

(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2005-534686

(P2005-534686A)

(43) 公表日 平成17年11月17日(2005. 11. 17)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/282	A 6 1 K 31/282 Z N A	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/513	A 6 1 K 31/513	4 B O 6 3
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 6
A 6 1 P 35/04	A 6 1 P 35/04	4 C 2 O 6
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-524265 (P2004-524265)	(71) 出願人	500279623
(86) (22) 出願日	平成15年7月31日 (2003. 7. 31)		ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月25日 (2005. 3. 25)		アメリカ合衆国, 90007 カリフォルニア, ロサンゼルス, サウス ホープ ストリート 3716, スイート 313
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/024065	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02004/011625		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成16年2月5日 (2004. 2. 5)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	60/400, 276		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成14年7月31日 (2002. 7. 31)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	60/400, 253		
(32) 優先日	平成14年7月31日 (2002. 7. 31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/400, 250		
(32) 優先日	平成14年7月31日 (2002. 7. 31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 疾患および処置結果の予見のための多型性

(57) 【要約】

本発明は、特定の癌の再発危険性の高まりならびに化学療法および放射線療法の一つまたは両方による処置の成功の可能性を決定するための組成物および方法を提供する。この方法は、被験者または患者から単離した目的の遺伝子の予め決められた領域に存在するゲノムの多型のタイプを決定する工程を包含する。患者の癌の危険性ならびに処置応答を決定するための核酸プローブおよびキットもまた提供する。本発明は、癌の処置プロトコールを選択するために、目的遺伝子の多型領域の対立遺伝子改変体の使用を含む。これら使用方法は、予後方法、診断方法、および治療方法を含む。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者の癌を処置するための治療的なレジメを選択するための方法であり、ここで化学療法の薬剤が該患者に投与され、該方法は、癌の処置結果と相関関係にあるゲノムの多型または遺伝子型について、該患者から単離した適切な細胞または組織サンプルを、スクリーニングする工程を包含する方法。

【請求項 2】

前記癌は、フルオロピリミジン薬剤または白金薬剤よりなる群から選択される化学療法の薬剤の投与により処置され得る癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記癌は、食道癌、胃癌、大腸癌、直腸癌、結腸直腸癌および肺癌よりなる群から選択される癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記癌処置はさらに、放射線治療を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ゲノムの多型は、チミジル酸シンターゼ遺伝子、除去修復相補性群遺伝子 (E R C C 1)、V E G F、E R C 2 遺伝子、X R C C - 1 遺伝子、ヒトグルタチオン S - トランスフェラーゼ P I 遺伝子、上皮細胞増殖因子レセプター遺伝子、マトリックスメタロプロテイナーゼ遺伝子 (- 1、および - 3)、インターロイキン 8 (I L - 8) 遺伝子、D - ピリミジンデヒドロゲナーゼ (D P D) ならびに C X C ケモカインよりなる群から選択される遺伝子内に生じる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記遺伝型は、チミジル酸シンターゼ、D - ピリミジンデヒドロゲナーゼ (D P D) E R C C 1 および V E G F であり、ならびに前記組織サンプルは、癌を処置するため癌タイプの薬剤に対応する正常組織である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

患者における癌化学療法に関連し化学的に誘導された神経毒性を減少させるための方法であり、該方法は、それを必要とする患者に対して有効量の C O X - 2 阻害剤を前記被験者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 8】

前記化学療法は、オキサリプラチンの投与を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記化学療法は、5 - F U の投与を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

ヒトの患者が、前記腫瘍を外科的に除去した後、腫瘍再発に陥る可能性が高いかを決定するための方法であり、該方法は、該腫瘍に隣接する正常組織から単離された細胞またはサンプル内において T S、D P D、E R C C 1 および V E G F よりなる群から選択された遺伝子の発現レベルを決定する工程、および該発現レベルと正常レベルを相関付ける工程であって、ここで、該遺伝子の過剰発現は、腫瘍再発の危険にある患者同定の予測となる、工程を包含する、方法。

【請求項 11】

前記腫瘍は、直腸癌に関連する、請求項 11 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

(関連出願の引用)

本願は、米国特許法 1 1 9 条 (e) 項に基づいて、以下の米国仮出願第 6 0 / 4 0 0 , 2 4 9 号 ; 第 6 0 / 4 0 0 , 2 5 0 号 ; 第 6 0 / 4 0 0 , 2 5 3 号 ; および第 6 0 / 4 0 0 , 2 7 6 号 (全て 2 0 0 2 年 7 月 3 1 日出願) に対して、優先権を主張する。これら出願の内容は、本明細書によって本開示内に参考として援用する。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

(発明の分野)

本発明は、薬理ゲノム学の分野に関連し、詳細には疾患の診断および処置へのゲノムの多型の適用に関連する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 3 】

(発明の背景)

本来、同種の生物は一般的に、いくつかの局面において互いに異なる（例えば、外観）。差異は、遺伝学的に決定され、そして多型と称される。多くの遺伝子座で、二以上の対立遺伝子が生じ得る（遺伝的多型）。遺伝的多型は、異なる対立遺伝子に起因する、二つ以上の遺伝学的に決定される選択的表現型集団の発生として定義される。多型は、全個体（whole individual）（表現型）、タンパク質および血液型物質の異型（生化学的多型）、染色体の形態的特徴（染色体多型）のレベルにおいて、またはヌクレオチドの差異におけるDNAのレベル（DNAの多型）で観察され得る。

10

【 0 0 0 4 】

多型は、薬剤への応答における個体差を決定する役割を果たし得る。癌化学療法は、特定集団の、薬剤毒性または乏しい薬剤応答性の性質により制限される。そのため、薬剤代謝酵素またはレセプター発現の遺伝子変化に起因し得る、抗癌剤投与に対する応答性および毒性における有意な個体間のバリエーションを理解するために例えば、薬理遺伝学（薬剤応答への遺伝的差異の影響）が、癌化学療法に適用される。本明細書中に参考として援

20

【 0 0 0 5 】

多型はまた、個体の癌感受性（癌遺伝子、腫瘍抑制遺伝子および代謝経路において含まれる酵素の遺伝子）に関連する。35歳よりも若い患者において、高まる癌の危険性の様々なマーカーが、同定されている。例えば、前立腺特異的抗原（PSA）を、無症候性の若い男性の前立腺癌の早期検出のため使用し得、一方、特定のチトクロムP4501A1およびグルタチオンS-トランスフェラーゼM1遺伝子型は、若い患者の前立腺癌発生の危険性に影響する。同様に、癌抑制遺伝子（p53）の変異は、若い成人の脳の癌に関連する。

【 0 0 0 6 】

そのため、薬剤毒性または乏しい薬剤応答性を予見するマーカー遺伝子を同定するという、要求が存在する。本発明は、この要求を満たし、およびその上、関連する利益を提供する。

30

【 発明の開示 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

(実施形態の説明)

一つの実施形態において、本発明は、癌の処置プロトコルを選択するために、目的遺伝子の多型領域の対立遺伝子改変体の使用を含む。これら使用方法は、予後方法、診断方法、および治療方法を含む。一つの局面において目的の変異体を、外科的切除の後に残存する、隣接、および対応する「正常」組織において、高発現（mRNAの発現レベルに基づく）する遺伝子として発現される。別の局面においては、目的の変異体は、ゲノムレベルで検出され、ならびに最終的にタンパク質へ転写または翻訳される遺伝子または、されない遺伝子の領域を含み得る。例えば、このような領域は、非翻訳のプロモーター領域または非翻訳の遺伝子の3'領域を含むが、これらに限定はされない。

40

【 0 0 0 8 】

多型を検出するための方法は、被験体が、癌発生の危険性および/または化学療法に対する被験体の応答性を有するのか、もしくはその状態にあるのかを決定するためのプローブまたはプライマーとして多型領域を含む核酸を使用する工程を、包含する。あるいは、mRNAレベルを、核酸プローブまたは核酸アレイの使用により検出し得る。

50

【 0 0 0 9 】

一つの局面において、癌は、白金療法（例えば、オキサリプラチンまたはシスプラチンまたは5 - フルロウリジン（5 - F U ））および経口利用可能なF U 療法（X e l o d a（R o c h e ）の名称の下市販される）により「処置可能」である癌または腫瘍を含む。このような癌の非限定的な例示としては、直腸癌、結腸直腸癌、大腸癌、胃癌、肺癌、食道癌を含むが、これらに限定はされない。一つの局面において、テストされるサンプルは、実際の腫瘍組織である。別の局面において、この方法においてテストされるサンプルは、腫瘍組織に「対応する」正常な組織である（例えば、正常な肺組織は、肺癌組織に対応する正常な組織であると考えられる）。また、さらなる例においては、サンプルは、患者の任意の組織であり、および末梢血リンパ球を含み得る。

10

【 0 0 1 0 】

別の実施形態において、本発明は、目的遺伝子に対してハイブリダイズ可能なプローブまたはプライマーを含む、目的遺伝子の少なくとも一部の分子構造を増幅および/または決定するためのキットならびに使用説明書を提供する。一つの実施形態において、プローブまたはプライマーは、目的遺伝子の対立遺伝子の変異体に対してハイブリダイズ可能である。

【 0 0 1 1 】

本発明の他の性質および利点を、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明確にする。

【 0 0 1 2 】

20

（発明実施のための形態）

本発明は、被験体の目的遺伝子における遺伝子型を決定することにより、被験体の癌の危険性および癌治療に対する応答性を決定するための方法ならびにキットを提供する。本発明の他の局面は、以下に説明されるか、または本開示の観点から当業者にとって明らかなものとなる。

【 0 0 1 3 】

この開示にわたって、様々な出版物、特許および公開された特許明細書を、引用表示により援用する。これら出版物、特許および公開された特許明細書の開示を、本発明の属する分野の状態をより完全に説明するために、本明細書により、参考として本開示へと援用する。

30

【 0 0 1 4 】

本発明の実施は、特に記載がない限り、分子生物学（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学および免疫学（これらは当該分野内である）の従来技術を使用する。これらの技術は、文献（例えば、以下の出版物）により完全に説明される。例えば、S a m b r o o k ら、M O L E C U L A R C L O N I N G : A L A B O R A T O R Y M A N U A L , 第2版（1989）；C U R R E N T P R O T O C O L S I N M O L E C U L A R B I O L O G Y（F . M . A u s u b e l ら、編集（1987））；M E T H O D S I N E N Z Y M O L O G Y シリーズ（A c a d e m i c P r e s s , I n c . , N . Y . ）；P C R : A P R A C T I C A L A P P R O A C H（M . M a c P h e r s o n ら、I R L P r e s s a t O x f o r d U n i v e r s i t y P r e s s（1991））；P C R 2 : A P R A C T I C A L A P P R O A C H（M . J . M a c P h e r s o n , B . D . H a m e s a n d G . R . T a y l o r 編集（1995））；A N T I B O D I E S , A L A B O R A T O R Y M A N U A L（H a r l o w a n d L a n e 編集（1988））；A N I M A L C E L L C U L T U R E（R . I . F r e s h n e y 編集（1987））；O L I G O N U C L E O T I D E S Y N T H E S I S（M . J . G a i t 編集（1984））；M u l l i s ら、米国特許第4,683,195号；N U C L E I C A C I D H Y B R I D I Z A T I O N（B . D . H a m e s & S . J . H i g g i n s 編集（1984））；T R A N S C R I P T I O N A N D T R A N S L A T I O N（B . D . H a m e s & S . J . H i g g i n s 編集（1984））；I M M O B I L I Z E D C E L L S A N D

40

50

ENZYMES (IRL Press (1986)); B. Perbal, A PRACTICAL GUIDE TO MOLECULAR CLONING (1984); GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (J. H. Miller および M. P. Calos 編集 (1987) Cold Spring Harbor Laboratory); IMMUNOCHEMICAL METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY (Mayer および Walker 編集、Academic Press, London (1987)); HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, 第 I - IV 巻 (D. M. Weir および C. C. Blackwell、編集 (1986)); MANIPULATING THE MOUSE EMBRYO (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1986)) を参照のこと。

【0015】

(定義)

用語「対立遺伝子」を、本明細書中「対立遺伝子の変異体」と交換可能に使用し、遺伝子またはその一部の代替的な形態をいう。対立遺伝子は、相同な染色体上の同一の遺伝子座または位置を占有する。被験体が、一つの遺伝子の二つの同一な対立遺伝子を有する場合、被験体は、その遺伝子または対立遺伝子についてホモ接合体であるといえる。被験体が、一つの遺伝子の二つの異なる対立遺伝子を有する場合、被験体は、その遺伝子についてヘテロ接合体であるといえる。特定遺伝子の対立遺伝子は、単一のヌクレオチドまたは複数のヌクレオチドにおいて互いに異なり得、ならびにヌクレオチドの置換、除去、および挿入を含み得る。遺伝子の対立遺伝子はまた、変異を含む遺伝子の形態であり得る。

【0016】

用語「目的遺伝子の多型領域の対立遺伝子改変体」は、他の個体における遺伝子領域内において見出される複数のヌクレオチド配列のうちの一つを有する目的遺伝子領域をいう。

【0017】

「細胞」、「宿主細胞」、または「組換え宿主細胞」は、本明細書中において交換可能に使用される用語である。このような用語は、特定の被験体の細胞をいうだけでなく、このような細胞の子孫または潜在的な子孫のことをいうものであると理解される。特定の改変が、変異または環境的影響のいずれかに起因して後継世代に生じ得るため、このような子孫は、実際は親細胞とは同一ではあり得ないが、本明細書中において使用される場合、この用語の範囲内に含まれる。

【0018】

表現「ポリヌクレオチドの増幅」は、例えば、PCR、ライゲーション増幅（またはリガーゼ連鎖反応、LCR）および Q - レプリカーゼの使用の基づく増幅方法のような方法を含む。これらの方法は、当該分野において周知であり、および広く実施されている。例えば、米国特許第 4,683,195 号および第 4,683,202 号、ならびに Innis ら、1990 (PCR について); および Wu, D. Y. ら (1989) Genomics 4:560-569 (LCR について) を参照のこと。一般的に、PCR 手順は、(i) DNA サンプル（またはライブラリー）内の特定遺伝子に対するプライマーの配列 - 特異的なハイブリダイゼーション、(ii) DNA ポリメラーゼを使用する、アニーリング、伸長、および変性の複数回のラウンドを含む続く増幅、ならびに (iii) 正確なサイズのバンドについて PCR 産物をスクリーニングする、ことを包含する遺伝子増幅の方法である。使用するプライマーは、十分な長さおよび重合の開始点を提供するための適切な配列のオリゴヌクレオチドである（すなわち、各プライマーを、増幅するゲノム部位の各鎖に対して相補的になるように特別に設計する）。

【0019】

PCR を実施するための薬剤およびハードウェアは、市販されている。特定の遺伝子領域から配列を増幅するために有用なプライマーは好ましくは、標的領域内または、その隣

10

20

30

40

50

接領域内の配列に対して相補的であり、および特異的にハイブリダイズするものである。増幅により生じた核酸配列を、直接的に配列決定し得る。あるいは、増幅配列を、シーケンス分析をする前にクローン化し得る。酵素的に増幅させたゲノムセグメントのダイレクトクローニングおよびダイレクトシーケンス分析のための方法は、当該分野において公知である。

【0020】

ポリヌクレオチドに適用する場合、用語「コードする (e n c o d e) 」は、ポリヌクレオチドをいい、その本来の状態においてまたは、当業者に周知の方法により操作された際に、ポリペプチドおよび/もしくはそのフラグメントの m R N A を産生するため転写ならびに/または翻訳され得る場合、ポリヌクレオチドは、そのポリペプチドを「コードする」という。そのアンチセンス鎖は、このような核酸の相補体であり、コードされる配列は、そこから推定され得る。

10

【0021】

用語「遺伝子型」は、細胞全体または特定の遺伝子の特定の対立遺伝子の組成をいい、ここで用語「表現型」は、特定の遺伝子型の検出可能な外面上の現れをいう。

【0022】

本明細書中で使用される場合、用語「遺伝子」または「組換え遺伝子」は、オープンリーディングフレームを含み、ならびに少なくとも一つのエクソン配列および(任意に)イントロン配列を含む核酸分子をいう。用語「イントロン」は、m R N A 成熟の間にスプライシングにより取除かれる所定の遺伝子内にある D N A 配列をいう。

20

【0023】

「相同性」または「同一性」または「類似性」は、二つのペプチド間もしくは二つの核酸分子間の配列の類似性をいう。相同性を、比較の目的のために整列 (a l i g n e d) させ得る各配列内の位置を比較することにより決定し得る。比較する配列内の位置が、同一の塩基またはアミノ酸により占められている場合、その時、その分子は、その位置において相同なものである。配列間の相同性の程度は、配列により共有される一致する位置または相同な位置の数の関数である。「無関係の」または「非相同的な」配列は、本発明の配列のうちの一つと、40%未満の相同性を共有するが、しかし好ましくは25%未満の相同性を共有する。

【0024】

用語「核酸のホモログ」は、その核酸または、その相補体のヌクレオチド配列と特定の程度の相同性をもつヌクレオチド配列を有する核酸をいう。二重鎖核酸のホモログは、特定の程度の相同性を有するヌクレオチド配列をもつ核酸またはその相補体を伴うものを含むことが意図される。一つの局面において、核酸のホモログは、核酸またはその相補体に対してハイブリダイズすることが可能である。

