

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-524003

(P2010-524003A)

(43) 公表日 平成22年7月15日(2010.7.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574 A	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 31/53 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/53	4 C 0 8 6
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-503220 (P2010-503220)	(71) 出願人	391015708
(86) (22) 出願日	平成20年4月11日 (2008.4.11)		ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン
(85) 翻訳文提出日	平成21年12月14日 (2009.12.14)		パニー
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/059974		BRISTOL-MYERS SQUIB
(87) 国際公開番号	W02008/128008		B COMPANY
(87) 国際公開日	平成20年10月23日 (2008.10.23)		アメリカ合衆国ニューヨーク州 1015
(31) 優先権主張番号	60/911,547		4 ニューヨーク パーク アベニュー
(32) 優先日	平成19年4月13日 (2007.4.13)		345
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100081422
			弁理士 田中 光雄
		(74) 代理人	100084146
			弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管内皮増殖因子受容体-2 モジュレーターに対する感受性を決定するためのバイオマーカーおよび方法

(57) 【要約】

VEGFR-2 モジュレーターまたは二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターを投与することを含む癌を処置する方法に対して、哺乳類が治療的に応答する可能性を予測するための方法であって、以下を含む方法：(a) 該哺乳類において FGF2 のレベルを測定すること；(b) FGF2 陽性のクラスもしくは FGF2 陰性のクラスのいずれかのメンバーへのサンプルの割り当てを可能にするため、サンプルにおける FGF2 のレベルを標準と比較すること、またはサンプルにおける FGF2 のレベルを標準と比較すること、ここで、FGF2 陽性サンプルのクラスへの哺乳類の割り当てまたは哺乳類が FGF2 の上昇したレベルを有するという決定は、患者が癌の処置に対して治療的に応答する可能性の増大を示す。これらの方法を含むキットに加えて、哺乳類が有効量の VEGFR-2 モジュレーターまたは二重 VEGFR-2/FGFR-1

モジュレーターを受け取ったかどうかを予測する方法も開示される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者が VEGFR-2 モジュレーターの投与を含む癌の処置に対して治療的に応答する可能性を予測するための方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) 前記患者からのサンプルにおける FGF2 のレベルを測定する工程； および

(b) FGF2 陽性のクラスまたは FGF2 陰性のクラスのメンバーのいずれかへの前記サンプルの割り当てを可能にするため、前記サンプルにおける FGF2 のレベルを標準と比較する工程、

ここで、FGF2 陽性のサンプルのメンバーは、患者が前記癌の処置に対して治療的に応答する可能性の増大を示し、他方、FGF2 陰性のサンプルのメンバーは、患者が前記癌の処置に対して治療的に応答する可能性の減少を示す。

10

## 【請求項 2】

前記癌の処置が、二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記癌の処置が、[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチルエステルまたはその医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物の投与を含む、請求項 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 4】

以下の工程を含む、癌を有する患者を処置するための方法：

(a) 前記患者からのサンプルにおける FGF2 のレベルを測定する工程； および

(b) FGF2 陽性または FGF2 陰性のサンプルのいずれかへの前記サンプルの割り当てを可能にするため、前記サンプルにおける FGF2 のレベルを標準と比較する工程、

ここで、FGF2 陽性のサンプルは、前記患者が治療上許容される量の VEGFR-2 モジュレーターを含む癌の処置を施されるべきことを示す。

## 【請求項 5】

癌を有する患者の処置において使用するための、以下を含むキット：

(a) 前記患者からのサンプルが FGF2 陽性であるかどうかを決定するための手段；

(b) 以下からなる群から選択される治療上有効な量の処置：(i) VEGFR-2 モジュレーター；(ii) 二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーター；および (iii) [(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチルエステルまたはその医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物、またはこれらの医薬上許容される塩もしくは水和物もしくは溶媒和物； および

30

(c) 前記キットの使用説明書。

## 【請求項 6】

患者が VEGFR-2 モジュレーターの投与を含む癌の処置に対して治療的に応答する可能性を予測する方法であって、以下の工程を含む方法：

(a) 前記患者からのサンプルにおける FGF2 のレベルを測定する工程； および

(b) 前記サンプルにおける FGF2 のレベルを標準と比較する工程、

ここで、前記サンプルにおける、前記標準と比較して上昇した FGF2 の発現レベルは、患者が前記癌の処置に対して治療的に応答する可能性の増大を示し、他方、前記サンプルにおける、前記標準と比較して減少したまたは低い FGF2 のレベルは、患者が前記癌の処置に対して治療的に応答する可能性の減少を示す。

40

## 【請求項 7】

以下の工程を含む、癌を有する患者を処置するための方法：

(a) 前記患者からのサンプルにおける FGF2 のレベルを測定する工程； および

(b) 前記サンプルにおける FGF2 のレベルを標準と比較する工程、

ここで、前記サンプルにおける、前記標準と比較して上昇した FGF2 の発現レベルは、

50

前記患者が治療上許容される量の VEGFR-2 モジュレーターを含む癌の処置を施されるべきことを示す。

【請求項 8】

癌を有する患者の処置において使用するための、以下を含むキット：

(a) 前記患者からのサンプルが前記サンプルにおいて、標準と比較して上昇した FGF2 の発現レベルを有するかどうかを決定するための手段；

(b) 以下からなる群から選択される治療上有効な量の処置：(i) VEGFR-2 モジュレーター；(ii) 二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーター；および (iii) [(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチルエステルまたはその医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物、またはこれらの医薬上許容される塩または水和物または溶媒和物；および

(c) 前記キットの使用説明書。

【請求項 9】

以下の工程を含む、癌に罹患している患者が VEGFR-2 モジュレーターの投与を含む有効な量の癌の処置を受けたかどうかを決定する方法：

(a) 前記患者からのサンプルにおける IV型コラーゲンのレベルを測定する工程；および

(b) 前記サンプルにおける IV型コラーゲンのレベルを標準と比較する工程、

ここで、前記サンプルにおける、前記標準と比較して減少した IV型コラーゲンのレベルは、患者が治療上有効な量の前記癌の処置を受けている可能性の増大を示し、他方、前記サンプルにおける、前記標準と比較して増大したまたは変化しない IV型コラーゲンのレベルは、前記患者が治療上有効な量の前記癌の処置を受けた可能性の減少を示す。

【請求項 10】

前記癌の処置が、二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターを含む、請求項 4、6、7 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記癌の処置が、[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチルエステルまたはその医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物の投与を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記測定が、以下からなる群から選択される方法を用いて行われる、請求項 1、4、6、7 または 9 に記載の方法：(a) PCR；(b) RT-PCR；(c) FISH；(d) IHC；(e) 免疫検出方法；(f) ウェスタンブロット；(g) ELISA；(h) ラジオイムノアッセイ；(i) 免疫沈降；(j) PET イメージング；(k) HPLC；(l) 表面プラズモン共鳴；(m) 光学的分光法；および (i) 質量分析。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、35 U.S.C. 119(e) に基づき、2007年4月13日出願の米国仮出願第60/911、547号の利益を主張する。該関連出願の教示事項全体が、引用により本明細書に取り込まれる。

【0002】

本発明の分野

本発明は一般的に、薬理ゲノム学の分野に関し、より具体的には、患者において応答をモニターしまたは感受性を決定して、疾患および障害の処置の助けとなる個人に合わせた(individualized)遺伝的プロファイルの同定を可能にするために用いられる方法および手順に関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

## 【0003】

## 本発明の背景

癌は、広範な臨床組織学的(histoclinical)不均一性を有する疾患である。従来の組織学および臨床的特徴は予後と相関しているが、見かけ上同じ(same apparent)腫瘍の予後タイプは、治療に対する応答性およびその結果としての患者の生存において幅広く異なる。

## 【0004】

診療所において、処置、例えば低分子薬または生体分子薬に対する患者の応答を正確に予測するため、各々の患者への治療の個別化を促進する新しい予後および予測的マーカーが必要とされている。この問題は、処置に対する患者の感受性をより良く予測できる新しいパラメーターを同定することによって解決し得る。患者サンプルを分類することは、癌の診断および処置の重大な側面である。処置に対する患者の応答と分子マーカーおよび遺伝的マーカーとの関連は、非応答性の患者における処置の発展のための新たな機会を切り開くことができ、または、有効性における高い信頼性のため、他の処置の選択肢の中から処置の適応(indication)を見分けることができる。さらに、医薬、薬剤または組み合わせ治療に対して良好に応答しやすい患者を前もって選択すること(pre-selection)により、臨床研究において必要とされる患者の数を減少させることができ、または臨床開発プログラムを完了させるために必要な時間を加速することができる(M. Cockett et al., *Current Opinion in Biotechnology*, 11:602-609 (2000))。

10

## 【0005】

薬剤応答は、標的細胞に内在する特性のみならず宿主の代謝特性をも反映するため、どの患者が抗血管新生治療(例えば VEGFR-2 モジュレーター)に応答しているのが決定する能力または患者における薬剤感受性を予測する能力は、特に挑戦的である。薬剤応答を予測またはモニターするために遺伝情報を用いる試みは、主として、広い効果を有する個別の遺伝子、例えば多剤耐性遺伝子 *mdr1* および *mrp1* に焦点を合わせてきた(P. Sonneveld, *J. Intern. Med.*, 247:521-534 (2000))。

20

## 【0006】

遺伝子の mRNA 発現パターンの大規模な特性決定のためのマイクロアレイ技術の発展は、分子マーカーを体系的に探索すること、および癌を伝統的な組織病理学的方法によっては明らかでない別々のサブグループに分類することを可能にした(J. Khan et al., *Cancer Res.*, 58:5009-5013 (1998); A.A. Alizadeh et al., *Nature*, 403:503-511 (2000); M. Bittner et al., *Nature*, 406:536-540 (2000); J. Khan et al., *Nature Medicine*, 7(6):673-679 (2001); および T.R. Golub et al., *Science*, 286:531-537 (1999); U. Alion et al., *P.N.A.S. USA*, 96:6745-6750 (1999))。かかる技術および分子ツールは、あらゆる所与の時点における細胞集団内の多数の転写産物の発現レベルをモニターすることを可能にした(例えば、Schena et al., *Science*, 270:467-470 (1995); Lockhart et al., *Nature Biotechnology*, 14:1675-1680 (1996); Blanchard et al., *Nature Biotechnology*, 14:1649 (1996); Ashby らの米国特許第5,569,588号を参照されたい)。

30

## 【0007】

近年の研究は、ヒトの腫瘍のマイクロアレイ解析によって生成された遺伝子発現情報が、臨床転帰を予測できることを示している(L.J. van't Veer et al., *Nature*, 415:530-536 (2002); M. Shipp et al., *Nature Medicine*, 8(1):68-74 (2002); G. Glinsky et al., *J. Clin. Invest.*, 113(6):913-923 (2004))。これらの知見は、治療に対する個々の腫瘍の応答をより良く予測およびモニターすることによって、癌の処置が大きく改善されるであろうという希望をもたらす。

40

## 【0008】

PCT 出願 PCT/US2006/034201 は、VEGFR-2 モジュレーターを投与することを含む癌を処置する方法に治療的に応答する哺乳類を同定するのに有用なバイオマーカーを提供する。

## 【0009】

50

患者において薬剤感受性を決定しまたは応答をモニターし、分子レベルでの患者の応答に基づいて疾患および障害を処置するのに必要な個人に合わせた診断法の発展を可能にするための新規かつ代替の方法および手順が必要とされている。

【発明の概要】

【0010】

本発明の概要

本発明はまた、分子レベルで、1以上の二重(dual) VEGFR-2 (血管内皮増殖因子受容体2) / FGFR1 (線維芽細胞増殖因子受容体-1)モジュレーターに対する患者の感受性を決定しまたは応答をモニターするための方法および手順を提供する。本発明はまた、疾患状態、例えば癌の治療を必要としている個体が処置に応答するか否かを、処置の投与の前に決定または予測する方法であって、該処置が1以上の二重 VEGFR-2/FGFR1 モジュレーターの投与を含む方法を提供する。1以上の二重 VEGFR-2/FGFR1 モジュレーターは、低分子、モノクローナル抗体、アンチセンス分子またはこれと等価なもの、RNAi 分子またはこれと等価なもの等のいずれかであり得る。

10

【0011】

本発明は、分子レベルで、1以上の血管内皮増殖因子受容体2 (VEGFR-2) モジュレーターに対する患者の感受性を決定しまたは応答をモニターするための方法および手順を提供する。本発明はまた、疾患状態、例えば癌の治療を必要としている個体が処置に応答するか否かを、処置の投与の前に決定または予測する方法であって、該処置が1以上の VEGFR-2 モジュレーターの投与を含む方法を提供する。1以上の VEGFR-2 モジュレーターは、例えば、1以上の VEGFR-2 特異的リガンド、1以上の低分子 VEGFR-2 阻害剤、または1以上の VEGFR-2 に結合するモノクローナル抗体から選択され得る化合物である。

20

【0012】

本発明は、分子レベルで、1以上の FGFR-1 モジュレーターに対する患者の感受性を決定しまたは応答をモニターするための方法および手順を提供する。本発明はまた、疾患状態、例えば癌の治療を必要としている個体が処置に応答するか否かを、処置の投与の前に決定または予測する方法であって、該処置が1以上の FGFR-1 モジュレーターの投与を含む方法を提供する。1以上の FGFR-1 モジュレーターは、例えば、1以上の FGFR-1 特異的リガンド、1以上の低分子 FGFR-1 阻害剤、または1以上の FGFR-1 に結合するモノクローナル抗体から選択され得る化合物である。

30

【0013】

一つの側面において、本発明は、哺乳類が、モジュレーターを投与することを含む癌を処置する方法に対して治療的に応答する可能性を予測する方法であって、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類において FGF2 のレベルを測定すること；(b) 該哺乳類を、以下からなる群から選択される前記モジュレーターに曝露すること：二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーター、VEGFR-2 モジュレーター、および FGFR-1 モジュレーター；(c) 工程 (b) の曝露の後に、該哺乳類において FGF2 のレベルを測定すること、ここで、工程 (a) において測定された FGF2 のレベルと比較して工程 (c) における FGF2 のレベルが増大することは、該哺乳類が前記癌を処置する方法に対して治療的に応答する可能性の増大を示す。

40

【0014】

別の側面において、バイオマーカーは、FGF2 を1以上のさらなるバイオマーカー、例えば FGF1、VEGFR-2、または IV型コラーゲンと共に含み得る。

【0015】

哺乳類が癌を処置する方法に対して治療的に応答するか否かを示すのに十分なバイオマーカーのレベルの差異は、公知の技術を用いて当業者によって容易に決定され得る。バイオマーカーのレベルの増大または減少は、該差異が治療的に応答する哺乳類を同定するのに十分かどうかを決定することと関連し得る。一つの側面において、哺乳類が処置に対して治療的に応答するかどうかを決定する前に、十分なバイオマーカーのレベルの差異を前もって決定することができる。一つの側面において、バイオマーカーのレベルの差異は、

50

(例えば RT-PCR またはマイクロアレイによって測定される) mRNA レベルの差異であり、例えば発現レベルの少なくとも約 2 倍の差異、少なくとも約 3 倍の差異、もしくは少なくとも約 4 倍の差異、またはそれ以上である。別の側面において、バイオマーカーのレベルの差異は、質量分析法または FISH または IHC によってタンパク質レベルで決定される。別の側面において、バイオマーカーのレベルの差異は、分散分析(Anova analysis)における  $<0.05$  の p 値をいう。さらに別の側面において、差異は ELISA アッセイにおいて決定される。

【0016】

本明細書において用いる場合、治療的に応答するとは、癌の軽減(alleviation)または抑制(abrogation)をいう。これは癌に罹患している個体の平均余命が増大すること、または 1 以上の癌の症候が減少または改善することを意味する。該用語は、癌性の細胞増殖または腫瘍量の減少を含む。哺乳類が治療的に応答するかどうかは、当該技術分野において周知の多くの方法、例えば PET イメージングによって測定することができる。

10

【0017】

哺乳類は、例えばヒト、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ネコ、霊長類、またはサルであり得る。

【0018】

本発明の方法は、例えば、哺乳類において少なくとも 1 つのバイオマーカーのレベルを測定する工程が、哺乳類から生物学的サンプルを取得すること、およびその後該生物学的サンプルにおいて 1 または複数のバイオマーカーのレベルを測定することを含む、インビトロの方法であり得る。生物学的サンプルは、例えば血清、新鮮な全血、末梢血単核球、凍結した全血、新鮮な血漿、凍結した血漿、尿、唾液、皮膚、毛包、骨髄、または腫瘍組織のうちの少なくとも 1 つを含み得る。

20

【0019】

少なくとも 1 つのバイオマーカーのレベルは、例えば、バイオマーカーのタンパク質および/または mRNA 転写産物のレベルであり得る。

【0020】

別の側面において、本発明は、哺乳類がモジュレーターを投与することを含む癌を処置する方法に対して治療的に応答する可能性を予測するための方法であって、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類をモジュレーターに曝露すること；(b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において FGF2 のレベルを測定すること、ここで、前記モジュレーターに曝露されていない哺乳類におけるバイオマーカーのレベルと比較して、工程 (b) において測定された FGF2 のレベルが増大することは、該哺乳類が前記癌を処置する方法に対して治療的に応答する可能性の増大を示し、前記モジュレーターは以下からなる群から選択される：二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーター、VEGFR-2 モジュレーター、および FGFR-1 モジュレーター。

30

【0021】

別の側面において、本発明は、哺乳類において化合物が VEGFR-2 活性を阻害するかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において FGF2 のレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における FGF2 のレベルと比較して、工程 (b) において測定された FGF2 のレベルが異なることは、該化合物が該哺乳類において VEGFR-2 活性を阻害することを示す。

40

【0022】

別の側面において、本発明は、化合物が哺乳類において VEGFR-2 活性を阻害するかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において IV型コラーゲンのレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における IV型コラーゲンのレベルと比較して、工程 (b) において測定された IV型コラーゲンのレベルが異なることは、該化合物が該哺乳類において VEGFR-2 活性を阻害することを示す。

50

## 【 0 0 2 3 】

別の側面において、本発明は、癌に罹患している患者が VEGFR-2 モジュレーターの投与を含む癌の処置の有効な量を受けているかどうかを予測するための、以下の工程を含む方法を提供する：(a) 前記患者からのサンプルにおいて IV型コラーゲンのレベルを測定すること；および (b) 前記サンプルにおける IV型コラーゲンのレベルを標準と比較すること、ここで、前記標準に対して、前記サンプルにおける IV型コラーゲンのレベルが減少することは、該患者が前記癌の処置の治療上有効な量を受けている可能性の増大を示し、一方で、前記標準に対して、前記サンプルにおける IV型コラーゲンのレベルが増大することまたは変化しないことは、前記患者が前記癌の処置の治療上有効な量を受けている可能性の減少を示す。前記癌の処置は、例えば VEGFR-2 モジュレーターの投与または二重 VEGFR-2/FGF モジュレーターの投与を含み得る、本明細書において概説される処置のいずれであってもよい。前記患者が前記癌の処置の有効な量を受けていないと予測される場合には、単独でまたは別の処置の投与と組み合わせ、前記処置のより高い用量またはより高い投与頻度が正当化され得る。

10

## 【 0 0 2 4 】

さらに別の側面において、本発明は、哺乳類が VEGFR-2 活性を阻害する化合物に曝露されたかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において FGF2 のレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における FGF2 のレベルと比較して、工程 (b) において測定された FGF2 のレベルが異なることは、該哺乳類が VEGFR-2 活性を阻害する化合物に曝露されたことを示す。

20

## 【 0 0 2 5 】

さらに別の側面において、本発明は、哺乳類が VEGFR-2 活性を阻害する化合物に曝露されたかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において IV型コラーゲンのレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における IV型コラーゲンのレベルと比較して、工程 (b) において測定された IV型コラーゲンのレベルが異なることは、該哺乳類が VEGFR-2 活性を阻害する化合物に曝露されたことを示す。

## 【 0 0 2 6 】

別の側面において、本発明は、哺乳類が VEGFR-2 活性を阻害する化合物に対して応答しているかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において FGF2 のレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における FGF2 のレベルと比較して、工程 (b) において測定された FGF2 のレベルが異なることは、該哺乳類が VEGFR-2 活性を阻害する化合物に対して応答していることを示す。

30

## 【 0 0 2 7 】

別の側面において、本発明は、哺乳類が VEGFR-2 活性を阻害する化合物に対して応答しているかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において IV型コラーゲンのレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における IV型コラーゲンのレベルと比較して、工程 (b) において測定された IV型コラーゲンのレベルが異なることは、該哺乳類が VEGFR-2 活性を阻害する化合物に反応していることを示す。

40

## 【 0 0 2 8 】

別の側面において、本発明は、哺乳類において化合物が FGFR-1 活性を阻害するかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において FGF2 のレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における FGF2 のレベルと比較して、工程 (b) において測定された FGF2 のレベルが異なることは、該哺乳類において該化合物が FGFR-1 活性を阻害することを示す。

50

## 【0029】

別の側面において、本発明は、哺乳類において化合物が FGFR-1 活性を阻害するかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において IV型コラーゲンのレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における IV型コラーゲンのレベルと比較して、工程 (b) において測定された IV型コラーゲンのレベルが異なることは、該哺乳類において該化合物が FGFR-1 活性を阻害することを示す。

## 【0030】

さらに別の側面において、本発明は、哺乳類が FGFR-1 活性を阻害する化合物に曝露されたかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において FGF2 のレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における FGF2 のレベルと比較して、工程 (b) において測定された FGF2 のレベルが異なることは、該哺乳類が FGFR-1 活性を阻害する化合物に曝露されたことを示す。

10

## 【0031】

さらに別の側面において、本発明は、哺乳類が FGFR-1 活性を阻害する化合物に曝露されたかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において IV型コラーゲンのレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における IV型コラーゲンのレベルと比較して、工程 (b) において測定された IV型コラーゲンのレベルが異なることは、該哺乳類が FGFR-1 活性を阻害する化合物に曝露されたことを示す。

20

## 【0032】

別の側面において、本発明は、哺乳類が FGFR-1 活性を阻害する化合物に対して応答しているかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において FGF2 のレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における FGF2 のレベルと比較して、工程 (b) において測定された FGF2 のレベルが異なることは、該哺乳類が FGFR-1 活性を阻害する化合物に対して応答していることを示す。

## 【0033】

別の側面において、本発明は、哺乳類が FGFR-1 活性を阻害する化合物に対して応答しているかどうかを決定するための、以下を含む方法を提供する：(a) 哺乳類を化合物に曝露すること；および (b) 工程 (a) の曝露の後に、該哺乳類において IV型コラーゲンのレベルを測定すること、ここで、前記化合物に曝露されていない哺乳類における IV型コラーゲンのレベルと比較して、工程 (b) において測定された IV型コラーゲンのレベルが異なることは、該哺乳類が FGFR-1 活性を阻害する化合物に対して応答していることを示す。

30

## 【0034】

本明細書において用いる場合、“応答”は、哺乳類における、生物学的および細胞性の応答による応答、ならびに臨床応答(例えば、症候、治療効果または有害事象の改善)を包含する。

40

## 【0035】

本発明はまた、単離された FGF2 バイオマーカー、単離された FGF1 バイオマーカー、単離された VEGFR-2 バイオマーカー、および単離された IV型コラーゲン バイオマーカーを提供する。本発明のバイオマーカーは、完全長の FGF2、FGF1、VEGFR-2 および IV型コラーゲンのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列、ならびにそれらの断片および変異体を含む。

