

(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2012-507290

(P2012-507290A)

(43) 公表日 平成24年3月29日(2012.3.29)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|---------------------------------|----------------------|-------------|
| C 1 2 Q 1/68 (2006.01) | C 1 2 Q 1/68 Z N A A | 2 G O 4 5 |
| G O 1 N 33/574 (2006.01) | G O 1 N 33/574 A | 4 B O 2 4 |
| G O 1 N 33/50 (2006.01) | G O 1 N 33/50 P | 4 B O 6 3 |
| C 1 2 N 15/09 (2006.01) | C 1 2 N 15/00 A | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2011-534634 (P2011-534634) | (71) 出願人 | 596047609 ウィリアム・ボーモント・ホスピタル WILLIAM BEAUMONT HOSPITAL アメリカ合衆国 ミシガン 48072 ロイヤル・オーク ウェスト・サーティーン・マイル・ロード 3601 3601 WEST THIRTEEN MILE ROAD, ROYAL OAK, MICHIGAN 48072, UNITED STATES OF AMERICA |
| (86) (22) 出願日 | 平成21年10月22日 (2009.10.22) | (74) 代理人 | 100083806 弁理士 三好 秀和 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成23年6月27日 (2011.6.27) | | |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2009/061670 | | |
| (87) 国際公開番号 | W02010/053717 | | |
| (87) 国際公開日 | 平成22年5月14日 (2010.5.14) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 61/109, 331 | | |
| (32) 優先日 | 平成20年10月29日 (2008.10.29) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオマーカーの使用方法

(57) 【要約】

本発明は、バイオマーカーを用いた癌治療への患者の応答を予測するための方法及び組成物を提供する：YAP - 1、bc1 - 2、VEGF - c、c - met、及びクロードイン - 4。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

頭部癌又は頸部癌に罹患している患者における化学放射線療法の治療への応答を予測するための方法であって、

該患者からの生物学的サンプル中の、

(i) Y A P - 1 ; 又は
 (i i) (b) から選択される少なくとも1つのバイオマーカー、及び (c) から選択される少なくとも一つのバイオマーカー：
 (b) b c l - 2、及び V E G F - c、
 (c) c - m e t 及びクローディン - 4、又は
 (i i i) (i) 及び (i i) の組み合わせ
 のタンパク質又は m R N A のレベルを測定することを含む、方法。

10

【請求項 2】

前記 m R N A のレベルは、

配列番号 1 (Y A P - 1)、
 配列番号 2 (b c l - 2)、
 配列番号 3 (V E G F - c)、
 配列番号 4 (c - m e t)、及び
 配列番号 5 (クローディン - 4)

からなる群より選択される1つ以上の核酸配列のレベルを測定することにより決定される、請求項1に記載の方法。

20

【請求項 3】

前記タンパク質のレベルは、

配列番号 6 (Y A P - 1)、
 配列番号 7 (b c l - 2)、
 配列番号 8 (V E G F - c)、
 配列番号 9 (c - m e t)、及び
 配列番号 10 (クローディン - 4)

からなる群より選択される1つ以上のアミノ酸配列のレベルを測定することにより決定される、請求項1に記載の方法。

30

【請求項 4】

前記頭部癌又は頸部癌は頭頸部の扁平上皮癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記癌は口腔咽頭又は喉頭扁平上皮癌である、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記生物学的サンプルは、腫瘍、癌組織、前癌組織、生検、血液、血清、唾液、又は組織由来である、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記化学放射線療法は、シスプラチン、セツキシマブ、ドセタキセル、及びエルロチニブからなる群から選択される一つ以上の薬剤を投与することを含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 8】

前記化学放射線療法は、シスプラチン及び 5 - フルオロウラシルを投与することを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記タンパク質レベルの決定は、免疫組織化学、イムノアッセイ、タンパク質アッセイ、質量分析、免疫蛍光、又はこれらの組み合わせを用いて行われる、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 10】

前記化学放射線療法の治療に対する応答は、患者が化学療法に不完全応答を示す、請求

50

項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、内容全体が参照として本明細書に包含される、2008年10月29日に出願された米国仮出願第61/109,331号の利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

口腔咽頭及び喉頭SCHNN（頭頸部扁平上皮癌）に対する主要な外科的治療は、根治的放射線治療へ又は単一の治療法として同時化学放射線療法へ、又は臓器の保存に有利な化学療法の併用へと移行してきた。これを支持するために、無作為化試験は、頭頸部の扁平上皮癌の患者の臓器温存のために放射線療法（RT）を使用する利点、及び報告された局所管理の利点だけでなく、放射線療法（CRT）と併用した化学療法の送達による生存率の改善を実証した。現在、PET/CT（陽電子放射断層撮影法/コンピュータ断層撮影）などの最近の画像診断法の出現により、CRTへの臨床的応答を有する初期のリンパ節転移陽性疾患の患者で頸部を観察するのが好ましいため、計画的に頸部を切開することは少なくなっている。

10

【0003】

上記の研究は、主に患者の腫瘍リンパ節 - 転移（TNM）ステージ分類に基づく、現在の治療法の決定のための基礎を提供している。しかし、同じTNMステージの患者でも、治療に対する反応は異なる。これらの患者はしばしば唯一の治療法としてRT及びCRTを受けているので、各患者の、それぞれの治療に応答する可能性を決定すること、及び局所再発のリスクが高い人々を分離することが重要になる。

20

【0004】

腫瘍の一定でない性質のため、何らかの1つのマーカーが予後的又は予測的な価値を有する可能性はさらに低くなる。このように、頭頸部癌患者におけるRT及びCRTに対する臨床応答を予測するために、前処理生検を評価する際に使用するためのバイオマーカーを同定する技術が求められている。

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

一態様において、本発明は、患者からの生物学的サンプル中の、(i) YAP - 1；又は(ii) (b) から選択される少なくとも1つのバイオマーカー、及び(c) から選択される少なくとも一つのバイオマーカー：(b) bcl - 2、及びVEGF - c、(c) はc - met及びクローディン - 4、又は(iii) (i) 及び(ii) の組み合わせのタンパク質又はmRNAのレベルを測定することを含む、頭部癌又は頸部癌に罹患している患者における化学放射線療法の治療への応答を予測するための方法を提供する。特定の態様において、mRNAレベルは、配列番号1（YAP - 1）、配列番号2（bcl - 2）、配列番号3（VEGF - c）、配列番号4（c - met）、及び配列番号5（クローディン - 4）からなる群から選択される一種以上の核酸配列のレベルを測定することにより決定される。別の態様において、タンパク質レベルは、配列番号6（YAP - 1）、配列番号7（bcl - 2）、配列番号8（VEGF - c）、配列番号9（c - met）、及び配列番号10（クローディン - 4）からなる群から選択される一種以上のアミノ酸配列のレベルを測定することにより決定される。特定の態様において、頭部癌又は頸部癌は、頭頸部扁平上皮癌である。別の態様において、癌は口腔咽頭扁平上皮癌及び喉頭扁平上皮癌である。

