

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6039656号
(P6039656)

(45) 発行日 平成28年12月7日(2016. 12. 7)

(24) 登録日 平成28年11月11日(2016. 11. 11)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)C 1 2 Q 1/68 Z N A A
C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 16 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2014-513083 (P2014-513083)	(73) 特許権者	508156328
(86) (22) 出願日	平成24年6月1日(2012. 6. 1)		メディカル プログノシス インスティテ
(65) 公表番号	特表2014-516543 (P2014-516543A)		ュート エー/エス
(43) 公表日	平成26年7月17日(2014. 7. 17)		デンマーク王国 ホーシュロム ヴェンリ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/002332		ゲスヴァイ 1
(87) 国際公開番号	W02012/163541	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開日	平成24年12月6日(2012. 12. 6)		弁理士 清水 初志
審査請求日	平成27年5月29日(2015. 5. 29)	(74) 代理人	100102118
(31) 優先権主張番号	PA201100416		弁理士 春名 雅夫
(32) 優先日	平成23年6月1日(2011. 6. 1)	(74) 代理人	100160923
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌再発の予後予測のための方法および装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌患者における肺非小細胞癌 (NSCLC) 再発を予後予測するための方法であって、該癌患者からの試料におけるSEQ ID NO: 1の配列またはその相補配列を含む第一のバイオマーカーの発現の量を測定する工程を含み、該第一のバイオマーカーの発現の量が該癌患者におけるNSCLC再発の予後徴候であり、

i) 該癌患者からの試料中の該第一のバイオマーカーの発現の量が、NSCLC再発のない良好な予後を有すると決定された第一の参照患者からの試料における該第一のバイオマーカーの発現の量と同程度であるとの決定が、該癌患者におけるNSCLC再発のない良好な予後を示し、

ii) 該癌患者からの試料中の該第一のバイオマーカーの発現の量が、NSCLC再発の不良な予後を有すると決定された第二の参照患者からの試料における該第一のバイオマーカーの発現の量と同程度であるとの決定が、該癌患者におけるNSCLC再発の不良な予後を示す方法。

【請求項 2】

SEQ ID NO: 2~4のいずれか一つの配列またはその相補配列を含む、一つまたは複数の第二のバイオマーカーの発現の量を測定する工程をさらに含み、

i) 前記癌患者からの試料中の一つまたは複数の該第二のバイオマーカーの発現の量が、NSCLC再発のない良好な予後を有すると決定された第一の参照患者からの試料における一つまたは複数の該第二のバイオマーカーの発現の量と同程度であるとの決定が、該癌患

者におけるNSCLC再発のない良好な予後を示し、

ii) 該癌患者からの試料中の一つまたは複数の該第二のバイオマーカーの発現の量が、NSCLC再発の不良な予後を有すると決定された第二の参照患者からの試料における一つまたは複数の該第二のバイオマーカーの発現の量と同程度であるとの決定が、該癌患者におけるNSCLC再発の不良な予後を示す、

請求項1記載の方法。

【請求項3】

試料が組織試料である、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

試料が腫瘍試料である、請求項3記載の方法。

10

【請求項5】

予後予測が最初の癌治療の後に患者において行われる、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項6】

予後予測が最初の癌治療の前に患者において行われる、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

予後予測が最初の癌治療の後、但し、第二の癌治療の前に患者において行われる、請求項1～4のいずれか一項記載の方法。

【請求項8】

20

予後予測が第二の癌治療の後に患者において行われる、請求項1～7のいずれか一項記載の方法。

【請求項9】

最初の癌治療または第二の癌治療が、手術、放射線療法、および化学療法の一つまたは複数を含む、請求項5～8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

試料中の前記第一のバイオマーカーの発現の量が、該試料から核酸分子を採取することによって、および該核酸分子を増幅するために定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(qRT-PCR)を用いることによって、測定される、請求項1～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

30

試料中の一つまたは複数の前記第二のバイオマーカーの発現の量が、該試料から核酸分子を採取することによって、および該核酸分子を増幅するためにqRT-PCRを用いることによって、測定される、請求項2～10のいずれか一項記載の方法。

【請求項12】

前記第一のバイオマーカーの発現の量を検出するための少なくとも一つの一本鎖核酸分子を含み、該一本鎖核酸分子と該第一のバイオマーカーまたはその相補配列の間でそれぞれ特異的なハイブリダイゼーションを可能とする、装置を用いて実行される、請求項1～11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

一つまたは複数の前記第二のバイオマーカーの発現の量を検出するための少なくとも一つの一本鎖核酸分子を含み、該一本鎖核酸分子と一つまたは複数の該第二のバイオマーカーまたはその相補配列の間でそれぞれ特異的なハイブリダイゼーションを可能とする、装置を用いて実行される、請求項2～12のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項14】

ハイブリダイゼーションが起こることを可能とする条件下において試料から調製された核酸分子の様々な集団と接触する場合に、前記装置が、前記第一のバイオマーカーの発現の量の測定を可能とする、請求項12または13記載の方法。

【請求項15】

ハイブリダイゼーションが起こることを可能とする条件下において試料から調製された核酸分子の様々な集団と接触する場合に、前記装置が、一つまたは複数の前記第二のバイ

50

オマーカーの発現の量の測定を可能とする、請求項13記載の方法。

【請求項16】

装置がマイクロアレイ装置である、請求項12～15のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、癌患者における癌再発を予後予測するための方法、装置およびキットを特徴とする。

【背景技術】

10

【0002】

発明の背景

癌の予後予測および診断を促進するために、患者からの腫瘍試料における遺伝子発現解析が用いられている。遺伝子発現パターンは、患者における癌の存在、そのタイプ、ステージ、および起源、ならびに遺伝子突然変異が関与しているかどうかを明らかにすることができる。遺伝子発現は化学療法の有効性の予見における役割も担い得る。

【0003】

近年、新しいクラスの調節分子であるマイクロRNAが発見されている。癌細胞中のそれらの濃度または発現を測定することは、癌における役割を明らかにした。マイクロRNAの検出は癌の起源の場所を調べるために用いることができ、攻撃性および非攻撃性の癌を区別するために用いることができる。遺伝子およびマイクロRNAの発現量に含まれる情報は相補的であり、予後予測または診断の方法においてこの情報を組み合わせることは、より臨床的に正確かつ有用な結果を生じ得る。

20

【0004】

肺癌は死亡率の高い疾病である。手術後であっても、肺癌患者の大部分が再発を経験して死亡する。除去された腫瘍が直径3cmよりも大きい場合、標準のケアは患者に再発を防ぐための化学療法を提供することである。腫瘍が直径3cm未満であり、かつ、腫瘍の拡散が認められない（ステージIaとも呼ばれる）場合は、患者はさらなる治療を提供されない。それでもなお、半数を超える肺癌患者が再発を経験し、5年以内に死亡する。

【0005】

30

手術を含めて、癌のための一つまたは複数の医学的治療後の癌患者における癌の再発を予後予測するための方法が必要である。

【発明の概要】

【0006】

本発明は、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307（それぞれ、SEQ ID NO: 1～4）の任意の一つの配列と少なくとも85%（例えば、85%、90%、95%、97%、99%、または100%）の配列同一性を持つ少なくとも一つのバイオマーカー（例えば、2、3もしくは4またはそれよりも多いバイオマーカーのように、一つよりも多いバイオマーカー）の発現の量を測定することによって、一つまたは複数の癌治療（例えば、手術、放射線療法、および/または化学療法）の前または後に癌患者における癌再発を予後予測するための方法を含む。一つの態様において、方法は、2、3または4つすべてのバイオマーカーの単独または任意の組み合わせのいずれかにおいて、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307の任意の一つの配列を持つ一つのバイオマーカーの発現量を（同時に、または順次）測定する工程を伴う。

40

【0007】

もう一つの態様において、本発明の方法は、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（またはhsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの任意の一つの配列と少なくとも85%、90%、95%、97%、99%または100%の配列同一性を持つバイオマーカー）の対の組み合わせの発現の量を測定する工程を含み得る。もう一つの態様において、本発明の方法は、

50

hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（またはhsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの任意の一つの配列と少なくとも85%、90%、95%、97%、99%または100%の配列同一性を持つバイオマーカー）の3つまたは4つの組み合わせの発現の量を測定する工程を含み得る。本発明の方法は、2つまたはそれよりも多いバイオマーカー（例えば、2、3、または4つのバイオマーカー）の発現の量を同時にまたは順次、測定する工程を伴い得る。

【0008】

本発明の方法は、癌患者からの試料中のバイオマーカーの発現の量を測定する工程を含む。試料は血液試料または組織試料、例えば腫瘍試料であり得る。本発明の方法は、癌患者における最初の癌治療の前または後に、任意のタイプの癌、例えば肺非小細胞癌のような肺癌の再発を予後予測するために用いることができる。本発明の一つの態様において、癌患者における癌再発の予後予測の方法は最初の癌治療の後に行われ得る。または、予後予測は最初の癌治療の前に行われ得る。もう一つの態様において、予後予測は最初の治療の後、但し、第二の治療の前に行われ得る。または、予後予測は第二の癌治療の後に行われても良い。本発明において記載される癌治療は、手術、放射線療法、および化学療法ならびに/または癌の治療の技術分野において公知である任意のその他の療法の一つまたは複数を含むことができる。本発明の一つの局面において、化学療法剤は一つの薬剤、一つの抗体、および一つのオリゴヌクレオチドの一つまたは複数を含み得る。

【0009】

方法の一つの局面において、少なくとも一つのバイオマーカー（例えば、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307（それぞれ、SEQ ID NO：1~4）の任意の一つの配列と少なくとも85%（例えば、85%、90%、95%、97%、99%、または100%）の配列同一性を持つバイオマーカー）の発現の量の増加または減少は癌再発のない良好な予後を示す。または、一つまたは複数のバイオマーカー（例えば、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307（それぞれ、SEQ ID NO：1~4）の任意の一つの配列と少なくとも85%（例えば、85%、90%、95%、97%、99%、または100%）の配列同一性を持つバイオマーカー）の発現の量の増加または減少は癌再発の不良な予後を示す。

【0010】

本発明の方法は、正常な患者からの試料または最初（またはその後）の癌治療の後の患者からの試料からのバイオマーカーの発現の量を基準として、癌患者における少なくとも一つのバイオマーカー（例えば、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307（それぞれ、SEQ ID NO：1~4）の任意の一つの配列と少なくとも85%（例えば、85%、90%、95%、97%、99%、または100%）の配列同一性を持つバイオマーカー）の発現の量に基づいて癌再発を予後予測する工程を含み得る。または、一つまたは複数のバイオマーカーの発現の検出は、それだけで癌再発の予後予測のための十分な情報を提供する。

【0011】

本発明の方法は、任意で核酸分子を増幅するための定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（qRT-PCR）を用いて、続いて試料中の一つまたは複数のバイオマーカー（例えば、1、2、3または4つのバイオマーカー）の検出によって患者（例えば、癌患者）の試料（例えば、腫瘍試料のような組織試料）から核酸分子を採取する工程、または試料中の少なくとも一つのバイオマーカー（例えば、1、2、3または4つのバイオマーカー）の発現量を測定する工程を含み得る。

【0012】

本発明は、少なくとも一つのバイオマーカー（例えば、2、3、もしくは4、またはそれよりも多いバイオマーカーのような一つよりも多いバイオマーカー）の発現を検出する、または発現量を測定するために用いることができ、バイオマーカーの配列またはその相補配列と少なくとも85%（例えば、85%、90%、95%、97%、99%、または100%）の配列同一性を持つ少なくとも一つ（例えば、1よりも多い、2、3、もしくは4またはそれより

10

20

30

40

50

も多い)の一本鎖核酸分子(オリゴヌクレオチドプローブとも呼ばれる)を含み得る。バイオマーカーの配列は、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307(それぞれ、SEQ ID NO:1~4)の任意の一つの配列の少なくとも5つ(例えば、5、6、7、8、10、12、15、20、または22)の連続したヌクレオチドを含む。例えば、装置は、患者(例えば、癌患者)からの組織試料におけるhsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307(それぞれ、SEQ ID NO:1~4)の任意の一つ、またはこれらのバイオマーカーに相補的な配列の発現を検出するために用いることができるオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。