## 【0036】

本発明はまた、本発明の2以上のバイオマーカーを含むバイオマーカー セットを提供する。

## 【0037】

50

本発明はまた、患者が1以上の VEGFR-2 モジュレーター、1以上の FGFR-1 モジュレーターまたは1以上の二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターを含む処置に対して感受性であるか抵抗性であるかを決定または予測するためのキットを提供する。患者は、癌または腫瘍、例えば結腸の癌または腫瘍を有し得る。

【0038】

一つの側面において、キットは、患者の組織検体または患者サンプルからの細胞を試験する際に使用するための1以上の特定の(specialized)本発明のマイクロアレイ、1以上の VEGFR-2 モジュレーター、1以上の FGFR-1 モジュレーターまたは1以上の二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターを含む適切な容器、および使用のための説明書を含む。キットは、バイオマーカー セットの発現を mRNA またはタンパク質のレベルでモニターするための試薬または物質をさらに含み得る。

10

【0039】

別の側面において、本発明は、2以上のバイオマーカーを含むキットを提供する。

【0040】

さらに別の側面において、本発明は、FGF2、FGF1、VEGFR-2 および IV型コラーゲンから選択されるバイオマーカーの少なくとも1つの存在を検出するための抗体および核酸のうち少なくとも1つを含むキットを提供する。一つの側面において、キットは、VEGFR-2 活性、FGFR-1 活性、または VEGFR-2/FGFR-1 双方の活性を阻害する化合物を投与することを含む癌を処置する方法に対して哺乳類が治療的に応答するか否かを決定するための説明書をさらに含む。

20

【0041】

本発明はまた、患者が1以上の VEGFR-2 モジュレーター、1以上の FGFR-1 モジュレーターまたは1以上の二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターでの処置に対して感受性であるか抵抗性であるかを決定するためのスクリーニングアッセイを提供する。

【0042】

本発明はまた、疾患を有する患者の処置をモニターする方法であって、前記疾患が1以上の VEGFR-2 モジュレーター、1以上の FGFR-1 モジュレーターまたは1以上の二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターを投与することを含む方法によって処置される方法を提供する。

【0043】

本発明はまた、分子レベルでの患者の応答に基づいて疾患および障害を処置するのに必要な個人に合わせた遺伝的プロファイルを提供する。

30

【0044】

本発明はまた、1以上の VEGFR-2 モジュレーター、1以上の FGFR-1 モジュレーターまたは1以上の二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターに対する感受性または抵抗性のいずれかと関連する発現プロファイルを有する1以上のバイオマーカーを含む、特定の(specialized)マイクロアレイ、例えばオリゴヌクレオチド マイクロアレイまたは cDNA マイクロアレイを提供する。

【0045】

本発明はまた、本発明の1以上のバイオマーカーに対して向けられた、ポリクローナルまたはモノクローナルを含む抗体を提供する。

40

【0046】

本発明は、添付の図と関連して考慮すれば、本発明の詳細な説明を読むことでより良く理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0047】

図の簡単な説明

本特許出願は、少なくとも1つのカラーで作成された図を含む。カラーの図を有する本特許出願の写しは、請求および必要な料金の支払いによって、特許商標局により提供される。

50

【図 1】図 1 (図 1A-1C) は、IV型コラーゲンの IHC の結果を示す。

【図 2】図 2 (図 2A-2B) は、VEGFR-2 の IHC の結果を示す。

【図 3】図 3 (図 3A-3C) は、FGF1 の IHC の結果を示す。

【図 4】図 4 (図 4A-4D) は、FGF2 の IHC の結果を示す。

【図 5】図 5 は、応答者および非応答者におけるベースラインからの腫瘍パーセンテージの変化対 FGF2 染色についての箱ひげ図を示す。

【図 6】図 6 は、経時的に無増悪生存を示す Kaplan-Meier 曲線を表す。

【図 7】図 7 は、プリバニブが FGF2 増殖因子の遺伝子発現レベルを変調したがベバシズマブは変調しなかったこと、その一方でプリバニブおよびベバシズマブの両方が VEGF の遺伝子発現レベルを変調したことを示す結果を表す。示される結果は、AFFYMETRIX (登録商標) ヒト アレイからのものである。

10

【図 8】図 8 は、インビトロで、スニチニブよりもずっと低い IC50 値で、プリバニブが FGF2 に誘導される腫瘍細胞株の増殖を阻害することを示す結果を表す。

【図 9】図 9 は、プリバニブ感受性およびプリバニブ抵抗性の腫瘍細胞株における、FGFR1、FGF2、VEGFR2 および VEGF の mRNA 発現レベルを表す。

【図 10】図 10 は、増殖を刺激するのに FGF2 を用いる場合、プリバニブが結腸癌細胞の増殖を直接的に阻害することを示す結果を表す。

【図 11】図 11 は、増殖を刺激するのに FGF2 を用いる場合、プリバニブが卵巣癌および膵臓癌細胞株の増殖を直接的に阻害することを示す結果を表す。

【図 12】図 12 は、ベバシズマブおよびスニチニブと比較して、プリバニブは FGF2 で刺激された GEO 腫瘍細胞の増殖を阻害したが、VEGF で刺激された GEO 腫瘍細胞の増殖は阻害しなかったことを示す結果を表す。

20

【図 13】図 13 は、ウエスタンブロットを用いて、FGFR1、VEGFR2、ERK および AKT のリン酸化に対するプリバニブの効果を示す。

【図 14】図 14 は、FGF2 刺激に対する応答における 67 の経路の発現解析を表す。示される通り、FGF 経路だけが有意に誘導された。

【図 15】図 15 は、FGF2 刺激に対する応答における、1 μm のプリバニブまたは 1 μm のスニチニブでの処理後の FGF 経路の発現解析を表す。示される通り、FGF2 に誘導される発現はプリバニブの存在下においてのみ抑制され、スニチニブの存在下では抑制されなかった。

30

【発明を実施するための形態】

【0048】

本発明の詳細な説明

複数の前臨床試験により、VEGF が、その同族の受容体、膜貫通タンパク質チロシンキナーゼの VEGFR ファミリーを介して血管新生過程を駆動する際に果たす重要な役割が明らかにされた。VEGFR-2 シグナル伝達経路は、特に、腫瘍の血管新生の主要な推進力(driver)であることが実験的に支持された。VEGFR-2 シグナル伝達経路は、VEGF のリガンド結合を妨げることによってこのシグナル伝達経路を間接的に阻害する AVASTIN (登録商標) (ベバシズマブ) の認可に基づく癌治療において臨床的に検証された経路である。プリバニブは、VEGFR-2 の強力な阻害、ならびに血管新生経路の根底にあり、FGF 増殖因子によって調節されるタンパク質チロシンキナーゼの別の受容体ファミリーである FGFR-1 および FGFR-2 の阻害を実証した。プリバニブは、複数の重要な血管新生経路(VEGF および FGF)を阻害することによって、GEO 結腸癌モデルにおけるベバシズマブと比較した場合に、腫瘍増殖を阻害する能力に対して増大した影響を有することが示されたと考えられる。

40

【0049】

本バイオマーカー研究は、ベバシズマブと比べてプリバニブがより大きな影響を持つ抗血管新生および抗腫瘍活性を分子レベルで反映するバイオマーカーのセットの同定をもたらした。これらのバイオマーカーが影響される程度は、このインビボの腫瘍モデルにおいて観察される有効性のレベルと強く関連する。これらのバイオマーカーは、癌患者にとって最適な抗血管新生治療を決定する際において重要な臨床的意味を有し得る。

50

## 【 0 0 5 0 】

有効性、薬剤曝露または臨床応答の迅速かつアクセス容易な読み出しを提供するバイオマーカーの同定は、薬剤候補の臨床開発においてますます重要となる。本発明の態様は、分泌タンパク質のレベル、またはバイオマーカーの1つのカテゴリーを代表する血漿バイオマーカーのレベルの変化を測定することを含む。一つの側面において、容易に入手可能な物質源を代表する血漿サンプルは、バイオマーカー解析のための代用組織としての役割を果たす。

## 【 0 0 5 1 】

本発明は、特定のシグナル伝達経路の変調に対して応答し、かつ、VEGFR-2 モジュレーター感受性または抵抗性にも関連するバイオマーカーを提供する。これらのバイオマーカーは、1以上の VEGFR-2 モジュレーターに対する応答を予測およびモニターするために採用することができる。一つの側面において、本発明のバイオマーカーは、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列の両方を含み、FGF2、FGF1、VEGFR-2 および IV型コラーゲンから選択される。別の側面において、本発明のバイオマーカーは、遺伝コードの縮重のため、配列表において提供されるポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列である。

10

## 【 0 0 5 2 】

バイオマーカーは、VEGFR-2 活性または VEGFR-2 シグナル伝達経路に影響を与える VEGFR-2 モジュレーターに対する応答を予測およびモニターするための有用な分子ツールとしての役割を果たす。

20

## 【 0 0 5 3 】

@ @

本明細書において用いる場合、“約”とは、測定可能な値、例えば量、時間的期間(temporal duration)などをいう場合には、開示された方法を実施するのに適する、特定された値から  $\pm 20\%$  または  $\pm 10\%$ 、より好ましくは  $\pm 5\%$ 、よりいっそう好ましくは  $\pm 1\%$ 、さらにいっそう好ましくは  $\pm 0.1\%$  の変動を包含するよう意図される。

## 【 0 0 5 4 】

本明細書において記載されるあらゆる所与のマーカーのレベルを測定する方法は、これらに限定されないが、PCR; RT-PCR; FISH; IHC; 免疫検出法; 免疫沈降; ウエスタンブロット; ELISA; ラジオイムノアッセイ; PET イメージング; HPLC; 表面プラズモン共鳴、および光学的分光法(optical spectroscopy); ならびに質量分析などを含む当該技術分野において周知の方法を用いて実施し得る。

30

## 【 0 0 5 5 】

本発明のバイオマーカーは、当該技術分野において公知のあらゆる免疫特異的(immunoprecipitation)結合方法を用いて定量することができる。用いることができるイムノアッセイは、これらに限定されないが、いくつか例を挙げればウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、“サンドイッチ”イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技術を用いる、競合的および非競合的アッセイ系を含む。かかるアッセイは、当該技術分野において常套かつ周知である(例えば、引用により全体が本明細書に取り込まれている Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York (1994)を参照されたい)。代表的なイムノアッセイを、以下に簡単に説明する(しかし、限定する意図はない)。

40

## 【 0 0 5 6 】

免疫沈降プロトコールは一般的に、溶解バッファー、例えば、タンパク質ホスファターゼおよび/またはプロテアーゼ阻害剤(例えば EDTA、PMSF、アプロチニン、パナジン酸ナトリウム)が補われた RIPA バッファー(1%の NP-40 または Triton X-100、1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1% SDS、0.15 M NaCl、pH 7.2 の 0.01 M リン酸ナトリウム、1% TRASYLOL(登録商標))中において細胞集団を溶解すること、興味のある抗体(すなわ

50

ち、本発明のバイオマーカーに向けられた抗体)を細胞溶解物に添加すること、ある時間の間(例えば 1-4 時間)4 でインキュベートすること、プロテイン A および/またはプロテイン G SEPHAROSE (登録商標) ビーズを該細胞溶解物に添加すること、約 1 時間以上 4 でインキュベートすること、該ビーズを溶解バッファー中で洗浄すること、および該ビーズを SDS/サンプルバッファー中に再懸濁させることを含む。興味のある抗体の、特定の抗原を免疫沈降させる能力は、例えばウエスタンブロット解析によって評価することができる。当業者は、抗原への抗体の結合を増大させ、バックグラウンドを減少させるために改変し得るパラメーター(例えば、細胞溶解物を SEPHAROSE (登録商標) ビーズでブレクリアすること(pre-clearing))については精通しているであろう。免疫沈降プロトコールに関するさらなる議論については、例えば Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.16.1 (1994) を参照されたい。

10

**【0057】**

ウエスタンブロット解析は通常、タンパク質サンプルを調製すること、ポリアクリルアミドゲル中でのタンパク質サンプルの電気泳動(例えば、抗原の分子量に応じて 8%-20% の SDS-PAGE)、タンパク質サンプルをポリアクリルアミドゲルから膜、例えば ニトロセルロース、PVDF またはナイロンへトランスファーすること、ブロッキング溶液(例えば 3% BSA または脱脂乳をとまなう PBS)中で膜をブロッキングすること、洗浄バッファー(例えば、PBS-Tween 20)中で膜を洗浄すること、ブロッキングバッファー中で希釈された一次抗体(興味のある抗体)で膜をブロッキングすること、洗浄バッファー中で膜を洗浄すること、ブロッキングバッファー中で希釈された、酵素材料(例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ)または放射性分子(例えば  $^{32}\text{P}$  または  $^{125}\text{I}$ ) と結合した二次抗体(一次抗体を認識するもの、例えば抗ヒト抗体)で膜をブロッキングすること、洗浄バッファー中で膜を洗浄すること、および抗原の存在を検出することを含む。当業者は、検出されるシグナルを増大させるためおよびバックグラウンドノイズを減少させるために改変し得るパラメーターについては精通しているであろう。ウエスタンブロットプロトコールに関するさらなる議論については、例えば Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.8.1 (1994) を参照されたい。

20

**【0058】**

ELISA は、抗原を調製すること、96 ウェル マイクロタイタープレートのウェルを抗原で被覆すること、検出可能な化合物、例えば酵素材料(例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ)と結合した興味のある抗体をウェルに添加して、ある時間の間インキュベートすること、および抗原の存在を検出することを含む。ELISA において、興味のある抗体は、検出可能な化合物と結合している必要はなく; 代わりに、検出可能な化合物と結合した(興味のある抗体を認識する)二次抗体をウェルに添加してもよい。さらに、ウェルを抗原で被覆する代わりに、抗体をウェルに被覆してもよい。この場合、被覆されたウェルへ興味のある抗原を添加した後に、検出可能な化合物と結合した二次抗体を添加することができる。当業者は、検出されるシグナルを増大させるために改変し得るパラメーターおよび当該技術分野において公知の ELISA の他のバリエーションについては精通しているであろう。ELISA に関するさらなる議論については、例えば Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1 (1994) を参照されたい。

30

40

**【0059】**

あるいは、1 または複数のバイオマーカーポリペプチドの相対量(relative quantitation)の同定は、タンデム質量分析; またはタンデム質量分析と連結した 1 次元もしくは多次元の高速度液体クロマトグラフィーを用いて行うことができる。該方法は、タンデム質量分析と連結した 1 次元もしくは多次元の高速度液体クロマトグラフィーを用いて分離された、同定されたタンパク質の断片の数の増大が、サンプル中に存在するタンパク質のレベルと直接に相関するという事実を考慮する。かかる方法は当業者に周知であり、多数の刊行

50

物、例えば 2-D Proteome Analysis Protocols, A.J. Link, ed., Humana Press (1999), ISBN: 0896035247; Mass Spectrometry of Proteins and Peptides, J.R. Chapman, ed., Humana Press (2000), ISBN: 089603609X に記載されている。

【 0 0 6 0 】

本明細書において用いる場合、“変調”または“変調する”または“モジュレーター”の用語は、サンプル中で検出される、特定の活性の量、質もしくは効果、または DNA、RNA もしくはタンパク質のレベルにおける増大または減少をいう。

【 0 0 6 1 】

VEGFR-2 モジュレーター

本明細書において用いる場合、“VEGFR-2 モジュレーター”の用語は、VEGFR-2 活性または VEGFR-2 シグナル伝達経路を直接的または間接的に変調する生体分子もしくは低分子である、化合物または薬剤を意味するよう意図される。したがって、化合物または薬剤は、本明細書において用いる場合、低分子および生体分子の両方を含むよう意図される。直接的または間接的な変調は、VEGFR-2 活性または VEGFR-2 シグナル伝達経路の活性化または阻害を含む。一つの側面において、阻害は、VEGFR-2 と VEGFR-2 リガンド、例えば VEGF との結合の阻害をいう。別の側面において、阻害は、VEGFR-2 のキナーゼ活性の阻害をいう。

【 0 0 6 2 】

VEGFR-2 モジュレーターは、例えば VEGFR-2 特異的リガンド、低分子 VEGFR-2 阻害剤、および VEGFR-2 モノクローナル抗体を含む。一つの側面において、VEGFR-2 モジュレーターは、VEGFR-2 活性を阻害し、および/または VEGFR-2 シグナル伝達経路を阻害する。別の側面において、VEGFR-2 モジュレーターは、VEGFR-2 活性を阻害し、および/または VEGFR-2 シグナル伝達経路を阻害する VEGFR-2 モノクローナル抗体である。

【 0 0 6 3 】

VEGFR-2 モジュレーターは、生体分子または低分子を含む。

【 0 0 6 4 】

VEGFR-2 モジュレーターはまた、アンチセンスおよび RNAi 分子を含む。

【 0 0 6 5 】

生体分子は、450 より大きい分子量を有する、全ての脂質ならびに単糖、アミノ酸およびヌクレオチドのポリマーを含む。したがって、生体分子は、例えばオリゴ糖および多糖；オリゴペプチド、ポリペプチド、ペプチドおよびタンパク質；ならびにオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、例えば DNA および RNA を含む。

【 0 0 6 6 】

生体分子は、上記の分子のあらゆるものの誘導体をさらに含む。例えば、生体分子の誘導体は、脂質ならびにオリゴペプチド、ポリペプチド、ペプチドおよびタンパク質のグリコシル化誘導体を含む。

【 0 0 6 7 】

生体分子の誘導体は、オリゴ糖および多糖の脂質誘導体、例えばリポ多糖をさらに含む。最も典型的には、生体分子は抗体、または抗体と機能的に等価なもの(functional equivalent)である。抗体と機能的に等価なものは、抗体に匹敵する結合特性を有し、VEGFR-2 を発現する細胞の増殖を阻害する。かかる機能的に等価なものは、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体および一本鎖抗体ならびにこれらの断片を含む。

【 0 0 6 8 】

抗体と機能的に等価なものは、抗体の可変領域または超可変領域のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをも含む。別の配列と実質的に同じであるが、1以上の置換、付加および/または欠失によって他の配列と異なるアミノ酸配列は、等価な配列であると見なされる。好ましくは、配列中のアミノ酸残基数の 50% 未満、より好ましくは 25% 未満、そしてさらに好ましくは 10% 未満が、タンパク質について置換され、タンパク質に付加され、またはタンパク質から欠失させられる。

10

20

30

40

50

## 【0069】

抗体と機能的に等価なものは、好ましくはキメラ抗体またはヒト化抗体である。キメラ抗体は、非ヒト抗体の可変領域およびヒト抗体の定常領域を含む。ヒト化抗体は、非ヒト抗体の超可変領域(CDR)を含む。ヒト化抗体のうち、超可変領域以外の可変領域、例えばフレームワーク可変領域および定常領域は、ヒト抗体のものである。

## 【0070】

適切な非ヒト抗体の可変領域および超可変領域は、モノクローナル抗体が作られるあらゆる非ヒト哺乳類によって生産された抗体から得ることができる。ヒト以外の哺乳類の適切な例は、例えば、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ヤギまたは霊長類を含む。

## 【0071】

機能的に等価なものは、抗体全体と同じかまたはこれに匹敵する結合特性を有する抗体の断片をさらに含む。適切な抗体の断片は、特異的に、かつ十分な親和性で VEGFR-2 チロシンキナーゼに結合してかかる受容体を発現する細胞の増殖を阻害するのに十分な超可変(すなわち、相補性決定)領域の部分を含むあらゆる断片を包含する。

## 【0072】

かかる断片は、例えば、1つもしくは両方の Fab 断片、または F(ab')<sub>2</sub> 断片を含有し得る。好ましくは、抗体断片は、抗体全体の6つ全ての相補性決定領域を含有するが、かかる領域の全てよりも少ない、例えば3つ、4つまたは5つの CDR を含有する機能的な断片も含まれる。

## 【0073】

一つの側面において、断片は、一本鎖抗体または Fv 断片である。一本鎖抗体は、相互接続リンカー(interconnecting linker)を伴うかまたは伴わない、少なくとも軽鎖の可変領域に結合した抗体の重鎖の可変領域を含むポリペプチドである。したがって、Fv 断片は、完全な抗体結合部位を含む。これらの鎖は、細菌または真核細胞において生産し得る。

## 【0074】

抗体および機能的に等価なものは、イムノグロブリンのいかなるクラス、例えば IgG、IgM、IgA、IgD または IgE、およびそれらのサブクラスのメンバーであってもよい。

## 【0075】

一つの側面において、抗体は、IgG1 サブクラスのメンバーである。機能的に等価なものはまた、上記のクラスおよびサブクラスのいずれかの組み合わせと等価なものであってもよい。

## 【0076】

一つの側面において、VEGFR-2 抗体は、CDP-791 (UCB) である。別の側面において、VEGFR-2 抗体は、IMC-1121b (ImClone Systems) である。さらに別の側面において、VEGFR-2 モジュレーターは、AVE-005 (VEGF trap, Regeneron Pharmaceuticals) である。

## 【0077】

上記の生体分子に加えて、本発明において有用な VEGFR-2 モジュレーターは、低分子であってもよい。生体分子ではないあらゆる分子が、本明細書において低分子であるとして考慮される。低分子のいくつかの例は、有機化合物、有機金属化合物、有機および有機金属化合物の塩、糖類、アミノ酸およびヌクレオチドを含む。低分子は、その分子量が 450 を超えないことを除けば生体分子とみなされ得る分子をさらに含む。したがって、低分子は、450 以下の分子量を有する脂質、オリゴ糖、オリゴペプチドおよびオリゴヌクレオチドならびにこれらの誘導体であり得る。

## 【0078】

低分子があらゆる分子量を有し得ることが強調される。それらは、通常 450 未満の分子量を有することから低分子と称されるにすぎない。低分子は、天然に見出される化合物および合成化合物を含む。一つの態様において、VEGFR-2 モジュレーターは、VEGFR-2 を発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する低分子である。別の態様において、VEGFR-2 モジュレーターは、VEGFR-2 を発現する不応性の腫瘍細胞の増殖を阻害する低分子である。

10

20

30

40

50

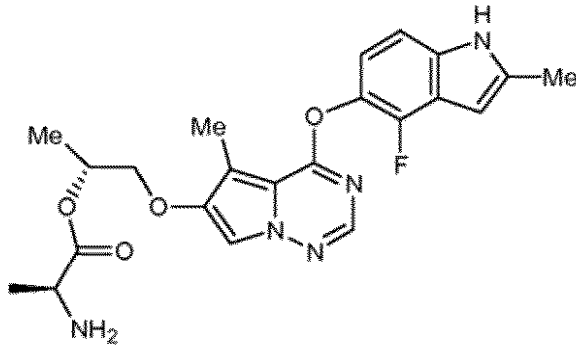
## 【 0 0 7 9 】

多数の低分子が、VEGFR-2 を阻害するのに有用であるとして記載されている。

## 【 0 0 8 0 】

一つの側面において、VEGFR-2 モジュレーターは、プリバニブ、すなわち (化合物 1) の構造を有する [(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール(indol)-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ [2,1-f][1,2,4]トリアジン(triazin)-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルである：

## 【 化 1 】



10

(1)。

20

## 【 0 0 8 1 】

別の側面において、VEGFR-2 モジュレーターは、引用により本明細書に取り込まれている米国特許第6,869,952号に記載される化合物から選択される。さらに別の側面において、VEGFR-2 モジュレーターは、引用により本明細書に取り込まれている PCT 公開公報第W000/71129号またはWO2004/009601号に記載される化合物から選択される。

## 【 0 0 8 2 】

別の側面において、VEGFR-2 モジュレーターは、アンジオセプト(Angiocept) (BMS)、C HIR-258 (Chiron)、AZD-2171 (AstraZeneca、GW786034 (GlaxoSmithKline)、AMG 706 (Amgen)、BIBF 1120 (Boehringer Ingelheim)、AE788 (Novartis)、ZD6474 (AstraZeneca)、BAY 43-9006 (Sorafenib、Bayer)、SU11248 (Sutent、Pfizer)、ラニズマブ (Lucentis)、スニチニブ (Sutent)、アキシチニブ、テムシロリムス、バンデタニブ、SU5416 およびパゾパニブ (GW-786034) から選択される。

