることができ得る。本発明の方法での使用が見出される生体試料は、血清、血液、血漿、全血及びその派生体、皮膚、毛髪、毛包、唾液、口腔粘膜、膣粘膜、汗、涙、上皮組織、尿、精液（semen）、精液（seminal fluid）、精漿、前立腺液、尿道球腺液（カウパー液）、排泄物、生検材料、腹水、脳脊髄液、リンパ液、組織抽出試料または生検試料を含むが、これに限定されない。（例えば、Clinical Proteomics: Methods and Protocols, Vol. 428 in Methods in Molecular Biology, Ed. Antonia Vlahou (2008)を参照）。一実施形態では、本発明の生体試料は、食道の任意の細胞または組織試料、例えば食道癌の部位上または循環細胞または遊走細胞を含む。別の実施形態では、本発明の生体試料は、食道の細胞または組織試料の任意の抽出または一部のまたは全体の分画、例えば食道癌の部位上または循環細胞または遊走細胞を含む。

20

【0070】

医薬組成物及び処置方法

本発明は、胃腫瘍を処置するための方法であって、かかる処置を必要とする患者に本明細書に記載の治療有効量の抗EGFR薬を投与することを含み、ここで患者がEGFRバイオマーカーを有すると判定されている、方法を提供する。本明細書で用いるとき、用語「有効量」は、所望の処置結果を与える一つ以上の化合物の量を指す。有効量は、一つ以上の投薬内に備えられ得る、つまり単回投薬または複数回投薬が所望の処置エンドポイントを達成するために必要とされ得る。用語「治療有効量」は、本明細書で用いるとき、場合によっては重大なマイナスのまたは有害副作用を引き起こすことなく、病状を処置する、または傷害または損傷を減らすまたは防ぐために必要な一つ以上の薬剤のレベルまたは量を指す。例えば、治療有効量は、例えば所望の治療結果（例えば疾患または病状の重症度の低減）を生成するのに十分にEGFR経路を変調することができる一つ以上の化合物を含む、医薬製剤の量を含む。一実施形態では、胃腫瘍は胃腺癌である。本明細書に記載の方法は、本明細書に記載のように患者がEGFRバイオマーカーを有すると判定されている場合の、腸型及びびまん型胃腺癌、消化管間質腫瘍（GIST）、消化管平滑筋肉腫、消化管カルチノイド及び消化管リンパ腫を含む任意のタイプの胃癌を処置するための方法を含む。ある特定の実施形態では、本方法は胃癌を処置するためのものである。具体的な実施形態では、本方法は、胃癌などのEGFR発現癌を処置するための方法を含み、ここで癌は食道胃腺癌（esophagogastric adenocarcinoma）（OGA）または転移性大腸癌でないことを特徴とする。一実施形態では、本発明は、胃腫瘍を処置するための方法であって、かかる処置を必要とする患者に治療有効量の抗EGFR薬を上述のように投与することを含み、患者がEGFRバイオマーカーを有し、HER2バイオマーカーを有しないと判定されている、方法を提供する。

30

40

【0071】

別の実施形態は、患者は本明細書に記載のようにEGFRバイオマーカーを有すると判

50

定されている場合の、癌患者に治療有効量の本明細書に記載の抗EGFR薬（EGFR特異的抗体など）を投与することによって、腸型及びびまん型胃腺癌、消化管間質腫瘍（GIST）、消化管平滑筋肉腫、消化管カルチノイド及び消化管リンパ腫を含むが、これに限定されない、胃癌の転移を予防するための方法を提供する。この点について、本方法は、投与後、統計的に有意な方式（すなわち、当業者に周知であるだろう適切な対照と比較して）で胃癌の転移を阻害する、防ぐ、または遅らせる、ある量の抗EGFR薬を投与することを含む。ある特定の実施形態では、患者は、EGFRバイオマーカーを有するが、HER2バイオマーカーは有しないと判定されている。ゆえに、一実施形態では、本発明は、胃癌の転移を防ぐための方法であって、それを必要とする患者が抗HER2薬を用いずに抗EGFR薬を投与される場合の、方法を提供する。

10

【0072】

本明細書で使用する時、用語「処置」、「処置する」などは、効果を得る目的で薬剤を投与することまたは手技（例えば放射線、外科手術等）を行なうことを指す。この効果は、癌などの疾患またはその症状を完全にまたは部分的に防止する点で予防的であり得、及び／または疾患またはその疾患の症状を部分的にまたは完全に治癒させる点で治療的であり得る。本明細書で使用する時、「処置」は、哺乳類における、特にヒトにおける、癌などの疾患に対するいずれの処置も包含し、（a）疾患に罹患する可能性があるが、それに罹患しているとまだ診断されていない患者にその疾患またはその疾患の症状が起こるのを防止すること（例えば原疾患と関連するかまたは原疾患が原因となっている可能性がある疾患を含む）、（b）疾患を阻害すること、すなわち、その進行を阻止すること、及び（c）疾患を軽減すること、すなわち退縮をもたらすまたは疾患の進行を停止させることを含む。

20

【0073】

抗EGFR薬処置に対する患者応答に関連して本明細書で使用する時、用語「応答する」、「有益な応答」、「有益な患者応答」及び「臨床的に有益な応答」、「臨床的有益性」などは互換可能に使用され、薬剤に対する好ましくない応答、すなわち処置に非応答性である及び／または有害事象を有するとは反対の、薬剤に対する好ましい患者応答を指す。個々の患者において、いくつかの臨床的パラメータを用いて有益な応答を示すことができる。臨床的パラメータには、検出可能な腫瘍の消失（完全寛解、CR）、腫瘍サイズ及び／または癌細胞数の減少（部分寛解、PR）、腫瘍成長停止（不変、SD）、腫瘍の退縮または拒絶をもたらす可能性のある抗腫瘍免疫応答の増強；腫瘍に関連した一つ以上の症状のある程度の軽減；処置後の生存期間の増加；及び／または処置後の所与の時点での死亡率の減少が含まれる。腫瘍サイズ及び／または癌細胞数の継続的な増加及び／または腫瘍転移は、処置に対する有益な応答が欠如していることを示す。

30

【0074】

集団においては、薬剤の臨床的有益性、すなわちその有効性は、一つ以上のエンドポイントに基づいて評価することができる。例えば、一実施形態では、全奏効率（ORR）の分析では、薬剤処置の後にCRまたはPRになる患者を応答者と分類する。疾病管理（DC）の分析では、薬剤処置の後にCR、PRまたはSDになる患者を応答者と分類する。

40

【0075】

本明細書で使用する時、用語「無増悪生存期間」は、患者の処置から癌の増悪または患者の死亡のいずれでも最初に起こるまでの期間を指す。

【0076】

本明細書で使用する時、本発明に係る応答者は、抗EGFR処置の後に処置有効性を呈する（例えば、有益な臨床応答を呈する）個体である。患者がEGFRバイオマーカーを有すると判定されており、抗EGFR薬を用いた処置の後に有益な臨床応答を呈する患者は、応答者である。

【0077】

本明細書で使用する時、用語「非応答者」または「非応答性」は、EGFR阻害剤を用いた処置の後に、処置有効性（例えば、有益な臨床応答）を呈さない患者を指す。ある

50

特定の実施形態では、非応答者はEGFRバイオマーカーを有すると判定されていてもよい。他の実施形態では、非応答者はEGFRバイオマーカーを有しないと判定されていてもよい。

【0078】

語句「処置有効性を判定する」または「処置の有効性を判定する」及びその変異形は、処置が利益を対象に提供することを判定するための任意の方法を含むことができる。用語「処置有効性」及びその変異形は、通常、疾患に関連する一つ以上の兆候または症状の緩和によって示され、当業者によって容易に判定されることができる。「処置有効性」は、典型的に、疾患の標準的または非標準的処置、すなわち癌の処置のための化学療法または放射線療法に関連する毒性の兆候及び症状の予防または改善も指しうる。処置有効性の判定は、通常は適応症及び疾患特異的であり、処置が有益な有効性を患者に提供していることを判定するために当該分野で周知または利用可能な任意の方法を含むことができる。例えば、処置有効性の証拠には、疾患または適応症の緩解を含むがこれに限定されず、癌についてこれは、腫瘍の大きさ、腫瘍転移などの低減または減少を含むが、これに限定されない。さらに、処置有効性は、限定されないが、患者の生活の質の向上、予測される対象生存率の増加、うつ病の低減または適応症の再発率の低減（緩解期間の増加）などの、対象の全体的な健康における全般的な改善も含むことができる（例えば、Physicians' Desk Reference（2010）を参照）。

【0079】

本発明の方法について、EGFRバイオマーカーは、EGFR RNAレベル、恒常的に活性なEGFR、EGFR活性、EGFR経路活性化またはEGFR経路シグナル伝達などのEGFR遺伝子増幅及び／またはEGFR過剰発現についての任意のインビトロまたはインビボ指標であることができる。一実施形態では、EGFRバイオマーカーは、L858R/T790M二重変異、挿入変異（エクソン20：2319～2320）、欠失変異（エクソン19：2236～2350）などのEGFR遺伝子増幅及び／またはEGFR過剰発現と関連するDNA、RNA、またはタンパク質レベルで変異の任意の形態を含む。別の実施形態では、EGFRバイオマーカーは、直接または間接的にEGFR遺伝子増幅及び／またはEGFR過剰発現と関連する任意の測定を含む。いくつかの実施形態では、EGFRバイオマーカーは、所定の基準レベルと比較したときの、EGFR遺伝子増幅、EGFR発現の増加、EGFR RNAレベルの増加、恒常的に活性なEGFR及びEGFR経路活性化の増強またはEGFR経路シグナル伝達の増強から選択される。

【0080】

抗EGFR抗体などの本明細書に記載の抗EGFR薬の、その物質だけ、または適切な医薬組成物中にある形での投与は、類似の有用性を提供するための任意の承認された様式の薬剤の投与を介して実行されることができる。医薬組成物は、抗EGFR薬（例えば、抗体）または抗EGFR薬含有組成物と適切な生理学的に許容され得る担体、希釈剤または賦形剤を組み合わせることによって調製されることができ、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、軟膏、液剤、坐剤、注射剤、吸入剤、ゲル、ミクロスフェア、及びエアロゾルなどの、固体、半固体、液体、または気体の形態へと製剤化されてよい。加えて、他の、医薬活性成分（本明細書の他の箇所に記載のような他の抗がん剤を含む）及び／または塩、緩衝剤及び安定剤などの好適な賦形剤が、組成物の中に存在してもよいが、必須ではない。投与は、経口、非経口、経鼻、静脈内、皮内、皮下または局所を含むがこれに限定されない様々な異なる経路で達成されてよい。投与の好ましい様式は、処置または予防される状態の性質に依存する。癌の進行及び／または転移を、投与後、減少させる、阻害する、予防する、または遅らせる量は、有効であると考えられる。

【0081】

抗EGFR抗体処置は、何ら制限なく、一つ以上の抗EGFR CDRを有する任意の分子を含む抗EGFR抗体または抗体様治療薬を使用した任意の処置を含むことができる。一実施形態では、抗EGFR抗体処置は、任意の承認された抗EGFR抗体、例えば、セツキシマブ（アービタックスとしても知られる）またはそのバイオシミラーまたは誘導

体、例えば、完全ヒト抗EGFR抗体、などを含む。セツキシマブ（北米ではImclone社及びBristol-Myers Squibb社によって、世界の残りの部分では、Merck社によって販売されている）は、上皮成長因子（EGF）受容体（EGFR）の活性化をブロックする、組換え、ヒト/マウスキメラモノクローナル抗体である。セツキシマブは、転移性大腸癌及び頭頸部癌の処置のために静脈内投与によって与えられることができる。いくつかの実施形態では、セツキシマブは、pH 7.0から7.4の無菌の無色の液体中に製剤化される。いくつかの実施形態では、セツキシマブは、100mg（50mL）または200mg（100mL）のいずれかに2mg/mLの濃度で製剤化される。いくつかの実施形態では、セツキシマブは、単回使用バイアルに製剤化される。いくつかの実施形態では、セツキシマブ製剤は、8.48mg/mLの塩化ナトリウム、1.88mg/mLのリン酸ナトリウム二塩基性七水和物、0.41mg/mLリン酸ナトリウム一塩基一水和物、及び注射のための無菌水を含む。セツキシマブを投与するための方法及び製剤は、医療分野の当業者によって周知であり、任意の周知のセツキシマブを投与するための方法、セツキシマブの用法または、セツキシマブの製剤は、本発明の方法とともに使用することが企図される。詳細な組成物及びセツキシマブの使用方法は、米国特許第8075916号、7977336号、6217866号に記載されている（そのそれぞれが全ての目的のためにその全体において参照により組み込まれる）。

