

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/203918

発行日 平成29年2月23日 (2017. 2. 23)

(43) 国際公開日 **平成26年12月24日 (2014. 12. 24)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z N A N	4 C O 8 4
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	4 C O 8 6
CO 7 K 14/71 (2006.01)	CO 7 K 14/71	4 H O 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く		

出願番号	特願2015-522950 (P2015-522950)	(71) 出願人	599045903 学校法人 久留米大学 福岡県久留米市旭町 6 7 番地
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/066100		
(22) 国際出願日	平成26年6月18日 (2014. 6. 18)		
(31) 優先権主張番号	特願2013-128714 (P2013-128714)	(74) 代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(32) 優先日	平成25年6月19日 (2013. 6. 19)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(74) 代理人	100106518 弁理士 松谷 道子
		(74) 代理人	100138911 弁理士 櫻井 陽子
		(72) 発明者	東 公一 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測する方法

(57) 【要約】

本発明は、E G F R チロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測する方法であって、以下の工程：

(1) 患者から E G F R チロシンキナーゼ阻害薬による治療前に採取された血液試料における、配列番号 2 ~ 5 から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体の量を測定する工程；および

(2) 測定した抗体量を基準値と比較する工程、

ここで、該抗体量が基準値より高い場合、該患者は E G F R チロシンキナーゼ阻害薬による治療効果が高いと予測される、

を含む方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

上皮成長因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測する方法であって、以下の工程を含む方法：

（１）患者からEGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療前に採取された血液試料における、配列番号２～５から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体の量を測定する工程；および

（２）測定した抗体量を基準値と比較する工程、

ここで、該抗体量が基準値より高い場合、該患者はEGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療効果が高いと予測される。

10

【請求項 2】

EGFRチロシンキナーゼ阻害薬がゲフィニチブである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

患者が非小細胞肺癌患者である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

配列番号 2～5 から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド若しくはその誘導体が結合したビーズまたはプレートを用いて抗体の量を測定する、請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

配列番号 2～5 から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドまたはその誘導体。

20

【請求項 6】

請求項 5 に記載のペプチドまたは誘導体が結合したビーズ。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のペプチドまたは誘導体が結合したプレート。

【請求項 8】

請求項 5 に記載のペプチド若しくは誘導体または請求項 6 に記載のビーズを含む、上皮成長因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測するための診断用組成物。

【請求項 9】

請求項 5 に記載のペプチド若しくは誘導体、請求項 6 に記載のビーズ、または請求項 7 に記載のプレートを含む、上皮成長因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測するためのキット。

30

【請求項 10】

癌を治療する方法であって、以下の工程を含む方法：

（１）患者から上皮成長因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ阻害薬による治療前に採取された血液試料における、配列番号 2～5 から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体の量を測定する工程；

（２）測定した抗体量を基準値と比較する工程；および

（３）該抗体量が基準値より高かった患者をEGFRチロシンキナーゼ阻害薬により治療する工程。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測する方法、当該方法に用いられるペプチド、診断用組成物、およびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

癌の発生および病態進展において、上皮成長因子受容体（EGFR）などのチロシンキナーゼの活性化が重要な役割を果たすことが判明し、それらを標的とする分子標的治療薬の研究、開発が進んでいる。特に、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI

50

)の登場により、切除不能で従来の化学療法に抵抗性の非小細胞肺癌患者の予後が飛躍的に改善している。しかしながら、その臨床効果は個体間で一定ではなく、最初から治療抵抗性を示す患者が少なからず存在する。

【0003】

非小細胞肺癌患者の国内での年間罹患者数は約9万人(悪性腫瘍の中で第3位)、年間死亡者数は約6万5千人(悪性腫瘍の中で第1位)であり、進行期の非小細胞肺癌患者の約40%はEGFR-TKI治療の対象となるEGFR突然変異を有している。現在、EGFR-TKIであるゲフィチニブの治療効果を予測するためのバイオマーカーとしては、主として、EGFR遺伝子変異の解析が一般的に実施されている(非特許文献1,2、参照により本願明細書の一部となす)。こうした遺伝子変異の解析は、癌患者より採取した組織または細胞診検体を用いて通常行われるが、進行癌患者においては検体が少量しか採取できず、解析が困難な状況もある。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Mitsudomi T, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2010;11:121-8.

20

【非特許文献2】Maemondo M, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med.* 2010;362:2380-8.

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測する方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、ゲフィチニブ治療前の非小細胞肺癌患者42人の血漿を用いて、EGFRのアミノ酸配列に由来する20merからなる60種類のペプチドに対する抗体(IgG)価を測定した。測定した抗体価とゲフィチニブ治療後の患者予後との相関を調べたところ、3種類のペプチド(EGFR41-60, EGFR61-80, EGFR481-500)が無増悪生存率(PFS)と有意に相関した。さらに、3種類のペプチド(EGFR41-60, EGFR481-500, EGFR881-900)が全生存率(OS)と有意に相関した。多変量解析において、これらの抗体価は、他の臨床病理学的因子(年齢、喫煙歴、EGFR遺伝子変異)に関わらず独立した予後規定因子であることが判明した。以上の結果から、本発明を完成した。

30

【0007】

本発明は、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測する方法であって、以下の工程:

40

(1)患者からEGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療前に採取された血液試料における、配列番号2~5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体の量を測定する工程;および

(2)測定した抗体量を基準値と比較する工程、

ここで、該抗体量が基準値より高い場合、該患者はEGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療効果が高いと予測される、

を含む方法を提供する。

【0008】

別の態様において、本発明は、配列番号2~5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドまたはその誘導体を提供する。

50

【0009】

別の態様において、本発明は、配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド若しくはその誘導体が結合したビーズまたはプレートを提供する。

【0010】

別の態様において、本発明は、配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド若しくはその誘導体、または前記ペプチド若しくは誘導体が結合したビーズを含む、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測するための診断用組成物を提供する。

【0011】

別の態様において、本発明は、配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド若しくはその誘導体、または前記ペプチド若しくは誘導体が結合したビーズ若しくはプレートを含む、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測するためのキットを提供する。

10

【発明の効果】

【0012】

本発明は、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を期待できる患者の選別を可能とし、当該治療薬の奏効率の向上や、不必要な治療による重篤な副作用の防止に寄与する。本発明は、従来の遺伝子変異解析と併用することにより、治療効果予測の精度をさらに高めることができる。

【図面の簡単な説明】

20

【0013】

【図1】図1は、ゲフィチニブ治療の開始後におけるPFSおよびOSについての Kaplan-Meier 解析を示す。

【図2】図2は、EGFRタンパク質のアミノ酸配列を示す。波線は、EGFR突然変異と相関するペプチドである egfr__481__500、egfr__721__740、egfr__741__760、egfr__841__860、および egfr__1001__1020 を表す。囲み線は、生存(PFSあるいはOS)と相関するペプチドである egfr__41__60、egfr__61__80、egfr__481__500、egfr__881__900 を表す。

【図3】図3は、選択したペプチドに対する抗体価の高値群および低値群における、PFSおよびOSについての Kaplan-Meier プロットを示す。抗体価の高値群および低値群は、中央値により定義した。

30

【図4】図4は、ペプチドに対する抗体量と臨床病理学的特徴(実線)または臨床病理学的特徴のみ(破線)を用いた、PFSおよびOSについての ROC 曲線を示す。AおよびBのペプチド: EGFR481-500、EGFR41-60、およびEGFR61-80; CおよびDのペプチド: EGFR481-500およびEGFR41-60。

【図5】図5は、PFS(A)およびOS(B)についての ラソペナルティーを伴う コックス回帰のソリューションパスを示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

40

本明細書において、上皮成長因子受容体(EGFR)由来ペプチドとは、EGFRのアミノ酸配列(配列番号1)の一部からなるペプチドを意味する。本明細書中、「EGFR x-y」または「egfr__x__y」とは、配列番号1のアミノ酸位置xからyまでのアミノ酸配列からなるペプチドを意味する。例えば、「EGFR41-60」または「egfr__41__60」とは、配列番号1の41番目から60番目のアミノ酸配列からなるペプチドを意味する。本発明の方法は、EGFR41-60(LGTFEDHFLSLQRMFNCEV:配列番号2)EGFR61-80(VLGNLEITYVQRNYDLSFLK:配列番号3)、EGFR481-500(FGTSGQKTKIISNRGENSCK:配列番号4)、およびEGFR881-900(MALESILHRIYTHQSDVWSY:配列番号5)から選択されるEGFR由来ペプチド(すなわち、配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド)に対する抗体の量を測定するこ

50

とを含む。本発明の方法では、2種類以上のペプチドに対する抗体の量を測定してもよい。ある態様において、本発明の方法は、EGFR41-60（配列番号2）、EGFR61-80（配列番号3）、およびEGFR481-500（配列番号4）から選択されるEGFR由来ペプチドに対する抗体の量を測定することを含む。別の態様において、本発明の方法は、EGFR41-60（配列番号2）、EGFR481-500（配列番号4）、およびEGFR881-900（配列番号5）から選択されるEGFR由来ペプチド、好ましくはEGFR41-60（配列番号2）およびEGFR481-500（配列番号4）から選択されるEGFR由来ペプチドに対する抗体の量を測定することを含む。

【0015】

EGFRチロシンキナーゼ阻害薬（以下、EGFR-TKIとも称する）には、ゲフィニチブおよびエルロチニブが含まれる。好ましくは、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬はゲフィニチブである。

10

【0016】

本発明の方法における患者には、非小細胞肺癌、脳神経膠芽腫、頭頸部扁平上皮癌、膵臓癌などEGFR-TKIにより治療効果の期待できる癌種の患者が含まれる。好ましくは、患者は、非小細胞肺癌患者である。

