

(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2004-507253

(P2004-507253A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 N 15/09

C 1 2 Q 1/02

G O 1 N 33/53

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/02

G O 1 N 33/53

C 1 2 N 15/00

テーマコード (参考)

4 B O 2 4

4 B O 6 3

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 78 頁)

(21) 出願番号 特願2002-522538 (P2002-522538)

(86) (22) 出願日 平成13年8月20日 (2001.8.20)

(85) 翻訳文提出日 平成15年2月28日 (2003.2.28)

(86) 国際出願番号 PCT/EP2001/009556

(87) 国際公開番号 W02002/018633

(87) 国際公開日 平成14年3月7日 (2002.3.7)

(31) 優先権主張番号 00118603.0

(32) 優先日 平成12年8月28日 (2000.8.28)

(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 591003013

エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー

F. HOFFMANN-LA ROCH

E AKTIENGESELLSCHAFT

T

スイス・シーエイチ-4070バーゼル・

グレンツアーヘルストラッセ124

(74) 代理人 100102978

弁理士 清水 初志

(74) 代理人 100108774

弁理士 橋本 一憲

(72) 発明者 サータ ウルリッヒ

スイス連邦 アルシュビル ベッテンシュ

トラッセ 58

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA09 CA12 HA12

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 患者の腫瘍治療に対する応答能の決定方法

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍治療に対する応答能を決定するための患者のスクリーニング方法に関し、該方法を実施するための診断試験にも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍治療に対する応答能を決定するため患者をスクリーニングする方法であって、

- 患者試料中の該治療の予測となる遺伝子の少なくとも一つの発現レベルを測定する段階；及び
- 測定の結果を参照試料で得られた結果と比較する段階を含む、方法。

【請求項 2】

患者が腫瘍に罹患した患者である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

患者が黒色腫瘍に罹患した患者である、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 4】

腫瘍治療が、I F N - α 、又はその誘導体の一つを含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

遺伝子発現が、治療の予測となる遺伝子の少なくとも一つに特異的な D N A プローブを用いた D N A 解析により、m R N A 転写レベルの決定により、又は遺伝子産物のレベルの決定により、直接的に測定される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の方法を実施するための診断試験であって、

- 抗体又は核酸プローブを含有している液相を用いて、マトリックスをプローブと接触させる段階、
- 腫瘍治療の予測となる遺伝子の一つの遺伝子転写又は産物を検出する段階、を含む試験。

20

【請求項 7】

マトリックスが核酸を含み、液相が標的核酸プローブを含有する、請求項 6 記載の診断試験。

【請求項 8】

マトリックスが標的タンパク質プローブを含み、液相が抗体を含有する、請求項 6 記載の診断試験。

【請求項 9】

プローブを含有するマトリックスを有する容器を含む、請求項 1 記載の方法のための診断キット。

30

【請求項 10】

核酸プローブを含むマトリックスを含む容器を含む、請求項 9 記載の診断キット。

【請求項 11】

腫瘍治療に対して感受性又は抵抗性である細胞又は組織の利用能をスクリーニングするための方法であって、該治療に特徴的な遺伝子発現プロファイルの同定を含む方法。

【請求項 12】

細胞が細胞株由来である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】

細胞が腫瘍細胞株由来である、請求項 11 記載の方法。

40

【請求項 14】

腫瘍治療応答性の細胞の選択を可能にする免疫学的マーカーであって、該治療の予測となる遺伝子の一つまたは複数の産物に特異的な抗体であるマーカー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、腫瘍治療に対する応答能を決定するための患者のスクリーニング方法に関する。本発明は、該方法を実施するための診断試験にも関する。

【0002】

発明の背景

50

治療研究において、腫瘍の発達に対抗することができる治療には、大きな関心が寄せられている。腫瘍は必ずしも同一ではないため、一部の患者のみが、特定の腫瘍治療に応答する。

【0003】

さらに、ある患者亜群においては、例えば胃腸障害、低血圧、高血圧、頻脈、疲労/無力症、又は頭痛を含む、健康にとって有害な効果が、腫瘍治療の特異的な活性に伴う。明白な有益な効果が観察されない患者亜群も存在する。

【0004】

最後に、腫瘍細胞は経時的に変化しており、最終的に、特定の腫瘍治療に対して抵抗性となる場合がある。

10

【0005】

発癌、腫瘍進展、及び転移は、バランスの崩れた転写プログラム、不適切な翻訳後修飾、及び脱制御されたエピジェネティック修飾に起因する (Schwirzke, M. ら、Anticancer Res 19 (1999) 1801-1814; Pardue, A. B., Advances in Cancer Res 65 (1994) 213-227; Ponta, H., Biochim Biophys Acta 1198 (1994) 1-10)。転写プログラムの変化は、癌遺伝子及び癌抑制遺伝子、細胞遺伝学的改変によって作出された融合タンパク質、DNAメチルトランスフェラーゼによる予定外のメチル化により改変された遺伝子の発現、並びにヒストンアセチルトランスフェラーゼ及びヒストンデアセチラーゼのようなクロマチン修飾酵素による (Lin, R. J. ら、Trends Genet 15 (1999) 179-184; Stunnenberg, H. G. ら、Biochem Biophys Acta 1423 (1999) F15-F33)。

20

【0006】

一つの主要な問題は、現在のところ、特定の患者の腫瘍が特定の腫瘍治療に応答するか否かを予測することが極稀にしか可能でないということである。腫瘍細胞がいかにして経時変化するか、及びそれらが特定の腫瘍治療に対して抵抗性となるか否か、を予測することも困難である。

【0007】

腫瘍関連候補遺伝子を同定するためには、転移性細胞株対非転移性細胞株のような細胞株、及び異なる進展段階に相当する腫瘍標本の転写プロファイルの決定が、この目標を達成するための第一工程である (Schlemann, S. ら、Anticancer Research 17 (1997) 13-20; Schwirzke, M. ら、Anticancer Research 18 (1998) 1409-1422; Schlemann, S. ら、Clin Exp Metastasis 16 (1998) 129-139)。さらなる工程は、異なる腫瘍において同定された改変の有病率の解析、安定的な形質転換体におけるアンチセンスRNA又はリボザイムを使用した過剰発現及びダウンレギュレーションによる考慮中の遺伝子のインビトロ調節、並びに受当なインビトロ系における結果の評価を含む。調査中の腫瘍の天然の転移親和性が維持されている、皮下異種移植片系及び同所移植を含むヌード・マウス系の出現により、インビボの候補遺伝子の機能的役割を評価するための道が開かれた (Fidler, I. J., Cancer Metastasis Rev 50 (1986) 29-49)。

30

40

【0008】

腫瘍治療から利益を得る可能性が高い患者の標的化された選択を可能にする臨床的、免疫学的、又は分子的な特徴は、これまで同定されていなかった。

【0009】

明らかに、腫瘍治療の潜在的有効性を予測するための基準を開発することが可能となれば、非応答者へ不要な毒性を与えずに済み、特定の応答患者亜群を同定しやすくなると考えられるため、临床上、極めて有意義であると思われる。

【0010】

50

発明の概要

本発明は、腫瘍治療に対する応答能を決定するための患者のスクリーニング方法を提供する。該方法は、該患者の該治療に応答性の一つまたは複数の遺伝子の発現レベルを測定する段階、及び測定の結果を参照試料と比較する段階を含む。本発明は、該方法を実施するための診断試験にも関する。

【0011】

発明の詳細な説明

「腫瘍治療」という表現には、本明細書において使用されるように、生物学的又は化学的な抗腫瘍薬全てが含まれる。

【0012】

「参照試料」という表現は、本明細書において使用されるように、正常細胞又は正常組織抽出物に特徴的な遺伝子発現レベルの参照に関する。

【0013】

「IFN- α 」という用語は、本明細書において使用されるように、任意の天然の物質（例えば、白血球、繊維芽細胞、リンパ球）、もしくはそれらに由来する物質（例えば、細胞株）に由来するIFN- α 、又は組換えDNA技術により調製されたものを含む。IFN- α のクローニング及びその直接発現、特に大腸菌における発現の詳細は、多くの出版物の主題となっている。組換えIFN- α の調製は、例えば、Goeddelら（1980）Nature 284, 316-320及び（1981）, Nature 290, 20-26、並びに欧州特許第32134号、同第43980号、及び同第211148号より既知である。IFN- α には、IFN- α 1、IFN- α 2のような多くの型が存在し、さらに、これらに限定はされないがIFN- α 2A、IFN- α 2B、IFN- α 2C、及びIFN- α 11（IFN- α 11又はw-IFNとも呼ばれる）を含むサブタイプが存在する。本発明においては、IFN- α 2Aの使用が好ましい。IFN- α 2Aの製造は、欧州特許第43980号及び同第211148号に記載されている。

【0014】

本発明の腫瘍治療に対する応答能を決定するための患者のスクリーニング法は、患者試料中の該治療の予測となる遺伝子のうちの少なくとも一つの発現レベルを測定する段階、及び測定の結果を参照試料で得られた結果と比較する段階を含む。

【0015】

本発明は、腫瘍に罹患した患者のスクリーニングに有用である。例示的な腫瘍には、卵巣癌、前立腺癌、乳癌、大腸癌、肝癌、胃癌、又は肺癌が含まれる。特に重要であるのは、黒色腫瘍である。

【0016】

本発明において、腫瘍治療には、例えばサイトカインのような腫瘍薬が含まれうる。

【0017】

それには、ウイルス感染の重度を減少させるための、治療的に有効な量の活性成分IFN- α 又はPEG化IFN- α コンジュゲートが含まれうる。

【0018】

本発明において使用されるIFN- α は、ポリアルキレングリコール（置換型又は非置換型）、例えばポリエチレングリコールのようなポリマーと結合し、PEG-IFN- α を形成していてもよい。結合は、当技術分野において既知の様々なリンカーによって、特に公開番号0510356及び593868の欧州特許出願、及び欧州特許出願第97108261.5号に開示されたようなリンカーによって達成されてもよい。好ましくはポリエチレングリコールであるポリマーの分子量は、300～30,000ダルトンの範囲であり、一つ以上、好ましくは1～3個のポリマーがIFN- α と結合されうる。

【0019】

最も好ましくは、試薬は、例えばリシンの第一アミノ基、又はIFN- α のN末端に付加される。試薬は、例えばセリンのヒドロキシルに付加されてもよい。一つ以上、好ましくは1～3個のPEGが、IFN- α と結合されうる。

10

20

30

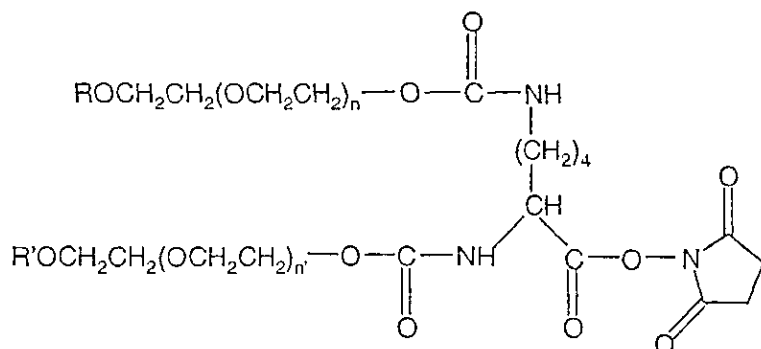
40

50

【 0 0 2 0 】

最も好ましい試薬は下記式のものである：

【化 1】

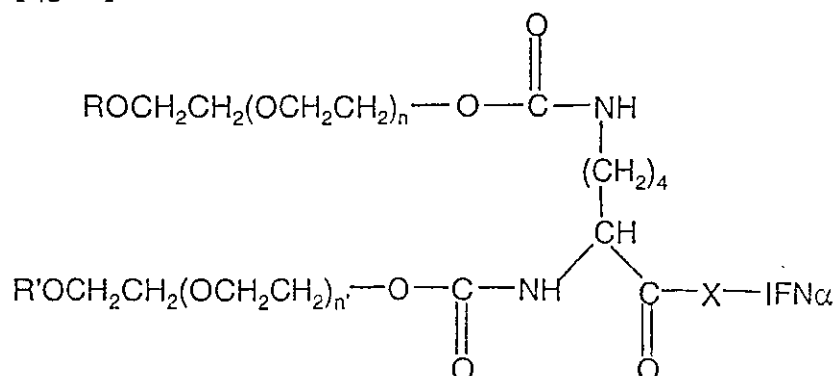


式中、カルバメート（ウレタン）結合を介してリシンの α アミノ基及び ϵ アミノ基にて全部で2個のモノメトキシPEG（m-PEG）鎖が連結されており、リシン・カルボキシル基がサクシンイミジル・エステルへと活性化されている。この試薬は、Rが低級アルキルであり、所望のnを有している試薬に適用可能な、既知の手法に従い、従来の手段によって入手されうる（Monfardiniら、「タンパク質修飾用の分岐型モノメトキシポリ（エチレングリコール）（A branched monomethoxypoly（ethylene glycol） for protein modification）」Bioconjugate Chem. 6: 62, 1995）。この試薬は、Shearwater Polymers, Inc.（Huntsville, Alabama）より入手されうる。PEGの好ましい平均分子量は、約20,000ダルトンであり、その場合PEG2-NHS中の総PEG質量は約40,000ダルトンとなる（他の分子量は、従来の手段によって、前記式の試薬のためのPEG-アルコール出発材料のnを変動させることにより入手され得る）。

【 0 0 2 1 】

好ましいPEG化IFN- α コンジュゲートは、下記式を有する：

【化 2】

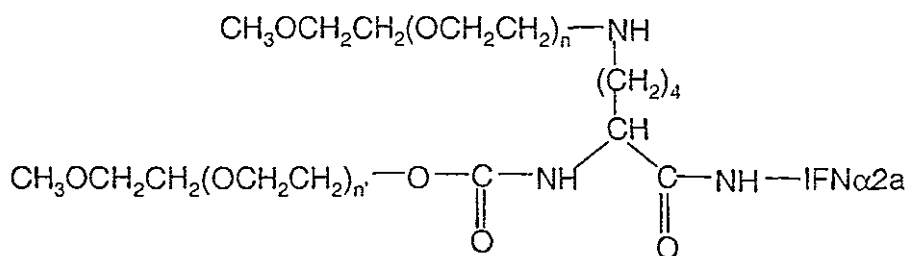


式中、R 及び R' は独立に低級アルキルであり；X はNH 又はO であり；n 及び n' は合計 600 ～ 1500 の整数であり；かつ該コンジュゲート中のポリエチレングリコールの平均分子量は約 26,000 ～ 約 66,000 ダルトンである。

