

(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2017-506506

(P2017-506506A)

(43) 公表日 平成29年3月9日 (2017.3.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 31/282 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/282	4 C O 8 4
<b>A 6 1 K 31/337 (2006.01)</b>	A 6 1 K 31/337	4 C O 8 6
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C 2 O 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 101 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2016-550631 (P2016-550631)	(71) 出願人	515149328
(86) (22) 出願日	平成27年2月9日 (2015.2.9)		アルマック・ダイアグノスティクス・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成28年9月23日 (2016.9.23)		Almac Diagnostics Limited
(86) 国際出願番号	PCT/GB2015/050352		英国ビーティ63・5キューディ、クレイガボン、シーゴー・インダストリアル・エステイト20番、アルマック・ハウス
(87) 国際公開番号	W02015/118353	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開日	平成27年8月13日 (2015.8.13)		弁理士 田中 光雄
(31) 優先権主張番号	61/937, 224	(74) 代理人	100084146
(32) 優先日	平成26年2月7日 (2014.2.7)		弁理士 山崎 宏
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100122301
(31) 優先権主張番号	1409479.1		弁理士 富田 憲史
(32) 優先日	平成26年5月28日 (2014.5.28)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗血管新生薬への応答およびがんの予後の予測のための分子診断試験

## (57) 【要約】

抗血管新生治療剤を、対象に投与するかどうかを選択する方法は、該対象由来のサンプルにおいて、表2または表3から選択される1個以上のバイオマーカーの発現レベルを測定する工程；1個以上のバイオマーカーの発現レベルから、対象由来のサンプルがバイオマーカーサインについて陽性であるか陰性であるかを評価する工程を含み、該サンプルがバイオマーカーサインについて陽性である場合、抗血管新生治療剤は禁忌である。関連する予後についての方法および処置方法もまた提供する。本発明は、特に、卵巣がんおよび結腸直腸がんに適用可能である。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

対象に抗血管新生治療剤を投与するかどうかを選択する方法であって：

対象由来のサンプルにおける表 2 または表 3 から選択される 1 個以上のバイオマーカーの発現レベルを測定すること；

1 個以上のバイオマーカーの発現レベルから、対象由来のサンプルがバイオマーカーサインについて陽性であるかまたは陰性であるかを評価することを含み、

対象がバイオマーカーサインについて陽性である場合、抗血管新生治療剤が禁忌である、方法。

**【請求項 2】**

サンプルがバイオマーカーサインについて陽性であるかまたは陰性であるかを評価することが：

1 個以上のバイオマーカーについてサンプル発現スコアを決定すること；

該サンプル発現スコアを閾値スコアと比較すること；および

該サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るかまたは同等であるかを決定することを含み、該サンプル発現スコアが閾値スコアを上回るかまたは同等である場合、該サンプルはバイオマーカーサインについて陽性である、請求項 1 記載の方法。

**【請求項 3】**

対象が、がん罹患している、請求項 1 または 2 記載の方法。

**【請求項 4】**

がんが、卵巣がんまたは結腸直腸がんである、請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の方法。

**【請求項 5】**

卵巣がんが、ハイグレード漿液性卵巣がんである、請求項 4 記載の方法。

**【請求項 6】**

対象が、化学療法剤による処置を受けているか、または、受けたことがある、請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の方法。

**【請求項 7】**

がんを処置する方法であって、対象に化学療法剤を投与すること、および、抗血管新生治療剤を投与しないことを含み、該対象が、請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の方法に基づいて処置のために選択され、該対象がバイオマーカーサインについて陽性である、方法。

**【請求項 8】**

がんを処置する方法であって、対象に化学療法剤を投与すること、および、抗血管新生治療剤を投与しないことを含み、

対象が、

対象由来のサンプルにおける表 2 または表 3 から選択される 1 個以上のバイオマーカーの発現レベルを測定すること；

バイオマーカーの発現レベルから、対象由来のサンプルが、バイオマーカーサインについて陽性であるか陰性であるかを評価することにより、処置のために選択され、

対象がバイオマーカーサインについて陽性である場合に、該対象が処置のために選択される、方法。

**【請求項 9】**

対象におけるがんを処置するのに使用するための化学療法剤であって、

対象が、処置のために、請求項 1 ~ 8 のいずれか記載の方法に基づいて選択され、対象がバイオマーカーサインについて陽性である場合、該対象を抗血管新生治療剤で処置しない、化学療法剤。

**【請求項 10】**

対象におけるがんの処置に使用するための化学療法剤であって、

対象が、

対象由来のサンプルにおける表 2 または表 3 から選択される 1 個以上のバイオマーカーの発現レベルを測定すること；

10

20

30

40

50

バイオマーカーの発現レベルから、対象由来のサンプルがバイオマーカーサインについて陽性であるか、または陰性であるかを評価することにより処置のために選択され、

サンプルがバイオマーカーサインについて陽性である場合、該対象を処置のために選択し、該対象を抗血管新生治療剤で処置しない、化学療法剤。

【請求項 1 1】

がんを処置する方法であって、対象に化学療法剤を投与することを含み、表 2 または表 3 から選択される 1 個以上のバイオマーカーの発現レベルにより決定されるバイオマーカーサインについて対象が陽性であり、抗血管新生治療剤が投与されない、方法。

10

【請求項 1 2】

対象におけるがんの処置に使用するための化学療法剤であって、対象が、表 2 または表 3 から選択される 1 個以上のバイオマーカーの発現レベルにより定義されるバイオマーカーサインについて陽性であり、該対象が抗血管新生剤で処置されない、化学療法剤。

【請求項 1 3】

化学療法剤が、プラチナベースの化学療法剤、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せを含む、請求項 6 ~ 8 および 1 1 のいずれか記載の方法、または、請求項 9、1 0 および 1 2 のいずれか記載の使用のための化学療法剤。

20

【請求項 1 4】

化学療法剤が、プラチナベースの化学療法剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せを含む、請求項 6 ~ 8 および 1 1 のいずれか記載の方法、または請求項 9、1 0 および 1 2 のいずれか記載の使用のための化学療法剤。

【請求項 1 5】

化学療法剤がカルボプラチンおよび/またはパクリタキセルを含む、請求項 6 ~ 8 および 1 1 のいずれか記載の方法、または、請求項 9、1 0 および 1 2 のいずれか記載の使用のための化学療法剤。

【請求項 1 6】

抗血管新生治療剤が、VEGF 経路標的治療剤、アンジオポエチン - T I E 2 経路阻害剤、内在性血管新生阻害剤または免疫調節剤である、請求項 1 ~ 8、1 1 および 1 3 ~ 1 5 のいずれか記載の方法、または、請求項 9、1 0 および 1 2 ~ 1 5 のいずれか記載の使用のための化学療法剤。

30

【請求項 1 7】

VEGF 経路標的治療剤が、ベバシズマブ(アバスタ)、アフリバーセプト(VEGF Trap)、I M C - 1 1 2 1 B (ラムシルマブ)、イマチニブ(グリベック)、ソラフェニブ(ネクサバル)、ゲフィチニブ(イレッサ)、スニチニブ(スーテント)、エルロチニブ、チボザニブ、セディラニブ(Recentin)、パゾパニブ(ヴォトリエント)、B I B F 1 1 2 0 (バルガテフ)、ドビチニブ、セマクサニブ(Sugen)、アキシチニブ(AG013736)、バンデタニブ(ザクティマ)、ニロチニブ(タシグナ)、ダサチニブ(スプリセル)、パタラニブ、モテサニブ、A B T - 8 6 9、T K I - 2 5 8 またはその組合せから選択される、請求項 1 6 記載の方法、または使用のための化学療法剤。

40

【請求項 1 8】

アンジオポエチン - T I E 2 経路阻害剤が、A M G - 3 8 6、P F - 4 8 5 6 8 8 4 C V X - 0 6 0、C E P - 1 1 9 8 1、C E - 2 4 5 6 7 7、M E D I - 3 6 1 7、C V X - 2 4 1、トラスツズマブ (ハーセプチン) またはその組合せから選択される、請求項 1 6 記載の方法、または使用のための化学療法剤。

【請求項 1 9】

内在性血管新生阻害剤が、トロンスポンジン、エンドスタチン、ツムスタチン、カンスタチン、アレスタチン、アンジオスタチン、バソスタチン、インターフェロンアルファマ

50

たはその組合せから選択される、請求項 16 記載の方法、または使用のための化学療法剤。

【請求項 20】

免疫調節剤が、サリドマイドおよびレナリドミドから選択される、請求項 16 記載の方法または、使用のための化学療法剤。

【請求項 21】

VEGF 経路標的治療剤がベバシズマブである、請求項 16 記載の方法または、使用のための化学療法剤。

【請求項 22】

バイオマーカーが、IGF2、SOX11、INS、CXCL17、SLC5A1、TMMEM45A、CXCR2P1、MFAP2、MATN3またはRTP4の1個以上を含む、請求項 1～8、11および13～21のいずれか記載の方法、または請求項 9、10および12～21のいずれか記載の、使用のための化学療法剤。

10

【請求項 23】

該バイオマーカーが、表 2 に記載のバイオマーカーを含む、請求項 1～8、11および13～21のいずれか記載の方法、または、請求項 9、10および12～21のいずれか記載の、使用のための化学療法剤。

【請求項 24】

サンプルが、バイオマーカーサインについて陽性であるか、または陰性であるかを評価することが、

20

1 個以上のバイオマーカーについてのサンプル発現スコアを決定すること；

サンプル発現スコアを閾値スコアと比較すること；および

サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るかまたは同等であるかを決定することを含み、

該サンプル発現スコアが閾値スコアを上回るかまたは同等である場合、該サンプルはバイオマーカーサインについて陽性である、請求項 7～8、11および13～23のいずれか記載の方法、または請求項 9、10および12～23のいずれか記載の、使用のための化学療法剤。

【請求項 25】

対象が、がん罹患している、請求項 7～8、11および13～24のいずれか記載の方法、または、請求項 9、10および12～24のいずれか記載の、使用のための化学療法剤。

30

【請求項 26】

がんが、ハイグレード漿液性卵巣がんであってよい卵巣がんまたは、結腸直腸がんである、請求項 25 記載の方法または、使用のための化学療法剤。

【請求項 27】

発現スコアを、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値が、表 2 に定義される、請求項 2 または 24 に記載の方法、または請求項 24 に記載の、使用のための化学療法剤。

【請求項 28】

発現スコアを、各バイオマーカーについての重み値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重みが、表 3 に定義するように、絶対値が順番に減少するようにランク付けされる、請求項 2 または 24 に記載の方法、または請求項 24 に記載の、使用のための化学療法剤。

40

【請求項 29】

バイオマーカーパネルが、IGF2、CDR1、COL3A1、SPARC、TIMP3、INS、COL8A1、NUAK1、MATN3、TMMEM45Aの1個以上を含む、請求項 1～8、11および13～28のいずれか記載の方法、または請求項 9、10および12～28のいずれか記載の、使用のための化学療法剤。

【請求項 30】

50

バイオマーカーパネルがINS、SPARC、COLA1、COL3A1、CDR1、NUAK1、TIMP3およびMMP14の1個以上を含む、請求項1～8、11および13～28のいずれか記載の方法、または、請求項9、10および12～28のいずれか記載の使用のための化学療法剤。

【請求項31】

がん罹患している対象の臨床予後を決定する方法であって：

対象由来のサンプルにおける表2または表3から選択される1個以上のバイオマーカーの発現レベルを測定すること；

1個以上のバイオマーカーの発現レベルから、対象由来のサンプルがバイオマーカーサインについて陽性であるかまたは陰性であるかを評価すること

を含み、対象がバイオマーカーサインについて陽性である場合、該対象は良好な予後を有する、方法。

10

【請求項32】

サンプルがバイオマーカーサインについて陽性であるか、または陰性であるかを評価することが：

バイオマーカーについてのサンプル発現スコアを決定すること；

該サンプル発現スコアを閾値スコアと比較すること；および

該サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るかまたは同等であるかを決定することを含み、

該サンプル発現スコアが閾値スコアを上回るかまたは同等である場合、該サンプルはバイオマーカーサインについて陽性である、請求項28記載の方法。

20

【請求項33】

良好な予後が、バイオマーカーサインについて陰性であるサンプル（閾値スコアを下回るサンプル発現スコアを有する）と比較して、無増悪生存率または全生存率の上昇を示す、請求項31または32記載の方法。

【請求項34】

がんが、卵巣がんまたは結腸直腸がんである、請求項31～33のいずれか記載の方法。

【請求項35】

卵巣がんが、ハイグレード漿液性卵巣がんである、請求項34記載の方法。

30

【請求項36】

対象が、化学療法処置を受けている、受けたことがある、および/または受ける予定があり、かつ/または抗血管新生治療剤による処置を受ける予定がない、請求項31～35のいずれか記載の方法。

【請求項37】

化学療法処置が、プラチナベースの化学療法剤、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含む、請求項36記載の方法。

【請求項38】

化学療法処置が、プラチナベースの化学療法剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含む、請求項36記載の方法。

40

【請求項39】

化学療法処置が、パクリタキセルおよびカルボプラチンの投与を含む、請求項36記載の方法。

【請求項40】

バイオマーカーが、IGF2、SOX11、INS、CXCL17、SLC5A1、TMEM45A、CXCR2P1、MFAP2、MATN3またはRTP4の1個以上を含む、請求項31～39のいずれか記載の方法。

【請求項41】

バイオマーカーが、表2に記載のバイオマーカーを含む、請求項31～40のいずれか

50

記載の方法。

【請求項 4 2】

発現スコアを、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値が、表 2 に定義される、請求項 3 2 ~ 4 1 のいずれか記載の方法。

【請求項 4 3】

発現スコアを、各バイオマーカーについての重み値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重みが、表 3 に定義するように、絶対値が順番に減少するようにランク付けされる、請求項 3 2 ~ 4 1 のいずれか記載の方法。

【請求項 4 4】

バイオマーカーが、IGF 2、CDR 1、COL 3 A 1、SPARC、TIMP 3、INS、COL 8 A 1、NUAK 1、MATN 3、TMEM 4 5 A の 1 個以上を含む、請求項 3 1 ~ 4 3 のいずれか記載の方法。

【請求項 4 5】

バイオマーカーが、INS、SPARC、COLA 1、COL 3 A 1、CDR 1、NUAK 1、TIMP 3 および MMP 1 4 の 1 個以上を含む、請求項 3 1 ~ 4 4 のいずれか記載の方法。

【請求項 4 6】

ベバシズマブを対象に投与するかどうかを選択する方法であって：

プラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤を用いた処置を受けているか、受けたことがあるか、および/または受ける予定がある、卵巣がん罹患している対象より得た試験サンプルにおいて；

1 個、2 個、またはそれより多い、最大で全ての、表 2 または 3 から選択されるバイオマーカーの発現レベルを評価すること；

1 個、2 個またはそれより多くのバイオマーカーの発現レベルから、対象由来のサンプルが、バイオマーカーサインについて陽性であるか陰性であるかを評価すること；

サンプルがバイオマーカーサインについて陽性であるかどうかに基づいて、処置を選択すること、を含み、

該サンプルがバイオマーカーサインについて陽性である場合、ベバシズマブが禁忌である、方法。

【請求項 4 7】

サンプルが、バイオマーカーサインについて陽性であるかまたは陰性であるかを評価することが；

1 個、2 個またはそれより多くのバイオマーカーについてサンプル発現スコアを決定すること；

サンプル発現スコアを閾値スコアと比較すること；および

サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るかまたは同等であるかを決定することを含み、

該サンプル発現スコアが閾値スコアを上回るかまたは同等である場合、該サンプルはバイオマーカーサインについて陽性である、請求項 4 6 記載の方法。

【請求項 4 8】

卵巣がんが、漿液性卵巣がんを含む、請求項 4 6 または 4 7 記載の方法。

【請求項 4 9】

漿液性卵巣がんが、ハイグレード漿液性卵巣がんである、請求項 4 8 記載の方法。

【請求項 5 0】

ベバシズマブが禁忌である場合、該患者を、プラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤で処置する、請求項 4 6 ~ 4 9 のいずれか記載の方法。

【請求項 5 1】

サンプル発現スコアが閾値スコアを下回る場合、該患者を、プラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤を、ベバシズマブとともに用いて処置する、請求項 4 6

10

20

30

40

50

～ 4 9 のいずれか記載の方法。

【請求項 5 2】

プラチナベースの化学療法剤がカルボプラチンを含む、請求項 4 6 ～ 5 1 のいずれか記載の方法。

【請求項 5 3】

有糸分裂阻害剤がタキサンを含み、パクリタキセルを含んでいてよい、請求項 4 6 ～ 5 2 のいずれか記載の方法。

【請求項 5 4】

バイオマーカーが、IGF 2、SOX 1 1、INS、CXCL 1 7、SLC 5 A 1、TMEM 4 5 A、CXCR 2 P 1、MFAP 2、MATN 3 または RTP 4 の 1 個以上を含む、請求項 4 6 ～ 5 3 のいずれか記載の方法。

10

【請求項 5 5】

バイオマーカーが、表 2 に記載のバイオマーカーを含む、請求項 4 6 ～ 5 3 のいずれか記載の方法。

【請求項 5 6】

該発現スコアを、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値が表 2 に定義される、請求項 4 7 ～ 5 5 のいずれか記載の方法。

【請求項 5 7】

該発現スコアを、各バイオマーカーについての重み値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重みが、表 3 に定義するように、絶対値が順番に減少するようにランク付けされる、請求項 4 7 ～ 5 5 のいずれか記載の方法。

20

【請求項 5 8】

バイオマーカーパネルが、IGF 2、CDR 1、COL 3 A 1、SPARC、TIMP 3、INS、COL 8 A 1、NUAK 1、MATN 3、TMEM 4 5 A の 1 個以上を含む、請求項 4 6 ～ 5 7 のいずれか記載の方法。

【請求項 5 9】

バイオマーカーパネルが、INS、SPARC、COLA 1、COL 3 A 1、CDR 1、NUAK 1、TIMP 3 および MMP 1 4 の 1 個以上を含む、請求項 4 6 ～ 5 8 のいずれか記載の方法。

30

【請求項 6 0】

対象の臨床予後を決定する方法であって：

- a．プラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤を用いて処置されている、処置されたことがある、および/または処置される予定がある、卵巣がんまたは結腸直腸がん罹患している対象より得た試験サンプルにおいて；
- b．表 2 または表 3 から選択される 1 個以上、最大で全てのバイオマーカーの発現レベルを測定すること；
- c．1 個以上のバイオマーカーの発現レベルから、対象由来のサンプルがバイオマーカーサインについて陽性であるかまたは陰性であるかを評価することを含み、該サンプルがバイオマーカーサインについて陽性である場合、該対象が良好な予後を有する、方法。

40

【請求項 6 1】

サンプルがバイオマーカーサインについて陽性であるか陰性であるかを評価することが：

- a．1 個以上のバイオマーカーについてサンプル発現スコアを決定すること；
- b．サンプル発現スコアを閾値スコアと比較すること；および
- c．サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るかまたは同等であるかを決定することを含み、該サンプル発現スコアが閾値スコアを上回るかまたは同等である場合、該サンプルはバイオマーカーサインについて陽性である、請求項 6 0 記載の方法。

【請求項 6 2】

50

卵巣がんが、漿液性卵巣がんを含む、請求項 6 0 または 6 1 記載の方法。

【請求項 6 3】

漿液性卵巣がんが、ハイグレード漿液性卵巣がんである、請求項 6 2 記載の方法。

【請求項 6 4】

患者が良好な予後を有する場合、ペバシズマブを用いた処置が禁忌である、請求項 6 0 ~ 6 3 のいずれか記載の方法。

【請求項 6 5】

サンプル発現スコアが、閾値スコアを下回る場合、該患者を、プラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤を、ペバシズマブとともに用いて処置する、請求項 6 0 ~ 6 3 のいずれか記載の方法。

10

【請求項 6 6】

プラチナベースの化学療法剤がカルボプラチンを含む、請求項 6 0 ~ 6 5 のいずれか記載の方法。

【請求項 6 7】

有糸分裂阻害剤が、タキサンを含み、パクリタキセルを含んでいてよい、請求項 6 0 ~ 6 6 のいずれか記載の方法。

【請求項 6 8】

バイオマーカーパネルが、IGF 2、SOX 1 1、INS、CXCL 1 7、SLC 5 A 1、TMEM 4 5 A、CXCR 2 P 1、MFAP 2、MATN 3 または RTP 4 の 1 個以上を含む、請求項 6 0 ~ 6 7 のいずれか記載の方法。

20

【請求項 6 9】

該バイオマーカーパネルが表 2 に記載のバイオマーカーを含む、請求項 6 0 ~ 6 7 のいずれか記載の方法。

【請求項 7 0】

発現スコアを、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値が表 2 に定義される、請求項 6 1 ~ 6 9 のいずれか記載の方法。

【請求項 7 1】

発現スコアを各バイオマーカーについての重み値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重みが、表 3 に定義するように、絶対値が順番に減少するようにランク付けされる、請求項 6 1 ~ 6 9 のいずれか記載の方法。

30

【請求項 7 2】

バイオマーカーが、IGF 2、CDR 1、COL 3 A 1、SPARC、TIMP 3、INS、COL 8 A 1、NUAK 1、MATN 3、TMEM 4 5 A の 1 個以上を含む、請求項 6 0 ~ 7 1 のいずれか記載の方法。

【請求項 7 3】

バイオマーカーが、INS、SPARC、COLA 1、COL 3 A 1、CDR 1、NUAK 1、TIMP 3 および MMP 1 4 の 1 個以上を含む、請求項 6 0 ~ 7 2 のいずれか記載の方法。

【請求項 7 4】

良好な予後が、バイオマーカーサインについて陰性であるサンプル（閾値スコアを下回るサンプル発現スコアを有する）と比較して、無増悪生存率または全生存率の上昇を示す、請求項 6 0 ~ 7 3 のいずれか記載の方法。

40

【請求項 7 5】

対象由来のサンプルにおいて、表 2 または表 3 から選択される 2 つ以上のバイオマーカーの発現レベルを測定することを含む、請求項 1 ~ 8、1 1 および 1 3 ~ 7 4 のいずれか記載の方法、または、請求項 9、1 0 および 1 2 ~ 3 0 のいずれか記載の使用のための化学療法剤。

【請求項 7 6】

対象由来のサンプルにおいて、表 2 または表 3 から選択される 5 つ以上のバイオマーカー

50



一の発現レベルを測定することを含む、請求項 1 ~ 8、11 および 13 ~ 74 のいずれかが記載の方法、または、請求項 9、10 および 12 ~ 30 のいずれかが記載の使用のための化学療法剤。

【請求項 77】

サンプルが、バイオマーカーサインについて陽性であるか陰性であるかを評価することが、分類ツリーまたはランダムフォレストを用いることを含む、請求項 1 ~ 8、11 および 13 ~ 76 のいずれかが記載の方法、または、請求項 9、10 および 12 ~ 30 のいずれかに記載の、使用のための化学療法剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、種々の解剖学的な部位からのがんの予後の提供または直接的な処置に有用な、分子診断試験に関する。本発明は、遺伝子発現レベルからの遺伝子分類モデルの派生を含む。1つの適用は、特定の治療法、例えば抗血管新生療法を、標準的ながん治療法を受けている患者に行うべきかどうかの選択である。他の適用は、がん患者の、臨床的な予後が良好であるか、または不良であるかの階層化である。本発明は、治療選択の指針となり得ると同時に、新規治療剤の臨床試験評価中の強化戦略のための患者群の選択の指針となり得る試験を提供する。本発明は、卵巣がん、乳がん、結腸がん、前立腺がん、肺がんおよび神経膠芽腫を含む、特定のがんの予後指標として使用できる。血管新生サブタイプは、新鮮/凍結(F F)またはホルマリン固定パラフィン包埋(F F P E)患者サンプルから同定できる。

20

【背景技術】

【0002】

医薬業界は、継続して、従来投与されている薬剤よりも有効である、より特異的である、または副作用がより少ない新規の処置の選択肢を追求している。薬物療法の代替法が常に関連されているのは、ヒト人口における遺伝的な変動により、多くの確立された薬物の有効性に実質的な差異が生じるためである。そのため、広範囲の薬物療法の選択肢が現在利用可能になっているにもかかわらず、患者が応答することのできない場合におけるさらなる治療法が常に必要とされている。

【0003】

30

従来、医師により用いられている処置パラダイムは、疾患の処置に成功する割合が最も高い可能性がある第一選択治療を処方することであった。その後、第一治療が有効でない場合に、代替となる薬物療法を処方する。このパラダイムは、特定の疾患については、明らかに、最適の処置方法ではない。例えば、がんのような疾患では、第一治療が最も重要であることがしばしばであり、治療が成功する最適の機会となるため、特定の患者の疾患に対して最も効果的となる最初の薬物を選択する必要性が高まっている。

【0004】

卵巣がんは、西洋諸国において、全ての婦人科がんの中で一番の死因となっている。この高い死亡率は、ほとんどの患者において、進行したステージで診断が行われることによる。上皮卵巣がん(E O C)は、卵巣悪性がんの90%を構成し、漿液性、粘液性、類内膜、明細胞、移行性、混合性および未分化サブタイプを含む明確な組織学的カテゴリーに分類される。これらの異なる組織像は、異なる病因から発生するとの根拠が増えている。上皮性卵巣がんの分類に使用する方法について最近進歩があった(McCluggage, W.G. "Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis", PATHOLOGY 2011 Aug;43(5):420-32)。この結果の一つは、以前は類内膜として分類されていたであろう多くの腫瘍が現在では漿液性と分類されることである。

40

【0005】

卵巣がんの現在の標準的な処置は、減量手術および標準的なプラチナ/タキサンベースの細胞毒性化学療法である。しかしながら、全ての患者がこれに応答するわけではなく、

50

応答した内で約70%が再発を経験する。組織学的分類または分子分類に基づく卵巣がんのための特異的標的治療もなお上市に至っていない。他のタイプのがんと同様、適当な細胞毒性化学療法剤を選択する正確な方法はまだない。

#### 【0006】

マイクロアレイおよび分子ゲノミクスの出現は、疾患の診断能力および予後分類に顕著な影響を与える可能性を有しており、個々の患者の規定の治療レジメンに対する応答の予測の一助となり得る。マイクロアレイは、大量の遺伝情報の解析を提供し、それにより個々の遺伝的フィンガープリントを提供する。この技術が最終的にオーダーメイドの薬物処置レジメンのための必要なツールを提供するであろうとの大きな期待がある。

#### 【0007】

現在、医療従事者は、化学療法剤が有益であろうがん患者を同定する助けとなる手段をほとんど持たない。最適な第一選択薬物の同定は、どの薬物処置が特定のがんの生理学に最も有効であるかを正確に予測できる方法が利用できないため、困難である。この欠陥が、相対的に低い単剤応答率と、がん罹患率および死亡者数の増加という結果をもたらす。さらに、患者は、しばしば、不必要に無効かつ有毒性の薬物治療を受けることになる。

#### 【0008】

血管新生は、腫瘍における新血管系形成の鍵となる要素であり、腫瘍形成および転移に必須である。したがって、治療介入の鍵となる領域であり、予後不良および生存低下と関連している。これにより、血管新生と関係する過程および経路を標的とする多くの薬物の開発が促進されており、Genentech/Rocheにより製造され、最初にFDAにより承認された市場のリーダーである抗血管新生剤ベバシズマブ(アバスチン)もこれに含まれる。

#### 【0009】

ベバシズマブを含む処置レジメンは広い臨床的活性を有することが証明されている<sup>1-10</sup>。しかしながら、全生存率(OS)における有益性は、細胞毒性化学療法にベバシズマブを追加した後の殆どのがんで示されていない<sup>8, 12-13</sup>。これにより、かなりの割合の腫瘍が、VEGF遮断(ベバシズマブの作用機序)に対して初めから耐性であるか、または急速に耐性を獲得することが示唆される。実際、卵巣がん患者の21%、腎がん患者の10%および直腸がん患者の33%が、ベバシズマブ単剤療法を受けたときに部分退縮を示し、ベバシズマブが患者の小サブグループで活性であり得ることが示唆されるが、このような部分的有効性は、任意抽出患者では有意に至らない<sup>15-18</sup>。したがって、ベバシズマブに対する応答のバイオマーカーの使用は、処置成績の評価を改善し、それにより、ベバシズマブ処置から最良の臨床的利益を受けるであろう患者サブグループの同定を可能にする。これは、臨床的に有益なバイオマーカーが存在しないために、ベバシズマブの使用が妨げられている転移乳がんの場合に特に当てはまる。これまで、ベバシズマブ有効性を予測するためのこのようなバイオマーカーは、臨床的に検証されていない。高血圧およびVEGF多型が、従来可能性を示す唯一のバイオマーカーであったが、臨床の現場におけるその使用については、重要な問題が残ったままである。

#### 【0010】

抗血管新生治療への他の取り組みは、VEGF経路の選択的標的化ではなく、複数血管新生経路の同時標的化である。理論上、多標的抗血管新生剤は、ベバシズマブのような薬剤よりも血管新生をより完全に阻害し、それにより、より大きな治療利益を生じ得るはずである。ある腫瘍において、血管新生は、疾患の初期段階ではVEGFしか必要としないが、疾患が進行するに連れて、さらなる血管新生経路により促進されるとの仮説が立てられている。したがって、複数経路を標的化することにより、VEGF阻害に対する耐性に至る代償性回避機構に対抗することが可能であり得る。

#### 【0011】

他のタイプのがんについては、抗血管新生治療的療法または単剤抗血管新生治療を用いる標準治療に応答する、または応答しない患者を選択する正確な方法はない。

#### 【先行技術文献】

#### 【非特許文献】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 2 】

【非特許文献 1】McCluggage, W.G. “Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis”, PATHOLOGY 2011 Aug;43(5):420-32

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【 0 0 1 3 】

したがって、標準治療と組み合わせた、または単剤治療としての抗血管新生治療剤に対する予測される応答に基づいた患者の階層化を促進する分子診断試験が必要とされている。これは、代替療法を受けるべき患者の迅速な同定を可能にする。このような分子診断試験は、十分な精度で種々のがんタイプの治療応答性を予測するはずである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 1 4 】

本明細書中において「非血管新生」または「免疫サブタイプ」と称する、免疫応答に関連する分子シグナル伝達の上方向制御および、血管新生および脈管構造の発達と関係する分子シグナル伝達の下方向制御を伴うがんのサブタイプを同定する方法であって、がんにおいて発現される 1 個以上のバイオマーカーまたはバイオマーカーのコレクションを使用する方法を、本明細書中に開示する。バイオマーカーのコレクションは、発現サインにより定義してよく、該発現サインは、バイオマーカーのコレクションの測定された発現値に累積スコアを割り当てるために使用する。異なる局面において、バイオマーカーおよび発現サインは、mRNA または蛋白質発現を定量できるマイクロアレイ、次世代シーケンシング (NGS)、Q-PCR、免疫組織化学、ELISA または他の科学技術のような当技術分野で公知の方法を使用して実施し得る単一パラメータまたは多重パラメータ予測的試験の基礎を形成し得る。

## 【 0 0 1 5 】

さらに、本明細書に記載のがんのサブタイプは、多くのタイプのがんに共通するものであり、単一のタイプのがんに限定されるものではない。したがって、本発明の発現サインは、単一のタイプのがんに限定されるものではない。特定の例示的な態様において、非血管新生発現サインは、表 1 に記載のバイオマーカーから選択される 2 つ以上のバイオマーカーを含む。他の例示的な態様において、非血管新生発現サインは、表 2 または 3 に記載するバイオマーカーを 2 つ以上含む。特定の他の態様において、発現サインは、IGF2、SOX11、INS、CXCL17、SLC5A1、TMEM45A、CXCR2PA、MFAP2、MATN3 または RTP4 の 1 個以上を含む。他の例示的な態様において、発現サインは、IGF2、CDR1、COL3A1、SPARC、TIMP3、INS、COL8A1、NUAK1、MATN3 および TMEM45A の 1 個以上を含む。他の例示的な態様において、発現サインは、INS、SPARC、COL8A1、COL3A1、CDR1、NUAK1、TIMP3 および MMP14 の 1 個以上を含む。他の例示的な態様において、非血管新生サインは、表 2 に挙げるバイオマーカーおよび PLS 分類指標を使用して決定された、それらの対応する重みを含む。他の例示的な態様において、非血管新生サインは、表 3 に記載のバイオマーカーおよび、それらの、決定関数内の対応するランクを含む。

## 【 0 0 1 6 】

一の局面において、本発明は、抗血管新生治療剤を対象に投与するかどうかを選択する方法であって：

対象由来のサンプルにおける、表 2 または表 3 から選択される 1 個以上のバイオマーカーの発現レベルを測定すること；

かかる 1 個以上のバイオマーカーの発現レベルから、対象由来のサンプルがバイオマーカーサインについて陽性であるか陰性であるかを評価することを含み、

該サンプルがバイオマーカーサインについて陽性である場合、抗血管新生治療剤が禁忌である、方法を提供する。特定の態様において、バイオマーカーサインについてサンプル

10

20

30

40

50

が陽性であるか陰性であるかを評価することは：１個以上のバイオマーカーについてサンプル発現スコアを決定すること；該サンプル発現スコアを閾値スコアと比較すること；および、該サンプル発現スコアが該閾値発現スコアを上回るか、または同等であるかを決定することを含み、該サンプル発現スコアが閾値スコアを上回るかまたは同等である場合、該サンプルは、該バイオマーカーサインについて陽性である。さらなる態様において、該対象は、化学療法剤による処置を受けているか、または受けたことがある。

