

(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2007-507222

(P2007-507222A)

(43) 公表日 平成19年3月29日(2007.3.29)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 6 3
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 C O 8 6
A 6 1 K 31/337 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-533426 (P2006-533426)	(71) 出願人	505175858
(86) (22) 出願日	平成16年5月24日 (2004.5.24)		ゲノミック ヘルス, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月15日 (2005.12.15)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 94063, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ 301
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/016553		
(87) 国際公開番号	W02004/111603	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成16年12月23日 (2004.12.23)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	60/473, 970	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成15年5月28日 (2003.5.28)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 化学療法に対する応答を予測するための遺伝子発現マーカー

(57) 【要約】

本発明は、遺伝子のセットを提供する。これらの遺伝子のセットの発現は、癌患者が化学療法に対して有益な処置応答を有する可能性があるか否かを予測する。さらに、本発明は、複数遺伝子のRNA分析を用いた、化学療法に応答する患者を予測する臨床的に有効な癌試験を提供する。本発明は、関連する遺伝子セットにおける全てのマーカーのアッセイのための、保存されたパラフィン包埋生検材料の使用を提供し、したがって、最も広く入手可能な型の生検材料に適合する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌と診断された被験体の、化学療法に対する応答を予測するための方法であって、以下：
該被検体から得られた癌細胞を含む生物学的サンプルにおいて、1つ以上の予後診断用
RNA 転写物またはそれらの発現産物の発現レベルを決定する工程であって、ここで該予
後診断用 RNA 転写物が、以下：

【化 1】

VEGFC; B-カテニン; MMP2; MMP9; CNN;

FLJ20354; TGFB3; PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RAD54L; RB1; SURV;

EIF4EL3; CYP2C8; STK15; ACTG2; NEK2; cMet; TIMP2; C20 orf1; DR5; CD31;

BIN1; COL1A2; HIF1A; VIM; CDC20; ID2; MCM2; CCNB1; MYH11; Chk2; G-
カテニン; HER2; GSN; Ki-67; TOP2A; CCND1; EstR1; KRT18; GATA3; cIAP2; KRT5;

RAB27B; IGF1R; HNF3A; CA9; MCM3; STMY3; NPD009; BAD; BBC3; EGFR;

CD9; AKT1; CD3z; KRT14; DKFZp564; Bcl2; BECN1; KLK10; DIABLO; MVP;

VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx; CDH1; HLA-DPB1; PR; KRT17; GSTp; IRS1;

NFKBp65; IGFBP2; RPS6KB1; DHPS; TIMP3; ZNF217; KIAA1209; COX2; pS2;

BRK; CEGP1; EPHX1; VEGF; TP53BP1; COL1A1; FGFR1; および CTSL2

10

20

からなる群より選択される 1 つ以上の遺伝子の転写物であり、ここで、

(a) 以下の 1 つ以上：

【化 2】

MMP9;

FLJ20354; RAD54L; SURV; CYP2C8; STK15; NEK2; C20 orf1; CDC20; MCM2;

CCNB1; Chk2; Ki-67; TOP2A; CCND1; EstR1; KRT18; GATA3; RAB27B; IGF1R;

HNF3A; STMY3; NPD009; BAD; BBC3; CD9; AKT1; Bcl2; BECN1; DIABLO; MVP;

VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx; CDH1; PR; IRS1; NFKBp65; IGFBP2; RPS6KB1;

DHPS; TIMP3; ZNF217; pS2; BRK; CEGP1; EPHX1; TP53BP1; COL1A1; および

FGFR1

30

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、該被検体が、増大
した応答の可能性を有すると予測され；そして

(b) 以下の 1 つ以上：

【化 3】

VEGFC;

B-カテニン; MMP2; CNN; TGFB3; PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RB1;

EIF4EL3; ACTG2; cMet; TIMP2; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A; VIM; ID2;

MYH11; G-カテニン; HER2; GSN; cIAP2; KRT5; CA9; MCM3; EGFR; CD3z; KRT14;

DKFZp564; KLK10; HLA-DPB1; KRT17; GSTp; KIAA1209; COX2; VEGF; および

CTSL2

40

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、該被検体が、低下
した応答の可能性を有すると予測される

工程を包含する、方法。

【請求項 2】

前記応答が臨床応答である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

50

請求項 2 に記載の方法であって、前記予後診断用 R N A 転写物が、以下：

【化 4】

CCND1; EstR1;
KRT18; GATA3; cIAP2; KRT5; RAB27B; IGF1R; HNF3A; CA9; MCM3; STMY3;
NPD009; BAD; BBC3; EGFR; CD9; AKT1; CD3z; KRT14; DKFZp564; Bcl2; BECN1;
KLK10; DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx; CDH1; HLA-DPB1; PR;
KRT17; GSTp; IRS1; NFKBp65; IGFBP2; RPS6KB1; DHPS; TIMP3; ZNF217;
KIAA1209; COX2; pS2; BRK; CEGP1; EPHX1; VEGF; TP53BP1; COL1A1; FGFR1;
および CTSL2

10

からなる群より選択される 1 つ以上の遺伝子の転写物であり、ここで：

(a) 以下の 1 つ以上：

【化 5】

CCND1;
EstR1; KRT18; GATA3; RAB27B; IGF1R; HNF3A; STMY3; NPD009; BAD; BBC3;
CD9; AKT1; Bcl2; BECN1; DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx; CDH1;
PR; IRS1; NFKBp65; IGFBP2; RPS6KB1; DHPS; TIMP3; ZNF217; pS2; BRK;
CEGP1; EPHX1; TP53BP1; COL1A1; および FGFR1

20

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、前記被検体が、増大した応答の可能性を有すると予測され；そして

(b) 以下の 1 つ以上：

【化 6】

cIAP2;
KRT5; CA9; MCM3; EGFR; CD3z; KRT14; DKFZp564; KLK10; HLA-DPB1; KRT17;
GSTp; KIAA1209; COX2; VEGF; および CTSL2

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、前記被検体が、低下した応答の可能性を有すると予測される、
方法。

30

【請求項 4】

前記応答が病理性応答である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の方法であって、前記予後診断用 R N A 転写物が、以下：

【化 7】

VEGFC; B-
カテニン; MMP2; MMP9; CNN; FLJ20354; TGFB3; PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1;
RIZ1; RAD54L; RB1; SURV; EIF4EL3; CYP2C8; STK15; ACTG2; NEK2; cMet;
TIMP2; C20 orf1; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A; VIM; CDC20; ID2; MCM2;
CCNB1; MYH11; Chk2; G-カテニン; HER2; GSN; Ki-67; TOP2A

40

からなる群より選択される 1 つ以上の遺伝子の転写物であり；そして

(a) 以下の 1 つ以上：

【化 8】

MMP9;

FLJ20354; RAD54L; SURV; CYP2C8; STK15; NEK2; C20orf1; CDC20; MCM2;

CCNB1; Chk2; Ki-67; TOP2A

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、前記被検体が、増大した応答の可能性を有すると予測され；そして

(b) 以下の 1 つ以上：

【化 9】

VEGFC;

10

B-カテニン; MMP2; CNN; TGFB3; PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RB1;

EIF4EL3; ACTG2; cMet; TIMP2; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A; VIM; ID2;

MYH11; G-カテニン; HER2; GSN.

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、前記被検体が、低下した応答の可能性を有すると予測される、方法。

【請求項 6】

前記被検体がヒトの患者である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

20

前記癌が、乳癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、および肺癌からなる群より選択される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記癌が乳癌である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記癌が浸潤性乳癌である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記癌が、病期 I I 期または病期 I I I 期の乳癌である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記化学療法が新補助化学療法である、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記化学療法が、タキサン誘導体の投与を包含する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 13】

前記タキサンが、ドセタキセルまたはパクリタキセルである、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記タキサンがドセタキセルである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記化学療法が、アントラサイクリン誘導体の投与を包含する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 16】

前記アントラサイクリン誘導体がドキソルビシンである、請求項 15 に記載の方法。

40

【請求項 17】

前記化学療法が、トポイソメラーゼインヒビターの投与を包含する、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 18】

前記トポイソメラーゼインヒビターが、カンプトテシン、トポテカン、イリノテカン、20-S-カンプトテシン、9-ニトロ-カンプトテシン、9-アミノ-カンプトテシン、および G I 1 4 7 2 1 1 からなる群より選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記化学療法が、少なくとも 2 つの化学療法剤の投与を包含する、請求項 8 に記載の方法。

50

【請求項 20】

前記化学療法剤が、タキサン誘導体、アントラサイクリン誘導体およびトポイソメラーゼインヒビターからなる群より選択される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

少なくとも 2 つの前記予後診断用転写物、またはそれらの発現産物の発現レベルを決定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 22】

少なくとも 5 つの前記予後診断用転写物またはそれらの発現産物の発現レベルを決定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

全ての前記予後診断用転写物またはそれらの発現産物の発現レベルを決定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

前記生物学的サンプルが、癌細胞を含有する組織サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

前記組織が、固定されて、パラフィン包埋されているか、または新鮮であるか、または凍結している、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記組織が、細針生検、コア生検、または他の型の生検由来である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記組織サンプルが、微細針吸引、気管支洗浄、または経気管支生検によって得られる、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 28】

前記予後診断用 RNA 転写物の発現レベルが、RT-PCR によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

前記発現産物の発現レベルが、免疫組織化学によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

前記発現産物の発現レベルが、プロテオミクス技術によって決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

前記予後診断用 RNA 転写物またはそれらの発現産物の測定のためのアッセイが、キットの形態で提供される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 32】

アレイであって、固体表面上に固定化された以下の遺伝子：

10

20

30

【化 1 0】

VEGFC; B-カテニン; MMP2; MMP9; CNN; FLJ20354; TGFB3;
 PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RAD54L; RB1; SURV; EIF4EL3; CYP2C8;
 STK15; ACTG2; NEK2; cMet; TIMP2; C20 orf1; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A;
 VIM; CDC20; ID2; MCM2; CCNB1; MYH11; Chk2; G-カテニン; HER2; GSN; Ki-67;
 TOP2A; CCND1; EstR1; KRT18; GATA3; cIAP2; KRT5; RAB27B; IGF1R; HNF3A;
 CA9; MCM3; STMY3; NPD009; BAD; BBC3; EGFR; CD9; AKT1; CD3z; KRT14;
 DKFZp564; Bcl2; BECN1; KLK10; DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx;
 CDH1; HLA-DPB1; PR; KRT17; GSTp; IRS1; NFkBp65; IGFBP2; RPS6KB1; DHPS;
 TIMP3; ZNF217; KIAA1209; COX2; pS2; BRK; CEGP1; EPHX1; VEGF; TP53BP1;
 COL1A1; FGFR1;および CTSL2

10

の 1 つ以上にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、アレイ。

【請求項 3 3】

複数の前記遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、請求項 3 2 に記載のアレイ。

【請求項 3 4】

アレイであって、固体表面上に固定化された以下の遺伝子：

20

【化 1 1】

CCND1; EstR1; KRT18; GATA3; cIAP2; KRT5; RAB27B; IGF1R;
 HNF3A; CA9; MCM3; STMY3; NPD009; BAD; BBC3; EGFR; CD9; AKT1; CD3z;
 KRT14; DKFZp564; Bcl2; BECN1; KLK10; DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3; MDM2;
 Bclx; CDH1; HLA-DPB1; PR; KRT17; GSTp; IRS1; NFkBp65; IGFBP2; RPS6KB1;
 DHPS; TIMP3; ZNF217; KIAA1209; COX2; pS2; BRK; CEGP1; EPHX1; VEGF;
 TP53BP1; COL1A1; FGFR1;および CTSL2

30

の 1 つ以上にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、アレイ。

【請求項 3 5】

複数の前記遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、請求項 3 4 に記載のアレイ。

【請求項 3 6】

アレイであって、固体表面上に固定化された以下の遺伝子：

【化 1 2】

VEGFC; B-カテニン; MMP2; MMP9; CNN; FLJ20354; TGFB3;
 PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RAD54L; RB1; SURV; EIF4EL3; CYP2C8;
 STK15; ACTG2; NEK2; cMet; TIMP2; C20 orf1; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A;
 VIM; CDC20; ID2; MCM2; CCNB1; MYH11; Chk2; G-カテニン; HER2; GSN; Ki-67;
 TOP2A

40

の 1 つ以上にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、アレイ。

【請求項 3 7】

複数の前記遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、請求項 3 6 に記載のアレイ。

【請求項 3 8】

前記ポリヌクレオチドが cDNA である、請求項 3 2、3 4、または 3 6 のいずれか 1 項に記載のアレイ。

50

【請求項 3 9】

前記ポリヌクレオチドがオリゴヌクレオチドである、請求項 3 2、3 4、または 3 6 のいずれか 1 項に記載のアレイ。

【請求項 4 0】

少なくとも 5 つの前記ポリヌクレオチドを含む、請求項 3 2、3 4、または 3 6 のいずれか 1 項に記載のアレイ。

【請求項 4 1】

少なくとも 1 0 個の前期ポリヌクレオチドを含む、請求項 3 2、3 4、または 3 6 のいずれか 1 項に記載のアレイ。

【請求項 4 2】

少なくとも 1 5 個の前期ポリヌクレオチドを含む、請求項 3 2、3 4、または 3 6 のいずれか 1 項に記載のアレイ。

【請求項 4 3】

全ての前記遺伝子の全てとハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、請求項 3 2、3 4、または 3 6 のいずれか 1 項に記載のアレイ。

【請求項 4 4】

同一遺伝子にハイブリダイズする 2 つ以上のポリヌクレオチドを含む、請求項 3 2、3 4、または 3 6 のいずれか 1 項に記載のアレイ。

【請求項 4 5】

少なくとも 1 つの前記ポリヌクレオチドが、対応するエキソン配列の発現に相関して発現するイントロンベースの配列を含む、請求項 3 2、3 4、または 3 6 のいずれか 1 項に記載のアレイ。

【請求項 4 6】

患者についての個人化されたゲノムプロファイルを作成する方法であって、以下の工程：
(a) 該患者から得られた癌細胞から抽出された R N A を遺伝子発現分析に供する工程；

(b) 以下：

【化 1 3】

VEGFC; B-カテニン; MMP2; MMP9; CNN; FLJ20354; TGFB3;
PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RAD54L; RB1; SURV; EIF4EL3; CYP2C8;
STK15; ACTG2; NEK2; cMet; TIMP2; C20orf1; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A;
VIM; CDC20; ID2; MCM2; CCNB1; MYH11; Chk2; G-カテニン; HER2; GSN; Ki-67;
TOP2A; CCND1; EstR1; KRT18; GATA3; cIAP2; KRT5; RAB27B; IGF1R; HNF3A;
CA9; MCM3; STMY3; NP009; BAD; BBC3; EGFR; CD9; AKT1; CD3z; KRT14;
DKFZp564; Bcl2; BECN1; KLK10; DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx;
CDH1; HLA-DPB1; PR; KRT17; GSTp; IRS1; NFKBp65; IGFBP2; RPS6KB1; DHPS;
TIMP3; ZNF217; KIAA1209; COX2; pS2; BRK; CEGP1; EPHX1; VEGF; TP53BP1;
COL1A1; FGFR1;および CTSL2

からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを決定する工程であって、ここで該発現レベルは、対照遺伝子に対して正規化され、そして必要に応じて、対応する癌参照組織セットにおいて見出された量と比較される、工程；そして

(c) 該遺伝子発現分析によって得られたデータをまとめた報告を作成する工程を包含する、方法。

【請求項 4 7】

前記癌細胞が固形腫瘍から得られる、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

10

20

30

40

50

前記固形腫瘍が、乳癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、膵臓癌、および肺癌からなる群より選択される、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記癌細胞が、固定され、パラフィン包埋された前期腫瘍の生検サンプルから得られる、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 R N A が断片化されている、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記報告が、前記患者に対する処置様式における推奨を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 2】

請求項 5 1 に記載の方法であって、ここで以下の 1 つ以上：

【化 1 4】

MMP9; FLJ20354; RAD54L; SURV; CYP2C8; STK15; NEK2; C20 orf1; CDC20;
MCM2; CCNB1; Chk2; Ki-67; TOP2A; CCND1; EstR1; KRT18; GATA3; RAB27B;
IGF1R; HNF3A; STMY3; NP009; BAD; BBC3; CD9; AKT1; Bcl2; BECN1;
DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx; CDH1; PR; IRS1; NFkBp65; IGFBP2;
RPS6KB1; DHPS; TIMP3; ZNF217; pS2; BRK; CEGP1; EPHX1; TP53BP1; COL1A1;

および FGFR1

またはその対応する発現産物のうちの発現の増加が決定された場合に、前記報告が、前記被検体が化学療法に対して増大した応答の可能性を有するという予測を含む、方法。

【請求項 5 3】

前記患者を化学療法剤で処置する工程をさらに含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記患者が、補助的化学療法に供される、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記患者が、新補助化学療法に供される、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記新補助化学療法が、タキサン誘導体の投与を包含する、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記タキサンが、ドセタキセルまたはパクリタキセルである、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記化学療法が、付加的な抗癌剤の投与をさらに包含する、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記付加的な抗癌剤が、アントラサイクリン系の抗癌剤の一種である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記付加的な抗癌剤がドキソルビシンである、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記付加的な抗癌剤がトポイソメラーゼインヒビターである、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 2】

請求項 5 1 に記載の方法であって、ここで以下の 1 つ以上：

10

20

30

40

【化 1 5】

VEGFC; B-カテニン; MMP2; CNN; TGFB3; PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1;
 RB1; EIF4EL3; ACTG2; cMet; TIMP2; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A; VIM;
 ID2; MYH11; G-カテニン; HER2; GSN; cIAP2; KRT5; CA9; MCM3; EGFR; CD3z;
 KRT14; DKFZp564; KLK10; HLA-DPB1; KRT17; GSTp; KIAA1209; COX2; VEGF;
 および CTSL2

またはその対応する発現産物の発現の増加が決定された場合に、前記報告が、前記被検体が化学療法に対して低下した応答の可能性を有するという予測を含む、方法。

10

【請求項 6 3】

表 3 に列挙される P C R プライマー - プロブセット。

【請求項 6 4】

表 4 に列挙される P C R アンプリコン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(発明の分野)

本発明は、その発現が癌の予後診断において重要な、遺伝子のセットを提供する。特に、本発明は、癌患者が化学療法に対する有益な処置応答を有するか否かを予測するための、有用な遺伝子発現情報を提供する。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

(関連技術の説明)

癌専門医は、彼らに利用可能な多くの処置上の選択肢を有する。これらの選択肢としては、「治療標準」として特徴付けられている化学療法薬と、特定の癌に関する効果を持たないがその癌における有効性の証拠が存在する多くの薬物との、種々の組合せが挙げられる。良好な治療結果の可能性を最大にするには、患者が最適な利用できる癌処置を与えられること、およびこの処置が、診断後可能な限り迅速になされることを必要とする。特に、「治療標準」の化学療法に対する患者の応答を決定することが重要である。なぜなら、化学療法薬（例えば、アントラサイクリンおよびタキサン）は、効力が限られており、かつ毒性だからである。したがって、応答の可能性が最も高い患者もしくは最も低い患者の同定は、より理にかなった患者の選択を経て、提供しなければならないこれらの薬物の正味の利益を増し得、かつ正味の罹患率および毒性を減少させ得る。

