

(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2019-516406

(P2019-516406A)

(43) 公表日 令和1年6月20日(2019.6.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6886 Z	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 Z	4 C 0 8 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 126 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-512943 (P2019-512943)
 (86) (22) 出願日 平成29年5月17日 (2017.5.17)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年1月16日 (2019.1.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/033107
 (87) 国際公開番号 W02017/201164
 (87) 国際公開日 平成29年11月23日 (2017.11.23)
 (31) 優先権主張番号 62/337,645
 (32) 優先日 平成28年5月17日 (2016.5.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/379,402
 (32) 優先日 平成28年8月25日 (2016.8.25)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/396,587
 (32) 優先日 平成28年9月19日 (2016.9.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

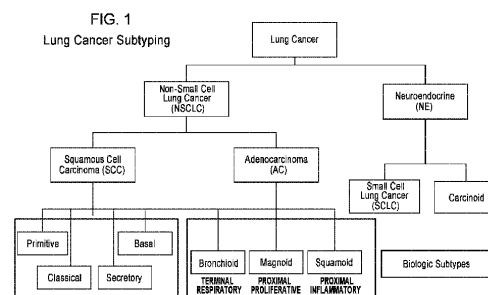
(71) 出願人 518410766
 ジーンセントリック セラピューティクス
 , インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27
 709, リサーチ トライアングル パ
 ーク, ティーダブリュー アレクサンダー
 ドライブ 79, リサーチ コモン
 ズ 4401, スイート 105
 (71) 出願人 514299550
 ザ ユニバーシティ オブ ノース カロ
 ライナ アット チャペル ヒル
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27
 516, チャペル ヒル, チャーチ ス
 トリート 109

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺扁平上皮癌のサブタイピングのための方法

(57) 【要約】

肺腺癌の遺伝子シグネチャーの群から選択される少なくとも1種の分類指標バイオマーカーの発現レベルを検出することにより、個体の肺扁平上皮癌 (SQ) のサブタイプを判定するための方法および組成物が提供される。また本明細書では、ある扁平上皮癌サブタイプを有する個体の免疫療法などの療法に対する応答を判定するための方法および組成物も提供される。患者から得られた肺組織試料の扁平上皮癌 (SQ) サブタイプを判定するための方法であって、前記方法が、表1の少なくとも1種の分類指標バイオマーカーの発現レベルを検出するステップを含み、前記分類指標バイオマーカーの前記発現レベルの前記検出が、基底、古典的、分泌性、または未分化SQサブタイプを特異的に特定する、方法。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者から得られた肺組織試料の扁平上皮癌（S Q）サブタイプを判定するための方法であって、前記方法が、表 1 の少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカの発現レベルを検出するステップを含み、前記分類指標バイオマーカの前記発現レベルの前記検出が、基底、古典的、分泌性、または未分化 S Q サブタイプを特異的に特定する、方法。

【請求項 2】

表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカの前記検出された発現レベルを、少なくとも 1 種のサンプルトレーニングセットにおける表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカの発現と比較するステップであって、前記少なくとも 1 種のサンプルトレーニングセットが、参照 S Q 基底試料からの表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカの発現データ、参照 S Q 古典的試料からの表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカの発現データ、参照 S Q 分泌性試料からの表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカの発現データ、参照 S Q 未分化試料からの表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカの発現データ、またはそれらの組合せを含む、ステップと、前記比較するステップの結果に基づいて前記試料を基底、古典的、分泌性、または未分化サブタイプに分類するステップとをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記比較するステップが、前記試料から得られた前記発現データと、前記少なくとも 1 種のトレーニングセットからの前記発現データとの間の相関を判定することを含む、統計的アルゴリズムを適用することと、前記統計的アルゴリズムの結果に基づいて前記試料を基底、古典的、分泌性、または未分化サブタイプに分類することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記分類指標バイオマーカの前記発現レベルが、核酸レベルで検出される、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

前記核酸レベルが R N A または c D N A である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記発現レベルを検出するステップが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（q R T - P C R）、R N A s e q、マイクロアレイ、遺伝子チップ、n C o u n t e r 遺伝子発現アッセイ、遺伝子発現連続解析（S A G E）、遺伝子発現高速解析（R A G E）、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロットイング、または任意の他の均等な遺伝子発現検出技術を行うことを含む、請求項 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記発現レベルが、q R T - P C Rを行うことにより検出される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記発現レベルの前記検出が、表 1 の少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカに特異的な少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である、前記請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカが、複数の分類指標バイオマーカを含

10

20

30

40

50

む、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記複数の分類指標バイオマーカーが、表 1 の少なくとも 2 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 10 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 20 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 30 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 40 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 50 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 60 種の分類指標バイオマーカー、または少なくとも 70 種の分類指標バイオマーカーを含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカーが、表 1 の分類指標バイオマーカーのすべてを含む、請求項 1 から 10 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 1 4】

肺がん細胞において特異的な発現パターンを有する分類指標バイオマーカーをコードする少なくとも 1 種の核酸分子の発現レベルを検出するステップを含む、患者から得られた肺組織試料の扁平上皮癌（S Q）サブタイプを判定するための方法であって、前記分類指標バイオマーカーが、表 1 に記載されている分類指標遺伝子からなる群から選択され、前記方法が、（a）患者由来の肺組織試料から核酸物質を単離するステップと、（b）前記核酸物質を、前記分類指標バイオマーカーの核酸分子の一部に対して実質的に相補的であるオリゴヌクレオチドと混合するステップと、（c）前記分類指標バイオマーカーの発現を検出するステップとを含む方法。

20

【請求項 1 5】

表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカーの前記検出された発現レベルを、少なくとも 1 種のサンプルトレーニングセットにおける表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカーの発現と比較するステップであって、前記少なくとも 1 種のサンプルトレーニングセットが、参照 S Q 基底試料からの表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカーの発現データ、参照 S Q 古典的試料からの表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカーの発現データ、参照 S Q 分泌性試料からの表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカーの発現データ、参照 S Q 未分化試料からの表 1 の前記少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカーの発現データ、またはそれらの組合せを含む、ステップと、前記比較するステップの結果に基づいて前記試料を基底、古典的、分泌性、または未分化サブタイプに分類するステップとをさらに含む、請求項 1 4 に記載の方法。

30

【請求項 1 6】

前記比較するステップが、前記試料から得られた前記発現データと、前記少なくとも 1 種のトレーニングセットからの前記発現データとの間の相関を判定することを含む、統計的アルゴリズムを適用することと、前記統計的アルゴリズムの結果に基づいて前記試料を基底、古典的、分泌性、または未分化サブタイプに分類することを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記発現レベルを検出する前記ステップが、q R T－P C Rまたは任意のハイブリダイゼーションベースの遺伝子アッセイを行うことを含む、請求項 1 4 から 1 6 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 1 8】

前記発現レベルが、q R T－P C Rを行うことにより検出される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記発現レベルの前記検出が、表 1 の少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカーに特異的な少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記分類指標バイオマーカーの前記検出された発現レベルに基づいて、肺扁平上皮癌（

50

S Q) のサブタイプを処置するための療法に対する応答を予測するステップをさらに含む、請求項 14 から 19 のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

前記療法が、化学療法、血管新生阻害剤、および／または免疫療法である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

肺 S Q の前記サブタイプが未分化であり、前記療法が免疫療法である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である、請求項 14 から 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

分類指標バイオマーカーをコードする前記少なくとも 1 種の核酸分子が、複数の分類指標バイオマーカーをコードする複数の核酸分子を含む、請求項 14 から 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 26】

前記複数の分類指標バイオマーカーが、表 1 から選択される少なくとも 2 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 10 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 20 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 30 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 40 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 50 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 60 種の分類指標バイオマーカー、または少なくとも 70 種の分類指標バイオマーカーを含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

分類指標バイオマーカーをコードする前記少なくとも 1 種の核酸分子が、表 1 の前記分類指標バイオマーカーのすべてを含む複数の核酸分子を含む、請求項 14 から 24 のいずれかに記載の方法。

【請求項 28】

患者から得られた肺組織試料中のバイオマーカーを検出する方法であって、増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイを使用して、表 1 から選択される複数のバイオマーカー核酸の発現レベルを測定するステップを含む方法。

【請求項 29】

前記肺組織試料が扁平上皮癌であると過去に診断された、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記過去の診断が組織学的検査によるものであった、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR)、RNAseq、マイクロアレイ、遺伝子チップ、nCounter 遺伝子発現アッセイ、遺伝子発現連続解析 (SAGE)、遺伝子発現高速解析 (RAGE)、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロッティング、または任意の他の均等な遺伝子発現検出技術を行うことを含む、請求項 28 から 30 のいずれかに記載の方法。

【請求項 32】

前記発現レベルが、qRT-PCRを行うことにより検出される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記発現レベルの前記検出が、表 1 から選択される前記複数のバイオマーカー核酸の各

10

20

30

40

50

々につき少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である、請求項 28 から 33 のいずれかに記載の方法。

【請求項 35】

前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記複数のバイオマーカー核酸が、表 1 の少なくとも 2 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 10 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 20 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 30 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 40 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 50 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 60 種のバイオマーカー核酸、または少なくとも 70 種のバイオマーカー核酸を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる、請求項 28 から 35 のいずれかに記載の方法。

【請求項 37】

前記複数のバイオマーカー核酸が、表 1 の分類指標バイオマーカー核酸のすべてを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる、請求項 28 から 35 のいずれかに記載の方法。

【請求項 38】

患者から得られた肺組織試料中のバイオマーカーを検出する方法であって、増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイを使用して、表 1 から選択される複数のバイオマーカー核酸の発現レベルを測定するステップから本質的になる方法。

【請求項 39】

前記肺組織試料が扁平上皮癌であると過去に診断された、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記過去の診断が組織学的検査によるものであった、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記配列決定アッセイが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）、RNAseq、マイクロアレイ、遺伝子チップ、nCounter 遺伝子発現アッセイ、遺伝子発現連続解析（SAGE）、遺伝子発現高速解析（RAGE）、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロッティング、または任意の他の均等な遺伝子発現検出技術を行うことを含む、請求項 38 から 40 のいずれかに記載の方法。

【請求項 42】

前記発現レベルが、qRT-PCRを行うことにより検出される、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記発現レベルの前記検出が、表 1 から選択される前記複数のバイオマーカー核酸の各々あたり少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である、請求項 38 から 43 のいずれかに記載の方法。

【請求項 45】

前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記複数のバイオマーカー核酸が、表 1 の少なくとも 2 種のバイオマーカー核酸、少な

10

20

30

40

50

くとも10種のバイオマーカー核酸、少なくとも20種のバイオマーカー核酸、少なくとも30種のバイオマーカー核酸、少なくとも40種のバイオマーカー核酸、少なくとも50種のバイオマーカー核酸、少なくとも60種のバイオマーカー核酸、または少なくとも70種のバイオマーカー核酸を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる、請求項38から45のいずれかに記載の方法。

【請求項47】

前記複数のバイオマーカー核酸が、表1の分類指標バイオマーカー核酸のすべてを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる、請求項38から45のいずれかに記載の方法。

【請求項48】

患者から得られた肺組織試料中のバイオマーカーを検出する方法であって、増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイを使用して、表1から選択される複数のバイオマーカー核酸の発現レベルを測定するステップからなる方法。

【請求項49】

前記肺組織試料が扁平上皮癌であると過去に診断された、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

前記過去の診断が組織学的検査によるものであった、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記配列決定アッセイが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）、RNAseq、マイクロアレイ、遺伝子チップ、nCounter遺伝子発現アッセイ、遺伝子発現連続解析（SAGE）、遺伝子発現高速解析（RAGE）、スクリーニングプロテクションアッセイ、ノーザンブロットング、または任意の他の均等な遺伝子発現検出技術を行うことを含む、請求項48から50のいずれかに記載の方法。

【請求項52】

前記発現レベルが、qRT-PCRを行うことにより検出される、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記発現レベルの前記検出が、表1から選択される前記複数のバイオマーカー核酸の各々あたり少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含む、請求項52に記載の方法。

【請求項54】

前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である、請求項48から53のいずれかに記載の方法。

【請求項55】

前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記複数のバイオマーカー核酸が、表1の少なくとも2種のバイオマーカー核酸、少なくとも10種のバイオマーカー核酸、少なくとも20種のバイオマーカー核酸、少なくとも30種のバイオマーカー核酸、少なくとも40種のバイオマーカー核酸、少なくとも50種のバイオマーカー核酸、少なくとも60種のバイオマーカー核酸、または少なくとも70種のバイオマーカー核酸を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる、請求項48から55のいずれかに記載の方法。

【請求項57】

前記複数のバイオマーカー核酸が、表1の分類指標バイオマーカー核酸のすべてを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる、請求項48から55のいずれかに記載の方法。

【請求項58】

扁平上皮癌患者が免疫療法に応答する可能性が高いかどうかを判定する方法であって、

10

20

30

40

50

前記患者由来の肺組織試料の扁平上皮癌サブタイプを判定するステップであって、前記扁平上皮癌サブタイプが、未分化、古典的、分泌性、および基底からなる群から選択される、ステップと、

前記サブタイプに基づいて、前記患者が免疫療法に応答する可能性が高いかどうかを査定するステップとを含む方法。

【請求項 59】

免疫療法のための扁平上皮癌患者を選択するための方法であって、前記患者由来の肺組織試料の扁平上皮癌サブタイプを判定するステップと、前記サブタイプに基づいて、免疫療法のための前記患者を選択するステップとを含む方法。

10

【請求項 60】

前記免疫療法がチェックポイント阻害剤療法を含む、請求項 58 または 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記チェックポイント阻害剤が PD-1 または PD-L1 を標的とする、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 62】

前記チェックポイント阻害剤が CTLA-4 を標的とする、請求項 60 に記載の方法。

【請求項 63】

前記チェックポイント阻害剤が、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、またはそれらの抗原断片結合性断片である、請求項 61 に記載の方法。

20

【請求項 64】

前記チェックポイント阻害剤が、イピリムマブまたはその抗原結合性断片である、請求項 62 に記載の方法。

【請求項 65】

前記患者が扁平上皮癌を有することが試料の組織学的解析により初めに判定される、請求項 58 から 64 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 66】

前記患者の扁平上皮癌サブタイプが、未分化、古典的、分泌性、または基底から選択され、前記患者から得られた試料の組織学的解析によって判定される、請求項 58 から 65 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 67】

前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、または前記患者から得られた体液である、請求項 65 から 66 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 68】

前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記扁平上皮癌サブタイプを判定する前記ステップが、複数の分類指標バイオマーカーの発現レベルを判定することを含む、請求項 58 から 68 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 70】

前記複数の分類指標バイオマーカーの前記発現レベルを判定することが、RNA 配列決定、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、またはハイブリダイゼーションベースの解析を行うことにより核酸レベルでなされる、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 71】

前記扁平上皮癌サブタイプを判定するための前記複数の分類指標バイオマーカーが、公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットから選択される、請求項 69 または 70 に記載の方法。

【請求項 72】

50

前記公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットが、TCGA肺SQ RNAseqデータセットである、請求項71に記載の方法。

【請求項73】

前記扁平上皮癌サブタイプを判定するための前記複数の分類指標バイオマーカーが、表1から選択される、請求項69に記載の方法。

【請求項74】

前記RT-PCRが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)である、請求項70に記載の方法。

【請求項75】

前記RT-PCRが、表1の前記複数の分類指標バイオマーカーに特異的なプライマーを用いて行われる、請求項74に記載の方法。

10

【請求項76】

表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの前記検出された発現レベルを、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットにおける表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの発現と比較するステップであって、前記少なくとも1種のサンプルトレーニングセットが、参照扁平上皮癌基底試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの発現データ、参照扁平上皮癌古典的試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの発現データ、参照扁平上皮癌未分化試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの発現データ、参照扁平上皮癌分泌性試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの発現データ、またはそれらの組合せを含む、ステップと、前記比較するステップの結果に基づいて第1の試料を基底、古典的、未分化、または分泌性に分類するステップとをさらに含む、請求項69から75のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項77】

前記比較するステップが、前記試料から得られた前記発現データと、前記少なくとも1種のトレーニングセットからの前記発現データとの間の相関を判定することを含む、統計的アルゴリズムを適用することと、前記統計的アルゴリズムの結果に基づいて前記試料を基底、古典的、原始的、または分泌性サブタイプに分類することを含む、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

前記複数の分類指標バイオマーカーが、表1に記載されている分類指標バイオマーカーの各々を含む、請求項69から77のいずれかに記載の方法。

30

【請求項79】

対象において肺がんを処置する方法であって、

前記対象から得られた肺がん試料中の少なくとも1種のバイオマーカー核酸の発現レベルを測定するステップであって、前記少なくとも1種のバイオマーカー核酸が、表1に列挙される一組のバイオマーカーから選択され、前記少なくとも1種のバイオマーカーの存在、非存在、および／またはレベルが、前記肺がんのサブタイプを示す、ステップと、前記肺がんの前記サブタイプに基づいて免疫療法剤を投与するステップとを含む、方法。

【請求項80】

前記肺がん試料が扁平上皮癌試料であり、前記一組のバイオマーカーが表1である、請求項79に記載の方法。

40

【請求項81】

前記一組のバイオマーカーから選択される前記少なくとも1種のバイオマーカー核酸が、表1の前記バイオマーカー核酸のうち少なくとも2種のバイオマーカー核酸、少なくとも10種のバイオマーカー核酸、少なくとも20種のバイオマーカー核酸、少なくとも30種のバイオマーカー核酸、少なくとも40種のバイオマーカー核酸、少なくとも50種のバイオマーカー核酸、少なくとも60種のバイオマーカー核酸、少なくとも70種のバイオマーカー核酸、またはそれらすべてを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる、請求項79に記載の方法。