30

【0025】

本明細書中で使用される場合、用語「相互作用」は、分子間の検出可能な相互作用(例えば、ハイブリダイゼーションアッセイの使用により検出され得るような)を含むことを意味する。用語相互作用はまた、分子間の「結合」性の相互作用を含むことを意味する。相互作用は、自然状態では、例えば、タンパク質-タンパク質、タンパク質-核酸、タンパク質-小分子または小分子-核酸であり得る。

40

【0026】

核酸(例えば、D N A または R N A) に関して本明細書中で使用される場合、用語「単離」は、それぞれ天然の高分子供給源において存在する他の D N A もしくは R N A から、分離した分子をいう。本明細書中で使用される場合、用語単離はまた、実質的に、細胞性物質、ウィルス性物質、または組み換え D N A 技術により生成される場合は培養培地を、または、化学合成される場合は化学前駆体もしくは他の化学物質を含まない核酸またはペプチドをいう。さらに、「単離した核酸」は、フラグメントとして自然に発生するものではなく、および自然状態において見出され得るものではない核酸フラグメントを含むことを意味する。用語「単離」はまた、他の細胞性タンパク質から単離したポリペプチドをい

50

うために本明細書中にて使用され、ならびに精製したポリペプチドおよび組換えポリペプチドの両者を含むことを意味する。

【0027】

用語「不一致」は、100%相同ではない、ハイブリダイズした核酸二本鎖をいう。全相同性の欠如は、除去、挿入、逆位、置換またはフレームシフトの変異に起因し得る。

【0028】

本明細書中で使用される場合、用語「核酸」は、デオキシリボ核酸(DNA)(および適切な場合にはリボ核酸(RNA))のようなポリヌクレオチドをいう。この用語はまた、ヌクレオチドの類似物からなるRNAまたはDNAいずれかの等価物、誘導体、変異体および類似体のような、ならびに記載した実施形態に適用可能であるような、一本鎖(セ 10
ンスまたはアンチセンス)および二本鎖ポリヌクレオチドを含むと理解すべきである。デオキシリボ核酸は、デオキシアデノシン、デオキシシチジン、デオキシグアノシンおよびデオキシチミジンを含む。明確化する目的のため、本明細書において核酸(DNAまたはRNAであり得る)のヌクレオチドをいう場合は、用語「アデノシン」、「シチジン」、「グアノシン」および「チミジン」を使用する。核酸がRNAである場合、ウラシル塩基を有するヌクレオチドは、ウリジンであるということが理解される。

【0029】

用語「オリゴヌクレオチド」もしくは「ポリヌクレオチド」、またはそれらの「一部」もしくは「セグメント」は、mRNAまたはDNA分子に同一な部分もしくは関連する部分 20
を同定または増幅するために、PCRもしくは様々なハイブリダイゼーション手順において使用するのに十分に長いポリヌクレオチド残基のストレッチをいう。本発明のポリヌクレオチド組成物は、当業者により容易に理解されるように、RNA、cDNA、ゲノムDNA、合成形態、ならびに混合型ポリマー(センス鎖およびアンチセンス鎖の両者)を含み、そして化学的にもしくは生化学的に改変され得、または非天然のヌクレオチド塩基もしくは誘導されたヌクレオチド塩基を含み得る。このような改変としては、例えば、標識、メチル化、アナログによる一以上の天然に存在するヌクレオチドの置換、ヌクレオチド間の改変(例えば、無電荷結合(例えば、メチルホスホン酸塩、リン酸トリエステル、亜リン酸アミダイト、カルバミン酸塩など)、荷電した結合(例えば、ホスホロチオエー 30
ト、ホスホロジチオエートなど)、ペンダント部分(例えば、ポリペプチド)、インターカレーター(例えば、アクリジン、ソラレンなど)、キレート剤、アルキレーター(al-
kylator)、および改変結合(例えば、アノマー核酸など))が挙げられる。また、含まれるものとしては、水素結合および他の化学的な相互作用を介して所定の配列に対して結合するポリヌクレオチドの能力を模倣する合成分子である。このような分子は、当該分野において公知であり、これらとしては例えば、分子骨格内のリン酸結合のペプチド結合への置換が挙げられる。

【0030】

用語「配列番号：xに示されるヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列」は、配列番号：xを有する核酸鎖の相補鎖のヌクレオチド配列をいう。用語「相補鎖」は、本明細書中において用語「相補体」と交換可能に使用される。核酸鎖の相補体は、コード鎖の相補体または非コード鎖の相補体であり得る。2本鎖核酸をいう場合、配列番号：xを有 40
する核酸の相補体は、配列番号：xを有する鎖の相補鎖または、配列番号：xの相補鎖のヌクレオチド配列を有する任意の核酸をいう。配列番号：xのヌクレオチド配列を有する1本鎖核酸をいう場合、この核酸の相補体は、配列番号：xのヌクレオチド配列に相補的であるヌクレオチド配列を有する核酸である。ヌクレオチド配列およびその相補的な配列は常に、5'から3'の方向に従う。用語「相補体」および「逆相補体」は、本明細書中で交換可能に使用される。

【0031】

本発明の「非ヒト動物」は、例えば、げっ歯類、非ヒト霊長類、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、雌ウシ、ニワトリ、両生類、八虫類などのような哺乳動物を含み得る。好ましい非ヒト動物は、ラットおよびマウスを含むげっ歯類のファミリー(最も好ましくはマウス) 50

から選択されるが、*Xenopus* 属のメンバーのようなトランスジェニック両生類、およびトランスジェニックニワトリがまた、例えば、胚形成および組織形成に影響を及ぼし得る因子を理解および同定するために重要な道具を提供し得る。用語「キメラ動物」は、動物の複数ではあるが全てではない細胞内で、外来性の配列が見出される、または外来性の配列が発現される動物をいうために本明細書中で使用される。用語「組織 - 特異的キメラ動物」は、いくつかの組織において外来性の配列が、存在するおよび/または発現される、もしくは破壊されるが、他の組織ではそうでないことを示す。

【0032】

用語「多型」は、一以上の形態の遺伝子またはその一部の共存をいう。少なくとも二以上の異なる形態（つまり、二つの異なるヌクレオチド配列）が存在する遺伝子の一部は、「遺伝子の多型領域」と称される。多型領域は、単一のヌクレオチドであり得、その同一性は、異なる対立遺伝子において異なる。

【0033】

「多型遺伝子」は、少なくとも一つの多型領域を有する遺伝子をいう。

【0034】

本発明は、治療レジメンを選択するための方法、または特定の治療レジメンが、癌を処置する可能性が高いのか、もしくはその患者が利用し得る他の化学療法よりも患者に適切な化学療法であるのかを決定するための方法を提供する。一般的に、治療は、一以上の以下の処置結果：初期治療後の癌再発の減少もしくは遅延；メディアン生存時間の増加または転移の減少、を提供する場合に、癌を「処置」と考えられる。方法は特に、どの患者が、フルオロピリミジン薬物（*flurorpyrimidine drug*）（例えば、5-FU）またはプラチナ薬物（例えば、オキサリプラチンあるいはシスプラチン）の投与を含む化学療法レジメンに対して好ましい処置結果を示すかもしくは、経験するかを決定するのに適している。一つの実施形態において、化学療法レジメンはさらに、放射線療法を含む。

【0035】

この方法は、患者から適切な細胞または組織サンプルを単離する工程、および出願人により癌の処置結果と関連付けられるゲノムの多型または遺伝子型をスクリーニングする工程を包含する。一つの局面において、癌は、フルロピリミジンまたはプラチナ薬物よりなる群から選択される化学療法薬物の投与により処置され得る癌である。別の局面において、癌は、食道癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌および肺癌よりなる群から選択される。

【0036】

一つの局面において、多型は、遺伝子の「サイレント（*silent*）」領域に存在し、別の局面においては、多型は、プロモーター領域内であり、およびまた別の局面においては、多型は、3' 非翻訳領域内である。またさらなる実施形態においては、多型は mRNA レベルでの発現を増加する。

【0037】

一つの実施形態において、適切な組織サンプルまたは細胞サンプルは、癌生検または癌切除の部位に隣接する正常組織を含む。例えば、直腸癌の腫瘍除去部位に隣接する正常な直腸組織を選択する。本明細書中で使用されるように、「隣接する」は、約 0.5 mm、または約 1.0 mm、または約 1.5 mm、または約 2.0 mm または約 2.5 mm、または約 3.0 mm、または 3.5 mm、または 4.0 mm あるいは約 4.5 mm あるいは約 5.0 mm あるいは、ただ癌または腫瘍と同一タイプの正常組織を限定する任意の距離を、意味する。

【0038】

別の実施形態において、組織は、癌組織自体である。また、さらなる実施形態においては、例えば多型が、遺伝的なものである場合、目的遺伝子を保有すると予期される任意の細胞（例えば、患者から単離した末梢血リンパ球）が、適切な細胞サンプルまたは組織サンプルである。

10

20

30

40

50

【0039】

予測的な結果であり得る遺伝的な多型は、チミジル酸合成酵素遺伝子、除去修復相補性群遺伝子（ERCC1）、VEGF、ERCC2遺伝子、XRCC-1遺伝子、ヒトグルタチオンS-トランスフェラーゼP1遺伝子、上皮増殖因子レセプター遺伝子、マトリックスメタロプロテインゼン遺伝子（-1、および-3）、インターロイキン8（IL-8）遺伝子、D-ピリミジンデヒドロゲナーゼ（DPD）およびCXCKEモカインよりなる群から選択される遺伝子内に生じる多型を含むが、これらに限定はされない。

【0040】

本発明はまた、患者における癌化学療法に関連し誘導された神経毒性を化学的に減少させるための方法を提供し、この方法は有効量のCOX-2インヒビターを患者に対して投与する工程、または、必要とする患者に対してCOX-2インヒビターの等価物を投与する工程を包含する。一つの実施形態において、神経毒性は、オキサリプラチン、シスプラチン、またはフルロピリミジン（例えば、5-FUまたはXeloda）を含む化学療法の投与の結果である。

10

【0041】

前記腫瘍の外科的除去の後、ヒト患者が、癌再発を被る可能性が高いものであるかを決定するための方法は、前記の腫瘍に隣接する正常な組織から単離した細胞またはサンプル内の、TS、D-ピリミジン脱水素酵素（DPD）、ERCC1およびVEGFよりなる群から選択される遺伝子の発現レベルを決定する工程、ならびに該発現レベルと正常レベルとを相関づける工程であって、ここで、前記遺伝子の過剰発現は、癌再発の危険にある患者を同定するための指標となる、工程を包含する。一つの局面において、腫瘍は、直腸癌に関連する。

20

【0042】

本明細書中に記載する発明は、目的位置の遺伝子に存在する対立遺伝子を決定および同定するための方法ならびに組成物に関連する。この情報は、疾患の進行の診断および予測ならびに処置の選択肢の間から最も効果的な処置を選択するのに有用である。プローブが、サンプルの遺伝子型を直接的に決定するために使用され得、または、増幅と同時にもしくは増幅後に使用され得る。用語「プローブ」は、天然に存在する、または組換えの一本鎖核酸もしくは組換え二本鎖核酸、あるいは化学的に合成した核酸を含む。これらは、ニックトランスレーション法、Klenowフィルイン（fill-in）反応法、PCR法または、当該分野で公知である他の方法により標識され得る。本発明のプローブは、その調製法および/または標識法が、Sambrookら（1989）前出に記載される。プローブは、本発明の多型領域を含む核酸に対して選択的にハイブリダイズするために適切な任意の長さのポリヌクレオチドであり得る。使用するプローブの長さは、一部は、使用するアッセイの性質および使用するハイブリダイゼーションの条件に依存する。

30

【0043】

本発明の一つの実施形態において、プローブは、いわゆる「分子ビーコン（beacon）」を形成するために二つの蛍光色素分子を用いて標識される（Tyagi, S. および Kramer, F. R. (1996) Nat. Biotechnol. 14:303-8）。色素間の分子間蛍光消沈の軽減を介して相補的な核酸配列に対して結合する、このような分子ビーコンシグナルは、オリゴヌクレオチドプローブ上の反対側の末端に結合する。遺伝子型を特定するための分子ビーコンの使用は、複数ビーコンの同時使用を有するものとして（Marras, S. A. (1999) Genet. Anal. 14:151-6）、記載されている（Kostrikis, L. G. (1998) Science 279:1228-9）。二つが互いに近接して保持される際に（例えば、分子ビーコン内）、または約1ヌクレオチド～約25ヌクレオチドまでのオリゴヌクレオチドの末端に結合する際に、フルオロフォアの蛍光を実質的に阻害するために十分なスペクトル重複を有する場合には、消光分子は、特定のフルオロフォアにより有用である。

40

【0044】

標識したプローブはまた、多型増幅と組み合わせて使用され得る（Hollandら、

50

(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 7276 - 7280)。Gelfandによる、米国特許第5,210,015号は、PCRの間の増幅産物のリアルタイムの測定を提供するための、蛍光ベースのアプローチを記載する。このようなアプローチは、既存の二本鎖DNAの量を示すために、挿入色素（例えば、エチジウムブロマイド）を使用するか、または、蛍光色素 - 消光剤ペアを含むプローブを使用する（「Taq-Man」アプローチと称される）（ここでプローブは、既存の二本鎖DNAの量と比例する濃度である蛍光分子を放出するために、増幅中に切断する）か、のいずれかである。増幅の間、プローブは、消光剤分子から分離される蛍光分子を生じるように標的配列にハイブリダイズした際、ポリメラーゼのヌクレアーゼ活性により消化され、それによって、レポーター分子から蛍光を生じさせる。Taq-Manアプローチは、多型を含む標的ポリヌクレオチドの領域を特異的にアニーリングするレポーター分子 - 消光剤分子ペアを含むプローブを使用する。 10

【0045】

プローブは、「ジーンチップ」として使用するために表面に固定され得る。このようなジーンチップは、当業者に公知である多数の技術により、遺伝子改変体を検出するために使用され得る。一つの技術において、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーションアプローチ（例えば、米国特許第6,025,136号、および同第6,018,041号に概略されるもの）による配列決定によりDNA配列を決定するためジーンチップ上にアレイされる。本発明のプローブはまた、遺伝子配列の蛍光を検出するために使用され得る。このような技術は例えば、米国特許第5,968,740号および同第5,858,659号に記載される。プローブはまた、核酸配列の電気化学検出のため電極表面に固定され得る（例えば、Kayyemら、米国特許第5,952,172号およびKelley, S.O.ら（1999）Nucleic Acids Res. 27: 4830 - 4837により記載）。 20

【0046】

用語「タンパク質」、「ポリペプチド」および「ペプチド」は、遺伝子産物をいう場合に、本明細書中において交換可能に使用される。

【0047】

用語「組換えタンパク質」は、DNA組換え技術により産生されるポリペプチドをいい、ここで一般的に、ポリペプチドをコードするDNAが、適切な発現ベクターに挿入され、次に、このベクターが異種タンパク質を産生させるために、宿主細胞を形質転換させるのに使用される。 30

【0048】

本明細書中に使用されるように、用語「処置する」は、少なくとも状態または疾患の一つの症状を治療するおよび寛解させることを含むことを意図する。例えば、癌の場合において、処置は、悪液質の減少を含む。処置の証明は、臨床的にまたは亜臨床的であり得る。

【0049】

本明細書中に使用される場合、用語「ベクター」は、結合した別の核酸を輸送することができる核酸分子をいう。好ましいベクターの一つのタイプは、エピソーム、つまり、染色体外複製を可能とする核酸である。好ましいベクターは、自律的な複製および/または結合した核酸の発現を可能とするベクターである。作動可能に結合した遺伝子の発現を導き得るベクターを、「発現ベクター」として本明細書中で称する。一般的に、組換えDNA技術における発現ベクターの有用性は、多くの場合「プラスミド」の形態にある。プラスミドは一般に、そのベクターの形態では、染色体に結合しない環状二本鎖DNAのループをいう。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般的に使用される形態であるので、交換可能に使用される。しかし、本発明は、同等の機能を果たし、かつ以下の本明細書の記載により公知となる、発現ベクターのこのような他の形態を含むことを意図する。 40

【0050】

用語「野生型対立遺伝子」は、被験体内の二つのコピーの提示が、野生型の表現形を生じる場合、その遺伝子の対立遺伝子と呼ぶ。特定遺伝子の複数の異なる野生型対立遺伝子が存在し得る。これは、遺伝子内における特定のヌクレオチドの変化が、ヌクレオチドの変化を伴う遺伝子の二つのコピーを有する被験体の表現形に影響を与え得ないからである。

【0051】

(核酸)

一つの局面において、遺伝子の対立遺伝子改変体またはその一部の核酸配列は、プローブまたはプライマーの基礎であり得る(例えば、多型領域の対立遺伝子の改変体の同一性を決定するための方法において)。そのため、これらは、被験体が結腸直腸癌を発症する危険性があるのかどうかを決定するために本発明の方法において使用され得る。

10

【0052】

本発明の方法は、脊椎動物から単離した核酸を使用し得る。一つの局面において、脊椎動物の核酸は、哺乳動物の核酸である。さらなる局面においては、本発明の方法において使用される核酸は、ヒトの核酸である。