30

【0 0 0 3】

現在のところ、治療で使用する診断試験は、単一の検体であり、ゆえに、多くの異なるマーカー間での公知の関係の潜在的価値を捕捉していない。さらに、診断試験は、多くの場合定量的でなく、免疫組織化学に依存している。この方法は、多くの場合、異なる研究室において異なる結果を生じる。これは、一部には、試薬が標準化されていないためであり、一部には、解釈が主観的で、容易に定量化できないからである。RNA ベースの試験は、多くの場合使用されてこなかった。なぜなら、経時的な RNA 分解の問題、および分析対象の患者から新鮮な組織サンプルを得ることが困難であるという事実のためである。固定パラフィン包埋組織は、より容易に入手可能であり、固定組織から RNA を検出するための方法が確立されている。しかし、これらの方法は、代表的に、少量の材料からの多数の遺伝子 (DNA もしくは RNA) の研究を可能にしていない。したがって、伝統的固定組織は、タンパク質の免疫組織化学検出のため以外には、稀にしか使用されてこなかった。

40

【0 0 0 4】

近年、いくつかのグループが、マイクロアレイ遺伝子発現分析による種々の癌の型の分類に関する研究を発表した (例えば、Golubら、Science 286:531 -

50

537 (1999); Bhattacharjاء, Proc Natl. Acad. Sci. USA 98:13790-13795 (2001); Chen-Hsiangら、Bioinformatics 17 (Suppl 1): S316-S322 (2001); Ramaswamyら、Proc Natl. Acad. Sci. USA 98:15149-15154 (2001)を参照のこと)。遺伝子発現パターンに基づくヒト乳癌の特定の分類もまた、報告されている (Martinら、Cancer Res. 60:2232-2238 (2000); Westら、Proc Natl. Acad. Sci. USA 98:11462-11467 (2001); Sorlieら、Proc Natl. Acad. Sci. USA 98:10869-10874 (2001); Yanら、Cancer Res. 61:8375-8380 (2001))。しかし、これらの研究は主に、種々の型の癌 (乳癌が挙げられる) の既に確立された分類を改善および精緻化することに焦点を当てており、そして全般的に、差次的に発現された遺伝子の関係への新しい見識を提供しておらず、かつ癌治療の臨床結果を改善するための処理戦略に対する知見に結び付いていない。

10

20

30

40

50

【0005】

現代の分子生物学および生化学は、その活性が腫瘍細胞の挙動、腫瘍細胞の分化の状態、ならびに腫瘍細胞の特定の治療薬に対する感受性および抵抗性に影響を及ぼす何百もの遺伝子を明らかにしたが、いくつかの例外を除いて、これらの遺伝子の状態は、薬物治療についての臨床的判断を慣習的に行う目的のために開発されてこなかった。1つの明らかな例外は、乳癌における、抗エストロゲン薬 (例えば、タモキシフェン) による処置に供する患者を選択するための、エストロゲンレセプター (ER) タンパク質発現の使用である。他の例外は、乳癌における、Her2アンタゴニスト薬 Herceptin (登録商標) (Genentech, Inc., South San Francisco, CA) を用いる患者を選択するための、ErbB2 (Her2) タンパク質発現の使用である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

近年の進歩にもかかわらず、癌処置への課題は、病原によって区別された腫瘍型に対する特異的処置レジメンを目標とすること、および最大の結果を得るために、腫瘍処置を最終的に個人化することにとどまっている。ゆえに、種々の処置選択肢に対する患者の応答についての予測情報を同時に提供する試験に対する必要性が存在する。これは、その生物学がほとんど理解されていない乳癌について、特にあてはまる。ErbB2陽性下位群、ならびにエストロゲンレセプター (ER) およびいくつかのさらなる転写因子の発現が低い～発現がないことによって特徴付けられる下位群 (Perouら、Nature 406:747-752 (2000)) のようないくつかの下位群への乳癌の分類は、乳癌の細胞および分子の異種性を反映せず、かつ患者の応答を最大限にする処置戦略の設計を可能にしない。

【0007】

乳癌は、米国内の女性の間で最も一般的な癌の型であり、40～59歳の女性の中に癌を原因とする死をもたらしている。したがって、化学療法に応答する患者を予測する臨床的に検証された乳癌試験に対する、特に高い必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

(発明の要旨)

本発明は、化学療法に対する癌 (例えば、乳癌) 患者の応答を予測するのに有用な遺伝子セットを提供する。さらに、本発明は、複数遺伝子のRNA分析を用いた、化学療法に応答する患者を予測する臨床的に有効な癌 (例えば、乳癌) 試験を提供する。本発明は、関連する遺伝子セットにおける全てのマーカーのアッセイのための、保存されたパラフィン包埋生検材料の使用を提供し、したがって、最も広く入手可能な型の生検材料に適合す

る。

【 0 0 0 9 】

一局面において、本発明は、癌と診断された被験体の、化学療法に対する応答を予測するための方法に関する。この方法は、以下の工程を包含する：

上記被験体から得られた癌細胞を包含する生物学的サンプルにおいて、1つ以上の予後診断用RNA転写物またはこれらの発現産物の発現レベルを決定するための工程。ここで、上記予後診断用RNA転写物は、以下からなる群より選択される1つ以上の遺伝子の転写物であり：

【 0 0 1 0 】

【 化 1 6 】

VEGFC; B-カテニン; MMP2; MMP9; CNN;

10

FLJ20354; TGFB3; PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RAD54L; RB1; SURV;

EIF4EL3; CYP2C8; STK15; ACTG2; NEK2; cMet; TIMP2; C20 orf1; DR5; CD31;

BIN1; COL1A2; HIF1A; VIM; CDC20; ID2; MCM2; CCNB1; MYH11; Chk2; G-

カテニン; HER2; GSN; Ki-67; TOP2A; CCND1; EstR1; KRT18; GATA3; cIAP2; KRT5;

RAB27B; IGF1R; HNF3A; CA9; MCM3; STMY3; NPD009; BAD; BBC3; EGFR;

CD9; AKT1; CD3z; KRT14; DKFZp564; Bcl2; BECN1; KLK10; DIABLO; MVP;

VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx; CDH1; HLA-DPB1; PR; KRT17; GSTp; IRS1;

20

NFKBp65; IGFBP2; RPS6KB1; DHPS; TIMP3; ZNF217; KIAA1209; COX2; pS2;

BRK; CEGP1; EPHX1; VEGF; TP53BP1; COL1A1; FGFR1; および CTSL2

ここで、

(a) 以下の 1 つ以上：

【 0 0 1 1 】

【 化 1 7 】

MMP9;

FLJ20354; RAD54L; SURV; CYP2C8; STK15; NEK2; C20 orf1; CDC20; MCM2;

CCNB1; Chk2; Ki-67; TOP2A; CCND1; EstR1; KRT18; GATA3; RAB27B; IGF1R;

30

HNF3A; STMY3; NPD009; BAD; BBC3; CD9; AKT1; Bcl2; BECN1; DIABLO; MVP;

VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx; CDH1; PR; IRS1; NFKBp65; IGFBP2; RPS6KB1;

DHPS; TIMP3; ZNF217; pS2; BRK; CEGP1; EPHX1; TP53BP1; COL1A1; および

FGFR1

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、上記被験体が、増大した応答の可能性を有すると予測され：そして

(b) 以下の 1 つ以上：

【 0 0 1 2 】

40

【 化 1 8 】

VEGFC;

B-カテニン; MMP2; CNN; TGFB3; PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RB1;

EIF4EL3; ACTG2; cMet; TIMP2; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A; VIM; ID2;

MYH11; G-カテニン; HER2; GSN; cIAP2; KRT5; CA9; MCM3; EGFR; CD3z; KRT14;

DKFZp564; KLK10; HLA-DPB1; KRT17; GSTp; KIAA1209; COX2; VEGF; および

CTSL2

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、上記被験体が、低

50

下した応答の可能性を有すると予測される。

【 0 0 1 3 】

特定の実施形態において、応答は臨床応答であり、上記予後診断用 R N A 転写物は、以下からなる群より選択される遺伝子のうちの 1 つ以上の転写物であり、

【 0 0 1 4 】

【 化 1 9 】

CCND1; EstR1;

KRT18; GATA3; cIAP2; KRT5; RAB27B; IGF1R; HNF3A; CA9; MCM3; STMY3;
NPD009; BAD; BBC3; EGFR; CD9; AKT1; CD3z; KRT14; DKFZp564; Bcl2; BECN1;
KLK10; DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx; CDH1; HLA-DPB1; PR;
KRT17; GSTp; IRS1; NFKBp65; IGFBP2; RPS6KB1; DHPS; TIMP3; ZNF217;
KIAA1209; COX2; pS2; BRK; CEGP1; EPHX1; VEGF; TP53BP1; COL1A1; FGFR1;

10

および CTSL2

そして、

(a) 以下の 1 つ以上 :

【 0 0 1 5 】

【 化 2 0 】

CCND1;

20

EstR1; KRT18; GATA3; RAB27B; IGF1R; HNF3A; STMY3; NPD009; BAD; BBC3;
CD9; AKT1; Bcl2; BECN1; DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx; CDH1;
PR; IRS1; NFKBp65; IGFBP2; RPS6KB1; DHPS; TIMP3; ZNF217; pS2; BRK;
CEGP1; EPHX1; TP53BP1; COL1A1; および FGFR1

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、上記被験体が、増大した臨床応答の可能性を有すると予測され : そして

(b) 以下の 1 つ以上 :

【 0 0 1 6 】

30

【 化 2 1 】

cIAP2;

KRT5; CA9; MCM3; EGFR; CD3z; KRT14; DKFZp564; KLK10; HLA-DPB1; KRT17;
GSTp; KIAA1209; COX2; VEGF; および CTSL2

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、上記被験体が、低下した臨床応答の可能性を有すると予測される。

【 0 0 1 7 】

別の実施形態において、上記応答は病理性応答であり、上記予後診断用 R N A 転写物は、以下からなる群より選択される遺伝子のうちの 1 つ以上の転写物であり、

40

【 0 0 1 8 】

【 化 2 2 】

VEGFC; B-

カテニン; MMP2; MMP9; CNN; FLJ20354; TGFB3; PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1;
RIZ1; RAD54L; RB1; SURV; EIF4EL3; CYP2C8; STK15; ACTG2; NEK2; cMet;
TIMP2; C20 orf1; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A; VIM; CDC20; ID2; MCM2;
CCNB1; MYH11; Chk2; G-カテニン; HER2; GSN; Ki-67; TOP2A

そして、

50

(a) 以下の 1 つ以上 :

【 0 0 1 9 】

【 化 2 3 】

MMP9;

FLJ20354; RAD54L; SURV; CYP2C8; STK15; NEK2; C20 orf1; CDC20; MCM2;

CCNB1; Chk2; Ki-67; TOP2A

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、上記被験体が、増大した病原性応答の可能性を有すると予測され : そして

(b) 以下の 1 つ以上 :

【 0 0 2 0 】

【 化 2 4 】

VEGFC;

B-カテニン ; MMP2; CNN; TGFB3; PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RB1;

EIF4EL3; ACTG2; cMet; TIMP2; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A; VIM; ID2;

MYH11; G-カテニン ; HER2; GSN.

またはその対応する発現産物の、あらゆる単位の発現の増加に対して、上記被験体が、低下した病原性応答の可能性を有すると予測される。

【 0 0 2 1 】

本方法の特定の実施形態において、少なくとも 2、もしくは少なくとも 5、もしくは少なくとも 10、もしくは少なくとも 15 の予測用 RNA 転写物、またはそれらの発現産物の発現レベルが予測される。

【 0 0 2 2 】

別の実施形態において、RNA は、上記被験体の、固定されたパラフィン包埋癌組織標本から得られる。この被験体は、好ましくは、ヒト被験体である。

【 0 0 2 3 】

上記癌は、任意の種類の癌であり得、これらの癌は、例えば、乳癌、卵巣癌、胃癌、結腸直腸癌、膵臓癌、前立腺癌、および肺癌を包含し、特に、乳癌（例えば、浸潤性乳癌）を包含する。

【 0 0 2 4 】

別の局面において、本発明は、固体表面上に固定された以下の遺伝子の 1 つ以上にハイブリダイズしたポリヌクレオチドを含むアレイに関する :

【 0 0 2 5 】

【 化 2 5 】

VEGFC; B-カテニン ; MMP2; MMP9; CNN; FLJ20354; TGFB3;

PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RAD54L; RB1; SURV; EIF4EL3; CYP2C8;

STK15; ACTG2; NEK2; cMet; TIMP2; C20 orf1; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A;

VIM; CDC20; ID2; MCM2; CCNB1; MYH11; Chk2; G-カテニン ; HER2; GSN; Ki-67;

TOP2A; CCND1; EstR1; KRT18; GATA3; cIAP2; KRT5; RAB27B; IGF1R; HNF3A;

CA9; MCM3; STMY3; NP009; BAD; BBC3; EGFR; CD9; AKT1; CD3z; KRT14;

DKFZp564; Bcl2; BECN1; KLK10; DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx;

CDH1; HLA-DPB1; PR; KRT17; GSTp; IRS1; NFkBp65; IGFBP2; RPS6KB1; DHPS;

TIMP3; ZNF217; KIAA1209; COX2; pS2; BRK; CEGP1; EPHX1; VEGF; TP53BP1;

COL1A1; FGFR1;および CTSL2

。

【 0 0 2 6 】

なお別の局面において、本発明は、固体表面上に固定された以下の遺伝子の1つ以上にハイブリダイズしたポリヌクレオチドを含むアレイに関する：

【0027】

【化26】

CCND1; EstR1; KRT18; GATA3; cIAP2; KRT5; RAB27B; IGF1R;
HNF3A; CA9; MCM3; STMY3; NPD009; BAD; BBC3; EGFR; CD9; AKT1; CD3z;
KRT14; DKFZp564; Bcl2; BECN1; KLK10; DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3; MDM2;
Bclx; CDH1; HLA-DPB1; PR; KRT17; GSTp; IRS1; NFKBp65; IGFBP2; RPS6KB1;
DHPS; TIMP3; ZNF217; KIAA1209; COX2; pS2; BRK; CEGP1; EPHX1; VEGF;
TP53BP1; COL1A1; FGFR1;およびCTSL2

10

。

【0028】

さらなる実施形態において、本発明は、固体表面上に固定された以下の遺伝子の1つ以上にハイブリダイズしたポリヌクレオチドを含むアレイに関する：

【0029】

【化27】

VEGFC; B-カテニン; MMP2; MMP9; CNN; FLJ20354; TGFB3;
PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RAD54L; RB1; SURV; EIF4EL3; CYP2C8;
STK15; ACTG2; NEK2; cMet; TIMP2; C20 orf1; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A;
VIM; CDC20; ID2; MCM2; CCNB1; MYH11; Chk2; G-カテニン; HER2; GSN; Ki-67;
TOP2A

20

。

【0030】

全ての実施形態において、上記アレイは、上記列挙された遺伝子にハイブリダイズした複数のポリヌクレオチドを含む。ここで、「複数」とは、1つ以上の任意の数を意味する。上記ポリヌクレオチドは、イントロンベースの配列を含み得、その発現は、対応するエキソンの発現に相関する。

30

【0031】

全ての局面において、上記ポリヌクレオチドは、代表的に、約500～5000塩基長のcDNA(“cDNAアレイ”)であり得る。しかし、より短いdDNAもしくはより長いcDNAもまた使用可能であり、これらも本発明の範囲内である。あるいは、上記ポリヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド(DNAマイクロアレイ)であり得、このオリゴヌクレオチドは、代表的に、約20～80塩基長であり得る。しかしより短いオリゴヌクレオチドもしくはより長いオリゴヌクレオチドもまた適当であり、これらも本発明の範囲内である。固体表面は、例えば、ガラスもしくはナイロンであるか、またはアレイ(例えば、マイクロアレイ)を調製するために代表的に使用される任意の他の固体表面であり得、そして代表的には、ガラスである。ハイブリダイゼーションは、代表的に、ストリンジェント条件下で実施されるか、または中間的にストリンジェントな条件下で実施される。種々の実施形態において、上記アレイは、上記に列挙された遺伝子のうちの少なくとも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などにハイブリダイズしたポリヌクレオチドを含む。あれ以上に存在する遺伝子から選択される任意の数の遺伝子への、任意の組合せでのハイブリダイゼーションが包含される。

40

【0032】

別の局面において、本方法は、患者についての個人化された遺伝子プロファイルを作成する方法に関する。この方法は、以下の工程を包含する。

(a) 上記患者から得られた癌細胞から抽出されたRNAを、遺伝子発現分析に供する工

50

程；

(b) 以下からなる群より選択される遺伝子うちの少なくとも一つの発現レベルを決定する工程：

【0033】

【化28】

VEGFC; B-カテニン; MMP2; MMP9; CNN; FLJ20354; TGFB3;
PDGFRb; PLAUR; KRT19; ID1; RIZ1; RAD54L; RB1; SURV; EIF4EL3; CYP2C8;
STK15; ACTG2; NEK2; cMet; TIMP2; C20orf1; DR5; CD31; BIN1; COL1A2; HIF1A;
VIM; CDC20; ID2; MCM2; CCNB1; MYH11; Chk2; G-カテニン; HER2; GSN; Ki-67;
TOP2A; CCND1; EstR1; KRT18; GATA3; cIAP2; KRT5; RAB27B; IGF1R; HNF3A;
CA9; MCM3; STMY3; NP009; BAD; BBC3; EGFR; CD9; AKT1; CD3z; KRT14;
DKFZp564; Bcl2; BECN1; KLK10; DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3; MDM2; Bclx;
CDH1; HLA-DPB1; PR; KRT17; GSTp; IRS1; NFKBp65; IGFBP2; RPS6KB1; DHPS;
TIMP3; ZNF217; KIAA1209; COX2; pS2; BRK; CEGP1; EPHX1; VEGF; TP53BP1;
COL1A1; FGFR1;およびCTSL2

10

ここで、上記発現レベルは、対照遺伝子（単数もしくは複数）に対して正規化され、そして必要に応じて、対応する癌参照組織セットにおいて見出された量と比較される。

20

(c) 上記遺伝子発現分析によって得られたデータをまとめた報告を作成する工程。

【0034】

胸部組織は、乳癌細胞を含み得、そしてそのRNAは、この組織の解剖された部分の、このような乳癌細胞が豊富な部分から得ることができる。対照遺伝子としては、例えば、任意の公知の参照遺伝子を使用され得る。これらの遺伝子としては、例えば、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、 α -アクチン、U-s n R N P 関連シクロフィリン (U S A - C Y P)、およびリボゾームタンパク質 L P O が挙げられる。あるいは、試験された遺伝子セットの全シグナルの総量の間での差異を補正することによって正規化が行われ得る（全体正規化法 (global normalization strategy)）。上記報告は、上記患者の処置結果についての予後診断を含み得る。本方法は、さらに、良好な予後診断が示された場合に上記被験体（例えば、ヒト被験体）を処置する工程を包含し得る。

