

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6312660号
(P6312660)

(45) 発行日 平成30年4月18日(2018.4.18)

(24) 登録日 平成30年3月30日(2018.3.30)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/574 D
	GO 1 N 33/53 K

請求項の数 4 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2015-517145 (P2015-517145)	(73) 特許権者 000207827 大鵬薬品工業株式会社 東京都千代田区神田錦町1-27
(86) (22) 出願日 平成26年5月16日(2014.5.16)	(74) 代理人 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(86) 国際出願番号 PCT/JP2014/063085	(72) 発明者 坂本 一樹 茨城県つくば市大久保3 大鵬薬品工業株式会社内
(87) 国際公開番号 W02014/185528	(72) 発明者 伊藤 雅信 東京都千代田区神田錦町1丁目27番地 大鵬薬品工業株式会社内
(87) 国際公開日 平成26年11月20日(2014.11.20)	審査官 伊藤 裕美
審査請求日 平成28年8月5日(2016.8.5)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-105082 (P2013-105082)	
(32) 優先日 平成25年5月17日(2013.5.17)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TK 1 タンパク質の発現が亢進した結腸直腸癌患者に対する治療効果予測方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記工程(1)~(3)を含む、結腸直腸癌患者におけるトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法の治療効果を予測するための方法:

(1) 当該患者から採取された生体試料に含まれる腫瘍細胞におけるTK 1タンパク質の発現を免疫組織化学法により検出する工程、

(2) 上記工程(1)で得られた検出結果から、腫瘍細胞を陽性細胞と陰性細胞に分類し、腫瘍細胞における陽性細胞の占有率を算出する工程、及び

(3) 上記工程(2)で得られた算出結果から、当該占有率が30%以上である場合、当該患者に対するトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高い基準とする工程。

10

【請求項 2】

陽性細胞が、染色強度に基づく0、1+、2+及び3+の4段階評価の判定スコアのうち2+又は3+と判定された細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

結腸直腸癌患者が、標準療法に不応又は不耐の結腸直腸癌患者である、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

結腸直腸癌患者におけるトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1:0.5で含有

20

する抗腫瘍剤を用いた化学療法の治療効果を予測するための、TK1タンパク質を特異的に認識する抗体を試薬として含有するキットであって、下記工程(1)~(3)により治療効果を予測することを特徴とするキット：

(1)当該患者から採取された生体試料に含まれる腫瘍細胞におけるTK1タンパク質の発現を免疫組織化学染色法により検出する工程、

(2)上記工程(1)で得られた検出結果から、腫瘍細胞を陽性細胞と陰性細胞に分類し、腫瘍細胞における陽性細胞の占有率を算出する工程、及び

(3)上記工程(2)で得られた算出結果から、当該占有率が30%以上である場合、当該患者に対するトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測する工程。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2013年5月17日に出願された、日本国特許出願第2013-105082号明細書(その開示全体が参照により本明細書中に援用される)に基づく優先権を主張する。

【0002】

本発明は、トリフルリジン(以下、「FTD」とも称す)とチピラシル塩酸塩(以下、「TPI」とも称す)をモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤を使用する化学療法に対する治療効果を予測する方法、抗腫瘍剤及びキットに関する。

20

【背景技術】

【0003】

結腸直腸癌患者に対する化学療法としては、フルオロピリミジン系抗腫瘍剤を含む化学療法(例えば、5-フルオロウラシル(5-FU)とロイコポリン(LV)の併用)をベースに、さらにイリノテカン又はオキサリプラチンを併用した多剤併用療法(FOLFIRI、FOLFOX等)が標準療法として実施されており、一定の治療効果が得られている(非特許文献1)。しかしながら、5-FU、イリノテカン、オキサリプラチンを含む標準療法に対して不応又は不耐となってしまう結腸直腸癌患者に対しては、生存期間を有意に延長できる抗腫瘍剤が非常に限られている。

30

【0004】

一方、新たな結腸直腸癌に対する抗腫瘍剤としてFTD及びTPIをモル比1:0.5で含有する配合剤(以下、「FTD・TPI配合剤」という場合がある。)が開発中である。FTD・TPI配合剤は、抗腫瘍効果を示す有効成分であるFTDと、チミジンホスホリラーゼ(TP)によるFTDの分解を抑制する成分であるTPIとを、モル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤であり、FTDによるチミジン酸シターゼ(TS)の阻害、及びチミジンキナーゼ1(TK1)によりリン酸化されたFTDのDNAへの取り込みによって抗腫瘍効果を発揮することが知られている(非特許文献2)。また、FTD・TPI配合剤は、標準療法に不応又は不耐の結腸直腸癌患者を対象とした大規模な臨床試験において、優れた全生存期間の延長が確認されたことから、結腸直腸癌に対する抗腫瘍剤として非常に期待されている(非特許文献3)。

