

(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2006-521793

(P2006-521793A)

(43) 公表日 平成18年9月28日(2006.9.28)

(51) Int.C1.	F 1	テーマコード (参考)
C 12Q 1/68	(2006.01)	C 12Q 1/68 Z N A A 4 B O 2 4
C 12N 15/09	(2006.01)	C 12N 15/00 F 4 B O 2 9
C 12M 1/00	(2006.01)	C 12M 1/00 A 4 B O 6 3
G O 1 N 33/15	(2006.01)	C 12N 15/00 A
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/15 Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 55 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-503407 (P2006-503407)	(71) 出願人	505175858 ゲノミック ヘルス, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 94063, レッドウッド シティー, ペノブスコット ドライブ 301
(86) (22) 出願日	平成16年2月5日 (2004.2.5)	(71) 出願人	398062149 セダーズーシナイ メディカル センター
(85) 翻訳文提出日	平成17年8月5日 (2005.8.5)	(71) 出願人	アメリカ合衆国 カリフォルニア 90048 ロサンゼルス ビバリー ブルバード 8700 TBS 290
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/003596	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(87) 國際公開番号	W02004/071572	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(87) 國際公開日	平成16年8月26日 (2004.8.26)		
(31) 優先権主張番号	60/445,968		
(32) 優先日	平成15年2月6日 (2003.2.6)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E G F R インヒビター薬物に応答性の遺伝子発現マーカー

(57) 【要約】

本発明は、癌に関連する予後のマーカーに関する。特に、本発明は、パラフィン包埋され、固定された、癌組織のサンプルにおける遺伝子発現の分子特徴づけに基づく予後的方法に関し、この方法は、患者が、E G F R インヒビターを用いる処置に十分に応答性である可能性があるかどうかを、医師が予測することを可能にする。1つの実施形態において、本発明は、E G F R インヒビターを用いる処置に対する候補である患者が、このような処置に応答する可能性を予測するための方法を提供し、この方法は、患者から得た癌組織サンプルにおける1つ以上の予後のR N A 転写物もしくはその発現産物の発現レベルを決定する工程を包含する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

E G F R インヒビターでの処置の候補である患者が、該処置に応答性である可能性を予測するための方法であって、該方法は、該患者から得た癌組織サンプルにおける 1 種以上の予後の R N A 転写物またはその発現産物の発現レベルを決定する工程であって、ここで、該予後の転写物は、以下：

S T A T 5 A、S T A T 5 B、W I S P 1、C K A P 4、F G F R 1、c d c 2 5 A、R A S S F 1、G - カテニン、H 2 A F Z、N M E 1、N R G 1、B C 1 2、T A G L N、Y B - 1、S r c、I G F 1 R、C D 4 4、D I A B L O、T I M P 2、A R E G、P D G F R a、C T S B、ヘプシン、E r b B 3、M T A 1、G u s および V E G F 10

からなる群より選択される 1 種以上の遺伝子の転写物であり、ここで、(a) S T A T 5 A、S T A T 5 B、W I S P 1、C K A P 4、F G F R 1、c d c 2 5 A、R A S S F 1、G - カテニン、H 2 A F Z、N M E 1、N R G 1、B C 1 2、T A G L N、Y B 1、S r c、I G F 1 R、C D 4 4、D I A B L O、T I M P 2、A R E G、P D G F R a、および C T S B の 1 種以上の転写物または対応する発現産物の過剰発現は、該患者が該処置に対して十分に応答する可能性がないことを示し、そして、(b) ヘプシン、E r b B 3、M T A、G u s、および V E G F の 1 種以上の転写物またはその応答する発現産物の過剰発現は、該患者が、該処置に対して十分に応答する可能性があることを示す、工程を包含する、方法。

【請求項 2】

前記予後の転写物またはその発現産物のうち少なくとも 2 つの前記発現レベルを決定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記予後の転写物またはその発現産物のうち少なくとも 5 つの前記発現レベルを決定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記予後の転写物またはその発現産物の全ての前記発現レベルを決定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記過剰発現が、前記サンプルにおける、全ての測定された遺伝子転写物またはその発現産物の平均発現レベルを参照して決定される、請求項 1 に記載の方法。30

【請求項 6】

前記癌が、卵巣癌、結腸癌、肺臓癌、非小細胞肺癌、乳癌および頭頸部癌からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記組織が、固定され、パラフィン包埋されるか、または、新鮮であるか、もしくは、凍結されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記組織が、細針生検、コア生検または他の型の生検に由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記組織サンプルが、細針吸引、気管支洗浄、または経気管支的生検により得られる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記予後の R N A 転写物の前記発現レベルが、R T - P C R によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記発現産物の前記発現レベルが、免疫組織化学によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

前記発現産物の前記発現レベルが、プロテオミクス技術によって決定される、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記予後のRNA転写物またはその発現産物の測定のためのアッセイが、キットの形態で提供される、請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記EGFRインヒビターが、抗体または抗体フラグメントである、請求項1に記載の方法。

【請求項15】

前記EGFRインヒビターが低分子である、請求項1に記載の方法。

10

【請求項16】

固体表面上に固定された以下の遺伝子：

STAT5A、STAT5B、WISP1、CKAP4、FGFr1、cdcc25A、RASSF1、G-カテニン、H2AFZ、NME1、NRG1、BC12、TAGLN、YB1、Src、IGF1R、CD44、DIABLO、TIMP2、AREG、PDGFRA、CTS B、ヘプシン、Erbb3、MTA、Gus、およびVEGFにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、アレイ。

【請求項17】

以下の遺伝子：

STAT5A、STAT5B、WISP1、CKAP4、FGFR1、cdcc25A、RASSF1、G-カテニン、H2AFZ、NME1、NRG1、BC12、TAGLN、YB1、Src、IGF1R、CD44、DIABLO、TIMP2、AREG、PDGFRA、およびCTS B

にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、アレイ。

20

【請求項18】

以下の遺伝子：

ヘプシン、Erbb3、MTA、Gus、およびVEGF

にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、アレイ。

【請求項19】

前記ポリヌクレオチドがcDNAである、請求項16～18のいずれか1項に記載のアレイ。

30

【請求項20】

前記cDNAが約500～5000塩基長である、請求項19に記載のアレイ。

【請求項21】

前記ポリヌクレオチドがオリゴヌクレオチドである、請求項16～18のいずれか1項に記載のアレイ。

【請求項22】

前記オリゴヌクレオチドが約20～80塩基長である、請求項21に記載のアレイ。

【請求項23】

約330,000のオリゴヌクレオチドを含む、請求項22に記載のアレイ。

40

【請求項24】

前記固体表面がガラスである、請求項16～18のいずれか1項に記載のアレイ。

【請求項25】

患者のための個別のゲノムプロファイルを調製する方法であって、該方法は以下：

(a) 該患者から得た癌組織から抽出したRNAを遺伝子発現分析に供する工程；

(b) 以下：

STAT5A、STAT5B、WISP1、CKAP4、FGFr1、cdcc25A、RASSF1、G-カテニン、H2AFZ、NME1、NRG1、BC12、TAGLN、YB1、Src、IGF1R、CD44、DIABLO、TIMP2、AREG、PDGFRA、CTS B、ヘプシン、Erbb3、MTA、Gus、およびVEGF

50

からなる群より選択される 1 種以上の遺伝子の、該組織における発現レベルを決定する工程であって、該発現レベルは、コントロール遺伝子に対して規準化され、かつ、必要に応じて、対応する癌参照組織セットにおいて見出される量と比較される、工程；ならびに
(c) 該遺伝子発現分析により得られるデータを要約するレポートを作製する工程を包含する、方法。

【請求項 2 6】

前記組織が、固定され、パラフィン包埋された生検サンプルから得られる、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 R N A が断片化されている、請求項 2 6 に記載の方法。

10

【請求項 2 8】

前記レポートが、前記患者が、 E G F R インヒビターを用いる処置に応答する可能性の予測を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記癌が肺癌である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記癌が、結腸癌、頭頸部癌、肺癌および乳癌からなる群より選択される、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記レポートが、前記患者の処置様式のための推奨を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

20

【請求項 3 2】

ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって、以下：

ST A T 5 A 、 ST A T 5 B 、 W I S P 1 、 C K A P 4 、 F G F r 1 、 c d c 2 5 A 、 R A S S F 1 、 G - カテニン、 H 2 A F Z 、 N M E 1 、 N R G 1 、 B C 1 2 、 T A G L N 、 Y B 1 、 S r c 、 I G F 1 R 、 C D 4 4 、 D I A B L O 、 T I M P 2 、 A R E G 、 P D G F R A 、 C T S B 、 ヘプシン、 E r b B 3 、 M T A 、 G u s 、 および V E G F

からなる群より選択される遺伝子を増幅するための方法であって、該方法は、表 3 に列挙される対応するアンプリコン、および、表 4 に列挙される対応するプライマー - プローブセットを使用することによって該 P C R を実施する工程を包含する、方法。

【請求項 3 3】

表 4 に列挙される、 P C R プライマー - プローブセット。

30

【請求項 3 4】

表 3 に列挙される、 P C R アンプリコン。

【請求項 3 5】

予後の方法であって、以下：

(a) 患者から得た癌細胞を含むサンプルを、 ST A T 5 A 、 ST A T 5 B 、 W I S P 1 、 C K A P 4 、 F G F R 1 、 c d c 2 5 A 、 R A S S F 1 、 G - カテニン、 H 2 A F Z 、 N M E 1 、 N R G 1 、 B C 1 2 、 T A G L N 、 Y B 1 、 S r c 、 I G F 1 R 、 C D 4 4 、 D I A B L O 、 T I M P 2 、 A R E G 、 P D G F R a 、 および C T S B からなる群より選択される少なくとも 1 種の遺伝子の R N A 転写物またはその生成物の発現レベルの定量的分析に供する工程；ならびに

40

(b) 該遺伝子またはその生成物の規準化された発現レベルが、規定された発現閾値を上回って上昇する場合、 E G F R インヒビターを用いる処置に十分に対応する減少した可能性を有する可能性があるとして、該患者を同定する工程を包含する、方法。

【請求項 3 6】

前記癌細胞が、非小細胞肺癌 (N S C L C) 細胞、結腸癌細胞、頭頸部癌細胞、肺癌細胞および乳癌細胞からなる群より選択される、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

予後の方法であって、以下：

50

(a) 患者から得た癌細胞を含むサンプルを、ヘプシン、ErbB3、MTA、Gus、およびVEGFからなる群より選択される少なくとも1種の遺伝子のRNA転写物またはその生成物の発現レベルの定量的分析に供する工程、ならびに

(b) 該遺伝子またはその生成物の規準化された発現レベルが、規定された発現閾値を上回って上昇する場合、EGFRインヒビターを用いる処置に十分に応答する増加した可能性を有する可能性があるとして、該患者を同定する、工程を包含する、方法。

【請求項38】

前記癌細胞が、非小細胞肺癌(NSCLC)細胞、結腸癌細胞、頭頸部癌細胞、肺癌細胞および乳癌細胞からなる群より選択される、請求項37に記載の方法。

10

【請求項39】

前記遺伝子のRNA転写物のレベルが、2つ以上のハウスキーピング遺伝子のRNA転写物または生成物の平均レベルに関して基準化されている、請求項35または37に記載の方法。

【請求項40】

前記ハウスキーピング遺伝子が、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)、CypI、アルブミン、アクチン、チューブリン、サイクロフィリンヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HRPT)、L32、28Sおよび18Sからなる群より選択される、請求項39に記載の方法。

20

【請求項41】

前記サンプルが、検出限界より上に存在する全ての遺伝子の全体的な遺伝子発現分析に供される、請求項35または37に記載の方法。

【請求項42】

前記遺伝子のRNA転写物のレベルが、該RNA転写物、または、アッセイされた全ての遺伝子の生成物もしくはそのサブセットの平均シグナルに関して規準化されている、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記RNA転写物のレベルが、定量的RT-PCR(qRT-PCR)により決定され、そして、シグナルが、Ct値である、請求項42に記載の方法。

30

【請求項44】

前記アッセイされた遺伝子が、少なくとも50の癌関連遺伝子を含む、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記アッセイされた遺伝子が、少なくとも100の癌関連遺伝子を含む、請求項43に記載の方法。

【請求項46】

前記患者がヒトである、請求項35または37に記載の方法。

【請求項47】

前記サンプルが、固定され、パラフィン包埋された組織(FPET)サンプルであるか、新鮮な組織サンプルであるか、もしくは凍結した組織サンプルである、請求項46に記載の方法。

40

【請求項48】

前記サンプルが、細針生検、コア生検または他の型の生検に由来する組織サンプルである、請求項46に記載の方法。

【請求項49】

前記定量的分析が、qRT-PCRにより実施される、請求項46に記載の方法。

【請求項50】

前記定量的分析が、前記遺伝子の生成物を定量することによって実施される、請求項46に記載の方法。

【請求項51】

50

前記生成物が、免疫組織化学によってか、または、プロテオミクス技術によって定量される、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