【0082】

いくつかの実施形態では、本発明のバイオマーカーは、胃腫瘍に罹患している患者を処置するために使用される同一の薬剤及び/または異なる薬剤の有効性を示す別のバイオマーカーと一緒に使用されることができる。

【0083】

いくつかの実施形態では、試料から得られた情報は、EGFR遺伝子増幅またはEGFR遺伝子過剰発現レベルにおける増加または低減に基づくインデックス値を含むことができる。例えば、EGFR遺伝子増幅またはEGFR遺伝子過剰発現のレベルは、増加または低減率に基づくインデックス値を割り当てられることができる。いくつかの実施形態では、増加または低減が大きければ、インデックス値も大きくなる。いくつかの実施形態では、インデックス値は複合物を生成するための群として蓄積されることができる。いくつかの実施形態では、複合物は所定の基準と比較される。いくつかの実施形態では、複合物の所定の基準に対する比較は、治療的実体を用いた処置の処置有効性を示す。いくつかの実施形態では、複合物の所定の基準に対する比較は、治療的実体を用いた処置の処置レジメンを改変するために使用されることができる。

【0084】

ある特定の実施形態では、投与される量は、成長し得る腫瘍の量の統計的に有意な低減、例えば腫瘍質量における少なくとも50%の低減、またはスキャン寸法の変更（統計学的有意性を伴う低減）によって示されるように、腫瘍退縮をもたらすのに十分である。他の実施形態では、投与される量は、胃癌において臨床的に妥当な減少をもたらすのに十分である。

【0085】

処置の正確な用量及び間隔は、処置される疾患の関数であり、既知の試験プロトコルを使用して経験的に、または当該分野で周知のモデルシステムで組成物を試験してそこから推定することによって決定され得る。比較臨床試験もまた行われ得る。用量は、緩和すべき状態の重症度に伴っても変動し得る。医薬組成物は通常、望ましくない副作用を最小にしつつ、治療的に有用な効果を及ぼすように処方され投与される。組成物は、一度で投与されてもよく、または間隔を空けて投与される複数のより小さい用量に分割されてもよい。任意の具体的な対象について、個別の必要性に従って、特定の用量が継続的に調整され得る。

【0086】

本明細書に記載のような抗EGFR薬を含む組成物は、単独または、放射線療法、化学療法、移植、免疫療法、ホルモン療法、光線力学療法などの他の既知の癌処置と組み合わ

10

20

30

40

50

せて投与されてよい。組成物は、抗生物質と組み合わせて投与されてもよい。いくつかの実施形態では、化学療法は、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、エトポシド、ミトラマイシン、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、フルオロウラシル、フォリン酸及びイリノテカンを含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、標的療法は、ベバシズマブ、トラスツズマブ、エルロチニブ、パニツムマブ、ソラフェニブ、インフリキシマブ、アダリムマブ、バシリキシマブ、ダクリズマブ及びオマリズマブを含むが、これに限定されない。いくつかの実施形態では、放射線療法は、約40 Gyから約80 Gyの用量で投与される。いくつかの実施形態では、用量は約50 Gyから約70 Gy、いくつかの実施形態では、用量は約50 Gyから約65 Gyである。いくつかの実施形態では、放射線療法は、約50 Gy、約55 Gy、約60 Gyまたは約65 Gyの用量で投与される。

10

【0087】

これら及び関連する医薬組成物を投与する典型的な経路は、限定されないが、経口、局所、経皮、吸入、非経口、舌下、頬側、直腸、膣、及び鼻腔内を含む。本明細書で用いられる非経口という用語は、皮下注射、静脈内、筋肉内、胸骨内注射または注入技術を含む。本発明のある特定の実施形態に係る医薬組成物は、そこに含有される活性成分が患者への組成物の投与の際に生物学的に利用可能であることを可能にするように、製剤化される。対象または患者に投与されるだろう組成物は、一つ以上の投薬単位の形態をとってよく、例えば、錠剤は単一投薬単位であってもよく、エアロゾル形態での本明細書に記載の抗EGFR剤の容器は複数の投薬単位を保持してよい。そのような剤形を調製する実際の方法は当業者に周知であるか、または明らかになるであろう；例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000)を参照。投与される組成物は、いずれにせよ、本明細書の教示に従い対象となる疾患または状態を処置するための、治療有効量の抗EGFR薬、例えば、本明細書に記載の抗EGFR抗体を含有するだろう。

20

【0088】

医薬組成物は固体または液体の形態であってよい。一実施形態では、組成物が例えば錠剤または粉末形態となるように、担体（複数可）は、粒子状である。組成物が、例えば吸入投与において有用である、例えば経口油、注射可能な液体またはエアロゾルで、担体（複数可）が液体であってよい。経口投与を意図するとき、医薬組成物は好ましくは固体または液体形態のいずれかであり、半固体、半液体、懸濁液及びゲル形態は本明細書では固体または液体のいずれかと考えられる形態に含まれる。

30

【0089】

経口投与用の固体組成物として、医薬組成物は、粉末、顆粒、圧縮錠剤、丸剤、カプセル剤、チューインガム、ウエハなどに製剤化され得る。かかる固体組成物は、一般的には一つ以上の不活性希釈剤または食用担体を含むだろう。加えて、以下の1つ以上が存在し得る：カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、微結晶性セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンなどの結合剤；デンプン、ラクトースまたはデキストリンなどの賦形剤、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、プリモゲル、コーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはステロテックスなどの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素などの流動促進剤；スクロースまたはサッカリンなどの甘味剤；ペパーミント、サリチル酸メチルまたはオレンジ香料などの香味剤；及び着色剤。医薬組成物がカプセルの形態、例えば、ゼラチンカプセルである場合、上記の種類の材料に加えて、ポリエチレングリコールまたは油などの液体担体を含有し得る。

40

【0090】

医薬組成物は、液体、例えば、エリキシル、シロップ、溶液、エマルジョンまたは懸濁液の形態であってよい。液体は、2つの例として、経口投与用または注射による送達用であってよい。経口投与を意図する場合、好ましい組成物は、本発明の化合物に加えて、甘味剤、防腐剤、染料／着色剤及び風味増強剤の一つ以上を含有する。注射による投与を意

50

図する組成物では、界面活性剤、防腐剤、湿潤剤、分散剤、懸濁剤、緩衝剤、安定剤、及び等張剤の1つ以上が含まれ得る。

【0091】

液体医薬組成物は、溶液、懸濁剤または他の同様の形態であっても、以下の1つ以上を含んでよい：注射用水、食塩水、好ましくは生理食塩水、リンゲル液、等張性塩化ナトリウムなどの滅菌希釈剤、溶媒または懸濁媒、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の溶媒として作用できる合成モノまたはジグリセリドなどの固定油；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌剤；アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩などの緩衝剤及び塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの等張性の調整のための薬剤。非経口製剤は、アンプル、使い捨てシリンジ、またはガラスもしくはプラスチック製の複数用量バイアル中に封入することができる。ある特定の実施形態では、生理食塩水は好ましい組成物である。注射用医薬組成物は好ましくは無菌である。

10

【0092】

非経口または経口投与のいずれかを意図する液体医薬組成物は、適切な投与量が得られるように、本明細書に開示のEGFR特異的抗体などの、ある量の抗EGFR薬を含有するべきである。一般的に、この量は、組成物中少なくとも0.01%の抗体である。経口投与を意図する場合、この量は、組成物の重量の0.1%～約70%の間になるように変動し得る。ある特定の経口医薬組成物は、約4%から約75%の抗体を含有する。ある特定の実施形態では、本発明にかかる医薬組成物及び製剤は、非経口投薬単位が0.01～10重量%の抗体を希釈前に含有するように調製される。

20

【0093】

医薬組成物は、局所投与を意図し得、その場合には、担体が、好適に、溶液、エマルジョン、軟膏またはゲル基材を含み得る。基材は、例えば、以下の1つ以上を含み得る：ワセリン、ラノリン、ポリエチレングリコール、蜜蝋、鉱油、水及びアルコールなどの希釈剤、及び乳化剤及び安定剤。増粘剤が、局所投与用の医薬組成物中に存在し得る。経皮投与を意図する場合、組成物は、経皮パッチまたはイオン導入装置を含んでよい。医薬組成物は、例えば、直腸で融解して薬物を放出する座薬の形態で、直腸投与を意図し得る。直腸投与用の組成物は、好適な非刺激性賦形剤として油性基剤を含有してよい。かかる基材は、限定されないが、ラノリン、ココアバター及びポリエチレングリコールを含む。

30

【0094】

医薬組成物は、固体または液体投薬単位の物理的形態を改変する種々の材料を含んでよい。例えば、組成物は、活性成分の周りにコーティングシェルを形成する材料を含み得る。コーティングシェルを形成する材料は、一般的には不活性であり、例えば、糖、シェラック、及び他の腸溶コーティング剤から選択され得る。あるいは、活性成分は、ゼラチンカプセルに入れてよい。固体または液体形態の医薬組成物は、本発明の抗体に結合し、それによって化合物の送達を補助する薬剤を含んでよい。この役割で作用することができる好適な薬剤には、他のモノクローナルまたはポリクローナル抗体、一つ以上のタンパク質またはリボソームが含まれる。医薬組成物は、本質的にエアロゾルとして投与されることができる投薬単位からなり得る。用語エアロゾルは、コロイド性質のものから加圧パッケージからなる系までの様々な系を示すために使用される。送達は、液化または圧縮ガスによって、または活性成分を分注する好適なポンプシステムによってなされ得る。エアロゾルは、活性成分（複数可）を送達するために、単相、二相、または三相系で送達され得る。エアロゾルの送達には、必要な容器、アクチベーター、バルブ、サブ容器、などが含まれ、一緒になってキットを形成してもよい。当業者は、不要な実験をすることなく、好ましいエアロゾルを決定し得る。

40

【0095】

医薬組成物は、医薬分野で周知の方法によって調製され得る。例えば、注射によって投与されることを意図する医薬組成物は、本明細書に記載のEGFR特異的抗体などの抗E

50

G F R 薬、及び必要に応じて、塩、緩衝剤及び／または安定剤の一つ以上を含む組成物と、溶液を形成するように無菌、蒸留水を、組み合わせることによって調製されることができる。界面活性剤は、均質な溶液または懸濁液の形成を促進するために添加され得る。界面活性剤は、水性送達系における抗体の溶解または均質な懸濁を促進するように、抗体組成物と非共有結合的に相互作用する組成物である。

【 0 0 9 6 】

組成物は、使用される特定の化合物（例えば、E G F R 特異的抗体）の活性；化合物の代謝安定性及び作用の長さ；患者の年齢、体重、一般健康状態、性別、及び食事；投与の様式及び時間；排泄速度；薬剤の組み合わせ；特定の障害または状態の重症度；治療を受ける対象を含む、種々の因子に依存して変動する治療有効量で投与され得る。

10

【 0 0 9 7 】

E G F R 特異的抗体などの抗 E G F R 薬を含む組成物は、一つ以上の他の治療薬の投与と同時に、その前に、または後に投与されてもよい。一実施形態では、本発明は、胃腫瘍を処置するための方法であって、かかる処置を必要とする患者に有効量の二つ以上の抗 E G F R 薬の組み合わせを投与することを含み、患者が E G F R バイオマーカを有すると判定されている、方法を提供する。この点に関して、処置は、セツキシマブ、パニツムマブ、ニモツズマブ、抗体 8 0 6、S y m 0 0 4、M M - 1 5 1、及び本明細書に記載の他の抗 E G F R 薬から選択される、有効量の 2 つ以上の抗 E G F R 薬の組み合わせを含み得る。