【0017】

患者の血液試料は、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療を受ける患者から、当該治療前に採取される。EGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療を受ける患者には、当該治療を受ける予定の患者および当該治療が選択肢として考えられる患者が含まれる。血液試料には、全血、血清および血漿が含まれる。好ましくは、血液試料は血清または血漿であり、より好ましくは血漿である。血液試料は、患者からの採取後、測定まで凍結保存してもよく、必要に応じて試薬等により処理してもよい。血液試料は、当業界にて知られる常套的方法によって調製することができる。

20

【0018】

抗体量は、当業界に知られるいずれの方法により測定してもよい。測定方法としては、ELISA法(Pedersen MK, et al., J Immunol Methods. 2006 Apr 20;311(1-2):198-206. Epub 2006 Mar 6.)、RIA法(Maruta T, et al., Immunol Invest. 2006;35(2):137-48.)、Luminox（登録商標）システムによる方法(Komatsu N, et al., Scand J Clin Lab Invest 64, 535-546, 2004)が挙げられる。測定する抗ペプチド抗体は、特に限定されないが、通常IgGである。

30

【0019】

Luminox（登録商標）システムによる方法は、微量（数マイクロリットル）の血液試料により高感度でハイスループットな解析が可能であるため、本発明に好適である。簡単に説明すると、EGFR由来ペプチドが結合したビーズに対して結合する、患者の血液試料中の抗体を蛍光等によって測定する。例えば、患者より採取した血液試料を必要に応じて希釈し、EGFR由来ペプチドが結合したビーズと共にインキュベートして、血液試料中の抗ペプチド抗体をビーズ上のEGFR由来ペプチドに結合させる。次いで、このビーズをビオチン化抗ヒトIgGと共にインキュベートして、ビーズに結合した抗ペプチド抗体に当該抗ヒトIgGを結合させる。さらに、ビーズをストレプトアビジン-PEとインキュベートして、ビーズに結合したPEの蛍光強度を測定することにより、抗ペプチド抗体の量を測定することができる。蛍光強度は、マルチプレックスビーズ懸濁アレイ（Luminox（登録商標）システム）により測定することができる。

40

【0020】

抗体量の測定には、配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド、またはその誘導体を用いることができる。本明細書において、ペプチドの誘導体とは、1または数個、好ましくは1または2個のアミノ酸残基の欠失、置換、または付加によりそのアミノ酸配列が改変されているが、血液試料中に存在する抗ペプチド抗体に対する反応性を維持するペプチドを意味する。ペプチドおよびその誘導体は、抗体による認識を損なわない範囲で、そのアミノ基やカルボキシル基が修飾されていてもよい。

50

【0021】

配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドまたはその誘導体は、ビーズまたはプレートに結合していてもよい。ペプチドおよび誘導体は、直接ビーズまたはプレートに結合していても、リンカーなどを介して間接的に結合していてもよい。ビーズとしては、例えばポリスチレンビーズおよび磁気ビーズが挙げられる。ビーズの大きさは、特に限定はされないが、例えば、直径が5～7μmである。ビーズは、Luminox（登録商標）システムに使用可能なLuminox（登録商標）ビーズであってもよい。プレートとしては、ポリスチレン製のプレートが例示される。ウェルの数は、例えば6、24、96、および384であり、好ましくは96である。プレートは、ELISA法またはRIA法に慣用されるプレートであってもよい。ペプチドまたは誘導体のビーズまたはプレートへの結合は、当業者が適宜実施できる。1つのビーズまたはプレートの1つのウェルに結合しているペプチドまたは誘導体は、1種類であっても、複数種類であってもよい。

10

【0022】

測定した抗体量は、基準値と比較される。基準値は、例えば、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療開始後一定期間内に疾患の進行した患者群および/または進行しなかった患者群の当該治療前の抗体量に基づき予め決定した値である。あるいは、基準値は、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療開始前の患者群における抗体量の中央値であってもよい。

20

【0023】

本発明において、測定した抗体量が基準値より高い場合、当該患者はEGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療効果が高いと予測される。また、抗体量が多ければ多いほど、治療効果がより高いと予測することができる。本明細書において、「EGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療効果が高い」とは、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療により、当該治療を行わなかった場合と比較して、全生存期間または無増悪生存期間が延長されることを意味する。

30

【0024】

ある態様において、本発明の方法は、EGFR41-60（配列番号2）、EGFR61-80（配列番号3）、およびEGFR481-500（配列番号4）から選択されるEGFR由来ペプチドに対する抗体の量を測定することを含み、測定した抗体量が基準値より高い場合、当該患者は、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療により、当該治療を行わなかった場合と比較して、無増悪生存期間が延長されると予測される。

40

【0025】

別の態様において、本発明の方法は、EGFR41-60（配列番号2）、EGFR481-500（配列番号4）、およびEGFR881-900（配列番号5）から選択されるEGFR由来ペプチド、好ましくはEGFR41-60（配列番号2）およびEGFR481-500（配列番号4）から選択されるEGFR由来ペプチドに対する抗体の量を測定することを含み、測定した抗体量が基準値より高い場合、当該患者は、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療により、当該治療を行わなかった場合と比較して、全生存期間が延長されると予測される。

40

【0026】

本発明の診断用組成物は、配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド若しくはその誘導体または前記ペプチド若しくは誘導体が結合したビーズを含む。本発明の診断用組成物は、本明細書に記載の、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測する方法に従って使用される。本発明の診断用組成物はさらに、適当な担体および緩衝剤、等張化剤などの添加剤を含んでいてもよく、凍結乾燥状態で提供され用時調製されるものであってもよい。本発明の診断用組成物は、本発明の方法に沿った使用説明書とともに提供されてもよい。

【0027】

本発明のキットは、配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド若し

50

くはその誘導体、または前記ペプチド若しくは誘導体が結合したビーズ若しくはプレートを含む。本発明のキットは、本明細書に記載の、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測する方法に従って使用される。キットは、例えば、ELISA法、RIA法、またはLuminex（登録商標）システムによる方法を実施するためのキットである。キットはさらに、ブロッキング液、洗浄液、希釈液、検出用抗体、対照試料、プレート、および本発明の方法に沿った使用説明書などを含んでも良い。

【0028】

本発明に用いられるペプチドおよび誘導体は、抗体による認識を損なわない範囲で、そのアミノ基やカルボキシル基が修飾されていてもよい。本発明に用いるペプチドおよびその誘導体は、通常のペプチド合成方法により製造することができる（Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966; The Proteins, Vol2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成、丸善（株）、1975; ペプチド合成の基礎と実験、丸善（株）、1985; 医薬品の開発続 第十四巻・ペプチド合成、広川書店、1991）。

10

【0029】

別の態様において、本発明は、上皮成長因子受容体（EGFR）チロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測するためのデータを収集する方法であって、以下の工程：

(1) 患者からEGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療前に採取された血液試料における、配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体の量を測定する工程；および

20

(2) 測定した抗体量を基準値と比較する工程、

ここで、該抗体量が基準値より高い場合、該患者はEGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療効果が高いと予測される、

を含む方法を提供する。

【0030】

別の態様において、本発明は、癌を治療する方法であって、以下の工程：

(1) 患者からEGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療前に採取された血液試料における、配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドに対する抗体の量を測定する工程；

30

(2) 測定した抗体量を基準値と比較する工程；および

(3) 該抗体量が基準値より高かった患者をEGFRチロシンキナーゼ阻害薬により治療する工程、

を含む方法を提供する。

【0031】

別の態様において、本発明は、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測するための診断用組成物の製造のための、配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド若しくはその誘導体または前記ペプチド若しくは誘導体が結合したビーズの使用を提供する。

40

【0032】

別の態様において、本発明は、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬の治療効果を予測するためのキットの製造のための、配列番号2～5から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド若しくはその誘導体、または前記ペプチド若しくは誘導体が結合したビーズ若しくはプレートの使用を提供する。

【0033】

以下、実施例により本発明をさらに説明するが、如何なる意味においても本発明は以下の実施例により限定されない。

【実施例】

【0034】

1. 材料および方法

(1) 患者、治療、および試料の回収

本研究では、ゲフィチニブによる治療を受けた42例の非小細胞肺癌（NSCLC）患

50

者を、2006年1月～2008年12月、単一の施設（日本、久留米市、久留米大学附属病院）においてスクリーニングした。年齢、性別、組織像、喫煙の状態、全身状態（PS）、病期、および治療法を含めた患者の臨床病理学的特徴の詳細は、臨床経過について知らされていない独立の審査者によるカルテ審査から得た（表1）。進行したNSCLCのため、いずれの患者も、毎日1回、経口によりゲフィチニブ（250mg）を投与された。記録した患者の特徴には、性別、年齢、Eastern Cooperative Oncology Group（ECOG）による全身状態（PS）、腫瘍組織像、喫煙歴、先行の化学療法、およびEGFR突然変異の種類が含まれた。腫瘍縮小効果（tumor response）は、コンピュータ断層撮影（CT）を介して調べ、RECIST（Response Evaluation Criteria in Solid Tumors）に従い評価した。縮小効果は、最初の記録から少なくとも4週間（完全奏功または部分奏功の場合）または6週間（疾患安定の場合）後に確認した。PFS（無増悪生存期間）は、EGFR-TKI治療の開始日から疾患進行日または最終診療日までを計算した。本研究はまた、ヘルシンキ宣言の条項も遵守する。本研究は、久留米大学の治験審査委員会による承認を受けた。

10

【0035】

血清または血漿は、ゲフィチニブ治療を受けたNSCLC患者から、ゲフィチニブ治療前に回収した。説明同意文書は、全ての対象から得た。血清または血漿を得たら、使用まで-80度で凍結した。