前記患者が、EGFR インヒビターを用いる処置に応答する減少した可能性を有することを示すレポートを作製する工程をさらに包含する、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 53】

前記患者が、EGFR インヒビターを用いる処置に応答する増加した可能性を有することを示すレポートを作製する工程をさらに包含する、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 54】

請求項 1、35 および 37 のいずれか 1 項に記載の方法を実施するのに適切な、(1) 抽出用緩衝液 / 試薬およびプロトコール；(2) 逆転写用緩衝液 / 試薬およびプロトコール；ならびに(3) qPCR 用緩衝液 / 試薬およびプロトコールのうちの 1 つ以上を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の背景)

本願は、米国仮出願番号 60/445,968 (2003 年 2 月 6 日出願) の出願日、米国特許法 119(e) の下の優先権を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、治療用 EGFR インヒビターを用いる処置に対する候補である患者から得られた組織サンプルの遺伝子発現プロファイリングに関する。より具体的には、本発明は、パラフィン包埋され、固定された癌組織サンプルにおける遺伝子発現の分子特徴づけに基づく方法を提供し、この方法は、患者が、EGFR インヒビターを用いる処置に十分に応答性である可能性があるかどうかを医師が予測することを可能にする。

【背景技術】

【0003】

(関連技術の説明)

癌専門医は、「治療の標準」として特徴付けられる化学療法剤、および特定の癌についてのラベル・クレイムを有さないが、その癌における有効性の証拠がある多数の薬物の種々の組み合わせを含む、癌に利用可能な多数の処置の選択肢を有する。良好な処置結果の最良の可能性は、患者が、最適な利用可能な癌処置に割り当てられ、そして、この割り当てが、診断後、可能な限り早くなされることを必要とする。

【0004】

現在、臨床実務において使用される診断試験は、単一の検体であり、従って、数十の異なるマーカー間の公知の関係性の潜在的な価値を捕らえない。さらに、診断試験は、免疫組織化学に依存して、しばしば定量的ではない。この方法は、しばしば、部分的には、試薬が規準化されていないこと、そして、部分的には、解釈が主観的であり、容易に定量化され得ないことに起因して、異なる実験室において異なる結果を生じる。RNA ベースの試験は、しばしば用いられるわけではない。これは、経時的な RNA 分解の問題、および、分析のために、患者から新鮮な組織サンプルを得ることが困難であるという事実によるものである。固定されたパラフィン包埋組織は、より容易に利用可能である。固定された組織は、インサイチュハイブリダイゼーションによる RNA の非定量的検出のために、慣用的に使用されている。しかし、近年の方法は、RT-PCR を使用して、固定された組織における RNA を定量するために確立されている。この技術プラットフォームはまた、複数分析物のアッセイのための基礎を形成し得る。

【0005】

近年、いくつかのグループが、マイクロアレイ遺伝子発現分析による、種々の癌の型の分類に関する研究を発表している（例えば、Golub ら、Science 286: 5

10

20

30

40

50

31-537(1999); Bhattacharjee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 13790-13795 (2001); Chen-Hsiangら、Bioinformatics 17 (Suppl. 1): S316-S322 (2001); Ramaswamyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 15149-15154 (2001)を参照のこと)。遺伝子発現パターンに基づくヒト乳癌の特定の分類がまた報告されている(Martinら、Cancer Res. 60: 2232-2238 (2000); Westら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 11462-11467 (2001); Sorlieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 10869-10874 (2001); Yanら、Cancer Res. 61: 8375-8380 (2001))。しかし、これらの研究のほとんどが、種々の型の癌(乳癌を含む)のすでに確立された分類を改善すること、および洗練することに焦点を当てており、一般には、癌治療の臨床的結果を改善するために、この知見を治療ストラテジーにリンクさせない。

【0006】

現代の分子生物学および生化学が、その活動が、わずかな例外を含めて、腫瘍細胞の挙動、その分化の状態および特定の治療薬に対するその感受性もしくは抵抗性に影響を及ぼす、数百の遺伝子を明らかにしているが、これらの遺伝子の状態は、薬物療法についての臨床的な決定を慣用的になすために活用されてはいない。1つの顕著な例外は、抗エストロゲン薬物(例えば、タモキシフェン)を用いる処置に対して患者を選択するための、乳癌におけるエストロゲンレセプター(ER)タンパク質発現の使用である。別の例外的な例は、Her2アンタゴニスト薬物であるHerceptin(登録商標)(Genentech, Inc., South San Francisco, CA)を用いて患者を選択するため、乳癌におけるerbB2(Her2)タンパク質発現の使用である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

近年の進歩にも関わらず、癌の処置における主要な課題は、特定の処置レジメンを、病理学的に異なる腫瘍型に標的化し、最終的には、結果を最適化するために、腫瘍の処置を個別化することに残ったままである。従って、種々の処置選択肢に対する患者の応答についての予測的な情報を同時に提供する試験に対する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の要旨)

本発明は、EGFRインヒビターを用いた処置に応答したか、または応答しなかった、非小細胞肺癌(NSCLC)を有するヒト患者から得た組織サンプルにおける遺伝子発現の第II相臨床治験の知見に基づく。

【0009】

1つの実施形態において、本発明は、EGFRインヒビターを用いる処置に対する候補である患者が、このような処置に応答する可能性を予測するための方法に関し、この方法は、患者から得た癌組織サンプルにおける1つ以上の予後のRNA転写物もしくはその発現産物の発現レベルを決定する工程を包含し、ここで、予後の転写物は、以下: STAT5A、STAT5B、WISP1、CKAP4、FGFR1、cdc25A、RASSF1、G-カテニン、H2AFZ、NME1、NRG1、BC12、TAGLN、YB-1、Src、IGF1R、CD44、DIABLO、TIMP2、AREG、PDGFRA、CTS B、ヘプシン、erbB3、MTA1、GusおよびVEGからなる群より選択される1つ以上の遺伝子の転写物であり、ここで、(a) STAT5A、STAT5B、WISP1、CKAP4、FGFR1、cdc25A、RASSF1、G-カテニン、H2AFZ、NME1、NRG1、BC12、TAGLN、YB1、Src、IGF1R、CD44、DIABLO、TIMP2、AREG、PDGFRAおよ

び C T S B の 1 つ以上の転写物、または対応する発現産物の過剰発現は、患者が、処置に對して十分に応答性である可能性がないことを示し、そして、(b) ヘプシン、E r b B 3、MTA、Gus および V E G F の 1 つ以上の転写物、または対応する発現産物の過剰発現は、患者が、処置に對して十分に応答性である可能性を示している。

【 0 0 1 0 】

この組織サンプルは、好ましくは、固定され、パラフィン包埋された組織である。組織は、細針生検、吸引生検、気管支洗浄生検または経気管支的生検を含む種々の方法によって得られ得る。

【 0 0 1 1 】

特定の実施形態において、予後の R N A 転写物の発現レベルは、R T - P C R によって決定される。この場合、そして、組織サンプルが、固定され、かつパラフィン包埋されている場合、R T - P C R アンプリコン (P C R プライマーにより補われるポリヌクレオチド配列として規定される) が、好ましくは、1 0 0 塩基長未満であるべきである。他の実施形態において、予後の R N A 転写物の発現産物は、当該分野で公知の他の方法 (例えば、免疫組織化学またはプロテオミクス技術) により決定される。予後の R N A 転写物またはその発現産物を測定するためのアッセイは、キット形式で利用可能であり得る。

【 0 0 1 2 】

別の局面において、本発明は、固体表面上に固定された、以下の遺伝子 : S T A T 5 A、S T A T 5 B、W I S P 1、C K A P 4、F G F R 1、c d c 2 5 A、R A S S F 1、G - カテニン、H 2 A F Z、N M E 1、N R G 1、B C 1 2、T A G L N、Y B 1、S r c、I G F 1 R、C D 4 4、D I A B L O、T I M P 2、A R E G、P D G F r A、C T S B、ヘプシン、E r b B 3、MTA、Gus および V E G F の 1 つ以上にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むアレイに関する。ポリヌクレオチドは、c D N A またはオリゴヌクレオチドであり得る。c D N A は、代表的には、約 5 0 0 塩基長 ~ 5 0 0 0 塩基長であり、一方で、オリゴヌクレオチドは、代表的には、約 2 0 塩基長 ~ 8 0 塩基長である。アレイは、非常に多数の c D N A またはオリゴヌクレオチド (例えば、3 3 0, 0 0 0 までのオリゴヌクレオチド) を含み得る。アレイを提示する固体表面は、たとえば、ガラスであり得る。遺伝子転写物の産物のレベルは、当該分野で公知の任意の技術 (例えば、免疫組織化学またはプロテオミクスを含む) により測定され得る。

【 0 0 1 3 】

種々の実施形態において、アレイは、上に列挙された遺伝子のうち、少なくとも 2 つ、少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、少なくとも 6 つ、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つ、少なくとも 1 0 、少なくとも 1 1 、少なくとも 1 2 、少なくとも 1 3 、少なくとも 1 4 、少なくとも 1 5 、少なくとも 1 7 、少なくとも 1 8 、少なくとも 1 9 、少なくとも 2 0 、少なくとも 2 1 、少なくとも 2 2 、少なくとも 2 3 、少なくとも 2 4 、少なくとも 2 5 、少なくとも 2 6 、または少なくとも 2 7 にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、ハイブリダイゼーションは、ストリンジエントな条件下で行なわれる。

【 0 0 1 4 】

本発明はさらに、患者のための個別化されたゲノムプロフィールを調製する方法に関し、この方法は、以下の工程を包含する :

(a) 患者から得た癌組織から抽出した R N A を、遺伝子発現分析に供する工程 ;
 (b) S T A T 5 A、S T A T 5 B、W I S P 1、C K A P 4、F G F r 1、c d c 2 5 A、R A S S F 1、G - カテニン、H 2 A F Z、N M E 1、N R G 1、B C 1 2、T A G L N、Y B 1、S r c、I G F 1 R、C D 4 4、D I A B L O、T I M P 2、A R E G、P D G F R A、C T S B、ヘプシン、E r b B 3、MTA、Gus および V E G F からなる群より選択される 1 つ以上の遺伝子の、組織における発現レベルを決定する工程であって、この発現レベルは、コントロール遺伝子に対して規準化され、かつ、必要に応じて、対応する癌参照組織セットにおいて見出される量と比較される、工程 ; ならびに

10

20

30

40

50

(c) 上記遺伝子発現分析により得られたデータを要約するレポートを作製する工程。

【0015】

本発明はさらに、S T A T 5 A、S T A T 5 B、W I S P 1、C K A P 4、F G F r 1、c d c 2 5 A、R A S S F 1、G - カテニン、H 2 A F Z、N M E 1、N R G 1、B C 1 2、T A G L N、Y B 1、S r c、I G F 1 R、C D 4 4、D I A B L O、T I M P 2、A R E G、P D G F R A、C T S B、ヘプシン、E r b B 3、M T A、G u s およびV E G F からなる群より選択される遺伝子の、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）による増幅のための方法に関し、この方法は、表3に列挙される対応するアンプリコン、および、表4に列挙される対応するプライマー - プローブセットを使用することによって、上記P C Rを実施する工程を包含する。

10

【0016】

本発明はさらに、表4に列挙される任意のP C Rプライマー - プローブセット、および表3に列挙される任意のP C Rアンプリコンを包含する。

【0017】

なお別の局面において、本発明は、予後的方法に関し、この方法は、以下の工程を包含する：

(a) 患者から得た癌細胞を含むサンプルを、S T A T 5 A、S T A T 5 B、W I S P 1、C K A P 4、F G F R 1、c d c 2 5 A、R A S S F 1、G - カテニン、H 2 A F Z、N M E 1、N R G 1、B C 1 2、T A G L N、Y B 1、S r c、I G F 1 R、C D 4 4、D I A B L O、T I M P 2、A R E G、P D G F R a およびC T S B からなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子のR N A転写物、またはその生成物の発現レベルの定量的分析に供する工程；ならびに

20

(b) 上記遺伝子またはその生成物の規準化された発現レベルが、規定された発現閾値を上回って上昇する場合に、患者を、E G F Rインヒビターを用いる処置に十分に応答する減少した可能性を有する可能性があるとして同定する工程。

【0018】

さらなる局面において、本発明は、予後的方法に関し、この方法は、以下の工程を包含する：

(a) 患者から得た癌細胞を含むサンプルを、ヘプシン、E r b B 3、M T A、G u s およびV E G F からなる群から選択される少なくとも1種の遺伝子のR N A転写物、またはその生成物の発現レベルの定量的分析に供する工程；ならびに

30

(b) 上記遺伝子またはその生成物の規準化された発現レベルが、規定された発現閾値を上回って上昇する場合に、患者を、E G F Rインヒビターを用いる処置に十分に応答する増加した可能性を有する可能性があるとして同定する工程。

【0019】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

(A. 定義)