40

【0006】

さらなる本発明の目的、特徴及び利点は、本明細書の一部を形成している図面及び特許請求の範囲を参照して、以下の開示を再度検討した後に、当業者にとって容易に明らかに

50

なるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は頭頸部扁平上皮癌患者の生検標本におけるYAP-1(A)、bcl-2(B)、VEGF-c(C)、c-met(D)、及びクローディン-4(E)の免疫組織化学的染色を示す。

【図2】図2は、YAP-1、bcl-2、VEGF-c、c-met、及びクローディン-4を高度又は低度発現する患者の、無再発生存率対月数の Kaplan-Meier 曲線を示す。

【図3】図3は、YAP-1、bcl-2及びVEGF-cを高度及び低度に発現する患者の、原因特異的生存率(%)対月数の Kaplan-Meier 曲線を示す。

【発明を実施するための形態】

【0008】

本発明は、頭頸部癌患者の化学放射線療法への応答を予測するバイオマーカーの使用のための方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、患者からの生物学的サンプル中の、(i) YAP-1;又は(ii)(b)から選択される少なくとも一つのバイオマーカー、及び(c)から選択される少なくとも一つのバイオマーカー:(b) bcl-2、及びVEGF-c、(c) c-met及びクローディン-4、又は(iii)(i)及び(ii)の組み合わせのタンパク質又はmRNAのレベルを測定することを含む、頭部又は頸部癌に罹患した患者における化学放射線療法の治療への応答を予測するための方法を提供する。

【0009】

特定の態様において、該方法は、患者からの生物学的サンプル中の、YAP-1(Yes-関連タンパク質 65kDa)、bcl-2(B-細胞CLL/リンパ腫2)、VEGF-c(血管内皮増殖因子C)、c-met、又はクローディン-4のいずれか一つ以上の核酸レベルを測定することを含む。YAP-1、bcl-2、VEGF-c、c-met又はクローディン-4の各々に関連する核酸の具体例を、表1に示す:

【表1】

表 1

| バイオマーカー | 配列番号 | GenBank 受入番号 |
|----------|-------|--------------|
| YAP-1 | 配列番号1 | NM_006106 |
| bcl-2 | 配列番号2 | M14745 |
| VEGF-c | 配列番号3 | BC035212 |
| c-met | 配列番号4 | NM_000245 |
| クローディン-4 | 配列番号5 | NM_001305 |

【0010】

YAP-1、c-met、又はクローディン-4の各々に関連する発現された配列タグ核酸配列の具体例を、表2に示す。

【表2】

表 2

| バイオマーカー | 配列番号 | GenBank 受入番号 |
|----------|--------|--------------|
| YAP-1 | 配列番号11 | AA708798 |
| c-met | 配列番号12 | AA191433 |
| クローディン-4 | 配列番号13 | AA430665 |

【0011】

特定の態様において、該方法は患者からの生物学的サンプル中の、YAP-1、bcl-2、VEGF-c、c-met、又はクローデン-4の一つ以上のタンパク質レベルを測定することを含む。YAP-1、bcl-2、VEGF-c、c-met又はクローデン-4の各々に関連するアミノ酸配列の具体例を、表3に示す：

【表3】

表 3

| バイオマーカー | 配列番号 | GenBank 受入番号 |
|---------|--------|--------------|
| YAP-1 | 配列番号6 | NP_006097 |
| bcl-2 | 配列番号7 | AAA35591 |
| VEGF-c | 配列番号8 | AAH35212 |
| c-met | 配列番号9 | NP_000236 |
| クローデン-4 | 配列番号10 | NP_001296 |

10

【0012】

一つ以上のバイオマーカーのmRNA又はタンパク質発現のレベルを調べるために、頭部又は頭部癌患者の生体試料は、典型的に、アッセイされる。「生物学的サンプル」は、腫瘍、がん組織、前癌組織、生検、血液、血清、唾液、又は組織を含む、頭部癌又は頭部癌に罹患した患者、又はまだ頭頸部癌と診断されていない患者からのサンプルを含む。

20

【0013】

生物学的サンプルは、典型的には、例えばmRNA、cDNA、cRNA、タンパク質などのようなバイオマーカー遺伝子の発現産物の1つ以上について、アッセイされる。

【0014】

一実施形態において、生体サンプルからRNAを含む試料は、バイオマーカーのmRNAレベルを測定するために直接使用される。特定の一実施形態において、RNAは生物学的サンプルから得られる。RNAは、当技術分野において公知の方法を用いて、cDNA（相補的DNA）コピーへと変換される。特定の実施形態においては、cDNAを蛍光標識又は他の検出可能な標識で標識する。cDNAは、目的の一つ又は複数のプローブを含む基質とハイブリダイズする。目的のプローブは、典型的に、目的のDNA配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。特定の態様において、1つ以上の核酸プローブは、65で6xSSC（0.9M NaCl、0.09Mクエン酸ナトリウム、pH7.4）のハイブリダイゼーション条件下で、目的の配列（例えば、配列番号1～5、11～13、又はそのフラグメント（例えば、フラグメントは少なくとも15ヌクレオチド長）のいずれか）とハイブリダイズすることが可能である。プローブは、核酸を含んでよい。核酸の具体例は、DNAである。用語「核酸」はそのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド及びそれらのポリマーを指す。該用語は、合成由来、天然、及び非天然由来であり、参照される核酸と同様の結合特性を有し、参照される核酸と同様の様式で代謝される、既知のヌクレオチド類似体又は修飾されたバックボーン残基又は連結を含む核酸を包含する。このような類似体の具体例には、ホスホロチオエート、ホスホロアミダイト、メチルホスホネート、キラル-メチルホスホネート、及びペプチド-核酸（PNA）が包含されるが、これらに限定されない。

30

40

【0015】

特定の場合において、プローブは長さが約15～約50塩基対である。cDNAのハイブリダイゼーションの量は、蛍光体などの検出可能な標識の存在をアッセイすることによって測定することができる。ハイブリダイゼーションシグナルの量は、試料中の目的の核酸のレベルを定性的又は定量的に測定するために使用することができる。

【0016】

用語「検出可能な標識」は、存在する測定対象又はプローブに共有結合又は非共有結合手段を介して接続されている部分を指す。「検出可能な標識」は、放射性部分、蛍光部分

50

、化学発光部分等であり得る。用語「蛍光標識」は、ある波長の放射エネルギーを受け取り、別の波長の放射エネルギーを放射するラベルを指す。検出可能な標識の存在は、分光手段（例えば、分光光度計）、放射手段（例えば、シンチレーションカウンター）、蛍光、ルミノメーターなどの、特定のラベルを検出するのに適切な、当技術分野における既知の方法を用いてアッセイすることができる。