【0013】

一つの態様において、装置はhsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの任意の一つもしくは複数の配列、またはそれらの相補配列に対して少なくとも100%の配列同一性を持つオリゴヌクレオチドプローブを含む。装置は、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー(それぞれ、SEQ ID NO:1~4)の任意の一つの配列、またはそれらの相補配列に対して少なくとも85%、90%、95%、97%、99%または100%の配列同一性を持つオリゴヌクレオチドプローブの対の、3つまたは4つの組み合わせを含むことができる。

【0014】

装置は、装置(例えば、オリゴヌクレオチドプローブ)の一本鎖核酸分子とバイオマーカーまたはその相補配列の間の特異的なハイブリダイゼーションを可能とする。装置は、10~100ヌクレオチドの範囲の長さ(例えば、10、20、25、30、40、60、80、もしくは100ヌクレオチドの長さ、または5~50、20~50、もしくは20~100ヌクレオチドの範囲の長さ)を持つ少なくとも一つの一本鎖核酸分子を含む。装置がハイブリダイゼーションを可能とする条件下で試料から調製された核酸分子の多用な集団と接触する場合、装置内のオリゴヌクレオチドプローブはターゲットバイオマーカーとハイブリダイズして、試料(例えば、患者組織試料)中の少なくとも一つのバイオマーカー(例えば、1、2、3または4のバイオマーカー)の存在を検出することができる。または、装置は、一つまたは複数(例えば、1、2、3または4)の上記のバイオマーカーの発現量を測定するために用いられることができる。本発明の一つの態様において、装置はマイクロアレイの装置である。

【0015】

本発明は、一つまたは複数(例えば、1、2、3または4)のバイオマーカーの検出または発現の量が患者における癌再発の予後徴候であるように、患者の試料(例えば、腫瘍試料)中の少なくとも一つのバイオマーカー(例えば、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307(それぞれ、SEQ ID NO:1~4)の任意の一つの配列と少なくとも85%(例えば、85%、90%、95%、97%、99%、または100%)の配列同一性を持つバイオマーカー)を検出または発現の量を測定するための上記の装置を用いることによって癌患者における癌再発を予後予測するための方法を含む。試料は、本明細書に記載される癌の任意の一つ(例えば、肺癌、より具体的には肺非小細胞癌)を診断された患者に由来であってよい。装置は、最初の癌治療の前または後に癌患者における癌再発の予後予測のために用いることができる。または、装置は最初の癌治療の後、但し、第二の治療の前に癌再発の予後予測のために用いられ得る。本発明のさらにもう一つの局面において、装置は第二の癌治療の後に癌再発の予後予測のために用いることができる。

【0016】

本方法の装置は、癌再発のない良好な予後を示す上記のバイオマーカーの少なくとも一つ(例えば、1、2、3または4つのバイオマーカー)の発現の量の増加または減少を検出するために用いることができる。または、装置は、癌再発の不良な予後を示す、上記のバイオマーカーの一つまたは複数(例えば、1、2、3または4つのバイオマーカー)の発現の量の増加または減少を検出するために用いることができる。

【0017】

装置は、正常な患者からの試料における、または最初の癌治療の後の患者からの試料からの発現の量を基準として、癌患者の試料中の一つまたは複数のバイオマーカーの発現量

10

20

30

40

50

に基づいて癌再発を予後予測するために用いることができる。または、装置による一つまたは複数のバイオマーカーの発現の検出は癌再発の予後予測を提供するために用いることができる。

【0018】

本発明は、癌患者からの試料から核酸分子を採取するための試薬、増幅した試料を產生するために試料から採取した核酸分子を増幅するための試薬、および増幅した試料中のSEQ ID NO: 1~4の任意の一つの配列を持つ少なくとも一つのバイオマーカー（例えば、1、2、3または4のバイオマーカー）の発現の量を検出するための少なくとも一つの装置を含み得るキットをさらに特徴とする。一つの態様において、増幅した試料の產生には定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（qRT-PCR）が用いることができる。キットは、少なくとも一つのバイオマーカー（例えば、SEQ ID NO: 1~4の任意の一つの配列を持つバイオマーカーの一つもしくは複数、またはすべて）の発現の量に基づいて、癌患者における癌再発を予後予測するための取扱説明書をさらに含み得る。

10

【0019】

一つの態様において、キットは試料中の少なくとも一つ（例えば、1、2、3または4つ）のバイオマーカー（例えば、SEQ ID NO: 1~4の任意の一つの配列を持つバイオマーカー）を検出するために、または試料中の少なくとも一つ（例えば、1、2、3または4つ）のバイオマーカーの発現量を測定するために、上記の装置（例えば、マイクロアレイ装置）を含んでもよい。キットは、試料から採取される核酸分子を装置に適用するための取扱説明書、および/または試料中の少なくとも一つのバイオマーカーの発現を検出するため、もしくは発現量を測定するために少なくとも一つのオリゴヌクレオチドプローブと少なくとも一つのバイオマーカーまたはその相補配列とのハイブリダイゼーションを検出するための説明書をさらに含むことができる。キットは、装置を用いて検出される少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量に基づいて、癌患者における癌再発を予後予測するための説明書をさらに含むことができる。

20

【0020】

癌再発を予後予測するための関連するバイオマーカーは、予後予測が正当化される関連する群間で差次的に発現するものとして同定される。例えば、癌患者から得られた試料は、患者が癌治療、例えば、手術、放射線療法および/または化学療法の後に再発を経験するか否かに基づいて患者を分類するために、本発明のバイオマーカーに関してアッセイされ得る。標準的な手順に従って、mRNAおよびマイクロRNAを含む全RNAが試料から抽出されて標識される。公知の各遺伝子からのmRNA、または公知の各マイクロRNA種からのマイクロRNAの量は、mRNAおよび/またはマイクロRNAに相補的なプローブを含む一つまたは複数のDNAマイクロアレイを用いて測定される。

30

【0021】

このアプローチは、マイクロRNAバイオマーカーと同様にmRNAバイオマーカーに用いることができる。予後予測は、すべて、患者の腫瘍からの試料から抽出された標識RNAに基づいて一つまたは複数のDNAマイクロアレイ（またはRT-PCR）を用いて測定されるmRNAバイオマーカー、マイクロRNAバイオマーカー、またはそれらの組み合わせに基づく。

【0022】

本発明の方法は、治療の前または後の癌（例えば、肺癌）の再発の予後予測のために適用することができる。現時点では、癌が再発するかどうかを調べるための良好かつ正確な方法はない。本明細書の記載される方法は、例えば、腫瘍学者が、個々の腫瘍の遺伝子構造に基づいて患者にとってもっとも適切な治療を選択するために用いることができる。再発の可能性を知るとは、腫瘍学者が一つまたは複数の適切な化学療法計画、または手術、化学療法および放射線療法の組み合わせを選択することを可能とする。

40

【0023】

本明細書で用いられるように「癌患者」は、癌を持つ、または持っていた、癌の治療を受けたかもしれない、または受けなかったかも知れない対象、例えばヒトの対象を指す。

【0024】

50

本明細書で用いられるように核酸配列の「相補型」または「相補性」核酸配列は、それが核酸配列とアラインする際に一つの配列の5'末端が他方の3'末端と対となるように「逆平行」となるオリゴヌクレオチドを指す。ヌクレオチドおよびその他の塩基は相補物を持ち得て、相補性核酸中に存在し得る。本発明の核酸に含まれ得る天然の核酸にあまり広く見られない塩基は、例えば、イノシンおよび7-デアザグアニンを含む。「相補性」は完全でない可能性がある；相補性核酸の安定な二重鎖は不適性塩基対または非対応塩基を含み得る。核酸の技術分野の業者は、例えば、オリゴヌクレオチドの長さ、オリゴヌクレオチド内のシトシンおよびグアニンの塩基の濃度パーセント、イオン強度、および不適性塩基対の発生数を含む多くの変数を考慮して、二重鎖の安定性を経験的に決定することができる。

10

【0025】

相補性核酸配列が安定な二重鎖を形成する場合、それらは互いに「ハイブリダイズされる」もしくは「ハイブリダイズする」と言われて、または「ハイブリダイゼーション」が生じたと言われる。核酸は、それらがWatson-Crickの塩基対合則（例えば、GとC、AとT、またはAとU）に従って水素結合を形成することができるヌクレオチドもしくはヌクレオチド相同体、または、例えば、ジアミノプリンとT、5-メチルCとG、2-チオチミジンとA、イノシンとC、シュードイソシトシンとGなどのようなその他の水素結合形成モチーフを含む場合、「相補性」とであると呼ばれる。アンチセンスRNAは、その他のオリゴヌクレオチド、例えば、mRNAに対して相補性である可能性がある。

【0026】

20

本明細書で用いられる「バイオマーカー」は、測定されることのできる形（例えば、mRNA、マイクロRNAまたはタンパク質として）で発現して、その発現が患者における癌再発の良好または不良な予後を示す遺伝子または対象の遺伝物質のその他の部分を示す。

【0027】

本明細書で用いられる「マーカー遺伝子」または「バイオマーカー遺伝子」は、その発現が細胞（および従って細胞が得られた患者）の治療（例えば、化合物への曝露）に対する感度または抵抗性に相関する細胞内の遺伝子を意味する

【0028】

本明細書で用いられるように「マイクロアレイ」は、一つまたは複数の対象のオリゴヌクレオチド、例えば、DNAもしくはRNA、またはそれらの類似体を同時に定量する任意の方法によって用いられる装置を意味する。マイクロアレイの一つの例示的な分類はガラスまたは石英表面に接続するDNAプローブからなる。例えば、Affymetrixによって作られる物を含む多くのマイクロアレイは、単一の遺伝子の発現を測定するための複数のプローブを使用する。DNAマイクロアレイは、例えば、RNAに相補性である完全長のcDNAまたはRNAの一部にハイブリダイズするcDNA断片であり得るオリゴヌクレオチドプローブを含み得る。DNAマイクロアレイは、ロックされた核酸、つまりLNAのようなDNAまたはRNAの修飾型も含むことができる。例示的なRNAはmRNA、miRNAおよびmiRNA前駆体を含む。例示的なマイクロアレイは基質に結合した多くの核酸を持つ「核酸マイクロアレイ」も含み、多くの結合核酸のそれぞれへのハイブリダイゼーションは別々に検出可能である。基質は固体または多孔性、平面状または非平面状、単体型または分散型であり得る。例示的な核酸マイクロアレイは、Schena (ed.), DNA Microarrays: A Practical Approach (Practical Approach Series), Oxford University Press (1999); Nature Genet. 21(1)(suppl.):1-60 (1999); Schena (ed.), Microarray Biochip: Tools and Technology, Eaton Publishing Company/BioTechniques Books Division (2000)において称されるすべての装置を含む。さらに、例示的な核酸マイクロアレイは、とりわけBrenner et al., Proc.Natl. Acad. Sci. USA 97(4): 1665-1670 (2000)に記載されているように、複数の核酸が単位平面基質上ではなく多数のピース上に露出している基質結合型の多くの核酸を含む。核酸マイクロアレイの例は、参照により開示が全体として本明細書に組み入れられる米国特許第6,391,623号、第6,383,754号、第6,383,749号、第6,380,377号、第6,379,897号、第6,376,191号、第6,372,431号、第6,351,712号、第6,344,316号、第6,316,193号、第6,312,906号、第6,3

