

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6657103号
(P6657103)

(45) 発行日 令和2年3月4日(2020.3.4)

(24) 登録日 令和2年2月7日(2020.2.7)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M
C 1 2 Q 1/6874 (2018.01)	GO 1 N 33/48 P
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6874 Z

請求項の数 43 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-552285 (P2016-552285)	(73) 特許権者 511286517 ヴェンタナ メディカル システムズ, インク. アメリカ合衆国 アリゾナ 85755, ツーソン, イースト イノベーション パーク ドライブ 1910
(86) (22) 出願日 平成27年2月16日(2015.2.16)	
(65) 公表番号 特表2017-508147 (P2017-508147A)	(73) 特許権者 506115514 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ ティ オブ カリフォルニア アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94 607-5200, オークランド, フラン クリン ストリート 1111, 5番 フ ロア
(43) 公表日 平成29年3月23日(2017.3.23)	
(86) 国際出願番号 PCT/EP2015/053196	
(87) 国際公開番号 W02015/121465	
(87) 国際公開日 平成27年8月20日(2015.8.20)	
審査請求日 平成30年2月1日(2018.2.1)	
(31) 優先権主張番号 61/940,705	
(32) 優先日 平成26年2月17日(2014.2.17)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ステージ I I の結腸直腸がんにおける予測マーカーとしてのGアルファ相互作用小胞結合タンパク質 (G I V)

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象から取得されたステージ I I のミスマッチ修復良好 (p M M R) 結腸直腸がん (C R C) 試料を解析するための方法であって、

ステージ I I の p M M R C R C を含む試料を、 G アルファ相互作用小胞結合タンパク質 - 完全長 (G I V - f 1) タンパク質特異的結合剤と接触させること；

試料における G I V - f 1 タンパク質の発現をスコアリングして、試料の G I V - f 1 状態を決定すること；

対象における C R C のリンパ管浸潤 (L V I) 状態を決定すること；及び

G I V - f 1 状態及び L V I 状態に基づいて試料を解析すること

を含み、

対象の起こり得る無増悪生存 (P F S) を予測することを補助するための方法であり、より高い L V I 及び高い G I V - f 1 レベルは、より高い確率の再発と関連する、方法。

【請求項 2】

診断時の対象の年齢、 C R C について陽性のリンパ節の数；対象の性別、腫瘍分化の状況、がんの T ステージ；及びどちら側に結腸がんが存在したのかを含む、対象の 1 又は複数の特性を決定すること；並びに

G I V - f 1 状態、 L V I 状態、及び対象の前記 1 又は複数の特性に基づいて、試料を解析すること

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

G I V - f 1 状態、L V I 状態、及び対象の特性の 1 又は複数を、コンピューターに入力すること；並びに

コンピューターから出力を生成し、それによって試料を解析することをさらに含む、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

G I V - f 1 タンパク質特異的結合剤が、G I V - f 1 抗体を含む、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 5】

G I V - f 1 抗体が、G I V - f 1 抗体クローン S P 1 7 3 を含む、請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 6】

G I V - f 1 タンパク質の発現をスコアリングすることが、

a . 0 から 3 のスケールで、試料の陽性 G I V - f 1 染色の程度を決定することであって、ここで試料の総面積の 0 % - 1 0 % が陽性染色される場合、陽性染色の程度には 0 が割り当てられ、試料の総面積の 1 1 % - 3 5 % が陽性染色される場合、陽性染色の程度には 1 が割り当てられ、試料の総面積の 3 6 % - 5 0 % が陽性染色される場合、陽性染色の程度には 2 が割り当てられ、試料の総面積の 5 1 % - 1 0 0 % が陽性染色される場合、陽性染色の程度には 3 が割り当てられる、試料の陽性 G I V - f 1 染色の程度を決定すること；

20

b . 0 (陰性)、1 (弱い)、2 (中程度) から 3 (強い) のスケールで、試料の染色の G I V - f 1 強度；G I V - f 1 の程度及び強度スコアを決定すること；

c . 陽性 G I V - f 1 染色の程度及び染色の G I V - f 1 強度を合計し、それによって 0 から 6 までの G I V - f 1 スコア値を生成すること；並びに

d . G I V - f 1 スコア値が 0 - 2 である場合に試料が G I V - f 1 陰性であると決定すること、又は G I V - f 1 スコア値が 3 - 6 である場合に試料が G I V - f 1 陽性であると決定すること

を含む、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 7】

G I V - f 1 タンパク質の発現をスコアリングすることが、

a . 試料の G I V - f 1 染色の総面積が 1 0 % よりも高いかどうかを決定すること、又は G I V - f 1 染色強度が 3 + (強い) であるかどうかを決定すること；及び

b . 試料の G I V - f 1 染色の総面積が、任意の染色強度で 1 0 % よりも高い場合、若しくは G I V - f 1 染色強度が、任意のパーセントで 3 + である場合に、試料が G I V - f 1 陽性であると決定すること；又は 0、1 + 又は 2 + の染色強度での試料の G I V - f 1 染色の総面積が 1 0 % 未満である場合に、試料が G I V - f 1 陰性であると決定すること

30

を含む、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 8】

化学療法又は生物療法による治療にตอบสนองする可能性が低い対象から、化学療法又は生物療法による治療にตอบสนองする可能性が高い対象を識別する方法である、請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項 9】

対象が、化学療法又は生物療法による治療にตอบสนองする可能性が高い対象として同定された場合、該対象を化学療法又は生物療法による治療のために選択することをさらに含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

化学療法又は生物療法が、5 - フルオロウラシル、ロイコボリン、パニツムマブ (V E C T I B I X (登録商標))、セツキシマブ (E R B I T U X (登録商標))、ペバシズマブ (A V A S T I N (登録商標))、z i v - アフリベルセプト (Z A L T R A P (登

50

録商標)、イリノテカン(CAMP T O S A R(登録商標))、オキサリプラチン(E L O X A T I N(登録商標))又はそれらの組合せを含む、請求項8又は9に記載の方法。

【請求項11】

対象が、化学療法未治療の対象である、請求項1から10の何れか一項に記載の方法。

【請求項12】

試料が、手術切除標本、組織生検又は穿刺吸引物を含む、請求項1から11の何れか一項に記載の方法。

【請求項13】

組織生検が、組織切片を含む、請求項12に記載の方法。

10

【請求項14】

試料が、固定された試料である、請求項1から13の何れか一項に記載の方法。

【請求項15】

試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料である、請求項1から14の何れか一項に記載の方法。

【請求項16】

試料が、ステージIIaのpMMR CRC試料である、請求項1から15の何れか一項に記載の方法。

【請求項17】

試料が、ステージIIbのpMMR CRC試料である、請求項1から15の何れか一項に記載の方法。

20

【請求項18】

試料のミスマッチ修復(MMR)状態を決定することをさらに含む、請求項1から17の何れか一項に記載の方法。

【請求項19】

試料をGIV-f1タンパク質特異的結合剤と接触させることが、自動化組織染色器を用いて実施される、請求項1から18の何れか一項に記載の方法。

【請求項20】

GIV-f1タンパク質の発現をスコアリングすることが、視覚的検査、又は対応するデジタル画像の画像解析を含む、請求項1から19の何れか一項に記載の方法。

30

【請求項21】

視覚的検査が、光学顕微鏡を利用して実施される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

GIV-f1タンパク質の発現をスコアリングすることが、試料の総面積の視覚的検査を含む、請求項1から21の何れか一項に記載の方法。

【請求項23】

試料におけるGIV-f1タンパク質の発現をスコアリングすることが、試料へのGIV-f1タンパク質特異的結合剤の結合の直接的又は間接的検出を含む、請求項1から22の何れか一項に記載の方法。

【請求項24】

1又は複数の工程が、適切にプログラムされたコンピューターによって実施される、請求項1から23の何れか一項に記載の方法。

40

【請求項25】

コンピューター実装方法であって、

GIV-f1特異的結合剤で検出可能に標識されたステージIIの結腸直腸がん(CRC)試料を示す表示された画像内の測定されたGIV-f1タンパク質発現に少なくとも基づいて、GIV-f1タンパク質発現スコアを生成することであって、ここでCRC試料は対象から取得されたものであり、GIV-f1タンパク質発現スコアが：

(i) 0から3のスケールで、試料の陽性GIV-f1染色の程度を決定することであって、ここで試料の総面積の0% - 10%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には

50

0 が割り当てられ、試料の総面積の 11% - 35% が陽性染色される場合、陽性染色の程度には 1 が割り当てられ、試料の総面積の 36% - 50% が陽性染色される場合、陽性染色の程度には 2 が割り当てられ、試料の総面積の 51% - 100% が陽性染色される場合、陽性染色の程度には 3 が割り当てられ；

0 (陰性)、1 (弱い)、2 (中程度) から 3 (強い) のスケールで、試料の染色の G I V - f 1 強度を決定すること、

陽性 G I V - f 1 染色の程度及び染色の G I V - f 1 強度を合計し、それによって、0 から 6 までの G I V - f 1 スコア値を生成すること；及び

G I V - f 1 スコア値が 0 - 2 である場合に試料が G I V - f 1 陰性であると決定すること、若しくは G I V - f 1 スコア値が 3 - 6 である場合に試料が G I V - f 1 陽性であると決定すること

10

によって生成されるか；又は

(i i) 試料の G I V - f 1 染色の総面積が 10% よりも高いかどうかを決定すること、又は G I V - f 1 染色強度が 3 + (強い) であるかどうかを決定すること；及び

試料の G I V - f 1 染色の総面積が、任意の染色強度で 10% よりも高い場合、若しくは G I V - f 1 染色強度が、任意のパーセントで 3 + である場合に、試料が G I V - f 1 陽性であると決定すること；又は G I V - f 1 染色の総面積が、0、1 + 又は 2 + の試料の染色強度で 10% 未満である場合に、試料が G I V - f 1 陰性であると決定すること

によって生成される、G I V - f 1 タンパク質発現スコアを生成すること；並びに

20

試料の G I V - f 1 タンパク質発現スコアを出力すること

を含み、

対象の起こり得る無増悪生存 (P F S) を予測する方法であり、

より高い L V I 及び高い G I V - f 1 レベルは、より高い確率の再発と関連する、コンピューター実装方法。

【請求項 26】

対象のリンパ管浸潤 (L V I) 状態を入力すること；及び

対象の予後を出力すること

をさらに含む、請求項 25 に記載のコンピューター実装方法。

【請求項 27】

30

診断時の対象の年齢、C R C について陽性のリンパ節の数；対象の性別、腫瘍分化の状況、がんの T ステージ；及びどちら側に結腸がんが存在したのを含む、対象の 1 又は複数の特性を入力することをさらに含む、請求項 25 に記載のコンピューター実装方法。

【請求項 28】

コンピューティングシステムに請求項 25 から 27 の何れか一項に記載の方法を実施させるコンピューターで実行可能な命令を含む、1 又は複数の非一時的コンピューター可読媒体。

【請求項 29】

対象から取得されたステージ I I のミスマッチ修復良好 (p M M R) 結腸直腸がん (C R C) 試料を解析するためのシステムであって、

40

試料中の G I V - f 1 のレベルを測定するための手段；

対象のリンパ管浸潤 (L V I) 状態を決定するための手段；

G I V - f 1 の測定されたレベルを G I V - f 1 参照値と比較するための実装ルール；

L V I 状態を L V I 状態参照値と比較するための実装ルール；並びに

前記ルールを実装するための手段

を備え、それによって、C R C 再発の起こり得るリスク及び / 又は化学療法若しくは生物療法に対する C R C の起こり得る応答の指標が、G I V - f 1 の測定されたレベル及び L V I 状態に基づいて提供され、

対象の起こり得る無増悪生存 (P F S) を予測するシステムであり、

より高い L V I 及び高い G I V - f 1 レベルは、より高い確率の再発と関連する、システ

50

ム。

【請求項 30】

診断時の対象の年齢、CRCについて陽性のリンパ節の数；対象の性別、腫瘍分化の状況、がんのTステージ；及びどちら側に結腸がんが存在したのかを含む、対象の1又は複数の特性を決定するための手段；並びに

前記1又は複数の特性の測定されたレベルを、1又は複数の特性についての参照値と比較するための実装ルール

をさらに含む、請求項 29 に記載のシステム。

【請求項 31】

G I V - f 1 特異的結合剤、又はG I V - f 1 遺伝子配列に特異的な核酸プローブ；及び

L V I の決定を可能にする特異的結合剤を含む、対象の起こり得る無増悪生存 (P F S) を予測するためのキットであって、より高いL V I 及び高いG I V - f 1 レベルは、より高い確率の再発と関連する、キット。

【請求項 32】

ミスマッチ修復タンパク質特異的結合剤；顕微鏡スライド；標識された二次抗体；及びI H C のためのバッファの、1又は複数を含む、請求項 31 に記載のキット。

【請求項 33】

G I V - f 1 タンパク質特異的結合剤が、G I V - f 1 抗体を含む、請求項 31 又は 32 に記載のキット。

【請求項 34】

G I V - f 1 抗体が、G I V - f 1 抗体クローン S P 1 7 3 を含む、請求項 33 に記載のキット。

【請求項 35】

L V I の決定を可能にする特異的結合剤が、C D 3 4 又はリンパ内皮に特異的な抗体を含む、請求項 31 から 34 の何れか一項に記載のキット。

【請求項 36】

ミスマッチ修復タンパク質特異的結合剤が、m u t L ホモログ 1 (M L H 1) ；減数分裂後隔離増加 2 (P M S 2) ；M u t S タンパク質ホモログ 2 M s h 2 (M S H 2) 及び / 又はM u t S タンパク質ホモログ 6 (M S H 6) に特異的な1又は複数の抗体を含む、請求項 32 から 35 の何れか一項に記載のキット。

【請求項 37】

対象から取得されたステージ I I のミスマッチ修復良好 (p M M R) 結腸直腸がん (C R C) 試料を解析するための方法であって、

試料からRNAを単離すること；

RNAを含有する試料を、Gアルファ相互作用小胞結合タンパク質 - 完全長 (G I V - f 1) m R N A に特異的な核酸プローブと接触させること；

試料中のG I V - f 1 m R N A の量を決定すること

を含み、

対象の起こり得る無増悪生存 (P F S) を予測することを補助するための方法であり、より高いL V I 及び高いG I V - f 1 m R N A レベルは、より高い確率の再発と関連する、方法。

【請求項 38】

試料中のG I V - f 1 m R N A の量が、定量的逆転写P C R (q R T - P C R) によって決定される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

試料中のG I V - f 1 m R N A の量が、コントロール遺伝子のm R N A の量に対して相対的に決定される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 40】

10

20

30

40

50

CRC腫瘍試料中のGIV-fl mRNAの相対的量が、非腫瘍試料中のGIV-fl mRNAの相対的量と比較される、請求項37に記載の方法。

【請求項41】

試料中のGIV-fl mRNAの量が、コントロール試料中のGIV-fl mRNAの量を超える場合に、試料にGIV-fl陽性を割り当ててをさらに含む、請求項37に記載の方法。

【請求項42】

対象のLVI状態を決定することをさらに含む、請求項37に記載の方法。

【請求項43】

対象から取得されたステージIIのミスマッチ修復良好(pMMR)結腸直腸がん(CRC)試料を解析するためのキットであって、

RNAを含有する試料を、Gアルファ相互作用小胞結合タンパク質-完全長(GIV-fl)mRNAに特異的な核酸プローブと接触させるための手段と；

試料中のGIV-fl mRNAの量を決定するための手段とを含み、

対象の起こり得る無増悪生存(PFS)を予測するためのキットであり、

より高いLVI及び高いGIV-fl mRNAレベルは、より高い確率の再発と関連する、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願とのクロスリファレンス

本出願は、2014年2月17日出願の米国特許仮出願第61/940705号に対する優先権を主張する。

【0002】

分野

ステージIIの結腸直腸がん(CRC)試料(例えば、ミスマッチ修復良好(mismatch repair proficient)、pMMR試料)を解析するための方法、システム及びキットが、本明細書に提供される。かかる方法は、CRCのリンパ管浸潤(LVI)状態を決定することと組み合わせて、Gアルファ相互作用小胞結合タンパク質(GIV、ギルジン(girdin)としても公知)完全長(GIV-fl)発現をスコアリングして、CRCについてGIV-fl状態を提供することを含み得る。

【0003】

共同研究契約に関わる団体

Ventana Medical Systems, Inc.及びUniversity of California, San Diegoは、本明細書に開示される発明を管理する共同研究契約に関わる団体である。

【背景技術】

【0004】

転移は、身体中の遠位の位置への腫瘍細胞の移動が関与する、多段階の複雑なプロセスである。移動又は浸潤するがん細胞は、増殖因子勾配を感知するために走化性受容体を利用し、PI3K-Aktシグナル伝達を増幅しなければならない(Muller等, Nature, 2001. 410(6824):50-6)。ヒト上皮がんでは、PI3K-Aktシグナル伝達経路は、がん浸潤の間に頻繁に過剰活性化され(Larue及びBellacosa, Oncogene, 2005. 24(50):7443-54)、効率的な細胞移動と共役したPI3K-Aktの進行性の増強は、高い転移能の特徴である(Qiao等, Cancer Res, 2007. 67(11):5293-9)。しかし、機械的に同定された生物学的マーカーを使用した、腫瘍の転移能の正確な予測は、一部しか成功していない(Fidler, Nat Rev Cancer, 2003. 3(6):453-8)。PI3K-Aktシグナル伝達、アクチン再構築、運動性及び浸潤に関連する遺伝子/タンパク質の発現が腫瘍間で変動すること

10

20

30

40

50

を示す最近の研究 (Qiao等, Cell Cycle, 2008, 7(19):2991-6) にもかわらず、それらのほとんどは、予後判定のためのバイオマーカーとしての、がん治療機関への移行はできていない。したがって、その作用機序の特徴が十分に明らかにされ、治療機関でがん患者の再発又は転移のリスクを階層化するようにも機能し得る、腫瘍浸潤の間に役割を果たすことが証明された分子/マーカーについての研究が継続している。

【発明の概要】

【0005】

本出願は、ミスマッチ修復良好 (pMMR) であるステージII (例えば、ステージIIa又はIIb) の結腸直腸がんを有する患者の、高リスク又は低リスクとしての分類、即ち、彼らのCRCが再発又は進行する可能性が高いかどうかの分類を可能にする方法を提供する。進行について高リスクの患者は、化学療法又は生物療法を受けるように選択され得るが、低リスクの患者は、化学療法も生物療法も受けないように選択され得るので、かかる方法は有用である。一部の例では、これらの方法は、高リスクを有すると同定された患者を、化学療法又は生物療法で治療することを含む。さらに、開示された方法は、化学予測のため、即ち、化学療法又は生物療法に応答する可能性がより高いCRC pMMRステージII (例えば、ステージIIa又はIIb) の腫瘍 (例えば、開示された方法によって高リスクと分類されたもの) を同定するために使用され得る。

10

【0006】

対象における完全長Gアルファ相互作用小胞結合タンパク質 (GIV-f1) の発現の決定 (例えば、GIV-f1発現をスコアリングすることによる)、及びリンパ管浸潤 (LVI) 状態の決定は、高い精度で、(例えば、少なくとも2年以内、又は少なくとも5年以内に) 再発する可能性が高いそれらのステージIIのCRC、及び再発する可能性が低いそれらのステージIIのCRCを予測できることが、本明細書で示される。一部の例では、これらの方法は、ステージIIのCRCが再発する可能性が高いかどうか、したがって化学療法又は生物療法で治療すべき高リスク腫瘍であるかどうかを決定するために、対象の1又は複数の他の特性、例えば、診断時の対象の年齢、CRCについて陽性のリンパ節の数、対象の性別、腫瘍分化の状況、がんのTステージ; 及びどちら側に結腸がんが存在したのかもまた使用する。

20

【0007】

したがって、本開示は、例えば、1年以内、2年以内、3年以内、4年以内、5年以内、又は6年以内に進行することについて高リスク又は低リスクを有するものとしてCRCを分類するなどのために、対象から取得されたステージIIのpMMR CRC試料を解析するための方法を提供する。特定の例では、この方法は、ステージIIのCRC試料を、GIV-f1タンパク質特異的結合剤、例えば、GIV-f1に特異的な抗体 (即ち、C末端、例えばC末端の762又は763個のアミノ酸を欠くGIVの形態を検出できない) と接触させることを含む。この方法は、試料におけるGIV-f1タンパク質の発現をスコアリングして、試料のGIV-f1状態 (例えば、陽性又は陰性) を決定することもまた含む。

30

【0008】

一例では、GIV-f1タンパク質の発現をスコアリングすることは、0から3のスケールで、試料の陽性GIV-f1染色の程度を決定することであって、ここで試料の総面積の0% - 10%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には0が割り当てられ、試料の総面積の11% - 35%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には1が割り当てられ、試料の総面積の36% - 50%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には2が割り当てられ、試料の総面積の51% - 100%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には3が割り当てられる、決定すること; 0 (陰性)、1 (弱い)、2 (中程度) から3 (強い) のスケールで、試料の染色のGIV-f1強度を決定すること; 陽性GIV-f1染色の程度及び染色のGIV-f1強度を合計し、それによって、0から6までのGIV-f1スコア値を生成すること; 並びにGIV-f1スコア値が0 - 2である場合に試料がGIV-f1陰性であると決定すること、又はGIV-f1スコア値が3 - 6である場合に試

40

50

料がG I V - f 1 陽性であると決定することを含む。

【 0 0 0 9 】

別の一例では、G I V - f 1 タンパク質の発現をスコアリングすることは、試料のG I V - f 1 染色の総面積が10%よりも高いかどうかを決定すること、又は試料のG I V - f 1 染色強度が3+ (強い)であるかどうかを決定することを含む。例えば、ネガティブコントロール試薬での強度と類似の任意の検出可能なシグナルも薄灰色/黄褐色シグナルも存在しない場合、試料は陰性(0)とスコアリングされ得る；ネガティブコントロール試薬で、及びバックグラウンドにおいて見られるものよりも高い明褐色染色強度が存在する場合、試料は弱い(1+)とスコアリングされ得る；褐色強度が存在する場合、試料は中程度(2+)とスコアリングされ得る；又は暗褐色から黒色のシグナル強度が存在する場合、試料は強い(3+)強度とスコアリングされ得る。G I V - f 1 状態は、試料のG I V - f 1 染色の総面積が、任意の強度で10%よりも高い場合、若しくはG I V - f 1 染色強度が、任意のパーセントで強い(3+)場合に、陽性であると決定される；又はG I V - f 1 状態は、G I V - f 1 染色の総面積が、試料について0、1+又は2+の染色強度で10%未満である場合に、陰性であると決定される。この方法は、例えば、生存C R C 細胞が、腫瘍中に存在する血管又はリンパ管のいずれか中に存在するかどうかを決定することによって、対象のリンパ管浸潤(L V I)状態を決定することもまた含む。一部の例では、この方法は、対象の1又は複数のさらなる特性、例えば、診断時の対象の年齢、C R C について陽性のリンパ節の数、対象の性別、腫瘍分化の状況、がんのTステージ；及びどちら側に結腸がんが存在したのかを決定することをさらに含む。決定されたG I V - f 1 状態、L V I 状態、及び任意選択的に対象の特性の1又は複数は、コンピューター又はアルゴリズムに入力され、これが次いで出力を生成し、それによって試料を解析する。一部の例では、この出力は、C R C が進行する(例えば転移する)可能性が高いかどうかに関する指標である。例えば、出力は、C R C が高リスク又は低リスクであるという表示であり得る。一部の例では、出力は、対象の起こり得る無増悪生存(P F S)である。これは、医師が、化学療法も生物療法も必要としない(低リスク)化学療法未治療の対象から、化学療法又は生物療法による治療に応答する可能性が高い(高リスク)化学療法未治療の対象を同定することを可能にできる。開示された方法の1又は複数の工程は、適切にプログラムされたコンピューターによって実施され得る。

10

20

【 0 0 1 0 】

この方法は、高リスクと同定された対象を、化学療法又は生物療法、例えば、5 - フルオロウラシル、ロイコポリン、パニツムマブ(V E C T I B I X (登録商標))、セツキシマブ(E R B I T U X (登録商標))、ペバシズマブ(A V A S T I N (登録商標))、z i v - アフリベルセプト(Z A L T R A P (登録商標))、イリノテカン(C A M P T O S A R (登録商標))及びオキサリプラチン(E L O X A T I N (登録商標))のうち1又は複数で治療することもまた含む得る。

30

【 0 0 1 1 】

コンピューター実装方法もまた提供される。一例では、この方法は、G I V - f 1 抗体で検出可能に標識されたステージIIの結腸直腸がん(C R C)試料を示す表示された画像内の測定されたG I V - f 1 タンパク質発現に少なくとも基づいて、G I V - f 1 タンパク質発現スコアを生成することであって、ここでC R C 試料は対象から取得されたものであり、G I V - f 1 タンパク質発現スコアが、(i)0から3のスケールで、試料の陽性G I V - f 1 染色の程度を決定することであって、ここで試料の総面積の0% - 10%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には0が割り当てられ、試料の総面積の11% - 35%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には1が割り当てられ、試料の総面積の36% - 50%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には2が割り当てられ、試料の総面積の51% - 100%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には3が割り当てられる、決定すること；0から3のスケールで、試料のG I V - f 1 染色強度スコア(例えば、全体的又は支配的な染色強度)を決定すること(例えば、ネガティブコントロール試薬での強度と類似の任意の検出可能なシグナルも薄灰色/黄褐色シグナルも存在しない場合、試

40

50

料は陰性(0)とスコアリングされ得る；ネガティブコントロール試薬で、及びバックグラウンドにおいて見られるものよりも高い明褐色染色強度が存在する場合、試料は弱い(1)とスコアリングされ得る；褐色強度が存在する場合、試料は中程度(2)とスコアリングされ得る；又は暗褐色から黒色のシグナル強度が存在する場合、試料は強い(3)強度とスコアリングされ得る)、陽性G I V - f 1染色の程度及び染色のG I V - f 1強度を合計し、それによって、0から6までのG I V - f 1スコア値を生成すること；及びG I V - f 1スコア値が0 - 2である場合に試料がG I V - f 1陰性であると決定すること、又はG I V - f 1スコア値が3 - 6である場合に試料がG I V - f 1陽性であると決定することによって生成されるか、又は(i i)試料のG I V - f 1染色の総面積が10%よりも高いかどうかを決定すること、又はG I V - f 1染色強度が3+(強い)かどうかを決定すること(例えば、ネガティブコントロール試薬での強度と類似の任意の検出可能なシグナルも薄灰色/黄褐色シグナルも存在しない場合、試料は陰性(0)とスコアリングされ得る；ネガティブコントロール試薬で、及びバックグラウンドにおいて見られるものよりも高い明褐色染色強度が存在する場合、試料は弱い(1+)とスコアリングされ得る；褐色強度が存在する場合、試料は中程度(2+)とスコアリングされ得る；又は暗褐色から黒色のシグナル強度が存在する場合、試料は強い(3+)強度とスコアリングされ得る)、及び試料のG I V - f 1染色の総面積が、任意の強度で10%よりも高い場合、若しくはG I V - f 1染色強度が、任意のパーセントで強い(3+)場合に、試料がG I V - f 1陽性であると決定すること；又はG I V - f 1染色の総面積が、試料について0、1+又は2+の染色強度で10%未満である場合に、試料がG I V - f 1陰性であると決定することによって生成される、G I V - f 1タンパク質発現スコアを生成することを含む。試料について得られたG I V - f 1タンパク質発現スコアは、視覚的又は可聴的出力など、コンピューターから出力され得る。一部の例では、これらのコンピューター実装方法は、対象のリンパ管浸潤(L V I)状態をコンピューターに入力すること、及び任意選択的に、診断時の対象の年齢、C R Cについて陽性のリンパ節の数；対象の性別、腫瘍分化の状況、がんのTステージ；及びどちら側に結腸がんが存在したのかを含む、対象の1又は複数の特性をコンピューターに入力することをさらに含む。一部の例では、対象の1又は複数の特性には、腫瘍悪性度、L V I、試験したリンパ節の数、神経周囲浸潤が存在するかどうか、局在化した穿孔が存在するかどうか、及び辺縁が不確定か陽性かが含まれる。次いで、コンピューターは、C R Cが進行する(例えば転移する)可能性が高いかどうかなどの出力を提供し得る。例えば、この出力は、C R Cが高リスク又は低リスクであるという表示、対象の起こり得る無増悪生存(P F S)、対象についての予後、対象が化学療法若しくは生物療法から利益を得る可能性が高いかどうか、又はそれらの組合せであり得る。

【0012】

コンピューティングシステムに本明細書に提供される方法を実施させるコンピューターで実行可能な命令を含む、1又は複数の非一時的コンピューター可読媒体も提供される。

【0013】

対象から取得されたステージIIのミスマッチ修復良好(p M M R)結腸直腸がん(C R C)試料を解析するためのシステムも提供される。かかるシステムは、試料中のG I V - f 1のレベルを測定するための手段(例えば、G I V - f 1特異的抗体)；及び対象のL V I状態を決定するための手段(例えば、H & E、又はC D 3 4及び/若しくはリンパ内皮などのL V Iマーカーに特異的な抗体)を含み得る。一部の例では、このシステムは、G I V - f 1の測定されたレベルに基づいて、試料のG I V - f 1状態(例えば、陽性又は陰性)を決定するための実装ルールを含む。一部の例では、このシステムは、G I V - f 1の測定されたレベルを、G I V - f 1ポジティブ又はネガティブコントロールなどのG I V - f 1参照値と比較するための実装ルールを含む。一部の例では、このシステムは、例えば、L V Iマーカーの測定されたレベルに基づいて、又は組織学的マーカー(例えば、H & E染色)に基づいて、試料のL V I状態(例えば、陽性又は陰性)を決定するための実装ルールを含む。一部の例では、このシステムは、測定されたL V Iマーカーを

10

20

30

40

50

、LVIポジティブ又はネガティブコントロールなどのLVI参照値又は試料と比較するための実装ルールを含む。一部の例では、GIV-f1及び/又はLVI参照値は、記憶された値である。一部の例では、GIV-f1及び/又はLVI参照値は、測定するための前記手段によってコントロール試料から測定されたGIV-f1及び/又はLVIのレベルである。このシステムは、ルールを実装するための1又は複数の手段を含み得て、それによって、CRC再発の起こり得るリスク及び/又は化学療法若しくは生物療法に対するCRCの起こり得る応答の指標が、GIV-f1及びLVI状態に基づいて提供される。一部の例では、このシステムは、診断時の対象の年齢、CRCについて陽性のリンパ節の数；対象の性別、腫瘍分化の状況、がんのTステージ；及びどちら側に結腸がんが存在したのかを含む、対象の1又は複数の特性を決定するための手段；並びに1又は複数の特性の測定されたレベルを、1又は複数の特性についての参照値と比較するための実装ルール、もまた含む。

10

【0014】

本開示は、本明細書に提供される方法と共に使用され得るものなどのキットもまた提供する。一例では、このキットは、抗体クローンSP173などのGIV-f1特異的結合剤を含む。このキットは、以下のうち1又は複数を含み得る：LVIの決定を可能にする特異的結合剤（例えば、CD34に特異的な抗体及び/又はリンパ内皮に特異的な抗体）；ミスマッチ修復タンパク質特異的結合剤（例えば、mutLホモログ1（MLH1）；減数分裂後隔離増加2（PMS2）；MutSタンパク質ホモログ2 Msh2（MSH2）、MutSタンパク質ホモログ6（MSH6）に特異的な抗体、又はかかる抗体の組合せ）；顕微鏡スライド；標識された二次抗体；及びIHCのためのバッファー。