【 0 0 9 8 】

20

一実施形態では、本発明は、胃腫瘍を処置するための方法であって、かかる処置を必要とする患者に有効量の抗 E G F R 薬を投与することを含み、患者が E G F R バイオマーカを有すると判定されている、方法を、胃癌のための標準治療と組み合わせて提供する。胃癌についての標準的処置は、外科手術、放射線療法、または化学療法、またはこれらの処置の組み合わせを含む。外科手術は、胃の患部や近くのリンパ節を除去するための手術を含んでもよく、またはある特定の場合には胃切除術を含むことができる。現在、胃癌の処置のために世界中で使用される単一の標準的な化学療法の処置計画はない。しかしながら、化学療法処置は、少なくとも二つの薬剤、フルオロウラシル（5 - F U、アドルシル）及びシスプラチン（プラチノール）の組み合わせを含み得る。5 - F U に類似する他の薬剤（カペシタピンまたはゼローダなど）、及びシスプラチンに類似する他の薬剤（オキサリプラチンまたはエロキサチンなど）は、等価であるとみられる。一般的に使用される他の薬剤は、ドセタキセル（タキソテール）、パクリタキセル（タキソール）、イリノテカン（カンプトサル）、及びエピルピシン（エレンス）を含む。

30

【 0 0 9 9 】

当業者によって理解され得るように、併用療法は、抗 E G F R 薬を含有する単一の医薬投与製剤と一つ以上の追加の活性剤の投与、並びに抗 E G F R 薬を含む組成物とその別々の医薬投与製剤の各活性剤の投与を含み得る。例えば、本明細書に記載のような抗 E G F R 抗体及び残りの活性剤は、錠剤またはカプセルなどの単一の経口投与組成物内で一緒に患者に投与されることができ、または各薬剤は別々の経口投与製剤において投与されることができる。同様に、本明細書に記載のような抗 E G F R 抗体及び残りの活性剤は、生理食塩水または他の生理学的に許容され得る溶液などの単一の非経口投与組成物内で一緒に患者に投与されることができ、または各薬剤は別々の非経口投与製剤において投与されることができる。別々の投与製剤が使用される場合、抗体などの抗 E G F R 薬を含む組成物、及び一つ以上の追加の活性剤は、本質的に同じ時間、つまり同時、または別々に時間をずらして、つまり順次及び任意の順番で投与されることができ、併用療法は全てのこれらのレジメンを含むと理解される。

40

【 0 1 0 0 】

ゆえに、ある特定の実施形態では、E G F R 特異的抗体などの抗 E G F R 薬を含む組成物を、一つ以上の他の治療薬と組み合わせて、投与することも企図される。かかる治療薬は、癌、具体的には胃癌などの本明細書に記載のような特定の疾患状態に対する標準的処

50

置として当分野で受け入れられ得る。企図される例示的な治療薬には、サイトカイン、成長因子、ステロイド、NSAID、DMARD、抗炎症剤、化学療法剤、放射線療法剤、または他の活性及び補助剤が含まれる。

【0101】

ある特定の実施形態では、抗EGFR抗体などの抗EGFR薬は、EGFRバイオマーカーを有すると同定された患者に、任意の数の化学療法剤を併用して投与され得る。化学療法剤の例としては、チオテパ及びシクロホスファミド(CYTOXAN(商標))などのアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンなどのスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)などのアジリジン類；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド(triethylenephosphoramidate)、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphoramidate)及びトリメチロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチルアメラミン類(methylamelamines)；クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビチン(novembichin)、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード類；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソ尿素類；アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アウスラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カリケアマイシン、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシンなどの抗生物質；メトトレキサート及び5-フルオロウラシル(5-FU)などの代謝拮抗物質；デノブテリン、メトトレキサート、プテロブテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、5-FUなどのピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなどのアンドロゲン類；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤(anti-adrenals)；フロリニン酸(frolinic acid)などの葉酸補助剤；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラムブシル(bestrabucil)；ピサントレン；エダトラキサート；デフォファミン(defofamine)；デメコルチン；ジアジクオン；エルフォルミチン(elformithine)；酢酸エリブチニウム；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダミン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラクリン；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルピシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK.RTM.；ラゾキサン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「アラ-C」)；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Oncology、ニュージャージー州プリンストン)及びドセタキセル(TAXOTERE

10

20

30

40

50

(登録商標)、Rhne-Poulenc Rorer、フランス、アントニー)；クロラムブシル；ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン及びカルボプラチンなどのプラチナ類似体；オキサリプラチン；イリノテカン；ビンブラスチン；プラチナ；エトポシド(VP-16)；イホスファミド；マイトマイシンC；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ビノレルビン；ナベルピン；ノバントロン；テニポシド；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害薬RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン(DMFO)；Targretin(商標)(ベキサロテン)、Panretin(商標)(アリトレチノイン)などのレチノイン酸誘導体；ONTAK(商標)(デニロイキンジフチトクス)；エスペラミシン；カペシタピン；及び上述のいずれかの薬学的に許容され得る塩、酸または誘導体が挙げられる。この定義には、以下のような、腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するよう作用する抗ホルモン剤が含まれる：抗エストロゲン(例えば、タモキシフェン、ラロキシフェン、アロマターゼ阻害性4(5)-イミダゾール、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン(keoxifene)、LY117018、オナプリストン及びトレミフェン(Fareston))；ならびに抗アンドロゲン(例えば、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド及びゴセレリン)；ならびに上記のいずれかの薬学的に許容可能な塩、酸または誘導体。

10

【0102】

種々の他の治療薬は、本明細書に記載の抗EGFR薬と併用され得る。一実施形態では、EGFRバイオマーカーを有すると同定された患者は、抗炎症剤とともに抗EGFR薬を投与される。抗炎症薬または薬剤は、ステロイド類及びグルココルチコイド類(ベタメタゾン、ブデソニド、デキサメタゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、プレドニゾン、トリアムシノロンを含む)、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、メトトレキサート、スルファサラジンを含む非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)、レフルノミド、抗TNF薬、シクロホスファミド及びマイコフェノレートを含むが、これに限定されない。

20

【0103】

例示的なNSAIDは、イブプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、COX-2阻害薬、例えばVIOXX(登録商標)(ロフェコキシブ)及びCELEBREX(登録商標)(セレコキシブ)、及びシアリレート(sialylates)からなる群から選択される。例示的な鎮痛剤は、アセトアミノフェン、オキシコドン、塩酸プロボキシフェンのトラマドールからなる群から選択される。例示的なグルココルチコイドは、コルチゾン、デキサメタゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾロン、プレドニゾロン、またはプレドニゾンからなる群から選択される。例示的な生物学的応答修飾因子には、細胞表面マーカー(たとえば、CD4、CD5など)に向けられた分子、TNFアンタゴニスト(たとえば、エタネルセプト(ENBREL(登録商標))、アダリムマブ(HUMIRA(登録商標))及びインフリキシマブ(REMICADE(登録商標)))などのサイトカイン阻害剤、ケモカイン阻害剤ならびに接着分子阻害剤が挙げられる。生物学的応答修飾因子には、モノクローナル抗体ならびに組換え型の分子が挙げられる。例示的なDMARDには、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、ペニシラミン、レフルノミド、スルファサラジン、ヒドロキシシクロロキン、Gold(経口(オーラノフィン)及び筋肉内)及びミノサイクリンが挙げられる。

30

40

【0104】

EGFR特異的抗体などの、本明細書に記載の抗EGFR薬を含む組成物は、時限放出型製剤またはコーティングなどの、抗体を体内からの迅速な排出に対して保護する担体と共に調製され得る。かかる担体は、インプラント及びマイクロカプセル化送達系を含むが、これに限定されない放出制御製剤、及びエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、ポリオルトエステル、ポリ乳酸及び当業者に周知の他のものなどの生物分解性、生体適合性のポリマーを含む。

【実施例】

50

【0105】

実施例1 E G F R 遺伝子増幅及び過剰発現は、胃腺癌におけるセツキシマブ処置に対する応答についての予測的バイオマーカーである

この実施例は、完全に分子的に注釈付けされた（発現及び変異プロファイリング）未処置のアジア人胃腺癌（G C - A D C）患者由来の異種移植片（P D X）のコホートで、応答者及び非応答者を同定し、その後予測的バイオマーカーの発見をするために実施された無作為化セツキシマブ試験の結果を記載する。

【0106】

序論及び要約

患者由来の異種移植片（P D X）は、いかなるインビトロ操作も伴わずに、患者の組織病理学的及び遺伝子プロファイルを反映する⁹⁻¹⁴。それは前臨床癌モデルとして予測力を改善しており、真の個別化療法及び予測的バイオマーカーの発見を可能にする。モデルは、「アバターマウス」または「異種移植モデル（*xenopatient*）」とも呼ばれ、それらの大規模な収集は、患者における腫瘍の多様性を潜在的に反映することが可能である。癌患者集団の広範囲にわたる多様性に起因して、臨床試験の成功性は、意図された標的を発現して適切な遺伝子プロファイルを有する有望な応答者の包含と、非応答者の排除に大いに依存する。これらのモデルはゆえに、臨床試験形式をモデル化することによって治験標的薬を試験するために使用されることができる。

【0107】

G C - A D C H u P r i m e（登録商標）モデル（類似のN S C L C - H u P r i m e が以前に記載されている）¹⁵と呼ばれる胃腺癌（G C - A D C）P D Xの大規模な収集が確立された。19のG C H u P r i m e（登録商標）のコホートをセツキシマブに対する腫瘍応答を評価するために試験し、E G F R 遺伝子増幅及び過剰発現を伴うG C - A D Cのサブセットがセツキシマブに十分に応答することが発見された。この観察は、E G F R 遺伝子コピー及び/または過剰発現が、セツキシマブに対する患者応答を予測するための潜在的な実用的な単一のバイオマーカーとして役割を果たし得ることを示し、これはG C - A D CのH E R 2 / H e r c e p t i n（登録商標）シナリオに類似した状況であった。E G F R 遺伝子コピー数を患者選択基準として使用する前向き臨床研究が、観察をさらに確かなものにするように保証され、規制当局が最終的にセツキシマブをG C - A D C処置として承認する結果となり得る。

【0108】

所見：試験された19のP D X G Cモデルのうちで、4モデル（21%）が、セツキシマブに応答した（ $T / C > 20\%$ により規定される）。発現プロファイリング及びコピー数多型解析は、15の非応答者（ $T / C > 20\%$ ）とは対照的に、4応答者全てがE G F R 遺伝子の増幅及び/または対応する高E G F R 発現を有することを明らかにした。この結果は、E G F R 増幅を有する4患者全てが応答者である追加の第II相臨床試験（E X T R A）においてなされた観察と一致する。これらの結果は、E G F R 遺伝子増幅及び/または高発現が、N S C L C及びC R Cについては一般的ではない、G C - A D Cのこのサブセットについて重要な発がん要因であることを示した。

【0109】

解釈：E G F R 遺伝子増幅及び過剰発現は、G C - A D Cにおけるセツキシマブ応答についての単一の予測的バイオマーカーとして役に立つことができる。

【0110】

材料及び方法

患者の試料、移植、セツキシマブ処置実験及びモデルの特徴付け。

外科的に取り出された新鮮なG C腫瘍組織を、外科手術の直後に、6～8週齢の雌B a l b / cヌードマウス（B e i j i n g H F K B i o s c i e n c e C o . L t d . , 中国、北京）に、以前に記載された手順¹⁰で皮下移植するために使用した。確立された腫瘍モデルは、経過及び研究実行のために連続的に再移植された。患者試料へのアクセス及びその使用は、患者からのインフォームドコンセントに加えて北京腫瘍医院の倫理