他に定義されない限り、本明細書中で使用される科学技術用語は、本発明が属する分野の当業者により通常理解される意味と同じ意味を有する。S i n g l e t o n ら、D i c t i o n a r y o f M i c r o b i o l o g y a n d M o l e c u l a r B i o l o g y 第2版, J . W i l e y & Sons (N e w Y o r k , N Y 1 9 9 4) およびM a r c h , A d v a n c e d O r g a n i c C h e m i s t r y R e a c t i o n s , M e c h a n i s m s a n d S t r u c t u r e 第4版, J o h n W i l e y & Sons (N e w Y o r k , N Y 1 9 9 2) は、本願において使用される用語の多くに対して、一般的なガイドを当業者に提供する。

40

【0020】

当業者は、本発明の実施において使用され得る、本明細書中に記載されるものと類似もしくは等価な多くの方法および物質を理解する。実際、本発明は、記載される方法および物質に決して限定されない。本発明の目的のために、以下の用語が以下に定義される。

【0021】

50

用語「マイクロアレイ」とは、ハイブリダイズ可能なアレイ要素、好ましくは、ポリヌクレオチドプロープの、基板上の秩序化された配置をいう。

【0022】

用語「ポリヌクレオチド」は、単数形または複数形で使用される場合、一般に、未修飾のRNAもしくはDNA、または、修飾されたRNAもしくはDNAであり得る、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドをいう。従って、例えば、本明細書中で定義されるようなポリヌクレオチドとしては、一本鎖DNAおよび二本鎖DNA、一本鎖領域および二本鎖領域を含むDNA、一本鎖RNAおよび二本鎖RNA、ならびに、一本鎖領域および二本鎖領域を含むRNA、一本鎖であっても、代表的には、二本鎖であっても、または、一本鎖領域および二本鎖領域を含んでいてもよいDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、本明細書中で使用される場合、用語「ポリヌクレオチド」とは、RNAもしくはDNA、またはRNAおよびDNAの両方を含む三本鎖領域をいう。このような領域における鎖は、同じ分子由来であっても、異なる分子由来であってもよい。この領域は、1つ以上の分子の全てを含み得るが、より代表的には、分子のいくつかの領域のみを含む。三重らせん領域の分子の1つは、しばしば、オリゴヌクレオチドである。用語「ポリヌクレオチド」は、具体的には、cDNAを含む。この用語は、1つ以上の修飾された塩基を含む、DNA(cDNAを含む)およびRNAを包含する。従って、安定性のため、または他の理由のために修飾された骨格を有するDNAまたはRNAは、この用語が本明細書中で意図される「ポリヌクレオチド」である。さらに、異常な塩基(例えば、イノシン)もしくは修飾された塩基(例えば、トリチウム化された塩基)を含むDNAまたはRNAは、本明細書中で定義されるような用語「ポリヌクレオチド」の範囲内に包含される。一般に、用語「ポリヌクレオチド」は、未修飾のポリヌクレオチドの、あらゆる化学的、酵素的および/または代謝的に修飾された形態、ならびに、単細胞および複合細胞を含む、ウイルスおよび細胞に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。

【0023】

用語「オリゴヌクレオチド」は、比較的短いポリヌクレオチドをいい、この例としては、一本鎖デオキシリボヌクレオチド、一本鎖リボヌクレオチドまたは二本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッドおよび二本鎖DNAが挙げられるがこれらに限定されない。一本鎖DNAプロープオリゴヌクレオチドのようなオリゴヌクレオチドは、しばしば、例えば、市販の自動化オリゴヌクレオチド合成装置を使用して、化学的な方法により合成される。しかし、オリゴヌクレオチドは、インビトロでの組換えDNA媒介技術、および細胞および生物体におけるDNAの発現による方法を含む、種々の他の方法によって作製され得る。

【0024】

交換可能に使用される用語「差次的に発現した遺伝子」、「差次的な遺伝子発現」およびその類義語は、その発現が、正常な被験体もしくはコントロールの被験体におけるその発現と比較して、疾患(特に、乳癌のような癌)を罹患する被験体においてより高いレベルもしくはより低いレベルまで活性化される遺伝子を指す。この用語はまた、同じ疾患の異なるステージにおいて、その発現がより高いレベルまたはより低いレベルまで活性化される遺伝子を含む。差次的に発現した遺伝子は、核酸レベルもしくはタンパク質レベルで活性化もしくは阻害され得るか、または、異なるポリペプチド生成物を生じる選択的スプライシングに供され得る。このような差は、例えば、mRNAレベル、表面発現、ポリペプチドの分泌または他の群分離における変化により証明され得る。差次的な遺伝子発現は、2つ以上の遺伝子もしくはその遺伝子産物間の発現の比較、または、2つ以上の遺伝子もしくはその遺伝子産物間の発現率の比較、または、同じ遺伝子の2つの別個にプロセシングされた産物の比較さえも含み得、正常な被験体と疾患(特に癌)を罹患する被験体との間、または同じ疾患の種々のステージ間で異なる。差次的な発現は、例えば、正常細胞および疾患細胞の間、または、異なる疾患事象もしくは疾患ステージを経験した細胞間での、遺伝子もしくはその発現産物における、一時的なもしくは細胞の発現パターンにおける

10

20

30

40

50

る、定量的および定性的両方の差を含む。本発明の目的について、少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約4倍、より好ましくは少なくとも約6倍、最も好ましくは少なくとも約10倍の、正常な被験体および疾患を罹患した被験体における、または、疾患を罹患した被験体における疾患の発生の種々のステージにおける、所定の遺伝子の発現の間の差が存在する場合に、「差次的な遺伝子発現」が存在すると考えられる。

【0025】

RNA転写物に関する用語「過剰発現」は、検体もしくは特定のmRNA参照セットにおいて測定された全ての転写物であり得る、参照mRNAのレベルに対する規準化によって決定される転写物のレベルをいうために使用される。

【0026】

句「遺伝子増幅」とは、複数コピーの遺伝子もしくは遺伝子フラグメントが特定の細胞または細胞株において形成されるプロセスをさす。重複する領域（増幅されたDNAのストレッチ）はしばしば、「アンプリコン」と呼ばれる。通常、生成されるメッセンジャーRNA(mRNA)の量（すなわち、遺伝子の発現レベル）はまた、発現される特定の遺伝子から構成されるコピーの数の割合を増加させる。

【0027】

用語「診断」は、本明細書において、癌に起因する死もしくは進行（非小細胞肺癌または頭頸部癌のような腫瘍性疾患の再発、転移速度および薬物耐性を含む）の可能性の予測を指すために使用される。用語「予測」は、本明細書において、患者が、薬物もしくは薬物のセットに対して有利に応答するか、不利に応答するかのいずれかである可能性、そしてまた、これらの応答の程度、または、原発性腫瘍の外科的除去および／もしくは癌の再発がない特定の期間に間の化学療法の後に、患者が生存する可能性を指すために使用される。本発明の予測方法は、任意の特定の患者に対する最も適切な処置様式を選択することによって、処置決定をなすために、臨床的に使用され得る。本発明の予測方法は、患者が、外科的介入、所定の薬物もしくは薬物の組み合わせを用いる化学療法、および／または放射線療法のような処置レジメンに有利に応答する可能性があるかどうか、あるいは、外科的手術の後および／または化学療法もしくは他の処置様式の終了後に、患者が長期生存する可能性があるかどうかを予測する際に、役立ツールである。

【0028】

用語「長期」生存は、本明細書において、外科的手術または他の処置の後、少なくとも1年間、より好ましくは少なくとも2年間、最も好ましくは、少なくとも5年間の生存を指すために使用される。

【0029】

特定の薬物もしくは処置の選択肢に対する用語「増加した耐性」とは、本発明に従って使用される場合、標準的な用量の薬物または標準的な処置プロトコールに対する減少した応答を意味する。

【0030】

特定の薬物もしくは処置の選択肢に対する用語「減少した感受性」とは、本発明に従って使用される場合、標準的な用量の薬物または標準的な処置プロトコールに対する減少した応答を意味し、この減少した応答は、薬物の用量または処置の強度を増加することによって、（少なくとも部分的に）補償され得る。

【0031】

「患者の応答」とは、患者に対する利益を示す任意のエンドポイントを用いて評価され得、このエンドポイントとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：（1）腫瘍増殖のある程度の阻害（減速および完全な増殖の停止を含む）；（2）腫瘍細胞数の減少；（3）腫瘍サイズの減少；（4）腫瘍細胞の隣接する末梢器官および／または組織への浸潤の阻害（すなわち、減少、減速または完全な停止）；（5）転移の阻害（すなわち、減少、減速または完全な停止）；（6）必ずしもそうでなければならないわけではないが、腫瘍の退行もしくは拒絶を生じ得る、抗腫瘍免疫応答の増強；（7）腫瘍に関連する1つ以上の症状のある程度の軽減；（8）処置後の生存の長さの増加；ならびに／あるいは

10

20

30

40

50

は(9)処置後の所定の時点における死亡率の減少。

【0032】

用語「処置」は、治療的処置および予防的(*prophylactic*)措置または予防的(*preventative*)措置の両方を指し、その目的は、標的化された病理学的状態もしくは障害を回避または減速(減少)することである。処置を必要とする個体としては、既に障害を有する個体、ならびに、障害を有する傾向がある個体、または、障害が防止されるべき個体が挙げられる。腫瘍(例えば、癌)の処置において、治療剤は、腫瘍細胞の病理を直接減少させるか、または、他の治療剤(例えば、照射および/または化学療法)による処置により感受性な腫瘍細胞にし得る。

【0033】

用語「腫瘍」は、本明細書中で使用される場合、悪性であれ、良性であれ、全ての腫瘍細胞、ならびに全ての前癌性および癌性の細胞および組織の増殖(*growth*)および増殖(*proliferation*)を指す。

【0034】

用語「癌」および「癌性」は、代表的に未制御の細胞増殖により特徴付けられる様式の生理学的状態を指すか、または、記載する。癌の例としては、乳癌、結腸癌、肺癌、前立腺癌、肝細胞癌、胃癌、膵臓癌、子宮頸部癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路の癌、甲状腺癌、腎臓癌、癌腫、黒色腫、頭頸部癌、および脳腫瘍が挙げられるがこれらに限定されない。

【0035】

癌の「病理」は、患者の福祉を含む全ての現象を含む。これとしては、異常なもしくは制御不能な細胞増殖、転移、隣接する細胞の正常な機能との干渉、サイトカインもしくは他の分泌生成物の異常なレベルでの放出、炎症性応答もしくは免疫学的応答の抑制もしくは悪化、新生物、前癌性、悪性、周囲もしくは遠隔の組織もしくは器官(例えば、リンパ節)の侵襲が挙げられるがこれらに限定されない。

【0036】

用語「EGFRインヒビター」は、本明細書中で使用される場合、ナイーブな上皮増殖因子レセプター(EGFR)の生物学的機能を阻害する能力を有する分子を指す。従って、用語「インヒビター」は、EGFRの生物学的役割の文脈において規定される。本明細書における好ましいインヒビターは、EGFRと特異的に相互作用(例えば、結合)するが、EGFRシグナル伝達経路の他のメンバーと相互作用することによってEGFRの生物学的活性を阻害する分子はまた、この定義内に具体的に包含される。EGFRインヒビターにより阻害される好ましいEGFRの生物学的活性は、腫瘍の発生、増殖または広がりに関連する。EGFRインヒビターとしては、非ペプチド低分子、抗体、抗体フラグメント、アンチセンス分子およびオリゴヌクレオチドデコイが挙げられるがこれらに限定されない。

【0037】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジエンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、そして一般に、プローブの長さ、洗浄温度および塩濃度に依存する経験的な推測である。一般に、より長いプローブは、適切なアニーリングのためにより高い温度を必要とし、一方で、より短いプローブは、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、一般に、その溶解温度下の環境中に相補鎖が存在する場合、変性したDNAを再びアニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望の相同性の程度がより高ければ、使用され得る相対温度がより高くなる。結果として、より高い相対温度が、反応条件をよりストリンジエントにする傾向があるが、より低い温度は、反応条件をより低いストリンジエントにする傾向がある。ハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーのより詳細および説明については、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience Publishers (1995)を参照のこと。

【0038】

10

20

30

40

50

本明細書中で定義される場合、「ストリンジエントな条件」または「高ストリンジエンシーの条件」とは、代表的には：(1)洗浄のための低いイオン強度および高温(例えば、50において、0.015M 塩化ナトリウム/0.0015M クエン酸ナトリウム/0.1% ドデシル硫酸ナトリウム)を使用するか；(2)ハイブリダイゼーションの間に変性剤(例えば、酔るムアミド)(例えば、42において、50%(v/v)ホルムアミド+0.1% ウシ血清アルブミン/0.1% Ficoll/0.1% ポリビニルピロリドン/50mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)+750mM 塩化ナトリウム、75mM クエン酸ナトリウム)を使用するか；または、(3)42において、50% ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl, 0.075M クエン酸ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1% ピロリン酸ナトリウム、5×Denhard液、超音波処理したサケ精子DNA(50μg/ml)、0.1% SDSおよび10% デキストランサルフェートを使用し、42において0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中で洗浄し、55において50% ホルムアミドを使用し、その後、55において、EDTAを含有する0.1×SSCを含む高ストリンジエンシーの洗浄を行なう。
10