30

【0035】

さらなる局面において、本発明は、表3に列挙されたPCRプライマー-プローブセット、および表4に列挙されたPCRアンプリコンに関する。

【0036】

(図面の簡単な説明)

表1は、遺伝子のリストである。これらの遺伝子の発現は、化学療法剤アドリアマイシンおよびタキサンに対する乳癌の応答と正もしくは負の相関がある。遡及的な治験からの結果。病理学的応答指標による二元的統計分析。

40

【0037】

表2は、遺伝子のリストである。これらの遺伝子の発現は、化学療法剤アドリアマイシンおよびタキサンに対する乳癌の応答と正もしくは負の相関がある。遡及的な治験からの結果。臨床応答指標による二元的統計分析。

【0038】

表3は、遺伝子のリストである。これらの遺伝子の発現は、化学療法に対する乳癌の応答を予測する。遡及的な治験からの結果。この表は、遺伝子についての受託番号、そしてPCR増幅に使用されたフォワードプライマーおよびリバースプライマーの配列（それぞれ、「f」および「r」で示される）ならびにプローブの配列（「p」で示される）を含

50

む。

【0039】

表4は、表示された遺伝子のPCR増幅に使用されたアンプリコン配列を示す。

【0040】

(詳細な説明)

(A. 定義)

他に定義されない限り、本明細書において使用される科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。Singtongら、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (第2版), J. Wiley & Sons (New York, NY 1994)、およびMarch, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure (第4版), John Wiley & Sons (New York, NY 1992)は、本出願に使用される多くの用語に対する一般的指針を当業者に提供する。

10

【0041】

当業者は、本発明の実施に使用され得る、本明細書において記載される方法および材料と類似もしくは等価な、多くの方法および材料を認識する。実際、本発明は、記載された方法および材料に決して制限されない。本発明の目的のために、以下の用語が、下記で定義される。

【0042】

用語「マイクロアレイ」とは、基材上の、ハイブリダイゼーション可能なアレイ要素(好ましくはポリヌクレオチドプローブ)の秩序正しい配列を指す。

20

【0043】

用語「ポリヌクレオチド」とは、単数もしくは複数で使用される場合、一般的に、ポリリボヌクレオチドもしくはポリデオキシリボヌクレオチドを指し、これらは、非改変RNAもしくは非改変DNA、または改変RNAもしくは改変DNAであり得る。したがって、例えば本明細書において定義される場合、ポリヌクレオチドとしては、1本鎖および2本鎖DNA、1本鎖領域および2本鎖領域を含むDNA、1本鎖および2本鎖RNA、ならびに1本鎖領域および2本鎖領域を含むRNA、DNAおよびRNAを含むハイブリッド分子(これは、1本鎖であり得、より代表的には2本鎖であり得、または1本鎖領域および2本鎖領域を含む)が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、用語「ポリヌクレオチド」とは、本明細書中で使用される場合、DNAもしくはRNA、またはその両方を含む3本鎖領域を指す。このような領域中の鎖は、同じ分子由来であり得るか、または異なる分子由来であり得る。この領域は、上記分子の一つ以上の全てを含み得るが、より代表的には、その分子の一部の領域のみを含む。3重螺旋領域の分子の1つは、多くの場合、オリゴヌクレオチドである。用語「ポリヌクレオチド」としては、具体的には、cDNAが挙げられる。この用語は、1つ以上の改変された塩基を含むDNA(cDNAを含む)およびRNAを包含する。したがって、安定性または他の理由のために改変された骨格を有するDNAまたはRNAは、本明細書において意図される用語としての「ポリヌクレオチド」である。さらに、通常でない塩基(例えば、イノシンもしくはトリチウム塩基のような改変塩基)を含有するDNAまたはRNAは、本明細書において定義される用語「ポリヌクレオチド」のうちに含まれる。一般的に、用語「ポリヌクレオチド」は、非改変ポリヌクレオチドの化学的、酵素的、および/または代謝性に改変された形態の全て、ならびにウイルスおよび細胞(単純細胞および複雑細胞を含む)に特有のDNAおよびRNAの化学形態を包含する。

30

40

【0044】

用語「オリゴヌクレオチド」とは、比較的短いポリヌクレオチドを指し、これらとしては、1本鎖デオキシリボヌクレオチド、1本鎖もしくは2本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッド、ならびに2本鎖DNAが挙げられるが、これらに限定されない。オリゴヌクレオチド(例えば、1本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチド)は、多くの場

50

合、化学的方法（例えば、市販の自動オリゴヌクレオチド合成機）によって合成される。しかし、オリゴヌクレオチドは、他の種々の方法（インビトロ組み換えDNAを介した技術が挙げられる）ならびに細胞および生体中におけるDNA発現によって合成され得る。

【0045】

用語「差次的に発現される遺伝子」、「差次的遺伝子発現」およびそれらの同義語は、本明細書において交換可能に使用されて、その発現が、正常被験体もしくは対照被験体における発現と比較して、疾患（特に、癌、例えば乳癌）に罹患する被験体内においてより高いレベルもしくはより低いレベルへと活性化される遺伝子を指す。この用語はまた、その発現が、同じ疾患の異なる病期においてより高いレベルもしくはより低いレベルへと活性化される遺伝子を指す。差次的に発現される遺伝子が、核酸レベルもしくはタンパク質レベルで活性化されるか阻害されるかのいずれかであり得、また異なるポリペプチド産物を生じる代替的スプライシングに供され得ることもまた理解される。このような差は、例えば、mRNAレベル、ポリペプチドの表面発現、分泌、または他の区分の変化によって証明され得る。差次的遺伝子発現は、2以上の遺伝子間もしくはそれらの遺伝子産物間での発現の比較、または2以上の遺伝子間もしくはそれらの遺伝子産物間での発現の比の比較、さらに同じ遺伝子の、異なる処理をされた2つの産物の比較を包含し得る。これらは、正常被験体と疾患（特に、癌）に罹患した被験体との間、または同じ疾患の異なる病期の間で異なる。差次的発現は、例えば、正常細胞と疾患細胞との間、または異なる疾患事象もしくは疾患の病期にある細胞間での、遺伝子もしくはその発現産物における定量的および定性的な、時間的もしくは細胞の発現パターンにおける差を包含する。本発明の目的に関して、「差次的遺伝子発現」は、正常被験体と疾患被験体における所与の遺伝子の発現の間、または疾患被験体の疾患発症の種々の病期において、少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約4倍、より好ましくは少なくとも約6倍、最も好ましくは少なくとも約10倍の差が存在することであるとみなされる。

【0046】

語句「遺伝子増幅」とは、複数の遺伝子もしくは遺伝子フラグメントのコピーが特定の細胞もしくは細胞株中で形成されるプロセスを指す。重複領域（増幅されたDNAの伸長部分）は、多くの場合、「アンプリコン」と呼ばれる。通常、生成されたメッセンジャーRNA（mRNA）の量（すなわち、遺伝子発現のレベル）もまた、発現された特定の遺伝子からなるコピーの数に比例して、増加する。

【0047】

RNA転写物に関する用語「過剰発現」は、参照mRNA（標本中で測定された転写物の全て、またはmRNAの特定の参照セットであり得る）のレベルに対して正規化することで決定される転写物の量を指すために使用される。

【0048】

用語「予後判定」とは、本明細書中では、新生物疾患（例えば、乳癌）の再発、転移性拡散および薬物耐性を含む癌に起因する死または経過の可能性の予測をいう。用語「予測」とは、本明細書中では、患者が薬物または一連の薬物に対して、好都合に、または好ましくなく、応答する可能性をいうため、およびその応答の程度をいうためか、または初期腫瘍の外科的除去および/もしくは化学治療の後、特定の期間癌の再発がなく、患者が生存する可能性をいうために使用される。本発明の予測方法は、任意の特定の患者に対する最も適切な処置様式を選択することにより処置判断を行うために臨床的に使用され得る。本発明の予測方法は、患者が、処置レジメン（例えば、外科的介入、所定の薬物もしくは薬物の組合せを用いた化学療法および/または放射線療法）に好都合に応答するか否かを予測するのに、あるいは、外科手術後および/または化学療法もしくは他の処置様式の終結後、患者の長期生存が有望か否かを予測するのに有用なツールである。

【0049】

用語「長期」生存とは、本明細書中では、外科手術または他の処置後、少なくとも3年間、好ましくは少なくとも8年間、最も好ましくは少なくとも10年間生存することをいう。

【 0 0 5 0 】

用語「腫瘍」とは、本明細書中で使用される場合、悪性であっても良性であってもよいが、全ての新生物細胞成長および細胞増殖、ならびに、全ての前癌および癌の細胞および組織をいう。

【 0 0 5 1 】

用語「癌」および「癌性」とは、調節されていない細胞成長によって代表的に特徴付けられる哺乳動物における生理学的条件をいうか、またはそれらを記載する。癌の例としては、乳癌、結腸直腸癌、肺癌、前立腺癌、肝細胞癌、胃癌、膵臓癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路の癌、甲状腺癌、腎臓癌、癌腫、黒色腫、および脳癌が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【 0 0 5 2 】

癌の「病理」は、患者の健康を損なう全ての減少を含む。これらとしては、限定せずに、異常な細胞成長もしくは制御されていない細胞成長、転移、周辺の細胞の正常な機能の妨害、異常なレベルでのサイトカインまたは他の分泌産物の放出、炎症反応または免疫応答の抑制または悪化、腫瘍形成、前悪性、悪性、周囲もしくは離れた組織もしくは器官（例えば、リンパ節など）への浸潤が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

「患者の応答」は、患者に対して利益を示す任意の終点を用いて評価され得、これらとしては、限定せずに、以下：（１）成長の遅延および完全な停止を示すことを含む腫瘍成長のある程度までの阻害；（２）腫瘍細胞の数の減少；（３）腫瘍の大きさの減少；（４）隣接する周辺器官および／または組織への腫瘍細胞の浸潤の阻害（すなわち、減少、遅延または完全な停止）；（５）転移の阻害（すなわち、減少、遅延または完全な停止）；（６）抗腫瘍免疫応答の増強、これは、そうでなくてもよいが、腫瘍の後退または排除を生じ得る；（７）腫瘍に関連する一種異常の症状のある程度までの軽減；（８）処置後の生存の長さの増加；および／または（９）処置後所定の時点での死亡率の減少が挙げられる。

20

【 0 0 5 4 】

用語「（リンパ）節陰性」癌（例えば、「（リンパ）節陰性」乳癌）とは、本明細書中で使用される場合、リンパ節に拡散しない癌をいう。

【 0 0 5 5 】

用語「遺伝子発現プロファイリング」とは、最も広い意味で使用され、生物学的サンプルにおける mRNA レベルおよび／またはタンパク質レベルの定量的方法を含む。

30

【 0 0 5 6 】

「新補助（neoadjuvant）療法」は、初期の（主要な）治療の前に行なわれる付属的な、または補助的な治療である。新補助療法としては、例えば、化学療法、放射線療法およびホルモン療法が挙げられる。従って、化学療法は、腫瘍を縮小するための外科手術の前に施され得る、従って、外科手術は、より効果的になり得るか、以前には手術不可能な腫瘍の場合に、手術が可能になり得る。

【 0 0 5 7 】

用語「癌に関連する生物学的機能」とは、本明細書中では、宿主に対して癌の成功に影響する分子活性をいうのに使用され、その活性としては、限定せずに、細胞増殖、プログラム細胞死（アポトーシス）、分化、浸潤、転移、腫瘍抑制、免疫監視機構に対する感受性、新脈管形成、不死の維持または獲得を調節する活性が挙げられる。

40

【 0 0 5 8 】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、概して、プローブの長さ、洗浄温度および塩濃度に依存する経験的な計算である。概して、より長いプローブは、適切なアニーリングのためにより高い温度を必要とするのに対して、より短いプローブは、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは概して、その融解温度以下の環境で、相補的な鎖が存在する場合、変性した DNA の再アニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所

50

望の相同性の程度が高ければ、使用され得る相対的な温度はより高くなる。結果として、相対的に高い温度は、反応条件をよりストリンジェントにする傾向があり、相対的に低い温度は、あまりそうではない傾向がある。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーのさらなる詳細および説明については、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology、Wiley Interscience Publishers (1985)を参照のこと。

【0059】

本明細書中で定義される「ストリンジェントな条件」または「高いストリンジェンシーの条件」は代表的に、以下：(1)洗浄に低イオン強度および高温を使用する(例えば、50℃で、0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム)；(2)ハイブリダイゼーションの間に、変性剤(例えば、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%Ficoll/0.1%ポリビニルピロリドン/750mM塩化ナトリウムでpH6.5にした50mMリン酸ナトリウム緩衝液、含む50%(v/v)ホルムアミドなどのホルムアミド)、75mMクエン酸ナトリウムを42℃で使用する；または(3)50%ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×Denhardt溶液、超音波処理したサケ精子DNA(50μg/ml)、0.1%SDSおよび10%硫酸デキストランを42℃で使用し、42℃で0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)および55℃で50%ホルムアミドで洗浄し、その後、55℃で、EDTAを含有する0.1×SSCからなる高ストリンジェンシーの洗浄を行なう。

【0060】

「中程度のストリンジェントな条件」は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、New York: Cold Spring Harbor Press、1989に記載されるとおりに特定され、上記よりストリンジェントではない洗浄溶液およびハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度およびSDS%)の使用を包含する。中程度のストリンジェントな条件の例は、以下：20%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH7.6)、5×Denhardt溶液、10%硫酸デキストランおよび20mg/mlの変性し、剪断したサケ精子DNAを含有する溶液中での37℃での一晚のインキュベーション、その後、約37~50℃での1×SSC中でのフィルターの洗浄である。当業者は、プローブ長などのような因子を適応させるために必要な温度、イオン強度などをどのように調節するかを理解する。

【0061】

本発明の文脈において、任意の特定の遺伝子セットに列挙した遺伝子の「少なくとも1つ」、「少なくとも2つ」、「少なくとも5つ」などの言及は、列挙した遺伝子の任意の一つ、または任意の数および全ての組合せを意味する。

【0062】

遺伝子転写産物または遺伝子発現産物に関して、用語「正規化された」とは、一連の参照遺伝子の転写産物/発現産物の平均レベルに比較した転写産物または遺伝子発現産物のレベルをいい、ここで、参照遺伝子は、患者、組織または処置を通した最小限の変化に基づいて選択される(「ハウスキーピング遺伝子」)か、または参照遺伝子は、試験した遺伝子の全体である。後者の場合、それは、一般に「全体的正規化」といわれ、試験した遺伝子の総数が、比較的大きいこと、好ましくは50より大きいことが重要である。特に、RNA転写産物に関して用語「正規化された」とは、一連の参照遺伝子の転写レベルの平均に対する転写レベルをいう。より詳細には、TaqaMan(登録商標)RT-PCRにより測定したRNA転写産物の平均レベルは、Ct値から一連の参照遺伝子転写産物の平均Ct値を引いたものをいう。

【0063】

用語「発現閾値」および「規定された発現閾値」は、相互変換可能に使用され、どの遺伝子または遺伝子産物が、患者の薬物に対する応答または耐性についての予測マーカーとして役立つかという上記問題における遺伝子または遺伝子産物のレベルをいう。閾値は、代表的に、臨床研究から実験的に定義される。発現閾値は、最大感受性（例えば、薬物に対する全ての応答者を検出するため）または最大選択性（例えば、薬物に対する応答者のみを検出するため）または最少誤差のいずれかについて選択され得る。

【0064】

（B．詳細な説明）

本発明の実施は、他に示されない限り、従来の分子生物学の技術（組換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学および生化学を使用し、これらは、当業者の範囲内である。このような技術は、文献、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」、第2版（Sambrookら、1989）；「Oligonucleotide Synthesis」（M. J. Gait編、1984）；「Animal Cell Culture」（R. I. Freshney編、1987）；「Methods in Enzymology」（Academic Press, Inc.）；「Handbook of Experimental Immunology」、第4版（D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、Blackwell Science Inc., 1987）；「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」（J. M. MillerおよびM. P. Calos編、1987）；「Current Protocols in Molecular Biology」（F. M. Ausubelら編、1987）および「PCR: The Polymerase Chain Reaction」（Mullisら編、1994）中に十分に説明される。

【0065】

（1．遺伝子発現プロファイリング）

遺伝子発現プロファイリングの方法としては、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション分析に基づいた方法、ポリヌクレオチドの配列決定に基づいた方法、およびプロトミクスに基づいた方法が挙げられる。サンプル中のmRNA発現の定量についての当該分野で公知の最も一般的に使用される方法としては、ノーザンブロットングおよびインサイチュハイブリダイゼーション（ParkerおよびBarnes、Methods in Molecular Biology 106: 247~283 (1999)）；RNAse保護アッセイ（Hod、Biotechniques 13: 852~854 (1992)）；およびPCRに基づいた方法（例えば、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）（Weisら、Trends in Genetics 8: 263~264 (1992)）が挙げられる。あるいは、特定の2本鎖（DNA 2本鎖、RNA 2本鎖およびDNA-RNAハイブリッド2本鎖またはDNA-タンパク質2本鎖を含む）を認識し得る抗体が使用され得る。配列決定に基づいた遺伝子発現分析のための代表的な方法としては、遺伝子発現の連続分析（Serial Analysis of Gene Expression）（SAGE）、および大規模平行シグネチャー配列決定（massively parallel signature sequencing）（MPSS）による遺伝子発現分析が挙げられる。

【0066】

（2．PCRに基づいた遺伝子発現プロファイル法）

（a．逆転写PCR（RT-PCR））

最も感度が良く、最も適応性のある定量的PCRベースの遺伝子発現プロファイル法の一つは、RT-PCRであり、この方法は、遺伝子発現のパターンを特徴付けるために、密接に関連したmRNA間を識別するために、およびRNA構造を分析するために、異なるサンプル集団（正常組織と腫瘍組織、薬物処理ありまたはなし）におけるmRNAレベルを比較して使用され得る。

【0067】

第一の工程は、標的サンプルからのmRNAの単離である。出発物質は、代表的に、ヒト腫瘍または腫瘍細胞株、およびそれぞれに対応する正常組織または正常細胞株から単離された総RNAである。従って、RNAは、健全なドナーからプールしたDNAを有する種々の一次腫瘍（乳房、肺、結腸直腸、前立腺、脳、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、精巣、卵巣、子宮などの腫瘍または腫瘍細胞株を含む）から単離され得る。mRNAの源が、一次腫瘍である場合、mRNAは、例えば、凍結するか、保管したパラフィン包埋して固定した（例えば、ホルマリン固定した）組織サンプルから抽出され得る。