10

20

30

40

50

委員会によって承認された。全ての手順は、Crown Bioscience社のSFP施設にて滅菌条件下で行われた。本発明者らの研究に関係する全ての実験動物は、国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関するガイドの推奨事項に厳密に従って行われた。プロトコルは、Crown Bioscience, Incの動物実験の倫理委員会(Crown Bioscience社のIACUC委員会)によって承認された。

【0111】

PDXモデルのセツキシマブに対する腫瘍応答を評価するための手順は、以前に詳細に記載されている¹⁵、¹⁷。腫瘍成長を週2回モニターし、 T/C %値をセツキシマブに対する腫瘍応答を評価するために算出した(T = 処置群における腫瘍の体積変化及び C = 対照群における腫瘍体積変化)。

10

【0112】

Affy U219、SNP6、IHC、qPCR、発がん遺伝子変異解析を使用する発現プロファイリングを含むモデルの特徴付けは、全て以前に詳細に記載されている¹⁵、¹⁷。

【0113】

抗腫瘍活性の評価。

腫瘍体積が100 ~ 150 mmに達したとき、マウスを類似の平均腫瘍体積を有する5匹のマウスの2群に無作為にグループ分けした。グループ分けの直後に、対照群をビヒクルで処置し(PBS、週一回の腹腔内注射(またはIP)を二週間)、処置群にセツキシマブを注射した(週一回のIP注射を二週間、50 mg/kg、Merck社)。腫瘍成長を週二回モニターし、 DT/DC 値を処置に対する腫瘍応答を評価するために算出した(DT = 処置群における腫瘍体積変化及び DC = 対照群における腫瘍体積変化)。異種移植用のマウスの総数は200(20のPDXモデルについて10匹のマウス/モデル)である。

20

【0114】

GC腫瘍のEGFR IHC解析。

標準の免疫組織化学(IHC)が、PDX異種移植片モデルからの腫瘍組織を解析するために使用された。簡潔には、組織を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、標準的な組織学的手順に従って、パラフィンに包埋した。脱パラフィン及び再水和の後、厚さ3 mmの組織切片を0.01 M クエン酸ナトリウム、pH 6.0 溶液中で95 °Cで30分間前処理し、その後ウサギ抗ヒトEGFR抗体(Cell Signaling、米国、ボストン)を用いて最終希釈1:5200で染色した。検出システム:HRPポリマーキット(Lab Vision、米国、フリーモント)を使用して陽性染色が検出された。DABを発色基質として使用し、切片をギルヘマトキシリン(Fisher Scientific、ニュージャージー州フェアローン)を用いて対比染色した。試験片を、次いで、2005年にShiaらが推奨した以下の基準に従って盲検様式で3人の研究者によって独立して採点した:スコア0は、特定の膜染色が腫瘍内になかったときであり、バックグラウンドレベルを超える任意の腫瘍細胞膜の染色があったとき正数である。正数であった場合、膜の染色強度に基づいてさらに1+、2+、及び3+へと分類される。最強度の領域は、腫瘍切片を低倍率(100x)で走査することによって同定され、次いで画像を、D

30

40

【0115】

GC-PDXの遺伝子発現プロファイリング及び遺伝子コピー数解析。

新鮮なGC PDX腫瘍組織を、腫瘍を有するマウスから採取し、遺伝子及びゲノム解析に使用される前に、瞬間凍結して280 °Cで保管した。遺伝子プロファイリング解析のために、全RNAを、Trizol(Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド)を製造業者の説明書に従って使用して凍結組織から単離し、RNeasyミニカラム(Qiagen)を使用して精製した。RNAの質をバイオアナライザー(Agilent)で評価した。高品質のRNA試料(RIN > 8)のみが、標準プロトコル(Ge

50

nChip (登録商標) 3'IVTエクスプレスキットユーザーマニュアル、P/N 702646 Rev. 8、Affymetrix)に従って、Affymetrix社のHG-U219アレイプレート上で発現プロファイリングアッセイのために使用された。全ての試料の生CELデータセットをRMAアルゴリズムによって正規化した。プローブセット強度を、 $\log(2)$ 変換値として表した。Affymetrix SNP6.0チップを使用するCNVアッセイのために、ゲノムDNAを、ゲノムDNA組織及び血液単離キット(Qiagen)を製造業者の説明書に従い使用して、単離及び精製した。DNAプロセッシング及びチップハイブリダイゼーションを、標準的なAffymetrix社のプロトコル(ゲノムワイドsnp6__マニュアル、Affymetrix)に従って行った。生CELデータを品質チェックし(QC-ed)、フィルタリングして低コールレート試料を除去し、PICNIC及び/またはPennCNV方法によって遺伝子コピー数解析を行った。全ての試料について、相対的なEGFR遺伝子発現レベルは、定量RT-PCRによって決定された。抽出されたmRNAを、TaqMan q-PCRにより、ヒトEGFR特異的プライマーを使用して増幅に供した。ヒトGAPDH遺伝子を参照として使用した。EGFRについてのTaqManプローブ及びプライマー(アッセイID: Hs01076078__m1)、GAPDH(アッセイID: Hs99999905__m1)を、Applied Biosystemsから得た。システムによって生成された生データを、DCT相対定量を用いて処理した。DCT5(標的遺伝子のCT値)-(参照遺伝子のCT値)。DCT値を、次いで強度値(相対mRNAレベル $5^{-2 \times DCT}$)に変換した。また、EGFR遺伝子コピー数を定量PCRによって決定した。簡潔には、同一のゲノムDNAをTaqMan q-PCRによって増幅に供した。EGFR(アッセイID: Hs04960197__cn)及び内因性参照としてのRNase P(部品番号4401631)についてのプライマーを、Applied Biosystems社から購入した。生データをCopyCallerソフトウェアへと転送し、解析した。

【0116】

EGFR遺伝子変異解析。

EGFR(エクソン18; 19; 20; 21)、KRAS(エクソン2; 3; 4)、BRAF(エクソン15; V600E)、c-MET(エクソン14; 16; 17; 18; 19; 21)、PI3KC(エクソン1; 9; 20)などの、セツキシマブに対する耐性に関連する一般的な発がん遺伝子の遺伝子ホットスポット解析を、腫瘍における変異を同定するために実行した。簡潔には、ゲノムDNAを、製造業者の説明書に従って上述のキットを使用して組織から抽出した。変異解析に使用されたプライマーを表5に示す。ポリメラーゼ連鎖反応を、100ngのゲノムDNA、5mLの103PCR緩衝液、各々0.2mMのプライマー、0.2mMの43dNTP及び1mLのTaqEを含有する50mLの反応混合物において行った。反応は、40回の増幅サイクルにわたって実行された。増幅されたPCR産物をゲル精製し、サンガー自動シーケンサー(ABI)によって配列決定した。プライマーのヒト遺伝子に対する特異性は、BLAST検索によって保証されていた。シーケンスデータアライメント解析及び変異同定を、BioEditソフトウェアを使用して行った。

【0117】

CFISH解析。

FISH(2色)手順を、Abbott社のPathVision EGFR DNAプローブキットを製造業者のプロトコル(Abbott、イリノイ州ダウナーズ・グローブ)に従って使用して、実行した。スペクトラムオレンジ蛍光標識EGFR(303kb)は、染色体7p12上のEGFR遺伝子座に特異的であり、スペクトラムグリーン蛍光標識染色体エニユメレータープローブ(5.4kb)は、染色体7のセントロメア領域(CEP7; 7p11.1~q11.1)に配置された - サテライトDNA配列を標的とした。簡潔には、FFPE切片を脱パラフィンし、その後ペプシンで消化しハイブリダイゼーションした。処理されたスライドを変性させ、プローブでハイブリダイズし、その後

15 μ LのDAPI / 抗フェード溶液で対比染色し、DAPI、ローダミン (7 p 1 2) 及びFITC (染色体7) を1000倍で検出するために単一のバンドパスフィルタセットを装備したオリンパスBX51蛍光顕微鏡 (オリンパスBX51、日本) を使用して走査した。

【0118】

統計解析。

腫瘍体積のデータを2つの比較についてスチューデントのt検定を、及び多重比較について一元配置分散分析を使用して評価した。全てのデータはSPSS 16.0を使用して解析された。P < 0.05は統計学的に有意であると考えられた。EGFR増幅モデルと非増幅モデル間の応答差異にアクセスするためにフィッシャーの正確確率検定を使用した (quantitativeskills.com/sisa/statistics/fisher.htmを参照)。

【0119】

結果

GC HuPrime (登録商標) モデルのサブセットはセツキシマブに応答する。

本発明者らは、GC - ADC HuPrime (登録商標) モデルの無作為に選択されたコホートを臨床試験のような研究によって潜在的なセツキシマブの活性を評価するための試験に着手した。これらのモデルはまず、GC - ADC患者から外科的に取り出された腫瘍組織を免疫低下状態のBalb/cヌードマウスに皮下接種を介して移植することによって確立された。元となる患者の診断及び説明を表2及び表3に要約した。次に、19の無作為に選択されたモデルを週一回のセツキシマブ処置に2週間供した (1 mg / マウスまたは50 mg / kg)。セツキシマブに対する腫瘍応答を、 T / C^{15} によって定量化し、表4に要約した。モデルは、活性に応じて二つのカテゴリーに分割することができる。GC - ADC HuPrime (登録商標) の4 / 19または21%がセツキシマブ処置に応答した ($T / C < 0\%$ でほぼ完全奏効) ; 15 / 19または79%は応答しなかった ($T / C > 30\%$ で部分的または完全抵抗性)。これらの二つのカテゴリーの代表的な腫瘍成長阻害曲線を図1Aに示す。 T / C 値によって測定される腫瘍応答の定量化を表1A及び表1Bに要約する。GA0152及びGA0075は、セツキシマブ感受性モデルの例であり、一方でGA0119及びGA0139は抵抗性モデルである。GC - ADCモデルにて見られるこれらのかなり明確な応答は、CRC¹⁷及びNSCLC¹⁵ HuPrime (登録商標) モデルにおいて観察された応答といくらか対照的である。それにもかかわらず、本発明者らのデータはGCのサブセットにセツキシマブが潜在的に有効であり得ることを示した。移植の生着率が100%未満 (本発明者らの手で通常30 ~ 50%) であること及び応答者または非応答者間での生着率にバイアスがかかる可能性があることに起因して、このGC - ADC研究で観察された21%の応答者が、GC - ADC集団における潜在的応答者の真のパーセンテージを必ずしも反映しない可能性があることは注目に値した。

【0120】

約50%の応答者がEGFR遺伝子増幅を呈する。

セツキシマブ応答の潜在的な予測マーカーを発見するために、それゆえ、本発明者らは、ゲノム全体のコピー数多型及びトランスクリプトームプロファイリングを含む、これらのモデルの分子特徴付けを行った。まず、本発明者らはAffymetrix社のgenome-wide human SNP6.0 array及びPICNIC (Predicting Integral Copy Numbers In Cancer; 癌における全体的なコピー数の予測) アルゴリズムを使用してGC - PDXのコピー数多型を調べた。本発明者らは4応答者全てのEGFRコピー数が非応答者の大半のものよりも高いことを見出した (表1、P = 0.002)。この発見をさらに確証するため、本発明者らはEGFR遺伝子コピー数をリアルタイム定量PCR (q-PCR) によって評価し、16の非応答者のうちの2 (12.5%) のみが4以上のコピー数を有する一方で、全応答者が4以上のコピー数を有することを見出した。これらの二群間の差異は有意である

($P = 0.008$)。SNP6 1 PICNIC解析による最高値である15、及びq-PCRによる最高値である1040.9は、最良の応答者でもあるGA0152からである。

【0121】

EGFR遺伝子増幅をさらに確証するために、本発明者らは、臨床診療で進行性GCに対する抗HER2処置をガイドするためのHER2遺伝子増幅の測定に使用されるより精密なアッセイである、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)をさらに行った。少なくとも100の非重複中間期核がEGFRのコピー数について観察された。EGFRの状態を核あたりのEGFRシグナルの数としてスコア化した。本発明者らの結果は、それぞれ平均コピー数5.8(GA0075)及び1.5(GA0152)(図1C、表1)を伴って、2/4(50%)の応答者でEGFR増幅を実証した。GA0152は、EGFR/CEP7比率が1.5でもあった。ゆえに、2/4(50%)応答者は、EGFR増幅によって予測されることができ得る。