【００１７】

さらなる局面において、本発明は、がんを処置する方法であって、対象に化学療法剤を投与すること、および、抗血管新生治療剤を投与しないことを含み、該対象が、本明細書に記載の方法に基づいて、処置のために選択され、該対象がバイオマーカーサインにおいて陽性である、方法を提供する。本発明のさらなる局面によって、がんを処置する方法であって：対象に、化学療法剤を投与すること、および、抗血管新生治療剤を投与しないことを含み、表２または表３から選択される１個以上のバイオマーカーの、対象由来のサンプルにおける発現レベルを測定すること；該バイオマーカーの発現レベルから、該対象由来のサンプルがバイオマーカーサインについて陽性であるか陰性であるかを評価することにより、該対象が処置のために選択され、該サンプルが該バイオマーカーサインについて陽性である場合、該対象が処置のために選択される、方法を提供する。なおさらなる局面において、本発明は、対象におけるがんを処置するのに用いるための化学療法剤に関し、該対象は、本明細書に記載の方法に基づいて、処置のために選択され、該バイオマーカーサインについて陽性であり、該対象が抗血管新生治療剤で処置されない。本発明はまた、対象におけるがんの処置に用いるための化学療法剤に関し、ここで、対象は、対象由来のサンプルにおける表２または表３から選択される１個以上のバイオマーカーの発現を測定すること；バイオマーカーの発現レベルから、該対象由来のサンプルが、バイオマーカーサインについて陽性であるかまたは陰性であるかを評価することにより処置のために選択され、該サンプルがバイオマーカーサインについて陽性である場合、該対象は処置のために選択され、該対象は抗血管新生治療剤により処置されない。さらなる局面において、本発明は、化学療法剤を対象に投与することを含むがんの処置方法であって、対象が、表２または表３から選択される１個以上のバイオマーカーの発現レベルによって定義されるバイオマーカーサインについて陽性であり、抗血管新生治療剤が投与されない、処置方法に関する。なおさらなる局面において、本発明は、対象におけるがんの処置に用いるための化学療法剤に関し、ここで、該対象は、表２または表３から選択される１個以上のバイオマーカーの発現レベルにより定義されるバイオマーカーサインについて陽性であり、該対象は、抗血管新生治療剤により処置されない。特定の態様において、該化学療法剤は、プラチナベースの化学療法剤、アルキル化剤、抗代謝剤（例えば５ＦＵ）、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤、またはその組み合わせを含んでいてよい。該化学療法剤は、プラチナベースの化学療法剤、有糸分裂阻害剤、またはその組み合わせを含んでいてよい。特定の態様において、化学療法剤は、カルボプラチンおよび/またはパクリタキセルを含む。該化学療法剤は、がんの標準治療処置に影響を与え得る。標準治療処置は、がんのタイプにより異なってよく、例えば、卵巣がんにおけるカルボプラチン、結腸直腸がんにおける５ＦＵ、頭頸部がんにおけるプラチナが挙げられる。本発明の全ての局面によれば、バイオマーカーサインについてサンプルが陽性であるか陰性であるかを評価することは、１個以上のバイオマーカーについてサンプル発現スコアを決定すること；および該サンプル発現スコアを閾値スコアと比較すること；および、サンプル発現スコアが閾値発現スコアより上であるか、または同等であるかを決定することを含み、該サンプル発現スコアが閾値スコアより上であるか、または同等である場合、該サンプルはバイオマーカーサインについて陽性である。本発明の全ての局面によれば、該対象は、がんに罹患していてよい。がんは卵巣がんであってよく、ハイグレードの漿液性卵巣がんであってよい。本明細書において、剤を「投与すること」は、剤「を用いて処置すること」と互換的に用いる。

【００１８】

10

20

30

40

50

本発明のさらなる局面によって、がん罹患している対象の臨床予後の決定方法であって：対象由来のサンプルにおける表 2 または表 3 から選択される 1 個以上のバイオマーカの発現レベルを測定することを含み；かかる 1 個以上のバイオマーカの発現レベルから、対象由来のサンプルがバイオマーカサインについて陽性であるかまたは陰性であるかを評価することを含み、該サンプルが該バイオマーカサインについて陽性である場合、該対象は良好な予後を有する、方法を提供する。該サンプルがバイオマーカサインについて陽性であるか陰性であるかを評価することは：バイオマーカについてのサンプル発現スコアを決定すること；該サンプル発現スコアを閾値発現スコアと比較すること；および、該サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るかまたは同等であるかを決定することを含んでいてよく、ここで、該サンプル発現スコアが閾値スコアを上回るかまたは同等である場合、該サンプルはバイオマーカサインについて陽性である。特定の態様において、良好な予後は、バイオマーカサインについて陰性であるサンプル、場合によっては、閾値スコアを下回るサンプル発現スコアを有するサンプルと比較して、無増悪生存率または全生存率が上昇していることを示す。特定の態様において、該対象は、化学療法処置を受けているか、受けたことがあるか、および/または受ける予定があり、かつ/または、抗血管新生治療剤による処置を受けることがない。化学療法処置は、プラチナベースの化学療法剤、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含んでいてよい。化学療法処置は、プラチナベースの化学療法剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含んでいてよい。特定の態様において、化学療法処置は、パクリタキセルおよびカルボプラチンの投与を含む。がんは、

10

20

#### 【0019】

さらなる局面において、本発明は、ペバシズマブを対象に投与するかどうかを選択する方法であって：卵巣がん罹患している対象であって、プラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤による処置を受けているか、受けたことがあるおよび/または受ける予定がある対象より得た試験サンプル中において；表 2 から選択される 1 個、2 個またはそれより多く、最大で全てのバイオマーカの発現レベルを測定すること；かかる 1 個、2 個またはそれより多くのバイオマーカの発現レベルから、該対象由来のサンプルが、バイオマーカサインについて陽性であるかまたは陰性であるかを評価すること、バイオマーカサインについて該サンプルが陽性であるかどうかに基づいて処置を選択することを含み、該サンプルがバイオマーカサインについて陽性である場合、ペバシズマブが禁忌である、方法に関する。特定の態様において、サンプルがバイオマーカサインについて陽性であるか陰性であるかを評価することは、1 個、2 個またはそれより多くのバイオマーカのサンプル発現スコアを決定すること；該サンプル発現スコアを閾値スコアと比較すること；および、該サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るかまたは同等であるかを決定することを含み、該サンプル発現スコアが閾値スコアを上回るかまたは同等である場合、該サンプルはバイオマーカサインについて陽性である。

30

#### 【0020】

本発明はまた、対象の臨床予後を決定する方法であって：(a) 卵巣がん罹患している対象であって、プラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤を用いた処置を受けている、受けたことがある、および/または受ける予定がある対象より得た、試験サンプルにおいて；(b) 表 2 または表 3 から選択されるバイオマーカの 1 個以上、最大で全ての発現レベルを測定すること；(c) かかる 1 個以上のバイオマーカの発現レベルから、対象由来のサンプルがバイオマーカサインについて陽性であるかまたは陰性であるかを評価することを含み、該サンプルが該バイオマーカサインについて陽性である場合、該対象が良好な臨床予後を有する、方法に関する。サンプルがバイオマーカサインについて陽性であるかまたは陰性であるかを評価することは：(i) 1 個以上のバイオマーカについてのサンプル発現スコアを決定すること；(i i) 該サンプル発現スコアを閾値スコアと比較すること；および (i i i) 該サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るかまたは同等であるかを決定することを含んでいてよく、該サンプル発現ス

40

50

コアが閾値スコアを上回るかまたは同等である場合、該サンプルはバイオマーカーサインについて陽性である。特定の態様において、良好な予後は、該バイオマーカーサインについて陰性であるサンプルと比較して、場合によっては、閾値スコアを下回る発現スコアを有するサンプルと比較して、無増悪生存率または全生存率が上昇していることを示す。

#### 【0021】

本発明の全ての局面によれば、表2または表3から選択される、2つ以上のバイオマーカーの発現レベルを、対象由来のサンプルにおいて測定してよい。表2または表3から選択される、5つ以上のバイオマーカーの発現レベルを、対象由来のサンプルにおいて測定してよい。バイオマーカーサインについてサンプルが陽性であるか陰性であるかを評価することは、分類ツリーまたはランダムフォレストの使用を含んでいてよい。分類ツリー(Breiman, Leo; Friedman, J. H.; Olshen, R. A.; Stone, C. J. (1984). Classification and regression trees. Monterey, CA: Wadsworth & Brooks/Cole Advanced Books & Software. ISBN 978-0-412-04841-8)は、論理および法則に基づいて結果を予測する方法を提供する。分類ツリーは、バイナリ再帰分割と呼ばれるプロセスにより構築し、該プロセスは、データを区分/分岐に分割する、反復性の手法である。目的は、事前に定義したクラス間を区別させるツリーを構築することである。ノードにおける最適な分割を選択するために、各変数を順番に考慮し、ここで、可能な全ての分割を試して考慮し、最適な分割は、各区分における分類ラベルの多様性を最も低下させるものである。これを全ての変数について繰り返し、勝者を当該ノードについて最適な分割として選択する。このプロセスを次のノードでも続け、この方法により、ツリー全体を作成する。他の管理的(supervised)学習アプローチ、例えば、判別分析に対する分類ツリーの利点の1つは、ツリーの構築に用いる変数が、カテゴリー的であるか、または、数値的であるか、または両方の混合であってよいことである。この方法により、遺伝子発現の方向性に基づいて結果を予測するための、分類ツリーを作成することが可能である。ランダムフォレストアルゴリズム (Breiman, Leo (2001). "Random Forests". Machine Learning 45 (1): 5 - 32. doi:10.1023/A:1010933404324)により、分類ツリーへのさらなる拡張が提供され、これにより、分類ツリー群を、「フォレスト」を形成するために無作為に作成し、各ツリーから予測した結果の平均を、該結果についての推測を行うのに用いる。

#### 【0022】

一の局面において、本明細書に記載の発現サインを用いて、対象に抗血管新生治療剤を投与するかどうかを選択する方法であって、該対象から試験サンプルを得ること、該試験サンプルからバイオマーカーパネルの発現レベルを測定すること、該バイオマーカーパネルについてのサンプル発現スコアを決定すること、該サンプル発現スコアを閾値スコアと比較することおよび、該発現スコアが閾値スコアを同等であるかまたは上回るかに基づいて処置を選択することを含む、方法を提供する。特定の例示的な態様において、サンプル発現スコアが閾値スコアと同等であるかまたは上回ることは、抗血管新生剤が禁忌であり、該対象に投与するべきでないことを示す。特定の例示的な態様において、閾値スコアを下回るサンプル発現スコアは、抗血管新生剤が禁忌ではなく、該対象に投与し得ることを示す。がんの成長速度が治療剤との接触の結果、該治療剤との接触がない場合の成長と比較して加速している場合、該治療剤は患者に対して「禁忌」または「有害」である。がんの成長は、種々の方法により測定し得る。例えば、腫瘍サイズまたは、腫瘍のタイプに適当な腫瘍マーカーの発現の測定が挙げられる。また、治療剤の投与により患者の全体的な予後(無増悪生存および全生存)が低下する場合も、該治療剤は、「禁忌」または「有害」と考えてよい。一の例示的な態様において、本明細書に記載の発現サインにより、がんの標準治療の後に抗血管新生剤を投与した際の患者の臨床予後を決定し得る。

#### 【0023】

特定の例示的な態様において、該対象は、がん罹患している。がんとしては、卵巣がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、神経膠芽腫、腎細胞がんを含む腎がん、肝細胞がん、甲状腺がん、膵臓がん、神経内分泌がん、食道がん、消化管間質腫瘍(GIST)、胃がん、成人原発性肝がんを含む肝がん、リンパ腫、黒色腫または多発性骨髄腫が挙げられ

るが、これらに限定されない。特定の例示的な態様において、がんは、卵巣がんである。特定の他の例示的な態様において、卵巣がんは、ハイグレード漿液性卵巣がんである。特定の例示的な態様において、患者は、該対象のがんのタイプの治療的処置の標準であり得る処置を受けたことがあるか、受けているか、および/または受ける予定であってよい。特定の例示的な態様において、標準治療処置であり得る処置としては、化学療法剤を用いた処置が挙げられる。該化学療法処置は、プラチナベースの化学療法剤、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含んでいてよい。特定の例示的な態様において、該化学療法処置は、プラチナベースの化学療法剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含む。他の特定の例示的な態様において、該化学療法処置は、カルボプラチンおよびパクリタキセルの投与を含む。一の例示的な態様において、該対象は、ハイグレード漿液性卵巣がん罹患しており、以前に、プラチナベースの化学療法剤および有糸分裂阻害剤の投与を受けている。他の例示的な態様において、該対象はハイグレード漿液性卵巣がん罹患しており、以前に、カルボプラチンおよびパクリタキセルの投与を受けている。抗血管新生治療剤は、VEGF経路標的治療剤（例えば、ベバシズマブまたはアフリベルセプト）、アンジオポエチン-TIE2経路阻害剤、内在性血管新生阻害剤または、免疫調節剤であってよい。一の例示的な態様において、抗血管新生治療剤は、VEGF経路標的治療剤である。他の例示的な態様において、抗血管新生治療剤は、ベバシズマブである。

#### 【0024】

他の局面において、本明細書に記載の発現サインを用いて、対象の臨床予後を決定する方法であって、該対象から試験サンプルを得ること、試験サンプルからバイオマーカーパネルの発現レベルを測定すること、該バイオマーカーパネルからサンプル発現スコアを決定すること、サンプル発現スコアを閾値スコアと比較することを含み、該発現スコアが閾値発現スコアと同等であるかまたは上回る場合、臨床予後は、良好な予後である、方法を提供する。特定の例示的な態様において、良好な予後は、閾値スコアを下回る発現スコアを有する対象と比較して、生存率が上昇していることを示す。特定の例示的な態様において、対象は、がん罹患している。がんとしては、卵巣がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、または神経膠芽腫が挙げられるが、これらに限定されない。特定の例示的な態様において、がんは、卵巣がんである。他の特定の例示的な態様において、卵巣がんは、ハイグレード漿液性卵巣がんである。特定の例示的な態様において、該対象は、化学療法処置を受けていてよいか、受けたことがあるか、および/または受ける予定がある。該化学療法処置は、プラチナベースの化学療法剤、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含んでいてよい。特定の例示的な態様において、化学療法処置は、プラチナベースの化学療法剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含む。他の特定の例示的な態様において、化学療法処置は、カルボプラチンおよびパクリタキセルの投与を含む。一の例示的な態様において、対象は、ハイグレード漿液性卵巣がん罹患しており、プラチナベースの化学療法剤および有糸分裂阻害剤、例えばタキサンの投与を受けていてよいか、受けたことがあるか、および/または受ける予定がある。他の例示的な態様において、対象は、ハイグレード漿液性卵巣がん罹患しており、カルボプラチンおよびパクリタキセルの投与を受けていてよいか、受けたことがあるか、および/または受ける予定がある。

#### 【0025】

他の局面において、本発明は、qPCR、NGS、マイクロアレイおよび免疫アッセイ、例えば免疫組織化学、ELISA、ウェスタンブロットなどのような上記の慣用の診断用キットに関する。このようなキットは、遺伝子または遺伝子産物の発現をアッセイするためおよびmRNAまたは蛋白質発現を定量するために適当な試薬および指示書を含む。

#### 【0026】

また、非血管新生表現型を有するまたは有しないヒト腫瘍を同定する方法を開示する。特定の例示的な態様において、このような方法を使用して、血管新生と関係する工程を直接的または間接的に阻害する薬物に対して感受性であり、応答する患者を同定し得る。ある

10

20

30

40

50

他の例示的態様において、このような方法を使用して、血管新生と関係するプロセスを直接的または間接的に阻害する薬物に耐性である、または応答しない、または、有害な応答をする、患者を同定し得る。

【0027】

本発明はまた、患者の有効な処置への指針にも関する。さらに、患者処置レジメンの選択に関する方法および血管新生に直接的または間接的に影響する現在のまたは開発段階の薬物の臨床試験のために患者を選択する方法を提供する。

【0028】

さらに、全ての転写物のアッセイのために、保存されたホルマリン固定パラフィン包埋(F F P E)生検材料ならびに新鮮/凍結(F F)組織の使用に順応し、それゆえに、最も広く利用可能な種類の生検材料と適合する方法を本明細書に記載する。バイオマーカー発現レベルを、F F P E組織、新鮮凍結組織またはRNAlater(登録商標)のような溶液に保存されている新鮮組織から得たRNAを使用して決定し得る。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】265のハイグレード漿液性卵巣がんにおける遺伝子発現データの非管理的(unsupervised)階層クラスタリングを示すヒートマップを示す。各カラムは、1つの腫瘍内のこれらのプローブセットの発現を表す。全クラスターにわたるプローブセットの発現を、水平方向に示す。ヒートマップの上のバーは、説明ボックスに記載するように、クラスターにより色分けされている。二番目のバーは、説明ボックスに記載するように、クラスラベルについて色分けされている。各プローブセットクラスターに対応する機能プロセスを、図の右にラベルする。

【図2】265のハイグレード漿液性卵巣がんにおける遺伝子発現の非管理的解析からの、クラスターによる全生存率のカプランマイヤー解析を示す。

【図3】Edinburgh(発見)データセットにおける、63-遺伝子サイン分類指標により定義される、2つのクラスの生存率のカプランマイヤー解析を示す。Proangiogenic群は、AngioサブグループおよびAngioimmuneサブグループからなる。A.無増悪生存率。B.全生存率。

【図4】Tothill(確認)データセットにおける、63-遺伝子サイン分類指標により定義される、2つのクラスの生存率のカプランマイヤー解析を示す。Proangiogenic群は、AngioサブグループおよびAngioimmuneサブグループからなる。A.無増悪生存率。B.全生存率。

【図5】ICON7治験コホートにおける、Immune(図5A)およびProangiogenic(図5B)サブグループの患者の無増悪生存率についてのカプランマイヤー曲線を示す。各図において、2つの無作為化処置群：1)カルボプラチンおよびパクリタキセルによる化学療法および2)カルボプラチンおよびパクリタキセル化学療法ならびに、ペバシズマブの間の生存率の差異を示す。

【図6】ICON7治験コホートにおける、Immune(図6A)およびProangiogenic(図6A)サブグループの患者の全生存率についてのカプランマイヤー曲線を示す。各図において、2つの無作為化処置群：1)カルボプラチンおよびパクリタキセルによる化学療法および2)カルボプラチンおよびパクリタキセル化学療法ならびに、ペバシズマブの間の生存率の差異を示す。

【図7】63遺伝子サインにより定義される、カルボプラチンおよびパクリタキセルにより処置した、ICON7治験患者の無増悪生存率(A)および全生存率(B)についてのカプランマイヤー曲線を示す。

【図8】結腸直腸がんサンプルに適用した、例示的な非血管新生サインの特定の分類パフォーマンスのベンチマークを示すグラフである。

【図9】サイン展開：CV下のトレーニングセットのAUC。

【図10】サイン展開：CV下のトレーニングセットのC指標。

【図11】サイン展開：CV下のトレーニングセットのHR。

10

20

30

40

50



【図 1 2】サイン展開：C V 下の I C O N 7 S O C サンプルの H R。  
 【図 1 3】サイン展開：C V 下の I C O N 7 S O C サンプルの C 指標。  
 【図 1 4】サイン展開：C V 下の、I C O N 7 I m m u n e サンプルの H R。  
 【図 1 5】サイン展開：C V 下の I C O N 7 P r o A n g i o サンプルの H R。  
 【図 1 6】コアセット解析：Immune63GeneSig\_CoreGenes\_InternalVal.png.  
 【図 1 7】コアセット解析：Immune63GeneSig\_CoreGenes\_ToThill.png.  
 【図 1 8】コアセット解析：Immune63GeneSig\_CoreGenes\_ICON7\_SOC.png.  
 【図 1 9】最小遺伝子セット解析：Immune63GeneSig\_MinGenes\_ToThill.png.  
 【図 2 0】I C O N 7 S O C：最小遺伝子セット解析：Immune63GeneSig\_MinGenes\_ICON7\_SOC.png.

10

【図 2 1】I C O N 7 I m m u n e：最小遺伝子セット解析：Immune63GeneSig\_MinGenes\_ICON7\_Immune.png.

【図 2 2】6 3 遺伝子サインにより、A n g i o - O f f (不活性)と予測されたサンプル対 A n g i o - O n (活性)と予測されたサンプルの間の、無増悪生存の可能性の差異を示す Kaplan-Meier 曲線。

【図 2 3】血管新生を定義する遺伝子リストを用いた、Marrisa et al (2013)に記載の 5 2 9 の C R C サンプルの半非管理的階層クラスタリング。

【図 2 4】Marissa CRC データにおける、血管新生活性サブタイプと血管新生不活性サブタイプの間の 6 3 遺伝子サインスコアの区別を示す ROC 曲線。

【図 2 5】GSE14333 CRC データにおける、6 3 遺伝子サインにより予測される、血管新生活性および血管新生不活性の患者（処置のみ）の間の生存率の差異を示す Kaplan-Meier 曲線を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0030】

特に断らない限り、本明細書で使用する学術用語および化学用語は、本発明が属する分野の当業者に共通して理解されるのと同じ意味を有する。分子生物学における一般的用語の定義は Benjamin Lewin, Genes IX、Jones and Bartlett により出版、2008 (ISBN 076375 2223); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology、Blackwell Science Ltd. により出版 1994 (ISBN 0632021829); Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers, Inc. により出版、1995 (ISBN 9780471185710); Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994) および March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4th ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992) に見ることができる。

30

【0031】

文脈から明らかに矛盾しない限り、単数表現は複数を含む。同様に、用語「または」は、文脈から明らかに矛盾しない限り、「および」を含むことを意図する。用語「含む (comprises)」は「含む (includes)」を意味する。矛盾がある場合、用語の説明を含む本明細書が支配する。

【0032】

本明細書で使用する用語「バイオマーカーマーカーパネル」、「発現分類指標」、「分類指標」、「発現サイン」または「サイン」は相互交換可能に使用し得る。パネルは、典型的には、複数のバイオマーカーを含むが、バイオマーカーが、単独で本発明の方法において有用である場合、単一のバイオマーカーのみを含んでもよい。

40

【0033】

本明細書において引用する全ての刊行物、公開特許明細書および特許出願は、本出願が関係する技術分野における技術レベルの指標である。本明細書に引用する全ての刊行物、公開特許明細書および特許出願は、個々の刊行物、公開特許明細書および特許出願が具体的におよび個々に引用により包含されたのと同程度に、引用により本明細書に包含される。

50

## 【 0 0 3 4 】

## 概説

がんにおける現在の研究努力の主な目標は、臨床的治療判断に分子パラメータを組み入れることによる、患者における術前術後の全身的治療の有効性を高めることである。薬理遺伝学/ゲノミクスは、外来化合物または薬物に対する個々の応答に關与する遺伝子/ゲノム因子の研究である。本発明のバイオマーカーの発現に対して刺激性または阻害性効果を有する因子またはモジュレーターを個体に投与して、患者のがんを(予防的または治療的に)処置し得る。このような処置と組み合わせることで個体の薬理ゲノミクスを考慮することも理想である。治療剤の代謝における差異は、薬理学的活性薬物の投与量と血中濃度の間の相関を変えることにより、重度の毒性または治療失敗に至る可能性がある。それゆえに、個体の薬理ゲノミクスの理解は、予防処置または治療処置に有効な薬剤(例えば、薬物)の選択を可能にする。このような薬理ゲノミクスは、さらに、適当な投与量および治療レジメンの決定のために使用できる。したがって、個体での本発明のバイオマーカーの発現レベルを決定し、それにより、該個体の治療的処置または予防的処置のための適当な薬剤を選択することができる。

10

## 【 0 0 3 5 】

本発明は、血管新生と関係する1つ以上の一般的サブタイプの使用を含む、種々の解剖学的部位由来のがんを診断するのに有用な分子診断試験に關する。本発明は、抗臨床予後良好または臨床予後不良であるとして、対象を同定する発現サインおよび、抗血管新生治療剤を対象に投与するかどうかの指標となる発現サインを含む。該発現サインは、病理および/または臨床成績が知られるサンプルセットからのサンプルの発現プロファイルを得ることにより得られる。サンプルは、同一サンプル組織型に由来しても、異なる組織型に由来してもよい。本明細書で使用する「発現プロファイル」は、特定のサンプルから解析した各バイオマーカーの発現レベルを表す値のセットを含む。

20

## 【 0 0 3 6 】

サンプルセット由来の発現プロファイルを、続いて数学モデルを使用して解析する。種々の数学モデルを適用でき、パターン認識(Duda et al. Pattern Classification, 2nd ed., John Wiley, New York 2001)、機械学習(Schoelkopf et al. Learning with Kernels, MIT Press, Cambridge 2002, Bishop, Neural Networks for Pattern Recognition, Clarendon Press, Oxford 1995)、統計学(Hastie et al. The Elements of Statistical Learning, Springer, New York 2001)、バイオインフォマティクス(Dudoit et al., 2002, J. Am. Statist. Assoc. 97:77-87, Tibshirani et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6567-6572)または計量化学(Vandeg I N Ste, et al., Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part B, Elsevier, Amsterdam 1998)の分野からのモデルが挙げられるが、これらに限定されない。数学モデルは、サンプルセットにおいて発現する、特定の疾患表現型について最も予測的である1個以上のバイオマーカーを同定する。これらの1個以上のバイオマーカーは発現サインを決定する。したがって、発現サインは、特定の疾患表現型について最も予測的であるとして同定したバイオマーカーを含む。特定の例示的態様において、数学モデルは、同定されたバイオマーカーのそれぞれについて、例えば重みのような変数を決定する。特定の例示的態様において、数学モデルは、決定関数を決定する。決定関数は、さらに、サンプルセットを2つの疾患表現型、例えば、非限定的には、臨床予後が良好であるサンプルおよび臨床予後不良であるサンプルに分類する閾値スコアを決定し得る。一の例示的態様において、線形分類指標を使用して、決定関数および発現サインを決定する。

30

40

## 【 0 0 3 7 】

既定の発現サインを使用して新規サンプルを分類するために、バイオマーカーパネルとも称する、発現サインにより定義されたバイオマーカーを単離し、該バイオマーカーパネルの発現プロファイルを決定する。新規サンプルバイオマーカーパネルの発現プロファイルを発現サインを定義するのに用いた同じ数学モデルを使用して解析する。該バイオマーカーパネルは、発現サインにより決定されるバイオマーカーを1個以上含んでいてよい。

50

該バイオマーカーパネルは、発現サインにより決定されるバイオマーカーを1個以上含んでいてよい。特定の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、表2に記載のバイオマーカーを1個以上含む。他の特定の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、表2に記載の全てのバイオマーカーを含む。特定の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、表2に記載の1個以上のバイオマーカーを含む。他の特定の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、表2に記載の全てのバイオマーカーを含む。特定の例示的な態様において、数学モデルは、新規サンプルの発現スコアを決定する。発現スコアは、バイオマーカーの発現値を、単一スカラー値を得るための非線形手段、代数的手段、三角法手段または相関手段を使用して、対応するスカラー重みと組み合わせることにより決定し得る。発現スコアを閾値スコアと比較し、発現スコアが閾値スコアより大きい  
10  
か、等しいか、または小さいかに基づいてサンプルを分類する。特定の例示的な態様において、閾値スコアと同等であるか、または上回るサンプル発現スコアは、対象が良好な臨床予後を有することを示し、閾値スコアを下回るサンプル発現スコアは、対象が不良な臨床予後を有することを示す。特定の例示的な態様において、閾値スコアと同等であるか、または上回るサンプル発現スコアは、対象が該サインを有することを示す。このことは、良好な臨床予後を示し得る。閾値スコアを下回るサンプル発現スコアは、対象が該サインを有さないことを示す。このことは、不良な臨床予後を示し得る。

#### 【0038】

本明細書に開示する発現サインの一つの適用は、予後良好および予後不良の患者の同定である。予後が良好であるかまたは不良であるかは、特定の処置バックグラウンド（例えば、本明細書に記載するカルボプラチン/パクリタキセル療法）の状況において決定し得る。例えば、対象は、該対象のがんのタイプについての標準的な化学療法処置を受けているか、または受けたことがあってよい。本明細書に記載の発現サインは、また、処置バックグラウンドを考慮して、さらなる治療剤、例えば、抗血管新生治療剤を、患者に投与すべきかどうかを決定するために用いてよい。腫瘍における同定されたバイオマーカーの少なくとも1個、場合によって、バイオマーカーのコレクションの発現を調べることにより、患者の、予想される臨床成績を決定することが可能である。したがって、少なくとも1個のバイオマーカー、場合によってはバイオマーカーのコレクションの発現を調べることにより、より積極的な治療レジメンを最も必要とする患者を同定し、同様に不要な治療処置または患者の臨床成績を有意に改善しない、または害する可能性がある治療処置を排除することが可能である。本発明は、少なくとも無増悪生存率または全生存率を用いた、臨床予後の予測に関する。したがって、「良好な予後」は、他のがんのサブタイプと比較して生存率の上昇を示すサブタイプのがんに罹患している対象集団を示す。一方、「不良な予後」または「悪い予後」は、他のがんサブタイプと比較して、生存率の低下を示すがんサブタイプの対象集団を示す。考慮に入れてよい、予後に関するさらなる要因は、民族性および人種、年齢、疾患ステージ、病歴、腫瘍グレード、腫瘍マーカー（例えばCA125）、部位特異的な外科処置、残存病変のサイズおよび腫瘍応答である。特定の例示的な態様において、閾値スコアと同等であるかまたは上回る発現スコアを有する対象を、非血管新生サブタイプを有すると分類する。他の例示的な態様において、閾値スコアを上回るサンプル発現スコアを有する対象を、良好な臨床予後を有すると分類する。さらに他の例示的な態様において、閾値スコアを上回るかまたは同等であるサンプル発現スコアを有する対象は、良好な臨床予後を有すると分類される。さらに他の例示的な態様において、閾値スコアを上回るかまたは同等であるサンプル発現スコアを有する対象は、抗血管新生治療剤を投与された場合、該対象が有害な作用を受けるか、または、臨床予後が不良になる可能性が高いことを示す。  
20  
30  
40

#### 【0039】

特定の例示的な態様において、対象の臨床予後の決定、または、さらなる治療剤の選択は、化学療法処置が過去に行われた、現在行われている、または計画されている状況において行ってよい。例えば、該対象は、該対象のがんのタイプの標準治療である化学療法処置をまだ開始していなくても、現在受けていても、または完了したところであってもよい  
50

。特定の例示的な態様において、該化学療法処置は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、プラチナベースの薬物、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤、コルチコステロイド、ホルモンベースの治療剤またはその組合せの投与を含んでよい。例示的なアルキル化剤としては、ナイトロジェンマスタード、ニトロソウレア、スルホン酸アルキル、トリアジンおよびエチレンイミンが挙げられる。例示的なプラチナ薬物としては、シスプラチン、カルボプラチンおよびオキサリプラチンが挙げられる。例示的な代謝拮抗薬としては、5-フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、カペシタビン、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、フロキシウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、ペメトレキセド、ペントスタチンおよびチオグアニンが挙げられる。例示的な抗腫瘍抗生物質としては、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、アクチノマイシン-D、ブレオマイシン、マイトマイシン-Cおよびミトキサントロンが挙げられる。例示的なトポイソメラーゼ阻害剤としては、トポテカン、イリノテカン、エトポシドおよびテニポシドが挙げられる。例示的な有糸分裂阻害剤としては、タキサン、エポチロン、ビンカルカロイドおよびエストラムスチンが挙げられる。例示的なコルチコステロイドとしては、プレドニゾン、メチルプレドニゾン、およびデキサメタゾンが挙げられる。特定の例示的な態様において、化学療法は、L-アスパラギナーゼ、イマチニブ、ゲフィチニブ、スニチニブ、ボルテゾミブ、レチノイド、トレチノイン、ベキサロテン、亜ヒ酸、フルベストラント、タモキシフェン、トレミフェン、アナストロゾール、エキセメスタン、レトロゾール、プロゲスチン、エストロゲン、ピカルタミド、フルタミド、ニルタミド、ゴナドトロピン放出ホルモン作動薬または類似体、リツキシマブ、アレムツズマブ、BCG、インターロイキン-2、インターフェロン、サリドマイド、およびレナリドミドを用いた処置を含んでよい。

10

20

30

40

50

#### 【0040】

特定の例示的な態様において、化学療法処置は、シクロホスファミド、メトトレキサート、およびフルオロウラシル(CMF)処置レジメン、シクロホスファミド、ドキソルビシンおよびフルオロウラシル(CAF)処置レジメン、エピルビシンおよびシクロホスファミド(EC)処置レジメン、フルオロウラシル、エピルビシン、およびシクロホスファミド(FFC)処置レジメン、パクリタキセルおよびシクロホスファミド処置レジメン、パクリタキセルおよびカルボプラチン処置レジメン、ドキソルビシンおよびシクロホスファミド処置レジメンまたはドキソルビシンおよびパクリタキセル処置レジメンを含んでよい。一の例示的な態様において、ネオアジュバントがん療法は、プラチナベースの化学療法処置レジメンを含む。一の例示的な態様において、プラチナベースの化学療法処置レジメンは、パクリタキセルおよびカルボプラチンを含む。

