(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6900314号
(P6900314)
(45)発行日　令和3年7月7日(2021.7.7)　(24)登録日　令和3年6月18日(2021.6.18)

(51)Int.Cl.　F I
A61K 31/517 (2006.01)　A61K 31/517 ZNA
A61P 35/04 (2006.01)　A61P 35/04
A61P 13/10 (2006.01)　A61P 13/10
C12Q 1/6851 (2018.01)　C12Q 1/6851 Z
C12Q 1/6813 (2018.01)　C12Q 1/6813 Z
請求項の数 19　(全 99 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2017-533956(P2017-533956)
(86)(22)出願日　平成27年12月23日(2015.12.23)
(65)公表番号　特表2018-508469(P2018-508469A)
(43)公表日　平成30年3月29日(2018.3.29)
(86)国際出願番号　PCT/US2015/000237
(87)国際公開番号　WO2016/105503
(87)国際公開日　平成28年6月30日(2016.6.30)
審査請求日　平成30年12月17日(2018.12.17)
(31)優先権主張番号　62/096,741
(32)優先日　平成26年12月24日(2014.12.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　509012625
ジェネンテック，　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　サウス　サンフランシスコ　ディーエヌエー　ウェイ　1
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　チョイ，　ユンジョン
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０－４９９０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー　ウェイ　1
(72)発明者　カバラ，　オマル
アメリカ合衆国　カリフォルニア　９４０８０－４９９０，　サウス　サンフランシスコ，　ディーエヌエー　ウェイ　1
最終頁に続く

(54)【発明の名称】膀胱癌の治療、診断、及び予後判定方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
筋層非侵襲性膀胱がん（ＮＭＩＢＣ）に罹患している患者を治療するための医薬であって、エルロチニブ　ＨＣｌを含む治療有効量の抗がん療法剤を含み、前記患者から得られた試料中のＥＧＦＲの発現レベルが、ＥＧＦＲの基準レベルに対して増加したことが決定されている、医薬。
【請求項２】
筋層非侵襲性膀胱がん（ＮＭＩＢＣ）を有する患者が、エルロチニブ　ＨＣｌを含む抗がん療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかの決定を補助する方法であって、
（ａ）前記患者から得られた試料中のＥＧＦＲの発現レベルを決定することと、
（ｂ）前記ＥＧＦＲの発現レベルを、ＥＧＦＲの基準レベルと比較することと、を含み、前記基準レベルに対する、前記患者試料中の前記ＥＧＦＲの発現レベルの増加が、低い無疾患生存（ＤＦＳ）可能性を有し、エルロチニブ　ＨＣｌを含む治療に応答する可能性がある患者を同定する、方法。
【請求項３】
筋層非侵襲性膀胱がん（ＮＭＩＢＣ）を有する患者に対するエルロチニブ　ＨＣｌを含む抗がん療法剤の治療効果の最適化を補助する方法であって、
（ａ）前記患者から得られた試料中のＥＧＦＲの発現レベルを決定することと、
（ｂ）前記ＥＧＦＲの発現レベルを、ＥＧＦＲの基準レベルと比較することと、を含み、前記基準レベルに対する、前記患者試料中の前記ＥＧＦＲの発現レベルの増加が、低い

無疾患生存（ＤＦＳ）可能性を有し、エルロチニブ　ＨＣｌを含む治療に応答する可能性がある患者を同定する、方法。
【請求項４】
前記抗がん療法剤が、（ｉ）抗新生物剤、化学療法剤、成長阻害剤、及び細胞毒性剤からなる群から選択される薬剤、（ｉｉ）放射線療法剤、または（ｉｉｉ）それらの組み合わせを更に含む、請求項２または３に記載の方法。
【請求項５】
前記患者から得られた前記試料中の前記ＥＧＦＲの発現レベルが、ｍＲＮＡを測定することによって決定される、請求項２～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記患者から得られた前記試料中の前記ＥＧＦＲの発現レベルが、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）アッセイによって決定される、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記ＰＣＲアッセイが、定量的ＰＣＲアッセイである、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記患者から得られた前記試料中の前記ＥＧＦＲの発現レベルが、タンパク質を測定することによって決定される、請求項２～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記患者から得られた前記試料中の前記ＥＧＦＲの発現レベルが、免疫組織化学（ＩＨＣ）法によって決定される、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記患者から得られた前記試料が、腫瘍試料である、請求項２～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
前記腫瘍試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（ＦＦＰＥ）腫瘍試料である、請求項１０に記載の方法。
【請求項１２】
ＦＧＦＲ３及びＴＰ５３の発現レベルを決定することを更に含む、請求項２～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
ＦＧＦＲ３の発現レベルが、基準レベルに対して少なくとも２倍増加したことが決定されている、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
ＦＧＦＲ３の発現レベルが、基準レベルに対して少なくとも４倍増加したことが決定されている、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
ＥＧＦＲの発現レベルが、基準レベルに対して少なくとも４倍増加したことが決定されている、請求項２～１４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１６】
ＥＧＦＲの発現レベルが、基準レベルに対して少なくとも８倍増加したことが決定されている、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記患者から得られる試料中の、ＤＵＳＢ３、ＦＲＳ２、ＴＳＣ１、ＥＲＢＢ３、ＣＤＫＮ１Ａ、ＣＣＮＤ１、ＴＰ６３、ＭＭＰ２、ＺＥＢ２、ＰＩＫ３ＣＢ、ＰＩＫ３Ｒ１、ＭＤＭ２、ＳＮＡＩ２、ＡＸＬ、ＺＥＢ１、ＢＣＬ２Ｂ、ＴＳＣ２、ＲＢ１、ＦＧＦＲ３２、ＰＩＫ３ＩＰ１、ＭＴＯＲ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＰＴＥＮ、ＡＫＴ１、ＢＣＬ２Ａ、ＦＲＳ３、ＥＲＢＢ２、ＦＧＦＲ３１、ＦＧＦ１、ＳＮＡＩ１、ＦＧＦＲ３４、ＦＧＦ９、及びＦＧＦ２からなる群から選択される少なくとも１つの追加遺伝子の発現レベルを決定することを更に含み、前記少なくとも１つの追加遺伝子の発現レベルは、前記少なくとも１つの追加遺伝子の基準レベルに対して変化している、請求項２～１６のいずれか一項に記

載の方法。
【請求項１８】
前記筋層非侵襲性膀胱がんが、再発性筋層非侵襲性膀胱がんである、請求項２～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
筋層非侵襲性膀胱がん（ＮＭＩＢＣ）を有する患者に対するエルロチニブ　ＨＣｌを含む抗がん療法剤の治療効果を最適化するためのキットであって、前記患者から得られた試料中のＥＧＦＲの発現レベルを決定するための少なくとも１つのプローブを含み、前記少なくとも１つのプローブが、ＥＧＦＲタンパク質に対して特異的な抗体であるか、またはＥＧＦＲタンパク質をコードする核酸配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドであり、
（ａ）前記患者から得られた試料中のＥＧＦＲの発現レベルが決定され、
（ｂ）前記ＥＧＦＲの発現レベルが、ＥＧＦＲの基準レベルと比較され、前記基準レベルに対する、前記患者試料中の前記ＥＧＦＲの発現レベルの増加が、低い無疾患生存（ＤＦＳ）可能性を有し、エルロチニブ　ＨＣｌを含む治療に応答する可能性がある患者を同定する、キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、癌、例えば、膀胱癌の治療、診断、及び予後判定の提供方法を対象とする。
【背景技術】
【０００２】
癌は、依然としてヒトの健康に対する最も致命的な脅威のうちの１つである。米国において、癌は、毎年約１３０万人の新たな患者に影響を及ぼし、心疾患に続く第２の主な死亡原因であり、死亡の約４件に１件を占める。固形腫瘍は、そのような死亡の大部分に関与する。悪性腫瘍は転移し、制御されていない様子で急速に成長し、時を得た検出及び治療を極めて困難にする。
【０００３】
膀胱癌は、世界で５番目に一般的な悪性腫瘍であり、４０万件近くの症例が新たに診断され、１年当たり約１５万件の関連死が報告されている。膀胱癌患者の約７５～８０％が、初期診断時に筋層非侵襲性膀胱癌（ＮＭＩＢＣ）を提示する。固有層に限定され、典型的に致命的ではないが、ＮＭＩＢＣの約５０～８０％は再発し、しばしば費用のかかる臨床介入を必要とする。ＮＭＩＢＣは、最も深刻な筋層侵襲性膀胱癌（ＭＩＢＣ）に対して症例の約２０～３０％において進行し得る。ＭＩＢＣ（Ｔ２及びＴ３）は、新たな症例のうちの約１０～１５％を占めるに過ぎないが、それらは、転移性膀胱癌（ｐＴ４）を発達させる高い危険性をもたらす。転移性膀胱癌は、悲観的な５年生存可能性と関連付けられ、主要な対処されていない医療ニーズを表し、今日まで有効な治療法がほとんどない。
【０００４】
したがって、癌、例えば、膀胱癌の治療、診断、及び予後判定の提供に有効な手段の必要性が残る。
【発明の概要】
【０００５】
本発明は、癌、例えば、膀胱癌の治療、診断、及び予後判定の提供方法を対象とする。
【０００６】
一態様において、本発明は、膀胱癌に罹患している患者の治療方法を特徴とし、本方法は、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含み、当該患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲのうちの少なくとも１つの発現レベルが、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルに対して増加したことが決定されている。
【０００７】

別の態様において、本発明は、患者における膀胱癌の診断方法を特徴とし、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲのうちの少なくとも１つの発現レベルを決定するステップと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加が、膀胱癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、本方法は、（ｃ）膀胱癌を有していることを患者に通知することを更に含む。一部の実施形態において、本方法は、（ｄ）基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加が検出された場合に、当該患者の治療のための抗癌療法剤を選択することを更に含む。一部の実施形態において、本方法は、（ｅ）治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含む。

【０００８】

別の態様において、本発明は、膀胱癌に罹患している患者の予後判定方法を特徴とし、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲのうちの少なくとも１つの発現レベルを決定することと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較することと、（ｃ）患者の予後を決定することと、を含み、不良な予後は、基準レベルに対して増加した患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加によって示される。一部の実施形態において、予後は、生存の予後である。一部の実施形態において、本方法は、抗癌療法剤を患者に投与する前に実行される。一部の実施形態において、本方法は、（ｄ）患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、抗癌療法剤の投与から利益を享受する可能性があるとして、患者を特定することを更に含む。一部の実施形態において、本発明は、（ｅ）患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含む。一部の実施形態において、生存は、無疾患生存または全生存である。

【０００９】

別の態様において、本発明は、膀胱癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかを決定する方法を特徴とし、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲのうちの少なくとも１つの発現レベルを決定することと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、本方法は、（ｃ）治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含む。

【００１０】

別の態様において、本発明は、膀胱癌を有する患者のための抗癌療法剤の治療効果の最適化方法を特徴とし、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲのうちの少なくとも１つの発現レベルを決定することと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、本方法は、（ｃ）治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含む。

【００１１】

別の態様において、本発明は、膀胱癌に罹患している患者の治療方法を特徴とし、本方法は、カルメット・ゲラン桿菌（ＢＣＧ）ワクチン以外の治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含み、患者から得られる試料中のＴＰ５３の発現レベルが、ＴＰ５３の基準レベルに対して増加したと決定されている。

【００１２】

上記態様のうちのいずれか１つの一部の実施形態において、抗癌療法剤は、ＦＧＦＲ３

アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、及び／またはＥＧＦＲアンタゴニストを含む。一部の実施形態において、抗癌療法剤は、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト及びＥＧＦＲアンタゴニストを含む。一部の実施形態において、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＥＧＦＲアンタゴニスト、またはＴＰ５３アンタゴニストは、抗体またはその機能的断片である。一部の実施形態において、ＦＧＦＲ３アンタゴニストは、抗ＦＧＦＲ３抗体、またはその機能的断片である。一部の実施形態において、ＥＧＦＲアンタゴニストは、抗ＥＧＦＲ抗体、またはその機能的断片である。一部の実施形態において、ＴＰ５３アンタゴニストは、抗ＴＰ５３抗体、またはその機能的断片である。一部の実施形態において、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、またはＥＧＦＲアンタゴニストは、小分子アンタゴニストである。一部の実施形態において、ＦＧＦＲ３アンタゴニストまたはＥＧＦＲアンタゴニストは、チロシンキナーゼ阻害剤である。一部の実施形態において、ＥＧＦＲアンタゴニストは、エルロチニブ（ＴＡＲＣＥＶＡ（商標））である。一部の実施形態において、抗癌療法剤は、（ｉ）抗新生物剤、化学療法剤、成長阻害剤、及び細胞毒性剤からなる群から選択される薬剤、（ｉｉ）放射線療法剤、または（ｉｉｉ）それらの組み合わせを更に含む。

【００１３】

上記態様のうちのいずれか１つの一部の実施形態において、患者から得られる試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルは、ｍＲＮＡを測定することによって決定される。一部の実施形態において、患者から得られる試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）アッセイによって決定される。一部の実施形態において、ＰＣＲアッセイは、定量的ＰＣＲアッセイである。

【００１４】

上記態様のうちのいずれか１つの一部の実施形態において、患者から得られる試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルは、タンパク質を測定することによって決定される。一部の実施形態において、患者から得られる試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルは、免疫組織化学（ＩＨＣ）法によって決定される。

【００１５】

上記態様のうちのいずれか１つの一部の実施形態において、患者から得られる試料は、腫瘍試料である。一部の実施形態において、腫瘍試料は、ホルマリン固定パラフィン包埋（ＦＦＰＥ）腫瘍試料である。

【００１６】

上記態様のうちのいずれか１つの一部の実施形態において、本方法は、遺伝子のうちの少なくとも２つの発現レベルを決定することを更に含む。一部の実施形態において、本方法は、遺伝子のうちの３つ全ての発現レベルを決定することを更に含む。

【００１７】

上記態様のうちのいずれか１つの一部の実施形態において、ＦＧＦＲ３の発現レベルは、基準レベルに対して少なくとも２倍増加したことが決定されている。一部の実施形態において、ＦＧＦＲ３の発現レベルは、基準レベルに対して少なくとも４倍増加したことが決定されている。

【００１８】

上記態様のうちのいずれか１つの一部の実施形態において、ＥＧＦＲの発現レベルは、基準レベルに対して少なくとも４倍増加したことが決定されている。一部の実施形態において、ＥＧＦＲの発現レベルは、基準レベルに対して少なくとも８倍増加したことが決定されている。

【００１９】

上記態様のうちのいずれか１つの一部の実施形態において、本方法は、ＤＵＳＢ３、ＦＲＳ２、ＴＳＣ１、ＥＲＢＢ３、ＣＤＫＮ１Ａ、ＣＣＮＤ１、ＴＰ６３、ＭＭＰ２、ＺＥＢ２、ＰＩＫ３ＣＢ、ＰＩＫ３Ｒ１、ＭＤＭ２、ＳＮＡＩ２、ＡＸＬ、ＺＥＢ１、ＢＣＬ２Ｂ、ＴＳＣ２、ＲＢ１、ＦＧＦＲ３２、ＰＩＫ３ＩＰ１、ＭＴＯＲ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＰＴＥＮ、ＡＫＴ１、ＢＣＬ２Ａ、ＦＲＳ３、ＥＲＢＢ２、ＦＧＦＲ３１、ＦＧＦ１、ＳＮ

ＡＩ１、ＦＧＦＲ３４、ＦＧＦ９、及びＦＧＦ２からなる群から選択される少なくとも１つの追加遺伝子の発現レベルを決定することを更に含み、少なくとも１つの追加遺伝子の発現レベルは、少なくとも１つの追加遺伝子の基準レベルに対して変化している。

【００２０】

上記態様のうちのいずれか１つの一部の実施形態において、膀胱癌は、筋層非侵襲性膀胱癌、筋層侵襲性膀胱癌、または転移性膀胱癌である。一部の実施形態において、筋層非侵襲性膀胱癌は、再発性筋層非侵襲性膀胱癌である。

【図面の簡単な説明】

【００２１】

【図１】患者に関する情報、及び実施例の節（例えば、実施例１～６）で解析された膀胱癌腫瘍標本の臨床病理学的特徴を示す表である。

【図２Ａ－２Ｂ】図２Ａ及び２Ｂは、Ｓｊｏｄａｈｌ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１８（１２）：３３７７－３３８６，２０１２からの１８，０００遺伝子の発現に関する主成分解析（ＰＣＡ）（図２Ａ）、及び実施例の節に記載されるカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現パネルと重複する８２遺伝子のみを使用するもの（例えば、表１を参照されたい）を示すグラフである（図２Ｂ）。両方の解析は、Ｓｊｏｄａｈｌら（上記）に記載される膀胱癌サブタイプに属する試料の類似の分布を示す。

【図２Ｃ－２Ｄ】図２Ｃ及び２Ｄは、重心に基づく分類器との交差検証が、１，０００遺伝子に基づく（図２Ｃ）及びカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現パネルと重複する８２遺伝子に基づく（図２Ｄ）、Ｓｊｏｄａｈｌら（上記）の膀胱癌サブタイプの類似の分類精度をもたらすことを示すグラフである。図２Ａ～２Ｄに提示されるデータは、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現パネルが、膀胱癌を分子的に定義されたサブタイプに正確に分類するできることを示す。ラインマーカーは、明確にするためであり、データ点を示してはいない。

【図３Ａ－３Ｂ】図３Ａ及び３Ｂは、Ｆｌｕｉｄｉｇｍアッセイ性能が、ユニバーサルＲＮＡ（ｕＲＮＡ）対照の入力量を減少させることにより、ＦＧＦＲ３（図３Ａ）及びＰＩＫ３ＣＡ（図３Ｂ）に関して示されるように、ＲＮＡ入力量によって影響されなかったことを示すグラフである。

【図３Ｃ－３Ｄ】図３Ｃ及び３Ｄは、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現パネルのラン・トゥ・ランデータ再現性が、臨床組織に関して高かったことを示すグラフである。図３Ｃ（ＨＰ－５２７１９）及び図３Ｄ（ＨＰ－５０３３１）は、各々が異なる日からのラン間で＞０．９８のR^2値を示す、２つの代表的なホルマリン固定パラフィンン包埋（ＦＦＰＥ）由来ＲＮＡ試料を示す。

【図３Ｅ】カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現パネルの高いチップ・トゥ・チップデータ再現性を示すグラフである。

【図４Ａ】Ｆｌｕｉｄｉｇｍ解析からの転写的に定義された組織クラスタ（組織）及び同時制御遺伝子の群（遺伝子）のヒートマップである。緑色、黄色、及び赤色の組織群は、試料の大半を含有していた。

【図４Ｂ】緑色、黄色、及び赤色組織クラスタ（例えば、図４Ａを参照されたい）が、明確な無疾患生存（ＤＦＳ）可能性と関連付けられることを示すグラフである。赤色群試料は、最良のＤＦＳプロファイルを有し（赤色対黄色：ＨＲ＝０．５４、Ｐ＝０．０３）、緑色群試料は、最悪のＤＦＳ可能性と関連付けられた（赤色対緑色：ＨＲ＝０．２９、Ｐ＝０．００４）。

【図４Ｃ】緑色群及び赤色群が、大部分の侵襲性組織及び全ての転移を含んでいた黄色群よりも著しく高い頻度の非侵襲性試料を含んでいたことを示す、非侵襲性及び侵襲性／転移組織像のコールを示すグラフである（緑色対赤色：Ｐ＝０．１０２９、有意でない（ＮＳ）；緑色対黄色及び赤色対黄色：両方の比較の場合、Ｐ＜０．０００１）。

【図４Ｄ】３つの主要な組織クラスタにおける、微小乳頭組織像を有する腫瘍の頻度を示すグラフである。より高い頻度の微小乳頭組織像が、黄色群において観察された（緑色対赤色：Ｐ＝０．２３５１、ＮＳ；緑色対黄色：Ｐ＝０．１１６７、ＮＳ；赤色対黄色：Ｐ

＝０．００６３）。
【図４Ｅ】免疫浸潤陽性試料の有病率に関して、緑色群、赤色群、及び黄色群間で有意差がないことを示すグラフである（緑色対赤色：Ｐ＝０．３３３２、ＮＳ；緑色対黄色：Ｐ＝０．５１９７、ＮＳ；赤色対黄色：Ｐ＝１、ＮＳ）。
【図４Ｆ】３つの群の治療頻度分布を示すグラフである。緑色群は、赤色群及び黄色群よりも重度に治療され（両方の比較の場合、Ｐ＜０．０００１）、赤色群及び黄色群は、同程度で治療された（Ｐ＝０．８８３６、ＮＳ）。治療は、カルメット・ゲラン桿菌（ＢＣＧ）ワクチン、化学療法、放射線、またはそれらの組み合わせを含んでいた。
【図５Ａ】実施例２に記載されるカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現パネルによる発現解析が、緑色群、黄色群、及び赤色群により表される３つの主要な組織のサブセット、ならびに青色群及び紫色群により表される２つのマイナーなサブタイプを特定したことを示すヒートマップである。
【図５Ｂ】実施例２に記載されるカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現パネルによる発現解析が、異なる生態と関連付けられる４つの主要な遺伝子発現クラスタを特定したことを示すヒートマップである。矢印は、ＴＰ５３及びＦＧＦＲ３（ピンク色クラスタＩ）；ＺＥＢ１／２のような上皮間葉転換（ＥＭＴ）遺伝子及びＰＩＫ３ＣＡ及びＰＩＫ３Ｒ１等のホスホイノシチド３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）遺伝子（水色クラスタＩＩ）；ＰＴＥＮ及びＡＫＴ１等の他のＰＩ３Ｋ遺伝子（マゼンタ色クラスタＩＩＩ）；ならびに線維芽細胞成長因子（ＦＧＦ）リガンド及び受容体（薄茶色クラスタＩＶ）を含む、各クラスタの代表的な遺伝子を指し示す。
【図５Ｃ】図５Ａに記載される組織サブタイプが、明確な無疾患生存（ＤＦＳ）可能性と関連付けられたことを示すグラフである。ラインマーカーは、明確にするためであり、データ点を示してはいない。
【図６Ａ－６Ｂ】図６Ａ～６Ｄは、（図６Ａ）筋層非侵襲性膀胱癌、（図６Ｂ）筋層侵襲性膀胱癌、（図６Ｃ）リンパ浸潤陽性組織、及び（図６Ｄ）微小乳頭組織像を有する膀胱腫瘍の組織学的特徴を示す、代表的なヘマトキシリン＆エオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色された部分である。スケールバーは、１００μｍを示す。
【図６Ｃ－６Ｄ】図６Ａ～６Ｄは、（図６Ａ）筋層非侵襲性膀胱癌、（図６Ｂ）筋層侵襲性膀胱癌、（図６Ｃ）リンパ浸潤陽性組織、及び（図６Ｄ）微小乳頭組織像を有する膀胱腫瘍の組織学的特徴を示す、代表的なヘマトキシリン＆エオシン（Ｈ＆Ｅ）で染色された部分である。スケールバーは、１００μｍを示す。
【図７Ａ】緑色群、赤色群、及び黄色群の標本に関するＦＧＦＲ３突然変異状態、ＦＧＦＲ３免疫組織化学（ＩＨＣ）、及び組織病理学コールを示すカラーマップである。
【図７Ｂ】ＦＧＦＲ３転写レベルが、Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現解析によって決定される通り、野生型（ＷＴ）試料（Ｐ＜０．０００１）と比較して、突然変異体（ＭＴ）においてより高かったことを示すグラフである。
【図７Ｃ】ＩＨＣによって測定される通り、ＦＧＦＲ３突然変異体試料が、野生型組織より高いレベルのタンパク質を発現したことを示すグラフである（Ｐ＜０．０００１）。
【図７Ｄ】ＦＧＦＲ３突然変異率が、赤色群及び侵襲性／転移性黄色群の両方と比較して、緑色群において著しく高かったことを示すグラフである（両方の比較の場合、Ｐ＜０．０００１）。
【図７Ｅ】緑色群の試料が、赤色群及び黄色群の試料よりも著しく高いＦＧＦＲ３転写レベルを発現したことを示すグラフである（両方の比較の場合、Ｐ＜０．０００１）。
【図７Ｆ】ＩＨＣによるＦＧＦＲ３タンパク質レベルが、赤色群よりも緑色群において高く、黄色群において最低であったことを示すグラフである（緑色対赤色：Ｐ＝０．０３４３；赤色対黄色：Ｐ＜０．０００１）。
【図７Ｇ】非侵襲性、侵襲性、及び膀胱癌転移におけるＦＧＦＲ３発現を示す一連の円グラフである。高タンパク質レベルのＦＧＦＲ３（ＩＨＣ　２＋／３＋）が、６６％、３２％、及び３３％の例でそれぞれ観察された。
【図７Ｈ】ＦＧＦＲ３－高侵襲性及び低侵襲性腫瘍ならびに膀胱癌転移を有する患者の３

年または５年ＤＦＳ率を示す一連のグラフであり、両方の状況の高発現腫瘍において低いＤＦＳ率を明示する（発現カットオフ＝５０パーセンタイル）。
【図７Ｉ】３年及び５年における全生存（ＯＳ）率が、ＦＧＦＲ３低発現例よりも高発現例において低いことを示す一連のグラフである（発現カットオフ＝２５パーセンタイル；高ＦＧＦＲ３、Ｎ＝１５；低ＦＧＦＲ３、Ｎ＝２４）。
【図７Ｊ】Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ　９：３，２０１０からの一般に入手可能なデータセットの解析を示し、カプラン・マイヤープロット（左パネル）ならびに３年及び５年ＯＳ率（右パネル）の両方によって、高（「ｈｉ」）レベル対低（「ｌｏ」）レベルのＦＧＦＲ３を発現する進行した膀胱癌を有する患者の著しく不良なＯＳプロファイルを示す（発現カットオフ＝７５パーセンタイル；高ＦＧＦＲ３、Ｎ＝１０；低ＦＧＦＲ３、Ｎ＝５２）。
【図８】ＩＮＧＥＮＵＩＴＹ（登録商標）ソフトウェア（Ｑｉａｇｅｎ，Ｒｅｄｗｏｏｄ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）解析が、ｐ５３、ＰＩ３Ｋ－ＡＫＴ、ＥＭＴ、及びＥＲＢＢ、及びＦＧＦＲ３経路を、非侵襲性の急速に再発する緑色群と、侵攻性の低い赤色群との間で異なって発現されるものとして特定したことを示すグラフである。緑色群と赤色群との間で著しく差次的に発現された４５／９６遺伝子（Ｐ＜０．０５、多重試験補正を用いる）を、解析のための入力として使用した。
【図９Ａ】緑色群、黄色群、及び赤色群からの試料において、Ｆｌｕｉｄｉｇｍ解析（ＭｕｔＭａｐ、Ｓｃｈｌｅｉｆｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．ＰｌｏＳ　Ｏｎｅ　９：ｅ９０７６１，２０１４を参照されたい）によって決定される、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）結果及び突然変異状態のカラーマップである。検証された突然変異は、ＮＧＳ及びＭｕｔＭａｐの両方によって特定されたものであった。
【図９Ｂ】は、緑色群、赤色群、及び黄色群の試料においてＮＧＳにより特定されたＴＰ５３突然変異を示すＴＰ５３遺伝子の概略図（ロリポッププロット）である。色付きのボックスは、組織群の割り当てを示す。類似の番号を有するボックスは、同じ試料中で同時検出された突然変異を指し示す。大部分の突然変異は、ＤＮＡ結合ドメイン内に密集し、重複していない。
【図９Ｃ】良性の赤色群と比較して、急速に再発する緑色群において著しく高いＴＰ５３突然変異率が存在したことを示すグラフである（Ｐ＝０．０３）。ＴＰ５３突然変異頻度は、赤色群と黄色群、または緑色群と黄色群との間で著しく異ならなかった（Ｐ＝０．１２２７、ＮＳ；及びＰ＝０．３６０５、ＮＳ）。
【図９Ｄ】ＴＰ５３の発現レベルが、Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現解析によって決定される通り、赤色群及び黄色群の両方と比較して、緑色群において高かったことを示すグラフである（それぞれＰ＝０．０１８７及びＰ＝０．００２０）。
【図９Ｅ】ＴＰ５３転写標的ｐ２１の発現レベルが、Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現解析によって決定される通り、赤色群及び黄色群の両方と比較して、緑色群において著しく高かったことを示すグラフである（両方の比較の場合、Ｐ＜０．０００１）。
【図９Ｆ】突然変異体ＴＰ５３試料が、ＩＨＣによって決定される通り、野生型例よりも高いレベルのＴＰ５３タンパク質を発現したことを示すグラフである（Ｐ＝０．０２０１）。
【図９Ｇ】実施例１に記載される膀胱癌群全体からの高ＴＰ５３例及び低ＴＰ５３例に関して類似のＤＦＳプロファイルを示すカプラン・マイヤープロットである（全腫瘍病期；Ｐ＝０．４２１８；高ＴＰ５３、Ｎ＝５３；低ＴＰ５３、Ｎ＝７３）。Ｈｉ、高い；Ｌｏ、低い。
【図９Ｈ】非侵襲性腫瘍において、高いＴＰ５３発現が、不良なＤＦＳ可能性に向かう傾向と関連付けられることを示すカプラン・マイヤープロットである（ＨＲ＝１．９９；Ｐ＝０．１２９２）。
【図９Ｉ】非侵襲性腫瘍状況において、高いＴＰ５３発現が、ＢＣＧ治療された患者における著しく不良なＤＦＳ可能性と関連付けられることを示すカプラン・マイヤープロットである（ＨＲ＝４．２；Ｐ＝０．０４０５）。

【図９Ｊ】非侵襲性腫瘍における高いＴＰ５３発現が、治療を受けなかった患者の不良なＤＦＳ可能性と関連付けられないことを示すカプラン・マイヤープロットである（ＨＲ＝０．５７；Ｐ＝０．５７４９）。
【図１０】膀胱癌標本のサブセットにおけるＥＲＢＢ経路リガンド及び受容体発現、ならびに同じ試料中の重要経路における重複する突然変異及びコピー数変更のＦｌｕｉｄｉｇｍ解析のカラーマップである。ＥＲＢＢ受容体及びリガンドの発現解析、突然変異解析、及びコピー数解析を、カスタムＦｌｕｉｄｉｇｍパネル上で実行した（Ｓｃｈｌｅｉｆｍａｎ ｅｔ ａｌ．ＰｌｏＳ Ｏｎｅ ９：ｅ９０７６１，２０１４）。Ｆｌｕｉｄｉｇｍ突然変異解析の場合：暗灰色の棒、突然変異体；中灰色の棒、技術的理由からコールなし；白色の棒、該当なし；明灰色の棒、野生型。Ｆｌｕｉｄｉｇｍ ＤＮＡコピー数解析の場合：暗灰色の棒、ＤＮＡコピー数増加；中灰色の棒、技術的理由からコールなし；明灰色の棒、ＤＮＡコピー数変化なし；白色の棒、該当なし。
【図１１Ａ】ＥＧＦＲが、Ｆｌｕｉｄｉｇｍによって決定される通り、赤色群及び黄色群の両方と比較して、緑色群において著しく高いレベルで発現されたことを示すグラフである（それぞれＰ＝０．０１２及びＰ＝０．００１２）。
【図１１Ｂ】非侵襲性膀胱癌腫瘍において、高いＥＧＦＲ発現レベルが、低減した３年及び５年ＤＦＳ率と関連付けられたことを示すグラフである（発現カットオフ＝２５パーセンタイル、高ＥＧＦＲ、Ｎ＝２２；低ＥＧＦＲ、Ｎ＝６６）。
【図１１Ｃ】高いＥＧＦＲ発現レベルが、膀胱癌転移を有する患者の低減したＤＦＳ率と関連付けられたことを示すグラフである（発現カットオフ＝２５パーセンタイル；高ＥＧＦＲ、Ｎ＝６；低ＥＧＦＲ、Ｎ＝４）。
【図１１Ｄ】膀胱癌転移を有する患者において、高いＥＧＦＲ発現レベルが、より低い３年及び５年ＯＳ率と関連付けられたことを示すグラフである（発現カットオフ＝５０パーセンタイル；高ＥＧＦＲ、Ｎ＝３；低ＥＧＦＲ、Ｎ＝７）。
【図１１Ｅ】Ｓｊｏｄａｈｌ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１８（１２）：３３７７－３３８６，２０１２からの独立データセットの解析を示すグラフである。このグラフは、高いＥＧＦＲ発現が、不良な３年及び５年ＯＳ頻度と関連付けられたことを示す（発現カットオフ＝５０パーセンタイル；高ＥＧＦＲ、Ｎ＝２３；低ＥＧＦＲ、Ｎ＝２８）。
【図１１Ｆ】Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ ９：３，２０１０からの独立データセットの解析を示すグラフである。このグラフは、高いＥＧＦＲ発現が、３年及び５年における低いＯＳ率と関連付けられることを示す（発現カットオフ＝２５パーセンタイル；高ＥＧＦＲ、Ｎ＝４８；低ＥＧＦＲ、Ｎ＝１４）。
【図１１Ｇ】ＥＧＦＲ阻害剤エルロチニブ（ＴＡＲＣＥＶＡ（商標））による膀胱癌細胞株の治療が、２５％超の成長阻害（ＧＩ）を示す３つの感受性細胞株（ＵＭＵＣ５、ＵＭＵＣ１０、及びＵＭＵＣ１７）、ならびに治療に応答して２５％未満のＧＩを示す４つの耐性細胞株（ＲＴ１１２、ＵＭＵＣ３、ＳＷ７８０、及びＢＦＴＣ９０５）を特定したことを示すグラフである。
【図１１Ｈ】ＥＧＦＲが、治療に応答して最小のＧＩを示す細胞株よりも、エルロチニブ（ＴＡＲＣＥＶＡ（商標））に感受性である膀胱癌細胞株（２５％超のＧＩ）において、著しく高いレベルで発現されることを示すグラフである（Ｐ＝０．０１０６）。
【図１２Ａ】実施例１（例えば、表１）に記載されるカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現パネルを含む遺伝子を示すベン図であり、ＩＮＧＥＮＵＩＴＹ（登録商標）解析に基づく３つの主要経路群、すなわち（１）ＦＧＦＲ、ＲＴＫ、ＭＡＰＫ、及びＰＩ３Ｋ経路；（２）発達及び上皮間葉転換（ＥＭＴ）軸；ならびに（３）ＴＰ５３、ゲノム安定性、及び細胞周期制御ネットワークに属する重複及び固有遺伝子を示す。数字は、ベン図の各部分における固有の遺伝子の数に対応する。
【図１２Ｂ】Ｓｊｏｄａｈｌら（上記）によって定義される通り、大きな公開データセットからの試料の無監督の階層クラスタリングの結果、ならびに対応する腫瘍悪性度、病期、及び分子クラスを示すグラフである。

【図１２Ｃ】カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現パネルに対応するプローブと比較して、減少数のＩｌｌｕｍｉｎａプローブに基づく、Ｓｊｏｄａｈｌら（上記）データセットからの腫瘍に関する相互検証された誤分類誤差曲線を示す一連のグラフである。各グラフは、総遺伝子のサブセットと共に最近収縮重心分類器を使用して、腫瘍悪性度、ＴＮＭ病期、または分子クラスの予測を試みる間に生じた分類誤差の量を示す。遺伝子の数は、下ｘ軸に示される対応する「収縮因子」と共に上ｘ軸に沿って示される。

【図１２Ｄ】カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現パネルの遺伝子に対応するプローブからのシグナル、及び対応する公開された基底／管腔状態に基づく４つの公開データセットからの試料の無監督の階層クラスタリングを示す一連のグラフである（Ｄａｍｒａｕｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　１１１：３１１０－３１１５，２０１４）。

【図１３Ａ】増加量の入力量のユニバーサルＲＮＡ（ｕＲＮＡ）対照に関して、６つの代表的なアッセイの線形性能及びそれらの原ＣＴ値を示す一連のグラフである。

【図１３Ｂ】異なる日に実行された２つの代表的なＦＦＰＥ由来ＲＮＡ試料に関して見られる通り、アーカイブＦＦＰＥ組織に関するラン・トゥ・ランデータを示す一連のグラフである。

【図１４Ａ】公開データセットからの遺伝子及び試料、ならびに実施例１及び図１に記載される膀胱癌ＦＦＰＥ組織群からのＮＭＩＢＣ、ＭＩＢＣ、及び転移（ＭＥＴ）の無監督のクラスタリングの結果を示すヒートマップである。白色ブロックは、それぞれのデータセットにおいて見出されない遺伝子を表す。

【図１４Ｂ】Ｄａｍｒａｕｅｒら（上記）の発見試料から計算された膀胱癌パネル遺伝子の基底プロファイル（赤色の棒）及び管腔プロファイル（青色の棒）を示すグラフである。平均中心及び単位分散正規化を、ログ変換された発現値に適用し、平均ログ正規化発現レベルを、基底及び管腔試料群に関して独立して計算して、最終プロファイルを形成した。

【図１４Ｃ】公開データからの基底／管腔サインを演算処理し、次いでこれらのサインを膀胱パネルデータに適用して、試料の基底／管腔類似性を測定するために使用される方法論を示す図である。

【図１５Ａ】膀胱癌パネル遺伝子発現ならびに癌関連遺伝子の対応するＢ／Ｌスコア、組織像、及び突然変異状態に基づく、２０４のＦＦＰＥ試料（実施例１及び図１を参照されたい）の無監督の階層クラスタリング（平均連結法、１－ピアソン相関距離メトリック）の結果を示す。追加の詳細については、実施例６を参照されたい。

【図１５Ｂ－１５Ｃ】図１５Ｂ～１５Ｅは、図１５Ａにおける転写的に定義された管腔及び基底クラスタからの試料中の、Ｂ／Ｌスコアの統計解析（図１５Ｂ）、ＮＭＩＢＣ、ＭＩＢＣ、及びＭＥＴの分布（図１５Ｃ）、ＦＧＦＲ３突然変異の有病率（図１５Ｄ）、及びＦＧＦＲ３　ＩＨＣスコア（図１５Ｅ）を示すグラフである。

【図１５Ｄ－１５Ｅ】図１５Ｂ～１５Ｅは、図１５Ａにおける転写的に定義された管腔及び基底クラスタからの試料中の、Ｂ／Ｌスコアの統計解析（図１５Ｂ）、ＮＭＩＢＣ、ＭＩＢＣ、及びＭＥＴの分布（図１５Ｃ）、ＦＧＦＲ３突然変異の有病率（図１５Ｄ）、及びＦＧＦＲ３　ＩＨＣスコア（図１５Ｅ）を示すグラフである。

【図１５Ｆ】図１５Ａにおいて管腔試料と基底試料との間で著しく差次的に発現された遺伝子の発現に基づく、ＩＮＧＥＮＵＩＴＹ（登録商標）経路活性化スコアを示す。

【図１６Ａ】同じ患者からの原発腫瘍におけるＢ／Ｌスコア（Ｘ軸）と、マッチさせた転移における対応するＢ／Ｌスコア（Ｙ軸）との間の相関プロットを示すグラフである。ドットの色は、ＳＮＰ遺伝子型判定に基づいて同じ患者にマッチさせた試料の有意性を反映する。Ｌｏｇ１０（ｐ値）＝－４（Ｐ＝０．０００１）、Ｌｏｇ１０（ｐ値）＝－３（Ｐ＝０．００１）、及びＬｏｇ１０（ｐ値）＝－２（Ｐ＝０．０１）。点線は、９５％信頼区間を表し、それを超えて、転移及び原発試料Ｂ／Ｌスコアは、０．０５のｐ値において異なる。

