

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-536004

(P2016-536004A)

(43) 公表日 平成28年11月24日 (2016. 11. 24)

| (51) Int. Cl.                       | F I             | テーマコード (参考) |
|-------------------------------------|-----------------|-------------|
| <b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>       | C 1 2 Q 1/68 A  | 2 G 0 4 5   |
| <b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>      | A 6 1 K 45/00   | 4 B 0 6 3   |
| <b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>      | A 6 1 P 35/00   | 4 C 0 8 4   |
| <b>A 6 1 K 31/138 (2006.01)</b>     | A 6 1 K 31/138  | 4 C 2 0 6   |
| <b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b>      | G 0 1 N 33/50 P |             |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く |                 |             |

(21) 出願番号 特願2016-542081 (P2016-542081)  
 (86) (22) 出願日 平成26年9月10日 (2014. 9. 10)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年5月9日 (2016. 5. 9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/055041  
 (87) 国際公開番号 W02015/038682  
 (87) 国際公開日 平成27年3月19日 (2015. 3. 19)  
 (31) 優先権主張番号 61/876, 757  
 (32) 優先日 平成25年9月11日 (2013. 9. 11)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516073602  
 バイオ セラノスティックス, インコーポ  
 レイテッド  
 アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル  
 ニア州, サンディエゴ, スイート 2 0 0  
 , タウン センター ドライブ 9 6 4 0  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100122389  
 弁理士 新井 栄一  
 (74) 代理人 100111741  
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌再発の予測

## (57) 【要約】

乳癌に罹患している被験者において癌再発リスクを決定する方法が提供される。また、乳癌に罹患している被験者の処置に対する奏功性を決定する方法も提供される。さらに、乳癌に罹患している被験者を処置する方法が提供される。

【選択図】 図 1

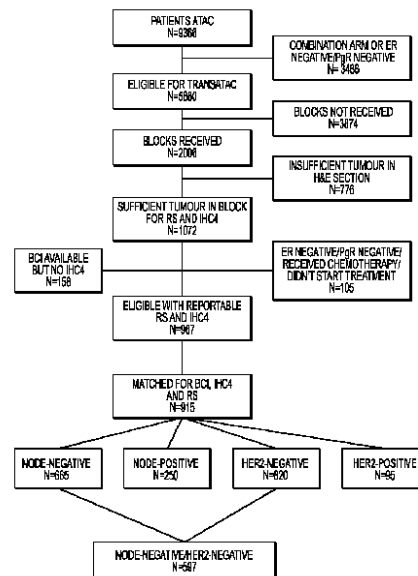


FIG. 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

乳癌に罹患している被験者において癌再発リスクを決定する方法であって、  
前記被験者由来の E R + 乳癌細胞のサンプルにおいて複数の遺伝子の m R N A 発現レベルを決定すること；および

乳癌疾患の診断における前記複数の遺伝子の m R N A 発現レベルの分析に基づき、被験者の癌再発リスクが低いか高いかを分類すること  
を含んでなり、

前記複数の遺伝子の分析が、およそ 5 年のアジュバント療法を受けた後の癌再発リスクを、5 年を超える転帰を有する後向き E R + 乳癌患者データセット、またはその代表サンプルと比べた場合に、低リスク群において約 5 % 未満とし、かつ、

前記被験者がおよそ 5 年のアジュバント療法を受けており、その療法後に無病である、  
方法。

## 【請求項 2】

中リスクカテゴリーもまた分類される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

低リスク群が E R + 患者の 5 0 % 超を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

低リスク群が E R + 患者の 5 5 % 超を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

低リスク群が E R + 患者の 6 0 % 超を含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

5 年後再発リスクが決定される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

遠隔再発リスクが決定される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

局所再発リスクが決定される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 0】

複数の遺伝子のうちの 1 つが H o x B 1 3 である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 1】

複数の遺伝子のうちの 1 つが I L 1 7 B R である、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 2】

H o x B 1 3 / I L 1 7 B R の発現レベルの比が決定される、請求項 1 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

複数の遺伝子のうちの 1 つが B u b 1 B である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

複数の遺伝子のうちの少なくとも 1 つが C E N P A 、 N E K 2 、 R A C G A P 1 、および R R M 2 から選択される、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 5】

B u b 1 B 、 C E N P A 、 N E K 2 、 R A C G A P 1 、および R R M 2 の発現レベルが決定される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

H o x B 1 3 / I L 1 7 B R ( H : I ) の発現レベルの比が決定される、請求項 1 5 記載の方法。

## 【請求項 1 7】

B u b 1 B 、 C E N P A 、 N E K 2 、 R A C G A P 1 、および R R M 2 の発現レベルが

10

20

30

40

50

合計され、MGI 指数を得るために適用される係数、および H : I および MGI を連続変数として連結して BCI 値とされる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

BCI が、個々の癌再発リスクを連続 BCI 変数の一部として評価することにより計算され、再発リスクが BCI 変数と直線的關係で増加する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

乳癌に罹患している被験者において癌再発リスクを決定する方法であって、

前記被験者由来の ER + 乳癌細胞のサンプルにおいて  $H \times B13$ 、IL17BR、Bub1B、CENPA、NEK2、RACGAP1、および RRM2 の mRNA 発現レベルを決定すること；

前記発現レベルを合計して乳癌指数 (BCI) 値とし、より高い BCI 値がより高い癌再発リスクと相関し、より低い BCI 値がより低い癌再発リスクと相関すること；ならびに

前記サンプルを BCI 値に基づき、前記被験者において中リスクカテゴリーを用いずに、癌再発の低リスクまたは高リスクを示すとして分類することを含んでなる、方法。

【請求項 20】

前記発現レベルが、

$H \times B13 / IL17BR$  の発現レベルの比 (「H : I」) を計算すること；

Bub1B、CENPA、NEK2、RACGAP1、および RRM2 の発現レベルを、MGI 指数を得るための係数を用いて合計すること；ならびに

H : I と MGI を連続変数として連結することによって合計される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記係数が主成分分析から決定される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記癌が非浸潤性乳管癌 (DCIS) であり、前記癌再発が局所再発を含んでなる、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

前記再発が晩期再発 (初期療法後 5 年を超える) である、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記指示が、5 年以下の初期期間中、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置された場合の被験者における高リスク遠隔再発であり、かつ、前記被験者を化学療法で処置することをさらに含んでなる、請求項 19 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記指示が、5 年以下の初期期間中、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置された場合の被験者における低リスク遠隔再発であり、かつ、前記被験者を前記アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置することをさらに含んでなる、請求項 19 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記指示が、さらに 5 年の間、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置されない場合の被験者における高リスク遠隔再発であり、かつ、前記被験者をアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法または別のアジュバント療法で処置することをさらに含んでなる、請求項 19 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記被験者を、癌再発無く最大 5 年の期間、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による処置を受けたと同定すること；

前記被験者を BCI 値に基づき、前記処置の終了後に癌の高い遠隔再発リスクを有するまたは有しないと分類すること；ならびに

10

20

30

40

50

前記被験者が高い再発リスクを有する場合には、前記被験者をさらなる期間、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置すること  
をさらに含んでなる、請求項 19 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

乳癌に罹患している被験者の長期処置の必要性を決定する方法であって、

前記被験者由来の ER + 乳癌細胞のサンプルにおいて H o x B 1 3、I L 1 7 B R、B u b 1 B、C E N P A、N E K 2、R A C G A P 1、および R R M 2 の m R N A 発現レベルを決定すること；

前記発現レベルを合計して乳癌指数 ( B C I ) 値とし、より低い B C I 値が、5 年以下のアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による初期治療後にアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による追加処理を必要としないことと相関すること；ならびに

前記サンプルを B C I に基づき、追加処置の必要が有ることまたは無いことを示すとして分類すること

を含んでなる、方法。

【請求項 29】

前記追加処置が 5 年以下の初期治療後、5 年以上の期間である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

乳癌に罹患している被験者を処置する方法であって、

前記被験者由来の ER + 乳癌細胞のサンプルにおいて H o x B 1 3、I L 1 7 B R、B u b 1 B、C E N P A、N E K 2、R A C G A P 1、および R R M 2 の m R N A 発現レベルを決定すること；

前記発現レベルを合計して乳癌指数 ( B C I ) 値とし、より低い B C I 値がより低い遠隔再発リスクと相関すること；ならびに

前記被験者に前記被験者の B C I 値決定と一致した処置を施すこと  
を含んでなる、方法。

【請求項 31】

被験者における高い遠隔再発リスクが、5 年以下の初期期間中にアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置された場合に示され、前記被験者が化学療法で処置される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

被験者における低い遠隔再発リスクが、5 年以下のアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置された場合に示され、前記被験者がアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

被験者における高い遠隔再発リスクが、さらに 5 年の期間、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置されない場合に示され、前記被験者がアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法または別のアジュバント療法で処置される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 34】

前記被験者がリンパ節転移陰性 ( N 0 ) 乳癌を有する、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記被験者が H E R 2 陰性乳癌を有する、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

前記 m R N A 発現レベルが、m R N A から c D N A を作製することにより決定される、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

10

20

30

40

50

前記 c D N A がポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) を用いてさらに増幅される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記決定がアレイの使用を含んでなる、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記サンプルが前記被験者から抽出された組織から切り出される、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記サンプルがホルマリン固定パラフィン包埋 ( F F P E ) サンプルである、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 4 1】

B C I が、個々の癌再発リスクを連続 B C I 変数の一部として評価することにより計算され、再発リスクが B C I 変数と直線的関係で増加する、請求項 1 9 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法がタモキシフェンである、請求項 2 4 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記再発リスクが遠隔再発リスクである、請求項 1 9 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

( 1 ) 発明の分野

本開示は、乳癌再発に臨床的関連を有する遺伝子発現プロファイル、またはパターンの同定および使用に関する。特に、本開示は、アジュバントタモキシフェンまたはアロマターゼ阻害剤などの抗乳癌療法による初期治療の後の癌再発の見込みを決定するアッセイを提供する。

【背景技術】

30

【0002】

( 2 ) 関連技術の説明

エストロゲン受容体陽性乳癌は、長期の再発リスクを有する疾患である。アジュバントタモキシフェンの 5 年後、患者は、診断後少なくとも 1 5 年間、持続的な疾患再発および死亡リスクを有する。アリミデックス、タモキシフェン、アロネオリン組合せ ( A T A C ) 治験および B r e a s t I n t e r n a t i o n a l G r o u p ( B I G ) 1 - 9 8 試験 (Cuzick et al., 2010) を含む、アジュバントアロマターゼ阻害剤の中核先行治験からの長期追跡調査は、初期療法後に年間約 2 % の持続的再発率を示し、5 年のアジュバント内分泌療法後に見られる全再発の半分より多い。これらの所見は、長期アジュバント療法および治療意思決定プロセスの指針となり得るバイオマーカーの必要を強調する。

40

【0003】

エストロゲン受容体陽性乳癌における再発リスクの評価のために過去 1 0 年に研究された多遺伝子発現シグネチャーは、主として、増殖関連の遺伝子発現の定量的測定に頼るものである。2 1 遺伝子再発スコア (Oncotype DX; Genomic Health, Redwood City, CA, US A) を含む、これらの多遺伝子シグネチャーは、遠隔再発の強力な予測因子であるが、それらの予後能は、診断から 5 年を超えてリスクを評価する場合には低下する (Sgroi et al., 2012)。対照的に、晩期再発の予測因子は十分な特徴付けがなされておらず、早期再発と晩期再発には異なる機構が関連していると思われる。5 年の内分泌療法だけで十分に処置される患者、および逆に、長期アジュバント内分泌療法または他の療法を保証し得る晩期再発リスクの高い患者を同定するためには、バイオマーカーが必要とされる。

50

## 【 0 0 0 4 】

従前の研究で、2つの独立に開発された遺伝子発現バイオマーカーセット：分子グレード指数（MGI）およびH O X B 1 3 / I L 1 7 B Rからなる乳癌指数（BCI）アッセイを開発し、妥当性の確認を行った。MGI、腫瘍グレードおよび増殖を再現する5遺伝子予測因子は、エストロゲン受容体陽性乳癌を有する患者において予後能が高い。腫瘍グレードまたは増殖とは独立に開発されたH O X B 1 3 / I L 1 7 B Rは、早期および晩期遠隔再発の予後能があり、初期エストロゲン受容体陽性乳癌を有する患者における長期アジュバントアロマトーゼ阻害剤の利益の予測能がある。BCIおよび21遺伝子再発スコアアッセイは両方とも、定量的リアルタイムPCRにより遺伝子発現を測定するが、それらが検出する遺伝子は異なる。IHC4は、最も情報が得られる免疫組織化学的バイオマーカーのうちの4つ：エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2、およびKi-67のタンパク質発現を測定するもう1つの予後のモデルであるが(Cusick et al., 2011)、その中にBCIアッセイの遺伝子によってコードされているものはない。BCIは、エストロゲン受容体陰性乳癌またはトリプルネガティブ乳癌を有する患者では評価されていない。米国特許第7,930,105号および同第7,504,214号、米国特許公開第2011/0136680号および同第2013/0281502号、およびPCT特許公開第WO/2012/079059号参照。

10

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 5 】

20

【 特許文献 1 】 米国特許第 7,930,105 号

【 特許文献 2 】 米国特許第 7,504,214 号

【 特許文献 3 】 米国特許公開第 2011/0136680 号

【 特許文献 4 】 米国特許公開第 2013/0281502 号

【 特許文献 5 】 WO/2012/079059 号

## 【 非特許文献 】

## 【 0 0 0 6 】

【 非特許文献 1 】 Cuzick et al., Lancet Oncol. 11:1135-1141 (2010).

【 非特許文献 2 】 Sgroi, et al., Proc SABVS; Abstract S1-9 (2012).

【 非特許文献 3 】 Cuzick et al., J. Clin. Oncol. 29:4273-4278 (2011).

30

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 7 】

よって、エストロゲン受容体陽性乳癌を有する患者における晩期再発に対する長期アジュバント内分泌療法のリスク-利益を改善するためにバイオマーカーの必要があることは明らかである。本発明はその必要に取り組む。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 8 】

発明の簡単な概要

本開示は、1つには、(a)2つのカテゴリースキーム（高リスク、低リスク）が従来技術の中リスク分類の不明確性を避けるためにBCI分析で効果的に使用可能である；(b)線形BCIモデル（BCI-L）は、キュービックモデル（BCI-C）よりも再発リスクに対して優れた予後能を有する；および(c)上記の発見は、治療選択肢の選択に使用することができる、癌再発などの予後情報および特定の療法に対する奏功性などの予測情報を提供するための、BCIのより簡単かつより正確な適用を可能とする、という発見に基づく。

40

## 【 0 0 0 9 】

本明細書では、乳癌に罹患している被験者において癌再発リスクを決定する方法が提供される。本方法は、を含んでなる。(a)前記被験者由来のER+乳癌細胞のサンプルにおいて複数の遺伝子のmRNA発現レベルを決定すること；および(b)乳癌疾患の診断

50

における前記複数の遺伝子の mRNA 発現レベルの分析に基づき、被験者の癌再発リスクが低いか高いかを分類することを含んでなる。この方法では、複数の遺伝子の分析は、およそ 5 年のアジュバント療法を受けた後の癌再発リスクを、5 年を超える転帰を有する後向き ER + 乳癌患者データセット、またはその代表サンプルと比べた場合に、低リスク群において約 5 % 未満とする。多くの実施形態では、被験者は、およそ 5 年のアジュバント療法を受けており、その療法後に無病である。

#### 【0010】

よって、いくつかの実施形態では、本発明は、乳癌に罹患している被験者において癌再発リスクを決定する方法を対象とする。本方法は、前記被験者由来の ER + 乳癌細胞のサンプルにおいて HoxB13、IL17BR、Bub1B、CENPA、NEK2、RACGAP1、および RRM2 の mRNA 発現レベルを決定すること；

前記発現レベルを合計して乳癌指数 (BCI) 値とし、より高い BCI 値がより高い癌再発リスクと相関し、より低い BCI 値がより低い癌再発リスクと相関すること；ならびに

前記サンプルを BCI 値に基づき、前記被験者において中リスクカテゴリーを用いずに、癌再発の低リスクまたは高リスクを示すとして分類することを含んでなる、方法。

#### 【0011】

他の実施形態では、本発明は、乳癌に罹患している被験者の処置に対する奏功性を決定する方法を対象とする。本方法は、

前記被験者由来の ER + 乳癌細胞のサンプルにおいて HoxB13、IL17BR、Bub1B、CENPA、NEK2、RACGAP1、および RRM2 の mRNA 発現レベルを決定すること；

前記発現レベルを合計して乳癌指数 (BCI) 値とし、より低い BCI 値が、5 年以下のアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による初期治療の後のアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による追加処置に対する奏功性と相関すること；ならびに

前記サンプルを BCI 値に基づき、前記奏功性またはその欠如を示すとして分類することを含んでなる。

#### 【0012】

さらに、本発明は、乳癌に罹患している被験者を処置する方法を対象とする。本方法は、

前記被験者由来の ER + 乳癌細胞のサンプルにおいて HoxB13、IL17BR、Bub1B、CENPA、NEK2、RACGAP1、および RRM2 の mRNA 発現レベルを決定すること；

前記発現レベルを合計して乳癌指数 (BCI) 値とし、より低い BCI 値が、(a) 5 年以下のアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による初期治療の後のアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による追加処置に対する奏功性、および (b) より低い遠隔再発リスクと相関すること；および

前記被験者に BCI 値決定と一致した処置を施すことを含んでなる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0013】

【図1】図1は、本発明に記載のコンソートのための ATAC CONSORT 図である。

【図2A】図2Aは、総ての ER + N0 患者における全 10 年遠隔再発に関して BCI - C および BCI - L に基づき予め指定されたリスク群の成績を示すグラフである。パネル A - BCI - C。

【図2B】図2Bは、総ての ER + N0 患者における全 10 年遠隔再発に関して BCI -

C および B C I - L に基づき予め指定されたリスク群の成績を示すグラフである。パネル B - B C I - L。

【図 3】図 3 は、全 10 年遠隔再発のリスクを E R + N 0 患者における連続 B C I 直線指数の関数として示すグラフである。

【図 4 A】図 4 A は、E R + N 0 H E R 2 陰性患者における全 10 年遠隔再発に関して B C I - C および B C I - L モデルに基づき予め指定されたリスク群の成績を示すグラフである。パネル A ) B C I - C。

