

(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2013-540108

(P2013-540108A)

(43) 公表日 平成25年10月31日(2013.10.31)

(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	4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/30 (2006.01)	C 0 7 K 16/30	4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	

D
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2013-529666 (P2013-529666)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月26日 (2011. 9. 26)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年3月26日 (2013. 3. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/066636
 (87) 国際公開番号 W02012/041796
 (87) 国際公開日 平成24年4月5日 (2012. 4. 5)
 (31) 優先権主張番号 10180981.2
 (32) 優先日 平成22年9月28日 (2010. 9. 28)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 503385923
 ベーリンガー インゲルハイム インター
 ナショナル ゲゼルシャフト ミット ベ
 シュレンクテル ハフツング
 ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲル
 ハイム アム ライン ビンガー シュト
 ラーセ 1 7 3
 (74) 代理人 100092093
 弁理士 辻居 幸一
 (74) 代理人 100082005
 弁理士 熊倉 禎男
 (74) 代理人 100084663
 弁理士 箱田 篤
 (74) 代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 P T K 2 阻害物質での治療に対する感受性についてのがん患者の層別化

(57) 【要約】

本発明は、がん患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であるかどうかを判定するための方法であって、前記がん患者のがん試料における E - カドヘリンタンパク質の発現を検出するステップを含み、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) が、がん患者がタンパク質チロシンキナーゼ 2 (P T K 2) 阻害物質での治療に対して感受性であることを示すステップを含む、方法に関する。がん患者のがん試料における E - カドヘリンタンパク質の発現の前記検出は、好ましくは免疫組織化学的 (I H C) 方法によって実施される。前記 I H C 法は、好ましくは E - カドヘリンに特異的な一次抗体および一次抗体に特異的に反応する二次抗体を使用する。本発明は、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) によって特徴付けられるがんを有するがん患者の治療方法であって、治療的有効量の P T K 2 阻害物質を患者に投与するステップを含む、方法にも関する。さらなる態様において本発明は、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) によって特徴付けられるがんを有するがん患者の治療における使用のための P T K 2 阻害物質に関する。本発明は、治療的に有効な P T K 2 阻害物質に関するスクリーニング方法であって、(a) 2、1 または 0 (1 は好ましく、さらに 0 はより好ましい) の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがん細胞またはがん細胞系を提供するステップと、(b) (a) のがん細胞またはがん細胞系を P T K 2 阻害物質と接触させるステップと、(c) P T K 2 阻害物質ががん細胞 / がん細胞系にネガティブに作用するかどうかを評価するステップとを含む、方法も提供する。さらなる態様において本発明は、P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性で

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

がん患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であるかどうかを判定するための方法であって、前記がん患者のがん試料における E - カドヘリンタンパク質の発現を検出するステップを含み、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) が、がん患者がタンパク質チロシンキナーゼ 2 (P T K 2) 阻害物質での治療に対して感受性であることを示すステップを含む、方法。

【請求項 2】

前記がん患者が哺乳動物である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記がんが癌腫である、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記がんが、十二指腸、結腸、直腸および肛門の癌腫；膵臓の癌腫；膀胱の癌腫；肺腫瘍（小細胞肺癌（ S C L C ）、例えば扁平上皮癌、腺癌（腺房、乳頭、細気管支 - 肺胞）および大細胞気管支癌（巨細胞癌、明細胞癌）などの非小細胞肺癌（ N S C L C ））；管、小葉、粘液性または管状の癌腫などの乳がん、卵巣がん（卵巣癌 - 粘液性または漿液性嚢胞腺癌、類内膜癌および明細胞腫瘍）；頭頸部腫瘍；肝臓細胞癌（肝細胞癌（ H C C ））；例えば（腎明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、嫌色素腎細胞癌および集合管癌）などの腎臓がん；前立腺がん；ならびに外陰部のがんからなる群から選択される、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

がん患者のがん試料における E - カドヘリンタンパク質の発現の前記検出が免疫組織化学的 (I H C) 方法によって実施される、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 I H C 法が E - カドヘリンに特異的な一次抗体および一次抗体と特異的に反応する二次抗体を使用する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) によって特徴付けられるがんを有するがん患者の治療方法であって、治療的有効量の P T K 2 阻害物質を患者に投与するステップを含む、方法。

【請求項 9】

0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) によって特徴付けられるがんを有するがん患者の治療のための医薬組成物の調製のための、P T K 2 阻害物質の使用。

【請求項 10】

0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) によって特徴付けられるがんを有するがん患者の治療における使用のための P T K 2 阻害物質。

【請求項 11】

P T K 2 阻害物質での治療に対するそれらの感受性に関してがん患者を層別化するための方法であって、前記がん患者のがん試料における E - カドヘリン I R S スコアを判定するステップを含み、0 ~ 2 (すなわち 2、1 または 0) の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) が、がん患者が P T 2 阻害物質での治療に対して感受性であることを示すステップを含む、方法。

【請求項 12】

前記がん / がん患者が、請求項 1 から 7 までまたは 11 のいずれか 1 項に記載の方法で同定、特徴付けおよび / または層別化される、請求項 8 から 10 までのいずれか 1 項に記載の方法、使用および / または P T K 2 阻害物質。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3】

前記がん患者が、前記治療の前におよび/または前記治療中に同定、特徴付けまたは層別化される、請求項 1 2 に記載の方法、使用および/または P T K 2 阻害物質。

【請求項 1 4】

治療的に有効な P T K 2 阻害物質に関するスクリーニング方法であって、

(a) 2、1 または 0 (1 は好ましく、さらに 0 はより好ましい) の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがん細胞またはがん細胞系を提供するステップと、

(b) (a) のがん細胞またはがん細胞系を P T K 2 阻害物質と接触させるステップと、

(c) P T K 2 阻害物質ががん細胞/がん細胞系にネガティブに作用するかどうかを評価するステップと

を含む、方法。

【請求項 1 5】

P T K 2 阻害物質と、

(a) 前記 P T K 2 阻害物質が、2、1 または 0 (1 は好ましく、0 はより好ましい) の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがんを罹患している患者の治療のために使用されるものであることを示す説明書および/もしくは標示; ならびに/または

(b) 前記患者が請求項 1 1 に記載の方法によって層別化されることを示す説明書および/もしくは標示; ならびに/または

(c) 請求項 1 から 1 4 までのいずれか 1 項に記載の方法を実行するための手段とを含む医薬用パッケージ。

【請求項 1 6】

P T K 2 阻害物質での治療に対する感受性に関するがん患者の層別化における使用のための E - カドヘリン抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、がん患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であるかどうかを判定するための方法であって、前記がん患者のがん試料における E - カドヘリンタンパク質の発現を検出するステップを含み、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) が、がん患者がタンパク質チロシンキナーゼ 2 (P T K 2) 阻害物質での治療に対して感受性であることを示す、方法に関する。がん患者のがん試料における E - カドヘリンタンパク質の発現の前記検出は、好ましくは免疫組織化学的 (I H C) 方法によって実施される。前記 I H C 法は、E - カドヘリンに特異的な一次抗体および一次抗体に特異的に反応する二次抗体を好ましくは使用する。本発明は、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) によって特徴付けられるがんを有するがん患者の治療方法であって、治療的有効量の P T K 2 阻害物質を患者に投与するステップを含む、方法にも関する。さらなる態様において本発明は、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) によって特徴付けられるがんを有するがん患者の治療における使用のための P T K 2 阻害物質に関する。本発明は、治療的に有効な P T K 2 阻害物質に関するスクリーニング方法であって、(a) 2、1 または 0 (1 は好ましく、さらに 0 はより好ましい) の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがん細胞またはがん細胞系を提供するステップと、(b) (a) のがん細胞またはがん細胞系を P T K 2 阻害物質と接触させるステップと、(c) P T K 2 阻害物質ががん細胞/がん細胞系にネガティブに作用するかどうかを評価するステップとを含む方法も提供する。さらなる態様において本発明は、P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であるがん患者を層別化するための方法であって、前記患者のがん試料において E - カドヘリン I R S スコアを判定するステップを含み、0 ~ 2 (すなわち 2、1 または 0) の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) が、がん患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受

10

20

30

40

50

性であることを示すステップを含む、方法に関する。本発明は、PTK2阻害物質と、(a)前記PTK2阻害物質が、2、1または0(1は好ましく、0はより好ましい)のE-カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがんを罹患している患者の治療のために使用されるものであることを示す説明書および/もしくは標示、ならびに/または(b)前記患者が本発明の方法によって層別化されることを示す説明書および/もしくは標示、ならびに/または(c)本明細書に定義の方法を実行するための手段とを含む医薬用パッケージにも関する。

【背景技術】

【0002】

接着斑キナーゼ1(FAK1)としても周知のタンパク質チロシンキナーゼ2(PTK2)は、主に接着斑に局在する非受容体型チロシンキナーゼである。PTK2は、インテグリンおよび増殖因子受容体を通じて伝達される細胞外シグナルと細胞内のシグナル伝達因子との間のリンカーとして働く。活性化PTK2は、細胞生存、増殖および運動の制御に関与すると考えられる。したがってPTK2の阻害は、がん増殖および転移巣形成を阻害する可能性がある。PTK2阻害物質は既に記載されており、いくつかの化合物は早期臨床試験において現在調査中である。

10

【0003】

PTK2キナーゼ阻害物質は、がんの種々の実験モデルにおいて、特に免疫不全マウスでのヒトがん異種移植モデルにおいて有効性を示す。しかしそれらの有効性は、さまざまながんモデルにおいて大きく異なる：がんの退縮または増殖の完全な抑制がいくつかのモデルにおいて達成されうる一方で、他の種類のがんの治療は増殖の部分的な抑制をもたらし、いくつかのがんは全く影響を受けない。発がん性変異または遺伝子増幅は、多数の遺伝子に関して記載されている、例えばEGFR、HER2またはBRAF。これらの存在は対応するキナーゼ阻害物質での治療に対する所与のがんの感受性を判定し、そのような阻害物質での治療に対する患者の適格性はがんDNA配列または遺伝子コピー数の分析によって容易に判定されうる。しかしPTK2遺伝子に関しては、ヒトのがんにおいてまたはPTK2阻害に対して感受性である前臨床モデル腫瘍において、これまでに記載された変異または増幅は無い。

20

したがってPTK2阻害物質での治療から最も恩恵を受けやすい患者の選択に関する予測的バイオマーカーの同定は、緊急に必要とされている。治療効果に関連して現在利用可能であるそのような予測的バイオマーカーまたは遺伝子サインは無い。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって本発明の基となる技術的課題は、PTK2阻害物質での治療に対して感受性のがん患者および/またはがんの種類を選択するための手段および方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、この要求に取り組み、PTK2阻害物質での治療に対して感受性のがん患者の選択を可能にする細胞性マーカーおよび方法を提供する。

40

ヒトがんの異種移植モデルを使用する本発明者らの前臨床研究において本発明者らは、例えば免疫組織化学的(IHC)方法で評価されうるがん細胞におけるE-カドヘリンタンパク質の発現レベルがPTK2阻害物質に対する感受性を予測するために使用されうることを驚くべきことに見出した。この観点から、本発明者らはがん/がん患者がPTK2阻害物質での治療に対して感受性であるか否かを判定するために、PTK2阻害物質の投与の前にE-カドヘリン発現レベルを検査することを提案する。本発明のさらなる実施形態は、本明細書において特徴付けられ、かつ記載され、特許請求の範囲においても反映される。

【0006】

50

本明細書において使用される単数形「a」「an」および「the」は、内容が明確に他を示す場合を除いて複数の参照物を含むことは言及されるべきである。したがって例えば「試薬」と称することはそのような異なる試薬の1つまたは複数を含み、「方法」と称することは当業者に周知であり、本明細書に記載の方法のために変更または置換されうる等価のステップおよび方法に関連して含む。他に示す場合を除いて、一連の要素に先行する用語「少なくとも」は、一連の要素の全てを参照すると理解される。「少なくとも1つ」は、例えば1つ、2つ、3つ、4つもしくは5つまたはさらにそれ以上を含む。

当業者は、本明細書に記載の本発明の具体的な実施形態について多数の等価物を認識するまたは日常の実験だけを使用して確認できる。そのような等価物は、本発明によって包含されると意図される。本明細書および続く特許請求の範囲全体を通じて、内容が他を必要とする場合を除いて、用語「含む」ならびに「含む」および「含んでいる」などの変化形は、記述される整数もしくはステップまたは整数もしくはステップの群の含有を意味するが、任意の他の整数もしくはステップまたは整数もしくはステップの群の排除を意味しないと理解される。

【0007】

本明細書の本文全体を通じていくつかの文書が引用される。本明細書に引用される書類（全ての特許、特許出願、科学出版物、製造者の仕様書、説明書などを含む）のそれぞれは、上記または下記にかかわらず、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。本明細書における事柄が、先行する発明を理由に本発明が先行するそのような開示に権利がないことの許可として解釈されることはない。

第一の態様において本発明は、がんおよび各がん患者がPTK2阻害物質での治療に対して感受性であるかどうかを判定するための方法であって、前記がんまたはがん患者からの（採取された）がん試料におけるE-カドヘリンタンパク質の発現を検出するステップを含み、0~2、好ましくは0~1のE-カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア（IRS）、より好ましくは1のIRSスコアおよびさらにより好ましくは0のIRSスコアががんおよび各がん患者がタンパク質チロシンキナーゼ2（PTK2）阻害物質での治療に対して感受性であることを示す、方法に関する。

【0008】

「0~2」のIRSスコア（またはIRS）は、0、1または2のIRSを意味する。同様に「0~1」のIRSスコアは、0または1のIRSスコアを意味する。当業者が所与のがん/がん試料において前記IRSスコアを評価できるようにする方法は、本明細書の他の箇所において説明される。本明細書において使用される用語「IRS」は、本明細書において開示の通りE-カドヘリンの免疫反応性スコアを意味する。

【0009】

好ましい実施形態において前記検出は、免疫組織化学的方法（IHC）の手段によって実行される。

がん試料が、がん患者から好ましくは採取されることは理解されるが、前記患者から前記がん試料を採取するステップが必然的に本発明の範囲に含まれることを意味しない。

【0010】

CD324、LCAMまたはECADとしても周知の「E-カドヘリン」または「E-カドヘリンタンパク質」は、1型膜貫通タンパク質の一種である「カドヘリン」（カルシウム依存性接着分子）に属する。それらは、細胞接着において重要な役割を演じ、組織中の細胞が相互に結合することを確実にする。カドヘリンは、機能するためにカルシウム（Ca²⁺）イオンに依存し、したがってこの名前となる。CDH1遺伝子にコードされるE-カドヘリンタンパク質は、5個の細胞外カドヘリンリピート、膜貫通領域および高度に保存された細胞質側末端からなり、全ての上皮組織において認められうる。細胞質ドメインは、細胞内付着タンパク質カテニンを介してアクチン細胞骨格に結合する。アクチン細胞骨格は、細胞の構造的統合性およびその極性を調節し、上皮細胞形態形成のために重要である経細胞ネットワークを形成する。

したがってE-カドヘリンは、上皮細胞およびほとんどの上皮由来がんに関するバイオ

10

20

30

40

50

マーカーとして役立つ。近年の免疫組織化学的分析は、がん細胞での E - カドヘリンの膜発現の低下が上皮がんを有する患者における有害な予後特性および全生存の低下に関連することを示している (Saito T, et al; Cancer, 2003; 97:1002-9)。したがって E - カドヘリンはそのように上皮細胞に関するバイオマーカーであるだけでなく、癌腫進行に関する予後マーカーとしても役立つ可能性がある。