20

【0015】

一部の実施態様では、本開示は、対象から取得されたステージIIのミスマッチ修復良好（pMMR）結腸直腸がん（CRC）試料を解析するための方法であって、試料からRNAを単離すること；RNAを含有する試料を、Gアルファ相互作用小胞結合タンパク質-完全長（GIV-f1）mRNAに特異的な核酸プローブと接触させること；及び試料中のGIV-f1 mRNAの量を決定することを含む方法を含む。別の実施態様では、GIV-f1 mRNAに特異的な核酸プローブ及びGIV-f1遺伝子配列に特異的な少なくとも1対のプライマーを含む、ステージIIのミスマッチ修復良好（pMMR）結腸直腸がん（CRC）試料を解析するためのキットが開示される。

30

【0016】

本開示の上述及び他の目的及び特徴は、添付の図面を参照して進行する以下の詳細な説明からより明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本明細書に開示される統計的モデル化において使用される工程を記載するデータフロー図である。

【図2A-B】IBLのGIV抗体又は実施例1に記載されるSP173 Abを用いた（A）正常及び（B）がん性結腸試料のIHC染色を示すデジタル画像を示す図である。

【図2C】がん性細胞株のGIV-f1 IHC染色を示すデジタル画像を示す図である

40

【図3A-C】異なる量の実施例1に記載されるGIV抗体を用いた、浸潤性がん細胞株（A）MDA MB231；（B）DLD1の、及び（C）正常肝臓における、IHC染色を示すデジタル画像を示す図である。

【図4A-B】異なる量の実施例1に記載されるGIV抗体を用いた、GIV陰性（A）及びGIV陽性（B）結腸がん症例のIHC染色を示すデジタル画像を示す図である。

【図5A-B】（A）0又は（B）1+のスコアを有する結腸直腸がんにおける、実施例1に記載されるGIV抗体を使用したIHC染色を示すデジタル画像を示す図である。

【図5C-D】（C）2+又は（D）3+のスコアを有する結腸直腸がんにおける、実施例1に記載されるGIV抗体を使用したIHC染色を示すデジタル画像を示す図である。

50

【図6】表7に示されるG I V - f 1の程度及び強度スコアのスコアリングアルゴリズムを使用して、ミスマッチ修復良好（p M M R）、ミスマッチ修復欠損（d M M R）、p M M R / G I V陽性、p M M R / G I V陰性によって階層化された全てのステージI IのC R C対象（T 3 + T 4）についての Kaplan-Meier 曲線を示す図である。

【図7A】表7からのG I V - f 1の程度及び強度スコアを使用した Kaplan-Meier 生存曲線を示す図である。

【図7B】G I V - f 1予測スコアを使用した Kaplan-Meier 生存曲線を示す図である。

【図8】表7に示されるG I V - f 1予測スコアのスコアリングアルゴリズムを使用して、ミスマッチ修復良好（p M M R）、ミスマッチ修復欠損（d M M R）、p M M R / G I V陽性、p M M R / G I V陰性によって階層化された化学療法未治療のステージI IのC R C対象（T 3 + T 4）についての Kaplan-Meier 曲線を示す図である。

10

【図9】調整された部分的 2 統計によってランク付けされた潜在的予測変数のドットプロットを示す図である。

【図10】（A）2年及び（B）5年の無増悪生存についての4つの統計的予測モデルについてのAUCプロットを示す図である。

【図11】G I V - f 1及びL V Iを含む統計的モデルに基づいた、化学療法未治療のステージI IのT 3 C R C患者についての予測性曲線を示す図である。

【図12】G I V + L V I及びM M Rについて階層化されたB i o G r i d 1コホートからの化学療法未治療の（上のグラフ）及び化学療法治療された（下のグラフ）ステージI IのT 3 C R C患者についての Kaplan-Meier 曲線を示す図である。

20

【図13】G I V + L V I及びM M Rについて階層化されたB i o G r i d 2コホートからの化学療法未治療の（上のグラフ）及び化学療法治療された（下のグラフ）ステージI IのT 3 C R C患者についての Kaplan-Meier 曲線を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

配列表

配列番号1は、G e n B a n k（登録商標）寄託番号B A E 4 4 3 8 7のタンパク質配列である。

30

1 meneiftplI eqfmtsplvt wvktfgplaa gngtnldeyv alvdgvflnq vmlqinpkle
61 sqrvnkkvnn daslrhmhls ilvrqikfyy qetlqqlimm slpnlviigk npfseqgte
121 vkklllllllg cavqcqkkee fieriqgldf dtkaavaahi qevthnqenv fdlqwmvevd
181 msqedieplI knmalhIkrl iderdehset iielseerdg lhflphasss aqspcgspgm
241 krtesrqhls veladakaki rrlrqeleek teqllDckqe leqmeielkr lqqenmnlIs
301 darsarmyrd eldalrekav rvdKlesevs rykerlhdie fykarveelk ednqvllEtK
361 tmlEdqlEgt rarsdklhel ekenlqlkak lhdmemerdm drkkieelme enmtlemaqk
421 qsmdeslhlg weleqisrts elseapqksl ghevneItss rllklemenq sltkTveelr
481 ttvdsvegna skilkmeken qrlskkveil eneivqekqs lqncqnlskd lmkekaqlek
541 tietlrense rqikilegen ehlnqtvssl rrsqisaea rvkdiekenk ilhesikets
601 sklskiefek rqikkelehy kekgeraeel enelhhleke nellqkkitn lkitcekiea
661 leqenseler enrklkktld sfknltfqlE slekensqlD eenlelrrnv eslkcasmmk
721 aqlqlenkel esekeqlkkg lellkasfkk terlevsyqg ldienqrLqk tlensnkkiq
781 qleselqdle menqtlqknI eelkisskrl eqlekenksl eqetsqlekd kkqlekenkr
841 lrqqaEikdt tleennvkig nlekenktls keigiykesc vrlkeleken kelvkratid
901 iktlvtlred lvsekIktqq mndleklth elekiglnke rllhdeqstd dryklleskl
961 estlkkslei keekiaalea rleestnynq qlrqelktvk knyealkqrq deermvqssp
1021 pisgednkwe resqettrel lkvkdrliev ernnatlqae kqalktqlkq letqnnnlqa
1081 qilalqrqtv slqeqnttlq tqnaklqven stlnsqstsl mnqnaqlliq qsslenenes
1141 vikeredlks lydslidhe klellherqa seyesliskh gtIksahknI evehrdledr

40

50

1201 ynqllkqkgq ledlekmlkv eqekmlenk nhetvaaeyk klcgendrln htysqllket
 1261 evlqtdhknl ksllnnskle qtrleaefsk lkeqyqqldi tstklinnqce llsqkgnle
 1321 eenrhllldqi qtlmlqnrtil leqnmeskd lfhveqrqyid klnelrrqke kleekimdqy
 1381 kfydpspprr rgnwitlkmr klikskkin rerqksltlt ptrsdssegf lqlphqdsqd
 1441 sssvgsnsle dgqtlgtkks smvalkrlpf lnrpkdkdk mkacyrrsms mndlvqsmvl
 1501 agqwtgsten levpddistg krrkelgama fsttainfst vnssagfrsk qlvnnkdttts
 1561 fedispqgvs ddsstgsrvh asrpasldsg rtstsnsnnn aslhevkaaga vnnqsrpqsh
 1621 ssgefslldhd heawsssgs piqylkrqtr sspvlqhkis etlesrhhki ktgspgsevv
 1681 tlqqfleesn kltsvqikss sqenlldevm kslsvssdf l gkdkpvcgl arsvsgktpg
 1741 dfydrtrtkp eflrpgprkt edtyfissag kptpgtqgki klvkesslsr qskdsnpyat
 1801 lprassvist aegtrrtsi hdfltkdsrl psvdppaa adsnttaasn vdkvqesrns
 1861 ksrreqqss

10

【 0 0 1 9 】

配列番号2は、GenBank(登録商標)寄託番号Q3V6T2のタンパク質配列である。

1 MENEI FTPLL EQFMTSPLVT WVKTFGPLAA GNGTNLDEYV ALVDGVFLNQ VMLQINPKLE
 61 SQRVNKKVNN DASLRMHNLS ILVRQIKFYQ QETLQQLIMM SLPNVLIIIGK NPFSEQGTEE
 121 VKKLLLLLLG CAVQCQKKEE FIERIQGLDF DTKAAVAABI QEVTHNQENV FDLQWMEVTD
 181 MSQEDIEPLL KNMALHLKRL IDERDEHSET IIEELSEERDG LHFLPHASSS AQSPCGSPGM
 241 KRTESRQHLS VELADAKAKI RRLRQELEEK TEQLLDCKQE LEQMEIELKR LQQENMNLLS
 301 DARSARMYRD ELDALREKAV RVDKLESEVS RYKERLHDIE FYKARVEELK EDNQVLLLETK
 361 TMLDQLEGT RARSDKLHEL EKENLQLKAK LHMEDMERDM DRKKIEELME ENMTLEMAQK
 421 QSMDESLHLG WELEQISRTS ELSEAPQKSL GHEVNELTSS RLLKLEMENQ SLTKTVEELR
 481 TTVDSVEGNA SKILKMEKEN QRLSKKVEIL ENEIVQEKQS LQNCQNLSDK LMKEKAQLEK
 541 TIETLRENSE RQIKILEQEN EHLNQTVSSL RQRSQISAEA RVKDIEKENK ILHESIKETS
 601 SKLSKIEFEK RQIKKELEHY KEKGERAEEL ENELHHLEKE NELLQKKITN LKITCEKIEA
 661 LEQENSELER ENRKLKKTLD SFKNLTFQLE SLEKENSQLD EENLELRRNV ESLKCA SMKM
 721 AQLQLENKEL ESEKEQLKKG LELLKASFVK TERLEVSYQG LD IENQRLQK TLENSNKKIQ
 781 QLESELQDLE MENQTLQKNL EELKISSKRL EQLEKENKSL EQETSQLEKD KKQLEKENKR
 841 LRQQA EIKDT TLEENNVKIG NLEKENKTLS KEIGIYKESC VRLKELEKEN KELVKRATID
 901 IKTLVTLRED LVSEKLKTQQ MNNDLEKLTH ELEKIGLNKE RLLHDEQSTD DSRYLKLESK
 961 LESTLKKSLE IKEEKIAALE ARLEESTNYN QQLRQELKTV KKNYEALKQR QDEERMVQSS
 1021 PPI SGEDNKW ERESQETTRE LLKVKDRLIE VERNNATLQA EKQALKTQLK QLETQNNNLQ
 1081 AQILALQRQT VSLQEQTTL QTQNAKLQVE NSTLNSQSTS LMNQAQLLI QSSLENENE
 1141 SVIKEREDLK SLYDSLKDH EKLELLHERQ ASEYESLISK HGTLKSAHKN LEVEHRDLED
 1201 RYNQLLKQKG QLEDLEKMLK VEQEKMLLEN KNHETVAAEY KKLCCGENDRL NHTYSQLLKE
 1261 TEVLQTDHKN LKSLLNNSKL EQTRLEAEFS KLKEQYQLD ITSTKLNNQC ELLSQLKGNL
 1321 EEENRHLLDQ IQTLMLQNRRT LLEQNMESKD LFHVEQRQYI DKLNELRRQK EKLEEKIMDQ
 1381 YKFYDPSPPR RRGNWITLKM RKLKSKKDI NRERQKSLTL TPTRSDSSEG FLQLPHQDSQ
 1441 DSSVGSNSL EDGQTLGTTK SSMVALKRLP FLRNRPKDKD KMKACYRRSM SMNDLVQSMV
 1501 LAGQWTGSTE NLEVPDDIST GKRRKELGAM AFSTTAINFST TVNSSAGFRS KQLVNNKDDT
 1561 SFEDISPQGV SDDSSTGSRV HASRPASLDS GRTSTSNSNN NASLHEVKAG AVNNQSRPQS
 1621 HSSGEFSLH DHEAWSSSGS SPIQYLKRQT RSSPVLQHKI SETLESRHHK IKTGSPGSEV
 1681 VTLQQFLEES NKLT SVQIKS SSQENLLDEV MKSLSVSSDF LGKDKPVSCG LARSVSGKTP
 1741 GDFYDRRTTK PEFLRPGPRK TEDTYFISSA GKPTPGTQGK IKLVKESSLS RQSKDSNPYA
 1801 TLPRASSVIS TAEGTRRTS IHDFLTKDSR LPISVDSPPA AADSNTTAAS NVDKVQESRN
 1861 SKSR SREQQS S

20

30

40

【 0 0 2 0 】

詳細な説明

50

用語及び方法の以下の説明は、本開示をより良く説明するため、さらに本開示の実施において当業者を導くために提供される。単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「この(the)」とは、文脈が明確に他を示さない限り、1つ又は1超を指す。例えば、用語「(1つの)細胞を含む」は、単数又は複数の細胞を含み、語句「少なくとも1つの細胞を含む」と等価とみなされる。用語「又は」とは、文脈が明確に他を示さない限り、述べられた代替的要素の単一の要素又は2以上の要素の組合せを指す。本明細書で使用する場合、「含む(comprises)」とは、「含む(includes)」を意味する。したがって、「A又はBを含む(comprising)」とは、さらなる要素を排除せず、「A、B、又はA及びBを含む(including)」を意味する。本明細書で言及されるGenBank(登録商標)寄託番号の日付は、少なくとも2014年2月17日の早期に入手可能な配列である。特許及び特許出願を含む全ての参考文献、並びに本明細書で引用されるGenBank(登録商標)寄託番号は、参照により援用される。

10

【0021】

特記しない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本開示が属する当該技術分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似又は等価な方法及び材料が、本開示の実施又は試験において使用され得るが、適切な方法及び材料は以下に記載される。材料、方法及び例は、例示に過ぎず、限定を意図しない。

【0022】

20

本開示の種々の実施態様の概説を容易にするために、特定の用語の以下の説明が提供される：

【0023】

抗体：免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、即ち、抗原(例えば、GIV-f1、CD34又はMMRタンパク質)を特異的に結合する(かかる抗原と免疫反応する)抗原結合部位を含有する分子。例示的抗体には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体及びヒト化抗体、例えば、完全長GIVに特異的なもの(例えば、実施例1に記載されるAbを使用するなどして、配列番号1又は2のC末端アミノ酸を検出できる)が含まれる。一部の例では、抗体は、診断的であり得、例えば、完全長GIV(GIV-f1)などのタンパク質の存在を検出するために使用され得る。一部の実施態様では、診断的GIV-f1抗体は、実施例1で産生された抗体の軽鎖可変ドメイン及び/又は重鎖可変ドメインを含む。一部の例では、GIV-f1抗体は、完全長GIVタンパク質に特異的に結合するが、C末端が欠失したGIVタンパク質(例えば、一部の例では、C末端の762又は763個のアミノ酸を欠くGIV-CT)には結合しない。

30

【0024】

一部の例では、抗体は、GIV-f1に対する高い結合親和性、例えば、少なくとも約 1×10^{-8} M、少なくとも約 1.5×10^{-8} 、少なくとも約 2.0×10^{-8} 、少なくとも約 2.5×10^{-8} 、少なくとも約 3.0×10^{-8} 、少なくとも約 3.5×10^{-8} 、少なくとも約 4.0×10^{-8} 、少なくとも約 4.5×10^{-8} 又は少なくとも約 5.0×10^{-8} Mの結合親和性を有する。特定の実施態様では、完全長GIVに結合する抗体は、104 nM、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM又は0.001 nM(例えば、 10^{-8} M以下、例えば、 10^{-8} Mから 10^{-13} M、例えば、 10^{-9} Mから 10^{-13} M)の解離定数(Kd)を有する。一実施態様では、Kdは、目的の抗体のFabバージョン及びその抗原を用いて実施される放射標識抗原結合アッセイ(RIA)によって測定される(例えば、Chen等, J. Mol. Biol. 293:865-881, 1999を参照のこと)。別の例では、Kdは、約10反応単位(RU)において、固定化されている抗原CM5チップを備えた25のBIACORES-2000又はBIACORES-3000(BIACore, Inc., Piscataway, N.J.)を使用して、表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。結合は、以下：ウェスタンブロット、イムノブロット、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、ラジオ

40

50

イムノアッセイ (RIA)、免疫沈降法、表面プラズモン共鳴、化学発光、蛍光偏光、リン光、免疫組織化学的解析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析、マイクロサイトメトリー、マイクロアレイ、顕微鏡法、蛍光活性化セルソーティング (FACS) 及びフローサイトメトリーが含まれるがこれらに限定されない当該技術分野で標準的な種々の方法を使用して測定され得る。

【0025】

天然に存在する抗体 (例えば、IgG、IgM、IgD) は、ジスルフィド結合によって相互接続された4つのポリペプチド鎖、2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖を含む。本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、細胞における1又は複数の抗体鎖をコードする核酸の発現によって産生される組換え抗体もまた含む (例えば、米国特許第4745055号; 米国特許第4444487号; 国際公開第88/03565号; 欧州256654号; 欧州120694号; 欧州125023号; Faoukner等, Nature 298:286, 1982; Morrison, J. Immunol. 123:793, 1979; Morrison等, Ann Rev. Immunol. 2:239, 1984を参照のこと)。

10

【0026】

用語「抗体」は、天然に存在する抗体又は組換え抗体の抗原結合断片もまた含む。用語「抗体」内に包含される結合断片の具体的な非限定的な例には、Fab、(Fab')₂、Fv及び単鎖Fv(scFv)が含まれる。Fabは、インタクトな軽鎖及び1つの重鎖の一部を得るための酵素パパイニンによる全抗体の消化によって、又は遺伝子操作によって等価に産生される抗体分子の一価の抗原結合断片を含有する断片である。Fab'は、インタクトな軽鎖及び重鎖の一部を得るために、ペプシンによって全抗体を処理し、その後還元することによって取得される抗体分子の断片である; 2つのFab'断片が、抗体分子1つ当たり取得される。(Fab')₂は、引き続き還元を伴わずに、酵素ペプシンによって全抗体を処理することによって、又は遺伝子操作によって等価に取得される、抗体の断片である。F(Ab')₂は、ジスルフィド結合によって一緒になった2つのFab'断片のダイマーである。Fvは、2つの鎖として発現される軽鎖の可変領域及び重鎖の可変領域を含む遺伝子操作された断片である。単鎖抗体(「SCA」)は、遺伝的に融合された単鎖分子として適切なポリペプチドリンカーによって連結された、軽鎖の可変領域、重鎖の可変領域を含む、遺伝子操作された分子である。これらの断片を作製する方法は、当該技術分野で常套的である。

20

30

【0027】

接触させる: 1つの薬剤を別の薬剤と近位にし、それによって、これらの薬剤を相互作用させること。例えば、GIV-f1抗体は、生物学的試料(例えば、ステージIIのCRC試料)を含有する顕微鏡スライド又は他の表面に適用され得、それによって、GIV-f1抗体によって特異的に認識される試料中のGIV-f1タンパク質の検出を可能にし得る。

【0028】

検出する: 薬剤が存在するか存在しないかを決定すること。一部の例では、これは、定量化をさらに含み得る。例えば、特定のタンパク質(例えば、GIV-f1)に特異的な抗体の使用は、がん組織を含有する試料などの試料中のタンパク質の検出を可能にする。特定の例では、検出可能な標識からの放出シグナル(例えば、標的が存在する場合のシグナルにおける増加)が検出される。検出は、バルクであってもよく、その結果、巨視的数の分子が、同時に観察できる。検出は、顕微鏡、及びバックグラウンドノイズを低減させるための全内部反射などの技術を使用した、単一分子からのシグナルの同定もまた含み得る。

40

【0029】

Gアルファ相互作用小胞結合タンパク質(GIV、ギルジンとしても公知)(OMIM 609736): G_iに対する非受容体型Guaninヌクレオチド交換因子(GEF)。GIVのC末端中の独自のGEFモチーフは、G_iの活性化に必要である(Garcia-Marcos等, Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106:3178-83)。G_iを活性化し、「遊離」

50

G を放出することによって、G I Vは、G - P I 3 K経路を介してA k tシグナル伝達を増幅する (Garcia-Marcos等, Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106:3178-83)。三量体Gタンパク質、G i及びG I Vを含む分子複合体は、A k tを増強し、アクチンを再構築し、細胞移動を誘発するために、増殖因子 (E G F (Enomoto等, Dev Cell, 2005. 9:389-402; Ghosh等, J Cell Biol, 2008. 182:381-93))、I G F (Jiang等, Cancer Res, 2008. 68(5):1310-8)、V E G F (Kitamura等, Nat Cell Biol, 2008. 10(3):329-37)、インスリン (Garcia-Marcos等, Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106:3178-83; Ghosh等, J Cell Biol, 2008. 182:381-93、Anai等, J Biol Chem, 2005. 280:18525-35) にとって必要である。

【 0 0 3 0 】

G I VのC末端は、E G F Rの自己リン酸化された細胞質テイルに直接結合し、それによって、リガンド活性化された受容体にGタンパク質を連結させる。G I VのC末端がインタクトである場合、G i - G I V - E G F Rシグナル伝達複合体がアセンブルされ、E G F R自己リン酸化が増強され、受容体の原形質膜 (P M) との会合が延長される。したがって、運動性を誘発するP Mベースのシグナル (P I 3 K - A k t及びP L C 1) が増幅され、アクチンが再構築され、細胞移動が誘発される (Ghosh等, Mol. Biol. Cell. 2010. 21:2338-54)。したがって、G I VのC末端は、前縁において、リガンド活性化された受容体 (Ghosh等, Mol. Biol. Cell. 2010. 21:2338-54) を、それらの相互作用が細胞移動に必須な3つの成分、アクチン (Enomoto等, Dev Cell, 2005. 9:389-402)、A k t (Enomoto等, Dev Cell, 2005. 9:389-402; Anai等, J Biol Chem, 2005. 280:18525-35) 及びG i (Garcia-Marcos等, Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106:3178-83) に連結させる共通のプラットフォームとして機能する。

【 0 0 3 1 】

G I Vは、ホスホイノシチド3 - キナーゼ (P I 3 K) に直接結合しそれを活性化するチロシンリン酸化タンパク質である。種々の受容体のリガンド刺激の際に、G I Vは、受容体型チロシンキナーゼ及び非受容体型チロシンキナーゼの両方によって、チロシン - 1764及びチロシン - 1798においてリン酸化される。これらのリン酸化事象は、P I 3 Kの調節サブユニットp85のアミノ末端及びカルボキシル末端S r c相同性2ドメインへのG I Vの直接的結合を可能にし、P I 3 Kとの受容体会合を安定化し、原形質膜においてP I 3 K活性を増強して、細胞移動を誘発する。

【 0 0 3 2 】

ヒトG I V遺伝子 (C C D C 8 8 A) は、一部の例では、約220 k D aの予測された分子量を有する、1870アミノ酸 (ヒトG I Vのアイソフォームでは1871) のタンパク質をコードする。G I Vの構造は、いくつかの異なる領域に分割され得る：微小管結合性フールドメイン (アミノ酸1 - 195)、コイルドコイルオリゴマー化ドメイン (アミノ酸196 - 1304)、Gアルファ結合ドメイン (アミノ酸1343 - 1424)、ホスホイノシチド (P I 4 P) 結合ドメイン (アミノ酸1390 - 1408)、A k t、アクチン及び受容体結合ドメイン (アミノ酸1623 - 1870)、G E Fモチーフ (アミノ酸1674 - 1694) の約15 a a下流であるS H 2ドメイン (アミノ酸1714 - 1815)。G I V mRNA発現は、乳房、結腸直腸、肺の悪性黒色腫、腎細胞癌、胃癌、膵臓癌、食道癌及び甲状腺癌を含むいくつかのがんにおいて、転移性進行の間に上方調節される。

【 0 0 3 3 】

G I V配列は、例えば、G e n B a n k (登録商標) 配列データベース (例えば、寄託番号N P _ 0 0 1 1 2 9 0 6 9及びB A E 4 4 3 8 7 . 1 (タンパク質)、並びにA B 2 0 1 1 7 2 . 1及びN M _ 0 0 1 1 3 5 5 9 7 . 1 (核酸)) から、公に入手可能である。G e n B a n k (登録商標) 寄託番号Q 3 V 6 T 2は、1871 a aのG I V - f l変異体を提供する。当業者は、G I V変異体を含む、さらなるG I Vの核酸及びタンパク質配列を同定できる。

【 0 0 3 4 】

10

20

30

40

50

ハイブリダイゼーション：DNA、RNAの2つの鎖の、又はDNAとRNAとの間の相補的領域間で塩基対を形成し、それによって、二重鎖分子を形成すること。特定の程度のストリンジェンシーを生じるハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション方法の性質、並びにハイブリダイズする核酸配列の組成及び長さ依存して変動する。一般に、ハイブリダイゼーションの温度及びハイブリダイゼーションバッファーのイオン強度（例えば、 Na^+ 濃度）が、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する。ハイブリダイゼーションバッファー中の、ハイブリダイゼーションを減少させる化学物質（例えば、ホルムアミド）の存在もストリンジェンシーを決定する（Sadhu等、J. Biosci. 6:817-821, 1984）。特定の程度のストリンジェンシーを達成するためのハイブリダイゼーション条件に関する計算は、Sambrook等、(1989) Molecular Cloning、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Plainview、NY（第9章及び第11章）において議論されている。ISHのためのハイブリダイゼーション条件は、Landegent等、Hum. Genet. 77:366-370、1987；Lichter等、Hum. Genet. 80:224-234、1988；及びPinkel等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9138-9142、1988においても議論されている。

10

【0035】

標識：例えば、分光光度法、フローサイトメトリー又は顕微鏡（例えば、光学顕微鏡）による検出が可能な薬剤。例えば、1又は複数の標識が抗体に結合され得、それによって、標的タンパク質（例えばGIV）の検出を可能にする。例示的標識には、放射性同位体、フルオロフォア、リガンド、化学発光剤、ハプテン、酵素及びそれらの組合せが含まれる。

20

【0036】

リンパ管浸潤（LVI）：CRC細胞などの腫瘍細胞の、血管又はリンパ管中への浸潤。腫瘍細胞が血管又はリンパ管中に存在する場合、対象又は腫瘍のLVI状態は陽性である。腫瘍細胞が血管中にもリンパ管中にも存在しない場合、対象又は腫瘍のLVI状態は陰性である。しかし、対象又は腫瘍がLVI陽性である場合、これは、腫瘍がリンパ節に広がったことを必ずしも意味しない。

【0037】

正常細胞又は組織：非腫瘍、非悪性の細胞及び組織。

30

【0038】

ミスマッチ修復良好（pMMR）：CRCなどの腫瘍は、欠損MMR（dMMR）系を有する腫瘍とは対照的に、DNAミスマッチ修復系（MMR）が良好である場合、pMMR陽性と言われる。pMMRを有するがんは、低頻度のマイクロサテライト不安定性（MSI）を示し得る。常套の方法が、PCRを使用するMSI試験、又はIHCによるMMRタンパク質、MLH1、PMS2、MSH2及びMSH6の発現の解析などによって、MMRの存在又は非存在を決定するために使用され得る。

【0039】

プライマー：標的核酸中の配列とハイブリダイズし、合成に適切な条件下で、核酸の相補鎖に沿ったかかる合成の開始点として作用することが可能な、オリゴヌクレオチド。完全な相補性は、プライマー伸長が生じるのに必要ではない。しかし、（特に3'末端近傍に）完全な相補性を有するプライマーは、ミスマッチ、特に、3'末端又はその近傍にミスマッチを有するプライマーよりも、効率的に伸長される。

40

【0040】

プローブ：標的核酸中の配列とハイブリダイズし、検出可能に標識され得る、オリゴヌクレオチド。プローブは、プローブを核酸ポリメラーゼによって延長不能なものにする3'末端修飾などの修飾；及び1又は複数の発色団を有し得る。

【0041】

定量的PCR又は定量的RT-PCR：標的核酸が定量的に検出される核酸増幅反応。QPCRは、独立変数が増幅サイクルの数であり、従属変数が、増幅の各サイクルにおい

50

て測定される、増幅依存的な測定可能なパラメーター（例えば、ハイブリダイゼーションの際に、又は核酸ポリメラーゼのヌクレアーゼ活性によるプローブの加水分解の際に、特異的プローブによって放出される蛍光の量）である関数のグラフである「増殖曲線」によって特徴が明らかにされる、Holland等、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 7276-7280及び米国特許第5210015号を参照のこと。増幅依存的な測定可能なパラメーターは、他の変数のなかでも、標的核酸の初期量を反映する。増殖曲線は、典型的には、所定の大きさの測定可能なパラメーターが達成されるサイクルの数である、「閾値までのサイクル」値又は「 C_t 値」によって特徴が明らかにされる。より低い又は「より早い」 C_t 値は、より多い量の入力標的核酸を反映するが、より高い又は「より遅い」 C_t 値は、より少ない量の入力標的核酸を反映する。

10

【0042】

試料：対象から取得された、ゲノムDNA、RNA（mRNAを含む）、タンパク質、インタクトな細胞（例えば、組織試料）又はそれらの組合せを含有する生物学的標本。例には、少なくとも1つのがん細胞を含有する標本（がん試料又はがん組織試料）、例えば、手術切除標本、組織若しくは腫瘍生検、穿刺吸引物、気管支肺胞洗浄、胸膜液、痰、手術標本、リンパ節、転移又は剖検材料が含まれる。他の例では、試料には、コントロール試料、例えば、非がん性の細胞又は組織試料が含まれる。一例では、コントロールは、ネガティブコントロール、例えば、検出可能なGIV-f1タンパク質を含まないことが既知の試料である（肝臓試料中の肝細胞は、GIV-f1抗体では染色されない）。別の一例では、コントロールは、ポジティブコントロール、例えば、検出可能なGIV-f1を

20

【0043】

特異的結合剤：規定された標的、例えば、GIV-f1タンパク質などのタンパク質のみに実質的に又は優先的に結合する薬剤。一部の例では、GIV-f1特異的結合剤は、完全長GIVタンパク質に特異的に結合するが、C末端が欠失したGIVタンパク質（例えば、一部の例では、C末端の762又は763個のアミノ酸を欠くGIV-CT）には結合しない。

【0044】

GIV-f1タンパク質特異的結合剤は、GIV-f1タンパク質のみに、又はGIV-f1タンパク質内の特定の領域（例えば、C末端）のみに、実質的に結合する。例えば、「GIV-f1特異的結合剤」には、抗体、及びGIV-f1ポリペプチドに実質的に結合する、アプタマーなどの他の薬剤が含まれる。抗体は、ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体又はポリクローナル抗体、及びそれらの免疫学的に有効な部分（「断片」）であり得る。特定の薬剤がGIV-f1ポリペプチドのみに実質的に結合するという決定は、常套的手順を使用する又は適応させることによって、容易に行われ得る。1つの適切なインビトロアッセイは、ウェスタンブロット法手順（Harlow及びLane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1999を含む、多くの標準的な教科書に記載されている）を使用する。