【図１６Ｂ】マッチさせた対におけるＢ／Ｌ状況の相違に関して、原発腫瘍（「ｐｒｉ」

）、マッチさせた転移（「ｍｅｔ」）のＢ／Ｌスコア、及び対応するｐ値を示す表である。
【図１７Ａ－１７Ｂ】図１７Ａ及び１７Ｂは、ＦＦＰＥ組織内の２つの群間で著しく差次的に発現された遺伝子に基づいて、基底試料との比較で管腔内のエストロゲン受容体の予測的活性化を示すＩＮＧＥＮＵＩＴＹ（登録商標）解析の結果を表す図である。
【図１８】少なくとも１００倍の読み取り範囲及び１０％超の頻度で全ての変異型部位における対立遺伝子頻度を比較する、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）ＡＭＰＬＩＳＥＱ（商標）データを使用するピアソン相関マトリックスである（平均して、１２０部位を任意の２つの試料間で比較した）。
【発明を実施するための形態】
【００２２】
Ｉ．序文
本発明は、癌、例えば、膀胱癌のための治療、診断、及び予後判定方法ならびに組成物を提供する。本発明は、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲを含む、表１に記載の遺伝子の少なくとも１つの発現レベル（例えば、基準試料に対して変化した発現レベル）の決定が、癌に罹患している患者を治療するため、癌に罹患している患者の予後を決定するため、癌を有する患者が抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかを決定するため、及び／または癌を有する患者に対する抗癌療法剤の治療効果を最適化するために有用であるという発見に基づいている。一部の実施形態において、次いで、抗癌療法剤が患者に対して選択され得、更に、抗癌療法剤は、任意選択で患者に投与され得る。
【００２３】
ＩＩ．定義
「発現レベル」、「発現のレベル」、または「レベル」は、交換可能に使用され、概して、生物試料中のポリヌクレオチド（例えば、メッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）またはアミノ酸産生物若しくはタンパク質の量を指す。「発現」は、概して、遺伝子コードされた情報が、細胞内に存在し、作動する構造体内に転換されるプロセスを指す。したがって、本発明によると、遺伝子の「発現」は、ポリヌクレオチド（例えば、ｍＲＮＡ）への転写、ポリペプチド（例えば、タンパク質）への翻訳、または更にポリペプチドの翻訳後修飾を指し得る。転写されたポリヌクレオチドの断片、翻訳されたポリペプチド、または翻訳後修飾されたポリペプチドも、それらが、代替的なスプライシングにより生成された転写産物若しくは劣化した転写産物、または例えば、タンパク質分解によるタンパク質の翻訳後処理を起源とするかどうかにかかわらず、発現されたと見なされよう。「発現遺伝子」には、ｍＲＮＡとしてポリヌクレオチドへと転写され、次いでタンパク質へと翻訳されるものと、また、ＲＮＡへと転写されるがタンパク質へと翻訳されないもの（例えば、トランスファーＲＮＡ及びリボソームＲＮＡ）とが含まれる。
【００２４】
「マーカー」及び「バイオマーカー」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、ＤＮＡ、ＲＮＡ、タンパク質、炭水化物、または糖脂質系分子マーカーを指し、対象または患者の試料におけるその発現または存在は、標準方法（または本明細書に開示される方法）によって検出され得、例えば、患者における膀胱癌を診断するため、膀胱癌に罹患している患者の予後を決定するため、膀胱癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかを決定するため、膀胱癌を有する抗癌患者の治療効果を最適化するため、及び／またはかかるマーカーの発現レベルを決定することを必要とする治療方法において有用である。かかるバイオマーカーには、表１に記載される遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、遺伝子は、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲのうちの１つ以上であり得る。一部の実施形態において、遺伝子は、ＦＧＦＲ３である。一部の実施形態において、遺伝子は、ＴＰ５３である。一部の実施形態において、遺伝子は、ＥＧＦＲである。他の実施形態において、遺伝子（複数可）は、ＤＵＳＢ３、ＦＲＳ２、ＴＳＣ１、ＥＲＢＢ３、ＣＤＫＮ１Ａ、ＣＣＮＤ１、ＴＰ６３、ＭＭＰ２、ＺＥＢ２、ＰＩＫ３ＣＢ、ＰＩＫ３Ｒ１、ＭＤＭ２、ＳＮＡＩ２、ＡＸＬ、ＺＥＢ１

、ＢＣＬ２Ｂ、ＴＳＣ２、ＲＢ１、ＦＧＦＲ３２、ＰＩＫ３ＩＰ１、ＭＴＯＲ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＰＴＥＮ、ＡＫＴ１、ＢＣＬ２Ａ、ＦＲＳ３、ＥＲＢＢ２、ＦＧＦＲ３１、ＦＧＦ１、ＳＮＡＩ１、ＦＧＦＲ３４、ＦＧＦ９、またはＦＧＦ２から選択されてもよい。かかるバイオマーカーの発現は、患者から得られる試料中で基準レベルよりも高いか、または低いかを決定することができる。少なくとも１つの遺伝子の基準発現レベルを超えるか、またはそれより低い発現レベルを有する個体は、膀胱癌に罹患している対象／患者として、特定の予後（例えば、良好な予後若しくは不良な予後）を有する患者として、または抗癌療法剤での治療に応答する可能性がある者として特定され得る。

【００２５】

ある特定の実施形態において、本明細書における「基準レベル」という用語は、既定値を指す。熟練者であれば理解するであろう通り、基準レベルは既定され、例えば、特異性及び／または感受性に関する要件を満たすように設定されている。これらの要件は、例えば、規制機関ごとに異なり得る。例えば、アッセイの感受性または特異性はそれぞれ、ある特定の制限、例えば、８０％、９０％、９５％、または９９％に設定される必要があり得る。これらの要件は、正または負の予測値に関して定義されてもよい。それにも関わらず、本発明において付与される教示に基づいて、それらの要件を満たす基準レベルに達することが常に可能となるであろう。一実施形態において、基準レベルは、健康な個体において決定される。一実施形態において、この基準レベルは、患者が属する疾病単位（例えば、膀胱癌等の癌タイプ、または膀胱癌のサブタイプ）において規定されていた。ある特定の実施形態において、基準レベルは、調査される疾病単位における値の全体分布の２０～９５パーセンタイルの間の任意のパーセンタイル（例えば、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、または９５パーセンタイル）に設定され得る。特定の実施形態において、基準レベルは、調査される疾病単位における値の全体分布の２５パーセンタイルに設定される。他の特定の実施形態において、基準レベルは、調査される疾病単位における値の全体分布の５０パーセンタイルに設定される。他の実施形態において、基準レベルは、例えば、調査される疾病単位における、または所与の集団における値の全体分布から決定されるメジアン、三分位値、四分位値、または五分位値に設定され得る。他の実施形態において、基準レベルは、調査される疾病単位における、または所与の集団における値の全体分布から決定される平均に設定され得る。

【００２６】

ある特定の実施形態において、「増加」または「より上」という用語は、基準レベルでのレベルを指すか、または基準試料からのレベルと比較して、本明細書に記載される方法によって検出されるマーカー（例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、若しくはＥＧＦＲ）のレベルにおいて、５％、１０％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、１００％、２倍、３倍、４倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、若しくはそれ以上の全体増加を指す。

【００２７】

ある特定の実施形態において、「減少」または「より下」という用語は、基準レベルより下のレベルを指すか、または基準試料からのレベルと比較して、本明細書に記載される方法によって検出されるマーカー（例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、若しくはＥＧＦＲ）のレベルにおいて、５％、１０％、２０％、２５％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、若しくはそれ以上の全体低減を指す。

【００２８】

ある特定の実施形態において、「基準レベルで」という用語は、基準試料からの、本明細書に記載される方法によって検出されるレベルと同じであるマーカー（例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲ）のレベルを指す。

【００２９】

「診断」という用語は、分子的または病理学的状態、疾患、または病態（例えば、膀胱癌を含む癌）の特定または分類を指すために本明細書で使用される。例えば、「診断」は、特定タイプの癌の特定を指し得る。「診断」はまた、例えば、病理組織学的基準による、または分子的特徴による、特定のサブタイプの癌の分類（例えば、バイオマーカー（例えば、特定の遺伝子または該遺伝子によってコードされるタンパク質）のうちの１つまたは組み合わせの発現によって特徴付けられるサブタイプ）を指す場合もある。一部の実施形態において、癌のサブタイプは、筋層非侵襲性膀胱癌（ＮＭＩＢＣ；Ｔ０、Ｔ１）、筋層侵襲性膀胱癌（ＭＩＢＣ；Ｔ２、Ｔ３）、または転移性膀胱癌であり得る。

【００３０】

治療または療法剤、例えば、有効量の抗癌療法剤（例えば、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、及び／若しくはＥＧＦＲアンタゴニストを含む抗癌療法剤）を含む治療に対する患者の「応答」または患者の「応答性」は、治療から、または治療の結果として、癌（例えば、膀胱癌）の危険性があるか、またはそれを有する患者に付与される臨床的または治療的利益を指す。かかる利益には、細胞または生物学的応答、完全応答、部分応答、安定した疾患（進行若しくは再発がない）、またはアンタゴニストでの治療から、または治療の結果として患者の晩期再発を伴う応答が含まれ得る。熟練者であれば、患者が応答性であるかどうかを決定するような立場に容易に置かれるであろう。例えば、膀胱癌に関して、応答は、膀胱癌による苦痛の減少、例えば、減退した及び／または停止した腫瘍増殖、腫瘍のサイズの低減、及び／または膀胱癌の１つ以上の症状の改善、例えば、血尿（血尿症）、排尿の変化、他の泌尿器症状、腰痛、または骨盤痛によって反映され得る。一部の実施形態において、応答は、癌の転移性変換の指標または癌の指標の減少または減退、例えば、転移の形成の予防または転移の数若しくはサイズの低減によって反映され得る。例えば、応答は、基準レベルに対して増加レベルまたは減少レベルの、表１に記載されるバイオマーカー（ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲ）のうちの１つを発現していると診断された患者における、低減した腫瘍サイズ、無疾患生存、無進行生存、または全生存であり得る。

【００３１】

「試料」及び「生物試料」という用語は、体液、体組織（例えば、腫瘍組織）、細胞、または他の源を含む個体から得られた任意の生物試料を指すために交換可能に使用される。体液は、例えば、リンパ、血清、全生血、末梢血単核細胞、凍結された全血、血漿（生または凍結を含む）、尿、唾液、精液、滑液、及び髄液である。試料には、乳房組織、腎組織、結腸組織、脳組織、筋組織、滑膜組織、皮膚、毛包、骨髄、及び腫瘍組織も含まれる。哺乳動物からの組織生検標本及び体液の入手方法は、当該技術分野において周知である。

【００３２】

本明細書における「腫瘍試料」は、患者の腫瘍に由来するかまたはその腫瘍細胞を含む試料である。本明細書における腫瘍試料の例には、腫瘍生検標本、循環腫瘍細胞、循環血漿タンパク質、腹水、腫瘍に由来するかまたは腫瘍の様な特性を示す初代細胞培養物または細胞株、ならびにホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍試料または凍結腫瘍試料等の保管された腫瘍試料が含まれるが、これらに限定されない。

【００３３】

関心対象のポリペプチドの「アンタゴニスト」（交換可能に「阻害剤」と呼ばれる）は、関心対象のポリペプチドの活性化または機能を干渉する、例えば、関心対象のポリペプチドによって媒介される生物活性を部分的にまたは完全に遮断、阻害、または中和する薬剤である。例えば、ポリペプチドＸのアンタゴニストは、ポリペプチドＸによって媒介される生物活性を部分的にまたは完全に遮断、阻害、または中和する任意の分子を指す。阻害剤の例には、抗体、リガンド抗体、小分子アンタゴニスト、アンチセンス、及び阻害性ＲＮＡ（例えば、ｓｈＲＮＡ）分子が含まれる。好ましくは、阻害剤は、関心対象のポリペプチドに結合する抗体または小分子である。特定の実施形態において、阻害剤は、約１，０００ｎＭ以下の関心対象のポリペプチドに対する結合親和性（解離定数）を有する。

別の実施形態において、阻害剤は、約１００ｎＭ以下の関心対象のポリペプチドに対する結合親和性を有する。別の実施形態において、阻害剤は、約５０ｎＭ以下の関心対象のポリペプチドに対する結合親和性を有する。特定の実施形態において、阻害剤は、関心対象のポリペプチドに共有結合される。特定の実施形態において、阻害剤は、１，０００ｎＭ以下の最大半量阻害濃度（ＩＣ５０）で関心対象のポリペプチドのシグナル伝達を阻害する。別の実施形態において、阻害剤は、５００ｎＭ以下のＩＣ５０で関心対象のポリペプチドのシグナル伝達を阻害する。別の実施形態において、阻害剤は、５０ｎＭ以下のＩＣ５０で関心対象のポリペプチドのシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態において、アンタゴニストは、関心対象のポリペプチドの発現レベルまたは生物活性を少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、９９％、またはそれ以上低減するか、または阻害する。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、ＦＧＦＲ３またはＦＧＦＲ３のリガンドである。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、ＥＧＦＲまたはＦＧＦＲ３のリガンドである。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、ＴＰ５３である。

【００３４】

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、別途指定されない限り、霊長類（例えば、ヒト）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源由来の関心対象の任意の天然ポリペプチド（例えば、タンパク質）を指す。この用語は、「完全長」未処理のポリペプチド、ならびに細胞内の処理から生じるポリペプチドの任意の形態を包含する。この用語は、ポリペプチドの天然に存在する変異型、例えば、スプライス変異型または対立遺伝子変異型も包含する。一部の実施形態において、ポリペプチドは、ＦＧＦＲ３である。他の実施形態において、ポリペプチドは、ＴＰ５３である。他の実施形態において、ポリペプチドは、ＥＧＦＲである。

【００３５】

本明細書で交換可能に用いられる、「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、ＤＮＡ及びＲＮＡを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド若しくは塩基、及び／またはそれらの類似体、あるいはＤＮＡまたはＲＮＡポリメラーゼによりポリマーに組み込むことができる任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体等の修飾ヌクレオチドを含んでよい。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーの組み立て前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断され得る。ポリヌクレオチドは、例えば標識との複合により、合成後に更に修飾され得る。他のタイプの修飾には、例えば、天然に存在するヌクレオチドのうちの１つ以上を類似体と置換する「キャップ」、ヌクレオチド間修飾、例えば、非電荷性結合（例えば、メチルホスホン酸塩、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート等）によるもの、及び電荷性結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）によるもの、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ－Ｌ－リシン等）の懸垂部分を含むもの、挿入剤（例えば、アクリジン、ソラーレン等）によるもの、キレート剤（例えば、金属、放射活性金属、ホウ素、酸化金属等）を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾結合（例えば、αアノマー核酸等）によるもの、ならびにポリヌクレオチド（複数可）の未修飾形態が含まれる。更に、糖内に通常存在するヒドロキシル基のうちのいずれかは、例えば、ホスホン酸基、リン酸基により置換されるか、標準保護基により保護されるか、若しくは活性化されて追加のヌクレオチドへの追加の結合を調製し得るか、または固体若しくは半固体支持体に複合されてもよい。５′及び３′末端ＯＨをリン酸化するか、またはアミン若しくは１～２０個の炭素原子の有機キャッピング基部分と置換することができる。他のヒドロキシルは、標準保護基に誘導体化されてもよい。ポリヌクレオチドには、一般に当該技術分野において既知のリボースまたはデオキシリボース糖の類似形態を含むこともでき、例えば、２′－Ｏ－メチル－、２′－Ｏ－アリル、２′－フルオロ－または２′－アジド－リボース、炭素環式糖類似体、α－アノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロース、または

リキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、及び脱塩基ヌクレオシド類似体、例えば、メチルリボシドも含まれる。１つ以上のホスホジエステル結合は、代替連結基に置き換えられてもよい。これらの代替連結基には、限定されないが、リン酸塩がＰ（Ｏ）Ｓ（「チオエート」）、Ｐ（Ｓ）Ｓ（「ジチオエート」）、〃（Ｏ）ＮＲ２（「アミデート」）、Ｐ（Ｏ）Ｒ、Ｐ（Ｏ）ＯＲ′、ＣＯまたはＣＨ２（「ホルムアセタール」）に置き換えられる実施形態が含まれ、各ＲまたはＲ′は、独立してＨであるか、または置換若しくは非置換アルキル（１－２０Ｃ）（任意にエーテル（－Ｏ－）結合を含む）、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはアラルジルである。ポリヌクレオチド内のすべての結合が同一である必要はない。前述の説明は、ＲＮＡ及びＤＮＡを含む、本明細書で言及される全てのポリヌクレオチドに適用する。

【００３６】

「小分子」という用語は、約２０００ダルトン以下、好ましくは約５００ダルトン以下の分子量を有する任意の分子を指す。

【００３７】

「抗体」という用語は、本明細書で最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体断片を含むが、これらに限定されない、種々の抗体構造を包含する。

【００３８】

「関心対象の抗ポリペプチド抗体」及び関心対象のポリペプチド「に結合する抗体」という用語は、その抗体が診断剤及び／または療法剤として関心対象のポリペプチドを標的とすることに有用となるような十分な親和性で関心対象のポリペプチドに結合することができる抗体を指す。一実施形態において、関心対象のタンパク質の無関係の非ポリペプチドへの関心対象の抗ポリペプチド抗体の結合の程度は、例えば、放射免疫測定法（ＲＩＡ）によって測定した場合に、関心対象のポリペプチドへの抗体の結合の約１０％未満である。ある特定の実施形態において、関心対象のポリペプチドに結合する抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ、または≦０．００１ｎＭ（例えば、10^{-8}Ｍ以下、例えば、10^{-8}Ｍ～10^{-13}Ｍ、例えば、10^{-9}Ｍ～10^{-13}Ｍ）の解離定数（Ｋｄ）を有する。ある特定の実施形態では、関心対象の抗ポリペプチド抗体は、異なる種に由来する関心対象のポリペプチド間で保存されている関心対象のポリペプチドのエピトープに結合する。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、ＦＧＦＲ３である。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、ＥＧＦＲである。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、ＴＰ５３である。

【００３９】

「遮断抗体」または「アンタゴニスト抗体」は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害または低減するものである。好ましい遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を実質的にまたは完全に阻害する。

【００４０】

「親和性」は、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の、非共有性相互作用の総和の強度を指す。別途指定されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体及び抗原）間の１：１の相互作用を反映する、本来の結合親和性を指す。分子Ｘの、そのパートナーＹに対する親和性は、一般に解離定数（Ｋｄ）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当該技術分野において既知の一般的な方法によって測定することができる。

【００４１】

「抗体断片」は、無傷抗体が結合する抗原に結合する、無傷抗体の一部を含む無傷抗体以外の分子を指す。「機能的断片」は、完全長抗体の機能を維持する抗体断片である。抗

体断片の例には、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ′、Ｆａｂ′－ＳＨ、Ｆ（ａｂ′）２；二重特異性抗体；線状抗体（ＬＩＮＥＡＲ　ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ）；一本鎖抗体分子（例えば、ｓｃＦｖ）；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【００４２】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／または軽鎖の一部分が特定の源または種に由来し、重鎖及び／または軽鎖の残りの部分が異なる源または種に由来する抗体を指す。

【００４３】

「完全長抗体」、「無傷抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書において、天然抗体構造と実質的に類似する構造を有するか、またはＦｃ領域を含む重鎖を有する抗体を指すために交換可能に使用される。

【００４４】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、かつ／または同じエピトープに結合するが、例えば、自然発生突然変異を含有する、またはモノクローナル抗体調製物の産生中に発生する、想定される変異型抗体を除いて、かかる変異形は一般に少量で存在する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象とする。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組み換えＤＮＡ法、ファージディスプレイ法、及びヒト免役グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法、例えば、モノクローナル抗体を作製するためのかかる方法及び他の例示的な方法を含むが、これらに限定されない、多様な技法によって作製されてもよい。

【００４５】

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生された、またはヒト抗体レパートリーを利用する非ヒト源に由来する、抗体のアミノ酸配列、または他のヒト抗体コード配列に対応する、アミノ酸配列を保有するものである。このヒト抗体の定義は、具体的に、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

【００４６】

「ヒト化」抗体は、非ヒト超可変領域（ＨＶＲ）由来のアミノ酸残基及びヒトフレームワーク（ＦＲ）由来のアミノ酸残基を含む、キメラ抗体を指す。ある特定の実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、そのＨＶＲ（例えば、相補性決定領域（ＣＤＲ））の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、そのＦＲの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意に、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでもよい。抗体、例えば非ヒト抗体の、「ヒト化形態」は、ヒト化を経た抗体を指す。

【００４７】

「免疫複合体」は、細胞毒性剤を含むが、これに限定されない１つ以上の異種性分子（複数可）に複合される抗体である。

【００４８】

本明細書で使用される「線維芽細胞成長因子受容体３」及び「ＦＧＦＲ３」という用語は、別途指定されない限り、霊長類（例えば、ヒト）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源由来の任意の天然ＦＧＦＲ３を指す。この用語は、「完全長」未処理のＦＧＦＲ３、ならびに細胞内の処理から生じるＦＧＦＲ３の任意の形態を包含する。この用語は、ＦＧＦＲ３の天然に存在する変異型、例えば、スプライス変異型または対立遺伝子変異型も包含する。ヒトＦＧＦＲ３ポリペプチドの例示的

な野生型配列は、Ｐ２２６０７－１またはＰ２２６０７－２のＵｎｉＰｒｏｔデータベースからのアミノ酸配列を含む。

【００４９】

本明細書で使用される場合、「ＦＧＦＲ３アンタゴニスト」及び「ＦＧＦＲ３阻害剤」という用語は、現在当該技術分野において既知であるか、または今後特定されるであろう任意のＦＧＦＲ３アンタゴニストを指し、患者への投与時に、他の方法でその天然リガンドのＦＧＦＲ３への結合から生じる下流生物学的作用のうちのいずれかを含む、患者におけるＦＧＦＲ３の活性化と関連付けられる生物活性の阻害をもたらす任意の化学実体を含む。かかるＦＧＦＲ３アンタゴニストには、ＦＧＦＲ３活性化、または患者における癌の治療に関連するＦＧＦＲ３活性化の下流生物学的作用のうちのいずれかを遮断することができる任意の薬剤が含まれる。かかるアンタゴニストは、受容体の細胞内ドメインに直接結合し、そのキナーゼ活性を阻害することによって作用することができる。代替として、かかるアンタゴニストは、ＦＧＦＲ３受容体のリガンド結合部位またはその一部分を占拠することによって作用することができ、それにより、受容体をその天然リガンドにアクセスできないようにして、その正常な生物活性が予防または低減される。代替として、かかるアンタゴニストは、ＦＧＦＲ３ポリペプチドの二量体化、若しくはＦＧＦＲ３ポリペプチドと他のタンパク質との相互作用を調整することによって作用し得るか、またはＦＧＦＲ３のユビキチン化及びエンドサイトーシス分解を強化し得る。ＦＧＦＲ３アンタゴニストには、小分子阻害剤、抗体または抗体断片、アンチセンス構築体、小阻害性ＲＮＡ（すなわち、ｄｓＲＮＡによるＲＮＡ干渉；ＲＮＡｉ）、及びリボザイムが含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、ＦＧＦＲ３アンタゴニストは、ヒトＦＧＦＲ３に特異的に結合する小分子または抗体である。例示的なＦＧＦＲ３アンタゴニスト抗体は、例えば、米国特許第８，４１０，２５０号に記載され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、米国特許第８，４１０，２５０号は、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト抗体クローン１８４．６、１８４．６．１、及び１８４．６．１Ｎ５４Ｓを説明している（これらのクローンは、「Ｒ３　Ｍａｂ」とも称される）。

【００５０】

「上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）」、「ＥｒｂＢ１」、「ＨＥＲ１」、及び「ＥＧＦＲキナーゼ」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、例えば、Ｃａｒｐｅｎｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．５６：８８１－９１４（１９８７）に開示される通りＥＧＦＲと称され、その天然に存在する突然変異体形態を含む（例えば、Ｈｕｍｐｈｒｅｙ　ｅｔ　ａｌ．ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）８７：４２０７－４２１１（１９９０）にあるような欠失突然変異体ＥＧＦＲ）。ＥＧＦＲまたはＥＲＢＢ１は、ＥＧＦＲタンパク質産生物をコードする遺伝子を指す。例示的なヒトＥＧＦＲタンパク質のアミノ酸配列は、例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ受入番号Ｐ００５３３で見出され得る。

【００５１】

本明細書で使用される場合、「ＥＧＦＲアンタゴニスト」及び「ＥＧＦＲ阻害剤」という用語は、現在当該技術分野において既知であるか、または今後特定されるであろう任意のＥＧＦＲアンタゴニストを指し、患者への投与時に、他の方法でその天然リガンドのＥＧＦＲへの結合から生じる下流生物学的作用のうちのいずれかを含む、患者におけるＥＧＦ受容体の活性化と関連付けられる生物活性の阻害をもたらす任意の化学実体を含む。かかるＥＧＦＲアンタゴニストには、ＥＧＦＲ活性化、または患者における癌の治療に関連するＥＧＦＲ活性化の下流生物学的作用のうちのいずれかを遮断することができる任意の薬剤が含まれる。かかるアンタゴニストは、受容体の細胞内ドメインに直接結合し、そのキナーゼ活性を阻害することによって作用することができる。代替として、かかるアンタゴニストは、ＥＧＦ受容体のリガンド結合部位またはその一部分を占拠することによって作用することができ、それにより、受容体をその天然リガンドにアクセスできないようにして、その正常な生物活性が予防または低減される。代替として、かかるアンタゴニストは、ＥＧＦＲポリペプチドの二量体化、若しくはＥＧＦＲポリペプチドと他のタンパク質との相互作用を調整することによって作用し得るか、またはＥＧＦＲのユビキチン化及び

エンドサイトーシス分解を強化し得る。ＥＧＦＲアンタゴニストには、小分子阻害剤、抗体または抗体断片、アンチセンス構築体、小阻害性ＲＮＡ（すなわち、ｄｓＲＮＡによるＲＮＡ干渉；ＲＮＡｉ）、及びリボザイムが含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、ＥＧＦＲアンタゴニストは、ヒトＥＧＦＲに特異的に結合する小分子または抗体である。

【００５２】

本発明での使用に適した例示的なＥＧＦＲアンタゴニストには、例えば、小分子ＥＧＦＲアンタゴニストが含まれ、キナゾリンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、ピリドーピリミジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、ピリミドーピリミジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、ピロローピリミジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、ピラゾローピリミジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、フェニルアミノーピリミジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、オキシンドールＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、インドロカルバゾールＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、フタラジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、イソフラボンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、キナロンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、及びチルホスチンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、例えば、以下の特許公開に記載されるもの、ならびにＥＧＦＲキナーゼ阻害剤の全ての薬学的に許容される塩及び溶媒和物が含まれる。国際特許公開第ＷＯ９６／３３９８０号、同第ＷＯ９６／３０３４７号、同第ＷＯ９７／３００３４号、同第ＷＯ９７／３００４４号、同第ＷＯ９７／３８９９４号、同第ＷＯ９７／４９６８８号、同第ＷＯ９８／０２４３４号、同第ＷＯ９７／３８９８３号、同第ＷＯ９５／１９７７４号、同第ＷＯ９５／１９９７０号、同第ＷＯ９７／１３７７１号、同第ＷＯ９８／０２４３７号、同第ＷＯ９８／０２４３８号、同第ＷＯ９７／３２８８１号、同第ＷＯ９８／３３７９８号、同第ＷＯ９７／３２８８０号、同第ＷＯ９７／３２８８号、同第ＷＯ９７／０２２６６号、同第ＷＯ９７／２７１９９号、同第ＷＯ９８／０７７２６号、同第ＷＯ９７／３４８９５号、同第ＷＯ９６／３１５１０号、同第ＷＯ９８／１４４４９号、同第ＷＯ９８／１４４５０号、同第ＷＯ９８／１４４５１号、同第ＷＯ９５／０９８４７号、同第ＷＯ９７／１９０６５号、同第ＷＯ９８／１７６６２号、同第ＷＯ９９／３５１４６号、同第ＷＯ９９／３５１３２号、同第ＷＯ９９／０７７０１号、及び同第ＷＯ９２／２０６４２号、欧州特許出願第ＥＰ５２０７２２号、同第ＥＰ５６６２２６号、同第ＥＰ７８７７７２号、同第ＥＰ８３７０６３号、及び同第ＥＰ６８２０２７号、米国特許第５，７４７，４９８号、同第５，７８９，４２７号、同第５，６５０，４１５号、及び同第５，６５６，６４３号、ならびにドイツ特許出願第ＤＥ１９６２９６５２号。小分子ＥＧＦＲアンタゴニストの追加の非限定例には、Ｔｒａｘｌｅｒ，Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｔｈｅｒ．Ｐａｔｅｎｔｓ ８（１２）：１５９９－１６２５（１９９８）に記載されるＥＧＦＲキナーゼ阻害剤のうちのいずれかが含まれる。

【００５３】

本発明に従って使用され得る小分子ＥＧＦＲアンタゴニストの特定の好ましい実施例には、［６，７－ビス（２－メトキシエトキシ）－４－キナゾリン－４－イル］－（３－エチニルフェニル）アミン（ＯＳＩ－７７４、エルロチニブ、またはＴＡＲＣＥＶＡ（商標）（エルロチニブ ＨＣｌ）、ＯＳＩ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ／Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ／Ｒｏｃｈｅとしても知られている）（米国特許第５，７４７，４９８号；国際特許公開第ＷＯ０１／３４５７４号、及びＭｏｙｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５７：４８３８－４８４８（１９９７））、ＣＩ－１０３３（以前はＰＤ１８３８０５として知られていた；Ｐｆｉｚｅｒ）（Ｓｈｅｒｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ａｍ．Ａｓｓｏｃ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４０：７２３（１９９９））、ＰＤ－１５８７８０（Ｐｆｉｚｅｒ）、ＡＧ－１４７８（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、ＣＧＰ－５９３２６（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＰＫＩ－１６６（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＥＫＢ－５６９（Ｗｙｅｔｈ）、ＧＷ－２０１６（ＧＷ－５７２０１６またはラパチニブジトシラートとしても知られている；ＧＳＫ）、及びゲフィチニブ（ＺＤ１８３９またはＩＲＥＳＳＡ（商標）としても知られている；Ａｓｔｒａｚｅｎｅｃａ）（Ｗｏｏｄｂｕｒｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ａｍ．Ａｓｓｏｃ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．３８：６３３（１９９７））が含まれる。本発明に従って使用され得る特定の好ましい小分子

ＥＧＦＲキナーゼ阻害剤は、［６，７－ビス（２－メトキシエトキシ）－４－キナゾリン－４－イル］－（３－エチニルフェニル）アミン（すなわち、エルロチニブ）、その塩酸塩（すなわち、エルロチニブＨＣｌ、ＴＡＲＣＥＶＡ（商標））、または他の塩形態（例えば、エルロチニブメシラート）である。

【００５４】

例示的なＥＧＦＲアンタゴニスト抗体には、Ｍｏｄｊｔａｈｅｄｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ６７：２４７－２５３（１９９３）、Ｔｅｒａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ ７７：６３９－６４５（１９９６）、Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１：１３１１－１３１８（１９９５）、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１５：５９（８）：１９３５－４０（１９９９）、及びＹａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５９：１２３６－１２４３（１９９９）が含まれる。したがって、一部の実施形態において、ＥＧＦＲアンタゴニスト抗体は、モノクローナル抗体Ｍａｂ Ｅ７．６．３（Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５９：１２３６－４３（１９９９））、またはＭａｂ Ｃ２２５（ＡＴＣＣ受入番号ＨＢ－８５０８）、またはその結合特異性を有する抗体若しくは抗体断片であり得る。好適なモノクローナルＥＧＦＲアンタゴニスト抗体には、ＩＭＣ－Ｃ２２５（セツキシマブまたはＥＲＢＩＴＵＸ（商標）としても知られている；Ｉｍｃｌｏｎｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＡＢＸ－ＥＧＦ（Ａｂｇｅｎｉｘ）、ＥＭＤ ７２０００（Ｍｅｒｃｋ ＫｇａＡ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ）、ＲＨ３（Ｙｏｒｋ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｉｎｃ．）、及びＭＤＸ－４４７（Ｍｅｄａｒｅｘ／Ｍｅｒｃｋ ＫｇａＡ）が含まれるが、これらに限定されない。

【００５５】

本明細書で交換可能に使用される「ＴＰ５３」、「細胞腫瘍抗原ｐ５３」、及び「ｐ５３」という用語は、３９３アミノ酸リンタンパク質をコードする強力な腫瘍抑制タンパク質を指す。ＴＰ５３は、多くの癌において負の制御を受けるか、または突然変異される。ＴＰ５３の不在または不活化は、癌に寄与し得る。多種多様なＴＰ５３突然変異が存在する。一部の例において、癌は、ＴＰ５３、特にＴＰ５３の突然変異体バージョンを過剰発現し得る。「野生型」ＴＰ５３は、正常（すなわち、非癌性細胞）において見出されるＴＰ５３、または癌に相関する突然変異を有しないＴＰ５３である。試料のＴＰ５３状況（例えば、試料が野生型ＴＰ５３を含むか、または突然変異体ＴＰ５３を含むか）は、例えば、Ｖｏｇｅｌｓｔｅｉｎらに発行された米国特許第６，０９０，５６６号に記載される通り、または例えば本明細書に記載されるか、若しくは当該技術分野において既知の標準技術を使用して評価され得る。ＴＰ５３分子には、制限なしに、例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ受入番号Ｐ０４６３７に記載されるものと実質的に同一の配列を含むポリペプチド、及びそれらの配列によってコードされる核酸分子が含まれ得る。

【００５６】

「チロシンキナーゼ阻害剤」は、ＥＧＦＲ受容体またはＦＧＦＲ３受容体等のチロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性をある程度阻害するアンタゴニスト分子である。

【００５７】

「カルメット・ゲラン桿菌（ＢＣＧ）ワクチン」は、結核（ＴＢ）の危険性が高い人々またはＴＢが流行している場所においてＴＢを予防するために使用されるワクチンを指す。それは、ＴＢを引き起こす細菌と類似している、ウシ型結核菌（カルメット・ゲラン桿菌）と呼ばれる細菌の脆弱化形態から作製される。このワクチンは、身体の免疫系がＴＢ細菌を破壊するための抗体を作製するのを助けることができる。また免疫系が癌細胞を殺滅するのを助けることもでき、例えば、膀胱癌における治療として使用される。

【００５８】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には制御されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態をさすか、または説明する。この定義には、良性癌及び悪性癌が含まれる。「早期癌」または「早期腫瘍」とは、侵襲性若しくは転移性でないか、または０期、Ｉ期、若しくはＩＩ期癌として分類される癌を意味する。癌の例には、癌種、

リンパ腫、芽細胞腫（髄芽細胞腫及び網膜芽細胞腫を含む）、肉腫（脂肪肉腫及び滑液細胞肉腫を含む）、神経内分泌腫瘍（カルチノイド腫瘍、ガストリン産生腫瘍、及び島細胞癌を含む）、中皮腫、シュワン細胞腫（聴神経腫瘍を含む）、髄膜腫、腺癌、黒色腫、ならびに白血病またはリンパ球腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。かかる癌のより具体的な例には、膀胱癌、扁平上皮細胞癌（例えば、上皮系扁平上皮細胞癌）、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、消化管癌を含む胃癌（ｇａｓｔｒｉｃ　ｃａｎｃｅｒ）または胃癌（ｓｔｏｍａｃｈ　ｃａｎｃｅｒ）、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝臓癌、乳癌（転移性乳癌を含む）、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌（ｋｉｄｎｅｙ　ｃａｎｃｅｒ）または腎臓癌（ｒｅｎａｌ　ｃａｎｃｅｒ）、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、胆管の腫瘍、ならびに頭頸部癌及び多発性骨髄腫が含まれる。

【００５９】

「前癌性」という用語は、典型的に癌に進行するか、または発達する病態または成長を指す。「前癌性」成長は、異常な細胞周期制御、増殖、または分化を特徴とする細胞を有し、細胞周期制御、細胞増殖、または分化のマーカーによって決定され得る。

【００６０】

本明細書で使用される「腫瘍」は、悪性か良性かを問わず、全ての腫瘍性細胞の成長及び増殖、ならびに全ての前癌性及び癌性細胞ならびに組織を指す。「癌」、「癌性」、「細胞増殖性障害」、及び「腫瘍」という用語は、本明細書で言及される場合、相互排他的ではない。

【００６１】

「転移」とは、その原発部位から体内の他の場所への癌の広がりを意味する。癌細胞は、原発性腫瘍から抜け出し、リンパ管及び血管に浸透し、血流を通して循環し、体内の他の場所の正常組織内にある遠隔の病巣内で成長する（転移する）ことができる。転移は、局所または遠隔であり得る。転移は、腫瘍細胞が原発性腫瘍から抜け出し、血流を通って移動し、遠隔部位で止まることを条件とする、逐次的プロセスである。この新しい部位において、細胞は、血液供給を確立し、成長して、生命を脅かす腫瘤を形成し得る。腫瘍細胞内の刺激性と阻害性との両方の分子経路がこの挙動を制御し、遠隔部位における腫瘍細胞と宿主細胞との間の相互作用もまた重要である。

【００６２】

「非転移性」とは、良性であるか、または原発部位に滞留し、リンパ管または血管系若しくは原発部位以外の組織に浸透しなかった癌を意味する。一般に、非転移性癌は、０期、Ｉ期、またはＩＩ期癌、及び場合によってＩＩＩ期癌である任意の癌である。

【００６３】

「抗癌療法剤」という用語は、癌の治療において有用な療法剤を指す。抗癌療法剤の例には、細胞毒性剤、化学療法剤、成長阻害剤、放射線療法で使用される薬剤、抗血管新生剤、アポトーシス剤、抗チューブリン剤、及び癌を治療するための他の薬剤、抗ＣＤ２０抗体、血小板由来成長因子阻害剤（例えば、ＧＬＥＥＶＥＣ（商標）（イマチニブメシル酸塩））、ＣＯＸ－２阻害剤（例えば、セレコキシブ）、インターフェロン、サイトカイン、以下の標的ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、ＰＤＧＦＲ－β、ＢｌｙＳ、ＡＰＲＩＬ、ＢＣＭＡ、またはＶＥＧＦ受容体（複数可）、ＴＲＡＩＬ／Ａｐｏ２、ならびに他の生物活性及び有機化学剤等のうちの１つ以上に結合するアンタゴニスト（例えば、中和抗体）が含まれるが、これらに限定される。特定の実施形態において、アンタゴニストは、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、またはＥＧＦＲアンタゴニストである。これらの組み合わせも、本発明に含まれる。

【００６４】

「放射線療法」とは、正常に機能する細胞の能力を限定するため、または細胞全体を破壊するために、細胞に対して十分な損傷を誘発するための、定方向のγ線またはβ線の使用を意味する。投薬量及び治療の持続時間を決定するための、当該技術分野で既知の多く

の方法が存在することは理解されるであろう。典型的な治療は、１回投与として与えられ、典型的な投薬量は、１日当たり１０～２００単位（グレイ）の範囲である。

【００６５】

本明細書で使用される場合、「治療」、「治療する」、またはその他の文法上の変形は、治療されている個体の自然経過を変えることを目的とした臨床介入を指し、予防のために、または臨床病理過程中のいずれかに行うことができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患進行速度の低減、病状の寛解または緩和、及緩解または予後の改善が含まれる。一部の実施形態において、抗癌療法剤（例えば、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、及び／またはＥＧＦＲアンタゴニストを含む抗癌療法剤）を使用して、疾患または傷害の発達を遅延させる。

【００６６】

「有効量」は、所望の治療結果または予防結果を達成するために必要な投薬量及び期間で有効な量を指す。

【００６７】

本発明の物質／分子、アゴニスト、またはアンタゴニストの「治療有効量」は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重等の要因、ならびに個体における所望の応答を引き出す物質／分子、アゴニスト、またはアンタゴニストの能力により変動し得る。治療有効量は、治療上有益な効果が、物質／分子、アゴニスト、またはアンタゴニストの任意の毒性または有害効果を上回るものでもある。「治療有効量」という用語は、哺乳動物（例えば、患者）における疾患または障害を「治療する」のに有効な本発明の抗体、ポリペプチド、またはアンタゴニストの量を指す。癌の場合、薬物の治療有効量は、癌細胞の数を低減する；腫瘍サイズまたは重量を低減する；末梢器官への癌細胞浸潤を阻害する（すなわち、ある程度の遅延及び好ましくは停止させる）；腫瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度の遅延及び好ましくは停止）；腫瘍成長をある程度阻害する；ならびに／または癌と関連付けられた症状のうちの１つ以上をある程度緩和することができる。薬物が既存の癌細胞の成長の予防及び／またはそれらの殺滅を行うことができる限り、この薬物は細胞増殖抑制性及び／または細胞毒性であり得る。一実施形態において、治療有効量は、成長阻害量である。癌療法剤に関して、インビボでの有効度は、例えば生存期間、疾患進行までの期間（ＴＴＰ）、無疾患生存期間（ＤＦＳ）、無進行生存期間（ＰＦＳ）、応答率（ＲＲ）、応答期間、及び／または生活の質を評価することにより測定され得る。

【００６８】

「生存」という用語は、患者が生存していることを指し、全生存、ならびに無疾患生存を含む。

【００６９】

「全生存」という用語は、患者が、診断または治療の時点から１年、５年等の定義された期間にわたってもなお生存していることを指す。

【００７０】

本発明の文脈において、「無進行生存」という表現は、治療中及び治療後の時間の長さを指し、その間に、治療している医師または調査者の評価に従い、患者の疾患は悪化しない（すなわち、進行しない）。当業者であれば理解するであろう通り、患者の無進行生存は、患者がより長い時間の長さを経験する場合に改善または強化され、その間に、疾患は、類似の状況にある患者の対照群の平均または平均無進行生存期間と比較して進行しない。

【００７１】

「無疾患生存（ＤＦＳ）」という表現は、癌の一次治療が、癌のいかなる兆候または症状もなく患者が生存するという結果になった後の時間の長さを指す。

【００７２】

「生存期間が延長すること」とは、未処置の患者と比べて（すなわち、抗癌療法剤（例えば、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、及び／またはＥＧＦＲアン

タゴニストを含む抗癌療法剤）で治療されていない患者と比べて）、または指定された基準レベルでＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲを発現しない患者と比べて治療される患者において、生存期間、例えば全生存期間または無疾患生存期間が増加することを意味する。

【００７３】

本明細書に使用される「細胞毒性剤」という用語は、細胞の機能を阻害若しくは阻止する、及び／または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射活性アイソトープ（例えば、At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}、P^{32}、及びＬｕの放射活性アイソトープ）、化学療法剤、例えば、メトトレキサート、アドリアミシン、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、ミトマイシンＣ、クロラムブシル、ダウノルビシン、または他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば、核酸分解酵素、抗生物質、及び細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素的に活性な毒素等の毒素（その断片及び／または変異型を含む）、ならびに下に開示される様々な抗腫瘍または抗癌剤を含むことを意図する。他の細胞毒性剤が下に記載される。殺腫瘍剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