【0053】

本発明の方法において使用するためのプライマーは、目的の領域に隣接する核酸配列(例えば、TS遺伝子の5'-非翻訳領域)または目的の領域をカバーする核酸配列および伸長される核酸配列に対してハイブリダイズする核酸である。プライマーは、検出方法において単独で使用され得、または、プライマーは、検出方法において、少なくとも一つの他のプライマーもしくはプローブと共に使用され得る。プライマーはまた、核酸の少なくとも一部を増幅するために使用され得る。本発明の方法において使用するためのプローブは、目的の領域に対してハイブリダイズする核酸、およびさらに伸長されることのない核酸である。例えば、プローブは、目的の遺伝子の多型領域に対してハイブリダイズする核酸であり、そして被験体のDNAに対するハイブリダイズにより、またはハイブリダイズを欠くことにより、目的遺伝子の多型領域対立遺伝子改変体の同一性を示す。

20

【0054】

一つの実施形態において、プライマーは、目的遺伝子の連続的な約6、または代替的に8、または代替的に10、または代替的に12、または代替的に25、または代替的に30、または代替的に40、または代替的に50、または代替的に75のヌクレオチドに対し、ストリンジェントな条件の下でハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する領域を含む、ヌクレオチド配列を含む。

30

【0055】

プライマーは、増幅したDNAの使用に依存して、互いに近接して位置するか、または、さらに離れて位置するヌクレオチド配列に対して相補的なものであり得る。例えば、プライマーは、これらが、少なくとも約10ヌクレオチドまたは数千ベースほどのDNAフラグメントを増幅するように選択され得る。好ましくは、本発明のプライマーは、約150~約350ヌクレオチド離れて位置するヌクレオチド配列に対して選択的にハイブリダイズする。

【0056】

核酸の少なくとも一部を増幅するために、好ましくは、フォワードプライマー(つまり5'プライマー)およびリバースプライマー(つまり3'プライマー)が使用される。フォワードプライマーおよびリバースプライマーは、二本鎖核酸の相補鎖に対しハイブリダイズし、その結果各プライマーからの伸長により、二本鎖核酸が増幅される。

40

【0057】

本発明のまた他の好ましいプライマーは、目的遺伝子の多型領域の対立遺伝子の改変体に対して選択的にハイブリダイズすることが可能である核酸である。そのため、このようなプライマーは、目的遺伝子に対してハイブリダイズすることが可能であるヌクレオチド配列を有する限り、目的配列の遺伝子に対して特異的であり得る。

【0058】

50

プローブまたはプライマーはさらに、それらに結合する、検出可能である標識を含み得、例えば、標識基は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、および酵素の補助因子の間から選択される。

【0059】

さらに、プローブまたはプライマーとして使用される単離した核酸は、より安定させるために改変され得る。改変された例示的な核酸分子としては、DNAのホスホラミデート、ホスホチオエート (phosphothioate) およびメチルホスホネートアナログが挙げられる (米国特許第5,176,996号; 同第5,264,564号; および同第5,256,775号をまた参照のこと)。

【0060】

本発明の方法において使用される核酸はまた、例えば、分子の安定性を改善するために、塩基部分、糖部分、またはリン酸の骨格において改変され得る。核酸 (例えば、プローブもしくはプライマー) は、ペプチド (例えば、インビボで宿主細胞のレセプターを標的化するためのもの)、または細胞膜を通過する輸送を容易にする薬剤 (例えば、Lettingerら、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86: 6553 - 6556; Lemaîtreら、(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648 - 652; およびPCT公開番号第WO88/09810号、1988年12月15日公開を参照のこと)、ハイブリダイゼーショントリガー切断薬剤 (例えば、Krollら、(1988) BioTechniques 6: 958 - 976 参照のこと) または、挿入剤 (例えば、Zon (1988) Pharm. Res. 5: 539 - 549 参照のこと) のような他の付加した群を含み得る。この目的のために、本発明の方法において使用される核酸は、別の分子 (例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーショントリガー架橋剤、輸送薬剤、ハイブリダイゼーショントリガー切断薬剤など) と結合体化させ得る。

【0061】

本発明の方法において使用される単離した核酸はまた、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソースが挙げられるがこれらに限定はされない群から選択される少なくとも一つの改変した糖部分を含み得るか、またはあるいは、ホスホロチオネート、ホスホロジチオネート、ホスホラミドチオネート、ホスホラミデート、ホスホジアミデート (phosphordiamidate)、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、およびホムアセタールあるいはそのアナログからなる群から選択される、少なくとも一つの改変されたリン酸骨格を含み得る。

【0062】

本発明の方法において使用される核酸またはそのフラグメントを、当該分野で周知の方法、および例えば、Sambrookら、(1989) 前出に記載される方法に従って調整し得る。例えば、別個のDNAフラグメントを、制限酵素を使用して、調製し、そしてクローン化し得る。あるいは、別個のフラグメントを、製造者の条件の下、適切な配列を有するプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を使用して調製し得る。

【0063】

オリゴヌクレオチドを、当該分野で公知である標準的な方法により (例えば、自動DNA合成機 (例えば、Biosearch, Applied Biosystems などから市販される) の使用により) 合成し得る。例えば、ホスホロチオネートオリゴヌクレオチドを、Steinら、(1988) Nucl. Acids Res. 16: 3209の方法により合成し得、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドを、制御されたポアガラスポリマー支持体 (Sarinら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85: 7448 - 7451) などの使用により調製し得る。

【0064】

(予測的な医薬およびゲノム薬理学)

本発明はさらに、目的遺伝子の多型領域の同一性決定に、少なくとも一部基づく予測的な医薬を特徴とする。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

例えば、本明細書中に記載される診断アッセイを使用して得られる情報は、被験体が、所定のタイプの癌処置に応答するのかを決定するのに有用である。予後の情報に基づいて、医師は、個体中の癌処置に有用な、レジメン（例えば、食事もしくは運動）または治療的プロトコルを推奨し得る。

【 0 0 6 6 】

さらに、個体の特定対立遺伝子の同一性の知見（遺伝子プロファイル）は、個体の遺伝子プロファイルに対する、特定疾患の治療法のカスタマイズを可能とする（「ゲノム薬理学」の目標）。例えば、個体の遺伝子プロファイルは、医師が：1）疾患もしくは状態の分子基盤に対処する薬剤をより効果的に処方すること；および2）特定の薬剤の適切な投薬量をより良く決定すること、を可能にし得る。次いで、患者個体の発現パターンを、疾患の発現プロファイルと比較して、患者に投与するため適切な薬剤および用量を決定し得る。

10

【 0 0 6 7 】

標的集団が正常なもしくは疾患の遺伝子プロファイルに基づく最高の臨床効果を示すことが予測される能力は、：1）失望的な市場結果を有する市販される薬剤の再配置；2）安全性もしくは効率性の制限の結果により臨床開発が中断された薬物候補の回収（この制限は、患者のサブグループ特異的である）；および3）薬物候補、およびより最適な薬物標識の、促進された開発ならびに低コストの開発を可能にし得る。

【 0 0 6 8 】

点変異の検出は、当該分野において公知の技術を使用して、特定の対立遺伝子の分子クローニングおよび続く対立遺伝子の配列決定により達成され得る。あるいは、遺伝子配列を、PCRを使用して、癌組織由来のゲノムDNA調整物から直接的に増幅し得、そして配列組成物を、増幅産物から決定する。より完全に以下に記載されるように、多数の方法を、例えば目的遺伝子のような所定の遺伝子座での変異について、被験体のDNAを分析するために、利用可能である。

20

【 0 0 6 9 】

検出方法は、多型部位に重り、そして多型領域周辺の約5、あるいは10、あるいは20、あるいは25、あるいは30ヌクレオチドを有するプローブを使用する、対立遺伝子特異的なハイブリダイゼーションである。本発明の別の実施形態において、対立遺伝子改変体に対して特異的にハイブリダイズし得るいくつかのプローブを、固相支持体（例えば、「チップ」）に取り付ける。オリゴヌクレオチドを、リソグラフィーを含む、種々のプロセスにより固体支持体に結合し得る。例えば、チップは、250,000オリゴヌクレオチドを支持し得る（GeneChip, Affymetrix）。オリゴヌクレオチドを含むこれらチップを使用して変異検出分析（また、「DNAプローブアレイ」と称される）は、例えば、Croninら、（1996）Human Mutation 7:244に記載される。

30

【 0 0 7 0 】

他の検出方法において、対立遺伝子改変体を同定する前に、目的遺伝子の少なくとも一部をはじめに増幅する必要がある。増幅を、当該分野において公知の方法に従って、例えば、PCRおよび/またはLCRにより、実施し得る。一つの実施形態において、細胞のゲノムDNAを、二つのPCRプライマーに曝し、そして必要とされる量の増幅DNAが十分に産生されるように複数サイクルの増幅をする。

40

【 0 0 7 1 】

代替的な増幅方法としては、自己持続的配列複製（self sustained sequence replication）（Guatelli, J. C. ら、（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878）、転写増幅システム（Kwoh, D. Y. ら、（1989）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177）、Q-レプリカーゼ（Lizardi, P. M. ら、（1988）Bio/Technology 6:1197）、または任意

50

の他の核酸増幅方法が挙げられ、当業者に公知である技術を使用する増幅分子の検出が続く。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に少数存在する場合に、これら分子の検出に有用である。

【0072】

一つの実施形態において、当該分野で公知の任意の種々の配列決定反応は、野生型（コントロール）配列に対応するサンプル配列の配列を比較することにより、目的遺伝子の少なくとも一部分の直接的な配列決定および対立遺伝子改変体（例えば、変異）の検出のために使用し得る。例示的な配列決定反応としては、MaxamおよびGilbert（（1997）Proc. Natl Acad Sci USA 74:560）またはSanger（Sangerら、（1977）Proc. Nat. Acad. Sci 74:5463）により開発された技術に基づく配列決定反応が挙げられる。被験体のアッセイ（Biotechniques（1995）19:448）を実施する場合、任意の種々の自動配列決定手順を、利用し得ることがまた、企図され、この手順としては、質量分析法（例えば、米国特許第5,547,835号および国際特許出願公開番号WO94/16101、H. Kosterによる表題DNA Sequencing by Mass Spectrometry；米国特許第5,547,835号および国際特許出願公開番号WO94/21822、H. Kosterによる表題「DNA Sequencing by Mass Spectrometry Via Exonuclease Degradation」；米国特許第5,605,798号および国際特許出願公開番号第PCT/US96/03651号、H. Kosterによる表題「DNA Diagnostics Based on Mass Spectrometry」；Cohenら（1996）Adv. Chromat. 36:127-162；およびGriffinら、（1993）Appl Biochem Bio. 38:147-159）による配列決定が挙げられる。特定の実施形態について、1, 2、または3核酸塩基のみの出現が、配列決定反応において決定されることを必要とされることが当業者に明白である。例えば、A-トラックなど（例えば、一つのヌクレオチドのみが、検出される）を、実施し得る。

【0073】

さらに他の配列決定方法が、例えば米国特許第5,580,732号、表題「Method Of DNA Sequencing Employing A Mixed DNA-Polymer Chain Probe」および、米国特許第5,571,676号、表題「Method For Mismatch-Directed In Vitro DNA Sequencing」に、開示される。

【0074】

いくつかの場合において、被験体に由来するDNAにおける特定の対立遺伝子の存在は、制限酵素分析法によって示され得る。例えば、特定のヌクレオチド多型は、別の対立遺伝子改変体のヌクレオチド配列を欠く制限部位を含む、ヌクレオチド配列を生じ得る。

【0075】

さらなる実施形態において、切断薬剤（例えば、ヌクレアーゼ、ヒドロキシルアミンまたは無水オスミン酸およびピペリジンを用いるもの）からの保護を、RNA/RNA DNA/DNA、またはRNA/DNAヘテロ二重鎖におけるミスマッチ塩基を検出するために使用され得る（例えば、Myersら、（1985）Science 230:1242を参照のこと）。一般的に、「ミスマッチ切断（mismatch cleavage）」の技術は、目的遺伝子の対立遺伝子改変体のヌクレオチド配列を含むコントロール核酸（必要に応じて標識される）（例えばRNAまたはDNA）とサンプル核酸（例えば、組織サンプルから得られた、RNAまたはDNA）とのハイブリダイズにより形成されるヘテロ二重鎖を提供することにより開始する。二本鎖の二重鎖を、二重鎖（例えば、コントロール鎖とサンプル鎖との間の塩基対のミスマッチに基づいて形成された二重鎖）の一本鎖領域を切断する薬剤を用いて処理する。例えば、RNA/DNA二重鎖を、RNaseを用いて処理し、そしてDNA/DNAハイブリッドをS1ヌクレアーゼを用いて処

理し、ミスマッチ領域を酵素的に消化する。他の実施形態において、DNA/DNA二重鎖またはRNA/DNA二重鎖のいずれかを、ミスマッチ領域を消化するためにヒドロキシルアミンまたは無水オスミン酸ならびにピペリジンをを用いて処理し得る。ミスマッチ領域を消化した後、得られた物質を次いで、コントロール核酸およびサンプル核酸が、同一のヌクレオチド配列を有するかどうか、またはどのヌクレオチドが異なるかを決定するために変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズにより分離する。例えば、Cottonら、(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397; Saleebaら、(1992) Methods Enzym. 217:286-295を参照のこと。別の実施形態においては、コントロール核酸またはサンプル核酸を、検出のために標識する。

10

【0076】

他の実施形態において、電気泳動の移動度の変化を、特定の対立遺伝子改変体を同定するために使用する。例えば、一本鎖のコンホメーション多型(SSCP)を、変異体核酸と野生型核酸との間の電気泳動の移動度における差異を検出するために使用し得る(Orिताら、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766, またCotton(1993) Mutat. Res. 285:125-144およびHayashi(1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79を参照のこと)。サンプル核酸およびコントロール核酸の一本鎖DNAフラグメントは、変性され、そして再生可能である。一本鎖核酸の二次構造は、配列に従い変化し、電気泳動の移動度において生じた変化は、単一塩基の変化でさえ検出可能である。DNAフラグメントを、標識プローブを用いて標識または検出し得る。アッセイの感度は、RNA(むしろDNAよりも)を使用することにより高められ得、その二次構造は、配列における変化に対してより感度が高い。別の好ましい実施形態において、対象の方法は、電気泳動の移動度の変化に基づいて、二本鎖のヘテロ二重鎖分子を分離するために、ヘテロ二重鎖分析を利用する(Keenら、(1991) Trends Genet. 7:5)。

20

【0077】

なお別の実施形態において、対立遺伝子改変体の同一性は、勾配した変性剤を含むポリアクリルアミドゲルにおいて、多型領域を含む核酸の移動度を分析する(変性勾配ゲル電気泳動(DGGE))を使用することによってアッセイされる)ことにより得られる(Myersら、(1985) Nature 313:495)。DGGEを、分析の方法として使用する場合、DNAを、完全に変性しないことを保証するために、例えば、PCRにより高融解GCリッチDNAの約40bpのGCクランプを付加することによって改変する。さらなる実施形態において、温度勾配を、コントロールDNAおよびサンプルDNAの移動度における差異を同定するために、変性剤の勾配に代えて使用する(Rosenbaum and Reissner(1987) Biophys. Chem. 265:1275)。

30

【0078】

二つの核酸の間の少なくとも一つのヌクレオチドの差異を検出するための技術の例としては、選択的なオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション、選択的な増幅、または選択的なプライマー伸長が挙げられるが、これに限定はされない。例えば、オリゴヌクレオチドプローブを、公知の多型ヌクレオチドが、中心に位置するように調製し得(対立遺伝子特異的プローブ)、そして次いで、完全一致を見つけた場合にのみハイブリダイゼーションが可能である条件の下、標的DNAに対してハイブリダイズさせ得る(Saikiら、(1986) Nature 324:163); Saikiら、(1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230; およびWallaceら、(1979) Nucl. Acids Res. 6:3543)。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション技術は、目的遺伝子の多型領域におけるヌクレオチド変化の検出のために使用され得る。例えば、特定の対立遺伝子改変体のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドを、ハイブリダイズ膜に結合させ、そして次いでこの膜を、標識したサンプル核酸を用いてハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション

40

50

シグナルの分析は次いで、サンプル核酸のヌクレオチドの同一性を明らかにする。

【0079】

あるいは、選択的なPCR増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術は、本発明と共に使用され得る。特異的な増幅のためプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中心に目的の対立遺伝子改変体を保有し得（その結果異なる増幅は、ハイブリダイゼーションに依存する）（Gibbsら、（1989）Nucleic Acids Res. 17:2437-2448）、または適切な条件の下、ミスマッチが、ポリメラーゼの伸長を防止し得るか、もしくは減少させ得る、一つのプライマーの3'終末端において、目的の対立遺伝子改変体を保有し得る（Prossner（1993）Tibtech 11:238；Newtonら、（1989）Nucl. Acids Res. 17:2503）。この技術はまた、Probe Oligo Base Extension（プローブオリゴベースの伸長）であるため、「PROBE」と称される。さらに、切断ベースの検出を行うため変異の領域内に、新しい制限部位を導入することが望ましくあり得る（Gaspariniら、（1992）Mol. Cell Probes 6:1）。