上皮がん細胞の膜上の E - カドヘリンのタンパク質発現の低下または発現の欠失は、本発明者らの前臨床研究において、驚くべきことに (ヒトがんの動物モデルにおける顕著ながん増殖阻害およびがん退縮にも翻訳される) PTK2 阻害への各がん細胞の感受性と良く相関することが見出された。したがって E - カドヘリン発現レベルは、PTK2 阻害物質での治療に関する患者の選択のためのバイオマーカーとして役立つ。これらの PTK2 阻害物質は、当業者に十分周知であり、本明細書以下にも極めて詳細に記載される。低い E - カドヘリン発現を有するがん (例えば 0 ~ 2 の、好ましくは 0 ~ 1 の E - カドヘリンスコア、より好ましくは 1 のおよびさらにより好ましくは 0 の IRS スコア (前記スコアは本明細書において詳細に説明される)) は、高い E - カドヘリン発現を有するがんよりも PTK2 阻害物質での治療により感受性でありやすいことは本発明者らによって実証されうる。

「がん細胞の膜」は、がん細胞の内部からがん細胞の外部を分離する細胞膜を意味する。E - カドヘリンは、上皮細胞の細胞膜上で通常発現されており、組織内の細胞が組織適合性を維持するために相互に確実に付着することを確実にしている。

【0011】

用語「PTK2 阻害物質での治療に対して感受性」は、本明細書において使用される場合、PTK2 阻害物質が、PTK2 阻害物質が投与されているおよび/または投与される患者において治療効果を潜在的に有しうることを意味する。本明細書において使用される場合前記用語は、用語「PTK2 阻害物質での治療に対して感受性」または「PTK2 阻害物質での治療に応答性」と等価である。

【0012】

「治療効果」または「治療的に有効」は、PTK2 阻害物質が、それが投与されたものに対して治療効果をもたらしうることを意味する。好ましくは治療効果は、がんの大きさ、転移の数またはがんの存在および/もしくは進行によって生じる/に関連する他の症状などのがん関連症状の進行の低減、安定化または阻害を含む。応答は、完全応答、部分応答、疾患の安定 (進行または再発が無い) および/または患者の後の再発を伴う応答を含む。好ましくは本明細書に記載の通り PTK2 阻害物質は、がん細胞が細胞死となるように影響することができ、それにより前記がん細胞が PTK2 タンパク質を発現するという条件で患者のがんを改善および/または治療する。本発明の各方法または各方法ステップの治療効果は、治療効果を示す確立された全ての方法および手法によって検出可能でありうる。代替として、患者の血清中のがんマーカー (存在する場合は) が、治療手法が有効であるかどうかを診断するために検出されることも想定される。当業者は、彼らまたは彼女らに PTK2 阻害物質の治療効果を観察できるようにする多数の他の方法を認識する。

PTK2 阻害物質で治療されうる患者のがん試料が前記 PTK2 阻害物質での治療前に、治療中および/または治療後に採取されることは想定される。好ましくは試料は、本発明の手段および方法に従ってがん患者が PTK2 阻害物質での治療に対して感受性でありうるか否か、患者が PTK2 阻害物質での治療に有利に応答しうるか否か、または患者が PTK2 阻害物質での治療から利益を得うるか否かを判定するために治療前に採取される。

【0013】

用語「潜在的」は、治療効果の内容において使用される場合に、PTK2 阻害物質が (そのような阻害物質は本発明の方法の結果に基づく治療効果を有すると考えられるが) 必然的に治療的に有効でなければならないのではないことを意味する。自明であるようにこれは、E - カドヘリンタンパク質の発現とは別に、年齢、体重、全身状態、性、食事、薬物相互作用などの個別の要因が、患者が PTK2 阻害物質に対して感受性であるか否かに

10

20

30

40

50

影響する場合があることから、本発明の方法が、患者がPTK2阻害物質に対して感受性でありうるか否かの100%確実な予測を提供できないためである。

【0014】

本明細書において使用する「治療する」または「治療」は、がんの大きさ、転移の数または、がんの存在および/もしくは進行によって生じる/に関連する他の症状などの症状の進行を低減する、安定化する、または抑制することを意味する。

本明細書において使用される用語「がん」は、全ての前がん性およびがん性の細胞および組織を含む悪性細胞成長および増殖を意味する。がんは、場合により本明細書において悪性がんまたは新生物または腫瘍とも記される。がん化した上皮細胞の浸潤性悪性がん、すなわち癌腫は、本発明の実施形態において好ましい。したがって本発明の実施形態において前記がん試料は、本質的に悪性上皮がん細胞からなる/を含むことが想定される。

本明細書において記載されるがんは、転移性(すなわちがん転移)であってもまたは非転移性であってもよい。

【0015】

本発明の実施形態によりPTK2阻害物質で治療されるがんはPTK2タンパク質を発現することは理解される。本明細書において既に考察した通り、本発明は、がん患者がPTK2阻害物質での治療に対して感受性であるかどうかを判定するための方法に本質的に関する。当然のことであるが、したがって、治療されるがん患者はPTK2ポリペプチド発現がん細胞を有する患者である。「PTK2ポリペプチド発現がん」は、PTK2ポリペプチド提示を有する細胞を含むがんである。「PTK2ポリペプチド発現がん」は、PTK2阻害物質が相互作用できるような十分なレベルのPTK2ポリペプチドをその細胞中で生成してもよい。PTK2ポリペプチドは、種々の方法において測定されうる、すなわち当業者はがん/がん細胞がPTK2陽性であるか否かをどのように検査するかを十分認識している。がん細胞中のPTK2ポリペプチドの評価が必須ではない、すなわち本発明の実施形態は、このステップを必然的には含まないことは理解される。現在、ほとんど全ての関連する上皮がんがPTK2を発現すると考えられる。そうであっても既に述べた通りPTK2キナーゼ阻害物質の有効性は、さまざまながんモデルにおいて大きく異なり：がんの退縮または増殖の完全な抑制がいくつかのモデルにおいて達成されうる一方で、他の種類のがんの治療は増殖の部分的な抑制をもたらし、いくつかのがんは全く影響を受けない。したがってそのようなPTK2発現は、PTK2阻害物質での治療へのがんの感受性に関して明らかに予測的でない。この隔たりが、PTK2阻害物質での治療に対して感受性であるがん/がん患者の同定を可能にする適切なバイオマーカーを初めて提供する本発明によって縮められる：前述のバイオマーカーは本明細書全体を通じて説明される通りE-カドヘリン発現である。

【0016】

本発明の内容において用語「がん患者」(場合により「患者」または「対象」とも記される)は、本明細書に記載のがんを有する対象(がんを罹患していると診断された対象を含んで)を、例えば原発がんの切除後のアジュバント治療中の対象も含んで意味する。

好ましくは前記対象は、ヒト、ウマ、ラクダ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ヤギなど哺乳動物または家禽である。ヒト対象が最も好ましい。本発明の組成物、化合物、使用および方法は、したがってヒトの治療および獣医学的適用の両方に適用可能である。

【0017】

「組織試料」(場合により「がん試料」または「がんの試料」などとも記される)は、対象(がん患者)由来であるまたはから採取され、針生検、外科的生検、骨髄生検などの生検を介して採取されうる。がん試料は、がんの検体、がんの一部、がん由来のがん細胞(がんから由来しうるおよび細胞培養で増殖されるがん細胞系を含む)を含み、全体としてのがん実体、ならびにそのがん細胞系、ならびに対象由来のおよびがん性が疑われるまたはがん性細胞を含むことが疑われる細胞および/または組織も含む。したがってがん試料が非がん性細胞も含みうることは想定される。例えばがん細胞および/または(マイクロ)転移は、健康な(すなわち非がん性組織)によってしばしば囲まれている、すなわち

10

20

30

40

50

がん細胞は健康な組織中に細胞のサブセットを形成する場合がある。したがってがん試料は、健康な（非がん性）細胞のサブセットおよびがん性細胞のサブセットを含有できる。用語「試料」は「検体」と互換的である。

【0018】

P T K 2 阻害物質で治療されるがんの非限定的な例示的表は、これだけに限らないが次の：十二指腸、結腸、直腸および肛門の癌腫を含む腸がん；膵臓の癌腫（例えば膵臓腺癌）；膀胱の癌腫；肺腫瘍（小細胞肺癌（SCLC）、例えば扁平上皮癌、腺癌（腺房、乳頭、細気管支-肺胞）および大細胞気管支癌（巨細胞癌、明細胞癌）などの非小細胞肺癌（NSCLC））；管、小葉、粘液性または管状の癌腫、パジェット癌腫などの乳がん；子宮がん（体癌または子宮内膜癌）；CUP症候群（原発未知のがん）；卵巣がん（卵巣細胞癌-粘液性または漿液性嚢胞腺癌、類内膜癌、明細胞腫瘍、ブレンナー腫瘍）；胆嚢がん；例えばクラツキン腫瘍などの胆管がん；精巣がん（胚性または非胚性胚細胞腫瘍）；例えば声帯の上声門、声門および声門下腫瘍などの喉頭腫瘍；例えば口唇および口腔の腫瘍（口唇、舌、口腔の癌腫）、鼻咽頭癌（鼻の腫瘍、リンパ上皮腫）、咽頭癌、中咽頭癌、扁桃腺（扁桃腺マリグノーマ）および舌（の底部）の癌腫、下咽頭癌、喉頭癌（喉頭のがん）、副鼻腔および鼻腔の腫瘍、唾液腺および耳の腫瘍などの頭頸部腫瘍（HNO腫瘍）；眼瞼腫瘍（眼瞼涙器の基底細胞腫または腺癌）；肝臓細胞癌（肝細胞癌（HCC））；胃がん（乳頭状、管状または粘液の腺癌、腺扁平上皮、扁平上皮または未分化の癌腫）；例えば腎明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、嫌色素腎細胞癌および集合管癌などの腎臓がん；食道がん；陰茎がん；前立腺がん（例えばホルモン不応性前立腺がん）；膣がんまたは膣の癌腫；乳頭状、濾胞状、髄様、無形成性の甲状腺癌などの甲状腺癌；尿道のがん（尿道の癌腫、尿路上皮癌）；ならびに外陰部のがん、の1つまたは複数を含む。

10

20

【0019】

十二指腸、結腸、直腸および肛門の癌腫；膵臓の癌腫（例えば膵臓腺癌）；膀胱の癌腫；肺腫瘍（小細胞肺癌（SCLC）、例えば扁平上皮癌、腺癌（腺房、乳頭、細気管支-肺胞）および大細胞気管支癌（巨細胞癌、明細胞癌）などの非小細胞肺癌（NSCLC））；管、小葉、粘液性または管状の癌腫などの乳がん、卵巣がん（卵巣の癌腫-粘液性または漿液性嚢胞腺癌、類内膜癌および明細胞腫瘍）；頭頸部腫瘍；肝臓細胞癌（肝細胞癌（HCC））；例えば（腎明細胞癌、乳頭状腎細胞癌、嫌色素腎細胞癌および集合管癌）などの腎臓がん；前立腺がん（例えばホルモン不応性前立腺がん）；ならびに外陰部のがんは、非常に重要であり、したがって好ましい。

30

40

【0020】

F A K、F A D K、F A K 1、p p 1 2 5 F A K、E C 2 . 7 . 1 0 . 2) としても周知のタンパク質チロシンキナーゼ2 (P T K 2) は、細胞外マトリクス成分の存在下で増殖する細胞の細胞膜に形成される接着斑において集中的に見出される細胞質タンパク質チロシンキナーゼである。コードされるタンパク質は、タンパク質チロシンキナーゼのF A K サブファミリーの一員であるが、他のサブファミリーからのキナーゼへの重要な配列類似性を欠いている。P T K 2 は、3個の機能ドメイン：(1) F A K の接着斑への局在化のためならびにパキシリンおよびタリンなどのインテグリン結合タンパク質の結合のために重要な接着斑標的化 (F A T) ドメイン；(2) チロシンキナーゼ活性を有する触媒ドメイン；および(3) インテグリンおよび増殖因子受容体との相互作用のために重要なN末端ドメインを有する(Parsons, J.T. (2003). Focal adhesion kinase: The first ten years. J. Cell Sci. 116, 1409-1416)。P T K 2 は、S H 2 ドメインを含有するアダプタータンパク質への結合のために必要な複数のリン酸化部位を有する。重要なリン酸化部位は、P T K 2 と R h o キナーゼなどの下流シグナル伝達分子との相互作用のために重要であると考えられるT y r 3 9 7 である。

【0021】

確証的証拠は、P T K 2 が細胞マトリクスシグナル伝達経路において重要な役割を演じることを示唆し(Clark and Brugge 1995, Science 268:233-239)、その異常な活性化は、がんの転移能の増大に関連する(Owens et al. 1995, Cancer Research 55:2752-2755)。P

50

PTK2は、v-Srcによって形質転換された細胞において高度にチロシンリン酸化された125kDaタンパク質として最初に同定された。後にPTK2は、培養細胞とそれらの下にある基層および強いチロシンリン酸化部位との接点である接着斑に局在するチロシンキナーゼであることが見出された。PTK2は、リン酸化され、次いでインテグリンへの細胞外マトリクス(ECM)結合に対する応答において活性化される。近年、研究はPTK2 mRNAレベルの増加ががんのより浸潤的な挙動に付随しており、PTK2発現の減衰は(アンチセンスオリゴヌクレオチドの使用を通じて)がん細胞においてアポトーシスを誘導することを実証している(Xu et al.1996,Cell Growth and Diff.7:413-418)。ほとんどの組織型において発現されることに加えて、PTK2は、ほとんどのヒトがんにおいて、特に高度に浸潤性および転移性のがんにおいてレベルが上昇して見出されている。10

そうであっても、既に記述の通り、PTK2キナーゼ阻害物質の有効性は、さまざまながんモデルにおいて大きく異なっている。したがってそのようなPTK2発現は、PTK2阻害物質での治療へのがんの感受性に関して明らかに予測的でない。この隔たりが、PTK2阻害物質での治療に対して感受性であるがん/がん患者の同定を可能にする適切なバイオマーカーを初めて提供する本発明によって縮められる：前述のバイオマーカーは本明細書全体を通じて説明される通りE-カドヘリン発現である。

【0022】

本発明の内容において用語「PTK2阻害物質」は、PTK2(好ましくはヒトPTK2)とキナーゼ活性が低下するように相互作用する1つまたは複数の化合物を定義する。20

そのような阻害物質を検出するために適切であるアッセイは、本明細書下にさらに詳細に説明される。用語「複数の化合物」は、同一でも同一でなくてもよい複数の物質として理解される。複数の化合物は、好ましくは相加的にまたは相乗的に作用しうる。前記1つまたは複数の化合物は、化学的に合成されうるあるいは微生物学的に産生されうるおよび/または例えば植物、動物もしくは微生物由来の例えば細胞抽出物である例えば試料中に含まれうる。

【0023】

本明細書において使用される用語「低下したPTK2キナーゼ活性」または「低下しているPTK2キナーゼ活性」は、PTK2のキナーゼ活性の、好ましくは比較できる対照細胞/対象の正常/天然状態と比較して少なくともほぼ同じレベルへの低下を定義する。30