【0017】

本発明の範囲内には、一つ以上のバイオマーカーの遺伝子配列にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする複数の配列を含むDNAマイクロアレイが含まれる。一つ以上の目的のプローブを含む基質の具体例は、基質に添加されている複数のDNAプローブである。特定の態様において、基質はゲル、ニトロセルロース、ナイロン、石英、ガラス、金属、シリカ系材料、シリカ、樹脂、ポリマー等、又はこれらの組み合わせなどの、一つ以上の材料を含んでよい。一般的に、DNAプローブは、約10~50bpの連続するDNAを含む。特定の態様において、DNAプローブは、連続した約20~約50bpのDNAである。特定の態様において、本発明は、配列番号1~5、11~13の一つ以上に、又は配列番号1~5、11~13のいずれかの相補鎖にストリンジентにハイブリダイズすることができる、複数の配列のマイクロアレイ構成キット及びその使用のための指示書きに関する。キットは、一つ以上のマイクロアレイを含むコンテナ及びこれらの使用のための指示書きを含んでよい。

10

【0018】

生物学的サンプルは、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）、RT-PCR（逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応）、定量PCRなどの、但しこれらに限定されない、核酸を検出することができる方法を使用して、一つ以上のバイオマーカーのmRNAについて分析することもできる。

20

【0019】

特定の態様において、バイオマーカータンパク質のレベルは、遺伝子又はDNA配列（例えば、配列番号6~10のいずれか）のタンパク質の発現産物を検出することによって測定される。タンパク質生成物のレベルは、特定のタンパク質に結合する抗体の使用を含む、当該分野で既知の方法を用いて測定してよい。ポリクローナル又はモノクローナル抗体を含むこれらの抗体は、当該分野で既知の方法を使用して製造することができる。これらの抗体はまた、抗体チップや抗体のマイクロアレイを形成するために、固体基板に結合することができる。抗体又はタンパク質マイクロアレイは、当技術分野で既知の方法を用いて製造することができる。また、免疫組織化学を含むイムノアッセイを用いることができる。特定の態様において、本発明は、配列番号6~10のいずれかに特異的に結合する試薬（抗体など）を含むキット、及びその使用方法についての指示書きに関する。該キットは、一つ以上の試薬を含む容器、及びこれらの使用のための指示書きを含んでよい。さらに、質量分析が、タンパク質又はその断片を検出するために使用されてもよく、及びHPLCのような他の技術と組み合わせて使用してもよい。

30

【0020】

特定の態様における頭頸部癌の治療は、YAP-1、bc1-2、VEGF-c、c-met、及びクローディン-4からなる群より選択される一つ以上のバイオマーカーのmRNA又はタンパク質のレベルを測定することを含む。治療方法は、癌の化学療法剤と放射線からなる群より選択される一つ以上の癌の治療剤の治療有効量を投与することを、典型的にはさらに含む。癌の治療は、手術及び外科処置を含んでもよい。用語「投与する」は、化合物を患者に接触させる方法を指す。「投与」の様式は、癌化学療法剤を、静脈内、腹腔内、鼻腔内、経皮、局所、移植を経由して、皮下、非経口、筋肉内、経口、全身、及び吸着により、接触させることを含む方法を含むが、これらに限定されない。用語「治療」は、治療対象となる癌に関連又は起因する、少なくとも一つの症状又特性の、急性な又は予防的な減退又は緩和を含む。例えば、治療は、癌のいくつかの症状の減退、又は癌の完全撲滅を含むことができる。用語「治療有効量」は、単独で又は他の薬剤と併用投与した場合、治療対象となる癌を阻害、停止、又は改善を可能にするのに十分な、癌化学療

40

50

法剤又はその薬学的に許容される塩の、量を意味する。例えば、ヒトにおける治療上有効量は、特定の疾患と治療される患者のための臨床現場で実験的に決定することができる。適切な剤形、投与量及び投与経路の決定は、医薬品や医療分野における当業者のレベル内であることを理解すべきである。

【0021】

これは適切な治療法を選択する熟練した医療従事者の範囲内である。治療法は、がんの化学療法剤及び/又は放射線の使用を含むことができる。化学放射線療法は、癌に罹患している患者を治療するために、放射線療法及び化学療法の両方を使用することである。放射線及び化学療法を同時に行う必要はなく、例えば、時間、日、又は月等の、時間によって分離することができる。癌化学療法剤は、癌の増殖を鈍化、減速、又は停止する、又は

10

【実施例】

【0022】

目的：頭頸部（SCCHN）の扁平上皮癌患者の、前処理された生検における、VEGF-c、bc1-2、クローディン-4、c-met、及びYAP-1の発現と、臨床転帰とを相関させる。

20

【0023】

方法：1995年12月から2004年11月にかけて、放射線療法単独（RT）又は同時シスプラチンベースの化学放射線療法（CRT）を施行した臨床病期II-IVAのSCCHNの86人の患者を選択した。VEGF-c、bc1-2、クローディン-4、YAP-1及びc-metのタンパク質の免疫組織化学染色（IHC）を、86人全ての患者から得られた治療前の生検標本について行った。染色は、2人の独立した観察者によって、陽性細胞の強度や割合に応じて評価した。

30

【0024】

結果：追跡期間の中央値は33.8ヶ月であった。12人の患者はIR（不完全応答）を経験し、11人の患者は中央値期間12.6ヶ月で再発した。再発のうち、7例はLR（局所再発）を有することが明らかにされ、及び4人の患者が遠隔転移を有することが明らかにされた。原因特異的生存率（CSS）及び無再発生存率（RFS）はそれぞれ、2年で85%及び90%、3年で81%及び84%であった。IRのための予測バイオマーカーが増加した：VEGF-c（ $P=0.02$ ）、YAP-1（ $P<0.01$ ）、クローディン-4（ $P<0.01$ ）、c-met（ $p<0.01$ ）及びbc1-2（ $P=0.02$ ）。RFSの予測バイオマーカーは、YAP-1（ $p=0.01$ ）及びbc1-2（ $P<0.01$ ）であった。CSSの予測バイオマーカーは、YAP-1（ $P=0.04$ ）、VEGF-c（ $P=0.03$ ）、及びクローディン-4（ $P=0.03$ ）であった。

40

【0025】

結論：すべてのバイオマーカーは、IRについて予測的であった。加えて、クローディン-4及びVEGF-cは、CSSについて、そしてbc1-2はRFSについて予測的であった。YAP-1はすべてのエンドポイントの予測について普遍的マーカーであった。上記のマーカーを使用して、臨床現場で個々の遺伝子プロファイルを解析することで、成果を向上させることを可能にする患者特異的な治療ができる可能性がある。

