

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2012-506560

(P2012-506560A)

(43) 公表日 平成24年3月15日 (2012. 3. 15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006. 01)	GO 1 N 33/574 A	2 G O 4 5
GO 1 N 37/00 (2006. 01)	GO 1 N 37/00 1 O 2	4 B O 2 4
GO 1 N 33/15 (2006. 01)	GO 1 N 33/15 Z	4 B O 2 9
GO 1 N 33/50 (2006. 01)	GO 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 129 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2011-533301 (P2011-533301)	(71) 出願人	506235926
(86) (22) 出願日	平成21年10月21日 (2009. 10. 21)		バイエル ヘルスケア エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成23年6月21日 (2011. 6. 21)		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1059
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/061506		1, タリタウン, ホワイト プレーン
(87) 国際公開番号	W02010/048304		ズ ロード 555
(87) 国際公開日	平成22年4月29日 (2010. 4. 29)	(74) 代理人	100087631
(31) 優先権主張番号	61/107, 217		弁理士 滝田 清暉
(32) 優先日	平成20年10月21日 (2008. 10. 21)	(74) 代理人	100136342
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 中村 成美
(31) 優先権主張番号	61/160, 929	(74) 代理人	100144543
(32) 優先日	平成21年3月17日 (2009. 3. 17)		弁理士 岩▲崎▼ 有穂
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ペナ, カロル イー. エー.
(31) 優先権主張番号	61/161, 315		アメリカ合衆国 ニューヨーク 1059
(32) 優先日	平成21年3月18日 (2009. 3. 18)		1, タリタウン, ホワイトプレーンズロー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ド 555
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 肝細胞癌と関連するシグネチャ遺伝子の同定

(57) 【要約】

本発明は、例えば、(1) 臨床的に有用な、血清及び／又は腫瘍バイオマーカー、並びに、肝細胞癌(HCC)の患者の治療を目的とした検出、予後判定及びガイダンスに利用可能な発現シグネチャの新規な同定方法；及び(2)例えば、ソラフェニブ（単独又は他の薬剤との組み合わせ）のような、化学療法レジメンの有効性をモニター及び／又は研究するために使用することのできる発現シグネチャの発見に関する。本発明は、前記バイオマーカーの分析に基づいて、例えば、全生存期間(OS)、無進行期間(TTP)、及び／又は、HCC患者で化学療法の利益を受ける可能性のような、臨床予後を予測する方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体 2 (s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体 3 (VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p21、リン酸化ERK(pERK)、アンジオポエチン 2 (Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)又はインシュリン様増殖因子(IGF-2)から選択される少なくとも 1 つのバイオマーカーを検出し；前記患者の試験サンプルにおける前記バイオマーカーの前記発現レベルを参照基準と比較することからなり、前記参照基準と比較された前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの発現レベルの差異が前記ソラフェニブ治療の予後を示すものとする、患者における肝細胞癌 (HCC) のソラフェニブ治療の予後を予測する方法。

10

【請求項 2】

前記予後が、無進行期間、全生存期間、治療の利点、又はそれらの組み合わせである、請求項 1 に記載された予測する方法。

【請求項 3】

患者の試験サンプルにおける、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体 2 (s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体 3 (VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p21、リン酸化ERK(pERK)、アンジオポエチン 2 (Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)又はインシュリン様増殖因子(IGF-2)の少なくとも一つのバイオマーカーの発現レベルを検出し；

前記患者の試験サンプルにおける前記バイオマーカーの前記発現レベルを参照基準と比較することからなり、

前記参照基準と比較された、前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの発現レベルの違いが予後を示すものとする、肝細胞癌 (HCC) 患者の予後を予測する方法。

20

【請求項 4】

前記バイオマーカーがタンパク質である、請求項 3 に記載された方法。

【請求項 5】

前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの前記発現レベルが、前記参照基準と比較して増加又は減少する、請求項 4 に記載された方法。

【請求項 6】

前記バイオマーカーが、血漿HGF、VEGF、s-VEGFR-3、Ras p21、Ang2、bFGF、IGF-2又はそれらの組み合わせである、請求項 4 に記載された方法。

30

【請求項 7】

前記予後が、全生存期間 (OS) 及び／又は無進行期間 (TTP) である、請求項 4 に記載された方法。

【請求項 8】

前記バイオマーカーが、HGF、VEGF、s-VEGFR-3、Ang2、IGF-2であり、前記予後が全生存期間 (OS) である、請求項 4 に記載された方法。

【請求項 9】

前記参照基準と比較された、前記HCC患者における前記HGF、VEGF、s-VEGFR-3若しくはAng2レベルの減衰；又は

前記参照基準と比較された、前記HCC患者における前記IGF-2の上昇が、全生存期間 (OS) の改善を示すものとする、請求項 8 に記載された方法。

40

【請求項 10】

前記参照基準と比較された、前記HCC患者における前記HGF、VEGF、s-VEGFR-3若しくはAng2レベルの上昇；又は

前記参照基準と比較された、前記HCC患者における前記IGF-2の減衰が、全生存期間の悪化を示すものとする、請求項 8 に記載された方法。

【請求項 11】

前記バイオマーカーがVEGF、Ras p21、Ang2であり、前記予後が無進行期間 (TTP) である、請求項 4 に記載された方法。

50

【請求項 1 2】

前記参照基準と比較された、前記HCC患者における、前記VEGFレベルの減衰、前記Ang2レベルの減衰、又は、Ras p21レベルの上昇が、無進行期間（TTP）の延長を示すものとする、請求項11に記載された方法。

【請求項 1 3】

前記参照基準と比較された、前記HCC患者における、前記VEGFレベルの上昇、前記Ang2レベルの上昇、又は、Ras p21レベルの減衰が、無進行期間（TTP）の短縮を示すものとする、請求項11に記載された方法。

【請求項 1 4】

前記バイオマーカーが、血漿HGF、VEGF、s-VEGFR-3、Ang2、bFGF又はIGF-2であり；

10

前記参照基準が、HCC患者群における、75パーセントイル血漿HGFレベル、75パーセントイル血漿VEGFレベル、25パーセントイル血漿s-VEGFR-3レベル、メジアンAng2レベル、メジアンbFGFレベル及び／又はメジアンIGF-2レベルからなる、

請求項 6 に記載された方法。

【請求項 1 5】

前記参照基準が、HCC患者群における、～3.279ng/ml血漿HGFレベル、～101.928pg/ml血漿VEGFレベル、～30.559ng/ml血漿s-VEGFR-3レベル、～6.061ng/ml血漿Ang2レベル、～7.5pg/ml血漿bFGFレベル、又は～797.7ng/ml血漿IGF-2レベルからなる、請求項14に記載された方法。

【請求項 1 6】

20

下記バイオマーカーの組み合わせを検出することからなる、請求項 4 に記載された方法；

15)HGFとVEGF；

16)HGFとs-VEGFR-3；

17)VEGFとs-VEGFR-3；

18)HGF、VEGFとs-VEGFR-3；

19)HGFとRas p21；

20)HGF、VEGFとRas p21；

21)VEGFとRas p21；

22)s-VEGFR-3とRas p21；

30

23)c-KITとbFGF；

24)c-KITとIGF-2；

25)bFGFとIGF-2；

26)HGFとbFGF；又は

27)HGFとIGF-2；

28)組み合わせ(1)-(13)の何れかの組み合わせ。

【請求項 1 7】

下記の追加のパラメーターの少なくとも1つを検出する、請求項 4 に記載された方法；

(a) イースタン・コーポレイティブ・オンコロジー・グループ パフォーマンスステータス (ECOG PS:0対1+2),

40

(b) 大血管性の血管浸潤；

(c) 腫瘍量；

(d) 肝外進展；

(e) アルファフェトプロテインレベル (AFP)；

(f) アルカリフォスファターゼレベル (AP)；

(g) 腹水；

(h) ビリルビンレベル；

(i) アルブミンレベル；

(j) PTスコア；及び／又は

(k) チャイルド-ピュー スコア。

50

【請求項 18】

前記患者の試験サンプルにおける、血漿Agn2の少なくとも一つのバイオマーカー、及び、下記の少なくとも一つの追加のパラメーターを検出し、

前記患者における前記血漿HGFレベル及び前記追加のパラメーターを参照基準と比較することからなり、

低いレベルの追加のパラメーター(i)、又は、パラメーター(a)～(h)若しくはパラメーター(j)～(k)の高いレベルの追加のパラメーターと組み合わせさせた、高いレベルの前記血漿Ang2が、全生存期間の悪化を示すものとする、請求項4に記載された方法；

(a) イースタン・コーポレイティブ・オンコロジー・グループ パフォーマンスステータス(ECOG PS:0対1+2),

10

(b) 大血管性の血管浸潤；

(c) 腫瘍量；

(d) 肝外進展；

(e) アルファフェトプロテインレベル(AFP)；

(f) アルカリフォスファターゼレベル(AP)；

(g) 腹水；

(h) ビリルビンレベル；

(i) アルブミンレベル；

(j) PTスコア；及び／又は

(k) チャイルド－ピュー スコア。

20

【請求項 19】

前記患者の前記試験サンプルにおける、血漿HGFの少なくとも一つのバイオマーカー及び下記追加のパラメーターの少なくとも1つを検出し、

前記患者における前記血漿HGFレベル及び前記追加のパラメーターを参照基準と比較することからなり、

低いレベルの追加のパラメーター(e)、又は、パラメーター(a)～(d)若しくはパラメーター(f)である高いレベルの追加のパラメーターと組み合わせさせた高いレベルの前記血漿HGFが、全生存期間の悪化と関連する、請求項4に記載された方法；

(a) 大血管性の浸潤；

(b) 腫瘍量；

(c) アルファフェトプロテインレベル(AFP)；

(d) ビリルビンレベル；

(e) アルブミンレベル；及び／又は

(f) アルカリフォスファターゼ (AP)

30

【請求項 20】

前記患者が、ソラフェニブで治療される、請求項4に記載された方法。

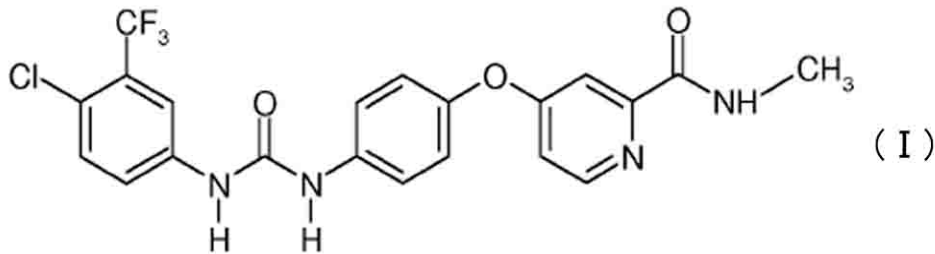
【請求項 21】

HCC患者の試験サンプルにおける、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体2(s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体3(VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p21、リン酸化ERK(pERK)、アンジオポエチン2(Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)又はインシュリン様増殖因子(IGF-2)の少なくとも1つのバイオマーカーの発現レベルを検出し、前記レベルを参照基準と比較することからなる、前記参照基準と比較された前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの発現差異が、前記治療の予後を示すものとする、HCC患者におけるソラフェニブ治療の予後を予測する方法。

40

【請求項 22】

前記ソラフェニブが下記の化学式Iの化合物、又は、薬剂的に許容されるその塩、多形体、水和物、溶媒和物又はその組み合わせからなる、請求項21に記載された方法。



【請求項 2 3】

前記ソラフェニブが、N-[4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]-N'-{4-[2-カルバモイル-1-オキソ-(4-ピリジルオキシ)]フェニル}尿素又はそのトシレート塩である、請求項21に記載された方法。 10

【請求項 2 4】

前記c-KIT、HGF、Ras p21、s-VEGFR-2及びs-VEGFR-3バイオマーカーが、前記ソラフェニブ治療患者において、前記参照基準と比較して減衰する、及び／又は、VEGFレベルが、前記ソラフェニブ治療患者において、前記参照基準と比較して上昇する、請求項21に記載された方法。

【請求項 2 5】

血漿バイオマーカーの組み合わせを検出することからなる、請求項21に記載された方法。 20

【請求項 2 6】

前記組み合わせが下記のものからなる、請求項25に記載された方法；

(a) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの1つからなる組み合わせ

- (i) HGFと、VEGF；
- (ii) s-c-Kitと、VEGF；
- (iii) s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv) HGFと、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (vi) s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2； 30
- (vii) Ang2と、VEGF；
- (viii) Ang2と、sVEGFR2；
- (ix) Ang2と、Ras p21；
- (x) IGF-2と、VEGF；
- (xi) IGF-2と、sVEGFR2；
- (xii) IGF-2と、Ras p21；又は

(b) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの2つからなる組み合わせ

- (i) HGFと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2； 40
- (iii) s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (v) Ang2と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (vi) Ang2と、Ras p21、及び、VEGF；
- (vii) IGF-2、VEGFと、sVEGFR2；
- (viii) IGF-2、sVEGFR2と、Ras p21；
- (ix) IGF-2、VEGFと、Ras p21；又は

(c) グループAのバイオマーカーの2つとグループBのバイオマーカーの1つからなる組み合わせ

- (i) HGF、s-c-Kitと、VEGF； 50

- (ii) HGF, s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv) HGF, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3と、VEGF；
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF, Ang2と、VEGF；
- (viii) HGF, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (ix) s-c-Kit, Ang2と、VEGF；
- (x) s-c-Kit, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (xi) s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
- (xii) s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (xiii) IGF-2, HGFと、VEGF；
- (xiv) IGF-2, HGFと、sVEGFR2；
- (xv) IGF-2, HGFと、Ras p21；
- (xvi) IGF-2, Ang2と、VEGF；
- (xvii) IGF-2, Ang2と、sVEGFR2；
- (xviii) IGF-2, Ang2と、Ras p21；
- (xix) IGF-2, s-c-Kitと、VEGF；
- (xx) IGF-2, s-c-Kitと、sVEGFR2；
- (xxi) IGF-2, s-c-Kitと、Ras p21；又は

10

20

(d) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) HGF, s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) s-c-Kit, s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) HGF, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vi) s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vii) IGF-2, HGFと、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (viii) IGF-2, HGFと、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (ix) IGF-2, HGFと、VEGF、及び、Ras p21；
- (x) IGF-2, Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (xi) IGF-2, Ang2と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (xii) IGF-2, Ang2と、VEGF、及び、Ras p21；
- (xiii) IGF-2, s-c-KitVEGF、及び、sVEGFR2；
- (xiv) IGF-2, s-c-Kitと、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (xv) IGF-2, s-c-Kitと、VEGF、及び、Ras p21；又は

30

(e) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3と、VEGF；
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2と、VEGF；
- (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
- (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (ix) HGF, s-c-Kit, IGF-2と、VEGF；
- (x) HGF, s-c-Kit, IGF-2と、s-VEGFR-2；
- (xi) HGF, IGF-2, Ang2と、VEGF；

40

50

(xii)HGF, IGF-2, Ang2と、s-VEGFR-2；又は

(f) グループAのバイオマーカーの3つとグループBのバイオマーカーの2つからなる組み合わせ

(i)HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(ii)HGF, s-c-Kit, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(iii)HGF, Ang2, s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(iv)s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(v)HGF, s-c-Kit, IGF-2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(vi)HGF, s-c-Kit, IGF-2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(vii)HGF, IGF-2, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(viii)HGF, IGF-2, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は

(g) グループAのバイオマーカーの4つとグループBのバイオマーカーの1つからなる組み合わせ

(i)HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；

(ii)HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；

(iii)HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2と、VEGF；

(iv)HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2と、s-VEGFR-2；又は

(h) グループAのバイオマーカーの4つとグループBのバイオマーカーの2つからなる組み合わせ

(i)HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(ii)HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は

(i) 前記バイオマーカーの全てからなる組み合わせ。

【請求項27】

前記予後が、全生存期間(OS)、死亡のリスク、無進行期間(TTP)、治療の利点(BOT)、無進行生存期間(PFS)、死亡までの期間(TTD)、無病生存期間(DFS)、進行症状までの期間(TSP)、無再発存在期間(RFS)、再発までの期間(TTR)、病状、レスポンスのタイプ、又はそれらの組み合わせの評価からなる、請求項21に記載された方法。

【請求項28】

前記予後が、全生存期間(OS)、死亡のリスク、無進行期間(TTP)、治療の利点(BOT)、又はそれらの組み合わせの評価からなる、請求項27に記載された方法。

【請求項29】

ソラフェニブ治療前のHCC患者の試験サンプルにおける、s-c-Kit、HGF、Rasp21、VEGF、s-VEGFR-2又はs-VEGFR-3の少なくとも1つのバイオマーカーのベースラインレベルを検出し、

ソラフェニブ治療後の前記患者の前記試験サンプルにおける少なくとも1つの前記バイオマーカーのレベルを検出し、

前記ソラフェニブ治療後のバイオマーカーレベルを、前記ソラフェニブ治療前のベースラインレベルと比較することからなり、

ソラフェニブ治療後の前記試験サンプルにおける、s-c-Kit、HGF、Rasp21、s-VEGFR-2若しくはs-VEGFR-3の少なくとも1つのレベルの減衰、及び／又は、VEGFレベルの上昇が、前記患者が前記ソラフェニブ治療に対してレスポンスすることを示すものとする、ソラフェニブ治療に対する、HCC患者のレスポンスをモニタリングする方法。

【請求項30】

ある時点でのHCC患者における血漿HGFレベルを検出し、

より遅い時点での前記患者における血漿HGFレベルを検出し、

2つの時点での前記患者における前記血漿HGFレベルを比較することからなり、

より遅い時点での前記血漿HGFレベルの減少が、前記ソラフェニブ治療の予後を示すものとする、HCC患者におけるソラフェニブ治療の予後を評価する方法。

【請求項31】

ソラフェニブ治療前の血漿HGFレベルを測定し、

サイクル 3 の 1 日目 (C3D1) に血漿HGFレベルを測定し、
 前記血漿HGFレベルの変化を特定し；
 前記変化を血漿HGFの標準値294pg/mLと比較することからなり、
 C3D1で294pg/mLより大きな血漿HGFレベルの変化が、無進行期間の延長を示すものとする、請求項30に記載された方法。

【請求項 3 2】

HCC患者の試験腫瘍サンプルにおける、リン酸化ERK (pERK) のレベルを検出し、
 前記pERKレベルを参照基準と比較することからなり；
 参照基準と比較された前記腫瘍サンプルにおける前記pERKの発現差異が、前記HCCの予後を示すものとする、HCCの患者の予後を予測する方法。

10

【請求項 3 3】

前記参照基準と比較された、前記腫瘍におけるpERKレベルの上昇が、TTPの延長を示すものとする、請求項32に記載された方法。

【請求項 3 4】

前記参照基準と比較された、前記腫瘍におけるpERKレベルの減衰が、TTPの短縮を示すものとする、請求項32に記載された方法。

【請求項 3 5】

腫瘍細胞を試験薬剤に接触させ；

前記薬剤との接触前後において、s-c-Kit、HGF、Ras p21、VEGF、s-VEGFR-2、s-VEGFR-3又はpERKの少なくとも1つのバイオマーカーの発現レベルを検出することからなり；

20

前記薬剤と接触した後における、s-c-Kit、HGF、Ras p21、s-VEGFR-2、又はs-VEGFR-3レベルの減衰、及び／又は、VEGF又はpERKレベルの上昇が、前記試験薬剤がHCCの予後に影響を与えうるものとする、HCC患者の予後に影響を与えることができる薬剤をスクリーニングする方法。

【請求項 3 6】

いずれも下記からなる抗原組成に特異的に結合する、複数の抗体分子からなる抗体アレイ又はキット；

(a) グループ A のバイオマーカーの 1 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

(i) HGF と、VEGF；

30

(ii) s-c-Kit と、VEGF；

(iii) s-VEGFR-3 と、VEGF；

(iv) HGF と、s-VEGFR-2；

(v) s-c-Kit と、s-VEGFR-2；

(vi) s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；

(vii) Ang2 と、VEGF；

(viii) Ang2 と、sVEGFR2；

(ix) Ang2 と、Ras p21；

(x) IGF-2 と、VEGF；

(xi) IGF-2 と、sVEGFR2；

40

(xii) IGF-2 と、Ras p21；又は

(b) グループ A のバイオマーカーの 1 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

(i) HGF と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(ii) s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(iii) s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(iv) Ang2 と、VEGF、及び、sVEGFR2；

(v) Ang2 と、sVEGFR2、及び、Ras p21；

(vi) Ang2 と、Ras p21、及び、VEGF；

(vii) IGF-2、VEGF と、sVEGFR2；

50

(viii) IGF-2, sVEGFR2 と、Ras p21 ;

(ix) IGF-2, VEGF と、Ras p21 ; 又は

(c) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

(i) HGF, s-c-Kit と、VEGF ;

(ii) HGF, s-c-Kit と、s-VEGFR-2 ;

(iii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF ;

(iv) HGF, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;

(v) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF ;

(vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;

10

(vii) HGF, Ang2 と、VEGF ;

(viii) HGF, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;

(ix) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF ;

(x) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;

(xi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;

(xii) s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;

(xiii) IGF-2, HGF と、VEGF ;

(xiv) IGF-2, HGF と、sVEGFR2 ;

(xv) IGF-2, HGF と、Ras p21 ;

(xvi) IGF-2, Ang2 と、VEGF ;

20

(xvii) IGF-2, Ang2 と、sVEGFR2 ;

(xviii) IGF-2, Ang2 と、Ras p21 ;

(xix) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF ;

(xx) IGF-2, s-c-Kit と、sVEGFR2 ;

(xxi) IGF-2, s-c-Kit と、Ras p21 ; 又は

(d) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

(i) HGF, s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

(ii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

(iii) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

30

(iv) HGF, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

(v) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

(vi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

(vii) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、sVEGFR2 ;

(viii) IGF-2, HGF と、sVEGFR2、及び、Ras p21 ;

(ix) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、Ras p21 ;

(x) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、sVEGFR2 ;

(xi) IGF-2, Ang2 と、sVEGFR2、及び、Ras p21 ;

(xii) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、Ras p21 ;

(xiii) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF、及び、sVEGFR2 ;

40

(xiv) IGF-2, s-c-Kit と、sVEGFR2、及び、Ras p21 ;

(xv) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF、及び、Ras p21 ; 又は

(e) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

(i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF ;

(ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;

(iii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF ;

(iv) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;

(v) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;

(vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;

50

- (vii)HGF, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
- (viii)HGF, s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (ix)HGF, s-c-Kit, IGF-2と、VEGF；
- (x)HGF, s-c-Kit, IGF-2と、s-VEGFR-2；
- (xi)HGF, IGF-2, Ang2と、VEGF；
- (xii)HGF, IGF-2, Ang2と、s-VEGFR-2；又は

(f) グループAのバイオマーカーの3つとグループBのバイオマーカーの2つからなる組み合わせ

- (i)HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii)HGF, s-c-Kit, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii)HGF, Ang2, s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv)s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (v)HGF, s-c-Kit, IGF-2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vi)HGF, s-c-Kit, IGF-2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vii)HGF, IGF-2, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (viii)HGF, IGF-2, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は

(g) グループAのバイオマーカーの4つとグループBのバイオマーカーの1つからなる組み合わせ

- (i)HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
- (ii)HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (iii)HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2と、VEGF；
- (iv)HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2と、s-VEGFR-2；又は

(h) グループAのバイオマーカーの4つとグループBのバイオマーカーの2つからなる組み合わせ

- (i)HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii)HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は

(i) 前記バイオマーカーの全てからなる組み合わせ。

【請求項37】

いずれも、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において、下記の遺伝子からなる組み合わせと特異的にハイブリダイズする、複数のオリゴヌクレオチド分子からなるオリゴヌクレオチドアレイ又はキット；

(a) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの1つからなる組み合わせ

- (i)HGFと、VEGF；
- (ii)s-c-Kitと、VEGF；
- (iii)s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv)HGFと、s-VEGFR-2；
- (v)s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (vi)s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii)Ang2と、VEGF；
- (viii)Ang2と、sVEGFR2；
- (ix)Ang2と、Ras p21；
- (x)IGF-2と、VEGF；
- (xi)IGF-2と、sVEGFR2；
- (xii)IGF-2と、Ras p21；又は

(b) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの2つからなる組み合わせ

- (i)HGFと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii)s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii)s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

- (iv)Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (v)Ang2と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (vi)Ang2と、Ras p21、及び、VEGF；
- (vii)IGF-2、VEGFと、sVEGFR2；
- (viii)IGF-2、sVEGFR2と、Ras p21；
- (ix)IGF-2、VEGFと、Ras p21；又は

(c) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i)HGF、s-c-Kitと、VEGF；
- (ii)HGF、s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (iii)HGF、s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv)HGF、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (v)s-c-Kit、s-VEGFR-3と、VEGF；
- (vi)s-c-Kit、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii)HGF、Ang2と、VEGF；
- (viii)HGF、Ang2と、s-VEGFR-2；
- (ix)s-c-Kit、Ang2と、VEGF；
- (x)s-c-Kit、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (xi)s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF；
- (xii)s-VEGFR-3、Ang2と、s-VEGFR-2；
- (xiii)IGF-2、HGFと、VEGF；
- (xiv)IGF-2、HGFと、sVEGFR2；
- (xv)IGF-2、HGFと、Ras p21；
- (xvi)IGF-2、Ang2と、VEGF；
- (xvii)IGF-2、Ang2と、sVEGFR2；
- (xviii)IGF-2、Ang2と、Ras p21；
- (xix)IGF-2、s-c-Kitと、VEGF；
- (xx)IGF-2、s-c-Kitと、sVEGFR2；
- (xxi)IGF-2、s-c-Kitと、Ras p21；又は

(d) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i)HGF、s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii)HGF、s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii)s-c-Kit、s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv)HGF、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (v)s-c-Kit、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vi)s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vii)IGF-2、HGFと、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (viii)IGF-2、HGFと、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (ix)IGF-2、HGFと、VEGF、及び、Ras p21；
- (x)IGF-2、Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (xi)IGF-2、Ang2と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (xii)IGF-2、Ang2と、VEGF、及び、Ras p21；
- (xiii)IGF-2、s-c-Kitと、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (xiv)IGF-2、s-c-Kitと、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (xv)IGF-2、s-c-Kitと、VEGF、及び、Ras p21；又は

(e) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i)HGF、s-c-Kit、s-VEGFR-3と、VEGF；
- (ii)HGF、s-c-Kit、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；

10

20

30

40

50

- (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF ;
- (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (ix) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF ;
- (x) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、s-VEGFR-2 ;
- (xi) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (xii) HGF, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2 ; 又は

10

(f) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, Ang2, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iv) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (v) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vi) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (viii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ; 又は

20

(g) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (iv) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2 ; 又は

(h) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ; 又は

30

(i) 前記バイオマーカー遺伝子の全てからなるオリゴヌクレオチドアレイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば、(1) 臨床的に有用な、血清及び／又は腫瘍バイオマーカー、並びに、肝細胞癌(HCC)の患者の治療を目的とした検出、予後判定及びガイダンスに利用可能な発現シグネチャの同定；及び(2)例えば、ソラフェニブ（単独又は他の薬剤との組み合わせ）のような、分子標的剤の有効性をモニター及び／又は研究するために使用することのできる発現シグネチャの発見に関する。本発明は、前記バイオマーカーの分析に基づいて、例えば、全生存期間(OS)、無進行期間(TTP)、及び／又は、HCC患者で化学療法（すなわちソラフェニブ）の利益を受ける可能性のような、臨床予後を予測する方法も提供する。他の関連性のある臨床予後としては、これらに限定されるものではないが、無進行生存期間、死亡までの期間、無病生存期間、進行症状までの期間、無再発生存期間、再発までの期間、病状(例えば、進行性、安定など)、及び、レスポンスのタイプ（すなわち、部分的、完全など）等が挙げられる。

40

【背景技術】

【0002】

世界的に、HCCは8番目に頻度の高い癌であって、頻度の高い男性の悪性腫瘍であるとされており、毎年100万人の新たな発症例がある(Parkin et al., Global cancer

50

statistics, 2002 CA Cancer J. Clin, 55, 74-108, 2005)。主として発展途上国及び新興国において、HCCは、毎年約100万人の死亡原因となっていると考えられている。合衆国においては、5年生存率(1992-1996)は、5%と報告されている(El-Serag et al., Hepatology 33:62-65, 2001)。例えば、B型又はC型肝炎などのウイルス感染に関連する肝機能障害、アルコール性肝障害及びアフラトキシンB暴露は、通常がん化を引き起こすと報告されている。実際には、世界におけるHCCの80%は、病原学的に、B型肝炎ウイルス(HBV)と関連があると報告されており、B型肝炎ウイルスは、合衆国に居住する非アジア人のHCCにおいて、4例のうちの1例を占めると推定されている(Bosch et al., "Primary liver cancer: worldwide incidence and trends." Gastroenterology, 127, S5-S16; 2004)。最近の報告によると、切除不能なHCCの標準的治療はない(Llov et al., Hepatology. 2003 Feb;37(2):429-42)。従って、HCCの予後予測、早期発見、及び治療の進歩に対して強いニーズがある。

【0003】

HCCに対する従来のバイオマーカーは、アルファフェトプロテイン(AFP)である(Yang et al., "Prospective study of early detection for primary liver cancer." J Cancer Res Clin Oncol. 1997; 123(6):357-60)。しかしながら、慢性肝疾患の患者及びアルコール依存症の患者も、AFPの血清レベルが上昇していることが報告されている(Mendenhall et al., "Alpha-fetoprotein alterations in alcoholics with liver disease. V.A. Cooperative Study Groups." Alcohol. 1991;26(5-6): 527-34)。HCCは、合併慢性肝疾患の患者で一般的に発生するので、AFPレベルは、単独では不十分なバイオマーカーであり、がんの予測値は40%台に過ぎないと考えられている(Huo et al., "The predictive ability of serum alpha-fetoprotein for hepatocellular carcinoma is linked with the characteristics of the target population at surveillance." J Surg Oncol. 2007 May 25;95 (8):645-651)。AFPのアイソフォームに係る定量分析は、診断価値を75%まで改善するが、膨大な時間と莫大な労働力を要すると考えられている(Sangiovanni et al., Gastroenterology 2004;126:1005-1014)。更に、HCC患者の約20%は20ng/ml未満という極めて低いAFPレベルである。P53タンパク質(Raedle et al., Eur J Cancer. 1998 Jul;34(8):198-203)や種々のアルデヒド脱水素酵素のアイソザイム(Park et al., Int J Cancer. 2002 Jan 10;97(2):261-5)のような更なるバイオマーカー等についても試された。しかしながら、これらの何れのものも、AFPと同等の予測値を持ってはいない(Huo et al.)。

【0004】

HCCを診断するために、生検を使用することができるが(Walter et al., Curr Opin Gastroenterol. 2008 May; 24(3):312-9. Review)、侵襲的な手法であり、望ましい方法であるとはいえないと考えられる(Saffroy et al., Clin Chem Lab Med. 2007; 45 (9): 1169-79. Review)。HCCに対する他の診断方法としては、超音波及びコンピューター断層撮影法(CT)スキャンがある(Schoelmerich et al., Gut 53: 1224-1226; 2004)。動脈性門脈造影の間の超音波検査法及びCTスキャンによって検出されたのは、HCC小結節(2cm以下)のたった25~28%であったと報告されている。

【0005】

HCCの同定に有用なだけでなくHCCの特徴(例えばソラフェニブで治療可能な人の特徴)づけも可能にする、バイオマーカー又はバイオマーカーの組み合わせを保有することは極めて望ましい。HCC診断のパンフレットには、前記バイオマーカー及びバイオマーカーの組み合わせは、未だ開示されていない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、がん診断に関する組成物及び方法、並びに、がんマーカー(これに限定されるものではない)を含む治療方法を提供するものである。特に本発明は、分子標的剤又は

10

20

30

40

50

標準的化学療法を用いた治療がなされる、肝細胞癌(HCC)患者の診断及び特徴づけに有用なマーカーを提供するものである。

【0007】

好ましくは、本発明は、進行した肝細胞癌（進行HCC）患者に関する。

【0008】

本発明は、血漿（又は血清）、がん患者由来の他の組織、及び、例えば治療後などの別の予後に対する1つの予後を伴う患者における腫瘍組織由来の他の組織、における遺伝子発現を調べることによって、腫瘍に関連した遺伝子発現における広範囲の変化を特定する。本発明は、有用な診断マーカーだけでなく、病状、疾患の進行及び治療的介入の効果をモニターするために使用可能なマーカーとしての機能を果たす、発現プロファイルも同定する。

10

【0009】

一つの実施態様において、本発明は、HCC患者の試験サンプルにおける、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体2(s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体3(s-VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p21、リン酸化ERK(pERK)、アンジオポエチン2(Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF、FGF2又はFGF- β としても知られる;以下bFGF)、上皮細胞増殖因子(EGF)及び／又はインシュリン様増殖因子2(IGF-2)の少なくとも1つのバイオマーカーを検出し、前記バイオマーカーの前記レベルを、参照基準と比較することからなり、前記参照基準と比較された前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの発現レベルの差異がHCCの予後を示すものとする、前記患者の予後を予測する方法を提供する。また本発明はHCC患者の試験サンプルにおける、例えば、可溶性VEGF受容体3(s-VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p21、又は、リン酸化ERK(pERK)の少なくとも1つのバイオマーカー及びアンジオポエチン2(Ang2)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体2(s-VEGFR-2)、インシュリン様増殖因子2(IGF-2)又は塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の、少なくとも1つのバイオマーカーのような、バイオマーカーの組み合わせを検出することからなる、HCC患者の予後を予測する方法も提供する。

20

【0010】

本発明は、バイオマーカーの発現差異を検出し、その発現／レベルを、例えば、メジアン値、75パーセンタイル値若しくは25パーセンタイル値、又は、非-HCC群（すなわち、健康者、又は、HCCではないが、肝硬変、B型肝炎及び／又はC型肝炎の被検者）によって定義される値のような参照基準と関連付ける方法を提供する。本発明のバイオマーカーは、以下の表に示される。

30

【0011】

表1A：患者集団におけるHGF、VEGF、sVEGFR3、Ras p21、c-Kit及びsVEGFR2レベルのベースライン値

ベースライン バイオマーカー	HGF (pg/mL)	VEGF (pg/mL)	sVEGFR-3 (pg/mL)	Ras p21 (pg/mL)	c-Kit (pg/mL)	sVEGFR-2 (pg/mL)
25 パーセンタイル	1802.2	32.2	30558.9	311.9	8.0	7347.3
メジアン	2431.1	54.8	39587.0	776.8	11.3	8653.4
75 パーセンタイル	3279.1	101.9	52314.9	1819.7	14.4	10206.6

40

【0012】

表1B：患者集団におけるAng2、bFGF、EGF及びIGF-2レベルのベースライン値

血漿 バイオマーカー	25 パーセンタイル	メジアン	75 パーセンタイル
Ang2 (pg/mL)	4101.6	6061.1	9167.4
bFGF (pg/mL)	3.3	7.5	17.0
EGF (pg/mL)	10.3	30.4	79.5
IGF-2 (ng/mL)	598.4	797.7	1078.6

表 1 C : バイオマーカーレベルの詳細な表

バイオマーカー サイクル	Ang-2		Ang-2		Ang-2		bFGFhs		bFGFhs		EGF		EGF		IGF-2		IGF-2	
	0	3	変 化	C3	変 化	C3	0	3	変 化	C3	0	3	変 化	C3	0	3	変 化	C3
単 位	pg/ml	pg/ml	%	pg/ml	%	pg/ml	pg/ml	pg/ml	%	pg/ml	pg/ml	pg/ml	%	pg/ml	ng/ml	ng/ml	%	ng/ml
パーセンタイル																		
0.05	2456.0	2342.6	-38.1	-4754.5	-81.8	-15.0	0.5	0.6	-15.0	-87.3	2.2	2.7	-87.3	-103.6	415.0	553.4	-46.2	-497.5
0.10	3085.4	3044.4	-28.9	-2509.9	-73.6	-10.2	1.5	1.2	-10.2	-78.8	3.9	3.6	-78.8	-58.7	462.0	404.7	-39.4	-392.3
0.15	3376.8	3453.8	-22.8	-1327.5	-64.9	-6.5	2.1	1.7	-6.5	-67.9	5.4	4.6	-67.9	-40.8	513.3	443.8	-30.7	-315.4
0.20	3819.7	3659.9	-19.2	-931.3	-53.3	-4.3	2.6	2.3	-4.3	-63.3	7.7	6.7	-63.3	-33.1	546.1	476.2	-26.3	-250.7
0.25	4101.6	4011.9	-14.0	-653.7	-41.0	-3.3	3.3	2.8	-3.3	-56.4	10.3	8.6	-56.4	-21.8	598.4	516.9	-23.7	-208.5
0.30	4567.1	4363.3	-9.3	-430.6	-30.2	-2.2	3.9	3.5	-2.2	-47.2	12.8	11.0	-47.2	-14.1	640.8	579.0	-20.5	-182.5
0.35	4942.4	4731.5	-5.3	-208.1	-23.0	-1.3	4.5	4.3	-1.3	-38.3	17.0	13.5	-38.3	-11.9	671.7	628.4	-18.6	-156.8
0.40	5210.3	5082.1	-2.1	-119.0	-14.4	-0.6	5.4	5.2	-0.6	-27.9	20.7	16.7	-27.9	-7.7	725.3	669.3	-15.9	-139.3
0.45	5624.9	5381.2	0.7	32.2	-4.7	-0.2	6.3	6.3	-0.2	-23.2	24.2	20.3	-23.2	-3.9	767.6	704.1	-13.9	-113.3
0.50	6061.1	5775.9	5.1	220.6	4.2	0.2	7.5	7.6	0.2	-14.6	30.4	27.7	-14.6	-2.2	797.7	737.8	-11.2	-94.3
0.55	6588.9	6205.5	9.0	428.4	14.5	0.6	9.5	8.7	0.6	-2.1	36.2	35.2	-2.1	-0.3	858.7	790.7	-9.2	-77.3
0.60	6999.0	6631.9	13.0	695.5	28.8	1.3	10.8	10.2	1.3	4.0	44.7	41.3	4.0	1.2	907.7	831.5	-6.3	-52.9
0.65	7814.6	7528.0	18.9	1087.5	44.8	2.3	12.9	12.2	2.3	14.6	53.8	48.5	14.6	3.0	959.8	863.5	-4.6	-28.3
0.70	8389.2	8123.1	25.3	1426.4	66.1	3.7	15.4	15.7	3.7	27.6	66.5	60.5	27.6	6.6	1015.2	915.4	-0.7	-5.1
0.75	9167.4	9265.9	30.8	1628.8	83.2	5.4	17.0	18.5	5.4	45.9	79.5	75.1	45.9	10.6	1078.6	1001.5	3.4	27.9
0.80	10364.0	10329.8	41.0	2327.8	108.2	6.8	19.3	21.5	6.8	87.5	99.8	90.7	87.5	19.7	1187.6	1106.7	7.8	58.6
0.85	11803.5	12491.2	58.2	3019.6	132.7	10.8	24.7	26.3	10.8	131.8	128.5	118.9	131.8	30.1	1299.9	1216.3	13.0	94.1
0.90	14016.8	15241.2	76.0	4814.4	194.1	14.2	34.4	37.7	14.2	229.1	158.4	151.4	229.1	56.4	1517.0	1343.5	17.3	134.5
0.95	18085.3	19795.7	126.0	8490.5	413.5	27.9	51.2	70.9	27.9	417.8	225.5	246.2	417.8	93.4	1842.6	1592.3	27.7	282.7

本発明に係る種々のバイオマーカーの構造情報を得るために、当業者は公知の技術を利用することができると思われる。例えば、バイオマーカーが、例えば、Ras p21のような遺伝子である場合には、当業者は、NCBIのウェブサイト(ワールドワイドウェブのncbi.nlm.nih.govで利用可能である)を通して、前記バイオマーカーのタンパク質／遺伝子／RNA配列の構造情報を得ることができる。純粹に理解を容易にするために、熟達した研究者は、本明細書におけるRas p21が、例えば、H-Ras(GeneID:3265)、K-Ras(GeneID:3845)及びN-Ras(GeneID:4893)のような、Rasファミリータンパク質のメンバーと関係づけられることを理解するであろう。

【0014】

本発明の理解を促進するため、本明細書におけるAng2は、アンジオポエチンファミリータンパク質のメンバー(例えば、Kim et al., J. Biol. Chem. 275: 18550-18556, 2000.に記載されている、Ang2前駆体及びAng2スプライスバリエーションタンパク質)と関係づけられる。好ましくは、Ang2はUniprot accession No.015123(NCBI accession No. NP_001138)を有するタンパク質と関係する。

【0015】

同様に本明細書におけるbFGFは、線維芽細胞増殖因子ファミリータンパク質のメンバー(例えばbFGF又はFGF2)と関係づけられる。好ましくは、bFGFは、Uniprot accession No. P09038(NCBI accession No. NP_001997)を有するヒトbFGFタンパク質と関係する。

【0016】

本明細書におけるEGFは、上皮細胞増殖因子ファミリータンパク質のメンバー(例えばEGF)と関係する。好ましくは、EGFは、Uniprot accession No. P01133 (NCBI accession No. NP_001954)を有するヒトEGFタンパク質と関係する。

【0017】

本明細書におけるIGF2は、インシュリン様増殖因子ファミリータンパク質のメンバーと関係する。好ましくは、Uniprot accession No. P01344 (NCBI accession No. NM_000612)を有するヒトIGF2タンパク質と関係する。

【0018】

当技術分野で公知であるVEGFのいくつかのアイソフォームに関して、本発明は、HCC患者の試験サンプルにおいて、血管内皮細胞増殖因子A(VEGF-A; GeneID: 7422)の、少なくとも1つのバイオマーカーを検出することからなる、HCC患者の予後を予測する方法を提供する。

【0019】

更に、循環する(即ち、可溶性である)バイオマーカータンパク質のレベルとその天然型のレベルとの間の相互関係に依拠して、本発明は、循環型が好ましくはあるものの、バイオマーカータンパク質の循環型に制限されることはないということを、当業者は理解するであろう。例えば、前記したように、本発明は、HCC患者の試験サンプルにおける、c-Kit(“可溶”c-KIT)の細胞外ドメイン(ECD)の、少なくとも1つのバイオマーカーを検出することからなる、前記患者の予後を予測する方法を提供する。循環するc-Kitの細胞外ドメインは、腫瘍自身から放出されるので、それは、腫瘍中に存在するc-Kitレベルを反映するかも知れない。従って、本発明は、例えば、c-Kit(s-c-Kit)の循環する細胞外ドメインのようなバイオマーカーに制限されることはなく、腫瘍上のフルレングスのc-Kitをも含む。

【0020】

好ましくは、本発明のバイオマーカーは、血漿で見られるか又は検出可能であり、従って、血漿バイオマーカーと呼ばれる。

【0021】

本発明者らは、VEGF、s-VEGFR-3、IGF-2及びAng2の血漿レベルが、単独又は組み合わせて、HCC患者における全生存期間(OS)の優れた予後指標となることを見出した。VEGF及びAng2は、無進行期間(TTP)及び全生存期間(OS)の優れた予後指標であることが判明した。IGF-2は、OSの優れた予後指標であることが判明した。他の関連性のある臨床予後

10

20

30

40

50

としては、これらに制限されるものではないが、無進行生存期間、死亡までの期間、無病生存期間、進行症状までの期間、無再発生存期間、再発までの期間、病状(すなわち、進行性、安定など)、及び、レスポンスのタイプ(例えば、部分的、完全など)等が挙げられる。

【0022】

本発明の一つの実施態様において、発明者らは、低いレベルの血漿VEGF及び／又は低いレベルの血漿Ang2が、HCC患者の全生存期間(OS)の改善に関連することを確認した。この実施態様に関連する研究において、HCC患者における75パーセンタイルの血漿VEGFレベル(VEGFについては101.928pg/ml)が、「低」又は「高」血漿バイオマーカー(すなわち、VEGF等)レベルを有する患者の特徴づけのための参照基準として使用された。Ang2に關して、メジアン(50パーセンタイル)の血漿Ang2レベル(6.061ng/ml)が、「低」又は「高」血漿バイオマーカーレベルを有する患者の特徴づけのための参照基準として使用された。このような研究において、血漿Ang2レベルが6.061ng/mlより高い患者は、血漿Ang2レベル6.061ng/mlよりも低い患者と比べて、全生存期間が悪くなることが確認された。血漿Ang2レベルとOSとの間の相関は、統計的に有意であることが判明した。

10

【0023】

関連する実施態様において、本発明者らは、高いレベルの血漿IGF-2がHCC患者の全生存期間(OS)の改善に関連することを確認した。この実施態様に関連する研究において、メジアン(50パーセンタイル)の血漿IGF-2レベル(797.7ng/ml)が、「低」又は「高」血漿バイオマーカーレベルを有する患者の特徴づけのための参照基準として使用された。血漿IGF-2レベルが797.7ng/mlよりも高い患者は、血漿IGF-2レベルが797.7ng/mlよりも低い患者に比べて、全生存期間が改善したことが確認された。IGF-2レベルとOSとの間の相関は、統計的に有意であることが判明した。

20

【0024】

本発明の別の側面は、無進行期間と血漿バイオマーカーの関連性に関する。このような研究において、血漿Ang2レベルが6.061ng/mlより高い患者は、血漿Ang2レベルが6.061ng/mlより低い患者と比べて、無進行期間が短かったことが確認された。血漿Ang2レベルとTTPとの間の関連性は、統計的に有意であることが判明した。

【0025】

HCC患者における、血漿VEGF及び血漿Ang2レベルと、独立に評価された無進行期間(TTP)との間の相関は、良く似ていることが判明した(すなわち、低VEGF及び／又は低Ang2レベルは、TTPの増大と関連している。)。

30

【0026】

全生存期間の改善と関連する低いレベルの血漿s-VEGFR-3を有するHCC患者における血漿s-VEGFR-3レベルと全生存期間との間の相関が、統計的に有意であることが判明した。これらの実施態様に関連する研究で、HCC患者における25パーセンタイルの血漿s-VEGFR-3レベル(30.559ng/ml)が、「低」対「高」s-VEGFR-3レベルの決定のための参照基準として使用された。

【0027】

本発明の他の実施態様において、発明者らは、低いレベルのRas p21バイオマーカーが、無進行期間(TTP)と関連することを確認した。このような実施態様では、Ras p21のメジアンレベル(1042.9pg/mL)が、「低」又は「高」Ras p21を有する患者の特徴づけのための参照基準として使用された。プラセボ患者の多変量解析において、Ras p21のレベルが低くなると、無進行期間(TTP)はより短くなった。そこで本発明は、低いレベルのRas p21の未治療の患者が、高いレベルの患者より予後TTPが悪い、TTPに対する予後因子としてのRas p21を同定する方法を提供する。