【図 4 B】図 4 B は、E R + N 0 H E R 2 陰性患者における全 10 年遠隔再発に関して B C I - C および B C I - L モデルに基づき予め指定されたリスク群の成績を示すグラフである。パネル B ) B C I - L。

【図 5 A】図 5 A は、E R + N 0 患者における初期および晩期遠隔再発に関する所定の B C I リスク群の成績を示すグラフである。5 A ) は、早期 0 ~ 5 年遠隔再発。集団 P I は、早期再発に関する、所定の低リスク群および中リスク群を意味し、P 2 は高リスク群を意味する。P 3 は、晩期再発に関する、所定の低リスク群を意味し、P 4 は中リスク群および高リスク群を意味する。

【図 5 B】図 5 B は、E R + N 0 患者における初期および晩期遠隔再発に関する所定の B C I リスク群の成績を示すグラフである。5 B ) 晩期 5 ~ 10 年遠隔再発。集団 P I は、早期再発に関する、所定の低リスク群および中リスク群を意味し、P 2 は高リスク群を意味する。P 3 は、晩期再発に関する、所定の低リスク群を意味し、P 4 は中リスク群および高リスク群を意味する。

【図 6 A】図 6 A は、早期および晩期遠隔再発のリスクを E R + N 0 患者における連続 B C 指数の関数として示すグラフである。6 A ) 早期 0 ~ 5 年遠隔再発のリスク。垂線は、所定の低、中 ( I n t e r ) および高 B C I リスク群の間の境界を示す。

【図 6 B】図 6 B は、早期および晩期遠隔再発のリスクを E R + N 0 患者における連続 B C 指数の関数として示すグラフである。6 B ) 晩期 5 ~ 10 年遠隔再発のリスク。垂線は、所定の低、中 ( I n t e r ) および高 B C I リスク群の間の境界を示す。

【図 7 A】図 7 A は、E R + N 0 H E R 2 陰性患者における早期および晩期遠隔再発に関する所定の B C I リスク群の成績を示すグラフである。パネル A ) 早期 ( 0 ~ 5 年 ) 遠隔再発のリスク。

【図 7 B】図 7 B は、E R + N 0 H E R 2 陰性患者における早期および晩期遠隔再発に関する所定の B C I リスク群の成績を示すグラフである。パネル B ) 晩期 ( 5 ~ 10 年 ) 遠隔再発のリスク。

【図 8 A】図 8 A は、早期 ( 0 ~ 5 年 ) および晩期 ( 5 ~ 10 年 ) 遠隔再発のリスクを E R + N 0 H E R 2 陰性患者における B C I 指数の関数として示すグラフである。パネル A - 早期遠隔再発のリスク。

【図 8 B】図 8 B は、早期 ( 0 ~ 5 年 ) および晩期 ( 5 ~ 10 年 ) 遠隔再発のリスクを E R + N 0 H E R 2 陰性患者における B C I 指数の関数として示すグラフである。パネル B - 晩期遠隔再発のリスク。

【図 9 A】図 9 A は、E R + N 0 患者における全 10 年遠隔再発に関する、B C I および R S の所定リスク群ならびに I H C 4 の事後決定されたカテゴリーリスク群の成績を示す、両アームを合わせた場合とアストロゾール ( A N A ) およびタモキシフェン ( T A M ) アーム単独の場合のグラフである。パネル A - 両アームを合わせた場合の B C I。

【図 9 B】図 9 B は、E R + N 0 患者における全 10 年遠隔再発に関する、B C I および R S の所定リスク群ならびに I H C 4 の事後決定されたカテゴリーリスク群の成績を示す、両アームを合わせた場合とアストロゾール ( A N A ) およびタモキシフェン ( T A M ) アーム単独の場合のグラフである。パネル B - 両アームを合わせた場合の R S。

【図 9 C】図 9 C は、E R + N 0 患者における全 10 年遠隔再発に関する、B C I および R S の所定リスク群ならびに I H C 4 の事後決定されたカテゴリーリスク群の成績を示す、両アームを合わせた場合とアストロゾール ( A N A ) およびタモキシフェン ( T A M ) アーム単独の場合のグラフである。パネル C - 両アームを合わせた場合の I H C 4。

10

20

30

40

50

【図 9 D】図 9 D は、E R + N 0 患者における全 1 0 年遠隔再発に関する、B C I および R S の所定リスク群ならびに I H C 4 の事後決定されたカテゴリーリスク群の成績を示す、両アームを合わせた場合とアストロゾール ( A N A ) およびタモキシフェン ( T A M ) アーム単独の場合のグラフである。パネル D - アストロゾールアーム単独の場合の B C I

。【図 9 E】図 9 E は、E R + N 0 患者における全 1 0 年遠隔再発に関する、B C I および R S の所定リスク群ならびに I H C 4 の事後決定されたカテゴリーリスク群の成績を示す、両アームを合わせた場合とアストロゾール ( A N A ) およびタモキシフェン ( T A M ) アーム単独の場合のグラフである。パネル E - アストロゾールアーム単独の場合の R S。

【図 9 F】図 9 F は、E R + N 0 患者における全 1 0 年遠隔再発に関する、B C I および R S の所定リスク群ならびに I H C 4 の事後決定されたカテゴリーリスク群の成績を示す、両アームを合わせた場合とアストロゾール ( A N A ) およびタモキシフェン ( T A M ) アーム単独の場合のグラフである。パネル F - アストロゾールアーム単独の場合の I H C

4。【図 9 G】図 9 G は、E R + N 0 患者における全 1 0 年遠隔再発に関する、B C I および R S の所定リスク群ならびに I H C 4 の事後決定されたカテゴリーリスク群の成績を示す、両アームを合わせた場合とアストロゾール ( A N A ) およびタモキシフェン ( T A M ) アーム単独の場合のグラフである。パネル G - タモキシフェンアーム単独の場合の B C I

。【図 9 H】図 9 H は、E R + N 0 患者における全 1 0 年遠隔再発に関する、B C I および R S の所定リスク群ならびに I H C 4 の事後決定されたカテゴリーリスク群の成績を示す、両アームを合わせた場合とアストロゾール ( A N A ) およびタモキシフェン ( T A M ) アーム単独の場合のグラフである。パネル H - タモキシフェンアーム単独の場合の R S。

【図 9 I】図 9 I は、E R + N 0 患者における全 1 0 年遠隔再発に関する、B C I および R S の所定リスク群ならびに I H C 4 の事後決定されたカテゴリーリスク群の成績を示す、両アームを合わせた場合とアストロゾール ( A N A ) およびタモキシフェン ( T A M ) アーム単独の場合のグラフである。パネル I - タモキシフェンアーム単独の場合の I H C

4。【図 1 0】図 1 0 は、E R + リンパ節転移陽性患者における全 1 0 年遠隔再発に関する所定のリスク群の成績を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

#### 発明の詳細な説明

本明細書で使用する場合、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈がそうではないことを明示しない限り、複数形も同様に含むものとする。さらに、「または」の使用は、文脈がそうではないことを明示しない限り、「および/または」を含むものとする。

【 0 0 1 5 】

#### 定義

遺伝子発現「パターン」または「プロファイル」または「シグネチャー」は、転帰間を識別することができるものと相関される 2 つ以上の臨床転帰、癌転帰、癌再発および/または生存転帰の間の、1 以上の遺伝子の相対的発現を意味する。いくつかの場合では、転帰は乳癌の転帰である。

【 0 0 1 6 】

「遺伝子」は、本来 R N A であれタンパク質性であれ、不連続産物をコードするポリヌクレオチドである。2 以上のポリヌクレオチドは不連続産物をコードすることができると考えられる。この用語には対立遺伝子、および同じ産物をコードする遺伝子の多形、または染色体の位置および正常な有糸分裂中の組換えに基づく、機能的に関連するその類似体（機能の獲得、欠損、または調節を含む）が含まれる。

【 0 0 1 7 】

用語「相関する」または「相関」またはその等価表現は、1 以上の遺伝子の発現間と本

10

20

30

40

50

発明に記載の方法の使用により同定される細胞のある生理状態（１以上の他の状態を除く）との間の関連を意味する。遺伝子は、より高いレベルまたはより低いレベルで発現されることがあるが、１以上の癌状態または転帰となお相関する。

【００１８】

「ポリヌクレオチド」は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態である。この用語は、分子の一次構造のみを意味する。従って、この用語は、二本鎖および一本鎖DNAおよびRNAを含む。それはまた、当技術分野で公知の標識、メチル化、「キャップ」、１以上の天然ヌクレオチドの、類似体での置換、および非電荷結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）などのヌクレオチド間修飾を含む既知のタイプの修飾、ならびに非修飾型のポリヌクレオチドを含む。

10

【００１９】

用語「増幅する」は、当技術分野で公知のように、DNAまたはRNAポリメラーゼを用いて酵素的に、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて作製することができる増幅産物の作出を意味して広義で用いられる。「増幅」は、本明細書で使用する場合、一般に、所望の配列の、特にサンプルの、複数のコピーを作製するプロセスを意味する。「複数のコピー」とは、少なくとも２コピーを意味する。「コピー」は、必ずしも完全な配列相補性または鋳型配列との同一性を意味しない。

【００２０】

対応するとは、ある核酸分子が別の核酸分子と実質的量の配列同一性を共有することを意味する。実質的量とは、少なくとも９５％、通常には少なくとも９８％、より通常には少なくとも９９％を意味し、配列同一性は、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)に記載されているようにBLASTアルゴリズムを用いて決定される（公開されているデフォルト状態、すなわち、パラメーター $w = 4$ 、 $t = 17$ を使用）。mRNAを増幅するための方法は一般に当技術分野で公知であり、逆転写PCR（RT-PCR）および米国特許第号6,794,141号に記載のものを含む。使用可能な別の方法は定量的PCR（またはQ-PCR）である。あるいは、RNAは、当技術分野で公知の方法により、対応するcDNAとして直接標識してもよい。

20

【００２１】

「マイクロアレイ」は、限定されるものではないが、ガラス、プラスチック、または合成膜などの固相支持体の表面に形成された、定義された領域をそれぞれ備えた、好ましくは不連続領域の線形アレイまたは二次元アレイである。マイクロアレイ上の不連続領域の密度は、単一の固相支持体の表面上の、検出される固定化ポリヌクレオチドの総数によって決定され、好ましくは、少なくとも約 $50 / \text{cm}^2$ 、より好ましくは、少なくとも約 $100 / \text{cm}^2$ 、いっそうより好ましくは、少なくとも約 $500 / \text{cm}^2$ であるが、好ましくは、約 $1,000 / \text{cm}^2$ 未満である。

30

【００２２】

好ましくは、アレイは、合計約 $500$ 、約 $1000$ 、約 $1500$ 、約 $2000$ 、約 $2500$ 、または約 $3000$ 未満の固定化ポリヌクレオチドを含む。本明細書で使用する場合、DNAマイクロアレイは、サンプルから増幅またはクローニングされたポリヌクレオチドにハイブリダイズさせるために用いるチップまたは他の表面上に配置されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのアレイである。アレイ内のプライマーの各特定群の位置は既知であるので、サンプルポリヌクレオチドの同一性が、マイクロアレイ内の特定の位置へのそれらの結合に基づいて決定可能である。

40

【００２３】

本開示は、過剰発現または過少発現される遺伝子の同定に頼るものであるもので、本開示の一実施形態は、サンプル細胞のmRNA、またはその増幅もしくはクローニング形態の、特定の遺伝子配列に対してユニークなポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって発現を決定することを含む。このタイプの好ましいポリヌクレオチドは、他の遺伝子配列には見られない少なくとも約 $20$ 、少なくとも約 $22$ 、少なくとも約 $24$ 、少なく

50

とも約 26、少なくとも約 28、少なくとも約 30、または少なくとも約 32 の連続塩基対の遺伝子配列を含む。用語「約」は、前文で使用される場合、示された数値から 1 の増減を意味する。他の遺伝子配列には見られない少なくとももしくは約 50、少なくとももしくは約 100、少なくとももしくは約 150、少なくとももしくは約 200、少なくともしくは約 250、少なくともしくは約 300、少なくともしくは約 350、または少なくともしくは約 400 塩基対の遺伝子配列のポリヌクレオチドがいつより好ましい。用語「約」は、前文で使用される場合、示された数値からの 10% の増減を意味する。このようなポリヌクレオチドはまた、本発明に記載の遺伝子の配列、またはそのユニークな部分とハイブリダイズし得るポリヌクレオチドプローブと呼ばれることもある。好ましくは、これらの配列は、これらの遺伝子のよりコードされる mRNA、このような mRNA に対応する cDNA、および / またはこのような配列の増幅形態の配列である。本開示の好ましい実施形態では、ポリヌクレオチドプローブは、それらのプローブが位置しているアレイ上、他のデバイス上、または個々のスポット内に固定化される。

#### 【0024】

本開示の別の実施形態では、開示配列の全部または一部は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、ならびに限定されるものではないが、定量的 PCR (Q-PCR)、逆転写 PCR (RT-PCR)、およびリアルタイム PCR、場合により、リアルタイム RT-PCR などのその変形形態といった方法によって増幅および検出され得る。このような方法では開示配列の一部と相補的な 1 以上のプライマーを使用し、これらのプライマーは核酸合成をプライムするために使用される。新たに合成された核酸は場合によって標識されてもよく、直接または本開示のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより検出され得る。新たに合成された核酸は、本開示のポリヌクレオチド (配列を含む) と、それらのハイブリダイゼーションを可能とする条件下で接触させればよい。

#### 【0025】

あるいは、また、本開示の別の実施形態では、遺伝子発現は、細胞サンプル中の個々の遺伝子産物 (タンパク質) の 1 以上のエピトープに特異的な 1 以上の抗体の使用による、対象とする細胞サンプル中の発現タンパク質の分析により決定され得る。このような抗体は好ましくは、遺伝子産物との結合の後にそれらの容易な検出を可能とするように標識される。

#### 【0026】

用語「標識」は、標識された分子の存在の指標となる検出可能なシグナルを産生し得る組成物を意味する。好適な標識としては、放射性同位元素、ヌクレオチド発色団、酵素、基質、蛍光分子、化学発光部分、磁気粒子、生物発光部分などが含まれる。従って、標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段によって検出可能な任意の組成物である。

#### 【0027】

用語「支持体」は、ビーズ、粒子、ディップスティック、繊維、フィルター、膜およびスライドガラスなどのシランまたはシリケート支持体といった従来の支持体を意味する。

#### 【0028】

本明細書で使用する場合、「癌組織サンプル」または「癌細胞サンプル」は、対応する癌に罹患している個人から単離された組織の細胞含有サンプルを意味する。サンプルは、生検などの外科的手順を介して取り出された材料に由来してもよい。このようなサンプルは、初代単離物 (培養細胞に対して) であり、当技術分野で認識されているいずれの好適な手段によって採取してもよい。いくつかの実施形態では、「サンプル」は、限定されるものではないが、掻爬または細針穿刺吸引を含む非侵襲的方法によって採取してもよい。

#### 【0029】

「乳房組織サンプル」または「乳房細胞サンプル」は、乳癌に罹患していることが疑われる、または乳癌を発症するリスクのある個人から単離された乳房組織または体液のサンプルを意味する。このようなサンプルは、初代単離物 (培養細胞に対して) であり、限定されるものではないが、乳管洗浄、細針穿刺吸引、針生検、米国特許第 6,328,70

10

20

30

40

50

9号に記載のデバイスおよび方法、または当技術分野で認識されてうる他の任意の好適な手段を含む、任意の非侵襲的手段によって採取してよい。あるいは、「サンプル」は、限定されるものではないが、生検などを含む侵襲的方法によって採取してもよい。

【0030】

「発現」および「遺伝子発現」には、核酸材料の転写および/または翻訳が含まれる。当然のことながら、この用語はまた、そのように指定されている場合には、核酸の転写のみを指すように限定されてもよい。

【0031】

本明細書で使用する場合、用語「を含んでなる(comprising)」およびその同語源語は包含の意味で使用され、すなわち、「含む(including)」およびその対応する同語源語に等しい。

10

【0032】

ハイブリダイゼーション、鎖の伸長などの、ある事象を起こすことを可能とする条件またはある事象が起こるのに「好適な」条件、または「好適な」条件は、そのような事象が起こることを妨げない条件である。よって、これらの条件は、その事象を可能とする、促進する、助長する、および/または助けとなる。当技術分野で公知の、本発明に記載のこのような条件は、例えば、ヌクレオチド配列の性質、温度、およびバッファー条件によって異なる。これらの条件はまた、ハイブリダイゼーション、切断、鎖の伸長または転写など、どの事象が望まれるかによって異なる。

20

【0033】

配列「突然変異」は、本明細書で使用する場合、参照配列に比べての、本明細書に開示される着目する遺伝子の任意の配列の変更を意味する。配列突然変異としては、置換、欠失または挿入などの機構によるヌクレオチド変化、または配列内の2つ以上のヌクレオチドの変更が含まれる。一塩基多型(SNP)も本明細書で使用される配列突然変異である。本開示は遺伝子発現の相対的レベルに基づくので、本明細書に開示される遺伝子の非コード領域における突然変異も、本開示の実施においてアッセイ可能である。

【0034】

「検出」は、遺伝子発現およびその変化の直接的および間接的検出を含む任意の検出手段を含む。例えば、「検出可能により少ない」産物が直接的または間接的に観察される場合があり、この用語はいずれの減少(検出可能なシグナルの不在を含む)も示す。同様に、「検出可能により多い」産物は、直接的に観察される場合であれ間接的に観察される場合であれ、いずれの増加も意味する。

30

【0035】

評価する2つの条件(例えば、高再発リスクまたは低発現リスク)間での開示配列の発現の違いは、その2条件の間の発現のパーセントまたは変化倍率に基づく以下の用語で定義される。2条件間の違いは、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、または200%であり得る。

【0036】

あるいは、一方の条件から他方の条件への倍率の増加または減少は、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、または10であり得る。

40

【0037】

そうではないことが定義されない限り、本明細書で使用される総ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の熟練者に一般に理解されているのと同じ意味を有する。