30

## 【 0 0 8 3 】

## 二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーター

本明細書において用いる場合、“二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーター”の用語は、FGFR-1 活性または FGF シグナル伝達経路を直接的または間接的に変調することに加えて VEGFR-2 活性または VEGFR シグナル伝達経路を直接的または間接的に変調する生体分子もしくは低分子である、化合物または薬剤を意味するよう意図される。したがって、二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターは、VEGF、VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3 または VEGF 経路内の他のいずれかの VEGF もしくは VEGF 受容体を直接的または間接的に阻害し、FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF5、FGF6、FGF7、FGF8、FGF9、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGFR-1、FGFR-2、FGFR-3 および/または FGFR-4 または FGF 経路内の他のいずれかの FGF もしくは FGF 受容体をも直接的または間接的に阻害し得る、当該技術分野において公知の生体分子もしくは低分子をも包含し得る。したがって、化合物もしくは薬剤は、本明細書において用いる場合、低分子および生体分子の両方を包含するよう意図される。直接的または間接的な変調は、VEGFR-2 活性または VEGFR-2 シグナル伝達経路の活性化または阻害を含む。直接的または間接的な変調は、FGFR-1 活性または FGF シグナル伝達経路の活性化または阻害を含む。一つの側面において、阻害は、VEGFR-2 と VEGFR-2 リガンド、例えば VEGF との結合の阻害をいう。別の側面において、阻害は、VEGFR-2 のキナーゼ活性の阻害を

40

50

いう。同様に、一つの側面において、阻害は、FGFR-1 と FGFR-1 リガンド、例えば FGF との結合の阻害をいう。別の側面において、阻害は、FGFR-1 のキナーゼ活性の阻害をいう。

【0084】

VEGFR-2 モジュレーターは、本明細書において別の場所に記載される。FGFR-1 モジュレーターは、例えば FGFR-1 特異的リガンド、低分子 FGFR-1 阻害剤および FGFR-1 モノクローナル抗体を含む。一つの側面において、FGFR-1 モジュレーターは、FGFR-1 活性を阻害しおよび/または FGFR-1 シグナル伝達経路を阻害する。別の側面において、FGFR-1 モジュレーターは、FGFR-1 活性を阻害しおよび/または FGFR-1 シグナル伝達経路を阻害する FGFR-1 モノクローナル抗体である。

10

【0085】

FGFR-1 モジュレーターは、生体分子または低分子を含む。

【0086】

FGFR-1 モジュレーターはまた、アンチセンスおよび RNAi 分子を含む。

【0087】

生体分子は、450 より大きい分子量を有する、全ての脂質ならびに単糖、アミノ酸およびヌクレオチドのポリマーを含む。したがって、生体分子は、例えば、オリゴ糖および多糖；オリゴペプチド、ポリペプチド、ペプチドおよびタンパク質；ならびにオリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドは、例えば DNA および RNA を含む。

20

【0088】

生体分子は、上記の分子のあらゆるものの誘導体をさらに含む。例えば、生体分子の誘導体は、脂質ならびにオリゴペプチド、ポリペプチド、ペプチドおよびタンパク質のグリコシル化誘導体を含む。

【0089】

生体分子の誘導体は、オリゴ糖および多糖の脂質誘導体、例えばリポ多糖をさらに含む。最も典型的には、生体分子は抗体、または抗体と機能的に等価なものである。抗体と機能的に等価なものは、抗体に匹敵する結合特性を有し、FGFR-1 を発現する細胞の増殖を阻害する。かかる機能的に等価なものは、例えばキメラ抗体、ヒト化抗体および一本鎖抗体ならびにこれらの断片を含む。

30

【0090】

抗体と機能的に等価なものは、抗体の可変領域または超可変領域のアミノ酸配列と実質的に同じアミノ酸配列を有するポリペプチドをも含む。別の配列と実質的に同じであるが、1以上の置換、付加および/または欠失によって他の配列と異なるアミノ酸配列は、等価な配列であるとみなされる。好ましくは、配列中のアミノ酸残基の数の50%未満、より好ましくは25%未満、そしてさらに好ましくは10%未満が、タンパク質について置換され、タンパク質に付加され、またはタンパク質から欠失させられる。

【0091】

抗体と機能的に等価なものは、好ましくはキメラ抗体またはヒト化抗体である。キメラ抗体は、非ヒト抗体の可変領域およびヒト抗体の定常領域を含む。ヒト化抗体は、非ヒト抗体の超可変領域(CDR)を含む。ヒト化抗体のうち、超可変領域以外の可変領域、例えばフレームワーク可変領域および定常領域は、ヒト抗体のものである。

40

【0092】

適切な非ヒト抗体の可変領域および超可変領域は、モノクローナル抗体が作られるあらゆる非ヒト哺乳類によって生産された抗体から得ることができる。ヒト以外の哺乳類の適切な例は、例えば、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ヤギまたは霊長類を含む。

【0093】

機能的に等価なものは、抗体全体と同じかまたはこれに匹敵する結合特性を有する抗体の断片をさらに含む。抗体の適切な断片は、特異的に、かつ十分な親和性で FGFR-1 チロシンキナーゼに結合してかかる受容体を発現する細胞の増殖を阻害するのに十分な超可変

50

(すなわち、相補性決定)領域の部分を含むあらゆる断片を包含する。

【0094】

かかる断片は、例えば、1つもしくは両方の Fab 断片、または F(ab')<sub>2</sub> 断片を含有し得る。好ましくは、抗体断片は、抗体全体の6つ全ての相補性決定領域を含有するが、かかる領域の全てよりも少ない、例えば3つ、4つまたは5つの CDR を含有する機能的な断片も含まれる。

【0095】

一つの側面において、断片は、一本鎖抗体または Fv 断片である。一本鎖抗体は、相互接続リンカーを伴うかまたは伴わない、少なくとも軽鎖の可変領域に結合した抗体の重鎖の可変領域を含むポリペプチドである。したがって、Fv 断片は、完全な抗体結合部位を含む。これらの鎖は、細菌または真核細胞において生産し得る。

10

【0096】

抗体および機能的に等価なものは、イムノグロブリンのいかなるクラス、例えば IgG、IgM、IgA、IgD または IgE、およびそれらのサブクラスのメンバーであってもよい。

【0097】

一つの側面において、FGFR-1 抗体は、Beitz et al. (Cancer、76(1):79-85 (1995)) によって開示される抗体である。別の側面において、FGFR-1 抗体は、11A8 (Doukas et al., FASEB Journal、13:1459-1466 (1999)) である。さらに別の側面において、FGFR-2 モジュレーターは、IMC-A1 (Imclone; Sun et al., Am. J. Physiol., Endocrinol Metab., November 28, 2006)) である。

20

【0098】

一つの側面において、抗体は、IgG1 サブクラスのメンバーである。機能的に等価なものはまた、上記のクラスおよびサブクラスのいずれかの組み合わせと等価なものであってもよい。

【0099】

上述の生体分子に加えて、本発明において有用な FGFR-1 モジュレーターは、低分子であってもよい。生体分子でないあらゆる分子が、本発明において低分子であるとして考慮される。低分子のいくつかの例は、有機化合物、有機金属化合物、有機および有機金属化合物の塩、糖類、アミノ酸およびヌクレオチドを含む。低分子は、その分子量が 450 を超えないことを除けば生体分子とみなされ得る分子をさらに含む。したがって、低分子は、450 以下の分子量を有する脂質、オリゴ糖、オリゴペプチドおよびオリゴヌクレオチドならびにこれらの誘導体であり得る。

30

【0100】

低分子があらゆる分子量を有し得ることが強調される。それらは、通常 450 未満の分子量を有することから低分子と称されるにすぎない。低分子は、天然に見出される化合物および合成化合物を含む。一つの態様において、FGFR-1 モジュレーターは、FGF を発現する腫瘍細胞の増殖を阻害する低分子である。別の態様において、FGFR-1 モジュレーターは、FGFR-1 を発現する不応性の腫瘍細胞の増殖を阻害する低分子である。

【0101】

多数の低分子が、FGFR-1 および VEGFR-2 の両方を阻害するのに有用であるとして記載されている。かかる FGFR-1 および VEGFR-2 の二重阻害剤の非限定的な例は、例えば、化合物 1 (プリバニブ); 可溶性 7-置換 3-(3,5-ジメトキシフェニル)-1,6-ナフチリジン-2-アミンおよび関連のウレア類(related ureas); 1-t-ブチル-3-(6-(3,5-ジメトキシフェニル)-2-(4-ジエチルアミノブチルアミノ)-ピリド[2,3-d]ピリミジン-7-イル)尿素 (PD 173074); 置換 3-[(4,5,6,7-テトラヒドロ-1H-インドール(indol)-2-イル)メチレン]-1,3-ジヒドロインドール(indol)-2-オン (Sun et al., J. Med. Chem., 43:2655-2663 (2000)) を含む。

40

【0102】

バイオマーカーおよびバイオマーカーセット

本発明は、VEGFR-2 または VEGFR-2 経路を介するシグナル伝達が重要である疾患領域

50

、例えば癌または腫瘍において、免疫学的な障害、症状または機能不全において、または細胞シグナル伝達および/または細胞増殖制御が異常(abnormal)または異所的(aberrant)である疾患状態において、診断的および予後的価値の両方を有する個別のバイオマーカーおよびバイオマーカーセットを包含する。バイオマーカーセットは、1以上の VEGFR-2 モジュレーターに対する抵抗性または感受性と高度に関連する複数のバイオマーカーを含む。

【0103】

本発明のバイオマーカーおよびバイオマーカーセットは、様々な生物学的系においてまたは細胞応答に関して、1以上の VEGFR-2 モジュレーターの見込まれる効果を人が予測しまたは合理的に予言することを可能にする。バイオマーカーおよびバイオマーカーセットは、インビボでの結果を予測するため、被検細胞による VEGFR-2 モジュレーター応答のインビトロアッセイにおいて用いることができる。本発明に従って、本明細書に記載される様々なバイオマーカーおよびバイオマーカーセット、またはこれらのバイオマーカーセットと他のバイオマーカーもしくはマーカーとの組み合わせを、例えば癌を有する患者が1以上の VEGFR-2 モジュレーターでの治療介入に対してどのように応答するかを予測またはモニターするために、用いることができる。

10

【0104】

1以上の VEGFR-2 モジュレーターに細胞を曝露した後の細胞の感受性または抵抗性と関連する細胞の遺伝子発現パターンのバイオマーカーおよびバイオマーカーセットは、VEGFR-2 モジュレーターでの処置の前に1以上の腫瘍サンプルをスクリーニングするための有用な手段を提供する。スクリーニングは、バイオマーカーおよびバイオマーカーセットの発現結果に基づき、腫瘍およびひいては腫瘍を有する患者が VEGFR-2 モジュレーターでの処置に対して応答するか否かに関して、1以上の VEGFR-2 モジュレーターに曝露された腫瘍サンプルの細胞を予測することを可能にする。

20

【0105】

バイオマーカーまたはバイオマーカーセットは、本明細書に記載されるとおり、VEGFR-2 モジュレーターを含む疾患の処置を受けている患者において疾患の処置または治療の進行をモニターするためにも用いることができる。

【0106】

バイオマーカーはまた、疾患の処置のための治療法開発の標的としても役割を果たす。かかる標的は特に、癌、例えば肝細胞癌、結腸直腸癌(CRC)、NSCLC および転移性乳癌の処置に適用できる。

30

【0107】

実際に、これらのバイオマーカーは感受性および抵抗性の細胞において示差的に発現するため、それらの発現パターンは VEGFR-2 モジュレーターでの処置に対する細胞の相対的な固有の(intrinsic)感受性と関連する。したがって、抵抗性の細胞において高度に発現するバイオマーカーは、VEGFR-2 モジュレーター、特に VEGFR-2 阻害剤に対して抵抗性の腫瘍に対する新たな治療法開発の標的として役割を果たし得る。バイオマーカータンパク質および/または mRNA のレベルは、当業者に周知の方法を用いて決定することができる。例えば、タンパク質の定量化は、方法、例えば ELISA、2次元 SDS PAGE、ウエスタンブロット、免疫沈降、免疫組織化学、蛍光活性化細胞分取(FACS) またはフローサイトメトリーを用いて行うことができる。mRNA の定量化は、方法、例えば PCR、アレイ ハイブリダイゼーション、ノーザンブロット、in-situ ハイブリダイゼーション、ドットブロット、TAQMAN (登録商標) または RNase プロテクションアッセイを用いて行うことができる。

40

【0108】

マイクロアレイ

本発明はまた、1以上の VEGFR-2 モジュレーターに対する感受性または抵抗性のいずれかに関連する発現プロファイルを示す1以上のバイオマーカーを含む、特定の(specialized)マイクロアレイ、例えばオリゴヌクレオチド マイクロアレイまたは cDNA マイクロ

50

アレイを包含する。かかるマイクロアレイは、腫瘍生検からの被験細胞におけるバイオマーカーの発現レベルを評価し、これらの被験細胞が VEGFR-2 モジュレーターに対して抵抗性でありそうか感受性でありそうかを決定するためのインビトロ アッセイにおいて採用することができる。例えば、特殊化されたマイクロアレイは、本明細書に記載される全てのバイオマーカーまたはそのサブセットを用いて調製することができる。組織または器官の生検からの細胞を単離して 1 以上の VEGFR-2 モジュレーターに曝露することができる。一つの側面において、未処理の細胞および処理された細胞の両方から単離された核酸を 1 以上の特殊化されたマイクロアレイにアプライした後、被験細胞の遺伝子発現のパターンを決定し、マイクロアレイ上のバイオマーカーセットを作成するのに用いた細胞の対照パネル(control panel)からのバイオマーカーパターンと比較することができる。試験を受けた細胞からの遺伝子発現パターンの結果に基づいて、細胞が抵抗性または感受性の遺伝子発現プロファイルを示すかどうかを決定することができる。次いで、組織または器官の生検からの試験された細胞が 1 以上の VEGFR-2 モジュレーターに対して応答するかどうか、ならびに処置または治療の方向を、特殊化されたマイクロアレイ解析の結果から収集された情報に基づいて決定または評価することができる。

10

20

30

40

50

#### 【0109】

##### 抗体

本発明はまた、1 以上のポリペプチド バイオマーカーに対して向けられたポリクローナルまたはモノクローナルを含む抗体を包含する。かかる抗体は、インビトロおよびインビボ両方の診断、検出、スクリーニングおよび/または治療方法を含む様々な方法で、例えば、本発明のバイオマーカーを精製するため、検出するため、および標的とするために用いることができる。

#### 【0110】

##### キット

本発明はまた、患者が 1 以上の VEGFR-2 モジュレーターを含む処置に対して感受性であるか抵抗性であるかを決定または予測するためのキットを包含する。患者は、癌または腫瘍、例えば乳癌または乳房の腫瘍を有し得る。かかるキットは、患者の腫瘍または癌の生検サンプルを試験する際に使用するための臨床条件(clinical setting)において、例えば、患者の腫瘍または癌が VEGFR-2 モジュレーターでの所与の処置または治療に対して抵抗性であるか感受性であるかを決定または予測するのに有用である。キットは、以下を含む適切な容器を包含する：VEGFR-2 モジュレーター、特に VEGFR-2 阻害剤に対する抵抗性および感受性と関連するバイオマーカーを含む 1 以上のマイクロアレイ、例えばオリゴヌクレオチド マイクロアレイまたは cDNA マイクロアレイ；患者の組織検体または患者サンプルからの細胞を試験する際に用いるための 1 以上の VEGFR-2 モジュレーター；および使用説明書。加えて、本発明によって考慮されるキットは、本明細書においてさらに記載される通り、例えば、当該技術分野において実行される他の技術および系、例えば、本明細書に記載される 1 以上のバイオマーカーに基づいて設計されたプライマーを採用する RT-PCR アッセイ、イムノアッセイ、例えば酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、イムノブロットング、例えばウエスタンブロット、または in situ ハイブリダイゼーションなどを用いて、本発明のバイオマーカーの発現を mRNA またはタンパク質のレベルでモニターするための試薬または材料をさらに包含し得る。

#### 【0111】

##### バイオマーカーおよびバイオマーカーセットの応用

バイオマーカーおよびバイオマーカーセットは、様々な応用において用いることができる。バイオマーカーセットは、様々な生物学的系においてあらゆる VEGFR-2 モジュレーターの期待される効果について予測するために構築することができる。本明細書において記載される様々なバイオマーカーおよびバイオマーカーセットは、例えば、疾患管理における診断上のまたは予後の指標として、癌を有する患者が VEGFR-2 を変調する化合物での治療介入に対してどのように応答するか予測するため、および患者が VEGFR-2 調節経路全体を介してシグナル伝達を変調する治療介入に対してどのように応答するかを予測す

るために用いることができる。

【0112】

本明細書に記載されるデータは、癌治療に関して潜在的な有用性を有する化合物をスクリーニングおよび同定するために通常用いられる細胞株において得られたものであるが、バイオマーカーは、VEGFR-2 または VEGFR-2 経路を介するシグナル伝達が重要である他の疾患領域、例えば免疫学において、または細胞のシグナル伝達および/または増殖の制御が消失した癌もしくは腫瘍において、診断的および予後的価値の両方を有する。

【0113】

本発明に従って、患者の組織サンプル、例えば腫瘍または癌の生検からの細胞を、1以上の VEGFR-2 モジュレーターでの処置の前に1以上のバイオマーカーの発現パターンを決定するためにアッセイすることができる。処置の成功または失敗は、被験組織、例えば腫瘍または癌の生検からの細胞(被験細胞)のバイオマーカーの発現パターンに基づいて、1以上のバイオマーカーの対照セット(control set)の発現パターンと比較的類似するかまたは異なるかで決定することができる。したがって、被験細胞が、VEGFR-2 モジュレーターに対して感受性である細胞の対照パネル(control panel)におけるバイオマーカーの発現プロファイルと合致するバイオマーカーの発現プロファイルを示す場合、個体の癌または腫瘍が VEGFR-2 モジュレーターでの処置に対して好ましく応答する可能性が高いかまたは好ましく応答すると予測される。対照的に、被験細胞が、VEGFR-2 モジュレーターに対して抵抗性である細胞の対照パネル(control panel)のバイオマーカー発現パターンと合致するバイオマーカー発現パターンを示す場合、個体の癌または腫瘍が VEGFR-2 モジュレーターでの処置に対して応答しない可能性が高いかまたは応答しないと予測される。

10

20

【0114】

本発明はまた、1以上の VEGFR-2 モジュレーターによって処置できる疾患を有する患者の処置をモニターする方法を提供する。患者の組織サンプル、例えば腫瘍の生検または血液サンプルから単離された被験細胞を、VEGFR-2 モジュレーターへの曝露の前および後に1以上のバイオマーカーの発現パターンを決定するためにアッセイすることができ、ここで、VEGFR-2 モジュレーターは好ましくは VEGFR-2 阻害剤である。処置の前および後において得られる被験細胞のバイオマーカーの発現プロファイルを、VEGFR-2 モジュレーターに対して抵抗性または感受性のいずれかである細胞の対照パネルにおいて高発現すると本明細書に記載されおよび示される1以上のバイオマーカーの発現プロファイルと比較する。したがって、1以上のバイオマーカーの発現プロファイルの相関に基づいて、患者の応答が VEGFR-2 モジュレーターによる処置に対して感受性である場合、患者の処置の予後は良好であると認めることができ、処置を継続することができる。また、VEGFR-2 モジュレーターでの処置の後において、被験細胞が、VEGFR-2 モジュレーターに対して感受性である細胞の対照パネルと合致するバイオマーカー発現プロファイルの変化を示さない場合、それは現在の処置を修正、変更または中止すべき指標として役に立ち得る。このモニター過程は、VEGFR-2 モジュレーターでの患者の処置の成功または失敗を指し示すことができ、かかるモニター過程は、必要または所望に応じて繰り返すことができる。

30

【0115】

本発明のバイオマーカーは、生物学的システムについて何らかの知識を有するより前に結果を予測するために用いることができる。本質的に、バイオマーカーは統計学的手段であると考えることができる。バイオマーカーは主として、生物学的システムを分類するために用いられる表現型を予測する際に有用である。本発明の一つの態様において、予測の目的は、活性なまたは不活性な VEGFR-2 経路を有するとして癌細胞を分類することである。不活性な VEGFR-2 経路を有する癌細胞は、VEGFR-2 モジュレーターでの処置に対して抵抗性であると考えることができる。

40

【0116】

投与計画

本明細書において記載される場合、組み合わせ治療とは、単独でのまたは別の VEGFR-2

50

モジュレーターと組み合わせた VEGFR-2 モジュレーターの投与、単独でのまたは VEGFR-2 モジュレーターもしくは別の二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターと組み合わせた二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターの投与、これらに限定されないが VEGFR-2 モジュレーターもしくは二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターまたはこれらの医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物を含む本明細書に記載される第 2 の治療を伴う [(1R), 2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ [2,1-f][1,2,4] トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはその医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物の投与をいう。かかる投与は、[(1R), 2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ [2,1-f][1,2,4] トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはその塩、水和物もしくは溶媒和物の投与に関して、第 2 の治療と並行した(すなわち同時の)、第 2 の治療より前の、または第 2 の治療の後の投与を包含し得る。

10

## 【0117】

処置計画は、例えば、本明細書に記載されるバイオマーカーを用いて予測される治療に対する患者の応答を基礎とすることができる。例えば、本発明は、当該技術分野において公知の方法を用いて、癌または関連する障害に罹患している可能性があるかまたは罹患している個体からの細胞の FGF2 および/または IV型コラーゲンのレベルを測定することを包含する。例えば、患者からのサンプルが FGF2(+)であると決定される場合、または患者のサンプルが標準に対して上昇した FGF2 発現レベルを示す場合、VEGFR-2 モジュレーターもしくは二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターまたはそれらの医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物の投与、または [(1R), 2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ [2,1-f][1,2,4] トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはその塩、水和物もしくは溶媒和物の投与は、正当化され得る。

20

## 【0118】

サンプルが FGF2(-)であるかまたは低いレベルのもしくは陽性に応答する FGF2 参照サンプルと比較して低いレベルの FGF2 を有すると決定される患者については、組み合わせ治療の投与が正当化され得、または以下のいずれか一つの投与量の増加もしくは投与頻度の増大が正当化され得る：VEGFR-2 モジュレーターもしくは二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターまたはそれらの医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物、または単独でのまたは本明細書に記載される別の化合物と組み合わせた [(1R), 2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ [2,1-f][1,2,4] トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはその塩、水和物もしくは溶媒和物の投与。さらなる処置計画もまた本発明によって考慮され、本明細書または当該技術分野において公知の文献において開示される。

30

## 【0119】

IV型コラーゲンのレベルが一定のままであるかまたは少なくとも非応答性の IV型コラーゲンレベルを表すとみなされるレベルにまでは減少しないという理由で、サンプルが VEGFR-2 モジュレーターもしくは二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターまたはそれらの医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物の投与に対して、または [(1R), 2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ [2,1-f][1,2,4] トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはその塩、水和物もしくは溶媒和物の投与に対して応答性でないとして決定される患者については、組み合わせ治療の投与が正当化され得、または以下のいずれか一つの投与量の増加もしくは投与頻度の増大が正当化され得る：VEGFR-2 モジュレーターもしくは二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターまたはそれらの医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物、または単独でのまたは本明細書に記載される別の化合物と組み合わせた [(1R), 2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ [2,1-f][1,2,4] トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはその塩、水和物もしくは溶媒和物の投与。

