(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2009-515553
(P2009-515553A)
(43)公表日　平成21年4月16日(2009.4.16)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q 1/68	A	4B063
G01N 33/53	(2006.01)	G01N 33/53	D	
		G01N 33/53	M	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 38 頁）

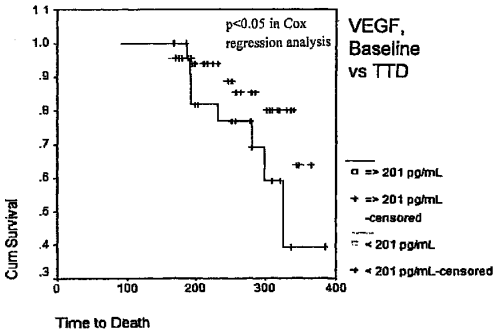
(21)出願番号　特願2008-541268 (P2008-541268)
(86)(22)出願日　平成18年11月14日 (2006.11.14)
(85)翻訳文提出日　平成20年7月14日 (2008.7.14)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/044117
(87)国際公開番号　WO2007/059094
(87)国際公開日　平成19年5月24日 (2007.5.24)
(31)優先権主張番号　60/735,854
(32)優先日　平成17年11月14日 (2005.11.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　506307234
バイエル　ヘルスケア　エルエルシー
ＢＡＹＥＲ　ＨＥＡＬＴＨＣＡＲＥ
アメリカ合衆国　ニューヨーク州　１０５９１－５１０９　タリータウン　ホワイト　プレインズ　ロード　５５５
(74)代理人　100060368
弁理士　赤岡　迪夫
(74)代理人　100124648
弁理士　赤岡　和夫
(72)発明者　ウイルヘルム，スコット
アメリカ合衆国０６４７７、コネチカット、オレンジ、ミッドランドドライブ２５５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】癌の予知および予後と、癌治療のモニタリング

(57)【要約】
本発明は、バイオマーカーおよび癌の予知および予後のためのバイオマーカーの使用、そして癌処置の有効性をモニターするためのバイオマーカーの使用に関する。特に本発明は、ソラフェニルで処置した対象のためのバイオマーカーとして、ＶＥＧＦおよびｓＶＥＧＦＲ－２の使用に関する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
患者標本中のＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２のレベルまたは活性を検出し、そして前記レベルを標準と比較することを含む、ソラフェニブで処置されている癌患者の応答をモニターする方法。
【請求項２】
前記ソラフェニブ処置患者標本および前記対照標本中のｍＲＮＡレベルにおいてＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２を検出することを含む、請求項１の方法。
【請求項３】
前記ソラフェニブ処置患者標本および前記対照標本中のタンパクレベルにおいてＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２を検出することを含む、請求項１の方法。
【請求項４】
前記ｍＲＮＡレベルは、前記患者標本を前記ｍＲＮＡへ特異的に結合する剤と接触させ、そして特異的に結合した剤の量を測定することによって決定される、請求項２の方法。
【請求項５】
前記タンパクレベルは、前記患者標本を前記タンパクに対して特異性の結合剤と接触させ、そして特異的に結合した剤の量を測定することによって決定される、請求項３の方法。
【請求項６】
前記結合剤は少なくとも１種のポリヌクレオチドを含んでいる請求項４の方法。
【請求項７】
前記結合剤は少なくとも１種の抗体を含んでいる請求項５の方法。
【請求項８】
前記患者標本は体液を含む請求項１の方法。
【請求項９】
前記ｍＲＮＡレベルは、ノーザン分析、ＲＴ－ＰＣＲ、またはｃＤＮＡマイクロアレイによって検出される請求項２の方法。
【請求項１０】
前記タンパクレベルは、免疫ブローティング、免疫沈澱、またはＥＬＩＳＡアッセイによって検出される請求項３の方法。
【請求項１１】
前記体液は血液である請求項８の方法。
【請求項１２】
前記癌は一次新生物または転移腫瘍である請求項２の方法。
【請求項１３】
前記癌は、カルシノーマ、リンパ腫、白血病、骨髄腫、肉腫、膠芽腫、星状細胞腫、黒色腫、またはＷｉｌｍｓ腫瘍である請求項２の方法。
【請求項１４】
前記癌は、乳房、呼吸管、脳、再生器官、消化管、尿管、眼、肝臓、皮膚、頭頸部、甲状腺、上皮小体、血液、または筋肉の癌である請求項１２の方法。
【請求項１５】
前記乳房癌は、侵襲的管癌、侵襲的小葉癌、その場の管癌、およびその場の小葉癌である請求項１２の方法。
【請求項１６】
前記呼吸管の癌は、小細胞および非小細胞肺癌、気管支アデノーマ、または胸膜肺芽腫である請求項１２の方法。
【請求項１７】
前記脳の癌は、脳管および松果体神経膠腫、脳星状細胞腫、髄芽腫、上衣細胞腫、または神経外胚葉皮または小果腫である請求項１２の方法。
【請求項１８】

前記再生産器官の癌は、前立腺癌、睾丸癌、子宮内膜、頸管、卵巣、膣、外陰の癌および子宮肉腫である請求項１２の方法。
【請求項１９】
前記消化管の癌は、肛門、結腸、結腸直腸、食道、胆のう、胃、膵臓、直腸、小腸、または唾液腺の癌である請求項１２の方法。
【請求項２０】
前記尿管の癌は、ぼう胱、陰莖、腎臓、腎、骨盤、または尿道の癌である請求項１２の方法。
【請求項２１】
前記眼の癌は、眼内黒色腫または網膜芽腫である請求項１２の方法。
【請求項２２】
前記肝臓の癌は、肝細胞癌、胆管腫、または混合胆汁管腫瘍である請求項１２の方法。
【請求項２３】
前記皮膚の癌は、鱗状細胞腫瘍、カポジ内腫、悪性黒色腫、メルケル細胞皮膚癌、または非黒色腫皮膚癌である請求項１２の方法。
【請求項２４】
前記頭頸部の癌は、咽頭、下咽頭、鼻咽頭、または口咽頭癌、唇癌、または口腔癌である請求項１２の方法。
【請求項２５】
前記血液の癌は、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、ホジキン病、中枢神経系のリンパ腫、急性骨髄白血病、急性リンパ芽白血病、慢性リンパ球白血病、急性骨髄白血病、または毛髪細胞白血病である請求項１２の方法。
【請求項２６】
前記肉腫は、軟組織の肉腫、骨肉腫、悪性線維組織腫、リンパ肉腫、または横紋筋肉腫である請求項１２の方法。
【請求項２７】
（ａ）ソラフェニブによる処置の前に患者から採取した第１の血漿サンプル中のバイオマーカーＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現のレベルを決定し、
（ｂ）ソラフェニブによる初期処置の後で患者から採取した少なくとも第２の血漿サンプル中のバイオマーカーＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現のレベルを決定し、そして
（ｃ）第２のサンプル中のＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルを第１のサンプル中の該バイオマーカーの発現レベルと比較することを含み、
ここで第１のサンプル中のＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルと比較した第２のサンプル中のＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルの変化はソラフェニブによる処置の有効性を指示する、ソラフェニブ投与によって腎細胞癌に対して処置されている患者の応答をモニターする方法。
【請求項２８】
（ａ）患者から採取した生物学的サンプルからＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルを決定し、
（ｂ）ＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルおよびサンプルを、
（ｉ）癌を持っている疑いのない一以上の対象からＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベル　（ｉｉ）癌を持っている疑いのある一以上の対象から採取した同様なサンプル中のレベル、または
（ｉｉｉ）別の時間に該患者から採取した同様なサンプル中のレベル、
の一以上と比較することを含み、
ここでサンプル（ａ）中のＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルと一以上の比較サンプルｉ）－ｉｉｉ）の間の差は、病的状態および／または病的状態の期待される変化に相関している。癌を有する患者の状態を評価する方法。
【請求項２９】

患者状態の評価は、病的状態を診断すること、変化について病的状態をモニターすること、および処置ありまたはなしで病的状態の変化を予後診断することの一以上を含む、請求項２８の方法。

【請求項３０】

生物学的サンプルは、血液、羊膜液、血漿、血清、精液、骨髄、尿、または組織生検から選ばれる請求項２８の方法。

【請求項３１】

生物学的サンプルは血漿である請求項２８の方法。

【請求項３２】

癌は、（ａ）乳房、呼吸管、脳、再生産器官、消化管、尿管、眼、肝臓、皮膚、頭頸部、甲状腺、上皮小体の固形腫瘍またはそれらの異なる転移、（ｂ）リンパ腫、（ｃ）肉腫、または（ｄ）白血病である、請求項２８の方法。

【請求項３３】

前記乳房癌は、侵襲的管癌、侵襲的小葉癌、その場の管癌、およびその場の小葉癌である請求項３２の方法。

【請求項３４】

前記呼吸管の癌は、小細胞および非小細胞肺癌、気管支アデノーマ、または胸膜肺芽腫である請求項３２の方法。

【請求項３５】

前記脳の癌は、脳管および松果体神経膠腫、脳星状細胞腫、髄芽腫、上衣細胞腫、または神経外胚葉皮または小果腫である請求項３２の方法。

【請求項３６】

前記再生産器官の癌は、前立腺癌、睾丸癌、子宮内膜、頸管、卵巣、膣、外陰の癌および子宮肉腫である請求項３２の方法。

【請求項３７】

前記消化管の癌は、肛門、結腸、結腸直腸、食道、胆のう、胃、膵臓、直腸、小腸、または唾液腺の癌である請求項３２の方法。

【請求項３８】

前記尿管の癌は、ぼう胱、陰莖、腎臓、腎、骨盤、または尿道の癌である請求項３２の方法。

【請求項３９】

前記眼の癌は、眼内黒色腫または網膜芽腫である請求項３２の方法。

【請求項４０】

前記肝臓の癌は、肝細胞癌、胆管腫、または混合胆汁管腫瘍である請求項３２の方法。

【請求項４１】

前記皮膚の癌は、鱗状細胞腫瘍、カポジ内腫、悪性黒色腫、メルケル細胞皮膚癌、または非黒色腫皮膚癌である請求項３２の方法。

【請求項４２】

前記頭頸部の癌は、咽頭、下咽頭、鼻咽頭、または口咽頭癌、唇癌、または口腔癌である請求項３２の方法。

【請求項４３】

前記血液の癌は、ＡＩＤＳ関連リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、皮膚Ｔ細胞リンパ腫、ホジキン病、中枢神経系のリンパ腫、急性骨髄白血病、急性リンパ芽白血病、慢性リンパ球白血病、急性骨髄白血病、または毛髪細胞白血病である請求項３２の方法。

【請求項４４】

前記肉腫は、軟組織の肉腫、骨肉腫、悪性線維組織腫、リンパ肉腫、または横紋筋肉腫である請求項３２の方法。

【請求項４５】

前記癌は腎細胞癌である請求項２８の方法。

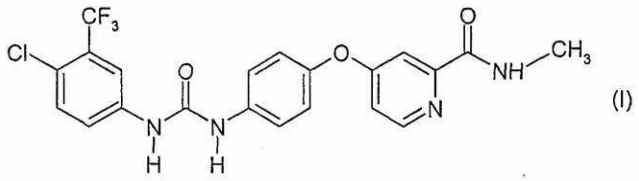
【請求項４６】

患者はソラフェニブで処置されている請求項１の方法。

【請求項４７】

下記式Ｉの化合物、Ｎ－〔４－クロロ－３－（トリフルオロメチル）フェニル〕－Ｎ’－｛４－〔２－カルバモイル－１－オキソ－（４－ピリジルオキシ）〕フェニル尿素｝、またはその薬学的に許容し得る塩、多形、水和物、溶媒和物またはそれらの組合せによって固形腫瘍のために処置されている患者の応答をモニターする方法であって、

【化１】



ａ）患者から採取した生物学的サンプル中のＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルを決定し、

ｂ）式Ｉの化合物、またはその薬学的に許容し得る塩、多形、水和物、溶媒和物またはそれらの組合せによる初期処置の後患者から採取した少なくとも第２の生物学的流体サンプル中のＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルを決定し、そして

ｃ）第２のサンプル中のＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルを、第１のサンプル中のＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルと比較することを含み、

ここで第１のサンプル中のＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルと比較した、第２のサンプル中のＶＥＧＦおよび／またはｓＶＥＧＦＲ－２の発現レベルの変化は、式Ｉの化合物、またはその薬学的に許容し得る塩、多形、水和物、溶媒和物、またはそれらの組合せによる処置の有効性を指示する、モニタリング方法。

【請求項４８】

生物学的サンプルは、血液、羊膜液、血漿、血清、精液、尿、骨髄、または組織生検である請求項４７の方法。

【請求項４９】

生物学的サンプルは血漿である請求項４７の方法。

【請求項５０】

癌は腎細胞癌である請求項４７の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、バイオマーカーおよび癌の予知および予後のための該バイオマーカーの使用と、そして癌療法の有効性をモニタするための該バイオマーカーの使用に関する。特に、本発明は、ソラフェニブによる治療の有効性のためのバイオマーカーとして可溶性ＶＥＧＦ（“ＶＥＧＦ”）および可溶性ＶＥＧＦレセプターの使用に関する。

【背景技術】

【０００２】

多数の病的状態は、遺伝子ＤＮＡのコピー数の変化、または特定の遺伝子の転写レベルを通じて（例えば開始のコントロール、ＲＮＡ前駆体の供給、ＲＮＡ処理などを通じて）種々の遺伝子の発現レベルの相違によって特徴化される。例えば、遺伝子材料の損失および獲得は悪性腫瘍転換および伝播において重要な役割を果す。これらの損失および獲得は少なくとも２種類の遺伝子、癌遺伝子および腫瘍抑制遺伝子によって駆動されると考えられる。癌遺伝子は腫瘍生成の正の調節剤であり、腫瘍抑制遺伝子は腫瘍の生成負の調節剤である（Ｍａｒｓｈａｌｌ，Ｃｅｌｌ　６４：３１３－３２６，１９９１；Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５４：１１３８－１１４６，１９９１）。それ故、無調節の生