【0080】

別の実施形態において、対立遺伝子改変体の同定を、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ（OLA）を使用して、例えば、米国特許第4,998,617号、およびLandegren, U.ら、Science 241:1077-1080（1988）に記載されるように実施する。OLAプロトコルは、一本鎖の標的の隣接する配列に対してハイブリダイズし得るように設計される二つのオリゴヌクレオチドを使用する。オリゴヌクレオチドの一つを、分離マーカーに対して結合させ（例えば、ビオチン化）、そして他方を、検出可能に標識する。正確に相補的な配列が、標的分子において見出される場合、オリゴヌクレオチドは、その末端に隣接するようにハイブリダイズし、そしてライゲーション基質を作製する。次いでライゲーションは、標識したオリゴヌクレオチドが、アビジンまたは別のビオチンリガンドを使用して元の状態に戻ることを可能とする。Nickerson, D. A.らは、PCRおよびOLAの特質と組み合わせる、核酸検出アッセイを記載した（Nickerson, D. A.ら、（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 87:8923-8927）。この方法においては、PCRを、標的DNAの指数関数的な増幅を達成するために使用し、この標的をその後OLAを使用して検出する。

【0081】

このOLA方法に基づく複数の技術は開発され、そして、目的遺伝子の多型領域の特異的な対立遺伝子改変体を検出するために使用され得る。例えば、米国特許第5,593,826号は、ホスホラミデート結合を有する結合体を形成するための3'-アミノ基および5'-リン酸化オリゴヌクレオチドを有するオリゴヌクレオチドを使用するOLAを開示する。Tobeら（1996）Nucleic Acids Res. 24:3728に記載されるOLAの別のバリエーションにおいては、PCRと組み合わせるOLAは、単一のマイクロタイターウェル内の二つの対立遺伝子の分類を可能とする。唯一のハプテン（すなわち、ジゴキシゲニンおよびフルオレセイン）を有する、各対立遺伝子特異的プライマーをマーキングすることにより、各OLA反応を、異なる酵素レポーター、アルカリホスファターゼまたは、西洋ワサビペルオキシダーゼを用いて標識されるハプテン特異的抗体を使用することにより検出し得る。この系は、二つの異なる色彩の産生を引き起こす高スループット様式を使用して二つの対立遺伝子の検出を可能にする。

【0082】

本発明はさらに、目的遺伝子における単一ヌクレオチド多型を検出するための方法を提供する。単一ヌクレオチド多型は、不変の配列領域が隣接した変動部位からなるため、これらの分析は、変動部位に存在する単一ヌクレオチドの同一性の決定を要するに過ぎず、そして各患者の完全な遺伝子配列を決定に必要ではない。複数の方法が、このような単一ヌクレオチド多型の分析を容易にするために開発される。

【0083】

一つの実施形態において、単一塩基多型は、特定のエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチドを使用することにより、例えば、Mundy, C. R. (米国特許第4,656,127号)に記載されるように検出し得る。この方法に従って、3'直後の対立遺伝子配列から多型部位に対する相補的なプライマーは、特定の動物またはヒトから得た標的分子に対してハイブリダイズすることが可能である。標的分子上の多型部位が、既存する特定のエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド誘導体に対して相補的なヌクレオチドを含む場合、次いでこの誘導体は、ハイブリダイズしたプライマーの末端に組み込まれる。このような組み込みは、プライマーにエキソヌクレアーゼ耐性を与え、それによって、その検出を可能にする。サンプルのエキソヌクレアーゼ耐性誘導体の同一性が、既知であるので、プライマーがエキソヌクレアーゼ耐性になったという知見は、標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドが、反応内で使用したヌクレオチド誘導体の多型部位に相補的であることを明らかにする。この方法は、大量な無関係の配列データの決定を必要としないという利点を有する。

10

【0084】

本発明の別の実施形態において、溶液ベースの方法を、多型部位のヌクレオチドの同一性を決定するために使用する(Cohen, D.ら、(仏国特許2,650,840号; PCT Appln. 番号WO91/02087))。米国特許第4,656,127号のMundyの方法のように、3'直後の対立遺伝子配列から多型部位に対して相補的であるプライマーを使用する。この方法は、標識したジデオキシリボヌクレオシドの誘導体を使用して、この部位のヌクレオチドの同一性を決定し、多型部位のヌクレオチドに対して相補的である場合プライマーの末端に組み込まれる。

20

【0085】

Genetic Bit AnalysisまたはGBATMとして公知の代替方法が、Goellet, P.ら、(PCT Appln. 番号92/15712)により記載される。この方法は、標識されたターミネーターおよび3'配列から多型部位に対して相補的なプライマーの混合物を使用する。組み込まれた標識されたターミネーターは、従って、評価される標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドによって、決定され、そして、このヌクレオチドに対して相補的である。Cohenら、(仏国特許第2,650,840号; PCT Appln. 番号WO91/02087)の方法と対照的に、Goellet, P.ら(前出)の方法は、プライマーまたは標的分子を、固相に固定化される不均質相のアッセイが好ましい。

30

【0086】

近年、DNAの多型部位をアッセイするためのプライマー誘導ヌクレオチドを組み込むためのいくつかの手順が、記載された(Komher, J. S.ら、(1989) Nucleic Acids Res. 17:7779-7784; Sokolov, B. P. (1990) Nucleic Acids Res. 18:3671; Syvanen, A. - C. ,ら、(1990) Genomics 8:684-692; Kuppuswamy, M. N.ら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1143-1147; Prezant, T. R.ら、(1992) Hum. Mutat. 1:159-164; Ugozzoli, L.ら、(1992) GATA 9:107-112; Nyren, P.ら、(1993) Anal. Biochem. 208:171-175)。これらの方法は、多型部位の塩基間の差異を見分けるために、標識したデオキシヌクレオチドの組み込みに全て依存する点で、GBATMとは異なる。このようなフォーマットにおいて、シグナルは、組み込まれたデオキシヌクレオチドの数に比例するため、同一ヌクレオチドの走向内に生じる多型は、走向の長さに対して比例するシグナルを生じ得る(Syvanen, A. - C. ,ら、(1993) Amer. J. Hum. Genet. 52:46-59)。

40

【0087】

多型領域が、目的遺伝子のコード領域に位置する場合、上記のこれらの方法とはまた他

50

の方法を、対立遺伝子改変体の同一性を決定するために使用し得る。例えば、変異したシグナルペプチドをコードする対立遺伝子改変体の同定は、例えば、免疫組織化学または免疫沈降において変異タンパク質を特異的に認識する抗体を使用することにより、実施され得る。野生型シグナルペプチドタンパク質または変異シグナルペプチド形態のシグナルペプチドタンパク質に対する抗体を、当該分野で公知の方法に従って調製し得る。

【0088】

目的遺伝子の対立遺伝子改変体によりコードされる野生型ペプチドまたは変異ペプチドに対する抗体はまた、疾患の診断および予後に使用し得る。このような診断方法は、ペプチドの発現レベルの異常性、またはペプチドの構造および/もしくは組織、細胞、あるいは垂細胞のペプチドの位置における異常性を検出するために使用され得る。分析するための組織タイプまたは細胞タイプ由来のタンパク質を、当業者に周知の技術（ウェスタンブロット分析を含むが、限定はされない）を使用することにより容易に検出もしくは単離し得る。ウェスタンブロット分析実施方法の詳細な説明については、Sambrookら、(1989)前出、Chapter 18を参照のこと。本明細書中で使用するタンパク質検出方法および単離方法はまた、HarlowおよびLane(1988)前出に記載されるようなものであり得る。これは、例えば、光学顕微鏡検出、フローサイトメトリー検出または蛍光定量検出を伴う、蛍光標識した抗体（下記参照のこと）を使用する免疫蛍光検査技術により達成し得る。本発明において有用な抗体（またはそれらのフラグメント）をさらに、ペプチドまたはこれらの対立遺伝子改変体のインサイチュ検出のため、免疫蛍光検査法もしくは免疫電子顕微鏡法のように、組織学的に使用し得る。インサイチュ検出は、患者から組織学的標本を取り出し、そしてそれに対して本発明の標識抗体を適用することにより達成し得る。抗体（またはフラグメント）は好ましくは、標識抗体（またはフラグメント）で生体サンプル上を覆うことにより適用する。このような手順の使用によって、対象のポリペプチドの存在だけでなく、検査する組織内におけるその分布をも決定することが可能である。本発明を使用することにより、当業者は、このようなインサイチュ検出を達成するため、様々な組織学的方法の任意のもの（例えば、染色手順）を、改変し得るということ、容易に認識する。

【0089】

しばしば固相支持体またはキャリアーを、抗原もしくは抗体に結合し得る支持体として使用する。周知の支持体またはキャリアーとしては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および改変セルロース、ポリアクリルアミド、斑糲岩、ならびに磁鉄鉱が挙げられる。キャリアーの性質は、本発明の目的のため、ある程度可溶性であるか、不溶性のいずれかであり得る。支持体物質は、結合した分子が、抗原または抗体に対して結合し得る限り、実質的にあらゆる可能な構造配置を有し得る。そのため、支持体の立体配置は、球状（ビーズのような）、または円柱状（試験管の内側表面もしくは、ロッドの外部表面のような）のものであり得る。あるいは、その表面は、例えば、シート、テストストリップなどのように平坦であり得るか、または、あるいは、ポリスチレンビーズであり得る。当業者は、結合する抗体または抗原のための多くの他の適切なキャリアーを知り、または、慣用的な実験の使用により、同一のものを突き止めることが可能である。

【0090】

さらに、遺伝子または遺伝子産物または多型変異体における変化を検出する上記の任意の方法は、処置もしくは治療の経過をモニターするために使用され得るということを理解する。

【0091】

本明細書中に記載する方法は、例えば、被験体が結腸直腸癌を有するか、もしくは、結腸直腸癌発生の危険性にあるのかを決定するために、都合よく使用し得る、本明細書中に記載するプローブ核酸またはプライマー核酸の少なくとも一つを含む、包装済みの診断キット（例えば、以下に記載される）を利用することにより、実施され得る。

【0092】

10

20

30

40

50

上記の診断方法および予測方法に使用するためのサンプル核酸は、被験体の任意の細胞タイプまたは組織から得られ得る。例えば、被験体の体液（例えば、血液）は、公知の技術（例えば、静脈穿刺）により得られ得る。あるいは、核酸テストは、乾燥サンプル（例えば、毛髪または表皮）で実施され得る。胎児核酸サンプルは、母体血液から得られ得る（国際特許出願番号WO91/07660、Bianchiに記載される）。あるいは、羊膜細胞または絨毛膜絨毛を、出生前検査の実施のため得られ得る。

【0093】

診断手順はまた、核酸精製の必要性がないように、生検または切除から得られた患者組織の組織切片（固定化および/もしくは凍結）について直接的にインサイチュで実施され得る。核酸試薬は、このようなインサイチュ手順のために、プローブおよび/またはプライマーとして使用され得る（例えば、Nuovo, G. J. (1992) 「PCR In Situ Hybridization: Protocols And Applications」、Raven Press, NYを参照のこと）。

10

【0094】

一つの核酸配列の検出に主に注力する方法に加えて、プロファイルをもた、このような検出スキームにおいて評価し得る。例えば、フィンガープリントプロファイルは、ディフュゼンシャルディスプレイ法、ノーザン分析法および/またはRT-PCR法を利用することにより、生じ得る。

【0095】

（処置の方法）

20

本発明はさらに、癌を有する被験体の処置方法を提供する。一つの実施形態において、この方法は、（a）対立遺伝子改変体の同一性を決定する工程；および（b）特定の対立遺伝子改変体について治療的な利点を提供する有効量の組成物を被験体に対して投与する工程、を包含する。

【0096】

（キット）

本明細書中に示すように、本発明は、例えば、目的遺伝子（例えば、ヒトTS遺伝子）内に存在する多型領域の対立遺伝子改変体のタイプを決定するための方法（例えば、診断方法および治療方法）を提供する。いくつかの実施形態において、これらの方法は、目的遺伝子の多型領域に対して相補的であるヌクレオチド配列を含むプローブまたはプライマーを使用する。従って、本発明は、これらの方法を実施するためのキットを提供する。

30

【0097】

実施形態において、本発明は、被験体が、癌治療また、あるいは様々な処置法の選択肢の内の一つに対して応答するか、否かを決定するためのキットを提供する。このキットは、一以上の上記の組成物および使用説明書を含む。例示としてのみで、本発明はまた、TS遺伝子の多型領域（すなわち、5'非翻訳領域）に対して特異的な第一および第二のオリゴヌクレオチドを含む、癌処置に対する応答を決定するためのキットを提供する。遺伝子座「に対して特異的」オリゴヌクレオチドは、多型領域の位置または多型領域に隣接する位置のいずれかに対して、結合する。増幅のためにプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドであるため、プライマーが、その多型領域を含むポリヌクレオチドを産生するために使用されるのに十分なほど近接している場合、プライマーは、隣接する。一つの実施形態において、オリゴヌクレオチドが、多型から約1~2 kb、および好ましくは1 kb未満内において結合する場合、オリゴヌクレオチドは、隣接する。特異的オリゴヌクレオチドは、配列に対してハイブリダイズし得、および適切な条件の下では、単一のヌクレオチドだけ異なる配列に対しては結合しない。

40

【0098】

本キットは、目的遺伝子の多型領域に対して特異的にハイブリダイズし得る少なくとも一つのプローブまたはプライマーを含み、および使用説明書を備える。これらのキットは、好ましくは、少なくとも一つは上記核酸を含む。目的遺伝子の少なくとも一部を増幅するための好ましいキットは、二つのプライマーを含み、それらのプライマーのうち少なく

50

とも一つのプライマーは、その対立遺伝子改変体の配列に対してハイブリダイズし得る。このようなキットは、例えば、蛍光検出法、電気化学検出法、または他の検出法による、遺伝子型の検出に適している。

【0099】

キットに含まれるオリゴヌクレオチドは（プローブとして、またはプライマーとして使用しよう）、検出可能に標識され得る。標識は、直接的（例えば、蛍光標識）、または間接的のいずれかで検出し得る。間接的検出法には、ビオチン・アビジン相互作用、抗体結合などを含む、当業者に公知の任意の検出方法を含み得る。蛍光標識したオリゴヌクレオチドはまた、消光分子を含み得る。オリゴヌクレオチドは、表面に対して結合し得る。一つの実施形態において、好ましい表面は、シリカまたはガラスである。別の実施形態において、その表面は、金属アーク溶接棒である。

10

【0100】

また、本発明のなお他のキットは、アッセイを実施するために必要な少なくとも一つの薬剤を含む。例えば、キットは、酵素を含み得る。あるいはそのキットは、緩衝液、または任意の他の必要な薬剤を含み得る。

【0101】

テストサンプルと共に核酸プローブをインキュベートするための条件は、アッセイ内で使用するフォーマット、使用する検出方法ならびにアッセイで使用する核酸プローブのタイプおよび性質に依存する。当業者は、一般的に利用可能なハイブリダイゼーションアッセイ、増幅アッセイ、または免疫学的アッセイのフォーマットの内の任意の一つを、本発明における使用のために核酸プローブを利用するために容易に適合させ得ることを認識する。これらのアッセイの例示は、Chard, T. (1986) 「An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques」 Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands; Bullock, G. R. 5、 「Techniques in Immunocytochemistry」 Academic Press, Orlando, FL Vol. 1 (1982), Vol. 2 (1983), Vol. 3 (1985); Tijssen, P.、 (1985) 「Practice and Theory of Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology」、Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlandsにおいて、見出され得る。

20

30

【0102】

診断キットにおいて使用するテストサンプルは、細胞、細胞のタンパク質抽出物もしくは膜抽出物、または唾液、血液、血清、血漿、あるいは尿のような生体の体液を含む。上記方法において使用するテストサンプルは、アッセイのフォーマット、検出方法の性質およびサンプルとして使用されてアッセイされる組織、細胞または抽出物に基づいて変わる。細胞のタンパク質抽出物または膜抽出物の調製方法は、当該分野において公知であり、そして利用するシステムに適合するサンプルを得るため容易に適合させ得る。

【0103】

これらのキットは、目的遺伝子の多型領域における被験体の遺伝子型を決定するための本明細書中に記載するポジティブコントロール、ネガティブコントロール、薬剤、プライマー、配列決定マーカー、プローブおよび抗体の全てまたは、いくつかを含み得る。

40

【0104】

受け入れられるように、これら提示するキットの構成要素を、当業者による使用のため慣用的な様式で包装し得る。例えば、これら提示するキットの構成要素は、溶液中または液体分散 (liquid dispersion) としてなどにより、提供し得る。

【0105】

（本発明の核酸の他の使用）

目的遺伝子の対立遺伝子の同定はまた、同一種に由来する他の個体の間から一個体を同

50

定するために有用であり得る。例えば、DNA配列を、同一種内の異なる個体検出のためのフィンガープリントとして使用し得る (Thompson, J. S. および Thompson, 編集 (1991) 「Genetics in Medicine」、W B Saunders Co., Philadelphia, Pa.)。これは、法医学的研究において有用である。