30

【0045】

対象：ヒト及び非ヒト哺乳動物、例えば獣医学対象を含むカテゴリー、生存多細胞脊椎動物生物。特定の例では、対象は、がん、例えば、結腸直腸がん、例えば、ステージIIのCRC（例えば、ステージIIa又はIIbのCRC）を有している、又はそれらを有する疑いがある対象である。一部の例では、ステージIIのCRCは、T3、T3/4又はT4である。一部の例では、対象は、化学療法未治療である（即ち、それらのCRCに対する化学療法治療も生物療法治療も、以前に受けていない）。一部の例では、対象は、化学療法未治療ではない。

40

【0046】

治療的有效量：疾患の前進を防止し、その進行を遅延させ、若しくはその後退を引き起こすのに十分な用量、又は疾患、例えばがん、例えば結腸直腸がん（例えば、ステージI

50

IのCRC)によって引き起こされる症候を低減させることが可能な用量。一例では、治療的有効量は、腫瘍のサイズ若しくは容積、又は腫瘍の数(例えば、転移の数)を、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%又は少なくとも90%低減させるのに十分な、例えば、CRC腫瘍のサイズ、容積又は数(例えば転移)を、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも70%又は少なくとも90%低減させるのに十分な、化学療法又は生物療法の量である。

【0047】

~に十分な条件下：所望の活性を許容する任意の環境を記述するために使用される語句。一例には、抗体を、試料中の1又は複数の標的タンパク質(例えば、GIV-f1)の検出を可能にするのに十分な、生物学的試料と接触させることが含まれる。

10

【0048】

概要

ステージIIの結腸直腸がん(CRC)を有する患者の常套的管理は、いまだ困難である。ステージIIのCRC患者の約25%は、アジュバント化学療法及び/又は生物療法を受ける(一般に、より若い患者及び臨床病理学的特性によって規定されるような高リスクを有する患者)。最終的には、小さいが明確な利益(全生存における約3%の絶対的改善)が、特にミスマッチ修復良好(pMMR)である腫瘍を有する患者において、アジュバント化学療法で観察される。

【0049】

本出願は、pMMRであるステージII(例えば、ステージIIa又はIIb)の結腸直腸がんを有する患者の、高リスク又は低リスクとしての分類、即ち、CRCが進行又は再発する可能性が高いかどうかの分類を可能にする方法を提供する。例えば、CRCは、局所リンパ節に(例えば、CRCステージIIIへの進行)、あるいは遠位リンパ節又は他の臓器、例えば肝臓若しくは肺に(例えば、CRCステージIVへの進行)、局所的に(がんが同じエリアに再出現する)進行又は再発し得る。進行又は再発について高リスクの患者は、進行について低リスクのCRCを有する患者よりも、化学療法又は生物療法からの利益を示す可能性がより高いので、開示された方法は有用である。一部の例では、これらの方法は、高リスクのCRCを有すると同定された患者を化学療法又は生物療法で治療することを含む。完全長Gアルファ相互作用小胞結合タンパク質(GIV-f1)の発現の決定(例えば、GIV-f1発現をスコアリングすることによる)、及び対象のリンパ管浸潤(LVI)状態の決定は、(例えば、少なくとも2年以内又は少なくとも5年以内に)再発する可能性が高い、したがって高リスクであるステージIIのCRC、及び再発する可能性が低く、したがって低リスクであるステージIIのCRCを、高い精度で予測できることが、本明細書で示される。一部の例では、これらの方法は、ステージIIのCRCが再発する可能性があるかどうか、したがって化学療法又は生物療法で治療すべき高リスク腫瘍であるかどうかを決定するために、対象の1又は複数の他の特性、例えば、診断時の対象の年齢、CRCについて陽性のリンパ節の数、対象の性別、腫瘍分化の情況、がんのTステージ；及びどちら側に結腸がんが存在したのかもまた使用する。一部の例では、対象の1又は複数の特性には、以下のうち1又は複数が含まれる：腫瘍悪性度、LVI、試験したリンパ節の数、神経周囲浸潤が存在するかどうか、局在化した穿孔が存在

20

30

40

【0050】

完全長GIVタンパク質(GIV-f1)、より具体的には、重要なモチーフ(EGFR結合、Akt/アクチン結合及びGEF)を含有するそのC末端(例えば、それぞれ配列番号1又は配列番号2のC末端の762又は763個のアミノ酸)は、選択的スプライシングによって、乳房及び結腸直腸腫瘍の細胞において、調節不全にされる(Ghosh等, Mol. Biol. Cell. 2010. 21:2338-54)。浸潤性が低いがん細胞及び前浸潤性の早期ステージの結腸直腸癌では、GIV-f1は、C末端トランケートされた変異体GIV-CTによって置き換えられる。浸潤性が高いがん細胞及び後期ステージの浸潤性癌では、GIV-f1は高度に発現される。結果として、全てではない一部の腫瘍細胞及び腫瘍だけが、

50

機能的にインタクトなC末端を含有するG I V - f 1を発現し、G I V - f 1発現は、転移性進行と相関する。

【 0 0 5 1 】

がん浸潤及び血管新生の間のG I V - f 1の分子的及び生物学的機能についての利用可能な情報の幅広さ (Garcia-Marcos等, Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(9):3178-83 ; Garcia-Marcos等, J Biol Chem. 2010. 285:12765-77 ; Enomoto等, Dev Cell, 2005. 9(3):389-402 ; Ghosh等, J Cell Biol, 2008. 182(2):381-93 ; Jiang等, Cancer Res, 2008. 68(5):1310-8 ; Kitamura等, Nat Cell Biol, 2008. 10(3):329-37 ; Anai等, J Biol Chem, 2005. 280(18):18525-35 ; Ghosh等, Mol. Biol. Cell. 2010. 21:2338-54 ; Enomoto等, Ann N Y Acad Sci, 2006. 1086:169-84 ; Weng等, Cancer Sci. 2010. 101:836-42) 、並びにG I V のC末端の存在が、転移性が低いがん (結腸、乳房及び膵臓) から転移性が高いがんを識別でき、それによって、結腸直腸がん患者において生存を予後判定できるという観察 (Garcia-Marcos等, Faseb J. 2011. 25:590-99) にもかかわらず、予後不良を有するどのステージI I の結腸直腸患者 (例えば、ミスマッチ修復良好 (p M M R) である患者) がアジュバント化学療法又は生物療法から利益を得るかを決定するために、G I V - f 1の発現が、他のインジケータと組み合わせて使用され得るかどうかは、未だ決定されていない。

10

【 0 0 5 2 】

本開示は、例えば、対象から取得されたC R C 試料を使用することによって、ステージI I (例えば、ステージI I a 又はステージI I b) のp M M R C R C を解析又は特徴付けるための方法を提供する。一部の例では、方法は、試料を取得することを含む。一部の例では、これらの方法は、化学療法又は生物療法による治療に应答する可能性が低い、ステージI I のp M M R C R C を有する対象 (例えば、化学療法未治療である対象) から、化学療法又は生物療法による治療に应答する可能性が高い、ステージI I のp M M R C R C を有する対象 (例えば、化学療法未治療である対象) を識別する。開示された方法は、対象の起こり得る無増悪生存 (P F S) を予測するため、例えば、対象が、がんの進行も再発もなしの、少なくとも1年間、少なくとも2年間、少なくとも3年間、少なくとも4年間、少なくとも5年間、少なくとも6年間又は少なくとも7年間のP F S を有するかどうかを予測するためにも、使用され得る。

20

【 0 0 5 3 】

方法は、ステージI I のC R C 試料 (例えば、T 3 又はT 3 / 4である) を、G I V - f 1 に特異的な特異的結合剤と接触させることを含む。かかる特異的結合剤、例えば、アプタマー又は抗体は、G I V - f 1 に特異的に結合できるが、G I V のC末端トランペクション (G I V C T、例えば、C末端の7 6 2 又は7 6 3 個のアミノ酸を欠くG I V タンパク質) には結合しない。これは、試料中のG I V - f 1 の存在の決定を可能にする。一部の例では、自動化組織染色器が、G I V - f 1 一次抗体 (及びさらなる抗体又は他のI H C 試薬) の適用のために使用される。

30

【 0 0 5 4 】

G I V - f 1 タンパク質の発現は、例えば、試料のG I V - f 1 状態 (例えば、陽性又は陰性) を決定するために、試料におけるその染色を検出することによってスコアリングされる。一例では、G I V - f 1 タンパク質の発現をスコアリングすることは、試料を試験すること、並びに全体的なG I V - f 1 染色のパーセント及び支配的なG I V - f 1 染色強度の特徴を明らかにすること又は決定することを含む。一部の例では、G I V - f 1 タンパク質の発現をスコアリングすることは、例えば、光学顕微鏡を使用した、G I V - f 1 染色の視覚的検査を含む。一部の例では、G I V - f 1 発現をスコアリングすることは、例えば、顕微鏡スライド上に存在する試料の総面積の視覚的検査を含む。一部の例では、G I V - f 1 発現をスコアリングすることは、例えば、スライド撮像器を使用した、試料の総面積の検査を含む。G I V - f 1 発現をスコアリングすることは、試料へのG I V - f 1 タンパク質特異的結合剤の結合の直接的又は間接的検出を含み得る。

40

【 0 0 5 5 】

50

一部の例では、顕微鏡スライドは、スライドスキャナーを使用して、処理及び/又は画像化される。スライドスキャナーは、当該技術分野で公知であり、これには、米国特許第8625930号；米国特許第8609023号及び米国特許第8290236号（全て本明細書で参照により援用される）中に開示されたもの、並びにVMSIから入手可能なものが含まれ得る。一部の例では、画像解析は、染色パターン、例えばGIV-f1発現を評価又は識別するために使用される。例えば、スライドのデジタル画像を使用したGIV-f1発現の自動化スコアリング、及びコンピューターベースの画像解析、例えば、米国特許第8625930号；米国特許第8537181号；米国特許第8515683号；及び米国特許第8428887号；（全て本明細書で参照により援用される）中に開示されたもの、並びにVMSIから入手可能なものが使用され得る。

10

【0056】

一例では、GIV-f1発現をスコアリングする方法は、0から3のスケールで、試料の陽性GIV-f1染色の程度を決定することを含み、ここで試料の総面積の0% - 10%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には0が割り当てられ、試料の総面積の11% - 35%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には1が割り当てられ、試料の総面積の36% - 50%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には2が割り当てられ、試料の総面積の51% - 100%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には3が割り当てられる。さらに、0（陰性）、1（弱い）、2（中程度）から3（強い）のスケールで、試料の染色のGIV-f1強度が決定される。例えば、ネガティブコントロール試薬での強度と類似の任意の検出可能なシグナルも薄灰色/黄褐色シグナルも存在しない場合、試料は陰性（0）とスコアリングされ得る；ネガティブコントロール試薬で、及びバックグラウンドにおいて見られるものよりも高い明るい染色強度（例えば、明褐色）が存在する場合、試料は弱い（1）とスコアリングされ得る；中程度の染色強度（例えば、褐色）が存在する場合、試料は中程度（2）とスコアリングされ得る；又は暗い染色強度（例えば、褐色から黒色のシグナル強度）が存在する場合、試料は強い（3）強度とスコアリングされ得る。検出される色は、使用される検出システムに依存する。一部の例では、陽性GIV-f1染色の程度及び染色のGIV-f1強度が、コンピューター又はアルゴリズムに入力される。陽性GIV-f1染色の程度及び染色のGIV-f1強度が合計され、それによって、0から6までのGIV-f1スコア値を生成する。0から6までのこの値に基づいて、GIV-f1スコア値が0 - 2である場合に試料はGIV-f1陰性であると決定される、又はGIV-f1スコア値が3 - 6である場合に試料はGIV陽性であると決定される。一部の例では、GIV-f1スコア値及び/又は試料のGIV-f1状態（例えば、陽性又は陰性）は、例えば、視覚的又は可聴的出力で、コンピューター又はアルゴリズムによって出力される。一部の例では、GIV-f1スコア値及び/又は試料のGIV-f1状態（例えば、陽性又は陰性）は、アルゴリズムに入力される。

20

30

【0057】

別の例では、GIV-f1予測スコアと呼ばれる、試料のGIV-f1タンパク質発現をスコアリングすることは、試料のGIV-f1染色の総面積が、任意の染色強度で10%よりも高いかどうかを決定すること、及び/又はGIV-f1染色強度が、任意のパーセント陽性で強い（3+）かどうかを決定することを含む。例えば、ネガティブコントロール試薬での強度と類似の任意の検出可能なシグナルも薄灰色/黄褐色シグナルも存在しない場合、試料は陰性（0）とスコアリングされ得る；ネガティブコントロール試薬で、及びバックグラウンドにおいて見られるものよりも高い明るい染色強度（例えば、明褐色）が存在する場合、試料は弱い（1+）とスコアリングされ得る；中程度の染色強度（例えば、褐色）が存在する場合、試料は中程度（2+）とスコアリングされ得る；又は暗い染色強度（例えば、褐色から黒色のシグナル強度）が存在する場合、試料は強い（3+）強度とスコアリングされ得る。検出される色は、使用される検出システムに依存する。この情報に基づいて、試料のGIV-f1染色の総面積が、任意の染色強度で10%よりも高い場合、若しくはGIV-f1染色強度が、任意のパーセント陽性で強い（3+）場合に、試料にGIV-f1陽性が割り当てられる；又はGIV-f1染色の総面積が、試料

40

50

について0、1+又は2+の染色強度で10%未満である場合に、試料にG I V - f l 陰性が割り当てられる。一部の例では、試料のG I V - f l 状態（例えば、陽性又は陰性）は、例えば、視覚的又は可聴的出力で、コンピューター又はアルゴリズムによって出力される。一部の例では、試料のG I V - f l 状態（例えば、陽性又は陰性）値は、アルゴリズムに入力される。

【0058】

別の例では、G I V - f l 発現は、G I V - f l m R N A を定量化することによって評価される。この方法は、腫瘍試料からR N A を単離すること、及び例えば、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（q R T - P C R）を介して、特異的ヌクレオチドプローブを使用して、G I V - f l m R N A を定量的に検出することを含む。一部の例では、G I V - f l m R N A の相対的量は、G I V - F L m R N A の絶対的量をハウスキーピング遺伝子のものと比較することによって決定される。なお他の例では、腫瘍試料中のG I V - f l m R N A の相対的量は、コントロール、例えば、非腫瘍試料中のG I V - f l m R N A の相対的量と比較される。G I V - f l m R N A の相対的量が、コントロール試料中のG I V - f l m R N A の相対的量よりも実質的に高い場合、腫瘍試料にはG I V - f l 陽性が割り当てられる。

10

【0059】

この方法は、例えば、血管又はリンパ管中へのC R C の浸潤が存在するかどうかを決定するために試料を試験することによって、対象のリンパ管浸潤（L V I）状態（例えば、陽性又は陰性）を決定することも含む。かかる決定は、H & E 又は抗体、例えば、リンパ内皮に特異的な抗体（例えば、A b D 2 - 4 0）若しくはC D 3 4 抗体で染色した試料の顕微鏡などの常套的方法を使用して行われ得る。

20

【0060】

この方法は、対象の1又は複数の特性を決定することを任意選択的に含み得る。一部の例では、対象の1又は複数の特性は、例えば、視覚的又は可聴的出力で、コンピューター又はアルゴリズムによって出力される。一部の例では、対象の1又は複数の特性は、アルゴリズムに入力される。例示的特性には、診断時の対象の年齢、C R C について陽性のリンパ節の数、対象の性別（雄性又は雌性）、腫瘍分化の状況（例えば、中程度、低い又は高い）、C R C のTステージ（例えば、原発腫瘍のサイズ及び/又は程度を反映する、T 1、T 2、T 3、T 4 又はT 3 / 4）、並びにどちら側に結腸がんが存在したのか（例えば、右又は左）が含まれるがこれらに限定されない。決定され得る入力される対象の他の例示的特性には、以下が含まれるがこれらに限定されない：腫瘍悪性度、L V I、試験したリンパ節の数、神経周囲浸潤が存在するかどうか、局在化した穿孔が存在するかどうか、及び辺縁が不確定か陽性か。

30

【0061】

この方法は、G I V - f l 状態、L V I 状態、及び任意選択的に対象の特性の1又は複数、コンピューター又はアルゴリズムに入力すること、並びに次いで、コンピューター又はアルゴリズムから出力を生成し、それによって、試料を解析又は特徴を明らかにすることを含む。例えば、出力は、解析されるC R C が、高リスクのC R C（再発又は進行する可能性が高い）かどうか、又は解析されるC R C が、低リスクのC R C（再発又は進行する可能性が低い）かどうか、の指標であり得る。例えば、出力は、視覚的若しくは可聴的に「高リスク」、「低リスク」であり得、又は化学療法若しくは生物療法が対象に投与されるべきか否かの指標を提供し得る。

40

【0062】

一部の例では、方法は、対象が、化学療法又は生物療法による治療にตอบสนองする可能性が高い対象（例えば、化学療法未治療の対象）として同定されたら、該対象を化学療法又は生物療法による治療のために選択することをさらに含む。一部の例では、かかる対象には、治療的有効量の1又は複数の適切な化学療法又は生物療法、例えば、5 - フルオロウラシル、ロイコボリン、パニツムマブ（V e c t i b i x（登録商標））、セツキシマブ（E r b i t u x（登録商標））、ペバシズマブ（A v a s t i n（登録商標））、z i v

50

- アフリベルセプト (Zaltrap (登録商標))、イリノテカン (Camptosar (登録商標))、オキサリプラチン (Eloxatin (登録商標)) 又はそれらの組合せが投与される。対照的に、対象が、化学療法又は生物療法による治療に応答する可能性が低い対象 (例えば、化学療法未治療の対象) として同定されたら、かかる対象には、化学療法も生物療法も投与されないが、緊密なモニタリングに割り当てられ得る。

【0063】

開示された方法を使用して解析される試料は、常套的であり、これには、組織生検 (例えば、組織切片) 又は穿刺吸引物が含まれ得る。一部の例では、試料は、固定された試料、例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 試料である。

【0064】

開示された方法の1又は複数の工程は、適切にプログラムされたコンピューターによって実施され得る。

【0065】

コンピューター実装方法もまた提供される。かかる方法は、GIV-f1抗体で検出可能に標識されたステージIIのpMMR試料を示す表示された画像内の測定されたGIV-f1タンパク質発現に少なくとも基づいて、GIV-f1タンパク質発現スコアを生成することを含み得、CRC試料は、対象から取得される。GIV-f1タンパク質発現スコアは、(i) 0から3のスケールで、試料の陽性GIV-f1染色の程度を決定することであって、ここで試料の総面積の0% - 10%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には0が割り当てられ、試料の総面積の11% - 35%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には1が割り当てられ、試料の総面積の36% - 50%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には2が割り当てられ、試料の総面積の51% - 100%が陽性染色される場合、陽性染色の程度には3が割り当てられる、決定すること；上記のように、0 (陰性)、1 (弱い)、2 (中程度) から3 (強い) のスケールで、試料の染色のGIV-f1強度を決定すること、陽性GIV-f1染色の程度及び染色のGIV-f1強度を合計し、それによって、0から6までのGIV-f1スコア値を生成すること、及びGIV-f1スコア値が0 - 2である場合に試料がGIV陰性であると決定すること、若しくはGIV-f1スコア値が3 - 6である場合に試料がGIV陽性であると決定すること；又は(ii) 上記スコアリング方法を使用して、試料のGIV-f1染色の総面積が、任意の染色強度で10%よりも高いかどうかを決定すること、若しくはGIV-f1染色強度が強い(3+)かどうかを決定すること；及び試料のGIV-f1染色の総面積が、任意の染色強度で10%よりも高い場合、若しくはGIV-f1染色強度が、任意のパーセント陽性で強い(3+)場合に、試料がGIV陽性であると決定すること；又はGIV-f1染色の総面積が、試料について0、1+又は2+の染色強度で10%未満である場合に、試料がGIV陰性であると決定することによって生成され得る。試料について得られたGIV-f1タンパク質発現スコアは、例えば、使用者又はアルゴリズムに、コンピューターによって出力され得る。

【0066】

コンピューター実装方法は、対象のリンパ管浸潤(LVI)状態を入力すること、並びに診断時の対象の年齢、CRCについて陽性のリンパ節の数、対象の性別、腫瘍分化の状況、がんのTステージ；及びどちら側に結腸がんが存在したのを含む、対象の1又は複数の特性を任意選択的に入力すること (入力され得る対象の他の例示的特性には、以下が含まれるがこれらに限定されない：腫瘍悪性度、LVI、試験したリンパ節の数、神経周囲浸潤が存在するかどうか、局在化した穿孔が存在するかどうか、及び辺縁が不確定か陽性か)、並びに対象の予後又は診断を出力することをさらに含み得る。例えば、出力は、CRCが高リスクか低リスクか、したがって患者がそれぞれ化学療法/生物療法を受けるべきか否かについての指標であり得る。

【0067】

コンピューティングシステムに本明細書に提供される方法を実施させるコンピューター実行可能な命令を含む、1又は複数の非一時的コンピューター可読媒体も提供される。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

対象から取得されたステージ I I (例えば、ステージ I I a 又は I I b) のミスマッチ修復良好 (p M M R) 結腸直腸がん (C R C) 試料を解析するためのシステムも提供される。かかるシステムは、試料中の G I V - f 1 のレベルを測定するための手段 (例えば、G I V - f 1 特異的抗体) ; 及び対象の L V I 状態を決定するための手段 (例えば、H & E、又は C D 3 4 及び / 若しくはリンパ内皮などの L V I マーカーに特異的な抗体) を含み得る。一部の例では、かかる手段には、光学顕微鏡、自動化組織若しくはスライド染色器、コンピューター、又はそれらの組合せが含まれる。一部の例では、システムは、G I V - f 1 の測定されたレベルに基づいて、試料の G I V - f 1 状態 (例えば、陽性又は陰性) を決定するための実装ルールを含む。G I V - f 1 発現をスコアリングする方法は、
10
本明細書で議論される。一部の例では、システムは、G I V - f 1 の測定されたレベルを、G I V - f 1 ポジティブ又はネガティブコントロールなどの G I V - f 1 参照値と比較するための実装ルールを含む。一部の例では、システムは、例えば、L V I マーカー又は他の組織学的若しくは構造的マーカー (例えば、H & E 染色) の測定されたレベルに基づいて、試料の L V I 状態 (例えば、陽性又は陰性) を決定するための実装ルールを含む。一部の例では、システムは、測定された L V I マーカーを、L V I ポジティブ又はネガティブコントロールなどの L V I 参照値又は試料と比較するための実装ルールを含む。一部の例では、G I V - f 1 及び / 又は L V I 参照値は、記憶された値又は記憶されたデジタル画像である。一部の例では、G I V - f 1 及び / 又は L V I 参照値は、測定するための
20
前記手段によってコントロール試料から測定された G I V - f 1 及び / 又は L V I のレベルである。システムは、ルール (例えば、コンピューター又はアルゴリズム) を実装するための 1 又は複数の手段もまた含み得て、それによって、C R C 再発の起こり得るリスク及び / 又は化学療法若しくは生物療法に対する C R C の起こり得る応答の指標が、G I V - f 1 及び L V I 状態に基づいて提供される。一部の例では、システムは、診断時の対象の年齢、C R C について陽性のリンパ節の数 ; 対象の性別、腫瘍分化の状況、がんの T ステージ ; 及びどちら側に結腸がんが存在したのかを含む、対象の 1 又は複数の特性を決定するための手段 (又は、アルゴリズムにかかる特性を入力するための手段、例えば、キーボード又はコンピュータープログラム) ; 並びに 1 又は複数の特性の測定されたレベルを、1 又は複数の特性についての参照値と比較するための実装ルール、もまた含む。

【 0 0 6 9 】

本開示は、本明細書に提供される方法と共に使用され得るものなどのキットもまた提供する。一例では、キットは、抗体クローン S P 1 7 3 などの G I V - f 1 特異的結合剤を含む。キットは、以下のうち 1 又は複数を含み得る : L V I の決定を可能にする特異的結合剤 (例えば、C D 3 4 に特異的な抗体及び / 又はリンパ内皮に特異的な抗体) ; ミスマッチ修復タンパク質特異的結合剤 (例えば、m u t L ホモログ 1 (M L H 1) ; 減数分裂後隔離増加 2 (P M S 2) ; M u t S タンパク質ホモログ 2 (M S H 2) 、M u t S タンパク質ホモログ 6 M S H 6 に特異的な抗体、又はかかる抗体の組合せ) ; 例えば E G F R、B a x、B c l、p 5 3 などの他の腫瘍マーカーに特異的な抗体 ; 顕微鏡スライド (例えば、ガラススライド及びカバーガラス) ; 標識された二次抗体 (例えば、検出可能な標識を含み、キット中の一次抗体の検出を可能にするもの) ; 及び I H C のためのバッファ
40
ー (例えば、V M S I の C C 1 バッファー)。別の一実施態様では、キットは、G I V - f 1 m R N A 発現を測定するための試薬を含有する。この実施態様では、キットは、G I V - f 1 m R N A 配列に特異的にハイブリダイズすることが可能な核酸プローブを含む。キットは、G I V - f 1 m R N A に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー、コントロール遺伝子、例えば、「ハウスキーピング」遺伝子に特異的なオリゴヌクレオチドプライマー及び 1 又は複数のプローブ、ヌクレオシド三リン酸、逆転写活性及び D N A 複製活性を提供するための 1 又は複数の D N A ポリメラーゼ、並びに 1 又は複数の D N A ポリメラーゼの活性を支持するためのバッファー及び補助因子、のうち 1 又は複数を含む、逆転写 P C R (R T - P C R) のための試薬もまた含有し得る。

【 0 0 7 0 】

10

20

30

40

50

ステージ I I の p M M R 結腸直腸がん試料を解析する方法

対象から取得されたステージ I I (例えば、I I a 及び I I b、それぞれ、T 3 及び T 4 と呼ばれる) のミスマッチ修復良好 (p M M R) 結腸直腸がん (C R C) 試料を解析するための方法が、本明細書で開示される。ステージ I I a の C R C は、筋固有層を通過して漿膜下組織中に、又は腹膜で覆われていない大腸周囲若しくは直腸周囲組織中に浸潤する腫瘍として一般に特徴を明らかにされるが、ステージ I I b の C R C は、腫瘍が他の臓器若しくは構造を直接浸潤する場合、及び / 又は内臓腹膜を穿孔する場合である。対照的に、ステージ I I c は、C R C が、結腸壁の漿膜を通過して広がっているが、近傍の臓器には広がっていない場合である。一部の例では、かかる方法は、試料を取得した対象について、良い又は悪い転帰を予後判定するために使用される。例えば、これらの方法は、C R C が元の診断後少なくとも 1、2、3、4、5、6 又はさらには 7 年間進行する可能性が高いかどうかを決定できる。例えば、方法が、C R C が進行する (例えば、手術後に再発又は転移する可能性が高い) ことを予測する場合、これは、C R C が高リスクであり、対象が化学療法又は生物療法を受けるべきであることを示す。対照的に、方法が、C R C が進行しない (例えば、手術後に再発又は転移する可能性が低い) ことを予測する場合、これは、C R C が低リスクであり、対象が化学療法も生物療法も受けるべきでないこと (それらが利益を受ける可能性は低いので) を示す。したがって、方法は、化学療法又は生物療法を受けることから利益を得る可能性が高いステージ I I の p M M R C R C を有する対象を同定するために、化学予測因子として使用され得る。

【 0 0 7 1 】

これらの方法は、ステージ I I (例えば、I I a 又は I I b) の p M M R C R C が G I V - f 1 タンパク質発現について陽性か陰性かを決定することを含み得る。例えば、方法は、G I V - f 1 タンパク質発現をスコアリングすることを含み得る。G I V - f 1 陽性 C R C は浸潤性がより高いので、G I V - f 1 陽性である C R C p M M R 腫瘍は、一般に、G I V - f 1 陰性であるものよりも悪い予後を有する (例えば、G I V - f 1 陰性 C R C を有する対象よりも、1、2、3、4、5、6 又はさらには 7 年以内に進行する可能性がより高いがん)。即ち、G I V - f 1 は、有害な予後因子である。しかし、全ての G I V - f 1 陽性 C R C が化学療法又は生物療法に応答するわけではない。したがって、本発明者らは、化学療法又は生物療法に応答する可能性が高いステージ I I の p M M R G I V - f 1 陽性 C R C がんと同定できるさらなる臨床変数を同定した。かかる方法は、化学療法又は生物療法による治療に応答すると予測されるステージ I I の p M M R C R C を有するとして、対象を同定するために使用され得る。一部の例では、かかる対象は、それらの C R C に対する化学療法剤又は生物療法剤によって以前に治療されている。他の例では、かかる対象は、それらの C R C に対する化学療法剤によっても生物療法剤によっても以前に治療されていない (化学療法未治療)。

【 0 0 7 2 】

開示された方法は、試料の G I V - f 1 状態を提供又は決定するために、G I V - f 1 発現を検出すること又は測定することを含む。かかる状態には、G I V - f 1 タンパク質スコア (例えば、0、1、2、3、4、5 又は 6)、G I V - f 1 陽性又は G I V - f 1 陰性のうち 1 又は複数が含まれ得る。かかる方法は、C R C 細胞を含有する試料 (例えば、対象から取得された試料) を、G I V - f 1 タンパク質特異的結合剤と接触させることを含み得る。G I V - f 1 タンパク質特異的結合剤の例には、抗体、例えば、高い特異性で G I V - f 1 に結合するが G I V C T には結合しない、モノクローナル抗体 (例えば、ウサギモノクローナル抗体クローン S P 1 7 3、実施例 1 を参照のこと)、ポリクローナル抗体、キメラ抗体及びそれらの断片、並びにアプタマーが含まれる。これらの G I V - f 1 タンパク質特異的結合剤は、試料中の G I V - f 1 タンパク質に G I V - f 1 タンパク質特異的結合剤を結合させる条件下で、試料と共にインキュベートされ得る。一例では、C T C 試料における G I V - f 1 タンパク質発現が検出又は測定され、次いで、これらの測定値に基づいて、G I V - f 1 タンパク質発現スコアが、試料について決定される。このスコアに基づいて、試料が G I V - f 1 陽性か陰性かが決定される。

【0073】

一例では、CRC試料のGIV-f1スコアは、以下のように決定される。試料の陽性GIV-f1染色の程度は、0から3のスケールでスコアリングされ、試料の総面積の0% - 10%がGIV-f1について陽性染色される場合、陽性染色の程度には0が割り当てられ、試料の総面積の11% - 35%がGIV-f1について陽性染色される場合、陽性染色の程度には1が割り当てられ、試料の総面積の36% - 50%がGIV-f1について陽性染色される場合、陽性染色の程度には2が割り当てられ、試料の総面積の51% - 100%がGIV-f1について陽性染色される場合、陽性染色の程度には3が割り当てられる。さらに、0（陰性）、1（弱い）、2（中程度）から3（強い）のスケールでの試料の染色のGIV-f1強度が、上記方法を使用して決定又は計算される。一部の例では、陽性GIV-f1染色の程度及び染色のGIV-f1強度の各々についての値は、コンピューター又はアルゴリズムに入力される。陽性GIV-f1染色の程度及び染色のGIV-f1強度の各々についての値が合計され、それによって、0から6までのGIV-f1スコア値を生成する。0から6までのこの値に基づいて、GIV-f1スコア値が0 - 2である場合に試料がGIV-f1陰性であること、又はGIV-f1スコア値が3 - 6である場合に試料がGIV-f1陽性であることが決定される。