育を活性化する１メカニズムは癌遺伝子タンパクをコードする遺伝子の数が増加することであり、またはこれら癌遺伝子の発現のレベルが増加すること（例えば、細胞または環境変化に応答して）であり、他のメカニズムは遺伝子材料が失われるか、または腫瘍抑制剤をコードする遺伝子の発現レベルが減少することである。このモデルは神経膠腫進行に関連する遺伝子材料の損失および獲得によって支持される（Ｍｉｋｋｅｌｓｏｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｂｉｏｃｈｅｍ．４６：３－８，１９９１）。このように特定の遺伝子（例えば癌遺伝子または腫瘍抑制剤）の発現（転写）レベルの変化は種々の癌の存在および進行のための信号標柱として役立つ。

【発明の開示】

【０００３】

本発明は、バイオマーカーおよび癌の予知および予後のための該バイオマーカーの使用と、そして癌療法の有効性をモニタするための該バイオマーカーの使用に関する。特に本発明は、ソラフェニブ治療の有効性のためのバイオマーカーとして、ｓＶＥＧＦＲ，もっと好ましくはｓＶＥＧＦＲ－２（可溶性ＶＥＧＦＲ－２）の使用に関する。後出の実施例にさらに詳細に記載するように、ソラフェニブで処置した対象においてはｓＶＥＧＦＲ－２が減少し、ＶＥＧＦレベルが増大することが発見された。このためこれらマーカーはソラフェニブ処置の有効性を決定するために使用することができる。

【０００４】

加えて、癌の予知、診断、予後および治療のための方法および試薬を提供することが本発明の目的である。

【０００５】

本発明の他の具体例は、組織または細胞サンプルに対する薬物の効果をスクリーニングするための方法であって、１以上の遺伝子および／または遺伝子産物の発現レベルを分析するステップを含み、ここで組織または細胞サンプル中の遺伝子発現および／または遺伝子産物レベルは該薬物への曝露前および後に分析され、そして遺伝子および／遺伝子産物の発現レベルの変動は薬物効果の指標であるか、または患者診断を提供するかまたは該処置に対応する患者の応答を予知させる、前記方法に関する。さらなる具体例において、薬物はソラフェニブである。他の具体例において、遺伝子または遺伝子産物はＶＥＧＦおよびＶＥＧＦＲであり、もっと好ましくはＶＥＧＦＲ－２およびそれらの可溶性形（例えば裂断したＶＥＧＦＲ２の検出）である。

【０００６】

本発明の他の局面は、１以上の遺伝子および／または遺伝子産物の発現レベルを分析するステップを含む新規薬物を発見する方法であり、ここで遺伝子発現および／または遺伝子産物レベルは薬物へ曝露する前および後で分析され、そして遺伝子および／または遺伝子産物の発現レベルは薬物有効性の指標である。さらなる面において、遺伝子および／または遺伝子産物はＶＥＧＦおよびＶＥＧＦＲ、もっと好ましくはＶＥＧＦＲ－２およびその可溶形（例えば裂断したＶＥＧＦＲ２の検出）である。

【０００７】

本発明はさらに、癌を有する対象へテスト化合物を投与し、そしてポリペプチドの活性を測定することを含む、癌の処置に有用な化合物を同定する方法を提供し、ここでポリペプチドの活性の変化はテスト化合物が癌の処置に有用であることの指標である。さらなる具体例において、ポリペプチドはＶＥＧＦおよびＶＥＧＦＲ、もっと好ましくはＶＥＧＦＲ－２およびその可溶形（例えば裂断したＶＥＧＦＲ２の検出）であり、そして他の具体例においては化合物はソラフェニブである。

【０００８】

このように本発明は、例えばアゴニストおよびアンタゴニスト、逆アゴニスト、アクチベーター、コアクチベーターおよび阻害剤のような、レギュレーターまたはモジュレーターとして作用し得る化合物を同定するために使用することができる方法を提供する。従って本発明は、ポリヌクレオチドまたは癌に関連したポリヌクレオチドの発現を調節する試薬および方法を提供する。ポリヌクレオチドの発現、安定性または量、またはポリペプチ

ドの活性を調節する試薬は、タンパク、ペプチド、タンパク模倣体、核酸、核酸アナログ（例えばペプチド核酸、ロックした核酸）、または小分子であり得る。

【０００９】

本発明は、１以上の遺伝子および／または遺伝子産物を分析するステップを含む患者の診断を提供する方法をも提供し、ここで正常および患者サンプルの遺伝子発現および／または遺伝子産物レベルが分析され、患者サンプル中の遺伝子および／または遺伝子産物の発現レベルの変動は疾病の診断である。患者サンプルは、限定でなく、血液、羊膜液、血漿、精液、骨髄、および生検を含む。さらなる具体例において、遺伝子または遺伝子産物はＶＥＧＦおよびＶＥＧＦＲ、もっと好ましくはＶＥＧＦＲ－２およびそれらの可溶形（例えば裂断したＶＥＧＦＲ２の検出）である。

【００１０】

本発明はなおさらに、癌を持っている疑いのある対象中のポリペプチドの活性を測定することを含む、対象中の癌の診断方法を提供し、ここでもし癌を持っている疑いのない対象中のポリペプチドの活性に比較してポリペプチドの活性に相違があったならば、その時対象は癌を持っていると診断される。さらなる具体例において、ポリペプチドはＶＥＧＦおよびＶＥＧＦＲ、もっと好ましくはＶＥＧＦＲ－２およびそれらの可溶形（例えば裂断したＶＥＧＦＲ２の検出）である。

【００１１】

他の具体例において、本発明は患者サンプル中のタンパクと反応させるためにあるタンパクに対する抗体が使用される、患者の癌の検出方法を提供する。なおさらなる具体例において、該抗体はＶＥＧＦおよびＶＥＧＦＲ、もっと好ましくはＶＥＧＦＲ－２およびそれらの可溶形（例えば裂断したＶＥＧＦＲ２の検出）に対して特異性である。抗体は、例えばポリペプチドの露出した区域に対して日常的に発生させることができる。例えば抗体はＶＥＧＦＲ－２の細胞外ドメイン、例えば可溶性ＶＥＧＦＲ－２に対して発生させることができる。

【００１２】

本発明の他の局面は、１以上の遺伝子および／または遺伝子産物の発現レベルを分析するステップを含む、正常と病的状態の間を区別する方法であり、ここで正常および病気組織の遺伝子発現およびまたは遺伝子産物レベルが分析され、そして遺伝子および／または遺伝子産物の発現レベルの変動は病的状態の指標である。さらなる局面において、遺伝子または遺伝子産物はＶＥＧＦまたはＶＥＧＦＲ－２である。

【００１３】

他の具体例において、本発明は少なくとも１遺伝子の正常細胞に対する差別的発現を検出することを含む、細胞の表現型を決定する方法に関し、ここで遺伝子は２のうちの少なくとも１因子、２０のうちの少なくとも１因子、または５０のうちの少なくとも１因子によって差別的に表現される。さらなる具体例において、遺伝子はＶＥＧＦおよびＶＥＧＦＲ、もっと好ましくはＶＥＧＦＲ－２をコードする。

【００１４】

なお他の具体例において、本発明は少なくとも１種のポリペプチドの正常細胞に対する差別的表現を検出することを含む、細胞の表現型を決定する方法に関し、ここでタンパクは２のうちの少なくとも１因子、または５のうちの少なくとも１因子、２０のうちの少なくとも１因子、または５０のうちの少なくとも１因子によって差別的に表現される。さらなる具体例において、ポリペプチドはＶＥＧＦおよびＶＥＧＦＲ、もっと好ましくはＶＥＧＦ－２およびそれらの可溶性形（例えば開裂したＶＥＧＦＲ２の検出）である。

【００１５】

他の具体例において、本発明は少なくとも１０、少なくとも１５、少なくとも約２５、または少なくとも約４０の連続ヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含む核酸プローブを提供し、患者から細胞のサンプルを取得し、任意に実質的にすべてが非癌性である細胞の第２のサンプルを準備し、該核酸サンプルを厳密な条件下で前記第１および第２の細胞サンプルの各自のｍＲＮＡと接触させ、そして（ａ）該プローブの第１の細胞サンプル

とのハイブリダイゼーションの量を、（b）該プローブの第２の細胞サンプルとのハイブリダイゼーションの量と比較することによる、患者からの細胞の表現型を決定する方法に関し、ここにおいて第２の細胞サンプルのｍＲＡＭとのハイブリダイゼーションの量と比較して第１の細胞サンプルのｍＲＮＡとのハイブリダイゼーションの量において２のうちの少なくとも１因子、５のうちの少なくとも１因子、２０のうちの少なくとも１因子、または５０のうちの少なくとも１因子の相違が第１の細胞サンプルの表現型の指標である。さらなる具体例において、核酸プローブはＶＥＧＦおよび／またはＶＥＧＦＲ、好ましくはＶＥＧＦＲ－２をコードするヌクレオチド配列である。

【００１６】

他の具体例において、本発明は患者から単離した細胞のサンプル中の核酸のレベルの測定するためのプローブ／プライマーを含む、癌細胞または組織の存在を同定するためのテストキットを提供する。ある具体例において、キットはキットを使用するための指示書、核酸をハイブリダイゼーションへ感受性とするための溶液、細胞を溶解するための溶液、または核酸を精製するための溶液をさらに含むことかできる。さらなる具体例において、プローブ／プライマーはＶＥＧＦおよび／またはＶＥＧＦＲ、好ましくはＶＥＧＦＲ－２のフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む。

【００１７】

一具体例において、本発明はあるタンパクに対して特異性の抗体を含む、癌細胞または組織を同定するためのテストキットを提供する。ある具体例においては、キットはキットを使用するための指示書をさらに含む。ある具体例において、キットは細胞を懸濁または固定するための溶液、検出可能なタグまたは標識、ポリペプチドを抗体の結合へ結合させるための溶液、細胞を溶解するための溶液、またはポリペプチドを精製するための溶液をさらに含むこができる。なおさらなる具体例において、抗体はＶＥＧＦおよび／またはＶＥＧＦＲ、好ましくはＶＥＧＦＲ－２に対して特異性である。

【００１８】

他の具体例において、本発明は患者から単離さられた細胞のサンプル中の核酸のレベルを測定するためのブローブ／プライマーを含む、癌細胞または組織において化合物または治療剤の有効性をモニタするためのテストキットを提供する。ある具体例において、キットは、キットを使用するための指示書、細胞を懸濁または固定するための溶液、検出可能なタグまたは標識、核酸をハイブリダイゼーションへ受容性とするための溶液、細胞を溶解するための溶液、または核酸を精製するための溶液をさらに含むことができる。さらなる具体例において、プローブ／プライマーはＶＥＧＦおよび／またはＶＥＧＦＲをコードするヌクレオチド配列を含む。

【００１９】

一具体例において、本発明はあるタンパクに対して特異性の抗体を含む、癌細胞または組織において化合物または治療剤の有効性をモニタするためのテストキットを提供する。ある具体例においては、キットはキットを使用するための指示書をさらに含むことができる。ある具体例においては、キットは細胞を懸濁または固定するための溶液、検出可能なタグまたは標識、ポリペプチドを抗体の結合に対し受容性とする溶液、細胞を溶解するための溶液、またはポリペプチドを精製するための溶液をさらに含むことができる。なお他の具体例において、抗体はＶＥＧＦおよび／またはＶＥＧＦＲ－２、例えば可溶性細胞外ドメインに対して特異性である。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２０】

本発明は、記載した特定の方法、プロトコール、細胞ライン、動物種または属、構成および試薬に限定されず、変動し得ることを理解すべきである。また、ここで用いた術語は特定の具体例を記載する目的のみであり、特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を制限することを意図しない。

【００２１】

ここおよび特許請求の範囲に使用される単一形は、文脈が特記しない限り複数形をも含

むことに注意すべきである。例えば“遺伝子”への言及は１または２以上の遺伝子、または当業者には既知のその均等物への言及等である。

【００２２】

他のように定義しない限り、ここで使用する技術的および科学的術語は、本発明が属する分野の当業者によって普通に理解される意味と同じ意味を有する。ここに記載したものと類似または均等な方法、装置および材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、今や好ましい方法、装置および材料が記載される。

【００２３】

例えば、ここに記載された発明に関して使用することができるかも知れない刊行物に記載された構成および方法を記載しそして開示する目的のため、ここで述べたすべての刊行物および特許が参照としてここに取り入れられる。上で論じたおよび本明細書を通じ刊行物は、本出願の出願日前のそれらの開示のみを提供する。本発明者らはそのような開示より先発明であると主張できないと自認したものと解してはならない。

【００２４】

定義

便宜上、明細書、実施例および特許請求の範囲に使用したいくつかの術後および語句の意味が以下に提供される。

【００２５】

アレイ（例えばマイクロアレイ）上の“アドレス”は、要素、例えばオリゴヌクレオチドがアレイの固体表面へ結合される位置をいう。

【００２６】

ここで使用される術語“アゴニスト”は、タンパクのバイオ活性を模倣または上方調節する（例えば強化または補強する）剤をいう。アゴニストは、野生タイプタンパクまたは野性タンパクの少なくともバイオ活性の１つを有するその誘導体であることができる。アゴニストはまた、遺伝子の発現を上方調節する、またはタンパクのバイオ活性の少なくとも１つを増大する化合物であることができる。アゴニストはまた、ポリペプチドと他の分子、例えば標的ペプチドまたは核酸との相互作用を増大する化合物であることができる。

【００２７】

ここで使用する“増幅”とは、核酸配列の追加のコピーの生産に関する。例えば、増幅は、この分野で良く知られたポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術（例えばＤｉｅｆｆｅｎｂａｃｈ ａｎｄ Ｄｖｅｋｓｌｅｒ（１９９５）ＰＣＲ Ｐｒｉｍｅｒ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ，Ｎ．Ｙ．を見よ）を使用して実施することができる。

【００２８】

ここで使用される“アンタゴニスト”とは、タンパクのバイオ活性の少なくとも１つを下方調節する（例えば抑制または阻害）する剤を意味する。例えば、ソラフェニブはそのようなアンタゴニストの一例である。アンタゴニストは、タンパクと他の分子、例えば標的ペプチドまたは酵素基質の間の相互作用を阻害または減小させる化合物であることができる。アンタゴニストはまた、遺伝子の発現を下方調節する、または発現されたタンパク提供量を減少させる化合物であることができる。

【００２９】

ここで使用する術語“抗体”とは、全抗体、例えばいかなるイソタイプ（ＩｇＧ，ＩｇＡ，ＩｇＭ，ＩｇＥ等）を含むことを意図し、そして脊椎動物（例えば哺乳類）タンパクと特異的反応性のそのフラグメントを含む。抗体は慣用の技術を使用してフラグメント化することができ、そしてフラグメントは全抗体について上で記載した同じ態様で有用性をスクリーニングすることができる。