【 0 0 2 2 】

最も好ましいPEG化インターフェロン- α は、下記式のものである：

【化 3】



式中、 n 及び n' は独立に 420 又は 520 である。この PEG 化 IFN- α コンジュゲートは、例えば、参照として本明細書に組み込まれる欧州特許出願 E P 8 0 9 9 9 6 号において既知である。 10

【0023】

本発明において使用される IFN- α は、ミコフェノール酸モフェチル (mycophenolate mofetil)、リバビリン、又はアマンタジンのような、他の活性薬学的化合物と組み合わせられてもよい。

【0024】

本発明における遺伝子の発現レベルの測定は、多様な方法で実施されうる。

- 固定化完全細胞、固定化組織試料を用いたインサイチュウ・ハイブリダイゼーション
- サザン・ハイブリダイゼーション (DNA 検出) (Sambrook ら、Molecular Cloning, vol. 2, 9.31-9.57)
- ノーザン・ハイブリダイゼーション (RNA 検出) (Sambrook ら、Molecular Cloning, vol. 1, 7.37 & 7.39)
- 血清解析 (例えば、スロットプロット解析による血清中の細胞の細胞型解析)
- 増幅後 (例えば、PCR 技術) (Sambrook ら、Molecular Cloning, vol. 2, 14.2-14.4)

20

【0025】

遺伝子発現は、ノーザン・プロット又はドット・プロット技術のような RNA 解析によって直接的に測定されうる。そのようなプロット技術は、該治療の予測となる遺伝子のうちの少なくとも一つに特異的な、通常は放射性標識されている核酸プローブの使用を必要とする。プローブは、参照試料の予測遺伝子の既知のヌクレオチド配列に基づき合成により調製されうる。ノーザン・プロット技術の場合には、従来の方法によって組織抽出物から RNA を得る。次いで、RNA を変性させ、電気泳動によりアガロース・ゲル上で分離した後、プロット技術によりナイロン又は硝酸セルロース・フィルターへ転写し、焼成により固定化する。次いで、フィルターを単一の標識された相補プローブへと曝し、通常オートラジオグラフィーにより、目的の mRNA を検出する。ドット・プロット技術は、mRNA を固定化前に電気泳動を行わない点を除き、同様である。インサイチュウ・ハイブリダイゼーションも、mRNA のレベルにより遺伝子発現を測定するために使用されうる。 30

【0026】

又は、遺伝子発現は、例えば、ウェスタン・プロット技術及び免疫組織化学的染色により、遺伝子産物のレベルによって、測定されうる。ウェスタン・プロット技術測定の場合には、参照試料及び被検試料の予測タンパク質、又は該タンパク質のペプチドを、SDS ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動によって分離し、ニトロセルロース膜へと転写する。次いで、洗浄後、ニトロセルロース膜を、放射性標識又は蛍光標識で標識された抗体と共にインキュベートする。免疫組織化学的染色の場合、抗体は、モノクローナル又はポリクローナルのいずれであってもよく、参照試料の少なくとも一つの予測遺伝子の報告された DNA に基づく合成ペプチドに対して調製されうる。それらの合成ペプチドは、次いで、周知の技術によって抗体の調製における免疫原として使用されうる。免疫原は、腫瘍治療の予測遺伝子及び / 又はそれらの一部のうちの少なくとも一つの天然産物から直接調製されてもよい。 40

50

【 0 0 2 7 】

本発明において、患者の腫瘍治療に対する応答能を決定するため、患者試料が癌の性質に応じて調製される。例えば、血液、尿、血清、リンパ節、骨髓、細胞抽出物、又は組織抽出物を含む患者試料が、使用されうる。

【 0 0 2 8 】

リンパ節は、新鮮試料であってもよいし又は凍結されたものでもよく、好ましくは液体窒素中で急速凍結され約 - 80 で保存されたものである。血液及び骨髓の試料が収集される場合には、それらは保存され、それらの細胞が、好ましくは界面活性剤を含むグアニジン塩酸塩系溶液を使用して溶解される。フィコール (F i c o l l) 勾配分離のような血中の特定の細胞画分を濃縮する付加的な工程を、細胞溶解の前に使用してもよい。

10

【 0 0 2 9 】

血液又は骨髓のような試料が使用される場合には、mRNA抽出の前に、上皮細胞又はリンパ球の濃縮を実施することが好ましい。そのような濃縮は、イムノビーズ又は高勾配磁気細胞分離 (M A C S) のような上皮特異的結合の使用により、実施されうる (H a r d i n g h a m , I . E . ら、I n t . J . C a n c e r 20 (2000) 8 - 13 ; M a r t i n , V . M . ら、E x p . H e m a t o l o g y 26 (1998) 252 - 264)。

【 0 0 3 0 】

本発明における診断試験は、核酸プローブ又はタンパク質プローブのようなプローブを含むマトリックスを、抗体又は核酸プローブを含有している液相と接触させる段階、及び腫瘍治療の予測となる遺伝子のうちの一つの遺伝子転写又は産物を検出する段階を含む。

20

【 0 0 3 1 】

該腫瘍治療の予測となる一つの遺伝子の産物の存在を検出するため、液相中の抗体にマーカーを結合させることができる。特に、酵素アルカリホスファターゼが、マーカーとして使用される。

【 0 0 3 2 】

本発明は、プローブを含有するマトリックスを有する容器を含む、患者の腫瘍治療応答能を決定するためのキットにも関する。好ましくは、マトリックス上のプローブは核酸である。

【 0 0 3 3 】

腫瘍治療の治療効果は、細胞に対する直接的な影響に関係しうる。

30

【 0 0 3 4 】

該治療に特異的な遺伝子発現プロファイルの同定を含む、腫瘍治療に対して感受性又は抵抗性である細胞の利用能をスクリーニングするための方法を有することは有用であると考えられる。細胞は、一つまたは複数の細胞株、特に腫瘍細胞株、より具体的には原発黒色腫細胞株でありうる。

【 0 0 3 5 】

本発明のもう一つの目的は、腫瘍治療に応答性の細胞の選択を可能にする免疫学的マーカーに関する。この免疫学的マーカーは、該腫瘍治療の予測となる遺伝子の一つまたは複数の産物に特異的な抗体である。

40

【 0 0 3 6 】

最後に、本発明は、ヒト細胞に由来する、又はヒト細胞を含有している癌細胞含有被検試料が、特定の腫瘍治療による腫瘍発達、腫瘍進展、又は転移の可能性を有しているか否かを決定するための診断試験に関する。ここで、被検試料及び非腫瘍細胞に由来する第二の試料は、同一個体又は同一種の異なる個体から得られる。該試験は以下の段階を含む：

(a) 各試料を、

(i) 該治療の予測となる遺伝子のうちの少なくとも一つの核酸配列；

(i i) (i) の任意の核酸配列に相補的な核酸配列；

(i i i) (i) の核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列；及び

50

(i v) (i i) の核酸配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列からなる群より選択される核酸プローブと共に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でインキュベートする段階；

(b) 各試料の該プローブとのハイブリダイゼーションのおよその量を決定する段階；並びに

(c) 被検試料が、該第二の試料より多い量の特異的な核酸又は核酸混合物を含有しているか否かを同定するため、被検試料のハイブリダイゼーションのおよその量を、第二の試料のハイブリダイゼーションのおよその量と比較する段階。

【 0 0 3 7 】

典型的には、ハイブリダイゼーションのおよその量は、例えばハイブリダイゼーション検出時の目測的検査によって定性的に決定される。例えば、試料中の標的核酸とハイブリダイズする、標識された核酸を分離するためにゲルが使用される場合には、得られたバンドが視覚的に検査されうる。被検試料におけるハイブリダイゼーションのおよその量を、非腫瘍細胞におけるハイブリダイゼーションのおよその量と比較することができる。そのような非腫瘍細胞は、例えば、上皮細胞又は末梢血細胞である。

【 0 0 3 8 】

本発明は、制限ではなく例示のために提示される以下の実施例に基づき、さらによく理解されられると思われる。

【 0 0 3 9 】

本発明において使用される細胞株は、任意のヒト細胞株であり得る。特に、ヒト原発黒色腫より単離された応答性細胞株 CNCM I - 2 5 4 4、CNCM I - 2 5 4 6、CNCM I - 2 5 4 7、及び CNCM I - 2 5 4 8、並びに非応答性細胞株 CNCM I - 2 5 4 5 及び CNCM I - 2 5 4 9 が好ましい。これらの細胞株の培養物は、2000年8月17日に、寄託当局 (Culture Collection) 「 Collection Nationale de Cultures de Microorganismes 」 に、ブダペスト条約 (規則 6 . 1) に基づき寄託され登録された。

【 0 0 4 0 】

実施例

以下の実施例は、以下の図面と関連している。

【 0 0 4 1 】

黒色腫細胞株における IFN - α 誘導可能遺伝子の同定

細胞株及び培養条件

増殖阻害及びHLAクラスI誘導に対する感受性に関して、黒色腫細胞株をスクリーニングした。研究は、6個の細胞株 (CNCM I - 2 5 4 4、CNCM I - 2 5 4 5、CNCM I - 2 5 4 6、CNCM I - 2 5 4 7、CNCM I - 2 5 4 8、及び CNCM I - 2 5 4 9) で実施した。

【 0 0 4 2 】

これらの細胞株は全て、10% FCS、グルタミン (2 mM)、ピルビン酸ナトリウム (1 mM)、非必須アミノ酸、及び HEPES 緩衝液 (10 mM) が補足された RPMI 培地 (全て、GIBCO Life Sciences, Paisley, UK) において培養した。コンフルエントになった時点で、トリプシン処理によって細胞を継代した。

【 0 0 4 3 】

オリゴヌクレオチド・アレイ解析

剥離により培養された黒色腫細胞を採集し、全細胞 RNA を抽出した。各試料のうち 10 μ g を、市販のキット (Roche Molecular Biochemicals, Rotkreuz, Switzerland) を使用した cDNA 合成のための鋳型として直接使用した。cDNA 合成プライマーに組み込まれた T7 プロモーター配列は、鋳型増幅、及び市販のキット (Affymetrix, Santa Clara, CA) を使用したインビトロ転写によるピオチン標識を可能にした。アルカリ熱断片化の後、cDNA をアレイ (Affymetrix, Santa Clara, CA) にハイブリ

10

20

30

40

50

ダイズさせ、その後の全工程はアレイと共に供給された標準的な手法に従い実施した。生データは、GeneChipソフトウェアv3.1 (Affymetrix, Santa Clara, CA) を使用して、共焦点レーザー・スキャナー (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) を用いて収集した。

【0044】

データ解析

生データを、ME15細胞株cDNAのハイブリダイゼーションで得られた全チップ・シグナルに基づき基準化した。このアレイは、i) 対照遺伝子の5' / 3' 強度比が3未満であったこと；ii) Genechipにより遺伝子の>25%が「存在している (present)」とされたこと；iii) 画像の様相が均質であり、バックグラウンドが低く、機械的なチップ損傷の徴候がなかったこと、より選択された。

【0045】

各遺伝子のパーフェクトのシグナルと、ミスマッチ・プローブセットのシグナルとの差の平均を正規化したもの (normalized average difference) (nAD) を、特定の遺伝子の発現レベルとして使用した。含められるためには、データの対比較における少なくとも一つのnAD値が50を超えていなければならない。nADに基づき、IFN- α 曝露と関係する変化係数も計算した。人為的に高い修飾の計算を回避するため、負のnAD値は20に設定した。アーチファクトを排除するため、2倍超の大きい変化係数を有する遺伝子のみを解析に含めた。これらの基準を適用することによって、約60~80個の遺伝子が、解析された細胞株によって示差的に発現されていることが見出された。アレイ間のばらつきは、試験的研究における、同じバッチからの5個のアレイへの一つの試料のハイブリダイゼーションに基づき、2%を超えていなかった。制御様式によって、遺伝子をクラスタリングした。

【0046】

IFN- α 感受性黒色腫細胞株及び抵抗性黒色腫細胞株の同定

多数の樹立黒色腫細胞株を、IFN- α がそれらの増殖を阻害し、HLAクラスI決定基の表面発現を増加させる能力を試験することにより、IFN- α に対する感受性に関してアッセイした。

【0047】

2つの細胞株 (CNCMI-2545及びCNCMI-2549) が、IFN- α の抗増殖効果に対して抵抗性であることが見出された。

【0048】

CNCMI-2547及びCNCMI-2548の増殖は、わずか10U/mlというIFN- α 濃度によって、少なくとも50%阻害されうるが、CNCMI-2544及びCNCMI-2546は、同様の効果を誘発するのに10倍高い用量を必要とした (表1)。

【0049】

IFN- α によるHLAクラスI発現のアップレギュレーションは、その抗増殖効果と密接に関連していた。2つの活性の解離が観察されることはなかった (表1)。

【0050】

【表1】IFN- α により誘導される増殖阻害及びHLAクラスI過剰発現に対して感受性又は抵抗性の黒色腫細胞株の同定

10

20

30

40

細胞株	増殖阻害 (IC50) (a)	HLAクラス I 誘導 (b)
CNCM I-2544	+ (100 U/ml)	(442vs.305)
CNCM I-2545	-	(184vs.196)
CNCM I-2546	+ (100 U/ml)	(521vs.257)
CNCM I-2547	+ (10 U/ml)	(980vs.135)
CNCM I-2548	+ (10 U/ml)	(559vs. 380)
CNCM I-2549	-	(175vs. 203)

10

(a) 黒色腫細胞株を、1 ~ 1000 U/ml の範囲の IFN- α 濃度の存在下で培養した。3H-チミジン取り込みを、18時間のパルス処理期間の後、5日間の培養期間中、毎日測定した。IC50とは、個々の実験において検出可能な最大増殖活性の少なくとも50%の阻害を誘導する IFN- α 濃度である。