【0039】

「中程度にストリンジエントな条件」とは、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989により記載されるように同定され得、そして、上記のものよりもストリンジエントが低い洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度および%SDS)の使用を含む。中程度にストリンジエントな条件の例は、20% ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mM トリクエン酸ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×Denhard溶液、10% デキストランサルフェートおよび20mg/ml 变性せん断サケ精子DNAを含む溶液中の、37における一晩のインキュベーションと、その後の、約37～50における1×SSCにおけるフィルターの洗浄である。当業者は、必要に応じて、プローブ長などのような因子を調整するための、温度、イオン強度などの調節方法を理解する。本発明の文脈において、任意の特定の遺伝子セットにおいて列挙される遺伝子の「少なくとも1つ」、「少なくとも2つ」、「少なくとも5つ」などに対する参照は、列挙される遺伝子のいずれか1つ、もしくはいずれか、および全ての組み合わせを意味する。
20
30

【0040】

用語「発現閾値」および「規定された発現閾値」は交換可能に使用され、遺伝子産物が、癌の再発を伴うことなく、患者の生存についての予測マーカーとして機能する、上記の質問における遺伝子産物のレベルを指す。閾値は、以下の実施例に記載されるもののような、臨床治験から実験的に規定される。発現閾値は、最大感受性、または、最大選択性、または、最小誤差のいずれかについて選択され得る。任意の状況についての発現閾値の決定は、十分に当業者の知識の範囲内である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0041】

(B. 詳細な説明)

他に示されない限り、本発明の実施は、当該分野の技術範囲内の、分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学および生化学の従来技術を用いる。このような技術は、例えば、以下の文献において完全に説明されている：「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」，第2版(Sambrookら、1989)；「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait編、1984)；「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney編、1987)；「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.)；「Handbook of Experimental Immunology」，第4版(D. M. Weir & C. C. Blackw
40
50

ell 編、Blackwell Science Inc., 1987); 「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」(J. M. Miller & M. P. Calos 編、1987); 「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubelら編、1987); および「PCR: The Polymerase Chain Reaction」(Mullisら編、1994)。

【0042】

(1. 遺伝子発現プロフィール)

一般に、遺伝子発現プロファイリングの方法は、2つの大きな群：ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション分析に基づく方法、およびポリヌクレオチドの配列決定に基づく方法に分けられ得る。最も一般的に使用される、サンプルにおけるmRNA発現の定量のための当該分野で公知の方法としては、ノーザンプロットティングおよびインサイチュハイブリダイゼーション(Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106: 247-283 (1999)); RNase保護アッセイ(Hod, Biotechniques 13: 852-854 (1992)); および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)(Weissら, Trends in Genetics 8: 263-264 (1992))が挙げられる。あるいは、特異的な二重鎖(DNA二重鎖、RNA二重鎖およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖またはDNA-タンパク質二重鎖を含む)を認識し得る抗体が、使用され得る。配列決定ベースの遺伝子発現分析のための代表的な方法としては、遺伝子発現の連続分析(SAGE)および超並列シグネチャー配列決定(MPSS)が挙げられる。

【0043】

(2. 逆転写酵素PCR(RT-PCR))

上記の技術のうち、最も感度が高く、かつ最も柔軟な定量方法は、RT-PCRであり、これは、薬物処置を行なったかまたは行なっていない、正常組織および腫瘍組織において、異なるサンプル集団におけるmRNAレベルを比較して、遺伝子発現のパターンを特徴付け、密接に関連するmRNA間を区別し、そして、RNA構造を分析するために使用され得る。

【0044】

第1の工程は、標的サンプルからのmRNAの単離である。出発物質は代表的には、それぞれ、ヒト腫瘍もしくは腫瘍細胞株、および、対応する正常組織もしくは正常細胞株から単離した総RNAである。従って、RNAは、健常なドナーに由来するプールしたDNAを用いて、種々の原発性腫瘍(胸部、肺、結腸、前立腺、脳腫、肝臓、腎臓、脾臓、脾臓、胸腺、精巣、卵巣、子宮、頭頸部などの腫瘍または腫瘍細胞株を含む)から単離され得る。mRNAの供給源が原発性腫瘍である場合、mRNAは、例えば、凍結されたかもしくは保存されたパラフィン包埋組織サンプルおよび固定された(例えば、ホルマリン固定)組織サンプルから抽出され得る。

【0045】

mRNA抽出のための一般的な方法は、当該分野で周知であり、分子生物学の標準的な教科書(Ausubelら、Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997)を含む)に開示されている。パラフィン包埋組織からRNAを抽出する方法は、例えば、RuppおよびLocker, Lab Invest. 56: A67 (1987)ならびにDeAndresら、Biotechniques 18: 42044 (1995)に開示されている。特に、RNAの単離は、Qiagenのような企業製の精製キット、緩衝液セットおよびプロテアーゼを使用して、製造業者の説明書に従って実施され得る。例えば、培養細胞からの総RNAは、Qiagen RNeasyミニカラムを使用して単離され得る。他の市販のRNA単離キットとしては、Master Pure Complete DNA and RNA Purification Kit (EPICENTRE (登録商標), Madison, WI) およびParaffin Block RNA

10

20

30

40

50

Isolation Kit (Ambion, Inc.) が挙げられる。組織サンプルからの総 RNA は、RNA Stat-60 (Tel-Test) を使用して単離され得る。腫瘍から調製された RNA は、例えば、塩化セシウム密度勾配遠心分離によって単離され得る。

【0046】

RNA は、PCR についてのテンプレートとして機能し得ないので、RT-PCR による遺伝子発現プロファイリングにおける第1の工程は、RNA テンプレートの cDNA への逆転写と、その後の、PCR 反応におけるその指數関数的な増幅である。2つの最も一般的に使用される逆転写酵素は、トリ (avil) 骨髄芽球症ウイルス逆転写酵素 (AMV-RT) およびモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素 (MMLV-RT) である。10 逆転写の工程は、代表的には、環境および発現プロファイリングの目的に依存して、特異的なプライマー、ランダムヘキサマー、またはオリゴ-dT プライマーを使用して開始される。例えば、抽出された RNA は、GeneAmp RNA PCR キット (Perkin Elmer, CA, USA) を使用して、製造業者の指示に従って逆転写され得る。次いで、誘導された cDNA は、その後の PCR 反応におけるテンプレートとして使用され得る。

【0047】

PCR 工程は、種々の熱安定性の DNA 依存性の DNA ポリメラーゼを使用し得るが、代表的には、5' - 3' ヌクレアーゼ活性は有するが、3' - 5' プルーフリーディングエンドヌクレアーゼ活性を欠くTaq DNA ポリメラーゼを使用する。従って、Taq Man (登録商標) PCR は、代表的には、Taq ポリメラーゼまたはTh ポリメラーゼの、ハイブリダイゼーションプローブを加水分解して、その標的アンプリコンに結合させる 5' - ヌクレアーゼ活性を利用するが、等価な 5' ヌクレアーゼ活性を有する任意の酵素が使用され得る。2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、PCR 反応に代表的なアンプリコンを作製する。第3のオリゴヌクレオチドまたはプローブは、2つの PCR プライマー間に位置するヌクレオチド配列を検出するように設計される。プローブは、Taq DNA ポリメラーゼ酵素により伸長可能ではなく、そして、レポーター蛍光色素およびクエンチャー蛍光色素で標識される。レポーター色素からの任意のレーザー励起発光は、2つの色素が、プローブ上にあるように互いに密接して位置付けられる場合に、クエンチング色素によりクエンチされる。増幅反応の間に、Taq DNA ポリメラーゼ酵素は、テンプレート依存性の様式でプローブを切断する。得られるプローブフラグメントは、溶液中で解離し、放出されたレポーター色素からのシグナルが、第2のフルオロフォアのクエンチング効果から開放される。レポーター色素の1つの分子は、合成された新しい分子の各々について遊離され、そして、クエンチされていないレポーター色素の検出は、データの定量的解釈のための基礎を提供する。20 30

【0048】

Taq Man (登録商標) RT-PCR は、例えば、ABI PRISM 7700^T Sequence Detection SystemTM (Perkin-Elmer - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) または Lightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) のような市販の装置を用いて実施され得る。好みの実施形態において、5' ヌクレアーゼ手順は、リアルタイム定量 PCR デバイス (例えば、ABI PRISM 7700^T Sequence Detection System) にて実行される。このシステムは、熱サイクラー、レーザー、電荷結合素子 (CCD) カメラおよびコンピュータから構成される。このシステムは、サンプルを 96 ウェル形式にて、熱サイクラー上で増幅する。増幅の間、96 ウェル全てについて、レーザー励起蛍光シグナルが光ファイバーケーブルを通してリアルタイムで回収され、そして CCD において検出される。このシステムは、機器を実行するためおよびデータを分析するためのソフトウェアを備える。40 50

【0049】

5' - ヌクレアーゼアッセイデータは、最初に、Ct、すなわち、閾値サイクルとして表現される。上で議論されるように、蛍光値が、各サイクルの間に記録され、そして、増幅反応におけるその点に対する、増幅された生成物の量を表す。蛍光シグナルが最初に統計的に有意であると記録される点が閾値サイクル (Ct) である。

【0050】

サンプル毎のバリエーションの誤差および効果を最小限にするために、RT-PCRは通常、内部標準を使用して実施される。同一の内部標準は、異なる組織の間で、比較的一定のレベルで発現され、そして、実験的な処理により影響を受けない。遺伝子の発現パターンを規準化するために頻繁に使用されるRNAは、ハウスキーピング遺伝子であるグリセロアルデヒソド-3-リン酸-デヒドロゲナーゼ (GAPDH) および - アクチンについてのmRNAである。

【0051】

RT-PCR技術のより最近のバリエーションは、リアルタイム定量的PCRであり、これは、二重標識された蛍光プローブ (すなわち、TaqMan (登録商標) プローブ) によってPCR産物の蓄積を測定する。リアルタイムPCRは、各標的配列に対する内部競合物が規準化のために使用される定量的競合的PCR、および、サンプル内に含まれる規準化遺伝子またはRT-PCRのためのハウスキーピング遺伝子を使用する定量的競合的PCRの両方と適合性である。さらなる詳細については、例えば、Hello、Genome Research 6:986-994 (1996) を参照のこと。

【0052】

固定され、パラフィン包埋された組織をRNA供給源として使用して、遺伝子発現をプロファイリングするための代表的なプロトコールの工程 (mRNAの単離、精製、プライマー伸長および増幅を含む) は、種々の刊行された学術文献に示される (例えば: T. E. Godfreyら、J. Molec. Diagnostics 2:84-91 [2000]; K. Spechtら、Am. J. Pathol. 158:419-29 [2001])。簡単に述べると、代表的なプロセスは、パラフィン包埋した腫瘍組織サンプルを約10 μm厚の切片に薄切することから開始する。次いで、RNAを抽出し、そして、タンパク質およびDNAを除去する。RNA濃度を分析した後、必要に応じてRNAの修復および/または増幅工程が含まれられてもよく、そして、RNAが、遺伝子特異的なプロモーターを使用して逆転写されて、その後に、RT-PCRが続く。

【0053】

(3.マイクロアレイ)

差次的な遺伝子発現はまた、マイクロアレイ技術を用いて同定または確認され得る。従って、乳癌関連遺伝子の発現プロフィールは、マイクロアレイ技術を用いて、新鮮な腫瘍組織またはパラフィン包埋された腫瘍組織のいずれかにおいて測定され得る。この方法において、目的のポリヌクレオチド配列 (cDNAおよびオリゴヌクレオチドを含む) が、マイクロチップ基板上にプレーティングされるか、または並べられる。並べられた配列は、次いで、目的の細胞もしくは組織に由来する特定のDNAプローブとハイブリダイズされる。RT-PCR法とまさに同じ様に、mRNAの供給源は、代表的には、ヒト腫瘍または腫瘍細胞株、および対応する正常組織または正常細胞株から単離された総RNAである。従って、RNAは、種々の原発性腫瘍または腫瘍細胞株から単離され得る。mRNAの供給源が原発性腫瘍である場合、mRNAは、例えば、凍結されたか、保存されたパラフィン包埋されかつ固定された (例えば、ホルマリン固定) 組織サンプルから抽出され得、これらのサンプルは、毎日の臨床実務において慣用的に調製および保存されている。

【0054】

マイクロアレイ技術の特定の実施形態において、cDNAクローンのPCR増幅したインサートは、高密度なアレイ内の基板に貼り付けられる。好ましくは、少なくとも10,000のヌクレオチド配列が基板に貼り付けられる。10,000要素ごとにマイクロチップ上に固定化された、マイクロアレイ化遺伝子は、ストリンジメントな条件下でのハイブリダイゼーションに適切である。蛍光標識されたcDNAプローブは、目的の組織から