40

【0028】

HCC患者における血漿Ras p21レベルと無進行期間との間の相関は、プラセボ患者において、高い血漿Ras p21レベルで無進行期間が改善し、統計的に有意であることが判明した。これらの実施態様に関連する研究において、血漿Ras p21レベルが低いほど、進行リス

50

クが著しく増加した。例えば、進行HCC患者の25パーセントイルのRas p21 (464.9 pg/mL) を有する患者は、75パーセントイルの患者より進行のリスクが29.4%増加する。

【0029】

従って本発明は、上記の血漿バイオマーカーの1つ以上のレベルに基づく、HCCと診断される患者の予後予測、例えば、全生存期間(OS)又は無進行期間(TTP)の予測を可能にする。本発明の方法は、前記患者の試験サンプルにおいて、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体3(s-VEGFR-3)、Ras p21、肝細胞増殖因子(HGF)、アンジオポエチン2(Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、上皮細胞増殖因子(EGF)及び／又はインシュリン様増殖因子2(IGF-2)の、少なくとも1つのバイオマーカーを検出し、前記患者の試験サンプルにおける前記バイオマーカーの発現レベルと参照基準とを比較することからなり、前記参照基準と比較された前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの発現レベルの差異が、前記予後の指標となる。バイオマーカーは、例えば、VEGF、s-VEGFR-3、Ang2、IGF-2又はそれらの組み合わせのような、血漿バイオマーカーであることが好ましい。

10

【0030】

一つの実施態様においては、予後はOSであり、方法は、Ang2、IGF2、VEGF又はs-VEGFR-3の少なくとも1つ血漿バイオマーカーを検出することからなる。上記のように、低いレベルの血漿Ang2、血漿VEGF又は血漿s-VEGFR-3(参照基準、例えば、HCC患者群における、50パーセントイルの血漿Ang2/IGF-2レベル、75パーセントイルのVEGFレベル、又は、25パーセントイルのs-VEGFR-3レベルと比較)は、HCC患者のOSの改善に関連する。

【0031】

20

他の実施態様では、予後はOSであり、方法は、Ang2、IGF-2又はs-VEGFR-3、及び、任意であるVEGFから選択される少なくとも1つの血漿バイオマーカーを検出することからなる。上記のように、低いレベルの血漿HGF、血漿VEGF又は血漿s-VEGFR-3(参照基準、例えば、HCC患者群における、75パーセントイルの血漿HGF/VEGFレベル又は25パーセントイルの血漿s-VEGFR-3レベルと比較)は、HCC患者におけるOSの改善に関連する。

【0032】

関連のある実施態様においては、予後は無進行期間(TTP)であり、方法は、Ang2、Ras p21、VEGF又はそれらを組み合わせたバイオマーカーの少なくとも1つを検出することからなる。バイオマーカーは、例えば、Ang2又はVEGFなどの血漿バイオマーカーであることが好ましい。上記したように、HCC患者における低いレベルの血漿Ang2(参照基準、例えば、HCC患者群の50パーセントイルの血漿Ang2レベルと比較)は、TTPの改善と関連する。同様に、HCC患者における低いレベルのVEGF(参照基準、例えば、HCC患者群の75パーセントイルの血漿VEGFレベルと比較)は、TTPの改善と関連する。

30

【0033】

また本発明は、前記バイオマーカーの組み合わせを検出することからなる、予後、例えば、HCC患者の全生存期間及び／又は無増殖期間を予測するという効果もある。好ましい組み合わせは、例えば、HGF及びVEGF；HGF及びs-VEGFR-3；VEGF及びs-VEGFR-3；HGF、VEGF及びs-VEGFR-3；HGF及びRas p21；HGF、VEGF及びRas p21；VEGF及びRas p21；s-VEGFR-3及びRas p21；c-KIT及びbFGF；c-KIT及びIGF-2；bFGF及びIGF-2；HGF及びbFGF；HGF及びIGF-2などが挙げられる。

40

【0034】

特に好ましい組み合わせとしては、例えば、c-KIT及びbFGF；c-KIT及びIGF-2；bFGF及びIGF-2；HGF及びbFGF；HGF及びIGF-2などが挙げられる。

【0035】

バイオマーカーの組み合わせのより高い効果のため、上記された1つの様なバイオマーカー(又はプロテオミック・シグネチャ)の組み合わせの使用が、特に好ましいと、技術者に十分に理解頂けているであろう。

【0036】

単なる例示を目的として、本出願の発明者らは、以下のことを特定する：

(a) 高BL VEGFのHCC患者は、低BL VEGFの患者よりOSが短く(75パーセントイルのHCC患

50

者は、25パーセンタイルのHCC患者より死亡の危険性がより高い)；

(b) 高BL s-VEGFR-3のHCC患者は、低BL s-VEGFR-3のHCC患者よりもOSが短く(75パーセンタイルのHCC患者は、25パーセンタイルのHCC患者より死亡の危険性がより高い)；

(c) 高いベースライン(BL) Ang2のHCC患者は、低BL Ang2の患者よりもOSが短く(75パーセンタイルのHCC患者は、25パーセンタイルのHCC患者より死亡の危険性がより高い)；

(d) 高いベースライン(BL) IGF-2のHCC患者は、低BL IGF-2の患者よりもOSが長く(75パーセンタイルのHCC患者は、25パーセンタイルのHCC患者より死亡の危険性がより低い)；

(e) 低いベースラインRas p21のHCC患者は、高Ras p21レベルのHCC患者よりも無進行期間(TTP)が短く(25パーセンタイルのHCC患者は、75パーセンタイルのHCC患者より進行する危険性がより高い)；

(f) 高BL VEGFのHCC患者は、低BL VEGFの患者よりもTTPが短く(75パーセンタイルのHCC患者は、25パーセンタイルのHCC患者より進行する危険性がより高い)；

(g) 高いベースライン(BL) Ang2のHCC患者は、低BL Ang2の患者よりもTTPが短く(75パーセンタイルのHCC患者は、25パーセンタイルのHCC患者より死亡の危険性がより高い)。

【0037】

表2A：HCCに対する予後因子としてのベースライン血漿バイオマーカーの例($p \leq 0.05$ は有意差を示す。)

バイオマーカー	TP	バイオマーカー変数の型	行われた解析	使用された母集団	EP	P-値	(B)	OS/TTPとの相関(延長/短縮)
c-Kit	ベースライン	Continuous	多変量	全患者	OS	0.078	-	延長
c-Kit	ベースライン	Continuous	多変量	ソラフェニブ患者のみ	OS	0.051	-	延長
c-Kit	ベースライン	Binned	多変量	全患者	OS	0.033	-	延長
c-Kit	ベースライン	Binned	多変量	ソラフェニブ患者のみ	OS	0.003	-	延長
HGF	ベースライン	Continuous	単変量	プラセボ患者のみ	OS	0.013	+	短縮
HGF	ベースライン	Continuous	多変量	ソラフェニブ患者のみ	OS	0.004	+	短縮
HGF	ベースライン	Continuous	多変量	ソラフェニブ患者のみ	TTP	0.081	+	短縮
HGF	ベースライン	Binned	単変量	プラセボ患者のみ	OS	0.032	+	短縮
HGF	ベースライン	Binned	多変量	ソラフェニブ患者のみ	OS	0.017	+	短縮
Ras p21	ベースライン	Continuous	多変量	プラセボ患者のみ	OS	0.075	-	延長
Ras p21	ベースライン	Continuous	多変量	プラセボ患者のみ	TTP	0.011	-	延長
Ras p21	ベースライン	Binned	多変量	プラセボ患者のみ	TTP	0.001	-	延長
VEGF	ベースライン	Continuous	単変量	プラセボ患者のみ	OS	0.001	+	短縮
VEGF	ベースライン	Continuous	多変量	全患者	OS	0.002	+	短縮
VEGF	ベースライン	Continuous	多変量	全患者	TTP	0.081	+	短縮
VEGF	ベースライン	Continuous	多変量	プラセボ患者のみ	OS	0.001	+	短縮
VEGF	ベースライン	Continuous	多変量	プラセボ患者のみ	TTP	0.005	+	短縮
VEGF	ベースライン	Binned	単変量	プラセボ患者のみ	OS	0.001	+	短縮
VEGF	ベースライン	Binned	多変量	全患者	OS	0.006	+	短縮
VEGF	ベースライン	Binned	多変量	プラセボ患者のみ	OS	0.001	+	短縮
VEGF	ベースライン	Binned	多変量	プラセボ患者のみ	TTP	<0.001	+	短縮
VEGFR-3	ベースライン	Continuous	単変量	プラセボ患者のみ	OS	0.014	+	短縮
VEGFR-3	ベースライン	Binned	単変量	プラセボ患者のみ	OS	0.083	+	短縮

*多変量解析は、コックス比例ハザードモデルを用いて行った。OS解析に関しては、変数(全てのベースライン値)としては、治療群(両方のグループが含まれる場合)、SHARP試験においてOSに対する予測が示された8臨床因子(ECOG PS、腫瘍量、AFP、肉眼的血管浸潤(macroscopic vascular invasion)、チャイルドピーユのステータス、アルブミン、アルカリフォスファターゼ、総ビリルビン)、及び、6つのベースライン血漿バイオマーカー(c-KIT、HGF、Ras p21、VEGF、VEGFR-2、VEGFR-3)が挙げられる。TTP解析に関しては、変数(全てのベースライン値)としては、治療群(両方のグループが含まれる場合)、SHARP試験においてTTPに対する予測が示された4臨床因子(腫瘍量、AFP、アルカリ

フォスファターゼ、病因)、及び、6つのベースライン血漿バイオマーカー(c-KIT、HGF、Ras p21、VEGF、VEGFR-2、VEGFR-3)が挙げられる。

【0038】

上記のベースライン血漿バイオマーカーは、調査された患者のクラスから得られた。ベースライン値は、患者のクラスによって異なる可能性があることが予測され、本発明はこれらのベースライン値の使用に制限されることはない。

【0039】

本発明においては、HCC患者の試験サンプルにおける、HGF、VEGF、s-VEGFR-3、c-Kit、Ang2又はIGF-2、好ましくは、s-VEGFR-3、Ang2又はIGF-2、特に好ましくは、s-VEGFR-3及びAng2である、少なくとも1つのバイオマーカー、並びに、任意で、以下の少なくとも1つの追加のパラメーターを検出することからなる、HCC患者の予後を予測する方法も提供される。

10

(a) イースタン・コーポレイティブ・オンコロジー・グループ (Eastern Cooperative Oncology Group) パフォーマンスステータス(ECOG PS:0対1+2),

(b) 大血管の血管浸潤 (macrovascular vascular invasion) ;

(c) 腫瘍量 ;

(d) 肝外進展 (extra-hepatic spread) ;

(e) アルファフェトプロテインレベル (AFP) ;

(f) アルカリフォスファターゼレベル (AP) ;

(g) 腹水 ;

20

(h) ビリルビンレベル ;

(i) アルブミンレベル ;

(j) PTスコア ; 及び/又は

(k) チャイルド-ピュー (child-pugh) スコア。

【0040】

本発明のバイオマーカーが、技術的に良く理解された、上記の追加の臨床的予後因子とは関係なく、有用な予後情報を提供するものであることは、既に、技術者に十分に理解頂けているであろう。例えば、高いECOGスコアの患者は、低ECOGの患者より悪くなる。このように、本発明のバイオマーカーは、単なるECOGスコア (及び他の7つのHCCに対する公知の予後因子) よりも優れた予後情報を提供するものである。従って、予後判定に関して、当業者は、これらの予後因子の何れか又は全て (又はいずれかの組み合わせ) に予後のバイオマーカーを加えて使用して、個々の患者の予後を判断することができる。

30

【0041】

本発明の追加の臨床的予後因子は、下記の通りである :

【0042】

ECOG (イースタン・コーポレイティブ・オンコロジー・グループ) パフォーマンスステータス、すなわち、患者が何をすることができるかの基準である。0~5のスケールで評価される。本発明の方法においては、単純に0~2のECOGステータスの患者を登録するだけであり、殆どの患者が0又は1である (2は殆どない)。統計解析に関して、患者は、2つのグループに分けられる : 0対1又は2 (Oken et al., American Journal of Clinical Oncology, 1982)。スケールは、下記の表に規定されている。

40

表3 : ECOGパフォーマンスステータス

ECOG パフォーマンスステータス

グレード	ECOG
0	全く問題なく活動できる。発病前と同じ日常生活が制限なく行える。
1	肉体的に激しい活動は制限されるが、歩行可能で、軽作業や座っての作業は行うことができる。 例: 軽い家事、事務作業
2	歩行可能で自分の身の回りのことはすべて可能だが作業はできない。日中の50%以上はベッド外で過ごす。
3	限られた自分の身の回りのことしかできない。日中の50%以上をベッドか椅子で過ごす。
4	全く動けない。自分の身の回りのことは全くできない。完全にベッドか椅子で過ごす。
5	死亡

* Am. J. Clin. Oncol.: Oken, M.M., Creech, R.H., Tormey, D.C., Horton, J., Davis, T.E., McFadden, E.T., Carbone, P.P.: Toxicity And Response Criteria Of The Eastern Cooperative Oncology Group. Am J Clin Oncol 5:649-655, 1982. に公開された通り

【0043】

腫瘍量: 「腫瘍量」は、腫瘍が血管浸潤を有しているか、肝外進展を有しているかのどちらか、又はその両方を意味している。これは、YESかNOの変数であり、YESは、予後の悪化を意味している。

【0044】

AFP、すなわち、高AFPレベルは、予後の悪化を意味する。本発明において（及び、AFPの予後値を示しているSHARPの研究にある公表された解析において；引用：Llovet et al. 2008

Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. NEJM 359(4):378- 390)、メジアン値は、例えば、AFPレベルのような、追加のパラメーターの「高」対「低」レベルを有する患者を分類するために使用された。例えば、100、200及び400ng/mLなどの、臨床的に有意であるとして公表された、他のAFPに対するカットオフ値を用いて更なる分析が行われた。「高」対「低」AFPレベルがどのように定義されても、OS及びTTPの両方に対して有意な予後因子であった。更に重要なことは、AFPに対するカットオフ値が異っても、バイオマーカーの知見の有意性に影響を与えなかった。

【0045】

肉眼的血管浸潤、即ち、この追加のパラメーターは、2進（すなわち、YES又はNO）法で評価され、YES（血管浸潤がある）は、予後不良と相関する。

【0046】

チャイルドープュー スコア: A、B又はCとして点数化し、“より高い”スコア（C）は、予後がより悪いことを意味する。A、B及びCは、下記の表に示される臨床的測定値によって決定される。

肝疾患重症度のチャイルド－ピュー分類

基準	1ポイント	2ポイント	3ポイント
ビリルビン(mg/dl)	<2	2-3	>3
アルブミン(g/dl)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
プロトロビン時間	1-3	4-6	>6
腹水	なし	わずか	中程度
脳障害(グレード)	なし	I-II	III-IV

グレードA:5-6ポイント、グレードB:7-9ポイント、グレードC:10-15ポイント

10

【0047】

アルブミン、アルカリフォスファターゼ及び総ビリルビン：本解析において（及び、これらの3因子の予後値を示すSHARPの研究にある公表された解析において）、アルブミン、AP及びビリルビンのメジアン値は、低いレベルから高いレベルを分けるために使用された。アルブミンに関しては、低いレベルは予後の悪化に関連した。アルカリフォスファターゼ及び総ビリルビンは、高いレベルが予後の悪化に関連した。

【0048】

追加のパラメーター、例えば、AFPのメジアンレベル、大血管浸潤の存在／非存在、ビリルビン、アルブミン及び／又はAPのメジアンレベルなどは、公知の技術によって決定することができる。どれを使用するかにかかわらず（例えば、メジアンAFPを使用することができる）バイオマーカーの結果は正しいので、例えば、AFP100ng/mL、200ng/mL又は400ng/mL等の他の値も、高対低AFPを決定するために使用することができる。追加のパラメーターレベルは、主治医によって決定されてもよく（例えば、大血管浸潤又は腫瘍量）、又は、臨床医（例えば、血漿ビリルビン、アルブミン、AFP及びAPレベル）によって決定されてもよい。「高」又は「低」のような追加のパラメーターの格付けは、所定のスコアリング手順を用いて行うことができる。例えば、二進法のスコアリング法[binary scoring technique]（すなわち、1=メジアンより上、0=メジアン以下）、スケールシステム[scale system]（すなわち、スケール1～5、スケール1が最も低く、5が最も高い）、又は、実測値を使用してもよい。

20

30

【0049】

代表例として、HGFとこれらのパラメーターとの関連性の方向性を、以下の表4に示す。

【0050】

表4の臨床パラメーターを、調査された患者のクラスから得た。ベースライン値は、患者のクラスで異なる場合がある可能性が予測され、本発明は、これらの値の使用に制限されることはない。

【0051】

本発明の実施態様において、下記からなる、HCC患者の全生存期間の予後診断を提供する；

40

前記患者の試験サンプルにおける、血漿Ang2のバイオマーカーの少なくとも1つ、及び、下記の追加のパラメーターの少なくとも1つを検出し、

- (a) イースタン・コーポレイティブ・オンコロジー・グループ パフォーマンスステータス(ECOG PS:0対1+2),
- (b) 大血管の血管浸潤;
- (c) 腫瘍量;
- (d) 肝外進展;
- (e) アルファフェトプロテイン(AFP)レベル;
- (f) アルカリフォスファターゼ(AP)レベル;
- (g) 腹水;

50

- (h) ビリルビンレベル;
- (i) アルブミンレベル;
- (j) PTスコア; 及び/又は
- (k) チャイルド-ピュー スコア;

前記患者における前記血漿HGFレベル及び前記追加のパラメーターを参照基準と比較することからなり;

低いレベルの追加のパラメーター (i)、又は、パラメーター(a)~(h)若しくはパラメーター(J)~(k)の高いレベルの追加のパラメーターと組み合わさった高いレベルの前記血漿Ang2レベルは、全生存期間の悪化を示すものとする。

表 4 : ベースラインHGFレベル及び人口統計学的変数 ($p \leq 0.05$ 有意性を示す)

ベースラインにおける 人口統計学的変数	N	HGF値		P-値
		平均	メジアン	
性別				
男性	403	2772.2	2429.6	0.833
女性	64	2754.2	2530.6	
年齢群				
<65歳	185	2768.5	2480.7	0.931
≥65歳	282	2770.6	2429.3	
ECOG ステータス				
0	241	2778.6	2418.7	0.936
>0	226	2760.3	2503.5	
腫瘍量				
無	146	2635.4	2429.3	0.298
有	321	2830.9	2464.3	
AFP				
≤メジアン	233	2549.5	2301.8	0.011
>メジアン	234	2989.0	2570.1	
肉眼的血管浸潤				
無	290	2570.4	2304.5	0.002
有	177	3096.4	2663.7	
アルブミン				
≤メジアン	232	3145.5	2808.5	<0.001
>メジアン	235	2398.8	2066.6	
アルカリフォスファターゼ				
≤メジアン	235	2472.1	2210.0	<0.001
>メジアン	232	3071.2	2662.6	
総ビリルビン				
≤メジアン	232	2412.8	2154.4	<0.001
>メジアン	235	3122.2	2738.8	

表 4 B : ベースラインAng2レベル及び人口統計学的変数 ($p \leq 0.05$ 有意性を示す)

ベースラインにおける 人口統計学的変数	N	Ang2 レベル		P-値*
		平均値	メジアン	
性別				
男性	405	7672.5	6018.8	0.6853
女性	64	8175.0	6264.0	
年齢群				
<65歳	187	7850.3	6422.8	0.6796
≥65歳	282	7668.6	5945.0	
ECOG ステータス				
0	239	6608.8	5598.4	<0.0001
>0	230	8917.6	6950.4	
腫瘍量				
無	145	6800.0	5442.8	0.016
有	324	8162.2	6348.2	
AFP				
≤メジアン	234	6887.8	5402.3	0.0015
>メジアン	235	8590.7	6546.8	
肉眼的血管浸潤				
無	291	6889.6	5514.3	<0.0001
有	178	9133.1	7357.6	
アルブミン				
≤メジアン	236	9273.2	7475.7	<0.0001
>メジアン	233	6189.2	4979.1	
アルカリフォスターゼ				
≤メジアン	236	6305.7	5112.2	<0.0001
>メジアン	233	9195.0	7288.1	
総ビリルビン				
≤メジアン	231	6857.3	5307.6	0.0003
>メジアン	238	8598.9	6877.5	

【0052】

特に、本発明者らは、高Ang2レベルが、下記のものに関連することを見出した；

- － 高ECOGスコア (>0)
- － 「腫瘍量」の存在 (MVI又はEHS)
- － 高AFP (>メジアン)
- － 肉眼的血管浸潤の存在
- － 低アルブミン (≤メジアン)
- － 高アルカリフォスファターゼ (>メジアン)
- － 高総ビリルビン (>メジアン)
- － これらの関連性全ての方向性が、極めて一致していた。

表4C：ベースラインIGF-2レベル及び人口統計学的変数 (p≤0.05有意性を示す)

10

20

30

40

ベースラインにおける 人口統計学的変数	N	IGF-2レベル		P-値*
		平均値	メジアン	
性別				
男性	408	840.7	778.1	<0.0001
女性	64	1374.7	1213.0	
年齢群				
<65歳	188	972.7	854.8	0.0182
≥65歳	284	873.6	793.2	
ECOG ステータス				
0	241	935.4	855.8	0.2197
>0	231	889.9	777.5	
腫瘍量				
無	146	885.2	780.1	0.4098
有	326	925.6	838.3	
AFP				
≤メジアン	235	947.2	847.2	0.1107
>メジアン	237	879.2	788.9	
肉眼的血管浸潤				
無	293	960.8	871.8	0.001
有	179	835.1	744.4	
アルブミン				
≤メジアン	237	754.6	653.8	<0.0001
>メジアン	235	1073.0	948.9	
アルカリフォスターゼ				
≤メジアン	239	929.6	856.6	0.1715
>メジアン	233	896.2	754.7	
総ビリルビン				
≤メジアン	234	1056.9	938.9	<0.0001
>メジアン	238	771.7	683.0	

【0053】

特に、本発明者らは、低IGF-2レベルと、下記のものとの関連性を見出した；

- －男性
- －年齢 65歳以上
- －肉眼的血管浸潤の存在
- －低アルブミン（≤メジアン）
- －高総ビリルビン（>メジアン）

【0054】

また本発明は、分岐変数(bifurcated variable)としてバイオマーカーを使用して、HCC患者の予後を予測する。この研究の結果を、表4D及び4Eに示す。

表4D：HCCにおけるOSに対する独立した予後因子を同定するための多変量解析一分岐変数としてバイオマーカーを使用（ $p \leq 0.05$ 有意性を示す）

10

20

30

40

変数	P-値		
	全患者	プラセボ患者のみ	ソラフェニブ患者のみ
治療	0.029		
ECOG PS (0 対1+2)	0.007	0.235	0.060
腫瘍量	0.015	0.981	<0.001
ベースライン AFP	0.001	0.005	0.067
肉眼的血管浸潤	0.005	0.001	0.774
チャイルド-Bピューのステータス	0.226	<0.0001	0.835
ベースライン アルブミン	0.030	0.036	0.336
ベースライン アルカリフォスターゼ	0.009	0.146	0.004
ベースライン総ビリルビン量	0.001	0.023	0.011
s-c-KIT	0.020	0.562	0.003
HGF	0.475	0.594	0.064
Ras P21	0.957	0.949	0.927
VEGF	0.006	0.001	0.804
sVEGFR-2	0.970	0.990	0.784
sVEGFR-3	0.751	0.211	0.390
Ang2	0.004	0.021	0.021
bFGF	0.189	0.244	0.423
EGF	0.308	0.206	0.816
IGF2	0.280	0.617	0.372

10

20

表 4 E : HCCにおけるOSに対する独立した予後因子を同定するための新多変量解析一分岐変数としてバイオマーカーを使用 ($p \leq 0.05$ 有意性を示す)

変数	P-値		
	全患者	プラセボ患者のみ	ソラフェニブ患者のみ
治療	0.043		
ECOG PS (0 対1+2)	0.018	0.290	0.070
ベースライン AFP	0.001	0.008	0.014
肉眼的血管浸潤	<0.0001	<0.001	0.005
肝外進展	0.231	0.851	0.016
ベースラインアルカリフォスターゼ	<0.001	0.015	<0.001
腹水	0.053	0.072	0.527
総ビリルビン量	0.922	0.763	0.123
総アルブミン量	0.794	0.173	0.681
PT スコア	0.614	0.193	0.922
s-c-KIT	0.101	0.888	0.006
HGF	0.215	0.496	0.014
Ras P21	0.620	0.546	0.998
VEGF	0.017	0.002	0.956
sVEGFR-2	0.863	0.831	0.656
sVEGFR-3	0.972	0.295	0.482
Ang2	0.002	0.002	0.091
bFGF	0.457	0.646	0.530
EGF	0.420	0.429	0.674
IGF2	0.846	0.788	0.544

30

40

表 4 F : HCCにおけるOSに対する独立した予後因子を同定するための新多変量解析のまとめ、その結果は、図 4 E に示されている。ハザード比 (HR) は、研究された各々のパラメーターに対して計算された ($p \leq 0.05$ 有意性を示す)。

	全患者の多変量解析		プラセボ患者の多変量解析		ソラフェニブ患者の多変量解析	
	P-値	HR	P-値	HR	P-値	HR
治療	0.043	0.779				
ECOG PS(0 対1+2)	0.018	1.353	0.290	1.203	0.070	1.451
ベースライン AFP	0.001	1.489	0.038	1.575	0.014	1.574
肉眼的血管浸潤	<0.001	1.806	<0.001	1.885	0.005	1.725
肝外進展	0.231	1.161	0.851	0.968	0.016	1.599
ベースライン アルカリフォスターゼ	<0.001	1.602	0.015	1.548	<0.001	1.872
腹水	0.053	1.384	0.072	1.529	0.527	1.190
ビリルビン スコア	0.922	1.027	0.763	0.893	0.123	1.914
アルブミン スコア	0.794	1.055	0.173	1.511	0.681	0.884
PT スコア	0.614	1.151	0.193	1.868	0.922	0.961
s-c-キット	0.101	0.814	0.888	1.025	0.006	0.581
HGF	0.215	1.200	0.496	0.863	0.014	1.718
Ras p21	0.620	0.913	0.546	0.857	0.998	0.999
VEGF	0.017	1.470	0.032	1.969	0.956	1.014
sVEGFR-2	0.863	0.974	0.831	1.047	0.656	1.103
sVEGFR-3	0.972	0.995	0.295	0.832	0.482	1.157
Ang2	0.002	1.545	0.002	1.842	0.091	1.435
bFGF	0.457	0.879	0.646	0.892	0.530	0.840
EGF	0.420	0.868	0.429	0.828	0.674	0.884
IGF2	0.846	1.026	0.788	0.950	0.544	1.126

図 4 G : HCC に対する予後因子としてのベースライン血漿バイオマーカー

バイオマーカー			p-値、一変量解析、 プラセボ患者のみ		p-値、 多変量解析、 全患者	p-値、 多変量解析、 プラセボ患者のみ	p-値、 多変量解析、 ソラフェニブ患者のみ
			OS	独立したTTP	OS	OS	OS
Ang-2	ベースライン	Binned	<0.0001	0.016	0.004	0.021	0.021
bFGF	ベースライン	Binned	0.606	0.600	0.189	0.244	0.423
EGF	ベースライン	Binned	0.402	0.489	0.308	0.206	0.816
IGF-2	ベースライン	Binned	0.002	0.722	0.280	0.617	0.372

【 0 0 5 5 】

要するに、本発明者らは、ベースライン血漿Ang2及びIGF-2が、HCCにおけるOSに対する予後因子であることを特定した；

(a) 高いベースラインAng2の患者は、低Ang2の患者よりもOSが短く；

(b) 高いベースラインIGF-2の患者は、低IGF-2の患者よりもOSが長く；

(c)Ang2は、他変数モデルにおいて、独立して予後として残る。

【0056】

ベースラインbFGF及びEGFは、HCCの予後ではない。

【0057】

がん治療の予後の予測

【0058】

また本発明は、HCC患者の予後の予測に関し、前記患者が治療処置（例えば、ソラフェニブ）を受けているか、受ける予定になっており、前記患者の試験サンプルにおいて1以上のバイオマーカーを検出し、前記バイオマーカーの前記レベルを参照基準（例えば、母集団における前記バイオマーカーのメジアンレベル）と比較することからなり、前記参照基準と比較された前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの発現差異が前記予後を示すものとする。

10

【0059】

このような実施態様において、「予後良好」は、全生存期間の改善及び／又は無進行期間の延長を意味し、これに対し、「予後不良」は、全生存期間の縮小及び／又は無進行期間の短縮に等しい。

【0060】

他の関連する臨床予後は、制限されるものではないが、無進行生存期間、死亡までの期間、無病生存期間、進行症状までの期間、無再発生存期間、再発までの期間、病状（すなわち、進行性、安定など）、及び、レスポンスのタイプ（部分的、完全など）が挙げられる。

20

【0061】

関連する実施態様におい、HCC患者の試験サンプルにおける1つ以上のバイオマーカーのレベルを検出し、前記バイオマーカーの前記レベルを参照基準（例えば、母集団における前記バイオマーカーのメジアンレベル）と比較することによって、前記患者がソラフェニブ治療の利益を受ける可能性を予測することができ、前記参照基準と比較された前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの発現差異が、前記利益を示すものとする。

【0062】

本明細書における「利益」は、全生存期間（OS;日数）及び／又は無進行期間（TTP;日数）に基づいて評価される。全生存期間の増加及び／又は進行までの時間の遅延は、患者が前記ソラフェニブ治療の利益を受ける／利益を受けられそうであることを示している。

30

【0063】

上記実施例の一側面としては、HCC患者の試験サンプルにおける、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、リン酸化ERK(pERK)である、又は、アンジオポエチン2(Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、インシュリン様増殖因子(IGF-2)の、少なくとも1つのバイオマーカーの発現レベルを検出し、前記レベルを参照基準と比較することからなる、HCC患者のソラフェニブ治療の予後を予測するための方法を教示することであり、前記参照基準と比較された前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの発現差異が、前記予後を示すものとする。

【0064】

前記の臨床的に関連する状態は、当業者によって理解される。例えば、無進行期間（TTP）は、非常に特異的な方法（RECIST基準を使用）で測定する場合に、予め設定された量まで患者の腫瘍（又は多発性腫瘍）が成長するのに、どのくらいの期間がかかるかを示している。それらは、「転移に進んだ」又は他の何らかの状態ではなく、腫瘍は、X線写真上で進行している、すなわち、規定された標準による成長である。

40

【0065】

上記の議論において、バイオマーカーレベルは、全生存期間（OS）及び無進行期間（TTP）と相関性があった。しかしながら、臨床予後を測定する規定された他の多くの方法が存在する。例としては、制限されることはないが、例えば、下記のものが挙げられる：

【0066】

50

PFS、すなわち、無進行生存期間 [Progression free survival] (TTPと関連するが、全く同じではない)

【0067】

TTD、すなわち、死亡までの期間 [Time to death] (OSと関連するが全く同一ではない)

【0068】

DFS、すなわち、無病生存期間 [Disease free survival]

【0069】

TTSP、すなわち、進行症状までの期間 [Time to symptomatic progression] (「進行」は、腫瘍サイズに基づくものではないが、他の臨床症状に基づくものである。)

10

【0070】

RFS、すなわち、無再発生存期間 [Recurrence free survival]

【0071】

TTR、すなわち、再発までの期間 [Time to recurrence] (RFSに関連するが全く同一ではない)

【0072】

PD、すなわち、進行性の疾患 (腫瘍サイズに基づく)

【0073】

SD、すなわち、安定性の疾患 (腫瘍サイズの変化なし、又は、少なくとも、定義される許容範囲を超えない非常に小さい変化)

20

【0074】

PR、すなわち、部分奏効 [Partial response] (所定の通院で、患者の腫瘍が所定の量に縮小していることを示している。)

【0075】

CR、すなわち完全奏効 [Complete response] (完全な腫瘍の消失を示している。)

【0076】

前記方法は、例えば、腫瘍バイオマーカー (例えば、リン酸化ERK) 又は血漿バイオマーカーなど、すべてのバイオマーカーの検出に関連するが、血漿バイオマーカーの検出が好ましい。例えば、s-c-Kit及びHGFのような血漿バイオマーカーが特に好ましい。

30

【0077】

本発明者らは、高い血漿c-KITレベル (すなわち、 $>11.3\text{ng/ml}$) の患者は、低い血漿c-KITレベルの患者よりもソラフェニブ治療の利益をより享受しやすいことを確認した。低い血漿HGFレベル (すなわち、 $<3.28\text{ng/mL}$) の患者は、高い血漿HGFレベルの患者より、ソラフェニブ治療の利益をより享受しやすいことも判明した。これらの実験に基づいて、血漿c-KITの測定されたベースライン値 11.3ng/ml 、又は、血漿HGFの測定されたベースライン値 3.28ng/mL は、合理的に、参照基準として利用することができる。

【0078】

更に本発明者らは、Ang2を連続型変数としてモニターした場合に、Ang2レベルとソラフェニブ治療の効果 (全生存期間について) との間に明らかな相互作用があることを確認した (相互作用に対する $p=0.015$)。ここで、低いベースラインAng2の患者は、高いAng2の患者よりもソラフェニブの利益を享受する可能性があることが確認された。更に、高いベースラインbFGFレベル (すなわち、 $>$ メジアン値 7.4pg/mL) の患者は、低いbFGFの患者よりもソラフェニブの利益を享受する (相互作用に対する $p=0.078$)。最後に、低いベースラインIGF-2レベル (すなわち、 $<$ メジアン値 797.7ng/mL) の患者は、高いIGF-2の患者よりもソラフェニブの利益を享受する (相互作用に対する $p=0.13$)。これらの研究に基づき、血漿bFGFの測定されたベースライン値 7.4pg/mL 、又は、血漿IGF-2の測定されたベースライン値 797.7ng/mL は、合理的に、参照基準として利用することができる。

40

【0079】

従って本発明においては、HCC患者の血漿サンプルにおける、s-c-Kitタンパク質、肝細

50

胞増殖因子(HGF)タンパク質、アンジオポエチン2(Ang2)タンパク質、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)タンパク質又はインシュリン様成長因子2(IGF-2)タンパク質のレベルを検出し、前記のs-c-Kit、HGF、Ang2、bFGF又はIGF-2の血漿レベルを参照基準と比較することからなり、前記参照基準と比較された前記患者における、前記血漿s-c-Kitレベルの上昇、前記血漿bFGFレベルの上昇及び／又は前記血漿HGFレベルの減衰(attenuated)、前記血漿Ang2レベルの減衰、前記血漿IGF-2レベルの減衰は、前記ソラフェニブ治療の良好な予後を示すものとする、ソラフェニブ治療を受ける予定の前記HCCの予後を予測する方法が提供される。

【0080】

同様に、本発明は、HCC患者の血漿サンプルにおける、s-c-Kitタンパク質、肝細胞増殖因子(HGF)タンパク質、Ang2タンパク質、bFGF又はIGF-2のレベルを検出し、前記s-c-Kit、前記HGF、前記Ang2、前記bFGF及び／又は前記IGF-2の前記レベルを参照基準と比較することからなり、前記参照基準と比較された前記患者における、前記血漿s-c-Kit又は前記bFGFのレベルの上昇単独、又は、これらと前記血漿HGF、前記Ang2又は前記IGF-2のレベルの減衰とが組み合わさった場合が、前記患者がソラフェニブ治療の利益を受ける可能性があるということを示すものとする、HCC患者がソラフェニブ治療の利益を受ける可能性があるとして予測する方法を提供する。

【0081】

このような実施態様においては、例えば、s-c-Kit及びHGF、s-c-Kit及びbFGF、c-KIT及びIGF-2;c-Kit及びAng2;HGF及びAng2;HGF及びbFGF;HGF及びIGF-2、bFGF及びIGF-2;などの前記血漿バイオマーカーの組み合わせを検出することも可能である。

【0082】

特に好ましい組み合わせとしては、s-c-Kit及びHGF;s-c-Kit及びbFGF;s-c-KIT及びIGF-2;bFGF及びIGF-2;HGF及びbFGF;HGF及びIGF-2;などが挙げられるが、これらに制限されることはない。

【0083】

また、例えば、s-c-Kit、HGF及びbFGF;s-c-Kit、HGF及びIGF-2からなる組み合わせが好ましい。

【0084】

参照基準は、ある母集団において実験的に測定されたバイオマーカーレベル、例えば、HCC患者における前記バイオマーカーの平均又はメジアン血漿レベルからなってもよい。他の参照基準は、例えば、信頼区間(例えば、95%信頼区間値)又はパーセンタイル(例えば、25パーセンタイル又は75パーセンタイル値)を利用してもよい。典型的な患者のサンプルで観察されるベースラインバイオマーカーレベルは、例えば、表1A及び1Bに記載されている。

【0085】

HCC患者からなる母集団が、参照基準を確立するのに特に好ましいが、母集団は、正常な(すなわち、健康)被験者からなってもよい。試験サンプル及び／又は参照基準は、例えば、血液、尿、汗、涙、粘液、胆汁、腔液、精液などの液体を使用することが好ましいが、任意の生物由来物質で構成してもよい。例えば、HGF、s-c-Kit、VEGF、sVEGFR2、sVEGFR3、Ang2、bFGF、IGF-2等の血漿バイオマーカーが最も好ましい。

【0086】

このような態様の1つでは、s-c-Kitバイオマーカーレベルが試験サンプル及び参照基準で測定される。HCC患者の研究で決定されたように、実施例の方法によって、s-c-Kitのメジアン血漿濃度11.3ng/mlをベースライン値として使用することができる。この参照基準と比較する場合には、得られた患者の血漿s-c-Kitレベルを、「高」(すなわち、>11.3ng/ml)又は「低」(すなわち、<11.3ng/ml)として分類してもよい。他の実施態様においては、HGFレベルが測定される。この場合においては、HCC患者の研究において決定されたように、HGFの75パーセンタイル血漿濃度3.28ng/mlを、「低」対「高」HGFレベルを決定するために使用することができる。

【0087】

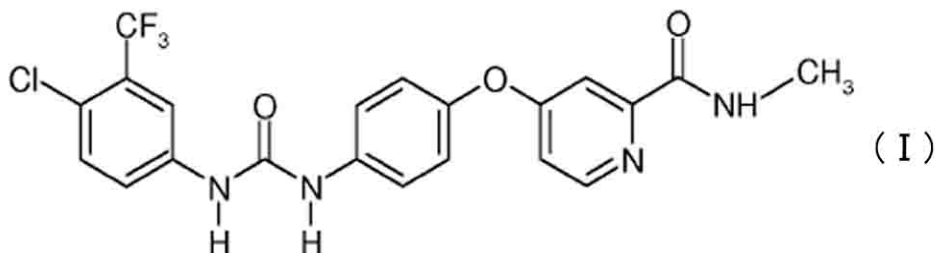
更に他の実施態様においては、VEGFレベルが測定される。この実施態様においては、HCC患者の母集団における、75パーセントイル血漿VEGFレベル(101.9pg/ml)を、「低」対「高」VEGFレベルの決定のための参照基準として使用することができる。HCC患者の母集団における25パーセントイル血漿s-VEGFR-3レベル(30.559ng/ml)を、「低」対「高」s-VEGFR-3レベルの決定のための参照基準として使用することができる。

【0088】

更に他の実施態様においては、Ang2レベルが測定される。この実施態様においては、HCC患者の母集団におけるメジアン、すなわち、50パーセントイル血漿Ang2レベル(6.061ng/ml)を、「低」対「高」Ang2レベルの決定のための参照基準として使用することができる。HCC患者の集団における50パーセントイル血漿bFGF又は血漿IGF-2レベル(7.5pg/ml及び798ng/ml、それぞれ、bFGF及びIGF-2)を、「低」対「高」バイオマーカーレベルの決定のための参照基準として使用することができる。

【0089】

本明細書における「ソラフェニブ」は、以下の化学式Iの化合物、又は、薬剂的に許容されるその塩、多形体、水和物、代謝産物、溶媒和物、若しくは、それらの組み合わせからなる。



【0090】

化学式I及びそれらの塩、多形体、水和物及び塩は、米国特許番号7,235,576、米国特許番号7,351,834、EP1,140,840B1、W003/068746及びW004/078746に記載されている。これらの出願／特許の中の開示は、そっくりそのまま参照することによって組み込まれる。

【0091】

好ましい実施例においては、「ソラフェニブ」は、N-[4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]-N'-{4-[2-カルバモイル-1-オキソ-(4-ピリジルオキシ)]フェニル}尿素、又はそのトシレート塩である、尿素化合物からなる。

【0092】

化学式Iの化合物は、単独、又は、例えば、化学療法薬、免疫治療薬等のようなその他の治療薬と組み合わせて使用することも可能である。最近の研究においては、ソラフェニブは単剤として使用されていた。しかしながら、他剤（化学療法、免疫調節薬、分子標的剤）と組み合わせてソラフェニブを使用する進行中の臨床試験が多数存在する。従って、本発明のバイオマーカーはソラフェニブの併用療法にも適用される。

【0093】

がん治療のモニタリング

【0094】

ある面においては、本発明は、ソラフェニブを患者に投与し、患者の血漿サンプル、血清サンプル、細胞又は組織サンプルからなる試験サンプルから発現プロファイルを作成し、試験サンプルの発現プロファイルを、同一人の治療前の発現プロファイル又は参照基準（例えば、非HCC集団由来の血漿又は血清サンプル、正常細胞、がん細胞又はその両方からなる細胞集団）と比較することからなり、s-c-Kit、HGF、Ras p21、s-VEGFR-3、pERK、Ang2、bFGF及び／又はIGF-2の少なくとも1つ、並びに、適宜VEGF及び／又はs-VEGFR-2のバイオマーカーの前記試験サンプルにおける発現差異が、治療の予後を示すものとする、がん患者の治療をモニタリングする方法を提供する。

【0095】

このような実施態様において、ソラフェニブ治療の前後で、s-c-Kit、HGF、Ras p21、s-VEGFR-3、pERK、Ang2、bFGF及びIGF-2の少なくとも1つ、並びに、適宜VEGF及び／又はs-VEGFR-2のバイオマーカーのレベルを患者のサンプルから検出することからなり、ソラフェニブ治療後の前記患者のサンプルにおける、少なくとも1つの前記バイオマーカーの異なった発現が、治療の良好な予後を示すものとする、ソラフェニブ治療を受けたHCC患者のモニタリングの方法が提供される。ソラフェニブ治療の継続期間は、医師によって決定することができ、例えば、ベースライン（BL、すなわち治療前）、12週（サイクル3の1日目又はC3D1）又は他の時点の値が使用されてもよい。

【0096】

例えば、s-c-Kit、HGF、Ras p21、VEGF、s-VEGFR-2、s-VEGFR-3、IGF-2及びAng2のような血漿バイオマーカーの使用は、前記実施例においては特に好ましい。

【0097】

関連する観点において、前記血漿バイオマーカーの組み合わせを使用してもよい。前記組み合わせを理解しやすくするため、前記バイオマーカーを下記のように分類する：

【0098】

グループAは、HGF、s-c-Kit、s-VEGFR-3、IGF-2及びAng2からなる。

【0099】

グループBは、VEGF、s-VEGFR-2、Ras p21からなる。

【0100】

好ましい組み合わせは下記に包含されているが、これらに制限されることはない：

(a) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの1つからなる組み合わせ

- (i) HGFと、VEGF;
- (ii) s-c-Kitと、VEGF;
- (iii) s-VEGFR-3と、VEGF;
- (iv) HGFと、s-VEGFR-2;
- (v) s-c-Kitと、s-VEGFR-2;
- (vi) s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2;
- (vii) Ang2と、VEGF;
- (viii) Ang2と、sVEGFR2;
- (ix) Ang2と、Ras p21;
- (x) IGF-2と、VEGF;
- (xi) IGF-2と、sVEGFR2;
- (xii) IGF-2と、Ras p21;又は

(b) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの2つからなる組み合わせ

- (i) HGFと、VEGF、及び、s-VEGFR-2;
- (ii) s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2;
- (iii) s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2;
- (iv) Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2;
- (v) Ang2と、sVEGFR2、及び、Ras p21;
- (vi) Ang2と、Ras p21、及び、VEGF;
- (vii) IGF-2VEGFと、sVEGFR2;
- (viii) IGF-2, sVEGFR2と、Ras p21;
- (ix) IGF-2, VEGFと、Ras p21;又は

(C) グループAの2つのバイオマーカーとグループBの1つのバイオマーカーからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kitと、VEGF;
- (ii) HGF, s-c-Kitと、s-VEGFR-2;

10

20

30

40

50

- (ii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF ;
- (iv) HGF, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF ;
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, Ang2 と、VEGF ;
- (vii) HGF, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (ix) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF ;
- (x) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (xi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (xii) s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ; 10
- (xii) IGF-2, HGF と、VEGF ;
- (xiv) IGF-2, HGF と、sVEGFR2 ;
- (xv) IGF-2, HGF と、Ras p21 ;
- (xvi) IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (xvii) IGF-2, Ang2 と、sVEGFR2 ;
- (xvii) IGF-2, Ang2 と、Ras p21 ;
- (xix) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF ;
- (xx) IGF-2, s-c-Kit と、sVEGFR2 ;
- (xxi) IGF-2, s-c-Kit と、Rasp21 ; 又は
- (d) グループ A の 2 つのバイオマーカーとグループ B の 2 つのバイオマーカーからなる組 20
み合わせ
 - (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
 - (ii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
 - (iii) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
 - (iv) HGF, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
 - (v) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
 - (vi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
 - (vii) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、sVEGFR2 ;
 - (viii) IGF-2, HGF と、sVEGFR2、及び、Rasp21 ;
 - (ix) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、Rasp21 ; 30
 - (x) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、sVEGFR2 ;
 - (xi) IGF-2, Ang2 と、sVEGFR2、及び、Rasp21 ;
 - (xii) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、Rasp21 ;
 - (xiii) IGF-2, s-c-Kit VEGF、及び、sVEGFR2 ;
 - (xiv) IGF-2, s-c-Kit と、sVEGFR2、及び、Rasp21 ;
 - (xv) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF、及び、Rasp21 ; 又は
- (e) グループ A の 3 つのバイオマーカーとグループ B の 1 つのバイオマーカーからなる組
み合わせ
 - (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF ;
 - (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ; 40
 - (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF ;
 - (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
 - (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
 - (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
 - (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
 - (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
 - (ix) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF ;
 - (x) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、s-VEGFR-2 ;
 - (xi) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
 - (xii) HGF, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2 ; 又は 50

(f) グループ A の 3 つのバイオマーカーとグループ B の 2 つのバイオマーカーからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, Ang2, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (v) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vi) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (viii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は

10

(g) グループ A の 4 つのバイオマーカーとグループ B の 1 つのバイオマーカーからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF；
- (iv) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2；又は

(h) グループ A の 4 つのバイオマーカーとグループ B の 2 つのバイオマーカーからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は