【００３０】

このようにこの術語は、あるタンパクと選択的に反応することができるタンパク分解的に開裂した、または組換えにより調製された抗体分子の部分のセグメントを含む。そのようなタンパク分解および／または組換えフラグメントの非限定例は、Ｆａｂ，Ｆ（ａｂ’

）２，Ｆａｂ’，Ｆｖおよびペプチドリンカーによって接合したＶ〔Ｌ〕および／またはＶ〔Ｈ〕ドメインを含んでいる単鎖抗体（ｓｃＦｖ）を含む。ｓｃＦｖは２以上の結合部位を有する抗体を形成するように共有または非共有結合で連結されることができる。本発明はポリクローナル、モノクローナル、または他の精製された抗体調製物および組換え抗体を含む。

【００３１】

術語“アレイ”または“マトリックス”は、デバイス上のアドレスし得る位置またはアドレスの配置を指称する。位置は二次元アレイに、三次元アレイに、
または他のマトリックスフォーマットに配置することができる。位置の数は数千ないし少なくとも１０万に範囲することができる。最も重要なことは、各位置が全く独立の反応部位を代表する。“核酸アレイ”は、オリゴヌクレオチドまたは遺伝子のより大きい部分のような核酸プローブを含有するアレイを指す。アレイ上の核酸は好ましくは１本鎖である。プローブがオリゴヌクレオチドであるアレイは“オリゴヌクレオチドアレイ”または“オリゴヌクレオチドチップ”という。ここでは“バイオチップ”または“バイオロジカルチップ”とも称される“マイクロアレイ”は、少なくとも約１００／ｃｍ^2，そして好ましくは少なくとも約１０００／ｃｍ^{2}の別々の区域密度を有する区域のアレイである。マイクロアレイの区域は、典型的には例えば約１０ないし２５０μｍの間の範囲の直径の寸法を有し、そしてアレイ中の他の区域から約同じ距離を離れている。

【００３２】

“生物学的活性”または“バイオ活性”または“活性”または“生物学的機能”は互換的に使用され、ここではポリペプチド（天然または変性コンフォメーションの）により、またはそのどのようなサブ配列によっても直接的または間接的に果されるエフエクターまたは抗原機能を意味する。生物学的活性は、ポリペプチドへの結合、他のタンパクまたは分子への結合、損傷されたＤＮＡへ結合する能力等を含む。バイオ活性は対象ポリペプチドへ直接作用させることによって調節することができる。代って、バイオ活性は、対応する遺伝子の発現を調節することによるような、ポリペプチドのレベルを調節することによって変えることができる。

【００３３】

ここで使用する“生物学的サンプル”なる術語は、生物から、または生物の成分（例えば細胞）から得たサンプルを指す。サンプルはどのような生物学的組織または流体でよい。サンプルは患者から誘導されたサンプルでよい。そのようなサンプルは限定でなく、痰、血液、血球（例えば白血球）、組織または生検サンプル（例えば腫瘍生検）、尿、腹水、および胸膜液またはそれからの細胞を含む。生物学的サンプルは、組織学目的で採取された凍結セクションのような組織のセクションを含むことができる。

【００３４】

術語“バイオマーカー”または“マーカー”は、広い範囲の細胞内および細胞外イベントと、全生物生理学的変化を含む。バイオマーカーは、細胞機能の実質上どのような面をも、例えば信号分子、転写因子、代謝物、遺伝子転写、それにタンパクのほん訳後、修飾の生産レベルまたは速度を代表することができる。バイオマーカーは、転写レベルの全ゲノム分析、またはタンパクレベルおよび／または修飾の全タンパク代識分析を含むことができる。

【００３５】

バイオマーカーはまた、病気を有する対象の化合物処置病気細胞中の無処置病気細胞と比較した上方または下方調節された遺伝子または遺伝子産物を指す。すなわち、遺伝子または遺伝子産物が、小分子の有効性を同定、予知または検知するために使用し得る、任意に他の遺伝子または遺伝子産物を有する処理した細胞に対して充分に特異性である。このようにバイオマーカーは、病気細胞中における化合物の有効性または該病気細胞の化合物による処置に対する応答に特徴的である遺伝子または遺伝子産物である。

【００３６】

ヌクレオチド配列は、もし二つの配列の塩基の各自がマッチするならば、すなわちワト

ソンークリック塩基付を形成することができるならば“相補的”である。術語“相補的ストランド”はここでは術語“相補体”と互換的に使用される。核酸の相補体はコードストランドの相補体または非コードストランドの相補体であることができる。

【００３７】

“遺伝子の検出剤”とは、遺伝子またはそれに関係する他の生物学的分子、例えば遺伝子から転写されたＲＮＡ、または遺伝子によってコードされたポリペプチドを特異的に検出するために使用し得る剤を指称する。例示的検出剤は、遺伝子へ対応する核酸へハイブリダイズする核酸プローブ、および抗体である。

【００３８】

術語“癌”は、限定でなく乳房、呼吸管、脳、再生器官、消化管、尿管、眼、肝臓、皮膚、頭および頸部、甲状腺、上皮小体、およびそれらの遠方転移の癌のような固形癌を含む。この術語はリンパ腫、肉腫および白血病も含む。

【００３９】

乳癌は、限定なしで侵襲的管癌、侵襲的小葉癌、その場の管癌、およびその場の小葉癌を含む。

【００４０】

呼吸管の癌の例は、限定なしで小細胞および非小細胞肺癌、それに気管支アデノーマおよび胸膜肺芽腫を含む。

【００４１】

脳癌の例は、限定でなく脳幹および松果体神経膠腫、脳星状細胞腫、髄葉腫、上衣細胞腫、および神経外胚葉皮および松果腫を含む。

【００４２】

男性再生産器官の腫瘍は、限定でなく前立腺および睾丸癌を含む。女性再生産器官の腫瘍は、限定でなく子宮内膜、頸管、卵巣、膣および外陰癌、それに子宮肉腫を含む。

【００４３】

消化管の腫瘍は、限定でなく肛門、結腸、結腸直腸、食道、膽のう、胃、膵臓、直腸、小腸および唾液腺の癌を含む。

【００４４】

尿管の腫瘍は、限定でなく膀胱、陰茎、腎臓、腎（例えば腎細胞癌）、骨盤、および尿道癌を含む。

【００４５】

眼癌は、限定でなく眼内黒色腫および網膜腫を含む。

【００４６】

肝臓癌は、限定でなく肝細胞癌（線維層状変異ありなしの肝細胞癌）、阻害腫（肝臓内胆汁管腫瘍）、および混合胆汁管腫瘍）を含む。

【００４７】

皮膚癌は、限定でなく鱗状細胞腫瘍、カポジ肉腫、悪性黒色腫、メルケル細胞皮膚癌および非黒色腫皮膚癌を含む。

【００４８】

頭頸部癌は、限定でなく咽頭／下咽頭／鼻咽頭腔／口咽頭腔癌、および唇および口腔癌を含む。

【００４９】

リンパ腫は、限定でなくＡＩＤＳ関連リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、皮膚Ｔ－細胞リンパ腫、ホジキン病および中枢神経系のリンパ腫を含む。

【００５０】

肉腫は、限定でなく軟組織の肉腫、骨肉腫、悪性線維組織腫、リンパ肉腫および横紋筋肉腫を含む。

【００５１】

白血病は、限定でなく急性骨髄白血病、急性リンパ芽白血病、慢性リンパ球白血病、慢性骨髄形成白血病、および毛髪細胞白血病を含む。

【００５２】
“癌の病気細胞”は、癌を持つ対象に存在する細胞を指す。すなわち、正常細胞の修飾された形にあり、そして癌を持っていない対象に存在しない細胞、または癌を持っていない対象に比較して有意に高いまたは低い数で存在する細胞である。
【００５３】
術語“均等物”とは、機能的に均等なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むものと理解される。均等はヌクレオチド配列は、対立遺伝子変種のような１以上のヌクレオチド置換、付加または欠損によって相違するヌクレオチド配列を含み得る。
【００５４】
術語“発現プロフィル”はここでは“遺伝子発現プロフィル”および細胞の“指紋”と互換的に使用され、細胞内の１以上の遺伝子のｍＲＮＡレベルを代表する値のセットを指称する。発現プロフィルは、好ましくは、少なくとも約１０遺伝子、好ましくは少なくとも約５０，１００，２００またはそれ以上の遺伝子の発現レベルを代表する値を含む。発現プロフィルはまた、多数細胞および条件において（例えばＧＡＰＤＨのようなハウスキーピング遺伝子）同様なレベルで発現される遺伝子のｍＲＮＡレベルを含む。例えば、癌の病気細胞の発現プロフィルは、病気細胞において１０以上の遺伝子のｍＲＮＡレベルを表す値のセットを指称する。
【００５５】
術語“遺伝子”は、ポリペプチドまたは前駆体の生産に必要な制御およびコーティング配列を含んでいる核酸配列を指す。ポリペプチドは全長コーディング配列により、またはコーディング配列のどれかの部分によってコードされることができる。遺伝子は、全体または一部が植物、カビ、動物、バクテリアゲノム、またはエピソーム、真核生物、核たまはプラスミドＤＮＡ，ｃＤＮＡ，ウイルスＤＮＡ、または化学的に合成したＤＮＡを含む、この分野で知られたどのような源からも誘導されることができる。遺伝子は、コーディングまたは非ほん訳区域に発現生成物の生物学的活性または化学構造に、発現速度または発現コントロールの態様に影響し得る一以上の修飾を含み得る。そのような修飾は限定でなく、一以上のヌクレオチドの変異、挿入、欠失および置換を含む。遺伝子は中断されないコーディング配列で構成されることができ、またはそれは適切なスライス接合によって結合した一以上のイントロンを含むことができる。
【００５６】
“ハイブリダイゼーション”は、核酸のストランドが塩基対形成によって相補的ストランドと結合するいかなるプロセスをも指す。例えば、２本の１本鎖核酸は、それらが２本鎖複製を形成する時に“ハイブリダイズ”する。２重鎖の区域は１本鎖核酸の一方または両方の全長、または一方の１本鎖核酸と他方の１本鎖核酸のサブ配列のすべてを含むことができ、または２本鎖の区域は各核酸のサブ配列を含むことができる。ハイブリダイゼーションは、２本のストランドがなお２重鎖らせんを形成する限りいくつかのミスマッチを含んでいる複製物の形成をも含む。“厳格なハイブリダイゼーション条件”とは、本質的に特異性のハイブリダイゼーションを結果するハイブリダイゼーション条件を指す。
【００５７】
ＤＮＡまたはＲＮＡのような核酸に関してここで使用する術語“単離された”は、巨大分子の天然ソースに存在する他のＤＮＡまたはＲＮＡそれぞれから分離された分子を指す。ここで使用する術語“単離された”は、組換えＤＮＡ技術によって生産された時、細胞物質、ウイルス物質、培地を実質上含まない、または化学的に合成された時化学的前駆体または他の化合物を実質上含まない核酸またはペプチドをも指称する。さらに、“単離された核酸”は、フラグメントとして天然に存在せず、そして天然状態では発見されない核酸フラグメントを含むことができる。また、ここで使用される術語“単離された”は、他の細胞タンパクから単離されたポリペプチドを指称し、精製されそして組換えられたポリペプチドの両方を意味する。
【００５８】
ここで使用される術語“標識”および“検出可能な標識”は、限定でなく、ラジオアイ

ソトープ、発蛍光団、ケミルミネセンス団、酵素、酵素基質、酵素助因子、酵素阻害剤、染料、金属イオン、リガンド（例えばビオチンまたはハプテン）等を含む、検出可能な分子を指す。術語“発蛍光剤”は、検出できる範囲で蛍光を発する物質またはその一部を指す。本発明において使用し得る標識の例は、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、ウンベリフエロン、テキサスレッド、ルミノール、ＮＡＰＰＨ，α－、β－ガライトシダーゼ、および西洋ワサビペルオキシダーゼを含む。

【００５９】

ここで使用される術語“発現のレベル”は、与えられた核酸の測定可能なレベルを指す。核酸の発現レベルはこの分野で良く知られた方法によって決定することができる。術語“応差的発現”または“応差発現”は、与えられた核酸の測定可能なレベルの増加または減少を指す。ここで使用されるように、“応差的発現”または“応差発現”は、比較のため使用され、両方とも同じ正常標準サンプルと比較される二つのサンプルにおいて核酸の発現レベルの差が少なくとも１．４倍であることを意味する。本発明による“応差的発現”または“応差発現”はまた、比較のため用いた二つのサンプルにおいて核酸の発現レベルが１．４倍またはそれ以上２倍、５倍、１０倍、２０倍、５０倍またはそれ以上までであることを意味する。核酸は、もし二つのサンプルのうち一方が与えられた核酸の検出可能な発現を含んでいないならば、検出可能に発現される核酸が±少なくとも１．４倍において発現される限り、二つのサンプル中で応差的に発現されるといわれる。核酸配列の応差的発現は、比較のため使用される２以上のサンプル中の核酸の発現レベルの差がもはや少なくとも１．４倍でなくなるように変えられる時“阻害”される。核酸の発現レベルの絶対的定量化は、一以上の対照核酸種の既知濃度を含め、対照核酸の量を基にして標準曲線を作成し、標準曲線に関して未知のハイブリダイゼーション強度から“未知”核酸種の発現レベルを補内することによって達成することができる。

【００６０】

ここで使用される術語“核酸”は、デオキシリボ核酸（ＤＮＡ）と、適切な場合リボ核酸（ＲＮＡ）を指す。この術語は、均等物、核酸アナログから作成したＲＮＡまたはＤＮＡのアナログ、そして記載した具体例に適用されるように、１本鎖（センスまたはアンチセンス）および２本鎖ポリヌクレオチドを含むものと解釈しなければならない。クロモソム、ｃＤＮＡ，ｍＲＮＡ，ｒＲＮＡおよびＥＳＴが核酸と呼ばれる分子の代表例である。

【００６１】

術語“オリゴヌクレオチド”は、ここでは例えば約１０ないし１０００のヌクレオチドを含む核酸分子を指す。本発明の使用するためのオリゴヌクレオチドは、好ましくは約１５ないし約１５０ヌクレオチド、もっと好ましくは約１５０ないし約１０００ヌクレオチドの長さである。オリゴヌクレオチドは、天然に存在するオリゴヌクレオチドか、または合成オリゴヌクレオチドでよい。オリゴヌクレオチドは、ホスフオラミダイト法（Ｂｅａｕｃａｇｅ ａｎｄ Ｃａｒｒｕｔｈｅｒｓ，Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．２２：１５８９－６２，１９８１）、またはトリエステル法（Ｍａｔｔｅｕｃｃｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１０３：３１８５，１９８１）、またはこの分野で既知の他の化学的方法によって調製することができる。