本内容において用語「比較できる対照細胞/対象の正常/天然状態」は、被検細胞と好ましくは同じ性質である(例えば両方の細胞が上皮細胞である)が異なる供給源由来である対照細胞中のPTK2キナーゼ活性を意味する。「異なる供給源」は、例えば健康な対象から、好ましくは癌腫を罹患していない対象から採取した細胞/組織試料または同じ対象の異なる部分から採取した細胞/組織試料であって前記異なる部分が癌腫の関連する症状を有しないと考えられる試料を含む。しかしPTK2阻害物質がPTK2のキナーゼ活性を比較できる対照細胞/対象のほぼ正常な/天然の状態にまで低下させないが、前記阻害物質を添加する前のPTK2キナーゼ活性と比較した場合にPTK2キナーゼ活性を実際に低下させる場合も、前記阻害物質は有益な効果を有すると考えられる。

【0024】

したがってPTK2阻害物質は、前記阻害物質を添加せずに達成されるPTK2キナーゼ活性と比較して、約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、40

80%、90%またはちょうど100%PTK2キナーゼ活性を少なくとも低下させることが想定される。PTK2キナーゼ活性を測定するための適切な検査系は、本明細書において開示される。したがって、本発明の阻害物質が例えば本明細書において開示する検査系(例えばPTK2酵素検査)と類似のまたは同一の条件下で約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%またはちょうど100%PTK2キナーゼ活性を低下させることは好ましい。

【0025】

PTK2酵素検査

本検査は、活性PTK2酵素(InvitrogenコードPV3832)およびキ 50

ナーゼ基質としてポリ - G l u - T y r (4 : 1、S i g m a P - 0 2 7 5) を使用する。キナーゼ活性は、D E L F I A (商標) アッセイで基質のリン酸化の方法によって検出される。リン酸化された基質は、ユーロピウム標識リン酸化チロシン抗体 P T 6 6 (P e r k i n E l m e r、N o . A D 0 0 4 0) で検出される。P T K 2 阻害物質での濃度 - 活性曲線を決定するために化合物は 1 0 % D M S O / H₂O 中に系列希釈され、各希釈物 1 0 μ L は 9 6 ウェルマイクロタイタープレート (透明 U 型底プレート、G r e i n e r N o . 6 5 0 1 0 1) の各ウェルに入れられ (阻害物質は 2 回ずつ検査される)、1 ウェルあたり 1 0 μ L の P T K 2 キナーゼ (1 ウェルあたり 0 . 0 1 μ g) と混合される。P T K 2 キナーゼは、キナーゼ希釈緩衝液 (新鮮調製 B S A (フラクシオン V、1 m g / m L) および D T T (1 m M) が添加された 2 0 m M T R I S / H C l p H 7 . 5、0 . 1 m M E D T A、0 . 1 m M E G T A、0 . 2 8 6 m M オルトバナジン酸ナトリウム、1 0 % グリセロール) で予め希釈される。被検化合物および P T K 2 キナーゼは、室温で 1 時間、5 0 0 r p m で振盪して予備インキュベートされる。次いで A T P 混合物 (3 0 m M T R I S / H C l p H 7 . 5、0 . 0 2 % B r i j、0 . 2 m M オルトバナジン酸ナトリウム、1 0 m M 酢酸マグネシウム、0 . 1 m M E G T A、1 × ホスファターゼ阻害物質カクテル 1 (S i g m a、N o . P 2 8 5 0)、5 0 μ M A T P (S i g m a、N o . A 3 3 7 7 ; 1 5 m M s t o c k s o l u t i o n)) 2 0 μ L が添加される。反応は、1 ウェルあたり 1 0 μ L のポリ (G l u、T y r) 基質 (2 5 0 m M T R I S / H C l p H 7 . 5、9 m M D T T に溶解された 1 ウェルあたり 2 5 μ g のポリ (G l u、T y r)、1 ウェルあたり 0 . 0 5 μ g のビオチン化ポリ (G l u、T y r)) の添加によって開始される - D M S O 最終濃度は 2 %。1 時間のキナーゼ反応後 (プレートは 5 0 0 r p m で振盪される)、反応は 1 ウェルあたり 1 2 μ L の 1 0 0 m M E D T A、p H 8 の添加によって停止される。さらに 5 分間、室温で振盪される (5 0 0 U / 分)。

10

20

30

40

【 0 0 2 6 】

反応混合物 5 5 μ L はストレプトアビジンプレート (R o c h e によって製造された S t r e p t a W e l l H i g h B i n d (透明、9 6 穴)、N o . 1 1 9 8 9 6 8 5 0 0 1) に移され、1 時間、室温でインキュベート (5 0 0 r p m で振盪) される。次いでマイクロタイタープレートは、D - P B S (I n v i t r o g e n、N o . 1 4 1 9 0) 1 ウェルあたり 2 0 0 μ L で 3 回洗浄される。1 : 2 0 0 0 希釈 D E L F I A E u - N I 抗リン酸化チロシン P T 6 6 抗体 (P e r k i n E l m e r、N o . A D 0 0 4 0 D E L F I A t e s t b u f f e r (P e r k i n E l m e r、N o . 1 2 4 4 - 1 1 1) 中に 1 : 2 0 0 0 希釈) 1 0 0 μ L が次いで添加され、1 時間、室温でインキュベート (5 0 0 r p m で振盪) される。次いでプレートは、D E L F I A 洗浄緩衝液 (P e r k i n E l m e r、N o . 1 2 4 4 - 1 1 4) 1 ウェルあたり 2 0 0 μ L で 3 回洗浄され、強化溶液 (P e r k i n E l m e r、N o . 1 2 4 4 - 1 0 5) 1 ウェルあたり 2 0 0 μ L が添加され、全体が 1 0 分間、室温でインキュベート (3 0 0 r p m で振盪) される。

次いで時間遅延ユーロピウム蛍光が、マイクロタイタープレートリーダー (V i c t o r、P e r k i n E l m e r) で測定される。陽性対照は、溶媒 (検査緩衝液中の 2 % D M S O) を含み、阻害されていないキナーゼ活性を示すウェルからなる。酵素の代わりに検査緩衝液を含むウェルは、バックグラウンドキナーゼ活性についての対照となる。I C₅₀ 値は、可変ヒル係数と共にシグモイド曲線分析アルゴリズム (G r a p h P A D P r i s m V e r s i o n 3 . 0 3 に基づく F I F T Y) を使用する反復計算による濃度 - 活性分析から決定される。

【 0 0 2 7 】

P T K 2 阻害物質を同定するために使用されうるさらなるアッセイは、当業者に十分周知であり、とりわけ P T K 2 ソフトアガーアッセイまたはホスホ P T K 2 (p Y 3 9 7) アッセイを含む。両アッセイは、本明細書下に詳細に説明される。

【 0 0 2 8 】

50

P T K 2 ソフトアガーアッセイ

この細胞性検査は、ソフトアガー中の P C - 3 前立腺癌細胞の増殖における P T K 2 阻害物質の影響を判定するために使用される（「足場非依存性増殖」）。2 週間のインキュベーション時間の後、細胞の生存能力を A l a m a r B l u e（レザズリン）染色によって実証する。P C - 3 細胞（A T C C C R L - 1 4 3 5）は、10%ウシ胎児血清（I n v i t r o g e n、N o . 1 6 0 0 0 - 0 4 4）を添加した F 1 2 カイン培地（G i b c o、N o . 2 1 1 2 7）を含む細胞培養フラスコ（175 cm²）中で培養される。培養物はインキュベーター中、37、5%CO₂でインキュベートされ、2週間に1度実施される。検査はマイクロタイタープレート（G r e i n e r、N o . 6 5 5 1 8 5）中で実行され、1.2%アガロースを含む培地90μLから作製される下層（I n v i r o g e n、4% a g a r o s e g e l 1 × l i q u i d 4 0 m L、N o . 1 8 3 0 0 - 0 1 2）に続く0.3%アガロースを含む60μL培地の細胞層、および最後に被検化合物を含有する30μL培地（アガロースは添加されない）を含む上層からなる。下層を調製するために4%アガロースは10×D - P B S（G i b c o、N o . 1 4 2 0 0）およびH₂Oと共に加熱され、次いで1×D - P B S中の3%アガロースで予備希釈される。後者は培養培地（F 1 2 カイン / 10% F C S）およびF C Sで10% F C Sを含むF 1 2 カイン培地中の1.2%アガロース最終希釈に調製される。マイクロタイタープレートの各ウェルは、下層用に懸濁液90μLを添加され、室温まで1時間冷却される。細胞層用に、P C - 3 細胞はトリプシン（G i b c o、0.05%、N o . 2 5 3 0 0）を使用して剥離され、計数され、0.3%アガロースを添加したF 1 2 カイン（10% F C S）60μL中に播種される（37）。室温まで1時間冷却後、被検化合物（系列希釈から30μL）が四重測定のために加えられる。被検化合物の濃度は10μMから0.3nMの間の検査範囲を通常網羅する。化合物（保存溶液：100%DMSO中10mM）は、1%DMSOの最終濃度を得るために6%DMSOを含むF 1 2 カイン培地中に予備希釈される。細胞は、37、5%CO₂、飽和蒸気雰囲気中で14日間インキュベートされる。次いで生存細胞の代謝活性は、色素A l a m a r B l u e（A b D S e r o t e c、N o . B U F O 1 2 B）で実証される。これを実施するためにA l a m a r B l u e 懸濁液1ウェルあたり18μLが添加され、全体がインキュベーター中37でおおよそ8時間インキュベートされる。陽性対照は、加圧滅菌で還元された18μLのA l a m a r B l u eと180μLのF 1 2 カイン培地（10% F C S）との混合物で満たされた空のウェルからなる。蛍光強度は、蛍光スペクトロメーター（S p e c t r a M A X G e m i n i X S、M o l e c u l a r D e v i c e s）の手段によって測定される。励起波長は530nmであり、発光波長は590nmである。

E C₅₀値は、可変ヒル係数と共にシグモイド曲線分析アルゴリズム（G r a p h P A D P r i s m V e r s i o n 3 . 0 3に基づくF I F T Y）を使用する反復計算による濃度 - 活性分析から決定される。

【0029】

ホスホ - P T K 2（p Y 3 9 7）アッセイ

この細胞検査は、チロシン397でのP T K 2リン酸化の状態（p Y 3 9 7）へのP T K 2阻害物質の影響を測定するために使用される。

P C - 3 細胞（前立腺癌、A T C C C R L - 1 4 3 5）は、10%ウシ胎児血清（I n v i t r o g e n、N o . 1 6 0 0 0 - 0 4 4）を添加したF 1 2 カイン培地（G i b c o、N o . 2 1 1 2 7）を含む細胞培養フラスコ（175 cm²）中で培養される。培養物はインキュベーター中、37、5%CO₂でインキュベートされ、2週間に1度実施される。

【0030】

検査用に、1ウェルあたり細胞2×10⁴個 / 90μL培地を96ウェルマイクロタイタープレート（C o s t a r、N o . 3 5 9 8）に入れられ、インキュベーター中、37、5%CO₂で一晩インキュベートされる。被検化合物（系列希釈から10μL）は翌日添加される。被検化合物の濃度は50μMから0.8nMの検査範囲を通常網羅する。

被検化合物（保存溶液：100% DMSO中10mM）は、培地/培地10% DMSOに、最終濃度が1% DMSOとなるように希釈される。次いで細胞は、インキュベーター中37℃、5% CO₂で2時間インキュベートされる。次いで培養上清は除去され、細胞はD-PBS中の4%ホルムアルデヒド150μLで20分間、室温で固定される。細胞叢はD-PBS中の0.1% Triton X-100 200μLで各回5分間で5回洗浄され、次いでブロッキング緩衝液（TBS-T（25mM Tris/HCl、pH 8.0、150mM NaCl、0.05% Tween 20）中の5%脱脂粉乳（Maresi Fixmilch））中で90分間インキュベートされる。ブロッキング緩衝液は、ブロッキング緩衝液中に1：200で希釈された一次抗体抗ホスホPTK2 [pY397]ウサギモノクローナル（Invitrogen/Biosource、No. 44-625G）50μLで置換される。対照の目的で代替として、ブロッキング緩衝液中に1：400で希釈されたPTK2 [total]抗体（クローン4.47マウスモノクローナル、Upstate、No. 05-537）が使用される。このインキュベーションは、4℃で一晩実施される。次いで細胞叢は、D-PBS中の0.1% Tween 100μLで各回5分間で5回洗浄され、1ウェルあたり50μLの二次抗体が添加される。結合したホスホPTK2 [pY397]抗体を検出するために、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合されたヤギ抗ウサギ抗体（Dako、No. P0448、ブロッキング緩衝液中1：500希釈）が使用される。結合したPTK2 [total]抗体を検出するために、これも西洋ワサビペルオキシダーゼに結合されたウサギ抗マウス抗体（Dako、No. P0161、ブロッキング緩衝液中1：1000希釈）が使用される。このインキュベーションは、1時間、室温で穏やかに振盪されて実施される。次いで細胞叢は、再びD-PBS中の0.1% Tween 100μLで各回5分間で5回洗浄される。ペルオキシダーゼ染色は、染色溶液（TMBペルオキシダーゼ基質（KPL、No. 50-76-02）とペルオキシダーゼ溶液B（H₂O₂）（KPL、No. 50-65-02）の1：1混合液）100μLを添加することによって実行される。染色の発色は、暗所で10～30分間行われる。反応は、1Mリン酸溶液の1ウェルあたり100μLの添加によって停止される。吸収は、吸収測定装置（VICTOR PerkinElmer）で450nmでの測光法により測定される。抗ホスホPTK2 [pY397]免疫染色の阻害は、EC50値を測定するために使用される。抗PTK2 [total]抗体での染色は対照目的であり、阻害物質の影響下で一定のままであるはずである。EC50値は、可変ヒル係数と共にシグモイド曲線分析アルゴリズム（GraphPAD Prism Version 3.03に基づくFIFTY）の支援を伴う反復計算による濃度-活性分析から決定される。

【0031】

細胞中、前記細胞を含む組織中または前記組織または細胞を含む対象における活性PTK2の量の低下に影響する化合物は同様にPTK2阻害物質として想定され、例えばアプタマー、抗体または、PTK2に結合できそれによりPTK2を阻害できるその機能性断片；アンチセンスオリゴヌクレオチド、iRNA、miRNAまたはsiRNA（PTK2をコードするヌクレオチド配列に特異的に結合し、それにより細胞または組織中の活性PTK2の量を低下させる）を含む。そのような抗体および干渉核酸配列は当業者に十分周知である。これらの多くは商業的に入手可能でさえある。

【0032】

本発明の内容において想定されるPTK2阻害物質の例は、本発明はこれらに限定されないが、WO 2010/106097、WO 2010/136559、WO 2011/039344、WO 2007/063384、WO 2010/058032、WO 2010/058030、WO 2010/055117、WO 2009/07153、WO 2005/1110245、WO 2008/129380、WO 2007/072158、WO 2005/111022、WO 2005/111023、WO 2005/111016、WO 2004/056807、WO 2009/071535、WO 2004/056786、WO 2010/062578、EP 204

7849、WO 2008/115369、WO 2009/024332、WO 2008/129380、WO 2007/072158、WO 2004/056807、WO 2006/021457、WO 2010/062578、WO 2009/105498、WO 2004/030620、WO 2008/115443、米国特許出願第2008/167368号および/またはWO 2009/153589において例示される化合物である。前述の文書はその全体が参照の方法により本明細書に含まれる。