40

50

## 【0120】

さらなる処置計画もまた本発明によって考慮され、本明細書または当該技術分野において公知の文献において開示される。

## 【0121】

一つの側面において、[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルの増大したレベルは、特定の適応症(indication)に対するまたは個体に対する[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルの典型的な用量よりも約 10、20、30、40、50、60、70、80、90 または 95% 大きくあり得、または、特定の適応症(indication)に対するもしくは個体に対するまたは本明細書に記載される他の治療に対する[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルの典型的な用量よりも約 1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍もしくは 10倍多い [(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルであり得る。同じ増大したレベルは、あらゆる他の VEGFR-2 モジュレーターまたは二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーター治療にも当てはまる。

## 【0122】

治療上有効な量の[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはその医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物は、経口投与することができる。採用される正確な投与量は、患者の要求および処置される症状の重症度に応じて変動し得る。特定の状況について適切な投与量を決定することは、当該技術分野における技能の範囲内である。[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはその医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物(および化合物 I の塩)の有効量は、当業者によって決定され得、1日あたり約 0.05 から約 100 mg/kg体重の[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはその医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物の、成人に対する代表的な投与量を含み、単回投与でまたは個別に分割された用量(individual divided dose)の形態で、例えば1日あたり約 1、2、3、4、5回またはそれ以上の回数、投与することができる。特定の態様において、[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはその医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物は、1日あたり 1、2、3、4、5、6、7 または 8 回、全部で1日あたり約 800 mg まで投与される。あるいは、それは例えば1日に1回約 15mg から 1000mg の間のいずれか、または1日に1回約 15mg、約 60mg、約 180mg、約 320mg、約 800mg もしくは約 1000mg、または1日に2回約 180mg から約 1000mg の間のいずれか、または1日に2回約 400mg で投与することができる。加えて、それは例えば1日あたり約 200mg で 1、2、3、4、5、6、7 または 8 回投与することもできる。いかなる特定の対象に対する特定の用量レベルおよび投与頻度も変動する可能性があり、採用される特定の化合物の活性、代謝安定性およびその化合物の作用の長さ、対象の種、年齢、体重、一般的健康状態、性別および食事、投与の様式および時間、排出の速度、薬剤の組み合わせ、ならびに特定の症状の重症度を含む様々な因子に依存することが理解されるであろう。好ましい処置対象は、タンパク質チロシンキナーゼに関連する障害を受けやすい動物、最も好ましくは哺乳類の種、例えばヒト、および家畜、例えばイヌ、ネコなどを含む。同じ事が、あらゆる他の VEGFR-2 モジュレーターまたは二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレー

ター治療、または本明細書に開示されるあらゆる組み合わせにも当てはまる。

【0123】

癌に罹患している個体の、治療、例えば VEGFR-2 モジュレーター、二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーター、および/または[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルに対する応答性を決定する方法が本明細書において開示される。例えば、患者のサンプルが FGF2(+)であるかどうかに基づき、患者のサンプルが標準のレベルと比べて増大した FGF2 のレベルを示す場合、および/または患者のサンプルが VEGFR-2 モジュレーター、二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターまたは[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルの投与の後に対応する IV型コラーゲンのレベルの減少を示す場合に、個体は特定のキナーゼ阻害剤に対して陽性の応答者であると決定され得る(または前記個体からの細胞が、ある程度の感受性を有すると期待される)。同様に、患者のサンプルが FGF2(-)であるかどうかに基づき、患者のサンプルが標準のレベルと比べて減少した FGF2 のレベルを示す場合、および/または患者のサンプルが VEGFR-2 モジュレーター、二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターまたは[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルの投与の後に対応する IV型コラーゲンのレベルの減少を示さない場合に、個体は特定のキナーゼ阻害剤に対して陰性の応答者であると決定され得る(または前記個体からの細胞が、ある程度の抵抗性を有すると期待される)。したがって、そのサンプル/細胞がかかる非応答性の表現型を示す、癌に罹患している個体は、VEGFR-2 モジュレーター、二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターもしくは[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはそれらの医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物での特定の処置計画に対して陰性の応答者もしくは少なくとも部分的には陰性の応答者であるかまたはそう期待されるが、VEGFR-2 モジュレーター、二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターもしくは[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはそれらの医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物のより積極的な処置計画に対して、または別の VEGFR-2 モジュレーター、二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターもしくは[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルまたはそれらの医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物およびイマチニブまたは他の治療との組み合わせ治療に対して、陽性の応答者であるかまたはそう期待される。

【0124】

処置計画は、1以上の VEGFR-2 モジュレーター、二重 VEGFR-2/FGFR-1 モジュレーターまたは[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステル阻害剤での処置、ならびに他の治療、例えば放射線および/または他の剤(すなわち、組み合わせ治療)を含み得る、癌に罹患している個体に対して施される治療の計画である。1より多くの治療を施す場合、治療は同時にまたは連続的に施すことができる(例えば、1より多くのキナーゼ阻害剤を、一緒に、または異なるスケジュールで異なる時間に投与することができる)。1より多くの治療の投与は、異なる時間(すなわち、連続的)であってもよく、それでも同じ処置計画の部分である。より積極的な治療が正当化される場合には、組み合わせ治療、または N-(2-クロロ-6-メチルフェニル)-2-[[6-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]-2-メチル-4-ピリミジニル]アミノ]-5-チアゾールカルボキサミドまたはその医薬上許容される塩、水和物もしくは溶媒和物のより積極的な用量もしくは投与計画、単独療法としての、または別のキナーゼ阻害剤と組み合わせた、また

10

20

30

40

50

は本明細書に開示される別の物質と組み合わせた、組み合わせでの処置を含む処置計画を確立することができる。さらに、組み合わせは放射線または他の公知の処置と共に投与することができる。かかる他の物質は、アービタックス(ERBITUX) (登録商標) (セツキシマブ)、エポチロン、タキソール(TAXOL) (登録商標)、パクリタキセル(paclitaxol)、イクサベピロン、チュー布林安定化剤(例えばパクリタキセル(pacitaxol)、エポチロン、タキサン等)、ファルネシルトランスフェラーゼ(farnesyl transferase)阻害剤、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、イリノテカン、フォルフィリ(FOLFIRI)、オキサリプラチン、フォルフォックス(FOLFOX)、抗血管新生(anti-angiogenesis)治療などを含み得る。

#### 【0125】

本明細書における本発明の多くの側面を実施するに際し、生物学的サンプルは、多くの源、例えば組織生検(細胞サンプルまたはそれから培養された細胞; 骨髄または固形組織の生検、例えば固形腫瘍からの細胞を含む)、血液、血液細胞(赤血球または白血球)、血清、血漿、リンパ、腹水(ascetic fluid)、嚢胞液、尿、痰、便、唾液、気管支吸引物(bronchial aspirate)、CSF または毛から選択することができる。サンプルからの細胞を用いることができ、または細胞サンプルの溶解物を用いることができる。特定の態様において、生物学的サンプルは組織生検の細胞サンプルまたはそれから培養された細胞、例えば、固形腫瘍から取り除いた細胞または細胞サンプルの溶解物である。特定の態様において、生物学的サンプルは腫瘍サンプルおよび/または血液細胞を含む。

#### 【0126】

本発明を実施するのに有用な、[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルを含む投与計画は、引用により全体が本明細書に取り込まれている Garrett et al., (Journal of Clinical Oncology, 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings, Vol. 25, No 18S (June 20 Supplement) (2007): 14018)に記載されている。

#### 【0127】

本発明における使用のための医薬組成物は、VEGFR-2 の阻害剤、VEGFR-2/FGFR-1 の二重阻害剤または[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルのうちの1つまたは組合せを、意図する目的を達成するのに有効な量で含む組成物を包含し得る。本発明の医薬組成物の有効量を決定することは、当業者の能力の範囲内である。治療上有効な量は、症候または症状を改善する活性成分の量をいう。治療上の有効性および毒性は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順、例えば ED50 (集団の 50% において治療上有効な量) および LD50 (集団の 50% にとって致死量) によって決定することができる。

#### 【0128】

VEGFR-2 の阻害剤もしくは VEGFR-2/FGFR-1 の二重阻害剤の“治療上有効な量”は、観察される IV型コラーゲンレベルの変化に基づく FGF2 の状態および/またはサンプルの応答性の関数であり得る。例えば、処置の投与の後に観察された IV型コラーゲンの変化に基づいて、サンプルが FGF2(+) および応答性であるとみなされる場合、患者についての通常のまたは規定の用量は、該患者を処置するのに十分でありうる。当業者は、応答性および非応答性サンプルの間および/または感受性または抵抗性サンプルの間の感受性の違い、ならびに、処置計画を設計し、それに従って治療上有効な量を決定するためにかかる観察をどのように用いることができるかについて理解するであろう。For 応答性、感受性の患者サンプルについては、[(1R),2S]-2-アミノプロピオン酸 2-[4-(4-フルオロ-2-メチル-1H-インドール-5-イルオキシ)-5-メチルピロロ[2,1-f][1,2,4]トリアジン-6-イルオキシ]-1-メチルエチル エステルの治療上関連のある(therapeutically relevant)用量は、例えば、規定の用量の 0.9倍、0.8倍、0.7倍、0.6倍、0.5倍、0.4倍、0.3倍、0.2倍、0.1倍、0.09倍、0.08倍、0.07倍、0.06倍、0.05倍、0.04倍、0.03倍、0.02倍、または 0.01倍でありうる。

## 【 0 1 2 9 】

以下の、本発明を実行するための特定の側面の代表的な態様は、説明のみを目的として提供するものであり、決して本発明の範囲を制限する意図はない。

## 【 0 1 3 0 】

## 参考文献

1. J. Fagnoli et al., Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 46:Abstract #3033 (2005).
2. M. Ayers et al., Proc. Amer. Assoc. Cancer Res., 48:Abstract #1618 (2007).
3. D.J. Jonker et al., 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I, Vol. 25, No. 18S (June 20 Supplement): Abstract # 3559 (2007). 10
4. K. Suzuki et al., Int. J. Urol., 12:152 (2005).
5. S. Javerzat et al., Trends Mol. Med., 8:483 (2002).
6. Y. Shing et al., Science, 223:1296 (1984).
7. N. Yoshimura et al., Clin. Immunol. Immunopathol., 89:28 (1998).
8. L.A. Chandler et al., Int. J. Cancer, 81:451 (1999).
9. J.A. Takahashi et al., J. Neurosurg., 76:792 (1992).
10. R.A. Lindner et al., J. Clin. Invest., 85:2004 (1990).
11. H. Miyake et al., Cancer Res., 56:2440 (1996).
12. I. el-Hariry et al., J. Pathol., 181:39 (1997).
13. T. Ohta et al., Br. J. Cancer, 72:824 (1995). 20
14. T. Ueba et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91:9009 (1994).
15. Y. Yamanaka et al., Cancer Res., 53:5289 (1993).
16. M. Ayers et al., Cancer Res., 67:6899 (2007).
17. N. Hiraoka et al., Cell, 95:365 (1998).
18. L.A. Liotta et al., Cell, 64:327 (1991).
19. L. Smith, et al., Cancer, 107:232 (2006).
20. H. Hung et al., (abstract), American Association for Cancer Research Annual Meeting: Proceedings, Apr. 14-18, 2007; Los Angeles, CA, Philadelphia, PA: AACR, Abstract nr 99 (2007).
21. D.J. Jonker et al., 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I, Vol. 25, No. 18S (June 20 Supplement): Abstract # 3559 (2007). 30
22. M.J. Piccart-Gebhart et al., N. Eng. J. Med., 353:1659 (2006).
23. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Lancet, 351:1451 (1998).

## 【 実施例 】

## 【 0 1 3 1 】

## 実施例

## 実施例 1 - バイオマーカーの同定

## 実験の手順

免疫組織化学(IHC)アッセイを、以下の方法を用いて最適化した。陽性対照の組織または細胞株を同定し、ホルマリン固定し、パラフィン包埋した。興味のあるマーカーを認識する特異的抗体を、商業的供給源を通して入手し、陽性の組織において試験した。3つの異なる濃度の抗体と、3つの異なる抗原回復(antigen retrieval)方法を用いた。最初の試験の後に最適化された条件が見いだせなかった場合には、抗体の希釈を拡張するかまたは異なる抗体を購入した。以下は、どのように各々の抗体を各々のバイオマーカーについて最適化したかについての説明である。 40

## 【 0 1 3 2 】

## FGF1

第1の試験: FGF1 抗体を、Santa Cruz から入手した(カタログ #sc-1884)。それを、2つの異なる力価(1:100; 1:250)において、3つの抗原回復条件(Citra Plus (BioGenex 50

solution; AR10 Biogenex solution; プロテイナーゼK (PK)) で用いた。第2の試験: FGF1 を、3つの抗原回復条件(Citra Plus; AR10; PK)で1つの力価(1:100; 供給元の推奨による)で Abcam から入手した(#ab18963)。第3の試験: FGF1 抗体を、PK 抗原回復で2つの異なる力価(1:50; 1:75)で Abcam から入手した(abcam#18963)。

【0133】

陽性対照: ヒト結腸腫瘍 PA154777A

スライドを、キシレン中の LEICA (登録商標) ST5020 Multistainer において2回、各5分、脱パラフィンおよび再水和し、その後100%エタノールで2回、95%エタノールで2回、70%エタノールで2回、各3分間リンスした。この後、dH<sub>2</sub>O 中で3回洗浄した。その後、プロテイナーゼK (PK) を用いて、10分間、室温(RT)で抗原回復を行った。試薬を BioGenex i6000 自動染色機にセットした。試薬がその領域だけを覆うよう組織の領域を定義するために、パップペン(pap pen)を用いた。自動染色機を、以下の条件でリサーチモードを用いて稼働させた: Peroxide Block でのブロッキング、10分、RT、その後、2% ヤギ血清でのパワーブロッキング(power Blocking)、30分、RT。次いで、スライドを一次抗体(Ab)またはウサギ IgG と共に RT で1時間インキュベートし、その後 HRP-抗-ウサギと共に30分間 RT でインキュベートした。発色基質(chromogen substrate)を添加し(DAB)、それを5分間発現させた。ヘマトキシリン(hematoxyline)で1分、対比染色した。

【0134】

FGF2

第1の試験: FGF2 抗体を、2つの異なる力価(1:100; 1:250)において3つの抗原回復条件(Citra Plus; AR10; PK)で Santa Cruz から入手した(カタログ #sc-1390)。第2の試験: FGF2 抗体を、1つの力価(1:100; 供給元の推奨)において3つの抗原回復条件(Citra Plus; AR10; PK)で Upstate から入手した(カタログ# 05-118)。第3の試験: FGF2 抗体を、2つの異なる力価(1:50-Upstate; 1:50-Santa Cruz)において3つの抗原回復条件(Citra Plus; AR10; PK)で Upstate (05-118) および Santa Cruz (#sc-1390) から入手した。第4の試験: FGF2 抗体を、2つの異なる力価(1:20; 1:40)において3つの抗原回復条件(Citra Plus; AR10; PK)で Abcam から入手した(#ab16828)。

【0135】

VEGFR-2

第1の試験: VEGFR-2 抗体を、2つの異なる力価(1:10; 1:100)において3つの抗原回復条件(Citra Plus; AR10; PK)で R&D Systems から入手した(#AF357)。第2の試験: VEGFR-2 抗体を、1つの力価(1:100; 供給元の推奨)において3つの抗原回復条件(Citra Plus; AR10; PK)で Upstate から入手した(07-158)。第3の試験: VEGFR-2 抗体を、2つの異なる力価(1:200; 1:250)において2つの抗原回復条件(Citra Plus; AR10)で Upstate から入手した(07-158)。第4の試験: VEGFR-2 抗体を、3つの異なる力価(1:75; 1:125; 1:250)において3つの抗原回復条件(Citra Plus; AR10; PK)で Cell Signaling から入手した(#2479)。第5の試験: VEGFR-2 抗体を、2つの異なる力価(1:35; 1:75)において AR10 抗原回復条件で Cell Signaling から入手した(#2479)。

【0136】

IV型コラーゲン

ウサギ ポリクローナル IgG である IV型コラーゲン抗体を、Fitzgerald Industries International から入手した(RDI)(RDI-PRO10760)。本発明者らが用いた抗原回復は、プロテイナーゼK で5分間であった。1:250 希釈で、rt にて1時間のインキュベーションを行った。Dako からの Envision kit を、検出のために用いた。

【0137】

臨床研究 CA 182-002

臨床研究 182-002 は、進行したまたは転移性の固形腫瘍を有する患者におけるプリバニブの安全性、薬物動態および薬力学を決定するための第一相用量漸増試験である。

【0138】

10

20

30

40

50

#### 臨床サンプルにおける免疫組織化学

最適化されたプロトコールを、臨床サンプルについて実施した。サンプルは3つのバッチ(batch)において実行した。各バッチについて、陽性および陰性対照を含めた。臨床試験 CA 182-002 における IHC 染色の結果:

【 0 1 3 9 】

臨床試験 182-002 において 40 の腫瘍サンプルを患者から得た。これらは、治療の前に得られたサンプルである。各患者の1つのスライドを、サンプル中に存在する癌の型および腫瘍の%を決定するための組織学的染色を提供する、ヘマトキシリン(hematoxilin)およびエオシン(H&E)で染色した(表 1 参照)。次いで、H&E スライドをサンプル中に存在する腫瘍の百分率および存在する腫瘍の型について記録する病理学者へ、スライドを送った。患者のサンプルのうち7つが、腫瘍を含んでいないことが判明した(表 1 参照)。

【表 1】

## 患者サンプルの H&amp;E 染色

部位 ID	H&E	% 腫瘍
CA182-002, 0001-00305	良性 卵管	
CA182-002, 0003-00306	平滑筋肉腫(leiomyosarcoma)	50
CA182-002, 0001-00307	腺(aden): ファーター膨大部?	50
CA182-002, 0003-00309	粘液様の領域(arcas)を有する軟部組織	
CA182-002, 0003-00310	肝臓の腺癌	60
CA182-002, 0001-00311	悪性の紡錘細胞腫瘍	80
CA182-002, 0003-00314	明細胞新生物	65
CA182-002, 0003-00315	明らかに悪性というわけではない真皮上層における血管増殖を伴う皮膚	
CA182-002, 0003-00317	明細胞癌	75
CA182-002, 0004-00501	軟部組織における腺癌	60
CA182-002, 0006-00502	軟部組織における腺癌	70
CA182-002, 0004-00503	軟部組織における腺癌	70
CA182-002, 0009-00504	乳頭状腎細胞癌	65
CA182-002, 0003-00505	明細胞癌	90
CA182-002, 0004-00506	壊死性の組織片(debri)における腺癌	30
CA182-002, 0003-00507	動脈(autery)アーティファクト(artifact)を伴う腺癌の断片	
CA182-002, 0006-00509	結腸の腺癌	70
CA182-002, 0004-00510	腺癌の転移を有する肝臓	30
CA182-002, 0006-00514	粘液性の腺癌を有する結腸	70
CA182-002, 0004-00516	浸潤性の腺癌を有する結腸	60
CA182-002, 0006-00517	浸潤性の腺癌を有する結腸	<10
CA182-002, 0008-00301	明細胞新生物	
CA182-002, 0008-00302	壁中に粘液性の腺癌を有する膀胱	60
CA182-002, 0001-00303	腺癌を有する軟部組織	60
CA182-002, 0008-00304	カルチノイド	85
CA182-002, 0008-00308	腺癌	90
CA182-002, 0008-00319	高度に非定型性の腺細胞を有する軟部組織	
CA182-002, 0005-00511	腺癌を有する結腸	50
CA182-002, 0005-00512	腺癌を有する結腸	30
CA182-002, 0007-00513	腺癌を有する結腸	40
CA182-002, 0005-00515	巨細胞を有するリンパ節および肉芽組織を伴う軟部組織。腫瘍細胞の分化なし(No differentiate tumor cells)	

10

20

30

40

H&E 実験に加えて、患者のスライドを、免疫組織化学(IHC)を用いて以下のマーカーについて染色した: FGF1、FGF2、VEGFR-2 および IV型コラーゲン。スライドを、各々のマーカーについて最適化されたプロトコールで染色し(実験手順を参照)、評価のために病理学者へ送った(病理学者は患者の結果に関して盲検とした)。病理学者は、IHC 染色されたスライドを、バイオマーカーについて、各々のバイオマーカーの強度、局在および染色のパーセンテージに関して記録した。行われた点数化は、1 から 3 のスケールを用いる標準的な病理学者の点数化であった。その点数化の結果を表 2 に示し、染色の例およびその点数を図 1 から 4 に示す。

【表 2 - 1】

## CA182-002 からの患者サンプルの IHC 点数化

患者 ID	IV型コラーゲン	VEGFR-2	FGF1	FGF2
CA182-002, 0001-00305	2	0	0	0
CA182-002, 0003-00306	1	0	0	0
CA182-002, 0001-00307	1	0	1	2
CA182-002, 0003-00309	3	0	0	0
CA182-002, 0003-00310	1	0	0	
CA182-002, 0001-00311	腫瘍 2	0	0	0
CA182-002, 0003-00314	2	0	0	2
CA182-002, 0003-00315	2	0	0	0
CA182-002, 0003-00317	1	0	0	0
CA182-002, 0004-00501	3, 3 線維形成	1	0	0
CA182-002, 0006-00502	2	0	1	1
CA182-002, 0004-00503	3	1	0	0
CA182-002, 0009-00504	3	1	3	
CA182-002, 0003-00505	2	2	2	
CA182-002, 0004-00506	3	0	0	0
CA182-002, 0003-00507	2	0	0	2
CA182-002, 0006-00509	2	0	1	1
CA182-002, 0004-00510	2	0	0	2
CA182-002, 0006-00514	1	0	0	0
CA182-002, 0004-00516	3	1	2	3
CA182-002, 0006-00517	3	0	3	1
CA182-002, 0008-00301	3	1	0	2
CA182-002, 0008-00302	3	0	0	1
CA182-002, 0001-00303	2	0	0	0
CA182-002, 0008-00304	3	0	0	0
CA182-002, 0008-00308	3	2	1	1
CA182-002, 0008-00319	3	2	0	1
CA182-002, 0005-00511	3	2	0	2
CA182-002, 0005-00512	3	2	0	2
CA182-002, 0007-00513	3	0	0	3

10

20

30

40

【表 2 - 2】

患者 ID	IV型コラーゲン	VEGFR-2	FGF1	FGF2
CA182-002, 0005-00515	3	2	0	0
CA182-002, 0008-00521	0	0	0	40% 2+ 細胞質
CA182-002, 0002-00532	0	0	0	0
CA182-002, 0002-00535	0	0	<5% 1+ 細胞質	90% 2+ 細胞質
CA182-002, 0004-00508	0	<2% 1+ 細胞質	<2% 1+ 細胞質	70% 1+ 細胞質
CA182-002, 0004-00520	0	0	0	0
CA182-002, 0004-00531	0	0	0	<10% 1+ 細胞質
CA182-002, 0006-00538	0	0	0	0
CA182-002, 0006-00539	0	0	0	<5% 2+ 細胞質
CA182-002, 0009-00534	0	0	0	60% 2+ 細胞質

