

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-210268

(P2015-210268A)

(43) 公開日 平成27年11月24日(2015. 11. 24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574	D 2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	Y 4 B O 6 3
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/53	D 4 C O 8 6
C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)	GO 1 N 33/48	P
A 6 1 K 31/4439 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/04	

審査請求 未請求 請求項の数 15 O L 外国語出願 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-87291 (P2015-87291)  
 (22) 出願日 平成27年4月22日 (2015. 4. 22)  
 (31) 優先権主張番号 61/983, 951  
 (32) 優先日 平成26年4月24日 (2014. 4. 24)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 593141953  
 ファイザー・インク  
 アメリカ合衆国10017ニューヨーク州  
 ニューヨーク市イースト・フォーティーセ  
 カンド・ストリート235  
 (74) 代理人 100133927  
 弁理士 四本 能尚  
 (74) 代理人 100137040  
 弁理士 宮澤 純子  
 (74) 代理人 100147186  
 弁理士 佐藤 真紀  
 (74) 代理人 100174447  
 弁理士 龍田 美幸

最終頁に続く

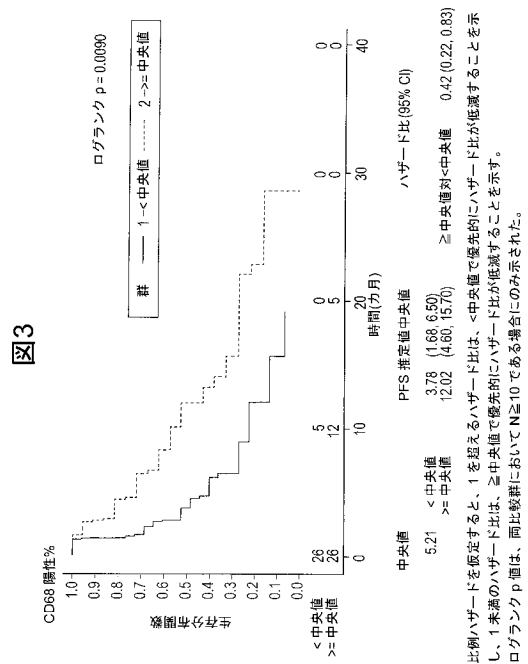
(54) 【発明の名称】 癌治療

(57) 【要約】

【課題】ヒト腫瘍がアキシチニブでの治療に感受性であるかどうかを予測するための診断方法、およびヒト腫瘍を治療する方法を提供すること。

【解決手段】本方法は、腫瘍の組織試料におけるCD68ポリペプチド発現レベルの測定に基づく。CD68発現レベルは、腫瘍内のCD68陽性細胞のパーセンテージおよびCD68陽性細胞の密度を決定することができる免疫組織化学を用いて測定することができる。

【選択図】 図3



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

アキシチニブでの治療に対して感受性である腫瘍を同定する方法であって、(a)アキシチニブでの治療を考慮されているヒト患者から得られた腫瘍の組織試料における、CD68ポリペプチド発現レベルを測定するステップ、ならびに(b)ステップ(a)におけるCD68発現レベルを、アキシチニブで事前に治療されアキシチニブに対して耐性であることが示されているヒト患者、およびアキシチニブで事前に治療されアキシチニブに対して感受性であることが示されているヒト患者から得られた腫瘍の組織試料におけるCD68ポリペプチド発現を測定することによって決定された閾値CD68発現レベルに対して比較するステップを含み、CD68発現レベルが閾値レベルを上回る場合、腫瘍がアキシチニブでの治療に対して感受性であることが示される、方法。

10

**【請求項 2】**

CD68ポリペプチド発現を測定するステップが、免疫組織化学によって行われる、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

免疫組織化学によってCD68ポリペプチド発現を測定するステップが、試料におけるCD68陽性細胞のパーセンテージが決定される、ホールスライドスキャンからの画像分析によって実行される、請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

試料におけるCD68陽性細胞の密度を決定するステップをさらに含む、請求項3に記載の方法。

20

**【請求項 5】**

腫瘍が、乳房腫瘍、肺腫瘍、腎臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、および膵臓腫瘍からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

請求項1に従ってアキシチニブに対して感受性であるmRCC腫瘍を有すると決定された患者に対してアキシチニブを投与するステップを含む、mRCCを治療する方法。

**【請求項 7】**

a)対象の腫瘍におけるCD68陽性細胞のパーセンテージを決定するステップ、およびb)前記パーセンテージが少なくとも5%であれば対象にアキシチニブを投与するステップを含む、癌を治療する方法。

30

**【請求項 8】**

a)対象の腫瘍におけるCD68陽性細胞の細胞密度を決定するステップ、およびb)前記細胞密度が少なくとも0.08細胞/mm<sup>2</sup>であれば対象にアキシチニブを投与するステップを含む、癌を治療する方法。

**【請求項 9】**

腫瘍における細胞の少なくとも5%がCD68陽性である腫瘍を有する対象にアキシチニブを投与するステップを含む、癌を治療する方法。

**【請求項 10】**

腫瘍におけるCD68陽性細胞の細胞密度が少なくとも0.08細胞/mm<sup>2</sup>である腫瘍を有する対象にアキシチニブを投与するステップを含む、癌を治療する方法。

40

**【請求項 11】**

a)対象の腫瘍におけるCD68陽性細胞のパーセンテージを決定するステップ、b)腫瘍におけるCD68陽性細胞の細胞密度を決定するステップ、およびc)前記パーセンテージが少なくとも5%であり、かつ、前記細胞密度が少なくとも0.08細胞/mm<sup>2</sup>であれば対象にアキシチニブを投与するステップを含む、癌を治療する方法。

**【請求項 12】**

腫瘍における細胞の少なくとも5%がCD68陽性であり、かつ、腫瘍におけるCD68陽性細胞の細胞密度が少なくとも0.08細胞/mm<sup>2</sup>である腫瘍を有する対象にアキシチニブを投与するステップを含む、癌を治療する方法。

50

## 【請求項 13】

前記腫瘍が、乳房腫瘍、肺腫瘍、腎臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、および膵臓腫瘍からなる群から選択される、請求項 7 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 14】

CD68 陽性細胞のパーセンテージまたは細胞密度を測定するステップが免疫組織化学を用いて行われる、請求項 7、8、および 11 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 15】

CD68 陽性細胞のパーセンテージまたは細胞密度を測定するステップが、免疫組織化学およびホールスライドスキャンからの画像分析を用いて行われる、請求項 14 に記載の方法。

10

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本開示の分野は、分子生物学、腫瘍学、および臨床的診断方法を含む。

## 【背景技術】

## 【0002】

大部分の抗癌剤は、一部の患者において効果的であるが、他の患者においては効果的ではない。これは、腫瘍間の遺伝的多様性に起因し得、同一の患者内の腫瘍間でさえ観察され得る。変化しやすい患者応答は、標的治療学に関して特に顕著である。したがって、標的療法の最大限の潜在能力は、どの患者にどの薬剤が有益であるかを決定するための適切な試験を行わなくては、実現することができない。国立衛生研究所 (NIH) によると、用語「バイオマーカー」は、「治療的介入に対する通常の生物学的プロセスもしくは発病プロセスまたは薬理的応答の指標として客観的に測定および評価される特徴」として定義されている。

20

## 【0003】

バイオマーカーの発見に基づく、改良された診断方法の開発は、所与の薬剤に対する臨床応答を示す可能性が最も高い患者を前もって同定することによって、新たな薬剤の開発を加速させる潜在能力を有する。このような診断方法は、臨床試験の規模、長さ、およびコストを顕著に低減させる潜在能力を有する。ゲノミクス、プロテオミクス、および分子イメージングなどの技術は、現在のところ、特異的な遺伝子の突然変異、特定の遺伝子の発現レベル、および他の分子バイオマーカーの迅速な、感度の高い、かつ信頼性の高い検出を可能にする。腫瘍の分子的特徴付けのための様々な技術の利用可能性にもかかわらず、癌バイオマーカーの臨床的利用は、依然としてほとんど実現されておらず、それは、発見されている癌バイオマーカーが比較的少ないためである。例えば、最近の総説は以下のように述べている：

30

課題は、癌バイオマーカーを発見することである。分子的に標的化された作用物質を用いて、慢性骨髄性白血病、消化管間質腫瘍、肺癌、および多形性膠芽腫などのいくつかの腫瘍タイプの分子的に規定されたサブセットを標的化することに、臨床的に成功してはいるが、このような成功をさらに広範な状況において適用する能力は、患者において標的作用物質を評価するための効率的な戦略を欠いていることによって非常に限られている。問題は、主に、これらの興味深い新たな薬剤を評価するための臨床試験に、分子的に規定された癌を有する患者を選択することが不可能であることにある。解決のためには、特定の作用物質が有益である可能性が最も高い患者を確実に同定するバイオマーカーが必要である (Sawyers, 2008, Nature 452: 548 ~ 552, 548)。

先のようなコメントは、臨床的に有用なバイオマーカーおよびこのようなバイオマーカーに基づく診断方法の発見の必要性の認識を示している。

40

## 【0004】

(1) 予後バイオマーカー、(2) 予測バイオマーカー、および(3) 薬力学的 (PD) バイオマーカーという、3つの異なるタイプの癌バイオマーカーが存在する。予後バイ

50

オマーカーは、侵襲性、すなわち成長および/または転移の速度、ならびに治療に対する応答性に従って、癌、例えば充実性腫瘍を分類するために用いられる。これは、「良好な転帰の」腫瘍を「不良な転帰の」腫瘍から区別するものと言われることがある。予測バイオマーカーは、特定の患者に特定の薬剤での治療が有益である見込みを評価するために用いられる。例えば、ERBB2 (HER2またはNEU) 遺伝子が増幅している乳癌患者は、トラスツズマブ (HERCEPTIN (登録商標)) での治療が有益である可能性が高く、一方、ERBB2 遺伝子の増幅を有さない患者は、トラスツズマブでの治療が有益である可能性が低い。PDバイオマーカーは、患者が薬剤を投与されている間の、患者に対する薬剤の影響の指標である。したがって、PDバイオマーカーは、新たな薬剤の臨床的開発の初期段階の際に投与量レベルおよび投与頻度を指導するために用いられることが多い。癌バイオマーカーの考察については、例えば、Sawyers、2008、Nature 452:548~552を参照されたい。

【0005】

アキシチニブ (Inlyta (登録商標) としても知られている) は、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFR) に作用する、経口的に投与される低分子受容体チロシンキナーゼ阻害剤である。アキシチニブは、血管新生を阻害することによって腫瘍の成長および転移を低減させ、かつ、これらの受容体を発現する細胞およびこれらの受容体に依存性の細胞に直接的に作用することによって、腫瘍の成長を低減させ、退縮を生じさせると考えられている。アキシチニブは、サイトカインまたはスニチニブ (Sutent (登録商標) としても知られている) での疾患の増悪またはそれらに対する耐性があつた後の転移性腎細胞癌 (mRCC) の治療について、多くの国で認可されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許出願公開第2005/0095634号

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Sawyers、2008、Nature 452:548~552、548

【非特許文献2】Polimenoら、2013、BJU Int 112:686~696

【非特許文献3】Shojaeiら (2007) Nat. Biotechnol. 25(8):911~920

【非特許文献4】Linら (2010) Eur. J. Cancer Suppl. 8(7):191

【非特許文献5】Tonini Gら (2011) Exper Rev Anticancer Ther 11(6):921~930

【非特許文献6】Sonpavde GおよびChoueiri T、(2012) Br J Cancer 107(7):1009~1016

【非特許文献7】Ausubelら、1997、Current Protocols of Molecular Biology、John Wiley and Sons

【非特許文献8】Clark-Langoneら、2007、BMC Genomics 8:279

【非特許文献9】De Andresら、1995、Biotechniques 18:42044

【非特許文献10】Robertsら、2007、Laboratory Investigation 87:979~997

【非特許文献11】Zweigら、1993、「Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine」、Cl

in . Chem . 39 : 561 ~ 577

【非特許文献12】Pepe、2003、The statistical evaluation of medial tests or classification and prediction、Oxford Press、New York