30

40

50

09,828号、第6,309,824号、第6,306,643号、第6,300,063号、第6,287,850号、第6,284,497号、第6,284,465号、第6,280,954号、第6,262,216号、第6,251,601号、第6,245,518号、第6,263,287号、第6,251,601号、第6,238,866号、第6,228,575号、第6,214,587号、第6,203,989号、第6,171,797号、第6,103,474号、第6,083,726号、第6,054,274号、第6,040,138号、第6,083,726号、第6,004,755号、第6,001,309号、第5,958,342号、第5,952,180号、第5,936,731号、第5,843,655号、第5,814,454号、第5,837,196号、第5,436,327号、第5,412,087号、第5,405,783号に見出すことができる。

【0029】

例示的なマイクロアレイは、基質結合型の多くのポリペプチドを持つ「ペプチドマイクロアレイ」または「タンパク質マイクロアレイ」も含み得て、複数の結合型ポリペプチドのそれぞれに対するオリゴヌクレオチド、ペプチドまたはタンパク質の結合は別々に検出可能である。または、ペプチドマイクロアレイは、特異的なオリゴヌクレオチド、ペプチドまたはタンパク質の結合を特異的に検出することができるモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ファージディスプレイ結合剤、酵母2ハイブリッド結合剤、アプタマーを含むがこれらに限定されない多くの結合剤を持ち得る。ペプチドアレイの例は、参照によりその開示が全体として本明細書に組み入れられるWO 02/31463、WO 02/25288、WO 01/94946、WO 01/88162、WO 01/68671、WO 01/57259、WO 00/61806、WO 00/54046、WO 00/47774、WO 99/40434、WO 99/39210、WO 97/42507および米国特許第6,268,210号、第5,766,960号、第5,143,854号に見出すことができる。

【0030】

本明細書で用いられるように「遺伝子発現」は、例えば、DNA、RNAもしくはタンパク質の量、スプライシング、リン酸化、アセチル化またはメチル化のようなDNA、RNAもしくはタンパク質の修飾物の量、または所与の遺伝子に結合するDNA、RNAもしくはタンパク質の活性の量のような、細胞、組織、臓器または対象における遺伝子産物の量を意味する。

【0031】

「治療」または「医学的治療」は、化合物（例えば、薬、タンパク質、抗体、オリゴヌクレオチド、化学療法物質、および放射性物質）または癌（例えば、肺癌）もしくは癌の症状を治療もしくは予防するために用いられる医学的介入の何らかのその他の形態（例えば、寒冷療法および放射線療法）を対象もしくは生体に投与する工程または細胞もしくは腫瘍に曝露する工程を意味する。放射線療法は、X線、ガンマ線、または電子（ベータ線）のビームを放射する粒子加速器および関連する医療用具のようなソースから発生する放射線の患者への投与を含む。治療は、例えば、対象または生体から腫瘍を除去するための手術をさらに含む得る。

【0032】

[本発明1001]

癌患者における癌再発を予後予測するための方法であって、該患者からの試料におけるSEQ ID NO: 1の配列と少なくとも85%の配列同一性を持つバイオマーカーの発現の量を測定する工程を含み、該バイオマーカーの発現の量が該患者における癌再発の予後徴候である、方法。

[本発明1002]

バイオマーカーがSEQ ID NO: 1の配列を含む、本発明1001の方法。

[本発明1003]

癌患者における癌再発を予後予測するための方法であって、該患者からの試料におけるSEQ ID NO: 2の配列と少なくとも85%の配列同一性を持つバイオマーカーの発現の量を測定する工程を含み、該バイオマーカーの発現の量が該患者における癌再発の予後徴候である、方法。

[本発明1004]

バイオマーカーがSEQ ID NO: 2の配列を含む、本発明1003の方法。

[本発明1005]

癌患者における癌再発を予後予測するための方法であって、該患者からの試料における

SEQ ID NO: 3の配列と少なくとも85%の配列同一性を持つバイオマーカーの発現の量を測定する工程を含み、該バイオマーカーの発現の量が該患者における癌再発の予後徴候である、方法。

[本発明1006]

バイオマーカーがSEQ ID NO: 3の配列を含む、本発明1005の方法。

[本発明1007]

癌患者における癌再発を予後予測するための方法であって、該患者からの試料におけるSEQ ID NO: 1～3の任意の一つの配列と少なくとも85%の配列同一性を持つ少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量を測定する工程を含み、該バイオマーカーの発現の量が該患者における癌再発の予後徴候である、方法。

10

[本発明1008]

バイオマーカーがSEQ ID NO: 1～3の任意の一つの配列を含む、本発明1007の方法。

[本発明1009]

SEQ ID NO: 4の配列と少なくとも85%の配列同一性を持つバイオマーカーの発現の量を測定する工程をさらに含む、本発明1001～1008のいずれかの方法。

[本発明1010]

SEQ ID NO: 4の配列を持つバイオマーカーの発現の量を測定する工程をさらに含む、本発明1001～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

試料が組織試料である、本発明1001～1010のいずれかの方法。

20

[本発明1012]

試料が腫瘍試料である、本発明1011の方法。

[本発明1013]

癌が肺癌である、本発明1001～1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

肺癌が肺非小細胞癌である、本発明1013の方法。

[本発明1015]

予後予測が最初の癌治療の後に患者において行われる、本発明1001～1014のいずれかの方法。

[本発明1016]

予後予測が最初の癌治療の前に患者において行われる、本発明1001～1014のいずれかの方法。

30

[本発明1017]

予後予測が最初の癌治療の後、但し、第二の癌治療の前に患者において行われる、本発明1001～1014のいずれかの方法。

[本発明1018]

予後予測が第二の癌治療の後に患者において行われる、本発明1001～1014のいずれかの方法。

[本発明1019]

治療が、手術、放射線療法、および化学療法の一つまたは複数を含む、本発明1015～1018のいずれかの方法。

40

[本発明1020]

バイオマーカーの発現の量の増加が癌再発のない良好な予後を示す、または一つもしくは複数の該バイオマーカーの発現の量の減少が癌再発のない良好な予後を示す、本発明1001～1019のいずれかの方法。

[本発明1021]

バイオマーカーの発現の量の増加が癌再発の不良な予後を示す、または一つもしくは複数の該バイオマーカーの発現の量の減少が癌再発の不良な予後を示す、本発明1001～1019のいずれかの方法。

[本発明1022]

50

試料中のバイオマーカーの発現の量が、該試料から核酸分子を採取することによって、および任意で、該核酸分子を増幅するために定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（qRT-PCR）を用いることによって、測定される、本発明1001～1021のいずれかの方法。

[本発明1023]

少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量を検出するための装置であって、該バイオマーカーの配列またはその相補配列と少なくとも85%の配列同一性を持つ少なくとも一つの一本鎖核酸分子を含み、該バイオマーカーの該配列がSEQ ID NO: 1の配列の少なくとも5つの連続するヌクレオチドを含み、かつ、該一本鎖核酸分子と該バイオマーカーまたはその相補配列の間でそれぞれ特異的なハイブリダイゼーションを可能とする、装置。

[本発明1024]

少なくとも1つの一本鎖核酸分子がSEQ ID NO: 1の配列またはその相補配列の少なくとも5つの連続するヌクレオチドを含む、本発明1023の装置。

[本発明1025]

少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量を検出するための装置であって、該バイオマーカーの配列またはその相補配列と少なくとも85%の配列同一性を持つ少なくとも一つの一本鎖核酸分子を含み、該バイオマーカーの該配列がSEQ ID NO: 2の配列の少なくとも5つの連続するヌクレオチドを含み、かつ該一本鎖核酸分子と該バイオマーカーまたはその相補配列の間でそれぞれ特異的なハイブリダイゼーションを可能とする、装置。

[本発明1026]

少なくとも一つの一本鎖核酸分子がSEQ ID NO: 2の配列またはその相補配列の少なくとも5つの連続するヌクレオチドを含む、本発明1025の装置。

[本発明1027]

少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量を検出するための装置であって、該バイオマーカーの配列またはその相補配列と少なくとも85%の配列同一性を持つ少なくとも一つの一本鎖核酸分子を含み、該バイオマーカーの該配列がSEQ ID NO: 3の配列の少なくとも5つの連続するヌクレオチドを含み、かつ該一本鎖核酸分子と該バイオマーカーまたはその相補配列の間でそれぞれ特異的なハイブリダイゼーションを可能とする、装置。

[本発明1028]

少なくとも一つの一本鎖核酸分子がSEQ ID NO: 3の配列またはその相補配列の少なくとも5つの連続するヌクレオチドを含む、本発明1027の装置。

[本発明1029]

少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量を検出するための装置であって、該バイオマーカーの配列またはその相補配列と少なくとも85%の配列同一性を持つ少なくとも一つの一本鎖核酸分子を含み、該バイオマーカーの該配列がSEQ ID NO: 1～3の任意の一つの配列の少なくとも5つの連続するヌクレオチドを含み、かつ該一本鎖核酸分子と該バイオマーカーまたはその相補配列の間でそれぞれ特異的なハイブリダイゼーションを可能とする、装置。

[本発明1030]

少なくとも1つの一本鎖核酸分子がSEQ ID NO: 1～3の任意の一つの配列またはその相補配列の少なくとも5つの連続するヌクレオチドを含む、本発明1027の装置。

[本発明1031]

バイオマーカーの配列またはその相補配列と少なくとも85%の配列同一性を持つ少なくとも一つの一本鎖核酸分子をさらに含み、該バイオマーカーの該配列がSEQ ID NO: 4の配列の少なくとも5つの連続するヌクレオチドを含み、かつ該一本鎖核酸分子と該バイオマーカーまたはその相補配列の間でそれぞれ特異的なハイブリダイゼーションを可能とする、本発明1023～1030のいずれかの装置。

[本発明1032]

少なくとも一つの一本鎖核酸分子がSEQ ID NO: 4の配列またはその相補配列の少なくとも5つの連続するヌクレオチドを含む、本発明1031の装置。

[本発明1033]

10

20

30

40

50

少なくとも一つの一本鎖核酸分子が10～100ヌクレオチドの範囲の長さを持つ、本発明1023～1032のいずれかの装置。

[本発明1034]

ハイブリダイゼーションが起こることを可能とする条件下において、試料から調製された核酸分子の様々な集団と接触する場合に、少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量の測定を可能とする、本発明1023～1033のいずれかの装置。

[本発明1035]

マイクロアレイ装置である、本発明1023～1034のいずれかの装置。

[本発明1036]

癌患者における癌再発を予後予測するための方法であって、本発明1023～1035のいずれかの装置を用いて患者試料における少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量を測定する工程を含み、該バイオマーカーの該発現の量が該患者における癌再発の予後徴候である、方法。

[本発明1037]

試料が組織試料である、本発明1036の方法。

[本発明1038]

試料が腫瘍試料である、本発明1037の方法。

[本発明1039]

癌が肺癌である、本発明1036の方法。

[本発明1040]

癌が肺非小細胞癌である、本発明1039の方法。

[本発明1041]

予後予測が最初の癌治療の後に患者において行われる、本発明1036～1040のいずれかの方法。

[本発明1042]

予後予測が最初の癌治療の前に患者において行われる、本発明1036～1040のいずれかの方法。

[本発明1043]

予後予測が最初の癌治療の後、但し、第二の治療の前に患者において行われる、本発明1036～1040のいずれかの方法。

[本発明1044]

予後予測が第二の癌治療の後に患者において行われる、本発明1036～1040のいずれかの方法。

[本発明1045]

治療が、手術、放射線療法、および化学療法の一つまたは複数の任意の組み合わせを含む、本発明1041～1044のいずれかの方法。

[本発明1046]

少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量の増加が癌再発のない良好な予後を示す、または少なくとも一つの該バイオマーカーの発現の量の減少が癌再発のない良好な予後を示す、本発明1036～1045のいずれかの方法。

[本発明1047]

少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量の増加が癌再発の不良な予後を示す、または少なくとも一つの該バイオマーカーの発現の量の減少が癌再発の不良な予後を示す、本発明1036～1045のいずれかの方法。

[本発明1048]

患者からの試料から核酸分子を採取するための試薬、増幅した試料を産生するために該試料から採取した該核酸分子を増幅するための試薬、および増幅した該試料におけるSEQ ID NOs: 1～4の任意の一つの配列を持つ少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量を検出するための少なくとも一つの装置を含む、キット。