【0036】

(2) EGFR突然変異解析

EGFR遺伝子の突然変異は、エクソン19（E746-A750del）および21（L858R）において、既報のとおりペプチド核酸-ロック核酸（PNA-LNA）PCRクランプ（22）により調べた。略述すると、ゲノムDNAを、QIAamp DNA Microキット（QIAGEN）を用いてパラフィン包埋した組織から精製した。使用したPCRプライマーは、Invitrogen Inc. に委託して合成させた。PNAクランプのプライマーおよびLNAの突然変異体プローブは、それぞれ、FASMEC（日本、神奈川県）およびIDT（Coralville, IA）から購入した。PNA-LNA PCRクランプは、SDS-7500 System（Applied Biosystems）を用いて行った。

20

30

【0037】

(3) EGFR由来ペプチドおよびEGFR由来ペプチドに対して反応性のある抗体量の測定

図2に示すように、EGFRタンパク質の配列から設計した60種類の異なる20merのペプチドを合成し、Sigma Aldrichから購入した。ペプチドは、既報のとおり（23）、DMSOにより溶解した。EGFR由来ペプチドに特異的な抗体量は、既報のとおり（24）、Luminex（登録商標）システムを用いるマルチプレックスビーズ懸濁アレイを介して測定した。略述すると、100μlの希釈した血漿を、EGFR由来ペプチドが結合したxMAPビーズ（Luminex Corp.、Austin, TX）と共に、プレートシェーカー上の96ウェルフィルタープレート（MABVN1250; Millipore Corp.、Bedford, MA）内で、室温で2時間インキュベートした。2時間後、プレートをT-PBSにより洗浄し、100μlのビオチン化ヤギ抗ヒトIgG（BA-3080; Vector Laboratories、Burlingame, CA）と共に、プレートシェーカー上で、室温において1時間インキュベートした。洗浄の後、100μlのストレプトアビジン-PEをウェルへと添加し、プレートを、プレートシェーカー上で、室温で30分間インキュベートした。結合したビーズを3回洗浄した後、100μlのPBSを各ウェルに添加した。各試料50μlずつを用いて、Luminex（登録商標）システムでビーズ上の蛍光を検出した。抗体量は、蛍光強度により表し、値は、既報のとおり（24）、蛍光強度単位（FIU）により示した。試料希釈アッセイから得たFIUの線形曲線が5～10,000FIUであっ

40

50

た（データ非提示）ため、カットオフレベルは10FIUに設定した。60種類の異なるペプチドの各々に対して反応性のある抗体の量を測定した。

【0038】

(4) 統計学的解析

60種類の異なるペプチドの各々に対して反応性のある抗体量が突然変異状態と関連するかについて調べた。この目的のため、ウィルコクソン順位和検定を用いて、60種類のペプチドの各々に対して反応性のある抗体量の中央値を、EGFRの突然変異体（d e l E 7 4 6 - A 7 5 0 および L 8 5 8 R）と野生型とで比較した。PFS（無増悪生存期間）は、ゲフィチニブ治療の開始日から疾患進行日までの期間として定義した。OS（全生存期間）は、ゲフィチニブ治療の開始日から、死因に関わらず死亡日までの期間として定義した。PFSまたはOSを決定できなかった患者は、最終診療日を観察打ち切りとして取り扱った。次に、60種類の異なるペプチドの各々に対して反応性のある抗体量がPFSまたはOSと関連するかについて調べた。説明変数としての各ペプチドに対して反応性のある抗体量、突然変異状態、喫煙の状態、性別、および全身状態と共に、コックスの比例ハザードモデルを適用した。また、60種類の異なるペプチドの各々に対して反応性のある抗体量が腫瘍縮小効果と関連するかどうかを、ロジスティック回帰を適用することにより調べ、CR（完全奏功）およびPR（部分奏功）を奏功するとみなした。60種類のペプチドを用いたため、困難な多重度の問題が生じた。本発明者らは、偽発見率（FDR）を5%のレベルに制御する、PFS（OSまたは腫瘍縮小効果）と有意に関連するペプチドを同定した。

10

20

【0039】

解析結果の説明として、臨床病理学的特徴のみを用いるよりも正確な患者の予後予測に有用なペプチドの同定を試みた。患者数より多いペプチドを用いたため標準的な多変量コックス回帰（多重回帰）を適用することができなかったが、これは本研究における極めて困難な問題であった。影響が大きい観察を回避するため、本発明者らは、各ペプチドに対して反応性のある抗体量を $\log(\text{ペプチドに対する抗体量} + 1)$ により変換し、ゼロ平均および単位標準偏差へと標準化した。本発明者らは、ラッソ型のペナルティーによるコックス回帰（25、26）を適用した。ラッソ法は有用であり、高次元データを解析するのによく用いられるようになりつつある。ラッソ法の注目すべき特徴は、疎らさである。すなわち、PFS（OS）と関連しないペプチドの回帰係数であれば、ゼロとして評価しうる。この特徴に基づき、本発明者らは、患者の予後予測に有用であると期待されるいくつかのペプチドを同定した。選択されたペプチドに対して反応性のある抗体量が患者の予後予測に実際に有用であるかを調べるために、コックス回帰解析および時間依存的ROC解析（27）を適用した。臨床病理学的特徴のみによるコックス回帰ならびに各ペプチドに対して反応性のある抗体量と臨床病理学的特徴の両方によるコックス回帰を介して、ROC曲線下面積（AUC）を危険性スコアについて評価した。ブートストラップ法による1000回の反復についてのP値を計算してAUCの同等性を検定することにより、AUCを比較した。統計学的解析は、R version 2.13ソフトウェアおよびSAS version 9.3ソフトウェア（SAS Institute, Cary, NC）により実施した。

30

40

【0040】

2. 結果

(1) 患者の特徴および生存解析

42例の患者の臨床学的特徴を、表1に示す。25例（59%）の患者が女性であり、24例（57%）が非喫煙者であり、全患者の年齢の中央値は63.5歳（範囲：38～82歳）であった。38例（90%）の患者が腺がんを有し、34例（80%）は全身状態良好であり（Eastern Cooperative Oncology Groupによる評定尺度が0）、15例の患者（32%）には第一選択の化学療法としてEGFR-TKI治療が施された。EGFR突然変異の種類について述べると、8例の患者がエクソン19に欠失を有し、13例の患者がエクソン21にL858Rミスセンス突然変異

50

を有し、21例の患者が野生型を有していた。

【0041】

解析の時点において、追跡期間の中央値は、418日間（範囲：16～1532日間）であった。PFSの中央値は、201日間（範囲：11～1379日間）であり、OSの中央値は、418日間（範囲：16～1532日間）であった。ゲフィチニブ治療の開始後におけるPFSおよびOSについての Kaplan-Meier 解析を、図1に示す。ログランク検定により、ゲフィチニブ治療の結果として、EGFR突然変異を有する患者におけるPFSは、突然変異を有さない患者におけるPFSより有意に延長された（中央値347日に対して54日、 $P = 0.0029$ ）（図1A）が、これら2つの患者群のOSの間には有意差が認められない（それぞれ、中央値314日に対して128日、 $P = 0.1095$ ）（図1B）ことが明らかとなった。突然変異を有する患者と野生型の患者との間におけるこのPFSの相違は、いずれの種類のEGFR突然変異についても明らかであった（図1C、D）。

10

【0042】

(2) EGFR由来ペプチドに対する抗体量とゲフィチニブによる治療を受けたNSCLC患者におけるEGFR突然変異との間の相関

本発明者らはまず、60種類の異なるペプチドの各々に対して反応性のある抗体が、NSCLC患者に由来する血漿または血清において、Luminex（登録商標）システムによって定量可能であるかを調べた（表3、図3Aおよび3B）。各ペプチドに対して反応性のある抗体量がEGFR突然変異と相関するかについて解析し、エクソン21の突然変異を有する患者では、ペプチド egfr__481__500、egfr__721__740、egfr__741__760 に対する抗体量が、エクソン21の突然変異を有さない患者におけるより有意に高いことを見出した（egfr__481__500 について $P = 0.017$ ；egfr__721__740 について $P = 0.036$ ；egfr__741__760 について $P = 0.007$ ）。これらの3つのペプチドにおいて、エクソン21の突然変異を有する患者における抗ペプチド抗体量の中央値は、エクソン21の突然変異を有さない患者における抗ペプチド抗体量の中央値の約2倍であった（表3）。一方、egfr__841__860 に対する抗体量は、エクソン19に欠失を有する患者では、欠失を有さない患者より有意に低かった（ $P = 0.047$ ）。egfr__1001__1020 に対する抗体量は、エクソン19に欠失を有する患者において有意に高かった。その他のペプチドに対して反応性のある抗体量は、EGFR突然変異との相関を有さなかった。

20

30

【0043】

(3) EGFR由来ペプチドに対する抗体量とゲフィチニブにより治療したNSCLC患者における生存との間の関係

さらに、抗ペプチド抗体量が、ゲフィチニブによる治療後のNSCLC患者のPFSおよびOSと十分に相関するかどうかを調べた。本発明者らは、全ペプチドのうちの多くのp値が5%未満であり、コックス回帰において38種類および32種類のペプチドのp値が5%未満であり、さらにFDRを5%のレベルに制御しても、PFSについて有意な35種類のペプチドおよびOSについて有意な20のペプチドが同定されることを見出した（表4）。本発明者らはまた、各ペプチドに対する抗体量が腫瘍縮小効果（CRまたはPR）と相関するかについても調べた。ロジスティック回帰解析により、いずれのペプチドに対する抗体量も腫瘍縮小効果とは相関しないことが示された（データ非提示）。