40

【0005】

また、上記のFTD・TPI配合剤の作用機序から、TK1等がFTD・TPI配合剤の治療効果予測因子として期待されていた。しかしながら、標準療法に不応又は不耐の結腸直腸癌患者を対象としたFTD・TPI配合剤の臨床試験において、免疫組織化学的評価法であるHスコア法にてTK1タンパク質の発現を解析したところ、TK1タンパク質の発現と全生存期間とが相関しないことが報告された(非特許文献4)。「Hスコア法」とは、以下の計算式により求められるHスコアに基づく評価法をいう：Hスコア=(染色強度×陽性細胞占有率(%)) (染色強度0:染色なし、1:弱い染色、2:中程度の染色、3:強い染色)(J Clin Pathol. 1995; 48: 876-878

50

)。

【0006】

以上のとおり、結腸直腸癌患者に対する化学療法が精力的に開発されているが、その治療効果は満足できるものではなく、特に標準療法に不応又は不耐の結腸直腸癌患者においては実質的に有効な化学療法が確立されていないのが現状である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】NCCN Clinical Practice Guideline
s in Oncology (NCCN Guidelines™); Colon C 10
ancer (Version 3.2011)、Rectal Cancer (Versi
on 4.2011)

【非特許文献2】Int J Mol Med. 2004; 13(2): 249-55

【非特許文献3】Eur J Cancer. 2011; 47(Suppl. 1): 3
92、#6005.

【非特許文献4】Eur J Cancer. 2011; 47(Suppl. 1): 4
21、#6099.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0008】

本発明は、結腸直腸癌患者に対して、顕著な延命効果を奏し、且つ副作用が少ない化学療法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

前述のとおり、TK1タンパク質の発現とFTD・TPI配合剤の治療効果の相関が否定された状況において、本発明者らは、生体試料の中の全ての腫瘍細胞における陽性細胞(特に、免疫組織化学法による判定スコアが2+又は3+である細胞)の占有率とFTD・TPI配合剤の治療効果の関係性に着目し、当該占有率が30%以上である結腸直腸癌患者は、当該占有率が30%未満である患者と比較して、FTD・TPI配合剤が顕著に 30
奏効しやすいことを見出し、本発明は完成に至った。

【0010】

なお、一般的に、TK1が高発現していると、癌患者の予後が悪いことが知られており、当該占有率が30%以上の時に、FTD・TPI配合剤の治療効果が顕著に高いことは当業者にとって予想外な成果である。

【0011】

すなわち本発明は、以下の方法、抗腫瘍剤及びキットを包含する。

【0012】

項1、下記工程(1)~(3)を含む、結腸直腸癌患者におけるトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法の治療効果を予測 40
する方法:

(1)当該患者から採取された生体試料に含まれる腫瘍細胞におけるTK1タンパク質の発現を免疫組織化学法により検出する工程、

(2)上記工程(1)で得られた検出結果から、腫瘍細胞を陽性細胞と陰性細胞に分類し、腫瘍細胞における陽性細胞の占有率を算出する工程、及び

(3)上記工程(2)で得られた算出結果から、当該占有率が30%以上である場合、当該患者に対するトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測する工程。

【0013】

項2、陽性細胞が、染色強度に基づき2+又は3+と判定された細胞である、項1記載 50

の方法。

【 0 0 1 4 】

項 3、結腸直腸癌患者が、標準療法に不応又は不耐の結腸直腸癌患者である、項 1 又は 2 記載の方法。

【 0 0 1 5 】

項 4、結腸直腸癌患者におけるトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比 1 : 0 . 5 で含有する抗腫瘍剤であって、当該患者が、下記工程 (1) ~ (3) を含む方法により当該抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測された患者であることを特徴とする抗腫瘍剤：

(1) 当該患者から採取された生体試料に含まれる腫瘍細胞における T K 1 タンパク質の発現を免疫組織化学法により検出する工程、

(2) 上記工程 (1) で得られた検出結果から、腫瘍細胞を陽性細胞と陰性細胞に分類し、腫瘍細胞における陽性細胞の占有率を算出する工程、及び

(3) 上記工程 (2) で得られた算出結果から、当該占有率が 3 0 % 以上である場合、当該患者に対するトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比 1 : 0 . 5 で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測する工程。

【 0 0 1 6 】

項 5、結腸直腸癌患者におけるトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比 1 : 0 . 5 で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法の治療効果を予測するための、T K 1 タンパク質を特異的に認識する抗体を試薬として含有するキットであって、下記工程 (1) ~ (3) により治療効果を予測することを特徴とするキット：