10

【0074】

別の例では、CRC試料のGIV-f1スコアは、以下のように決定される。試料は、上記方法を使用して、試料のGIV-f1染色の総面積が10%よりも高いかどうかを決定するため、及び/又はGIV-f1染色強度が3+（強い）かどうかを決定するために解析される。この情報に基づいて、試料のGIV-f1染色の総面積が、任意の染色強度で10%よりも高い場合、若しくはGIV-f1染色強度が、任意のパーセントで強い（3+）場合に、試料にはGIV-f1陽性が割り当てられ；又は試料のGIV-f1染色の総面積が、0、1+又は2+の染色強度で10%未満である場合に、試料にはGIV-f1陰性が割り当てられる。

20

【0075】

試料中の標的タンパク質を検出するために抗体及び他のタンパク質特異的結合剤を使用する方法は、常套的であり、本開示は、特定の方法に限定されない。一部の例では、IHCが、例えば光学顕微鏡と組み合わせて、利用される。例えば、試料におけるGIV-f1タンパク質発現は、試料へのGIV-f1タンパク質特異的結合剤の結合によって、直接的又は間接的に検出され得る。一部の例では、試料をGIV-f1タンパク質特異的結合剤と接触させること、及び試料におけるGIV-f1タンパク質発現を検出することは、自動化組織染色器で実施される。一部の例では、GIV-f1タンパク質発現を検出することは、例えば光学顕微鏡を利用することによる、視覚的検査を利用する。

30

【0076】

試料から単離されたmRNAを使用してmRNA発現を検出する方法も、同様に常套的である。これらの方法には、例えばTaqMan（登録商標）プローブを用いた定量的逆転写PCR（RT-PCR）、又はPCRなしの系、例えばInvader（登録商標）アッセイ（Third Wave Technologies）、例えばマイクロアレイの一部としての、固定化されているプローブへのハイブリダイゼーション、又は利用可能な若しくは利用可能になるであろうmRNAを定量化する任意の他の方法が含まれる。

40

【0077】

この方法は、対象のリンパ管浸潤（LVI）状態（例えば、陽性又は陰性）を知ることによって依存する。LVIを決定する方法は、顕微鏡を使用するなど、常套的である。例えば、CRC試料は、血管又はリンパ管中へのCRCの浸潤が存在したかどうかを決定するために、例えば顕微鏡を使用して解析され得る。LVI状態は、ステージIIのpMMRCRCが、化学療法又は生物療法に应答する可能性が高いか低いかを決定するために、GIV-f1状態と組み合わせて使用され得る。

【0078】

この方法は、対象の1又は複数の特性を決定することを、任意選択的に含む得る。一部

50

の例では、対象の1又は複数の特性は、例えば、視覚的又は可聴的出力で、コンピューター又はアルゴリズムによって出力される。一部の例では、対象の1又は複数の特性は、アルゴリズムに入力される。例示的特性には、診断時の対象の年齢、CRCについて陽性のリンパ節の数、対象の性別（雄性又は雌性）、腫瘍分化の状況（例えば、中程度、低い又は高い）、CRCのTステージ（例えば、原発腫瘍のサイズ及び/又は程度を反映する、T1、T2、T3、T4又はT3/4）、並びにどちら側に結腸がんが存在したのか（例えば、右又は左）が含まれるがこれらに限定されない。対象の1又は複数の特性と組み合わせた、及び一部の例ではLVI状態とも組み合わせたGIV-f1状態は、ステージIIのpMMR CRCが、化学療法又は生物療法に応答する可能性が高いか低いかを決定するために使用され得る。

10

【0079】

一部の例では、開示された方法は、化学療法又は生物療法による治療に応答する可能性が高い又は応答すると予測されたステージIIのpMMR CRCを有するとして、対象を同定する方法である。例えば、この方法は、対象から取得された腫瘍試料がGIV-f1陽性であり、患者がLVI陽性である場合に、その対象が化学療法又は生物療法による治療から利益を得ると決定することを含み得る。かかる同定された対象は、化学療法による治療のために選択され得る。さらに、この方法は、かかる同定及び選択された対象に、治療的有効量の化学療法又は生物療法を投与することを含み得る。対照的に、この方法は、対象から取得された腫瘍試料がGIV-f1陰性であり、患者がLVI陰性である場合に、その対象が化学療法による治療から利益を得ないと決定することを含み得る。

20

【0080】

一部の例では、試験試料におけるGIV-f1タンパク質発現は、コントロール、例えば、ポジティブ及び/又はネガティブコントロールと比較される。したがって、一部の例では、この方法は、1又は複数のコントロール試料においてGIV-f1タンパク質発現を検出すること又は測定することを含む。例えば、肝臓試料中の肝細胞は、GIV-f1を内因性に発現せず、したがって、染色強度について0、又はGIV-f1タンパク質発現について染色された総面積について10%未満とスコアリングすべきである。対照的に、COS-7細胞は、GIV-f1を発現し、したがって、染色強度について2若しくは3、又はGIV-f1タンパク質発現について染色された総面積について50%超とスコアリングすべきである。

30

【0081】

開示された方法の1又は複数の工程は、システム又は適切にプログラムされたコンピューターによって実施され得る。例えば、GIV-f1タンパク質発現は、画像化解析システム又はコンピューターを使用して、検出及びスコアリングされ得る。一部の例では、システム又はコンピューターは、スコア、例えば、陽性GIV-f1染色の程度については0、1、2若しくは3のスコア；0、1、2若しくは3のGIV-f1染色強度のスコア；0、1、2、3、4、5若しくは6のGIV-f1染色スコア、又は試料がGIV-f1陽性か陰性かを計算するために使用される、GIV-f1タンパク質スコア又は値の出力を提供する。さらに、LVI状態は、画像化解析システム又はコンピューターを使用して検出され得る。一部の例では、システム又はコンピューターは、LVI陽性又は陰性などのLVI状態の出力を提供する。一部の例では、システム又はコンピューターは、CRCが進行（例えば再発）する可能性が高いかどうか及び/又は化学療法若しくは生物療法に応答する可能性が高いかどうかの出力を提供する。一部の例では、出力は、視覚的又は可聴、例えば、プリントアウトである。一部の例では、出力は、例えばコンピューター可読媒体上に記憶される。

40

【0082】

したがって、ステージIIのpMMR CRCが高リスクか低リスクか、したがってCRCが化学療法又は生物療法に応答する可能性が高いかどうかを決定するための、コンピューター実装方法が、本明細書に提供される。かかる方法は、GIV-f1抗体で検出可能に標識されたCRC試料を示す表示された画像内の測定されたGIV-f1タンパク質

50

発現に少なくとも基づいて、G I V - f 1 タンパク質発現スコアを生成することを含み得、C R C 試料は、対象から取得される。G I V - f 1 タンパク質発現スコアは、C R C 細胞におけるG I V - f 1 タンパク質の発現を検出することによって生成され得る。G I V - f 1 タンパク質発現スコアを生成する方法は、本明細書に提供される。試料について得られたG I V - f 1 タンパク質発現スコアは、例えば、使用者又はアルゴリズムに、コンピューターによって出力され得る。コンピューター実装方法は、対象のL V I 状態（例えば、陽性又は陰性）を入力することをさらに含み得る。あるいは、L V I 状態は、C R C 試料（例えば、H & E で又はリンパ内皮のマーカー、抗体D 2 - 4 0 で、又はC D 3 4 抗体で染色されたもの）を示す表示された組織学画像に少なくとも基づいて決定され得る。コンピューター実装方法は、診断時の対象の年齢、C R C について陽性のリンパ節の数、対象の性別、腫瘍分化の状況、がんのTステージ；及びどちら側に結腸がんが存在したのかを含む、対象の1又は複数の特性を入力すること、並びに対象についての予後又は診断を出力することを任意選択的に含み得る。例えば、出力は、C R C が高リスクか低リスクか、したがって患者がそれぞれ化学療法又は生物療法を受けるべきか否かについての指標であり得る。

10

【 0 0 8 3 】

コンピューティングシステムにかかる方法を実施させるコンピューターで実行可能な命令を含む、1又は複数の非一時的コンピューター可読媒体も提供される。

【 0 0 8 4 】

A . G I V - F L の検出

対象から取得されたステージI I のp M M R C R C 試料は、1又は複数のC R C 細胞中に、検出可能なレベルのG I V - f 1 タンパク質などのG I V - f 1 を含有するかどうかを決定するために解析される。したがって、試料は、試料中のG I V - f 1 タンパク質の存在、例えば、定性的又は半定量的測定値を検出又は測定するために解析され得る。特定の実施態様では、開示された方法は、試料中の腫瘍細胞中のG I V - f 1 タンパク質の存在の定性的測定値を利用する。G I V - f 1 スコアに基づいて、試料は、G I V - f 1 陽性又は陰性であると決定される。

20

【 0 0 8 5 】

一部の例では、G I V - f 1 は、1 8 7 0 又は1 8 7 1 アミノ酸長、例えば、それぞれ、配列番号1又は2である。対照的に、G I V C T は、G タンパク質活性化E F ドメインを含むC末端の7 6 2 又は7 6 3 個のアミノ酸（例えば、それぞれ、配列番号1又は配列番号2のC末端の7 6 2 又は7 6 3 個のアミノ酸）を欠く。トランケーションは、エクソン19の終端において生じ、Q 1 1 0 8 において終結し、C末端に、イントロン-19配列の翻訳から生じる3つのさらなるアミノ酸（V V I）を含有するタンパク質を生じる。したがって、トランケートされたG I V タンパク質のC末端配列は、Q T Q N A K L Q V V I である。G I V - f 1 特異的結合剤は、G I V - f 1 を検出するが、G I V C T は検出しない。

30

【 0 0 8 6 】

I H C は、対象由来の試料中に存在するG I V - f 1 タンパク質を検出又は測定するために使用され得る。I H C は、抗原と特異的結合剤、例えば、抗体又はアプタマーとの相互作用を検出することによって、試料（例えば、腫瘍試料、例えば、G I V - f 1 を発現するC R C 細胞又は組織を含む組織の一部又は切片）中の抗原（例えばタンパク質）の存在又は分布を決定できる。抗原（例えば、G I V - f 1）を含む試料は、抗体-抗原結合を可能にする条件下で、G I V - f 1 特異的抗体（例えば、実施例1に記載されるS P 1 7 3 A b）と共にインキュベートされる。抗体-抗原結合は、抗体にコンジュゲートされた検出可能な標識によって（直接的検出）、又は一次抗体に対して惹起された二次抗体にコンジュゲートされた検出可能な標識によって（例えば、間接的検出）、検出され得る。間接的検出の他の例では、抗体-抗原結合は、二次抗体に結合することが可能な三次抗体（例えば、二次抗体に対して惹起された、又は二次抗体にコンジュゲートされた分子、例えばハプテンに対して惹起された）にコンジュゲートされた検出可能な標識によって

40

50

検出される。IHCに使用され得る例示的な検出可能な標識には、放射性同位体、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、フルオレセインイソチシアネート及びローダミン）、ハプテン、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）及び色素原（例えば、3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）又はFast Red）が含まれるがこれらに限定されない。一部の例では、抗原-抗体結合の検出は、シグナル増幅（例えば、チラミドシグナル増幅又は関連の方法）もまた含む。シグナル増幅方法には、その全内容が本明細書に参照により援用される米国特許出願公開第2012/0171668号に記載される方法が含まれ得る。

【0087】

一部の例では、GIV-f1特異的結合剤は、抗体、例えば、ポリクローナル抗体若しくはモノクローナル抗体、又はそれらの断片である。かかるGIV-f1-特異的結合剤、例えば抗体は、一部の例では、GIV-f1とGIV-CTとの間を識別するために使用され得る。したがって、一部の例では、GIV-f1抗体は、高い親和性でGIV-CTに結合することはない（例えば、GIV-CTのみが存在する場合、検出可能なシグナルを生成しない）。所望される場合、GIV-f1抗体は、GIV-f1タンパク質/抗体複合体の検出、及び一部の場合にはその定量化を可能にするために、検出可能な標識を含み得る。他の例では、GIV-f1抗体は、適切な標識された二次抗体を用いて検出される。さらなる例では、GIV-f1抗体は、適切な標識された三次抗体を用いて検出される。

【0088】

GIV-f1発現を検出するために使用され得る抗体は、公知であり、本明細書に提供される（例えばSP173）。当業者は、他の抗体が、現在入手可能なもの又は将来開発されるものを含め、本明細書に提供される方法において使用され得ることを理解する。例えば、特定の標的タンパク質に対する抗体を調製する方法は、当該技術分野で周知である。GIV-f1タンパク質又はその断片若しくは保存的変異体（例えば、C末端の700、600、500、400、300、200、100、50又は20個のアミノ酸内の領域などの、GIV-f1のC末端の独自の領域）は、GIV-f1タンパク質のエピトープに対して免疫反応性である又はそれと特異的に結合する抗体を産生するために使用され得る。異なるエピトープ特異性を有するプールされたモノクローナル抗体から本質的になる抗体、ポリクローナル抗体、並びに異なるモノクローナル抗体調製物が含まれる。ポリクローナル抗体の調製は、当業者に周知である。例えば、Green等、「Production of Polyclonal Antisera」、Immunochemical Protocols、p1-5、Manson編、Humana Press、1992；Coligan等、「Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats, Mice and Hamsters」、Current Protocols in Immunology、2.4.1章、1992を参照のこと。モノクローナル抗体の調製も同様に慣習的である（例えば、Kohler及びMilstein、Nature 256:495、1975；Coligan等、sections 2.5.1-2.6.7；並びにHarlow等、Antibodies: a Laboratory Manual、p 726、Cold Spring Harbor Pub.、1988を参照のこと）。

【0089】

一部の例では、試料は、対象（例えば、GIV-f1を発現することが既知又はGIV-f1を発現する疑いがある腫瘍試料、例えば、ステージIIのpMMR-CRC）から取得され、IHCのために処理される。例えば、試料は、例えばホルマリン及びパラフィンで固定及び包埋され得る。次いで、試料は、ガラス顕微鏡スライドなどの支持体上にマウントされ得る。例えば、試料は、一連の薄い切片にスライスされ得（例えば、マイクロームを使用して）、これらの切片は、顕微鏡スライド上にマウントされ得る。一部の例では、単一のスライドが、同じがん試料由来の複数の組織切片を含むか、又は同じがん試料由来の切片は、異なるスライド上に配置され得る。次いで、がん（例えば、CRC）試料の異なる切片は、異なる抗体、例えば、抗GIV-f1抗体及びネガティブコントロール

10

20

30

40

50

抗体（例えば、CRC中の内因性の抗原には特異的に結合しない抗体）で個々に標識され得る。即ち、1つの切片は、G I V - f 1抗体で標識され得、別の切片は、ネガティブコントロール抗体（例えば、試料中には内因性に存在しない標的に結合する抗体）で標識され得る。一部の例では、同じ対象由来の別々のスライドが、H & Eで染色される（例えば、同じ腫瘍試料由来の隣接又は連続切片）。一部の例では、目的のさらなるタンパク質は、さらなる抗体（例えば、他の腫瘍マーカー、例えば、E G F R、B a x、M M Rタンパク質（例えば、M L H 1；P M S 2；M S H 2及びM S H 6）、p A K T、P T E N及びP I 3 K突然変異体に特異的な抗体）によって標識することによって、同じ又はさらなる組織試料において検出され得る。一部の例では、自動化スライド又は組織染色器（例えば、V E N T A N A B E N C H M A R K機器、例えば、B e n c h M a r k X T又はB e n c h M a r k G X機器）が、スライドを染色及び処理するために使用され得る。

10

【0090】

一部の例では、試料中のG I V - f 1タンパク質を検出することは、試料へのG I V - f 1抗体の結合の間接的検出を含む（例えば、G I V - f 1（一次）抗体は、検出可能に標識されない）。例えば、試料は、G I V - f 1抗体が試料中のG I V - f 1タンパク質に結合するのに十分な条件下で、G I V - f 1抗体（例えばS P 1 7 3）と接触させられる。次いで、試料は、二次抗体がG I V - f 1抗体に結合するのに十分な条件下で、G I V - f 1抗体に特異的に結合できる二次抗体（例えば、G I V - f 1抗体がウサギ抗体の場合には抗ウサギ抗体、又はG I V - f 1抗体がマウス抗体の場合には抗マウス抗体）と接触させられる。二次抗体は、検出可能に標識され得る。検出可能な標識は、二次抗体にコンジュゲートされ得る。一部の例では、二次抗体にコンジュゲートされた検出可能な標識は、直接検出され得る（例えば、蛍光性標識、又は適切な基質の存在下で検出可能な反応生成物を産生し得る酵素）。他の例では、二次抗体は、1又は複数のハプテン（例えば、フルオレセイン、ジニトロフェニル、ビオチン又は3 - ヒドロキシキノキサリン - 2 - カルボン酸（H Q））にコンジュゲートされる。次いで、試料は、三次抗体がハプテンに結合するのに十分な条件下で、ハプテンがコンジュゲートされた二次抗体に特異的に結合できる三次抗体（例えば、抗ハプテン抗体、例えば、抗H Q抗体）と接触させられる。一部の例では、三次抗体は、検出可能な標識、例えば、酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（H R P）又はアルカリホスファターゼ（A P））にコンジュゲートされる。次いで、試料は、酵素の存在下で検出可能な反応生成物を産生する1又は複数の試薬と接触させられる。一部の例では、試料は、H R P基質（例えば過酸化水素）及びH R Pの存在下で視覚的に検出可能な生成物を産生する色素原（例えばD A B）と接触させられる。一部の例では、試料中のG I V - f 1タンパク質を検出することは、V E N T A N A O p t i V i e w D A B I H C D e t e c t i o n K i t（V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s , I n c . , T u c s o n , A Z、カタログ番号760 - 700）又はV E N T A N A u l t r a V i e w U n i v e r s a l D A B D e t e c t i o n K i t（V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m s , I n c . , T u c s o n , A Z、カタログ番号760 - 500）を使用して実施される。

20

30

【0091】

特定の実施態様では、試料中のG I V - f 1タンパク質を検出することは、シグナル増幅を含む間接的検出を含む。一部の例では、シグナル増幅は、シグナル増幅なしでは弱い染色のみを示し得るG I V - f 1陽性標本の明白な検出を可能にする。I H Cのためのシグナル増幅方法は、当業者に公知である。一部の例では、シグナル増幅には、T y r a m i d e S i g n a l A m p l i f i c a t i o n（T S A（商標））としても公知のC A t a l y z e d R e p o r t e r D e p o s i t i o n（C A R D）が含まれる。この方法の1つのバリエーションでは、酵素がコンジュゲートされた二次抗体（例えば、H R Pがコンジュゲートされた二次抗体）が、一次抗体に結合する。次に、H R P酵素と相互作用する場合におそらくはフリーラジカルになる、ビオチン化チラミドの基質（チラミンは、4 - （2 - アミノエチル）フェノールである）が使用される。次いで、フェノール性ラジカルは、周辺材料と迅速に反応し、したがって、ビオチンを近くに沈着又は固

40

50

定する。このプロセスは、より多くの基質（ビオチン化チラミド）を提供し、より多くの局在化したビオチンを構築することによって、反復される。最後に、「増幅された」ビオチン沈着が、蛍光性分子に結合されたストレプトアビジンを用いて検出される。あるいは、増幅されたビオチン沈着は、アビジン-ペルオキシダーゼ複合体を用いて検出され得、これが次いで、DABと接触させられて、褐色の色を生じる。

【0092】

他の例では、シグナル増幅は、試料をHRPがコンジュゲートされた三次抗体と接触させた後に、試料に結合した一次抗体の部位又はその近傍にHQを沈着させるのに十分な条件下で、試料を過酸化水素及びチラミド-HQコンジュゲートと接触させることを含む。次いで、試料は、HQに特異的に結合する、酵素がコンジュゲートされた抗体（例えば、HRP又はAPがコンジュゲートされた抗体）と接触させられる。一部の例では、この酵素がコンジュゲートされた抗体は、HRPがコンジュゲートされた三次抗体と同じである。他の例では、酵素がコンジュゲートされた抗体は、HRPがコンジュゲートされた三次抗体とは異なる抗体である。次いで、試料は、酵素の存在下で検出可能な反応生成物を産生する1又は複数の試薬と接触させられる。一部の例では、試料は、HRP基質（例えば過酸化水素）及びHRPの存在下で視覚的に検出可能な生成物を産生する色素原（例えばDAB）と接触させられる。一部の例では、シグナル増幅は、VENTANA OptiView Amplification Kit (Ventana Medical Systems, Inc., カタログ番号760-099) を使用して実施される。

【0093】

B.GIV-f1発現をスコアリングすること

GIV-f1発現について試料をスコアリングするために、検出可能に標識されたGIV-f1を有するCRC試料（例えば、CRC試料の切片を含有する1又は複数のスライド、例えば、1、2、3、4又は5つのスライド）が使用される。試料は、例えば上記セクションAに記載されたように、GIV-f1に特異的な抗体（又は他のタンパク質特異的結合剤、例えばアプタマー）並びに適切に標識された二次及び/又は三次抗体で標識され得る。

【0094】

当業者は、腫瘍性である試料の部分（例えば、腫瘍細胞）及び正常な組織又は細胞である試料の部分を、例えば、形態学的及び/又は組織学的特性に基づいて、同定できる。一部の例では、試料は、組織及び細胞の形態学を同定することを補助するために、H&E（例えば、隣接組織切片）で染色される。

【0095】

抗GIV-f1標識された試料（又はそのデジタル画像）は、例えば、病理学者又はコンピューターによって視覚的に検査され得る（例えば、光学顕微鏡を用いて又は用いずに）。一部の例では、試料全体（例えば、組織切片全体）は、例えば、約2x-20xの倍率で、例えば光学顕微鏡を使用して、視覚的に検査される。一部の例では、Ventana Image Analysis System (VIAS) が、染色強度又は染色の総面積をデジタルで定量化するために使用される。高解像度の画像がとられ、同じスライド上のクリアなエリアと比較した、GIV-f1と関連する色素原の光学濃度(OD)が得られ得る。標本1つ当たり3つ以上の異なるエリアが解析され得る。平均ODは、その標本についてのGIV-f1の発現のデジタル尺度として記録され得る。

【0096】

開示された方法は、例えば、試料のGIV-f1スコアを最初に決定することによって、CRC試料がGIV-f1陽性か陰性かを決定するために使用され得る。一例では、CRC試料のGIV-f1スコアは、以下のように決定される。試料の陽性GIV-f1染色の程度は、0から3のスケールでスコアリングされ、試料の総面積の0%-10%がGIV-f1について陽性染色される場合、スコアには0が割り当てられ（即ち、%陽性ピンには0が割り当てられ得る）、試料の総面積の11%-35%がGIV-f1について陽性染色される場合、スコアには1が割り当てられ（即ち、%陽性ピンには1が割り当て

られ得る)、試料の総面積の36% - 50%がG I V - f 1について陽性染色される場合、スコアには2が割り当てられ(即ち、%陽性ピンには2が割り当てられ得る)、試料の総面積の51% - 100%がG I V - f 1について陽性染色される場合、スコアには3が割り当てられる(即ち、%陽性ピンには3が割り当てられ得る)。さらに、0から3+(強い)のスケールで、試料の染色のG I V - f 1強度の値又はスコアが、決定又は計算される。染色強度を決定する一般的方法(例えば、半定量的IHC方法)は、当業者に公知である。例えば、0のスコアは、バックグラウンドを上回る染色が存在しない場合に使用され、1又は1+は、弱い強度の染色について使用され、2又は2+は、中程度の強度の染色について使用され、3又は3+は、強い強度の染色について使用される(例えば、上で議論したとおり)。したがって、染色のG I V - f 1強度のピンには、0、1、2又は3が割り当てられ得る。一部の例では、陽性G I V - f 1染色の程度及び染色のG I V - f 1強度の各々について決定された値は、コンピューター又はアルゴリズムに入力される。陽性G I V - f 1染色の程度及び染色のG I V - f 1強度の値又はスコアが合計され、それによって、0から6までのG I V - f 1スコア値を生成する。0から6までのこの値に基づいて、G I V - f 1スコア値が0 - 2である場合、試料はG I V - f 1陰性であると決定される、又はG I V - f 1スコア値が3 - 6である場合、試料はG I V - f 1陽性であると決定される。

10

【0097】

別の例では、CRC試料のG I V - f 1スコアは、以下のように決定される。試料は、上記の方法を使用して、試料のG I V - f 1染色の総面積が、10%よりも高いかどうかを決定するため、及び/又はG I V - f 1染色強度が、任意のパーセント陽性細胞で強い(3+)かどうかを決定するために、解析される。この情報に基づいて、試料のG I V - f 1染色の総面積が、任意の染色強度で10%よりも高い場合、若しくはG I V - f 1染色強度が、任意のパーセントで強い(3+)場合、試料にはG I V - f 1陽性が割り当てられる;又はG I V - f 1染色の総面積が、試料について0、1+又は2+の染色強度で10%未満である場合、試料にはG I V - f 1陰性が割り当てられる。

20

【0098】

一部の例では、スコアリング方法は、G I V - f 1標識された腫瘍試料を、G I V - f 1特異的結合剤(例えば、抗体)で標識された1又は複数のコントロール(例えば、試験試料と同じIHC実行でアッセイされるコントロール)と比較することも含む。一部の例では、コントロールには、ポジティブコントロール、例えば、G I V - f 1陽性であることが既知の細胞(例えば、COS-7細胞)を含む試料が含まれる。他の例では、コントロールには、ネガティブコントロール、例えば、G I V - f 1陰性であることが既知の細胞(例えば、肝細胞)を含む試料が含まれる。一部の例では、ポジティブ及び/又はネガティブコントロール試料は、アッセイ試薬及び機器の適切な機能を確実にするための、システムレベルのコントロールである。一例では、これらのコントロールには、ポジティブコントロール及びネガティブコントロールの両方が含まれる。

30

【0099】

他の例では、ネガティブコントロールには、ネガティブコントロール抗体で染色されたステージIIのpMMR CRC試料(例えば、ステージIIa又はステージIIb)が含まれる。一部の例では、ネガティブコントロール抗体は、CRC試料中に内因性には存在しない標的抗原に特異的に結合する抗体である。一部の例では、ネガティブコントロール抗体は、免疫グロブリン、例えばモノクローナル抗体である。ネガティブコントロール抗体による染色は、対象由来の試料におけるバックグラウンド染色のレベルを評価するために使用され得る。一部の例では、ネガティブコントロール抗体で染色された試料は、G I V - f 1特異的結合剤(例えば、抗体)で染色された試料と同じ対象由来の試料(例えば、試料由来の隣接又は連続切片)である。他の例では、ネガティブコントロール抗体で染色された試料は、G I V - f 1特異的結合剤(例えば、抗体)で染色された試料とは異なる対象由来である。

40

【0100】

50

なお別の例では、G I V - f 1 の発現は、m R N A を定量化することによって測定される。新鮮な又はホルマリン固定パラフィン包埋組織 (F F P E T) を含むいくつかの技術が、組織から m R N A を精製するために公知である、例えば、米国特許第 6 2 4 8 5 3 5 号「Method for isolation of RNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens」を参照のこと。ハウスキーピング遺伝子と比較した標的遺伝子の R T - P C R による m R N A の定量的検出も同様に、当該技術分野で公知である、例えば、米国特許第 8 5 8 6 3 1 1 号を参照のこと。典型的な反応は、フォワード及びリバースプライマーを含む。プライマーのうち少なくとも一方、好ましくは逆転写工程に使用されるプライマーは、残留 D N A の増幅を回避するために、標的遺伝子の 2 つのエクソンの接合点にわたる。完全長転写物 (G I V - f 1) を検出するために、少なくとも 1 つのプライマーは、遺伝子の最後のコーディングエクソンに特異的である。一部の実施態様では、G I V - f 1 m R N A の相対的量は、「ハウスキーピング遺伝子」と呼ばれることがある、構成的レベルの転写を有する遺伝子の m R N A の検出された量との比較によって決定される。比較は、2 つの測定値の差異又は比率を決定することによって実施され得る。ハウスキーピング遺伝子の例には、ベータ - アクチン、G A D P H、トランスフェリン受容体遺伝子又は T M E M 5 5 B 遺伝子が含まれるがこれらに限定されない。なお他の例では、腫瘍試料中の G I V - f 1 m R N A の相対的量は、コントロール、例えば、非腫瘍試料中の G I V - f 1 m R N A の相対的量と比較される。G I V - f 1 m R N A の相対的量が、コントロール試料中の G I V - f 1 m R N A の相対的量よりも実質的に高い場合、腫瘍試料には G I V - f 1 陽性が割り当てられる。

10

20

【 0 1 0 1 】

C . L V I

開示された方法は、対象のリンパ管浸潤 (L V I) 状態 (例えば、陽性又は陰性) を考慮に入れる。L V I を決定する方法は、顕微鏡を使用するなど、常套的である。例えば、C R C 試料は、例えば、H & E で、又はリンパ内皮に特異的な抗体、例えば D 2 - 4 0 で、又は C D 3 4 に特異的な抗体で染色された画像の顕微鏡法を使用して、血管又はリンパ管中への C R C の浸潤が存在したかどうかを決定するために解析され得る。L V I 状態は、ステージ I I a 又は I I b の p M M R C R C が化学療法又は生物療法に应答する可能性が高いか低いかを決定するために、G I V - f 1 状態と組み合わせて使用され得る。

30

【 0 1 0 2 】

D . 他の臨床変数

開示された方法は、対象の 1 又は複数の特性 (又は対象についての公知の特性をコンピューター又はアルゴリズムに入力すること) を考慮に入れる。一部の例では、対象の 1 又は複数の特性は、例えば、視覚的又は可聴的出力で、コンピューター又はアルゴリズムによって出力される。一部の例では、対象の 1 又は複数の特性は、アルゴリズムに入力される。例示的特性には、診断時の対象の年齢、C R C について陽性のリンパ節の数、対象の性別 (雄性又は雌性)、腫瘍分化の状況 (例えば、中程度、低い又は高い)、C R C の T ステージ (例えば、原発腫瘍のサイズ及び / 又は程度を反映する、T 1、T 2、T 3、T 4 又は T 3 / 4)、並びにどちら側に結腸がんが存在したのか (例えば、右又は左) が含まれるがこれらに限定されない。G I V - f 1 状態は、対象の 1 又は複数の特性と組み合わせて、及び一部の例では L V I 状態とも組み合わせて、ステージ I I の p M M R C R C が化学療法又は生物療法に应答する可能性が高いか低いかを決定するために使用され得る。

40

【 0 1 0 3 】

E . 試料

一部の例では、開示された方法は、試料を取得する工程、解析のために試料を調製する工程 (例えば、試料を固定すること、試料を G I V - f 1 抗体と接触させること、又は H & E 染色)、又はそれら両方を含む。対象から手術切除標本などの生物学的試料を取得する方法は、当該技術分野で公知である。例えば、結腸直腸組織、リンパ節組織、結腸直腸

50

細胞又はリンパ節細胞などの組織を取得する方法は、常套的である。例えば、細胞性材料を含有するCRC由来の試料は、腫瘍の全て又は一部の外科的切除によって、腫瘍から穿刺吸引物を収集することによって、並びに当該技術分野で公知の他の方法によって、取得され得る。一部の例では、試料は、ステージIIのCRC（例えば、ステージIIa又はIIb）を有している、又はそれらを有する疑いがある対象から取得される。特定の例では、対象から取得された試料は、腫瘍細胞、例えば、腫瘍の少なくとも一部分を含む。一部の例では、対象由来の試料は、正常（例えば、非腫瘍）組織又は細胞も含む。一部の例では、腫瘍試料は、対象からの取り出しの際に10%中性緩衝ホルマリン中に配置される。