#### 【0041】

本明細書に開示する発現サインの他の適用は、抗血管新生治療剤を含む治療剤クラスに対する患者の応答の層化および選択である。腫瘍における同定されたバイオマーカーのコレクションの発現を調べることにより、どの治療剤または、薬剤の組み合わせががんの成長速度を最も低下させる可能性があるかを決定することが可能である。また、どの治療剤または薬剤の組み合わせが、がんの成長速度を最も減少させない可能性があるか、および/または、どれが有害な影響を及ぼし、禁忌となり得るかを決定することが可能である。従って、バイオマーカーのコレクションの発現を審査することにより、無効なまたは不適切な治療剤を排除することが可能である。重要なことに、ある態様において、これらの決定は患者毎原則または薬剤毎原則でなし得る。それゆえに、特定の治療レジメンが特定の患者または患者タイプに有益であるか否かおよび/または特定のレジメンを継続すべきか否かを決定できる。本発明は、治療選択の指針となり得るだけでなく、新規治療剤の臨床試験評価中の濃縮戦略のための患者群を選択できる試験を提供する。例えば、推定抗血管新生剤または処置レジメンを評価するとき、ここに開示する発現サインおよび方法を使用して、抗血管新生剤に応答性である、がんサブタイプを有する個体を臨床試験に選択し得る。

#### 【0042】

がんは、治療剤との接触の非存在下での成長と比較して、治療剤との接触の結果として成長速度が抑制されるならば、該治療剤に対して「応答性」である。がんの成長は多様な方法で測定できる。例えば、腫瘍サイズまたはその腫瘍タイプに適する腫瘍マーカーの発現の測定が挙げられる。一の例示的な態様において、本明細書に記載の発現サインは、該患者のがんタイプのための標準治療である化学療法の後、抗血管新生剤の投与時に、患者の臨床予後を決定することができる。

#### 【0043】

がんは、治療剤との接触の非存在下での成長と比較して、治療剤との接触の結果として成長速度が抑制されないまたは極めて低い程度にしか抑制されないならば、該治療剤に対して「非応答性」である。上記のとおり、がんの成長は、多様な方法で、例えば、腫瘍のサイズまたはその腫瘍タイプに適する腫瘍マーカーの発現の測定により測定できる。治療剤に対して非応答性であるという性質は高度に変動的であり、異なるがんは、異なる条件下で、特定の治療剤に対して異なるレベルの「非応答性」を示す。なおさらに、非応答性の尺度は、患者のクオリティ・オブ・ライフおよび転移の程度のような、しかしこれらに限定されない腫瘍成長サイズ以外の付加的基準を使用して評価できる。

#### 【0044】

血管新生サブタイプを、新鮮/凍結(F F)またはホルマリン固定パラフィン包埋(F F P E)患者サンプルから同定できる。一の例示的な態様において、がんタイプは卵巣がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、肺がん、前立腺がんまたは神経膠芽腫である。他の例示的な態様において、がんタイプは卵巣がんである。さらなる例示的な態様において、がんタイプは乳がんである。他の例示的な態様において、がんタイプは肺がんである。他の例示的な態様において、がんタイプは結腸がんである。他の例示的な態様において、がんタイプは前立腺がんである。他の例示的な態様において、がんタイプは神経膠芽腫である。

#### 【0045】

発現サインの同定

本発明の発現サインを、患者サンプルセットにおける特定のバイオマーカーの発現プロファイルの解析により同定する。本発明における使用に適するバイオマーカーとしてはDNA、RNAおよび蛋白質が挙げられる。一の例示的な態様において、本発明に使用するのに適当なバイオマーカーとしては、RNAおよびcDNAが挙げられる。バイオマーカーを患者サンプルから単離し、その発現レベルを測定して、患者サンプルセットにおいて分析した各サンプルについての発現プロファイルのセットを得る。特定の例示的な態様において、発現サインは、閾値を上回るか、または同等である、バイオマーカーの組合せについてのサインスコアとして同定される、がん組織で観察される非血管新生表現型であって、免疫応答関連遺伝子の上方制御および血管新生または脈管構造の発達に関連するプロセスと関連する遺伝子の下方制御により特徴付けられる表現型を特定する。

#### 【0046】

a. 発現プロファイル

特定の態様において、得られる発現プロファイルは、ゲノムまたは核酸発現プロファイルであり、ここで、サンプル中の1つ以上の核酸の量またはレベルを決定する。これらの態様において、診断方法または予後についての方法において用いる発現プロファイルを作成するためにアッセイするサンプルは、核酸サンプルである。該核酸サンプルは、分析する細胞または組織の表現型確定的バイオマーカーの発現情報を含む核酸集団である。ある態様において、核酸は、サンプルが由来する宿主細胞または組織の発現情報を保持する限り、RNAまたはDNA核酸、例えば、mRNA、cRNA、cDNA等であってよい。サンプルは当分野で知られるとおり、多くの多様な方法で、例えば、細胞からのmRNAの単離により製造してよく、ここで、差次的遺伝子発現の分野において知られるとおり、単離mRNAを単離したままで使用するか、増幅して使用するか、またはcDNA、cRNA等を製造するために使用する。したがって、サンプル中のmRNAレベルの測定は、mRNAからのcDNAまたはcRNAの製造と、続くcDNAまたはcRNAの測定を含む。サンプルは、典型的に、処置を必要とする対象から、例えば、組織生検を介して

採取した細胞または組織から標準的プロトコルを使用して調製し、ここで、このような核酸を産生し得る細胞型または組織は、疾患細胞または組織、体液などを含むが、これらに限定されない、測定する表現型の発現パターンが存在するあらゆる組織を含む。

#### 【0047】

発現プロファイルは、任意の慣用のプロトコルを使用して、最初の核酸サンプルから作成し得る。差次的遺伝子発現 / バイオマーカー分析の分野で用いられているもののよう、発現プロファイルを作成するための多種多様な方法が知られているが、発現プロファイルを作成するための一つの代表的かつ簡便なプロトコルのタイプは、アレイに基づく遺伝子発現プロファイル作成プロトコルである。このような適用は、作成するプロファイルにおいてアッセイ / プロファイルする遺伝子の各々に対する「プローブ」核酸を呈する核酸を用いるハイブリダイゼーションアッセイである。これらのアッセイにおいて、最初に、標的核酸のサンプルをアッセイする最初の核酸サンプルから調製し、該調製は、標識、例えば、シグナル生成系のメンバーでの標的核酸の標識を含み得る。標的核酸サンプル調製後、サンプルをアレイとハイブリダイゼーション条件下に接触させ、それにより、アレイ表面に結合したプローブ配列と相補的である標的核酸の間に複合体が形成される。次いで、ハイブリダイズした複合体の存在を、定性的または定量的に検出する。対象方法において用いる発現プロファイルの作成のために実施し得る具体的ハイブリダイゼーション技術としては、米国特許第 5,143,854 号；第 5,288,644 号；第 5,324,633 号；第 5,432,049 号；第 5,470,710 号；第 5,492,806 号；第 5,503,980 号；第 5,510,270 号；第 5,525,464 号；第 5,547,839 号；第 5,580,732 号；第 5,661,028 号；第 5,800,992 号明細書；ならびに国際公開第 95 / 21265 号；国際公開第 96 / 31622 号；国際公開第 97 / 10365 号；国際公開第 97 / 27317 号；欧州特許第 373203 号；および欧州特許第 785280 号明細書に記載された科学技術が挙げられる(これらの開示は、引用により本明細書に包含される)。これらの方法において、発現をアッセイするバイオマーカーの各々に対するプローブを含む「プローブ」核酸のアレイを、上記のとおり標的核酸と接触させる。接触を、上記のとおりハイブリダイゼーション条件下、例えば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で行い、未結合核酸をその後除去する。得られたハイブリダイズした核酸のパターンは、プローブされたバイオマーカーの各々の発現に関する情報を提供し、ここで、発現情報は、該遺伝子が発現しているか、していないか、および典型的には、どの程度のレベルかの観点によるものであり、該発現データ、すなわち、発現プロファイルは定性的および定量的の両者であり得る。

#### 【0048】

##### b. 疾患およびサンプル組織スコア

特定の例示的な態様において、患者サンプルは、保存されたサンプルのようながん組織サンプルを含む。該患者サンプルは、好ましくはがん組織由来であり、予後、再発の可能性、長期生存、臨床成績、処置応答、診断、がん分類または個別化ゲノミクスプロファイルにより特徴付けられているサンプル由来であってよい。本明細書において、がんは、白血病、脳がん、前立腺がん、肝がん、卵巣がん、胃がん、結腸直腸がん、咽頭がん、乳がん、皮膚がん、黒色腫、肺がん、肉腫、子宮頸がん、精巣がん、膀胱がん、内分泌がん、子宮内膜がん、食道がん、神経膠腫、リンパ腫、神経芽腫、骨肉腫、膵がん、下垂体がん、腎がんなどを含むが、これらに限定されない。本明細書で使用する結腸直腸がんは、直腸および結腸の他の部分の両方の組織におけるがんを含み得るがんならびに結腸がんまたは直腸がんのいずれかに分類され得るがんを含んでいてよい。一の態様において、本明細書に記載する方法は、抗血管新生剤、抗血管新生標的治療、血管新生シグナル伝達の阻害剤で処置されるがんに関及するが、これらのクラスに限定されない。これらのがんはまた、種々の病理学的ステージにあるこれらのがんのサブクラスおよびサブタイプを含む。特定の例示的な態様において、患者サンプルは、卵巣がんサンプルを含む。特定の例示的な態様において、該卵巣がんサンプルは、漿液性卵巣がんサンプル、例えばハイグレード漿液性卵巣がんサンプルである。他の例示的な態様において、患者サンプルは乳がんサンプル

を含む。さらに他の例示的な態様において、患者サンプルは神経膠芽腫サンプルを含む。

【0049】

「生物学的サンプル」、「サンプル」および「試験サンプル」は、個体から得たまたは他の方法でもたらされた任意の物質、体液、組織または細胞を指すためにここで交換可能に使用する。これは血液(全血、白血球、末梢血単核細胞、パフィーコート、血漿および血清を含む)、痰、涙、粘液、鼻洗浄液、鼻咽頭吸引液、息、尿、精液、唾液、髄膜液、羊水、腺液、リンパ液、乳頭吸引液、気管支吸引液、滑液、関節吸引液、腹水、細胞、細胞抽出物および脳脊髄液を含む。これはまた、前記の全ての、実験的に分離させたフラクションも含む。例えば、血液サンプルを血清、または赤血球もしくは白血球(ロイコサイト)のような特定の種類の血球を含むフラクションに分離し得る。所望により、サンプルは一個体からの、組織サンプルと体液サンプルの組み合わせのようなサンプルの組み合わせであり得る。用語「生物学的サンプル」はまた、例えば、便サンプル、組織サンプルまたは組織生検由来のような均質化固形物を含む物質も含む。用語「生物学的サンプル」はまた、組織培養物または細胞培養物由来の物質、例えば、切除組織および生検組織も含む。生物学的サンプルを得るのに適する任意の方法を使用してよく、方法の例としては、例えば、静脈切開術、スワブ(例えば、口腔スワブ)および穿刺吸引細胞診法が挙げられる。サンプルはまた、例えば、マイクロダイセクション(例えば、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)またはレーザーマイクロダイセクション(LMD))、膀胱洗浄、スメア(例えば、PAPスメア)または乳管洗浄細胞診によっても採取できる。個体から得たまたは個体に由来する「生物学的サンプル」は、個体から得られた後、任意の適当な方法、例えば、新鮮凍結またはホルマリン固定および/またはパラフィン包埋で処理されている任意のこのようなサンプルを含む。本明細書に定義する本発明の方法を、得たサンプルで開始してよく、それゆえに、患者からサンプルを得る工程は必ずしも含まれない。方法は、単離サンプル上で実施するインピットの方法であり得る。

10

20

【0050】

本明細書で使用する用語「患者」はヒトおよび非ヒト動物を含む。処置のための好ましい患者はヒトである。「患者」、「個体」および「対象」は、ここでは相互交換可能に使用する。

【0051】

c. バイオマーカー

ここで使用する用語「バイオマーカー」は遺伝子、mRNA、cDNA、アンチセンス転写物、miRNA、ポリペプチド、蛋白質、蛋白質フラグメントまたは遺伝子発現レベルもしくは蛋白質産生レベルのいずれかを示す任意の他の核酸配列またはポリペプチド配列を指してよい。バイオマーカーが個体における異常な過程、疾患または他の状態の徴候を示すか、または徴候であるとき、該バイオマーカーは、個体における正常な過程、疾患または他の状態の不在の徴候を示すか、または徴候であるバイオマーカーの発現レベルまたは値と比較して、一般に過剰発現または過小発現していると表現される。「上方制御」、「上方制御された」、「過剰発現」、「過剰発現した」およびそのあらゆる異形を、健全なまたは正常な個体由来の同等な生物学的サンプルで典型的に検出されるバイオマーカーの値またはレベル(または値もしくはレベルの範囲)より大きな、生物学的サンプルにおけるバイオマーカーの値またはレベルを指すために相互交換可能に使用する。本用語はまた、特定の疾患の異なるステージで検出され得るバイオマーカーの値またはレベル(または値もしくはレベルの範囲)より大きい、生物学的サンプルにおけるバイオマーカーの値またはレベルを指していてもよい。

30

40

【0052】

「下方制御」、「下方制御された」、「過小発現」、「過小発現した」およびそのあらゆる異形を、健全なまたは正常な個体由来の同等な生物学的サンプルで典型的に検出されるバイオマーカーの値またはレベル(または値もしくはレベルの範囲)より低い生物学的サンプルにおけるバイオマーカーの値またはレベルを指すために相互交換可能に使用する。本用語はまた、特定の疾患の異なるステージで検出され得るバイオマーカーの値またはレ

50

ベル(または値もしくはレベルの範囲)より小さい、生物学的サンプルにおけるバイオマーカーの値またはレベルを指していてもよい。

【0053】

さらに、過剰発現または過小発現しているバイオマーカーはまた、個体における正常なプロセス、または疾患、疾患サブタイプもしくは他の状態の不在の徴候を示すか、または徴候であるバイオマーカーの「正常」発現レベルまたは値と比較して、「差次的に発現している」または「差次的レベル」または「差次的な値」を有するということもできる。したがって、バイオマーカーの「差次的発現」はまた、バイオマーカーの「正常」発現レベルからの変動ということもできる。

【0054】

用語「差次的バイオマーカー発現」および「差次的発現」は、正常対象における発現と比較して、または特定の治療に対して異なる応答を示す、または異なる予後の患者における発現と比較して、特定の疾患に罹患している対象において発現がより高いまたはより低いレベルに活性化されているバイオマーカーを指すのに相互交換可能に使用する。本用語はまた、同じ疾患の異なるステージで、発現がより高いまたは低いレベルに活性化されているバイオマーカーも含む。差次的に発現しているバイオマーカーは、核酸レベルまたは蛋白質レベルで活性化されていても、阻害されていてもよく、選択的スプライシングに付されて、異なるポリペチド産物を生じていてもよいことも理解される。このような差異は、mRNAレベル、miRNAレベル、アンチセンス転写物レベルまたは蛋白質表面発現、分泌またはポリペチドの他の分割を含む、広範な変化により証明され得る。差次的バイオマーカー発現は、2個以上の遺伝子またはそれらの遺伝子産物の発現の比較；または2個以上の遺伝子またはそれらの遺伝子産物の発現の割合の比較；または正常対象と疾患に罹患している対象の間で異なる同じ遺伝子の2個の異なって処理された産物の比較；または同じ疾患の種々のステージでの比較を含み得る。差次的発現は、例えば、正常細胞と罹患細胞の間のまたは異なる疾患事象または疾患ステージにある細胞間の、バイオマーカーにおける一過性または細胞性発現パターンの定量的および定性的差異の両方を含む。

【0055】

特定の例示的な態様において、バイオマーカーはRNA転写物である。本明細書で使用する「RNA転写物」は、メッセンジャーRNA(mRNA)、選択的スプライシングされたmRNA、リボソームRNA(rRNA)、トランスファーRNA(tRNA)、核内低分子RNA(snRNA)およびアンチセンスRNAを含む、コードRNAおよび非コードRNAの両者を指す。生物学的サンプルにおけるmRNAの測定を、該生物学的サンプルにおける対応する蛋白質および遺伝子のレベルを検出するための代用として使用し得る。そのため、本明細書に記載する任意のバイオマーカーまたはバイオマーカーパネルを、適当なRNAの検出によっても検出できる。バイオマーカー発現プロファイリングの方法としては、定量的PCR、NGS、ノーザンブロット、サザンブロット、マイクロアレイ、SAGE、免疫アッセイ(ELISA、EIA、凝集、比濁分析、比濁法、ウェスタンブロット、免疫沈殿、免疫細胞化学、フローサイトメトリー、ルミネックスアッセイ)および質量分析が挙げられるが、これらに限定されない。特定のサンプルの全体的発現データを、異なる量の出発物質、抽出および増幅反応の効率変動を補正するために、当業者に公知の方法を使用して正規化し得る。

【0056】

特定の例示的な態様において、良好な臨床予後および不良な臨床予後を示すがんサブタイプを区別するために有用なバイオマーカーを、上記発現検出方法および患者サンプルセットを使用して決定した、患者データセットにおけるサンプル間で最も高度な可変性を示すバイオマーカーの同定により決定できる。発現データの高度に可変的なデータポイントを同定するための当分野で公知の標準的統計法を使用して、高度に可変的なバイオマーカーを同定し得る。例えば、バックグラウンドフィルタおよび分散フィルタの組み合わせを患者データセットに使用する。例えば、バックグラウンドフィルタおよび分散フィルタの組み合わせを患者データセットに使用する。バックグラウンドフィルタは、発現Eならび

10

20

30

40

50



にバックグラウンド標準偏差  $B_g$  により決定した閾値(Expression Consoleソフトウェアから)を超える発現分散を有するプローブセットの選択に基づき、

【数 1】

$$E > \log_2((z_a \sigma_{Bg})); \log_2(\text{var}_E) > 2 [\log_2(\sigma_{Bg}) - E - \log_2(\log(2))]$$

〔式中、 $a$  は有意性閾値を定義する〕

であるならば、プローブセットは、特定の有意性  $a$  での標準正規分布の分位点  $z$  が維持されている。特定の例示的態様において、有意性閾値は  $6.3 \times 10^{-5}$  である。他の例示的態様において、有意性閾値は  $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-3}$  であり得る。

【0057】

特定の例示的態様において、高度に可変的なバイオマーカーをさらに分析して、患者データセットのサンプルを類似遺伝子発現プロファイルに基づき、サブタイプまたはクラスターに群別けしてよい。例えば、バイオマーカーを、その発現の上方制御または下方制御が互いにどの程度高度に相関するかに基づき、クラスター化してよい。当分野で知られる多様なクラスタリング解析技術を使用し得る。一の例示的態様において、階層凝縮型クラスタリングを使用して、がんサブタイプを同定する。各サブタイプの生物学的関連性を決定するために、各クラスター内のバイオマーカーを、それらの対応する遺伝子にさらにマッピングし、該遺伝子と関係する生物学的活性および生物学的経路についての情報を含む 1 つ以上の遺伝子オントロジーデータベースへの相互参照により注釈付けしてよい。他の例示的態様において、免疫応答の一般的な機能的用語について上方制御および濃縮された

10

20

【0058】

一の例示的な態様において、本発明で使用するための発現サインの抽出において有用なバイオマーカーは表 1 に挙げるバイオマーカーである。これらのバイオマーカーは、治療剤に対する患者応答を決定するための予測的価値および / または個体が良好な臨床予後を

30

【0059】

特定の例示的な態様において、本明細書に記載のバイオマーカーの発現は、患者が、抗血管新生治療剤の投与から、有害なまたは有益な効果を得るかどうかと相関する。バイオマーカーのコレクションの発現を調べることにより、無効なまたは不適切な治療剤を排除することが可能である。重要なことに、特定の態様において、これらの決定は患者毎原則または薬剤毎原則でなし得る。それゆえに、特定の治療レジメンが特定の患者または患者タイプに有益であるか、および / または特定のレジメンを継続すべきかどうかを決定できる。

40

【0060】

他の特定の例示的な態様において、本明細書に開示するバイオマーカーの発現は、患者の全体的臨床予後と相関する。腫瘍において同定されたバイオマーカーのコレクションの発現を調べることにより、該個体が臨床予後良好または臨床予後不良と相関するがんサブタイプを有するかどうかを決定することが可能である。重要なことに、特定の態様において、これらの決定は患者毎原則でなし得る。したがって、当業者は、望まないまたは医学的に不当な有害副作用を生じる可能性が最も高い処置レジメンを排除しながら、根底の疾患を処置するのに適当な処置レジメンを選択する助けとして、予測予後を使用できる。

【0061】

表 1 に挙げる配列番号は、例示的なトランスクリプトームアレイにおける、遺伝子の発

50

現レベルを測定するために使用するプローブセット識別子を指す。本発明の発現サインは、下記の実施例にさらに詳述する、異なるプローブセットを有する異なるアレイからの発現データを使用して交差検証されている。したがって、本明細書に開示する発現サインおよび方法は、本明細書に開示するプローブセットを使用して測定した発現値に限定されない。

【表 1 - 1】

表 1: 図 1 のクラスター中の遺伝子

配列番号:	配向	遺伝子記号
1	センス(全エキソン)	PDGFC
2	センス (全エキソン)	TGFB3
3	センス (全エキソン)	RAC2
4	センス (全エキソン)	MARCKS
5	センス (全エキソン)	ALOX5
6	センス (全エキソン)	COL8A1
7	センス (全エキソン)	KCNAB2
8	センス (全エキソン)	THBS1
9	センス (全エキソン)	CTGF
10	センス (全エキソン)	CTGF
11	センス (全エキソン)	VCAN
12	センス (全エキソン)	IGKC
13	センス (全エキソン)	IGKC
14	センス (イントロンを含む)	NFATC1
15	センス (全エキソン)	HMHA1
16	センス (全エキソン)	FCGR1B
17	センス (全エキソン)	EDA2R
18	センス (全エキソン)	COL8A1
19	センス (全エキソン)	COL12A1
20	センス (全エキソン)	HLA-B
21	センス	HLA-F
22	センス (全エキソン)	EGR1
23	センス (全エキソン)	SULF2
24	センス (全エキソン)	CERCAM
25	センス (全エキソン)	ATF3
26	センス (全エキソン)	MIR21
27	センス (全エキソン)	IFIT2
28	センス (全エキソン)	IGLC3
29	センス (全エキソン)	IGLC3
30	センス (全エキソン)	IGLC3
31	センス (全エキソン)	IGLC3
32	センス (全エキソン)	IGLC3
33	センス (全エキソン)	IGLC3

10

20

30

40

【表 1 - 2】

34	センス (全エキソン)	ANGPTL2
35	センス (全エキソン)	COL5A2
36	センス (全エキソン)	THY1
37	センス (全エキソン)	NDN
38	センス (全エキソン)	RGS2
39	センス (全エキソン)	MEIS3P2
40	センス (全エキソン)	GBP2
41	センス (全エキソン)	FAT1
42	センス (全エキソン)	COL1A1
43	センス (全エキソン)	MMP11
44	センス (全エキソン)	GADD45B
45	センス (全エキソン)	MMP14
46	センス (全エキソン)	IGHG4
47	センス (全エキソン)	HCLS1
48	転写物適合なし	
49	センス (全エキソン)	JAM3
50	センス (全エキソン)	TMEM49
51	センス (全エキソン)	LTBP2
52	センス (全エキソン)	IRS1
53	センス (全エキソン)	C17orf91
54	センス (全エキソン)	GPNMB
55	センス (全エキソン)	FAM198B
56	センス (全エキソン)	CHST15
57	センス (全エキソン)	DCN
58	センス (全エキソン)	VCAM1
59	センス (全エキソン)	CIITA
60	センス (全エキソン)	GAS7
61	センス (全エキソン)	COL3A1
62	センス (全エキソン)	ITGB2
63	センス (全エキソン)	ELN
64	センス (全エキソン)	CMTM3
65	センス (全エキソン)	ANTXR1
66	センス (全エキソン)	IL4I1
67	センス (全エキソン)	ANTXR2
68	センス (全エキソン)	IGLC2 /// IGLC3

10

20

30

40

【表 1 - 3】

69	センス (全エキソン)	IGLC3
70	センス (全エキソン)	BST2
71	センス (全エキソン)	COL10A1
72	センス (全エキソン)	IGLC3
73	センス (全エキソン)	FBP1
74	センス (全エキソン)	RHOBTB3
75	センス (全エキソン)	CD74
76	センス (全エキソン)	ISM1
77	センス (全エキソン)	CSRNP1
78	センス (全エキソン)	DCN
79	センス (全エキソン)	IGFBP4
80	センス (全エキソン)	CCDC80
81	センス (全エキソン)	COL3A1
82	センス (全エキソン)	ZFP36
83	センス (全エキソン)	MMP11
84	センス (全エキソン)	COL1A2
85	センス (全エキソン)	HLA-DPA1
86	センス (全エキソン)	TWIST1
87	センス (全エキソン)	ZNF154
88	センス (全エキソン)	IGLC3
89	センス (全エキソン)	IGKC
90	センス (全エキソン)	IGHG1
91	センス (全エキソン)	COL1A2
92	センス (全エキソン)	APOC1
93	アンチセンス	EGR1
94	センス (全エキソン)	KIAA0146
95	センス (全エキソン)	TPM1
96	センス (イントロンを含む)	DMD
97	転写物適合なし	
98	センス (全エキソン)	DUSP1
99	センス (全エキソン)	GBP1
100	センス (イントロンを含む)	PDGFC
101	センス (イントロンを含む)	MSN
102	センス (イントロンを含む)	TPM1
103	センス (全エキソン)	EMB
104	センス (全エキソン)	FOS
105	センス (イントロンを含む)	DPYSL3
106	アンチセンス	EGR1

10

20

30

40

【表 1 - 4】

107	アンチセンス	NRP2
108	センス (全エキソン)	MMP2
109	センス (全エキソン)	CTGF
110	センス (全エキソン)	ACTA2
111	センス (全エキソン)	LOXL1
112	センス (全エキソン)	CDH11
113	センス (全エキソン)	LUM
114	センス (全エキソン)	NNMT
115	センス (全エキソン)	GJA1
116	アンチセンス	CTHRC1
117	センス (全エキソン)	CTSB
118	センス (全エキソン)	PLAU
119	センス (全エキソン)	PDGFRA
120	センス (全エキソン)	VCAN
121	アンチセンス	--
122	センス (全エキソン)	IGHG4 /// IGHG2 /// IGHG1 ///I GHGP
123	センス (全エキソン)	IGHG2
124	センス (イントロンを含む)	C3orf26
125	アンチセンス	ATF3
126	アンチセンス	ATF3
127	センス (全エキソン)	FN1
128	アンチセンス	CALD1
129	アンチセンス	CALD1
130	アンチセンス	EGR1
131	アンチセンス	TWIST1
132	アンチセンス	TWIST1
133	アンチセンス	BATF2
134	アンチセンス	NFKBIZ
135	センス (イントロンを含む)	C3orf26
136	アンチセンス	LOXL1
137	センス (イントロンを含む)	--
138	アンチセンス	FN1
139	アンチセンス	COL1A1
140	センス (全エキソン)	TREH
141	アンチセンス	APOL1

10

20

30

40

【表 1 - 5】

142	センス (全エキソン)	COL10A1
143	センス (全エキソン)	GAL3ST4
144	センス (全エキソン)	TAGLN
145	センス (全エキソン)	TWIST1
146	センス (全エキソン)	HCLS1
147	センス (全エキソン)	ITGB2
148	センス (全エキソン)	HLA-B
149	センス (全エキソン)	C17orf91
150	センス (全エキソン)	FBLIM1
151	センス (全エキソン)	COL15A1
152	センス (全エキソン)	AQP7P3
153	アンチセンス	IGFBP5
154	センス (全エキソン)	FANK1
155	アンチセンス	INS
156	センス (全エキソン)	COL27A1
157	センス (全エキソン)	COL5A1
158	センス (全エキソン)	PRICKLE2
159	センス (全エキソン)	N/A
160	センス (全エキソン)	GXYLT2
161	センス (イントロンを含む)	KLF12
162	転写物適合なし	
163	センス (全エキソン)	FBXO32
164	転写物適合なし	
165	センス (全エキソン)	ASAH2B
166	アンチセンス	PPFIBP1
167	アンチセンス	XIST
168	センス (全エキソン)	IGFBP6
169	センス (全エキソン)	ROBO1
170	センス (全エキソン)	TPM1
171	アンチセンス	N/A
172	アンチセンス	PLEKHG1
173	センス (全エキソン)	NR2F1
174	センス (全エキソン)	NPDC1
175	アンチセンス	INS
176	センス (全エキソン)	TRAF5

10

20

30

40

【表 1 - 6】

177	センス (全エキソン)	CALD1
178	センス (イントロンを含む)	CHRM3
179	センス (全エキソン)	AMOTL1
180	センス (イントロンを含む)	COL12A1
181	センス (全エキソン)	PLXNA4
182	センス (イントロンを含む)	TMEM43
183	センス (イントロンを含む)	RORA
184	アンチセンス	INS
185	センス (全エキソン)	TSPAN18
186	転写物適合なし	
187	センス (全エキソン)	TNC
188	センス (全エキソン)	TYRO3
189	アンチセンス	EFNA5
190	センス (全エキソン)	MYL9
191	センス (全エキソン)	MIR198
192	センス (イントロンを含む)	N/A
193	センス (イントロンを含む)	PLA2R1
194	センス (全エキソン)	COL14A1
195	センス (全エキソン)	NRP1
196	センス (全エキソン)	FSCN1
197	センス (イントロンを含む)	PDGFD
198	転写物適合なし	
199	センス (イントロンを含む)	DOCK4
200	センス (全エキソン)	TRIM13
201	センス (全エキソン)	IGFBP5
202	センス (全エキソン)	C19orf63
203	アンチセンス	KLF6
204	アンチセンス	TRIO
205	センス (全エキソン)	COL4A1
206	センス (全エキソン)	EPDR1
207	センス (全エキソン)	FNDC1
208	センス (全エキソン)	IL1R1
209	センス (全エキソン)	CES4
210	センス (全エキソン)	GPR176
211	センス (イントロンを含む)	GXYLT2

10

20

30

40



【表 1 - 7】

212	アンチセンス	WHSC1L1
213	センス (全エキソン)	N/A
214	センス (全エキソン)	RGN
215	センス (イントロンを含む)	CA3
216	センス (全エキソン)	TIMP3
217	センス (全エキソン)	EFNA5
218	センス (全エキソン)	RASGRF2
219	センス (イントロンを含む)	RELL1
220	アンチセンス	ACSS3
221	センス (全エキソン)	STMN3
222	センス (全エキソン)	N/A
223	アンチセンス	C7orf29
224	センス (全エキソン)	HOXC6
225	センス (全エキソン)	KLF8
226	センス (イントロンを含む)	SERINC5
227	センス (全エキソン)	AKT3
228	センス (全エキソン)	TGFB2
229	アンチセンス	WNT5A
230	転写物適合なし	
231	転写物適合なし	
232	アンチセンス	IGFBP7
233	転写物適合なし	
234	センス (イントロンを含む)	SULT1C4
235	センス (全エキソン)	AASS
236	センス (全エキソン)	HEPH
237	センス (全エキソン)	ADH5
238	センス (全エキソン)	TIMP2
239	センス (全エキソン)	EMP1
240	センス (全エキソン)	CXCL14
241	センス (全エキソン)	ZNF548
242	センス (全エキソン)	SGCB
243	センス (イントロンを含む)	ASH2L
244	センス (イントロンを含む)	SERINC5
245	ゲノム適合なし	
246	センス (全エキソン)	TMEM159

10

20

30

40

【表 1 - 8】

247	センス (イントロンを含む)	RBMS3
248	センス (全エキソン)	TMEM49
249	センス (イントロンを含む)	RORA
250	転写物適合なし	
251	アンチセンス	ZNF608
252	ゲノム適合なし	
253	センス (全エキソン)	ADAMTS2
254	センス (全エキソン)	APCDD1
255	アンチセンス	GXYLT2
256	センス (全エキソン)	XIST
257	センス (全エキソン)	MBNL2
258	センス (全エキソン)	SHF
259	センス (イントロンを含む)	APBB2
260	転写物適合なし	
261	センス (全エキソン)	COL14A1
262	センス (全エキソン)	IGFBP5
263	センス (全エキソン)	CREB5
264	アンチセンス	INS
265	センス (全エキソン)	BAHCC1
266	センス (全エキソン)	RFXAP
267	センス (全エキソン)	INS
268	センス (全エキソン)	DDR2
269	センス (全エキソン)	CA12
270	センス (全エキソン)	RHOB
271	センス (全エキソン)	N/A
272	センス (全エキソン)	SNORD116-4
273	センス (全エキソン)	MEG3
274	センス (全エキソン)	WNT4
275	センス (全エキソン)	FBLN2
276	アンチセンス	DAAM1
277	転写物適合なし	
278	センス (全エキソン)	CHN1
279	センス (イントロンを含む)	APBB2
280	センス (全エキソン)	PTRF
281	アンチセンス	IGF1