10

20

30

40

50

抽出したRNAの逆転写による蛍光ヌクレオチドの取込みによって作製され得る。チップに貼り付けられた標識されたcDNAプローブは、このアレイのDNAの各スポットに対して特異的にハイブリダイズする。ストリンジエントな洗浄を行い、非特異的に結合したプローブを取り除いた後、チップは、共焦点レーザー顕微鏡またはCCDカメラのような別の検出方法により走査される。並べられた要素の各々のハイブリダイゼーションの定量は、対応するmRNAの量の評価を可能にする。二色蛍光を用いると、2つのRNA供給源から作製された、別個に標識されたcDNAプローブが、アレイに対してペアを成してハイブリダイズする。特定の遺伝子の各々に対応する2つの供給源に由来する転写物の相対量は、こうして、同時に決定される。ハイブリダイゼーションの小型スケールは、多数の遺伝子についての発現パターンの簡便かつ迅速な評価を可能にする。このような方法は、1細胞あたり数コピーで発現される希な転写物を検出するため、そして、発現レベルの少なくともおよそ2倍差で再現可能に検出するために、必要とされる感度を有することが示されている (Schenkら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (2) : 106-149 (1996))。マイクロアレイ分析は、例えば、Affymetrix GeneChip技術またはAgilent'sマイクロアレイ技術を使用することによって、製造業者のプロトコールに従って、市販の機器によって実施され得る。

10

20

30

40

50

【0055】

遺伝子発現の大規模分析のためのマイクロアレイ法の開発は、分子マーカーを体系的に検索し、種々の腫瘍型における予測を得ることを可能にする。

【0056】

(4. 遺伝子発現の連続分析 (SAGE))

遺伝子発現の連続分析 (SAGE) は、各転写物についての個々のハイブリダイズプローブを提供する必要なく、多数の遺伝子転写物の同時かつ定量的な分析を可能にする方法である。第1に、転写物を固有に同定するための十分な情報を含む短い配列タグ (約10~14bp) が作製されるが、このタグは、各転写物内の固有の位置から得られる。次いで、多くの転写物が互いに連結されて、長い連続した分子を形成し、これを配列決定して、複数のタグのアイデンティティを同時に明らかにし得る。任意の集団の転写物の発現パターンは、個々のタグの量を決定し、そして、各タグに対応する遺伝子を同定することによって、定量的に評価され得る。さらなる詳細については、例えば、Velculescuら、Science 270 : 484-487 (1995)；およびVelculescuら、Cell 88 : 243-51 (1997) を参照のこと。

【0057】

(5. 大量配列決定 (MPSS) による遺伝子発現分析)

Brennerら、Nature Biotechnology 18 : 630-634 (2000) により記載されるこの方法は、非ゲルベースのシグネチャー配列決定と、別個の直径5μmのマイクロビーズ上の数百のテンプレートのインビトロクローニングとを組合せる配列決定アプローチである。第1に、DNAテンプレートのマイクロビーズライブラリーは、インビトロクローニングにより実施される。この次に、フロー・セル内の高密度 (代表的には、 3×10^6 マイクロビーズ/cm²以上) のテンプレート含有マイクロビーズの平面アレイのアセンブリが続く。各マイクロビーズ上のクローニングしたテンプレートの自由端は、DNAフラグメントの分離を必要としない蛍光ベースのシグネチャー配列決定法を使用して、同時に分析される。この方法は、一回の操作で、酵母cDNAライブラリーから数十万の遺伝子シグネチャー配列を同時かつ正確に提供することが示されている。

【0058】

(6. 免疫組織化学)

免疫組織化学法がまた、本発明の予後のマーカーの発現レベルを検出するために適切である。従って、抗体または抗血清、好ましくは、ポリクローナル抗血清、そして最も好ましくは、各マーカーに特異的なモノクローナル抗体が、発現を検出するために使用される。抗体は、例えば、放射標識、蛍光標識、ハプテン標識 (例えば、ビオチン) または酵素

(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ)を使用する、抗体自体の直接標識によって検出され得る。あるいは、未標識の一次抗体は、抗血清、ポリクローナル抗血清または一次抗体に特異的なモノクローナル抗体を含む標識された二次抗体と組合せて使用される。免疫組織化学のプロトコールおよびキットは、当該分野で周知であり、かつ、市販されている。

【0059】

(7. プロテオミクス)

用語「プロテオーム」は、特定の時点における、サンプル(例えば、組織、生物または細胞培養物)中に存在するタンパク質の全体として規定される。プロテオミクスとしては、とりわけ、サンプル内のタンパク質発現の全体的な変化の研究(「発現プロテオミクス」とも呼ばれる)が挙げられる。プロテオミクスは、代表的には、以下の工程を包含する: (1) 2-D ゲル電気泳動(2-D PAGE)による、サンプル内の個々のタンパク質の分離; (2) 例えば、質量分析または N 末端配列決定による、ゲルから回収された個々のタンパク質の同定、および(3) バイオインフォマティクスを使用する、データの分析。プロテオミクス法は、遺伝子発現プロファイリングの他の方法に対する価値ある捕捉であり、本発明の予後のマーカーの生成を検出するために、単独でか、または他の方法と組合せて使用され得る。

【0060】

(8. E G F R インヒビター)

上皮増殖因子レセプター(E G F R)ファミリー(E G F R、e r b - B 2、e r b - B 3 および e r b - B 4 を含む)は、上皮の悪性腫瘍においてしばしば活性化されている増殖因子レセプターのファミリーである。従って、上皮増殖因子レセプター(E G F R)は、例えば、卵巣癌、肺腺癌、非小細胞肺癌{N S C L C}、乳癌および頭頸部癌を含む、いくつかの腫瘍型において活性であることが知られている。いくつかの E G F R インヒビター(例えば、Z D 1 8 3 9(ゲフィニチブまたは I r e s s a としても公知); および O S I 7 7 4(E r l o t i n i b , T a r c e v a))は、癌の処置のための有望な薬物候補である。

【0061】

小さな合成キナズリンである I r e s s a は、E G F R の A T P 結合部位、増殖促進レセプターチロシンキナーゼを完全に阻害し、非小細胞肺癌の処置についての第 I I I 相臨床治験中である。別の E G F R インヒビターである [a g r] シアノ - [b g r] メチル - N - [(トリフルオロメトキシ)フェニル] - プロペンアミド(L F M - A 1 2)は、ヒト乳癌細胞の増殖および侵襲性を阻害することが示されている。

【0062】

C e t u x i m a b は、E G F R および E G F R 依存性の細胞増殖をブロックするモノクローナル抗体である。これは、現在、第 I I I 相臨床治験において試験されている。

【0063】

T a r c e v a ^{T M} は、進行した卵巣癌および非小細胞肺癌および頭頸部癌を有する患者における抗癌活性の有望な指標を示す。

【0064】

本発明は、E G F R インヒビターを用いる処置の候補である患者が、E G F R インヒビターを用いる処置に応答する可能性があるかどうかを予測する、価値ある分子マーカーを提供する。

【0065】

E G F R インヒビターの列挙される例は、薬物の有機低分子と抗 E G F R 抗体分類の両方を表す。本発明の知見は、アンチセンス分子、小さなペプチドなどを含むがこれらに限定されない他の E G F R インヒビターにも同等に適用可能である。

【0066】

(9. m R N A の単離、精製および増幅の一般的な説明)

R N A 供給源として、固定され、パラフィン包埋された組織を使用して、遺伝子発現を

10

20

30

40

50

プロファイリングするための代表的なプロトコールの工程 (mRNA の単離、精製、プライマー伸長および増幅を含む) は、種々の刊行された学術文献に示される (例えば: T. E. Godfrey ら、J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 [2000]; K. Specht ら、Am. J. Pathol. 158: 419-29 [2001])。簡単に述べると、代表的なプロセスは、パラフィン包埋した腫瘍組織サンプルを約 10 μm 厚の切片に薄切することから開始する。次いで、RNA を抽出し、そして、タンパク質および DNA を除去する。RNA 濃度を分析した後、必要に応じて RNA の修復および / または増幅工程が含まれてもよく、そして、RNA が、遺伝子特異的なプロモーターを使用して逆転写されて、その後に、RT-PCR が続く。最終的に、データは、試験される腫瘍差ブルにおいて同定された特徴的な遺伝子発現パターンに基づいて、患者に利用可能な最良な処置選択肢を同定するために分析される。

10

【0067】

(10. 癌遺伝子セット、アッセイされた遺伝子下位配列、および、遺伝子発現データの臨床への応用)

本発明の重要な局面は、癌 (例えば、肺癌) 組織による特定の遺伝子の測定された発現を使用して、予後の情報を提供することである。この目的のために、圧制される RNA の量の差と、使用される RNA の量の可変性の両方を補正する (規準化する) ことが必要である。従って、アッセイは、代表的には、特定の規準化遺伝子 (GAPDH および Cyp I のような周知のハウスキーピング遺伝子を含む) の発現を測定し、そして組み込む。あるいは、規準化は、アッセイされる遺伝子の全てまたはその大きなサブセット (全体的な規準化アプローチ) の平均またはメジアンシグナル (Ct) に基づき得る。遺伝子ごとの観点から、患者の腫瘍 mRNA の、測定され、かつ規準化された量は、癌組織の参照セットにおいて見出される量と比較される。この参照セットにおける癌組織の数 (N) は、異なる参照セットが (概して)、本質的に同じように挙動することを確認するのに十分に多い。この条件が適合する場合、個々のセットに存在する個々の癌組織の同定は、アッセイされる遺伝子の相対量に対して有意な効果を有さない。通常、癌組織参照セットは、少なくとも約 30、好ましくは、少なくとも約 40 の異なる FPE 癌組織生検から構成される。他に記されない限り、各 mRNA / 試験された腫瘍 / 患者についての規準化された発言レベルは、参照セットにおいて測定された発現レベルの百分率として表わされる。より具体的には、十分に多い数 (例えば、40) の腫瘍の参照セットは、各 mRNA 種の規準化されたレベルの分布を生じる。分析されるべき特定の腫瘍サンプルにおいて測定されるレベルは、この範囲内のある百分率に入り、この範囲は、当該分野で周知の方法により決定され得る。以下に、他に記されない限り、遺伝子の発現レベルに対する参照は、参照セットに対する規準化された発現を想定するが、このことは、常に明白に述べられているわけではない。

20

【0068】

本発明のさらなる詳細は、以下の非限定的な実施例から明らかである。

【実施例】

【0069】

(非小細胞肺癌 (NSCLC) における遺伝子発現の第 II 相研究)

40

遺伝子発現研究は、EGFR インヒビターを用いる処置に応答したか、または応答しなかった NSCLC 患者の、パラフィン包埋され、固定された組織サンプルにおける遺伝子発現を分子的に特徴付けるという主な目的を以って、設計および実施した。この結果は、1 つの EGFR インヒビターの使用に基づく。

【0070】

(研究設計)

分子アッセイを、NSCLC と診断された 29 人の個々の患者から得た、パラフィン包埋し、ホルマリン固定した腫瘍組織について行なった。患者は、材料および方法の節において記載されたように実施した組織病理学的評価が、腫瘍組織の適切な量を示した場合に限り、研究に含めた。全ての患者が、NSCLC についての以前の処置歴を有し、前処置

50

の性質は多様であった。

【0071】

(材料および方法)

代表的な腫瘍ブロックの各々を。診断、腫瘍の量および腫瘍のグレードの半定量的な評価のための標準的な組織病理学により特徴付けた。合計6つの切片(各々10ミクロン厚)を調製し、2つのCostar Brand Microcentrifugeチューブ(ポリプロピレン、1.7mLチューブ、透明；各チューブに3つの切片)に入れた。腫瘍が全生検面積の30%未満を構成した場合、サンプルは解剖学者により切開され得、腫瘍組織を直接Costarチューブに入れた。

【0072】

1つ以上の腫瘍ブロックが外科手順の一部として得られた場合、最も代表的な病理のブロックを分析に用いた。

【0073】

(遺伝子発現分析)

mRNAを、固定され、パラフィン包埋された組織サンプルから抽出および精製し、そして、上記のような遺伝子発現分析のために調製した。

【0074】

ABI PRISM 7900TM Sequence Detection SystemTM (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を使用して、定量的な遺伝子発現の分子アッセイを、RT-PCRにより実施した。ABI PRISM 7900TMは、熱サイクラー、レーザー、電荷結合素子(CCD)カメラおよびコンピュータから構成される。このシステムは、サンプルを384ウェル形式にて、熱サイクラー上で増幅する。増幅の間、384ウェル全てについて、レーザー励起蛍光シグナルが光ファイバーケーブルを通してリアルタイムで回収され、そしてCCDにおいて検出される。このシステムは、機器を実行するためおよびデータを分析するためのソフトウェアを備える。

【0075】

(分析および結果)