(1) 当該患者から採取された生体試料に含まれる腫瘍細胞における T K 1 タンパク質の発現を免疫組織化学染色法により検出する工程、

(2) 上記工程 (1) で得られた検出結果から、腫瘍細胞を陽性細胞と陰性細胞に分類し、腫瘍細胞における陽性細胞の占有率を算出する工程、及び

(3) 上記工程 (2) で得られた算出結果から、当該占有率が 3 0 % 以上である場合、当該患者に対するトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比 1 : 0 . 5 で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測する工程。

【 0 0 1 7 】

項 6、下記工程 (1) ~ (4) を含む、結腸直腸癌患者の治療方法：

(1) 当該患者から採取された生体試料に含まれる腫瘍細胞における T K 1 タンパク質の発現を免疫組織化学染色法により検出する工程、

(2) 上記工程 (1) で得られた検出結果から、腫瘍細胞を陽性細胞と陰性細胞に分類し、腫瘍細胞における陽性細胞の占有率を算出する工程、及び

(3) 上記工程 (2) で得られた算出結果から、当該占有率が 3 0 % 以上である場合、当該患者に対するトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比 1 : 0 . 5 で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測する工程、及び

(4) 上記工程 (3) で当該化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測された患者に、当該抗腫瘍剤を投与する工程。

【 0 0 1 8 】

項 7、トリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比 1 : 0 . 5 で含有する抗腫瘍剤であって、

下記工程 (1) ~ (3) を含む方法の結果、当該抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測された結腸直腸癌患者の治療に用いるための、抗腫瘍剤：

(1) 当該患者から採取された生体試料に含まれる腫瘍細胞における T K 1 タンパク質の発現を免疫組織化学法により検出する工程、

(2) 上記工程 (1) で得られた検出結果から、腫瘍細胞を陽性細胞と陰性細胞に分類し、腫瘍細胞における陽性細胞の占有率を算出する工程、及び

(3) 上記工程 (2) で得られた算出結果から、当該占有率が 3 0 % 以上である場合、当該患者に対するトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比 1 : 0 . 5 で含有する抗腫

10

20

30

40

50

瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測する工程。

【0019】

本発明は、さらに以下の態様をも包含する。

【0020】

・下記工程(1)～(3)を含む、結腸直腸癌患者におけるトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法の治療効果を検査する方法：

(1)当該患者から採取された生体試料に含まれる腫瘍細胞におけるTK1タンパク質の発現を免疫組織化学法により検出する工程、

(2)上記工程(1)で得られた検出結果から、腫瘍細胞を陽性細胞と陰性細胞に分類し、腫瘍細胞における陽性細胞の占有率を算出する工程、及び

(3)上記工程(2)で得られた算出結果から、当該占有率が30%以上である場合、当該患者に対するトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測する工程。

【0021】

・下記工程(1)～(3)を含む、トリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法が、結腸直腸癌患者に対する治療効果を示すか否かを試験する方法：

(1)当該患者から採取された生体試料に含まれる腫瘍細胞におけるTK1タンパク質の発現を免疫組織化学法により検出する工程、

(2)上記工程(1)で得られた検出結果から、腫瘍細胞を陽性細胞と陰性細胞に分類し、腫瘍細胞における陽性細胞の占有率を算出する工程、及び

(3)上記工程(2)で得られた算出結果を、当該占有率が30%以上である場合、当該患者に対するトリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いという基準と比較する工程。

【発明の効果】

【0022】

本発明の予測方法は、結腸直腸癌患者(特に、従来は、抗腫瘍剤に対する応答性が低く、生存期間を有意に延長させる抗腫瘍剤がほとんどなかった標準療法に不応又は不耐となった結腸直腸癌患者)に対して、より顕著な延命効果を示す化学療法を提供することができる。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明の予測方法は、結腸直腸癌患者においてFTD及びTPIをモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示すか否かを、腫瘍細胞におけるTK1陽性細胞の占有率に基づき予測、試験又は検査するものである。

【0024】

本発明で指標であるTK1タンパク質は、チミジンをリン酸化することによりデオキシチミジンリン酸を合成する酵素であり、DNA合成に不可欠なピリミジンの合成に関与していることが知られている。また、多くの癌種においてTK1タンパク質の高発現と腫瘍の悪性度に関連性があることが報告されている。

【0025】

本発明の対象となる患者は、結腸直腸癌患者である。本発明において「結腸直腸癌」とは結腸又は直腸から発生した悪性腫瘍を指し、原発性結腸直腸癌のほか、局所的に再発した結腸直腸癌及び他の組織(例えば、肝臓)に転移した結腸直腸癌も含まれる。なお、ここで結腸直腸癌患者には、結腸直腸癌の腫瘍組織を現に有する患者のみならず、結腸直腸癌の腫瘍組織の切除を受けた患者も含む。従って、本明細書において、化学療法の治療効果は、結腸直腸癌の縮小及び増殖抑制、患者の延命だけでなく、結腸直腸癌の腫瘍組織の切除後の再発の抑制を包含する。