【００６２】

術語“患者”または“対象”は、ここでは哺乳類（例えばヒトおよび動物）を含む。

【００６３】

ここで使用されるように、アレイへ取付けた核酸または他の分子は、“プローブ”または“捕獲プローブ”を指す。アレイが一つの遺伝子に対応するいくつかのプローブを含んでいる時、これらのプローブは“遺伝子プローブセット”と称される。遺伝子プローブセットは、例えば約２ないし約２０のプローブ、好ましくは約２ないし１０のプローブ、最も好ましくは約５プローブよりなることができる。

【００６４】

細胞の生物学的状態の“プロフィル”は、細胞の薬物処理および他の動揺に対する応答を変化させることが知られている細胞の種々の構成成分のレベルを指す。細胞の構成成分

は、例えばＲＮＡのレベル、タンパク豊富さのレベル、またはタンパク活性レベルを含む。

【００６５】

術語“タンパク”は、ここでは“ペプチド”および“ポリペプチド”と互換的に使用される。

【００６６】

一つの細胞の発現プロフィルは、他の細胞の発現プロフィルと、二つのプロフィル中の遺伝子の発現レベルが十分に類似している時“類似”であり、この類似性は共通の特徴、例えば同じタイプの細胞の指標である。従って、第１および第２の細胞の発現プロフィルは、第１の細胞で発現される遺伝子の少なくとも７５％が、第２の細胞において第１の細胞に対して係数２以上のレベルで発現される時に類似である。

【００６７】

ここでは“小分子”は、約５ｋＤ以下、もっと好ましくは約４ｋＤ以下の分子量を有する分子を指す。小分子は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模倣物、炭水化物、脂質、または他の有機または無機分子であり得る。多数の製薬会社は、化学的および／または生物学的混合物、しばしばカビ、バクテリア、藻類抽出物の莫大なライブラリを持っており、これらは生物活性を変調する化合物を同定するために本発明のアッセイでスクリーニングすることができる。

【００６８】

鋳型核酸の標的部位へのプローブの“特異的ハイブリダイゼーション”とは、ハイブリダイゼーション信号が明確にほん訳できるようにプローブが標的へ優先的にハイブリダイズすることを指す。ここでさらに記載されるように、特異的ハイブリダイゼーションをもたらす条件は、相同の区域の長さ、該区域のＧＣ含量、およびハイブリッドの融点（Ｔｍ）に応じて変動する。このためハイブリダイゼーション条件は、塩類含量、酸性度、ハイブリダイゼーション溶液および洗液の温度において変動し得る。

【００６９】

ポリペプチドの“変種”は、一以上のアミノ酸残基が変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。変種は、置換したアミノ酸が類似の構造また化学的性質を持っている（例えばイソロイシンによるロイシンの置換）、保存的変化を持つことができる。変種はまた、非保存的変化（例えばトリプトファンによるグリシンの置換）を持つことができる。類似の微小変動は、アミノ酸欠失または挿入または両方を含むことができる。生物学的または免疫学的活性を損傷することなくどのアミノ酸残基を置換、欠失または挿入できるかのガイダンスは、この分野で良く知られたコンピュータプログラム、例えばＬＡＳＥＲＧＥＮＥソフトウエア（ＤＮＡＳＴＡＲ）を使用して同定することができる。

【００７０】

ポリヌクレオチド配列の文脈で使用される時、術語“変種”は、特定の遺伝子またはそのコーディング配列のそれに関係したポリヌクレオチド配列を含むことができる。この定義はまた、例えば“対立”、“スプライス”、“種”、または“多形”変種を含み得る。スプライス変種は参照分子に対し有意な同一性を持ち得るが、しかしｍＲＮＡプロセシングの間エクソンの交差スプライシングによりより多いまたはより少ない数のポリヌクレオチドを一般に持つであろう。対応するポリペプチドは、追加の機能的ドメインまたはドメイン不存在を持ち得る。種の変種は、一の種からの他の種へ変ったポリヌクレオチド配列である。得られるポリヌクレオチドは相互に有意なアミノ酸同一性を一般に持つであろう。多形変種は、与えられた種の個体間の特定遺伝子のポリヌクレオチド配列における変種である。多形変種は、ポリヌクレオチド配列が一塩基だけ変った“単一ヌクレオチド多形”（ＳＮＰ）を含むことができる。ＳＮＰの存在は、例えばある種の集団、病的状態、または病的状態の傾向の指標となり得る。

【００７１】

本発明の一局面は、異常型の増殖によって特徴付けられる細胞分化および増殖を変調することができる剤の同定に関する。もっと特定すれば、本発明は候補化合物について核酸

配列の応差的発現を調節するそれらの能力をスクリーニングする方法に関する。すなわち、もしある核酸配列が癌細胞において過剰発現されれば、候補化合物が発現を減少させるそれらの能力についてスクリーニングされ、そしてもしある核酸配列が癌細胞において発現されなければ、テスト化合物が発現を増加させるその能力についてスクリーニングされる。加えて、本発明はここに記載される応差的に発現される配列によってコードされる一以上のポリペプチドの活性の変調するテスト化合物または物質を同定するスクリーニングアッセイに関する。この点に関し、本発明は、マーカー核酸の発現を変調するか、および／またはコードされたポリペプチドのバイオ活性の変化させる化合物を決定するためのアッセイを提供する。

【００７２】

応差発現の変調のためのスクリーニング

薬物スクリーニングは、テスト化合物（例えばソラフエニブおよびジアリール尿素誘導体）を細胞サンプルへ加え、そして効果をモニターすることによって実施される。テスト化合物を含んでいない平行的サンプルも対照としてモニターされる。次に処置および未処置細胞は、限定なしで顕微鏡分析、生存性テスト、複製能力、組織学的検査、細胞に関連する特定のＲＮＡまたはポリペプチドのレベル、細胞または細胞溶解物により発現される酵素活性のレベル、および他の細胞または化合物と相互作用する細胞の能力を含む、適当な表現型基準によって比較される。処置および未処置細胞間の差はテスト化合物に帰すことができる効果を指示する。

【００７３】

テスト化合物の望ましい効果は、癌関連マーカー核酸配列によって与えられた表現型に対する効果である。その例は、ｍＲＮＡの過豊富さを制限する、コードされタンパクの生産を制限する、またはタンパクの機能的効果を制限する化合物である。テスト化合物の効果は、処置および未処置細胞間の結果を比較する時明らかであろう。

【００７４】

このように本発明は、核酸マーカーの発現をインビボで阻害または増強する剤（例えばソラフエニブおよびそのジアリール尿素誘導体）についてスクリーニング方法を包含し、該方法は、培養した細胞中でマーカー核酸（例えばＶＥＧＦまたはＶＥＧＦＲ－２）が検出可能である細胞または組織を該剤がｍＲＮＡの生産を阻害または増強することができるかどうかを決定するために剤へ曝露し、そして曝露した細胞または組織中のmＲＮＡのレベルを決定することを含み、ここで細胞ラインの剤への曝露後のｍＲＮＡのレベルの減少はマーカー核酸ｍＲＮＡ生産の阻害の指標であり、そしてｍＲＮＡレベルの増加はマーカーｍＲＮＡ生産の増強の指標である。

【００７５】

代ってスクリーニング方法は、マーカータンパクが培養細胞中で検出可能である細胞または組織をマーカータンパクの生産を阻害または増強すると思われる剤へ曝露し、そして細胞または組織中のマーカータンパクのレベルを決定することを含むインビトロスクリーニング方法を含むことができ、ここで細胞または組織の剤への曝露後のマーカータンパクのレベルの減少はマーカータンパク生産レベルの阻害の指標であり、マーカータンパク生産レベルの増加はマーカータンパク生産増強の指標である。

【００７６】

また本発明は、マーカーｍＲＮＡまたはタンパクが検出可能である対象をマーカーｍＲＮＡまたはタンパクの生産を阻害または増強すると思われる剤へ曝露し、そして曝露した哺乳類の腫瘍細胞中のマーカーｍＲＮＡまたはタンパクのレベルを決定することを含む、マーカー核酸の発現を阻害または増強する剤のインビボスクリーニング方法を包含する。剤へ対象の曝露後マーカーｍＲＮＡまたはタンパクレベルの減少はマーカー核酸発現の阻害の指標であり、マーカーｍＲＮＡまたはタンパクレベルの増加はマーカー核酸発現の増強の指標である。

【００７７】

従って本発明は、マーカー核酸を発現する細胞をテスト化合物と共にインキュベートし

、そしてｍＲＮＡまたはタンパクレベルを測定することを含む方法を提供する。本発明はさらに、細胞集団中のマーカー核酸の発現レベルを定量的に決定する方法と、そしてある剤が細胞集団中のマーカー核酸の発現のレベルを増加または減少できるかどうかを決定する方法を提供する。剤が細胞集団中のマーカー核酸の発現レベルを増加することができるか減少させることができるかを決定する方法は、（ａ）対照および剤処置細胞集団の抽出液を調製し、（ｂ）細胞抽出液からマーカーポリペプチドを単離し、そして（ｃ）マーカーポリペプチドと、該ポリペプチドに対して特異性の抗体の間に形成された免疫複合体の量を定量化（例えば並列に）するステップを含む。本発明のマーカーポリペプチドは、そのバイオ活性をアッセイすることによっても定量化することができる。マーカー核酸発現の増加を誘発する剤は、処置した細胞に生成した免疫複合体の量を対照細胞中に生成した免疫複合体の量と比較して増加させるそれらの能力によって同定することができる。類似の態様で、マーカー核酸の発現を減少する剤は、対照細胞と比較して処置した細胞抽出液に生成した免疫複合体の量を減少させるそれらの能力によって同定することができる。

【００７８】

本発明は、癌において応差的に調節される単離された核酸配列を提供する。本発明は、対象から得たＲＮＡに相当する核酸サンプルを既知アイデンティティの一以上の核酸サンプルとハイブリダイズさせ、そして既知アイデンティティの一以上の核酸分子へ核酸サンプルのハイブリダイゼーションを測定することを含む、癌を有する対象において応差的に調節される核酸配列を同定する方法を提供し、ここで癌を持たない対象から得た核酸サンプルと比較して、既知アイデンティティの一以上の核酸分子への核酸サンプルのハイブリダイゼーションの２倍の差は癌を有する対象中のヌクレオチド配列の応差的発現の指標である。

【００７９】

一般に本発明は、対象からメッセンジャーＲＮＡを単離し、ｍＲＮＡサンプルからｃＲＮＡを発生させ、アレイの別々の位置へ安定に会合させた複数の核酸分子を含んでいるマイクロアレイへｃＲＮＡをハイブリダイズさせ、そしてアレイへのｃＲＮＡのハイブリダイゼーションのパターンを同定することを含む、癌を有する対象において応差的に調節される核酸配列を同定する方法を提供する。本発明によれば、アレイの与えられた位置へハイブリダイズする核酸分子は、もしハイブリダイゼーション信号が癌を有しない対象から得た核酸サンプルとハイブリダイズした同じアレイ上の同じ位置におけるハイブリダイゼーション信号よりも少なくとも２倍高いか低いならば、応差的に調節されたというべきである。

【００８０】

遺伝子の発現レベルを決定するためのマイクロアレイ

遺伝子発現レベルの決定はマイクロアレイを使用して達成することかできる。一般に以上のステップを含み得る：（ａ）対象からｍＲＮＡサンプルを取得し、それから標識した核酸を調製すること（“標的核酸”または“標的”）；（ｂ）標的核酸がアレイ上の対応するプローブへ結合するのに充分な条件下で、例えばハイブリダイゼーションまたは特異的結合により、標的核酸をアレイと接触させること；（ｃ）任意に未結合標的をアレイから除去すること；（ｄ）結合した標的を検出すること；そして（ｅ）例えばコンピュータ利用分析方法を用いて結果を分析すること。ここで使用するように、“核酸プローブ”または“プローブ”は、アレイへ取付けた核酸であり、他方“標的核酸”はアレイへハイブリダイズされる核酸である。

【００８１】

核酸標本は、テストされる対象から“侵襲的”または“非侵襲的”サンプリング手段を使用して得ることができる。もし動物（ネズミ、ヒト、ヒツジ、イヌ、ウシ、ブタ、ネコを含む）の皮膚または器官内からの核酸の採取を含むならば、そのサンプリング手段は“侵襲的””といわれる。侵襲的方法の例は、例えば血液採取、精液採取、生検針、胸膜吸引、臍帯生検を含む。そのような方法の例は、Ｋｉｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．６６：３８７９－３８８２，１９９２；Ｂｉｓｗａｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．ＮＹ　Ａ

ｃａｄ．Ｓｃｉ．５９０：５８２－５８３，１９９０；Ｂｉｓｗａｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．２９：２２２８－２２３３，１９９１によって論じられている。

【００８２】

対照的に、“非侵襲的”サンプリング手段は、核酸分子が動物の内表面または外表面から回収される手段である。そのような“非侵襲的”サンプリング手段の例は、綿棒、涙、唾液、尿、糞、汗、髪の採取を含む。

【００８３】

本発明の一具体例において、テストされる対象から一以上の細胞が得られ、そして細胞からＲＮＡが単離される。好ましい具体例においては、対象から末梢血白血球（ＰＢＬ）のサンプルが得られる。対象から細胞サンプルを得て、サンプルを望みの細胞タイプのためにエンリッチすることもできる。例えば、細胞は、望む細胞タイプの細胞表面上のエピトープへの抗体結合での単離のような、種々の技術を使用して他の細胞から単離することができる。望む細胞が固形組織中にある場合は、特定の細胞は例えばミクロ切開またはレーザー捕捉ミクロ切開（ＬＣＭ）によって切開することができる（例えば、Ｂｏｎｎｅｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７８：１４８１，１９９７；Ｅｍｍｅｒｔ－Ｂｕｃｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７４：９９８，１９９６；Ｆｅｎｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈ．１５４：６１，１９９９；ａｎｄ　Ｍｕｒａｋａｍｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｋｉｄｎｅｙ　Ｉｎｔ．５８：１３４６，２０００を見よ）。