【0038】

本発明は、ある面では、以下にさらに述べるいくつかの発見に基づくものである。第1の発見は、従来技術の中リスク分類の不明確性を避けるために、2つのカテゴリースキーム(高リスク、低リスク)がBCI分析で効果的に使用できるということである。例えば、以下の実施例2を参照。第2の発見は、線形BCIモデル(BCI-L)がキュービッ

50

クモデル (BCI - C) よりも優れた再発リスクの予後能を有するということである。これらの発見は、治療選択肢の選択に使用することができる、癌再発などの予後情報および特定の療法に対する奏功性などの予測情報を提供するための、BCI のより簡単かつより正確な適用を可能とする。従って、BCI は、乳癌患者の 60 % 超を包含する 5 % 未満の再発リスクを有する低リスク群を同定することができた (実施例 2)。これにより、初期療法を受けている患者の 60 % 超が、再発リスクがほとんど無く長期療法を無しで済ますようになる。

#### 【0039】

これらの利点は、これとともに、本明細書に開示される発現パターンに関してアッセイすることにより予後および / または癌再発を決定する方法として提供される。従って、癌患者の予後および / または処置の決定にこれまで主観的解釈が用いられてきたところ、本開示は、単独で使用可能な、または生存および癌の再発を含む患者転帰のより正確な評価を提供するための主観的基準と併用可能な客観的な遺伝子発現パターンを提供する。

10

#### 【0040】

よって、いくつかの実施形態では、乳癌に罹患している被験者において癌再発リスクを決定する方法が提供される。本方法は、(a) 前記被験者由来の ER + 乳癌細胞のサンプルにおいて複数の遺伝子の mRNA 発現レベルを決定すること; および (b) 乳癌疾患の診断における前記複数の遺伝子の mRNA 発現レベルの分析に基づき、被験者の癌再発リスクが低いか高いかを分類することを含んでなる。この方法では、複数の遺伝子の分析は、およそ 5 年のアジュバント療法を受けた後の癌再発リスクを、5 年を超える転帰を有する後向き ER + 乳癌患者データセット、またはその代表サンプルと比べた場合に、低リスク群において約 5 % 未満とする。多くの実施形態では、被験者はおよそ 5 年のアジュバント療法を受けており、その療法後に無病である。

20

#### 【0041】

これらの方法は、低および高リスク分類のみを用いて実施することができる。別の実施形態では、中リスクカテゴリーもまた分類される。

#### 【0042】

いくつかの実施形態では、低リスク群は、データセットの 50 % 超を含んでなる。他の実施形態では、低リスク群は、データセットの 55 % 超を含んでなる。さらなる実施形態では、低リスク群は、データセットの 60 % 超を含んでなる。

30

#### 【0043】

これらの方法は、例えば、5 年以下、5 年を超える、10 年、10 年を超えるなどの、いずれの期間の再発リスクも評価することできる。加えて、これらの方法は、遠隔再発または局所再発のリスク、または両者を評価することできる。

#### 【0044】

発現レベルが分析され、5 % 未満の再発リスクを有する低リスク群を同定可能な限り、いずれの複数の遺伝子もこれらの方法に使用できる。いくつかの実施形態では、複数の遺伝子のうちの 1 つは HoxB13 である。他の実施形態では、複数の遺伝子のうちの 1 つは IL17BR である。さらなる実施形態では、HoxB13 / IL17BR (H : I) の発現レベルの比が決定される。

40

#### 【0045】

さらなる実施形態では、複数の遺伝子は、MGI 遺伝子、すなわち、Bub1B、CENPA、NEK2、RACGAP1、および RRM2 のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたは 5 つ総てを含んでなる。いくつかの実施形態では、Bub1B、CENPA、NEK2、RACGAP1、および RRM2 の発現レベルが決定される。これらの実施形態のいくつかでは、HoxB13 / IL17BR (H : I) の発現レベルの比もまた決定される。これらの実施形態の様々な態様では、Bub1B、CENPA、NEK2、RACGAP1、および RRM2 の発現レベルが合計され、MGI 指数を得るために適用されると H : I および MGI を連続変数として連結して BCI 値とする。

#### 【0046】

50

B C I が使用される場合、B C I は、当技術分野で公知のいずれの方法によって計算してもよい。いくつかの実施形態では、B C I は、連続 B C I 変数の一部としての個々の癌再発リスクを評価することによって計算され、この場合、再発リスクは B C I 変数と直線の関係で増加する。

#### 【 0 0 4 7 】

本発明はまた、乳癌に罹患している被験者において癌再発リスクを決定する方法を対象とする。本方法は、

前記被験者由来の E R + 乳癌細胞のサンプルにおいて H o x B 1 3、I L 1 7 B R、B u b 1 B、C E N P A、N E K 2、R A C G A P 1、および R R M 2 の m R N A 発現レベルを決定すること；

前記発現レベルを合計して乳癌指数 ( B C I ) 値とし、より高い B C I 値がより高い癌再発リスクと相関し、より低い B C I 値がより低い癌再発リスクと相関すること；ならびに

前記サンプルを B C I 値に基づき、前記被験者において中リスクカテゴリーを用いずに、癌再発の低リスクまたは高リスクを示すとして分類することを含んでなる。

#### 【 0 0 4 8 】

本開示の方法のいくつかは、B C I の成分としての、被験者の乳癌細胞における H o x B 1 3 の発現レベルを含む、特定の遺伝子の発現レベルに基づく。いくつかの実施形態では、H o x B 1 3 発現対 I L 1 7 B R 発現の 2 遺伝子比 (または H o x B 1 3 : I L 1 7 B R 比) が使用される (米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 3 9 0 7 9 号、同第 2 0 0 5 / 0 2 3 9 0 8 3 号、および同第 2 0 0 6 / 0 1 5 4 2 6 7 号)。乳癌指数の別の実施形態では、H o x B 1 3 発現対 C H D H 発現の 2 遺伝子比が使用される。

#### 【 0 0 4 9 】

H o x B 1 3 : I L 1 7 B R ( H : I ) 比は、標準的な予後因子を超える臨床転帰を予測する新規なバイオマーカーの研究に基づいて発見された。癌再発を起こした患者は、そうではなかった患者と腫瘍ステージおよびグレードを一致させた。単純な H : I 比が、アジュバントタモキシフェン療法を受けているエストロゲン受容体陽性 ( E R + ) 乳癌を有する患者において癌再発を予測するために好適であることが判明した。続いての研究 (Ma et al., 2006; Goetz et al., 2006; Jerevall et al., 2007; Jansen et al., 2007) は、後向き臨床試験および無作為化臨床試験の両方の中で、この比が、腫瘍の悪性度の指標となることで予後能を持ち、また、タモキシフェン利益 (すなわち、タモキシフェン奏効 / 耐性) の予測能があることをさらに示した。

#### 【 0 0 5 0 】

B C I は、H o x B 1 3 / I L 1 7 B R 発現と組み合わせた 1 以上の付加的遺伝子の発現を含む。この組合せは、以下のように付加的に開示される遺伝子のうちいずれか 1 つ、2 つ、3 つ、4 つまたは 5 つ総てを伴い得る。本開示のこれらの付加的遺伝子は、B u b 1 B ("budding uninhibited by benzimidazoles 1 beta) または p 2 1 タンパク質活性化キナーゼ 6 ( P A K 6 ) ; C E N P A (セントロメアタンパク質 A、アイソフォーム a) ; N E K 2 ( N I M A 関連キナーゼ 2 または "never in mitosis gene a" 関連キナーゼ 2 ) ; R A C G A P 1 ( R a c G T P アーゼ活性化タンパク質 1 ) ; および R R M 2 (リボヌクレオチドレダクターゼ M 2 ) をコードする。これらの 5 つの遺伝子単独の使用は、本明細書では分子グレード指数 (Molecular Grade Index) ( M G I ) とも呼ばれる。M G I を計算する方法は、例えば、以下の実施例 2 および U S 特許公開第 2 0 1 1 / 0 1 3 6 6 8 0 号に述べられている。いくつかの実施形態では、M G I は、B u b 1 B、C E N P A、N E K 2、R A C G A P 1、および R R M 2 の発現レベルを、各遺伝子の発現レベルの係数を用いて合計することにより計算される。これらの係数は当技術分野で公知のいずれの方法によって決定してもよい。種々の実施形態では、これらの係数は主成分分析から決定される。

#### 【 0 0 5 1 】

本開示の態様は、予後情報を提供するため、および／または臨床奏功性の予測を提供するために、H o x B 1 3 発現の使用に関して記載された組成物および方法を、I L I 7 B R とともに、上記 5 つの検討遺伝子のうち 1 以上の発現レベルと組み合わせる含む。

#### 【 0 0 5 2 】

これらの 5 つの M G I 遺伝子は細胞周期に役割を有し、ピーク発現は次のように報告されている。

| 遺伝子            | 発現ピーク | 細胞周期における役割        |
|----------------|-------|-------------------|
| <i>Bub 1B</i>  | G2/M  | 有糸分裂紡錘体形成チェックポイント |
| <i>CENPA</i>   | G2/M  | セントロメア形成          |
| <i>NEK2</i>    | G2/M  | セントロメア倍加          |
| <i>RACGAP1</i> | 未決定   | 細胞質分裂の開始          |
| <i>RRM2</i>    | S     | DNA 複製            |

10

これらの遺伝子の属性の詳細については P C T 特許出願第 W O / 2 0 1 2 / 0 7 9 0 5 9 号を参照。

#### 【 0 0 5 3 】

よって、本開示は、ある面では、遺伝子発現レベルが被験者に対して予後決定および予測決定を提供するために有用であるという発見に基づく。7 つ総ての開示遺伝子の使用は、乳癌指数 ( B C I ) と呼ばれる。

20

#### 【 0 0 5 4 】

実施例に示されるように、B C I は、内分泌療法、標的療法またはアロマターゼ阻害剤による処置の最大 5 年の初期期間中に中リスクを有する被験者を低リスクまたは高リスクのいずれかに割り付けることにより、乳癌患者における再発リスクの選りすぐれた階層化を提供する。よって、どの期間においても、3 つの異なるリスク群ではなく 2 群の同定 ( 早期再発に関しては中リスクと低リスクを一緒に分類し、晚期再発に関しては中リスクと高リスクを一緒に分類することによる ) は、エストロゲン受容体陽性乳癌を有する患者の 4 0 % といった多くを見込み得る中リスクカテゴリーの排除を可能とするので、B C I は他の現行の遺伝子発現シグネチャーよりも有利である。いくつかの場合では、B C I は、長期アジュバント内分泌療法およびその有害な副作用なしで済ますことができる患者を同定する手段を可能とするので、晚期疾患再発の状況で適用される。

30

#### 【 0 0 5 5 】

リンパ節の状態および腫瘍サイズなどの臨床病理因子は、より高い晚期再発リスクに関連し；しかしながら、本明細書に開示される結果は、晚期再発リスクの個別化評価を可能にし、かつ、臨床病理因子を超える予後成績に統計学的に有意な改善をもたらす精密化を表す。言い換えれば、本開示の方法は、リンパ節の状態および腫瘍サイズなどの臨床病理因子を使用せずに、または場合により前記臨床病理因子と併用して実施することができる。他の遺伝子発現に基づくアッセイ ( E n d o P r e d i c t および P A M 5 0 ) は、晚期再発に関して臨床病理因子を超える予後能を有する。これらの研究はさらに、晚期疾患再発リスクの評価のための分子に基づくアッセイの臨床使用の妥当性を検証する。

40

#### 【 0 0 5 6 】

本開示の実施において遺伝子の発現レベルを決定するためには、当技術分野で公知のいずれの方法を使用してもよい。いくつかの実施形態では、本明細書において同定および開示遺伝子とハイブリダイズする m R N A の検出に基づく発現が使用される。これは、限定されるものではないが、逆転写 P C R、米国特許第 6, 7 9 4, 1 4 1 号に開示されている方法、および R N A 安定化または不安定化配列の有無を検出するための方法など、当技術分野で公知のまたは等価と認識されている任意の m R N A の検出または増幅 + 検出法によって容易に実施される。種々の実施形態では、m R N A は c D N A に変換される。

#### 【 0 0 5 7 】

50

鑑別能は、個々の遺伝子の発現を関連があるとして同定することによって付与されるものであって、実際の発現レベルを決定するために使用されるアッセイの形態によるのではない。そのアッセイが「トランスクリプトーム」（ゲノム中の遺伝子の転写画分）または「プロテオーム」（ゲノム中の発現遺伝子の翻訳画分）における遺伝子の発現を定量的または定性的に表す限り、本明細書に開示される同定済みの個々の遺伝子の特徴についていずれの同定を行うアッセイも使用可能である。特徴の同定には、限定されるものではないが、コード（DNA）、または発現（RNA）に用いられているユニークな核酸配列が含まれ、前記遺伝子または前記遺伝子によりコードされているタンパク質に特異的なエピトープまたは前記タンパク質の活性が含まれる。必要とされるのは、癌転帰と発現アッセイにおいて使用するための適当な細胞を含有するサンプルとの間で鑑別を行うのに必要な遺伝子の同定だけである。同様に、本開示の方法では新鮮組織、新鮮冷凍組織、および固定組織、例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織が使用可能であるので、細胞含有サンプルの性質は限定されない。

10

20

30

40

50

#### 【0058】

タンパク質レベルまたは活性の存在、増加、または減少の検出に基づく発現もまた、使用可能である。検出は、当技術分野で公知であり、かつ、タンパク質の検出に相当であると認識されている、任意の免疫組織化学（IHC）に基づく、血液に基づく（特に、分泌タンパク質向け）、抗体（そのタンパク質の対する自己抗体を含む）に基づく、剥離細胞（癌からの）に基づく、質量分析に基づく、および画像（標識リガンドの使用を含む）に基づく方法により実施することができる。抗体および画像に基づく方法は、癌細胞の供給源が知られていない場合に、非侵襲的手順（乳管洗浄または細針穿刺吸引など）により得られる細胞の使用による癌の決定の後の腫瘍の位置決定にさらに有用である。標識抗体またはリガンドは、患者内での癌腫の位置決定のために使用可能である。

#### 【0059】

発現を決定するための核酸に基づくアッセイを用いた一実施形態は、限定されるものではないが、アレイもしくはビーズなどの固相基質を含む固相支持体上への本明細書で同定された遺伝子の1以上の配列の固定化、または当技術分野で公知のビーズに基づく技術による。あるいは、当技術分野で公知の溶液に基づく発現アッセイも使用可能である。

#### 【0060】

1または複数の固定化遺伝子は、ポリヌクレオチドがその1または複数の遺伝子に対応するDNAまたはRNAとハイブリダイズし得るように、その1または複数の遺伝子にユニークなまたはそうでなければ特異的なポリヌクレオチドの形態であり得る。これらのポリヌクレオチドは、1もしくは複数の遺伝子の全長またはそれらの遺伝子のより短い配列（例えば、その配列の5'または3'末端からの欠失によるなどで、当技術分野で公知の全長配列より最大1ヌクレオチド短い）であってよく、これらは、それらの1または複数の遺伝子に対応するDNAまたはRNAとのハイブリダイゼーションが影響を受けないように、場合により最小限の中断があってもよい（ミスマッチまたは挿入非相補的塩基対によるなど）。いくつかの場合では、使用されるポリヌクレオチドは、遺伝子の3'末端に由来し、例えば、遺伝子または発現配列のポリアデニル化シグナルまたはポリアデニル化部位由来の約350、約300、約250、約200、約150、約100、または約50ヌクレオチドである。

#### 【0061】

当業者ならば、同一のまたは保存された変化の領域を、他の遺伝子と比較してこれらの遺伝子のそれぞれを独自に同定する領域として特定するために、これらの遺伝子のそれぞれについて既知の発現配列のうちいずれか2つ以上をアラインすることが十分可能である。さらに、当業者ならば、発現配列うち1以上にユニークな領域を、少なくとも1つの他の発現配列に比べて1つの既知の発現配列を独自に同定する領域として特定するために、これらの遺伝子のそれぞれについて既知の発現配列のうちいずれか2つ以上をアラインすることが十分可能である。限定されない例として、ユニークな領域は、その領域が変異体の発現を同定するために使用可能なように、既知の遺伝子の1つの発現配列の変異体内に

あり得る。

【 0 0 6 2 】

また、同じ遺伝子の配列が他の動物種からも同定され、特性決定されている。よって、当業者には、他の動物の遺伝子に対して開示遺伝子をどのようにして同定すればよいかが自明である。当業者はまた場合により、種々の動物源からの開示遺伝子の既知の配列を比較して、保存されている領域および他の遺伝子に比べてこれらの遺伝子にユニークな配列を同定することができる。

【 0 0 6 3 】

開示遺伝子の配列に比べて突然変異を含むポリヌクレオチドもまた、それらの突然変異の存在がなおハイブリダイゼーションを可能として検出可能なシグナルを生じる限り、使用可能である。1または複数の固定化遺伝子を用いて、それに関してサンプルの被験者（例えば、そのサンプルが得られる患者）の転帰が分かっていない、またはサンプルの被験者にすでに割り付けられている転帰の確認のための、サンプル癌細胞または乳房細胞から調製した核酸サンプルの状態を決定するために使用することができる。本開示を限定することなく、このような細胞は、ER+乳癌を有する患者に由来し得る。固定化ポリヌクレオチドは、好適な条件下でサンプル由来の対応する核酸分子と特異的にハイブリダイズするに十分なものであることだけを要する。

【 0 0 6 4 】

当業者により認識されているように、上記の対応する配列のいくつかは、開示配列のユニーク性に寄与しない3'ポリA（または相補鎖上のポリT）ストレッチを含む。よって、本開示は、3'ポリA（またはポリT）ストレッチを欠く配列で実施してもよい。開示配列のユニーク性は、遺伝子の3'非翻訳部分に見られるユニークな配列を含む、開示遺伝子の核酸にのみ見られる配列の一部または全部を意味する。本開示の実施に好ましいユニークな配列は、それらのユニークな配列が一部の個人に存在する多形に特異的なものではなく多様な個人における発現を検出するのに有用となるように、3セットそれぞれのコンセンサス配列に寄与するものである。あるいは、ある個人またはある部分集団にユニークな配列を使用してもよい。好ましいユニークな配列は好ましくは、本明細書に述べられている本開示のポリヌクレオチドの長さのものである。

【 0 0 6 5 】

RNA安定性の増強（発現の増強の観察をもたらす）またはRNA安定性の低下（発現の低下の観察をもたらす）を同定するための方法もまた使用可能である。これらの方法には、遺伝子の配列を含むmRNAの安定性を増強または低下させる配列の検出を含む。