50

【請求項 8 2】

前記肺組織試料が扁平上皮癌であると過去に診断された、請求項 7 9 から 8 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 3】

前記過去の診断が組織学的検査によるものであった、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

さらなる一組のバイオマーカーからの少なくとも 1 種のバイオマーカーの発現を測定するステップをさらに含む、請求項 7 9 から 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記さらなる一組のバイオマーカーが、自然免疫細胞 (I I C)、適応免疫細胞 (A I C)、1 つもしくは複数の個々の免疫バイオマーカー、1 つもしくは複数のインターフェロン (I F N) 遺伝子、1 つもしくは複数の主要組織適合遺伝子複合体、クラス I I (M H C I I) 遺伝子、またはそれらの組合せの遺伝子発現シグネチャーを含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記さらなる一組のバイオマーカーが、表 4 A、4 B、5、6、7、またはそれらの組合せから選択される遺伝子を含む、請求項 8 4 または 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

A I C の前記遺伝子発現シグネチャーが、表 4 A から選択される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

I I C の前記遺伝子発現シグネチャーが、表 4 B から選択される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記 1 つまたは複数の個々の免疫バイオマーカーが、表 5 から選択される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記 1 つまたは複数の I F N 遺伝子が、表 6 から選択される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記 1 つまたは複数の M H C I I 遺伝子が、表 7 から選択される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記発現レベルを測定する前記ステップが、増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイを使用して遂行される、請求項 7 9 から 9 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9 3】

前記増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (q R T - P C R)、R N A s e q、マイクロアレイ、遺伝子チップ、n C o u n t e r 遺伝子発現アッセイ、遺伝子発現連続解析 (S A G E)、遺伝子発現高速解析 (R A G E)、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロッティング、または任意の他の均等な遺伝子発現検出技術を行うことを含む、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記発現レベルが、q R T - P C Rを行うことにより検出される、請求項 9 3 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋 (F F P E) 肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である、請求項 7 9 から 9 4 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 6】

前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である、請求項 9 5 に記載の方法。

【請求項 9 7】

前記患者の扁平上皮癌サブタイプが、未分化、古典的、分泌性、または基底から選択される、請求項 7 9 から 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記肺がんサブタイプが原始的であり、前記免疫療法剤がチェックポイント阻害剤を含む、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記チェックポイント阻害剤が P D - 1 または P D - L 1 を標的とする、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記チェックポイント阻害剤が C T L A - 4 を標的とする、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記チェックポイント阻害剤が、ペンプロリズマブ、ニボルマブ、またはそれらの抗原断片結合性断片である、請求項 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記チェックポイント阻害剤が、イピリムマブまたはその抗原結合性断片である、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

前記少なくとも 1 種のバイオマーカー核酸が、複数のバイオマーカー核酸であり、前記複数のバイオマーカー核酸が、公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットからの 1 つまたは複数のバイオマーカー核酸と組み合わせた、表 1 に列挙される少なくとも 1 種のバイオマーカー核酸を含み、前記複数のバイオマーカー核酸の存在、非存在、および／またはレベルが、前記肺がんのサブタイプを示す、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記少なくとも 1 種のバイオマーカー核酸が、複数のバイオマーカー核酸であり、前記複数のバイオマーカー核酸が、公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットからの 1 つまたは複数のバイオマーカー核酸と組み合わせた、表 1 に列挙される前記バイオマーカー核酸のすべてを含み、前記複数のバイオマーカー核酸の存在、非存在、および／またはレベルが、前記肺がんのサブタイプを示す、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットが、T C G A 肺 S Q R N A s e q データセットである、請求項 1 0 3 または 1 0 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

相互参照

本出願は、2016 年 5 月 17 日に提出された米国仮出願番号第 62 / 337, 645 号、2016 年 8 月 25 日に提出された米国仮出願番号第 62 / 379, 402 号、2016 年 9 月 19 日に提出された米国仮出願番号第 62 / 396, 587 号、2016 年 11 月 11 日に提出された米国仮出願番号第 62 / 420, 836 号、および 2016 年 11 月 23 日に提出された米国仮出願番号第 62 / 425, 717 号に基づく優先権を主張しており、これら仮出願の各々は、すべての目的のためにその全体が本明細書中に援用される。

【0 0 0 2】

発明の分野

本発明は、肺試料の扁平上皮癌サブタイプを判定するため、および特定のサブタイプの肺がんに関与する患者の処置に対する応答を予測するための方法に関する。

10

20

30

40

50

【0003】

配列表に関する記載

本出願に関連する配列表は、紙コピーの代わりにテキスト形式で提供され、参照により本明細書に組み込まれている。配列表を含むテキストファイルの名称は、GNCN__010__01WO__SeqList__ST25. txtである。テキストファイルは319KBであり、2017年5月16日に作成され、EFS-Webによって電子的に提出されている。

【背景技術】

【0004】

発明の背景

肺がんは、米国および世界的規模の両方において、がんによる死亡原因の第1位である。2005年にはおよそ172,000件の肺腫瘍が診断され、推定死亡件数は結腸、乳房、および前立腺の合計を超える163,000件であった。患者の少なくとも75%は局所進行性疾患を示す。高解像度CTなどの技術を使用してスクリーニングを改善するために多くの試みが行われてきたが、これらの方法は偽陽性結果をもたらすことが多く、通常はアウトカムを変化させない。したがって、早期に検出される小さな腫瘍でさえ、ステージI肺がんの術後5年生存率が47~63パーセントと推定される患者に対しては多大な脅威となる。進行性疾患を有する患者の予後はより悪く、生存期間中央値は1年を優に下回る。概して、緩和療法は効果的であるが持続可能ではなく、全生存期間に対する影響の平均はおよそ3か月である。

【0005】

集団レベルにおいて、肺がんの根底にある原因は明らかにタバコの使用であり、すべての肺がんの90%が喫煙に直接起因する。肺がんリスク因子としてはアスベスト、ラドン、およびいくつかの肺刺激物質が一般的に認められているものの、喫煙は肺がんと非常に密接に関連しているため、ほとんどの他のリスク因子との決定的な関連性と交絡する。遺伝的関連性が強く疑われるが、厳密な機構は、稀なメンデル型(Mendelian)がん症候群の選択群以外で今後判定される必要がある。多くの分類スキームおよび進行中の臨床治験があるにもかかわらず、臨床診断および治療学の分野における進歩は全体的に期待外れなものとなっている。

【0006】

遺伝子発現、突然変異スペクトル、およびコピー数変化を含むゲノムプロファイルが異なる、4つの異なる内因性肺扁平上皮癌サブタイプが存在する。この4つの生物学的肺扁平上皮癌サブタイプ、未分化、古典的、分泌性、および基底は、それらのゲノム特徴が異なるのみならず、潜在的に重要な臨床的特徴の差も明示する。

【0007】

ほとんどの肺がんは、気道全体で生じるサブタイプを有する多様な群である非小細胞肺癌(NSCLC)(>85%)と分類される。NSCLCの2種の主なサブタイプである腺癌(AD)および扁平上皮癌(SCCまたはSQ)は、ほぼ等しい頻度で診断されるが、異なる場所で見出されることが多く、SCCがより中心で生じる。世界保健機関(WHO)により開発された肺がんのコンセンサス分類の第6版には、90以上の悪性の形態的クラスおよびバリエーションが記載されている。とりわけ>1.5cmの大きな腫瘍では不均一性があることが多く、形態学的分類がより困難になり、腺扁平上皮癌などの名称につながり得る。さらに、組織診断再現性の研究は、病理学者中の一致率および病理学者間の一致率が限定されていることを示している。形態の変動性、限定された組織試料、および治療標的となるマーカーの増え続けるリストを査定する必要性は、現在の診断基準に対する課題をもたらす。これは、肺がんの種々の形態的サブタイプ間の区別が患者管理を進めるうえで必要不可欠であり得、さらなる分子試験を使用することで特異的な治療標的マーカーを特定することができるという考えによってさらに強調されている。

【0008】

その全体が参照により本明細書に組み込まれているWilkersonら、Clin Cancer Res、

10

20

30

40

50

2010年；16巻（19号）：4864～75頁に記載されているように、現在、遺伝子発現ベースの肺扁平上皮癌（SQ）サブタイピングは主に、新鮮な冷凍肺腫瘍からのRNAの抽出に続いて200個を超える遺伝子の定量的遺伝子発現を使用した最近隣重心予測因子の適用を含む研究プロトコルに制限されている。遺伝子発現ベースのSQサブタイピングは、4つの生物学的に異なるサブタイプである基底、古典的、未分化、および分泌性に扁平上皮癌腫瘍を分類することが示されている。さらに、これら4つのサブタイプは、生存期間アウトカム、患者集団、生物学的プロセス、および免疫原性応答の特徴において異なり得る。SQサブタイピングによる予後および予測的な利益の証拠があるにもかかわらず、>200個の遺伝子の遺伝子発現の要件は、複雑な生物情報学解析と相まって、薬物開発および／または診療所におけるSQサブタイピングの応用を妨げてきた。

10

【0009】

がん免疫監視とは、免疫系が前がん性およびがん性細胞を特定し、これらの細胞が臨床的意義をもつ前にそれらを死滅させることができるという原理であり、これは免疫不全マウスモデルにおいて実証されている。自然および適応免疫応答は、がん増殖を促進または阻害するように連携する場合があります、免疫破壊の回避は、がんの新たな特質である。歴史的に、免疫刺激の方法は、診療所における肺がん患者に対して効果的ではなかった。腫瘍抗原発現および抗原提示細胞（APC）における提示の不全、免疫抑制細胞およびサイトカインの浸潤、ならびに効果的でないT細胞活性化は、腫瘍部位における免疫抑制をもたらし得る。がんおよび免疫系の理解が進み、肺がんなどの高度に発達した免疫回避法を有する腫瘍においても抗腫瘍応答を活性化する効果的な療法がもたらされている。しかしながら、患者における免疫活性化と免疫抑制とのバランスが繊細であるため、肺腫瘍により引き起こされる高い免疫抑制効果は、これらの進歩の有益な効果を限定する。例えばNSCLCでは、腫瘍のタイプ、疾患の進行期、および腫瘍量に関係すると示唆されている、免疫活性化を妨害する免疫抑制細胞の役割が大きい。

20

したがって、内因性の肺扁平上皮癌サブタイプを効果的に弁別する方法の開発は、臨床診断および疾患管理に重要である。したがって、免疫療法に応答する可能性が高いと考えられ得る集団をさらに定義するための新しい方法が必要とされている。本発明は、患者のSQサブタイプ（基底、古典的、未分化、分泌性）に部分的に基づいて腺癌患者集団の予後または疾患アウトカムを判定するための当分野におけるこれらのおよび他の必要性に対処する。本発明の方法は、肺がんの細胞および分子起源を判定するための手段（例えば、SQのサブタイピング）を提供し、当技術分野で公知の診断法と比較してより正確な診断および適用可能な処置を提供し得る。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Wilkersonら、Clin Cancer Res、2010年；16巻（19号）：4864～75頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

一態様では、患者から得られた肺組織試料の扁平上皮癌（SQ）サブタイプを判定するための方法であって、方法が、表1の少なくとも1種の分類指標バイオマーカーの発現レベルを検出するステップを含み、分類指標バイオマーカーの発現レベルの検出が、基底、古典的、分泌性、または未分化SQサブタイプを特異的に特定する、方法が、本明細書において提供される。一部の 경우에는、この方法は、表1の少なくとも1種の分類指標バイオマーカーの検出された発現レベルを、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットにおける表1の少なくとも1種の分類指標バイオマーカーの発現と比較するステップであって、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットが、参照SQ基底試料からの表1の少なくとも1種の分類指標バイオマーカーの発現データ、参照SQ古典的試料からの表1の少なくとも1種の分類指標バイオマーカーの発現データ、参照SQ分泌性試料からの表1

40

50

の少なくとも1種の分類指標バイオマーカの発現データ、参照S Q未分化試料からの表1の少なくとも1種の分類指標バイオマーカの発現データ、またはそれらの組合せを含む、ステップと、比較するステップの結果に基づいて試料を基底、古典的、分泌性、または未分化サブタイプに分類するステップとをさらに含む。一部の場合では、比較するステップは、試料から得られた発現データと、少なくとも1種のトレーニングセットからの発現データとの間の相関を判定するステップを含む、統計的アルゴリズムを適用するステップと、統計的アルゴリズムの結果に基づいて試料を基底、古典的、分泌性、または未分化サブタイプに分類するステップとを含む。一部の場合では、前記分類指標バイオマーカの前記発現レベルが、核酸レベルで検出される。一部の場合では、前記核酸レベルがRNAまたはcDNAである。一部の場合では、前記発現レベルを検出するステップが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)、RNAseq、マイクロアレイ、遺伝子チップ、nCounter遺伝子発現アッセイ、遺伝子発現連続解析(SAGE)、遺伝子発現高速解析(RAGE)、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロッティング、または任意の他の均等な遺伝子発現検出技術を行うことを含む。一部の場合では、前記発現レベルが、qRT-PCRを行うことにより検出される。一部の場合では、前記発現レベルの前記検出が、表1の少なくとも1種の分類指標バイオマーカに特異的な少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含む。一部の場合では、前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である。一部の場合では、前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である。一部の場合では、前記少なくとも1種の分類指標バイオマーカが、複数の分類指標バイオマーカを含む。一部の場合では、前記複数の分類指標バイオマーカが、表1の少なくとも2種の分類指標バイオマーカ、少なくとも10種の分類指標バイオマーカ、少なくとも20種の分類指標バイオマーカ、少なくとも30種の分類指標バイオマーカ、少なくとも40種の分類指標バイオマーカ、少なくとも50種の分類指標バイオマーカ、少なくとも60種の分類指標バイオマーカ、または少なくとも70種の分類指標バイオマーカを含む。一部の場合では、前記少なくとも1種の分類指標バイオマーカが、表1の分類指標バイオマーカのすべてを含む。

【0012】

別の態様では、本明細書において提供されるのは、肺がん細胞において特異的な発現パターンを有する分類指標バイオマーカをコードする少なくとも1種の核酸分子の発現レベルを検出するステップを含む、患者から得られた肺組織試料の扁平上皮癌(SQ)サブタイプを判定するための方法であって、前記分類指標バイオマーカが、表1に記載されている分類指標遺伝子からなる群から選択され、前記方法が、(a)患者由来の肺組織試料から核酸物質を単離するステップと、(b)前記核酸物質を、前記分類指標バイオマーカの核酸分子の一部に対して実質的に相補的であるオリゴヌクレオチドと混合するステップと、(c)前記分類指標バイオマーカの発現を検出するステップとを含む方法である。一部の場合では、前記方法は、表1の前記少なくとも1種の分類指標バイオマーカの前記検出された発現レベルを、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットにおける表1の前記少なくとも1種の分類指標バイオマーカの発現と比較するステップであって、前記少なくとも1種のサンプルトレーニングセットが、参照S Q基底試料からの表1の前記少なくとも1種の分類指標バイオマーカの発現データ、参照S Q古典的試料からの表1の前記少なくとも1種の分類指標バイオマーカの発現データ、参照S Q分泌性試料からの表1の前記少なくとも1種の分類指標バイオマーカの発現データ、参照S Q未分化試料からの表1の前記少なくとも1種の分類指標バイオマーカの発現データまたはそれらの組合せを含む、ステップと、前記比較するステップの結果に基づいて前記試料を基底、古典的、分泌性、または未分化サブタイプに分類するステップとをさらに含む。一部の場合では、前記比較するステップが、前記試料から得られた前記発現データと、前記少なくとも1種のトレーニングセットからの前記発現データとの間の相関を判定することを含む、統計的アルゴリズムを適用することと、前記統計的アルゴリズムの結果に基づい

て前記試料を基底、古典的、分泌性、または未分化サブタイプに分類することを含む。一部の 경우에는、前記発現レベルを検出する前記ステップが、q R T－P C Rまたは任意のハイブリダイゼーションベースの遺伝子アッセイを行うことを含む。一部の 경우에는、前記発現レベルが、q R T－P C Rを行うことにより検出される。一部の 경우에는、前記発現レベルの前記検出が、表 1 の少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカーに特異的な少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含む。一部の 경우에는、前記方法は、前記分類指標バイオマーカーの前記検出された発現レベルに基づいて、肺扁平上皮癌（S Q）のサブタイプを処置するための療法に対する応答を予測するステップをさらに含む。一部の 경우에는、前記療法が、化学療法、血管新生阻害剤、および／または免疫療法である。一部の 경우에는、肺 S Q の前記サブタイプが分泌性であり、前記療法が免疫療法である。一部の 경우에는、前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である。一部の 경우에는、前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である。一部の 경우에는、分類指標バイオマーカーをコードする前記少なくとも 1 種の核酸分子が、複数の分類指標バイオマーカーをコードする複数の核酸分子を含む。一部の 경우에는、複数の分類指標バイオマーカーは、表 1 から選択される少なくとも 2 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 10 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 20 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 30 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 40 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 50 種の分類指標バイオマーカー、少なくとも 60 種の分類指標バイオマーカー、または少なくとも 70 種の分類指標バイオマーカーを含む。一部の 경우에는、分類指標バイオマーカーをコードする少なくとも 1 種の核酸分子は、表 1 の分類指標バイオマーカーのすべてを含む複数の核酸分子を含む。