【0026】

材料と方法

患者

50

このヒト調査委員会 (Human Investigation Committee) が承認した研究に対して、William Beaumont 病院で、1995年5月～2004年7月にかけて、中咽頭及び喉頭の扁平上皮癌に対して一次RT又はCRTで継続的に治療された130人の患者が特定された。45人の患者が、非黒色腫 (non-melanomatous) 皮膚癌を除く癌の既往歴、外部機関での治療、治療の記録が使用不能であるか又は分析に使用できる組織の欠如が原因で、解析から除外された。1995年12月から2004年11月にかけて、RT単独 (n = 47) 又はCRT (N = 39) のいずれかの治療を受けた、臨床ステージ I - IVa の口腔咽頭 (N = 30) と、ステージ I - IVa の喉頭 (N = 56) の SCC HN である86人の患者を、分析のために選択した。

10

【0027】

治療

原発部位を、6 mV の光子で処理した。早期の喉頭の患者については、5 × 5 又は 6 × 6 のフィールドボックスを利用した二次元放射線治療計画を使用した。2004年以前に、残りの患者のほとんどは、三次元原体照射で治療され、その後、強度変調放射線治療が最大限に正常組織を残すために使用された。15人の患者は、1日2回、週5日の割合で、画分 (fraction) あたり 120 cGy (センチグレイ) の治療を受けた。71人の患者は、1日1回、週5日の割合で、画分あたり 180 ~ 225 cGy の範囲の治療を受けた。原発部位への総投与量の中央値は、7000 cGy (2400 cGy ~ 8160 cGy の範囲) であり、全体的な処理時間の中央値は、50日 (16 ~ 69日の範囲) であった。1人の患者は、治療コンプライアンスの困難性に続く小分割照射投与計画で 2400 cGy を受けた。すべてのCRT患者は、放射線治療と並行して供給されるプラチナベースの化学療法を受けた。治療に対する応答は、上咽頭鏡検査、コンピュータ断層撮影、及び/又は生検を用いて治療中及び治療後に評価した。放射線治療終了後6ヶ月以内の任意の局所領域での再発は、部分的応答又は応答なしのいずれかとして定義される、不完全応答と考えられていた。

20

【0028】

腫瘍サンプル

腫瘍サンプルは、上記の86人の患者からの制度的ヒト治験委員会 (institutional human investigational committee) の承認を得て収集した。腫瘍のすべてを、ホルマリンで固定し、そしてパラフィンワックスに包埋した。頭頸部病理学者は、各事例の病理組織学を、ヘマトキシリン及びエオシン染色切片の光学顕微鏡により検討し、免疫組織化学を実行するための適切な組織の領域を同定した。

30

【0029】

組織アレイ

1 ~ 4 個の 1.5 mm パンチ生検を、ヘマトキシリン/エオシン (H & E) 染色した切片中の代表的な腫瘍を含む領域を顕微鏡による同定した後、パラフィン包埋標本から採取した。パンチ生検を、その後、新しいパラフィンブロックに取り付け、個々のブロックで最大 100 検体を得た。5 µm の切片を、免疫組織化学的分析のための正規の方法で切断した。

40

【0030】

免疫組織化学

VEGF、bc1-2、クローディン-4、YAP-1 及び c-met についての免疫組織化学染色 (IHC) は、86人の患者全てから得られた検前生検標本について行った。組織アレイ技術を、各試料中の目的の領域を分析するために使用した。これらの領域を、病理学者と一緒にマークした。ヘマトキシリン/エオシン (H & E) を、特定の切片を染色するために使用した。5種類のタンパク質を検出するために、免疫組織化学を、Discovery XT System (Ventana, Tucson, AZ) を使用して、以下の希釈率で完了した: bc1-2 (1:200)、c-met (1:50)、クロー

50

ディン - 4 (1 : 5 0)、VEGF - c (1 : 1 0 0)、及びYAP - 1 (1 : 2 5)。抗原賦活化は、pH 6 のクエン酸緩衝液を用いて、9 5 で 2 5 分間行った。内因性ペルオキシダーゼのクエンチングのために、切片を 2 . 5 % 正常ウマ血清 (RT . U . Vectastain Kit , Vector Laboratories , Burlingame , CA) で 2 0 分間ブロックした。二次抗体 (RTU ビオチン標識ユニバーサル抗体抗ウサギ / マウス IgG、ベクタステイン ABC キット、Vector Laboratories , Burlingame , CA) を、3 0 分間添加した。PBS 中で洗浄後、検体を ABC - 試薬 (ベクタステイン ABC キット、Vector Laboratories , Burlingame , CA) で 3 0 分間インキュベートし、そしてヘマトキシリンで対比染色した。

10

【 0 0 3 1 】

スライドは、2 人の独立した観察者によって採点された。染色は、陽性細胞の強度及び割合に応じて評価された。2 人の独立した観察者の間に不一致があった場合、第三の独立した観察者が、スライドを採点し、そして結果を平均した。

【 0 0 3 2 】

統計解析

不完全応答は、治療後の巨視的もしくは微視的な、持続的に生存可能な腫瘍、又は治療終了後半年以内の腫瘍の再発として定義した。無再発生存率を、放射線治療の終了から、最初の再発 (治療終了から半年後)、死亡、又は最後の追跡の、いずれか先に発生するまでの期間として定義した。原因特異的生存率を、放射線治療の終了から、疾患に起因する死亡又は最後の追跡までの時間として定義した。累積生存確率はカプラン - マイヤー曲線を用いてプロットし、そしてログランク検定で比較した。計算された p 値が 0 . 0 5 未満であった場合、すべての試験を、統計的に有意であると宣言した。カイ二乗検定を、バイオマーカーと臨床治療要因間の相関関係を検出するために使用した。統計解析を、SAS 統計ソフトウェアパッケージ (SAS Institute Inc , Cary , NC) のバージョン 5 . 0 及び (R バージョン 2 . 6 . 1) を用いて行った。

20

【 0 0 3 3 】

結果

患者 / 腫瘍特性

追跡期間の中央値は 2 9 ヶ月であった。臨床病理学的特性を表 4 にまとめる。表に示すように、年齢の中央値は、6 3 歳 (範囲、4 0 ~ 9 5 歳) であった。8 6 人の患者の内、6 9 人 (8 0 %) が男性であった。3 1 人の患者が原発性口腔咽頭を有し、及び 5 5 人の患者が原発性喉頭を有していた。喉頭 SCC HN のうち、4 1 人の患者が T 1 - T 2 病変であり、1 4 人の患者が T 3 - T 4 病変であり、そして 1 0 人の患者が局所リンパ節転移を有していた。口腔咽頭 SCC HN のうち、1 9 人の患者が T 1 - T 2 病変を有し、1 2 人の患者が T 3 - T 4 病変を有し、そして 2 2 人の患者がリンパ節転移を有していた。