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

VEGFR阻害剤に焦点を当てた前臨床的リサーチおよび臨床的リサーチが多くあるにもかかわらず、このような阻害剤の抗腫瘍活性の原因であるメカニズムは、完全には理解されていない。特に、mRCC患者の予後および抗血管形成剤に対する感度/耐性への影響における腫瘍浸潤リンパ球の役割は、完全には理解されていない(例えば、Polimenoら、2013、BJU Int 112:686~696を参照されたい)。他のタイプの標的療法でのように、全てではないが一部の患者は、アキシチニブ療法が有益である。したがって、アキシチニブでの治療に応答する可能性が高い(または可能性が低い)腫瘍を有する患者を同定するために用いることができる予測バイオマーカーに基づく診断方法が必要である。

10

【課題を解決するための手段】

【0009】

本明細書においてさらに詳細に論じられるように、本開示は、一部には、哺乳動物の腫瘍の組織試料における、腫瘍骨髄(すなわち、分化抗原群68「CD68」)の浸潤(例えば、CD68陽性細胞のパーセンテージおよびCD68陽性細胞の密度に関して上昇したCD68レベル)がアキシチニブなどのVEGFR阻害剤での無増悪生存の向上と相関する、という所見に関するものである。したがって、本開示は、アキシチニブなどのVEGFR阻害剤での治療が奏効する可能性がより高い腫瘍を同定する方法、およびアキシチニブなどのVEGFR阻害剤での治療に対して応答する可能性がより高いと同定されている腫瘍を有する対象を治療する方法を提供する。

20

【0010】

例えば、1つの実施形態において、本開示は、VEGFR阻害剤での治療に対して感受性である腫瘍を同定する方法であって、(a)VEGFR阻害剤での治療を考慮されているヒト患者から得られた腫瘍の組織試料における、CD68ポリペプチド発現レベルを測定するステップ、ならびに(b)ステップ(a)におけるCD68発現レベルを、VEGFR阻害剤で事前に治療されVEGFR阻害剤に対して耐性であることが示されているヒト患者、およびVEGFR阻害剤で事前に治療されVEGFR阻害剤に対して感受性であることが示されているヒト患者から得られた腫瘍の組織試料におけるCD68ポリペプチド発現を測定することによって決定された閾値CD68発現レベルに対して比較するステップを含み、CD68発現レベルが閾値レベルを上回る場合、腫瘍がVEGFR阻害剤での治療に対して感受性であることが示される、方法に関する。1つの実施形態において、VEGFR阻害剤はアキシチニブである。さらなる実施形態において、CD68ポリペプチド発現を測定するステップは、免疫組織化学によって行われる。さらなる実施形態において、免疫組織化学によってCD68ポリペプチド発現を測定するステップは、試料におけるCD68陽性細胞のパーセンテージが決定される、ホールスライドスキャンからの画像分析によって実行される。さらなる実施形態において、このような方法は、試料におけるCD68陽性細胞の密度を決定するステップをさらに含む。さらなる実施形態において、このような方法のいずれかにおける腫瘍は、乳房腫瘍、肺腫瘍、腎臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、および膵臓腫瘍からなる群から選択される。

30

40

【0011】

さらなる実施形態において、本開示は、本明細書において記載される方法に従ってVEGFR阻害剤に対して感受性であるmRCC腫瘍を有すると決定された患者に対してVEGFR阻害剤を投与するステップを含む、mRCCを治療する方法を提供する。1つの実施形態において、VEGFR阻害剤はアキシチニブである。

50

## 【0012】

さらなる実施形態において、本開示は、a) 対象の腫瘍におけるCD68陽性細胞のパーセンテージを決定するステップ、およびb) 前記パーセンテージが少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも4.5%、少なくとも4.6%、少なくとも4.7%、少なくとも4.8%、少なくとも4.9%、少なくとも5.0%、少なくとも5.1%、少なくとも5.2%、少なくとも5.3%、少なくとも5.4%、少なくとも5.5%、少なくとも5.6%、少なくとも5.7%、少なくとも5.8%、少なくとも5.9%、少なくとも6.0%、少なくとも6.5%、少なくとも7.0%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも15%、または少なくとも20%であれば、対象にVEGFR阻害剤を投与するステップを含む、癌を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、VEGFR阻害剤はアキシチニブである。

10

## 【0013】

さらなる実施形態において、本開示は、a) 対象の腫瘍におけるCD68陽性細胞の細胞密度を決定するステップ、およびb) 前記細胞密度が少なくとも0.05細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.06細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.07細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.08細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.09細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.0細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.1細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.2細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.3細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.4細胞/mm<sup>2</sup>、または少なくとも1.5細胞/mm<sup>2</sup>であれば、対象にアキシチニブを投与するステップを含む、癌を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、VEGFR阻害剤はアキシチニブである。

20

## 【0014】

さらなる実施形態において、本開示は、腫瘍における細胞の少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも4.5%、少なくとも4.6%、少なくとも4.7%、少なくとも4.8%、少なくとも4.9%、少なくとも5.0%、少なくとも5.1%、少なくとも5.2%、少なくとも5.3%、少なくとも5.4%、少なくとも5.5%、少なくとも5.6%、少なくとも5.7%、少なくとも5.8%、少なくとも5.9%、少なくとも6.0%、少なくとも6.5%、少なくとも7.0%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも15%、または少なくとも20%がCD68陽性である腫瘍を有する対象にVEGFR阻害剤を投与するステップを含む、癌を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、VEGFR阻害剤はアキシチニブである。

30

## 【0015】

さらなる実施形態において、本開示は、腫瘍におけるCD68陽性細胞の細胞密度が少なくとも0.05細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.06細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.07細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.08細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.09細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.0細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.1細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.2細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.3細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.4細胞/mm<sup>2</sup>、または少なくとも1.5細胞/mm<sup>2</sup>である腫瘍を有する対象にVEGFR阻害剤を投与するステップを含む、癌を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、VEGFR阻害剤はアキシチニブである。

40

## 【0016】

さらなる実施形態において、本開示は、a) 対象の腫瘍におけるCD68陽性細胞のパーセンテージを決定するステップ、b) 腫瘍におけるCD68陽性細胞の細胞密度を決定するステップ、およびc) 前記パーセンテージが少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも4.5%、少なくとも4.6%、少なくとも4.7%、少なくとも4.8%、少なくとも4.9%、少なくとも5.0%、少なくとも5.1%、少なくとも5.2%、少なくとも5.3%、少なくとも5.4%、少なくとも5.5%、少なくとも5.6%、少なくとも5.7%、少なくとも5.8%、少なくとも5.9%、少なくとも6.0%、少なくとも6.5%、少なくとも7.0%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも15%、または少なくとも20%であり、かつ、前記

50

細胞密度が少なくとも0.05細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.06細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.07細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.08細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.09細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.0細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.1細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.2細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.3細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.4細胞/mm<sup>2</sup>、または少なくとも1.5細胞/mm<sup>2</sup>であれば、対象にVEGFR阻害剤を投与するステップを含む、癌を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、VEGFR阻害剤はアキシチニブである。

【0017】

さらなる実施形態において、本開示は、腫瘍における細胞の少なくとも2%、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも4.5%、少なくとも4.6%、少なくとも4.7%、少なくとも4.8%、少なくとも4.9%、少なくとも5.0%、少なくとも5.1%、少なくとも5.2%、少なくとも5.3%、少なくとも5.4%、少なくとも5.5%、少なくとも5.6%、少なくとも5.7%、少なくとも5.8%、少なくとも5.9%、少なくとも6.0%、少なくとも6.5%、少なくとも7.0%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも15%、または少なくとも20%がCD68陽性であり、かつ、腫瘍におけるCD68陽性細胞の細胞密度が少なくとも0.05細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.06細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.07細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.08細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも0.09細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.0細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.1細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.2細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.3細胞/mm<sup>2</sup>、少なくとも1.4細胞/mm<sup>2</sup>、または少なくとも1.5細胞/mm<sup>2</sup>である腫瘍を有する対象にVEGFR阻害剤を投与するステップを含む、癌を治療する方法を提供する。1つの実施形態において、VEGFR阻害剤はアキシチニブである。

10

20

【0018】

さらなる実施形態において、本開示は、前記腫瘍が乳房腫瘍、肺腫瘍、腎臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、および膵臓腫瘍からなる群から選択される、本明細書において開示される方法のいずれかを提供する。1つの実施形態において、本開示は、癌または腫瘍がmRCCである、本明細書において開示される方法のいずれかを提供する。

【0019】

さらなる実施形態において、CD68陽性細胞のパーセンテージまたは細胞密度を測定するステップが免疫組織化学を用いて行われ、またさらに、腫瘍試料から得たホールスライドスキャンからの画像分析の使用が採用される、本明細書において開示される方法が実行される。

30

【0020】

本開示のいくつかの実施形態において、マクロファージ含有量の測定は、マクロファージマーカータンパク質の存在または量を測定することによって行われる。他の実施形態において、マクロファージ含有量の測定は、所与の細胞集団におけるマクロファージの数を決定することによって行われる。例えば、マクロファージ含有量の測定は、マクロファージマーカータンパク質の検出を伴う免疫組織化学によって行うことができる。別の実施形態において、マクロファージ含有量の測定は、マクロファージマーカータンパク質をコードするmRNAの存在または量を測定することによって行われる。マクロファージマーカータンパク質の例には、CCR2、CD14、CD68、CD163、CSF1R、およびMSR1が含まれる。閾値決定分析は、受信者動作特性曲線分析を含み得る。本開示の方法は、例えば乳房腫瘍、肺腫瘍、腎臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、および膵臓腫瘍を含む、様々なタイプの腫瘍を試験するために有用である。

40

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】A4061032研究に含まれた対象の人口統計学的特徴およびベースライン特徴を示す図である。

【図2】A4061032研究の一部として収集されたスライド対ブロックによる、バイ

50

オマーカーCD3およびCD68についての陽性細胞のパーセントおよび密度の概要を示す図である。

【図3】バイオマーカーCD68についての陽性細胞のパーセントおよび密度の、中央値未満の値と中央値以上の値との比較のための、PFSのカプラン・マイヤープロットを示す図である。

【図4】事前のSutent（登録商標）治療を受けた患者における、バイオマーカーCD68についての陽性細胞のパーセントおよび密度の、中央値未満の値と中央値以上の値との比較のための、PFSのカプラン・マイヤープロットを示す図である。

【図5】バイオマーカーCD3についての陽性細胞のパーセントおよび密度の、中央値未満の値と中央値以上の値との比較のための、PFSのカプラン・マイヤープロットを示す図である。

【図6】事前のSutent（登録商標）治療を受けた患者における、バイオマーカーCD3についての陽性細胞のパーセントおよび密度の、中央値未満の値と中央値以上の値との比較のための、PFSのカプラン・マイヤープロットを示す図である。

【図7】各バイオマーカーCD3およびCD68の陽性細胞のパーセントおよび密度についての、中央値カットポイント層未満の値および中央値カットポイント層以上の値による、OSの概要を示す図である。

【図8】事前のSutent（登録商標）治療を受けた患者における、各バイオマーカーCD3およびCD68の陽性細胞のパーセントおよび密度についての、中央値カットポイント層未満の値および中央値カットポイント層以上の値による、OSの概要を示す図である。

【図9】事前のSutent（登録商標）治療を受けた患者における、バイオマーカーCD3およびCD68の陽性細胞のパーセントおよび密度についての、中央値未満の値と中央値以上の値との比較のための、OSのカプラン・マイヤープロットを示す図である。