【００８４】

ＲＮＡは、組織または細胞サンプルから種々の方法、例えばグアニジニウム溶解、次いでＣｓＣｌ遠心により（Ｃｈｉｒｇｗｉｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　１８：５２９４－５２９９，１９７９）抽出することができる。単一細胞からのＲＮＡは、単一細胞からｃＤＮＡライブラリの調製方法に記載されたように得ることができる（例えば、Ｄｕｌａｃ，Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．３６：２４５，１９９８；Ｊｅｎａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　１９０：１９９，１９９６を見よ）。

【００８５】

ＲＮＡサンプルは特定の種についてさらにエンリッチすることができる。一具体例において、例えば、ポリ（Ａ）＋ＲＮＡをＲＮＡサンプルから単離することができる。他の具体例において、ＲＮＡ集団は関心ある配列についてプライマー特異性ｃＤＮＡ合成、またはｃＤＮＡ合成に基づく直線増幅の多数ラウンドおよび鋳型指向インビトロ転写によってエンリッチすることができる（例えば、Ｗａｎｇ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ，Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：９７１７，１９８９；Ｄｕｌａｃ，ｅｔ　ａｌ．，上出；Ｊｅｎａ，ｅｔ　ａｌ．，上出を見よ）。加えて、エンリッチした、または特定の種または配列にないＲＮＡの集団は、例えばＰＣＲ，リガーゼ連鎖反応（ＬＣＲ）（例えば、Ｗｕ　ａｎｄ　Ｗａｌｌａｃｅ，Ｇｅｎｏｍｉｃｓ　４：５６０，１９８９；Ｌａｎｄｅｇｎｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４１：１０７７，１９８８を見よ）；自己支持配列複製（ＳＳＲ）（例えばＧｕａｔｅｌｌ　ｅｔａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：１１７３，１９８９を見よ）；核酸に基く配列増幅（ＮＡＳＢＡ）および転写増幅（例えばＫｗｏｈ，ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８６：１１７３，１９８９を見よ）を含む、種々の増幅方法によってさらに増幅することができる。ＰＣＲ技術の方法はこの分野では良く知られている（例えば、ＰＣＲ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｆｏｒ　ＤＮＡ　Ａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ，ｅｄ．Ｈ．Ａ．Ｅｒｌｉｃｈ　Ｆｒｅｅｍａｎ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎ．Ｙ．，Ｎ．Ｙ．，１９９２；ＰＣＲ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ：Ａ　Ｇｕｉｄｅ　ｔｏ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ　ｅｄｓ．Ｉｎｎｉｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，Ｃａｌｉｆ．１９９０；Ｍａｔｔｉｌａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．１４：４９６７，１９９１；Ｅｃｋｅｒｔ，ｅｔ　ａｌ．，ＰＣＲ　Ｍ

ethods and Applications 1：17，1991；PCR，eds．McPherson et al.，IRL Press，Oxford）；U．S．Pat．No．4，683，202を見よ）。増幅方法は、例えば、Ohyama et al.，BioTechniques 29：530，2000；Luo，et al.，Nat．Med．5：117，1999；Hegde，et al.，BioTechniques 29：548，2000；Kacharmina，et al.，Invest．Ophtalmol．Vis．Sci．40：3108，1998；Sakai，et al.，Anal．Biochem．287：32，2000によって記載されている。RNA増幅も細胞中その場で実施することができる（例えばEberwine，et al.，Proc．Natl．Acad．Sci．USA 89，3010，1992を見よ）。

【0086】

核酸分子は、マイクロアレイへ核酸分子のハイブリゼーションの検出を許容するように標識することができる。すなわち、プローブは多数の信号発生システムを含むことができ、このため直接、または信号発生システムの一以上の追加メンバーとの結合した作用を通して検出可能である。例えば、核酸は、例えば蛍光標識したdNTP（例えばKricka，1992，Nonisotopic DNA Probe Techniques，Academic Press，San Diego，Calf．を見よ）、ビオチニル化dNTPまたはrNTP次いで標識したストレプトアビジン、化学ルミネセンス標識またはアイソトープで標識することができる。標識の他の例は、TyagiおよびKramer（Nature Biotech．14：303，1996）に記載された“分子ビーコン”を含む。ハイブリダイゼーションは、例えばプラスモン共鳴（例えばThiel，et al.，Anal．Chem．69：4948，1997を見よ）を含む。

【0087】

一具体例において、標的核酸の複数のセット（例えば2，3，4，5またはそれ以上）が標識され、そして一つのハイブリダイゼーション反応に使用される（多重分析）。例えば、核酸の1セットが1つの細胞からのRNAに対応することができ、核酸の他の1セットが他の1細胞からのRNAへ対応することができる。核酸の複数のセットは異なる標識、例えば独自の発光スペクトルを有し、区別することができる異なる蛍光標識（例えばフルオロセインとローダミン）で標識することができる。複数のセットは次に混合し、一つのマイクロアレイへ同時にハイブリダイズさせることができる（例えば、Shena，et al.，Science 270：467－470，1995を見よ）。

【0088】

本発明に使用するためのマイクロアレイは、小分子有効性に特徴的な遺伝子の一以上のプローブを含む。好ましい具体例においては、マイクロアレイは癌において上方調節された遺伝子および癌において下方調節される遺伝子よりなる群から選ばれた一以上の遺伝子に相当するプローブを含んでいる。マイクロアレイは、小分子有効性に特徴的な遺伝子の少なくとも10、好ましくは20、少なくとも50、少なくとも100、または少なくとも1000に相当するプローブを含むことができる。

【0089】

マイクロアレイ上には各遺伝子に相当する1または2以上のプローブが存在し得る。例えば、一つのマイクロアレイは一つの遺伝子に相当するプローブ2ないし20、好ましくは約5ないし10を含むことができる。プローブは小分子有効性が特徴の遺伝子のRNA配列またはその相補体の全長に相当することができ、またはプローブは、特異的ハイブリダイゼーションを許容するのに充分な長さのその一部分に相当することができる。そのようなプローブは約50ヌクレオチドから約100、200、500または1000ヌクレオチド、または1000ヌクレオチド以上を含むことができる。ここでさらに記載されるように、マイクロアレイは、約10ないし50ヌクレオチド、好ましくは約15ないし30ヌクレオチド、そしてもっと好ましくは約20～25ヌクレオチドよりなるオリゴヌクレオチドプローブを含むことができる。プローブは、好ましくは1本鎖であり、そして配

列特異性ハイブリダイゼーションの望むレベルを提供するようにその標的に対し十分な相補性を有するであろう。

【００９０】

典型的には、本発明に使用されるアレイはｃｍ^{2}あたり１００より多い異なるプローブの部位密度を有するであろう。好ましくは、アレイは、５００／ｃｍ^{2}以上、もっと好ましくは約１０００／ｃｍ^{2}以上、そして最も好ましくは約１０，０００／ｃｍ^{2}以上の部位密度を持っているであろう。好ましくは、アレイは、単一の基板上に１００以上の異なるプローブを、もっと好ましくは約１０００以上、なおもっと好ましくは１０，０００以上の異なるプローブ、最も好ましくは１００，０００以上の異なるプローブを持っているであろう。多数の異なるマイクロアレイ配列およびそれらの製造方法が当業者に知られており、そして米国特許Ｎｏｓ．５，２４２，９７４；５，３８４，２６１；５，４０５，７８３；５，４１２，０８７；５，４２４，１８６；５，４２９，８０７；５，４３６，３２７；５，４４５，９３４；５，５５６，７５２；５，４０５，７８３；５，４１２，０８７；５，４２４，１８６；５，４２９，８０７；５，４３６，３２７；５，４７２，６７２；５，５２７，６８１；５，５２９，７５６；５，５４５，５３１；５，５５４，５０１；５，５６１，０７１；５，５７１，６３９；５，５９３，８３９；５，６２４，７１１；５，７００，６３７；５，７４４３０５；５，７７０，４５６；５，７７０，７２２；５，８３７，８３２；５，８５６，１０１；５，８７４，２１９；５，８８５，８３７；５，９１９，５２３；６，０２２，９６３；６，０７７，６７４；６，１５６，５０１；およびＳｈｅｎａ，ｅｔ ａｌ．，Ｔｉｂｔｅｃｈ １６：３０１，１９９８；Ｄｕｇｇａｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．２１：１０，１９９９；Ｂｏｗｔｅｌｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｇｅｎｅｔ．２１：２５，１９９９；Ｌｉｐｓｈｕｔｚ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔ．２１，２０－２４，１９９９；Ｂｌａｎｃｈａｒｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｓｅｎｓｏｒｓ ａｎｄ Ｂｉｏｅｌｅｃｔｒｏｎｉｃｓ １１：６８７－９０，１９９６；Ｍａｓｋｏｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．２１：４６６３－６９，１９９３；Ｈｕｇｈｅｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｏｌ．１９：３４２，２００１に記載されている。アレイを種々の応用に使用する方法を記載している特許は、米国特許Ｎｏｓ．５，１４３，８５４；５，２８８，６４４；５，３２４，６３３；５，４３２，０４９；５，４７０，７１０；５，４９２，８０６；５，５０３，９８０；５，５１０，２７０；５，５２５，４６４；５，５４７，８３９；５，５８０，７３２；５，６６１，０２；５，８４８，６５９；５，８７４，２１９を含む。

【００９１】

アレイは好ましくは対照および参照核酸を含んでいる。対照核酸は、例えばｂｉｏＢ，ｂｉｏＣａｎｄおよびｂｉｏＤのような原核生物遺伝子ｄａｐ，ｌｙｓ，ｐｈｅ，ｔｈｒおよびｔｒｐのようなＰ１バクテリオファージまたはポリＡからのｃｒｅを含む。参照核酸は一つの実験から他の実験までの結果の正規化および定量的レベルでの多数実験の比較を許容する。例示的な参照核酸は既知発現レベルのハウスキーピング遺伝子、例えばＧＡＰＤＨ，ヘキソキナーゼおよびアクチンを含む。

【００９２】

一具体例においては、オリゴヌクレオチドのアレイは固体支持体上で合成することができる。例示的固体支持体はガラス、プラスチック、ポリマー、金属、メタロイド、セラミック、有機物等を含む。

【００９３】

マスキング技術および光保護化学を用いて、核酸プローブの順序正しいアレイを発生させることができる。例えば“ＤＮＡチップ”または非常に大規模免疫化ポリマーアレイ（“ＶＬＳＩＰＳ”アレイ）は、約１ｃｍ^{2}ないし数ｃｍ^{2}の面積を持つ基板上に数百万の区切られたプローブ区域を含み、それにより数個から数百万のプローブを含むことができる（例えば米国特許Ｎｏ．５，６３１，７３４を見よ）。

【００９４】

発現レベルを比較するため、標識した核酸は標的核酸とアレイ上のプローブの間の結合に充分な条件下でアレイと接触させることができる。好ましくは具体例では、ハイブリダイゼーション条件はハイブリダイゼーション特異性の望むレベルを提供するように選択される。すなわち、標識した核酸とマイクロアレイ上のプローブの間にハイブリダイゼーションが発生するのに充分な条件である。

【００９５】

ハイブリダイゼーションは、本質的に特異的ハイブリダイゼーションを許容する条件で実施することができる。核酸の長さおよびＧＣ含量が熱溶融点を決め、そのため標的核酸へのプローブの特異的ハイブリダイゼーションを得るために必要なハイブリダイゼーション条件を決定するであろう。これらの要因は当業者には良く知られており、そしてアッセイにおいてテストすることができる。核酸ハイブリダイゼーションに対する広汎のガイドは、Ｔｉｊｓｓｅｎ，ｅｔ ａｌ，，Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２４；Ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ Ｗｉｔｈ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｐｒｏｂｅｓ，Ｐ．Ｔｉｊｉｓｓｅｎ ｅｔ ａｌ．，ｅｄ．Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，Ｎ．Ｙ．，１９９３に見られる。

【００９６】

上に記載した方法は、アレイ表面上に標識した核酸のハイブリダイゼーションパターンを与える。標識核酸のハイブリダイゼーションパターンは、標的核酸の特定標識に基いて選択された特定の検出方法で種々の方法で可視化または検出することができる。代表的検出手段はシンチレーション計数、オートラジオグラフィー、蛍光測定、比色測定、発光測定、光散乱等を含む。

【００９７】

そのような検出方法の一つは、市販のアレイスキャナー（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ，Ｓａｎｔａ Ｃｌａｒａ，ＣＡ）、例えば４１７アレイヤー、４１８アレイスキャナー、またはＡｇｆｉｌｅｎｔ ＧｅｎｅＡｒｒａｙ Ｓｃａｎｎｅｒを利用する。このスキャナーはインターフェースおよび使用容易なソフトウエアツールを備えたシステムコンピュータによって制御される。出力は種々のソフトウエアアプリケーションによって直接入力または直接読取ることができる。好ましい走査装置は、例えば米国特許Ｎｏｓ．５，１４３，８５４および５，４２４，１８６に記載されている。

【００９８】

蛍光標識プローブについては、転写アレイの各部位における蛍光発光が好ましくは走査共焦点レーザーマイクロスコピーによって検出されることができる。代って、二つの発蛍光原に対して特異的な波長において同時の標本照射を許容するレーザーを用いることができ、そして二つの発蛍光団からの発光を同時に分析することができる（例えば、Ｓｈａｌｏｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｅ Ｒｅｓ．６：６３９－６４５，１９９６を見よ）。好ましくは具体例においては、アレイはコンピュータ制御Ｘ－Ｙステージおよび対物顕微鏡を備えた蛍光スキャナーで走査することができる。遺伝子発現データ、例えば実施される比較のタイプを分析するための種々のアルゴリズムが利用できる。ある具体例においては、同時調節される遺伝子をグループ化するのが望ましい。これは多数プロフィルの比較を許容する。遺伝子のそのようなグループを同定するための好ましい具体例は、クラスタリングアルゴリズムを含む。（クラスタリングアルゴリズムの概観については、例えばＦｕｋｕｎａｇａ，１９９０，Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ｐａｔｔｅｒｎ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ，２ｎｄ Ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ ｐｒｅｓｓ，ＳａｎＤｉｅｇｏ；Ｅｖｅｒｉｔｔ，１９７４，Ｃｌｕｓｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ，Ｌｏｎｄｏｎ；Ｈｅｉｎｅｍａｎｎ Ｅｄｕｓ．Ｂｏｏｋｓ；Ｈａｒｉｇａｎ，１９７５，Ｃｌｕｓｔｅｒｉｎｇ Ａｌｇｏｒｉｔｈｍｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，Ｗｉｌｅｙ；Ｓｎｅａｔｈ ａｎｄ Ｓｏｋａｌ，１９７３，Ｎｕｍｅｒｉｃａｌ Ｔｏｘｏｎｏｍｙ，Ｆｒｅｅｍａｎ；Ａｎｄｅｒｂｅｒｇ，１９７３３，Ｃｌｕｓｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｆｏｒ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；Ｎｅｗ Ｙｏｒｋを見よ）。