【0033】

本発明の内容において用語「PTK2阻害物質」は用語「PTK2アンタゴニスト」などと互換的である。

【0034】

PTK2阻害物質は、がんのさまざまな実験モデルにおいて、特に免疫不全マウスでのヒトがん異種移植モデルにおいて有効性を示す。しかしその有効性はさまざまながんモデルで大きく異なる：がんの退縮または増殖の完全な抑制がいくつかのモデルにおいて達成されうる一方で、他の種類のがんの治療は増殖の部分的な抑制をもたらし、いくつかのがんは全く影響を受けない。本発明は、上皮がん由来のがん細胞におけるE-カドヘリンタンパク質の発現レベルが、本発明によって確立されたスコアリング方法によってスコアリングされる場合に、PTK2阻害物質に対する各がんの感受性を予測するために使用されうるといふ、驚くべき発見に本質的に基づいている。この観点から患者由来のがん試料におけるE-カドヘリンタンパク質の発現を検出することが想定され、0~2の、好ましくは0~1のE-カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア(I RS)、より好ましくは1の、さらにより好ましくは0のI RSスコアは、がん/がん患者がPTK2阻害物質での治療に対して感受性であることを示す。

前記I RSスコアは、I HC法の手段によって好ましくは評価(検出)されるが、他の免疫学的方法は排除されない。

【0035】

「I HC法」は、標識によって可視化される標的-結合ドメイン相互作用を介した特異的試薬としての結合ドメインの使用による組織切片中の標的(例えば抗原)の検出を意味する。前記組織切片(例えば厚さ約2~5 μm)が好ましくは例えばパラフィン中に包埋されている組織試料から採取されることが想定される。検出方法の詳細を記載しているI HCプロトコールおよびE-カドヘリン抗体の供給源は、下に記載される。例において使用されるI HC法は、DABを反応のための基質として伴う間接アビジン-ビオチン複合体(ABC)免疫ペルオキシダーゼ法である。さらなるI HC法は本明細書下にさらに詳細に説明される。

【0036】

用語「結合ドメイン」は、E-カドヘリンを特異的に認識するポリペプチドのドメインを本発明との関連において特徴付ける。用語「E-カドヘリンを特異的に認識する」または「E-カドヘリンに特異的」は、本発明により、結合ドメイン(例えば抗体)がE-カドヘリンと特異的に相互作用および/または結合できることを意味する。本明細書において使用する用語「結合」は、E-カドヘリンと結合ドメインとの間の相互作用と関連して、一般的なタンパク質との関連(すなわち非特異的結合)と比較して結合ドメインがE-カドヘリンと統計的に有意な程度関連する(例えば相互作用するまたは複合体化する)ことを示す。したがって用語「結合ドメイン」は、E-カドヘリンと統計的に有意に関連するまたは結合するドメインを意味するとも理解される。

本発明に沿う結合ドメインの好ましい例は、エピトープ結合ドメイン、好ましくは抗体、より好ましくはモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であるかまたはこれらを含む。

【0037】

用語「抗体」は、標的に結合するモノクローナルもしくはポリクローナル抗体(Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, USA, 1988を参照されたい)またはその結合特異性を保持しているまたは本質的に保持している前記

10

20

30

40

50

抗体の誘導体を意味する。そのような抗体の好ましい誘導体は、例えばマウスまたはラットの可変領域とヒト定常領域とを含むキメラ抗体である。用語「抗体」は、二機能性（二重特異性）抗体および、1本鎖Fvs（scFv）または抗体融合タンパク質などの抗体構築物も含む。用語「scFv断片」（1本鎖Fv断片）は、当技術分野において十分周知であり、そのサイズが小さいことおよびそのような断片を組換え的に産生する可能性から好ましい。前記抗体または抗体結合部分は、例えばラット、マウス、ラクダ、ヤギ、ヒツジ、ニワトリ、ウマもしくはヒトの抗体またはヒト化抗体である。用語「ヒト化抗体」は、本発明により、可変領域中の少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）（CDR3などおよび好ましくは6個全てのCDR）が所望の特異性を有するヒト由来の抗体のCDRによって置換されている非ヒト由来の抗体を意味する。抗体の（1つまたは複数の）非ヒト定常領域はヒト抗体の（1つまたは複数の）定常領域によって置換されていてもよい。ヒト化抗体産生のための方法は、例えばEP-A1 0 239 400およびWO 90/07861に記載されている。用語抗体またはその機能性断片は、重鎖抗体およびその可変ドメインも含み、WO 94/04678、WO 96/34103およびWO 97/49805、WO 04/062551、WO 04/041863、WO 04/041865、WO 04/041862およびWO 04/041867において述べられており；同様にドメイン抗体もしくは「dAb」（伝統的な4本鎖抗体分子の重鎖可変ドメイン（VH）または軽鎖可変ドメイン（VL）に基づくまたはそれに由来する）も含む（例えばWard et al.1989 Nature 341,544-546を参照されたい）。

10

【0038】

20

本明細書において使用される用語「抗原結合断片」は、抗体様の結合特異性を保持しているまたは本質的に保持している本明細書において特定する抗体の断片、分離された軽鎖および重鎖、Fab、Fab/c、Fv、Fab'、F(ab')₂を意味する。抗原結合断片は、抗体の軽鎖可変領域（VL）および重鎖可変領域（VR）を含んでよいが、しかし両方を含む必要はない。例えばFd断片はVH領域2個を有し、無処理抗原結合断片の抗原結合機能をしばしば保持する。

【0039】

次の例示的抗体は、本発明の実施形態において使用されうる。しかし本発明は、これらの具体的な抗体に限定されない。

- E-カドヘリンの細胞外ドメインに対するマウスモノクローナル抗体 [HECD-1] (Abcam Ab1416)
- E-カドヘリンの120kD成熟形態および82kD断片を認識するE-カドヘリンに対するマウスモノクローナル抗体 (Dako M3612)
- ヒトE-カドヘリンの細胞質ドメインと反応する；マウス抗E-カドヘリンモノクローナル抗体 (Invitrogen 18-0223)
- E-カドヘリンに対するマウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich WH0000999M1)
- E-カドヘリンに対するウサギポリクローナル抗体 (Cell Signalling 4065)

30

【0040】

40

用語「エピトープ結合ドメイン」は、抗体またはその抗原結合断片（場合により「機能性断片」とも記される）に加えて、E-カドヘリンなどのタンパク質性標的に結合する（特異的に結合する）他の結合体を含む。用語「エピトープ結合ドメイン」は、例えばヒト、ラクダもしくはサメ免疫グロブリン単一可変ドメインである例えばドメイン抗体（dAb）を含み、または天然リガンド以外のリガンドへの結合を得るためにタンパク質工学の対象となっている、CTLA-4 (EviBody)；リボカリン；プロテインAのZ-ドメイン (Affibody, SpA)、A-domain (Avimer/Maxibody)などのプロテインA由来分子；GroEIおよびGroESなどの熱ショックタンパク質；トランスフェリン (trans-body)；アンキリン反復タンパク質 (DARPin)；ペプチドアプタマー；C-型レクチンドメイン (Tetranectin

50

); ヒト - クリスタリンおよびヒトユビキチン (a f f i l i n s); P D Z ドメイン; ヒトプロテアーゼ阻害物質のサソリ毒クニツ型ドメイン; ならびにフィブロネクチン (a d n e c t i n) からなる群から選択されるスキャフォールドの誘導体であるドメインであってよい。C T L A - 4 (細胞傷害性 T リンパ球 - 関連抗原 4) は、主に C D 4 + T 細胞で発現される C D 2 8 ファミリー受容体である。その細胞外ドメインは、I g ホールド様の可変ドメインを有する。抗体の C D R に対応するループは、異なる結合特性を付与するために異種性配列で置換されうる。異なる結合特性を有するように操作された C T L A - 4 分子はエピボディーとしても周知である。さらなる詳細については Journal of Immunological Methods 248(1-2), 31-45(2001) を参照されたい。

【 0 0 4 1 】

本発明の結合ドメインは、標識されているかまたは標識されていないかのいずれかである。

標識は、本発明の内容において分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的または化学的手段によって検出可能な化合物または組成物を意味する。

標識は、直接的または間接的に検出可能でありうる。

「直接的」は、放射活性、発光性または蛍光性シグナルなどのシグナルを生成する標識を意味する。直接標識は、放射線標識、蛍光標識、高電子密度試薬などを含む。直接標識は、結合した結合ドメインを定量および / または (定性的に) 検出するために使用される測定可能なシグナルを有するかまたは生成する。

「間接的」は、標識が検出可能になるように例えば他の実体によって結合されることを意味する (検出実体) 。間接的検出または間接的標識は、間接的標識への第 2 の直接的または間接的に検出可能な結合ドメインの結合を含む。例えば、本発明の結合ドメインの間接標識は、(ストレプトアビジンに対する結合パートナーである) ビオチン、または特異的にハイブリダイズできるなどの (相補的配列に対する結合パートナーである) ヌクレオチド配列など結合パートナーのリガンドでありうる。したがって「間接的標識」は、操作 (例えばビオチン標識) に対して特異的な二次結合ドメイン (場合により検出実体とも記される) によって検出可能でありうるように一次結合ドメインが操作されることにおいて特徴付けられる。

【 0 0 4 2 】

好ましい実施形態において前記結合ドメインは、抗体 (一次抗体) であり、前記検出実体は、一次抗体と特異的に反応する二次抗体または一次抗体の標識である。

間接的および直接的標識化が混合されることも想定される。例えば直接標識は既にシグナルを生成することができる (例えば F I T C などの蛍光標識) が、二次結合ドメインは例えば、一次シグナルの標識に結合する標識 (抗 F I T C 抗体) に特異的に結合する直接標識でも標識され、検出可能なシグナルを増加させることもできる。そのような手段および方法は、当業者、特に免疫化学の分野の実務家に十分周知である。

他の実施形態において一次結合ドメイン (例えば抗体) はそのように標識されないが、一次結合ドメインに結合する二次結合ドメイン (検出実体) の手段 (例えばマウスで産生された一次非標識抗体は、別の種で産生され、マウス抗体に特異的に結合する二次、標識抗体 (例えばヤギ抗マウス抗体) によって検出される) によって検出される / 検出可能である。次いで二次結合ドメインは、直接的にまたは間接的に標識される。そのような抗体検出サンドイッチは、十分に確立されており、当業者はそのような系を生成 / 確立または作るために問題を有さない。

【 0 0 4 3 】

e x v i v o で実行される「検出」(場合により「測定」およびその文法的変化形でも記される) は、当業者に十分周知であり、これだけに限らないが、近赤外に基づく顕微鏡を含む光学および蛍光に基づく顕微鏡ならびに共焦点顕微鏡などの任意の種類の適切な I H C 検出技術を含む標準的検出技術によって実行される。

「i n v i t r o」と互換的である用語「e x v i v o」は、制御された条件下で細胞中において実施される活動を意味する。本発明の方法は e x v i v o で実施される

10

20

30

40

50

。

【0044】

本明細書で既に述べた通り免疫組織化学（IHC）は、直接的に標識された（直接IHC）または間接的に標識された（間接IHC）結合ドメイン（結合ドメインはそれらの標的と特異的標的 - 結合ドメイン相互作用を通じて反応する）の使用による組織切片中の標的（本発明の内容においては例えばE-カドヘリン）および/または前記標的を提示している細胞のサブセットの検出である。本発明の内容において前記標的は、E-カドヘリンである。

次いでこれらの相互作用は、前述の標識によって可視化される。組織中の抗原の免疫組織化学的（IHC）検出のために使用される主に2つの戦略、直接法および間接法がある。IHCの直接法は、染色される標的に直接結合する1つの直接標識された結合ドメインを使用する。したがって直接法は、1ステップ染色法であり、例えば組織切片中で抗原と直接反応する標識抗体（例えばFITCコンジュゲート抗血清）を含む。この技術は抗体を1つだけ利用し、したがって手順は、簡便かつ迅速である。IHCの間接法は、E-カドヘリンに対する1つの結合ドメインおよび、第一結合ドメインに対する第二の標識された結合ドメインを使用する。第二結合ドメインは、例えば第一抗体が産生された動物種のIgGに対して産生された抗体である。

【0045】

本発明の方法のいくつかの実施形態において、前記IHC法は次のステップ：

- (a) がん試料を提供してもよい（または代替的にがん試料を含む容器を提供してもよい）ステップ；
 - (b) 前記がん試料の固定ステップ；
 - (c) がん試料をパラフィン中に包埋してもよいステップ；
 - (c) 固定されたがん試料のE-カドヘリン特異的結合ドメインとのインキュベーションステップ；
 - (d) 結合ドメインおよびそれによりがん細胞上のE-カドヘリン発現を直接的または間接的に検出するステップ
- によって特徴付けられることが想定される。

【0046】

「固定する」または「固定」は、続くIHC検出手順用のがん試料を調製するために適切である固定手順を意味する。「固定」は、組織構造および細胞形態の保存を確実にするために特に実行される。適切な固定条件は十分周知であり、本明細書にも開示される。代替的に組織/サブセットが低温凍結の手段（例えば液体窒素中）によって保存されることも想定される。

上の予備処置ステップ/測定の前には用語「固定」の範囲内であり、すなわち具体的に固定はホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒドなどの固定剤での固定；および/もしくは組織試料/細胞のサブセットの低温凍結を含み、ならびに/または組織/細胞のサブセットのパラフィンもしくは同様の薬剤中への包埋も含んでもよい。

【0047】

さまざまなIHCプロトコールを実行するための手段および方法は、当業者に十分周知である。例えば文献またはインターネット上（例えばwww.ihcworld.com）の各プロトコールを参照されたい。

【0048】

免疫組織化学のために使用される最も一般的な固定剤は、約1から5%パラホルムアルデヒドを含有する多様な緩衝液においてしばしば使用されるパラホルムアルデヒドである。パラホルムアルデヒドに基づく具体的な緩衝液は、次に例示される：

- a) 0.1Mリン酸緩衝液中の4%パラホルムアルデヒド
- b) 0.1Mリン酸緩衝液中の0.2%ピクリン酸を含む2%パラホルムアルデヒド
- c) PLP（パラホルムアルデヒド、リジン、パラホルムアルデヒド）固定剤：例えば0.1Mリン酸緩衝液中の4%パラホルムアルデヒド、0.2%過ヨウ素酸および1.2%

10

20

30

40

50

リジン

d) 0.05% グルタルアルデヒドを含む4% パラホルムアルデヒド

これらの緩衝液は本発明を限定する意図はなく、組織の十分な固定を達成するために通常適用される具体的な条件を単に例示する。標準的固定時間は約5、10、15、20、30分間から一晩である。そのように処置された組織は、続くパラフィン包埋プロトコールにしばしば供され、例えばキシレンおよびエタノール処置などの有機溶媒中でのインキュベーションが続く。次いで試料は、それを95%、70%、50%、30%アルコール（例えばエタノール）中に各数分間置くことによって通常水和される。しかしIHC用の標準的プロトコールはなく、すなわちプロトコールは組織、使用される結合ドメインなどに応じて変更される。これらは全て当業者に周知であり、さらなる労力をかけることなく日常的に扱われる。具体的なプロトコールが、例えばインターネットにおいて開示されている（Googleなどの検索マシンにおいて文字列「IHCプロトコール」で検索可能）。いくつかの抗原は、アルデヒド固定の中程度の量でさえ耐えられない。この条件では組織は液体窒素中にしばしば新鮮凍結され、クリオスタットで切断される。切片は冷アセトンまたはアルコールでの固定まで-20 またはそれ以下で凍結を維持される。

10

【0049】

一度「シグナル」が得られても、シグナルが標的の分布を真に反映することを証明するのは、やや困難な問題である。最も簡単な陰性対照は、E-カドヘリンに対するRNAが発現されないことが周知である組織における発現の欠如である。代替的陰性対照は、結合ドメインをそれが産生されたペプチドまたはタンパク質の過剰量と予備インキュベーションすることによるシグナルの除去である。