40

【0044】

(4) 患者の予後予測に有用なペプチドの同定

前述のとおり、多くのペプチドに対する抗体量がPFSおよび/またはOSと有意に相関した。多くのペプチドに対する抗体量が、中程度または高度に相関していた（データ非提示）。これにより、比較的少数のペプチドに対する抗体量であっても、患者の予後予測に有用な規則の構築に十分でありうることが示唆された。ラッソペナルティーを伴うコックス回帰から、本発明者らは、egfr__41__60、egfr__61__80、およびegfr__481__500 に対する抗体量がPFSに対して比較的大きな効果を及ぼし、e

50

g f r _ 4 1 _ 6 0、e g f r _ 4 8 1 _ 5 0 0、およびe g f r _ 8 8 1 _ 9 0 0 に対する抗体量がOSに対して比較的大きな効果を及ぼすことを見出した(PFSおよびOSについてのソリューションパス(solution path)を、それぞれ図5Aおよび5Bに示す)。PFSについての予測規則を構築するため、e g f r _ 4 1 _ 6 0、e g f r _ 6 1 _ 8 0、およびe g f r _ 4 8 1 _ 5 0 0 に対する抗体量を用いた。また、e g f r _ 4 1 _ 6 0 に対する抗体量およびe g f r _ 8 8 1 _ 9 0 0 に対する抗体量は強く相関していた(スピアマンの順位相関係数は、0.71であり、 $P < 0.001$ であった)ため、本発明者らは、OSについてはe g f r _ 4 1 _ 6 0 およびe g f r _ 4 8 1 _ 5 0 0 に対する抗体量を用いた。表2Aには、交絡因子となる可能性があるPS、年齢、性別、および喫煙の状態について調整した、e g f r _ 4 1 _ 6 0、e g f r _ 6 1 _ 8 0、およびe g f r _ 4 8 1 _ 5 0 0 に対する抗体量を用いたPFSについてのコックス回帰の結果を示した。3つのペプチド全てが、臨床病理学的特徴とは独立した有意な予後規定因子であることが見出された(e g f r _ 4 1 _ 6 0 については $P = 0.001$ であり、e g f r _ 6 1 _ 8 0 については $P = 0.020$ であり、e g f r _ 4 8 1 _ 5 0 0 については $P = 0.028$ であった)。表2Bには、e g f r _ 4 1 _ 6 0 およびe g f r _ 4 8 1 _ 5 0 0 に対する抗体量を用いたOSについてのコックス回帰の結果を示した。いずれのペプチドに対する抗体量も、臨床病理学的特徴とは独立した有意な予後規定因子であることが見出された(e g f r _ 4 1 _ 6 0 については $P = 0.018$ であり、e g f r _ 4 8 1 _ 5 0 0 については $P = 0.027$ であった)。選択したペプチドに対する抗体量の限界効果を把握するため、図3Aおよび図3Bのそれぞれに、選択したペプチドに対する抗体量の高値群および低値群における、PFSおよびOSについての Kaplan-Meierプロットを示す(臨床病理学的特徴による影響については調整していない)。また、時間依存的ROC解析を用いて、臨床病理学的特徴にペプチドに対する抗体量を追加することにより、患者の予後予測が改善されるかを調べた。図4Aおよび4Bは、ペプチドに対する抗体量と臨床病理学的特徴、および臨床病理学的特徴のみを用いて、表2A(PFSに関する)および表2B(OSに関する)に示すコックス回帰により評価した、1年間および2年間の危険性スコアのROC曲線を示す。ROC曲線は、1年間および2年間のPFSについての診断が実質的に改善されることを示す(AUCの比較について $P < 0.001$)。OSについても、1年間および2年間の時間依存的ROC曲線のAUCが、ペプチドに対する抗体量を追加することにより、臨床病理学的特徴のみの場合より有意に大きくなった($P < 0.001$) (図4Cおよび4D)。したがって、時間依存的ROC解析は、臨床病理学的特徴にペプチドに対する抗体量を追加することにより、PFSとOSのいずれについても、より正確な患者の予後予測が可能となることを示した。

【0045】

10

20

30

【表 1】

表 1 患者の特徴

特徴	数	
年齢 (歳)		
中央値	63.5	
範囲	38~82	
性別		
男性	17	
女性	25	10
組織像		
腺がん	38	
扁平上皮がん	4	
喫煙の状態		
非喫煙者	24	
喫煙者	18	
病期		
病期 I I I B	4	
I V または再発	38	
腫瘍縮小効果		
部分奏功 (PR)	19	20
疾患安定 (SD)	14	
疾患進行 (PD)	9	

【0046】

【表 2 A】

表 2 A NSCLC 患者の PFS についてのコックス回帰解析

因子	ハザード比	P 値	
	(95%の信頼区間)		
突然変異 (突然変異体/野生型)	0.17 (0.07~0.43)	<0.001	30
EGFR481-500	0.59 (0.37~0.94)	0.028	
EGFR61-80	0.54 (0.32~0.91)	0.020	
EGFR41-60	0.24 (0.10~0.56)	0.001	
性別 (女性/男性)	1.11 (0.11~11.17)	0.929	
PS (1-3/0)	2.18 (0.85~5.60)	0.105	40
喫煙 (喫煙者/非喫煙者)	1.13 (0.12~10.83)	0.913	
年齢	1.03 (0.99~1.08)	0.101	

【0047】

【表 2 B】

表 2 B NSCLC 患者の OS についてのコックス回帰解析

因子	ハザード比	P 値
	(95%の信頼区間)	
突然変異 (突然変異体/野生型)	0.67 (0.30~1.50)	0.331
EGFR481-500	0.63 (0.42~0.95)	0.027
EGFR41-60	0.39 (0.18~0.85)	0.018
性別 (女性/男性)	0.43 (0.04~4.35)	0.472
PS (1-3/0)	1.82 (0.73~4.54)	0.199
喫煙 (喫煙者/非喫煙者)	0.58 (0.06~5.47)	0.632
年齢	1.01 (0.97~1.05)	0.540

10

20

【0048】

【表 3 - 1】

表3 NSCLC患者におけるEGFR変異とEGFR由来ペプチドとの相関

Peptide	P-value		Mutation	n	Expression of peptide					
	mutation/others	L858R/others			Del746/others	min	q1	median	q3	max
egfr_1_20	0.7118	0.8048	0.4098	8	746DEL	0	2	51.75	60.5	84
					L858R	0	0	17	47	171
egfr_21_40	0.6439	0.658	0.5229	8	NO	0	4	27	40	124
					746DEL	0	0	24.5	29.5	90
egfr_41_60	0.8762	0.8383	0.6083	8	L858R	0	0	3	32	122
					NO	0	0	1	25.5	80
egfr_61_80	0.3836	0.5138	0.1717	8	746DEL	139	215.5	328.5	693	1417.5
					L858R	70	210	275	781	903
egfr_81_100	0.4548	0.2107	0.6195	8	NO	0	202.5	289	468	5076.5
					746DEL	0	0	0	59.5	363
				13	L858R	0	0	0	0	27.5
					NO	0	0	0	0	210.5
				13	746DEL	17	61	89	106	113.5
					L858R	27	75.5	96	202	481
				21	NO	0	37	69.5	139	507.5

10

20

30

40

【表 3 - 2】

Peptide	P-value		Mutation	n	Expression of peptide				
	mutation/others	L858R/others			Del746/others	min	q1	median	q3
egft_101_120	0.3584	0.4875	0.1584	8	66	213.5	301.25	619.5	7292
egft_121_140	0.2575	0.1414	0.8224	13	0	52	93.5	470.5	1017.5
				21	0	36	121.5	711	3521
egft_141_160	0.7814	0.7235	0.491	8	0	8	58.75	538.5	4929
				13	7.5	32	68	146	2231
egft_161_180	0.815	0.5226	0.8226	21	0	22	43	56	184
				8	19	119.5	309.5	683	1405
egft_181_200	0.764	0.5585	0.5427	13	51	87	254	436	626
				21	23	121.5	219.5	377.5	12168
egft_161_180	0.815	0.5226	0.8226	8	189.5	257.75	533	739.25	821
				13	115	340.5	639.5	870.5	5702.5
egft_181_200	0.764	0.5585	0.5427	21	128	323.5	470	706.5	1922.5
				8	57	82.75	157.75	223.5	265
egft_181_200	0.764	0.5585	0.5427	13	70	127.5	152.5	216	484
				21	65	109	151.5	241	619.5

10

20

30

40

【表 3 - 3】

Peptide	P-value		Expression of peptide							
	mutation/others	L858R/others	De1746/others	Mutation	n	min	q1	median	q3	max
egfr_201_220	0.7881	0.505	0.9617	746DEL	8	0	19.25	76	167.75	629.5
egfr_221_240	0.1936	0.362	0.2359	L858R	13	16.5	71	85	114	255
				NO	21	0	37	57	116	1002
egfr_241_260	0.2663	0.4301	0.2761	746DEL	8	9	100.25	155.5	227	10446
				L858R	13	62.5	93	112	244	534.5
egfr_261_280	0.3016	0.1344	0.9107	NO	21	0	76	95.5	129	356.5
				746DEL	8	18.5	118	191.25	365.5	561
egfr_281_300	0.4919	0.7856	0.2359	L858R	13	77.5	117.5	140	287.5	989
				NO	21	0	99.5	126.5	187	328
egfr_261_280	0.3016	0.1344	0.9107	746DEL	8	0	36.75	110	160.5	193
				L858R	13	26.5	59	160	266.5	357
egfr_281_300	0.4919	0.7856	0.2359	NO	21	0	46.5	73.5	127	740.5
				746DEL	8	73	153	220	317.5	351
egfr_261_280	0.3016	0.1344	0.9107	L858R	13	122	204	257.5	345.5	1098.5
				NO	21	122	169.5	259.5	398	578