【0106】

本発明はさらに、以下の実施例 (決して限定されるものとして解釈されるべきではない) により、例示される。前述の全ての参考文献 (本願にわたる前述のような文献参考文献、特許公報、特許出願公報を含む) の内容は、参考文献として本明細書により明示的に援用される。本発明の実施は、特に断りのない限り、当該分野内における、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を使用する。

10

このような技術は、文献内に完全に説明される。例えば、Sambrook, ら、(1989) を参照のこと。

【0107】

本発明を今回概ね記載したが、参考文献により、本発明の特定の局面および実施形態の例示の目的のみのために含まれ、かつ発明を限定することを意図しない以下の実施例を参照することによって容易に理解する。

【実施例】

【0108】

20

(実施例1 - 正常組織における遺伝子発現プロファイルによって、アジュバント化学放射線療法での直腸癌処置を受けた患者における骨盤内再発が予測される)

結腸直腸癌の発生率は、この10年間で増加し、そして現在、米国において、1年間で、新症例として41,000人程であると推定され、そして死者8,500人である。直腸癌のII期~V期において、局所的な再発は、20%~70%の外科手術のみで処置した患者において発生する (Kapiteijn E. ら、(2001) N. Engl. J. Med. 345: 638-646)。アジュバント放射性 - 化学療法は、危険度の高い直腸癌に対して外科的な切除を行った患者に対する標準的な治療法として、米国において一般的に認可されている (NIH Consensus Conference. Adjuvant Therapy For Patients With Colon And Rectal Cancer (1990) JAMA 264: 1444-1450)。

30

【0109】

直腸癌におけるこれまでの研究は、TSおよびDPDを含む特定遺伝子のレベルの増加 (Salonga D. ら、(2000) Clin. Cancer Res. 6: 1322-1327 および Ishikawa ら、(1999) Clin. Cancer Res. 5: 883-889) と 5-FU を伴うネオアジュバント処置後のより悪い結果との間の関連を示す。

【0110】

そのため、直腸癌をアジュバント化学 - 放射線を用いて処置した患者における骨髄内の再発を予測するマーカーを同定することは有益である。この目的で、腫瘍組織と隣接する正常組織における決定遺伝子の推定反応のmRNAレベルを測定した。調べた遺伝子は、5-FU経路 (TS、DPD)、DNA修復 (ERCC1、RAD51)、および血管新生 (VEGF) に含まれた。

40

【0111】

(方法) 局所的に進行した直腸癌 (UICC II期およびIII期) の患者73人を選択した。彼らは、骨盤全体に対する45 Gyのアジュバント放射線照射を受け、外科手術において腫瘍組織の切除の後に54 Gyまでのさらなる放射線照射および5-FU注入療法を用いる処置を以前に行っている。QRT-PCR (蛍光基盤、定量的リアルタイム検出方法 (Taqman (登録商標))) は、遺伝子発現レベルを確立するために、ホルマ

50

リン固定し、パラフィン包埋し、レーザー - キャプチャー - マイクロダイセクション処理した組織から抽出したRNAで実施された。そのmRNAを、cDNAへと逆転写し、そして目的遺伝子およびコントロールとしての内部基準遺伝子（ β -アクトリン）も同様に定量した。全ての遺伝子発現レベルは、分析する前にlog変換処理した。Miller、Siegmund (Miller R. および Siegmund D. Biometrics (1982) 38:1011-1016) ならびに Halpern (Halpern J. (1982) Biometrics 38:1017-1023) の c^2 の方法を使用して、どの遺伝子発現が、患者を、乏しい予後の部分群と良好な部分群に最もよく分離するかを決定した。2000回のブストラップ型のシミュレーションを使用して、最大 c^2 統計量の分布を、相関のないとする帰無仮説のもとで推定した。

10

【0112】

【表1】

表1. 人工統計学および臨床学的パラメーターに基づく直腸癌における局所再発までの時間

パラメーター	n	5-yr 再発の 確率 \pm SE	再発までの時間中央値		相対危険度		P ^a
			月	95% CI	危険度	95% CI	
全患者数	73	0.53 \pm 0.08	57.0	38.4, 130.2 ^b			
年齢							
< 50 歳	30	0.48 \pm 0.11	65.7	27.3, 130.2 ⁺	1.00	基準	0.56
\geq 50 歳	43	0.57 \pm 0.11	56.0	25.8, 124.6 ⁺	1.24	0.60-2.56	
性別							
男性	48	0.58 \pm 0.10	56.0	27.3, 124.6 ⁺	1.00	基準	0.24
女性	25	0.44 \pm 0.13	130.2 ⁺	36.0, 130.2 ⁺	0.62	0.28-1.40	
人種							
白人	50	0.57 \pm 0.09	56.0	25.4, 124.6 ⁺	1.00	基準	0.25
その他	23	0.43 \pm 0.14	65.7	40.5, 130.2 ⁺	0.63	0.28-1.40	
pT							
pT ₂	22	0.61 \pm 0.14	56.0	25.8, 130.2 ⁺	1.00	基準	0.91
pT ₃	51	0.48 \pm 0.09	65.7	38.4, 102.7 ⁺	0.96	0.45-2.04	
pN							
pN ₀	35	0.43 \pm 0.11	65.7	40.5, 130.2 ⁺	1.00	基準	0.46
PN ₊	38	0.60 \pm 0.10	56.0	25.8, 124.6 ⁺	1.31	0.64-2.67	
段階							
I-II	57	0.60 \pm 0.09	56.0	27.3, 130.2 ⁺	1.00	基準	0.26
III	16	0.24 \pm 0.12	103.7 ⁺	65.7, 103.7 ⁺	0.56	0.19-1.59	
外科処置の型							
APR ^c	20	0.73 \pm 0.15	56.0	25.2, 130.2 ⁺	1.00	基準	0.66
LAR	44	0.48 \pm 0.09	65.7	38.4, 102.7 ⁺	0.82	0.37-1.80	
TRA	9	0.22 \pm 0.14	103.7 ⁺	103.7 ⁺ , 103.7 ⁺	0.51	0.11-2.35	

a. ログ順位検定に基づく

b. 推定値に達しなかった

c. APR, 腹部会陰切除;
LAR, 下部前方切除;
TRA, 経肛門部切除;

(結果) 5 - FU代謝およびDNA修復に関連する遺伝子の腫瘍内mRNAレベルは、直腸癌の患者におけるアジュバント放射線 - 化学療法後の結果に関連しなかった。腫瘍に隣接する正常組織におけるTS、DPD、ERCC1、およびVEGFの遺伝子発現レベルは、臨床結果に関連し、ならびに骨盤再発のより大きな危険にある患者を同定するために有益であり得る。これらの結果は、腫瘍組織の遺伝子発現ではないが、腫瘍に隣接する正常組織の遺伝子発現は、局所的な腫瘍の再発を引き起こし得る、外科処置後に残存する腫瘍細胞の生物学的挙動を表すものである。

40

【0113】

(実施例2 - プロモーター領域内のTSの多型は、処置した癌患者における骨盤再発を予測する)

酵素のチミジル酸生成酵素(TS)は、デオキシチミジル酸(DNA合成に必須の前駆体、チミジル酸の唯一のデノボソースである)へのデオキシウリジレートの細胞内変化を触媒する(Heidelberg C.ら、(1957) Nature (179):

50

663 - 666)。ヒトチミジル酸生成酵素遺伝子(hTS)は、調節領域の5'末端のキャップ部位の下流28塩基対配列の、2重タンデムリピートまたは3重タンデムリピートのいずれかを有する多型である(Horie N.ら、(1995)Cell Struct. Funct. 20:191-197)。

【0114】

TS遺伝子内の多型および、5-FU処置の効率とその相関は、共有に係る米国特許出願第09/715,764号(この内容全体は、本明細書中に参考として援用される)に、以前に記載された。この開示の中で報告された予測多型は、チミジル酸生成酵素遺伝子の5'UTR内のタンデムに繰り返された28塩基対配列である。TS有効性薬物(例えば、5-フルオロウラシル)処置に対する応答性があまり高くない患者は、タンデムに繰り返された配列の、この3重リピートに関してホモ接合性であるということが決定された。タンデムに繰り返された配列の、2重リピートおよび3重リピートのヘテロ接合性遺伝子型を示す患者。TS有効性薬物(例えば、5-フルオロウラシル)の投与に対し最も応答しがちな患者は、タンデムに繰り返された配列2重リピートに関してホモ接合性である。

10

【0115】

成功した処置の後であっても、直腸癌患者の局所的再発は、重大な医療問題である。局所的な直腸癌患者を、局所的再発危険性を減じるため放射線療法を用いて処置する。手術前または手術後いずれかの、局所的に進行した直腸癌に対する標準的な治療法は、5-FU化学療法および放射線療法である。腫瘍再発の危険性は、病理学的分類に応じて、10%と60%の間である。腫瘍再発の大きな危険にある患者を同定することは、大きな危険にある患者に対するより良い処置方法の開発を可能とする。このために、TS遺伝子内の28bpのタンデムリピート多型は、手術前の化学放射線療法または手術後の化学放射線療法のいずれかで処置した直腸癌患者における、局所的再発の危険性の予測であることが見出されたということを開示する。

20

【0116】

(方法)局所的に進行した直腸癌患者43人(彼らは、手術前か、または手術後のいずれかに5-FUおよび骨盤の放射線照射を用いて処置された)を、分析した。ゲノムDNAを、パラフィンで包埋した組織サンプルから抽出した。患者のTS多型の遺伝子型を、TSプロモーター領域のポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅により決定した。PCR産物を次いで、電気泳動すると220bp(2/2)、248bp(3/3)または、両方(2/3)のバンドが現れた。遺伝子型の特定を、局所的再発が発生した24人の患者および、発生しなかった19人の患者の間で、繰り返し実施した。

30

【0117】

(結果)手術前か、または手術後のいずれかの化学放射線療法の後、骨盤再発が、3重タンデムリピートに関してホモ接合性(3/3)の遺伝子型患者の87%で見出された((2/2)および(2/3)を有するヘテロ接合性患者の37%に対して)。P値は、0.01未満である。しかし、(3/3)遺伝子型は、進行したT段階またはN段階にも、高度組織学(high grade histology)にも、ポジティブの周縁にも、血管腔浸潤にも関連しなかったため、骨盤再発については無関係の予測因子である。

【0118】

そのため、3/3TS多型の直腸癌患者は、5-FUおよび放射線照射の両者に対する彼ら耐性が原因で、5-FUおよび骨盤の放射線照射の組み合わせの後、局所的に制御される可能性は低い。放射線照射との組み合わせにおける、他の化学療法薬剤(例えば、CPT-11、またはオキサリプラチン)は、代替的な治療法である。

40

【0119】

(実施例3-5-FUおよびオキサリプラチンに対する応答ならびに延命を予測するためのTS3の多型)

この実施例は、TS遺伝子に関連する多型が、癌患者における5-FU/オキサリプラチン化学療法に対する臨床反応ならびに延命に関連することを示す。実施例2(前出)は、TSプロモーター内の多型が、正常組織および腫瘍組織におけるTS遺伝子発現に関連

50

していることを報告する。この知見は、末梢血球細胞のTS多型を測定することにより、腫瘍内のTS遺伝子発現を予測することが可能であるということを示す。最近、多型が、腫瘍内の遺伝子発現に関連するとして見出された遺伝子の3'末端にあると記載された。このTS多型は、オキサリプラチンおよび5-FUで処置した患者の全ての延命に関連し、結果の独立予測因子である。

【0120】

化学療法に基づく5-FUに対する応答の予測および5-FUの適切な用量の予測は、治療効果を最大化し、ならびに処置の危険性を最小化する。抗癌剤の標的および抗癌剤の代謝に関連する遺伝子多型は、腫瘍内遺伝子発現レベルの予測となり得る。多型プロファイルはそのため、化学療法の薬物の選択または投薬に影響し得る。任意の説により制限されることを望まないが、本明細書中に報告した結果はまた、これら多型の多くは、人種群に関連する特有の遺伝子頻度を有することが示されたので、異なる人種群における抗癌剤薬物の毒性および抗癌剤の有効性の差異を説明する。

10

【0121】

(方法) この多型に関連する機能を調べるために、第2ラインまたは第3ラインの化学療法にて、5-FUおよびオキサリプラチン処置した、進行した結腸直腸癌の患者102人における、相対的なTS mRNAレベルおよび、TS遺伝子の3'非翻訳領域における多型を、評価した。ポリメラーゼ連鎖反応増幅/RFLLP分析法を、当該分野において公知である、公知の方法を使用することによりTS遺伝子を同定するために実施した。TS mRNAを、当該分野で公知である定量的RT-PCR法を使用することにより定量した(Hankoshi T.ら、(1992) Cancer Res. 52:108-116に記載)。

20

【0122】

野生型改変体(+6bp/+6bp)は、5.42のTSレベル(95%CI: 3.57, 8.24)を有するヘテロ接合性改変体(+6bp/-6bp)および、TS 2.71(95%CI: 1.18, 5.26)を有するホモ接合性変異改変体と比較した場合、腫瘍内における最高のTS mRNA発現に関連した(11.35, 95%CI: 6.43, 20.03)($p = 0.017$, F-検定, 表1参照のこと)。

【0123】

【表 2】

表 2. 腫瘍組織における TS 遺伝子型および TS mRNA レベル

組織	TS		TS		TS 平均値の比較		
	遺伝子型	N	%	平均値 ¹	95% CI ²	遺伝子型	p-値 ³
転移性腫瘍組織 (N=43)							
	+6bp/+6bp	13	30%	11.35	(6.43,20.03)	+6bp/+6bp vs. -6bp/-6bp	0.007
	+6bp/-6bp	24	56%	5.42	(3.57,8.24)	+6bp/+6bp vs. +6bp/-6bp	0.041
	-6bp/-6bp	6	14%	2.71	(1.18,6.26)	+6bp/-6bp vs. -6bp/-6bp	0.14
						Overall	0.017

1. TS 平均値 = β アクチン mRNA に対する TS mRNA 発現の相乗平均

2. 95% 信頼区間

3. 全比較についての p-値は、F-検定に基づき、他の全ての p-値は、LSD-検定に基づく（最小有意差検定）。

野生型改変体（+6bp/+6bp）は、ヘテロ接合性改変体（+6bp/-6bp）および、ホモ接合性変異改変体と比較した場合、有意な延命効果に関連した（ECOGにより分けられるコックス比例ハザードモデルおよび多変量解析に基いて $p = 0.040$ ）。そのため、3' 非翻訳領域におけるこの多型は、幾人かの患者の臨床反応および臨床結果の予測となる。

【0124】

（実施例 4 - 5 - FU / オキサリプラチン化学療法に対する応答および延命を予測するための ERCC1 遺伝子多型）

以下に示す結果は、ERCC1 遺伝子（excision repair cross complementation group 1）に関連する多型が癌を有する患者における 5 - FU / オキサリプラチン化学療法に対する臨床応答および延命に関連し、ならびに ERCC1 mRNA レベルに関連することを確立する。

【0125】

ERCC1 は、高保存された酵素であり、ヌクレオチド除去修復（NER）1 経路に特異的であり、および、この欠失は、生命と相容れない。NER に関連するタンパク質のなかで、ERCC1 の欠損は、最も重篤な DNA 修復欠損に関連するようである。

【0126】

白金化合物は、とりわけ、胃癌、卵巣癌、および直腸結腸癌の主要な化学療法処置となりつつある。白金化合物の耐性の機構のなかで、増加された DNA 修復は、最も重要な機構であるようである。

【0127】

研究は、増加させた ERCC1 mRNA レベルが直接的に、ヒト卵巣癌および子宮頸癌におけるシスプラチンに対する臨床耐性に関連することを示した。ERCC1 mRNA レベルはまた直接的に、胃癌患者における、5 - FU およびシスプラチンに対する臨床

耐性に関連することを以前示した。腫瘍内 E R C C 1 m R N A レベルはまた、5 - F U / オキサリプラチンを用いて処置した転移性 (m e t a t a s t a t i c) 結腸直腸癌患者における、臨床応答および全延命を予測することが可能であることを、最近示した。

【 0 1 2 8 】

E R C C 1 遺伝子は、第 1 1 8 コドン (エクソン 4) の非常に一般的な多型を含む。この多型は、同一のアミノ酸 (アスパラギン) を生じる、C から T への単一ヌクレオチドの変化である。この変化は、一般的な遺伝子使用法 (c o m m o n u s a g e) のコドン (A A C) を、あまり使用されないコドンへ (A A T) と変換する。後者の報告された遺伝子使用法頻度は、前者よりも 2 倍少ない。卵巣癌の細胞株を使用する研究は、「野生型」と比べて、多型を含む細胞株の D N A 付加物の修復における、5 0 % の減少を示した。しかし、この卵巣癌細胞株は、白金に対して等しく耐性であることが分かった。

10

【 0 1 2 9 】

この研究において、5 - F U / オキサリプラチンを用いて処置した転移性結腸直腸癌患者 3 2 人の第 1 1 8 コドンでの E R C C 1 多型および腫瘍内 E R C C 1 m R N A レベルを、評価した。m R N A レベルの中央値は、2 . 9 5 であった。C / C 遺伝子型を有する患者 1 1 人の内 3 人 (2 7 . 3 %) が、2 . 9 5 よりも大きな E R C C 1 m R N A レベルを有した一方、それぞれ、C / T 遺伝子型を有する患者 1 2 人の内 5 人 (4 1 . 7 %) および、T / T 遺伝子型を有する患者 9 人の内 7 人 (7 7 . 8 %) が 2 . 9 5 よりも大きな E R C C 1 m R N A レベルを有した。C 対立遺伝子を有する患者の m R N A レベルを、C 対立遺伝子を含まないものと比較した場合、その差異は、統計学的に有意であった (p = 0 . 0 4 9) 。