【００９９】
バイオマーカー発見
発現パターンは、患者の薬物処置の有効性を予知するために使用することができるバイオマーカーのパネルを誘導するために使用し得る。バイオマーカーは、生物学的サンプルから単離したＲＮＡ，腫瘍生検の凍結サンプルから単離したＲＮＡ，または血清中の質量スペクトル分析誘導タンパク・質量のマイクロアレイ実験からの遺伝子発現レベルによりなることができる。
【０１００】
データ解析の精密なメカニズムはデータの正確な性格に依存するであろうが、バイオマーカーのパネルを開発するための典型的な操作は以下のとおりである。データ（遺伝子発現レベルまたは質量スペクトル）が処置前各患者から集められる。研究が進むにつれ、患者は薬物処置に対する彼等の応答に従って有効または非有効として分類される。有効性の多数レベルをデータに入れることができるが、もし患者集団が数百より少なければ特に、二元比較が最適と考えられる。各クラスにおいて患者の数が適切であると考えて、タンパクおよび／または遺伝子発現データはこの分野で知られた多数の技術によって解析できる。これら技術の多くは伝統的な統計およびマシンラーニングの分野から誘導される。これら技術は二つの目的を果たす。
【０１０１】
１．データの次元性を減らす－質量スペクトルまたは遺伝子発現マイクロアレイの場合、データは数千の個々のデータポイントは約３ないし１０へ減らされる。この減少はセットとして取った時データポイントの予知力に基いている。
２．トレーニング－これら３ないし１０のデータポイントは、次にこの場合、有効薬物処置を比有効から区別するタンパク質量または遺伝子発現を認識するように学習する、多数マシンラーニングアルゴリズムを訓練するために使用される。すべての患者サンプルがアルゴリズムを訓練するために使用できる。
【０１０２】
得られた訓練されたアルゴニズムは、次にそれらの予知力を測定するためにテストされる。典型的には数百以下の訓練例が利用できる時、ある形の交差バリデーションが実施される。例示として、１０倍交差バリデーションを考慮せよ。この場合、患者サンプルは無作為に１０個のビンの一つへ割当てられる。バリデーションの最初のラウンドにおいて、９個のビン中のサンプルがトレーニングのために使用され、１０番目のビン中の残りのサンプルがアルゴリズムストするために使用される。これは追加の９回くり返され、各回サンプルをテストのため異なるビン中に残す。すべての１０ラウンドからの結果（正確な予知およびエラー）が結合され、予知力が評価される。異なるアルゴリズム、そして異なるパネルがこの研究においてこの方法で比較されることができる。ベストなアルゴリズム／パネル組合せが次に選択されるであろう。この“かしこい”アルゴリズムは処置に最も応答するらしい患者を選ぶために将来の研究において使用することができる。
【０１０３】
多数のアルゴリズムは患者から取った追加情報から利益を受ける。例えば性別または年令が予知力を改善するために使用できる。また、正規化およびスムーズ化のようなデータ変換をノイズを減らすために使用できる。この理由のため、多数のアルゴリズムが結果を最適化するために多数の異なるパラメータを使用して訓練されることができる。もしデータ中に予知パターンが存在すれば、最適な、または最適に近いかしこいアルゴリズムが開発できる。もしもっと沢山の患者サンプルが入手できれば、アルゴリズムは新しいデータの利益を取るために保留することができる。
【０１０４】
質量スペクトル分析を使用する例として、血漿（１μｌ）を疎水性ＳＥＬＤＩ－標的を適用し、水中でよく洗い、そしてＳＥＬＤＩ－Ｔｏｆ質量スペクトル計によって分析することができる。これは１００以上の患者サンプルについてくり返すことかできる。各サンプル中の１６，０００ｍ／ｚ値の一部の強度から得られたタンパクプロフィルは、薬物有

効性の予知である特定のｍ／ｚ値のセットを同定するために統計学的に解析されるであろう。イオン交換またはＩＭＡＣ表面のような他のＳＥＬＤＩ標的を用いる同じ実験も実施することができる。これらは血漿中に存在するタンパクの異なるサブセットを捕捉するであろう。さらに血漿はＳＥＬＤＩ標的へ適用前に変性し、前分画することができる。

【０１０５】

診断および予後アッセイ

本発明は、バイオマーカー（例えばＶＥＧＦまたはＶＥＧＦＲ－２のようなＶＥＧＦＲ）、すなわち癌に対しては核酸および／またはポリペプチドを検出することによって、対象が望まない細胞増殖によって特徴付けられる病気または状態に発展するリスクにあるかどうかを決定する方法を提供する。

【０１０６】

臨床応用において、ヒト組織サンプルがここで同定したバイオマーカーの存在および／不存在についてスクリーニングされることができる。そのようなサンプルは、生検針コア、外科的切開サンプル、リンパ節、または血清からなることができる。例えば、これら方法は生検針サンプルを含み、これは任意に腫瘍細胞を全細胞集団の約８０％へエンリッチするため冷凍切開によって分画される。ある具体例においては、これらサンプルから抽出された核酸はこの分野で良く知られた技術によって増幅することができる。検出された選択したマーカーのレベルが転移、変転移悪性、良性または正常組織サンプルの統計学的に有効なグループと比較されるであろう。

【０１０７】

一具体例において、診断方法は例えばノーザンブロット分析、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応、その場のハイブリダイゼーション、免疫沈澱、ウエスタンブロットハイブリダイゼーション、または免疫組織化学によって、対象が異常なｍＲＮＡおよび／またはバイオマーカーのタンパクレベル（例えばＶＥＧＦまたはその可溶性形を含むＶＥＧＦＲ－２のようなＶＥＧＦＲ）を持っているかどうかを決定することを含む。この方法によれば、細胞は対象から得ることができ、そしてバイオマーカー、タンパク、またはｍＲＮＡのレベルが決定され、そして健康対象中のこれらマーカーのレベルと比較される。バイオマーカーポリペプチドまたはｍＲＮＡの異常レベルは癌の指標となり得る。

【０１０８】

従って、一面において本発明はここに開示したユニークな核酸マーカーに特異的なプローブおよびプライマーを提供する。従って核酸プローブは、マーカー核酸配列のコーディング配列の一部分に対して相補的であるコーディング配例の長さ１０ヌクレオチド、好ましくは１５ヌクレオチド、もっと好ましくは２５ヌクレオチド、および最も好ましくは少なくとも４０ヌクレオチド、そしてすべてまたはすべてに近くまでのコーディング配列を含む。

【０１０９】

一具体例において、この方法は患者からの組織中の癌細胞の存在を決定するために核酸プローブ使用することを含む。特にこの方法は、

１．ヌクレオチド配列のコーディング配列の一部に対して相補的であり、そして腫瘍細胞に応差的に発現されるコーディング配列の少なくとも１０ヌクレオチド長さ、好ましくは少なくとも１５ヌクレオチド、もっと好ましくは２５ヌクレオチド、そして最も好ましくは少なくとも４０ヌクレオチド、そして全部または全部近くまでのヌクレオチド配列を含んでいるヌクレトチドプローブを準備し、

２．潜在的に癌細胞を含んでいる患者からの組織サンプルを採取し、

３．実質上すべてが非癌である細胞を含んでいる第２の組織サンプルを準備し、

４．核酸プローブを厳格な条件下で第１および第２の組織サンプルのＲＮＡと接触させ（例えばノーザンブロットまたはその場のハイブリダイゼーションにおいて）、および

５．（ａ）第１の組織サンプルのＲＮＡとプローブとのハイブリダイゼーション量と、（ｂ）第２の組織サンプルのＲＮＡとプローブとのハイブリダイゼーション量を比較することを含み、ここで第２の組織サンプルのＲＮＡとのハイブリダイゼーション量と比較して

、第１の組織サンプルのＲＮＡとのハイブリダイゼーション量の統計学的に有意な差が、第１の組織中の癌細胞の存在の指標である。

【０１１０】

一局面において、この方法に与えられたマーカー核酸配列（例えばＶＥＧＦまたはＶＥＧＦＲ－２）から誘導されたプローブとのその場ハイブリダイゼーションを含む。この方法は、標識したハイブリダイゼーションプローブと、潜在的に癌または前癌細胞の与えられたタイプのサンプルおよび正常細胞と接触させ、そしてプローブが与えられた組織タイプの一部の細胞を同じ組織タイプの他の細胞を標識するよりも有意に相違する程度（例えば少なくとも係数２、または少なくとも係数３、または少なくとも係数５、または少なくとも係数２０、または少なくとも係数５０だけ）に標識するかどうかを決定することを含む。

【０１１１】

または本発明は、与えられたヒト組織からのテスト細胞の表現型、例えば細胞が（ａ）正常、または（ｂ）癌性または前癌性であるかを決定する方法を包含し、該方法は、テスト細胞のｍＲＮＡを、核酸配列のコーディング配列の一部に対して相補的であり、そして与えられた組織タイプの正常細胞と比較して腫瘍細胞中に応差的に発現される配列の少なくとも１２ヌクレオチド長さ、好ましくは少なくとも１５ヌクレオチド、もっと好ましくは少なくとも２５ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも４０ヌクレオチド、そしてすべてまたは殆どすべてを含んでいる核酸プローブと接触させ、そしてプローブのｍＲＮＡへのハイブリダイゼーションの大体の量を決定することを含み、ここでその組織タイプの正常細胞のｍＲＮＡで見られるよりも多いかまたは少ないかは、テスト細胞が癌または前癌性であること指示である。

【０１１２】

代って、上の診断アッセイはマーカー核酸配列（例えばＶＥＧＦまたはｓＶＥＧＦＲ－２）によってコードされたタンパク生産物を検出するために抗体を使用して実施してもよい。従って一具体例においては、アッセイはテストセルのタンパクをある核酸の遺伝子産物に対し特異的な抗体と接触させ（マーカー核酸はテスト細胞タイプの正常細胞に与えられた対照レベルで発現されるものである）、そして抗体とテスト細胞のタンパクによる免疫複合体形成の大体の量を決定すること含み、ここで同じ組織タイプの正常細胞と比較してテスト細胞のタンパクで形成された免疫複合体の量の統計学に有意な差は、テスト細胞が癌または前癌性であることの指標である。好ましくは、抗体はＶＥＧＦまたはｓＶＥＧＦＲ－２、特にその細胞外ドメインに対して特異性である。

【０１１３】

本発明において有用なポリペプチドと特異結合するポリクローナルおよび／またはモノクローナル抗体の生産方法は当業者には既知であり、そして例えば、Ｄｙｍｅｃｋｉ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８７：４８１５，１９９２；Ｂｏｅｒｓｍａ ＆ Ｖａｎ Ｌｅｅｕｗｅｎ，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ５１：３１７，１９９４；Ｇｒｅｅｎ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ２８：４７７，１９８２；Ａｒｎｈｅｉｔｅｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ２９４：２７８，１９８１に見られる。

【０１１４】

他のそのような方法は、与えられた組織タイプの癌組織において同じ組織タイプの非癌組織中の遺伝子産物のレベルよりも多いレベルで与えられた組織タイプの癌細胞中に存在する、マーカー核酸配列の遺伝子産物に対して特異性の抗体を準備し、潜在的に癌細胞を含んでいる与えられた組織タイプの組織の第１のサンプルを患者から採取し、同じ組織タイプの組織の第２のサンプルを用意し（これは同じ患者または正常対照、例えば他の個人または培養細胞からでよく、この第２のサンプルは正常細胞を含み、本質的に癌細胞を含まない）、抗体（溶解したがしかし未分画のまたはその場の細胞中の）を第１および第２のサンプルと、抗体とサンプル中に存在する遺伝子産物の間に免疫複合体の形成を許容する条件下で接触させ、そして（ａ）第１のサンプル中の免疫複合体生成量を、（ｂ）第２のサンプル中の免疫複合体生成量と比較するステップを含み、ここで第２のサンプル中の

免疫複合体生成量と比較して少ない第１のサンプル中の免疫複合体生成量の統計学的に有意な差は、組織の第１のサンプル中に癌細胞の存在の指示である。

【０１１５】

さらに本発明は、（ａ）対象から細胞サンプルを採取し、（ｂ）採取したサンプル中のマーカーポリペプチドの量を定量的に決定し、そして（ｃ）決定したマーカーペプチドの量を既知標準と比較し、それにより対象サンプルがマーカーポリペプチドの異常量を有するかどうかを決定することを含む、マーカーポリペプチドの異常量を対象から得たサンプルが有するかどうかを決定する方法を提供する。そのようなマーカーポリペプチドは免疫組織化学アッセイ、ドットブロットアッセイ、ＥＬＩＳＡ等によって検出することができる。

【０１１６】

イムノアッセイはサンプル中のタンパクレベルを定量するために普通に使用されており、多数のイムノアッセイ技術がこの分野で知られている。本発明は特定のアッセイ操作へ限定されず、それ故均質および不均質操作の両方を含むことを意図する。本発明に従って、実施し得る例示的イムノアッセイは、蛍光分極化イムノアッセイ（ＦＰＩＡ）、蛍光イムノアッセイ（ＦＩＡ）、酵素イムノアッセイ（ＥＩＡ）、ネフェロメトリック阻害イムノアッセイ（ＮＩＡ）、酵素リンクイムノアッセイ（ＥＬＩＳＡ）、およびラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）を含む。指示薬部分、または標識基を対象抗体へ取付けることができ、そしてしばしばアッセイ設備およびコンパチブルなイムノアッセイ操作の利用可能性によって指図される方法の種々の使用の必要性に合致するように選択される。上記の種々のイムノアッセイを実施するのに使用される一般的技術は当業者に知られている。