10

20

30

40

【表 1 - 9】

282	センス (全エキソン)	UST
283	センス (全エキソン)	SMARCA1
284	センス (イントロンを含む)	N/A
285	センス (全エキソン)	IGLC3
286	アンチセンス	INS
287	センス (全エキソン)	KANK4
288	アンチセンス	IGF1
289	センス (全エキソン)	CYP27A1
290	アンチセンス	EIF2B5
291	転写物適合なし	
292	センス (全エキソン)	SNRNP25
293	センス (全エキソン)	SETD7
294	センス (全エキソン)	MSX1
295	センス (全エキソン)	HOPX
296	センス (全エキソン)	NID2
297	センス (全エキソン)	IGF1
298	センス (全エキソン)	PSD3
299	センス (全エキソン)	FGFR1
300	センス (全エキソン)	ETV1
301	センス (全エキソン)	ZNF655
302	ゲノム適合なし	
303	アンチセンス	INS
304	センス (全エキソン)	SFRP2
305	センス (全エキソン)	SPAG16
306	アンチセンス	NR2F2
307	センス (イントロンを含む)	SYNPO2
308	センス (全エキソン)	FAM101B
309	アンチセンス	IGF2
310	センス (全エキソン)	CA3
311	センス (全エキソン)	XIST
312	転写物適合なし	
313	センス (全エキソン)	WNT7A
314	センス (イントロンを含む)	N/A
315	センス (全エキソン)	FGFR1
316	アンチセンス	FXYD6

10

20

30

40

【表 1 - 1 0】

317	センス (全エキソン)	FGFR1
318	センス (イントロンを含む)	IGFBP7
319	センス (全エキソン)	TIMP2
320	センス (全エキソン)	DUSP1
321	センス (イントロンを含む)	SERINC5
322	転写物適合なし	
323	センス (全エキソン)	ABLIM1
324	センス (全エキソン)	ARL4A
325	アンチセンス	SH3TC2
326	アンチセンス	NR2F2
327	センス (全エキソン)	ENG
328	センス (全エキソン)	MGP
329	センス (全エキソン)	MEG3
330	アンチセンス	FAM115A
331	センス (全エキソン)	EGR1
332	センス (全エキソン)	SNORD116-3
333	センス (全エキソン)	AEBP1
334	センス (イントロンを含む)	SDK1
335	センス (全エキソン)	ENC1
336	センス (全エキソン)	SNORD116-7
337	センス (全エキソン)	N/A
338	センス (全エキソン)	APOD
339	アンチセンス	N/A
340	アンチセンス	GAS1
341	センス (全エキソン)	VPS36
342	転写物適合なし	
343	センス (全エキソン)	SPHK2
344	センス (全エキソン)	SNORD116-8
345	センス (全エキソン)	MYO10
346	センス (全エキソン)	HOXC6
347	センス (全エキソン)	RNF149
348	センス (全エキソン)	BTG2
349	センス (イントロンを含む)	MAP3K1
350	センス (全エキソン)	SNORD116-23
351	センス (イントロンを含む)	ACSL4

10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

352	センス (全エキソン)	CYP27C1
353	センス (イントロンを含む)	COL12A1
354	センス (全エキソン)	IGFBP5
355	センス (全エキソン)	DUSP4
356	センス (全エキソン)	PFKFB3
357	センス (全エキソン)	SDC2
358	アンチセンス	FXYD6
359	センス (全エキソン)	COL5A1
360	センス (全エキソン)	MARCKS
361	センス (全エキソン)	IRS2
362	センス (全エキソン)	N/A
363	アンチセンス	FSCN1
364	センス (全エキソン)	FYN
365	センス (全エキソン)	IGFBP5
366	センス (全エキソン)	NUDT4P1
367	センス (全エキソン)	NFKBIZ
368	センス (全エキソン)	N/A
369	センス (全エキソン)	C7orf41
370	センス (全エキソン)	MEG3
371	センス (全エキソン)	N/A
372	センス (全エキソン)	PLEKHG1
373	センス (全エキソン)	ZNF827
374	センス (全エキソン)	ZNF175
375	センス (全エキソン)	XIST
376	センス (イントロンを含む)	GSN
377	センス (イントロンを含む)	RORA
378	センス (全エキソン)	CA13
379	アンチセンス	TMX4
380	センス (全エキソン)	KIT
381	センス (イントロンを含む)	WDR78
382	センス (全エキソン)	ECEL1
383	センス (全エキソン)	XIST
384	センス (全エキソン)	PROCR
385	センス (全エキソン)	C9orf167
386	センス (全エキソン)	MUC6

10

20

30

40

【表 1 - 1 2】

387	センス (イントロンを含む)	P4HA2
388	センス (全エキソン)	FAM69C
389	センス (全エキソン)	NOX4
390	センス (イントロンを含む)	N/A
391	転写物適合なし	
392	センス (全エキソン)	SMOX
393	センス (全エキソン)	KIAA0922
394	転写物適合なし	
395	センス (全エキソン)	XIST
396	センス (全エキソン)	NPAS2
397	センス (全エキソン)	NAV1
398	センス (イントロンを含む)	N/A
399	センス (全エキソン)	HLA-A
400	センス (全エキソン)	FAM46C
401	センス (全エキソン)	N/A
402	センス (全エキソン)	SLAMF7
403	センス (全エキソン)	FCER1G
404	センス (全エキソン)	C1S
405	センス (全エキソン)	NUPR1
406	アンチセンス	C1QC
407	アンチセンス	SAT1
408	センス (全エキソン)	SOD2
409	センス (全エキソン)	IRF1
410	センス (全エキソン)	SFN
411	アンチセンス	LTB
412	センス (全エキソン)	ARID5A
413	センス (全エキソン)	BST2
414	センス (全エキソン)	HLA-F
415	センス (全エキソン)	XAF1
416	センス (全エキソン)	TCOF1
417	センス (全エキソン)	RPL23AP1
418	センス (全エキソン)	IL1RN
419	センス (全エキソン)	IFIT5
420	センス (全エキソン)	B2M
421	アンチセンス	GBP1

10

20

30

40

【表 1 - 1 3】

422	センス (全エキソン)	HLA-F
423	センス (全エキソン)	DGKA
424	センス (全エキソン)	XBP1
425	センス (全エキソン)	PLCG2
426	センス (全エキソン)	FAM46C
427	ゲノム適合なし	
428	センス (全エキソン)	TREM2
429	センス (全エキソン)	LGALS9
430	センス (全エキソン)	HLA-DPB1
431	アンチセンス	ODF3B
432	センス (全エキソン)	MX1
433	センス (全エキソン)	STAT1
434	センス (全エキソン)	CTSB
435	センス (全エキソン)	FAM26F
436	センス (イントロンを含む)	PARP14
437	アンチセンス	SAT1
438	センス (全エキソン)	CTSS
439	転写物適合なし	
440	センス (全エキソン)	CTSB
441	センス (全エキソン)	ADAM8
442	センス (イントロンを含む)	B2M
443	センス (全エキソン)	FLVCR2
444	センス (全エキソン)	TYROBP
445	アンチセンス	SAMD9L
446	センス (全エキソン)	SAMD9L
447	センス (全エキソン)	SIGLEC1
448	センス (全エキソン)	MMP7
449	センス (全エキソン)	APOL1
450	センス (全エキソン)	CYLD
451	センス (全エキソン)	HLA-B
452	センス (全エキソン)	SAT1
453	センス (全エキソン)	C1QB
454	センス (全エキソン)	HLA-DMB
455	センス (全エキソン)	NLRC5
456	センス (全エキソン)	FAM20A

10

20

30

40

【表 1 - 1 4】

457	アンチセンス	N/A
458	センス (全エキソン)	STAT1
459	センス (イントロンを含む)	STAT1
460	センス (全エキソン)	STAT1
461	アンチセンス	N/A
462	センス (全エキソン)	DERL3
463	センス (全エキソン)	HLA-F
464	センス (全エキソン)	MAFB
465	センス (全エキソン)	CD4
466	センス (全エキソン)	HLA-A
467	センス (全エキソン)	UBE2L6
468	センス (全エキソン)	C1QC
469	センス (全エキソン)	CD163
470	センス (全エキソン)	LRMP
471	センス (全エキソン)	C11orf17
472	センス (全エキソン)	XAF1
473	センス (全エキソン)	GLRX
474	センス (全エキソン)	IFIH1
475	センス (全エキソン)	CD44
476	センス (全エキソン)	LITAF
477	センス (全エキソン)	CCDC69
478	センス (全エキソン)	GBP5
479	センス (全エキソン)	PML
480	センス (全エキソン)	SAMD9
481	センス (全エキソン)	CBR3
482	センス (全エキソン)	RASGRP2
483	センス (全エキソン)	FCGR2A
484	センス (全エキソン)	BST2
485	センス (全エキソン)	HLA-A
486	アンチセンス	COL1A1
487	ゲノム適合なし	
488	ゲノム適合なし	

## 【0064】

特定の例示的態様において、表 1 に記載するバイオマーカーの全てまたは一部を発現サインに使用し得る。例えば、表 1 のバイオマーカーを含む発現サインを、本明細書中に提供する方法を使用して作成してよく、該発現サインは、表 1 に示すマーカーセットの 1 つおよび全て、および間のそれぞれのおよび全ての組み合わせ(例えば、4 個の選択されたマーカー、16 個の選択されたマーカー、74 個の選択されたマーカーなど)を含み得る。いくつかの態様において、発現サインは、少なくとも 5 個、10 個、20 個、40 個、

10

20

30

40

50



60個、100個、150個、200個または300個またはそれより多くのマーカーを含む。他の態様において、予測的バイオマーカーパネルは、5個以下、10個以下、20個以下、40個以下、60個以下、100個以下、150個以下、200個以下、300個以下、400個以下、500個以下、600個以下または700個以下のマーカーを含む。一の例示的な態様において、発現サインは表1に挙げる複数のマーカーを含む。いくつかの態様において、発現サインは、表1に挙げたマーカーの少なくとも約1%、約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%または約99%を含む。選択した発現サインを、本明細書に記載の方法および類似した当技術分野で知られる方法を使用して提供されるバイオマーカーから組み立てることができる。一の態様において、発現サインは、表1の全ての遺伝子および遺伝子産物を含む。

10

#### 【0065】

#### 4. 数学モデル

次の方法を使用して、抗血管新生治療剤に対して応答性または非応答性である対象を区別するための、または特定のがんタイプの予後指標としての、上記のバイオマーカー由来の発現サインを含む、発現サインを得ることができる。他の特定の例示的な態様において、発現サインを、線形、斜め線形、二次およびロジスティック判別分析、PAM (Prediction Analysis for Microarray, (Tibshirani et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6567-6572))またはSIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy, (Wold, 1976, Pattern Recogn. 8:127-139))解析を含むが、これらに限定されない、決定ツリー (Hastie et al. The Elements of Statistical Learning, Springer, New York 2001)、ランダムフォレスト (Breiman, 2001 Random Forests, Machine Learning 45:5)、ニューラルネットワーク (Bishop, Neural Networks for Pattern Recognition, Clarendon Press, Oxford 1995)、判別分析 (Duda et al. Pattern Classification, 2nd ed., John Wiley, New York 2001)を使用して導く。

20

#### 【0066】

バイオマーカー発現値を、種々の強度の実規模での対応するスカラー重みと組み合わせで定義してよく、これを、さらに、線形または非線形、代数的、三角法または相関手段を経て、代数的、統計的学習、ベイジアン、回帰または類似のアルゴリズムを介して単一スカラー値に併せ、これは、スカラー値上の数学的に導かれる決定関数と共に予測的モデルを提供し、これにより、サンプル由来の発現プロファイルを、特定の薬物、薬物群、分子サブタイプまたは処置レジメンに対するレスポンスまたは非レスポンス、耐性または非耐性の別個の群に分解し得る。バイオマーカーメンバーシップを含むこのような予測的モデルは、薬物応答および/または耐性が知られる歴史的な患者サンプルからの代表的な発現プロファイルのセットから、交差検証、ブートストラッピングまたは類似するサンプリング技術下に、感度、特異性、陰性および陽性予測的値、ハザード比またはこれらの組み合わせのいずれかに対して最適化された、重み学習および判定閾値により開発される。

30

#### 【0067】

一の態様において、バイオマーカーを使用してこれらのシグナルの加重和を形成し、ここで、個々の重みは陽性でも陰性でもよい。得られた和(「発現スコア」)を定義済み対照点または値と比較する。対照点または値との比較を、臨床状態または臨床成績の診断または予測に使用し得る。

40

#### 【0068】

上記のとおり、当業者は、表1で提供する分類指標に含まれるバイオマーカーが、臨床予後の決定のための分類指標において、同等ではない重みを持つことを認識する。それゆえに、わずか1個のバイオマーカーを、臨床予後または治療剤に対する応答の診断または予測に使用し得るが、特異性および感度、または診断もしくは予測精度はバイオマーカーが多いほど上昇し得る。

#### 【0069】

本明細書で使用する用語「重み」は、統計的計算における項目の絶対的な大きさを指す

50

。遺伝子発現分類指標における各バイオマーカーの重みを、当技術分野で公知の学習方法を使用して、患者サンプルのデータセットで決定し得る。本明細書で使用する用語「バイアス」または「オフセット」は、トレーニングセットにおけるサイン遺伝子の平均発現を使用して導いた定数項を指し、試験データセットで解析される各遺伝子の中心に併せることを意味するために使用される。

【 0 0 7 0 】

特定の例示的な態様において、発現サインを決定関数により決定する。決定関数は、線形分類指標を使用して導いた重み付けした発現値のセットである。全ての線形分類指標は、次の等式：

【 数 2 】

10

$$f(x) = w' \cdot x + b = \sum w_i \cdot x_i + b \quad (1)$$

を使用して決定関数を決定する。

【 0 0 7 1 】

ある特定のサンプルのマイクロアレイ遺伝子発現強度  $x_i$  のような全測定値をベクトル  $x$  に集める。次いで、各強度に対応する重み  $w_i$  で乗算し、オフセット項  $b$  を加算して、決定関数  $f(x)$  の値を得る。決定関数を導くとき、線形分類指標は、さらに、遺伝子発現データ領域を2個の互いに素なセクションに分ける閾値をさらに決定する。線形分類指標の例としては、部分最小二乗法 (PLS) (Nguyen et al., Bioinformatics 18 (2002) 39-50)、サポートベクターマシン (SVM) (Schoelkopf et al., Learning with Kernels, MIT Press, Cambridge 2002) および縮小判別分析 (SDA) (Ahdesmaeki et al., Annals of applied statistics 4, 503-519 (2010)) が挙げられるが、これらに限定されない。一つの例示的な態様において、線形分類指標は PLS 線形分類指標である。

20

【 0 0 7 2 】

決定関数は、例えば良好または不良な臨床予後を示す患者からの、大きなトレーニングサンプルセット上で経験的に導かれる。閾値は、特定の治療的処置の前後の臨床予後を含むが、これに限定されない異なる特徴に基づき、患者群に分ける。この量の解釈、すなわちカットオフ閾値は、成績が知られている患者のセットからの開発段階(「トレーニング」)で得られる。決定スコアについての対応する重みおよび応答性/耐性カットオフ閾値は、当業者に公知の方法により、トレーニングデータから推測的に固定される。一の例示的な態様において、部分最小二乗法判別分析 (PLS - D A) を重みの決定に使用する (L. Stahle, S. Wold, J. Chemom. 1 (1987) 185-196; D. V. Nguyen, D.M. Rocke, Bioinformatics 18 (2002) 39-50)。

30

【 0 0 7 3 】

實際上、これは、データ領域、すなわちバイオマーカー発現値の全ての可能な組み合わせのセットを、異なる臨床的分類または予測に対応する、2つの背反する群、例えば、良好な臨床予後と不良な臨床予後に分けることを意味する。全体的分類指標において、特定のバイオマーカーの相対的過剰発現は、判定スコアを上昇 (正の重み) または低下 (負の重み) させることができ、それにより、例えば、良好な臨床予後の、全体的決定に寄与する。

40

【 0 0 7 4 】

本発明の特定の例示的な態様において、データを、上記のとおり加重和を適用する前に非線形的に変換する。この非線形変換は、データの次元性の増加を含む可能性がある。非線形変換および加重総和法はまた、例えば、核関数の使用を介して、陰関数により実施される可能性がある (Schoelkopf et al. Learning with Kernels, MIT Press, Cambridge 2002)。

【 0 0 7 5 】

特定の例示的な態様において、患者トレーニングセットデータは、対応するがん組織サンプルセットから RNA を単離し、単離 RNA をマイクロアレイにハイブリダイズすることにより発現値を測定することにより導く。特定の例示的な態様において、発現サインを導

50

くの使用するマイクロアレイはトランスクリプトームアレイである。本明細書で使用する「トランスクリプトームアレイ」は、目的の罹患組織において発現されることが立証されている配列にハイブリダイズするように設計されたプローブセットを含むマイクロアレイを指す。組織および生物学的状況での選択的スプライシングおよび可変性ポリAテイルプロセッシングを考慮すると、他の組織源または生物学的状況に由来する同じ遺伝子配列に対して設計したプローブは、目的の罹患組織において発現する転写物に効果的に結合せず、潜在的に関連する生物学的情報の損失に至る可能性がある。したがって、どの配列が目的の罹患組織で発現するかを、マイクロアレイプローブセットを得る前に検証することは有益である。特定の疾患状況で発現された配列の検証は、例えば、罹患組織サンプルセットから全RNAを単離および配列決定し、単離配列と公知の核酸配列データベースを相互参照して、トランスクリプトームアレイ上のプローブセットが目的の罹患組織で実際発現している配列に対して設計されていることを検証することにより行い得る。トランスクリプトームアレイの製造方法は、米国特許出願公開第2006/0134663号明細書に記載されており、当該文献は、引用により本明細書に包含される。特定の例示的態様において、トランスクリプトームアレイのプローブセットを転写物の3'末端の300個以内のヌクレオチドと結合するように設計する。標的転写物の3'末端の300個以内のヌクレオチドと結合するプローブセットを備えたトランスクリプトームアレイを設計する方法は、米国特許出願公開第2009/0082218号明細書に記載されており、これを引用により本明細書に包含させる。特定の例示的態様において、本発明の遺伝子発現プロファイルを導くのに使用するマイクロアレイは、Almac Ovarian Cancer DSA<sup>TM</sup>マイクロアレイ(Almac Group, Craigavon, United Kingdom)である。

10

20

#### 【0076】

最適な線形分類指標を、「曲線下面積」(AUC)のような診断を使用して、線形分類指標の性能を評価することにより選択できる。AUCは、受信者動作特性(ROC)曲線の曲線下面積を指し、このいずれも当分野で公知である。AUC尺度は、完全データ範囲にわたる分類指標の精度の比較に有用である。線形分類指標のAUCが高い程、未知のものを目的の2群(例えば、卵巣がんサンプルと正常または対照サンプル)に正確に分類する能力が高い。ROC曲線は、2つの集団(例えば、治療剤に応答する個体および、応答しない個体)の区別において、特定の特性(例えば、ここに記載するバイオマーカーのいずれかおよび/または付加的生物医学的情報のいずれかの項目)の性能をプロットするのに有用である。典型的には、集団全体(例えば、症例と対照)にわたる特性データを、単一特性の値に基づき昇順でソートする。次いで、この特性の各値について、データの真陽性率および偽陽性率を計算する。真陽性率は、この特性について該値を超える症例の数を計数し、陽性症例の総数で除算することにより決定する。偽陽性率は、この特性について該値を超える対照の数を計数し、対照の総数で除算することにより決定する。この定義は、特性が対照と比較して症例で上昇しているシナリオを参照しているが、特性が対照と比較して症例で低下しているシナリオにもこの定義は適用される(このようなシナリオにおいて、この特性について該値を下回るサンプルを計数する)。ROC曲線は単一特性と同様に他の単一結果で作成でき、例えば、2個以上の特性の組み合わせを数学的に併せ(例えば、加算、減算、乗算など)、単一合計値を得ることができ、この単一合計値をROC曲線にプロットしてよい。さらに、単一結果値を導く複数特性のあらゆる組み合わせをROC曲線にプロットしてよい。これらの特性の組み合わせは試験を構成し得る。ROC曲線は、試験の偽陽性率(1 - 特異性)に対する試験の真陽性率(感度)のプロットである。

30

40

#### 【0077】

一の例示的な態様において、血管新生発現サインは、表2に詳述する対応するランク、重みおよび関係するバイアスまたは、例えば、病状に依存する他のランク付け、重み付けおよび関連するバイアスを有する、表2に詳述する63個のバイオマーカーに関する。表2は、化合物決定スコア関数において、例示的分類指標における重みの絶対値が小さくなる順で、バイオマーカーをランク付けする。本発明の方法は、1個以上、最大で全ての表2に記載のバイオマーカーを測定することに依存し得る。本発明の方法は、表2に記載の

50

バイオマーカーの少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60 個またはそれぞれの発現レベルを測定することを含んでいてよい。特定の態様において、本方法は、表 2 に記載のバイオマーカーの 2～5 個の発現レベルを測定することを含んでいてよい。

【表 2 - 1】

表 2

63 バイオマーカーサイン			
ランク	遺伝子記号	重み	バイアス
1	IGF2	-0.01737	9.8884
2	SOX11	-0.01457	4.5276
3	INS	-0.01409	7.0637
4	CXCL17	0.012568	4.8478
5	SLC5A1	0.012426	4.8920
6	TMEM45A	-0.0124	6.1307
7	CXCR2P1	0.011427	3.1478
8	MFAP2	-0.01039	9.0516
9	MATN3	-0.01028	3.7313
10	RTP4	0.010052	4.9852
11	COL3A1	-0.01002	8.4130
12	CDR1	-0.00916	8.1778
13	RARRES3	0.009056	6.8964
14	TNFSF10	0.008876	6.2325
15	NUAK1	-0.0087	6.6771
16	SNORD114-14	-0.00864	5.6385
17	SRPX	-0.00862	5.0850
18	SPARC	-0.00848	6.0135
19	GJB1	0.008445	5.8142
20	TIMP3	-0.00823	6.5937
21	ISLR	-0.0079	8.9876
22	TUBA1A	-0.00754	9.6540
23	DEXI	0.007271	5.5913
24	BASP1	-0.00724	8.4396
25	PXDN	-0.00724	7.7570
26	GBP4	0.007226	3.1119
27	SLC28A3	0.007201	4.2125
28	HLA-DRA	0.007197	8.3089
29	TAP2	0.007189	4.8464
30	ACSL5	0.007155	6.8703
31	CDH11	-0.00708	4.9925
32	PSMB9	0.006962	4.1122
33	MMP14	-0.00683	10.1689
34	CD74	0.006825	9.2707
35	LOXL1	-0.00676	9.6429
36	CHTA	0.006623	5.5396
37	ZNF697	-0.00658	7.0319
38	SH3RF2	0.006549	5.0029
39	MIR198	-0.00654	5.1935
40	COL1A2	-0.00645	6.0427

【表 2 - 2】

41	TNFRSF14	0.006421	9.0366
42	COL8A1	-0.00642	6.4565
43	C21orf63	0.006261	5.9811
44	TAPI	0.006215	8.6458
45	PDPN	-0.00612	5.3198
46	RHOBTB3	-0.00597	3.5609
47	BCL11A	0.005943	4.3818
48	HLA-DOB	0.005851	4.6075
49	XAF1	0.005742	7.9229
50	ARIIGAP26	0.005632	4.3991
51	POLD2	-0.00558	9.4183
52	DPYSL2	-0.00533	8.3469
53	COL4A1	-0.0052	7.0317
54	ID3	-0.00516	7.5673
55	CFB	0.005077	5.7951
56	NID1	-0.00494	4.7186
57	FKBP7	-0.00489	2.9437
58	TIMP2	-0.00468	7.5253
59	RCBTB1	-0.00458	7.4491
60	ANGPTL2	-0.00448	5.6807
61	ENTPD7	-0.00442	7.3772
62	SIHSA4	-0.00403	6.0601
63	HIINT1	0.003651	6.0724

10

20

## 【0078】

他の例示的な態様において、血管新生発現サインは、表3に詳述する対応するランクまたは、例えば、病状に依存する他のランクを有する、表3に詳述する63個のバイオマーカーに関する。表3は、化合物決定スコア関数において、例示的な分類指標における、重みの絶対値が小さくなる順に、バイオマーカーをランク付けする。本発明の方法は、表3に記載の1個以上、最大全てのバイオマーカーを測定することに依存し得る。本発明の方法は、表3のバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60個またはそれぞれの発現レベルを測定することを含んでいてよい。特定の態様において、該方法は、表3のバイオマーカーの2～5個の発現レベルを測定することを含んでいてよい。

30

## 【0079】

【表 3 - 1】

表 3

遺伝子	総デルタ HR	ランク
IGF2	0.048910407	1
CDR1	0.045335288	2
COL3A1	0.044869217	3
SPARC	0.043434096	4
TIMP3	0.042053053	5
INS	0.04013658	6
COL8A1	0.026780907	7
NUAK1	0.026752491	8
MATN3	0.02402318	9
TMEM45A	0.016999761	10
SRPX	0.016372168	11
CDH11	0.015604812	12
MMP14	0.014583388	13
LOXL1	0.010315358	14
PXDN	0.009728534	15
COL1A2	0.009267887	16
ANGPTL2	0.006071504	17
POLD2	0.004297935	18
NID1	0.00408724	19
ISLR	0.003014488	20
SNORD114-14	0.002992636	21
CXCR2P1	0.002804432	22
MIR198	0.002173041	23
BCL11A	0.001258286	24
PDPN	0.000989109	25
TNFRSF14	0.000132838	26
ENTPD7	6.25143E-05	27
HINT1	-0.000113156	28
TAP1	-0.000379242	29
ID3	-0.000452476	30
RCBTB1	-0.000695459	31
SOX11	-0.001068812	32
SHISA4	-0.001470801	33
COL4A1	-0.001714442	34
TUBA1A	-0.001817696	35
TIMP2	-0.004079263	36
FKBP7	-0.004575097	37
TAP2	-0.004597761	38
TNFSF10	-0.005307314	39
ZNF697	-0.007733496	40

10

20

30

40

【表 3 - 2】

CIITA	-0.008785689	41
BASP1	-0.009340492	42
XAF1	-0.009760794	43
DEXI	-0.009798099	44
SH3RF2	-0.009856754	45
HLA-DOB	-0.009987248	46
RHOBTB3	-0.010264542	47
GBP4	-0.010747831	48
DPYSL2	-0.012042179	49
ARHGAP26	-0.012380203	50
MFAP2	-0.013981916	51
CD74	-0.016415304	52
ACSL5	-0.016912224	53
SLC28A3	-0.016996213	54
GJB1	-0.018395345	55
C21orf63	-0.019853038	56
PSMB9	-0.020314379	57
HLA-DRA	-0.020436677	58
CFB	-0.022202886	59
RARRES3	-0.034723666	60
CXCL17	-0.038523986	61
SLC5A1	-0.042034346	62
RTP4	-0.045259104	63

10

20

【 0 0 8 0 】

バイオマーカーの発現を測定するのに使用し得るプローブセットを表 4 に示す。

【表 4 - 1】

表 4

プローブセット	遺伝子	配列番号
OC3P.6916.C1_s_at	ACSL5	489
OC3P.5381.C1_s_at	ACSL5	490
OC3P.2679.C1_s_at	ANGPTL2	491
ADXStrongB12_at	ANGPTL2	N/A
OC3P.9834.C1_s_at	ANGPTL2	492
OCMX.9546.C1_x_at	ANGPTL2	493
OCADA.8226_s_at	ANGPTL2	494
OCADNP.8811_s_at	ANGPTL2	495
OCADA.3065_s_at	ARHGAP26	496
OCADA.1272_s_at	ARHGAP26	497
OC3SNGnh.16379_x_at	ARHGAP26	498
OCMX.11710.C1_at	ARHGAP26	499
OCADA.4396_s_at	ARHGAP26	500
OC3P.15451.C1_at	ARHGAP26	501
OC3SNGnh.16379_at	ARHGAP26	502
OC3SNGnh.17316_s_at	ARHGAP26	503
OCADA.964_s_at	ARHGAP26	504
OC3SNGnh.6403_s_at	ARHGAP26	505
OC3P.3912.C1_s_at	ARHGAP26	506
OC3P.2419.C1_s_at	BASP1	507
OCRS2.9952_s_at	BASP1	508
OCRS2.9952_x_at	BASP1	509
OCRS.854_s_at	BCL11A	510
OC3P.14938.C1_s_at	BCL11A	511
OCMX.12290.C1_at	BCL11A	512
OCADA.10230_s_at	BCL11A	513
OC3SNGnh.4343_at	BCL11A	514
OC3SNGnh.16766_x_at	BCL11A	515
OCMX.1680.C1_s_at	BCL11A	516
OC3P.14938.C1-334a_s_at	BCL11A	517
OCMX.12290.C1_x_at	BCL11A	518
OCADA.2850_s_at	BCL11A	519
OCADA.1135_s_at	C21orf63	520
OCMX.14248.C1_s_at	C21orf63	521
OC3P.14091.C1_s_at	C21orf63	522
OC3P.14431.C1_s_at	C21orf63	523
OCADA.8368_x_at	CD74	524
OC3SNGnh.19144_s_at	CD74	525
OC3P.104.CB1_x_at	CD74	526
OCADNP.1805_s_at	CD74	527
OC3SNG.3064-21a_x_at	CD74	528
OC3P.14147.C1_s_at	CDH11	529
OCADNP.10024_s_at	CDH11	530
OCHP.148_s_at	CDH11	531
OCADA.6210_s_at	CDH11	532

10

20

30

40



【表 4 - 2】

OC3SNGnh.5056_x_at	CDH11	533
OC3SNGnh.4032_s_at	CDH11	534
OCHPRC.58_s_at	CDH11	535
OCMX.1718.C1_s_at	CDH11	536
OCADA.8067_x_at	CDH11	537
OCADNP.8007_s_at	CDR1	538
OC3P.295.C1_s_at	CFB	539
ADXStrongB56_at	CFB	N/A
OC3P.295.C2_x_at	CFB	540
OC3SNGnh.14167_at	CFB	541
OC3SNGn.5914-165a_s_at	CFB	542
OC3SNGn.970-10a_s_at	CFB	543
OCADNP.9683_s_at	CFB	544
OC3P.295.C2_at	CFB	545
OC3SNGnh.14167_s_at	CFB	546
OCADNP.17538_s_at	CIITA	547
OC3P.805.C1_s_at	CIITA	548
OCEM.1780_s_at	CIITA	549
OC3SNGnh.16892_s_at	CIITA	550
OCADA.6540_s_at	CIITA	551
OCHP.1927_s_at	CIITA	552
OC3SNGn.354-123a_s_at	CIITA	553
OC3SNGnh.4794_at	CIITA	554
OC3SNGn.8474-50a_x_at	COL1A2	555
OCMX.184.C11_s_at	COL1A2	556
OC3SNG.115-2502a_at	COL1A2	557
OC3SNG.116-9169a_s_at	COL1A2	558
OC3P.60.CB2_x_at	COL1A2	559
OC3P.6454.C1_s_at	COL1A2	560
OC3SNG.115-2502a_x_at	COL1A2	561
OCMX.184.C16_x_at	COL1A2	562
OCHP.173_x_at	COL1A2	563
OC3P.60.CB1_x_at	COL1A2	564
OC3SNGn.2538-539a_x_at	COL1A2	565
OCMX.184.C16_s_at	COL1A2	566
OCADNP.4048_s_at	COL3A1	567
OC3P.81.CB2_s_at	COL3A1	568
OC3SNGnh.19127_s_at	COL3A1	569
OC3SNGn.1211-6a_s_at	COL3A1	570
OCADNP.11975_s_at	COL4A1	571
OC3P.850.C1-1145a_s_at	COL4A1	572
OCHPRC.29_s_at	COL4A1	573
OC3SNGnh.276_x_at	COL4A1	574
OC3SNGnh.18844_at	COL8A1	575
OC3P.1087.C1_s_at	COL8A1	576
OC3P.13652.C1_s_at	COL8A1	577
OCADNP.14932_s_at	COL8A1	578

10

20

30

40

【表 4 - 3】

OC3P.10562.C1_s_at	COL8A1	579
OCHPRC.94_s_at	CXCL17	580
OC3SNG.3604-23a_at	CXCR2P1	581
OC3SNG.3604-23a_x_at	CXCR2P1	582
OC3SNGnh.13095_at	DEXI	583
OC3P.7366.C1_s_at	DEXI	584
OCADA.2531_s_at	DEXI	585
OC3SNGnh.3527_at	DEXI	586
OC3P.10489.C1_s_at	DEXI	587
OCADNP.10600_s_at	DEXI	588
OCADA.1911_s_at	DPYSL2	589
OC3P.7322.C1_s_at	DPYSL2	590
OC3SNG.366-35a_s_at	ENTPD7	591
OC3SNGnh.5644_s_at	FKBP7	592
OC3SNGnh.17831_at	FKBP7	593
OCADNP.7326_s_at	FKBP7	594
OC3P.12003.C1_x_at	FKBP7	595
OC3P.4378.C1_s_at	GBP4	596
OC3SNGnh.5459_s_at	GBP4	597
OCADNP.3694_s_at	GBP4	598
OC3SNG.3671-13a_s_at	GJB1	599
2874688_at	HINT1	N/A
2874689_at	HINT1	N/A
Adx-200093_s_at	HINT1	600
OC3SNGnh.5235_x_at	HINT1	601
2874702_at	HINT1	N/A
2874727_at	HINT1	N/A
200093_s_at	HINT1	602
2874697_at	HINT1	N/A
2874725_at	HINT1	N/A
2874696_at	HINT1	N/A
2874737_at	HINT1	N/A
2874735_at	HINT1	N/A
Adx-200093-up_s_at	HINT1	603
OC3P.14829.C1_s_at	HLA-DOB	604
ADXBad55_at	HLA-DOB	N/A
OC3P.674.C1_s_at	HLA-DRA	605
OCADNP.8307_s_at	HLA-DRA	606
OC3P.2407.C1_s_at	ID3	607
ADXGood100_at	IGF2	N/A
OC3SNG.899-20a_s_at	IGF2	608
OC3SNGn.5728-103a_x_at	IGF2	610
OC3P.4645.C1_s_at	IGF2	613
OC3SNGnh.19773_s_at	IGF2	614
OCADNP.10122_s_at	IGF2	615
OCADNP.7400_s_at	IGF2	616