30

【表 4】

表4
患者特性

| 因子 | n (%) |
|-----------|----------|
| 性別 | |
| 男性 | 69 (80%) |
| 女性 | 17 (20%) |
| サブサイト | |
| 中咽頭 | 31 (36%) |
| 咽頭 | 55 (64%) |
| T ステージ | |
| T1-T2 | 60 (70%) |
| T3-T4 | 26 (30%) |
| 結節状態 | |
| N0 | 54 (63%) |
| N+ | 32 (37%) |
| AJCC ステージ | |
| I | 20 (23%) |
| II | 18 (21%) |
| III | 20 (23%) |
| IV | 28 (33%) |
| 化学療法 | |
| Yes | 39 (45%) |
| No | 47 (55%) |

10

20

【 0 0 3 4 】

臨床転帰

患者を、臨床試験、上咽頭鏡検査、放射線学的検査、又は生検を通じて、治療中及び治療後の応答について評価した。12人の患者（喉頭7、中咽頭5）が不完全応答を経験し、これらの患者の臨床特性及び治療特性を表5にまとめる。不完全応答の、又は再発した患者の誰も、6600cGy未滿を受けていない。不完全応答の予測において有意な臨床的要因の唯一のものは、50日を越える放射線の経過時間（ $P = 0.04$ ）を有していた。治療への不完全応答（ $P < 0.01$ ）と共に、遠隔再発（distant failure）を経験する可能性が増大した。

30

【表5】

表5
不完全応答を示す患者の臨床特性と治療特性

| 患者 | 部位 | 全体の ステージ | Tステージ | N ステージ |
|----|-----|-------------|-------|-----------|
| 1 | 咽頭 | 1 | 1a | 0 |
| 2 | 咽頭 | 1 | 1a | 0 |
| 3 | 咽頭 | 2 | 2 | 0 |
| 4 | 中咽頭 | 2 | 2 | 0 |
| 5 | 中咽頭 | 3 | 3 | 0 |
| 6 | 咽頭 | 3 | 3 | 0 |
| 7 | 咽頭 | 3 | 3 | 0 |
| 8 | 咽頭 | 3 | 3 | 0 |
| 9 | 咽頭 | 3 | 2 | 1 |
| 10 | 中咽頭 | 4a | 1 | 2 |
| 11 | 中咽頭 | 4a | 4 | 2a |
| 12 | 中咽頭 | 4b | 4 | 3 |

10

20

【0035】

11人の患者（喉頭8、中咽頭3）は、再発までの期間の中央値が12.5ヶ月（範囲7.6～67.8ヶ月）で再発することが認められた。再発のうち、7人の患者が局所再発（中央値、10.8ヵ月）していることが判明し、及び4人の患者が遠隔転移（中央値、25.2ヵ月）していることが判明した。

【0036】

2年及び3年での無再発生存率（RFS）及び原因特異的生存率（CSS）はそれぞれ90%及び85%、84%及び81%であった。分析された治療変数は、年齢、性別、原発部位、臨床病期、一次治療、放射線量、放射経過所要日数を含んだ。単変量解析では、年齢（ $P=0.04$ ）及び一次治療（RT対CRT）（ $P=0.03$ ）が、RFSを予測することが明らかになった。一次治療の経過を、その後、2以下のステージ（ $N=38$ ）対2を越えるステージ（ $N=48$ ）、及びリンパ節陽性患者（ $n=54$ ）対リンパ節陰性患者（ $n=32$ ）について解析した。予想通り、化学放射線療法は、ステージ3及び4の患者群、並びにリンパ節陽性の患者群で有意な効果がある。連続変数（ $P=0.04$ ）としての解析時における高い年齢、並びに62歳超であるか又は未満であるか（ $P=0.03$ ）及びより高い臨床Tステージ（ 0.03 ）は、UVA（単変量解析）上のCSSを予測した。

30

【0037】

予測的バイオマーカー

不完全応答の予測バイオマーカー

不完全応答のための予測バイオマーカーは、増加した78.6%のVEGF-c最適カット（optimal cut）（ $P=0.02$ ）、YAP-1の強度等級（ $P<0.01$ ）、連続的な変数としてのYAP-1の強度等級（ $P<0.01$ ）、増加した85.1%のクローディン-4最適カット（ $P<0.01$ ）、c-metの強度等級（ $p<0.01$ ）及びbc1-2の強度等級（ $P=0.02$ ）であった。

40

【0038】

無再発生存率を予測するバイオマーカー

RFSの予測バイオマーカーは、37.8%のYAP-1最適カット（ $P=0.01$ ）、YAP-1の強度等級（ $P=0.03$ ）、及び10%のbc1-2最適カット（ $P<0$

50

. 01)であった。

【0039】

原因特異的生存率の予測バイオマーカー

CSSの予測バイオマーカーは、YAP-1の中央値強度等級 ($P = 0.04$)、81.8%のYAP-1最適カット ($P = 0.02$)、78.6%のVEGF-c最適カット ($P = 0.03$)、及び85.1%のクローディン-4最適カット ($P = 0.03$)であった。

【0040】

重要なバイオマーカーを、バイオマーカーの独立した予後的意義を試験するために、各エンドポイントについて重要な臨床的要因に対して試験した。YAP-1及びbc1-2は、RFSについての予測において診断時年齢とは独立であることが判明し、YAP-1及びVEGF-cは、CSSについての診断時年齢とは独立し、及びVEGF-cは、CSSについての連続変数としての臨床Tステージとは独立していた。すべてのバイオマーカーは、不完全応答の予測において放射日数とは独立していた。興味深いことに、ログランクスコアが、CSS及びRFSの両方について評価され、そして、臨床ステージ、クローディン-4、YAP-1及び年齢の組み合わせがCSSについて非常に重要であること ($P < 0.01$)、並びに年齢、YAP-1、クローディン-4、及び一次治療がRFSについて重要であること ($P = 0.02$)を明らかにした。

10

【0041】

バイオマーカーYAP-1、bc1-2、VEGF-c、c-met、及びクローディン-4を、陽性細胞の等級と陽性細胞の割合に関して分析したところ、2つの組み合わせ、すなわち割合に等級を乗じたものは、相乗効果を有していた。この式に基づく等級と割合の組み合わせは、治療及び予後の応答を分析する際の、バイオマーカーの重要性を改善した。さらに、c-met及びYAP-1の組み合わせは、これら2つのマーカーを放射線単独で治療された患者又は化学放射線療法の治療を受けた患者のいずれかからなるサブグループにおいて解析した場合と比べて、治療結果を90%正しく予測する、全調査対象 ($n = 86$)における放射線ベースの治療法に対する応答のより有意な予測因子であった。

20

【0042】

考察

SCCHNの一次治療は放射線療法又は化学放射線療法の使用にシフトしているため、両方の方法に対する腫瘍応答を予測することは、患者に特異的な治療をするために有用である。本研究において、治療に対する治療応答は、TNMステージとは独立していることが判明し、そして一次治療 (RT又はCRT) について不完全応答をする患者は、完全応答をする患者よりも、より遠隔転移を経験し、低いCSSを有する傾向がある。治療は、確立された予後及び予測バイオマーカーを評価することによる、個々の腫瘍バイオロジーを評価することによって導くことができる。この方法は、化学療法の利点を決定するために、早期の乳がんにおいてすでに使用されている。