【００７４】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びＣＹＴＯＸＡＮ（登録商標）シクロスホスファミド等のアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、及びピポスルファン等のアルキルスルホネート；ベンゾドパ（ｂｅｎｚｏｄｏｐａ）、カルボコン、メツレドパ（ｍｅｔｕｒｅｄｏｐａ）、及びウレドパ（ｕｒｅｄｏｐａ）等のアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、及びトリメチローロメラミン（ｔｒｉｍｅｔｈｙｌｏｌｏｍｅｌａｍｉｎｅ）を含むエチレンイミン及びメチルアメラミン；アセトゲニン（特にブラタシン及びブラタシノン）；デルタ－９－テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、ＭＡＲＩＮＯＬ（登録商標）；β－ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成アナログトポテカン（ＨＹＣＡＭＴＩＮ（登録商標）、ＣＰＴ－１１（イリノテカン、ＣＡＭＰＴＯＳＡＲ（登録商標）、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン（ｓｃｏｐｏｌｅｃｔｉｎ）、及び９－アミノカンプトテシンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ－１０６５（そのアドゼレシン、カルゼレシン、及びビゼレシン合成アナログを含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン１及びクリプトフィシン８）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログ、ＫＷ－２１８９及びＣＢ１－ＴＭ１を含む）；エリュテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチイン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン（ｃｈｌｏｒｎａｐｈａｚｉｎｅ）、コロホスファミド（ｃｈｏｌｏｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン（ｎｏｖｅｍｂｉｃｈｉｎ）、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード等の窒素マスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムヌスチン（ｒａｎｉｍｎｕｓｔｉｎｅ）等のニトロスレア；エンジイン抗生物質（例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシンγ１Ｉ及びカリケアミシンωＩ１（例えば、Ａｇｎｅｗ，Ｃｈｅｍ Ｉｎｔｌ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．，３３：１８３－１８６（１９９４）を参照されたい）；ダイネミシンＡを含む、ダイネミシン；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォア及び関連色素タンパク質エネジイン抗生物質クロモフォア）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシニス、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ＡＤＲＩＡＭＹＣＩＮ（登録商標）ドキソルビシン（モルホリノ－ドキソルビシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシン、及びデオキシドキソルビシンを含む）、エピルビ

シン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、ミトマイシンＣ等のミトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピュロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキサート及び５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）等の抗代謝物；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサート等の葉酸類似体；フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン等のプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロキシウリジン等のピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン等のアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン等の抗副腎；フロリン酸等の葉酸補液；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトレキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォルニチン；酢酸エリプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン；マイタンシン及びアンサミトシン等のマイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモル；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメト；ピラルビシン；ロソキサントロン；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ（登録商標）多糖錯体（ＪＨＳ　Ｎａｔｕｒａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ，Ｅｕｇｅｎｅ，ＯＲ）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；２，２′，２′′－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にＴ－２毒素、ベラキュリンＡ、ロリジンＡ、及びアングイジン）；ウレタン；ビンデシン（ＥＬＤＩＳＩＮＥ（登録商標）、ＦＩＬＤＥＳＩＮ（登録商標））；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ａｒａ－Ｃ」）；チオテパ；タキソイド、例えばＴＡＸＯＬ（登録商標）パクリタキセル（Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ，Ｎ．Ｊ．）、ＡＢＲＡＸＡＮＥ（商標）クレモホールを含有しない、アルブミン操作されたパクリタキセルのナノ粒子製剤（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｐａｒｔｎｅｒｓ，Ｓｃｈａｕｍｂｅｒｇ，Ｉｌｌｉｎｏｉｓ）、及びＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）ドセタキセル（Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ　Ｒｏｒｅｒ，Ａｎｔｏｎｙ，Ｆｒａｎｃｅ）；クロラムブシル（ｃｈｌｏｒａｎｂｕｃｉｌ）；ゲムシタビン（ＧＥＭＺＡＲ（登録商標））；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン及びカルボプラチン等の白金類似体；ビンブラスチン（ＶＥＬＢＡＮ（登録商標））；白金；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン（ＯＮＣＯＶＩＮ（登録商標））；オキサリプラチン；ロイコボビン（ｌｅｕｃｏｖｏｖｉｎ）；ビノレルビン（ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ（登録商標））；ノバントロン（ｎｏｖａｎｔｒｏｎｅ）；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ　２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）；レチノイン酸等のレチノイド；カペシタビン（ＸＥＬＯＤＡ（登録商標））；上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびにＣＨＯＰ（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、及びプレドニゾロンの併用療法の略語）；及びＦＯＬＦＯＸ（５－ＦＵ及びロイコボビンと組み合わせたオキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮ（商標））を用いた治療計画の略語）等の上記の２つ以上の組み合わせが含まれる。追加の化学療法剤には、例えばマイタンシノイド（例えば、ＤＭ１）、ならびにオーリスタチンＭＭＡＥ及びＭＭＡＦ等の抗体薬物複合体として有用な細胞毒性剤が含まれる。

【００７５】

「化学療法剤」には、癌の成長を促進し得るホルモンの有効性を制御、低減、遮断、または阻害するために作用し、しばしば全身性または体全体の治療の形態にある「抗ホルモン剤」も含まれる。それら自体がホルモンであってもよい。例には、例えばタモキシフェン（ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）タモキシフェンを含む）、ＥＶＩＳＴＡ（登録商標）

ラロキシフェン、ドロロキシフェン、４－ドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン、及びＦＡＲＥＳＴＯＮ（登録商標）トレミフェンを含む抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体修飾薬（ＳＥＲＭ）；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方制御薬（ＥＲＤ）；卵巣を抑制するかまたは閉鎖させるように機能する薬剤、例えばＬＵＰＲＯＮ（登録商標）及びＥＬＩＧＡＲＤ（登録商標）ロイプロリド酢酸塩、ゴセレリン酢酸塩、ブセレリン酢酸塩、ならびにトリプテレリン等の黄体形成ホルモン放出ホルモン（ＬＨＲＨ）アゴニスト；フルタミド、ニルタミド、及びビカルタミド等の他の抗アンドロゲン；更に例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、ＭＥＧＡＳＥ（登録商標）メゲストロール酢酸塩、ＡＲＯＭＡＳＩＮ（登録商標）エキセメスタン、ホルメスタイン、ファドロゾール、ＲＩＶＩＳＯＲ（登録商標）ボロゾール、ＦＥＭＡＲＡ（登録商標）レトロゾール、及びＡＲＩＭＩＤＥＸ（登録商標）アナストロゾール等の、副腎内のエストロゲン産生を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤が含まれる。加えて、化学療法剤のかかる定義には、クロドロネート（例えば、ＢＯＮＥＦＯＳ（登録商標）またはＯＳＴＡＣ（登録商標）、ＤＩＤＲＯＣＡＬ（登録商標）エチドロネート、ＮＥ－５８０９５、ＺＯＭＥＴＡ（登録商標）ゾレドロン酸／ゾレドロネート、ＦＯＳＡＭＡＸ（登録商標）アレンドロネート、ＡＲＥＤＩＡ（登録商標）パミドロネート、ＳＫＥＬＩＤ（登録商標）チルドロネート、またはＡＣＴＯＮＥＬ（登録商標）リセドロネート等のビスホスホネート；ならびにトロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、例えばＰＫＣ－α、Ｒａｆ、Ｈ－Ｒａｓ、及び表皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）等の異所（ａｂｅｒｒａｎｔ）細胞増殖に関係があるとされるシグナル伝達系路における遺伝子の発現を阻害するもの；ＴＨＥＲＡＴＯＰＥ（登録商標）ワクチン及び遺伝子治療ワクチン、例えばＡＬＬＯＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチン、ＬＥＵＶＥＣＴＩＮ（登録商標）ワクチン、及びＶＡＸＩＤ（登録商標）ワクチン等のワクチン；ＬＵＲＴＯＴＥＣＡＮ（登録商標）トポイソメラーゼ１阻害剤；ＡＢＡＲＥＬＩＸ（登録商標）ｒｍＲＨ；ジトシル酸ラパチニブ（別名ＧＷ５７２０１６、ＥｒｂＢ－２及びＥＧＦＲ二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤）；ならびに上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が含まれる。

【００７６】

「成長阻害剤」は、本明細書で使用される場合、インビトロまたはインビボのいずれかで細胞（例えば、膀胱癌細胞）の成長及び／または増殖を阻害する化合物または組成物を指す。したがって、成長阻害剤は、Ｓ相における細胞のパーセンテージを著しく低減するものであってよい。成長阻害剤の例には、Ｇ１停止及びM相停止を誘導する薬剤等の細胞周期進行を（Ｓ相以外の場所で）遮断する薬剤が含まれる。従来のM相遮断剤には、アントラサイクリン抗生物質ドキソルビシン（（８Ｓ－シス）－１０－［（３－アミノ－２，３，６－トリデオキシ－α－Ｌ－リキソ－ヘキサピラノシル）オキシ］－７，８，９，１０－テトラヒドロ－６，８，１１－トリヒドロキシ－８－（ヒドロキシアセチル）－１－メトキシ－５，１２－ナフタセンジオン）、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシン等のビンカ（ビンクリスチン及びビンブラスチン）、タキサン、及びトポイソメラーゼＩＩ阻害剤が含まれる。Ｇ１を停止させるそのような薬剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、５－フルオロウラシル、及びａｒａ－Ｃ等のＤＮＡアルキル化剤はまた、Ｓ相停止へと波及する。更なる情報は、"Ｔｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ, "Ｍｅｎｄｅｌｓｏｈｎ ａｎｄ Ｉｓｒａｅｌ, ｅｄｓ., Ｃｈａｐｔｅｒ １, ｅｎｔｉｔｌｅｄ"Ｃｅｌｌ ｃｙｃｌｅ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ, ｏｎｃｏｇｅｎｅｓ, ａｎｄ ａｎｔｉｎｅｏｐｌａｓｔｉｃ ｄｒｕｇｓ"ｂｙ Ｍｕｒａｋａｍｉ ｅｔ ａｌ.（ＷＢ Ｓａｕｎｄｅｒｓ：Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ, １９９５）、特に１３頁に見出すことができる。タキサン（パクリタキセル及びドセタキセル）は、いずれもイチイの木由来の抗癌薬である。ヨーロッパイチイ由来のドセタキセル（ＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）、Ｒｈｏｎｅ－Ｐｏｕｌｅｎｃ Ｒｏｒｅｒ）は、パクリタキ

セルの半合成類似体（ＴＡＸＯＬ（登録商標）、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ）である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管のアセンブリを促進し、脱重合を防止することによって微小管を安定させ、細胞内の有糸分裂の阻害をもたらす。

【００７７】

本明細書で使用される場合、「患者」または「対象」という用語は、交換可能に使用され、治療が所望される任意の単一の動物、より好ましくは哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウサギ、動物園の動物、雌ウシ、ブタ、ヒツジ、及び非ヒト霊長類等のかかる非ヒト動物を含む）を指す。最も好ましくは、本明細書における患者はヒトである。

【００７８】

本明細書で使用される場合、「投与すること」は、対象（例えば、患者）への化合物（例えば、アンタゴニスト）または薬学的組成物（例えば、アンタゴニストを含む薬学的組成物）の投薬量の供与方法を意味する。投与することは、非経口的、肺内、及び鼻腔内、ならびに局所的治療が所望される場合は、病変内投与を含む任意の好適な手段によることができる。非経口的注入には、例えば、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。投薬は、任意の好適な経路により、例えば、投与が短時間であるか、または慢性的であるかに部分的に応じた、静脈内注射または皮下注射等の注射により、行うことができる。単回または様々な時点にわたる複数回投与、ボーラス投与、及びパルス注入を含むがこれらに限定されない様々な投薬スケジュールが本明細書で企図される。

【００７９】

「有効量」という用語は、障害を治療するため、例えば、癌を治療するために有効な医薬品の量を指す。

【００８０】

「医薬製剤」という用語は、医薬品の生物活性が有効になるような形態であり、製剤が投与されることになる対象にとって許容できないほど有毒である追加の構成成分を何ら含有しない滅菌調製物を指す。

【００８１】

「滅菌」製剤は、無菌であるか、または全ての生きた微生物及びそれらの胞子を含まない。

【００８２】

「添付文書」は、かかる治療薬若しくは薬品の適応症、使用法、投薬量、投与、禁忌症についての情報、パッケージ製品と組み合わされる他の治療薬、及び／またはその使用に関する警告を含有する、治療薬または薬品の商用のパッケージに通例含まれる指示書を指すように使用される。

【００８３】

「キット」は、少なくとも１つの試薬、例えば、癌（例えば、膀胱癌）の治療のための薬品、または本発明のバイオマーカー遺伝子若しくはタンパク質を特異的に検出するためのプローブを含む、任意の製品（例えば、パッケージ若しくは容器）である。この製品は、好ましくは、本発明の方法を行うためのユニットとして奨励、分配、または販売される。

【００８４】

「標識」という単語は、本明細書で使用されるとき、核酸プローブ等の試薬または抗体に直接的または間接的に複合または融合され、試薬に複合または融合して試薬の検出を容易にする化合物または組成物を指す。標識は、それ自体が検出可能であり得るか（例えば、放射性同位標識または蛍光標識）、または酵素標識の場合、検出可能である基質化合物若しくは組成物の化学改変を触媒化し得る。この用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体に結合すること（すなわち、物理的に連結すること）によるプローブまたは抗体の直接的標識化、ならびに直接的に標識化される別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識化を包含することを意図する。間接的標識化の例には、蛍光的に標識された二次抗体を使用した一次抗体の検出、及びそれが蛍光的に標識されたストレプトアビ

ジンを用いて検出され得るようなビオチンを有するＤＮＡプローブの末端標識化が含まれる。

【００８５】

ＩＩＩ．治療法

本発明は、癌に罹患している患者の治療方法を提供する。癌という用語は、前癌性成長、良性腫瘍、及び悪性腫瘍を含むがこれらに限定されない、増殖性障害の集合を包含する。良性腫瘍は、依然として起源部位に位置し、遠隔部位へと浸潤、侵襲、または転移する能力を有しない。悪性腫瘍は、それらの周りの他の組織を侵襲及び損傷することになる。それらはまた、起源部位から離脱する能力を得て、通常は血流を通して、またはリンパ節が位置するリンパ系を通して体内の他の部分に広がる（転移する）ことができる。原発腫瘍は、それらが生じる組織のタイプによって分類され、転移性腫瘍は、癌細胞が由来する組織タイプによって分類される。経時的に、悪性腫瘍の細胞は、より異常になり、正常細胞のようには見えない。癌細胞の外観のこの変化は、腫瘍悪性度と呼ばれ、癌細胞は、良好に分化している（低悪性度）、中度に分化している、不良に分化している、または未分化（高悪性度）であると記載される。良好に分化した細胞は、比較的正常な外観であり、それらが起源とする正常細胞に類似する。未分化細胞は、異常になったため、もはや細胞の起源を特定することができない細胞である。特定の実施形態において、本発明は、膀胱癌の治療方法を提供する。

【００８６】

癌病期分類システムは、癌が解剖学的にどれだけ広がったかを説明し、類似の予後及び治療を有する患者を同じ病期群に入れることを目的とする。生検、ならびに胸部ｘ線、マンモグラフ、骨走査、ＣＴ走査、及びＭＲＩ走査等のある特定の撮像検査を含むいくつかの検査を行って、癌の病期分類を助けることができる。血液検査及び臨床評価も使用して、患者の全体健康状態を評価し、癌がある特定の臓器に広がっているかどうかを検出する。

【００８７】

癌を病期分類するために、対癌米国合同委員会は、最初に、癌、特に固形腫瘍を、ＴＮＭ分類システムを使用して文字カテゴリーに分ける。癌は、文字Ｔ（腫瘍サイズ）、Ｎ（触知可能な結節）、及び／またはＭ（転移）で指定される。Ｔ１、Ｔ２、Ｔ３、及びＴ４は、増加サイズの原発病変を説明し、Ｎ０、Ｎ１、Ｎ２、Ｎ３は、次第に進行する結節の関与を示し、Ｍ０及びＭ１は、遠隔転移の不在または存在を反映する。

【００８８】

全病期グループ分けまたはローマ数字病期分類としても知られる第２の病期分類法において、癌は、病期０～ＩＶに分割され、原発病変のサイズならびに結節の広がり及び遠隔転移の存在を組み込む。このシステムにおいて、症例は、ローマ数字Ｉ～ＩＶによって示される４つの病期にグループ分けされるか、または「再発」として分類される。一部の癌の場合、０期は、「上皮内」または「Ｔｉｓ」、例えば、乳癌の場合は上皮内腺管癌または上皮内小葉癌と称される。高悪性度腺腫は、０期として分類することもできる。一般にＩ期癌は、通常は治癒可能な小さな限局性癌であるが、ＩＶ期は、通常は手術不可能な癌または転移性癌を表す。ＩＩ期及びＩＩＩ期癌は、通常は限局的に進行し、かつ／または局所リンパ節の関与を示す。一般に、より高い病期数は、より広範な疾患を示し、より大きい腫瘍サイズ及び／または付近のリンパ節及び／若しくは原発腫瘍に隣接する臓器への癌の広がりを含む。これらの病期は、正確に定義されるが、この定義は、各種の癌に関して異なり、熟練者に既知である。

【００８９】

ＮＣＩの監視、疫学、最終結果プログラム（ＳＥＥＲ）等の多くの癌レジストリは、要約病期分類を使用する。このシステムは、全ての癌タイプに使用される。癌症例を５つの主要カテゴリーにグループ分けする。

【００９０】

上皮内癌は、それが開始する細胞の層にのみ存在する早期癌である。

【００９１】
限局性癌は、広がりの証拠なしに、それが開始する臓器に限定される癌である。
【００９２】
局所癌は、元の（原発）部位を越えて付近のリンパ節または臓器及び組織に広がった癌である。
【００９３】
遠隔癌は、原発部位から遠隔臓器または遠隔リンパ節に広がった癌である。
【００９４】
不明は、病期を示すのに十分な情報がない症例を説明するために使用される。
【００９５】
加えて、原発腫瘍が除去されてから数ヶ月または数年後に癌が再発することが一般的である。全ての目に見える腫瘍が根絶された後に再発する癌は、再発性疾患と呼ばれる。原発腫瘍の領域で再発する疾患は、限局的に再発し、転移として再発する疾患は、遠隔再発と称される。
【００９６】
腫瘍は、固形腫瘍または非固形若しくは軟組織腫瘍であり得る。軟組織腫瘍の例には、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、成人急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、成熟Ｂ細胞急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、前リンパ球性白血病、若しくは毛様細胞白血病）またはリンパ腫（例えば、非ホジキンリンパ腫、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、若しくはホジキン病）が含まれる。固形腫瘍には、血液、骨髄、またはリンパ系以外の体組織の任意の癌が含まれる。固形腫瘍は、上皮細胞起源のものと、非上皮細胞起源のものとに更に分割され得る。上皮細胞固形腫瘍の例には、膀胱、消化管、結腸、乳房、前立腺、肺、腎臓、肝臓、膵臓、卵巣、頭頸部、口腔、胃、十二指腸、小腸、大腸、肛門、堪能、口唇、鼻咽頭、皮膚、子宮、男性器、泌尿器、及び皮膚が含まれる。非上皮起源の固形腫瘍には、肉腫、脳腫瘍、及び骨腫瘍が含まれる。腫瘍の他の例は、定義部分に記載されている。
【００９７】
一部の実施形態において、本発明の方法は、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含み、患者から得られる試料の本発明のバイオマーカー（例えば、表１に列挙されるバイオマーカー）のうちの少なくとも１つの発現レベルが、本発明のバイオマーカーの基準レベルに対して変化したと決定されている。例えば、一部の実施形態において、本発明は、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含む、癌（例えば、膀胱癌）の治療方法を提供し、表１に列挙される少なくとも１つの遺伝子（例えば、表１に列挙される１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、または９６遺伝子）の発現レベルが、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルに対して変化したと決定されている。
【００９８】
別の実施例では、一部の実施形態において、本発明は、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含む、癌（例えば、膀胱癌）の治療方法を提供し、表４に列挙される少なくとも１つの遺伝子（例えば、表４に列挙される１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、または４８遺伝子）の発現レベルが、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルに対して変化したと決定

されている。一部の実施形態において、変化は増加である。他の実施形態において、変化は減少である。

【００９９】

特定の実施形態において、本発明の方法は、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含み、患者から得られる試料中の以下の遺伝子、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲのうちの少なくとも１つの発現レベルが、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルに対して増加したことが決定されている。本発明のバイオマーカーの（例えば、表１に列挙される遺伝子、例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲ）の発現レベルは、本明細書に記載される方法またはアッセイ（例えば、本発明の詳細な説明の第ＩＶ節または実施例に記載される方法またはアッセイ）のうちのいずれかを使用して決定され得る。一部の実施形態において、膀胱癌は、ＮＭＩＢＣである。他の実施形態において、膀胱癌は、ＭＩＢＣである。更に他の実施形態において、膀胱癌は、転移性膀胱癌である。患者は、任意選択で、進行性、難治性、再発性、及び／または化学療法耐性形態の癌を有し得る。例えば、一部の実施形態において、患者は、再発性膀胱癌、例えば、再発性ＮＭＩＢＣを有し得る。

【０１００】

本発明の上記方法のうちのいずれかにおいて、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカー（例えば、表１に列挙される遺伝子、例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲ）の発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上変化し得る。例えば、一部の実施形態において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上増加し得る。他の実施形態において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上減少し得る。

【０１０１】

特定の実施形態において、患者から得られる試料中の以下、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲのうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、２つ、または３つ）の発現レベルは、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上増加し得る。例えば、ＦＧＦＲ３の発現レベルは、ＦＧＦＲ３の基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上増加し得る。別の例において、ＴＰ５３の発現レベルは、ＴＰ５３の基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上増加し得る。更に別の例において、ＥＧＦＲの発現レベルは、ＥＧＦＲの基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上増加し得る。

【０１０２】

一部の実施形態において、基準レベルは、例えば、所与の癌タイプ（例えば、膀胱癌）におけるバイオマーカー（例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、またはＥＧＦＲ）の発現レベ

ルの全体分布の２０～９９パーセンタイルの間の任意のパーセンタイル（例えば、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または９９パーセンタイル）に設定され得る。特定の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布の２５パーセンタイルに設定され得る。他の特定の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布の５０パーセンタイルに設定され得る。他の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布のメジアンであり得る。

【０１０３】

一部の実施形態において、本発明の方法は、以下、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲアンタゴニストのうちの１つ以上（例えば、１つ、２つ、または３つ）を含む抗癌療法剤を患者に投与することを含む。例えば、一部の実施形態において、本発明の方法は、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、またはＥＧＦＲアンタゴニストを含む抗癌療法剤を投与することを含む。他の事例において、本方法は、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト及びＥＧＦＲアンタゴニストを含む抗癌療法剤を投与することを含み得る。他の事例において、本方法は、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、及びＥＧＦＲアンタゴニストを含む抗癌療法剤を投与することを含み得る。

【０１０４】

上記方法のうちのいずれかにおいて、ＦＧＦＲ３アンタゴニストは、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト抗体または小分子ＦＧＦＲ３アンタゴニストであり得る。例示的なＦＧＦＲ３アンタゴニスト抗体、例えば、１８４．６、１８４．６．１、及び１８４．６．１Ｎ５４Ｓは、例えば、米国特許第８，４１０，２５０号に記載され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態において、小分子ＦＧＦＲ３アンタゴニストは、チロシンキナーゼ阻害剤である。

【０１０５】

上記方法のうちのいずれかにおいて、ＴＰ５３アンタゴニストは、ＴＰ５３アンタゴニスト抗体、または小分子ＴＰ５３アンタゴニストであり得る。

【０１０６】

上記方法のうちのいずれかにおいて、ＥＧＦＲアンタゴニストは、ＥＧＦＲアンタゴニスト抗体または小分子ＥＧＦＲアンタゴニストであり得る。一部の実施形態において、小分子ＦＧＦＲ３アンタゴニストは、チロシンキナーゼ阻害剤である。特定の実施形態において、小分子ＦＧＦＲ３アンタゴニストは、エルロチニブ（ＴＡＲＣＥＶＡ（商標））である。

【０１０７】

本発明の方法で使用され得る例示的なＥＧＦＲアンタゴニストには、例えば、小分子ＥＧＦＲアンタゴニストが含まれ、キナゾリンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、ピリドーピリミジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、ピリミドーピリミジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、ピロローピリミジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、ピラゾローピリミジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、フェニルアミノーピリミジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、オキシンドールＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、インドロカルバゾールＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、フタラジンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、イソフラボンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、キナロンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、及びチルホスチンＥＧＦＲキナーゼ阻害剤、例えば、以下の特許公開に記載されるもの、ならびにＥＧＦＲキナーゼ阻害剤の全ての薬学的に許容される塩及び溶媒和物が含まれる。国際特許公開第ＷＯ９６／３３９８０号、同第ＷＯ９６／３０３４７号、同第ＷＯ９７／３００３４号、同第ＷＯ９７／３００４４号、同第ＷＯ９７／３８９９４号、同第ＷＯ９７／４９６８８号、同第ＷＯ９８／０２４３４号、同第ＷＯ９７／３８９８３号、同第ＷＯ９５／１９７７４号、同第ＷＯ９５／１９９７０号、同第ＷＯ９７／１３７７１号、同第ＷＯ９８／０２４３７号、同第ＷＯ９８／０２４３８号、同第ＷＯ９７／３２８８１号、同第ＷＯ９８／３３７９８号、同第ＷＯ９７／３２８８０号、同第ＷＯ９７／３２８８号、同第ＷＯ９７／０２２６６号、同第ＷＯ９７／２７１９９号、同第ＷＯ９８／０７７２６号、

同第ＷＯ９７／３４８９５号、同第ＷＯ９６／３１５１０号、同第ＷＯ９８／１４４４９号、同第ＷＯ９８／１４４５０号、同第ＷＯ９８／１４４５１号、同第ＷＯ９５／０９８４７号、同第ＷＯ９７／１９０６５号、同第ＷＯ９８／１７６６２号、同第ＷＯ９９／３５１４６号、同第ＷＯ９９／３５１３２号、同第ＷＯ９９／０７７０１号、及び同第ＷＯ９２／２０６４２号、欧州特許出願第ＥＰ５２０７２２号、同第ＥＰ５６６２２６号、同第ＥＰ７８７７７２号、同第ＥＰ８３７０６３号、及び同第ＥＰ６８２０２７号、米国特許第５，７４７，４９８号、同第５，７８９，４２７号、同第５，６５０，４１５号、及び同第５，６５６，６４３号、ならびにドイツ特許出願第ＤＥ１９６２９６５２号。小分子ＥＧＦＲアンタゴニストの追加の非限定例には、Ｔｒａｘｌｅｒ，Ｅｘｐ．Ｏｐｉｎ．Ｔｈｅｒ．Ｐａｔｅｎｔｓ ８（１２）：１５９９－１６２５（１９９８）に記載されるＥＧＦＲキナーゼ阻害剤のうちのいずれかが含まれる。

【０１０８】

本発明の方法で使用され得る小分子ＥＧＦＲアンタゴニストの特定の好ましい実施例には、［６，７－ビス（２－メトキシエトキシ）－４－キナゾリン－４－イル］－（３－エチニルフェニル）アミン（ＯＳＩ－７７４、エルロチニブ、またはＴＡＲＣＥＶＡ（商標）（エルロチニブ ＨＣｌ）、ＯＳＩ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ／Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ／Ｒｏｃｈｅ）（米国特許第５，７４７，４９８号；国際特許公開第ＷＯ０１／３４５７４号、及びＭｏｙｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５７：４８３８－４８４８（１９９７））、ＣＩ－１０３３（以前はＰＤ１８３８０５として知られていた；Ｐｆｉｚｅｒ）（Ｓｈｅｒｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ．，１９９９，Ｐｒｏｃ．Ａｍ．Ａｓｓｏｃ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．４０：７２３）、ＰＤ－１５８７８０（Ｐｆｉｚｅｒ）、ＡＧ－１４７８（Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）、ＣＧＰ－５９３２６（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＰＫＩ－１６６（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＥＫＢ－５６９（Ｗｙｅｔｈ）、ＧＷ－２０１６（ＧＷ－５７２０１６またはラパチニブジトシラートとしても知られている；ＧＳＫ）、及びゲフィチニブ（ＺＤ１８３９またはＩＲＥＳＳＡ（商標）としても知られている；Ａｓｔｒａｚｅｎｅｃａ）（Ｗｏｏｄｂｕｒｎ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｐｒｏｃ．Ａｍ．Ａｓｓｏｃ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．３８：６３３）が含まれる。

【０１０９】

本発明の方法で使用され得る例示的なＥＧＦＲアンタゴニスト抗体には、Ｍｏｄｊｔａｈｅｄｉ ｅｔ ａｌ．，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ６７：２４７－２５３（１９９３）、Ｔｅｒａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ ７７：６３９－６４５（１９９６）、Ｇｏｌｄｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１：１３１１－１３１８（１９９５）、Ｈｕａｎｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１５：５９（８）：１９３５－４０（１９９９）、及びＹａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５９：１２３６－１２４３（１９９９）に記載されるものが含まれる。したがって、一部の実施形態において、ＥＧＦＲアンタゴニスト抗体は、モノクローナル抗体Ｍａｂ Ｅ７．６．３（Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５９：１２３６－４３（１９９９））、またはＭａｂ Ｃ２２５（ＡＴＣＣ受入番号ＨＢ－８５０８）、またはその結合特異性を有する抗体若しくは抗体断片であり得る。好適なモノクローナルＥＧＦＲアンタゴニスト抗体には、ＩＭＣ－Ｃ２２５（セツキシマブまたはＥＲＢＩＴＵＸ（商標）としても知られている；Ｉｍｃｌｏｎｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＡＢＸ－ＥＧＦ（Ａｂｇｅｎｉｘ）、ＥＭＤ ７２０００（Ｍｅｒｃｋ ＫｇａＡ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ）、ＲＨ３（Ｙｏｒｋ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ Ｉｎｃ．）、及びＭＤＸ－４４７（Ｍｅｄａｒｅｘ／Ｍｅｒｃｋ ＫｇａＡ）が含まれるが、これらに限定されない。

【０１１０】

ある特定の実施形態において、癌は、ＦＧＦＲ３、増幅ＦＧＦＲ３、転座ＦＧＦＲ３、及び／または突然変異ＦＧＦＲ３を発現する。ある特定の実施形態において、癌は、活性化ＦＧＦＲ３を発現する。ある特定の実施形態において、癌は、転座ＦＧＦＲ３（例えば

、ｔ（４；１４）転座）を発現する。ある特定の実施形態において、癌は、構成的ＦＧＦＲ３を発現する。一部の実施形態において、構成的ＦＧＦＲ３は、チロシンキナーゼドメイン及び／または膜近傍ドメイン及び／またはリガンド結合ドメイン内に突然変異を含む。ある特定の実施形態において、癌は、リガンド独立型ＦＧＦＲ３を発現する。一部の実施形態において、癌は、リガンド依存型ＦＧＦＲ３を発現する。

【０１１１】

一部の実施形態において、癌は、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{S248C}に対応する突然変異を含むＦＧＦＲ３を発現する。一部の実施形態において、癌は、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{S248C}及び／またはＦＧＦＲ３－ＩＩＩｃ^{S248C}を発現する。

【０１１２】

一部の実施形態において、癌は、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{K652E}に対応する突然変異を含むＦＧＦＲ３を発現する。一部の実施形態において、癌は、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{K652E}及び／またはＦＧＦＲ３－ＩＩＩｃ^{K650E}を発現する。

【０１１３】

ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{S249C}に対応する突然変異を含むＦＧＦＲ３。一部の実施形態において、癌は、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{S249C}及び／またはＦＧＦＲ３－ＩＩＩｃ^{S249C}を発現する。

【０１１４】

一態様において、癌は、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{G372C}に対応する突然変異を含むＦＧＦＲ３を発現する。一部の実施形態において、癌は、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{G372C}及び／またはＦＧＦＲ３－ＩＩＩｃ^{G370C}を発現する。

【０１１５】

一態様において、癌は、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{Y375C}に対応する突然変異を含むＦＧＦＲ３を発現する。一部の実施形態において、癌は、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{Y375C}及び／またはＦＧＦＲ３－ＩＩＩｃ^{Y373C}を発現する。

【０１１６】

一部の実施形態において、癌は、（ａ）ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{K652E}、ならびに（ｂ）ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{R248C}、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{Y375C}、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{S249C}、及びＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{G372C}のうちの１つ以上を発現する。

【０１１７】

一部の実施形態において、癌は、（ａ）ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{R248C}、ならびに（ｂ）ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{K652E}、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{Y375C}、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{S249C}、及びＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{G372C}のうちの１つ以上を発現する。

【０１１８】

一部の実施形態において、癌は、（ａ）ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{G372C}、ならびに（ｂ）ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{K652E}、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{Y375C}、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{S249C}、及びＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{R248C}のうちの１つ以上を発現する。

【０１１９】

一部の実施形態において、癌は、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{R248C}、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{K652E}、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{Y375C}、ＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{S249C}、及びＦＧＦＲ３－ＩＩＩｂ^{G372C}を発現する。

【０１２０】

ある特定の実施形態において、癌は、対照試料（例えば、正常組織の試料）またはレベルに対して増加したレベルのホスホ－ＦＧＦＲ３、ホスホ－ＦＲＳ２、及び／またはホスホ－ＭＡＰＫを発現する。

【０１２１】

抗癌療法剤、例えば、アンタゴニスト（例えば、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３

アンタゴニスト、及び／またはＥＧＦＲアンタゴニスト）を含む抗癌療法剤を含む組成物は、良質な医療実践と一致する形で製剤、投薬、及び投与される。この文脈における考慮の要因には、治療されている特定タイプの癌、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的病態、癌の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール管理、及び医療従事者に知られている他の要因が含まれる。投与されるアンタゴニストの有効量は、このような考慮によって管理される。

【０１２２】

本発明の療法剤は、ボーラスとしての静脈内投与または一定期間にわたる連続注入による、筋内、腹腔内、脳髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、局所、または吸入経路による等の既知の方法に従い、ヒト患者に投与される。体外戦略を治療用途に使用することもできる。体外戦略は、対象から得られる細胞を、アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドで形質移入または形質導入することを含む。次いで、形質移入または形質導入された細胞を対象に戻す。これらの細胞は、限定なしに、造血細胞（例えば、骨髄細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、Ｔ細胞、またはＢ細胞）、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、角化細胞、または筋細胞を含む広範囲のタイプのうちのいずれかであり得る。

【０１２３】

例えば、抗癌療法がアンタゴニスト抗体（例えば、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト抗体、ＴＰ５３アンタゴニスト抗体、またはＥＧＦＲアンタゴニスト抗体）を含む場合、抗体は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、及び鼻腔内投与、ならびに局所免疫抑制治療で所望される場合の病変内投与を含む、任意の好適な手段によって投与される。非経口注入には、筋肉内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。加えて、抗体は、パルス注入によって、特に抗体の用量を低下させながら好適に投与される。好ましくは、投薬は、投与が短時間であるか慢性的であるかに部分的に応じて、最も好ましくは静脈内または皮下注射等の注射によって付与される。

【０１２４】

別の例において、アンタゴニスト化合物は、腫瘍の障害または場所が許す場合、例えば、直接注射によって局所的に投与され、注射は定期的に繰り返すことができる。アンタゴニストは、局所再発または転移を予防または低減するために、対象に全身的に、または腫瘍の外科的切開に続いて腫瘍細胞、例えば、腫瘍若しくは腫瘍床に直接送達することもできる。

【０１２５】

抗癌療法剤は、併用療法として、併用医薬製剤または投与計画において、抗癌特性を有する少なくとも１つの追加の化合物と組み合わされ得る。併用医薬製剤または投与計画の少なくとも１つの追加の化合物は、好ましくは、それらが互いに悪影響を及ぼさないように、アンタゴニスト組成物に対して相補的な活性を有する。

【０１２６】

抗癌療法剤は、化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、及びそれらの組み合わせを含み得る。かかる分子は、意図する目的に有効な量で組み合わせて適切に存在する。例えば、アンタゴニスト（例えば、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、及び／またはＥＧＦＲアンタゴニスト）を含有する医薬組成物はまた、治療有効量の抗新生物剤、化学療法剤、成長阻害剤、細胞毒性剤、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。

【０１２７】

療法剤の組み合わせ投与は、典型的に、定義された期間（選択される組み合わせに応じて通常は数分、数時間、数日、または数週間）にわたって行われる。併用療法は、これらの療法剤の逐次的投与（つまり、各療法剤が異なる時間に投与される）、ならびにこれらの療法剤または療法剤のうちの少なくとも２つの実質的に同時投与を包含することを意図する。

【０１２８】

療法剤は、同じ経路または異なる経路によって投与され得る。例えば、アンタゴニスト抗体の組み合わせは、静脈内注射によって投与されるのに対し、化学療法剤の組み合わせは、経口投与され得る。代替として、例えば、特定の療法剤に応じて、療法剤の両方が経口投与され得るか、または両方の療法剤が静脈内注射によって投与され得る。療法剤が投与される順序もまた、特定の薬剤に応じて異なる。

【０１２９】

疾患の種類及び重症度に応じて、例えば、１回以上の別個の投与によるか、または連続注入によるかを問わず、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇの各療法剤が、患者に投与するための初回候補投薬量である。典型的な日用量は、上述の要因に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ、またはそれ以上の範囲に及び得る。数日間またはそれ以上にわたる反復投与については、病態に応じて、上記の方法によって測定して、癌が治療されるまで治療が継続される。しかしながら、他の投薬計画も有用であり得る。抗癌療法剤、例えば、１つ以上のアンタゴニスト（例えば、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、及び／またはＥＧＦＲアンタゴニスト）、化学療法剤等を含む抗癌療法剤の組成の調製及び投薬スケジュールは、製造元の指示に従うか、または熟練した医師によって経験的に決定される通り使用されてもよい。かかる化学療法剤の調製及び投薬スケジュールは、"Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，"Ｅｄ．，Ｍ．Ｃ．Ｐｅｒｒｙ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ&Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ（１９９２）にも記載されている。

【０１３０】

併用療法は、「相乗効果」をもたらし、「相乗性」を証明することができる。つまり、活性成分が一緒に使用される場合に達成される効果は、化合物を別個に使用することから生じる効果の総和を超える。相乗効果は、活性成分が、（１）共製剤及び投与されるか、若しくは組み合わされた単位投与製剤で同時に送達される場合、（２）別個の製剤として交互に、若しくは平行して送達される場合、または（３）いくつかの他の計画による場合に達成され得る。代替療法で送達される場合、相乗効果は、化合物が逐次的に投与または送達される場合、例えば、別個の注射器での異なる注射によって達成され得る。概して、交互療法の間、各活性成分の有効な投薬量は、逐次的に、すなわち、連続的に投与され、一方、併用療法においては、２つ以上の活性成分の有効な投薬量は、一緒に投与される。

【０１３１】

上記の伝統的経路による患者への抗癌療法剤の投与とは別に、本発明は、遺伝子療法による投与を含む。アンタゴニストをコードする核酸のこのような投与は、「有効量の抗癌療法剤を投与する」という表現によって包含される。例えば、細胞内抗体を生成するための遺伝子療法の使用に関しては、ＷＯ１９９６／０７３２１を参照されたい。かかる方法は、例えば、ＴＰ５３等の細胞内タンパク質を標的とするのに有用であり得る。

【０１３２】

核酸（任意選択でベクターに含有される）を患者の細胞にインビボ及び体外で入れ込むための２つの主なアプローチが存在する。インビボ送達の場合、核酸は、通常はアンタゴニストが必要とされる部位において患者に直接注射される。体外治療の場合、患者の細胞が除去され、これらの単離された細胞に核酸が導入され、修飾された細胞が患者に直接投与されるか、または例えば、患者に埋め込まれる多孔質膜内に被包される（例えば、米国特許第４，８９２，５３８号及び同第５，２８３，１８７号を参照されたい）。核酸を生きた細胞に導入するために使用可能な様々な技法が存在する。これらの技法は、意図される宿主の細胞において、インビトロまたはインビボで、核酸が培養された細胞に移行したかどうかに応じて異なる。インビトロでの哺乳動物細胞への核酸の移行に適した技法には、リポソームの使用、電気穿孔、微量注入、細胞融合、ＤＥＡＥ－デキストラン、リン酸カルシウム沈降法等が含まれる。遺伝子の体外送達に一般に使用されるベクターは、レトロウイルスである。