【 0 0 6 6 】

これらの方法はまた、mRNA分解の増強の検出を含む。本開示のいくつかの実施形態では、上記開示配列の3'非翻訳および/または非コード領域に存在する配列を有するポリヌクレオチドが、癌細胞または乳房細胞における遺伝子配列の発現レベルを検出するために使用される。このようなポリヌクレオチドは場合により、上記開示配列のコード領域の3'部分に見られる配列を含む。

【 0 0 6 7 】

コード領域および3'非コード領域由来の配列の組合せを含有するポリヌクレオチドは、好ましくは、介在する異種配列無く、連続的に配置された配列を有する。

【 0 0 6 8 】

あるいは、本開示は、癌細胞、または乳房細胞における遺伝子配列の5'非翻訳および/または非コード領域に存在する配列を有するポリヌクレオチドを用い、それらの発現レベルを検出するために実施することができる。このようなポリヌクレオチドは場合により、コード領域の5'部分に見られる配列を含む。コードおよび5'非コード領域由来の配列の組合せを含有するポリヌクレオチドは、好ましくは、介在する異種配列無く、連続的に配置された配列を有する。本開示はまた、開示遺伝子配列のコード領域に存在する配列を用いて実施してもよい。

【 0 0 6 9 】

非限定ポリヌクレオチドは、少なくとも約 20、少なくとも約 22、少なくとも約 24、少なくとも約 26、少なくとも約 28、少なくとも約 30、少なくとも約 32、少なくとも約 34、少なくとも約 36、少なくとも約 38、少なくとも約 40、少なくとも約 42、少なくとも約 44、または少なくとも約 46 の連続するヌクレオチドの 3' または 5' 非翻訳および / または非コード領域に由来する配列を含む。用語「約」は、前文で 사용되는場合、示された数値から 1 の増減を意味する。少なくとももしくはは約 50、少なくともしくは約 100、少なくともしくは約 150、少なくともしくは約 200、少なくともしくは約 250、少なくともしくは約 300、少なくともしくは約 350、または少なくともしくは約 400 の連続するヌクレオチドの配列を含むポリヌクレオチドがいっそうより好ましい。用語「約」は、前文で 사용되는場合、示された数値からの 10 % の増減を意味する。

10

#### 【0070】

開示のポリヌクレオチドに見られる上記のコード領域の 3' または 5' 末端由来の配列は、それらが本来コード領域の長さ限定されないということ以外は、上記のものと同じ長さである。コード領域の 3' 末端は、コード領域の最大 3' 側半分の配列を含み得る。逆に、コード領域の 5' 末端は、コード領域の最大 5' 側半分の配列を含み得る。当然のことながら、上記の配列、またはコード領域およびその一部を含むポリヌクレオチドは、それらの全長を用いてもよい。

#### 【0071】

3' 非翻訳および / または非コード領域由来の配列とコード領域の関連の 3' 末端由来の配列を組み合わせたポリヌクレオチドは、少なくともまたは約 100、少なくともまたは約 150、少なくともまたは約 200、少なくともしくは約 250、少なくともしくは約 300、少なくともしくは約 350、または少なくともしくは約 400 の連続するヌクレオチドであり得る。好ましくは、使用されるポリヌクレオチドは、遺伝子の 3' 末端に由来し、例えば、遺伝子または発現配列のポリアデニル化シグナルまたはポリアデニル化部位由来の約 350、約 300、約 250、約 200、約 150、約 100、または約 50 ヌクレオチドの範囲内である。開示遺伝子の配列に対して突然変異を含むポリヌクレオチドもまた、それらの突然変異の存在がなおハイブリダイゼーションを可能として検出可能なシグナルを生じる限り使用可能である。

20

#### 【0072】

本開示の別の実施形態では、上記開示配列の 5' および / または 3' 末端に由来するヌクレオチドの欠失を含むポリヌクレオチドが使用可能である。欠失は、好ましくは、5' および / または 3' 末端由来の 1 ~ 5、5 ~ 10、10 ~ 15、15 ~ 20、20 ~ 25、25 ~ 30、30 ~ 35、35 ~ 40、40 ~ 45、45 ~ 50、50 ~ 60、60 ~ 70、70 ~ 80、80 ~ 90、90 ~ 100、100 ~ 125、125 ~ 150、150 ~ 175、または 175 ~ 200 ヌクレオチドものであるが、欠失の程度は本来、配列の長さおよび発現レベルの検出にそれらのポリヌクレオチドが使用できるという必要に限定されない。

30

#### 【0073】

上記開示配列の 3' 末端由来の、開示の他のポリヌクレオチドは、定量的 PCR のプライマーおよび任意選択のプロープのものである。いくつかの実施形態では、プライマーおよびプロープは、遺伝子または発現配列のポリアデニル化シグナルまたはポリアデニル化部位由来の約 350 未満、約 300 未満、約 250 未満、約 200 未満、約 150 未満、約 100 未満、または約 50 未満のヌクレオチドの領域を増幅するものである。

40

#### 【0074】

本開示のさらに他の実施形態では、3' 末端を含む上記開示配列の一部を含むポリヌクレオチドが使用可能である。このようなポリヌクレオチドは、開示配列の 3' 末端に由来する少なくともしくは約 50、少なくともしくは約 100、少なくともしくは約 150、少なくともしくは約 200、少なくともしくは約 250、少なくともしくは約 300、少なくともしくは約 350、または少なくともしくは約 400 の連続する

50

ヌクレオチドを含む。

#### 【0075】

本開示はまた、乳癌細胞において遺伝子発現を検出するために使用されるポリヌクレオチドを含む。これらのポリヌクレオチドは、それらの配列との組合せでは本来見られない異種配列との組合せで上記遺伝子中に見られる配列からなるより短いポリヌクレオチドを含んでなり得る。限定されない例としては、クローニングベクターに由来する、または本発明に記載の標識プローブもしくはプライマーを調製するために使用される制限断片に存在する短い配列が含まれる。

#### 【0076】

必要な発現レベルは、使用する遺伝子に関して本発明に記載の方法により同定されるものであり得る。さらに、本アッセイは、場合によりPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）または本発明に記載の他の分析法で使用するためのサンプルからRNAを調製することを含み得る。PCR方は場合によりRT-PCR（逆転写-PCR）定量的PCR、例えば、リアルタイムRT-PCRであり得る。あるいは、本アッセイは、マイクロアレイなどのアレイの使用によるか、次世代シーケンシングによるか、または当技術分野で公知の他の任意の方法により行ってもよい。場合により、癌細胞のサンプルは、前記被験者から摘出されたまたは得られた組織から切り出されたものである。本発明に記載されるように、限定されない例としてホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルを含む、多様なサンプル種が使用可能である。また、本発明に記載されているように、本方法は、本明細書に開示されるサンプルにおいてH:I比（HoxB13とIL17BRの発現レベルの比）をアッセイまたは決定することを含み得る。

#### 【0077】

限定されない例として、MGIの5つ総ての遺伝子が、本明細書に開示されるように、MGIに関して「高リスク」である（カットオフを超える）値に相当する発現レベルを検出するために、またはMGIに関して「低リスク」である（カットオフ以下である）値に相当する発現レベルを検出するためにアッセイおよび使用することができる。いくつかの場合では、MGIカットオフ閾値は0（ゼロ）であってよく、例えばこの場合には、発現レベルの測定値は、標準偏差を1として、0（ゼロ）に対して正規化される。別の実施形態では、カットオフは、0.05または約0.05、0.10または約0.10、0.15または約0.15、0.20または約0.20、0.25または約0.25、-0.05または約-0.05、-0.10または約-0.10、-0.15または約-0.15、-0.20または約-0.20、-0.25または約-0.25、-0.30または約-0.30、-0.35または約-0.35、-0.40または約-0.40、-0.45または約-0.45、-0.50または約-0.50、-0.55または約-0.55、-0.60または約-0.60、-0.65または約-0.65、-0.70または約-0.70、-0.75または約-0.75、-0.80または約-0.80、-0.85または約-0.85、-0.90または約-0.90、-0.95または約-0.95、-1.0または約-1.0、-1.1または約-1.1、-1.2または約-1.2、-1.3または約-1.3、-1.4または約-1.4、-1.5または約-1.5、-1.6または約-1.6、-1.7または約-1.7、-1.8または約-1.8、-1.9または約-1.9、-2.0または約-2.0またはそれより低い値であり得る。H:I比に関して、その決定は、Ma et al., 2004 and Ma et al., 2006に記載される通りに行うことができる。例えば、サンプルが「高リスク」（ $> 0.06$ ）または「低リスク」（ $0.06$ ）H:I比を持つかを決定するためには、 $0.06$ の値を用いればよい。

#### 【0078】

従って、5つ総ての遺伝子を用いるMGIの限定されない例として閾値またはカットオフ0（ゼロ）を用いると、開示の方法は、所与のサンプルに関して、0（ゼロ）を超える値に相当する「高リスクMGI」および0の値に相当する「低リスクMGI」の、2つの可能性のあるアッセイ転帰を与える。「高リスクMGI」は、当技術分野で公知の方法および標準によって定義されるグレードIII腫瘍のリスクに類似する乳癌を含む「高リス

10

20

30

40

50

ク」癌の指標となる。「低リスクMGI」は、当技術分野で公知の方法および標準によって定義されるグレードI腫瘍のリスクに類似する乳癌を含む「低リスク」癌の指標となる。

#### 【0079】

中リスクの癌再発を決定するために使用される閾値またはカットオフは本明細書で開示されるものであってよく、またはその2%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%またはそれを超える範囲内である。

#### 【0080】

限定されない例として、癌細胞は、被験者において癌を診断するために使用される術前組織学的サンプル、または生検由来のものであってよい。このような非浸潤性乳管癌(DCIS)を有する被験者では、現行の標準治療は手術であり、DCISを除去するためには根治的乳房切除術よりも乳房温存術が好ましい。この後、多く場合、術後放射線療法、場合により、タモキシフェン、選択的エストロゲン受容体調節薬(SERM)、選択的エストロゲン受容体下方調節薬(SERD)、レトロゾールなどのアロマターゼ阻害剤(AI)による処置などの内分泌療法、抗mTOR療法(例えば、アフィニートール(登録商標)による)などの標的療法または抗HER2療法(例えば、ハーセプチン(登録商標))および/または当技術分野で公知の任意の化合物を用いた。

#### 【0081】

遺伝子発現の検出およびBCIの決定は、当然のことながら、本発明に記載のいずれの好適な細胞を含有するサンプルにおいてであってもよい。本開示で使用するための細胞の限定されない例としては、被験者から新しく単離されたもの、単離後に冷凍されたもの、および固定および/または包埋されているもの、例えば、ホルマリン固定、パラフィン包埋(FFPE)が含まれる。ほとんどの実施形態では、細胞は乳癌細胞などの乳房細胞である。

#### 【0082】

本明細書で開示されるように、BCIは、乳癌に罹患している患者において癌再発リスクを決定するために使用される。晩期再発の限定されない例としては、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法、例えば、タモキシフェンによる処置の5年後が含まれるが、4年後、3年後、または2年後もしくはそれより短い処置期間も含まれる。同様に、BCIは、上記の期間後のアナストロゾールもしくはレトロゾールなどの抗アロマターゼ療法、標的療法または抗エストロゲン作用薬療法に対する奏功性を予測するために使用してもよい。

#### 【0083】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法は、DCISサンプルなどの、被験者由来の乳癌細胞を含有するサンプルに対して有利に使用することができるが、本発明に記載の方法は、任意の非浸潤性、浸潤性乳癌、例えば、浸潤性乳管癌、浸潤性小葉癌、炎症性乳癌、男性乳癌、転移性乳癌、再発性乳癌、乳頭状癌腫、トリプルネガティブ乳癌、乳頭のパジェット病、乳房肉腫、髄様癌腫、腺管癌腫、粘液癌腫、化生性癌腫、腺囊癌腫、葉状腫瘍および血管肉腫を含む任意のタイプの乳癌とともに使用することができる。

#### 【0084】

以下の実施例2に述べられているように、BCIを用いた再発リスクは、精度の喪失無く、中リスクカテゴリーを用いずに低リスクおよび高リスクとして分類することができる。このスキームでは、例えばUS特許公開第2013/0281502号(例えば、その中の表2を参照)に記載されるような中分類は、5年以下(例えば、4年、3年、2年または1年)の再発リスクが分類される場合には低リスク群で分類することができ、5年を超える(例えば、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年またはそれを超える年数)の再発リスクが分類される場合には高リスク群で分類することができる。

#### 【0085】

10

20

30

40

50

BCIは、1～10の範囲の尺度とされ（例えば、図3、6および8参照）、中間群は約5～6.5の間のBCIスコアである。上述のように、BCIが1～10の範囲の尺度とされ、5年以下の再発リスクが分類される場合、中間群は低リスク群と一緒にすることができる。従って、低（+中）リスク群と高リスク群の間のカットオフ値は、中間群が高リスク群を満たす場合、すなわち、約6.5、例えば、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.33、7.4または7.5、またはその間の任意の値である。これらの状況下でのカットオフ値は、再発リスクが決定される年数によって（年数が少ないほど高いカットオフ点が見込まれる）、また、オペレーターがどれほど内輪に見積もって患者を低いまたは高い再発リスクを有するとして示そうとするか（すなわち、その下の指数が低再発リスクである再発パーセンテージ）によって、5.5～7.5の間であり得る。当業者ならば、過度な実験なく、所望の任意の特定の年数およびリスクレベルに関する適正なBCIスコアを決定することができる。

10

**【0086】**

同様に、BCIが1～10の範囲の尺度とされ、5年を超える再発リスクが分類される場合、中間群は高リスク群と一緒にすることができ、低リスク群と高（+中間）群の間のカットオフは、中間群が低リスク群を満たす点、すなわち、約5、例えば、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、または6.0、またはその間の任意の値となる。

20

**【0087】**

上記の具体的シナリオは、乳癌診断後のタモキシフェン、標的療法またはアロマターゼ阻害剤によるいずれかの前処置（初期処置）および/または外科的介入の後に低リスクの患者に対して、BCI検査はさらなる全身療法の選択肢を提供しないことができることを示す。例えば、初期アジュバントタモキシフェン後に高再発リスクの患者（高H O X B I 3 / T L 1 7 B Rを有する患者）は、アロマターゼ阻害剤レトロゾールに切り替えた長期ホルモン療法から利益を受ける。これらの患者は高いH : I比またはBCIスコアを示すと思われる。しかしながら、初期アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法の、再発リスクの高い患者は、長期アジュバントホルモン療法から、または実際にはいずれの全身療法からも利益を受ける場合あれば受けない場合もある。それらの患者はまた試験治療アプローチの候補でもあり得る。しかしながら、本開示は、それらの患者のより適正なトリアージュを助ける手段としてBCIを提供する。

30

**【0088】**

いくつかの実施形態では、計算されたBCIは低リスクまたは中リスクを示すので、計算されたBCIは、5年以下の初期期間中、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法、例えば、タモキシフェンで処置された場合の被験者において低リスク遠隔再発を示す。よって、この被験者は、最初の5年の期間、低再発リスクでアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法により処置することができる。この初期期間の後、計算されたBCIが中リスクであれば、指示内容は、さらに5年の期間にアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置されない場合、被験者は癌再発が高リスクとなるというものである。

40

**【0089】**

他の実施形態では、計算されたBCIは高リスクまたは中リスクであるので、計算されたBCIは、5年以下の初期期間中、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法、例えば、タモキシフェンで処置された場合の被験者において高リスク遠隔再発を示す。よって、この被験者は、成功の期待が弱いながらアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置することができる。いくつかの場合では、被験者は、初期期間中、限定されない例として化学療法または放射線療法などの付加的療法でさらに処置してもよい。

**【0090】**

本開示は、被験者を、5年以下の期間など、初期抗アロマターゼ、標的療法または内分

50

泌療法の過程中的無再発生存期間の後に付加的療法から利益を受けると期待されるとして同定することを含む。

【 0 0 9 1 】

従って、本開示は、アジュバントタモキシフェン療法などの初期抗アロマターゼ療法、標的療法または内分泌療法後に、被験者における癌再発の高い見込みの指標としての B C I を決定することを含む。よって、これらの方法は、被験者を、局所癌再発または遠隔癌再発を受ける、見込みがあるまたはないとして同定することを含む。限定されない例として、長期の初期治療後療法の不在下での再発の見込みの決定は、その後最大 5 年またはそれを超える期間適用可能である。

【 0 0 9 2 】

本発明はまた、連続変数として計算された B C I の一部として、またはそれに関連して個々のリスク評価を行うことによって乳癌被験者における癌再発リスクを決定することを提供する。本明細書に開示されるように、乳癌サンプルの集団における B C I の決定は、B C I が乳癌に罹患している被験者の癌再発リスクと相関する連続変数であることを示す。よって、再発リスクは、B C I 値の増加とともに直線的関係で増加する。いくつかの実施形態では、連続変数としての B C I 値の範囲を個々の乳癌サンプルについて決定された B C I 値と比較して、癌再発リスクを低リスク、中リスク、または高リスクとして評価する。

【 0 0 9 3 】

本明細書に開示される追加のまたは続いての期間の処置または療法は、第一選択（初期）療法後の、例えば、直後、第一選択療法終了後 3 か月以内、第一選択療法終了後 6 か月以内、第一選択療法終了後 9 か月以内、第一選択療法終了後 1 2 か月以内、第一選択療法終了後 1 8 か月以内、または第一選択療法終了後 2 4 か月以内（またはそれを超える）などのいつ行ってもよい。

【 0 0 9 4 】

高再発リスクまたは低再発リスクを同定するための予後能は、処置コースを決定する手段となり得る情報を提供する。例えば、B C I が、その被験者（例えば、患者）が、5 年以下の初期期間中、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法、例えば、タモキシフェンで処置された場合に、高い遠隔再発リスクを有することを示す場合には、このような療法は禁忌となり、化学療法などの他の療法に置き換え可能である。

【 0 0 9 5 】

逆に、B C I が、その被験者が、5 年以下の初期期間中、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法、例えば、タモキシフェンで処置された場合に、低い遠隔再発リスクを有することを示す場合には、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による処置が指示され得る。