【0013】

なお別の態様では、本明細書において提供されるのは、患者から得られた肺組織試料中のバイオマーカーを検出する方法であって、増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイを使用して、表 1 から選択される複数のバイオマーカー核酸の発現レベルを測定するステップを含む方法である。一部の 경우에는、前記肺組織試料が扁平上皮癌であると過去に診断された。一部の 경우에는、前記過去の診断が組織学的検査によるものであった。一部の 경우에는、前記配列決定アッセイが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（q R T－P C R）、RNA s e q、マイクロアレイ、遺伝子チップ、n C o u n t e r 遺伝子発現アッセイ、遺伝子発現連続解析（S A G E）、遺伝子発現高速解析（R A G E）、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロッティング、または任意の他の均等な遺伝子発現検出技術を行うことを含む。一部の 경우에는、前記発現レベルが、q R T－P C Rを行うことにより検出される。一部の 경우에는、前記発現レベルの前記検出が、表 1 から選択される前記複数のバイオマーカー核酸の各々あたり少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含む。一部の 경우에는、前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である。一部の 경우에는、前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である。一部の 경우에는、前記複数のバイオマーカー核酸が、表 1 の少なくとも 2 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 10 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 20 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 30 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 40 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 50 種のバイオマーカー核酸、少なくとも 60 種のバイオマーカー核酸、または少なくとも 70 種のバイオマーカー核酸を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。一部の 경우에는、前記複数のバイオマーカー核酸が、表 1 の分類指標バイオマーカー核酸のすべてを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。

【0014】

さらなる態様では、本明細書において提供されるのは、患者から得られた肺組織試料中

10

20

30

40

50

のバイオマーカーを検出する方法であって、増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイを使用して、表1から選択される複数のバイオマーカー核酸の発現レベルを測定するステップから本質的になる方法である。一部の場合では、前記肺組織試料が扁平上皮癌であると過去に診断された。一部の場合では、前記過去の診断が組織学的検査によるものであった。一部の場合では、前記配列決定アッセイが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（q R T - P C R）、R N A s e q、マイクロアレイ、遺伝子チップ、n C o u n t e r 遺伝子発現アッセイ、遺伝子発現連続解析（S A G E）、遺伝子発現高速解析（R A G E）、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロッティング、または任意の他の均等な遺伝子発現検出技術を行うことを含む。一部の場合では、前記発現レベルが、q R T - P C Rを行うことにより検出される。一部の場合では、前記発現レベルの前記検出が、表1から選択される前記複数のバイオマーカー核酸の各々あたり少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含む。一部の場合では、前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である。一部の場合では、前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である。一部の場合では、前記複数のバイオマーカー核酸が、表1の少なくとも2種のバイオマーカー核酸、少なくとも10種のバイオマーカー核酸、少なくとも20種のバイオマーカー核酸、少なくとも30種のバイオマーカー核酸、少なくとも40種のバイオマーカー核酸、少なくとも50種のバイオマーカー核酸、少なくとも60種のバイオマーカー核酸、または少なくとも70種のバイオマーカー核酸を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。一部の場合では、前記複数のバイオマーカー核酸が、表1の分類指標バイオマーカー核酸のすべてを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。

10

20

【0015】

一つの態様では、本明細書において提供されるのは、患者から得られた肺組織試料中のバイオマーカーを検出する方法であって、増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイを使用して、表1から選択される複数のバイオマーカー核酸の発現レベルを測定するステップからなる方法である。一部の場合では、前記肺組織試料が扁平上皮癌であると過去に診断された。一部の場合では、前記過去の診断が組織学的検査によるものであった。一部の場合では、前記配列決定アッセイが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（q R T - P C R）、R N A s e q、マイクロアレイ、遺伝子チップ、n C o u n t e r 遺伝子発現アッセイ、遺伝子発現連続解析（S A G E）、遺伝子発現高速解析（R A G E）、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロッティング、または任意の他の均等な遺伝子発現検出技術を行うことを含む。一部の場合では、前記発現レベルが、q R T - P C Rを行うことにより検出される。一部の場合では、前記発現レベルの前記検出が、表1から選択される前記複数のバイオマーカー核酸の各々あたり少なくとも一対のオリゴヌクレオチドプライマーを使用することを含む。前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である。一部の場合では、前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である。一部の場合では、前記複数のバイオマーカー核酸が、表1の少なくとも2種のバイオマーカー核酸、少なくとも10種のバイオマーカー核酸、少なくとも20種のバイオマーカー核酸、少なくとも30種のバイオマーカー核酸、少なくとも40種のバイオマーカー核酸、少なくとも50種のバイオマーカー核酸、少なくとも60種のバイオマーカー核酸、または少なくとも70種のバイオマーカー核酸を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。一部の場合では、前記複数のバイオマーカー核酸が、表1の分類指標バイオマーカー核酸のすべてを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。

30

40

【0016】

別の態様では、本明細書において提供されるのは、扁平上皮癌患者が免疫療法に応答する可能性が高いかどうかを判定する方法であって、前記患者由来の肺組織試料の扁平上皮

50

癌サブタイプを判定するステップであって、前記扁平上皮癌サブタイプが、未分化、古典的、分泌性および基底からなる群から選択される、ステップと、前記サブタイプに基づいて、前記患者が免疫療法に応答する可能性が高いかどうかを査定するステップとを含む方法である。一部の場合では、前記免疫療法がチェックポイント阻害剤療法を含む。一部の場合では、前記チェックポイント阻害剤がPD-1またはPD-L1を標的とする。一部の場合では、前記チェックポイント阻害剤がCTLA-4を標的とする。一部の場合では、前記チェックポイント阻害剤が、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、またはそれらの抗原断片結合性断片である。一部の場合では、前記チェックポイント阻害剤が、イピリムマブまたはその抗原結合性断片である。一部の場合では、前記患者が扁平上皮癌を有することが試料の組織学的解析により初めに判定される。一部の場合では、前記患者の扁平上皮癌サブタイプが、未分化、古典的、分泌性または基底から選択され、前記患者から得られた試料の組織学的解析によって判定される。一部の場合では、前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、または前記患者から得られた体液である。一部の場合では、前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である。一部の場合では、前記扁平上皮癌サブタイプを判定する前記ステップが、複数の分類指標バイオマーカの発現レベルを判定することを含む。一部の場合では、前記複数の分類指標バイオマーカの前記発現レベルを判定することが、RNA配列決定、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、またはハイブリダイゼーションベースの解析を行うことにより核酸レベルでなされる。一部の場合では、前記扁平上皮癌サブタイプを判定するための前記複数の分類指標バイオマーカが、公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットから選択される。一部の場合では、前記公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットが、TCGA肺SQ RNAseqデータセットである。一部の場合では、前記扁平上皮癌サブタイプを判定するための前記複数の分類指標バイオマーカが、表1から選択される。一部の場合では、前記RT-PCRが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）である。一部の場合では、前記RT-PCRが、表1の前記複数の分類指標バイオマーカに特異的なプライマーを用いて行われる。一部の場合では、前記方法は、表1の前記複数の分類指標バイオマーカの前記検出された発現レベルを、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットにおける表1の前記複数の分類指標バイオマーカの発現と比較するステップであって、前記少なくとも1種のサンプルトレーニングセットが、参照扁平上皮癌基底試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカの発現データ、参照扁平上皮癌古典的試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカの発現データ、参照扁平上皮癌未分化試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカの発現データ、参照扁平上皮癌分泌性試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカの発現データ、またはそれらの組合せを含む、ステップと、前記比較するステップの結果に基づいて第1の試料を基底、古典的、未分化または分泌性に分類するステップとをさらに含む。一部の場合では、前記比較するステップが、前記試料から得られた前記発現データと、前記少なくとも1種のトレーニングセットからの前記発現データとの間の相関を判定することを含む、統計的アルゴリズムを適用することと、前記統計的アルゴリズムの結果に基づいて前記試料を基底、古典的、未分化または分泌性サブタイプに分類することを含む。一部の場合では、前記複数の分類指標バイオマーカが、表1に記載されている分類指標バイオマーカの各々を含む。

【0017】

なお別の態様では、本明細書において提供されるのは、免疫療法のための扁平上皮癌患者を選択するための方法であって、前記患者由来の肺組織試料の扁平上皮癌サブタイプを判定するステップと、前記サブタイプに基づいて、免疫療法のための前記患者を選択するステップとを含む方法である。一部の場合では、前記免疫療法がチェックポイント阻害剤療法を含む。一部の場合では、前記チェックポイント阻害剤がPD-1またはPD-L1を標的とする。一部の場合では、前記チェックポイント阻害剤がCTLA-4を標的とする。一部の場合では、前記チェックポイント阻害剤が、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、またはそれらの抗原断片結合性断片である。一部の場合では、前記チェックポイント阻害

剤が、イピリマブまたはその抗原結合性断片である。一部の場合では、前記患者が扁平上皮癌を有することが試料の組織学的解析により初めに判定される。一部の場合では、前記患者の扁平上皮癌分子サブタイプが、未分化、古典的、分泌性または基底から選択され、前記患者から得られた試料の組織学的解析によって判定される。一部の場合では、前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、または前記患者から得られた体液である。一部の場合では、前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である。一部の場合では、前記扁平上皮癌サブタイプを判定する前記ステップが、複数の分類指標バイオマーカーの発現レベルを判定することを含む。一部の場合では、前記複数の分類指標バイオマーカーの前記発現レベルを判定することが、RNA配列決定、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、またはハイブリダイゼーションベースの解析を行うことにより核酸レベルでなされる。一部の場合では、前記扁平上皮癌サブタイプを判定するための前記複数の分類指標バイオマーカーが、公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットから選択される。一部の場合では、前記公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットが、TCGA肺SQRNAseqデータセットである。一部の場合では、前記扁平上皮癌サブタイプを判定するための前記複数の分類指標バイオマーカーが、表1から選択される。一部の場合では、前記RT-PCRが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）である。一部の場合では、前記RT-PCRが、表1の前記複数の分類指標バイオマーカーに特異的なプライマーを用いて行われる。一部の場合では、前記方法は、表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの前記検出された発現レベルを、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットにおける表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの発現と比較するステップであって、前記少なくとも1種のサンプルトレーニングセットが、参照扁平上皮癌基底試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの発現データ、参照扁平上皮癌古典的試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの発現データ、参照扁平上皮癌未分化試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの発現データ、参照扁平上皮癌分泌性試料からの表1の前記複数の分類指標バイオマーカーの発現データまたはそれらの組合せを含む、ステップと、前記比較するステップの結果に基づいて第1の試料を基底、古典的、未分化または分泌性に分類するステップとをさらに含む。一部の場合では、前記比較するステップが、前記試料から得られた前記発現データと、前記少なくとも1種のトレーニングセットからの前記発現データとの間の相関を判定することを含む、統計的アルゴリズムを適用することと、前記統計的アルゴリズムの結果に基づいて前記試料を基底、古典的、未分化または分泌性サブタイプに分類することを含む。一部の場合では、前記複数の分類指標バイオマーカーが、表1に記載されている分類指標バイオマーカーの各々を含む。

【0018】

1つの態様では、本明細書において提供されるのは、対象において肺がんを処置する方法であって、前記対象から得られた肺がん試料中の少なくとも1種のバイオマーカー核酸の発現レベルを測定するステップであって、前記少なくとも1種のバイオマーカー核酸が、表1に列挙される一組のバイオマーカーから選択され、前記少なくとも1種のバイオマーカーの存在、非存在、および／またはレベルが、前記肺がんのサブタイプを示す、ステップと、前記肺がんの前記サブタイプに基づいて免疫療法剤を投与するステップとを含む、方法である。一部の場合では、前記肺がん試料が、扁平上皮癌の試料であり、前記バイオマーカーのセットが表1である。一部の場合では、前記一組のバイオマーカーから選択される前記少なくとも1種のバイオマーカー核酸が、表1の少なくとも2種のバイオマーカー核酸、少なくとも10種のバイオマーカー核酸、少なくとも20種のバイオマーカー核酸、少なくとも30種のバイオマーカー核酸、少なくとも40種のバイオマーカー核酸、少なくとも50種のバイオマーカー核酸、少なくとも60種のバイオマーカー核酸、少なくとも70種のバイオマーカー核酸、またはバイオマーカー核酸すべてを含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。一部の場合では、前記肺組織試料が扁平上皮癌であると過去に診断された。一部の場合では、前記過去の診断が組織学的検査によ

るものであった。一部の場合では、前記方法は、さらなる一組のバイオマーカーからの少なくとも1種のバイオマーカーの発現を測定するステップをさらに含む。一部の場合では、前記さらなる一組のバイオマーカーが、自然免疫細胞（I I C）、適応免疫細胞（A I C）、1つもしくは複数の個々の免疫バイオマーカー、1つもしくは複数のインターフェロン（I F N）遺伝子、1つもしくは複数の主要組織適合遺伝子複合体、クラス I I（M H C I I）遺伝子、またはそれらの組合せの遺伝子発現シグネチャーを含む。一部の場合では、前記さらなる一組のバイオマーカーが、表 4 A、4 B、5、6、7、またはそれらの組合せから選択される遺伝子を含む。一部の場合では、A I Cの前記遺伝子発現シグネチャーが、表 4 Aから選択される。一部の場合では、I I Cの前記遺伝子発現シグネチャーが、表 4 Bから選択される。一部の場合では、前記1つまたは複数の個々の免疫バイオマーカーが、表 5から選択される。一部の場合では、前記1つまたは複数の I F N 遺伝子が、表 6から選択される。一部の場合では、前記1つまたは複数の M H C I I 遺伝子が、表 7から選択される。一部の場合では、前記発現レベルを測定する前記ステップが、増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイを使用して遂行される。一部の場合では、前記増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイが、定量的リアルタイム逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（q R T - P C R）、R N A s e q、マイクロアレイ、遺伝子チップ、n C o u n t e r 遺伝子発現アッセイ、遺伝子発現連続解析（S A G E）、遺伝子発現高速解析（R A G E）、ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロッティング、または任意の他の均等な遺伝子発現検出技術を行うことを含む。一部の場合では、前記発現レベルが、q R T - P C Rを行うことにより検出される。一部の場合では、前記試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）肺組織試料、新鮮なもしくは冷凍組織試料、エキソソーム、洗浄液、細胞ペレット、または前記患者から得られた体液である。一部の場合では、前記体液が、血液もしくはその画分、尿、唾液、または喀痰である。一部の場合では、前記対象の扁平上皮癌サブタイプが、未分化、古典的、分泌性または基底から選択される。一部の場合では、前記肺がんサブタイプが未分化であり、前記免疫療法剤がチェックポイント阻害剤を含む。一部の場合では、前記チェックポイント阻害剤が P D - 1 または P D - L 1 を標的とする。一部の場合では、前記チェックポイント阻害剤が C T L A - 4 を標的とする。一部の場合では、前記チェックポイント阻害剤が、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、またはそれらの抗原断片結合性断片である。一部の場合では、前記チェックポイント阻害剤が、イピリムマブまたはその抗原結合性断片である。一部の場合では、前記少なくとも1種のバイオマーカー核酸が、複数のバイオマーカー核酸であり、前記複数のバイオマーカー核酸が、公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットからの1つまたは複数のバイオマーカー核酸と組み合わせた、表 1 に列挙される少なくとも1種のバイオマーカー核酸を含み、前記複数のバイオマーカー核酸の存在、非存在、および／またはレベルが、前記肺がんのサブタイプを示す。一部の場合では、前記少なくとも1種のバイオマーカー核酸が、複数のバイオマーカー核酸であり、前記複数のバイオマーカー核酸が、公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットからの1つまたは複数のバイオマーカー核酸と組み合わせた、表 1 に列挙される前記バイオマーカー核酸のすべてを含み、前記複数のバイオマーカー核酸の存在、非存在、および／またはレベルが、前記肺がんのサブタイプを示す。一部の場合では、前記公的に利用可能な肺扁平上皮癌データセットが、T C G A 肺 S Q R N A s e q データセットである。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】図1は、肺がんサブタイプならびに扁平上皮癌（S C C または S Q）および腺癌（A C または A D）の生物学的サブタイプを例示する。

【0020】

【図2】図2は、実施例1に記載される研究において使用した肺 S Q データセットを例示する。

【0021】

【図3】図3は、C a n c e r G e n o m e A t l a s（T C G A）の肺 S Q データ

10

20

30

40

50

セットにおける免疫細胞シグネチャー発現（すなわち、実施例1のB i n d e aらによる参考文献）、他の免疫マーカー、および個々の免疫マーカーのヒートマップを例示する。

【0022】

【図4】図4は、TCGAのSQデータセットにおける免疫細胞シグネチャーを階層的クラスタリングによって並べたシグネチャーの相関行列を例示する。より濃い赤色は、一対の遺伝子がより強く正の相関を示すことを意味する。白色は、相関がないことを意味する。より濃い青色は、負の相関を意味する。

【0023】

【図5-1】図5は、実施例1に記載される複数のSQデータセット間のT細胞シグネチャー遺伝子発現サブタイプパターンの再現性を例示する。RNAseq（Illumina、San Diego、CA）ならびにAffymetrix（Santa Clara、CA）およびAgilent（Santa Clara、CA）の両方によるマイクロアレイ。

【図5-2】図5は、実施例1に記載される複数のSQデータセット間のT細胞シグネチャー遺伝子発現サブタイプパターンの再現性を例示する。RNAseq（Illumina、San Diego、CA）ならびにAffymetrix（Santa Clara、CA）およびAgilent（Santa Clara、CA）の両方によるマイクロアレイ。