20

(i) 上記のバイオマーカーの全てからなる組み合わせ。

【0101】

上記のベースライン血漿バイオマーカーは、調査された患者のクラスに対して得られた。ベースライン値は、患者のクラスで異なることが予測され、本発明はこれらのベースライン値の使用に制限されることはない。

【0102】

本出願の発明者らは、血漿VEGFレベルが上昇する一方で、血漿c-KIT、HGF、Ras p21、s-VEGFR-2及びs-VEGFR-3バイオマーカーのレベルは、コントロール（すなわち、ベースラインレベル）と比較して、ソラフェニブ治療患者において減衰することを確認した。結果を表にまとめた（表5A及び表6）。

30

【0103】

本出願の発明者らは、血漿Ang2レベルが、プラセボ患者において、コントロール（すなわち、ベースラインレベル）と比較して増加する一方、バイオマーカーである血漿Ang2レベルは、ソラフェニブ治療患者において、コントロール（すなわち、ベースラインレベル）と比較して減衰することを確認した。結果を表にまとめた（表5B）。

表5A：バイオマーカーレベルにおけるサイクル3の1日目（C3D1）の変化（ $p \leq 0.05$ 有意性を示す）

バイオマーカー		プラセボ		ソラフェニブ		ソラフェニブ VS プラセボ
		平均値 (d)	ベースライン との差(e)	平均値 (d)	ベースライン との差(e)	P値 (C3D1)
c-KIT (ng/mL)	ベースライン	11.9	NA	12.2	NA	NA
	C3D1	11.5	-0.8	8.6	-4.5	<0.0001
HGF (pg/mL)	ベースライン	2877.3	NA	2630.0	NA	NA
	C3D1	3197.8	371.0	2220.3	-285.0	<0.0001
Ras p21 (pg/mL)	ベースライン	1677.3	NA	2115.7	NA	NA
	C3D1	1336.1	55.8	1144.7	-259.8	0.046
VEGF (pg/mL)	ベースライン	88.5	NA	100.7	NA	NA
	C3D1	102.1	19.9	170.1	66.8	0.010
VEGFR-2 (pg/mL)	ベースライン	8974.3	NA	8773.4	NA	NA
	C3D1	9087.6	154.7	6395.6	-2295.8	<0.0001
VEGFR-3 (pg/mL)	ベースライン	42000.8	NA	44754.1	NA	NA
	C3D1	45950.2	5038.6	37903.8	-6826.3	<0.0001

表 5 B：バイオマーカーレベルにおけるサイクル 3 の 1 日目 (C3D1) の変化 ($p \leq 0.05$ 有意性を示す)

バイオマーカー		プラセボ		ソラフェニブ		ソラフェニブ VS プラセボ
		平均値 (d)	ベースライン との差(e)	平均値 (d)	ベースライン との差(e)	p値 (C3D1)
Ang2 (pg/mL)	ベースライン	7718.1	NA	7510.0	NA	NA
	C3D1	8847.5	1916.9	6456.4	-293.0	<0.0001
bFGF (pg/mL)	ベースライン	14.9	NA	14.1	NA	NA
	C3D1	16.1	2.7	16.1	2.5	0.196
EGF (pg/mL)	ベースライン	59.3	NA	61.8	NA	NA
	C3D1	63.9	1.1	53.4	-8.9	0.240
IGF-2 (ng/mL)	ベースライン	888.2	NA	938.8	NA	NA
	C3D1	815.2	-94.3	847.9	-129.4	0.145

(d) 平均値はこの時点において得られるバイオマーカーのデータをもつすべての被検者に対して計算された。

(e) ベースラインからの絶対的変化は、各々の被検者に対して、個々に計算され、次いで、全ての患者に対する変化が平均された

【 0 1 0 4 】

更に、血漿 IGF-2 の平均レベルは、ソラフェニブ治療中 ($p < 0.0001^*$) 及びプラセボ治療中 ($p < 0.0001^*$) において減少する一方、血漿 EGF の平均レベルは、ソラフェニブ治療中に減少する ($p = 0.025^*$) ことが確認された。

表 6 A：ソラフェニブ治療に対するレスポンスに関する血漿バイオマーカーレベルの変化

10

20

30

40

バイオマーカー	ソラフェニブに対する レスポンスに おける変化の傾向	ソラフェニブ 治療群における 平均値の変化
c-KIT	↓	- 33.9%
HGF	↓	- 7.4%
Ras p21	↓ *	-259.8 pg/mL*
VEGF	↑	+ 195.7%
s-VEGFR-2	↓	- 25.7%
s-VEGFR-3	↓	- 14.1%

10

20

表 6 B：ソラフェニブ治療に対するレスポンスに関する血漿バイオマーカーレベルの変化

バイオマーカー	ソラフェニブに おける変化の傾向	ソラフェニブに おける 平均値の変化	プラセボにおける 変化の傾向	プラセボにおける 平均値の変化
Ang2	無		↑	+ 35.6%
bFGF	無		無	
EGF	混合		無	
IGF-2	↓	- 11.3%	↓	- 8.1%

30

40

【 0 1 0 5 】

従って本発明においては、

ソラフェニブ治療前のHCC患者の試験サンプルにおける、s-c-Kit、HGF、Ras p21、VEGF、s-VEGFR-2、s-VEGFR-3、Ang2又はIGF-2の、少なくとも1つのバイオマーカーのベースラインレベルを検出し、

ソラフェニブ治療後の前記患者の前記試験サンプルにおける、前記少なくとも1つのレベルを検出し、

前記ソラフェニブ治療後のバイオマーカーレベルを、前記ソラフェニブ治療前のベースラインレベルと比較することからなり、

ソラフェニブ治療後の前記試験サンプルにおける、s-c-Kit、HGF、Ras p21、s-VEGFR-2、s-VEGFR-3、IGF-2又はAng2の少なくとも1つのレベルの減衰、及び／又は、VEGFレベルの上昇、若しくは、前記Ang2レベルの安定レベル、IGF-2の減少若しくはわずかな減少が、前記患者が前記ソラフェニブ治療にレスポンスすることを示すものとする、

ソラフェニブ治療に対するHCC患者のレスポンスをモニタリングする方法を提供する。

【 0 1 0 6 】

50

薬効を示す新規なバイオマーカー

【0107】

本発明者らは、治療レジメン（例えば、ソラフェニブ治療）の経過中の変化が、治療レジメン（therapeutic regimen）の予後と相関関係がある新規な血漿バイオマーカーを特定した。好ましくは、例えば、s-c-Kit、HGF、Ras p21、VEGF、s-VEGFR-2、s-VEGFR-3、Ang2及びIGF-2のような血漿バイオマーカーであり、その発現プロファイルは、ソラフェニブの治療経過中に変化する。

【0108】

本明細書における「治療経過」とは、2以上の時点からなってもよい。例えば、最初の時点は、ソラフェニブ治療前の前記バイオマーカーレベルの測定からなってもよく、より遅い時点は、ソラフェニブ治療の12週（サイクル3の1日目又はC3D1）の測定からなる。これら2つの時点の間に存在する3番目の時点をも、更に用いてもよい。追加の時点も用いることもできる。

【0109】

更に具体的には、発明者らは、ソラフェニブ治療のサイクル3の1日目（C3D1）において、少なくとも294pg/mL（すなわち、メジアン血漿HGFレベル）の血漿HGFレベルの減少が、無進行期間の著しい延長と関連することを特定した。

【0110】

説明のためだけに用いられる限定されない例として、前記方法は、ソラフェニブ治療前及びサイクル3の1日目（C3D1）の血漿HGFレベルを測定し、前記血漿HGFレベルの変化を特定し、前記変化を血漿HGFの基準値294pg/mLと比較することからなり、C3D1での294pg/mLより大きい血漿HGFレベルの変化が、無進行期間の著しい延長を示すものであってもよい。

【0111】

更に発明者らは、プラセボ患者においては、Ang2血漿レベルがサイクル3の1日目（C3D1）で著しく増加する一方で、ソラフェニブ治療患者においては、C3D1で血漿Ang2レベルに変化がない（すなわち、メジアン血漿Ang2レベルが同じ状態である）ことも特定した。この患者群においては、Ang2が減少する患者はAng2が増加する患者より全生存期間が長い（ $p < 0.001$ ）ことが分かった。この患者群におけるAng2が減少するソラフェニブ患者は、Ang2が増加する患者より無進行期間がはるかに長い（ $p = 0.005$ ）ことが分かった。ソラフェニブ治療患者における血漿Ang2レベルとOS及びTTPとの関連性を測定する双方の研究において、メジアンAng2レベルにおいて二分化した変化（bifurcate change）（0%の代わり）をとった場合に、同様の結果が得られた。全てのグループのAng2におけるメジアン変化は、5.1%と計算された。

【0112】

またAng2レベルはプラセボ患者における予後であり、C3D1でAng2が減少するプラセボ患者は、Ang2が増加する患者よりOSが長かった（ $p < 0.0001$ ）。更に、C3D1でAng2が減少するプラセボ患者もまた、Ang2が増加する患者よりTTPが長い。

【0113】

更に発明者らは、メジアンIGF-2レベルが、HCC患者においてC3D1で減衰することを特定した。全患者においてIGF-2レベルのメジアン変化は94.3ng/mLであった。興味深いことに、メジアン変化よりも大きな（すなわち、94.3 ng/mLより大きい）、血漿IGF-2レベルの変化を伴うソラフェニブ治療患者は、メジアン変化よりも小さい（すなわち、94.3 ng/mL未満）IGF-2変化を伴うソラフェニブ治療患者よりOSが長い（ $p = 0.011$ ）。更に、メジアン変化よりも大きな（すなわち、94.3 ng/mLより大きい）血漿IGF-2レベルの変化を伴うソラフェニブ治療患者は、メジアン変化よりも小さな（すなわち、94.3ng/mL未満）IGF-2変化を伴うソラフェニブ治療患者より、TTPが長い（ $p = 0.008$ ）。

【0114】

同様に、興味深いことに、メジアン変化よりも大きな（すなわち、94.3 ng/mLより大きい）血漿IGF-2レベルの変化を伴うプラセボ患者は、メジアン変化よりも小さい（すなわち

10

20

30

40

50

、94.3 ng/mL未満) IGF-2変化を伴うソラフェニブ治療患者より、OSが長い ($p=0.002$)。更に、メジアン変化より大きな (すなわち、94.3ng/mLより大きい) 血漿IGF-2レベルの変化を伴うプラセボ治療患者は、メジアン変化より小さな (すなわち、94.3 ng/mL未満) IGF-2変化を伴うソラフェニブ治療患者より、TTPが長い。IGF-2において二分化された変化 (bifurcate change) (メジアン変化の代わり) を研究したところ、一貫した結果が得られた。

【0115】

更に発明者らは、HCC患者において、メジアンIGF-2レベルがC3D1で減衰したことを特定した。全ての患者におけるIGF-2レベルのメジアン変化は、11.2%であった。メジアン変化より大きい (すなわち、11.2%より大きい) 血漿IGF-2レベルの変化を伴うソラフェニブ患者は、メジアン変化より小さい (すなわち、11.2%未満) IGF-2変化を伴うソラフェニブ治療患者より、OSが長い ($p=0.063$)。

【0116】

6つの血漿バイオマーカーに対するバイオマーカーレベルのC3D1変化の解析、及び、OSとTTPとその関連性は、下記の表に示した (表7A及び7B)。

【0117】

従って一つの実施態様においては、本発明は、
ある時点で、HCC患者における血漿HGF、Ang2又はIGF-2レベルを検出し；
より遅い時点で、前記患者における血漿HGF、Ang2又はIGF-2レベルを検出し；
2つの時点での前記患者における血漿HGF、Ang2又はIGF-2レベルを比較することからなり、
前記より遅い時点での前記患者における血漿HGF、Ang2又はIGF-2レベルの減少が、ソラフェニブ治療の前記有効性を示すものとする、
HCC患者におけるソラフェニブ治療の有効性を評価する方法を提供する。

【0118】

最も好ましい実施態様としては、本発明は、
ある時点で、HCC患者における血漿HGF、Ang2又はIGF-2レベルを検出し；
より遅い時点で、前記患者における血漿HGF、Ang2又はIGF-2レベルを検出し；
2つの時点での前記患者における血漿HGF、Ang2又はIGF-2レベルを比較することからなり、
前記より遅い時点での血漿HGFレベルの減少、血漿Ang2の減少、又はIGF-2レベルの減少が、前記HCCの無進行期間の増加を示すものとする、
ソラフェニブ治療を受けているHCC患者の全生存期間を予測するための方法を提供する。

【0119】

関連する実施態様において、本発明は、
ある時点で、HCC患者における血漿HGF、Ang2又はIGF-2レベルを検出し；
より遅い時点で、前記患者における血漿HGF、Ang2又はIGF-2レベルを検出し；
2つの時点での前記患者における血漿HGF、Ang2又はIGF-2レベルを比較することからなり、
前記より遅い時点での血漿HGFレベルの減少、血漿Ang2の減少、又はIGF-2レベルの減少が、前記HCCの無進行期間の増加を示すものとする、
ソラフェニブ治療を受けているHCC患者における無進行期間を予測する方法を提供する。

【0120】

上記したように、HGF、Ang2及び／又はIGF-2の組み合わせを利用してもよい。好ましい組み合わせは、制限されることはないが、HGF及びAng2、HGF及びIGF-2、Ang2及びIGF-2、並びに、HGF、Ang2及びIGF-2が挙げられる。単純に理解を容易にするため、本発明は、
ある時点で、HCC患者における血漿HGF、血漿Ang2又は血漿IGF-2の、バイオマーカーの組み合わせのレベルを検出し；

より遅い時点で、前記患者における前記バイオマーカーの組み合わせのレベルを検出し；

2つの時点での前記患者におけるバイオマーカーレベルの前記組み合わせを比較することからなり、

前記より遅い時点におけるバイオマーカーの前記組み合わせのレベルの減少が、HCC患者の無進行期間の増加を示すものとする、

ソラフェニブ治療を受けているHCC患者の予後を予測する方法を提供する。

【0121】

例えば、遠隔転移、二次腫瘍の存在、分化のレベル、化学療法（例えば、ソラフェニブ治療）のレスポンスなどのような、追加のパラメーターをHCC腫瘍の特徴づけに使用してもよい。

表7A：血漿バイオマーカーレベルにおけるソラフェニブに関連したC3D1変化（ベースラインとの比較）及び予後（ $p \leq 0.1$ は有意差を示す。）

バイオマーカー		高いバイオマーカー変化 VS 低い変化に対するP値(ソラフェニブ患者のみ)		
		OS	独立したTTP	治験責任医師 のTTP
c-KIT	絶対的な差 BL-C3D1	0.663	0.289	0.922
	%差 BL-C3D1	0.930	0.540	0.683
HGF	絶対的な差 BL-C3D1	0.960	0.029	0.052
	%差 BL-C3D1	0.147	0.063	0.048
Ras p21	絶対的な差 BL-C3D1	0.191	0.168	0.580
	%差 BL-C3D1	0.123	0.092	0.958
VEGF	絶対的な差 BL-C3D1	0.569	0.597	0.955
	%差 BL-C3D1	0.914	0.446	0.973
VEGFR-2	絶対的な差 BL-C3D1	0.480	0.697	0.311
	%差 BL-C3D1	0.177	0.835	0.992
VEGFR-3	絶対的な差 BL-C3D1	0.183	0.803	0.199
	%差 BL-C3D1	0.141	0.822	0.271

表 7 B : 血漿バイオマーカーレベルにおけるソラフェニブに関連したC3D1変化 (ベースラインとの比較) 及び予後 ($p \leq 0.1$ は有意差を示す。)

10

20

30

40

バイオマーカー		高いバイオマーカー変化 VS 低い変化に対するP値			
		ソラフェニブ患者のみ		プラセボ患者のみ	
		OS	独立したTTP	OS	独立したTTP
Ang2	絶対的な差 (BL-C3D1) 0 split	0.001	0.005	<0.001	0.002
	絶対的な差 (BL-C3D1) median split	<0.001	0.001	<0.001	<0.001
	%差 (BL-C3D1) median split	0.001	0.006	<0.001	0.002
bFGF	絶対的な差 (BL-C3D1) 0 split	0.198	0.875	0.407	0.320
	絶対的な差 (BL-C3D1) median split	0.155	0.729	0.326	0.191
	%差 (BL-C3D1) median split	0.001	0.414	0.890	0.140
EGF	絶対的な差 (BL-C3D1) 0 split	0.174	0.875	0.654	0.351
	絶対的な差 (BL-C3D1) median split	0.796	0.648	0.391	0.289
	%差 (BL-C3D1) median split	0.796	0.648	0.391	0.289
IGF-2	絶対的な差 (BL-C3D1) 0 split	0.102	0.742	<0.001	0.046
	絶対的な差 (BL-C3D1) median split	0.011	0.008	0.002	0.026
	%差 (BL-C3D1) median split	0.063	0.675	<0.001	0.030

【0122】

また本発明は、前記パラメーター（例えば、無進行期間の増加を伴う生存グループの改善、無進行期間の減少を伴う生存グループの減少、など）の組み合わせに従った、がん患者の分類方法に関する。国際予後因子（international prognostication index; IPI）の算定における前記パラメーターの有用性は、当技術分野で公知である。

【0123】

腫瘍バイオマーカー

【0124】

更に本発明は、その発現及び／又はその活性がソラフェニブ治療にレスポンスして調節される、新規な腫瘍バイオマーカーに関する。

【0125】

一つの実施態様において、

HCC患者の試験腫瘍サンプルにおける、ホスホ - ERK (pERK) レベルを検出し；

前記pERKレベルを参照基準と比較することからなり、

参照基準と比較された前記腫瘍サンプルにおける前記pERKの発現差異が、前記HCCの予後を示すものとする、

HCC患者の予後を予測する方法が提供される。

【0126】

本出願の発明者らは、腫瘍におけるpERKレベルの上昇が、ソラフェニブ治療におけるTTPの延長と有意に相関することを特定した。この研究において、特定の腫瘍サンプルが、

「高」又は「低」pERKレベルを有すると特徴づけられたことに基づき、HCC患者におけるベースライン腫瘍pERKレベルが、公知の技術（例えば、免疫染色）を用いて初めて特定された。

【0127】

本発明において、pERKレベルは、腫瘍サンプルの免疫組織化学検査（IHC）の解析によってスコア化された。現在、病理学者が、IHCにおけるタンパク質レベル、つまり強度及び染色エリア%（彼らは、例えば、信頼できる強度レベルを超える染色エリア%、又は、強度レベルと全染色エリアを掛け算したもの、又は、陽性に染色された核を有する細胞の評価など、これらの置換を使用することも可能である）をスコアする、2つの主要な方法がある。

10

【0128】

本発明における典型的な例として、0～4+の値からなるスコアリング手順に基づいた、染色強度（染色はどの程度の濃さか）が使用された。従って、スコアリング強度のスケールは、0、1+、2+、3+、4+であり、4+が最も濃く、0は、無染色である。

【0129】

本発明において、高いpERK（最大強度スコア3+又は4+を有すると定義された）のがん患者は、低いpERK（最大強度スコア0、1+又は2+を有すると定義された）の患者よりソラフェニブ治療の利益を受けた。陽性に染色されたエリア%を分析に使用した場合に、同様の結果が得られた。従って、>5%の腫瘍エリアに陽性染色を有する患者は、0～5%の腫瘍エリアに染色を有する患者より、ソラフェニブ治療の利益を受けた。これらの研究に基づき、当業者は、pERKレベルを予後と関連づけるために、追加のカットオフ値（すなわち、0～10%対>10%染色）を指定することができる。

20

【0130】

好ましい実施態様においては、

HCC患者の試験腫瘍サンプルにおける、ホスホ-ERK(pERK)のレベルを検出し；

pERKの前記レベルを、前記HCC患者の母集団において測定されたpERKからなる参照基準と比較することからなり、

前記参照基準と比較して上昇した、前記腫瘍サンプルにおける前記pERKの発現が、前記HCCの予後を示すものとする、

HCC患者の無進行期間を予測する方法を提供するものである。

30

【0131】

腫瘍の予測

【0132】

本発明はまた、HCC患者の試験腫瘍サンプルにおいて、1つ以上の腫瘍バイオマーカーを検出することからなる、化学療法（例えば、ラフェニブ）を受けている、又は、受ける予定であるHCC患者の予後予測に関する。この実施態様における、全生存期間（OS）又は無進行期間（TTP）に関するソラフェニブ治療の効果は、前記患者においてホスホ-ERK(pERK)のレベルを検出し、前記レベルを参照基準（例えば、抗体染色によって特定されるような、腫瘍サンプルにおけるメジアンpERK）と比較することによって予測され、前記参照基準と比較した前記試験腫瘍サンプルにおける前記pERKレベルの上昇が、全生存期間及び／又は無進行期間の改善を示すものとする。

40

【0133】

生物活性剤（bioactive agent）のスクリーニング方法

【0134】

本発明は、腫瘍細胞を薬剤に接触させ、s-c-Kit、HGF、Ras p21、VEGF、s-VEGFR-2、s-VEGFR-3、pERK、Ang2、bFGF又はIGF-2の、少なくとも1つのバイオマーカーの発現レベルを検出することからなり、参照基準と比較された腫瘍細胞における前記バイオマーカーの発現差異が、前記HCCの予後を調節することができる薬剤であることを示すものとする、被検者においてHCCの予後を調節することができる薬剤をスクリーニングする方法を含む。

50

【0135】

本発明者らは、ソラフェニブ治療が、プラセボ治療の被検者と比較してHCC患者の無進行期間及び／又は全生存期間を増加させることを特定した。これらの患者においては、s-c-Kit、HGF、Ras p21、s-VEGFR-2及び／又はs-VEGFR-3バイオマーカーレベルの減衰、及び／又は、VEGFの上昇、及び／又は、pERKバイオマーカーレベルの減少が継続的に観察された。

【0136】

従って、本発明は、

腫瘍細胞を薬剤に接触させ；

前記薬剤と接触させた前後における、s-c-Kit、HGF、Ras p21、VEGF、s-VEGFR-2、s-VEGFR-3又はpERKの、少なくとも1つのバイオマーカーの発現レベルを検出することからなり、

前記薬剤と接触させた後における、s-c-Kit、HGF、Ras p21、s-VEGFR-2又はs-VEGFR-3のレベルの減衰、及び／又は、VEGFレベルの上昇、又は、pERKの減少が、前記HCC患者の予後に影響を与えることができる薬剤であることを示すものとする、

HCC患者の予後（例えば、無進行期間の延長及び／又は生存期間の改善）に影響を与える薬剤をスクリーニングする方法を提供する。

【0137】

抗体及びそのためのアレイ

【0138】

関連する実施態様において、本発明は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体2(s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体3(VEGFR-3)、可溶性s-c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p 21、リン酸化ERK(pERK)、アンジオポエチン2(Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、インシュリン様増殖因子(IGF-2)に特異的に結合する抗体分子である。上皮細胞増殖因子(EGF)に特異的に結合するコントロール抗体を使用してもよい。

【0139】

本発明は、複数の前記抗体分子からなる抗体マイクロアレイに関する。好ましくは、このような抗体 - マイクロアレイは、天然（非変性）型の状態で前記タンパク質に特異的に結合する抗体分子からなる。検出可能な標識を含む抗体分子は、この標識方法を含み、当技術分野において公知である。

【0140】

本発明の抗体アレイは、前記タンパク質の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又はそれ以上と特異的に結合する複数の抗体分子を含んでもよい。全ての又は大半のタンパク質バイオマーカーを検出する方法が好ましい。例えば、ソラフェニブ治療にレスポンスして、上昇させるタンパク質のセット及び／又は減衰させるタンパク質のセットを検出することなど、抗体に基づく検出の何れの組み合わせを用いてもよい。

【0141】

このようなアレイの理解を容易にするために、本発明の抗体に結合する抗原からなる前記バイオマーカーを下記のように分類する。

【0142】

グループAは、HGF、s-c-Kit、s-VEGFR-3、IGF-2及びAng2からなる。

【0143】

グループBは、VEGF、s-VEGFR-2、Ras p21からなる。

【0144】

好ましいアレイは下記に包含されているが、これらに制限されることはない：

(a) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの1つに結合する抗体分子であって、バイオマーカーは：

(i) HGFと、VEGF；

(ii) s-c-Kitと、VEGF；

(iii) s-VEGFR-3と、VEGF；

- (iv)HGFと、s-VEGFR-2；
- (v)s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (vi)s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii)Ang2と、VEGF；
- (viii)Ang2と、sVEGFR2；
- (ix)Ang2と、Rasp21；
- (x)IGF-2と、VEGF；
- (xi)IGF-2と、sVEGFR2；
- (xii)IGF-2と、Rasp21；又は

- (i)HGFと、VEGF；
- (ii)s-c-Kitと、VEGF；
- (iii)s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv)HGFと、s-VEGFR-2；
- (v)s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (vi)s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii)Ang2と、VEGF；
- (viii)Ang2と、sVEGFR2；
- (ix)Ang2と、Rasp21；

10

(b) グループ A の 1 つのバイオマーカーとグループ B の 2 つのバイオマーカーと結合する抗体分子であって、バイオマーカーは：

20

- (i)HGFと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii)s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii)s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv)Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (v)Ang2と、sVEGFR2、及び、Rasp21；
- (vi)Ang2と、Rasp21、及び、VEGF；
- (vii)IGF-2、VEGFと、sVEGFR2；
- (viii)IGF-2、sVEGFR2と、Rasp21；
- (ix)IGF-2、VEGFと、Rasp21；又は

- (i)HGFと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii)s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii)s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv)Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (v)Ang2と、sVEGFR2、及び、Rasp21；
- (vi)Ang2と、Rasp21、及び、VEGF；

30

(c) グループ A の 2 つのバイオマーカーとグループ B の 1 つのバイオマーカーと結合する抗体分子であって、バイオマーカーは：

- (i)HGF, s-c-Kitと、VEGF；
- (ii)HGF, s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (iii)HGF, s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv)HGF, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (v)s-c-Kit, s-VEGFR-3と、VEGF；
- (vi)s-c-Kit, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii)HGF, Ang2と、VEGF；
- (viii)HGF, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (ix)s-c-Kit, Ang2と、VEGF；
- (x)s-c-Kit, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (xi)s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
- (xii)s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (xiii)IGF-2, HGFと、VEGF；

40

50

- (xiv) IGF-2, HGF と、sVEGFR2 ;
- (xv) IGF-2, HGF と、Rasp21 ;
- (xvi) IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (xvii) IGF-2, Ang2 と、sVEGFR2 ;
- (xviii) IGF-2, Ang2 と、Rasp21 ;
- (xix) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF ;
- (xx) IGF-2, s-c-Kit と、sVEGFR2 ;
- (xxi) IGF-2, s-c-Kit と、Rasp21 ; 又は、

- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF ;
- (ii) HGF, s-c-Kit と、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF ;
- (iv) HGF, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF ;
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, Ang2 と、VEGF ;
- (viii) HGF, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (ix) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF ;
- (x) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (xi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (xii) s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;

10

20

(d) グループ A の 2 つのバイオマーカーとグループ B の 2 つのバイオマーカーに結合する抗体分子であって、バイオマーカーが:

- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iii) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iv) HGF, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (v) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vii) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、sVEGFR2 ;
- (viii) IGF-2, HGF と、sVEGFR2、及び、Rasp21 ;
- (ix) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、Rasp21 ;
- (x) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、sVEGFR2 ;
- (xi) IGF-2, Ang2 と、sVEGFR2、及び、Rasp21 ;
- (xii) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、Rasp21 ;
- (xiii) IGF-2, s-c-KitVEGF、及び、sVEGFR2 ;
- (xiv) IGF-2, s-c-Kit と、sVEGFR2、及び、Rasp21 ;
- (xv) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF、及び、Rasp21 ; 又は

30

- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iii) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iv) HGF, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (v) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

40

(e) グループ A の 3 つのバイオマーカーとグループ B の 1 つのバイオマーカーに結合する抗体分子であって、バイオマーカーが:

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF ;
- (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;

50

- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (ix) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF ;
- (x) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、s-VEGFR-2 ;
- (xi) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (xii) HGF, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2 ; 又は、

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF ;
- (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;

10

(f) グループ A の 3 つのバイオマーカーとグループ B の 2 つのバイオマーカーに結合する抗体分子であって、バイオマーカーが：

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, Ang2, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iv) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (v) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vi) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (viii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ; 又は、

20

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, Ang2, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iv) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

(g) グループ A の 4 つのバイオマーカーとグループ B の 1 つのバイオマーカーに結合する抗体分子であって、バイオマーカーが：

30

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (iv) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2 ; 又は、
- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;

(h) グループ A の 4 つのバイオマーカーとグループ B の 2 つのバイオマーカーに結合する抗体分子であって、バイオマーカーが：

40

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ; 又は、
- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

(i) 上記バイオマーカーの全てからなる組み合わせ；

【0145】

キット、バイオチップ及びデーターセット

【0146】

更に本発明は、1 つ以上の、本発明の方法の実施に有用なキットからなる。いくつかの好ましい実施態様においては、キットは、1 つ以上の前記抗体を付けた、1 つ以上の固体支持体を含んでもよい。固体支持体は、高密度抗体アレイであってもよい。更に、キットは、アレイと共に使用する 1 つ以上の試薬、1 つ以上のシグナル検出及び／又はアレイ処

50

理装置、1つ以上のタンパク質データベース、及び、1つ以上の解析及びデータベース管理ソフトウェアパッケージからなってもよい。

【0147】

好ましい実施例における本発明は、前記ポリペプチドに特異的に結合する複数の抗体からなるバイオチップに関する。好ましいバイオチップは、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体2(s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体3(VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p 21、リン酸化ERK(pERK)、アンジオポエチン2(Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、インシュリン様増殖因子(IGF-2)からなるグループのタンパク質の少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、又は、全てからなる。上皮細胞増殖因子(EGF)に特異的に結合するコントロール抗体を使用してもよい。

【0148】

本発明は、例えば、少なくとも2つの前記タンパク質の、組織又は細胞における発現レベルを確認する情報を提示するための、コンピューターシステムの使用方法のような、腫瘍組織又は細胞における少なくとも1つのタンパク質の発現レベルを、データベースにおけるタンパク質の発現レベルと比較するステップからなる、データベースの使用方法を含む。いくつかの好ましい実施態様において、前記方法は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体2(s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体3(VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p 21、リン酸化ERK(pERK)、アンジオポエチン2(Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、インシュリン様増殖因子(IGF-2)の1つ以上の発現レベルの検出である。上皮細胞増殖因子(EGF)に特異的に結合するコントロール抗体を使用してもよい。

【0149】

技術者は、多くの生物学的機能が、様々なタンパク質及び／又はその活性の発現を変化させることによって達成されるという事実を熟知している。例えば、細胞周期、細胞分化及び細胞死のような基礎的な生物学的プロセスは、しばしば、独創的な経路に関わるタンパク質グループの発現レベルにおける変化によって特徴づけられる。そのような独創的な経路、及び、この経路に対する前述した遺伝子が関連する例を以下に記載する。翻訳後の修飾イベント(例えばリン酸化反応)によってもたらされるタンパク質の活性における変化は、発症とも関連している。例えば、機能上の腫瘍抑制因子の十分な発現の欠如、及び／又は、オンコプロテインの過剰発現は、細胞の腫瘍形成又は肥厚成長の原因となりうる(Marshall, (1991) CeU, 64,313-326; Weinberg, (1991) Science, 254, 1138-1146)。従って、特定のタンパク質(例えば、オンコプロテイン又は腫瘍抑制因子)の発現レベルの変化は、様々な腫瘍の存在及び進行の手がかりとしての役割を果たす。そのため、本発明はまた、一つ以上のタンパク質を検出することからなる、広範な腫瘍の独創的な経路分析の方法に関する。例えば、本発明は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体2(s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体3(VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p 21、リン酸化ERK(pERK)の1つ以上からなる、1つ以上のシグネチャプロファイルにタンパク質を分類する方法を提供する。このようなシグネチャプロファイルの例としては、制限されることはないが、増殖受容体リガンド[growth receptor ligand](VEGF, HGF, Ang2, bFGF, IGF-2)、増殖受容体[growth receptor](s-VEGFR2及びs-VEGFR-3)、増殖／生存タンパク質(Ras p21及びpERK)などが挙げられる。

【0150】

オリゴヌクレオチド及びそれに基づくアレイ

【0151】

本発明は、1つ以上の本発明の方法を実施するために有用な、オリゴヌクレオチドアレイからなる。このアレイは、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体2(s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体3(VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p 21、リン酸化ERK(pERK)、アンジオポエチン2(Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、インシュリン様増殖因子(IGF-2)をコードしている遺伝子に、特異的にハイブリ

ダイズするオリゴヌクレオチドを含んでもよい。上皮細胞増殖因子(EGF)をコードする遺伝子に特異的にハイブリダイズするコントロールオリゴヌクレオチドを使用してもよい。

【0152】

好ましくは、このようなアレイは、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、又は、それ以上の前記遺伝子に特異的にハイブリダイズする複数のオリゴヌクレオチドからなってもよい。好ましい方法は、前記遺伝子の全て又は大半を検出してもよい。例えば、上方制御する遺伝子セット、又は、下方制御する遺伝子セットなど、何れの遺伝子の組み合わせを使用してもよい。

【0153】

本発明は、サンプルにおける血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体2(s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体3(VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p 21、リン酸化ERK(pERK)、アンジオポエチン2(Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、インシュリン様増殖因子(IGF-2)の発現レベルを測定するためのプライマー及び／又はプローブに関する。プライマー及び／又はプローブは、構造情報(すなわち、アクセッションナンバー)に基づいて、公知の技術を使用することによってデザインされる。遺伝子は、例えば、PCR、インサイツハイブリッド形成法、シーケンシング等の、公知の一般的ないずれの方法によっても測定することができる。

【0154】

分析技術

【0155】

参照基準

【0156】

一つの実施態様においては、バイオマーカーレベルは、例えば、全てのHCC患者など、患者サンプルのセットに基づいて、又は、患者サンプル内のパーセントイルとして分類される。このような実施態様においては、発現の許容限界レベルが確立され、例えば、特定のパーセントイルと比較して「より高い」、又は「より低い」発現レベルが、予後予測の基準として使用される。参照基準は、非HCC集団(例えば、健常者、又は、HCCではないが、肝硬変、B型肝炎ウイルス、及び／又はC型肝炎ウイルスの患者)におけるバイオマーカーレベルによって定義されてもよい。

【0157】

バイオマーカーの検出

【0158】

一つの実施態様においては、バイオマーカーのレベルは、抗体に基づいた検出戦略[例えば、酵素結合性免疫吸着定量法(enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)、イムノブロットティング(WB)又は免疫組織化学検査(IHC)]を用いて測定される。しかしながら、このような方法は抗体に基づいた分析に制限されることはない。遺伝子及び／又はそのポリペプチド産物の発現を検出する方法のいずれも確実に用いることができる。前記方法としては、制限されることはないが、RT-PCR解析、ハイブリダイゼーションに基づく解析(すなわち、ノーザン解析)、吸光度分析及び／又はプロテオミクス解析(すなわち、質量スペクトル解析)を挙げることができる。

【0159】

タンパク質の二次的な修飾(例えば、リン酸化、アセチル化、ファルネシル化など)及び前記修飾されたタンパク質の活性におけるその効果を分析する最新技術は、技術的に良く知られている(例えば、イムノブロットティング、酵母-2-ハイブリッド試験、レポーターに基づく試験、活性試験など)。

【0160】

また、本発明は、

(a) 上記のような腫瘍と非腫瘍組織で異なった発現をする、1つ以上のタンパク質からなる前記腫瘍の腫瘍性シグネチャプロファイルを作成し、

10

20

30

40

50

(b) 前記シグネチャプロファイルを、例えば、臨床予後又は臨床的進展のある1人又は多数の患者由来のがん組織を含む1つ、のようながんのデータセットと比較することからなる、

腫瘍の臨床挙動を研究する方法に関する。

【0161】

前記データセットの例は、技術的に知られており、例えば、シンガポールにあるバイオテクノロジープロセッシングセンターの肝細胞癌プロテオームデータベース(ワールドワイドウェブのbti.a-star.edu.sg/hccm/servlet/CounterDBで利用可能)である。他のデータベースを使用してもよい。一つの実施態様においては、腫瘍の臨床挙動は、前記腫瘍の転移の可能性に関連する。他の実施態様においては、臨床挙動は、前記腫瘍に関連する生存の可能性又は無進行生存期間と関連する。臨床予後の評価は、全生存期間の予測解析又は無転移生存の予測解析であってもよい。他の分類パラメーター、例えば、腫瘍分化度、腫瘍サイズ、腫瘍悪性度及び／又はステージ分類方法を使用してもよい。

【0162】

一つの実施態様においては、前記データセットの比較の結果として、進行及び／又は転移に関連する腫瘍の臨床挙動を研究することができる。従って、がんの進行及び／又は転移性疾患から非転移性を区別する研究のための方法を提供するものである。例えば、本発明は、患者の試験サンプルにおける、s-c-Kit、HGF、Ras p 21、VEGF、s-VEGFR-2、s-V EGFR-3、pERK、Ang2、bFGF又はIGF-2の少なくとも1つのバイオマーカーの発現レベルを検出し、前記バイオマーカーの前記発現レベルを、HCC患者における前記バイオマーカーの発現レベルの測定結果であるデータセットからなる参照基準と比較することからなり、前記バイオマーカーと前記データセットにおける進行性又は転移性HCCとの関連性が、前記患者のHCCの予後を示すものとする、患者におけるHCCの予後(例えば、進行性又は転移性の性質)を予測するための方法を提供する。上記技術を使用すると、前記発現プロファイルと進行及び／又は転移との関連性は、データセットから得られる情報に基づき標準化(calibrated)することができる。

【0163】

本発明は、記載された特定の方法、プロトコール、細胞株、動物種又は属、構築物(construct)、及び、試薬に制限されることはなく、従って、変更してもよいと理解されるべきである。また、本明細書における専門用語は、特定の実施態様のみを説明する目的であり、添付のクレームによってのみ制限される本発明の範囲を、制限する目的ではないものと理解されるべきである。

【0164】

本明細書及び添付のクレームで使用される、単数形"a"、"and"、及び"the"は、文脈が明らかに別の方法で指示している場合を除いて、複数を含んでいることを留意しなければならない。従って、例えば、"a protein"は、1つ以上のタンパク質であり、当業者に知られるその等価物等が含まれる。

【0165】

定義される他の点を除き、本明細書における全ての技術的及び科学的な用語は、本発明が属する技術における、通常の当業者における通常理解と同義である。ここに記載された方法、装置、物質及びそれらと類似又は同等のいかなるものも、本発明の実施又は試験に使用することができるが、以下に好ましい方法、装置及び物質について記載する。

【0166】

米国特許公報No.20070178494及び20070105142の記載を含む、本明細書において言及される全ての公報及び特許は、例えば、現在記載されている発明と共に使用することができ、公報に記載された構築物及び方法などの、記載及び開示の目的で、参照することにより本明細書に組み込まれる。上記及び本文全体を通して説明された公報は、本発明の出願日より前のそれらの開示を単に提供するものである。この場合におけるなにもものも、先行する発明に基づくこのような先行する開示に対して、発明者が、何ら権利が与えられないことを承認しているものと理解されるべきではない。

定義

【0167】

便宜上、明細書、実施例、及び添付されたクレームにおいて使用された他の用語及びフレーズの意味は、下記の通りである。

【0168】

本明細書における「及び」は、明示的に別段の定めをした場合を除き、「又は」と互換性を持って使用される。

【0169】

「大きい発現差異」に関しては、発現レベルが有意（例えば、 $p \leq 0.05$ ）であるか、参照基準における発現レベルに基づいて、少なくとも約20%、より好ましくは50%、最も好ましくは100%まで異なることを意味する。

10

【0170】

本明細書における用語「がん」又は「腫瘍」は、制限されることはないが、例えば、胸、呼吸器、脳、生殖器、消化管、泌尿器、眼、肝臓、腎臓、皮膚、頭及び首、甲状腺、副甲状腺、及び、それらの遠隔転移のがん、などの固形腫瘍を含む。また前記用語は、リンパ腫、肉腫及び白血病も含む。

【0171】

好ましいがんとしては、制限されることはないが、肝臓がん（原発性及び二次性）が挙げられる。原発性肝がんとしては、良性腫瘍のほかにも肝臓の悪性腫瘍が含まれる。良性肝腫瘍の例としては、制限されることはないが、血管腫、肝腺腫及び限局性結節性過形成（FNH）が挙げられる。悪性肝腫瘍としては、制限されることはないが、肝芽腫と同様に、肝細胞癌（HCC）、胆管細胞癌、血管肉腫（angiosarcoma）、血管肉腫（hemangiosarcoma）が挙げられる。二次（転移）肝がんは、別の部位の原発性腫瘍から肝臓に転移したがん細胞からなる。前記の場合において、腫瘍は、大腸、直腸、胃、胸及び／又は肺のがん細胞からなる。

20

【0172】

本明細書において特に研究されたがんは、肝細胞癌（HCC）である。HCCの例としては、制限されることはないが、線維層板型、偽腺管型（腺様）、多形性（巨細胞）、明細胞HCCを挙げることができる。

【0173】

本明細書における「肝細胞癌」（HCC、ヘパトーマとも云う）は、肝臓の原発性悪性腫瘍（がん）である。

30

【0174】

好ましくは、本発明の方法は、進行性の肝細胞癌（HCC）患者の治療のための、検出、予後判定及びガイダンスに有用である。例えば、無兆候性、進行性などのような、様々なステージにおけるHCC患者の特徴づけに対するステージ分類手順が、技術的に知られている。

【0175】

本明細書におけるフレーズ「がん型」（又は単に「型」）は、がんにおける診断上の分類のことを指す。例えば、肝臓がんについては、前記フレーズは、広いクラス（例えば、肝細胞癌、胆管細胞癌、血管肉腫（angiosarcoma）、血管肉腫（hemangiosarcoma）、肝芽腫など）、又は、クラス内のサブグループ又はサブタイプ（例えば、線維層板型HCC、偽腺管型HCC、多形性HCC及び明細胞HCC）を指してもよい。

40

【0176】

「サンプル」は、例えば、細胞株及び組織培養細胞のようなin vitroで増やされた細胞はもとより、全ての生命体に由来する生物組織又は体液又は生体細胞の何れであってもよい。好ましくは、前記「サンプル」は、腫瘍性疾患を患う患者（すなわち、「臨床サンプル」）及び／又は健康な被検者から分離された生物試料からなる。このようなサンプルは、バイオマーカーが直接的に放出される試料、又は、バイオマーカーが補足される試料からなってもよい。このような派生物（derivation）は、in vivo又はin vitroで生じても

50

よい。場合によっては、生物試料は、たとえば血液若しくはリンパ液のような循環血、又は、例えば血清若しくは血漿のようなその画分である。別のケースでは、生物試料は、例えば、髄液、脳脊髄液又は間質液のように、実質的には特定の位置に留まる。更に追加的なケースにおいては、生物試料は、例えば、尿、母乳、唾液、汗、涙、粘液、乳頭吸引液（nipple aspirants）、精液、腔液、尿道球腺液等の排泄された液体である。また、生物試料は、細胞が、in vitroで培養された、例えば成長培地等の液体、又は、細胞サンプルがホモジナイズされた、例えば、バッファー等の液体も指す。試料は、更に、組織、生検組織、組織切片、培養細胞、外科的に切除された腫瘍サンプル等からなる拭き取り検体からなる。また、「サンプル」は、例えば、組織学的目的のために取られた凍結切片又はホルマリン固定切片などの組織の切片を含んでもよい。

10

【0177】

本明細書における用語「患者」又は「被検者」は、哺乳動物（例えば、ヒト及び動物）を含む。

【0178】

タンパク質サンプル

【0179】

何れの原料に由来する何れのサンプルも開示された方法で 사용할 ことができる。一般に、「タンパク質サンプル」は、タンパク質分子を含む、又は含んでもよいサンプルであるべきである。適したタンパク質サンプルの例としては、細胞サンプル、組織サンプル、細胞抽出液、別のサンプルから精製した画分又は構成要素、環境試料、生体膜サンプル、培養サンプル、組織サンプル、体液及び生検サンプルが挙げられる。多数の他のサンプル源が知られており、又は、開発可能であり、何れのものも、開示された方法で 사용할 ことができる。開示された方法で使用するための好ましいタンパク質サンプルとしては、細胞及び組織のサンプルである。タンパク質サンプルは、複合体、単体、又は、それらの中間物でありうる。例えば、タンパク質サンプルは、タンパク質の複合混合物を含んでも良く、タンパク質サンプルは、高純度のタンパク質製剤、又は単一タイプのタンパク質であってもよい。

20

【0180】

「参照基準」は、かなり多くのサンプルのタイプ又は各タンパク質の基準となる発現レベルを決定する方法であってよく、これらは、正常な血漿、血清、組織若しくは細胞、正常血漿、血清若しくは組織由来の正常範囲、患者のグループ内における発現の範囲又はある種の予後を伴う患者のセットを包含する。「参照基準」は、測定されたパラメーター（すなわち、コントロール）に関するベースラインを提供するサンプルを意味する。参照基準は、培養された初期細胞／組織はもとより、被検者から分離された正常、又は、非 - がん性細胞／組織サンプルを含んでも良い。参照基準の例としては、制限されることはないが、患者の同じ組織又は体の部位から得られた、隣接した正常細胞／組織、正常な被検者から分離されたサンプル、保管場所（例えば、American type tissue cultureのアクセッションNo.87253又はNo.87254、それぞれ、72日及び58日目の胎性肝に関係する）から得られた初代培養細胞／組織等が挙げられる。また、参照基準は、（例えば）HCC患者におけるセット等の患者のセット、又は、ある治療（例えば、ソラフェニブ）を受けているHCC患者におけるセット、又はそのほかの予後に対するある予後を伴う患者のセットに対する、発現レベルであってもよい。前者の場合は、各々の患者における特定のレベルを、発現のパーセントイルレベルに当てはめるか、又は、平均（mean）若しくは平均（average）よりも高いか低いかにして表わすことができる。本発明において用いられる用語「参照基準」は、具体的に、正常細胞、標準的化学療法、例えばソラフェニブで治療された患者由来の細胞、又は、良性リンパ腫の患者由来の細胞が含まれる。また、参照基準は、測定レベル、例えば、母集団における特定遺伝子の発現レベルの平均／メジアンレベルからなってもよい。このような母集団は、正常被検者、何れの治療も受けていないHCC患者（すなわち、未治療）、ソラフェニブ治療を受けたHCC患者、ソラフェニブ以外の化学療法を受けたHCC患者又は良性の肝臓がん患者からなってもよい。「陽性参照基準」又は「陽性コ