【図10】応答カテゴリーごとの、CD3バイオマーカーおよびCD68バイオマーカーの陽性細胞のパーセントおよび密度の概要を示す図である。

【図11】事前のSutent（登録商標）治療を受けた患者における、応答カテゴリーごとの、CD3バイオマーカーおよびCD68バイオマーカーの陽性細胞のパーセントおよび密度の概要を示す図である。

【発明を実施するための形態】

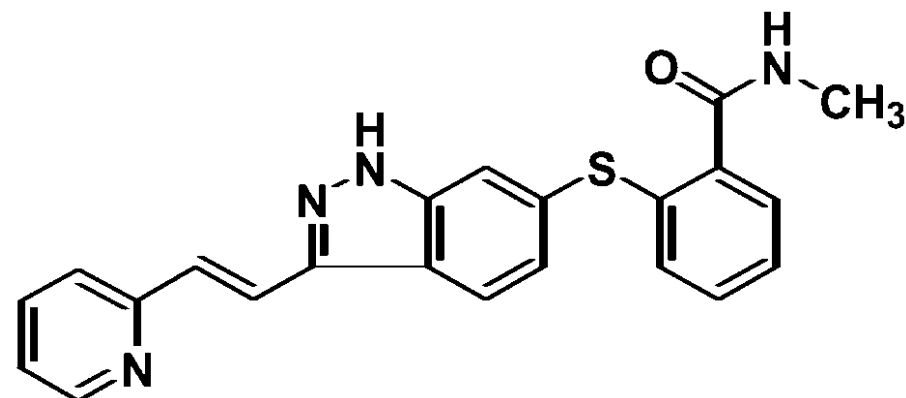
【0022】

定義

本明細書において用いられる場合、Inlyta（登録商標）、「AG-13736」、および「アキシチニブ」は、その塩および多形を含む、以下の化学構造を有する6-[2-(メチルカルバモイル)フェニルスルファニル]-3-E-[2-(ピリジン-2-イル)エテニル]インダゾールを意味する。

【0023】

【化1】



【0024】

10

20

30

40

50

本明細書において用いられる場合、「マクロファージマーカータンパク質」は、マクロファージ細胞表面タンパク質を意味し、その検出は、腫瘍の組織試料内に存在する他のタイプの細胞の間でマクロファージを同定するために有用である。典型的なヒトマクロファージマーカータンパク質は、CCR2、CD14、CD68、CD163、CSF1R、およびMSR1である。他のマクロファージマーカータンパク質を、本開示の実施において採用することができる。

【0025】

本明細書において用いられる場合、「受信者動作特性」(ROC)曲線は、2値分類系での偽陽性率(感度)対真陽性率(特異度)のプロットを意味する。ROC曲線の構築において、以下の定義が適用される。

10

偽陰性率「FNR」= 1 - TPR

真陽性率「TPR」= 真陽性 / (真陽性 + 偽陰性)

偽陽性率「FPR」= 偽陽性 / (偽陽性 + 真陰性)

【0026】

本明細書において用いられる場合、治療された腫瘍に関して、治療に対する「応答」または「応答している」は、腫瘍が(a)成長の減速、(b)成長の停止、または(c)退縮を示すことを意味する。

【0027】

本明細書において用いられる場合、「閾値決定分析」は、所与の腫瘍タイプ、例えばヒト腎細胞癌腫についての閾値スコアを決定するための、その特定の腫瘍タイプを代表するデータセットの分析を意味する。所与の腫瘍タイプを代表するデータセットには、このような腫瘍の群から得た各腫瘍について、(a)実際の腫瘍応答データ(アキシチニブなどの治療に対する応答および非応答)、ならびに(b)マクロファージ含有量および/またはCD68発現レベルが含まれ得る。

20

【0028】

本明細書において用いられる場合、「閾値スコア」は、それを超えると腫瘍がアキシチニブなどでの治療に対して感受性である可能性が高いと分類されるスコアを意味する。

【0029】

本明細書において用いられる場合、「CD68発現レベル」または「CD68ポリペプチド発現レベル」は、腫瘍試料において発現され、免疫組織化学などのあらゆる適切な分析技術によって決定することができる、CD68タンパク質のレベルを意味する。さらに、「CD68発現レベル」は、所与の試料における「CD68陽性」であると決定される細胞のパーセンテージ、および所与の試料における「CD68陽性」であると決定される細胞の密度を含む、様々な用語で表現され得る。

30

【0030】

本明細書において用いられる場合、「CCR2」(CD192、CKR2、CMKBR2、MCP-I-R、CC-CKR-2、FLJ78302、MGC103828、MGC111760、およびMGC168006としても知られている、ケモカイン(C-Cモチーフ)受容体2)は、Entrez Gene ID No. 729230によって同定される遺伝子によってコードされるヒトタンパク質、およびその対立遺伝子変異体を意味する。

40

【0031】

本明細書において用いられる場合、「CD14」は、Entrez Gene ID No. 929によって同定される遺伝子によってコードされるヒトタンパク質、およびその対立遺伝子変異体を意味する。

【0032】

本明細書において用いられる場合、「CD68」(GP110、SCARD1、およびDKFZp686M18236としても知られている)は、Entrez Gene ID No. 968によって同定される遺伝子によってコードされるヒトタンパク質、およびその対立遺伝子変異体を意味する。

50

## 【0033】

本明細書において用いられる場合、「CD68陽性」細胞は、CD68の存在が免疫組織化学などのあらゆる適切な分析技術によって検出される細胞である。

## 【0034】

本明細書において用いられる場合、「CD163」(MI30およびMM130としても知られている)は、Entrez GeneID No. 9332によって同定される遺伝子によってコードされるヒトタンパク質、およびその対立遺伝子変異体を意味する。

## 【0035】

本明細書において用いられる場合、「CSF1R」(CSFR、FMS、FIM2、C-FMS、およびCD115としても知られている、コロニー刺激因子1受容体)は、Entrez GeneID No. 1436によって同定される遺伝子によってコードされるヒトタンパク質、およびその対立遺伝子変異体を意味する。

10

## 【0036】

本明細書において用いられる場合、「MSR1」(CD204、SCARA1、SR-A、phsRI、およびphsR2としても知られている、マクロファージスカベンジャー受容体1)は、Entrez GeneID No. 4481によって同定される遺伝子によってコードされるヒトタンパク質、およびその対立遺伝子変異体を意味する。

## 【0037】

## 臨床研究

Inlyta(登録商標)は、以下ではアキシチニブと呼ぶが、血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)に作用する、経口的に投与される低分子受容体チロシンキナーゼ阻害剤である。アキシチニブは、血管新生を阻害することによって腫瘍の成長および転移を低減させ、かつ、これらの受容体を発現する細胞およびこれらの受容体に依存性の細胞に直接的に作用することによって、腫瘍の成長を低減させ、退縮を生じさせることが期待されている。アキシチニブは、サイトカインまたはスニチニブでの疾患の増悪またはそれらに対する耐性があつた後の転移性腎細胞癌(mRCC)の治療について、多くの国で認可されている。

20

## 【0038】

研究A4061032(ClinicalTrials.gov識別番号:NCT00678392)は、「転移性腎細胞癌のための第二選択療法としてのアキシチニブ(AG-013736):Axistrial」というタイトルの第3相登録試験であつた。この試験は、1つの第一選択レジメンが失敗した後のmRCC患者において腫瘍の増悪を遅らせることにおいてアキシチニブがソラフェニブよりも優れていることを実証するために設計された。全部で650人の患者が参加することが予定されており、723人の対象が実際に研究に参加した。

30

## 【0039】

実施例においてさらに詳細に記載されるように、ホルマリン固定されパラフィン包埋された(FFPE)腫瘍試料を、A4061032に加わり、腫瘍試料の収集について明確に同意した患者から収集した。腫瘍骨髄(分化抗原群68「CD68」)またはリンパ球(分化抗原群3「CD3」)の浸潤を、52人のアキシチニブ治療した患者の腫瘍試料において免疫組織化学(IHC)によって評価した。目的は、骨髄の浸潤が、VEGF-VEGFR2経路を標的化する抗血管形成剤に対する耐性を付与するという仮説と一致する(Shojaeiら(2007)Nat. Biotechnol. 25(8):911~920、およびLinら(2010)Eur. J. Cancer Suppl. 8(7):191を参照されたい)、これらのバイオマーカーと有効性との潜在的な関連を調べることであつた。

40

## 【0040】

CD3およびCD68の評価を、ホールスライドスキャンからの画像分析によって行った。目的の領域に丸印を付け、画像分析アルゴリズムを実行した。陽性細胞のパーセンテージ(細胞総数当たりの陽性細胞の数)および陽性細胞の密度(例えば、1mm<sup>2</sup>当たり

50

の陽性細胞の数)を測定した。一部の患者はFFPEブロックを提供し、一部の患者はブロックからのスライドカットを提供した。全患者から得た試料を、それらがスライドとして提供されたかまたはブロックとして提供されたかについて分析した。

#### 【0041】

IHCデータについて52人の評価可能な患者があり、そのうち33人はSutent(登録商標)(スニチニブ)で事前に治療されていた。CD3データと測定されたいずれの評価項目との間にも相関はなかった。実施例においてさらに詳細に記載されるように、CD68では、陽性細胞のパーセンテージおよび細胞密度は密接に相関しており、非応答者に対して、客観的応答を有する患者において2倍高かった。

#### 【0042】

前治療にかかわらず、CD68の中央値(カットオフ=5.21%の陽性細胞または0.08細胞/mm<sup>2</sup>の細胞密度)以上の患者における無増悪生存(PFS)の中央値は、両カットポイントで12.0か月であり、それに対し、バイオマーカーの中央値より小さい患者ではそれぞれ3.7か月および3.8か月であった(ハザード比[HR]=0.42、ログランクP値0.01)。Sutent(登録商標)で前治療された患者では、ぎりぎりの統計的有意性を伴って、PFSと類似の傾向が観察された(p値:陽性細胞%および細胞密度についてそれぞれ0.066および0.056)。良好な有効性の類似の傾向が、比較的高いCD68細胞数を有する患者についての客観的応答および全生存(OS)で観察されたが、これらの差異は、全患者を共に評価した場合、またはSutent(登録商標)で前治療された患者のみを評価した場合には、統計的に有意ではなかった。

#### 【0043】

さらなる受信者動作特性(ROC)分析を、ベースライン腫瘍CD68レベルの感度および特異度をさらに良く理解するため、ならびに最初に選択されたCD68の中央値からのCD68カットポイントの定義を最適化するために行った。デフォルトのカットオフ値である2、4、6、および8か月のPFSを選択し、ここでも、CD68陽性細胞の高いパーセンテージおよび細胞密度を有する患者が、4つのPFS時点のそれぞれで、より長いPFS値を有する(または、疾患の増悪もしくは死亡の可能性が同等に低い)ことが観察された。

#### 【0044】

実施例においてさらに詳細に記載されるように、最も高い観察された感度、特異度、および曲線下面積(AUC)の値は、2か月のPFSで観察され、ここで、ROC曲線のAUCは、CD68陽性細胞のパーセンテージおよび細胞密度でそれぞれ0.776および0.809であり、このことは、CD68発現レベルを用いる、PFSについての説得力のある全体的な診断正確度を示す。6か月のPFSを予測するための最適なカットオフ点は、CD68の陽性細胞のパーセントおよび密度でそれぞれ4.41%および0.06細胞/mm<sup>2</sup>であった。値は、Sutent(登録商標)で前治療された患者で同様であった。