10

20

## 【0141】

IV型コラーゲンは患者のほとんどにおいて高く、それは IV型コラーゲンが他の腫瘍において過剰発現すること(E. Iochim et al., Eur. J. Cancer, 38(18):2362-2370 (Dec. 2002) および A. Isisag et al., Anal. Quant. Cytol. Histol., 25:263-272 (Oct. 2003))から期待された事であった。見られた高い点数値はすべて、このマーカーが通常存在する場所である内皮組織においてであった。最初に、血管内皮(endothelial vessel)周辺に関する染色を点数化した(図 1C 参照)。染色の強度が増大すると、同様に点数も増大した(図 1A における 1+ を図 1C における 3+ と比較されたい)。何人かの(a couple of)患者が腫瘍領域においてこのマーカーの染色を示し(図 1B 参照)、それは興味深い観察であるとともに、それが何を意味するのか不明確であった。全ての腫瘍が処置前の生検において IV型コラーゲンの高いレベルを有していたことが見出されたため、患者の最後のバッチにおいて、腫瘍におけるこのマーカーの染色を評価した。結果として、最後の 9 人の患者についてのスコア付けが変化し、腫瘍患者のサンプルにおける IV型コラーゲンの染色強度についてのみスコア付けした(表 1 中の患者 008-00521 から該表の最後まで、該表の第 2 の部分における全ての患者)。

30

## 【0142】

VEGFR-2 バイオマーカーを用いて観察された染色は、2つの集団を区別するようになっている。これらの結果に基づいて、VEGFR-2 の高いレベルは PD 患者と関連すると考えられる。

40

## 【0143】

観察された FGF1 染色は、それが FGF2 と同じ傾向にある(trend with)ように見える点で興味深かった。FGF1 陽性の腫瘍の全てが、FGF2 についても陽性であったため、それらは関係しているであろう。このことは、両方のリガンドが同じ経路に影響を及ぼし得ることを示唆し得る。

## 【0144】

FGF2 IHC 染色は、興味深い結果を示した。該マーカーの陽性の発現は、調査された患

50

者のうち少数において、応答および4か月より長く安定な疾患(SD)(SD>4)と関連するよう  
に思われる。仮に応答者を、解析の時点で部分的な応答(PR)または4か月より長く安定な  
疾患(SD)を有した患者として定義すれば、結果は5人の応答者のうち4人が FGF2 IHC  
染色について陽性ということになるであろう。IHC アッセイにおける陽性は、0より大き  
いあらゆる値として定義した。非応答者として定義された残りの患者のうち、18人中12  
人が FGF2 染色について陽性であった。これらの結果は、0.8の感度(95% CI: (0.28、0  
.99)) および 0.4の特異度(95% CI: (0.19、0.64))をもたらす。したがって、95% CI:(0  
.07、0.52)での 0.25の陽性予測値(PPV) および 95% CI:(0.52、1.00)での 0.89の陰性  
予測値(NPV)をもたらす。これらの相関は、現時点で統計学的に有意でないが、FGF2 染色  
に関して陽性の患者はプリバニブでの処置に対して応答する方向にある傾向がある。別の  
興味深い相関は、FGF2 の存在と腫瘍の収縮との間に相関があると考えられることであ  
った。腫瘍収縮のパーセンテージをベースラインから解析の時までプロットすると、FGF2  
で染色される腫瘍は、陰性染色の腫瘍よりも大きく収縮する傾向があることが明らかにな  
った(図5)。しかし、医学的応答が得られた患者の数が少ないため、現時点でその数字は  
統計学的に有意でない。

10

## 【0145】

FGF2 陽性の患者についての腫瘍収縮の増大のほかに、プリバニブで処置された、その  
腫瘍が FGF2 に関して陽性の患者は、生存率の改善を有する傾向があることも見出された  
(図6)。重ねて、これは統計学的に有意ではないが(p値 0.475)、生存プロットの曲線の  
分離は観察され始めている。したがって、FGF2 陽性腫瘍がより長く生存する傾向にある  
ことを示す。

20

## 【0146】

実施例 2 - プリバニブによる FGF 発現レベルの変調  
材料および方法

図7は、プリバニブが FGF2 増殖因子遺伝子の発現レベルを変調したが、ベバシズマ  
ブは変調しなかったこと、その一方でプリバニブおよびベバシズマブの両方が VEGF 遺  
伝子の発現レベルを変調したことを示す結果を表す。示される結果は、AFFYMETRIX (登録商  
標) ヒト アレイからのものである。

## 【0147】

プリバニブを DMSO 中に 10 mM の濃度で溶解し、-20 で保管した。ベバシズマブは 2  
5mg/ml の濃度であり、4 で保管した。

30

## 【0148】

組換えヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF2)を PBS 中に 100  $\mu$ g/ml の濃度で溶解し  
、-20 で保管した。

## 【0149】

組換えヒト血管内皮増殖因子(VEGF)を PBS 中に 100  $\mu$ g/ml の濃度で溶解し、-20 で  
保管した。

## 【0150】

プリバニブは FGF2 に誘導される腫瘍細胞の増殖をインビトロで抑制する

VEGF および FGF2 に刺激された細胞増殖に対する、プリバニブ(10 nM)、スニチニブ(1  
0 nM)およびベバシズマブ(25 mg/ml) AVASTIN (登録商標) (ベバシズマブ)の効果を、以  
下の癌細胞株において評価した: A2870、GEO、L2987、786-0、A549、A498、Du145、PANC-  
1、ACHN、HT1197、CALU6、SKOV3、769-P、T24、HCT166 および UMUC3。VEGF (2.5 ng/ml)  
または FGF2 (2.5 ng/ml) で刺激された細胞株における腫瘍細胞の抑制を、プリバニブ  
(0、0.3、0.6、1.25、2.5、5 および 10 mM) およびスニチニブ (0、0.3、0.6、1.25、2.  
5、5 および 10 mg/ml) を用いて評価した。

40

## 【0151】

AFFYMETRIX (登録商標) GeneChip System を用いて、腫瘍細胞株からの RNA サンプル  
について遺伝子発現プロファイリングを行った。この解析に関して、データは 16 の細胞  
株(8つの感受性および8つの抵抗性)についてしか得られなかったが、FGF2 刺激後のプ

50

リバニブ感受性については 19 の細胞株を試験した。

【 0 1 5 2 】

IC50  $\leq$  3  $\mu$ M の細胞株を感受性とみなし、IC50 > 3  $\mu$ M の細胞株を抵抗性とみなした。

【 0 1 5 3 】

図 8 に示される通り、プリバニブは FGF2 に誘導される腫瘍細胞増殖を、インビトロで、0.7 から 10 mM の範囲の IC50 値で、16 の細胞株のパネルにわたって抑制することが示され、一方でスニチニブの IC50 値は、大部分が約 10 mM であった。表 3 は、試験された癌細胞株の組織分布を示す。

10

【表 3】

インビトロでの FGF2 刺激後の  
細胞株のプリバニブ感受性

細胞株	プリバニブ感受性 ( $\leq$ 3 $\mu$ M)	プリバニブ抵抗性 (> 3 $\mu$ M)
腎臓	3	1
NSCLC	2	1
膀胱	1	2
卵巣	1	1
前立腺	1	1
結腸	0	3
膵臓	1	1
合計	9	10

20

【 0 1 5 4 】

FGFR1、FGF2、VEGFR2 および VEGF の mRNA 発現レベルを、プリバニブ感受性および抵抗性の腫瘍細胞株において解析した。図 9 に示される通り、FGF2 および FGFR1 の RNA 発現レベルは、インビトロでプリバニブに対する感受性と正の相関を示した。全体として、より高い FGF2 および FGFR1 の RNA 発現レベルが、感受性の細胞株において検出された。VEGF は、様々な細胞株において発現したが、その発現レベルはインビトロでプリバニブに対する感受性と相関しなかった。同様に、VEGFR2 の発現は試験された全ての腫瘍細胞株にわたって低く、そのレベルはインビトロでプリバニブ感受性と相関しなかった。

30

【 0 1 5 5 】

VEGF および FGF2 が刺激する細胞増殖

細胞培養 - GEO 結腸癌細胞株を、1% ウシ胎児血清 (Cellgro、Virginia) を伴う RPMI 1640 (Cellgro、Virginia) 中で、37 °C で、5% 二酸化炭素/95% 空気中において、100 ユニット/ml のペニシリン、100  $\mu$ g/ml のストレプトマイシン(Cellgro、Virginia)の存在下で、日常的に維持した。

40

【 0 1 5 6 】

細胞増殖を、CELLTITER 96 (登録商標) Aqueous One Solution Reagent (Promega、Madison、Wisconsin) を用いて、改変された MTS アッセイによって決定した。A2780 卵巣癌細胞、MIAPAC-2 膵臓癌細胞または GEO 結腸癌細胞を、37 °C で、5% 二酸化炭素/95% 空気中において、100 ユニット/ml のペニシリン、100  $\mu$ g/ml のストレプトマイシンの存在下で、96-ウェル平底組織培養プレート(Becton Dickinson、San Jose、California)上に、1% ウシ胎児血清を伴う RPMI 1640 中において  $3 \times 10^3$  細胞/ウェルの濃度で播種し、終夜、プレートへ接着させた。次いで、細胞を、0(対照)、0.3、0.6、1.25、2.5、5、1

50

0 ng/ml の各濃度の FGF2 または VEGF の存在下で、さらに 72 時間、37 °C で、空気中 5 % CO<sub>2</sub> の加湿された大気中においてインキュベートした。処理後、20 µl の CELLTITER 96 (登録商標) Aqueous One Solution Reagent をプレートの各ウェル中に滴下した。180 分のインキュベーションの後、これらのサンプルの光学密度(OD)を、SPECTRAMAX (登録商標) plus (Molecular Device、California) および 490 nm の基準波長(reference wavelength)を用いて直ちに測定した。対照サンプルの OD を 100 とみなした。各々の条件を 4 ウェルで実施し、実験を 2 回繰り返した。

#### 【0157】

図 10 は、GEO 結腸癌細胞における FGF2 および VEGF に誘導される細胞増殖について得られた結果を示す。FGF2 および VEGF の増殖活性を、対照と比較した細胞増殖(%)によって示す。示される通り、プリバニブは GEO 細胞において FGF2 に誘導される細胞増殖を強力に抑制したが、VEGF に誘導される細胞増殖を強くは抑制しなかった。

10

#### 【0158】

図 11 は、A2780 卵巣癌細胞および MIAPAC-2 膵臓癌細胞において、FGF2 に誘導される細胞増殖について得られた結果を示す。FGF2 の増殖活性を、対照と比較した細胞増殖(%)によって示す。示される通り、プリバニブは、A2780 卵巣癌細胞および MIAPAC-2 膵臓癌細胞の両方において、FGF2 に誘導される細胞増殖を強力に抑制した。具体的には、プリバニブ(IC<sub>50</sub> < 1 µM)は、卵巣癌細胞株 A2870 において FGF2 に誘導される細胞増殖を 50% より多く抑制し、その一方、プリバニブ(IC<sub>50</sub> < 0.5 µM)は、膵臓癌細胞株 MIAPAC-2 において FGF2 に誘導される細胞増殖を 50% より多く抑制した。ベバシズマブは、卵巣癌細胞株 A2870 および 膵臓癌細胞株 MIAPAC-2 において、FGF2 に誘導される細胞増殖に対して有意な感受性を示さなかった(データ示さず)。同様に、AVASTIN (登録商標) は、卵巣癌細胞株 A2870 および膵臓癌細胞株 MIAPAC-2 において、VEGF に誘導される細胞増殖に対して有意な感受性を示さなかった(データ示さず)。

20

#### 【0159】

##### 腫瘍細胞の抑制

細胞培養 - GEO 結腸癌細胞株を、1% ウシ胎児血清(Cellgro、Virginia)を伴う RPMI 1640 (Cellgro、Virginia) 中において、37 °C で、5% 二酸化炭素 95% 空気中において、100 ユニット/ml のペニシリン、100 µg/ml のストレプトマイシン(Cellgro、Virginia)の存在下で、14 日間、2.5ng/ml の VEGF または FGF2 と共に維持した。

30

#### 【0160】

細胞増殖を、CELLTITER 96 (登録商標) Aqueous One Solution Reagent (Promega、Madison、Wisconsin) を用いて、改変された MTS アッセイによって決定した。GEO 細胞を、37 °C で、5% 二酸化炭素/95% 空気中において、100 ユニット/ml のペニシリン、100 µg/ml のストレプトマイシンの存在下で、1% ウシ胎児血清を伴う RPMI 1640 中において 3 × 10<sup>3</sup> 細胞/ウェルの濃度で 96-ウェル平底組織培養プレート(Becton Dickinson、San Jose、California)上に播種し、終夜、プレートへ接着させた。次いで、0 (対照)、0.3、0.6、1.25、2.5、5、10 µM の各濃度のプリバニブまたは 0.3、0.6、1.25、2.5、5、10 µg/ml の各濃度のベバシズマブの存在下で、細胞をインキュベートした。30 分の薬剤処理の後、さらに 72 時間、37 °C で、空気中 5% CO<sub>2</sub> の加湿された空気において、細胞を 0 (対照)、2.5ng/ml の濃度の VEGF または FGF2 で刺激した。処理後、20 µl の CELLTITER 96 (登録商標) Aqueous One Solution Reagent をプレートの各ウェルに滴下した。180 分のインキュベーションの後、SPECTRAMAX (登録商標) plus (Molecular Device、California) および 490 nm の基準波長を用いて、これらのサンプルの光学密度(OD)を直ちに測定した。対照サンプルの OD を 100 とみなした。各々の条件を 4 ウェルで実施し、各実験を 2 回繰り返した。図 10 は、得られた結果を示し、ここで、増殖を刺激するために FGF2 を用いた場合、プリバニブは癌細胞の増殖を直接的に抑制した。プリバニブおよびベバシズマブの抗増殖活性を、IC<sub>50</sub> によって示す。

40

#### 【0161】

##### 経時的な腫瘍細胞の抑制

50

腫瘍細胞抑制方法を用いて、VEGF または FGF2 が存在する状態で、細胞を 2.5  $\mu\text{M}$  の濃度のプリバニブ、10  $\mu\text{g/ml}$  のベパシズマブ、または 2.5  $\mu\text{M}$  のスニチニブで処理した。薬剤での処理後の各時点 (0 日(処理なし対照))、1、2、3、6、7、8 日目において、20  $\mu\text{l}$  の CELLTITER 96 (登録商標) Aqueous One Solution Reagent を、プレートの各ウェルに滴下した。180 分のインキュベーションの後、SPECTRAMAX (登録商標) plus (Molecular Device、California) および 490 nm の基準波長を用いて、これらのサンプルの光学密度(OD)を直ちに測定した。対照サンプルの OD を 100 とみなした。図 12 は得られた結果を示し、ここで、プリバニブは FGF2 で刺激された GEO 腫瘍細胞の増殖を抑制したが、VEGF で刺激された GEO 腫瘍細胞の増殖は抑制しなかった。プリバニブ、スニチニブ(sunitinib)およびベパシズマブの抗増殖活性を、VEGF および FGF2 が存在する条件における、0 日目の対照と比較した細胞増殖(%)によって示す。

10

## 【0162】

FGFR1 のリン酸化に対するプリバニブの効果

40ng/ml の FGF2 の存在下における、2  $\mu\text{m}$  プリバニブでの処理後の FGFR1、VEGFR2、ERK および AKT のリン酸化(phosphorylation)状態を、各標的に向けられた市販の抗リン酸化(anti-phospho)一次抗体を用いてウエスタンブロットによって解析した。抗-FGFR1、抗-VEGFR2、抗-ERK、抗-AKT および抗- チューブリン抗体も利用した。ブロットを、示される一次抗体および 1:7500 セイヨウワサビ ペルオキシダーゼ結合二次抗体と共にインキュベートした。すべての一次抗体を 1  $\mu\text{g/ml}$  の終濃度で用いた。次いで、ブロットを化学発光検出システムで可視化した。

20

## 【0163】

図 13 に示される通り、プリバニブは HCC 細胞株において、FGF2 での刺激後の FGFR1 のリン酸化を抑制し、下流の経路の遺伝子、例えば pERK および pAKT に影響を及ぼす。

## 【0164】

要約すると、インビトロで、プリバニブは 16 の癌細胞株において、FGF2 に誘導される腫瘍細胞増殖を抑制した。しかし、細胞が VEGF の存在下で生育する場合には、プリバニブは腫瘍細胞増殖に全く影響を及ぼさなかった。FGF2 および FGFR1 の RNA 発現レベルは、インビトロで、プリバニブに対する感受性と正の相関を示した。全体的に、プリバニブに対して感受性の細胞株において、より高い RNA 発現レベルが検出された。対照的に、VEGF は全ての細胞株において発現したが、レベルは、インビトロでプリバニブに対する感受性と相関しなかった。VEGFR2 の発現は試験された全ての腫瘍細胞株にわたって低く、そのレベルはインビトロでプリバニブ感受性と相関しなかった。加えて、プリバニブは、インビトロで、FGF2 リガンドでの刺激後の FGFR1 のリン酸化を抑制した。

30

## 【0165】

実施例 3 - プリバニブ感受性における FGF 経路の関与を確認する方法

FGF 経路がプリバニブ感受性の重要な予測因子(predictor)であることを確認するため、プリバニブまたはスニチニブの存在下で、FGF2 誘導を伴うかまたは伴わないプリバニブ感受性および抵抗性両方の細胞株について遺伝子セット濃縮(enrichment)解析を行った。各経路内における個体の遺伝子の発現プロファイルを解析し、各条件について発現プロファイルの変化の対数を測定した。全体として、67 の経路を解析した。各々の経路について解析される各々の遺伝子が提供された訳ではない。しかし、FGF 経路から 46 の遺伝子を、VEGF 経路から 62 の遺伝子を解析し、FGF 経路に関して 92 の遺伝子からなるより多い総称数の遺伝子を AMBION (登録商標) 遺伝子セットを用いて解析した。

40

## 【0166】

図 14 に示される通り、プリバニブ感受性の細胞において、FGF 経路に関連する遺伝子が最も著しく誘導された。

## 【0167】

FGF2 刺激後に 1  $\mu\text{m}$  のプリバニブまたは 1  $\mu\text{m}$  のスニチニブで細胞を処理した後、FGF 2 に誘導される FGF 経路の上方制御は、プリバニブによってのみ抑制され、スニチニブ

50

によっては抑制されなかった。

【0168】

結果として、FGF2 リガンドの存在は、腫瘍細胞株の増殖の増大をもたらす FGFR および FGF 経路の活性化にとって重大である。本明細書に記載される結果に基づくと、プリバニブは FGF2 によって誘導される腫瘍細胞の増殖を抑制することができ、そのため、増大した FGF2 の発現は、プリバニブ治療に対する感受性の予測因子(predictor)として有用である。

【0169】

実施例 4 - FGF2 腫瘍発現と、プリバニブでの処置後の腫瘍応答、PFS および血漿薬力学的(PD)マーカーの変化との関連を確認する方法

10

材料および方法

患者

本研究に含まれる患者を、プリバニブ アラニネート(brivanib alaninate)についての安全性、薬物動態、薬力学および最大許容用量を調査する第一相臨床試験に登録した(K. Suzuki et al., Int. J. Urol., 12:152 (2005))。全ての患者は、適切な組織内審査委員会によって承認された臨床試験および本研究について同意した。組み入れ基準(Inclusion criteria)は、ECOG 0-1 (S. Javerzat et al., Trends Mol. Med., 8:483 (2002))、十分な(adequate)骨髄および肝機能、ならびに腫瘍組織塊を有すること、または 20 から 30 の最初の生検の未染色のスライドが手に入ることを含む。除外基準(Exclusion criteria)は、血管内皮増殖因子(VEGF)阻害剤への事前の曝露、最近 6 ヶ月における心血管疾患、血栓塞栓症または出血の存在を含んだ。臨床試験に登録されたすべての患者は、以前に一次および二次の化学療法過程に失敗したことがあった。患者の連続コホート(Sequential cohort)を、180 mg から 1000 mg の用量でプリバニブ アラニネートで処置した。患者の応答を、コントラスト増強断層撮影(CT)により腫瘍のサイズを定量化することによって測定した。

20

【0170】

腫瘍サイズの測定

腫瘍応答を、改変された WHO 腫瘍応答基準を用いて評価した。病変を、コンピュータ断層撮影(CT)によって評価した。病変は 2 次元であり、少なくとも 1 の、標準 CT 上で > 2 cm、らせん CT 上で > 1 cm の直径を有した。2 次元測定に関して、第 2 の直径は最も長い直径に対して垂直であった。病変の面積を、最長の直径に最大の垂直方向の直径(perpendicular diameter)を掛けることによって算出した。

30

【0171】

FGF-2 免疫組織化学

腫瘍塊を 4 μm で切り分けた(were sectioned)。スライドを、LEICA (登録商標) ST5020 Multistainer 中で脱パラフィンおよび再水和させた。BIOGENEX (登録商標) EZ-Retriever Microwave 中で、Citra Plus Antigen retrieval solution (BioGenex, Cat # HK080-9K) と共に、95 °C で 15 分間、スライドを加熱することによって抗原回復を行った。次いで、スライドを室温で 5 分間冷却し、蒸留水で 3 回リンスした(各回 ~ 1分)。スライドを、i6000 Automated Staining System (BioGenex) 中で、以下の条件を用いて免疫染色した: peroxide block (DAKO, Cat# K4007) で 5 分間ブロッキング、その後 5% ヤギ血清で 30 分間、一次抗体 ウサギ抗-線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) (Abcam Cat# #16828) 1:25 またはウサギ イムノグロブリン G (ウサギ IgG, LabVision, Cat# NC-100-P) 5 μg/ml を添加して 1 時間インキュベートし、その後ペルオキシダーゼ 抗-ウサギ IgG (H+L) 二次抗体 (Vector, Cat# PI-1000) を 1:200 希釈で添加し、45 分間インキュベートした。発色基質(chromogen substrate) DAB (DAKO, Cat# K4007) を添加し、5 分間インキュベートした。スライドを、ヘマトキシリン(hematoxyline)(DAKO cat# S3309) で 1 分間、対比染色した。染色されたスライドを、LEICA (登録商標) ST5020 Multistainer 中で脱水し、カバースリッパを乗せ、患者の医学的状態について知らない有資格の(boar

40

50

d-certified) 病理学者によって評価した。

【 0 1 7 2 】

統計学的解析

FGF-2(+) 群と FGF-2(-) 群の間の応答率(rate)を比較するため、フィッシャーの正確確率検定を用いた。FGF-2(+) 群と FGF-2(-) 群の間の、腫瘍におけるベースラインからのパーセント変化の違いについて検定するために、ノンパラメトリック Wilcoxon 順位検定を用いた (t 検定(t-statistic)のための周辺分布についての仮説が、ベースラインからのパーセント変化に関してわずかに違反した(violated)ため、および小さなサンプルサイズは仮説違反(violations)に対する検定の脆弱性を増大させ得るため)。同じ方法を、8 日目および 26 日目における該 2 群間の CIV のベースラインからのパーセント変化の違いについての検定にも適用した。加えて、ベースラインの腫瘍量について調整された、ベースライン後の(post-baseline)腫瘍量に対する FGF-2 状態の影響を調査するため、順位に基づく(Rank-based)ANCOVA を用いた。全ての解析は、R (Y. Shing et al., Science, 223:1296 (1984)) を用いて行った。

10

【 0 1 7 3 】

結果

利用可能な保存された(archival)腫瘍組織を有する 43 の評価可能な患者を、FGF2 状態 (+ または -) およびプリバニブ処用量と、腫瘍応答、PFS および PD 血漿マーカーの変化との間の関連について解析した。19 pts が FGF2(-) であり、24 pts が FGF2(+) であった。低用量 (<600 mg) および高用量 ( 600 mg) のプリバニブを、それぞれ 17 人および 26 人の患者に与えた。患者は、様々な腫瘍の型を有していた: 28 人(65%)が結腸直腸癌(CRC)を有し、5 人(12%)が腎細胞癌(RCC)を有し、残りの 10 人が膀胱、膵臓、卵巣、神経内分泌および筋肉を含む様々な腫瘍を有した。処置の前に得られた生検サンプルを切り分け(were sectioned)、FGF-2 発現について染色した。結果に従い、観察された染色に基づいて腫瘍を FGF-2(-) または FGF-2(+) に分けた。高用量のプリバニブを受け取った FGF2(+) の患者を除く全ての群の患者は、平均腫瘍サイズの変化の平均が増大した。