30

【0043】

本研究において、YES関連タンパク質 (YAP-1) は普遍的なバイオマーカーであることが判明した。YAP-1の過剰発現は、上衣細胞腫 (Modena et al. (2006))、NSCLC (非小細胞肺癌) (Saviozzi et al. 2006)、及び膵臓癌 (Guo et al. (2006))に見られる。

40

【0044】

以前の研究では、チロシンキナーゼYES関連タンパク質 (YAP65) の遺伝子が、形質転換及び転移性腫瘍細胞株において優先的に発現していることが示されている (Dong et al. (1997))。YAP-1のサイレンシングは、p53のヒストンアセチル化を減少し、その結果P73が関与するアポトーシスが遅延又は減少する (Strano et al. (2005))。

【0045】

50

先行研究は、c - m e tの低い発現がシスプラチン感受性と関連することを見出し、及び先行研究の間、c - m e tが高発現している腫瘍を有する患者は、併用化学放射線療法のための良い候補にはならない可能性がある」と結論されていた (A k e r v a l l e t a l . (2 0 0 4)) 。これは本研究において検証されているように、c - m e tは、放射線療法又は化学放射線療法に対する乏しい応答についての予測に有用であった。M E Tは、増殖、有糸分裂、血管新生、及び転移に關与するチロシンキナーゼ受容体である。M e tの過剰発現は、乳、卵巣、甲状腺、膵臓、脳、及び消化管の腫瘍で報告されており、及びc - m e tの過剰発現は、上咽頭癌の患者における予後不良と相関している (Q i a n e t a l . (2 0 0 2)) 。c - m e tの過剰発現は、口腔舌癌の局所再発の予測因子であることも示されている (E n d o e t a l . (2 0 0 6)) 。これまでは、c - m e tは、C S Sにおいて予測的ではなかった。R F Sにおいてc - m e tの予測は存在していなかった。これは、不完全応答を有する患者が、R F S解析を打ち切られたという事実が原因である可能性がある。

10

【 0 0 4 6 】

本研究では、クロードイン - 4は、R F Sを予測する上で重要であることが判明した。クロードイン - 4は、タイトジャンクションタンパク質をコードしている。その高発現は、乳癌、尿路上皮癌、及び前立腺癌の患者で認められている。H N S C C及びN S C L C細胞株におけるクロードイン - 4の増加は、ゲフィチニブについての感度の増加と関連付けられることが発見されたが (F r e d e r i c k e t a l . (2 0 0 7)) 、これは標的療法であり、該結論は本研究では正しくない可能性がある。漿液性乳頭癌において、クロードイン - 4の過剰発現は、D F S及びO Sの欠如、悪性表現型に見られる過剰発現と関連していた (K o n e c n y e t a l . (2 0 0 8)) 。尿路上皮癌及び前立腺癌において、これはステージ及び転移と関連付けられることが判明した。おそらく、クロードイン - 4は、腫瘍の広がりに対する代理マーカー (s u r r o g a t e m a r k e r) であり、このことがより悪いR F Sにつながり得る理由である。

20

【 0 0 4 7 】

本研究において、b c l - 2は無再発生存率及び原因特異的生存率を予測する上で有意であった。歴史的に、これはp53を抑制する、抗アポトーシス癌遺伝子として発見された。最近では、高用量の放射線療法を施行した鼻咽頭の患者のコホートにおいて、b c l - 2の過剰発現は悪い5年D F Sを伴った (C h e n e t a l . (2 0 0 8)) ; 化学放射線療法で治療された、局所進行S C C H Nの21人の患者は、B c l - 2を過剰発現した場合、好ましくない結果と短いR F Sを有することが判明した (M a n n a r i n i e t a l . (2 0 0 7)) 。

30

【 0 0 4 8 】

腫瘍低酸素症は、放射線治療への反応の乏しさと関連している。本研究において、V E G F - cは、R F S及びC S Sを予測する上で意義を有することが判明した。V E G F - cは、血管新生促進癌遺伝子である。以前は、V E G F - cの高発現は、放射線治療への応答不良と関連していた。病理学的完全応答は、術前の直腸癌患者で評価された。V E G F - c陽性と考えられていた癌は、病理学的に不完全応答を有することが認められた (Z l o b e c e t a l . (2 0 0 8)) 。ステージII - IV S C C H Nの患者27人において、V E G F - cの高発現は有意に局所制御及び生存率を減少した (M a r t i n e t a l . (2 0 0 7)) 。高レベルのV E G F - cは、腫瘍低酸素、すなわち放射線抵抗性を導く低酸素症、の代用であり得る。

40

【 0 0 4 9 】

本研究にはいくつかの制限がある。分析された患者は、異なる頭頸部の病変部位及びT N Mステージを有する、混成グループだった。声門原発性の患者対口腔咽頭原発性の患者間で、局所リンパ節への広がりパターンは異なる。この研究は、9年間の期間に亘ったので、異なる放射線治療技術と化学療法投与計画とが用いられた。しかし、本研究で特定されたものと同様の不均一な集団は、全国で実施されている臨床の広い範囲で遭遇する人をより代表する可能性があり、従ってマーカーのパネルの使用を、より普遍的に適用可

50

能なものとする。また、すべての過去の研究に伴う偏見 (b i a s) を考慮する必要がある。

【 0 0 5 0 】

結論

本研究では、以前の c - DNA マイクロアレイ研究 (発表済み及び未発表) に基づく化学的感受性又は放射線感受性のための潜在的な重要性を有する 5 つのマーカー (V E G F - c、b c l - 2、クローディン - 4、c - m e t、及び Y A P - 1) の予後及び予測能力の評価を行った。前処理された生検を評価することによって、Y A P - 1 は、R T / C R T 応答、C S S、及び R F S の予測のための普遍的なマーカーであることがわかった。クローディン - 4 及び V E G F - c は、C S S 及び R F S の両方を予測し、並びに B c l - 2 は、R T / C R T 応答及び R F S を予測する。上記の試験したバイオマーカーを用いて、局所再発のリスクが高い患者を早期に同定することができ、そして適切な治療を前もって供給して、がんの治療を最適化し、及び一次治療に追加する必要なサルベージ療法によって、罹患率を減少することができる。

10

【 0 0 5 1 】

参考文献

A k e r v a l l e t a l . " G e n e t i c a n d e x p r e s s i o n p r o f i l e s o f s q u a m o u s c e l l c a r c i n o m a o f t h e h e a d a n d n e c k c o r r e l a t e w i t h c i s p l a t i n s e n s i t i v i t y a n d r e s i s t a n c e i n c e l l l i n e s a n d p a t i e n t s . " C l i n C a n c e r R e s . (2 0 0 4) 1 0 (2 4) : 8 2 0 4 - 8 2 1 3 .