【0026】

10

20

30

40

50

また、本発明の対象となる結腸直腸癌患者の前治療歴は、上記抗腫瘍剤が投与できる状態であれば、特に制限されないが、本発明の予測精度の点から、標準療法に不応又は不耐の結腸直腸癌患者であることが好ましい。本発明において標準療法とは、結腸直腸癌の治療に標準的に用いられている化学療法であり、フルオロピリミジン系抗腫瘍剤（5 - フルオロウラシル（5 - F U）など）、イリノテカン、オキサリプラチンを含む化学療法などをいう。具体的には、フルオロピリミジン系抗腫瘍剤を含む化学療法（例えば、5 - フルオロウラシル（5 - F U）とロイコボリン（L V）の併用）、及び当該化学療法にイリノテカン又はオキサリプラチンを併用した化学療法（F O L F I R I、F O L F O X等）などが挙げられる。ここで「標準療法に不応又は不耐」とは、標準療法を実施していたものの治療効果が認められなくなった場合（例えば、標準療法の実施中に増悪（P D）した症例、術後補助化学療法として標準療法を実施中若しくは終了後6ヶ月以内に再発した症例などを含む）及び病状の悪化や副作用等により標準的な投与量を投与することができなくなった場合などをいう。「標準療法に不応又は不耐」とは、「標準的な治療が困難」と換言することができる。

10

【0027】

本発明の抗腫瘍剤は、トリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1：0.5で含有する抗腫瘍剤であり、経口投与により主に結腸直腸癌等の固形癌に抗腫瘍効果を奏することが知られている（国際公開W O 9 6 / 3 0 3 4 6号パンフレット）。

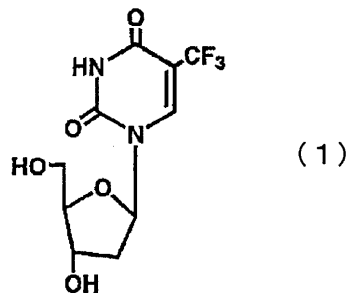
【0028】

「トリフルリジン」（別名： ， ， -トリフルオロチミジン。）は、チミジンの5位のメチル基をトリフルオロメチル基に置換した公知の核酸誘導体であり、DNA合成阻害作用による抗腫瘍効果を有することが知られている（J . A m . C h e m . S o c . 8 4 : 3 5 9 7 - 3 5 9 8 , 1 9 6 2 ; J . M e d . C h e m . , 7 : 1 - 5 , 1 9 6 4 ; B i o c h e m i s t r y , 3 3 : 1 5 0 8 6 - 1 5 0 9 4 , 1 9 9 4）。トリフルリジンは、下記化学式（1）で示される。

20

【0029】

【化1】



30

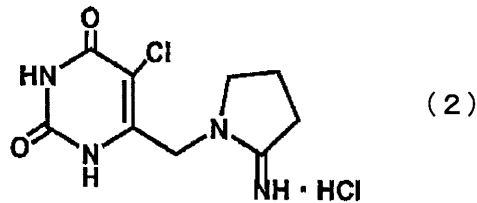
【0030】

「チピラシル塩酸塩」（化学名：5 - クロロ - 6 - [(2 - イミノピロリジン - 1 - イル) メチル] ピリミジン - 2 , 4 (1 H , 3 H) - ジオン塩酸塩。) は、チミジンホスホリラーゼ活性阻害作用を有する公知の化合物であり、抗腫瘍効果の増強作用（国際公開W O 9 6 / 3 0 3 4 6号パンフレット）、癌転移抑制作用（国際公開W O 9 8 / 1 3 0 4 5号パンフレット）、抗腫瘍剤の消化管障害の軽減作用（国際公開W O 0 0 / 5 6 3 3 7号パンフレット）、放射線治療の増強作用（国際公開W O 2 0 0 8 / 0 0 1 5 0 2号パンフレット）が知られている。チピラシル塩酸塩は、下記化学式（2）で示される。

40

【0031】

【化2】



【0032】

本発明の抗腫瘍剤は、トリフルリジン及びチピラシル塩酸塩を配合剤（複数の有効成分を含有する製剤）として一の剤型に製剤化したもの（1剤型形態）であっても、上記有効成分の各々を単剤として複数の剤型に製剤化したもの（多剤型形態）であってもよい。このうち、トリフルリジン及びチピラシル塩酸塩は配合剤で用いることが好ましい。