【0104】

試料は、新鮮な、凍結された、又は固定されたものであり得る。一部の例では、試料は、固定によって収集後に処理され、一部の例では、ワックス（例えば、パラフィン）包埋される。マウントされた細胞及び組織調製物のための固定剤は、当該技術分野で周知であり、これには、ホルマリン固定剤、95%アルコール性Bouin固定剤；95%アルコール固定剤；B5固定剤、Bouin固定剤、Karnovsky固定剤（グルタルアルデヒド）、Hartman固定剤、Hollande固定剤、Orth溶液（ジクロメート固定剤）及びZenker固定剤が含まれるがこれらに限定されない（例えば、Carson, Histotechnology: A Self-Instructional Text, Chicago:ASCP Press, 1997を参照のこと）。GIV-f1染色強度は、使用される特定の固定剤（例えば、95%アルコール、AFA、B5又はPrefer）に依存して変動し得る。特定の例では、試料は、中性緩衝ホルマリン（例えば、10%中性緩衝ホルマリン）又は亜鉛ホルマリン中で固定される。一部の例では、試料は、少なくとも約6時間（例えば、約6-48時間、12-24時間又は約6、12、16、18、24、36若しくは48時間）、固定される。さらなる例では、試料は、収集の約6時間以内（例えば、約15分間、30分間、1、2、3、4、5又は6時間以内）に、固定剤中に配置される。

【0105】

一部の例では、試料は、固定されたワックス包埋組織試料、例えば、腫瘍細胞を含む固定されたワックス包埋組織試料であり得る。一部の例では、試料は、直接的又は間接的に（例えば、標識された二次抗体で）標識され得るGIV-f1に特異的な一次抗体で標識された、一部の例では、H&Eで（例えば、同じ試料由来の隣接又は連続切片を使用して）さらに染色される、腫瘍細胞を含む組織切片である。

【0106】

一部の例では、試料（又はその画分）は、固体支持体上に存在する。固体支持体は、生物学的試料を有し、試料中の成分（例えば、タンパク質）の簡便な検出を可能にする。例示的支持体又は基材には、顕微鏡スライド（例えば、ガラス顕微鏡スライド又はプラスチック顕微鏡スライド）、カバーガラス（例えば、ガラス製カバーガラス又はプラスチック製カバーガラス）、組織培養皿、マルチウェルプレート、メンブレン（例えば、ニトロセルロース又はフッ化ポリビニリデン（PVDF））又はBIACORE（商標）チップが含まれる。

【0107】

F. 治療の方法

開示された方法は、化学療法又は生物療法による治療のために対象を同定及び/又は選択することをさらに含み得る。例えば、開示された方法が、CRCが高リスクであることを示す場合、対象は、化学療法又は生物療法による治療のために選択され得るが、開示された方法が、CRCが低リスクであることを示す場合、対象は、化学療法又は生物療法を控えるように選択され得る。さらに、開示された方法は、対象から取得された試料が、高リスクである（例えば、例えば試料がGIV-f1陽性かつLVI陽性である場合、進行又は再発する可能性が高いもの）と結論付けられる場合に、1又は複数の化学療法又は生物療法を対象に投与することをさらに含み得る。対照的に、開示された実施態様は、例えば、対象から取得された腫瘍試料が、低リスクである（例えば、例えば試料がGIV-f

10

20

30

40

50

1 陰性かつLVI陰性である場合、進行又は再発する可能性が高いもの)と結論付けられる場合に、化学療法又は生物療法から利益を受ける可能性が低い対象を同定することをさらに含み得る。

【0108】

1. 例示的CRC化学療法及び生物学的療法

CRC化学療法及び生物療法には、治療の有効量で投与される場合に所望の応答を誘導する治療剤が含まれる(例えば、腫瘍のサイズ若しくは容積を低減させること、又は転移のサイズ、容積若しくは数を低減させることなどによる、CRCの治療)。使用され得るCRC化学療法及び生物療法の例には、以下のうち1又は複数が含まれるがこれらに限定されない: 5-フルオロウラシル(例えば、Adrucil(登録商標)、Efudex(登録商標)、Fluoroplex(登録商標))、Avastin(登録商標)(ペバシズマブ)、Camptosar(登録商標)(イリノテカン塩酸塩)、カペシタピン(例えば、Xeloda(登録商標))、オキサリプラチン(例えば、Eloxatin(登録商標))、Erbitux(登録商標)(セツキシマブ)、ロイコボリンカルシウム、レゴラフェニブ、Stivarga(登録商標)(レゴラフェニブ)、Vectibix(登録商標)(パニツムマブ)、Wellcovorin(登録商標)(ロイコボリンカルシウム)及びZaltrap(登録商標)(Ziv-アフリベルセプト)。CRCのための薬物組合せ使用の例には、以下が含まれるがこれらに限定されない: CAPOX(カペシタピン及びオキサリプラチン)、FOLFIRI(5-FU、ロイコボリン及びイリノテカン)、FOLFIRI-ペバシズマブ、FOLFIRI-セツキシマブ、FOLFOX(5-FU、ロイコボリン及びオキサリプラチン)並びにXELOX。

【0109】

一例では、CRC化学療法又は生物療法は、CRC細胞の死滅を増加させる(又はそれらの生存能力を低減させる)。かかる死滅は、CRC細胞の100%低減を生じる必要はない;例えば、(例えば、CRC化学療法による治療も生物療法による治療もない場合と比較して)少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%又は少なくとも95%の、生存CRC細胞の数における低減を生じるCRC化学療法が、本明細書に提供される方法において使用され得る。例えば、CRC化学療法又は生物療法は、(例えば、化学療法も生物療法もなしの場合と比較して)少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%又は少なくとも95%、CRC細胞の増殖を低減させ得る。

【0110】

一例では、CRC化学療法又は生物療法は、GIV-f1の発現又は活性を減少させる。かかる阻害は、GIV-f1の発現又は活性の100%低減を生じる必要はない;例えば、(例えば、CRC化学療法による治療も生物療法による治療もない場合と比較して)少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも90%又は少なくとも95%の、GIV-f1の発現又は活性における低減を生じるCRC化学療法が、本明細書に提供される方法において使用され得る。例えば、CRC化学療法又は生物療法は、遺伝子発現(転写、プロセシング、翻訳、翻訳後修飾)に干渉し得る。

【0111】

一例では、CRC生物療法は、ヒト化抗体などの抗体を含むか、又はかかる抗体からなる。かかる抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体又はキメラ抗体であり得る。上述のように、特定の標的に特異的な抗体を作製する方法は、常套的である。一部の例では、治療抗体は、毒素にコンジュゲートされる。

【0112】

CRC生物療法の他の例には、阻害性核酸分子、例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、siRNA、microRNA(miRNA)、shRNA又はリボザイムが含まれる。かかる分子は、GIV-f1遺伝子発現を減少又は排除するために使用され得る。

10

20

30

40

50

G I V - f 1 核酸を特異的に標的化しその発現を調節する任意の型のアンチセンス化合物が、使用のために企図される。アンチセンス化合物は、標的核酸分子（例えば、G I V - f 1）と特異的にハイブリダイズし、その発現をモジュレートする化合物である。これらの化合物は、一本鎖、二本鎖、環状、分岐鎖又はヘアピン化合物として導入され得、構造的エレメント、例えば、内部又は末端のバルジ又はループを含有し得る。二本鎖アンチセンス化合物は、二本鎖化合物を形成するようにハイブリダイズした2本の鎖、又は全体の若しくは部分的に二本鎖の化合物のハイブリダイゼーション及び形成を可能にするのに十分な自己相補性を有する単一の鎖であり得る。一部の例では、アンチセンスG I V - f 1オリゴヌクレオチドは、一本鎖アンチセンス化合物であり、その結果、アンチセンスオリゴヌクレオチドがG I V - f 1 mRNAにハイブリダイズする場合、二重鎖は、RNA 10
s e Hによって認識され、mRNAの切断を生じる。他の例では、miRNAは、RNA i経路を介して遺伝子発現を調節するmRNA分子と少なくとも部分的に相補的な、約21 - 23ヌクレオチドの一本鎖RNA分子である。さらなる例では、shRNAは、siRNAへと切断されるタイトなヘアピンを形成するRNAオリゴヌクレオチドである。siRNA分子は、一般に約20 - 25ヌクレオチド長であり、3'末端上に2ヌクレオチドのオーバーハングを有し得るか、又は平滑末端であり得る。一般に、siRNAの一方の鎖は、標的核酸と少なくとも部分的に相補的である。G I V - f 1遺伝子の特異的に標的化するアンチセンス化合物は、mRNA配列などのG I V - f 1ヌクレオチド配列と相補的な化合物を設計することによって調製され得る。G I V - f 1アンチセンス化合物は、G I V - f 1を特異的にハイブリダイズし、その発現を調節するために、G I V - f 1 20
核酸分子と100%相補的である必要はない。例えば、アンチセンス化合物、又は二本鎖化合物である場合にはその化合物のアンチセンス鎖は、G I V - f 1核酸配列と少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも99%又は100%相補的であり得る。特異性についてアンチセンス化合物をスクリーニングする方法は、周知である（例えば、米国特許出願公開第2003 - 0228689号を参照のこと）。さらに、阻害性核酸分子を設計、調製及び使用する方法は、当業者の能力の範囲内である。さらに、G I V - f 1についての配列は、公に入手可能である。

【0113】

2 化学療法又は生物療法及び他の薬剤の投与 30

一部の例では、開示された方法は、高リスクのステージIIのpMMR CRCを有する対象に、治療的有効量の1又は複数のCRC化学療法又は生物療法を提供することを含む。方法並びにかかる薬剤及び治療の治療的投薬量は、当業者に公知であり、例えば熟練の臨床医によって決定され得る。一部の例では、開示された方法は、化学療法又は生物療法と組み合わせて（例えば、順次、実質的に同時に、又は同時に）、対象に手術及び/又は放射線療法を提供することをさらに含む。投与は、単一又は複数の用量によって達成され得る。方法並びにかかる薬剤及び治療の治療的投薬量は、当業者に公知であり、熟練の臨床医によって決定され得る。必要とされる用量は、対象の種、年齢、体重及び全身状態、使用されている特定の治療剤、並びにその投与様式に依存して、対象毎に変動する。

【0114】 40

CRC化学療法又は生物療法を含む治療剤は、当該技術分野で公知の任意の適切な手段を使用して、治療を必要とする対象に投与され得る。投与の方法には、皮内、経皮、筋肉内、腹腔内、非経口、静脈内、皮下、膺、直腸、鼻腔内、吸入、経口又は遺伝子銃によるものが含まれるがこれらに限定されない。鼻腔内投与とは、一方又は両方の鼻孔を介した鼻及び鼻道中への組成物の送達を指し、これには、スプレー機構若しくは液滴機構による、又は治療剤のエアロゾル化を介した送達が含まれ得る。

【0115】

吸入剤による、CRC化学療法又は生物療法を含む治療剤の投与は、スプレー又は液滴機構による送達を介して、鼻又は口を介してであり得る。送達は、挿管を介して、呼吸器系の任意のエリアに直接であり得る。非経口投与は、一般に、注射によって達成される。 50

注射剤は、液体溶液若しくは懸濁物のいずれかとして、注射前に液体中の懸濁物の溶液にするのに適切な固体形態で、又はエマルジョンとして、従来形態で調製され得る。注射溶液及び懸濁物は、滅菌の粉末、顆粒及び錠剤から調製され得る。投与は、全身性又は局所であり得る。

【0116】

CRC化学療法又は生物療法を含む治療剤は、任意の適切な様式で、例えば薬学的に許容される担体と共に、投与され得る。薬学的に許容される担体は、投与されている特定の組成物、並びに組成物を投与するために使用される特定の方法によって、一部決定される。したがって、本開示の薬学的組成物の広範な種々の適切な製剤が存在する。本開示において有用な薬学的に許容される担体（ビヒクル）は、従来のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 第15版(1975)は、1又は複数の治療剤の薬学的送達に適切な組成物及び製剤を記載している。

10

【0117】

非経口投与のための調製物には、滅菌の水溶液又は非水溶液、懸濁物及びエマルジョンが含まれる。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、植物油、例えばオリーブ油、及び注射可能な有機エステル、例えばオレイン酸エチルである。水性担体には、生理食塩水/食塩水及び緩衝媒体を含め、水、アルコール性/水性の溶液、エマルジョン又は懸濁物が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロース及び塩化ナトリウム、乳酸リンゲル又は揮発性油が含まれる。静脈内ビヒクルには、流体及び栄養補充剤、電解質補充剤（例えば、リンゲルデキストロースに基づくもの）などが含まれる。例えば、抗微生物剤、抗酸化剤、キレート剤及び不活性気体などの、防腐剤及び他の添加剤もまた存在し得る。

20

【0118】

局所投与のための製剤には、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐薬、スプレー、液体及び粉末が含まれ得る。従来薬学的担体、水性、粉末又は油性基剤、増粘剤などが、必要又は所望され得る。

【0119】

経口投与のための、CRC化学療法又は生物療法を含む治療剤には、粉末若しくは顆粒、水若しくは非水性媒体中の懸濁物若しくは溶液、カプセル剤、サシェ剤又は錠剤が含まれる。増粘剤、香味剤、希釈剤、乳化剤、分散補助剤又はバインダーが望まれ得る。

30

【0120】

CRC化学療法又は生物療法を含む治療剤は、無機酸、例えば塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸及びリン酸、並びに有機酸、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルピン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸及びフマル酸との反応によって、又は無機塩基、例えば水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カリウム、並びに有機塩基、例えば、モノ-、ジ-、トリアルキル及びアリールアミン並びに置換エタノールアミンとの反応によって形成される、薬学的に許容される酸付加塩又は塩基付加塩として投与され得る。

【0121】

CRC化学療法及び生物療法には、抗腫瘍化学療法剤、抗生物質、アルキル化剤及び抗酸化剤、キナーゼ阻害剤並びに他の薬剤、例えば抗体が含まれ得る。使用され得るさらなる化学療法剤の特定の例には、アルキル化剤、例えば、ナイトロジェンマスタード（例えば、クロラムブシル、クロルメチン、シクロホスファミド、イホスファミド及びメルファラン）、ニトロソウレア類（例えば、カルムスチン、ホテムスチン、ロムスチン及びストレプトゾシン）、白金化合物（例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン及びBBR3464）、プスルファン、ダカルバジン、メクロレタミン、プロカルバジン、テモゾロミド、チオテパ及びウラムスチン；葉酸（例えば、メトトレキサート、ペメトレキセド及びラルチトレキセド）、プリン（例えば、クラドリピン、クロファラピン、フルダラピン、メルカプトプリン及びチオグアニン）、ピリミジン（例えば、カベシタピ

40

50

ン)、シタラピン、フルオロウラシル及びゲムシタピン;植物アルカロイド、例えば、ポドフィルム(例えば、エトポシド及びテニポシド);微小管結合剤(例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、ビンブラスチン、ビンデシン、ビノレルピン(ナベルピン)ビンクリスチン、エポチロン、コルヒチン、ドラスタチン15、ノコダゾール、エピポドフィロトキシン、リゾキシシ並びにそれらの誘導体及びアナログ)、DNAインターカレーター又はクロスリンカー(例えば、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、マイトマイシン、例えば、マイトマイシンC、プレオマイシン、クロラムブシル、シクロホスファミド並びにそれらの誘導体及びアナログ)、DNA合成阻害剤(例えば、メトトレキサート、5-フルオロ-5'-デオキシウリジン、5-フルオロウラシル及びそれらのアナログ);アントラサイクリンファミリーメンバー(例えば、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、エピルピシン、イダルピシン、ミトキサントロン及びバルルピシン);代謝拮抗剤、例えば、細胞傷害性/抗腫瘍抗生物質、プレオマイシン、リファンピシン、ヒドロキシウレア及びマイトマイシン;トポイソメラーゼ阻害剤、例えば、トポテカン及びイリノテカン;モノクローナル抗体、例えば、アレムツズマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、ゲムツズマブ、リツキシマブ、パニツムマブ、ペルツズマブ及びトラスツズマブ;光線感作物質、例えば、アミノレブリン酸、アミノレブリン酸メチル、ポルフィマーナトリウム及びベルテポルフィン、酵素、酵素阻害剤(例えば、カンプトテシン、エトポシド、ホルメスタン、トリコスタチン並びにそれらの誘導体及びアナログ)、キナーゼ阻害剤(例えば、イマチニブ、ゲフィチニブ及びエルロチニブ)、遺伝子制御因子(例えば、ラロキシフェン、5-アザシチジン、5-アザ-2'-デオキシシチジン、タモキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、ミフェプリストン並びにそれらの誘導体及びアナログ);並びに他の薬剤、例えば、アリトレチノイン、アルトレタミン、アムサクリン、アナグレリド、三酸化ヒ素、アスパラギナーゼ、アキシチニブ、ベキサロテン、ベバシズマブ、ボルテゾミブ、セレコキシブ、デニロイキンジフチトクス、エストラムスチン、ヒドロキシカルバミド、ラパチニブ、パゾパニブ、ペントスタチン、マソプロコール、ミトタン、ペグアスパルガーゼ、タモキシフェン、ソラフェニブ、スニチニブ、ベムラフェニブ、バンデタニブ及びトレチノインが含まれる。方法及びかかる薬剤の治療的投薬量は、当業者に公知であり、熟練の臨床医によって決定され得る。上記分類のうち1又は複数の中に入れても入らなくてもよい他の治療剤、例えば抗腫瘍剤も記載された特異的結合剤との組合せ投与に適切である。かかる薬剤の選択及び治療的投薬量は、当業者に公知であり、熟練の臨床医によって決定され得る。

【0122】

一部の例では、GIV-f1阻害性核酸(例えば、アンチセンス分子、siRNA、shRNA又はmiRNA)の用量は、約1mgから約1000mg、約10mgから約500mg又は約50mgから約100mgである。一部の例では、アンチセンス化合物の用量は、約1mg、約10mg、約50mg、約100mg、約250mg、約500mg又は約1000mgである。一部の実施態様では、阻害性核酸の用量は、約1.0mg/kgから約100mg/kg、又は約5.0mg/kgから約500mg/kg、約10mg/kgから約100mg/kg、又は約25から約50mg/kgである。一部の例では、阻害性核酸の用量は、約1.0mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約12.5mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kg、約60mg/kg、約70mg/kg、約80mg/kg又は約100mg/kgである。これらの投薬量は、例に過ぎず、適切な用量が、常套的実験のみを使用して当業者によって決定され得ることが理解される。

【0123】

一部の実施態様では、抗体又は抗体コンジュゲートの用量は、約1mg/kgから約25mg/kg、例えば、約2mg/kgから約15mg/kg、約2mg/kgから約10mg/kg、又は約2mg/kgから約8mg/kgである。一部の例では、抗体の用量は、約1mg/kg、約2mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg

10

20

30

40

50

kg、約8mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg又は約25mg/kgである。他の実施態様では、抗体の用量は、約50mg/m²から約500mg/m²、例えば、約50mg/m²から約400mg/m²、約100mg/m²から約400mg/m²又は約250mg/m²から約400mg/m²である。一部の例では、用量は、約50mg/m²、約100mg/m²、約150mg/m²、約200mg/m²、約250mg/m²、約300mg/m²、約400mg/m²又は約500mg/m²である。これらの投薬量は、例に過ぎず、適切な用量が、常套的実験のみを使用して当業者によって決定され得ることが理解される。

【0124】

G. 出力

G I V - f 1 発現の検出、並びにG I V - f 1 タンパク質スコア及びG I V - f 1 状態、並びにL V I 状態及び任意選択的に他の患者特性の決定の後に、アッセイ結果（例えば、G I V - f 1 状態及びL V I 状態）、知見、予後、予測及び/又は治療推奨が記録され得、例えば、技術者、医師及び/又は患者に連絡され得る。特定の実施態様では、コンピューターが、かかる情報を、関係者、例えば、患者及び/又は主治医に連絡するために使用される。G I V - f 1 状態、L V I 状態、及び任意選択的に他の患者特性、C R C が高リスクか低リスクか（例えば、C R C が進行又は再発する可能性が高いかどうか、したがって、化学療法又は生物療法に应答する可能性が高いかどうか）に関する出力に基づいて、試料が取得された対象には、治療計画、例えば、化学療法若しくは生物療法による治療又はそれらによらない治療が割り当てられ得る。

【0125】

一実施態様では、出力（C R C が高リスクか低リスクか）に基づく予後、予測及び/又は治療推奨は、アッセイが完了し、予後が生成された後、可能な限りすぐに、関係者に連絡される。結果及び/又は関連情報は、対象を治療している医師によって、対象に連絡され得る。あるいは、これらの結果は、例えば報告書を提供することによる書面、電子的形態の連絡、例えば電子メール、又は電話を含む、連絡の任意の手段によって、関係者に直接連絡され得る。連絡は、電子メール連絡の場合など、適切にプログラムされたコンピューターの使用によって促進され得る。特定の実施態様では、試験の結果並びに/又は試験から引き出された結論及び/若しくは試験に基づく治療推奨を含有する連絡は、電気通信学の当業者に知られたコンピューターハードウェア及びソフトウェアの組合せを使用して、生成され得、関係者に自動的に送達され得る。医療指向性の連絡システムの一例は、米国特許第6283761号に記載されている；しかし、本開示は、特定の連絡システムを利用する方法に限定されない。

【0126】

本開示の方法の特定の実施態様では、試料のアッセイ、G I V - f 1 タンパク質発現のスコアリング、腫瘍の予後、及びアッセイ結果又は予後の連絡を含む方法工程の全て又は一部は、多様な（例えば、外国の）管轄権で実施され得る。

【0127】

H. コンピューター可読媒体

本明細書のコンピューター可読媒体のいずれかは、非一時的（例えば、メモリ、磁気記憶、光学式記憶など）であり得る。

【0128】

本明細書に記載される記憶作用のいずれかは、1又は複数のコンピューター可読媒体（例えば、コンピューター可読記憶媒体又は他の有形的媒体）中に記憶することによって実装され得る。

【0129】

記憶されたと記載された事物のいずれかは、1又は複数のコンピューター可読媒体（例えば、コンピューター可読記憶媒体又は他の有形的媒体）中に記憶され得る。

【0130】

本明細書に記載される方法のいずれかは、1又は複数のコンピューター可読媒体（例え

10

20

30

40

50

ば、コンピューター可読記憶媒体又は他の有形的媒体)中の(例えば、かかる媒体上にコード化された)コンピューターで実行可能な命令によって実装され得る。かかる命令は、コンピューターに方法を実施させることができる。本明細書に記載されるテクノロジーは、種々のプログラミング言語で実装され得る。

【0131】

本明細書に記載される方法のいずれかは、1又は複数のコンピューター可読記憶デバイス(例えば、メモリ、磁気記憶、光学式記憶など)中に記憶されたコンピューターで実行可能な命令によって実装され得る。かかる命令は、コンピューターに方法を実施させることができる。

【0132】

I. 統計的予測モデル

これらの方法は、統計的予測モデルを利用する。GIV-fI状態、LVI状態、及び任意選択的に他の臨床的特性に基づいて、これらの方法は、ステージIIのpMMR-CRCが化学療法又は生物療法にตอบสนองする可能性が高いかどうかについて予測する。モデルを開発するにあたり、別の変数を一定に保ちつつ、各変数を把握した。これらの統計的モデルは、Cox比例ハザードモデル化を利用した(Cox, Journal of the Royal Statistical Society, Series B 34 (2): 187-220, 1972)。

【0133】

数学的に、Cox比例ハザード生存モデル化は、確率密度関数(分子)及び生存関数(分母)の比である、故障率とも呼ばれるハザード関数 $h(t)$ の観点から、イベントまでの時間の転帰を規定する。潜在的予測因子は、以下のように、この統計的モデル中に組み込まれ得る：

$$h(t|\mathbf{X}) = h_0(t) \exp(\beta_1 X_1 + \dots + \beta_p X_p)$$

【0134】

これらのモデルでは、 $h_0(t)$ は、ベースラインハザード(線形モデルにおける切片と類似)であり、ハザード関数は、p推定された係数において線形であり、p予測因子は、係数を通じて相加的であり、カテゴリカル型又は連続型のいずれかであり得る。Cox比例ハザードモデルは、ベースラインハザード $h_0(t)$ についてのパラメトリックな仮定をいずれも行わず、 β が推定される場合、これらは、予測因子内で経時的に比例すると仮定される。推定された係数は、一般的な統計的技術である部分尤度方法を使用して取得される。オープンソースパッケージR(www.R-project.org)及びSASソフトウェアバージョン9.3(SAS Institute, Carey, North Carolina)を、統計的プログラミングに使用した。

【0135】

各予測因子についての、べき乗されフィッティングされた係数、

$$\exp(\hat{\beta})$$

は、予測因子におけるハザード率間の比率を記述する「ハザード比」と解釈される；カテゴリカル型予測因子について、これは、任意の時間tにおける別の群と比較した、1つの群において生じるイベント(再発)の確率であり、連続型予測因子について、これは、隣接区間と比較した、予測因子の一部の区間にわたって生じるイベントの確率である(再び、任意の時間tにおける)。1よりも小さい比率は、参照群(分母)がより高い確率の再発を有することを示し、1よりも大きい比率は、コンパレーターカテゴリーがより高い確率の再発を有することを示す。例えば、GIV-fI陽性及びLVIを用いると、GIV-fI陰性及びLVI陰性群を参照として使用した。表11中の結果の第3のセットは、両方の変数がフィッティングされたモデル中に含まれる場合の、GIV-fI陽性(GIV-fI陰性と比較して)及びLVI陽性(LVI陰性と比較して)についての推定され

10

20

30

40

50

たハザード比を示す（それぞれ、2.56及び2.07）。フィッティングされたモデルは、指数関数の尺度で線形であるので、これらの変数の両方が陽性（例えば、共に値1を取る、したがって $X_1 = 1$ かつ $X_2 = 1$ ）である場合についての2因子ハザード比は、ハザード比の積によって推定される：

$$HR_{GIV=1,LVI=1} = \exp(\hat{\beta}_1 X_1) \exp(\hat{\beta}_2 X_2) = (2.56)(2.07) = 5.30$$

【0136】

GIV-f1が陽性（ $X_1 = 1$ ）であり、LVIが陰性（ $X_2 = 0$ ）である場合、2因子ハザード比は、以下になる（ $\exp(0) = 1$ であることに留意のこと）：

$$HR_{GIV=1,LVI=0} = \exp(\hat{\beta}_1 X_1) \exp(\hat{\beta}_2 X_2) = (2.56)(1) = 2.56$$

【0137】

そしてさらに、GIV-f1及びLVIが共に陰性（ $X_1 = 0$ かつ $X_2 = 0$ ）である場合、2因子ハザード比は、以下になる：

$$HR_{GIV=0,LVI=0} = \exp(\hat{\beta}_1 X_1) \exp(\hat{\beta}_2 X_2) = (1)(1) = 1$$

【0138】

したがって、いずれも有さない患者と比較して、これらの変数単独のいずれかよりも、GIV-f1発現及びLVIの両方について陽性の患者について、より高い確率の再発が存在する；両方の変数を有する患者は、GIV-f1陽性又はLVIのいずれも有さない患者と比較して、再発する可能性が5倍高い。再発のリスクのこの比率は、GIV陽性単独についての2.56のリスク及びLVI単独についての2.07よりも高い。多因子ハザード比のいずれかは、多因子モデル（例えば、「全ての」臨床変数を含むモデル）から、この様式で取得できる。ハザード比は対称ではないが、それは、これが定義上、0ととの間の数だからである；このハザード比のlogに関してこれらの推定を試験することはよくあることだが、それは、比率が次いで、からへと至る対称的な数だからである。後者の場合、陰性logハザード比は、特定の群と比較して、参照群が再発する可能性がより高い場合を記述し、陽性logハザード比は、参照群が再発する可能性がより低い場合を記述する。

【0139】

分類のために、化学療法未治療の患者集団を使用して係数を推定し、線形予測因子（ L_p ）は、高リスク及び低リスクについてのカットポイントとして、最大感受性/感度及び特異性を本発明者らに与えるものである。具体的には、線形予測因子は、任意のp因子モデル（ここで、pは、予測因子の数である）について、各化学療法未治療患者について取得され、

$$L_p = \exp(\hat{\beta} X_{1i} \dots X_{pi})$$

である。 L_p についてのカットポイントは、感受性/感度及び特異性の両方が最大化される場合に取得される： $\max(\text{感受性/感度, 特異性}) = \max(\text{感受性/感度, 特異性})$ 。この最適なカットポイントが計算されると、これは、カットポイントを化学療法治療された個体に単に適用することによって、独立した集団におけるXの新たな値に適用され得る。高リスク個体は、 $L_p >$ カットポイントを有する個体であり、低リスク個体は、 $L_p <$ カットポイントを有する個体である。統計的予測を検証するために、これらの高リスク及び低リスクのカテゴリーを、化学療法治療された集団中の各個体についての実際の再発と比較する。最終 L_p は、個々の患者リスクを決定するために使用され得、高リスク患者は、化学療法又は生物療法の治療から利益を得る可能性が高い。

【 0 1 4 0 】

図 1 中のデータフロー図は、統計的モデル化において使用される工程を記載している。

$$\hat{\beta}_p$$

及び L_p 値は、臨床医に提供され得る入力である。次いで、臨床医は、これらの変数を使用し、予測因子の各個体の値 X_p の値に基づいて、個体のリスクを決定できる。図中に示されるプロセスは、各評価に必要なわけではない；これは、入力を取得するために使用されるプロセスの説明である。

【 0 1 4 1 】

最後の工程は、化学療法又は生物療法を受けた患者の集団への、統計的モデル化の適用である。この工程は、高リスクとして分類された患者について、そのうち 80% が化学療法又は生物療法に実際に応答したことを実証している（陽性予測値 = 高リスクの分類を考慮して再発を有さない確率）。

【 0 1 4 2 】

本開示は、以下の非限定的な実施例によって例示される。

【実施例】

【 0 1 4 3 】

実施例 1

G I V 抗体の生成及び染色条件の最適化

この実施例は、完全長 G I V タンパク質に特異的なウサギモノクローナル抗体を生成するために使用した方法を記載する。

【 0 1 4 4 】

G I V に特異的なウサギモノクローナル抗体は、ヒト G I V の最後の 11 個の C 末端アミノ酸 (S K S R S R E Q Q S S、配列番号 2 のアミノ酸 1 8 6 1 - 1 8 7 1) を使用して生成した。この抗 G I V ウサギモノクローナル抗体は、クローン番号 S P 1 7 3 (V M S I カタログ番号 M 4 7 3 4) である。

【 0 1 4 5 】

実施例 2

I H C 染色条件の最適化

この実施例は、免疫組織化学 (I H C) による、完全長 G I V タンパク質を標的化する 4 つの G I V 抗体 (3 つの市販のポリクローナル抗体及び実施例 1 に記載されるウサギモノクローナル抗体) の評価を記載する。各 I H C アッセイを、ネガティブコントロールとして機能した肝臓症例 (正常、脂肪肝及び肝硬変) に対して開発した。