30

40

50

ントロール」は、技術的に知られており、例えば、形質転換された肝細胞癌細胞株（HepG2細胞；ATCC No.HB-8065）を任意に用いてもよい。

【0181】

特に好ましい実施態様においては、参照基準は、試験サンプルと同じ系統及び／又は型のサンプルからなる。このような態様においては、試験サンプルと参照基準の両方が、血液サンプル（血漿バイオマーカーに対する）及び／又は腫瘍サンプル（腫瘍バイオマーカーに対する）からなる。

【0182】

アレイ（例えば、マイクロアレイ）上の「アドレス」は、エレメント、例えば、アレイの固体表面にオリゴヌクレオチドを付着させた位置を指す。

【0183】

「アレイ」又は「マトリックス」は、指定可能な位置の配置、又は装置上の「アドレス」を指す。位置は、二次元配列、三次元配列、又は、その他のマトリックスフォーマットに配列することができる。位置の数は、数個から少なくとも数十万までの幅があってもよい。最も重要なことは、各々の位置が、完全に独立した反応サイトを表わしていることである。「核酸アレイ」は、例えば、オリゴヌクレオチド又は遺伝子のより大きな部分等の核酸プローブを含むアレイである。アレイ上の核酸は、一本鎖であることが好ましい。プローブがオリゴヌクレオチドであるアレイは、「オリゴヌクレオチドアレイ」又は「オリゴヌクレオチドチップ」と呼ばれている。「抗体アレイ」は、1つ以上の抗原（すなわち、タンパク質）に結合することができる、抗体分子を含むアレイを指す。「マイクロアレイ」は、本明細書において、「バイオチップ」又は「バイオリジカルチップ」とも云うが、少なくとも約100/cm²の不連続領域の密集を持つアレイ領域であり、少なくとも約1000/cm²であることが好ましい。マイクロアレイの領域は、約10～250 μmの範囲内で、例えば直径などの特有の寸法を有し、ほぼ同じ距離でアレイ内の他の領域から離れている。

【0184】

「生物活性」又は「生理活性」又は「活性」又は「生物学的機能」は、交互に用いられ、本明細書においては、ポリペプチド（天然の構造、変性の構造にかかわらず）によって又はそのサブシーケンスによって、直接的又は間接的に実施されるエフェクター又は抗原性の機能を意味する。生物活性としては、ポリペプチドへの結合、その他のタンパク質又は分子への結合、DNA結合タンパク質、転写調節因子としての活性、損傷DNA結合能力などが挙げられる。対象とするポリペプチドに直接的に作用することによって、生理活性を調節することができる。また、生理活性は、例えば、対応する遺伝子の発現の調節によってなど、ポリペプチドのレベルを調節することによって変化させることができる。

【0185】

本発明で用いられる用語「生体サンプル」は、生命体から、又は、生命体の構成要素（例えば細胞）から得られるサンプルを指す。サンプルは、いかなる生体組織又は体液であってもよい。サンプルは、患者に由来するサンプルであってもよい。このようなサンプルとしては、制限されることはないが、痰、血液、血液細胞（例えば白血球）、組織又は生検サンプル（例えば腫瘍生検）、尿、腹水、及び、胸水、又は、それから得られる細胞が挙げられる。生体サンプルは、例えば、組織学的目的のために取られた凍結切片などの組織の切片を含んでもよい。

【0186】

用語「遺伝子」は、ポリペプチド又は前駆体の生産に必要なコントロール及びコード配列からなる核酸配列を指す。ポリペプチドは、フルレングスのコード配列又はコード配列の部分の何れかによってコードされる。遺伝子は、植物、菌類、動物、バクテリアゲノム若しくはエピソーム、核若しくはプラスミドDNA、cDNA、ウイルスDNA、又は、化学的に合成されたDNAを含む、技術的に知られた供給源から、全部又は一部が抽出されてもよい。遺伝子は、発現産物の生物活性若しくは化学構造、発現率、又は、発現調節の方法に影響を与えることが可能な、1つ以上の改変を翻訳領域又は非翻訳領域に含んでいてもよい。

このような改変としては、制限されることはないが、突然変異、挿入、欠失及び1つ以上のヌクレオチドの置換が挙げられる。遺伝子は、中断されていないコード配列で構成されていてもよく、適切なスプライスジャンクションによって結合されている、1つ以上のイントロンを含んでいてもよい。

【0187】

本明細書における用語「核酸」は、例えば、デオキシリボ核酸（DNA）及び、必要に応じて、リボ核酸（RNA）のような、ポリヌクレオチドを指す。前記用語は、ヌクレオチド類似体から作られたRNA又はDNAの類似体、及び、記載された実施態様に適用できるような、一本鎖（センス又はアンチセンス）及び二本鎖ポリヌクレオチドも、同等に含むと理解される。クロモソーム、cDNA、mRNA、rRNA及びESTは、核酸としてみなされる分子の代表例である。

10

【0188】

本発明で用いられる用語「オリゴヌクレオチド」は、例えば、約10～約1000ヌクレオチドからなる核酸分子を指す。本発明で使用されるオリゴヌクレオチドは、好ましくは、約15～約150ヌクレオチドであり、特に好ましくは、約20～約100の長さである。オリゴヌクレオチドは、自然に生じるオリゴヌクレオチド又は合成オリゴヌクレオチドであってもよい。オリゴヌクレオチドは、ホスホラミダイト法（Beaucage and Carruthers, Tetrahedron Lett. 22:1859-62, 1981）、又はトリエステル法（Matteucci, et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185, 1981）、又は、その他の公知の化学的方法によって調製されてもよい。

【0189】

20

用語、鋳型核酸の標的サイトに対するプローブの「特異的なハイブリダイゼーション」は、ハイブリダイゼーションのシグナルがはっきりと読み取れるような、主として標的に対する、プローブのハイブリダイゼーションを指す。ここで更に記載されているように、特異的なハイブリダイゼーションを引き起こすこのような条件は、相同性領域の長さ、領域のGC含量及びハイブリッドの融解温度（「Tm」）に依存して変化する。従って、ハイブリダイゼーションの条件は、ハイブリダイゼーション溶液と洗浄液の、塩含有量、酸性度及び温度で変化する。

【0190】

本明細書における、例えばDNA又はRNAなどの核酸に関して用いる用語「単離された」は、それぞれ高分子の天然源に存在する、その他の、DNA又はRNAから分離された分子を指す。本明細書における用語「単離された」は、細胞物質、ウイルス物質、遺伝子組み換え技術によって作製する際の培地、又は、化学的に合成する際の化学的な前駆体又は他の化学薬品が実質的に存在しない、核酸又はペプチドも指す。さらに、「単離された核酸」は、断片として自然では生じない、又は、自然状態では見られない核酸断片を含んでもよい。本発明で用いられる用語「単離された」は、その他の細胞タンパク質から単離されたポリペプチドを指してもよく、精製されたポリペプチド、組み換えポリペプチドの両方を含むように意図されている。

30

【0191】

本発明で用いられる用語「標識」及び「検出可能な標識」は、検出可能な分子を指しており、特に制限されることはないが、放射性同位元素、フルオロフォア、化学発光成分、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、色素、金属イオン、リガンド（例えばビオチン又はハプテン）などが挙げられる。用語「フルオレッセサー（fluorescer）」は、検出可能な領域の蛍光を示すことが可能な基質又はその一部を指す。本発明で使用してもよい標識の特定例としては、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン、テキサス・レッド（Texas red）、ルミノール、NADPH、アルファ - β - ガラクトシダーゼ及び西洋わさびペルオキシダーゼが挙げられる。

40

【0192】

本明細書における用語「発現レベル」は、所定の核酸の測定可能な発現レベルを指す。核酸の発現レベルは公知の方法によって測定される。用語「異なって発現した」又は「発現差異」は、所定の核酸の測定可能な発現レベルにおける、増加又は減少を指す。本明細

50

書における「異なって発現した」又は「発現差異」は、タンパク質の発現レベルの違いが有意（例えば $p \leq 0.05$ ）であることを意味し、同じコントロールタンパク質（例えばアクチン）と比較し、次いで参照基準と比較された、比較として使用された2つのサンプルにおいて、その違いは、少なくとも1.2倍、少なくとも1.4倍、少なくとも2.0倍又はそれ以上であり得る。本発明に従って「異なって発現した」又は「発現差異」は、比較として用いられた2つのタンパク質の発現レベルにおける違いが、1.2倍以上を意味し、1.5倍、2倍、5倍、10倍、20倍、50倍以上までを意味する。また、検出可能に発現した核酸が、＋／－少なくとも1.2倍で表わされ、2つのサンプルのうちの1つが、所定の核酸の検出可能な発現がなければ、タンパク質は、2つのサンプルにおいて「異なって発現した」といわれる。比較に用いられた2つ以上のサンプルにおけるタンパク質の発現レベルの違いが、もはや少なくとも1.2倍の違いとはならないように変化したら、タンパク質の発現差異は「阻害された」となる。タンパク質の発現レベルの絶対的定量は、既知の濃度のコントロールタンパク質を1つ以上含み、コントロールタンパク質の量に基づく検量線を作成し、検量線に対して未知のシグナル強度から「未知」のタンパク質の発現レベルを推定する（例えば、アッセイに基づく吸光度）ことによって達成された。

10

【0193】

本明細書におけるフレーズ「発現レベルの検出」は、発現レベルを定量する方法はもちろん、目的とするタンパク質が発現しているかどうかだけを決定する方法も含む。従って、必ずしも発現量の定量化を提供することなく、YES又はNOの結果を提供する試験は、ここで使用される前記フレーズとしての「発現レベルの検出」を必要とする試験である。所定のサンプルにおける1つのタンパク質又は複数のタンパク質の発現レベルを検出又は定量するために、肝臓がんにおいて異なった発現であるとして特定されたタンパク質を、様々なプロテオーム試験において使用してもよい。例えば、従来の抗体に基づいた試験、二次元ゲル電気泳動、ELISA試験などである。異なった発現遺伝子に関しては、ノーザンブロットティング、ヌクレアーゼプロテクション、RT-PCR、インサイツハイブリッド形成法、シーケンシング及びディファレンシャルディスプレイ法を使用してもよい。これらの方法は、本発明のいくつかの実施態様に有用である。しかしながら、本発明の方法及び試験は、抗体アレイ又はチップに基づく方法を考慮して最も効果的に設計される。

20

【0194】

タンパク質

30

【0195】

用語「タンパク質」は、本明細書において、用語「ペプチド」及び「ポリペプチド」と交互に用いられる。

【0196】

変異体

【0197】

ポリペプチドの「変異体」は、1つ以上のアミノ酸残基を変化させたアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。上記変異体は、置換されたアミノ酸が類似の構造又は化学的性質（例えば、ロイシンとイソロイシンの置換）を有する、「保存的」変化を有していてもよい。変異体は、「非保存的」変化（例えば、グリシンとトリプトファンの置換）を有していてもよい。類似したマイナーな変異体は、アミノ酸欠失又はアミノ酸挿入、又は両方を含んでもよい。生物活性又は免疫学的活性を消滅させることなく、アミノ酸残基が置換、挿入又は欠失しているかを決定するガイダンスを、例えば、LASERGENEソフトウェア（DNASTAR）などの、当技術分野で公知のコンピュータープログラムを用いて特定してもよい。ポリヌクレオチド配列との関連で使用される前記用語「変異体」は、特定の遺伝子に関連するポリヌクレオチド配列又はそのコード配列を包含してもよい。この定義は、例えば、「対立遺伝子」、「スプライス」、「種」、又は、「多形」変異体を含んでもよい。スプライス変異体は、参照分子に対してかなりの同一性を有していてもよいが、一般に、mRNAプロセッシングの間におけるエキソンの選択的スプライシングの結果、より多くの数又はより少ない数のポリヌクレオチドを有する。対応するポリペプチドは、更なる機

40

50

能ドメイン又はドメインの欠落を有する。変種は、ある種から他の種に変化したポリヌクレオチド配列である。結果として生じるポリペプチドは、一般的に、お互いに関連したかなりのアミノ酸同一性を有する。多形変異体は、所定の種における個体間の特定遺伝子のポリヌクレオチド配列における変形である。多形変異体は、ポリヌクレオチド配列が1つの塩基で異なる「一塩基多形」(SNP)を包含してもよい。SNPの存在は、例えば、ある母集団、病態又は病状の傾向を示すかもしれない。

【0198】

ここで、「タンパク質発現プロファイル」及び「プロテオーム」、又は、細胞のプロテオミクス・シグネチャと共に相互に用いられる用語「発現プロファイル」は、1つ以上のタンパク質のレベル又は活性を表わす値のセットを指す。発現プロファイルは、少なくとも約2つのタンパク質、好ましくは、少なくとも約2, 3, 5, 6又はそれ以上のタンパク質の発現レベルを表わす値からなることが好ましい。また、発現プロファイルは、複数の細胞及び条件(例えばアクチン)において同様のレベルで発現しているタンパク質のレベルを包含してもよい。例えば、がんの異常細胞の発現プロファイルは、異常細胞又は組織における2~6若しくはそれ以上のタンパク質、及び、少なくとも1つのコントロールタンパク質のタンパク質レベルを表わすレベルのセットを指す。

10

【0199】

1つの細胞における発現プロファイルは、2つのプロファイルにおけるタンパク質の発現レベルが十分に類似しており、その類似性が、例えば同じタイプの細胞であるという共通の特徴を示す場合、他の細胞における発現プロファイルと「類似」する。従って、最初の細胞で発現している少なくとも75%のタンパク質が、最初の細胞に関連する、2つのうちの1つのファクターにおける範囲内のレベルで、2番目の細胞において発現している場合に、最初の細胞と2番目の細胞の発現プロファイルは、類似している。

20

【0200】

「特異的に結合する」は、本発明の抗体及び標的タンパク質の間の相互作用だけでなく、他の分子、例えば、タンパク質、アプタマーのような他の分子との相互作用をも指す。当技術分野で公知のように、抗原-抗体の「特異的な結合」は、それに向かう抗体によって未だ検出可能である、エピトープ領域の外側にマイナーな変化がある場合も包含する。

【0201】

「実質的に結合する」は、プローブ核酸と標的核酸の間の相補的なハイブリダイゼーションを指し、所望する標的ポリヌクレオチド配列の検出を達成するために、ハイブリダイゼーションメディアのストリンジェンシーを緩和させることによって順応が可能となるマイナーなミスマッチを包含する。

30

【0202】

シグネチャ

【0203】

本発明は、「プロテオミクス・シグネチャ(proteomic signature)」を作り上げる、VEGF、s-VEGFR-2、VEGFR-3、s-c-Kit、HGF、Ras p21、pERK、Ang2、bFGF又はIGF-2からなるグループから選択される、1つ以上のタンパク質バイオマーカーに関する。このようなシグネチャは、一つのタンパク質、又は、前記タンパク質の2つ、好ましくは3つ、更に好ましくは4つ、特に好ましくは5つ、及び、最も好ましくは6以上の組み合わせである。このような組み合わせの例は制限されることはないが、HGF及びVEGF；HGF及びs-VEGFR-3；VEGF及びs-VEGFR-3；HGF、VEGF及びs-VEGFR-3；HGF及びRas p21；HGF、VEGF及びRas p21；VEGF及びRas p21；s-VEGFR-3及びRas p21；c-KIT及びbFGF；c-KIT及びIGF-2；bFGF及びIGF-2；HGF及びbFGF；HGF及びIGF-2などが挙げられる。HGF、s-c-Kit、bFGF及び／又はIGF-2の組み合わせからなるシグネチャが、最も好ましい。

40

【0204】

本発明のシグネチャは、1つ以上の前記タンパク質バイオマーカー、例えば、VEGF、s-VEGFR-2、VEGFR-3、s-c-Kit、HGF、Ras p21、pERK、Ang2、bFGF又はIGF-2をコードしている遺伝子からなってもよい。これは、本明細書で「遺伝子シグネチャ(gene signature)

50

」として記載された。前記したように、このような遺伝子シグネチャは、単独の遺伝子、又は、前記遺伝子の2つ、好ましくは3つ、更に好ましくは4つ、特に好ましくは5つ及び最も好ましくは6つの組み合わせからなる、このようなシグネチャからなってもよい。

【0205】

このような組み合わせを理解しやすくするため、前記バイオマーカーを下記のように分類する：

【0206】

グループAは、HGF、s-c-Kit、s-VEGFR-3及びAng2からなる；

【0207】

グループBは、VEGF、s-VEGFR-2、Ras p21からなる

10

【0208】

好ましい組み合わせは下記に包含されるが、これらに制限されることはない：

(a) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの1つからなる組み合わせ

- (i) HGFと、VEGF；
- (ii) s-c-Kitと、VEGF；
- (iii) s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv) HGFと、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (vi) s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii) Ang2と、VEGF；
- (viii) Ang2と、sVEGFR2；
- (ix) Ang2と、Rasp21；
- (x) IGF-2と、VEGF；
- (xi) IGF-2と、sVEGFR2；
- (xii) IGF-2と、Rasp21；又は

20

(b) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの2つからなる組み合わせ

- (i) HGFと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (v) Ang2と、sVEGFR2、及び、Rasp21；
- (vi) Ang2と、Rasp21、及び、VEGF；
- (vii) IGF-2VEGFと、sVEGFR2；
- (viii) IGF-2、sVEGFR2と、Rasp21；
- (ix) IGF-2、VEGFと、Rasp21；又は

30

(c) グループAのバイオマーカーの2つとグループBのバイオマーカーの1つからなる組み合わせ

- (i) HGF、s-c-Kitと、VEGF；
- (ii) HGF、s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF、s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv) HGF、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit、s-VEGFR-3と、VEGF；
- (vi) s-c-Kit、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF、Ang2と、VEGF；
- (viii) HGF、Ang2と、s-VEGFR-2；
- (ix) s-c-Kit、Ang2と、VEGF；
- (x) s-c-Kit、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (xi) s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF；

40

50

- (xii) s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (xiii) IGF-2, HGF と、VEGF ;
- (xiv) IGF-2, HGF と、sVEGFR2 ;
- (xv) IGF-2, HGF と、Rasp21 ;
- (xvi) IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (xvii) IGF-2, Ang2 と、sVEGFR2 ;
- (xviii) IGF-2, Ang2 と、Rasp21 ;
- (xix) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF ;
- (xx) IGF-2, s-c-Kit と、sVEGFR2 ;
- (xxi) IGF-2, s-c-Kit と、Rasp21 ; 又は

10

(d) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iii) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iv) HGF, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (v) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vii) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、sVEGFR2 ;
- (viii) IGF-2, HGF と、sVEGFR2、及び、Rasp21 ;
- (ix) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、Rasp21 ;
- (x) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、sVEGFR2 ;
- (xi) IGF-2, Ang2 と、sVEGFR2、及び、Rasp21 ;
- (xii) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、Rasp21 ;
- (xiii) IGF-2, s-c-Kit VEGF、及び、sVEGFR2 ;
- (xiv) IGF-2, s-c-Kit と、sVEGFR2、及び、Rasp21 ;
- (xv) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF、及び、Rasp21 ; 又は

20

(e) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF ;
- (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (ix) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF ;
- (x) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、s-VEGFR-2 ;
- (xi) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (xii) HGF, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2 ; 又は

30

40

(f) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, Ang2, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iv) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (v) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vi) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

50

- (viii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は
- (g) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ
- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
 - (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；
 - (iii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF；
 - (iv) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2；又は
- (h) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ
- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
 - (ii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は
- (i) 上記バイオマーカーの全てからなる組み合わせ
- (a) グループ A のバイオマーカーの 1 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ
- (i) HGF と、VEGF；
 - (ii) s-c-Kit と、VEGF；
 - (iii) s-VEGFR-3 と、VEGF；
 - (iv) HGF と、s-VEGFR-2；
 - (v) s-c-Kit と、s-VEGFR-2；
 - (vi) s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
 - (vii) Ang2 と、VEGF；
 - (viii) Ang2 と、sVEGFR2；
 - (ix) Ang2 と、Rasp21.
- (b) グループ A のバイオマーカーの 1 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ
- (i) HGF と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
 - (ii) s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
 - (iii) s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
 - (iv) Ang2 と、VEGF、及び、sVEGFR2；
 - (v) Ang2 と、sVEGFR2、及び、Rasp21；
 - (vi) Ang2 と、Rasp21、及び、VEGF；
- (c) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ
- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF；
 - (ii) HGF, s-c-Kit と、s-VEGFR-2；
 - (iii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF；
 - (iv) HGF, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
 - (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF；
 - (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
 - (vii) HGF, Ang2 と、VEGF；
 - (viii) HGF, Ang2 と、s-VEGFR-2；
 - (ix) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF；
 - (x) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
 - (xi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
 - (xii) s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (d) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ
- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
 - (ii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
 - (iii) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

- (iv) HGF, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vi) s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (e) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ
 - (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3と、VEGF；
 - (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
 - (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2と、VEGF；
 - (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2と、s-VEGFR-2；
 - (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
 - (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；
 - (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
 - (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (f) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ
 - (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
 - (ii) HGF, s-c-Kit, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
 - (iii) HGF, Ang2, s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
 - (iv) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (g) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ
 - (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
 - (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (h) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ
 - (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (i) 前記バイオマーカーの全てからなる組み合わせ

【0209】

抗体

【0210】

本発明で用いられる用語「抗体」は、例えば、アイソタイプ (IgG, IgA, IgM, IgE等) などの全ての抗体、及び、脊椎動物 (例えば、哺乳動物) のタンパク質と特異的に反応するそのフラグメントも含むことを意味する。抗体は、従来の技術を使用して断片化してもよく、フラグメントは、全ての抗体について上記と同じ方法で使用するために、スクリーニングしてもよい。従って、前記用語は、あるタンパク質と選択的に反応することが可能である、タンパク質的に切断された (proteolytically-cleaved) 又は組み換え調製された (recombinantly-prepared) された抗体の一部分の断片を含む。前記タンパク質分解型及び／又は組み換え型のフラグメントの例は制限されることはないが、Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv及びペプチドリンカーによって連結されたV[L]及び／又はV[H]ドメインを含む単鎖抗体 (scFv) を包含する。scFvは、共有結合的又は非共有結合的に結合して、2つ以上の結合部位を有する抗体を形成してもよい。対象の発明は、ポリクローナル、モノクローナル、又は、その他の抗体及び組み換え抗体の精製品を包含する。

【0211】

バイオマーカー

【0212】

用語「バイオマーカー」又は「マーカー」は、全ての生命体の生物学的変化はもとより、様々な、細胞内及び細胞外イベントを網羅する。バイオマーカーは、例えば、制限されることはないが、本質的にシグナリング分子、転写因子、代謝物、遺伝子転写だけでなく、翻訳後におけるタンパク質の修飾の生産率又はレベルなど、細胞機能の性質のいずれを表わしていてもよい。バイオマーカーは、タンパク質レベル及び／又は修飾のプロテオーム

ム解析の全体又はトランスクリプトレベルのゲノム解析の全てを含んでもよい。

【0213】

好ましくは、本発明のバイオマーカーはタンパク質及び／又はポリペプチドである。

【0214】

また、バイオマーカーは、化合物処理された、未治療の異常細胞若しくは組織と比較された疾患、若しくは、同じ疾患を伴う患者と比較された疾患を有する被検者の異常細胞又は組織、又は、異なる予後を伴う患者において、上方制御又は下方制御される遺伝子又は遺伝子産物を指してもよい。すなわち、遺伝子又は遺伝子産物は、治療された細胞又は組織に十分に特異的であるので、患者に対する治療及び／又は臨床予後、又は、小分子の有効性の特定、予測若しくは検出をするために、適宜、他の遺伝子又は遺伝子産物と共に使用してもよい。従って、バイオマーカーは、異常細胞における化合物の有効性の特性を示す、又は、化合物による治療に対するその異常細胞のレスポンスを示す遺伝子又は遺伝子産物である。

【0215】

フレーズ「特異的にハイブリダイズする」とは、配列が複合混合物（例えば、細胞全体）のDNA又はRNAに存在する場合に、ストリンジェントな条件下で、実質的に特異的なヌクレオチド配列又は配列に、又は、特異的なヌクレオチド配列又は配列のみに、分子が結合、二本鎖化（duplexing）若しくはハイブリダイズすることを指す。本発明の試験及び方法は、少なくとも約2、10、100、10,000又は1,000,000若しくはそれ以上、及び好ましくは、2～50若しくはそれ以上の異なる核酸のハイブリダイゼーションを同時にスクリーニングするための、利用可能なフォーマットを利用してもよい。

【0216】

用語「ストリンジェントな条件」とは、プローブが、その他の配列、又は、違いが確認される可能性のある他の配列に対しては、不十分にハイブリダイゼーションするが、プローブの標的サブシーケンスに対してハイブリダイズするであろう条件を指す。ストリンジェントな条件は、配列依存性であり、違う環境では異なるであろう。長い配列は、高い温度で特異的にハイブリダイズする。一般的に、ストリンジェントな条件は、規定されたイオン強度とpHにおける、特定の配列に対する熱融解温度（thermal melting point; T_m ）より、約5℃低く選択される。特に、ストリンジェントな条件は、pH7.0～8.3における塩濃度が、少なくとも約0.01～1.0Mナトリウム濃度（又はその他の塩）であり、短いプローブ（例えば、10～50ヌクレオチド）に対して、温度が少なくとも約30℃である。また、ストリンジェントな条件は、ホルムアミドのような不安定化剤の添加で実現されてもよい。例えば、高ストリンジェンシーな状態は、42℃で、例えば、約5xSSC、0.5%SDS、100 µg/ml変性したサケの精子DNA、及び、50%ホルムアミドなどを含むハイブリダイゼーション溶液中で、ポリヌクレオチドプローブと共に、プロットを一晚（例えば、少なくとも12時間）インキュベートする、又は、42℃で、5x SSPE、0.5% SDS及び50%ホルムアミド中で100 µg/ml 変性したサケの精子DNAをハイブリダイズし、65℃で、0.1% SSC及び0.1% SDS溶液中で洗浄することによって達成され得る。例えば、95%又は優れた配列同一性を有する配列を選択するために、高ストリンジェンシーな条件、例えば、塩基対ミスマッチ5%未満（例えば、65℃で30分間、0.1%SSC及び0.1%SDS内で2回洗浄）で、プロットを洗浄してもよい。

【0217】

ここで用いられる試験及び方法に基づくハイブリダイゼーションは、当技術分野において公知である。目的とするポリヌクレオチド（長又は短）からなる、フィルタータイプのプロット（すなわち、例えばニトロセルロースのような、ポリヌクレオチドを含むマトリックス）、ガラスチップ、並びに、その他のマトリクス及び基質を、22～68℃で一晚、プレハイブリダイゼーション溶液（例えば6xSSC、0.5%SDS、100 µg/ml、変性したサケの精子DNA、5xデンハート液及び50%ホルムアミド）中でインキュベートすることができ、次いで、所定のストリンジェンシーを得るために適切な条件下において、検出可能なポリヌクレオチドプローブとハイブリダイズする。一般的に、高い相同性又は配列同一性が求めら

れる場合には、高い温度（例えば、65℃）を使用することができる。相同性が低下するので、低い洗浄温度が使用される。塩濃度に関しては、塩濃度が低いほど、ストリンジェンシーは高い。プローブの長さは、別の検討事項である。たとえ相同性が高い場合であっても、極めて短いプローブ（例えば、100塩基対）は、低温で洗浄される。短いプローブの場合には、ホルムアミドを除外することができる。例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Chapter 6, Screening of Recombinant Libraries; Sambrook et al., Molecular Cloning, 1989, Chapter 9を参照。

【0218】

「配列同一性のパーセンテージ」又は「配列同一性」は、2つの最適に整列させた配列又はサブシーケンスを、比較ウィンドウ(comparison window)又はスパン(span)上で、比較することによって決定される。この場合、2つの配列の最適な配列比較のために参照配列（追加又は欠失を包含しない）と比較して、比較ウィンドウにおけるポリヌクレオチド配列の一部は、追加又は欠失（すなわち、ギャップ）から構成されてもよい。パーセンテージは、同一のモノマー単位（例えば、核酸残基又はアミノ酸残基）が両方の配列に生じる位置の数を決定すると一致する位置の数が得られ、比較のウィンドウにおける位置の総数で一致する位置の数を割り、その結果に100をかけて、配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。プログラムGAP又はBESTFITを用いて計算する場合は、配列同一性のパーセンテージは、デフォルトのギャップ重量(gap weight)を用いて計算される。

【0219】

「相同性」又は「同一性」は、配列の類似性検索に適合したプログラムblastp、blastn、blastx、tblastn及びtblastx(Karlin et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264-2268 and Altschul, (1993) J. Mol. Evol. 36, 290-300, fully incorporated by reference)によって使用されるアルゴリズムを用いた、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 解析によって決定されてもよい。BLASTプログラムによって使用されたアプローチは、最初に、問い合わせ配列とデータベース配列との間の類似のセグメントを検討し、次いで、同定された全ての一致点の統計的優位性を評価し、最後に、事前に選択した有意性の閾値を満足したこれらの一致点のみを取りまとめる。配列データベースの類似性検索における基本的な問題の考察に関しては、Altschul et al., (1994) Nature Genet. 6, 119-129を参照することによって組み込まれる。ヒストグラム、記述、配列比較、予測（すなわち、データベース配列に対する一致点を報告するための統計的に有意な閾値）、カットオフ、マトリックス及びフィルターに対する検索パラメーターが、デフォルト設定で存在する。blastp、blastx、tblastn及びtblastxで使用されるデフォルトのスコアリングマトリックスは、BLOSUM62マトリックスである(Henikoff et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919, fully incorporated by reference)。4つのblastnパラメーターは、下記のように調整される：Q=10(ギャップクリエーションペナルティー：gap creation penalty);R=10(ギャップエクステンションペナルティー：gap extension penalty);wink=1(要求に従って全ての位置でワードヒットを生じる);及びgapw=16(ギャップアラインメントが生じるウィンドウ幅を設定)。対応するBlastpのパラメーター設定は、Q=9;R=2;wink=1;及びgapw=32である。配列間を比較するBestfitは、GCGパッケージバージョン10.0で入手できるが、DNAパラメーターGAP=50(ギャップクリエーションペナルティー：gap creation penalty)及びLEN=3(ギャップエクステンションペナルティー：gap extension penalty)及び、タンパク質比較における対応する設定は、GAP=8及びLEN=2である。

【0220】

プローブ

【0221】

本明細書における「プローブ」は、核酸と定義づけられ、1つかそれ以上のタイプの化学結合、通常は相補的な塩基のペアリング、通常は水素結合形成を介して、相補配列する

標的核酸に結合可能である。ここで用いられるように、天然（すなわち、A、G、U、C 又は T）又は修飾された塩基（7-デアザグアノシン、イノシン、ロックド核酸、PNA's など）を含んでもよい。さらに、プローブにおける塩基は、ハイブリダイゼーションを邪魔しない限り、リン酸ジエステル結合以外の結合で連結されてもよい。従って、プローブは、構成成分である塩基をリン酸ジエステル結合というより、ペプチド結合によって結合しているペプチド核酸であってもよい。1つの遺伝子に対応する数個のプローブをアレイが含む場合、これらのプローブは「遺伝子プローブセット」と呼ばれる。遺伝子プローブセットは、例えば、約2～約20のプローブからなってもよく、好ましくは、約2～約10のプローブ、特に好ましくは約4～約8のプローブ、及び、最も好ましくは約5のプローブである。

10

【0222】

キット

【0223】

更に本発明は、異なった組み合わせで、上記した、高密度抗体アレイ、アレイと共に使用するための試薬、シグナル検出及びアレイ処理装置、プロテオミクスのデータベース及び解析方法、マニュアル及びデータベース管理ソフトを組み合わせる「キット」に関する。例えば、上記した、試験化合物の毒性反応を予測する又は毒性反応のモデルを作ること、肝臓の病状の進行をモニターすること、新しい薬剤標的として将来が期待される遺伝子を特定すること、及び、既知又は新しくデザインされた薬剤をスクリーニングすることに、キットを使用してもよい。キットと共にパッケージされたデータベースは、ヒト又は実験動物のプロテオーム及び／又はフラグメント（本発明のタンパク質に対応する）由来の発現パターンを集めたものである。データーは、正常及び罹患動物の両方の組織の保存場所から集められ、再現性のある、定量的結果、すなわち、所定の条件下において、参照基準と比較して、タンパク質が過剰発現している又は過小発現している程度を提供する。

20

【0224】

キットは、PCR、シーケンシング、インサイツハイブリッド法のキットを含むこともできる。

【0225】

キットは、薬開発に関連する高いコストによって、早く薬剤試験を行うための必要性は強いが、バイオインフォマティクス、特に、特定の遺伝子発現のインフォマティクスは、まだ不足している製薬工場で使用されてもよい。これらのキットは、細胞培養及び実験動物を使用した従来の新薬スクリーニングに関連する、コスト、時間及びリスクを削減することができるであろう。事前にグループ化された患者集団の大規模薬剤スクリーニング、薬理ゲノミクス試験の結果を、優れた効果とより少ない副作用を有する薬剤を選択するために適用してもよい。キットは、より小さなバイオテクノロジーの会社及び前記の大規模試験を自身で行うための施設がない研究所によって使用されてもよい。

30

【0226】

発現をモニタリングするためのオリゴヌクレオチドプローブアレイは、当技術分野において公知である何れの技術(例えば、Lockhart et al., (1996) Nat. Biotechnol. 14, 1675-1680; McGaU et al., (1996) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93, 13555-13460参照)に従って作ること、及び使用することができる。このようなプローブアレイは、本明細書で記載した遺伝子の1つ以上に対し、相補的である又はハイブリダイズする、少なくとも1つ以上のオリゴヌクレオチドを含んでもよい。このようなアレイは、本明細書で記載した、少なくとも約2、3、4、5、6またはそれ以上の遺伝子に対し、相補的である又はハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを含んでもよい。

40

【0227】

アプタマー又はその他のプローブを使用するタンパク質の測定も、本発明においては許容される。また、本発明は、適切なプローブを同時に使用する、タンパク質及びオリゴヌクレオチドの測定に関する。さらに別の側面において、本発明は、不溶性タンパク質（例

50

えば、FFPEサンプルにおける）に対するプローブのハイブリダイゼーション（又は結合）、その後の除去、プローブ又はプローブ／標的分子の測定に関し、前記標的分子がダメージ、損傷、破壊又は切断されたとしても、プローブ又はプローブ複合体は、無傷又は十分に形を保っている。プローブが、架橋結合又は表面結合された標的分子（例えば、膜結合性受容体）及び可溶性の標的分子（例えば、可溶性受容体変異体）の両方と関連する、又は、架橋結合又は表面結合された標的分子とのみ関連づけられた、何れの方法においても、プローブは標的分子に対して解析可能な量に減少され、更に、組織から取り除かれ、測定される。

【0228】

データーベース

10

【0229】

本発明は、例えば、上記のタンパク質に関するタンパク質情報と同様に、様々な細胞又は組織サンプルにおけるタンパク質に関連する発現情報も含む、リレーショナル・データーベースを包含する。発現パターンは、患者の治療及びレスポンス、又は、予後情報、又は、その他の診断情報（例えば、病期の判定、例えばHCC）、又は、患者のリスク評価（例えば、IPIスコアによる）と関連してもよい。データーベースは、例えば、配列情報と関連するタンパク質についての記述的情報、又は、生体サンプルの臨床状態若しくはサンプルが抽出された患者に関連する記述的情報のような、所定のプロテオーム若しくは組織サンプルと関連する情報を含んでもよい。データーベースは、例えば、プロテオームデーターベース及び遺伝子発現データーベースのように、異なる部分を含むようにデザインされてもよい。このようなデーターベースの構造及び構築に関する方法は、幅広く利用可能である。本発明のデーターベースは、外部又は外国のデーターベースにリンクされてもよい。このような外国データーベースとしては、制限されることはないが、日本の疾患ゲノムデーターベース [Genome Medicine Database of Japan] (world-wide-webの gemdbj.nibio.go.jp/dgdb/ で入手できる)が挙げられる。特に、エレクトロニック・ウエスタンブロット (electronic Western blot) を製造して、ユーザーが所定のタンパク質が発現した細胞種類若しくは組織を決定することができるように、又は、特定の組織若しくは細胞における所定のタンパク質の存在量又は発現レベルの定量することができるように、本発明のデーターベースを用いてもよい。

20

【0230】

本発明のデーターベースは、少なくとも2つの前記タンパク質からなる遺伝子セットの、組織又は細胞における発現レベルを特定する情報を提示するために用いられてもよく、データーベースにおけるタンパク質の発現レベルと、少なくとも組織内タンパク質の発現レベルを比較するステップを含む。この方法は、タンパク質又はサンプルから得られたタンパク質の発現レベルを、正常組織、がん組織、又は、同じ疾患（例えばHCC）及び治療（ソラフェニブ）を伴う患者、若しくは、異なる臨床予後を有する他の患者の悪性腫瘍若しくは組織でみられる発現レベルと比較することによって、所定の組織の生理状態を予測するために用いられてもよい。このような方法は、前記した薬又は薬剤のスクリーニング解析に用いることもできる。

30

【0231】

適切なコンピューターシステムは、発現情報、翻訳後の修飾情報（例えば、スプライシング、リン酸化）、活性情報及びデーターベースにおけるその他の情報間の必要な比較を実行するために使用されてもよく、又は、入力装置として提供されてもよい。例えば、多数のコンピューターワークステーションは、様々な製造業者、例えばシリコングラフィックス社などから提供されて利用することができる。また、クライアントサーバーの環境、データーベースのサーバー及びネットワークは、幅広く利用することが可能であり、本発明のデーターベースに対して適切なプラットフォームである。

40

【0232】

予測

【0233】

50

「予後」は、無進行期間（TTP）及び／又は全生存期間（OS）又は無進行生存期間の評価を意味する。例えば、リスクを割り当てる国際予後因子（international prognostication index; IPI）の予測のような、臨床予後及びリスクを予測するための技術及び手順は、当業界において知られている。

【0234】

全生存期間（OS）は、ランダム化からあらゆる原因による死亡までの期間として定義される。分析の時点で生存していた被検者の全生存期間（OS）は、彼らの経過観察最終日で打ち切られる。

【0235】

進行症状（Symptomatic progression）は、FHSI-8質問表に基づくベースラインスコアから少なくとも4ポイントの減少と定義され、予定された次の3週間の評価で確認された。ベースラインから4ポイント又はそれ以上のFHSI-8スコアの減少があり、次の通院予定より前に死亡した場合を除き、死亡は、進行症状として考慮されない。もし、研究からの離脱が、ECOG4ステータスへの悪化であれば、進行症状として考慮される。

【0236】

進行症状までの期間（TTSP）は、ランダム化から最初に記録された進行症状までの期間として定義される（上記の進行症状の定義を参照）。解析時に、症状的に進行していない被検者に関しては、TTSPは、彼らのFHSI-8評価の最終日で打ち切られる。

【0237】

無進行期間（TTP）は、ランダム化から疾患の進行（放射線のみ）までの期間として定義される。解析の時点において腫瘍の進行がない患者は、彼らの腫瘍評価の最終日で打ち切られる。

【0238】

病勢コントロール率（Disease control rate）は、レスポンス評価の最初の実証から少なくとも28日間維持されるレシスト（RECIST）に従って、完全奏効（Complete Response；CR）、部分奏効（Partial Response；PR）又は安定（Stable Disease；SD）について最良のレスポンス評価を有する患者の割合として定義される。

【0239】

最良の奏効率（overall response rate）は、RECIST腫瘍奏効基準に従って確認される、治療の間又は実薬治療（active therapy）の終了後30日以内に実現される、最もよい腫瘍レスポンス（部分又は完全奏効を確認）を伴う患者の割合として定義される。

【0240】

全奏効期間（Overall response duration）は、最初の多覚的なレスポンスの日から、PDが最初に多覚的なレスポンスの日として記録された日又は死亡した日（仮に、進行よりも早く死亡した場合）までが測定される。多覚的なレスポンスに達しなかった患者に対しては、全奏効期間としてゼロが割り当てられる。

【0241】

多覚的なレスポンスまでの期間（Time to objective response）は、ランダム化の日から、RECIST腫瘍奏効基準に従って多覚的なレスポンスが最初に記録された日までの期間として定義される。レスポンスは、引き続き確認されなければならない。多覚的なレスポンスに達しなかった患者、及び、トライアルの間に進行しなかった患者に関しては、多覚的なレスポンスまでの期間は、彼らの腫瘍評価の最終日で打ち切られる。彼らの最良のレスポンスとしてPDを有する被検者に対しては、多覚的なレスポンスまでの期間としては、無限大が割り当てられる。

【0242】

無再発存在期間（Recurrence Free Survival；RFS）は、ランダム化から、独立した放射線学的評価による最初に記録された病気の再発まで、又は、どの順番で起こるかわからず、いずれかの原因によって死亡するまでの期間として定義される。解析の時点で死亡又は再発していない被検者に対しては、RFSは、彼らの評価可能なスキャンの最終日で打ち切られる。

10

20

30

40

50

【0243】

病気の再発（肝内又は肝外）は次のように定義される：

【0244】

肝内再発は、下記の状態を満たす、1つ以上の肝内病変の出現として定義される：

【0245】

1. その最も大きい直径が10mm以上であり、動的撮像（dynamic imaging）上で、小結節がHCCに特徴的な血管像、すなわち、門脈又は静脈相における流出を伴う動脈相における過剰な血管新生（hypervascularization）を示している。

【0246】

2. 特異的な血管像を示さない10mmより大きい領域は、次のスキャンまでに少なくとも1cm成長（interval growth）したという証拠によって、HCCと診断される。

【0247】

肝外再発は、RECIST基準により定義される。腹水又は胸水浸出に起因する除去の場合は、悪性を証明した場合のみ。

【0248】

再発までの期間（TTR）は、ランダム化から、独立した放射線学的評価による最初に記録された再発までの期間として定義される。解析の時点で再発していない被検者に関しては、TTRは、彼らの評価可能なスキャンの最終日で打ち切られる。

【0249】

本発明の一つの実施態様においては、予後不良及び／又は成績不良に対するリスクがある個人は、VEGF、s-VEGFR-2、VEGFR-3、s-c-Kit、HGF、Ras p21、pERK、Ang2、bFGF又はIGF-2ならなるグループから選択された1つ以上のタンパク質が、差別的に発現をしている個人である。他の実施態様においては、遺伝子の組み合わせを使用してもよい。遺伝子と関連する有意性は、当技術分野において公知の技術によって測定される。例えば、有意性はオッズ比の算定で測定される。さらなる実施態様においては、有意性は、統計解析によって測定される（例えば、生存曲線の解析）。

【0250】

一つの実施態様においては、0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0及び40.0に制限されることはないが、重大なリスクは、0.8以下又は少なくとも約1.2のオッズ比として測定される。更なる実施態様においては、リスクの顕著な増加又は減少は、約25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%および98%に制限されることはないが、少なくとも約20%である。更なる実施態様においては、リスクの顕著な増加は、少なくとも約50%である。しかしながら、リスクが医学上重要であるかどうかを特定することは、また、例えば、がんの家族歴、特に、HCCの家族歴、喫煙、アルコール摂取、肝硬変、身体活動性の欠如、ウイルス感染症（例えば、肝炎ウイルス感染）及び公知の炎症性マーカーによって示されるような炎症性の要素など、種々の要因に依存すると理解される。

【0251】

更なる記述なしで、前述の説明及び以下の説明に役立つ実施例を使用して、当業者は、本発明の化合物を利用及び製造し、クレームされた方法を実施することができると考えられる。従って、以下の実施例は、本発明の好ましい実施態様を特に挙げたものであり、開示された本発明を何ら制限するものではない。

【0252】

本発明の特徴としては、制限されるものではないが、以下のものが挙げられる：

【0253】

一つの実施態様においては、本発明は以下のアスペクトを提供する。

アスペクト1. 肝細胞癌（HCC）の患者の予後を予測する方法であって、

前記患者の試験サンプルにおける、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体2 (s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体3 (VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(H

10

20

30

40

50

GF)、Ras p21、リン酸化ERK (pERK)、アンジオポエチン2(Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)又はインシュリン様増殖因子(IGF-2)の、少なくとも1つのバイオマーカーの発現レベルを検出し；

前記患者の試験サンプルにおける前記バイオマーカーの前記発現レベルと参照基準を比較することからなる、

前記参照基準と比較された前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの発現レベルの違いが、前記予後を示すものとする方法。

アспект 2. バイオマーカーがタンパク質である、請求項 1 に記載された方法。

アспект 3. 前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの前記発現レベルが、参照基準と比較して増加又は減少する、アспект 2 に記載された方法。

アспект 4. 前記バイオマーカーが、血漿HGF、VEGF、s-VEGFR-3、Ras p21、Ang2、bFGF、IGF-2又はそれらの組み合わせである、アспект 2 に記載された方法。

アспект 5. 前記予後が、全生存期間 (OS) 及び／又は無進行期間 (TTP) である、アспект 2 に記載された方法。

アспект 6. 前記バイオマーカーが、HGF、VEGF、s-VEGFR-3、Ang2、IGF-2であり、前記予後が全生存期間 (OS) である、アспект 2 に記載された方法。

アспект 7. 前記参照基準と比較した、前記HCC患者における前記HGF、VEGF、s-VEGFR-3又はAng2レベルの減衰；又は前記参照基準と比較した、HCC患者における前記IGF-2の上昇が、全生存期間 (OS) の改善を示すものとする、アспект 6 に記載された方法。

アспект 8. 前記参照基準と比較した、前記HCC患者における前記HGF、VEGF、s-VEGFR-3又はAng2レベルの上昇；又は前記参照基準と比較した、前記HCC患者におけるIGF-2の減衰が、全生存期間の悪化を示すものとする、アспект 6 に記載された方法。

アспект 9. 前記バイオマーカーが、VEGF、Ras p21、Ang2であり、前記予後が無進行期間 (TTP) である、アспект 2 に記載された方法。

アспект 10. 前記参照基準と比較された、前記HCC患者における、前記VEGFレベルの減衰、前記Ang2レベルの減衰、又はRas p21レベルの上昇が、無進行期間 (TTP) の延長を示すものとする、アспект 9 に記載された方法。

アспект 11. 前記VEGFレベルの上昇、前記Ang2レベルの上昇、又は前記Ras p21レベルの減衰が、無進行期間 (TTP) の短縮を示すものとする、アспект 9 に記載された方法。

アспект 12. 前記バイオマーカーが、血漿HGF、VEGF、s-VEGFR-3、Ang2、bFGF又はIGF-2であり；

前記参照基準が、HCC患者の母集団における、75パーセントイル血漿HGFレベル、75パーセントイル血漿VEGFレベル、25パーセントイル血漿s-VEGFR-3レベル、メジアンAng2レベル、メジアンbFGFレベル、及び／又はメジアンIGF-2レベルからなる、

アспект 4 に記載された方法。

アспект 13. 前記参照基準が、HCC患者の母集団において、～3.279ng/ml血漿HGFレベル、～101.928pg/ml血漿VEGFレベル、～30.559ng/ml血漿s-VEGFR-3レベル、～6.061ng/ml血漿Ang2レベル、～7.5pg/ml血漿bFGFレベル又は～797.7ng/ml血漿IGF-2レベルからなるアспект 12 に記載された方法。