10

【0033】

抗腫瘍剤の投与形態に特に制限は無く、治療目的に応じて適宜選択でき、具体的には経口剤（錠剤、被覆錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、液剤など）、注射剤、坐剤、貼付剤、軟膏剤等が例示できる。このうち、トリフルリジンとチピラシル塩酸塩の配合剤は経口剤の形態が好ましい。各抗腫瘍剤は、それぞれの投与形態に応じ薬理的に許容される担体を用いて、通常公知の方法により調製することができる。斯かる担体としては、通常の薬剤に汎用される各種のもの、例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、希釈剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、pH調整剤、緩衝剤、安定化剤、着色剤、矯味剤、矯臭剤等を例示できる。

20

【0034】

本発明における「トリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1：0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法」とは、少なくとも本発明の抗腫瘍剤を投与する化学療法を意味し、FTD・TPI配合剤を単独で用いた化学療法のみならず、本発明の抗腫瘍剤と他の抗腫瘍剤を併用した化学療法をも含むものである。

【0035】

当該化学療法の投与スケジュールは患者の年齢、性別、病期、転移の有無、前治療歴などの条件により適宜選択される。例えば、4週間のうち、初日から5日目及び8日目から12日目に本発明の抗腫瘍剤をFTD量として20～80mg/m²（体表面積）/dayで1日2～4回に分けて投与する、好適には50～70mg/m²（体表面積）/dayで1日2～3回に分けて投与する、より好適には70mg/m²（体表面積）/dayで1日2回に分けて投与するスケジュールを1コースとして、当該コースを繰り返す投与スケジュールが好ましい。1日あたりの投与回数は、特に限定されるものではないが、2～4回、好適には2～3回、より好適には2回とすることができる。

30

【0036】

なお、当該化学療法は、当該化学療法の後に腫瘍の摘出を行う術前補助化学療法であっても、腫瘍の摘出の後に当該化学療法を行う術後補助化学療法であってもよい。

【0037】

FTD及びTPIをモル比1：0.5で含有する抗腫瘍剤は、日本国において、「ロンサーフ配合錠」として、製造販売が承認されている。

40

【0038】

本発明において「治療効果」は、上述の通り、腫瘍縮小効果、再発抑制効果、延命効果などにより評価することができ、再発抑制効果は無再発生存期間の延長や再発率の改善の程度、延命効果は全生存期間や無増悪生存期間の中央値の延長の程度などにより表すことができる。「トリフルリジンとチピラシル塩酸塩をモル比1：0.5で含有する抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す」とは、本発明の抗腫瘍剤を投与することにより、非投与の場合と比較して、生存期間を顕著に延長させたり、再発を顕著に抑制させたりする程度の優れた治療効果をいう。

【0039】

50

本発明の予測方法は、後述の(1)～(3)の工程を含むものである。

【0040】

工程(1)は、結腸直腸癌患者から採取された生体試料に含まれる腫瘍細胞におけるTK1タンパク質の発現を免疫組織化学法により検出する工程である。

生体試料としては、結腸直腸癌患者から採取したものであり腫瘍細胞を含む試料であれば特に限定されず、体液(血液、尿等)、組織、その抽出物及び採取した組織の培養物などが例示できるが、腫瘍細胞を含む組織が好ましい。また、生体試料の採取方法は、生体試料の種類に応じ適宜選択することができる。

【0041】

本発明におけるTK1タンパク質の発現の検出方法としては、腫瘍細胞毎にTK1タンパク質の発現を染色強度に基づく判定スコアとして半定量的に判定できる免疫組織化学法であれば特に制限されず、公知の検出方法を使用することができる。本発明における染色強度に基づく判定スコアとしては、0(染色なし)、1+(染色あり)の2段階評価、又は0(染色なし)、1+(弱い染色)、2+(中程度の染色)、3+(強い染色)の4段階評価が好ましい。4段階評価は、例えば、*Histopathology* 2008; 52: 797-805におけるHER2タンパク質の発現強度の4段階評価に準じて行うことができる。

【0042】

生体試料は、検出方法に応じて、適切な処理をされることにより生検組織又は臓器からの組織切片標本等として調製される。また、組織切片標本は、例えば、新鮮、凍結、またはホルマリン、アルコールまたはアセトンまたは他の方法で固定および/またはパラフィン包埋および脱パラフィンされ得る。好ましくは、事前にホルマリン固定パラフィン包埋ブロックの連続切片のうち一枚についてヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、細胞の形態に基づき腫瘍細胞と正常細胞との鑑別を実施し、腫瘍細胞の部分のみを、本発明における判定に用いる。染色強度の陰性コントロールや陽性コントロールに関しては、ホルマリン固定パラフィン包埋された細胞株(あらかじめタンパク質発現量が明らかな数種の株)を用いることができる。または、コントロールの検体がない場合には、複数の検体を同時に評価し全体の標本の染色強度の分布を確認後、染色強度を設定する場合もある。評価部位に関しては、標本全体を評価することが望ましいが、代表的な1視野のみの評価でも可能である。