【 0 0 9 6 】

加えて、B C I が、さらに 5 年の期間、その被験者がアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置されない場合に、高い遠隔再発リスクを有することを示す場合には、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法または別のアジュバント療法による処置が指示され得る。

【 0 0 9 7 】

他の実施形態では、被験者は、最大 5 年の期間中、癌再発なく、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による処置を受けたと同定される。この被験者は次に、被験者の腫瘍の B C I 値に基づき、処置の終了後に癌の高い遠隔再発リスクを有する、または有しないと分類される。被験者が高い再発リスクを有する場合には、その被験者は次に、追加の期間、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置される。

【 0 0 9 8 】

知られているように、高い H O X B 1 3 / I L 1 7 B R 指数は、アジュバント内分泌処置の利益に関して予後能があるだけでなく予測能もある。米国特許第 7, 5 0 4, 2 1 4 号および P C T 特許公開第 W O / 2 0 1 2 / 0 7 9 0 5 9 号参照。実施例 2 に述べられて

10

20

30

40

50

いるように、BCI - Cの奏功性予測能は、H O X B 1 3 / I L 1 7 B R 予後および内分泌処置予測の二重特性と混同される場合がある。対照的に、BCI - Lは、M G IとH O X B 1 3 / T L 1 7 B Rの相加的機能のみを含み、臨床転帰が乳癌の自然歴を表した非処置群の乳癌被験者において開発されたものである。実施例2で報告された所見は、BCI - LがH O X B 1 3 / I L 1 7 B Rの内分泌処置予測特性の交絡効果をなしで済ませ、結果として、BCI - LはH O X B 1 3 / I L 1 7 B RとM G Iの組合せの好ましい予後形態であることを示唆する。

#### 【0099】

第2の態様において、本開示は、5年以下のアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による初期治療後の処置、例えば、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による追加処置に対する奏功性を同定する方法を提供する。いくつかの実施形態では、追加処置は、初期治療期間後、5年以上の期間である。

10

#### 【0100】

よって、さらなる実施形態では、本発明は、乳癌に罹患している被験者の長期処置の必要性を決定する方法を対象とする。本方法は、

前記被験者由来のE R + 乳癌細胞のサンプルにおいてH o x B 1 3、I L 1 7 B R、B u b 1 B、C E N P A、N E K 2、R A C G A P 1、およびR R M 2のm R N A 発現レベルを決定すること；

前記発現レベルを合計して乳癌指数（BCI）値とし、より低いBCI値が、5年以下のアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による初期治療後にアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法によるさらなる追加処理を必要としないことと相関すること；および

20

前記サンプルをBCIに基づき、追加処置の必要が有ることまたは無いことを示すとして分類すること

を含んでなる。

#### 【0101】

治療選択肢を提供するために、再発リスクを識別するBCIの能力と処置に対する奏効を組み合わせることができる。

#### 【0102】

よって、本発明はまた、乳癌に罹患している被験者を処置する方法を対象とする。本方法は、

30

前記被験者由来のE R + 乳癌細胞のサンプルにおいてH o x B 1 3、I L 1 7 B R、B u b 1 B、C E N P A、N E K 2、R A C G A P 1、およびR R M 2のm R N A 発現レベルを決定すること；

前記発現レベルを合計して乳癌指数（BCI）値とし、より低いBCI値が、（a）5年以下のアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による初期処置後のアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法による追加処置に対する奏功性、および（b）より低い遠隔再発リスク；より遠隔再発リスクと相関すること；および

前記被験者に前記被験者のBCI値決定と一致した処置を施すこと

を含んでなる。

40

#### 【0103】

いくつかの実施形態では、BCI分析は、5年以下の初期期間中にアロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置された場合の被験者において高い遠隔再発リスクを示す。このような被験者は化学療法で処置されてよい。

#### 【0104】

他の実施形態では、BCI分析は、5年以下の間、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置された場合の被験者において低い遠隔再発リスクを示す。このような被験者は、最初の5年の期間、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置された後、長期療法を受けなくてよい。

#### 【0105】

50

さらなる実施形態では、BCI分析は、さらに5年の期間中、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法で処置されない場合の被験者において高い遠隔再発リスクを示す。このような被験者は、アロマターゼ阻害剤、標的療法または内分泌療法または別のアジュバント療法で処置されてよい。上記方法はいずれも、閉経前の女性および閉経後の女性における臨床奏功性の予後因子または予測因子の決定に有用であり得る。閉経後の女性は50歳を超える女性と定義され、閉経前の女性は50歳未満の女性と定義され得る。いくつかの態様では、これらの女性は、抗アロマターゼ、標的療法または内分泌療法による処置を受けており、その期間、無癌を維持した。

#### 【0106】

さらなる実施形態では、本開示は、夾雑細胞から切り離された、またはそうでなければ単離もしくは精製された単細胞または均質な細胞集団からグローバルな、またはグローバルに近い遺伝子発現を分析することによる、単純生検によって可能なものを超える遺伝子発現パターンの同定を提供する。多くの遺伝子の発現は異なる患者由来の細胞間で、ならびに同じ患者サンプルに由来する細胞間で変動するので、遺伝子発現のレベルは、その発現が患者の細胞でまたは患者間で比較的一定している1以上の「対照」または「標準化」遺伝子と比較して決定することができる。

#### 【0107】

このアプローチの1つの利点は、夾雑する非癌細胞（例えば、浸潤リンパ球または他の免疫系細胞は、同定される遺伝子またはその後の患者の癌再発および/または生存転帰を同定するための遺伝子発現の分析に影響を及ぼす可能性があるほどには存在しない。このような夾雑は、多くの細胞種を含有する生検が遺伝子発現プロファイルのアッセイに使用される場合に存在する。

#### 【0108】

本開示は主として、乳癌などのヒト癌に関して記載されるが、いずれの動物の癌に関して実施してもよい。本開示の適用に好ましい動物は哺乳動物、特に、農業適用に重要なもの（例えば、限定されるものではないが、ウシ、ヒツジ、ウマ、および他の「農用動物」）、癌の動物モデル、およびヒト伴侶動物（例えば、限定されるものではないが、イヌおよびネコ）である。

#### 【0109】

本開示より提供される方法はまた、全体的にまたは部分的に自動化可能である。

#### 【0110】

#### キット

本開示の方法において使用するための材料は、周知の手順に従って製造されたキットの調製に適合しているのが理想的である。よって、本開示は、腫瘍グレードを分類するまたは癌転帰を決定するための開示遺伝子の発現を検出するための薬剤を含んでなるキットを提供する。このようなキットは場合により、薬剤を、本開示の方法におけるそれらの使用に関する識別記述またはラベルまたは説明とともに含んでなる。このようなキットは、例えば、既製マイクロアレイ、バッファー、適当なヌクレオチド3リン酸（例えば、dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP；またはrATP、rCTP、rGTPおよびUTP）、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、および本開示の1以上のプライマー複合体（例えば、適当な長さのポリ（T）またはRNAポリメラーゼと反応製のあるプロモーターに連結されたランダムプライマー）を含む、本方法で使用される種々の試薬（一般に、濃縮形態）の1以上をそれぞれ含む容器を含んでなり得る。説明書一式もまた一般に含まれる。

#### 【0111】

以下の実施例に好ましい実施形態を記載する。本明細書の特許請求の範囲内の他の実施形態は、本明細書に開示される明細または実施を考慮すれば当業者には自明である。明細は実施例とともに単に例と考えられ、本発明の範囲および趣旨は、実施例の後にある特許請求の範囲によって示されるものとする。

#### 【実施例】

## 【0112】

## 実施例 1

## 試験計画および患者

前向き比較研究では、組織サンプルを、橋渡し研究を支援するための A T A C 試験の単剤療法群に由来する、エストロゲン受容体陽性乳癌を有する閉経後の患者からのホルマリン固定パラフィン包埋 ( F F P E ) 原発腫瘍ブロックの組織バンクを確立するために 2 0 0 2 年に開始された T r a n s A T A C プロジェクトから得た (Paik et al., 2004; Dows ett et al., 2010)。ローカル検査に従ってエストロゲン受容体およびプロゲステロン受容体陰性であることが分かっているもの、および A T A C 試験の組合せ処置群に無作為に割り付けられたものを除き、21 遺伝子再発スコアおよび I H C 4 がすでに計算されている総ての患者の保存用腫瘍ブロックを要求した。本研究は、サウスイースト・ロンドン・リサーチ倫理委員会およびマサチューセッツ総合病院治験審査委員会によって承認されたものである。患者からは、患者の組織がさらなる治験に使用されることに関して書面による同意を得た。

10

## 【0113】

## 手順

事前に、21 遺伝子再発スコアを計算および試験するために、U K 患者の T r a n s A T A C 組織バンクからの F F P E ブロック (これらのサンプルは収集物の 7 9 % を占めた) から R N A を抽出する研究を行った (Paik et al., 2004)。次に、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、H E R 2、K i - 6 7 および腫瘍グレード評価のための免疫組織化学分析法を行い、I H C 4 および臨床治療スコア (腫瘍のサイズおよびグレード、リンパ節の状態、年齢、および処置の古典的変数を用いる予後モデル) を、組織が 21 遺伝子再発スコアを計算するために使用された同じ患者 (これらの患者からは十分な追加組織が入手可能であった) からの組織サンプルを用いて計算した。

20

## 【0114】

本研究では、十分な残余 R N A がある、従前の研究で使用したのと同じ適合サンプルを使用し、B C I 分析を行った。これらの遺伝子を検査し、プライマーおよびプローブ配列を分析し、従前に報告されているように (米国特許第 7, 9 3 0, 1 0 5 号および同第 7, 5 0 4, 2 1 4 号、U S 特許公開第 2 0 1 1 / 0 1 3 6 6 8 0 号および同第 2 0 1 3 / 0 2 8 1 5 0 2 号、および P C T 特許公開第 W O / 2 0 1 2 / 0 7 9 0 5 9 号)、H O X B 1 3 / I L 1 7 B R および M G I を計算するために R T - P C R 手順を行った。所定の 2 つの B C I モデルを試験した。これらのモデルは、変数のキュービックおよび線形組合せに基づきキュービック型 ( B C I - C ) と線形 ( B C I - L ) であった。

30

## 【0115】

B C I スコアは最終スコア ( 0 ~ 1 0 ) に直線的に尺度化した。群は低リスク、中リスク、および高リスクとして識別され、各モデルの所定のカットオフ点は: B C I - C 低リスク ( < 5 . 0 点 )、B C I - C 中リスク ( 5 . 0 ~ 6 . 4 )、および B C I - C 高リスク ( > 6 . 4 ) ; および B C I - L 低リスク ( < 5 . 0 8 2 5 点 )、B C I - L 中リスク ( 5 . 0 8 2 5 ~ 6 . 5 0 2 5 )、および B C I - L 高リスク ( > 6 . 5 0 2 5 ) であった。21 遺伝子再発コア (21-gene recurrence core) リスク群は、従前に報告されているように同定した (Paik et al., 2004)。3 つの I H C 4 リスク群は、T r a n s A T A C コホートにおいてそれぞれ 1 0 % および 2 0 % の 1 0 年遠隔再発率に相当する 2 つのカットオフ点を用いて確立した (すなわち < 1 0 %、> 1 0 % ~ 2 0 %、および > 2 0 % )。I H C 4 カットオフは、独立に妥当性評価が行われていない。

40

## 【0116】

遠隔再発は、反対側性疾患、局所領域再発および同側性再発、ならびに他の二次的な原発性癌を除く、遠隔器官における総ての再発を指す一次エンドポイントとして前向きに定義した。また、局所領域再発の後に遠隔再発の時点で一事象として起こった遠隔再発も含めた。遠隔再発前に死亡した患者は場外した。全再発、乳癌により死亡、および全生存期間 (原因によらず死亡するまでの期間) を二次エンドポイントと定義した。一次分析集団

50

はエストロゲン受容体陽性、N0乳癌を有する患者であり、二次分析集団は、エストロゲン受容体陽性、N0、HER2陰性乳癌を有する患者、およびエストロゲン受容体陽性、リンパ節転移陽性乳癌を有する患者を含んだ。一次研究目標は、エストロゲン受容体陽性、N0乳癌を有する患者における遠隔再発に関するBCI-Cモデルの全体的な(0~10年)予後能の評価と前向きに定義された。二次的な目標は、BCI-Lモデルとその成分、HoxB13/IL17BRおよびMGIの予後能を全体(0~10年)、早期(0~5年)、および晩期(5~10年)遠隔再発に関して評価すること、ならびにBCI-Lの能力を再発スコアおよびIHC4の能力と比較することであった。

【0117】

#### 統計分析

統計分析プランは、試験開始前にATACおよびLATIE(長期アナストロゾール対タモキシフェン処置効果(Long-term Anastrozole versus Tamoxifen Treatment Effects))治験の運営委員会により承認された。早期遠隔再発は、診断5年後の全患者の経過観察の打切りにより評価した。晩期遠隔再発は、その早期再発の予後効果が除かれた後に遺伝子シグネチャーが予後能を維持していたかどうかを評価するために、少なくとも5年間、無遠隔再発で留まった患者のサブセット内で評価した。Cox比例ハザード回帰モデルに基づく尤度比検定を用い、臨床治療スコアに基づく減法比例ハザードモデル(reduced proportional hazards model)と、BCI、21遺伝子再発コア(21-gene recurrence core)、またはIHC4を含む全比例ハザードモデルの間の有意差に関して検定した。予測の改善は、臨床治療スコアに比較してタイル遺伝子シグネチャーにより比例ハザードモデルに加えられた情報量の評価する尤度比 $\chi^2$ (LR- $\Delta\chi^2$ )値の変化によって定量した。IHC4はTransATACサンプルのサブセットにおいて開発されたものであり、潜在的な過剰充填に関して補正を行うために、従前に記載の通りにサンプル分割を行った。 Kaplan-Meier生存分析を用いて、BCIの3つの所定のリスク群において遠隔再発を有する患者の割合をグラフ表示し、それらの曲線の質をログランク検定で検定した。

【0118】

遠隔再発リスクを、全体(0~10年)、早期(0~5年)、および晩期(5~10年)遠隔再発に関してCox比例ハザードモデルから得られた線形共変量としてのBCIの関数として計算した。BCI、21遺伝子再発スコア、およびIHC4を比較するために、四分位数ハザード比(HR)を、バイオマーカーの連続スコアの75パーセンタイル対25パーセンタイルとCox比例ハザードモデルからの関連の95%CIを比較することにより評価した。0.05未満の両側p値を統計的に有意と見なした。再発スコアはTransATACにおいてすでに検討され、これらの患者のサブセットにおいてIHC4が開発されていたことから、連続スコアとしての21遺伝子再発スコアおよびIHC4の能力はすでに指定されたものであり、いずれの多重検定補正も行われなかった。統計分析はSTATAバージョン12.1を用いて行った。

【0119】

#### 実施例2

#### 患者およびサンプル

21遺伝子再発スコア、IHC4、およびBCIを用いた値を915名(そのうち665名はエストロゲン受容体陽性、N0乳癌)の女性に関して計算した(図1)。これら665名の患者の臨床的特徴を表2に示し、ATAC試験に参加したがTransATACには属していなかったエストロゲン受容体陽性、N0乳癌を有する561名のUK患者の特徴と比較する。非TransATACコホートでTransATAC患者よりも有意に十分に分化した腫瘍が多く、分化度の低い腫瘍が少なく、晩期遠隔再発が有意に少なかったこと以外は、これらの2つの群の間に有意差はなかった。

【0120】

10

20

30

40

【表 1】

表 1 患者の人口統計的および臨床的特徴

|            | N0 BCI コホート<br>TransATAC<br>(n=665) | N0 HER2neg<br>BCI コホート<br>TransATAC (n=597) | N0 UK 患者<br>非 TransATAC*<br>(n=561) | P 値#   |    |
|------------|-------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------|--------|----|
| 年齢平均(SD)   | 63.3(8.1)                           | 63.4(8.0)                                   | 62.6(7.8)                           | 0.12   |    |
| BMI 平均(SD) | 27.1(4.8)                           | 27.2 (4.8)                                  | 26.8(5.1)                           | 0.28   |    |
| 腫瘍サイズ      |                                     |                                             |                                     | 0.13   | 10 |
| <2cm       | 486(73.1%)                          | 442(74.1%)                                  | 432(77.0%)                          |        |    |
| 2-3cm      | 144(21.7%)                          | 125(20.9%)                                  | 95(16.9%)                           |        |    |
| >3cm       | 35(5.2%)                            | 30(5%)                                      | 29(5.2%)                            |        |    |
| 未知         | 0                                   | 0                                           | 5(0.9%)                             |        |    |
| 腫瘍グレード     |                                     |                                             |                                     | 0.0051 |    |
| 分化度高       | 143 (21.5%)                         | 138(23.1%)                                  | 155(27.6%)                          |        |    |
| 分化度中       | 395(59.4%)                          | 357(59.8%)                                  | 300(53.5%)                          |        |    |
| 分化度低       | 127 (19.1%)                         | 102 (17.1%)                                 | 78(13.9%)                           |        | 20 |
| 未知         | 0                                   | 0                                           | 28(5.0%)                            |        |    |
| 放射線療法      |                                     |                                             |                                     | 0.95   |    |
| 無し         | 220(33.1%)                          | 189(31.7%)                                  | 187 (33.3%)                         |        |    |
| 有り         | 445(66.9%)                          | 408(68.3%)                                  | 374(66.7%)                          |        |    |
| 乳房切除       |                                     |                                             |                                     | 0.86   |    |
| 無し         | 439(66.0%)                          | 404(67.7%)                                  | 374(66.7%)                          |        |    |
| 有り         | 226(34.0%)                          | 193(32.3%)                                  | 187 (33.3%)                         |        |    |
| 処置         |                                     |                                             |                                     |        | 30 |
| アナストロゾール   | 337(50.7%)                          | 309(51.8%)                                  | 285(50.8%)                          | 0.95   |    |
| タモキシフェン    | 328 (49.3%)                         | 288(48.2%)                                  | 276(49.2%)                          |        |    |
| 遠隔再発       |                                     |                                             |                                     |        |    |
| 早期(0-5 年)  | 33(5.0%)                            | 21(3.5%)                                    | 23(4.1%)                            | 0.56   |    |
| 晩期(5-10 年) | 39(5.9%)                            | 36(6.6%)                                    | 12(2.3%)                            | 0.0022 |    |