20

本発明のIHC法が、さらなるがん関連シグナルおよびまたはがん細胞の他の細胞内シグナルを確認するまたは検出するためにin situハイブリダイゼーション技術（例えば蛍光in situハイブリダイゼーション）などの組織切片に適用できる他の技術と組み合わせられることが想定される。

【0050】

本発明の内容において使用されうる方法、例えばIHC法は、本明細書において開示され添付の例において例示される。

本質的に本発明の主旨は、がん細胞中のE-カドヘリンタンパク質の発現レベルがPTK2阻害物質への各がんの感受性を予測するために使用されうるという驚くべき発見である。この観点から、0~2のE-カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア（IRS）、好ましくは0~1のIRSスコア、より好ましくは1のIRSスコアおよびさらにより好ましくは0のIRSスコアががん/がん患者がPTK2阻害物質での治療に対して感受性であることを示す、患者由来のがんにおいて/がん試料においてE-カドヘリンタンパク質の発現を検出することが想定される。

30

【0051】

本発明のIRSスコアは、以下の通り確立された。本発明者らは、パラホルムアルデヒド固定およびパラフィン包埋組織試料を使用して膜結合E-カドヘリン陽性がん細胞の数を評価した。使用したがんは、膵臓がん細胞系MiPaCa-2およびBxPC-3；前立腺がん細胞PC-3および卵巣がん細胞TOV-21Gを含む、ヌードマウス（BomTac:NMRI-Foxn1nu）で増殖させたヒトがん細胞系の異種移植モデル由来であった。

40

各試料由来の切片全体が分析され、検査された組織学的視野全体中のがん細胞の総数に対するE-カドヘリン陽性細胞の数としてE-カドヘリン陽性がん細胞の百分率の平均が決定された。がん細胞における膜E-カドヘリン免疫反応性だけがスコアリングの目的のために陽性とみなされた。病理学分野の当業者は、方法を実施する際に現在の条件下でどの細胞が関連するかを理解し、彼/彼女の全般的知識および本開示の教示に基づいて陽性細胞の画分を決定できる。

本明細書において提案するスコアリングは、半定量的であり；タンパク質発現レベルは0、1、2、3または4（0は実質的にタンパク質発現を検出できない（1%未満）であ

50

り、4は最も高く検出されたタンパク質発現 (> 60%))として記録される。

【0052】

陽性対照として、E-カドヘリンを発現することが周知である正常結腸粘膜および/または直腸結腸がん試料由来の組織切片が含まれる。任意の所与の組織(正常または腫瘍)に存在する結合組織は、これらのアッセイにおいて陰性対照として役立つ。

前述の「対照」「陽性対照」または「対照試料」は、好ましくは、例えば両試料が主に同じ細胞型からなる(例えば両者が上皮細胞からなる)または両試料が異なる供給源由来だが同じ組織由来であることにより、被検試料との比較を可能にする試料(細胞または組織)である。「異なる供給源」は、例えば健康な対象から、好ましくはがんを罹患していない対象から採取された細胞/組織試料、または同じ対象の離れた部分から採取された細胞/組織試料(前記離れた部分のがんの関連する症状を有さないと考えられる)を含む。

10

【0053】

E-カドヘリン陽性がん細胞の数は次の通りスコアリングされた:

0(1%未満)、1(約1~10%)、2(約11~30%)、3(約31~60%)、4(>60%)。それにより「陽性細胞」は本明細書の上に説明の通りのE-カドヘリン発現を示しているがん細胞を意味する。本明細書において述べるスコアリングは、本発明の全ての実施形態に適用される。好ましくは、IRS-0のE-カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア(IRS)は、検査された1つまたは複数の組織学的視野におけるがん細胞の総数に対して平均1%未満の膜E-カドヘリン陽性がん細胞によって特徴付けられ; IRS-1は、検査された1つまたは複数の組織学的視野におけるがん細胞の総数に対して平均約1~10%の膜E-カドヘリン陽性がん細胞によって特徴付けられ; IRS-2は、検査された1つまたは複数の組織学的視野におけるがん細胞の総数に対して平均約11~30%の膜E-カドヘリン陽性がん細胞によって特徴付けられ; IRS-3は、検査された1つまたは複数の組織学的視野におけるがん細胞の総数に対して平均約31~60%の膜E-カドヘリン陽性がん細胞によって特徴付けられ; およびIRS-4は、検査された1つまたは複数の組織学的視野におけるがん細胞の総数に対して平均60%を超える膜E-カドヘリン陽性がん細胞によって特徴付けられる。述べられたスコアリングは、好ましい実施形態において、パラホルムアルデヒド固定およびパラフィン包埋組織試料を使用してIHCを介して実施される。

20

「1つまたは複数」は、この件については分析される(好ましくは1試料あたり)1、2、3、4、5、6、7、8、9またはそれ以上の組織学的視野を条件に応じて含む。少なくとも「3個」の組織学的視野が好ましい。

30

【0054】

ヌードマウスで増殖させたヒトがん細胞系の上に述べた異種移植モデルを検査する場合に、本発明者らは、PTK2阻害物質がある種のモデルにおいて非常に有効であった一方で他における応答はやや低かったことを実証できた。異種移植モデルは、以下の通り確立された:胸腺欠損メスBomTac:NMRI-Foxn1nuマウス約6週齢を、それらを実験に使用する前に少なくとも3日間新しい環境に順応させた。動物はMacrolon(登録商標)II型ケージ内に5匹の群で標準化された条件下で飼育された。標準化食餌(PROVIMI-KLIBA)および加圧滅菌済水道水を自由に与えられた。皮下腫瘍を樹立するために細胞がトリプシン処理によって回収され、遠心分離され、洗浄され、氷冷PBS+5%FCS中に再懸濁された。細胞5,000,000個を含む細胞懸濁液100μLは次いでヌードマウスの右側腹部に皮下的に注入された(マウス1匹あたり1カ所)。腫瘍が十分に樹立され、直径6~9mmに達したら、マウスは治療群とビヒクル対照群とに無作為に分配された(細胞注入の10~14日後)。腫瘍直径は、1週間に3回ノギスで測定された(月曜日、水曜日および金曜日)。各腫瘍の体積[mm³]は、式「腫瘍体積=長さ×直径²/6」に従って算出された。治療の副作用をモニターするために、マウスは異常について毎日視診され、体重を1週間に3回測定された(月曜日、水曜日および金曜日)。動物は治療開始から約3週間後の研究終了時に屠殺された。壊死性腫瘍または2000mm³を超える腫瘍サイズを有する動物は、倫理的理由により研究

40

50

中の早い時期に屠殺された。

【 0 0 5 5 】

ヌードマウスで増殖させたヒトがん細胞系の上に述べた異種移植モデルを検査する場合に、本発明者らは、PTK2阻害物質がある種のモデルにおいて非常に有効であった一方で他への応答はやや低かったがことを実証できた。例えば、細胞系MiaPaCa-2由来のヒト膵臓腺癌モデルは、PTK2阻害物質での治療に非常に応答性であり、114%のTGIおよびがん退縮の発生によって示されるがん増殖の強い抑制(すなわち「腫瘍増殖阻害」またはTGI)を生じた。組織切片は、このがんから調製され、E-カドヘリンに対する抗体で免疫組織化学的に染色された。E-カドヘリンのタンパク質発現は、「0」のIRS(<1%E-カドヘリン陽性細胞)に対応してこれらのがん切片において完全に欠如していた。TGIは、本明細書下に定義される。

10

【 0 0 5 6 】

対照的に、細胞系BxPC-3またはAsPC-1由来のさらなる2つの膵臓腺癌モデルは、PTK2阻害物質での治療後に49%(BxPC-3)および13%(AsPC-1)のTGIを有して弱い感受性を示したまたは感受性を示さず、がん退縮は完全に欠如していた。E-カドヘリンに対する抗体でのこれらのがんモデル由来の組織切片の免疫組織化学は、BxPC-3について「4」のIRS(>60%陽性細胞)およびAsPC-1について「3」(31~60%陽性細胞)に対応してこれらのがんにおけるE-カドヘリンの強い発現を実証した(さらなる例示のために図2を参照されたい)。したがってこれらの腺癌モデルが、本発明のIRSスコアの評価および/または調整のための基準/基準試料として役立つことは想定される。BxPC-3異種移植片は、IRSスコア「4」のための基準として役立つと考えられる一方でAsPC-1異種移植片はIRSスコア「3」のための基準として役立つ。同様に「MiaPaCa-2」は「0」のE-カドヘリンIRSのための基準として役立つ。そのような異種移植片の生成は本明細書に記載される。

20

上のデータは、E-カドヘリンの少量の発現または発現の欠如がPTK2阻害物質への前臨床がんモデルの感受性に対応することを示し、E-カドヘリン発現がん細胞の中程度から高い百分率を有するがんはあまり感受性でないまたは感受性でないと考えられる。この観点からE-カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア0~2、好ましくは0~1のIRSスコア、およびさらにより好ましくは0のIRSスコアはがん/がん患者がPTK2阻害物質での治療に対して感受性であることを示すことが証明されえた。

30

「腫瘍増殖阻害」または「TGI」は次の通り定義される：

【 0 0 5 7 】

【 数 1 】

$$TGI = 100 * \frac{(C_d - C_1) - (T_d - T_1)}{(C_d - C_1)}$$

式中「C₁」および「T₁」は、実験開始1日目での対照群および治療群における腫瘍体積中央値を意味し、「C_d」および「T_d」は実験終了時d日目での対照群および治療群における腫瘍体積中央値を意味する。

40

【 0 0 5 8 】

さらなる実施形態において本発明は、治療的有効量のPTK2阻害物質を患者に投与するステップを含む、E-カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア0~2、好ましくは0~1のIRSスコア、より好ましくは1のIRSスコア、さらにより好ましくは0のIRSスコアを有するがんを有する患者を治療する方法に関する。

本発明の実施形態の内容において、E-カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアが、上に示すおよび本明細書で例示する通りIHC法の手段で好ましくは評価されることは理解される。本発明はこれらの具体的プロトコールに限定されないが、適切なIHC法は本明細書に記載される。

【 0 0 5 9 】

50

「治療的有効量」または「治療的に活性」は、投与されたものに対して治療効果を生じる P T K 2 阻害物質の用量を意味する。薬物の治療的有効量は、がん細胞の数を低下させる、がんのサイズを低減する、末梢器官へのがん細胞の浸潤を抑制する（すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止）、がん転移を抑制する（すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止）、がん増殖を少なくともある程度抑制するおよび/または障害に関連する1つまたは複数の症状をある程度軽減することができる。厳密な用量は、周知の技術を使用して当業者によって確認されうる。当技術分野において周知の通り、年齢、体重、全身状態、性、食事、薬物相互作用および状態の重症度に関する調整が必要である場合があり、当業者による日常的な実験で確認されうる。

【0060】

がん試料の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアが P T K 2 阻害物質治療への各がんの感受性と良く相関することが本発明者らによって初めて示された。これらの発見に基づいて、P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であるがん患者またはがん（もしくはがん細胞系）を層別化することがいまや可能である。本発明の発見に基づいて、0、1または2の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア（I R S）を示すがんを有する患者は、これらの患者について達成される治療的利益の可能性が I R S 3 または 4 を有する患者についてよりも高いことから P T K 2 阻害物質で優先的に治療されるべきであることはいまや明らかである。しかし高い I R S スコア（3 ~ 4）は P T K 2 阻害物質で患者に関して治療効果を達成する可能性が低いことを明らかに示しているが、これらの P T K 2 阻害物質の残存する治療効果を排除する必要がないことから、3 以上の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアを有するがんも P T K 2 阻害物質で治療されてもよいことが想定される。そのような患者は、代替法（P T K 2 阻害物質への代替）または追加的抗がん治療（すなわち P T K 2 阻害物質に基づかない治療）でも治療されうる。追加的または代替的抗がん治療は、これだけに限らないが抗悪性腫瘍剤、抗血管新生剤、化学療法剤およびペプチドがん治療剤から選択されうる治療を含む。抗悪性腫瘍剤は、抗生物質型薬剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、ホルモン剤、免疫学的薬剤、インターフェロン型薬剤、キナーゼ阻害剤およびこれらの組合せから選択されうる。そのような薬学的に活性な化合物/薬剤は、例えば伝統的な小さな有機化学的分子であるか、またはタンパク質、抗体（その断片を含む）、ペプチボディー、DNA、RNA などの巨大分子もしくはそのような巨大分子の断片でありうる。

【0061】

本発明は、P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であるがん患者を層別化する方法であって、前記患者のがん試料における E - カドヘリン I R S スコアを判定するステップを含み、0 ~ 2（すなわち 2、1 または 0）の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア（I R S）が、がん患者が P T 2 阻害物質での治療に対して感受性であることを示す、方法にさらに関する。3 ~ 4（すなわち 3 または 4）の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア（I R S）は、患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性でないことまたは、P T K 2 阻害物質で患者に関して治療的利益を達成する可能性がやや低いことを少なくとも示す。

【0062】

用語「層別化」または「層別化する」は、P T K 2 阻害物質に基づく抗がん治療から他よりもより利益を得やすい（または得にくい）患者を選別することを意味する。したがって本発明の方法は、P T K 2 阻害物質での治療に対する感受性に関してがん患者を層別化するために使用されうる。述べた通り、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア I R S、好ましくは 0 ~ 1 の I R S スコア、より好ましくは 1 の I R S スコアおよびさらにより好ましくは 0 の I R S スコアを示すがんを有する患者は前記 P T 2 阻害物質に基づく治療からより利益を得やすく、一方がんの E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア（I R S）が 3 以上の者はそのような治療から利益を得にくい。

具体的には P T K 2 阻害物質での抗がん治療から「利益を得られる患者」は、P T K 2 阻害物質が治療効果を有する高い可能性を有する患者である。がんおよび/またはがん患

10

20

30

40

50

者が好ましく応答しうるか否かの可能性は、本明細書に記載のとおり前記患者の各がん細胞の細胞膜上の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアに依存する。

対応して、PTK2 阻害物質での抗がん治療から「利益を得られない場合がある患者」は、PTK2 阻害物質が治療効果を有する高い可能性を有さない患者である。

【0063】

本発明はさらに、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア、好ましくは 0 ~ 1 の IRS スコア、およびより好ましくは 0 の IRS スコアによって特徴付けられるがんを有するがん患者の治療のための医薬組成物の調製のための、本明細書に定義の PTK2 阻害物質の使用に関する。

前記医薬組成物は、薬学的に許容される担体および/または希釈剤をさらに含む。適切な薬学的に許容される担体および/または希釈剤の例は当技術分野において十分周知であり、リン酸緩衝生理食塩水、水、油/水乳濁液などの乳濁液、種々の種類の湿潤剤、滅菌溶液などを含む。そのような担体を含む組成物は、十分周知の従来法によって製剤されうる。

【0064】

本発明のこれらの医薬組成物は、適切な用量で対象に投与されうる。投与計画は、主治医および臨床学的因子によって決定される。医学分野において十分周知である通り、任意の一患者のための用量は、患者の大きさ、体表面積、年齢、投与される具体的な化合物、性、投与の時間および経路、全身状態および同時に投与される他の薬物を含む多数の要因に依存する。非経口投与のための調製物は、滅菌水性または非水性溶液、懸濁液および乳濁液を含む。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、オレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体は、塩類溶液および緩衝化された媒体を含む、水、アルコール性/水性溶液、乳濁液または懸濁液を含む。非経口ビヒクルは、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲルまたは固定油を含む。静脈内ビヒクルは、水分および栄養補充剤、電解質補充剤（リンゲルデキストロースに基づくものなど）などを含む。例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤および不活性ガスなどの保存剤および他の添加物も存在できる。