【0068】

mRNA抽出に対する一般的方法は、当該分野で周知であって、分子生物学の標準的な教科書（Ausubelら、Current Protocols of Molecular Biology、John Wiley and Sons（1997））に開示される。パラフィン包埋組織からRNAを抽出するための方法は、例えば、RuppおよびLocker、Lab Invest. 56: A67（1987）およびDe Andresら、BioTechniques 18: 42044（1995）に開示される。特に、RNA単離は、例えば、Qiagenから市販される精製キット、緩衝液セットおよびプロテアーゼを使用して、製造者の指示書に従って行われ得る。例えば、培養した細胞由来の前RNAは、Qiagen RNeasyミニカラムを使用して単離され得る。他の市販の利用可能なRNA単離キットとしては、MasterPureTM Complete DNA and RNA Purification Kit（EPICE NTRE（登録商標）、Madison、WI）およびParaffin Block RNA Isolation Kit（Ambion、Inc.）が挙げられる。組織サンプル由来の総RNAは、RNA Stat-60（Tel-Test）を使用して単離され得る。腫瘍から調製したRNAは、例えば、塩化セシウム密度勾配遠心分離によって単離され得る。

【0069】

RNAは、PCRのためのテンプレートとしての役目を果たさないので、RT-PCRによる遺伝子発現プロファイリングにおける第一工程は、RNAテンプレートのcDNAへの逆転写、その後のPCR反応におけるその指数関数的な増加である。2つの最も一般的に使用される逆転写酵素は、avilo myeloblastosisウイルス逆転写酵素（AMV-RT）およびMoloneyマウス白血病ウイルス逆転写酵素（MMLV-RT）である。逆転写工程は、代表的に、発言プロファイリングの状況および目的に依存して、特定のプライマー、ランダムヘキサマーまたはオリゴdTプライマーを用いてプライミングされる。例えば、抽出されたRNAは、製造者の指示書に従って、Gene Amp RNA PCRキット（Perkin Elmer、CA、USA）を使用して逆転写され得る。次いで、生成されたcDNAは、その後のPCR反応においてテンプレートとして使用され得る。

【0070】

PCR工程は、種々の熱安定性のDNA依存性DNAポリメラーゼを使用し得るが、代表的にTaq DNAポリメラーゼを使用する。これは、5'-3'ヌクレアーゼ活性を有するが、3'-5'校正エンドヌクレアーゼ活性は欠如する。従って、TaqMan（登録商標）PCRは、代表的に、その標的アンプリコンに結合したハイブリダイゼーションプローブにハイブリダイズするTaqポリメラーゼまたはTthポリメラーゼまたはTthポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性を利用するが、等価な5'ヌクレアーゼ活性を有する任意の酵素が使用され得る。PCR反応の代表的なアンプリコンを生成するために、2つのオリゴヌクレオチドプライマーが使用される。第3のオリゴヌクレオチドまたはプローブは、2つのPCRプライマーの間に位置するヌクレオチド配列を検出するように設計される。このプローブは、Taq DNAポリメラーゼ酵素により伸長されず、レポーター蛍光色素およびクエンチャー蛍光色素で標識される。レポーター色素からの任意のレーザー誘導性発光は、2つの色素が、それらがプローブ上に存在し、近接して位置する場合、色素をクエンチすることによりクエンチされる。増幅反応の間、Taq DNAポ

リメラーゼ酵素は、テンプレート依存様式でプローブを切断する。生じたプローブフラグメントは、溶液中で解離し、放出されたレポーター色素からのシグナルは、第2のフルオロフォアのクエンチ効果を受けない。レポーター色素の一分子は、合成された各新規分子を解放し、クエンチされていないリポーター色素の検出は、データの定量的解釈のための根拠を提供する。

【0071】

Taqman (登録商標) RT-PCRは、市販の装置(例えば、ABI PRISM 7700TM Sequence Detection SystemTM (Perkin-Elmer-Applied Biosystems、Foster City、CA、USA)またはLightcycler (Roche Molecular Bioc hemicals、Mannheim、Germany))を使用して行われ得る。好ましい実施形態において、5'ヌクレアーゼ手順を、リアルタイム定量PCRデバイス(例えば、ABI PRISM 7700TM Sequence Detection SystemTM)で行なう。このシステムは、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合素子(CCD)カメラおよびコンピュータからなる。このシステムは、サーモサイクラー上で、96ウェル形式でサンプルを増幅する。増幅の間、レーザー誘導性蛍光シグナルは、光ファイバーケーブルを通して、96個の全てのウェルに対してリアルタイムで収集され、CCDで検出される。このシステムは、機器を作動させ、データを分析するためのソフトウェアを備える。

10

【0072】

5'ヌクレアーゼアッセイデータは、最初にCt、すなわち閾値周期として表される。上で議論されたように、蛍光値は、全ての周期の間記録され、増幅反応のその時点までに増幅された生成物の量を表す。蛍光シグナルが、統計的に有意として最初に記録される点は、閾値周期(Ct)である。誤差およびサンプル-サンプルの偏差の効果を最小化するために、RT-PCRは通常内標を用いて実施される。同一の内標は、異なる組織の間で一定のレベルで発現され、実験処理によって影響を受けない。遺伝子発現のパターンを正規化するために最も頻繁に使用されるRNAは、ハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)および-アクチンに対するmRNAである。

20

【0073】

RT-PCR技術のより最近の変化は、リアルタイム定量PCRであり、これは、二重標識蛍光(fluorogenic)プローブ(すなわち、TaqMan(登録商標)プローブ)を介してPCR産物蓄積を測定する。リアルタイムPCRは、定量的拮抗PCRに適合性であり、ここで、各標的配列に対する内部コンペティターは正規化のために使用され、そして、定量的比較PCRに適合性であり、定量的比較PCRは、サンプル中に含まれる正規化遺伝子またはRT-PCRのためのハウスキーピング遺伝子を使用する。さらなる詳細については、例えば、Heldら、Genome Research 6: 986~994(1996)を参照のこと。

30

【0074】

(b. Mass ARRAYシステム)

Sequenom, Inc. (San Diego, CA)によって開発されたMass ARRAYベースの遺伝子発現プロファイリング方法において、RNAの単離および逆転写の後に、得られたcDNAを合成DNA分子(コンペティター)でスパイク(spike)する。この合成DNA分子は、一つの塩基を除いて全ての位置で標的化cDNA領域に適合し、内標として役立つ。cDNA/コンペティター混合物をPCR増幅し、PCR後シュリンブアルカリホスファターゼ(SAP)酵素処理に供し、それにより、残るヌクレオチドの脱リン酸化を生じる。アルカリホスファターゼの不活性化後、コンペティター由来のPCR産物およびcDNAをプライマー伸長に供し、それにより、コンペティターに由来するPCR産物およびcDNAに由来するPCR産物に対する異なる量のシグナルが生じる。精製後、これらのサンプルを、チップアレイに分配し、これを、マトリック

40

50

ス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF MS)を用いた分析に必要な成分で前処理する。次いで、この反応に存在するcDNAは、生成した質量分析におけるピーク面積の比を分析することにより定量化される。さらなる詳細については、例えば、DingおよびCantor、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100:3059~3064(2003)を参照のこと。

【0075】

(c. 他のPCRに基づいた方法)

さらなるPCRに基づいた技術としては、例えば、ディファレンシャルディスプレイ(LiangおよびPardee、Science 257:967~971(1992))；増幅断片長多型(iAFLP)(Kawamotoら、Genome Res. 12:1305~1312(1999))；Bead ArrayTM技術(Illumina、San Diego、CA；Oliphantら、Discovery of Markers for Disease(Biotechniquesに対する補遺)、2002年6月；Fergusonら、Analytical Chemistry 72:5618(2000))；遺伝子発現のための迅速なアッセイにおいて市販のLuminox¹⁰⁰ LabMAPシステムおよび多色でコードされたマイクロスフェアを使用する遺伝子発現の検出のためのビーズアレイ(BADGE)(Yangら、Genome Res. 11:1888~1898(2001))；ならびに広範囲発現プロファイリング(HiCEP)分析(Fukumuraら、Nucleic Acids Res. 31(16):e94(2003))が挙げられる。

【0076】

(3. マイクロアレイ)

差次的遺伝子発現はまた、マイクロアレイ技術を使用して同定され、確認され得る。従って、乳癌関連遺伝子の発現プロファイルは、新鮮な腫瘍組織またはパラフィン包埋腫瘍組織において、マイクロアレイ技術を使用して測定され得る。この方法において、目的のポリヌクレオチド配列(cDNAおよびオリゴヌクレオチドを含む)は、マイクロチップ基材上に配置され、整列される。次いで、この整列された配列は、目的の細胞または組織由来の特異的なDNAプローブとハイブリダイズされる。RT-PCR法と同様に、mRNAの源は代表的に、ヒト腫瘍または腫瘍細胞株および対応する正常組織または正常細胞株から単離された全RNAである。従って、RNAは、種々の一次腫瘍または腫瘍細胞株から単離され得る。mRNAの源が一次腫瘍である場合、mRNAは、例えば、凍結するか、保管したパラフィン包埋して固定した(例えば、ホルマリン固定した)組織サンプルから抽出され得る。これらの組織サンプルは、日常的に調製され、毎日の臨床業務において保存される。

【0077】

マイクロアレイ技術の特定の実施形態において、cDNAクローンのPCR増幅した挿入部分は、密度の高いアレイの基材に適用される。好ましくは、少なくとも約10,000個のヌクレオチド配列が、その基材に適用される。10,000個の各要素でマイクロチップ上に固定されたマイクロアレイ化された遺伝子は、ストリンジントな条件下でのハイブリダイゼーションに適している。蛍光標識したcDNAプローブは、目的の組織からのRNA抽出物の逆転写により、蛍光ヌクレオチドの組込みを介して作製され得る。チップに適用された標識されたcDNAプローブは、アレイ上のDNAの各スポットに対して特異性を伴ってハイブリダイズする。非特異的な結合プローブを除去するためのストリンジントな洗浄の後、そのチップは、共焦点レーザー顕微鏡または別の検出方法(例えば、CCDカメラ)により走査される。整列したそれぞれの要素のハイブリダイゼーションの定量は、対応するmRNAの量の評価を可能にする。2色蛍光を用いて、RNAの2つの源から作製した別々に標識したcDNAプローブは、2つ一組でアレイにハイブリダイズされる。従って、それぞれの特定の遺伝子に対応する2つの源からの転写産物の相対量は、同時に決定される。小型化した規模のハイブリダイゼーションは、簡便性および多数の遺伝子に対する発現パターンの迅速な評価を提供する。このような方法は、稀な転写

10

20

30

40

50

残物（これは、細胞あたり数コピーで発現され、発現レベルの少なくとも約2倍の差で再現性を持って検出される。）を検出するために必要とされる感度を有することが示されている（Schenarら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93(2): 106~149 (1996)）。マイクロアレイ分析は、例えば、Affimetrix GenChip技術またはIncyteのマイクロアレイ技術を使用して製造者のプロトコルに従って、市販の装置により実施され得る。

【0078】

遺伝子発現の大規模な分析のためのマイクロアレイ方法の開発は、癌分類の分子マーカーについての体系的な探索を可能にさせ、種々の腫瘍型の結果予測を可能にさせる。

【0079】

（4．遺伝子発現の連続分析（SAGE））

遺伝子発現の連続分析（SAGE）は、各転写産物に対する個々のハイブリダイゼーションプローブを提供する必要がなく、多数の遺伝子転写産物の同時かつ定量的分析を可能にする方法である。第一に、転写産物を独自に同定するための十分な情報を含む短い配列タグ（約10~14bp）を生成し、但し、タグは、各転写産物内の固有の位置から得られる。次いで、多くの転写産物が、一緒に連結され、長い連続する分子を形成し、それは、配列決定され得、複数のタグの同一性を同時に明らかにする。転写産物の任意の集団の発現パターンは、個々のタグの量を決定し、各タグに対応する遺伝子を同定することにより定量的に評価され得る。より詳細については、例えば、Veliculescuら、Science 270: 484~487 (1995) および Veliculescuら、Cell 88: 243~51 (1997) を参照のこと。

【0080】

（5．大規模平行シグネチャー配列決定（MPSS）による遺伝子発現分析）

この方法（Brennerら、Nature Biotechnology 18: 630~634 (2000) に記載される）は、非ゲルベースのシグネチャー配列決定を、別個の直径5μmのマイクロビーズ上の数百万のテンプレートのインビトロクロニングと合わせる配列決定アプローチである。第一に、DNAテンプレートのマイクロビーズライブラリーは、インビトロクロニングにより構築される。これに続いて、フローセル中に高密度（代表的には、 3×10^6 マイクロビーズ/cm² より大きい）でテンプレートを含むマイクロビーズのプレーナアレイのアセンブリが構築される。各マイクロビーズ上のクロニングしたテンプレートの遊離末端は、DNAフラグメント分離を必要としない蛍光に基づいたシグネチャー配列決定方法を用いて同時に分析される。この方法は、一回の操作で、酵母cDNAライブラリー由来の数百から数千の遺伝子シグネチャー配列を同時かつ性格に提供することが示されている。

【0081】

（6．免疫組織化学）

免疫組織化学法はまた、本発明の予後判定マーカーの発現レベルを検出するのに適している。従って、発現を検出するために、抗体または抗血清、好ましくはポリクローナル抗血清、および最も好ましくは各マーカーに特異的なモノクローナル抗体が、使用され得る。この抗体は、抗体自体を、例えば、放射性標識、蛍光標識、ハプテン標識（例えば、ピオチン）または酵素（例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）で直接標識することにより検出され得る。あるいは、標識していない一次抗体は、標識した二次抗体と結合して使用され、この二次抗体は、一次抗体に特異的な抗血清、ポリクローナル抗血清またはモノクローナル抗体を含む。免疫組織化学プロトコルおよびキットは、当該分野で周知であり、市販されている。

【0082】

（7．プロテオミクス）

用語「プロテオーム」は、特定の時点におけるサンプル（例えば、組織、生体または細胞培養物）に存在するタンパク質の全体として定義される。プロテオミクスとしては、特に、サンプルにおけるタンパク質発現の全体的な変化の研究（「発現プロテオミクス」と

10

20

30

40

50

も呼ばれる)が挙げられる。プロテオミクスは、代表的には、以下の工程を包含する：(1) サンプル中の個々のタンパク質の2-Dゲル電気泳動(2-D PAGE)による分離；(2) 上記ゲルから回収された個々のタンパク質の同定(例えば、質量分析またはN末端配列決定)、および(3) バイオインフォマティクスを使用してのデータの分析。プロテオミクス法は、他の遺伝子発現プロファイリング方法に対する有用な補完であり、単独かまたは他の方法と組み合わせて使用され、本発明の予後マーカーの産物を検出し得る。

【0083】

(8. mRNAの単離、精製および増幅の一般的説明)

RNA供給源としての固定パラフィン包埋組織を使用して遺伝子発現をプロファイリングするための代表的なプロトコルの工程(mRNAの単離、精製、プライマー伸長および増幅を含む)は、種々の刊行された雑誌文献(例えば：T. E. Godfreyら J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 [2000]；K. Spechtら, Am. J. Pathol. 158: 419-29 [2001])に提供されている。手短に言うと、代表的なプロセスは、パラフィン包埋組織サンプルの約10 μm厚さの切片を切り出す工程により開始する。次いで、RNAが抽出され、そしてタンパク質およびDNAが取り除かれる。RNA濃度の分析の後、必要に応じて、RNAの修復および/または増幅工程が包含され得、そしてRNAは、遺伝子特異的プロモーターを使用して逆転写され、これにRT-PCRが続く。最後に、このデータを分析して、試験された腫瘍サンプルにおいて同定された特徴的な遺伝子発現パターンに基づいて、患者に利用可能な最良の処置選択肢を同定する。

【0084】

(9. 癌化学療法)

癌処置に使用される化学療法剤は、それらの作用機構に依存して、いくつかの群に分けられ得る。いくつかの化学療法剤は、DNAおよびRNAを直接的に損傷する。DNAの複製を中断することによって、このような化学療法剤は、複製を完全に中止させるか、またはナンセンスDNAもしくはナンセンスRNAの産生を生じるかのいずれかである。この分類としては、例えば、以下が挙げられる：シスプラチン(Platinol(登録商標))、ダウノルビシン(Cerubidine(登録商標))、ドキソルビシン(Adriamycin(登録商標))、およびエトポシド(Vepesid(登録商標))。癌治療剤の他の群は、ヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドの形成を阻害し、その結果、RNA合成および細胞複製が遮断される。このクラスにおける薬物の例としては、メトトレキサート(Abitrexate(登録商標))、メルカプトプリン(Purine-thol(登録商標))、フルオロウラシル(Adrucil(登録商標))、およびヒドロキシ尿素(Hydra(登録商標))が挙げられる。化学療法剤の第3のクラスは、紡錘体の合成または分解に影響を与え、結果として、細胞分裂を阻害する。このクラスにおける薬物の例としては、ビンブラスチン(Velban(登録商標))、ビンクリスチン(Oncovin(登録商標))、ならびにタキセン(例えば、パシタキセル(Taxol(登録商標))およびトセタキセル(Toxatere(登録商標))が挙げられる。トセタキセルは、現在米国で、先の化学療法が失敗した後の局所的に進行したかまたは転移性の乳癌を有する患者、および先の白金ベースの化学療法が失敗した後の局所的に進行したかまたは転移性の非小細胞肺癌を有する患者を処置することに認証されている。これらの化学療法剤および他の化学療法剤の全てに回答する患者の予測は、詳細には、本発明の範囲内である。

【0085】

特定の実施形態において、化学療法としては、タキサン誘導体での処置が挙げられる。タキサンとしては、パクリタキセル(Taxol(登録商標))およびドセタキセル(Taxotere(登録商標))が挙げられるが、これらに限定されず、これらは、癌の処置に広範に使用される。上で考察したように、タキサンは、微小管(これは、細胞機能において重要な役割を果たす)と呼ばれる細胞構造に影響を与える。正常な細胞増殖におい

て、微小管は、細胞が分裂し始めるときに形成される。一旦細胞が分裂をやめると、微小管は分解または破壊される。タキサンは、微小管が分解することを停止させ；癌細胞は、微小管でいっぱいになって増殖および分裂できないようになる。別の特定の実施形態において、化学療法としては、アントラサイクリン誘導体（例えば、ドキソルピシン、ダウノルピシンおよびアクラシノマイシン）での処置が挙げられる。

【0086】

さらなる特定の実施形態において、化学療法としては、トポイソメラーゼインヒビター（例えば、カンプトセシン、トポテカン、イリノテカン、20-S-カンプトセシン、9-ニトロ-カンプトセシン、9-アミノ-カンプトセシン、またはGI147211）での処置が挙げられる。