[本発明1049]

10

20

30

40

50

増幅した試料を産生するために定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（qRT-PCR）が用いられる、本発明1048のキット。

[本発明1050]

少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量に基づいて癌患者における癌再発を予後予測するための取扱説明書をさらに含む、本発明1048～1049のいずれかのキット。

[本発明1051]

装置が本発明1023～1047のいずれかの装置である、本発明1048～1050のいずれかのキット。

[本発明1052]

試料から採取された核酸分子を装置に適用するための取扱説明書、および／またはバイオマーカーもしくはその相補配列に対する該少なくとも一つの一本鎖核酸分子のハイブリダイゼーションを検出することによって少なくとも一つの該バイオマーカーの発現の量を測定するための取扱説明書をさらに含む、本発明1051のキット。

[本発明1053]

前記装置を用いて検出される少なくとも一つのバイオマーカーの発現の量に基づいて癌患者における癌再発を予後予測するための取扱説明書をさらに含む、本発明1052のキット。

。

本発明のその他の特徴および利点は、以下の詳細な説明、図面および特許請求の範囲から明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】60マイクロRNAモデルを用いてリーブ-ワン-アウト（leave-one-out）交差確認法で予見された78名の肺非小細胞癌（NSCLC）患者における再発のKaplan-Meierプロットを示すグラフである。

【図2】4マイクロRNAモデルを用いて独立検証法で予見された30名のNSCLC患者における全体生存率のKaplan-Meierプロットを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0034】

詳細な説明

本発明は、癌治療（例えば、手術および／または一つもしくは複数、好ましくは二つもしくはそれよりも多い化学療法剤および／または放射線を用いた治療）の前または後の癌患者における癌再発を予後予測するための患者試料からの一つまたは複数のバイオマーカーの発現量を測定するための方法の特徴とする。本発明は、患者試料からの一つまたは複数のバイオマーカーの発現を検出することができる核酸プローブを含む装置（例えば、マイクロアレイ）も特徴とする。装置は、治療の前または後に患者における癌が再発するかどうかを予後予測するために用いることができる。本発明は、癌患者における癌再発を予後予測するための患者試料からの一つまたは複数のバイオマーカーの発現の量を測定するためのキットも特徴とする。本発明による方法は、マイクロアレイのような検出装置と連結して遺伝子発現を測定するための道具で動作するソフトウェアを用いて実行することができる。本発明の方法を実行するために、対象からの腫瘍試料を加工するためのキットに含まれる検出装置（例えば、DNAマイクロアレイのようなマイクロアレイ）、および装置を判定して結果を対象における予後予測に合わせるための道具が用いられ得る。

【0035】

癌

本発明の方法、装置およびキットは、癌、例えば、乳房、前立腺、肺（例えば、肺非小細胞癌）、気管支、結腸、直腸、膀胱、皮膚、腎、膵臓、口腔、咽頭、卵巣、甲状腺、上皮小体、胃、脳、食道、肝臓、肝内胆管、頸部喉頭、心臓、精巣、小腸、大腸、肛門、肛門管、肛門結腸、外陰、胆嚢、胸膜、骨、関節、下咽頭、眼球および／または眼窩、鼻、鼻腔、中耳、鼻咽頭、尿管、腹膜、網、腸間膜、および／または胃腸の癌、ならびに例え

ば、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫、黒色腫、癌腫、基底細胞癌、悪性中皮腫、神経芽腫、多発性骨髄腫、白血病、網膜芽腫、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、ホジキン病、カルチノイド腫瘍、急性の腫瘍および／または軟部組織肉腫（例えば、好ましくは癌が膀胱、乳房、結腸、直腸、子宮、腎、肺、皮膚（例えば、黒色腫）、脾臓、前立腺、血液および／または骨髄（例えば、白血病）、リンパ球（例えば、非ホジキンリンパ腫）、および／または甲状腺の癌である）を含む任意の形態の癌である癌を患っているまたは診断された患者において癌再発を予後予測するために用いることができる。

【0036】

癌治療

本発明の方法、装置およびキットは、最初の治療の前または後に癌患者、例えば、肺癌患者における癌の再発の可能性を調べるために用いることができる。最初の治療は、例えば、手術、放射線療法および／または化学療法の一つまたは複数を含み得る。化学療法は次の物質の一つまたは複数（例えば、2つまたはそれ以上）の投与を含んでよい：ピンクリスチン、シスプラチン、エトポシド、アザグアニン、カルボプラチン、アドリアマイシン、アクリルピシン、ミトキサントロン、ミトキサントロン、マイトマイシン、パクリタキセル、ゲムシタピン、タキソテール、デキサメタゾン、ara-c、メチルプレドニゾン、メトトレキサート、プレオマイシン、メチルGAG、ベリノスタット（belinostat）、カルボプラチン、5-fu（5-フルオロウラシル）、イダルピシン、メルファラン、IL4-PR38、バルプロ酸、オールトランスレチノイン酸（ATRA）、サイトキサン、トポテカン、スベロイルアニリドヒドロキサム酸（SAHA、ポリノスタット）、デブシペプチド（FR901228）、ボルテゾミブ、リユーケラン、フルダラビン、ビンブラスチン、ブスルファン、ダカルバジン、オキサリプラチン、ヒドロキシ尿素、テガフル、ダウノルピシン、エストラムスチン、メクロレタミン、ストレプトゾシン、カルムスチン、ロムスチン、メルカプトプリン、テニポシド、ダクチノマイシン、トレチノイン、イホスファミド、タモキシフェン、イリノテカン、フロクスウリジン、チオグアニン、PSC833、エルロチニブ、ハーセプチン、ペバシズマブ、セレコキシブ、フルベストラント、イレッサ、アナストロゾール、レトロゾール、セツキシマブ、リツキシマブ、放射線、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤、および5-アザ-2'-デオキシシチジン（デシタピン）。

【0037】

本発明の有益な局面は、方法、装置およびキットがhsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307からなる群から選択される一つまたは複数（例えば、2、3または4つ）のバイオマーカーの発現の量を同時にまたは順次、アッセイすることによって、癌のための一つまたは複数の治療（例えば、癌のための2、3、4、5、10、20、30、またはそれよりも多い治療）の前または後に癌患者における癌再発を予後予測するために用いることができることである。これらの各バイオマーカーの発現は患者における癌再発の予後徴候であることが明らかとされている。患者における癌再発を予後予測するために用いることができるその他のバイオマーカーは、以下の表1および2に列記するバイオマーカーの一つまたは複数を含む。

【0038】

本発明の方法、装置およびキットは、一般的な集団においては疾病（例えば、癌）の治療に有効でないと考えられる一つまたは複数の治療に反応性である患者亜集団を特定するために使用することもできる。より一般的には、一つまたは複数の治療で治療された癌患者における癌再発の予後予測は、患者の事前の癌治療に関する知識に関わらず、バイオマーカー発現を用いて行うことができる。本発明の方法は、マイクロアレイと連結して遺伝子発現を測定するための道具で動作するソフトウェアを用いて実行することができる。本発明の装置（例えば、DNAおよび／またはRNAマイクロアレイのようなマイクロアレイ）は対象からの腫瘍試料（例えば、細胞、組織、または腫瘍もしくはその細胞を含む臓器の試料）を加工するためのキットに含まれてよく、本発明の方法を実行するために、装置を判定して結果を対象における予後予測プロフィールに合わせるための道具が用いられてもよ

10

20

30

40

50

い。

【 0 0 3 9 】

本発明のバイオマーカー

本発明は、
hsa-miR-513b (5' UUCACAAGGAGGUGUCAUUUAU3'; SEQ ID NO:1);

hsa-miR-650 (5' AGGAGGCAGCGCUCUCAGGAC3'; SEQ ID NO: 2); hsa-miR-324-3p

(5' ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG3'; SEQ ID NO: 3); および hsa-miR-1307

(ACUCGGCGUGGCGUCGGUCGUG; SEQ ID NO 4)

の任意の一つの配列と少なくとも85% (例えば、85%、90%、95%、97%、99%または100%) の配列同一性を持つバイオマーカーを特徴とする。本発明の方法、装置およびキットにおいて用いることができるさらなるバイオマーカーを以下の表1および2に列記する。これらのさらなるバイオマーカーは、独立して、またはhsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307の任意の一つの配列と85%またはそれよりも高い配列同一性 (例えば、100%配列同一性) を持つバイオマーカーと組み合わせて使用することができる。好ましくは、本発明のバイオマーカーはhsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307の配列を持ち、以下に示すように任意の組み合わせで (同時に、または順次) 用いられ得る。さらに、これらの4つのバイオマーカーの任意の組み合わせは表1および2に列記するバイオマーカーの一つまたは複数と共に (同時に、または順次) 用いることができる。

【 0 0 4 0 】

本方法のバイオマーカーは、上記の癌治療のような癌のための一つまたは複数の治療の前または後に患者における癌 (例えば、肺癌) の再発の可能性を調べるために、以下に示すように方法、装置およびキットにおいて用いられ得る。

【 0 0 4 1 】

本発明のバイオマーカーを用いた癌患者における癌再発を予後予測するための方法

本発明は、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307の任意の一つの配列と少なくとも85% (例えば、85%、90%、95%、97%、99%、または100%) の配列同一性を持つ一つまたは複数 (例えば、1、2、3もしくは4つ) のバイオマーカーの発現の量を測定することによって、癌の一つまたは複数の治療、例えば、手術、放射線療法、および/または化学療法の前または後に癌を伴う患者における癌再発を予後予測するための方法を特徴とする。好ましくは、方法は、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307 (それぞれ、SEQ ID NO: 1~4) の任意の一つの配列を持つ一つのバイオマーカーの発現量を単独または2、3もしくは4つすべてのバイオマーカーの任意の組み合わせで (同時に、または順次) 測定する工程を伴う。好ましくは、方法は癌に関する少なくとも一つの治療の後に患者において実施される。

【 0 0 4 2 】

例えば、本発明の方法は、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー (またはhsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの任意の一つの配列と少なくとも85%、90%、95%、97%、99%または100%の配列同一性を持つバイオマーカー) の対の組み合わせの発現の量を測定する工程を含み得る。特に、バイオマーカーの次の対の組み合わせの発現の量は同時にまたは順次、測定することができる。

- 1) hsa-miR-513b および hsa-miR-650;
- 2) hsa-miR-513b および hsa-miR-324-3p;
- 3) hsa-miR-513b および hsa-miR-1307;
- 4) hsa-miR-650 および hsa-miR-513b;
- 5) hsa-miR-650 および hsa-miR-324-3p;
- 6) hsa-miR-650 および hsa-miR-1307;
- 7) hsa-miR-324-3p および hsa-miR-513b;
- 8) hsa-miR-324-3p および hsa-miR-650;
- 9) hsa-miR-324-3p および hsa-miR-1307;
- 10) hsa-miR-1307 および hsa-miR-513b;
- 11) hsa-miR-1307 および hsa-miR-650; ならびに
- 12) hsa-miR-1307 および hsa-miR-324-3p

【 0 0 4 3 】

本発明の方法は、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、および hsa-miR-1307 のバイオマーカー（または hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、および hsa-miR-1307 のバイオマーカーの任意の一つの配列と少なくとも85%、90%、95%、97%、99%、または100%の配列同一性を持つバイオマーカー）の3つの組み合わせの発現の量を測定する工程も含み得る。特に、バイオマーカーの次の3つの組み合わせの発現の量は同時にまたは順次、測定することができる。