さらに本発明の医薬組成物は、付加的抗がん治療/剤などの薬剤をさらに含む。付加的抗がん治療は、抗悪性腫瘍剤、抗血管新生剤、化学療法剤およびペプチドがん治療剤から選択されうる治療をこれだけに限らないが含む。抗悪性腫瘍剤は、抗生物質型薬剤、アルキル化剤、代謝拮抗剤、ホルモン剤、免疫学的薬剤、インターフェロン型薬剤、キナーゼ阻害剤およびこれらの組合せから選択されうる。そのような薬学的に活性な化合物/薬剤は、例えば伝統的な小さな有機化学的分子であるか、またはタンパク質、抗体（その断片を含む）、ペプチポディー、DNA、RNA などの巨大分子もしくはそのような巨大分子の断片でありうる。そのような治療は当業者に十分周知である。

【0065】

本明細書に記載の PTK2 阻害物質または本発明の医薬組成物の投与経路は、環境に依存し（これだけに限らないが）経口投与、非経口投与（例えば静脈内、筋肉内、腹腔内など）、皮下投与、経皮投与、吸入投与、坐薬によるものなどを含む。

さらなる実施形態において本発明は、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア、好ましくは 0 ~ 1 の IRS スコア、より好ましくは 1 の IRS スコアおよびさらにより好ましくは 0 の IRS スコアによって特徴付けられるがんを有するがん患者の治療における使用のための、本明細書に定義の PTK2 阻害物質に関する。

【0066】

本発明の内容において、がん患者が本明細書で定義された方法で、好ましくは本明細書に記載の IHC 法で同定される、されている（特徴付けられるまたは層別化される）ことは、好ましい。前記同定または層別化法は、前記 PTK2 阻害物質での前記治療の前および/または途中で実行されうる。

【0067】

10

20

30

40

50

本発明者らは、がん試料の E - カドヘリタンパク質免疫反応性スコアが P T K 2 阻害物質治療への各がんの感受性と非常によく相関することを証明した。この発見に基づいて、各 E - カドヘリン I R S に基づいて、がんを罹患しているがん患者に対して、具体的には癌腫を罹患しているがん患者に対して治療的に有効である可能性がある適切な抗がん治療を選択することがいまや可能である。

E - カドヘリタンパク質免疫反応性スコア (I R S) が 3 より大きい患者および / またはがんは、本発明の発見に基づいて、P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性が低いはずである。これらの患者は、付加的にまたは代替的に代替的抗がん治療で治療されうるが、P T K 2 阻害物質がこれらの患者において有益な効果をいまだ及ぼすことがあることは排除されえない。したがって 3 以上の E - カドヘリン I R S スコアによって特徴付けられる患者においてさえこれらの化合物を使用することはいまだ可能であるが、2 の、好ましくは 1 およびさらにより好ましくは 0 の E - カドヘリン I R S によって特徴付けられる患者においてと同様にはこれらの患者において各 P T K 2 阻害物質が効果的ではないことが予測される。したがって本発明の手段により、各 E - カドヘリン I R S スコアに応じてより適切な治療形態を選択することが可能であることは理解される。

したがって本発明はさらなる実施形態において、

(a) 患者のがん試料の E - カドヘリタンパク質免疫反応性スコアを判定するステップ ; および

(b) (a) において判定された E - カドヘリタンパク質免疫反応性スコアが 2、1 または 0 である場合 (1 は好ましく、0 はより好ましい) に前記患者のための抗がん治療として好ましくは P T K 2 阻害物質を選択するステップ ; または

(c) (a) において判定された E - カドヘリタンパク質免疫反応性スコアが 3 または 4 である場合好ましくは代替または付加的抗がん治療を選択するステップを含むがん患者のための抗がん治療を選択するための方法に関する。

「抗がん治療として好ましくは P T K 2 阻害物質を選択するステップ」は、2、1 または 0 (1 は好ましく、0 はより好ましい) の E - カドヘリタンパク質免疫反応性スコアを有するがんに対して P T K 2 阻害物質に基づく治療を使用することが好ましいことを意味する。しかし、高い I R S スコア (3 ~ 4) は P T K 2 阻害物質で患者に対して治療的利益を達成する可能性が低いことを明確に示すが、これらの P T K 2 阻害物質の残存する治療効果を排除する必要がないことから、3 以上の E - カドヘリタンパク質免疫反応性スコアを有するがんも P T K 2 阻害物質で治療されることが想定される。そのような場合 (3 以上の高 I R S スコア)、P T K 2 阻害物質は好ましくは単独では使用されない。

【 0 0 6 8 】

本発明の新規発見、すなわち 2、1 または 0 (1 は好ましく、さらに 0 はより好ましい) の E - カドヘリタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがんが P T K 2 阻害物質に対して感受性であることに基づいて、P T K 2 阻害物質をスクリーニングするために 2、1 または 0 (1 は好ましく、0 はより好ましい) の E - カドヘリタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがん細胞を使用するスクリーニング法を、これらのがん細胞が P T K 2 阻害物質に (より) 感受性でありそれにより (そうでなければ (すなわち 3 以上の E - カドヘリタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがんを使用する場合) 選別されている) 新規 P T K 2 阻害物質の確実な同定を可能にすることから、提供することも想定される。

【 0 0 6 9 】

したがってさらなる実施形態において本発明は、治療的に有効な P T K 2 阻害物質のためのスクリーニング方法であって、

(a) 2、1 または 0 (1 は好ましく、0 はさらにより好ましい) の E - カドヘリタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがん細胞またはがん細胞系を提供するステップと、

(b) (a) のがん細胞またはがん細胞系を P T K 2 阻害物質に接触させるステップと、

(c) P T K 2 阻害物質ががん細胞 / がん細胞系にネガティブに作用するかどうかを評価

するステップと

を含む、方法に関する。

上のスクリーニング法は、好ましくは P T K 2 阻害物質への応答（さらにこれらの応答は P T K 2 阻害物質が治療的に有効であるか否かを示す）におけるがん細胞の表現型的に検出可能な変化を使用する「表現型的」スクリーニング法である。用語「表現型的に検出可能な変化」は、がん細胞にネガティブに作用する変化を意味する。これらのネガティブな影響は、いくつか挙げるとアポトーシスまたは壊死などの細胞死、がん細胞 / がん細胞系の遊走能力の低下および / またはこれらの細胞の増殖抑制を含む。しかしこの表は、排他的ではなく、すなわち当業者は、被検化合物が実際に各細胞にネガティブに作用することを示すものかもしれないがん細胞のさらなる表現型の変化を認識する。上のスクリーニング法の手段により治療的に有効な P T K 2 阻害物質を同定することが容易になる。

【 0 0 7 0 】

本発明は、少なくとも 1 つの P T K 2 阻害物質と、

(a) 前記 P T K 2 阻害物質が、 2 以下の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがんを罹患している患者の治療のために好ましくは使用されることを示す説明書および / もしくは標示 ; ならびに / または

(b) 前記患者が本明細書に記載の方法によって層別化されることを示す説明書および / もしくは標示 ; ならびに / または

(c) 本明細書に定義の方法を実行するための手段
とを含む医薬用パッケージにも関する。

【 0 0 7 1 】

「本明細書に定義の方法を実行するための手段」は、とりわけ E - カドヘリン特異的抗体、本明細書の別の箇所に記載の陽性および / もしくは陰性対照、 I H C 法のために使用されうる緩衝剤ならびに / または対照抗体、二次抗体、 I H C 用のガラスもしくはプラスチックスライドなどの本発明の検出方法のために使用されうる他の手段を含む。

さらなる実施形態において本発明は、 P T K 2 阻害物質を含み、さらに E - カドヘリン I R S の予測のために使用される E - カドヘリン抗体を含む医薬用キットまたはパッケージに関する。

【 0 0 7 2 】

別の実施形態において本発明は、 E - カドヘリン I R S の予測のための E - カドヘリン抗体および、本発明の方法により測定された、特徴付けられた、同定されたまたは層別化された患者の治療のために使用される P T K 2 阻害物質を含む診断キットまたはパッケージに関する。

さらなる態様において本発明は、本発明の手段および方法により E - カドヘリンタンパク質発現を検出するための手段と、

(a) 前記 E - カドヘリン検出 (スコアリング) を実行するためのパッケージ挿入物および / もしくは説明書 ; ならびに / または

(b) スコアの検証を可能にする陽性および / または陰性対照

とを含むキット、好ましくは診断キットまたは診断用パッケージに関する。

【 0 0 7 3 】

用語「パッケージ挿入物および / もしくは説明書」は、そのような診断用製品の使用方法、使用、保存、取り扱い、および / または警告に関わる情報を含む診断用製品の商業的パッケージ中に習慣的に含まれる説明書を意味して使用される。「陽性対照」は、 E - カドヘリンを発現しているがん細胞もしくはがん試料または本明細書に記載される標準的免疫学的方法において使用されうる E - カドヘリンそれ自体 (タンパク質対照) を含む。「陰性対照」は、タンパク質レベルで E - カドヘリンを発現していない参照細胞または参照試料を含む。陽性および陰性の両方の対照は、各スコアを示すことで、開業医を支援する図によって置き換えられることができる。「 E - カドヘリンタンパク質発現を検出する手段」は、とりわけ E - カドヘリン特異的抗体 (例えば E - カドヘリンに結合する抗体) を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 4 】

本発明はさらなる実施形態において、PTK2阻害物質での治療に対する感受性に関するがん患者の層別化における使用のためのE-カドヘリン抗体に関する。層別化は、本発明の方法により実施されうる。

同様に本発明は、がん患者がタンパク質チロシンキナーゼ2 (PTK2) 阻害物質での治療に対して感受性であるかどうかを判定するための方法における使用のためのE-カドヘリン抗体に関する。前記方法は、前記がん患者のがん試料におけるE-カドヘリンタンパク質の発現の検出であって、0~2のE-カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (IRS) が、がん患者がPTK2阻害物質での治療に対して感受性であることを示す検出を含む。

10

【 0 0 7 5 】

本発明者らは、例えば本明細書に記載のタンパク質免疫反応性スコアの手段によって評価されたE-カドヘリンタンパク質発現が、PTK2阻害物質治療への各がんの感受性と非常によく相関することを証明した。しかし、各がん細胞において評価される場合にE-カドヘリンmRNAの発現プロファイルは、PTK2阻害物質治療への各がん/がん患者の感受性に関して同様に予測的であることが想定される。したがって、本発明の要旨がE-カドヘリンmRNAの評価に同様に及ぶことは理解される。したがって、本明細書に開示および記載される本発明の全ての実施形態は、がん細胞中のE-カドヘリンmRNAの発現レベルの測定に等しく適用される。E-カドヘリンmRNAの発現の低下またはE-カドヘリンmRNAの発現の欠如が(1つまたは複数の)PTK2阻害物質での治療への各がん/がん患者の感受性の増加を示すことは特に想定される。当業者がE-カドヘリン発現がん細胞の発現プロファイルを評価できるようにする方法は、当業者に十分周知であり、例えばノーザンブロッティング、核酸アレイに基づく検出技術を含むmRNAプロファイリング技術、リアルタイム定量PCRまたは「Q-PCR」などのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を含む。本発明が、当業者に周知の技術のいくつかを説明するために単に例示されたこれらの技術に限定されないことは理解される。用語「定量PCR」または「Q-PCR」は、特定の核酸配列に対するポリメラーゼ連鎖反応の結果を定量するために使用される種々の方法を意味する。そのような方法は、閾サイクル数(C_t)を決定するなどの増幅係数を一般に決定するまたは比較する動力学に基づく系として、または標的および標準鋳型の同時増幅から生成された産生物の量を一般に比較する共増幅方法として典型的には分類される。多くのQ-PCR技術は、レポータープローブ、挿入剤または両方を含む。例えばこれだけに限らないがTaqMan(登録商標)プローブ(Applied Biosystems)、i-プローブ、分子ビーコン、エク립スプローブ、スコピオンプライマー、Lux(商標)プライマー、FRETプライマー、臭化エチジウム、SYBR(登録商標)グリーンI(Molecular Probes)およびPicoGreen(登録商標)(Molecular Probes)。当業者は、各E-カドヘリンmRNAの発現レベルをどのように測定するかを十分認識する。

20

30

【 0 0 7 6 】

本開示は、参照として本明細書に組み込まれる添付の図と併せて最良に理解されうる。さらに本発明およびその多数の有利点のよりよい理解は、例示の方法によって与えられ、限定を意図しない続く例から得られる。

40

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 7 】

【 図 1 】 培養細胞でのE-カドヘリン発現を示す図である。 ヒト腫瘍細胞は、チャンバースライドに播種され、ヒトE-カドヘリンに対する特異的抗体で染色された。抗体結合は、蛍光色素(Alexa 488、緑色シグナル)で標識された二次抗体で検出された。核DNAは、ヨウ化プロビジウム(PI、赤色シグナル)で染色された。E-カドヘリンは、欠如していたかまたは細胞の小フラクションにおいて発現されていたかのいずれかであった(細胞系MiaPaca2およびTOV-21Gを参照されたい)。対照的にBxPC-3細胞は、E-カドヘリンの強い発現を有する上皮表現型を示した。

50

【図2】異種移植がんにおけるE-カドヘリン発現を示す図である。厚さ5マイクロメートルのパラフィン切片はMiaPaCa-2、AsPC-1およびBxPC3細胞由来の異種移植がんから得られ、ABC免疫ペルオキシダーゼ法に続いてヘマトキシリン対比染色を使用してE-カドヘリンについて染色された。腫瘍細胞の膜における茶色染色はマーカータンパク質の存在を示す(MiaPaCa2では染色されず; AsPC-1(30%)およびBxPC-3(>60%)では茶色に染色)。

【発明を実施するための形態】

【0078】

<実施例>

次の例は本発明を例示する。これらの例は本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。例は、例示の目的で含まれ、本発明は特許請求の範囲によってのみ限定される。

【0079】

(例1)PTK2阻害物質に対するヒト腫瘍異種移植片の感受性

異種移植モデルは、次の通り確立された：胸腺欠損メスBomTac：NMRI-Foxn1nuマウス約6週齢を実験にそれらを使用する前に少なくとも3日間新しい環境に順応させた。動物はMacrolon(登録商標)II型ケージ内に5匹の群で標準化された条件下で飼育した。標準化食餌(PROVIMI-KLIBA)および加圧滅菌済水道水を自由に与えられた。皮下腫瘍を樹立するために細胞をトリプシン処理によって回収し、遠心分離し、洗浄し、氷冷PBS+5%FCS中に再懸濁した。細胞5,000,000個を含む細胞懸濁液100μLを次いでヌードマウスの右側腹部に皮下的に注入した(マウス1匹あたり1カ所)。腫瘍が十分に樹立され、直径6~9mmに達したら、マウスを治療群とビヒクル対照群とに無作為に分配した(細胞注入の10~14日後)。腫瘍直径は、1週間に3回ノギスで測定した(月曜日、水曜日および金曜日)。各腫瘍の体積[mm³]は、式「腫瘍体積=長さ×直径²/6」に従って算出した。治療の副作用をモニターするために、マウスを異常について毎日視診し、体重を1週間に3回測定した(月曜日、水曜日および金曜日)。動物は治療開始から約3週間後の研究終了時に屠殺した。壊死性腫瘍または2000mm³を越える腫瘍サイズを有する動物は、倫理的理由により研究中の早い時期に屠殺した。