10

【0122】

次に、セツキシマブによってこれらの腫瘍においてEGFRシグナル伝達が実際に不活性化されたかどうかを、単回投与薬力学的分析を行うことによって調査した。腫瘍を有する動物は、まずセツキシマブを用いて処置され、処置後6、24、72時間の時点で腫瘍を採取した。一例として、処置後にGA0022の腫瘍組織をpERK(EGFRシグナル伝達の下流エフェクター)について免疫化学解析(IHC)によって解析した。結果は、同一モデルにおいて観察された抗腫瘍活性と相関して、腫瘍におけるpERKの減少(図1B)を明確に実証した。

20

【0123】

CRCにおけるセツキシマブに対する応答を支配する因子は、GC-ADCにおける応答に対し有意に少なく寄与するように見える。

観察された応答GC-ADCについての予測的バイオマーカー(複数可)を発見するために、このコホートのモデルを、いくつかの一般的な発がん遺伝子の発現及び遺伝子コピー数、ならびに遺伝子変異について全身的にプロファイルした。KRAS、BRAF(V600E)、c-MET、EGFR、AKT及びPI3KCのものを含む、活性化変異は、CRC患者におけるセツキシマブに対する耐性と関連してきた¹⁵、¹⁷⁻²¹。ゆえに、これらのモデルは、まずこれらの発がん遺伝子のホットスポット変異配列決定によって解析された。興味深いことに、検査されたモデルのほとんどが、応答者または非応答者にかかわらず、G13Dを含有するGA0139及びPIK3CAにおいて327~329欠失を含有するGA044を除いて、いずれの変異も示さなかった(表1)。ゆえに、GC HuPrime(登録商標)のセツキシマブに対する非応答は、明らかにこれらの発がん遺伝子の変異に単に起因することができない。

30

【0124】

以前の別の研究では、セツキシマブに対するCRC HuPrime(登録商標)応答がRAS経路シグナル伝達に依存しているか、または低いLoboda-RAS経路シグネチャースコアと関連することが観察された¹⁷、²²。それゆえ、RASシグナル伝達経路またはLobodaスコアがGC HuPrime(登録商標)応答への影響を同様に持っているかどうかを知ることは興味深いだろう。驚くべきことに、Loboda-RAS経路シグネチャースコアが、腫瘍応答にはほとんど相関関係を有さないことが見出され(図3参照)、これはRAS経路の活性化状態が、CRCにおいて見られるものよりも、GC-ADCにおけるセツキシマブに対する応答または耐性に有意に少なく寄与することを示す。

40

【0125】

EGFR遺伝子増幅は、セツキシマブに応答する、GC-ADC HuPrime(登録商標)のサブセットにおいて発がん要因であるとみられる。

しかしながら、一方で、Affymetix社のHG-U219 GeneChip解析は、4応答者全てが高レベルのEGFR(mRNAレベル)を発現したこと、及び15

50

の不良応答者全てがより低レベルの発現と関連することを明らかにした（図 2 A 及び 2 C、表 1）。より高い発現を介した E G F R のより高い活性は、これらの腫瘍において発がん性形質転換を推進でき、ゆえにセツキシマブによる不活性化は腫瘍成長を阻害することができるため、この観察結果はもっともらしく思われる。

【 0 1 2 6 】

さらには、A f f y m e t r i x S N P 6 解析を使用して遺伝子コピーを調べることによってどの遺伝的欠損が高 E G F R 発現の背景にあるのか調査した（図 2 B）。興味深いことに、全ての応答者が、対応する E G F R 遺伝子増幅を有する（図 2 A 及び 2 B）（表 1、表 4）（フィッシャーの正確確率検定に従い、 P 値 < 0.00026 ）。このほぼ完璧な相関は、E G F R 遺伝子増幅が、応答者における重要な発がん要因であり、G C - A D C のセツキシマブに対する応答を予測するための潜在的な実用的な単一のバイオマーカーである可能性が高いことを示唆した。遺伝子増幅をさらに確証するために、本発明者らは E G F R - 蛍光インサイチューハイブリダイゼーション、または F I S H（臨床的に実用的なアッセイである）を全てのモデルの E G F R 遺伝子増幅状態を評価するために行った。F I S H データは S N P 6 によってみられる観察を実際に確証した。一例として G A 1 5 2 の F I S H 解析は、E G F R 増幅を明確に示した。臨床的に許容される F I S H 手順は、セツキシマブ G C - A D C 処置のための診療現場でのセツキシマブ処置についてのコンパニオン診断の発展を可能にする。

【 0 1 2 7 】

（表 1 A）G C H u P r i m e（登録商標）モデルパネルのプロファイル

10

20

モデル ID	T/C	EGFR SNP6 PICNIC	FGFR2 SNP6	HER2 SNP6	EGFR U219 強度	EGFR (q-PCR)	EGFR (FISH)	CEP7 (FISH)	比率 (EGFR/ CEP7)	EGFR 相対強度	タンパク質 EGFR IHC スコア変異
GA0114	1.62	6	15	5	2.9	5.1	1.9	1.9	0.96	0	0
GA2140	1.32				NE	3.8	2.3	2.2	1.04	0.1	2
GA0119	0.93	5	3	5	3.6	2.1	2	2	1.03	0.14	1
GA0139	0.91	5	5	15	2.9	4.8	3	2.7	1.09	0	0
GA0138	0.9	5	5	5	2.3	2.7	2.6	2	1.29	0	0
GA0037	0.88	5	5	6	2.5	3.7	2.7	2.3	1.16	0	0
GA0033	0.81	5	15	4	2.4	3.9	2.4	2	1.21	0.02	0
GA0023	0.78	4	4	5	2.5	1.9	2.1	2.5	0.83	0.02	0
GA0080	0.75	6	6	4	2.8	3.7	2.4	2.1	1.16	0.02	1
GA0151	0.7				4	1.4	2.1	2.2	0.93	0.2	1
GA0044	0.69	5	6	4	3.1	2.1	2.4	2.3	1.03	0.13	1
GA0098	0.55	5	4	5	4.2	3.7	2.5	2.1	1.2	0.07	1
GA0060	0.45	5	4	15	4.2	3.1	2	2.2	0.91	0.13	1
GA0025	0.31				3.8	2.1	2.3	2.3	1.05	0.1	0
GA0022	-0.071	7	5	4	6.5	5.4	2.8	2	1.39	0.81	3
GA046	-0.072	7	4	3	6.9	4.3	2.3	2.3	1.03	0.62	3
GA0075	-0.098	8	4	5	5.8	4.6	5.8	2	1.12	0.5	3
GA0152	-0.121	15	3	5	10.5	1040.9	>15		>15	13	3
P値 (非応答者 対 応答者)	0.002	0.002			0.003	0.008	0.029		0.099	0.002	0.002

網掛け部分は応答者を示す：NE：評価不可

10

20

30

40

50

【 0 1 2 8 】

(表 1 B) G C H u P r i m e (登録商標) モデルパネルのプロファイル

モデル ID	EGFR エクソン 18;19;20;21	k-RAS エクソン2;3;4	BRAF エクソン15	c-MET エクソン 14; 16;17;18;19;21	PIK3CA エクソン1;9;20
GA0114	WT	WT	WT	WT	WT
GA2140					
GA0119	WT	WT	WT	WT	WT
GA0139	WT	G13D	WT	WT	WT
GA0138	WT	WT	WT	WT	WT
GA0037	WT	WT	WT	WT	WT
GA0033	WT	WT	WT	WT	WT
GA0023	WT	WT	WT	WT	WT
GA0080	WT	WT	WT	WT	WT
GA0151	WT	WT	WT	WT	WT
GA0044	WT	WT	WT	WT	欠失 327-329
GA0098	WT	WT	WT	WT	G545Y
GA0060	WT	WT	WT	WT	WT
GA0025	WT	WT	WT	WT	WT
GA0022	WT	WT	WT	WT	WT
GA046	WT	WT	WT	WT	WT
GA0075	WT	WT	WT	WT	WT
GA0152	WT	WT	WT	WT	WT

10

20

30

網掛け部分は応答者を示す

【 0 1 2 9 】

(表 2) G C 患者診断及び病理、及び対応するモデルの病理確証

ID	性別	最初の病院病理報告
GA0114	女性	胃腺癌
GA2140	男性	胃体から幽門洞の壊死を伴う中～低分化の腺癌、腫瘍体積：12×11cm。腫瘍は胃壁を通過して浸潤する。領域LN：NO. 1LN (0/6)、NO. 2LN (0/1)、NO. 3LN (0/6)、NO. 5LN (0/2)、NO. 6LN (0/2)、NO. 7、8、9LN (0/5)、NO. 4dLN (0/4)。IHC結果：CD44 (+)、cMet (+)、EGFR (+)、HER2 (1+)、Ki-67 (+>75%)、MMP7 (+)、P170 (+)、P27 (+25～50%)、P53 (+<25%)、TOPOII (+50～75%)。
GA0119	男性	粘液癌及びいくつかの印環細胞癌を伴う胃噴門の腺癌、潰瘍型、低分化、腫瘍体積：6.5cm×7cm×2cm、漿膜及び神経叢浸潤。下断端に隣接する悪性細胞。領域LN：小弯のLN (6/6)、左胃LN (5/6)、下幽門LN (1/1)。
GA0139	男性	乳頭腺癌を伴う胃噴門の腺癌、潰瘍型、中分化、腫瘍体積：6.5cm×7cm×1cm、漿膜外脂肪組織の浸潤。両断端に隣接する悪性細胞なし。領域LN：小弯のLN (0/11)、傍食道LN (0/4)。
GA0138	男性	胃の腺癌、浸潤性、潰瘍型、低分化、腫瘍体積：11cm×9cm×3cm、深筋層の浸潤、両断端に隣接する可視悪性細胞なし。領域LN：小弯のLN (1/5)。
GA0037	男性	胃噴門の腺癌、潰瘍型、低分化、腫瘍体積：4cm×4cm×2.5cm、漿膜浸潤。両断端に隣接する可視悪性細胞なし。領域LN：小弯のLN (0/9)。
GA0033	男性	胃噴門の腺癌、潰瘍型、低分化、腫瘍体積：9cm×6cm×1.5cm、漿膜浸潤、及び壊死及び少量のリンパ球付着を伴う。両断端に隣接する可視悪性細胞なし。領域LN：噴門LN (0/5)、左胃LN (0/7)。
GA0023	女性	腺癌、潰瘍型、低分化。
GA0080	男性	1. 胃噴門の腺癌、浸潤型、中～低分化、腫瘍体積：8cm×6cm×1.5cm、漿膜浸潤。両断端に隣接する可視悪性細胞なし。領域LN：領域LN：噴門LN (1/5)、左胃LN (2/2)。2. B型肝炎
GA0044	男性	肝臓由来の転移性腺癌、中～低分化。患者は2年前に胃癌手術を受けている。
GA0025	女性	胃大弯の印環細胞癌、一部は粘液癌、隆起型、腫瘍体積：3.5cm×3.5cm×2cm、胃壁を通して浸潤。領域LN：LN周囲腹腔動脈 (1/1)。IHC結果：HER-1 (-)、HER-2 (-)、p53 (-)、p170 (-)、Ki-67 (+25～50%)、VEGF (+)、Top-IIα (+<25%)、p16 (-)。
GA0022	男性	胃噴門の腺癌、潰瘍型、中～低分化、腫瘍体積：5cm×4cm×2.5cm、胃壁を通過し漿膜まで浸潤。両断端に隣接する可視悪性細胞なし。領域LN：左胃LN (5/9)、下肺静脈近傍 (inferior parapulmonary vein) のLN (0/6)。
GA0046	男性	小弯における食道胃接合部由来の腺癌、隆起潰瘍型、低分化、腫瘍体積：6cm×5cm×1.5cm。悪性細胞が胃壁及び食道を通過して浸潤。領域LN：小弯のLN (3/14)。IHC結果：HER-1 (+)、HER-2 (-)、P53 (+25～50%)、P170 (-)、Ki-67 (+25～50%)、VEGF (++)、Top-IIα (+約10%)、p16 (-)。