【0043】

また、検出に用いられるTK1タンパク質を特異的に認識する抗体は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のいずれであってもよく、Fab断片やF(ab')₂断片などの抗体断片であってもよい。抗体の由来生物種は、特に限定されない。

【0044】

また、当該抗体は、公知であるヒトTK1のアミノ酸配列情報(GenBank ID: AAH07986)に基づき、通常公知の手法により作製することができる(例えば、*Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987), Publish. John Wiley and Sons. Section 11.12-11.13*)。例えば、ポリクローナル抗体の場合は、常法に従って大腸菌で発現し精製した上記ポリペプチドを用いて、或いは常法に従ってこれらの部分アミノ酸配列を有するよう合成したポリペプチドを用いて、実験動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、例えばモノクローナル抗体の場合は、常法に従って大腸菌等で発現し精製した上記ポリヌクレオチドを用いて、或いは常法に従ってこれらの部分アミノ酸配列を有するよう合成したポリペプチドを用いて、実験動物に免疫し、該実験動物から得られた脾臓細胞と骨髄腫細胞とを融合させてハイブリドーマ細胞を合成し、該細胞中から得ることができる。また、公知の抗ヒトTK1抗体を用いても良い(*Hybridoma*. 2001; 20(1): 25-34.)。

【0045】

10

20

30

40

50

工程(2)は、上記工程(1)における検出結果に基づき、判定した腫瘍細胞を細胞毎に陽性細胞と陰性細胞に分類し、腫瘍細胞における陽性細胞の占有率を算出する工程である。

本発明における陽性細胞とは、免疫組織化学法によりTK1タンパク質の発現が確認された腫瘍細胞をいう。具体的には、上記工程(1)で得られた腫瘍細胞毎の染色強度に基づき、2段階評価の場合は1+、4段階評価の場合は2+又は3+と判定された腫瘍細胞である。

【0046】

工程(3)は、上記工程(2)における算出結果に基づき、腫瘍細胞における陽性細胞の占有率が30%以上である場合、当該患者に対する本発明の抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測する工程である。本発明において、診断基準となる陽性細胞の占有率の閾値(カットオフポイント)は30%である。後述の実施例を含め、種々のカットオフポイントによる解析を行ったところ、カットオフポイントが30%のとき、予測精度及び治療効果(全生存期間の延長効果等)の観点から、最も層別効果が高かった。

10

【0047】

かくして、結腸直腸癌患者における本発明の抗腫瘍剤を用いた化学療法の治療効果を予測することができる。

【0048】

本発明の予測方法により本発明の抗腫瘍剤を用いた化学療法が十分な治療効果を示す可能性が高いと予測された結腸直腸癌患者に、当該抗腫瘍剤を投与することで、結腸直腸癌の縮小及び増殖抑制、患者の延命、並びに結腸直腸癌の腫瘍組織の切除後の再発の抑制等の優れた化学療法の治療効果を奏する治療方法も提供される。本発明は、このような治療方法及び本発明の抗腫瘍剤の使用形態をも提供する。

20

【0049】

本発明はまた、結腸直腸癌患者における本発明の抗腫瘍剤を用いた化学療法の治療効果を予測するためのキットをも提供する。本発明のキットは、上記する本発明の予測方法により化学療法の治療効果を予測するために好適に用いられる。

【0050】

本発明のキットは、TK1タンパク質を特異的に認識する抗体を試薬として含有することを特徴とする。本発明のキットは、一次抗体であるTK1タンパク質を特異的に認識する抗体を検出するための手段などの免疫組織化学法を実施するためのその他の試薬及び/又は器具、染色強度の陰性コントロールや陽性コントロールなどが含まれていてもよい。一次抗体を検出するための手段としては、例えば、二次抗体が挙げられる。二次抗体は、必要に応じて、ペルオキシターゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素;フルオレセインイソチシアネート(FITC)、カルボキシメチルインドシアニン(Cy3)等の蛍光もしくは発光物質等で標識されていてもよい。二次抗体が酵素で標識されている場合は、本発明のキットは、さらに、3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)などの発色基質を含むことが好ましい。さらに、本発明のキットは、本発明の予測方法を実施するための手順などを記載した取扱説明書、手順書などが含まれていてもよい。

30

40

【実施例】

【0051】

以下、本発明を実施例に基づきより詳細に説明するが、本発明がこれら実施例に限定されないことはいうまでもない。

【0052】

[実施例1]

前治療歴が2レジメン以上で、5-FU、イリノテカン、オキサリプラチンを含む標準療法に不応又は不耐な進行再発結腸直腸癌患者(169例)をFTD及びTPIをモル比1:0.5で含有する抗腫瘍剤(以下、「FTD・TPI配合剤(FTP・TPI combination