10

【0087】

これらの化学療法薬および他の化学療法薬の任意の組み合わせでの処置は、詳細に企図される。

【0088】

大部分の患者は、腫瘍の外科手術的除去の直後に化学療法を受ける。このアプローチは、一般的に、補助（*adjuvant*）治療と呼ばれる。しかし、化学療法は、外科手術の前にも施され得、そのような場合、新補助（*neoadjuvant*）処置と呼ばれる。新補助化学療法の使用は、進行した乳癌または手術が不可能な乳癌の処置に起因するが、同様に他の型の癌の処置において承認を得ている。新補助化学療法の効力は、いくつかの臨床試験において試験されている。多施設における、National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18（NSAB B-18）試験（Fisherら, J Clin Oncology 15:2002-2004（1997）；Fisherら, J Clin Oncology 16:2672-2685（1998））において、新補助治療を、アドリアマイシンおよびシクロホスファミドの組み合わせを使用して行った（「ACレジメン」）。別の臨床試験において、新補助治療を、5-フルオロウラシル、エピルピシンおよびシクロホスファミドの組み合わせを使用して施した（「FECレジメン」）（van Der Hageら, J Clin Oncol 19:4224-4237（2001））。より新しい臨床試験もまた、タキサン含有新補助処置レジメンを使用した。例えば、Holmesら, J Natl Cancer Inst 83:1797-1805（1991）およびMoliterニら, Seminars in Oncology, 24: S17-10-S-17-14（1999）を参照のこと。乳癌のための新補助化学療法についてのさらなる情報に関しては、Cleatorら, Endocrine-Related Cancer 9:183-195（2002）を参照のこと。

20

30

【0089】

（10．遺伝子発現データの、癌遺伝子セット、アッセイされた遺伝子配列、および臨床適用）

本発明の重要な局面は、乳癌組織による特定の遺伝子の測定された発現を使用して、予後情報を提供することである。この目的のために、アッセイされたRNAの量の差異、使用されたRNAの品質の可変性の両方を補正（正規化）することを必要とする。従って、上記アッセイは、代表的には、特定の正規化遺伝子（周知のハウスキーピング遺伝子（例えば、GAPDHおよびCyp1）を含む）の発現を測定して取り入れる。あるいは、正規化は、アッセイされた遺伝子またはその大きなサブセットの全ての平均シグナルまたは中央値シグナル（Ct）に基づき得る（全体的正規化アプローチ）。遺伝子ごとの基礎について、患者の腫瘍mRNAの、測定されて正規化された量は、乳癌組織基準セットに見出される量と比較される。この基準セットにおける乳癌組織の数（N）は、異なる基準セットが（全体として）本質的に同じ挙動をとることを確かめるために十分に多くあるべきである。この条件が満たされる場合、特定のセットに存在する個々の乳癌組織の同一性は、アッセイされた遺伝子の相対的な量に対して有意な影響を有さない。通常、乳癌組織基準セットは、少なくとも約30個、好ましくは少なくとも約40個の異なるFPE乳癌組

40

50

組織標本からなる。他で特に述べられない限り、患者1人の試験された腫瘍1つあたりの各 mRNA についての正規化された発現レベルは、基準セットにおいて測定された発現レベルの百分率として表される。より詳細には、十分に多い（例えば、40個）の腫瘍の基準セットは、各 mRNA 種の正規化レベルの分布を生じる。分析される特定の腫瘍サンプルにおいて測定されるレベルは、ある%にてこの範囲内であり、これは、当該分野で周知の方法によって決定され得る。以下、他で特に述べられない限り、遺伝子発現レベルへの言及は、基準セットに対する正規化された発現レベルと仮定するが、これは、必ずしも明確に述べられるとは限らない。

【0090】

（11．再発スコア）

同時係属の出願番号第60/486,302は、癌再発の可能性および/または患者が処置様式に良好に応答する可能性を決定するためのアルゴリズムベースの予後判定試験を記載する。上記予後判定試験を他の癌予後試験と区別するこのアルゴリズムの特徴としては、以下が挙げられる：1）再発可能性を決定するために使用される mRNA（または対応する遺伝子発現産物）の独特のセット、2）発現データを式に合わせるために使用される特定の重量、ならびに3）患者を異なる危険性レベルの群（例えば、危険性が低い群、危険性が中間の群、および危険性が高い群）に分けるために使用される閾値。上記アルゴリズムは、数値的な再発スコア（RS）を生じるか、または処置に応答する患者がアッセイされる場合、治療スコア（RTS）を生じる。

【0091】

上記試験は、特定の mRNA またはそれらの発現産物のレベルを測定する実験室アッセイを必要とするが、上記試験は、新鮮な組織、またはすでに患者から必然的に収集されて記録された凍結組織もしくは固定パラフィン包埋腫瘍生検試料のいずれかの非常に少量を利用し得る。従って、上記試験は、非浸潤性であり得る。上記試験はまた、例えば、コア生検または細針吸引による、いくつかの異なる腫瘍組織回収方法に適合する。

【0092】

上記方法に従って、癌再発スコア（RS）は、以下によって決定される：

（a）上記被験体から得られた癌細胞を含む生物学的サンプルを、遺伝子またはタンパク質の発現プロファイリングに供する工程；

（b）複数の個々の遺伝子の発現レベル（例えば、mRNA のレベルまたはタンパク質のレベル）を、各遺伝子の発現値を決定するように定量する工程；

（c）遺伝子発現値のサブセットを作製する工程であって、各サブセットは、癌に関連する生物学的機能および/または同時発現によって関連する遺伝子についての発現レベルを含む、工程；

（d）サブセット内の各遺伝子の発現レベルと、そのサブセット内の癌再発または治療応答へのその相対的寄与を反映する係数とを掛けて、その掛け算の積を足して、上記サブセットについての項を得る工程；

（e）各サブセットの項と、癌再発または治療応答へのその寄与を反映する因子とを掛ける工程；ならびに

（f）上記因子を掛けられた各サブセットについての項の合計を得て、再発スコア（RS）または治療応答（RTS）スコアを得る工程

（ここで、癌再発または治療応答と線形の相関を示さない各サブセットの寄与は、事前決定された閾値レベルの上でのみ含まれ、そして

特定の遺伝子発現の増加が癌再発の危険性を低下させるサブセットは、負の値を割り当てられ、特定の遺伝子発現が癌再発の危険性を増加させるサブセットは、正の値が割り当てられる）。

【0093】

特定の実施形態において、RS は、以下によって決定される：

（a）上記被験体から得られた腫瘍細胞を含む生物学的サンプルにおける、GRB7、HER2、EstR1、PR、Bcl2、CEGP1、SURV、Ki-67、MYBL

10

20

30

40

50

2、CCNB1、STK15、CTSL2、STMY3、CD68、GSTM1、およびBAG1、またはこれらの発現産物の発現レベルを決定する工程；ならびに

(b) 以下の式によって再発スコア(RS)を計算する工程：

$RS = (0.23 \sim 0.70) \times \text{GRB7 軸閾値} (axis\ threshold) - (0.17 \sim 0.51) \times \text{ER 軸} + (0.53 \sim 1.56) \times \text{増殖軸閾値} (proliferation\ axis\ threshold) + (0.07 \sim 0.21) \times \text{浸潤性軸} (invasion\ axis) + (0.03 \sim 0.15) \times \text{CD68} - (0.04 \sim 0.25) \times \text{GSTM1} - (0.05 \sim 0.22) \times \text{BAG1}$ であって、

ここで

(i) $\text{GRB7 軸} = (0.45 \sim 1.35 \times \text{GRB7} + (0.05 \sim 0.15) \times \text{HER2})$ であり； 10

(ii) $\text{GRB7 軸} < -2$ の場合、 $\text{GRB7 軸閾値} = -2$ であり、そして $\text{GRB7 軸} > 2$ の場合、 $\text{GRB7 軸閾値} = \text{GRB7 軸}$ であり；

(iii) $\text{ER 軸} = (\text{Est1} + \text{PR} + \text{Bcl2} + \text{CEGP1}) / 4$ であり；

(iv) $\text{増殖軸} = (\text{SURV} + \text{Ki67} + \text{MYBL2} + \text{CCNB1} + \text{STK15}) / 5$ であり；

(v) $\text{増殖軸} < -3.5$ の場合、 $\text{増殖軸閾値} = -3.5$ であり、 $\text{増殖軸} > 3.5$ の場合、 $\text{増殖軸閾値} = \text{増殖軸}$ であり；そして

(vi) $\text{浸潤性軸} = (\text{CTSL2} + \text{STMY3}) / 2$ である

(ここで、範囲が詳細に示されていない個々の遺伝子全てについての項は、約 $0.5 \sim 1.5$ であり、より大きな RS は、癌再発の可能性の増加を表す)。 20

【0094】

本発明のさらなる詳細は、以下の非限定的な実施例に記載される。

【実施例】

【0095】

(浸潤性乳癌における新補療法化学療法の遡及研究：パラフィン包埋コア生検組織の遺伝子発現プロファイリング)

遺伝子発現研究を、浸潤性の乳房腺管癌のパラフィン包埋固定組織サンプルにおける遺伝子発現を分子的に特徴付け、そしてこのような分子プロファイルと化学療法に対する患者の応答との間の相関を調査することを第1の目標として、設計して行った。 30

【0096】

(研究設計)

前処置を行うことなく、第II段階または第III段階の乳癌と新たに診断された70人の患者を、研究に登録した。登録された70人の患者のうち、45人の個々の患者由来の腫瘍組織が、評価に対して利用可能であった。患者の平均年齢は、 49 ± 9 歳(29歳と64歳との間)であった。平均腫瘍サイズは、 6.8 ± 4.0 cm(2.3 cmと21 cmとの間)であった。材料および方法の節に記載されるように実行した組織病理学的評価が、適切な量の腫瘍組織および同種病原を示した場合にのみ、患者を研究に含めた。

【0097】

登録の後、上記患者を、ドキソルビシン $75 \text{ mg} / \text{m}^2$ q2 wks $\times 3$ (+ G-CSF、2~11日)およびドセタキセル $40 \text{ mg} / \text{m}^2$ (毎週) $\times 6$ を連続的に投与する、化学療法処置に供した。処置の順番を、ランダムに割り当てた。45人の患者のうち20人(44%)を、最初にドキソルビシンで処置し、続いてドセタキセルで処置した。他方、45人の患者のうち25人(56%)を、最初にドセタキセルで処置し、続いてドキソルビシンで処置した。 40

【0098】

(材料および方法)

生検からの固定パラフィン包埋(FPE)腫瘍組織を、化学療法の前後に得た。病理学者は、最も代表的な一次腫瘍ブロックを選択し、そして6個の10ミクロン切片をRNA分析のために提出した。詳細には、全部で6個の切片(各々、厚さが10ミクロン)の全 50

部を作製して、2つのCostar Brand Microcentrifuge Tube (ポリプロピレン、1.7mLチューブ、透明；各チューブ中に3個の切片)中に配置した。腫瘍が、標本面積全体の30%未満を構成した場合、サンプルは、病理学者によって、粗い顕微解剖 (gross microdissection) を使用して、腫瘍組織をCostarチューブに直接入れたまま、粗く解剖された。

【0099】

mRNAを抽出し、そしてRiboGreen (登録商標) 蛍光法 (Molecular probe) によって定量した。定量的遺伝子発現の分子アッセイを、RT-PCRによって、ABI PRISM 7900TM Sequence Detection SystemTM (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用して行った。ABI PRISM 7900TM は、サーモサイクラー、電荷結合素子 (CCD)、カメラおよびコンピュータから構成される。このシステムは、384ウェル形式のサンプルを、サーモサイクラーで増幅する。増幅の間、レーザー誘導蛍光シグナルは、384ウェルの全てについて光ファイバーケーブルを通してリアルタイムで収集され、そしてCCDにおいて検出される。上記システムは、機器を稼動するため、およびデータを分析するためのソフトウェアを備える。

【0100】

(分析および結果)

腫瘍組織を、187個の癌関連遺伝子および5個の参照遺伝子について分析した。各患者についての閾値周期 (CT) 値を、特定の患者についての5個の参照遺伝子の中央値に基づいて正規化した。化学療法に有利に応答した患者を、2つの異なる二元的な方法 (病理学的完全寛解および臨床完全寛解) によって評価した。患者を、6週間後および12週間後 (化学療法の完了時) の応答について正式に評価した。

【0101】

臨床完全寛解 (cCR) は、物理的検査または診断的乳房画像化のいずれかによる、臨床的に検出可能な疾患全ての完全な消失を必要とする。

【0102】

病理学的完全寛解 (pCR) は、初期の化学療法後の、生検乳房組織の組織学的検査、乳腺腫瘍摘出標本、または乳房切除標本に対して、残存の乳癌がないことを必要とする。残存のDCISは、存在し得る。局所的結節における残存の癌は、存在し得ない。

【0103】

部分的な臨床寛解を、腫瘍面積 (最長の垂直直径の積和) における50%の減少、または乳房および腋窩における多病巣の、最長の垂直直径の積和において50%と定義した。疾患面積は25%より多くは増加し得ず、新たな病巣は出現し得ない。

【0104】

病理学的寛解データと臨床的寛解データとが、遺伝子の予測的影響の方向性に対して矛盾した場合 (すなわち、陰性対陽性)、病理学的寛解データを使用した。なぜなら、病理学的寛解は、化学療法に対する応答の、より厳密な指標であるからである。

【0105】

病理学的寛解のカテゴリーは、以下である：

- 0 外科手術的切除の後の検出可能な腫瘍の存在 {CRなし}
- 1 外科手術的切除の後の検出可能な腫瘍の非存在 {CR}。

【0106】

完全臨床寛解のカテゴリーは、以下である：

- 0 処置終了時における塊の存在 {CRなし}
- 1 処置終了時における塊の非存在 {CR}。

【0107】

分析を、以下によって行った：正規化された遺伝子発現と0または1の二元的結果との間の相関の分析。定量的遺伝子発現データを、単変量解析 (t検定) に供した。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 8 】

表 1 は、遺伝子発現との病理学的寛解の相関を表し、そして群間の差異についての p 値が < 0 . 1 1 1 であった 4 0 個の遺伝子を列挙する。一列目の、平均正規化発現 { C_T } 値は、病理学的完全寛解を有しなかった患者に関する。二列目の、平均正規化発現 { C_T } 値は、病理学的完全寛解を有した患者に関する。頭書き「 p 」および「 N 」は、それぞれ、統計学的 p 値、および患者の数を表す。

【 0 1 0 9 】

(表 1 遺伝子発現および病理学的寛解)

【 0 1 1 0 】

【 表 1 - 1 】

	平均	平均	p	N	N	標準偏差	標準偏差
	CRなし	CR		CRなし	CR	CRなし	CR
VEGFC	-5.2	-6.5	0.001	39	6	0.8	0.4
B-カテニン	-1.6	-2.3	0.013	39	6	0.6	0.6
MMP2	0.2	-1.0	0.016	39	6	1.1	1.3
MMP9	-3.4	-1.5	0.016	39	6	1.5	3.2
CNN	-4.4	-5.7	0.023	39	6	1.3	1.0
FLJ20354	-5.7	-4.7	0.024	39	6	1.0	1.0
TGFB3	-2.6	-3.9	0.027	39	6	1.4	1.4
PDGFRb	-2.2	-3.2	0.029	39	6	1.0	1.2

【 0 1 1 1 】

【表 1 - 2】

PLAUR	-3.9	-4.6	0.033	39	6	0.7	0.6
KRT19	1.7	0.3	0.033	39	6	1.4	1.6
ID1	-2.7	-3.7	0.039	39	6	1.1	0.5
RIZ1	-3.8	-4.6	0.039	39	6	0.8	1.2
RAD54L	-5.9	-5.0	0.039	39	6	0.9	1.0
RB1	-3.9	-4.6	0.040	39	6	0.7	1.1
SURV	-4.8	-3.5	0.040	39	6	1.4	1.1
EIF4EL3	-3.6	-4.0	0.042	39	6	0.4	0.4
CYP2C8	-7.2	-6.6	0.044	39	6	0.4	1.8
STK15	-4.3	-3.7	0.047	39	6	0.8	0.5
ACTG2	-4.6	-6.1	0.049	39	6	1.8	0.9
NEK2	-5.2	-4.2	0.060	39	6	1.2	1.0
CMet	-6.5	-7.3	0.061	39	6	0.9	0.2
TIMP2	1.1	0.4	0.063	39	6	0.8	1.1
C20 orf1	-3.4	-2.3	0.063	39	6	1.3	0.9
DR5	-5.3	-5.9	0.066	39	6	0.7	0.6
CD31	-2.5	-3.2	0.068	39	6	0.8	0.6
BIN1	-3.8	-4.6	0.069	39	6	0.9	0.8
COL1A2	2.4	1.3	0.073	39	6	1.3	1.4
HIF1A	-2.9	-3.4	0.074	39	6	0.6	0.4
VIM	0.7	0.2	0.079	39	6	0.7	0.9
CDC20	-3.7	-2.5	0.080	39	6	1.6	0.8
ID2	-2.9	-3.4	0.082	39	6	0.6	0.6
MCM2	-3.8	-3.2	0.087	39	6	0.7	1.1
CCNB1	-4.5	-3.8	0.088	39	6	0.9	0.6
MYH11	-3.8	-5.0	0.094	39	6	1.8	1.3
Chk2	-5.0	-4.6	0.095	39	6	0.6	0.8
G-カテニン	-0.9	-1.4	0.096	39	6	0.6	0.9
HER2	-0.7	-1.8	0.100	39	6	1.4	1.6
GSN	-2.1	-2.8	0.109	39	6	1.0	1.0
Ki-67	-3.9	-3.0	0.110	39	6	1.3	0.4

【 0 1 1 2 】

【表 1 - 3】

TOP2A	-2.3	-1.4	0.111	39	6	1.3	1.0
-------	------	------	-------	----	---	-----	-----

上記の表 1 において、C R なしの患者に対して、C R 患者において発現の増加を示す遺伝子は、処置に対する有利な応答の可能性が増加することについての指標であり、C R 患者に対して、C R なしの患者において発現の増加を示す遺伝子は、処置に対する有利な応

10

20

30

40

50

答の可能性が減少することについての指標である。例えば、VEGFCの発現は、{CRなしの腫瘍における、より陰性でない正規化されたCT値によって示されるように}CR患者の腫瘍に対してCRなしの患者の腫瘍においてより高く、従って、VEGEF遺伝子の発現の増加{正確には、VEGFC mRNAのより高いレベル}は、化学療法に対する患者の有利な応答の可能性が減少することを予測する。

【0113】

表1に示されるデータに基づいて、以下の遺伝子の発現の増加は、処置に対する病理学的完全寛解の可能性が上昇することに相関する：MMP9；FLJ20354；RAD54L；SURV；CYP2C8；STK15；NEK2；C20orf1；CDC20；MCM2；CCNB1；Chk2；Ki-67；TOP2A。以下の遺伝子の発現が増加することは、処置に対する病理学的完全寛解の可能性が減少することに相関する：VEGFC；B-カテニン；MMP2；CNN；TGFB3；PDGFRb；PLAUR；KRT19；ID1；RIZ1；RB1；EIF4EL3；ACTG2；cMet；TIMP2；DR5；CD31；BIN1；COL1A2；HIF1A；VIM；ID2；MYH11；G-カテニン；HER2；GSN。