【 0 1 4 6 】

実施例 1 で生成した G I V 抗体 (S P 1 7 3) を、完全長 G I V タンパク質を検出するそれらの能力について、ヒト G I V の C 末端部分に対して惹起された 3 つの他の抗体と比較した。試験した 3 つの市販の抗体は、以下であった：(1) ヒトギルジンの 78 個の C 末端アミノ酸 (1 7 3 8 - 1 8 1 5) に対して惹起されたアフィニティ精製されたウサギポリクローナル抗体である、Sigma Prestige の抗 G I V (カタログ番号 H P A 0 3 8 1 0 1)；(2) ヒト起源のギルジンの C 末端におけるペプチドマッピングに対して惹起されたアフィニティ精製されたウサギポリクローナル抗体である、Santa Cruz Biotechnology, Inc. の抗 G I V (T - 1 3) (カタログ番号 s c - 1 3 3 3 7 1)；及び(3) ヒトギルジンの 19 個の C 末端アミノ酸に対して開発されたアフィニティ精製されたウサギポリクローナル抗体である、Immuno-Biological Laboratories Co. の抗 G I V (I B L、カタログ番号 1 8 9 7 9)。

【 0 1 4 7 】

OptiView DAB IHC 検出キット (Ventana Medical Systems, Inc. [VMSI]、カタログ番号 7 6 0 - 7 0 0) を、完全長 G I V

10

20

30

40

50

タンパク質 (G I V - f l) のクロモジェニック検出に使用した。対比染色を、D A B シグナルを増強するために、スライドをヘマトキシリン I I 及び B l u i n g 試薬と共にインキュベートすることによって達成した。以下のパラメーター：抗体滴定；一次抗体インキュベーション時間及び温度；抗原回復条件及び抗体希釈剤を試験した。

【 0 1 4 8 】

滴定系列を実施して、一次抗体濃度を最適化した。各一次抗体を、V M S I A n t i b o d y D i l u e n t (カタログ番号 9 5 1 1 9) を使用して、種々の濃度 (S i g m a P r e s t i g e の抗体について 0 . 6 から 6 0 μ g / m l ; S a n t a C r u z の抗体について 0 . 1 から 5 μ g / m l ; I B L の抗体について 0 . 4 から 1 6 μ g / m l ; 及び実施例 1 で生成した G I V 抗体 S P 1 7 3 について 0 . 1 から 1 0 0 μ g / m l) に希釈し、肝臓及び結腸直腸がん組織上に、8 5 μ l の容積で適用した。S i g m a P r e s t i g e の G I V 抗体は、試験した全ての濃度で陰性染色を示した。結果として、この抗体はさらなる解析から排除した。

10

【 0 1 4 9 】

S a n t a C r u z の抗体 (0 . 6 7 μ g / m l) 、 I B L の抗体 (8 μ g / m l) 及び S P 1 7 3 (1 0 μ g / m l) についての初期力価を選択した後に、抗原回復条件を最適化し、一次抗体希釈剤をスクリーニングした。以下の希釈剤を試験した：V M S I A n t i b o d y D i l u e n t カタログ番号 9 5 1 1 9 ; 9 5 0 2 8 ; 9 0 0 3 9 ; 9 0 0 4 0 ; 及び 9 0 1 0 3 。正常及び脂肪肝の症例を、G I V I H C 最適化のための特異性評価として機能するように使用した。

20

【 0 1 5 0 】

S a n t a C r u z の抗体についての最適な希釈剤は、9 5 1 1 9 であり、I B L (8 μ g / m l) については 9 0 0 3 9 であり、G I V 抗体 S P 1 7 3 については 9 0 0 4 0 であった。最適な事前処理条件は、S a n t a C r u z 及び I B L の抗体については C C 1 細胞馴化試薬 (より穏やかな T r i s ベースの細胞馴化バッファー) 中で 9 5 で 6 4 分間のインキュベーション、並びに G I V 抗体 S P 1 7 3 については C C 1 細胞馴化試薬中で 9 5 で 4 8 分間のインキュベーションであった。一次抗体中でのインキュベーションに最適な時間量は、S a n t a C r u z 及び I B L の抗体については 3 7 で 1 6 分間であり、G I V 抗体 S P 1 7 3 については 3 7 で 1 2 分間であった。

【 0 1 5 1 】

実施例 3

G I V 抗体による正常肝臓試料の染色

コントロール肝臓標本に対する、各 G I V 抗体についての、実施例 2 に記載された同定された最適なアッセイ条件、即ち、9 5 1 1 9 中 0 . 6 7 μ g / m l の S a n t a C r u z の G I V 抗体、希釈剤 9 0 0 3 9 中 8 μ g / m l の G I V (I B L) 抗体、及び希釈剤 9 0 0 4 0 中 1 0 μ g / m l の G I V A b S P 1 7 3 を使用して、I H C を使用して肝臓試料を染色した。

【 0 1 5 2 】

肝臓において以前に決定された G I V m R N A レベルに基づくと、肝細胞は陰性のままであったが、全ての炎症細胞 (K u p p f e r マクロファージ、星状細胞) は、類洞空間において陽性染色を示した。G I V 免疫染色は、病理学者が評価した。2 つの G I V 抗体クローン (I B L 及び実施例 1 の S P 1 7 3 抗体) は、これらの基準を満たした。両方の抗体が、非常に類似したシグナル強度で、正常及び脂肪肝試料上の類洞及び星状細胞を検出した。肝細胞 (ネガティブコントロール) 及び任意の硬変肝臓試料上で染色を生じた抗体は存在しなかった。I B L 抗体は、一部の血管を染色し、他の点では、染色は陰性であった。したがって、I B L 抗体及び実施例 1 の S P 1 7 3 抗体による I H C は、非肝細胞において、主に細胞質の染色を伴って、陽性類洞を示し、肝細胞では完全に陰性であった。一部の正常細胞 (胆管) は、核染色を有した。対照的に、S a n t a C r u z の G I V 抗体は、非肝細胞において陰性染色を生じ、肝細胞において限局的な赤みを生じ、したがって、この抗体は、さらなる解析から排除した。

40

50

【 0 1 5 3 】

実施例 4

G I V 抗体による、肝臓及び結腸直腸がん試料の染色

正常、脂肪肝及び肝硬変患者由来の36の肝臓症例のセット（肝臓コホート）を、最適化された染色手順（実施例2）で染色して、最適化されたG I V I H Cのための特異性評価として機能するようにした。試料を、実施例1の最適化されたG I V S P 1 7 3 抗体のI H Cアッセイ（表1）及びG I V - I B L 抗体のI H Cアッセイ（表2）によって染色した。

表1: SP173抗体IHCアッセイ

1	パラフィン[選択]	10
2	脱パラフィン[選択]	
3	細胞馴化[選択]	
4	CC1[選択]	
5	CC1 8分[選択]	
6	CC1 16分[選択]	
7	CC1 24分[選択]	
8	CC1 32分[選択]	
9	CC1 40分[選択]	
10	CC1 48分[選択]	
11	事前一次ペルオキシダーゼ阻害[選択]	20
12	一次抗体[選択]	
13	一次抗体温度[選択]	
14	Abインキュベーション温度までスライドを加熱[一次抗体]	
15	カバーガラスの適用、1滴の[抗体10](抗体)及びインキュベーション[0時間12分]	
16	対比染色[選択]	
17	1滴の[ヘマトキシリンII]の適用(対比染色)、カバーガラスの適用、及びインキュベーション[4分]	
18	後の対比染色[選択]	
19	1滴の[Bluing試薬]の適用(後の対比染色)、カバーガラスの適用、及びインキュベーション[4分]	

30

表2:IBL抗体IHCアッセイ

1	パラフィン[選択]	
2	脱パラフィン[選択]	
3	細胞馴化[選択]	
4	CC1[選択]	
5	CC1 8分[選択]	
6	CC1 16分[選択]	
7	CC1 24分[選択]	
8	CC1 32分[選択]	
9	CC1 40分[選択]	10
10	CC1 48分[選択]	
11	CC1 56分[選択]	
12	GC1 64分[選択]	
13	事前一次ペルオキシダーゼ阻害[選択]	
14	一次抗体[選択]	
15	一次抗体温度[選択]	
16	Abインキュベーション温度までスライドを加熱[一次抗体]	
17	カバーガラスの適用、1滴の[抗体8](抗体)及びインキュベーション[0時間16分]	
18	対比染色[選択]	
19	1滴の[ヘマトキシリンII]の適用(対比染色)、カバーガラスの適用、及びインキュベーション[4分]	20
20	後の対比染色[選択]	
21	1滴の[Bluing試薬]の適用(後の対比染色)、カバーガラスの適用、及びインキュベーション[4分]	

【 0 1 5 4 】

G I V - I B L 及び G I V A b S P 1 7 3 抗体の両方が、中程度から重症の線維症を有する全ての肝臓試料において G I V タンパク質を検出したが、G I V は、正常肝臓では検出不能なままであった。C型肝炎患者の間で、これら2つの抗体による染色は、炎症スコアとも、肝脂肪症とも、大した相関は示さなかったが、それらの線維症重症度スコアとは、以前に観察された相関を示した。

30

【 0 1 5 5 】

G I V I H C の 予 後 判 定 能 力 を 試 験 す る た め に 、 1 0 人 の 患 者 の C R C コ ホ ー ト (表 3) を 、 同 じ 最 適 化 さ れ た 染 色 手 順 で 染 色 し 、 病 理 学 者 が ス コ ア リ ン グ し た 。

表3. CRCコホートについてのGIV IHC結果

症例ID	GIV-IBL	GIV-Spring	全生存	患者の転帰
9838872	陰性	陰性	0.8	未知
9610517	陰性	陰性	14.35	生存
973446	陰性	陰性	13.47	生存
012982A5	陰性	陰性	8.93	敗血症性ショック、呼吸不全
012768A7	陰性	陰性	8.98	GI大出血
96118110	陰性	陽性	14.33	追跡不能
071207A8	陰性	陽性	N/A	敗血症、胆管炎
012688A5	陰性	陽性	2.93	肝臓/肺への転移
9835799	陰性	陽性	11.57	生存
981154	陰性	陽性	2.78	肝臓、肺、副腎転移

10

20

【0156】

IBL抗体及びSP173抗体は、肝臓症例上で同じ特異性を有したが、これらの抗体の感受性/感度及び特異性は、結腸直腸組織上で異なっていた。GIV抗体SP173は、IBL抗体よりも感受性が高く、より強い染色を生じたが、正常結腸上でいくらかの非特異的染色もまた有した（おそらくはクロモジェニック沈着）（図2A）。しかし、この非特異的染色は、腫瘍染色に対して影響を有さなかった；腫瘍エリアの染色は、非常に特異的なままであった（図2B）。GIV抗体SP173を用いたGIV IHCは、5人のGIV陽性患者を同定し、そのうち2人は再発を有した。IBL抗体を用いたGIV IHCは、間質細胞において強い陽性染色を生じたが、腫瘍細胞の細胞質では、弱い、大部分が陰性の染色を生じた（図2B）。再発を有する全ての結腸直腸がん症例を検出することができたので、これらの結果は、GIV抗体SP173がより感受性が高いことを実証している。したがって、この抗体を、さらなる解析のために選択した。

30

【0157】

実施例5

GIV抗体によるがん試料及びマウスGIV-KO組織の染色

この実施例は、GIV IHC染色をさらに最適化するために使用した方法を記載する。

【0158】

ウサギモノクローナル抗GIV抗体SP173を使用するGIV IHCアッセイを使用した（実施例2を参照のこと）。Benchmark XT自動化染色器（VMSI）のための公称染色条件は、表4に列挙される。使用した一次抗体濃度は、希釈剤90040中に10 µg/mlであった。対比染色を、DABシグナルを増強するために、スライドをヘマトキシリンI I及びBluing試薬と共にインキュベートすることによって達成した。肝臓組織において確立された条件と共に、最適化された一次抗体製剤を使用して、非肝細胞（類洞、星状細胞）は陽性染色されたが、肝細胞は陰性のままであった。

40

表4. GIV IHCのためのアッセイ条件

手順	XT OptiView DAB IHC
抗原	完全長GIVタンパク質
試料型	結腸直腸がん症例(4 μ m切片)
パラフィン	選択
脱パラフィン	選択
細胞馴化	CC1、48分
事前一次ペルオキシダーゼ阻害	選択
一次Ab温度	選択、37°C
一次Abインキュベーション	12分
増幅	選択なし
対比染色	ヘマトキシリンII、4分
	Bluing試薬、4分

10

20

【0159】

注釈付きのがん細胞株(GIV-flタンパク質の発現は、RT-PCRによって以前に決定された)を使用して、GIV IHCアッセイの特異性及び感受性/感度を試験した:

- DLD1 結腸浸潤性: 検出可能なGIV-fl mRNA及び/又はタンパク質、
- HT29 結腸低浸潤性: 検出不能なGIV-fl mRNA及び/又はタンパク質、
- Ls174T 結腸低浸潤性: 検出不能なGIV-fl mRNA及び/又はタンパク質、
- MDA-MB231 乳房浸潤性: 検出可能なGIV-fl mRNA及び/又はタンパク質、
- MCF7 乳房非浸潤性: 検出不能なGIV-fl mRNA及び/又はタンパク質。

30

【0160】

公開されたデータによれば、高度に浸潤性の細胞株は、それらの非浸潤性対応物よりも、20-50倍多いGIV完全長タンパク質レベルを有する。非浸潤性細胞は、C末端トランケートされたGIVタンパク質(完全長mRNAを選択的スプライシングすることによって創出される)を主に含有し、したがって、これらの細胞株は、C末端終端に対して惹起されたGIV(fl)抗体(SP173、実施例1を参照のこと)とは、大した反応性を示さないはずである。上記GIV IHCアッセイを、これらの細胞株に適用した。染色されたスライドは、病理学者が評価した。

40

【0161】

公開されたデータと一致して、GIV IHCアッセイは、浸潤性乳房MDA-MB231及び結腸DLD1細胞株において陽性染色を生じたが、非浸潤性又は低浸潤性の細胞株は、完全長GIVタンパク質については主に陰性であった(図2C)。定常状況、飢餓状況又はEGF刺激した細胞のGIV-fl発現において、IHCによって差異は観察されなかった。

【0162】

GIV IHCアッセイを、解剖されたGIV KOマウス臓器に対して評価した。ヘテロ接合性及びホモ接合性試料は、野生型と比較して低減されたGIV染色を示したが、

50

G I Vタンパク質の完全な枯渇は、I H Cによっては検出されなかった。ギルジンについてのホモ接合性(-/-)又はヘテロ接合性(-/+)を一致させるために、一次抗体濃度を、10から5、2.5及び1 μ g/mlに減少させた。K Oマウス臓器は、1 μ g/mlのG I V - A b濃度でさえも、陽性染色を示した。

【0163】

G I Vの完全な枯渇は、突然変異体マウスにおいて生じる可能性は低いので、注釈付きのコントロール細胞株及び正常肝臓試料を使用して、G I V抗体濃度を仕上げた。G I V I H Cアッセイを、5、2.5及び1 μ g/mlの一次抗体を使用したこと以外、最適な条件で反復した。乳房がん細胞株は、1 μ g/mlの一次抗体においても陽性のままであったが、有意に低減されたシグナル又はシグナルの完全な喪失のいずれかが、5 μ g/mlの抗体で、正常肝臓及び浸潤性結腸細胞株において観察された(図3A - 3C)。

10

【0164】

より低い抗体濃度によるG I V染色も10人の患者のC R Cコホートで試験した(表3)(より良い及びより悪い転帰)。5 μ g/mlのG I V力価は、結腸症例においてG I V状態を変化させず(図4A - 4B)、むしろ不要なバックグラウンド染色を減少させたので、最終G I V抗体濃度は、7.5 μ g/mlに設定した。

【0165】

実施例6(予言的)

q R T - P C RによってG I V - f l遺伝子発現のレベルを評価する

C R C患者試料をこの実験で使用する。RNAを、例えば、それぞれ、M o l e c u l a r C l o n i n g . A L a b o r a t o r y M a n u a l、T M a n i a t i s、E F F r i t s c h及びJ S a m b r o o k、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y、N e w Y o r k . 1 9 8 2又は米国特許第6248535号に記載されるプロトコールを使用して、新鮮若しくは凍結した組織又はF F P E Tから単離する。

20

【0166】

この実施例では、G I V - f l標的の増幅は、G I V - f l m R N Aに特異的なフォワードプライマー、リバースプライマー及び検出プローブを利用する。プライマーの1つは、G I V遺伝子の最後のコーディングエクソンに特異的である。並行反応は、ハウスキーピング遺伝子G A D P Hに特異的なフォワードプライマー、リバースプライマー及び検出プローブを利用する。例示的反応混合物は、0.075 - 0.2 μ Mの各フォワードプライマー、リバースプライマー及び検出プローブ、ヌクレオシド三リン酸、3mMのM g C l ₂、50mMのトリシンpH8.0、55mMの酢酸カリウム、160 - 200 μ Mの各d A T P、d C T P及びd G T P、160 μ Mのd T T P(又は任意選択的に320 μ Mのd U T P及び0.2U/ μ Lのウラシル - N - グリコシラーゼ)、逆転写酵素活性を有する熱安定性DNAポリメラーゼ、0.1mMのE D T A、1.25% - 2%のD M S O、2.5mMの酢酸マグネシウム及び標的DNA(鋳型)を含む。増幅及び解析を、R o c h e L i g h t C y c l e r(登録商標)480機器(R o c h e A p p l i e d S c i e n c e、I n d i a n a p o l i s、I n d.)を使用して実施する。例示的溫度プロファイルは以下である: 50 で5分間; 95 (10秒間)から55 - 65 (30秒間)を2サイクル、その後、93 (10秒間)から55 - 65 (30秒間)を40 - 60回サイクリング、37 への冷却(10秒間)1サイクル、及び25 への冷却(10秒間)1サイクル。蛍光データを、各55 - 65 工程の開始時に収集し、C_t値を、各試料中の標的G I V - f l m R N A及びコントロールG A D P H m R N Aを増幅する反応について決定した。G I V - f l遺伝子の相対的発現を、標的遺伝子とコントロール遺伝子との間のC_t値の差異として測定する。

30

40

【0167】

実施例7

結腸直腸がん(C R C)におけるアッセイ検証

この実施例は、既知の臨床的転帰を有するステージI IのC R C試料の大きいコホート

50

において、免疫組織化学（IHC）によって、G I V 発現を解析的に検証するために使用した方法を記載する。

【 0 1 6 8 】

1 セットの 1 9 2 のステージ I I の結腸直腸がん症例を使用して、予測バイオマーカーとして G I V 発現を検証して、MMR 良好（pMMR）ステージ I I の CRC について腫瘍の再発 / 予後をさらに予測した。試料を、最適化された G I V 免疫組織化学アッセイ（表 1）で染色した。陰性染色のために、ウサギモノクローナルネガティブコントロール I g を、一次抗体として使用した（VMSI カタログ番号 7 9 0 - 4 7 9 5 ; 表 5）。

表5: ウサギモノクローナルネガティブコントロールIgイムノアッセイ

1	パラフィン[選択]	10
2	脱パラフィン[選択]	
3	細胞馴化[選択]	
4	CC1[選択]	
5	CC1 8分[選択]	
6	CC1 16分[選択]	
7	CC1 24分[選択]	
8	CC1 32分[選択]	
9	CC1 40分[選択]	
10	CC1 48分[選択]	
11	CC1 56分[選択]	20
12	CC1 64分[選択]	
13	事前一次ペルオキシダーゼ阻害[選択]	
14	一次抗体[選択]	
15	一次抗体温度[選択]	
16	Abインキュベーション温度までスライドを加熱[一次抗体]	
17	カバーガラスの適用、1滴の[抗体30](抗体)及びインキュベーション[0時間16分]	
18	対比染色[選択]	
19	1滴の[ヘマトキシリンII]の適用(対比染色)、カバーガラスの適用、及びインキュベーション[4分]	
20	後の対比染色[選択]	
21	1滴の[Bluing試薬]の適用(後の対比染色)、カバーガラスの適用、及びインキュベーション[4分]	30

【 0 1 6 9 】

染色したスライドを、支配的なシグナル強度及び陽性腫瘍細胞染色の百分率についてスコアリングした（表 6）。

表6. 192のステージII CRC試料のGIV IHC結果

症例ID	H&E(腫瘍の存在:あり/なし)	ネガティブコントロール	支配的なシグナル強度/ゲシュタルト(0-3+)	%陽性	核染色の存在(あり/なし)
00A1026-1C	あり	許容可能	2+	35	なし
00A6122-I	あり	許容可能	1+	15	なし
01A1336-1C	あり	許容可能	1+	10	なし
02A5647-1I	あり	許容可能	1+	10	なし
04A14059-3B	あり	許容可能	0	0	なし
04A15855-1B	あり	許容可能	2+	50	なし
04A20697-1D	あり	許容可能	1+	4	なし
05A10353-D	あり	許容可能	1+	1	なし
05A11669-B	あり	許容可能	1+	10	あり
05A12666-1C	あり	許容可能	2+	60	なし
05A13217-B	あり	許容可能	2+	85	なし
05A14795-A	あり	許容可能	1+	10	なし
05A16650-1E	あり	許容可能	2+	10	なし
05A17166-2D	あり	許容可能	1+	50	なし
05A19460-D	あり	許容可能	1+	20	なし
05A21057-D	あり	許容可能	2+	30	なし
05A21534-A	あり	許容可能	2+	85	なし
05A2963-1E	あり	許容可能	2+	35	なし
06A12643-F	あり	許容可能	1+	5	なし
06A13463-L	あり	許容可能	1+	40	なし
06A14696-2B	あり	許容可能	1+	<1	なし
06A15628-E	あり	許容可能	2+	2	なし
06A16584-A	あり	許容可能	1+	10	あり
06A17444-1E	あり	許容可能	2+	10	なし
06A18488-E	あり	許容可能	1+	40	なし
06A18930-1A	あり	許容可能	2+	35	あり
06A20990-1C	あり	許容可能	1+	3	なし
06A21078-A	あり	許容可能	2+	5	なし
06A21661-D	あり	許容可能	2+	7	なし
06A22137-1B	あり	許容可能	1+	8	なし
07A20580-C	あり	許容可能	1+	65	なし
07A21258-B	あり	許容可能	1+	35	なし

10

20

30

40

症例ID	H&E(腫瘍の存在:あり/なし)	ネガティブコントロール	支配的なシグナル強度/ゲシュタルト(0-3+)	%陽性	核染色の存在(あり/なし)
07A22295-1D	あり	許容可能	0	0	なし
07A25123-C	あり	許容可能	2+	6	なし
07A25327-1G	あり	許容可能	1+	4	なし
07A25823-C	あり	許容可能	1+	4	なし
07A26280-B	あり	許容可能	3+	60	あり (3+; 90%)
07A27529-1B	あり	許容可能	2+	80	なし
07A27620-B	あり	許容可能	0	0	なし
07A28429-C	あり	許容可能	1+	90	なし
07A29535-C	あり	許容可能	1+	5	なし
07A30498-1D	あり	許容可能	1+	45	なし
07A31038-F	あり	許容可能	2+	60	なし
07A32490-C	あり	許容可能	1+	7	なし
08A10093-C	あり	許容可能	2+	3	なし
08A21989-C	あり	許容可能	1+	90	なし
08A23446-1D	あり	許容可能	1+	80	なし
08A24383-F	あり	許容可能	1+	80	なし
08A26142-B	あり	許容可能	0	0	なし
09A619-D	あり	許容可能	0	0	なし
02A0517-1C	あり	許容可能	1+	10	なし
02A18759-C	あり	許容可能	1+	95	なし
02A3045-1C	あり	許容可能	2+	20	なし
04A12674-B	あり	許容可能	0	0	なし
06A2249-1N	あり	許容可能	2+	5	なし
06A3482-1D	あり	許容可能	2+	8	なし
06A3578-1G	あり	許容可能	0	0	なし
06A4157-1C	あり	許容可能	1+	60	なし
06A5014-A	あり	許容可能	2+	2	なし
06A6684-1D	あり	許容可能	1+	2	なし
06A7316-1C	あり	許容可能	1+	35	なし
06A7985-1D	あり	許容可能	1+	25	なし
06A9173-B	あり	許容可能	1+	20	なし
06A9592-1M	あり	許容可能	0	0	なし
07A10014-1E	あり	許容可能	1+	7	なし

10

20

30

40

症例ID	H&E(腫瘍の存在:あり/なし)	ネガティブコントロール	支配的なシグナル強度/ゲシュタルト(0-3+)	%陽性	核染色の存在(あり/なし)
07A1016-1E	あり	許容可能	1+	2	あり
07A10357-A	あり	許容可能	1+	55	なし
07A1523-1E	あり	許容可能	1+	8	なし
07A2051-D	あり	許容可能	1+	8	なし
07A2577-D	あり	許容可能	1+	20	なし
07A27758-C	あり	許容可能	1+	50	なし
07A3796-1D	あり	許容可能	2+	20	なし
07A4252-C	あり	許容可能	1+	75	なし
07A6444-1B	あり	許容可能	2+	25	なし
07A6924-1C	あり	許容可能	1+	20	なし
07A8451-B	あり	許容可能	1+	5	なし
07A8691-C	あり	許容可能	1+	4	なし
07A9065-B	あり	許容可能	0	0	なし
07A9116-C	あり	許容可能	2+	6	なし
07A9194-E	あり	許容可能	1+	5	なし
07A921-1C	あり	許容可能	1+	4	あり
08A1198-B	あり	許容可能	2+	35	なし
08A1577-C	あり	許容可能	2+	10	なし
08A3217-D	あり	許容可能	1+	5	なし
08A3404-D	あり	許容可能	2+	35	なし
08A3746-C	あり	許容可能	2+	1	なし
08A4872-D	あり	許容可能	1+	99	なし
08A498-C	あり	許容可能	0	0	なし
08A5142-C	あり	許容可能	1+	30	なし
08A5453-B	あり	許容可能	1+	5	なし
08A6122-D	あり	許容可能	1+	40	なし
08A7715-1C	あり	許容可能	1+	35	なし
08A822-B	あり	許容可能	2+	35	あり
08A8610-E	あり	許容可能	0	0	なし
08A9631-1F	あり	許容可能	2+	10	なし
08A9717-C	あり	許容可能	1+	6	あり
09A155-C	あり	許容可能	2+	2	なし
09A96-E	あり	許容可能	2+	2	なし

10

20

30

40

症例ID	H&E(腫瘍の存在:あり/なし)	ネガティブコントロール	支配的なシグナル強度/ゲシュタルト(0-3+)	%陽性	核染色の存在(あり/なし)
10A23348-E	あり	許容可能	1+	3	なし
11A29407-1D	あり	許容可能	0	0	あり (3+; 75%)
00A3119-E	あり	許容可能	1+	90	なし
01A17541-B	あり	許容可能	2+	20	なし
02A3063-1D	あり	許容可能	1+	<1	なし
02A7072-3M	あり	許容可能	1+	4	なし
03A3541-1D	あり	許容可能	2+	10	なし
03A3673-1B	あり	許容可能	2+	40	なし
03A4545-1C	あり	許容可能	1+	20	なし
03A7890-1F	あり	許容可能	2+	80	なし
03A14704-1C	あり	許容可能	1+	5	なし
04A2285-1B	あり	許容可能	0	0	なし
04A5521-1A	あり	許容可能	0	0	なし
05A2500-1F	あり	許容可能	1+	1	なし
05A13714-D	あり	許容可能	1+	70	あり (2+)
05A19183-B	あり	許容可能	2+	40	なし
05A19886-1E	あり	許容可能	1+	45	あり
06A1251-E	あり	許容可能	0	0	なし
06A1299-1C	あり	許容可能	1+	90	なし
06A1518-1E	あり	許容可能	0	0	なし
06A2200-1D	あり	許容可能	0	0	なし
06A2603-1D	あり	許容可能	1+	3	なし
06A2792-1F	あり	許容可能	0	0	なし
06A3182-E	あり	許容可能	2+	35	なし
06A9658-1D	あり	許容可能	1+	5	なし
06A10044-2B	あり	許容可能	0	0	あり (3+; 20%)
06A10707-D	あり	許容可能	1+	6	なし
06A12718-F	あり	許容可能	0	0	なし
06A13059-1E	あり	許容可能	1+	50	あり
06A18530-1B	あり	許容可能	3+	25	あり
06A19265-C	あり	許容可能	1+	45	あり
06A19803-1E	あり	許容可能	2+	55	あり

10

20

30

40

症例ID	H&E(腫瘍の存在:あり/なし)	ネガティブコントロール	支配的なシグナル強度/ゲシュタルト(0-3+)	%陽性	核染色の存在(あり/なし)
06A20116-B	あり	許容可能	1+	5	なし
07A1514-1D	あり	許容可能	0	0	なし
07A10191-1C	あり	許容可能	1+	10	なし
07A21005-E	あり	許容可能	2+	75	なし
07A22217-B	あり	許容可能	1+	10	なし
07A24787-D	あり	許容可能	1+	15	なし
07A26453-B	あり	許容可能	0	0	なし
07A26589-C	あり	許容可能	1+	7	なし
07A29013-B	あり	許容可能	1+	60	あり
07A33075-E	あり	許容可能	1+	40	あり(60%)
08A20458-D	あり	許容可能	1+	35	なし
08A26455-E	あり	許容可能	2+	40	あり
08A28427-E	あり	許容可能	1+	25	あり(4+)
09A883-C	あり	許容可能	2+	10	なし
09A1181-1D	あり	許容可能	1+	1	なし
09A1215-E	あり	許容可能	0	0	なし
09A3356-C	あり	許容可能	1+	25	なし
09A3848-C	あり	許容可能	2+	40	あり
10A22093-E	あり	許容可能	2+	70	あり
6A110044-1C	あり	許容可能	2+	40	なし
00-16804-B	あり	許容可能	2+	35	あり
00-20289-C	あり	許容可能	1+	20	なし
01-104530-C	あり	許容可能	1+	10	なし
01-15728-D	あり	許容可能	1+	35	なし
00A2038-D	あり	許容可能	2+	25	なし
01A3315-1B	あり	許容可能	1+	7	なし
01A4630-1B	あり	許容可能	2+	30	なし
02A6377-1F	あり	許容可能	2+	40	なし
02A11503-B	あり	許容可能	1+	4	なし
02A17602-E	あり	許容可能	0	0	なし
03A2250-1D	あり	許容可能	2+	10	なし
03A2334-1E	あり	許容可能	1+	20	なし
03A4041-1C	あり	許容可能	2+	5	なし