【0024】

【図6】図6は、TCGAデータセットの扁平上皮癌（SCCまたはSQ）評価におけるCD274（PD-L1）発現と適応免疫細胞（AIC）シグネチャーとの間の関連性（調整済み決定係数（adjusted R-squared））を例示する。関連性は、PD-L1よりもサブタイプに対して一貫して強かった。SQにおける関連性は、実施例1に記載されるように、PD-L1よりもサブタイプに対して一貫して強かった。Tcmは、セントラルメモリーT細胞であり、Temは、エフェクターメモリーT細胞であり、Th1は、1型Tヘルパー細胞であり、Th2は、2型Tヘルパー細胞であり、TFHは、濾胞性ヘルパーT細胞であり、Th17は、Tヘルパー17細胞であり、Tregは、制御性T細胞であり、Tgdは、ガンマデルタT細胞である。

【0025】

【図7A】図7A～7Bは、実施例1に記載されるように、全体的およびサブタイプ別のシグネチャーと生存期間の関連性を例示する。層別coxモデルから算出されたハザード比（HR）および信頼区間は、正規化された免疫マーカーの単位増加に対応し、病理学的ステージに合わせて調整した。サブタイプ特有のHRはステージに合わせて調整し（全体はステージおよびサブタイプによって調整した）、少なくとも1種のサブタイプに対して有意な関連性（名目上 $p < 0.05$ ）を有する免疫特徴のみが示されている。SQは、扁平上皮癌であり、MHC IIは、主要組織適合性クラスII遺伝子シグネチャーであり、Th1は、1型Tヘルパー細胞であり、Th2は、2型Tヘルパー細胞であり、TFHは、濾胞性ヘルパーT細胞であり、Th17は、Tヘルパー17細胞であり、Tregは、制御性T細胞であり、DCは、樹状細胞であり、iDCは、未成熟樹状細胞である。図7A～7Bは、SQについてであり、TCGAコホート（図7A）またはTGCA、UNC、およびRaponiコホート（図7B）における、サブタイプによる免疫細胞シグネチャーおよびマーカーの生存期間関連性を示す。サブタイプ特有の免疫マーカーハザード比および95%信頼区間は、図7AのTCGAコホート（ $n = 501$ SQ）における5年の全生存期間に対するものであった。

【図7B】図7A～7Bは、実施例1に記載されるように、全体的およびサブタイプ別のシグネチャーと生存期間の関連性を例示する。層別coxモデルから算出されたハザード比（HR）および信頼区間（CI）は、正規化された免疫マーカーの単位増加に対応し、病理学的ステージに合わせて調整した。サブタイプ特有のHRはステージに合わせて調整し（全体はステージおよびサブタイプによって調整した）、少なくとも1種のサブタイプに対して有意な関連性（名目上 $p < 0.05$ ）を有する免疫特徴のみが示されている。S

10

20

30

40

50

Qは、扁平上皮癌であり、MHC I Iは、主要組織適合性クラスI I遺伝子シグネチャーであり、Th 1は、1型Tヘルパー細胞であり、Th 2は、2型Tヘルパー細胞であり、TFHは、濾胞性ヘルパーT細胞であり、Th 17は、Tヘルパー17細胞であり、Tregは、制御性T細胞であり、DCは、樹状細胞であり、iDCは、未成熟樹状細胞である。図7A～7Bは、SQについてであり、TCGAコホート（図7A）またはTGCA、UNC、およびRaponiコホート（図7B）における、サブタイプによる免疫細胞シグネチャーおよびマーカーの生存期間関連性を示す。サブタイプ特有の免疫マーカーハザード比および95%信頼区間は、図7AのTCGAコホート（n=501 SQ）における5年の全生存期間に対するものであった。

【0026】

10

【図8】図8は、実施例2に記載されるように、肺SQをサブタイピングするための遺伝子セットに含める遺伝子を選択するための手法（すなわち、TCGA RNASeq肺SQデータセットに対する50-50高/低手法；単純手法；ハイブリッド手法；トランスクリプトームに対する50-50高/低手法（50-50高/低20K手法））の比較を例示する。50-50高/低20K手法を除いては、Cancer Genome Atlas（TCGA）のRNASeq肺扁平上皮癌（SQ）データセットに対して5分割交差検証研究を行った。

【0027】

【図9】図9は、SQをサブタイピングするために含めるのに最適な遺伝子数を判定するためにCancer Genome Atlas（TCGA）RNASeq肺SQデータセットに行った5分割交差検証研究を例示する。

20

【0028】

【図10】図10は、遺伝子間の相関係数および扁平上皮癌サブタイプを例示する。

【0029】

【図11】図11は、表1のSQ遺伝子分類指標セットに含まれるCancer Genome Atlas（TCGA）の肺RNASeq SQデータセット（n=506）に改変された最近隣重心へのアレイ分類（CLANC）アルゴリズムを適用することにより選択された208遺伝子至適基準SQ分類指標の遺伝子の遺伝子ランク（X軸）およびt統計量（Y軸）を例示する。

【0030】

30

【図12】図12は、基底試料を区別するために選択された80種の遺伝子分類指標のうち20種の遺伝子サブセットの遺伝子発現中央値を例示する。

【0031】

【図13】図13は、古典的試料を区別するために選択された80種の遺伝子分類指標のうち20種の遺伝子サブセットの遺伝子発現中央値を例示する。

【0032】

【図14】図14は、未分化試料を区別するために選択された80種の遺伝子分類指標のうち20種の遺伝子サブセットの遺伝子発現中央値を例示する。

【0033】

【図15】図15は、分泌性試料を区別するために選択された80種の遺伝子分類指標のうち20種の遺伝子サブセットの遺伝子発現中央値を例示する。

40

【0034】

【図16】図16は、複数の検証データセットおよび新たに収集されたFFPE検証データセットについて至適基準のサブタイプを定義するための208遺伝子分類指標を用いた本明細書において提供される80種の遺伝子シグネチャー（CLANC80）によるSQサブタイプ予測の一致率を例示する。Lee、Raponi（rap）、FFPE、TGCA、およびUNCとの一致率は、それぞれ、84%、91%、87%、88%、および89%である。

【0035】

【図17】図17は、Cancer Genome Atlas（TCGA）肺SQデー

50

タセットにおける免疫細胞シグネチャー（すなわち、実施例3のBindeaらによる参考文献）、他の免疫マーカー、および個々の免疫マーカーのヒートマップを例示する。

【0036】

【図18-1】図18は、実施例3に記載される複数のSQデータセット間のT細胞シグネチャー遺伝子発現サブタイプパターンの再現性を例示する。

【図18-2】図18は、実施例3に記載される複数のSQデータセット間のT細胞シグネチャー遺伝子発現サブタイプパターンの再現性を例示する。

【図18-3】図18は、実施例3に記載される複数のSQデータセット間のT細胞シグネチャー遺伝子発現サブタイプパターンの再現性を例示する。

【0037】

【図19】図19は、実施例3に記載されるように、CD274（PD-L1）発現と適応免疫細胞（AIC）シグネチャーとの間の関連性（調整済み決定係数）をサブタイプおよびAICシグネチャーと対比して例示する。Tcmは、セントラルメモリーT細胞であり、Temは、エフェクターメモリーT細胞であり、Th1は、1型Tヘルパー細胞であり、Th2は、2型Tヘルパー細胞であり、TFHは、濾胞性ヘルパーT細胞であり、Th17は、Tヘルパー17細胞であり、Tregは、制御性T細胞であり、Tgdは、ガンマデルタT細胞である。

【0038】

【図20】図20は、実施例3に記載されるように、全体的およびサブタイプ別のSQシグネチャーと生存期間の関連性を例示する。ハザード比（HR）および信頼区間は、層別coxモデルから算出された。サブタイプ特有のHRはステージに合わせて調整し（全体はステージおよびサブタイプによって調整した）、有意な関連性（ $p < 0.05$ ）を有する免疫特徴のみが示されている。

【0039】

【図21-1】図21は、SQサブタイプによるすべての免疫細胞およびイムノマーカー（すなわち、IFN遺伝子、MHCII遺伝子、ならびに個々のイムノマーカーPDL1、PDL2、PDCD1、およびCTLA4）のボックスプロットを例示する。SCCは扁平上皮癌である。

【図21-2】図21は、SQサブタイプによるすべての免疫細胞およびイムノマーカー（すなわち、IFN遺伝子、MHCII遺伝子、ならびに個々のイムノマーカーPDL1、PDL2、PDCD1、およびCTLA4）のボックスプロットを例示する。SCCは扁平上皮癌である。

【図21-3】図21は、SQサブタイプによるすべての免疫細胞およびイムノマーカー（すなわち、IFN遺伝子、MHCII遺伝子、ならびに個々のイムノマーカーPDL1、PDL2、PDCD1、およびCTLA4）のボックスプロットを例示する。SCCは扁平上皮癌である。

【図21-4】図21は、SQサブタイプによるすべての免疫細胞およびイムノマーカー（すなわち、IFN遺伝子、MHCII遺伝子、ならびに個々のイムノマーカーPDL1、PDL2、PDCD1、およびCTLA4）のボックスプロットを例示する。SCCは扁平上皮癌である。

【図21-5】図21は、SQサブタイプによるすべての免疫細胞およびイムノマーカー（すなわち、IFN遺伝子、MHCII遺伝子、ならびに個々のイムノマーカーPDL1、PDL2、PDCD1、およびCTLA4）のボックスプロットを例示する。SCCは扁平上皮癌である。

【0040】

【図22】図22は、扁平上皮癌（SQ）サブタイプ非サイレント突然変異量、SQにおけるNFE2L2発現、およびMHCクラスIIシグネチャーを、クラスカルウォリス関連性検定のp値とともに例示する。MHCIIは、主要組織適合性クラスII遺伝子シグネチャーである。

【0041】

10

20

30

40

50

【図 2 3 - 1】図 2 3 は、増殖、非サイレント突然変異量、ならびに肝要な薬物標的である CD 2 7 4 (PD-L 1)、PDCD 1 (PD-1)、および CTLA 4 における扁平上皮癌 (SQ) サブタイプの有意差を例示する。SQ サブタイピングは、実施例 4 に記載するように判定した。

【図 2 3 - 2】図 2 3 は、増殖、非サイレント突然変異量、ならびに肝要な薬物標的である CD 2 7 4 (PD-L 1)、PDCD 1 (PD-1)、および CTLA 4 における扁平上皮癌 (SQ) サブタイプの有意差を例示する。SQ サブタイピングは、実施例 4 に記載するように判定した。

【図 2 3 - 3】図 2 3 は、増殖、非サイレント突然変異量、ならびに肝要な薬物標的である CD 2 7 4 (PD-L 1)、PDCD 1 (PD-1)、および CTLA 4 における扁平上皮癌 (SQ) サブタイプの有意差を例示する。SQ サブタイピングは、実施例 4 に記載するように判定した。

10

【0042】

【図 2 4】図 2 4 は、臨床的な固形腫瘍突然変異パネル (表 8 に開示されている 3 2 2 種の遺伝子) における過半数の遺伝子に関する SQ サブタイプの薬物標的遺伝子発現の有意差を例示する。SQ サブタイプでは、76% が差次的発現 (KW ボンフェローニ閾値 $p < 0.000155$) を示した。SQ サブタイピングは、実施例 4 に記載するように判定した。

【0043】

【図 2 5】図 2 5 は、臨床的な固形腫瘍突然変異パネル (表 8 に開示されている 3 2 2 種の遺伝子) における過半数の遺伝子に関する SQ サブタイプの薬物標的遺伝子発現の有意差を例示する。SQ サブタイプでは、70% が差次的発現 (KW ボンフェローニ閾値 $p < 0.000155$) を示した。SQ サブタイピングは、実施例 5 に記載するように判定した。

20

【0044】

【図 2 6】図 2 6 は、増殖における扁平上皮癌 (SQ) サブタイプの有意差を例示する。SQ サブタイピングは、実施例 5 に記載するように判定した。

【発明を実施するための形態】

【0045】

発明の詳細な説明

30

概説

本発明は、肺がんを特定または診断するためのキット、組成物、および方法を提供する。すなわち、本方法は、肺がん、特に肺扁平上皮癌 (SQ) のサブセットを分子的に定義するために有用であり得る。本方法は、治療応答の予後診断能および予測能を有し得る肺がんの分類を提供する。疫学的目的で有用な用語であるが、「肺がん」は特定の疾患を指さない場合があり、むしろ、肺、気管支、および胸膜の腫瘍の異種集合を表す場合がある。実用的な目的では、肺がんは概して、小細胞肺がん (SCLC) および非小細胞肺がん (NSCLC) の 2 種の組織学的サブタイプに分けることができる。これらの主な腫瘍タイプは、異なる頻度で提示される場合があり、異なる解剖学的位置を有する場合があり、異なる転移偏向を有する場合があり、療法への応答が異なる場合があり、異なる細胞先駆体に由来する可能性が高い場合がある。

40

【0046】

「扁平上皮癌サブタイプを判定すること」には、例えば、肺扁平上皮癌の存在およびタイプを診断または検出すること、疾患の進行をモニタリングすること、ならびにサブタイプを示す細胞または試料を特定または検出することが含まれ得る。

【0047】

一実施形態では、肺がんの状態は、1 つまたは複数の対象試料における複数の分類指標遺伝子またはバイオマーカーの発現パターンまたはプロファイルの評価によって査定される。論述を目的として、対象または対象試料という用語は、健康および／または疾患状態を問わず個体を指す。対象は、本発明の文脈においては、試料が得られ査定される対象、

50

研究参加者、患者、対照対象、スクリーニング対象、または任意の他のクラスの個体であり得る。したがって、対象は、肺扁平上皮癌（そのサブタイプまたはグレードを含む）と診断されている場合があったり、肺S Qがんの1つもしくは複数の症状、または肺がんの素因、例えば家族（遺伝的）もしくは病歴（医学的）因子を提示する場合があったり、肺がんの処置または療法を受けている場合があったりする。代替的には、対象は、前述の因子または基準のいずれに関しても健常であり得る。「健常」という用語は任意の絶対的な評価または状態に対応するよう定義することができないため、本明細書で使用する「健常」という用語は、肺がん状態に関するものであることが理解されよう。したがって、任意の規定の疾患または疾患基準に関して健常と定義される個体は、実際には任意の他の1つもしくは複数の疾患と診断されていたり、または1つもしくは複数の他のがんを含む任意の他の1つもしくは複数の疾患基準を呈したりする場合がある。

10

【0048】

本明細書で 사용되는場合、「発現プロファイル」または「バイオマーカープロファイル」または「遺伝子シグネチャー」は、バイオマーカーまたは判別的または分類指標遺伝子の発現の相対的な存在量、レベル、存在、または非存在の測定に対応する1つまたは複数の値を含む。発現プロファイルは、肺がんの診断の前もしくは後の対象に由来してもよく、処置もしくは療法の前もしくは後の1つもしくは複数の時点で対象から収集された生物学的試料に由来してもよく、処置もしくは療法が行われない（例えば、肺がんを診断されているかもしくはそのリスクがある対象における疾患の進行をモニタリングするため、もしくは疾患の発症を査定するため）1つもしくは複数の時点で対象から収集された生物学的試料に由来してもよく、または健常な対象から収集されてもよい。対象という用語は、患者と互換的に使用され得る。患者はヒト患者であり得る。本明細書において提供されるバイオマーカープロファイルの1つまたは複数のバイオマーカーは、表1の1つまたは複数のバイオマーカーから選択される。

20

【0049】

本明細書で 사용되는場合、バイオマーカーまたは分類指標に関して使用される「発現レベルを判定すること」または「発現プロファイルを判定すること」または「発現レベルを検出すること」または「発現プロファイルを検出すること」という用語は、バイオマーカー（単数または複数）の量、例えばバイオマーカーポリペプチドまたはmRNA（またはそれに由来するcDNA）の量を定量的、半定量的、または定性的に確認または測定するために、プローブ、プライマー、もしくは抗体などのバイオマーカー特異的試薬および／または方法を、試料、例えば対象もしくは患者の試料および／または対照試料に適用することを意味する。例えば、バイオマーカーのレベルは、例えば、バイオマーカー検出剤、例えば抗体、例えば標識抗体がバイオマーカーに特異的に結合し、例えばポリペプチドバイオマーカーの量の相対的または絶対的な確認を可能にする、例えば免疫組織化学的検査、ELISA、ウェスタンブロット、免疫沈降などを含むイムノアッセイや、例えばマイクロアレイ解析、定量的RT-PCR（qRT-PCR）などのRT-PCR、遺伝子発現連続解析（SAGE）、ノーザンブロット、デジタル分子バーコード技術、例えばNanosttring Counter解析、およびTaqMan定量的PCRアッセイを含む、例えばプローブベースおよび増幅ベースの方法を含む、プローブまたはプライマーもしくはプライマーセットを使用して核酸バイオマーカーの量を確認する、ハイブリダイゼーションおよびPCRプロトコルを含むいくつかの方法によって判定することができる。ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織試料または細胞におけるmRNAのin situハイブリダイゼーションなどの、mRNA検出および数量化の他の方法を適用してもよい。この技術は現在、Quantigene ViewRNA（Affymetrix）によって提供されており、これは、増幅系に特異的に結合してハイブリダイゼーションシグナルを増幅するプローブセットを各mRNAに使用する；これらの増幅されたシグナルは、標準的な蛍光顕微鏡または撮像系を使用して可視化することができる。例えばこの系は、例えば同じ組織切片中に存在する正常および腫瘍細胞を試料が有する場合、不均一試料中の転写物レベルを検出および測定することができる。言及したように、