#### 【0045】

ROC分析もまた、ORRに対するCD68の評価のために用いた。実施例においてさらに詳細に記載されるように、AUCは、CD68陽性細胞のパーセンテージおよび細胞密度でそれぞれ0.791および0.784であり、このことは、ここでも、CD68発現レベルを用いてORRを予測するための説得力のある全体的な正確度を示す。ORRを予測するための最適なカットオフ点は、CD68陽性細胞のパーセンテージおよび細胞密度でそれぞれ9.42%および0.13細胞/mm<sup>2</sup>であった。値は、Sutent(登録商標)で前治療された患者で同様であった。試験のための中央値である21か月での生存可能性について、ROC分析は統計的に有意な関連を示さず、AUCは0.559であった。

#### 【0046】

結論として、事前の治療にかかわらず、良好なPFSは、より高い腫瘍CD68レベルを有する患者で観察された。CD68の中央値を超える患者におけるPFSの中央値は、

10

20

30

40

50

両カットポイントで12.0か月であり、それに対し、バイオマーカーの中央値より小さい値を有する患者では3.7か月および3.8か月であった(HR = 0.42、ログランクp値 0.01)。ROC分析は、2、4、6、および8か月でのこのデータについての説得力のある予測値、ならびに正確なカットオフ点(6か月 - CD68陽性細胞のパーセンテージおよび細胞密度について、4.41%および0.06細胞/mm<sup>2</sup>)を示した。

#### 【0047】

したがって、本開示は、アキシチニブなどのVEGFR阻害剤で治療した患者について、より高いCD68発現がより高いORRおよびより長いPFSと関連するという所見に関する。OSとの関連の不存在は、アキシチニブ増悪後の交絡的な増悪後治療に起因し得る。これらの所見は、VEGF生産の増大のメカニズム、およびそれに付随する、より高いマクロファージ浸潤を伴う血管形成状態、したがってアキシチニブの治療の影響に対するより高い感度と一致する。登録評価項目であるPFSのROC分析は、2か月の治療の後に最も高い感度および特異度を示した。

10

#### 【0048】

CD68の発現は、チボザニブ治療を受けているmRCC患者での転帰と関連することが先に報告されている(Linら(2010)Eur. J. Cancer Suppl. 8(7):191)。骨髄(CD11b Gr+)細胞もまた、肺動物モデルにおいて、ベパシズマブに対する耐性を付与することが先に示されている(Shojaeiら(2007)Nat Biotechnol. 25(8):911~920)。このデータは、より高いCD68腫瘍レベルを有する患者でのさらに不良な転帰と一致するであろう。しかし、このことは、この研究においては観察されなかった。

20

#### 【0049】

RCC患者にとって、予後バイオマーカーの同定は著しく進歩してきているが、アキシチニブなどの標的VEGFR阻害剤について、有効性の予測マーカーは同定されていない。最近の概説によると(Tonini Gら(2011)Exper Rev Anticancer Ther 11(6):921~930)、RCC患者にとって最も適切な治療法の選択は、依然として、リスク基準(MSKCC)および他の予後基準に依存している。さらに、著者は、これらの組み合わせられた基準がRCC患者の転帰についての情報を提供すること、およびmRCCについての治療法に対する応答の予測因子が必要であることを述べている。ランダム化された臨床試験(Id.)における潜在的マーカーの検証が必要である。組織の収集および分析の標準化もまた、治療法を潜在的に指導するための分子バイオマーカーの開発における主要な課題として挙げられている(Sonpavde GおよびChoueiri T、(2012)Br J Cancer 107(7):1009~1016)。

30

#### 【0050】

本開示の実行において用いることができる方法および分析技術を、以下にさらに開示する。

#### 【0051】

##### 組織試料

ヒト患者における腫瘍の組織試料を、RNAの供給源、タンパク質の供給源、または免疫組織化学(IHC)のための薄片の供給源として用いることができ、したがって、試料におけるCD68発現のレベルを、本開示において記載されているように決定することができる。組織試料は、従来の腫瘍生検機器および手順を用いて得ることができる。内視鏡生検、切除生検、切開生検、細針生検、パンチ生検、薄片生検、および皮膚生検が、腫瘍試料を得るために当業者によって用いられ得る、認識されている医療手順の例である。腫瘍組織試料は、マーカー遺伝子、例えばCD68発現レベルを測定するために、または、IHCによって、例えばCD68陽性細胞の発現によってマクロファージを可視化するために十分なRNA、タンパク質、または薄片を提供するために、十分な量でなくてはならない。

40

50

## 【 0 0 5 2 】

腫瘍組織試料は、マクロファージ含有量、または具体的にはCD68の測定を可能にするあらゆる形態であり得る。言い換えると、組織試料は、RNA抽出、タンパク質抽出、または薄片の調製のために十分でなくてはならない。したがって、組織試料は、新鮮であり得るか、適切な低温技術を介して保存され得るか、または非低温技術を介して保存され得る。臨床生検標本を扱うための標準的なプロセスは、組織試料をホルマリン内で固定し、次いでそれをパラフィン内に包埋することである。この形態の試料は、ホルマリン固定されパラフィン包埋された（FFPE）組織として一般に知られている。その後の分析のための組織調製の適切な技術は、当業者に周知である。

## 【 0 0 5 3 】

## マクロファージ含有量

本開示の実施において、組織試料（例えば、腫瘍から得た）における、マクロファージ含有量のレベル（例えば、マクロファージの数、またはCD68などのマクロファージマーカーの発現、例えば、マクロファージマーカータンパク質の発現、またはCD68などのマクロファージマーカータンパク質をコードするmRNAの発現）の決定は、いくつが存在するあらゆる適切な方法によって行うことができる。例えば、マクロファージ含有量の間接的な測定は、CD68などのマクロファージマーカーとして有用であることが知られている1つまたは複数の遺伝子の発現を測定することによって行うことができる。遺伝子発現を測定するための様々な方法が、当技術分野において知られている。このような方法は、マクロファージマーカータンパク質またはマクロファージマーカータンパク質をコードするmRNAのレベルの決定において適用することができる。典型的なヒトマクロファージマーカー遺伝子は、CCR2、CD14、CD68、CD163、CSF1R、およびMSR1である。他のマクロファージマーカーも同様に用いることができる。

## 【 0 0 5 4 】

## RNA分析

従来のマイクロアレイ分析および定量的ポリメラーゼ連鎖反応（QPCR）は、マクロファージマーカー遺伝子の発現のレベルをmRNAのレベルで決定するための方法の例である。本開示のいくつかの実施形態において、RNAは、標準的なプロトコルを用いて、目的の細胞、腫瘍、または組織から抽出される。他の実施形態において、RNA分析は、RNAの単離を要しない技術を用いて行われる。

## 【 0 0 5 5 】

## RNAの単離

組織試料からの、真核細胞mRNA、すなわちポリ（a）RNAの迅速かつ効率的な抽出のための方法は確立されており、当業者に知られている。例えば、Ausubelら、1997、Current Protocols of Molecular Biology、John Wiley and Sonsを参照されたい。組織試料は、新鮮な、凍結された、または固定されパラフィン包埋された（FFPE）、臨床研究腫瘍標本などの試料であり得る。通常、新鮮なまたは凍結された組織試料から単離されたRNAは、FFPE試料から得たRNAよりも断片化されにくい傾向がある。腫瘍材料のFFPE試料は、しかし、より容易に入手可能であり、FFPE試料は、本開示の方法において用いるためのRNAの適切な供給源である。RT-PCRによる遺伝子発現プロファイリングのためのRNA供給源としてのFFPE試料の考察については、例えば、Clark-Langoneら、2007、BMC Genomics 8：279を参照されたい。また、De Andresら、1995、Biotechniques 18：42044、およびBakerら、米国特許出願公開第2005/0095634号も参照されたい。RNAの抽出および調製のために、市販されているキットを販売者の指示と共に用いることは、広く行われており、一般的である。様々なRNA単離製品および完全なキットの商業的販売者には、Qiagen（パレンシア、カリフォルニア州）、Invitrogen（カールズバッド、カリフォルニア州）、Ambion（オースチン、テキサス州）、およびExiqon（Woburn、マサチューセッツ州）が含まれる。

10

20

30

40

50

## 【0056】

通常、RNAの単離は、組織/細胞の破壊で開始される。組織/細胞の破壊の間、RNaseによるRNAの分解を最少にすることが望ましい。RNA単離プロセスの間のRNase活性を制限するための1つのアプローチは、細胞が破壊されたらすぐに变性剤を細胞内容物と接触させることを確実にすることである。別の一般的な慣例は、1つまたは複数のプロテアーゼをRNA単離プロセスに含めることである。場合によって、新鮮な組織試料が、それらが収集されるとすぐに、RNA安定化溶液内に室温で浸される。安定化溶液は、迅速に細胞に浸透し、その後の単離のために、4℃での保存のためにRNAを安定化させる。

## 【0057】

いくつかのプロトコルにおいて、全RNAが、塩化セシウム密度勾配遠心分離によって、破壊された腫瘍材料から単離される。通常、mRNAは、全細胞RNAのおよそ1パーセントから5パーセントを占める。固定化されたオリゴ(dT)、例えばオリゴ(dT)セルロースは、リボソームRNAおよび運搬RNAからmRNAを分離するために一般的に用いられる。単離の後に保存される場合、RNAは、RNaseの存在しない条件下で保存されなくてはならない。単離されたRNAの安定な保存のための方法は、当技術分野において知られている。RNAの安定な保存のための様々な商品が利用可能である。

## 【0058】

## マイクロアレイ

CD68などのマクロファージマーカータンパク質をコードする1つまたは複数の遺伝子のmRNA発現レベルは、従来のDNAマイクロアレイ発現プロファイリング技術を用いて測定することができる。DNAマイクロアレイは、ガラス、プラスチック、またはシリコンなどの固体表面または固体基質に固定された特異的なDNAセグメントまたはプローブの集まりであり、各特異的DNAセグメントが、アレイ内の既知の位置に存在している。通常はストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下の、標識されたRNAの試料とのハイブリダイゼーションによって、アレイ内の各プローブに対応するRNA分子の検出および定量が可能になる。非特異的に結合した試料材料を除去するためのストリンジェントな洗浄の後、マイクロアレイを、共焦点レーザー顕微鏡法または他の適切な検出方法によってスキャンする。DNAチップとして知られていることが多い、最新の市販のDNAマイクロアレイは、何万ものプローブを典型的には含み、したがって、何万もの遺伝子の発現を同時に測定することができる。このようなマイクロアレイは、本開示の実施において用いることができる。あるいは、CD68などのマクロファージマーカータンパク質をコードする1つまたは複数の遺伝子の発現を測定するために必要なだけのプローブと、例えばデータの正規化のための必要な対照または標準とを含む、カスタムチップを、本開示の実施において用いることができる。

## 【0059】

データの正規化を容易にするために、2色マイクロアレイリーダーを用いることができる。2色(2チャンネル)システムにおいて、試料は、第1の波長を発する第1のフルオロフォアで標識され、一方、RNAまたはcDNA標準は、異なる波長を発する第2のフルオロフォアで標識される。例えば、Cy3(570nm)およびCy5(670nm)が、2色マイクロアレイシステムにおいて共に採用されることが多い。

## 【0060】

DNAマイクロアレイ技術は、良く開発されており、市販されており、かつ広く採用されている。したがって、本明細書において開示される方法の実施において、当業者は、不必要な実験を行うことなく、CD68などのマクロファージマーカータンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定するためのマイクロアレイ技術を用いることができる。DNAマイクロアレイチップ、試薬(RNAまたはcDNAの調製、RNAまたはcDNAの標識、ハイブリダイゼーション、および洗浄の溶液のためのものなど)、機器(マイクロアレイリーダーなど)、およびプロトコルは、当技術分野において周知であり、様々な商業的供給源から入手可能である。マイクロアレイシステムの商業的販売者には、Agilent