\*これらは橋渡し研究に利用可能な腫瘍ブロックが無い、ATAC 試験における英国の患者である。

40

#比較は N0 TransATAC コホートと N0 非 TransATAC コホート間である。年齢と BMI には t 検定を用い、遠隔再発には正規近似に基づく比較検定を用い、他は総てフィッシャーの直接確率検定を用いた。

略号: ER、エストロゲン受容体; N0、リンパ節転移陰性; HER2neg、ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2 陰性; BMI、体格指数; UK、英国

BCI TransATAC コホートの N0 女性の中には、乳房切除後の 72 名の遠隔再発および 7 名の局所再発を含む 106 名の再発があった。BCI TransATAC コホートの経過観察期間中央値は 9.97 年 (IQR 8.5 ~ 10) であった。

【0121】

50

## H / I および M G I の計算

一般に、また、M G I に関して、開示遺伝子の発現レベルを合わせて、強力な予後因子および臨床転帰の予測因子として役立つ単一の指数とすることが好ましい。この指数は使用した遺伝子の発現レベルの総和であり、2 つ以上の開示遺伝子の各場合を合わせて単一の指数とするために、主成分分析 ( P C A ) から決定された係数を用いる。これらの係数は、代表データセットの各遺伝子の発現レベルの標準偏差、および各サンプルの各遺伝子の発現値などの因子によって決定される。代表データセットは、本明細書に開示されている参照遺伝子の平均発現値に基づいて品質管理される。

### 【 0 1 2 2 】

言い換えれば、例えば、マイクロアレイ、次世代シーケンシングまたは R T - P C R からこれらの 5 つの遺伝子の正規化された発現レベルを、各データセット内のサンプルで平均値 0 および標準偏差 1 に標準化した後、第 1 の主成分を用いる P C A により各サンプルについて合わせ、単一の指数とした。異なるプラットフォーム ( マイクロアレイ、シーケンシングおよび r t P C R ) およびサンプルタイプ ( 冷凍および F F P E ) を考慮するためには、各データセット内の一次発現データの標準化が必要であった。結果として、また、スケーリングパラメーターに従い、指数を定義する発現値の総和を求める式が作成される。次に、スケーリングパラメーターの精度は、データセットの遺伝子の発現レベルの平均値、標準誤差、および標準偏差 ( 信頼区間を持つ ) に基づいて検定することができる。よって、この指数のための式の作成は、データセット、参照遺伝子、および M G I の遺伝子に依存する。

### 【 0 1 2 3 】

H O X B 1 3 : I L 1 7 B R 比は、従前に記載されているように ( Ma et al., 2006 )、H O X B 1 3 と I L 1 7 B R の間の、標準化した発現レベルの違いとして計算した。表 2 のコホートを標準化するために用いた H O X B 1 3 および I L 1 7 B R の平均値および標準偏差は、エストロゲン受容体陽性、リンパ節転移陰性乳癌患者の別集団に基づくコホートからの 1 9 0 の F F P E 組織切片の分析から導くことができる。

### 【 0 1 2 4 】

M G I では、明らかに異常な生の C T 値を、各遺伝子および各サンプルについて 2 反復の値の平均を求める前に除いた。次に、各遺伝子に関して平均をとった生 C T 値を、4 つの参照遺伝子 ( A C T B、H M B S、S D H A、および U B C ) の平均 C T 値により正規化した。正規化発現レベル ( C T ) を 0 などの所定のカットオフ値と比較し、高い M G I はカットオフを超え、低 M G I はカットオフより小さい。

### 【 0 1 2 5 】

## 乳癌指数 ( B C I )

B C I は、H : I および M G I を連続変数として連結することにより構築される。これらの 2 変数の直線性を、制限キュービックスプラインを備えた C o x 比例ハザード回帰モデルの当てはめを行うことにより確認したところ、H : I は有意な非直線性を示した。赤池情報量規準を用いた制限モデルを近似されるために H : I の多項式関数を用いた。最終的な C o x 回帰モデルから得られた予測因子を次に 0 ~ 1 0 の範囲に尺度化し直し、これが B C I と呼ばれる。

### 【 0 1 2 6 】

B C I は、本発明に記載のように低リスク、中リスク、および高リスクの 3 つのレベルにさらに分類される。

### 【 0 1 2 7 】

H / I カットポイント： 本試験では、アジュバントタモキシフェンにより処置された患者を低再発リスクおよび高再発リスクに階層化するために従前に定義された H O X B 1 3 : I L 1 7 B R 比に関する 0 . 0 6 のカットポイントを使用した。

### 【 0 1 2 8 】

6 6 5 名のエストロゲン受容体陽性、N 0 患者において、B C I - C モデルのカプラン - マイヤー分析は、腫瘍のサイズおよびグレード、年齢、および処置の効果 ( 臨床治療ス

10

20

30

40

50

コアで決定；図 2 A 参照）に關しての補正後に、所定のカテゴリ－BCI - C リスク群間で 10 年の期間の絶對的遠隔再発に有意差を示し（ $p < 0.001$ ）、また、低リスク群と他のリスク群の間で HR に違いを示した。定義されたカットオフを有するサブグループとしてではなく連続変数として分析した BCI - C は、臨床治療スコアに關して補正した場合の全（0 ~ 10 年）遠隔再発リスクと有意な關連が無かった（四分位間 HR 1.39；LR -  $\Delta \chi^2 = 3.70$ ； $p = 0.054$ ）。

【0129】

同じ患者集団における BCI - L の評価は、このバージョンは、臨床治療スコアに關して補正した場合の BCI - C よりも全遠隔再発リスクとはるかに強い關連があった（四分位間 HR 2.30；LR -  $\Delta \chi^2 = 22.69$ ； $p < 0.0001$ ；表 2）。

10

【0130】

【表 2】

表 2

|                    |         | 全再発(0-10 年)     |                          | 早期再発(0-5 年)     |                          | 晚期再発(5-10 年)    |                          |
|--------------------|---------|-----------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------|--------------------------|
|                    |         | HR* (95%CI)     | LR-ΔX <sup>2</sup> (p 値) | HR* (95%CI)     | LR-ΔX <sup>2</sup> (p 値) | HR* (95%CI)     | LR-ΔX <sup>2</sup> (p 値) |
| 単変量                |         |                 |                          |                 |                          |                 |                          |
| <u>BCI</u>         |         |                 |                          |                 |                          |                 |                          |
| N0                 |         | 3.12(2.25-4.32) | 49.07(p<0.0001)          | 4.11(2.52-6.70) | 34.58(p<0.0001)          | 2.47(1.59-3.83) | 17.37(p<0.0001)          |
| N0                 | HER2 陰性 | 3.30(2.30-4.73) | 46.03(p<0.0001)          | 4.22(2.32-7.64) | 25.86(p<0.0001)          | 2.84(1.80-4.48) | 22.66(p<0.0001)          |
| <u>21 遺伝子再発スコア</u> |         |                 |                          |                 |                          |                 |                          |
| N0                 |         | 1.64(1.39-1.94) | 27.37(p<0.0001)          | 1.96(1.60-2.41) | 28.09(p<0.0001)          | 1.28(0.95-1.72) | 2.99(p=0.21)             |
| N0                 | HER2 陰性 | 1.89(1.45-2.47) | 19.55(p<0.0001)          | 2.38(1.61-3.53) | 16.18(p<0.0001)          | 1.59(1.09-2.31) | 6.65(p=0.014)            |
| <u>IHC4</u>        |         |                 |                          |                 |                          |                 |                          |
| N0                 |         | 2.30(1.80-2.95) | 40.90(p<0.0001)          | 3.38(2.39-4.78) | 42.46(p<0.0001)          | 1.55(1.06-2.26) | 5.58(p=0.022)            |
| N0                 | HER2 陰性 | 2.66(1.85-3.81) | 27.04(p<0.0001)          | 4.08(2.26-7.36) | 22.13(p<0.0001)          | 2.06(1.29-3.28) | 9.32(p=0.0034)           |
| 臨床治療スコアを含む多変量      |         |                 |                          |                 |                          |                 |                          |
| <u>BCI</u>         |         |                 |                          |                 |                          |                 |                          |
| N0                 |         | 2.30(1.62-3.27) | 22.69(p<0.0001)          | 2.77(1.63-4.70) | 15.42(p<0.0001)          | 1.95(1.22-3.14) | 7.97(p=0.0048)           |
| N0                 | HER2 陰性 | 2.49(1.68-3.68) | 21.99(p<0.0001)          | 3.26(1.96-6.30) | 13.65(p=0.00023)         | 2.12(1.30-3.47) | 9.453(p=0.0021)          |
| <u>21 遺伝子再発スコア</u> |         |                 |                          |                 |                          |                 |                          |

10

20

30

40

|            |                 |                 |                 |                 |                 |               |
|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| N0         | 1.48(1.22-1.78) | 13.68(p=0.0002) | 1.80(1.42-2.29) | 18.48(p<0.0001) | 1.13(0.82-1.56) | 0.48(p=0.47)  |
| N0 HER2 陰性 | 1.52(2.15-2.02) | 7.65(p=0.0055)  | 1.93(1.26-2.96) | 8.37(p=0.0041)  | 1.28(0.87-1.88) | 1.33(p=0.28)  |
| IHC4       |                 |                 |                 |                 |                 |               |
| N0         | 1.69(1.51-2.56) | 22.83(p=0.0001) | 2.90(2.01-4.18) | 29.14(p<0.0001) | 1.30(0.88-1.94) | 1.59(p=0.20)  |
| N0 HER2 陰性 | 2.13(1.45-3.14) | 13.75(p=0.0002) | 3.41(1.83-6.39) | 13.83(p<0.0001) | 1.61(0.98-2.66) | 3.30(p=0.086) |

HR=ハザード比、LR=ΔX<sup>2</sup>=尤度比統計量に基づく X<sup>2</sup> 値の変化。BCI=乳癌指数アッセイ。N0=リンパ節陰性、IHC4=4つの免疫組織学的マーカー(エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2、および Ki-67)。\*HR は各バイオマーカーの連続スコアの IQR 間として計算し、IHC4の HR および X<sup>2</sup> を計算するためにサンプル分割を用いた。

10

20

30

40

50

# 【 0 1 3 1 】

カプラン - マイヤー曲線は、所定の B C I - L リスク群に従って絶対的遠隔再発率に明らかな違いを示す ( p < 0 . 0 0 1 ; 図 2 B ) 。全 1 0 年遠隔再発リスクは B C I - L の増加とともに直線的に増加した ( 図 3 ) 。

# 【 0 1 3 2 】

5 9 7 名の患者の H E R 2 陰性、N 0 サブセットでは、B C I - C および B C I - L の両方が全遠隔再発リスクと有意に関連していた ( B C I - C 四分位間 H R 1 . 6 5 、 L R

-  $\Delta \chi^2 = 6.61$ 、 $p = 0.0001$ ；BCI - L 四分位間HR 2.49、LR -  $\Delta \chi^2 = 21.9$ 、 $p < 0.0001$ ；表2）。両形態のBCIに関する所定群のカプラン・マイヤー曲線は、絶対的遠隔再発に明瞭な違いを示した（図4A - BCI - C；4B - BCI - L）。

#### 【0133】

BCI - LとBCI - Cの予後能を比較したところ、BCI - Cとは異なり、BCI - Lは続変数としてもカテゴリ変数としても再発リスクの有意な予測因子であり、臨床治療スコアに関する補正後のHRは、BCI - CおよびBCI - Lの高リスク群と低リスク群の間でそれぞれ2.19と4.86であった。続いての以下の考察では線形モデル（ここではBCIと呼ぶ）を用いる。

10

#### 【0134】

##### BCIに基づく群

BCIは、臨床治療スコアに関して補正した場合、早期（0～5年）遠隔再発リスクと有意な関連があった（表3）。カプラン・マイヤー曲線（図5A）は、5年の絶対的遠隔再発率に違いを示した。3つのリスク群が事前に指定されたが、所定のカプラン・マイヤー分析からの結果は、低リスク患者と中リスク患者が同等の遠隔再発率を持っていたこと、および高リスク患者群とが明瞭に異なる一群を構成していることを示した。

#### 【0135】

事後カプラン・マイヤー分析は、BCI低リスク群と中リスク群の間で5年遠隔再発にほとんど違いを示さず、これらは665名のうち556名（84%）の患者（PI）を含み、合わせた5年遠隔再発率は2～6%であった（表3）。

20

#### 【0136】

##### 【表3】

表3 臨床関連のあるER+ N0患者のサブセットにおける絶対的早期および晩期遠隔再発リスク

##### 早期再発(0-5年)

| リスクサブセット          | N(%)      | 5年早期DRリスク(95% CI)     |
|-------------------|-----------|-----------------------|
| P1 (BCI 低および中リスク) | 556 (84%) | 2.6% (1.5% - 4.3%)    |
| P2 (BCI 高リスク)     | 109 (16%) | 18.1% (12.0% - 27.0%) |

30

##### 晩期再発(5-10年)

| リスクサブセット          | N(%)      | 5年早期DRリスク(95% CI)    |
|-------------------|-----------|----------------------|
| P3 (BCI 低リスク)     | 366 (61%) | 3.5% (2.0% - 6.1%)   |
| P4 (BCI 中および高リスク) | 230 (39%) | 13.4% (9.3% - 19.0%) |

#### 【0137】

665名の患者のうち109名（16%）を含んだBCI高リスク群（P2）の5年遠隔再発率は18.1%であった。臨床治療スコアに関して補正した場合、PIとP2の間のHRは4.61であった。

40

#### 【0138】

晩期（5～10年）再発では、BCIは、臨床治療スコアに関して補正した場合、遠隔再発リスクと有意に関連していた（表2）。カプラン・マイヤー曲線は、BCI低リスク群、中リスク群、および高リスク群に関して、5～10年の絶対的遠隔再発率に違いを示した（図5B）。所定のカプラン・マイヤー分析からの結果は、中リスク患者と高リスク患者は極めて類似した再発率を持ち、低リスク患者の集団とは明瞭に異なった一集団を構成することを示した。さらなる事後カプラン・マイヤー分析（表3）は、BCI低リスク

50

群 ( P 3 ) の 5 ~ 1 0 年遠隔再発率が 3 . 5 % であり、 1 3 . 4 % の再発率である B C I 中リスク群と高リスク群を合わせたもの ( P 4 ) とは実質的に異なっていることを示した。臨床治療スコアに関して補正すると、 P 3 と P 4 の間の H R は 2 . 9 4 であった。遠隔再発リスクは、早期再発と晩期再発の両方に関して、 B C I 値の増加とともに直線的に増加した ( 図 6 A および 6 B ) 。

#### 【 0 1 3 9 】

##### H E R 2 の状態

エストロゲン受容体陽性、 H E R 2 陽性乳癌の自然歴はエストロゲン受容体陽性、 H E R 2 陰性乳癌の場合と異なっているので、全 N 0 エストロゲン受容体陽性 T r a n s A T A C コホートにおける B C I の予後能が、 H E R 2 陽性患者のサブセットの包含によって過度に影響を受けたかどうかを評価するためにサブセット分析を行った。 5 9 7 名の患者 ( 全供試研究群の 9 0 % ) の H E R 2 陰性 N 0 サブセットにおいて、 B C I は早期遠隔再発および晩期遠隔再発のリスクに有意に関連しているとともに ( 表 2 ) 、 B C I リスク群による絶対的遠隔再発に明瞭な違いがあった ( 図 7 ) 。早期再発と晩期再発の両方に関して、遠隔再発リスクは B C I 値の増加とともに増加した ( 図 8 ) 。

#### 【 0 1 4 0 】

##### アロマターゼ阻害剤および内分泌療法

全患者の 2 1 遺伝子再発コア ( 21-gene recurrence core ) および I H C 4 リスク群の全 ( 0 ~ 1 0 年 ) 遠隔再発のカプラン - マイヤー曲線を、処置群 ( アナストロゾールまたはタモキシフェン ) に従って別々に図 9 に示す。合わせた全患者 ( すなわち、アナストロゾールまたはタモキシフェンのいずれかを受容した患者 ) について、 B C I 低リスク群は、 2 1 遺伝子再発スコア低リスク群 ( 6 . 5 % ) および I H C 4 低リスク群 ( 6 . 2 % ) に比べて、 1 0 年遠隔再発を有する患者の割合が最小であり ( 4 . 8 % ) 、 B C I 高リスク群は、 2 1 遺伝子再発スコア高リスク群 ( 2 7 . 1 % ) および I H C 4 高リスク群 ( 2 1 . 8 % ; 図 9 ) に比べて、遠隔再発の割合が最高であった ( 2 9 . 0 % ) 。

#### 【 0 1 4 1 】

加えて、図 9 D ~ 9 F に示されるように、 B C I は、高リスクアナストロゾール群と低リスクアナストロゾール群の間の遠隔再発リスクを、 2 1 遺伝子および I H C 4 システムよりもはるかに良好に階層化し、これは B C I がその高リスク群において最高の再発 % ( 2 1 . 6 % 対 1 3 . 5 % および 1 5 . 6 % ) を有し、また、その低リスク群において最低の再発 % ( 4 . 8 % 対 9 . 4 % および 8 . 0 % ) を有していたためである。

#### 【 0 1 4 2 】

##### 他の評価との比較

尤度比  $L R - \Delta \chi^2$  値の変化を用い、 I H C 4 および 2 1 遺伝子再発スコアによる B C I の直接的 1 対 1 比較を行った。各バイオマーカーの相対的予後能は遠隔再発時間枠によって異なった ( 表 2 ) 。早期再発では、 B C I 、 I H C 4 、 および 2 1 遺伝子再発スコアは、単変量分析と多変量分析の両方で遠隔再発に関して総て予後能があった ( 表 2 ) 。全 N 0 患者では、 I H C 4 は、臨床治療スコアに関する補正の後に再発スコアおよび B C I よりも予後能が高かった。しかしながら、 N 0 H E R 2 陰性患者では、 B C I および I H C 4 は同等の予後能を持ち、これは両方とも臨床治療スコアに関する補正の後に 2 1 遺伝子再発スコアの予後能よりも良好であった ( 表 2 ) 。晩期再発の多変量分析では、 B C I だけが全 N 0 および N 0 H E R 2 陰性患者において強い予後能を維持しており、 I H C 4 および 2 1 遺伝子再発スコアはともにいずれの集団においても予後能は無かった ( 表 2 ) 。エンドポイントとして全再発、乳癌死亡、および全生存期間を考える場合にも同様の結果が示された ( 表 4 ) 。