20

(b) 黒色腫細胞を、IFN- α (100 U/ml) の存在下 (左側の数字) 又は非存在下 (右側の数字) で2日間培養した後、HLAクラス I 特異的単形性 mAb で染色し、フローサイトメトリーにより試験した。データは、標識された細胞株の平均蛍光強度として表されている。

【0051】

黒色腫細胞株における腫瘍関連抗原をコードする遺伝子の検出

上記のように同定された感受性及び抵抗性の黒色腫細胞株から全細胞RNAを抽出し、逆転写し、7000個の全長ヒト遺伝子に由来するプローブセットを含有しているオリゴヌクレオチド・アレイ (Hu6800FL, PN900183) へのハイブリダイゼーションのため処理した。各遺伝子の発現レベルを、正規化平均差 (nAD、材料及び方法を参照のこと) として計算した。

30

【0052】

まず、腫瘍関連抗原 (TAA) である MART-1 / Melan-A、pmel-17 (gp100)、TRP-2、及びチロシナーゼをコードする遺伝子に関するデータセットを解析した。これらの4個の遺伝子は、CNCM I-2546 及び CNCM I-2545 細胞株において発現していることが見出されたが、CNCM I-2544、CNCM I-2546、CNCM I-2547、及び CNCN I-2548 細胞株においては発現が事実上検出不能であった (図1)。機能試験によって、これらの所見が確認された。実際、HLA-A2.1 陽性 CNCM I-2545 黒色腫細胞は、MART-1 / Melan-A、pmel-17 / gp100、チロシナーゼ、又は TRP-2 タンパク質に由来するエピトープを認識する HLA-A2.1 拘束性 CTL 株によって効率的に死滅させられた。対照的に、調査中の遺伝子を発現していない HLA-A2.1 陽性 CNCM I-2548 細胞は、特異的 CTL によって死滅させられなかった (図1)。注目すべきことに、IFN- α 処理は、これら TAA をコードする遺伝子の発現に影響を及ぼさないようである。

40

【0053】

従って、調査中の細胞系へのマイクロアレイ技術の適用は、機能レベル及び遺伝子発現レベルで同時に得られた結果によって認められる。

【0054】

黒色腫細胞株における IFN- α 受容体遺伝子発現

50

IFN- α の効果に対する示差的な感受性は、特異的受容体の示差的な発現と関係している。実際、IFN- α 受容体遺伝子(IFNAR2)からの転写物は、調査中の細胞株由来のcDNAのマイクロアレイ・ハイブリダイゼーションで、低レベル(nAD 60)で検出された(表2、遺伝子クラス5)。

【0055】

より高感度なRT-PCRアッセイ法を使用することにより、IFN- α 受容体遺伝子発現を評価した(図2B)。

【0056】

程度は異なるが、IFN- α への応答性のレベルとは無関係に、特異的転写物が全ての株において検出可能であった。

10

【0057】

可能性のあるIFN- α 応答性マーカー遺伝子の検出

黒色腫細胞株の遺伝子プロファイルを、IFN- α の重要な直接効果、即ち増殖阻害及びHLAクラスI発現のアップレギュレーションに対する感受性又は抵抗性に従い分類した。

【0058】

IFN- α 応答性に関して十分に言及された6個のヒト黒色腫細胞株からの大きなmRNA発現データセットの利用能のため、サイトカイン処理の非存在下で感受性又は抵抗性の株において優先的に発現されている遺伝子を同定することが可能となった。応答性細胞株(CNCMI-2544、CNCMI-2546、CNCMI-2547、及びCNCNI-2548)及び非応答性細胞株(CNCMI-2545及びCNCMI-2549)に由来する全遺伝子のマイクロアレイ・データを合わせ、二つの平均データセットを得た。次いで、これらのデータを、一方のグループにおいて3倍超アップレギュレートされている遺伝子に関してスクリーニングした。次いで、各細胞株における個々の発現レベルを得るため、平均データを分解した。平均からの偏差がnADの平均値の30%未満である場合、その遺伝子を陽性又は予測性とみなした。

20

【0059】

この解析によって、IFN- α 感受性細胞株において優先的に発現されている4個の遺伝子の群が同定された(図2、パネルA)。それらのうちの2個、IFI16及びRCC1は、それぞれ有糸分裂制御能及び転写活性化能を有する核タンパク質をコードしている。第3は、hox2ホメオボックス遺伝子であり、第4のh19遺伝子は、DNAメチル化及び遺伝子インプリンティングの過程に関与している非翻訳RNAをコードしている。しかしながら、注目すべきことに、IFN- α 感受性細胞株のうちの一つ、ME51は、RCC1を発現していない。

30

【0060】

他方、おそらくシグナル伝達経路の成分をコードしている2個の遺伝子、SHB及びPKC- ζ は、IFN- α 抵抗性のD10及びME67細胞株において優先的に発現されているようであった(図2、パネルB)。

【0061】

感受性細胞及び抵抗性細胞において典型的なプロファイルに従い優先的に発現されている遺伝子のパターンが、明白に出現した。IFI16、h19、及びRCC1のような細胞増殖の制御に関与している遺伝子のみならず、hox2も、感受性細胞株において優先的に発現されていることが見出された。興味深いことに、規定のシグナル伝達経路の既知の成分であるSHB及びPKC- ζ タンパク質をコードする遺伝子は、IFN- α 抵抗性細胞において優先的に発現されているようであった。これらの複雑なデータは、IFN- α 抵抗性が、単なる活性化の欠損ではなく、一連の活性イベントに起因するのかもしれないことを示唆している。

40

【0062】

感受性細胞株及び抵抗性細胞株におけるIFN- α による遺伝子発現の誘導

IFN- α の存在下で48時間培養した場合の、IFN- α 感受性黒色腫細胞株及びIF

50

N - α 抵抗性黒色腫細胞株において発現された遺伝子のパターンを調査した。CNCMI - 2546 及び CNCMI - 2545 を、詳細に研究した。解析は、未処理の細胞と比較して少なくとも 3 倍アップレギュレート又はダウンレギュレートされており、四つの実験のうちの一つにおいて少なくとも 50 という nAD 値を示した遺伝子に焦点を当てた。

【0063】

クラスタ 1 (表 2) には、感受性 CNCMI - 2546 細胞株においてのみ誘導可能な遺伝子が含まれる。予想通り、これらの遺伝子の発現は、IFN - α 抵抗性 CNCMI - 2545 細胞においては、処理によって有意な影響を受けなかった。この遺伝子セットには、HLA クラス I 遺伝子、2 - 5A シンセターゼ、TAP - 1、多数のインターフェロン誘導可能タンパク質をコードする遺伝子のみならず、p27 サイクリン依存性キナーゼ阻害剤及び ROX タンパク質も含まれる。アンブラキシン (amp lax in) 又は ems - 1 をコードする、腫瘍細胞において高頻度に増幅される遺伝子座 11q13 に由来する単一の遺伝子は、両方の株において IFN - α により誘導されるようであった (クラスタ 2)。

10

【0064】

既知の IFN - α 誘導可能遺伝子である ip - 30、及び dss1 を含むクラスタ 3 遺伝子は、CNCMI - 2545 抵抗性細胞株において誘導されたが、それらの発現は CNCMI - 2546 感受性細胞においては有意に改変されなかった。クラスタ 4 には、クラスタ 1 とは対照的に、IFN - α 抵抗性 CNCMI - 2545 においてダウンレギュレートされる、CNCMI - 2546 において IFN - α により誘導可能な付加的な遺伝子が含まれる。興味深いことに、IFN - α シグナル伝達に参与している転写因子 ISGF - 3 が、他の IFN 関連遺伝子を含んでいるこのクラスタに属する。クラスタ 5 は、抵抗性 CNCMI - 2545 細胞においては IFN - α 処理によりダウンレギュレートされるが、感受性 CNCMI - 2546 細胞においては事実上影響を受けない遺伝子を含む。興味深いことに、このクラスタは、IFN - α 受容体をコードする遺伝子を含む。クラスタ 6 は、CNCMI - 2545 抵抗性細胞株においては基本的に発現が検出不可であり、CNCMI - 2546 IFN - α 感受性細胞においてはダウンレギュレートされる、2 つの遺伝子 (irf - 2、及びインターフェロンにより誘導される細胞抵抗性メディエーター) を含んでいる。興味深いことに、IRF - 2 遺伝子産物は、I 型 IFN 誘導可能遺伝子のプロモーター領域と結合し、転写を防止することが既知である。従って、ダウンレギュレーションは、IFN 誘導可能遺伝子の活性化を促進することができる。

20

30

【0065】

下記の表 2 においては、100 U/ml IFN - α の非存在下又は存在下で 48 時間培養された CNCMI - 2546 及び CNCMI - 2545 を、繊維肉腫細胞において得られたデータと一致するよう、サイトカインによりモジュレートされる遺伝子発現をアッセイするために使用した。この解析により、6 個の遺伝子クラスタが得られた。クラスタ 1 は、IFN - α 感受性 CNCMI - 2546 においてのみ誘導される遺伝子を含んでいる。クラスタ 2 は、両方の株においてアップレギュレートされるアンブラキシン (amp lax in) を含んでおり、クラスタ 3 は、CNCMI - 2545 抵抗性株においてのみ誘導される遺伝子を含んでいる。クラスタ 4 は、CNCMI - 2545 においてダウンレギュレートされ、CNCMI - 2546 において誘導される遺伝子を指す。クラスタ 5 は、CNCMI - 2545 においてダウンレギュレートされる遺伝子を含み、クラスタ 6 は、CNCMI - 2546 においてダウンレギュレートされる遺伝子を指す。データは、マッチ・プローブセットとミスマッチ・プローブセットとのシグナル強度の差の平均として提示されている。

40

【0066】

【表 2】 IFN - α により調節される遺伝子

クラスター		CNCMI-2545 (-)	CNCMI-2545 (+)	CNCMI-2546 (-)	CNCMI-2546 (+)	CNCMI-2545 CF	CNCMI-2546 CF	クラスター
U51127	インターフェロン 制御因子5	262	91	3	116	-1.88	4.8	~u
X07730	前立腺特異抗原	234	85	-64	132	-1.75	5.6	~u
X57522	ring4 cdna	143	49	-49	97	-1.92	3.85	~u
Z56281	インターフェロン 制御因子3	93	31	12	136	-2	5.8	~u
J04164	インターフェロン 誘導可能タンパク質 27-sep	-447	-97	-89	2066	0	102.3	~u
U50648	インターフェロン 誘導可能rna依存性 プロテinkinナーゼ (pkr)	106	46	-70	71	-1.3	2.55	~u

X67325	p27		-460	-86	-211	410	0	19.5	~u
HG658	主要組織適合性 複合体シラスI _C		1183	455	156	1692	-1.6	9.85	~u
M13755	インターフェロン 誘導性17-kda/15-kda タンパク質		-163	31	-181	716	0.55	34.8	~u
D28137	bst-2,		37	88	28	305	1.38	9.89	~u
M19650	2',3'-サイクリク ヌクレオチド3 プライムホスホ ジエステラーゼ		137	99	55	269	-0.38	3.89	~u
X96401	roxタンパク質		229	83	34	143	-1.76	3.21	~u
U22970	16-Jun遺伝子、 インターフェロン 誘導可能ペプチド (6-16)		-190	24	43	2363	0.2	53.95	~u

X57351	インターフェロン誘導可能遺伝子ファミリーの1-8d遺伝子	2469	2686	24	297	0.09	11.38	~u
X02874	2-5Aシンセターゼ(1.6kb)	57	-4	-116	486	-1.85	23.3	~u
J00105	β 2ミクログロブリン遺伝子	1668	2101	248	1453	0.26	4.86	~u
M94880	mhcクラスi (hla-a*8001)	551	421	202	932	-0.31	3.61	~u
HG2917	主要組織適合性複合体クラスi, c	353	322	147	813	-0.1	4.53	~u
D49824	hla-bヌル対立遺伝子	527	267	144	925	-0.97	5.42	~u

[illegible]

U72882	インターフェロン誘導性ロイシンジッパータンパク質 (ifp35)	125	27	-9	502	-3.63	24.1	du
U53830	インターフェロン制御因子-7a	103	5	-31	237	-4.15	10.85	du
M97935	転写因子 ifsgf-3	331	92	-37	296	-2.6	13.8	du
U01824	グルタミン酸/アスパラギン酸トランスポーター	339	35	-73	91	-8.69	3.55	du
クラスダ5								
J00212	白血球インターフェロン (ifn- α)	106	9	138	49	-4.3	-1.82	d~
U52513	rig-g,	289	10	49	96	-13.45	0.96	d~
X90846	混合系統キナーゼ2	357	60	425	173	-4.95	-1.46	d~

L42243	ifnar2遺伝子 (インターフェロン 受容体)	62	-6	46	-4	-2.1	-1.3	d~
M79462	pml-1	201	11	43	1	-9.05	-1.15	d~
K01900	白血球インター フェロン α 201塩基	156	7	55	85	-6.8	0.55	d~
クラスタ6								
M30818	インターフェロン 誘導性細胞抵抗性 媒介タンパク質	20	5	756	155	0	-3.88	~d
X15949	インターフェロン 制御因子-2 (irf-2)	0	13	67	11	0	-2.35	~d

10

20

30

40

50

カラム 1 = GenBank ID ; カラム 2 = 遺伝子名 ; カラム 3 = IFN - α の非存在
 下で培養された CNCM I - 2545 における nAD ; カラム 4 = IFN - α の存在下
 で培養された CNCM I - 2545 における nAD ; カラム 5 = IFN - α の非存在下
 で培養された CNCM I - 2546 における nAD ; カラム 6 = IFN - α の存在下で

培養された CNCM I - 2546 ; カラム 7 = CNCM I - 2545 における変化係数 (CF) ; カラム 8 = CNCM I - 2546 における変化係数 ; カラム 9 = クラスタの特徴 (~ = 変化なし ; d = ダウンレギュレート ; u = アップレギュレート) 。

