

(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2018-536700

(P2018-536700A)

(43) 公表日 平成30年12月13日(2018.12.13)

(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 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/5025 (2006.01)	A 6 1 K 31/5025	
A 6 1 K 31/501 (2006.01)	A 6 1 K 31/501	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-541106 (P2018-541106)	(71) 出願人	517065817 メディヴェイション テクノロジーズ, エルエルシー アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 105 サンフランシスコ 36トフ フ ロアー マーケット ストリート 525
(86) (22) 出願日	平成28年10月26日 (2016.10.26)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(85) 翻訳文提出日	平成30年6月21日 (2018.6.21)	(72) 発明者	イング フェング アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94 949 ノバト デジタル ドライブ 105
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/058928		
(87) 国際公開番号	W02017/075091		
(87) 国際公開日	平成29年5月4日 (2017.5.4)		
(31) 優先権主張番号	62/246,538		
(32) 優先日	平成27年10月26日 (2015.10.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PARP阻害剤を用いる小細胞肺がんの治療

(57) 【要約】

Schlafen-11(SLFN11)を発現する小細胞肺がん対象を、ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)阻害剤又は医薬として許容し得るその塩を用いて治療する方法を記載する。具体的には、この方法は、該対象の腫瘍細胞試料中のSLFN11を検出すること、及び有効量のタラゾパリブもしくはタラゾパリブのトシレート塩のようなPARP阻害剤を該対象に投与することを含む。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

SLFN11を発現する対象における小細胞肺がんを治療する方法であって、該対象に有効量のPARP阻害剤を投与することを含む方法。

【請求項 2】

小細胞肺がん対象を治療する方法であって、該対象の腫瘍細胞サンプル中のSLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上を検出すること、及び該対象に有効量のPARP阻害剤を投与することを含む方法。

【請求項 3】

PARP阻害剤化学療法について小細胞肺がん対象を選択する方法であって、該対象の小細胞肺がん腫瘍サンプル中のSLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、及びGULP1の1以上を検出すること、及び該対象に有効量のPARP阻害剤を投与することを含む方法。

10

【請求項 4】

前記PARP阻害剤が、タラゾパリブ、オラパリブ、ルカパリブ、ベリパリブ、CEP9722、MK4827、又はBGB-290、あるいは医薬として許容し得るそれらの塩である、請求項1~3のいずれか1項記載の方法。

【請求項 5】

前記PARP阻害剤がタラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩である、請求項4記載の方法。

20

【請求項 6】

前記PARP阻害剤がタラゾパリブのトシレート塩である、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

SLFN11を発現する対象における小細胞肺がんを治療する方法であって、該対象に有効量のタラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩を投与することを含む方法。

【請求項 8】

タラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩を、1日当たり約0.5~約2mg、又は約1mg/日、又は約0.10~0.75mg/kg/日、又は約0.25~0.30mg/kg/日の投与量で、経口的に1日1回投与する、請求項1~7のいずれか1項記載の方法。

【請求項 9】

前記対象が、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上を発現する、請求項1~8のいずれか1項記載の方法。

30

【請求項 10】

前記対象が、SLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上の増大した発現レベルを有する、請求項1~9のいずれか1項記載の方法。

【請求項 11】

前記PARP阻害剤、又はタラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩を、1以上の化学療法剤、手術、及び/又は放射線照射との組合わせで投与する、請求項1~10のいずれか1項記載の方法。

【請求項 12】

前記1以上の化学療法剤が、DNA損傷剤、テモゾロミド、トポイソメラーゼ1阻害剤、イリノテカン、トポテカン、トポイソメラーゼ2阻害剤、エトポシド、エンザルタミド、ATR阻害剤、EGFR阻害剤、プラチナ薬、シスプラチン、カルボプラチン、又はエトポシドである、請求項11記載の方法。

40

【請求項 13】

前記対象が、プラチナ薬、又はシスプラチン、又はカルボプラチンを用いて、場合によってはエトポシドとの組合わせで、以前治療されたことがある、請求項1~12のいずれか1項記載の方法。

【請求項 14】

前記対象が、低減したレベルのATMを発現する、請求項1~13のいずれか1項記載の方法

50

。

【請求項 15】

前記検出されたバイオマーカーのひとつがSLFN11である、請求項2又は3記載の方法。

【請求項 16】

前記検出工程が、免疫組織学的アッセイ、免疫組織化学染色(IHC)アッセイ、インサイチュLC/MSアッセイ、プロモーターメチル化アッセイ、細胞学的アッセイ、mRNA発現アッセイ、RT-PCRアッセイ、ノーザンブロットアッセイ、タンパク質発現免疫吸着アッセイ(ELISA)、酵素結合免疫スポットアッセイ(ELISPOT)、ラテラルフローテストアッセイ、酵素免疫アッセイ、蛍光偏光免疫アッセイ、化学発光免疫アッセイ(CLIA)、又は蛍光標識細胞分取アッセイ(FACS)による検出を含む、請求項2～6又は8～15のいずれか1項記載の方法。

10

【請求項 17】

前記対象が、増大したレベルのSLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上を発現する、請求項1又は4～16のいずれか1項記載の方法。

【請求項 18】

前記検出工程が、増大したレベルのSLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上を検出することを含む、請求項2～6又は8～16のいずれか1項記載の方法。

【請求項 19】

前記対象が低減したレベルのATMを発現する、請求項17記載の方法。

【請求項 20】

前記検出工程が、ATMを検出すること、又はATMの低減したレベルの発現を検出することをさらに含む、請求項18記載の方法。

20

【請求項 21】

前記対象が、TP53及び/又はRB1突然変異を発現する、請求項1～20のいずれか1項記載の方法。

【請求項 22】

前記対象におけるSLFN11についてのRMAスコアが、4以上、又は5以上、又は6以上、又は7以上、又は8以上である、請求項1～21のいずれか1項記載の方法。

【請求項 23】

前記対象が、40以下、又は35以下、又は30以下、又は25以下、又は20以下のMyriad HRDスコアを有する、請求項1～22のいずれか1項記載の方法。

30

【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、それらの全体が引用により組み込まれている、2015年10月26日に出願された「PARP阻害剤を用いる小細胞肺がんの治療(Treatment of Small Cell Lung Cancer with a PARP Inhibitor)」と題された米国仮出願第62/246,538号を基礎とする優先権を主張する。

【0002】

40

(発明の属する分野)

本明細書において、PARP阻害剤を用いる、又はタラゾパリブもしくはその医薬として許容し得る塩を用いる、Schlafen-11 (SLFN11)を発現する小細胞肺がん対象の治療方法が記載される。

【背景技術】

【0003】

(発明の背景)

小細胞肺がん(SCLC)は、肺がんの攻撃的なサブタイプであって、米国における全肺がん症例の約15%を占める。SCLCは、不明瞭な細胞境界及び最小限の細胞質、稀な核小体、及び細かい顆粒状のクロマチンを有する小細胞によって特徴付けられる。この疾患の攻撃的

50

な性質、早期診断率の低さ、及び有効な療法の欠如のため、予後は一般に不良である。未治療のSCLC患者の診断からの生存期間中央値はわずか2~4ヶ月である。化学療法及び/又は放射線様式が使用される場合、SCLC患者の初期応答率は高いが(約60~80%)、治療された患者の大多数で再発が起こり、それらの患者はその後の全身療法にほとんど不応性となる。したがって、現在の治療様式をもってしても、限局型疾患の患者の生存期間中央値は16~24ヶ月であり、広範囲の疾患の患者の場合は7~12ヶ月である。患者の生存率を改善するためには、腫瘍が感受性を有する化学療法剤で患者を治療することが不可欠である。SCLCの治療における標的薬物の使用は、満たされていない主要な医療ニーズを代表する。非小細胞肺癌(NSCLC)とは違って、現在のところ、この疾患の患者のための実証された利益を有する標的治療はない。したがって、SCLC患者を個々の遺伝的プロファイルに基づいて適切な治療法と整列させる必要がある。所与の腫瘍の遺伝的プロファイルを理解することにより、早期の診断、検出、及び治療の選択も可能になる。

10

20

30

40

50

【0004】

増大したSLFN11発現は、トポイソメラーゼ阻害剤、アルキル化剤、及びDNA損傷剤に対するSCLC細胞の感受性の増大と正の相関があることが報告されている。Zoppoliらの文献、PNAS USA 2012, 109(37), 15030-15035; Zoppoliらの文献、Cancer Res. 2012, 72(8 補遺): 4693を参照されたい。ポリ(ADP-リボース)ポリメラーゼ(PARP)阻害剤は、より最近抗がん物質群(anti-cancer arsenal)に追加されている。ある種のPARP阻害剤は、PARP-DNA複合体を捕獲することによりPARP毒としてならびに触媒阻害剤として作用する(Muraiらの文献、Cancer Res. 2012: 72:5588-99)。タラゾパリブ(BMN 673)は、腫瘍細胞毒性及びPARP捕捉活性の点で現在までに報告された最も強力なPARP阻害剤である(Shenらの文献、Clin. Cancer Res. 2013:19:5003-15; Muraiらの文献、Mol. Cancer Ther. 2014:13:433-43)。タラゾパリブは、有害な生殖細胞系BRCA1/2突然変異を有する卵巣がん及び乳がん患者において有意な臨床活性を実証してきた(De Bonoらの文献、ASCO 2013, Abstract 2580)。しかし、BRCA突然変異は、PARP阻害剤に対するSCLCのより大きい感受性を予測することは示されていない。タラゾパリブに対する抗腫瘍応答は、SCLC患者においても報告された(Wainbergらの文献、ASCO 2014, Abstract 7522)。従前の研究は、SCLCにおけるタラゾパリブ感受性と相関するDNA修復タンパク質マーカーの候補分子群(slate)を同定したが(Cardnellらの文献、Clin. Cancer Res. 2013, 19(22), 6322-6328)、これらは臨床的に確認されていない。さらに、NCI60細胞株パネルのインビトロスクリーンは、Schlafen 11(SLFN11)の増大した発現はある範囲の腫瘍細胞株においてタラゾパリブ曝露に対する増大した細胞感受性と相関していることを明らかにした(Muraiらの文献、AACR 2014, Abstract 1718)。しかし、このNCI60パネルは、SCLC由来細胞株を欠いており、そのため、何らかの特定の遺伝的特徴がPARP阻害剤又はタラゾパリブに対するSCLC細胞の増大した感受性と相関しているか否かという質問については未回答のままであった。要するに、PARP阻害剤に対する応答性を予測する、SCLC患者における確認された遺伝的プロファイルはない。このような決定基の同定は、PARP阻害剤、又は特にタラゾパリブに良好に応答する可能性のある患者の同定を可能にするであろう。

【0005】

PARP阻害剤を用いる特定の遺伝的に感受性のSCLC患者の治療方法が依然として必要とされている。さらに、SCLCについての、確認され、臨床的に適切なバイオマーカーを同定することは、より早期の検出及び適切な治療標的化を可能にするであろう。

【発明の概要】

【0006】

(発明の概要)

38種のSCLC細胞株のコレクションの研究は、タラゾパリブの単一剤治療に対する感受性は以下の遺伝子、SLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、及びGULP1の各々の発現と良好に相関することを明らかにした。インビトロでの感受性の結果は、インビボで、いくつかのSCLC細胞株由来異種移植片(CDX)モデルで確認された。注目すべきことに、SCLCの12種の患者由来異種移植片(PDX)サンプルを使用したインビボの研究は

、SLFN11発現(メッセンジャーRNAレベル及びタンパク質レベルの両方での)とPARP阻害剤治療に対する腫瘍の感受性との間の相関を解明した。

【0007】

したがって、本発明は、SLFN11-、SIL1-、SLC25A3-、MAF-、AP3B1-、C1orf50-、BCL2-、DDX6-、及び/又はGULP1-陽性SCLC患者を治療する方法であって、この患者に有効量のPARP阻害剤を投与することを含む方法を含む。別のひとつの態様において、本発明は、SLFN11-陽性SCLC患者を治療する方法であって、この患者に有効量のPARP阻害剤を投与することを含む方法に関する。他の態様において、本発明は、SLFN11-、SIL1-、SLC25A3-、MAF-、AP3B1-、C1orf50-、BCL2-、DDX6-、及び/又はGULP1-陽性SCLC患者を治療する方法であって、この患者に有効量のタラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩を投与することを含む方法に関する。別のひとつの態様において、本発明は、SLFN11-陽性SCLC患者を治療する方法であって、この患者に有効量のタラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩を投与することを含む方法に関する。

10

【0008】

ひとつの態様において、本発明は、SLFN11を発現している対象のSCLCを治療する方法であって、この対象に有効量のPARP阻害剤を投与することを含む方法に関する。別のひとつの態様において、本発明は、SLFN11を発現している対象のSCLCを治療する方法であって、この対象に有効量のタラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩を投与することを含む方法に関する。

20

【0009】

別のひとつの態様において、本発明は、SLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上を発現している対象のSCLCを治療する方法であって、この対象に有効量のPARP阻害剤、又は有効量のタラゾパリブもしくは医薬として許容し得るその塩を投与することを含む方法に関する。いくつかの態様において、その対象はSLFN11を発現し、場合によってSIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上を発現する。

30

【0010】

本発明は、小細胞肺癌対象を治療する方法であって、この対象からの腫瘍細胞サンプルのSLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、及びGULP1の1以上を検出すること、及びこの対象に有効量のPARP阻害剤を投与することを含む方法にも関する。

30

【0011】

別のひとつの態様において、本発明は、PARP阻害剤化学療法について小細胞肺癌対象を選択する方法であって、この対象の小細胞肺癌腫瘍サンプルのSLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上を検出することを含む方法に関する。この方法は、場合によっては、この対象に対して有効量のPARP阻害剤を投与することをさらに含む。他の態様において、本発明は、PARP阻害剤化学療法について小細胞肺癌対象を選択する方法であって、この対象のSLFN11発現を検出することを含み、及び場合によってはこの対象に有効量のPARP阻害剤を投与することをさらに含む方法に関する。別のひとつの態様において、本発明は、タラゾパリブ化学療法について小細胞肺癌対象を選択する方法であって、この対象のSCLC腫瘍サンプルのSLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上を検出することを含む方法に関する。この方法は、場合によってはこの対象に有効量のタラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩を投与することをさらに含む。他の態様において、本発明は、タラゾパリブ化学療法について小細胞肺癌対象を選択する方法であって、この対象のSLFN11発現を検出することを含み、及び場合によってはこの対象に有効量のタラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩を投与することをさらに含む方法に関する。

40

【0012】

別のひとつの態様において、本発明は、小細胞肺癌を有するヒト対象をPARP阻害剤で治療する方法に関し、この方法は、以下の工程：

(a) 核酸ベースの検出アッセイを行って、mRNA発現を検出することにより、このヒト対

50

象の生物学的サンプルの細胞のSLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、及びGULP1からなる群から選択される1以上の遺伝子のmRNA発現レベルを検出する工程；

(b) このヒト対象の細胞が、健常ヒトコントロールの生物学的サンプルの細胞におけるそれぞれの遺伝子の発現レベルを上回るレベルで前記1以上の遺伝子を発現することを決定する工程；及び

(c) 健常ヒトコントロールの生物学的サンプルの細胞におけるそれぞれの遺伝子の発現レベルを上回るレベルでその1以上の遺伝子を発現するヒト対象に、有効量のPARP阻害剤を投与し、それによってこのヒト対象の小細胞肺癌を治療する工程を含む。

10

【0013】

別のひとつの態様において、本発明は、ヒト対象のSCLCを診断及び治療する方法に関し、この方法は、以下の工程：

(a) 核酸ベースの検出アッセイを行って、mRNA発現を検出することにより、このヒト対象の生物学的サンプルの細胞のSLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、及びGULP1からなる群から選択される1以上の遺伝子のmRNA発現レベルを検出する工程；

(b) このヒト対象の細胞が、健常ヒトコントロールの生物学的サンプルの細胞におけるそれぞれの遺伝子の発現レベルを上回るレベルで前記1以上の遺伝子を発現することを決定する工程；及び

(c) 健常ヒトコントロールの生物学的サンプルの細胞におけるそれぞれの遺伝子の発現レベルを上回るレベルでその1以上の遺伝子を発現するヒト対象に、有効量のPARP阻害剤を投与し、それによってこのヒト対象の小細胞肺癌を治療する工程を含む。

20

【0014】

別のひとつの態様において、本発明は、対象におけるSCLCを診断する方法であって、この対象におけるSLFN11の発現を検出することを含む方法に関する。この方法は、場合によっては対象におけるSIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上を検出することをさらに含む。

【0015】

他の態様において、本発明は、低減した発現レベルのATMを有する小細胞肺癌対象を治療する方法であって、この対象に、有効量のPARP阻害剤又はタラゾパリブもしくは医薬として許容し得るその塩を投与することを含む方法に関する。他の態様において、対象におけるATM発現は、本明細書において記載される1以上の検出標的に加えて検出される。他の態様において、対象におけるATM発現は低減している。

30

【0016】

本発明のさらなる実施態様、特徴、及び利点は、以下の詳細な説明から、及び本発明の実施を通じて、明らかになるであろう。

【0017】

簡潔さのために、特許を含む本明細書に引用された刊行物の開示は、参照により本明細書に組み込まれている。

40

【図面の簡単な説明】

【0018】

(図面の簡単な説明)

本出願は、添付の図面と併せて以下の説明を参照することによって理解することができる。

【0019】

【図1】図1は、種々の小細胞肺癌(SCLC)細胞株におけるタラゾパリブ及びシスプラチン感受性間のGI₅₀値の相関を説明する。タラゾパリブについてのlog₁₀スケールのGI₅₀値をx軸に沿って表し、シスプラチンについてをy軸に沿って表す。線形回帰直線が示され、

50

Spearman相関及びp値はそれぞれR及びPとして掲載されている。

【0020】

【図2】図2は、タラゾパリブに対する細胞株の感受性を説明する。矢印のない円は5日間研究した細胞株を示す；矢印をつけた円は7日間研究した細胞株を示す。データポイントのサイズは、 $\log_{10}(GI_{50})$ に基づいて設定されている（より小さい GI_{50} = より小さいサイズの円）。

【0021】

【図3】図3Aは、種々の小細胞肺癌株におけるSLFN11発現についてのロブストマルチアレイ平均（RMA）スコアを説明する。6を超えるRMAスコア（この線を上回るものを、「高」RMAと呼ぶ）をもつ細胞株は、6未満のRMAスコア（この線を下回るものを、「低」RMAと呼ぶ）をもつ細胞株と区別される。図3Bは、高又は低RMAスコアによりプールされた、タラゾパリブで処理された細胞株についての、 GI_{50} 及び最大増殖阻害の箱ひげ図を説明する。示されているp値は、Anovaテストに基づいている。図3Cは、タラゾパリブによる最大増殖阻害によってランク付けされた小細胞肺癌（SCLC）細胞株のWaterfallプロットを説明する。矢印のない棒線は「高」RMAと名付けられた細胞株に相当し、矢印のついた棒線は「低」RMAと名付けられた細胞株に相当する。図3Dは、試験した細胞株のタラゾパリブについての GI_{50} 及びSLFN11 RMA発現スコアの相関を説明する。線形回帰直線が示され、Spearman相関及びp値はそれぞれR及びPとして掲載されている。図3Eは、試験した細胞株についてのSLFN11 RMA発現スコア及び最大増殖阻害の相関を説明する。線形回帰直線が示され、Spearman相関及びp値はそれぞれR及びPとして掲載されている。

10

20

【0022】

【図4】図4は、38種のNCI SCLC細胞株におけるタラゾパリブ感受性と関連する上位の遺伝子発現の特徴を説明する。公称p値が0.001未満のものは、表中のボックスでハイライトを付されている。表の列には、遺伝子名 = entrez遺伝子シンボル；logFC = 感受性 / 抵抗性細胞株群のlog倍率変化；t = t 統計量；P. 値 = モデレートt検定に基づく公称p値；調整p値 = FDRに基づく調整p値、が含まれている。ボックスでハイライト表示された遺伝子をヒートマップでプロットした。これは、上位9遺伝子を使用した階層的クラスタリングを示す。このヒートマップの上の棒線は、細胞株感受性群を同定し、ここで「R」は抵抗性群であり、「S」は感受性群である。

【0023】

30

【図5】図5は、12種の小細胞肺癌（SCLC）細胞株におけるSLFN11タンパク質のウェスタンプロットを説明する。CCLEからのSLFN11遺伝子発現データは、タンパク質レベルと相関させるためにプロットの下に掲載されている。

【0024】

【図6】図6A、6B、及び6Cは、ベヒクル（三角）、シスプラチン（円、図6A及び6Bのみ）、及びタラゾパリブ（BMN 673；四角）で処理されたNCI-H1048（図6A）、NCI-H209（図6B）、及びNCI-H69（図6C）小細胞肺癌（SCLC）異種移植片についての経時的な平均腫瘍体積を説明する。

【0025】

【図7】図7は、12種のSCLC PDX異種移植片モデルについての平均腫瘍体積（ベースラインからの変化として測定した）に対するタラゾパリブ毎日投薬の効果（図7A）を説明する。

40

【0026】

【図8】図8A～8Fは、ベヒクル（実線の円）又はBMN 673（点線の三角）を毎日投薬した後の部分的応答（図8A、8B）、安定疾患（図8C、8D）及び進行性疾患（図8E、8F）を有する個別の動物の腫瘍増殖曲線を説明する。

【0027】

【図9】図9Aは、12種のPDX異種移植片モデルの単一剤タラゾパリブ治療の退縮分析を説明する。これらの結果は、タラゾパリブ治療について進行性疾患（PD、n = 6）、安定疾患（SD、n = 3）、又は部分的応答（PR、n = 3）として群に分けた。斜線は正の値を示し、一方、斜線なしは負の値を示す。図9Bは、タラゾパリブについて進行性疾患（PD、n = 6）、安定疾患

50

(SD、n = 3)、又は部分的応答(PR、n = 3)を示す12種のPDXモデルについてのSLFN11タンパク質の発現を説明する。示されているp値は、Anovaテストに基づいている。図9Cは、タラゾパリブ治療について進行性疾患(PD、n = 6)、安定疾患(SD、n = 3)、又は部分的応答(PR、n = 3)の12種のPDX異種移植片モデルを横断するRNAシーケンシング解析(名詞化カウント(log2))によるSLFN11の発現を説明する。示されているp値は、Anovaテストに基づいている。

【0028】

【図10】図10Aは、PDX異種移植片モデルのPD、SD、及びPR群についてのATMタンパク質の発現を説明する。図10Bは、RNA配列解析によるこの12種のPDX異種移植片モデルにおけるATMの発現を説明する。

10

【0029】

【図11】図11は、HRDスコア及びタラゾパリブ感受性(GI₅₀)間の相関を説明する。線形回帰直線が示され、Spearman相関及びp値はそれぞれR及びPとして掲載されている。

【発明を実施するための形態】

【0030】

(発明の詳細な説明)

本発明をさらに記載する前に、本発明は記載されている特定の実施態様に限定されず、当然のことながら変更してもよいことが理解されるべきである。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるので、本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態の記載のみを目的とするものであり、限定することを意図するものではないことも理解されるべきである。

20

【0031】

ひとつの態様において、本発明は、SLFN11を発現する対象の小細胞肺癌を治療する方法であって、この対象に有効量のPARP阻害剤を投与することを含む方法に向けられている。

【0032】

別のひとつの態様において、本発明は、SLFN11を発現する対象の小細胞肺癌を治療する方法であって、この対象に有効量のタラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩を投与することを含む方法に向けられている。

【0033】

別のひとつの態様において、本発明は、PARP阻害剤化学療法について小細胞肺癌対象を選択する方法であって、この対象のSCLC腫瘍サンプルのSLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上を検出すること、及びこの対象に有効量のPARP阻害剤を投与することを含む方法に向けられている。この選択方法のいくつかの実施態様において、SLFN11が検出される。

30

【0034】

いくつかの実施態様において、この対象は、SLFN11を発現する。他の実施態様において、この対象は、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上を発現する。いくつかの実施態様において、この対象は、SLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、又はGULP1の1以上の増大した発現レベルを有する。いくつかの実施態様において、この対象は、ATMを発現する。他の実施態様において、この対象は、低減したレベルのATM発現を呈する。ある種の実施態様において、この対象は、TP53及び/又はRB1突然変異を発現する。いくつかの実施態様において、本明細書において記載される検出工程は、ATMを検出すること、又は低減したレベルのATM発現を検出することをさらに含む。

40

【0035】

いくつかの実施態様において、対象におけるSLFN11についてのRMAスコアは、4以上、又は5以上、又は6以上、又は7以上、又は8以上である。RMAスコアは、当該技術分野の当業者に公知の方法に基づいて、特に、本明細書の実施例に記載されている方法を使用して、決定される。

50

【0036】

いくつかの実施態様において、対象は、40以下、又は35以下、又は30以下、又は25以下、又は20以下のMyriad HRDスコアを有する。Myriad HRDスコアの決定は、当該技術分野の当業者に公知の方法を使用して、場合によっては市販の試験キットを使用して、達成される。

【0037】

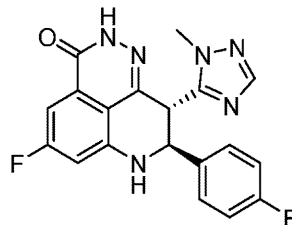
本発明の方法のいくつかの実施態様において、対象は進行型SCLCを有する。他の実施態様において、この対象は、シスプラチン又はカルボプラチンのようなプラチナ薬を、場合によってはエトポシドとの組み合わせで用いて、以前治療されたことがあるか、又は同時治療されている。

10

【0038】

いくつかの実施態様において、PARP阻害剤は、PARP活性を阻害する任意の化合物である。他の実施態様において、PARP阻害剤は、タラゾパリブ、オラパリブ、ルカパリブ、ベリパリブ、CEP9722、MK4827、又はBGB-290、あるいは医薬として許容し得るそれらの塩である。他の実施態様において、PARP阻害剤は、タラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩である。さらなる実施態様において、PARP阻害剤は、タラゾパリブのトシレート塩である。タラゾパリブは以下に示す構造を有する：

【化1】



20

【0039】

いくつかの実施態様において、タラゾパリブ又は医薬として許容し得るその塩は、経口的に、1日1回、約25～約1100 μg/日、又は約0.5～約2 mg/日、又は約1 mg/日、又は約0.10～0.75 mg/kg/日、又は約0.25～0.30 mg/kg/日の投与量で投与される。本明細書で与えられる投薬量の数字は、タラゾパリブの遊離塩基形態の投与量を指すか、又は投与されたタラゾパリブ塩形態の遊離塩基当量として計算される。たとえば、1 mgのタラゾパリブトシレートの投薬量は、タラゾパリブの1 mg 遊離塩基当量に等しい量のタラゾパリブトシレートを指す。