【０１１７】

他の具体例において、患者の生物学的流体（例えば血液または尿）中のコードされた産物のレベル、または代ってポリペプチドの量は、その患者の細胞内のマーカー核酸配列の発現レベルのモニター方法として決定することができる。そのような方法は、患者から生物学的流体のサンプルを取得し、サンプル（またはサンプルからタンパク）をコードされたマーカーポリペプチドに特異性の抗体と接触させ、そして免疫複合体生成量はサンプル中のマーカーにコードされた産物のレベルの指標である、抗体による免疫複合体生成量を決定するステップを含んでいる。この決定は、正常な個人から採取した対照サンプル中の、または同じ人から前にまたは後で得た一以上のサンプル中の同じ抗体による免疫複合体生成量と比較する時特に指示的である。

【０１１８】

他の具体例において、本方法は細胞内に存在し、高増殖異常に相関させることができるマーカーポリペプチドの量を決定するために使用し得る。マーカーポリペプチドのレベルは、細胞のサンプルが転換されつつある、またはそれへ向って前処理されている細胞を含んでいるかどうかを評価するために予見的に使用し得る。さらに、本方法は転換されたことが知られている細胞の表現型を評価するために使用でき、表現型決定結果は、特定の治療法の計画に有用である。例えば、サンプル細胞中の非常に高いマーカーポリペプチドレベルは癌に対する強力な診断および予後マーカーである。マーカーポリペプチドレベルの観察は、例えば、もっと攻撃的な治療剤の使用に関する決定に用いることができる。

【０１１９】

上述のように、本発明の一面はマーカーポリペプチドのレベルがサンプル細胞中で有意に減少したかを患者から単離した細胞の文脈において決定するための診断アッセイに関する。術語“有意に減少”とは、細胞が類似の組織起源の正常細胞と比較したマーカーポリペプチドの減少した細胞量を持っている細胞表現型を指す。例えば、細胞は正常細胞に比較して約５０％、２５％または５％少ないマーカーポリペプチドを持ち得る。特にこのアッセイはテスト細胞中のマーカーポリペプチドのレベルを評価し、そして好ましくは測定したレベルを少なくとも一つの対照細胞、例えば正常細胞および／または既知表現型の転換細胞中に検出されたマーカーポリペプチドと比較する。

【０１２０】

本発明にとって特に重要なのは、正常および異常マーカーポリペプチドレベルに関連する細胞の数によって決定されマーカーポリペプチドのレベルを定量化できる能力である。特定のマーカーポリペプチド表現型を有する細胞の数は、その時患者の予後診断に相関させることができる。本発明の一具体例においては、病変のマーカーポリペプチド表現型は、マーカーポリペプチドの異常に高い／低いレベルを持つことが見られた生検細胞パーセントとして決定される。そのような発現は免疫組織化学アッセイ、ドットブロートアッセイ、ＥＬＩＳＡ等によって検出することができる。

【０１２１】

組織サンプルが使用される場合は、免疫組織化学染色がマーカーポリペプチド表現型を有する細胞の数を決定するために使用し得る。そのような染色において、生検または他の組織サンプルから組織の多数ブロックが採取され、そしてプロテアーゼＫまたはペプシンのような剤を使用してタンパク加水分解にかけることができる。ある具体例においては、サンプル細胞から核分画を単離し、そして核分画中のマーカーポリペプチドのレベルを検出することが望ましい。

【０１２２】

組織サンプルはホルマリン、グルタルアルデヒド、メタノール等のような試薬による処理によって固定される。サンプルは次にマーカーポリペプチドに対して結合特異性を有する抗体、好ましくはモノクローナル抗体とインキュベートされる。この抗体は後からの結合検出のための標識へ接合することができる。サンプルは免疫複合体の形成に十分な時間インキュベートされる。次にこの抗体へ接合した標識によって抗体の結合が検出される。抗体が標識されない場合は、例えば抗マーカーポリペプチド抗体のアイソタイプに対して特異性の第２の標識抗体を使用することができる。使用し得る標識の例は、放射性核種、蛍光剤、化学ルミネセンス剤、酵素等を含む。

【０１２３】

酵素が使用される場合、酵素のための基質が発色したまた蛍光生成物を提供するためにサンプルへ加えられる。接合体に使用し得る好適の酵素の例は、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、マレエートデヒドロゲナーゼ等を含む。商業的に入手し得ない場合、そのような抗体／酵素接合体は当業者に知られた技術によって容易に調製し得る。

【０１２４】

一具体例において、アッセイはドットブロートアッセイとして実施することができる。ドットブロートアッセイは、組織サンプルが使用される場合に特別の用途を見出す。これは単一細胞に関連するマーカーポリペプチドの平均量をあらかじめ定めた細胞数から生産された細胞不含抽出液中のマーカーポリペプチドの量へ相関させることによって決定することを許容する。

【０１２５】

癌の文献においては、同じタイプの腫瘍細胞（例えば乳房および／または結腸腫瘍細胞）は、個々の癌遺伝子の均一に増加した発現、または個々の腫瘍抑制遺伝子の均一に減少した発現を示さないことが良く確立されている。与えられたタイプの癌細胞の間にさえも与えられたマーカー遺伝子の発現の変動するレベルがあり、さらに単一のテストよりもテストの組に依存する必要性がさらに強調される。従って一面において本発明は、診断テストの信頼性および／または正確度を改良するため本発明のプローブのいくつかを使用するテストの組を提供する。

【０１２６】

一具体例において、本発明は核酸プローブがＤＮＡチップ上に組織化されたアレイに固定化される方法を提供する。オリゴヌクレオチドは、リソグラフィーを含む種々のプロセスによって固体支持体へ結合することができる。例えば、チップは２５０，０００オリゴヌクレオチドまでを保持することができる。これらの核酸プローブは、マーカー核酸配列のコーディング配例の一部分に相補的であり、そして腫瘍細胞において応差的に発現される、長さ少なくとも約１２ヌクレオチド、好ましくは約１５ヌクレオチド、最も好ましく

は約４０ヌクレオチド、そして配列の全部または殆ど全部のヌクレオチド配列を含む。本発明は、単一チップ上に核酸マーカーのアレイを提供することによってテストの信頼度を増強するため、種々の癌のためについて利用可能なテストを上廻る有意義な利益を提供する。

【０１２７】

この方法は、全細胞集団の約８０％へ腫瘍細胞をエンリッチする冷凍状態切開によって任意に分画される生検片を取得することを含む。次にＤＮＡまたはＲＮＡが抽出され、増幅され、そしてマーカー核酸配列の存在または不存在を決定するためＤＮＡチップで分析される。

【０１２８】

一具体例において、核酸プローブは二次元マトックスまたはアレイに基板上にスポットされる。核酸のサンプルが標識され、プローブへハイブリダイズされる。プローブ核酸へ結合した標識したサンプル核酸を含む２本鎖核酸は、サンプルの未結合部分を洗い落とした後に検出することができる。

【０１２９】

プローブ核酸は、ガラス、ニトロセルロース等を含む基板上にスポットすることができる。プローブは、共有結合により、または疎水性相互作用のような非特異的相互作用によって基板へ結合することができる。サンプル核酸は放射活性標識、発蛍光団、発色団等によって標識することができる。

【０１３０】

アレイの構築方法およびこれらアレイの使用方法は例えば以下の特許に記載されている。ＥＰ　Ｎｏ．０７９８９７；ＷＯ９７／２９２１２，ＷＯ９７／１２７３１７；ＥＰ　Ｎｏ．０７８５２８０；ＷＯ９７／０２３５７；Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，５９３，８３９；Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，５７８，８３２；ＥＰ　Ｎｏ．０７２８５２０；Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，５９９，６９５；ＥＰ　Ｎｏ．０７２１０１６；Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，５５６，７５２；ＷＯ９５／２２０５８；Ｕ．Ｓ．Ｐａｔ．Ｎｏ．５，６３１，７３４

【０１３１】

さらに、アレイは遺伝子の応差発現を検査するために使用することができ、そして遺伝子機能を決定するために使用することができる。例えば、核酸配列のアレイは、該核酸配列が正常細胞と癌細胞の間に応差発現されるかどうかを決定するために使用し得る。対応する正常細胞中は観察されない癌細胞中の特定のメッセージの増加した発現は、癌特異性タンパクを指示し得る。

【０１３２】

一具体例において、核酸分子は、配置された核酸分子を核酸のどれかが正常細胞もしくは組織と癌細胞もしくは組織の間で応差的に発現するかどうかを決定するために使用できるように、固体表面（例えば膜）上にマイクロアレイを発生するために使用し得る。

【０１３３】

一具体例において、核酸分子は、配置された核酸分子を核酸のどれかが正常細胞もしくは組織と癌細胞もしくは組織の間で応差的に発現するかどうかを決定するために使用できるように、固体表面（例えば膜）上にマイクロアレイを発生するために使用し得る。

【０１３４】

一具体例において、本発明拡散分子はｃＤＮＡであることができ、そして後でＰＣＲによって増幅され、そしてナイロン膜上にスポットされるｃＤＮＡを発生させるために使用し得る。この膜は次に、癌および正常組織または細胞から得た放射標識した標的核酸と反応させることができる。ｃＤＮＡ発生およびマイクロアレイ調製は当業者には知られており、例えばＢｅｒｔｕｃｃｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．８：２１２９，１９９９；Ｎｇｕｙｅｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｏｍｉｎｉｃｓ　２９：２０７，１９９５；Ｚｈａｏ，ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅ　１５６：２０７；Ｇｒｅｓｓ，ｅｔ　ａｌ．，Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｇｅｎｏｍｅ　３：６０９，１９９２；Ｚｈｕｍｂａｙｅｖａ

，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅ　３０：１５８，２００１；およびＬｅｎｎｏｎ，ｅｔ　ａｌ，Ｔｒｅｎｄｓ　Ｇｅｎｅｔ．７：３１４，１９９９に見られる。

【０１３５】

なお他の具体例において、本発明は本発明のマーカーポリペプチドに対して発生させた抗体のパネルの使用を目論む。好ましくは抗体はＶＥＧＦまたはＶＥＧＦＲ－２に対して発生させる。そのような抗体パネルは癌のための信頼し得る診断プローブとして使用し得る。本発明のアッセイは細胞、例えば肺細胞を含んでいる生検サンプルを、マーカーポリペプチドの存在または不存在を決定する一以上のコードされた産物に対する抗体のパネルと接触させることを含む。

【０１３６】

本発明の診断方法は、処理の追跡として、例えばマーカーポリペプチドの定量が現在または以前に採用された癌治療の有効性と、それに患者の予後におけるこれら治療の効果の指示としても使用し得る。

【０１３７】

加えて、マーカー核酸またはマーカーポリペプチドは、初期検出、追跡スクリーニング、再発の検出、および化学療法または外科処置の処置後モニタリングのための診断パネルの一部として使用し得る。

【０１３８】

従って、本発明は例えば、細胞の主要変換から発生する増殖異常の診断および表現型決定を助けるため、細胞からのマーカーポリペプチドの増加または損失を検出するための診断アッセイおよび試薬を提供可能とする。

【０１３９】

上記診断アッセイは、予後的診断にも同様に使用されるように適応化できる。そのような適用は、腫瘍の進行の特徴的段階に起こる出来事に対して本発明のアッセイの感度の利益を受ける。例えば、与えられたマーカー遺伝子は非常に早い段階で、多分細胞が悪性腫瘍へ不可逆的に発展する前に上方または下方調節され、他方他のマーカー遺伝子はもっと遅い段階においてのみ特徴的に上方または下方調節され得る。そのような方法は、テスト細胞のｍＲＮＡを、腫瘍進行の異なる段階において癌または前癌細胞において異なる特徴レベルにおいて発現される、与えられた核酸から誘導された核酸プローブと接触させ、そして細胞内の遺伝子発現のレベルの指示であり、従って細胞の腫瘍進行の段階の指示である、細胞のｍＲＮＡに対するプローブの大体のハイブリダゼーション量を決定するステップを含む。代ってアッセイは、与えられた核酸の遺伝子産物に特異性の抗体をテスト細胞タンパクと接触させることによって実施することができる。そのようなテストの組は腫瘍の存在および位置を開示するばかりでなく、臨床医が腫瘍のために最も適切な処置モードを選択し、そしてその処置の成功の可能性を予知することを許容する。

【０１４０】

本発明の方法は、腫瘍の臨床コースを追従するために使用し得る。例えば、本発明のアッセイは、癌のための患者の処置後患者からの組織サンプルへ適用することができ、他の組織サンプルを採取し、そしてテストを反復することができる。成功的な処置は癌または前癌細胞の応差的発現特徴を示すすべての細胞の除去か、または多分正常レベルへ近付く、またはそれを上廻るそれら細胞中の遺伝子発現の実質増加をもたらすであろう。

【０１４１】

予見的アッセイ

与えられた抗癌剤からの臨床利益を予見することができる研究室アッセイは、癌を有する患者の臨床的管理を大きく促進するであろう。この効果を評価するため、抗癌剤に関連したバイオマーカーを処置前、最中および処置後に生物学的サンプル（例えば腫瘍サンプル、血漿）中で分析することができる。

【０１４２】

例えば、ＶＥＧＦまたはＶＥＧＦＲ、好ましくはｓＶＥＧＦＲ－２ポリペプチドを血漿中で検出することができる。このためこれらのポリペプチドのベースライン血漿濃度の変

化が癌を有する患者においてモニターされ得る。例えば、ＶＥＧＦのレベルの増加およびｓＶＥＧＦＲ－２の減少したレベルはソラフェニブ有効性に関連し得る。

【０１４３】

加えて、ポリペプチドレベルがパラフィン埋込み腫瘍生検サンプルを用いて定量的免疫組織化学によってモニターされ得る。

【０１４４】

処理をモニターするための他のアプローチは血清タンパクスペクトルの評価である。特に、血漿サンプルは質量スペクトル分析（例えば表面増強レーザー脱着およびイオン化）に服せしめ、そしてタンパクスペクトルを各患者に対して作成することができる。患者から処置前および処置中に得た血漿の分析から誘導したスペクトルのセットは、処置したサンプルを未処置サンプルから完全に区別するタンパクパターンを同定することができる対話型サーチングアルゴリズムによって解析し得る。得られるパターンは処置後の臨床利益を予知するために使用し得る。

【０１４５】

生物学的サンプル（例えば腫瘍生検サンプル、血液サンプル）のプロフィルを描くグローバル遺伝子発現およびバイオ情報誘導同定は、抗癌剤に対する臨床的利益および感度、それに抵抗性の発展を予知するために使用することができる。例えば、処置前および処置中に患者全血から得た細胞から単離されたＲＮＡをＡｆｆｍｅｔｒｉｘ　ＧｅｎｅＣｈｉｐ技術およびアルゴリズムを用いて血球遺伝子発現プロフィルを作成するために使用し得る。これらの遺伝子発現プロフィルは、特定の抗癌剤での処置からの臨床利益を予知するために使用し得る。