10

【0114】

表2は、遺伝子発現に相関する臨床的寛解を表し、群間の差異についてのp値が<0.095であった遺伝子を列挙する。一列目の、平均正規化発現{CT}値は、臨床完全寛解を有しなかった患者に関する。二列目の、平均正規化発現値は、臨床完全寛解を有した患者に関する。頭書き「p」および「N」は、それぞれ、統計学的p値、および患者の数を表す。

20

【0115】

(表2 遺伝子発現および臨床寛解)

【0116】

【表2-1】

平均	平均	p	有効数	有効数	標準偏差	標準偏差	
	CRなし	CR		CRなし	CR	CRなし	CR
CCND1	-1.2	0.5	0.000	25	20	1.3	1.3
EstR1	-3.8	-0.9	0.000	25	20	2.9	1.9
KRT18	0.5	1.7	0.000	25	20	1.2	0.9
GATA3	-2.2	0.2	0.001	25	20	2.4	1.6

30

【0117】

【表 2 - 2】

cIAP2	-4.9	-5.9	0.001	25	20	0.8	1.2
KRT5	-3.8	-5.8	0.001	25	20	2.2	1.1
RAB27B	-4.5	-2.9	0.001	25	20	1.8	1.1
IGF1R	-3.6	-2.1	0.002	25	20	1.6	1.4
CMet	-6.3	-7.1	0.002	25	20	0.9	0.6
HNF3A	-3.7	-1.6	0.004	25	20	2.7	1.6
CA9	-5.4	-6.9	0.004	25	20	2.1	1.1
MCM3	-5.6	-6.2	0.005	25	20	0.8	0.6
STMY3	-1.7	-0.2	0.006	25	20	1.9	1.5
NPD009	-4.5	-3.3	0.006	25	20	1.6	1.2
BAD	-3.2	-2.8	0.008	25	20	0.6	0.4
BBC3	-5.3	-4.7	0.009	25	20	0.8	0.7
EGFR	-3.2	-4.2	0.009	25	20	1.3	1.2
CD9	0.2	0.7	0.010	25	20	0.6	0.6
AKT1	-1.2	-0.7	0.013	25	20	0.7	0.6
CD3z	-5.5	-6.3	0.014	25	20	1.0	1.3
KRT14	-3.6	-5.3	0.014	25	20	2.7	1.4
DKFZp564	-4.9	-5.8	0.015	25	20	1.1	1.2
Bcl2	-3.6	-2.6	0.016	25	20	1.3	1.4
BECN1	-2.4	-2.0	0.017	25	20	0.7	0.5
KLK10	-5.0	-6.5	0.017	25	20	2.5	1.2
DIABLO	-4.7	-4.3	0.019	25	20	0.6	0.6
MVP	-2.5	-1.9	0.021	25	20	0.7	0.8
VEGFB	-2.5	-1.9	0.021	25	20	0.9	0.5
ErbB3	-2.8	-2.0	0.021	25	20	1.2	0.8
MDM2	-1.3	-0.7	0.021	25	20	0.7	1.0
Bclx	-2.7	-2.3	0.022	25	20	0.6	0.7
CDH	-3.0	-2.1	0.022	25	20	1.0	1.4
HLA-DPB1	0.9	0.3	0.022	25	20	0.9	0.9
PR	-5.4	-3.9	0.026	25	20	2.1	2.1
KRT17	-3.3	-4.8	0.027	25	20	2.6	1.4

【 0 1 1 8 】

10

20

30

40

【表 2 - 3】

GSTp	-0.8	-1.5	0.029	25	20	0.8	1.1
IRS1	-3.7	-2.8	0.034	25	20	1.4	1.4
NFKBp65	-2.4	-2.1	0.039	25	20	0.6	0.4
IGFBP2	-1.9	-0.9	0.040	25	20	1.7	1.3
RPS6KB1	-5.3	-4.9	0.042	25	20	0.8	0.5
BIN1	-3.7	-4.2	0.043	25	20	0.9	0.9
CD31	-2.4	-2.9	0.046	25	20	0.8	0.9
G-カテニン	-1.2	-0.8	0.049	25	20	0.6	0.7
DHPS	-2.6	-2.2	0.054	25	20	0.8	0.5
TIMP3	0.7	1.4	0.054	25	20	1.2	1.0
ZNF217	-1.1	-0.6	0.058	25	20	0.8	0.8
KIAA1209	-4.2	-4.8	0.061	25	20	1.0	1.0
CYP2C8	-7.3	-6.9	0.061	25	20	0.3	1.1
COX2	-7.3	-7.5	0.063	25	20	0.4	0.1
RB1	-4.2	-3.8	0.063	25	20	1.0	0.5
ACTG2	-4.4	-5.3	0.065	25	20	2.0	1.2
pS2	-3.9	-1.9	0.068	25	20	3.6	3.2
COL1A2	1.9	2.7	0.069	25	20	1.4	1.3
BRK	-5.5	-4.9	0.070	25	20	1.0	1.2
CEGP1	-4.8	-3.5	0.073	25	20	2.5	2.4
EPHX1	-2.0	-1.6	0.078	25	20	0.8	0.8
VEGF	-0.3	-0.8	0.084	25	20	0.9	0.8
TP53BP1	-3.3	-2.9	0.085	25	20	0.8	0.7
COL1A1	4.3	5.0	0.089	25	20	1.4	1.1
FGFR1	-3.6	-2.8	0.090	25	20	1.2	1.8
CTSL2	-5.6	-6.4	0.095	25	20	1.7	1.0

10

20

30

表 2 に示されるデータに基づいて、以下の遺伝子の発現の増加は、処置に対する臨床完全寛解の可能性が上昇することに相関する：CCND1；EstR1；KRT18；GATA3；RAB27B；IGF1R；HNF3A；STMY3；NPD009；BAD；BBC3；CD9；AKT1；Bcl2；BECN1；DIABLO；MVP；VEGFB；ErbbB3；MDM2；Bclx；CDH1；PR；IRS1；NFKBp65；IGFBP2；RPS6KB1；DHPS；TIMP3；ZNF217；CYP2C8；pS2；BRK；CEGP1；EPHX1；TP53BP1；COL1A1；およびFGFR1。

40

【0119】

以下の遺伝子の発現が増加することは、処置に対する臨床完全寛解の可能性が減少することに相関する：cIAP2；KRT5；CA9；MCM3；EGFR；CD3z；KRT14；DKFZp564；KLK10；HLA-DPB1；KRT17；GSTp；BIN1；CD31；KIAA1209；COX2；VEGF；およびCTSL2。

50

【 0 1 2 0 】

本開示の全体を通して記載される全ての参考文献は、本明細書中で明確に参照として援用される。

【 0 1 2 1 】

本発明は、ある特定の実施形態について強調して記載されたが、特定の方法および技術において改変および変更が可能であることは、当業者に明らかである。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲によって定義されるような、本発明の精神および範囲内に包含される変更の全てを含む。

【 0 1 2 2 】

【 表 3 - 1 】

10

表3

名称	登録	名称	配列番号	配列	長さ
ACTG2	NM_001615	S4543/ACTG2.f3	配列番号1	ATGTACGTGCGCCATTCAAGCT	21
ACTG2	NM_001615	S4544/ACTG2.r3	配列番号2	ACGCCATCACCTGAATCCA	19
ACTG2	NM_001615	S4545/ACTG2.p3	配列番号3	CTGGCCGCACGACAGGCATC	20
AKT1	NM_005163	S0010/AKT1.f3	配列番号4	CGCTTCTATGGCGCTGAGAT	20
AKT1	NM_005163	S0012/AKT1.r3	配列番号5	TCCCGGTACACCACTTCTT	20
AKT1	NM_005163	S4776/AKT1.p3	配列番号6	CAGCCCTGGACTACCTGCACTCGG	24
B-カテニン	NM_001904	S2150/B-Cate.f3	配列番号7	GGCTCTTGTGCGTACTGTCCTT	22
B-カテニン	NM_001904	S2151/B-Cate.r3	配列番号8	TCAGATGACGAAGAGCACAGATG	23
B-カテニン	NM_001904	S5046/B-Cate.p3	配列番号9	AGGCTCAGTGATGTCTTCCCTGTCAACCAG	29
BAD	NM_032989	S2011/BAD.f1	配列番号10	GGGTCAGGTGCCTCGAGAT	19
BAD	NM_032989	S2012/BAD.r1	配列番号11	CTGCTCACTCGGCTCAAATC	21
BAD	NM_032989	S5058/BAD.p1	配列番号12	TGGGCCAGAGCATGTTCCAGATC	24
BBC3	NM_014417	S1584/BBC3.f2	配列番号13	CCTGGAGGGTCCTGTACAAT	20
BBC3	NM_014417	S1585/BBC3.r2	配列番号14	CTAATTGGGCTCCATCTCG	19
BBC3	NM_014417	S4890/BBC3.p2	配列番号15	CATCATGGGACTCCTGCCCTTACC	24
Bcl2	NM_000633	S0043/Bcl2.f2	配列番号16	CAGATGGACCTAGTACCCACTGAGA	25
Bcl2	NM_000633	S0045/Bcl2.r2	配列番号17	CCTATGATTAAAGGGCATTTTCC	24
Bcl2	NM_000633	S4732/Bcl2.p2	配列番号18	TTCCACGCCGAAGGACAGCGAT	22
Bclx	NM_001191	S0046/Bclx.f2	配列番号19	CTTTTGTGGAACCTATGGGAACA	24
Bclx	NM_001191	S0048/Bclx.r2	配列番号20	CAGCGGTTGAAGCGTTCCT	19
Bclx	NM_001191	S4898/Bclx.p2	配列番号21	TTGGGCTCTCGGCTGCTGCA	20
BECN1	NM_003766	S2642/BECN1.f3	配列番号22	CAGTTTGGCACAATCAATAACTTCA	25
BECN1	NM_003766	S2643/BECN1.r3	配列番号23	GCAGCATTAACTCTCATTCATTCC	24
BECN1	NM_003766	S4953/BECN1.p3	配列番号24	TGCGCTGCCAGTGTTCCCG	20
BIN1	NM_004305	S2651/BIN1.f3	配列番号25	CCTGCAAAAGGGAACAAGAG	20

20

30

【 0 1 2 3 】

【表 3 - 2】

BIN1	NM_004305	S2652/BIN1.r3	配列番号26	CGTGGTTGACTCTGATCTCG	20
BIN1	NM_004305	S4954/BIN1.p3	配列番号27	CTTCGCCTCCAGATGGCTCCC	21
BRK	NM_005975	S0678/BRK.f2	配列番号28	GTGCAGGAAAGGTTACAAA	20
BRK	NM_005975	S0679/BRK.r2	配列番号29	GCACACACGATGGAGTAAGG	20
BRK	NM_005975	S4789/BRK.p2	配列番号30	AGTGTCTGCGTCCAATACACGCGT	24
C20 orf1	NM_012112	S3560/C20 or.f1	配列番号31	TCAGCTGTGAGCTGCGGATA	20
C20 orf1	NM_012112	S3561/C20 or.r1	配列番号32	ACGGTCCTAGGTTTGAAGTTAAGA	24
C20 orf1	NM_012112	S3562/C20 or.p1	配列番号33	CAGGTCCCATTGCCGGGCG	19
CA9	NM_001216	S1398/CA9.f3	配列番号34	ATCCTAGCCCTGGTTTTTGG	20
CA9	NM_001216	S1399/CA9.r3	配列番号35	CTGCCTTCTCATCTGCACAA	20
CA9	NM_001216	S4938/CA9.p3	配列番号36	TTTGCTGTCACCAGCGTCGC	20
CCNB1	NM_031966	S1720/CCNB1.f2	配列番号37	TTCAGGTTGTTGCAGGAGAC	20
CCNB1	NM_031966	S1721/CCNB1.r2	配列番号38	CATCTTCTTGGGCACACAAT	20
CCNB1	NM_031966	S4733/CCNB1.p2	配列番号39	TGTCTCCATTATTGATCGGTTTCATGCA	27
CCND1	NM_001758	S0058/CCND1.f3	配列番号40	GCATGTTCTGTGGCCTCTAAGA	21
CCND1	NM_001758	S0060/CCND1.r3	配列番号41	CGGTGTAGATGCACAGCTTCTC	22
CCND1	NM_001758	S4986/CCND1.p3	配列番号42	AAGGAGACCATCCCCCTGACGGC	23
CD31	NM_000442	S1407/CD31.f3	配列番号43	TGTATTTCAAGACCTCTGTGCACTT	25
CD31	NM_000442	S1408/CD31.r3	配列番号44	TTAGCCTGAGGAATTGCTGTGTT	23
CD31	NM_000442	S4939/CD31.p3	配列番号45	TTTATGAACCTGCCCTGCTCCCACA	25
CD3z	NM_000734	S0064/CD3z.f1	配列番号46	AGATGAAGTGAAGGCGCTT	20
CD3z	NM_000734	S0066/CD3z.r1	配列番号47	TGCCTCTGTAATCGGCAACTG	21
CD3z	NM_000734	S4988/CD3z.p1	配列番号48	CACCGCGGCCATCCTGCA	18
CD9	NM_001769	S0686/CD9.f1	配列番号49	GGGCGTGGAACAGTTTATCT	20
CD9	NM_001769	S0687/CD9.r1	配列番号50	CACGGTGAAGGTTTCGAGT	19
CD9	NM_001769	S4792/CD9.p1	配列番号51	AGACATCTGCCCCAAGAAGGACGT	24
CDC20	NM_001255	S4447/CDC20.f1	配列番号52	TGGATTGGAGTTCTGGGAATG	21
CDC20	NM_001255	S4448/CDC20.r1	配列番号53	GCTTGCACTCCACAGGTACACA	22
CDC20	NM_001255	S4449/CDC20.p1	配列番号54	ACTGGCCGTGGCACTGGACAACA	23
CDH1	NM_004360	S0073/CDH1.f3	配列番号55	TGAGTGTCCCCCGGTATCTTC	21
CDH1	NM_004360	S0075/CDH1.r3	配列番号56	CAGCCGCTTTCAGATTTTCAT	21
CDH1	NM_004360	S4990/CDH1.p3	配列番号57	TGCCAATCCCGATGAAATTGGAAATTT	27
CEGP1	NM_020974	S1494/CEGP1.f2	配列番号58	TGACAATCAGCACACCTGCAT	21
CEGP1	NM_020974	S1495/CEGP1.r2	配列番号59	TGTGACTACAGCCGTGATCCTTA	23
CEGP1	NM_020974	S4735/CEGP1.p2	配列番号60	CAGGCCCTCTTCCGAGCGGT	20
Chk2	NM_007194	S1434/Chk2.f3	配列番号61	ATGTGGAACCCCCACCTACTT	21
Chk2	NM_007194	S1435/Chk2.r3	配列番号62	CAGTCCACAGCACGGTTATACC	22
Chk2	NM_007194	S4942/Chk2.p3	配列番号63	AGTCCCAACAGAAACAAGAACTTCAGGCG	29
clAP2	NM_001165	S0076/clAP2.f2	配列番号64	GGATATTTCCGTGGCTCTTATCA	24
clAP2	NM_001165	S0078/clAP2.r2	配列番号65	CTTCTCATCAAGGCAGAAAAATCTT	25
clAP2	NM_001165	S4991/clAP2.p2	配列番号66	TCTCCATCAAATCCTGTAACTCCAGAGCA	30
cMet	NM_000245	S0082/cMet.f2	配列番号67	GACATTTCCAGTCCCTGCAGTCA	22
cMet	NM_000245	S0084/cMet.r2	配列番号68	CTCCGATCGCACACATTTGT	20
cMet	NM_000245	S4993/cMet.p2	配列番号69	TGCCTCTCTGCCCCACCCCTTTGT	23
CNN	NM_001299	S4564/CNN.f1	配列番号70	TCCACCCTCCTGGCTTTG	18

10

20

30

40

【表 3 - 3】

CNN	NM_001299	S4565/CNN.r1	配列番号71	TCACTCCCACGTTACGCTTGT	21
CNN	NM_001299	S4566/CNN.p1	配列番号72	TCCTTTTCGTCTTCGCCATGCTGG	23
COL1A1	NM_000088	S4531/COL1A1.f1	配列番号73	GTGGCCATCCAGCTGACC	18
COL1A1	NM_000088	S4532/COL1A1.r1	配列番号74	CAGTGGTAGGTGATGTTCTGGGA	23
COL1A1	NM_000088	S4533/COL1A1.p1	配列番号75	TCCTGCGCCTGATGTCCACCG	21
COL1A2	NM_000089	S4534/COL1A2.f1	配列番号76	CAGCCAAGAACTGGTATAGGAGCT	24
COL1A2	NM_000089	S4535/COL1A2.r1	配列番号77	AAACTGGCTGCCAGCATTG	19
COL1A2	NM_000089	S4536/COL1A2.p1	配列番号78	TCTCCTAGCCAGACGTGTTTCTTGCTCTG	30
COX2	NM_000963	S0088/COX2.f1	配列番号79	TCTGCAGAGTTGGAAGCACTCTA	23
COX2	NM_000963	S0090/COX2.r1	配列番号80	GCCGAGGCTTTTCTACCAGAA	21
COX2	NM_000963	S4995/COX2.p1	配列番号81	CAGGATACAGCTCCACAGCATCGATGTC	28
CTSL2	NM_001333	S4354/CTSL2.f1	配列番号82	TGTCTCACTGAGCGAGCAGAA	21
CTSL2	NM_001333	S4355/CTSL2.r1	配列番号83	ACCATTGCAGCCCTGATTG	19
CTSL2	NM_001333	S4356/CTSL2.p1	配列番号84	CTTGAGGACGCGAACAGTCCACCA	24
CYP2C8	NM_000770	S1470/CYP2C8.f2	配列番号85	CCGTGTTCAAGAGGAAGCTC	20
CYP2C8	NM_000770	S1471/CYP2C8.r2	配列番号86	AGTGGGATCACAGGGTGAAG	20
CYP2C8	NM_000770	S4946/CYP2C8.p2	配列番号87	TTTTCTCAACTCCTCCACAAGGCA	24
DHPS	NM_013407	S4519/DHPS.f3	配列番号88	GGGAGAACGGGATCAATAGGAT	22
DHPS	NM_013407	S4520/DHPS.r3	配列番号89	GCATCAGCCAGTCCTCAAACCT	21
DHPS	NM_013407	S4521/DHPS.p3	配列番号90	CTCATTGGGCACCAGCAGGTTTCC	24
DIABLO	NM_019887	S0808/DIABLO.f1	配列番号91	CACAATGGCGGCTCTGAAG	19
DIABLO	NM_019887	S0809/DIABLO.r1	配列番号92	ACACAAACACTGTCTGTACCTGAAGA	26
DIABLO	NM_019887	S4813/DIABLO.p1	配列番号93	AAGTTACGCTGCGCGACAGCCAA	23
DKFZp564	XM_047080	S4405/DKFZp5.f2	配列番号94	CAGTGCTTCCATGGACAAGT	20
DKFZp564	XM_047080	S4406/DKFZp5.r2	配列番号95	TGGACAGGGATGATTGATGT	20
DKFZp564	XM_047080	S4407/DKFZp5.p2	配列番号96	ATCTCCATCAGCATGGGCCAGTTT	24
DR5	NM_003842	S2551/DR5.f2	配列番号97	CTCTGAGACAGTGCTTCGATGACT	24
DR5	NM_003842	S2552/DR5.r2	配列番号98	CCATGAGGCCCAACTTCCT	19
DR5	NM_003842	S4979/DR5.p2	配列番号99	CAGACTTGGTGCCCTTTGACTCC	23
EGFR	NM_005228	S0103/EGFR.f2	配列番号100	TGTCGATGGACTTCCAGAAC	20
EGFR	NM_005228	S0105/EGFR.r2	配列番号101	ATTGGGACAGCTTGATCA	19
EGFR	NM_005228	S4999/EGFR.p2	配列番号102	CACCTGGGCAGCTGCCAA	18
EIF4EL3	NM_004846	S4495/EIF4EL.f1	配列番号103	AAGCCGCGGTTGAATGTG	18
EIF4EL3	NM_004846	S4496/EIF4EL.r1	配列番号104	TGACGCCAGCTTCAATGATG	20
EIF4EL3	NM_004846	S4497/EIF4EL.p1	配列番号105	TGACCTCTCCCTCTCTGGATGGCA	25
EPHX1	NM_000120	S1865/EPHX1.f2	配列番号106	ACCGTAGGCTCTGCTCTGAA	20
EPHX1	NM_000120	S1866/EPHX1.r2	配列番号107	TGGTCCAGGTGGAAAACCTC	20
EPHX1	NM_000120	S4754/EPHX1.p2	配列番号108	AGGCAGCCAGACCCACAGGA	20
ErbB3	NM_001982	S0112/ErbB3.f1	配列番号109	CGGTTATGTCATGCCAGATACAC	23
ErbB3	NM_001982	S0114/ErbB3.r1	配列番号110	GAAC TGAGACCCACTGAAGAAAGG	24
ErbB3	NM_001982	S5002/ErbB3.p1	配列番号111	CCTCAAAGGTACTCCCTCCTCCGGG	25
EstR1	NM_000125	S0115/EstR1.f1	配列番号112	CGTGGTGCCCCCTCTATGAC	19
EstR1	NM_000125	S0117/EstR1.r1	配列番号113	GGCTAGTGGGCGCATGTAG	19
EstR1	NM_000125	S4737/EstR1.p1	配列番号114	CTGGAGATGCTGGACGCC	19
FGFR1	NM_023109	S0818/FGFR1.f3	配列番号115	CACGGGACATTACCACATC	20