30

【0040】

いくつかの実施態様において、PARP阻害剤は、1以上の化学療法剤、手術、及び/又は放射線照射との組み合わせで投与される。他の実施態様において、1以上の化学療法剤は、DNA損傷剤、テモゾロミド、トポイソメラーゼ 1阻害剤、イリノテカン、トポテカン、トポイソメラーゼ 2阻害剤、エトポシド、エンザルタミド、ATR阻害剤、EGFR 阻害剤、プラチナ薬、シスプラチン、カルボプラチン、及びエトポシドからなる群から選択される。

40

【0041】

いくつかの実施態様において、1以上のバイオマーカーは、免疫組織学的アッセイ、免疫組織化学染色(IHC)アッセイ、インサイチュLC/MSアッセイ、プロモーターメチル化アッセイ、細胞学的アッセイ、mRNA発現アッセイ、RT-PCRアッセイ、ノーザンブロットアッセイ、タンパク質発現免疫吸着アッセイ(ELISA)、酵素免疫スポットアッセイ(ELISPOT)、ラテラルフローテストアッセイ、酵素免疫アッセイ、蛍光偏光免疫アッセイ、化学発光免疫アッセイ(CLIA)、又は蛍光標識細胞分取アッセイ(FACS)によって検出される。

【0042】

いくつかの実施態様において、対象からの試験サンプルにおける1以上のバイオマーカー

50

一の発現レベルは、当該技術分野の当業者に公知の方法を使用して決定され、各バイオマーカーの発現レベルは、正常サンプル又は標準サンプルにおける相当するバイオマーカーの発現レベルと比較される。いくつかの実施態様において、正常サンプル又は標準サンプルのレベルとの関係において増大した試験サンプルの発現レベルは、この対象がPARP阻害剤療法に応答する可能性が高いことを示す。いくつかの実施態様において、1以上の遺伝子又はタンパク質の増大した発現レベルは、PARP阻害剤療法に対する応答性を示し、ここで、この1以上の遺伝子又はタンパク質は、SLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、及びGULP1からなる群から選択される。他の実施態様において、ひとつの遺伝子又はタンパク質はSLFN11である。

【0043】

別途定義されていない限り、本明細書において使用されるすべての技術的及び科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書において記載されているものと同様又は等価の任意の方法及び材料も、本発明の実施又は試行において使用することができるが、好ましい方法及び材料がここで記載されている。本明細書において言及されているすべての刊行物は、その刊行物が引用されているものとの関係でそれらの方法及び/又は材料を開示及び記載するために、参照により本明細書に取り込まれる。

【0044】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形態の「ひとつの(a)」、「ひとつの(an)」、及び「該(この、その)」は、文脈上明確に別の指示がない限り、複数の対象を含むことに留意しなければならない。さらに、請求項は任意の付加的要素を排除するように作成されてもよいことに留意されたい。それゆえ、この記述は、請求項要素の列挙又は「否定的」限定の使用に関連して、「専ら」、「のみ」などのような排他的な用語の使用の前提として役立つことを意図している。

【0045】

本明細書において使用される場合、「含有する」、「包含する」、及び「含む」という用語は、その開放的で非制限的な意味で使用される。

【0046】

より簡潔な記載を提供するために、本明細書において与えられるいくつかの定量的表現は、「約」という用語で修飾されていない。「約」という用語が明示的に使用されているか否かにかかわらず、本明細書において与えられる各量は、実際の所与の値を指すことを意味すること、及びそれはまた、そのような所与の値についての実験及び/又は測定条件による等価及び近似を含め、当該技術分野の当業者には合理的に推測されるような所与の値への近似を指すことを意味することは理解される。パーセンテージとして与えられる濃度は、異なるように示されていない限り、質量比を指す。

【0047】

本明細書において使用される場合、「対象」は、ヒト又は動物を指し、霊長類(特に高等霊長類)、ヒツジ、イヌ、げっ歯類(たとえば、マウス又はラット)、モルモット、ヤギ、ブタ、ネコ、ウサギ、及びウシなどのすべての哺乳類を含む。いくつかの実施態様において、対象はヒトである。他の実施態様において、対象は、現在又は過去の喫煙者である個体を含む、SCLCの発症について高リスクであると考えられ得るヒトである。ある種の実施態様において、対象は、SCLCを罹患しているか、又はSCLCと診断されている。本明細書において使用される場合、「個体」は、対象又は患者を指す。健常又は正常個体は、目的の疾患又は状態(たとえば、肺疾患、肺関連疾患、又は他の肺状態を含む)が従来の診断方法で検出できない個体である。

【0048】

「生物学的サンプル」、「サンプル」、及び「試験サンプル」は、本明細書において互換的に使用され、肺がんを有する又は(たとえば、重度の喫煙のような個人歴又は家族歴に基づいて)肺がんのリスクのある哺乳類から単離されたサンプルのような、対象から単離された任意の器官、組織、細胞又は細胞抽出物であることができる。たとえば、サン

10

20

30

40

50

ルは、患者(ヒト又は動物)、試験対象、健常志願者、又は実験動物から得られる、肺がんを有する哺乳類から単離された、固形肺腫瘍からの細胞又は組織(たとえば、生検又は剖検からの)、喀痰、咳、気管支肺胞洗浄液、気管支擦過物、頬粘膜、末梢血、全血、赤血球濃縮物、血小板濃縮物、白血球濃縮物、血液細胞タンパク質、血漿、多血小板血漿、血漿濃縮物、血漿の任意の分画からの沈殿物、血漿の任意の分画からの上清、血漿タンパク質画分、精製又は部分精製血液タンパク質又は他の成分、血清、組織又は穿刺生検サンプル、及び胸水など、又は任意の他の検体、又はそれらの任意の抽出物であることができるが、それらに限定はされない。サンプル供給源は、血液(全血、白血球、末梢血単核球、パフィーコート、血漿、及び血清を含む)、喀痰、涙液、粘液、鼻洗浄液、鼻吸引液、息、尿、精液、唾液、腹腔洗浄液、嚢胞液、髄膜液、羊水、腺液、リンパ液、細胞学的液体、腹水、胸水、乳頭吸引液、気管支吸引液、気管支擦過物、滑液、関節吸引液、器官分泌物、細胞、細胞抽出物、及び脳脊髄液を含む。サンプルは、前記のすべての生物学的供給源の実験的に分離された画分をも含む。たとえば、血液サンプルは、血清又は血漿に、又は赤血球又は白血細胞(白血球)のような特定のタイプの血液細胞を含有する画分に、分画することができる。望ましい場合、サンプルは、組織及び液体サンプルの組み合わせのような個体からのサンプルの組み合わせであることができる。「生物学的サンプル」という用語は、たとえば、便サンプル、組織サンプル、又は組織生検由来のような、ホモジナイズされた固形材料を含む材料をも含む。「生物学的サンプル」という用語は、組織培養又は細胞培養から由来する材料をも含む。生物学的サンプルを得るための任意の好適な方法を用いることができる；例示的な方法としては、たとえば、瀉血、スワブ(たとえば、頬スワブ)、手術、生検、及び穿刺吸引生検手順が含まれる。穿刺吸引を受け入れる例示的な組織は、リンパ節、肺、肺洗浄液、BAL(気管支肺胞洗浄液)、胸膜、胸腺、乳房、膵臓、及び肝臓を含む。サンプルは、たとえば、顕微解剖(たとえば、レーザーキャプチャー顕微解剖法(LCM)又はレーザー顕微解剖(LMD))、膀胱洗浄、スメア(たとえば、PAPスメア)、又は乳管洗浄細胞診によっても集めることができる。個体から入手又は誘導された「生物学的サンプル」は、個体から得られた後、任意の好適な方法で加工された任意のサンプルを含む。サンプルは、組織学上の目的のために採取された凍結切片のような組織の切片を含んでいてもよい。「サンプル」は、対象から直接単離されていない、実験条件下で作製された細胞又は細胞株であってもよい。「コントロール」又は「参照」は、ベースラインの発現又は活性を決定する用途のために得られたサンプルを含む。したがって、コントロールサンプルは、非がん細胞又は組織、たとえば、対象の腫瘍又はがん様細胞を取り囲む細胞から；がんを有さない対象から；がんのリスクがあると疑われていない対象から；又は、そのような対象由来の細胞又は細胞株から、を含む多数の手段によって得ることができる。コントロールは、以前に特徴付けされたSCLCのような、以前確立された標準をも含む。したがって、本発明に従って実施される任意の試験又はアッセイは、確立された標準と比較してもよく、比較のために毎回コントロールサンプルを得なくてもよい。

【0049】

さらに、生物学的サンプルは多数の個体から生物学的サンプルを採取し、それらをプールすることにより、又は各個体の生物学的サンプルのアリコートをプールすることにより、誘導することができることは認識されるべきである。このプールされたサンプルは、単一の個体からのサンプルとして扱うことができ、そのプールされたサンプルにがんの存在が確立された場合、各個体の生物学的サンプルを関連結果のために再試験することができる。

【0050】

本明細書において使用される場合、「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために、本明細書において互換的に使用される。このポリマーは、直鎖状でも分岐状でもよく、修飾アミノ酸を含んでいてもよく、及び非アミノ酸で中断されていてもよい。これらの用語は、たとえば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、又は標識成分とのコンジュゲーションなどの他の任意の操作又は修飾による、天然に又は介入によって修飾さ

10

20

30

40

50

れたアミノ酸ポリマーをも包含する。また、たとえば、1以上のアミノ酸のアナログ（たとえば、非天然アミノ酸を含む）、ならびに当該技術分野で公知の他の修飾を含むポリペプチドも、この定義に含まれる。ポリペプチドは、単一鎖又は会合鎖であることができる。プレタンパク質及びインタクトな成熟タンパク質；成熟タンパク質から誘導されたペプチド又はポリペプチド；タンパク質のフラグメント；スプライシング変異体；タンパク質の組換え形態；アミノ酸修飾、欠失、又は置換を有するタンパク質変異体；消化物；及びグリコシル化、アセチル化、リン酸化などの翻訳後修飾物もまた、この定義内に含まれる。

【0051】

本発明は、肺がんを有する対象から誘導された組織学的に正常な細胞及び/又は悪性肺がん細胞において、がんを有さない対象から誘導された正常細胞と比較して、差次的に発現されるバイオマーカー、たとえば、核酸分子及びその発現産物を提供する。

10

【0052】

「バイオマーカー」は、特定の生物学的特性の分子指標であり、本明細書において使用される場合、細胞又は組織内におけるその差次的発現（存在、非存在、参照に関して過剰発現又は過少発現）が、小細胞肺がんの存否、又はPARP阻害剤曝露に対する増大した又は低減した感受性を示す核酸分子（たとえば、遺伝子又は遺伝子フラグメント）又はそれらの発現産物（たとえば、ポリペプチド又はペプチドフラグメントあるいはそれらの変異体）である。本明細書において使用される「発現産物」は、転写されたセンス又はアンチセンスRNA分子（たとえばmRNA）、又はポリヌクレオチド配列に相当する又はそれから誘導される翻訳されたポリペプチドである。いくつかの実施態様において、発現産物は、増幅産物（アンプリコン）又はポリヌクレオチド配列から転写されたRNA発現産物に相当するcDNAを指すことができる。バイオマーカーは、実験室アッセイ及び医用画像を含む多様な方法によって検出可能であり、測定可能である。バイオマーカーがタンパク質である場合、生物学的サンプル中の相当するタンパク質バイオマーカーの量又は存否、あるいはこのバイオマーカー又はこのバイオマーカーの発現をコントロールするタンパク質をコードする遺伝子のメチル化状態の代用測定値として、相当する遺伝子の発現を使用することも可能である。

20

【0053】

「差次的発現」又は「差次的に発現された」は、参照細胞又は組織又はサンプルと比較した、肺がんを有する対象由来の細胞又は組織又はサンプル中の、たとえば悪性肺がん細胞中の、及び/又は参照又は正常細胞と比較した、たとえばがんを有さない又は検出不可能ながんを有する対象由来の細胞、あるいは肺がんの切除に成功した対象由来の正常細胞と比較した、肺がんを有する対象由来の正常細胞（すなわち悪性腫瘍に関連する変化を有する細胞）中の、バイオマーカーの頻度もしくは量、又はその両方における差異を意味する。いくつかの実施態様において、このコントロール又は参照細胞は、SCLC又はNSCLCであってもよい。いくつかの実施態様において、差次的発現は、参照細胞と比較した悪性肺がん細胞中のバイオマーカーの頻度又は量、又はその両方における差異を指す。たとえば、バイオマーカーの差次的発現は、参照対象のサンプルと比較した、肺がん患者サンプル中のバイオマーカーの上昇したレベル又は低減したレベルの発現、たとえば、健常対象ならびに気管支炎及び細気管支炎のような呼吸器感染症の対象を含む非肺がんコントロールから採取した血液、尿、唾液、血清、胸水、又は気管支肺胞洗浄液サンプル中のタンパク質レベル又は抗体タイターの測定値と比較した、肺がん患者から採取した血液、尿、唾液、血清、胸水、又は気管支肺胞洗浄液サンプル中のタンパク質レベル又は抗体タイターの測定値を指すことができる。代替的に、又は付加的に、バイオマーカーの差次的発現は、参照対象のサンプルと比較した、肺がん患者のサンプル中のバイオマーカーのより高い頻度又はより低い頻度での検出を指すことができる。バイオマーカーは、量、頻度、又はその両方に関して差次的に存在することができる。いくつかの実施態様において、本発明のバイオマーカーの差次的発現は、異なる時点で、たとえば、療法の前後で測定することができる。「発現（の）レベル」又は「発現するレベル」は、細胞内の遺伝子にコードさ

30

40

50

れるmRNA、ならびにプレmRNA新生転写物、転写物プロセッシング中間体、成熟mRNA、及び分解産物のレベル、及び/又は細胞内のタンパク質、タンパク質フラグメント、及び分解産物のレベルを意味する。好適な比較は、同じ患者の正常細胞中の検出産物のレベルに対して、又は履歴データベースとの比較によって行うこともできる。

【0054】

バイオマーカーの量又は頻度、又はその両方における差異は、統計学的技術のような任意の好適な技術によって測定してもよい。たとえば、スチューデントの t-テスト又はAnovaテストのような標準的な統計学的解析（ここでは $p < 0.05$ は統計学的に有意であると一般に考えられる）によって測定した場合、肺がんサンプル中でバイオマーカーを検出する頻度が参照サンプル中よりも有意に高い又は低いのであれば、そのバイオマーカーは、肺がんサンプル及び参照サンプル間で差次的に発現されていることができる。いくつかの実施態様において、バイオマーカーは、参照サンプルと比較して、小細胞肺がんにおいて高又は低頻度のレベルで検出されるのであれば、差次的に発現されている；たとえば、検出は、少なくとも約1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%又はそれ以上、又は2倍、5倍、10倍、又はそれ以上の倍数で、参照サンプルと比較して肺がんにおいて高又は低頻度であることができる。代替的に又は付加的に、バイオマーカーは、たとえば、参照サンプル中のバイオマーカーの量と比較した場合、たとえば少なくとも1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%又はそれ以上、又は2倍、5倍、10倍、又はそれ以上の倍数で、参照サンプル中のバイオマーカーの量より多い又は少ないことによって、肺がんにおけるそのバイオマーカーの量が統計学的に有意に異なるのであれば、あるいは一方のサンプル中で検出可能であり、他方で検出不能であれば、差次的に発現されている。いくつかの実施態様において、差次的発現は、発現の増大又は低減を指してもよく、それは参照サンプルに関して試験サンプルにおける少なくとも1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100%又はそれ以上、又は2倍、5倍、10倍、又はそれ以上の倍数での増大又は低減であることができる。

10

20

【0055】

本発明に従って、PARP阻害剤に対して感受性の小細胞肺がん対象を同定するためのバイオマーカーは、SLFN11、SIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、及びGULP1を含む。2以上のこれらのバイオマーカー、たとえば、2、3、4、5、6、7、8、又は9種のバイオマーカーを、本発明に従ってアッセイにおいて任意の組み合わせで一緒に使用してもよい。いくつかの実施態様において、1以上のバイオマーカーを、アッセイから特異的に排除してもよい。いくつかの実施態様において、たとえばSCLC及びNSCLCの区別、又はPARP阻害剤又はタラゾパリブに対する感受性の決定において、特定の組合せが用いられる。本発明の特定の実施態様において、SLFN11が使用されるか、又はSLFN11がSIL1、SLC25A3、MAF、AP3B1、C1orf50、BCL2、DDX6、及びGULP1からなる群から選択される少なくとも1以上のバイオマーカーとの組み合わせで使用される。

30

【0056】

本発明に従ったバイオマーカーは、本明細書において記載されている核酸分子及びその発現産物の実質的に同一のホモログ及び変異体、たとえば、本発明のバイオマーカーと機能的に等価のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、たとえばアレル変異体又はスプライシング変異体又は種変異体のような、1以上のヌクレオチド置換、付加、又は欠失を有する配列、を含む分子、又は遺伝コードの縮重により本明細書において言及されている核酸分子及びポリペプチドとは異なる分子を含む。種変異体は、ある種と別の種とで変化している核酸配列であるが、それらから生じるポリペプチドは一般に互いに関して有意なアミノ酸同一性及び機能的類似性を有することになる。多型変異体(たとえば、一塩基多型又はSNP)は、所与の種の個体間の特定の遺伝子の核酸配列における変動である。

40

【0057】

「実質的に同一」の配列は、本明細書において考察するように、1以上の保存的置換のみによって、又はアミノ酸又は核酸分子の生物学的機能を破壊しない配列の位置に局在する1以上の非保存的置換、欠失、もしくは挿入のみによって、参照配列と相違するアミノ

50

酸又はヌクレオチド配列である。このような配列は、たとえば、the Align Program (Myers及びMillerの文献、CABIOS, 1989, 4:11-17)又はFASTAを使用して、比較のために使用した配列に対してアミノ酸又はヌクレオチドレベルで最適に整列させた場合、10%~99%の任意の整数、又はより一般に少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、55%、もしくは60%、又は少なくとも65%、75%、80%、85%、90%、もしくは95%、又は96%、97%、98%、もしくは99%もの高さで同一であることができる。ポリペプチドについては、比較配列の長さは、少なくとも2、5、10、もしくは15アミノ酸、又は少なくとも20、25、もしくは30アミノ酸であることができる。代替的な実施態様において、比較配列の長さは、少なくとも35、40、もしくは50アミノ酸、又は60、80、もしくは100アミノ酸超、又はそのタンパク質の長さ全体であることができる。核酸分子については、比較配列の長さは、少なくとも5、10、15、20、もしくは25ヌクレオチド、又は少なくとも30、40、もしくは50ヌクレオチドであることができる。代替的な実施態様において、比較配列の長さは、少なくとも60、70、80、もしくは90ヌクレオチド、又は100、200、もしくは500ヌクレオチド超であることができる。配列同一性は、公的に利用可能な配列解析ソフトウェア(たとえば、the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705のSequence Analysis Software Package又はthe National Library of Medicineから入手可能なBLASTソフトウェア、又は本明細書において記載されているもの)を使用して容易に測定することができる。有用なソフトウェアの例は、Pile-up プログラム及びPrettyBoxプログラムを含む。このようなソフトウェアは、種々の、欠失、置換、及び他の修飾にホモロジーの度合いを割り当てることにより類似の配列をマッチさせる。代替的に、又は付加的に、2つの核酸配列は、高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする場合、「実質的に同一」であることができる。いくつかの実施態様において、高ストリンジエンシー条件は、たとえば、少なくとも500ヌクレオチドの長さのDNAプローブを使用して、0.5 M NaHPO₄、pH 7.2、7% SDS、1 mM EDTA、及び1% BSA(フラクションV)を含有する緩衝液中、65 °Cの温度で、又は48%ホルムアミド、4.8x SSC、0.2 M Tris-Cl、pH 7.6、1x デンハルト 溶液、10% 硫酸デキストラン、及び0.1% SDSを含有する緩衝液中、42 °Cの温度で(これらは高ストリンジエンシーのノーザン又はサザンハイブリダイゼーションのための典型的な条件である。)起きるハイブリダイゼーションと匹敵するハイブリダイゼーションを可能にする条件である。ハイブリダイゼーションは、約20~30分間、又は約2~6時間、又は約10~15時間、又は24時間超もしくはそれ以上の期間にわたって行ってもよい。高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーションには、高ストリンジエンシーPCR、DNAシーケンシング、一本鎖高次構造多型分析、及びインサイチュハイブリダイゼーションのような、分子生物学者によってルーチンに行われている多数の技術の成功が依拠している。ノーザン及びサザンハイブリダイゼーションとは対照的に、これらの技術は、通常、比較的短いプローブ(たとえば、PCR又はシーケンシングには通常約16ヌクレオチド又はそれ以上、及びインサイチュハイブリダイゼーションには約40ヌクレオチド又はそれ以上)を用いて実施される。これらの技術において使用される高ストリンジエンシー条件は、分子生物学の技術分野の当業者に周知であり、それらの例は、たとえば、Ausubelらの文献、「分子生物学における現在のプロトコール」(Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1998に見出され、これは参照により本明細書に取り込まれる。

10

20

30

40

【0058】

(バイオマーカーを使用する試薬の調製)

本明細書において記載されるバイオマーカーは、本明細書において記載されるバイオマーカーにハイブリダイズするか又は特異的に結合するオリゴヌクレオチドプローブ及び抗体、及びそのホモログ及び変異体を調製するために使用することができる。

【0059】

- ・ 抗体

「抗体」は、任意のアイソタイプ (IgG、IgA、IgM、IgEなど)の全抗体、ポリクローナル抗体、及びそれらのフラグメントのような、抗原結合領域を有する分子を含む。抗体フ

50

ラグメントは、Fab'、Fab、F(ab')₂、単一ドメイン抗体、Fv、scFvなどを含む。抗体は、たとえば、Harlow及びLaneの文献(Harlow及びLaneの「抗体；実験室マニュアル」(Antibodies ; A Laboratory Manual), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988)に記載されたもののような、又は当該技術分野の当業者に公知の、調製の標準技術を使用して調製してもよい。たとえば、本発明のポリペプチドバイオマーカをコードする配列は、ウサギの免疫のために必要な程度に精製してもよい。抗血清の低アフィニティ又は特異性の潜在的な問題を最小限にしようと試みるために、各タンパク質について2又は3のポリペプチド構築物を作製してもよく、各構築物を少なくとも2匹のウサギに注射してもよい。抗血清は、好ましくは少なくとも3回のブースター注射を含む、一連の注射によって惹起してもよい。一次免疫は、フロイントの完全アジュバントを用いて行い、続いての免疫はフロイントの不完全アジュバントを用いて行うことができる。抗体タイターは、精製されたタンパク質を使用してウェスタンブロット及び免疫沈降解析によって監視してもよい。免疫血清は、CNBr-セファロースとカップリングしたタンパク質を使用してアフィニティ精製してもよい。抗血清特異性は、無関係のタンパク質のパネルを使用して決定してもよい。抗体フラグメントは、組換えにより又はタンパク質切断により調製してもよい。本発明のポリペプチドバイオマーカの比較的獨特の免疫原性領域に相当するペプチドを作製し、導入されたC末端リジンを通じてキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)にカップリングしてもよい。これらのペプチドの各々に対する抗血清は、BSAとコンジュゲート化したペプチドでアフィニティ精製し、ペプチドコンジュゲートを使用するELISA及びウェスタンブロットで、及びウェスタンブロット及び免疫沈降によって、特異性を試験してもよい。

10

20

【0060】

本発明のポリペプチドバイオマーカの任意のものの特異的に結合するモノクローナル抗体は、標準的ハイブリドーマ技術(たとえば、Kohlerらの文献、Nature 256:495, 1975; Kohlerらの文献、Eur. J. Immunol. 6:511, 1976; Kohlerらの文献、Eur. J. Immunol. 6:292, 1976; Hammerlingらの文献、「モノクローナル抗体及びT細胞ハイブリドーマ」(Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas), Elsevier, N. Y., 1981中を参照されたい)に従って調製される。代替的に、モノクローナル抗体は、本発明のポリペプチド及びファージディスプレイライブラリーを使用して調製してもよい(Vaughanらの文献、Nature Biotech 14:309-314, 1996)。作製されたら、モノクローナル抗体は、ウェスタンブロット又は免疫沈降により特異的認識について試験してもよい。

30

【0061】

いくつかの実施態様において、抗体は、高頻度の荷電した残基のような基準によって免疫原性である可能性が高いと思われるポリペプチドフラグメントを使用して作製してもよい。抗体は、たとえば、1つの種由来の抗原結合ドメイン及び別の種由来のFc部分を含有するキメラ抗体を使用して、又は適切な種のハイブリドーマから作製した抗体を使用することによって、有害な宿主免疫応答を最小限にするよう仕立てることができる。たとえば、SLFN11を用いて、抗体は、あるSLFN11領域について特異的であるように仕立てられる。

【0062】

抗体は、抗原、たとえば本明細書において記載されるバイオマーカ、を認識してその抗原に結合するが、サンプル中の他の分子は実質的に認識せず、結合しない場合に、その抗原に「特異的に結合」する。このような抗体は、たとえば、サンプル中の別の参照分子についてのその抗体のアフィニティより少なくとも2、5、10、100、1000、又は10000倍大きいアフィニティを、その抗原に対して有する。このような条件下での抗体への特異的結合は、特定のバイオマーカに対する特異性について選択された抗体を必要とする可能性がある。たとえば、ラット、マウス、又はヒトのような特異的な種由来のバイオマーカに対して惹起されたポリクローナル抗体は、そのバイオマーカと特異的に免疫反応性であるが、そのバイオマーカの多型変異体及びアレルを除き、他のタンパク質とは反応しないポリクローナル抗体のみについて選択してもよい。いくつかの実施態様において、ラット、マウス、又はヒトのような特異的な種からのバイオマーカに対して惹起された