ヌードマウスにおいて増殖させたヒト腫瘍異種移植片のPTK2阻害物質での治療に対する感受性は以下の通りであった：

【0080】

【表1】

がんの種類	モデル	TGI	優位性対照	退縮	スコア
膵臓腺癌	MiaPaCa-2	114 %	あり	あり	0
	AsPc-1	13 %	なし	なし	3
前立腺ca	PC-3	102 %	あり	あり	n.a.
卵巣ca	TOV-21G	100 %	あり	あり	0
膵臓AC	BxPC-3	49 %	あり	なし	4
大腸ca	HCT-116	34 %	なし	なし	4
	LoVo	24 %	なし	なし	4
	HT-29	7 %	なし	なし	4

【0081】

(例2)異種移植モデルにおけるE-カドヘリン発現を測定するための免疫組織化学的プロトコール(ABC法)

10

20

30

40

50

【 0 0 8 2 】

脱パラフィン：

- スライドを 1 時間、65℃ で加熱；
- スライドをキシレン中に 5 分間 × 3 回、次いで 100% EtOH 無水、96% EtOH、70% EtOH 中に（それぞれ 20 秒間 × 3 回）、次いで蒸留水中に置く；

【 0 0 8 3 】

抗原修復：

- スライドをクエン酸緩衝液中、20 分間、121℃ / 1 bar のオートクレーブ内に置く；
- スライドを室温で 30 分間冷却；
- PBS で洗浄；

10

【 0 0 8 4 】

染色：

- スライドを PBS 中の 3% H₂O₂ で 5 分間インキュベート；
- PBS で洗浄；
- 組織に M.O.M. ブロッキング試薬（2 滴 = 2500 μL PBS 中の 90 μL 保存液）を添加し、60 分間、室温でインキュベート；
- PBS で洗浄；
- 組織に M.O.M. 希釈液（7500 μL PBS 中の 600 μL 保存液）を添加し、5 分間、室温でインキュベート；
- 吸引；
- 組織に抗体（M.O.M. 希釈液中に希釈）を添加、60 分間、室温でインキュベート；
- PBS で洗浄；
- 組織に M.O.M. ビオチン化抗マウス IgG 試薬（2500 μL M.O.M. 希釈液中の 10 μL 保存液）を添加、10 分間、室温でインキュベート；
- PBS で洗浄；
- 組織に Vectastain ABC Elite kit（使用 30 分前に：A 2 滴 + 2500 μL PBS、混合、B を 2 滴添加、混合；Vector #PK-6200）を添加、10 分間、室温でインキュベート；
- PBS で洗浄；
- スライドを PBS / 0.5% Triton X-100 中 4 分間；
- DAB 溶液中で染色；
- PBS で洗浄；
- スライドを蒸留水中に 1 分間置く；

20

30

【 0 0 8 5 】

対比染色：

- スライドをヘマトキシリン溶液中に 1 分間置く；
- 流水で洗浄；
- スライドを HCl / EtOH 中に 1 秒間置く；
- 流水で洗浄；
- スライドをアンモニウム水中に 20 秒間置く；
- 流水で洗浄；
- スライドを 70% EtOH、96% EtOH、100% EtOH 無水中に（各 20 秒間 3 回）置く；
- スライドをキシレン中に 1 分間、2 分間、2 分間置く；

40

【 0 0 8 6 】

緩衝液および試薬：

クエン酸緩衝液：

800 mL 蒸留水中にクエン酸 1 水和物 21.01 g

50

pH = 6 に 2 M NaOH で調整、次いで蒸留水で 1000 mL にする。

Tris / EDTA 緩衝液 : 0.01 M Tris / 0.001 M EDTA ; pH = 8
HCl / EtOH :

175 mL EtOH 無水

2.5 mL 37% HCl

72.5 mL 蒸留水

アンモニウム水 : 250 mL 蒸留水 + アンモニウム溶液 10 滴 (32%)

ヘマトキシリン : 160 mL パパニコロウ溶液 1 a ハリスのヘマトキシリン溶液、Merck # 1.092.530.500 + 80 mL 蒸留水

(使用前に濾過) !

DAB 溶液 : 250 mL PBS / 0.5% Triton X - 100 中に DAB 125 mg、濾過し、使用前に 30% H₂O₂ を 25 μL 添加

マウス抗 E - カドヘリン (Abcam # ab1416 ; 1 : 100)

M.O.M. kit basic : Vector # BMK - 2202

【0087】

(例 3) 培養細胞上の E - カドヘリン 発現

ヒトがん細胞をチャンバースライドに播種し、ヒト E - カドヘリンに対する特異的抗体で染色した。抗体結合を蛍光色素 (Alexa 488 緑色シグナル) で標識した二次抗体で検出した。核 DNA をヨウ化プロビジウム (PI、赤色シグナル) で染色した。E - カドヘリンは、欠如していたかまたは細胞の小フラクシオンにおいて発現されていたかのいずれかであった (細胞系 TOV - 21G および MiaPaca2 を参照されたい)。対照的に BxPC - 3 細胞は、ほとんどの細胞において E - カドヘリンの強い膜発現を有する上皮表現型を示した。この実験の結果を図 1 に示す。

【0088】

(例 4) 培養腫瘍細胞中の E - カドヘリン 発現を測定するための免疫蛍光プロトコール

- 選択した細胞系をコンフルエンス付近まで 4 チャンバー組織培養処理済ガラススライドで増殖させる ;

- 組織培養培地を吸引し、スライドをアセトン / メタノール (1 : 1 v / v)、10 分間、4 で固定する ;

- スライドを 5 分間、室温で乾燥させ、使用まで - 80 保存 ;

染色

- スライドを 10 分間、室温で解凍 ;

- PBS で洗浄 ;

- スライドをブロッキング血清 10% 正常ヤギ血清中で 20 分間、室温でインキュベート ;

- 血清を吸引し、洗浄しない ;

- 2% BSA / PBS 中の E - カドヘリン抗体 1 : 200 と 60 分間、室温でインキュベート ;

- PBS で洗浄 ;

- Alexa 488 コンジュゲートヤギ抗マウス二次抗体 (PBS 中 1 : 1000) と 45 分間、室温でインキュベート ;

- PBS で洗浄 ;

- PBS 中の 0.5 μg / mL ヨウ化プロビジウムで 2 分間、室温で染色 ;

- PBS で洗浄 ;

- Dako 蛍光マウンティングメディウムでカバースリップ ; 顕微鏡検査まで暗所、4 で保存 ;

【0089】

緩衝液および試薬 :

クエン酸緩衝液 :

800 mL 蒸留水中にクエン酸 1 水和物 21.01 g

10

20

30

40

50

pH = 6 に 2 M NaOH で調整、次いで蒸留水で 1000 mL にする。

マウス抗ヒト E - カドヘリン (Abcam # ab1416)

正常ヤギ血清 (Vector Laboratories # S - 1000)

Alexa488 コンジュゲートヤギ抗マウス Invitrogen # a - 11017

DakoCytomation 蛍光マウンティングメディウム # S3023

ヨウ化プロピジウム Sigma # P4170

【0090】

(例5) ヒト組織試料における E - カドヘリン 発現を測定するための免疫組織化学的プロトコール (ABC 法)

10

脱パラフィン：

- スライドを 1 時間、65 で加熱；
- スライドをキシレン中に 5 分間 × 3 回、次いで EtOH 無水、96% EtOH、70% EtOH 中に (それぞれ 20 秒間 × 3 回) 置く；
- 蒸留水中で洗浄；

抗原修復：

- スライドをクエン酸緩衝液中、20 分間、121 / 1 bar のオートクレーブ内に置く
- スライドを室温で 30 分間冷却；

20

- PBS で洗浄；

【0091】

染色：

- スライドを PBS 中の 3% H₂O₂ で 5 分間インキュベート；
- PBS で洗浄；
- ブロッキング血清中でインキュベート：PBS / 2% BSA 中の 10% 正常ウマ血清 (Vector Laboratories # S - 2000) を組織へ、30 分間、室温でインキュベート；
- 血清を吸引、スライドは洗浄しない；
- 組織にマウス抗 E - カドヘリン (Abcam # ab1416；PBS / 2% BSA 中 1 : 200) を添加、60 分間、室温でインキュベート；
- PBS で洗浄；
- 組織にビオチン化ウマ抗マウス IgG (Vector Laboratories # BA - 2000；PBS 中 1 : 200) を添加、30 分間、室温でインキュベート；
- PBS で洗浄；
- 組織に Vectastain ABC Standard kit (PBS 中 1 : 100；Vector # PK - 4000) を添加、30 分間、室温でインキュベート；
- PBS で洗浄；
- スライドを PBS / 0.5% Triton X - 100 中に 4 分間置く；
- DAB 溶液中で染色；
- PBS で洗浄；
- スライドを蒸留水中に 1 分間置く；

30

40

【0092】

対比染色：

- ヘマトキシリン溶液中で 1 分間染色；
- 流水で洗浄；
- スライドを HCl / EtOH 中に 1 秒間置く；
- 流水で洗浄；
- スライドをアンモニウム水中に 20 秒間置く；
- 流水で洗浄；
- 切片を 70% EtOH、96% EtOH、EtOH 無水中 (3 回 / 各 20 秒間) で脱水

50

;

- キシレン (× 3 回) 中に 1 分間、 2 分間、 2 分間置く ;
- エンテランでカバースリップ ;

【 0 0 9 3 】

緩衝液および試薬 :

クエン酸緩衝液 :

8 0 0 m L 蒸留水中にクエン酸 1 水和物 2 1 . 0 1 g

p H = 6 に 2 M N a O H で調整、次いで蒸留水で 1 0 0 0 m L にする。

H C l / E t O H :

1 7 5 m L E t O H 無水

2 . 5 m L 3 7 % H C l

7 2 . 5 m L 蒸留水

アンモニウム水 :

2 5 0 m L 蒸留水 + アンモニウム溶液 1 0 滴 (3 2 %)

ヘマトキシリン :

1 6 0 m L パパニコロウ溶液 1 a ハリスのヘマトキシリン溶液、Merck # 1 . 0

9 2 . 5 3 0 . 5 0 0

8 0 m L 蒸留水

使用前に濾過 !

D A B 溶液 :

2 5 0 m L P B S / 0 . 5 % T r i t o n X - 1 0 0 中に D A B (S i g m a # D

5 9 0 5) 1 2 5 m g 、濾過し、使用前に 3 0 % H ₂ O ₂ を 2 5 μ L 添加

正常ウマ血清 (V e c t o r L a b o r a t o r i e s # S - 2 0 0 0)

マウス抗ヒト E - カドヘリン (A b c a m # a b 1 4 1 6)

ビオチン化ウマ抗マウス I g G (V e c t o r L a b o r a t o r i e s # B A - 2 0 0 0)

V e c t a s t a i n A B C S t a n d a r d k i t (P B S 中 1 / 1 0 0 ; V e c t o r # P K - 4 0 0 0)

エントラン (M e r k 1 . 0 7 9 6 1 . 0 1 0 0)

【 0 0 9 4 】

本発明が、前述の記述および例において具体的に記載された以外にも実施されうることが明らかである。本発明の多数の変更および変形は上の教示に照らして可能であり、したがって添付の特許請求の範囲の範囲内である。

【 0 0 9 5 】

本発明の背景技術、詳細な記載、および例において引用された各文書 (特許、特許出願、学術論文、要約、実験室マニュアル、書籍または他の開示を含む) の開示全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