【０１４６】

１Ｄ^{1}Ｈ－ＮＭＲ（核磁気共鳴）による尿の化学的組成の分析も予見的アッセイとして使用することができる。パターン認識技術は、抗癌剤による処置の代謝応答を評価し、この応答を臨床的エンドポイントと相関させるために使用することができる。尿へ排泄された生化学的または内因性代謝産物は正常対象のためのプロトンＮＭＲによってよく特徴化されている（Ｚｕｐｐｉ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｃｈｉｍ　Ａｃｔａ　２６５：８５－９７，１９９７）。これら代謝産物（約３０－４０）は、クエン酸および尿素サイクルのような主要代謝経路の副産物を代表する。薬物、病気および遺伝子刺激は、刺激に対する代謝応答等の時間ラインおよび強さの指示であるベースライン尿プロフィルの代謝特異的変化を産むことが示されている。これらの分析は多変動因子であり、それ故データー解釈を改良するためパターン認識技術を使用する。尿代謝プロフィルは臨床利益の臨床エンドポイントに相関させることができる。

【０１４７】

これ以上考究することなく、当業者は以上の説明を使用して、本発明をその全範囲に利用することができると信じられる。それ故、以下の特定の好ましい実施例は単に例証と解すべきであり、開示の残部の限定と解すべきでない。

【０１４８】

以前および以後の実施例において、温度は未補正の摂氏で与えられ、そしてすべての部およびパーセントは特記しない限り重量による。

【実施例】

【０１４９】

本発明は以下の非限定的実施例を参照して以下に説明される。

【０１５０】

序説：フェーズＩＩＩ　ＴＡＲＧＥＴ研究、進行した腎臓細胞癌を有する患者において無作為プラセボ対照研究が全体の生存に対するソラフェニブの効果を検討した。この研究の二次的目的は、特異的バイオマーカーで処置効果を評価し、そしてこれらのバイオマーカーと患者結末の間の関係を評価することである。

【０１５１】

方法：候補バイオマーカーの同定のためのサンプル、特に記録用生検標本、全血、血漿

および尿が採取された。すべての分析はＩＲＢ承認プロトコールのもとに実施された。組織標本は、ＤＮＡ配列決定、および免疫組織化学（ＩＨＣ）によるホスフォＥＲＫ（ｐＥＲＫ）レベルによって、ＶＨＬ遺伝子突然変異状態（遺伝子分析に同意した患者のみ）について分析された。ｍＲＮＡが血液から単離され、そして患者結末と相関する遺伝子発現プロフィルについてマイクロアレイによって分析された。加えて、タンパクサインについて血漿を評価するため質量スペクトル分析アプローチが使用され、そして尿は患者結末と相関する小分子のパターンについて^{1}Ｈ－ＮＭＲによって分析された。前および後処理血漿サンプルがＶＥＧＦおよび可溶性ＶＥＧＦＲ－２（ｓＶＥＧＦＲ－２）についてＥＬＩＳＡによって分析され、そしてソラフェニブ処置に関係したこれら分子の変化が検討された。

【０１５２】

結果：ソラフェニブで処置した患者においては、ｓＶＥＧＦＲ－２が処置３週後血漿中で有意に減少した（ｐ＜２Ｅ$^{-16}$）。プラセボ処置患者におけるｓＶＥＧＦＲ－２血漿レベルにはこの同じ時間にわたって変化がなかった。ＶＥＧＦレベルも患者の両グループにおいて分析された。ソラフェニブを受けた患者においては、ＶＥＧＦのレベルが３週間後ベースラインより有意に増加したが（ｐ＝３．２Ｅ$^{-5}$）、しかしプラセボ処置患者においては増加は観察されなかった。高いベースラインＶＥＧＦを有する患者（＞２５０ｐｇ／ｍｌ）は低いＶＥＧＦベースラインを有する患者（＜２５０ｐｇ／ｍｌ）よりも有意に短い進行なし生存（ＰＦＳ）を持ったが、ソラフェニブを受けている患者では、高いまたは低いベースラインＶＥＧＦレベルを有する患者間でＰＦＳにおいて有意差は観察されなかった。ＩＨＣによるｐＥＲＫのための染色は、患者サンプルの大部分は高い最高染色強度（０ないし４＋のスケールで４＋）を持っていることを示した。同様に、大部分のサンプルはｐＥＲＫのために染色された腫瘍細胞の低いパーセント（染色された腫瘍細胞の＜２５％）を持っていた。

【０１５３】

患者中のＶＥＧＦレベルを検査する研究が臨床的結果の相関を同定するためにと実施された。

【０１５４】

有用である判明した患者結末の測定は、Ｃｏｘ回帰解析を用いる死亡までの時間（ＴＴＤ）と、進行なし生存（ＰＦＳ）であった。ＶＥＧＦのベースラインレベルが決定され、そしてベースラインレベルの変化が処置１８週において決定された。観察された効果は年令、性別、ＥＣＯＧ状態またはＭｏｔｚｅスコアについて調節された。これらの調節は最小であった。

【０１５５】

ＶＥＧＦベースライン対ＴＴＤの関係が図１（Ｋａｐｌａｎ－Ｍｅｙｅｒ解析）に示され、そして週１８におけるＶＥＧＦ変化対ＴＴＤの関係が図２（Ｋａｐｌａｎ－Ｍｅｙｅｒ解析）に示されている。図に示しれているように、高いベースラインＶＥＧＦレベルは短い死亡までの時間に相関している（ＶＥＧＦが連続的変数として解析される時）。週１８におけるＶＥＧＦレベルの大きい上昇は短い死亡までの時間に相関している（ＶＥＧＦが連続的変数として解析される時）。

【０１５６】

以上の実施例は、一般的または特定的に記載した反応剤および／または作業条件で上記実施例に記載されたそれらを置換することによって類似の成功度をもって繰り返すことができる。

【０１５７】

以上の記載から、当業者は本発明の本質的特徴を確かめることができ、そしてその精神および範囲を逸脱することなく種々の用途および条件に適応化するため種々の変更および修飾を加えることができる。

【図面の簡単な説明】

【０１５８】

【図１】ＶＥＧＦベースライン対ＴＴＤのグラフ。
【図２】△ＢＬ－Ｗｋ１８（１８週までのベースラインの変化）対ＴＴＤのグラフ。

【図１】

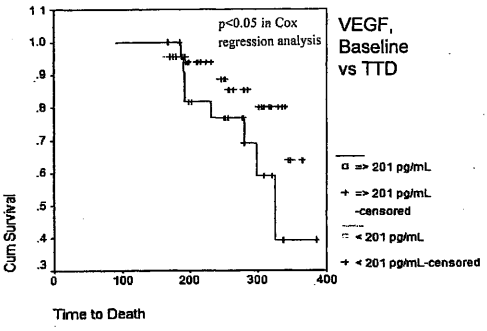


FIG. 1

【図２】

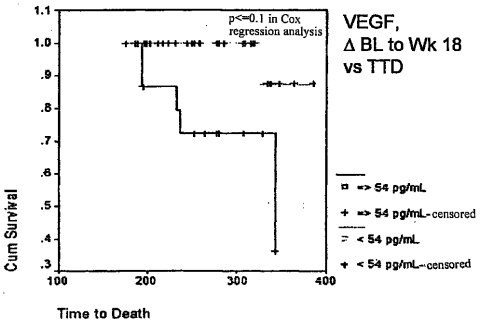


FIG. 2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/044117

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50 G01N33/574

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AHMAD T ET AL: "Kinase inhibition with BAY 43-9006 in renal cell carcinoma" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 10, no. 18 Pt 2, 19 March 2004 (2004-03-19), pages 6388S-6392S, XP002362669 ISSN: 1078-0432 page 6390S, left-hand column, paragraph 3 - page 6391S, right-hand column, paragraph 5	1,8, 11-26,46
Y	page 6388S, right-hand column, paragraph 3	2-7,9,10
A	the whole document	27,47-50

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

Date of the actual completion of the International search	Date of mailing of the International search report
21 March 2007	14/11/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer FLEITMANN, J

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/044117

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DATABASE MEDLINE [Online] US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; May 2004 (2004-05), GÓMEZ-ESQUER FRANCISCO ET AL: "mRNA expression of the angiogenesis markers VEGF and CD105 (endoglin) in human breast cancer." XP002425577 Database accession no. NLM15274325 the whole document & ANTICANCER RESEARCH 2004 MAY-JUN, vol. 24, no. 3a, May 2004 (2004-05), pages 1581-1585, ISSN: 0250-7005	2,4,6,9
Y	FOEKENS JOHN A ET AL: "High tumor levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to systemic therapy in advanced breast cancer" CANCER RESEARCH, vol. 61, no. 14, 15 July 2001 (2001-07-15), pages 5407-5414, XP002425575 ISSN: 0008-5472 abstract	3,5,7,10
A	WO 2005/089443 A (PENN STATE RES FOUND [US]; ROBERTSON GAVIN P [US]; KESTER MARK [US]; S) 29 September 2005 (2005-09-29) page 98, line 27 - line 29 example 19	1-27, 46-50
P,X	VERONESE MARIA LUISA ET AL: "Mechanisms of hypertension associated with BAY 43-9006." JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY 20 MAR 2006, vol. 24, no. 9, 20 March 2006 (2006-03-20), pages 1363-1369, XP001249174 ISSN: 1527-7755 page 1364, right-hand column, paragraph 2 - left-hand column, paragraph 3	1-27, 46-50

-/--

9

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/044117

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	ELTING JAMES ET AL: "Biomarkers associated with clinical outcomes in TARGETs, a Phase III single-agent, placebo-controlled study of sorafenib in advanced renal cell carcinoma." PROCEEDINGS OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH ANNUAL MEETING, vol. 47, April 2006 (2006-04), pages 683-684, XP001245679 & 97TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR); WASHINGTON, DC, USA; APRIL 01 -05, 2006 ISSN: 0197-016X the whole document	1-27, 46-50

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/044117

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-27, 46-50

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /044117

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-27,46-50

Monitoring the response of a patient having cancer treated with sorafenib by analysing a sample taken from that patient for VEGF and/or sVEGFR-2

---

2. claims: 28-32 (all partly for solid tumor of the breast),33 (complete)

Evaluating the condition of a patient with breast cancer by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

---

3. claims: 28-32 (all partly for cancer of the respiratory tract),34 (complete)

Evaluating the condition of a patient with cancer of the respiratory tract by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

---

4. claims: 28-32 (all partly for cancer of the brain),35 (complete)

Evaluating the condition of a patient with cancer of the brain by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

---

5. claims: 28-32 (all partly for cancer of the reproductive organ),36 (complete)

Evaluating the condition of a patient with cancer of the reproductive organ by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

---

6. claims: 28-32 (all partly for cancer of the digestive tract),37 (complete)

Evaluating the condition of a patient with cancer of the digestive tract by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

---

7. claims: 28-32 (all partly for cancer of the urinary tract),38,45 (complete)

Evaluating the condition of a patient with cancer of the urinary tract by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

8. claims: 28-32 (all partly for cancer of the eye),39 (complete)

Evaluating the condition of a patient with cancer of the eye by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

---

9. claims: 28-32 (all partly for cancer of the liver),40 (complete)

Evaluating the condition of a patient with cancer of the liver by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

---

10. claims: 28-32 (all partly for cancer of the skin),41 (complete)

Evaluating the condition of a patient with cancer of the skin by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

---

11. claims: 28-32 (all partly for cancer of the head and neck),42 (complete)

Evaluating the condition of a patient with cancer of the head-and-neck by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

---

12. claims: 28-32 (all partly for cancer of the blood),43 (complete)

Evaluating the condition of a patient with cancer of the blood by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

---

13. claims: 28-32 (all partly for sarcoma of the soft tissue),44 (complete)

Evaluating the condition of a patient with sarcoma of the soft tissue by determining the level of expression of VEGF and/or sVEGFR-2 in a sample taken from the patient.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2006/044117

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005089443 A	29-09-2005	AU 2005223649 A1	29-09-2005
		BR PI0508970 A	21-08-2007
		CA 2560269 A1	29-09-2005
		EP 1744788 A2	24-01-2007

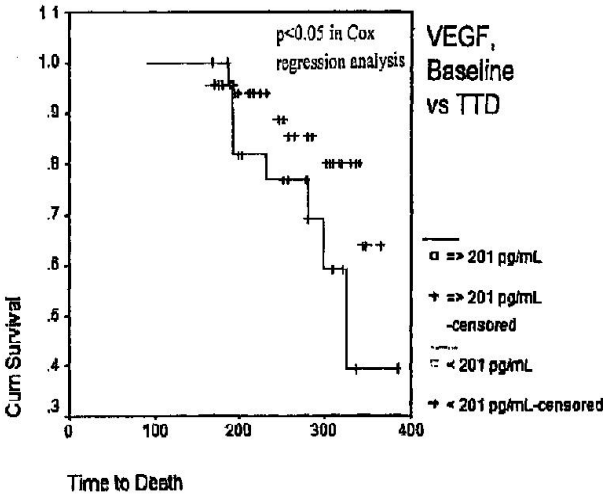
フロントページの続き

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

(72)発明者 エルティング，ジェームス
アメリカ合衆国０６４４３、コネチカット、マジソン、ヒーザーウッドドライブ５

Ｆターム(参考) 4B063 QA05 QA19 QQ03 QQ08 QQ53 QR08 QR32 QR56 QR62 QS25
QS34 QX02

专利名称(译)	癌症的预测和预后以及癌症治疗的监测		
公开(公告)号	JP2009515553A	公开(公告)日	2009-04-16
申请号	JP2008541268	申请日	2006-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔健康护理有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳医药保健有限责任公司		
[标]发明人	ウイルヘルムスコット エルティングジェームス		
发明人	ウイルヘルム,スコット エルティング,ジェームス		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5011 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/57488 G01N33/57492 G01N2333/475 G01N2333/71		
FI分类号	C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M		
F-TERM分类号	4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	一夫Akaoka		
优先权	60/735854 2005-11-14 US		
其他公开文献	JP2009515553A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明还涉及生物标志物和生物标志物用于癌症预测和预后的用途以及生物标志物用于监测癌症治疗功效的用途。具体地，本发明涉及VEGF和sVEGFR作为索拉非尼治疗的受试者的生物标志物的用途。