40

50

ポリクローナル抗体は、その種由来のバイオマーカーと特異的に免疫反応性であるが、そのバイオマーカーの多型変異体及びアレルを含む他のタンパク質とは反応しないポリクローナル抗体のみについて選択してもよい。本明細書において記載されるバイオマーカーの任意のものと特異的に結合する抗体は、サンプルを抗体と接触させ、サンプル中のバイオマーカーに結合した抗体の複合体の存在を検出することにより、免疫アッセイにおいて使用することができる。免疫アッセイにおいて使用される抗体は、本明細書において記載されるように又は当該技術分野で公知のとおり製造してもよく、Dako Canada, Inc., Mississauga, ONのような供給業者から商業的に入手可能してもよい。この抗体は、後続のアッセイ手順を容易にするために、サンプルと接触させる前に、固体基材(たとえば、ナイロン、ガラス、セラミック、プラスチックなど)に固定しておいてもよい。抗体バイオマーカー複合体は、放射能、蛍光、発光、化学発光、吸光度の検出、又は顕微鏡法、イメージング法などのような、多様な標準的手順を使用して可視化又は検出してもよい。免疫アッセイは、免疫組織化学、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウェスタンブロット、免疫放射線アッセイ(IRMA)、ラテラルフロー、エヴァネッセンス(DiaMed AG, Cressier surMorat, Switzerland、欧州特許公報EP1371967、EP1079226及びEP1204856に記載されているもの)、免疫組織/細胞化学、及び当該技術分野の当業者に公知の他の方法を含む。免疫アッセイは、サンプル中のバイオマーカーの存否、ならびにサンプル中のバイオマーカーの量を決定するために使用することができる。抗体-バイオマーカー複合体の量は、サンプル中に存在することが公知のポリペプチドのような参照又は標準に対する比較によって決定することができる。抗体-バイオマーカー複合体の量は、参照又はコントロールサンプル中のバイオマーカーの量のような、参照又は標準に対する比較によっても決定することができる。したがって、サンプル中のバイオマーカーの量は、絶対的な用語で定量される必要はなく、参照又はコントロールに関して相対的な用語で測定することができる。

【0063】

・ プローブ及びプライマー

「プローブ」又は「プライマー」は、相補的配列(標的)を含む第二のDNA又はRNA分子と塩基対を形成し得る定義された配列の一本鎖DNA又はRNA分子である。得られるハイブリッド分子の安定性は、生じる塩基対形成の範囲に依存し、プローブ及び標的分子間の相補性の程度、及びハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーの程度のようなパラメーターに影響される。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーの程度は、温度、塩濃度、及びホルムアミドなどの有機分子の濃度のようなパラメーターに影響され、当該技術分野の当業者に公知の方法によって決定される。本明細書において記載される核酸バイオマーカーについて特異的なプローブ又はプライマー、又はそれらの部分は、プローブ又はプライマーを使用する目的及び条件によって、少なくとも8ヌクレオチドから500ヌクレオチド超までの間の任意の値を含む任意の整数で長さを変化させることができる。たとえば、プローブ又はプライマーは、8、10、15、20、又は25ヌクレオチドの長さであってもよく、又は少なくとも30、40、50、又は60ヌクレオチドの長さであってもよく、又は100、200、500、又は1000ヌクレオチド超の長さであってもよい。本明細書において記載される核酸バイオマーカーに特異的なプローブ又はプライマーは、本明細書において記載される核酸バイオマーカーに対して、20~30%超の配列同一性、又は少なくとも55~75%の配列同一性、又は少なくとも75~85%の配列同一性、又は少なくとも85~99%の配列同一性、又は100%の配列同一性を有することができる。プローブ又はプライマーは、たとえば増幅によってゲノムDNA又はcDNAから、又はクローニングされたDNAセグメントから誘導してもよく、単一個体からの単一遺伝子の全体又は部分を表すゲノムDNA又はcDNA配列を含んでいてもよい。プローブは、特有の配列(たとえば、核酸バイオマーカーに対する100%同一性)を有していてもよく、及び/又は公知の配列を有していてもよい。プローブ又はプライマーは、化学的に合成してもよい。プローブ又はプライマーは、本明細書において記載される高ストリンジェンシー条件下で核酸バイオマーカーにハイブリダイズしてもよい。

。

10

20

30

40

50

【0064】

プローブ又はプライマーは、当該技術分野の当業者に公知の方法によって、放射性又は非放射性に、検出可能に標識することができる。プローブ又はプライマーは、核酸シーケンシング、ポリメラーゼ連鎖反応(たとえば、RT-PCR)による核酸増幅、一本鎖高次構造多型分析(SSCP)解析、制限断片長多型(RFLP)解析、サザンハイブリダイゼーション、ノーザンハイブリダイゼーション、インサイチュハイブリダイゼーション、電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)、及び当該技術分野の当業者に公知の他の方法のような核酸ハイブリダイゼーションを包含する肺がん検出方法のために使用することができる。

【0065】

「検出可能に標識する」は、分子、たとえば、オリゴヌクレオチドプローブ又はプライマー、遺伝子又はそのフラグメント、又はcDNA分子の存在をマーキングし同定するための任意の手段を意味する。分子を検出可能に標識するための方法は、当該技術分野において周知であり、制限なしに、放射性標識(たとえば、³²P又は³⁵Sのような同位元素を用いる)、及び酵素的標識(たとえば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼを使用する)、化学発光標識、蛍光標識(たとえば、フルオレセインを使用する)、生物発光標識、又はプローブに付着したリガンドの抗体検出のような非放射性標識を含む。同じくこの定義に含まれるのは、間接手段によって検出可能に標識された分子、たとえば、第一の部分(たとえばビオチン)と結合しており、この第一の部分が次に、観察又は測定され得る第二の部分(たとえばフルオレセイン標識ストレプトアビジン)に結合する分子である。標識は、ジゴキシゲニン、ルシフェラーゼ、及びエクオリンをも含む。

【0066】

・ アレイ及びキット

本発明のバイオマーカーを使用して調製された抗体、プローブ、プライマー及び他の試薬は、肺がんの検出に使用するためのアレイを製造するために使用してもよい。「アレイ」又は「マトリックス」は、表面の上の、独立した部位をそれぞれ表す、アドレス指定できる位置又は「アドレス」のパターン又はアレンジメントを指すことを意味する。アレイは、一般に固体支持体(たとえば、ナイロン、ガラス、セラミック、プラスチックなど)を必要とし、この支持体に、核酸分子、ポリペプチド、抗体、組織などが、プローブへのハイブリダイゼーションのパターンが容易に決定され得るように特定された次元のアレンジメントで付着する。

【0067】

一般に、プローブ(たとえば、抗体、核酸プローブ又はプライマー、ポリペプチドなど)は、アレイ表面に固定化されており、結合に好適な条件下で標的結合パートナー(たとえば、抗体の場合、抗体を特異的に結合するポリペプチド、又はプローブの場合、プローブにハイブリダイズする核酸分子)を含有するサンプルに接触させる。望ましい場合、サンプル中の結合しない物質は、除去してもよい。結合した標的は検出され、結合結果は適切な統計学的又は他の方法を用いて解析される。プローブ又は標的は、検出及び後続する解析を容易にするために検出可能に標識されていてもよい。本明細書において記載されるバイオマーカーに相当する複数のプローブを使用してもよい。この複数のプローブは、本明細書において記載される1以上のバイオマーカーに相当していてもよい。本明細書において記載されるバイオマーカーと結合することができるプローブに加えて、アレイは、ある実験から別の実験への結果の正規化及び定量的レベルでの複数の実験の比較を可能にするために、核酸分子、ポリペプチド、又は抗体をコントロール及び参照してもよい。したがって、本発明は、核酸、ポリペプチド、抗体、又は細胞学アレイを使用する生物学的アッセイを提供する。

【0068】

本発明は、小細胞肺がんを検出するための、特に本明細書において記載される遺伝子発現モチーフに関するキットも提供する。このキットは、本明細書において記載されるバイオマーカーに相当する1以上の試薬、たとえば、体液中に抗原として分泌されるバイオマ

10

20

30

40

50

ーカーに特異的に結合する抗体、バイオマーカー特異的抗体に結合する組換えタンパク質、バイオマーカーにハイブリダイズする核酸プローブ又はプライマーを含んでいてもよい。いくつかの実施態様において、キットは、たとえば、アレイ上に、本明細書において記載されるバイオマーカーに相当する、複数の試薬を含んでいてもよい。キットは、検出試薬、たとえば、検出可能に標識された試薬を含んでいてもよい。キットは、肺がんの(早期)検出及びサブタイピングにおいてキットを使用するための指示書を含んでいてもよく、コントロール又は参照標準、洗浄溶液、解析ソフトウェアなどのような、他の試薬及び情報を含んでいてもよい。

【0069】

(診断方法及び他の方法)

本明細書において同定される1以上のバイオマーカーを発現する小細胞肺癌対象は、免疫組織化学、ELISA、ウェスタンブロットのような免疫アッセイによって、又は診断技術分野の当業者に公知の任意の他の方法によって、1以上のバイオマーカーの差次的発現を検出することによって、診断することができる。この検出は、インビトロ又はインビボで実施することができる。

【0070】

個々のバイオマーカー及び2以上のバイオマーカーの組み合わせは有用な診断薬である。特に、本明細書において記載される1以上のバイオマーカーの組み合わせは、肺がんの正確な(早期)診断及びサブタイピングを可能にする。異なるサンプル中の複数のバイオマーカーにわたる差次的発現の変動は、特定のタイプの肺がんの存否、肺がんのための特定の療法に対する応答を診断又は予測することができ、又は肺がんを発症するリスクをより良く評価することができる。たとえば、SLFN11の発現は、サンプル中のSCLCの存在を検出するために、又はPARP阻害剤療法又はタラゾパリブ療法について患者を選択するために使用することができる。好適な統計学的方法及びアルゴリズム、たとえばロジスティック回帰アルゴリズムは、診断、予後、セラノスティック、又は他の目的のために、複数のバイオマーカーを解析及び使用するために使用することができる。バイオマーカー(又は任意の1以上のバイオマーカーの特異的組み合わせ)は、複数回、たとえば小細胞肺癌のための療法の前、最中、及び後に、検出及び測定することができる。

【0071】

本明細書において記載されるバイオマーカーの検出は、肺がんの(早期)検出及びサブタイピングのための当初スクリーニングとして実施してもよく、及び/又は喀痰細胞学、胸部X線、CTスキャン、スパイラルCT、PET、特異的トレーサーを用いるPET-CT、たとえば⁸⁹Zr、¹¹C、蛍光色素、シンチグラフィ、生検、従来形態学的MACs分析などのような肺がん診断の従来法と併せて使用してもよい。本明細書において記載されるバイオマーカーの検出は、pRb2/p130、p53、及び/又はrasのような、肺がんについて以前認識されたバイオマーカーと併せて実施してもよい。本明細書において記載されるバイオマーカーの検出は、たとえば、ある年齢を超えた(たとえば60歳超)大量喫煙者の、ルーチンの検査の一部として実施してもよく、又は肺がんについてリスクのある対象(たとえば大量喫煙者)におけるバイオマーカーのベースラインレベルを決定するために実施してもよい。

【0072】

一般に、本発明のバイオマーカーパネルは、分子診断及び/又は検出のための分子イメージング(前述のインビボイメージング技術を含む)、及び/又は肺がんのための治療を監視するために、及び/又はPARP阻害剤治療のための対象を同定するために、使用すべきである。本明細書において記載されるバイオマーカーの検出は、医師が診断に基づいて対象のための適切な行動方針(たとえばさらなる試験、手術、何もせず、など)を決定することを可能にし得る。本明細書において記載されるバイオマーカーの検出は、小細胞肺癌の存否の決定、小細胞肺癌の早期診断、小細胞肺癌についての予後、小細胞肺癌のサブタイピング、小細胞肺癌についての療法の有効性の評価、対象における小細胞肺癌療法の監視、又は小細胞肺癌についての療法を経験し緩解中の対象における小細胞肺癌の再発の検出も、補助し得る。代替的な態様において、バイオマーカー及びバイオマ

10

20

30

40

50

ーカーを使用して調製された試薬は、SCLC治療剤を同定するために使用してもよい。キット及びアレイは、肺がんを診断及びサブタイピングするために、本発明に従ってバイオマーカーを測定するために使用することができる。キットは、SCLC療法に対する対象の応答を監視し、試験の結果に基づいて医師が治療を修正することを可能にするために使用することもできる。キットは、低分子、ペプチドなどのような肺がん治療剤を同定し、確認するために使用することもできる。

【0073】

本明細書において使用される場合、「バイオマーカー値」、「値」、「バイオマーカーレベル」、及び「レベル」は、生物学的サンプル中のバイオマーカーを検出するための任意の分析方法を用いて得られ、及び生物学的サンプル中のバイオマーカーの、それについての、又はそれに相当する、存在、不存在、絶対量又は濃度、相対量又は濃度、タイター、レベル、発現レベル、測定されたレベルの比などを示す、測定値を指すために互換的に使用される。「値」又は「レベル」の正確な性質は、バイオマーカーを検出するために使われる特定の分析方法の具体的な設計及び成分に依存する。

10

【0074】

バイオマーカーが個体における異常なプロセス又は疾患又は他の状態を示すか、又はその徴候である場合、そのバイオマーカーは、一般に、個体における正常なプロセス又は疾患の不存在又は他の状態を示すか、又はその徴候であるそのバイオマーカーの発現レベル又は値と比較して、過剰発現されているか、又は過少発現されているかのいずれかであると記載される。「アップレギュレーション」、「アップレギュレートされる」、「過剰発現」、「過剰発現される」、及びこれらの任意の変化形は、健常又は正常個体からの同様の生物学的サンプル中に典型的に検出されるバイオマーカーの値又はレベル(又は値もしくはレベルの範囲)を上回る、生物学的サンプル中のバイオマーカーの値又はレベルを指すために互換的に使用される。これらの用語は、特定の疾患の異なるステージで検出される可能性のあるバイオマーカーの値又はレベル(又は値もしくはレベルの範囲)を上回る、生物学的サンプル中のそのバイオマーカーの値又はレベルを指すこともある。

20

【0075】

「ダウンレギュレーション」、「ダウンレギュレートされる」、「過少発現」、「過少発現される」、及びこれらの任意の変化形は、健常又は正常個体からの同様の生物学的サンプル中に典型的に検出されるバイオマーカーの値又はレベル(又は値もしくはレベルの範囲)を下回る、生物学的サンプル中のバイオマーカーの値又はレベルを指すために互換的に使用される。これらの用語は、特定の疾患の異なるステージで検出される可能性のあるバイオマーカーの値又はレベル(又は値もしくはレベルの範囲)を下回る、生物学的サンプル中のそのバイオマーカーの値又はレベルを指すこともある。

30

【0076】

さらに、過剰発現又は過少発現されるバイオマーカーは、個体における正常なプロセス又は疾患の不存在又は他の状態を示すか、又はその徴候であるバイオマーカーの「正常」発現レベル又は値と比較して、「差次的に発現される」、又は「差次的レベル」もしくは「差次的値」を有すると呼ばれることもできる。したがって、バイオマーカーの「差次的発現」は、そのバイオマーカーの「正常」発現レベルからの変動として呼ばれることもできる。

40

【0077】

「差次的遺伝子発現」及び「差次的発現」という用語は、正常又はコントロール対象における発現に対して、特定の疾患に罹患した対象において高い又は低いレベルにその発現が活性化される遺伝子(又はその相当するタンパク質発現産物)を指すために互換的に使用される。これらの用語は、同一疾患の異なるステージで、高い又は低いレベルにその発現が活性化される遺伝子(又はその相当するタンパク質発現産物)も含む。差次的に発現される遺伝子は、核酸レベル又はタンパク質レベルで活性化又は阻害されてもよく、又は異なるポリペプチド産物をもたらすための選択的スプライシングの対象であってもよいことも理解される。このような相違は、mRNAレベル、表面発現、ポリペプチドの分泌又は他の分

50

配を含む種々の変化によって証明することができる。差次的遺伝子発現は、2以上の遺伝子間又はそれらの遺伝子産物間の発現の比較；又は2以上の遺伝子間又はそれらの遺伝子産物間の発現の比の比較；又は正常対象及び疾患に罹患した対象間で相違する、異なってプロセッシングされた同一遺伝子の2つの産物の比較；あるいは同一疾患の種々のステージ間を含んでいてもよい。差次的発現は、たとえば、正常及び疾患細胞間、又は異なる疾患事象又は疾患ステージを経験してきた細胞間の、遺伝子又はその発現産物における時間的又は細胞の発現パターンの定量的ならびに定性的な相違を含む。

【0078】

本明細書において使用される場合、バイオマーカー値に関する「検出する」又は「決定する」は、バイオマーカー値に相当するシグナルを観察及び記録するために必要な機器及びそのシグナルを生成するために必要な材料の両方の使用を含む。種々の実施態様において、バイオマーカー値は、蛍光、化学発光、表面プラズモン共鳴、表面弾性波、質量分析、赤外分光、ラマン分光法、原子間力顕微鏡法、走査型トンネル顕微鏡、電気化学的検出法、核磁気共鳴、量子ドットなどを含む任意の好適な方法を使用して検出される。

10

【0079】

「診断する」、「診断している」、「診断」、及びそれらの変化形は、1以上の徴候、症状、データ、又はその個体に属する他の情報に基づく、個体の健康ステータス又は状態の検出、決定又は認識を指す。個体の健康ステータスは、健常/正常(たとえば、疾患又は状態の不存在の診断)として診断され、又は病気/異常(たとえば、疾患又は状態の存在又は特徴の評価の診断)として診断されることができ、「診断する」、「診断している」、「診断」などの用語は、特定の疾患又は状態に関して、その疾患の最初の検出；疾患の特徴づけ又は分類；疾患の進行、緩解、又は再発の検出；及び個体に治療又は療法を施した後の疾患応答の検出にわたる。SCLCの診断は、がんを有する個体を、がんを有さない個体から区別することを含む。

20

【0080】

「予後判断する」、「予後判断している」、「予後」、及びそれらの変化形は、疾患又は状態を有する個体におけるその疾患又は状態の将来の経過の予測(たとえば患者生存の予測)を指し、これらの用語は、個体に治療又は療法を施した後の疾患応答の評価にわたる。

【0081】

(バイオマーカーの例示的用途)

種々の例示的な実施態様において、本明細書において記載される分析方法のいずれかを含む任意の数の分析法によって、血清又は血漿中のような、個体の循環中に存在する1以上のバイオマーカーに相当する1以上のバイオマーカー値を検出することによって、個体におけるSCLCを診断するための方法が提供される。これらのバイオマーカーは、たとえば、SCLCを有さない個体と比較してSCLCを有する個体において差次的に発現されるか、又はPARP阻害剤治療に対して感受性である可能性が高いSCLC対象において差次的に発現される。個体におけるバイオマーカーの差次的発現の検出は、たとえば、SCLCの早期診断を可能にするために、又はSCLC再発を監視するために、又はPARP阻害剤療法の処方箋のために、又は他の臨床的適応症のために、使用することができる。

30

40

【0082】

本明細書において記載される任意のバイオマーカーは、SCLCについての多様な臨床的適応症において使用してもよく、それらは以下のもの、すなわち、(高リスク個体又は集団などにおけるような)SCLCの検出；非小細胞肺癌(NSCLC)及び小細胞肺癌(SCLC)を区別することなどによるようなSCLCの特徴づけ(たとえばSCLCのタイプ、サブタイプ、又はステージ決定)；SCLC予後の決定；SCLC進行又は緩解の監視；SCLC再発についての監視；転移の監視；治療選択、特にPARP阻害剤又はタラゾパリブを用いる治療についての選択；治療剤又は他の治療に対する応答の監視；コンピュータ断層撮影(CT)スクリーニングのための個体の層別化(たとえば、SCLCのリスクがより大きい個体を同定し、それによってスパイラルCTスクリーニングの利益を最もよく得られるようにし、したがって、CTの陽性的

50

中率を増大すること) ; (CT試験又はバイオマーカー試験単独と比較して増大した診断性能を発揮するアッセイを提供するなどのために)バイオマーカー試験を喫煙歴などのような付加的な生体医学的情報と、又は小結節サイズ、形態学などと、組み合わせること ; 悪性又は良性としての肺の小結節の診断を容易にすること ; ひとたびCTで肺の小結節が観察された場合の臨床的決断を容易にすること(たとえば、小結節サイズのカテゴリー化有り又は無しでバイオマーカーベースの試験が陰性であるときなど、その小結節が低リスクであると思われる場合、CTスキャンの繰り返しを命じる、又は、小結節サイズのカテゴリー化有り又は無しでバイオマーカーベースの試験が陽性であるときなど、その小結節が中～高リスクであると思われる場合、生検を考慮する、など) ; 及び臨床的フォローアップに関する決断を容易にすること(たとえば、石灰化していない小結節がCTで観察された後、反復CTスキャン、細針生検、小結節切除又は開胸術を施すべきか否か)、のいずれかを含む。バイオマーカー試験は、単独の高リスク個体のCT又は胸部X線スクリーニングに対して陽性的中率(PPV)を改善する可能性がある。CTスクリーニングと併せての有用性に加えて、本明細書において記載されるバイオマーカーは、胸部X線、気管支鏡法又は蛍光気管支鏡法、MRI又はPETスキャンのような、SCLCのために使用される他の任意のイメージング様式と併せて使用することもできる。そのうえ、記載バイオマーカーは、SCLCの適応症がイメージング様式又は他の臨床的相関物によって検出される前に、又は症状が出現する前に、これらの用途のある種のもを許容することにおいても有用である可能性がある。それは、CTスキャン又は他のイメージング法で同定された非決定的な肺の小結節を有する個体を区別すること、SCLCについての高リスク喫煙者のスクリーニング、及びSCLCを有する個体の診断をさらに含む。

【0083】

SCLCを診断するために本明細書において記載されるバイオマーカーの任意のものを使用し得る方式の例として、SCLCを有することがわかっていない個体における1以上の記載バイオマーカーの差次的発現は、その個体がSCLCを有することを示す可能性があり、それによって、おそらくはSCLCが他の手段によって検出される前又は症状が出現する前の、その疾患の治療が最も効果的な早期ステージでのSCLCの検出が可能になる。SCLCの経過中の1以上のバイオマーカーの過剰発現は、SCLCの進行、たとえば、SCLC腫瘍が増殖及び/又は転移していること(及びしたがって予後不良を示す)の暗示であることができ、一方、1以上のバイオマーカーが差次的に発現される度合いの低減(たとえば、後続するバイオマーカー試験において、その個体における発現レベルが「正常」発現レベルに向かって移動又は接近していること)は、SCLC緩解、たとえば、SCLC腫瘍が縮小していること(及びしたがって、良好又はより良い予後を示す)の暗示であることができる。同様に、SCLC治療の経過中において、1以上のバイオマーカーが差次的に発現される度合いの増大(たとえば、後続するバイオマーカー試験において、その個体における発現レベルが「正常」発現レベルからさらに遠ざかること)は、SCLCが進行していることを示し、それ故、その治療が有効でないことを示すことができ、一方、SCLC治療の経過中において、1以上のバイオマーカーの差次的発現の低減は、SCLC緩解の暗示であり、それ故、その治療が成功裡に作用していることを示すことができる。付加的に、個体のSCLCが見かけ上治癒した後の1以上のバイオマーカーの差次的発現における増大又は低減は、SCLC再発の暗示である可能性がある。このような状況において、たとえば、その個体は、SCLCの再発が後期まで検出されなかった場合よりも早いステージで、療法(又はその個体が療法を維持していた場合、投薬量及び/又は頻度を増大するように改変された治療レジメン)を再開することができる。さらに、個体における1以上のバイオマーカーの差次的発現レベルは、特定の治療剤に対するその個体の応答の予測であり得る。SCLC再発又は進行についての監視において、バイオマーカー発現レベルの変化は、たとえばSCLC活性を決定するため又は治療の変更の必要性を決定するために、反復イメージング(たとえば、反復CTスキャンニング)の必要性を示すことができる。

【0084】

本明細書において記載されるバイオマーカーの任意のものの検出は、たとえば治療後に

治療の成功を評価するため又はSCLC緩解、再発、及び/又は進行(転移を含む)を監視するために、SCLC治療の後に、又はそれと併せて、有用であることができる。SCLC治療は、たとえば、個体に対する治療剤の投与、手術の実施(たとえば、SCLC腫瘍の少なくとも部分の外科的切除又はSCLC及び周囲組織の除去)、放射線照射療法の施行、又は当該技術分野で使用される他の任意の種類SCLC治療、及びこれらの治療の任意の組合せを含むことができる。肺がん治療は、たとえば、個体に対する治療剤の投与、手術の実施(たとえば、肺腫瘍の少なくとも部分の外科的切除)、放射線照射療法の施行、又は当該技術分野で使用される他の任意の種類SCLC治療、及びこれらの治療の任意の組合せを含むことができる。たとえば、siRNA分子は、遺伝子発現を阻害し、標的化肺がん治療薬として役立つ可能性がある合成二本鎖RNA分子である。たとえば、任意のバイオマーカーは、治療後少なくとも1回検出してもよく、又は治療後複数回(定期的な間隔などで)検出してもよく、あるいは、治療の前後の両方で検出してもよい。個体における任意のバイオマーカーの経時的な差次的発現レベルは、SCLC進行、緩解、又は再発の暗示であることができ、それらの例示として、以下の任意のもの、すなわち、治療前のバイオマーカーの発現レベルと比較して治療後のバイオマーカーの発現レベルにおける増大又は低減；治療後の早期の時点でのバイオマーカーの発現レベルと比較して治療後の後期の時点でのバイオマーカーの発現レベルにおける増大又は低減；及びバイオマーカーの正常レベルと比較して治療後の単一時点でのバイオマーカーの差次的発現レベル、が含まれる。

10

【0085】

具体的な例として、本明細書において記載されるバイオマーカーの任意のものについてのバイオマーカーレベルは、手術前及び手術後(たとえば、手術後2~16週)の血清又は血漿サンプル中で決定することができる。手術前サンプルと比較して手術後サンプルにおけるバイオマーカー発現レベルの増大は、SCLCの進行(たとえば、不成功の手術)を示すことができ、一方、手術前サンプルと比較して手術後サンプルにおけるバイオマーカー発現レベルの低減は、SCLCの退縮(たとえば、該手術が成功裡に該肺腫瘍を除去した)を示すことができる。バイオマーカーレベルの同様の解析は、放射線照射療法又は治療剤もしくはがんワクチンの投与の前後のような、他の形態の治療の前後に行うことができる。

20

【0086】

独立型診断試験としてのバイオマーカーレベルの試験に加えて、バイオマーカーレベルは、疾患の易罹患性の増大したリスクの暗示であるSNPs又は他の遺伝的病変もしくは変異性の決定と併せて行うこともできる(たとえば、Amosらの文献、Nature Genetics 40, 616-622 (2009)を参照されたい)。