アспект 14. バイオマーカーの組み合わせを検出することからなる、アспект 2 に記載された方法であって、前記組み合わせが、

- 1) HGF及びVEGF；
- 2) HGF及びs-VEGFR-3；
- 3) VEGF及びs-VEGFR-3；
- 4) HGF, VEGF及びs-VEGFR-3；
- 5) HGF及びRasp21；
- 6) HGF, VEGF及びRasp21；
- 7) VEGF及びRasp21；
- 8) s-VEGFR-3及びRasp21；

- 9)c-KIT及びbFGF；
- 10)c-KIT及びIGF-2；
- 11)bFGF及びIGF-2；
- 12)HGF及びbFGF；又は
- 13)HGF及びIGF-2；

14)組み合わせ(1)-(13)の任意の組み合わせからなる方法。

アспект15. 下記の追加のパラメーターの少なくとも1つを検出してなる、アспект2に記載された方法；

- (a)イースタン・コーポレイティブ・オンコロジー・グループ パフォーマンスステータス (ECOG PS:0対1+2),
- (b)大血管性の血管浸潤；
- (c)腫瘍量；
- (d)肝外進展；
- (e)アルファフェトプロテインレベル(AFP)；
- (f)アルカリフォスファターゼレベル(AP)；
- (g)腹水；
- (h)ビリルビンレベル；
- (i)アルブミンレベル；
- (j)PTスコア；及び／又は
- (k)チャイルド-ピュー スコア。

10

20

アспект16. アспект2に記載された方法であって、

前記患者の試験サンプルにおける、血漿Ang2の少なくとも1つのバイオマーカー及び下記の追加のバイオマーカーの少なくとも1つを検出し、

- (a)イースタン・コーポレイティブ・オンコロジー・グループ パフォーマンスステータス (ECOG PS:0対1+2),
- (b)大血管性の血管浸潤；
- (c)腫瘍量；
- (d)肝外進展；
- (e)アルファフェトプロテインレベル(AFP)；
- (f)アルカリフォスファターゼレベル(AP)；
- (g)腹水；
- (h)ビリルビンレベル；
- (i)アルブミンレベル；
- (j)PTスコア；及び／又は
- (k)チャイルド-ピュー スコア

30

前記患者における、前記血漿HGFレベル及び前記追加のパラメーターを参照基準と比較してなり；

低いレベルの追加のパラメーター (i)、又は、パラメーター (a) ~ (h) 若しくはパラメーター (j) ~ (k) である高いレベルの追加のパラメーターと組み合わせ、高いレベルの血漿Ang2が、全生存期間の悪化を示すものとする方法。

40

アспект17. アспект2に記載された方法であって、

前記患者の試験サンプルにおける、血漿HGFの少なくとも1つのバイオマーカー、及び、下記の追加のパラメーターの少なくとも1つを検出し、

- (a)大血管性の浸潤；
- (b)腫瘍量；
- (c)アルファフェトプロテインレベル(AFP)；
- (d)ビリルビンレベル；
- (e)アルブミンレベル；及び／又は
- (f)アルカリフォスファターゼレベル (AP)

前記患者における前記血漿HGFレベル及び前記追加のパラメーターレベルを参照基準と

50

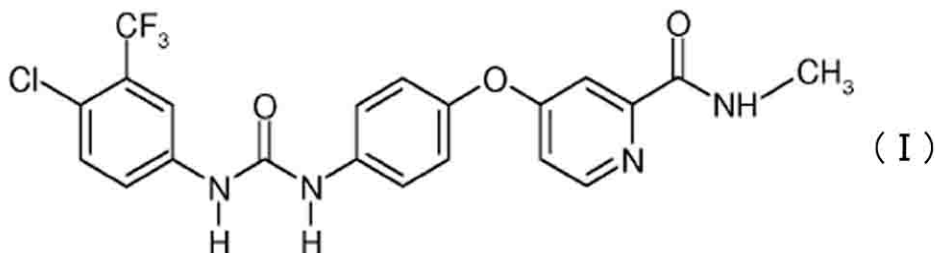
比較することからなり；

低いレベルの追加のパラメーター (e)、又は、パラメーター (a) ～ (d) 若しくはパラメーター (f) である高いレベルの追加のパラメーターと組み合わせさせた、高いレベルの前記血漿HGFが、全生存期間の悪化と関係する方法。

アспект18. 前記患者がソラフェニブ治療を受けている、アспект2に記載された方法。

アспект19. HCC患者におけるソラフェニブ治療の予後を予測する方法であって、前記患者の試験サンプルにおける、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、可溶性VEGF受容体2 (s-VEGFR-2)、可溶性VEGF受容体3 (VEGFR-3)、可溶性c-Kit(s-c-Kit)、肝細胞増殖因子(HGF)、Ras p21、リン酸化ERK (pERK)、アンジオポエチン2(Ang2)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)又はインシュリン様増殖因子(IGF-2)の、少なくとも1つのバイオマーカーの発現レベルを検出し、前記レベルを参照基準と比較することからなり、前記参照基準と比較した前記試験サンプルにおける前記バイオマーカーの発現差異が、前記治療の予後を示すものとする方法。 10

アспект20. 前記ソラフェニブが、下記の化学式I、又は、薬剂的に許容されるそれらの塩、多形体、水和物、溶媒和物又はそれらの組み合わせからなる、アспект19に記載された方法。



アспект21. 前記ソラフェニブが、N-[4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]-N'-{4-[2-カルバモイル-1-オキシ-(4-ピリジルオキシ)]フェニル}尿素又はそのトシレート塩である、アспект19に記載された方法。

アспект22. 前記c-KIT、HGF、Ras p21、s-VEGFR-2及びs-VEGFR-3バイオマーカーが、前記ソラフェニブ治療患者において、前記参照基準と比較して減衰し、及び／又は、VEGFレベルが、ソラフェニブ治療患者において、前記参照基準と比較して上昇する、アспект19に記載された方法。 30

アспект23. 血漿バイオマーカーの組み合わせからなる、アспект19に記載された方法。

アспект24. 下記の組み合わせからなる、アспект23に記載された方法：

(a) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの1つからなる組み合わせ、

- (i)HGFと、VEGF；
- (ii)s-c-Kitと、VEGF；
- (iii)s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv)HGFと、s-VEGFR-2；
- (v)s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (vi)s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii)Ang2と、VEGF；
- (viii)Ang2と、sVEGFR2；
- (ix)Ang2と、Ras p21；
- (x)IGF-2と、VEGF；
- (xi)IGF-2と、sVEGFR2；
- (xii)IGF-2と、Ras p21；又は

(b) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの2つからなる 50

組み合わせ

- (i) HGFと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (v) Ang2と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (vi) Ang2と、Ras p21、及び、VEGF；
- (vii) IGF-2VEGFと、sVEGFR2；
- (viii) IGF-2、sVEGFR2と、Ras p21；
- (ix) IGF-2、VEGFと、Ras p21；又は

10

(c) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i) HGF、s-c-Kitと、VEGF；
- (ii) HGF、s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF、s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv) HGF、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit、s-VEGFR-3と、VEGF；
- (vi) s-c-Kit、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF、Ang2と、VEGF；
- (viii) HGF、Ang2と、s-VEGFR-2；
- (ix) s-c-Kit、Ang2と、VEGF；
- (x) s-c-Kit、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (xi) s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF；
- (xii) s-VEGFR-3、Ang2と、s-VEGFR-2；
- (xiii) IGF-2、HGFと、VEGF；
- (xiv) IGF-2、HGFと、sVEGFR2；
- (xv) IGF-2、HGFと、Ras p21；
- (xvi) IGF-2、Ang2と、VEGF；
- (xvii) IGF-2、Ang2と、sVEGFR2；
- (xviii) IGF-2、Ang2と、Ras p21；
- (xix) IGF-2、s-c-Kitと、VEGF；
- (xx) IGF-2、s-c-Kitと、sVEGFR2；
- (xxi) IGF-2、s-c-Kitと、Ras p21；又は

20

30

(d) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF、s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) HGF、s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) s-c-Kit、s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) HGF、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vi) s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vii) IGF-2、HGFと、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (viii) IGF-2、HGFと、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (ix) IGF-2、HGFと、VEGF、及び、Ras p21；
- (x) IGF-2、Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (xi) IGF-2、Ang2と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (xii) IGF-2、Ang2と、VEGF、及び、Ras p21；
- (xiii) IGF-2、s-c-KitVEGF、及び、sVEGFR2；
- (xiv) IGF-2、s-c-Kitと、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (xv) IGF-2、s-c-Kitと、VEGF、及び、Ras p21；又は

40

50

(e) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF ;
- (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (ix) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF ;
- (x) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、s-VEGFR-2 ;
- (xi) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (xii) HGF, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2 ; 又は

10

(f) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, Ang2, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iv) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (v) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vi) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (viii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ; 又は

20

(g) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (iv) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2 ; 又は

30

(h) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ; 又は

(i) 前記バイオマーカーのすべてからなる組み合わせ ;

(a) グループ A のバイオマーカーの 1 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i) HGF と、VEGF ;
- (ii) s-c-Kit と、VEGF ;
- (iii) s-VEGFR-3 と、VEGF ;
- (iv) HGF と、s-VEGFR-2 ;
- (v) s-c-Kit と、s-VEGFR-2 ;
- (vi) s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (vii) Ang2 と、VEGF ;
- (viii) Ang2 と、sVEGFR2 ;
- (ix) Ang2 と、Ras p21.

40

(b) グループ A のバイオマーカーの 1 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

50

(iii) s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(iv) Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2；

(v) Ang2と、sVEGFR2、及び、Ras p21；

(vi) Ang2と、Ras p21、及び、VEGF；

(c) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

(i) HGF、s-c-Kitと、VEGF；

(ii) HGF、s-c-Kitと、s-VEGFR-2；

(iii) HGF、s-VEGFR-3と、VEGF；

(iv) HGF、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；

(v) s-c-Kit、s-VEGFR-3と、VEGF；

(vi) s-c-Kit、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；

(vii) HGF、Ang2と、VEGF；

(viii) HGF、Ang2と、s-VEGFR-2；

(ix) s-c-Kit、Ang2と、VEGF；

(x) s-c-Kit、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；

(xi) s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF；

(xii) s-VEGFR-3、Ang2と、s-VEGFR-2；

(d) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

(i) HGF、s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(ii) HGF、s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(iii) s-c-Kit、s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(iv) HGF、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(v) s-c-Kit、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(vi) s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(e) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

(i) HGF、s-c-Kit、s-VEGFR-3と、VEGF；

(ii) HGF、s-c-Kit、s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；

(iii) HGF、s-c-Kit、Ang2と、VEGF；

(iv) HGF、s-c-Kit、Ang2と、s-VEGFR-2；

(v) s-c-Kit、s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF；

(vi) s-c-Kit、s-VEGFR-3、Ang2と、s-VEGFR-2；

(vii) HGF、s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF；

(viii) HGF、s-VEGFR-3、Ang2と、s-VEGFR-2；

(f) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

(i) HGF、s-c-Kit、s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(ii) HGF、s-c-Kit、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(iii) HGF、Ang2、s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(iv) s-c-Kit、s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(g) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

(i) HGF、s-c-Kit、s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF；

(ii) HGF、s-c-Kit、s-VEGFR-3、Ang2と、s-VEGFR-2；

(h) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

(i) HGF、s-c-Kit、s-VEGFR-3、Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(i) 前記バイオマーカーのすべてからなる組み合わせ。

10

20

30

40

50

アスペクト25. 前記予後が、全生存期間（OS）、死亡のリスク、無進行期間（TTP）、治療の利点（BOT）、無進行生存期間（PFS）、死亡までの期間（TTD）、無病生存期間（DFS）、進行症状までの期間（TSP）、無再発生存期間（FRS）、再発までの期間（TTR）、病状、レスポンスのタイプ又はそれらの組み合わせの評価からなる、アスペクト19に記載された方法。

アスペクト26. 前記予後が、全生存期間（OS）、死亡のリスク、無進行期間（TTP）、治療の利点（BOT）又はそれらの組み合わせの評価からなる、アスペクト25に記載された方法。

アスペクト27. ソラフェニブ治療に対するHCC患者のレスポンスをモニタリングする方法であって、

ソラフェニブ治療前の前記患者の試験サンプルにおける、s-c-Kit、HGF、Ras p21、VEGF、s-VEGFR-2又はs-VEGFR-3の少なくとも1つのバイオマーカーのベースラインレベルを検出し、

ソラフェニブ治療後の前記患者の前記試験サンプルにおける、少なくとも1つの前記バイオマーカーを検出し、

前記ソラフェニブ治療後のバイオマーカーレベルを前記ソラフェニブ治療前のベースラインレベルと比較することからなり、

ソラフェニブ治療後の前記試験サンプルにおける、s-c-Kit、HGF、Ras p21、s-VEGFR-2又はs-VEGFR-3の少なくとも1つのレベルの減衰、及び／又は、VEGFのレベルの上昇が、前記ソラフェニブ治療に対してレスポンスすることを示すものとする方法。

アスペクト28. HCC患者におけるソラフェニブ治療の予後を評価する方法であって、

ある時点での前記患者の血漿HGFレベルを検出し、

より遅い時点での前記患者の血漿HGFレベルを検出し、

2つの時点での前記患者における前記血漿HGFレベルを比較することからなり、

より遅い時点での前記血漿HGFレベルの減少が、ソラフェニブ治療の前記予後を示すものとする方法。

アスペクト29. アスペクト28に記載された方法であって、

ソラフェニブ治療前の血漿HGFレベルを測定し、

サイクル3の1日目（C3D1）にHGFレベルを測定し、

前記血漿HGFレベルの変化を特定し；

前記変化を血漿HGFの標準値294pg/mLと比較することからなり、

C3D1で>294pg/mLの血漿HGFレベルの変化が、無進行期間の延長を示すものとする方法。

アスペクト30. HCC患者の予後を予測する方法であって、前記患者の試験腫瘍サンプルにおけるリン酸化ERK（pERK）のレベルを検出し、前記pERKレベルを参照基準と比較することからなり；

参照基準と比較された、前記腫瘍サンプルにおける前記pERKの発現差異が、前記HCCの予後を示すものとする方法。

アスペクト31. 前記参照基準と比較された、前記腫瘍におけるpERKレベルの上昇が、TTPの延長を示すものとする、アスペクト30に記載された方法。

アスペクト32. 前記参照基準と比較された、前記腫瘍におけるpERKレベルの減衰が、TTPの短縮を示すものとする、アスペクト30に記載された方法。

アスペクト33. HCCの患者の予後に影響を与えることができる薬剤をスクリーニングする方法であって、

腫瘍細胞を試験薬剤に接触させ；

前記薬剤との接触前後における、s-c-Kit、HGF、Ras p21、VEGF、s-VEGFR-2、s-VEGFR-3又はpERKの少なくとも1つのバイオマーカーの発現レベルを検出することからなり；

前記薬剤と接触した後におけるs-c-Kit、HGF、Ras p21、s-VEGFR-2、又はs-VEGFR-3レベルの減衰、及び／又は、VEGF又はpERKレベルの上昇が、前記薬剤が前記HCCの予後に影響を与えることができる薬剤であることを示すものとする方法。

10

20

30

40

50

アスペクト34. いずれも、下記からなる抗原組成に特異的に結合する、複数の抗体分子からなる抗体アレイ又はキット：

(a) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの1つからなる組み合わせ

- (i)HGFと、VEGF；
- (ii)s-c-Kitと、VEGF；
- (iii)s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv)HGFと、s-VEGFR-2；
- (v)s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (vi)s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii)Ang2と、VEGF；
- (viii)Ang2と、sVEGFR2；
- (ix)Ang2と、Ras p21；
- (x)IGF-2と、VEGF；
- (xi)IGF-2と、sVEGFR2；
- (xii)IGF-2と、Ras p21；又は

10

(b) グループAのバイオマーカーの1つとグループBのバイオマーカーの2つからなる組み合わせ

- (i)HGFと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii)s-c-Kitと、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii)s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv)Ang2と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (v)Ang2と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (vi)Ang2と、Ras p21、及び、VEGF；
- (vii)IGF-2VEGFと、sVEGFR2；
- (viii)IGF-2, sVEGFR2と、Ras p21；
- (ix)IGF-2, VEGFと、Ras p21；又は

20

(c) グループAのバイオマーカーの2つとグループBのバイオマーカーの1つからなる組み合わせ

- (i)HGF, s-c-Kitと、VEGF；
- (ii)HGF, s-c-Kitと、s-VEGFR-2；
- (iii)HGF, s-VEGFR-3と、VEGF；
- (iv)HGF, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (v)s-c-Kit, s-VEGFR-3と、VEGF；
- (vi)s-c-Kit, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (vii)HGF, Ang2と、VEGF；
- (viii)HGF, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (ix)s-c-Kit, Ang2と、VEGF；
- (x)s-c-Kit, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (xi)s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
- (xii)s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (xiii)IGF-2, HGFと、VEGF；
- (xiv)IGF-2, HGFと、sVEGFR2；
- (xv)IGF-2, HGFと、Ras p21；
- (xvi)IGF-2, Ang2と、VEGF；
- (xvii)IGF-2, Ang2と、sVEGFR2；
- (xviii)IGF-2, Ang2と、Ras p21；
- (xix)IGF-2, s-c-Kitと、VEGF；
- (xx)IGF-2, s-c-Kitと、sVEGFR2；
- (xxi)IGF-2, s-c-Kitと、Ras p21；又は

30

40

50

(d) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) HGF, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vii) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (viii) IGF-2, HGF と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (ix) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、Ras p21；
- (x) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (xi) IGF-2, Ang2 と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (xii) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、Ras p21；
- (xiii) IGF-2, s-c-Kit VEGF、及び、sVEGFR2；
- (xiv) IGF-2, s-c-Kit と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (xv) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF、及び、Ras p21；又は

10

(e) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF；
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF；
- (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
- (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (ix) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF；
- (x) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、s-VEGFR-2；
- (xi) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF；
- (xii) HGF, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2；又は

20

30

(f) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, Ang2, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (v) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vi) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (viii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は

40

(g) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF；
- (iv) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2；又は

(h) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

50

(ii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は
 (i) 前記バイオマーカーのすべてからなる組み合わせ

(a)

- (i) HGF と、VEGF；
- (ii) s-c-Kit と、VEGF；
- (iii) s-VEGFR-3 と、VEGF；
- (iv) HGF と、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit と、s-VEGFR-2；
- (vi) s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (vii) Ang2 と、VEGF；
- (viii) Ang2 と、sVEGFR2；
- (ix) Ang2 と、Ras p21.

10

(b)

- (i) HGF と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) Ang2 と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (v) Ang2 と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (vi) Ang2 と、Ras p21、及び、VEGF；

20

(c)

- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF；
- (ii) HGF, s-c-Kit と、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF；
- (iv) HGF, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF；
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF, Ang2 と、VEGF；
- (viii) HGF, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (ix) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF；
- (x) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (xi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
- (xii) s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；

30

(d)

- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) HGF, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(e)

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF；
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF；
- (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
- (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；

40

(f)

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

50

- (ii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, Ang2, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(g)

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；

(h)

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(i) 前記バイオマーカーのすべてからなる抗原組成。

アスペクト35. いずれも、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下において、
下記の遺伝子からなる組み合わせと特異的にハイブリダイズする、複数のオリゴヌクレオ
チドからなるオリゴヌクレオチドアレイ又はキット；

(a) グループ A のバイオマーカーの 1 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる
組み合わせ

- (i) HGF と、VEGF；
- (ii) s-c-Kit と、VEGF；
- (iii) s-VEGFR-3 と、VEGF；
- (iv) HGF と、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit と、s-VEGFR-2；
- (vi) s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (vii) Ang2 と、VEGF；
- (viii) Ang2 と、sVEGFR2；
- (ix) Ang2 と、Ras p21；
- (x) IGF-2 と、VEGF；
- (xi) IGF-2 と、sVEGFR2；
- (xii) IGF-2 と、Ras p21；又は

(b) グループ A のバイオマーカーの 1 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる
組み合わせ

- (i) HGF と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) Ang2 と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (v) Ang2 と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (vi) Ang2 と、Ras p21、及び、VEGF；
- (vii) IGF-2VEGF と、sVEGFR2；
- (viii) IGF-2, sVEGFR2 と、Ras p21；
- (ix) IGF-2, VEGF と、Ras p21；又は

(c) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる
組合せ

- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF；
- (ii) HGF, s-c-Kit と、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF；
- (iv) HGF, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF；
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF, Ang2 と、VEGF；
- (viii) HGF, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (ix) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF；
- (x) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (xi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；

10

20

30

40

50

- (xii) s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (xiii) IGF-2, HGF と、VEGF ;
- (xiv) IGF-2, HGF と、sVEGFR2 ;
- (xv) IGF-2, HGF と、Ras p21 ;
- (xvi) IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (xvii) IGF-2, Ang2 と、sVEGFR2 ;
- (xviii) IGF-2, Ang2 と、Ras p21 ;
- (xix) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF ;
- (xx) IGF-2, s-c-Kit と、sVEGFR2 ;
- (xxi) IGF-2, s-c-Kit と、Ras p21 ; 又は

10

(d) グループ A のバイオマーカーの 2 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iii) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iv) HGF, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (v) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vii) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、sVEGFR2 ;
- (viii) IGF-2, HGF と、sVEGFR2、及び、Ras p21 ;
- (ix) IGF-2, HGF と、VEGF、及び、Ras p21 ;
- (x) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、sVEGFR2 ;
- (xi) IGF-2, Ang2 と、sVEGFR2、及び、Ras p21 ;
- (xii) IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、Ras p21 ;
- (xiii) IGF-2, s-c-Kit VEGF、及び、sVEGFR2 ;
- (xiv) IGF-2, s-c-Kit と、sVEGFR2、及び、Ras p21 ;
- (xv) IGF-2, s-c-Kit と、VEGF、及び、Ras p21 ; 又は

20

(e) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF ;
- (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF ;
- (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2 ;
- (ix) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF ;
- (x) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、s-VEGFR-2 ;
- (xi) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF ;
- (xii) HGF, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2 ; 又は

30

40

(f) グループ A のバイオマーカーの 3 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (ii) HGF, s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iii) HGF, Ang2, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (iv) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (v) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vi) HGF, s-c-Kit, IGF-2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;
- (vii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2 ;

50

(viii) HGF, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は
 (g) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 1 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF；
- (iv) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、s-VEGFR-2；又は

(h) グループ A のバイオマーカーの 4 つとグループ B のバイオマーカーの 2 つからなる組み合わせ

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) HGF, s-c-Kit, IGF-2, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；又は

10

(a)

- (i) HGF と、VEGF；
- (ii) s-c-Kit と、VEGF；
- (iii) s-VEGFR-3 と、VEGF；
- (iv) HGF と、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit と、s-VEGFR-2；
- (vi) s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (vii) Ang2 と、VEGF；
- (viii) Ang2 と、sVEGFR2；
- (ix) Ang2 と、Ras p21.

20

(b)

- (i) HGF と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) Ang2 と、VEGF、及び、sVEGFR2；
- (v) Ang2 と、sVEGFR2、及び、Ras p21；
- (vi) Ang2 と、Ras p21、及び、VEGF；

(c)

- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF；
- (ii) HGF, s-c-Kit と、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF；
- (iv) HGF, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF；
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF, Ang2 と、VEGF；
- (viii) HGF, Ang2 と、s-VEGFR-2；
- (ix) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF；
- (x) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、s-VEGFR-2；
- (xi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF；
- (xii) s-VEGFR-3, Ang2 と、s-VEGFR-2；

30

40

(d)

- (i) HGF, s-c-Kit と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) HGF, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) HGF, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (v) s-c-Kit, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (vi) s-VEGFR-3, Ang2 と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(e)

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3 と、VEGF；

50

- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3と、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, s-c-Kit, Ang2と、VEGF；
- (iv) HGF, s-c-Kit, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
- (vi) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；
- (vii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
- (viii) HGF, s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；

(f)

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (ii) HGF, s-c-Kit, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iii) HGF, Ang2, s-VEGFR-3と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (iv) s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；

(g)

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF；
- (ii) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、s-VEGFR-2；

(h)

- (i) HGF, s-c-Kit, s-VEGFR-3, Ang2と、VEGF、及び、s-VEGFR-2；
- (i)

(i) 前記バイオマーカー遺伝子のすべてからなるオリゴヌクレオチドアレイ。

【図面の簡単な説明】

【0254】

本発明の様々な特徴及びそれに伴う利点は、添付の図面と併せて検討されることによってより理解されたときに、より十分に評価されるだろう。この添付図面における符号は、参考文献同様、各図を通してすべて同じ又は類似の部分を示す。

【0255】

【図1】図1は、HCC患者の血漿HGFレベルと全生存期間との関連を示す。P値0.013は、連続型変数（continuous variable; 図示されてない）としてHGF解析において観察され、P値0.032は、ビン化型変数（binned variable）（図示されている）としてHGF解析において観察された。HCC患者における75パーセンタイルの血漿HGFレベル（3.279ng/ml）が、HGFレベルが高いか低いかを決定する参照基準として用いられた。

【0256】

【図2】図2は、HCC患者の血漿VEGFレベルと全生存期間との関連を示す。P値0.001は、連続型変数（図示されてない）としてVEGF解析において観察され、P値0.001は、ビン化型変数（binned variable）（図示されている）としてVEGF解析において観察された。HCC患者における75パーセンタイルの血漿VEGFレベル（101.928ng/ml）が、VEGFレベルが高いか低いかを決定する参照基準として用いられた。似たような傾向が、独立に評価された無進行期間（TTP）に対して観察された（ $p=0.125$ ）。

【0257】

【図3】図3は、HCC患者の血漿s-VEGFR-3レベルと全生存期間との関連を示す。P値0.014は、連続型変数（図示されてない）としてs-VEGFR-3解析において観察され、P値0.083は、ビン化型変数（binned variable）（図示されている）としてs-VEGFR-3解析で観察された。HCC患者における25パーセンタイルの血漿VEGFR-3レベル（30.559ng/ml）が、s-VEGFR-3レベルが高いか低いかを決定する参照基準として用いられた。

【0258】

【図4】図4は、HCC患者の血漿Ang2レベルと全生存期間又は無進行期間との関連を示す。0.0001より低いP値は、OSの予後指標としてAng2解析において観察され、P値0.016は、TTPの予後指標としてAng2解析において観察された。HCC患者における50パーセンタイルの血漿Ang2レベル（6.061ng/ml）が、Ang2レベルが高いか低いかを決定する参照基準として用いられた。

【0259】

10

20

30

40

50

【図 5】図 5 は、HCC 患者の血漿 IGF-2 レベルと全生存期間との関連を示す。P 値 0.002 は、OS の予後指標として IGF-2 解析において観察された。HCC 患者における 50 パーセントイルの血漿 IGF-2 レベル (797.7 ng/ml) が、IGF-2 レベルが高いか低いかを決定する参照基準として用いられた。

【0 2 6 0】

【図 6】図 6 は、Ang2 レベルと VEGF レベルとの相関関係を示す。HCC 患者における二つのパラメーター間での相関関係は希薄であった。

【0 2 6 1】

【図 7】図 7 は、HCC 患者における血漿 s-c-Kit レベルと全生存期間に対してソラフェニブがもたらす効果との関連を示す (相互作用に対する $p=0.081$)。HCC 患者におけるメジアン血漿 s-c-Kit レベル (11.3 ng/ml) が、s-c-Kit レベルが高いか低いかを決定する参照基準として用いられた。似たような傾向は、独立に評価された TTP (相互作用に対する $p=0.052$) 及び治験責任医師により評価された TTP (相互作用に対する $p=0.117$) で観察された。

【0 2 6 2】

【図 8】図 8 は、HCC 患者における血漿 HGF レベルと全生存期間に対してソラフェニブがもたらす効果との関連を示す (相互作用に対する $p=0.073$)。HCC 患者における 75 パーセントイルの血漿 HGF レベル (3279.1 pg/ml) が、HGF レベルが高いか低いかを決定する参照基準として用いられた。似たような傾向は、独立に評価された TTP (相互作用に対する $p=0.396$) 及び治験責任医師により評価された TTP (相互作用に対する $p=0.246$) で観察された。

【0 2 6 3】

【図 9】図 9 は、HCC 患者における血漿 Ang2 レベルと全生存期間に対してソラフェニブがもたらす効果との関連を示す (相互作用に対する $p=0.80$)。HCC 患者における 50 パーセントイルの血漿 HGF レベル (6.061 ng/ml) が、Ang2 レベルが高いか低いかを決定する参照基準として用いられた。

【0 2 6 4】

【図 10】図 10 は、HCC 患者における血漿 bFGF レベルと無進行期間に対してソラフェニブがもたらす効果との関連を示す (相互作用に対する $p=0.078$)。HCC 患者における 50 パーセントイルの血漿 bFGF レベル (7.5 pg/ml) が、bFGF レベルが高いか低いかを決定する参照基準として用いられた。

【0 2 6 5】

【図 11】図 11 は、HCC における血漿 IGF-2 レベルと無進行期間に対してソラフェニブがもたらす効果との関連を示す (相互作用に対する $p=0.13$)。HCC 患者における 50 パーセントイルの血漿 IGF-2 レベル (797.7 pg/ml) が、IGF-2 レベルが高いか低いかを決定する参照基準として用いられた。

【0 2 6 6】

【図 12】図 12 は、ソラフェニブによる治療を受けた HCC 患者の血漿 s-c-Kit バイオマーカーレベルにおける C3D1 の患者内変化を示す。血漿 c-Kit の平均レベルは、ソラフェニブによる治療中、およびプラセボ群においては減少する。しかしながら、ソラフェニブに関連した減少は、プラセボ群に見られる減少とはかなり異なる ($p<0.0001$)。

【0 2 6 7】

【図 13】図 13 は、ソラフェニブによる治療を受けた HCC 患者の血漿 HGF バイオマーカーレベルにおける C3D1 の患者内変化を示す。血漿 HGF の平均レベルは、ソラフェニブによる治療中に減少する一方で、プラセボ群において増加する。ソラフェニブに関連した減少は、プラセボ群に見られる増加とはかなり異なる ($p<0.0001$)。

【0 2 6 8】

【図 14】図 14 は、ソラフェニブによる治療を受けた HCC 患者の s-c-Kit 及び HGF バイオマーカーレベルにおける、患者内変化の平均を示す。ベースラインとサイクル 3 の 1 日目 (C3D1) のレベルが示される。s-c-Kit 及び HGF 両方のソラフェニブに関連した減少は、プラセボ群とはかなり異なる ($p<0.0001$)。

【0 2 6 9】

10

20

30

40

50

【図15】図15は、ソラフェニブによる治療を受けたHCC患者のRas p21及びVEGFバイオマーカーレベルにおける、患者内変化の平均を示す。ベースラインとサイクル3の1日目（C3D1）のレベルが示される。Rasp21のソラフェニブに関連した減少は、プラセボ群に見られる増加とはかなり異なる（ $p=0.010$ ）。

【0270】

【図16】図16は、ソラフェニブによる治療を受けたHCC患者の可溶性VEGFR-2及び可溶性VEGFR-3バイオマーカーレベルにおける、変化を示す。ベースラインとサイクル3の1日目（C3D1）のレベルが示される。両バイオマーカーのソラフェニブに関連した減少は、プラセボ群とはかなり異なる（ $p<0.0001$ ）。

【0271】

【図17】図17は、HCC患者の血漿Ang2バイオマーカーレベルにおける、C3D1の患者内変化を示す。結果は、Ang2の平均レベルがプラセボ群で増加し、ソラフェニブ群では大きな変化がなく、プラセボ群におけるAng2の変化は、ソラフェニブ群とはかなり異なる（ $p<0.0001$ ）ことを示している。

【0272】

【図18】図18は、（A）血漿EGF及び（B）血漿IGF-2レベルにおけるC3D1の患者内変化を示す。血漿EGFの平均レベルはソラフェニブによる治療中に減少する（ $p=0.025^*$ ）。血漿IGF-2の平均レベルはソラフェニブによる治療中（ $p<0.0001^*$ ）及びプラセボ治療中（ $p<0.001^*$ ）に減少する。

【0273】

【図19】図19は、HCC患者の血漿HGF（ベースラインとの比較）における、ソラフェニブに関連するC3D1の患者内変化を示す。血漿HGFレベル（ -294.02pg/ml ）の絶対的な変化（減少）のメジアンが示される。

【0274】

【図20】図20は、血漿HGFにおける、ソラフェニブに関連するC3D1の変化と治療の予後の関連を示す。C3D1（12週目）で血漿HGFレベルが 294.02pg/ml （50パーセンタイルレベル）より多く減少したソラフェニブ患者は、血漿HGFレベルがこの時点で同量まで減少しなかった患者より無進行期間（TTP）が長い（ $p=0.029$ ）。この所見は、（a）HGF対独立したTTPのパーセンテージ変化解析（ $p=0.083$ ）、（b）HGF対治験責任医師によるTTPの絶対変化解析（ $p=0.052$ ）；（c）HGF対治験責任医師によるTTPのパーセンテージ変化解析（ $p=0.016$ ）においても、一貫して観察された。

【0275】

【図21】図21は、（A）ソラフェニブ治療を受けたHCC患者、又は、（B）プラセボ治療を受けたHCC患者の血漿Ang2レベルにおける、ソラフェニブに関連したC3D1の患者内変化（ベースラインとの比較）を示す。C3D1におけるメジアンAng2レベルの増加が、プラセボ患者においても観察された。

【0276】

【図22】図22は、C3D1における血漿Ang2レベルの変化と治療の予後の間の関連性を示す。（A）Ang2の減少を伴うソラフェニブ治療患者は、Ang2の増加を伴う患者よりOSが長い（ $p<0.001$ ）。（B）Ang2の減少を伴うプラセボ患者は、Ang2の増加を伴う患者よりOSが長い（ $p<0.0001$ ）。

【0277】

【図23】図23は、C3D1での血漿Ang2レベルの変化と無進行期間（TTP）の成績との間の関連性を示す。Ang2の減少を伴うソラフェニブ治療患者は、Ang2の増加を伴う患者よりTTPが長い（ $p=0.005$ ）。

【0278】

【図24】図24は、A）ソラフェニブ治療／プラセボのHCC患者、又は、（B）全HCC患者の血漿Ang2レベル（%変化換算）における、C3D1での患者内変化を示す。C3D1でのメジアンAng2レベルにおける5.1%の増加が、プラセボ患者で観察された。

【0279】

10

20

30

40

50

【図 2 5】図25は、C3D1における血漿Ang2レベルのパーセント変化と治療の予後の間の関連性を示す。(A) メジアン変化5.1%以下のAng2における%変化を伴うソラフェニブ治療患者は、メジアン変化5.1%より多いAng2における%変化を伴うソラフェニブ治療患者より、OSが長い ($p<0.001$)。(B) メジアン変化5.1%以下のAng2における%変化を伴うプラセボ患者は、メジアン変化5.1%より多いAng2における%変化を伴う患者より、OSが長い ($p<0.0001$)。

【0 2 8 0】

【図 2 6】図26は、C3D1でのIGF2における絶対的变化を示す。すべての患者(pts)間でメジアンIGF2の減少が観察された (例えば-94.3ng/mlの減少)。

【0 2 8 1】

【図 2 7】図27は、C3D1での血漿IGF-2レベルの変化と、治療の予後 (OS) との関連を示す。(A) メジアンレベル94.3ng/mlの減少よりも大きいIGF-2の変化を伴うソラフェニブ治療患者は、メジアンレベル94.3ng/mlの減少よりも少ないIGF-2の変化を伴う患者より、OSが長い ($p<0.011$)。(B) メジアンレベル94.3ng/mlの減少よりも大きいIGF-2の変化を伴うプラセボ患者は、メジアンレベル94.3ng/mlの減少より小さいIGF-2の変化を伴う患者より、OSが長い ($p=0.002$)。

【0 2 8 2】

【図 2 8】図28は、C3D1での血漿IGF-2レベルの変化と、無進行期間に関する治療の予後との関連を示す。メジアンレベル94.3ng/mlの減少より大きいIGF-2の変化を伴うソラフェニブ治療患者は、メジアンレベル94.3ng/mlの減少より少ないIGF-2の変化を伴う患者より TTPが長い ($p=0.008$)。

【0 2 8 3】

【図 2 9】図29は、(A) ソラフェニブ治療／プラセボのHCC患者、又は、(B) 全HCC患者における、C3D1における血漿IGF-2レベルの患者内変化を示す。C3D1でのメジアン血漿IGF-2レベルにおける11.2%の減少が、すべての患者で観察された。

【0 2 8 4】

【図 3 0】図30は、C3D1での血漿IGF-2レベルにおけるパーセント変化と、全生存期間との関連を示す。(A) メジアンレベル11.2%の減少より大きいIGF-2の変化を伴うソラフェニブ治療患者は、メジアンレベル11.2%の減少より少ないIGF-2の変化を伴う患者より、OSが長い ($p<0.063$)。この違いは、統計的に有意に近づいた。(B) メジアンレベル11.2%の減少より大きいIGF-2の変化があったプラセボ患者は、メジアンレベル11.2%の減少より少ないIGF-2の変化があった患者よりOSが長い ($p=0.0001$)。

【0 2 8 5】

【図 3 1】図31は、ソラフェニブ治療を受けたHCC患者における、ベースライン腫瘍 p ERK レベルに基づくTTPのカプラン-マイヤー解析を示す ($N=33$)。治療前の p ERK レベルが高ければ高いほど (腫瘍の最大染色度)、TTPの延長と強く関連する (Abou-Alfa et al, 2006, J. Clin Oncol.)。

【0 2 8 6】

【図 3 2】図32は、ポリクローナル p ERK 部分集団における全生存期間 (OS) と無進行期間 (TTP) を示す ($N=107$; ソラフェニブ治療61人、プラセボ46人)。この部分集団において、OSとTTPの時間は、治験対象母集団の典型である: パネル (A) : OSに対する $p=0.104$; パネル (B) : 独立に評価されたTTPに対する $p=0.0001$; およびパネル (C) : 治験責任医師評価のTTPに対する $p=0.205$ 。

【実施例】

【0 2 8 7】

本発明は、下記の限定されない実施例に基づいて以下に説明される。

【0 2 8 8】

実施例 1

【0 2 8 9】

血漿の E L I S A (エライザ)

10

20

30

40

50

【0290】

概要

【0291】

患者の血漿サンプルにおける6つの候補バイオマータンパク質は、ELISAによって分析された。これらのタンパク質には、VEGF、s-VEGFR-2、s-VEGFR-3、HGF、c-KIT及びRasp21が含まれた。

【0292】

血漿サンプルは、スクリーニング、C3D1、及び、治療来診の終了時に患者から得られた。スクリーニング及びC3D1のサンプルは検査されたが、治療来診終了時のサンプルは、検査されていない。

10

【0293】

ELISA試験は、512人の患者の血漿サンプルについて行われた。患者及び時点の結果リストを表1 (Appendix1) に示す。

【0294】

ELISA法

【0295】

6つの試験の全ては、商業的供給源から得られたサンドウィッチ免疫測定試験であった。以下に要約したように、全ての試験は、製造者のプロトコールに従って行われた。全てのサンプルは、2回試験を行い、平均値を相関解析に用いた。各々の患者に対する各々の時点の平均バイオマータンパク質値を、表1 (Appendix1) に記載する。

20

【0296】

VEGF、s-VEGFR-2、HGF及びc-KITに対するELISA

【0297】

VEGF(cat#DVE00)、s-VEGFR-2(cat#DVR200)、HGF(cat#DHG00)、及びc-KIT(cat#DSCR00)に対するELISAキットは、R&Dシステム社から入手した。

【0298】

標的タンパク質に特異的なモノクローナル捕捉抗体は、マイクロプレートのウェル内にプレコートして提供された。適切に希釈されたサンプル及びスタンダードをピペットでウェル内に取り、固定化された抗体によって標的タンパク質を捕捉した。非結合サンプルを洗い流し、同様に、標的タンパク質に特異的な西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗体をウェルに添加した。ウェルを再び洗浄し、基質溶液を各々のウェルに添加した。着色した反応生成物を分光光度法で測定し、同時に作成された検量線によって、サンプルにおけるバイオマータンパク質の量 (pg/mL又はng/mL) に換算した。

30

【0299】

s-VEGFR-3に対するELISA

【0300】

s-VEGFR-3(cat#DY349)に対するELISAキットは、R&Dシステム社から入手した。

【0301】

標的タンパク質に特異的な捕捉抗体は、製造者によって溶解した状態で提供され、試験を行う前にマイクロプレートのウェル内にコーティングされた。適切に希釈されたサンプル及びスタンダードを、ピペットでウェル内に取り、固定化された抗体によって、標的タンパク質を捕捉した。非結合サンプルを洗浄し、同様に、標的タンパク質に対して特異的なビオチン化抗体をウェルに添加した。洗浄後、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体を加えた。ウェルを洗浄し、次いで、基質溶液を加えた。着色した反応生成物を分光光度法で測定し、同時に作成された検量線によって、サンプルにおけるバイオマータンパク質の量 (pg/mL) に換算した。

40

【0302】

Ras p21に対するELISA

【0303】

Ras p21 (cat#06490009)に対するELISAキットは、マサチューセッツ州、ケンブリッジ

50

にあるSiemens Diagnostics社の一部である、Oncogene Science Biomarker Groupから入手した。この試験は、全ての型の循環Ras p21（H-Ras, N-Ras及びD-Ras）を検出する。

【0304】

標的タンパク質に特異的なモノクローナル捕捉抗体は、マイクロプレートのウェルに予めコートして提供された。適切に希釈されたサンプル及びスタンダードを、ピペットでウェル内に取り、固定化された抗体によって標的タンパク質を捕捉した。非結合サンプルを洗浄し、同様に、標的タンパク質に対して特異的なビオチン化モノクローナル抗体をウェルに添加した。洗浄後、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体を加えた。再度ウェルを洗浄し、更に、基質溶液を添加した。着色した反応生成物を分光光度法で測定し、同時に作成された検量線を使用することによって、サンプル内におけるバイオマーカータンパク質の量（pg/mL）に換算した。

10

【0305】

生検腫瘍における、リン酸化ERK(pERK)に対する免疫組織化学的染色。

【0306】

2.1概要

【0307】

この相関関係にあるバイオマーカーの研究目標は、HCCに関するこのプラセボ対照試験におけるソラフェニブ治療患者の予後に対する、保存された、診断に用いる腫瘍生検におけるリン酸化ERK(pERK)の関連性を調べることであった。

【0308】

この試験に参加する病院から受領した、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）診断用腫瘍生検サンプルについて、免疫組織化学的検査（IHC）が行われ、コネチカット州、ウエストヘーブンのBayerPharmaceuticals社に転送された。免疫組織化学的検査は、2つの異なる開発業務受託機関（CRO）で、2つの異なる抗-pERK抗体を用いて行われた。Oncotech社は、Sigma社のマウスモノクローナル抗体（cat#M8159）を使用して、免疫組織化学染色を行い、メリーランド州、フレデリックのPathology Associates International社（PAI）（Charles River Laboratoriesの一部門）は、Cell Signaling Technology社のウサギポリクローナル抗体（cat # CST 9101）を使用した。両方の抗体は、Thr202/Tyr204でリン酸化されたERKに対して産生された。染色手順は、以下に記載されている。染色されたスライドは、開発業務受託機関（CRO）によって提供された病理学者、時には、エール大学の病理学者であるDr David Rimm氏に助言を求めることによって、pERKに対してスコア化された。病理学者のスコアリング方法は、以下に記載されている。

20

30

【0309】

FFPE試料は、143人の患者から入手され、そのうちの125人分がpERK染色と解析に使用可能であった。有効なpERK結果のリストを表1（Appendix1）に示す。

【0310】

IHC法

【0311】

ミクロトーム法

【0312】

FFPE試料は、パラフィンブロックか、セット済みスライドとして、臨床現場から入手された。パラフィンブロックは、4ミクロン（Onchotech社）又は5～6ミクロン（PAI社）の厚さで、ミクロトーム上で薄片化された。切片をウォーターバスに浮かせ、ガラス顕微鏡スライドの上に拾い上げた。パラフィン切片をセットしたスライドを、染色前に一晩乾燥した。

40

【0313】

IHC染色

【0314】

PAI社での、ウサギポリクローナル抗体（cat # CST9101）を用いた染色手順

【0315】

50

PAI社でのIHC染色は、GLP基準のもとで行われた。間接標準であるABC手順（アビジン-ビオチン-西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体）が、臨床試験サンプルのIHC染色に用いられた。検出抗体は、Cell Signaling Technology社から入手したpERK（ホスホ-p44/42 MARK(Thr202/Tyr204)）に対するウサギポリクローナル抗体であった（cat #CST9101）。ネガティブコントロール抗体は、KLHに向かう、Rb α KLHと指定された、Lockland社から提供されたアフィニティ精製抗-KLH（キーホールリンペットヘモシアニン）[ウサギ]であった。二次抗体は、ビオチン化ヤギ抗ウサギIgGであった。すべての抗体に対する希釈剤として、TBST+1%BSAが用いられた。

1.95℃の圧力釜の中で、Declere溶液で30分間スライドを処理することによって、抗原が回復し、脱パラフィンが生じた。

2.スライドを圧力釜から取り出し、30分間で室温にした。

3.スライドを脱イオン水中で2回すすいだ。

4.スライドをトリス緩衝生理食塩水（0.15M NaCl, pH7.2）+0.05% Tween 20(TBST)中で、5分間すすいだ。

5.スライドを、1.5%過酸化水素ブロッキング試薬（hydrogen peroxide block）の中に、10分間静置した。

6.スライドをTBSTで2回すすいだ。

7.次いで、スライドを、TBST中1%BSA及び1.5%正常ヤギ血清から構成される非特異タンパク質ブロッキング試薬（nonspecific protein block）中で、30分間インキュベートした。

8.検出抗体及びネガティブコントロール抗体（1:50の希釈）を、30分間アブライした。

9.スライドをTBST中で2回すすいだ。

10.ビオチン化二次抗体を、30分間アブライした。

11.スライドをTBST中で2回すすいだ。

12.ABC Eliteを、30分間スライドにアブライした。

13.スライドをTBSTで2回すすいだ。

14.スライドをDAB基質で4分間処理した。

15.スライドを水道水ですすいだ。

16.スライドをヘマトキシリンで対比染色し、次いで、洗浄した。

17.スライドを、飽和炭酸リチウム中で青色にし、次いで洗浄した。

18.スライドをアルコールで脱水し、キシレンで洗浄し、カバーガラスをかけた。

IHCコントロール

【0316】

FEPEブロックを提供してくれた患者については、切片をカットしてセットし、IgGネガティブコントロールスライド1枚が、各サンプルに対して、染色された。スライドを提供してくれた患者については、使用できるスライドの数が限られているために、IgGネガティブコントロールスライドは、実行されなかった。