30

40

50

組織試料中の遺伝子発現レベルを測定するために、TaqManプロンプベースの遺伝子発現解析（PCRベース）を使用することもでき、この技術は、FFPE試料中のmRNAレベルを測定するのに有用であることが示されている。手短に述べると、TaqManプロンプベースのアッセイは、mRNA標的と特異的にハイブリダイズするプロンプを利用する。このプロンプは、各末端に結合したクエンチャー色素およびレポーター色素（蛍光分子）を含み、mRNA標的との特異的なハイブリダイゼーションが起こったときにのみ蛍光が発せられる。増幅ステップ中、ポリメラーゼ酵素のエキソヌクレアーゼ活性がクエンチャーおよびレポーター色素をプロンプから脱離させ、蛍光発光が生じ得る。検出系によってこの蛍光発光が記録され、シグナルが測定される；これらのシグナル強度を使用して、試料中の所与の転写物の存在量（遺伝子発現）を算出する。

10

【0050】

一実施形態では、本明細書（例えば表1および2）に記載される遺伝子カセットまたは分類指標遺伝子に関連付けられる「発現プロファイル」または「バイオマーカープロファイル」または「遺伝子シグネチャー」は、正常試料と腫瘍試料とを弁別するのに有用であり得る。別の実施形態では、腫瘍試料は肺SQ試料である。別の実施形態では、SQは、本明細書において提供される方法を使用して判定された発現プロファイルに基づいて、基底、古典的、未分化、または分泌性にさらに分類され得る。遺伝子発現を使用した基底、古典的、未分化、または分泌性扁平上皮癌の特徴付けは、Wilkerson MDら、Clin Cancer Res、2010年；16巻（19号）：4864～75頁に記載されている。

20

【0051】

本明細書（例えば表1）に開示される分類指標またはバイオマーカー遺伝子を使用した発現プロファイルは、肺扁平上皮癌サブタイプを特異的に特定するため、および肺扁平上皮癌の処置における治療有効性を評価するために役立つ分子ツールを提供し得る。したがって、本発明は、分子SQサブタイプについて対象をスクリーニングおよび分類するための方法、ならびに肺SQのための特定の治療的処置の有効性をモニタリングするための方法を提供する。

【0052】

一部の事例では、本明細書において提供される単一の分類指標遺伝子は、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、最大100%の予測成功率で肺扁平上皮癌のサブタイプを特定する能力を有する。

30

【0053】

一部の事例では、本明細書において提供される単一の分類指標遺伝子は、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、最大100%の感度または特異度で肺扁平上皮癌サブタイプを判定する能力を有する。

40

【0054】

本発明は、現在の方法を使用して検出することができない肺扁平上皮癌の種々のサブタイプを弁別する能力を有する系も包含する。この系は、多数の対象ならびに発現プロファイルおよび他の診断基準などの対象変数を処理する能力を有し得る。本明細書に記載される方法は、例えば、療法に対する応答の予測能を有するファーマコゲノミクスと同様に「ファーマコメタボノミクス（pharmacometabonomics）」のために使用することもできる。この実施形態では、「応答」の証拠としての発現プロファイルを使用して対象を「レスポnder」および「非レスポnder」に分けてもよく、次いで、発現プロファイルの特徴を使用して、特定の治療過程に応答する可能性が高い将来の対象を標的としてもよい。

50

【0055】

発現プロファイルは、肺組織の組織学評価または形態計測評価を含む、組織化学的、免疫組織化学的、細胞学的、免疫細胞学的、および視覚的な診断法を含む、他の診断法と組み合わせて使用することができる。

【0056】

本発明の種々の実施形態では、対象に由来する発現プロファイルは、参照発現プロファイルと比較される。「参照発現プロファイル」は、処置もしくは療法の前の対象に由来するプロファイルであってもよく、特定の時点（通常は処置もしくは療法の前もしくは後だが、肺がんの診断の前もしくは後の特定の時点を含む場合もある）において対象試料から生成されたプロファイルであってもよく、または健常な個体もしくは健常な個体からプールされた参照に由来してもよい。参照発現プロファイルは、肺がんに対して包括的であってもよく、または肺扁平上皮癌の異なるサブタイプに特異的であってもよい。

【0057】

参照発現プロファイルは、試験発現プロファイルと比較され得る。「試験発現プロファイル」は、後の時点（例えば、参照発現プロファイルの収集から1日または複数日、数週間または数か月後）であることを除いては参照発現プロファイルと同じ対象に由来してもよく、または異なる対象に由来してもよい。まとめると、対象の任意の試験発現プロファイルが、基底、古典的、未分化、または分泌性サブタイプを有する対象から過去に収集されたプロファイルと比較され得る。

【0058】

本発明の分類指標バイオマーカーは、核酸（RNA、cDNA、およびDNA）およびタンパク質、ならびにそれらのバリエーションおよび断片を含み得る。そのようなバイオマーカーには、バイオマーカーをコードする核酸配列またはかかる配列の相補体の全体または一部の配列を含むDNAが含まれ得る。本明細書に記載されるバイオマーカーは、目的の核酸配列のうちのいずれかの全体もしくは一部の配列を含むRNA、または逆転写反応において *in vitro* で合成的に得られたその非天然cDNA産物を含む場合がある。バイオマーカー核酸は、目的の核酸配列の任意の発現産物またはその一部分を含む場合もある。バイオマーカータンパク質は、本発明のDNAバイオマーカーによってコードされる、またはそれに対応するタンパク質であってもよい。バイオマーカータンパク質は、バイオマーカータンパク質またはポリペプチドのいずれかの全体または一部のアミノ酸配列を含み得る。バイオマーカー核酸は、細胞から抽出される場合もあり、またはセルフリーである場合もあり、またはエキソソームなどの細胞外小胞実体から抽出される場合もある。

【0059】

「分類指標バイオマーカー」または「バイオマーカー」または「分類指標遺伝子」は、組織または細胞内の発現レベルが正常または健常な細胞または組織のものと比較して変化している任意の遺伝子またはタンパク質であり得る。例えば、「分類指標バイオマーカー」または「バイオマーカー」または「分類指標遺伝子」は、組織または細胞内の発現レベルが特定の肺扁平上皮癌サブタイプにおいて変化している任意の遺伝子またはタンパク質であり得る。本発明のバイオマーカーの検出は、特定のサブタイプの判定を可能にし得る。「分類指標バイオマーカー」または「バイオマーカー」または「分類指標遺伝子」は、本明細書において提供される参照または対照と比べて上方制御された（例えば、発現が増加した）もの、または下方制御された（例えば、発現が減少した）ものであり得る。この参照または対照は、本明細書において提供される任意の参照または対照であり得る。一部の実施形態では、肺扁平上皮癌の特定のサブタイプにおいて上方制御または下方制御される遺伝子の発現値は、1つの遺伝子カセットにプールすることができる。各遺伝子カセットにおける全体的な発現レベルは、本明細書において「発現プロファイル」と呼ばれ、肺扁平上皮癌のサブタイプに従って試験試料を分類するために使用される。しかしながら、本明細書において開示される遺伝子の各々の発現の独立した評価を使用すれば、上方制御および下方制御される遺伝子を1つまたは複数の遺伝子カセットにグループ分けする必要

なく、腫瘍サブタイプの分類が可能であることが理解される。一部の場合では、表 2 に示されるように、合計 80 種のバイオマーカーを S Q サブタイプ判定に使用することができる。各 S Q サブタイプについて、20 種中 10 種のバイオマーカーは負の相関を示す遺伝子であり得、10 種は、特定の S Q サブタイプの遺伝子シグネチャーとして選択され得る正の相関を示す遺伝子であり得る。

【0060】

本発明の分類指標バイオマーカーは、本明細書上文に定義されるように、肺 S Q において選択的に発現される任意の遺伝子またはタンパク質を含み得る。サンプルバイオマーカー遺伝子を以下の表 1 または 2 に列挙する。表 2 中、表の第 1 の縦列は、基底 S Q を弁別するために選択されるバイオマーカーのリストを表す。表の第 2 の縦列は、古典的 S Q に

10

【0061】

肺 S Q サブタイピングのための分類指標バイオマーカーの本明細書に記載される t s a t t により表される相対的な遺伝子発現レベルを表 1 に示す。一実施形態では、肺 S Q サブタイピングのための分類指標バイオマーカーの遺伝子発現レベルは、表 1 に示されている。一実施形態では、S Q のサブタイプを分類するために、80 種すべての遺伝子を使用することができる。一実施形態では、最初の 20 種の遺伝子が、基底のための選択された遺伝子シグネチャーバイオマーカーであり、非基底試料と比較して遺伝子番号 1 ~ 10 は上

20

【0062】

30

【表 1 - 1】

表1.種の分類指標バイオマーカーの肺扁平上皮癌(SQ)サブタイプ別の遺伝子重心

遺伝子番号	遺伝子略号	遺伝子名	基底	古典的	未分化	分泌性	GenBank 受託番号*	配列番号
1	SERPIN B4	セルピンファミリーBメンバー4	15.1924	-1.28178	-10.0199	-7.32845	NM_002974.3	1
2	CXCL1	C-X-Cモチーフモカインリガンド1	14.47981	-8.31954	-8.37503	0.217875	NM_001511.3	2
3	S100A9	S100 カルシウム結合タンパク質 A9	14.35103	-5.8793	-9.10206	-1.88807	NM_002965.3	3
4	S100A8	S100 カルシウム結合タンパク質 A8	14.00816	-4.229	-9.53669	-3.08348	NM_001319196.1	4
5	SERPIN B3	セルピンファミリーBメンバー3	13.97538	1.502713	-10.9279	-8.54433	NM_006919.2	5
6	EPHA2	EPHA2	12.36835	-4.75069	-8.27087	-1.67711	NM_004431.4	6
7	S100A2	S100 カルシウム結合タンパク質 A2	12.02474	2.060853	-9.93545	-7.83677	NM_005978.3	7
8	MMP10	マトリックスメタロペプチダーゼ 10	11.70464	-5.18263	-3.79013	-3.73457	NM_002425.2	8
9	IL4R	インターロイキン 4 受容体	11.67838	-11.2637	-9.61741	7.418712	NM_000418.3	9
10	PDZK1 P1	PDZK1 相互作用タンパク質 1	11.00384	-9.67747	-7.37829	4.707793	NM_005764.3	10
11	CDK5RA P2	CDK5 制御サブユニット関連タンパク質 2	-13.3044	15.44094	0.582601	-3.89079	NM_018249.5	11
12	FAM125 B	配列類似性を有するファミリー 125、メンバーB	-12.2853	4.665284	4.308726	4.558947	BC028675.1	12

10

20

30

【表 1 - 2】

13	CABC1	bc1 複合体様のシャペロン活性	-10.3757	4.343061	7.391224	0.672574	AB073905.1	13
14	ODC1	オルニチンデカルボキシラーゼ 1	-10.1908	15.84852	0.119301	-7.30631	NM_002539.2	14
15	LPIN1	リピン 1	-10.134	3.748752	3.061368	4.230976	NM_145693.2	15
16	WASF1	WAS タンパク質ファミリーメンバー1	-9.89134	18.55734	1.814068	-11.9252	NM_003931.2	16
17	USP13	ユビキチン特異的ペプチダーゼ 13(イソペプチダーゼ T-3)	-9.17202	7.072314	7.133335	-3.50892	NM_003940.2	17
18	NUP210	ヌクレオポリン 210	-8.91997	5.496247	2.508106	1.366756	NM_024923.3	18
19	GLI2	GLI ファミリージンクフィンガー2	-8.58227	17.05556	-5.643	-6.1972	NM_005270.4	19
20	SPAG5	精子関連抗原 5	-8.26995	8.478108	6.146636	-5.34162	NM_006461.3	20
21	ME1	リンゴ酸酵素 1	-11.1058	21.38387	-2.66141	-10.605	NM_002395.5	21
22	TALDO1	トランスアルドラーゼ 1	-11.3472	21.05835	-2.95802	-9.76549	NM_006755.1	22
23	AKR1C3	アルドーケトレダクターゼファミリー 1、メンバー C3	-6.34178	19.62236	-6.31166	-10.9917	NM_003739.5	23
24	TXN	チオレドキシン	-7.28934	19.56185	-6.64144	-9.68306	NM_003329.3	24
25	ALDH3A1	アルデヒドデヒドロゲナーゼ 3 ファミリーメンバーA1	-4.42445	19.16675	-7.69158	-11.4995	NM_001135168.1	25
26	CHST7	炭水化物スルホトランスフェラーゼ 7	-6.70839	18.66004	-5.80704	-9.87835	NM_019886.3	26
27	ADAM23	ADAM メタロペプチダーゼドメイン 23	-7.14726	18.4093	-5.05087	-9.67848	NM_003812.3	27

10

20

30

40

【表 1 - 3】

28	TUFT1	タフテリン 1	-6.31534	18.07229	-4.12497	-10.8461	NM_020127.2	28
29	FOXE1	フォークヘッドボックス E1	-2.047	17.53642	-9.74136	-10.6746	NM_004473.3	29
30	ALDH3A2	アルデヒドデヒドロゲナーゼ 3 ファミリーメンバー A2	-7.7634	15.83759	-4.12228	-6.78263	NM_001031806.1	30
31	PHC2	ポリホメオティックホモログ 2	5.947711	-19.3491	3.975339	12.79184	NM_198040.2	31
32	SLC43A3	溶質担体ファミリー 43 メンバー 3	2.164732	-15.4786	4.435501	12.06209	NM_014096.3	32
33	CAPZB	筋 Z 線アクチンキャッピングタンパク質ベータサブユニット	9.697325	-15.4337	-0.08505	7.331941	NM_004930.4	33
34	FAM46A	配列類似性を有するファミリー 46 メンバー A	9.050488	-14.8822	0.551123	6.928165	NM_017633.2	34
35	PTP4A2	タンパク質チロシンホスファターゼ IVA 型、メンバー 2	5.400389	-14.838	1.837093	9.801226	NM_080391.3	35
36	DPYD	ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ	8.78203	-14.5434	-5.09695	10.92233	NM_000110.3	36
37	TRIM8	三要素モチーフ含有 8	3.847394	-14.5393	-1.94247	13.84298	NM_030912.2	37
38	CD47	CD47 分子	8.84354	-14.3091	-2.8533	8.964713	NM_001777.3	38
39	CRIP2	システインリッチタンパク質 2	4.809366	-14.1729	1.781357	9.711258	NM_001312.3	39
40	ST3GAL5	ST3 ベータガラクトシドアルファ-2,3-シアリルトランスフェラーゼ 5	2.667885	-13.865	-1.29718	13.85595	NM_003896.3	40

10

20

30

40

【表 1 - 4】

41	HSF2	熱ショック転写因子 2	-5.79001	1.050968	11.39169	-3.33599	NM_004506.3	41
42	MARCKSL1	MARCKS 様 1	1.317716	-10.696	9.825417	3.621776	NM_023009.6	42
43	EFHD1	EF ハンドドメインファミリーメンバー D1	-2.47675	-11.1247	9.620027	8.265181	NM_025202.3	43
44	CHKA	コリンキナーゼアルファ	-2.84869	-7.08145	9.530024	4.135237	NM_001277.2	44
45	PLEKHB1	プレクストリン相同ドメイン含有 B1	-5.94374	-6.54778	9.307835	6.960047	NM_021200.2	45
46	FNBP1L	ホルミン結合タンパク質 1 様	2.207537	-13.5657	9.226556	6.372445	NM_001024948.2	46
47	ZNF239	ジンクフィンガータンパク質 239	-2.61452	-7.55963	8.698057	5.033708	NM_005674.2	47
48	ABI2	Abelson 相互作用因子 2	-8.51982	0.375002	8.621929	2.322745	NM_001282925.1	48
49	MYL6B	ミオシン軽鎖 6B	-1.67839	-4.74647	8.614632	0.913087	NM_001199629.1	49
50	TTLL4	チューブリンチロシンリガーゼ様 4	-4.42597	-4.4529	8.316108	3.698664	NM_014640.4	50
51	CLCA2	クロライドチャンネルアクセサリー 2	11.3747	9.8531	-13.5607	-13.3641	NM_006536.5	51
52	GJB3	Gap ジャンクションタンパク質ベータ 3	9.738857	1.975392	-12.8741	-3.19459	NM_024009.2	52
53	GPR87	G タンパク質共役受容体 87	8.675319	3.714366	-12.5406	-4.28629	NM_023915.3	53
54	SFN	ストラチフィン	9.34036	7.030931	-12.0548	-9.10453	NM_006142.3	54
55	CSTA	シスタチン A	8.521125	6.642274	-11.6462	-8.09435	NM_005213.3	55
56	DSG3	デスモグレイン 3	8.011909	9.629873	-11.4831	-11.0649	NM_001944.2	56

10

20

30

40

【表 1 - 5】

57	ST6GAL NAC2	ST6 N-アセ チルガラクト サミニドアル ファ-2,6-シ アリルトラン スフェラーゼ 2	3.15872	10.40711	-11.4486	-6.84553	NM_006456.2	57
58	GJB5	Gap ジャン クションタン パク質ベータ 5	9.68863	5.741838	-11.4122	-8.47546	NM_005268.3	58
59	TMPRS S4	膜貫通プロ テアーゼ、 セリン 4	7.421295	10.31518	-10.907	-11.6365	NM_019894.3	59
60	SDC1	シンデカン 1	7.820035	8.717049	-10.7889	-10.3298	NM_001006946. 1	60
61	FMNL1	ホルミン様 1	-1.24826	-12.3922	-4.15625	18.39415	NM_005892.3	61
62	BIRC3	バキュロウ イルス IAP リピート含 有 3	0.52973	-12.5421	-4.71506	17.09129	NM_001165.4	62
63	ARHGDI B	Rho GDP 解 離阻害因子 ベータ	1.579196	-12.7865	-4.70303	16.25141	NM_001175.6	63
64	SH2B3	SH2B アダ プタータン パク質 3	-3.48062	-9.12196	-3.04569	16.23607	NM_005475.2	64
65	HLA- DPA1	主要組織適 合抗原クラ ス II、DP ア ルファ 1	-2.12031	-9.65989	-3.99607	16.09867	NM_033554.3	65
66	NCF4	好中球細胞 質因子 4	1.545361	-11.6937	-6.10253	16.0617	NM_000631.4	66
67	ACSL5	アシル-CoA シンテター ゼ長鎖ファ ミリーメンバ ー5	1.654978	-14.5012	-1.66186	15.91216	NM_016234.3	67
68	CSF2RA	コロニー刺 激因子 2 受 容体アルファ サブユニ ット	-1.37456	-10.508	-2.90331	15.48108	NM_006140.4	68