30

【0087】

独立型診断試験としてのバイオマーカーレベルの試験に加えて、バイオマーカーレベルは、CTスクリーニングのような放射線学的スクリーニングと併せて行うこともできる。たとえば、バイオマーカーは、SCLCについてリスクのある大規模の無症候性集団(たとえば喫煙者)をスクリーニングするためのような、CTスクリーニングの実施についての医学的及び経済的正当化を容易にする可能性がある。たとえば、バイオマーカーレベルの「CT前」試験は、バイオマーカーレベルに基づいてSCLCについて最高リスクにあり、CTスクリーニングについて優先されるべき者を同定するためのような、CTスクリーニングについて高リスクの個体を層別化するために使用し得る。CT試験が実施される場合、1以上のバイオマーカーの(たとえば、血清又は血漿サンプルのアプタマーアッセイによって決定されるような)バイオマーカーレベルを測定することができ、その診断スコアは、CT又はバイオマーカー試験単独に対して陽性的中率(PPV)を増強するために、付加的な生体医学的情報(たとえば、CT試験によって決定される腫瘍パラメーター)と併せて評価し得る。バイオマーカーレベルを決定するための「CT後」アプタマーパネルは、CT(又は他のイメージング様式)によって観察された肺の小結節が悪性又は良性である確率を決定するために使用することができる。

40

【0088】

本明細書において記載される任意のバイオマーカーの検出は、CT後試験のために有用であ

50

ることができる。たとえば、バイオマーカー試験は、CT単独に対して偽陽性試験の数を有意に低減する又はなくす可能性がある。さらに、バイオマーカー試験は、患者の治療を容易にする可能性がある。例として、肺小結節のサイズが5 mm未満である場合、バイオマーカー試験の結果はより早期に患者を「待機」から生検へ前進させることができる；肺小結節が5~9 mmであれば、バイオマーカー試験は、偽陽性スキャンでの生検又は開胸術の使用を排除することができる；及び肺小結節が10 mm超である場合、バイオマーカー試験は、良性小結節を有するこれらの患者の下位集団についての手術を排除することができる。バイオマーカー試験に基づくいくらかの患者における生検の必要性の排除は、小結節の位置によっては小結節組織入手の困難性、及び小結節生検と関連する有意な罹患率があるため、有益であろう。同様に、小結節が実際に良性である患者のようないくらかの患者における手術の必要性の排除は、手術と関連する不要なリスク及びコストを回避するであろう。

10

【0089】

高リスク個体における放射線学的スクリーニングと併せてのバイオマーカーレベル試験に加えて(たとえば、肺小結節のサイズ又は他の特徴、又はイメージングスキャンで観察された量と併せてバイオマーカーレベルを評価すること)、バイオマーカーに関する情報は、他のタイプのデータ、特にSCLCについての個体のリスクを示すデータ(たとえば患者の臨床歴、職業性曝露歴、症状、がんの家族歴、該個体が喫煙者であったか否かのようなリスク要因、及び/又は他のバイオマーカーのステータスなど)と併せて評価することもできる。これらの種々のデータは、コンピュータ又は他の装置/デバイスに搭載され得る、コンピュータプログラム/ソフトウェアのような、自動化された方法によって評価することができる。

20

【0090】

記載バイオマーカーの任意のものは、イメージング試験において使用することもできる。たとえば、イメージング剤は、記載の任意のバイオマーカーとカップリングことができ、それは、中でも特に、疾患の進行/緩解又は転移を監視するため、疾患再発について監視するため、又は療法に対する応答を監視するため、SCLC診断において補助するために使用することができる。

【0091】

(バイオマーカー及びバイオマーカー値の検出及び決定)

30

本明細書において記載されるバイオマーカーについてのバイオマーカー値は、多様な公知の分析法の任意のものを使用して検出することができる。ひとつの実施態様において、バイオマーカー値は、捕獲試薬を使用して検出される。本明細書において使用される場合、「捕獲剤」又は「捕獲試薬」は、バイオマーカーに特異的に結合することができる分子を指す。種々の実施態様において、捕獲試薬は、溶液中のバイオマーカーに曝露することができ、又は捕獲試薬が固体支持体に固定化されている間にバイオマーカーに曝露することができる。他の実施態様において、捕獲試薬は、固体支持体上の二次的特徴と反応性である特徴を含む。これらの実施態様において、捕獲試薬は、溶液中でバイオマーカーに曝露することができ、次いでバイオマーカーを固体支持体に固定するために、捕獲試薬上のその特徴を固体支持体上の二次的特徴と併せて使用することができる。捕獲試薬は、実行される分析のタイプに基づいて選択される。捕獲試薬は、アプタマー、抗体、抗原、アドネクチン(adnectins)、アンキリン、他の抗体ミメティック及び他のタンパク質スキャフォールド、自己抗体、キメラ、低分子、F(ab')₂フラグメント、単鎖抗体フラグメント、Fvフラグメント、単鎖Fvフラグメント、核酸、レクチン、リガンド結合レセプター、アフイボディ(affibodies)、ナノボディ、インプリンテッドポリマー、アヴィマー、ペプチドミメティック、ホルモンレセプター、サイトカインレセプター、及び合成レセプター、ならびにそれらの改変物及びフラグメントを含むが、これらに限定されない。

40

【0092】

いくつかの実施態様において、バイオマーカー値は、バイオマーカー/捕獲試薬複合体を使用して検出される。他の実施態様において、バイオマーカー値は、バイオマーカー/

50

捕獲試薬複合体から誘導され、間接的に、たとえばバイオマーカー / 捕獲試薬相互作用に続く反応の結果として、検出されるが、バイオマーカー / 捕獲試薬複合体の形成に依存する。

【0093】

いくつかの実施態様において、バイオマーカー値は、生物学的サンプル中のバイオマーカーから直接的に検出される。ひとつの実施態様において、バイオマーカーは、生物学的サンプル中の2以上のバイオマーカーの同時検出を可能にする多重化されたフォーマットを使用して検出される。多重化されたフォーマットのひとつの実施態様において、捕獲試薬は、直接的又は間接的に、共有結合的又は非共有結合的に、固体支持体上の別々の位置に固定化されている。別の実施態様において、多重化されたフォーマットは、各固体支持体とその固体支持体に関連した独特の捕獲試薬、たとえば量子ドットを有する、別々の固体支持体を使用する。別の実施態様において、個々のデバイスは、生物学的サンプル中の検出されるべき複数のバイオマーカーの各1つの検出のために使用される。個々のデバイスは、生物学的サンプル中の各バイオマーカーが同時に処理されることを可能にするように設定することができる。たとえば、マイクロタイタープレートは、プレート内の各ウェルが生物学的サンプル中の検出されるべき複数のバイオマーカーのひとつを独特に分析するために使用されるように用いることができる。

10

【0094】

前述の1以上の実施態様において、蛍光タグは、バイオマーカー値の検出を可能にするようにバイオマーカー / 捕獲複合体の成分を標識するために使用することができる。種々の実施態様において、蛍光標識は、公知の技術を使用して、本明細書において記載されるバイオマーカーの任意のものに特異的な捕獲試薬とのコンジュゲートにすることができ、その蛍光標識は、次いで相当するバイオマーカー値を検出するために使用することができる。好適な蛍光標識は、希土類キレート、フルオレセイン及びその誘導體、ローダミン及びその誘導體、ダンシル、アロフィコシアニン、PBXL-3、Qdot 605、リサミン、フィコエリトリン、テキサスレッド、及び他のこのような化合物を含む。

20

【0095】

ひとつの実施態様において、蛍光標識は蛍光色素分子である。いくつかの実施態様において、蛍光色素分子は、少なくとも1つの置換されたインドリウム環系を含み、このインドリウム環の3位の炭素上の置換基が化学的に反応性の基又はコンジュゲート化された物質を含む。いくつかの実施態様において、色素分子は、たとえば、AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 647、AlexaFluor 680、又はAlexaFluor 700のようなAlexFluor分子を含む。他の実施態様において、色素分子は、たとえば、2種の異なるAlexaFluor分子のような第一のタイプ及び第二のタイプの色素分子を含む。他の実施態様において、色素分子は、第一のタイプ及び第二のタイプの色素分子を含み、それら2種の色素分子は異なる放出スペクトルを有する。

30

【0096】

蛍光は、広範囲のアッセイフォーマットと適合可能な多様な計測手段で測定することができる。たとえば、分光蛍光光度計は、マイクロタイタープレート、顕微鏡スライド、プリントドアレイ、キュベットなどを分析するために設計されている。J. R. Lakowicz著、「蛍光分光法の原理」(Principles of Fluorescence Spectroscopy)、Springer Science + Business Media, Inc., 2004を参照されたい。「生物発光と化学発光：進歩と現在のアプリケーション」(Bioluminescence & Chemiluminescence: Progress & Current Applications)、Philip E. Stanley 及び Larry J. Kricka 編、World Scientific Publishing Company, January 2002を参照されたい。

40

【0097】

前述の1以上の実施態様において、化学発光タグは、場合によってはバイオマーカー / 捕獲複合体の成分を標識してバイオマーカー値の検出を可能にするために使用することができる。好適な化学発光材料は、塩化オキサリル、ローダミン6G、Ru(bipy)32+、TMAE(テトラキス(ジメチルアミノ)エチレン)、ピロガロール(1,2,3-トリヒドロキシベンゼン)、

50

ルシゲニン、ペルオキシシュウ酸、アリアルシュウ酸、アクリジニウムエステル、ジオキセタン、及びその他の任意のものを含む。

【0098】

さらに他の実施態様において、検出法は、バイオマーカー値に相当する検出可能なシグナルを生成する酵素/基質の組合わせを含む。一般に、酵素は、分光光度法、蛍光、及び化学発光を含む種々の技術を使用して測定することができる色原性基質の化学的変更を触媒する。好適な酵素は、たとえば、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRPO)、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、ウリカーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ラクトペルオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼなどを含む。

10

【0099】

さらに他の実施態様において、検出法は、蛍光、化学発光、放射性核種の組合わせ、又は測定可能なシグナルを生成する酵素/基質の組合わせであることができる。マルチモードのシグナリングは、バイオマーカーアッセイフォーマットにおいて独特かつ有利な特徴を有する可能性がある。

【0100】

より具体的には、本明細書において記載されるバイオマーカーについてのバイオマーカー値は、本明細書において説明されるように、一重化されたアプタマーアッセイ、多重化されたアプタマーアッセイ、一重化又は多重化された免疫アッセイ、mRNA発現プロファイリング、miRNA発現プロファイリング、質量分光分析、組織学的/細胞学的方法などを含む公知の分析方法を使用して検出することができる。

20

【0101】

(インビボ分子イメージング技術を使用するバイオマーカーの検出)

記載バイオマーカーの任意のものを、分子イメージング試験においても使用してもよい。たとえば、イメージング剤は記載の任意のバイオマーカーとカップリングすることができ、これを、中でも特に、SCLC診断を補助するため、疾患の進行/緩解又は転移を監視するため、疾患の再発について監視するため、又は療法に対する応答を監視するために使用することができる。

【0102】

30

インビボイメージング技術は、個体の身体における特定の疾患の状態を決定するための非侵襲性の方法を提供する。たとえば、身体の部分全体、又は全身さえも、三次元イメージとして見ることができ、それによって体内の形態学及び構造に関する価値のある情報が提供される。このような技術は、個体の、がんのステータス、特にSCLCステータスに関する情報を提供するために、本明細書において記載されるバイオマーカーの検出と組合わせてもよい。

【0103】

インビボ分子イメージング技術の用途は、技術の種々の進展によって拡大している。これらの進展は、体内で強いシグナルを提供することができる、放射性標識及び/又は蛍光標識のような、新規なコントラスト剤又は標識の開発;及び体外からそれらのシグナルを十分な感度及び精確性で検出し分析し、有用な情報を提供することができる、強力な新規イメージング技術の開発を含む。コントラスト剤は、適切なイメージング系で可視化し、それによってコントラスト剤が局在する身体部分(1つ又は複数)のイメージを提供することができる。コントラスト剤は、たとえばアプタマー又は抗体のような捕獲試薬と、及び/又はペプチド又はタンパク質、又はオリゴヌクレオチド(たとえば、遺伝子発現検出のため)、又はこれらの任意のものを1以上の巨大分子及び/又は他の粒子形態と共に含む複合体と、結合又は会合させてもよい。

40

【0104】

コントラスト剤は、イメージングに有用な放射性原子を主役とするものでもよい。好適な放射性原子は、シンチグラフィ研究のためのテクニチウム-99m又はヨウ素-123を含む。

50

他の容易に検出可能な部分は、たとえば、ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、又は鉄のような、たとえば磁気共鳴画像法(MRI)用のスピン標識を含む。このような標識は、当該技術分野で周知であり、当業者は容易に選択し得る。

【0105】

標準的なイメージング技術は、磁気共鳴画像法、コンピュータ断層撮影スキャンニング、ポジトロン放射断層撮影(PET)、単一光子放射型コンピュータ断層撮影法(SPECT)などを含むがこれらに限定されない。診断インビロイイメージングのために、利用可能な検出機器のタイプは、所与の放射性核種及び標的(タンパク質、mRNAなど)に使用される特定のバイオマーカーのような、所与のコントラスト剤を選択することにおいて主要な要因である。10
選択される放射性核種は、典型的には、所与のタイプの機器によって検出可能である崩壊のタイプを有する。また、インビロ診断のための放射性核種を選択する場合、その半減期は、標的組織による最大取り込みの時に検出を可能にするためには十分長い、宿主の有害な放射線照射が最小限であるよう十分短いものであるべきである。

【0106】

例示的なイメージング技術は、放射性核種を個体に全身投与又は局所投与するイメージング技術であるPET及びSPECTを含むが、それらに限定されない。その後続く放射性トレーサーの取り込みは、経時的に測定され、標的化された組織及びバイオマーカーについての情報を得るために使用される。用いられた特異的同位元素の高エネルギー(線)放射、及びそれらを検出するために使用される機器の感度及び洗練のため、放射能の二次元分布は、身体の外側から推論してもよい。20

【0107】

PETにおいて通常使用されるポジトロン放射核種は、たとえば、炭素-11、窒素-13、酸素-15、及びフッ素-18を含む。電子捕獲及び/又はガンマ放射によって崩壊する同位元素は、SPECTにおいて使用され、たとえばヨウ素-123及びテクニチウム-99mを含む。テクニチウム-99mでアミノ酸を標識する例示的な方法は、キレート前駆体の存在下での過テクネチウム酸イオンの還元であり、易動性テクニチウム-99m-前駆体複合体が形成され、それが二官能性に改変された走化性ペプチドの金属結合基と反応して、テクニチウム-99m-走化性ペプチドコンジュゲートが形成される。

【0108】

抗体は、このようなインビロイイメージング診断法のために頻繁に使用される。インビロ診断のための抗体の調製及び使用は当該技術分野で周知である。本明細書において記載されるバイオマーカーの任意のものと特異的に結合する標識抗体は、ある種のタイプのがん(たとえばSCLC)を有することが疑われる個体に注射することができ、該個体の疾患ステータスを診断又は評価する目的のために、使用される特定のバイオマーカーに従って検出可能である。使用される標識は、以前記載されたように、使用されるべきイメージング様式に従って選択されることになる。標識の局在は、がんの広がり決定を可能にする。器官又は組織内の標識の量も、その器官又は組織内のがんの存否の決定を可能にする。30

【0109】

同様に、アプタマーは、このようなインビロイイメージング診断法のために使用することができる。たとえば、本明細書において記載される特定のバイオマーカーを同定するために使用された(及びそれ故該特定のバイオマーカーに特異的に結合する)アプタマーは、適切に標識し、SCLCを有することが疑われる個体に注射してもよく、その個体のSCLCステータスを診断又は評価する目的のために、その特定のバイオマーカーに従って検出可能である。使用される標識は、以前記載されたように、使用されるべきイメージング様式に従って選択されることになる。標識の局在は、がんの広がり決定を可能にする。器官又は組織内の標識の量も、その器官又は組織内のがんの存否の決定を可能にする。アプタマー指40
導型イメージング剤は、他のイメージング剤と比較して組織浸透、組織分布、動態学、排除、効力、及び選択性に関連して独特かつ有益な特徴を有する可能性がある。

【0110】

10

20

30

40

50

このような技術は、場合によっては、たとえばアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いるイメージングを通じた遺伝子発現の検出について、標識オリゴヌクレオチドを用いて実施してもよい。これらの方法は、たとえば蛍光分子又は放射性核種を標識として用いて、インサイチュハイブリダイゼーションに使用される。遺伝子発現の検出のための他の方法は、たとえば、レポーター遺伝子の活性の検出を含む。

【0111】

別の一般的タイプのイメージング技術は、対象内の蛍光シグナルが対象の外部の光学的デバイスによって検出される光学的イメージングである。これらのシグナルは、実際の蛍光及び/又は生物発光によるものであってもよい。光学的検出デバイスの感度の改良は、インビボ診断アッセイのための光学的イメージングの有用性を増大している。

10

【0112】

インビボ分子バイオマーカーイメージングの用途は、たとえば、新規ながん療法についての治験において臨床的有効性をより迅速に測定するため、及び/又は倫理的に疑問であると考えられ得る、多発性硬化症のような疾患のためのプラセボでの長期治療を回避するための臨床試験を含め、増大している。

【0113】

(組織学的/細胞学的方法を使用するバイオマーカー値の決定)

SCLCの評価のために、多様な組織サンプルを組織学的又は細胞学的方法において使用してもよい。サンプルの選択は、一次腫瘍の位置及び転移の部位に依存する。たとえば、気管支内及び経気管支性生検、細針吸引、角針、及びコア生検は、組織学のために使用することができる。気管支洗浄及び擦過法、胸膜吸引、胸水、及び喀痰は細胞学のために使用することができる。細胞学的解析はSCLCの診断においてまだ使用されているが、組織学的方法はがんの検出についてより良い感度を提供することが知られている。SCLCを有する個体においてアップレギュレート又はダウンレギュレートされることが示された、本明細書において記載される任意のバイオマーカーは、疾患の適応症として組織学的検体を染色するために使用することができる。

20

【0114】

ひとつの実施態様において、相当するバイオマーカーに対して特異的な1以上の捕獲試薬は、肺組織細胞サンプルの細胞学的評価において使用され、以下のような1以上のもの、すなわち、細胞サンプルの収集、細胞サンプルの固定、脱水、透徹、顕微鏡スライド上への細胞サンプルの固定化、細胞サンプルの透過処理、分析物賦活化のための処理、染色、脱色、洗浄、ブロッキング、及び緩衝化溶液中での1以上の捕獲試薬との反応、を含んでいてもよい。別のひとつの実施態様において、細胞サンプルは細胞ブロックから作製される。

30

【0115】

別のひとつの実施態様において、相当するバイオマーカーに対して特異的な1以上の捕獲試薬は、肺組織サンプルの組織学的評価において使用され、以下のような1以上のもの、すなわち、組織検体の収集、組織サンプルの固定、脱水、透徹、顕微鏡スライド上への組織サンプルの固定化、組織サンプルの透過処理、分析物賦活化のための処理、染色、脱色、洗浄、ブロッキング、再水和、及び緩衝化溶液中での1以上の捕獲試薬との反応、を含んでいてもよい。別のひとつの実施態様において、固定及び脱水は、凍結に置き換えられる。

40

【0116】

別のひとつの実施態様において、相当するバイオマーカーに対して特異的な1以上のアプタマーは、組織学的又は細胞学的サンプルと反応させ、核酸増幅法において核酸標的として役立つことができる。好適な核酸増幅法は、たとえば、PCR、Qレプリカゼ、ローリングサークル増幅、鎖置換、ヘリカゼ依存増幅、ループ介在等温増幅、リガゼ連鎖鎖反応、及び制限環状化補助ローリングサークル増幅を含む。

【0117】

ひとつの実施態様において、組織学的又は細胞学的評価における使用のための相当する

50

バイオマーカーに特異的な1以上の捕獲試薬は、以下の任意のもの、すなわちブロッキング材料、競合相手、界面活性剤、安定化剤、担体核酸、ポリアニオン材料などを含有することができる、緩衝化溶液に混合される。

【0118】

「細胞学プロトコール」は、一般にサンプル収集、サンプル固定、サンプル固定化、及び染色を含む。「細胞調製」は、調製された細胞の染色のための1以上の遅い解離速度 (slow off-rate) のアダマーの使用を含む、サンプル収集後のいくつかのプロセス工程を含むことができる。

【0119】

サンプル収集は、未処理輸送コンテナに直接サンプルを置くこと、何らかのタイプの媒体を含有する輸送コンテナにサンプルを置くこと、又は何らの処理又は固定なしでスライド上に直接サンプルを置くこと(固定化)を含むことができる。

【0120】

サンプル固定化は、ポリリジン、ゼラチン、又はシランで処理されたガラススライドに収集された検体の一部を適用することにより改善することができる。スライドは、スライドを横切って細胞の薄く均一な層を塗抹することによって調製することができる。機械的な歪み及び乾燥アーチファクトを最小にするために一般的に注意が払われる。液体の検体は、細胞ブロック法で処理することができる。代替的に、液体の検体は、室温で約10分間、固定溶液と1:1で混合することができる。

【0121】

細胞ブロックは、残存浸出液、喀痰、尿沈査、胃腸液、肺液、細胞擦過物、又は細針吸引物から調製することができる。細胞は、遠心分離又は膜ろ過によって濃縮し又は詰める。細胞ブロック調製のための多数の方法が開発されている。代表的な手順は、固定沈査法、細菌寒天法又は膜ろ過法を含む。固定沈査法において、細胞沈査は、ブアン、ピクリン酸、又は緩衝化ホルマリンなどの固定液と混合し、次いでこの混合物は、固定された細胞をペレットにするために遠心分離する。上清は除去し、細胞ペレットはできる限り完全に乾燥させる。ペレットを集め、レンズペーパーで包み、次いで組織カセット中に置く。組織カセットは、付加的な固定液を含むジャーに置き、組織サンプルとして処理する。寒天法は、非常に類似しているが、ペレットは除去し、ペーパータオル上で乾燥させ、次いで半分に切断する。切断サイドは、ガラススライド上の一滴の溶解した寒天中に置き、次いでペレットを、寒天中に気泡が入らないように確認しながら寒天で被覆する。寒天は固まらせ、次いで余分な寒天を削り取る。これを組織カセット中に置き、組織プロセスが完了する。代替的に、ペレットは、2%液体寒天に65 で直接懸濁させてもよく、このサンプルは遠心分離する。寒天細胞ペレットは、4 で1時間固化させる。固体寒天は、遠心チューブから除去して半分にスライスしてもよい。寒天は、ろ紙で、次いで組織カセットで包む。この時点から先の処理は上述のとおりである。遠心分離は、これらの任意の手順において膜ろ過に置き換えることができる。これらの任意のプロセスは、「細胞ブロックサンプル」を作製するために使用することができる。

【0122】

細胞ブロックは、Lowicryl樹脂、LR White、LR Gold、Unicryl、及びMonoStepを含む特殊樹脂を使用して調製することができる。これらの樹脂は、低粘度を有し、低温で紫外線(UV)光を用いて重合させることができる。この包埋プロセスは、脱水の間に次第にサンプルを冷却し、サンプルを樹脂に移行し、及び最終的な低温で適切なUV波長でブロックを重合させることに依拠する。

【0123】

細胞ブロック切片は、細胞形態学的検査のためにヘマトキシリン - エオシンを用いて染色することができる。一方、付加的な切片は特異的マーカーについての検査に使用される。

【0124】

プロセスが細胞学的であるか又は組織学的であるかに関わらず、サンプルは、サンプル分解を防止するために、さらに処理する前に固定してもよい。このプロセスは、「固定」

10

20

30

40

50

と呼ばれ、互換的に使用され得る広範囲の材料及び手順を記載する。サンプル固定プロトコール及び試薬は、検出すべき標的及び分析すべき特定の細胞/組織タイプに基づいて経験的に最良に選択される。サンプル固定は、エタノール、ポリエチレングリコール、メタノール、ホルマリン、又はイソプロパノールのような試薬に依拠する。サンプルは、収集及びスライドへの貼付後なるべく迅速に固定すべきである。しかし、選択された固定液は、種々の分子標的に構造的な変化を導入し、後のそれらの検出をより困難にする場合がある。固定及び固定化プロセス、及びそれらの配列は、細胞の外観を改変することができ、これらの変化は、細胞技術者に予期及び認識されなければならない。固定液は、ある種の細胞タイプの縮小を引き起こすことができ、その細胞質が顆粒状又は網状に見えることを引き起こす。多くの固定液は、細胞成分を架橋することによって機能する。これは、特異的エピトープを損傷又は改変し、新規なエピトープを生成させ、分子の会合を引き起こし、及び膜透過性を低減させる場合がある。ホルマリン固定は、最も通常の細胞学的/組織学的アプローチのひとつである。ホルマリンは、隣合うタンパク質間又はタンパク質内にメチル架橋を形成する。沈殿又は凝集も、固定のために使用され、エタノールは、このタイプの固定において頻繁に使用される。架橋及び沈殿の組み合わせも、固定のために使用することができる。強力な固定プロセスは、形態学的情報を保存することにおいて最良であり、一方、より弱い固定プロセスは、分子標的の保存のために最良である。

10

【0125】

代表的な固定液は、50%無水エタノール、2 mMポリエチレングリコール(PEG)、1.85%ホルムアルデヒドである。この処方の変化形は、エタノール(50%~95%)、メタノール(20%~50%)、及びホルマリン(ホルムアルデヒド)のみである。別の通常の固定液は、2%PEG 1500、50%エタノール、及び3%メタノールである。スライドは、固定液中に室温で約10~15分間置き、及び次に除去して、乾燥させる。いったんスライドが固定されると、それらはPBSのような緩衝化溶液でリンスすることができる。

20

【0126】

広範囲の色素を、細胞、細胞内、及び組織の特徴、又は形態学的構造を差次的にハイライト及びコントラストをつけ、又は「染色する」ために使用することができる。ヘマトキシリンは、核を青色又は黒色に染色するために使用される。オレンジG-6及びエオシンアズールは、いずれも細胞の細胞質を染色する。オレンジGは、ケラチン及びグリコーゲン含有する細胞を黄色に染色する。エオシンYは、核小体、繊毛、赤血球、及び表面上皮系扁平上皮細胞を染色するために使用される。ロマノフスキー染色は、風乾されたスライドのために使用され、多形性の強化及び細胞外と細胞質内物質との区別に有用である。