ID	性別	最初の病院病理報告
GA0075	女性	噴門及び胃底部の腺癌、浸潤性潰瘍型、中～低分化、腫瘍体積：6.5cm×5cm×1.5cm、漿膜浸潤。両断端に隣接する悪性細胞なし。領域LN：小弯のLN（1／6）、噴門LN（0／4）、大弯のLN（0／4）、下肺静脈近傍のLN（0／3）。
GAF152	女性	低分化腺癌（P0、P5）。

10

20

30

40

【 0 1 3 0 】

(表 3) G C 患者の臨床病理学的パラメータ及び対応する P D X モデルの病理学確証

ID	性別	腫瘍の大きさ (cm)	壁浸潤の深度	リンパ節転移	遠隔転移	TNMステージ	組織学 (患者およびPDX)	分化
GA0006	男性	>5.0	T4a	N1	N0	IIa	腺癌	中～低
GA0022	男性	≤5.0	T4a	N2	N0	IIb	腺癌	中～低
GA0023	女性	≤5.0	T4a	N2	N0	IIb	腺癌	低
GA0025	女性	≤5.0	T4a	N1	N0	IIa	印環細胞癌	低
GA0033	男性	>5.0	T4a	N0	N0	IIb		低
GA0037	男性	≤5.0	T4a	N0	N0	IIb		低
GA0044	男性	肝臓からの病変	n/a	n/a	N1	IV		中～低
GA0046	男性	>5.0	T4a	N2	N0	IIb	腺癌	低
GA0055	女性	≤5.0	T4a	N3b	N0	IIc	腺癌	中
GA0060	男性	≤5.0	T4a	N3a	N0	IIc	腺癌	中～低
GA0075	女性	>5.0	T4a	N1	N0	IIa	腺癌	中～低
GA0080	男性	>5.0	T4a	N2	N0	IIb	腺癌	中～低
GA0098	男性	≤5.0	T4a	N0	N0	IIb	腺癌	中
GA0114	女性	>5.0	T4a	N1	N0	IIa	腺癌	中～低
GA0119	男性	>5.0	T4a	N3b	N0	IIc	腺癌	低
GA0138	男性	>5.0	T2	N1	N0	IIa	腺癌	低
GA0139	男性	>5.0	T4a	N0	N0	IIb	腺癌	高
GA0151	女性	>5.0	T4a	N1	N0	IIa	腺癌	中～低
GA0152	女性	>5.0	T4a	N0	N0	IIb	腺癌	低
GA2140	男性	>5.0	T4a	N0	N0	IIb	腺癌	中～低

* G C のステージは、国際対癌連合推奨の、腫瘍 - 結節 - 転移 (T N M) 分類第 7 版に従

10

20

30

40

50

い分類された。

【 0 1 3 1 】

(表 4) 異なる方法で測定された E G F R コピー数。

モデルID	EGFR SNP6 PICNIC	EGFR qPCR	EGFR FISH
GA0114	6		N/A
GA2140			N/A
GA0119	5		0.99
GA0139	5	1.06	
GA0138	5	0.96	
GA0037	5	1.50	
GA0033	5	+0.64	
GA0023	4	0.00	
GA0080	6	0.94	
GA0151		N/A	
GA0044	5	N/A	
GA0098	5	N/A	
GA0060	5	N/A	+
GA0025	N/A	0.32	
GA0022	7	1.21	
GA046	7	N/A	
GA0075	8	2.29	
GA0152	15	8.22	

10

20

網掛け部分は応答者を示す

【 0 1 3 2 】

(表 5) 変異解析に使用されるプライマーのパネル

変異 プライマー

EGFR

- エクソン18 フォワード 5'-CATGGTGAGGGCTGAGGTGA-3' (SEQ ID NO: 1)
 リバース 5'-CCCCACCAGACCATGAGAGG-3' (SEQ ID NO: 2)
- エクソン19 フォワード 5'-GTGCATCGCTGGTAACATCCA-3' (SEQ ID NO: 3)
 リバース 5'-GGAGATGAGCAGGGTCTAGAGCA-3' (SEQ ID NO: 4)
- エクソン20 フォワード 5'-CGCATTTCATGCGTCTTCACC-3' (SEQ ID NO: 5)
 リバース 5'-CTATCCCAGGAGCGCAGACC-3' (SEQ ID NO: 6)
- エクソン21 フォワード 5'-TGGCATGAACATGACCCTGAA-3' (SEQ ID NO: 7)
 リバース 5'-CAGCCTGGTCCCTGGTGTC-3' (SEQ ID NO: 8)

KRAS

- エクソン2 フォワード 5'-TTATGTGTGACATGTTCTAAT-3' (SEQ ID NO: 9)
 リバース 5'-AGAATGGTCCTGCACCAGTAA-3' (SEQ ID NO: 10)
- エクソン3 フォワード 5'-TCAAGTCCTTTGCCCATTTT-3' (SEQ ID NO: 11)
 リバース 5'-TGCATGGCATTAGCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 12)
- エクソン4 フォワード 5'-TTGTGGACAGGTTTTGAAAGA-3' (SEQ ID NO: 13)
 リバース 5'-AGAAGCAATGCCCTCTCAAG-3' (SEQ ID NO: 14)

BRAF

- エクソン15 フォワード 5'-CTCTTCATAATGCTTGCTC-3' (SEQ ID NO: 15)
 リバース 5'-GTGAATACTGGGAAGTATG-3' (SEQ ID NO: 16)

c-MET

- エクソン14 フォワード 5'-TGGGCACTGGGTCAAAGTCTC-3' (SEQ ID NO: 17)
 リバース 5'-AACAATGTCACAACCCACTGAGGTA-3' (SEQ ID NO: 18)
- エクソン16 フォワード 5'-ATTAAATGTTACGCAGTGCTAAC-3' (SEQ ID NO: 19)
 リバース 5'-GGTTGCAAACCAAAAAGTAT-3' (SEQ ID NO: 20)
- エクソン17 フォワード 5'-GTATTCCTGTTCCATAATGAAGT-3' (SEQ ID NO: 21)
 リバース 5'-GATGGCTGGCTTACAGCTAGTT-3' (SEQ ID NO: 22)
- エクソン18 フォワード 5'-AACAGTAGATGCTTAGTTTATGCT-3' (SEQ ID NO: 23)
 リバース 5'-AACAGATTCCTCCTTGTCACTT-3' (SEQ ID NO: 24)
- エクソン19 フォワード 5'-TTCTATTTACGCCACGGGTAAT-3' (SEQ ID NO: 25)
 リバース 5'-ATGAAAGTAAAAGAGGAGAACTC-3' (SEQ ID NO: 26)
- エクソン21 フォワード 5'-CACCTAAAGCCGAAATGCG-3' (SEQ ID NO: 27)
 リバース 5'-CAAGGAGCAAAGAATATCGATGGC-3' (SEQ ID NO: 28)

PI3KCA

- エクソン1 フォワード 5'-CTCCACGACCATCATCAGG-3' (SEQ ID NO: 29)
 リバース 5'-GATTACGAAGGTATTGGTTTAGACAG-3' (SEQ ID NO: 30)
- エクソン9 フォワード 5'-GATTGGTTCTTTCCTGTCTCTG-3' (SEQ ID NO: 31)
 リバース 5'-CCACAAATATCAATTTACAACCATG-3' (SEQ ID NO: 32)
- エクソン20 フォワード 5'-TGGGGTAAAGGGAATCAAAAG-3' (SEQ ID NO: 33)
 リバース 5'-CCTATGCAATCGGTCTTTGC-3' (SEQ ID NO: 34)

【 0 1 3 3 】

全応答者が、より高いEGFR mRNA発現レベルを呈する。

一方で、Affymetrix社のHG-U219 GeneChipを使用したトランスクリプトームプロファイリングは、16の非応答者全てよりも4応答者全てがより高いレベルのEGFR mRNA発現を発現したことを明らかにした(P = 0.003)(表1)。EGFR遺伝子発現は、さらにq-RT-PCR(定量逆転写PCR)によって、ハウスキーピング遺伝子GAPDHに対して定量化された。試験された試料の中で、高いEGFR mRNAレベル(相対強度 0.5、恣意的に定義された)を呈した4試料は、全て応答者であり、残りのモデルが中から低いEGFR mRNAレベル(相対強度 0.1)(表1、図1C)を示したこととは対照的である。差異は有意である(P = 0.002)。具体的には、最も高い値はGA0152からであり、GeneChip解析によって10.5及びq-RT-PCRによって13であり、上記のEGFR増幅に起因することができる。

10

20

30

40

50

【0134】

全応答者が、より高いEGFR免疫組織化学スコアを呈する。

次いで、本発明者らはEGFR免疫組織化学(IHC)(GCの抗HER2処置についてのHER2発現を決定するための臨床的に実用的なアッセイ)を行った。IHCは、12/20(60%)のモデルにおいて陽性なEGFR免疫染色を実証した。それらの中で、6/12は11、3/12は21、及び3/12は31の染色強度を示した。全応答者でEGFR IHC 31が見出され、一方で非応答者はより低いEGFR IHCスコア0~21(P=0.002)(表1、図1C)を呈した。典型的なEGFRの強い免疫染色(GA0152及びGA0075)を図1Bに示す。これらの結果は、EGFR高発現(mRNA及びタンパク質レベルの両方において)が、セツキシマブに対する応答に相関することを実証した。関連する発がん遺伝子の変異は稀である。EGFR経路に関連するいくつかの一般的な発がん遺伝子の遺伝的変異、例えば、KRAS、BRAF(V600E)、c-MET、EGFR、AKT及びPI3KCもまた、これらのモデルにおいてホットスポット変異配列決定によって調査されている。興味深いことに、G13DKRAS変異を含有するGA0139、PIK3CAにおいて327~329欠失を含有するGA0044、及びG545YP1K3CA変異を含有するGA0098を除く試験されたモデルのほとんどが、応答者または非応答者にかかわらず、異常を示さなかった(表1)。それゆえ、GC異種移植片のセツキシマブに対する非応答は、明らかにこれらの発がん遺伝子の変異に単に起因することができない。

【0135】

考察

この研究は、EGFR遺伝子増幅及び過剰発現を伴うGC-HuPrime(登録商標)モデルのサブセットがセツキシマブに応答する(4/4)ことを明確に実証した。これと一致して、EXTRA第II相試験における4人中4人のEGFR増幅患者は、セツキシマブ及びシスプラチン/カペシタビン(NCT00477711)の併用処置に対して応答者であり¹⁶、PDXモデルの想定される予測力及びセツキシマブGC-ADC処置についてのEGFR予測的バイオマーカーの本発明者らの仮説を支持する。この仮定は、データが入手可能になったときに、最近完了された食道胃腺癌における第III相試験(EXPAND)を遡及的に調査することによってもさらに確証されることができる。EGFR遺伝子増幅についてのFISHは、医療現場にて日常的に行われることができ、したがって、これがコンパニオン診断として使用されることが可能になる。それゆえ、かかる前向き試験は容易に実現できる。最終的な承認は、HER2遺伝子増幅を有する患者へのトラスツズマブ(Herceptin(登録商標))³に加えて、GC-ADC患者のためのもう一つの標的療法選択肢を提供するだろう。

【0136】

セツキシマブに対するGC-HuPrime(登録商標)応答で見られたEGFR遺伝子増幅への大きな依存は、しかしながら、NSCLC(Yangら、提出中)及びCRC¹⁷ HuPrime(登録商標)では観察されなかった。これは、異なる癌のタイプ間で根本的な差異があることを示している。非常に興味深いことに、GC-ADCにおけるこのEGFR依存性は、どういうわけか、GC-ADCにおけるトラスツズマブ応答についてのHer2依存性を反映する。この類似性は、トラスツズマブについてのコンパニオン診断のように、GCのセツキシマブ治療についてのコンパニオン診断に明確な実現可能な開発パスを提供する。