【０１３３】

現在好ましいインビボ核酸移行技法には、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス

、Ｉ型単純ヘルペスウイルス、またはアデノ関連ウイルス）による形質移入、及び脂質系システム（遺伝子の脂質媒介性移行に有用な脂質は、例えば、ＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、及びＤＣ－Ｃｈｏｌである）が含まれる。一部の状況において、核酸源を、標的細胞に特異的な薬剤、例えば、標的細胞上の細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体、標的細胞上の受容体のためのリガンド等と共に提供することが望ましい。リポソームが用いられる場合、エンドサイトーシスと関連付けられた細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質は、例えば、特定の細胞タイプに向性のカプシドタンパク質またはその断片、循環中の内部化を受けるタンパク質の抗体、及び細胞内限局化を標的とし、細胞内半減期を強化するタンパク質を標的とするため、及び／またはそれらの取り込みを促進するために使用され得る。受容体媒介性エンドサイトーシスの技法は、例えば、Ｗｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２（１９８７）、及びＷａｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　８７：３４１０－３４１４（１９９０）によって記載されている。遺伝子マーキング及び遺伝子療法プロトコルは、例えば、Ａｎｄｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５６：８０８－８１３（１９９２）及びＷＯ１９９３／２５６７３に記載されている。

【０１３４】

ＩＶ．診断及び予後判定方法

本発明は、癌に罹患している患者を診断するため、癌に罹患している患者の予後を決定するため、癌を有する患者が抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかを決定するため、及び癌を有する患者に対する抗癌療法剤の治療効果を最適化するための方法を提供する。これらの方法は、特に、癌のサブタイプを診断するため、治療転帰を予測するため、及び患者への抗癌療法剤の投与が有効となる可能性を増加させるために有用である。いくつかの実施形態において、これらの方法は、患者から得られる試料中の、本発明のバイオマーカー（例えば、表１に列挙されるバイオマーカー）のうちの少なくとも１つの発現レベルを決定することと、その発現レベルを、本発明のバイオマーカーの基準レベルと比較することと、を含む。特定の実施形態において、これらの方法は、患者から得られる試料中の以下の遺伝子、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲのうちの少なくとも１つの発現レベルを決定することと、この発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較することと、を含む。本発明のバイオマーカー（例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲ）の発現レベルは、下記の方法若しくはアッセイのうちのいずれかを使用するか、または当該技術分野において既知の任意の方法若しくはアッセイによって決定され得る。特定の実施形態において、癌は、膀胱癌である。一部の実施形態において、膀胱癌は、ＮＭＩＢＣである。他の実施形態において、膀胱癌は、ＭＩＢＣである。更に他の実施形態において、膀胱癌は、転移性膀胱癌である。患者は、任意選択で、進行性、難治性、再発性、及び／または化学療法耐性形態の癌を有し得る。例えば、一部の実施形態において、患者は、再発性膀胱癌、例えば、再発性ＮＭＩＢＣを有し得る。

【０１３５】

例えば、一部の実施形態において、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、表１に列挙される遺伝子（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、または９６遺伝子）の発現レベルを決定するステップと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルが、癌を有する患者を特定する。一

部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。例えば、特定の実施形態において、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲのうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、２つ、または３つ）の発現レベルを決定するステップと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加が、癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１３６】

一部の事例において、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中のＦＧＦＲ３の発現レベルを決定するステップと、（ｂ）ＦＧＦＲ３の発現レベルをＦＧＦＲ３の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中のＦＧＦＲ３の発現レベルの増加が、癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１３７】

一部の事例において、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中のＴＰ５３の発現レベルを決定するステップと、（ｂ）ＴＰ５３の発現レベルをＴＰ５３の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中のＴＰ５３の発現レベルの増加が、癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１３８】

一部の事例において、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中のＥＧＦＲの発現レベルを決定するステップと、（ｂ）ＥＧＦＲの発現レベルをＥＧＦＲの基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中のＥＧＦＲの発現レベルの増加が、癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１３９】

別の実施例において、一部の実施形態では、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、表４に列挙される遺伝子（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、または４８遺伝子）の発現レベルを決定するステップと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの変化が、癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１４０】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、（ｃ）癌を有していることを患者に通知することを更に含み得る。上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、（ｄ）試料に対する、患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加が検出された場合に、患者の治療のための抗癌療法剤を選択することを更に含み得る。上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、例えば、本発明の詳細な説明の第ＩＩＩ節に記載される通り、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含み得る。

【０１４１】

他の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、表１に列挙される遺伝子（例えば、表１に列挙される１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６

、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、または９６遺伝子）のうちの少なくとも１つの発現レベルを決定することと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較することと、（ｃ）患者の予後を決定することと、を含み、基準レベルに対して変化した患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルによって、不良な予後が示される。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１４２】

例えば、一部の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲのうちの少なくとも１つの発現レベルを決定することと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較することと、（ｃ）患者の予後を決定することと、を含み、不良な予後は、基準レベルに対して増加した患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加によって示される。

【０１４３】

一部の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中のＦＧＦＲ３の発現レベルを決定することと、（ｂ）ＦＧＦＲ３の発現レベルを、ＦＧＦＲ３の基準レベルと比較することと、（ｃ）患者の予後を決定することと、を含み、基準レベルに対して増加した患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加によって、不良な予後が示される。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１４４】

他の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中のＴＰ５３の発現レベルを決定することと、（ｂ）ＴＰ５３の発現レベルを、ＴＰ５３の基準レベルと比較することと、（ｃ）患者の予後を決定することと、を含み、基準レベルに対して増加した患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加によって、不良な予後が示される。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１４５】

例えば、一部の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中のＥＧＦＲの発現レベルを決定することと、（ｂ）ＥＧＦＲの発現レベルを、ＥＧＦＲの基準レベルと比較することと、（ｃ）患者の予後を決定することと、を含み、基準レベルに対して増加した患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加によって、不良な予後が示される。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１４６】

他の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、表４に列挙される遺伝子（例えば、表４に列挙される１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、または４８遺伝子）のうちの少なくとも１つの発現レベルを決定することと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較することと、（ｃ）患者の予後を決定することと、を含み、基準レベルに対して変化した患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルによって、不

良な予後が示される。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１４７】

上記方法のうちのいずれかにおいて、予後は、生存の予後であり得る。一部の事例において、本方法は、抗癌療法剤を患者に投与する前に実行される。他の実施形態において、本方法は、抗癌療法剤を患者に投与している間に実行される。他の実施形態において、本方法は、抗癌療法剤を患者に投与した後に実行される。

【０１４８】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、抗癌療法剤の投与から利益を享受する可能性があるとして、患者を特定することを更に含み得る。他の事例において、本方法は、患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、抗癌療法剤の投与から利益を享受する可能性が低いとして、患者を特定することを更に含み得る。

【０１４９】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、例えば、本発明の詳細な説明の第ＩＩＩ節に記載される通り、患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含み得る。

【０１５０】

上記方法のうちのいずれかにおいて、生存は、無疾患生存、無進行生存、または全生存であり得る。

【０１５１】

他の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、表１に列挙される遺伝子（例えば、表１に列挙される１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、または９６遺伝子）のうちの少なくとも１つの発現レベルを決定するステップと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの変化が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１５２】

例えば、一部の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲのうちの少なくとも１つの発現レベルを決定することと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１５３】

例えば、一部の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中のＦＧＦＲ３の発現レベルを決定するステップと、（ｂ）ＦＧＦＲ３の発現レベルをＦＧＦＲ３の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料

中のＦＧＦＲ３の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１５４】

他の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中のＴＰ５３の発現レベルを決定するステップと、（ｂ）ＴＰ５３の発現レベルをＴＰ５３の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中のＴＰ５３の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１５５】

更に他の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中のＥＧＦＲの発現レベルを決定するステップと、（ｂ）ＥＧＦＲの発現レベルをＥＧＦＲの基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中のＥＧＦＲの発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１５６】

他の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、表４に列挙される遺伝子（例えば、表４に列挙される１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、または４８遺伝子）のうちの少なくとも１つの発現レベルを決定するステップと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの変化が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１５７】

一部の事例において、本発明は、癌を有する患者のための抗癌療法剤の治療効果の最適化方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、表１に列挙される遺伝子（例えば、表１に列挙される１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、５０、５１、５２、５３、５４、５５、５６、５７、５８、５９、６０、６１、６２、６３、６４、６５、６６、６７、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、または９６遺伝子）のうちの少なくとも１つの発現レベルを決定するステップと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの変化が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１５８】

例えば、一部の事例において、本発明は、癌を有する患者のための抗癌療法剤の治療効果の最適化方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲのうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、２つ、または３つ）の発現レベルを決定することと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベル

を、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１５９】

一部の事例において、本発明は、癌を有する患者のための抗癌療法剤の治療効果の最適化方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中のＦＧＦＲ３の発現レベルを決定するステップと、（ｂ）ＦＧＦＲ３の発現レベルをＦＧＦＲ３の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中のＦＧＦＲ３の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１６０】

一部の事例において、本発明は、癌を有する患者のための抗癌療法剤の治療効果の最適化方法を提供し、本方法は、（ａ）患者から得られる試料中の、表４に列挙される遺伝子（例えば、表４に列挙される１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、または４８遺伝子）のうちの少なくとも１つの発現レベルを決定するステップと、（ｂ）少なくとも１つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する患者試料中の少なくとも１つの遺伝子の発現レベルの変化が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【０１６１】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、ＤＵＳＢ３、ＦＲＳ２、ＴＳＣ１、ＥＲＢＢ３、ＣＤＫＮ１Ａ、ＣＣＮＤ１、ＴＰ６３、ＭＭＰ２、ＺＥＢ２、ＰＩＫ３ＣＢ、ＰＩＫ３Ｒ１、ＭＤＭ２、ＳＮＡＩ２、ＡＸＬ、ＺＥＢ１、ＢＣＬ２Ｂ、ＴＳＣ２、ＲＢ１、ＦＧＦＲ３２、ＰＩＫ３ＩＰ１、ＭＴＯＲ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＰＴＥＮ、ＡＫＴ１、ＢＣＬ２Ａ、ＦＲＳ３、ＥＲＢＢ２、ＦＧＦＲ３１、ＦＧＦ１、ＳＮＡＩ１、ＦＧＦＲ３４、ＦＧＦ９、及びＦＧＦ２からなる群から選択される少なくとも１つの追加遺伝子の発現レベルを決定することを更に含むことを更に含み得る。

【０１６２】

一部の事例において、本発明は、膀胱癌に罹患している患者の治療方法を提供し、本方法は、カルメット・ゲラン桿菌（ＢＣＧ）ワクチン以外の治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含み、患者から得られる試料中のＴＰ５３の発現レベルが、ＴＰ５３の基準レベルに対して増加したと決定されている。

【０１６３】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、例えば、本発明の詳細な説明の第ＩＩＩ節に記載される通り、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含み得る。

【０１６４】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本発明のバイオマーカー、例えば、表１に列挙される遺伝子、例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲの発現レベルは、例えば、下記の通り、または当該技術分野において既知の方法によってメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を測定することにより決定され得る。一部の事例において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）アッセイによって決定される。一部の実施形態において、ＰＣＲアッセイは、定量的ＰＣＲアッセイである。一部の実施形態において、定量的ＰＣＲアッセイは、ＴＡＱＭＡＮ（

登録商標）アッセイである。一部の実施形態において、アッセイは、Ｆｌｕｉｄｉｇｍアッセイを使用して行われる。

【０１６５】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本発明のバイオマーカー、例えば、表１に列挙される遺伝子、例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲの発現レベルは、例えば、下記の通り、または当該技術分野において既知の方法によってタンパク質を測定することにより決定され得る。一部の事例において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、免疫組織化学法によって決定される。

【０１６６】

免疫組織化学によってＦＧＦＲ３の発現レベルの例示的な決定方法は、下に提供される。同様のアッセイを本発明の他のバイオマーカーに使用することができる。

【０１６７】

一実施形態において、ＦＧＦＲ３過剰発現は、ＩＨＣによって解析され得る。腫瘍生検組織からのパラフィン包埋組織断片は、ＩＨＣアッセイに供され、以下のようなＦＧＦＲ３タンパク質染色強度基準に一致し得る。

スコア０：染色が観察されないか、または膜染色が腫瘍細胞の１０％未満で観察される。

スコア１＋：かすかな／ほとんど認識不可能な膜染色が、腫瘍細胞の１０％超で検出される。細胞は、それらの膜の一部分が染色されるだけである。

スコア２＋：弱～中度の完全膜染色が、腫瘍細胞の１０％超で観察される。

スコア３＋：中～強度の完全膜染色が、腫瘍細胞の１０％超で観察される。

【０１６８】

一部の実施形態において、ＦＧＦＲ３過剰発現アセスメントの０または１＋スコアを有する腫瘍は、ＦＧＦＲ３を過剰発現しないと特徴付けられ得るが、２＋または３＋スコアを有する腫瘍は、ＦＧＦＲ３を過剰発現すると特徴付けられ得る。

【０１６９】

一部の実施形態において、ＦＧＦＲ３を過剰発現する腫瘍は、１細胞当たりに発現されるＦＧＦＲ３のコピー数に対応する免疫組織化学スコアによって評価されてもよく、生化学的に決定され得る。

０＝０～９０コピー／細胞、

１＋＝少なくとも約１００コピー／細胞、

２＋＝少なくとも約１０００コピー／細胞、

３＋＝少なくとも約１０，０００コピー／細胞。

【０１７０】

一部の事例において、患者から得られる試料は、腫瘍試料である。

【０１７１】

本発明の上記方法のうちのいずれかにおいて、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカー（例えば、表１に列挙される遺伝子）の発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上変化し得る。例えば、一部の実施形態において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上増加し得る。他の実施形態において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上減少し得る。

【０１７２】
特定の実施形態において、患者から得られる試料中の以下、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲのうちの少なくとも１つ（例えば、１つ、２つ、または３つ）の発現レベルは、少なくとも１つの遺伝子の基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上増加し得る。例えば、ＦＧＦＲ３の発現レベルは、ＦＧＦＲ３の基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上増加し得る。別の例において、ＴＰ５３の発現レベルは、ＴＰ５３の基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上増加し得る。更に別の例において、ＥＧＦＲの発現レベルは、ＥＧＦＲの基準レベルに対して少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、２倍、３倍、５倍、６倍、７倍、８倍、９倍、１０倍、１１倍、１２倍、１３倍、１４倍、１５倍、１６倍、またはそれ以上増加し得る。
【０１７３】
一部の実施形態において、基準レベルは、例えば、所与の癌タイプ（例えば、膀胱癌）におけるバイオマーカー（例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、またはＥＧＦＲ）の発現レベルの全体分布の２０～９９パーセンタイルの間の任意のパーセンタイル（例えば、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、または９９パーセンタイル）に設定され得る。特定の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布の２５パーセンタイルに設定され得る。他の特定の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布の５０パーセンタイルに設定され得る。他の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布のメジアンであり得る。
【０１７４】
開示される方法及びアッセイは、便利で効率的、かつ恐らくは費用効果がある手段を提供し、患者を治療するための適切な、または有効な療法剤を評価する際に有用なデータ及び情報を入手する。例えば、患者は、特定の癌または癌のサブタイプの診断のための試料（例えば、腫瘍生検組織または血液試料）を提供することができる。一部の事例において、診断は、膀胱癌に関し得る。他の事例において、診断は、膀胱癌のサブタイプ、例えば、ＮＭＩＢＣ、ＭＩＢＣ、または転移性膀胱癌に関し得る。他の事例において、患者は、抗癌療法剤での治療前に試料（例えば、腫瘍生検組織または血液試料）を提供することができ、試料は、様々なインビトロアッセイによって調べて、患者の細胞が抗癌療法剤、例えば、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、及び／またはＥＧＦＲアンタゴニストを含む抗癌療法剤に感受性があるかどうかを決定することができる。
【０１７５】
特に診断検査の適用及び療法剤での治療に関する医術の分野における当業者は、生物系がある程度変動性であり、常に全体的に予測可能であるとは限らないため、多くの良好な診断検査または療法剤が効果的でない場合があることを認識するであろう。したがって、最終的には、検査結果、患者の病態及び病歴、及び担当医自身の経験に基づいて、個々の患者に最も適切な治療過程を決定するのは担当医の判断次第である。例えば、診断検査からまたは他の基準からのデータに基づいて、患者がＶＥＧＦアンタゴニストに対して特に感受性であることが予測されない場合、特に他の明らかな治療オプションの全て若しくは大部分が失敗した場合、または別の治療と共に付与される場合にいくらかの相乗効果が期待される場合であっても、医師は、抗癌療法剤、例えば、アンタゴニスト（例えば、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、及び／またはＥＧＦＲアンタゴニスト）を含む抗癌療法剤で患者を治療することを選ぶことになる場合もあり得る。

【０１７６】
試料は、癌（例えば、膀胱癌）を有することが疑われるか、若しくは有すると診断された、したがって、治療を必要とする可能性がある患者から、またはいかなる障害をも有することが疑われない正常な個体から採取され得る。マーカー発現のアセスメントの場合、細胞、またはこれらの細胞によって産生されるタンパク質若しくは核酸を含有するもの等の患者試料が、本発明の方法で使用されてもよい。本発明の方法において、バイオマーカーのレベルは、試料、好ましくは組織試料（例えば、生検組織等の腫瘍組織試料）中のマーカーの量（例えば、絶対量または濃度）を評価することによって決定され得る。加えて、バイオマーカーのレベルは、検出可能なレベルのバイオマーカーを含有する体液または分泌物中で評価され得る。本発明における試料として有用な体液または分泌物には、例えば、血液、尿、唾液、便、胸水、リンパ液、痰、腹水、前立腺液、脳髄液（ＣＳＦ）、または任意の他の体分泌物若しくはそれらの誘導体が含まれる。血液という単語は、全血、血漿、血清、または血液の任意の誘導体を含むことを意味する。かかる体液または分泌物中のバイオマーカーのアセスメントは、侵襲的な試料採取法が不適切であるか、または不便である状況において好ましい場合があり得る。しかしながら、試料が体液である場合において、本明細書で検査される試料は、好ましくは血液、滑膜組織、または滑膜液であり、最も好ましくは血液である。
【０１７７】
試料は、冷凍、生鮮、固定（例えば、ホルマリン固定）、遠心分離、及び／または包埋（例えば、パラフィン包埋）等であり得る。細胞試料は、試料中のマーカーの量を評価する前に、当然のことながら、種々の周知の収集後調製及び保管技法（例えば、核酸及び／またはタンパク質抽出、固定、保管、冷凍、超濾過、濃縮、蒸発、遠心分離等）に供され得る。同様に、生検組織は、収集後調製及び保管技法、例えば、固定に供されてもよい。
【０１７８】
上記の通り、上記方法のうちのいずれかは、任意選択で、患者への投与のための抗癌療法剤の選択を含み得、任意選択で、患者への抗癌療法剤の投与を更に含み得る。
【０１７９】
Ａ．遺伝子発現の検出
本明細書に記載される遺伝的バイオマーカーは、当該技術分野において既知の任意の方法を使用して検出され得る。例えば、哺乳動物からの組織または細胞試料は、例えば、関心対象の遺伝的バイオマーカーからのｍＲＮＡまたはＤＮＡに関して、ノーザン、ドットブロット、またはポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）解析、アレイハイブリダイゼーション、ＲＮａｓｅ保護アッセイを使用するか、またはＤＮＡマイクロアレイスナップショットを含む、市販のＤＮＡ　ＳＮＰチップマイクロアレイを使用して、便宜的にアッセイされ得る。例えば、定量的ＰＣＲアッセイ等のリアルタイムＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）アッセイは、当該技術分野において周知である。本発明の例示の実施形態において、生物試料中の関心対象の遺伝的バイオマーカーからのｍＲＮＡの検出方法は、少なくとも１つのプライマーを使用する逆転写によって試料からｃＤＮＡを産生することと、増幅ｃＤＮＡの存在を検出することと、を含む。加えて、かかる方法は、生物試料中のｍＲＮＡのレベルを決定するのを可能にする（例えば、アクチンファミリーメンバー等の「ハウスキーピング」遺伝子の比較対照ｍＲＮＡ配列のレベルを同時に調べることによって）、１つ以上のステップを含み得る。任意選択で、増幅ｃＤＮＡの配列が決定され得る。ＦＧＦＲ３の発現レベルの例示的な決定方法は、例えば、米国特許出願公開第２０１４／００３０２５９号、及び米国特許第８，４１０，２５０号に提供され、両方が参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。
【０１８０】
１．核酸の検出
１つの特定の実施形態において、表１に記載される遺伝子の発現は、ＲＴ－ＰＣＲ技術によって行われ得る。ＰＣＲに使用されるプローブは、検出可能なマーカー、例えば、放射線同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤、または酵

素等で標識されてもよい。かかるプローブ及びプライマーを使用して、試料中の表１に記載される発現遺伝子の存在を検出することができる。熟練者によって理解されるであろう通り、非常に多くの異なるプライマー及びプローブが、本明細書に提供されるシーケンスに基づいて調製され、それらを有効に使用して、表１及び／または表４に記載される発現遺伝子の存在及び／またはレベルを増幅、クローン化、及び／または決定することができる。一部の実施形態において、ＲＴ－ＰＣＲは、定量的ＲＴ－ＰＣＲであり得る。一部の事例において、定量的ＲＴ－ＰＣＲは、微小流体デバイス、例えば、Ｆｌｕｉｄｉｇｍ ＢＩＯＭＡＲＫ（商標）ＢＭＫ－Ｍ－９６．９６プラットフォームにおいて行われてもよい。

【０１８１】

他の方法には、マイクロアレイ技術により、組織または細胞試料中の、表１に記載の遺伝子（例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及びＥＧＦＲ ｍＲＮＡ）のうちの少なくとも１つからのｍＲＮＡを調べるか、または検出するプロトコルが含まれる。核酸マイクロアレイを使用して、検査及び対照組織試料からの検査及び対照ｍＲＮＡ試料を逆転写及び標識化して、ｃＤＮＡプローブを生成する。次いで、プローブは、固体支持体上に固定された核酸のアレイにハイブリダイズされる。このアレイは、該アレイの各メンバーの配列及び位置が既知であるように構成される。例えば、ある特定の疾患状態において発現される可能性がある遺伝子の抜粋が、固体支持体上に配置され得る。特定のアレイメンバーによる標識化プローブのハイブリダイゼーションは、プローブが由来する試料が当該遺伝子を発現することを示す。疾患組織の差次的遺伝子発現解析は、有益な情報を提供し得る。マイクロアレイ技術は、核酸ハイブリダイゼーション技術及びコンピューター技術を用いて、単一実験内で数千の遺伝子のｍＲＮＡ発現プロファイルを評価する（例えば、ＷＯ２００１／７５１６６を参照されたい）。例えば、アレイ成形加工の考察については、米国特許第５，７００，６３７号、米国特許第５，４４５，９３４号、及び米国特許５，８０７，５２２号、Ｌｏｃｋａｒｔ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１４：１６７５－１６８０（１９９６）、及びＣｈｅｕｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ２１（Ｓｕｐｐｌ）：１５－１９（１９９９）を参照されたい。

【０１８２】

加えて、ＥＰ１７５３８７８に記載されるマイクロアレイを利用するＤＮＡプロファイリング及び検出方法が用いられてもよい。この方法は、短いタンデム反復（ＳＴＲ）解析及びＤＮＡマイクロアレイを利用する異なるＤＮＡ配列を迅速に特定し、区別する。ある実施形態において、標識化されたＳＴＲ標的配列は、相補性プローブを担持するＤＮＡマイクロアレイにハイブリダイズされる。これらのプローブは、想定されるＳＴＲの範囲を網羅するように長さが異なる。ＤＮＡハイブリッドの標識化された一本鎖領域は、ハイブリダイゼーション後酵素消化を利用するマイクロアレイ表面から選択的に除去される。不明な標的内の反復の数は、マイクロアレイにハイブリダイズされたままの標的ＤＮＡのパターンに基づいて推測される。

【０１８３】

マイクロアレイプロセッサの一例は、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ ＧＥＮＥＣＨＩＰ（登録商標）システムであり、これは商業的に入手可能であり、ガラス表面上のオリゴヌクレオチドの直接合成によって成形加工されたアレイを含む。他のシステムは、当業者に既知のように使用され得る。

【０１８４】

ＲＴ－ＰＣＲ以外のバイオマーカーのレベルを決定するための他の方法、または別のＰＣＲベースの方法には、プロテオミクス技法、ならびに分子レベルでの患者応答に基づいて癌を治療するために必要な個別化された遺伝的プロファイルが含まれる。本明細書における特殊化されたマイクロアレイ、例えば、オリゴヌクレオチドマイクロアレイまたはｃＤＮＡマイクロアレイは、１つ以上の抗癌療法剤に対する感受性または耐性のいずれかと相関する発現プロファイルを有する１つ以上のバイオマーカーを含み得る。本発明における使用のための、核酸を検出するために使用され得る他の方法は、例えば、ＲＮＡＳｅｑ

等のＲＮＡベースのゲノム解析を含む、高スループットＲＮＡ配列発現解析を必要とする。

【０１８５】

多くの参考文献が、上記技法を適用する際にガイダンスを提供するために入手可能である（Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８０）、Ｔｉｊｓｓｅｎ，Ｐｒａｃｔｉｃｅ ａｎｄ Ｔｈｅｏｒｙ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，１９８５）、Ｃａｍｐｂｅｌｌ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ａｍｓｔｅｒｄａｍ，１９８４）、Ｈｕｒｒｅｌｌ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ，１９８２）、及びＺｏｌａ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，ｐｐ．１４７－１５８（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，１９８７））。ノーザンブロット解析は、当該技術分野において周知の従来技法であり、例えば、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ｓｅｃｏｎｄ ｅｄｉｔｉｏｎ，１９８９，Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｃｈ，Ｍａｎｉａｔｉｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，１０ Ｓｋｙｌｉｎｅ Ｄｒｉｖｅ，Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ，ＮＹ １１８０３－２５００に記載されている。遺伝子及び遺伝子産生物の状態を評価するための典型的なプロトコルは、例えば、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．ｅｄｓ．，１９９５，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｕｎｉｔｓ ２（ノーザンブロッティング）、４（サザンブロッティング）、１５（イムノブロッティング）、及び１８（ＰＣＲ解析）に見出される。

【０１８６】

２．タンパク質の検出

表１に列挙されるもの等のタンパク質バイオマーカーの検出に関して（例えば、ＦＧＦＲ３、ＴＰ５３、及び／またはＥＧＦＲ）、例えば、抗体ベースの方法、ならびに質量分光法及び当該技術分野において既知の他の類似手段を含む、様々なタンパク質アッセイが使用可能である。抗体ベースの方法の場合において、例えば、試料は、抗体－バイオマーカーの錯体が形成し、次いで当該錯体を検出するのに十分な条件下で、当該バイオマーカーに特異的な抗体と接触させてもよい。タンパク質バイオマーカーの存在の検出は、ウェスタンブロッティング（免疫沈降の有無を問わず）、二次元ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、免疫沈降、蛍光活性化細胞分類（ＦＡＣＳ）、フローサイトメトリー、及び血漿または血清を含む多種多様な組織及び試料をアッセイするためのＥＬＩＳＡ手順等の多くの方法において達成され得る。かかるアッセイ形式を使用する広範囲のイムノアッセイ技法が使用可能であり、例えば、米国特許第４，０１６，０４３号、同第４，４２４，２７９号、及び同第４，０１８，６５３号を参照されたい。これらには、非競合型の単一部位及び二部位、または「サンドイッチ」アッセイ、ならびに伝統的な競合結合アッセイの両方が含まれる。これらのアッセイにはまた、標的バイオマーカーへの標識された抗体の直接結合が含まれる。

【０１８７】

サンドイッチアッセイは、最も有用で一般に使用されるアッセイに含まれる。サンドイッチアッセイ技法の多くの変型が存在し、全ては、本発明によって包含されるものとする。簡潔に言えば、典型的な順方向アッセイにおいて、標識化されていない抗体を固体基質上に固定し、検査される試料を、結合された分子と接触させる。適切なインキュベーション期間後に、抗体－抗原錯体の形成を可能にするのに十分な期間にわたって、検出可能なシグナルを産生することができるレポーター分子で標識化された抗原に特異的な第２の抗体を次いで添加し、インキュベートして、抗体－抗原標識化された抗体の別の錯体の形成に十分な時間を許す。任意の未反応の材料が洗い流され、抗原の存在は、レポーター分子

により産生されるシグナルの観察によって決定される。これらの結果は、視覚シグナルの単純な観察によって定量的であり得るか、または既知量のバイオマーカーを含有する対照試料と比較することによって定量化され得るかのいずれかである。

【０１８８】

順方向アッセイの変型には、試料と標識化された抗体の両方が、結合された抗体に同時に添加される、同時アッセイが含まれる。これらの技法は、当業者には周知であり、容易に明らかとなるように任意のわずかな変型を含む。典型的な順方向サンドイッチアッセイにおいて、バイオマーカーに対する特異性を有する第１の抗体は、共有的または受動的のいずれかで固体表面に結合される。固体表面は、典型的に、ガラスまたはポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンである。固体支持体は、管、ビーズ、マイクロプレートの円板の形態、またはイムノアッセイを行うのに適した任意の他の表面であってもよい。結合プロセスは、当該技術分野において周知であり、一般に、共有結合または物理的吸着を架橋することからなり、ポリマー－抗体錯体は、検査試料の調製において洗浄される。次いで、検査される試料のアリコートを、固相錯体に添加し、十分な期間（例えば、２～４０分またはより好都合であれば終夜）にわたって、適切な条件下（例えば、室温～４０℃、２５℃と３２℃を含めて２５℃～３２℃等）でインキュベートして、抗体内に存在する任意のサブユニットの結合を可能にする。インキュベーション期間に続いて、抗体サブユニット固相は、洗浄及び乾燥され、バイオマーカーの一部分に特異的な第２の抗体でインキュベートされる。第２の抗体は、分子マーカーへの第２の抗体の結合を示すために使用されるレポーター分子に結合される。

【０１８９】

代替方法は、試料中の標的バイオマーカーを固定することと、次いで、レポーター分子で標識されてもされなくてもよい特定の抗体に固定された標的を曝露することとを含む。標的の量及びレポーター分子シグナルの強度に応じて、結合された標的は、抗体との直接標識化によって検出可能であり得る。代替として、第１の抗体に特異的な第２の標識された抗体を、標的－第１の抗体錯体に曝露して、標的－第１の抗体－第２の抗体三級錯体を形成する。この錯体は、レポーター分子により放出されたシグナルによって検出される。「レポーター分子」とは、本明細書で使用される場合、その化学的性質により、抗原結合された抗体の検出を可能にする解析的に特定可能なシグナルを提供する分子を意味する。このタイプのアッセイにおける最も一般に使用されるレポーター分子は、酵素、フルオロフォア、または放射線核種含有分子（すなわち、放射線同位体）、及び化学発光分子のいずれかである。

【０１９０】

酵素イムノアッセイの場合において、酵素は、一般にグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩によって第２の抗体に複合される。しかしながら、容易に認識されるであろう通り、熟練者には容易に使用可能な多種多様な異なる複合技法が存在する。一般に使用される酵素には、特に西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、及びアルカリホスファターゼが含まれる。特定の酵素と共に使用される基質は、一般に、対応する酵素による加水分解時に、検出可能な色変化の産生のために選択される。好適な酵素の例には、アルカリホスファターゼ及びペルオキシダーゼが含まれる。上記の色素原基質ではなく蛍光産生物をもたらす、蛍光原基質を用いることも可能である。全ての場合において、酵素標識された抗体は、第１の抗体－分子マーカー錯体に添加され、結合させられた後、過剰な試薬が洗い流される。次いで、適切な基質を含有する溶液が、抗体－抗原－抗体の錯体に添加される。基質は、第２の抗体に結合された酵素と反応して、定性的視覚シグナルを付与し、これを通常は分光光度的に更に定量化して、試料中に存在していたバイオマーカーの量の指標を付与することができる。代替として、フルオレセイン及びローダミン等の蛍光化合物は、それらの結合能力を変えることなく抗体に化学的に結合され得る。特定波長の光での照明により活性化された場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子内の励起性状態を誘導するのに続いて、光顕微鏡で

視覚的に検出可能な特徴的な色での光の放射を誘導する。ＥＩＡと同様に、蛍光標識された抗体は、第１の抗体－分子マーカー錯体に結合することが許される。未結合試薬を洗い流した後、次いで、残留する三級錯体を適切な波長の光に曝露し、観察された蛍光は、関心対象の分子マーカーの存在を示す。免疫蛍光及びＥＩＡ技法の両方は、当該技術分野で十分に確立されている。しかしながら、放射線同位体または生物発光分子等の他のレポーター分子が用いられてもよい。

【０１９１】

Ｂ．キット

バイオマーカーの検出における使用の場合、製造元のキットまたは製品もまた本発明により提供される。かかるキットを使用して、例えば、癌（例えば、膀胱癌）に罹患しているか、または罹患していると疑われる患者を診断すること、癌、例えば、膀胱癌に罹患している患者の予後判定を提供すること、及び／または癌（例えば、膀胱癌）を有する患者が、抗癌療法剤に対して有効に応答性となるかどうかを決定することができる。これらのキットは、厳重な管理下で、バイアル、管等の１つ以上の容器手段を受容するように区分化された担体手段を備えてよく、容器手段のそれぞれは、本方法で使用される別個の要素のうちの１つを含む。例えば、容器手段のうちの１つは、検出可能に標識されるか、または検出可能に標識され得るプローブを備えてよい。かかるプローブは、タンパク質またはメッセージにそれぞれ特異的な抗体またはポリヌクレオチドであってもよい。キットが核酸ハイブリダイゼーションを用いて標的核酸を検出する場合、キットは、標的核酸配列の増幅のためのヌクレオチド（複数可）を含む容器、及び／または酵素、蛍光、若しくは放射性同位元素標識等のレポーター分子に結合されるアビジン若しくはストレプトアビジン等のビオチン結合タンパク質等のレポーター手段を含む容器も有し得る。

【０１９２】

かかるキットは、典型的に、上記の容器と、緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を伴う添付文書を含む、商業的及びユーザーの視点から望ましい材料を含む１つ以上の他の容器と、を備える。標識は、組成物が特定の用途に用いられることを示すために容器上に提示され得、上記のもの等のインビボ使用またはインビトロ使用のいずれかに関する指示も示し得る。

【０１９３】

本発明のキットは、多くの実施形態を有する。典型的な実施形態は、容器と、当該容器上のラベルと、当該容器内に収容された組成物と、を備えるキットであり、組成物は、タンパク質または自動抗体バイオマーカーに結合する一次抗体を含み、当該容器上のラベルは、組成物を使用して、試料中のこのようなタンパク質または抗体の存在を評価できることを示し、このキットは、特定試料タイプにおけるバイオマーカータンパク質の存在を評価するために、抗体を使用するための指示を含む。このキットは、試料を調製し、抗体を試料に適用するための指示及び材料のセットを更に備え得る。このキットは、一次抗体及び二次抗体の両方を含んでもよく、二次抗体は、ラベル、例えば、酵素ラベルに複合される。

【０１９４】

別の実施形態は、容器と、当該容器上のラベルと、当該容器内に収容された組成物と、を備えるキットであり、組成物は、厳しい条件下で表１に記載されるバイオマーカーの相補体にハイブリダイズする１つ以上のポリヌクレオチドを含み、当該容器上のラベルは、組成物を使用して、試料中の表１に記載されるバイオマーカーの存在を評価できることを示し、このキットは、特定試料タイプにおけるバイオマーカーＲＮＡまたはＤＮＡの存在を評価するために、ポリヌクレオチド（複数可）を使用するための指示を含む。

【０１９５】

キットの他の任意の構成要素には、１つ以上の緩衝剤（例えば、ブロック緩衝剤、洗浄緩衝剤、基質緩衝剤等）、酵素標識により化学的に改変される基質（例えば、クロモゲン）等の他の試薬、エピトープ抽出溶液、対照試料（正及び／または負の対照）、対照スライド（複数可）等が含まれる。キットはまた、当該キットを使用して得られる結果を解釈

するための説明書を含むことができる。

【０１９６】

更に特定の実施形態において、抗体ベースのキットの場合、キットは、例えば、（１）バイオマーカータンパク質に結合する第１の抗体（例えば、固体支持体に付着される）と、任意選択で（２）タンパク質または第１の抗体のいずれかに結合し、検出可能な標識に複合される第２の異なる抗体と、を含み得る。

【０１９７】

オリゴヌクレオチドベースのキットの場合、キットは、例えば、（１）オリゴヌクレオチド、例えば、バイオマーカータンパク質をコードする核酸配列にハイブリダイズする、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド、または（２）バイオマーカー核酸分子を増幅させるために有用な一対のプライマーを含み得る。このキットはまた、例えば、緩衝剤、保存剤、またはタンパク質安定化剤を含み得る。このキットは、検出可能なラベルを検出するために必要な構成要素（例えば、酵素または基質）を更に含み得る。このキットはまた、アッセイされ、検査試料と比較され得る、対照試料または一連の対照試料を含有し得る。キットの各構成要素は、個々の容器内に封入され得、様々な容器の全ては、キットを使用して行われるアッセイの結果を解釈するための説明書と共に、単一パッケージ内であり得る。

【０１９８】

一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載されるヌクレオチド配列のうちのいずれか、例えば、配列番号１～５１のうちの１つ以上を含む。

【０１９９】

Ｖ．医薬製剤

本発明に従って使用される、本発明に記載される抗癌療法剤（例えば、ＦＧＦＲ３アンタゴニスト、ＴＰ５３アンタゴニスト、及び／またはＥＧＦＲアンタゴニスト等のアンタゴニストを含む抗癌療法剤）の療法剤（複数可）の治療製剤は、所望の純度を有する療法剤（複数可）を、凍結乾燥された製剤または水溶液の形態にある任意選択の薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤と混合することにより、保管のために調製される。製剤に関する一般情報については、例えば、Ｇｉｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（ｅｄｓ．）（１９９０），Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｅｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，８ｔｈ Ｅｄ．，Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ、Ａ．Ｇｅｎｎａｒｏ（ｅｄ．），Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ'ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，１８ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，（１９９０），Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｒｉ，Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ、Ａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．，（ｅｄｓ．）（１９９３）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ Ｍｅｄｉｃａｔｉｏｎｓ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（ｅｄｓ．）（１９９０）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｔａｂｌｅｔｓ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、及びＬｉｅｂｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（ｅｄｓ．）（１９９０），Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｄｉｓｐｅｒｓｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｋｅｎｎｅｔｈ Ａ．Ｗａｌｔｅｒｓ（ｅｄ．）（２００２）Ｄｅｒｍａｔｏｌｏｇｉｃａｌ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｄｅｒｍａｌ Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ（Ｄｒｕｇｓ ａｎｄ ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ），Ｖｏｌ １１９，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒを参照されたい。

【０２００】

許容される担体、賦形剤、または安定剤は、受容者に対し、利用される用量及び濃度で非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸等の緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；及びｍ－クレゾ

ール等）；低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む他の炭水化物；ＥＤＴＡ等のキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）；及び／またはＴＷＥＥＮ（商標）、ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（商標）、またはポリエチレングリコール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤を含む。

【０２０１】

皮下投与のために適合された凍結乾燥製剤は、例えば、米国特許第６，２６７，９５８号（Ａｎｄｙａら）に記載されている。かかる凍結乾燥製剤は、好適な希釈剤により高タンパク質濃度に再構成されてもよく、この再構成された製剤は、本明細書で治療される哺乳動物に皮下投与され得る。

【０２０２】

療法剤（複数可）の結晶化形態も企図される。例えば、ＵＳ２００２／０１３６７１９Ａ１を参照されたい。

【０２０３】

本明細書の製剤は、複数の活性化合物（上記の第２の薬品）、好ましくは、互いに影響を不利に及ぼさない相補的活性を有するものも含有してもよい。かかる薬品の種類及び有効量は、例えば、製剤中に存在する療法剤（複数可）の量及び種類、ならびに対象の臨床的パラメータに応じる。好ましいこのような第２の薬品は上に記載される。

【０２０４】

活性成分は、例えばコアセルベーション技法または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース若しくはゼラチン－マイクロカプセル及びポリ－（メチルメタチレート）マイクロカプセル中に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及びナノカプセル）中に、またはマクロ乳濁液中に取り込まれてもよい。かかる技法は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ １６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．（１９８０）に開示されている。

【０２０５】

持続放出調製物が調製されてもよい。持続放出調製物の好適な例には、アンタゴニストを含有する固体の疎水性ポリマーの半透性マトリクスが含まれ、そのマトリクスは、成形品、例えばフイルムまたはマイクロカプセルの形態にある。持続放出マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチルメタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号）、Ｌ－グルタミン酸とγエチル－Ｌ－グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、例えばＬＵＰＲＯＮ ＤＥＰＯＴ（商標）等の分解性の乳酸－グリコール酸コポリマー（乳酸－グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア）、ならびにポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が含まれる。

【０２０６】

インビボ投与のために使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、無菌ろ過膜によるろ過により容易に果たされる。