30

【0127】

染色プロセスは、染色に対する細胞の透過性を増大するための処理を含むことができる。界面活性剤を用いる細胞の処理は、透過性を増大するために使用することができる。細胞及び組織透過性を増大するために、固定されたサンプルは、溶剤、サポニン、又は非イオン性界面活性剤を用いてさらに処理することができる。酵素的消化も、組織サンプル中の特異的な標的のアクセシビリティを改善することができる。

【0128】

染色後、サンプルは、アルコール濃度を増大させながらのアルコールリンスの連続を使用して脱水される。最終洗浄は、キシレン、又は、スライドに適用されるべきカバースリップの屈折率に近い屈折率を有する柑橘類のテルペンのようなキシレン代替物を用いて行う。この最終工程は、透徹と呼ばれる。サンプルが脱水及び透徹されると、封入剤が適用される。封入剤は、ガラスに近い屈折率を有し、カバースリップをスライドに接着することができるように選択される。それは、細胞サンプルのさらなる乾燥、縮小、又は退色を阻害することも行うことになる。

40

【0129】

使用された染色又はプロセッシングに関わらず、肺細胞学的検体の最終的な評価は、視覚的な形態学の精査及びマーカーの存否の決定を可能にするために何らかのタイプの顕微鏡によって行われる。例示的な顕微鏡法は、明視野、位相差、蛍光、及び微分干渉コントラ

50

スト顕微鏡を含む。

【0130】

検査後、サンプルについて二次的な試験が必要な場合、カバースリップを除去し、スライドを脱色してもよい。脱色は、当初の染色手順と逆順で、添加色素なしで当初にスライドを染色することに使用した当初の溶剤系を使用することに関与する。脱色は、細胞が無色になるまで酸アルコールにスライドを浸漬することによって完了してもよい。いったん無色になれば、スライドを水浴中で十分にリンスし、第二の染色手順を適用する。

【0131】

さらに、特異分子分化は、抗体又は核酸プローブ又はアプタマーのような特異的分子試薬の使用を通じて細胞の形態学的解析と併せて可能であり得る。これは、診断的細胞学の精確性を改善する。顕微解剖は、細胞のサブセットを付加的な評価、特に異常染色体、遺伝子発現、又は突然変異の遺伝的評価について単離するために使用することができる。

10

【0132】

組織学的評価のための組織サンプルの調製は、固定、脱水、浸潤、包埋、及び薄切を包含する。組織学に使用される固定試薬は、細胞学に使用されるものと非常に類似しているか又は同一であり、個々のタンパク質のような分子的特徴を犠牲にして形態学的特徴を保存するという同じ課題を有する。組織サンプルを固定及び脱水せず、その代わりに凍結後に凍結状態で薄切する場合、時間は節約できる。これは、より穏健なプロセッシング手順であり、個々のマーカーをより多く保存することができる。しかし、凍結は、氷結晶の導入のため細胞内情報が失われるので、組織サンプルの長期保存のためには許容されない。凍結組織サンプル中の氷は、薄切プロセスで非常に薄い切片を生成することも防止し、したがって、細胞内構造のいくらかの顕微鏡的解像度及びイメージングが失われ得る。ホルマリン固定に加えて、四酸化オスミウムはリン脂質(膜)を固定及び染色するために使用される。

20

【0133】

組織の脱水は、アルコール濃度が増大する連続的な洗浄を用いて達成される。透徹は、アルコールと混和性の材料及び包埋材料を利用し、50:50アルコール透徹試薬から始めて次いで100%透徹剤(キシレン又はキシレン代替物)の段階的プロセスを包含する。浸潤は、最初は50:50包埋剤/透徹剤、及び100%包埋剤の液体形態の包埋剤(温ワックス、ニトロセルロース溶液)と共に組織をインキュベートすることを包含する。包埋は、組織をモールド又はカセット中に置き、ワックス、寒天、又はゼラチンのような溶解した包埋剤を充填することによって完了される。包埋剤は硬化させる。硬化した組織サンプルは、次に、染色及びその後の検査のために薄い切片にスライスしてもよい。

30

【0134】

染色に先立って、組織切片は、除ワックスし、再水和させる。キシレンは切片を除ワックスするために使用し、1以上の交換のキシレンを使用してもよく、組織は、低減する濃度のアルコール中での連続的な洗浄によって再水和させる。除ワックスに先立って、組織切片は、ガラススライドに約80 で約20分間、熱固定化してもよい。

【0135】

レーザー捕獲顕微解剖は、組織切片からのさらなる解析のための細胞サブセットの単離を可能にする。

40

【0136】

細胞学におけるように、顕微鏡的特徴の視覚化を強化するために、組織切片又はスライスは、多様な染色を用いて染色することができる。多数のメニューの市販染色を、特異的特徴を強化又は同定するために使用することができる。

【0137】

分子試薬と細胞学的/組織学的サンプルとの相互作用をさらに増大させるために、「分析物賦活化」のための多数の技術が開発されている。最初のこのような技術は、固定されたサンプルの高温加熱を使用する。この方法は、熱誘導エピトープ回収又はHIERとも呼ばれる。蒸気加熱、マイクロ波、オートクレーブ法、水浴、及び高圧調理、又はそれらの加

50

熱法の組合わせを含む種々の加熱技術が使用されてきた。分析物賦活化溶液は、たとえば、水、クエン酸、及び正常生理食塩水緩衝液を含む。分析物賦活化の鍵は、高温での時間であるが、より長い時間でのより低い温度もまた、成功裡に使用されてきた。分析物賦活化に対する別の鍵は、加熱溶液のpHである。低pHは、最良の免疫染色を提供するが、陰性コントロールとして第二の組織切片の使用を頻繁に必要とするバックグラウンドをも生み出すことが見出された。最も一貫した利益（バックグラウンドの増加なしで増大した免疫染色）は、緩衝液組成に関わらず、一般に高pH溶液を用いて得られる。特異的標的についての分析物賦活化プロセスは、熱、時間、pH、及び緩衝液組成をプロセス最適化のための変数として使用して、標的に対して経験的に最適化される。マイクロ波分析物賦活化法の使用は、抗体試薬を用いた異なる標的の連続的染色を可能にする。染色工程間で抗体及び酵素複合体を達成するために必要な時間は、細胞膜分析物を分解することも示されている。マイクロ波加熱法は、インサイチュハイブリダイゼーション法も同様に改善している。

10

【0138】

分析物賦活化プロセスを開始するために、切片を、最初に除ワックスし水和させる。スライドは、次に皿又はジャー中の10 mMクエン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.0中に置く。代表的な手順は、1100Wマイクロ波を使用し、スライドを100%パワーで2分間マイクロ波処理し、続いて、スライドが液体に覆われていることを確かめた後、スライドを、20%パワーを用いて18分間マイクロ波処理する。スライドは、次に、カバーしていない容器中で冷まし、次に蒸留水でリンスする。HIERは、免疫化学試薬に対する標的の反応性を改善するために酵素的消化と組合わせて使用してもよい。

20

【0139】

このような酵素的消化プロトコールのひとつは、プロテイナーゼKを使用する。20 g/mLの濃度のプロテイナーゼKは、50 mM トリス塩基、1 mM EDTA、0.5% Triton X-100、pH 8.0の緩衝液中で調製される。このプロセスは、最初に切片を5分間ずつで2回キシレンを換えて除ワックスすることを包含する。次に、サンプルを、3分間ずつで2回換える100%エタノール、各1分間の95%及び80%エタノール中で水和させ、及び次いで蒸留水でリンスする。切片を、プロテイナーゼK作業溶液でカバーし、加湿チャンパー内で37℃で10~20分間インキュベートする(最適なインキュベーション時間は組織タイプ及び固定の程度によって変化し得る)。切片は、室温で10分間冷まし、次にPBS Tween 20で2回×2分間、リンスする。所望の場合、切片は、内因性化合物及び酵素による潜在的な干渉を排除するためにブロッキングすることができる。切片は、次に一次抗体希釈緩衝液で適切に希釈された一次抗体と共に、室温で1時間又は4℃で一晩、インキュベートする。切片を、次に、PBS Tween 20で2回×2分間、リンスする。具体的な適用のために必要な場合、付加的なブロッキングを行い、その後PBS Tween 20での3回×2分間の付加的なリンス処理を行い、次に最終的に免疫染色プロトコールを完了することができる。

30

【0140】

室温で1% SDSを用いた簡便な処理もまた、免疫組織化学染色を改善することが実証されている。分析物賦活化法は、スライドにマウントされた切片、ならびに遊離浮遊切片に適用されてきた。別の処理オプションは、pH6.0のクエン酸及び0.1%のNonident P40を含有するジャーにスライドを入れ、95℃に加熱することである。スライドは、次にPBSのような緩衝溶液で洗浄する。

40

【0141】

組織の免疫学的染色のために、血清又は脱脂粉乳のようなタンパク質溶液中に切片を浸漬することによって抗体と組織タンパク質との非特異的会合をブロッキングすることは、有用であり得る。

【0142】

ブロッキング反応は、内因性ビオチンのレベルを低減し；内因性電荷効果を排除し；内因性ヌクレアーゼを不活性化し；及び/又はペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼのような内因性酵素を不活性化する必要性を含み得る。内因性ヌクレアーゼは、プロテイナーゼKを用いる分解、熱処理、EDTA又はEGTAのようなキレート剤の使用、担体DNA又は

50

RNAの導入、たとえば尿素、チオ尿素、塩酸グアニジン、チオシアン酸グアニジン、過塩素酸リチウムなどのようなカオトロブ又はジエチルピロカーボネートを用いる処理によって不活性化してもよい。アルカリホスファターゼは、室温で5分間の0.1 N HClでの処理、又は1 mMレバミソールでの処理によって不活性化してもよい。ペルオキシダーゼ活性は、0.03%過酸化水素での処理によって排除してもよい。内因性ピオチンは、アビジン(ストレプトアビジン、ニュートラアビジンを代用してもよい)溶液中に室温で少なくとも15分間、スライド又は切片を浸漬することにより、ブロックしてもよい。スライド又は切片は、次に、緩衝液中で少なくとも10分間洗浄する。これは、少なくとも3回繰り返してもよい。次に、スライド又は切片を、ピオチン溶液に10分間浸漬する。これは、各回新鮮ピオチン溶液を用いて少なくとも3回繰り返してもよい。緩衝液洗浄手順を繰り返す。ブロッキングプロトコルは、細胞又は組織構造、又は目的の標的の損傷を防止するために最小限にするべきであるが、1以上のこれらのプロトコルは、1以上の遅い解離速度のアプタマーとの反応に先立ってスライド又は切片を「ブロック」するために組み合わせ得る。「基礎医学組織学：細胞、組織及び器官の生物学」(Basic Medical Histology: the Biology of Cells, Tissues and Organs)、Richard G. Kessel著、Oxford University Press、1998を参照されたい。

10

【0143】

(質量分析法を使用するバイオマーカー値の決定)

種々の配置の質量分析計を、バイオマーカー値を検出するために使用することができる。いくつかのタイプの質量分析計は、種々の配置で利用可能又は製造可能である。一般に、質量分析計は、以下のような主要な成分、すなわち、サンプル注入口、イオン源、質量分析器、検出器、真空システム、及び機器コントロールシステム、及びデータシステムを有する。サンプル注入口、イオン源、及び質量分析器の差異は、一般に機器のタイプ及び性能を定義する。たとえば、注入口は、キャピラリー-カラム液体クロマトグラフィ源であることができ、又はマトリックス支援レーザー脱離に使用されているもののような直接プローブ又はステージであることができる。通常のイオン源は、たとえば、ナノスプレー及びマイクロスプレーを含むエレクトロスプレー、又はマトリックス支援レーザー脱離である。通常の質量分析器は、四重極マスフィルタ、イオントラップ質量分析器、及び飛行時間型質量分析器を含む。付加的な質量分析法は、当該技術分野で周知である(Burlingameらの文献、Anal. Chem. 70:647 R-716R (1998); Kinter及びSherman, New York (2000)を参照されたい)。

20

30

【0144】

タンパク質バイオマーカー及びバイオマーカー値は、以下のもの、すなわち、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)、ESI-MS/MS、ESI-MS/(MS)_n、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF-MS)、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(SELDI-TOF-MS)、シリコンを利用した脱離イオン化(DIOS)、二次イオン質量分析(SIMS)、四重極飛行時間型(Q-TOF)、タンデム飛行時間型(TOF/TOF)技術、ultraflex III TOF/TOFと呼ばれるもの、大気圧化学イオン化質量分析(APCI-MS)、APCI-MS/MS、APCI-(MS)_N、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、APPI-MS/MS、及びAPPI-(MS)_N、四重極質量分析、フーリエ変換質量分析(FTMS)、定量的質量分析、及びイオントラップ質量分析、の任意のものによって検出及び測定することができる。

40

【0145】

サンプル調製戦略は、質量分析によるタンパク質バイオマーカーの特徴づけ及びバイオマーカー値の決定の前にサンプルを標識し、豊富化するために使用することができる。標識方法は、相対及び絶対定量用同重体標識法(iTRAQ)及び細胞培養におけるアミノ酸を用いた安定同位体標識法(SILAC)を含むが、これらに限定されない。質量分光分析に先立って候補バイオマーカータンパク質についてサンプルを選択的に豊富化するために使用される捕獲試薬は、アプタマー、抗体、核酸プローブ、キメラ、低分子、F(ab')₂フラグメント、単鎖抗体フラグメント、Fvフラグメント、単鎖Fvフラグメント、核酸、レクチン、リガンド結合レセプター、アフィボディ、ナノボディ、アンキリン、ドメイン抗体、代替的

50

抗体スキャフォールド(たとえば、ダイアボディ)インプリンテッドポリマー、アヴィマー(avimers)、ペプチドミメティック、ペプトイド、ペプチド核酸、トレース核酸、ホルモンレセプター、サイトカインレセプター、及び合成レセプター、及びこれらの改変物及びフラグメントを含むが、これらに限定されない。

【0146】

(近接ライゲーションアッセイを使用するバイオマーカー値の決定)

近接ライゲーションアッセイは、バイオマーカー値を決定するために使用することができる。手短かに言えば、試験サンプルを、一对の抗体又は一对のアプタマーであってもよい一对のアフィニティプローブと接触させ、この対の各メンバーをオリゴヌクレオチドで伸長させる。この一对のアフィニティプローブのための標的は、ひとつのタンパク質の2つの個別の決定体(determinates)であってもよく、又は2つの異なるタンパク質の各々の1つの決定体であってもよく、それらはホモ又はヘテロ多量体複合体として存在してもよい。プローブがこの標的決定体に結合する場合、オリゴヌクレオチド伸長の遊離末端は、十分に近接して互いにハイブリダイズする。オリゴヌクレオチド伸長のハイブリダイゼーションは、それらが十分に近接して位置する場合に、オリゴヌクレオチド伸長を架橋するのに役立つ共通のコネクターオリゴヌクレオチドによって容易になる。プローブのオリゴヌクレオチド伸長がいったんハイブリダイズすると、これらの伸長の末端は酵素的DNA連結によって接合される。

【0147】

各オリゴヌクレオチド伸長は、PCR増幅のためのプライマー部位を含む。このオリゴヌクレオチド伸長が互いにいったん連結されると、オリゴヌクレオチドは、連続的DNA配列を形成し、これは、PCR増幅を通じて、標的タンパク質の正体及び量に関する情報、ならびに、標的決定体が2つの異なるタンパク質上にある場合のタンパク質-タンパク質相互作用に関する情報を解明する。近接ライゲーションは、リアルタイムPCRの使用を通して、リアルタイムのタンパク質濃度及び相互作用情報についての高感度で特異的なアッセイを提供することができる。目的の決定体に結合しないプローブは、相当するオリゴヌクレオチド伸長を近接させることはなく、連結又はPCR増幅が進行できず、シグナルが生成されない。

【0148】

前述のアッセイは、本明細書において記載される方法において有用なバイオマーカー値の検出を可能にし、ここで、これらの方法は、個体からの生物学的サンプル中で、それぞれが本明細書において提供されるバイオマーカーからなる群から選択されるバイオマーカーに相当する少なくともN個のバイオマーカー値を検出することを含み、ここで、以下で詳述するように、これらのバイオマーカー値を使用する分類は、その個体がSCLCを有するか否か、又はその個体がPARP阻害剤化学療法から恩恵を受ける可能性が高いか否かを示す。記載されるSCLCバイオマーカーのうちのある種のもは、PARP阻害剤化学療法を受けるよう対象を割り当てることについて単独で有用である一方、それらは、単独で、又は2以上のバイオマーカーのパネルとしてそれぞれが有用なSCLCバイオマーカーの複数のサブセットとしての組み合わせで、SCLCを検出及び診断するためにも有用である。したがって、本出願の種々の実施態様は、本明細書において記載される1以上のバイオマーカーを含む組み合わせを提供する。他の実施態様において、Nは、1~10個のバイオマーカーの任意の数であるように選択される。Nは、上述の任意の範囲、ならびに同様であるが高次の範囲からの任意の数であるように選択されることができ、これは認識されるであろう。本明細書において記載される任意の方法に従って、バイオマーカー値は、個別に検出及び分類することができ、あるいは、それらは、たとえば多重化されたアッセイフォーマットで、集合的に検出及び分類することができる。

【0149】

別のひとつの態様において、方法は、PARP阻害剤に対する感受性の増大した可能性、又はSCLCの存否を検出するために提供され、これらの方法は、個体からの生物学的サンプル中に、それぞれが本明細書において提供されるバイオマーカーからなる群から選択される

バイオマーカーに相当する少なくともN個のバイオマーカー値を検出することを含み、ここで、以下で詳述するように、これらのバイオマーカー値の分類は、その個体中のSCLCの不存在を示す。

【0150】

別途注記されている場合を除き、本実施態様の方法及び技術は、当該技術分野で周知である従来法に従って、及び本明細書全体において引用され考察されている種々の一般的及びより具体的な参照に記載されたように、一般に実施される。

【0151】

本発明のある種の特徴は、明確性のために、別々の実施態様の文脈において記載されているが、単一の実施態様において組合わせて提供されてもよいことは認識される。反対に、本発明の種々の特徴は、簡潔さのために、単一の実施態様の文脈において記載されているが、別々に又は任意の好適なサブコンビネーションで提供されてもよい。変数によって代表される化学基に属する実施態様のすべての組合わせは、具体的に本発明に包含され、各々の全ての組合わせが個別に及び明示的に開示されているかのように、このような組合わせが安定な化合物である化合物（すなわち、単離、特徴づけ、及び生物学的活性について試験することができる化合物）を包含する範囲まで、本明細書において開示される。さらに、このような変数を記載する実施態様に掲載された化学基のすべてのサブコンビネーションもまた、本発明によって具体的に包含され、本明細書においてこのような化学基の各々の全てのサブコンビネーションが個別に及び明示的に開示されているかのように、本明細書において開示される。

10

20

【0152】

いくつかの実施態様において、試験サンプルは、肺組織、気管支生検、喀痰、及び/又は血清から得てもよい。

【0153】

当業者は、本明細書において掲載される又は説明される種は、網羅的ではないこと、及びこれらの定義された用語の範囲内でさらなる種を選択してもよいことを認識するであろう。

【0154】

本明細書において記載されている任意の式は、その構造式の化合物、ならびに一定の変化形又は形態を表すことを意図されている。たとえば、本明細書において与えられる式は、ラセミ体、又は1以上のエナンチオマー、ジアステレオマー、又は幾何異性体、あるいはそれらの混合物を含むことが意図される。さらに、本明細書において与えられる任意の式は、水和物、溶媒和物、又はそのような化合物の多形体、あるいはそれらの混合物をも指すことが意図される。

30

【0155】

本明細書中において与えられる任意の式は、その化合物の非標識形態ならびに同位体標識形態を表すことも意図される。同位体標識化合物は、1以上の原子が選択された原子質量又は質量数を有する原子によって置換されることを除き、本明細書において与えられる式によって表される構造を有する。実施態様の化合物に取り込まれることができる同位体の例は、水素、炭素、窒素、酸素、リン、フッ素、塩素、及びヨウ素の同位体、たとえばそれぞれ²H、³H、¹¹C、¹³C、¹⁴C、¹⁵N、¹⁸O、¹⁷O、³¹P、³²P、³⁵S、¹⁸F、³⁶Cl、及び¹²⁵I、である。

40

【0156】

「医薬として許容し得る塩」は、非毒性、生物学的に許容される、又はそれら以外で対象に対する投与について生物学的に好適な、本明細書に表される化合物の遊離酸又は塩基の塩を意味することが意図される。一般に、S.M. Bergeらの文献、「医薬品の塩」(Pharmaceutical Salts)、J. Pharm. Sci., 1977, 66, 1-19を参照されたい。好ましい、医薬として許容し得る塩は、薬理的に有効であり、過度の毒性、刺激、又はアレルギー応答なしに、対象の組織との接触に適したものである。本明細書において記載される化合物は、十分に酸性の基、十分に塩基性の基、両方のタイプの官能基、又は2以上の各タイプを

50

有してもよく、したがって、いくつかの無機又は有機塩基、及び無機及び有機酸と反応して医薬として許容し得る塩を形成してもよい。

【0157】

(医薬組成物及び治療方法)

治療目的のために、本明細書において記載される化合物を含む医薬組成物は、1以上の医薬として許容し得る賦形剤をさらに含んでもよい。医薬として許容し得る賦形剤は、非毒性であり、それ以外で対象への投与について生物学的に好適な物質である。このような賦形剤は、本明細書において記載される化合物の投与を容易にし、活性成分と適合性である。医薬として許容し得る賦形剤の例は、安定剤、潤滑剤、サーファクタント、希釈剤、酸化防止剤、結合剤、着色剤、増量剤、乳化剤、又は矯味剤を含有する。好ましい実施態様において、本発明の医薬組成物は、滅菌された組成物である。医薬組成物は、当該技術分野で公知の又は当業者に利用可能となる調合技術を使用して調製してもよい。

10

【0158】

滅菌された組成物も、本発明によって企図され、そのような組成物を規制する国内及び地方の規則に従う組成物を含む。

【0159】

本明細書において記載される医薬組成物及び化合物は、好適な医薬的溶剤又は担体中の溶液、乳濁液、懸濁液、又は分散液として製剤化してもよく、又は種々の投薬形態の調製のために当該技術分野で公知の従来の方法に従って、固体担体と共にビル、錠剤、ロゼンジ、坐剤、サシェ、糖衣錠、顆粒、粉末、再構成のための粉末、又はカプセルの形態として製剤化してもよい。本発明の医薬組成物は、経口、非経口、直腸、経鼻、局所、又は眼の経路のような好適な送達経路によって、又は吸入によって投与してもよい。好ましくは、この組成物は、静脈内又は経口投与のために製剤化される。

20

【0160】

経口投与のために、PARP阻害剤又はタラゾパリブは、錠剤又はカプセルのような固体形態で、又は溶液、乳濁液、もしくは懸濁液として、提供してもよい。経口組成物を調製するために、活性剤は、たとえば、毎日約0.01～約50mg/kgまで、又は毎日約0.05～約20mg/kgまで、又は毎日約0.1～約10mg/kgまでの投薬量を生じるように製剤化してもよい。いくつかの実施態様において、経口投薬量形態は、約25～約1100µg/日まで、又は約0.5～約2mg/日、又は約1mg/日、又は約0.10～0.75mg/kg/日まで、又は約0.25～0.30mg/kg/日の投与量を提供する。経口錠剤は、希釈剤、崩壊剤、結合剤、潤滑剤、甘味剤、香料、着色料及び保存料のような、適合性の医薬として許容し得る賦形剤と混合された活性成分を含んでもよい。好適な不活性フィラーは、炭酸ナトリウム及びカルシウム、リン酸ナトリウム及びカルシウム、ラクトース、スターチ、糖、グルコース、メチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、マンニトール、ソルビトールなどを含む。例示的な液体経口賦形剤は、エタノール、グリセロール、水などを含む。スターチ、ポリビニル-ピロリドン(PVP)、デンプングリコール酸ナトリウム、微結晶セルロース、及びアルギン酸は、例示的な崩壊剤である。結合剤は、スターチ及びゼラチンを含んでもよい。潤滑剤は、存在する場合、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、又はタルクであってもよい。所望の場合、錠剤は、消化管における吸収を遅らせるためにモノステアリン酸グリセリル又はジステアリン酸グリセリルのような物質でコーティングしてもよく、又は腸溶コーティングでコーティングしてもよい。

30

40

【0161】

経口投与のためのカプセルは、硬及び軟ゼラチンカプセルを含む。硬ゼラチンカプセルを調製するために、活性成分は、固体、半固体、又は液体希釈剤と混合してもよい。軟ゼラチンカプセルは、活性成分を水、ピーナツ油又はオリーブ油のような油、液体パラフィン、短鎖脂肪酸のモノ及びジグリセリドの混合物、ポリエチレングリコール 400、又はプロピレングリコールと混合することにより調製してもよい。

【0162】

経口投与のための液体は、懸濁液、溶液、乳濁液、又はシロップの形態であってもよく

50

、又は凍結乾燥されていてもよく、又は使用前に水又は他の好適なベヒクルで再構成するための乾燥製品として提示されてもよい。このような液体組成物は、場合によっては以下のもの、すなわち、懸濁剤(たとえば、ソルビトール、メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ゼラチン、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ステアリン酸アルミニウムゲルなど)のような、医薬として許容し得る賦形剤；非水性ベヒクル、たとえば、油(たとえばアーモンド油、又は分画ココナツ油)、プロピレングリコール、エチルアルコール、又は水；保存剤(たとえばメチル又はプロピル p-ヒドロキシベンゾエート又はソルビン酸)；レシチンのような湿潤剤；及び、所望の場合、香料又は着色料、を含有してもよい。

【0163】

本発明の組成物は、直腸投与のために坐剤として製剤化してもよい。静脈内、筋肉内、腹腔内、鼻腔内、又は皮下経路を含む非経口使用のために、本発明の剤は、適切なpH及び等張性に緩衝化されている滅菌された水性溶液又は懸濁液中で、又は非経口的に許容し得る油中で提供してもよい。好適な水性ベヒクルは、リンゲル溶液及び等張性塩化ナトリウムを含む。このような形態は、アンプル又は使い捨て注射デバイスのようなユニット投与量形態、適切な投与量を引き出すことができるピアルのような多投与量形態、又は注射可能製剤を調製するために使用することができる固体形態もしくはプレ濃縮物で、提示することができる。説明的な注入投与量は、数分から数日の範囲の期間にわたって、医薬担体と混合した、約1~1000 µg / kg / 分の剤の範囲である。