10

20

30

40

【表 1 - 6】

69	LAPTM5	リソソーム膜貫通タンパク質 5	-1.16591	-9.77656	-4.28777	15.43442	NM_006762.2	69
70	ARL6IP5	ADP-リボシル化様因子 6 相互作用タンパク質 5	3.195006	-13.6479	-4.55752	15.41665	NM_006407.3	70
71	ADH7	アルコールデヒドロゲナーゼ 7(クラス IV)、ミューまたはシグマ	0.182052	20.14673	-9.26939	-16.3334	NM_001166504.1	71
72	ABCC5	ATP 結合カセットサブファミリー C メンバー 5	-1.26645	17.73313	-4.3337	-15.6431	NM_005688.3	72
73	SOX2	SRV ボックス 2	-2.70147	15.71135	0.455164	-15.3051	NM_003106.3	73
74	SLC9A3R1	溶質担体ファミリー 9、サブファミリー A(NHE3、カチオンプロトンアンチポーター 3)、メンバー 3 制御因子 1r1	1.902295	17.71886	-9.60834	-15.1497	NM_004252.4	74
75	KLF5	クルップル様因子 5(腸)	4.456364	13.41893	-8.16611	-14.0138	NM_001730.4	75
76	GPX2	グルタチオンペルオキシダーゼ 2	-2.8397	17.49375	-3.93026	-14.0021	NM_002083.3	76
77	PIR	ピリン	-4.58676	16.97955	-1.18296	-13.5651	NM_003662.3	77
78	TPD52L1	腫瘍タンパク質 D52 様 1	1.334706	10.49961	0.210322	-13.4769	NM_003287.3	78

【表 1 - 7】

79	SLC6A8	溶質担体ファミリー 6 メンバー 8	3.006892	11.83057	-4.32575	-13.4647	NM_005629.3	79
80	SIAH2	Siah E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ 2	1.897743	11.60785	-2.92619	-13.0552	NM_005067.5	80

*各GenBank受託番号は列挙される遺伝子の代表的または例示的なGenBank受託番号であり、その全体はあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれている。さらに、列挙される代表的または例示的な各受託番号は、特定の受託番号に特許請求の範囲を限定するものと解釈されてはならない。

【0063】

【表 2】

表2.基底、古典的、未分化、および分泌性のSQサブタイプに関して選択される分類指標バイオマーカー

基底	古典的	未分化	分泌性
SERPINB4	ME1	HSF2	FMNL1
CXCL1	TALDO1	MARCKSL1	BIRC3
S100A9	AKR1C3	EFHD1	ARHGD1B
S100A8	TXN	CHKA	SH2B3
SERPINB3	ALDH3A1	PLEKHB1	HLA-DPA1
EPHA2	CHST7	FBNP1L	NCF4
S100A2	ADAM23	ZNF239	ACSL5
MMP10	TUFT1	AB12	CSF2RA
IL4R	FOXE1	MYL6B	LAPTM5
PDZK1LP1	ALDH3A2	TTLL4	ARL61P5
CDK5RAP2	PHC2	CLCA2	ADH7
FAM125B	SLC43A3	GJB3	ABCC5
CABC1	CAPZB	GPR87	SOX2
CDC1	FAM46A	SFN	SLC9A3R1
LPIN1	PTP4A2	CSTA	KLF5
WASF1	DPYD	DSG3	GPX2
USP13	TRIM8	ST6GALNAC2	PIR
NUP210	CD47	GJB5	TPD52L1
GL12	CRIP2	TMPRSS4	SLC6A8
SPAG5	ST3GAL5	SDC1	SIAH2

10

20

【0064】

診断的使用

一実施形態では、本明細書において提供される方法および組成物は、扁平上皮癌の4つのサブタイプ：（1）基底；（2）古典的；（3）未分化；および（4）分泌性の区別を可能にし、当技術分野で公知の分子S Qサブタイピング法よりも少ない遺伝子が必要とされる。

30

【0065】

概して、本明細書において提供される方法は、肺がん試料を特定の肺がんサブタイプ（例えば扁平上皮癌のサブタイプ）に分類するために使用される。一実施形態では、本方法は、任意の公的に利用可能な肺A D発現データセットの分類指標バイオマーカーのうちの少なくとも1種の発現レベルを検出または判定するステップを含む。一実施形態では、本方法は、患者または対象から得られた肺がん試料中の、表1の分類指標バイオマーカーのうちの少なくとも1種の発現レベルを測定するステップ、検出するステップ、または判定するステップを含む。

40

【0066】

本明細書に記載される検出または区別方法のための肺がん試料は、過去に扁平上皮癌試料と判定または診断された試料であってもよい。過去の診断は、組織学的解析に基づき得る。組織学的解析は、1名または複数名の病理学者によって行われてよい。

【0067】

一実施形態では、本明細書において提供される方法において用いられる測定または検出するステップは、少なくとも1種の分類指標バイオマーカー（例えば表1の分類指標バイオマーカー）のcDNA分子の一部に対して実質的に相補的であるオリゴヌクレオチドを用い、RNA-seq、RT-PCR、またはハイブリダイゼーションに好適な条件下

50

でRNA-seq、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、またはハイブリダイゼーションアッセイを行うこと、および検出するステップに基づいて少なくとも1種の分類指標バイオマーカの発現レベルを得ることにより、核酸レベルでなされる。次いで、分類指標バイオマーカのうちの少なくとも1種の発現レベルが、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットにおける分類指標バイオマーカ（例えば表1の分類指標バイオマーカ）のうちの少なくとも1種の参照発現レベルと比較される。少なくとも1種のサンプルトレーニングセットは、（i）少なくとも1種のバイオマーカを過剰発現する試料からの少なくとも1種のバイオマーカの発現レベル、（ii）参照基底、古典的、未分化、もしくは分泌性SQサブタイプの発現レベル、または（iii）扁平上皮癌不含肺試料からの発現レベル、および肺組織試料を基底、古典的、未分化、または分泌性サブタイプに分類することを含み得る。次いで、比較するステップの結果に基づいて、肺がん試料を扁平上皮癌の基底、古典的、未分化、または分泌性サブタイプに分類することができる。一実施形態では、比較するステップは、肺組織またはがん試料から得られた発現データと、少なくとも1種のトレーニングセットからの発現データとの間の相関を判定するステップを含む、統計的アルゴリズムを適用するステップと、統計的アルゴリズムの結果に基づいて肺組織またはがん試料を基底、古典的、未分化、または分泌性サブタイプに分類するステップとを含み得る。

【0068】

一実施形態では、本明細書において提供される方法は、患者から得られた肺がん試料中の、本明細書において提供される分類指標バイオマーカ、例えば表1の分類指標バイオマーカのうちの少なくとも1種のレベルを、核酸レベルでプローブするステップを含む。肺がん試料は、過去に扁平上皮癌試料と判定または診断された試料であってもよい。過去の診断は、組織学的解析に基づき得る。組織学的解析は、1名または複数名の病理学者によって行われてよい。プローブするステップは、一実施形態では、試料を、本明細書において提供される少なくとも1種の分類指標バイオマーカ、例えば表1の分類指標バイオマーカのcDNA分子の一部に対して実質的に相補的である1つまたは複数のオリゴヌクレオチドと、1つまたは複数のオリゴヌクレオチドをそれらの相補体または実質的な相補体とハイブリダイズさせるのに好適な条件下で混合するステップと；1つまたは複数のオリゴヌクレオチドと、それらの相補体または実質的な相補体との間でハイブリダイゼーションが生じるかどうかを検出するステップと；検出するステップに基づいて少なくとも1種の分類指標バイオマーカのハイブリダイゼーション値を得るステップとを含む。次いで、少なくとも1種の分類指標バイオマーカのハイブリダイゼーション値は、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットからの参照ハイブリダイゼーション値と比較される。例えば、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットは、参照基底試料、参照古典的試料、参照未分化試料および／または参照分泌性試料からのハイブリダイゼーション値を含む。肺がん試料は、比較するステップの結果に基づいて、例えば、基底、古典的、未分化または分泌性と分類される。

【0069】

肺組織試料は、ヒト対象または患者から単離された任意の試料であり得る。例えば、一実施形態では、パラフィンワックスに包埋された肺生検に対して解析が行われる。一実施形態では、試料は、新鮮な冷凍肺組織試料であり得る。別の実施形態では、試料は、患者から得られた体液であってもよい。体液は、血液もしくはその画分（すなわち、血清、血漿）、尿、唾液、喀痰、または脳脊髄液（CSF）であり得る。試料は、本明細書において提供される方法で使用するための核酸の細胞源ならびに細胞外源を含有し得る。細胞外源は、セルフリーDNAおよび／またはエキソソームであり得る。一実施形態では、試料は、細胞ペレットまたは洗浄液であってもよい。本発明のこの態様は、小さな生検からであっても主要な組織学的タイプを正確に特定することにより、現在の診断学を改善する手段を提供する。本発明の方法は、RT-PCR法を含め、高感度、高精度であり、パラフィン包埋試料で使用するための多試料分析能（multi-analyte capability）を有する。例えば、参照により本明細書に組み込まれている、Croninら（20

10

20

30

40

50

04年)、Am. J Pathol.、164巻(1号):35~42頁を参照されたい。

【0070】

ホルマリン固定およびパラフィンワックスへの組織包埋は、光学顕微鏡評価の前に組織を処理するための普遍的手法である。ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)検体により得られる主な利点は、組織切片における細胞および構築的な形態の詳細の保存である(Foxら(1985年)、J Histochem Cytochem、33巻:845~853頁)。生検検体を処理する標準的な緩衝ホルマリン固定剤は、典型的には、37%のホルムアルデヒドおよび10~15%のメチルアルコールを含有する水溶液である。ホルムアルデヒドは、タンパク質-核酸間およびタンパク質-タンパク質間の架橋の*in vitro*での形成をもたらす、反応性の高い双極性化合物である(Clarkら(1986年)、J Histochem Cytochem、34巻:1509~1512頁;McGheeおよびvon Hippel(1975年)、Biochemistry、14巻:1281~1296頁、それぞれ参照により本明細書に組み込まれている)。

【0071】

一実施形態では、本明細書において使用される試料は個体から得られ、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織を含む。しかしながら、他の組織および試料タイプは本明細書における使用に適している。一実施形態では、他の組織および試料タイプは、新鮮な冷凍組織、洗浄液、または細胞ペレットなどであり得る。一実施形態では、試料は、個体から得られた体液であってよい。体液は、血液もしくはその画分(例えば、血清、血漿)、尿、喀痰、唾液、または脳脊髄液(CSF)であり得る。本明細書において提供されるバイオマーカー核酸は、細胞から抽出される場合もあり、またはセルフリーである場合もあり、またはエキソソームなどの細胞外小胞実体から抽出される場合もある。

【0072】

FFPE組織からRNAを単離するための方法は、当技術分野で公知である。一実施形態では、参照により本明細書に組み込まれている、Bibikovaら(2004年)、American Journal of Pathology、165巻:1799~1807頁に記載されるように、全RNAがFFPE組織から単離され得る。同様に、High Pure RNA Paraffin Kit(Roche)が使用され得る。パラフィンは、キシレン抽出後にエタノール洗浄を行うことによって除去される。RNAは、MasterPure Purificationキット(Epicenter、Madison、Wis.)を使用して組織ブロックの切片から単離され得る;DNase I処置ステップが含まれる。RNAは、Trizol試薬を供給元の説明(Invitrogen Life Technologies、Carlsbad、Calif.)に従って使用して冷凍試料から抽出してもよい。測定可能な残存するゲノムDNAを含む試料は、再度DNase I処置にかけてDNA混入についてアッセイしてもよい。すべての精製、DNase処置、および他のステップは、製造元のプロトコールに従って行ってもよい。全RNAの単離後、試料は、使用まで-80℃で保管することができる。

【0073】

mRNA抽出の一般的な方法は当技術分野で周知であり、Ausubelら編、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York、1987~1999年を含む、分子生物学の標準的な教本に開示されている。パラフィン包埋組織からRNAを抽出するための方法は、例えば、RuppおよびLocker(Lab Invest.、56巻:A67頁、1987年)ならびにDe Andresら(Biotechniques、18巻:42~44頁、1995年)において開示されている。特に、RNA単離は、Qiagen(Valencia、Calif.)などの商業的な製造元からの精製キット、バッファーセット、およびプロテアーゼを製造元の説明に従って使用して行うことができる。例えば、培養下の細胞の全RNAは、Qiagen RNeasyミニカラムを使用して単離することができる。他の市販のRNA単離キットとしては、MasterPure(商標)Complete DNA and RNA Purification Kit(Epicentre、Madison、Wis.)およびParaffin Block RNA Isol

ation Kit (Ambion, Austin, Tex.) が挙げられる。組織試料の全RNAは、例えば、RNA Stat-60 (Tel-Test, Friendswood, Tex.) を使用して単離することができる。腫瘍から調製されたRNAは、例えば、塩化セシウム密度勾配遠心分離によって単離することができる。さらに、例えば、Chomczynskiの単一ステップRNA単離プロセス（米国特許第4, 843, 155号、その全体はあらゆる目的のために参照により組み込まれている）などの当業者に周知の技術を使用して、多数の組織試料を容易に処理することができる。

【0074】

一実施形態では、試料は、肺組織試料、例えば、扁平上皮癌試料から採取された細胞を含む。細胞は、当技術分野で公知の標準的技術を使用して、生物学的試料から採取され得る。例えば、一実施形態では、細胞試料を遠心分離し、ペレット化された細胞を再懸濁することによって細胞が採取される。細胞は、リン酸緩衝食塩水（PBS）などの緩衝液中に再懸濁してよい。細胞懸濁液を遠心分離して細胞ペレットを得た後、細胞を溶解して、核酸、例えばメッセンジャーRNAを抽出することができる。対象から得られたすべての試料は、任意の種類のさらなる処理にかけたものを含め、対象から得られたものとみなされる。

10

【0075】

この試料は、一実施形態では、本明細書に記載のバイオマーカーの組合せのバイオマーカーレベルの検出前に、さらに処理される。例えば、細胞または組織試料中のmRNAは、試料の他の成分から分離してもよい。mRNAがその天然の環境にない場合、mRNAをその非天然状態で単離するために、試料を濃縮および／または精製してもよい。例えば、mRNAの*in vivo*の高次構造は同じ配列の*in vitro*構造と異なることが研究により示されている（例えば、その全体はあらゆる目的のために本明細書に組み込まれている、Rouskinら（2014年）、Nature、505巻、701～705頁を参照されたい）。

20

【0076】

試料のmRNAは、一実施形態では、合成DNAプローブとハイブリダイズされ、合成DNAプローブは、一部の実施形態では、検出部分（例えば、検出可能な標識、捕捉配列、バーコード報告配列）を含む。したがって、これらの実施形態では、非天然mRNA-cDNA複合体が最終的に作製され、バイオマーカーの検出のために使用される。別の実施形態では、試料のmRNAは、検出可能な標識、例えばフルオロフォアで直接標識される。さらなる実施形態では、非天然の標識mRNA分子がcDNAプローブとハイブリダイズされ、複合体が検出される。

30

【0077】

一実施形態では、mRNAが試料から得られると、mRNAは、ハイブリダイゼーション反応において相補的DNA（cDNA）に変換されるか、または、ハイブリダイゼーション反応において1つもしくは複数のcDNAプローブとともに使用される。cDNAは*in vivo*で存在せず、したがって非天然分子である。さらに、cDNA-mRNAハイブリッドは合成であり、*in vivo*で存在しない。cDNAは、*in vivo*で存在しないことに加え、デオキシリボ核酸を含み、リボ核酸を含まないため、cDNAはmRNAとは必然的に異なる。cDNAは次いで、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または当業者に公知の他の増幅方法によって増幅される。例えば、用いることができる他の増幅方法としては、その全体はあらゆる目的のために参照により組み込まれている、リガーゼ連鎖反応（LCR）（WuおよびWallace、Genomics、4巻：560頁（1989年）、Landegrenら、Science、241巻：1077頁（1988年）、その全体はあらゆる目的のために参照により組み込まれている）、転写増幅（Kwohら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻：1173頁（1989年）、その全体はあらゆる目的のために参照により組み込まれている）、自家持続配列複製法（Guatelliら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、87巻：1874頁（1990年）、その全体はあらゆる目的のために参照により組み込まれている）、および核酸ベースの配列増幅（NASBA）が挙げられ

40

50

る。PCR増幅のためのプライマーを選択するための指針は、当業者には公知である。例えば、その全体があらゆる目的のために参照により組み込まれている、McPhersonら、PCR Basics: From Background to Bench、Springer-Verlag、2000年を参照されたい。この増幅反応の産物、すなわち、増幅されたcDNAもまた、必然的に非天然産物である。第1には、上述のように、cDNAは非天然分子である。第2に、PCRの場合、増幅プロセスは、出発物質の個々のcDNA分子すべてについて何億ものcDNAコピーを作出する役割を果たす。生成されるコピーの数は、*in vivo*で存在するmRNAのコピーの数とはかけ離れている。