10

20

30

40

症例ID	H&E(腫瘍の存在:あり/なし)	ネガティブコントロール	支配的なシグナル強度/ゲシュタルト(0-3+)	%陽性	核染色の存在(あり/なし)
03A14751-E	あり	許容可能	2+	25	なし
04A7560-1A	あり	許容可能	1+	60	なし
04A13501-C	あり	許容可能	1+	7	なし
05A1060-1G	あり	許容可能	3+	94	なし
05A1891-1B	あり	許容可能	2+	7	あり
05A2558-1E	あり	許容可能	3+	80	なし
05A4276-I	あり	許容可能	1+	25	なし
05A4629-1C	あり	許容可能	1+	3	なし
05A5756-1E	あり	許容可能	0	0	あり
05A6341-E	あり	許容可能	2+	65	なし
05A6414-E	あり	許容可能	1+	50	なし
05A7548-1D	あり	許容可能	2+	35	なし
05A7834-1D	あり	許容可能	2+	60	なし
05A17127-A	あり	許容可能	1+	2	なし
05A19004-1E	あり	許容可能	1+	1	あり
06A165-1G	あり	許容可能	3+	5	なし
06A177-1D	あり	許容可能	0	0	なし
06A14020-E	あり	許容可能	1+	5	なし
06A18238-A	あり	許容可能	2+	15	なし
06A18241-D	あり	許容可能	1+	40	なし
07A0882-1F	あり	許容可能	1+	35	なし
07A7276-E	あり	許容可能	1+	4	なし
07A7601-B	あり	許容可能	2+	1	なし
07A10206-1C	あり	許容可能	2+	2	なし
07A25413-E	あり	許容可能	1+	10	なし
07A27032-1B	あり	許容可能	0	0	なし
07A29654-C	あり	許容可能	1+	35	あり
08A26322-E	あり	許容可能	2+	15	なし
11A25489-D	あり	許容可能	1+	60	あり (2+; 55%)

10

20

30

40

【 0 1 7 0 】

表 6 に示すように、G I V I H C は、全ての結腸直腸がん症例において評価可能であった。間質組織は、一貫して強く陽性染色されたが、腫瘍上皮は、変動する染色強度及び陽性腫瘍細胞の百分率で、変動する染色パターン（細胞質及び / 又は核染色）を示した。図 5 A - 5 D は、ヒト結腸直腸がんにおける G I V の I H C 染色の例を示す。

【 0 1 7 1 】

実施例 8

50

G I V - f 1スコアリングアルゴリズムの開発

この実施例は、192のCRC試料について実施例6に記載されたデータに基づいて、G I V I H C染色のためのスコアリングアルゴリズムを開発するために使用した方法を記載する。

【0172】

G I V I H Cデータを使用して、スコアリングアルゴリズムを開発した。染色の強度及び陽性染色の程度を別々に又は組み合わせて取り込んだ、11のスコアリング測定基準を評価した(表7)。これらのうち7つは、4つのカテゴリーへのパーセント染色のビンニングを必要とし、次いで、これらに、合計した又は染色強度を乗算したかのいずれかであるランク数(0-3)を割り当てた。次に、陽性及び陰性G I Vは、これらの合計積からのカットポイントに基づいた。残り4つの測定基準を、染色強度のみ又はパーセント染色のみのいずれかに基づいて開発し、次いで、これらの測定基準の各々について2つの異なる型のカットポイントを使用して、陽性及び陰性G I Vを定義した。

表7. 再発を経験する可能性が高い患者間を識別する能力に関して評価した、GIV発現をスコアリングするための候補方法の測定基準及び説明を示す。この解析において、合計11のスコアリングシステム(各々陽性についての複数のカットポイントを用いた5つのスコアリングアルゴリズム)を評価した。

マーカー (変数名)	染色強度	パーセント陽性染色処理	組成の方法	陰性/陽性 定義	
GIV 強度のみの スコアリング アルゴリズム	範囲: [0、1、2、3]	-	-	0 / 1-3 0-1 / 2-3	10
GIV 複合スコア リングアルゴ リズム	範囲: [0、1、2、3]	<u>ビニング</u> <u>方法#1:</u> [0、1、2、3] 0: 0%-10% 1: 11%-25% 2: 26%-50% 3: 51%-100%	合計(+) 範囲: [0、1、2、3、4、 5、6]	0-2 / 3-6 0-3 / 4-6	20
	範囲: [0、1、2、3]	<u>ビニング</u> <u>方法#2:</u> [0、1、2、3] 0: 0%-10% 1: 11%-35% 2: 36%-50% 3: 51%-100%	合計(+) 範囲: [0、1、2、3、4、 5、6]	<u>0-2 / 3-6</u> 0-3 / 4-6 0-4 / 5-6	
	範囲: [0、1、2、3]	<u>ビニング</u> <u>方法#2</u> (上記参照)	積(*) 範囲: [0、1、2、3、4、 6、9]	0-3 / 4, 6, 9 0-4 / 6, 9	30
GIV パーセントの みのスコア リングアルゴ リズム	範囲: [0%-100%]	<u>二分化:</u> カットポイントとし ての中央値 カットポイントとし てのQ3	-	0%-10% / 11%+ 0%-35% / 36%+	40

【0173】

統計的文脈では、関連性は、マーカー陽性及びマーカー陰性の患者についての転帰における差異によって実証される。これを、GIV-f1陽性患者とGIV-f1陰性患者との間の生存曲線の分離を試験することによって確立した。これは、統計的予測とは異なる；一般に、関連性は、必要ではあるが十分ではない、予測値についての指標である（Pepe等，Am J Epidemiol 159:882-90，2004）。

【0174】

スコアリング測定基準の全てが、GIV発現と進行との間の強い相関を示したが、GIV-f1の程度及び強度スコア（表7中で太字かつ下線）のみが、pMMRの化学療法未治療の患者において腫瘍増殖停止時間転帰を伴って、統計的に有意な関連性（p値=0. 50

0 2 1 2) を実証した (図 6)。図 6 は、G I V - f 1 の程度及び強度スコアのスコアリング系を使用して、ステージ I I の C R C 試料の p M M R 集団中の G I V - f 1 状態を階層化することによって達成される分離を示す。上から下への線は、悪化する予後、即ち、経時的に生存の尤度が低いことを示す。上の線は、d M M R 試料を示し、下の線は、p M M R かつ G I V 陽性の試料を示す。p M M R 集団についての生存曲線は、比較目的のために示される。このログランク検定についての p 値は、0 . 0 2 1 2 であり、G I V - f 1 陽性群と陰性群との間の生存経験における統計的分離を実証している。これは、G I V - f 1 が予測値を提供できることを確立している。

【 0 1 7 5 】

したがって、一部の例では、G I V - f 1 染色は、0 から 3 のスケールで、試料の陽性 G I V - f 1 染色の程度を最初に決定することによって、p M M R であるステージ I I (例えばステージ I I a) の結腸がん試料において評価され、試料の総面積の 0 % - 1 0 % が陽性染色される場合、陽性染色の程度には 0 が割り当てられ、試料の総面積の 1 1 % - 3 5 % が陽性染色される場合、陽性染色の程度には 1 が割り当てられ、試料の総面積の 3 6 % - 5 0 % が陽性染色される場合、陽性染色の程度には 2 が割り当てられ、試料の総面積の 5 1 % - 1 0 0 % が陽性染色される場合、陽性染色の程度には 3 が割り当てられる。次いで、得られた値 (0、1、2 又は 3) を、試料の染色の G I V - f 1 強度 (0 (陰性)、1 (弱い)、2 (中程度) から 3 (強い) のスケールでの強度スコア) に加算して、G I V - f 1 の程度及び強度スコア値を提供する。したがって、患者が、2 の染色の G I V - f 1 強度で、8 % の陽性 G I V - f 1 染色の程度を有する場合、患者は、パーセント陽性について 0 を受け、G I V - f 1 の程度及び強度スコア値は、 $0 + 2 = 2$ である。G I V - f 1 の程度及び強度スコア値が 0 - 2 である場合、この試料には、G I V - f 1 染色について陰性が割り当てられ、3 - 6 の G I V - f 1 の程度及び強度スコア値には、G I V - f 1 染色について陽性が割り当てられる。したがって、各患者又は試料は、全体的なパーセント染色及び全体的な強度について、ビンニングされたスコアに基づいて陽性又は陰性のいずれかである。

【 0 1 7 6 】

表 7 中の G I V - f 1 の程度及び強度スコアのスコアリングアルゴリズムの代わりに使用できる、より単純なスコアリング測定基準を開発した。この方法は、G I V - f 1 A b を使用して試料を染色することにも依存する。G I V - f 1 予測スコアと呼ばれる、このより単純な G I V - f 1 スコアリング測定基準では、症例又は試料は、(1) その全体的なパーセント染色が任意の染色強度で 1 0 % よりも高い場合、又は (2) 支配的な染色強度が任意のパーセントで 3 + である場合、G I V 陽性とみなされる。したがって、一部の例では、G I V - f 1 染色は、試料における G I V - f 1 染色の全体的なパーセントが、(任意の染色強度で) 1 0 % よりも高い場合、又は試料における G I V - f 1 染色の支配的な強度が (染色の程度に関わりなく) 3 + である場合に、試料を G I V - f 1 陽性とスコアリングすることによって、p M M R ステージ I I (例えば、ステージ I I a) の結腸がん試料において評価される。対照的に、p M M R ステージ I I の結腸がん試料が、1 0 % 未満の全体的な G I V - f 1 染色を有し、3 + 未満の支配的な G I V - f 1 染色強度を有する場合、これには、G I V - f 1 陰性が割り当てられる。

【 0 1 7 7 】

図 7 A - 7 B に示すように、両方のスコアリング測定基準 (G I V - f 1 の程度及び強度スコア並びに G I V - f 1 予測スコア) が、それぞれ 2 . 0 3 及び 1 . 7 5 のハザード比 (H R) で、生存による識別を提供した。

【 0 1 7 8 】

新たな I H C アッセイは、ホルマリン固定パラフィン包埋組織中の完全長 G I V タンパク質 (G I V - f 1) を検出できる。1 9 2 の結腸直腸症例を、M M R に対する I H C によって最初に評価し、次いで G I V タンパク質に対する I H C によって評価した。1 9 2 の試料のうち、1 0 2 の症例が、p M M R の化学療法未治療の患者であり、3 2 / 1 0 2 の患者のみが、疾患再発を示した (進行 = イエス)。最適化されたスコアリングアルゴリ

10

20

30

40

50

ズムに基づいて、16 / 32 (50% ; G I V - f 1 の程度及び強度スコア)又は18 / 32 (56% ; G I V - f 1 予測スコア)の、再発を有する患者が、G I V 陽性腫瘍を有した(表8)。したがって、ステージIIのCRC(例えば、ステージIIa)がpMMRかつG I V - f 1 陽性である場合、これは、例えば、12から96か月以内、例えば、12か月以内、24か月以内、36か月以内、48か月以内、60か月以内、72か月以内、84か月以内、又は96か月以内に、患者が進行又は再発を経験する可能性がより高いことを示している。再発は、局所再発(同じエリアにおいて再度がんになる)、又は局所リンパ節(ステージIII)若しくは遠位リンパ節(ステージIV、転移性)若しくは他の部位(例えば、肝臓又は肺)のいずれかへのがんの進行であり得る。

表8: GIV-f1の程度及び強度スコア又はGIV-f1予測スコアリングアルゴリズムを使用したpMMRの化学療法未施行CRC患者におけるGIV IHCの予後能力

GIV-f1の程度及び強度スコア		進行	
		なし	あり
GIV染色	陰性	50	16
	陽性	20	16
GIV-f1予測スコア			
		なし	あり
GIV染色	陰性	43	14
	陽性	27	18

10

20

【0179】

このデータは、IHCによるGIVの検出が、アジュバント化学療法で以前に治療されていないpMMRのステージII(例えば、ステージIIa)の結腸直腸がんを有する患者において、再発についての個体のリスクを定義することにおいて、予後バイオマーカーとして使用できることを実証している。

30

【0180】

実施例9

ステージIIのCRCにおけるGIV-f1発現及び腫瘍増殖停止時間の統計的予測モデル

この実施例は、ステージIIのCRC患者についての予後/予測インジケータとして、pMMR及びGIV発現と組み合わせた他のマーカーを評価するために使用した方法を記載する。

【0181】

統計的モデルを、実施例7に記載されたコホートからの化学療法未治療の患者のサブセットから開発した。GIV-f1予測スコアを、統計的予測モデル化のために繰り越した。次いで、この統計的モデルを、化学療法を受けている患者のサブセットに、フィッティングされた統計的予測モデルを適用することによって評価した。統計的予測モデルの開発は、4つの工程で始めた: 1)バイオマーカーと転帰(無増悪生存、PFS)との間の関連性を評価すること; 2)モデル選択; 3)統計的予測能力の評価; 及び4)個体レベルでの予測能力を実証すること。最後に、個々の患者リスクを通知するため; 並びにバイオマーカーGIV-f1を含む統計的予測モデルが治療応答を予測する能力を実証するためのモデルの妥当性を、決定した。

40

【0182】

実施例7に記載されるコホートは、103人のpMMRの化学療法未治療の患者を含み

50

、評価可能な患者の31% (32 / 103) が、疾患再発を経験した。表9は、103人のpMMRの化学療法未治療の患者を記述する臨床的及び病理学的変数の分布を記載している。このコホートを、転帰の適切な特徴づけを確実にするために、再発についてオーバーサンプリングした。スコアリングアルゴリズムの目的のために、103人全ての患者を使用した。統計的予測モデルの開発のために、この集団をステージIIa患者に限定したが、それは、この下位群の患者が、高リスク及び低リスクの分類、並びにアジュバント化学療法についての決定の明確化をさらに必要とするからである。

表9. 患者の特性

変数	N	進行する割合
LVI		
なし	75	0.27
報告なし	7	0.14
あり	21	0.52
年齢^a		
[50.9,65.8)	26	0.27
[65.8,71.7)	26	0.38
[71.7,79.5)	26	0.31
[79.5,92.4]	25	0.32
リンパ節の数		
<12	27	0.33
≥12	76	0.30
性別		
F	46	0.37
M	57	0.26
腫瘍分化		
中程度	84	0.27
低い	18	0.44
高い	1	1.00
Tステージ(TMNクラス)		
3	91	0.29
4	12	0.50
側		
左	59	0.29
右	44	0.34
全体	103	0.31

^a連続的に表現された診断時の年齢に基づく四分位

10

20

30

40

50

【 0 1 8 3 】

スコアリングアルゴリズム

染色強度及びパーセント染色を取り込んだ11のスコアリングアルゴリズムを評価した。これは、実施例7においては192全てのステージIIのCRC試料を分析したが、ここでは、腫瘍病理学的ステージ3又は4（例えば、T3/4）のいずれかであった103人の化学療法未治療の患者のサブセットだけを分析したことを除いて、実施例7で実施したものと類似である。これらの測定基準の一部は、パーセント染色及び強度をビニングし、次いで、これらの尺度の両方を含むスコア（乗法的又は相加的のいずれか）を取得することによって、創出した。他の測定基準は、最大ランクの試験統計量と関連するパーセント染色を見出し、高い及び低いパーセント染色が生存曲線間での最大の差異を示した点を測定することによって、パーセント染色を最適化した方法を使用した（Larson及びSchumacher, Biometrics, 48, 73-85, 1992）。

10

【 0 1 8 4 】

表10は、評価した最も堅固な測定基準、及び無増悪生存による分離におけるそれらの性能をまとめる。「最適な」パーセントの染色（>10%）を取り込んだ単純な測定基準（GIV-f1予測スコア）は、高い強度（3+）のGIV-f1予測スコアもまた含み（実施例7を参照のこと）、これは、統計的予測モデル化のために繰り越されたスコアリングアルゴリズムである。44パーセント（45/103）のステージII患者（T3+T4）は、GIV-f1陽性であった；47パーセント（42/90）のステージII患者は、GIV-f1陽性であった。ステージII集団単独に適用した場合のGIV-f1予測スコアについてのハザード比は、2.56（CI：1.15、5.87）であった。

20

表10. 103のステージII、pMMR、化学療法未施行症例(T3及びT4の両方)に基づいた、見込みのあるスコアリングアルゴリズムのまとめ。

スコアリング測定基準	%GIV陽性(n)	ハザード比 (95%CI)	
複合測定基準:染色強度(0-3)及びパーセント染色(0%-100%)の両方を使用する。「Chundong等」、「百分位数」及び「複合」1-3について、ビンに割り当てられたパーセント染色に基づく指数を使用し、染色強度と合計した。ビン及びカットポイントは、各測定基準の下に定義される。			
GIV-fl予測スコア (>10%又は3+強度)	43.69 % (45)	1.92 (0.94, 3.92)	10
Chundong等、Anticancer Res 31:1141-5、 2011 (0:0%、1:1-25%、2:26-50%、3:>50%) 強度との合計(陰性:0-3/陽性:4-6)	26.21 % (27)	1.37 (0.64, 2.91)	
百分位数 (0:0-2%、1:3-9%、2:10-34%、3:≥35%) 強度との合計(陰性:0-3/陽性:4-6)	41.75 % (43)	1.56 (0.77, 3.16)	20
複合1 (0:0-10%、1:11-25%、2:26-50%、3:>50%) 強度との合計(陰性:0-2/陽性:3-6)	38.83 % (40)	1.84 (0.91, 3.73)	
複合2 (このGIV-flの程度及び強度スコアは、 表7からである) (0:0-10%、1:11-35%、2:36-50%、3:>50%) 強度との合計(陰性:0-2/陽性:3-6)	34.95 % (36)	2.19 (1.08, 4.43)	30
複合3 (0:0-10%、1:11-35%、2:36-50%、3:>50%) 強度との合計(陰性:0-3/陽性:4-6)	18.45 % (19)	1.59 (0.71, 3.56)	
パーセントのみの測定基準:パーセント染色のみを使用する。カットポイントは、各測定基準の下に定義される。			
Liu等、Mol Biol Rep 39:8717-22、2012 (陰性:0%/陽性:1%+)	84.47 % (87)	1.23 (0.43, 3.51)	40
中央値パーセント (陰性:0%-10%/陽性:11%+)	42.72 % (44)	1.73 (0.85, 3.51)	
Q3パーセント (陰性:0%-35%/陽性:36%+)	20.39 % (21)	1.63 (0.75, 3.54)	

【 0 1 8 5 】

マーカーと進行との間の統計的関連性を確立する

統計的文脈では、関連性は、マーカー陽性及びマーカー陰性の患者についての転帰にお

ける差異によって実証される。これを、G I V - f 1 陽性患者とG I V - f 1 陰性患者との間の生存曲線の分離を試験することによって、本明細書で確立した。これは、統計的予測とは異なる；一般に、関連性は、必要ではあるが十分ではない、予測値についての指標である (Pepe, Am J Epidemiol 159:882-90, 2004)。

【 0 1 8 6 】

図 8 は、G I V - f 1 予測スコアアルゴリズムを使用して、103 人の化学療法未治療の患者について、p M M R 集団中のG I V - f 1 状態を階層化することによって達成される分離を示す。d M M R 集団についての生存曲線は、比較目的のために示される。このロジック検定についての p 値は、0.0209 であり、G I V - f 1 陽性群と陰性群との間の生存経験における統計的分離を実証している。これは、G I V - f 1 が予測値を提供することを実証している。40 パーセント (18 / 45) のG I V - f 1 陽性患者は、再発を経験した；26 パーセント (14 / 57) のG I V - f 1 陰性患者は再発した。

【 0 1 8 7 】

変数選択及びC o x 比例モデル

G I V - f 1 に加えて、統計的予測モデル中に含めるための変数を同定するために、モデルに割り当てるのに利用可能な自由度がどのくらいかを最初に決定した。生存解析のために、これは一般に、オーバーフィッティングすることなく、最大で、10 又は20 によって除算したイベントの数にフィットさせることができる。オーバーフィッティングは、性能が過大評価されているときに統計的予測として顕れ、これは、統計的モデルが実際に適用される場合に、予測されたほど十分には機能しないことを意味している。この特定の試料について、モデルのオーバーフィッティングなしに、およそ2 の自由度をフィットさせることが可能であると予測された。部分的² (各変数が寄与する自由度に合わせて調整された) を使用してこの統計的モデルにおいてより重要であると思われる変数を同定した。これらの試験統計量は、各変数を除去したモデルと比較した、完全モデルからの尤度における差異を比較するフィッティングの良さの統計的尺度、逸脱を比較することに基づく。

【 0 1 8 8 】

無増悪生存を記述することに関してより重要な変数は、大きい部分的² を有するが、あまり重要でない変数は、より小さい値を有する。試料サイズが十分に大きい場合、一般に、全ての利用可能な臨床的及び利用可能な記述的情報を使用する方がよい；しかし、潜在的重要な変数の間で選択する場合、部分的² に基づく選択が、段階的選択方法に依存する選択方法に好ましい。

【 0 1 8 9 】

図 9 に示すように、最初の2つの変数 (G I V - f 1 陽性及びリンパ管浸潤 (L V I)、右上の2つのドット) と他の重要な変数 (左側のドット) との間には、明確な描写が存在する。これは、G I V - f 1 及びL V I を用いた予測モデルが、どのステージ I I (例えば、ステージ I I a) の p M M R C R C が化学療法又は生物療法から利益を得るかを決定するために使用できることを示している。

【 0 1 9 0 】

表 1 1 は、単一変数、多変数 (表 1 1 に列挙した全ての可能な予測因子を含む) についてのC o x 比例ハザードモデル、並びにG I V - f 1 及びL V I 変数だけを用いた最終モデルからの結果を示すまとめである。これらのハザード比は、全てのモデルについて (影響の方向に関して) 一致しており、より高いL V I 及び高いG I V - f 1 レベルは、より高い確率の再発と関連した。表 1 1 は、Q U A S A R 及びC A L G B 研究コホートを使用した12 遺伝子再発スコア (G e n o m i c H e a l t h, C A) 検証研究 (Gray等, J. Clin. Oncol. 29:4611-4619, 2011; Venook等, J. Clin. Oncol. 31:1775-81, 2013) と類似の様式でモデル化される；これらの変数のほとんどの方向性は、これらのコホートにおいて見られたものと類似している。適切な差異 (例えば、雌性におけるより高いリスクの再発及び右側の腫瘍) は、このコホートにおける小さい試料サイズに起因し得、これらの変数は、無増悪生存 (P F S) における統計的に有意な差異は実証しなかった。

変数	単一共変数			GIV及び臨床病理学的変数			提唱されたモデル:LVI及びGIV			方向	
	N	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P	HR	95% CI		P
二分法											
リンパ浸潤 ¹	85	2.62	1.16 から 5.92	0.0208	2.31	0.95 から 5.61	0.0645	2.07	0.90 から 4.76	0.0872	浸潤の方が悪い
Tステージ:T4対T3 ²	103	2.39	0.98 から 5.83	0.0553							Tステージ4の方が悪い
部位の側	91	1.26	0.58 から 2.73	0.5553	1.48	0.60 から 3.67	0.3918				右側の方が悪い
性別:雌性対雄性	91	1.53	0.71 から 3.14	0.2793	1.40	0.58 から 3.34	0.4512				雌性の方が悪い
リンパ節収量: <12対≥12	91	0.77	0.34 から 1.73	0.5252	1.17	0.48 から 2.85	0.7290				<12の方が悪い
MMR状態 ³	114	3.45	0.82 から 14.56	0.0916							MMR良好の方が悪い
MMR状態 ⁴	128	4.18	1.00 から 17.45	0.0499							MMR良好の方が悪い
GIV状態	91	2.49	1.11 から 5.58	0.0273	2.28	0.94 から 5.53	0.0684	2.56	1.12 から 5.87	0.0265	GIV陽性の方が悪い
連続的											
年齢	91	1.02	0.98 から 1.06	0.4261	1.02	0.97 から 1.07	0.4312				年を取っている方が悪い

1.単一共変数としての解析には「報告なし」として記録されたLVIを有する症例は含まれなかった。

2.解析にはT3及びT4(ステージIIa及びIIb)の両方のpMMR症例が含まれた。

3.解析にはpMMR及びdMMRの両方のT3(ステージIIa)症例が含まれた。

4.解析にはT3及びT4(ステージIIa及びIIb)の両方であったpMMR及びdMMR症例が含まれた。

この統計的予測モデルの予測能力を、2つの方法で評価した。最初に、ROC曲線下の面積（AUC）を使用して、モデルが患者を高リスク及び低リスクにどれだけ良好に分類したかを評価した。モデルの内部検証を、モデルオーバーフィッティングに起因するAUCにおけるバイアスを測定することによって決定した；バイアスは、ブーツストラップリサンプリングを使用することによって推定される。ブーツストラップリサンプルは、復元を伴って取得されるランダム試料である。この問題について、200のリサンプルを使用し、これらのリサンプルの各々について、AUCの尺度を取得した。オーバーフィッティングは、これらのリサンプルと比較して、フィッティングされたモデルで見られる楽観主義と推定される；調整されたAUCは、試料サイズが適切にフィットさせることができるものよりも多くの変数が含まれる場合に見ることができた、潜在的な過度に楽観的なAUCに合わせて調整する方法である。

10

【0192】

比較されたモデルは、このコホートについての最も有用な統計的予測モデルとして提唱されたモデルである：（1）臨床的／記述的変数のみを含むモデル、このモデルは、患者リスクを評価するために現在実際に使用されている情報を理論的に含有するから；並びに（2）完全モデル、マーカー及び現在の実務上の変数の両方を含むモデル；並びにGIV-fl（マーカー）モデル単独（ベースラインとして）。この完全モデルは、全ての患者情報を使用するので、全ての他のモデルを凌ぐと予測される。しかし、これらのデータについて、この統計的モデルの性能は、オーバーフィッティングに起因して評価が難しい可能性がある。

20

【0193】

2年及び5年PFSについてのROC曲線は、図10A及び10Bに示される。図の注釈に示されるAUCは、潜在的オーバーフィッティングに合わせて調整されておらず、むしろ、これらは表12に示される。AUCが大きくなるほど、マーカーの感受性／感度及び特異性（真陽性値及び真陰性値とも呼ばれる）は良くなる。AUCは、Max（感受性／感度、特異性）において最も高い - 一般に、「良い」AUC値は、0.70よりも高い。表12は、2つよりも多い変数がモデル中に追加される場合に、未調整のAUCと調整済みのAUCとの間の差異がより大きいことを示している。具体的には、完全モデル（全ての臨床的／記述的変数及びGIV-flマーカー）及び臨床的モデル（臨床的／記述的変数のみ）の両方は、かなり良い未調整のAUC値を有する；しかし、オーバーフィッティングに合わせて調整された場合、LVI+GIV-flモデルは、2年及び5年の両方のPFSについて完全モデルと同様に等しく機能する。

30

表12. 比較統計予測モデルについてのAUC値のまとめ

モデル	2年PFS		5年PFS	
	未調整	調整済み ^a	未調整	調整済み ^a
GIV-flのみ	0.61	0.62	0.63	0.62
LVI+GIV-fl	0.69	0.68	0.74	0.69
全ての臨床的変数 (表9中のもの)	0.65	0.62	0.71	0.65
完全モデル (全ての予測因子+GIV-fl)	0.71	0.68	0.74	0.69

40

^a200のブーツストラップリサンプルから推定されたバイアスに合わせて調整された後の値

【0194】

個体レベルの予測能力

AUC、感受性／感度、特異性、Brierスコア及び他の測定基準は、統計的予測能

50

力の尺度であるが、これらの尺度と予測の尺度との統合が、しばしば失われる。予測性曲線と呼ばれる、P e p e (J. Epidemiol. 167:362, 2008)に記載される方法を使用して、分類及びリスク予測のこれら2つの尺度を組み合わせた。予測性曲線のy軸は、各患者についての予測された転帰(本明細書では、logスケールでのハザード比)であり、x軸は、分類からの累積リスクである。G I V - f l マーカーについてのこれらの個体レベルの確率を、色でコード化した(赤色G I V - f l 陰性、青色G I V - f l 陽性)。

【0195】

図11は、G I V - f l 及びL V I 統計的モデルに基づいた、ステージI I aの化学療法未治療のC R C 患者についての予測性プロットを示す。比率スケールは対称ではないので、解釈の容易さのために、ハザードスケールはlogスケールである；これは、「有意性」のスケールを1から0にシフトさせ、その結果、0を上回る値は、より高い確率の進行を実証し、0を下回る値は、より低い確率の進行を示す。この統計的モデルについて、50%を僅かに下回る患者が、より高いリスクの進行を有し、これらの患者の大部分は、G I V - f l 陽性である。リスク/logハザードスケールの下端には、なおG I V - f l 陽性である5人の患者が存在し、G I V - f l 陰性である高リスクの進行を有する6人の患者が存在する；しかし一般に、G I V - f l 陽性患者は、高い確率の進行を有し、低リスク及び低い確率の進行を一般に有するG I V - f l 陰性患者と比較して、高リスクと分類される。

【0196】

モデルの妥当性

予測が意図される患者の下位試料において予測するこのモデルの能力を決定した。G I V - f l 及びL V I 統計的予測モデルを、アジュバント化学療法を受けたコホートからの患者に適用した(表13及び14)。その予測は、アジュバント化学療法から利益を得ていると予測された患者が、実際に利益を得たというものである。これは、コホートの下位サンプリングされた集団であるので、妥当性のある外部モデルは存在せず、したがって、統計的モデル(及びマーカー)の予測値に焦点を当てた。感受性/感度及び特異性の両方の最大を、フィッティングされた統計的予測モデルが化学療法治療された患者集団に適用される場合の、予測された確率についてのカットポイントとして使用した。したがって、高リスク患者(予測された確率 2年P F S について0.22及び5年P F S について0.24)が高い陽性予測値を有する可能性が高いという仮定を試験して、各対象を、これらのカットポイントに基づいて高リスク及び低リスクに分類した。

【0197】

表15及び16は、G I V - f l 及びL V I 統計的モデルの予測された確率に基づいた、推定された利益を示す。このモデルは、20/37の人々が、2年の時点で化学療法から利益を受けているはずであると予測した(表13)。実際、15/20が化学療法に回答した(陽性予測値(P P V) = 0.75)。さらに、25/37の人々が、5年の時点で化学療法から利益を受けているはずであると予測された(表14)。実際、20/25が化学療法に回答した(P P V = 0.80)。これらの値は、アジュバント化学療法から利益を得る患者を分類するための中程度に高いレベルの予測値を示す。

表13. 予測された2年PFS対観察された2年PFSのクロス集計

2年PFS (予測されたもの)	2年PFS(観察されたもの)		
	再発なし	再発	合計
低リスク	15	2	17
高リスク	15	5	20
合計	30	7	37

表14. 予測された5年PFS対観察された5年PFSのクロス集計

5年PFS (予測されたもの)	5年PFS(観察されたもの)		
	再発なし	再発	合計
低リスク	10	2	12
高リスク	20	5	25
合計	30	7	37

10

【0198】

完全モデル(全ての予測因子+GI V-f l 標識化)の陽性予測値を決定し、表15及び16に示す。表15及び16は、GI V-f l 及び全ての臨床病理学的変数についての統計的予測モデルを使用した、ステージII a (T3)患者についての予測有用性を示す。表15に示すように、このモデルは、12/37の人々が、化学療法から利益を得ているはずであると予測し、10/12が化学療法に应答した(PPV=0.83)。表16に示すように、このモデルは、19/37の人々が、化学療法から利益を得ているはずであると予測し、16/19が化学療法に应答した(PPV=0.84)。それぞれ2年及び5年のPFSについての0.83及び0.84の得られた値は、高い予測有用性を実証する。

20

表15. 予測された2年PFS対観察された2年PFSのクロス集計

2年PFS (予測されたもの)	2年PFS(観察されたもの)		
	再発なし	再発	合計
低リスク	20	5	25
高リスク	20	2	12
合計	30	7	37

30

表16. 予測された5年PFS対観察された5年PFSのクロス集計

5年PFS (予測されたもの)	2年PFS(観察されたもの)		
	再発なし	再発	合計
低リスク	14	4	18
高リスク	16	3	19
合計	30	7	37