【0317】

さらに、ポジティブコントロール組織は、各サンプルの一部として染色された。これらのコントロールは、(1+2)刺激又は刺激されていないMIAPACA2（ヒト膵臓腺がん）細胞ペレットブロック；(3+4)刺激又は刺激されていないMDA-MB-231（ヒト乳がん）細胞ペレットブロック；及び5）MDA-MB-231（ヒト乳がん）細胞からなるマウス異種移植片から構成された。以前のIHC実験において、類似物質がpERK染色の範囲を網羅していたために、これらのコントロールが選択された。

【0318】

オンコテック社でのマウスモノクローナル抗体（シグマ#M8159）を使用した染色手順

【0319】

オンコテック社におけるpERKのIHC試験は、「社内（homebrew）」SRAクラスI評価試験に対する、CLIAガイドラインに適合するようにデザインされ、評価された。

【0320】

pERKに対するIHC染色は、BioGenex i6000 自動染色機でDAKO Mouse Envision Plus System(Cat #K4007)を用いて、室温で行われた。検出抗体は、pERK (抗-MAPキナーゼ、活性化(脱リン酸化されたERK-1&2)、クローンMAPK-YT, lot#015k4757)に対する、シグマ社から入手したマウスモノクローナル抗体 (cat # M8159) である。ネガティブコントロール抗体は、DakoCytomation社のマウスIgG1であった (lot#0018854)。二次抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したヤギ抗マウスであった。

1. BORG(トリス緩衝液, pH9.5±0.2)中において、120±3℃で3分間、デクロッキング・チャンバー (decloaking chamber) 内でスライドを熱することによって、抗原が回復した。

2. スライドを、BioGenex i6000自動染色機のプラスチャンバー内に配置した。

3. スライドを洗浄バッファーで1回すすいだ。

4. スライドを、エンビジョン・ペルオキシダーゼ (Envision peroxidase) と共に5+1分間インキュベートした。

5. 組織切片を洗浄バッファーで2回すすいだ。

6. スライドを、抗-pERK抗体 (1.25 µg/ml) 又は対応するアイソタイプのネガティブコントロール試薬 (被検物質として同じ濃度で) と共に、30±1分間インキュベートした。

7. スライドを洗浄バッファーで1回すすいだ。

8. スライドを、西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したヤギ抗マウスポリマーと共に、約30±1分インキュベートした。

9. スライドを洗浄バッファーで2回すすいだ。

10. スライドをDAB基質と共に5±1分インキュベートした。

11. スライドを、再度洗浄バッファーで1回すすいだ。

12. スライドを脱イオン水で2回すすいだ。

13. 染色されたスライドを、脱イオン水中に沈められるプラスチック製のスライドバスケット内に配置した。

14. スライドをヘマトキシリンで対比染色した。

15. スライドを段階的なアルコールで脱水し、キシレンで洗浄し、カバーガラスをかけた。

【0321】

IHCコントロール

【0322】

FFPEブロック又は少なくとも2つのスライドが得られた患者の全てについては、IgGネガティブコントロールスライド1枚が、各々のサンプルに対して、染色された。

【0323】

更に、ポジティブコントロール組織は、各々のサンプルの一部として染色された。FFPE乳癌サンプルは、ポジティブコントロール及び検査中の検査システムとして使用するためにOncotech社によって提供された。Oncotech社によって提供された標本は、IRBに承認されたONC01プロトコールに従って集められた。

【0324】

病理学者によるスライドの検査の後、腫瘍の標本としての組織の特定が問題になっているサンプルのサブセットについては、追加のスライドがH&Eで染色され、病理学者による腫瘍の判定が容易となった。

【0325】

病理学者のスコアリング

【0326】

PAI社の病理学者のスコアリング

【0327】

PAI社で染色されたスライドは、PAI社の獣医病理学者によってスコアリングされ (Joan Wicks, DVM, PhD)、そのスコアは、2番目のPAI社の獣医病理学者によって、レビューされた。(抗-pERK抗体を用いてOncotech社で染色されたスライドも、スコアリングの

10

20

30

40

50

ためにPAI社に送られた。) 病理学者は、患者の識別、臨床予後、及び全ての関連する臨床データーを知らされなかった。

【0328】

半定量的なスコアリングは、染色強度及びpERKに対して染色された腫瘍エリアのパーセントを評価した。染色強度は、表2-1に示された5点満点制で点数がつけられた。染色強度は、所定のサンプルに対して観察された強度の範囲（例えば、2～4+）として報告されたことに留意すべきである。強度データーの統計分析に関して、最大染色強度（報告された範囲におけるもっとも大きい染色強度；この例においては、4+）が利用される。染色されたエリアのパーセントは、表2-2に示されたスケールに分けられた。染色位置の性質の記載（核（N）又は細胞質（C））も提供された。

10

【0329】

染色強度に対するPAI社の病理学者のスコアリングスケール

- 0 = 細胞染色なし
- 1+ = 薄く染色
- 2+ = 中程度の染色
- 3+ = 強い染色
- 4+ = 著しく強い染色

表2-2：染色された腫瘍エリア%に対するPAI社の病理学者のスコアリングスケール

- 0 = 染色された細胞なし
- < 5% = < 5%の細胞
- 第1四分位（1Q）= 6～25%の細胞
- 第2四分位（2Q）= 26～50%の細胞
- 第3四分位（3Q）= 51～75%の細胞
- 第4四分位（4Q）= 76～100%の細胞

20

【0330】

Oncotech社の病理学者のスコアリング

【0331】

スライドは、医療病理学者によってスコアリングされた。モノクローナルな抗-pERK抗体を用いて染色されたスライドは、スコアリングのために、コンサルティング病理学者にも送られた。病理学者は、患者の識別、臨床予後、及び全ての関連する臨床データーを知らされなかった。

30

【0332】

半定量的スコアリングは、染色強度及びpERKに対して染色された腫瘍エリアのパーセントを評価した。染色強度は、示された4点満点制で点数がつけられた。染色強度のスケールが異なることに留意すべきである。腫瘍の染色は、フォーマット形式で報告された。このスコアリングは、細胞の何パーセントが各々の染色強度のレベルに対して陽性に染色されるかを詳述したものである。総合スコア（H-スコア）は、腫瘍の染色について報告され、以下のように計算された：

$$H = (3 \times 3 + \text{に染色された細胞の}\%) + (2 \times 2 + \text{に染色された細胞の}\%) + (1 \times 1 + \text{に染色された細胞の}\%)$$

40

従って、標本4の例に関しては、 $H = (3 \times 0\%) + (2 \times 20\%) + (1 \times 0\%) = 40$ である。

【0333】

スコアリングされた腫瘍pERKのデーターの統計分析に関しては、2つの追加変数が病理報告書から導かれた：最大染色強度（陽性に染色された何れかの細胞で最も大きな染色強度）及び陽性に染色された細胞の%（3+、2+及び1+レベルで染色された細胞の%の合計）。

【0334】

病理学者は、腫瘍pERK染色のスコアリングに加え、他の細胞型／構造におけるpERK染色に対する単一の強度のスコアを提供した。

50

【0335】

コンサルティング病理学者によるスコアリング

【0336】

モノクローナル抗-pERK抗体を使用して病理検査室で染色されたスライドは、コンサルティング病理学者にも、スコアリングのために送られた。コンサルティング病理学者は、患者の識別、臨床予後、及び全ての関連する臨床データを知らされなかった。コンサルティング病理学者は、再現性を考慮して、染色強度及び染色エリアの両方を包含するpERKスコアリングスケール（0～2）を開発した。病理学者は、腫瘍細胞のpERK染色及び内皮細胞pERK染色に対するこのスケールで、染色されたサンプルを評価した。

【0337】

前の実施例において使用された反応物及び／又は動作条件に対し、一般的又は特異的に記載された本発明の反応物及び／又は動作条件で代替することによって、前の実施例は、同様の成功を繰り返すことができる。

【0338】

上述の説明から、当業者は、本発明の精神と範囲から逸脱することなく、本発明の基本的特徴を簡単に確かめることが可能であり、様々な使用及び条件にそれを適合させるために発明の様々な変更及び改変が可能である。上記及び下記のリストで引用された公報及び特許は、本明細書で参照することによって組み込まれる。

【0339】

更に苦勞することなく、当業者は、前述の説明を用いて、以下の発明を最大限に利用することが可能であることを確信する。従って、下記の好ましい実施態様は、単に説明しているだけであり、いかなる制限をももたらすものではない。

【0340】

別段の指示がなければ、前述及び前記実施例において、特に言及されない限り、全ての温度は摂氏温度であり、全ての体積部及び体積パーセントは、容量に基づく。

【0341】

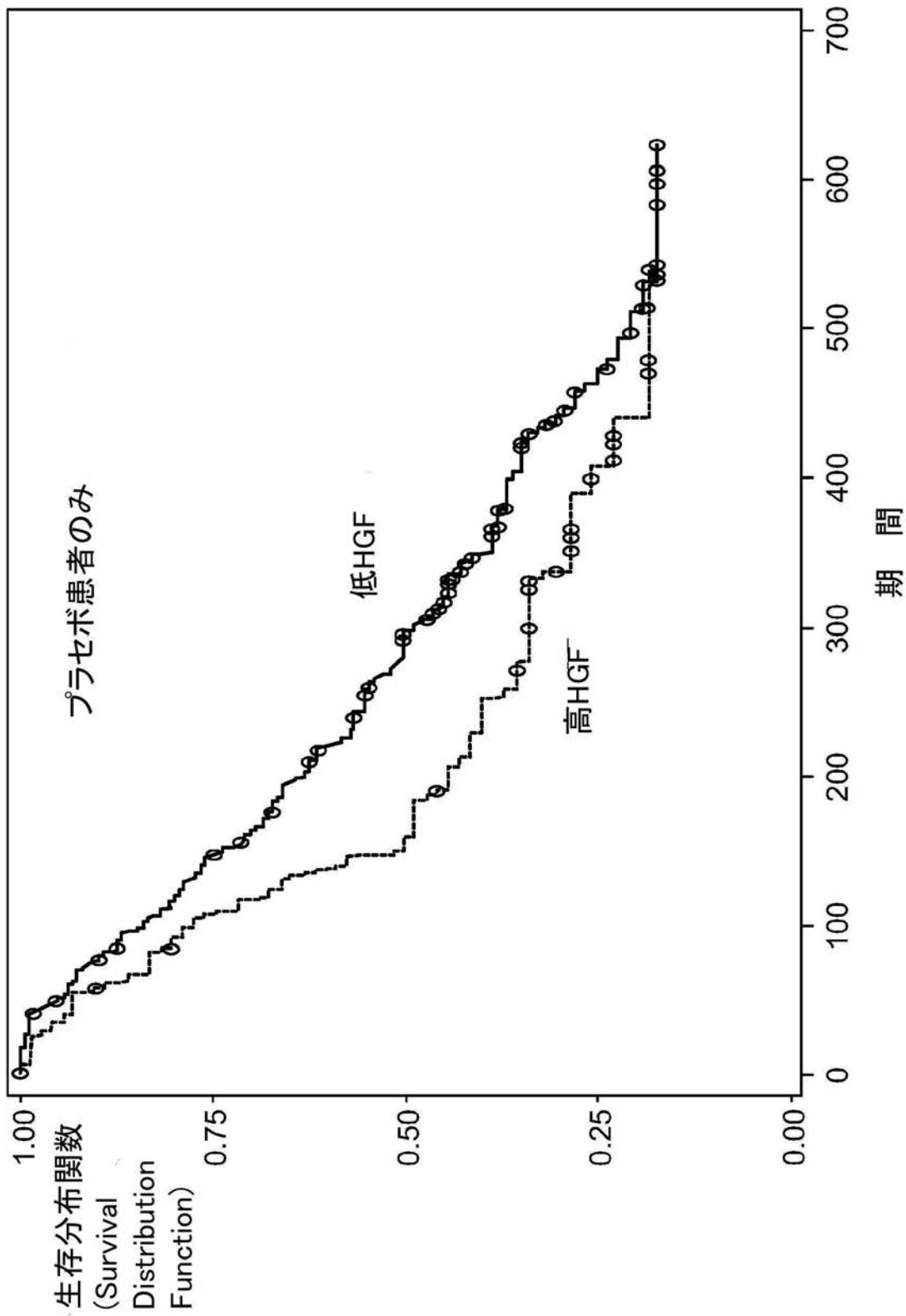
原稿に関する全ての捕捉テキスト、表及び図のコピーと共に、本出願に添付される、「Plasma Biomarkers as Predictors of Outcome in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma: Results from the Randomized Phase III SHARP Trial」(EASL Abstract, March 2009)という題名のJM Llovet, C Pena, M Shan, C Lathia and J Bruix et al.による科学論文の要約における開示の全体が、本明細書において参照されることによってそっくりそのまま組み込まれる。