【0078】

一実施形態では、断片上にさらなるDNA配列（例えば、アダプター、レポーター、捕捉配列または部分、バーコード）を導入するプライマーを用いて（例えば、アダプター特異的プライマーを使用して）cDNAが増幅されるか、または、さらなる配列（例えば、アダプター、レポーター、捕捉配列または部分、バーコード）を含むcDNAプローブに直接mRNAもしくはcDNAバイオマーカー配列がハイブリダイズされる。したがって、mRNAの増幅および／またはcDNAプローブへのハイブリダイゼーションは、さらなる配列を導入し、非天然ハイブリッドを形成することにより、非天然の一本鎖cDNAまたはmRNAから非天然の二本鎖分子を作出する役割を果たす。さらに、当業者には公知であるように、増幅手順は、それに関連した誤差率を有する。したがって、増幅は、さらなる修飾をcDNA分子に導入する。一実施形態では、アダプター特異的プライマーを用いた増幅中、検出可能な標識、例えばフルオロフォアが一本鎖cDNA分子に付加される。したがって、増幅は、天然に生じないDNA複合体を作出する役割も果たし、それは少なくとも（i）cDNAは*in vivo*で存在しない、（i）アダプター配列がcDNA分子の末端に付加されて、*in vivo*で存在しないDNA配列が作られる、（ii）増幅に関連した誤差率が、*in vivo*で存在しないDNA配列をさらに作出する、（iii）cDNA分子の構造は天然に存在するものと比較して異なる、そして（iv）検出可能な標識がcDNA分子に化学的に付加されるからである。

【0079】

一実施形態では、目的のバイオマーカーの発現は、非天然cDNA分子の検出により核酸レベルで検出される。

【0080】

一実施形態では、肺がんSQサブタイピングのための、本明細書において提供される方法は、分類指標バイオマーカーセットの発現レベルを検出するステップを含む。一実施形態では、この検出するステップは、核酸レベルまたはタンパク質レベルにおける表1の分類指標バイオマーカーのすべてを含む。別の実施形態では、表1のうち単一の分類指標バイオマーカーまたはそれらのサブセットまたは複数、例えば、約10種～約20種が検出される。例えば、一実施形態では、肺がんSQサブタイプを判定する方法において、表1のバイオマーカーのうちの約5種～約10種、約10種～約20種、約20種～約40種、約40種～約60種、約60種～約80種が検出される。別の実施形態では、肺がんサブタイプを判定する方法において、表1のバイオマーカーの各々が検出される。別の実施形態では、表1のバイオマーカーのうち20種が、特定の肺がんSQサブタイプの遺伝子シグネチャーとして選択される。

【0081】

検出するステップは、RNA-seq、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、マイクロアレイハイブリダイゼーションアッセイ、または別のハイブリダイゼーションアッセイ、例えば、NanoStringアッセイ、例えば、分類指標バイオマーカーに特異的なプライマーおよび／もしくはプローブを用いるもの、ならびに／または同様のものを含むがこれらに限定されない、任意の好適な技術によって行うことができる。一部の場合では、増幅方法（例えば、RT-PCRまたはqRT-PCR）に有用なプライマーは、表1に列挙された分類指標バイオマーカーなどの本明細書において提供される分類指標遺伝子に結合するのに好適な任意のフォワードおよびリバースプライマーである。

【0082】

本明細書に記載されるバイオマーカーは、目的の核酸配列のうちのいずれかの全体もしくは一部の配列を含むRNA、または逆転写反応において *in vitro* で合成的に得られたその非天然cDNA産物を含む。「断片」という用語は、少なくとも10、15、20、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、800、900、1,000、1,200、もしくは1,500個の連続したヌクレオチド、または最大で本明細書において開示される全長バイオマーカーポリヌクレオチドに存在する数のヌクレオチドを概して含むポリヌクレオチドの一部分を指すよう意図される。バイオマーカーポリヌクレオチドの断片は、概して、少なくとも15、25、30、50、100、150、200、もしくは250個の連続したアミノ酸、または最大で本発明の全長バイオマーカータンパク質に存在する総数のアミノ酸をコードする。

【0083】

一部の実施形態では、例えばRNA転写物またはその発現産物などの過剰発現は、すべて試料中の測定された転写物（もしくはそれらの産物）、またはRNA転写物（もしくはそれらの非天然cDNA産物）の特定の参照セットであり得る、参照RNA転写物またはそれらの発現産物のレベルに対する正規化によって判定される。正規化は、アッセイしたRNAもしくはcDNAの量と、使用したRNAもしくはcDNAの質の変動性との両方の差を補正するか、または正規化により除去するために行われる。したがって、アッセイは典型的に、例えばGAPDHおよび／またはβ-アクチンなどの周知のハウスキーピング遺伝子を含むある特定の正規化遺伝子の発現を測定し、それを組み込む。代替的には、正規化は、アッセイされるバイオマーカーのすべてまたはそれらの大きなサブセットのシグナルの平均値または中央値に基づいてもよい（大域的正規化手法）。

【0084】

単離されたmRNAは、サザンまたはノーザン解析、PCR解析およびプローブアッセイ、NanoStringアッセイを含むがこれらに限定されない、ハイブリダイゼーションまたは増幅アッセイにおいて使用することができる。mRNAレベルの検出のための1つの方法は、単離されたmRNAまたは合成されたcDNAを、検出される遺伝子によってコードされるmRNAとハイブリダイズし得る核酸分子（プローブ）と接触させるステップを含む。核酸プローブは、例えば、cDNA、またはその一部分、例えば、少なくとも7、15、30、50、100、250、または500ヌクレオチドの長さで、ストリンジェントな条件下で本発明の非天然cDNAまたはmRNAバイオマーカーと特異的にハイブリダイズするのに十分なオリゴヌクレオチドであり得る。

【0085】

上記で説明したように、一実施形態では、mRNAが試料から得られると、mRNAは、ハイブリダイゼーション反応において相補的DNA（cDNA）に変換される。mRNAからcDNAへの変換は、特定のmRNAの一部分に対して相補的である配列を含むオリゴヌクレオチドまたはプライマーを用いて行うことができる。mRNAからcDNAへの変換は、ランダム配列を含むオリゴヌクレオチドまたはプライマーを用いてもよい。mRNAからcDNAへの変換は、mRNAのポリ（A）テールに対して相補的である配列を含むオリゴヌクレオチドまたはプライマーを用いてもよい。cDNAは *in vivo* で存在せず、したがって非天然分子である。さらなる実施形態では、cDNAは次いで、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）または当業者に公知の他の増幅方法によって増幅される。PCRは、本明細書において提供される分類指標遺伝子、例えば表1の分類指標バイオマーカーの少なくとも一部分に対して相補的な配列を含むフォワードおよび／またはリバースプライマーを用いて行うことができる。この増幅反応の産物、すなわち、増幅されたcDNAは、必然的に非天然産物である。上述のように、cDNAは非天然分子である。第2に、PCRの場合、増幅プロセスは、出発物質の個々のcDNA分子すべてについて何億ものcDNAコピーを作出する役割を果たす。生成されるコピーの数は、 *in vivo* で存在するmRNAのコピーの数とはかけ離れている。

【0086】

一実施形態では、断片上にさらなるDNA配列（アダプター配列）を導入するプライマーを用いて（アダプター特異的プライマーを使用して）cDNAが増幅される。アダプター配列は、テール配列がcDNAに対して相補的でないテールであってよい。例えば、本明細書において提供される分類指標遺伝子、例えば表1の分類指標バイオマーカーの少なくとも一部分に対して相補的な配列を含むフォワードおよび／またはリバースプライマーは、テール配列を含み得る。したがって、増幅は、すでに非天然のcDNAにバーコード、アダプター、および／またはレポーター配列を導入することにより、非天然の一本鎖cDNAから非天然の二重鎖分子を作出する役割を果たす。一実施形態では、アダプター特異的プライマーを用いた増幅中、検出可能な標識、例えばフルオロフォアが一本鎖cDNA分子に付加される。したがって、増幅は、天然に生じないDNA複合体を作出する役割も果たし、それは少なくとも（i）cDNAは*in vivo*で存在しない、（ii）アダプター配列がcDNA分子の末端に付加されて、*in vivo*で存在しないDNA配列が作られる、（iii）増幅に関連した誤差率が、*in vivo*で存在しないDNA配列をさらに作出する、（iv）cDNA分子の構造は天然に存在するものと比較して異なる、そして（v）検出可能な標識がcDNA分子に化学的に付加されるからである。

10

【0087】

一実施形態では、合成されたcDNA（例えば、増幅されたcDNA）は、例えばマイクロアレイによるプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、固体表面上に固定化される。別の実施形態では、cDNA産物は、cDNA産物とハイブリダイズする蛍光プローブの導入により、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって検出される。例えば、一実施形態では、バイオマーカーの検出は、定量的蛍光発生RT-PCRにより（例えば、TaqMan（登録商標）プローブを用いて）査定される。PCR解析に関しては、解析に使用するプライマー配列の判定のための周知の方法が当技術分野で利用可能である。

20

【0088】

一実施形態において本明細書に提供されるバイオマーカーは、捕捉プローブおよび／またはレポータープローブを用いるハイブリダイゼーション反応により検出される。例えば、ハイブリダイゼーションプローブは、ビーズ、ガラス、またはシリコン基質などの固体表面に誘導体化されたプローブである。別の実施形態では、捕捉プローブは溶液中に存在し、患者の試料と混合され、その後、例えばビオチン-アビジン相互作用により（例えば、ビオチンが捕捉プローブの一部であり、アビジンが表面上にある場合）、表面にハイブリダイゼーション産物が結合する。ハイブリダイゼーションアッセイは、一実施形態では、捕捉プローブとレポータープローブとの両方を用いる。レポータープローブは、捕捉プローブまたはバイオマーカー核酸のいずれともハイブリダイズすることができる。例えばレポータープローブは、次いで、試料中のバイオマーカーのレベルを判定するために計数され、検出される。捕捉および／またはレポータープローブは、一実施形態では、検出可能な標識、および／または表面への官能基付与を可能にする基を含有する。

30

【0089】

例えば、nCounter遺伝子解析系（例えば、その全体があらゆる目的のために参照により組み込まれている、Geissら（2008年）、Nat. Biotechnol.、26巻、317～325頁を参照されたい）は、本明細書において提供される方法で使用するのに適している。

40

【0090】

開示内容の全体があらゆる目的のために参照により組み込まれている、米国特許第7,473,767号および同第8,492,094号に記載されているハイブリダイゼーションアッセイは、本明細書において提供される方法で使用するのに、すなわち、本明細書に記載されるバイオマーカーおよびバイオマーカーの組合せを検出するのに適している。

【0091】

バイオマーカーレベルは、膜プロット（例えば、ノーザン、サザン、ドットなどのハイ

50

ブリダイゼーション解析で使用されるもの)、またはマイクロウェル、試料管、ゲル、ビーズ、もしくは繊維(または結合した核酸を含む任意の固体支持体)を使用してモニタリングすることができる。例えば、それぞれそれらの全体が参照により組み込まれている、米国特許第5,770,722号、同第5,874,219号、同第5,744,305号、同第5,677,195号、および同第5,445,934号を参照されたい。

【0092】

一実施形態では、バイオマーカーレベルを検出するためにマイクロアレイが使用される。マイクロアレイは、異なる実験間で再現性があるため、この目的にとりわけ適している。DNAマイクロアレイは、多数の遺伝子の発現レベルの同時測定のための1つの方法を提供する。各アレイは、固体支持体に結合した再現可能なパターンの捕捉プローブからなる。標識されたRNAまたはDNAがアレイ上の相補的プローブとハイブリダイズされ、次いでレーザー走査により検出され、アレイ上の各プローブのハイブリダイゼーション強度が判定され、相対的な遺伝子発現レベルを表す定量的値に変換される。例えば、それぞれそれらの全体が参照により組み込まれている、米国特許第6,040,138号、同第5,800,992号、および同第6,020,135号、同第6,033,860号、および同第6,344,316号を参照されたい。試料中の多数のRNAの遺伝子発現プロファイルを判定するためには、高密度オリゴヌクレオチドアレイが特に有用である。

【0093】

機械的合成方法を使用してこれらのアレイを合成するための技術は、例えば、米国特許第5,384,261号に記載されている。平面的なアレイ表面が一般的に使用されるが、アレイは、事実上いかなる形状の表面またはさらには多重の表面上にも製作することができる。アレイは、ビーズ、ゲル、ポリマー表面、繊維(例えば光学繊維)、ガラス、または任意の他の適切な基質上の核酸(またはペプチド)であり得る。例えば、それぞれそれらの全体が参照により組み込まれている、米国特許第5,770,358号、同第5,789,162号、同第5,708,153号、同第6,040,193号、および同第5,800,992号を参照されたい。アレイは、包括的なデバイスの診断または他の操作を可能にするような様式でパッケージングされていてもよい。例えば、それぞれそれらの全体が参照により組み込まれている、米国特許第5,856,174号および同第5,922,591号を参照されたい。

【0094】

一実施形態では、本明細書に記載される方法において、遺伝子発現連続解析(SAGE)が用いられる。SAGEは、各転写物に対して個々のハイブリダイゼーションプローブを準備する必要なく、多数の遺伝子転写物を同時かつ定量的に解析することを可能にする方法である。まず、タグが各転写物中の一意的な位置から得られることを条件として、転写物を一意的に特定するのに十分な情報を含む短い配列タグ(約10~14bp)を生成する。次いで、多くの転写物をひとつにつなげて長い連続的な分子を形成し、この配列決定を行うことで、複数のタグの同一性を同時に明らかにすることができる。個々のタグの存在量を判定し、各タグに対応する遺伝子を特定することにより、転写物の任意の集団の発現パターンを定量的に評価することができる。その全体が参照により組み込まれている、Velculescuら、Science、270巻:484~87頁、1995年;Cell、88巻:243~51頁、1997年を参照されたい。

【0095】

核酸レベルにおけるバイオマーカーレベル解析のさらなる方法は、配列決定法、例えば、RNAseq、次世代配列決定、およびBrennerら(Nat. Biotech., 18巻:630~34頁、2000年、その全体は参照により組み込まれている)により記載されている超並列シグネチャー配列決定(MPSS)の使用である。これは、ゲルに基づかないシグネチャー配列決定を、5μm直径の別々のマイクロビーズ上での数百万の鋳型のin vitroクローニングと組み合わせた、配列決定手法である。まず、in vitroクローニングにより、DNA鋳型のマイクロビーズライブラリーを構築する。これには、高い密度における(典型的には 3.0×10^6 マイクロビーズ/cm²を超える)フローセ

ル内の鋳型含有マイクロビーズの平面的アレイのアセンブリが続く。DNA断片の分離を必要としない蛍光に基づくシグネチャー配列決定法を使用して、各マイクロビーズ上のクローニングした鋳型の遊離末端を同時に解析する。この方法は、酵母cDNAライブラリーから単回の作業において数十万の遺伝子シグネチャー配列を同時かつ正確に提供することが示されている。

【0096】

核酸レベルでのバイオマーカーレベル発現解析の別の方法は、例えば、RT-PCRまたは定量的RT-PCR（qRT-PCR）などの増幅方法の使用である。試料中のバイオマーカーmRNAのレベルを判定するための方法は、例えば、RT-PCR（Mullis、1987年、米国特許第4,683,202号に記載されている実験的实施形態）、リガーゼ連鎖反応（Barany（1991年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88巻：189～193頁）、自家持続配列複製法（Guatelliら（1990年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、87巻：1874～1878頁）、転写増幅系（Kwohら（1989年）、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、86巻：1173～1177頁）、Q-ベータレプリカーゼ（Lizardiら（1988年）、Bio/Technology、6巻：1197頁）、ローリングサークル複製（Lizardiら、米国特許第5,854,033号）、または任意の他の核酸増幅方法による核酸増幅のプロセスに続き、当業者に周知の技術を使用する増幅された分子の検出を含み得る。数多くの異なるPCRまたはqRT-PCRプロトコルは、当技術分野において公知であり、試料中の判別的遺伝子の発現の検出および／または数量化のために本明細書に記載される組成物を使用して直接適用するか、または使用のために適10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

【0097】

定量的RT-PCR（qRT-PCR）（リアルタイムRT-PCRとも呼ばれる）は、定量的測定のみならず時間および混入の低減をもたらすため、一部の状況下で好ましい。本明細書で使用される場合、「定量的PCR」（または「リアルタイムqRT-PCR」）とは、反応産物のサンプリングを繰り返す必要なしに、PCR増幅が起こっている際にその進行を直接的にモニタリングすることを指す。定量的PCRでは、シグナルがバックグラウンドレベルを超えて上昇した後、しかし反応がプラトーに達する前に反応産物が生成および追跡されるとき、シグナル伝達機構（例えば蛍光）によって反応産物をモニタリングすることができる。蛍光の検出可能なまたは「閾値」レベルを達成するために要求されるサイクル数は、PCRプロセスの開始時の増幅可能な標的の濃度に正比例して変化40
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480

野で周知である。

【0099】

一実施形態では、本明細書において提供されるバイオマーカー、例えば表1の分類指標バイオマーカー（またはそれらのサブセット、例えば10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、または70～80種のバイオマーカー）のレベルは、すべてのRNA転写物もしくはそれらの非天然cDNA発現産物、または試料中のタンパク質産物、またはRNA転写物の参照セットもしくはそれらの非天然cDNA発現産物の参照セット、または試料中のそれらのタンパク質産物の参照セットの発現レベルに対して正規化される。