10

20

30

40

50

lent Technologies (サンタ・クララ、カリフォルニア州) および Affymetrix (サンタ・クララ、カリフォルニア州) が含まれるが、他の PCR システムも同様に用いることができる。

#### 【0061】

##### 定量的 RT-PCR

CD68 などのマクロファージマーカートンパク質をコードする個別の遺伝子を代表する mRNA のレベルを、従来の定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) 技術を用いて測定することができる。qRT-PCR の利点には、感度、柔軟性、定量的正確度、および緊密に関連する mRNA の間を区別する能力が含まれる。定量的 PCR のための組織試料の処理に関連するガイダンスは、qRT-PCR のための商品の製造者および販売者 (例えば、Qiagen (パレンシア、カリフォルニア州) および Ambion (オースチン、テキサス州)) を含む、様々な供給源から入手可能である。qRT-PCR の自動性能のための機器システムは市販されており、多くの実験室において日常的に用いられている。周知の市販のシステムの例は、Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems、フォスターシティー、カリフォルニア州) である。

10

#### 【0062】

mRNA が単離されると、RT-PCR による遺伝子発現プロファイリングにおける第 1 のステップは、cDNA への mRNA 鋳型の逆転写であり、cDNA は次いで、PCR 反応において指数関数的に増幅される。2 つの一般的に用いられる逆転写酵素は、トリ骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素 (AMV-RT) およびモロニー Maus 白血病ウイルス逆転写酵素 (MMLV-RT) である。逆転写反応は、典型的には、特異的プライマー、ランダムヘキサマー、またはオリゴ (dT) プライマーで開始される。結果として得られる cDNA 生成物は、その後のポリメラーゼ連鎖反応において鋳型として用いることができる。

20

#### 【0063】

PCR ステップは、熱安定性 DNA 依存性 DNA ポリメラーゼを用いて実行される。PCR システムにおいて最も一般的に用いられるポリメラーゼは、サーマス・アクアティクス (Thermus aquaticus) (Taq) ポリメラーゼである。PCR の選択性は、増幅のために標的化される DNA 領域、すなわち、CD68 などのマクロファージマーカートンパク質をコードする遺伝子から逆転写される cDNA の領域に相補的なプライマーの使用の結果生じる。したがって、qRT-PCR が本開示において採用される場合、各マーカートン遺伝子に特異的なプライマーは、遺伝子の cDNA 配列に基づく。SYBR (登録商標) グリーンまたは TaqMan (登録商標) (Applied Biosystems、フォスターシティー、カリフォルニア州) などの市販の技術を、販売者の指示に従って用いることができる。メッセンジャー RNA のレベルは、ベータアクチンまたは GAPDH などのハウスキーピング遺伝子のレベルを比較することによって、試料間のロード量における差異について正規化することができる。mRNA の発現のレベルは、正常な非腫瘍組織または細胞から得た mRNA などの、あらゆる単一の対照試料と比較して表すことができる。あるいは、それは、腫瘍試料もしくは腫瘍細胞系のプールから、または市販されている対照 mRNA のセットから得た mRNA と比較して表すことができる。

30

40

#### 【0064】

CD68 などのマクロファージマーカートンパク質をコードする遺伝子の発現レベルの PCR 分析のための適切なプライマーセットは、不必要な実験を行うことなく、当業者によって設計および合成され得る。あるいは、本開示を実施するための PCR プライマーセットは、商業的供給源、例えば Applied Biosystems から購入することができる。PCR プライマーは、好ましくは、約 17 から 25 ヌクレオチド長である。プライマーは、融解温度 (T<sub>m</sub>) 推定のための従来のアルゴリズムを用いて、特定の T<sub>m</sub> を有するように設計することができる。プライマーの設計および T<sub>m</sub> 推定のためのソフトウ

50

エアは、例えば Primer Express (商標) (Applied Biosystems) が商業的に入手可能であり、また、例えば Primer 3 (Massachusetts Institute of Technology) がインターネットで入手可能である。PCRプライマー設計の確立された原理を適用することによって、多くの異なるプライマーを、CD14、CD68、MSR1、CSFR1、CD163、およびCCR2などのマクロファージマーカー遺伝子を含むあらゆる所与の遺伝子の発現レベルを測定するために用いることができる。

#### 【0065】

本開示のいくつかの実施形態において、RNA分析は、RNAの抽出または単離を伴わない技術を用いて行われる。1つのこのような技術は、定量的ヌクレアーゼ保護アッセイであり、これは、qNPA (商標) の名前で市販されている (High Throughput Genomics, Inc.、トゥーソン、アリゾナ州)。この技術は、分析される腫瘍組織試料がFFPE材料の形態である場合に有利であり得る。例えば、Robertsら、2007、Laboratory Investigation 87:979~997を参照されたい。

10

#### 【0066】

##### タンパク質の分析

本開示の方法において、CD68などのマクロファージマーカー遺伝子の発現は、タンパク質レベルで検出することができる。タンパク質レベルでマクロファージマーカー遺伝子の発現のレベルを測定するための方法の例には、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) およびIHC分析が含まれる。

20

#### 【0067】

##### ELISA

マクロファージマーカータンパク質のELISA、例えばCD68のELISAの実施には、マクロファージマーカータンパク質に対する少なくとも1つの抗体、すなわち検出抗体が必要である。典型的な実施形態において、CD68は、マクロファージマーカータンパク質である。分析される試料から得たCD68タンパク質は、ポリスチレンマイクロタイタープレートなどの固体担体上に固定化される。この固定化は、例えば、表面への吸着を介する、CD68の非特異的な結合によるものであり得る。あるいは、固定化は、「サンドイッチ」ELISAにおいて、例えば、捕捉抗体 (検出抗体と異なる抗CD68抗体) による、試料から得たCD68タンパク質の結合を介する、特異的な結合によるものであり得る。CD68が固定化された後、検出抗体が添加され、そして検出抗体は、結合したCD68と複合体を形成する。検出抗体は、直接的にまたは間接的に、例えば検出抗体を特異的に認識する二次抗体を介して、酵素に連結する。典型的には各ステップの間に、結合したCD68を有するプレートを、穏やかな洗剤溶液で洗浄する。典型的なELISAプロトコルにはまた、プレートへのタンパク質試薬の望ましくない非特異的な結合をブロックするための、ウシ血清アルブミンなどの非特異的な結合タンパク質の使用を伴う、1つまたは複数のブロックステップも含まれる。最後の洗浄ステップの後、プレートを、適切な酵素基質の添加によって発色させて、試料内のCD68の量を示す可視的シグナルを生じさせる。基質は、例えば、発色性基質または蛍光発生性基質であり得る。ELISAの方法、試薬、および設備は、当技術分野において周知であり、市販されている。

30

40

#### 【0068】

他のマクロファージマーカータンパク質、例えば、CCR2、CD14、CD163、CSFR1、およびMSR1、ならびに他のマクロファージ特異的なマーカータンパク質の発現レベルが、各マクロファージマーカータンパク質に特異的な抗体の検出を用いるELISAによって測定され得ることが理解される。

#### 【0069】

##### 免疫組織化学 (IHC)

所与の細胞集団におけるマクロファージの数を、免疫組織化学によって決定する (例えば視覚化する) ことができる。さらに、CD68などの所与のバイオマーカータンパク質

50

について陽性の、試料内の細胞のパーセンテージおよび密度を、免疫化学によって決定することができる。IHCによるマクロファージマーカータンパク質のアッセイ、例えばCD68 IHCには、マクロファージマーカータンパク質に対する少なくとも1つの抗体、例えば、少なくとも1つの抗CD68抗体が必要である。IHCに適切な多くの抗CD68抗体が市販されている。例えば、適切な抗体は、Dako North America, Inc. (カーペンテリア、カリフォルニア州)、Abcam (ケンブリッジ、マサチューセッツ州)、Abnova (ウォールナット、カリフォルニア州)、R&D Systems (ミネアポリス、ミネソタ州)、またはInvitrogen (カールズバッド、カリフォルニア州)から購入することができる。標準的な技術を用いて、抗CD68抗体は、パラフィン包埋され凍結された腫瘍切片を含む、腫瘍から得た切片、例えば5ミクロンの切片内の、CD68タンパク質の存在を検出するために用いることができる。典型的には、腫瘍切片は、腫瘍材料の収集および保存の最初のプロセスにおいて固定されたタンパク質の抗原性構造を取り戻すような方法で、最初に処理される。スライドは、次いで、抗CD68検出抗体による非特異的な結合を防ぐためにブロックされる。CD68タンパク質の存在が、次いで、CD68タンパク質への抗CD68抗体の結合によって検出される。検出(一次)抗体は、直接的にまたは間接的に、例えば、検出(一次)抗体を特異的に認識する二次抗体またはポリマーを介して、酵素に連結する。典型的には、腫瘍切片は、ステップの間に、ウシ血清アルブミンなどの非特異的タンパク質で洗浄およびブロックされる。スライドは、可視的なシグナルを生じさせるために、適切な酵素基質を用いて発色させられる。試料は、ヘマトキシリンで対比染色することができる。

10

20

#### 【0070】

他のマクロファージマーカータンパク質、例えば、CCR2、CD14、CD163、CSF1R、およびMSR1、ならびに他のマクロファージ特異的マーカータンパク質の発現が、各マクロファージマーカータンパク質に特異的な抗体を用いる類似の様式でIHCによって検出され得ることが、理解される。

#### 【0071】

##### データ解釈

腫瘍についてのマクロファージスコアは、閾値スコアに関して解釈することができる。閾値スコア以上のマクロファージスコア、またはCD68などの特定のバイオマーカーの発現レベルは、アキシチニブなどのVEGFR阻害剤での治療に対して感受性(応答性)である可能性が高い腫瘍を予測するものとして解釈することができる。あるいは、閾値スコア以下のマクロファージスコア、またはCD68などの特定のバイオマーカーの発現レベルは、アキシチニブなどのVEGFR阻害剤での治療に対して耐性(非応答性)である可能性が高い腫瘍を予測するものとして解釈することができる。

30

#### 【0072】

マクロファージスコアまたはCD68発現レベルの最適閾値は、閾値決定分析を行うことによって経験的に決定(または少なくとも概算)することができる。好ましくは、閾値決定分析には、受信者動作特性(ROC)曲線分析が含まれる。ROC曲線分析は、確立された統計技術であり、その適用は、当技術分野における通常の技術の範囲内である。ROC曲線分析の考察については、全般的に、Zweigら、1993、「Receiver operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine」、Clin. Chem. 39: 561~577、およびPepe、2003、「The statistical evaluation of medical tests or classification and prediction」、Oxford Press、New Yorkを参照されたい。

40

#### 【0073】

マクロファージスコア、CD68発現レベル、および最適閾値スコアは、腫瘍タイプごとに変化し得る。したがって、閾値決定分析は、好ましくは、本開示を用いて試験されるあらゆる所与の腫瘍タイプを代表する1つまたは複数のデータセットについて行われる。

50

閾値決定分析に用いられるデータセットには、(a) 実際の応答データ（応答または非応答）、および (b) 腫瘍の群から得た各腫瘍試料についてのマクロファージスコアまたは CD68 発現レベルが含まれる。所与の腫瘍タイプに関してマクロファージスコアまたは CD68 発現レベルの閾値が決定されると、その閾値は、その腫瘍タイプの腫瘍から得たマクロファージスコアまたは CD68 発現レベルを解釈するために適用され得る。