10

20

- 1) hsa-miR-513b, hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p;
- 2) hsa-miR-513b, hsa-miR-650, hsa-miR-1307;
- 3) hsa-miR-513b, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-650;
- 4) hsa-miR-513b, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307;
- 5) hsa-miR-513b, hsa-miR-1307, hsa-miR-650;
- 6) hsa-miR-513b, hsa-miR-1307, hsa-miR-324-3p;
- 7) hsa-miR-650, hsa-miR-513b, hsa-miR-324-3p;
- 8) hsa-miR-650, hsa-miR-513b, hsa-miR-1307; 10
- 9) hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-513;
- 10) hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307;
- 11) hsa-miR-650, hsa-miR-1307, hsa-miR-513b;
- 12) hsa-miR-650, hsa-miR-1307, hsa-miR-324-3p;
- 13) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-513b, hsa-miR-650;
- 14) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-513b, hsa-miR-1307;
- 15) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-650, hsa-miR-513;
- 16) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-650, hsa-miR-1307; 20
- 17) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307, hsa-miR-513b;
- 18) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307, hsa-miR-650;
- 19) hsa-miR-1307, hsa-miR-513b, hsa-miR-650;
- 20) hsa-miR-1307, hsa-miR-513b, hsa-miR-324-3p;
- 21) hsa-miR-1307, hsa-miR-650, hsa-miR-513b;
- 22) hsa-miR-1307, hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p;
- 23) hsa-miR-1307, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-513b; および
- 24) hsa-miR-1307, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-650 30

【 0 0 4 4 】

本発明の方法は、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（またはhsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの任意の一つの配列と少なくとも85%、90%、95%、97%、99%または100%の配列同一性を持つバイオマーカー）の4つの組み合わせの発現の量を測定する工程も含み得る。特に、バイオマーカーの次の4つの組み合わせの発現の量は同時にまたは順次、測定することができる。

- 1) hsa-miR-513b, hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307;
 - 2) hsa-miR-513b, hsa-miR-650, hsa-miR-1307, hsa-miR-324-3p;
 - 3) hsa-miR-513b, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-650, hsa-miR-1307;
 - 4) hsa-miR-513b, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307, hsa-miR-650;
 - 5) hsa-miR-513b, hsa-miR-1307, hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p;
 - 6) hsa-miR-513b, hsa-miR-1307, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-650;
 - 7) hsa-miR-650, hsa-miR-513b, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307;
 - 8) hsa-miR-650, hsa-miR-513b, hsa-miR-1307, hsa-miR-324-3p; 10
 - 9) hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-513b, hsa-miR-1307;
 - 10) hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307, hsa-miR-513b;
 - 11) hsa-miR-650, hsa-miR-1307, hsa-miR-513b, hsa-miR-324-3p;
 - 12) hsa-miR-650, hsa-miR-1307, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-513b;
 - 13) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-513b, hsa-miR-650, hsa-miR-1307;
 - 14) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-513b, hsa-miR-1307, hsa-miR-1307;
 - 15) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-650, hsa-miR-513b, hsa-miR-1307;
 - 16) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-650, hsa-miR-1307, hsa-miR-513b; 20
 - 17) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307, hsa-miR-513b, hsa-miR-650;
 - 18) hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307, hsa-miR-650, hsa-miR-513b;
 - 19) hsa-miR-1307, hsa-miR-513b, hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p;
 - 20) hsa-miR-1307, hsa-miR-513b, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-650;
 - 21) hsa-miR-1307, hsa-miR-650, hsa-miR-513b, hsa-miR-324-3p;
 - 22) hsa-miR-1307, hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-513b;
 - 23) hsa-miR-1307, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-513b, hsa-miR-650; および
 - 24) hsa-miR-1307, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-650m, hsa-miR-513b 30
- 【 0 0 4 5 】

本発明の方法は、試料、例えば、組織試料から核酸試料を採取する工程を含み得る。試料は、好ましくは癌患者からの腫瘍試料である。例えば、試料は肺非小細胞癌を患う患者のような肺癌患者由来であり得る。本発明の方法は、任意で、増幅した溶液を産生するために、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）を用いて核酸分子を増幅する工程を含み得る。本発明の方法は、試料内のバイオマーカーの一つまたは複数の発現の量を測定するために、試料から採取された核酸分子を用いて、または上記の増幅した溶液を用いてサーマルサイクラーにおいてqRT-PCRを実施する工程をさらに含むことができる。qRT-PCRを実施するための手順は、例えば、参照によりそれぞれが本明細書に組み入れられる米国特許第7,101,663号および米国特許出願第2006/0177837号および第2006/0088856号に記載され 40

ている。試料中のhsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307の2つまたはそれよりも多いバイオマーカー（ならびに、任意で、表1および2に列記する一つまたは複数のさらなるバイオマーカー）の発現の量は同一の反応において同時に測定することができる。または、試料中のhsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307の2つまたはそれよりも多いバイオマーカー（ならびに、所望ならば、任意で、表1および2に列記する一つまたは複数のさらなるバイオマーカー）の発現の量は異なる反応において同時に測定することができる。さらに、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307の2つまたはそれよりも多いバイオマーカー（ならびに、所望ならば、表1および2に列記する一つまたは複数のさらなるバイオマーカー）の発現の量は同一または別々の反応において次々に測定することができる。 50

【 0 0 4 6 】

本発明の方法は、試料内のhsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの一つまたは複数（ならびに、所望ならば、表1および2に列記する一つまたは複数のさらなるバイオマーカー）の発現の量に基づいて、例えば、手術、放射線療法、および/または化学療法の一つまたは複数の癌治療の後の癌患者における癌再発を予後予測する工程も含んでよい。

【 0 0 4 7 】

例えば、バイオマーカーの一つまたは複数の発現の量の増加が上記の治療のような一つまたは複数の癌治療の後に再発のない良好な予後を示し得る。または、バイオマーカーの一つまたは複数の発現の量の減少が上記の治療のような一つまたは複数の癌治療の後に再発のない良好な予後を示し得る。さらに、バイオマーカーの一つまたは複数の発現の量の増加が一つまたは複数の癌治療の後に癌再発の不良な予後を示し得る。または、バイオマーカーの一つまたは複数の発現の量の減少が一つまたは複数の癌治療の後に癌再発の不良な予後を示し得る。または、任意のバイオマーカーの発現単独の検出が癌治療の後の癌患者における癌の再発の予後予測の指標であり得る。

【 0 0 4 8 】

良好な予後とは患者が最初の癌治療の後に少なくとも5年間（例えば、4、5、6、7、8、10もしくは12年、またはそれ以上）生存するケースを指し、不良な予後は患者が最初の癌治療の後に少なくとも5年間生存する可能性がないことを指す。図1および2に示す通り、時間を通じての生存性の比較にはKaplan-Meierの曲線を用いることができる。

【 0 0 4 9 】

癌再発の予後予測のための方法において、バイオマーカーの一つまたは複数の発現量は正常な細胞におけるそれを基準として、または治療の最初のコースを受けた患者からの癌細胞を基準として測定することができる。

【 0 0 5 0 】

本発明のバイオマーカーを用いた癌の予後予測のための装置および方法

本発明は、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの一つまたは複数の配列の少なくとも5つ（例えば、5、6、7、8、10、12、15、20、または22；好ましくは22）の連続したヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）と同一または相補性である配列を持つ一つまたは複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む装置を特徴とする。装置のオリゴヌクレオチドプローブは、少なくとも約5つ（例えば、5、6、7、8、10、12、15、20、または22；好ましくは22）の連続したヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を超える、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1~4）の任意の一つの配列またはそれらの相補型と少なくとも85%（例えば、85%、90%、95%、97%、99%、または100%）の配列同一性を持つ配列も含み得る。例えば、装置は、患者からの組織試料におけるhsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307バイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1~4）の任意の一つまたは複数（例えば、任意の組み合わせ）の存在または発現の量を検出するために用いることができるオリゴヌクレオチドプローブを含んでよい。

【 0 0 5 1 】

好ましくは、本発明の装置は、少なくとも約22の連続したヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を超える、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1~4）の任意の一つまたは複数の配列またはそれらの相補型と少なくとも85%の配列同一性を持つ配列を持つオリゴヌクレオチドプローブを含む。より好ましくは、装置はhsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの任意の一つもしくは複数の配列、またはそれらの相型列に対して少なくとも100%の配列同一性を持つオリゴヌクレオチドプローブを含む。装置はバイオマーカーの一つのみの存在または発現の量を検出するために用いることができるプローブを含んでもよく、またはバイオマーカーの2、3または4つの組み合わせ

の存在または発現の量を検出するために用いることができるプローブを含んでもよい。

【 0 0 5 2 】

例えば、装置は、少なくとも約5（例えば、5、6、7、8、10、12、15、20または22；好ましくは22）の連続したヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を超える、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1～4）の任意の一つの配列またはその相補型と少なくとも85%、90%、95%、97%、99%、または100%の配列同一性を持つオリゴヌクレオチドプローブの以下の対の組み合わせを含むことができる。

- 1) hsa-miR-513b および hsa-miR-650;
- 2) hsa-miR-513b および hsa-miR-324-3p;
- 3) hsa-miR-513b および hsa-miR-1307;
- 4) hsa-miR-650 および hsa-miR-324-3p;
- 5) hsa-miR-650 および hsa-miR-1307;
- 6) hsa-miR-324-3p および hsa-miR-1307

10

【 0 0 5 3 】

好ましくは、装置は、少なくとも約22の連続したヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を超える、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1～4）の任意の一つの配列またはそれらの相補型と少なくとも85%の配列同一性を持つ配列を持つオリゴヌクレオチドプローブの対の組み合わせを含む。より好ましくは、装置は、少なくとも約22の連続したヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を超える、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1～4）の任意の一つの配列またはそれらの相補型と少なくとも100%の配列同一性を持つ配列を持つオリゴヌクレオチドプローブの対の組み合わせを含む。

20

【 0 0 5 4 】

装置は、少なくとも約5（例えば、5、6、7、8、10、12、15、20または22）の連続したヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を超える、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307バイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1～4）の任意の一つの配列またはその相補型と少なくとも85%、90%、95%、97%、99%、または100%の配列同一性を持つオリゴヌクレオチドプローブの以下の3つの組み合わせも含むことができる。

30

- 1) hsa-miR-513b, hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p;
- 2) hsa-miR-513b, hsa-miR-650, hsa-miR-1307;
- 3) hsa-miR-513b, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307; および
- 4) hsa-miR-650, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-1307

【 0 0 5 5 】

好ましくは、装置は、少なくとも約22の連続したヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を超える、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1～4）の任意の一つの配列またはそれらの相補型と少なくとも85%の配列同一性を持つ配列を持つオリゴヌクレオチドプローブの3つの組み合わせを含む。より好ましくは、装置は、少なくとも約22の連続したヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を超える、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1～4）の任意の一つの配列またはそれらの相補型と少なくとも100%の配列同一性を持つ配列を持つオリゴヌクレオチドプローブの3つの組み合わせを含む。

40

【 0 0 5 6 】

装置は、少なくとも約5（例えば、5、6、7、8、10、12、15、20または22）の連続した

50

ヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を超える、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307バイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1~4）の各々の配列またはそれらの相補型と少なくとも85%、90%、95%、97%、99%、または100%の配列同一性を持つオリゴヌクレオチドプローブも含むことができる。好ましくは、装置は、少なくとも約22の連続したヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を超える、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1~4）の各々の配列またはそれらの相補型と少なくとも85%の配列同一性を持つ配列を持つオリゴヌクレオチドプローブを含む。より好ましくは、装置は、少なくとも約22の連続したヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）を超える、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカー（それぞれ、SEQ ID NO: 1~4）の各々の配列またはそれらの相補型と少なくとも100%の配列同一性を持つ配列を持つオリゴヌクレオチドプローブを含む。

10

【0057】

上記の装置のオリゴヌクレオチドプローブは、例えば5~20、25、5~50、5~100、25~100、50~100または100ヌクレオチドを超える長さを持ち得る。オリゴヌクレオチドプローブはデオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）であり得る。

【0058】

本発明は、癌治療の後の癌の再発を予後予測するための患者試料におけるhsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307バイオマーカーの一つ、またはhsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307バイオマーカーの2つまたはそれよりも多い任意の組み合わせの発現を検出または発現の量を測定するために、上記の装置を用いる方法も特徴とする。