20

【 0 1 3 0 】

関連する研究においては、5 - F U / オキサリプラチンを用いて処置した転移性結腸直腸癌患者 6 0 人の第 1 1 8 コドンでの E R C C 1 多型および全延命をまた、評価した。患者の延命中央値は、C / C 遺伝子型を有する患者については、5 3 1 日、C / T 遺伝子型については 2 5 4 日、および、T / T 遺伝子型については、2 5 6 日であった (傾向 p = 0 . 0 8 9) 。死亡についての相対危険度は、C / T 遺伝子型については 2 . 1 2 および、T / T 遺伝子型については 2 . 3 6 であった。T 対立遺伝子を有する患者の延命中央値は、2 5 6 日であり、および有さないものは、5 3 1 日であった (p = 0 . 0 5 6) 。

30

【 0 1 3 1 】

文献検索は、どのように「サイレント」多型 (より少ない使用頻度のコドンを生じる) が、より高レベルの m R N A レベルに関連し得るのかという説明を提供することができなかった。任意の説により制限されることはないが、出願人は、この多型が、E R C C 1 m R N A レベルに関連し、そしてそのため、5 - F U / オキサリプラチンを用いて処置した転移性結腸直腸癌患者の延命を予測し得ることを記載する。

【 0 1 3 2 】

(実施例 5 - 白金ベースの化学療法に対する応答および延命を予測するための多型 - X P D (E R C 2) 遺伝子)

以下に示す結果は、X P D 遺伝子に関連する多型が癌患者の白金ベースの化学療法に対する臨床応答および延命に関連することを確立した。

40

【 0 1 3 3 】

X P D タンパク質は、ヌクレオチド除去修復 (N E R) 経路における転写および主要な関与に必須である。X P D 遺伝子における複数の多型が、同定された。しかし、その機能的なシノニリカンス (s i o n i l i c a n c e) は、明らかになっていない。コドン 7 5 1 の単一ヌクレオチドの多型 (A から C) は、L y s から G l n へのアミノ酸変化を生じる。コドン 7 5 1 での多型は、D N A 修復能力をもたらし得るという証拠が存在するが、しかし、この問題に関するこれまでの研究は、相矛盾する結果を示した (H e i d e l b e r g e r , C . ら、(1 9 5 7) N a t u r e 1 7 9 : 6 6 3 - 6 6 6 および H o r r i e , N . ら、(1 9 9 5) C e l l S t r u c t . F u n c t . 2 0 : 1 9 1 - 1 9 7 参照のこと) 。

50

【0134】

増幅したDNA修復は、白金ベースの化合物（例えば、オキサリプラチン）に対する化学耐性のため、よく療法された機構である。本明細書内に報告される結果は、ERCC1（NER酵素ファミリーのメンバー）の増加した遺伝子発現は、胃癌患者の5-FUおよびシスプラチン化学療法に対する耐性に関連することを示す。

【0135】

（方法）これまでに5-FUベースの化学療法に失敗し、および5-FU/オキサリプラチンの組み合わせ処置に対する応答ならびに全延命を決定した転移性結腸直腸癌患者69人のXPDのコドン751の多型の状態。遺伝子型の特定は、RFLP-PCR法を使用することにより白血球で行った。

10

【0136】

67人の患者を、応答について評価した。全応答率は、15%（10/67）であった。Lys/Lys遺伝子型を有する25%（5/20）の患者が、それぞれLys/Gln遺伝子型を有する患者の11%（4/37）およびGln/Gln遺伝子型を有する患者の10%（1/10）と比較して、応答した（ $p = 0.007$ フィッシャーの直接確率検定、両側検定）。さらに注目すべきは、Gln/Gln遺伝子型を有する患者の間で、50%（5/10）のものが、それぞれLys/Lys遺伝子型を有する患者の10%（2/20）およびLys/Gln遺伝子型を有する患者の5%（2/37）と比較して、進行性疾患を有した。

【0137】

全延命およびその多型との関連性をまた、評価した。Lys/Lys遺伝子型を有する患者についての生存期間の中央値は、530日であった。Lys/Gln遺伝子型を有する患者は、356日の生存期間の中央値を有した。最後に、Gln/Gln遺伝子型を有する患者は、186日の生存中央値を有した（傾向について $p = 0.06$ ）。そのため、死者のR.R.は、Lys/Lys群の1.00、Lys/Glnを有する群についての1.49、およびGln/Glnを有する群についての3.01であった。

20

【0138】

（結果）DNA修復能力および化学療法に対する耐性にXPD遺伝子のLys751Gln多型が影響を与える機構は、知られていない。事実、DNA修復能力におけるまさにその役割は、いまだ議論されている。研究は、多型が、増加したDNA修復能力に関連するののか、または減少したDNA修復能力に関連するののかについて、相矛盾する結果を示した（Heidelberg, C.ら、(1957) Nature 179:663-666およびHorie, N.ら、(1995) Cell Struct. Funct. 20:191-197参照のこと）。

30

【0139】

これらの結果は、XPD遺伝子が、化学療法耐性および遺伝子型の特定において重要な役割を果たすことを示す。751多型は、臨床応答、延命、および白金ベースの化学療法に対する臨床毒性、ならびにXPD機能を調節する新規薬剤設計の予測において有用である。XPDはまた、薬物開発の重要な標的である。

【0140】

（実施例6-XRCC1は、白金ベースの化学療法で処置した患者における応答の予測的なものである）

40

最近、Divineら（Proceedings AACR Annual meeting、2000年3月、591ページ）は、XRCC-1多型が、より高いAFB1-付属物およびGPA体細胞変異に関連し、またエジプト人の肺癌の危険、大腸癌の危険（Abdel-Rahmanら、Proceedings AACR Annual Meeting、2000年3月、595ページ）ならびに前立腺癌の危険（Huら、Proceedings AACR Annual Meeting、2000年3月、596ページ）に関連することを示した。エクソン6内の多型は、膀胱癌の発生に対する保護的効果を有することを示した（Sternら、Proceedings, AACR An

50

n u a l m e e t i n g、2000年3月、592ページ)。

【0141】

X R C C - 1は、一本鎖切断修復および、塩基除去修復において中心的役割を果たす。さらに、哺乳動物における一本鎖切断修復に必要とされる遺伝子産物の少なくとも一つ、X R C C 1ポリペプチドは、マウスの生存に必要とされ、X R C C - 1を欠損する変異細胞は、電離放射線およびアルキル化剤に対する細胞の感受性を示し、ならびに染色体異常の高い自発性頻度を示す(Caldecottら、Proceedings AACR Annual Meeting、2000年3月、891ページ)。

【0142】

(方法) 5 - F Uおよびオキサリプラチンを用いた、進行した結腸直腸癌の患者45人(以前に化学療法レジメに少なくとも一度失敗した)を、選択した。X R C C 1の多型および、5 - F Uならびにオキサリプラチンを用いて処置した転移性結腸直腸癌患者における臨床結果とのX R C C 1の関連を、研究した。これらの患者は、念入りに前処置されたが、しかし、最初にプラチナ化合物を受けた。X R C C - 1 D N A修復遺伝子におけるバリエーションが、宿主のD N A損傷に関連するのか、について決定するために、X R C C 1の多型(コドン399)と姉妹染色分体の変換(S C E)の頻度(n = 76)およびポリフェノールD N A付加物(n = 61)との間の関係を、研究した。X R C C 1遺伝子型を、P C R - R F L Pを使用することにより同定した。

【0143】

(結果) 患者45人のうち、患者6人(13%)に部分的な反応が生じ、患者30人(67%)が安定した疾患を有し、および9人(20%)が進行性疾患を有した。患者18人はA / A多型を有し、22人がA / G多型および5人がG / G多型を有した。6人の反応した患者のうち、5人はA / A多型を有し、および一人がA / G多型を有した。進行性疾患を有する9人の患者のうち3人がG / G多型を有し、およびこれら9人のうち4人がA / G多型を有した。ヨンキー・テラプストラ検定(モンテカルロ両側検定)を使用するとp値は、0.0043と0.0083の99%の信頼区間を有する0.0063を伴い、統計的に有意であった。これらのデータは、A / A多型が、化学療法に対する応答に関連し、およびG / G多型を有する患者がプラチナ化合物に対する耐性に関連することを示す。

【0144】

X R C C 1の399 G l n対立遺伝子のホモ接合性キャリアーである現喫煙者間のS C E頻度の平均値は、399 A r g / A r gの現喫煙者の平均値よりも大きかった。X R C C 1 399 G l nおよび検出可能なD N A付加物への可能な遺伝子投与効果を記載し、そして、399 A r g / A r g遺伝子型を有する若い患者よりも、399 G l n対立遺伝子の保有者である高齢の被験体の間で有意に多い付加物は、多型のX R C C 1 399 G l n対立遺伝子の保有者が、D N A損傷のより大きな危険にあり得ることを示す。(C a r c i n o g e n e s i s (O x f o r d) 21(5)(2000): 965 - 971)。

【0145】

出願人は、X R C C - 1遺伝子が、白金ベースの化学療法で処置した患者の応答を予測することを見出した。X R C C - 1の多型の同定は、プラチナが有益であるかを決定するためだけではなく、またプラチナを用いる副作用の危険性を決定し得ることを可能とした。X R C C - 1の多型は、治療のための方法の個体化 - この事前選別の使用に基づく抗癌剤の用量および選択の個体化、を可能とした。本明細書中の研究報告はまた、白金ベースの化学療法から利得を有する者、およびプラチナ薬剤の副作用をうける可能性を有する者であり得る個体を同定する。

【0146】

(実施例7 - ヒトグルタチオンS - トランスフェラーゼP 1多型は、5 - F U / オキサリプラチン化学療法を用いて処置した進行型結腸直腸癌患者の延命を予測する)

グルタチオントランスフェラーゼは、還元されたグルタチオンの結合を触媒する第二相

の代謝酵素のスーパーファミリーに属する。これら反応の解毒特性は、発癌性薬剤および細胞毒性薬剤により引き起こされる損傷からの細胞マクロ分子の保護によるものである (Mannervik, B. (1985) Adv. Enzymol. 57: 357-417 を参照のこと)。GSTP1-1 は、ヒト上皮組織において広範に発現し、および大腸癌を含む多くの腫瘍において過剰に発現することが示された (Terrier P. ら、(1990) Am. J. Pathol. 137: 845-853; Moscow J. A. ら、(1989) Cancer Res. 49: 1422-1428; Howie A. F. ら、(1990) Carcinogenesis 11: 451-458; Peters W. M. ら、(1992) Gastroenterology 103: 448-455; および Singh S. V. ら、(1990) Cancer Lett. 51: 43-48)。腫瘍における増加レベルは、多くの腫瘍において見出されたように、化学療法に対して見出された耐性に一部起因し得るが、この機構はいまだ、知られていない (Tsuchida S. ら、(1992) Rev. Biochem. Mol. Biol. 27: 337-384)。GSTP1 の発現レベルに影響する因子は、特定の薬剤または薬剤の組合せを用いて処置した患者の治療応答および延命を予測するための重要な道具となり得る。エキソン5における第313位のヌクレオチドにおけるGからAへの転移は、タンパク質におけるイソロイシンからバリンへのアミノ酸置換を引き起こす (Board ら、(1989) Ann. Hum. Genet. 53: 205-213 によりこれまでに報告された)。インビトロでのcDNA発現の研究は、このアミノ酸変更とGSTP1酵素の減少した活性レベルとの間の相関性を示した (Zimniak P. ら、(1994) Eur. J. Biochem. 224: 893-899)。最近、GSTP1遺伝子の対立遺伝子改変体のエクソン5の第105番目Valが、正常肺組織および食道のバレット上皮組織におけるGST酵素の低活性に関連していることが見出された (Watson M. A. ら、(1998) Carcinogenesis 19: 275-280 および Van Leishout, E. M. M. (1999) Cancer Res. 59: 588-589)。さらに、第105番目Val対立遺伝子が、精巣癌、膀胱癌および食道癌についての危険性増加に関連するが、しかし大腸癌または乳癌については関連しないことが示された (Harries L. W. (1997) Carcinogenesis 18: 641-644)。

【0147】

さらに、このIle105Valの置換は、化学療法(シクロホスファミド、5-FU、アドリアマイシン)を受けた乳癌の女性における延命の改善に関連することが示された (Sweeney C. (2000) Cancer Res. 60: 5621-5624)。Nishimura ら (Nishimura T. ら、(1998) Chem. Biol. Interact. 111: 187-198) は、白金ベースの化学療法を受けている頭頸部の癌を有する患者の応答速度が、GSTタンパク質の低発現を伴う患者について有意に高いものであったことを示した。これら明るいデータに基づいて、5-FU/オキサリプラチンの組合せの化学療法を受けた進行型結腸直腸癌の患者81人の、遺伝子型を特定した。

【0148】

(方法および結果) 本研究において、5-FUおよびCPT-11に失敗した後、第3ラインの処置として5-FU/オキサリプラチン化学療法を受けた進行型結腸直腸癌の患者81人を、GSTP1遺伝子のエクソン5での多型についてスクリーニングした。全生存時間中央値は、11ヶ月の経過観察時間の中央値(95%CI: 1.1, 15.3)を伴い10.2ヶ月であった(95%CI: 7.9, 13.3)。VAL/VAL遺伝子型を有する患者は、ヘテロ接合性またはホモ接合性のILE対立遺伝子の患者と比べて、有意な延命効果を有した($p = 0.028$, ログランク検定)。ホモ接合性のVAL対立遺伝子である患者は、ヘテロ接合性ILE対立遺伝子の患者についての0.40およびホモ接合性ILE対立遺伝子の患者についてのわずかに0.06と比較して、18ヶ月で0.89の生存率を有した。ホモ接合性ILE対立遺伝子の患者は、VAL/VAL群と比較し

た場合、5.4倍増加した相対危険度を示した(表3)。ホモ接合性 ILE 対立遺伝子の患者は、ヘテロ接合性についての13.3ヶ月(95%CI: 8.4, 23.7)と比較して、7.9ヶ月の延命中央値を有した(95%CI: 5.9, 12.8)。ホモ接合性 VAL 対立遺伝子の患者は、24+ヶ月延命した(95%CI: NA)($p = 0.028$ 、ログランク検定、表4)。

【0149】

【表3】

表3. 大腸癌患者延命の単一変量分析

因子	患者数	相対危険度 ¹	95% CI ²	18ヶ月で生存の確率	p-値 ³
GST-P1					0.028
VAL/VAL	9	1.00		0.89 ± 0.10	
ILE/VAL	37	2.73	(1.43,5.23)	0.40 ± 0.11	
ILE/ILE	35	5.40	(2.83,10.30)	0.06 ± 0.06	
GST-P1					0.011
Any VAL	46	1.00		0.44 ± 0.11	
ILE/ILE	35	2.12	(1.15,4.18)	0.06 ± 0.06	
GST-P1					0.14
VAL/VAL	9	1.00		0.89 ± 0.10	
Any ILE	72	3.93	(0.55,28.23)	0.21 ± 0.07	

1. 相対危険度は、第一群の患者について任意時点での増加した死亡率平均と比較した第二群の患者についての任意時点での増加した死亡率平均として考え得られ得る。より良い予後を有する群を、最初に示す。

2. 95%信頼区間

3. ログランク順位検定に基づく。

【0150】

【表4】

表4. GSTP1 遺伝子の遺伝子型と進行型結腸直腸癌患者の延命との関連性

遺伝子型	患者数	延命中央値	95% CI ¹	p-値 ²
ILE/ILE	35	7.9ヶ月	(5.9,12.8)	0.028
ILE/VAL	37	13.3ヶ月	(8.4,23.7)	
VAL/VAL	9	24+ヶ月	(NA)	

1. 95% 信頼区間

2. ログランク検定に基づく。

全延命時間の中央値およびその 95% CI: 10.2 (7.9, 13.3) ヶ月

全経過観察期間の中央値および範囲: 11.0 (1.1, 25.3) ヶ月

本研究から離れた延命は、GENDERおよびETHNICITYに関連しない。

10

20

30

40

50

出願人は、延命とGSTP1遺伝子のエクソン5での11e105Val多型との間の有意な関連性を示す。ホモ接合性アミノ酸置換の患者は、有意な延命効果を有した。これまでのインビトロでの報告および異なるヒト組織における研究によると、Val/Val遺伝子型は、ヘテロ接合性遺伝子型およびILE/ILE遺伝子型と比べて、GST酵素の低活性に関連する(Zimniak P.ら、(1994)上記; Watson M. A.ら、(1998)上記; およびVan Lieshout (1999), 上記)。これらの結果を考慮すると、VAL/VAL遺伝子型およびそれぞれのGST酵素の低活性を伴う患者は、ヘテロ接合性ならびにILE/ILE遺伝子型群と比較して、5-FU/オキサリプラチンを用いる処置から恩恵を受ける。GST酵素の低活性は、薬物媒介性のグルタチオン結合体において、低効率であると考えられ、より長くおよび、おそらくより効率的な腫瘍細胞への活性薬剤の暴露を引き起こす。これは、ILE/ILE遺伝子型と比較して、2または少なくとも1つのVAL対立遺伝子を有する患者についての延命効果を説明し得る。