【 0067 】

新規な IFN - α 誘導可能遺伝子の検出

表 3 に報告されるクラスタ 1 及び 2 は、黒色腫細胞処理により発現がアップレギュレートされうる、IFN - α 誘導可能であることがこれまで知られていなかった遺伝子を含んでいる。クラスタ 1 は、感受性細胞においてのみ誘導される遺伝子を含み、クラスタ 2 は、「表現型上の」感受性に関わらず、黒色腫細胞の IFN - α 処理によってアップレギュレートされる遺伝子を指す。これらの遺伝子のうちのいくつかは、明らかに、メラニン細胞 (黒色腫分化抗原 (melanoma differentiation antigen)、mda - 6) 又は神経外胚葉 (例えば、ニューロロイキン (neuroleukin) 又はカテコール o - メチルトランスフェラーゼ) の細胞株列に属し、例えば、血漿ゲルゾリン又はスベルミジンシンターゼをコードするもののような他の明白に誘導可能な遺伝子は、明確な類似の組織特異的分類に当てはまらなかった。表 3 中のクラスタ 2 は、解析された両方の株における IFN - α 応答性に関わらず、誘導可能な新規遺伝子を含んでいる。多数のこれらの遺伝子 (rheb、PP1、ATPase、セラミダーゼ、eif3) が、機能的には細胞内シグナル伝達経路に関係している。

10

【 0068 】

下記の表 3 においては、100 U / ml IFN - α の非存在下又は存在下で 48 時間培養された CNCM I - 2546 及び CNCM I - 2545 細胞株を、繊維肉腫細胞においては発現が調節されないことが見出された、新規なサイトカインにより誘導される遺伝子を同定するために使用した。クラスタ 1 は、CNCM I - 2546 感受性細胞株において誘導可能であるが、CNCM I - 2545 抵抗性細胞株においては誘導可能でない遺伝子を含んでいる。クラスタ 2 は、両方の株において誘導可能な遺伝子を含んでいる。データは、マッチ・プローブセットとミスマッチ・プローブセットとのシグナル強度の差の平均として提示されている。

20

【 0069 】

【表 3】新規な IFN - α 誘導可能遺伝子

クラスター		CNCMI-2545 (-)	CNCMI-2545 (+)	CNCMI-2546 (-)	CNCMI-2546 (+)	CNCMI-2546 CF	CNCMI-2545 CF	CNCMI-2546	クラスター
L37043	カゼインキナーゼi _ε	218	221	0	441	0.01	21.05	~u	
D32050	アラニル-tRNAシンセターゼ	1458	761	21	427	-0.92	19.33	~u	
D28137	bst-2	37	88	28	305	1.38	9.89	~u	
S81914	icx-1=放射線誘導可能 前初期遺伝子	-66	21	31	312	0.05	9.06	~u	
X95325	dna結合タンパク質a異型	634	253	58	375	-1.51	5.47	~u	
U91316	アシル-coaチオエステレル ヒドロラーゼ	253	428	141	706	0.69	4.01	~u	
U47025	胎児脳グリコーゲン ホスホリラーゼ _b	672	465	193	924	-0.45	3.79	~u	
Z26491	遺伝子・カタコール ^o - メチルトランスフェラーゼ	238	181	73	337	-0.31	3.62	~u	

10

20

30

40

L13210	mac-2結合タンパク質	2555	2092	444	2016	-0.22	3.54	~u
K03515	ニューロロイキン	2998	2552	487	2126	-0.17	3.37	~u
U09579	黒色腫分化関連 (mda-6)	-59	-26	83	361	0	3.35	~u
U72206	グアニンヌクレオチド制御因子 (lfp40)	238	162	113	459	-0.47	3.06	~u
X76538	mpv17	132	101	77	313	-0.31	3.06	~u
U18009	染色体17q21クローン1f113	674	423	187	735	-0.59	2.93	~u
U69126	fusc結合タンパク質2 (fbp2)	114	159	77	302	0.39	2.92	~u
U50327	プロテインキナーゼの基質80k-h 遺伝子 (prkcs1)	401	236	80	312	-0.7	2.9	~u
D21235	hhr23aタンパク質	388	346	150	582	-0.12	2.88	~u
HG1612	macnarks	588	505	401	1440	-0.16	2.59	~u
X04412	血漿ゲルノリン	220	220	107	372	0	2.48	~u

U65579	ミトコンドリア ^{nadh} デヒドロゲナーゼ-ユビキノ	630	621	110	377	-0.01	2.43	~u
Y00264	アミロイド ^{a4} 前駆体	392	427	89	304	0.09	2.42	~u
M31013	非筋肉ミオシン重鎖 (nmhc)	377	263	132	441	-0.43	2.34	~u
M34338	スベルミジンシンターゼ	472	277	429	1413	-0.7	2.29	~u
D50914	EST	234	78	110	359	-2	2.26	~u
U18018	elaエンハンサー結合タンパク質 (ela-f)	11	23	107	340	0.15	2.18	~u
U61263	アセト乳酸シンターゼホモログ	410	301	150	464	-0.36	2.09	~u
U65932	細胞外マトリックスタンパク質1 (ecm1)	2498	1066	300	907	-1.34	2.02	~u
クラスタ2								
D78132	rheb遺伝子、ras関連gtp結合 タンパク質遺伝子	88	253	119	307	1.88	1.58	uu

10

20

30

40

M65028	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質 a/b	154	353	153	326	1.29	1.13	uu
X70848	プロテインホスファターゼ1、 触媒サブユニット	24	226	122	370	8.42	2.03	uu
J04182	リソソーム膜糖タンパク質-1 (lamp1)	66	484	168	452	6.33	1.69	uu
J04444	シトクロムc-1遺伝子	886	2268	309	1286	1.56	3.16	uu
L07633	インターフェロン- γ	22	275	184	463	11.5	1.52	uu
L35249	液胞型h+-atpase mr56,000 サブユニット (ho57)	-40	357	92	227	16.85	1.47	uu
M60784	u1 snrnp特異的タンパク質	115	413	24	216	2.59	8	uu
U70063	ヒト酸性セラミダーゼ	115	400	86	221	2.48	1.57	uu
U78525	ヒト肝細胞細胞開始因子 (eif3)	165	372	275	589	1.25	1.14	uu

Z47055	ファルネシルピロリン酸 シンセターゼ様	394	797	263	529	1.02	1.01	uu
--------	------------------------	-----	-----	-----	-----	------	------	----

10

20

30

40

50

カラム 1 = GenBank ID ; カラム 2 = 遺伝子名 ; カラム 3 = IFN - α の非存在
 下で培養された CNCM I - 2545 における nAD ; カラム 4 = IFN - α の存在下
 で培養された CNCM I - 2545 における nAD ; カラム 5 = IFN - α の非存在下
 で培養された CNCM I - 2546 における nAD ; カラム 6 = IFN - α の存在下で
 培養された CNCM I - 2546 ; カラム 7 = CNCM I - 2545 における変化係数
 (CF) ; カラム 8 = CNCM I - 2546 における変化係数 ; カラム 9 = クラスターの

特徴 (~ = 変化なし ; d = ダウンレギュレート ; u = アップレギュレート) 。

【 0 0 7 0 】

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関する
ブタベスト条約

国際様式

寄託者：

ホフマンロシュ AG
F.Hoffmann-La Roche AG
Postfach
CH-4070 Basel

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い発行される
原寄託についての受託証

寄託者の名称および住所

10

I. 微生物の表示

寄託者が付した識別のための表示：

A375

国際寄託当局による受託番号：

I - 2544

20

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。



科学的性質



分類学上の位置

(あてはまるものに×をマークする)

III. 受託および寄託

本国際寄託当局は 2000 年 8 月 17 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。

30

IV. 移管請求の受領

本国際寄託当局は 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。そして、 年 月 日に原寄託より
ブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。

V. 国際寄託当局

名称：

CNCM
Collection Nationale
de Cultures de Microorganismes

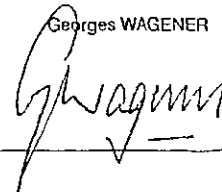
国際寄託当局を代表する権限のある職員：

宛名：

INSTITUT PASTEUR
28, Rue du Docteur Roux
F-75724 PARIS CEDEX 15

2000 年 11 月 9 日

Georges WAGENER



40

1. ここは規則 6.4(d) に従い、国際寄託当局としての地位を取得した日。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関する
ブタベスト条約

国際様式

寄託者：

ホフマンロシュ AG

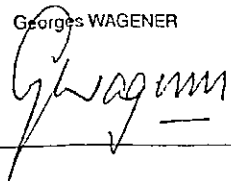
F.Hoffmann-La Roche AG
Postfach

CH-4070 Basel

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い発行される
原寄託についての受託証

寄託者の名称および住所

10

I. 微生物の表示	
寄託者が付した識別のための表示： D10	国際寄託当局による受託番号： I - 2545
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 ☒ 科学的性質 ☒ 分類学上の位置 (あてはまるものに×をマークする)	
III. 受託および寄託	
本国際寄託当局は 2000 年 8 月 17 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。そして、 年 月 日に原寄託より ブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
名称： CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes 宛名： INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	国際寄託当局を代表する権限のある職員： Georges WAGENER  2000年11月9日

20

30

40

1 ここは規則 6.4(d) に従い、国際寄託当局としての地位を取得した日。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関する
ブタベスト条約

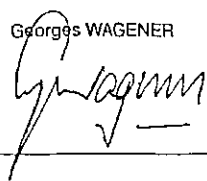
国際様式

寄託者：

ホフマンロシュ AG
F.Hoffmann-La Roche AG
Postfach
CH-4070 Basel下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い発行される
原寄託についての受託証

寄託者の名称および住所

10

I. 微生物の表示	
寄託者が付した識別のための表示： ME15	国際寄託当局による受託番号： I - 2546
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 ☒ 科学的性質 ☒ 分類学上の位置 (あてはまるものに×をマークする)	
III. 受託および寄託	
本国際寄託当局は 2000 年 8 月 17 日(原寄託日)に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は 年 月 日(原寄託日)に I 欄の微生物を受領した。そして、 年 月 日に原寄託より ブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
名称： CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes 宛名： INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	国際寄託当局を代表する権限のある職員： Georges WAGENER  2000年11月9日

20

30

40

1. ここは規則 6.4(d) に従い、国際寄託当局としての地位を取得した日。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関する
ブタベスト条約

国際様式

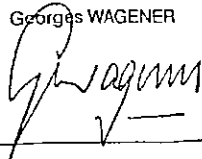
寄託者:

ホフマンロシュ AG
F. Hoffmann-La Roche AG
Postfach
CH-4070 Basel

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い発行される
原寄託についての受託証

寄託者の名称および住所

10

I. 微生物の表示	
寄託者が付した識別のための表示: ME51	国際寄託当局による受託番号: I - 2547
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
☒	科学的性質
☒	分類学上の位置
(あてはまるものに×をマークする)	
III. 受託および寄託	
本国際寄託当局は 2000 年 8 月 17 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。そして、 年 月 日に原寄託より ブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
名称: CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	国際寄託当局を代表する権限のある職員: Georges WAGENER  2000 年 11 月 9 日
宛名: INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	

20

30

40

1. ここは規則 6.4(d) に従い、国際寄託当局としての地位を取得した日。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関する
ブタベスト条約

国際様式

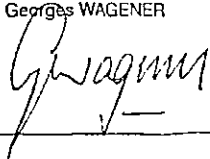
寄託者：

ホフマンロシュ AG
F.Hoffmann-La Roche AG
Postfach
CH-4070 Basel

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い発行される
原寄託についての受託証

寄託者の名称および住所

10

I. 微生物の表示	
寄託者が付した識別のための表示： ME59	国際寄託当局による受託番号： I - 2548
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 ☒ 科学的性質 ☒ 分類学上の位置 (あてはまるものに×をマークする)	
III. 受託および寄託	
本国際寄託当局は 2000 年 8 月 17 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。そして、 年 月 日に原寄託より ブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
名称： CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes 宛名： INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	国際寄託当局を代表する権限のある職員： Georges WAGENER  2000 年 11 月 9 日

20

30

40

1. ここは規則 6.4(d) に従い、国際寄託当局としての地位を取得した日。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関する
ブタベスト条約

国際様式

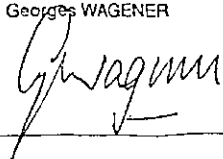
寄託者:

ホフマンロシュ AG
F.Hoffmann-La Roche AG
Postfach
CH-4070 Basel

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い発行される
原寄託についての受託証

寄託者の名称および住所

10

I. 微生物の表示	
寄託者が付した識別のための表示: ME67	国際寄託当局による受託番号: I - 2549
II. 科学的性質及び分類学上の位置	
I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
☒ 科学的性質 ☒ 分類学上の位置 (あてはまるものに×をマークする)	
III. 受託および寄託	
本国際寄託当局は 2000 年 8 月 17 日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。	
IV. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は 年 月 日 (原寄託日) に I 欄の微生物を受領した。そして、 年 月 日に原寄託より ブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
V. 国際寄託当局	
名称: CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes 宛名: INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	国際寄託当局を代表する権限のある職員: Georges WAGENER  2000 年 11 月 9 日

20

30

40

1. ここは規則 6.4(d) に従い、国際寄託当局としての地位を取得した日。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 黒色腫細胞株における腫瘍関連抗原及び I F N - α 受容体をコードする遺伝子の発現を示す図である。