【0164】

経鼻、吸入、又は経口投与のために、本発明の医薬組成物は、たとえば、適切な担体も含む噴霧剤を使用して投与してもよい。

【0165】

局所適用のために、本発明の化合物は、好ましくは、クリーム又は軟膏、又は局所投与に適した同様のベヒクルとして製剤化される。局所適用のために、本発明の化合物は、約0.1%~約10%の薬剤対ベヒクルの濃度で医薬担体と混合してもよい。本発明の薬剤を投与する別のモードは、経皮送達を有効にするためにパッチ剤を利用してよい。

【0166】

本明細書において使用される場合、「治療する」、「治療している」、及び「治療」という用語は、臨床的結果を含む、有益な又は所望の結果を得るためのアプローチを指す。本発明の適用上、有益な又は所望の結果は、症状の軽減、及び/又は症状の範囲の縮減、及び/又は疾患もしくは状態に関連する症状の悪化の防止、及び/又は既存の疾患、症状又は状態の重症度の低減もしくは悪化の抑制を含むが、それらに限定されない。したがって、治療は、既存の疾患症状の寛解又は悪化防止、付加的な症状の出現の防止、症状の根底にある全身的原因の寛解又は防止、障害又は疾患の阻害、たとえば、障害又は疾患の発症の停止、障害又は疾患の緩和、障害又は疾患の退縮の誘起、疾患又は障害によって引き起こされた状態の緩和、あるいは疾患又は障害の症状の阻止を含む。ひとつのバリエーションにおいて、SCLCの治療は、たとえば、腫瘍サイズの低減、腫瘍増殖の減速、又は転移の低減によって示される。

【0167】

本発明に従った治療方法において、「有効量」は、そのような治療を必要とする対象に所望の治療的利益を一般にもたらすのに十分な量又は投与量を意味する。本発明の化合物の有効量又は投与量は、たとえば、投与又は薬剤送達のモード又は経路、その剤の薬物動態、感染の重症度及び経過、その対象の健康ステータス、状態、及び体重、及び治療する医療者の判断のようなルーチンの要因を考慮して、モデリング、用量漸増、又は臨床試験のようなルーチンの方法により確かめることができる。例示的な投与量は、1日当たり対象の体重1kg当たり約1 µg ~ 2mgの範囲の活性薬剤、好ましくは約0.05 ~ 100mg / kg / 日、又は約1 ~ 35mg / kg / 日、又は約0.1 ~ 10mg / kg / 日である。総投薬量は、単一又は分割投薬量ユニット(たとえば、1日2回、1日3回、1日4回)で与えてもよい。いくつかの実施態様において、投与量は、毎日約0.01 ~ 約50mg / kg、又は毎日約0.05 ~ 約20mg / kg、又は毎

10

20

30

40

50

日約0.1～約10mg/kgである。いくつかの実施態様において、投薬量形態は、約25～約1100µg/日、又は1日当たり約0.5～約2mg、又は約1mg/日、又は約0.10～0.75mg/kg/日、又は約0.25～0.30mg/kg/日の投与量を提供する。いくつかの実施態様において、日総投与量は、単一投与量、又は単一経口投与量で投与される。

【0168】

患者の疾患の改善がいったん起こったら、投与量は、予防に寄与する又は維持治療のために調整してもよい。たとえば、投与の投薬量又は頻度、又はそれらの両方は、症状の回数として、所望の治療的又は予防的効果が維持されるレベルに低減してもよい。もちろん、症状が適切なレベルに軽減したのであれば、治療を中止してもよい。しかし、患者は症状の再発時に長期的な断続的治療を必要とする可能性がある。患者は長期的な慢性治療を必要とすることもある。

【実施例】

【0169】

(実施例)

本明細書において記載される例は、本発明の代表的な実施態様を説明するためにのみ提供されている。したがって、本発明は、本明細書において考察されるこれら又は任意の他の例に記載された特異的条件又は細部に限定されるものではないこと、及びこのような例がいかなる方法によっても本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではないことは理解されるべきである。以下の例は、本発明を説明するために提供されるものであって、本発明を限定するためのものではない。

【0170】

(実施例1：単一剤タラゾパリブを用いた細胞株細胞傷害性アッセイ)

種々のSCLC細胞株(38)は、表1に示すとおり、ATCC(American Type Culture Collection)、ECACC(European Collection of Cell Cultures)、JCRB(Japanese Collection of Research Bioresources)、及びCLS Cell Lines Serviceから入手した。

表1:

【表1】

名称	供給業者	カタログ番号	名称	供給業者	カタログ番号	名称	供給業者	カタログ番号
COR-L88	ECACC	92031917	NCI-H211	ATCC	CRL-5824	NCI-H1618	ATCC	CRL-5879
SBC-5	JCRB	JCRB0819	NCI-H2141	ATCC	CRL-5927	NCI-H1694	ATCC	CRL-5888
DMS 114	ATCC	CRL-2066	NCI-H2171	ATCC	CRL-5929	NCI-H1930	ATCC	CRL-5906
DMS 79	ATCC	CRL-2049	NCI-H446	ATCC	HTB-171	NCI-H2081	ATCC	CRL-5920
NCI-H1836	ATCC	CRL-5898	NCI-H82	ATCC	HTB-175	SCLC-21H	CLS	300225
NCI-H1876	ATCC	CRL-5902	NCI-H889	ATCC	CRL-5817	NCI-H524	ATCC	CRL-5831
NCI-H1963	ATCC	CRL-5982	SHP-77	ATCC	CRL-2195	NCI-H526	ATCC	CRL-5811
NCI-H69	ATCC	HTB-119	NCI-H1105	ATCC	CRL-5856	NCI-H841	ATCC	CRL-5845
NCI-H1048	ATCC	CRL-5853	NCI-H2066	ATCC	CRL-5917	NCI-H2107	ATCC	CRL-5983
NCI-H1341	ATCC	CRL-5864	COR-L279	ECACC	96020724	NCI-H748	ATCC	CRL-5841
NCI-H146	ATCC	HTB-173	DMS-153	ATCC	CRL-2064			
NCI-H196	ATCC	CRL-5823	DMS-53	ATCC	CRL-2062			
NCI-H2029	ATCC	CRL-5913	NCI-H1092	ATCC	CRL-5855			
NCI-H209	ATCC	HTB-172	NCI-H1436	ATCC	CRL-5871			

【0171】

細胞は、示唆された培地で増殖させ、96ウェルプレートに所定の細胞密度で播種した。24時間後、0.2%DMSO中の2000、400、80、16、3.2、又は0.64nMのタラゾパリブ、又は100,000、2000、400、80、16、又は3.2nMのシスプラチンを二連で添加し、さらに5日又は7日間インキュベートした。細胞生存は、CellTiter Gloアッセイ(Promega)によって決定した。細胞増殖阻害は、2つの方法で計算した：(a)IC₅₀を得るための、無処理コントロールに対する処理細胞カウント(従来生存率法)、又は(b)GraphPad Prism5を用いる、GI₅₀を得るための、処理なしのベースラインからの倍加に対する処理下のベースラインからの倍加(世代法)である。各方法についての最大阻害レベルも得た。

【0172】

38種のSCLC株は、タラゾパリブ(2nM～>2000nMの範囲にわたるGI₅₀、中央値GI₅₀=56nM)及びシスプラチン処理(10nM～>10,000nMの範囲にわたるGI₅₀)に対して広範囲の感受性

を示した。図1に示すように、タラゾパリブ及びシスプラチンに対する感受性は良好に相関している (Spearman相関 = 0.756)。

【 0 1 7 3 】

図2に示すように、タラゾパリブに対する細胞株感受性と関連する遺伝子発現特徴を同定するために、細胞株を、タラゾパリブによるそれらの中央値GI₅₀及び90%実験的GI₅₀阻害に基づいて、以下の基準、感受性: 最大GI阻害 > 190及びGI₅₀ < 56 nM(スクリーニングしたSCLC細胞株を通じた平均); 抵抗性: 最大GI阻害 < 190及びGI₅₀ > 56nMを用いて感受性群に分類し、残りの細胞株を中間性とした。

【 0 1 7 4 】

SCLC細胞株についての遺伝子発現データは、the CCLE portal (CCLE_Expression_Entrez_2012-09-29.gct; Barretina Caponigro Stranskyらの文献、Nature 483, 603-307, 2012を参照されたい)から入手した。36種のSCLC細胞株についての平均SLFN11発現レベルは、5.78であった。6.0を上回るSLFN11発現を有する16種の細胞株は、高SLFN11群(6.4~9.5)と標識し、残りの20種のSCLC細胞株は低SLFN11群(3.6~5.0)と標識した。

【 0 1 7 5 】

Spearman相関及びANOVA試験を含む標準的な統計学的解析を、得られたデータに適用した。感受性及び抵抗性細胞株群間で差次的に発現される遺伝子は、the limma package in R (Ritchieらの文献、Nucleic Acids Res. 2015, 43(7): e47を参照されたい)によって同定した。the limma package in Rを使用する中程度のt検定を、感受性及び抵抗性細胞株群間の差次的遺伝子発現解析に使用し、名目p値は、the FDR method in Rを使用して多重仮説検定について調整した。SLFN11は、この解析に基づいて最も有意な特徴であり、調整されたp値は < 0.5、名目p値は 2.3×10^{-5} であった。図3A~3Eに示すように、タラゾパリブに対する感受性に基づいた差次的遺伝子発現解析は、SLFN11を上位遺伝子発現特徴として同定した。

【 0 1 7 6 】

図4に示すのは、感受性と関連する上位の遺伝子発現特徴であり、名目p値 < 0.001を有するものは、ボックス内でハイライト表示し、上位9遺伝子を使用する階層的クラスタリングを示す左側のヒートマップにプロットした。この同定された9遺伝子は、SLFN11、ならびにアポトーシス調節 (BCL2、GULP1)、オンコジーン(MAF)、DNA/RNA調節(DDX6)、小胞体ストレス応答(SIL1)、オルガネラ新生(AP3B1)、及びリン酸輸送(SLC25A3)に關与する遺伝子、及び機能不明の遺伝子(C1orf50)を含み、これらはすべてタラゾパリブに対する細胞株感受性との関連について名目上有意であった。

【 0 1 7 7 】

12種のSCLC株から抽出された細胞溶解物を、SLFN11抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。 -チューブリンをローディングコントロールとして使用した。図5に示すように、SLFN11タンパク質レベルは、CCLEデータベースの遺伝子発現RMAデータと良好に相関し、SLFN11タンパク質発現は、転写を通じて、おそらくプロモーターメチル化により、エピジェネティックに制御されていることが示唆された。

【 0 1 7 8 】

(実施例2: 細胞株由来異種移植片モデル)

ヒトNCI-H1048、NCI-H209、及びNCI-H69 SCLC腫瘍細胞を、BALB/cヌードマウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍が平均体積およそ130 mm³に達した時、動物(1群当たりn = 8)を、ベヒクル(Q1D × 28、経口)、シスプラチン(6 mg / kg、Q6D × 2、腹腔内)、又はタラゾパリブ(0.33 mg / kg、Q1D × 28、経口)で処理した。腫瘍増殖及び動物体重を、標準的な方法によって週2回監視した。

【 0 1 7 9 】

高SLFN11発現SCLC異種移植片モデルであるNCI-H1048(図6A)及びNCI-H209(図6B)ならびに低SLFN11発現モデルであるNCI-H69(図6C)を、タラゾパリブ単一剤治療に対するそれらの応答性について評価した。腫瘍増殖データは、同様の実験条件下でH209及びH1048モデルがH69モデルよりもはるかにタラゾパリブに対する感受性が高いこと、及びこの応答はR

MAレベルと相関していること(表2)を確認した。

表2:

【表2】

SCLC 細胞株	SLFN11 RMA	BMN 673感受性	
		インビトロ GI ₅₀ (nM)	インビボ 腫瘍増殖
NCI-H209	8.794	2.03	遅延
NCI-H1048	7.583	14.4	遅延
NCI-H69	3.981	190.2	遅延なし

10

【0180】

(実施例3: ヒト患者由来異種移植片(PDX)モデル)

12種のヒトSCLC PDXモデル(Crown Biosciences, OncoTest, WuxiAppTecから入手した)を、タラゾパリブ単一剤処理に対するそれらの応答について評価した。PDX腫瘍は、免疫低下マウスにおいて3~13回の継代で皮下増殖させた。腫瘍が平均体積およそ150mm³に達した時、動物(1群当たりn=5)に、ベヒクル(1日1回投与量)、又は最大許容投与量(MTD; 0.25~0.3mg/kg、1日1回)のタラゾパリブを経口投与した。腫瘍体積及び動物体重は、研究の終了時まで、又は腫瘍サイズが2000mm³を超えるまで、週2回測定した。無処理の腫瘍サンプルは、マウスから集めた。最初の処理後第21日及びそれ以降の腫瘍体積中央値を使用して、ベースラインからの変化を計算し、応答を評価した。

20

【0181】

12種のヒトSCLC PDXモデルを、ベヒクルコントロールと比較して最大許容投与量のタラゾパリブを用いてさらに試験した。12種のPDXモデルのうち3種は、タラゾパリブ処理の間、ベースラインと比較して30%以上の腫瘍退縮を示し、部分的応答者(PR)と定義した; 12種のPDX腫瘍のうち3種は、最初の投薬後第21日又はそれ以降に100%未満の腫瘍増殖があり、安定疾患(SD)様応答を呈したが、一方、残りのPDXモデルはタラゾパリブ処理に対して抵抗性であり、進行性疾患(PD)と名付けた(図7)。代表的な個々の腫瘍増殖曲線を図8A~8Fに示す。

30

【0182】

(逆相プロテインアレイ(RPPA))

Byersらの文献、Cancer Discovery 2012, 2, 798に記載された方法を使用して、これらのPDX腫瘍サンプルにRPPAを実施した。RPPAアッセイに使用したSLFN11抗体は、Santa Cruz Biotechnology(Cat # sc-374339)から入手した。RPPA解析は、PR及びSD応答群がPD応答群より高い平均SLFN11タンパク質を発現し、p値は0.049(図9A、9B)であったことを解明した。RNAレベルでは、SLFN11はPR及びSD群においてやはり高く、p値は0.046(図9C)であった。

40

【0183】

(RNA-Seqトランスクリプトーム シークエンシング及び解析)

2種の異種移植片腫瘍を、各PDXモデルから集めて処理し、AllPrep DNA/RNA Miniキット(Qiagen)を使用して全RNAを抽出した。RNAサンプルは、ライブラリー構築前にRibo-zeroキット(Illumina)を使用してリボソームRNA除去を行った。RNAシークエンシングは、HiSeq4000 PE100を用いて実施した。RNA-Seqペアードエンドの読み取りは、STAR(バージョン2.4.1b; Dobinらの文献、Bioinformatics 2012, 29(1): 15-21を参照されたい)を使用して、ヒト(GRCh38, release 20 from GENCODE; Harrowらの文献、Genome Res. 2012, 22(9):1760-74を参照されたい)及びマウス(GRCm38.p3, release M4 from GENCODE)由来の複合型ゲノムと整列させた。得られたアラインメントBAMファイルは、Samtools(バージョン1.2; Liらの文献、Bioinformatics 2009, 25: 2078-9を参照されたい)を使用して読み取り

50

名によって選別した。複合型ヒト及びマウス アノテーション(それぞれreleases 20及びM 4 from GENCODE)における各遺伝子に整列された読み取りペアの数は、HTSeq(バージョン0.6.1p1; Andersらの文献、Bioinformatics 2015, 31(2): 166-9を参照されたい)によってカウントした。ヒトに特有に整列され得た読み取りペアは、遺伝子発現及びタラゾパリブ感受性間の関係を調べるために使用した。

【0184】

RPPA及びRNA-Seqによるバイオマーカー解析は、図10A及び10Bに示すように、低ATM発現PDXモデルはタラゾパリブに対してより感受性が高いことを解明した。

【0185】

(遺伝子突然変異解析)

遺伝子突然変異解析は、SCLCについて予期されるとおり、12種のSCLC PDX腫瘍のすべてがTP53及び/又はRB1突然変異を有することを示す(表3を参照されたい)。

表3:

【表3】

SCLC PDX 腫瘍	過去の治療	RB1	TP53	*最良の応答：ベースラインからの変化(%)	Myriad HRD スコア
LU-01-0547	無	突然変異	突然変異	-95 (D83)	33
CTG-0198	有	Wt	突然変異	-55 (D29)	18
LU1267	N/A	喪失	Wt	-30 (D38)	11
LU67	N/A	突然変異	突然変異	-29 (D25)	29
LU65	有	突然変異	Wt	17 (D21)	31
LXFS 615	N/A	喪失	突然変異	83 (D21)	24
LXFS 1129	N/A	突然変異	突然変異	260 (D21)	20
LU2514	N/A	突然変異	突然変異	262 (D21)	24
LXFS 650	有	突然変異	突然変異	314 (D21)	17
CTG-0199	有	突然変異	喪失	318 (D21)	17
LXFS 573	N/A	突然変異	突然変異	351 (D21)	14
LXFS 2156	N/A	突然変異	突然変異	615 (D21)	43

N/A: 利用不可。Wt: 野生型

*腫瘍体積中央値 (n=5)。

【0186】

(実施例4: Myriad HRDスコアとの比較)

図11に示すように、試験したSCLC細胞株又はこれらのSCLC PDXモデルのどちらにおいても、タラゾパリブ応答及びMyriad HRD(相同組換え欠損)スコア間に明らかな関係は見出されなかった。

【0187】

刊行物、特許、特許出願、及び公開された特許出願などのすべての参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0188】

前述の発明は、理解の明確さの目的のために、説明及び例示として幾分詳細に記載されているが、ある種の軽微な変更及び修正が実施されることは、当該技術分野の当業者には明らかである。したがって、これらの記載及び例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

10

20

30

40

【 図 1 】

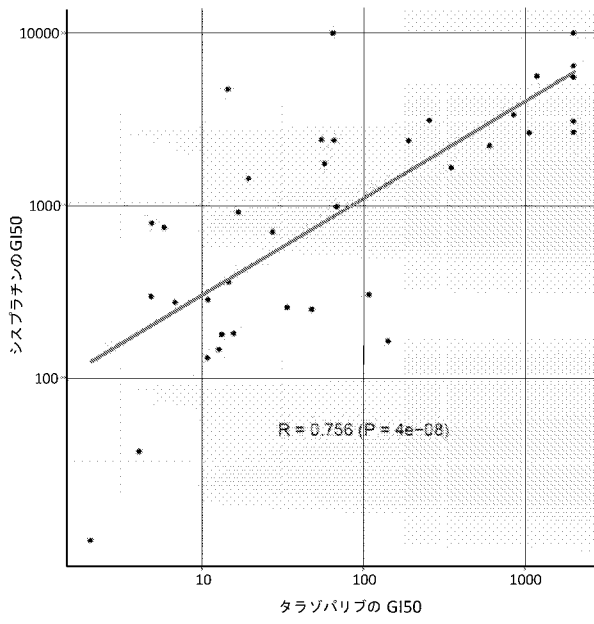


図 1

【 図 2 】

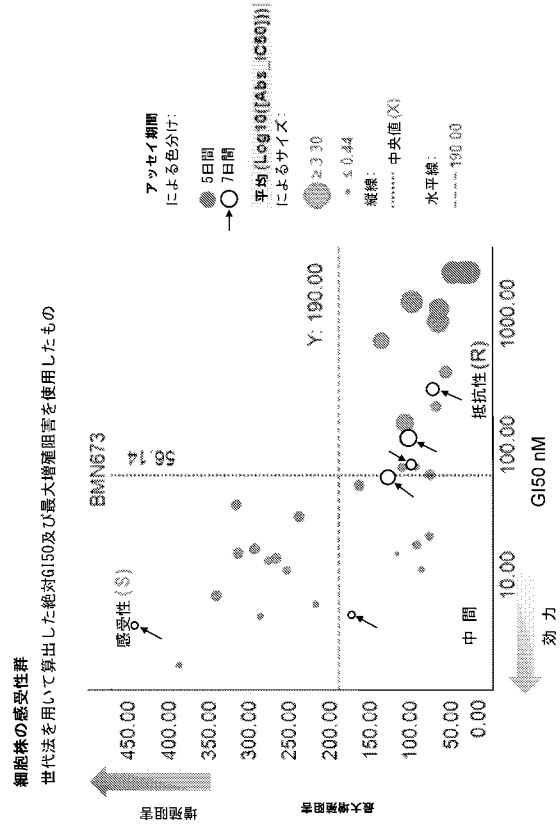


図 2

【 図 3 A - B 】

SCLC 株における SLFN11 発現

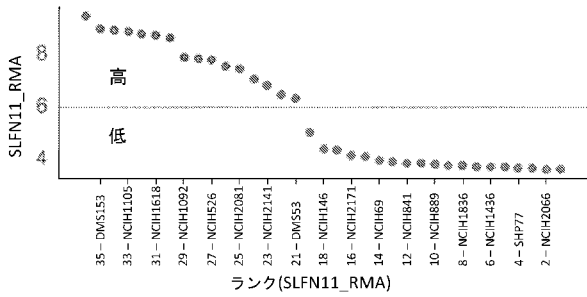


図 3A

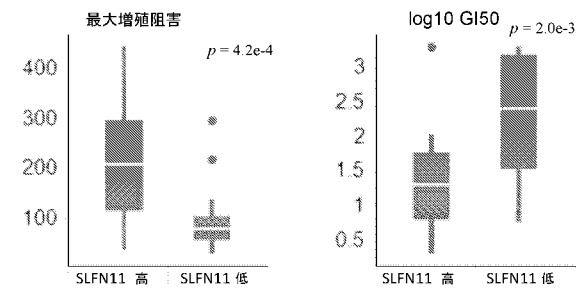


図 3B

【 図 3 C 】

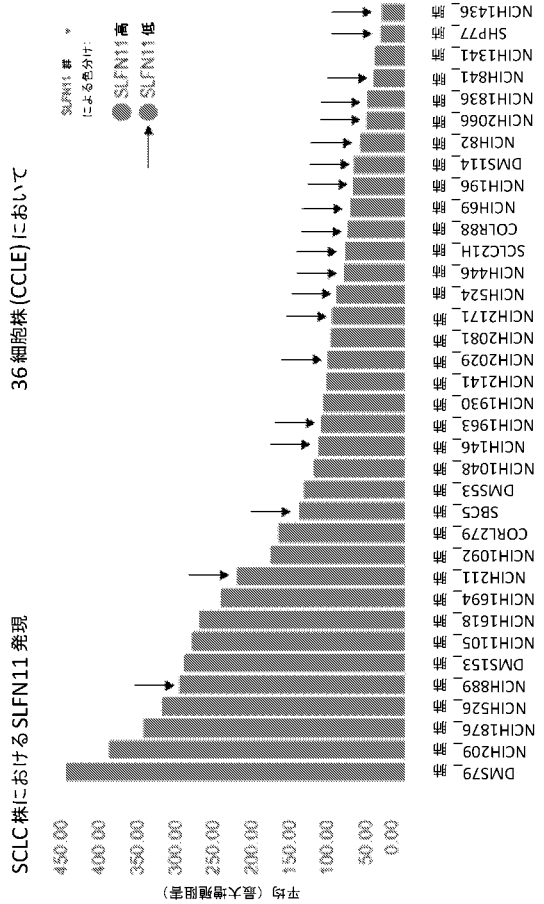
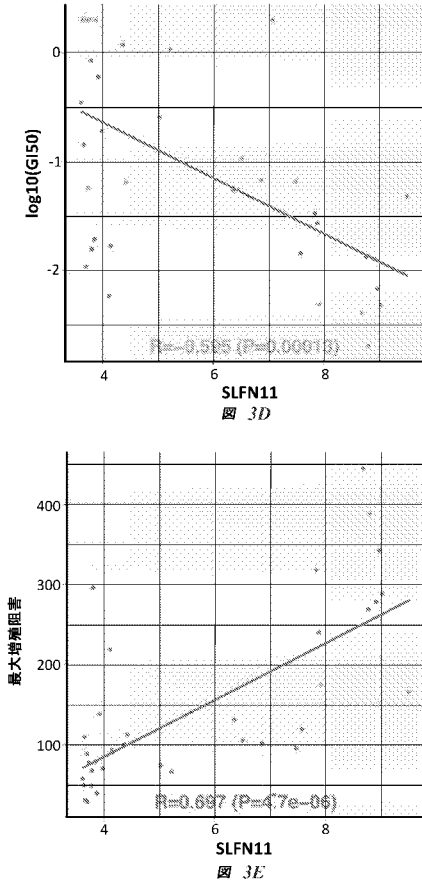
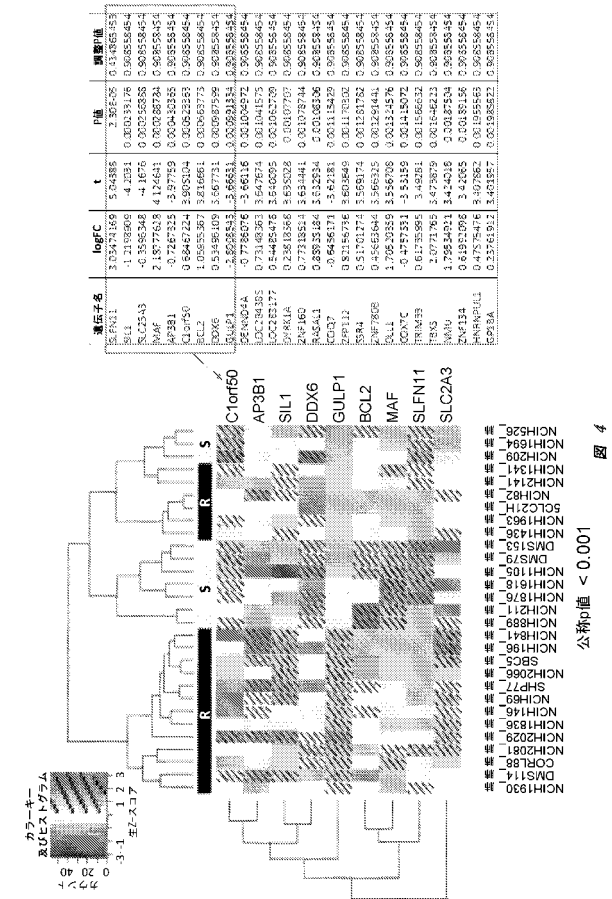