【実施例】

【０２０７】

以下の実施例は例示するために提供され、本件で請求される発明を限定するものではない。

【０２０８】

実施例１．材料及び方法

腫瘍試料

２０４ホルマリン固定パラフィン包埋（ＦＦＰＥ）膀胱癌腫瘍試料の集合は、サンクト

ペテルブルグ市臨床腫瘍学病院の倫理委員会の承認及び書面によるインフォームドコンセントの適切な確認に続いて、Ｃｕｒｅｌｉｎｅ，Ｉｎｃ．（Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）から、または施設内審査委員会（スターリング施設内審査委員会）の承認に続いて、Ｔｈｅ ＭＴ Ｇｒｏｕｐ（Ｖａｎ Ｎｕｙｓ，ＣＡ）から入手した。臨床試料は、膀胱癌において典型的に観察される約８０％／２０％の予想男性／女性比を忠実に再現し、筋層非侵襲性膀胱癌（ＮＭＩＢＣ；Ｔ０、Ｔ１）、筋層侵襲性膀胱癌（ＭＩＢＣ；Ｔ２、Ｔ３）、及び転移の割合は、それぞれ約７５％及び約２５％であり（図１）、膀胱癌集団におけるこれらの病期の臨床発症率と一致していた（Ｊｅｍａｌ ｅｔ ａｌ．ＣＡ Ｃａｎｃｅｒ Ｊ．Ｃｌｉｎ．６１（２）：６９－９０，２０１１、Ｈｅｎｅｙ，Ｕｒｏｌ．Ｃｌｉｎ．Ｎｏｒｔｈ Ａｍ．１９（３）：４２９－４３３，１９９２、Ｈａｌｌ ｅｔ ａｌ．Ｕｒｏｌｏｇｙ ５２（４）：５９４－６０１，１９９８）。症例のサブセットは、それぞれの群に関して予想された臨床パラメータと同様に、付随の治療情報、無疾患生存（ＤＦＳ）、及び全生存（ＯＳ）の注釈を有していた（図１、表３）。

【０２０９】

ヘマトキシリン＆エオシン（Ｈ＆Ｅ）染色された断片を、２人の独立した病理学者が評価したところ、１人の病理学者が、マクロ切開の場合、７０％未満の新生物細胞性を有する症例の腫瘍面積に注目した。全体として、腫瘍含有率は、７０～９０％の範囲であった。ＲＮＡ及びＤＮＡは、前述の通り、マクロ切開された試料から抽出された（Ｓｃｈｌｅｉｆｍａｎ ｅｔ ａｌ．ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ９（３）：ｅ９０７６１、Ｓｃｈｌｅｉｆｍａｎ ｅｔ ａｌ．ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ９（２）：ｅ８８４０１）。

【０２１０】

発現解析

遺伝子発現解析は、前述の通り、ＥＮＶＩＲＥＮＥ（商標）による脱パラフィン化後に、高純度ＦＦＰＥ ＲＮＡマイクロキット（Ｒｏｃｈｅ Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）を使用してマクロ切開されたＦＦＰＥ腫瘍試料から抽出されたＲＮＡ上で行った（Ｓｃｈｌｅｉｆｍａｎ ｅｔ ａｌ．ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ９（２）：ｅ８８４０１）。膀胱癌関連遺伝子の９６の固有のｍＲＮＡ転写産物の遺伝子発現解析（表１を参照されたい）は、ＳＵＰＥＲＳＣＲＩＰＴ（登録商標）ＩＩＩ／ＰＬＡＴＩＮＵＭ（登録商標）Ｔａｑ及び前置増幅反応ミックス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用し、単一反応においてｃＤＮＡに逆転写され、前置増幅された合計１００ｎｇのＲＮＡから開始して患者標本上で行った。全９６のＴＡＱＭＡＮ（登録商標）プライマー／プローブのセットは、元のＴＡＱＭＡＮ（登録商標）アッセイ濃度（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ）の０．０５倍の最終希釈での前置増幅反応に含まれた。熱循環条件は、以下の通りであった。５０℃で１５分間の１サイクル、７０℃で２分間の１サイクル、９５℃で１５秒間の１４サイクル、及び６０℃で４分間の１サイクル。前置増幅されたｃＤＮＡを２倍に希釈し、次いで、製造元の指示に従い、ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）ユニバーサルＰＣＲマスターミックス（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ，ＣＡ）を、ＢＩＯＭＡＲＫ（商標）ＢＭＫ－Ｍ－９６．９６プラットフォーム（Ｆｌｕｉｄｉｇｍ，Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）上で使用して増幅させた。全ての試料を３回アッセイした。サイクル閾値（Ｃｔ）を、$2^{-\Delta Ct}$法を使用して相対発現に変換し（Ｌｉｖａｋ ｅｔ ａｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ２５（４）：４０２－４０８，２００１）、式中、ΔＣｔは、標的遺伝子の平均からそれぞれの患者標本に関して計算された９６Ｃｔ値の平均を引いたものである。表２は、指示された遺伝子に関して使用されたカスタムＴＡＱＭＡＮ（登録商標）プローブ及びオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

表１．カスタム膀胱癌マイクロフルイディクスパネル及び対応するアッセイ

遺伝子記号	ヒトゲノム機構（ＨＵＧＯ）遺伝子命名法	ＨＧＮＣＩＤ	遺伝子座	Ａｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓプローブＩＤ
ＡＣＥＲ３	アルカリセラミダーゼ３	１６０６６	１１ｑ１３．５	Ｈｓ００２１８０３４＿ｍ１
ＡＣＶＲＬ１	アクチビンＡ受容体ＩＩ型様１	１７５	１２ｑ１３．１３	カスタム
ＡＤＡＭ９	ＡＤＡＭメタロペプチダーゼドメイン９	２１６	８ｐ１１．２３	Ｈｓ０１１０６１０１＿ｍ１
ＡＫＴ１	ｖ－ａｋｔマウス胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ１	３９１	１４ｑ３２．３２－ｑ３２．３３	Ｈｓ００１７８２８９＿ｍ１
ＡＫＴ１Ｓ１	ＡＫＴ１基質１（プロリンに富む）	２８４２６	１９ｑ１３．３３	Ｈｓ００２６０７１７＿ｍ１
ＡＲＡＦ	ｖ－ｒａｆマウス肉腫３６１１ウイルス癌遺伝子ホモログ	６４６	Ｘｐ１１．３－ｐ１１．２３	Ｈｓ００１７６４２７＿ｍ１
ＡＸＬ	ＡＸＬ受容体チロシンキナーゼ	９０５	１９ｑ１３．１	Ｈｓ０１０６４４４４＿ｍ１
ＢＣＬ２	αアイソフォーム：Ｂ細胞ＣＬＬ／リンパ腫２	９９０	１８ｑ２１．３	カスタム
ＢＣＬ２	βアイソフォーム：Ｂ細胞ＣＬＬ／リンパ腫２	９９０	１８ｑ２１．３	カスタム
ＢＣＬ２Ｌ１	ＢＣＬ２様１	９９２	２０ｑ１１．２１	カスタム
ＢＩＤ	ＢＨ３相互作用ドメイン死アゴニスト	１０５０	２２ｑ１１．２	カスタム
ＢＭＰ２	骨形態形成タンパク質２	１０６９	２０ｐ１２	Ｈｓ００１５４１９２＿ｍ１
ＢＭＸ	ＢＭＸ非受容体チロシンキナーゼ	１０７９	Ｘｐ２２．２	Ｈｓ０１１０７４０７＿ｍ１

遺伝子記号	ヒトゲノム機構（ＨＵＧＯ）遺伝子命名法	ＨＧＮＣＩＤ	遺伝子座	Ａｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓプローブＩＤ
ＢＳＧ	ベイシジン（Ｏｋ血液型）	１１１６	１９ｐ１３．３	Ｈｓ００９３６２９５＿ｍ１
ＣＢＬＢ	Ｃｂｌプロト癌遺伝子、Ｅ３ユビキチンタンパク質リガーゼＢ	１５４２	３ｑ	Ｈｓ００１８０２８８＿ｍ１
ＣＣＮＤ１	サイクリンＤ１	１５８２	１１ｑ１３	Ｈｓ００７６５５５３＿ｍ１
ＣＣＮＤ２	サイクリンＤ２	１５８３	１２ｐ１３	Ｈｓ００１５３３８０＿ｍ１
ＣＤＣ２０	細胞分割サイクル２０ホモログ（出芽酵母）	１７２３	１ｐ３４．１	Ｈｓ００４１５８５１＿ｇ１
ＣＤＨ１	カドヘリン１、１型、Ｅ－カドヘリン（上皮）	１７４８	１６ｑ２２．１	Ｈｓ０１０２３８９４＿ｍ１
ＣＤＨ２	カドヘリン２、１型、Ｎ－カドヘリン（ニューロン）	１７５９	１８ｑ１２．１	Ｈｓ００９８３０５６＿ｍ１
ＣＤＫＮ１Ａ	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤１Ａ（ｐ２１、Ｃｉｐ１）	１７８４	６ｐ２１．１	Ｈｓ００３５５７８２＿ｍ１
ＣＤＫＮ２Ａ	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤２Ａ	１７８７	９ｐ２１	Ｈｓ０２９０２５４３＿ｍＨ
ＣＳＫ	ｃ－ｓｒｃチロシンキナーゼ	２４４４	１５ｑ２４．１	Ｈｓ０１０６２５８５＿ｍ１
ＣＸＣＬ１	ケモカイン（Ｃ－Ｘ－Ｃモチーフ）リガンド１（黒色腫増殖刺激活性、α）	４６０２	４ｑ１３．３	Ｈｓ００２３６９３７＿ｍ１
ＤＵＳＰ１	二重特異性ホスファターゼ１	３０６４	５ｑ３５．１	Ｈｓ００６１０２５６＿ｇ１

遺伝子記号	ヒトゲノム機構（ＨＵＧＯ）遺伝子命名法	ＨＧＮＣＩＤ	遺伝子座	Ａｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓプローブＩＤ
ＤＵＳＰ３	二重特異性ホスファターゼ３	３０６９	１７ｑ２１	Ｈｓ０１１１５７７６＿ｍ１
ＤＵＳＰ６	二重特異性ホスファターゼ６	３０７２	１２ｑ２２－ｑ２３	Ｈｓ００７３７９６２＿ｍ１
ＥＩＦ４ＥＢＰ１	真核生物翻訳開始因子４Ｅ結合タンパク質１	３２８８	８ｐ１２	Ｈｓ００６０７０５０＿ｍ１
ＥＰＡＳ１	内皮ＰＡＳドメインタンパク質１	３３７４	２ｐ２１－ｐ１６	Ｈｓ０１０２６１４９＿ｍ１
ＥＲＢＢ２	ｖ－ｅｒｂ－ｂ２赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ２、神経／神経膠芽腫由来癌遺伝子ホモログ（鳥類）	３４３０	１７ｑ１１．２－ｑ１２	カスタム
ＥＲＢＢ３	ｖ－ｅｒｂ－ｂ２赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ３（鳥類）	３４３１	１２ｑ１３	Ｈｓ００１７６５３８＿ｍ１
ＦＧＦ１	線維芽細胞成長因子１（酸性）	３６６５	５ｑ３１．３－ｑ３３．２	Ｈｓ００２６５２５４＿ｍ１
ＦＧＦ１０	線維芽細胞成長因子１０	３６６６	５ｐ１３－ｐ１２	Ｈｓ００６１０２９８＿ｍ１
ＦＧＦ２	線維芽細胞成長因子２（塩基性）	３６７６	４ｑ２６	Ｈｓ００２６６６４５＿ｍ１
ＦＧＦ７	線維芽細胞成長因子７	３６８５	１５ｑ２１．２	Ｈｓ００９４０２５３＿ｍ１
ＦＧＦ９	線維芽細胞成長因子９（グリア活性化因子）	３６８７	１３ｑ１１－ｑ１２	Ｈｓ００１８１８２９＿ｍ１

遺伝子記号	ヒトゲノム機構（ＨＵＧＯ）遺伝子命名法	ＨＧＮＣＩＤ	遺伝子座	Ａｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓプローブＩＤ
ＦＧＦＲ１	線維芽細胞成長因子受容体１	３６８８	８ｐ１２	Ｈｓ００２４１１１１＿ｍ１
ＦＧＦＲ２	線維芽細胞成長因子受容体２	３６８９	１０ｑ２５．３－ｑ２６	Ｈｓ０１５５２９２６＿ｍ１
ＦＧＦＲ３	Ｃアイソフォーム：線維芽細胞成長因子受容体３	３６９０	４ｐ１６．３	カスタム
ＦＧＦＲ３	Ｂアイソフォーム：線維芽細胞成長因子受容体３	３６９０	４ｐ１６．３	カスタム
ＦＧＦＲ３	線維芽細胞成長因子受容体３	３６９０	４ｐ１６．３	カスタム
ＦＧＦＲ４	線維芽細胞成長因子受容体４	３６９１	５ｑ３３－ｑｔｅｒ	Ｈｓ０１１０６９０８＿ｍ１
ＦＬＴ１	ｆｍｓ関連チロシンキナーゼ１（血管内皮成長因子／血管透過性因子受容体）	３７６３	１３ｑ１２	Ｈｓ０１０５２９６１＿ｍ１
ＦＮ１	フィブロネクチン１	３７７８	２ｑ３４	Ｈｓ０１５４９９７６＿ｍ１
ＦＯＳＬ１	ＦＯＳ様抗原１	１３７１８	１１ｑ１３	Ｈｓ００７５９７７６＿ｓ１
ＦＲＳ２	線維芽細胞成長因子受容体基質２	１６９７１	１２ｑ１５	Ｈｓ００１８３６１４＿ｍ１
ＦＲＳ３	線維芽細胞成長因子受容体基質３	１６９７０	６ｐ２１．１	Ｈｓ００１８３６１０＿ｍ１
ＧＡＴＡ３	ＧＡＴＡ結合タンパク質３	４１７２	１０ｐ１５	Ｈｓ００２３１１２２＿ｍ１

遺伝子記号	ヒトゲノム機構（ＨＵＧＯ）遺伝子命名法	ＨＧＮＣＩＤ	遺伝子座	Ａｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓプローブＩＤ
ＧＬＩ１	ＧＬＩファミリー亜鉛フィンガー１	４３１７	１２ｑ１３．２－ｑ１３．３	Ｈｓ０１１１０７６６＿ｍ１
ＨＩＦ１Ａ	低酸素誘導因子１、αサブユニット（塩基性らせん－ループ－らせん転写因子）	４９１０	１４ｑ２３．２	Ｈｓ００１５３１５３＿ｍ１
ＨＰＳＥ	ヘパラナーゼ	５１６４	４ｑ２１．３	Ｈｓ００９３５０３６＿ｍ１
ＪＡＧ１	鋸歯状１	６１８８	２０ｐ１２．１－ｐ１１．２３	Ｈｓ００１６４９８２＿ｍ１
ＭＡＰ２Ｋ２	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ２	６８４２	１９ｐ１３．３	Ｈｓ００３６０９６１＿ｍ１
ＭＡＰＫ１４	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ１４	６８７６	６ｐ２１．３－ｐ２１．２	Ｈｓ００１７６２４７＿ｍ１
ＭＤＭ２	Ｍｄｍ２、ｐ５３　Ｅ３ユビキチンタンパク質リガーゼホモログ（マウス）	６９７３	１２ｑ１３－ｑ１４	Ｈｓ００２３４７５３＿ｍ１
ＭＥＴ	ｍｅｔプロト癌遺伝子（肝細胞成長因子受容体）	７０２９	７ｑ３１	カスタム
ＭＭＰ２	マトリックスメタロペプチダーゼ２（ゼラチナーゼＡ、７２ｋＤａゼラチナーゼ、７２ｋＤａ　ＩＶ型コラゲナーゼ）	７１６６	１６ｑ１３－ｑ２１	Ｈｓ０１５４８７２７＿ｍ１
ＭＭＰ９	マトリックスメタロペプチダーゼ９（ゼラチナーゼＢ、９２ｋＤａゼラチナーゼ、９２ｋＤａ　ＩＶ型コラゲナーゼ）	７１７６	２０ｑ１２－ｑ１３	Ｈｓ００２３４５７９＿ｍ１

遺伝子記号	ヒトゲノム機構（ＨＵＧＯ）遺伝子命名法	ＨＧＮＣＩＤ	遺伝子座	Ａｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓプローブＩＤ
ＭＴＯＲ	ラパマイシンの機構的標的（セリン／トレオニンキナーゼ）	３９４２	１ｐ３６	Ｈｓ００２３４５２２＿ｍ１
ＭＹＣ	ｖ－ｍｙｃ骨髄細胞腫症ウイルス癌遺伝子ホモログ（鳥類）	７５５３	８ｑ２４	Ｈｓ００９０５０３０＿ｍ１
ＮＦ１	ニューロフィブロミン１	７７６５	１７ｑ１１．２	Ｈｓ０１０３５１０８＿ｍ１
ＮＯＴＣＨ１	ノッチ１	７８８１	９ｑ３４．３	カスタム
ＮＯＴＣＨ２	ノッチ２	７８８２	１ｐ１３－ｐ１１	Ｈｓ０１０５０７０２＿ｍ１
ＰＩＫ３ＣＡ	ホスファチジルイノシトール－４，５－ビスホスフェート３－キナーゼ、触媒サブユニットα	８９７５	３ｑ２６．３	カスタム
ＰＩＫ３ＣＢ	ホスファチジルイノシトール－４，５－ビスホスフェート３－キナーゼ、触媒サブユニットβ	８９７６	３ｑ２１－ｑｔｅｒ	Ｈｓ００１７８８７２＿ｍ１
ＰＩＫ３ＩＰ１	ホスホイノシチド－３－キナーゼ相互作用タンパク質１	２４９４２	２２ｑ１２．２	Ｈｓ０１０１８２０６＿ｍ１
ＰＩＫ３Ｒ１	ホスホイノシチド－３－キナーゼ、制御サブユニット１（α）	８９７９	５ｑ１３．１	Ｈｓ００３８１４５９＿ｍ１
ＰＯＵ５Ｆ１	ＰＯＵクラス５ホメオボックス１	９２２１	６ｐ２１．３３	Ｈｓ００９９９６３２＿ｇ１
ＰＴＣＨ１	パッチ状１	９５８５	９ｑ２２．１－ｑ３１	Ｈｓ００１８１１１７＿ｍ１

遺伝子記号	ヒトゲノム機構（ＨＵＧＯ）遺伝子命名法	ＨＧＮＣＩＤ	遺伝子座	Ａｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓプローブＩＤ
ＰＴＥＮ	ホスファターゼ及びテンシンホモログ	９５８８	１０ｑ２３	Ｈｓ０２６２１２３０＿ｓ１
ＰＴＧＳ２	プロスタグランジン－エンドペルオキシド合成酵素２（プロスタグランジンＧ／Ｈ合成酵素及びシクロオキシゲナーゼ）	９６０５	１ｑ２５．２－ｑ２５．３	Ｈｓ００１５３１３３＿ｍ１
ＰＴＰ４Ａ１	タンパク質チロシンホスファターゼＩＶＡ型、メンバー１	９６３４	６ｑ１２	Ｈｓ００７４８５９１＿ｓ１
ＰＴＰＮ１	タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体１型	９６４２	２０ｑ１３．１－ｑ１３．２	Ｈｓ００１８２２６０＿ｍ１
ＲＢ１	網膜芽細胞腫１	９８８４	１３ｑ１４．２	Ｈｓ０１０７８０６６＿ｍ１
ＲＰＳ６	リボソームタンパク質Ｓ６	１０４２９	９ｐ２１	Ｈｓ０１０５８６８５＿ｇ１
Ｓ１ＰＲ１	スフィンゴシン－１－リン酸受容体１	３１６５	１ｐ２１	Ｈｓ００１７３４９９＿ｍ１
ＳＭＯ	スムーズンド、ｆｒｉｚｚｌｅｄファミリー受容体	１１１１９	７ｑ３２．１	Ｈｓ０１０９０２４２＿ｍ１
ＳＮＡＩ１	ｓｎａｉｌホモログ１（ドロソフィラ）	１１１２８	２０ｑ１３．２	Ｈｓ００１９５５９１＿ｍ１
ＳＮＡＩ２	ｓｎａｉｌホモログ２（ドロソフィラ）	１１０９４	８ｑ１１．２１	Ｈｓ００９５０３４４＿ｍ１
ＳＰ２	ハウスキーピング酵素：Ｓｐ２転写因子	１１２０７	１７ｑ２１．３－ｑ２２	カスタム

遺伝子記号	ヒトゲノム機構（ＨＵＧＯ）遺伝子命名法	ＨＧＮＣＩＤ	遺伝子座	Ａｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓプローブＩＤ
ＳＰＨＫ１	スフィンゴシンキナーゼ１	１１２４０	１７ｑ２５．２	Ｈｓ００１８４２１１＿ｍ１
ＳＰＲＹ１	ｓｐｒｏｕｔｙホモログ１、ＦＧＦシグナル伝達のアンタゴニスト（ドロソフィラ）	１１２６９	４ｑ	Ｈｓ０１０８３０３６＿ｓ１
ＳＲＣ	ｖ－ｓｒｃ肉腫（Ｓｃｈｍｉｄｔ－ＲｕｐｐｉｎＡ－２）ウイルス癌遺伝子ホモログ（鳥類）	１１２８３	２０ｑ１２－ｑ１３	Ｈｓ０１０８２２４６＿ｍ１
ＴＩＭＰ１	ＴＩＭＰメタロペプチダーゼ阻害剤１	１１８２０	Ｘｐ１１．３－ｐ１１．２３	Ｈｓ００１７１５５８＿ｍ１
ＴＩＭＰ２	ＴＩＭＰメタロペプチダーゼ阻害剤２	１１８２１	１７ｑ２５	Ｈｓ００２３４２７８＿ｍ１
ＴＰ５３	腫瘍タンパク質ｐ５３	１１９９８	１７ｐ１３．１	カスタム
ＴＰ６３	腫瘍タンパク質ｐ６３	１５９７９	３ｑ２７－ｑ２９	カスタム
ＴＰ７３	腫瘍タンパク質ｐ７３	１２００３	１ｐ３６．３	カスタム
ＴＳＣ１	結節性硬化症１	１２３６２	９ｑ３４	Ｈｓ０１０６０６４８＿ｍ１
ＴＳＣ２	結節性硬化症２	１２３６３	１６ｐ１３．３	Ｈｓ０１０２０３８７＿ｍ１
ＵＳＰ７	ユビキチン特異的ペプチダーゼ７（ヘルペスウイルス関連）	１２６３０	１６ｐ１３．３	Ｈｓ００９３１７６３＿ｍ１

遺伝子記号	ヒトゲノム機構（ＨＵＧＯ）遺伝子命名法	ＨＧＮＣＩＤ	遺伝子座	Ａｐｐｌｉｅｄ ＢｉｏｓｙｓｔｅｍｓプローブＩＤ
ＶＥＧＦＡ	血管内皮成長因子Ａ	１２６８０	６ｐ１２	Ｈｓ００９０００５５＿ｍ１
ＶＰＳ３３Ｂ	ハウスキーピング酵素：液胞タンパク質選別３３ホモログＢ	１２７１２	１５ｑ２６．１	カスタム
ＷＮＴ２	ウイングレス型ＭＭＴＶ統合部位ファミリーメンバー２	１２７８０	７ｑ３１	Ｈｓ０１１２８６５２＿ｍ１
ＺＥＢ１	亜鉛フィンガーＥ－ボックス結合ホメオボックス１	１１６４２	１０ｐ１１．２２	Ｈｓ００２３２７８３＿ｍ１
ＺＥＢ２	亜鉛フィンガーＥ－ボックス結合ホメオボックス２	１４８８１	２ｑ２２．３	Ｈｓ００２０７６９１＿ｍ１

ＨＧＮＣ＝ＨＵＧＯ遺伝子命名委員会

表２：カスタムＴＡＱＭＡＮ（登録商標）プローブ及びプライマーのオリゴヌクレオチド配列

遺伝子記号	カスタムプローブ	順方向プライマー	逆方向プライマー
ＡＣＶＲＬ１	ＣＴＧＧＣＴＧＣＡＧＡＣＣＣＧＧＴＣＣＴ（配列番号１）	ＡＧＧＴＧＧＴＧＴＧＴＧＧＡＴＣＡＧ（配列番号２）	ＣＣＧＣＡＴＣＡＴＣＴＧＡＧＣＴＡＧＧ（配列番号３）
ＢＣＬ２（αアイソフォーム）	ＴＧＣＡＣＡＣＣＴＧＧＡＴＣＣ（配列番号４）	ＣＣＴＧＴＧＧＡＴＧＡＣＴＧＡＧＴＡＣＣＴＧＡＡ（配列番号５）	ＧＧＧＣＣＧＴＡＣＡＧＴＴＣＣＡＣＡＡＡ（配列番号６）
ＢＣＬ２（βアイソフォーム）	ＡＧＧＣＴＧＧＧＴＡＧＧＴＧＣＡ（配列番号７）	ＡＣＣＴＧＣＡＣＡＣＣＴＧＧＡＴＣＣＡ（配列番号８）	ＧＣＣＣＡＧＡＣＴＣＡＣＡＴＣＡＣＣＡＡ（配列番号９）
ＢＣＬ２Ｌ１	ＣＧＧＣＴＧＧＧＡＴＡＣＴＴ（配列番号１０）	ＡＡＴＧＡＣＣＡＣＣＴＡＧＡＧＣＣＴＴＧＧＡ（配列番号１１）	ＣＴＣＧＧＣＴＧＣＴＧＣＡＴＴＧＴＴＣ（配列番号１２）
ＢＩＤ	ＡＧＡＧＧＣＡＧＡＴＴＣＴＧ（配列番号１３）	ＣＡＣＴＣＣＣＧＣＴＴＧＧＧＡＡＧＡＡ（配列番号１４）	ＣＣＴＧＧＣＡＡＴＡＴＴＣＣＧＧＡＴＧＡ（配列番号１５）
ＥＲＢＢ２	ＴＴＴＧＧＡＣＣＧＧＡＧＧＣＴＧ（配列番号１６）	ＧＡＧＴＧＴＣＡＧＣＣＣＣＡＧＡＡＴＧＧ（配列番号１７）	ＧＴＧＧＧＣＡＣＡＧＧＣＣＡＣＡＣＡ（配列番号１８）
ＦＧＦＲ３（Ｃアイソフォーム）	ＴＴＡＧＣＧＣＣＣＧＣＣＧＴＣＴＴＧＡＧ（配列番号１９）	ＧＡＣＧＧＣＡＣＡＣＣＣＴＡＣＧＴＴＡＣ（配列番号２０）	ＴＣＴＡＧＣＴＣＣＴＴＧＴＣＧＧＴＧＧＴ（配列番号２１）

遺伝子記号	カスタムプローブ	順方向プライマー	逆方向プライマー
FGFR3（Bアイソフォーム）	CGTCCCGCTCCGACACATTG（配列番号２２）	CTCAAGTCCTGGATCAGTGAGA（配列番号２３）	GGTGGCTCGACAGAGGTACT（配列番号２４）
FGFR3	CCTCGGGAGATGAC（配列番号２５）	ACTTCAGTGTGCGGGTGACA（配列番号２６）	CCTCGTCCTCCCCGTCTT（配列番号２７）
MET	TGTCTGCCTGCAATC（配列番号２８）	CGGGACATGGACTCAACAGA（配列番号２９）	TGCACTATTTGGGAAAACCTTGT（配列番号３０）
NOTCH1	TCTGCATGCCCGGCTACGAG（配列番号３１）	CACCTGCCTGGACCAGAT（配列番号３２）	GTCTGTGTTGACCTCGCAGT（配列番号３３）
PIK3CA	TTCGACACTCTTCAAGCCTGA（配列番号３４）	CCCTGCTCATCAACTAGGAAACC（配列番号３５）	CAATTCAACCACAGTGGCCTTTT（配列番号３６）
SP2	TGGAGCAGCTTCCT（配列番号３７）	GGCTCGAGACCAGCTCATCTA（配列番号３８）	GAGATCTGCCTCAATGAATAAATCC（配列番号３９）
TP53	CAGATAGCGATGGTCTG（配列番号４０）	GCTGCCCCCCACCATGAG（配列番号４１）	CCTTCCACTCGGATAAGATGCT（配列番号４２）
TP63	ACCTGGACGTATTCC（配列番号４３）	GTCGAGCACCGCCAAGTC（配列番号４４）	GCAATTTGGCAGTAGAGTTCTTCA（配列番号４５）
TP73	CTGGACGTACTCCC（配列番号４６）	CCAGCACGGCCAAGTCA（配列番号４７）	CTTGGCGATCTGGCAGTAGAG（配列番号４８）

遺伝子記号	カスタムプローブ	順方向プライマー	逆方向プライマー
ＶＰＳ３３Ｂ	ＡＧＡＡＧＡＧＧＴＣＴＧＧＡＧＡＧＣ（配列番号４９）	ＣＣＴＧＣＡＣＧＴＧＴＣＣＣＡＡＣＴＧ（配列番号５０）	ＧＧＣＡＣＡＣＧＴＧＣＴＴＣＴＴＣＴＴＧ（配列番号５１）

【０２１１】

突然変異解析及び次世代シーケンシング

突然変異解析は、ＥＮＶＩＲＥＮＥ（商標）による脱パラフィン化後に、ＱＩＡＡＭＰ（登録商標）ＦＦＰＥキット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）を使用してマクロ切開されたＦＦＰＥ組織から抽出されたゲノムＤＮＡ上で実行した（Ｓｃｈｌｅｉｆｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　９（３）：ｅ９０７６１）。ＰＩＫ３ＣＡ、ＥＧＦＲ、ＫＲＡＳ、ＮＲＡＳ、ＨＲＡＳ、ＦＧＦＲ３、ＭＥＴ、ＢＲＡＦ、ＫＩＴ、ＡＫＴ１、ＦＬＴ３における突然変異は、前述される通り、突然変異特異的ｑＰＣＲを使用して検出した（Ｓｃｈｌｅｉｆｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　９（３）：ｅ９０７６１）。次世代シーケンシング（ＮＧＳ）は、ＩＯＮ　ＡＭＰＬＩＳＥＱ（商標）癌ホットスポットパネルｖ２（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用するＩＯＮ　ＴＯＲＲＥＮＴ（商標）次世代シーケンシングを使用し、製造元のガイドラインに従って実行した（例えば、Ｔｓｏｎｇａｌｉｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｌａｂ．Ｍｅｄ．５２（５）：７０７－７１４，２０１４を参照されたい）。表３は、膀胱癌試料（ＷＴ、野生型；ＭＵＴ、突然変異体）のＮＧＳ突然変異解析の結果の要約を示す。

表３：膀胱癌試料のＮＧＳ突然変異解析

試料ＩＤ	遺伝子	ＮＧＳコール	ＮＧＳ突然変異
ＨＰ－３２２７８	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｈ１０４７Ｒ
ＨＰ－３２２７８	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｙ３７３Ｃ
ＨＰ－４４２３６	ＥＲＢＢ２	ＭＵＴ	Ｖ８４２Ｉ
ＨＰ－４４２４２	ＫＲＡＳ	ＭＵＴ	Ｇ１２Ｄ
ＨＰ－５０３３０	ＶＨＬ	ＭＵＴ	Ｐ８６Ｓ
ＨＰ－５０３３１	ＶＨＬ	ＭＵＴ	Ｐ８６Ｓ
ＨＰ－５０３３２	ＫＲＡＳ	ＭＵＴ	Ｇ１２Ａ
ＨＰ－５０３３５	ＦＧＦＲ３	ＷＴ	
ＨＰ－５０３３６	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０３３７	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０６８４	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０６８５	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｑ５４６Ｒ
ＨＰ－５０６８５	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０６８６	ＦＧＦＲ３	ＷＴ	
ＨＰ－５０６８６	ＥＧＦＲ	ＭＵＴ	Ｇ７２１Ｓ
ＨＰ－５０６８６	ＶＨＬ	ＭＵＴ	Ｐ８１Ｓ　Ｑ９６＊
ＨＰ－５０６８６	ＫＲＡＳ	ＮＣ	ＮＣ
ＨＰ－５０６８８	ＦＧＦＲ３	ＷＴ	
ＨＰ－５０６９９	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０６９９	ＥＧＦＲ	ＭＵＴ	Ｇ７３５Ｓ　Ａ７６７Ｖ

試料ＩＤ	遺伝子	ＮＧＳコール	ＮＧＳ突然変異
ＨＰ－５０６９９	ＥＲＢＢ４	ＭＵＴ	Ｓ３４１Ｌ
ＨＰ－５０７０７	ＦＧＦＲ３	ＷＴ	
ＨＰ－５０７０７	ＥＧＦＲ	ＭＵＴ	Ａ６９８Ｔ
ＨＰ－５０７１３	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０７１３	ＥＧＦＲ	ＭＵＴ	Ｒ１０８Ｋ
ＨＰ－５０７１３	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｔ１０２５Ｔ
ＨＰ－５０７１４	ＦＧＦＲ３	ＷＴ	
ＨＰ－５０７１５	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｒ２４８Ｃ
ＨＰ－５０７１５	ＥＧＦＲ	ＭＵＴ	Ｈ８７０Ｙ
ＨＰ－５０７１５	ＶＨＬ	ＭＵＴ	Ｗ８８＊
ＨＰ－５０７１５	ＫＲＡＳ	ＭＵＴ	Ｇ１２Ｄ
ＨＰ－５０７２２	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｅ５４２Ｋ
ＨＰ－５０７２２	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｒ２４８Ｃ
ＨＰ－５０７２７	ＫＲＡＳ	ＭＵＴ	Ｇ１３Ｄ
ＨＰ－５０７２８	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｒ８８Ｑ
ＨＰ－５０７３７	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｈ１０４７Ｒ
ＨＰ－５０７３７	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｒ２４８Ｃ
ＨＰ－５０７３７	ＫＲＡＳ	ＷＴ	
ＨＰ－５０７３７	ＶＨＬ	ＭＵＴ	Ｑ９６＊
ＨＰ－５０７４２	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｙ３７３Ｃ

試料ＩＤ	遺伝子	ＮＧＳコール	ＮＧＳ突然変異
ＨＰ－５０８８５	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｒ２４８Ｃ
ＨＰ－５０８８８	ＨＲＡＳ	ＭＵＴ	Ｑ６１Ｒ
ＨＰ－５０８９２	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｙ３７３Ｃ
ＨＰ－５０８９３	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｅ５４５Ｋ
ＨＰ－５０８９３	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｇ３７０Ｃ
ＨＰ－５０８９４	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｇ３７０Ｃ
ＨＰ－５０９００	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｈ１０４７Ｒ
ＨＰ－５０９００	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０９０６	ＨＲＡＳ	ＭＵＴ	Ｑ６１Ｋ
ＨＰ－５０９０７	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｙ３７３Ｃ
ＨＰ－５０９０８	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｅ５４２Ｋ
ＨＰ－５０９１２	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０９１４	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０９１８	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｒ２４８Ｃ
ＨＰ－５０９２０	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０９２２	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ３７１Ｃ
ＨＰ－５０９２３	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｅ５４５Ｋ
ＨＰ－５０９２３	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０９２７	ＦＧＦＲ３	ＷＴ	
ＨＰ－５０９２７	ＩＤＨ２	ＭＵＴ	Ｒ１４０Ｗ

試料ＩＤ	遺伝子	ＮＧＳコール	ＮＧＳ突然変異
ＨＰ－５０９２８	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｇ３７０Ｃ
ＨＰ－５０９３６	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０９４２	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｅ５４２Ｋ
ＨＰ－５０９４２	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５０９４２	ＫＲＡＳ	ＭＵＴ	Ｇ１２Ｖ
ＨＰ－５０９４９	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５１２２３	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｙ３７３Ｃ
ＨＰ－５１２２３	ＩＤＨ２	ＭＵＴ	Ｇ１７１Ｄ
ＨＰ－５１２２３	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｅ５４５Ｋ
ＨＰ－５１２２７	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｓ２４９Ｃ
ＨＰ－５１２２７	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｅ５４２Ｋ
ＨＰ－５１２２７	ＩＤＨ２	ＭＵＴ	Ｇ１７１Ｄ
ＨＰ－５１９３０	ＦＧＦＲ３	ＭＵＴ	Ｋ６５０Ｅ
ＨＰ－５２７１０	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｋ１１１Ｅ
ＨＰ－５２７１５	ＦＧＦＲ３	ＷＴ	
ＨＰ－５２７１６	ＦＧＦＲ３	ＷＴ	
ＨＰ－５２７１７	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｅ５４５Ｋ
ＨＰ－５２７２４	ＰＩＫ３ＣＡ	ＭＵＴ	Ｒ１０８Ｈ
ＨＰ－５２７２４	ＶＨＬ	ＭＵＴ	Ｗ１１７＊　Ｃ１６２Ｙ　Ｑ１６４＊

【０２１２】

ＦＧＦＲ３免疫組織化学

免疫組織化学（ＩＨＣ）は、Ｖｅｎｔａｎａ　ＤＩＳＣＯＶＥＲＹ（登録商標）ＸＴ自動染色器プラットフォーム（Ｖｅｎｔａｎａ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ，Ｔｕｃｓｏｎ，ＡＺ）を使用して、厚さ４μｍのＦＦＰＥ組織断片上で行った。ＦＧＦＲ３の検出の場合、スライドは、ＣＣ１伸長された抗原抽出に続いて、抗ＦＧＦＲ３、１

μｇ／ｍＬに希釈されたクローン１５Ｃ３（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）一次抗体での染色を用いる前処置を受け、室温で６０分間インキュベートされた。ＦＧＦＲ３シグナルの増幅の場合、複合されていないウサギ抗マウスリンカー抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｗｅｓｔ Ｇｒｏｖｅ，ＰＡ）を、１μｇ／ｍＬで適用し、室温で３２分間インキュベートした。これに続いて、抗ウサギＯＭＮＩＭＡＰ（商標）西洋わさびペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）キット（Ｖｅｎｔａｎａ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ Ｉｎｃ，Ｔｕｃｓｏｎ，ＡＺ）を用いた。

【０２１３】

断片をヘマトキシリンで対染色し、脱水し、清澄化して、見るためにカバーガラスを置いた。

【０２１４】

細胞株生存性研究

膀胱癌細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ＡＴＣＣ，Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡ）から、またはＤｅｕｔｓｃｈｅ Ｓａｍｍｌｕｎｇ ｖｏｎ Ｍｉｋｒｏｏｒｇａｎｉｓｍｅｎ ｕｎｄ Ｚｅｌｌｋｕｌｔｕｒｅｎ ＧｍｂＨ（ＤＳＭＺ，Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）から入手した。細胞株は、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ細胞バンクにおける早期部分に記録保管され、多重短タンデム反復アッセイによるか、または前述の通りのいずれかで認証された（Ｏ′Ｂｒｉｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１６（１４）：３６７０－３６８３，２０１０）。全ての細胞株は、１０％胎仔血清（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）、非必須アミノ酸、及び２ｍｍｏｌ／Ｌ Ｌ－グルタミンで補充されたＲＰＭＩ １６４０またはＤＭＥＭ中で維持した。

【０２１５】

エルロチニブ（ＴＡＲＣＥＶＡ（商標））は、ＥＧＦＲの選択的かつ有能な阻害剤である。その構造、選択性、及び生物学的特性の詳細は、以前に説明されている（Ｓｔａｍｏｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７（４８）：４６２６５－４６２７２，２００２）。細胞生存性研究は、前述の通り行った（Ｏ′Ｂｒｉｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１６（１４）：３６７０－３６８３，２０１０）。正常な成長培地内の３８４ウェルプレートにおいて、１ウェル当たり２，５００細胞の密度で４回細胞をプレートに置き、終夜接着させた。エルロチニブ用量応答は、５μＭ用量から開始して、３倍希釈シリーズに基づき、１０の濃度で処理することによって決定した。細胞生存性は、７２時間後に、ＣＥＬＬＴＩＴＥＲ－ＧＬＯ（登録商標）蛍光細胞生存性アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を使用して測定した。各濃度での生存率は、ＤＭＳＯのみで処理された対照と比較して計算した。

【０２１６】

統計解析

組織試料クラスタ（下位群）を特定するために、ユークリッド距離及び完全連結法を使用して、無監督の階層クラスタリングを行った。ノンパラメトリック・マン・ホイットニー検定（例えば、Ｍａｎｎ ａｎｄ Ｗｈｉｔｎｅｙ，Ａｎｎａｌｓ ｏｆ Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃａｌ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ １８（１）：５０－６０，１９４７を参照されたい）、及びボンフェローニ補正（例えば、Ｂｏｎｆｅｒｒｏｎｉ，Ｐｕｂｂｌｉｃａｚｉｏｎｉ ｄｅｌ Ｒ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｏ Ｓｕｐｅｒｉｏｒｅ ｄｉ Ｓｃｉｅｎｚｅ Ｅｃｏｎｏｍｉｃｈｅ ｅ Ｃｏｍｍｅｒｃｉａｌｉ ｄｉ Ｆｉｒｅｎｚｅ ８：３－６２，１９３６、及びＭｉｌｌｅｒ，Ｓｉｍｕｌｔａｎｅｏｕｓ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ｉｎｆｅｒｅｎｃｅ，２ｎｄ Ｅｄ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｖｅｒｌａｇ，ｐａｇｅｓ ６－８，１９８１を参照されたい）を適用して、膀胱試料クラスタの中で差次的に発現された遺伝子を更に特定した。ＤＦＳは、手術日から再発または死亡日までの時間として定義した。ＯＳは、手術日から死亡日までの時間として同様に定義した。生存転帰は、患者が無再発であるか（ＤＦＳの場合）、または生存であるか（ＯＳの場合）が分かった最新の観察時点で打ち切られた。カプラン・マイヤー推定（例えば、Ｋａｐｌａｎ