10

20

30

40

【表 4 - 4】

ADXGood100_at	INS	N/A
OCADNP.17017_s_at	INS	609
OC3SNGn.5728-103a_x_at	INS	610
OCEM.2174_s_at	INS	611
OCEM.2035_x_at	INS	612
OC3P.4645.C1_s_at	INS	613
OC3SNGnh.19773_s_at	INS	614
OCADNP.10122_s_at	INS	615
OCADNP.7400_s_at	INS	616
OCEM.2035_at	INS	617
OC3P.9976.C1_x_at	ISLR	618
OCHP.1306_s_at	LOXL1	619
OCADA.10621_s_at	MATN3	620
OC3P.2576.C1_x_at	MFAP2	621
OCHP.1079_s_at	MFAP2	622
OC3P.11139.C1_s_at	MIR198	623
OC3P.211.C1_x_at	MIR198	624
ADXBad7_at	MIR198	N/A
OCHP.462_s_at	MIR198	625
OC3SNGn.8954-766a_s_at	MIR198	626
OCADNP.4997_s_at	MIR198	627
OCHP.228_s_at	MMP14	628
OC3P.4123.C1_x_at	MMP14	629
OC3P.4123.C1_s_at	MMP14	630
OCADA.1433_x_at	NID1	631
OCADNP.7347_s_at	NID1	632
OC3P.3404.C1_s_at	NID1	633
OC3SNGn.3328-664a_s_at	NID1	634
OCADNP.9225_s_at	NUAK1	635
ADXStrongB87_at	NUAK1	N/A
OC3SNGn.2676-391a_s_at	NUAK1	636
OCHPRC.111_s_at	PDPN	637
OCADNP.10047_s_at	PDPN	638
OCHPRC.96_s_at	PDPN	639
OC3P.13523.C1_s_at	PDPN	640
OC3SNG.4571-22a_x_at	POLD2	641
OCEM.1126_s_at	POLD2	642
ADXGood4_at	POLD2	N/A
OC3SNGn.890-5a_s_at	POLD2	643
OC3P.14770.C1_s_at	PSMB9	644
OCRS.920_s_at	PSMB9	645
OC3P.4627.C1_s_at	PSMB9	646
OC3SNGnh.8187_at	PSMB9	647
OCMX.15283.C1_x_at	PSMB9	648
OCADNP.804_s_at	PSMB9	649
OC3SNGnh.8187_x_at	PSMB9	650
OCMX.14440.C1_x_at	PSMB9	651

10

20

30

40

【表 4 - 5】

OC3P.1307.C1_s_at	PXDN	652	
OC3P.8838.C1_s_at	PXDN	653	
OCHP.1891_s_at	RARRES3	654	
OC3P.8963.C1_s_at	RCBTB1	655	
OC3SNGnh.6721_x_at	RHOBTB3	656	
OC3SNGnh.6912_x_at	RHOBTB3	657	
OC3SNGnh.957_s_at	RHOBTB3	658	
OC3SNG.2402-2883a_s_at	RHOBTB3	659	
OCHPRC.1436_at	RHOBTB3	660	10
OC3SNGn.5382-76a_s_at	RHOBTB3	661	
OC3SNGnh.957_x_at	RHOBTB3	662	
OC3SNGnh.957_at	RHOBTB3	663	
OC3P.12862.C1_s_at	RHOBTB3	664	
OC3SNG.2401-1265a_x_at	RHOBTB3	665	
OC3P.5737.C1_s_at	RHOBTB3	666	
OCHP.1722_s_at	RTP4	667	
OC3P.9552.C1-496a_s_at	RTP4	668	
OC3P.9552.C1_x_at	RTP4	669	
OC3P.9552.C1_at	RTP4	670	20
OC3SNGnh.865_s_at	SH3RF2	671	
OC3SNGnh.16695_s_at	SH3RF2	672	
OCADNP.12161_s_at	SH3RF2	673	
OC3SNGn.439-184a_s_at	SH3RF2	674	
OCHPRC.86_s_at	SH3RF2	675	
OCADNP.2340_s_at	SHISA4	676	
OC3SNG.6118-43a_s_at	SHISA4	677	
OCADNP.8940_s_at	SLC28A3	678	
OC3SNGnh.971_s_at	SLC28A3	679	
OCADA.4025_s_at	SLC28A3	680	
OC3P.9666.C1_s_at	SLC28A3	681	30
OC3P.5726.C1_s_at	SLC5A1	682	
OCADNP.7872_s_at	SLC5A1	683	
OCRS2.10331_x_at	SNORD114-14	684	
OCRS2.8538_x_at	SNORD114-14	685	
OCRS2.10331_at	SNORD114-14	686	
OC3SNGn.2110-23a_s_at	SOX11	687	
OCHP.1171_s_at	SOX11	688	
OCHP.1523_s_at	SOX11	689	
OC3SNGnh.19157_x_at	SPARC	690	
OCHP.508_s_at	SPARC	691	
OC3P.148.CB1-990a_s_at	SPARC	692	40
OCEM.2143_at	SPARC	693	
OC3SNG.2614-40a_s_at	SPARC	694	
OC3P.148.CB1_x_at	SPARC	695	
OCEM.2143_x_at	SPARC	696	
OC3SNG.1657-20a_s_at	SRPX	697	
ADXGoodB4_at	TAP1	N/A	

【表 4 - 6】

OC3SNG.2665-23a_s_at	TAP1	698
OC3P.5602.C1_s_at	TAP2	699
OCADNP.2260_s_at	TAP2	700
OCADNP.8242_s_at	TAP2	701
OC3SNGnh.18127_s_at	TAP2	702
OC3P.14195.C1_s_at	TIMP2	703
OCHP.320_s_at	TIMP2	704
OC3P.543.CB1_x_at	TIMP2	705
OC3SNGnh.19238_s_at	TIMP2	706
OC3P.543.CB1-699a_s_at	TIMP2	707
OCADNP.14191_s_at	TIMP2	708
OCADNP.13017_s_at	TIMP3	709
OCADA.9324_s_at	TIMP3	710
OCHP.1200_s_at	TIMP3	711
ADXGood73_at	TIMP3	N/A
OC3P.10470.C1_s_at	TIMP3	712
OC3P.15327.C1_at	TIMP3	713
OCHP.112_s_at	TIMP3	714
OC3P.5348.C1_s_at	TMEM45A	715
OC3P.4028.C1_at	TNFRSF14	716
OC3SNGn.2230-103a_s_at	TNFRSF14	717
OC3P.4028.C1_x_at	TNFRSF14	718
OC3SNG.1683-90a_s_at	TNFSF10	719
OC3P.2087.C1_s_at	TNFSF10	720
OCHP.318_x_at	TNFSF10	721
OC3SNGn.6279-343a_s_at	TNFSF10	722
OC3SNGn.5842-826a_x_at	TNFSF10	723
OCADNP.9180_s_at	TNFSF10	724
OCHP.1136_s_at	TUBA1A	725
OCADNP.7771_s_at	XAF1	726
ADXStrongB9_at	XAF1	N/A
OC3SNG.2606-619a_x_at	XAF1	727
OC3SNGnh.10895_at	XAF1	728
OC3P.4873.C1_s_at	XAF1	729
OC3SNGnh.10895_x_at	XAF1	730
OC3SNG.2605-236a_x_at	XAF1	731
OC3SNG.5460-81a_x_at	XAF1	732
OCADA.154_s_at	ZNF697	733
OCADA.3112_s_at	ZNF697	734

【 0 0 8 2 】

一の例示的な態様において、発現サインは、次のバイオマーカー：IGF2、SOX1、INS、CXCL17、SLC5A1、TMEM45A、CXCR2P1、MFAP2、MATN3、RTP4、COL3A1、CDR1、RARRES3、TNFSF10、NUAK1、SNORD114-14、SRPX、SPARC、GJB1、TIMP3、ISLR、TUBA1A、DEXI、BASP1、PXDN、GBP4、SLC28A3、HLA-DRA、TAP2、ACSL5、CDH11、PSMB9、MMP14、CD74、LOXL1、CIITA、ZNF697、SH3RF2、MIR198、COL1A2、TNFRSF14、COL8A1、C21orf63、TAP1、PDPN、RHOBTB3、BCL11A、FLA-DOB、XAF1、ARHGAP26、POLD2、DPYSL2、COL4A1、ID3、CFB、NID1、FKBP7、TIMP2

、RCBTB1、ANGPTL2、ENTPD7、SHISA4およびHINT1の全てまたは一部を含む。

【0083】

他の例示的な態様において、発現サインはIGF2、SOX11、INSおよびCXCL17ならびに表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58または59である。

10

【0084】

他の例示的な態様において、発現サインはIGF2、INS、SPARC、TMEM45A、COL8A1ならびに表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58または59である。

【0085】

他の例示的な態様において、発現サインはIGF2、INS、SPARC、TMEM45A、COL8A1、COL3A1、CDR1、NUAK1、TIMP3、LOXL1ならびに表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52または53である。

20

【0086】

他の例示的な態様において、発現サインはIGF2、TIMP3、INS、CXCR2P1、NUAK1ならびに表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58または59である。

30

【0087】

他の例示的な態様において、発現サインはIGF2、TIMP3、INS、CXCR2P1、NUAK1、CDR1、MATN3、SOX11、SNORD114-14、COL3A1ならびに表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52または53である。

40

【0088】

他の例示的な態様において、発現サインはCOL3A1、SPARC、CDR1、SRPX、MATN3ならびに表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37

50

、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58または59である。

【0089】

他の例示的な態様において、発現サインはCOL3A1、SPARC、CDR1、SRPX、MATN3、TIMP3、CDH11、COL8A1、BCL11A、MMP14ならびに表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52または53である。

10

【0090】

他の例示的な態様において、発現サインはIGF2、CDR1、COL3A1、SPARC、TIMP3ならびに表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58または59である。

20

【0091】

他の例示的な態様において、発現サインはIGF2、CDR1、COL3A1、SPARC、TIMP3、INS、COL8A1、NUAK1、MATN3、TMEM45Aならびに表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58または59である。

30

【0092】

他の例示的な態様において、発現サインはINS、SPARC、COL8A1、COL3A1、CDR1、NUAK1、TIMP3およびMMP14ならびに表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54または55である。

40

【0093】

他の例示的な態様において、発現サインは、少なくとも、INS、SPARC、COL8A1、COL3A1、CDR1、NUAK1、TIMP3およびMMP14を含む。他の例示的な態様において、発現サインは、少なくとも、IGF2、CDR1、COL3A1、SPARC、TIMP3、INS、COL8A1、NUAK1、MATN3、TMEM45Aを含む。他の例示的な態様において、発現サインは、少なくとも、IGF2、CDR1、COL3A1、SPARC、TIMP3を含む。他の例示的な態様において、発現サインは、少なくとも、COL3A1、SPARC、CDR1、SRPX、MATN3、TIMP3、CDH11、COL8A1、BCL11A、MMP14を含む。他の例示的な態様において、発現サインは、少なくとも、COL3A1、SPARC、CDR1、SRPX、MATN3を含む。他の例示的な態様において、発現サインは、少なくとも、IGF2、TIMP3、INS、CXCR2P1

50

、NUAK1、CDR1、MATN3、SOX11、SNORD114-14、COL3A1を含む。他の例示的な態様において、発現サインは、少なくともIGF2、TIMP3、INS、CXCR2P1、NUAK1を含む。他の例示的な態様において、発現サインは、少なくとも、IGF2、INS、SPARC、TMEM45A、COL8A1、COL3A1、CDR1、NUAK1、TIMP3、LOXL1を含む。他の例示的な態様において、発現サインは、少なくとも、IGF2、INS、SPARC、TMEM45A、COL8A1を含む。他の例示的な態様において、発現サインは、少なくとも、IGF2、SOX11、INSおよびCXCL17を含む。

#### 【0094】

他の例示的な態様において、発現サインはIGF2および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

10

#### 【0095】

他の例示的な態様において、発現サインはSOX11および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

20

#### 【0096】

他の例示的な態様において、発現サインはINSおよび表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

30

#### 【0097】

他の例示的な態様において、発現サインはCXCL17および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

40

#### 【0098】

他の例示的な態様において、発現サインはCDR1および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

#### 【0099】

他の例示的な態様において、発現サインはCOL3A1および表2のバイオマーカーの

50



一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

【0100】

他の例示的な態様において、発現サインはSPARCおよび表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

10

【0101】

他の例示的な態様において、発現サインはTIMP3および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

20

【0102】

他の例示的な態様において、発現サインはCOL8A1および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

30

【0103】

他の例示的な態様において、発現サインはNUAK1および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

【0104】

他の例示的な態様において、発現サインはMATN3および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

40

【0105】

他の例示的な態様において、発現サインはTMM45Aおよび表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、

50

18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

【0106】

他の例示的な態様において、発現サインはC X C R 2 P 1および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

10

【0107】

他の例示的な態様において、発現サインはS R P Xおよび表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

20

【0108】

他の例示的な態様において、発現サインはC D H 1 1および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

【0109】

他の例示的な態様において、発現サインはB C 1 1 Aおよび表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

30

【0110】

他の例示的な態様において、発現サインはL O X L 1および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

40

【0111】

他の例示的な態様において、発現サインはM M P 1 4および表2のバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45

50

、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

【0112】

他の例示的態様において、例示的な発現サインは、表2に挙げたバイオマーカーおよび対応するバイオマーカー重み値を含む。他の例示的な態様において、例示的な発現サインは表2に挙げたバイオマーカーおよび対応するバイオマーカー重み値からなる。他の例示的な態様において、例示的な発現スコアは、表3に記載のバイオマーカーおよびランクを含む。他の例示的な態様において、例示的な発現サインは、表3に記載のバイオマーカーおよび対応するランクからなる。

【0113】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために、個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルは、表2または3に記載のバイオマーカーの全てまたは一部を含む。

【0114】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはIGF2、SOX11、INSおよびCXCL17ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58または59である。

【0115】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはIGF2、INS、SPARC、TMEM45A、COL8A1ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58または59である。

【0116】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはIGF2、INS、SPARC、TMEM45A、COL8A1、COL3A1、CDR1、NUAK1、TIMP3、LOXL1ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52または53である。

【0117】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはIGF2、TIMP3、INS、CXCR

10

20

30

40

50

2 P 1、N U A K 1ならびに表 2 または 3 に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくとも N 個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、N は 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58 または 59 である。

【0118】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける 1 個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルは I G F 2、T I M P 3、I N S、C X C R 2 P 1、N U A K 1、C D R 1、M A T N 3、S O X 1 1、S N O R D 1 1 4 - 1 4、C O L 3 A 1 ならびに表 2 または 3 に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくとも N 個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、N は 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52 または 53 である。

10

【0119】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける 1 個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルは C O L 3 A 1、S P A R C、C D R 1、S R P X、M A T N 3 ならびに表 2 または 3 に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくとも N 個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、N は 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58 または 59 である。

20

【0120】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける 1 個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルは C O L 3 A 1、S P A R C、C D R 1、S R P X、M A T N 3、T I M P 3、C D H 1 1、C O L 8 A 1、B C L 1 1 A、M M P 1 4 ならびに表 2 または 3 に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくとも N 個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、N は 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52 または 53 である。

30

40

【0121】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける 1 個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルは I G F 2、C D R 1、C O L 3 A 1、S P A R C、T I M P 3 ならびに表 2 または 3 に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくとも N 個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、N は 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58 または 59 である。

50

。

## 【0122】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはIGF2、CDR1、COL3A1、SPARC、TIMP3、INS、COL8A1、NUAK1、MATN3、TMEM45Aならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52または53である。

10

## 【0123】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはINS、SPARC、COL8A1、COL3A1、CDR1、NUAK1、TIMP3およびMMP14ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54または55である。

20

## 【0124】

他の例示的な態様において、バイオマーカーパネルは、少なくとも、INS、SPARC、COL8A1、COL3A1、CDR1、NUAK1、TIMP3およびMMP14を含む。他の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、少なくとも、IGF2、CDR1、COL3A1、SPARC、TIMP3、INS、COL8A1、NUAK1、MATN3、TMEM45Aを含む。他の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、少なくとも、IGF2、CDR1、COL3A1、SPARC、TIMP3を含む。他の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、少なくとも、COL3A1、SPARC、CDR1、SRPX、MATN3、TIMP3、CDH11、COL8A1、BCL11A、MMP14を含む。他の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、少なくとも、COL3A1、SPARC、CDR1、SRPX、MATN3を含む。他の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、少なくとも、COL3A1、SPARC、CDR1、SRPX、MATN3を含む。他の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、少なくとも、IGF2、TIMP3、INS、CXCR2P1、NUAK1、CDR1、MATN3、SOX11、SNORD114-14、COL3A1を含む。他の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、少なくとも、IGF2、TIMP3、INS、CXCR2P1、NUAK1を含む。他の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、少なくともIGF2、INS、SPARC、TMEM45A、COL8A1、COL3A1、CDR1、NUAK1、TIMP3、LOXL1を含む。他の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、少なくとも、IGF2、INS、SPARC、TMEM45A、COL8A1を含む。他の例示的な態様において、該バイオマーカーパネルは、少なくとも、IGF2、SOX11、INSおよびCXCL17を含む。

30

40

## 【0125】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはIGF2ならびに表2または3に挙げるバ

50

バイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

【0126】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはSOX11ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

10

【0127】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはINSならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

20

【0128】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはCXCL17ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

30

【0129】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはSPARCならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

40

【0130】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはTMEM45Aならびに表2または3に挙

50

げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

【0131】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはCOL8A1ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

10

【0132】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはCOL3A1ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

20

【0133】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはCDR1ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

30

【0134】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはNUAK1ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

40

【0135】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはTIMP3ならびに表2または3に挙げる

50

バイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

【0136】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはLOXL1ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

10

【0137】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはCXCR2P1ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

20

【0138】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはSPARCならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

30

【0139】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはMATN3ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

40

【0140】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはSNORD114-14ならびに表2また

50



は3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

【0141】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはSRPXならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

10

【0142】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはCDH11ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

20

【0143】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはBC11Aならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

30

【0144】

さらなる局面において、本発明の方法は、バイオマーカーパネルにおける1個以上のバイオマーカーの発現レベルを決定するために個体からの生物学的サンプルでアッセイを実施することを含み、該バイオマーカーパネルはMMP14ならびに表2または3に挙げるバイオマーカーの一覧から選択される少なくともN個の付加的バイオマーカーを含み、ここで、Nは1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61または62である。

40

【0145】

発現サインを使用する新規試験サンプル分類

上記のような発現サインを使用して新規試験サンプルを分類するために、がん組織における1個以上のバイオマーカーの相対的発現レベルを測定して、試験サンプル発現プロフ

50

ファイルを作成する。特定の例示的な態様において、試験サンプル発現プロファイルを化合物決定スコア(「発現スコア」)の形で要約し、患者データのトレーニングセットから数学的に導かれる閾値スコアと比較する。スコア閾値は、良好/不良臨床予後を含むが、これに限定されない、特徴に基づき患者群を異なる群に分けることができる能力を最大化するために、確立する。患者トレーニングセットデータは、好ましくは予後、再発の可能性、長期生存、臨床成績、処置応答、診断、がん分類または個別化ゲノミクスプロファイルにより特徴付けされているがん組織サンプルに由来する。患者サンプルからの発現プロファイルおよび対応する決定スコアを、トレーニングセットにおける、数学的に導かれるスコア決定閾値の同じ側にある患者サンプルの特徴と関連させ得る。特定の例示的な態様において、線形分類指標スカラー出力の閾値を、トレーニングデータセット内で観察された交差検証下の感度および特異性の和を最大化するために最適化する。

10

#### 【0146】

異なる量の出発物質、抽出および増幅反応の効率変動などについて補正するために、サンプルの全体的発現データを、当業者に知られる方法を使用して正規化する。

#### 【0147】

一の態様において、患者組織サンプルのバイオマーカー発現プロファイルを線形分類指標で評価する。本明細書で使用する、線形分類指標は、個々のバイオマーカー強度の化合物決定スコア(「決定関数」)への加重和を指す。次いで、サンプルがスコア閾値と同等であるか、もしくは、上回るか(決定関数正)または、下回るか(決定関数負)を示す、感度および特異性の観点でのある設定値に対応する、定義済みカットオフスコア閾値と、決定スコアを比較する。

20

#### 【0148】

正規化データで線形分類指標を使用して診断または予後コール(例えば良好または不良な臨床予後)を作成するのは、データ領域を分ける、すなわち分類指標における全遺伝子の発現値の全ての可能な組み合わせを、分離超平面の手段により2個の互いに素なセグメントに分ける、効果的な手段である。この分割は、例えば治療剤に応答性または耐性を示す患者からの、例示的な大きなトレーニングセットにおいて経験的に導かれる。普遍性を損なうことなく、一つを除いて全てのバイオマーカーについてある特定の固定された値のセットを仮定でき、これにより、例えば、治療剤に対する応答性または耐性から判定が変わるところで、この残ったバイオマーカーの閾値が自動的に決定される。この動的閾値を上回る発現値は、不良臨床予後(負の重みを有するバイオマーカーについて)または良好臨床予後(正の重みを有するバイオマーカーについて)を示す。この閾値の厳密な値は、分類指標内の他の全てのバイオマーカーの実際に測定された発現プロファイルに依存するが、特定のバイオマーカーの一般的指標は固定されたままであり、すなわち高値または「相対的過剰発現」は常に良好臨床予後(正の重みを有する遺伝子)または不良臨床予後(負の重みを有する遺伝子)に貢献する。したがって、全体的遺伝子発現分類指標において、相対的発現は、特定のバイオマーカーの上方制御または下方制御のいずれが良好または不良な臨床予後の指標であるかを示し得る。特定の例示的な態様において、閾値発現スコアを上回るサンプル発現スコアは、対象が非血管新生サブタイプを有することを示す。特定の他の例示的な態様において、閾値スコアを上回るサンプル発現スコアは、対象が、閾値スコアを下回るサンプル発現スコアを示す対象と比較して、良好な臨床予後を有することを示す。特定の他の例示的な態様において、閾値スコアを上回るサンプル発現スコアは、抗血管新生剤を投与した場合に、対象が、有害な効果を受けるか、または、予後が不良になる可能性があることを示す。

30

40

#### 【0149】

試験サンプルの発現プロファイルを測定するための多数の適切な方法があり、該方法は、アッセイするバイオマーカーの種類に依存する。生物学的サンプルにおけるmRNAの測定は、該生物学的サンプルにおける対応する蛋白質レベルの検出の代用として使用し得る。したがって、本明細書に記載するバイオマーカーまたはバイオマーカーパネルのいずれも、適当なRNAの検出により検出できる。遺伝子発現プロファイリングの方法として

50

は、マイクロアレイ、RT-PCR、qPCR、NGS、ノーザンブロット、SAGE、質量分析が挙げられるが、これらに限定されない。

【0150】

mRNA発現レベルは、逆転写定量的ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCRと、それに続くqPCR)で測定される。RT-PCRを、mRNAからcDNAを作製するために使用する。該cDNAを、DNA増幅過程が進行するに連れて蛍光を発するように、qPCRアッセイに使用し得る。標準曲線との比較により、qPCRは、細胞あたりのmRNAコピー数のような絶対測定値を生じ得る。ノーザンブロット、マイクロアレイ、インベーターアッセイおよびRT-PCRは、全て、キャピラリー電気泳動と組み合わせて、サンプルにおけるmRNAの発現レベルの測定に使用されている。Gene Expression Profiling: Methods and Protocols, Richard A. Shimkets, editor, Humana Press, 2004参照。

10

【0151】

miRNA分子は、非コードであるが、遺伝子発現を制御し得る低分子RNAである。mRNA発現レベルの測定に適する方法は、いずれも対応するmiRNAについて使用し得る。近年、多くの研究所で、疾患のバイオマーカーとしてのmiRNAの使用が検討されている。多くの疾患は、広汎な転写制御が関与し、miRNAのバイオマーカーとしての役割が発見されたとしても驚きではない。miRNA濃度と疾患の関係は、蛋白質レベルと疾患の関係よりもはるかに不明であることがしばしばであるが、miRNAバイオマーカーの値は実質的なものであり得る。言うまでもないことであるが、疾患によって差次的に発現されるRNAと同様、インビトロ診断製品の開発中に直面する問題としては、miRNAが罹患細胞で生存し、解析のために容易に抽出されるか、またはmiRNAが血中または他のマトリックスに遊離され、その場所で、測定するのに十分長く生存しなければならないとの要件が挙げられる。蛋白質バイオマーカーも類似の要件を有するが、多くの潜在的蛋白質バイオマーカーが、疾患の間、病変部位で、傍分泌により選択的に分泌され、機能する。多くの潜在的蛋白質バイオマーカーが、これらの蛋白質が合成される細胞の外側で機能するようになっている。

20

【0152】

遺伝子発現は、質量分析方法を使用して評価してもよい。質量分析計の種々の配置を使用してバイオマーカー値を検出できる。数種の質量分析計が利用可能であるかまたは種々の設計で製造し得る。一般的に、質量分析計は、主として、サンプル注入口、イオン源、質量分析器、検出器、真空系および装置制御系およびデータ系によって構成される。サンプル注入口、イオン源および質量分析器の差により、一般に装置のタイプおよびその性能が決定される。例えば、注入口はキャピラリーカラム液体クロマトグラフィー源であっても、マトリックス支援レーザー脱離に使用されるような直接プローブまたはステージであってもよい。一般的なイオン源は、例えば、ナノスプレーおよびマイクロスプレーを含むエレクトロスプレーまたはマトリックス支援レーザー脱離である。一般的な質量分析器としては、四重極質量フィルタ、イオントラップ質量分析器および飛行時間型質量分析器が挙げられる。さらなる質量分析方法は当分野で周知である(Burlingame et al., Anal. Chem. 70:647 R-716R (1998); Kinter and Sherman, New York (2000)参照)。

30

40

【0153】

蛋白質バイオマーカーおよびバイオマーカー値を、次のいずれか：エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)、ESI-MS/MS、ESI-MS/(MS)<sub>n</sub>、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析(MALDI-TOF-MS)、表面増強レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析(SELDI-TOF-MS)、シリコン上の脱離/イオン化(DIOS)、二次イオン質量分析(SIMS)、四重極飛行時間型(Q-TOF)、ultraflex III TOF/TOFと呼ばれるタンデム飛行時間型(TOF/TOF)技術、大気圧化学イオン化質量分析(APCI-MS)、APCI-MS/MS、APCI-(MS).sup.N、大気圧光イオン化質量分析(APPI-MS)、APPI-MS/MSおよびAPPI-(MS).sup.N、四重極質量分析、フーリエ変換質量分析(FTMS)

50

、定量的質量分析およびイオントラップ質量分析、を使用して検出および測定し得る。

【0154】

サンプル調製戦略を使用して、蛋白質バイオマーカーの質量分光学的な定性分析およびバイオマーカー値の決定の前に、サンプルを標識および濃縮する。標識方法としては、相対的および絶対的定量的のための同重体標識 (i T R A Q) および細胞培養物におけるアミノ酸での安定同位体標識 (S I L A C) が挙げられるが、これらに限定されない。質量分光分析に先だって、候補バイオマーカー蛋白質についてサンプルを選択的に濃縮するのに使用する捕捉剤としてはアプタマー、抗体、核酸プローブ、キメラ、小分子、F (a b ' ) 2 フラグメント、一本鎖抗体フラグメント、F v フラグメント、一本鎖 F v フラグメント、核酸、レクチン、リガンド結合受容体、アフィボディ、ナノボディ、アンキリン、ドメイン抗体、代替抗体スキファールド (例えば二重特異性抗体等)、刷り込みポリマー、アビマー、ペプチド模倣体、ペプチド、ペプチド核酸、トレオース核酸、ホルモン受容体、サイトカイン受容体および合成受容体ならびにこれらの修飾物およびフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。

【0155】

前記アッセイは、患者の臨床予後を決定し、適当な処置レジメンを選択する方法において有用であるバイオマーカー値の検出を可能にし、該方法は、個体からの生物学的サンプルにおいて、表1または表2に示すバイオマーカーからなる群から選択されるバイオマーカーにそれぞれ対応する、少なくともN個のバイオマーカー値を検出することを含み、バイオマーカー値を使用する分類は、下に詳述するように、該個体が、良好な予後を有するか、もしくは不良な予後を有するか、または、特定の治療剤を投与する場合に、有害な効果を受けるか、もしくは有益な効果を受けるかを示す。記載した予測的バイオマーカーのいくつかは、臨床予後予測に単独で有用であるが、2個以上のバイオマーカーのパネルとして、それぞれ有用であるバイオマーカーの複数のサブセットのグループ分けの方法も本明細書に記載する。したがって、本発明の多様な態様は、N個のバイオマーカーを含む組み合わせを提供し、ここで、Nは少なくとも3個のバイオマーカーである。Nは上記範囲、ならびに類似であるが、より高次の範囲のいずれかから選択される任意の数であることは理解されることである。本明細書に記載する任意の方法によって、バイオマーカー値を個々に検出および分類しても、または、例えば多重アッセイフォーマットにおけるように、集合的に検出および分類してもよい。

【0156】

b) マイクロアレイ方法

一の態様において、本発明は、「オリゴヌクレオチドアレイ」(本明細書では「マイクロアレイ」とも称する)を利用する。マイクロアレイを、細胞におけるバイオマーカーの発現の解析に、特にがん組織のバイオマーカーの発現の測定に使用し得る。

【0157】

一の態様において、バイオマーカーアレイを、細胞に存在するmRNA転写物を表す検出可能に標識されたポリヌクレオチド(例えば、全細胞mRNAから合成した蛍光標識cDNAまたは標識cRNA)をマイクロアレイにハイブリダイズすることにより調製する。マイクロアレイは、細胞または生物のゲノムにおける多くの遺伝子、好ましくは遺伝子の大部分またはほとんど全ての産物のための、規則正しく配列した結合(例えば、ハイブリダイゼーション)の部位を有する表面である。マイクロアレイは当分野で知られる多くの方法で製造できる。どのように製造しても、マイクロアレイは、一定の特徴を共有する。アレイは再現性があり、アレイの複数コピーの製造と互いの容易な比較を可能にする。好ましくは、マイクロアレイは小さく、通常5cm<sup>2</sup>より小さく、結合(例えば、核酸ハイブリダイゼーション)条件下で安定な物質から製造される。マイクロアレイにおける特定の結合部位または独特の結合部位のセットは、細胞における単一遺伝子の産物と特異的に結合する。具体的態様において、各位置に付着させた公知配列の核酸を含む、位置指定の可能なアレイを使用する。

【0158】

細胞のRNAと相補的なcDNAを作製し、適切なハイブリダイゼーション条件下でマイクロアレイにハイブリダイズするとき、任意の特定の遺伝子に対応する、アレイ中の部位へのハイブリダイゼーションレベルが、該遺伝子/バイオマーカーから転写されたmRNAの細胞内の分布を反映することは理解されることである。例えば、全細胞mRNAに相補的な、検出可能に(例えば、フルオロフォアで)標識されたcDNAまたはcRNAをマイクロアレイにハイブリダイズするとき、細胞において転写されない遺伝子に対応する(すなわち、遺伝子の産物と特異的に結合できる)アレイ上の部位のシグナル(例えば、蛍光シグナル)はわずかであるか、シグナルは全くなく、コードされているmRNAが分布している遺伝子は、相対的に強いシグナルを有する。核酸ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を、プローブが特異的アレイ部位に「特異的に結合」または「特異的にハイブリダイズ」するように選択し、すなわち、プローブは、相補性核酸配列を有する配列アレイ部位とハイブリダイズ、二本鎖化または結合するが、非相補性核酸配列を有する部位とはハイブリダイズしない。本明細書において、短い方のポリヌクレオチドが25塩基以下であれば、標準塩基対形成法則を使用してミスマッチがないとき、または、短い方のポリヌクレオチドが25塩基より長いならば、ミスマッチが5%を超えないとき、あるポリヌクレオチドは、他のポリヌクレオチドと相補的であると見なす。ポリヌクレオチドは完全に相補的(ミスマッチなし)であることが好ましい。慣用的な実験を使用した、陰性対照を含むハイブリダイゼーションアッセイを実施することにより、特異的ハイブリダイゼーション条件が特異的なハイブリダイゼーションを生じることを示すことができる。