10

20

30

40

【表 3 - 4】

Peptide	P-value		Expression of peptide							
	mutation/others	L858R/others	Del746/others	Mutation	n	min	q1	median	q3	max
egfr_301_320	0.6758	0.5134	0.7244	746DEL	8	0	37.5	98.25	128	345.5
egfr_321_340	0.533	0.744	0.2622	L858R	13	0	60	90.5	135.5	331
				NO	21	0	31	62.5	98.5	1220.5
egfr_341_360	0.7549	0.9891	0.481	746DEL	8	72	208.5	321.75	678	4894.5
				L858R	13	75.5	163.5	212	351	659
egfr_361_380	0.1809	0.0793	0.2623	NO	21	56	117	248.5	356	3067
				746DEL	8	93	181.25	289	316.25	356
egfr_381_400	0.4832	0.2947	0.8225	L858R	13	85	177	228	387.5	1818.5
				NO	21	93.5	205	267.5	385.5	1007
egfr_361_380	0.1809	0.0793	0.2623	746DEL	8	182	268	519.5	593.25	748
				L858R	13	212.5	480	694	1533	3884.5
egfr_381_400	0.4832	0.2947	0.8225	NO	21	146.5	377	459.5	769	1442.5
				746DEL	8	0	28	76	100	107
egfr_361_380	0.1809	0.0793	0.2623	L858R	13	18	35	69	126	2168.5
				NO	21	0	24.5	51	69.5	191

10

20

30

40

【表 3 - 5】

Peptide	P-value		Expression of peptide							
	mutation/others	L858R/others	Del746/others	Mutation	n	min	q1	median	q3	max
egfr_401_420	0.71	0.5226	0.481	746DEL	8	35	124	368	373.75	401
egfr_421_440	0.2652	0.1242	0.3129	L858R	13	98	208.5	274	526	2721
				NO	21	0	172	256	432	1291
egfr_441_460	0.5293	0.3839	0.3366	746DEL	8	0	21.5	74	97.75	169
				L858R	13	18	51	117.5	206	391
egfr_461_480	0.1004	0.3903	0.1144	NO	21	0	42	73	115	467
				746DEL	8	31	115.5	282.5	367.25	473
egfr_481_500	0.053	0.0172	0.7244	L858R	13	52	197	358	559	3751.5
				NO	21	5.5	174	265.5	446	1134
egfr_481_500	0.053	0.0172	0.7244	746DEL	8	0	0	0	20.5	322
				L858R	13	0	0	0	0	0
egfr_481_500	0.053	0.0172	0.7244	NO	21	0	0	0	0	93
				746DEL	8	0	36.5	65.75	137	208.5
egfr_481_500	0.053	0.0172	0.7244	L858R	13	30	59.5	147	202	26064
				NO	21	0	20	55.5	109	1718.5

10

20

30

40

【表 3 - 6】

Peptide	P-value		Mutation	n	Expression of peptide				
	mutation/others	L858R/others			Del746/others	min	q1	median	q3
egfr_501_520	0.2067	0.0791	0.7486	8	0	34.5	107.75	139	151.5
egfr_521_540	0.6436	0.3479	0.7487	8	0	90	120.5	205.5	417.5
				21	0	50	72.5	123	207
				8	106	120.25	182.75	268	332
egfr_541_560	0.1723	0.0683	0.8601	13	114	179	204	228.5	977
				21	0	128	186	277	510
				8	105.5	130.25	186.25	208	301
egfr_561_580	0.6027	0.505	0.6195	13	70	173.5	309	346	656
				21	0	114	143	232	638
				8	79	119.75	182.25	212.5	256
egfr_581_600	0.5751	0.3477	0.4514	13	48	115	177	220.5	3390
				21	0	90	129	209	720
				8	0	25.25	70.75	89.25	108
				13	24.5	45	73	179.5	274
				21	0	43	69.5	91	304.5

10

20

30

40

【表 3 - 7】

Peptide	P-value		Mutation	n	Expression of peptide				
	mutation/others	L858R/others			Del746/others	min	q1	median	q3
egfr_601_620	0.9505	0.9458	0.7854	8	71	123	181	320	575
egfr_621_640	0.3359	0.5643	0.2718	746DEL	74.5	130.5	181	441	1683
				L858R	86	134.5	175	303.5	2204.5
				NO	0	18	48.75	77.25	115
egfr_641_660	0.814	0.8596	0.5217	L858R	0	18	35	44.5	610
				746DEL	0	0	28	41	130
				NO	21	62.75	177.75	220	264.5
egfr_661_680	0.4409	0.9673	0.2213	L858R	0	36	112.5	224	593.5
				746DEL	0	56	116.5	205.5	734.5
				NO	0	21	201.25	390.5	429
egfr_681_700	0.2731	0.1445	0.8636	L858R	0	0	250.5	640	1761
				746DEL	0	213.5	333	527	900.5
				NO	0	0	0	16.5	166.5
				L858R	0	0	0	46	142
				NO	0	0	0	0	1612

10

20

30

40

【表 3 - 8】

Peptide	P-value			Expression of peptide						
	mutation/others	L858R/others	Del746/others	Mutation	n	min	q1	median	q3	max
egfr_701_720	0.6074	0.3249	0.8721	746DEL	8	0	7	91.75	213.5	252.5
				L858R	13	0	83	99	220	439.5
				NO	21	0	5	82	154	312
egfr_721_740	0.106	0.0361	0.7006	746DEL	8	0	40.75	62	90.25	252.5
				L858R	13	24	48	126.5	199.5	342.5
				NO	21	0	17.5	57	87.5	227
egfr_741_760	0.0253	0.0067	0.4416	746DEL	8	0	7	23.25	48.5	56
				L858R	13	12.5	30	46	86.5	222
				NO	21	0	13	20	44.5	75
egfr_761_780	0.5661	0.5494	0.5218	746DEL	8	213.5	246.5	300	408.5	903
				L858R	13	121	161.5	311.5	770	2484
				NO	21	118.5	183	245	387	11198
egfr_781_800	0.9291	0.9241	0.7487	746DEL	8	138	168.75	254	348	454.5
				L858R	13	112	202	246.5	359.5	3226.5
				NO	21	0	150	296	427.5	833

10

20

30

40

【表 3 - 9】

Peptide	P-value		Mutation	n	Expression of peptide				
	mutation/others	L858R/others			Del746/others	min	q1	median	q3
egfr_801_820	0.5498	0.4878	0.3053	8	15	56.5	156	209.25	413
egfr_821_840	0.9631	0.9025	746DEL	13	58	92	183	503.5	1079.5
			NO	21	65.5	102.5	143	231.5	1485.5
egfr_841_860	0.1112	0.201	746DEL	8	0	63	192	754.75	1354
			L858R	13	39	85	161.5	310	712
egfr_861_880	0.4903	0.2947	NO	21	0	77	132	284	2626
			746DEL	8	0	16	28.25	46	91.5
egfr_881_900	0.5093	0.2475	L858R	13	0	33	76	130	376.5
			NO	21	1	31	43.5	85	156.5
egfr_861_880	0.4903	0.2947	746DEL	8	0	5.25	27.5	69.75	95
			L858R	13	13.5	29	42	101.5	242
egfr_881_900	0.5093	0.2475	NO	21	0	26.5	39	57	398
			746DEL	8	27	56.5	159.25	282.25	361
egfr_861_880	0.4903	0.2947	L858R	13	27.5	117	156	415	629
			NO	21	0	84.5	112.5	265	535

10

20

30

40

【表 3 - 1 0】

Peptide	P-value		Expression of peptide							
	mutation/others	L858R/others	Del746/others	Mutation	n	min	q1	median	q3	max
egfr_901_920	0.4154	0.196	0.8853	746DEL	8	0	14.5	62	128.75	193
egfr_921_940	0.6451	0.8489	0.3529	L858R	13	0	46	60.5	209	356
				NO	21	0	25.5	45.5	84.5	204
				746DEL	8	7.5	66.5	118.25	155.75	800
egfr_941_960	0.367	0.1823	0.9872	L858R	13	23	99	137.5	270	700
				NO	21	0	87.5	156	223	3485
				746DEL	8	0	35	70.75	95.75	108.5
egfr_961_980	0.6065	0.5032	0.6276	L858R	13	0	52.5	85.5	133	1409.5
				NO	21	0	23.5	47.5	93	368
				746DEL	8	0	0	0	0	0
egfr_981_1000	0.2249	0.1129	0.2443	L858R	13	0	0	0	0	0
				NO	21	0	0	0	0	481
				746DEL	8	0	2.5	12.5	68.5	193.5
				L858R	13	0	0	0	7	458
				NO	21	0	0	4.5	55	633.5

10

20

30

40

【表 3 - 1 1】

Peptide	P-value			Mutation	n	Expression of peptide				
	mutation/others	L858R/others	Del746/others			min	q1	median	q3	max
egfr_1001_1021	0.1194	0.5032	0.0393	746DEL	8	0	0	0	0	5
				L858R	13	0	0	0	0	0
				NO	21	0	0	0	0	0
egfr_1021_1040	0.5261	0.6521	0.2585	746DEL	8	0	0.5	19	54	228
				L858R	13	0	0	0	38	13092.5
				NO	21	0	0	0	39	134.5
egfr_1041_1060	0.953	0.9674	0.7609	746DEL	8	118	137.25	196.75	236.5	304
				L858R	13	64	126	157	331.5	600
				NO	21	67	118.5	176	224	1031
egfr_1061_1080	0.6363	0.3684	1	746DEL	8	0	17.5	40.5	74	80.5
				L858R	13	0	22	67	72	179
				NO	21	0	23.5	37	63	494
egfr_1081_1100	0.9772	0.9643	0.8538	746DEL	8	0	0	0	0	11.5
				L858R	13	0	0	0	0	10
				NO	21	0	0	0	0	186