腫瘍組織を、185の癌関連遺伝子および7の参照遺伝子について分析した。各患者についての閾値サイクル(CT)値を、その特定の患者についての全ての遺伝子の平均に基づいて基準化した。臨床的結果のデータは、全ての患者について利用可能であった。

【0076】

結果を、2つの方法(各々、応答に関して、2つの群に患者を分けた)で評価した。

【0077】

1つの分析は、完全もしくは部分的な応答[RES]を1つの群として、そして、安定な疾患(3ヶ月のmin)または新構成の疾患を1つの群[NR]として分類した。第2の分析は、臨床上の利益の観点から患者をグループ分けし、ここでは、臨床上の利益は、部分的な応答、完全な応答、または3ヶ月における安定な疾患として定義される。

【0078】

応答(部分的な応答および完全な応答)を、Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (RECIST基準)により決定した。安定な疾患を、3ヶ月以上にわたる、進行性の疾患の不在として命名した。

【0079】

(t検定による17人の患者の分析)

分析を、17人の処置された患者全てについて行い、規準化された遺伝子発現と、RES(応答)またはNR(非応答)の二成分の結果との間の関係性を決定した。RESもしくはNRとして分類された患者群についてt検定を実施し、各遺伝子についての群間の差についてのp値を算出した。以下の表は、群間の差についてのp値が<0.10であった、23の遺伝子を列挙する。この場合、応答は、部分的な応答または完全な応答として定義され、前者は、腫瘍の>50%縮小であり、後者は、腫瘍の消失である。示されるよう

10

20

30

40

50

に、応答は、2人の患者において同定した。

【0080】

【表1】

表1

	応答なし 平均	応答あり 平均	t値	df	p	応答 なし 有効数	応答 あり 有効数
STAT5A.1	-0.9096	-2.1940	3.48829	15	0.003302	15	2
STAT5B.2	-0.9837	-2.2811	3.35057	15	0.004380	15	2
WISP1.1	-3.8768	-6.1318	2.88841	15	0.011256	15	2
CKAP4.2	-0.1082	-1.0934	2.54034	15	0.022627	15	2
FGFR1.3	-3.0647	-4.9591	2.42640	15	0.028323	15	2
cdc25A.4	-4.3752	-5.2888	2.28383	15	0.037373	15	2
RASSF1.3	-1.8402	-2.8002	2.28308	15	0.037427	15	2
ErbB3.1	-10.0166	-8.7599	-2.13036	15	0.050103	15	2
GUS.1	-2.2284	-1.2524	-2.12833	15	0.050296	15	2
NRG1.3	-7.6976	-10.2172	2.10836	15	0.052227	15	2
Bcl2.2	-2.4212	-3.9768	2.10197	15	0.052859	15	2
Hepsin.1	-7.2602	-5.0055	-2.09847	15	0.053208	15	2
CTSB.1	3.2027	2.0683	2.06857	15	0.056279	15	2
TAGLN.3	1.7465	0.0009	2.05991	15	0.057199	15	2
YB-1.2	1.3480	0.8782	2.03095	15	0.060374	15	2
Src.2	-0.0393	-0.9239	1.93370	15	0.072248	15	2
IGF1R.3	-2.8269	-3.7970	1.93140	15	0.072553	15	2
CD44s.1	0.0729	-1.3075	1.90370	15	0.076315	15	2
DIABLO.1	-3.6865	-4.4254	1.84770	15	0.084461	15	2
VEGF.1	1.3981	2.3817	-1.82941	15	0.087285	15	2
TIMP2.1	2.5347	1.4616	1.82763	15	0.087565	15	2
AREG.2	-1.5665	-4.5616	1.82558	15	0.087887	15	2
PDGFRa.2	-0.8243	-2.7529	1.79553	15	0.092738	15	2

上記の表1において、より低い平均発現C t値は、より低い発現を示し、逆に、より高い平均発現値は、特定の遺伝子のより高い発現を示す。従って、例えば、STAT5AまたはSTAT5B遺伝子の発現は、EGFRインヒビター処置に応答しなかった患者において、この処置に応答した患者よりもより高かった。従って、STAT5AまたはSTAT5Bの上昇した発現は、EGFRインヒビターを用いる処置の乏しい結果の指標である。言い換えると、STAT5AまたはSTAT5B遺伝子が、NSCLC患者の癌から得た組織サンプルにおいて過剰発現する場合、EGFRインヒビターを用いる処置は、機能する可能性がなく、従って、医師は、代替的な処置選択肢を探すことが賢明である。

【0081】

従って、腫瘍におけるSTAT5A、STAT5B、WISP1、CKAP4、FGFR1、cdc25AまたはRASSF1の上昇した発現は、EGFRインヒビターを用いた処置に十分応答する可能性がないことの指標である。一方で、ErbB3の上昇した発現は、患者が、EGFRインヒビター処置に応答する可能性があることの指標である。

【0082】

以下の表2において、二成分の分析を、部分的な応答、完全な応答または安定な疾患のいずれかとして定義される、臨床上の利益に関して実施した。示されるように、5人の患者は、臨床上の利益についてこれらの基準を満たした。

【0083】

10

20

30

40

【表2】

表2

	利益なし	利益あり	t値	df	p	利益なし	利益あり
	平均	平均				有効数	有効数
G-カテニン .1	0.0595	-0.7060	2.28674	15	0.037164	12	5
ハプシン.1	-7.4952	-5.7945	-2.28516	15	0.037277	12	5
ErbB3.1	-10.1269	-9.2493	-2.09612	15	0.053444	12	5
MTA1.1	-2.3587	-1.6977	-1.94548	15	0.070705	12	5
H2AFZ.2	-1.0432	-1.6448	1.82569	15	0.087869	12	5
NME1.3	0.4774	-0.1769	1.80874	15	0.090578	12	5
LMYC.2	-3.6259	-3.2175	-1.71006	15	0.107853	12	5
AREG.2	-1.3375	-3.3140	1.67977	15	0.113704	12	5
Surfact A1.1	-1.9341	2.9822	-1.63410	15	0.123046	12	5
CDH1.3	-1.3614	-2.1543	1.59764	15	0.130971	12	5
PTPD1.2	-2.7517	-2.0708	-1.52929	15	0.147004	12	5

上記の表2に示されるように、6つの遺伝子が、 $p < 0.1$ で臨床上の利益と相關した。G-カテニン、H2AFZおよびNME1の発現は、抗EGFR処置に応答しなかった患者においてより高かった。従って、これらの遺伝子のより高い発現は、患者が抗EGFR処置から利益を受ける可能性がないことの指標である。逆に、ハプシン、ErbB3およびMTAの発現は、抗EGFR処置に応答した患者においてより高かった。これらの遺伝子のより高い発現は、患者が抗EGFR処置から利益を受ける可能性があることの指標である。

【0084】

表3は、同定された遺伝子のPCR增幅の間に使用される、登録番号およびアンプリコンの配列を示す。

【0085】

表4は、同定された遺伝子のPCR增幅の間に使用される、プライマー／プローブセットの登録番号および配列を示す。各遺伝子について、フォワードプライマー配列番号をf2と同定し、プローブ配列をp2と同定し、そして、リバースプライマー配列をr2と同定する。

【0086】

本明細書中に示されるデータは、NSCLC由来の組織サンプルを使用して得られたが、これらの組織発現プロフィールから引き出される結果は、例えば、結腸癌、卵巣癌、膵臓癌、乳癌および頭頸部癌のような他の癌にも同等に適用可能であることが協調される。

【0087】

本明細書を全体で引用される全ての参考文献は、本明細書により参考として援用される。

【0088】

10

20

30

【表3】

【表4-1】

表4

遺伝子	登録番号	部分名	配列	長さ
NME1	NM_000269	S2528/NME1.p3	CCTGGGACCATCCGTGGAGACTTCT	25
NRG1	NM_013957	S1240/NGR1.f3	CGAGACTCTCCTCATAGTGAAGGTAT	27
NRG1	NM_013957	S1241/NGR1.r3	CTTGGCGTGTGGAAATCTACAG	22
NRG1	NM_013957	S1242/NGR1.p3	ATGACCACCCCGGCTCGTATGTCA	24
PDGFRa	NM_006206	S0226/PDGFRa.f2	GGGAGTTCCAAGAGATGGA	20
PDGFRa	NM_006206	S0227/PDGFRa.p2	CCCAAGACCCGACCAAGCACTAG	23
PDGFRa	NM_006206	S0228/PDGFRa.r2	CTTCAACCACCTTCCCAAAC	20
RASSF1	NM_007182	S2393/RASSF1.f3	AGTGGGAGACACCTGACCTT	20
RASSF1	NM_007182	S2394/RASSF1.r3	TGATCTGGCATTGTACTCC	20
RASSF1	NM_007182	S2395/RASSF1.p3	TTGATCTCTGCTCAATCTCAGCTTGAGA	29
Src	NM_004383	S1820/Src.f2	CCTGAACATGAAGGAGCTGA	20
Src	NM_004383	S1821/Src.r2	CATCACGTCCTCGAACACTCC	19
Src	NM_004383	S1822/Src.p2	TCCCGATGGTCTGCAGCAGCT	21
STAT5A	NM_003152	S1219/STAT5A.f1	GAGGCGCTCAACATGAAATTC	21
STAT5A	NM_003152	S1220/STAT5A.r1	GCCAGGAACACGAGGTTCTC	20
STAT5A	NM_003152	S1221/STAT5A.p1	CGGTTGCTCTGCACCTTCGGCCT	22
STAT5B	NM_012448	S2399/STAT5B.f2	CCAGTGGTGGTGTATCGTTCA	20
STAT5B	NM_012448	S2400/STAT5B.r2	GCAAAAGCATTGTCAGCAGAGA	21
STAT5B	NM_012448	S2401/STAT5B.p2	CAGCCAGGACAACAATGCGACGG	23
TAGLN	NM_003186	S3185/TAGLN.f3	GATGGAGCAGGTGGCTCAGT	20
TAGLN	NM_003186	S3186/TAGLN.r3	AGTCTGGAACATGTCAGTCTTGATG	25
TAGLN	NM_003186	S3187/TAGLN.p3	CCCAGAGTCCTCAGCCGCCTCAG	24
TIMP2	NM_003255	S1680/TIMP2.f1	TCACCCCTCTGTGACTTCATCGT	22
TIMP2	NM_003255	S1681/TIMP2.r1	TGTGGTTCAGGCTCTTCTCTG	22
TIMP2	NM_003255	S1682/TIMP2.p1	CCCTGGGACACCCCTGAGCACCA	22
VEGF	NM_003376	S0286/VEGF.f1	CTGCTGTCTGGGTGCATTG	20
VEGF	NM_003376	S0287/VEGF.p1	TTGCCTTGCTGCTCACCTCCACCA	25
VEGF	NM_003376	S0288/VEGF.r1	GCAGCCTGGGACCAACTTG	18
WISP1	NM_003882	S1671/WISP1.f1	AGAGGCATCCATGAACCTCACA	22
WISP1	NM_003882	S1672/WISP1.r1	CAAACCTCCACAGTACTTGGGTTGA	24
WISP1	NM_003882	S1673/WISP1.p1	CGGGCTGCATCAGCACACGC	20
YB-1	NM_004559	S1194/YB-1.f2	AGACTGTGGAGTTGATGTTGTTGA	30
YB-1	NM_004559	S1195/YB-1.r2	GGAACACCACCAGGACCTGTAA	22
YB-1	NM_004559	S1199/YB-1.p2	TTGCTGCCTCCGCACCCCTTTCT	23