10

20

30

40

50

#### 【0159】

最適なハイブリダイゼーション条件は、標識プローブおよび固定化ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドの長さ(例えば、オリゴマー対200塩基より大きいポリヌクレオチド)および種類(例えば、RNA、DNA、PNA)による。核酸のための特異的(すなわち、ストリンジェント)なハイブリダイゼーション条件の一般的パラメータは、Sambrook et al., 上掲およびAusubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", Greene Publishing and Wiley-interscience, NY (1987)に記載され、当該文献は、その全体が、全ての目的のために本明細書に包含される。cDNAマイクロアレイを使用するとき、典型的ハイブリダイゼーション条件は、0.2% SDSを含む5×SSC中、65で4時間のハイブリダイゼーションおよび、それに続く、25における低ストリンジェントな洗浄緩衝液(0.2% SDSを含む1×SSC)での洗浄、続いて10分間、25における、高ストリンジェントな洗浄緩衝液(0.2% SDSを含む0.1SSC)での洗浄である(Shena et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, p. 10614 (1996)参照)。有用なハイブリダイゼーション条件はまた、例えば、Tijessen, "Hybridization With Nucleic Acid Probes", Elsevier Science Publishers B.V. (1993)およびKricka, "Nonisotopic DNA Probe Techniques", Academic Press, San Diego, Calif. (1992)に示される。

#### 【0160】

##### c)免疫アッセイ方法

免疫アッセイ方法は、抗体の、その対応する標的または分析物への反応に基づくものであり、具体的なアッセイフォーマットによりサンプル中の分析物を検出できる。免疫反応性に基づくアッセイ方法の特異性および感度を改善するために、モノクローナル抗体がしばしば使用されるが、これは、エピトープ認識が特異的であるためである。ポリクローナル抗体もまた、モノクローナル抗体免疫アッセイと比較して、標的に対する親和性が高いため、多様な免疫アッセイにおいて成功裏に使用されている。免疫アッセイフォーマットは定性的、半定量的および定量的結果を提供するように設計されている。

#### 【0161】

定量的結果は、濃度が知られている、検出する具体的な分析物で作成した標準曲線の使用を介して作製してよい。未知サンプルからの応答またはシグナルを標準曲線にプロットし、未知サンプル中の標的に対応する量または値を確立する。

#### 【0162】

多数の免疫アッセイ形式が設計されている。E L I S AまたはE I Aは、分析物/バイオマーカーの検出について定量的であり得る。この方法は、分析物または抗体のいずれかへの標識の結合に依存し、標識成分は、直接的または間接的に、酵素を含む。E L I S A試験は、分析物の直接、間接、競合またはサンドイッチ検出のためのフォーマットでよい。他の方法は、例えば、放射性同位体( $I^{125}$ )または蛍光のような標識に依存する。さらなる技術としては、例えば、凝集、比濁分析、比濁法、ウェスタンブロット、免疫沈殿、免疫細胞化学、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ルミネックスアッセイおよびその他が挙げられる(ImmunoAssay: A Practical Guide, edited by Brian Law, Taylor & Francis, Ltd.により出版、2005 edition参照)。

#### 【0163】

アッセイフォーマットの例としては、酵素結合免疫吸着検定法(E L I S A)、放射免疫アッセイ、蛍光、化学発光および蛍光共鳴エネルギー移動(F R E T)または時間分解F R E T(T R - F R E T)免疫アッセイが挙げられる。バイオマーカーの検出方法の例としては、バイオマーカーおよびそれに続く、免疫沈殿ゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動、平面電気クロマトグラフィーなどのようなサイズおよびペプチドレベルの区別を可能にする定量的方法が挙げられる。

#### 【0164】

検出可能標識またはシグナル発生物質を検出および/または定量する方法は標識の性質による。適当な酵素(検出可能標識は酵素である; 上記参照)により触媒される反応産物は、非限定的に、蛍光性、発光性または放射性であってよく、または可視光または紫外線を吸収してよい。このような検出可能標識の検出に適する検出器の例は、X線フィルム、放射能カウンタ、シンチレーションカウンタ、分光光度計、比色計、蛍光光度計、ルミノメーターおよび濃度計を含むが、これらに限定されない。

#### 【0165】

検出のためのあらゆる方法を、反応物のあらゆる適切な調製、処理および解析を可能にするあらゆるフォーマットで実施してよい。これは、例えば、多ウェルアッセイプレート(例えば、96ウェルまたは384ウェル)中または任意の適切なアレイまたはマイクロアレイの使用であり得る。多様な試薬の原液を手動でまたはロボット制御で製造し、その後のピペット操作、希釈、混合、分配、洗浄、インキュベート、サンプル読み出し、データ収集および解析の全てを、市販の解析ソフトウェア、ロボット工学および検出可能標識の検出可能な検出器具類を使用してロボット制御で実施してよい。

#### 【0166】

#### キット

本明細書に記載する方法を実施するための試薬、ツールおよび/または指示書をキットで提供してよい。例えば、キットは、がん患者の適当な治療を決定するための試薬、ツールおよび指示書を含み得る。このようなキットは、生検によるような患者から組織サンプルを採取するための試薬および該組織を処理するための試薬を含む。キットはまた、患者のサンプルにおける遺伝子または遺伝子産物マーカーの発現レベルを決定するための核酸増幅(例えばR T - P C R、q P C R)、配列決定(例えば次世代配列決定)、ノーザンブロット、プロテオミクス解析または免疫組織化学を実施するための試薬のような、遺伝子または遺伝子産物発現分析を実施するための1種以上の試薬を含み得る。例えば、R T - P C Rを実施するためのプライマー、ノーザンブロット分析を実施するためのプローブおよび/またはウェスタンブロット、免疫組織化学およびE L I S A分析のようなプロテオミクス分析を実施するための抗体を、このようなキットが含んでよい。アッセイのための適当な緩衝液も含むことができる。これらのアッセイに必要な任意の検出試薬も含んでよい。適当な試薬および方法を下にさらに詳述する。キットは、表2におけるバイオマーカーの少なくとも1個(最大全て)の発現レベルを検出するための適切なプライマーおよび/またはプローブを含み得る。発現を蛋白質レベルで測定する場合、キットは目的の蛋白質に特異的な結合試薬を含み得る。結合試薬は、その全てのフラグメントおよび誘導体を含むために、抗体を含み得る。本発明の多様な態様の文脈において、用語「抗体」は、関係の

10

20

30

40

50

ある蛋白質に対する特異的結合親和性を有する全ての免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様分子(例としては、I g A、I g D、I g E、I g GおよびI g M、これらの組み合わせおよび任意の脊椎動物、例えば、ヒト、ヤギ、ウサギおよびマウスのような哺乳動物において免疫応答中に生じる類似分子が挙げられるが、これらに限定されない)を含む。本発明の多様な態様において有用な具体的免疫グロブリンとしては、I g Gアイソタイプが挙げられる。本発明の多様な態様において有用な抗体は、本来はモノクローナルでもポリクローナルでもよいが、典型的にモノクローナル抗体である。抗体はヒト抗体、非ヒト抗体または非ヒト抗体のヒト化バージョンまたはキメラ抗体であり得る。抗体のヒト化のための種々の技術は十分確立されており、任意の適切な技術を用いてよい。用語「抗体」はまた、抗原のエピトープを特異的に認識し、結合する軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を少なくとも含むポリペプチドリガンドも指し、関係のある蛋白質と特異的に結合する能力を維持する限り、全ての抗体誘導体およびフラグメントまで拡大される。これらの誘導体およびフラグメントとしては、F a b フラグメント、F ( a b ' ) 2 フラグメント、F v フラグメント、一本鎖抗体、単ドメイン抗体、F c フラグメントなどが挙げられる。抗体という用語は、重鎖および軽鎖の両者からなる抗体だけでなく、重鎖(のみ)抗体(これは、多様な軟骨魚類種またはラクダ科の動物に由来し得る)を含む。具体的な態様において、抗体を、2つ以上の蛋白質に特異的であるように、例えば本明細書に示すように、2つの標的蛋白質への結合を可能にするために二特異的であるように操作し得る(表2参照)。

10

20

30

40

50

**【0167】**

いくつかの態様において、該キットはまた、試験により応答性と予測された場合に投与する、特定の抗血管新生治療剤も含み得る。この薬剤は、特定の処置に合わせた形態、例えば剤形で提供し得る。キットは、適当な処置レジメンにしたがう投与のための、適切な指示書を備え得る。

**【0168】**

本明細書で考慮するキットは、遺伝子または遺伝子産物発現を測定するためのアッセイをどのように行うかを記載した指示書も含み得る。該指示書はまた、対照コホートにおける遺伝子または遺伝子産物マーカーの発現レベルをどのように測定するかおよび、試験する患者との比較のための対照を確立するためにどのように発現データを構築するかを含む、対照コホートをどのように決定するかの指示も含み得る。該指示書はまた、試験する患者における遺伝子または遺伝子産物発現のアッセイの実施および、該発現レベルを対照コホートにおける発現と比較し、次いで、試験した患者のための適当な化学療法を決定するための指示も含み得る。適当な化学療法を決定する方法は上に記載され、指示書に詳細に記載してよい。

**【0169】**

キットに含まれる情報資料は、本明細書に記載する方法および/または本明細書に記載する方法のための試薬の使用と関係する、説明的資料、指示的資料、マーケティング資料または他の試料であり得る。例えば、キットの情報資料は、特に、特定の治療剤に対してヒトが陽性応答を有する可能性に応用されるときに、キット使用者が遺伝子発現解析の実施および、結果の解釈に関する実質的な情報が得られる、問い合わせ先情報、例えば、医師のアドレス、メールアドレス、ウェブサイトまたは電話番号を含んでよい。

**【0170】**

本明細書で考慮するキットはまた、遺伝子産物マーカー発現から、患者が特定の治療剤に対して陽性応答を有する可能性を推測するために必要なソフトウェアも含んでよい。

**【0171】****治療剤**

上記のとおり、本明細書に記載する方法は、化学療法剤処置後、または、化学療法剤処置と組み合わせた、抗血管新生治療剤の投与時または投与後に、良好な臨床予後を有する、または不良な臨床予後を有するとして患者を分類することを可能にする。がんの処置に使用される現在のこのような抗血管新生治療剤は、次の薬剤：多標的経路阻害剤(V E G

F / P D G F / F G F / E G F T / F L T - 3 / c - k i t ) を含む V E G F 経路標的治療剤、アンジオポエチン - T I E 2 経路阻害剤、内在性血管新生阻害剤、免疫調節剤が挙げられるが、これらに限定されない。V E G F 特異的阻害剤としては、ベバシズマブ(アバスチン)、アフリバーセプト(VEGF Trap)、I M C - 1 1 2 1 B (ラムシルマブ)が挙げられるが、これらに限定されない。多標的経路阻害剤としては、イマチニブ(グリベック)、ソラフェニブ(ネクサバル)、ゲフィチニブ(イレッサ)、スニチニブ(スーテント)、エルロチニブ、チボザニブ、セディラニブ(Recentin)、パゾパニブ(ヴォトリエント)、B I B F 1 1 2 0 (バルガテフ)、ドビチニブ、セマクサニブ(Sugen)、アキシチニブ(A G 013736)、パンデタニブ(ザクティマ)、ニロチニブ(タシグナ)、ダサチニブ(スプリセル)、パタラニブ、モテサニブ、A B T - 8 6 9、T K I - 2 5 8 が挙げられるが、これらに限定されない。アンジオポエチン - T I E 2 経路阻害剤としては、A M G - 3 8 6、P F - 4 8 5 6 8 8 4 C V X - 0 6 0、C E P - 1 1 9 8 1、C E - 2 4 5 6 7 7、M E D I - 3 6 1 7、C V X - 2 4 1、トラスツマブ(ハーセプチン)が挙げられるが、これらに限定されない。内在性血管新生阻害剤としては、トロンボスポンジン、エンドスタチン、タムスタチン、カンスタチン、アレスタチン、アンジオスタチン、バソスタチン、インターフェロンアルファが挙げられるが、これらに限定されない。免疫調節剤としては、サリドマイドおよびレナリドマイドが挙げられるが、これらに限定されない。一の例示的な態様において、該抗血管新生剤は、ベバシズマブである。

#### 【 0 1 7 2 】

本発明を、次の番号付けした項においてさらに定義する。

1. 対象に抗血管新生治療剤を投与するかどうかを選択する方法であって、  
対象から試験サンプルを得；  
該対象から得た試験サンプルから、バイオマーカーパネルの発現レベルを測定し、該バイオマーカーは表 2 または表 3 から選択される 1 個以上のバイオマーカーを含み；  
バイオマーカーパネルについてのサンプル発現スコアを決定し；  
サンプル発現スコアを閾値スコアと比較し；かつ  
サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るかまたは同等であるかに基づき、処置を選択することを含み、該サンプル発現スコアが閾値スコアを上回る場合、該抗血管新生剤が禁忌である、方法。
2. 対象が、がん罹患している、項 1 に記載の方法。
3. がんが卵巣がんである、項 2 に記載の方法。
4. 卵巣がんが、ハイグレード漿液性卵巣がんである、項 3 に記載の方法。
5. 対象が、化学療法処置を受けているか、または、受けたことがある、項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。
6. 化学療法処置が、プラチナベースの化学療法剤、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含む、項 5 に記載の方法。
7. 化学療法処置が、プラチナベースの化学療法剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含む、項 6 に記載の方法。
8. 化学療法処置が、カルボプラチンおよびパクリタキセルの投与を含む、項 6 に記載の方法。
9. 抗血管新生治療剤が V E G F 経路標的治療剤、アンジオポエチン - T I E 2 経路阻害剤、内在性血管新生阻害剤および免疫調節剤である、項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。
10. V E G F 経路標的治療剤がベバシズマブ(アバスチン)、アフリバーセプト(VEGF Trap)、I M C - 1 1 2 1 B (ラムシルマブ)、イマチニブ(グリベック)、ソラフェニブ(ネクサバル)、ゲフィチニブ(イレッサ)、スニチニブ(スーテント)、エルロチニブ、チボザニブ、セディラニブ(Recentin)、パゾパニブ(ヴォトリエント)、B I B F 1 1 2 0 (バルガテフ)、ドビチニブ、セマクサニブ(Sugen)、アキシチニブ(AG013736)、パンデタニブ(ザクティマ)、ニロチニブ(タシグナ)、ダサチニブ(スプリセル)、パタラニブ、モテサニブ、A B T - 8 6 9、T K I - 2 5 8 またはこれらの組み合わせを含む、項 9 に記載の方法。



法。

【 0 1 7 3 】

1 1 . アンジオポエチン - T I E 2 経路阻害剤が A M G - 3 8 6 、 P F - 4 8 5 6 8 8 4 C V X - 0 6 0 、 C E P - 1 1 9 8 1 、 C E - 2 4 5 6 7 7 、 M E D I - 3 6 1 7 、 C V X - 2 4 1 、 トラスツマブ(ハーセプチン)またはこれらの組み合わせを含む、項 1 6 に記載の方法。

1 2 . 内在性血管新生阻害剤がトロンボスポンジン、エンドスタチン、タムスタチン、カンスタチン、アレスタチン、アンジオスタチン、バソスタチン、インターフェロンアルファまたはこれらの組み合わせを含む、項 9 に記載の方法。

1 3 . 免疫調節剤がサリドマイドおよびレナリドマイドまたはこれらの組み合わせを含む、項 9 に記載の方法。

1 4 . V E G F 経路標的治療剤がベバシズマブである、項 1 0 記載の方法。

1 5 . バイオマーカーパネルが、I G F 2 、 S O X 1 1 、 I N S 、 C X C L 1 7 、 S L C 5 A 1 、 T M E M 4 5 A 、 C X C R 2 P 1 、 M F A P 2 、 M A T N 3 または R T P 4 の 1 個以上を含む、項 1 ~ 1 4 のいずれか記載の方法。

1 6 . バイオマーカーパネルが表 2 に記載のバイオマーカーを含む、項 1 ~ 1 4 のいずれか記載の方法。

1 7 . 発現スコアを、バイオマーカーパネル中の各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値が、表 2 に定義される、項 1 6 記載の方法。

1 8 . 発現スコアを、バイオマーカーパネル中の各バイオマーカーについての重み値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重みが、表 3 に記載のように、絶対値が順番に減少するようにランク付けされる、項 1 6 記載の方法。

1 9 . バイオマーカーパネルが、I G F 2 、 C D R 1 、 C O L 3 A 1 、 S P A R C 、 T I M P 3 、 I N S 、 C O L 8 A 1 、 N U A K 1 、 M A T N 3 、 T M E M 4 5 A の 1 個以上を含む、項 1 ~ 1 4 のいずれか記載の方法。

2 0 . バイオマーカーパネルが、I N S 、 S P A R C 、 C O L A 1 、 C O L 3 A 1 、 C D R 1 、 N U A K 1 、 T I M P 3 および M M P 1 4 の 1 個以上を含む、項 1 ~ 1 4 のいずれか記載の方法。

【 0 1 7 4 】

2 1 . 対象の臨床予後を決定する方法であって：

がんに罹患している対象から試験サンプルを得；

該対象より得た試験サンプルからバイオマーカーパネルの発現レベルを測定し、該バイオマーカーパネルは、表 2 から選択される 1 個以上のバイオマーカーを含み；

バイオマーカーパネルについてのサンプル発現スコアを決定し；

サンプル発現スコアを閾値スコアと比較し；かつ

サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るかどうかに基づいて、該対象について臨床予後を決定することを含み、該サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るかまたは同等である場合、臨床予後が良好な予後である、方法。

2 2 . 良好な予後が、閾値スコアを下回るサンプル発現スコアを有するサンプルと比較して、無増悪生存率または全生存率の上昇を示す、項 2 1 記載の方法。

2 3 . がんが、卵巣がんである、項 2 1 または 2 2 記載の方法。

2 4 . 卵巣がんが、ハイグレード漿液性卵巣がんである、項 2 3 記載の方法。

2 5 . 化学療法処置が、プラチナベースの化学療法剤、アルキル化剤、代謝拮抗薬、抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含む、項 2 1 ~ 2 4 のいずれか記載の方法。

2 6 . 化学療法処置が、プラチナベースの化学療法剤、有糸分裂阻害剤またはその組合せの投与を含む、項 2 5 記載の方法。

2 7 . 化学療法処置が、パクリタキセルおよびカルボプラチンの投与を含む、項 2 5 記載の方法。

10

20

30

40

50

28．バイオマーカーパネルが、IGF2、SOX11、INS、CXCL17、SLC5A1、TMM45A、CXCR2P1、MFAP2、MATN3またはRTP4の1個以上を含む、項21～27のいずれか記載の方法。

29．バイオマーカーパネルが、表2記載のバイオマーカーを含む、項21～28のいずれか記載の方法。

【0175】

30．発現スコアをバイオマーカーパネル中の各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値が表2で定義される、項29記載の方法。

31．発現スコアをバイオマーカーパネルの各バイオマーカーについての重み値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重みが、表3に記載のように、絶対値が順番に減少するようにランク付けされる、項29記載の方法。

32．バイオマーカーパネルがIGF2、CDR1、COL3A1、SPARC、TIMP3、INS、COL8A1、NUAK1、MATN3、TMM45Aの1個以上を含む、項21～28のいずれか記載の方法。

33．該バイオマーカーパネルが、INS、SPARC、COLA1、COL3A1、CDR1、NUAK1、TIMP3およびMMP14の1個以上を含む、項21～28のいずれか記載の方法。

34．ベバシズマブを対象に投与するかどうかを選択する方法であって：

プラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤を用いて処置されている、処置されたことがある、および/または処置される予定がある、卵巣がん罹患している対象より得た試験サンプルにおいて；

表2から選択される1個以上、最大で全てのバイオマーカーの発現レベルを測定し；

1個以上のバイオマーカーについて、サンプル発現スコアを決定し；

該サンプル発現スコアを閾値スコアと比較し；かつ

サンプル発現スコアが、閾値発現スコアを上回るかどうかに基づいて、処置を選択することを含み、サンプル発現スコアが閾値スコアを上回るか、または同等である場合、ベバシズマブが禁忌である、方法。

35．卵巣がんが、漿液性卵巣がんを含む、項34記載の方法。

36．漿液性卵巣がんが、ハイグレード漿液性卵巣がんである、項35記載の方法。

37．ベバシズマブが禁忌である場合、該患者をプラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤を用いて処置する、項34～35のいずれか記載の方法。

38．該サンプル発現スコアが該閾値スコアを下回る場合、該対象を、プラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤を、ベバシズマブとともに用いて処置する、項34～37のいずれか記載の方法。

39．プラチナベースの化学療法剤が、カルボプラチンを含む、項34～38のいずれか記載の方法。

40．有糸分裂阻害剤がタキサンを含み、パクリタキセルを含んでいてよい、項34～39のいずれかに記載の方法。

【0176】

41．バイオマーカーパネルが、IGF2、SOX11、INS、CXCL17、SLC5A1、TMM45A、CXCR2P1、MFAP2、MATN3またはRTP4の1個以上を含む、項34～40のいずれか記載の方法。

42．バイオマーカーパネルが表2に記載のバイオマーカーを含む、項34～40のいずれか記載の方法。

43．発現スコアを、バイオマーカーパネルの各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値が表2に定義される、項42記載の方法。

44．発現スコアを、バイオマーカーパネルの各バイオマーカーについての重み値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重みが、表3に記載するように、絶対値が順番に

10

20

30

40

50

減少するようにランク付けされる、項 4 2 記載の方法。

4 5 . バイオマーカーパネルが、I G F 2、C D R 1、C O L 3 A 1、S P A R C、T I M P 3、I N S、C O L 8 A 1、N U A K 1、M A T N 3、T M E M 4 5 A の 1 個以上を含む、項 3 4 ~ 4 0 のいずれかに記載の方法。

4 6 . バイオマーカーパネルが、I N S、S P A R C、C O L A 1、C O L 3 A 1、C D R 1、N U A K 1、T I M P 3、および M M P 1 4 の 1 個以上を含む、項 3 4 ~ 4 0 のいずれかに記載の方法。

4 7 . 対象の臨床予後を決定する方法であって：

a . プラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤を用いて処置されている、処置されたことがある、および/または処置される予定がある、卵巣がん罹患している対象より得た試験サンプルにおいて；

b . 表 2 から選択される 1 個以上、最大で全てのバイオマーカーの発現レベルを測定すること；

c . 1 個以上のバイオマーカーについてサンプル発現スコアを決定すること；

d . 該サンプル発現スコアを閾値スコアと比較すること；および

e . サンプル発現スコアが閾値発現スコアを上回るか、または同等であるかに基づいて、臨床予後を決定することを含み、該サンプル発現スコアが、閾値スコアを上回るか、または同等である場合、該臨床予後が良好な臨床予後である、方法。

4 8 . 卵巣がんが、漿液性卵巣がんを含む、項 4 7 に記載の方法。

4 9 . 漿液性卵巣がんが、ハイグレード漿液性卵巣がんである、項 4 8 に記載の方法。

5 0 . 患者が良好な予後を示す場合、ベバシズマブを用いた処置が禁忌である、4 7 ~ 4 8 のいずれかに記載の方法。

#### 【 0 1 7 7 】

5 1 . サンプル発現スコアが、閾値スコアを下回る場合、該患者を、プラチナベースの化学療法剤および/または有糸分裂阻害剤を、ベバシズマブとともに用いて処置する、項 4 7 ~ 5 0 のいずれかに記載の方法。

5 2 . プラチナベースの化学療法剤が、カルボプラチンを含む、項 4 7 ~ 5 1 のいずれかに記載の方法。

5 3 . 有糸分裂阻害剤が、タキサンを含み、パクリタキセルを含んでいてよい、項 4 7 ~ 5 2 のいずれかに記載の製剤または方法。

5 4 . バイオマーカーパネルが、I G F 2、S O X 1 1、I N S、C X C L 1 7、S L C 5 A 1、T M E M 4 5 A、C X C R 2 P 1、M F A P 2、M A T N 3 または R T P 4 の 1 個以上を含む、項 4 7 ~ 5 3 のいずれかに記載の方法。

5 5 . バイオマーカーパネルが、表 2 に記載のバイオマーカーを含む、項 4 7 ~ 5 3 のいずれかに記載の方法。

5 6 . 発現スコアを、バイオマーカーパネルの各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重み値およびバイアス値が表 2 に定義される、項 5 5 記載の方法。

5 7 . 発現スコアを、バイオマーカーパネルの各バイオマーカーについての重み値を用いて計算し、各バイオマーカーについての重みが、表 3 に記載するように、絶対値が順番に減少するようにランク付けされる、項 5 5 記載の方法。

5 8 . バイオマーカーパネルが、I G F 2、C D R 1、C O L 3 A 1、S P A R C、T I M P 3、I N S、C O L 8 A 1、N U A K 1、M A T N 3、T M E M 4 5 A の 1 個以上を含む、項 4 7 ~ 5 2 のいずれかに記載の方法。

5 9 . バイオマーカーパネルが、I N S、S P A R C、C O L A 1、C O L 3 A 1、C D R 1、N U A K 1、T I M P 3、および M M P 1 4 の 1 個以上を含む、項 4 7 ~ 5 2 のいずれかに記載の方法。

#### 【 0 1 7 8 】

本発明をさらに次の実施例により説明するが、これは、決してそれに範囲を限定するものとして解釈してはならない。むしろ、本明細書の記載により、本発明の精神および/ま

10

20

30

40

50

たは末尾の特許請求の範囲から逸脱することなければ、多様な他の態様、修飾および同等物を有し得ることが当業者に示唆され得ることは、明確に理解すべきである。

# 【実施例】

## 【0179】

実施例1：組織プロセッシング、階層クラスタリング、サブタイプ同定および分類指標構築腫瘍材料

発現サインの例を、NHS LothianおよびUniversity of Edinburghから入手したマクロダイセクションした上皮性漿液性卵巣腫瘍FFPE組織サンプルのコホートの遺伝子発現解析から同定した。

## 【表5】

表3：357の上皮卵巣がんサンプルの病態の再調査の結果

	全患者 (N=357) No. (%)	クラスターA (N=106) No. (%)	クラスターB (N=97) No. (%)	クラスターC (N=79) No. (%)	クラスターD (N=75) No. (%)	非調整 p値	p値 (補正)
診断時の年齢(年) 中間値 範囲	60.6 23-86	60.4 36-83	60.6 30-86	63.7 33-84	57.8 23-78	0.004	0.13
ブロック年齢(年) 中間値 範囲	8.7 2.9-24.1	8.5 2.9-24.1	9.0 3.0-22.2	8.7 2.9-19.5	8.3 2.9-19.4	0.73	1.00
組織診断 ハイグレード漿液性 ローグレード漿液性 類内膜 明細胞 粘液性	265 (74) 12 (3) 45 (13) 26 (7) 9 (3)	96 (91) 0 (0) 6 (6) 4 (4) 0 (0)	86 (89) 4 (4) 4 (4) 3 (3) 0 (0)	72 (91) 1 (1) 4 (5) 2 (3) 0 (0)	11 (15) 7 (9) 31 (41) 17 (23) 9 (12)	$3.66 \times 10^{-33}$	$1.24 \times 10^{-31}$
グレード* 高 低	300 (84) 57 (16)	103 (97) 3 (3)	91 (94) 6 (6)	76 (96) 3 (4)	30 (40) 45 (60)	$1.21 \times 10^{-29}$	$4.12 \times 10^{-28}$
FIGO ステージ I II III IV 不適切な情報	46 (13) 41 (11) 206 (58) 55 (15) 9 (3)	6 (6) 11 (10) 67 (63) 19 (18) 3 (3)	1 (1) 6 (6) 72 (74) 15 (15) 3 (3)	7 (9) 5 (6) 51 (65) 15 (19) 1 (1)	32 (43) 19 (25) 16 (21) 6 (8) 2 (3)	$2.71 \times 10^{-18}$	$9.20 \times 10^{-17}$
デバルキング** <2cm 2-5cm >5cm 不明	166 (46) 68 (19) 84 (24) 39 (11)	41 (39) 22 (21) 25 (24) 18 (17)	34 (35) 20 (21) 31 (32) 12 (12)	34 (43) 21 (27) 21 (27) 3 (4)	57 (76) 5 (7) 7 (9) 6 (8)	$1.69 \times 10^{-6}$	$5.75 \times 10^{-5}$
第一選択化学療法 プラチナ単独 プラチナおよびタキサン 他	218 (61) 128 (36) 11 (3)	57 (54) 45 (42) 4 (4)	60 (62) 34 (35) 3 (3)	51 (65) 26 (33) 2 (3)	50 (67) 23 (31) 2 (3)	0.70	1.00
再発 再発 再発なし	276 (77) 81 (23)	88 (83) 18 (17)	87 (90) 10 (10)	69 (87) 10 (13)	32 (43) 43 (57)	$2.65 \times 10^{-14}$	$9.02 \times 10^{-13}$

## 【0180】

FFPEからの遺伝子発現プロファイリング

全RNAを、マクロダイセクションしたFFPE組織から、High Pure RNA Paraffin Kit(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を使用して抽出した。RNAを相補性デオキシリボ核酸(cDNA)に変換し、これを用いてWT-Ovation™ FFPE RNA Amplification System V2(NuGEN Technologies Inc., San Carlos, CA, USA)のSPIA(登録商標)技術を使用して増幅し、一本鎖形態に変換した。増幅した一本鎖cDNAを次いで断片化し、FL-Ovation™ cDNA Biotin Module V2(NuGEN Technologies Inc.)を使用してビオチン標識した。断片化し、標識したcDNAを、次いでAlmac Ovarian Cancer DSA™にハイブリダイズさせた。AlmacのOvarian Cancer DSA™研究ツールはFFPE組織サンプルの解析に最適化されており、有用な保存された組織バンクの使用を可能とする。Almac Ovarian Cancer DSA™研究ツールは、正常およびがん性の両者の卵巣組織のトランスクリプトームを表す革新的マイクロアレイプラットフォームである。結果的に、Ovarian Cancer DSA™は、一般的なマイクロアレイプラットフォームでは利用不可能な、卵巣疾患および組

10

20

30

40

50

織状況におけるトランスクリプトームの包括的提示を提供する。アレイを、Affymetrix Genechip(登録商標) Scanner 7G(Affymetrix Inc., Santa Clara, CA)を使用して走査した。

#### 【0181】

##### データ調製

プロファイルしたサンプルの品質管理(QC)を、MAS5処理アルゴリズムを使用して実施した。平均ノイズおよびバックグラウンド均一性、現コールのパーセンテージ(アレイ品質)、シグナル品質、RNA品質およびハイブリダイゼーション品質の種々の技術的側面に対処した。対応するパラメータの分布および中央絶対偏差を解析し、潜在的な外れ値の特定に使用した。

#### 【0182】

AlmacのOvarian Cancer DSA™は、3'末端から300ヌクレオチド以内の領域を一次標的とするプローブを含む。それゆえに標準Affymetrix RNA品質尺度を適用した - ハウスキーピング遺伝子に関しては、通常の3' / 5'比に加えて、3'末端プローブセット強度対平均バックグラウンド強度の比と共に3'末端プローブセットの強度を使用した。ハイブリダイゼーション対照を確認して、それらの強度および現コールを、Affymetrixにより特定される要件に確実に一致させた。

#### 【0183】

##### 階層クラスタリングおよび機能解析

RMA (Robust Multi-array Average) を用いて、サンプルの前処理を行った[16]。分散を低下させ、強度を低下させ、cDNA収量に対する相関を上昇させることにより、データマトリクスを分類した。cDNA収量と相関した、プローブセットのフィルタリングの後、データマトリクスの増加的なサブセットを、クラスター安定性について調べた: GAP統計[17]を、サンプルおよびプローブセットクラスターの数計算するのに適用し、クラスター構成の安定性を、分配比較法を用いて評価した[18,19]。最終的な最も可変的なプローブセットリストを、選択した数のサンプルクラスターの最小および最も安定したデータマトリクスに基づいて決定した。

#### 【0184】

データマトリクスの中央プローブセット発現値への標準化後、ユークリッド距離およびワード連結法(Ward's linkage method)を用いて、凝集型階層クラスタリングを行った[20]。サンプルおよびプローブセットクラスターの最適数を、GAP統計を用いて決定した[17]。サンプルクラスター間の、臨床パラメータ因子レベルの分散の有意性を、ANOVA(連続因子)またはカイ二乗解析(離散因子)を用いて評価し、FDR(false discovery rate; p値と実施した試験の数の積)について補正した。補正p値の閾値(0.05)を、有意性の基準として用いた。

#### 【0185】

Ovarian Cancer DSA(登録商標)プローブセットを、Ensembl v60[<http://oct2012.archive.ensembl.org/>]に基づいたアノテーションパイプラインを用いて、遺伝子に再配置した。Gene Ontology生物学的プロセス分類を用いて、クラスター遺伝子セットに関連していることが明らかになった生物学的エンティティの同定およびランク付けのために、FEA(Functional enrichment analysis)を行った[21]。エンティティを統計的に得た濃縮スコアによりランク付けし[22]、多重検定に適合させた[23]。補正p値0.05を、有意性の閾値として用いた。同定した濃縮プロセスを、各プローブセット/遺伝子クラスターについて、全体的な集団機能に集約した。

#### 【0186】

##### サイン開発および評価

サブタイプ同定の後、分子群の予測のために、遺伝子サインを開発した。異なるプラットフォーム上でプロファイルしたサンプルへのサインの適用を促進するために、全てのプローブセットをその中央発現値にまとめ、データをlog<sub>2</sub>変換することにより、プローブセットを遺伝子に再配置した。PLS(partial least squares)モデル[24]を、フィ