10

20

30

40

【表 3 - 1 2】

Peptide	P-value		Expression of peptide							
	mutation/others	L858R/others	De1746/others	Mutation	n	min	q1	median	q3	max
egfr_1101_1120	0.908	0.6623	0.8517	746DEL	8	0	0	0	2.25	11
				L858R	13	0	0	0	0	42
				NO	21	0	0	0	0	449
egfr_1121_1140	0.8691	0.6058	0.7791	746DEL	8	0	0	0	4.75	14
				L858R	13	0	0	0	0	40
				NO	21	0	0	0	0	8787.5
egfr_1141_1160	0.3498	0.2601	0.619	746DEL	8	0	0	1.5	20	40.5
				L858R	13	0	0	1	10	46
				NO	21	0	0	6	35	259
egfr_1161_1180	0.2732	0.1379	0.9107	746DEL	8	0	25.5	88.25	100.25	116
				L858R	13	4.5	42	77	123	382
				NO	21	0	22.5	49.5	80	735
egfr_1181_1200	0.2863	0.1529	0.8601	746DEL	8	0	13.5	77.5	102.5	202
				L858R	13	30.5	50	74	139	337.5
				NO	21	0	25.5	61.5	73	306.5

【 0 0 4 9】

10

20

30

40

【表 4 - 1】

	PFS (log)				OS(log)					
	HR	95%CI	P-value	Significance	HR	95%CI	P-value	Significance		
egfr_1_20	0.56	0.38	0.82	0.003	yes	0.67	0.46	0.97	0.036	no
egfr_21_40	0.97	0.71	1.33	0.851	no	0.98	0.69	1.39	0.914	no
egfr_41_60	0.20	0.08	0.48	<0.001	yes	0.28	0.13	0.60	0.001	yes
egfr_61_80	0.51	0.32	0.80	0.004	yes	0.62	0.37	1.03	0.065	no
egfr_81_100	0.43	0.19	0.96	0.039	no	0.37	0.14	0.95	0.039	no
egfr_101_120	0.66	0.49	0.89	0.006	yes	0.67	0.49	0.91	0.009	yes
egfr_121_140	0.66	0.45	0.96	0.032	no	0.58	0.39	0.87	0.007	yes
egfr_141_160	0.89	0.48	1.65	0.708	no	0.87	0.49	1.57	0.654	no
egfr_161_180	0.27	0.10	0.73	0.010	yes	0.32	0.11	0.94	0.038	no
egfr_181_200	0.16	0.04	0.57	0.005	yes	0.10	0.02	0.45	0.003	yes
egfr_201_220	0.76	0.46	1.25	0.282	no	0.71	0.43	1.17	0.184	no
egfr_221_240	0.34	0.19	0.60	<0.001	yes	0.32	0.18	0.58	<0.001	yes
egfr_241_260	0.37	0.22	0.63	<0.001	yes	0.45	0.27	0.75	0.002	yes
egfr_261_280	0.50	0.34	0.73	<0.001	yes	0.55	0.38	0.80	0.002	yes
egfr_281_300	0.26	0.10	0.72	0.009	yes	0.23	0.07	0.74	0.014	yes

10

20

30

40

【表 4 - 2】

	PFS (log)				OS(log)					
	HR	95%CI	P-value	Significance	HR	95%CI	P-value	Significance		
egfr_301_320	0.55	0.37	0.81	0.003	yes	0.61	0.41	0.90	0.012	yes
egfr_321_340	0.47	0.20	1.08	0.076	no	0.59	0.24	1.44	0.243	no
egfr_341_360	0.38	0.16	0.91	0.030	no	0.32	0.11	0.96	0.043	no
egfr_361_380	0.43	0.15	1.23	0.114	no	0.27	0.07	1.00	0.051	no
egfr_381_400	0.52	0.34	0.79	0.003	yes	0.56	0.37	0.85	0.007	yes
egfr_401_420	0.30	0.14	0.64	0.002	yes	0.42	0.21	0.85	0.016	yes
egfr_421_440	0.54	0.34	0.85	0.008	yes	0.58	0.37	0.91	0.018	no
egfr_441_460	0.54	0.28	1.04	0.067	no	0.58	0.28	1.20	0.143	no
egfr_461_480	0.48	0.29	0.80	0.004	yes	0.57	0.34	0.96	0.036	no
egfr_481_500	0.44	0.28	0.68	<0.001	yes	0.52	0.35	0.78	0.001	yes
egfr_501_520	0.63	0.42	0.94	0.024	yes	0.68	0.45	1.03	0.068	no
egfr_521_540	0.06	0.02	0.21	<0.001	yes	0.15	0.05	0.45	0.001	yes
egfr_541_560	0.20	0.06	0.68	0.010	yes	0.35	0.13	0.89	0.027	no
egfr_561_580	0.27	0.09	0.80	0.017	yes	0.33	0.13	0.86	0.023	no
egfr_581_600	0.57	0.36	0.89	0.013	yes	0.58	0.38	0.88	0.011	yes

10

20

30

40

【表 4 - 3】

	PFS (log)				OS(log)					
	HR	95%CI	P-value	Significance	HR	95%CI	P-value	Significance		
egfr_601_620	0.32	0.14	0.74	0.008	yes	0.29	0.10	0.86	0.025	no
egfr_621_640	0.63	0.43	0.93	0.021	yes	0.72	0.50	1.05	0.088	no
egfr_641_660	0.61	0.42	0.88	0.009	yes	0.68	0.44	1.04	0.073	no
egfr_661_680	0.90	0.71	1.15	0.414	no	0.91	0.69	1.22	0.538	no
egfr_681_700	0.96	0.68	1.35	0.797	no	0.89	0.63	1.26	0.518	no
egfr_701_720	0.65	0.48	0.88	0.005	yes	0.60	0.43	0.83	0.002	yes
egfr_721_740	0.33	0.20	0.56	<0.001	yes	0.37	0.22	0.61	<0.001	yes
egfr_741_760	0.70	0.41	1.20	0.199	no	0.70	0.41	1.20	0.193	no
egfr_761_780	1.00	0.39	2.55	0.995	no	1.32	0.54	3.21	0.541	no
egfr_781_800	0.33	0.12	0.86	0.024	yes	0.40	0.17	0.96	0.039	no
egfr_801_820	0.49	0.19	1.21	0.123	no	0.61	0.23	1.59	0.311	no
egfr_821_840	0.59	0.41	0.85	0.004	yes	0.64	0.46	0.89	0.008	yes
egfr_841_860	0.70	0.44	1.13	0.146	no	0.74	0.43	1.26	0.270	no
egfr_861_880	0.89	0.52	1.51	0.667	no	0.88	0.53	1.48	0.635	no
egfr_881_900	0.17	0.07	0.42	<0.001	yes	0.21	0.09	0.46	<0.001	yes

10

20

30

40

【表 4 - 4】

	PFS (log)				OS(log)					
	HR	95%CI	P-value	Significance	HR	95%CI	P-value	Significance		
egfr_901_920	0.51	0.34	0.77	0.001	yes	0.62	0.42	0.93	0.021	no
egfr_921_940	0.66	0.35	1.26	0.208	no	0.70	0.38	1.27	0.238	no
egfr_941_960	0.58	0.38	0.87	0.009	yes	0.74	0.48	1.13	0.157	no
egfr_961_980	0.83	0.48	1.43	0.502	no	1.14	0.67	1.97	0.627	no
egfr_981_1000	0.82	0.58	1.15	0.250	no	0.76	0.54	1.06	0.106	no
egfr_1001_1021	1.13	0.26	4.93	0.870	no	1.30	0.22	7.86	0.774	no
egfr_1021_1040	0.98	0.72	1.33	0.898	no	1.02	0.73	1.42	0.905	no
egfr_1041_1060	0.22	0.08	0.65	0.006	yes	0.13	0.03	0.55	0.005	yes
egfr_1061_1080	0.61	0.40	0.94	0.025	yes	0.82	0.54	1.24	0.344	no
egfr_1081_1100	1.43	0.85	2.40	0.173	no	1.14	0.68	1.90	0.623	no
egfr_1101_1120	1.01	0.66	1.57	0.954	no	0.94	0.60	1.48	0.795	no
egfr_1121_1140	1.15	0.81	1.63	0.426	no	0.77	0.50	1.18	0.232	no
egfr_1141_1160	1.02	0.71	1.46	0.913	no	1.08	0.73	1.59	0.704	no
egfr_1161_1180	0.60	0.39	0.95	0.028	yes	0.64	0.41	1.00	0.048	no
egfr_1181_1200	0.45	0.30	0.67	<0.001	yes	0.51	0.34	0.77	0.001	yes

10

20

30

40

【 0 0 5 0 】

参考文献

References

1. Parkin DM, Bray FI, Devasa SS. Cancer burden in the year 2000: the global picture. Eur J Cancer 2001;37:4-66.
2. Yarden Y, and Sliwkowski MX. Untagling the ErbB signaling network. Nat Rev M

50

ol Cell Biol 2001; 2: 127-137.

3. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350:2129-39.

4. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 2004;304:1497-500.

5. Ono M, Kuwano M. Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clin Cancer Res* 2006;12:7242-51.

6. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010;362:2380-8.

7. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:121-8.

8. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:947-57.