【0074】

ROC 曲線分析は、以下のように行うことができる。閾値以上のマクロファージスコアまたは CD68 発現レベルを有するあらゆる試料を、応答者（感受性）として同定する。あるいは、閾値以下のマクロファージスコアまたは CD68 発現レベルを有するあらゆる試料を、非応答者（耐性）として同定する。試験した試料セットから得た全てのマクロファージスコアまたは CD68 発現レベルについて、「応答者」および「非応答者」（仮判定）を、そのスコアを閾値として用いて分類する。このプロセスによって、データセットについての実際の応答データに対する仮判定の比較を介して、各潜在的閾値についての TPR（y ベクトル）および FPR（x ベクトル）の計算が可能になる。次いで、TPR ベクトルおよび FPR ベクトルを用いてドットプロットを作成することによって、ROC 曲線を構築する。ROC 曲線が、(0, 0) 点から (1, 0.5) 点まで対角線よりも上にあれば、このことは、マクロファージ試験の結果がランダムよりも良好な試験であることを示す。

10

【0075】

ROC 曲線は、最良の動作点を同定するために用いることができる。最良の動作点は、偽陰性のコストに対して重み付けされた偽陽性のコスト間の最良のバランスをもたらす点である。これらのコストは、等しい必要はない。ROC 空間における点  $x$ ,  $y$  での分類の平均予想コストは、以下の式によって決定される。

20

$$C = (1 - p) \text{アルファ} * x + p * \text{ベータ} (1 - y)$$

式中、

アルファ = 偽陽性のコスト、

ベータ = 陽性を見逃す（偽陰性の）コスト、および

$p$  = 陽性のケースの割合。

【0076】

偽陽性および偽陰性は、アルファおよびベータに異なる値を割り当てることによって異なって重み付けされ得る。例えば、非応答者であるさらなる患者を治療するコストで応答者群にさらなる患者を含めることを決定する場合、アルファに対してさらなる重み付けをしてよい。このケースにおいて、偽陽性および偽陰性のコストは同一である（アルファはベータに等しい）ことが仮定される。したがって、ROC 空間における点  $x$ ,  $y$  での分類の平均予想コストは、

30

$$C' = (1 - p) * x + p * (1 - y)$$

である。最小の  $C'$  は、偽陽性および偽陰性 ( $x$ ,  $y$ ) の全ての対を用いた後に計算することができる。最適なスコア閾値は、 $C'$  での ( $x$ ,  $y$ ) のスコアとして計算される。

【0077】

腫瘍がアキシチニブなどの VEGFR 阻害剤に対して感受性であるかまたは耐性であるかを予測することに加えて、マクロファージスコアまたは CD68 発現レベルは、腫瘍が感受性または耐性である可能性がどの程度高いかの、およびその、しかし有用な指標を提供する。

40

【0078】

試験キット

本開示には、本開示の方法を行うための特定の構成要素を含む診断試験キットが含まれる。診断試験キットは、診断アッセイの性能における利便性、スピード、および再現性を高める。例えば、典型的な、qRT-PCR に基づく本開示の実施形態において、基本的な診断試験キットには、マクロファージマーカー、例えば CD68 の発現を分析するための PCR プライマーが含まれる。他の実施形態において、より精密な試験キットは、PC

50

Rプライマーだけではなく、緩衝液、試薬、およびPCR技術を用いてCD68発現レベルを測定するための詳細な指示も含む。いくつかの実施形態において、キットには、試験プロトコル、および、RNA試料を除く、試験に必要な全ての消耗構成要素が含まれる。

#### 【0079】

典型的な、DNAマイクロアレイに基づく本開示の実施形態において、試験キットには、特定の機器と共に用いるように設計されたマイクロ流体カード（アレイ）が含まれる。場合によって、マイクロ流体カードは、マクロファージマーカー遺伝子の発現の測定のために特別に設計された、オーダーメイドの装置である。このような特注のマイクロ流体カードは、市販されている。例えば、TaqMan Arrayは、Applied Biosystems 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems、フォスターシティ、カリフォルニア州)と共に用いるために設計された、384ウェルのマイクロ流体カード（アレイ）である。典型的な流体カードには、CCR2、CD14、CD68、CD163、CSF1R、および/またはMSR1の発現を測定するためのプローブのあらゆる組み合わせと、例えばデータの正規化のための必要な対照または標準とが含まれ得る。他のマクロファージマーカータンパク質もまた、本開示を実施するための流体カード上に含まれ得る。

10

#### 【0080】

本開示のいくつかの実施形態において、試験キットは、IHCによって腫瘍のマクロファージ含有量を決定するための材料を含む。IHCキットは、例えば、ヒトマクロファージマーカーに対する一次抗体、例えばマウス抗ヒトCD68抗体、およびレポーター酵素、例えばホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートした二次抗体を含み得る。いくつかの実施形態において、二次抗体は、一次抗体を特異的に認識する、コンジュゲートしたポリマーで置き換えられる。

20

#### 【実施例】

#### 【0081】

本開示を、以下の実施例によってさらに説明するが、これは、いかなる方法によっても本開示の範囲または内容を限定するものとして解釈されるべきではない。

#### 【0082】

##### (実施例1)

スライド対ブロックによる、CD3およびCD68陽性細胞のパーセントおよび密度  
この研究は、作用物質スニチニブ、ベバシズマブ+IFN、テムシロリムス、またはサイトカインの1つまたは複数を含む1つの事前の全身の第一選択レジメンが失敗した後の、転移性腎細胞癌腫(mRCC)患者における、アキシチニブ対ソラフェニブの、2群の、ランダム化された、非盲検の、多施設の、第3相研究であった。全体で、723人のmRCC患者がランダム化され、この研究に参加し、そのうち52人のアキシチニブ治療した患者が、免疫組織化学(IHC)分析について評価可能であり、さらに、52人の患者の33人が、Sutent(登録商標)で事前に治療された。

30

#### 【0083】

図1において示されるように、IHC分析に含められた患者の大部分は、白人(患者の90.4%)、男性(患者の69.2%)、ならびに北アメリカ出身(患者の57.7%)およびヨーロッパ出身(32.7%)であった。年齢、身長、および体重の全体的な平均(標準偏差)は、それぞれ、58.3(11.0)歳、173.0(10.0)cm、および84.6(19.1)kgであった。全患者は、0(患者の51.9%)または1(患者の48.1%)のECOGパフォーマンスステータスを有していた。全体で、Memorial Sloan-Kettering Cancer Center(MSKCC)の、生存についての予後群因子モデルについて、患者の23.1%が良好と分類され、患者の34.6%および42.3%がそれぞれ中間および不良と分類された。さらに、MSKCCリスク群を、高ラクテートデヒドロゲナーゼ(>1.5x正常の上限)、低血清ヘモグロビン(正常の下限未満)、高補正血清カルシウム(>10mg/dL)、および事前の腎臓摘出の不存在という4つのリスク因子を用いて導いた。

40

50

## 【0084】

52人の患者全員が、CD3およびCD68の両方について評価可能であった。52人のCD3およびCD68が評価可能な患者のうち、分析のために、26人はホルマリン固定されパラフィン包埋された(FPE)腫瘍ブロックを提供し、26人はスライドを提供した。Mosaic Laboratoriesから、ヒト正常物およびヒト癌を代表するFPE材料が提供された。標本は、Office of Human Research Protectionによって規定された「Exemption from Human Subject Research」を規定するガイドラインの下で、残存の、非特定化された、または匿名化されたヒト試料の、インビトロ分析への使用を可能にする、IRBによって審査されたプロトコル(MOS001)の下で生産された。CD68マウスモノクローナルKP1抗体(カタログ番号M0814、ロット番号46406、使用期限:2011年9月)をDako(カーペンテリア、カリフォルニア州、米国)から購入し、添付の文書に従って2~8で保存した。マウスIgGアイソタイプ対照抗体(ロット番号37211、使用期限:2010年7月)をDakoから購入し、添付の文書に従って2~8で保存した。IHCを、Mosaic LaboratoriesのSOPに従って行った。CD68 IHCアッセイを設計し、「homebrew」クラスI試験検証のためのCLIAガイドラインに適合することを確認した。

10

## 【0085】

染色は病理学者によって評価され、反応性の評価は、CD68染色の細胞局在化、染色強度、細胞内局在化、および目的の組織タイプの主な構成要素における染色細胞のパーセンテージの組み合わせを伴う。顕微鏡写真(20倍倍率)を、Nikon Eclipse 50i顕微鏡に付属した、Spot Insight QE Model 4.2冷却電荷結合素子カメラ(Diagnostic Instruments、スターリングハイツ、ミシガン州、米国)で得た。

20

## 【0086】

CD3およびCD68陽性細胞の平均パーセンテージは、スライドにおいてブロックよりもわずかに低く、CD3では13.61%対17.95%であり、CD68では5.83%対8.21%であった。同様に、ブロックよりもわずかに低い平均細胞密度が、スライドにおいて観察され、CD3では489.15細胞/mm<sup>2</sup>対590.50細胞/mm<sup>2</sup>であり、CD68では0.08細胞/mm<sup>2</sup>対0.13細胞/mm<sup>2</sup>であった(図2)。

30

## 【0087】

(実施例2)

より高いCD68発現レベルは、良好なORRおよびPFSと正に相関するが、OSとはしない

IHCバイオマーカー分析では、少なくとも1用量の研究治療を受けた全患者を含む、バイオマーカー分析セットを用いた。PFS、OS、および客観的奏効率(ORR)という有効性評価項目を分析した。要約統計量を、応答カテゴリー(各マーカーについて、完全奏効[CR]+部分奏効[PR]対、安定状態[SD]+増悪[PD])によって、陽性細胞のパーセントおよび密度について提供した。ウィルコクソンの順位和検定を行って、応答カテゴリー間の差について試験した。フィッシャーの正確確率検定を用いて、中央値をカットオフ点として用いて、応答カテゴリーとバイオマーカー層との間の関連について試験した。OSおよびPFSの分布を、カプラン・マイヤー法を用いて、カットオフ点としてのバイオマーカーの中央値によって、バイオマーカー層の間で比較し、p値は、いずれの層においても、N<10である場合には提示されなかった。推定ハザード比(HR)およびその両側の95%信頼区間(CI)、ならびに中央値イベント時刻およびその両側の95%CIが報告された。腫瘍容積における最良の応答パーセントの変化を、ウィルコクソンの順位和検定を用いて、カットオフ点としての中央値を用いて、バイオマーカー層の間で比較した。

40

## 【0088】

50

バイオマーカー層の間の、ORR、PFS、およびOSの分析における有意な試験結果 ( $p < 0.05$ ) について、受信者動作特性 (ROC) 曲線を作成して、患者の選択マーカーとしての有用性の潜在能力について評価した。ROC分析を、患者の客観的2値応答 (CR + PR 対 SD + PD) の予測における連続的診断マーカーとしてのベースラインCD68値に基づいて行った。時間依存的な臨床転帰であるPFSおよびOSについて、ROC(t)と呼ばれる(tは目的の時点を示す)時間依存的なROCが、カプラン・マイヤー estimator 20を用いる生存転帰の予測において、ベースラインCD68値を分析するために適用された。臨床転帰を予測するためのCD68値の最適なカットオフ点を、感度および特異度の値が共に1である点からの距離が最小であるROC曲線上の点から得た。AUCを、台形公式を用いて計算した。

10

## 【0089】

より長いPFSおよびより高いORRに関連する、より高いCD68発現が観察されたが、CD68の発現と患者におけるOSとの間に相関は観察されなかった。前治療にかかわらず、CD68中央値以上(カットオフ = 5.21%の陽性細胞または0.08細胞/mm<sup>2</sup>)の患者におけるPFS中央値は、両カットオフ点について12.0か月であり、それに対し、全患者を前治療にかかわらず評価した場合、バイオマーカー中央値未満の患者ではそれぞれ3.7か月および3.8か月であった(HR = 0.42、ログランクp値0.01)(図3)。しかし、Sutent(登録商標)で前治療された患者では、PFSとの類似であるが統計的に有意ではない傾向が観察された(図4)。前治療にかかわらず、またはSutent(登録商標)で前治療された患者についての場合のいずれでも、CD3のレベルとPFSとの間に統計的に有意な関連はなかった(図5および6)。