10

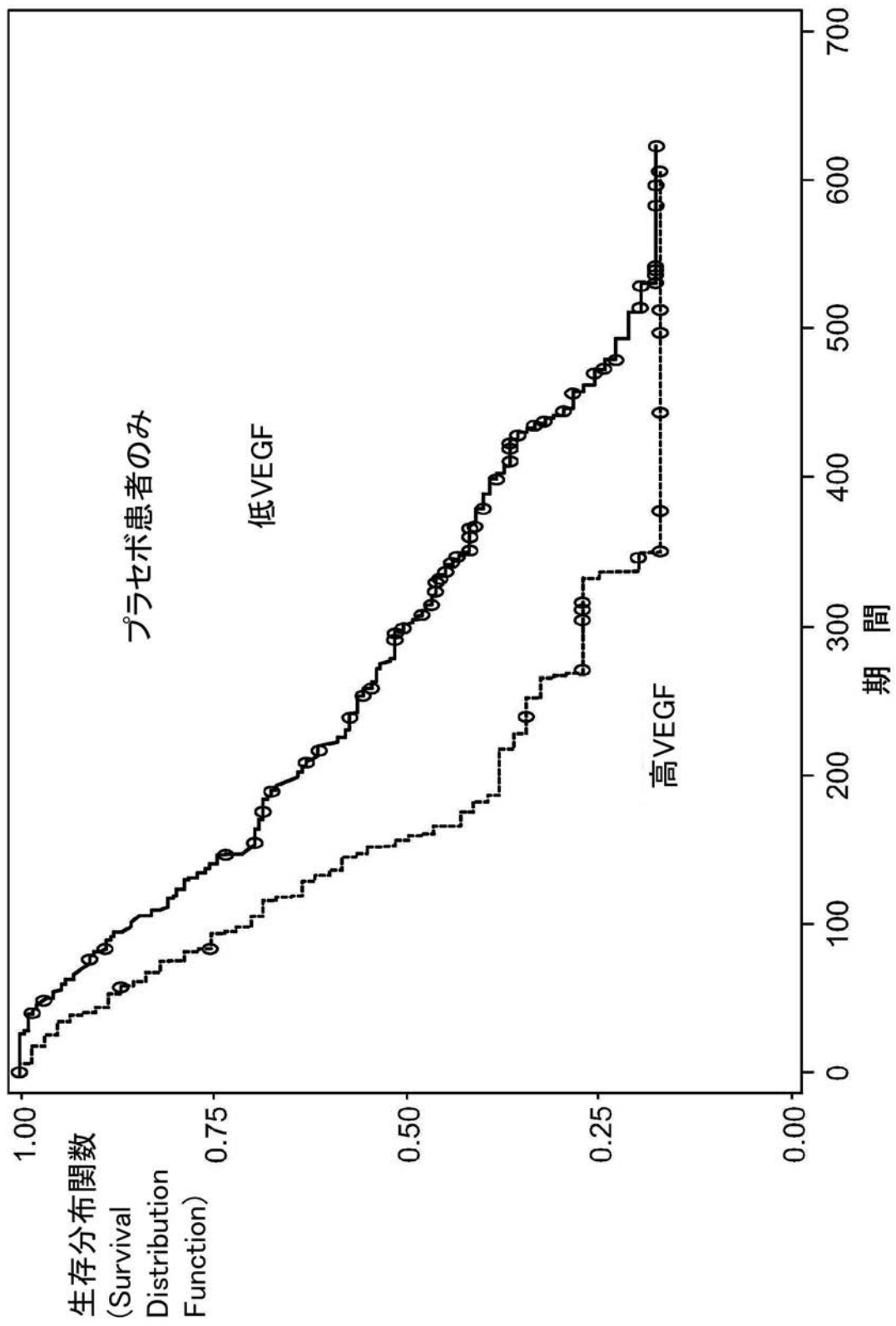
20

30

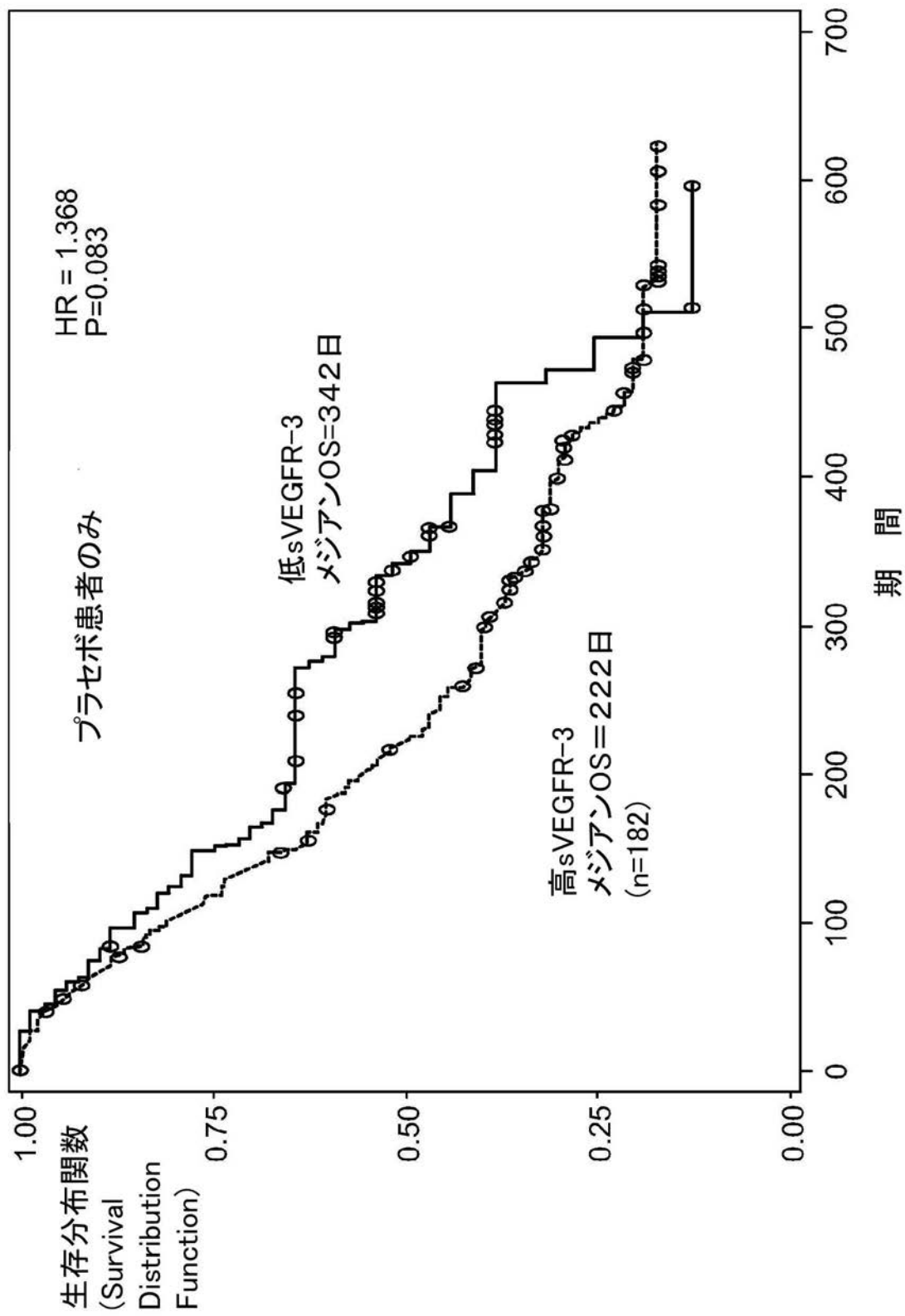
【図 1】



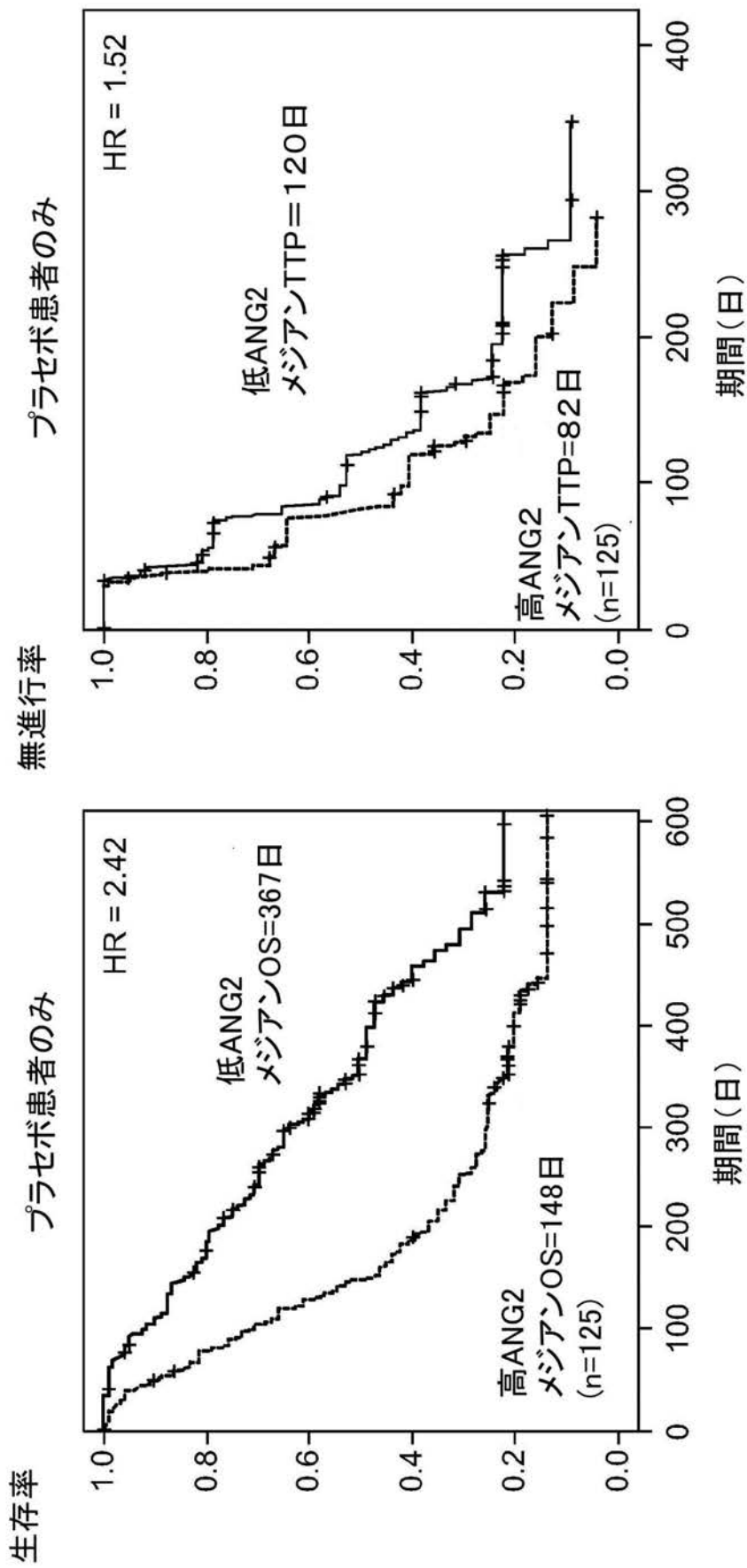
【図 2】



【図 3】



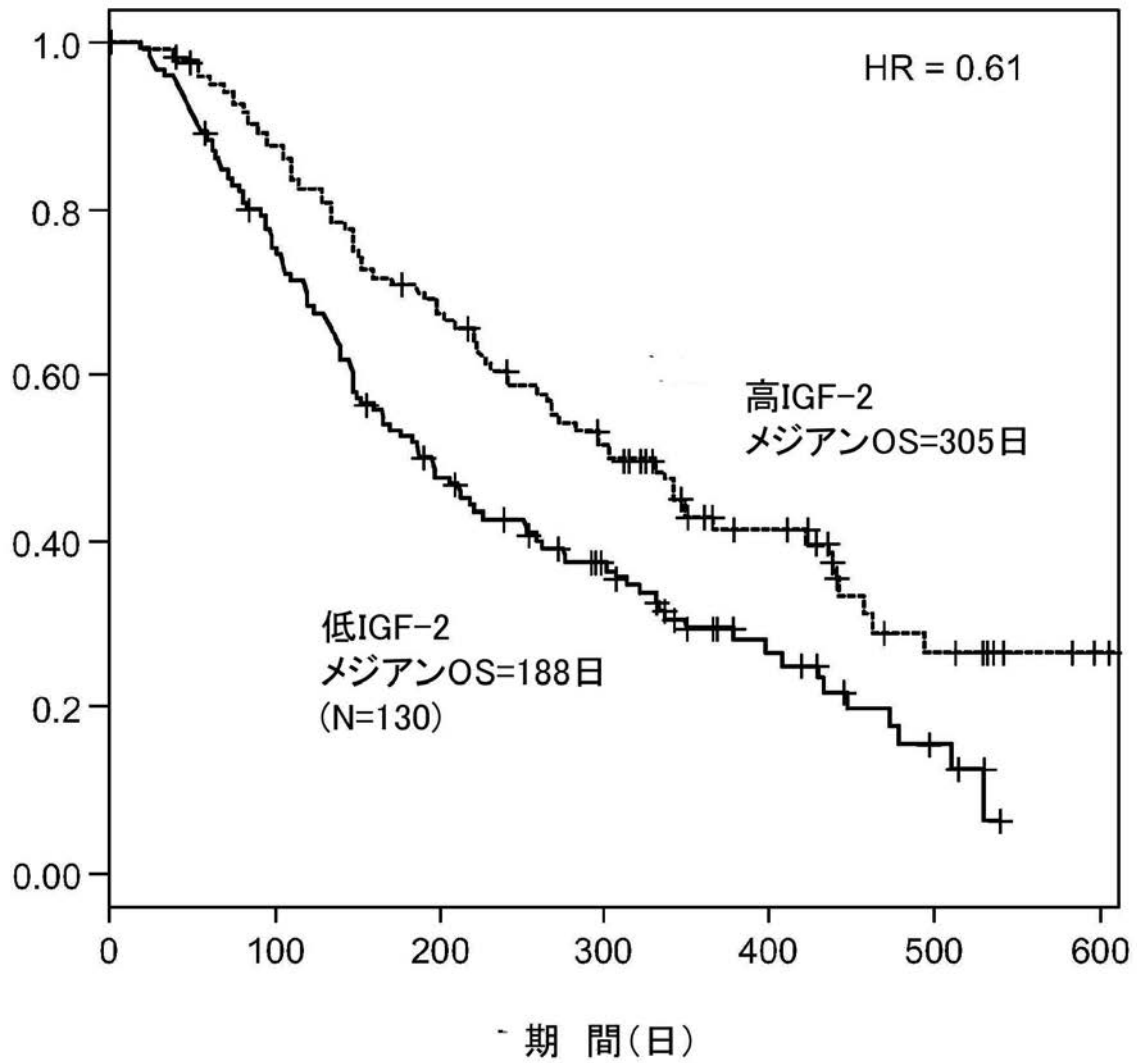
【図 4】



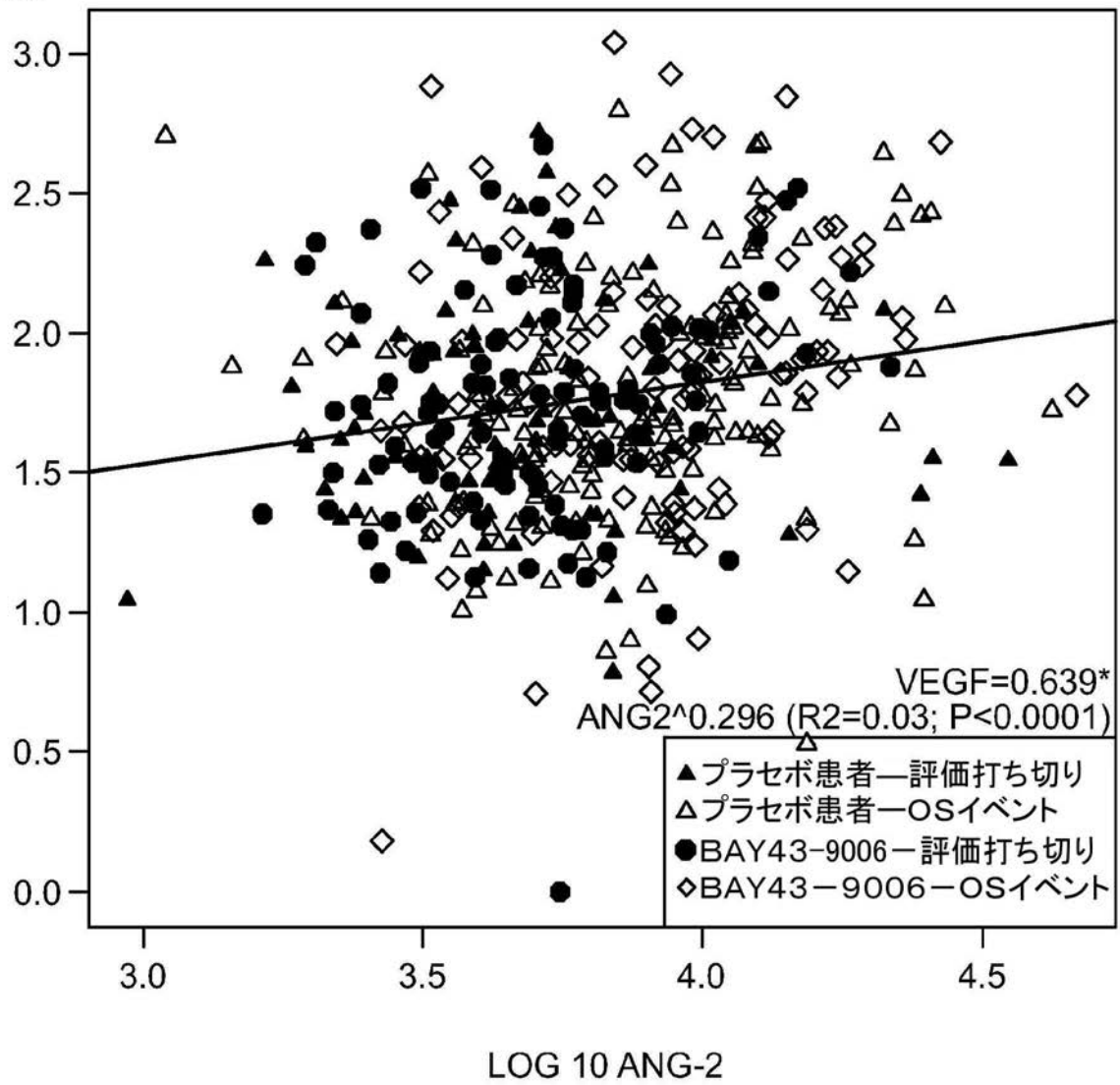
【図 5】

生存率

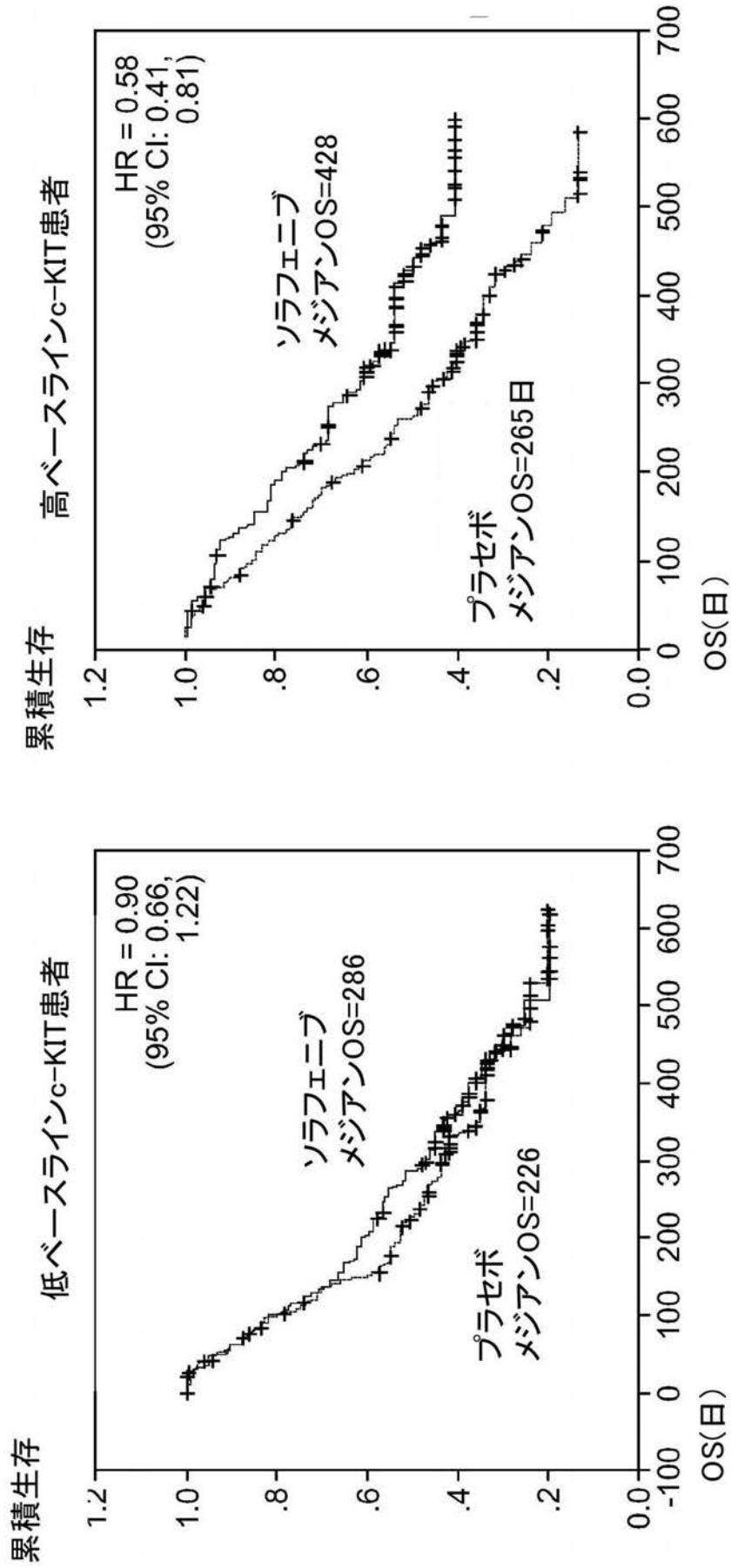
プラセボ患者のみ



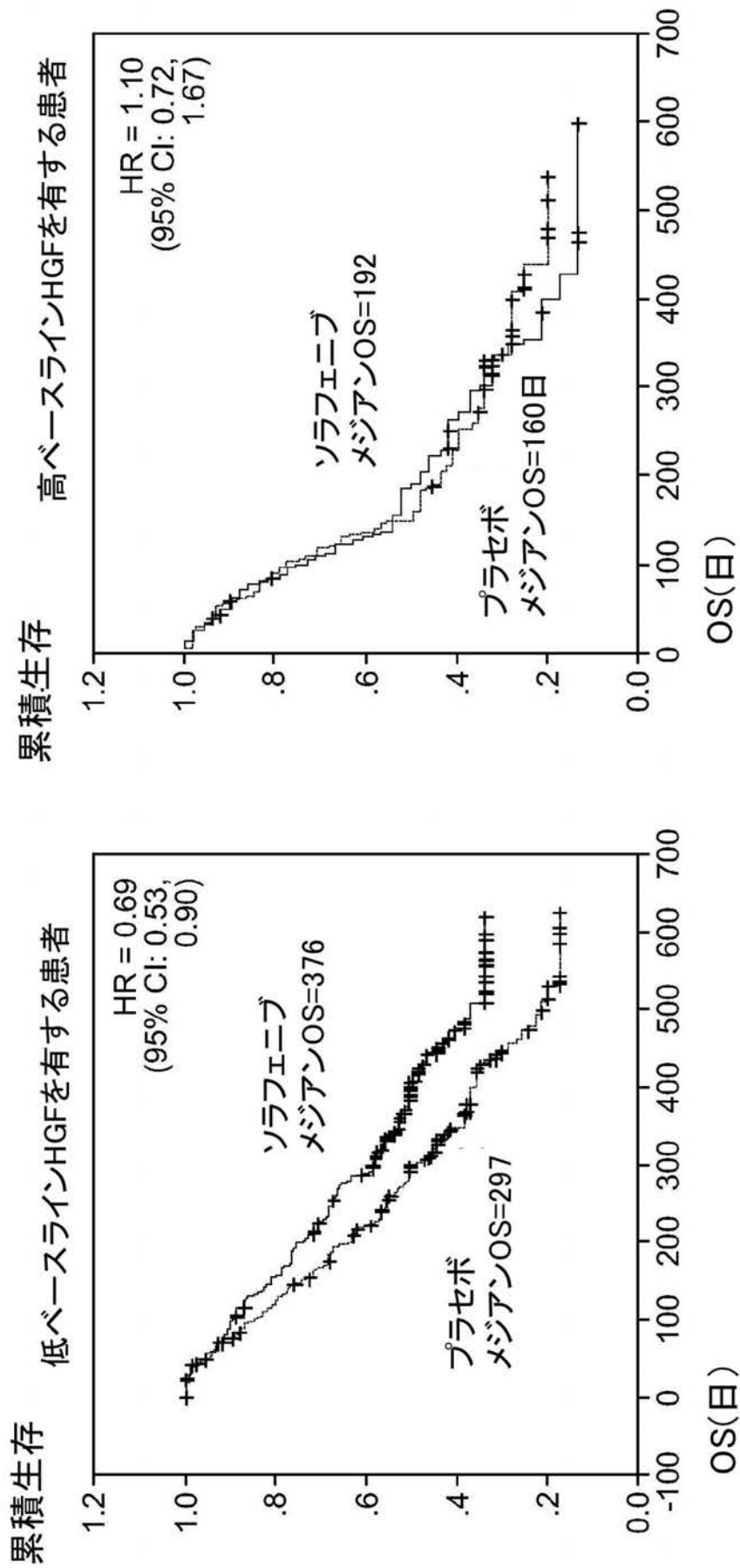
【図 6】

LOG
10
VEGF

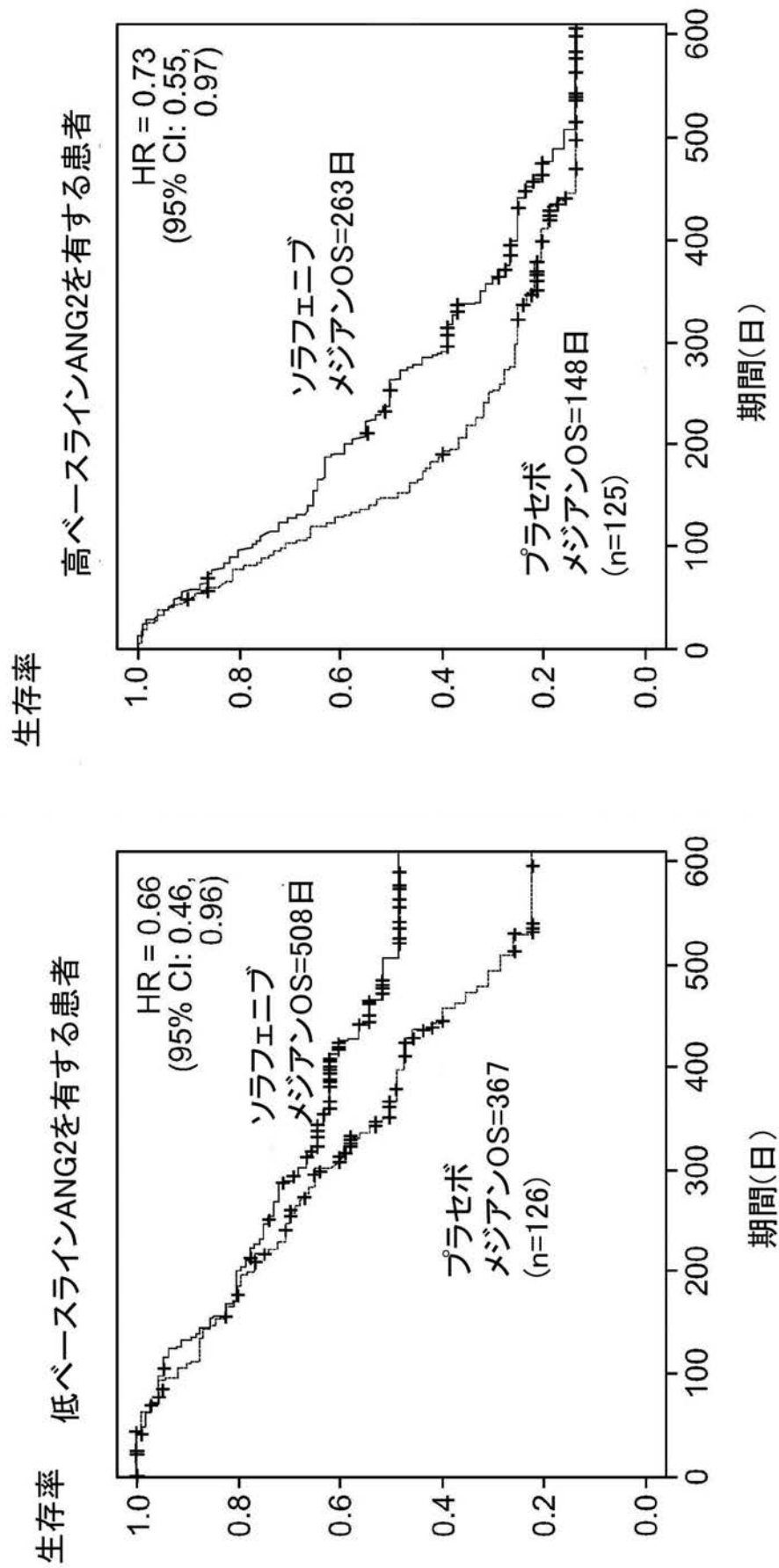
【図 7】



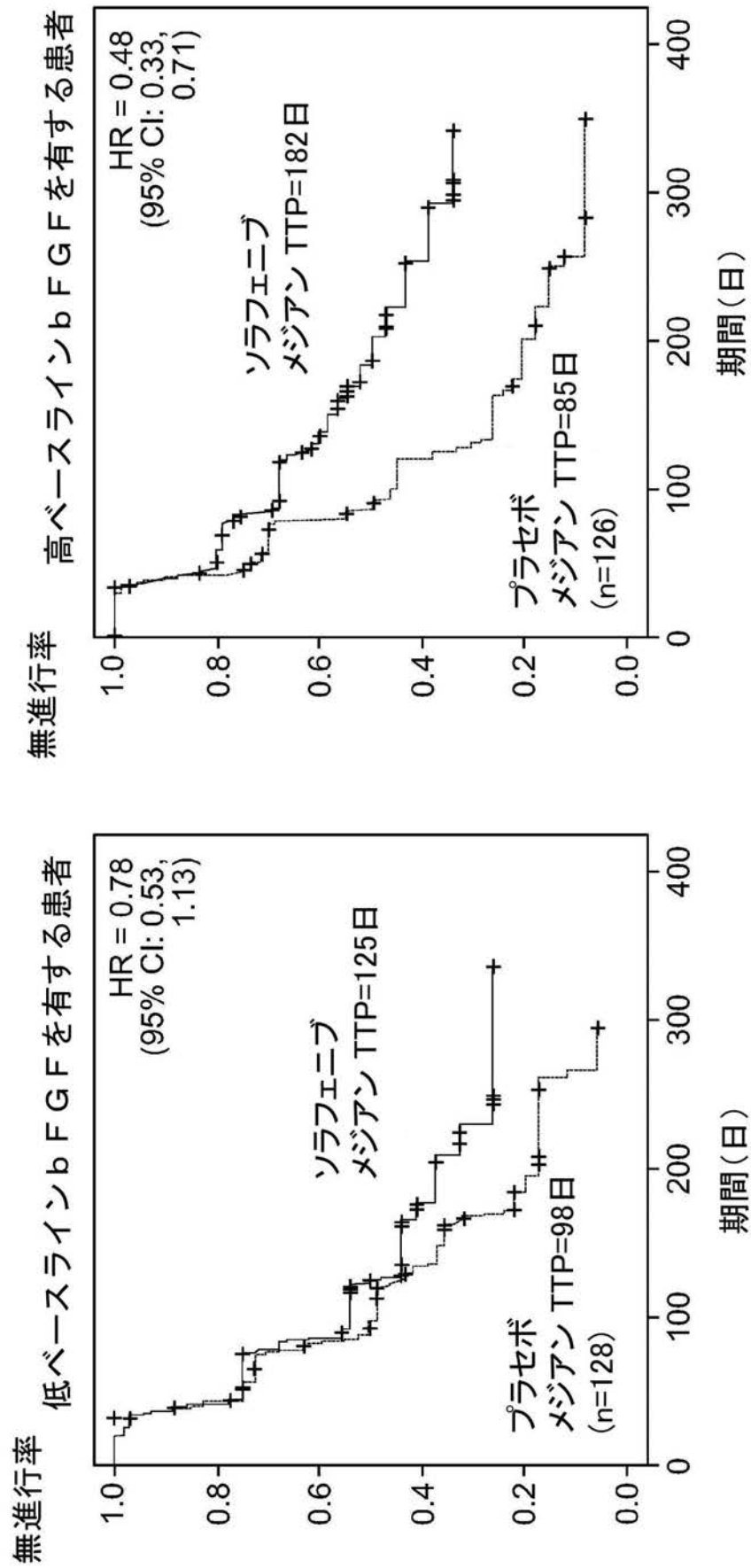
【図 8】



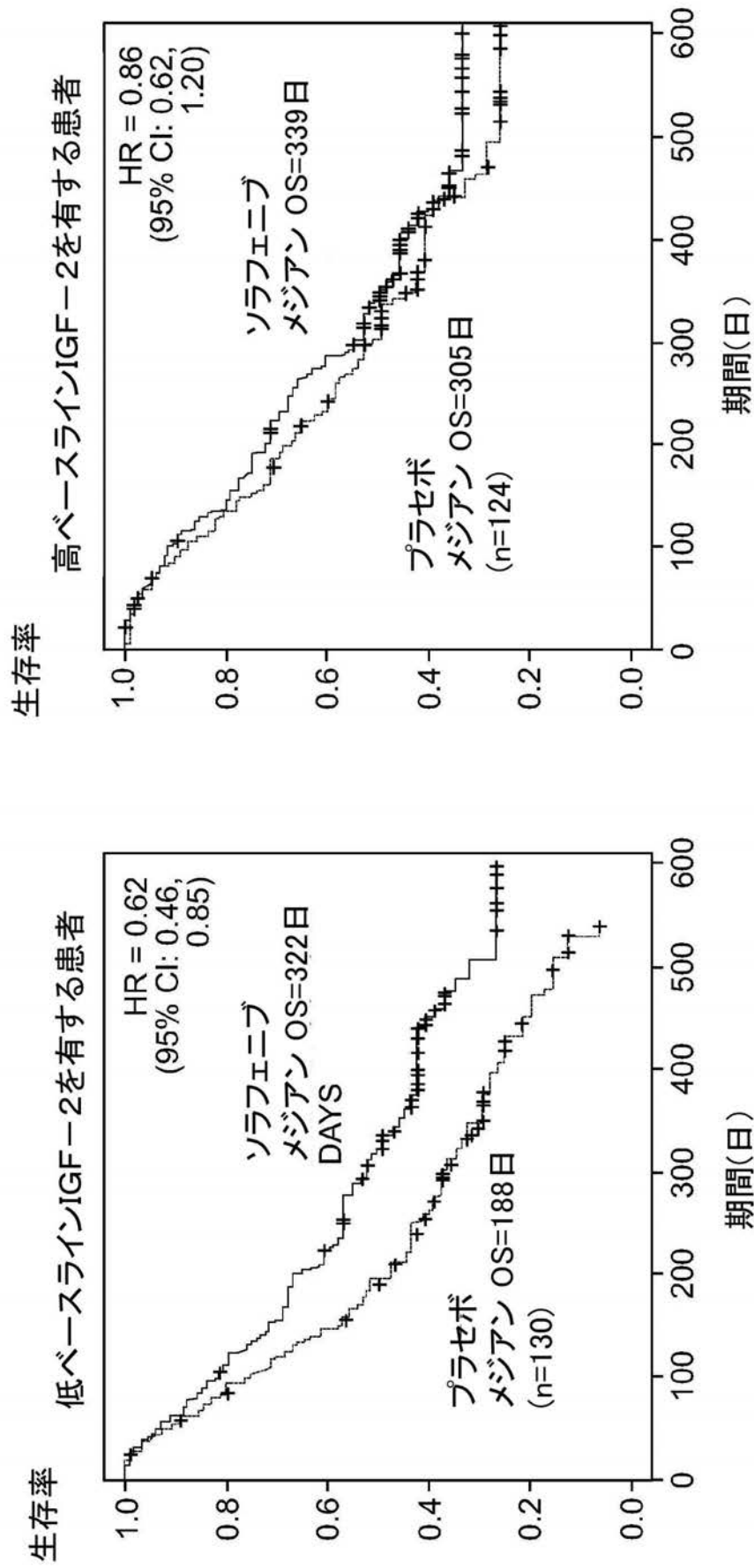
【図 9】



【図 10】

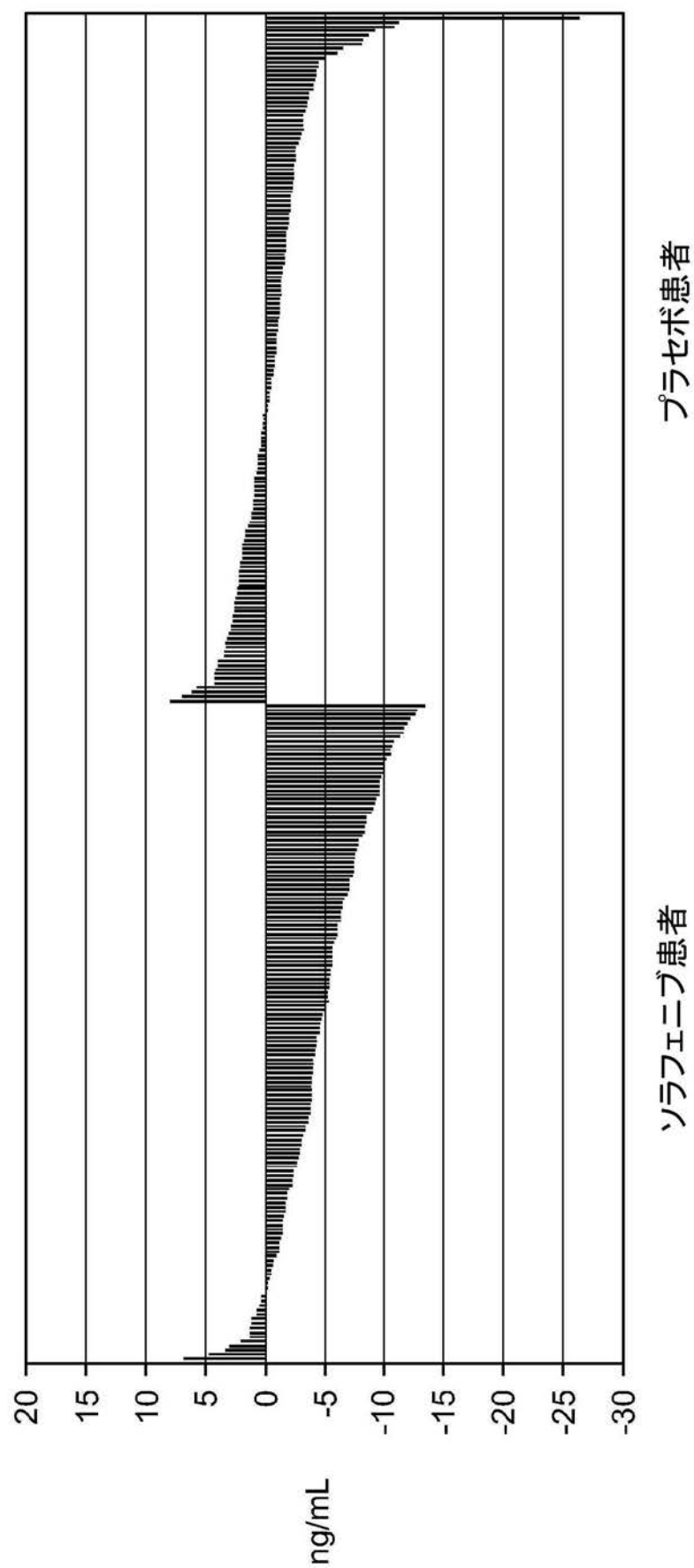


【図 1 1】



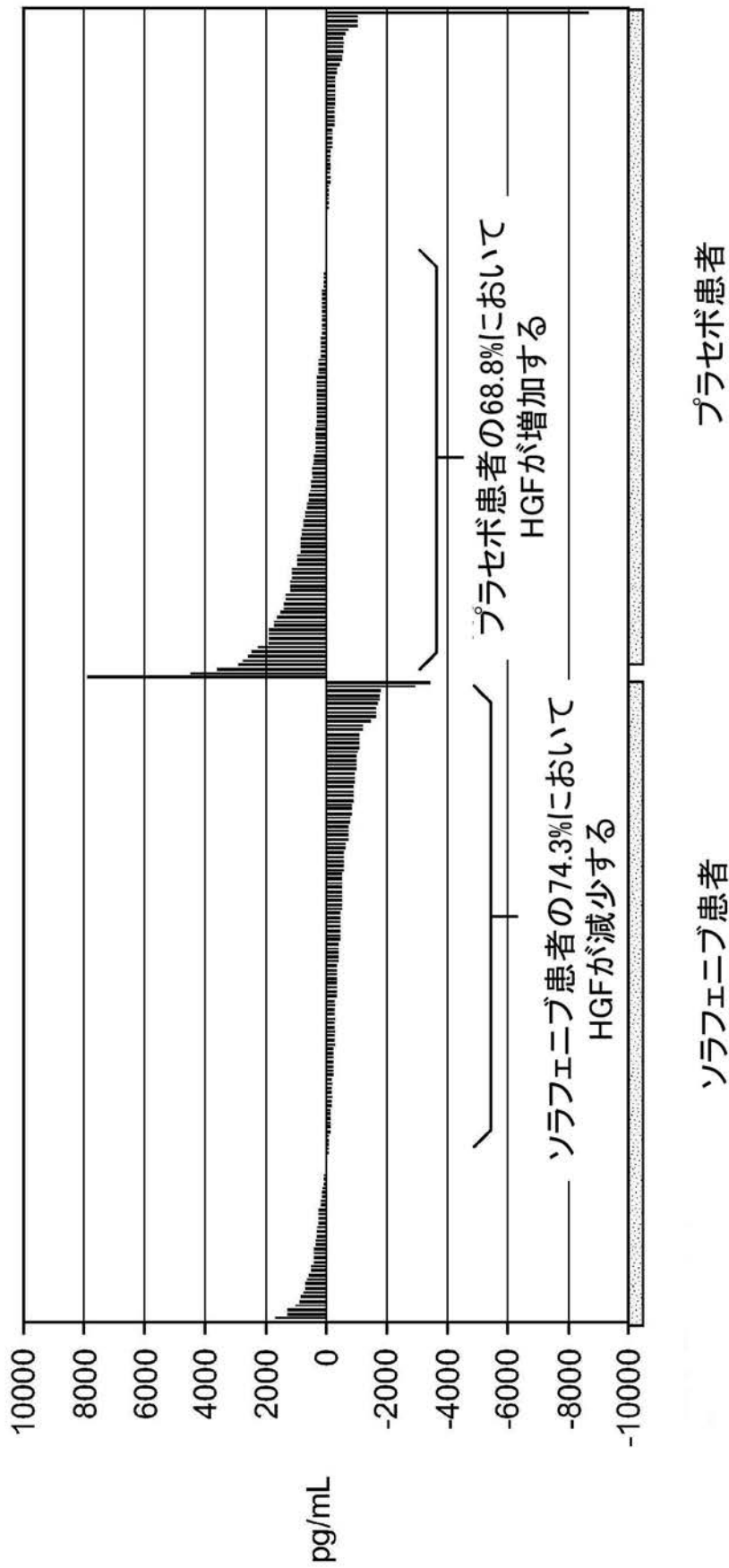
【図 1 2】

c-KITにおけるC3D1の絶対的な変化

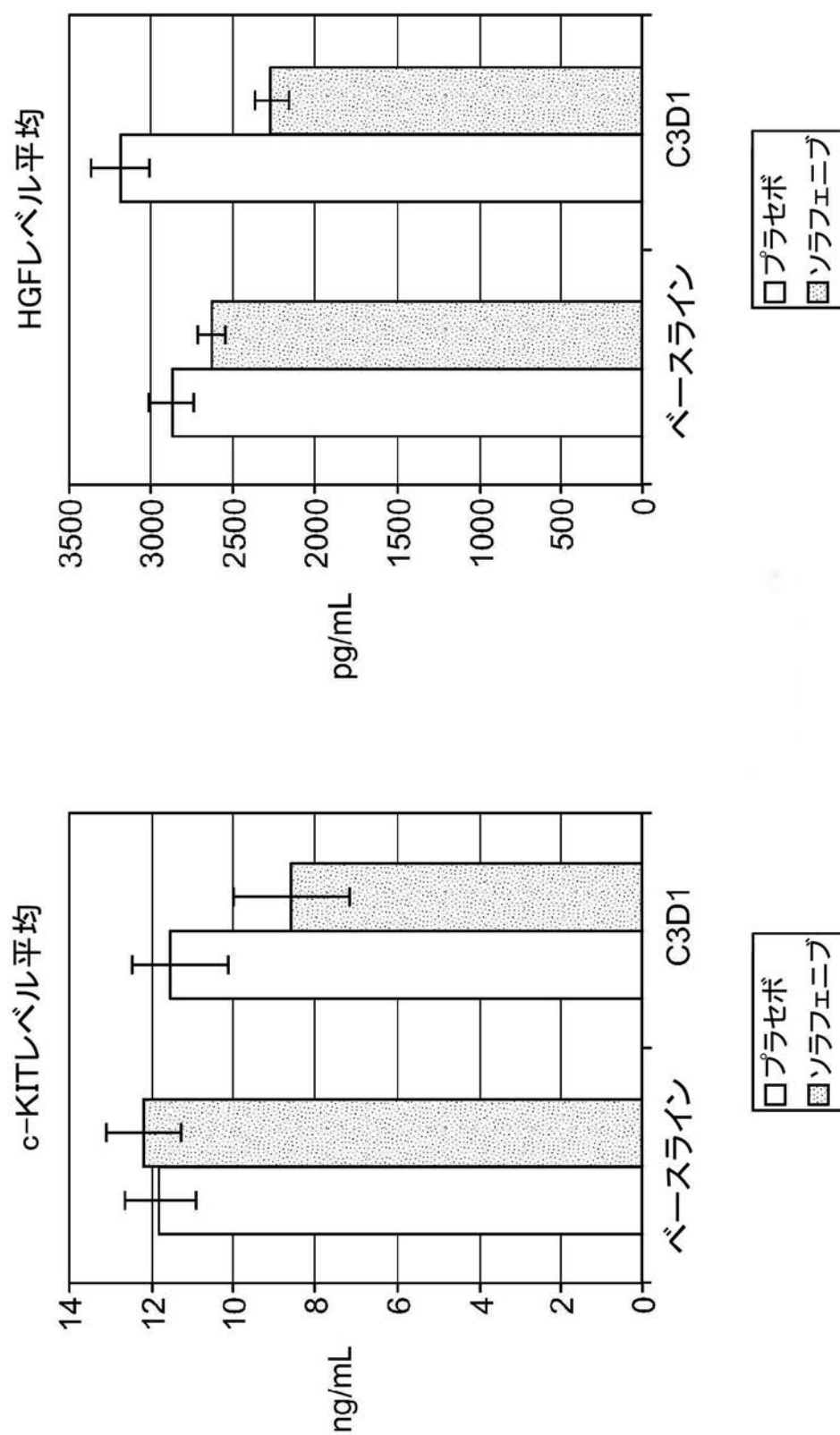


【図 13】

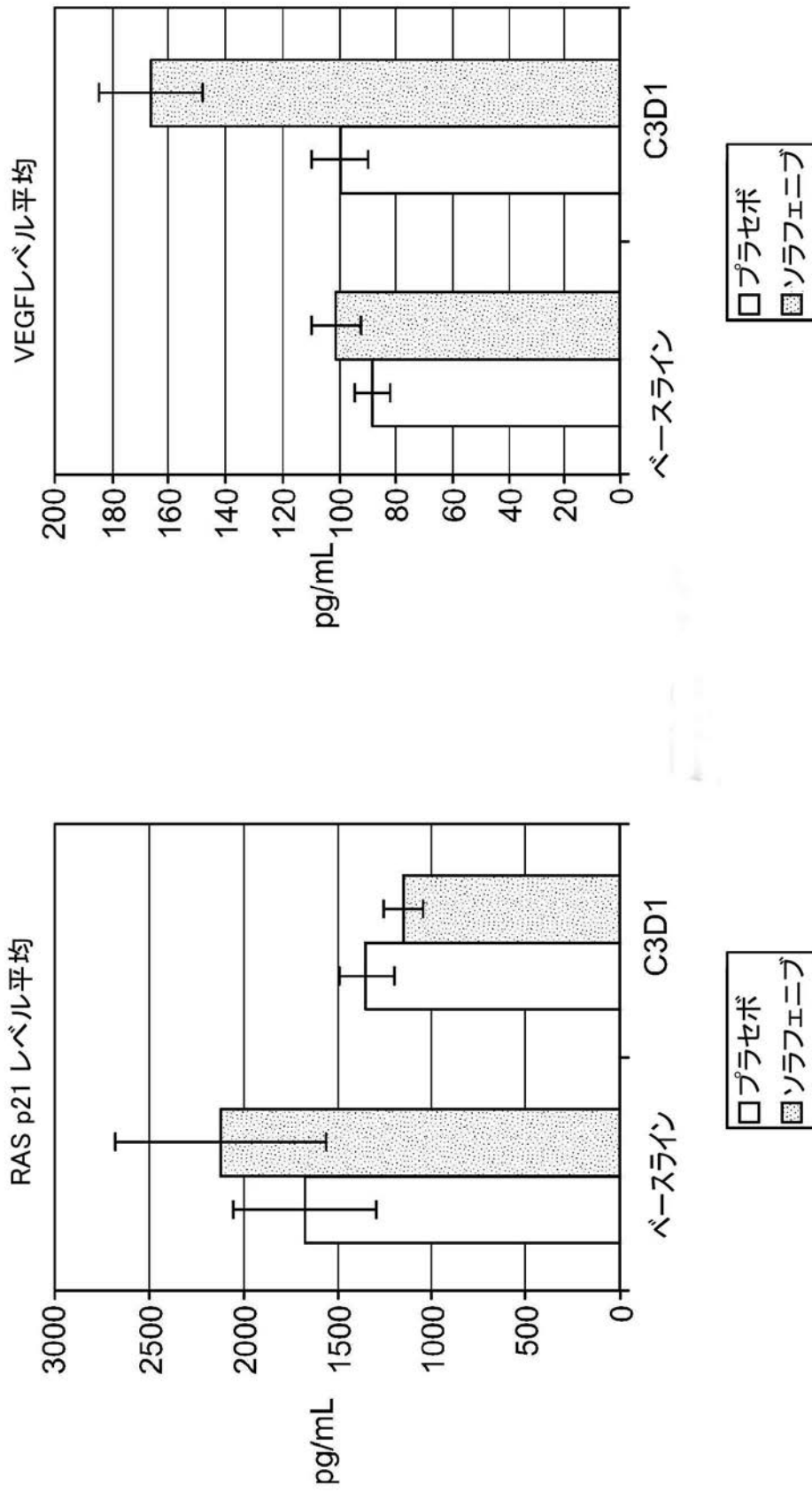
HGFにおけるC3D1の絶対的な変化



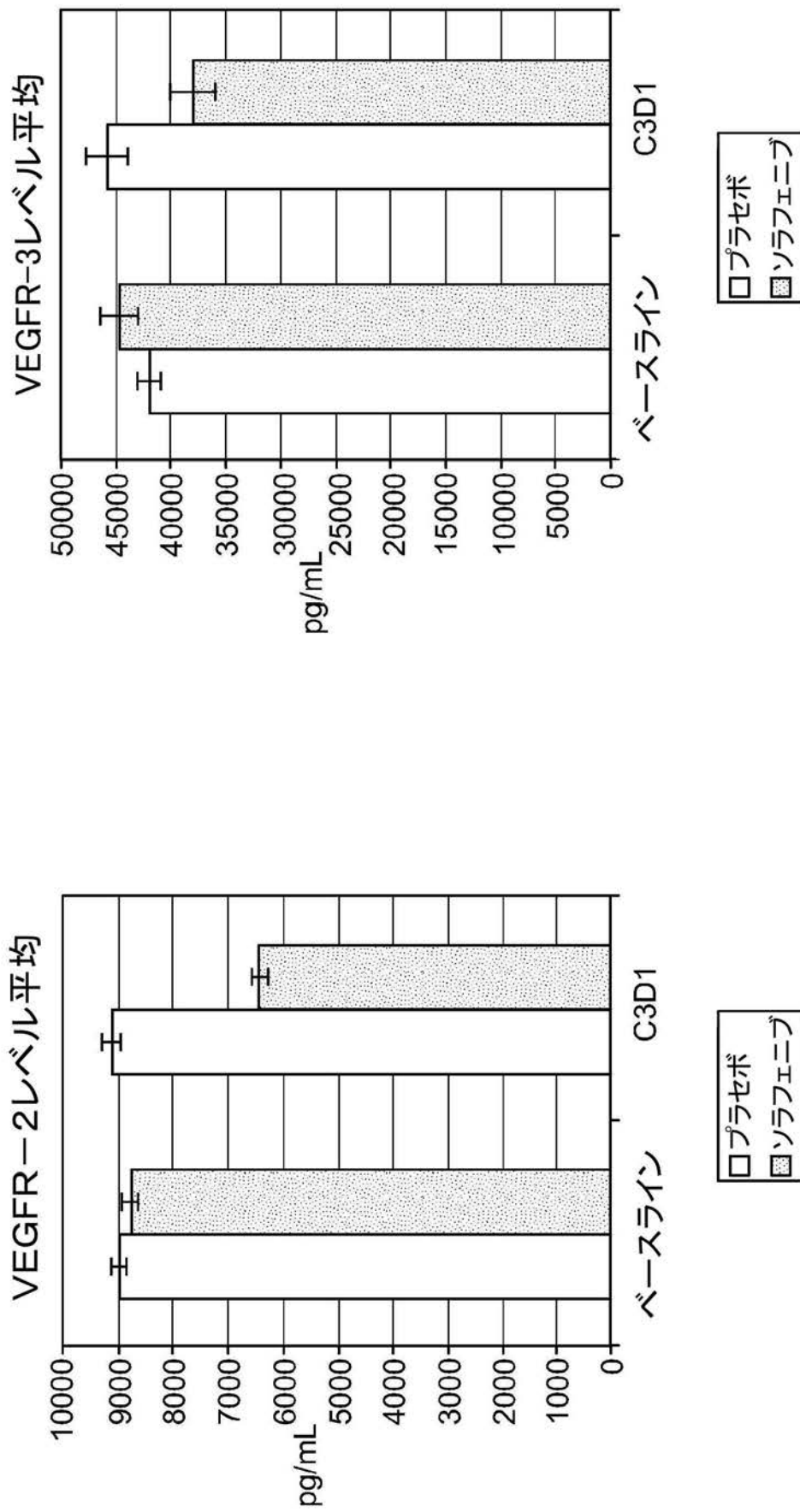
【図 1 4】



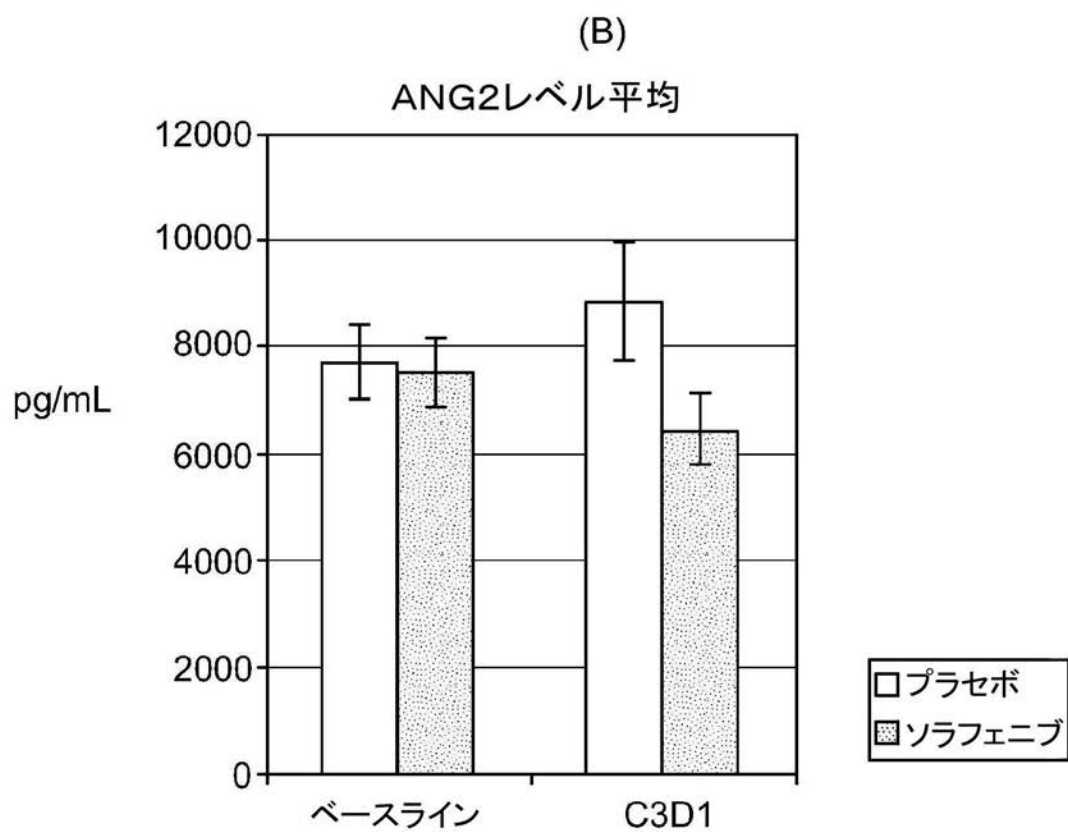
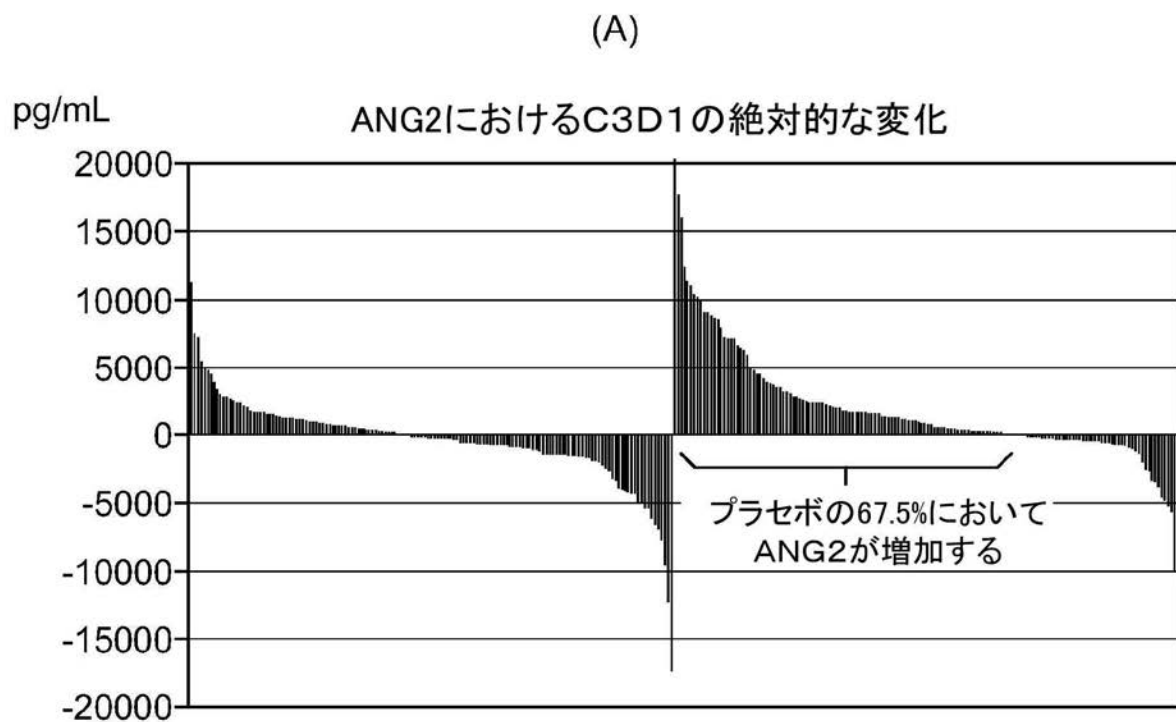
【図 15】



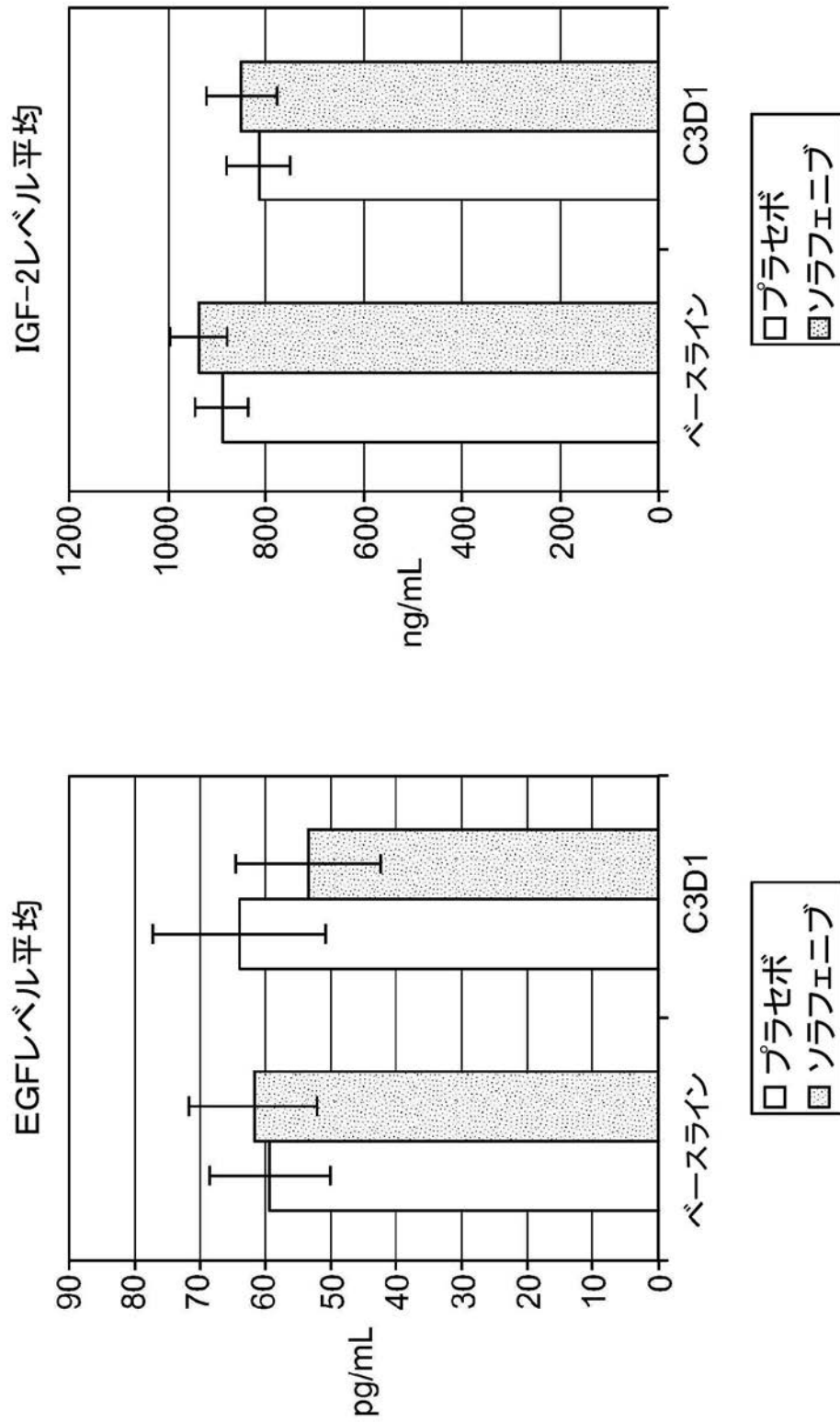
【図 16】



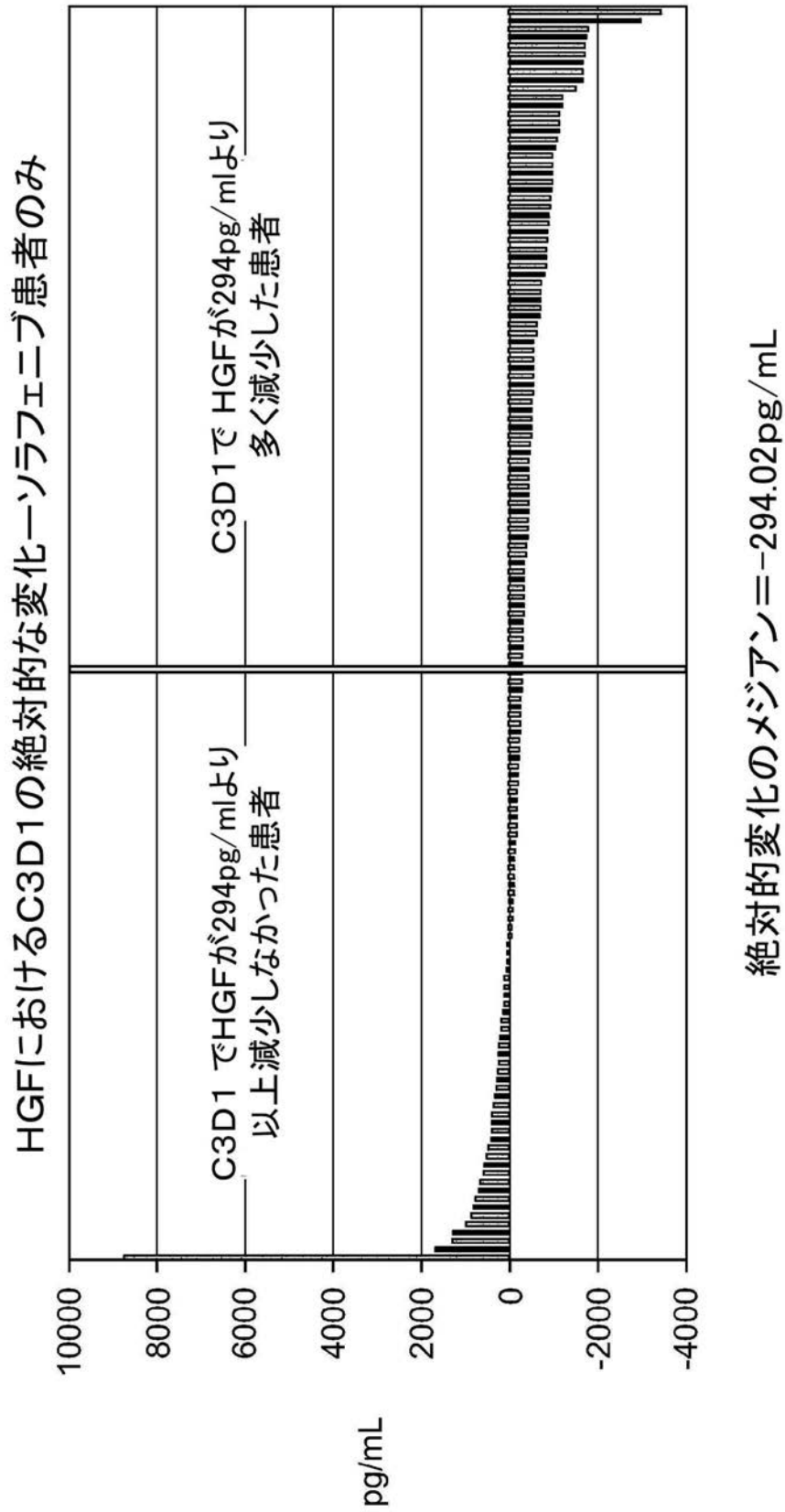
【図 17】



【図 18】

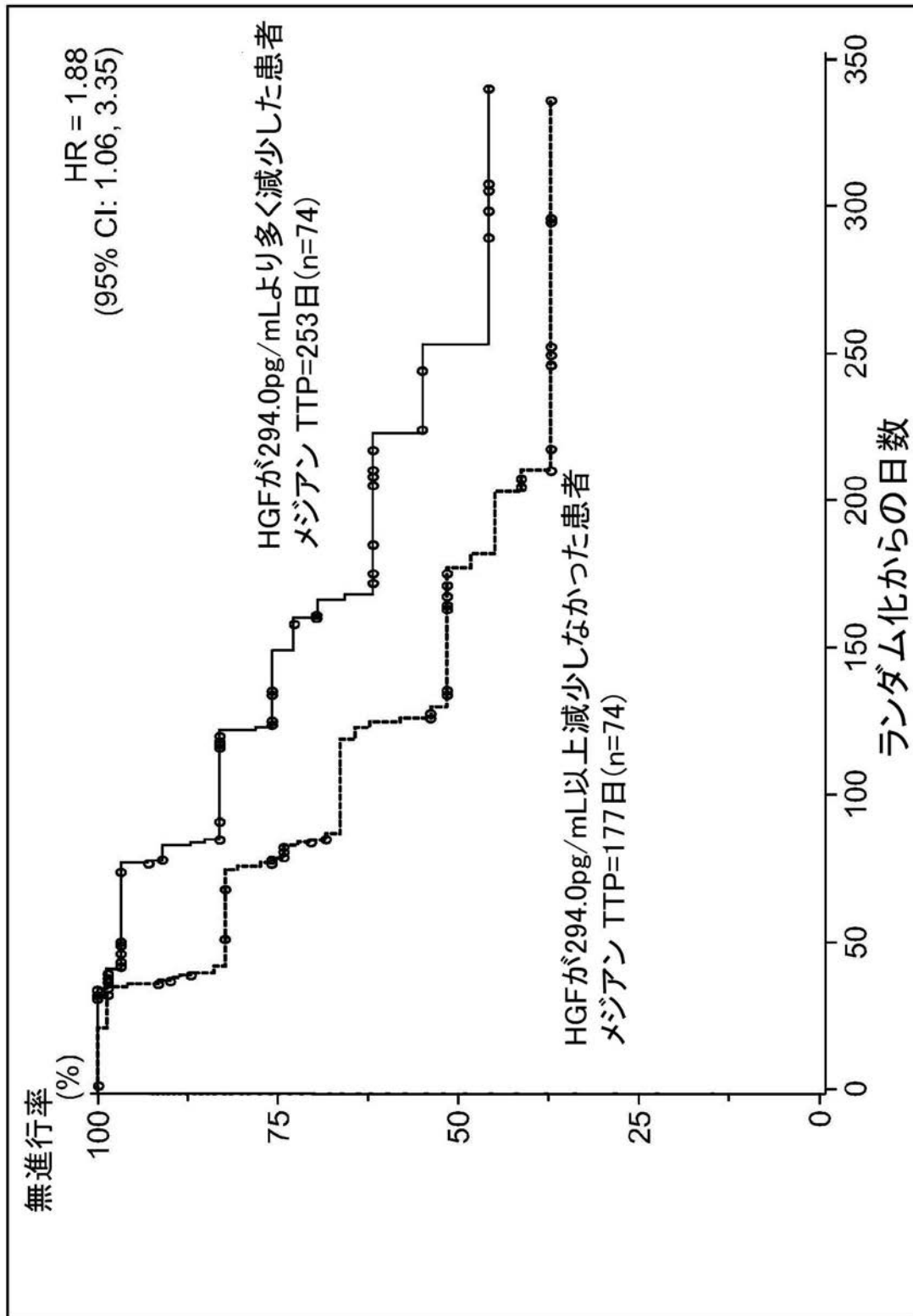


【図 19】

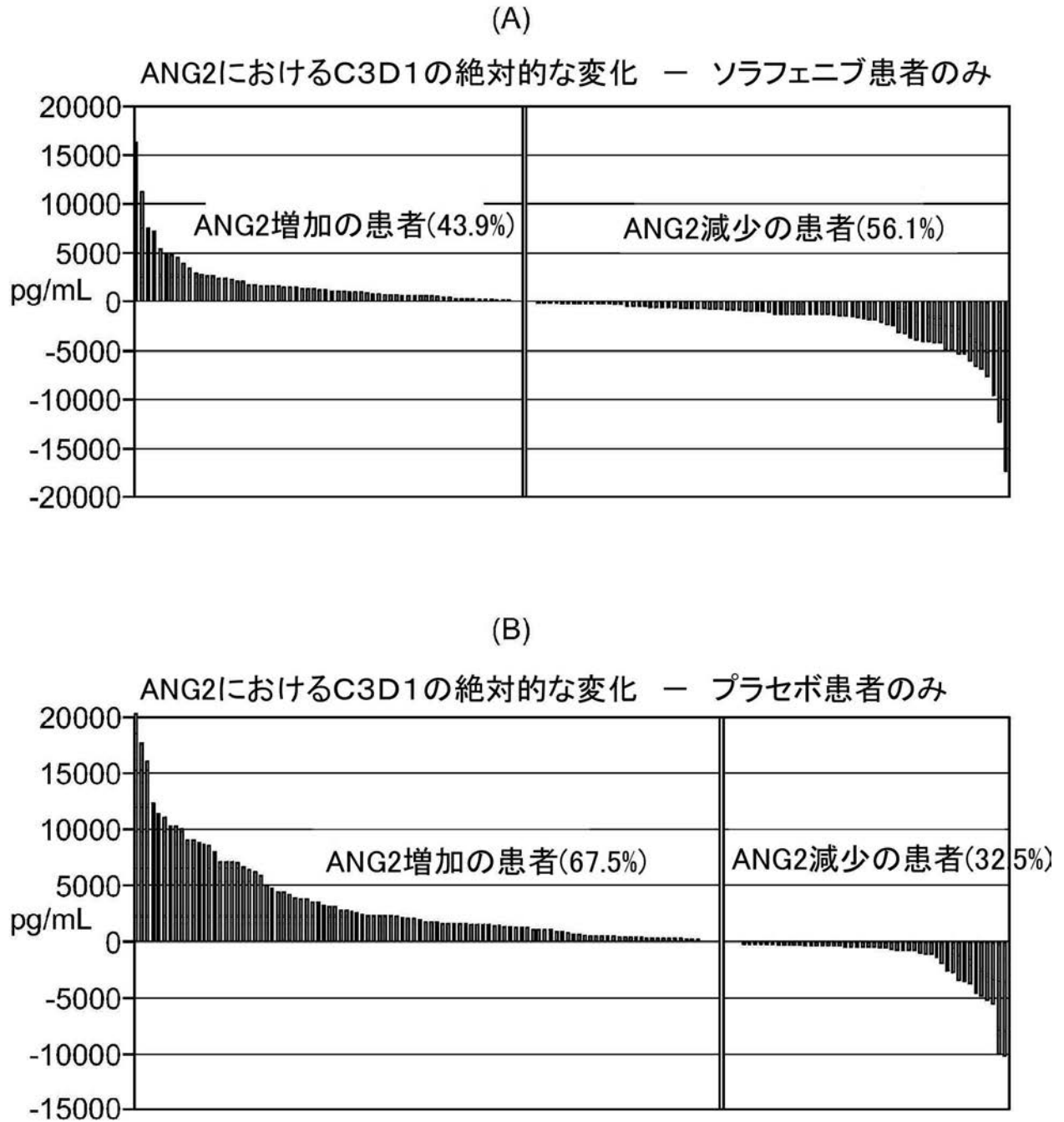


【図 20】

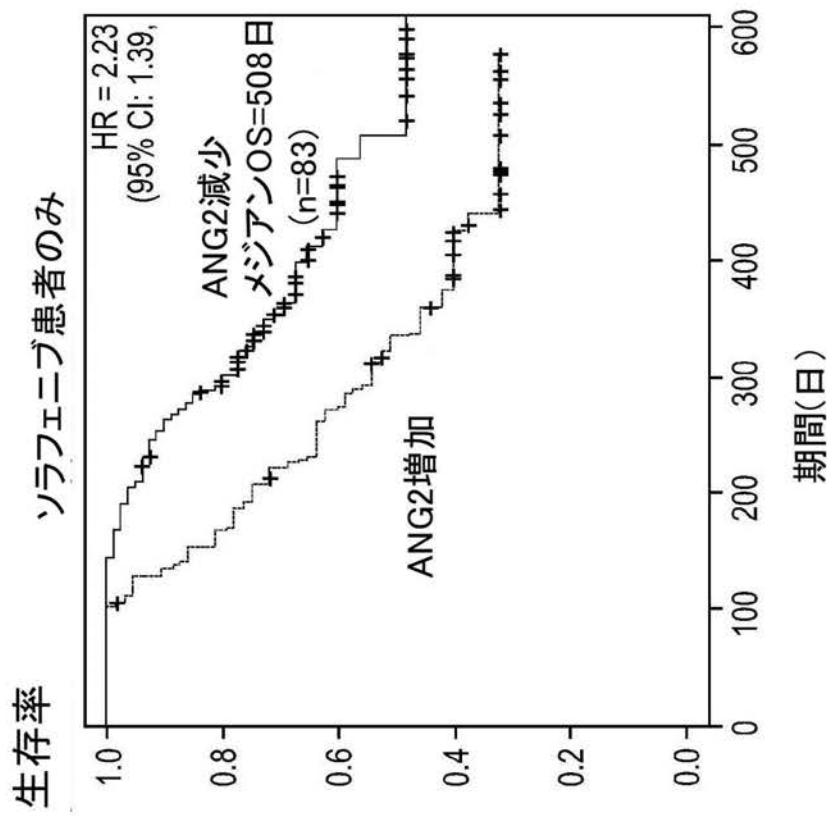
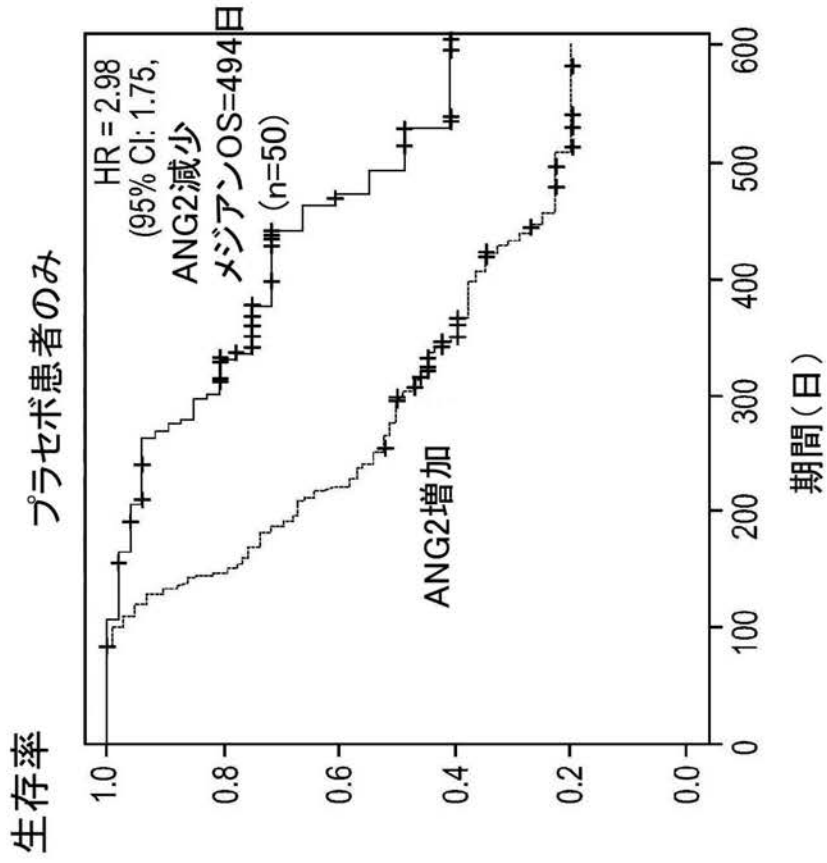
ソラフェニブ患者のみ