【0090】

【表4-2】

表4

遺伝子	登録番号	部分名	配列	長さ
AREG	NM_001657	S0025/AREG.f2	TGTGAGTCAAATGCCTCTAGTAGTGA	27
AREG	NM_001657	S0026/AREG.p2	CCGTCCCTCGGGAGCCGACTATGA	23
AREG	NM_001657	S0027/AREG.r2	TTGTGGTTCGTTATCATACTCTCTGA	27
Bcl2	NM_000633	S0043/Bcl2.f2	CAGATGGACCTAGTACCCACTGAGA	25
Bcl2	NM_000633	S0044/Bcl2.p2	TTCCACGCCGAAGGACAGCGAT	22
Bcl2	NM_000633	S0045/Bcl2.r2	CCTATGATTAAAGGGCATTTC	24
CD44s	M59040	S3102/CD44s.f1	GACGAAGACAGTCCCTGGAT	20
CD44s	M59040	S3103/CD44s.r1	ACTGGGGTGGAAATGTGTCTT	10 20
CD44s	M59040	S3104/CD44s.p1	CACCGACAGCACAGACAGAACCCC	24
cdc25A	NM_001789	S0070/cdc25A.f4	TCTTGCTGGCTACGCCTCTT	20
cdc25A	NM_001789	S0071/cdc25A.p4	TGTCCCTGTTAGACGTCCCTCCGTCCATA	28
cdc25A	NM_001789	S0072/cdc25A.r4	CTGCATTGTGGCACAGTCTG	21
CKAP4	NM_006825	S2381/CKAP4.f2	AAAGCCTCAGTCAGCCAAGT	20
CKAP4	NM_006825	S2382/CKAP4.r2	AACCAAACGTCCACAGCAG	20
CKAP4	NM_006825	S2383/CKAP4.p2	TCCTGAGCATTTCAGTCCGCCT	24
CTSB	NM_001908	S1146/CTSB.f1	GGCCGAGATCTACAAAAACG	20
CTSB	NM_001908	S1147/CTSB.r1	GCAGGAAGTCCGAATACACA	20
CTSB	NM_001908	S1180/CTSB.p1	CCCCGTGGAGGGAGCTTCTC	21
DIABLO	NM_019887	S0808/DIABLO.f1	CACAATGGCGGCTCTGAAG	19
DIABLO	NM_019887	S0809/DIABLO.r1	ACACAAACACTGTCTGTACCTGAAGA	20 26
DIABLO	NM_019887	S1105/DIABLO.p1	AAGTTACGCTGCGCAGGCCAA	23
ErbB3	NM_001982	S0112/ErbB3.f1	CGGTTATGTCATGCCAGATACAC	23
ErbB3	NM_001982	S0113/ErbB3.p1	CCTCAAAGGTACTCCCTCCTCCGG	25
ErbB3	NM_001982	S0114/ErbB3.r1	GAACTGAGACCCACTGAAGAAAGG	24
FGFR1	NM_023109	S0818/FGFR1.f3	CACGGGACATTACCCACATC	20
FGFR1	NM_023109	S0819/FGFR1.r3	GGGTGCCATCCACTTCACA	19
FGFR1	NM_023109	S1110/FGFR1.p3	ATAAAAAGACAACCAACGGCCGACTGC	27
G-カテニン	NM_002230	S2153/G-Cate.f1	TCAGCAGCAAGGGCATCAT	19
G-カテニン	NM_002230	S2154/G-Cate.r1	GGTGGTTTCTTGAGCGTGTACT	23
G-カテニン	NM_002230	S2155/G-Cate.p1	CGCCCGCAGGCCCTCATCCT	23
GUS	NM_000181	S0139/GUS.f1	CCCACTCAGTAGCCAAGTC	19
GUS	NM_000181	S0140/GUS.p1	TCAAAGTAAACGGGCTGTTTCAAACA	20
GUS	NM_000181	S0141/GUS.r1	CACGCAGGTGGTATCAGTCT	30 27
H2AFZ	NM_002106	S3012/H2AFZ.f2	CCGGAAAGGCCAAGACAA	18
H2AFZ	NM_002106	S3013/H2AFZ.r2	AATACGGCCCCTGGGAAC	20
H2AFZ	NM_002106	S3014/H2AFZ.p2	CCCGCTCGCAGAGAGCCGG	19
ヘプシン	NM_002151	S2269/Hepsin.f1	AGGCTGCTGGAGGTCTATCTC	20
ヘプシン	NM_002151	S2270/Hepsin.r1	CTTCCTGGGCCACAGTCT	19
ヘプシン	NM_002151	S2271/Hepsin.p1	CCAGAGGCCGTTCTGGCCG	21
IGF1R	NM_000875	S1249/IGF1R.f3	GCATGGTAGCCGAAGATTCA	21
IGF1R	NM_000875	S1250/IGF1R.r3	TTCCGGTAATAGTCTGTCTAGATATC	30
IGF1R	NM_000875	S1251/IGF1R.p3	CGCGTCATACCAAAATCTCGATTGAT	28
MTA1	NM_004689	S2369/MTA1.f1	CCGCCCTCACCTGAAGAGA	19
MTA1	NM_004689	S2370/MTA1.r1	GGAATAAGTTAGCCCGCTTCT	40 22
MTA1	NM_004689	S2371/MTA1.p1	CCCAAGTGTCCGCCAAGGAGCG	21
NME1	NM_000269	S2526/NME1.f3	CCAACCCCTGCAGACTCCAA	19
NME1	NM_000269	S2527/NME1.r3	ATGTATAATGTTCTGCCAACTTGTATG	28

【配列表】

39740-0009 PCT.txt

SEQUENCE LISTING

<110> GENOMIC HEALTH, INC.
CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER
AGUS, David
SHAK, Steven
CRONIN, Maureen T.
BAKER, Joffre B.

<120> Gene Expression Markers for Response to
EGFR Inhibitor Drugs

<130> 39740-0009 PCT

10

<140> Not Assigned
<141> 2004-02-05

<150> US 60/445,968
<151> 2003-02-06

<160> 108

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

20

<400> 1
tgtgagtgaa atgccttcta gtagtgaacc gtcctcgaaa gccgactatg actactcaga 60
agagtatgtat aacgaaccac aa 82

<210> 2
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 2
cagatggacc tagtacccac tgagatttcc acgccgaagg acagcgatgg gaaaaatgcc 60
cttaaatcat agg 73

<210> 3
<211> 78
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> Amplicon

<400> 3
gacgaagaca gtccctggat caccgacagc acagacagaa tccctgctac cagagaccaa 60
gacacattcc accccagt 78

<210> 4
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

40

39740-0009 PCT.txt

<223> Amplicon

<400> 4
tcttgctggc tacgcctctt ctgtccctgt tagacgtcct ccgtccatat cagaactgtg 60
ccacaatgca g 71

<210> 5
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 5
aaaggctcag tcagccaaatggagggcggac ttgaaaatgc tcaggactgc tgtggacagt 60
ttggtt 66

<210> 6
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 6
ggccgagatc tacaaaacg gccccgtgga gggagcttc tctgtgtatt cggacttcct 60
gc 62

<210> 7
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 7
caaatggcg gctctgaaga gttggctgtc ggcgcgcgtta acttcattct tcaggtacag 60
acagtgtttg tgt 73

<210> 8
<211> 81
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 8
cggttatgtc atgccagata cacacctaaggtactccc tcctccggg aaggcaccc 60
ttcttcagtg ggtctcagtt c 81

<210> 9
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 9
cacgggacat tcaccacatc gactactata aaaagacaac caacggccga ctgcctgtga 60
agtggatggc accc 74

<210> 10

39740-0009 PCT.txt

<211> 68
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 10
tcagcagcaa gggcatcatg gaggaggatg aggcctgcgg gcccgtac acgctcaaga 60
aaaccacc 68

<210> 11
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 10

<220>
<223> Amplicon

<400> 11
cccaactcgtt agccaagtca caatgtttgg aaaacagccc gtttacttga gcaagactga 60
taccacccgtc gtg 73

<210> 12
<211> 71
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 12
ccggaaaggc caagacaaag gcggtttccc gctcgcagag agccggcttg cagttccag 60
tggggcgat t 71 20

<210> 13
<211> 84
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 13
aggctgctgg aggtcatctc cgtgtgtat tgcccccagag gccgtttctt ggccgcccac 60
tgcccaagact gtggccgcag gaag 84

<210> 14
<211> 83
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 30

<220>
<223> Amplicon

<400> 14
gcatggtagc cgaagatttc acagtcaaaa tcggagattt tggtagacg cgagatatct 60
atgagacaga ctattaccgg aaa 83

<210> 15
<211> 77
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

39740-0009 PCT.txt

<400> 15
ccggccctcac ctgaagagaa acgcgcgtcct tggcggacac tgggggagga gaggagaag 60
cgcggctaac ttattcc 77

<210> 16
<211> 74
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 16
ccaaacctgc agactccaag cctgggacca tccgtggaga cttctgcata caagttggca 60
ggaacattat acat 74

<210> 17
<211> 83
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 17
cgagactctc ctcatagtga aaggatgtg tcagccatga ccaccccgcc tcgtatgtca 60
cctgttagatt tccacacgccc aag 83

<210> 18
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 18
gggagtttcc aagagatgga ctagtgcttg gtcgggtctt ggggtctgga gcgttggga 60
agggtggttga ag 72

<210> 19
<211> 69
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 19
agtgggagac acctgacctt tctcaagctg agattgagca gaagatcaag gagtacaatg 60
cccagatca 69

<210> 20
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amplicon

<400> 20
cctgaacatg aaggagctga agctgctgca gaccatcggg aagggggagt tcggagacgt 60
gatg 64

<210> 21
<211> 77
<212> DNA

39740-0009 PCT.txt

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amplicon

<400> 21

gaggcgctca acatgaatt caaggccgaa gtgcagagca accggggcct gaccaaggag 60
aacctcggtt tcctggc 77

<210> 22

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amplicon

10

<400> 22

ccagtgggtgg tgcgtttca tggcagccag gacaacaatg cgacggccac tggctctgg 60
gacaatgctt ttgc 74

<210> 23

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amplicon

<400> 23

gatggagcag gtggctcagt tcctgaaggc ggctgaggac tctgggtca tcaagactga 60
catgttccag act 73

20

<210> 24

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amplicon

<400> 24

tcaccctctg tgacttcatc gtgcctggg acaccctgag caccacccag aagaagagcc 60
tgaaccaca 69

<210> 25

<211> 71

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amplicon

30

<400> 25

ctgctgtctt ggggtgcattg gaggccttgcc ttgctgtct acctccacca tgccaagtgg 60
tcccaggctg c 71

<210> 26

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amplicon

<400> 26

agaggcatcc atgaacttca cacttgcggg ctgcatcagc acacgctcct atcaacccaa 60

39740-0009 PCT.txt

gtactgttga gtttg	75
<210> 27	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Amplicon	
<400> 27	
agactgttga gtttgatgtt gttgaaggag aaaagggtgc ggaggcagca aatgttacag 60	
gtctctgggtgg tgttcc	76
<210> 28	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> forward primer	
<400> 28	
tgtgagtgaa atgccttcta gtagtga	27
<210> 29	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe	
<400> 29	
ccgtcctcgg gagccgacta tga	23
<210> 30	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> reverse primer	
<400> 30	
ttgtggttcg ttatcatact cttctga	27
<210> 31	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> forward primer	
<400> 31	
cagatggacc tagtacccac tgaga	25
<210> 32	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe	
<400> 32	

39740-0009 PCT.txt	22
ttccacgccc aaggacagcg at	
<210> 33	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> reverse primer	
<400> 33	
cctatgattt aaggcattt ttcc	24
<210> 34	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> forward primer	
<400> 34	
gacgaagaca gtccctggat	20
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> reverse primer	
<400> 35	
actggggtgg aatgtgtctt	20
<210> 36	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe	
<400> 36	
caccgacagc acagacagaa tccc	24
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> forward primer	
<400> 37	
tcttgctggc tacgcctctt	20
<210> 38	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> probe	
<400> 38	
tgtccctgtt agacgtccctc cgtccata	28
	40

39740-0009 PCT.txt

<210> 39
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> reverse primer

<400> 39
ctgcatttg gcacagttct g 21

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence 10

<220>
<223> forward primer

<400> 40
aaagcctcag tcagccaagt 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> reverse primer

<400> 41
aaccaaactg tccacagcag 20
20

<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> probe

<400> 42
tcctgagcat tttcaagtcc gcct 24

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> forward primer 30

<400> 43
ggccgagatc tacaaaaacg 20

<210> 44
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer

<400> 44
gcaggaagtc cgaatacaca 20

39740-0009 PCT.txt

<210> 45		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> probe		
<400> 45		
ccccgtggag ggagctttct c	21	
<210> 46		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> forward primer		
<400> 46		
cacaatggcg gctctgaag	19	
<210> 47		
<211> 26		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 47		
acacaaaacac tgtctgtacc tgaaga	26	
<210> 48		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> probe		
<400> 48		
aagttacgct gcgcgacagc caa	23	
<210> 49		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> forward primer		30
<400> 49		
cggttatgtc atgccagata cac	23	
<210> 50		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> probe		
<400> 50		
cctcaaaggc actccctcct cccgg	25	
<210> 51		

39740-0009 PCT.txt

<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 51		
gaactgagac ccactgaaga aagg	24	
<210> 52		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		10
<223> forward primer		
<400> 52		
cacgggacat tcaccacatc	20	
<210> 53		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 53		
gggtgccatc cacttcaca	19	
<210> 54		
<211> 27		20
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> probe		
<400> 54		
ataaaaagac aaccaacggc cgactgc	27	
<210> 55		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 55		30
tcagcagcaa gggcatcat	19	
<210> 56		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 56		
ggtggttttc ttgagcgtgt act	23	
<210> 57		
<211> 19		

39740-0009 PCT.txt

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 57
 cgcccgcgagg cctcatcct 19
 <210> 58
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220> 10
 <223> forward primer
 <400> 58
 cccactcagt agccaagtca 20
 <210> 59
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> probe
 <400> 59
 tcaagtaaac gggctgtttt ccaaaca 27
 <210> 60
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20
 <220>
 <223> reverse primer
 <400> 60
 cacgcaggtg gtatcagtct 20
 <210> 61
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer
 <400> 61
 ccggaaaggc caagacaa 18 30
 <210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> reverse primer
 <400> 62
 aatacggccc actgggaact 20
 <210> 63
 <211> 19
 <212> DNA
 40