50

drug)」という。)の投与群(112例)とプラセボ群(57例)に群分けした。なお、両患者群のバックグラウンドに顕著な違いはなかった(男性比率(FTD・TPI配合剤投与群、57.1%;プラセボ群、49.1%)、平均年齢(FTD・TPI配合剤投与群、63才;プラセボ群、62才)、ECOG PS(Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status) 0(FTD・TPI配合剤投与群、64.3%;プラセボ群、61.4%)、前治療歴が3レジメン以上の比率(FTD・TPI配合剤投与群、84.8%;プラセボ群、77.2%)。FTD・TPI配合剤投与群に対しては、4週間のうち、初日から5日目及び8日目から12日目にFTD・TPI配合剤をFTD量として 35 mg/m^2 (体表面積)/回を1日2回、すなわち1日あたり合計 70 mg/m^2 (体表面積)/day投与するスケジュールを1コースとして、繰り返し行った。一方、プラセボ群に対してはFTD・TPI配合剤を含むあらゆる抗腫瘍剤を投与しなかった。

10

【0053】

全症例において全生存期間(Overall Survival:OS)を評価した。また、全症例中145例(FTD・TPI配合剤投与群(FTD・TPI combination drug):95例、プラセボ群(Placebo):50例)に対し投薬前に生体試料として病変組織を採取し、ホルマリン固定処理を行った後パラフィン包埋処理を行い、 $3\sim 4\ \mu\text{m}$ に薄切した。薄切した標本をパラフィン熔融器内で一晚乾燥させた後、キシレンとエタノールにより脱パラフィン処理を施した。さらに0.3%過酸化水素加メタノール処理による内因性ペルオキシダーゼの阻止を行った後、 $1\text{ mM EDTA (pH }8.0)$ 中で圧力鍋処理(10分間)により抗原の賦活化を行った。その後流水洗洗浄、PBS(-)による洗浄の後、一次抗体(配列番号1(FKKASGQPAAGPDNKENC)で表されるヒトTK1タンパク質のC末側のアミノ酸配列を認識する抗TK1ウサギポリクローナル抗体、大鵬薬品)を室温で一晩反応させた。さらにPBS(-)による洗浄の後、ペルオキシダーゼ・二次抗体結合ポリマー試薬(シンプルステインMAX-PO(R)、株式会社ニチレイバイオサイエンス)を室温で30分反応させ、PBS(-)で洗浄した。その後、シンプルステインDAB溶液(株式会社ニチレイバイオサイエンス)により発色させた後、カラッチのヘマトキシリン液で核を染色し、脱水・透徹処理を行い、マリノールで封入し、TK1染色標本作製した。

20

【0054】

次いで個別に2名の病理専門家によって、顕微鏡下にて、腫瘍細胞の細胞質中における染色強度に応じて、腫瘍細胞毎にTK1タンパク質の発現を0(染色なし)、1+(弱い染色)、2+(中程度の染色)、3+(強い染色)の4段階評価で判定し、2+又は3+と判定された腫瘍細胞の全腫瘍細胞における占有率を症例毎に算出した。

30

【0055】

症例をTK1高発現群(High)及びTK1低発現群(Low)に分けるためのカットオフポイント(Cutoff)として、20%又は30%を採用した場合の、各群の症例数を表1に示す。また、それぞれのカットオフポイントでの、高発現群と低発現群における全生存期間の中央値及びハザード比(HR)を表2に示す。高発現群と低発現群との有意差を評価するためのp値は、ログランク検定により算出した。

40

【0056】

カットオフポイントが20%のとき、プラセボ群のTK1高発現群の全生存期間の中央値は5.9ヶ月であるの対し、FTD・TPI配合剤治療群のTK1高発現群の全生存期間の中央値は7.8ヶ月であり、FTD・TPI配合剤治療群とプラセボ群のハザード比の差は小さかった。一方、カットオフポイントが30%のとき、プラセボ群のTK1高発現群の全生存期間の中央値は7.7ヶ月であるの対し、FTD・TPI配合剤治療群のTK1高発現群の全生存期間の中央値は10.4ヶ月であり、FTD・TPI配合剤治療群とプラセボ群のハザード比の差が非常に大きかった。

【0057】

【表 1】

	TK1 Cutoff=20%		TK1 Cutoff=30%		Total
	High	Low	High	Low	
FTD・TPI combination drug	43	56	27	72	99
Placebo	21	30	13	38	51
Total	64	86	40	110	150

【 0 0 5 8 】

10

【表 2】

	TK1 Cutoff=20%		TK1 Cutoff=30%	
	High	Low	High	Low
FTD・TPI combination drug (N=99)	7.8 vs. 9.0 HR=0.98 95%CI [0.57, 1.68] (p=0.93)		10.4 vs. 7.7 HR=0.51 95%CI [0.27, 0.97] (p=0.04)	
Placebo (N=51)	5.9 vs. 6.9 HR=1.16 95%CI [0.59, 2.31] (p=0.66)		4.9 vs. 7.2 HR=1.56 95%CI [0.63, 3.89] (p=0.34)	