20

## 【0090】

さらに、前治療にかかわらず、CD68中央値以上(カットオフ = 5.21%の陽性細胞または0.08細胞/mm<sup>2</sup>)の患者におけるOS中央値は、20.0か月および22.6か月であり、それに対し、全患者を前治療にかかわらず評価した場合、バイオマーカー中央値未満の患者ではそれぞれ21.8か月または17.8か月であった(全てのケースにおいてHR > 0.6であり、統計的に有意ではない)(図7)。Sutent(登録商標)で前治療された患者では、OSとの統計的に有意な関連は観察されなかった。治療にかかわらず、またはSutent(登録商標)で前治療された患者において、CD3のレベルとOSとの間に統計的に有意な関連はなかった(図8)。0.559というAUC値は、CD68レベルの予測値において信頼性が低いことを示すものの、ROC分析を用いて、良好なOSが、より高いCD68細胞数を有する患者で観察された(図9)。

30

## 【0091】

最後に、前治療にかかわらず、陽性細胞のパーセンテージ(p値 = 0.0059)または細胞密度(p値 = 0.0071)によって測定されたCD68レベルは、非応答者(SD + PD)に対して応答者(CR + PR)において2倍高かった(図10)。Sutent(登録商標)で事前に治療された患者では、陽性細胞のパーセンテージ(p値 = 0.407)または細胞密度(p値 = 0.0762)によって測定されたCD68レベルは、非応答者に対して応答者において2倍高かった(図11)。バイオマーカーが評価可能な患者についてのORR分析において、CD68の陽性細胞のパーセントおよび密度がより高い患者は、腫瘍の客観的応答が見られる可能性がより高い傾向にある。ROC分析は、CD68の陽性細胞のパーセンテージおよび密度でそれぞれ0.818および0.795の予測正確度を示す。0.791および0.784というAUCは、CD68バイオマーカーを用いるORRについての高い全体的な予測正確度を示す。ORRを予測するための最適なカットオフ点は、CD68陽性細胞のパーセンテージおよび細胞密度でそれぞれ9.42%および0.13細胞/mm<sup>2</sup>であった。

40

## 【0092】

同様の結果が、事前のSutent(登録商標)治療を受けた、バイオマーカーが評価可能な患者についてのORR分析において見られた。CD68陽性細胞のパーセンテージ

50

および密度がより高い患者は、腫瘍の客観的応答が見られる可能性がより高い傾向にある。ROC分析は、CD68陽性細胞のパーセンテージおよび密度でそれぞれ0.777および0.852の予測正確度を示す。0.809および0.764というAUCは、CD68バイオマーカーを用いるORRについての高い全体的な診断正確度を示す。ORRを予測するための最適なカットオフ点は、CD68陽性細胞のパーセンテージおよび密度でそれぞれ5.20%および0.16細胞/mm<sup>2</sup>である。

【図1】

図1

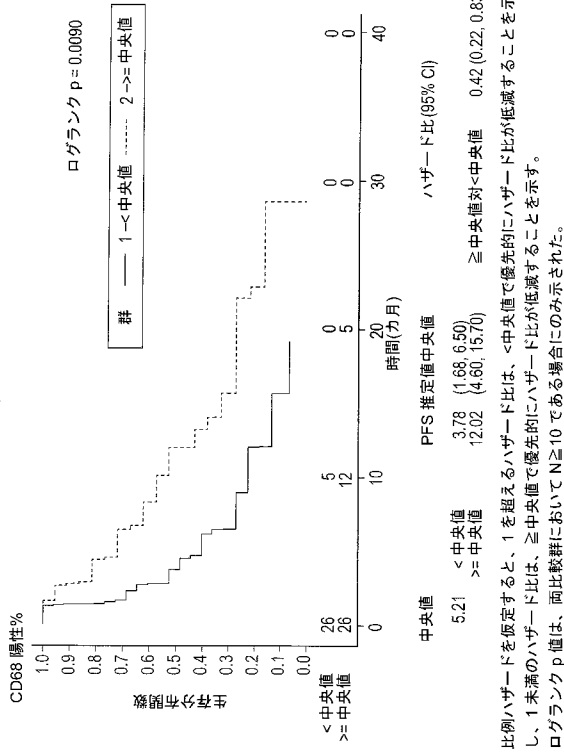
	AG-013736 5.0 mg (BID)		
	男性	女性	全体
対象の数(%)	38	14	52
年齢(歳)			
<65	25 (65.8)	11 (78.6)	36 (69.2)
>=65	13 (34.2)	3 (21.4)	16 (30.8)
中央値	61.5	54.0	61.0
平均	59.2	55.6	58.3
SD	10.0	13.5	11.0
範囲	39-82	22-78	22-82
人種			
白人	35 (92.1)	12 (85.7)	47 (90.4)
アジア人	2 (5.3)	2 (14.3)	4 (7.7)
その他	1 (2.6)	0	1 (1.9)
体重(kg)			
中央値	87.5	67.5	84.8
平均	90.0	69.8	84.6
SD	15.4	20.8	19.1
範囲	121.2	41.0-106.2	41.0-121.2
N	38 (100.0)	14 (100.0)	52 (100.0)
身長(cm)			
中央値	177.3	159.0	174.6
平均	177.9	159.6	173.0
SD	5.7	5.8	10.0
範囲	169.2-194.0	151.5-174.0	151.5-194.0
N	38 (100.0)	14 (100.0)	52 (100.0)
ECOG:			
0	20 (52.6)	7 (50.0)	27 (51.9)
1	18 (47.4)	7 (50.0)	25 (48.1)
地理的範囲			
北アメリカ	23 (60.5)	7 (50.0)	30 (57.7)
ヨーロッパ	13 (34.2)	4 (28.6)	17 (32.7)
アジア	1 (2.6)	2 (14.3)	3 (5.8)
その他	1 (2.6)	1 (7.1)	2 (3.8)
MSKCC:			
良好	8 (21.1)	4 (28.6)	12 (23.1)
中間	14 (36.8)	4 (28.6)	18 (34.6)
不良	16 (42.1)	6 (42.9)	22 (42.3)

【図2】

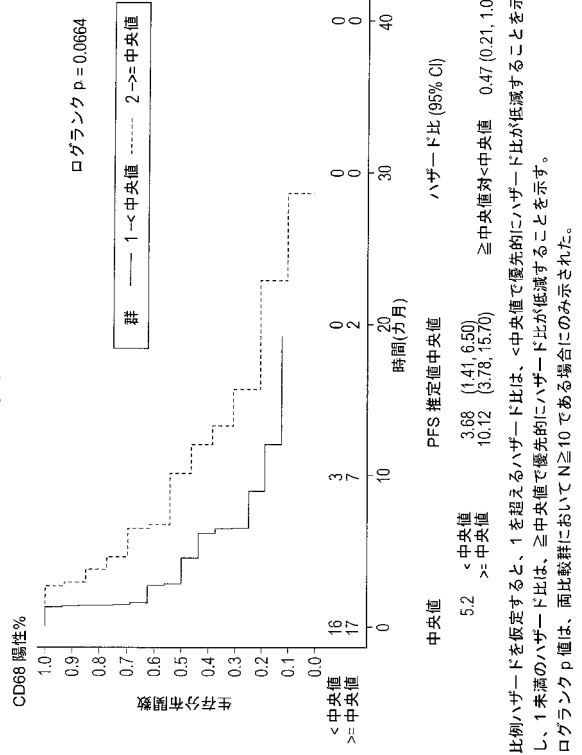
図2

	AG-013736 5.0 mg (BID)		
	スライド N=26	ブロック N=26	全体 N=52
バイオマーカー			
CD3 陽性%			
n	26	26	52
平均	13.61	17.95	15.78
標準偏差	10.328	13.031	11.846
%CV	75.9	72.6	75.1
第1四分位数	5.00	7.00	7.00
中央値	11.37	15.21	12.66
第3四分位数	20.50	29.40	24.00
(最小、最大)	(0.57, 31.1)	(0.08, 44.85)	(0.08, 44.85)
CD3 細胞密度			
n	26	26	52
平均	489.15	590.50	539.83
標準偏差	516.170	513.747	512.448
%CV	105.5	87.0	94.9
第1四分位数	77.00	264.00	168.00
中央値	336.50	414.50	399.50
第3四分位数	801.00	775.00	781.50
(最小、最大)	(14,2241)	(1,2056)	(1,2241)
CD68 陽性%			
n	26	26	52
平均	5.83	8.21	7.02
標準偏差	6.456	6.859	6.704
%CV	110.8	83.5	95.5
第1四分位数	1.00	4.00	2.80
中央値	3.94	7.08	5.21
第3四分位数	8.10	10.00	9.70
(最小、最大)	(0.2, 20.92)	(2.48, 36.89)	(0.2, 36.89)
CD68 細胞密度			
n	26	26	52
平均	0.08	0.13	0.11
標準偏差	0.087	0.101	0.096
%CV	103.3	80.5	91.2
第1四分位数	0.00	0.10	0.00
中央値	0.05	0.10	0.08
第3四分位数	0.10	0.20	0.20
(最小、最大)	(0, 0.29)	(0.03, 0.53)	(0, 0.53)

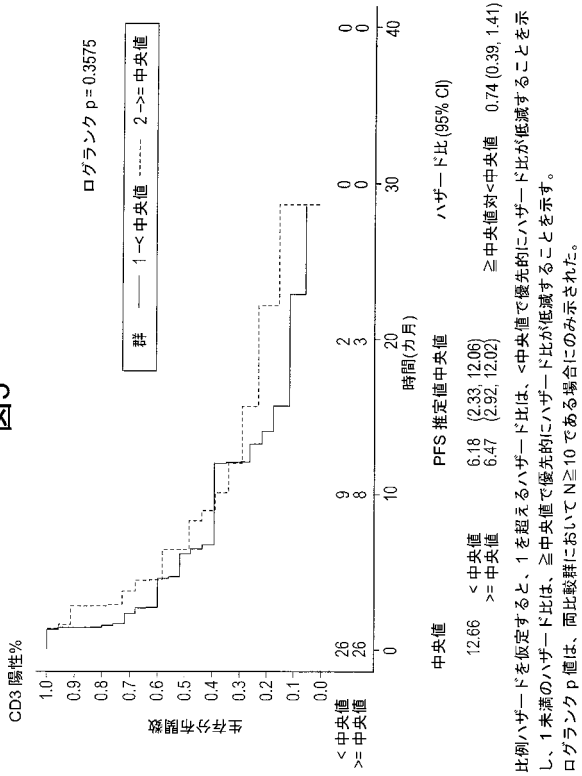
【 図 3 】



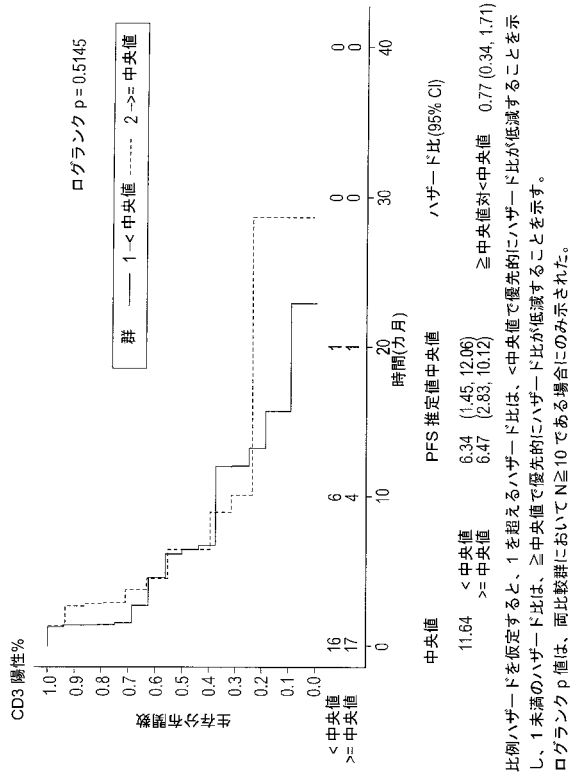
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】