<213> Artificial sequence 39740-0009 PCT.txt

<220>
<223> probe

<400> 63
cccgctcgca gagagccgg

19

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer

<400> 64
aggctgctgg aggtcatctc

20

<210> 65
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer

<400> 65
cttcctgcgg ccacagtct

19

<210> 66
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 66
ccagaggccg tttcttggcc g

21

<210> 67
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer

<400> 67
gcatggtagc cgaagatttc a

21

30

<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer

<400> 68
tttccggtaa tagtctgtct catagatatc

30

<210> 69
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40

39740-0009 PCT.txt

<220>		
<223> probe		
<400> 69		
cgcgctcatac caaaatctcc gattttga	28	
<210> 70		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 70	10	
ccgcctcac ctgaagaga	19	
<210> 71		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 71		
ggaataagtt agccgcgtt ct	22	
<210> 72		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		20
<220>		
<223> probe		
<400> 72		
cccagtgtcc gccaggagc g	21	
<210> 73		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 73		
ccaaccctgc agactccaa	19	
<210> 74	30	
<211> 28		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 74		
atgtataatg ttccctgccaa cttgtatg	28	
<210> 75		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		

39740-0009 PCT.txt

<220>		
<223> probe		
<400> 75		
cctgggacca tccgtggaga cttct	25	
<210> 76		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 76		10
cgagactctc ctcatagtga aaggat	27	
<210> 77		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 77		
cttggcgtgt ggaaatctac ag	22	
<210> 78		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		20
<223> probe		
<400> 78		
atgaccaccc cggctcgat gtca	24	
<210> 79		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 79		
ggagagttcc aagagatgga	20	
<210> 80		30
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> probe		
<400> 80		
cccaagaccc gaccaagcac tag	23	
<210> 81		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		

39740-0009 PCT.txt

<223> reverse primer

<400> 81
cttcaaccac cttcccaaac 20

<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 82
agtggagac acctgacctt 20 10

<210> 83
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 83
tgatctgggc attgtactcc 20

<210> 84
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220> 20

<223> probe

<400> 84
ttgatcttct gctcaatctc agcttgaga 29

<210> 85
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer

<400> 85
cctgaacatg aaggagctga 20

<210> 86
<211> 19
<212> DNA 30
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> reverse primer

<400> 86
catcacgtct ccgaactcc 19

<210> 87
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> probe

39740-0009 PCT.txt

<400> 87		
tccccgatggt ctgcagcagc t	21	
<210> 88		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 88		
gaggcgctca acatgaaatt c	21	
<210> 89		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 89		
gccaggaaca cgaggttctc	20	
<210> 90		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> probe		20
<400> 90		
cggttgctct gcacttcggc ct	22	
<210> 91		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 91		
ccagtggtag tgatcggtca	20	
<210> 92		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		30
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 92		
gcaaaagcat tgtccagag a	21	
<210> 93		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> probe		

39740-0009 PCT.txt

<400> 93	cagccaggac aacaatgcga cg	23
<210> 94		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 94	gatggagcag gtggctcagt	20
<210> 95		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 95	agtctggAAC atgtcagtct tgatg	25
<210> 96		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> probe		
<400> 96	cccaagatcc tcagccgcct tcag	24
<210> 97		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 97	tcaccctctg tgacttcatc gt	22
<210> 98		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 98	tgtggttcag gcttttttc tg	22
<210> 99		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> probe		
<400> 99		

39740-0009 PCT.txt		
ccctgggaca ccctgagcac ca		22
<210> 100		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 100		
ctgctgtctt gggtgatttg		20
<210> 101		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> probe		
<400> 101		
ttgccttgt gctctacctc cacca		25
<210> 102		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 102		
gcagcctggg accacttg		18
<210> 103		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 103		
agaggcatcc atgaacttca ca		22
<210> 104		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 104		
caaactccac agtacttggg ttga		24
<210> 105		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> probe		
<400> 105		
cgggctgcat cagcacacgc		20

39740-0009 PCT.txt

<210> 106		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220>		
<223> forward primer		
<400> 106		
agactgtgga gtttgatgtt gttga	25	
<210> 107		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		10
<220>		
<223> reverse primer		
<400> 107		
ggaacaccac caggacacctgt aa	22	
<210> 108		
<211> 23		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> probe		
<400> 108		
ttgctgcctc cgcacccttt tct	23	
		20

【手続補正書】

【提出日】平成18年3月23日(2006.3.23)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2006521793000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/US2004/003596
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
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 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>HUMPHREYS R C ET AL: "Signal transducer and activator of transcription 5a influences mammary epithelial cell survival and tumorigenesis." CELL GROWTH & DIFFERENTIATION : THE MOLECULAR BIOLOGY JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. OCT 1999, vol. 10, no. 10, October 1999 (1999-10), pages 685-694, XP002286318 ISSN: 1044-9523 page 691, right-hand column - page 692, paragraph 1</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-15, 25-36, 39-52,54
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 26 July 2004		Date of mailing of the international search report 12.11.2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Reuter, U

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No
PCT/US2004/003596

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2002/192652 A1 (DANENBERG KATHLEEN D) 19 December 2002 (2002-12-19) page 5, right-hand column, paragraph 3; claim 1 page 6, right-hand column, last paragraph -----	1-15, 25-36, 39-52,54
X	VEER VAN 'T L J ET AL: "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 415, no. 6871, 31 January 2002 (2002-01-31), pages 530-536, XP002259781 ISSN: 0028-0836 abstract page 532 & [Online] Retrieved from the Internet: URL: http://www.rii.com/publications/data/ArrayData_less_than_5yr.xls STAT5A expression analysis via microarray sentence 1168 -----	25-31,54
X	HINZ MICHAEL ET AL: "Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE. 2 SEP 2002, vol. 196, no. 5, 2 September 2002 (2002-09-02), pages 605-617, XP002286321 ISSN: 0022-1007 page 607, last paragraph - page 608; figure 2 page 610, left-hand column & DATABASE EMBL EMBL; ID HSU43185 13 January 1996 (1996-01-13), "Human signal transducer and activator of transcription-Stat5A" Database accession no. U43185 comprises SED ID NOS 21, and 88-90 abstract ----- -/-	25-34,54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l Application No PCT/US2004/003596
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CRISTILLO ANTHONY D ET AL: "Identification of novel targets of immunosuppressive agents by cDNA-based microarray analysis." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 8 FEB 2002, vol. 277, no. 6, 8 February 2002 (2002-02-08), pages 4465-4476, XP002286319 ISSN: 0021-9258 page 4466; table 1 -----	33,34
X	WO 02/47007 A (EILS ROLAND ; PHASE IT INTELLIGENT SOLUTIONS (DE)) 13 June 2002 (2002-06-13) page 38 - page 40; sequence 26 -----	25-31,54
X	WO 02/24867 A (HERNANDEZ JAVIER MARTIN ; MOVING HELLE OTTE (DK); UNIV AARHUS (DK); NI) 28 March 2002 (2002-03-28) page 5; claim 10 pages 37-38; claim 17 page 56 -----	25-34,54
A	ARTEAGA C L: "THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR: FROM MUTANT ONCOGENE IN NONHUMAN CANCERS TO THERAPEUTIC TARGET IN HUMAN NEOPLASIA" JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, GRUNE AND STRATTON, NEW YORK, NY, US, vol. 19, no. 18, SUPPL, 15 September 2001 (2001-09-15), pages 32S-40S, XP008031982 ISSN: 0732-183X page 37S, left-hand column page 38S, right-hand column -----	1-15, 25-36, 39-52,54
A	GODFREY T E ET AL: "Quantitative mRNA expression analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues using 5' nuclease quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction." THE JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS : JMD. MAY 2000, vol. 2, no. 2, May 2000 (2000-05), pages 84-91, XP002286320 ISSN: 1525-1578 page 84; table 1 -----	1-15, 25-36, 39-52,54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In... application No.

PCT/US2004/003596

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
 table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- in written format
 in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
 filed together with the international application in computer readable form
 furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In application No.
PCT/US2004/003596

Box 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.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box 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:

see additional 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.:

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.:

1-15, 25-36, 39-52, 54 (all partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2004/003596

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially)

A method for predicting the likelihood that a patient will respond to a treatment with an EGFR inhibitor comprising determining the expression level of STAT5A, a method of preparing a personalized genomics profile for a patient comprising determining the expression level of said gene, a method for amplification of said gene, an amplicon of said gene being defined by SEQ ID NO 21, a primer-probe set for the amplification of said amplicon defined by SEQ ID NOs 88-90, a prognostic method comprising determining the expression level of said gene, and a kit comprising reagents for performing said methods.

2. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

A method for predicting the likelihood that a patient will respond to a treatment with an EGFR inhibitor comprising determining the expression level of STAT5B, an array comprising oligonucleotides hybridizing to said gene, a method of preparing a personalized genomics profile for a patient comprising determining the expression level of said gene, a method for amplification of said gene, an amplicon of said gene, a primer-probe set for the amplification of said amplicon, a prognostic method comprising determining the expression level of said gene, and a kit comprising reagents for performing said methods.

3. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

A method for predicting the likelihood that a patient will respond to a treatment with an EGFR inhibitor comprising determining the expression level of WISP1, an array comprising oligonucleotides hybridizing to said gene, a method of preparing a personalized genomics profile for a patient comprising determining the expression level of said gene, a method for amplification of said gene, an amplicon of said gene, a primer-probe set for the amplification of said amplicon, a prognostic method comprising determining the expression level of said gene, and a kit comprising reagents for performing said methods.

4. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for CKAP4

International Application No. PCT/US2004/003596

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

5. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for FGFR1

6. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for cdc25A

7. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for RASSF1

8. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for G-Catenin

9. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for H2AFZ

10. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for NME1

11. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for NRG1

12. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for BC12

13. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for TAGLN

International Application No. PCT/ US2004/ 003596

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

14. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for YB-1

15. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for Src

16. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for IGF1R

17. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for CD44

18. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for DIABLO

19. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for TIMP2

20. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for AREG

21. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for PDGFR α

22. claims: 1-15,25-36,39-52,54 (all partially) 16,17,19-24 (all completely)

idem for CTSB

23. claims: 1-15,25-34,37-51,53 and 54 (all partially) 16,18-24

International Application No. PCT/US2004/003596

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

(all completely)

idem for Hepsin

24. claims: 1-15,25-34,37-51,53 and 54 (all partially) 16,18-24
(all completely)

idem for ErbB3

25. claims: 1-15,25-34,37-51,53 and 54 (all partially) 16,18-24
(all completely)

idem for MTA1

26. claims: 1-15,25-34,37-51,53 and 54 (all partially) 16,18-24
(all completely))

idem for Gus

27. claims: 1-15,25-34,37-51,53 and 54 (all partially) 16,18-24
(all completely)

idem for VEGF

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten application No
PCT/US2004/003596

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 2002192652	A1	19-12-2002	AU	2001202 A	11-06-2002
			AU	3240902 A	11-06-2002
			CA	2436910 A1	06-06-2002
			CN	1488002 T	07-04-2004
			EP	1379686 A2	14-01-2004
			WO	0244413 A2	06-06-2002
			WO	0244423 A2	06-06-2002
			US	2003211530 A1	13-11-2003
<hr/>					
WO 0247007	A	13-06-2002	AU	2800002 A	18-06-2002
			CA	2430142 A1	13-06-2002
			WO	0247007 A2	13-06-2002
			EP	1342201 A2	10-09-2003
			JP	2004524604 T	12-08-2004
			US	2004076984 A1	22-04-2004
<hr/>					
WO 0224867	A	28-03-2002	AU	9121701 A	02-04-2002
			WO	0224867 A2	28-03-2002
			US	2003044803 A1	06-03-2003
			US	2002164576 A1	07-11-2002
			US	2003077590 A1	24-04-2003
			US	2002115058 A1	22-08-2002
			US	2003224460 A1	04-12-2003
			WO	03006688 A2	23-01-2003
			CA	2460642 A1	23-01-2003
			WO	03006689 A2	23-01-2003
			EP	1419276 A2	19-05-2004
<hr/>					

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 37/00	1 0 2

(81)指定国 AP(BW,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,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,MW,MX,MZ,NA,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 アガス , デービッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 2 1 0 , ビバリー ヒルズ , ノース クレセント ドライブ 5 2 2

(72)発明者 シャク , スティーブ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0 , ヒルズバラ , フェアウェイ サークル 6 4 8

(72)発明者 クロニン , モウリーン ティー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 4 , ロス アルトス , アンダーソン ドライブ 7 7 1

(72)発明者 ベイカー , ジョフレ ピー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 3 7 , モンタラ , ピー . オー . ボックス 3 7 1 2 1 2

F ターム(参考) 4B024 AA12 BA80 CA04 CA05 CA09 CA12 DA03 HA12

4B029 AA07 BB20 CC03 FA15

4B063 QA05 QA19 QQ08 QQ53 QQ61 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR55
QR62 QR82 QS25 QS34 QS39