ａｎｄ Ｍｅｉｅｒ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ａｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ５３（２８２）：４５７－４８１，１９５８を参照されたい）を使用して、ＤＦＳ可能性及び生存可能性を経時的に推定した。３年及び５年ＤＦＳ率及び生存率もまた、カプラン・マイヤーＤＦＳ／ＯＳ曲線推定から計算した。クラスタ間の差次的突然変異頻度の有意性に関して、フィッシャーの直接検定を行った。フィッシャーの直接検定（例えば、Ｆｉｓｈｅｒ，Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｔｈｅ Ｒｏｙａｌ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ｓｏｃｉｅｔｙ ８５（１）：８７－９４，１９２２を参照されたい）及び両側Ｔ検定（例えば、Ｓｔｕｄｅｎｔ，Ｂｉｏｍｅｔｒｉｋａ ６（１）：１－２５，１９０８を参照されたい）を、統計比較に関して示される通り使用した。

【０２１７】

実施例２：カスタムマイクロフルイディクス膀胱癌遺伝子発現パネルの開発及びアーカイブ膀胱癌臨床試料を階層化することにおけるその適用

ゲノム解析が、膀胱癌の分子的基礎に関する価値ある洞察を提供したが、以前の研究の大半は、高品質の核酸を産生し、一般に臨床治験からのアーカイブ標本の特徴付けには十分に適していない冷凍組織の使用に依存する。しかしながら、臨床治験からのアーカイブ標本は、多くの場合、付随する治療情報、無疾患生存（ＤＦＳ）及び全生存（ＯＳ）情報、ならびにそれらを癌ゲノム解析のための優れたプラットフォームにする他の情報と関連付けられる。ここで、我々は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織の解析のために最適化されたマイクロフルイディクスに基づく膀胱癌遺伝子発現パネルを開発した。カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルは、膀胱癌生物学の重要な属性を捕捉するように選択された９６の遺伝子からなる（表１を参照されたい）。表１に記載されるカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルは、９１の固有の膀胱癌関連遺伝子と共に、データ品質制御及び正規化のための２つのハウスキーピング遺伝子を含む（図１２Ａを参照されたい）。

【０２１８】

カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルが、大きな一般に入手可能なデータセットにおいて膀胱癌サブタイプを良好に特定する能力を評価した（Ｓｊｏｄａｈｌ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１８（１２）：３３７７－３３８６，２０１２）。Ｓｊｏｄａｈｌら（上記）からの１８，０００遺伝子の発現に基づく主成分解析（ＰＣＡ）プロットと、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルからの８２重複遺伝子を使用するＰＣＡプロットとの比較は、試料分離の比較パターンを示した（図２Ａ～２Ｂ）。次に、対角線形判別解析（ＤＬＤＡ）解析（Ｄｉａｚ－Ｕｒｉａｒｔｅ ｅｔ ａｌ．ＢＭＣ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ７：３，２００６）を行い、Ｓｊｏｄａｈｌ研究から膀胱癌を正確に分類することにおける当パネルの精度を評価した。Ｓｊｏｄａｈｌら（上記）からの１８０００遺伝子のうちの約２００が、それらの研究において報告された大部分のサブタイプを８０％超の精度で正確に分類する必要があることを見出した（図２Ｃ）。比較において、膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルからわずか２０遺伝子のみが、Ｓｊｏｄａｈｌデータセットを８０％超の精度で正確に分類した（図２Ｄ）。これは、パネル上の慎重に選択された遺伝子が、疾患の重要な転写クラスを高い精度で捕捉することを示した。

【０２１９】

ＦＦＰＥ試料中の遺伝子発現を測定することにおけるカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルの頑強性及び再現性を確認するために、一連の品質制御実験を行った（図３Ａ～３Ｅ）。第１に、連続希釈を行って、９６アッセイの各々の性能を評価し、必要に応じて、アッセイを再設計して、全ての検査に関する線形標準希釈曲線を得た（図３Ａ及び３Ｂ）。第２に、ＦＦＰＥ由来のＲＮＡ試料のセットを実行し、異なる日に実行された複製試料に関する結果において高い一致を観察した（図３Ｃ及び３Ｄ；R^2＞０．９８）。第３に、各々７回の独立ランに含めた対照ＲＮＡ試料に関する高度のチップ・トゥ・チップデータ再現性を認めた（図３Ｅ；R^2＞０．９２）。まとめると、我々の定性的及び定量的評価からの結果は、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルが、転写的に定義された膀胱癌に対して頑強かつ生物学的に関連するプラットフォームを提供することを示す。

【０２２０】
２０４のＦＦＰＥ膀胱癌組織のセットの解析において、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルを用いた（実施例１及び図１を参照されたい）。Ｆｌｕｉｄｉｇｍ遺伝子発現データの無監督の階層解析は、明確なＤＦＳ可能性と関連付けられた５つの転写的に定義された膀胱癌組織クラスタを明らかにした（図４Ａ～４Ｆ、図５Ａ及び５Ｃ）。組織クラスタリングを駆動するのは、線維芽細胞成長因子（ＦＧＦＲ）及び上皮成長因子（ＥＧＦ）経路メンバー等の受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）シグナル伝達遺伝子を含む共制御された遺伝子、腫瘍抑制遺伝子ＴＰ５３を含むアポトーシス遺伝子、ならびに上皮間葉転換（ＥＭＴ）遺伝子（図５Ｂ）の５つの主要な群であった。

【０２２１】
３つの主要な組織クラスタは、患者試料の大半を含んでいたためそれらに注目し、これ以降それらを緑色群、黄色群、及び赤色群と称する（図４Ａ）。カプラン・マイヤー解析は、赤色群が、黄色群より良好なＤＦＳ可能性と関連付けられたことを明らかにし（図４Ｂ；ＨＲ＝０．５４、Ｐ＝０．０３）、黄色群は、緑色群より著しく良好なＤＦＳプロファイルを有していた（図４Ｂ；ＨＲ＝０．２９、Ｐ＝０．００４）。膀胱癌組織像と患者転帰との十分に確立された関連を考慮して（Ｎａｒｇｕｎｄ　ｅｔ　ａｌ．Ｓｅｍｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．３９（５）：５５９－５７２，２０１２、Ｒｅｓｎｉｃｋ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２５（３）：２８１－２８８，２０１３）、次に緑色、赤色、及び黄色組織群の組織病理学的属性を調べた。予想通り、最良のＤＦＳプロファイルと関連付けられた赤色群の試料の大半は、ＮＭＩＢＣ組織像であることを観察した（図４Ｂ及び４Ｃ、図６Ａ～Ｄ）。黄色群は、赤色群よりも著しく高い割合のＭＩＢＣ症例からなり、監督下解析のいかなる必要性もなしに、転移症例を排他的にこの群にクラスタ化した（図４Ｃ）。

【０２２２】
驚くべきことに、最悪のＤＦＳ可能性と関連付けられた緑色群は、典型的に非侵攻性のＮＭＩＢＣ組織像の試料からほぼ全体的に構成される（図４Ｂ及び４Ｃ、図６Ａ～Ｄ）。これは、カスタムＦｌｕｉｄｉｇｍパネルが、綿密な臨床モニタリング及び治療的介入から利益を享受し得る、急速に再発するＮＭＩＢＣを有する患者の群を特定したことを示唆する驚くべき観察であった。緑色群が、侵攻性の組織学的変型を表し得る可能性を除外するために、緑色群、赤色群、及び黄色群からの組織の包括的試験を行った（例えば、図４Ｄ及び４Ｅを参照されたい）。予想通り、ＮＭＩＢＣ赤色群と比較して、ＭＩＢＣ及び転移性黄色群において前侵襲性微小乳頭組織像の著しく高い発症率が見られた（図４Ｄ；Ｐ＝０．００６３、図６Ａ～６Ｄ）。しかしながら、赤色群と比較して、侵襲性ＮＭＩＢＣ緑色群の微小乳頭組織像の発症率において統計的に有意な差を観察しなかった（図４Ｄ；Ｐ＝０．２３５１、図６Ａ～６Ｄ）。３つの組織群において、膀胱癌患者の臨床転帰と関連付けられることが報告された免疫浸潤も調べたが（Ｏｔｔｏ　ｅｔ　ａｌ．Ｗｏｒｌｄ　Ｊ．Ｕｒｏｌ．３０（６）：８７５－８７７，２０１２）、それらの間に有意差は認められなかった（図４Ｅ）。緑色群及び赤色群に属する試料の腫瘍病期及び悪性度に有意差はなかった。したがって、転写的に定義された緑色群は、好ましい転帰の赤色群とは組織学的に異なる疾患サブタイプを表すとは思われない。

【０２２３】
次に、緑色群において観察された急速な疾患再発が、この患者集団の不適切な治療に起因し得るかどうかを決定した。３つの転写的に定義された群において、カルメット・ゲラン桿菌（ＢＣＧ）ワクチン、化学療法、または放射線、ならびにそれらの組み合わせによる治療の頻度を調べた（図４Ｆ）。治療を受けたＮＭＩＢＣ赤色群及び侵襲性／転移性黄色群からの患者の比較分率（＞６０％）（図４Ｆ；Ｐ＝０．８８３６）。急速に再発するＮＭＩＢＣ緑色群の患者は、赤色群及び黄色群の両方よりも著しく高い割合で治療された（図４Ｆ；両方の比較の場合、Ｐ＜０．０００１）。これらの結果は、緑色群からの急速な再発例が不適切な補助剤治療に起因しなかったこと、及びこのＮＭＩＢＣサブタイプからの侵襲性腫瘍の分子的駆動因子が存在し得ることを示した。

【０２２４】
したがって、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルは、アーカイブ膀胱癌組織を定義するための頑強なプラットフォームを提供する。このパネルに関する臨床的に注解された膀胱癌試料の組の解析は、不良なＤＦＳ可能性と関連付けられたＮＭＩＢＣ緑色群を含む３つの転写的に別個の膀胱癌サブタイプを明らかにした。
【０２２５】
実施例３：ＦＧＦＲ３は、急速に再発するＮＭＩＢＣにおいて高頻度突然変異及び過剰発現され、浸潤性及び転移性腫瘍のサブセットにおける高発現は、不良な臨床転帰と関連付けられる。
ＮＭＩＢＣの特徴的機能のうちの１つは、それらが、症例の約６０～７０％において線維芽細胞成長因子受容体３（ＦＧＦＲ３）に体細胞活性化突然変異を担持することである（ｖａｎ Ｒｈｉｊｎ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．１９８（２）：２４５－２５１、Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．２１３（１）：９１－９８，２００７、Ｍａｒｔｉｎｅｚ－Ｔｏｒｒｅｃｕａｄｒａｄａ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１１（１７）：６２８０－６２９０，２００５、Ｋｏｍｐｉｅｒ ｅｔ ａｌ．ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ５（１１）：ｅ１３８２１，２０１０、Ｊｕａｎｐｅｒｅ ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ．Ｐａｔｈｏｌ．４３（１０）：１５７３－１５８２，２０１２、Ｇｕｓｔ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ．１２（７）：１２４５－１２５４，２０１３、Ｃａｐｐｅｌｌｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．２３（１）：１８－２０，１９９９、Ａｈ－Ａｈｍａｄｉｅ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．２２４（２）：２７０－２７９，２０１１）。ＦＧＦＲ３突然変異の大半は、細胞外または膜近傍ドメイン内のミスセンス置換であり、リガンド独立型受容体二量体化及び後次の活性化につながる（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．上記、Ｃａｐｐｅｌｌｅｎ ｅｔ ａｌ．上記）。侵襲性及び転移性疾患におけるＦＧＦＲ３における突然変異頻度が、１１～１６％に低下するという事実は、ＦＧＦＲ３が進行した疾患において腫瘍化を駆動し続けるかどうか、またはその腫瘍化の役割が、膀胱癌発達の早期にほぼ限定されるかどうかに関する不確実性につながった（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．上記、Ａｌ－Ａｈｍａｄｉｅ ｅｔ ａｌ．上記、Ｑｉｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１９（５）：１２１６－１２２９，２００９、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅｔ．Ｍｏｌ．Ｒｅｓ．１３（１）：１１０９－１１２０，２０１４）。
【０２２６】
既知のＦＧＦＲ３突然変異の大半を捕捉したカスタム多重ＰＣＲパネルを使用して、ＦＧＦＲ３の突然変異状態を評価した（Ｓｃｈｌｅｉｆｍａｎ ｅｔ ａｌ．ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ９（３）：ｅ９０７６１）。赤色群のＮＭＩＢＣ試料の解析は、約６０％の予想されたＦＧＦＲ３突然変異の頻度が、期待通り、ＭＩＢＣ及び転移性黄色群の試料が、約１５％の著しく低いＦＧＦＲ突然変異の頻度を示したことを明らかにした（図７Ａ）。ＦＧＦＲ３の突然変異は、より高いＦＧＦＲ３の発現レベルを駆動することが報告された（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎら、上記）。これらの報告と一致して、転写及びタンパク質レベルの両方に関して野生型試料と比較して、突然変異体内の著しく高いＦＧＦＲ３発現レベルを検出した（図７Ｂ及び７Ｃ；両方の比較の場合、Ｐ＜０．０００１）。我々は、緑色群のＦＧＦＲ３突然変異の高頻度の存在が、それがＮＭＩＢＣサブタイプに属することの更なる確認であり得ると納得した。実際に、急速に再発するＮＭＩＢＣ緑色群において頻繁なＦＧＦＲ３突然変異を観察した（図７Ａ）。しかしながら、驚くべきことに、緑色群からの試料の大半は、ＮＭＩＢＣ赤色群において観察されるものよりも著しく高い頻度で、ＦＧＦＲ３に突然変異を内包していた（図７Ａ及び７Ｄ；Ｐ＜０．０００１）。緑色群における高頻度ＦＧＦＲ３突然変異は、転写（図７Ｅ；両方の比較の場合、Ｐ＜０．０００１）及びタンパク質レベル（図７Ｆ；緑色対赤色の場合、Ｐ＝０．０３４３、及び赤色対黄色の場合、Ｐ＜０．０００１）の両方に関してＮＭＩＢＣ赤色群及び侵襲性／転移性黄色群よりも著しく高いＦＧＦＲ発現と関連付けられた。
【０２２７】

上記のデータは、ＦＧＦＲ３発現の高頻度突然変異及び同時過剰発現が、急速に再発するＮＭＩＢＣと相関することを示す。ＦＧＦＲ３は、疾患の後期に癌駆動因子として作用し続ける場合、次いで、上昇したＦＧＦＲ３発現は、少なくとも症例のサブセットにおいて、膀胱癌発達中に維持されるべきである。これがその例であったかどうかを決定するために、ＲＮＡ及びタンパク質両方のレベルにおいて、ＦＧＦＲ３の発現レベルを調べ、ＮＭＩＢＣの６６％が、免疫組織化学（ＩＨＣ）によって決定される通り、高レベルのＦＧＦＲ３を発現したことを見出した（図７Ｇ）。高いＦＧＦＲ３発現例の発症率が、ＭＩＢＣ及び膀胱癌転移において低減されたが、これらのより進行した病期の腫瘍の３０％超が、ＦＧＦＲ３の高い発現レベルを維持し（図７Ｇ、ＩＨＣスコア２＋／３＋）、進行した疾患におけるＦＧＦＲ３の継続的要件と一致する。

【０２２８】

当研究の全体膀胱癌群において、高ＦＧＦＲ３発現例に関して好ましいＤＦＳ及びＯＳ生存可能性を観察し、これは、以前に公開された報告と一致する（Ｓｊｏｄａｈｌ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１８（１２）：３３７７－３３８６，２０１２、Ｄｙｒｓｋｊｏｔ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．３３（１）：９０－９６，２００３、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ ９：３，２０１０）。しかしながら、想定外に、ＭＩＢＣ及び転移性状況の両方における高いＦＧＦＲ３発現は、減少した３年及び５年ＤＦＳ可能性と関連付けられた（図７Ｈ）。更に、当試料シリーズにおいて進行した疾患（ＭＩＢＣ及び転移性膀胱癌）における高いＦＧＦＲ３発現は、低減した３年及び５年ＯＳ可能性に関連していた（図７Ｉ）。これらの観察を検証するために、ＦＧＦＲ３発現及びＯＳデータの両方を提供したいくつかの公開データセットを調べた（Ｓｊｏｄａｈｌ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１８（１２）：３３７７－３３８６，２０１２、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ ９：３，２０１０）。高レベルのＦＧＦＲ３は、当データセットにおける観察と同様に、それら２つの研究において、全体集団で良好な予後を付与したが、上記のＫｉｍらによる研究からの低いＦＧＦＲ３発現侵襲性／転移性膀胱癌と比較して高い、著しく不良なＯＳ可能性を認め、故に我々の見出に関する独立した確認を提供する（図７Ｊ）。Ｓｊｏｄａｈｌら（上記）による研究から、進行した病期の低ＦＧＦＲ３腫瘍に対して、高ＦＧＦＲ３腫瘍における不良なＯＳの傾向も観察した。

【０２２９】

まとめると、これらのデータは、ＦＧＦＲ３の急速に再発するＮＭＩＢＣの駆動因子として、ならびに浸潤性（ＭＩＢＣ）及び転移性状況における侵襲性疾患の促進因子としての役割を支持する。いくつかの研究は、ＦＧＦＲ３の阻害が、高ＦＧＦＲ３発現膀胱癌の腫瘍成長を、インビトロ及びインビボで抑制することを明示した（Ｍａｒｔｉｎｅｚ－Ｔｏｒｒｅｃｕａｄｒａｄａ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１１（１７）：６２８０－６２９０，２００５、Ｇｕｓｔ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒ．１２（７）：１２４５－１２５４，２０１３、Ｑｉｎｇ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１１９（５）：１２１６－１２２９，２００９、Ｇｏｍｅｚ－Ｒｏｍａｎ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１１（２ Ｐｔ １）：４５９－４６５，２００５、Ｌａｍｏｎｔ ｅｔ ａｌ．Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ １０４（１）７５－８２，２０１１、Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ２６（４０）：５８８９－５８９９，２００７）。したがって、癌が高ＦＧＦＲ３を発現する、高リスク膀胱癌患者（例えば、急速に再発するＮＭＩＢＣ、ＭＩＢＣ、または転移性膀胱癌を有する患者）は、ＦＧＦＲ３アンタゴニストでの治療の良好な候補を表す。

【０２３０】

実施例４：腫瘍抑制因子ＴＰ５３は、急速に再発するＮＭＩＢＣにおいて、突然変異され、過剰発現される。

カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルは、ＮＭＩＢＣの転写的に定義された侵襲性サブセットを特定した。比較発現解析は、４５／９６遺伝子（４７％）が、急速に再発するＮＭＩＢＣ緑色群と、より良性の赤色群との間で著しく差次的に発現されたことを示した

（Ｐ＜０．０５、多重試験補正を伴う）。差次的に発現された遺伝子は、上記の通り、ＦＧＦＲ３経路に属し、また腫瘍抑制因子ＴＰ５３、鳥類の赤芽球症発癌遺伝子Ｂ（ＥＲＢＢ）、上皮間葉転換（ＥＭＴ）、ホスファチジルイノシトール－３－キナーゼ、及びタンパク質キナーゼＢ（ＰＩ３Ｋ－ＡＫＴ）経路にも属する（図８）。

【０２３１】

突然変異レベルで当試料を更に特徴付けるために、ＮＧＳ解析を行った（Ｔｓｏｎｇａｌｉｓ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｌａｂ．Ｍｅｄ．５２（５）：７０７－７１４，２０１４）。予想通り、ＮＧＳデータは、上記のＦＧＦＲ３突然変異の存在を確認し、図７Ａに提示される（図９Ａ、表３）。追加として、ＮＧＳ解析は、特にＴＰ５３、ＰＩＫ３ＣＡ、ＫＲＡＳ、ＶＨＬ、ＥＧＦＲ、ＰＴＥＮ、及びＩＤＨ２を含むいくつかの他の遺伝子における突然変異を明らかにした（図９Ａ、表３）。ＴＰ５３における突然変異は、浸潤性及び転移性膀胱癌において、またより低い程度で表層疾患において報告されてきた（Ｇｅｏｒｇｅ　ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２５（３４）：５３５２－５３５８，２００７）。侵襲性／転移性黄色群、及びより少ないＮＭＩＢＣ赤色群において、ＴＰ５３突然変異の存在を認めた（図９Ａ）。しかしながら、驚くべきことに、急速に再発するＮＭＩＢＣ緑色群において、高頻度のＴＰ５３突然変異を観察した（図９Ａ）。３例を除く全ての症例において、ＴＰ５３のＤＮＡ結合ドメインにマップされた突然変異、及び黄色群、赤色群、緑色群の各々におけるＴＰ５３突然変異部位は、ほとんど重複していなかった（図９Ｂ）。

【０２３２】

ＴＰ５３における突然変異が、緑色群において観察された不良なＤＦＳ可能性に寄与し得ると仮定した。これと一致して、我々は、赤色群と比較して急速に再発する緑色群のＮＭＩＢＣにおいて、著しく高い頻度のＴＰ５３突然変異を認めたが、侵襲性／転移性黄色群において観察されたものとは統計的に異なっていた（図９Ｃ；それぞれＰ＝０．０３及びＰ＝０．３６０５）。ＴＰ５３の発現レベルはまた、赤色群及び黄色群よりも緑色群において著しく高かった（図９Ｄ；それぞれＰ＝０．０１８７及びＰ＝０．００２）。ＴＰ５３転写標的ｐ２１の発現レベルもまた、他の２つの群と比較して、緑色群において著しく高く、ＴＰ５３の増加した発現レベルを更に確認する（図９Ｅ、両方の比較の場合、Ｐ＜０．０００１）。研究群から得た野生型試料と比較して、突然変異体において著しく高いＴＰ５３タンパク質レベルを観察した（図９Ｆ、Ｐ＝０．０２０１）。これらの見出は、ＴＰ５３遺伝子が、緑色群の急速に再発するＮＭＩＢＣにおいて突然変異し、優先的に過剰発現されることを示す。

【０２３３】

次に、当患者群におけるＴＰ５３過剰発現の臨床影響を決定した。全体膀胱癌集団において、高いＴＰ５３発現レベルを有する腫瘍は、低発現腫瘍よりも好ましいＤＦＳプロファイルを有する傾向があることを見出した（図９Ｇ、Ｐ＝０．４２１８）。興味深いことに、高ＴＰ５３発現とより良いＤＦＳ可能性との間のこの関係は、ＮＭＩＢＣ群におけるＴＰ５３発現を他の群とは別個に見た場合、逆であった（図９Ｈ）。ＮＭＩＢＣ群において、上昇したレベルの腫瘍抑制因子が、低発現例と比較して、たとえ統計的に有意でないとしても不良なＤＦＳ可能性を付与したことを見出した（図９Ｈ、ＨＲ＝１．９９、Ｐ＝０．１２９２）。ＴＰ５３サインは、侵襲性膀胱癌状況において化学療法への耐性と関連付けられることが示された（Ｃｈｏｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｅｌｌ　２５（２）：１５２－１６５，２０１４）。当研究群のＮＭＩＢＣサブセットにおいて、高ＴＰ５３発現は、一般に膀胱癌患者に投与される治療であるＢＣＧで治療された患者において著しく不良なＤＦＳと関連付けられた（図９Ｉ、ＨＲ＝４．２、Ｐ＝０．０４０５）。しかしながら、ＮＭＩＢＣにおける高ＴＰ５３発現と不良なＤＦＳとの間のこの関係は、未治療の患者（すなわち、治療を受けていない患者）において見られなかった（図９Ｊ、ＨＲ＝０．５７、Ｐ＝０．５７４９）。当データは、高頻度のＴＰ５３突然変異が、ＮＭＩＢＣを有する患者において侵攻性腫瘍挙動に寄与し得ること、及びこれが、この患者集団におけるＢＣＧの逆効果に一部起因し得ることを示唆する。

【０２３４】
実施例５：高ＥＧＦＲ発現は、不良な臨床転帰と関連付けられ、膀胱癌細胞株においてエルロチニブに対する感受性を付与する。
ＥＲＢＢ２における突然変異は、侵攻性微小乳頭組織像の腫瘍において報告されてきた（Ｒｏｓｓ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０（１）：６８－７５，２０１４）。当患者群において、ＥＲＢＢ２突然変異は検出されなかったが、より良性の表層赤色群から、または侵襲性／転移性黄色群からの腫瘍ではなく、急速に再発するＮＭＩＢＣ緑色群からの腫瘍において、ＥＧＦＲ内の突然変異を特定した（図３Ａ）。ＥＲＢＢファミリーリガンド及び受容体のより詳細なゲノム解析を行い、膀胱癌の駆動因子としてのこの経路の潜在的役割を調査した（図１０）。黄色群からの試料の２／３９（約５％）においてＥＧＦＲコピー数、及び４／３９（約１０％）においてＥＲＢＢ２の増加を観察するとともに、赤色群からの１／３０（約３％）の試料においてＥＲＢＢ２コピー数の増加を観察した（図１０）。これらの見出は、以前の報告と一致しており（Ｗｅｉｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ５０７（７４９２）：３１５－３２２，２０１４、Ｃａｐｅｌｌｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．２３（１）：１８－２０，１９９９）、この経路が膀胱癌生成において役割を果たし得ることを示す。
【０２３５】
急速に再発するＮＭＩＢＣにおけるＥＲＢＢファミリーメンバーのＤＮＡコピー数の変化を検出しなかったが、Ｆｌｕｉｄｉｇｍデータ解析は、ＥＧＦＲの発現レベルが、より良性のＮＭＩＢＣ赤色群ならびに侵襲性／転移性黄色群からの試料の両方と比較して、急速に再発するＮＭＩＢＣ緑色群において著しく高いことを明らかにした（図１１Ａ、それぞれＰ＝０．０１２及びＰ＝０．００１２）。ＥＧＦＲが、ＮＭＩＢＣにおける侵攻性膀胱癌挙動に少なくとも部分的に寄与し得る可能性を調査するために、腫瘍が高レベルのＥＧＦＲを発現した患者と低レベルのＥＧＦＲを発現した患者のＤＦＳ可能性を調べた。非浸潤性状況において、高レベルのＥＧＦＲを発現したＮＭＩＢＣを有する患者は、低発現悪性腫瘍を有する患者と比較して、３年ならびに５年ＤＦＳ可能性を低減していた（図１１Ｂ）。進行した転移性状況において、高ＥＧＦＲ発現レベルは、減少した３年及び５年ＤＦＳ可能性とも関連した（図１１Ｃ）。更に、転移性疾患を有する当群からの患者における高ＥＧＦＲ発現は、低発現例と比較して、好ましくない３年及び５年ＯＳ可能性と関連付けられた（図１１Ｄ）。
【０２３６】
これらの見出を検証するために、２つの独立したデータセットにおけるＥＧＦＲ発現レベルの予後値を評価した（Ｓｊｏｄａｈｌ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１８（１２）：３３７７－３３８６，２０１２、Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ．Ｃａｎｃｅｒ ９：３，２０１０）。これら２つの研究からの侵襲性／転移性症例において、高ＥＧＦＲ発現が、３年及び５年両方のフォローアップ時間枠において、低減したＯＳ可能性を伴うことを観察した（図１１Ｅ及び１１Ｆ）。したがって、当群からのデータならびに２つの独立した研究からのデータは、高ＥＧＦＲ発現が、膀胱癌の侵攻的挙動に少なくとも部分的に寄与し得ることを示唆する。
【０２３７】
膀胱癌における抗ＥＧＦＲ両方剤への応答に関する予測的バイオマーカーとしてのＥＧＦＲ発現レベルを評価するために、膀胱癌細胞株のパネルを、ＥＧＦＲ小分子阻害剤エルロチニブへの感受性についてスクリーニングした（Ｓｔａｍｏｓ ｅｔ ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７（４８）：４６２６５－４６２７２，２００２）。ＵＭＵＣ－５、ＵＭＵＣ－１０、及びＵＭＵＣ－１７細胞株は、エルロチニブに対して異なる程度の感受性を示し、ＵＭＵＣ－５に対する７５％超の成長阻害（ＧＩ）～ＵＭＵＣ－１７に対する約４０％ＧＩの範囲であった（図１１Ｇ）。一方、４つの細胞株（ＲＴ－１１２、ＵＭＵＣ－３、ＳＷ７８０、及びＢＦＴＣ９０５）は、エルロチニブ治療への応答において最小ＧＩを示した（図１１Ｇ）。次に、当細胞株におけるＥＧＦＲ発現のレベルを調べた。感受性でない膀胱癌細胞株と比較して、感受性の細胞株（＞２５％ ＧＩ）著しく高いレ

ベルのＥＧＦＲを発現した（最小ＧＩ＜２５％）（図１１Ｈ、Ｐ＝０．０１０６）。これらの結果は、膀胱癌におけるＥＧＦＲの発現レベルが、ＥＧＦＲ経路阻害剤（例えば、エルロチニブ）へのその感受性を予測することを示す。

【０２３８】

実施例６：カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルは、膀胱癌試料を基底及び管腔サブタイプに正確に分類する。

この実施例は、アーカイブＦＦＰＥ膀胱癌臨床試料を含む、膀胱癌の転写解析のためのカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルの追加の開発及びインシリコ検証を説明する。実施例１及び２に記載される通り、パネルの遺伝子には、ＦＧＦＲ、ＥＲＢＢ、ＭＥＴ、ＰＩ３Ｋ／ＡＫＴ、及びＭＡＰＫ軸等の受容体チロシンキナーゼ（ＲＴＫ）の構成要素；ＴＰ５３等の細胞周期及びゲノム安定性遺伝子；ならびに細胞分化及び発達の制御、ならびに上皮間葉転換（ＥＭＴ）に関与する遺伝子が含まれる（図１２Ａ）。

【０２３９】

インシリコで、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネル（表１を参照されたい）が、大きな公開データセットからの試料の重要な分子的及び組織学的属性を捕捉する能力を評価した（Ｓｊｏｄａｈｌ ｅｔ ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１８（１２）：３３７７－３３８６，２０１２）。カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルに対応する１２５プローブの発現に基づく無監督の階層クラスタリングは、２つの主な分岐を明らかにした（図１２Ｂ）。左分岐は、Ｓｊｏｄａｈｌ ｅｔ ａｌ．（上記）に定義される通り、低悪性度（Ｇ１／Ｇ２）腫瘍、Ｔ１期の癌、及びＭＳ１分子クラスに関して増強された（図１２Ｂ）。右分岐下で、Ｇ３／Ｇ４腫瘍の優勢、及びＴ３／Ｔ４悪性腫瘍の増強、膀胱癌のＭＳ２ａクラスの共クラスタリング、及びＳｊｏｄａｈｌ定義された分子サブタイプからのＭＳ２ｂ腫瘍の分離を認めた（図１２Ｂ）。

【０２４０】

次に、Ｓｊｏｄａｈｌ ｅｔ ａｌ．（上記）により定義される通り、２４，３９４のＩｌｌｕｍｉｎａプローブセット全てを使用するか、またはカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルの内容と重複する１２５プローブセットを使用するかのいずれかで、腫瘍悪性度、ＴＮＭ病期、及び転写クラスの誤分類エラー率を計算し、重心分類器において使用され、相互検証により評価される場合、遺伝子サブセットを減少させる能力の予測を決定した（Ｔｉｂｓｈｉｒａｎｉ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９９：６５６７－６５７２，２００２）（図１２Ｃ）。腫瘍悪性度及びＴＮＭ病期に関して約４０％の比較誤分類エラー率、ならびにＭＳ１、ＭＳ２ａ、及びＭＳ２ｂクラスに関して約２０％の誤分類エラー頻度を見出した（図１２Ｃ）。誤分類エラー率の同様の増加は、プローブの数が低減された場合に両方の例において観察された（図１２Ｃ）。これらの結果は、Ｓｊｏｄａｈｌ ｅｔ ａｌ．（上記）において使用されるＩｌｌｕｍｉｎａマイクロアレイの内容全体を使用して、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルの遺伝子が、分子クラスを高い精度で、ならびに腫瘍悪性度及びＴＮＭ病期を同様の有効性で捕捉することを示唆する。

【０２４１】

膀胱癌の最近説明された基底及び管腔サブタイプの生物学的及び臨床的関連を考慮して（Ｄａｍｒａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １１１：３１１０－３１１５，２０１４、Ｃｈｏｉ ｅｔ ａｌ．ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ７：ｅ３０２０６，２０１２）、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルが、いくつかの公開データセットにおけるこれらの２つの分子下位群を区別する能力を調べた。Ｄａｍｒａｕｅｒら（上記）及びＣｈｏｉら（Ｃａｎｃｅｒ Ｃｅｌｌ ２５：１５２－１６５，２０１４）により発見及び検証群において決定された基底／管腔割り当てを使用して、膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネル内の遺伝子に対応するプローブの発現に基づいて試料を階層的にクラスタ化する無監督アプローチを用いた（図１２Ｄ）。このアプローチは、Ｓｊｏｄａｈｌら（上記）データセットからの管腔試料の３９／４４（８０％）及び基底試料の４２／４７（８９％）、ならびにＫｉｍ群からの管腔腫瘍の１０／１２（８３％）及び基底腫

瘍の１７／１８（９４％）を正確に分類した（Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃａｎｃｅｒ　９：３，２０１０）（図１２Ｄ）。更に、このアプローチは、Ｄａｍｒａｕｅｒ発見セット（Ｄａｍｒａｕｅｒら、上記）からの標本を、それぞれ症例の３３／３３（１００％）及び２３／２８（８２％）で管腔及び基底サブタイプに正確に分類した（図１２Ｄ）。最後に、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルの遺伝子は、Ｃｈｏｉ発見データセット（Ｃｈｏｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１２、上記）からの管腔及び基底状態に基づいて、試料を、それぞれ２３／２４（９６％）及び２３／２３（１００％）の事例において正しく分類することができた。まとめると、このインシリコ解析からの見出は、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルにおける慎重に選択された遺伝子が、４つの公開データセット内で基底／管腔状態を正確に検出することを明示する。

【０２４２】

カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルの頑強性及びＦＦＰＥ試料における遺伝子発現を測定する際の再現性を評価するために、一連の品質制御実験を行った。第１に、連続希釈を行って、アッセイの各々の性能を評価し、必要に応じてプライマーを再設計して、全ての検査に関する線形標準希釈曲線を得た（図１３Ａ）。ＦＦＰＥ由来のＲＮＡ試料のセットも実行したところ、異なる日に実行された複製試料からのパネル上の各遺伝子の正規化された発現において高い一致を観察した（図１３Ｂ、R^2範囲＝０．９８～０．９９）。最後に、各々７回の独立ランに含めたユニバーサルヒトＲＮＡ対照に対して、高度のチップ・トゥ・チップデータ再現性を認めた（図３Ｅ；R^2範囲＝０．９１～０．９８）。

【０２４３】

まとめると、我々の定性的及び定量的評価からの結果は、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルが、技術的に頑強であり、転写的に定義されたＦＦＰＥ膀胱癌組織に対して使用され得ることを示す。ＦＦＰＥ組織の転写特徴付けのためのカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルの実用性を更に明示するために、実施例１及び表１において上述される、原発性ＮＩＭＢＣ、ＭＩＢＣ、ならびにリンパ節及び遠位ＭＥＴで構成される２０４試料のセットを解析した。これらの試料が、基底／管腔転写特徴に関していくつかの公開データベースからの試料とどのように比較されるかを調べた。予想通り、当パネル上の遺伝子に対応するプローブからのメジアン中心発現を使用する、４つの公開データベース（Ｄａｍｒａｕｅｒ　ｅｔ　ａｌ．２０１４，上記、Ｋｉｍ　ｅｔ　ａｌ．２０１０，上記、Ｓｊｏｄａｈｌ　ｅｔ　ａｌ．２０１２，上記、及びＣｈｏｉ　ｅｔ　ａｌ．２０１４，上記）からの試料の無監督の階層クラスタリングは、試料の明確な分離を明らかにした（図１４Ａ）。顕著に、Ｋｉｍ管腔試料は、３つの他のデータセットからの基底試料と共にクラスタ化され、故にこの解析において外れ値であった（図１４Ａ）。実施例１及び図１に記載される膀胱癌群のＮＭＩＢＣは、管腔試料と共にクラスタ化されたことを観察したが、ＭＩＢＣ及びＭＥＴは、より基底であるように思われ、公開データセットからの基底試料と共にクラスタ化された（図１４Ａ）。

【０２４４】

実施例１及び図１に記載される２０４ＦＦＰＥ試料の基底／管腔（Ｂ／Ｌ）転写サインを更に評価するために、次に、これらの腫瘍の各々に関するＢ／Ｌ類似性スコアの計算方法を確立した。最初に、公開データセットにおけるカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルの遺伝子に対応する全てのプローブの発現をメジアンで中心化し、基底群及び管腔群における平均遺伝子発現値を、Ｄａｍｒａｕｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（上記）及びＣｈｏｉら（上記）により指定される通りに計算した（図１４Ｂ）。これにより、公開データセットからの管腔群及び基底群におけるこれらの遺伝子の各々の発現の平均図を得ることができた（図１４Ｂ及び１４Ｃ）。例えば、ＦＧＦＲ３は、当パネル上のいかなる他の遺伝子よりも管腔試料中で最高の平均発現値を有し、この平均ＦＧＦＲ３発現レベルは、公開データセットからの基底試料中で最も低いものの１つであった（図１４Ｂ）。次いで、公開された基底及び管腔プロファイルに対する相関を計算することによって、各ＦＦＰＥ試料のＢ／Ｌ類似性スコアを得た（図１４Ｃ）。

【０２４５】

実施例１及び図１に記載される２０４ＦＦＰＥ試料の無監督の階層クラスタリングは、遺伝子発現の別個のパターンを有する２つの主な分岐、（１）低Ｂ／Ｌ類似性スコアを有する試料（管腔様）が共クラスタ化された右分岐、及び（２）高Ｂ／Ｌスコアを有する試料で構成された左分岐（基底様）を示した（図１５Ａ）。統計解析は、管腔状態を示す左分岐において著しく低いＢ／Ｌスコア、及び階層ツリーの右アーム下の基底状態と一致する著しく高いＢ／Ｌスコアを確認した（図１５Ｂ、上左）。基底群と比較して、管腔群においてＮＭＩＢＣの著しく高い分率を観察した（図１５Ｂ、上右）。ＭＩＢＣは、基底群及び管腔群の両方で表されたが、著しく高い比率のＭＩＢＣが基底群において観察された（図１５Ｂ）。興味深いことに、ほぼ全てのＭＥＴは、階層ツリーの基底アーム下でクラスタ化し、実施例１及び図１に記載される膀胱癌群におけるＭＥＴの大半が、基底転写プロファイルを示したことを示唆する（図１５Ａ及び１５Ｃ）。

【０２４６】

上記の通り、ＮＭＩＢＣの特徴的機能のうちの１つは、それらが、症例の約６０～８０％においてＦＧＦＲ３に体細胞活性化突然変異を担持することであり、ＭＩＢＣ及びＭＥＴでは、約１５％のはるかに低い頻度が報告されている。カスタム対立遺伝子特異的ＰＣＲパネルを使用する群からの試料中のＦＧＦＲ３及び癌関連遺伝子の突然変異状態を評価した（Ｓｃｈｌｅｉｆｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．上記、Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．上記、ｖａｎ　Ｒｈｉｊｎ　ｅｔ　ａｌ．上記、Ｍａｒｔｉｎｅｚ－Ｔｏｒｒｅｃｕａｄｒａｄａ　ｅｔ　ａｌ．上記、Ｃａｐｐｅｌｌｅｎ　ｅｔ　ａｌ．上記、１９９９、及びＡｌ－Ａｈｍａｄｉｅ　ｅｔ　ａｌ．上記）。予想通り、腫瘍の約７５％が管腔標識下で共クラスタ化したことを見出し、約２０％よりも著しく高い分率が、基底群からの試料において観察された（図１５Ａ及び１５Ｄ）。ＦＧＦＲ３における突然変異は、より高いＦＧＦＲ３タンパク質の発現レベルを駆動することが報告されてきた。これらの報告と一致して、基底群からの試料と比較して管腔群からの試料において、ＩＨＣにより測定される通り、著しく高いＦＧＦＲ３タンパク質のレベルを認めた（図１５Ａ及び１５Ｄ）。ＦＧＦＲ３突然変異及び発現データは、当試料の管腔及び基底状態の分子的確認を提供する。

【０２４７】

Ｂ／Ｌ転写特徴以外に、膀胱癌の発現に関与することが知られている経路、例えば、ＴＰ５３経路、ＰＩ３Ｋ／ＡＫＴ経路、ＥＲＫ／ＭＡＰＫ経路、及び細胞周期シグナル伝達軸の構成要素に属する遺伝子の発現の測定におけるカスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルの実用性を評価した。順列調節されたｐ値を使用して、複数仮説検証を制御し、４９／９１の固有遺伝子を、基底群と管腔群との間で著しく差次的に発現されたと特定し（表４）、ＩＮＧＥＮＵＩＴＹ（登録商標）ソフトウェアを使用してこれらの遺伝子を経路にマッピングした（図１５Ｆ）。