20

【 0 1 7 4 】

FGF 状態は、プリバニブに対する患者の応答を予測すると思われた。標準の WHO 基準に従って、コンピュータ断層撮影スキャンから、患者を進行性疾患、安定な疾患またはプリバニブ処置に対する部分的な応答を有する者に分類した。処置の 56 日後、FGF-2 腫瘍を有する患者(26.3% [19人中5人]; P = 0.03)と比較して、有意に多くの FGF-2(+) 腫瘍を有する患者(62.5% [24人中15人])が、部分的な応答または安定な疾患を有した。加えて、FGF-2(-) 腫瘍を有する患者(19人中14人)よりも少ない FGF-2(+) 腫瘍を有する患者が、進行性疾患(24人中9人)を有した。応答を予測するために陽性の FGF-2 状態を用いる場合、陽性の予測値(PPV)は 63% であり(95% CI は 0.41-0.81 である)、陰性の予測値(NPV)は 74% であり(95% CI は 0.49-0.91 である)、これは FGF2 に関して陽性である患者がプリバニブ(brivatinib)アラニネートでの処置に対して応答する 63% の機会を有し、一方、陰性である場合には応答しない 74% の機会を有することを示す。

30

【 0 1 7 5 】

図 2 は、2 サイクルの処置(およそ 56 日)後の、FGF-2(-) 腫瘍を有する患者と比較した、FGF-2(+) 腫瘍を有する患者におけるベースラインからの腫瘍サイズの最大のパーセント変化を示す。FGF-2(+) 腫瘍を有する患者におけるたった 1% の増大 (IQR = 42%、P = 0.007) と比較して、FGF-2(-) 腫瘍を有する患者においては腫瘍サイズの 36% の中央値の増大 (四分位範囲 [IQR] = 44%) があった。したがって、FGF-2 腫瘍と比較して、FGF-2(+) 腫瘍は、プリバニブ アラニネートで処置された患者における腫瘍増殖の減少と明確かつ有意な関連を有する。FGF2(+) および FGF2(-) 患者に関する、腫瘍応答、PR および SD 8 wks の違いを表 4 に示す。

40

【 0 1 7 6 】

PFS の中央値もまた、FGF2(-) 患者よりも FGF2(+) 患者において長かった (表 4 参照)

50

。

## 【0177】

結論として、FGF の過剰発現が通常、不良な予後と関連する一方、FGF2(+) 腫瘍発現は、その腫瘍が FGF2 を発現しなかった患者と比較して、プリバニブでの処置後の腫瘍応答、PFS および血漿 PD マーカーの変化が改善する傾向と関連し、それ故、FGF-2 はプリバニブ アラニネート処置に対する応答性を予測するバイオマーカーである。実際、プリバニブ アラニネートでの処置は、FGF-2(-) 腫瘍を有する患者と比較して、FGF-2(+) 腫瘍を有する患者において腫瘍サイズの有意な減少をもたらした。さらに、FGF-2(-) 腫瘍を有する患者と比較して、有意に多くの FGF-2(+) 腫瘍を有する患者が、より良い疾患制御率(rate)(部分的な応答および安定な疾患)を有した。

10

## 【0178】

本研究において、患者は他の治療によってたくさん事前処置を受けた(were heavily pre-treated)が、何人かが安定な疾患または部分的な改善すら達成し得たという事実は、FGF-2(+) 腫瘍を有する患者におけるプリバニブ アラニネートの強力な活性を実証する。これらの患者において、プリバニブ アラニネート処置は、FGF-2(-) 腫瘍を有する患者と比較して、3倍、腫瘍増殖を減少させた。したがって、FGF-2 の存在は、FGF 経路および VEGF 経路の両方を標的とする治療、例えばプリバニブ アラニネートを用いるための強力な予測指標となり得る。これらの研究はまた、患者をその FGF-2 状態に基づいて事前選択することが陽性の治療応答の機会を改善し得る、という仮説を提案する。

20

## 【0179】

したがって、FGF-2 状態が、二重抗-FGFR1 および抗-VEGR2 活性を有するチロシンキナーゼ阻害剤であるプリバニブ アラニネートに対する治療応答を予測するのに有用であることが初めて示された。様々な腫瘍の型における FGF-2 の発現は、バイオマーカーの発現に基づき、複数の腫瘍の型にわたって治療に対する患者応答を予測することが達成可能な目標であることを示唆する。将来、複数の腫瘍の型にわたって患者を FGF-2 状態についてスクリーニングすることが、単独でのまたは患者の応答の CIV モニターと組み合わせた、FGFR または VEGFR を標的とする治療を考慮するための一般的な方法になる可能性がある。

【表 4】

FGF2 発現状態とブリバニブに対する患者の応答との間の相関

	腫瘍サイズの平均変化 (%) (-8 週間)		PFS 中央値 (日数)		ベースラインからの COL IV 変化 (%) (26 日目) (n = 42)	ベースラインからの sVEGFR2 変化 (%) (26 日目) (n = 39)	PR	SD ≥8 週間	PD
	低 (<600 mg) (n = 17)	高 (≥600 mg) (n = 26)	低 (<600 mg) (n = 17)	高 (≥600 mg) (n = 26)					
FGF2- (n = 19)	71	24	54	56	-16	-15	0	5	14
FGF2+ (n = 24)	28	0.9	71	107	-30	-23	2	13	9
P 値	0.03*		0.075 <sup>†</sup>		0.029*	0.138*			

\* Wilcoxon 順位和検定 (FGF2- 対 FGF2+ を評価する、低用量と高用量の組み合わせ)。

† 対数順位検定 (FGF2- 対 FGF2+ を評価する、低用量と高用量の組み合わせ)。

## 【 0 1 8 0 】

実施例 5 - IV型コラーゲンの発現と薬学的応答との間の相関を確認する方法ならびにブリバニブに伴う単独でのおよび FGF2 腫瘍発現と組み合わせた予測

## 材料および方法

以下に記載される方法に加えて、実施例 4 に記載される通りに方法を実施した。

## 【 0 1 8 1 】

## IV型コラーゲン ELISA

血漿 IV型コラーゲン(CIV) を、Biotrin International、Ltd.(Dublin、Ireland)から入手した酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)キットを用いて測定した。製造者の説明書に従ってキットを使用した。サンプルは、以下の来診(visit)を含んだ: ベースライン(ブリバニブ アラニネート処置の前)および 8 日目および 26日目、簡潔には、品質管理サンプル(QC)を、組換えヒトIV型コラーゲンタンパク質(Southern Biotech、Birmingham、AL)を EDTA 血漿(Bioreclamation、Hicksville、NY)中にスパイク(spiking)することによって調製した。製造者のキット挿入物および説明書によって、キットの標準、QC および EDTA 血漿患者サンプルを、複合体(保存料として 30 mg/l のプロクリン(Proclin)300 を含有する、セイヨウワサビ ペルオキシダーゼと結合した抗-IV型コラーゲン マウス Fab')と共に希釈した。希釈されたサンプルを、第 2 の抗-IV型コラーゲン抗体でコートされたウェル中において 30 分間インキュベートし、次いで、キットの洗浄バッファー(Tween 20 および保存料としてのプロクリン(proclin)300 を伴うリン酸バッファー)で 3 回洗浄した。使用準備済みの TMB 基質を添加し、30 分間インキュベートした。1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の添加によって反応を停止させた。基準として 630 nm を用いる 450 nm での吸収を、SPECTRAM

10

20

30

40

50

AX (登録商標) プレートリーダー (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) を用いて測定した。CIV キット標準を用いて 4-パラメーターロジスティック (4-PL) 曲線適合を生成するために、Softmax Pro 4.8 ソフトウェアを使用した。

#### 【0182】

##### 結果

患者における CIV レベルの変化を、ELISA によっても評価した。8 日目および 26 日目に、320 mg および 800 mg の用量でプリバニブ アラニネートを受け取っていた患者を、FGF-2 状態にかかわらず、評価した。8 日後 (24% 対 2.6%;  $P < 0.05$ ) および 26 日後 (31% 対 2.3%;  $P < 0.01$ ) において、プリバニブ アラニネート 320 mg を受け取っている患者と比較して、プリバニブ アラニネート 800 mg を受け取っている患者において CIV レベルの中央値に有意な減少が見られた。

10

#### 【0183】

FGF-2(+) および FGF-2(-) 腫瘍を有する患者において、CIV レベルのパーセント変化を測定した (図 4)。プリバニブ アラニネート処置の 8 日後、FGF-2(+) 腫瘍を有する患者および FGF-2(-) 腫瘍を有する患者の両方において、CIV レベルはベースラインのレベルから減少したが、中央値の減少は、FGF-2(-) 腫瘍を有する患者 (4.9% [IQR = 20.0%];  $P = 0.049$ ) よりも FGF-2(+) 腫瘍を有する患者 (16.1% [IQR = 31.0%]) の方が 3.3 倍大きかった (図 4A)。結果は、26 日後においてよりいっそう顕著である。FGF-2(-) 腫瘍を有する患者における 4.3% ( $P = 0.019$ ) と比較して、FGF-2(+) 腫瘍を有する患者における CIV レベルのベースラインからの中央値の減少は、およそ 7 倍大きな応答を表す 30.7% であった (図 4B)。興味深いことに、CIV の変化は、腫瘍の収縮とも相関した (データ示さず)。これらの結果は、FGF-2<sup>-</sup> 患者と比較して、FGF-2<sup>+</sup> 患者において IV 型コラーゲンが有意に大きく減少することを実証する。

20

#### 【0184】

この事は、この治療に対する患者の応答を評価するための容易かつ迅速な方法として CIV 測定を用いることができるという初めての証明である。初めて、CIV は、一般的には治療に対する、具体的にはプリバニブに対する患者の応答の指標となる薬力学的バイオマーカーであることが証明された。FGF-2(+) である患者のサンプルが有する CIV の減少と腫瘍収縮との相関、および FGF-2(+) とプリバニブ アラニネートでの処置に対するより良い結果との相関は、このバイオマーカーを使用することの有用性をさらに実証する。

30

#### 【0185】

いくつかの腫瘍の型に関しては、予測的バイオマーカーについてのスクリーニングが標準的な臨床業務になりつつある。例えば、浸潤性の乳癌の 10-34% において起こるヒト上皮増殖因子受容体-2 (HER2) の過剰発現は、トラスツズマブ治療に対する治療応答を予測することができる (M.J. Piccart-Gebhart et al., N. Eng. J. Med., 353:1659 (2006))。さらに、エストロゲン陽性の状態は、転移性乳癌を有する患者における抗エストロゲン治療に対する治療応答を予測する (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Lancet, 351:1451 (1998))。

#### 【0186】

したがって、複数の腫瘍の型にわたって患者を FGF-2 状態についてスクリーニングすることは、単独でのまたは患者の応答の CIV モニターと併用した、FGFR または VEGFR を標的とする治療を考慮するための一般的な実務となる可能性がある。

40

#### 【0187】

##### 実施例 6 - バイオマーカーに対する抗体の生産

バイオマーカーに対する抗体は、様々な方法によって調製することができる。例えば、バイオマーカーポリペプチドを発現する細胞を動物に投与して、該発現されるポリペプチドに対して向けられたポリクローナル抗体を含有する血清の生産を誘導することができる。一つの側面において、当該技術分野において通常実践される技法を用いて、バイオマーカータンパク質を調製し、天然の夾雑物を実質的に含まない状態にするために単離もしくは精製する。次いで、発現および単離されたポリペプチドに対してより大きな特異的活性

50

を有するポリクローナル抗血清を生産するため、かかる調製物を動物に導入する。

【0188】

一つの側面において、本発明の抗体はモノクローナル抗体(またはそのタンパク質に結合する断片)である。バイオマーカーポリペプチドを発現する細胞は、あらゆる適切な組織培養培地において培養することができるが、(約 56 で非働化された) 10% ウシ胎児血清を含有するよう補われ、かつ約 10 g/l の非必須アミノ酸、約 1,00 U/ml のペニシリンおよび約 100 μg/ml のストレプトマイシンを含有するよう補われた Earle の改変 Eagle 培地中において細胞を培養することが好ましい。

【0189】

免疫された(および追加免疫された(boosted))マウスの脾細胞を抽出し、適切なミエロマ細胞株と融合させることができる。本発明に従って、あらゆる適切なミエロマ細胞株を採用することができるが、ATCC(登録商標)から入手可能な親ミエロマ細胞株(SP2/0)を採用することが好ましい。融合の後、得られるハイブリドーマ細胞を HAT 培地中で選択的に維持し、その後 Wands et al. (Gastroenterology, 80:225-232 (1981))によって記載される通りに限界希釈によってクローン化する。次いで、かかる選択を通して得られたハイブリドーマ細胞を、ポリペプチド免疫原またはその一部に結合することができる抗体を分泌する細胞クローンを同定するためにアッセイする。

【0190】

あるいは、バイオマーカーポリペプチドに結合することができるさらなる抗体を、抗イディオタイプ抗体を用いる2段階の手順で生産することができる。かかる方法は、抗体はそれ自身が抗原であり、それ故に第2の抗体に結合する抗体を得ることが可能であるという事実を利用する。この方法に従って、タンパク質特異的な抗体を、動物、好ましくはマウスを免疫するために用いることができる。次いで、かかる免疫された動物の脾細胞を、ハイブリドーマ細胞を生産するために用い、タンパク質特異的な抗体に結合するその能力がポリペプチドによって妨害され得る抗体を生産するクローンを同定するために該ハイブリドーマ細胞をスクリーニングする。かかる抗体は、タンパク質特異的な抗体に対する抗イディオタイプ抗体を含み、動物を免疫してさらなるタンパク質特異的な抗体の形成を誘導するために用いることができる。

【0191】

あるいは、VEGFR2、FGF2 および CIV 抗体が当該技術分野において公知であり、商業的に入手可能である。

【0192】

FGF2 に関して、適用できる場合には、本明細書に記載されるアッセイにおいて以下の抗体のいずれかを用いることができる: FGF-2 (147): sc-79 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (3H2133): sc-71105 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (500-M38): sc-65350 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (AS24): sc-52765 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (AS25): sc-52766 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (A-7): sc-74413 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (C-18): sc-1360 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (C-2): sc-74412 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (F-343): sc-52845 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (F-474): sc-52846 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (F-343): sc-52845 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (F-474): sc-52846 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (F-74): sc-52847 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (FB-8): sc-53119 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (H-131): sc-7911 (Santa Cruz Biotechnology); FGF-2 (MC-GF1): sc-57125 (Santa Cruz Biotechnology); または FGF-2 (N-19): sc-1390 (Santa Cruz Biotechnology)。

【0193】

IV型コラーゲンに関して、適用できる場合には、本明細書に記載されるアッセイにおいて以下の抗体のいずれかを用いることができる: IV型コラーゲン (C IV 22): sc-59813 (Santa Cruz Biotechnology); IV型コラーゲン (C-19): sc-9302 (Santa Cruz Biotechnology); IV型コラーゲン (COL-94): sc-59814 (Santa Cruz Biotechnology); IV型コラーゲ

10

20

30

40

50

ン (G-20): sc-9301 (Santa Cruz Biotechnology); IV型コラーゲン (H-234): sc-11360 (Santa Cruz Biotechnology); IV型コラーゲン (N-16): sc-18177 (Santa Cruz Biotechnology); IV型コラーゲン (SPM131): sc-56517 (Santa Cruz Biotechnology); または IV型コラーゲン (T-15): sc-18178。

【 0 1 9 4 】

VEGFR2 に関して、適用できる場合には、本明細書に記載されるアッセイにおいて、本明細書に記載される VEGFR2 に対して向けられたいずれかの抗体に加えて、以下の抗体のいずれかをを用いることができる: Flk-1 (A-3): sc-6251 (Santa Cruz Biotechnology); Flk-1 (C-1158): sc-504 (Santa Cruz Biotechnology); Flk-1 (EIC): sc-57135 (Santa Cruz Biotechnology); Flk-1 (EWC): sc-57136 (Santa Cruz Biotechnology); Flk-1 (KDR-2): sc-57134 (Santa Cruz Biotechnology); Flk-1 (N-931): sc-505 (Santa Cruz Biotechnology); Flk-1 (Q-20): sc-19530 (Santa Cruz Biotechnology); Flk-1 (S-20): sc-48161 (Santa Cruz Biotechnology); Flk-1 (xx13): sc-74001 (Santa Cruz Biotechnology); Flk-1 (Y-23): sc-74002 (Santa Cruz Biotechnology); p-Flk-1 (Tyr 951): sc-16628 (Santa Cruz Biotechnology); または p-Flk-1 (Tyr 996)-R: sc-16629-R (Santa Cruz Biotechnology)。

【 0 1 9 5 】

実施例 7 - 免疫蛍光アッセイ

以下の免疫蛍光プロトコールは、例えば、細胞上での FGF2、VEGFR-2 または IV型コラーゲン バイオマーカータンパク質の発現を検証するため、または、例えば、細胞表面上に発現する FGF2、VEGFR-2 または IV型コラーゲン バイオマーカーに結合する 1 以上の抗体の存在をチェックするために用いることができる。簡潔には、LAB-TEK<sup>®</sup> (登録商標) I 1 チャンバースライド(chamber slide)を、4 において、終夜、カルシウムおよびマグネシウムを含有する DPBS (DPBS++) 中の 10 マイクログラム/ミリリットル( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )のウシ II 型コラーゲンでコートする。次いで、該スライドを冷たい DPBS++ で 2 回洗浄し、8000 CHO-CCR5 または CHO pC4 がトランスフェクトされた細胞と共に 125  $\mu\text{l}$  の総容積で播種し、95% 酸素/5% 二酸化炭素の存在下において 37 °C でインキュベートする。

【 0 1 9 6 】

培地を吸引によって穏やかに取り除き、接着性の細胞を周囲の温度(ambient temperature)において DPBS++ で 2 回洗浄する。スライドを、0-4 °C で 1 時間、0.2% BSA (ブロッカー) を含有する DPBS++ でブロックする。該ブロッキング溶液を吸引によって穏やかに取り除き、125  $\mu\text{l}$  の抗体含有溶液(抗体含有溶液は、例えば、通常は未希釈で用いられるハイブリドーマ培養上清、または通常は希釈、例えば約 1/100 に希釈される血清/血漿であり得る)を添加する。スライドを、0-4 °C で 1 時間インキュベートする。次いで、抗体溶液を吸引によって穏やかに取り除き、細胞を 400  $\mu\text{l}$  の氷冷のブロッキング溶液で 5 回洗浄する。次に、ブロッカー溶液中の 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のローダミン標識された二次抗体(例えば、抗ヒト IgG)を 125  $\mu\text{l}$ 、細胞に添加する。再度、細胞を 0-4 °C で 1 時間インキュベートする。

【 0 1 9 7 】

次いで、二次抗体溶液を吸引によって穏やかに取り除き、細胞を 400  $\mu\text{l}$  の氷冷のブロッキング溶液で 3 回洗浄し、冷たい DPBS++ で 5 回洗浄する。次いで、細胞を、DPBS++ 中の 3.7% ホルムアルデヒド 125  $\mu\text{l}$  で、周囲の温度(ambient temperature)において 15 分間、固定する。その後、細胞を周囲の温度(ambient temperature)において 400  $\mu\text{l}$  の DPBS++ で 5 回洗浄する。最後に、細胞を 50% 含水グリセロール中にマウント(mount)し、ローダミンフィルターを用いて蛍光顕微鏡で観察した。

【 0 1 9 8 】

実施例 8 - 免疫組織化学アッセイを用いて FGF2 発現のレベルを測定する方法

本明細書に記載される通り、FGF2(+) 細胞は FGF2 阻害剤および 二重 FGF2/VEGFR2 阻害剤に対して感受性である。細胞が FGF2(+) であるかどうかを確認する方法は、当該技術分野において周知である。一つの方法は、細胞が FGF2 を発現するかどうかを決定するた

めに免疫組織化学(IHC)アッセイを用いることである。簡潔には、多くの IHC 方法が当該技術分野において公知であり、FGF2 の発現レベルを検出するため、または細胞が FGF2(+ )であるかどうかを決定するためにそれらを用いることができる。

【 0 1 9 9 】

一般的に、IHC は基本的に本明細書に記載される通りに行うことができる。簡潔には：

スライドの調製

A. 初代細胞株および細胞株

患者の組織または細胞株から単離された初代培養細胞を、無菌のガラスカバースリップまたはスライド上で、37 °C で終夜、増殖させる。PBS で手短に洗浄する。所望通りに固定する。細胞を、PBS 中の 10% ホルマリンと共に 10 分間インキュベートすることによって固定する(湿った状態を保つ；氷冷のメタノールと共に 5 分、空気乾燥させる；そして氷冷のアセトンと共に 5 分、空気乾燥させる。次いで PBS 中で洗浄する。

【 0 2 0 0 】

B. 凍結切片

凍結した新鮮組織を、液体窒素中または液体窒素中で予め冷却されたイソペンタン中で、クライオモールド(cryomold)中の OCT 化合物に包埋する。凍結塊を -80 °C で保管する。4-8 μm 厚のクライオスタット切片を切り、SUPERFROST PLUS (登録商標) スライドまたはゼラチンがコートされたスライド上に乗せる。必要時までスライドを -80 °C で保管する。

【 0 2 0 1 】

染色の前に、スライドを室温で 30 分間温め、氷冷のアセトン中で 5 分間固定する。30 分間、空気乾燥する。PBS 中で洗浄する。

【 0 2 0 2 】

C. パラフィン切片

切片をキシレン中で 2x5分、脱パラフィンする。100% エタノールで 2x3分、水和させる。95% エタノールで 1分、水和させる。蒸留水中でリンスする。必要に応じて前処理のための手順を行う。

【 0 2 0 3 】

組織切片の前処理

サンプルがホルマリン固定またはパラフィン包埋のいずれかであった場合、エピトープアンマスキング(epitope unmasking)、酵素的消化またはサポニン等によって抗原決定基を露出させることができる。

【 0 2 0 4 】

手順

切片を PBS-Tween 20 中で 2x2分間、リンスする。

【 0 2 0 5 】

以下の工程を順番に行う。

【 0 2 0 6 】

血清ブロッキング：イムノグロブリンの非特異的結合を阻止するため、切片を、二次抗体と同じ種の標準的血清ブロック(normal serum block)と共に 30 分間インキュベートする。注意：本プロトコールはアビジン-ビオチン検出系を用いるため、組織の型に基づいてアビジン/ビオチンのブロックが必要となり得る。その場合、アビジン/ビオチンのブロックは標準的血清ブロックの後に行うべきである。

【 0 2 0 7 】

一次抗体：切片を、一次抗体希釈バッファー中の適切な希釈の一次抗体と共に、室温で 1 時間、または 4 °C で終夜、インキュベートする。PBS-Tween 20 中でリンスする。