10

【0151】

出願人が知る限り、これが、GSTP1遺伝子のILE105VAL多型の役割についておよび、5-FU/オキサリプラチン化学療法を受けた転移性結腸直腸癌患者についての初めての報告である。このGSTP1多型は、第3ラインの化学療法に失敗するという高まる危険性を伴う患者を同定するための有益なマーカーとなり得、そのため事前処置した患者の5-FU/オキサリプラチン療法のひどい副作用をなくし得、他の治療法をかれらに指示し得る。単純な血液検査の方法を、臨床家がより個体化した化学療法の設計のために使用し得る。

20

【0152】

(実施例8 - EGFR遺伝子のイントロン1における多型のジヌクレオチドリピートは、進行型結腸直腸疾患患者における白金ベースの化学療法に対する臨床応答に関連する) EGFRは、170kDの膜貫通型糖タンパク質であり、その遺伝子は、ヒト染色体7p12の短腕上に位置する。これは、上皮成長因子epidermal growth factor (EGF)、およびTGF-を含む、複数の細胞外成長因子リガンドを有するレセプタータンパク質チロシンキナーゼファミリーのメンバーである。EGFRは頻繁に、多くの型のヒトの癌(CRC (結腸直腸癌) およびそれらの過剰発現を含む)において過剰発現し、そしてこの過剰発現は典型的に、より悪性の臨床行動を与える(Salomon, D.ら、(1995) Critical Reviews in Oncology - Hematology 19:183-232)。

30

【0153】

EGFRの発現レベルは主に、そのmRNAの存在量により調節され、およびEGFR過剰発現の性質は、EGFRの転写速度の高まりに起因すると考えられる(Grandis, J. R. およびTweardy, D. J. (1993) Cancer Res. 53:3579-3584)。最近、研究が、EGFR遺伝子転写活性は、イントロン1における高多型のジヌクレオチドリピート(CAリピート)の数の増加に伴い減少することを示した(Gebhardt F.ら、(1999) J. Bio. Chem. 274:13176-13180)。

40

【0154】

5-FUベースの化学療法に以前失敗した転移性結腸直腸癌患者78人のEGFRの多型ジヌクレオチドリピート(CAリピート)を、5-FU/オキサリプラチンの組み合わせ療法に対する、かれらの応答および全延命を決定するために評価した。CAリピートの数は、フォワードプライマー5'-GTTTGAAGAAATTTGAGCCCAAC-C3' (配列番号) およびリバースプライマー5'-TTCCTTCCTGCACACCTTGGCAC3' (配列番号) を使用する、5'末端標識化ポリメラーゼ連鎖反応により決定した。この反応を、94 で1分間の変性、55 で1分間のアニーリング、および72 で2分間の伸長を伴う28サイクルの間、インキュベートした。反応産物を、Chi, D. D.ら、(1992) Human Molecular Genetics 1:13

50

5 に記載されるように周知の方法を使用することにより、6 % 変性ポリアクリルアミド DNA 配列決定ゲルで分離し、真空プロットし、そして一晚 Kodak XAR フィルムに曝した。

【0155】

患者 38 人を、応答について評価した。全応答率は、18 % であった (7 / 38)。患者の 56 % (4 / 9) は、それぞれ 16 / 18 リピートを有する患者の 6 % (1 / 17) および 16 / 20 リピートを有する患者の 8 % (1 / 12) と比較して、進行した 16 / 16 リピートを有することが見出された ($p = 0.008$ フィッシャーの直接確率検定、両側)。全延命およびそれに関連する多型をまた、評価した。16 / 16 リピートを有する患者については、延命中央値は、66 日であった。16 / 18 リピートを有する患者は、179 日の延命中央値を有した。最後に、16 / 20 リピートを有する患者は、805 日の延命中央値を有した (傾向については $p = 0.1$)。 10

【0156】

本報告は、短い CA リピート (16 / 16) が、EGFR 遺伝子の転写および過剰発現した遺伝子を増加することを示す。そのため短い CA リピート (16 / 16) は、長い CA リピート (16 / 20) と比較して、乏しい予後を有する。

【0157】

(実施例 9 - 上皮増殖因子レセプター (EGFR) 遺伝子発現および多型は、化学放射線処置した直腸癌患者における骨盤再発を予測する)

EGFR は頻繁に、結腸直腸癌を含む多くのタイプの癌において過剰発現され、または変異される。EGFR の過剰発現は、より攻撃性の腫瘍の動きならびに細胞毒性の薬剤および放射線に対する乏しい腫瘍の反応に関連する。インビトロおよび臨床研究は、EGFR の過剰発現を放射線耐性に関連付けた。上記実施例 8 は、EGFR 遺伝子のイントロン 1 におけるジヌクレオチドの繰り返しの長さの多型が、転移性結腸直腸癌患者における 5 - FU / オキサプラチンに対する応答に関連することを示す。インビボデータはまた、このゲノム多型が、EGFR の発現レベルに関連することを示す。 20

【0158】

(方法) 局所的な進行型直腸癌 (UICC II 段階および III 段階) 患者 73 人を、アジュバント放射線化学療法で処置した。年齢中央値 52 歳 (25 歳 ~ 79 歳の範囲) の女性 25 人 (34.2 %) および男性 48 人 (65.8 %) が存在した。患者 31 人 (42.5 %) が、経過観察期間の間に局所的な腫瘍再発が発生した。腫瘍を、高度に分化したもの (G1; 患者 1 人)、中程度に分化したもの (G2; 患者 56 人)、および低分化したもの (G3; 患者 16 人) として、組織病理学的に分類した。組織学的段階は、患者 22 人が T2 段階、患者 51 人が T3 段階を示した。患者 35 人は、リンパ節陰性であって、38 人がリンパ節転移を有した。どの患者も、最初の診断の時に全身性転移を有していなかった。人種背景: 白色人種の患者 50 人、ヒスパニック系 13 人、アジア系 8 人、アフリカ系 - アメリカ人 2 人。患者のデータを、遡及的に集めた。インフォームドコンセントを、本研究に関わる全ての患者に、署名承認させた。下部前方切除 (LAR; $n = 44$)、腹部会陰切除 (APR; $n = 20$)、または経肛門部切除を受けた患者を、5 - FU 注入と骨盤放射線照射により追従した。骨盤放射線照射を、全骨盤に対して 45 Gy の線量で与え、および 54 Gy までの追付上昇を与える。 30 40

【0159】

遺伝子発現分析のためのサンプルを、外科処置をしながら得た。全てのサンプルは、ホルマリン固定され、およびパラフィン包埋された。全てのパラフィン包埋された標本を、腫瘍組織および隣接する正常組織から RNA を単離するためにレーザーカプチャー顕微解剖を行なった。切除後の RNA 単離は、米国特許第 6,248,535 号に従って行なった。RNA 単離に続いて、cDNA を、各サンプルから調製した。cDNA および内部標準遺伝子 (- アクチン) の定量を蛍光ベースのリアルタイム検出法 (ABI PRISM 7900 Sequence Detection System [TaqMan (登録商標)] ; Perkin-Elmer Applied Biosystems, F 40 50

oster City, CA)を使用することにより実施した。PCR混合液は、600 nmol/Lの各プライマー、200 nmol/Lプローブ(使用される配列を、以下に示す)、AmpliTaq(登録商標)Gold polymerase 5単位、各dATP、dCTPおよびdGTPの200 μmol/L、dTTPの400 μmol/L、3.5 mmol/L MgCl₂、およびレファレンス色素を含む1×TaqMan(登録商標)緩衝液A、最終容量20 μLより構成された(全ての薬剤は、Perkin-Elmer Applied Biosystemsより供給された)。サイクル条件は、50 で10秒間および90 で10分間、続く95 で15秒ならびに60 で1分間での46サイクルであった。大腸、肝臓、および肺のRNA(全てStratagene, La Jolla, CA.)を、各プレート上にコントロール検定物質として使用した。血液サンプルを、各個体から採取し、およびゲノムDNAをQiaAmp kit(Qiagen, Valencia, CA)を使用することにより末梢血リンパ球から抽出した。EGFRマイクロサテライト(microsatellite)分析法を周知の手順に従って行なった。簡単に述べると、標準的なPCR反応を5'-³³P-ATP末端標識化フォワードプライマーを用いる周知の方法に従って実施し、および反応産物を6%変性ポリアクリドアミドDNA配列決定ゲル上で分離し、真空プロットしならびに一晩XARフィルム(Eastman-Kodak Co., Rochester NY)に暴露した。EGFR CAリピートの正確な個数をPCR産物の直接配列決定により確定した。

10

20

30

【0160】

(結論)骨盤再発とEGFR遺伝子発現レベルとの間の有意な関連性を直腸の正常組織において見出した。高EGFR遺伝子発現レベルの患者は化学放射線処置した低EGFR遺伝子発現レベル($p = 0.022$ ログランク検定)を有する患者と比較して、骨盤再発についてのより高い相対的危険度(3.8倍)を有した。あり得る関連性の傾向($P = 0.17$ ログランク検定)は、EGFR遺伝子のイントロン1におけるジヌクレオチド繰り返し長さの多型と直腸癌患者における局所的再発までの時間との間に存在する。短い(CA)nリピート(CAリピート<20両者)の患者は、長い(CA)nリピート(CAリピート≥20両者)の患者に比べて、局所的再発までの短い時間を有する。腫瘍組織におけるEGFR遺伝子発現レベルは、化学照射療法処置した患者の直腸における局所的再発までの時間を予測するための統計学的有意性を有しない。

【0161】

これは、正常直腸組織におけるEGFR遺伝子発現レベルおよびEGFR遺伝子のイントロン1におけるジヌクレオチドの繰り返しの長さの多型が、化学照射療法処置した患者の直腸癌における局所再発までの時間に関連し得ることを示す。これらのデータは、正常直腸組織におけるEGFR遺伝子発現レベルおよびEGFR遺伝子の多型が骨盤再発の大きな危険にある患者を同定し得ることを示す。

【0162】

(実施例10-COX-2は、化学療法に関連する臨床毒性を防ぐ)

プロスタグランジン(PG)は、サイクロオキシゲナーゼ(COX)の作用により形成される。二つの関連アイソフォーム(COX-1およびCOX-2)は、アラキドン酸をプロスタグランジンへと変えるが、これらの生理的役割および分布において異なる(Smith W.L.ら、(1996)J Biol Chem. 271:33157-33160)。COX-1(構成的アイソフォーム)は、ヒトの体にわたり多くの細胞型に存在し、および細胞保護プロスタノイドの産生による胃粘膜の維持、適切な血小板機能ならびに腎臓の血流に、特異的に担う。

誘導可能なアイソフォームCOX-2は正常な状態の下では欠失しているが、しかし、サイトカイン、成長因子、分裂促進剤および腫瘍促進剤により誘導され、ならびに炎症、発熱、腫瘍成長、そして、痛みの介在を担う(Hla T.およびNeilson K.(1992)Proc Natl Acad Sci USA 89:7384-7388 およびJones D.A.ら(1993)J. Biol. Chem. 268:9049

50

- 9054)。

【0163】

標準的なNSAIDは、標準的な抗炎症投与量で両アイソフォームを阻害する。COX-2の阻害は、痛みおよび炎症を仲介するPGの形成に関与するので治療効果の説明になる。しかし、併発するCOX-1の阻害により、望まない副作用（例えば、胃の毒性、中度出血特異体質（mild bleeding diathesis）および腎不全）をまた生じる（Dannhardt G. および Kieffer W (2001) Eur. J. Med. Chem. 36: 109 - 126）。最近、サイクロオキシゲナーゼ-2の選択的なインヒビターが、これら望まない副作用のない治療効果をもたらすことが証明された（Reddy B. S. ら (1996) Cancer Res. 56: 4566 - 4569）。

10

【0164】

癌患者（特に疾患の進行段階にある）はしばしば、ひどい痛みを経験するため、効果的な軽減を与える薬物が、必要とされる。しかし、これら痛み止めからの副作用は、必要な化学療法により生じる毒性に干渉し得ることを考慮しなくてはならない。プロスタグランジン経路は、分泌性下痢において重要な役割を果たすため、COX-2の阻害は、化学療法により引き起こされる下痢を実際に減少させ得る（Beubler E. および Sch uligoi R. (2000) Annals of the New York Academy of Sciences. 915: 339 - 46）。動物のデータは、COX-2の阻害がつまり、神経毒性におけるCOX-2の潜在的役割を示すラット脳内に化学的に引き起こされる神経毒性を阻害または防止し得ることを示唆する（Kunz T. および Oliw E. H. (2001) Eur. J. of Neuroscience 13(3): 569 - 75 および Hewett S. J. ら、(2000) J. Pharmacology & Experimental Therapeutics 293(2): 417 - 25）。

20

【0165】

選択的なCOX-2インヒビターは、二つの理由のため化学療法を受ける患者の最も効果的な症状の処置である。第一に、COX-2インヒビターがプロスタグランジンが媒介する痛みおよび炎症の形成を妨げるため、患者の痛みを減少させる。第二に、胃腸管における細胞保護プロスタグランジンの形成は変化しない。

30

化学療法レジメンに由来する酸および薬物のような攻撃的化合物に対する生理的保護は、保持される。これは化学療法由来の少ない副作用を生じ得る。さらに多くの腫瘍において高発現されるPG経路の律速酵素（rate-limiting enzyme）（COX-2）（Bae S. H. ら (2001) Clin. Cancer Res. 7: 1410 - 1418）は、結腸直腸癌の発癌過程に関連することが示唆された（Sano H. ら、Cancer Res. 55: 3785 - 3789 および Hao X. (1999) ら (1999) J. Pathol. 187: 295 - 301）。アゾキシメタンによる結腸直腸腫瘍の誘導は、選択的なCOX-2の阻害によりほぼ完全に抑制されることが示され（Kawamori T. ら (1998) Cancer Res. 58: 409 - 412）、および結腸ポリープは、非選択的NSAID処置後、軽減を示した（Giardiello F. M. ら (1993) N. Engl. J. Med. 328: 1313 - 1316）。

40

【0166】

遡及的な分析において、出願人は200mg日と400mg日との間の用量のセレブレックスは、オキサリプラチン処置した患者の神経毒性に対して保護していることを同定した。患者156人の分析において、そのうちの90人の患者は、オキサリプラチンと5-FUとの組み合わせにおけるセレブレックス処置を有さず、これらの患者のうちの26人はII段階またはIII段階の細胞毒性を発生し、オキサリプラチン/5-FU化学療法との組み合わせにおけるセレブレックス治療を有する患者56人から、3人のみが、II段階または活性化された（lit）神経毒性を発生した。これは大いに統計学的優位であ

50

る ($p < 0.01$)。

【0167】

(実施例11 - マトリックスメタロプロテイナーゼの機能的多型は、進行型結腸直腸癌患者の遠隔転移を予測するのが可能である)

マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) は、細胞外マトリックス (ECM) の分解に関する亜鉛依存性酵素ファミリーのメンバーである。インビトロの研究は、MMP が結合組織タンパク質の配列を分解することが可能であり、これらの酵素が、癌の浸潤および転移を含む様々な病理の工程に関連する結合組織の分解および形成、関節炎における軟骨分解、アテローム硬化のプラーク破裂、ならびに動脈瘤の発生に関わり得ることを示唆する。

10

【0168】

天然に存在する種々の配列変異は、MMP-1 (-1607 1G/2G)、MMP-3 (-161 25A/6A)、およびMMP-9 (-1562 C/T)を含む、多数のMMP遺伝子のプロモーター内に見出された。これら生殖系列の多型は、これらMMP遺伝子プロモーター転写活性に対する対立遺伝子特異的效果を有することを示した。

【0169】

つまり、MMP-1 (コラゲナーゼ-1) 遺伝子のプロモーター内の2G対立遺伝子を保有する患者に由来する卵巣腫瘍組織は、2G対立遺伝子を保有しない患者に由来する卵巣腫瘍組織と比較して、より多くのMMP-1を発現することを示した (Kanamor i Y. ら、(1999) Cancer Research 59:4225-4227)。不十分なMMP-3 (ストロメライン-1) の発現は、血管のマトリックスを引き起こす遺伝子プロモーター内の6A対立遺伝子の存在に起因し、および研究は、6A/6A遺伝子型が、非侵襲性の超音波検査を使用して測定した、増加した頸動脈壁の厚さに関連することを示した (Gnasso A. ら (2000) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology 20:1600-1605)。冠状アテローム硬化症の白人患者のコホート研究において、MMP-9 (ゼラチナーゼB) 遺伝子のC-1562T多型と疾患の重篤度との関連性が、同定され、およびこの関連性は、T対立遺伝子を保有する個体のアテローム発生の間の、血管の平滑筋の移動能ならびに増殖能の増加のためであり得る (Zhang B. ら、(1999) Circulation 99:1788-1794)。