表４：基底群と管腔群との間で差次的に発現された遺伝子

遺伝子	指標	原P値	調節されたP値	管腔平均遺伝子	管腔標準偏差遺伝子	基底平均遺伝子	基底標準偏差遺伝子
ACVRL1	4.470992	1.00E-04	6.00E-04	-0.377392	0.897960	0.202966	0.850912
ADAM12	10.714632	1.00E-04	1.00E-04	-1.007148	1.132818	1.073608	1.529736
ARAF	-5.315843	1.00E-04	2.00E-04	0.187836	0.418587	-0.159546	0.472994
AXL	7.402348	1.00E-04	1.00E-04	-0.568450	0.864129	0.468449	1.052838
BCL2	3.327797	0.0012	0.0392	-0.599461	2.561637	0.476490	1.529934
BMP2	-5.506106	1.00E-04	2.00E-04	0.511055	1.388453	-0.842703	1.982201
BMX	3.869332	3.00E-04	0.007	-0.365686	1.125407	0.432270	1.699462
CCND1	-6.648141	1.00E-04	1.00E-04	0.614065	1.302003	-0.828593	1.671470
CDH1	-6.186010	1.00E-04	1.00E-04	0.308209	0.626927	-0.554378	1.255825
CDH2	6.767331	1.00E-04	1.00E-04	-0.902216	1.477841	0.789598	1.949093

CDKN1A	−6.302967	1.00E−04	1.00E−04	0.379429	0.948515	−0.569761	1.109340
CXCL1	6.101031	1.00E−04	1.00E−04	−3.427841	5.233372	0.556695	2.950078
DUSP1	8.894016	1.00E−04	1.00E−04	−0.569185	1.050108	1.194473	1.662705
DUSP6	−4.465429	1.00E−04	6.00E−04	0.417010	1.107095	−0.372185	1.309016
ERBB3	−6.987278	1.00E−04	1.00E−04	0.389256	0.766742	−0.753400	1.450475
FGF1	4.885552	1.00E−04	3.00E−04	−0.540165	1.013078	0.318677	1.397265
FGF10	7.953402	1.00E−04	1.00E−04	−2.155413	2.835254	0.693114	1.700124
FGF2	4.811158	1.00E−04	3.00E−04	−0.573742	1.578183	0.416837	1.088209
FGF7	10.092045	1.00E−04	1.00E−04	−3.061246	3.278922	1.283664	2.317224
FGFR1	9.680571	1.00E−04	1.00E−04	−0.951231	1.204470	0.572352	0.835639

FGFR2	−4.331482	2.00E−04	0.0013	0.297819	0.883154	−0.529580	1.703266
FGFR3	−8.404252	1.00E−04	1.00E−04	0.839686	1.482499	−1.598363	2.478029
FN1	8.759580	1.00E−04	1.00E−04	−1.026195	1.398537	0.927437	1.650205
GATA3	−5.228866	1.00E−04	2.00E−04	0.302732	1.061456	−0.922919	2.105784
HPSE	7.679572	1.00E−04	1.00E−04	−0.715992	1.228429	0.728751	1.332539
JAG1	−4.036317	1.00E−04	0.0034	0.255673	0.778658	−0.289823	1.074384
KDR	−4.325874	1.00E−04	0.0013	0.258180	0.953954	−0.394809	1.108172
MET	−5.005419	1.00E−04	2.00E−04	0.255420	0.616484	−0.350746	1.036428
MMP9	8.924212	1.00E−04	1.00E−04	−2.041185	2.736507	1.112735	1.811595
NF1	−6.641973	1.00E−04	1.00E−04	0.227033	0.418262	−0.248162	0.562626

NOTCH1	−4.467071	1.00E−04	6.00E−04	0.330623	0.996084	−0.296385	0.882330
PIK3CB	−4.982987	1.00E−04	3.00E−04	0.202197	0.459353	−0.158992	0.530615
PIK3IP1	−4.399226	1.00E−04	0.001	0.217791	0.743936	−0.333888	0.974954
POU5F1	−4.881466	1.00E−04	3.00E−04	0.432596	0.827815	−0.253551	1.099119
RB1	−4.511634	1.00E−04	6.00E−04	0.433954	0.990320	−0.250475	1.074869
S1PR1	3.347376	8.00E−04	0.0368	−0.936400	2.098207	0.115313	2.164647
SMO	4.108037	2.00E−04	0.0029	−0.570215	1.316376	0.232323	1.330061
SNAI1	9.720121	1.00E−04	1.00E−04	−0.738706	0.826979	0.693255	1.192486
SPHK1	9.390921	1.00E−04	1.00E−04	−1.073262	1.331036	0.798386	1.373050
SRC	−8.409151	1.00E−04	1.00E−04	0.440559	0.616653	−0.588228	1.052038

TIMP1	5.78934 6	1.00E−04	1.00E−04	−0.440995	0.772238	0.424382	1.265678
TIMP2	7.99748	1.00E−04	1.00E−04	−0.693068	0.994608	0.562759	1.150134
TP53	−6.756884	1.00E−04	1.00E−04	0.283202	0.585345	−0.359823	0.717235
TP63	−9.036731	1.00E−04	1.00E−04	0.541066	1.058843	−1.725567	2.304475
TP73	−3.264090	0.0014	0.0477	0.355626	1.529634	−0.413410	1.679960
TSC1	−4.289175	1.00E−04	0.0015	0.239069	0.686542	−0.196540	0.688436
ZEB1	6.68104 0	1.00E−04	1.00E−04	−0.451146	0.807057	0.310871	0.720614
ZEB2	9.85133 1	1.00E−04	1.00E−04	−0.718784	0.956315	0.632488	0.888236

【０２４８】

管腔腫瘍において著しい活性化スコアを示した経路には、ＮＦ－κＢ、ＴＰ５３、ＥＲＫ／ＭＡＰ、Ｇ１／Ｓ細胞周期チェックポイント、ＨＧＦ、及びＶＥＧＦシグナル伝達経路が含まれた（図１５Ｆ）。一方で、基底群において著しく活性化された経路には、ＰＴＥＮ、ＰＩ３Ｋ／ＡＫＴ、セラミド、及び細胞周期制御シグナル伝達経路が含まれた（図１５Ｆ）。ＩＮＧＥＮＵＩＴＹ（登録商標）ソフトウェアを使用する上流経路活性化解析はまた、管腔群に属する試料が、高レベルのＦＧＦＲ３、ＧＡＴＡ３、ＣＣＮＤ１、及びＥＲＢＢ３、低レベルのＡＸＬ１、ＣＸＣＬ１、ＦＧＦＲ１、及びＢＣＬ２、ならびにＳＮＡＩ１及びＺＥＢ１等の低発現レベルのＥＭＴ遺伝子を含む、エストロゲン受容体（ＥＲ）活性化と一致する発現プロファイルを有していたことを明らかにした（図１７Ａ）。対照的に、基底群に属する試料は、これらの遺伝子に対して反対の発現プロファイルを示した（図１７Ｂ）。これらの見出は、当パネルが、ＦＦＰＥ組織内の膀胱癌関連経路の転写状態を測定するために有益である。

【０２４９】

原発膀胱癌の組織病理学的特徴は、膀胱癌患者に対して病歴的に促される臨床管理決定

を有する。膀胱癌の遺伝的駆動因子に関する理解が高まると共に、疾患の分子的属性に基づく治療介入のための新たな道が敷かれている。しかしながら、しばしば原発腫瘍の分子的特徴を使用して、転移状況において開発されている薬物の場合でも、標的薬剤の臨床決定をガイドする。原発腫瘍の重要な分子的特徴が、転写レベルで膀胱癌転移のものを代表するかどうかを述べるために、同じ患者からの９対のマッチさせた原発腫瘍／ＭＥＴのＢ／Ｌスコアを比較した。最初に、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）データを調べ、９対の原発／転移からの変異型が高度に相関していたことを見出し、故にマッチさせた腫瘍が、実際に同じ患者からのものであることを確認した（図１６Ａ及び１８）。原発腫瘍とマッチさせたＭＥＴとのＢ／Ｌスコア間の相関解析は、５／９対が、ほぼ同一のＢ／Ｌスコアを有し、２／９がそれらのＢ／Ｌ状況にわずかな差を示したことを示した（図１７Ａ及び１７Ｂ）。興味深いことに、２／９例においてＢ／Ｌスコアの著しい変化を観察し、それらの両方は、管腔原発腫瘍及び基底ＭＥＴを有すると特徴付けられた（図１７Ａ及び１７Ｂ）。これらの見出は、原発腫瘍のＢ／Ｌ状態が、転移性病変において観察されるものを常に反映しているとは限らないことを示唆し、膀胱癌転移の分子的特徴付けが、診療所における治療決定をより正確に導くことが保証され得る。

【０２５０】

実施例６の追加の材料及び方法

公開データセットの解析

いくつかの公開データセットを使用して、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネル遺伝子が腫瘍病期、悪性度、基底／管腔状態等の疾患の重要な転写特徴を捕捉する能力を保証した。Ｓｊｏｄａｈｌ　ＩｌｌｕｍｉｎａヒトＨＴ－１２　Ｖ３．０遺伝子発現データ（Ｓｊｏｄａｈｌ　ｅｔ　ａｌ．２０１２、上記）を、遺伝子発現オムニバス（ＧＥＯ）ウェブサイト（ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｇｅｏ／ＧＳＥ３２８９４）からダウンロードした。発現データは、メジアンポリッシュを使用して正規化した（Ｔｕｋｅｙ　ｅｔ　ａｌ．Ｅｘｐｌｏｒａｔｏｒｙ　Ｄａｔａ　Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ａｄｄｉｓｏｎ－Ｗｅｓｌｅｙ，ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，１９７７）。無監督の階層クラスタリング解析を、平均連結法、１－ピアソン相関距離メトリックを使用して適用し、試料のグループ分けを見出し、試料腫瘍の悪性度、ＴＭＮ病期、及び分子クラスを報告した（Ｓｊｏｄａｈｌ　ｅｔ　ａｌ．２０１２、上記）。重心分類器アプローチを使用して決定された腫瘍悪性度、ＴＮＭ病期、及び分子クラスを正確に特定するために、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルの９１の固有の遺伝子の能力を評価した。相互検証誤分類エラー曲線は、ＰＡＭＲ　Ｒライブラリを使用し（Ｔｉｂｓｈｉｒａｎｉ　ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９９：６５６７－６５７２，２００２）、Ｓｊｏｄａｈｌ　ｅｔ　ａｌ．（上記）発現データセットの全アレイまたは対応する１２５プローブサブセットを使用して作成した。カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルの遺伝子が、転写プロファイリングを通じて基底様及び管腔様試料を特定する能力を、４つの文献データセット（ＧＳＥ３２８９４、ＧＳＥ５２８７、ＧＳＥ１３５０７、ＧＳＥ４８０７５）において評価した。

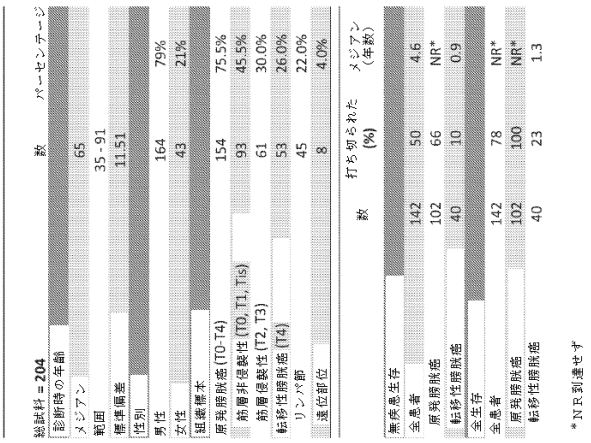
【０２５１】

これらの公開データ上で行われた基底または管腔分類は、Ｄａｍｒａｕｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（上記）により記載される通りであった。手短に言えば、Ｄａｍｒａｕｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（上記）発見試料（Ｎ＝３０、ＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘヒトゲノムＵ１３３Ａアレイ）を、ＮＣＢＩ遺伝子発現オムニバス（ＧＳＥ５２８７）からダウンロードした。カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネル上の遺伝子に対応するＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘプローブセットを使用した。次いで、ログ変換された発現データの残りのサブセットを平均値で中心化し、単位変数に正規化した。次いで、平均遺伝子発現値を、管腔様として分類された１２試料の９１の固有遺伝子に関して、及び基底様として分類された１８試料に関して計算して（著者対応により受領された分類）、基底及び管腔発現プロファイルを産生した。このプロセスを、３つの他の公開データセット（ＧＳＥ３２８９４、ＧＳＥ１３５０７、ＧＳＥ４８０７５）に対して繰り返した。

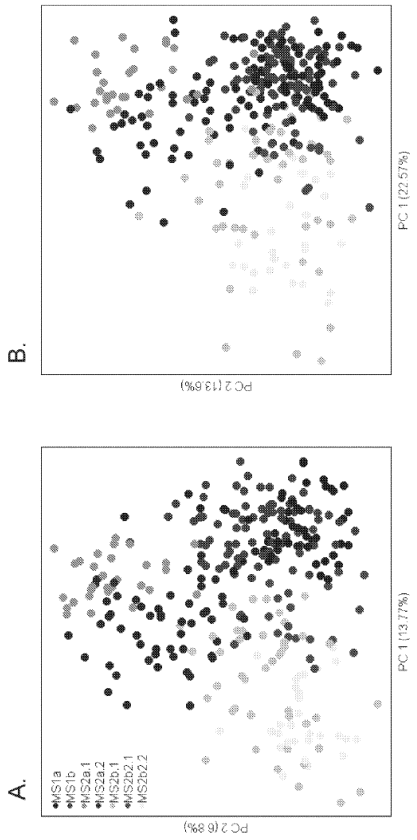
【０２５２】
腫瘍
実施例１に記載される２０４のホルマリン固定パラフィン包埋（ＦＦＰＥ）膀胱腫瘍試料の集合を、本実施例に記載される実験で使用した。ＲＮＡ及びＤＮＡは、実施例１に記載されるマクロ切開された試料から抽出した。
【０２５３】
ＦＦＰＥ腫瘍のＦｌｕｉｄｉｇｍ発現解析
遺伝子発現解析は、前述される通り、ＥＮＶＩＲＥＮＥ（登録商標）による脱パラフィン化後に、高純度ＦＦＰＥ　ＲＮＡマイクロキット（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）を使用して、マクロ切開されたＦＦＰＥから抽出したＲＮＡ上で実行した（Ｏ'Ｂｒｉｅｎ　ｅｔ　ａｌ．Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１６：３６７０－３６８３，２０１０）。膀胱癌関連遺伝子の９６の固有のｍＲＮＡ転写産物の遺伝子発現解析は、Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ　ＩＩＩ／Ｐｌａｔｉｎｕｍ　Ｔａｑ及び前置増幅反応ミックス（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用し、単一反応においてｃＤＮＡに逆転写され、前置増幅された合計１００ｎｇのＲＮＡから開始して患者標本上で行った。全９６のＴａｑｍａｎプライマー／プローブのセットは、元のＴＡＱＭＡＮ（登録商標）アッセイ濃度（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）の０．０５倍の最終希釈での前置増幅反応に含まれた。熱循環条件は、以下の通りであった。５０℃で１５分間の１サイクル、７０℃で２分間の１サイクル、９５℃で１５秒間の１４サイクル、及び６０℃で４分間。前置増幅されたｃＤＮＡを２倍に希釈し、次いで、製造元の指示に従い、ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）ユニバーサルＰＣＲマスターミックス（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ，Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）を、ＢＩＯＭＡＲＫ（商標）ＢＭＫ－Ｍ－９６．９６プラットフォーム（Ｆｌｕｉｄｉｇｍ，Ｓｏｕｔｈ　Ｓａｎ　Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）上で使用して増幅させた。全ての試料を３回アッセイした。サイクル閾値（Ｃｔ）を、ΔＣｔ法（Ｏ'Ｂｒｉｅｎら、上記）を使用して相対発現に変換し、式中、ΔＣｔは、標的遺伝子の平均からそれぞれの患者標本に関して計算された基準遺伝子の幾何学平均を引いたものであった。カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネル上で評価された遺伝子の場合、サイクル閾値（Ｃｔ）は、メジアンポリッシュを使用して正規化した（Ｔｕｋｅｙら、上記）。差次的に発現された遺伝子の階層クラスタリングは、距離メトリックとして１－ピアソン相関を使用する平均連結法を用いて、正規化されたデータ上で実行し、後次にＲを使用して可視化した。
【０２５４】
突然変異解析
突然変異解析は、ＥＮＶＩＲＥＮＥ（登録商標）による脱パラフィン化後に、ＱＩＡａｍｐ　ＦＦＰＥキット（Ｑｉａｇｅｎ，Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）を使用してマクロ切開されたＦＦＰＥ組織から抽出されたゲノムＤＮＡ上で実行した（Ｌｉｎｄｇｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　７：ｅ３８８６３，２０１２）。ＰＩＫ３ＣＡ、ＥＧＦＲ、ＫＲＡＳ、ＮＲＡＳ、ＨＲＡＳ、ＦＧＦＲ３、ＭＥＴ、ＢＲＡＦ、ＫＩＴ、ＡＫＴ１、ＦＬＴ３における突然変異は、前述される通り、突然変異特異的ｑＰＣＲを使用して検出した（Ｓｃｈｌｉｅｆｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ　９：ｅ８８４０１，２０１４）。
【０２５５】
免疫組織化学
免疫組織化学は、実施例１に記載の通り行った。
【０２５６】
基底／管腔類似性スコアの計算、マッチさせた原発腫瘍及び転移の解析、ならびに統計解析
実施例１に記載される２０４の膀胱癌群ＦＦＰＥ試料からの試料の基底／管腔類似性スコアは、前述される通り、公開されたＤａｍｒａｕｅｒらの発見データセットから基底／

管腔発現プロファイルを最初に派生させることによって決定した（Ｄａｍｒａｕｅｒら、上記）。次に、各プロファイルと平均値で中心化された単位変数により正規化された各ＦＦＰＥ試料との間の基底及び管腔ピアソン相関を決定した。これら２つの相関スコアを組み合わせて、全体Ｂ／Ｌ類似性スコアを産生した。Ｂ／Ｌスコア＝（基底プロファイル相関－管腔プロファイル相関）／２．０。このＢ／Ｌスコアは、＋１．０～－１．０の範囲を有し、ゼロより上のスコアは、基底様試料を示し、ゼロ以下のスコアは、管腔様試料を示す。同様に、９つのマッチさせた原発及び転移試料のＢ／Ｌ類似性スコアも同様に計算した。マッチさせた試料が同じ患者からのものであることを確認するために、次世代シーケンシング（ＮＧＳ）を、ＩＯＮ　ＡＭＰＬＩＳＥＱ（商標）癌ホットスポットパネルｖ２（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を使用し、製造元のガイドライン（Ｔｓｏｎｇａｌｉｓ　ｅｔ　ａｌ．ＣＣＬＭ／ＦＥＳＣＣ　５２：７０７－７１４，２０１４）に従って実行し、ピアソン相関を、両方の試料が少なくとも１００倍の読み取り範囲を有し、少なくとも１つの試料が１０％超の対立遺伝子頻度を有していた全ての変異型部位における対立遺伝子の頻度を比較することによって計算した（平均して、任意の２つの試料間で１２０箇所を比較した）。原発－転移試料がミスマッチであった可能性は、それらの相関スコアを、ランダム試料対合の３，５００相関と比較することによって見出した。プライマーとマッチさせた転移との間のＢ／Ｌスコアの差を、典型的なシステムエラーに起因すると予想される差と比較した。システムエラーの推定は、ランダムに選択された試料の置換と共に、カスタム膀胱癌Ｆｌｕｉｄｉｇｍパネルからの遺伝子をサンプリングし、１００，０００置換においてＢ／Ｌスコアを再計算することにより得た。クラスタ間の差次的突然変異頻度の有意性に関して、フィッシャーの直接検定を行った。フィッシャーの直接検定及び両側ｔ検定を、全ての他の統計比較に使用した。