【0137】

別の興味深い観察としては、EGFR過剰発現(同じく遺伝子増幅)を有するモデルは、HER2過剰発現(または遺伝子増幅)を有さないこと、及び逆も同様、すなわち単一モデルにおいて両方のこれらの遺伝子の過剰発現(遺伝子増幅)は観察されていないことが挙げられる(図4A及び4Bを参照)。この観察は、両遺伝子の増幅/過剰発現は、発がんを推進しないことを示す。ゆえに、GC患者処置のためにセツキシマブ及びトラスツズマブの組み合わせを使用する理由はないだろうことは理解できる。

【 0 1 3 8 】

本発明者らのデータは、G Cにおけるセツキシマブ応答とm R N A及びタンパク質レベルの両方でのE G F R高発現、ならびにE G F R遺伝子増幅間の正の相関を指し示す。この相関は、最も高いE G F R m R N A発現、I H Cスコア及び遺伝子増幅を有するG A 0 1 5 2によって例示される。データは、より高い発現を介したE G F Rのより高い活性はこれらの腫瘍における発がん性形質転換を推進すると示すようであり、それゆえセツキシマブによるその不活性化は腫瘍成長を阻害する。E G F Rの過剰発現は、2つの症例において、遺伝子増幅に起因し得る。

【 0 1 3 9 】

本発明者らのデータは、m R N A及びタンパク質レベルの両方におけるE G F R高発現が応答に相関することも実証した。しかしながら、E G F R遺伝子のm R N A発現が臨床試料において日常的にアッセイされていないため、及びI H Cが生物学的及び技術的要因のために議論となり得るため、抗H E R 2処置の診療と同様に、本発明者らはF I S HとI H C試験の併用が日常の診療としてセツキシマブの有効性を予測するのに好適であると推奨する。

【 0 1 4 0 】

要約すると、本発明者らの研究は、高E G F R m R N A発現及びI H Cスコアを伴うG Cサブタイプに、セツキシマブ処置が有効である可能性があり、F I S HによるE G F R遺伝子増幅はまた、約5 0 %前後の陽性予測値で応答者を予測することができることを示した。これらのマーカーは、将来の潜在的に成功する臨床試験を導く及び最終的には臨床処置のための患者の階層化ガイドとして役立つことができる。

【 0 1 4 1 】

参考文献

1. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 2006 May 10;24(14):2137-50.
2. Kelley JR, Duggan JM. Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol*. 2003 Jan;56(1):1-9.
3. Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet*. 2010 Aug 28;376(9742):687-97.
4. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med*. 2008 Mar 13;358(11):1160-74.
5. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol*. Jan;11(1):21-8.
6. Pinto C, Di Fabio F, Barone C, Siena S, Falcone A, Cascinu S, et al. Phase II study of cetuximab in combination with cisplatin and docetaxel in patients with untreated

advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (DOCETUX study). *Br J Cancer*. 2009 Oct 20;101(8):1261-8.

7. Pinto C, Di Fabio F, Siena S, Cascinu S, Rojas Llimpe FL, Ceccarelli C, et al. Phase II study of cetuximab in combination with FOLFIRI in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (FOLCETUX study). *Ann Oncol*. 2007 Mar;18(3):510-7.

8. Lordick F, Luber B, Lorenzen S, Hegewisch-Becker S, Folprecht G, Woll E, et al. Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Br J Cancer*. 2010 Feb 2;102(3):500-5.

10

9. Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature*. 2010 Apr 15;464(7291):999-1005.

10. Marangoni E, Vincent-Salomon A, Auger N, Degeorges A, Assayag F, de Cremoux P, et al. A new model of patient tumor-derived breast cancer xenografts for preclinical assays. *Clin Cancer Res*. 2007 Jul 1;13(13):3989-98.

20

11. Nemati F, Sastre-Garau X, Laurent C, Couturier J, Mariani P, Desjardins L, et al. Establishment and characterization of a panel of human uveal melanoma xenografts derived from primary and/or metastatic tumors. *Clin Cancer Res*. 2010 Apr 15;16(8):2352-62.

12. Nemati F, Daniel C, Arvelo F, Legrier ME, Froget B, Livartowski A, et al. Clinical relevance of human cancer xenografts as a tool for preclinical assessment: example of in-vivo evaluation of topotecan-based chemotherapy in a panel of human small-cell lung cancer xenografts. *Anticancer Drugs*. 2010 Jan;21(1):25-32.

30

13. Fichtner I, Rolff J, Soong R, Hoffmann J, Hammer S, Sommer A, et al. Establishment of patient-derived non-small cell lung cancer xenografts as models for the identification of predictive biomarkers. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 15;14(20):6456-68.

14. Hennessey PT, Ochs MF, Mydlarz WW, Hsueh W, Cope L, Yu W, et al. Promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma cell lines is significantly different than methylation in primary tumors and xenografts. *PLoS One*. 2011;6(5):e20584.

40

15. Yang M, Xiaoming Song, Jianyun Deng, Jie Cai, Taiping Chen, Jean-Pierre Wery, Yiyu Chen and Qixiang Li. Overcoming drug resistance with tailored treatment regimen in patient derived xenografts from naïve Asian NSCLC patients resistant to EGFR inhibitors. 2012; Submitted.

16. Zhang X, Jianming Xu, Lin Shen, Lin Yang, Jun Liang, Nong Xu, Yuxian Bai⁶, Jiejun Wang. A Multicenter Prospective Phase II study of Cetuximab with Cisplatin/Capecitabine for untreated patients with Advanced Gastric or Esophago-gastric Adenocarcinoma (EXTRA study). 2012.
17. Chen D, Petra Ross-Macdonald, Sheng Guo, , Jie Cai, Rolf Ryseck, Craig Fairchild, Heshani de Silva, Jian Cao, Aiqing He, Xiaoming Song, Mengmeng Yang, Jianyun Deng, Taiping Chen¹, Jean-Pierre Wery¹, Yiyu Chen¹ and Qixiang Li. Cetuximab response in CRC patient-derived xenografts is predicted by RAS pathway activation rather than KRAS mutation status. 2012. 10
18. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006 Apr 15;66(8):3992-5.
19. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, De Schutter J, Biesmans B, Fountzilas G, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010 Aug;11(8):753-62. 20
20. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2011 Jun;12(6):594-603.
21. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Dec 10;26(35):5705-12. 30
22. Loboda A, Nebozhyn M, Klinghoffer R, Frazier J, Chastain M, Arthur W, et al. A gene expression signature of RAS pathway dependence predicts response to PI3K and RAS pathway inhibitors and expands the population of RAS pathway activated tumors. *BMC Med Genomics.* 2010;3:26.
23. Jemal et al. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 69-90 (2011)
24. Han et al., Phase II study and biomarker analysis of cetuximab combined with modified FOLFOX6 in advanced gastric cancer *Br. J. Cancer* 100, 298-304 (2009) 40
25. Kim et al. A prospective phase II study of cetuximab in combination with XELOX (capecitabine and oxaliplatin) in patients with metastatic and/or recurrent advanced gastric cancer. *Invest. New Drugs* 29, 366-373 (2011)

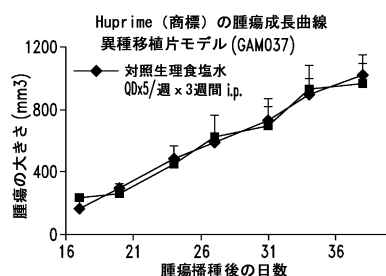
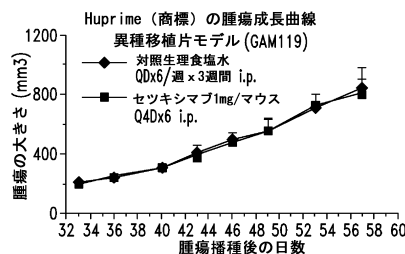
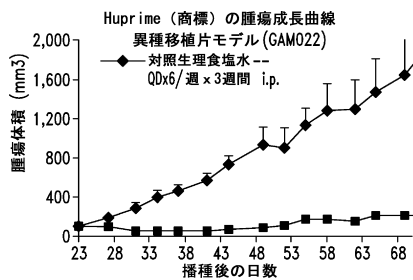
26. Lordick et al. Capecitabine and cisplatin with or without cetuximab for patients with previously untreated advanced gastric cancer (EXPAND): a randomised, open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 14, 490-499 (2013)

27. Lubner et al. Biomarker analysis of cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric and oesophago-gastric junction cancer: results from a phase II trial of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO) *BMC Cancer* 11, 509 (2011)

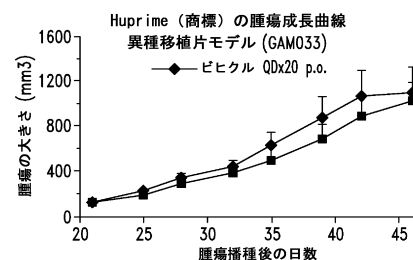
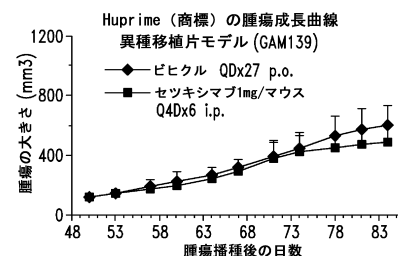
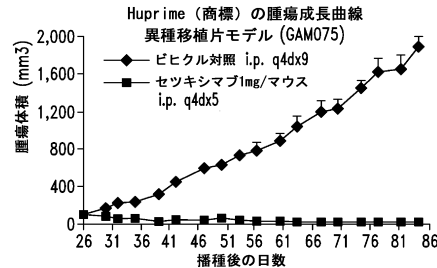
28. Shia et al., Epidermal growth factor receptor expression and gene amplification in colorectal carcinoma: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. *Mod. Pathol.*