【 0 2 0 8 】

ペルオキシダーゼ ブロッキング：切片を、ペルオキシダーゼ ブロッキング溶液中で、室温で 10 分間インキュベートする。PBS-Tween 20 中でリンスする。

10

20

30

40

50

## 【0209】

二次抗体：切片を、PBS 中の適切な希釈のビオチン化された二次抗体と共に、室温で 30 分間インキュベートする。

## 【0210】

PBS-Tween 20 中で 3x2分間、リンスする。

## 【0211】

検出：切片を、PBS 中のストレプトアビジン-HRP(1:500、Vector Labs)中において、室温で 30 分間インキュベートする。

## 【0212】

TBS 中で 3x2分間、リンスする。

10

## 【0213】

色素原/基質：切片を、DAB 溶液中で 1-3 分間、インキュベートする。

## 【0214】

PBS-Tween 20 中で 2x2分、リンスする。

## 【0215】

所望により、対比染色する。

## 【0216】

蒸留水中でリンスする。

## 【0217】

95% エタノールを介して 2 分間、100% エタノールで 2x3分間、脱水する。

20

## 【0218】

キシレン中で 2x5分間、清澄化(Clear)する。

## 【0219】

マウント液(mounting medium)と共にカバースリップを乗せる。

## 【0220】

IHC の他の方法は当該技術分野において公知であり、アルカリ ホスファターゼに基づく検出、一次抗体結合の二次抗体検出、アビジン-ビオチン、免疫蛍光、触媒シグナル増幅等の使用を含む。

## 【0221】

加えて、当該技術分野において用いられるいくつかの IHC 方法は、臨床診断のために最適化される。かかる一つの方法は、PHARMDX<sup>(登録商標)</sup> IHC として記載される。簡潔には、

30

## (1) 検体調製

生検の検体は、IHC 染色のために、組織を保護するように扱わなければならない。組織を処理する(tissue processing)標準的な方法は、全ての検体に使用されるべきである (D .C. Sheehan、et al.、Theory and Practice of Histotechnology、The C. V. Mosby Co.、St. Louis (1980) を参照されたい)。

## 【0222】

## (i) パラフィン包埋切片

ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織が、使用に適している。代替の固定剤は検証されておらず、誤った結果をもたらし得る。生検からの検体を、3 または 4 mm の厚さに分け、固定剤にとって適切な時間の間、固定すべきである。次いで、組織を脱水し、一連のアルコールおよびキシレン中において清澄化し、その後、融解したパラフィンを浸透させる。パラフィンの温度は、60 を超えるべきではない。c-kit タンパク質を発現する、適切に固定され、包埋された組織塊は、涼しい場所(15-25 )に保管すれば、切片作成およびスライドのマウントの前は無期限に保存がきく。

40

## 【0223】

組織検体を、3-5 μm の切片に切るべきである。切片切り出しの後、組織を Fisher's SUPERFROST PLUS<sup>(登録商標)</sup>、DakoCytomation's Silanized (コード S3003)、帯電スラ

50

イド(charged slide)またはポリ-L-リジンがコートされたスライド上にマウントし、乾燥棚の中に置くべきである。スライド棚を吸収性タオル上でたたいてパラフィンの下およびガラスの上に補足された水を取り除き、次いで、室温で1時間乾燥させるべきである。次いで、スライドの棚を56-60のインキュベーター内に1時間置くべきである。インキュベーターから取り出した後にスライド上に残っているあらゆる余分な水を、タオル上でスライドをたたき、インキュベーター内でさらに1時間乾燥させることによって取り除くべきである。インキュベーターから取り出した後、冷えてパラフィンが固くなるまでスライドを室温に保持すべきである。抗原性を保持するため、室温(20-25)にて保持する場合、スライド上にマウントされた組織切片を切片作成の2ヶ月以内に染色すべきである。DakoCytomation Handbookを参考にする：検体調製についてのさらなる詳細に関する“Immunochemical Staining Methods”または参考文献14および15。脱灰された組織の使用は検証されておらず、推奨されない。FGF2評価および腫瘍の存在の検証のために必要とされるスライドは、同時に調製するべきである。最小限で5つのスライドを調製すべきであり、1つのスライドは腫瘍の存在のため、2つのスライドはc-kitタンパク質の評価用、そして2つのスライドは予備である。

#### 【0224】

##### (II) 試薬調製

染色の前に、以下の試薬を調製する必要がある：

#### 【0225】

##### 標的回復溶液(コード S1699)

洗浄工程のため、蒸留水または脱イオン水(試薬品質の水)を用いて標的回復溶液10xを1:10に希釈することにより、十分な量の標的回復溶液を調製する。標的回復溶液は、使用後に廃棄する。

#### 【0226】

注意：DakoCytomationの標的回復溶液(コード S1700)を使用する場合には、希釈は不要である。

#### 【0227】

##### 洗浄バッファー溶液(コード S3006)

洗浄工程のため、蒸留水または脱イオン水(試薬品質の水)を用いて洗浄バッファー10xを1:10に希釈することにより、十分な量の洗浄バッファーを調製する。未使用の溶液は2-8で7日以下の間保管する。曇りが現れた場合にはバッファーを廃棄する。

#### 【0228】

##### 基質-色素原溶液(DAB+) (コード 3467 または K3468)

この溶液は、使用前に完全に混合すべきである。溶液中に発生するいかなる沈殿も、染色の品質には影響を与えない。To prepare DAB+ 基質-色素原溶液を調製するため、1滴の液体 DAB+ 色素原を1 mLのDAB+ 基質バッファーに添加し、混合する。未使用の溶液は廃棄する。調製されたDAB+の安定性は、2-8で保管する場合およそ5日である。

#### 【0229】

重要な注意点：ピンの中の液体 DAB+ 色素原の色は、透明から明るいラベンダーブラウン(light lavender brown)まで異なり得る。上記の指針にしたがって希釈する。余分な液体 DAB+ 色素原を DAB+ 基質バッファーへ添加する事は、陽性シグナルの劣化をもたらす。

#### 【0230】

##### マウント液(Mounting Medium)

非水性の、耐久性(permanent)マウント液、例えば DakoCytomation Ultramount(コード S1964)が推奨される。水性のマウント液、例えば DakoCytomation Faramount Mounting Medium、Ready-to-use(コード S3025)または DakoCytomation GLYCERGEL(登録商標) Mounting Medium(コード C0563)も適している。使用前に、およそ40(±5)まで温めることによって GLYCERGEL(登録商標)を液化する。

#### 【0231】

10

20

30

40

50

## (III) 手動使用のための染色手順の手順上の注意

使用者は、使用前にこれらの説明書を注意深く読み、全ての構成要素について熟知すべきである(注意事項を参照)。

## 【0232】

全ての試薬は、免疫染色の前に室温(20-25 )まで平衡化すべきである。同様に、全てのインキュベーションは室温で行うべきである。

## 【0233】

染色手順の間は、組織切片を乾燥させてはいけない。乾燥した組織切片は、増大した非特異的染色を示し得る。乾燥を避けるため、スライドを湿ったチャンバーの中に置く。

## 【0234】

脱パラフィンおよび再水和

染色の前に、組織スライドを脱パラフィンして包埋液(embedding medium)を除去し、再水和する必要がある。不完全なパラフィンの除去を避ける。残った包埋液は、非特異的な染色の増大をもたらす。

## 【0235】

工程 1. スライドをキシレンの浴槽(bath)中に置き、5(±1)分間インキュベートする。浴槽を変え、一度繰り返す。

## 【0236】

工程 2. 余分な液を軽く叩いて除き、スライドを無水エタノール中に 3(±1)分間置く。浴槽を変え、一度繰り返す。

## 【0237】

工程 3. 余分な液を軽く叩いて除き、スライドを 95% エタノール中に 3(±1)分間置く。浴槽を変え、一度繰り返す。

## 【0238】

工程 4. 余分な液を軽く叩いて除き、スライドを試薬品質の水の中に 5(±1)分間置く。

## 【0239】

工程 5. 余分な液を軽く叩いて除き、スライドを洗浄バッファー中に置く。染色手順において記載される通りにアッセイを開始する。キシレンおよびアルコール溶液は、40 のスライドの後に交換すべきである。トルエンまたはキシレンの代替物、例えば Histoclear をキシレンの代わりに用い得る。

## 【0240】

標的回復 - 推奨される手順: 水浴

工程 1. 染色ビン(staining jar)、例えばコプリンジャー(Coplin jar)を、希釈された標的回復溶液で満たす(試薬調製を参照)。標的回復溶液を含有する染色ビンを、水浴中に置く。水浴および標的回復溶液を 95-99 まで加熱する(沸騰させない)。温度を安定させ、蒸発を避けるために、ビンを蓋で覆う。

## 【0241】

工程 2. 室温で脱パラフィンした切片を染色ビン中の予熱した標的回復溶液に浸す。水浴および標的回復溶液の温度を 95-99 まで再度平衡化する。95-99 で 20(±1)分間インキュベートする。

## 【0242】

工程 3. スライドと共にビン全体を水浴から取り出す。スライドを、標的回復溶液中で、室温で 20(±1)分間冷却する。

## 【0243】

工程 4. 標的回復溶液をデカントし、切片を洗浄バッファー中でリンスする(試薬調製を参照)。

## 【0244】

工程 5. 最適な結果のため、標的回復の後でかつ染色の前に、切片を洗浄バッファー中に 5(±1)分間浸す。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 4 5 】

## (IV) 手動染色プロトコール

工程 1. 二重内在性酵素ブロック(Dual Endogenous Enzyme Block)(コード S2003)。余分な水を軽く叩いて除く。くずのない(lintless)ティッシュを用い、検体の周りを注意深く拭いてあらゆる残っている液体を除去し、試薬を所定の領域内に保つ。十分な二重内在性酵素ブロック(Dual Endogenous Enzyme Block)をアプライし、検体を覆う [最小で 3 滴 (100  $\mu$ L)]。5( $\pm$ 1)分間インキュベートする。洗浄ボトルからの洗浄バッファーで穏やかにリンスする(組織に直接流れを当ててはいけない。さもないと、組織がスライドから洗い流されてしまう可能性がある)。新鮮な洗浄バッファーの浴槽中に 5( $\pm$ 1)分間置く。

## 【 0 2 4 6 】

工程 2. 一次抗体または陰性対照試薬。組織の乾燥を避けるため、一次抗体/陰性対照試薬および標識されたポリマー(Labeled Polymer)のインキュベーションの間、スライドを湿ったチャンパーの中に置く。余分なバッファーを軽く叩いて除き、上記の通りにスライドを拭く。十分な一次抗体または陰性対照試薬をアプライして検体を覆う[最小で 3 滴 (100  $\mu$ L)]。湿ったチャンパー内で 30( $\pm$ 1)分間インキュベートする。スライドを工程 1 と同様にリンスする。

## 【 0 2 4 7 】

工程 3. EnVision + HRP、抗-ウサギ (コード K4002 または K4003)。余分なバッファーを軽く叩いて除き、スライドを上記の通りに拭く。十分な標識されたポリマー(Labeled Polymer)をアプライして検体を覆う[最小で 3 滴 (100  $\mu$ L)]。湿ったチャンパー中で 30( $\pm$ 1)分間インキュベートする。スライドを工程 1 と同様にリンスする。

## 【 0 2 4 8 】

工程 4. DAB+ 基質-色素原溶液 (コード K3467 または K3468)。余分なバッファーを軽く叩いて除き、スライドを上記の通りに拭く。十分な、調製された DAB+ 基質-色素原溶液をアプライして検体を覆う[最小で 3 滴 (100  $\mu$ L)]。10( $\pm$ 1)分間インキュベートする。洗浄ボトルからの試薬品質の水で穏やかにリンスする(組織に直接流れを当ててはいけない。さもないと組織がスライドから洗い流されてしまう可能性がある)。適切な廃棄のため、DAB+ 基質-色素原溶液の廃液を有害物質の容器に回収する。試薬品質の水の水浴中に 2-5 分間置く。対比染色およびマウントに進む。

## 【 0 2 4 9 】

## (V) 対比染色 (ヘマトキシリン用の説明)

色の付いた染色反応の最終産物は、アルコールおよび水に不溶性である。アルコールまたは水に基づくヘマトキシリン、例えば DakoCytomation ヘマトキシリン(コード S3301、自動化; または S3302、手動)を使用し得る。退行性の(regressive)対比染色を用いてはならない。

## 【 0 2 5 0 】

工程 1. スライドをヘマトキシリンの浴槽中に浸す。使用するヘマトキシリンの強さに応じて、2-5 分間インキュベートする。

## 【 0 2 5 1 】

工程 2. 試薬品質の水の浴槽中で穏やかにリンスする。残りの全てのヘマトキシリンが取り除かれたことを確実にする。

## 【 0 2 5 2 】

注意: DakoCytomation のヘマトキシリン(コード S3302)の使用を強く推奨する。3 分のインキュベーションを用い、この対比染色は、特異的免疫染色を不明瞭にすることがないやわらかい紫/青色の最終産物をもたらす。強い対比染色は、弱い c-kit/CD117 発現を覆い隠し得る。

## 【 0 2 5 3 】

工程 3. 試薬品質の水の浴槽中で、2-5 分間穏やかにリンスする。

## 【 0 2 5 4 】

## (VI) マウント

10

20

30

40

50

非水性の、耐久性のマウント液、例えば DakoCytomation Ultramount (コード S1964) が推奨される。水性のマウント液、例えば DakoCytomation Faramount Mounting Medium, Ready-to-use (コード S3025) または DakoCytomation GLYCERGEL (登録商標) Mounting Medium (コード C0563) も適する。使用前に、およそ 40(±5) まで温めることによって GLYCERGEL (登録商標) を液化する。

【0255】

注意：スライドは、染色の6週間以内に読み取ることを推奨する。しかし、これらに限定されないが、以下を含むいくつかの要因によって、いくらかの減衰が起こり得る；対比染色、マウント材料およびマウント方法ならびにスライドの保管条件。減衰を最小化するため、スライドを室温(20-25 )で暗黒中に保管する。

10

【0256】

IHC の他の方法が、当該技術分野において知られている。例えば、以下の方法は全体が本明細書に取り込まれる：

1. J.A. Ramos-Vara, "Technical Aspects of Immunohistochemistry", Vet Pathol., 42: 405-426 (2005).

2. J.T. Jorgensen et al., "Pharmacodiagnosics and targeted therapies - a rational approach for individualizing medical anticancer therapy in breast cancer", The Oncologist, 12(4):397-405 (April 2007). United States: AlphaMed Press. doi:10.1634/theoncologist.12-4-397. ISSN 1083-7159. PMID 17470682. Retrieved on 2008-03-14.

20

3. J.S. Gold et al., "Combined surgical and molecular therapy: the gastrointestinal stromal tumor model", Annals of Surgery, 244(2):176-184 (August 2006). United States: Lippincott Williams & Wilkins. doi:10.1097/01.sla.0000218080.94145.cf.. ISSN 0003-4932. PMID 16858179. Retrieved on 2008-03-14.

4. P.M. Harari, "Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology", Endocrine-Related Cancer, 11(4):689-708. (December 2004). England: Society for Endocrinology. doi:10.1677/erc.1.00600. ISSN 1351-0088. PMID 15613446. Retrieved on 2008-03-14.

5. M.F. Press et al., "Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials", Clinical Cancer Research, 11(18):6598-6607 (September 15, 2005). United States: American Association for Cancer Research. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0636. ISSN 1078-0432. PMID 16166438. Retrieved on 2008-03-14.

30

6. F. Bibeau et al., "Assessment of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in primary colorectal carcinomas and their related metastases on tissue sections and tissue microarray", Virchows Archiv., 449(3):281-287 (July 25, 2006).

【0257】

実施例 9 - 定量的 RT-PCR アッセイを用いて FGF2 発現のレベルを測定する方法

40

本明細書に記載される通り、FGF2(+)の細胞は FGF2 阻害剤および二重 FGF2/VEGFR2 阻害剤に対して感受性である。細胞が FGF2(+)であるかどうかを確認する方法は、当該技術分野において周知である。一つの方法は、細胞が FGF2 を発現するかどうかを決定するために RT-PCR を用いることである。簡潔には：

【0258】

TAQMAN (登録商標) リアルタイム PCR 蛍光発生アッセイを用いて、RNA の定量化を行う。TAQMAN (登録商標) アッセイは、核酸鋳型の濃度をアッセイするための最も正確な方法の一つである。

【0259】

TRIZOL (登録商標) プロトコール(Invitrogen)を用いて全 RNA を組織から単離し、260

50

nM における吸収を決定することによって定量する。RNA の完全性を決定するため、変性ゲル電気泳動によって、18s および 28s リボソーム RNA のバンドの評価を行うことができる。

#### 【0260】

標準的な方法を用いて、好ましくは、Qiagen (Valencia, CA) から市販されている RNEASY (登録商標) Maxi Kit を採用して、RNA を調製する。リアルタイム PCR のための cDNA 鋳型は、SUPERSCRIPT (登録商標) First Strand Synthesis system for RT-PCR を用いて生成することができる。FGF2 のための代表的なフォワードおよびリバース RT-PCR プライマーを用い得る。例えば、ABI からの FGF2 TAQMAN (登録商標) プライマーを用い得る (カタログ番号 Hs00266645\_m1、またはカタログ番号 Hs00960934\_m1; ABI)。

10

#### 【0261】

SYBR (登録商標) Green リアルタイム PCR 反応を以下のように調製した: 反応混合物は 20 ng の first strand cDNA; 50 nM のフォワードプライマー; 50 nM のリバースプライマー; 0.75X SYBR (登録商標) Green I (Sigma); 1X SYBR (登録商標) Green PCR バッファー (pH 8.3 の 50 mM Tris-HCl、75 mM KCl); 10% DMSO; 3 mM の MgCl<sub>2</sub>; 各々 300 μM の dATP、dGTP、dTTP、dCTP; 1 U の PLATINUM (登録商標) Taq DNA Polymerase High Fidelity (Cat# 11304-029; Life Technologies; Rockville, MD) を含有する。Applied Biosystems の 5700 Sequence Detection System を用いてリアルタイム PCR を行う。条件は、95 で 10分 (変性および PLATINUM (登録商標) Taq DNA Polymerase の活性化)、40 サイクルの PCR (95 で 15 秒、60 で 1 分) である。PCR 産物を、5700 S

20

#### 【0262】

鋳型量の規準化に用いる cDNA 定量化を、TAQMAN (登録商標) 技術を用いて行う。TAQMAN (登録商標) 反応を以下のように調製する: 反応混合物は、20 ng の first strand cDNA; 25 nM の GAPDH-F3、フォワードプライマー; 250 nM の GAPDH-R1 リバースプライマー; 200 nM の GAPDH-PVIC TAQMAN (登録商標) プローブ (蛍光色素標識されたオリゴヌクレオチドプライマー); 1X バッファー A (Applied Biosystems); 5.5 mM の MgCl<sub>2</sub>; 300 μM の dATP、dGTP、dTTP、dCTP; および 1 U の AMPLITAQ GOLD (登録商標) (Applied Biosystems) を含む。GAPDH (D-グリセルアルデヒド-3-リン酸 デヒドロゲナーゼ) を、mRNA レベルを規準化するための対照として用いる。Applied Biosystems の 7700 Sequence Detection System を用いてリアルタイム TAQMAN (登録商標) PCR を行う。条件は、95 で 10 分 (変性および AMPLITAQ GOLD (登録商標) の活性化)、40 サイクルの PCR (95 で 15 秒、60 で 1 分) である。

30

#### 【0263】

TAQMAN (登録商標) 反応において用いる GAPDH オリゴヌクレオチドの配列は、以下の通りである:

GAPDH-F3: 5'-AGCCGAGCCACATCGCT-3' (配列番号 1);

GAPDH-R1: 5'-GTGACCAGGCGCCCAATAC-3' (配列番号 2); および

GAPDH-PVIC TAQMAN (登録商標) プローブ -VIC-5'-CAAATCCGTTGACTCCGACCTTACCTT-3' TAMRA (配列番号:3)。

40

#### 【0264】

Sequence Detection System は、各々の入力された cDNA 鋳型の濃度を算出するために用いられる Ct (閾値サイクル) 値を生成する。入力サンプル中における全 cDNA 量の変動を相殺するため、FGF2 の cDNA レベルを GAPDH の cDNA レベルに対して規準化する。これは、各細胞株について GAPDH の Ct 値を生成することによってなされる。興味のあるポリヌクレオチドおよび GAPDH についての Ct 値を、各々特定の cDNA についての GAPDH に対して規準化された相対的 cDNA レベルを算出するために用いられる Ct 方程式の改変版 (Applied Biosystems PRISM (登録商標) 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2) に入れる。Ct 方程式は、以下の通りである: 核酸鋳型の相対量 =

50

2  $Ct = 2^{-(Cta - Ctb)}$ 、ここで、 $Cta =$  標的の  $Ct -$  GAPDH の  $Ct$  であり、 $Ctb =$  基準の  $Ct -$  GAPDH の  $Ct$  である。(相対量の算出のために基準の細胞株を使用しない;  $Ctb$  は 21 と定義される)。

【0265】

本発明が前述の説明および実施例において特に記載される以外に実施され得ることは明らかであろう。上記の教示を踏まえると、本発明の多数の改変およびバリエーションが可能であり、そのため、添付の特許請求の範囲の内である。

【0266】

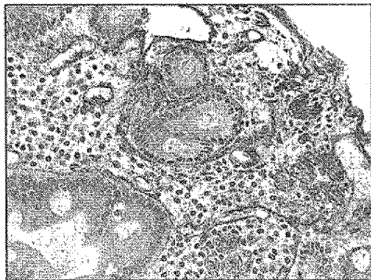
本発明の背景、詳細な説明、図面の簡単な説明および実施例において引用される各文書の開示事項全体(特許、特許出願、雑誌記事、要約、実験マニュアル(laboratory manual)、書籍、GENBANK(登録商標)受入番号、SWISS-PROT(登録商標)受入番号、または他の開示を含む)が、引用により本明細書に取り込まれる。さらに、本明細書と共に提出する配列表のハードコピーは、その対応するコンピュータ読み取り可能な形態に加えて、引用により全体が本明細書に取り込まれる。