パネル A : 腫瘍関連抗原をコードする遺伝子の発現。

細胞株 CNCM I - 2544 (375)、CNCM I - 2545 (D10)、CNCM 50

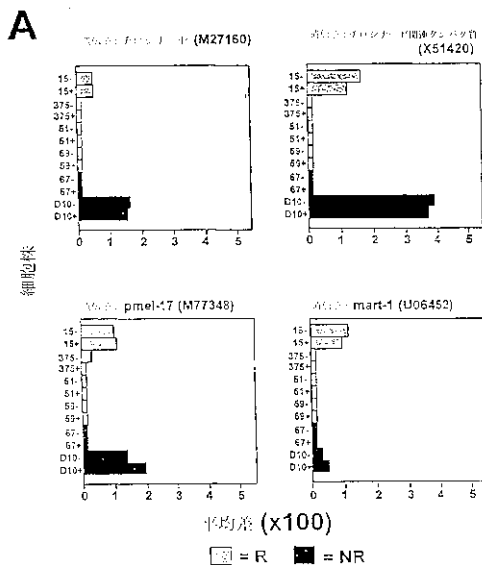
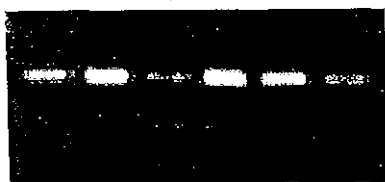
I - 2546 (15)、CNCM I - 2547 (51)、CNCM I - 2548 (59)、及びCNCM I - 2549 (67)を、100 U/ml IFN- α の存在下(+)又は非存在下(-)で48時間培養した。HLA拘束性腫瘍関連抗原であるチロシナーゼ、チロシナーゼ関連タンパク質-2、pme1-17、及びmart-1をコードする遺伝子の発現パターンが報告されている。灰色のバーはIFN- α 感受性細胞株を指し、黒色バーはIFN- α 抵抗性株を指す(表1参照)。データは、マッチ・プローブセットとミスマッチ・プローブセットとのシグナル強度の差の平均として提示されている。

パネルB: IFN- α 受容体遺伝子発現が、25サイクルRT-PCRにより、IFN- α 感受性黒色腫細胞株及びIFN- α 抵抗性黒色腫細胞株において検出される。

【図2】IFN- α 感受性黒色腫細胞株又はIFN- α 抵抗性黒色腫細胞株において優先的に発現されている遺伝子を示す図である。

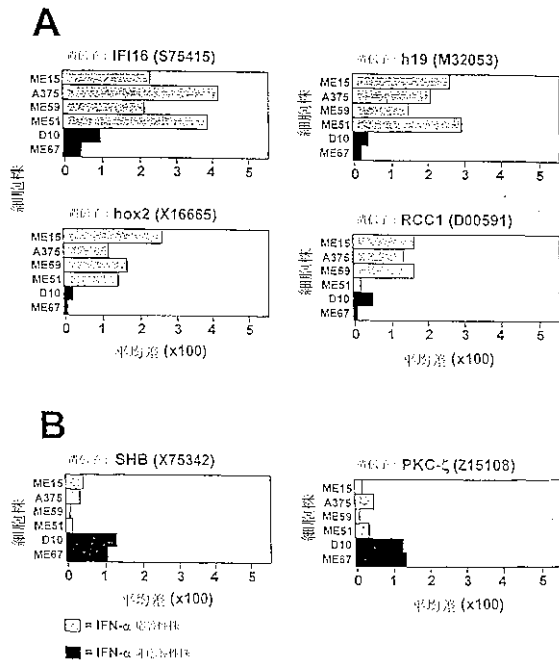
オリゴヌクレオチド・アレイ発現データを、未処理細胞より収集した。感受性細胞株(CNCM I - 2544 (A375)、CNCM I - 2546 (ME15)、CNCM I - 2547 (ME51)、及びCNCN I - 2548 (ME59))、又は抵抗性細胞株(CNCM I - 2545 (D10)及びCNCM I - 2549 (ME67))からのデータを、2つのデータ・セット(パネルA及びパネルB)へと合わせた。次いで、一方の群において少なくとも3倍アップレギュレートされている遺伝子を同定するため、個々の遺伝子についての平均値をフィルターした。データは、マッチ・プローブセットとミスマッチ・プローブセットとのシグナル強度の差の平均として提示されている。

【図1】

**B**IFN- α 受容体 (L42243)

15 375 51 59 67 D10

【図2】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/18633 A2(51) International Patent Classification: C12Q 1/68.
G01N 33/50, C07K 16/18

(21) International Application Number: PCT/EP01/09556

(22) International Filing Date: 26 August 2001 (26.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 06/18603.0 28 August 2000 (28.08.2000) EP

(71) Applicant: E. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH/CH);
124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basel (CH).(81) Designated States (*internationally*): AP, AT, AU, AM, AI, AL, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, ES, FI, GB, GD, GG, GR, GU, HK, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (*regionally*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(72) Inventor: CERTA, Ulrich; Bettenstrasse 58, CH-4124 Allschwil (CH).

(74) Agent: WITTE, Hubert; 124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basel (CH).



WO 02/18633 A2

(54) Title: DETERMINATION OF THE ABILITY OF PATIENTS TO RESPOND TO TUMOUR TREATMENT

(57) Abstract: The present invention relates to a method for screening patients to determine their ability to respond to a tumour treatment and also to a diagnostic test for carrying out the said method.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 1 -

Determination of the ability of patients to respond to tumor treatmentField of The Invention

5 The present invention relates to a method for screening patients to determine their ability to respond to a tumor treatment. It concerns also a diagnostic test for carrying out the said method.

Background of The Invention

10 Treatment capable of opposing the development of tumors have a lot of interest in the therapeutically research. Since not all tumors are the same, only some of the patients respond to a particular tumor treatment.

Furthermore, in subgroups of patients, specific activities of tumor treatments are accompanied by toxic effects for health, including, for example, gastrointestinal disorders, hypo- or hypertension, tachycardia, fatigue/asthenia or headache. In other subgroups of patients, no obvious beneficial effects are observed.

15 Finally, tumor cells change over time and may eventually become resistant to a specific tumor treatment.

Carcinogenesis, tumor progression and metastasis result from an imbalanced transcriptional program, inappropriate post-translational modifications and deregulated epigenetic modifications (Schwartzke, M. et al., Anticancer Res 19 (1999) 1801-1814; Pardee, A.B., Advances in Cancer Res 65 (1994) 213-227; Ponta, H., Biochim Biophys Acta 1198 (1994) 1-10). Changes of the transcriptional program are due to oncogenes and tumor suppressor genes, fusion proteins created by cytogenetic alterations, altered expression of genes due to unscheduled methylation by DNA methyltransferases and chromatin modifying enzymes such as histone acetyltransferases and histone deacetylases (Lin, R.J. et al., Trends Genet 15 (1999) 179-184; Stunnenberg, H.G. et al., Biochem Biophys Acta 1423 (1999) F15-F33).

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 2 -

One major difficulty is that, at present, it is only rarely possible to predict whether a particular patient's tumor will respond to a specific tumor treatment. It is also difficult to predict how tumor cells change over time and if they become resistant to a specific tumor treatment.

5 For identification of tumor-related candidate genes, transcriptional profiling of cellular systems such as metastasizing versus non-metastasizing cell lines and tumor specimen corresponding to different stages of progression is the first step for achievement of this goal (Schiemann, S. et al., *Anticancer Research* 17 (1997) 13-20; Schwirzke, M. et al., *Anticancer Research* 18 (1998) 1409-1422; Schiemann, S. et al., *Clin Exp Metastasis* 16 (1998) 129-139). Further steps involve analysis of
10 prevalence of the identified alteration in different tumors, in-vitro modulation of the gene under consideration by overexpression and downregulation making use of antisense RNA or ribozymes in stable transfectants and assessing the consequences in relevant in-vitro systems. The advent of nude mouse systems,
15 including subcutaneous xenograft systems and orthotopic implantation in which the natural tropism of metastasis of the tumor under investigation is maintained, has paved the way for assessment of the functional role of candidate genes in vivo (Fidler, I.J., *Cancer Metastasis Rev* 50 (1986) 29-49).

20 Clinical, immunological or molecular features enabling a targeted selection of patients likely to take advantage of tumor treatments have not been identified so far.

Clearly, the possibility to develop criteria predicting the potential effectiveness of tumor treatments would be of high clinical relevance since it would spare unnecessary toxicity to non responders and it would contribute to the
25 identification of specific responder patients' subgroups.

Summary of The Invention

The present invention provides a method for screening patients to determine their ability to respond to a tumor treatment, said method comprising measuring
30 by said patients the expression level of one or more genes responsive for said treatment and comparing the result of measurement to a reference sample. The present invention also concerns a diagnostic tests for carrying out said method.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 3 -

Detailed Description of The Invention

The expression "tumor treatments" as used herein includes all biological or chemical antitumor drugs.

5 The expression "reference sample" as used herein concerns a reference of gene expression level characteristic of normal cells or of normal tissue extracts.

10 The term "IFN- α " as used herein includes IFN- α s derived from any natural material (e.g., leukocytes, fibroblasts, lymphocytes) or material derived therefrom (e.g. cell lines), or those prepared with recombinant DNA technology. Details of the cloning of IFN- α and the direct expression thereof, especially in *E. coli*, have been the subject of many publications. The preparation of recombinant IFN- α s is known, for example from Goeddel et al. (1980) *Nature* 284, 316-320 and (1981), *Nature* 290, 20-26, and European Patents Nos. 32134, 43980 and 211148. There are many types of IFN- α such as IFN- α 1, IFN- α 2; and further their subtypes including but not limited to IFN- α 2A, IFN- α 2B, IFN- α 2C and IFN- α II (also designated IFN- α LI or w-IFN). In the present invention, the use of IFN- α 2A is preferred. The manufacture of IFN- α 2A is described in European Patents Nos. 43980 and 211148.

20 The method of the present invention for screening patients to determine their ability to respond to a tumor treatment comprises measuring the expression level of at least one of the genes predictive for said treatment in patient samples and comparing the result of the measurement with the result obtained with a reference sample.

25 The present invention is useful for screening patients suffering from tumor. Exemplary tumors include ovaries cancer, prostate cancer, breast cancer, colon cancer, liver cancer, stomach cancer or lung cancer. Of particular interest is melanoma cancer.

In the present invention, the tumor treatment may include tumor drugs like cytokine, for example.

It may include an active ingredient IFN- α or pegylated IFN- α conjugate in a therapeutically effective amount to decrease the severity of the viral infection.

30 The IFN- α used in this invention may be conjugated to a polymer such as a polyalkylene glycol (substituted or unsubstituted), for example polyethylene glycol, to form PEG-IFN- α . Conjugation may be accomplished by means of various

WO 02/18633

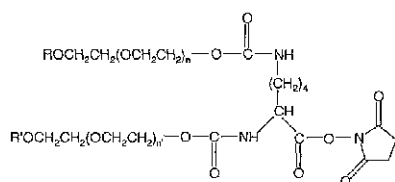
PCT/EP01/09556

- 4 -

linkers known in the art, in particularly by linkers such as those disclosed in European Patent Applications, Publication Nos. 0510356 and 593868 and European Patent Application No. 97108261.5. The molecular weight of the polymer, which is preferably polyethylene glycol, may range from 300 to 30,000 Dalton, and one or more, preferably one to three, polymers may be conjugated to the IFN- α .

Most preferably, the reagents attach to primary amino groups on for example lysine or to the N-terminus of the IFN- α . The reagents can also attach to a hydroxyl on for example serine. One or more, preferably one to three, PEGs may be conjugated to the IFN- α .

A most preferred reagent is of the formula



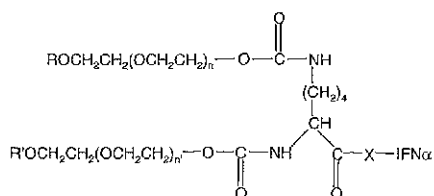
in which a total of 2 monomethoxy PEG (m-PEG) chains is linked to lysine, one at the α and ϵ amino groups via carbamate (urethane) bonds and the lysine carboxyl group is activated to a succinimidyl ester. This reagent may be obtained by conventional means, according to known procedures (Monfardini et al., "A branched monomethoxypoly(ethylene glycol) for protein modification", Bioconjugate Chem. 6:62, 1995) applicable to a reagent with R being lower alkyl and having a desired n. This reagent may be obtained from Shearwater Polymers, Inc. (Huntsville, Alabama). The preferred average molecular weight of the PEG is about 20,000 Daltons, providing a total PEG mass of about 40,000 Daltons in PEG2-NHS (other molecular weights may be obtained by varying n for the PEG-alcohol starting materials for the reagent of the above formula, by conventional means.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

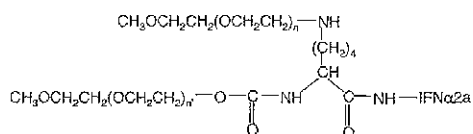
- 5 -

A preferred pegylated-IFN- α conjugate has the formula:



wherein R and R' are independently lower alkyl; X is NH or O; n and n' are integers having a sum of from 600 to 1500; and the average molecular weight of the polyethylene glycol in said conjugate is from about 26,000 Daltons to about 66,000 Daltons.

Most preferred is the pegylated interferon- α of the formula



wherein n and n' are independently 420 or 520. This pegylated IFN- α conjugate is known, for example in European Patent Application EP 809996, incorporated herein by reference.

The IFN- α used in the present invention may be associated with other active pharmaceutical compounds, like mycophenolate mofetil, ribavirin or amantadine.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 6 -

Measurement of the expression level of genes in the present invention can be carried out in a variety of ways:

- in situ hybridization with fixed whole cells, with fixed tissue samples,
- Southern hybridization (DNA detection) (Sambrook et al., Molecular Cloning, vol. 2, 9.31-9.57),
- Northern hybridization (RNA detection) (Sambrook et al., Molecular Cloning, vol. 1, 7.37 & 7.39),
- serum analysis (e.g., cell type analysis of cells in the serum by slot-blot analysis),
- after amplification (e.g., PCR technique) (Sambrook et al., Molecular Cloning, vol. 2, 14.2-14.4).

Gene expression may be measured directly by RNA analysis such as Northern blot or Dot blot techniques. Such blotting techniques require the use of nucleic acid probes, usually radiolabelled, specific to at least one of the genes predictive for said treatment. Probes may be prepared synthetically based on the known nucleotide sequences of the predictive genes of reference sample. For Northern blotting RNA is obtained from tissue extracts by conventional methods. The RNA is then denatured and separated on an agarose gel by electrophoresis followed by transfer to a nylon or a cellulose nitrate filter by blotting and fixation by baking. The filter is then exposed to a single labeled complementary probe and mRNA of interest is detected, usually, by autoradiography. Dot blotting is similar except that the mRNA is not electrophoresed before immobilization. In situ hybridization may also be used to measure gene expression by the level of mRNA.