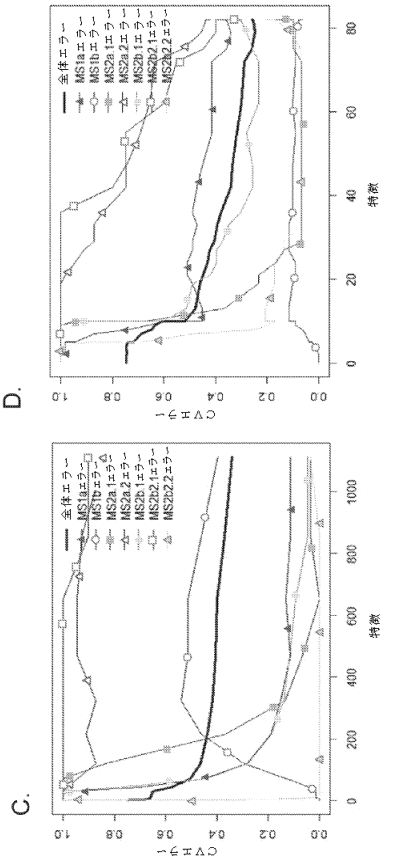
【図１】



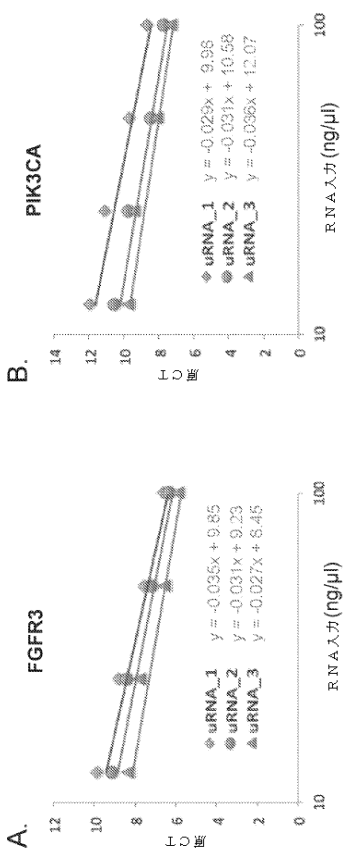
【図２Ａ－２Ｂ】



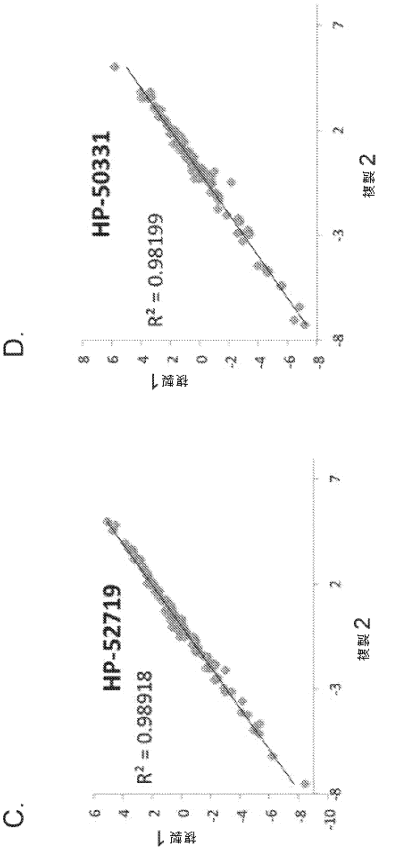
【図２Ｃ－２Ｄ】



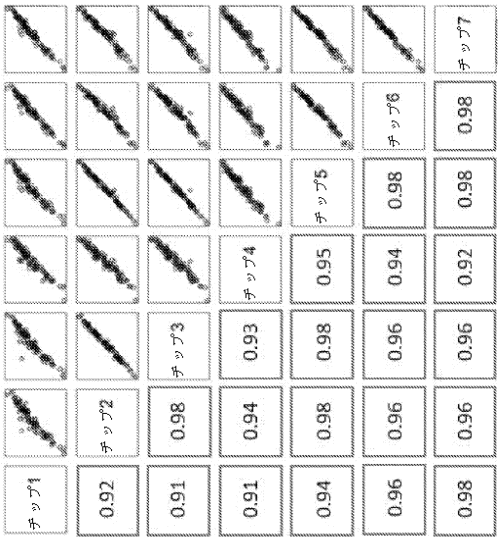
【図３Ａ－３Ｂ】



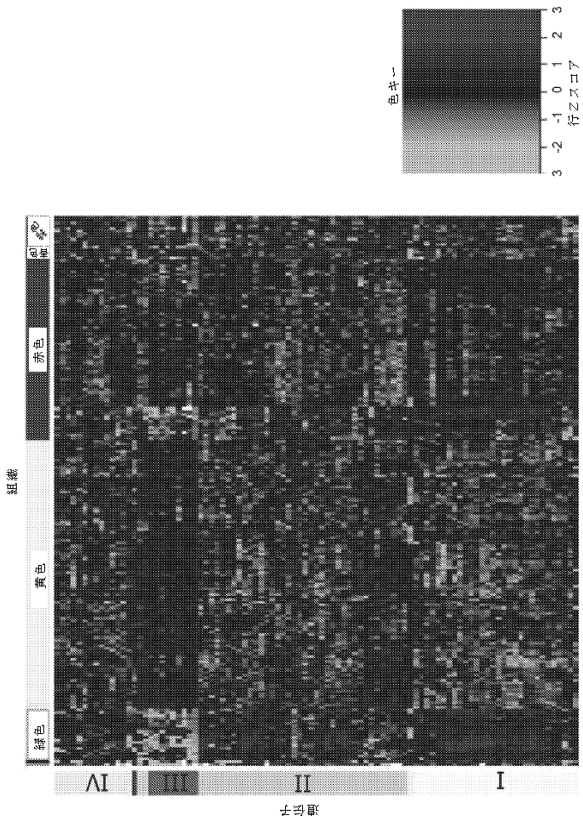
【図３Ｃ－３Ｄ】



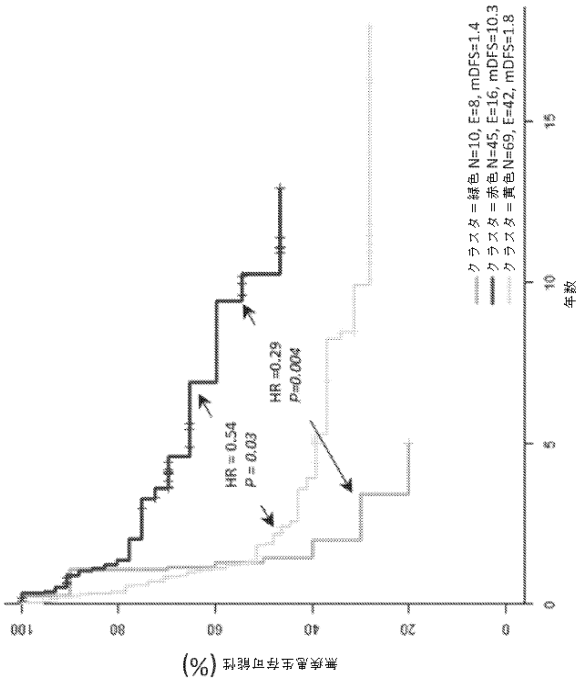
【図３Ｅ】



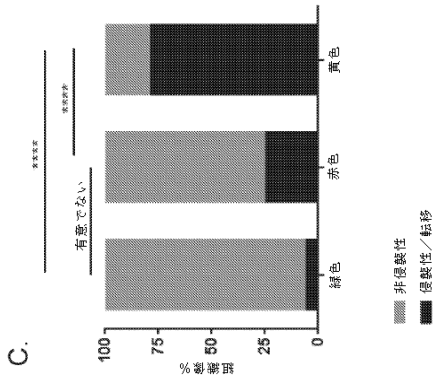
【図４Ａ】



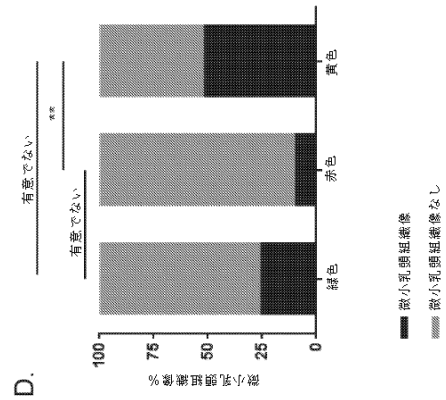
【図４Ｂ】



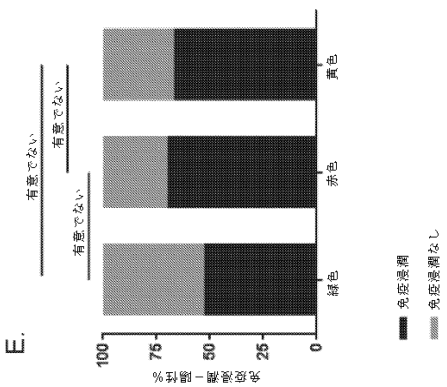
【図４Ｃ】



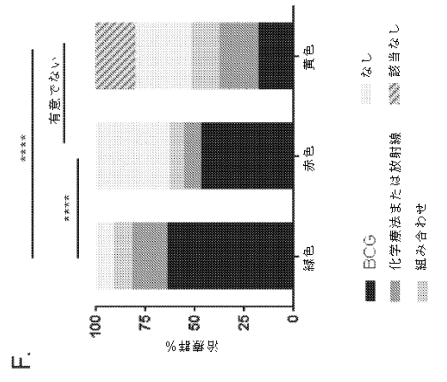
【図４Ｄ】



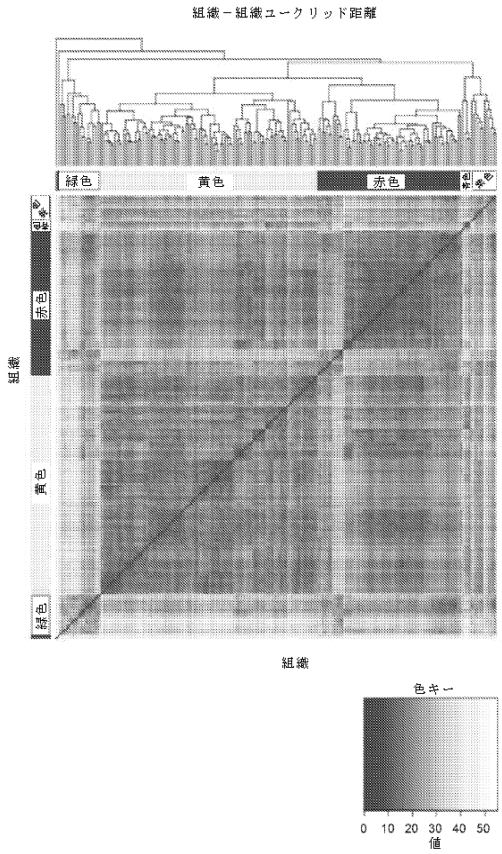
【図４Ｅ】



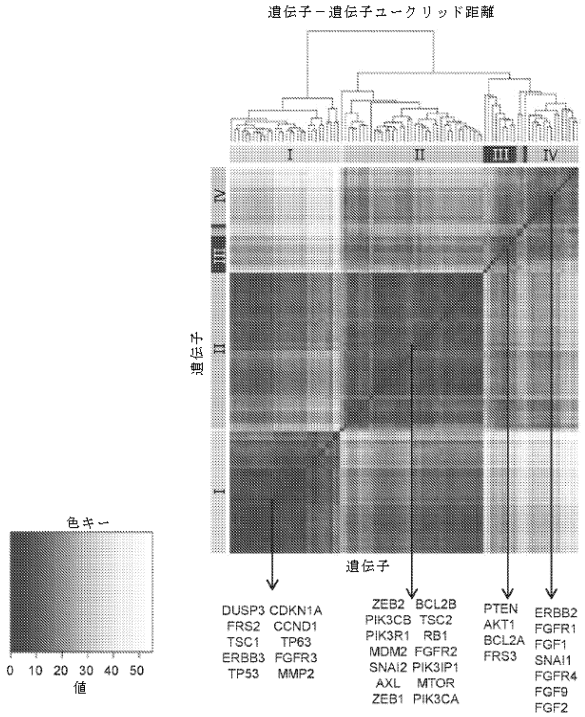
【図４Ｆ】



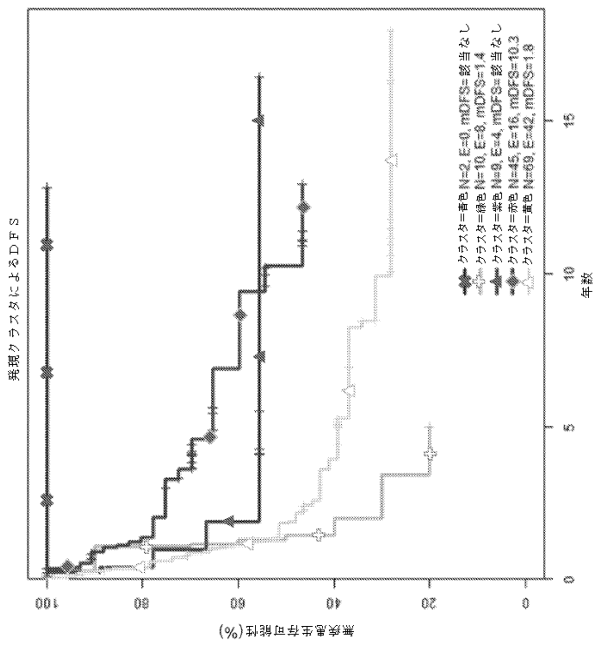
【図５Ａ】



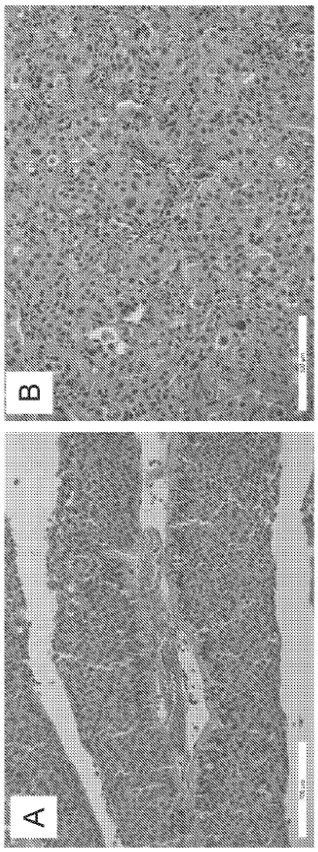
【図５Ｂ】



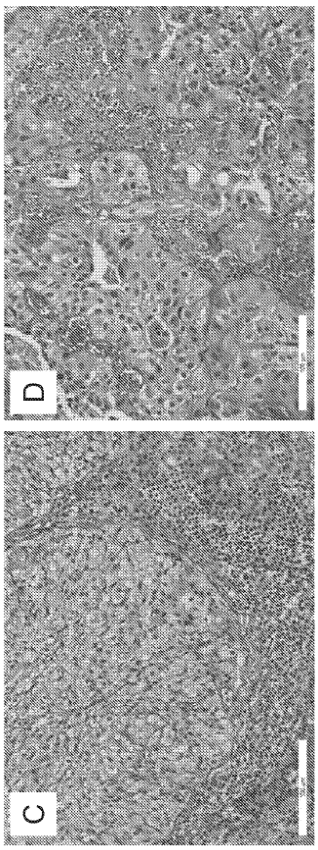
【図５Ｃ】



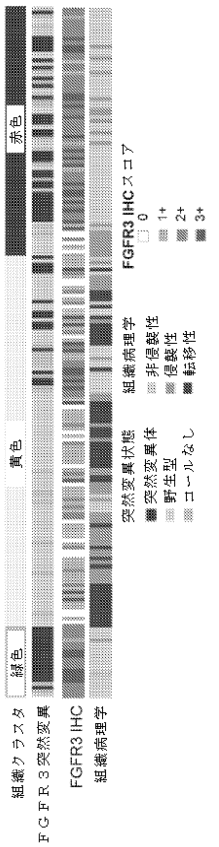
【図６Ａ－６Ｂ】



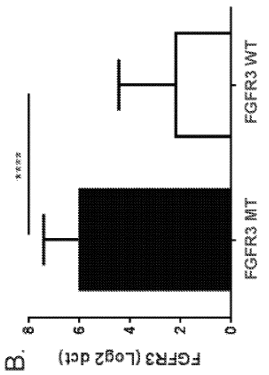
【図６Ｃ－６Ｄ】



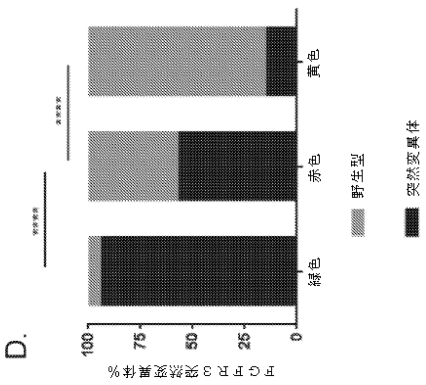
【図７Ａ】



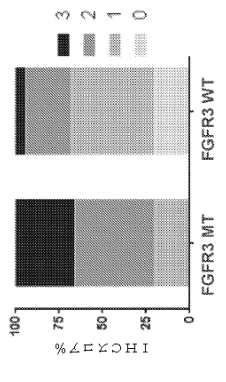
【図７Ｂ】



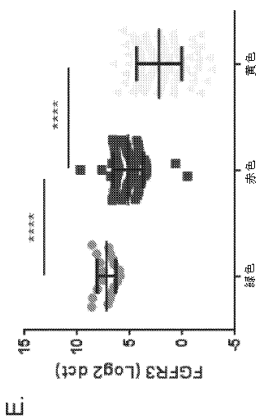
【図７Ｄ】



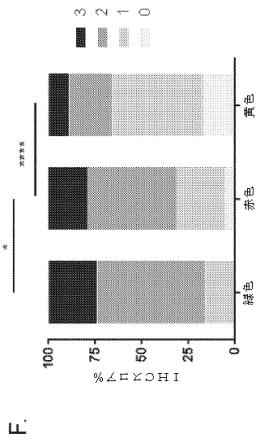
【図７Ｃ】



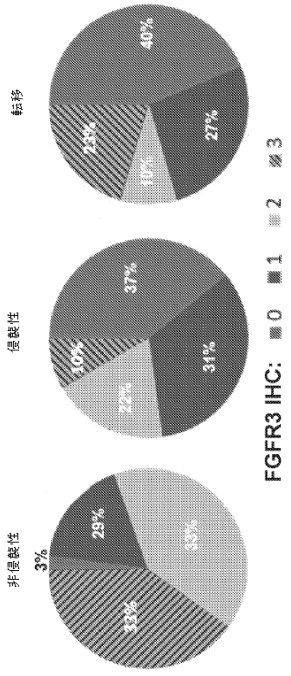
【図７Ｅ】



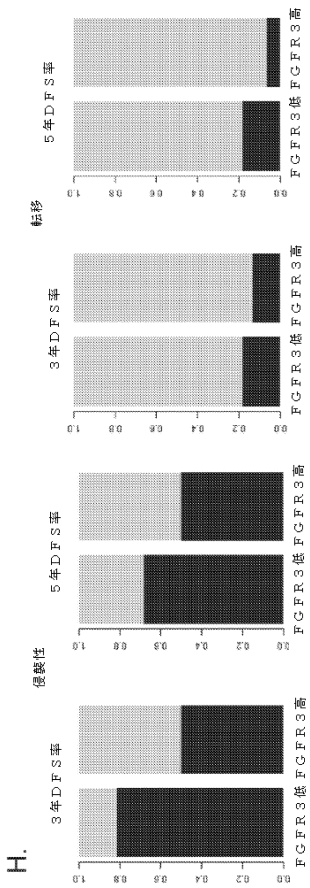
【図７Ｆ】



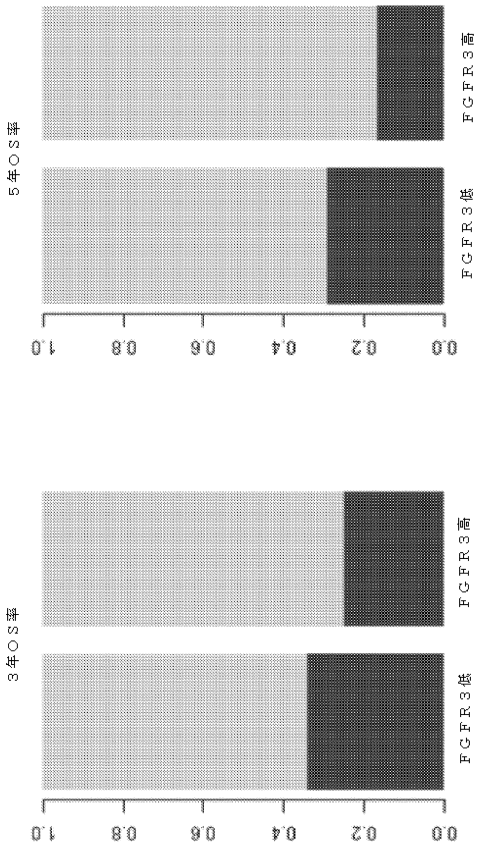
【図７Ｇ】



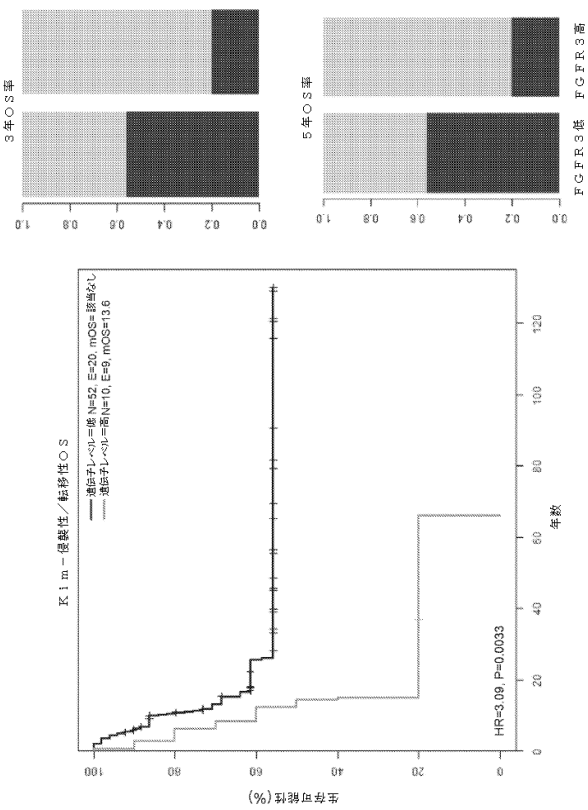
【図７Ｈ】



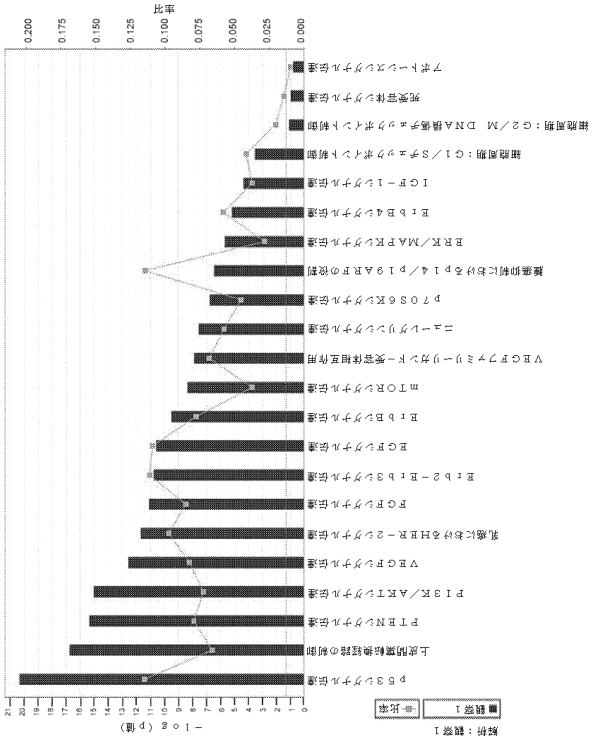
【図７Ｉ】



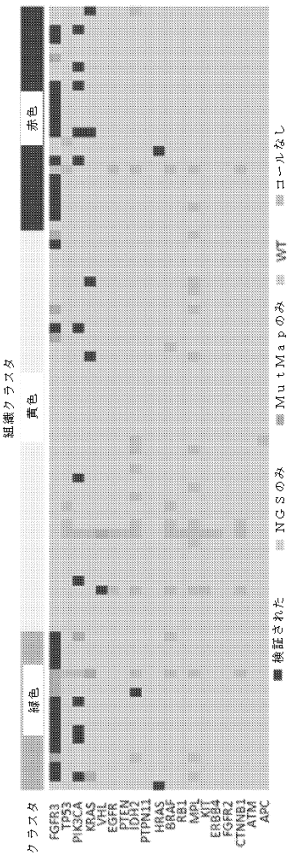
【図７Ｊ】



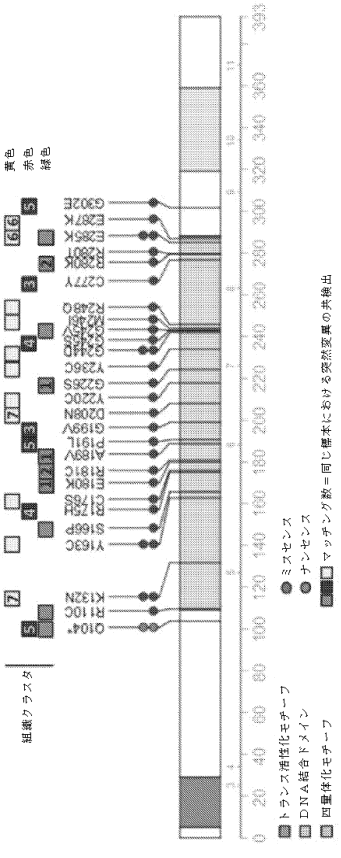
【図８】



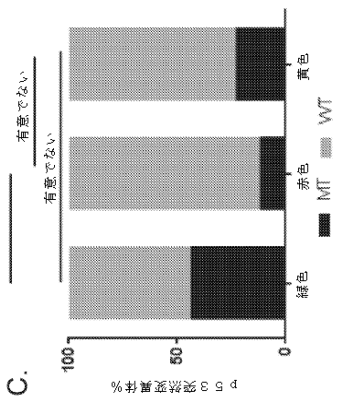
【図９Ａ】



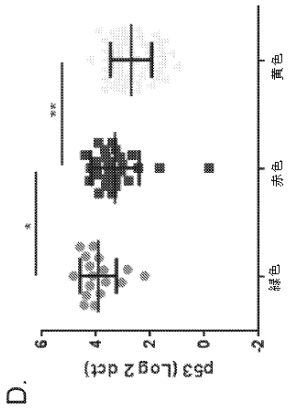
【図９Ｂ】



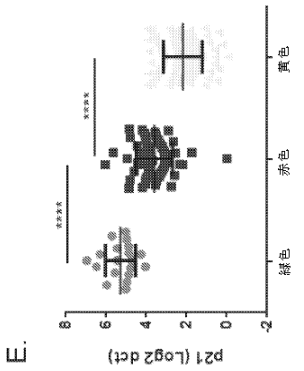
【図９Ｃ】



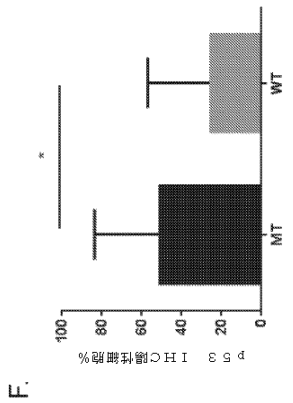
【図９Ｄ】



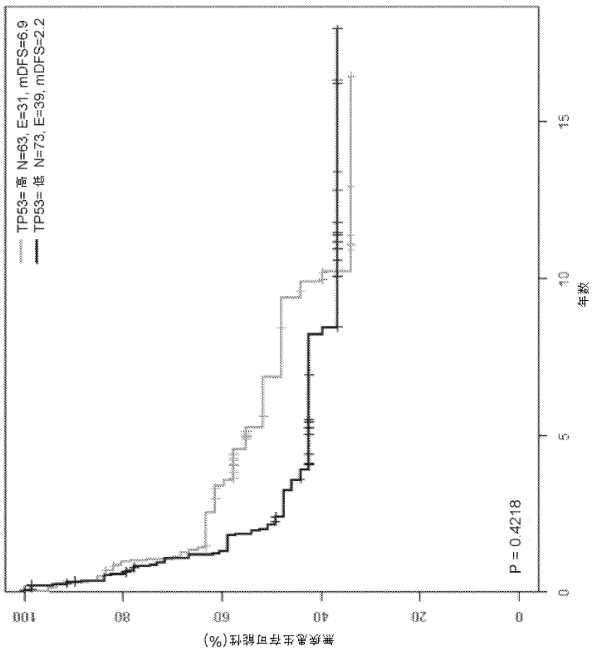
【図９Ｅ】



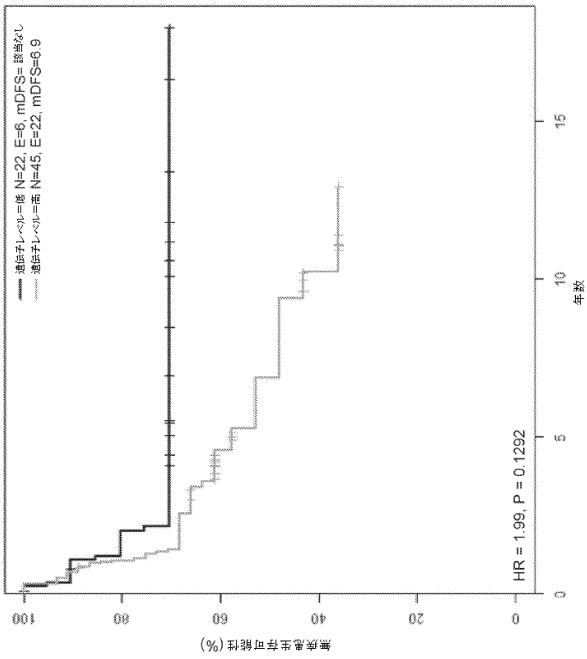
【図９Ｆ】



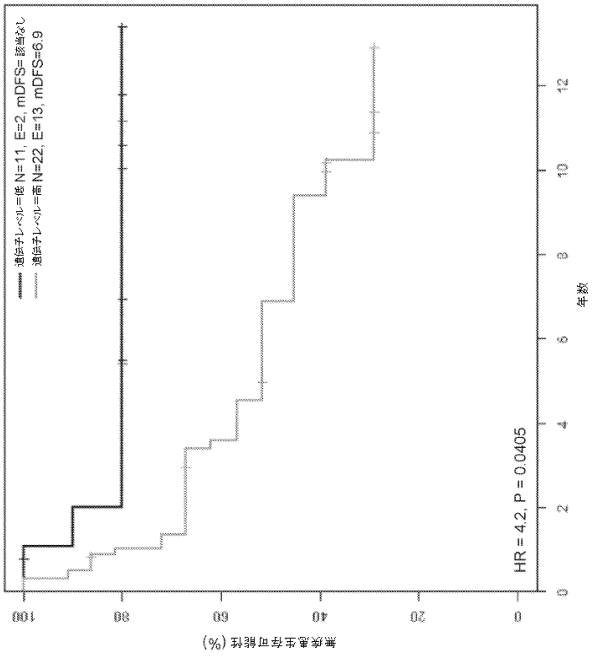
【図９Ｇ】



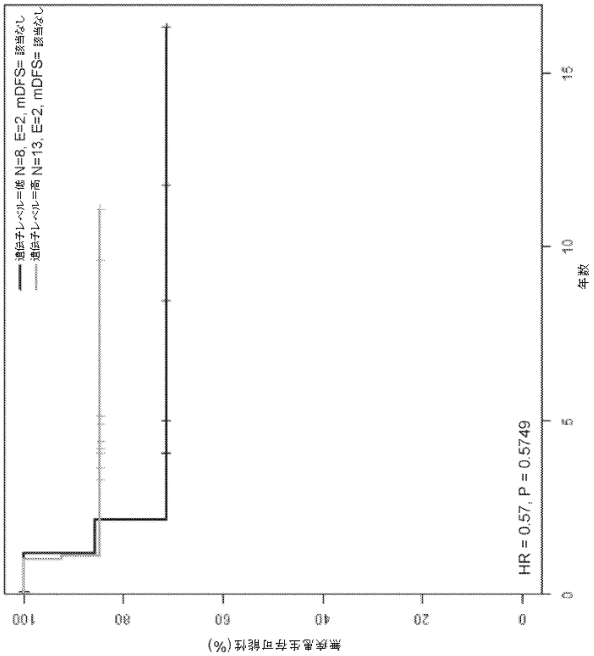
【図９Ｈ】



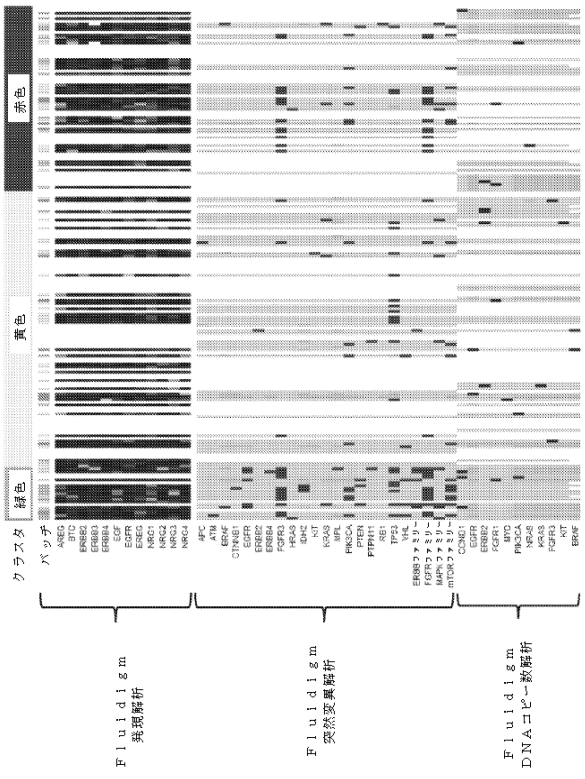
【図９Ｉ】



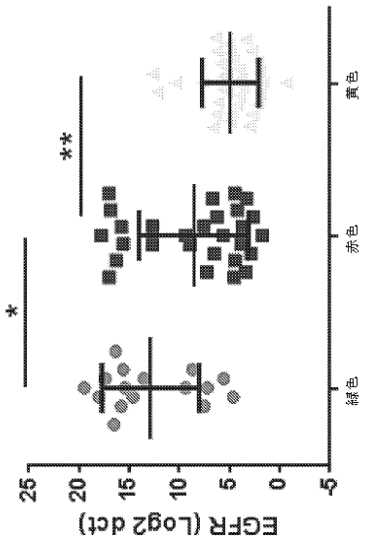
【図９Ｊ】



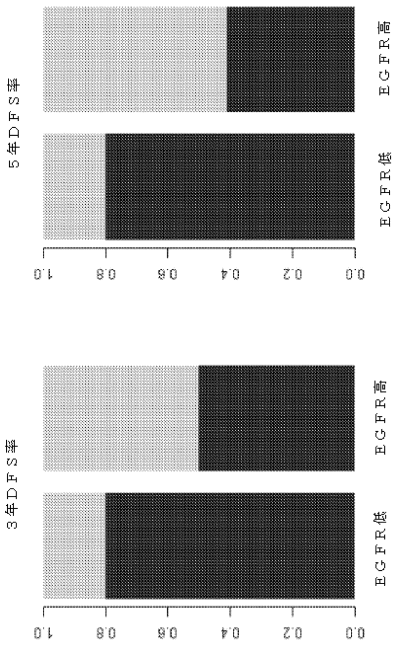
【図１０】



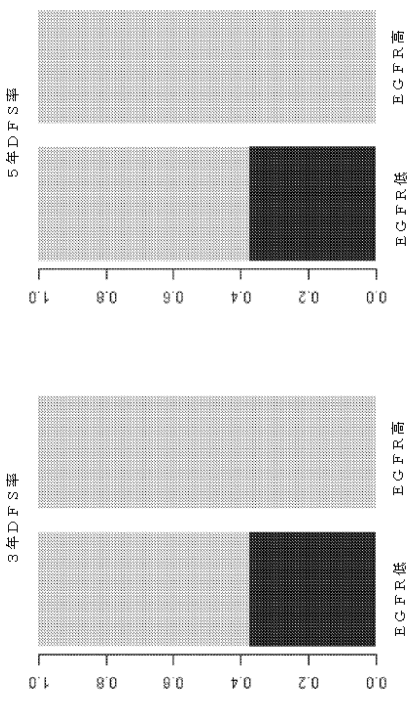
【図１１Ａ】



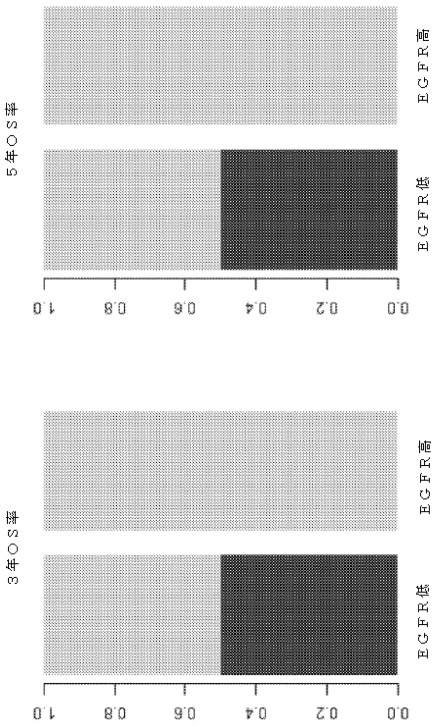
【図１１Ｂ】



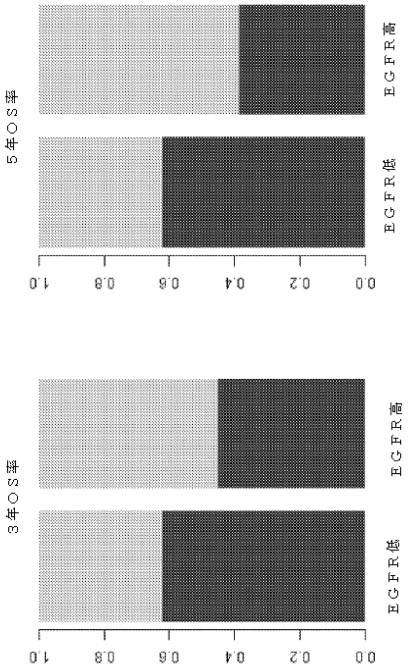
【図１１Ｃ】



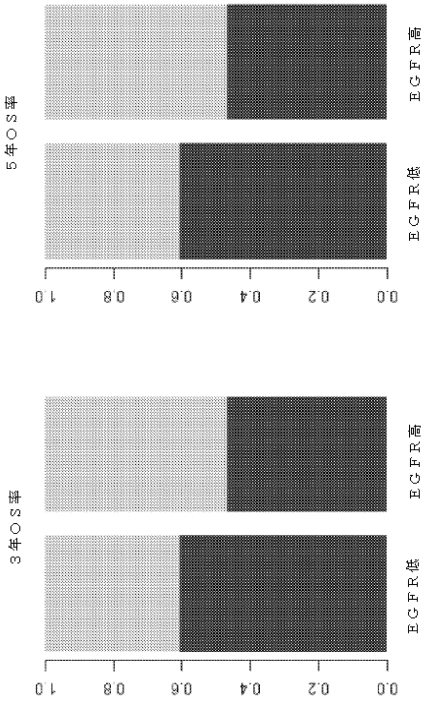
【図１１Ｄ】



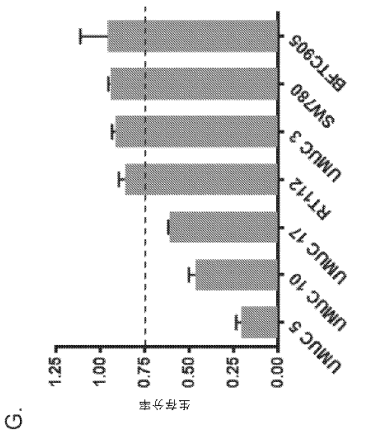
【図１１Ｅ】



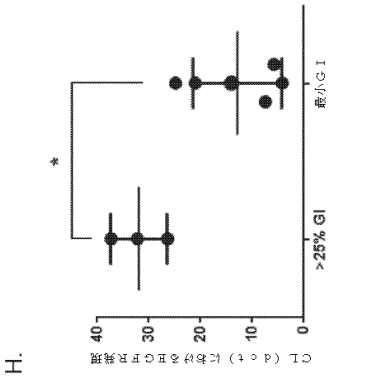
【図１１Ｆ】



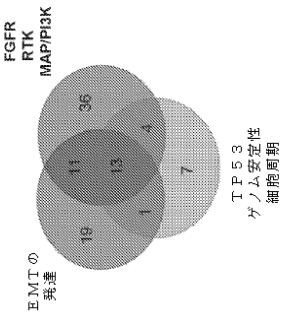
【図１１Ｇ】



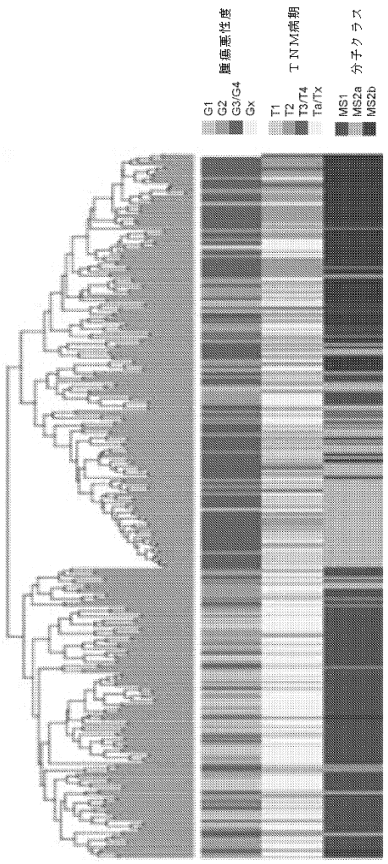
【図１１Ｈ】



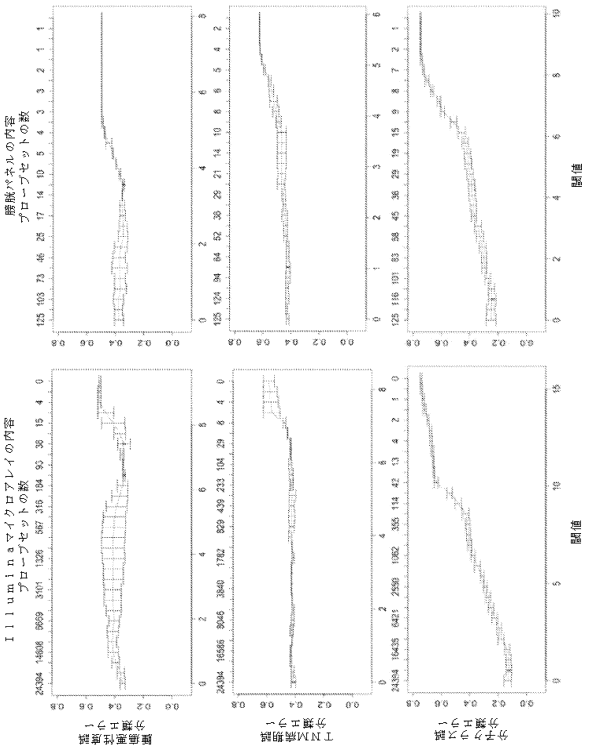
【図１２Ａ】



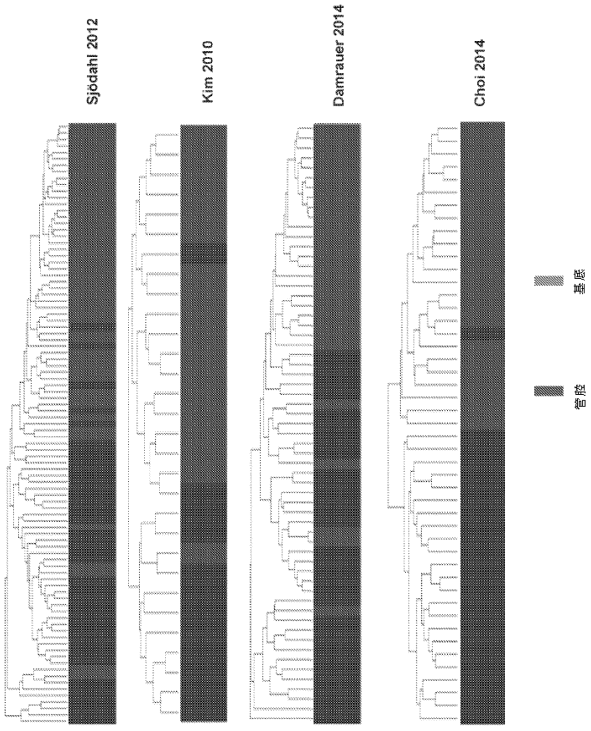
【図１２Ｂ】



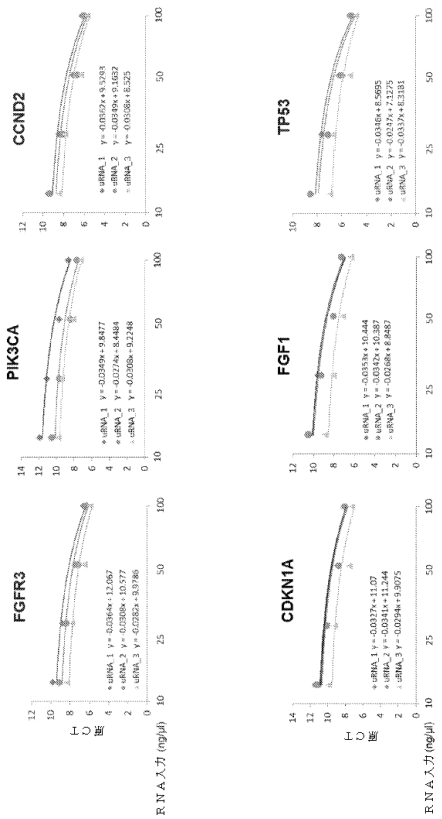
【図１２Ｃ】



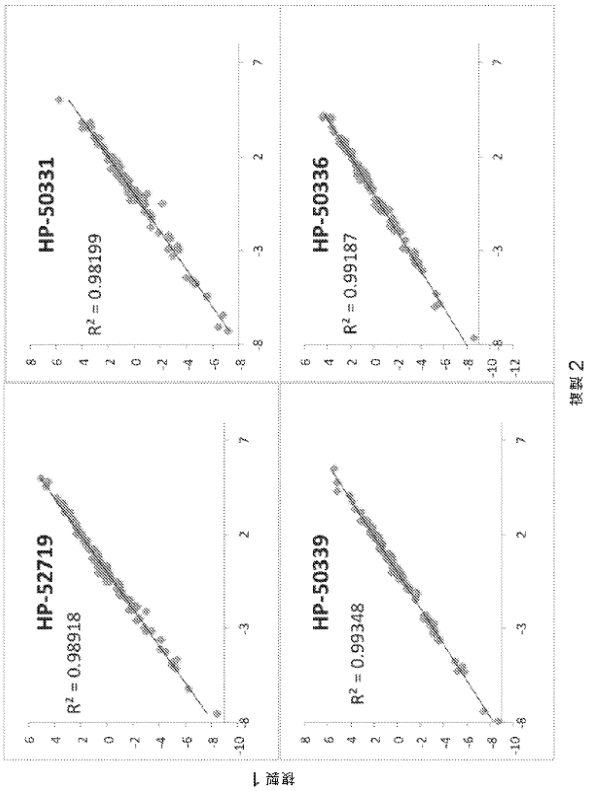
【図１２Ｄ】



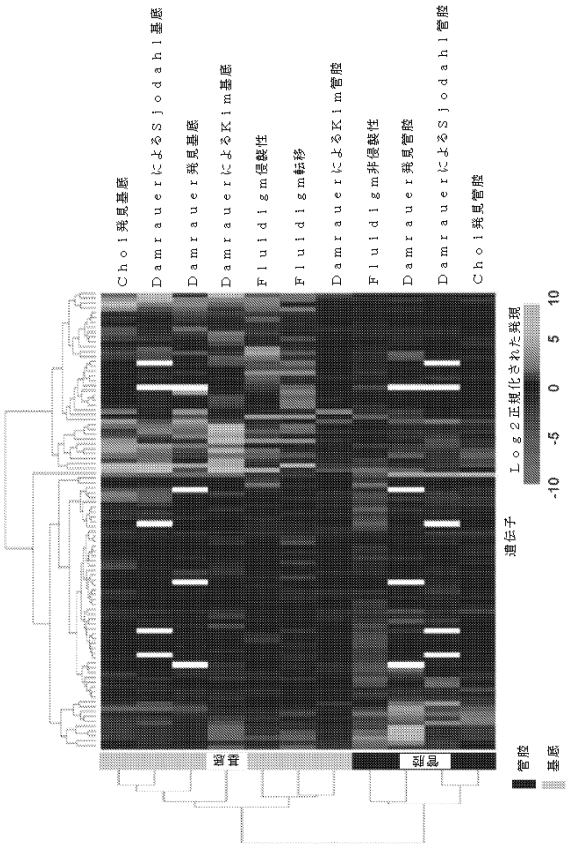
【図１３Ａ】



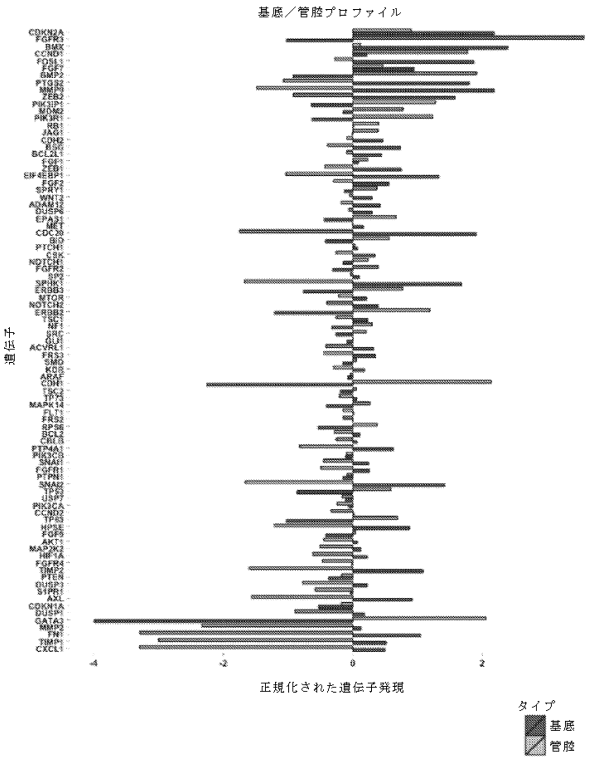
【図１３Ｂ】



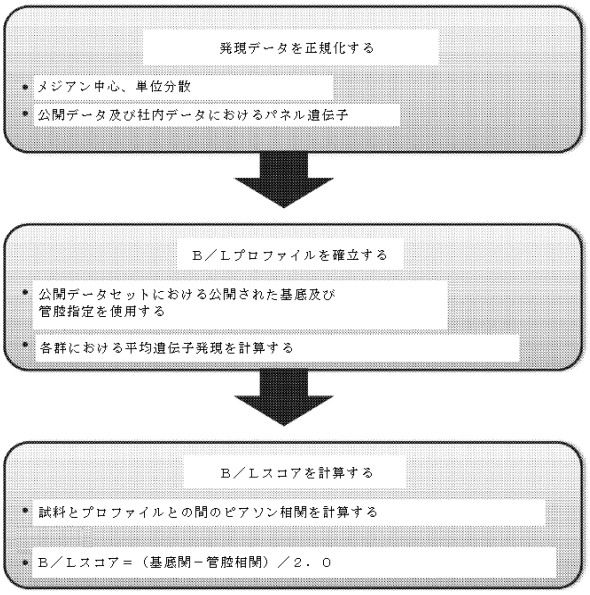
【図１４Ａ】



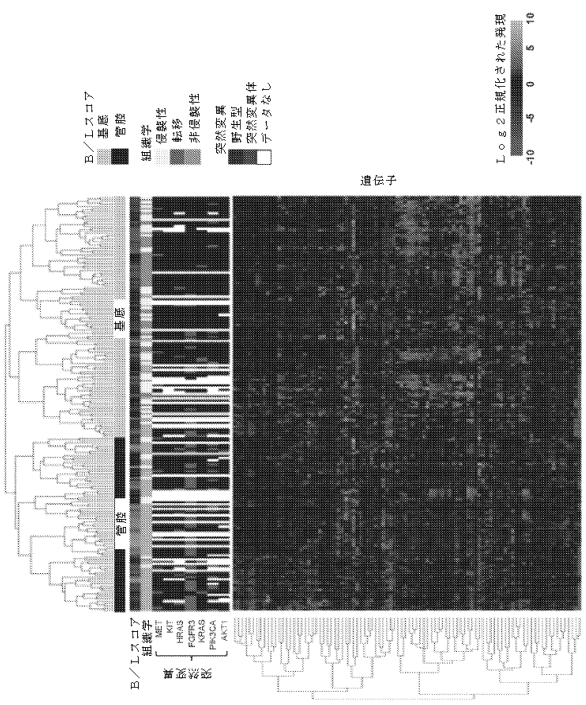
【図１４Ｂ】



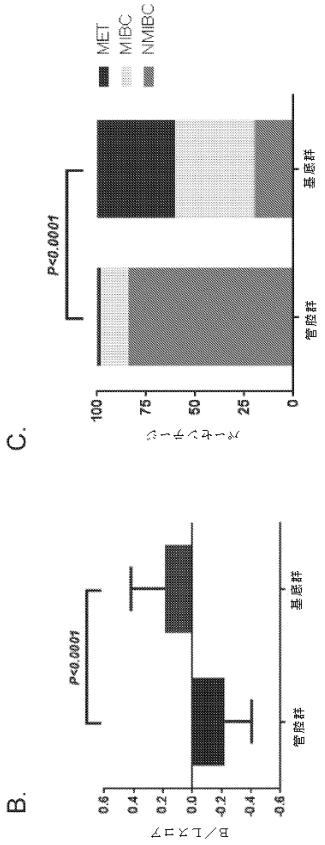
【図１４Ｃ】



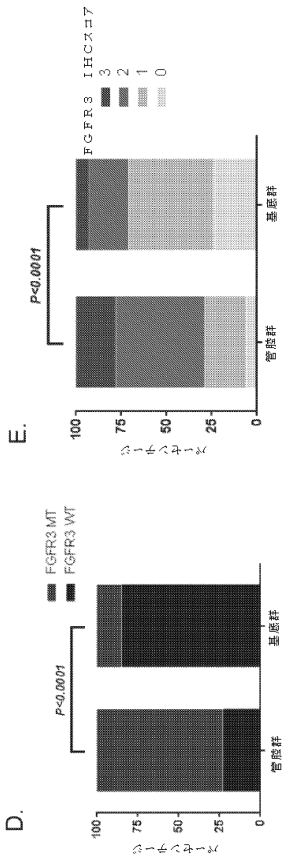
【図１５Ａ】



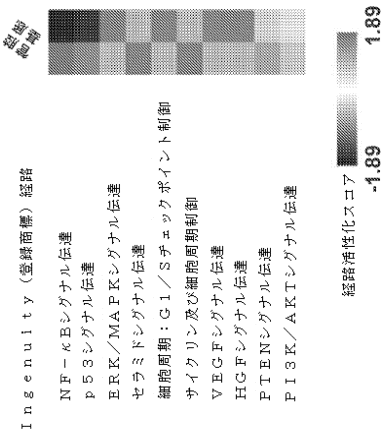
【図１５Ｂ－１５Ｃ】



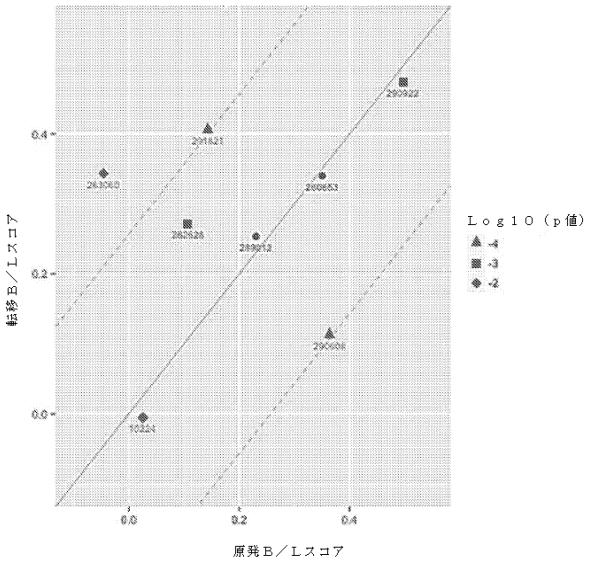
【図１５Ｄ－１５Ｅ】



【図１５Ｆ】



【図１６Ａ】



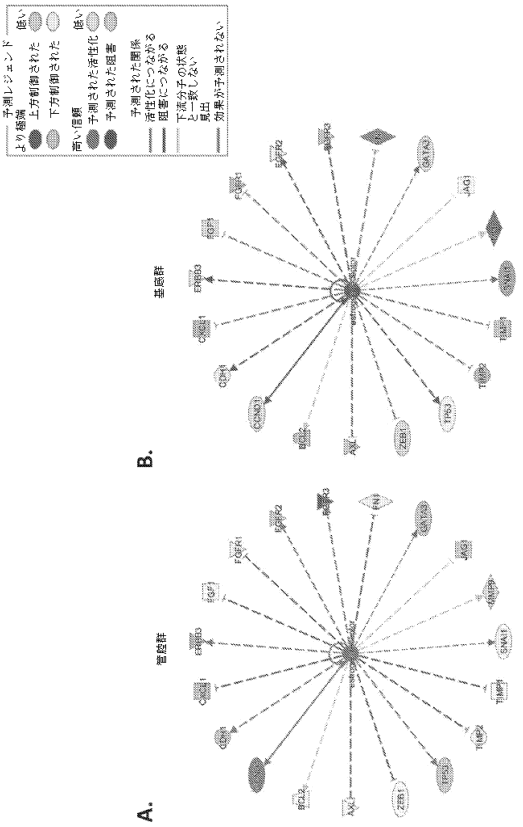
【図１６Ｂ】

マッチされた原発（Ｐｒｉ）腫瘍対マッチされた転移（ｍｅｔ）におけるＢ／Ｌ状態

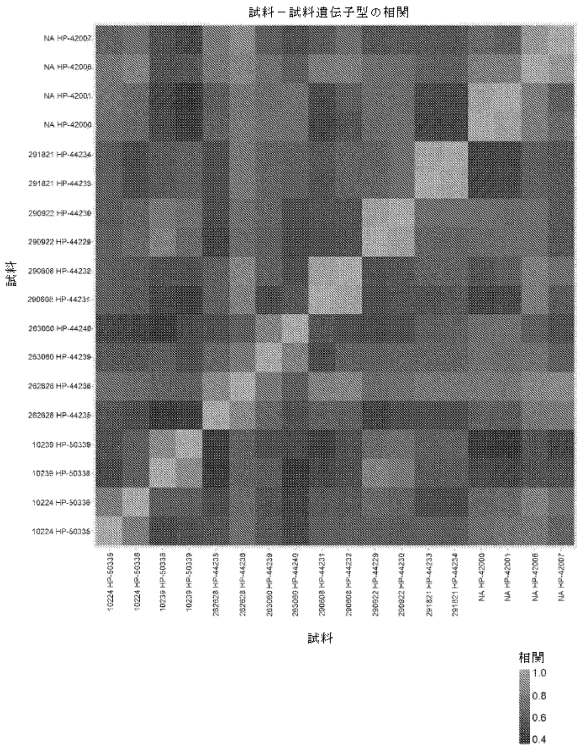
患者ＩＤ	Ｐｒｉ Ｂ／Ｌスコア	Ｍｅｔ Ｂ／Ｌスコア	Ｐｒｉ−Ｍｅｔ Ｂ／Ｌ変化ｐ値
10224	0.024	0.005	*0.813*
10239	0.581	0.443	*0.270*
260653	0.350	0.340	*0.934*
262628	0.107	0.272	*0.194*
263060	-0.046	0.343	***0.005***
289012	0.230	0.253	*0.851*
290608	0.364	0.112	*0.054*
290922	0.490	0.471	*0.852*
291821	0.144	0.406	***0.046***

管腔　基底

【図１７Ａ－１７Ｂ】



【図１８】



【配列表】
0006900314000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	G01N	33/53	D
G01N	*33/50*	*(2006.01)*	G01N	33/50	P

(72)発明者 キム, ドリス
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４０８０－４９９０, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ １

審査官 佐々木 大輔

(56)参考文献 国際公開第２０１４／１３５６５５（WO, Ａ１）
国際公開第２０１４／１５１８５３（WO, Ａ１）
MOOSO BENJAMIN A, THE ROLE OF EGFR FAMILY INHIBITORS IN MUSCLE INVASIVE BLADDER CANCER : A REVIEW OF CLINICAL 以下備考, JOURNAL OF UROLOGY, ２０１４年 ８月２３日, VOL:193, NR:1, PAGE(S):19 - 29, DATA AND MOLECULAR EVIDENCE, ＵＲＬ, http://www.jurology.com/article/S0022-5347(14)04269-4/pdf
MAZZOLA C R, DOVITINIB: RATIONALE, PRECLINICAL AND EARLY CLINICAL DATA IN UROTHELIAL CARCINOMA OF THE BLADDER, EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS, ２０１４年１１月, VOL:23, NR:11, PAGE(S):1553 - 1562, ＵＲＬ, http://dx.doi.org/10.1517/13543784.2014.966900
SHINOHARA A, ASSOCIATION OF TP53 AND MDM2 POLYMORPHISMS WITH SURVIVAL IN BLADDER CANCER PATIENTS 以下備考, CANCER SCIENCE, ２００９年１２月, VOL:100, NR:12, PAGE(S):2376 - 2382, TREATED WITH CHEMORADIOTHERAPY, ＵＲＬ, http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01331.x

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ ３９／００－３９／４４
Ａ６１Ｋ ４１／００－４５／０８
Ａ６１Ｋ ３１／３３－３３／４４
Ｃ１２Ｑ １／００－ ３／００
Ｇ０１Ｎ ３３／４８－３３／９８
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）