#### 【 0 1 4 3 】

【表 4】

表 4 全ホルモン受容体陽性 N0 患者および N0 HER2 サブセットにおける BCI、RS(21 遺伝子再発スコア)、および IHC4 の二次的早期および晩期疾患イベントに関する比較予後成績

早期再発(0-5 年)

晩期再発(5-10 年)

|       |          | HR (95% CI)*      | LR- $\Delta\chi^2$ (P 値) | HR (95% CI)*     | LR- $\Delta\chi^2$ (P 値) |
|-------|----------|-------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| 単変量   |          |                   |                          |                  |                          |
| 全再発   |          |                   |                          |                  |                          |
| BCI   | N0       | 2.58 (1.74-3.82)  | 23.08 (<0.0001)          | 1.79 (1.26-2.54) | 10.53 (0.0012)           |
|       | N0/HER2- | 2.20 (1.40-3.45)  | 11.92 (0.00061)          | 1.95 (1.37-2.79) | 13.60 (0.00021)          |
| RS    | N0       | 1.90 (1.57-2.29)  | 32.11 (<0.0001)          | 1.28 (0.95-1.72) | 2.02 (0.15)              |
|       | N0/HER2- | 2.03 (1.46-2.82)  | 14.62 (0.00012)          | 1.48 (1.09-2.02) | 5.52 (0.018)             |
| IHC4  | N0       | 2.52 (1.88-3.40)  | 33.37 (<0.0001)          | 1.55 (1.06-2.26) | 4.47 (0.034)             |
|       | N0/HER2- | 2.48 (1.54-3.98)  | 13.23 (0.00031)          | 1.91 (1.31-2.78) | 10.50 (0.0012)           |
| 乳癌死亡  |          |                   |                          |                  |                          |
| BCI   | N0       | 5.82 (3.10-10.92) | 34.36 (<0.0001)          | 2.23 (1.29-3.86) | 8.42 (0.0037)            |
|       | N0/HER2- | 7.30 (3.22-16.51) | 26.42 (<0.0001)          | 2.52 (1.42-4.45) | 10.38 (0.0013)           |
| RS    | N0       | 2.05 (1.62-2.60)  | 24.15 (<0.0001)          | 1.41 (1.01-1.99) | 3.24 (0.072)             |
|       | N0/HER2- | 2.90 (1.80-4.65)  | 15.35 (0.0001)           | 1.78 (1.14-2.77) | 5.36 (0.021)             |
| IHC4  | N0       | 3.66 (2.40-5.56)  | 33.84 (<0.0001)          | 1.73 (1.09-2.75) | 5.03 (0.024)             |
|       | N0/HER2- | 4.91 (2.32-10.41) | 16.62 (<0.0001)          | 2.26 (1.27-4.01) | 7.13 (0.0076)            |
| 全生存期間 |          |                   |                          |                  |                          |
| BCI   | N0       | 2.25 (1.54-3.28)  | 18.26 (<0.0001)          | 1.96 (1.43-2.68) | 17.87 (<0.0001)          |
|       | N0/HER2- | 2.04 (1.34-3.12)  | 11.07 (0.00091)          | 2.04 (1.47-2.82) | 18.63 (<0.0001)          |
| RS    | N0       | 1.54 (1.26-1.89)  | 13.59 (0.00020)          | 1.19 (0.94-1.50) | 1.93 (0.16)              |
|       | N0/HER2- | 1.58 (1.12-2.24)  | 5.86 (0.016)             | 1.33 (0.99-1.78) | 3.17 (0.075)             |
| IHC4  | N0       | 1.84 (1.37-2.48)  | 14.45(0.00010)           | 1.25 (0.94-1.67) | 2.21 (0.14)              |
|       | N0/HER2- | 1.57 (0.98-2.51)  | 3.36(0.066)              | 1.45 (1.01-2.07) | 3.97 (0.046)             |

CTS を含む多変量

|     |          |                  |                |                  |              |
|-----|----------|------------------|----------------|------------------|--------------|
| 全再発 |          |                  |                |                  |              |
| BCI | N0       | 1.99 (1.27-2.99) | 9.71 (0.0018)  | 1.49 (1.02-2.17) | 4.25 (0.039) |
|     | N0/HER2- | 1.83 (1.12-3.01) | 5.93 (0.014)   | 1.57 (1.07-2.30) | 5.34 (0.021) |
| RS  | N0       | 1.76(1.43-2.17)  | 22.21(<0.0001) | 1.10(0.83-1.46)  | 0.44(0.51)   |

10

20

30

40

|       |          |                  |                |                 |             |
|-------|----------|------------------|----------------|-----------------|-------------|
|       | N0/HER2- | 1.80(1.26-2.56)  | 9.41(0.0022)   | 1.27(0.92-1.74) | 2.01(0.16)  |
| IHC4  | N0       | 2.22(1.62-3.03)  | 22.48(<0.0001) | 1.25(0.90-1.73) | 1.65(0.19)  |
|       | N0/HER2- | 2.16(1.31-3.57)  | 8.60(0.0034)   | 1.61(1.08-2.40) | 5.27(0.022) |
| 乳癌死亡  |          |                  |                |                 |             |
| BCI   | N0       | 3.92(1.98-7.76)  | 17.41(<0.0001) | 1.68(0.94-3.01) | 3.10(0.078) |
|       | N0/HER2- | 7.18(2.77-18.64) | 20.17(<0.0001) | 1.78(0.97-3.26) | 3.60(0.057) |
| RS    | N0       | 1.92(1.46-2.52)  | 16.62(<0.0001) | 1.26(0.86-1.84) | 1.29(0.25)  |
|       | N0/HER2- | 2.54(1.49-4.31)  | 10.70(0.0011)  | 1.40(0.88-2.23) | 1.90(0.16)  |
| IHC4  | N0       | 3.19(2.05-4.98)  | 24.02(<0.0001) | 1.45(0.88-2.37) | 2.04(0.15)  |
|       | N0/HER2- | 4.31(1.96-9.47)  | 12.50(0.00041) | 1.73(0.93-3.22) | 2.83(0.092) |
| 全生存期間 |          |                  |                |                 |             |
| BCI   | N0       | 1.75(1.16-2.64)  | 7.25(0.0071)   | 1.51(1.08-2.11) | 5.86(0.015) |
|       | N0/HER2- | 1.77(1.11-2.84)  | 5.91(0.015)    | 1.54(1.08-2.18) | 5.98(0.014) |
| RS    | N0       | 1.40(1.12-1.75)  | 7.37(0.0066)   | 1.04(0.81-1.33) | 0.07(0.78)  |
|       | N0/HER2- | 1.39(0.97-2.01)  | 2.97(0.084)    | 1.08(0.80-1.46) | 0.25(0.61)  |
| IHC4  | N0       | 1.58(1.15-2.17)  | 7.39(0.0066)   | 1.02(0.75-1.39) | 0.02(0.89)  |
|       | N0/HER2- | 1.33(0.81-2.20)  | 1.23(0.27)     | 1.11(0.76-1.63) | 0.30(0.58)  |

10

20

\*HR は、各バイオマーカーの連続スコアの四分位範囲間で計算した。

略号: BCI、乳癌指数; RS、OncotypeDX 再発スコア; IHC4、4つの免疫組織化学的マーカー(エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、ヒト上皮細胞増殖因子 2、および Ki-67; HR、ハザード比;  $LR-\Delta \chi^2$ 、尤度比統計量に基づく  $\chi^2$  値; CTS、臨床治療スコア; N0、リンパ節転移陰性; HER2-、上皮細胞増殖因子受容体陰性。

30

#### 【 0 1 4 4 】

##### リンパ節転移陽性乳癌

これらの実施例の一次分析は N 0 患者を中心としたが、リンパ節転移陽性患者の分析は、BCI がこれらの患者における遠隔再発にも予後能があったことを示した (ログランク  $p = 0.0045$ ; 図 10)。さらに、比較分析は、N 0 サブセットでシメされたものよりもロバスト性は低いものの、BCI、IHC4、および 21 遺伝子再発スコアは、この患者集団において極めて類似した予後能を持っていたことを示した (表 5)。

#### 【 0 1 4 5 】

## 【表 5】

表 5 ホルモン受容体陽性、リンパ節陽性患者における BCI、RS、IHC4 の 0-10 年遠隔再発に関する比較予後成績

|            | HR* (95% CI)    | LR- $\Delta\chi^2$ (P-value) |
|------------|-----------------|------------------------------|
| 単変量        |                 |                              |
| BCI        | 1.70(1.21-2.40) | 9.48(0.0021)                 |
| RS         | 1.30(1.07-1.58) | 5.97(0.014)                  |
| IHC4       | 1.40(1.07-1.85) | 5.56(0.018)                  |
| CTS を含む多変量 |                 |                              |
| BCI        | 1.42(1.02-1.97) | 4.49(0.034)                  |
| RS         | 1.25(1.02-1.52) | 4.24(0.039)                  |
| IHC4       | 1.40(1.05-1.87) | 4.92(0.027)                  |

10

## 【 0 1 4 6 】

表 5 は、癌再発に関する多変量分析を示す。

## 【 0 1 4 7 】

上記によって示されたように、BCI は、5 年のタモキシフェン処置後の ER + 患者において晩期癌再発の予後能がある。HoxB13 発現もまた、5 年のタモキシフェン処置後の ER + 患者において晩期癌再発の予後能がある。

20

## 【 0 1 4 8 】

## 参照文献

Cuzick et al., Lancet Oncol. 11:1135-1141 (2010).  
 Cuzick et al., J. Clin. Oncol. 29:4273-4278 (2011).  
 Dowsett et al., J. Clin. Oncol. 28:1829-1834 (2010).  
 Goetz et al., Clin Cancer Res. 12:2080-7 (2006).  
 Jansen et al., J. Clin. Oncol. 25:662-8 (2007).  
 Jerevall et al., Breast Cancer Res.Treat (2007).  
 Ma et al., Cancer Cell, 5:607-16 (2004).  
 Ma et al., J. Clin. Oncol., 24:4611-9 (2006).  
 Paik et al., N. Engl. J. Med. 351:2817-26 (2004).  
 Sgroi, et al., Proc SABVS; Abstract S1-9 (2012).  
 米国特許第 6, 291, 170 号  
 米国特許第 6, 794, 141 号  
 米国特許第 7, 930, 105 号  
 米国特許第 7, 504, 214 号  
 米国特許出願公開第 2005 / 0239079 号  
 米国特許出願公開第 2005 / 0239083 号  
 米国特許出願公開第 2006 / 0154267 号  
 米国特許出願公開第 2011 / 0136680 号  
 米国特許出願公開第 2013 / 0281502 号  
 PCT 特許公開第 WO / 2012 / 079059 号

30

40

## 【 0 1 4 9 】

上記を考慮すれば、本発明のいくつかの目的が達成され、他の利点も達成されると思われる。

## 【 0 1 5 0 】

本発明の範囲から逸脱することなく上記の方法および組成物に種々の変更を行うことができるので、上記に含まれ、添付図面に示される総ての事項が例示であって限定の意味で

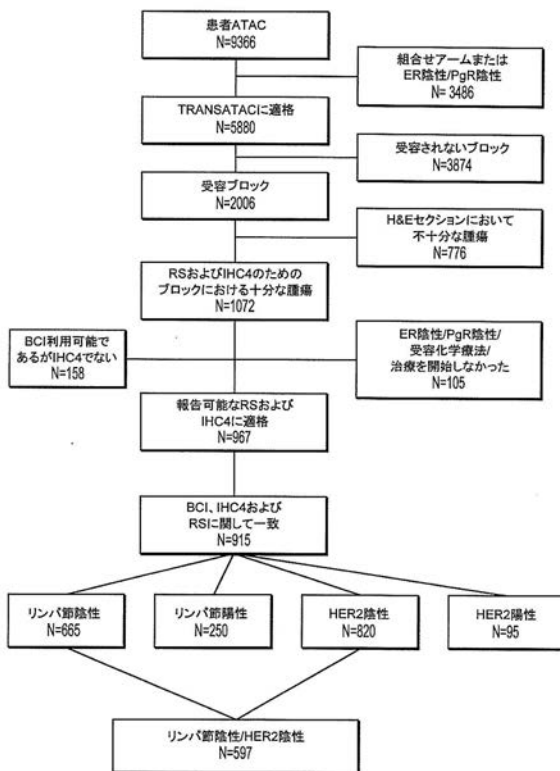
50

はないと解釈されるべきであることが意図される。

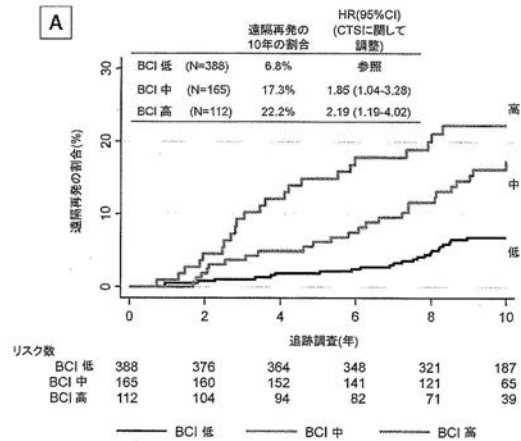
【 0 1 5 1 】

本明細書に引用されている総ての参考文献は、引用することにより本明細書の一部とされる。本明細書の参考文献の記述は、著者らによって行われる主張の単に概略を述べるものが意図され、参考文献が従来技術を構成することを何ら承認するものではない。さらに、それらの引例は、関連の開示の検索を示すものではない。出願者は引用されている参考文献の正確性および適切性に疑問を呈する権利を有する。