Alternatively, gene expression may be measured by the level of gene product by Western blotting and by immunohistochemical staining, for example. According to Western blotting measurement, predictive proteins of the reference sample and the sample to be tested or peptides of said proteins are separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred on to nitrocellulose membrane. After washing, the nitrocellulose membrane is then incubated with antibodies labeled with radioactive or fluorescence labels. According to immunohistochemical staining antibodies may be either monoclonal or polyclonal and may be prepared against a synthetic peptide based on the reported DNA of at

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 7 -

least one predictive gene of a reference sample. Those synthetic peptides may then be used as immunogen in preparing antibodies by well-known techniques. Immunogen may be also directly prepared from the native product of at least one of the predictive genes for tumor treatment and/or portions thereof.

5

In the present invention, for determining the ability of patients to respond to a tumor treatment, patient samples are prepared depending on the nature of the cancer. Patient samples including blood, urine, serum, lymph node, bone marrow, cell extracts or tissue extracts may be used, for example.

10

The lymph node may be fresh samples or frozen, preferably snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at about -80°C. Blood and bone marrow samples, upon collection, are stored and their cells lysed using preferably a guanidine hydrochloride-based solution with detergent. Additional steps to enrich specific cell fractions in blood, such as Ficoll-gradient separation, can also be used prior to

15

If samples such as blood or bone marrow are used, it is preferred to perform an enrichment of epithelial cells or lymphocytes prior to mRNA extraction. Such an enrichment can be done by the use of epithelial specific binding such as immuno beads or high gradient and magnetic cell sorting (MACS) (Hardingham, I.E., et al., *Int. J. Cancer* 20 (2000) 8-13; Martin, V.M., et al., *Exp. Hematology* 26 (1998) 252-264).

20

The diagnostic test in the present invention comprises contacting a matrix with probes like nucleic acid or protein probes with a liquid phase containing antibodies or nucleic acid probes and detecting gene transcription or product of one of the genes predictive for tumor treatment.

25

For detecting the presence of the product of one gene predictive for said tumor treatment, the antibodies in the liquid phase may be bound to a marker. Particularly, the enzyme alkaline phosphatase is used as marker.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 8 -

The present invention also relates to a kit for determining the ability of patients to respond to a tumor treatment, said kit comprising a container with a matrix with probes. Preferably, the probes on the matrix are nucleic acids.

5 The therapeutic efficacy of tumor treatment may be related to direct effects on the cells.

It would be useful to have a method for screening the availability of cells to be sensitive or resistant to tumor treatment, said method comprising the identification of gene expression profiles specific of said treatment. Cells may be one or more cell lines, especially tumor cell lines and more particularly melanoma
10 primary cell lines.

Another object of the present invention concerns an immunological marker enabling the selection of cells responding to a tumor treatment. This immunological marker is an antibody specific for a product of one or more of the genes predictive for said tumor treatment.

15 Finally the present invention concerns a diagnostic test for determining whether or not a cancer cell-containing test sample originating from or containing human cells has potential for tumor development, tumor progression or metastasis with a specific tumor treatment, wherein the test sample and a second sample originating from non-tumor cells obtained from the same individual or a different
20 individual of the same species, which test comprises the following steps:

(a) incubating each respective sample under stringent hybridization conditions with a nucleic acid probe which is selected from the group consisting of:

- (i) a nucleic acid sequence of at least one of the genes predictive for said treatment;
- 25 (ii) a nucleic acid sequence which is complementary to any nucleic acid sequence of (i);
- (iii) a nucleic acid sequence which hybridizes under stringent conditions with the sequence of (i); and
- 30 (iv) a nucleic acid sequence which hybridizes under stringent conditions with the sequence of (ii); and

(b) determining the approximate amount of hybridization of each respective sample with said probe, and

- (c) comparing the approximate amount of hybridization of the test sample to an approximate amount of hybridization of said second sample to identify whether or not the test sample contains a greater amount of the specific nucleic acid or mixture of nucleic acids than does said second sample.

5 Typically, the approximate amount of hybridization is determined qualitatively, for example, by a sight inspection upon detecting hybridization. For example, if a gel is used to resolve labelled nucleic acid which hybridizes to target nucleic acid in the sample, the resulting band can be inspected visually. One can compare the approximate amount of hybridization in the test sample to the
10 approximate amount of hybridization in non-tumor cells. Such non-tumor cells are, e.g., epithelial cells or peripheral blood cells.

The present invention will be better understood on the basis of the following examples, offered by way of illustration and not by way of limitation.

15 The cell lines used in the present invention can be any human cell lines. Especially, preferred are the responder cell lines CNCM I-2544, CNCM I-2546, CNCM I-2547 and CNCM I-2548 and the non responder cell lines CNCM I-2545 and CNCM I-2549 isolated from human primary melanoma. Cultures of these cell lines were deposited and registered under the Budapest Treaty (Rule 6.1) by the Culture Collection "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes" on
20 August 17, 2000.

Examples

The examples below are in connection with the following figures:

Figure 1. Expression of genes encoding tumor associated antigens and IFN- α receptor in melanoma cell lines.

25 Panel A: Expression of genes encoding tumor associated antigens.

The cell lines CNCM I-2544 (375), CNCM I-2545 (D10), CNCM I-2546 (15), CNCM I-2547 (51), CNCM I-2548 (59) and CNCM I-2549 (67) were cultured for 48 hours in the presence (+) or absence (-) of 100U/ml IFN- α . The expression patterns of genes encoding tyrosinase, tyrosinase related protein-2, pmel-17 and
30 mart-1, HLA restricted, tumor associated antigens are reported. Grey bars refer to IFN- α sensitive cell lines and black bars refer to IFN- α resistant lines (see Table 1).

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 10 -

Data are presented as average difference of signal intensity between match and mismatch probesets.

Panel B: IFN- α receptor gene expression is detected in IFN- α sensitive and resistant melanoma cell lines by 25 cycles RT-PCR.

5 Figure 2. Genes preferentially expressed in IFN- α sensitive or resistant melanoma cell lines.

10 Oligonucleotide array expression data were collected from untreated cells. Data from the sensitive (CNCM I-2544 (A375), CNCM I-2546 (ME15), CNCM I-2547 (ME51) and CNCM I-2548 (ME59)) or resistant cell lines (CNCM I-2545 (D10) and CNCM I-2549 (ME67)) were combined into two data sets (panel A and panel B). Average values for individual genes were then filtered to identify genes upregulated at least three fold in either group. Data are presented as average difference of signal intensity between match and mismatch probesets.

15 Identification of IFN- α inducible genes in melanoma cell lines

Cell lines and culture conditions

20 Melanoma cell lines were screened for their sensitivity to proliferation inhibition and HLA class I induction. The study was done of six cell lines (CNCM I-2544, CNCM I-2545, CNCM I-2546, CNCM I-2547, CNCM I-2548 and CNCM I-2549).

25 All these cell lines were cultured in RPMI medium supplemented with 10% FCS, glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM), non-essential amino acids and HEPES buffer (10mM) (all from GIBCO Life Sciences, Paisley, UK). When confluent, the cells were passaged by trypsinization.

Oligonucleotide array analysis

30 Cultured melanoma cells were harvested by scraping and total cellular RNA was extracted. 10 μ g from each sample were used directly as templates for cDNA synthesis using a commercial kit (Roche Molecular Biochemicals, Rotkreuz, Switzerland). The T7 promoter sequence incorporated into the cDNA synthesis

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 11 -

primer allowed template amplification and biotin labeling by *in vitro* transcription using a commercial kit (Affymetrix, Santa Clara, CA). After alkaline heat fragmentation cDNA was hybridised to the array (Affymetrix, Santa Clara, CA) and all subsequent steps were performed following standard procedures as supplied with the arrays. Raw data were collected with a confocal laser scanner (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) using GeneChip software v3.1 (Affymetrix, Santa Clara, CA).

Data analysis

Raw data were normalized based on the total chip signal obtained upon hybridisation of ME15 cell line cDNA. This array was selected because : i) the 5'/3' intensity ratio of control genes was smaller than 3; ii) >25% of the genes are called "present" by Genechip; iii) the image appearance is homogeneous with low background and no sign of mechanical chip damage.

The normalized average difference (nAD) between the signals of the perfect and of the mismatch probesets for each gene was used as the expression level of a given gene. At least one nAD value in a pairwise comparison of data has to exceed 50 to be included. Based on nAD, change factors related to IFN- α exposure were also calculated. Negative nAD values were set to 20 in order to avoid the calculation of artificially high modifications. In order to exclude artefacts, only genes with robust change factors, greater than 2-fold, were included in the analysis. By applying these criteria, about 60-80 genes were found to be differentially expressed depending on the cell line analyzed. Array to array variations did not exceed 2% based on the hybridization of one sample to 5 arrays from the same batch in a pilot study. Genes were clustered according to their mode of regulation.

Identification of IFN- α sensitive and resistant melanoma cell lines

A number of established melanoma cell lines were assayed for their sensitivity to IFN- α by testing the capacity of IFN- α to inhibit their proliferation and to increase their surface expression of HLA class I determinants.

Two cell lines (CNCM I-2545 and CNCM I-2549) were found to be resistant to the antiproliferative effects of IFN- α .

Proliferation of CNCM I-2547 and CNCM I-2548 could be at least 50% inhibited by IFN- α concentrations as low as 10U/ml, whereas CNCM I-2544 and CNCM I-2546 required a ten times higher dose for the elicitations of similar effects (Table 1).

The upregulation of HLA class I expression by IFN- α closely matched its antiproliferative effects. In no case a dissociation of the two activities could be observed (Table 1).

Table 1. Identification of melanoma cell lines sensitive or resistant to the inhibition of proliferation and to the HLA class I overexpression induced by IFN- α .

Cell line	proliferation inhibition (IC50) (a)	HLA class I induction (b)
CNCM I-2544	+ (100 U/ml)	(442vs.305)
CNCM I-2545	-	(184vs.196)
CNCM I-2546	+ (100 U/ml)	(521vs.257)
CNCM I-2547	+ (10 U/ml)	(980vs.135)
CNCM I-2548	+ (10 U/ml)	(559vs. 380)
CNCM I-2549	-	(175vs. 203)

(a) Melanoma cell lines were cultured in the presence of IFN- α concentrations ranging between 1 and 1000 U/ml. 3H-Thymidine incorporation was measured daily over a five days culture period following an 18 hour pulsing time. IC50 is the IFN- α concentration inducing at least a 50% inhibition of a maximal proliferation activity detectable in individual experiments.

(b) Melanoma cells were stained with HLA class I specific monomeric mAbs following a two days culture in the presence (digits on the left) or absence (digits on the right) of IFN- α (100 U/ml) and tested by flow-cytometry. Data are expressed as mean fluorescence intensity of labelled cell lines.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 13 -

Detection of genes encoding tumor associated antigens in melanoma cell lines

Total cellular RNA was extracted from the sensitive and resistant melanoma cell lines identified above, reverse transcribed and processed for hybridization to an oligonucleotide array (Hu6800FL, PN 900183) containing probe sets derived from 7000 full-length human genes. Expression levels for each gene were calculated as normalized average difference (nAD, see materials and methods).

Datasets for genes encoding MART-1/Melan-A, pmel-17 (gp100), TRP-2 and tyrosinase tumor associated antigens (TAA) were first analyzed. These four genes were found to be expressed in CNCM I-2546 and CNCM I-2545 cell lines, whereas virtually no expression was detectable in CNCM I-2544, CNCM I-2546, CNCM I-2547 and CNCM I-2548 cell lines (Figure 1). Functional tests confirmed these findings. Indeed, CNCM I-2545, HLA-A2.1 positive melanoma cells were effectively killed by HLA-A2.1 restricted CTL lines recognizing epitopes derived from MART-1/Melan-A, pmel-17/gp100, tyrosinase or TRP-2 proteins. In contrast, CNCM I-2548 HLA-A2.1 positive cells, that do not express the genes under investigation failed to be killed by the specific CTL (Figure 1). Remarkably, IFN- α treatment does not appear to influence the expression of the genes encoding these TAA.

Thus, the application of the microarray technology to the cellular system under investigation is validated by results concurrently obtained at functional and gene expression levels.

IFN- α receptor gene expression in melanoma cell lines

A differential sensitivity to the effects of IFN- α is related to a differential expression of the specific receptor. Indeed, transcripts from the IFN- α receptor gene (IFNAR2) were detected at low levels, nAD $\leq$ 60, (Table 2, gene cluster 5) upon microarray hybridization of the cDNA from the cell lines under investigation.

IFN- α receptor gene expression was evaluated by using a more sensitive RT-PCR assay (Figure 2B).

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 14 -

Although to different extents, unrelated to the level of responsiveness to IFN- α , specific transcripts were detectable in all lines.

Detection of potential marker genes for IFN- α responsiveness

5 The genetic profile of melanoma cell lines was classified according to their sensitivity or resistance to critical direct effects of IFN- α , namely the inhibition of proliferation and the upregulation of HLA class I expression.

10 The availability of large mRNA expression data sets from six human melanoma cell lines well mentioned for their responsiveness to IFN- α raised the possibility of identifying genes preferentially expressed in sensitive or resistant lines in the absence of cytokine treatment. Microarray data of all genes from responder (CNCM I-2544, CNCM I-2546, CNCM I-2547 and CNCM I-2548) and non responder (CNCM I-2545 and CNCM I-2549) cell lines were combined resulting in two averaged data sets. These data were then screened for genes upregulated 15 more than three fold in either group. The average data were then dissociated in order to obtain the individual expression levels in each cell line. A gene was considered positive or predictive when the deviation from the mean was lower than 30% of the average value of the nAD.

20 This analysis resulted in the identification of a group of four genes preferentially expressed in IFN- α sensitive cell lines (Figure 2, panel A). Two of them, IFI16 and RCC1 encode nuclear proteins endowed with mitotic regulation and transcriptional activation capacities, respectively. A third is the *hox2* homeobox gene, whereas the fourth, *h19* gene, encodes an untranslated RNA, involved in the DNA methylation and genetic imprinting processes. Notably, 25 however, one of the IFN- α sensitive cell lines, ME51, does not express RCC1.

On the other hand, two genes encoding likely components of signal transduction pathways, SHB and PKC- ζ , appeared to be preferentially expressed in IFN- α resistant D10 and ME67 cell lines (Figure 2, panel B).