10

20

30

40

50

ルタ特性選択に基づく特性/遺伝子の選択とともに用いて、5分割交差検証を10回繰り返す間に、サイン作成を行った。

#### 【0187】

一変量および多変量生存解析を、R 2.15.0の生存パッケージを用いて行った[25]。多変量解析を次の要因：ハイグレード漿液性：診断時の減量(debulking)状態、ステージ、化学療法および年齢；Tothill：グレード、ステージ、ネオアジュバント処置および残存病変について補正した。全てのカプランマイヤーグラフは、生存データの単変量提示である。

#### 【0188】

結果

265個のHGS腫瘍について、1400の最も可変的なプローブセット(1040遺伝子に対応)に基づいて、非管理的階層クラスタリング(unsupervised hierarchical clustering)を行った。3つのサンプルクラスターおよび4つの遺伝子クラスターを同定した(図1)。HGSクラスターと臨床病理学的徴候の間には有意な相関は存在しなかった。機能解析(図1)により、クラスターHGS3は、免疫応答および血管新生/血管発達に関連する遺伝子の上方制御により特徴付けられていることが明らかになった(以降Angioimmuneと称するクラスター)。クラスターHGS1は、(クラスターHGS3よりは明らかに低い程度であったが)血管新生/血管発達の上方制御と関連していたが、免疫応答に関連する遺伝子の高発現は伴っていなかった(以降Angioと称するクラスター)。クラスターHGS2は、血管新生または血管発達に関連する遺伝子の上方制御を伴わない、免疫応答に関連する遺伝子の上方制御により特徴付けられた(以降、Immuneと称するクラスター)。

#### 【0189】

サブグループによる多変量生存解析より、Immuneクラスターの患者は、Angioimmuneクラスター(HR = 0.58 [0.41 ~ 0.82]、 $p_{adj} = 0.001$ )およびAngioクラスター(HR = 0.55 [0.37 ~ 0.80]、 $p_{adj} = 0.001$ )の両方の患者と比較して、OSが有意に延長していることが明らかになった。カプランマイヤー曲線を図2に示す(単変量HRおよびp値を示す)。

#### 【0190】

Immuneクラスターの患者が、他のクラスターの患者よりも有意に優れた結果を示すため、臨床においてこれらの患者を予め特定するためのアッセイの開発をすすめた。さらに、immuneクラスターにおける血管新生遺伝子の低発現を考慮し、このアッセイが、血管新生を標的とする治療から益を得ない集団を特定し得ることを仮定したが、この理論を試験するためにはさらなるデータセットが必要となる。サイン作成のために、AngioクラスターおよびAngioimmuneクラスターを同じ群とし、「pro-angiogenic」群とラベルした。

#### 【0191】

次いで、Immuneクラスターの患者を特定し得る、63遺伝子バイオマーカーアッセイを開発した(表2)。該アッセイによりImmuneクラスターに分類された患者は、階層クラスタリング解析と一致して、他のHGS患者と比較して、有意に改善した無増悪生存(PFS)(多変量解析；HR = 0.72 [0.52 ~ 0.99]、 $p = 0.043$ )およびOS(多変量解析；HR = 0.61 [0.44 ~ 0.86]、 $p = 0.004$ )を示した。これらの多変量解析を、減量状態、ステージ、化学療法および診断時の年齢により補正した。Edinburghデータセットにおけるサインコールによる、PFSおよびOSについてのカプランマイヤー曲線をそれぞれ、各図に表示する単変量HR成績とともに、図3Aおよび3Bに表す。

#### 【0192】

予後アッセイとして本発明のバイオマーカーを独立して検証するために、Tothill et al. Clinical Cancer Research 2008: 14(16):5198-208に記載のデータセット内のHGS卵巣腫瘍に適用した。Immuneクラスターに含まれると同定された患者は、他のHGS

10

20

30

40

50

S患者と比較して、PFS（多変量解析；HR = 0.62 [0.41 ~ 0.95]、 $p = 0.029$ ）およびOS（多変量解析；HR = 0.32 [0.19 ~ 0.54]、 $p = 0.0001$ ）の有意な改善を示した。これらの多変量解析を、グレード、ステージ、ネオアジュバント処置および残存病変について補正した。Tothillデータセットにおけるサインコールによる、PFSおよびOSについてのカプランマイヤー曲線を、各図に示す多変量HR成績とともに、それぞれ図4Aおよび4Bに示す。

#### 【0193】

実施例2：「immune」サインの予測的有用性の独立した検証  
背景

International Collaboration on Ovarian Neoplasms 7 (ICON7) 治験は、原発性腹膜がん、ファロピウス管がんおよび上皮性卵巣がん罹患する患者における、カルボプラチンおよびパクリタキセルを用いた標準化学療法に、同時におよび継続して、ベバシズマブを追加した効果を評価する婦人科がん群間第3相治験である(Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, et al. A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med.* 365(26): 2484-96, Aghajanian C, Blank SV, Goff BA, Judson PL, Teneriello MG, Husain A, et al. OCEANS: A randomized, double-blind, placebo-controlled phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent epithelial ovarian, primary peritoneal, or fallopian tube cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2012; 30(17): 2039-45)。

#### 【0194】

患者特徴、無増悪生存、毒性および予備的全生存データおよびクオリティ・オブ・ライブ(QoL)データの要約はICON7から報告されている。標準化学療法群において、764名のうち696名(91%)の女性が、プロトコルにより18週の化学療法を受けた。ベバシズマブ群において、764名のうち719名(94%)の女性が18週の化学療法およびベバシズマブを受け、472名(62%)が54週のプロトコル終了までベバシズマブを続けた。標準化学療法およびベバシズマブに関する無増悪生存のハザード比は0.81(95%CI = 0.70 ~ 0.94、 $p = 0.004$ )であった。減量手術後、1.0 cmを超える残留疾患を有する、世界産婦人科連合(FIGO)ステージIV疾患またはステージIII疾患と定義される、進行のリスクが高い患者において、ベバシズマブ群における死亡のハザード比は0.64(95%CI = 0.48 ~ 0.85； $p = 0.002$ )であった。

#### 【0195】

方法

医学研究審議会(MRC)を介してICON7治験サンプルにアクセスした。公正な仲介者がMRCからの関係する臨床的データを保持した。サンプルをプロファイリングするための無作為化戦略は、臨床的因子に基づいて成されていた。全反応剤、アレイおよび対照サンプルは予め検査し、品質基準を通過していた。

#### 【0196】

診断および組織診断タイプを確認するために、2人の専門の婦人科病理学者が、H+Eスライドを用いて全てのサンプルを独立して再調査し、問題になる症例では、WT1染色を用いて漿液性の組織診断を確認した。切片は、FFPEブロック(腹腔または大網疾患よりも、むしろ殆ど独占的に付属器腫瘍由来である)より採取し、明視野顕微鏡下で、マクロディセクションし、間質の混入を最小化した(<10%)。用いた10  $\mu$ m切片の数は、ブロック中の腫瘍のパーセンテージにより：それぞれ、ブロック中の腫瘍含量が>50%の場合2個、25~50%の場合3個、および<25%の場合、4個であった。

#### 【0197】

全RNAを、High Pure RNA Paraffin Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を使用してマクロダイセクションしたFFPE組織から抽出した。RNAを相補性デオキシリボ核酸(cDNA)に変換し、これを続いてWT-Ovation™ FFPE RNA Amplific

ation System V2 (NuGEN Technologies Inc., San Carlos, CA, USA) の S P I A (登録商標) 技術を使用して増幅し、一本鎖形態に変換した。増幅した一本鎖 c D N A を次いで断片化し、FL-Ovation™ cDNA Biotin Module V2 (NuGEN Technologies Inc.) を使用してビオチン標識した。断片化し、標識した c D N A を、次にサインを構築すべき Almac Ovarian Cancer DSA にハイブリダイズした。アレイを Affymetrix Genechip (登録商標) Scanner 7G (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) を使用して走査する。

#### 【 0 1 9 8 】

病態の再調査後では、ハイグレード漿液性卵巣がん罹患しているサンプルには 2 8 6 人の患者があり；そのうち 1 4 4 人の患者は、ペバシズマブ群 (arm)、1 4 2 人はペバシズマブなしの群からであった。患者の 6 9 % が、P r o - a n g i o g e n i c 群に含まれると評価され、これは両方の試験群で同じである。

10

#### 【 0 1 9 9 】

一次試験仮説は、「P r o - a n g i o g e n i c」サブグループ内では、i m m u n e サブグループと比較して、無増悪生存についてのハザード比を少なくとも半減させるのに相当する、ペバシズマブの顕著な効果が見られるというものであった。対照的に、「i m m u n e」サブグループでは、ペバシズマブは、最良の場合で、効果を全く示さないか、または、わずかに不利益であり得ることさえ予測されている。

#### 【 0 2 0 0 】

5 つのサンプルが、プロセッシング Q C を通過しなかったため、ハイグレード漿液性臨床試験データセットには、2 3 8 の無増悪生存事象 ( 8 3 %) が見られた。

20

#### 【 数 3 】

### 9 > 2

( 前段落で概要を示したペバシズマブの差次的な効果に相当 ) を検出するための、検定の検出力 (C Schmoor, W Sauerbrei, and M Schumacher Sample size considerations for the evaluation of prognostic factors in survival analysis Statist. Med. 2000; 19 :441-452 に記載の式 6 を使用) は、片側有意水準 1 0 % で、8 8 % と推定された。データセット中には、1 4 7 の死亡例があり、生存についての同じ解析についての検出力は 7 5 % であった。

#### 【 0 2 0 1 】

30

無増悪生存期間は、一次的なエンドポイントであり；これは、該データセットで提供される、M R C により計算される時間である。これは、無作為化から、進行または ( 任意の原因による ) 死亡のうちの、いずれか先に起こる方までの時間である。全生存期間は、二次試験エンドポイントであった。これは、無作為化から任意の原因による死亡までの時間である。

#### 【 0 2 0 2 】

層別化コックス比例ハザードモデルを、最初に、無増悪生存データにあてはめた。該モデルは、無作為化試験群について単一の効果タームを有していた。次いで、二次層別化コックス比例ハザードモデルを、無増悪生存データに適合させた。このモデルもまた層別化されていたが、各層中の無作為化試験群の効果について、個別のタームを有していた。

40

#### 【 0 2 0 3 】

2 つの適合モデルの l o g 尤度を比較し、無作為化試験群の効果が、血管新生促進状態 ( 層の数 - 1 に相当する自由度を用いた 二乗検定 ) に依存するかどうかを決定した。上記の試験が、5 % 有意水準で統計学的に有意である場合、各層中の無作為化試験群について個別のタームを有するモデルについての、比例ハザード仮説の適合性を評価する。

#### 【 0 2 0 4 】

比例ハザードについての検定は、Grambsch-Therneau 検定 [P. Grambsch and T. Therneau (1994), Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals . Biometrika, 81, 515-26] により行った。該検定のために、無増悪生存期間を、対数目盛りに変換した。各層内の試験群の各タームについての検定を、個別に、有意水準 5 % を

50



用いて概算した。1つ以上の層において、比例ハザードについての検定が棄却された場合、各層において、フレキシブルパラメトリック生存分析モデルを用いて、制限平均生存 (restricted mean survival) モデルを適合させる [P Royston, MKB Parmar The use of restricted mean survival time to estimate the treatment effect in randomized clinical trials when the proportional hazards assumption is in doubt Stat Med, 30 (2011), pp. 2409-2421]。これらのモデルは、ベースラインの分布関数を推定するのに、自由度3を用い、時間依存性処置効果については自由度1を用いる。それぞれの場合についての制限平均を計算する最大時間は3年であった。

【0205】

上記の解析を、全生存期間について繰り返す。

10

【0206】

結果

Immuneサブタイプ(39%)と分類された患者については、ペバシズマブの追加により、proangiogenicの患者と比較して、無増悪生存(HR1.73(1.12~2.68))および全生存(HR2.00(1.11~3.61))が悪化した。図5A~Bおよび6A~B参照のこと。したがって、Immuneがんサブタイプの対象は、ペバシズマブをその処置レジメンに加えたとき、Immuneがんサブタイプに罹患していない対象と比較して、不良な予後を示した。

【0207】

実施例3：免疫サインの予後についての有用性の独立した検証

20

試験の一次的な目的は：1. 患者の遺伝子発現データ上の63遺伝子サインを用いた、腫瘍再発の個々の危険性の予測；2. 患者の無増悪生存(PFS)結果ならびに全生存(OS)についての、サイン予後予測の性能の評価；3. 無増悪生存事象に関する、サイン予後の性能への臨床共変数の影響の検討、である。

【0208】

この探索試験は、試験の対照群の139人の患者全てを含んでいた。85人の患者(61.2%)が、遺伝子サインによって、血管新生促進性(サイン陰性)であるとカテゴリー分けされた。チャートおよび事後観察から、該群において、72人が無増悪生存事象を示し、46人が死亡している(全生存事象)ことが示された(患者数およびパーセンテージについての情報は、Jim Paulにより提供)。

30

【0209】

サンプルサイズおよび検出力の計算方法を用いた(Freedman, L.S. (1982). Tables of the number of patients required in clinical trials using the log-rank test. Statistics in Medicine. 1: 121-129)、コックス比例ハザード回帰下の後ろ向き検出力計算により、「Immuneのみ」の無増悪生存を、「proangiogenic」分子サブグループの患者と、両側有意水準5%で比較したときに、ハザード比(HR)0.5を検出するための約85%の検出力が、上述の試験の図により示されることが示された。

【0210】

予後として、無増悪生存を用いた時間事象(生存)解析を、サインの予後効果を評価するためにを行った。血管新生状態(「proangiogenicまたはサイン陰性」および「Immuneのみまたはサイン陽性」)により決定する患者群の生存分布を、カプランマイヤー(KM)曲線を用いて可視化した。

40

【0211】

患者の血管新生状態(陰性または陽性)を、無増悪生存事象に関連付けるために、コックス比例ハザード回帰を行った。単変量(未調整)調査に加えて、他の重要な臨床共変数についてのPFSおよびOS調整へのサイン分子サブグループ(陽性または陰性)の影響を調べるために、多変量(調整)コックスモデルを行った。概算した効果は全て、その有意性にかかわらず、該サインおよび標準予後変数が含まれる解析から、95%信頼区間で報告されている(P Royston, MKB Parmar The use of restricted mean survival time to estimate the treatment effect in randomized clinical trials when the proportion

50

al hazards assumption is in doubt Stat Med, 30 (2011), pp. 24092421)。サイズ限定により、ごく少数の重要な共変数のみが考慮されており、これらには、FIGOステージ、腫瘍グレード、減量状態、活動指標 (ECOG) および患者年齢が含まれる。

#### 【0212】

分子サブグループにおける比例ハザード仮説の適合性を、コックスモデルの結果を解釈する前に検討した。治験データの以前の解析に沿って、比例ハザードについての検定が棄却される場合、制限平均生存モデルを各分子サブグループに適合させた。制限平均を計算する最大時間は4年間であった。

#### 【0213】

結果

ICON7 治験データにおいて、対照群 (カルボプラチンに加えてパクリタキセルの化学療法処置を受けている) の、ハイグレード漿液性 (HGS) 卵巣がん患者において、63 遺伝子サインは、予後の指標となる。コックス比例ハザード回帰を用いた結果により、遺伝子サインにより「immune」分子サブグループに分類された患者は、年齢、グレード、ECOG、減量状態およびステージを含む他の臨床共変数について調整する前 (単変量 HR = 0.48、95% CI = 0.32、0.72;  $p < 0.001$ ) および後 (多変量 HR = 0.50; 95% CI = 0.32、0.79;  $p = 0.003$ ) において、proangiogenic と分類された患者と比較して、統計学的に有意に改善した無増悪生存を有することが示された。図7A参照。同様に、immune 分子サブグループに分類された患者は、他の臨床共変数について調整する前 (単変量 HR = 0.46; 95% CI = 0.26、0.80;  $p = 0.006$ ) および後 (多変量 HR = 0.53; 95% CI = 0.29、0.97;  $p = 0.041$ ) において、proangiogenic の患者と比較して、統計学的に改善した全生存を有する。図7Bを参照のこと。データは、比率仮定の重大な逸脱がないことを示している。

#### 【0214】

実施例4：結腸直腸がんにおける非血管新生サインの予測有用性

プラス2アレイ上の再発性または転移性結腸直腸がんのベバシズマブに対するレスポナーおよび非レスポナーのコホートについての、Gene Expression Omnibus databaseより得た公共のアレイデータセット (E-GEOD-19862) を得、表2の63個の遺伝子サイン例を使用して解析した。63個の遺伝子卵巣免疫サインは、AUC: 0.86 (0.60 ~ 1.00) でベバシズマブに対する応答を予測する。図8参照。

#### 【0215】

実施例5：63 遺伝子サインの概要

サンプル：

- ・内部トレーニングサンプル：このサンプルセットは、Edinburgh Ovarian Cancer Databaseより検索した193のハイグレード漿液性卵巣がんサンプルを含んでいた。
- ・Tothillサンプル：これは、公開で利用可能なデータセットであり、ここから、152のハイグレード漿液性卵巣がんサンプルを解析に用いた。
- ・ICON7サンプル：このサンプルセットは、MRC (Medical Research Council) を介して入手した、ベバシズマブの第一選択がん処置を伴う、もしくは伴わない、カルボプラチンおよびパクリタキセルの、第III相無作為試験より得た284のハイグレード漿液性卵巣がんサンプルを含む。

・ICON7 SOC (標準治療) - 140サンプル - ベバシズマブの追加投与を受けていない患者を指す

・ICON7 Immune群 - 116サンプル：Immune 63 遺伝子サインにより、Immune群であると予測されたICON7サンプルを指す。

・ICON7 ProAngio群 - 168サンプル：Immune 63 遺伝子サインにより、ProAngiogenesis群であると予測されたICON7サンプルを指す。

#### 【0216】

方法:

#### サイン開発

193の卵巣がんHGSサンプルのバランスサンプルセットを用いて、5分割交差検証(CV)を10回繰り返す間に、PLS(Partial Least Squares)法を用いて、サインを展開した(Dejong S. Simpls - an Alternative Approach to Partial Least-Squares Regression. Chemometr Intell Lab 1993;18:251-63)。サイン開発には次の工程を用いた:

- ・ プローブセットを遺伝子に配置し、各遺伝子についての中央値プローブセット発現値の $\log_2$ 変換を用いて、遺伝子発現を測定した;
- ・ ネステッドCV内で、低分散、低強度およびcDNAとの高い相関を示す遺伝子の75%を除くために、前フィルタリング後に正規化を行った;
- ・ 遺伝子/特性を、相関調整t-スコアに基づいてランク付けし、特性縮小は、5遺伝子が残るまで、重要度の最も低い遺伝子の10%の切り捨てることを伴った;
- ・ 無増悪生存(PFS)を交差検証下で予測するハザード比(HR)が最適であった特性セットとして、63遺伝子サインを同定した。

#### 【0217】

CV内で次のデータセットを比較し、63遺伝子サインのパフォーマンスを評価した:

- ・ 内部トレーニングセット - 193サンプル
- ・ ICON7 SOC (標準治療) - 140サンプル
- ・ ICON7 Immune群 - 116サンプル
- ・ ICON7 ProAngio群 - 168サンプル

#### 【0218】

#### コア遺伝子解析

サインのコア遺伝子セットを評価する目的は、サインから除いたときのパフォーマンスへの影響に基づいて、遺伝子のランクを決定することである。

この解析には、元の63サイン遺伝子セット由来の、10サイン遺伝子の1,000,000の無作為サンプリングを用いた。各反復において、10個の無作為に選択したサイン遺伝子を除き、残りの53遺伝子のパフォーマンスを、PFSエンドポイントを用いて評価し、次の3つのデータセットにおける、これらの10遺伝子を除いたときのHRパフォーマンスへの影響を決定した:

- ・ 内部検証 - 72サンプル
- ・ Tothill HGS (Tothill RW, Tinker AV, George J, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. Clin Cancer Res 2008;14:5198-208) (ハイグレード漿液性) - 152サンプル
- ・ ICON7 SOC (標準治療) - 140サンプル

#### 【0219】

これらの3つのデータセットのそれぞれにおいて、サイン遺伝子を、それが含まれるか、または除かれているかに基づく、HRパフォーマンスの変化(デルタHR)に基づいて、重み付けした。「1」とランク付けされる遺伝子は、除いたときのパフォーマンスへの悪影響が最も大きく、「63」とランク付けした遺伝子は、除いたときの影響が最も小さい。

#### 【0220】

#### 最小遺伝子解析

最も少ない数の遺伝子を評価する目的は、元のサインの、より小さいサブセットにおいて、有意なパフォーマンスを達成し得るかどうかを決定することである。

この解析には、1遺伝子/特性から開始して、最大で25遺伝子/特性までの、63サイン遺伝子の10,000の無作為サンプリングを伴った。無作為に選択した特性の長さ(feature length)のそれぞれについて、CVおよび得たモデルパラメーター下で、PLS機械学習法を用いて、サインを再開発した。それぞれの特性の長さにおいて、無作為に選択したサインを全て適用し、次の3つのデータセットについてのサインスコアを計算した:

- ・ Tothill HGS (ハイグレード漿液性) - 152サンプル

- ・ I C O N 7 S O C (標準治療) - 1 4 0 サンプル
- ・ I C O N 7 I m m u n e 群 - 1 1 6 サンプル

## 【0221】

連続的なサインスコアを、P F S (無増悪生存) を用いて評価し、H R (ハザード比) 効果を決定した。各特性の長さ(feature length)における、全ての無作為サインについての H R をまとめ、C V におけるパフォーマンスを可視化するために図を作成した。

## 【0222】

結果

サイン開発

ここでは、C V 内におけるサイン開発の結果を示す。

・ 内部トレーニングセット: 図 9、1 0 および 1 1 は、トレーニングセットの A U C (Area under the receiver operating curve)、C 指標(Concordance Index) および H R を示し、ここから 6 3 遺伝子サインを同定した。

・ I C O N 7 S O C: 図 1 2 および 1 3 は、C V 下における、(6 3 遺伝子サインにより同定された) I C O N 7 S O C サンプルの H R および C 指標を示す。

・ I C O N 7 P r o A n g i o 群: 図 1 5 は、C V 下における、(6 3 遺伝子サインにより同定された) I C O N 7 P r o A n g i o サンプルの H R を示す。

## 【0223】

コア遺伝子解析

3 つのデータセット中の、6 3 遺伝子サインのコア遺伝子解析についての結果を示す。

・ 内部検証: このデータセットにおいて、6 3 サイン遺伝子について測定したデルタ H R パフォーマンスを図 1 6 に示す。この図は、このデータセット内で、良好な H R パフォーマンスを維持するのに最も重要な、該サイン内の上から 1 0 番目までにランク付けされた遺伝子を強調している。

・ Tothill HGS: このデータセットにおいて、6 3 サイン遺伝子について測定したデルタ H R パフォーマンスを図 1 7 に示す。この図は、このデータセット内で、良好な H R パフォーマンスを維持するのに最も重要である、該サイン内の上から 1 0 番目までにランク付けされた遺伝子を強調している。

・ I C O N 7 S O C: このデータセットにおいて、6 3 サイン遺伝子について測定したデルタ H R パフォーマンスを図 1 8 に示す。この図は、このデータセット内で、良好な H R パフォーマンスを維持するのに最も重要である、該サイン内の上から 1 0 番目までにランク付けされた遺伝子を強調している。

・ これらの 3 つのデータセットのデルタ H R を評価し、サイン遺伝子のそれぞれについての、組合せ遺伝子ランクを得た。コアセット解析に基づいてサイン遺伝子に割り当てられたランクは、Immune63GeneSig\_CoreGenes\_HR.txt に要約されている。

## 【0224】

最小遺伝子解析

3 つのデータセット中の 6 3 遺伝子サインの最小遺伝子解析についての結果をこの段落に示す。

・ Tothill HGS: 特性の長さ(feature length) 1..2 5 のサイン遺伝子の無作為サンプリングを用いて、このデータセットで測定した平均 H R パフォーマンスを図 1 9 に示す。この図は、有意な H R パフォーマンス(すなわち H R < 1)を維持するためには、最小で 5 個のサイン遺伝子を選択しなければならないことを示す。

・ I C O N 7 S O C: 特性の長さ(feature length) 1..2 5 のサイン遺伝子の無作為サンプリングを用いて、このデータセットで測定した平均 H R パフォーマンスを図 2 0 に示す。この図は、有意な H R パフォーマンス(すなわち H R < 1)を維持するためには、最小で 2 個のサイン遺伝子を選択しなければならないことを示す。

・ I C O N 7 I m m u n e: 特性の長さ(feature length) 1..2 5 のサイン遺伝子の無作為サンプリングを用いて、このデータセットで測定した平均 H R パフォーマンスを図 2 1 に示す。この図は、有意な H R パフォーマンス(すなわち H R < 1)を維持するために

10

20

30

40

50

は、最小で5個のサイン遺伝子を選択しなければならないことを示す。

まとめると、最小で、少なくとも5個の遺伝子を用いることで、有意なパフォーマンスが維持されることが推奨されている。

【0225】

実施例6：結腸がんサンプル

サンプルおよび方法

サンプル

うち232人が、アジュバント化学療法を受けた後の経過観察で、無増悪生存データを示した、ステージII、IIIまたはIVの疾患に罹患している患者由来の529の新鮮凍結（FF）原発性腫瘍サンプルを63遺伝子サインを用いて評価した。Affymetrix U13 3 Plus 2.0 platform上での遺伝子発現プロファイリングからのマイクロアレイデータを、パブリックドメイン（GEO accession number GSE40967）より得た。

【0226】

サインスコア計算

サインスコアは次の工程を用いて計算した：

RMA（Robust Multi-array Analysis）バックグラウンド補正。

発現中央値を用いた、プローブのプローブセットへの集約。

発現中央値を用いた、プローブセットの遺伝子への集約。

正規化モデルを、サンプルごとに、遺伝子レベルマトリクス（またはベクター）に適用し、これにより、個々の患者の遺伝子プロファイルの分布がトレーニングデータと同様に変換される。

サインスコアを、該サイン中の核遺伝子の発現の重みの合計を用いて、サンプルごとに計算する：

【数4】

$$\text{サインスコア} = \sum_i w_i \times (x_i - b_i) + k$$

[式中： $w_i$  が各遺伝子についての重みであり、 $b_i$  が遺伝子特異的なバイアスであり、 $i$  が、前処理の後に観察される遺伝子発現レベルであり、

【数5】

$$k = 0.2953$$

が、定常オフセットである。]

【0227】

統計解析

コックス比例ハザード回帰モデルを、アジュバント化学療法後の、無増悪生存についての63遺伝子サインの単変量ハザード比（HR）効果を推定するのに用いる。HR推定についてのp値を、ログランク検定を用いて計算する。

【0228】

結果

図22は、アジュバント化学療法を受けた232人の患者における、サイン予測のための Kaplan-Meier 曲線を提供し、これにより、予後を予測するために63遺伝子サインを使用し得ることが示される。コックス比例ハザード回帰モデルから計算した単変量HRは、0.49（ログランク  $p = 0.001$ ）である。「Angio on」は、バイオマーカーサインについて陰性であることと同等であり、「Angio off」は、バイオマーカーサインについて陽性であることと同等である。

【0229】

実施例7：結腸直腸がんにおけるサブタイプの予後についての有用性

サンプル

結腸直腸がん罹患している529人の患者のコホートを含む（Marrisa et al, 2013）、Gene Expression Omnibus database（GSE40967）より公共のアレイデータセットを得た

。サンプルをAffymetrix Plus 2.0アレイプラットフォーム上でプロファイルした。該データは、ステージII、IIIおよびIVの疾患に罹患している患者および、アジュバント化学療法を受け、その後の無再発生存(RFS)経過観察データが得られている232人の患者を含む。

#### 【0230】

##### 方法

RMAを用いて全てのサンプルを前処理し、図1で「angiogenesis」遺伝子クラスター(クラスター4)を定義するEntrez Gene IDを用いて、半管理的階層クラスタリングを行い、データマトリクスをフィルタリングした。フィルタリングしたデータマトリクスを、遺伝子発現中央値に標準化した後、ユークリッド距離およびワード連結法(Ward's linkage method)を用いて凝集型階層クラスタリングを行った。サンプルと遺伝子クラスターの最適数を、GAP統計法を用いて決定した。サンプルのクラスタリングに用いた遺伝子リストが、血管新生生物学に高度に濃縮されていたため、これらの遺伝子の上方制御を伴うサンプルクラスターを、血管新生活性(またはangi on)とクラス標識し;これらの遺伝子の下方制御を伴うサンプルクラスターを血管新生不活性(またはangi o f f)とクラス標識した。

#### 【0231】

サンプルをさらに、63遺伝子サインを用いて試験し、63遺伝子サインスコアとサンプルクラスター(血管新生活性または血管新生不活性)の間の相関関係を、ROC(Receiver Operating Characteristic)曲線の曲線下面積(AUC)を用いて評価した。結腸直腸がんにおいて、患者を血管新生活性/不活性と分類するための閾値を、階層クラスタリング解析により決定される、サブタイプの予測についての感度+特異性を最大化するために最適化した。

#### 【0232】

63遺伝子サイン予測の臨床有意性を、カプランマイヤー曲線およびコックス比例ハザード生存解析を用いて評価した。エンドポイントを、無増悪生存と決定し、コックス比例ハザードモデリングは、臨床共変数:年齢;性別;ステージ;腫瘍部位およびMSI状態についての調整を含んでいた。

#### 【0233】

##### 結果

520のサンプルについて、219遺伝子(図23においてクラスター4を定義する遺伝子)に基づく、半非管理的クラスタリングを行った。2つのサンプルクラスターおよび3遺伝子クラスターを同定した(図23)。サンプルクラスター1(273患者)は、血管新生遺伝子の発現の上方制御により特徴付けられており、そのため、血管新生活性であるとラベルし;サンプルクラスター2(256患者)は、血管新生遺伝子の発現の下方制御により特徴付けられており、そのため、血管新生不活性とラベルした。

#### 【0234】

2つのサンプルクラスターの予測に関する、63遺伝子サインについてのAUCは、図24のROC曲線に示すように、0.86[0.83~0.89]であった。サブタイプの予測についての感度および特異性の最大合計を、サインスコア閾値0.6604で決定し;これは、患者が血管新生活性または不活性サブタイプにあてはまることを予測するのに適用される閾値である。サインスコアが0.6604を超える患者を、血管新生活性と分類し、サインスコアが0.6604以下の患者を、血管新生不活性と分類する。

#### 【0235】

該サインにより予測される無増悪生存についてのコックス比例ハザードモデル(臨床共変数について調整)により、血管新生不活性群の患者は、血管新生活性群の患者と比較して、無増悪生存が有意に上昇していることが明らかになった(表4:HR=0.47[0.30~0.76])。カプランマイヤー曲線は、表22に示す。

10

20

30

40

## 【表 6】

表 4：232 人のアジュバント処置した患者を用いた、多変量生存解析

予測に関する変数	HR [95% CI]
アッセイ陽性	0.47 [0.30 - 0.76]
ステージ(II)	1.37 [0.74 - 2.55]
III	3.24 [1.45 - 7.23]
IV	
腫瘍部位	1.68 [0.99 - 2.85]
年齢	1.01 [0.99 - 1.03]
性別	1.23 [0.79 - 1.92]
MMR	0.91 [0.32 - 2.62]

10

20

## 【0236】

実施例 8：63 遺伝子サインの予後についての有用性の独立検証

サンプル

公共のアレイデータセットを、結腸直腸がん罹患している 290 人の患者のコホートを含む Gene Expression Omnibus database (GSE14333) より得た。サンプルを Affymetrix Plus 2.0 プラットフォーム上でプロファイルした。87 人の患者は、アジュバント化学療法を受けており、無増悪生存 (RFS) について経過観察を受けている。

## 【0237】

方法

実施例 5 で決定した、0.6604 の閾値を用いて、血管新生活性か、または、血管新生不活性に分類される 63 遺伝子サインを用いて、サンプルを試験した。

63 遺伝子サイン予測の臨床有意性は、カプランマイヤー曲線およびコックス比例ハザード生存解析を用いて評価した。エンドポイントは、無増悪生存と定義し、コックス比例ハザードモデリングは、利用可能な全ての臨床共変数：年齢；性別；ステージおよび腫瘍部位についての調整を含んでいた。

## 【0238】

結果

159 人の患者は、サインスコアが 0.6604 を上回り、血管新生活性に分類され；131 人の患者は、サインスコアが 0.6604 以下となり、血管新生不活性と分類された。

該サインにより予測される無増悪生存のコックス比例ハザードモデリング（臨床共変数についての調整）により、血管新生不活性群の患者は、血管新生活性群の患者と比較して、無増悪生存が有意に上昇していることが明らかになった（表 5：HR = 0.33 [0.14 ~ 0.83]）。カプランマイヤー曲線を図 25 に示す。

30

40

## 【表 7】

表5：87人のアジュバント処置した患者を用いた、多変量生存解析

予測に関する変数		HR [95% CI]
アッセイ陽性		0.33 [0.14 - 0.83]
ステージ (III)		1.03 [0.41 - 2.59]
IおよびII		
腫瘍部位 (左)		0.40 [0.08 - 1.95]
	再発 右	0.50 [0.20 - 1.23]
年齢		1.01 [0.98 - 1.04]
性別		1.13 [0.47 - 2.68]

10

## 【 0 2 3 9 】

20

## 参考文献

1. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. J Clin Oncol ; 27 : 4733 - 40 (2009).
2. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med;350:2335 - 42 (2004).
3. Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, et al. Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. J Clin Oncol; 26:5422 - 8 (2008).
4. Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel - carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N Engl J Med; 355: 2542 - 50 (2006).
5. Wolmark N, Yothers G, O'Connell MJ, et al. A phase III trial comparing mFOLFOX6 to mFOLFOX6 plus bevacizumab in stage II or III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. J Clin Oncol; 27:LBA4 (2009).
6. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, et al., A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer, N Engl J Med 349 427 - 434 (2003).
7. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, et al., Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer, Nat. Med. 10, 145 - 147 (2004).
8. Miller K, Wang M, Gralow J, et al., Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer, N Engl J Med 357 2666 - 2676 (2007).
9. Miller KD, Chap LI, Holmes FA, et al., Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer, J Clin Oncol 23 792 - 799 (2005).
10. O'Shaughnessy J, Miles D, Gray RJ, et al., A meta-analysis of overall survival data from three randomized trials of bevacizumab (BV) and first-line chemotherapy as treatment for patients with metastatic breast cancer (MBC), J Clin Oncol 28 (suppl) (abstr 1005) (2010).
11. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, et al., Phase III trial of cisplatin pl

30

40

50



us gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL, *J Clin Oncol* 27, 1227 - 1234 (2009).