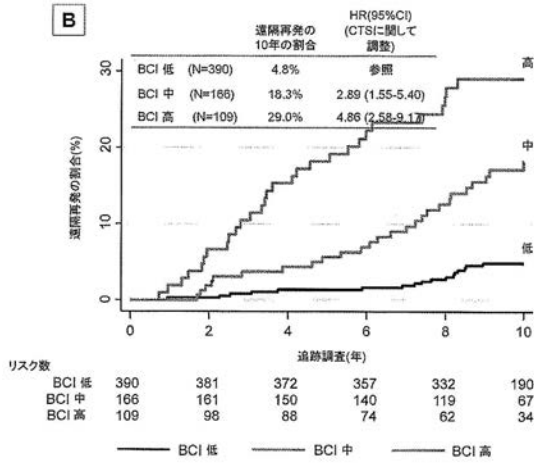
【 図 1 】



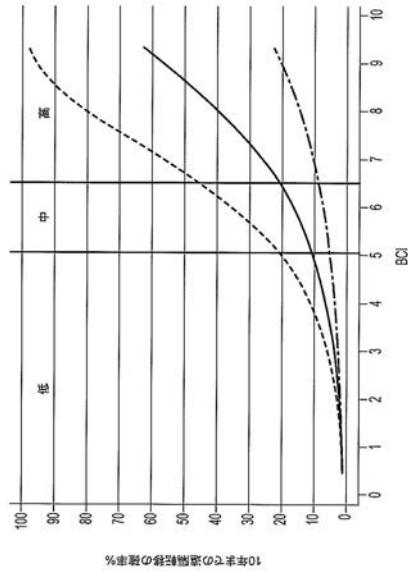
【 図 2 A 】



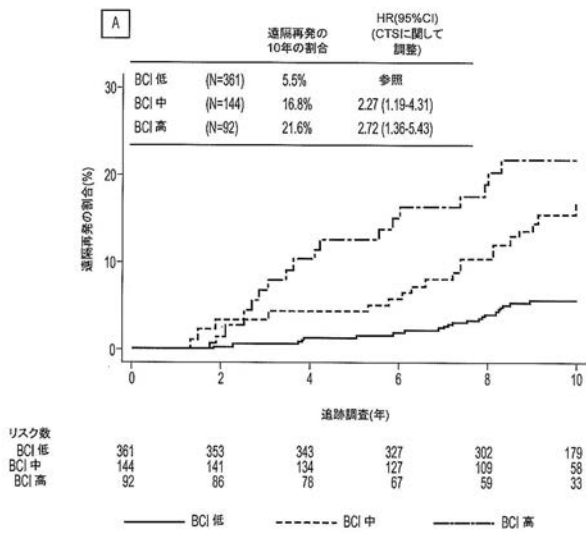
【図 2 B】



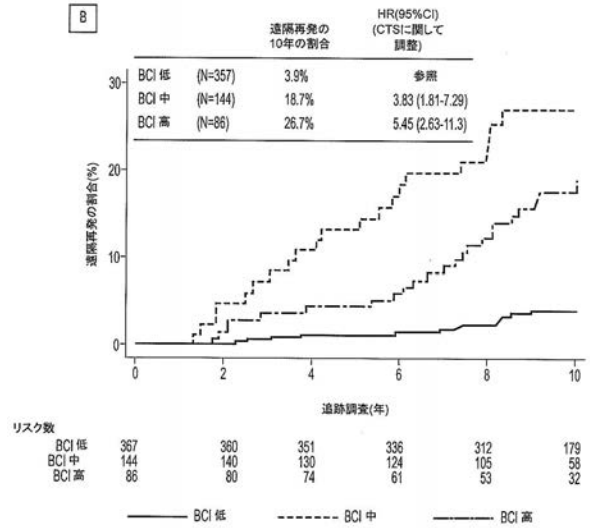
【図 3】



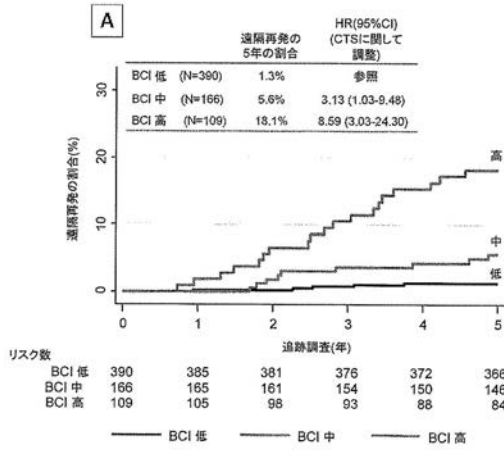
【図 4 A】



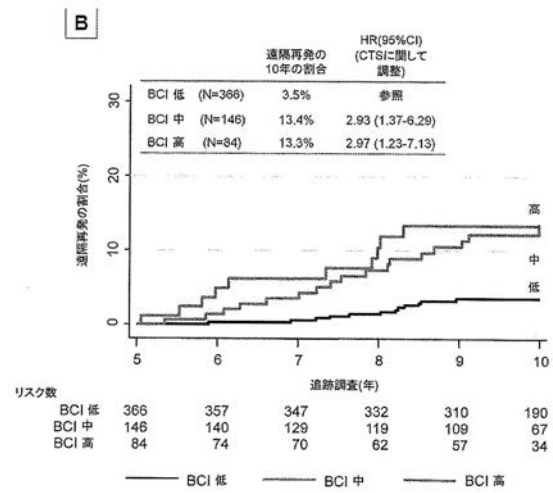
【図 4 B】



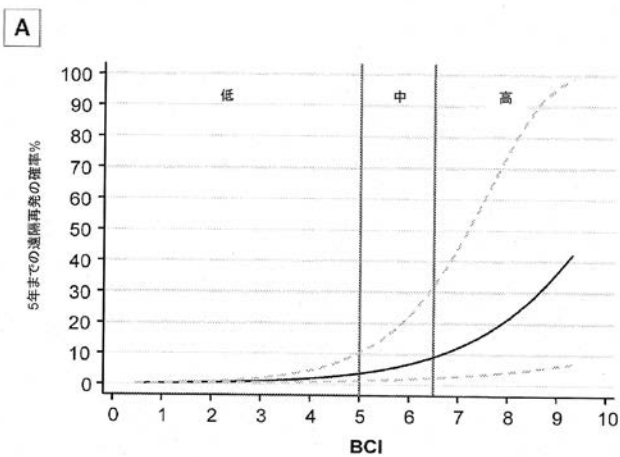
【図 5 A】



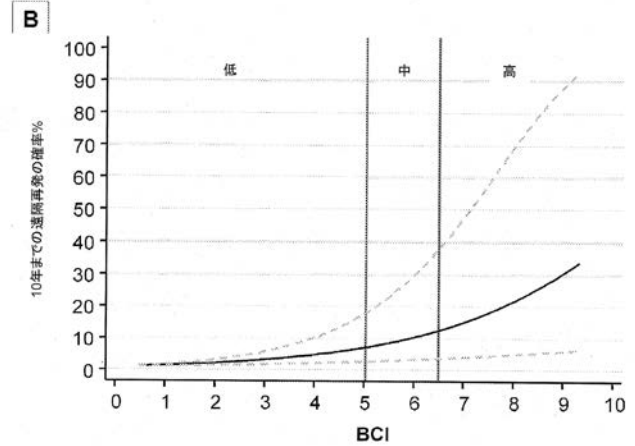
【図 5 B】



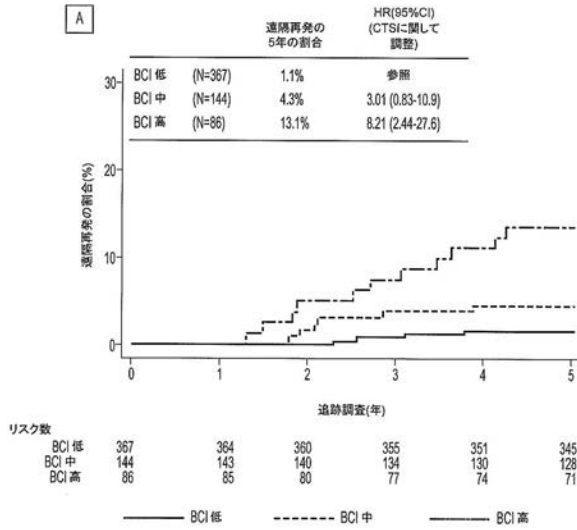
【図 6 A】



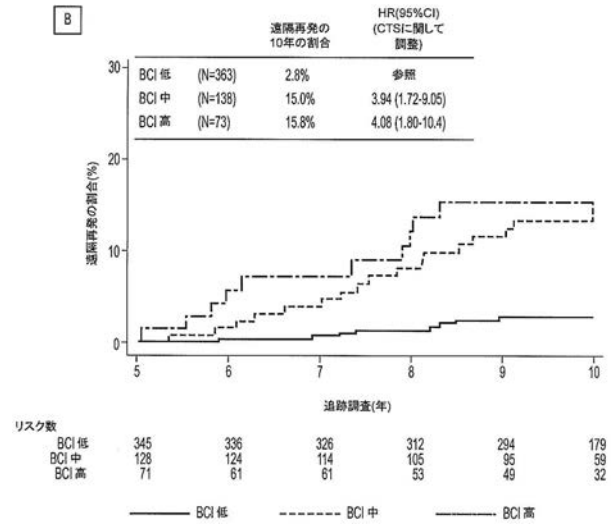
【図 6 B】



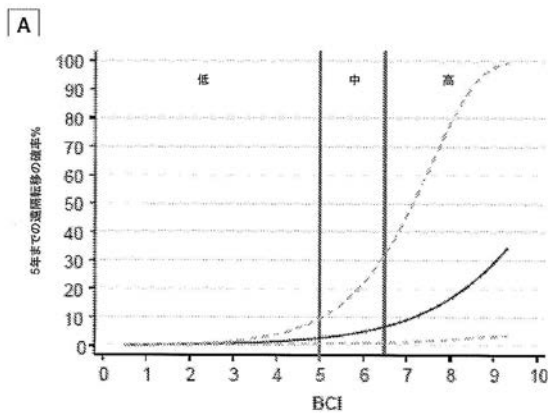
【図 7 A】



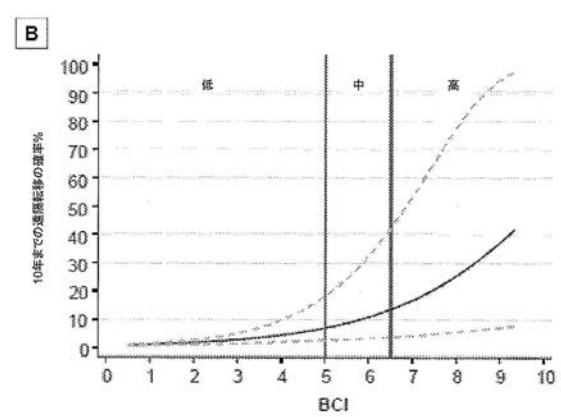
【図 7 B】



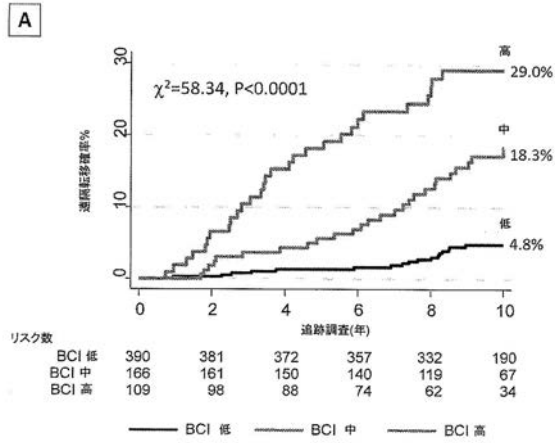
【図 8 A】



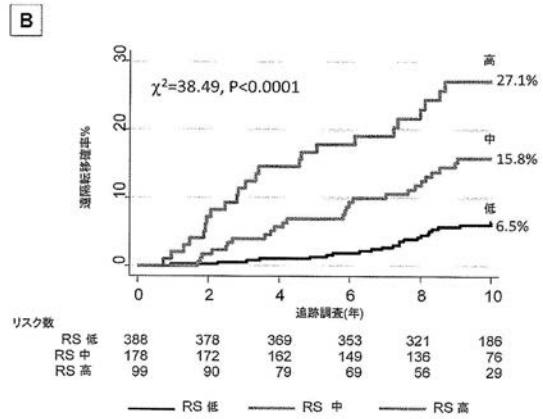
【図 8 B】



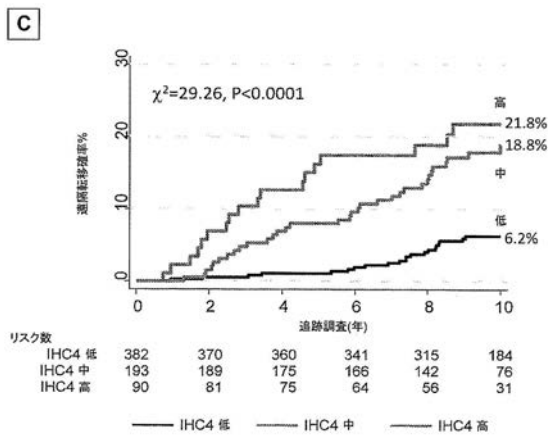
【図 9 A】



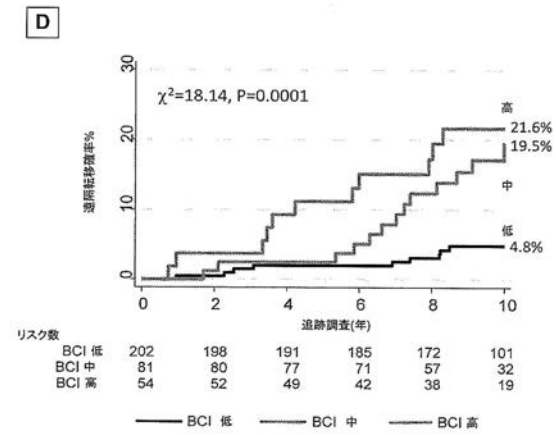
【図 9 B】



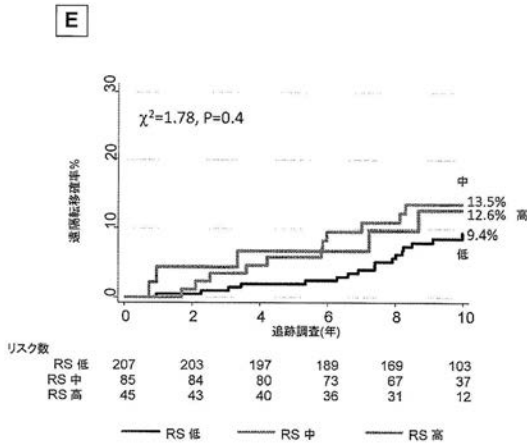
【図 9 C】



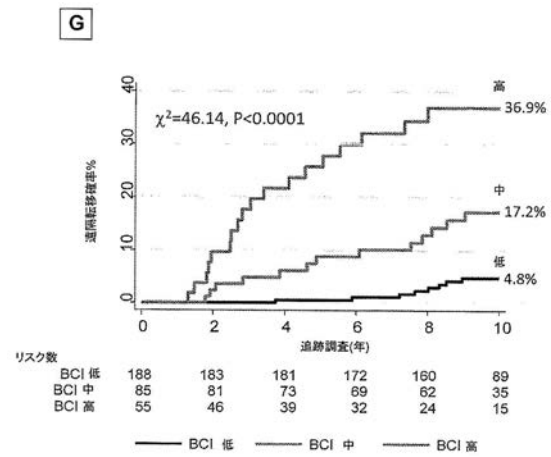
【図 9 D】



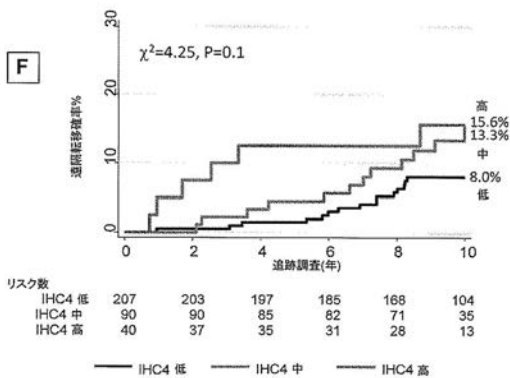
【図 9 E】



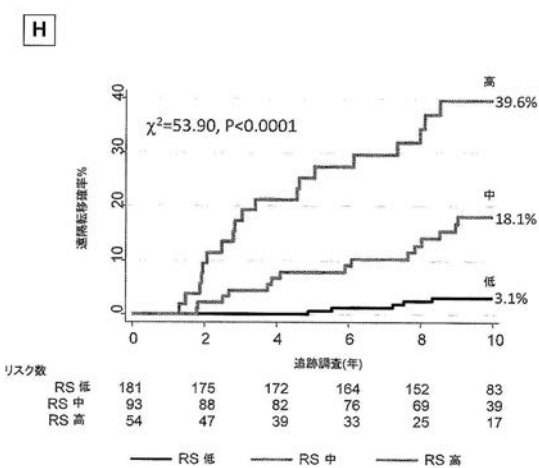
【図 9 G】



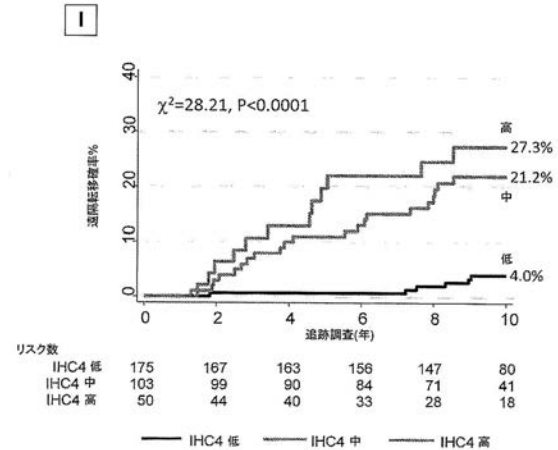
【図 9 F】



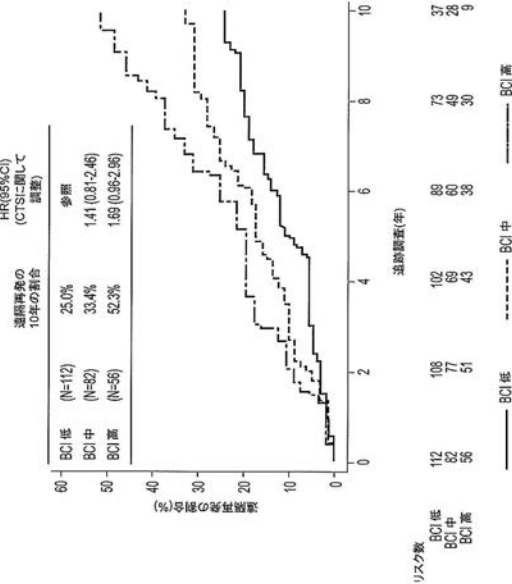
【図 9 H】



【図 9 I】



【図 10】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2014/055041

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - C12Q 1/68 (2014.01)<br>CPC - G01N 2800/54 (2014.11)<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC(8) - C12Q 1/68; C40B 30/04, 30/06, 40/00, 40/08; G01N 33/50 (2014.01)<br>CPC - C12Q 1/6886, 2600/106, 2600/118, 2600/158; G01N 33/57415, 2800/54, 2800/56, 2800/60 (2014.11)<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>US Class - 435/8.11, 6.12, 13, 15; 506/7; 506/9, 16, 17<br>CPC - C12Q 1/6886, 2600/106, 2600/118, 2600/158; G01N 33/57415, 2800/54, 2800/56, 2800/60 (2014.11) (keyword delimited)<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>Orbit, Google Patents, Google Scholar, Google, PubMed<br>Search terms used: predicting breast cancer recurrence gene expression HoxB13 IL17BR Bub1B CENPA NEK2 RACGAP1 RRM2<br>Estrogen Receptor positive cancer tumor                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                     |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                     |
| Category*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                           | Relevant to claim No.                                                                               |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2012/079059 A2 (ERLANDER et al) 14 June 2012 (14.06.2012) entire document                                                                                                                                                                 | 1-3, 5-7, 19-22, 28-33                                                                              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | US 2013/0065786 A1 (DARTMANN et al) 14 March 2013 (14.03.2013) entire document                                                                                                                                                               | 1-3, 5-7, 19-22, 28-33                                                                              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | WO 2013/070521 A1 (BAKER et al) 16 May 2013 (16.05.2013) entire document                                                                                                                                                                     | 1-3, 5-7, 19-22, 28-33                                                                              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | HABEL et al. "HOXB13:IL17BR and molecular grade index and risk of breast cancer death among patients with lymph node-negative invasive disease," Breast Cancer Research, 14 March 2013 (14.03.2013), Vol. 15:R24, Pgs. 1-11. entire document | 1-3, 5-7, 19-22, 28-33                                                                              |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | MA et al. "A Five-Gene Molecular Grade Index and HOXB13:IL17BR Are Complementary Prognostic Factors in Early Stage Breast Cancer," Clin Cancer Res. 01 May 2008 (01.05.2008), Vol. 14, No. 9, Pgs. 2601-2608. entire document                | 1-3, 5-7, 19-22, 28-33                                                                              |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                     |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                     |
| Date of the actual completion of the international search<br>19 November 2014                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                              | Date of mailing of the international search report<br>19 DEC 2014                                   |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-3201                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                              | Authorized officer:<br>Blaine R. Copenheaver<br>PCT Helpdesk: 571-272-4300<br>PCT OSP: 571-272-7774 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/055041

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

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

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 8-18, 23-27, 34-43  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

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

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72)発明者 シュナーベル, キャサリン, エー.

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州, サンディエゴ, スイート 2 0 0 タウン センター ドライブ 9 6 4 0

(72)発明者 スグロイ, デニス, シー.

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州, サンディエゴ, スイート 2 0 0 タウン センター ドライブ 9 6 4 0

(72)発明者 ツァン, イ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州, サンディエゴ, スイート 2 0 0 タウン センター ドライブ 9 6 4 0

(72)発明者 スクローダー, ブロック

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州, サンディエゴ, スイート 2 0 0 タウン センター ドライブ 9 6 4 0

(72)発明者 エルランダー, マーク, ジー.

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州, サンディエゴ, スイート 2 0 0 タウン センター ドライブ 9 6 4 0

F ターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA14

4B063 QA01 QA13 QA19 QQ02 QQ08 QQ53 QQ58 QR08 QR32 QR55

QR62 QS10 QS14 QS25 QS34 QS39 QX02

4C084 AA17 NA05 ZB261

4C206 AA01 AA02 FA23 MA01 MA04 NA05 ZB26