10

20

30

40

【表 3 - 4】

FGFR1	NM_023109	S0819/FGFR1.r3	配列番号116	GGGTGCCATCCACTTCACA	19	
FGFR1	NM_023109	S4816/FGFR1.p3	配列番号117	ATAAAAAGACAACCAACGGCCGACTGC	27	
FLJ20354	NM_017779	S4309/FLJ203.f1	配列番号118	GCGTATGATTTCCCGAATGAG	21	
FLJ20354	NM_017779	S4310/FLJ203.r1	配列番号119	CAGTGACCTCGTACCCATTGC	21	
FLJ20354	NM_017779	S4311/FLJ203.p1	配列番号120	ATGTTGATATGCCAAACTTCATGA	25	
G-カテニン	NM_002230	S2153/G-Cate.f1	配列番号121	TCAGCAGCAAGGGCATCAT	19	
G-カテニン	NM_002230	S2154/G-Cate.r1	配列番号122	GGTGGTTTTCTTGAGCGTGTACT	23	
G-カテニン	NM_002230	S5044/G-Cate.p1	配列番号123	CGCCCGCAGGCCCTCATCCT	19	
GATA3	NM_002051	S0127/GATA3.f3	配列番号124	CAAAGGAGCTCACTGTGGTGTCT	23	
GATA3	NM_002051	S0129/GATA3.r3	配列番号125	GAGTCAGAATGGCTTATTACAGATG	26	10
GATA3	NM_002051	S5005/GATA3.p3	配列番号126	TGTTCCAACCACTGAATCTGGACC	24	
GSN	NM_000177	S2679/GSN.f3	配列番号127	CTTCTGCTAAGCGGTACATCGA	22	
GSN	NM_000177	S2680/GSN.r3	配列番号128	GGCTCAAAGCCTTGCTTCAC	20	
GSN	NM_000177	S4957/GSN.p3	配列番号129	ACCCAGCCAATCGGGATCGGC	21	
GSTp	NM_000852	S0136/GSTp.f3	配列番号130	GAGACCCTGCTGTCCCAGAA	20	
GSTp	NM_000852	S0138/GSTp.r3	配列番号131	GTTGTAGTCAGCGAAGGAGATC	23	
GSTp	NM_000852	S5007/GSTp.p3	配列番号132	TCCACAATGAAGTCTTGCTCCCT	26	
HER2	NM_004448	S0142/HER2.f3	配列番号133	CGGTGTGAGAAGTGACAGCAA	20	
HER2	NM_004448	S0144/HER2.r3	配列番号134	CCTCTCGCAAGTGCTCCAT	19	
HER2	NM_004448	S4729/HER2.p3	配列番号135	CCAGACCATAGCACACTCGGGCAC	24	
HIF1A	NM_001530	S1207/HIF1A.f3	配列番号136	TGAACATAAAGTCTGCAACATGGA	24	20
HIF1A	NM_001530	S1208/HIF1A.r3	配列番号137	TGAGGTTGGTTACTGTTGGTATCATATA	28	
HIF1A	NM_001530	S4753/HIF1A.p3	配列番号138	TTGCACTGCACAGGCCACATTCAC	24	
HLA-DPB1	NM_002121	S4573/HLA-DP.f1	配列番号139	TCCATGATGGTTCTGCAGGTT	21	
HLA-DPB1	NM_002121	S4574/HLA-DP.r1	配列番号140	TGAGCAGCACCATCAGTAACG	21	
HLA-DPB1	NM_002121	S4575/HLA-DP.p1	配列番号141	CCCCGGACAGTGGCTCTGACG	21	
HNF3A	NM_004496	S0148/HNF3A.f1	配列番号142	TCCAGGATGTTAGGAACTGTGAAG	24	
HNF3A	NM_004496	S0150/HNF3A.r1	配列番号143	GCGTGTCTGCGTAGTAGCTGTT	22	
HNF3A	NM_004496	S5008/HNF3A.p1	配列番号144	AGTCGCTGGTTTCATGCCCTTCCA	24	
ID1	NM_002165	S0820/ID1.f1	配列番号145	AGAACCGCAAGGTGAGCAA	19	
ID1	NM_002165	S0821/ID1.r1	配列番号146	TCCAACCTGAAGGTCCCTGATG	21	
ID1	NM_002165	S4832/ID1.p1	配列番号147	TGGAGATTCTCCAGCACGTACGAC	26	30
ID2	NM_002166	S0151/ID2.f4	配列番号148	AACGACTGCTACTCCAAGCTCAA	23	
ID2	NM_002166	S0153/ID2.r4	配列番号149	GGATTTCATCTTGCTCACCTT	22	
ID2	NM_002166	S5009/ID2.p4	配列番号150	TGCCCAGCATCCCCAGAACAA	22	
IGF1R	NM_000875	S1249/IGF1R.f3	配列番号151	GCATGGTAGCCGAAGATTTCA	21	
IGF1R	NM_000875	S1250/IGF1R.r3	配列番号152	TTCCGGTAATAGTCTGTCTCATAGATATC	30	
IGF1R	NM_000875	S4895/IGF1R.p3	配列番号153	CGCGTCATACCAAATCTCCGATTTTGA	28	
IGFBP2	NM_000597	S1128/IGFBP2.f1	配列番号154	GTGGACAGCACCATGAACA	19	
IGFBP2	NM_000597	S1129/IGFBP2.r1	配列番号155	CCTTCATACCCGACTTGAGG	20	
IGFBP2	NM_000597	S4837/IGFBP2.p1	配列番号156	CTTCCGGCCAGCACTGCCTC	20	
IRS1	NM_005544	S1943/IRS1.f3	配列番号157	CCACAGCTCACCTTCTGTCA	20	
IRS1	NM_005544	S1944/IRS1.r3	配列番号158	CCTCAGTGCCAGTCTCTTCC	20	40
IRS1	NM_005544	S5050/IRS1.p3	配列番号159	TCCATCCCAGCTCCAGCCAG	20	
Ki-67	NM_002417	S0436/Ki-67.f2	配列番号160	CGGACTTTGGGTGCGACTT	19	

【 0 1 2 6 】

【表 3 - 5】

KI-67	NM_002417	S0437/KI-67.r2	配列番号161	TTACAACCTCTTCCACTGGGACGAT	24
KI-67	NM_002417	S4741/KI-67.p2	配列番号162	CCACTTGTCGAACCACCGCTCGT	23
KIAA1209	AJ420468	S4438/KIAA12.f1	配列番号163	GCCTAGCAGTTCTACCATGATCAG	24
KIAA1209	AJ420468	S4439/KIAA12.r1	配列番号164	GGTGATCGGTCCAGATGTTTCT	22
KIAA1209	AJ420468	S4440/KIAA12.p1	配列番号165	AGAGCTCCACCCGCTCGAAGCA	22
KLK10	NM_002776	S2624/KLK10.f3	配列番号166	GCCCAGAGGCTCCATCGT	18
KLK10	NM_002776	S2625/KLK10.r3	配列番号167	CAGAGGTTTGAACAGTGCAGACA	23
KLK10	NM_002776	S4978/KLK10.p3	配列番号168	CCTCTTCCTCCCCAGTCGGCTGA	23
KRT14	NM_000526	S1853/KRT14.f1	配列番号169	GGCCTGCTGAGATCAAAGAC	20
KRT14	NM_000526	S1854/KRT14.r1	配列番号170	GTCCACTGTGGCTGTGAGAA	20
KRT14	NM_000526	S5037/KRT14.p1	配列番号171	TGTTCTCAGGTCCTCAATGGTCTTG	26
KRT17	NM_000422	S0172/KRT17.f2	配列番号172	CGAGGATTGGTTCTTCAGCAA	21
KRT17	NM_000422	S0174/KRT17.r2	配列番号173	ACTCTGCACCAGCTCACTGTTG	22
KRT17	NM_000422	S5013/KRT17.p2	配列番号174	CACCTCGCGGTTCACTTCTCTGT	24
KRT18	NM_000224	S1710/KRT18.f2	配列番号175	AGAGATCGAGGCTCTCAAGG	20
KRT18	NM_000224	S1711/KRT18.r2	配列番号176	GGCCTTTTACTTCCTCTTCG	20
KRT18	NM_000224	S4762/KRT18.p2	配列番号177	TGTTTCTTCTTCATGAAGAGCAGCTCC	27
KRT19	NM_002276	S1515/KRT19.f3	配列番号178	TGAGCGGCAGAATCAGGAGTA	21
KRT19	NM_002276	S1516/KRT19.r3	配列番号179	TGCGGTAGGTGGCAATCTC	19
KRT19	NM_002276	S4866/KRT19.p3	配列番号180	CTCATGGACATCAAGTCGCGGCTG	24
KRT5	NM_000424	S0175/KRT5.f3	配列番号181	tcagtggagaaggagtggga	20
KRT5	NM_000424	S0177/KRT5.r3	配列番号182	tgccataccagaggaaaca	20
KRT5	NM_000424	S5015/KRT5.p3	配列番号183	ccagtcacatctctgttcacaaagca	28
MCM2	NM_004526	S1602/MCM2.f2	配列番号184	GACTTTTGCCCGCTACCTTTC	21
MCM2	NM_004526	S1603/MCM2.r2	配列番号185	GCCACTAACTGCTTCAGTATGAAGAG	26
MCM2	NM_004526	S4900/MCM2.p2	配列番号186	ACAGCTCATGTGTGTACGCCGGA	24
MCM3	NM_002388	S1524/MCM3.f3	配列番号187	GGAGAACAATCCCCTTGAGA	20
MCM3	NM_002388	S1525/MCM3.r3	配列番号188	ATCTCCTGGATGGTGATGGT	20
MCM3	NM_002388	S4870/MCM3.p3	配列番号189	TGGCCTTTCTGTCTACAAGGATCACCA	27
MDM2	NM_002392	S0830/MDM2.f1	配列番号190	CTACAGGGACGCCATCGAA	19
MDM2	NM_002392	S0831/MDM2.r1	配列番号191	ATCCAACCAATCACCTGAATGTT	23
MDM2	NM_002392	S4834/MDM2.p1	配列番号192	CTTACACCAGCATCAAGATCCGG	23
MMP2	NM_004530	S1874/MMP2.f2	配列番号193	CCATGATGGAGAGGCAGACA	20
MMP2	NM_004530	S1875/MMP2.r2	配列番号194	GGAGTCCGTCTTACCGTCAA	21
MMP2	NM_004530	S5039/MMP2.p2	配列番号195	CTGGGAGCATGGCGATGGATACCC	24
MMP9	NM_004994	S0656/MMP9.f1	配列番号196	GAGAACCAATCTCACCGACA	20
MMP9	NM_004994	S0657/MMP9.r1	配列番号197	CACCCGAGTGTAACCATAGC	20
MMP9	NM_004994	S4760/MMP9.p1	配列番号198	ACAGGTATTCTCTGCCAGCTGCC	24
MVP	NM_017458	S0193/MVP.f1	配列番号199	ACGAGAACGAGGGCATCTATGT	22
MVP	NM_017458	S0195/MVP.r1	配列番号200	GCATGTAGGTGCTTCCAATCAC	22
MVP	NM_017458	S5028/MVP.p1	配列番号201	CGCACCTTTCGGTCTTGACATCCT	25
MYH11	NM_002474	S4555/MYH11.f1	配列番号202	CGGTACTTCTCAGGGCTAATATATACG	27
MYH11	NM_002474	S4556/MYH11.r1	配列番号203	CCGAGTAGATGGGCAGGTGTT	21
MYH11	NM_002474	S4557/MYH11.p1	配列番号204	CTCTTCTGCGTGGTGGTCAACCCCTA	26
NEK2	NM_002497	S4327/NEK2.f1	配列番号205	GTGAGGCAGCGCGACTCT	18

10

20

30

40

【表 3 - 6】

NEK2	NM_002497	S4328/NEK2.r1	配列番号206	TGCCAATGGTGTACAACACTTCA	23
NEK2	NM_002497	S4329/NEK2.p1	配列番号207	TGCCTTCCCGGGCTGAGGACT	21
NFKBp65	NM_021975	S0196/NFKBp6.f3	配列番号208	CTGCCGGGATGGCTTCTAT	19
NFKBp65	NM_021975	S0198/NFKBp6.r3	配列番号209	CCAGGTTCTGGAACTGTGGAT	22
NFKBp65	NM_021975	S5030/NFKBp6.p3	配列番号210	CTGAGCTCTGCCCCGACCGCT	21
NPD009	NM_020686	S4474/NPD009.f3	配列番号211	GGCTGTGGCTGAGGCTGTAG	20
NPD009	NM_020686	S4475/NPD009.r3	配列番号212	GGAGCATTGAGGTCAAATCA	21
NPD009	NM_020686	S4476/NPD009.p3	配列番号213	TTCCAGAGTGTCTCACCTCCAGCAGAG	28
PDGFRb	NM_002609	S1346/PDGFRb.f3	配列番号214	CCAGCTCTCCTTCCAGCTAC	20
PDGFRb	NM_002609	S1347/PDGFRb.r3	配列番号215	GGGTGGCTCTCACTTAGCTC	20
PDGFRb	NM_002609	S4931/PDGFRb.p3	配列番号216	ATCAATGTCCCTGTCCGAGTGCTG	24
PLAUR	NM_002659	S1976/PLAUR.f3	配列番号217	CCCATGGATGCTCCTCTGAA	20
PLAUR	NM_002659	S1977/PLAUR.r3	配列番号218	CCGGTGGCTACCAGACATTG	20
PLAUR	NM_002659	S5054/PLAUR.p3	配列番号219	CATTGACTGCCGAGGCCCATG	22
PR	NM_000926	S1336/PR.f6	配列番号220	GCATCAGGCTGTCATTATGG	20
PR	NM_000926	S1337/PR.r6	配列番号221	AGTAGTTGTGCTGCCCTTCC	20
PR	NM_000926	S4743/PR.p6	配列番号222	TGTCCTTACCTGTGGGAGCTGTAAGGTC	28
pS2	NM_003225	S0241/pS2.f2	配列番号223	GCCCTCCAGTGTGCAAAT	19
pS2	NM_003225	S0243/pS2.r2	配列番号224	CGTCGATGGTATTAGGATAGAAGCA	25
pS2	NM_003225	S5026/pS2.p2	配列番号225	TGCTGTTTCGACGACACCGTTCC	23
RAB27B	NM_004163	S4336/RAB27B.f1	配列番号226	GGGACACTGCGGGACAAG	18
RAB27B	NM_004163	S4337/RAB27B.r1	配列番号227	GCCCATGGCGTCTCTGAA	18
RAB27B	NM_004163	S4338/RAB27B.p1	配列番号228	CGGTTCCGGAGTCTCACCAGTGCAT	25
RAD54L	NM_003579	S4369/RAD54L.f1	配列番号229	AGCTAGCCTCAGTGACACACATG	23
RAD54L	NM_003579	S4370/RAD54L.r1	配列番号230	CCGGATCTGACGGCTGTT	18
RAD54L	NM_003579	S4371/RAD54L.p1	配列番号231	ACACAACGTCGGCAGTGCAACCTG	24
RB1	NM_000321	S2700/RB1.f1	配列番号232	CGAAGCCCTTACAAGTTTCC	20
RB1	NM_000321	S2701/RB1.r1	配列番号233	GGACTCTTCAGGGGTGAAAT	20
RB1	NM_000321	S4765/RB1.p1	配列番号234	CCCTTACGGATTCTCGGAGGGAAC	24
RIZ1	NM_012231	S1320/RIZ1.f2	配列番号235	CCAGACGAGCGATTAGAAGC	20
RIZ1	NM_012231	S1321/RIZ1.r2	配列番号236	TCCTCCTCTTCTCCTCCTC	20
RIZ1	NM_012231	S4761/RIZ1.p2	配列番号237	TGTGAGGTGAATGATTGGGGGA	23
RPS6KB1	NM_003161	S2615/RPS6KB.f3	配列番号238	GCTCATTATGAAAAACATCCCAAAC	25
RPS6KB1	NM_003161	S2616/RPS6KB.r3	配列番号239	AAGAAACAGAAGTTGTCTGGCTTTCT	26
RPS6KB1	NM_003161	S4759/RPS6KB.p3	配列番号240	CACACCAACCAATAATTTGCGATT	24
STK15	NM_003600	S0794/STK15.f2	配列番号241	CATCTTCCAGGAGGACCACT	20
STK15	NM_003600	S0795/STK15.r2	配列番号242	TCCGACCTTCAATCATTCA	20
STK15	NM_003600	S4745/STK15.p2	配列番号243	CTCTGTGGCACCCCTGGACTACCTG	24
STMY3	NM_005940	S2067/STMY3.f3	配列番号244	CCTGGAGGCTGCAACATACC	20
STMY3	NM_005940	S2068/STMY3.r3	配列番号245	TACAATGGCTTTGAGGATAGCA	23
STMY3	NM_005940	S4746/STMY3.p3	配列番号246	ATCCTCCTGAAGCCCTTTTCGCAGC	25
SURV	NM_001168	S0259/SURV.f2	配列番号247	TGTTTTGATTCCCGGGCTTA	20
SURV	NM_001168	S0261/SURV.r2	配列番号248	CAAAGCTGTCAGCTCTAGCAAAAG	24
SURV	NM_001168	S4747/SURV.p2	配列番号249	TGCCTTCTCCTCCCTCACTTCTACCT	28
TGFB3	NM_003239	S1653/TGFB3.f1	配列番号250	GGATCGAGCTCTTCCAGATCCT	22