9. Sasada T, Komatsu N, Suekane S, Yamada A, Noguchi M, Itoh K. Overcoming the hurdles of randomised clinical trials of therapeutic cancer vaccines. *Eur J Cancer* 2010;46(9): 1514-9.

10. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002;347(25): 1999-2009.

11. Bedognetti D, Wang E, Sertoli MR, Marincola FM. Gene-expression profiling in vaccine therapy and immunotherapy for cancer. *Expert Rev Vaccines* 2010;9(6): 55-65.

12. Bogunovic D, O'Neill DW, Belitskaya-Levy I, et al. Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(48): 20429-34.

13. Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG, et al. Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 2010;362(20): 1890-900.

14. Noguchi M, Kakuma T, Uemura H, et al. A randomized phase II trial of personalized peptide vaccine plus low dose estramustine phosphate (EMP) versus standard dose EMP in patients with castration resistant prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59(7): 1001-9.

15. Mine T, Sato Y, Noguchi M, et al. Humoral responses to peptides correlate with overall survival in advanced cancer patients vaccine with peptides based on pre-existing, peptide-specific cellular responses. *Clin Cancer Res* 2004;10:929-37.

16. Ugurel S, Schrama D, Keller G, et al. Impact of the CCR5 gene polymorphism on the survival of metastatic melanoma patients receiving immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57(5): 685-91.

17. Liu D, O'Day SJ, Yang D, et al. Impact of gene polymorphisms on clinical outcome for stage IV melanoma patients treated with biochemotherapy: an exploratory study. *Clin Cancer Res* 2005;11(3): 1237-46.

18. Leibovici D, Grossman HB, Dinney CP, et al. Polymorphisms in inflammation genes and bladder cancer: from initiation to recurrence, progression, and survival. *J Clin Oncol* 2005;23(24): 5746-56.

19. Breunis WB, Tarazona-Santos E, Chen R, Kiley M, Rosenberg SA, Chanock SJ. In

10

20

30

40

50

- fluence of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA4) common polymorphisms on outcome in treatment of melanoma patients with CTLA-4 blockade. *J Immunother* 2008;31(6): 586-90.
20. Yurkovetsky ZR, Kirkwood JM, Edington HD, et al. Multiplex analysis of serum cytokines in melanoma patients treated with interferon-alpha2b. *Clin Cancer Res* 2007;13(8): 2422-8.
21. Sabatino M, Kim-Schulze S, Panelli MC, et al. Serum vascular endothelial growth factor and fibronectin predict clinical response to high-dose interleukin-2 therapy. *J Clin Oncol* 2009;27(16): 2645-52.
22. Nagai Y, Miyazawa H, Huqun, et al. Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer Res* 2005;65:7276-82.
23. Harada M, Kobayashi K, Matsueda S, Nakagawa M, Noguchi M, Itoh K. Prostate-specific antigen-derived epitopes capable of inducing cellular and humoral responses in HLA-24+ prostate cancer patients. *Prostate* 2003; 57(2): 152-9.
24. Komatsu N, Shichijo S, Nakagawa M, Itoh K. New multiplexed flow cytometric assay to measure anti-peptide antibody: a novel tool for monitoring immune responses to peptides used for immunization. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 535-45.
25. Goeman JJ. L1 penalized estimation in the Cox proportional hazards model. *Biometrical J* 2010; 52: 170-84.
26. Everitt BS. *An R and S-PLUS Companion to Multivariate Analysis*. 2005. Springer-Verlag London Limited.
27. Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS. Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker. 2000; 56: 2337-344.
28. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, et al. Crystal structure of complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002; 110: 775-787.
29. Garrett PJ, Mckern NM, Lou M, et al. Crystal structure of truncated epidermal growth factor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 2002; 110: 763-773.
30. Leahy DJ, and Cho HS. Structure of extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* 2002; 297: 1330-1333.
31. Lemmon MA. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res*. 2009; 315:638-648.
32. Bose R, Zhang X. The ErbB kinase domain: structural perspectives into kinase activation and inhibition. *Exp Cell Res* 2009; 315: 649-658.
33. Zhang X, Dureasko J, Shen K, et al. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* 2006; 125: 1137-1149.
34. Talavera A, Friemann R, Gomez-Puerta S, et al. Nimotuzumab, an antitumor antibody that targets the epidermal growth factor receptor, blocks ligand binding while permitting the active receptor conformation. *Cancer Res* 2009; 69: 5851-9.
35. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, et al. Structural basis for inhibition of epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 2005; 7:301-311.
36. Schmiedel J, Blaukat A, Li S, et al. Matuzumab binding to EGFR prevents the conformational rearrangement required for dimerization. *Cancer Cell* 2008; 13:365-373.
37. Kimura H, Kasahara K, Kawanishi M, et al. Detection of epidermal growth factor receptor mutations in serum as a predictor of the response to gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 2009; 113:103-110.

ients with non-small-cell lung cancer. Clin Cancer Res 2006; 12: 3915-21.

【配列表フリーテキスト】

【0051】

配列番号1：ヒトEGFR

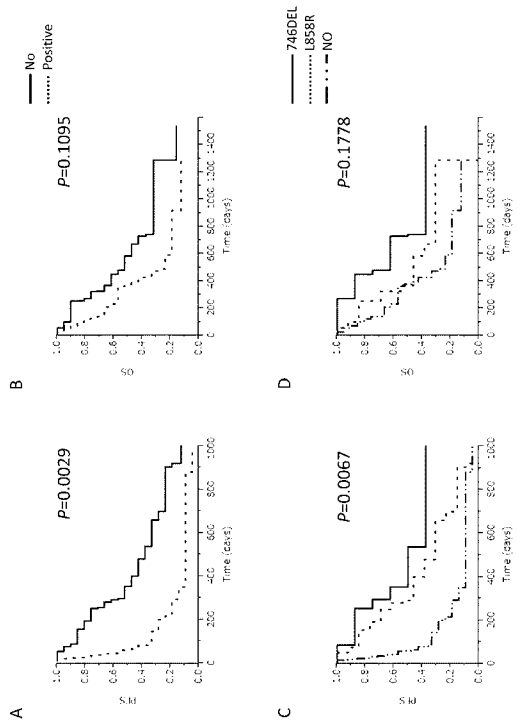
配列番号2：EGFR由来ペプチド(EGFR41-60)

配列番号3：EGFR由来ペプチド(EGFR61-80)

配列番号4：EGFR由来ペプチド(EGFR481-500)

配列番号5：EGFR由来ペプチド(EGFR881-900)

【図1】



【図2】

0001 MRPSGTAGAA L L A L L A A L C P A S R A L E E K K V C Q G T S N K I T Q L G T F E D H F L S L Q R M F N N C E V

0061 V L G N L E T Y V Q R N Y D L S F L S T I Q E V A G Y V L I A L N T V E R I P L E N L Q I H R G N M Y E N S Y A L A

0121 V L S N Y D A N K T G L K E L P M R N L Q E I L H G A V R F S N X P A L C N V E S I Q W R D I V S S D F L S N X M S M D F

0181 Q N H L G S C K C D P S C P N G S C W G A G E E N C Q K L T K I I C A Q Q S G R C R G K S P S D C C H X Q C A A G C

0241 T G P R E S D C I A C R K F R D E A T C K D T C P P L M L Y N P T T Y Q M D V N P E G K Y S F G A T C V K K C P R N Y V

0301 V T D H G S C V R A C G A D S Y E M E E D G V R K C K C E G P C R K Y C X G I G I G E F K D S L S I N A T N I K H F K

0361 N C T S I S G D L H I L P V A F R G D S F T H T P P L D P Q E L D I L K T V K E I T G F L L I Q A W P E N R T D I H A F

0421 E N L E I R G R T K Q H G Q F S L A V V S L N I T S L G L R S L K E I S D G D V I I S G N K N L C Y A N T I N W K K L

0481 F G T S G Q K T K I I S N R G E N S C H A T G Q Y C H A L C S P E G C W G P E P R D C V S C R N V S R G R E C Y D R C N

0541 L L E G E P R E F V E N S E C I Q C H P E C L P Q A M N I T C T G R G P D N C I Q C A I H Y D G P H C V K T C P A G V M

0601 G E N N T I A W K Y A D A G H V C H L C H P N C T Y G C T G P G L E G C P T X G P K I P S I A T G M V G A L L L I A V

0661 A L G I G L F M R R R H I V R K R T L R R I L Q E R E I A E P L T P S G E A P N Q A L L R I L K E T E F K K I K Y L G S

0721 G A F G T Y Y K G L W I P E G E K Y K I P Y A I K E L R E A T S P K A N K E I L D E A Y V M A S V D N P H V C R L L G H

0781 C I T S T V Q L I T Q I M P F G C L L D Y V R E H K D N I G S Q Y L L N W C V Q I A K G M N Y L E D R R I A V H R D L A A

0841 R N V L E K T P Q U V K I T D E G L A K L L G A E E K E Y H A E G G K V P I K W N A L E S I L H R I Y T H Q S D V W S Y

0901 G V T V W E I M T F G S K P Y D G H P A S E I S S I E K G E R L P Q P P I C T I D V Y M I M V K C W M H A D S R P K

0961 F R E L I E F S K M A R D P Q R Y L V I Q G D E R M H I L P S P T D S N F Y R A L M D E E D M D D Y V D A D E Y L I P Q