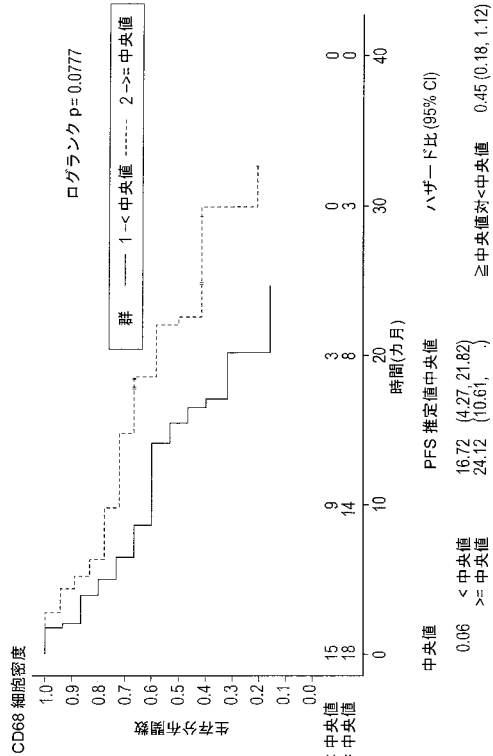


【 図 7 】

変数	OS 中央値(カ月)					
	BM 中央値	< BM 中央値 (95% CI)	≥ BM 中央値 (95% CI)	ハザード比 (95% CI)		
CD3 % 陽性	12.66	20.0 (11.53, 32.36)	26	21.8 (9.33, 23.82)	0.5668	1.222 (0.615, 2.426)
CD3 細胞密度	399.50	19.2 (10.61, 32.36)	26	22.6 (13.08, 24.41)	0.8153	0.922 (0.465, 1.826)
CD68 % 陽性	5.21	21.8 (11.53, .)	26	20.0 (10.61, 32.36)	0.9901	0.996 (0.497, 1.994)
CD68 細胞密度	0.08	17.8 (7.03, 24.41)	29	22.6 (13.47, .)	0.1733	0.619 (0.308, 1.243)

比例ハザードを仮定すると、1を超えるハザード比は、<中央値で優先的にハザード比が低減することを示し、1未満のハザード比は、≥中央値で優先的にハザード比が低減することを示す。  
 ログランクp値は、両比較群においてN≥10である場合にのみ示され、ハザード比統計は、両比較群においてN≥5である場合にのみ示された。しかし、ログランクp値およびハザード比は、ゼロ事象がいずれかの群において観察された場合には除外された。

【 図 9 】



比例ハザードを仮定すると、1を超えるハザード比は、<中央値で優先的にハザード比が低減することを示し、1未満のハザード比は、≥中央値で優先的にハザード比が低減することを示す。  
 ログランクp値は、両比較群においてN≥10である場合にのみ示された。

【 図 8 】

変数	OS 中央値(カ月)					
	BM 中央値	< BM 中央値 (95% CI)	≥ BM 中央値 (95% CI)	ハザード比 (95% CI)		
CD3 % 陽性	11.64	21.4 (6.87, 32.36)	17	20.0 (5.65, 23.82)	0.6444	1.225 (0.517, 2.900)
CD3 細胞密度	334.00	19.2 (10.61, 32.36)	17	21.8 (4.73, 24.41)	0.6802	1.198 (0.508, 2.824)
CD68 % 陽性	5.20	18.2 (7.00, .)	17	23.8 (5.65, 32.36)	0.6576	0.818 (0.337, 1.989)
CD68 細胞密度	0.06	15 (4.27, 21.82)	18	24.1 (10.61, .)	0.0777	0.451 (0.182, 1.116)

比例ハザードを仮定すると、1を超えるハザード比は、<中央値で優先的にハザード比が低減することを示し、1未満のハザード比は、≥中央値で優先的にハザード比が低減することを示す。  
 ログランクp値は、両比較群においてN≥10である場合にのみ示され、ハザード比統計は、両比較群においてN≥5である場合にのみ示された。しかし、ログランクp値およびハザード比は、ゼロ事象がいずれかの群において観察された場合には除外された。

【 図 10 】

バイオマーカー	AG-013736 5.0 mg (BD)		*P 値	全体 N=44
	CR+PR N=11	SD+PD N=33		
CD3 陽性%				
n	11	33	0.1364	44
平均	19.54	12.93		14.58
標準偏差	13.168	10.265		11.274
%CV	67.4	79.4		77.3
第1四分位数	9.20	5.00		6.00
中央値	11.20	11.60		11.40
第3四分位数	30.20	19.20		19.90
(最小、最大)	(5.01, 44.85)	(0.57, 39.15)		(0.57, 44.85)
CD3 細胞密度				
n	11	33	0.174	44
平均	683.18	455.39		512.34
標準偏差	635.836	479.921		524.766
%CV	93.1	105.4		102.4
第1四分位数	223.00	93.00		162.00
中央値	415.00	295.00		356.00
第3四分位数	936.00	643.00		715.50
(最小、最大)	(159, 2241)	(14, 2056)		(14, 2241)
CD68 陽性%				
n	11	33	0.0059	44
平均	10.21	4.58		5.98
標準偏差	6.206	4.235		5.328
%CV	60.8	92.6		89.0
第1四分位数	4.40	1.30		2.10
中央値	10.02	3.73		4.34
第3四分位数	15.50	6.50		8.30
(最小、最大)	(1.18, 20.66)	(0.2, 20.92)		(0.2, 20.92)
CD68 細胞密度				
n	11	33	0.0071	44
平均	0.15	0.07		0.09
標準偏差	0.085	0.055		0.072
%CV	58.3	82.0		82.4
第1四分位数	0.10	0.00		0.00
中央値	0.16	0.05		0.08
第3四分位数	0.20	0.10		0.10
(最小、最大)	(0.02, 0.29)	(0, 0.22)		(0, 0.29)

\*ウィルコクソンの順位と検定のP値は、両側t近似値である。

## 【 図 1 1 】

AG-013736  
5.0 mg (BID)

バイオマーカー	CR+PR N=05	SD+PD N=22	*P 値	全体 N=27
<b>CD3 陽性%</b>				
n	5	22	0.1912	27
平均	17.83	11.88		12.98
標準偏差	10.975	9.995		10.235
%CV	61.6	84.1		78.8
第 1 四分位数	9.20	4.50		5.00
中央値	11.20	8.25		9.16
第 3 四分位数	29.40	18.60		19.40
(最小、最大)	(9.15, 30.21)	(0.57, 39.15)		(0.57, 39.15)
<b>CD3 細胞密度</b>				
n	5	22	0.4071	27
平均	744.20	410.23		472.07
標準偏差	862.342	422.772		525.592
%CV	115.9	103.1		111.3
第 1 四分位数	223.00	93.00		111.00
中央値	401.00	267.50		271.00
第 3 四分位数	697.00	643.00		697.00
(最小、最大)	(159,2241)	(14,1744)		(14,2241)
<b>CD68 陽性%</b>				
n	5	22	0.0407	27
平均	10.15	3.52		4.74
標準偏差	7.429	2.611		4.570
%CV	73.2	74.3		96.4
第 1 四分位数	5.40	0.90		1.00
中央値	10.81	3.47		3.92
第 3 四分位数	12.70	5.20		6.50
(最小、最大)	(1.18, 20.66)	(0.2, 8.71)		(0.2, 20.66)
<b>CD68 細胞密度</b>				
n	5	22	0.0762	27
平均	0.14	0.06		0.07
標準偏差	0.102	0.045		0.066
%CV	74.0	80.8		92.6
第 1 四分位数	0.10	0.00		0.00
中央値	0.16	0.05		0.05
第 3 四分位数	0.20	0.10		0.10
(最小、最大)	(0.02, 0.28)	(0, 0.16)		(0, 0.28)

\*ウィルコクソンの順位検定の P 値は、両側 t 近似値である。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	31/4439
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	11/00
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	1/04
		A 6 1 P	1/18

(72)発明者 ジーン フランソア アンドレ マーティニ  
 アメリカ合衆国 9 2 0 0 9 カリフォルニア州 カールスバッド市 サーキュロ・セクオイア  
 7 4 2 0

(72)発明者 ジャマル クリスト タラツイ  
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 4 カリフォルニア州 サンディエゴ市 ペソス・プレイス 1 0 8 6  
 7

(72)発明者 ジェームス アンドリュー ウリアムズ  
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サンディエゴ市 サイエンス・センター・ドラ  
 イブ 1 0 5 5 5

F ターム(参考) 2G045 AA24 AA26 BA14 BB24 CB01 CB02 DA14 DA36 FA16 FA19  
 FA29 FB01 FB03 FB12 GB01 GC15 JA01  
 4B063 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS07 QS33  
 QX01  
 4C086 AA01 AA02 BC37 GA07 GA08 MA01 MA04 NA14 ZA59 ZA66  
 ZA81 ZB26

【外国語明細書】

2015210268000001.pdf

专利名称(译)	癌治疗		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015210268A</a>	公开(公告)日	2015-11-24
申请号	JP2015087291	申请日	2015-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞公司		
[标]发明人	ジーンフランソアアンドレマーティニ ジャマルクリストタラツイ ジェームスアンドリュウウリアムズ		
发明人	ジーン—フランソア アンドレ マーティニ ジャマル クリスト タラツイ ジェームス アンドリュウ ウリアムズ		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N33/48 C12Q1/04 A61K31/4439 A61P35/00 A61P15/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P1/04 A61P1/18		
CPC分类号	A61K31/4439 C07K16/2896 G01N33/57484 G01N33/57492 G01N2333/70596 A61P1/04 A61P1/18 A61P11/00 A61P13/12 A61P15/00 G01N2800/52 A61K39/395 G01N33/574		
FI分类号	G01N33/574.D G01N33/53.Y G01N33/53.D G01N33/48.P C12Q1/04 A61K31/4439 A61P35/00 A61P15/00 A61P11/00 A61P13/12 A61P1/04 A61P1/18		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FA19 2G045/FA29 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GB01 2G045/GC15 2G045/JA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS07 4B063/QS33 4B063/QX01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC37 4C086/GA07 4C086/GA08 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA81 4C086/ZB26		
代理人(译)	四本 能尚 宫泽顺子 佐藤 真纪		
优先权	61/983951 2014-04-24 US		
其他公开文献	JP2015210268A5 JP6603474B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供预测人类肿瘤是否易受阿西替尼治疗的诊断方法，以及治疗人类肿瘤的方法。该方法基于测量肿瘤组织样品中CD68多肽表达的水平。可以使用免疫组织化学测量CD68表达水平，所述免疫组织化学可以确定肿瘤内CD68阳性细胞的百分比和CD68阳性细胞的密度。点域

(21) 出願番号	特願2015-87291 (P2015-87291)	(71) 出願人	593141953 ファイザー・インク
(22) 出願日	平成27年4月22日 (2015. 4. 22)		アメリカ合衆国10017ニューヨーク州
(31) 優先権主張番号	61/983, 951		ニューヨーク市イースト・フォーティーセ
(32) 優先日	平成26年4月24日 (2014. 4. 24)		カンド・ストリート235
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100133927 弁理士 四本 能尚
		(74) 代理人	100137040 弁理士 宮澤 純子
		(74) 代理人	100147186 弁理士 佐藤 真紀
		(74) 代理人	100174447 弁理士 龍田 美幸

最終頁に続く