20

【 0 0 5 9 】

以上から、TK1タンパク質の発現に関わらず、結腸直腸癌患者においてFTD・TPI配合剤は臨床上有用であるが、特にTK1タンパク質の発現に応じて2+又は3+と判定された腫瘍細胞の全腫瘍細胞における占有率が30%以上である患者において非常に優れた治療効果をもたらすことが証明された。なお、一般的に、TK1が高発現していると、癌患者の予後が悪いことが知られており、当該治療効果は当業者にとって予想外な成果である。

30

【配列表】

000631266000001.app

フロントページの続き

- (56)参考文献 国際公開第2006/080327(WO, A1)
国際公開第2013/024865(WO, A1)
特表2006-526156(JP, A)
欧州特許出願公開第1849470(EP, A1)
米国特許出願公開第2014/0213602(US, A1)
国際公開第2004/100760(WO, A1)
Komatsu, Y., The Value of Thymidine Kinase 1 (TK1) and Thymidine Phosphorylase (TP) Expression as Predictive Factor, European Journal of Cancer, 2011年, 47/supp.1, S421-6099
YOSHINO, T. et al., TAS-102 monotherapy for pretreated metastatic colorectal cancer: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 2 trial, THE LANCET ONCOLOGY, 2012年10月1日, 13/10, 993-1001
新谷路子, 諸臓器の正常および癌組織におけるthymidine kinaseの発現, 日本病理学会会誌, 2009年3月20日, 98/1, 371 P3-109
中條正豊, 大腸癌FLT PET陽性と陰性のリンパ節転移の検討, 第52回日本核医学会学術総会, 2012年, S244 M2IVE4

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98
A61K 31/506
A61K 31/7072
A61P 35/00
A61P 43/00
C07K 16/18
C07K 16/40
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

专利名称(译)	预测结肠直肠癌患者治疗效果的方法，其中TK1蛋白的表达增强		
公开(公告)号	JP6312660B2	公开(公告)日	2018-04-18
申请号	JP2015517145	申请日	2014-05-16
申请(专利权)人(译)	大鹏药业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	大鹏药业有限公司		
[标]发明人	坂本一樹 伊藤雅信		
发明人	坂本一樹 伊藤雅信		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/7072 A61K31/513 G01N33/57419 G01N2333/91205 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A G01N33/48.P G01N33/574.D G01N33/53.K		
审查员(译)	伊藤弘美		
优先权	2013105082 2013-05-17 JP		
其他公开文献	JPWO2014185528A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明包括以下步骤(1)至(3)，在患者三氟尿苷和Chipirashiru盐酸盐的摩尔比大肠癌1：预测化疗用含有0.5抗肿瘤剂的治疗效果提供一种方法。(1)通过免疫组织化学方法检测从患者采集的生物样品中包含的肿瘤细胞的细胞质中TK1蛋白的表达，从)上述步骤(1)在2中得到的结果检测中，肿瘤细胞被分为阳性和阴性细胞，步骤计算阳性细胞在肿瘤细胞中的占用率，以及(3)步骤(2)计算得到的结果，当占用率是30%以上时，三氟尿苷和Chipirashiru盐酸盐向患者1的摩尔比：0.5化疗与含有抗肿瘤剂是足够的治疗效果并预测显示的可能性很高。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6312660号 (P6312660)
(45) 発行日 平成30年4月18日(2018.4.18)	(24) 登録日 平成30年3月30日(2018.3.30)	
(51) Int. Cl.	F I	
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/574 ZNA A	
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/48 P	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/574 D	
	GO1N 33/53 K	
請求項の数 4 (全 12 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-517145 (P2015-517145)	(73) 特許権者 000207827 大鵬薬品工業株式会社	
(86) (22) 出願日 平成26年5月16日(2014.5.16)	東京都千代田区神田錦町1-2-7	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2014/063085	110000796	
(87) 国際公開番号 W02014/185528	特許業務法人三枝国際特許事務所	
(87) 国際公開日 平成26年11月20日(2014.11.20)	(72) 発明者 坂本一樹	
審査請求日 平成28年8月5日(2016.8.5)	茨城県つくば市大久保3 大鵬薬品工業株式会社内	
(31) 優先権主張番号 特願2013-105082 (P2013-105082)	(72) 発明者 伊藤雅信	
(32) 優先日 平成25年5月17日(2013.5.17)	東京都千代田区神田錦町1丁目2-7番地 大鵬薬品工業株式会社内	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	審査官 伊藤 裕美	
最終頁に続く		

(54) 【発明の名称】 TK1タンパク質の発現が亢進した結腸直腸癌患者に対する治療効果予測方法