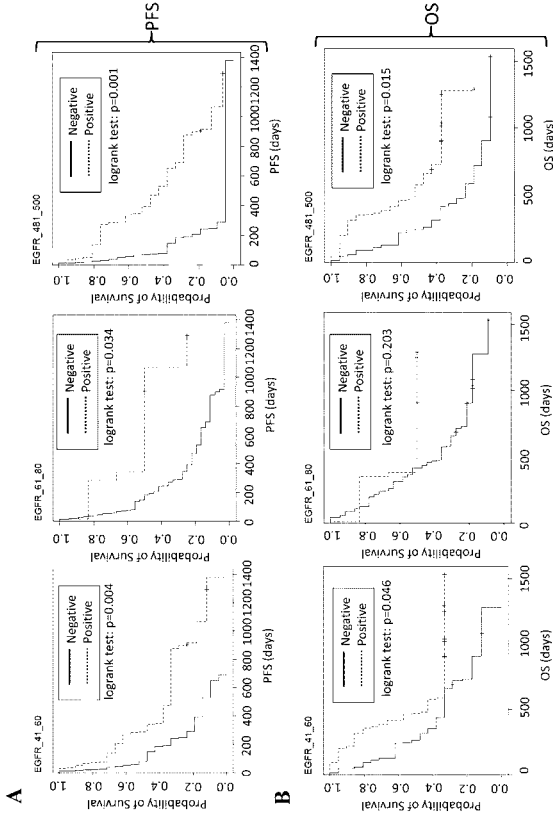
1021 Q G F F S S P S T S R T P L L S S L A T S N N S T V A C I D R N G L Q S C P I K E D S F L Q R Y S S D P T G A L T E D

1081 S I D D T F L P V P E Y I N Q S V P K R P A G S V Q N P V Y H N Q P L N P A P S R D P H Y Q D P H S T A V G N P E Y L N

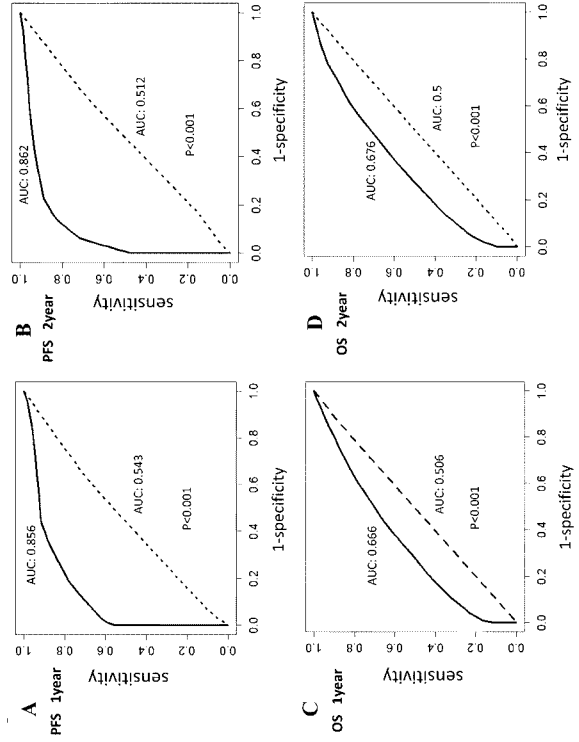
1141 T V Q P T C V N S T F D S P A H W A Q K G S H Q I S L D N P D Y Q Q D F P P K E A K P N G I P K G S T A E N A E Y L R V

1201 A P Q S S E F I G A

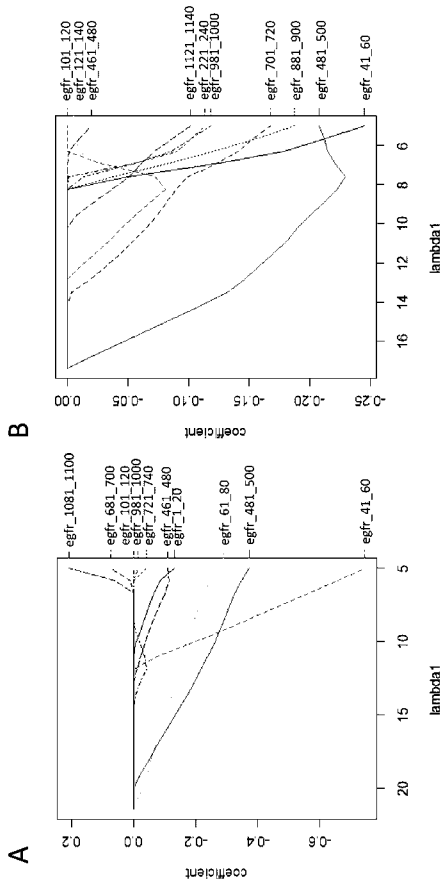
【 3 】



【 4 】



【 5 】



【配列表】

2014203918000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/066100
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, C07K14/71(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/53, C07K14/71, G01N33/574 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Koichi AZUMA, "Analysis of peptide antibodies derived from EGFR in non-small cell carcinoma", Kagaku Kenkyuhi Hojokin Kenkyu Seika Hokokusho, 2009, [retrieval date 04 September 2014 (04.09.2014)], Internet <URL http://kaken.nii.ac.jp/pdf/2009/seika/mext/37104/19790571seika.pdf>	1-9
A	Kawahara A et al, A diagnostic algorithm using EGFR mutation-specific antibodies for rapid response EGFR-TKI treatment in patients with non-small cell lung cancer, Lung Cancer, 2012. 10, 78(1), 39-44	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 September, 2014 (10.09.14)		Date of mailing of the international search report 30 September, 2014 (30.09.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/066100

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-531525 A (The General Hospital Corp.), 08 November 2007 (08.11.2007), entire text; all drawings & US 2006/0147959 A1 & EP 1733056 A1 & WO 2005/094357 A2	1-9
A	JP 2007-322211 A (Green Peptide Co., Ltd.), 13 December 2007 (13.12.2007), entire text; all drawings (Family: none)	1-9
P,X	Koichi Azuma et al, Humoral Immune Responses to EGFR-Derived Peptides Predict Progression-Free and Overall Survival of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Receiving Gefitinib, PLOS ONE, 2014.01.31, Volume 9 Issue 1 e86667	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/066100

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.: 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 1 pertains to a therapeutic method and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
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:

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 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.:

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.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2014/066100	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, C07K14/71(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, C07K14/71, G01N33/574			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X	東 公一, 非小細胞肺癌患者における抗上皮成長因子受容体(EGFR)由来ペプチド抗体の解析, 科学研究費補助金研究成果報告書, 2009, [検 索 日 2014.09.04], インターネット <URL http://kaken.nii.ac.jp/pdf/2009/seika/mext/37104/19790571seika.pdf>	1-9	
A	Kawahara A et al, A diagnostic algorithm using EGFR mutation-specific antibodies for rapid response EGFR-TKI treatment in patients with non-small cell lung cancer, Lung	1-9	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 10.09.2014		国際調査報告の発送日 30.09.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 赤坂 祐樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	
		2 J	3316

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 6 6 1 0 0
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
	Cancer, 2012. 10, 78(1), 39-44	
A	JP 2007-531525 A (ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイション) 2007. 11. 08, 全文、全図 & US 2006/0147959 A1 & EP 1733056 A1 & WO 2005/094357 A2	1-9
A	JP 2007-322211 A (株式会社グリーンペプタイド) 2007. 12. 13, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-9
P, X	Koichi Azuma et al, Humoral Immune Responses to EGFR-Derived Peptides Predict Progression-Free and Overall Survival of Non-Small Cell Lung Cancer Patients Receiving Gefitinib, PLOS ONE, 2014. 01. 31, Volume 9 Issue 1 e86667	1-9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2014/066100

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 10 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求項1は治療方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査を行うことができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)		A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)		A 6 1 K	31/5377	

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

(72) 発明者 星野 友昭
 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内

(72) 発明者 服部 聡
 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内

(72) 発明者 伊東 恭悟
 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内

(72) 発明者 笹田 哲朗
 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内

(72) 発明者 小松 誠和
 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内

(72) 発明者 松枝 智子
 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内

F ターム(参考) 4C084 AA17 NA05 NA20 ZB26 ZC20
 4C086 AA01 AA02 BC73 GA07 GA12 MA01 MA04 NA05 NA20 ZB26
 ZC20
 4H045 AA30 BA17 CA40 DA50 EA50

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	预测表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂治疗效果的方法		
公开(公告)号	JPWO2014203918A1	公开(公告)日	2017-02-23
申请号	JP2015522950	申请日	2014-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	久留米大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人 久留米大学		
[标]发明人	東公一 星野友昭 服部聡 伊東恭悟 笹田哲朗 小松誠和 松枝智子		
发明人	東公一 星野友昭 服部聡 伊東恭悟 笹田哲朗 小松誠和 松枝智子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 C07K14/71 A61P43/00 A61P35/00 A61K45/00 A61K31/5377		
CPC分类号	A61P35/00 A61P43/00 C07K14/71 G01N33/57423 G01N33/6854 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.N G01N33/574.A C07K14/71 A61P43/00.111 A61P35/00 A61K45/00 A61K31/5377		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/NA20 4C084/ZB262 4C084/ZC202 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC73 4C086/GA07 4C086/GA12 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/NA20 4C086/ZB26 4C086/ZC20 4H045/AA30 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA50		
代理人(译)	山田卓司 櫻井洋子		
优先权	2013128714 2013-06-19 JP		
其他公开文献	JP6463675B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是预测EGFR酪氨酸激酶抑制剂治疗效果的方法，其包括以下步骤：（1）在用EGFR酪氨酸激酶抑制剂治疗之前从患者采集的血液样品中测量针对由选自SEQ ID NOs：2至5的氨基酸序列组成的肽的抗体的量；和（2）将测得的抗体量与参考值进行比较的步骤，此处，当抗体量高于参考值时，可预测患者通过EGFR酪氨酸激酶抑制剂具有较高的治疗效果，提供一种包括的方法。