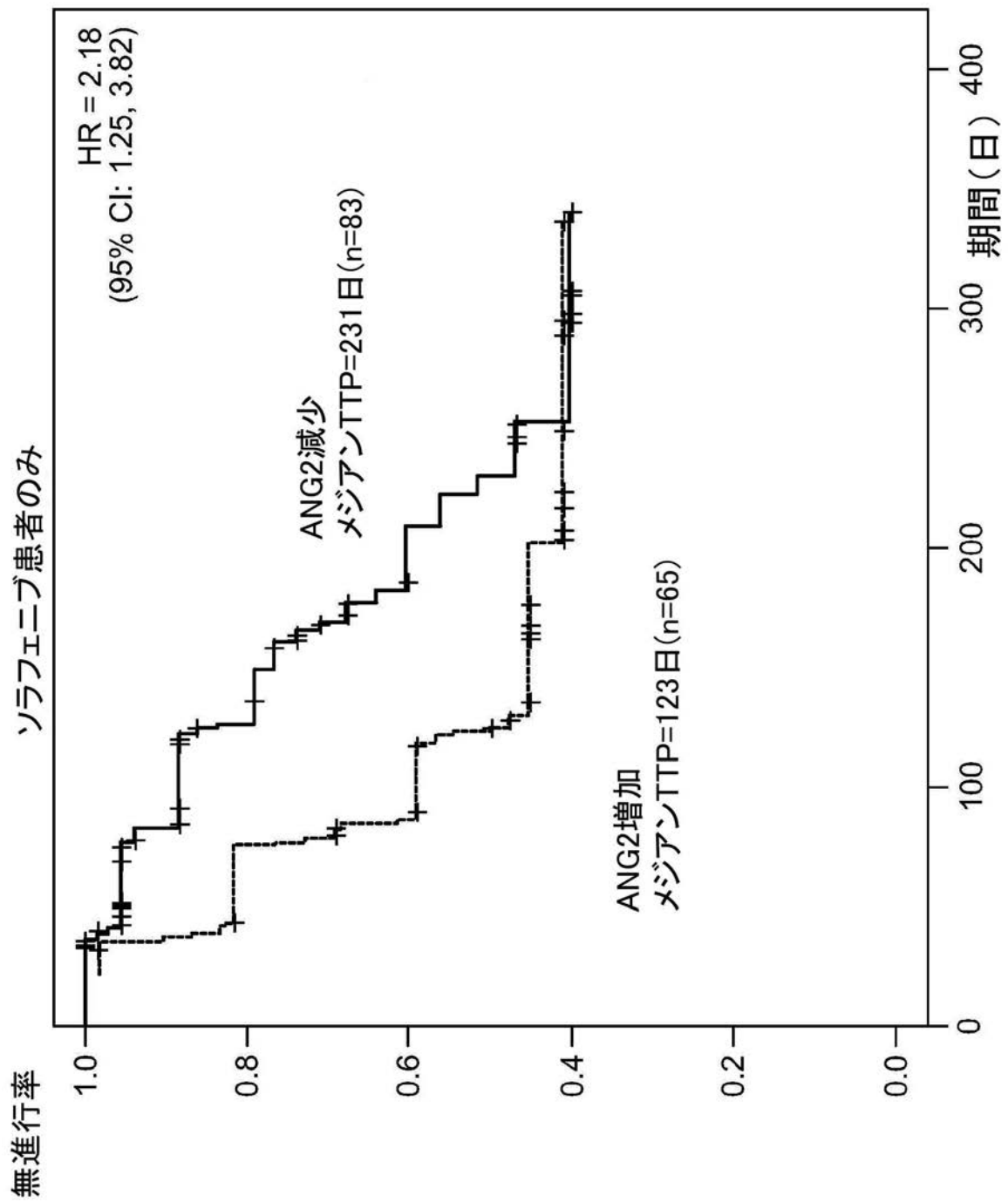
【図 2 1】



【図 2 2】

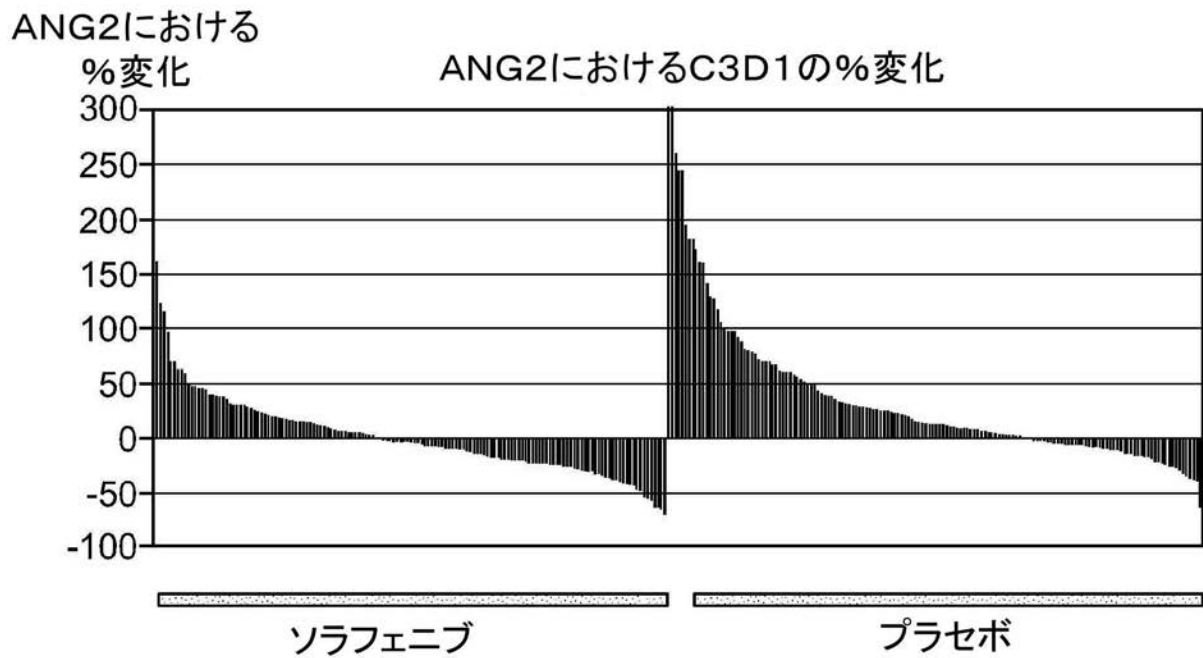
A**B**

【図 23】

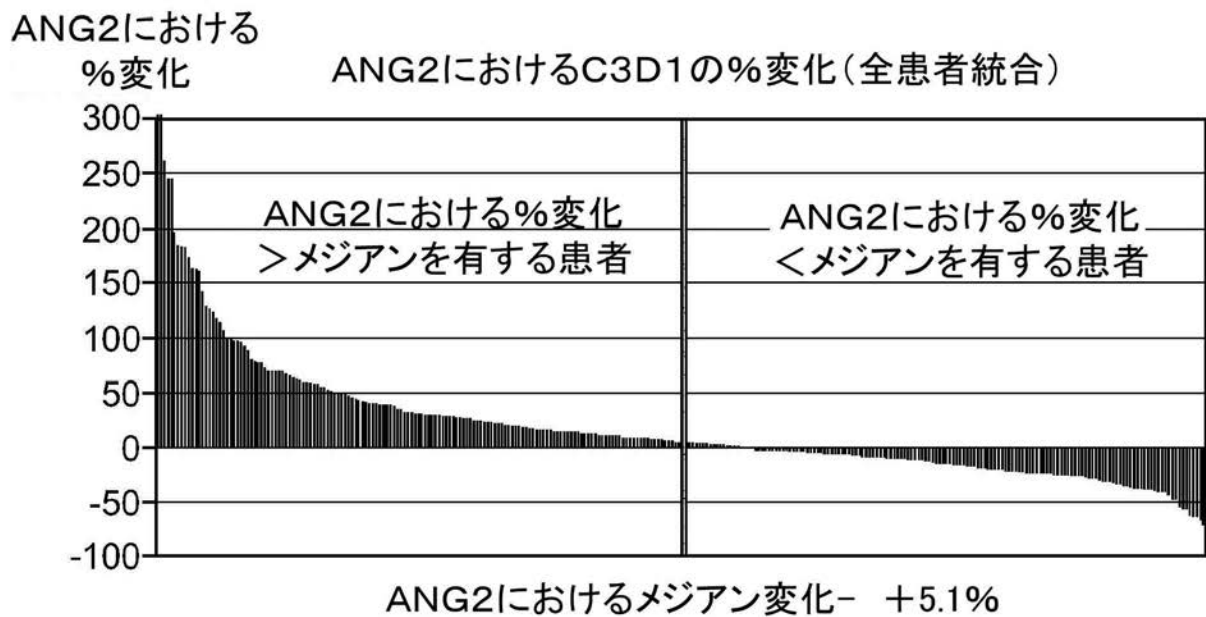


【図 2 4】

A

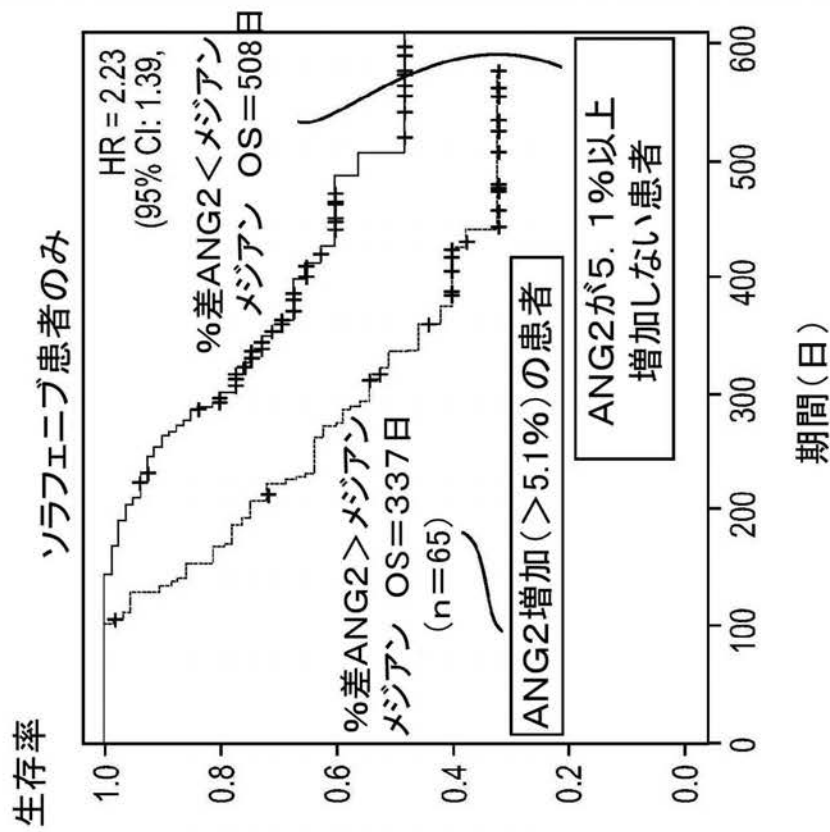


B

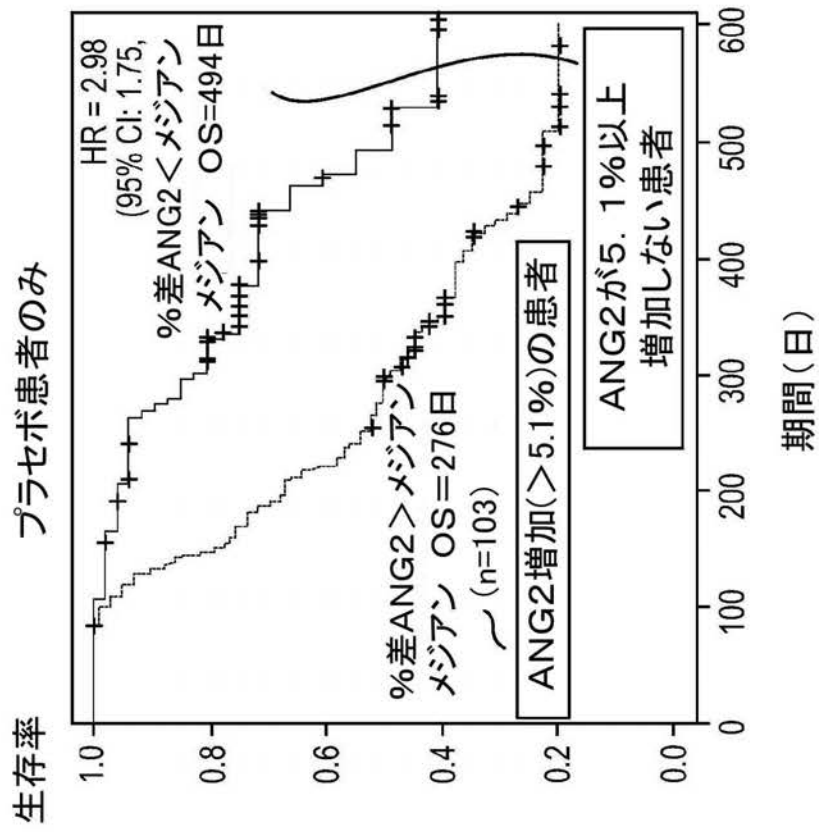


【図 25】

A

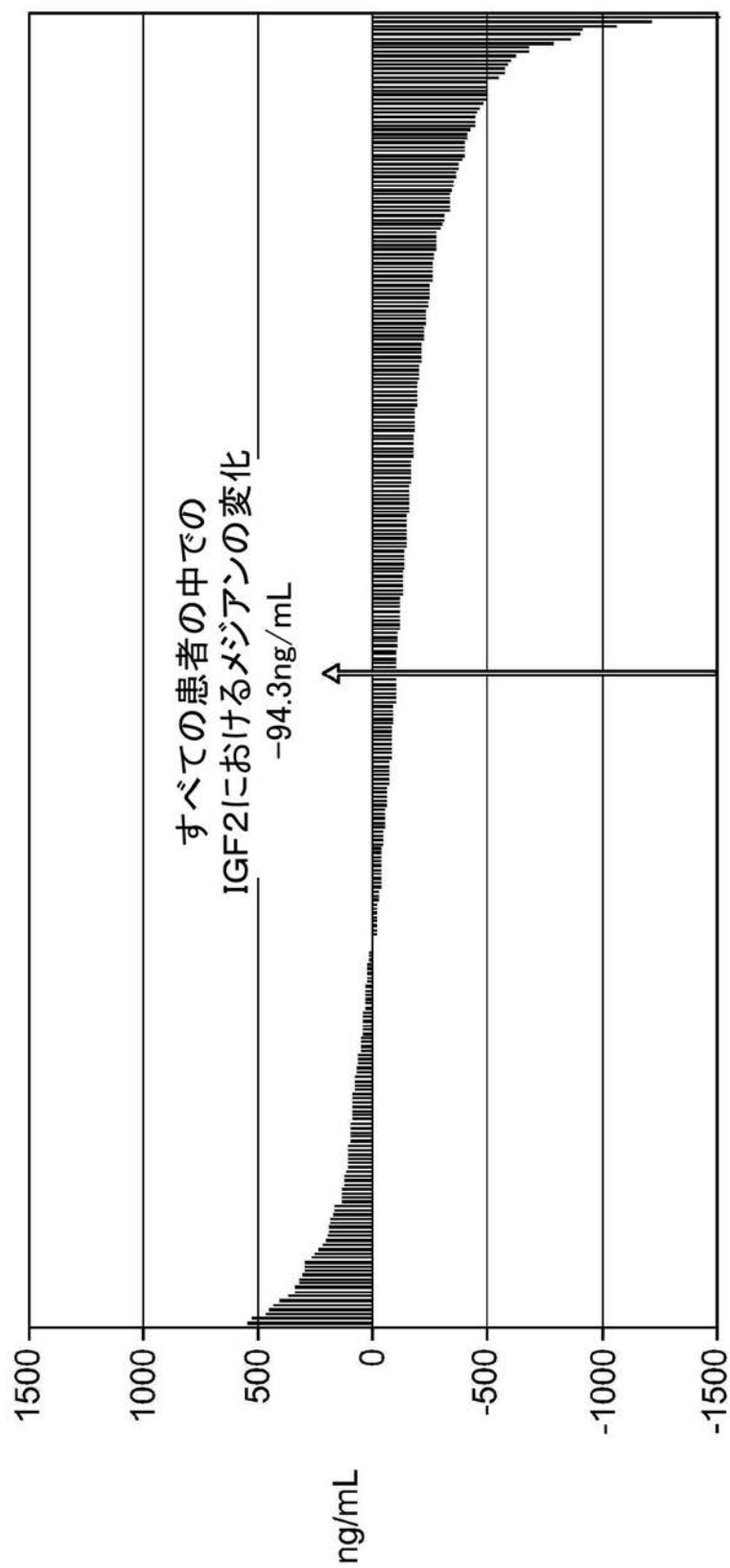


B

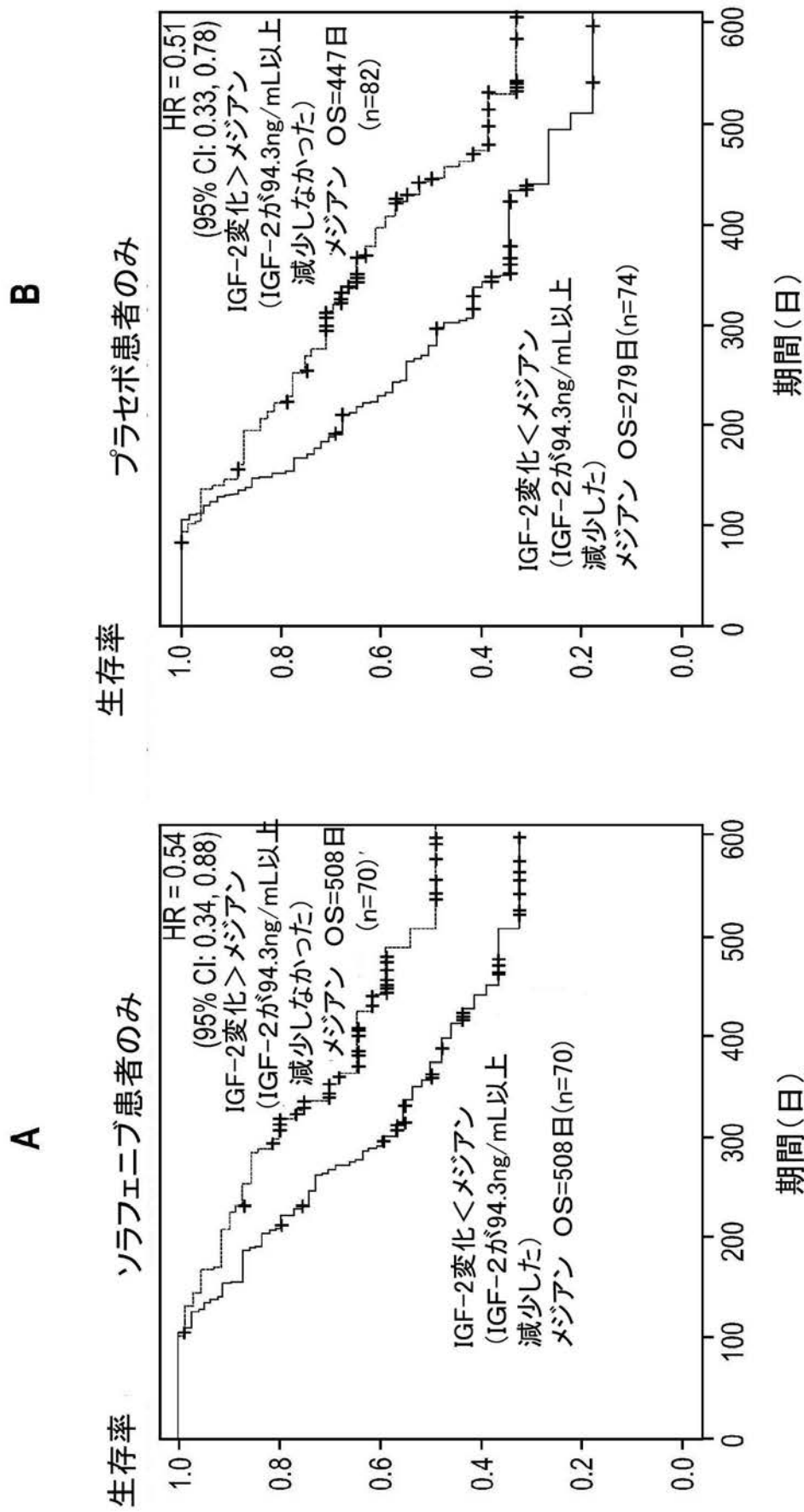


【図 26】

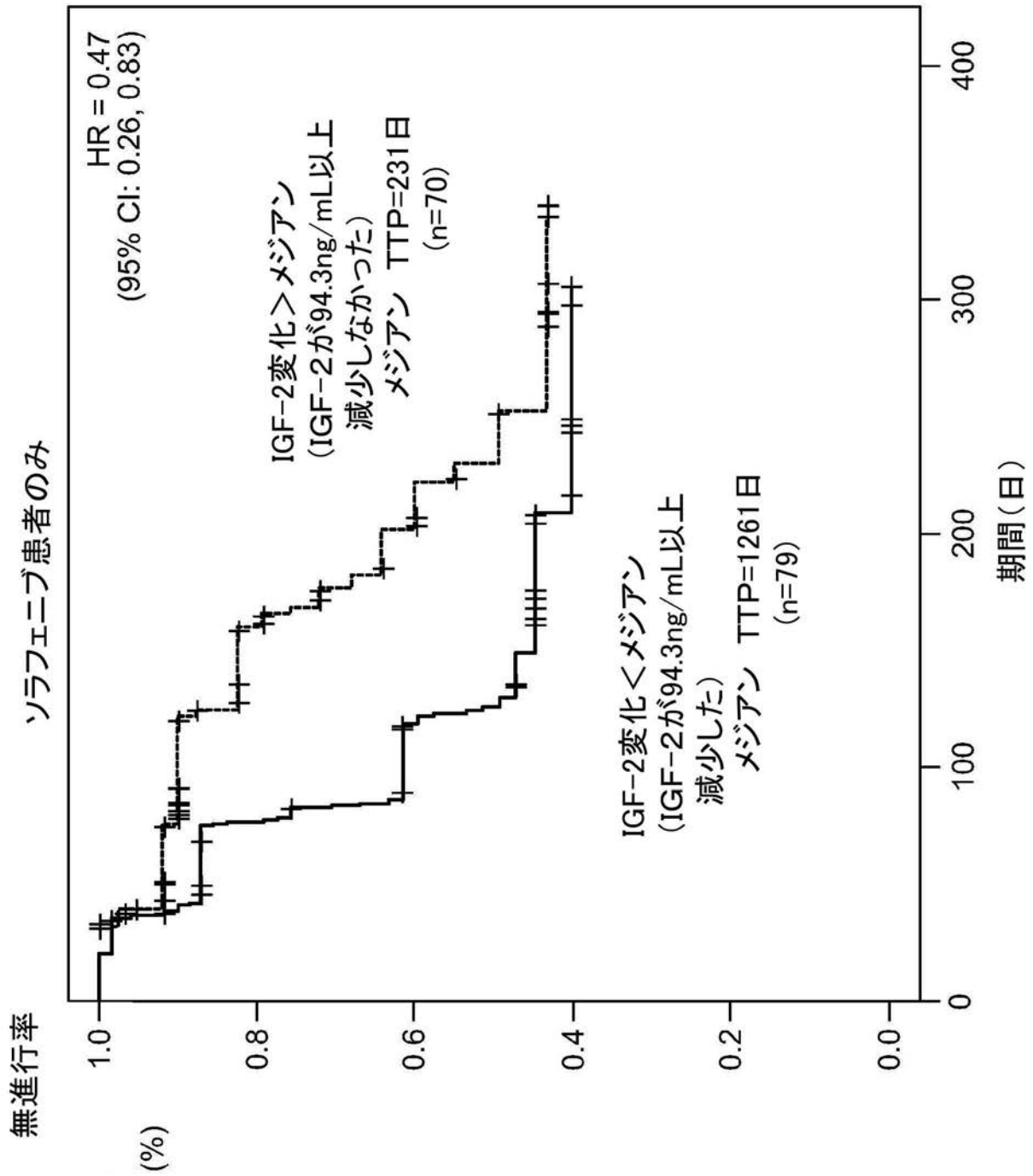
IGF-2におけるC3D1の絶対的な変化(全患者)



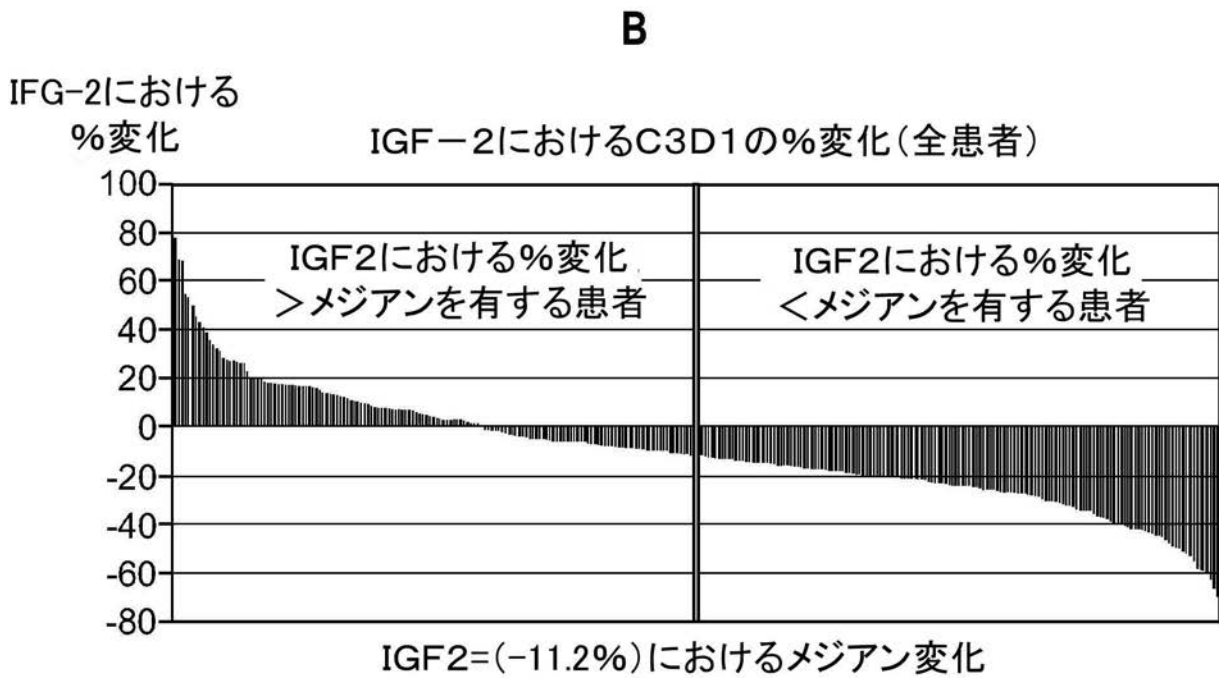
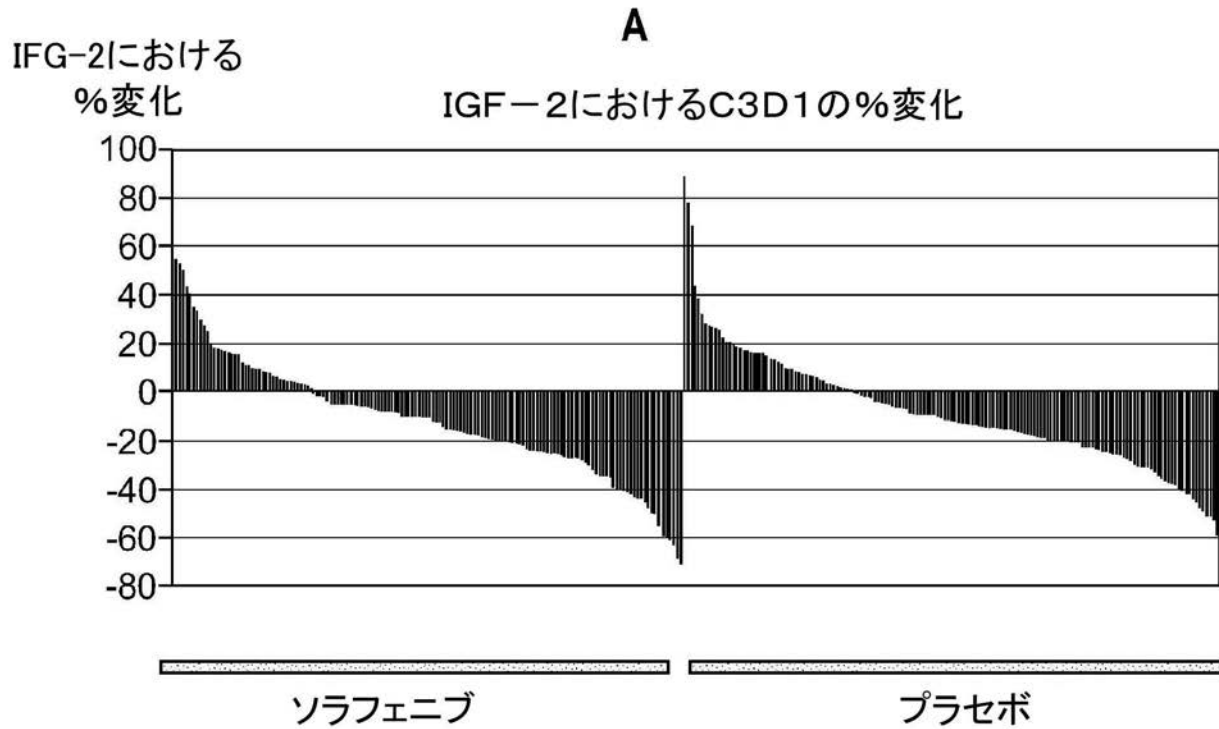
【図 27】



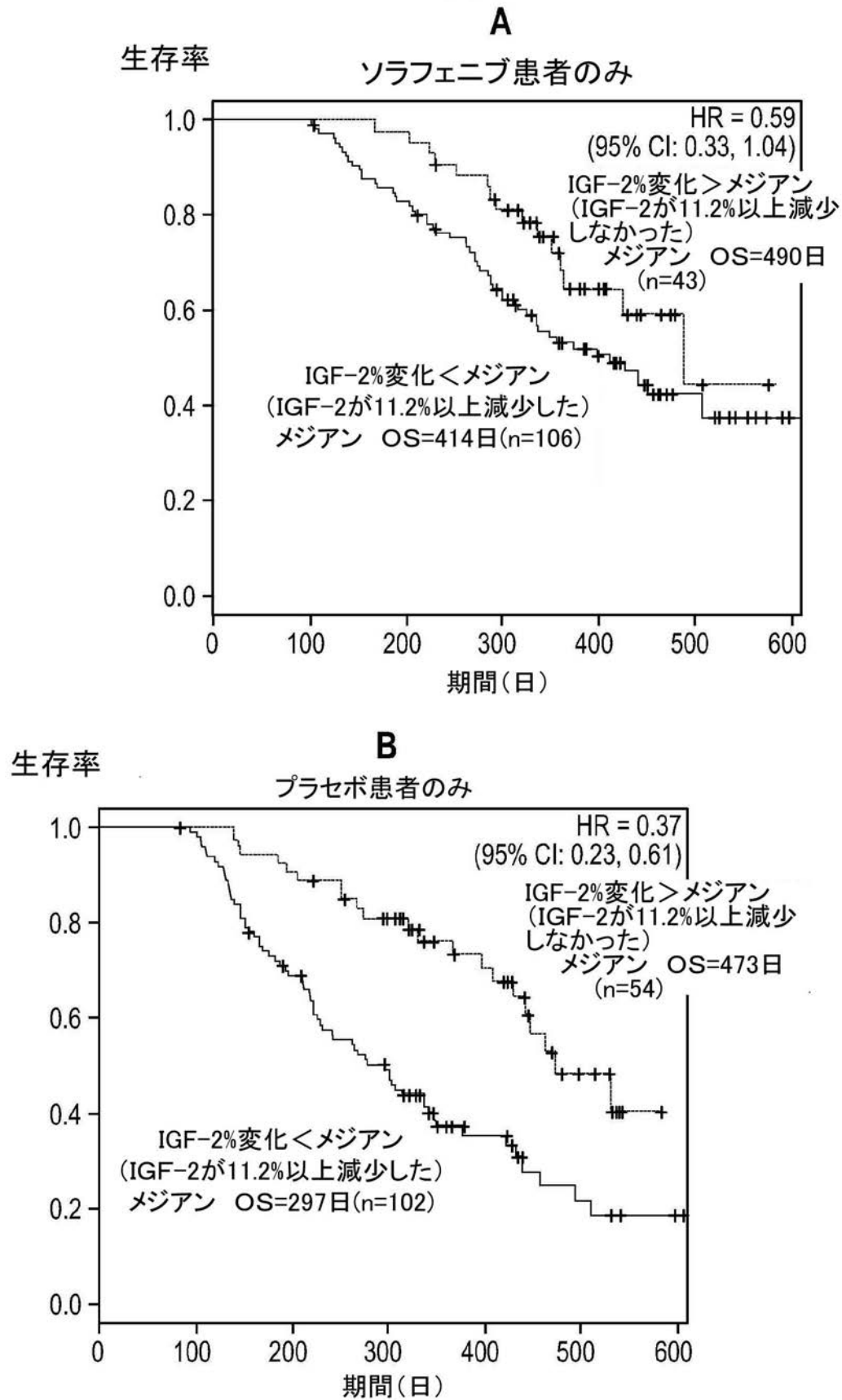
【図 28】



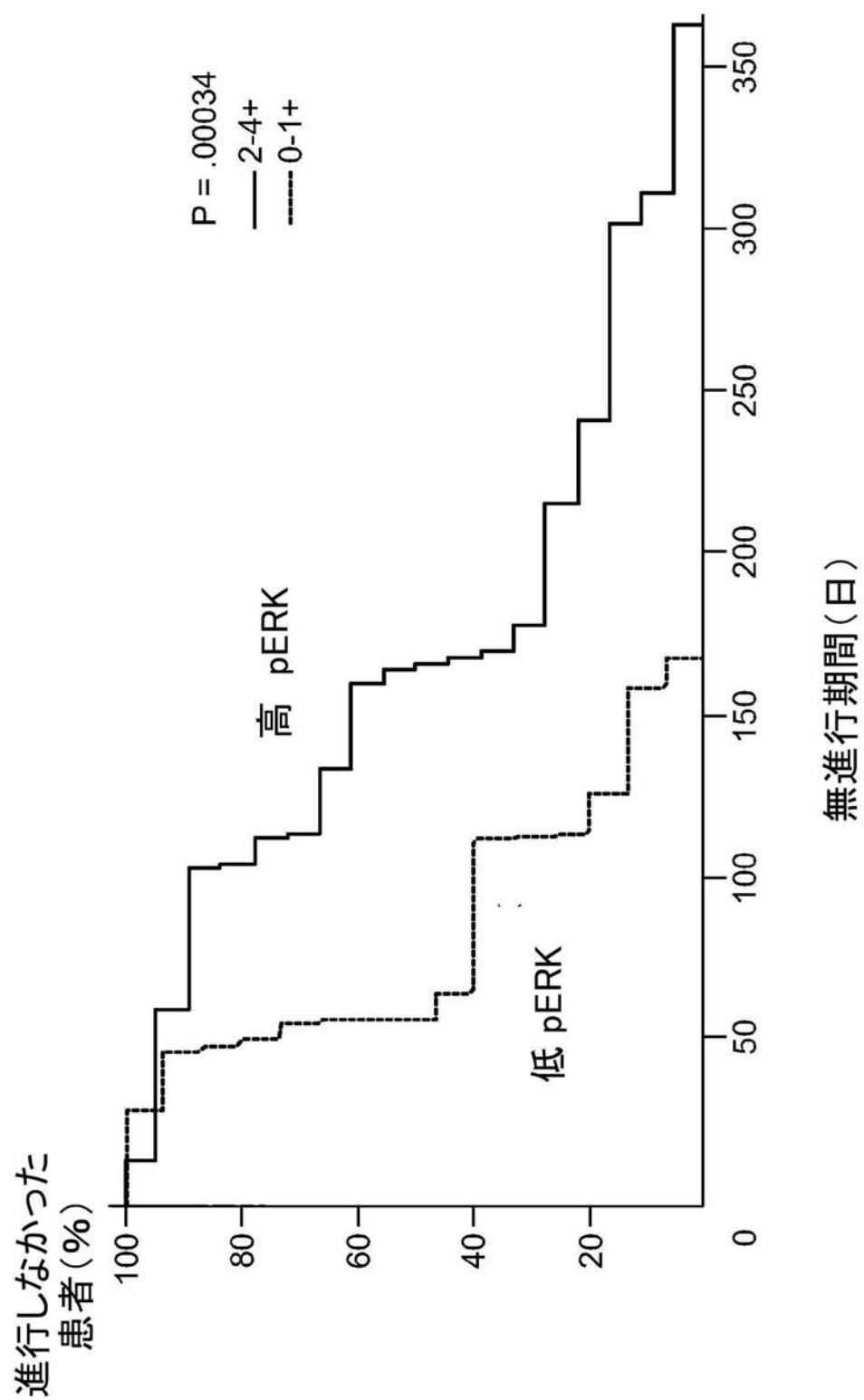
【図 29】



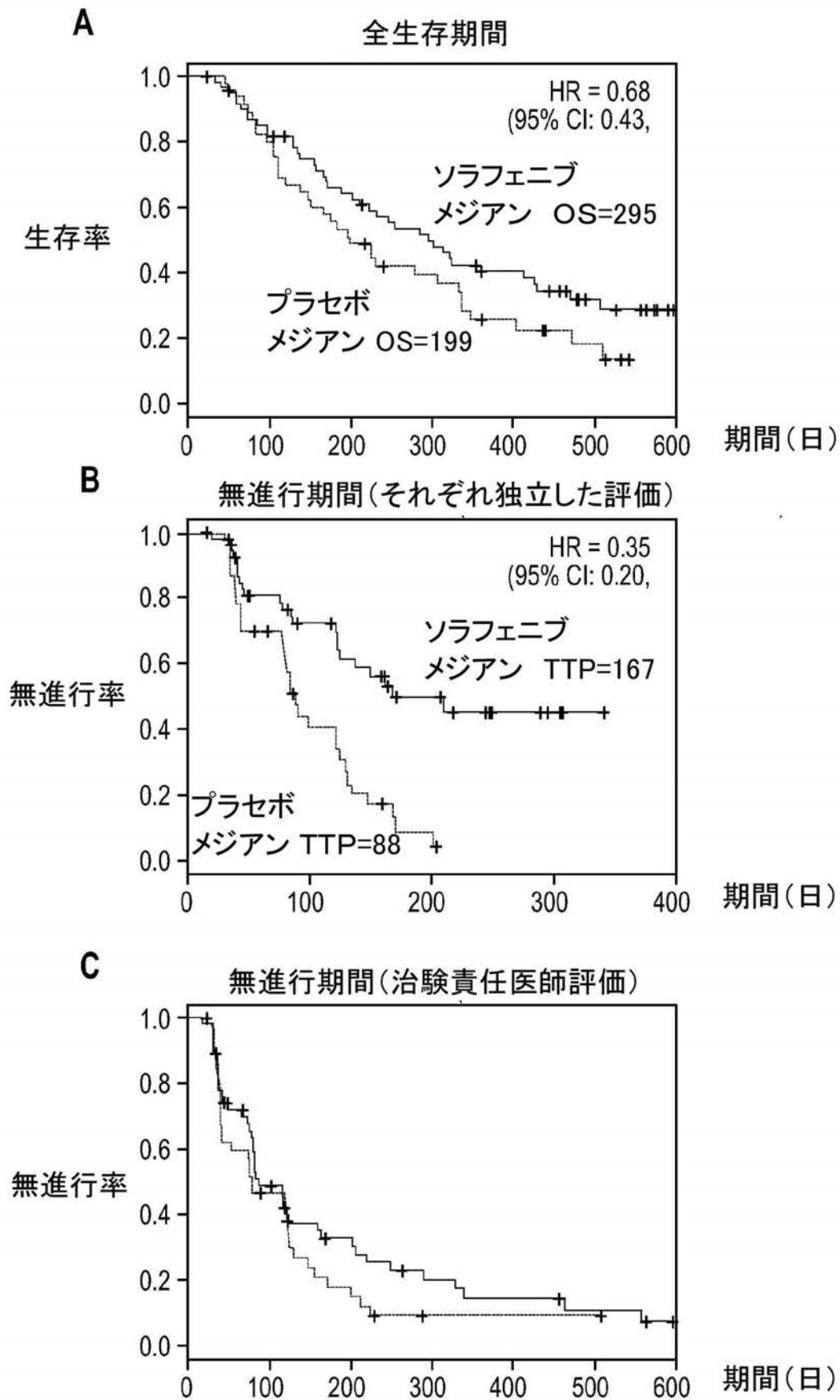
【図 30】



【図 3 1】



【図 3 2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/061506

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/574

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LLOVET JOSEP ET AL: "BIOMARKERS PREDICTING OUTCOME OF PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA: RESULTS FROM THE RANDOMIZED PHASE III SHARP TRIAL" HEPATOLOGY, vol. 48, no. Suppl. 1, 24 September 2008 (2008-09-24), page 372A, XP002575917 & 59TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES; SAN FRANCISCO, CA, USA; OCTOBER 31 - NOVEMBER 04, 2008 ISSN: 0270-9139 the whole document ----- -/-	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

7 Apr11 2010

Date of mailing of the international search report

02/07/2010

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

C.F. Angioni

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/061506

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZENDER LARS ET AL: "Molecular Pathogenesis and Targeted Therapy of Hepatocellular Carcinoma" ONKOLOGIE, vol. 31, no. 10, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 550-555, XP008120963 ISSN: 0378-584X the whole document In particular: Summary; Table 1; p. 553.	1,2
X	US 2007/105142 A1 (WILHELM SCOTT [US]) 10 May 2007 (2007-05-10) the whole document In particular: paragraphs 4, 60, 68, 102ff, 122ff, 129ff; Claim 1.	1,2
X	WO 2007/047955 A2 (BAYER HEALTHCARE LLC [US]; ELTING JAMES J [US]; CARNEY WALTER P [US];) 26 April 2007 (2007-04-26) the whole document In particular: 1, 5-12, 28, 36, 44-45; claims 1-36.	1,2
X	FURUSE ET AL: "Growth factors as therapeutic targets in HCC" CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY / HEMATOLOGY, vol. 67, no. 1, 1 July 2008 (2008-07-01), pages 8-15, XP022705761 ELSEVIER SCIENCE IRELAND LTD., LIMERICK, IE ISSN: 1040-8428 [retrieved on 2008-04-22] the whole document In particular: Abstract; sections 1.2-1.3; Table 2.	1-5
A	POON R T P ET AL: "Prognostic significance of serum vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma." THE BRITISH JOURNAL OF SURGERY, vol. 91, no. 10, October 2004 (2004-10), pages 1354-1360, XP002575918 ISSN: 0007-1323 the whole document In particular: Abstract and patients and methods section.	1,2

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/061506

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RONG-PING GUO ET AL: "Clinical value of apoptosis and angiogenesis factors in estimating the prognosis of hepatocellular carcinoma" JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND CLINICAL ONCOLOGY, vol. 132, no. 9, 9 June 2006 (2006-06-09), pages 547-555, XP019427894 SPRINGER, BERLIN, DE ISSN: 1432-1335 the whole document In particular: Abstract; Materials and methods section.	1,2
A	KUBOKI S ET AL: "Angiopoietin-2 levels in the hepatic vein as a useful predictor of tumor invasiveness and prognosis in human hepatocellular carcinoma" JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY AND HEPATOLOGY, vol. 23, no. 7pt2, July 2008 (2008-07), pages E157-E164, XP002575919 In particular: Abstract; Methods section.	1,2
A	RONNIE T P POON ET AL: "High Serum Vascular Endothelial Growth Factor Levels Predict Poor Prognosis after Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma: Importance of Tumor Biomarker in Ablative Therapies" ANNALS OF SURGICAL ONCOLOGY, vol. 14, no. 6, 4 April 2007 (2007-04-04), pages 1835-1845, XP019496928 SPRINGER-VERLAG, NE ISSN: 1534-4681 the whole document In particular: Abstract; Patients and methods section.	1,2
A	JENG KUO-SHYANG ET AL: "Prognostic significance of preoperative circulating vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in resectable hepatocellular carcinoma: a prospective study." WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY : WJG, vol. 10, no. 5, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 643-648, XP002575920 ISSN: 1007-9327 the whole document In particular: Abstract; Materials and methods section.	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/061506

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

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

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

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an 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.:
1, 2

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US2009 /061506

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention: 1; Claims: 1, 2

A method of prognosticating the outcome of sorafenib treatment of HCC in a patient.

Inventions: 2-5; Claims: 21-24

The subject-matter of claims 21-24

Inventions: 6-88; Claims: 25, 26

A method of predicting the outcome of sorafenib treatment of HCC in a patient comprising detecting a combination of biomarkers and wherein the combination is one listed in claim 26.

Invention: 89; Claims: 27, 28

The subject-matter of claim 27.

Invention: 90; Claims: 29

The subject-matter of claim 29.

Invention: 91; Claims: 30, 31

The subject-matter of claim 30.

Inventions: 92-98; Claims: 3-13

The subject-matter of claims 3-13.

Invention: 99; Claims: 14, 15

The subject-matter of claim 14.

Inventions: 100-112; Claims: 16

A method of screening for an agent capable of influencing the outcome of patients with HCC comprising detecting a combination of biomarker, wherein said combination is one listed in claim 16.

International Application No. PCT/US2009 /061506

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Inventions: 113-116; Claims: 17-20

The subject-matter of claims 17-20.

Invention: 117; Claims: 32-34

The subject-matter of claims 32-34.

Invention: 118; Claims: 35

A method of screening for an agent capable of influencing
the outcome of patients with HCC.

Inventions: 119-201; Claims: 36

An antibody array comprising a plurality of antibody which
specifically binds to a combination of molecules as listed
in claim 36.

Inventions: 202-285; Claims: 37

An oligonucleotide array comprising a plurality of
oligonucleotides which hybridize under stringent conditions
to a combination of genes as listed in claim 37.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/061506

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007105142	A1	10-05-2007	NONE
WO 2007047955	A2	26-04-2007	
		AU 2006304764 A1	26-04-2007
		CA 2626019 A1	26-04-2007
		CN 101506351 A	12-08-2009
		EP 1946115 A2	23-07-2008
		JP 2009512860 T	26-03-2009
		KR 20080073711 A	11-08-2008
		US 2009221010 A1	03-09-2009
		ZA 200803430 A	26-08-2009

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	F
A 6 1 K	31/44	(2006.01)	A 6 1 K 31/44	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 M	1/00	(2006.01)	C 1 2 M 1/00	A

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

F ターム (参考) 2G045 AA26 DA14 DA36 FB02 FB03
 4B024 AA12 CA09 CA11 HA14
 4B029 AA07 BB20 CC03 FA12
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR08 QR42 QR55
 QR62 QS34 QS36 QX02
 4C086 AA01 AA02 BC17 MA01 MA04 NA14 ZB26