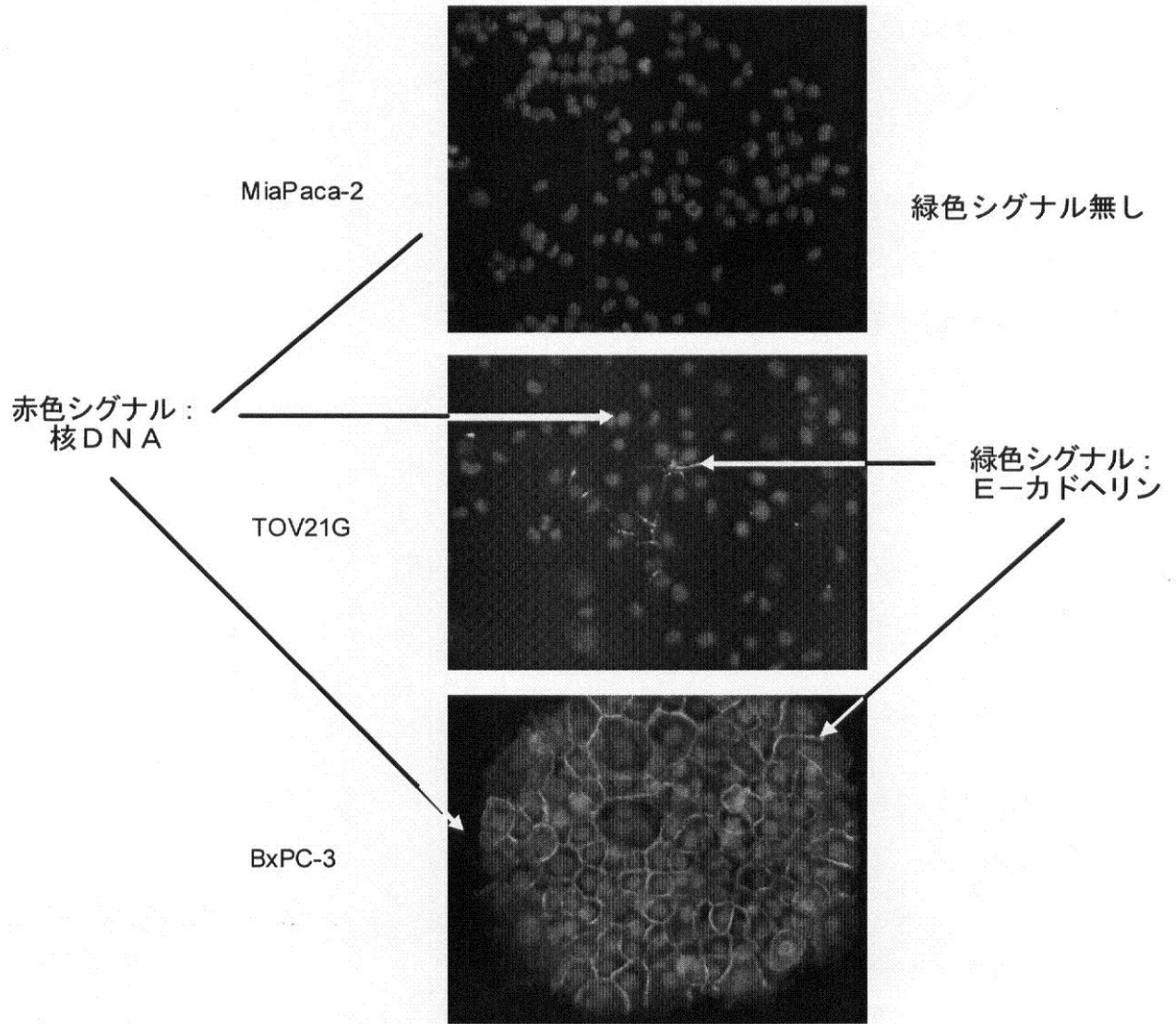
10

20

30

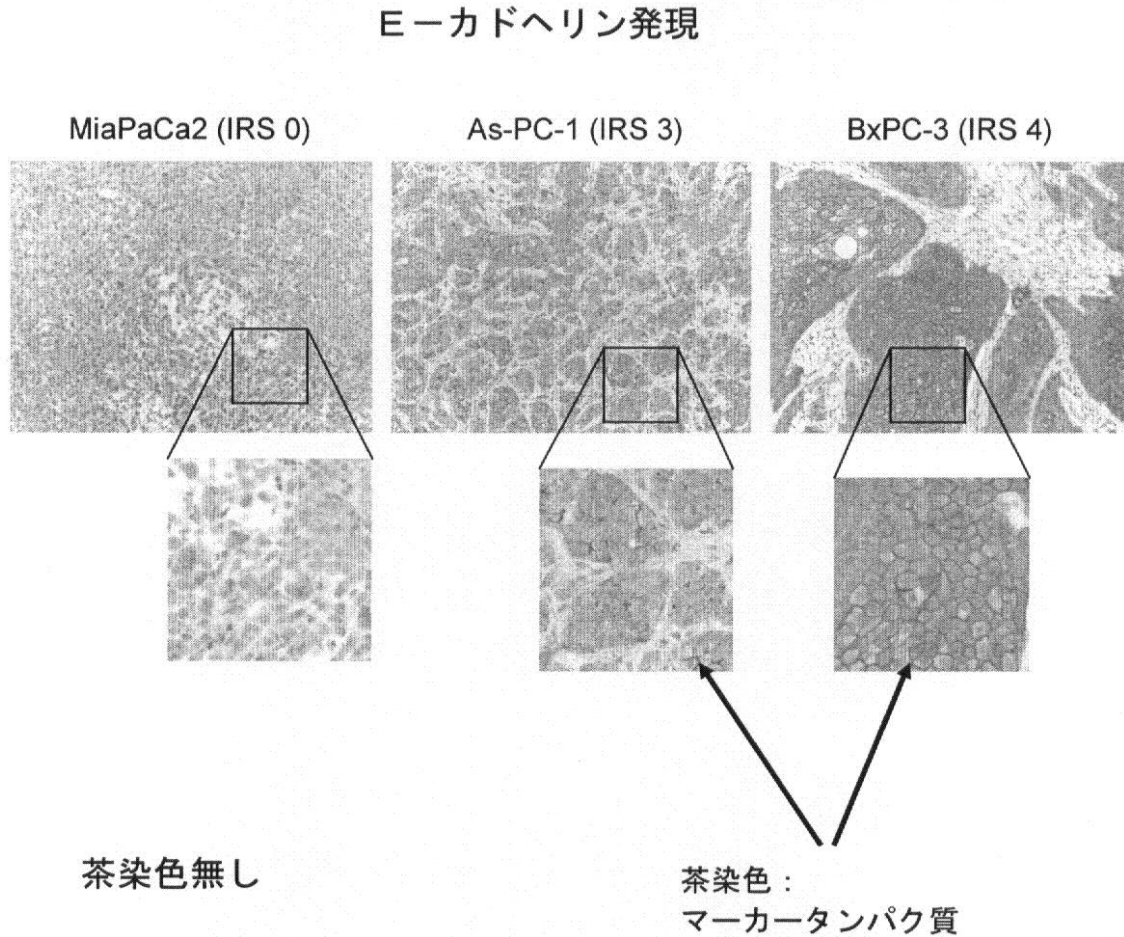
【 図 1 】

Fig. 1



【図 2】

Fig. 2



【手続補正書】

【提出日】平成25年5月28日(2013.5.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

タンパク質チロシンキナーゼ2 (PTK2) 阻害物質を含み、0~2のE-カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (IRS) によって特徴付けられるがんを有するがん患者の治療において使用するための、医薬組成物。

【請求項2】

0~2のE-カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (IRS) によって特徴付けられるがんを有するがん患者の治療のための医薬組成物の調製のための、タンパク質チロシンキナーゼ2 (PTK2) 阻害物質の使用。

【請求項3】

前記がん/がん患者が、がん患者がPTK2阻害物質での治療に対して感受性であるかどうかを判定するための方法で同定、特徴付けまたは層別化され、前記方法が、前記がん

患者のがん試料における E - カドヘリンタンパク質の発現を検出するステップを含み、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) が、がん患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であることを示す、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

前記がん患者が、がん患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であるかどうかを判定するための方法で同定、特徴付けおよび / または層別化され、前記方法が、前記がん患者のがん試料における E - カドヘリンタンパク質の発現を検出するステップを含み、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) が、がん患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であることを示す、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記がん患者が、前記治療の前におよび / または前記治療中に同定、特徴付けまたは層別化される、請求項 3 に記載の使用。

【請求項 6】

前記がん患者が、前記治療の前におよび / または前記治療中に同定、特徴付けまたは層別化される、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

治療的に有効な タンパク質チロシンキナーゼ 2 (P T K 2) 阻害物質に関するスクリーニング方法であって、

(a) 2、1 または 0 (1 は好ましく、さらに 0 はより好ましい) の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがん細胞またはがん細胞系を提供するステップと、

(b) (a) のがん細胞またはがん細胞系を P T K 2 阻害物質と接触させるステップと、

(c) P T K 2 阻害物質ががん細胞 / がん細胞系にネガティブに作用するかどうかを評価するステップと

を含む、方法。

【請求項 8】

タンパク質チロシンキナーゼ 2 (P T K 2) 阻害物質と、

(a) 前記 P T K 2 阻害物質が、2、1 または 0 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがんを罹患している患者の治療のために使用されるものであることを示す説明書および / もしくは標示 ; ならびに / または

(b) 前記がん患者が、P T K 2 阻害物質での治療に対するそれらの感受性に関してがん患者を層別化するための方法であって、前記がん患者のがん試料における E - カドヘリン I R S スコアを判定するステップを含み、0 ~ 2 (すなわち 2、1 または 0) の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) が、がん患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であることを示すステップを含む方法によって層別化されることを示す説明書および / もしくは標示 ; ならびに / または

(c) がん患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であるかどうかを判定するための方法であって、前記がん患者のがん試料における E - カドヘリンタンパク質の発現を検出するステップを含み、0 ~ 2 の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) が、がん患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であることを示すステップを含む、方法を実行するための手段

とを含む医薬用パッケージ。

【請求項 9】

がん試料における E - カドヘリンタンパク質の発現が免疫組織化学的 (I H C) 方法によって検出される、請求項 8 に記載の医薬用パッケージ。

【請求項 10】

免疫組織化学的方法が、E - カドヘリンに特異的な一次抗体および一次抗体に特異的に反応する二次抗体を使用する、請求項 9 に記載の医薬用パッケージ。

【請求項 11】

タンパク質チロシンキナーゼ 2 (P T K 2) 阻害物質での治療に対する感受性に関する

がん患者の層別化における使用のための E - カドヘリン抗体。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/066636

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 ADD.		
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) G01N		
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, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALT-HOLLAND A ET AL: "Silencing of FAK and Src kinases normalizes human, 3D tissue models of squamous cell carcinoma harboring E-cadherin-deficient tumor cells", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 129, no. Suppl.1, 1 April 2009 (2009-04-01), page S31, XP009141480, ISSN: 0022-202X the whole document	1-15
<input checked="" 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		Date of mailing of the international search report
13 October 2011		31/10/2011
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 Thumb, Werner

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/066636

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ALT-HOLLAND A ET AL: "E-cadherin suppression is coordinates with elevated FAK expression and redistribution leading to a highly motile, invasive phenotype", JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 126, no. suppl. 1, 1 April 2006 (2006-04-01), page 34, XP009141501, ISSN: 0022-202X, DOI: DOI:10.1038/SJ.JID.5700298 the whole document	1-15
X	WANG H-J ET AL: "Expression of ezrin, E-cadherin and focal adhesion kinase in colorectal carcinoma and their clinical significances", SHIJIE HUAREN XIAOHUA ZAZHI - WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY, SHIJIE WEI-CHANGBINGXUE ZAZHISHE, TAIYUAN, CN, vol. 15, no. 6, 1 February 2007 (2007-02-01), pages 591-595, XP009141537, ISSN: 1009-3079 abstract	16
Y	-----	1-15
X	WO 2009/105498 A1 (SMITHKLINE BEECHAM CORP [US]; ADAMS JERRY LEROY [US]; FAITG THOMAS H []) 27 August 2009 (2009-08-27) claims 1-10	8-10,12, 13,15
Y	page 1, line 1 - page 2, line 15	1-7,11, 14
X	WO 2008/115443 A1 (UNIV FLORIDA [US]; CANCE WILLIAM G [US]; KURENOVA ELENA [US]; GOLUBOV S) 25 September 2008 (2008-09-25) abstract	8-10,12, 13,15
Y	page 1, line 19 - page 3, line 20 page 5, lines 1-4 page 13, lines 3-6 page 18, lines 23-26	1-7,11, 14
X	JIHE ZHAO ET AL: "Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer", CANCER AND METASTASIS REVIEWS, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DO, vol. 28, no. 1-2, 24 January 2009 (2009-01-24), pages 35-49, XP019671818, ISSN: 1573-7233	8-10,12, 13,15
Y	abstract Chapters 5 and 6	1-7,11, 14
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/066636

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>TSUYOSHI SAITO ET AL: "Hypermethylation in promoter region of E-cadherin gene is associated with tumor dedifferentiation and myometrial invasion in endometrial carcinoma", CANCER, vol. 97, no. 4, 15 February 2003 (2003-02-15), pages 1002-1009, XP55009235, ISSN: 0008-543X, DOI: 10.1002/cncr.11157 cited in the application abstract page 1003, column 2, paragraph 2 -----</p>	16
A	<p>US 2009/092596 A1 (HALEY JOHN D [US] ET AL) 9 April 2009 (2009-04-09) abstract paragraphs [0057], [0058], [0095], [0096] -----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/066636

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009105498 A1	27-08-2009	EP 2249650 A1	17-11-2010
		JP 2011512413 A	21-04-2011
		US 2010317663 A1	16-12-2010
WO 2008115443 A1	25-09-2008	AU 2008229483 A1	25-09-2008
		CA 2681038 A1	25-09-2008
		CN 101801401 A	11-08-2010
		EA 200901249 A1	30-04-2010
		EP 2136829 A1	30-12-2009
		JP 2010522697 A	08-07-2010
		US 2009239850 A1	24-09-2009
US 2009092596 A1	09-04-2009	AU 2008307579 A1	09-04-2009
		CA 2694356 A1	09-04-2009
		EP 2208066 A2	21-07-2010
		JP 2011501660 A	13-01-2011
		WO 2009045389 A2	09-04-2009

フロントページの続き

(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, MD, RU, T, J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R, O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H, U, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74) 代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74) 代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74) 代理人 100147588

弁理士 渡辺 浩司

(72) 発明者 アドルフ ギュンター

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
コーポレート パテント内

(72) 発明者 ガリン - チェサ ピラール

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
コーポレート パテント内

(72) 発明者 ヒルト ウルリヒ

ドイツ連邦共和国 5 5 2 1 6 インゲルハイム アム ライン ピンガー シュトラーセ 1 7
3 ベーリンガー インゲルハイム ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
コーポレート パテント内

F ターム(参考) 4B063 QA19 QQ08 QR48 QS33 QS36 QX02

4C084 AA17 NA14 ZB261 ZC411

4H045 AA30 CA41 DA76 EA28 EA50 FA72 FA74

【要約の続き】

あるがん患者を層別化するための方法であって、前記患者のがん試料において E - カドヘリン I R S スコアを判定するステップを含み、0 ~ 2 (すなわち 2、1 または 0) の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコア (I R S) が、がん患者が P T K 2 阻害物質での治療に対して感受性であることを示す、方法に関する。本発明は、P T K 2 阻害物質と、(a) 前記 P T K 2 阻害物質が、2、1 または 0 (1 は好ましく、さらに 0 はより好ましい) の E - カドヘリンタンパク質免疫反応性スコアによって特徴付けられるがんを罹患している患者の治療のために使用されるものであることを示す説明書および/もしくは標示；ならびに/または (b) 前記患者が本発明の方法によって層別化されることを示す説明書および/もしくは標示；ならびに/または (c) 本明細書に定義の方法を実行するための手段とを含む医薬用パッケージにも関する。

专利名称(译)	癌症患者对PTK2抑制剂治疗敏感性的分层		
公开(公告)号	JP2013540108A	公开(公告)日	2013-10-31
申请号	JP2013529666	申请日	2011-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	百灵佳殷格翰国际股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	勃林格殷格翰国际法理社会手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	アドルフギンター ガリンチェサピラール ヒルトウルリヒ		
发明人	アドルフ ギンター ガリン-チェサピラール ヒルト ウルリヒ		
IPC分类号	A61K45/00 C07K16/30 C12Q1/04 A61P35/00 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57492 C12Q1/6886 G01N33/57484 G01N33/57496 G01N2333/705 G01N2333/91205 G01N2800/52		
FI分类号	A61K45/00 C07K16/30 C12Q1/04 A61P35/00 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084 /NA14 4C084/ZB261 4C084/ZC411 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	山崎 一夫 渡边浩二		
优先权	2010180981 2010-09-28 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种用于确定癌症患者是否易受蛋白酪氨酸激酶2 (PTK2) 抑制剂治疗的方法, 包括检测所述癌症患者的癌症样品中E-钙粘蛋白的表达, 其中E-cadherin蛋白免疫反应性评分 (IRS) 为0-2表明癌症患者易于用PTK2抑制剂治疗。所述癌症患者癌症样品中E-钙粘蛋白蛋白表达的检测优选通过免疫组织化学 (IHC) 方法进行。所述IHC方法优选使用对E-钙粘蛋白特异的一抗和与一抗特异性反应的二抗。本发明还涉及治疗癌症患者的方法, 所述癌症患者的癌症的特征在于E-cadherin蛋白免疫反应性评分 (IRS) 为0-2, 包括给予患者治疗有效量的PTK2抑制剂。另一方面, 本发明涉及用于治疗癌症患者的PTK2抑制剂, 其癌症的特征在于E-cadherin蛋白免疫反应性评分 (IRS) 为0-2。本发明还提供了筛选治疗有效的PTK2抑制剂的方法, 该方法包括: 步骤 (a) 提供癌细胞或癌细胞系, 其特征在于E-钙粘蛋白蛋白免疫反应性评分为2,1或0 (优选1, 更优选0); (b) 使 (a) 的癌细胞或癌细胞系与PTK2抑制剂接触; (c) 评估PTK2抑制剂是否对癌细胞/癌细胞系产生负面影响。另一方面, 本发明涉及一种对易受PTK2抑制剂治疗的癌症患者进行分层的方法, 包括测定所述患者的癌症样品中的E-钙粘蛋白IRS评分, 其中E-钙粘蛋白免疫反应性评分。(IRS) 0-2 (即2,1或0) 表明癌症患者易于用PTK2抑制剂治疗。本发明还涉及包含PTK2抑制剂的药物包装, 和 (a) 说明书和/或说明书, 其指示所述PTK2抑制剂用于治疗患有癌症的患者, 所述患者的特征在于E-钙粘蛋白蛋白免疫反应性得分为2,1或0 (优选1, 更优选0); 和/或 (b) 指示和/或指示所述患者将通过本发明的方法分层的印记; 和/或 (c) 实施所定义的方法于此。

害物質での治療に対して感受性で
「腫瘍増殖阻害」または「TG

【 0 0 5 7 】

【 数 1 】

$$TGI = 100 * \frac{(C_2 - C_1) - (T_2 - T_1)}{(C_2 - C_1)}$$