20

【0059】

一つまたは複数のオリゴヌクレオチドプローブを含む本発明の方法はマイクロアレイ装置であることができる。マイクロアレイ装置は、例えば、RNA（例えば、mRNA）またはマイクロRNAに対応するまたは相補性であるcDNAであり得るオリゴヌクレオチドを含んでよく、またはオリゴヌクレオチドプローブはRNA（例えば、mRNA）またはマイクロRNAの一部にハイブリダイズするcDNA断片であってもよい。例示的なRNAはmiRNAおよびmiRNA前駆体を含む。例示的なマイクロアレイは、複数の結合型核酸のそれぞれへのハイブリダイゼーションが別々に検出可能である基質結合型の多くの核酸を持つ「核酸マイクロアレイ」も含む。

30

【0060】

本発明のマイクロアレイは、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの、例えば、少なくとも5、8、12、20、22、30、40、60、80、100、150、もしくは200の連続するヌクレオチド（またはヌクレオチド類似体）、および/または以下の表1および2に列記するバイオマーカーの一つまたは複数と同一または相補性であるヌクレオチド配列を持つ一つまたは複数のオリゴヌクレオチドプローブを含むことができる。オリゴヌクレオチドプローブは、例えば5~20、5~50、25~50、5~100、25~100、50~100または100ヌクレオチドの長さをを超える範囲の長さを持ち得る。オリゴヌクレオチドプローブはデオキシリボ核酸（DNA）もしくはリボ核酸（RNA）またはLNAのようなそれらの類似体であってもよい。癌治療に対する反応性のバイオマーカーとして用いられるオリゴヌクレオチドプローブ内の連続するヌクレオチド（例えば、5~20、25、5~50、50~100、または100を超える連続するヌクレオチド）は、例えば、以下の表1および2に列記する遺伝子の1番目、10番目、20番目、30番目、40番目、50番目、60番目、70番目、80番目、90番目、100番目、150番目、200番目、500番目、または1000番目のヌクレオチドから、または近くから始まる、本明細書に記載される一つまたは複数の遺伝子内の連続するヌクレオチドとしても出現し得る。

40

【0061】

試料、例えば患者試料から調製される核酸分子の様々な集団が上記の装置に適用される場合、試料中の標的核酸分子は装置のプローブとハイブリダイズする。このハイブリダイ

50

ゼーションは試料（例えば、本明細書に記載される一つまたは複数のバイオマーカー）中の標的核酸分子の検出および／または量の測定を可能として、該標的核酸分子の発現の量の読み取り値を提供する。標的核酸分子は上記のhsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの任意の一つであり得て、いずれも、以下の表1および2に記載されるバイオマーカーの任意の一つまたは複数も含むことができる。上記の装置は、一つまたは複数のこれらのバイオマーカーを同時に（または順次）検出、または発現の量を測定するために用いることができる。任意で、試料から単離される核酸分子は、増幅した試料を産生するために、本発明の装置を用いて検出する前に、例えばPCRを用いて増幅することができる。その後、増幅した試料を本発明の装置に適用することができる。

10

【0062】

本発明の装置は、一つまたは複数の癌治療の前および／または後に癌患者における癌再発を予後予測するために、試料中のhsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの一つまたは複数の発現量を測定するための方法において用いることができる。装置は、複数のバイオマーカー、例えば2、3または4つのバイオマーカーの発現量を同時に（または順次）測定するために、および患者における癌再発の予後予測にこの情報を用いるために、用いることができる。

【0063】

一つの例において、細胞／組織の試料は加工まで液体窒素中で急速凍結される。RNAは、例えば、InvitrogenのTrizol Reagentを用いて製造業者の取扱説明書に従って抽出してもよい。RNAは、例えば、Ambion Inc.のMessageAmpキットを用いて製造業者の取扱説明書に従って増幅することができる。マイクロRNAは、ホルマリン固定してパラフィン包埋した試料から、例えば、RecoverAll (Ambion Inc.)を用いて抽出して、例えば、Genisphere HSR (Genisphere Inc.)を用いて標識することができる。増幅されたRNAは、例えば、Affymetrix IncのHG-U133A GeneChipおよび例えばAffymetrixのGCS3000Dxの適合可能な道具を用いて、製造業者の取扱説明書を用いて定量することができる。マイクロRNAはAffymetrix miRNAバージョン1.0または2.0を用いて定量することができる。

20

【0064】

得られる遺伝子発現測定値は、例えば、実施例1～3に記載されるようにさらに加工することができる。記載される手順はR-Projectから入手可能なRソフトウェアを用いて実行して、Bioconductorから入手可能なパッケージで補うことができる。

30

【0065】

肺癌の予後予測においては、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの任意の一つが正確な予想を与えるために十分である場合がある。好ましくは、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの二つまたはそれよりも多くが用いられる。さらに、より正確な予見を提供するために、表1および2に列記するもののような、3ないし50のmRNAまたはマイクロRNAのバイオマーカーを用いることができる。相対的に少ない数のバイオマーカーが要求される場合は、試料中に発現するバイオマーカーの量をより高い精度で測定するために、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（qRT-PCR）のような手順を実施してよい。これは、上記の装置の使用の代わるものまたは補うものを提供する。例えば、qRT-PCRは単独で、または本明細書に記載されるマイクロアレイと組み合わせて実施することができる。

40

【0066】

癌患者における癌治療の後の癌再発を予後予測するためのキット

本発明は、一つまたは複数の癌治療の後に癌患者（例えば、肺癌患者）における癌再発を予測するためのキットも特徴とする。キットは患者からの試料から核酸分子を採取するための試薬を含み得る。例えば、キットは患者試料の溶解ならびに／または患者試料からRNAを単離および精製するための試薬を含み得る。キットは、患者試料から単離された核酸分子を、例えば、PCRによって増幅するための試薬をさらに含み得る。キットは、当技術分野において公知のアッセイ、例えば、qRT-PCRを用いて、hsa-miR-650、hsa-miR-324-

50

3p、hsa-miR-513b、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの任意の一つの配列、またはそれらの相補型と少なくとも85%（例えば、85%、90%、95%、97%、99%、または100%）の配列同一性を持つ一つまたは複数のバイオマーカーの発現の量を測定するための試薬を含み得る。キットは、上記のバイオマーカーの発現量を測定するためにqRT-PCRを実施するためのプライマーおよびプローブを含み得る。キットは、キットを用いて測定される一つまたは複数のバイオマーカーの発現の量に基づいて、癌再発を予後予測する取扱説明書を含んでよい。

【0067】

キットは、装置上のプローブが試料中の標的バイオマーカーとハイブリダイズして、試料中の一つまたは複数のバイオマーカー（例えば、hsa-miR-513b、hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、およびhsa-miR-1307のバイオマーカーの一つまたは複数）の発現の量の読み取り値を提供することができるように、患者からの核酸試料または増幅された溶液が適用され得る上記の装置の任意の一つをさらに含み得る。装置は試料中のバイオマーカーの一つまたは複数の発現の量の同時（または順次）の測定を可能とする。キット内の装置はマイクロアレイ装置であり得る。キットは、上記の装置を用いて測定される一つまたは複数のバイオマーカーの発現の量に基づいて、例えば、良好な予後または不良な予後の、癌患者における癌再発を予後予測するための取扱説明書をさらに含むことができる。加えて、キットの装置は、一つまたは複数のバイオマーカーの発現の量を測定するためにqRT-PCRをベースとするアッセイと組み合わせて用いることができる。さらに、キットはバイオマーカーの発現量に基づいて癌再発を予後予測するためのソフトウェアプログラムを含んでよい。

【0068】

一つの例において、キットは、腫瘍からのRNA抽出のための試薬（例えば、Invitrogen IncからのTrizol）、RNA増幅のための試薬（例えば、Ambion IncからのMessageAmp）、遺伝子発現を調べるためのマイクロアレイ（例えば、Affymetrix IncからのHG-U133A GeneChip）、マイクロアレイハイブリダイゼーションのステーションおよびスキャナー（例えば、Affymetrix IncからのGeneChip System 3000Dx）、および本明細書に記載されるようなバイオマーカーの発現量を分析するためのソフトウェア（例えば、R-ProjectからのRまたはInsightful Corp.からのS-Plusにおいて実行される）を含み得る。

【実施例】

【0069】

実施例1：肺癌の予後予測に有用なマイクロRNA

病理学的ステージ1のNSCLCを伴う79名の患者からのホルマリン固定してパラフィン包埋した（FFPE）組織標本を分析のために使用した。臨床データはRoswell Park Cancer Instituteの腫瘍レジストリから収集して、カルテの点検により検証した。組織を脱パラフィン処理して、miRNAを抽出した。抽出したRNAの品質管理評価の後、miRBaseバージョン11においてすべてのmiRのプローブを含むロックされた核酸（LNA）をベースとするアレイプラットフォーム（Exiqon Inc.）へのハイブリダイゼーションを実施した。アレイからのデータはバックグラウンド補正して、Loess正規化を行った。リープ-ワン-アウト交差確認法において、再発を伴う患者と伴わない患者の間で差次的に発現するmiRNAを、偽陽性比率を0.1%として多重検定補正を用いてt検定で選択した。得られるmiRNAを主成分分析に供して、5つのもっとも重要な成分が分類アルゴリズムであるK最近傍（K nearest neighbor）法、最近傍重心（nearest centroid）法、ニューラルネットワーク法およびサポートベクトルマシン法を用いて多変量分類子をトレーニングする（train）ために用いられた。残される一つの試料は、良好または不良な予後への分類アルゴリズム間の多数決により予見された。良好または不良な予後予測群毎に再発までの時間に関してKaplan-Meierのプロットを作製した。2群間の差の統計学的有意性に関する対数順位検定を実施した。

【0070】

結果 - 79検体の試料の内、78検体の試料がハイブリダイゼーションのための品質管理条件を通過した。上記に詳述する通り実施されたデータ分析より、78検体のすべての分類子

のために60のマイクロRNAが選択された。60のマイクロRNAを、78検体の全試料の解析において統計学的に有意（FDR = 1%）であり、P値およびlog2倍率変化が算出される157のすべてのマイクロRNAと共に表1に示す。60遺伝子モデルにより、統計学的に意味のある方法で帰結が予見された（図1）。

【 0 0 7 1 】

実施例2：肺癌の予後予測に有用なマイクロRNA

実施例1に示す通り、肺癌の試料の分類を得るためには2または3の少ないマイクロRNAを使用することが可能である。2または3のマイクロRNAがhsa-miR-141 hsa-miR-22 hsa-miR-200b^{*} hsa-miR-630 hsa-miR-27a hsa-miR-510 hsa-miR-30c-1^{*}のリストから選択されるならば、図1に示されるものと同様の分類成績を得ることができる。再発または非再発を予見するために、カットオフ 0の第一の主成分を単独で用いることができる。表1から選択される2または3のマイクロRNAの発現に基づくその他の分類法も同様に用いることができる。

10

【 0 0 7 2 】

実施例3：マイクロRNAと相補性のDNAプローブを用いたAffymetrixアレイの使用

実施例1および2は、良好および不良な予後を持つ患者間を識別するために用いることができるマイクロRNAを特定するためにExiqonからのロックされた核酸プラットフォームの使用を伴う。AffymetrixのようにDNAをベースとするプラットフォームは異なる物理的および化学的特性を持ち、同一の目的のために最適なマイクロRNAの異なるリストが得られる。実施例1で用いられた同一のFFPE試料をAffymetrix GeneChip（登録商標）miRNA 1.0アレイで分析した。正規化は、各試料について一定の全RNAを用いて実施した。www.bioconductor.orgのライブラリe1071からのサポートベクトルマシーンsvmおよび既定のパラメータを、予測子をトレーニングするために用いた。交差検証実験において、Affyプラットフォームにおける次の3つのマイクロRNAプローブが良好な予後の患者からの不良な予後の選別に極めて優れていた：hsa-miR-650、hsa-miR-324-3p、hsa-miR-513b。これらの内、hsa-miR-513bは予後予測にもっとも貢献し、続いてhsa-miR-650であり、もっとも重要度の低いhsa-miR-324-3pが続く。4番目のmiRが望ましい場合、いくつかのデータセットではhsa-miR-1307を用いることができ成績が向上する場合がある。