12. Escudier B, Bellmunt J, Negrier S et al., Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival, *J Clin Oncol* 28, 2144 - 2150 (2010)

13. Burger RA, Sill MW, Monk BJ, et al. Phase II trial of bevacizumab in persistent or recurrent epithelial ovarian cancer or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group Study. *J Clin Oncol*; 20;25(33):5165 - 71 (2007).

14. Tothill RW et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 14(16), 5198 - 208 (2008)

15. Bagri A, Berry L, Gunter B, et al. (2010) Effects of anti-VEGF treatment duration on tumor growth, tumor regrowth, and treatment efficacy. *Clin Cancer Res* 16:3887 - 3900.

16. Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, et al. (2009) Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15:232-239.

17. Grepin R, Guyot M, Jacquin M, Durivault J, Chamorey E, Sudaka A, Serdjebi C, Lacarelle B, Scoazec JY, Negrier S, Simmonet H, Pages G. Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. *Oncogene* 2012 Mar 29;31(13).

18. Ma J, Pulfer S, Li S, Chu J, Reed K, Gallo JM. Pharmacodynamic-mediated reduction of temozolomide tumor concentrations by the angiogenesis inhibitor TNP-470. *Cancer Res.* 2001;61:5491-5498.

19. Marissa et al. (2013) Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value *PLoS Med* 2013; 10(5):e1001453

20. Jorissen et al. (2009) Metastasis-associated gene expression changes predict poor outcomes in patients with Dukes stage B and C colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(24):7642 - 51

10

20

30

【図 1】

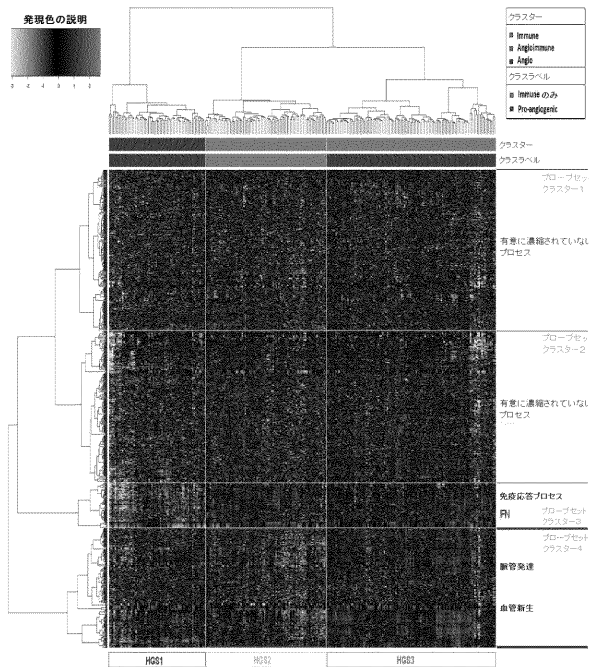


Figure 1

【図 2】

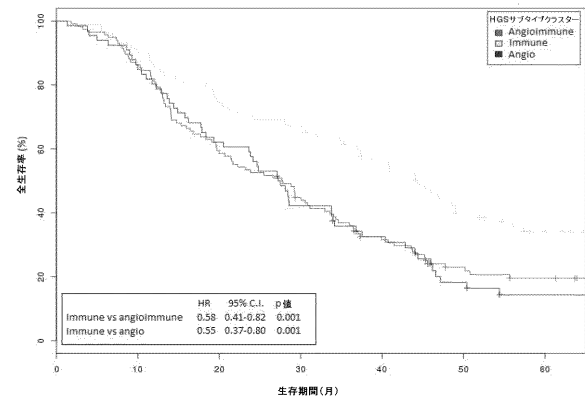
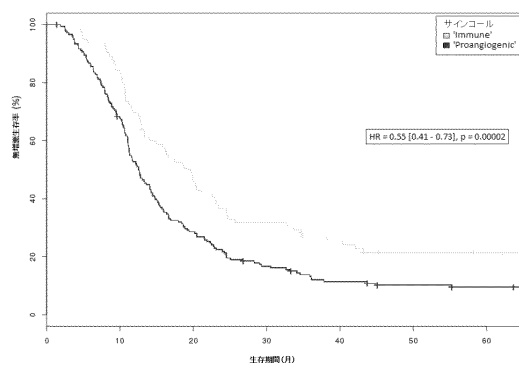


Figure 2

【図 3】

A)



B)

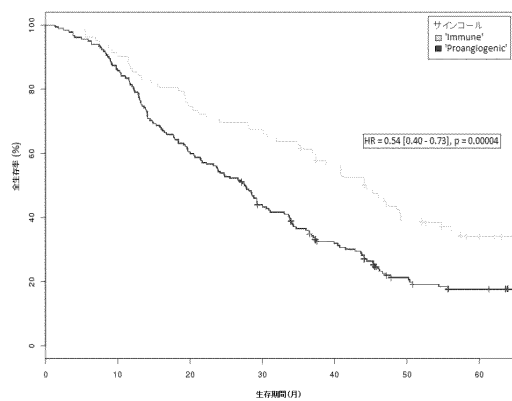
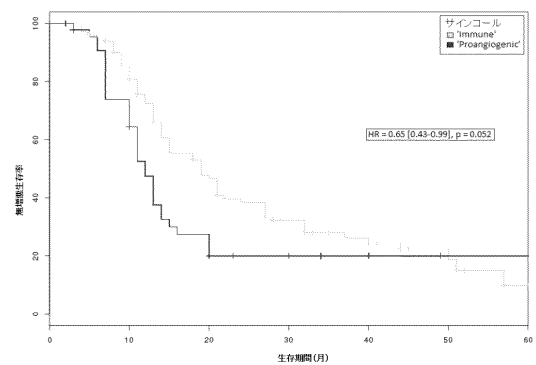


Figure 3

【図 4】

A)



B)

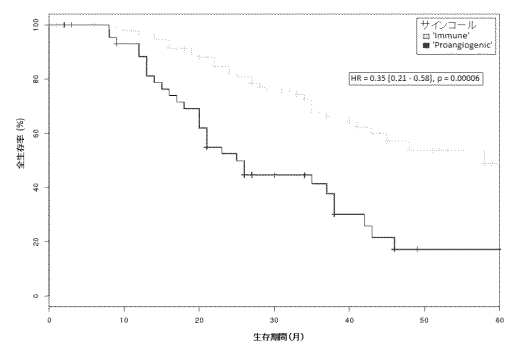


Figure 4

【図 5】

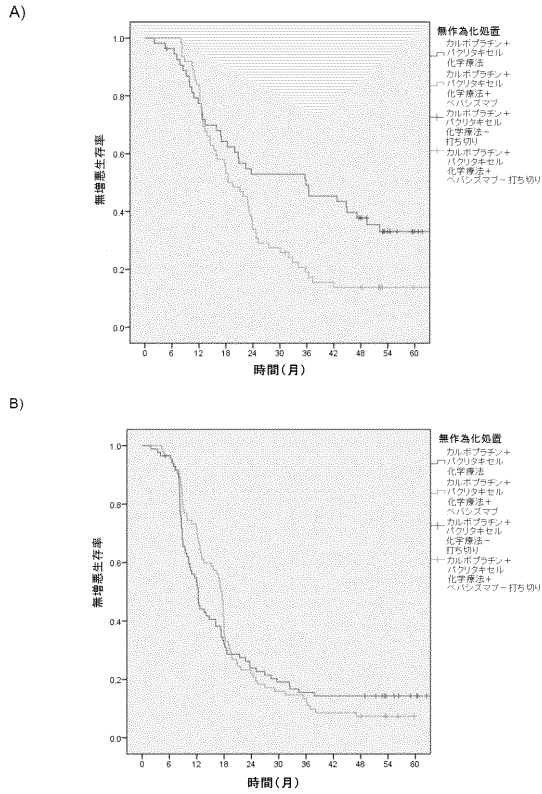


Figure 5

【図 6】

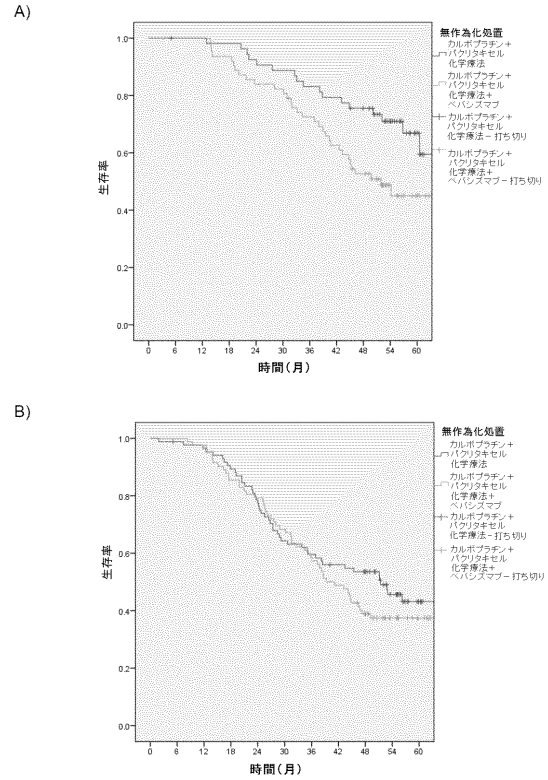


Figure 6

【図 7】

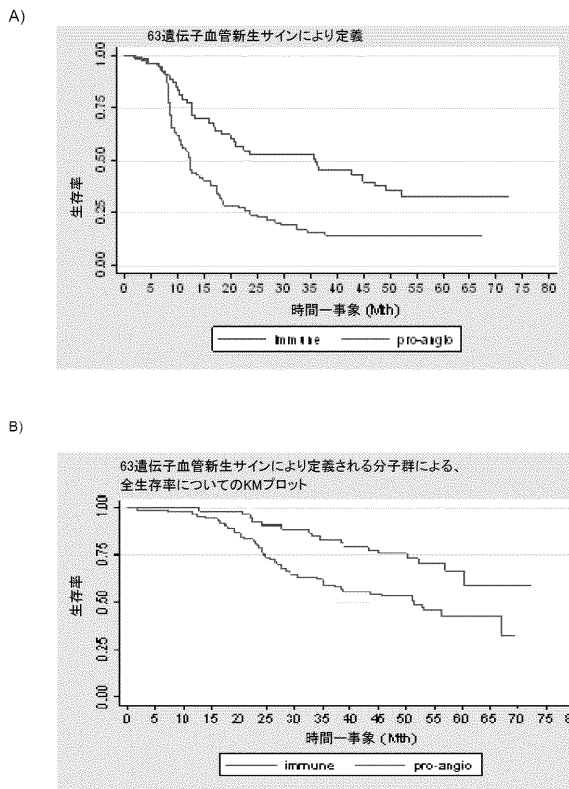


Figure 7

【図 8】

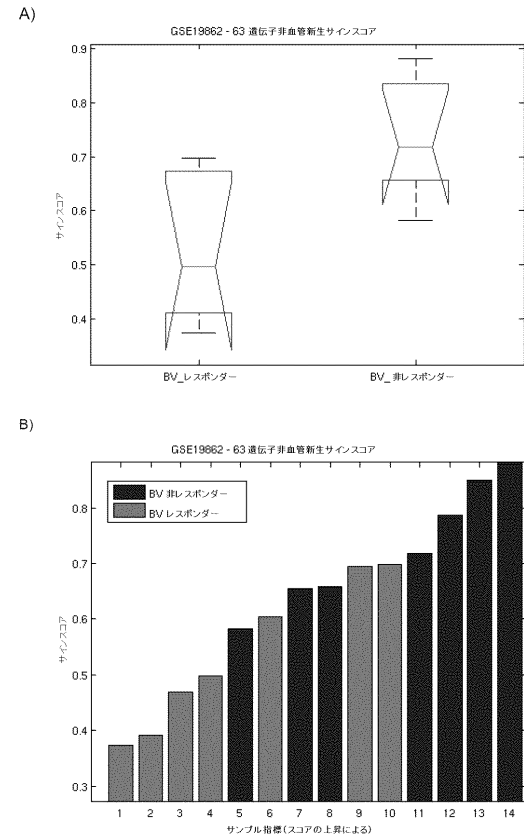


Figure 8

【 図 9 】

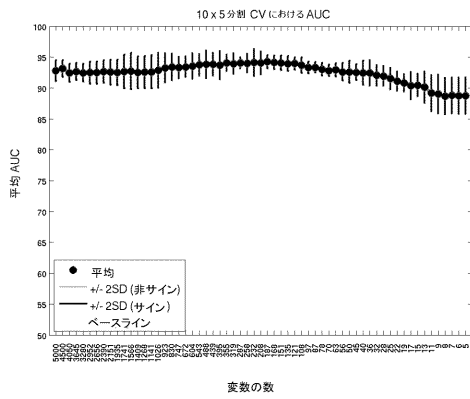


Figure 9

【 図 10 】

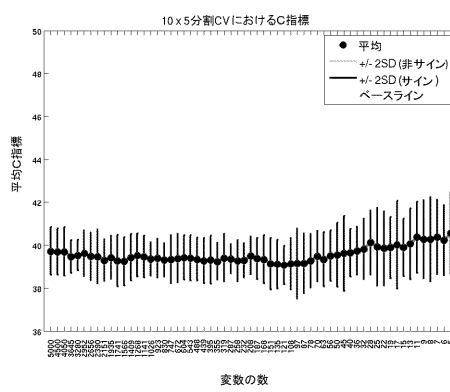


Figure 10

【 図 11 】

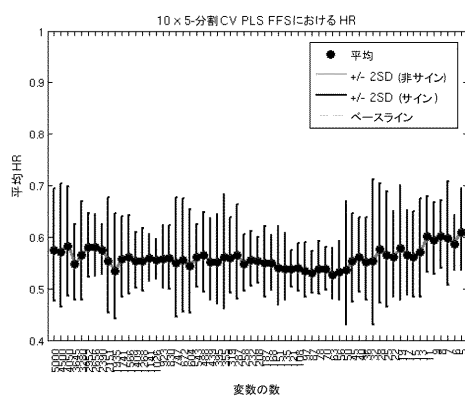


Figure 11

【 図 12 】

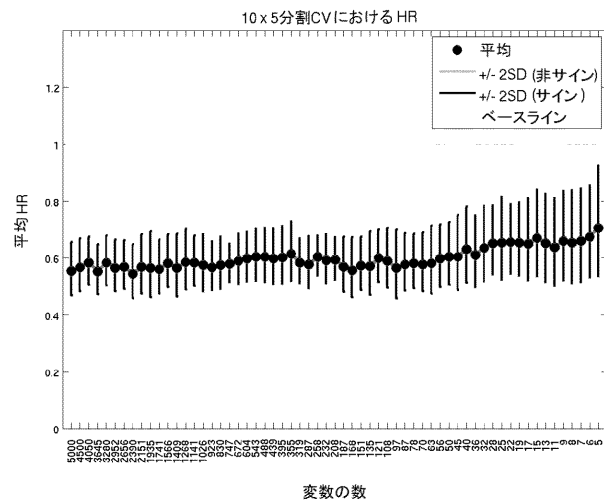


Figure 12

【図 13】

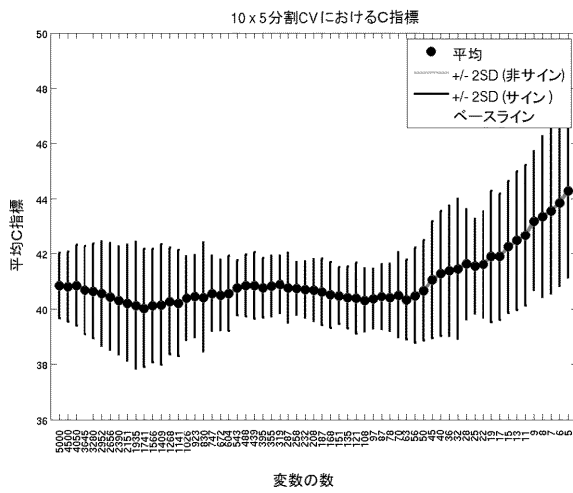


Figure 13

【図 14】

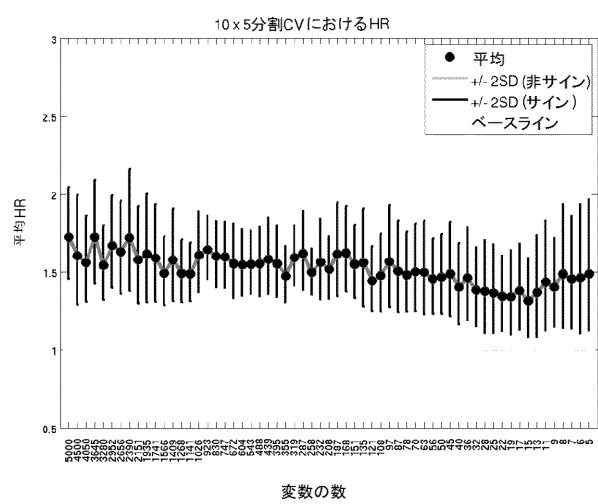


Figure 14

【図 15】

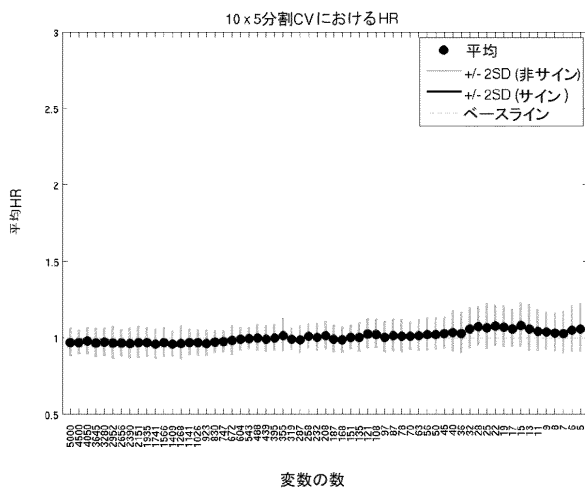


Figure 15

【図 16】

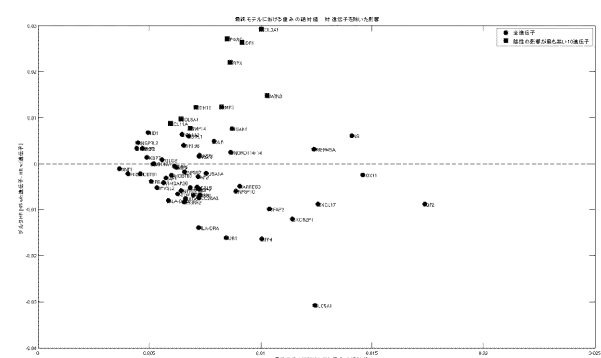


Figure 16

【図 17】

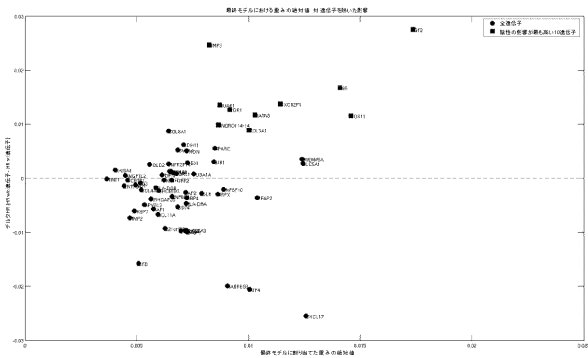


Figure 17

【図 18】

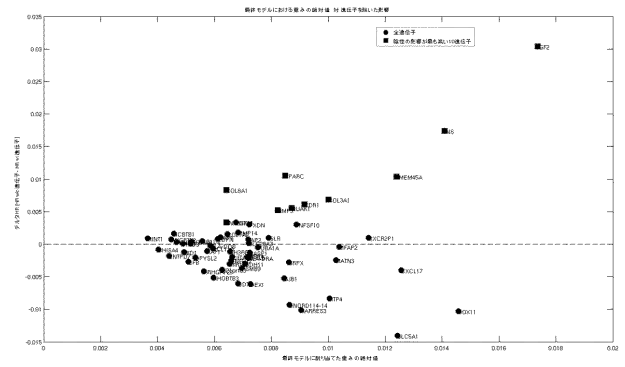


Figure 18

【図 19】

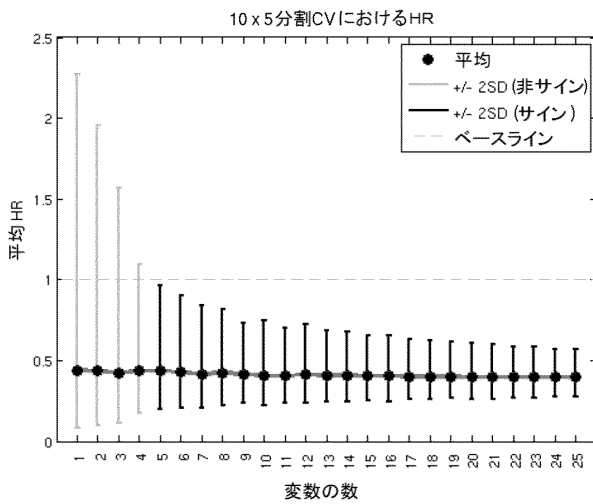


Figure 19

【図 20】

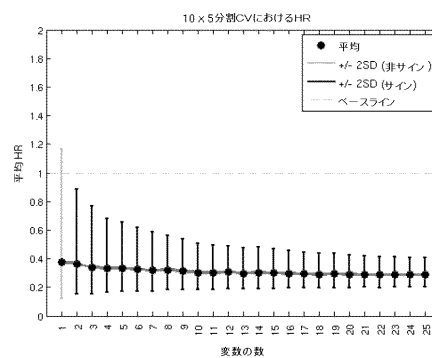


Figure 20

【図 2 1】

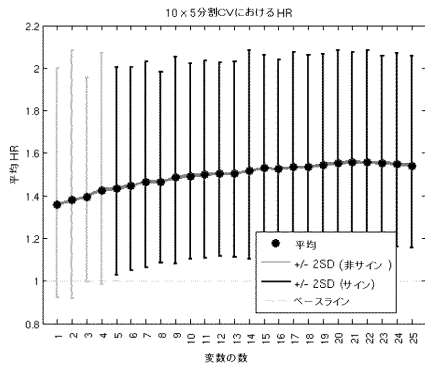


Figure 21

【図 2 2】

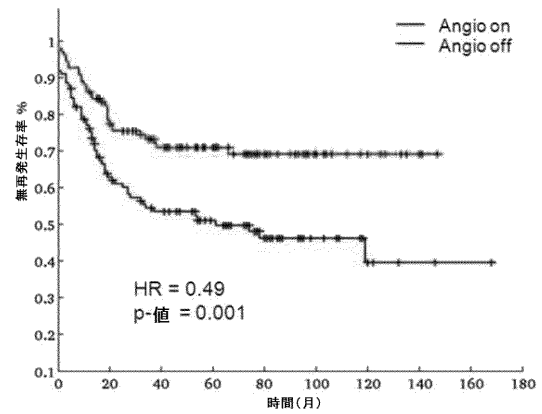


Figure 22

【図 2 3】

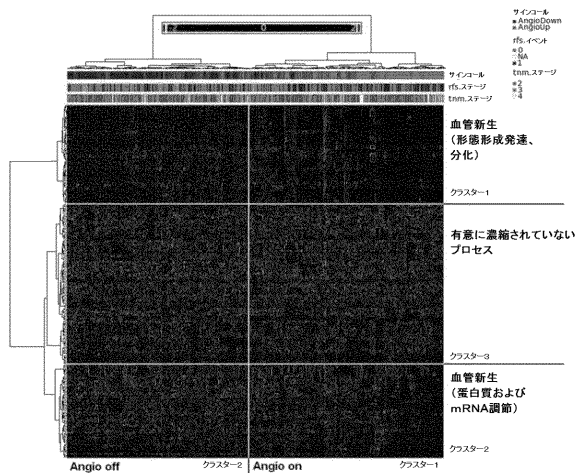


Figure 23

【図 2 4】

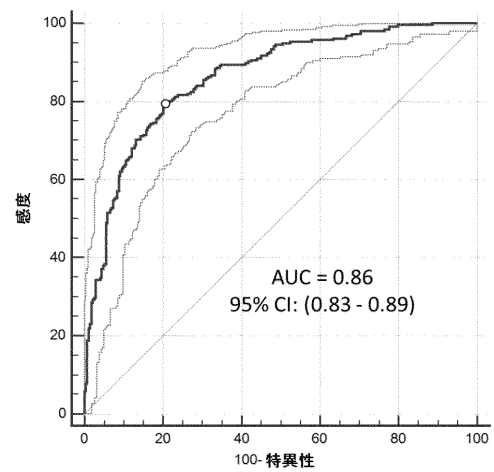


Figure 24

【図 25】

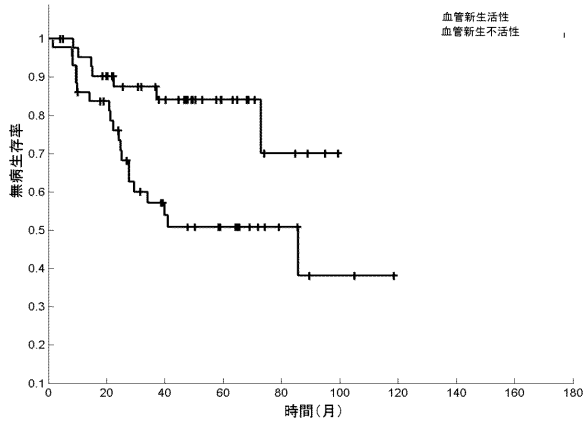


Figure 25

【配列表】

2017506506000001.app



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/GB2015/050352

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) 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 practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 2014/087156 A1 (ALMAC DIAGNOSTICS LTD [GB]) 12 June 2014 (2014-06-12) paragraphs [0002] - [0018], [0046], [0047], [0049] - [0053], [0061]; claims 1-27 table 1A paragraphs [0076] - [0087], [0111] - [0123], [0160], [0164] examples 2-4 <div style="text-align: center;">----- -/--</div>	1-41, 44-77
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt 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		Date of mailing of the international search report
28 April 2015		07/05/2015
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  Bruma, Anja

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2015/050352

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>WO 2012/167278 A1 (ALMAC DIAGNOSTICS LTD [GB]; HARKIN DENNIS PAUL [GB]; MCDYER FIONNUALA) 6 December 2012 (2012-12-06) claims 1-68  paragraphs [0002] - [0022], [0046] - [0048], [0050], [0052], [0065], [0080], [0082], [0083], [0085] - [0088], [0110], [0113], [0129]  tables 1A, 2B</p> <p>-----</p>	1-34, 36-41, 44-77
X	<p>WO 2013/106765 A1 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH])  18 July 2013 (2013-07-18)  page 1, paragraph 3 - page 5, paragraph 1;  claims 1-49  page 25, last paragraph - page 29  page 31, last paragraph - page 34  page 56, paragraph 2 - page 63  tables 1,2</p> <p>-----</p>	1-77
X	<p>WO 2012/092336 A2 (CARIS MPI INC [US]; ALARCON ARLET [US]; ARGUELLO DAVID [US]; BASU GARG) 5 July 2012 (2012-07-05) claims 1-49  paragraphs [0267] - [0269], [0274] - [0290], [0381] - [0399], [0401] - [0402], [0405] - [0422], [0433] - [0438]</p> <p>-----</p>	1-77
A	<p>REINMUTH N ET AL: "Current data on predictive markers for antiangiogenic therapy in thoracic tumours", EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL, MUNKSGAARD INTERNATIONAL PUBLISHERS, COPENHAGEN, DK</p> <p>vol. 36, no. 4  1 January 2010 (2010-01-01), pages 915-924, XP008146564,  ISSN: 0903-1936, DOI:  10.1183/09031936.00074009  Retrieved from the Internet:  URL:http://erj.ersjournals.com/  [retrieved on 2015-04-24]  the whole document</p> <p>-----</p>	1-77
A	<p>DIRK O BAUERSCHLAG ET AL: "Evaluation of Potentially Predictive Markers for Anti-Angiogenic Therapy with Sunitinib in Recurrent Ovarian Cancer Patients", TRANSLATIONAL ONCOLOGY,  vol. 6, no. 3, 1 June 2013 (2013-06-01), pages 305-310, XP055141223,  United States  ISSN: 1936-5233, DOI: 10.1593/tlo.13205  the whole document</p> <p>-----</p>	1-77

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB2015/050352

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2015/050352

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014087156	A1	12-06-2014	NONE
WO 2012167278	A1	06-12-2012	CA 2838086 A1 06-12-2012 CN 103733065 A 16-04-2014 EA 201391805 A1 31-03-2014 EP 2715348 A1 09-04-2014 JP 2014516552 A 17-07-2014 KR 20140044341 A 14-04-2014 NZ 618191 A 24-04-2015 SG 195208 A1 30-12-2013 US 2014342924 A1 20-11-2014 WO 2012167278 A1 06-12-2012
WO 2013106765	A1	18-07-2013	AU 2013207778 A1 21-08-2014 CA 2862835 A1 18-07-2013 CN 104203268 A 10-12-2014 EP 2802346 A1 19-11-2014 KR 20140114415 A 26-09-2014 US 2013216533 A1 22-08-2013 US 2014017233 A1 16-01-2014 WO 2013106765 A1 18-07-2013
WO 2012092336	A2	05-07-2012	AU 2011352167 A1 11-07-2013 CA 2823348 A1 05-07-2012 EP 2659005 A2 06-11-2013 US 2015024952 A1 22-01-2015 WO 2012092336 A2 05-07-2012

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 33/50 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/50	P	
<b>G 0 1 N 33/68 (2006.01)</b>		G 0 1 N 33/68		

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

(72) 発明者 デニス・ポール・ハーキン  
英国ビーティ 2 5 ・ 1 アールキュー、カウンティ・ダウン、ドロモア、パリーゴワウン・ロード 1 9 5 番

(72) 発明者 リチャード・ケネディ  
英国ビーティ 4 ・ 2 イージー、ベルファスト、エッジカム・ガーデンズ 1 5 番

(72) 発明者 キャサリン・イー・キーティング  
英国ビーティ 4 5 ・ 6 エルキュー、マラフェルト、ウォーターフット・ロード 4 4 番

(72) 発明者 アンドリーナ・マッキヤビガン  
英国ビーティ 6 6 ・ 6 キューエイチ、カウンティ・アーマー、ルーガン、デリアッド、ピア・ランパート 2 9 エイ番

(72) 発明者 ローラ・エイ・ヒル  
英国ビーティ 2 7 ・ 5 エフビー、カウンティ・アントリム、リスバーン、バランタイン・ガーデンズ 1 0 番

(72) 発明者 スティーブ・デハロ  
英国ビーティ 7 ・ 3 エルエフ、ベルファスト、カレッジ・ドライブ 1 番、アパートメント 2

(72) 発明者 ティモシー・デイピソン  
英国ビーティ 2 6 ・ 6 ピーダブリュー、ヒルズバラ、レイクランド・ロード 2 1 番

(72) 発明者 フィオヌアラ・パターンソン  
英国シービー 2 2 ・ 5 エイチエス、ケンブリッジ、ホークストン、チャーチ・ロード 4 0 番

(72) 発明者 シニード・ドネガン  
英国ビーティ 9 ・ 5 エルエックス、ベルファスト、マローン・ロード、クリーパー・アベニュー、クリーパー・コート 2 4 番

(72) 発明者 ゲラ・ジェレマ  
英国ビーティ 6 3 ・ 5 エフワイ、ポータダウン、リスニスキー・ウォーク 5 3 番

(72) 発明者 チャーリー・ゴウリー  
英国ケイワイ 1 1 ・ 8 エルエイ、ダンファームリン、ターマッカン・ロード 4 6 番

F ターム (参考) 2G045 AA26 CB02 DA14 FB01 FB02  
4B063 QA07 QA08 QA19 QQ42 QQ52 QQ58 QR55 QS34 QX01 QX04  
4C084 AA17 NA06 ZB26  
4C086 AA01 AA02 BA02 MA01 MA04 NA06 ZB26  
4C206 AA01 AA02 JB13 MA01 MA04 NA06 ZB26