30 A pattern of genes preferentially expressed according to typical profiles in sensitive and resistant cells clearly emerged. Genes involved in the regulation of cell proliferation, such as IFI16, *h19* and RCC1, but also *hox2*, were found to be preferentially expressed in sensitive cell lines. Intriguingly, genes encoding SHB

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 15 -

and PKC- ζ proteins, known components of defined signal transduction pathways appeared to be preferentially expressed in IFN- α resistant cells. These puzzling data suggest that IFN- α resistance could result from a series of active events as opposed to a merely defective activation.

5

Induction of gene expression by IFN- α in sensitive and resistant cell lines

Patterns of genes expressed in IFN- α sensitive and resistant melanoma cell lines were investigated upon 48 hour culture in the presence of IFN- α . CNCM I-2546 and CNCM I-2545 were studied in detail. Analysis was focused on genes which were at least 3-fold up or down regulated as compared to untreated cells and displayed nAD values of at least 50 in one of the four experiments.

Cluster 1 (Table 2) includes genes only inducible in the sensitive CNCM I-2546 cell line. As expected expression of these genes was not significantly affected by the treatment in IFN- α resistant CNCM I-2545 cells. This set of genes includes HLA class I genes, 2-5A synthetase, TAP-1, genes encoding a number of interferon-inducible proteins, but also p27 cyclin-dependent kinase inhibitor and ROX protein. A single gene, encoding amplaxin or cms-1 and derived from the locus 11q13 frequently amplified in tumor cells, appeared to be induced by IFN- α in both lines (cluster 2).

Cluster 3 genes, including ip-30, a known IFN- γ inducible gene, and dss 1 were induced in the CNCM I-2545 resistant cell line but their expression was not significantly altered in CNCM I-2546 sensitive cells. Cluster 4 includes additional genes inducible by IFN- α in CNCM I-2546 which are, in contrast to cluster 1, downregulated in IFN- α resistant CNCM I-2545 cells. Interestingly, the transcription factor ISGF-3, of relevance for IFN- α signalling, belongs to this cluster that includes other IFN related genes. Cluster 5 comprises genes downregulated by IFN- α treatment in resistant CNCM I-2545 cells, but virtually unaffected in sensitive CNCM I-2546 cells. Interestingly, this cluster comprises the gene encoding IFN- α receptor. Cluster 6 includes two genes (irf-2 and interferon-induced cellular resistance mediator) whose expression, basically undetectable in the CNCM I-2545 resistant cell line, is downregulated in CNCM I-2546 IFN- α sensitive cells. Interestingly, the IRF-2 gene product is known to bind to the

25

30

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 16 -

promoter region of IFN type I inducible genes and to prevent transcription. Downregulation could thus promote the activation of IFN inducible genes.

5 In Table 2 below, CNCM I-2546 and CNCM I-2545 cultured for 48 hours in the absence or in the presence of 100 U/ml IFN- α were used to assay cytokine modulated gene expression as matched with data obtained in fibrosarcoma cells. This analysis yielded six clusters of genes. Cluster 1 contains genes only induced in the IFN- α sensitive CNCM I-2546. Cluster 2 includes amplaxin, upregulated in both lines and cluster 3 comprises genes only induced in the CNCM I-2545 resistant line.
10 Cluster 4 refers to genes downregulated in CNCM I-2545 and induced in CNCM I-2546. Cluster 5 includes genes downregulated in CNCM I-2545 and cluster 6 refers to genes downregulated in CNCM I-2546. Data are presented as average difference of signal intensity between match and mismatch probesets.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 17 -

Table 2: IFN- α modulated genes

Cluster 1		CNCM I-2545 (-)	CNCM I-2545 (+)	CNCM I-2545 (-)	CNCM I-2545 (+)	CNCM I-2546 (-)	CNCM I-2546 (+)	CNCM I-2545 CF	CNCM I-2546 CF	Cluster
U51127	interferon regulatory factor 5	262	91	3	116	-188	4.8	~u	~u	~u
X07730	prostate specific antigen	234	85	-64	132	-175	5.6	~u	~u	~u
X57522	ring4 cdna	143	49	-49	97	-192	3.85	~u	~u	~u
Z56281	interferon regulatory factor 3	93	31	12	136	-2	5.8	~u	~u	~u
J04164	interferon-inducible protein 27-sep	-447	-97	-89	2066	0	102.3	~u	~u	~u
U50648	interferon-inducible rna-dependent protein kinase (pkr)	106	46	-70	71	-1.3	2.85	~u	~u	~u

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 18 -

X6725	p27	-460	-86	-211	410	0	19.5	~u
HG58	major histocompatibility complex, class I c	1183	455	156	1692	-1.6	9.85	~u
M13755	interferon-induced 17-kDa/15-kDa protein	-163	51	-181	716	0.55	34.8	~u
D28137	bst-2	37	88	28	305	1.38	9.89	~u
M19650	2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase	137	99	55	269	-0.38	3.89	~u
X96401	rox protein	229	63	34	143	-1.76	3.21	~u
U72970	16-jun gene, interferon-inducible peptide (6-16)	-190	24	43	2363	0.2	53.95	~u

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 19 -

XG7351	1-8d gene from interferon-inducible gene family	2469	2686	24	297	0.09	11.38	~u
X02874	2-5A synthetase (1.6 kb)	57	-4	-116	486	-1.85	23.3	~u
J00105	beta-2-mikroglobulin gene	1668	2101	248	1453	0.26	4.86	~u
M94880	mhc class i (hla- a*8001)	551	421	202	922	-0.31	3.61	~u
HC2917	major histocompatibility complex, class i, e	353	322	147	813	-0.1	4.53	~u
D49824	hla-b null allele	527	267	144	925	-0.97	5.42	~u

Cluster2							
M98343	amplasin (ams1)	-24	63	15	141	2.15	6.05
Cluster3							uu
M95642	alpha-1 type xvi collagen (col16a1)	11	115	-147	-133	4.75	0
J03909	gamma-interferon-inducible protein (ip-30)	42	142	18	57	2.38	1.85
U41515	dss1	-62	123	104	51	5.15	-1.04
Cluster4							uu
L40387	thyroid receptor interactor (trip14)	104	5	0	85	-4.2	3.25
							du

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 21 -

U72882	interferon-induced leucine zipper protein (lzf35)	125	27	-9	502	-3.63	24.1	du
U53830	interferon regulatory factor 7a	103	5	-31	237	-4.15	10.85	du
M57935	transcription factor tgf-3	331	92	-37	296	-2.6	13.8	du
U01824	glutamate/aspartate transporter	339	35	-73	91	-8.69	3.55	du
Cluster 5								
J00212	leukocyte interferon (lfn-alpha)	106	9	138	49	-4.3	-1.82	d-
U52513	lzf-5	289	10	49	96	-13.45	0.96	d-
X90846	mixed lineage kinase 2	357	60	425	173	-4.95	-1.46	d-

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 22 -

L42243	ifnar2 gene (interferon receptor)	62	-6	46	-4	-2.1	-1.3	d~
M79462	pml-1	201	13	43	1	-9.05	-1.15	d~
K01900	lymphocyte interferon alpha type 201	156	7	55	85	-6.8	0.55	d~
Cluster 6								
M30818	interferon-induced cellular resistance mediator protein	20	5	756	155	0	-3.88	-d
X15949	interferon regulatory factor-2 (irf-2)	0	13	67	11	0	-2.35	-d

Column 1 = GenBank ID; column 2 = gene description; column 3 = nAD; in CNM 1-2548 cultured in the absence of IFN- α ; column 4 = nAD in CNM 1-2548 cultured in the presence of IFN- α ; column 5 = nAD in CNM 1-2546 cultured in the absence of IFN- α ; column 6 = CNM 1-2546 cultured in the presence of IFN- α ; column 7 = change factor (CF) in CNM 1-2548; column 8 = change factor in CNM 1-2546; column 9 = cluster characteristics (- = no change; d = downregulated; u = upregulated).

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 23 -

Detection of novel IFN- α inducible genes

Clusters 1 and 2, reported in Table 3, include genes previously unknown as IFN- α inducible, whose expression can be upregulated upon melanoma cell treatment. Cluster 1 comprises genes only induced in sensitive cells, whereas cluster 2 refers to genes upregulated upon IFN- α treatment of melanoma cells regardless of their „phenotypic“ sensitivity. Some of these genes obviously belong to melanocytic (melanoma differentiation antigen, mda-6) or neuroectodermic (e.g., neuroleukin or catechol o-methyltransferase) cell lineages, while others clearly inducible genes such as, for instance, those encoding plasma gelsolin or spermidine synthase escape an evident, similar, tissue specific classification. Cluster 2 in Table 3 includes novel genes inducible regardless of IFN- α responsiveness in both lines analyzed. A number of these genes (rheb, PP1, ATPase, ceramidase, eif3) are functionally related to intracellular signaling pathways.

In Table 3 below, CNCM I-2546 and CNCM I-2545 cell lines cultured for 48 hours in the absence or in the presence of 100 U/ml IFN- α were used to identify novel cytokine induced genes whose expression was not found to be modulated in fibrosarcoma cells. Cluster 1 includes genes inducible in the CNCM I-2546 sensitive but not in the CNCM I-2545 resistant cell line. Cluster 2 comprises genes inducible in both lines. Data are presented as average difference of signal intensity between match and mismatch probesets.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 24 -

Table 3: Novel JFN- α inducible genes

Cluster 1		CNCM1-2545	(-)	(+)	CNCM1-2546	(-)	(+)	CNCM1-2546	CF	CNCM1-2546	Cluster
I37043	casein kinase I epsilon	218	221	0	441	0	441	0.01	21.05	~u	~u
D52050	alanyl-tRNA synthetase	1458	761	21	437	21	437	-0.92	19.33	~u	~u
D28137	bst-2	37	88	28	305	28	305	1.38	9.89	~u	~u
S81914	icx-1= radiation-inducible immediate-early gene	-66	21	31	312	31	312	0.05	9.06	~u	~u
X95325	dna binding protein a variant	634	253	58	375	58	375	-1.51	5.47	~u	~u
U91316	acyl-coa thioester hydrolase	253	428	141	706	141	706	0.69	4.01	~u	~u
U47025	fetal brain glycogen phosphorylase b	672	465	193	924	193	924	-0.45	3.79	~u	~u
Z26491	gene catechol o-methyltransferase	238	181	73	337	73	337	-0.31	3.62	~u	~u

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 25 -

L13210	mac-2 binding protein	2555	2092	444	2016	-0.22	3.54	~u
R03515	neuroleukin	2998	2552	487	2126	-0.17	3.37	~u
U09579	melanoma differentiation associated (mda-6)	59	26	83	361	0	3.35	~u
U72206	guanine nucleotide regulatory factor (Gp40)	238	162	113	459	-0.47	3.06	~u
X76538	mpv17	132	101	77	313	-0.31	3.06	~u
U18009	chromosome 17q31 clone H13	674	423	187	735	-0.59	2.93	~u
U69126	base binding protein 2 (bbp2)	114	159	77	302	0.39	2.92	~u
U50327	protein kinase c substrate 80k-b gene (pkcsh)	401	236	80	312	-0.7	2.9	~u
D21235	hhr23a protein	388	346	150	582	-0.12	2.88	~u
HG1612	macmarcks	588	505	401	1440	-0.16	2.59	~u
X04412	plasma gelsolin	220	220	107	372	0	2.48	~u

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

1 2 6 1

U65579	mitochondrial nadh dehydrogenase-ubiquinone	630	621	110	377	+0.01	2.43	-u
Y00264	amyloid A precursor	392	427	89	304	0.09	2.42	-u
M31013	nonmuscle myosin heavy chain (nmhc)	377	263	132	441	+0.43	2.34	-u
M34338	spermidine synthase	472	277	429	1413	-0.7	2.29	-u
D50914	EST	234	78	110	359	-2	2.26	-u
U18018	e1a enhancer binding protein (e1a-f)	11	23	107	340	0.15	2.18	-u
U61263	acetylacate synthase homolog	410	301	150	464	-0.36	2.09	-u
U65932	extracellular matrix protein 1 (ecm1)	2498	1066	300	907	-1.34	2.02	-u
Cluster 2								
D78132	RhoB gene, ras-related gtp binding protein gene	86	253	119	307	1.88	1.58	uu

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

- 27 -

M65028	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	154	355	153	326	1.29	1.13	uu
X70843	protein phosphatase 1, catalytic subunit	24	226	122	370	8.42	2.03	uu
J04182	lysosomal membrane glycoprotein-1 (lamp1)	66	484	168	452	6.33	1.69	uu
J04444	cytochrome c-1 gene	886	2268	309	1286	1.56	3.16	uu
L07633	interferon-gamma	22	275	164	463	11.5	1.52	uu
L35249	vacuolar H ⁺ -ATPase mr 56,000 subunit (hvac57)	40	357	92	227	16.85	1.47	uu
M60784	u1 snRNP-specific protein	115	413	24	216	2.59	8	uu
U70063	human acid ceramidase	115	400	86	221	2.48	1.57	uu
U78525	human eukaryotic translation initiation factor (eIF3)	165	372	275	589	1.25	1.14	uu

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

247055	farnesyl pyrophosphate synthase like	394	797	263	529	1.02	1.01	uu
--------	--------------------------------------	-----	-----	-----	-----	------	------	----

Column 1= GenBank ID; column 2= gene description; column 3= α 1D in CNCM1-2545 cultured in the absence of IFN- α ; column 4= α 1D in CNCM1-2545 cultured in the presence of IFN- α ; column 5= α 1D in CNCM1-2546 cultured in the absence of IFN- α ; column 6= CNCM1-2546 cultured in the presence of IFN- α ; column 7= change factor (CF) in CNCM1-2545; column 8= change factor in CNCM1-2546; column 9= clusters' characteristics (-= no change; *down*=regulated; *up*= upregulated).