20

【 0 0 7 3 】

実施例4：実施例3からの4-マイクロRNAの独立した検証

30

実施例3からの3-マイクロRNAプロフィールは、ステージIaの31名のNSCLC患者のコホートにおいて独立して確認された（図2）。このコホートは実施例3のコホートと同じ方法で正規化された。実施例3のコホートについてトレーニングされたサポートベクトルマシーンを用いて、患者は良好な予後または不良な予後のいずれかを予見された。図2のKaplan-Meierの曲線は2つの予後群における全体の生存性を示す。良好および不良な予後の群の間で生存性に統計学的に有意な差がある（対数順位検定においてP = 0.0001）。

【 0 0 7 4 】

（表1）miRCURY LNAアレイ（v. 10.0、Exiqon）においてmiRNAに照会されるプローブIDのリスト。60-遺伝子は、リーブ-ワン-アウト交差検証においてすべての分類子に関してmiRNAが選択されたか否かを示す。「真」の評価はそのmiRNAがより信頼できて重要であることを意味する。

40

ID	名称	log2 (FC)	P值	60-遺伝子	
17327	hsa-miR-630	-0.421	2.74e-09	真	
17859	hsa-miR-200b*	-0.438	8.78e-09	真	
42834	hsa-miR-219-2-3p	-0.606	1.11e-07	偽	
42682	hsa-miR-25	0.979	1.47e-07	偽	
42957	hsa-miR-323-3p	-0.536	2.99e-07	偽	
42702	hsa-miR-30c-1*	-0.426	3.22e-07	真	
42593	hsa-miR-623	-0.551	3.23e-07	真	
5250	hsa-miR-105	1.14	3.75e-07	偽	10
42524	hsa-miR-21*	0.77	1.46e-06	偽	
17752	hsa-let-7f	1.13	1.5e-06	偽	
10986	hsa-miR-193a-3p	1.1	2.03e-06	偽	
42811	hsa-miR-542-5p	-0.539	2.45e-06	真	
33596	hsa-miR-126*	1.17	2.48e-06	偽	
19593	hsa-miR-27a	1.28	2.51e-06	真	
27720	hsa-miR-15a	1.23	2.82e-06	偽	
30687	hsa-miR-93	1.14	2.85e-06	偽	
11065	hsa-miR-335	1.17	3.29e-06	偽	20
11142	hsa-miR-510	-0.325	3.36e-06	真	
42458	hcmv-miR-US25-1*	-0.51	3.59e-06	真	
14302	hsa-miR-374b	1.01	4.21e-06	偽	
27537	ebv-miR-BART13	-0.432	4.5e-06	真	
13132	hsa-miR-519e*	-0.325	5.12e-06	真	
27378	hsa-miR-374a	1.23	5.17e-06	偽	
10985	hsa-miR-191	1.16	5.35e-06	真	
10995	hsa-miR-199a-3p/				
	hsa-miR-199b-3p	1.26	5.37e-06	偽	30
10138	hsa-miR-130a	1.13	5.92e-06	偽	
11078	hsa-miR-365	0.661	6.44e-06	偽	
27551	hsa-miR-612	-0.325	6.58e-06	真	
13143	hsa-miR-301a	1.11	7.03e-06	偽	
17552	hsa-miR-617	-0.433	7.07e-06	真	
11022	hsa-miR-221	0.931	8.4e-06	偽	

17836	hsa-miR-30b*	-0.392	8.52e-06	真	
10972	hsa-miR-181b	0.596	9.57e-06	偽	
42513	hsa-miR-300	-0.339	1.16e-05	真	
42533	hiv1-miR-H1	-0.408	1.16e-05	偽	
29562	hsa-miR-199a-5p	1.22	1.18e-05	真	
27541	hcmv-miR-UL70-3p	-0.517	1.18e-05	偽	
13175	hsa-miR-27b	1.26	1.2e-05	真	
42838	miRPlus_42838	-0.387	1.28e-05	真	
10998	hsa-miR-19b	1.34	1.42e-05	偽	10
10967	hsa-miR-16	1.35	1.62e-05	真	
11020	hsa-miR-22	1.03	1.74e-05	真	
10306	hsa-miR-146b-5p	1.02	1.75e-05	偽	
42467	hsa-miR-129-5p	-0.485	1.88e-05	真	
42843	hsa-miR-654-5p	-0.411	2.11e-05	真	
42865	hsa-miR-181a	0.795	2.11e-05	真	
4610	hsa-miR-126	1.08	2.11e-05	真	
4700	hsa-miR-140-5p	0.923	2.17e-05	偽	
11023	hsa-miR-222	0.881	2.21e-05	真	20
19011	hsa_SNORD10	0.903	2.22e-05	真	
17541	ebv-miR-BART1-5p	-0.268	2.84e-05	偽	
5740	hsa-miR-21	1.5	2.91e-05	真	
19015	hsa-miR-142-5p	1.14	3.03e-05	偽	
11182	hsa-miR-98	0.837	3.12e-05	偽	
11151	hsa-miR-516b	-0.265	3.17e-05	真	
17608	hsa-miR-425	0.753	3.35e-05	偽	
17460	hsa-miR-657	-0.359	3.48e-05	真	
19580	hsa-let-7i	1.03	3.63e-05	真	30
10997	hsa-miR-19a	1.35	3.67e-05	偽	
28191	hsa-miR-30e	1.13	3.71e-05	偽	
11104	hsa-miR-422a	0.423	3.78e-05	偽	
42717	hsa-miR-92b*	-0.447	3.94e-05	真	
27565	hsa-miR-423-5p	-0.238	4.03e-05	真	
42929	hsa-miR-25*	-0.279	4.33e-05	真	
17445	hsa-miR-610	-0.352	4.94e-05	真	
11279	U6-snRNA-2	0.587	5.54e-05	真	40
42532	hsa-miR-22*	0.455	5.73e-05	偽	
19005	hsa_SNORD118	0.665	5.91e-05	真	
42738	hsa-miR-340*	-0.397	6.04e-05	真	

19602	hsa-let-7g	0.859	6.81e-05	偽	
42831	hsa-miR-28-5p	0.953	7.32e-05	偽	
31026	hsa-miR-101	1.01	7.48e-05	偽	
19591	hsa-miR-199b-5p	1.04	7.51e-05	偽	
42758	hsa-miR-640	-0.389	7.78e-05	真	
29460	hsa-miR-553	-0.249	7.94e-05	偽	
17328	ebv-miR-BART8*	-0.465	7.99e-05	真	
42744	hsa-miR-23a	1.25	8.62e-05	真	
11040	hsa-miR-29b	1.17	8.91e-05	偽	10
42832	hsa-miR-638	-0.381	9.56e-05	真	
42570	hsa-miR-194*	-0.448	9.65e-05	真	
19604	hsa_SNORD4A	0.728	0.000105	真	
42795	kshv-miR-K12-3	-0.326	0.000108	真	
10962	hsa-miR-154	0.719	0.000127	偽	
42902	hsa-miR-185	0.375	0.000129	真	
42754	hsa-miR-586	-0.31	0.000135	真	
42887	hsa-miR-331-3p	0.473	0.000139	真	
17561	ebv-miR-BART6-3p	-0.452	0.00014	真	20
19585	hsa-miR-148b	0.757	0.000146	偽	
17567	kshv-miR-K12-1	-0.206	0.00015	偽	
42650	hsa-miR-17	1.13	0.000153	真	
32884	hsa-miR-342-3p	0.974	0.000162	偽	
17358	ebv-miR-BART16	-0.345	0.000164	真	
19582	hsa-miR-106b	0.96	0.000167	真	
42652	hsa-miR-584	-0.438	0.000178	真	
42802	hsa-miR-150	-0.236	0.000187	真	30
10928	hsa-miR-125a-5p	0.531	0.000189	真	
33430	hsa-miR-548b-3p	-0.307	0.000191	真	
42739	hsa-miR-339-5p	0.533	0.000192	真	
13485	hsa-miR-10a	0.882	0.000195	偽	
13148	hsa-miR-195	0.892	2e-04	偽	
11030	hsa-miR-26a	1.19	0.000203	偽	
42693	hsa-miR-326	-0.414	0.000209	真	
10946	hsa-miR-141	1.08	0.000209	真	
17646	ebv-miR-BHRF1-3	-0.222	0.000211	真	40
42648	hsa-miR-106a	1.16	0.000213	真	
42564	hsa-miR-26b	1.18	0.000237	偽	
10925	hsa-miR-10b	0.781	0.00025	偽	

42700	hsa-miR-631	-0.532	0.000254	偽	
11024	hsa-miR-223	0.727	0.000273	偽	
19581	hsa-miR-100	0.796	0.000273	偽	
17280	hsa-miR-15b	1.06	0.000291	偽	
42442	hsa-miR-498	-0.252	0.000325	偽	
19008	hsa_SNORD2	0.48	0.000357	偽	
27533	hsa-miR-320a	0.543	0.00036	偽	
10919	hsa-miR-103	0.427	0.000361	偽	
42528	hsa-miR-296-3p	-0.335	0.000372	偽	10
42609	hsa-miR-135a*	-0.295	0.000373	偽	
42951	ebv-miR-BHRF1-2	-0.345	0.000398	偽	
17506	hsa-miR-24	1.26	0.000411	偽	
17718	hsa-miR-92b	0.547	0.000425	偽	
29872	hsa-miR-340	0.338	0.000431	偽	
28431	miRPlus_28431	-0.167	0.000436	偽	
11053	hsa-miR-32	0.881	0.000448	偽	
42603	hsa-miR-424*	-0.291	0.00045	偽	
42965	hsa-miR-424	0.629	0.000518	偽	20
42529	hsa-miR-939	-0.229	0.00053	偽	
19606	hsa_SNORD12	0.264	0.000534	偽	
17952	miRPlus_17952	-0.231	0.000534	偽	
42630	hsa-miR-140-3p	0.744	0.00056	偽	
11027	hsa-miR-23b	1.14	0.000573	偽	
42640	hsa-miR-20b	1.01	0.000582	偽	
42649	hsa-miR-20a	0.995	0.000596	偽	
11048	hsa-miR-30a	0.83	0.000605	偽	
42679	hsa-miR-642	-0.29	0.000615	偽	30
42527	hsa-miR-935	-0.447	0.000622	偽	
11134	hsa-miR-502-5p	-0.152	0.000651	偽	
17613	hsa-miR-645	-0.346	0.000655	偽	
42751	hsa-miR-720	0.501	0.000717	偽	
11224	hsa-miR-30e*	0.687	0.000725	偽	
17822	hsa-miR-490-5p	-0.363	0.000729	偽	
42695	hsa-miR-596	-0.36	0.000743	偽	
42486	hsa-miR-149*	-0.238	0.000744	偽	40
10978	hsa-miR-184	-0.21	0.000749	偽	
11041	hsa-miR-29c	0.858	0.000763	偽	
42782	hcmv-miR-UL148D	-0.303	0.00078	偽	

10947	hsa-miR-142-3p	0.962	0.000794	偽	
28302	miRPlus_28302	0.387	0.000857	偽	
42573	hsa-miR-1	0.323	0.000871	偽	
42899	hsa-miR-377*	-0.233	0.000896	偽	
42845	hsa-miR-125b-2*	-0.206	0.00091	偽	
17463	hsa-miR-151-3p	0.597	0.000956	偽	
30787	hsa-miR-125b	0.753	0.000967	偽	
17470	kshv-miR-K12-2	-0.399	0.001	偽	
42812	hsa-miR-508-5p	-0.272	0.00106	偽	10
17493	hsa-miR-622	-0.358	0.0011	偽	
42853	hsa-miR-433	-0.358	0.00116	偽	
11175	hsa-miR-525-5p	-0.188	0.00116	偽	