40

【0199】

まとめると、GI V-f l は、他の臨床病理学的変数、例えば、LVI、年齢、陽性リンパ節の数、性別、腫瘍分化、Tステージ、又は腫瘍が存在する側と併せて使用した場合、化学療法未治療のステージII患者を高リスク及び低リスク集団に分類するために使用され得る。これらの方法を使用して高リスクと分類された患者は、化学療法を受けるよう

50

に割り当てられ得るが、これらの方法を使用して低リスクと分類された患者は、化学療法を受けないように割り当てられ得る。

【0200】

一例では、このモデルは、G I V - f l 状態及びL V Iからなった。当業者は、他の臨床病理学的変数、例えば、年齢、陽性リンパ節の数、性別、腫瘍分化、Tステージ、又は腫瘍が存在する側のうち1又は複数が、このモデル中に含まれ得ることを理解する。この統計的予測モデルを、化学療法治療した下位群に適用した場合、このモデルは、高い陽性予測値(P P V)を有した。この高いP P Vは、統計的モデルの性能(例えば、A U C)と共に、予後的有用性の証拠を与える。

【0201】

B i o G r i d 2 を使用したモデル検証

表17及び18は、2つのコホート(B i o G r i d 1 及びB i o G r i d 2 と称する)のデータ概要を提供する。

変数	カテゴリー	再発		再発なし		合計	
		N	%	N	%	N	%
MMR	欠損	34	6.2%	36	25.5%	39	20.6%
	良好	45	93.8%	105	74.5%	150	79.4%
化学療法	なし	34	70.8%	91	64.5%	125	66.1%
	あり	14	29.2%	50	35.5%	64	33.9%
LVI	なし	26	54.2%	99	70.2%	125	66.1%
	あり	19	39.6%	31	22%	50	26.5%
	報告なし/NA	3	6.2%	11	7.8%	14	7.4%
リンパ節の数	[2,12)	15	31.2%	35	24.8%	50	26.5%
	[12,15)	11	22.9%	29	20.6%	40	21.2%
	[15,21)	10	20.8%	38	27%	48	25.4%
	[21,56]	12	25%	39	27.7%	51	27%
Ln収量	<12	15	31.2%	35	24.8%	50	26.5%
	>=12	33	68.8%	106	75.2%	139	73.5%
性別	F	24	50%	71	50.4%	95	50.3%
	M	24	50%	70	49.6%	94	49.7%
腫瘍分化	低い-中程度	13	27.1%	28	19.9%	41	21.7%
	中程度-高い	35	72.9%	110	78%	145	76.7%
	報告なし/NA	0	0%	3	2.1%	3	1.6%
Tステージ	3	36	75%	123	87.2%	159	84.1%
	4	12	25%	18	12.8%	30	15.9%
部位の側	左	25	52.1%	68	48.2%	93	49.2%
	右	23	47.9%	73	51.8%	96	50.8%
rfs		19.7 (16.5)		62 (20)		51.2 (26.6)	
合計		48	25.4%	141	74.6%	189	

表17(BioGrid 1)

10

20

30

40

変数	カテゴリー	再発		再発なし		合計		
		N	%	N	%	N	%	
MMR	欠損	1	2.9%	60	21.1%	61	19.1%	
	良好	33	97.1%	225	78.9%	258	80.9%	
化学療法	なし	25	73.5%	240	84.2%	265	83.1%	
	あり	9	26.5%	43	15.1%	52	16.3%	
	不明	0	0%	2	0.7%	2	0.6%	
LVI	なし	13	38.2%	206	72.3%	219	68.7%	10
	あり	18	52.9%	63	22.1%	81	25.4%	
	報告なし/NA	3	8.8%	16	5.6%	19	6%	
リンパ節の数	[2,12)	6	17.6%	54	18.9%	60	18.8%	
	[12,15)	7	20.6%	47	16.5%	54	16.9%	
	[15,21)	5	14.7%	92	32.3%	97	30.4%	
	[21,56]	15	44.1%	89	31.2%	104	32.6%	
	不明	1	2.9%	3	1.1%	4	1.3%	
Ln収量	<12	6	17.6%	56	19.6%	62	19.4%	20
	>=12	28	82.4%	229	80.4%	257	80.6%	
性別	F	11	32.4%	126	44.2%	137	42.9%	
	M	23	67.6%	159	55.8%	182	57.1%	
腫瘍分化	低い-中程度	6	17.6%	65	22.8%	71	22.3%	
	中程度-高い	28	82.4%	216	75.8%	244	76.5%	
	報告なし/NA	0	0%	4	1.4%	4	1.3%	
Tステージ	3	23	67.6%	248	87%	271	85%	30
	4	11	32.4%	37	13%	48	15%	
部位の側	左	20	58.8%	140	49.1%	160	50.2%	30
	右	14	41.2%	145	50.9%	159	49.8%	
dfs			21.2 (15.9)		52.7 (37.3)		49.4 (37)	
合計		34	10.7%	285	89.3%	319		

表18(BioGrid 2)

【0202】

BioGrid 1及び2のハザード比

表19、20及び21は、種々のモデルについてのハザード比(HR)並びに関連する95%信頼区間及びp値を示す。

40

【0203】

表19は、これらのリスクモデルによって階層化される高リスク群対低リスク群のHRを示す。全てのリスク階層化は、BioGrid 1において開発した訓練セットにおいて開発したモデルに基づく。

モデル	化学療法	B1 HR	B1 P値	B2 HR	B2 P値
GIV	未施行	2.37 (1.05, 5.32)	0.037	2.36 (0.84, 6.61)	0.104
GIV	治療され た	2.48 (0.48, 12.78)	0.279	2.26 (0.37, 13.58)	0.375
GIV + LVI	未施行	3.74 (1.50, 9.32)	0.005	7.83 (1.03, 59.54)	0.047
GIV + LVI	治療され た	無限大	0.999	無限大	0.999

10

表19: リスクモデルについてのハザード比

【0204】

表20及び21は、単一変数モデル、並びにGIV及びLVIを含む多変数モデルの両方における、各変数のHRを示す。

【0205】

表20は、BioGrid 1、pMMR、T3、化学療法未治療の集団におけるGIV及び臨床変数についてのハザード比を実証する。列3 - 5は、単一変数モデルについてのHR、CI及びP値を示す。列6 - 8は、GIV + LVIモデル中の各変数についてのHR、CI及びP値を示す。

20

	N	HR	95% CI	p値	HR2	95% CI2	p値2
lvi	83	2.54	1.12から5.74	0.03	2.09	0.9から4.86	0.09
Giv	89	2.37	1.05から5.32	0.04	2.49	1.07から5.78	0.03
部位の側	89	1.30	0.6から2.8	0.51			
性別	89	1.46	0.67から3.15	0.33			
年齢	89	1.01	0.97から1.06	0.11			

30

表20: BioGrid 1についてのハザード比

【0206】

表21は、BioGrid 1、pMMR、T3、化学療法未治療の集団におけるGIV及び臨床変数についてのハザード比を実証する。列3 - 5は、単一変数モデルについてのHR、CI及びP値を示す。列6 - 8は、GIV + LVIモデル中の各変数についてのHR、CI及びP値を示す。

	N	HR	95% CI	p値	HR2	95% CI2	p値2
lvi	175	3.36	1.22から9.27	0.02	3.44	1.24から9.49	0.02
Giv	188	2.36	0.84から6.61	0.1	2.21	0.7から6.98	0.18
部位の側	188	0.87	0.34から2.25	0.78			
性別	188	0.58	0.19から1.75	0.33			
年齢	188	1.04	0.99から1.09	0.11			

40

表21: BioGrid 2についてのハザード比

【0207】

BioGrid 2のAUC

50

表22は、種々のモデルについてのROC曲線下の面積(AUC)を提供する。全てのモデルを、BioGrid 1において開発した訓練セットにおいて開発し、次いで、BioGrid 2/pMMR/化学療法未治療データに適用した。

	T3	T3+T4
臨床	0.639	0.656
GIV	0.596	0.577
LVI	0.628	0.652
GIV + LVI	0.682	0.677
GIV + 臨床	0.697	0.695

表22

【0208】

BioGrid 1及びBioGrid 2のリスク予測

表23-26は、観察された再発対5年リスク予測の2行2列の表を提供する。全てのリスク予測は、訓練セットにおいて開発したモデルに基づく。

	再発なし	再発
低リスク	34	5
高リスク	26	18

表23: リスク予測、GIV+LVI、BioGrid 1/化学療法未施行

	再発なし	再発
低リスク	10	0
高リスク	20	5

表24: リスク予測、GIV+LVI、BioGrid 1/化学療法治療

	再発なし	再発
低リスク	62	1
高リスク	99	13

表25: リスク予測、GIV+LVI、BioGrid 2/化学療法未施行

	再発なし	再発
低リスク	12	0
高リスク	11	5

表26: リスク予測、GIV+LVI、BioGrid 3/化学療法治療

【0209】

表27は、PPV及び誤計算率を提供する。PPV = 高リスクかつ再発なしの数 / 高リスクの数。

10

20

30

40

50

モデル	コホート	化学療法	PPV	誤分類
GIV + LVI	BioGrid 1	未施行	0.59	0.37
GIV + LVI	BioGrid 1	治療された	0.80	0.57
GIV + LVI	BioGrid 2	未施行	0.88	0.57
GIV + LVI	BioGrid 2	治療された	0.69	0.39

表27

10

【0210】

Kaplan-Meier 曲線

図12-13は、BioGrid 2からの種々のマーカー/LVI組合せについての Kaplan-Meier 曲線を提供する。全てのリスク階層化は、上の訓練セットにおいて開発されたモデルに基づく。

【0211】

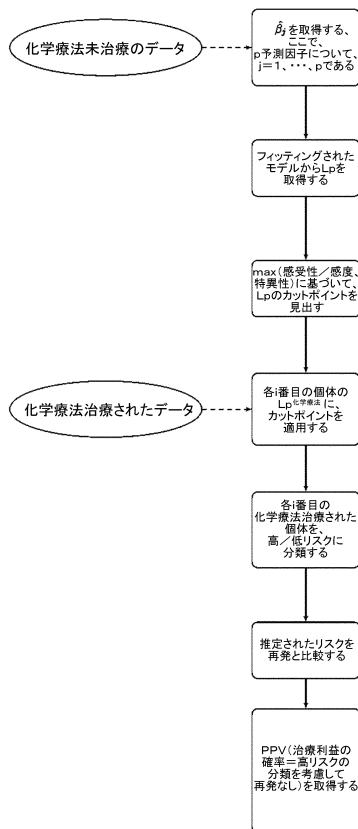
上述の図及び表からわかるように、GIVは、ステージIIのCRCにおける再現性よい予後及び予測バイオマーカーとして、2つの独立したコホートにわたって検証されている。

【0212】

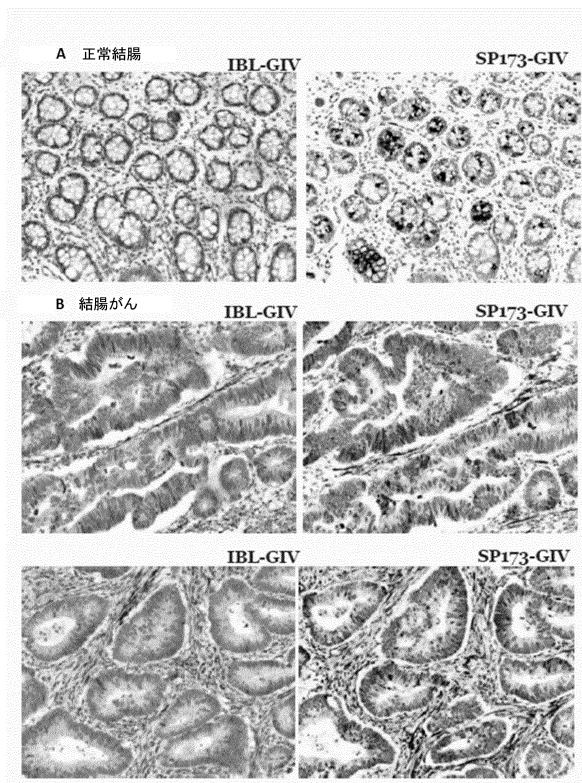
本開示の原理が適用され得る多くの可能な実施態様を考慮すると、例示された例は、本開示の例に過ぎず、本発明の範囲を限定すると解釈すべきでないことが、認識されるべきである。むしろ、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲によって規定される。したがって、本発明者らは、これらの請求項の範囲及び精神の内に入る全てを、本発明者らの発明として特許請求する。

20

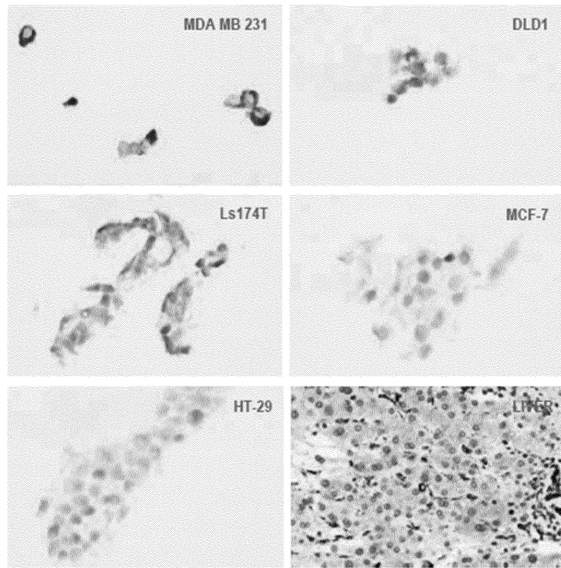
【図1】



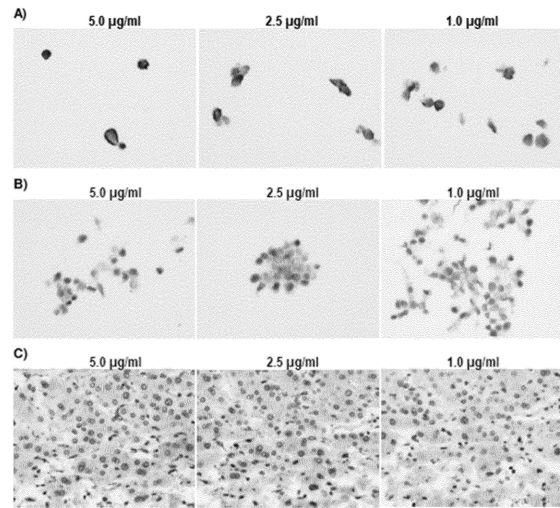
【図2A-B】



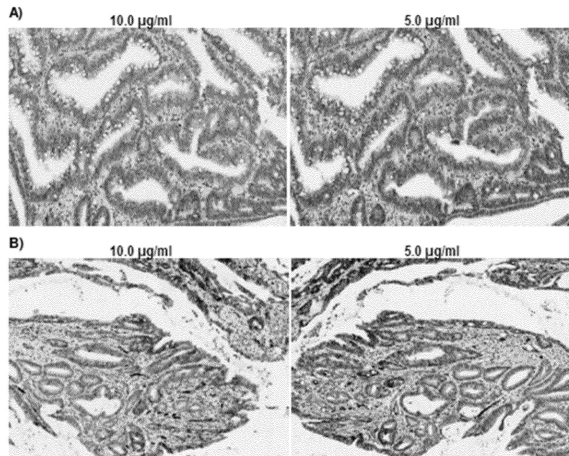
【 図 2 C 】



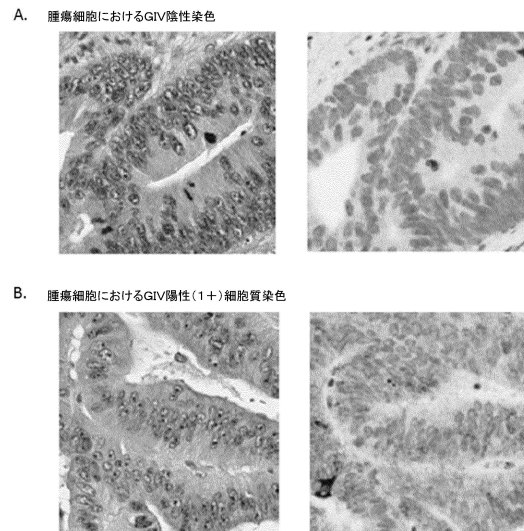
【 図 3 A - C 】



【 図 4 A - B 】

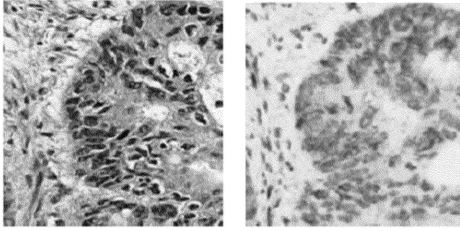


【 図 5 A - B 】

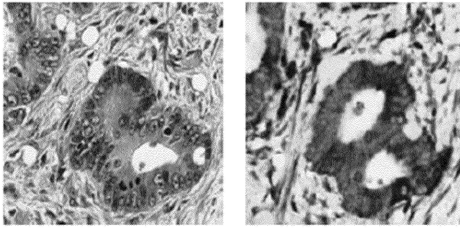


【図5 C - D】

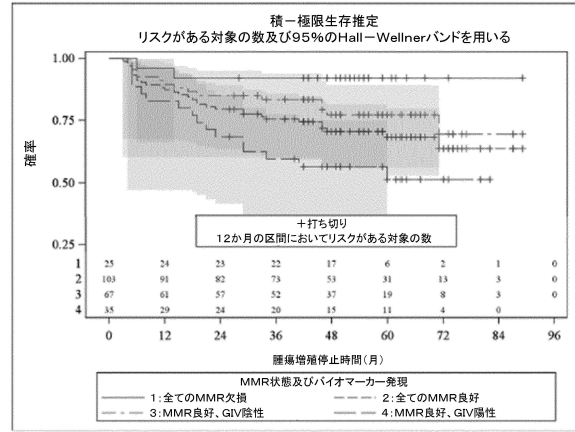
C 腫瘍細胞におけるGIV陽性(2+)細胞質及び核染色



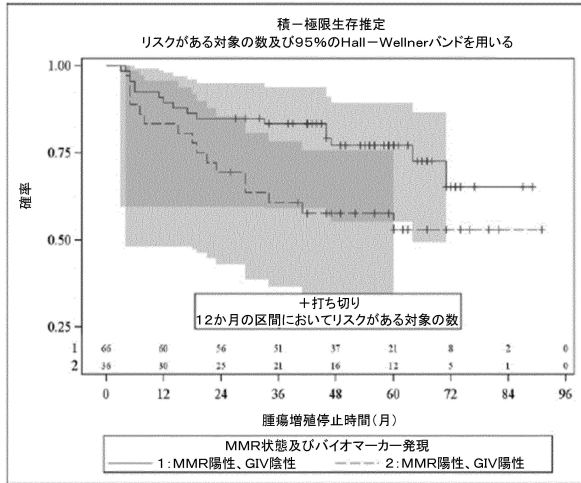
D 腫瘍細胞におけるGIV陽性(3+)細胞質及び核染色



【図6】

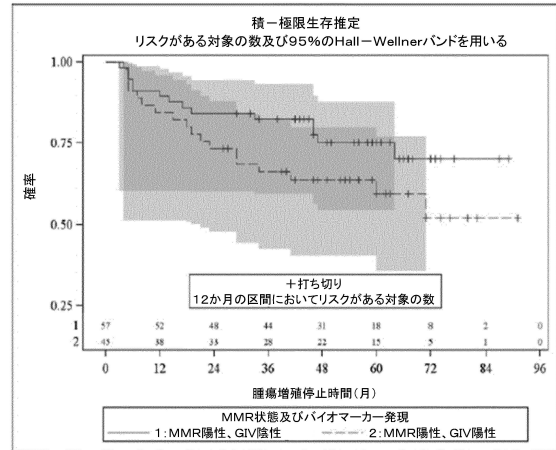


【図7 A】



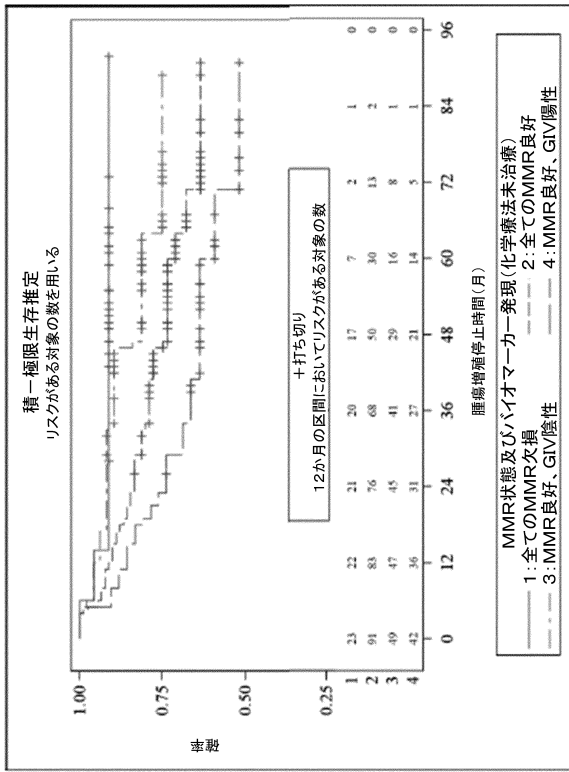
パーセント陽性 (N)	HR (95% CI)
35.29% (36)	2.03 (1.02, 4.07)

【図7 B】

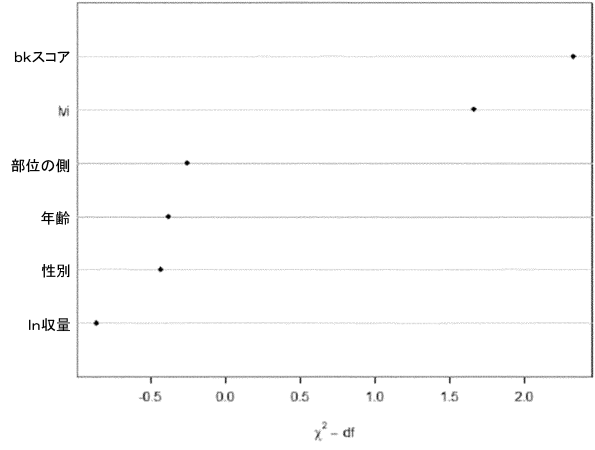


パーセント陽性 (N)	HR (95% CI)
44.12% (45)	1.75 (0.87, 3.52)

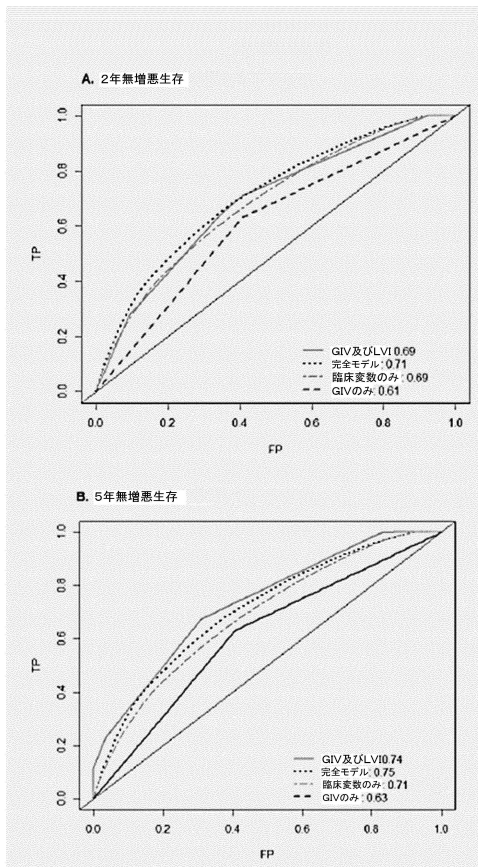
【図 8】



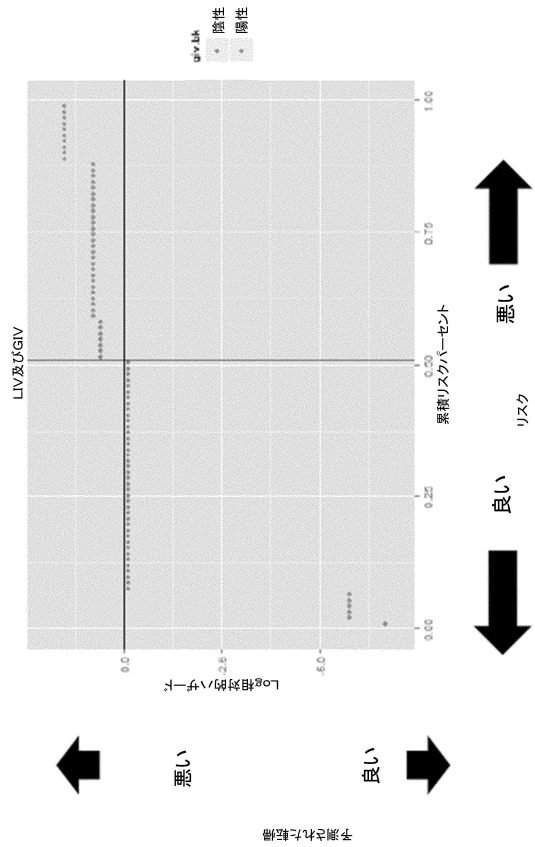
【図 9】



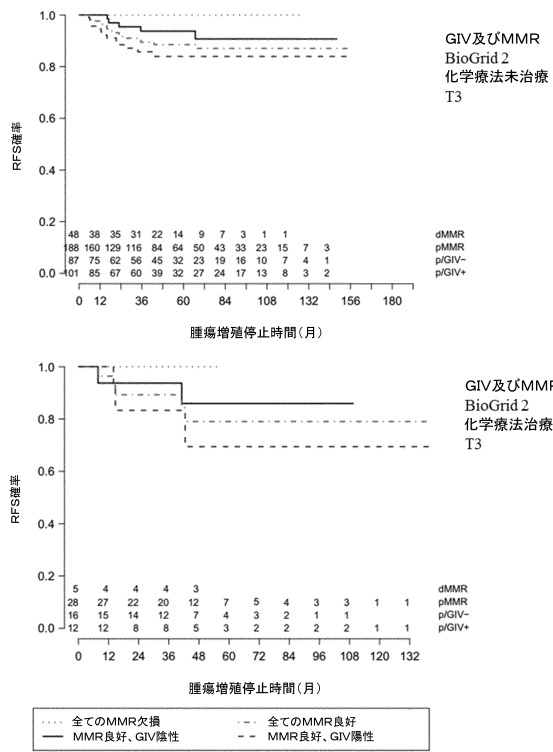
【図 10】



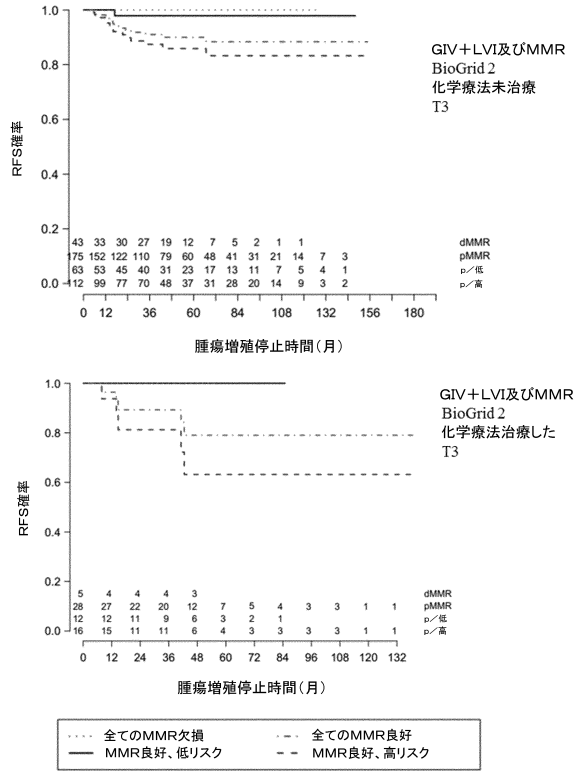
【図 11】



【図 1 2】



【図 1 3】



【配列表】

0006657103000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/686 Z
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	31/513 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 K	31/519 (2006.01)	A 6 1 K	31/513
A 6 1 K	31/4725 (2006.01)	A 6 1 K	31/519
A 6 1 K	31/282 (2006.01)	A 6 1 K	31/4725
		A 6 1 K	31/282

(73)特許権者 307014119

ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ・アズ・リプレゼンティッド・バイ・ザ・デパートメント・オブ・ヴェテランズ・アフェアーズ
 アメリカ合衆国・ワシントン・ディストリクト・オブ・コロンビア・20420・ノース・ウエスト・ヴァーモント・アヴェニュー・810・オフィス・オブ・ザ・ジェネラル・カウンセル・(024)

(73)特許権者 306021192

エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アクチェンゲゼルシャフト
 スイス、ツェハー - 4070パーゼル、グレンツァッハーシュトラッセ124番

(74)代理人 110002077

園田・小林特許業務法人

(72)発明者 リース, キャサリン

アメリカ合衆国 アリゾナ 85719, ツーソン, ノース ユークリッド アヴェニュー
 3926

(72)発明者 ロール, ユルリッシュ - ピーター

フランス国 エフ - 68220 フォルジャンスプール, リュ ドゥ プレ 30

(72)発明者 シン, シャリーニ

アメリカ合衆国 アリゾナ 85750, ツーソン, ノース モカシン トレイル 5741

(72)発明者 ゴーシュ, プラディプタ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 92130, サンディエゴ, サンダウン ウェイ 130
 44

(72)発明者 フー, ソン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94588, プレザントン, ハートウェル コート 33
 75

(72)発明者 ラフルール, ボニー

アメリカ合衆国 アリゾナ 85745, ツーソン, ウェスト スピードウェイ ブールヴァ
 ード 4151

(72)発明者 ムレイニー, アンドレア

アメリカ合衆国 アリゾナ 85718, ツーソン, ノース カミノ パドリー イサイドロ
 6181

(72)発明者 シャンムガム, カンダウエル

アメリカ合衆国 アリゾナ 85226, チャンドラー, ウェスト ジャスパー ドライブ
 3881

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0246789 (US, A1)
国際公開第2013/016465 (WO, A1)
国際公開第2012/103250 (WO, A2)
GARCIA-MARCOS M; JUNG B H; EAR J; ET AL, EXPRESSION OF GIV/GIRDIN, A METASTASIS-RELATED PROTEIN, PREDICTS PATIENT SURVIVAL IN COLON CANCER, THE FASEB JOURNAL, 2010年10月25日, VOL:25, NR:2, PAGE(S):590 - 599, URL, <http://dx.doi.org/10.1096/fj.10-167304>
Jiang B et al., Tube-like structures with co-expression of D2-40 and CD34: newly formed vasculatures?", Int J Biol Sci., 2012年, Vol.8, No.8, p1206-16
JUN BYOUNG YEON; KIM SANG WOO; JUNG CHAN KWON; ET AL, EXPRESSION OF GIRDIN IN HUMAN COLORECTAL CANCER AND ITS ASSOCIATION WITH TUMOR PROGRESSION, DISEASES OF THE COLON & RECTUM, 米国, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2013年 1月 1日, VOL:56, NR:1, PAGE(S):51 - 57, URL, <http://dx.doi.org/10.1097/DCR.0b013e31826b9b7e>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98