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

29
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO :
F. Hoffmann-La Roche AG
Postfach
CH-4070 Basel

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : A375	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY : I - 2544
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by : ☒ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 August 2000 (date of the original deposit)¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes Address : INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s) : <i>Georges WAGENER</i> Date : 09 November 2000

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

30
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO :
F.Hoffmann-La Roche AG
Postfach

CH-4070 Basel

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : D10	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY : I - 2545
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by : ☒ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 August 2000 (date of the original deposit)¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
NAME : CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes Address : INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s) : George WADENER Date : 09 November 2000

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international
depositary authority was acquired.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

31
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE.

INTERNATIONAL FORM

TO :
F. Hoffmann-La Roche AG
Postfach
CH-4070 Basel

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the depositor: ME15	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: I - 2546
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
☐ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 August 2000 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes Address: INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <i>Georg WAGENER</i> Date: 09 November 2000

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of International depositary authority was acquired.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

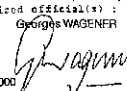
32
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO :
F. Hoffmann-La Roche AG
Postfach
CH-4070 Basel

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : ME51	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY : I - 2547
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by :	
☒ a scientific description ☐ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 August 2000 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes Address : INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s) : Georges WAGENER  Date : 09 November 2000

¹ Where Rule 6.4(a) applies, such date is the date on which the status of international
depository authority was acquired.

WO 02/18633

33

PCT/EP01/09556

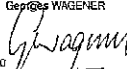
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO :
F. Hoffmann-La Roche AG
Postfach
CH-4070 Basel

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : ME59	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY : I - 2548
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by : ☒ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 August 2000 (date of the original deposit)¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes Address : INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s) : George WAGNER  Date : 09 November 2000

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of International Depositary Authority was acquired.

WO 02/18633

34

PCT/EP01/09556

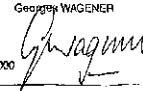
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO :
F. Hoffmann-La Roche AG
Postfach
CH-4070 Basel

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR : ME67	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY : I - 2549
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by :	
☒ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 17 August 2000 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name : CNCM Collection Nationale de Cultures de Microorganismes	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s) : Georges WAGENER 
Address : INSTITUT PASTEUR 28, Rue du Docteur Roux F-75724 PARIS CEDEX 15	Date : 09 November 2000

¹ Where Rule 6.4(c) applies, such date is the date on which the status of International
depositary authority was acquired.

WO 02/18633

35

PCT/EP01/09556

Claims

1. A method for screening patients to determine their ability to respond to a tumor treatment, said method comprising:
 - measuring the expression level of at least one of the genes predictive for said treatment in patient samples; and
 - comparing the result of measurement to the result obtained with a reference sample.
2. A method as in claim 1, wherein patients are patients suffering from tumor.
3. A method as in claim 1, wherein patients are patients suffering from melanoma cancer.
4. A method as in claim 1, wherein the tumor treatment includes IFN- α or one of its derivatives.
5. A method as in claim 1, wherein gene expression is measured directly by DNA analysis with a DNA probe specific to at least one of the genes predictive for said treatment or by determination of the level of mRNA transcription or by determination of the level of gene product.
6. A diagnostic test for carrying out the method claimed in 1 to 5, comprising
 - contacting a matrix with probes with a liquid phase containing antibodies or nucleic acid probes
 - detecting gene transcription or product of one of the genes predictive for the tumor treatment.
7. A diagnostic test as claimed in 6, wherein the matrix comprises nucleic acids and the liquid phase contains target nucleic acid probes.
8. A diagnostic test as claimed in 6, wherein the matrix comprises target protein probes and the liquid phase contains antibodies.

WO 02/18633

36

PCT/EP01/09556

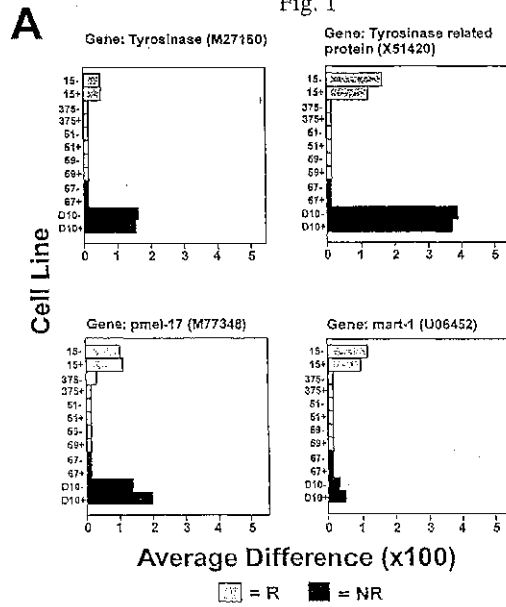
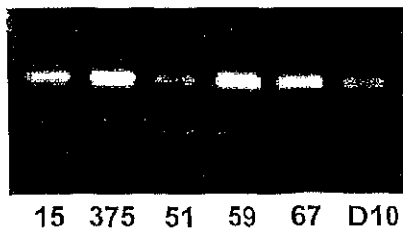
9. A diagnostic kit for the method as claimed in 1 comprising a container with a matrix with probes.
10. A diagnostic kit as claimed in 9 comprising a container with a matrix with nucleic acid probes.
- 5 11. A method for screening the availability of cells or tissues to be sensitive or resistant to tumor treatment, said method comprising the identification of gene expression profiles characteristic of said treatment.
12. A method as in claim 11, wherein the cells originate from cell lines.
13. A method as in claim 11, wherein the cells originate from tumor cell
10 lines.
14. An immunological marker enabling the selection of cells responding to a tumor treatment characterized in that it is an antibody specific for product of one or more of the genes predictive for said treatment.
15. The invention substantially as herein before described especially with
15 reference to the foregoing Examples.

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

1/2

Fig. 1

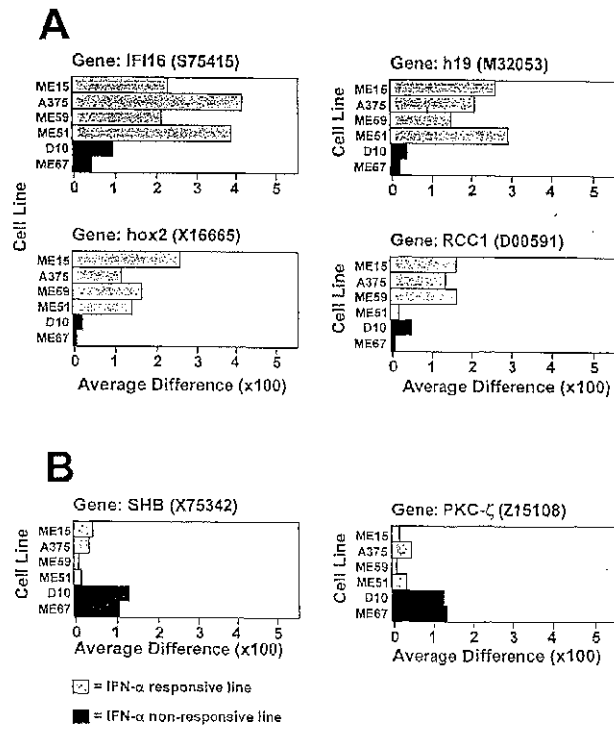
**B**IFN- α receptor (L42243)

WO 02/18633

PCT/EP01/09556

2/2

Fig. 2



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
7 March 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/018633 A3(51) International Patent Classification: C12Q 1/68.
G01N 33/50, C07K 16/38

(21) International Application Number: PCT/EP01A09556

(22) International Filing Date: 20 August 2001 (20.08.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 00118603.0 28 August 2000 (28.08.2000) LP

(71) Applicant: F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH/CH);
124 Grenzacherstrasse, CH-4070 Basel (CH)(72) Inventor: CERTA, Ulrich; Bottenstrasse 58, CH-4123
Allschwil (CH)(74) Agent: WITTE, Hubert; 124 Grenzacherstrasse,
CH-4070 Basel (CH)(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, FR, GB, GR, GU, GH,
GM, HN, 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, MY, NZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TL, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), European
patent (AM, AZ, BY, BG, KZ, MD, RU, TT, TM), Eurasian
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IL, LU, MC, NL, PL, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI,
CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
5 June 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/018633 A3

(54) Title: DETERMINATION OF THE ABILITY OF PATIENTS TO RESPOND TO TUMOUR TREATMENT

(57) Abstract: The present invention relates to a method for screening patients to determine their ability to respond to a tumour treatment; and also to a diagnostic test, for carrying out the said method.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 01/09556
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50 C07K16/18		
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 501N C07K		
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) BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOHNSTON P G ET AL: "THYMIDYLATE SYNTHASE GENE AND PROTEIN EXPRESSION CORRELATE AND ARE ASSOCIATED WITH RESPONSE TO 5-FLUOROURACIL IN HUMAN COLORECTAL AND GASTRIC TUMORS" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 55, no. 7, 1 April 1995 (1995-04-01), pages 1407-1412, XP001008766 ISSN: 0008-5472 abstract page 1410, column 1, paragraph 2 -page 1411, column 1, paragraph 1: figures 1,5,6; tables 1,2 page 1411, column 2, paragraph 2 -page 1412, column 1, paragraph 1 -/-	1,2,5, 9-11,14
☒ Further documents are cited in the continuation of box C. ☒ 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 "B" earlier document(s) published on or after the international filing date "C" document(s) which may throw doubts on priority claim(s) or which is/are cited to establish the published state of the art "D" document relating to an earlier invention, use, exhibition or other matters "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "F" late 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 "G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step without the document(s) taken alone "H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step without the document(s) combined with one or more other cited documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "I" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 5 February 2003		Date of mailing of the international search report 24/02/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2911, 7000 Leuven NL - 2800 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340 2400, Fax: (+31-70) 340 2401 Fax: (+31-70) 340 2406		Authorized officer Tilkorn, A-C

Form PCT/ISA/210 (last amended July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		information: publication No PCT/EP 01/09566
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Outline of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 998 151 A (FISHER EDWIN R ET AL) 7 December 1999 (1999-12-07) column 3, line 32 -column 5, line 20 column 6, line 20 -column 7, line 21; claims 1-11 abstract ---	1,2,4,5, 9,11,14
X	WO 96 35949 A (LANDSTINGET I OESTERGOETLAND; HAAKANSSON LEIF (SE); HAAKANSSON ANN) 14 November 1996 (1996-11-14) abstract page 2, paragraph 2 page 3, line 12 -page 5, line 20 page 11, line 20 -page 14, line 3; claims 1-11 ---	1,2,4,5, 9,11,14
X	CELIS J E ET AL: "Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 480, no. 1, 25 August 2000 (2000-08-25), pages 2-16, XP004337487 -SSN: 0014-5793 page 5, column 1, paragraph 2 -column 2, paragraph 2 page 5, column 2, paragraph 5 -page 6, column 1, paragraph 6 page 10, column 2, paragraph 3 -page 11, column 2, paragraph 1 page 13, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 3 ---	9-14
X	SCHERF U ET AL: "A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer" NATURE GENETICS, NATURE AMERICA, NEW YORK, US, vol. 24, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 236-244, XP002224798 ISSN: 1061-4036 abstract page 241, column 1, paragraph 2 -page 242, column 1, paragraph 2; figure 5 page 242, column 2, paragraph 4 -page 243, column 1, paragraph 2 page 242, column 1, paragraph 5 ---	9-13

Form PCT/ISA/E 10 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Intertrack application No PC~/EF/01/09566
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DER SANDY D ET AL: "Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 95, no. 26, 22 December 1998 (1998-12-22), pages 15623-15628, XP002229726 Dec. 22, 1998 ISSN: 0027-8424 abstract page 15623, column 2, paragraph 3 -page 15626, column 1, paragraph 1; figure 1; table 2 page 15627, column 1, paragraph 2 -page 15628, column 1, paragraph 1 page 15628, column 2, paragraph 2	9-13
P, X	GROTTKE C ET AL: "IDENTIFICATION OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES IN HUMAN MELANOMA CELLS WITH ACQUIRED RESISTANCE TO VARIOUS ANTINEOPLASTIC DRUGS" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 88, 15 November 2000 (2000-11-15), pages 535-546, XP000992613 ISSN: 0020-7136 abstract page 537, column 1, paragraph 4 -page 540, column 2, paragraph 1; figures 1,4-6; tables I,II page 541, column 2, paragraph 2 -page 545, column 2, paragraph 2	9-13

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2003)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	Inter- national Application No. PCT/EP 01/09556
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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.: 5 (partially), 6-8, 15 (completely) 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210	
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 II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:	
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.:	
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/EP 01/09556

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 5 (partially), 6-8, 15 (completely)

Claim 5 includes an embodiment wherein gene expression is measured directly by DNA analysis with a DNA probe specific to at least one of the genes predictive for the treatment. It is unclear what is meant by "measured directly by DNA analysis" and there is no support found in the description (Art 6 PCT). Furthermore, the application does not enable the skilled person to carry out this embodiment in particular because it is unclear how to determine gene expression on the basis of genomic DNA (Art 5 PCT). Therefore, claim 5 is only searched with respect to the other embodiments i.e. determination of the level of RNA transcription and by determination of the level of gene product.

Claim 6 is so unclear that no meaningful search can be carried out (Art 6 PCT): It is totally unclear what the probes are supposed to be, and where the sample/analyte comes in. Hence, it is not clear, what the claim is supposed to cover. The same applies to the dependent claim 7 and 8. It is not clear what is meant by "target nucleic acid probes" or "target protein probes" respectively.

Claim 15 does not contain any technical features and does not define the invention and is thus so unclear (Art 6 PCT), that no search can be carried out for said claim.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International publication No.
Information on patent family members				PCT/EP 01/09556
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 5996151	A	07-12-1999	NONE	
WO 9635949	A	14-11-1996	AT 196698 T	15-10-2000
			CA 2215627 A1	14-11-1996
			DE 69610496 D1	02-11-2000
			DE 69610496 T2	10-05-2001
			DK 824696 T3	02-01-2001
			WO 9635949 A1	14-11-1996
			EP 0824696 A1	25-02-1998
			ES 2151665 T3	01-01-2001
			GR 3034891 T3	28-02-2001
			JP 11504715 T	27-04-1999
			PT 824696 T	30-03-2001
			US 6114128 A	05-09-2000

フロントページの続き

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

Fターム(参考) 4B063 QA05 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR13 QR51 QS03
QS34