図 3C

【 図 3 D - E 】



【 図 4 】



【 図 5 】

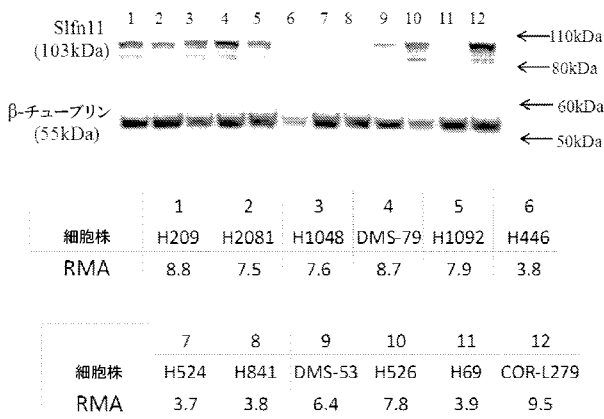


図 5

【 図 6 A - B 】

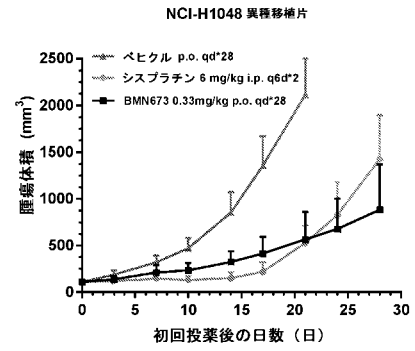


図 6A

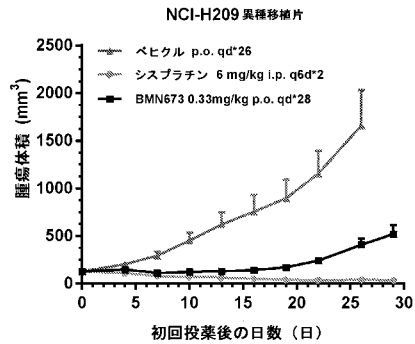


図 6B

【 図 6 C 】

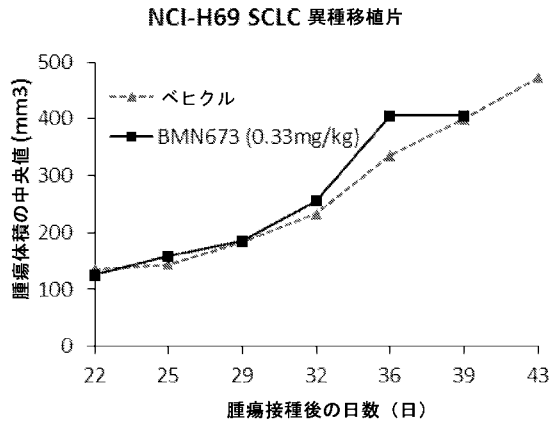


図 6C

【 図 7 】

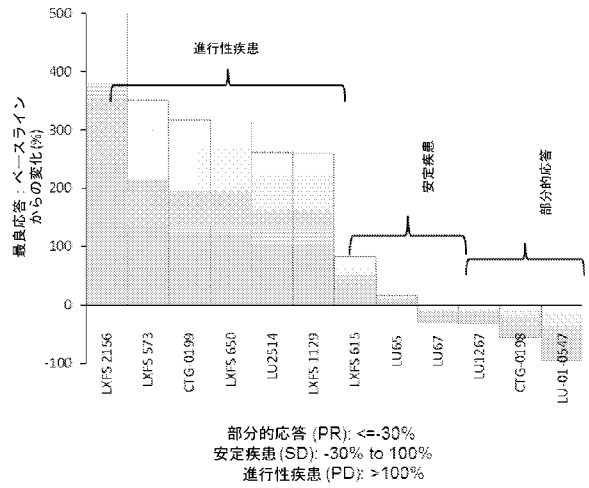


図 7

【 図 8 A - B 】

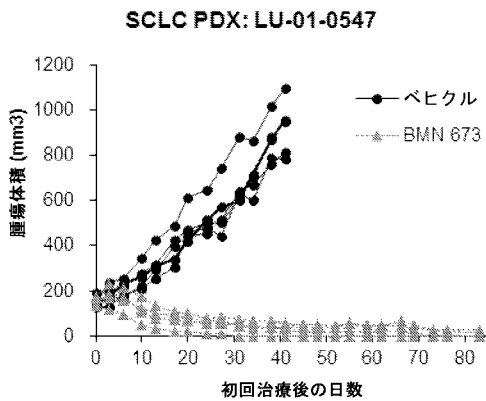


図 8A

【 図 8 C - D 】

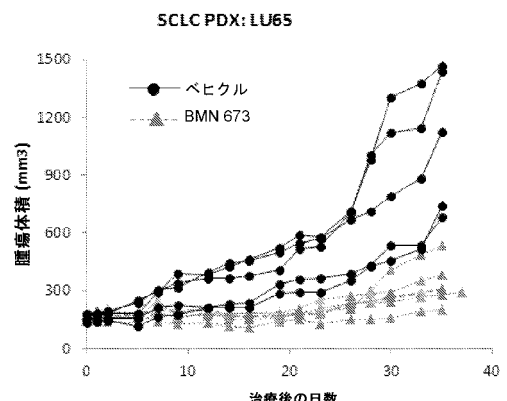


図 8C

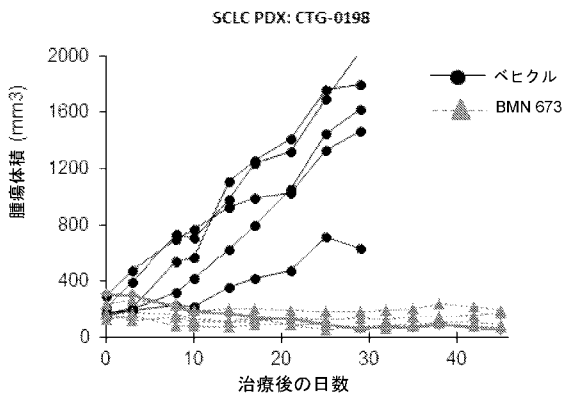


図 8B

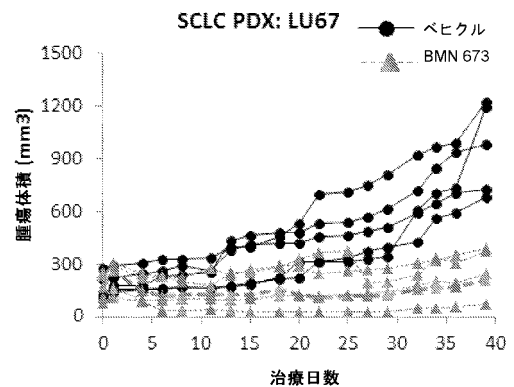


図 8D

【 図 8 E - F 】

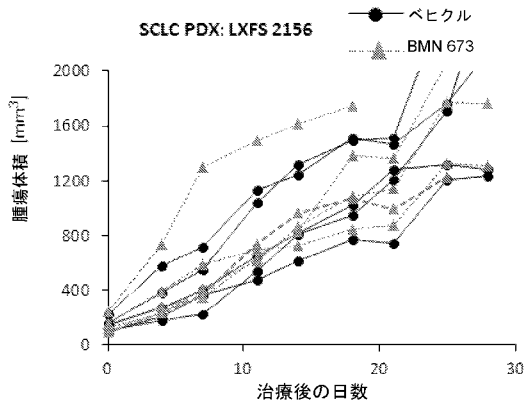


図 8E

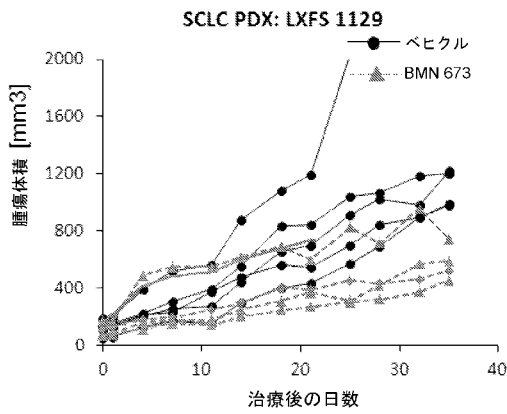


図 8F

【 図 9 】

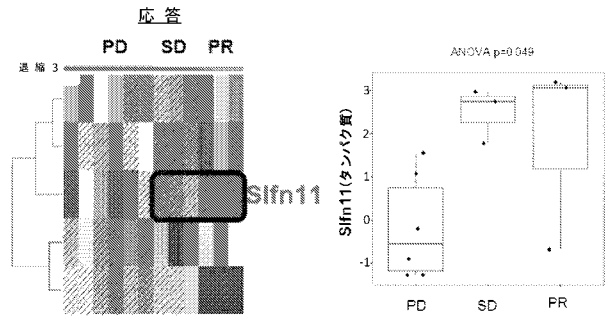


図 9A

図 9B

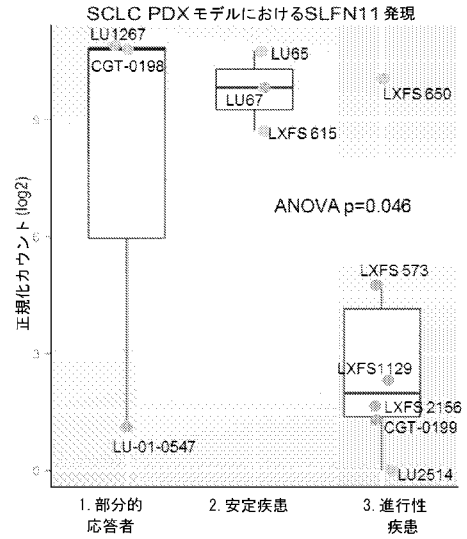


図 9C

【 図 10 】

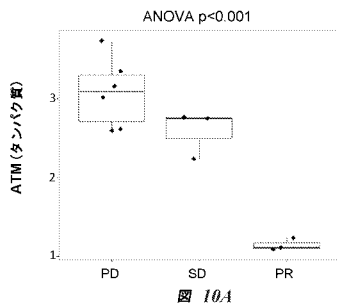


図 10A

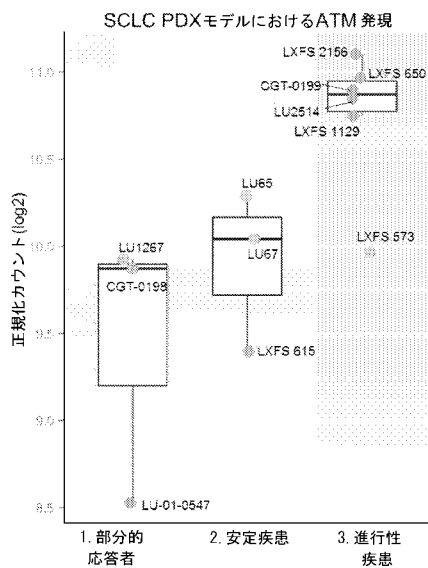


図 10B

【 図 11 】

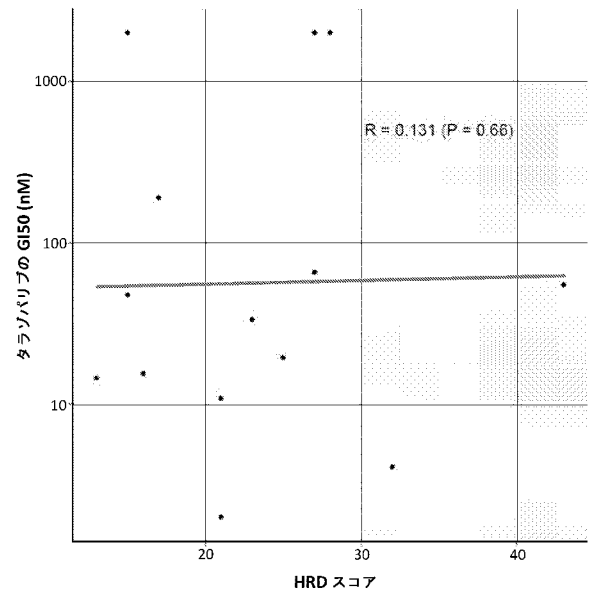


図 11

- 【 手続補正書 】
- 【 提出日 】平成30年8月21日 (2018.8.21)
- 【 手続補正 1 】
- 【 補正対象書類名 】図面
- 【 補正対象項目名 】全図
- 【 補正方法 】変更
- 【 補正の内容 】

【 図 1 】

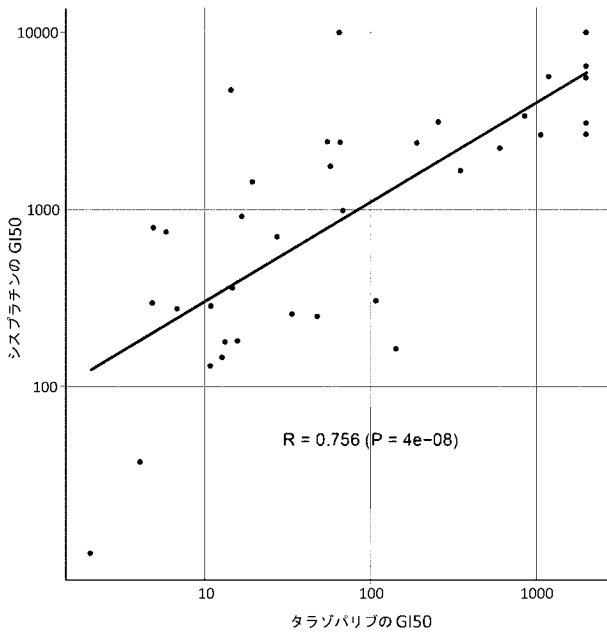


図 1

【 図 2 】

細胞株の感受性群
 世代法を用いて算出した絶対GI50及び最大増殖阻害を使用したもの

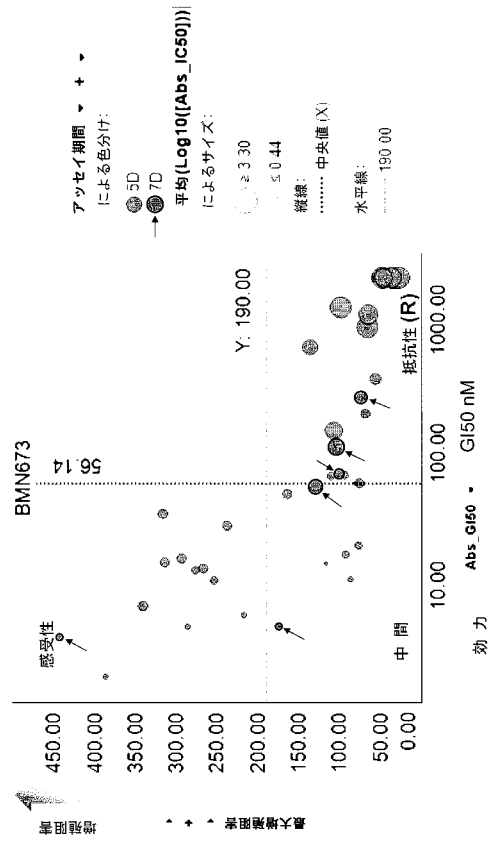


図 2

【図 3 A - B】

SCLC株におけるSLFN11発現

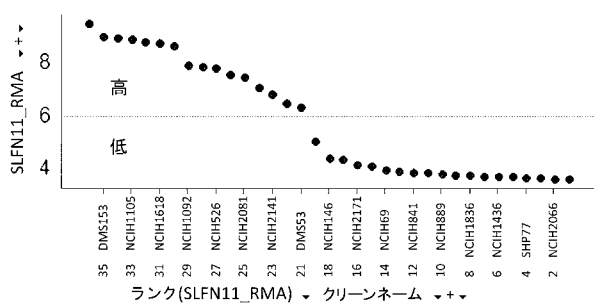


図 3A

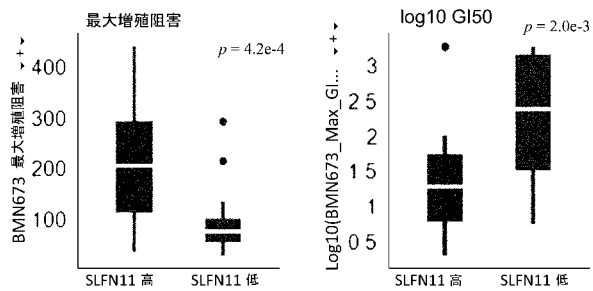


図 3B

【図 3 D - E】

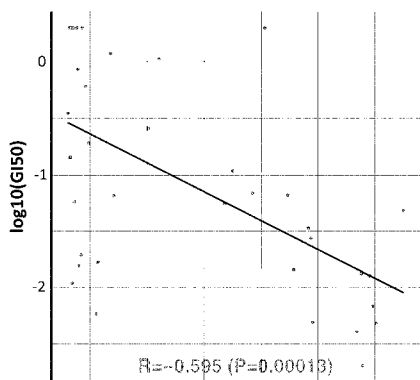


図 3D

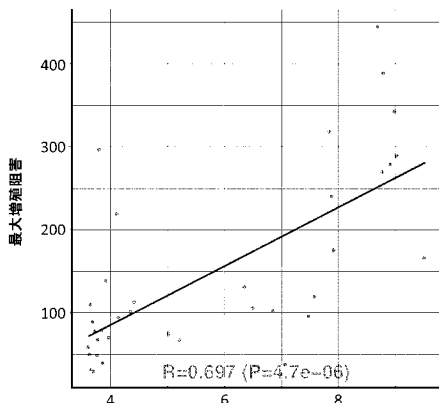
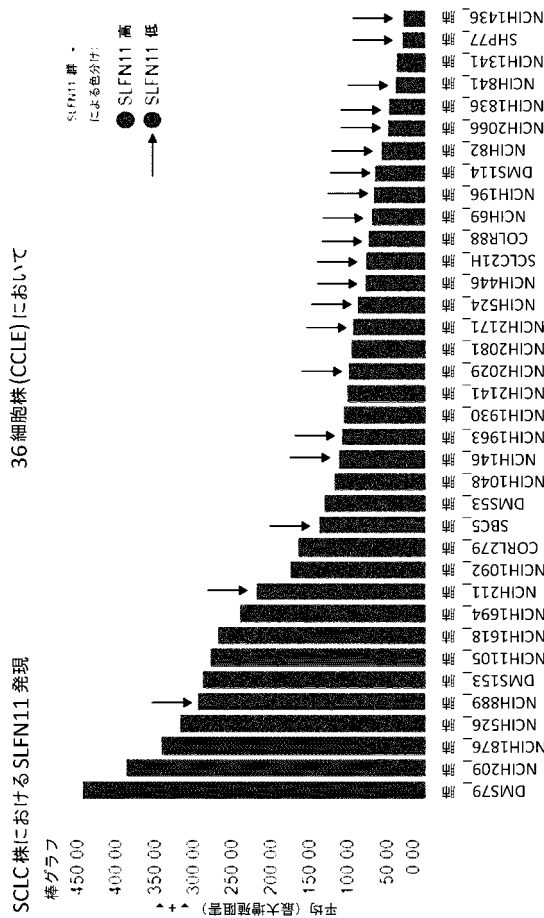


図 3E

【図 3 C】



36細胞株(CCL)において

SCLC株におけるSLFN11発現

【図 4】

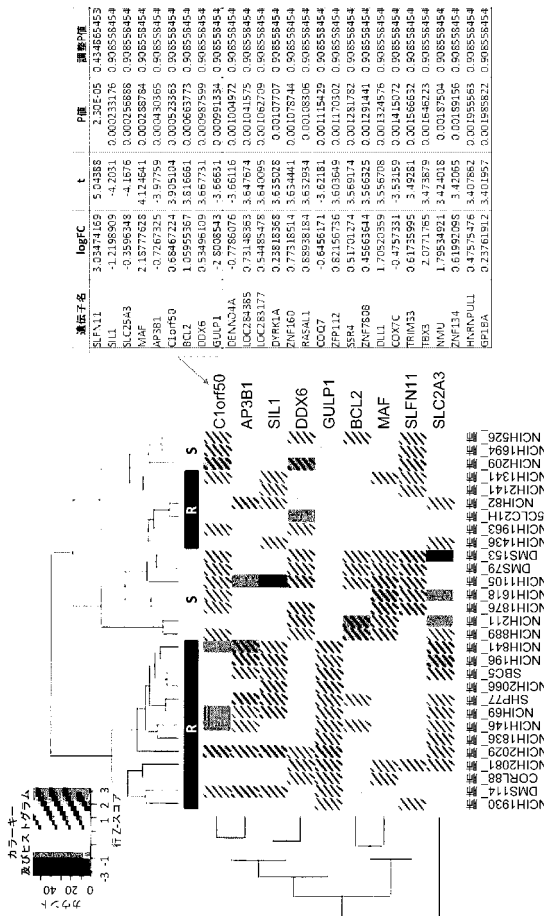


図 3C

図 4

公称 p 値 < 0.001

【 図 5 】

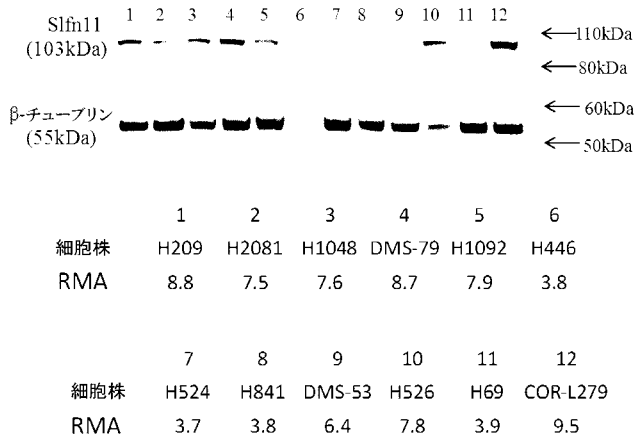


図 5

【 図 6 A - B 】

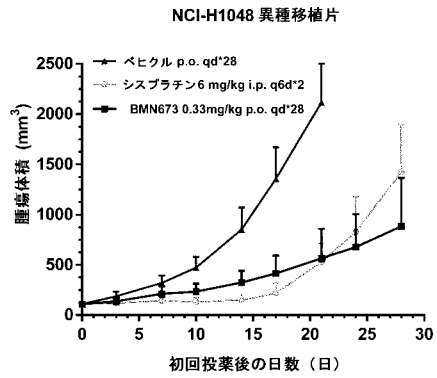


図 6A

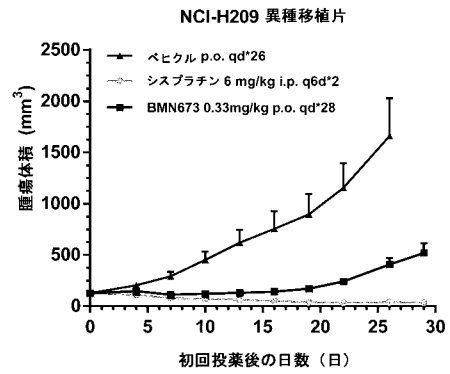


図 6B

【 図 6 C 】

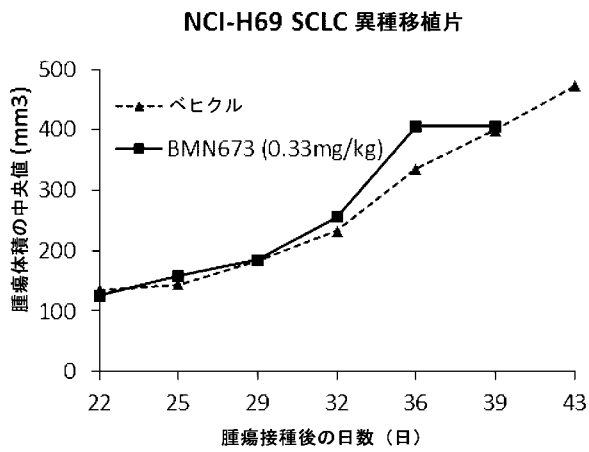


図 6C

【 図 7 】

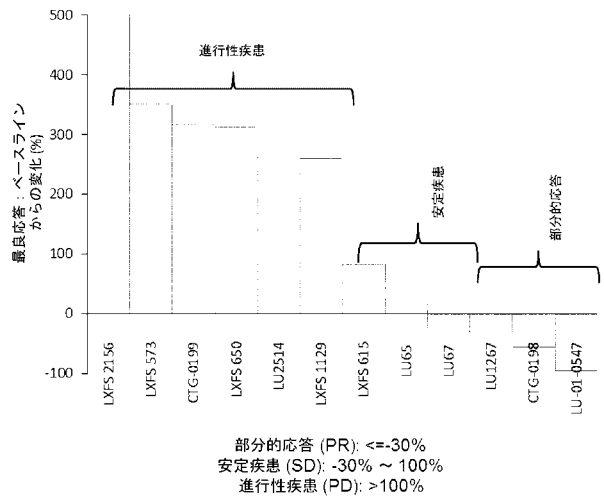
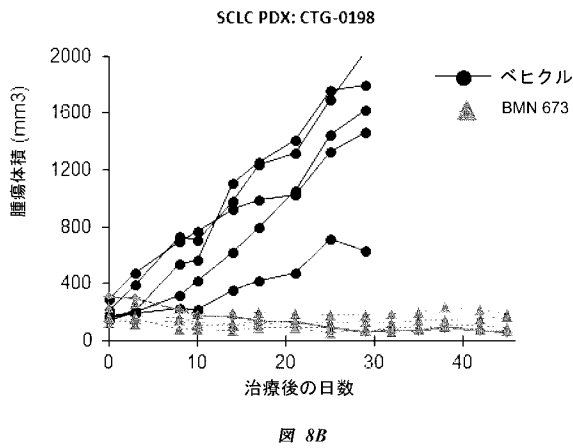
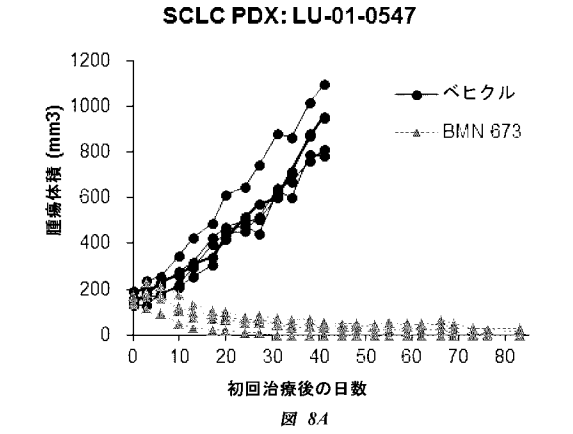
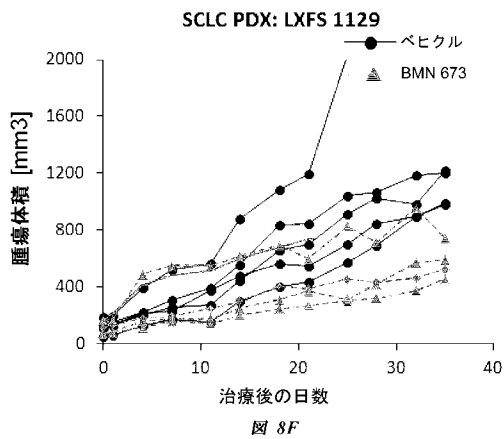
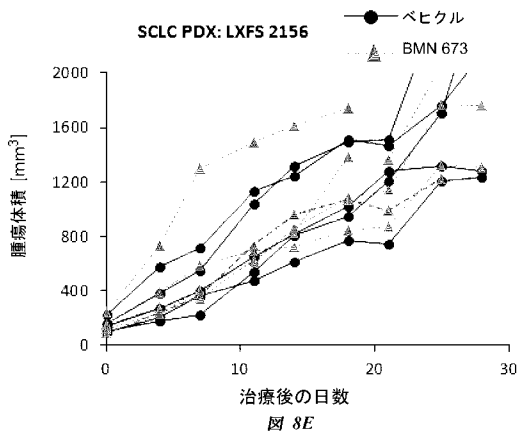