10

【図1A】

FIG. 1A

1+ IHC 点数

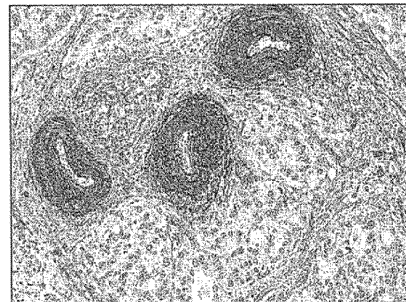


患者 001-307

【図1C】

FIG. 1C

3+ IHC 点数

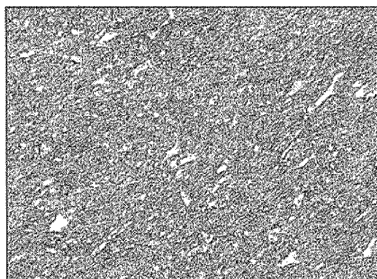


患者 005-511

【図1B】

FIG. 1B

2+ IHC 点数

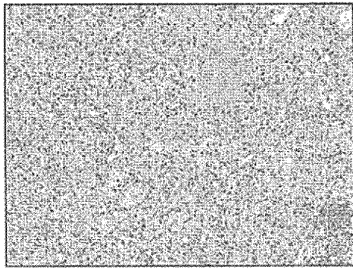


患者 001-311

【 图 2 A 】

FIG. 2A

0 IHC 点数

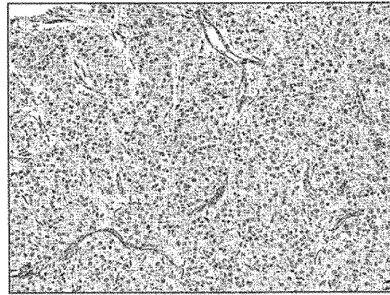


患者 003-314

【 图 2 B 】

FIG. 2B

2+ IHC 点数

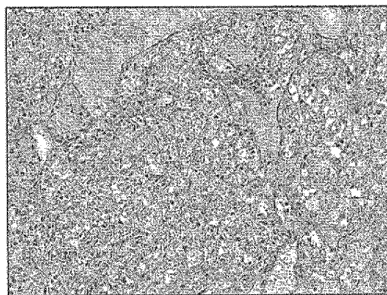


患者 008 308

【 图 3 A 】

FIG. 3A

0 IHC 点数

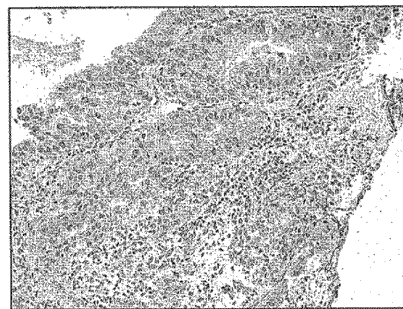


患者 003-314

【 图 3 B 】

FIG. 3B

1+ IHC 点数

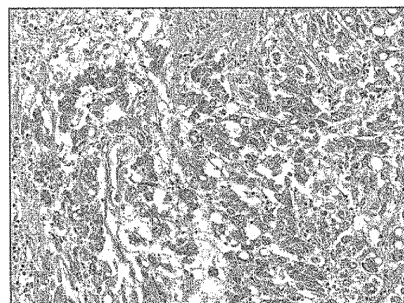


患者 001-307

【 图 3 C 】

FIG. 3C

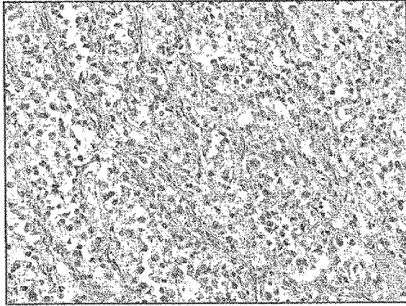
3+ IHC 点数



患者 009 504

【图 4 A】

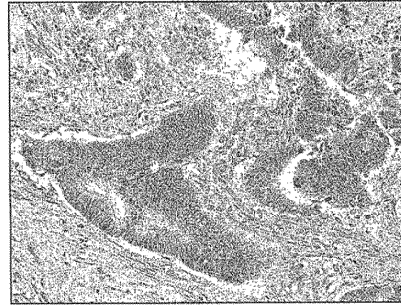
FIG. 4A  
0 IHC 点数



患者 0030317

【图 4 B】

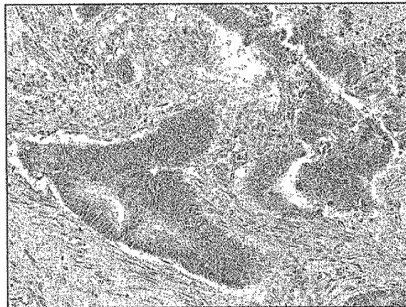
FIG. 4B  
1+ IHC 点数



患者 06-0509

【图 4 C】

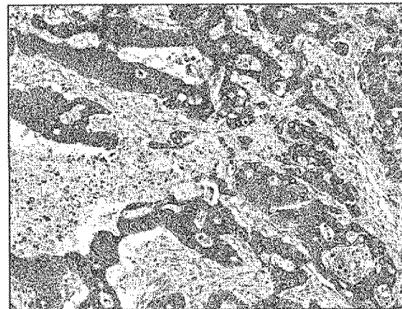
FIG. 4C  
2+ IHC



患者 06-0509

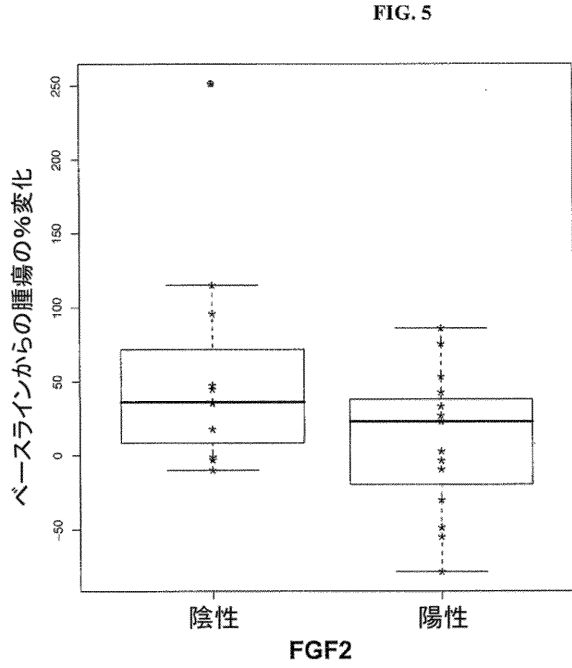
【图 4 D】

FIG. 4D  
3+ IHC 点数

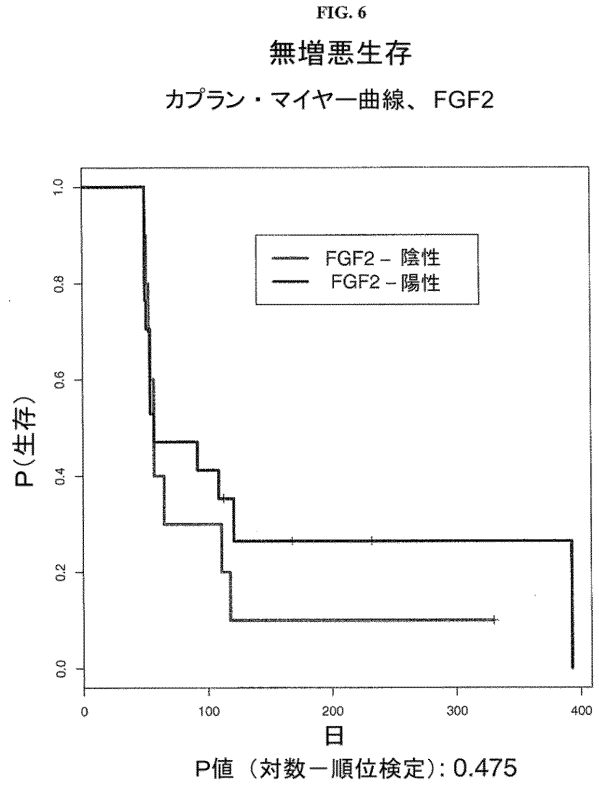


患者 007513

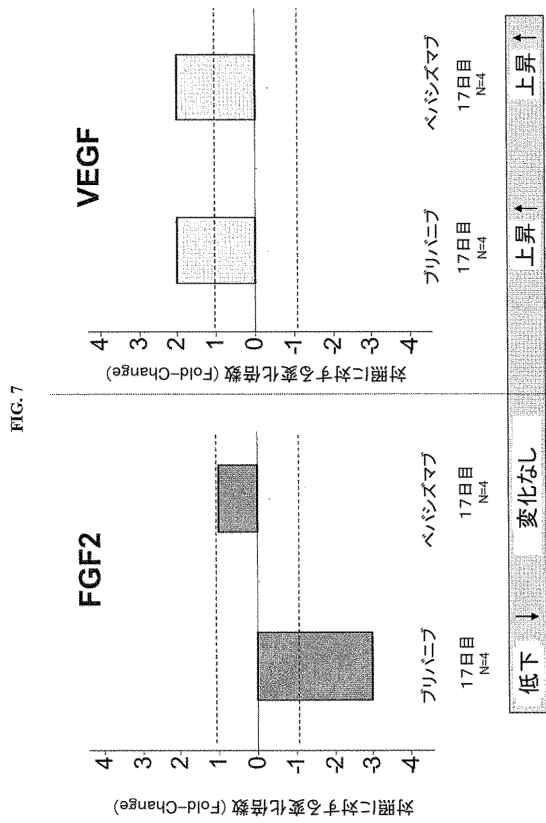
【 図 5 】



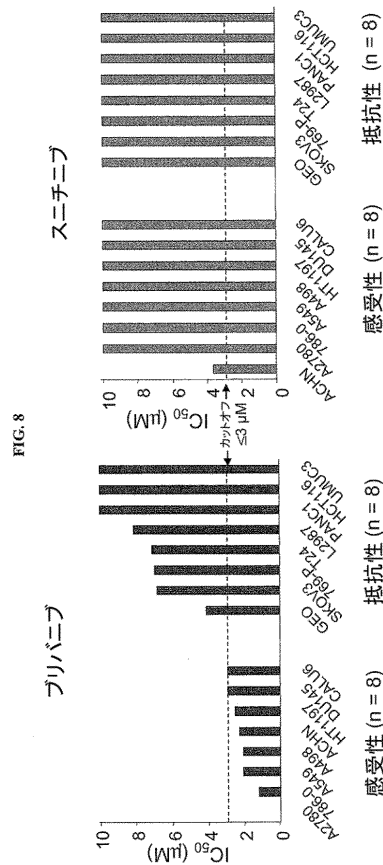
【 図 6 】



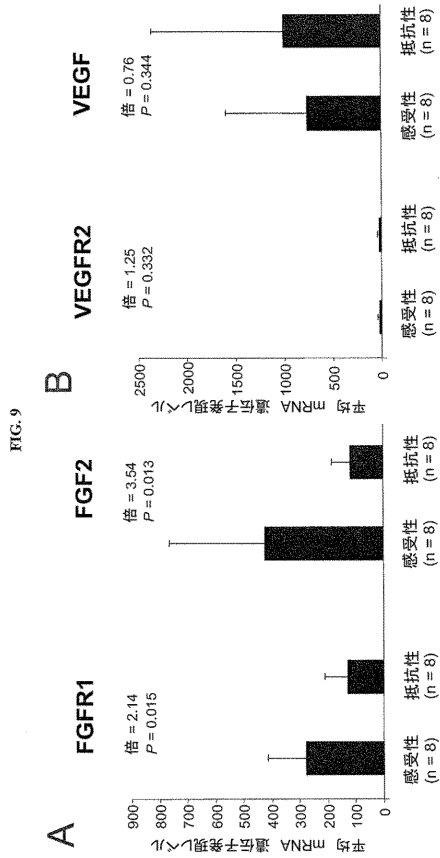
【 図 7 】



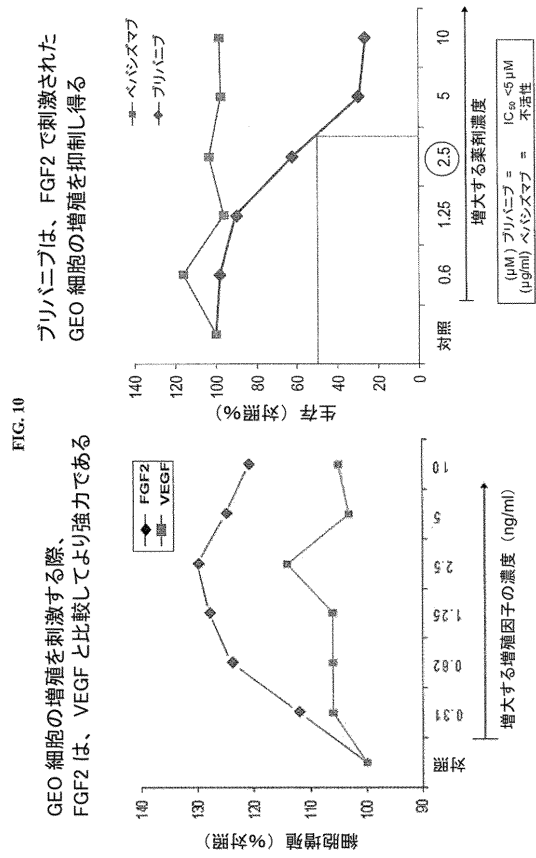
【 図 8 】



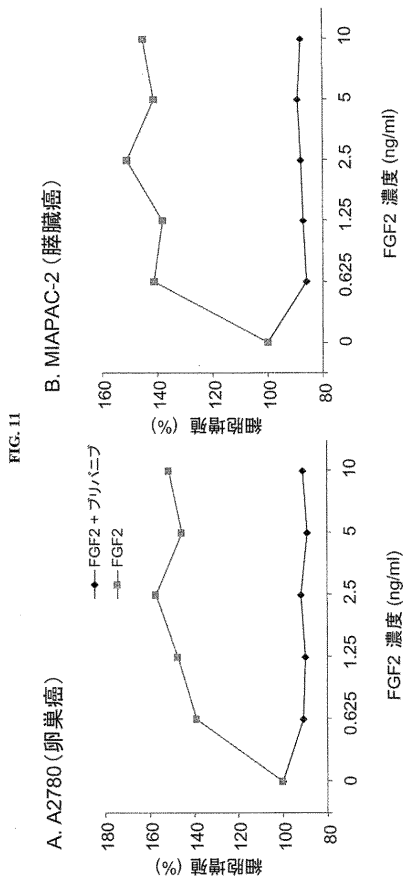
【 図 9 】



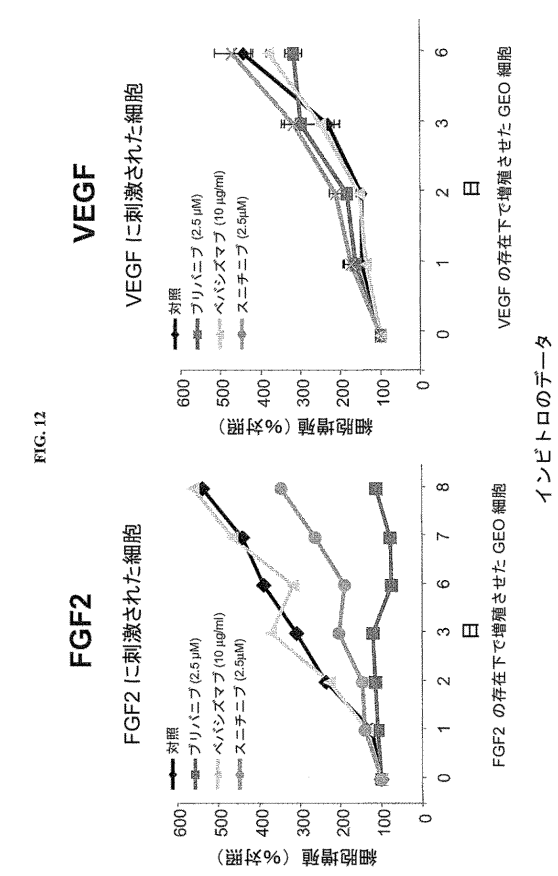
【 図 10 】



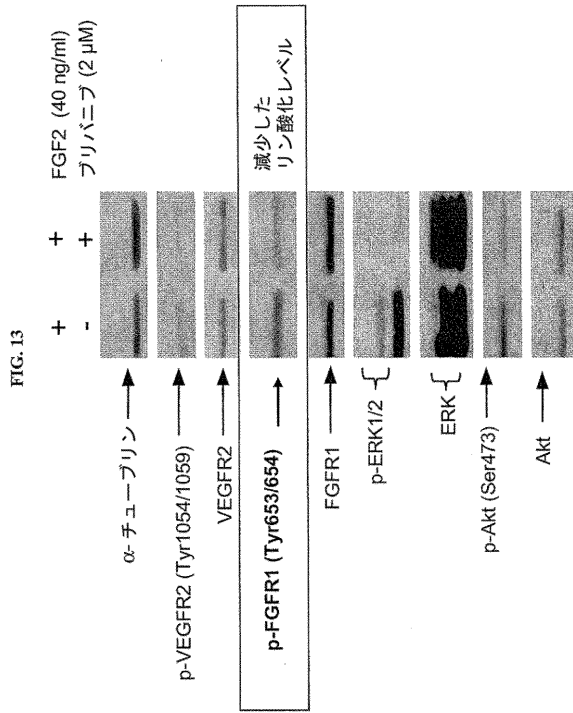
【 図 11 】



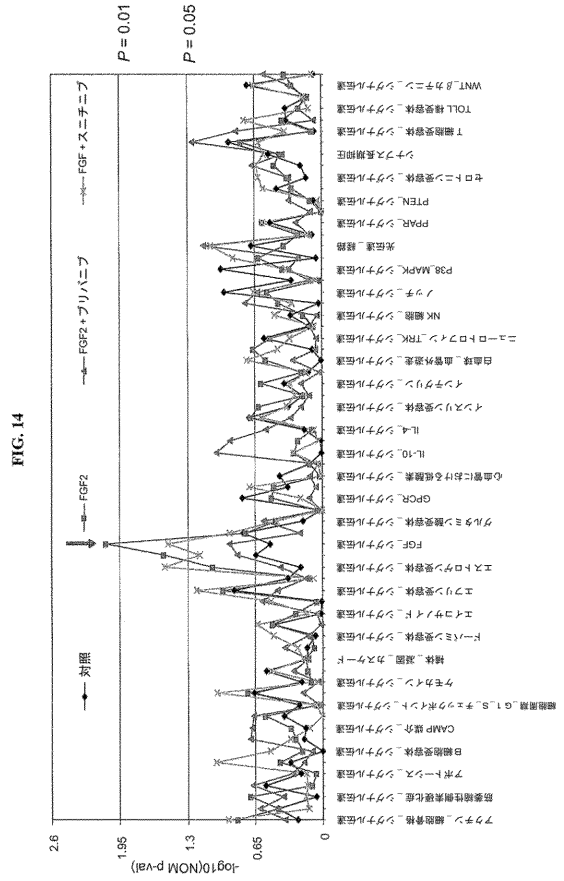
【 図 12 】



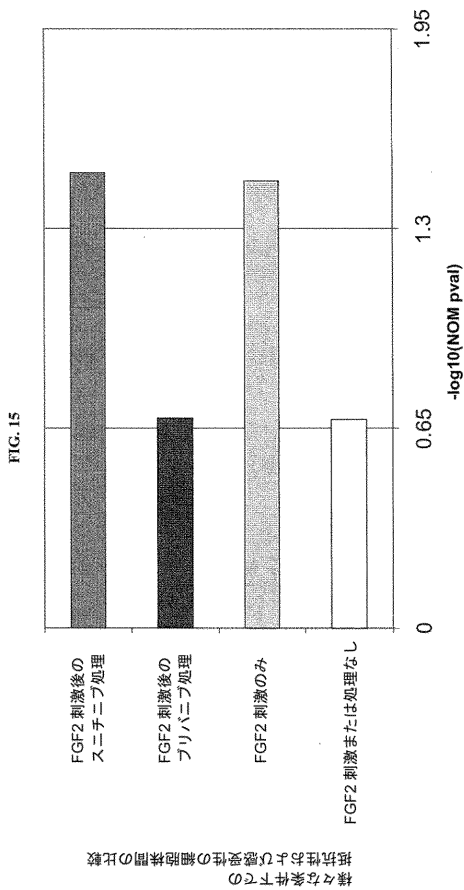
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



様々な癌モデルでの遺伝子の発現レベルの比較

【手続補正書】

【提出日】平成21年12月15日(2009.12.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2010524003000001.app

【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2008/059974

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/059179 A (BAYER PHARMACEUTICAL CORP [US]; KASPER JAMES [US]; PAULOSKI NICOLE [US]) 30 June 2005 (2005-06-30) claims 1,2 the whole document	1-8
A	WO 2006/032009 A (BAYER PHARMACEUTICALS CORP [US]; BIGWOOD DOUGLAS [US]) 23 March 2006 (2006-03-23) claims 1,3 the whole document	1-8
A	WO 2007/028005 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; AYERS MARK DAVID [US]) 8 March 2007 (2007-03-08) claim 1 the whole document	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  26 September 2008		Date of mailing of the international search report  26/01/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Helliot, Bertrand

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2008/059974**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-8 (completely)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2008 /059974

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-8 (completely)

- Methods for predicting the likelihood a patient will respond therapeutically to a method of treating cancer comprising administering an VEGFR-2 modulator;
- Methods for treating a patient with cancer; wherein both methods comprises measuring and comparing the expression level of FGF2.
- Kits.

2. claims: 9-12 (completely)

Same methods and kits as herein above wherein the methods and kits comprise measuring and comparing the expression level of collagen IV.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/059974

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005059179 A	30-06-2005	CA 2548394 A1 EP 1694865 A1 JP 2007515957 T	30-06-2005 30-08-2006 21-06-2007
WO 2006032009 A	23-03-2006	NONE	
WO 2007028005 A	08-03-2007	CA 2621303 A1 EP 1937314 A2	08-03-2007 02-07-2008

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	M	
		A 6 1 P 35/00		

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

(74)代理人 100127638

弁理士 志賀 美苗

(74)代理人 100138911

弁理士 櫻井 陽子

(74)代理人 100146259

弁理士 橋本 諭志

(72)発明者 ヘスス・プラテロ・パラダ

アメリカ合衆国08543ニュージャージー州プリンストン、ルート206アンド・プロピンス・ライン・ロード、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 スーザン・メアリー・ガルブレイス

アメリカ合衆国08543ニュージャージー州プリンストン、ルート206アンド・プロピンス・ライン・ロード、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

Fターム(参考) 4C084 AA02 ZB261 ZC412 ZC422

4C086 AA01 CB05 MA01 MA04 ZB26

专利名称(译)	用于确定对血管内皮生长因子受体-2调节剂的易感性的生物标志物和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010524003A</a>	公开(公告)日	2010-07-15
申请号	JP2010503220	申请日	2008-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	百时美施贵宝公司		
申请(专利权)人(译)	布里斯托尔 - 迈尔斯宝公司		
[标]发明人	ヘススプラテロパラダ スーザンメアリーガルブレイス		
发明人	ヘスス・プラテロ・パラダ スーザン・メアリー・ガルブレイス		
IPC分类号	G01N33/574 A61K31/53 A61K45/00 A61P43/00 G01N33/53 A61P35/00		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158		
FI分类号	G01N33/574.A A61K31/53 A61K45/00 A61P43/00.111 G01N33/53.D G01N33/53.M A61P35/00		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/ZB261 4C084/ZC412 4C084/ZC422 4C086/AA01 4C086/CB05 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/ZB26		
代理人(译)	田中，三夫 山崎 宏 櫻井洋子		
优先权	60/911547 2007-04-13 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)	19) 日本国特許庁(JP)	(12) 公表特許公報(A)	(11) 特許出願公表: 特表2010- P2010- (43) 公表日 平成22年7月15日(20)
	<p>治疗癌症包括施用VEGFR-2调节剂或双VEGFR-2 / FGFR-1调制器，用于对哺乳动物的方法来预测对治疗的反应的可能性的相对方法，下面的 ( A ) 测量所述哺乳动物中FGF2的水平; ( b ) 测量FGF2的水平将样品中的FGF2水平与标准品进行比较，或将样品中的FGF2水平与标准品进行比较，以便将样品分配给阳性类别或FGF2阴性类别的成员，这里，FGF2将哺乳动物分配给阳性样品类别或确定哺乳动物具有升高的FGF2水平表明患者对癌症治疗有治疗反应的可能性增加。除了包含这些方法的试剂盒外，还可以给哺乳动物施用有效量的VEGFR-2调节剂或双VEGFR-2 / FGFR-1。还公开了一种预测是否已经接收到调制器的方法。</p>		
	51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参)
	<b>GO 1 N 33/574 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/574	A 4 C 0 8 4
	<b>A 6 1 K 31/53 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/53	4 C 0 8 6
	<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	
	<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	D
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終	
21) 出願番号	特願2010-503220 (P2010-503220)	(71) 出願人	391015708
86) (22) 出願日	平成20年4月11日 (2008.4.11)		ブリストル・マイヤーズ スクイブ パニー
85) 翻訳文提出日	平成21年12月14日 (2009.12.14)		BRISTOL-MYERS S C B COMPANY
86) 国際出願番号	PCT/US2008/059974		アメリカ合衆国ニューヨーク州 4 ニューヨーク パーク アベ 3 4 5
87) 国際公開番号	W02008/128008		
87) 国際公開日	平成20年10月23日 (2008.10.23)	(74) 代理人	100081422
31) 優先権主張番号	60/911,547		弁理士 田中 光雄
32) 優先日	平成19年4月13日 (2007.4.13)	(74) 代理人	100084146
33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100106518
			弁理士 松谷 道子