10

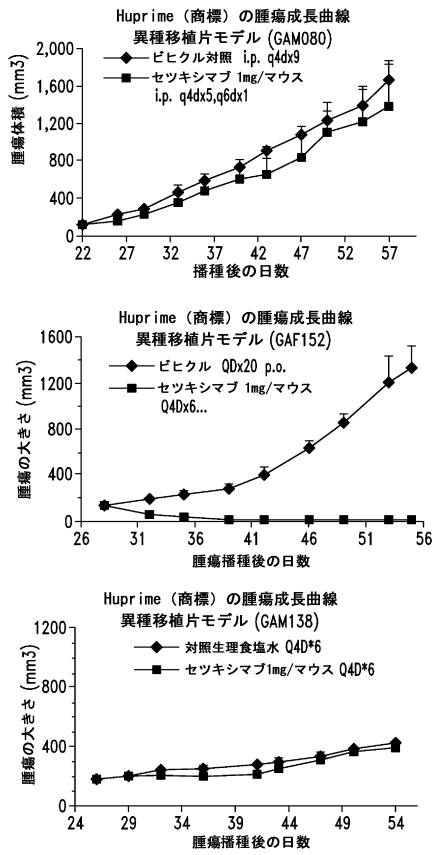
【図 1 A - 1】



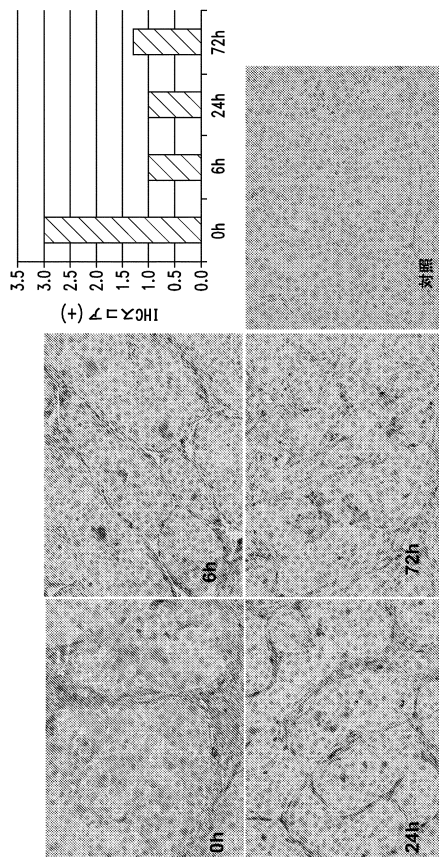
【図 1 A - 2】



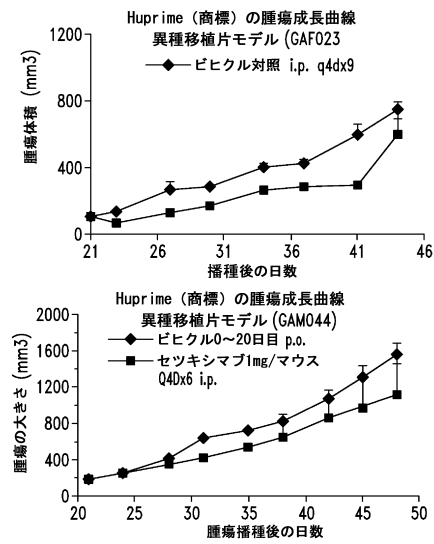
【図 1 A - 3】



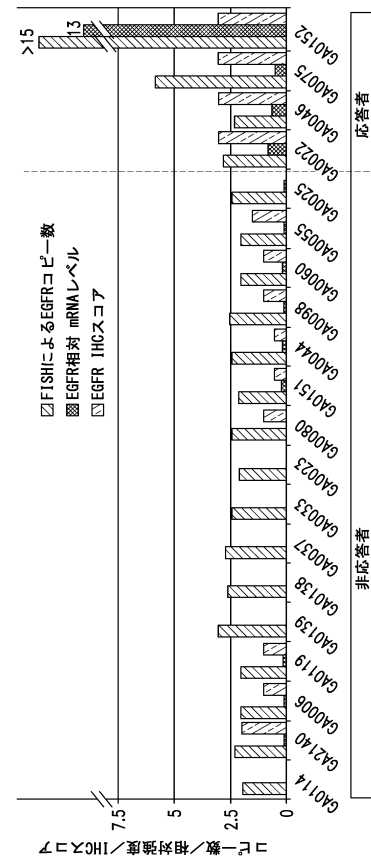
【図 1 B】



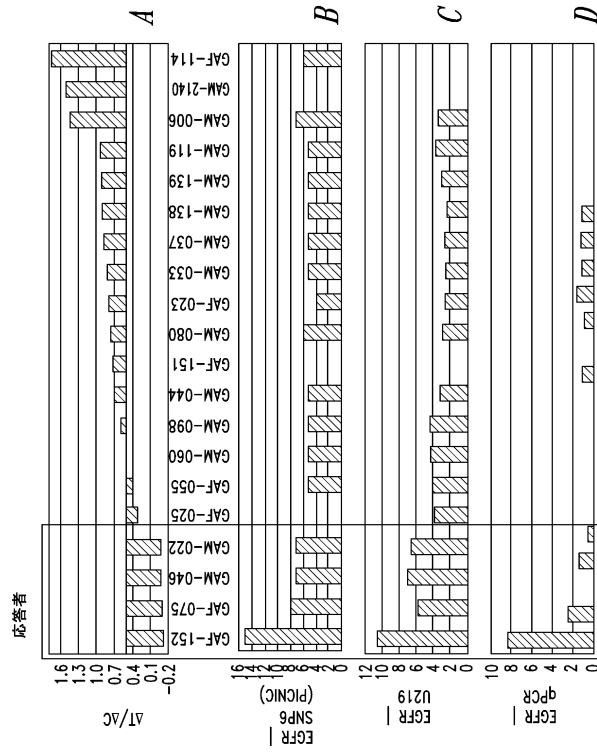
【図 1 A - 4】



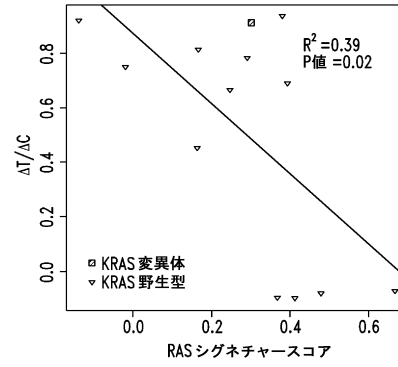
【図 1 C】



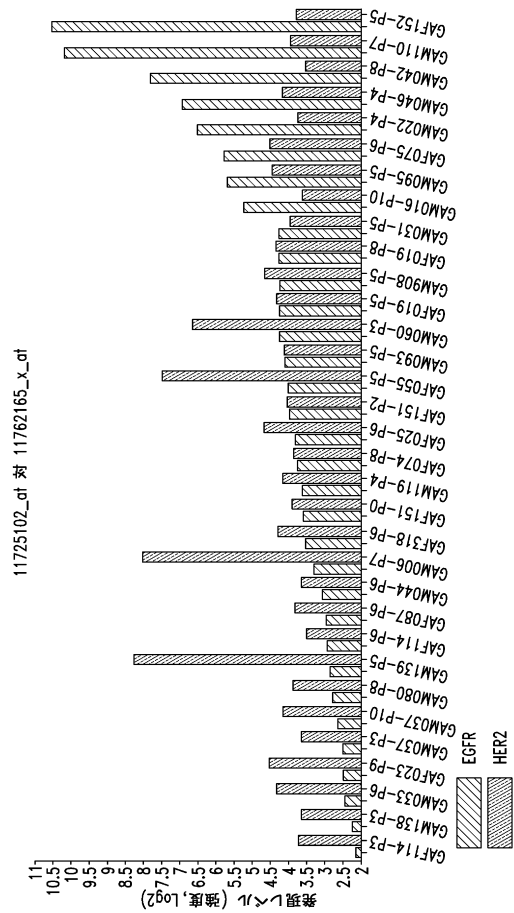
【図2】



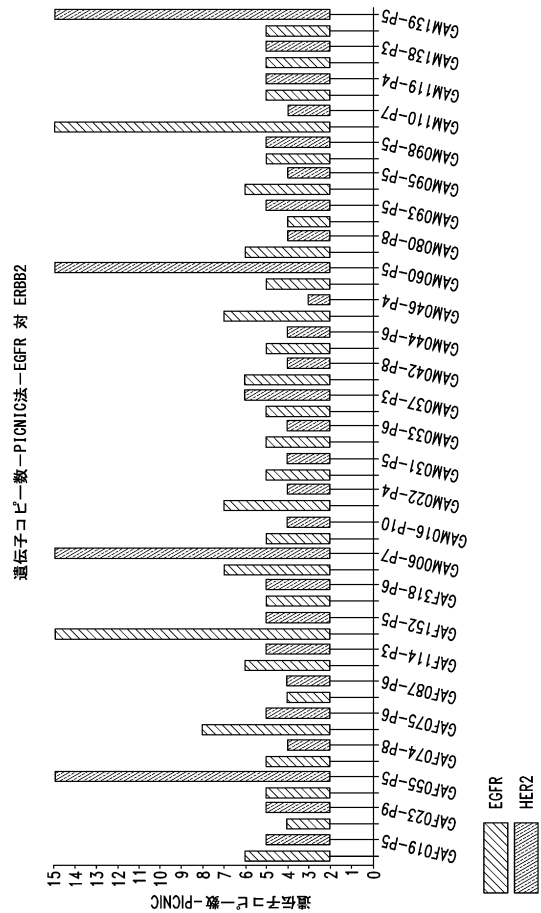
【図3】



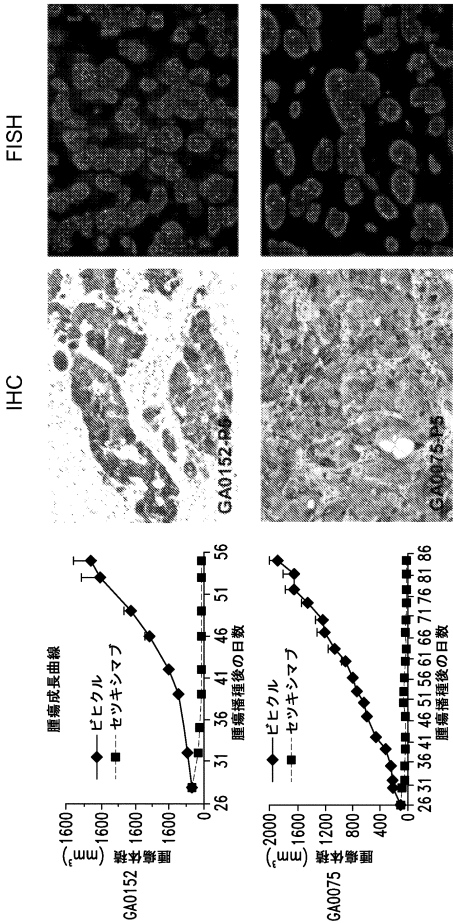
【図4A】



【図4B】



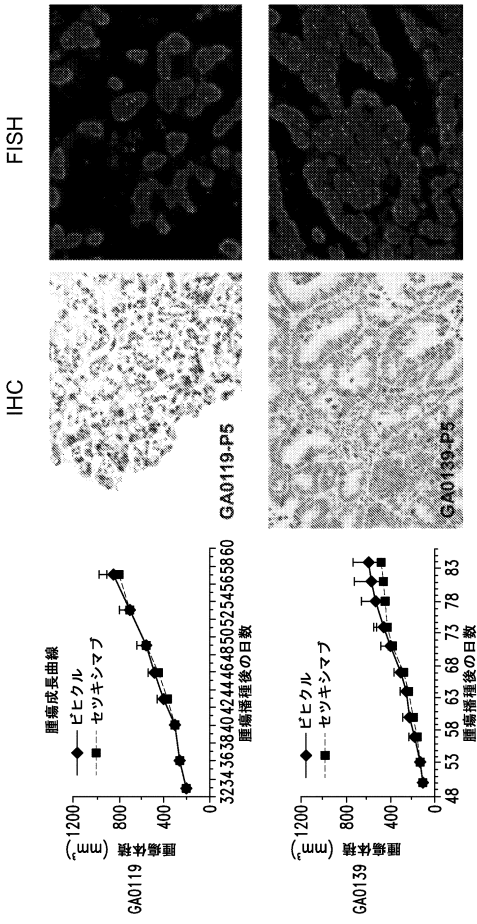
【図 5 - 1】



【配列表】

0006675300000001.app

【図 5 - 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 Q 1/68 (2018.01) C 1 2 Q 1/68 Z N A

- (74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 ヤン チエ
 中華人民共和国 ペキン チャンピン ディストリクト フォジュー ロード ナンバー 19
 ライト ミュラー ビルディング ファースト フロア
- (72)発明者 チェン イーヨウ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンノゼ メンロ ドライブ 6434
- (72)発明者 リ ヘンリー チシャン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 カールスバッド カーレ メジャー 7760
- (72)発明者 カイ チエ
 中華人民共和国 ペキン チャンピン ディストリクト フォジュー ロード ナンバー 19
 ライト ミュラー ビルディング ファースト フロア

審査官 参鍋 祐子

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2011/0230360 (US, A1)
 国際公開第2012/157647 (WO, A1)
 米国特許出願公開第2009/0017050 (US, A1)
 特表2008-502328 (JP, A)
 Journal of Oncology, 2009年, Vol.2009, Article ID 804108, pp.1-8
 Cancer. Sci., 2008年, Vol.99(7), pp.1471-1478
 Pthology International, 2000年, Vol.50, pp.767-777
 British Journal of Cancer, 2006年, Vol.95, pp.1504-1513
 Cancer. Sci., 2007年, Vol.98(8), pp.1275-1280
 Jpn. J. Clin.Pharmacol. Ther., 2011年, Vol.42(3), pp.165-166

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
 A 6 1 P 1 / 0 0
 A 6 1 P 3 5 / 0 0
 C 1 2 Q 1 / 6 8
 G 0 1 N 3 3 / 5 0
 G 0 1 N 3 3 / 6 8

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)