【 0 0 7 5 】

(表2) 表1に列記される成熟マイクロRNAの配列
hsa-let-7f UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU

hsa-miR-15a	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	
hsa-miR-16	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	20
hsa-miR-17	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	
hsa-miR-19a	UGUGCAAUAUCUAUGCAAACUGA	
hsa-miR-19b	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA	
hsa-miR-20a	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	
hsa-miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	
hsa-miR-22	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	
hsa-miR-23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	
hsa-miR-24	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	30
hsa-miR-25	CAUUGCACUUGUCUCGGUCUGA	
hsa-miR-26a	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	
hsa-miR-26b	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	
hsa-miR-27a	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC	
hsa-miR-28-5p	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	
hsa-miR-30a	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	
hsa-miR-32	UAUUGCACAUAUAAGUUGCA	
hsa-miR-93	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	40
hsa-miR-98	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	
hsa-miR-100	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	

hsa-miR-101 UACAGUACUGUGAUAACUGAA
 hsa-miR-29b UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
 hsa-miR-103 AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
 hsa-miR-105 UCAA AUGCUCAGACUCCUGUGGU
 hsa-miR-106a AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
 hsa-miR-199a-5p CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC
 hsa-miR-129-5p CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC
 hsa-miR-10a UACCCUGUAGA UCCGAAUUUGUG 10
 hsa-miR-10b UACCCUGUAGA ACCGAAUUUGUG
 hsa-miR-181a AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU
 hsa-miR-181b AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU
 hsa-miR-199b-5p CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC
 hsa-miR-221 AGCUACA UUGUCUGCUGGGUUUC
 hsa-miR-222 AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
 hsa-miR-223 UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
 hsa-let-7g UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU 20
 hsa-let-7i UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU
 hsa-miR-1 UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU
 hsa-miR-15b UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA
 hsa-miR-23b AUCACAUUGCCAGGGAUUACC
 hsa-miR-27b UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC
 hsa-miR-125b UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA
 hsa-miR-130a CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU
 hsa-miR-140-5p CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG 30
 hsa-miR-140-3p UACCACAGGGUAGAACCACGG
 hsa-miR-141 UAACACUGUCUGGUAAAGAUGG
 hsa-miR-142-5p CAUAAAGUAGAAAGCACUACU
 hsa-miR-142-3p UGUAGUGUUUCCUACUUAUGGA
 hsa-miR-191 CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG
 hsa-miR-125a-5p UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA
 hsa-miR-126 UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
 hsa-miR-150 UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG 40
 hsa-miR-154 UAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCG
 hsa-miR-184 UGGACGGAGAACUGAUAAGGGU

hsa-miR-185 UGGAGAGAAAGGCAGUUCCUGA
 hsa-miR-193a-3p AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU
 hsa-miR-195 UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC
 hsa-miR-320a AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA
 hsa-miR-106b UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU
 hsa-miR-29c UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
 hsa-miR-219-2-3p AGAAUUGUGGCUGGACAUCUGU
 hsa-miR-301a CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAGC 10
 hsa-miR-296-3p GAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCC
 hsa-miR-30e UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG
 hsa-miR-365 UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU
 hsa-miR-374a UUAUAAUACAACCUGAUAAAGUG
 hsa-miR-340 UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU
 hsa-miR-342-3p UCUCACACAGAAUUCGCACCCGU
 hsa-miR-323-3p CACAUUACACGGUCGACCUCU
 hsa-miR-326 CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG 20
 hsa-miR-151-3p CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG
 hsa-miR-148b UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU
 hsa-miR-331-3p GCCCCUGGGCCUAUCCUAGAA
 hsa-miR-339-5p UCCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG
 hsa-miR-335 UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU
 ebv-miR-BHRF1-2 UAUCUUUUGCGGCAGAAAUUGA
 ebv-miR-BHRF1-3 UAACGGGAAGUGUGUAAGCACA
 ebv-miR-BART1-5p UCUUAGUGGAAGUGACGUGCUGUG 30
 hsa-miR-422a ACUGGACUUAGGGUCAGAAGGC
 hsa-miR-423-5p UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU
 hsa-miR-424 CAGCAGCAAUUCAUGUUUUGAA
 hsa-miR-425 AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA
 hsa-miR-20b CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG
 hcmv-miR-UL148D UCGUCCUCCCCUUCUUCACCG
 hsa-miR-433 AUCAUGAUGGGCUCCUCGGUGU
 kshv-miR-K12-1 AUUACAGGAAACUGGGUGUAAGC 40
 kshv-miR-K12-2 AACUGUAGUCCGGGUCGAUCUG
 kshv-miR-K12-3 UCACAUUCUGAGGACGGCAGCGA

hsa-miR-490-5p	CCAUGGAUCUCCAGGUGGGU	
hsa-miR-146b-5p	UGAGAACUGAAUCCAAGGCU	
hsa-miR-498	UUUCAAGCCAGGGGGCGUUUUUC	
hsa-miR-525-5p	CUCCAGAGGGAUGCACUUUCU	
hsa-miR-516b	AUCUGGAGGUAAGAAGCACUUU	
hsa-miR-502-5p	AUCCUUGCUAUCUGGGUGCUA	
hsa-miR-508-5p	UACUCCAGAGGGCGUCACUCAUG	
hsa-miR-510	UACUCAGGAGAGUGGCAAUCAC	10
hsa-miR-553	AAAACGGUGAGAUUUUGUUUU	
hsa-miR-92b	UAUUGCACUCGUGCCGGCCUCC	
hsa-miR-584	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG	
hsa-miR-586	UAUGCAUUGUAUUUUUAGGUCC	
hsa-miR-548b-3p	CAAGAACCUCAGUUGCUIUUUGU	
hsa-miR-596	AAGCCUGCCCCGGCUCCUCGGG	
hsa-miR-610	UGAGCUAAAUGUGUGCUGGGA	
hsa-miR-612	GCUGGGCAGGGCUUCUGAGCUCCUU	20
hsa-miR-617	AGACUUCCCAUUUGAAGGUGGC	
hsa-miR-622	ACAGUCUGCUGAGGUUGGAGC	
hsa-miR-623	AUCCCUUGCAGGGGCUGUUGGGU	
hsa-miR-630	AGUAUUCUGUACCAGGGAAGGU	
hsa-miR-631	AGACCUGGCCCAGACCUCAGC	
hsa-miR-638	AGGGAUCGCGGGCGGGUGGCGGCCU	
hsa-miR-640	AUGAUCCAGGAACCUGCCUCU	
hsa-miR-642	GUCCCUCUCCAAAUGUGUCUUG	30
hsa-miR-645	UCUAGGCUGGUACUGCUGA	
hsa-miR-654-5p	UGGUGGGCCGCAGAACAUGUGC	
hsa-miR-657	GGCAGGUUCUCACCCUCUCUAGG	
hsa-miR-542-5p	UCGGGGAUCAUCAUGUCACGAGA	
hcmv-miR-UL70-3p	GGGGAUGGGCUGGCGCGCGG	
ebv-miR-BART6-3p	CGGGGAUCGGACUAGCCUUAGA	
ebv-miR-BART13	UGUAACUUGCCAGGGACGGCUGA	
ebv-miR-BART16	UUAGAUAGAGUGGGUGUGUCUCU	40
hsa-miR-300	UAUACAAGGGCAGACUCUCUCU	
hsa-miR-374b	AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG	

hsa-miR-935 CCAGUUACCGCUUCCGCUACCGC
 hsa-miR-939 UGGGGAGCUGAGGCUCUGGGGGUG
 hiv1-miR-H1 CCAGGGAGGCGUGCCUGGGC
 hsa-miR-720 UCUCGCUGGGGCCUCCA
 hsa-miR-21* CAACACCAGUCGAUGGGCUGU
 hsa-miR-22* AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA
 hsa-miR-25* AGGCGGAGACUUGGGCAAUUG
 hsa-miR-200b* CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA
 hsa-miR-30b* CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC
 hsa-miR-135a* UAUAGGGAUUGGAGCCGUGGCG
 hsa-miR-125b-2* UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC
 hsa-miR-126* CAUUAUUACUUUUGGUACGCG
 hsa-miR-149* AGGGAGGGACGGGGGCUGUGC
 hsa-miR-194* CCAGUGGGGCUGCUGUUAUCUG
 hsa-miR-30c-1* CUGGGAGAGGGUUGUUUACUCC
 hsa-miR-30e* CUUUCAGUCGGAUGUUUACAGC
 hsa-miR-377* AGAGGUUGCCCUUGGUGAAUUC
 hsa-miR-340* UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGC
 hsa-miR-424* CAAAACGUGAGGCGCUGCUAU
 hcmv-miR-US25-1* UCCGAACGCUAGGUCGGUUCUC
 hsa-miR-519e* UUCUCCAAAAGGGAGCACUUUC
 hsa-miR-92b* AGGGACGGGACGCGGUGCAGUG
 ebv-miR-BART8* GUCACAAUCUAUGGGGUCGUAGA

10

20

【 0 0 7 6 】

30

その他の態様

表示および説明される本発明の一部の新しい特徴は添付する特許請求の範囲に指摘されているが、関連する技術分野の業者は、いかなる観点においても本発明の精神から逸脱することなく、例証される本発明の形態および詳細ならびにその操作において様々な省略、修正、置き換えおよび変更が行われ得ることを理解するので、本発明は明記される詳細に限定されることを意図されるものではない。「決定的」または「本質的」であるとして特別に記載される場合を除いて、本発明の特徴は決定的または本質的ではない。

【 0 0 7 7 】

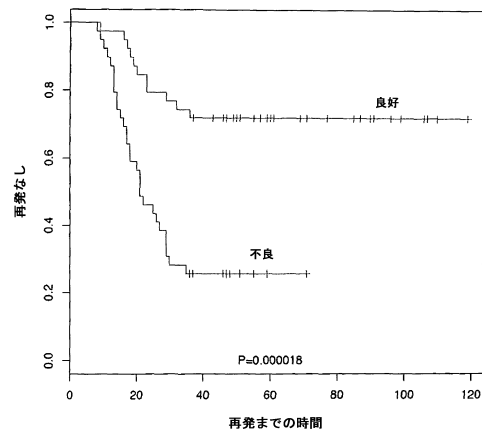
当業者は、ごく定型の実験を用いて、本明細書に記載される本発明の具体的態様に対する多くの同等物を認識し、または確認することができる。このような同等物は本発明の範囲に内包されることが意図される。

40

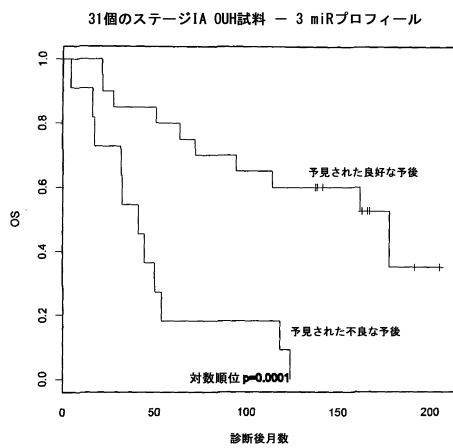
【 0 0 7 8 】

本明細書において言及されるすべての刊行物、特許および特許出願は、各々の独立した刊行物、特許または特許出願が参照により組み入れられることが具体的かつ個別に明記される場合と同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

【図 1】



【図 2】



【配列表】

0006039656000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 クヌーセン スティーン
デンマーク王国 ピアケレズ フーアスーバゲン 6
- (72)発明者 マジン ヴィクトー
デンマーク王国 ホルデ ルーゼ ヴァング 27ビー

審査官 宮岡 真衣

- (56)参考文献 中国特許出願公開第102002490(CN,A)
国際公開第2011/135459(WO,A1)
国際公開第2011/080315(WO,A1)
国際公開第2011/080318(WO,A1)
Carcinogenesis, 30(11)(2009), p.1903-1909

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12Q 1/68
C12N 15/09
CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS
(STN)