図 7

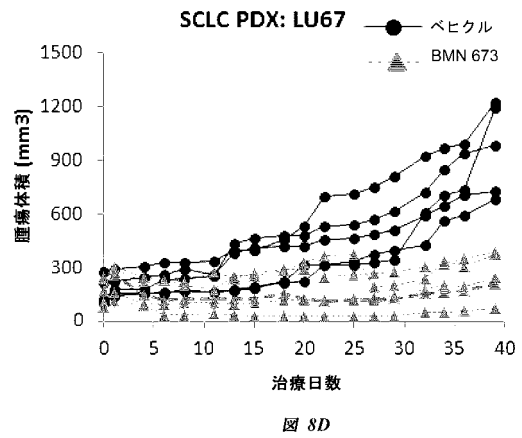
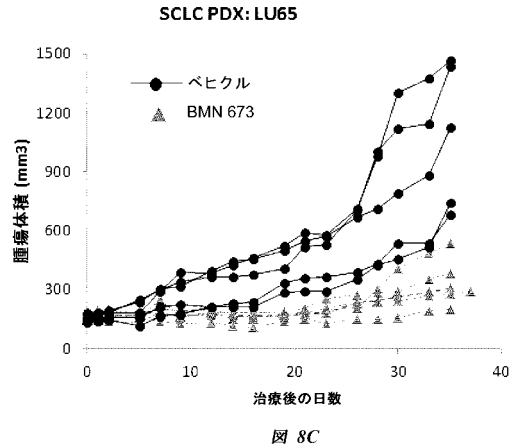
【 図 8 A - B 】



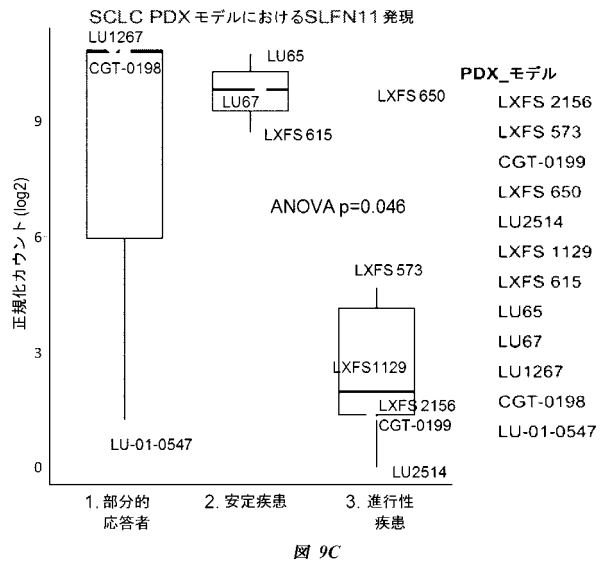
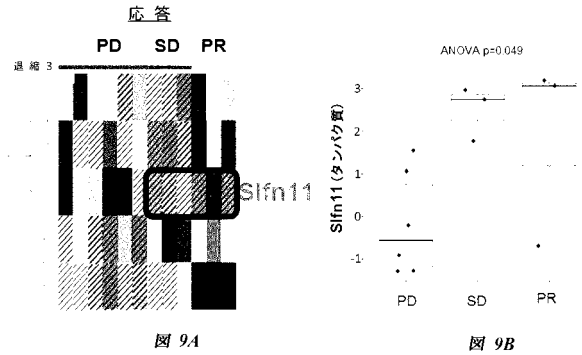
【 図 8 E - F 】



【 図 8 C - D 】



【 図 9 】



【 図 1 0 】

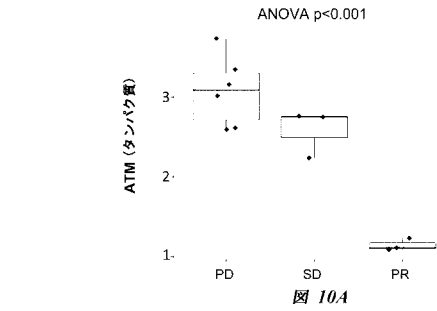


図 10A

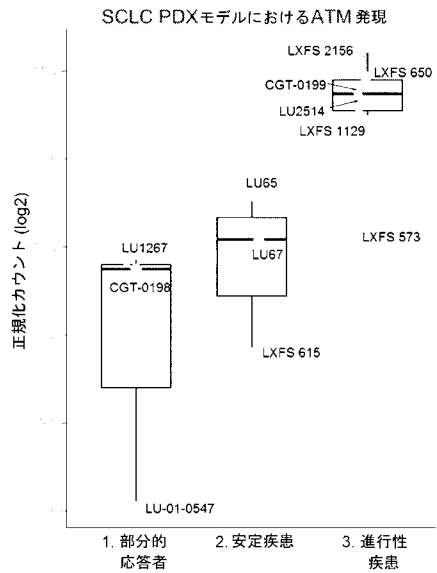


図 10B

【 図 1 1 】

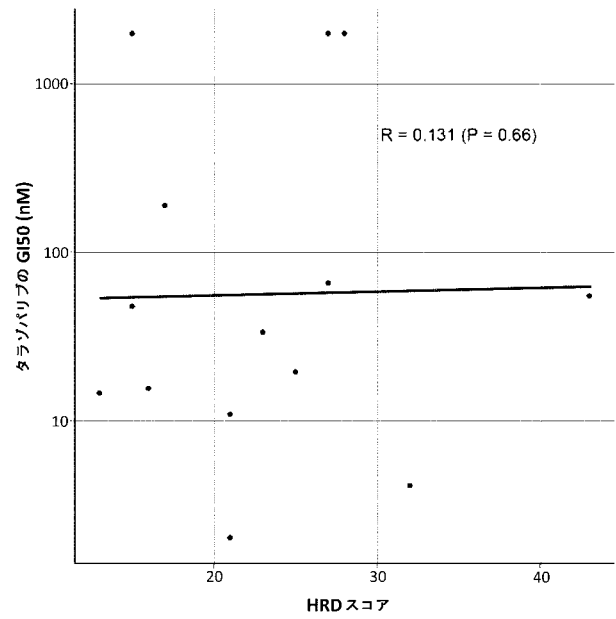


図 11

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/58928

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC(8) - A61K 31/535; C12Q 1/68; G01N 33/574; G01N 33/53 (2016.01)
 CPC - C07D 213/28; C07D 215/06; C12Q 1/6886; G01N 33/574
 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)
 IPC(8) - A61K 31/535; C12Q 1/68; G01N 33/574; G01N 33/53 (2016.01)
 CPC - C07D 213/28; C07D 215/06; C12Q 1/6886; G01N 33/574; USPC - 514/235.5; 514/228.8; 435/6.14; 435/7.23; 436/813

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 IPC(8) - A61K 31/535; C12Q 1/68; G01N 33/574; G01N 33/53 (2016.01) - see keyword below
 CPC - C07D 213/28; C07D 215/06; C12Q 1/6886; G01N 33/574; USPC - 514/235.5; 514/228.8; 435/6.14; 435/7.23; 436/813

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 PubWEST(USPT,PGPB,EPAB,JPAB); PatBase; Medline, Google: Schlafen-11, SLFN11, treating, small cell lung cancer, SCLC, Poly(ADP-ribose) polymerases, PARP, inhibitors, talazoparib, BMN 673, olaparib, rucaparib, veliparib, CEP9722, MK4827, BGB-290, binmarker, administering, effective, amount, pharmaceutical, tosylate, lung, cancer, detecting, marker.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	OWONIKOKO et al., Poly (ADP) ribose polymerase enzyme inhibitor, veliparib, potentiates chemotherapy and radiation in vitro and in vivo in small cell lung cancer. Cancer Med. 2014, Vol. 3(6), p. 1579-94. Abstract; pg 1580, col 1, para 1; pg 1581, col 1, last para, and col 2, top para; pg 1584, col 1, top para and middle para, and col 2, top para; pg 1585, Fig 2; pg 1586, col 1, and Fig 3; pg 1587-88, Fig 4; pg 1591, col 2, up para; and pg 1593, col 2, Ref. 39	1-7, 15
Y	TANG et al., SLFN11 is a Transcriptional Target of EWS-FLI1 and a Determinant of Drug Response in Ewing Sarcoma. Clin Cancer Res. 2015 Sep, Vol. 21(18), p. 4184-93. Epub 2015 Mar 16. Abstract; pg 4184, col 1; pg 4185, col 1, Translational Relevance; and pg 4189, col 2, middle para	1-7, 15
A	US 2013/0317027 A1 (MYREXIS, INC) 28 November 2013 (28.11.2013), para [0020], [0742], [0746], [0760], [0802], and [0806]	1-7, 15
A	MURAI et al., Stereospecific PARP Trapping by BMN 673 and Comparison with Olaparib and Rucaparib. Mol Cancer Ther. 2014, Vol. 13(2), p. 433-43. Abstract	1-7, 15
A	SMITH et al., Synergistic activity of PARP inhibition by talazoparib (BMN 673) with temozolomide in pediatric cancer models in the pediatric preclinical testing program. Clin Cancer Res. 2015 Feb, Vol. 21(4), p. 819-32. Epub 2014 Dec 10. Abstract	1-7, 15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 December 2016

Date of mailing of the international search report
13 MAR 2017

Name and mailing address of the ISA/US
 Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
 Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer:
Lee W. Young
 PCT Helpdesk: 571-272-4300
 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/58928

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CLINICAL_TRIAL_NCT02286687, Phase II Study of the PARP Inhibitor BMN 673 (Talazoparib Tosylate) in Advanced Cancer Patients With Somatic Alterations in BRCA1/2, Mutations/Deletions in PTEN or PTEN Loss, a Homologous Recombination Defect, Mutations/Deletions in Other BRCA Pathway Genes and Germline Mutation in BRCA1/2 (Not Breast or Ovarian Cancer). Clinical Trial ID: NCT02286687. Lead Sponsor M.D. Anderson Cancer Center. Start Date: 01 December 2014 [online]. [Retrieved on 2018.12.19]. Retrieved from the Internet: <URL: https://covalentdata.com/clinical-trial/NCT02286687 > PDF File: pg 1-3. Title; Lead Sponsor; and Start Date	1-7, 15
A	US 2015/0044288 A1 (WINDWARD PHARMA, INC) 12 February 2015 (12.02.2015), para [0246], and [0256]	1-7, 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 16/58928

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.: 8-14,16-23
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-7, 15, directed to a method of treating small cell lung cancer in a subject. The "detecting" will be searched to the extent that the "detecting" encompasses detecting Schlafen-11 (SLFN11). It is believed that claims 1, 2-3(in part), 4-7, 15 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass detecting SLFN11. Additional "detecting" will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected "detecting". Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be detecting SL1 [claims 2-3 (in part), (4-6)/2-3 (in part)].
.....Continued in the extra sheet.....

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1, 2-3(in part), 4-7, 15, limited to Schlafen-11 (SLFN11)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/58928

Continuation of:
Box No III (unity of invention is lacking)

The inventions listed as Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Feature

Among Groups I+, each biomarkers of SLFN11, SIL1, SLC25A3, MAF, AP3B1, Clorf50, BCL2, DDX6, and GULP1 is structurally and functional different from all others.

Common Technical Features

The inventions of Groups I+ share the technical feature of a method of treating a small cell lung cancer subject, comprising detecting one or more of biomarkers including SLFN11, in a tumor cell sample from the subject, and administering an effective amount of a Poly (ADP-ribose) polymerases (PARP) inhibitor to the subject (part of claim 2); or
—a method of selecting a small cell lung cancer subject for PARP inhibitor chemotherapy, comprising detecting one or more of biomarkers including SLFN11, in a small cell lung cancer tumor sample of the subject, and administering an effective amount of a PARP inhibitor to the subject (part of claim 3).

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art as being obvious over an article entitled 'Poly (ADP) ribose polymerase enzyme inhibitor, veliparib, potentiates chemotherapy and radiation in vitro and in vivo in small cell lung cancer' by OWONIKOKO et al. (hereinafter 'Owonikoko'; Cancer Med. 2014, Vol. 3(6), p. 1579-94), in view of an article entitled 'SLFN11 is a Transcriptional Target of EWS-FLI1 and a Determinant of Drug Response in Ewing Sarcoma' by TANG et al. (hereinafter 'Tang'; Clin Cancer Res. 2015 Sep, Vol. 21(18), p. 4184-93) as follows:

Owonikoko discloses a method of treating a small cell lung cancer model subject (pg 1584, col 1, middle para - 'model the clinical management of SCLC patients ... the addition of veliparib ... the triplet regimen significantly delayed tumor regrowth'; Abstract - 'small cell lung cancer (SCLC)'), comprising
-- detecting one or more of biomarkers in a tumor cell sample from the subject (or in a small cell lung cancer tumor sample of the subject, for claim 3) (pg 1586, col 1 - 'SCLC cell lines ...H146, H187,... displayed increased sensitivity to cisplatin and to PARP inhibition...Five of these genes were restricted to the sensitive cell lines', wherein detecting biomarker genes in the cell lines of 'H146, H187' is equivalently to 'detecting one or more of biomarkers in a tumor cell sample from the subject/(or in a small cell lung cancer tumor sample of the subject)', because the model subject is produced by using the small cell lung cancer (SCLC) cell lines of 'H146, H187'; pg . 1581, col 1, last para to col 2, top para - 'Tumor xenografts were raised in 6-week-old athymic (nu/nu) mice...H146 (1-2 x 10(7)) and H128 cells (2 x 10(7)) suspended in serum-free medium... injected subcutaneously into the flank region of nude mice'; pg 1584, col 2, top para - 'native expression of BRCA1, ERCC1, and DNA-PKcs ...DNA-PKcs expression was altered ... less sensitive H128 cell line (Fig. 4B). ...H146 cell line ... (Fig. 4C)'; pg 1587-1588, Fig 4; pg 1584, col 1, top para - 'in vivo experiments. There was greater tumor growth inhibition with the veliparib and cisplatin combination than with cisplatin alone in H146 xenografts'; Abstract - 'small cell lung cancer (SCLC)'), and
--administering an effective amount of a Poly (ADP-ribose) polymerases (PARP) inhibitor to the subject (Abstract - 'Poly (ADP) ribose polymerase (PARP) plays a key role in DNA repair and is highly expressed in small cell lung cancer (SCLC). ... therapeutic impact of PARP inhibition in SCLC. ... veliparib...Subcutaneous xenografts in athymic nu/nu mice...employed for in vivo testing'; pg 1584, col 1, middle para - 'model the clinical management of SCLC patients ... addition of veliparib ...The triplet combination of veliparib, ... significantly delayed tumor regrowth...when treated animals were observed off treatment for up to 4 weeks (P = 0.02; Fig. 3)', wherein 'veliparib' is a PARP inhibitor, and wherein 'the addition of veliparib ... significantly delayed tumor regrowth' is resulted from 'administering to the subject an effective amount of a PARP inhibitor'; pg 1580, col 1, para 1 - 'Veliparib (ABT-868) is a small molecule inhibitor of PARP-1 and PARP-2 enzymes'; pg 1581, col 2, top para - 'tumor-bearing mice ...assigned to treatments:..veliparib (5 and 25 mg/kg o.g. daily),... plus veliparib (25 mg/kg o.g. daily)'; pg 1585, Fig 2; pg 1586, Fig 3).
Although Owonikoko does not specifically teach using the method for treating a real subject having a small cell lung cancer, one of the ordinary skill in the art at the time the invention was made would have known to apply the method of treating a model subject taught by Owonikoko to treat a real subject having a small cell lung cancer, because it is a routine practice of developing a method for treating a model cancer subject before using the method for treating a real cancer subject, especially a method of using a Poly (ADP-ribose) polymerases (PARP) inhibitor for treating different types of cancers including a small cell lung cancer in a subject was disclosed long before the invention was made, as evident by US 2013/0317027 A1 to MYREXIS, INC (para [0760] - 'cancers that can be treated... include...small-cell lung carcinoma'; para [0746] - 'treating a wide range of cancers ...SCLC'; para [0806] - 'small cell lung carcinoma (SCLC)... small-cell lung cancer (SCLC)'; para [0802] - 'treating cancer ... administering a therapeutically-effective amount of a PARP inhibitor'; para [0742] - 'poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs)'; para [0020] - 'PARP inhibitors... synergize to cause cell death').
Owonikoko further discloses PARP plays a key role in DNA repair and is highly expressed in small cell lung cancer (Abstract - 'Poly (ADP) ribose polymerase (PARP) plays a key role in DNA repair and is highly expressed in small cell lung cancer (SCLC)').
*****Continued in the next extra sheet*****

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/58928

Continuation of:

The previous extra sheet - Box No III (unity of invention is lacking)

Owonikoko neither specifically teaches wherein the biomarkers comprising Schlafen-11 (SLFN11); nor teaches the method is for selecting a small cell lung cancer subject for PARP inhibitor chemotherapy (for claim 3). Tang discloses cancer cells expressing SLFN11 has been suggested as a predictor for the sensitivity of the cancer cells to cancer therapy using DNA-damaging agents in combination with PARP inhibitors (Abstract - 'Results ...SLFN11 expression is responsible for high sensitivity of Ewing sarcoma to camptothecin and combinations of PARP inhibitors with temozolomide'; pg 4184, col 1 - 'Schlafen genes (SLFN)... SLFN11 ...dominant response factor of cancer cells to topoisomerase I inhibitors ...Knockdown of SLFN11 increases chemoresistance of cancer cells to a broad range of DNA-damaging agents'; pg 4185, col 1, Translational Relevance - 'DNA-damaging agents, such as topoisomerase I inhibitors... synergistic effects of inhibitors of PARP combined with temozolomide for treating Ewing sarcoma.... SLFN11 has been suggested as a predictor for the sensitivity of cancer cells, and importantly SLFN11 is capable of sensitizing cancer cells to DNA-damaging agents...SLFN11 expression sensitizes Ewing sarcoma cells to camptothecin and PARP inhibitors plus temozolomide'), wherein SLFN11 has been detected in different cancer cells (pg 4189, col 2, middle para - 'a strong positive correlation with SLFN11 ...of breast cancers... and prostate cancers'; pg 4184, col 1 - 'Schlafen genes (SLFN)...SLFN11 sensitizes colon cancer cells to topoisomerase I inhibitors'). Although Tang also does not specifically teach wherein the biomarkers comprising SLFN11, one of the ordinary skill in the art at the time the invention was made would have known to identify wherein the subject expressing SLFN11, based on the combination of Tang and Owonikoko as well as the inherent property of the subject expressing SLFN11, in order to combine the methods and knowledge available in the art for effectively using a PARP inhibitor in a combination therapy for treating a small cell lung cancer subject who is sensitive to the treatment with a desired effect and without undue experimentation.

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time the invention was made to combine the teachings of Owonikoko and Tang, to obtain a method of treating a small cell lung cancer subject, comprising detecting one or more of biomarkers in a tumor cell sample from the subject (or in a small cell lung cancer tumor sample of the subject, for claim 3), and administering an effective amount of a Poly (ADP-ribose) polymerases (PARP) inhibitor to the subject, based on the teaching of Owonikoko, and further wherein the biomarkers comprising Schlafen-11 (SLFN11), and the method is for selecting a small cell lung cancer subject for PARP inhibitor chemotherapy (for claim 3), based on the combination of Tang and Owonikoko as well as the inherent property of the subject expressing SLFN11, in order to combine the methods and knowledge available in the art for facilitating effectively using a PARP inhibitor in a combination therapy for treating a small cell lung cancer subject who is sensitive to the treatment with a desired effect and without undue experimentation.

Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another.

Groups I+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Claims 8-14, 16-23 are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a). These claims are improper multiple dependent claims.

Note:

I) Claim 1 is objected as lacking a definition for the first appeared abbreviation "SLFN11" and "PARP" limitations in claims. For the purposes of this ISR, "SLFN11" and "PARP" in claim 1 are rewritten as "Schlafen-11 (SLFN11)" and "Poly (ADP-ribose) polymerases (PARP)", respectively, based on the Specification (Specification: para [0002] - 'Schlafen-11 (SLFN11)'; para [0004] - 'Poly (ADP-ribose) polymerases (PARP)').

II) Claims 2 and 3 contain many additional biomarkers. However there is no full name for each of the additional biomarkers disclosed in the application.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/55 (2006.01)	A 6 1 K 31/55	
A 6 1 K 31/4184 (2006.01)	A 6 1 K 31/4184	
A 6 1 K 31/496 (2006.01)	A 6 1 K 31/496	
A 6 1 K 31/4462 (2006.01)	A 6 1 K 31/4462	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
A 6 1 K 31/551 (2006.01)	A 6 1 K 31/551	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 31/4188 (2006.01)	A 6 1 K 31/4188	
A 6 1 K 31/4745 (2006.01)	A 6 1 K 31/4745	
A 6 1 K 31/7048 (2006.01)	A 6 1 K 31/7048	
A 6 1 K 33/24 (2006.01)	A 6 1 K 33/24	
A 6 1 K 31/282 (2006.01)	A 6 1 K 31/282	
A 6 1 K 31/4166 (2006.01)	A 6 1 K 31/4166	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	Y

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

(72)発明者 レオナルド イー . ポスト
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 9 4 9 ノバト デジタル ドライブ 1 0 5
 (72)発明者 ユキアオ シェン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 9 4 9 ノバト デジタル ドライブ 1 0 5
 (72)発明者 ユアンピン ル
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 9 4 9 ノバト デジタル ドライブ 1 0 5
 (72)発明者 エブリン ワング
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 9 4 9 ノバト デジタル ドライブ 1 0 5
 (72)発明者 カレン ユ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 9 4 9 ノバト デジタル ドライブ 1 0 5

Fターム(参考) 4C084 AA17 AA18 AA19 MA02 MA13 MA17 MA22 MA23 MA28 MA35
 MA37 MA52 MA55 MA58 MA59 MA60 MA65 NA05 NA14 ZA591
 ZA592 ZB261 ZB262 ZC751
 4C086 AA01 AA02 BC35 BC37 BC39 BC50 CB03 CB05 CB09 CB11
 CB22 EA11 GA07 GA14 HA12 HA24 HA26 HA28 MA01 MA02
 MA04 MA52 NA05 NA14 ZA59 ZB26 ZC75
 4C206 AA01 AA02 JB16 KA01 MA01 MA02 MA04 MA72 NA05 NA14
 ZA59 ZB26 ZC75

专利名称(译)	用PARP抑制剂治疗小细胞肺癌		
公开(公告)号	JP2018536700A	公开(公告)日	2018-12-13
申请号	JP2018541106	申请日	2016-10-26
[标]发明人	イングフェング レオナルドイーポスト ユキアオシエン ユアンビンル エブリンワング カレンユ		
发明人	イング フェング レオナルド イー. ポスト ユキアオシエン ユアンビン ル エブリン ワング カレン ユ		
IPC分类号	A61K45/00 A61P35/00 A61P11/00 A61K31/5025 A61K31/501 A61K31/55 A61K31/4184 A61K31/496 A61K31/4462 A61K45/06 A61K31/551 A61P43/00 A61K31/4188 A61K31/4745 A61K31/7048 A61K33 /24 A61K31/282 A61K31/4166 G01N33/53		
CPC分类号	A61K31/4184 A61K31/454 A61K31/496 A61K31/502 A61K31/5025 A61K31/55 A61K31/551 A61K45 /06 A61P35/00 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158 G01N33/57423 A61K2300/00 A61K9/0053		
FI分类号	A61K45/00 A61P35/00 A61P11/00 A61K31/5025 A61K31/501 A61K31/55 A61K31/4184 A61K31/496 A61K31/4462 A61K45/06 A61K31/551 A61P43/00.121 A61K31/4188 A61K31/4745 A61K31/7048 A61K33/24 A61K31/282 A61K31/4166 G01N33/53.D G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/AA18 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084 /MA23 4C084/MA28 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA58 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA65 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA591 4C084/ZA592 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC751 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC35 4C086/BC37 4C086/BC39 4C086 /BC50 4C086/CB03 4C086/CB05 4C086/CB09 4C086/CB11 4C086/CB22 4C086/EA11 4C086/GA07 4C086/GA14 4C086/HA12 4C086/HA24 4C086/HA26 4C086/HA28 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086 /MA04 4C086/MA52 4C086/NA05 4C086/NA14 4C086/ZA59 4C086/ZB26 4C086/ZC75 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/AB16 4C206/KA01 4C206/MA01 4C206/MA02 4C206/MA04 4C206/MA72 4C206 /NA05 4C206/NA14 4C206/ZA59 4C206/ZB26 4C206/ZC75		
代理人(译)	石川彻		
优先权	62/246538 2015-10-26 US		
其他公开文献	JP2018536700A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了用聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 抑制剂或其药学上可接受的盐治疗表达Schlafen-11 (SLFN11) 的小细胞肺癌受试者的方法。具体地, 该方法包括在受试者的肿瘤细胞样品中检测SLFN11, 并向受试者施用有效量的PARP抑制剂, 例如他拉索巴利布或他拉索巴利布的甲苯磺酸盐。 [选择图]无