20

C h e n e t a l . " P r o g n o s t i c i m p a c t o f b c l - 2 e x p r e s s i o n o n a d v a n c e d n a s o p h a r y n g e a l c a r c i n o m a . " H e a d N e c k . (2 0 0 8) 3 0 (8) : 1 0 5 2 - 1 0 5 7

D o n g , G . e t a l . " G e n e s d i f f e r e n t i a l l y e x p r e s s e d w i t h m a l i g n a n t t r a n s f o r m a t i o n a n d m e t a s t a t i c t u m o r p r o g r e s s i o n o f m u r i n e s q u a m o u s c e l l c a r c i n o m a . " J C e l l B i o c h e m . S u p p l 2 8 - 2 9 (1 9 9 7) : 9 0 - 1 0 0 .

30

E n d o e t a l . " P r o g n o s t i c v a l u e o f c e l l m o t i l i t y a c t i v a t i o n f a c t o r s i n p a t i e n t s w i t h t o n g u e s q u a m o u s c e l l c a r c i n o m a . " H u m P a t h o l . (2 0 0 6) 3 7 (8) : 1 1 1 1 - 1 1 1 6 .

F r e d e r i c k e t a l . " E p i t h e l i a l t o m e s e n c h y m a l t r a n s i t i o n p r e d i c t s g e f i t i n i b r e s i s t a n c e i n c e l l l i n e s o f h e a d a n d n e c k s q u a m o u s c e l l c a r c i n o m a a n d n o n - s m a l l c e l l l u n g c a r c i n o m a . " M o l C a n c e r T h e r . (2 0 0 7) 6 (6) : 1 6 8 3 - 1 6 9 1 .

40

G u o , J . e t a l . " Y e s - a s s o c i a t e d p r o t e i n (Y A P 6 5) i n r e l a t i o n t o S m a d 7 e x p r e s s i o n i n h u m a n p a n c r e a t i c d u c t a l a d e n o c a r c i n o m a . " I n t . J M o l . M e d . 1 7 . 5 (2 0 0 6) : 7 6 1 - 6 7 .

50

Konecny et al. "Claudin-3 and claudin-4 expression in serous papillary, clear-cell, and endometrioid endometrial cancer." *Gynecol Oncol*. (2008) 109(2): 263 - 269.

Mannahni et al. "Markers of chemoradiation resistance in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma, treated by intra-arterial carboplatin and concurrent radiation." *Acta Otorhinolaryngol Ital*. (2007) 27(4): 173 - 180

10

Martin et al. "Vascular endothelial growth factor expression predicts outcome after primary radiotherapy for head and neck squamous cell cancer." *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. (2007) 19(1): 71 - 76

Modena, P. et al. "Identification of tumor-specific molecular signatures in intracranial ependymoma and association with clinical characteristics." *J Clin. Oncol*. 24. 33(2006): 5223 - 33.

20

Qian et al. "Met protein expression level correlates with survival in patients with late-stage nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Res*. (2002) 62(2): 589 - 596

30

Saviozzi, S. et al. "Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer." *BMC. Cancer* 6(2006): 200.

Strano, S. et al. "The transcriptional coactivator Yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to DNA Damage." *Mol. Cell* 18.4(2005): 447 - 59

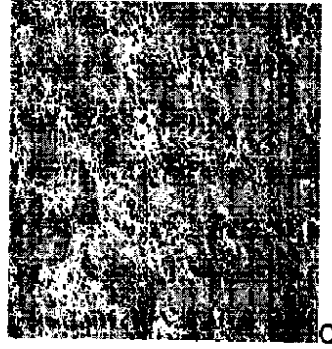
40

Zlobec et al. "Combined analysis of VEGF and EGFR predicts complete tumour response in rectal cancer treated with preoperative radiotherapy." *Br J Cancer*. (2008) 98(2): 450 - 456.

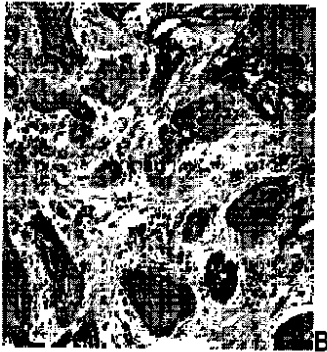
【 図 1 A 】



【 図 1 C 】



【 図 1 B 】



【 図 1 D 】

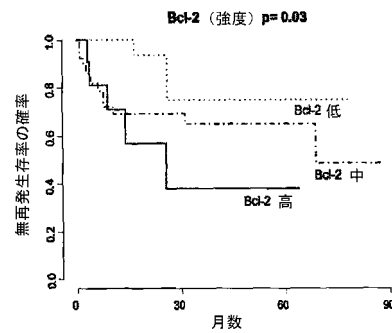
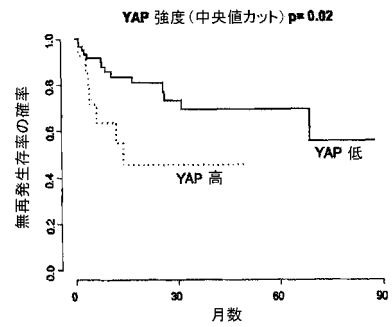