20

30

【0170】

(方法) 1998年から2000年を通して、University of Southern California/Norris Comprehensive Cancer Centerで処置された進行型結腸直腸癌患者472人を、同定した。これら472人の患者のうち、本研究の分析法に適任な60人の患者における、MMP-1、MMP-3、およびMMP-9の多型と転移の部位との間の関連性を、調べた。本研究は、Norris comprehensive Cancer Centerで調査し、およびUniversity of Southern California for Medical SciencesのInstitutional Review Board (IRB) により証明した。各被験体の年齢、人種および経過観察情報を遡及的な病歴審査から得た。

40

【0171】

血液サンプルを各患者から採取し、および対応するゲノムDNAを、QiaAmpキット (Qiagen, Valencia, CA, USA) を使用することにより末梢血リンパ球から抽出した。全てのサンプルをPCR-RFLP技術を使用することにより評価した。制限酵素分解の後、PCR産物を、4%アガロースゲル上で視覚化し、そして分析した。

【0172】

(結果) 本研究の関与者については患者10人のみが、腫瘍進行の前に17ヵ月の経過観察中央値 (95%CI, 10.6-25.3ヶ月) を伴う腹膜癌腫症を有し; および肝

50

臓ならびに／または肺の転移を示した患者50人は、腫瘍進行前34.3ヶ月の経過観察中央値(95%CI, 11.6 - 61.3ヶ月)を有した。これらの患者の年齢の中央値は55.3歳であり(36.2 - 91.1歳)および経過観察の中央値は、30.1ヶ月であった(95%CI, 10.6 - 61.3ヶ月)。

【0173】

MMP-3、およびMMP-9の多型の分析は、統計学的優位を示すに至らなかった(それぞれ $p = 0.18$ および $p = 0.69$)。しかし、MMP-1の高い転写速度に関連した2G対立遺伝子の存在は、腹膜疾患の患者を遠隔転移の患者と比較した場合に転移の部位に関連した($p = 0.08$)。

【0174】

患者14人(23%)はMMP-1 1G/1G遺伝子型を保有し、患者15人(25%)は、2G/2G遺伝子型を有し、および患者30人(50%)はこの改変体に関してヘテロ接合性であった。腹膜癌腫症のみの本研究参加人のうち、40%(4/10)は、1G/1G遺伝子型を有し、一方、2G/2G遺伝子型の参加人0%(0/10)およびヘテロ接合性の参加人60%(6/10)は局所的疾患の症候を示した。遠隔転移を有した患者のうち、20%(10/49)は、ホモ接合性2G対立遺伝子を有する31%(15/49)および異型遺伝子型を有する49%(24/49)と比較して、ホモ接合性1G対立遺伝子を保有した。

【0175】

2G対立遺伝子は、深部侵襲性の原発性腫瘍、それゆえの、皮膚悪性黒色腫(CMM)患者の乏しい予後に関連し、CMMの攻撃性が、MMP-1遺伝子プロモーターの変動により影響を受けることを示唆する(Ye S.ら(2001)Cancer Research 61:1296-1298)。MMP-1発現は、結腸直腸癌の血液性の転移についての新規マーカーとして関係し、その阻害は、転移予防のための方法であり得ることを示す(Sunami E.ら(2000)The Oncologist 5:108-114)。MMP-1免疫応答はまた、リンパ節および肝転移、腫瘍増殖パターンに有意に関連し、そしてさらに、リンパ侵襲、静脈侵襲、ならびに神経侵襲の存在に関連した(Shiozawa J.らThe U.S. and Canadian Academy of Pathology 13(9):925-933)。

【0176】

そのため、2G対立遺伝子の遺伝は、結腸直腸癌および遠隔転移の侵襲に関連付けられることが示された。特に、ホモ接合性2G対立遺伝子を保有する患者は、増加したECMの分解に起因する遠隔転移の発生、血管新生の促進により遺伝的に感受性であり得る。

【0177】

(実施例12 - インターロイキン-8(IL-8)の遺伝子多型とそのレセプターCXCR1との間の関連性および5FU/オキサリプラチン処置した転移性結腸直腸癌患者の延命)

CXCケモカインファミリーのメンバーであるインターロイキン8(IL-8)は腫瘍細胞の増殖および結腸直腸癌の転移に関与していることが知られている(Xie K.(2001)Cytokine Growth Factor Rev 12(4):375-91.)。そのレセプターCXCR1およびCXCR2は、腫瘍の進行ならびに血管新生において欠く事のできない役割を有する(Miller L.J.ら(1998)Anticancer Res. 18(1A):77-81)。研究は、IL-8、CXCR1、およびCXCR2の発現が、インビトロおよびインビボにおける腫瘍の進行そして転移の一因となることを示す(Brew R.ら(2000)Cytokine 12(1):78-85)およびLi A.ら(2001)Clin. Cancer Res. 7(10):3298-304)。IL-8遺伝子のプロモーター領域の多型(T-251A)およびCXCR1遺伝子のエクソン2における新規の多型(Ser+2607Thr)は、IL-8およびそのレセプターの発現に影響し得、そのため転移性結腸直腸癌患者の臨床結果に影響し得る(Hull J.A.ら(2000)Thorax 55(1

10

20

30

40

50

2) : 1023 - 7 および Renzoni E. ら (2000) Arthritis Rheum 43 (7) : 1633 - 40)。インターロイキンの高発現または活性に関連する遺伝子多型を伴う患者は、乏しい予後を有するという仮説をテストした。

【0178】

患者を1998年から2000年の間University of Southern California / Norris Comprehensive Cancer Centerでやさしいオキサリプラチンプロトコル3C-98-3に登録した。化学療法レジメンは、以下：3週間毎にオキサリプラチン130mg/m²および5-FU (200mg/m²/d)の連続注入、であった。全ての患者は、以前に5-FU処置に失敗しており、および79%は付加的な第2ラインのイリノテカン (CPT-11) 処置に失敗した。延命を、5-FU/オキサリプラチン化学療法の開始日から死亡までで決定した。進行までの時間を、化学療法の開始日から、患者が疾患の進行により研究を離れるまでで決定した。最終の経過観察の評価の際に生存していた患者をこの時に検閲した。治療に応答したものを腫瘍の負担が少なくとも6週間で50%以上減少した患者として分類した。進行型疾患を腫瘍の負担において25%以上増加したものとして、または、新しい病巣の出現として定義した。5-FU/オキサリプラチンの開始の後、最初の12週間以内に、応答しなかった患者および進行しなかった患者を、安定した疾患を有するとして分類した。患者4人は応答を評価するには、あまりにも早く、本研究から脱退したが、しかし彼らを、延命の決定に含めた。

10

【0179】

血液サンプルを、各個体から収集し、およびゲノムDNAをQiaAmp キット (Qiagen, Valencia, CA) を使用することにより、末梢血リンパ球から抽出した。IL-8およびCXCR1の多型を、PCR-RFLPを使用することにより行なった。

20

【0180】

(結果) 患者群の全応答率は、9%であった。患者16人のみが、生存し続け、ならびに6ヶ月から18ヶ月までの経過観察期間を続ける。延命の中央値は、9.4ヶ月であり (95% C.I. 7.6 - 12.8)、および進行までの時間の中央値は、5.0ヶ月であった (95% C.I. 4.4 - 6.5)。

【0181】

有意な関係 ($P < 0.05$) を、CXCR1エクソン2のSer + 2607 Thr多型と、ECOG、組織学、または、以前のCPT-11処置により層化された後、5-FU/オキサリプラチン処置した結腸直腸癌患者の全延命との間に見出した。

30

【0182】

CXCR1 GC遺伝子型を有する患者は、ECOG、組織学、または、以前のCPT-11処置により層化された後のGC遺伝子型を有する患者と比較して2.35倍の死亡の相対危険度を有した。IL-8プロモーターの多型と全延命との間に優位な関係は、存在しない。また、臨床応答と両多型との間に優位な関係は存在しない。

【0183】

これは、IL-8レセプターのCXCR1 Ser + 2607 Thr多型が白金ベースの化学療法処置した結腸直腸癌患者の全延命に関連し得ることを示す初めての研究である。

40

【0184】

前述の実施例は、本明細書に記載した発明を例示することを意図するが、限定はされない。

【図面の簡単な説明】

【0185】

【図1】 図1は、分子パラメーターに基づいて直腸癌における局所的再発までの時間を示す。

【図2-1】 図2A ~ 2Bは、直腸癌患者の再発のない生存の推定確率対正常な直腸組織

50

におけるTS、DPD、ERCC1およびVEGFの遺伝子発現を示す。実験の詳細について実験番号1を参照のこと。

【図2-2】図2C~2Dは、直腸癌患者の再発のない生存の推定確率対正常な直腸組織におけるTS、DPD、ERCC1およびVEGFの遺伝子発現を示す。実験の詳細について実験番号1を参照のこと。

【図3】図3は、直腸癌患者の再発のない生存の推定確率対直腸癌組織におけるVEGFの遺伝子発現を示す。実験の詳細について実験番号1を参照のこと。

【図1】

パラメータ	VEG	n	正常組織			p ^a	VEG	n	癌組織			p ^a
			発現	発現率	95% CI				発現	発現率	95% CI	
TS	≤2.5	40	0.46 ± 0.11	1.00	n ^b	<0.0	≤2.5	43	0.53 ± 0.11	1.00	n ^b	0.91
	>2.5	8	0.70 ^b ± 0.15	5.44	1.85-18.91		>2.5	14	0.88 ± 0.14	1.98	0.50-4.33	
DPD	≤1.2	30	-0.38 ± 0.12	1.00	n ^b	0.04	≤1.2	7	0.38 ± 0.21	1.00	n ^b	0.94
	>1.2	13	0.88 ± 0.11	2.11	1.19-8.13		>1.2	44	0.94 ± 0.09	1.54	0.25-6.31	
ERCC-1	≤2.2	40	0.47 ± 0.11	1.80	n ^b	0.03	≤2.2	8	0.75 ± 0.15	1.00	n ^b	0.14
	>2.2	9	0.81 ± 0.18	5.64	1.32-8.93		>2.2	43	0.90 ± 0.08	0.41	0.16-1.03	
VEGF	≤1.4	39	0.45 ± 0.12	1.00	n ^b	0.25	≤1.4	48	0.54 ± 0.10	1.00	n ^b	0.56
	>1.4	18	0.69 ± 0.15	1.01	0.63-4.09		>1.4	7	0.71 ± 0.22	1.71	0.85-4.65	
VEGF	≤2.5	36	0.39 ± 0.11	1.00	n ^b	0.05	≤2.5	38	0.32 ± 0.09	1.00	n ^b	0.03
	>2.5	10	0.85 ± 0.14	2.79	1.05-7.03		>2.5	18	0.91 ± 0.08	2.23	1.30-6.97	

a. Fisher's exact test. b. n: number of patients with no recurrence.

図1

【図2-1】

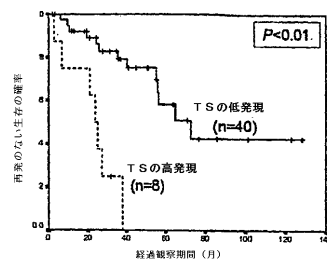


図2A

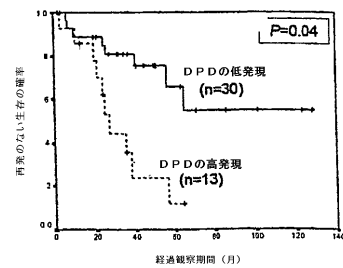


図2B

【図 2 - 2】

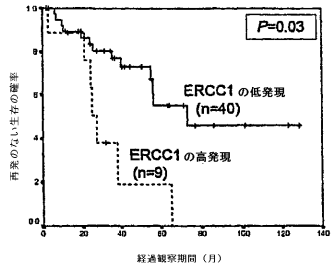


図 2C

【図 3】

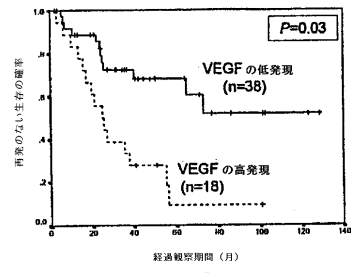


図 3

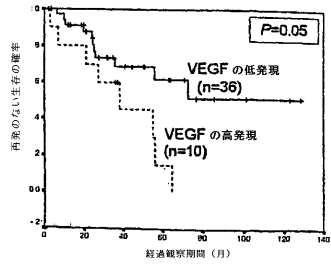


図 2D

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/24065

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : C12Q 1/68; C07H 21/02, 21/04

US CL : 435/6; 536/23.1, 23.5

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)

U.S. : 435/6; 536/23.1, 23.5

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,705,336 A (REED et al) 06 January 1998 (06.01.1998), column 2, lines 3-12, column 3, lines 45-47 and column 8.	1-6, 10 and 11
X	SWEENEY et al. Association between survival after treatment for breast cancer and glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism. Cancer Research. 15 October 2000, Vol. 60, pages 5621-5624, see especially page 5623.	1-5, 10 and 11
X	WEI et al. Molecular basis of the human dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and 5-fluorouracil toxicity. Journal of Clinical Investigations. August 1996, Vol. 98, No. 3, pages 610-615, especially page 615.	1-5
X	EDLER et al. Thymidylate synthase expression: an independent prognostic factor for local recurrence, distant metastasis, disease-free and overall survival in rectal cancer. Clinical Cancer Research. April 2000, Vol. 6, pages 1378-1384, especially page 1382.	1-4, 6, 10, 11
Y		5
X	LEICHMAN et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. Journal of Clinical Oncology. October 1997, Vol. 15, No. 10, pages 3223-3229, especially pages 3227-3228.	1-4, 6, 10, 11
Y		5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

06 July 2004 (06.07.2004)

Date of mailing of the international search report

27 SEP 2004

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. (703) 305-3230

Authorized officer

Carla Myers

Telephone No. 571-272-0747

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/24065

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HORIE et al. Functional analysis and DNA polymorphism of hte tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of hte human gene for thymidylate synthase. Cell Structure and Function. 1995, Vol. 20, pages 191-197, especially page 195.	5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/24065

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

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

Group 1, claims 1-6, drawn to a method for selecting a therapeutic regimen for treating a cancer in a patient, wherein the method comprises screening a suitable cell or tissue isolated from said patient for a genomic polymorphism or phenotype that is correlated to treatment outcome of the cancer.

Group 2, claims 7-9, drawn to a method for reducing chemically induced neurotoxicity associated with chemotherapy in a patient comprising administering an effective amount of COX-2 inhibitor.

Group 3, claims 10-11, a method for determining if a patient is more likely to experience tumor recurrence comprising determining the level of expression of TS, DPD, ERCC1 or VEGF. The inventions listed as Groups I-III 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:

According to PCT Rule 13.2, unity of invention exists only when there is a shared same or corresponding technical feature among the claimed inventions. While Groups I-III are each directed to methods associated with cancer, each group has a different special technical feature not shared by the remaining groups. In particular, Group I is directed to methods for selecting a therapeutic regimen. The methods of Group I require screening a cell or tissue sample for the presence of a genomic polymorphism or genotype that is associated with treatment outcome. The special technical feature of group I is the association between polymorphisms or genotypes and the selection of therapy. The methods of groups II and III do not require detecting a polymorphism or genotype as a means for selecting a therapy. Group II is directed to methods for reducing chemically induced neurotoxicity associated with cancer and has the special technical feature of administering a COX-2 inhibitor. The methods of Groups I and III do not share this special technical feature. Group III is drawn to methods for determining if a patient is more likely to experience tumor recurrence. The special technical feature of Group III is the determination of expression levels as predictive of risk for tumor recurrence. The methods of Groups I and II do not require determining expression levels of TS, DPD, ERCC1 or VEGF as a means for predicting risk for tumor recurrence.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

DIALOG: MEDLINE, CA, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH; WEST: US, EP, JP, WO Patents

search terms: TS, thymidylate synthase., ERCC1, VEGF, ERCC2, XRCC-1, glutathione transferase, GSTP1, EGFR, metalloproteinase, MMP1, MMP3, IL-1, interleukin 8, DPD, pyrimidine dehydrogenase, CXC chemokine, therapy, chemotherapy, treatment, drug, cancer, tumor, carcinoma

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/24065

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

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

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim 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. ☐ Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.: 1-6, 10 and 11
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
☐
☒

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
// C 0 7 D 239/553	C 0 7 D 239/54	C
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A

(31)優先権主張番号 60/400,249

(32)優先日 平成14年7月31日(2002.7.31)

(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM ,ZW

(72)発明者 レンツ, ハインツ - ヨーゼフ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 0 0 1, アルタデナ, ウィンロック アベニュー 2 7 5 3

(72)発明者 シュテールマッハー, ヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 0 1 6, モンロビア, メルローズ アベニュー 1 4 6

(72)発明者 パーク, デービッド (ジョン - ハン)

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 7 4 8, ロウランド ハイッ, イースト コリマ ロード 1 7 8 0 0, ナンバー 3 5 0

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA12 CA04 CA09 HA12

4B063 QA12 QA18 QA19 QQ02 QQ24 QQ40 QQ42 QQ52 QR56 QR62

QS12 QS25 QS34 QX01

4C086 AA01 AA02 BC43 DA32 MA01 MA04 NA05 NA06 ZB26 ZC75

4C206 AA01 AA02 JB16 MA01 MA04 NA05 NA06 ZB26 ZC75