10

20

30

40

【表 3 - 7】

TGFB3	NM_003239	S1654/TGFB3.r1	配列番号251	GCCACCGATATAGCGCTGTT	20
TGFB3	NM_003239	S4911/TGFB3.p1	配列番号252	CGGCCAGATGAGCACATTGCC	21
TIMP2	NM_003255	S1680/TIMP2.f1	配列番号253	TCACCCTCTGTGACTTCATCGT	22
TIMP2	NM_003255	S1681/TIMP2.r1	配列番号254	TGTGGTTCAGGCTCTTCTCTG	22
TIMP2	NM_003255	S4916/TIMP2.p1	配列番号255	CCCTGGGACACCCCTGAGCACCA	22
TIMP3	NM_000362	S1641/TIMP3.f3	配列番号256	CTACCTGCCTTGCTTTGTGA	20
TIMP3	NM_000362	S1642/TIMP3.r3	配列番号257	ACCGAAATTGGAGAGCATGT	20
TIMP3	NM_000362	S4907/TIMP3.p3	配列番号258	CCAAGAACGAGTGTCTCTGGACCG	24
TOP2A	NM_001067	S0271/TOP2A.f4	配列番号259	AATCCAAGGGGGAGAGTGAT	20
TOP2A	NM_001067	S0273/TOP2A.r4	配列番号260	GTACAGATTTTGCCCGAGGA	20
TOP2A	NM_001067	S4777/TOP2A.p4	配列番号261	CATATGGACTTTGACTCAGCTGTGGC	26
TP53BP1	NM_005657	S1747/TP53BP.f2	配列番号262	TGCTGTTGCTGAGTCTGTTG	20
TP53BP1	NM_005657	S1748/TP53BP.r2	配列番号263	CTTGCCTGGCTTCACAGATA	20
TP53BP1	NM_005657	S4924/TP53BP.p2	配列番号264	CCAGTCCCCAGAAGACCATGTCTG	24
VEGF	NM_003376	S0286/VEGF.f1	配列番号265	CTGCTGTCTTGGGTGCATTG	20
VEGF	NM_003376	S0288/VEGF.r1	配列番号266	GCAGCCTGGGACCACTTG	18
VEGF	NM_003376	S4782/VEGF.p1	配列番号267	TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCACCA	25
VEGFB	NM_003377	S2724/VEGFB.f1	配列番号268	TGACGATGGCCTGGAGTGT	19
VEGFB	NM_003377	S2725/VEGFB.r1	配列番号269	GGTACCGGATCATGAGGATCTG	22
VEGFB	NM_003377	S4960/VEGFB.p1	配列番号270	CTGGGCAGCACCAAGTCCGGA	21
VEGFC	NM_005429	S2251/VEGFC.f1	配列番号271	CCTCAGCAAGACGTTATTTGAAATT	25
VEGFC	NM_005429	S2252/VEGFC.r1	配列番号272	AAGTGTGATTGGCAAACTGATTG	24
VEGFC	NM_005429	S4758/VEGFC.p1	配列番号273	CCTCTCTCTCAAGGCCCAAACCAGT	26
VIM	NM_003380	S0790/VIM.f3	配列番号274	TGCCCTTAAAGGAACCAATGA	21
VIM	NM_003380	S0791/VIM.r3	配列番号275	GCTTCAACGGCAAAGTTCTCTT	22
VIM	NM_003380	S4810/VIM.p3	配列番号276	ATTTCACGCATCTGGCGTTCCA	22
ZNF217	NM_006526	S2739/ZNF217.f3	配列番号277	ACCCAGTAGCAAGGAGAAGC	20
ZNF217	NM_006526	S2740/ZNF217.r3	配列番号278	CAGCTGGTGGTAGGTTCTGA	20
ZNF217	NM_006526	S4961/ZNF217.p3	配列番号279	CACTCACTGCTCCGAGTGCGG	21

10

20

【 0 1 2 9 】

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PC1/US2004/016553
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
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, WPI Data, PAJ, EMBL, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DIAS SERGIO ET AL: "Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy" BLOOD, vol. 99, no. 6, 15 March 2002 (2002-03-15), pages 2179-2184, XP002318502 ISSN: 0006-4971 the whole document	1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 March 2005		Date of mailing of the international search report 03.06.2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hagenmaier, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PC/US2004/016553

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LACROIX M ET AL: "A LOW-DENSITY DNA MICROARRAY FOR ANALYSIS OF MARKERS IN BREAST CANCER" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MARKERS, WICHTIG EDITORE, MILAN, IT, vol. 17, no. 1, 2002, pages 5-23, XP008010290 ISSN: 0393-6155 page 6, left-hand column, paragraph 2 page 18; table 1 the whole document</p>	<p>1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64</p>
X	<p>ROSS DT ET AL: "Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines" NATURE GENETICS, NATURE AMERICA, NEW YORK, US, vol. 24, March 2000 (2000-03), pages 227-235, XP002246279 ISSN: 1061-4036 the whole document -& ANONYMOUS: "2 datasets contain expression data for Hs.435215" INTERNET ARTICLE, 'Online! XP002318503 Retrieved from the Internet: URL:http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/expressionSearch?option=cluster&criteria=Hs.435215&organism=Hs> 'retrieved on 2005-02-14! abstract -& ANONYMOUS: "GenePage for Gene HS.435215" INTERNET ARTICLE, 'Online! XP002318504 Retrieved from the Internet: URL:http://genome-www5.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceResult> 'retrieved on 2005-02-21! the whole document</p>	<p>32,36,44</p>
X	<p>ANONYMOUS: "GeneChip Human Genome U95Av2" AFFYMETRIX PRODUCT CATALOG, XX, XX, July 2002 (2002-07), pages 1-3, XP002278897 the whole document -& ANONYMOUS: "Information for probe set 1934_s_at(HG-U95Av2)" INTERNET ARTICLE, 'Online! XP002318987 Retrieved from the Internet: URL:http://genecards.weizmann.ac.il/cgi-bin/geneannot/GA_search.pl?keyword_type=probe_set_id&keyword=1934_s_at&target=genecards> 'retrieved on 2005-02-21! -/--</p>	<p>32,36,44</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PC1/US2004/016553

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>-& AFFYMETRIX: "GeneChip Probe Selection and Array Design" INTERNET ARTICLE, 'Online! XP002318988 Retrieved from the Internet: URL:http://www.affymetrix.com/technology/design/index.affx> 'retrieved on 2005-02-21! the whole document</p>	
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! 10 January 1996 (1996-01-10), "Human vascular endothelial growth factor related protein VRP mRNA, complete cds." XP002318992 retrieved from EBI accession no. EM_PRO:U43142 Database accession no. U43142 See title.</p>	62-64
Y	<p>TSAI PEI-WEN ET AL: "Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-beta1. A critical role of p38/nuclear factor-kappaB signaling pathway." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 278, no. 8, 21 February 2003 (2003-02-21), pages 5750-5759, XP002318505 ISSN: 0021-9258 page 5757, right-hand column, paragraph 1 page 5758, left-hand column, paragraph 2</p>	1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64
Y	<p>NAKAMURA YASUSHI ET AL: "Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor-C in breast carcinoma with long-term follow-up." MODERN PATHOLOGY, vol. 16, no. 4, April 2003 (2003-04), pages 309-314, XP002318506 ISSN: 0893-3952 the whole document</p>	1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64
Y	<p>KINOSHITA JUNKO ET AL: "Clinical significance of vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) in breast cancer" BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, vol. 66, no. 2, March 2001 (2001-03), pages 159-164, XP008043038 ISSN: 0167-6806 the whole document</p>	1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/US2004/016553

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 02/46467 A (IPSOGEN; BERTUCCI, FRANCOIS; HOULGATTE, REMI; BIRNBAUM, DANIEL; NGUYEN) 13 June 2002 (2002-06-13)</p> <p>the whole document</p>	<p>1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64</p>
Y	<p>SOTIRIOU CHRISTOS ET AL: "Gene expression profiles derived from fine needle aspiration correlate with response to systemic chemotherapy in breast cancer." BREAST CANCER RESEARCH : BCR. 2002, vol. 4, no. 3, 2002, pages R3-1-R3-8, XP002318508 ISSN: 1465-5411 the whole document</p>	<p>1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64</p>
Y	<p>VEER VAN 'T L J ET AL: "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 415, no. 6871, 31 January 2002 (2002-01-31), pages 530-536, XP002259781 ISSN: 0028-0836 the whole document</p>	<p>1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64</p>
Y	<p>BUCHHOLZ T A ET AL: "GLOBAL GENE EXPRESSION CHANGES DURING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY FOR HUMAN BREAST CANCER" CANCER JOURNAL, JONES AND BARTLETT PUBLISHERS, US, vol. 8, no. 6, November 2002 (2002-11), pages 461-468, XP009015206 ISSN: 1528-9117 the whole document</p>	<p>1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64</p>
Y	<p>STEARNS VERED ET AL: "A prospective randomized pilot study to evaluate predictors of response in serial core biopsies to single agent neoadjuvant doxorubicin or paclitaxel for patients with locally advanced breast cancer." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. JAN 2003, vol. 9, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 124-133, XP002318509 ISSN: 1078-0432 the whole document</p>	<p>1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64</p>

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC1/US2004/016553

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SORLIE T ET AL: "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 98, no. 19, 11 September 2001 (2001-09-11), pages 10869-10874, XP002215483 ISSN: 0027-8424 the whole document	1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64
Y	MUSS HYMAN B ET AL: "C-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer" NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 330, no. 18, 1994, pages 1260-1266, XP009040793 ISSN: 0028-4793 the whole document	1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64
Y	SPECHT K ET AL: "Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY. FEB 2001, vol. 158, no. 2, February 2001 (2001-02), pages 419-429, XP002318989 ISSN: 0002-9440 the whole document	1,2, 4-20, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64
E	WO 2004/046386 A (GENOMIC HEALTH, INC; VALL D'HEBRON UNIVERSITY HOSPITAL; BAKER, JOFFRE,) 3 June 2004 (2004-06-03) See Seq.IDs 271-273 and Seq.ID 91 the whole document	1,2,4-6, 23-32, 36,44, 46-51, 62-64
E	WO 2004/074518 A (GENOMIC HEALTH, INC; SCOTT, RANDAL, W; KIEFER, MICHAEL, C; BAKER, JOFF) 2 September 2004 (2004-09-02) the whole document	1,2,4-9, 23-32, 36,44, 46-51,62
P,X	WO 03/078662 A (GENOMIC HEALTH; BAKER, JOFFRE, B; CRONIN, MAUREEN, T; KIEFER, MICHAEL,) 25 September 2003 (2003-09-25) the whole document	32,36, 44, 46-51,62
P,Y		1,2,4-9, 23-30, 63,64

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

Information on patent family members

PGI/US2004/016553

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0246467	A	13-06-2002	US 2003143539 A1	31-07-2003
			AU 3479902 A	18-06-2002
			CA 2430981 A1	13-06-2002
			EP 1353947 A2	22-10-2003
			WO 0246467 A2	13-06-2002
			JP 2004537261 T	16-12-2004
WO 2004046386	A	03-06-2004	AU 2003295598 A1	15-06-2004
			WO 2004046386 A1	03-06-2004
			US 2005019785 A1	27-01-2005
WO 2004074518	A	02-09-2004	US 2004191817 A1	30-09-2004
			WO 2004074518 A1	02-09-2004
WO 03078662	A	25-09-2003	AU 2003253986 A1	29-09-2003
			CA 2478850 A1	25-09-2003
			EP 1488007 A1	22-12-2004
			WO 03078662 A1	25-09-2003
			US 2003225528 A1	04-12-2003

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 national application No.
PCT/US2004/016553
Box 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 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-2, 4-20, 23-32, 36, 44, 46-51, 62-64 (all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: 1-2,4-20,23-32,36,44,46-51,62-64 (all partially)

Methods for preparing a personalized genomics profile of a subject diagnosed with cancer and for predicting the response of said subject to chemotherapy wherein the method comprises determining the expression level of one gene, especially wherein the one gene is VEGFC, especially wherein the subject has been diagnosed with breast cancer; array comprising polynucleotides hybridizing to VEGFC; a PCR primer probe set consisting of primers with Seq.ID 271-273; a PCR amplicon with Seq. ID 370.

Invention 2: 1-2,4-7,46-48 (all partially)

Methods for preparing a personalized genomics profile of a subject diagnosed with cancer and for predicting the response of said subject to chemotherapy wherein the method comprises determining the expression level of one gene, wherein the one gene is VEGFC and wherein the subject has been diagnosed with ovarian cancer.

Invention 3: 1-2,4-7,46-48 (all partially)

Methods for preparing a personalized genomics profile of a subject diagnosed with cancer and for predicting the response of said subject to chemotherapy wherein the method comprises determining the expression level of one gene, wherein the one gene is VEGFC and wherein the subject has been diagnosed with gastric cancer.

Invention 4: 1-2,4-7,46-48 (all partially)

Methods for preparing a personalized genomics profile of a subject diagnosed with cancer and for predicting the response of said subject to chemotherapy wherein the method comprises determining the expression level of one gene, wherein the one gene is VEGFC and wherein the subject has been diagnosed with colorectal cancer.

Invention 5: 1-2,4-7,46-48 (all partially)

Methods for preparing a personalized genomics profile of a subject diagnosed with cancer and for predicting the response of said subject to chemotherapy wherein the method comprises determining the expression level of one gene, wherein the one gene is VEGFC and wherein the subject has been diagnosed with prostate cancer.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Invention 6: 1-2,4-7,46-48 (all partially)

Methods for preparing a personalized genomics profile of a subject diagnosed with cancer and for predicting the response of said subject to chemotherapy wherein the method comprises determining the expression level of one gene, wherein the one gene is VEGFC and wherein the subject has been diagnosed with pancreatic cancer.

Invention 7: 1-2,4-7,46-48 (all partially)

Methods for preparing a personalized genomics profile of a subject diagnosed with cancer and for predicting the response of said subject to chemotherapy wherein the method comprises determining the expression level of one gene, wherein the one gene is VEGFC and wherein the subject has been diagnosed with lung cancer.

Invention 8: 32,34,36,45 (all partially)

Array comprising polynucleotides hybridizing to VEGFC wherein at least one of said polynucleotides comprises an intron-based sequence the expression of which correlates with the expression of a corresponding exon sequence.

Inventions 9-47 : claims 1-2,4-33,36-64 (all partially)

Methods for preparing a personalized genomics profile of a subject diagnosed with cancer and for predicting the response of said subject to chemotherapy wherein the method comprises determining the expression level of one gene, wherein the one gene is B-catenin; array comprising polynucleotides hybridizing to VEGFC; array comprising polynucleotides which hybridize to B-catenin and all genes listed in claim 32; array comprising polynucleotides which hybridize to B-catenin and all genes listed in claim 36; a PCR primer probe set consisting of primers specific to B-catenin as listed in table 3 for; a PCR amplicon from B-catenin as listed in table 4.

..ibidem for inventions 10-47, each relating to a different gene selected from MMP2; MMP9; CNN; FLJ20354; TGFB3; PDGFRb ; PLAUR; KRT19; ID1 ; RIZ1 ; RAD54L; RB1 ; SURV ; EIF4EL3; CYP2C8 ; STK15; ACTG2; NEK2; cMet ; TIMP2 ; C20 orf1; DR5 ; CD31; BIN1 ; COL1A2 ; HIF1A ; VIM ; CDC20; ID2 ; MCM2; CCNB1 ; MYH11 ; Chk2; G-Catenin; HER2; GSN; Ki-67; TOP2A.

Inventions 48-101: 1-4,6-35,38-61 (all partially)

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Methods for preparing a personalized genomics profile of a subject diagnosed with cancer and for predicting the response of said subject to chemotherapy wherein the method comprises determining the expression level of one gene, wherein the one gene is CCND1; array comprising polynucleotides hybridizing to CCND1; array comprising polynucleotides which hybridize to CCND1 and all genes listed in claim 32; array comprising polynucleotides which hybridize to CCND1 and all genes listed in claim 36; a PCR primer probe set consisting of primers specific to CCND1 as listed in table 3 for; a PCR amplicon from CCND1 as listed in table 4.

..ibidem for inventions 49-101, each relating to a different gene selected from EstR1; KRT18 ; GATA3; cIAP2 ; KRT5 ; RAB27B ; IGF1R ; HNF3A; CA9; MCM3; STMY3; NPDO09 ; BAD; BBC3 ; EGFR; CD9; AKT1 ; CD3z; KRT14 ; DKFZp564; Bcl2 ; BECN1 ; KLK10; DIABLO; MVP; VEGFB; ErbB3 ; MDM2; Bclx; CDH1; HLA-DPB1 ; PR; KRT17 ; GSTp ; IRS1 ; NFkBp65 ; IGFBP2; RPS6KB1 ; DHPS; TIMP3 ; ZNF217; KIAA1209 ; COX2; pS2; BRK; CEGP1 ; EPHX1 ; VEGF; TP53BP1 ; COL1A1 ; FGFR1 ; and CTSL2.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/337	
A 6 1 K 31/475 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	
	A 6 1 K 31/475	

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

(72) 発明者 ベーカー, ジョフリ ビー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94037, モンタラ, アベリー ストリート 1400

(72) 発明者 ミラー, キャシー ディー.
アメリカ合衆国 インディアナ 46202, インディアナポリス, バーンヒル ドライブ 535, アールティアー 474, インディアナ カンサー パビリオン

(72) 発明者 シャク, スティーブン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94010, ヒルズバラ, フェアウェイ サークル 648

(72) 発明者 スレッジ, ジョージ ダブリュー.
アメリカ合衆国 インディアナ 46202, インディアナポリス, バーンヒル ドライブ 535, アールティアー 474, インディアナ カンサー パビリオン

(72) 発明者 スーレ, シャロン イー.
アメリカ合衆国 インディアナ 46202, インディアナポリス, バーンヒル ドライブ 535, アールティアー 473, インディアナ ユニバーシティ スクール オブ メディシン, ディビジョン オブ ヘマトロジー/オンコロジー

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 HA14
4B029 AA07 BB11 CC03 CC08 FA15
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55 QR62
QS25 QS34 QX02
4C086 AA01 BA02 CB21 EA10 MA01 NA06 ZB26