【 図 1 E 】

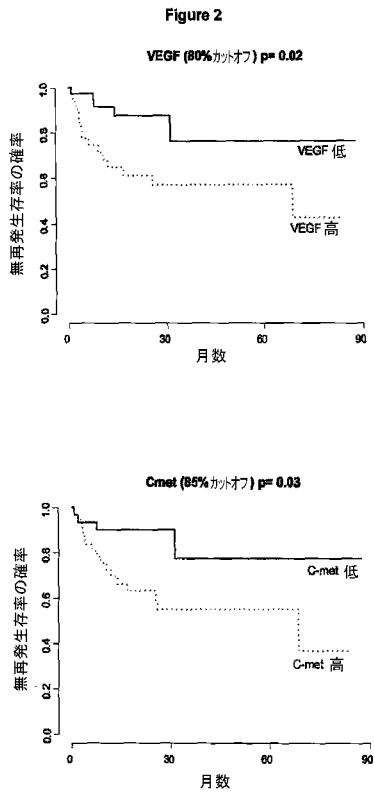


【 図 2 - 1 】

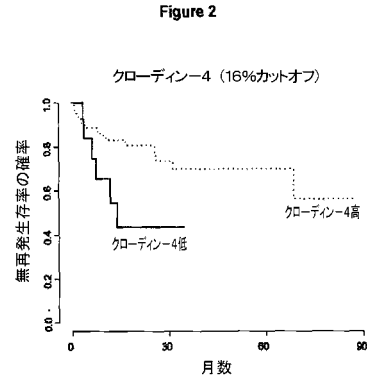
Figure 2



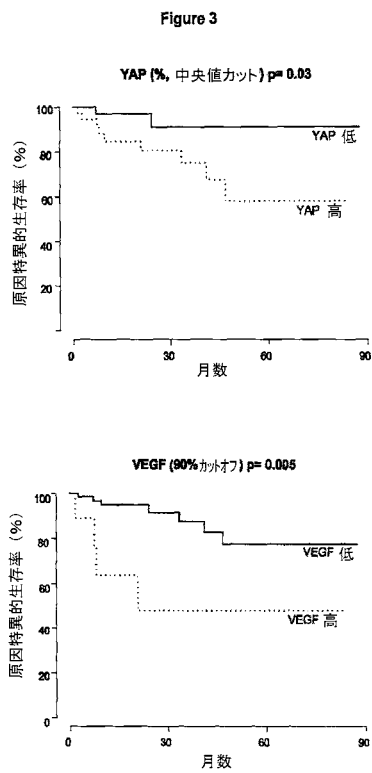
【 図 2 - 2 】



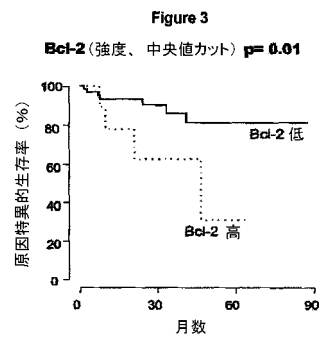
【 図 2 - 3 】



【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】



【配列表】

2012507290000001.app

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/US 09/61670 |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68 (2010.01) USPC - 435/6 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) USPC- 435/6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 424/155.1 (text search) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (EPAB, JPAB, PGPB, USPT); Google Scholar: Yes-associated protein 1 (YAP1, YAP-1, YAP65); head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC); predictive model therapy, cisplatin, erlotinib, tarceva, p63, p73, cIAP2. GenCore6.3: SEQ ID NO: 1 | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | LEE et al. A novel nuclear factor-kappaB gene signature is differentially expressed in head and neck squamous cell carcinomas in association with TP53 status. Clin Cancer Res 1 October 2007, 13(19):5680-5691; abstract, pg5680 right col para 2, pg5683 right col para 2, pg5687 right col para2, pg 5688 right col para 3, pr 5689 right col para 1 | 1, 4-7, 10 ----- 2, 8 |
| Y | 2008/0181896 A1 (KHAN et al.) 31 July 2008 (31.07.2008) SEQ ID NO: 57, claim 15 | 2 |
| Y | MICHI et al. Pretreatment with 5-FU enhances cisplatin cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma cells. Cancer Chemother Pharmacol Epub 13 December 2007, 62(5):745-752; Abstract | 8 |
| A | JARVINEN et al. High-Resolution Copy Number and Gene Expression Microarray Analyses of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines of Tongue and Larynx. Genes Chromo Cancer June 2008, 47(6):500-509 | 1-2, 4-8, 10 |
| A | YAN et al. Genome-wide identification of novel expression signatures reveal distinct patterns and prevalence of binding motifs for p53, nuclear factor-kB and other signal transcription factors in head and neck squamous cell carcinoma. Genome Biol 2007, 8(5):R78.1-R78.25. [Retrieved from the internet on 8 March 2010: <URL: http://genomebiology.com/2007/8/5/R78 >] | 1-2, 4-8, 10 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search 8 March 2010 (08.03.2010) | | Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em; font-weight: bold;">16 MAR 2010</div> |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201 | | Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/61670

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

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

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

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

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

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

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

Group I-: claims 1-2, 4-8, 10, drawn to a method for predicting the response to chemoradiotherapy treatment in a patient having a head or neck cancer by measuring in a biological sample from said patient the mRNA levels of a marker. The first invention encompasses measuring in a biological sample from said patient the mRNA levels of (i) YAP-1. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect an additional SEQ ID NO(s) and/or combination(s) thereof to be searched.

Group II-: claims 1, 3-10, drawn to a method for predicting the response to chemoradiotherapy treatment in a patient having a head or neck cancer by measuring in a biological sample from said patient the levels of a marker protein. Should an additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect a specific SEQ ID NO(s) and/or combination(s) thereof to be searched.

-----continued on Separate Sheet-----

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1-2, 4-8, 10, restricted to measuring mRNA levels of (i) YAP-1

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/61670

***** SUPPLEMENTAL BOX *****

Continuation of Box III (LACK OF UNITY OF INVENTION):

The inventions listed as Groups I+ and II+ 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:

The inventions of Group I+ do not include the inventive concept of a measuring a level of a protein, as required by Group II+.
The inventions of Group II+ do not include the inventive concept of a measuring a level of an mRNA, as required by Group I+.

The inventions of Groups I+ and II+ share the technical feature of predicting the response to chemoradiotherapy treatment in a patient suffering from a head or neck cancer by measuring in a biological sample from said patient the mRNA levels of a predictive marker. However, this shared technical feature does not represent a contribution over the prior art of US US 2004/0156854 A1 to Mulligan, et al. that discloses "methods of identifying or selecting a cancer patient who is responsive to a therapeutic regimen comprising proteasome inhibition therapy. Additionally provided are methods of identifying a patient who is non-responsive to such a therapeutic regimen. These methods typically include the determining the level of expression of one or more predictive markers in a patient's tumor (e.g., a patient's cancer cells), and identifying whether expression in the sample includes a pattern or profile of expression of a selected predictive marker or marker set which correlates with response or non-response to proteasome inhibition therapy (para [0005]), wherein "Cancer cells include, but are not limited to... squamous cell carcinoma of the neck and head region (para [0043]), and wherein said predictive marker may be Yes associated protein (YAP) (TABLE 1, PREDICTIVE MARKER IDENTIFICATION, entry 322). As 1) said predicting the response to chemoradiotherapy treatment in a patient suffering from a head or neck cancer by measuring in a biological sample from said patient the mRNA levels of a predictive marker agent was known at the time of the invention, and 2) the claimed predictive markers are unique genes/proteins known in the art that do not share structural similarities can readily, the inventions do not share a special technical feature. Without a shared special technical feature, the inventions lack unity with one another. this cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

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

フロントページの続き

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

(74)代理人 100095500

弁理士 伊藤 正和

(74)代理人 100111235

弁理士 原 裕子

(72)発明者 アカーヴァル、 ジャン

アメリカ合衆国 4 8 1 0 5 ミシガン州 アン アーバー ストーンバレー ドライブ 5 5 2
0

Fターム(参考) 2G045 CA25 CA26 CB01 CB02 CB07 DA14 DA36 FB02 FB03 FB07
4B024 AA12 BA80 CA09 CA12 HA14 HA15
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ53 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR42
QR48 QR55 QR62 QS15 QS25 QS33 QS34 QX02