【0100】

一実施形態では、肺扁平上皮癌サブタイプは、本明細書において提供される分類指標遺伝子、例えば表1に列挙される分類指標バイオマーカーのうちの1つまたは複数のタンパク質発現レベルを使用して評価することができる。タンパク質発現レベルは、免疫学的検出法を使用して測定してもよい。本明細書において使用され得る免疫学的検出法としては、例えばウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技術を使用した競合および非競合アッセイ系が挙げられるが、これらに限定されない。このようなアッセイは当技術分野では日常のかつ周知である（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、Ausubelら編、1994年、Current Protocols in Molecular Biology、I巻、John Wiley & Sons, Inc.、New Yorkを参照されたい）。

【0101】

一実施形態では、身体試料中のバイオマーカータンパク質の発現を検出するために、バイオマーカータンパク質に特異的な抗体が利用される。本方法は、患者または対象から身体試料を得るステップと、身体試料を肺がん細胞内で選択的に発現されるバイオマーカーに対する少なくとも1種の抗体と接触させるステップと、抗体の結合を検出して、患者試料中でバイオマーカーが発現されているかどうかを判定するステップとを含む。本発明の好ましい態様は、肺がんサブタイプを診断するための免疫細胞化学技術を提供する。本明細書以下に記載される免疫細胞化学法が、手作業で行われてもよいし、または自動化された様式で行われてもよいことは、当業者には認識されよう。

【0102】

随所に提示されるように、本明細書に記載の方法は、患者の肺がんSQサブタイプを判定するための方法を提供する。バイオマーカーレベルが、例えば非天然cDNAバイオマーカーレベルまたは非天然mRNA-cDNAバイオマーカー複合体を測定することによって判定されたら、このバイオマーカーレベルが、例えば統計学的方法の使用または検出されたレベルの直接的な比較によって参照値または参照試料と比較されて、肺がんの分子的SQサブタイプの判定が行われる。この比較に基づいて、患者の肺がん試料が、例えば基底、古典的、未分化または分泌性にSQ分類される。

【0103】

一実施形態では、本明細書において提供される少なくとも1種の分類指標バイオマーカー、例えば表1の分類指標バイオマーカーの発現レベル値が、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットからの参照発現レベル値と比較され、ここで、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットは、参照試料からの発現レベル値を含む。さらなる実施形態では、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットは、基底試料、古典的試料、未分化試料または分泌性試料、またはそれらの組合せからの、本明細書において提供される少なくとも1種の分類指標バイオマーカー、例えば表1の分類指標バイオマーカーの発現レベル値を含む。

【0104】

別個の実施形態では、本明細書において提供される少なくとも1種の分類指標バイオマ

10

20

30

40

50

ーカー、例えば表1の分類指標バイオマーカーのハイブリダイゼーション値が、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットからの参照ハイブリダイゼーション値と比較され、ここで、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットは、参照試料からのハイブリダイゼーション値を含む。さらなる実施形態では、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットは、近位基底試料、古典的試料、未分化試料または分泌性試料、またはそれらの組合せからの、本明細書において提供される少なくとも1種の分類指標バイオマーカー、例えば表1の分類指標バイオマーカーのハイブリダイゼーション値を含む。バイオマーカーの検出されたレベルを参照値および／または参照試料と比較するための方法は、本明細書において提供される。この比較に基づいて、一実施形態では、対象の試料から得られたバイオマーカーレベルと参照値との間の相関が得られる。次いで、肺がんS Qサブタイプの査定が行われる。

10

【0105】

患者から得られたバイオマーカーレベルと、例えば、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットからの参照バイオマーカーレベルとの比較を支援するためには、種々の統計学的方法を使用することができる。

【0106】

一実施形態では、教師ありパターン認識法が用いられる。教師ありパターン認識法の例としては、最近隣重心法 (Dabney (2005年)、Bioinformatics、21巻 (22号) : 4148~4154頁およびTibshiraniら (2002年)、Proc. Natl. Acad. Sci.

USA、99巻 (10号) : 6576~6572頁) ; クラス解析のソフト独立モデリング (SIMCA) (例えば、Wold、1976年を参照されたい) ; 部分最小二乗法解析 (PLS) (例えば、Wold、1966年 ; Joreskog、1982年 ; Frank、1984年 ; Bro, R.、1997年を参照されたい) ; 線形判別分析 (LDA) (例えば、Nillson、1965年を参照されたい) ; K最近傍解析 (KNN) (例えば、Brownら、1996年を参照されたい) ; 人工ニューラルネットワーク (ANN) (例えば、Wasserman、1989年 ; Ankerら、1992年 ; Hare、1994年を参照されたい) ; 確率ニューラルネットワーク (PNN) (例えば、Parzen、1962年 ; Bishop、1995年 ; Speckt、1990年 ; Broomheadら、1988年 ; Patterson、1996年を参照されたい) ; 規則帰納 (RI) (例えば、Quinlan、1986年を参照されたい) ; およびベイズ法 (例えば、Brethorst、1990年 a、1990年 b、1988年を参照されたい) を挙げることができ、これらに限定されない。一実施形態では、遺伝子発現データに基づいて腫瘍サブタイプを特定するための分類指標は、Mullinsら (2007年)、Clin Chem.、53巻 (7号) : 1273~9頁に記載されている重心ベースの方法であり、これらは各々、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。

20

30

【0107】

他の実施形態では、教師なしトレーニング手法が用いられ、したがってトレーニングセットは使用されない。

【0108】

教師あり学習手法のサンプルトレーニングセットに再度言及すると、一部の実施形態では、サンプルトレーニングセットは、扁平上皮癌試料由来の分類指標バイオマーカーのうちの複数またはすべて (例えば、表1の分類指標バイオマーカーのすべて) の発現データを含み得る。複数の分類指標バイオマーカーは、表1のうち少なくとも2種の分類指標バイオマーカー、少なくとも10種の分類指標バイオマーカー、少なくとも20種の分類指標バイオマーカー、少なくとも30種の分類指標バイオマーカー、少なくとも40種の分類指標バイオマーカー、少なくとも50種の分類指標バイオマーカー、少なくとも60種の分類指標バイオマーカー、または少なくとも70種の分類指標バイオマーカーを含み得る。一部の実施形態では、サンプルトレーニングセットは、サンプル間のばらつきを除去するために正規化される。

40

【0109】

一部の実施形態では、比較することは、例えば、パラメトリックでもノンパラメトリッ

50

クでもよい任意の好適な多変量統計解析モデルなどの統計的アルゴリズムを適用することを含み得る。一部の実施形態では、統計的アルゴリズムを適用することは、ヒト肺組織試料から得られた発現データと、扁平上皮癌トレーニングセットからの発現データとの間の相関を判定することを含み得る。一部の実施形態では、（例えば）一個抜き交差検証（LOOCV）などの交差検証が行われる。一部の実施形態では、統合相関（integrative correlation）が行われる。一部の実施形態では、スピアマン相関が行われる。一部の実施形態では、その全体が参照により本明細書に組み込まれているMullinsら（2007年）、Clin Chem.、53巻（7号）：1273～9頁に記載されている統計的アルゴリズムに関し、および遺伝子発現データに基づいて、重心に基づく方法が用いられる。

10

【0110】

対象由来の試料（試験試料）に対して行われた遺伝子発現の結果は、正常であることが既知であるかまたは正常であると思われる生物学的試料または生物学的試料に由来するデータ（「参照試料」または「正常試料」、例えば非扁平上皮癌試料）と比較され得る。一部の実施形態では、参照試料または参照遺伝子発現データは、扁平上皮癌の特定の分子サブタイプ、すなわち、基底、古典的、分泌性または未分化を有することが既知である個体から得られるか、またはそれに由来する。

【0111】

参照試料は、試験試料と同時にまたはそれと異なる時点でアッセイしてもよい。代替的には、参照試料からのバイオマーカーレベル情報は、データベースまたは後日アクセスするための他の手段に記憶してもよい。

20

【0112】

試験試料に対するアッセイのバイオマーカーレベル結果は、参照試料に対する同じアッセイの結果と比較され得る。一部の 경우에는、参照試料に対するアッセイの結果は、データベースまたは参照値から得られる。一部の 경우에는、参照試料に対するアッセイの結果は、既知の、または当業者に一般的に許容される値または値の範囲である。一部の 경우에는、比較は定性的である。他の 경우에는、比較は定量的である。一部の 경우에는、定性的または定量的比較は、蛍光値、スポット強度、吸光度値、化学発光シグナル、ヒストグラム、臨界閾値、統計的有意値、本明細書に記載される遺伝子の発現レベル、mRNAコピー数のうちの1つまたは複数を比較することを含み得るが、これらに限定されない。

30

【0113】

一実施形態では、各バイオマーカーレベルパネル測定に関し、オッズ比（OR）が算出される。ここでORとは、患者のバイオマーカー測定値と、アウトカム、例えば肺扁平上皮癌サブタイプとの間の関連性の尺度である。例えば、その全体があらゆる目的のために参照により組み込まれている、J. Can. Acad. Child Adolesc. Psychiatry、2010年；19巻（3号）：227～229頁を参照されたい。

【0114】

一実施形態では、肺がんサブタイプに関する信頼レベルを提供するために、規定の統計的信頼レベルが判定され得る。例えば、90%超の信頼レベルが肺がんサブタイプの有用な予測因子であり得ると判定される場合がある。他の実施形態では、多かれ少なかれストリンジェントな信頼レベルが選択されてもよい。例えば、約または少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%、99.5%、または99.9%の信頼レベルが選択され得る。提供される信頼レベルは、一部の 경우에는、試料の質、データの質、解析の質、使用される具体的な方法、および／または解析される遺伝子発現値の数（すなわち遺伝子の数）に関係することがある。応答の尤度を提供するための規定の信頼レベルは、予想される偽陽性数または偽陰性数に基づいて選択され得る。規定の信頼レベルを達成するためまたは診断能力のあるマーカーを特定するためのパラメータを選択するための方法としては、受信者動作特性（ROC）曲線解析、従法線ROC、主成分解析、オッズ比解析、部分最小二乗法解析、特異値分解、最小絶対収縮および選択演算子解析、最小角回帰、ならびに閾値勾配正則化法が挙げられるが、

40

50

これらに限定されない。

【0115】

一部の場合では、肺扁平上皮癌サブタイプを判定することは、遺伝子発現データを正規化するためおよび／またはその信頼度を改善するためにデザインされたアルゴリズムの適用によって改善することができる。本発明の一部の実施形態では、データ解析において多数の個々のデータ点が処理されるため、本明細書に記載される種々のアルゴリズムを適用するためにコンピュータまたは他のデバイス、機械もしくは装置が利用される。「機械学習アルゴリズム」とは、例えば肺扁平上皮癌サブタイプを判定するために遺伝子発現プロファイル（単数または複数）を特徴付けるために用いられる、当業者には「分類指標」としても公知である計算ベースの予測方法論を指す。例えばマイクロアレイベースのハイブリダイゼーションアッセイ、配列決定アッセイ（例えば、RNAseq）、NanoStringアッセイ、定量的増幅アッセイなどにより判定されるバイオマーカーレベルは、一実施形態では、プロファイルを分類するためにアルゴリズムにかけられる。教師あり学習は、概して、基底陽性、古典的陽性、分泌性陽性、または未分化陽性などのサブタイプ間の差別を認識するよう分類指標を「トレーニング」することと、次いで独立した試験セットで分類指標の正確度を「試験」することを含む。したがって、新しい未知の試料についてこの分類指標を使用して、例えば、試料が属するクラス（例えば、基底対古典的対分泌性対マグノイド）を予測することができる。

【0116】

一部の実施形態では、ロバストマルチアレイ平均（RMA）法を使用して、生データを正規化してもよい。RMA法は、いくつかのマイクロアレイ上の各マッチセルに関してバックグラウンド補正後の強度を計算することから始まる。一実施形態では、その全体があらゆる目的のために参照により組み込まれているIrizarryら（2003年）、Biostatistics、4月、4巻（2号）：249～64頁によって記載されているように、バックグラウンド補正後の値は正值に制限される。バックグラウンド補正後、次いで、各々のバックグラウンド補正後のマッチセル強度の2を底とする対数が得られる。次いで、各マイクロアレイ上の、バックグラウンド補正後、対数変換後のマッチした強度が、分位正規化法を使用して正規化される。分位正規化法では、各入力アレイおよび各プローブ値についてアレイパーセンタイルプローブ値がすべてのアレイパーセンタイル点の平均に置き換えられる。この方法は、その全体が参照により組み込まれている、Bolstadら、Bioinformatics、2003年によって、より全面的に記載されている。分位正規化後、正規化されたデータを次いで線形モデルに当てはめ、各マイクロアレイ上の各プローブに関する強度基準を得ることができる。次いで、Tukeyの中央値洗練アルゴリズム（Tukey, J. W., Exploratory Data Analysis、1977年、その全体はあらゆる目的のために参照により組み込まれている）を使用して、正規化されたプローブセットデータに関する対数スケールの強度レベルを判定してもよい。

【0117】

種々の他のソフトウェアプログラムを実施してもよい。ある特定の方法において、特徴選択およびモデル推定は、glmnetを使用してlassoペナルティを用いるロジスティック回帰により行うことができる（Friedmanら（2010年）、Journal of statistical software、33巻（1号）：1～22頁、その全体は参照により組み込まれている）。生のリードは、TopHatを使用してアラインすることができる（Trapnellら（2009年）、Bioinformatics、25巻（9号）：1105～11頁、その全体は参照により組み込まれている）。諸方法において、e1071ライブラリー（Meyer D., Support vector machines: the interface to libsvm in package e1071、2014年、その全体は参照により組み込まれている）を使用して、線形サポートベクターマシン（SVM）（Suykens JAK, Vandewalle J., Least Squares Support Vector Machine Classifiers, Neural Processing Letters、1999年；9巻（3号）：293～300頁、その全体は参照により組み込まれている）をトレーニングするために、トップフィーチャ（10～200の範囲のN）が使用される。信頼区間は、一実施形態では、p

R O C パッケージ (Robin X、Turck N、Hainard Aら、pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves、BMC bioinformatics、2011年；12巻：77頁、その全体は参照により組み込まれている) を使用して計算される。

【0118】

加えて、疑わしいとみなされ得るデータを除去するためにデータをフィルタリングしてもよい。一実施形態では、約4、5、6、7、または8より少ないグアノシン+シトシンヌクレオチドを有するマイクロアレイプローブに由来するデータは、それらの異常なハイブリダイゼーション傾向または二次構造の問題に起因して信頼できないとみなされる場合がある。同様に、約12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、または22より多くのグアノシン+シトシンヌクレオチドを有するマイクロアレイプローブに由来するデータは、一実施形態では、それらの異常なハイブリダイゼーション傾向または二次構造の問題に起因して信頼できないとみなされる場合がある。

【0119】

本発明の一部の実施形態では、プローブセットからのデータは、それらが検出可能なレベル (バックグラウンドを超える) で特定されない場合は解析から除外される場合がある。

【0120】

本開示の一部の実施形態では、分散を呈さない、または低分散を呈するプローブセットは、さらなる解析から除外される場合がある。低分散プローブセットは、カイ二乗検定によって解析から除外される。一実施形態では、プローブセットは、その変換後の分散が自由度 ($N-1$) のカイ二乗分布の99パーセント信頼区間の左側にある場合、低分散であるとみなされる。 ($N-1$) * プローブセット分散 / (遺伝子プローブセット分散)。 $Chi-Sq(N-1)$ について、式中、 N は、入力CELファイルの数であり、 ($N-1$) は、カイ二乗分布の自由度であり、「遺伝子のプローブセット分散」は、遺伝子全部のプローブセット分散の平均である。本発明の一部の実施形態では、所与のmRNAまたはmRNA群のプローブセットに含まれる、GC含量、信頼度、分散などに関してこれまでに記載されているフィルタステップを通過するプローブの数が最小数に満たない場合、これらはさらなる解析から除外され得る。例えば、一部の実施形態では、所与の遺伝子または転写物クラスターのプローブセットは、それらが約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個未満、または約20個未満のプローブを含む場合、さらなる解析から除外されてよい。

【0121】

バイオマーカーレベルのデータ解析方法は、一実施形態では、本明細書において提供される特徴選択アルゴリズムの使用をさらに含む。本発明の一部の実施形態では、特徴選択は、LIMMAソフトウェアパッケージ (Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor、R. Gentleman、V. Carey、S. Dudoit、R. Irizarry、W. Huber (編)、Springer、New York、397~420頁のSmyth、G. K. (2005年) Limma: linear models for microarray data、その全体はあらゆる目的のために参照により組み込まれている) の使用によって行われる。

【0122】

バイオマーカーレベルのデータ解析方法は、一実施形態では、予備分類 (pre-classifier) アルゴリズムの使用を含む。例えば、アルゴリズムは、特異的な分子指紋を使用して、試料の組成に従って試料を予備分類し、次いで補正/正規化係数を適用することができる。次いで、このデータ/情報を最終分類アルゴリズムに供給することができ、最終分類アルゴリズムは、最終診断を支援するためにこの情報を組み込む。

【0123】

バイオマーカーレベルのデータ解析方法は、一実施形態では、本明細書において提供される分類指標アルゴリズムの使用をさらに含む。本発明の一実施形態では、マイクロアレイデータの分類のために、対角線形判別解析 (diagonal linear dis

c r i m i n a n t a n a l y s i s)、k最近傍アルゴリズム、サポートベクターマシン (SVM) アルゴリズム、線形サポートベクターマシン、ランダムフォレストアルゴリズム、もしくは確率モデルに基づく方法、またはそれらの組合せが用いられる。一部の実施形態では、試料 (例えば、バイオマーカーレベルプロファイルが異なるもの、および/または扁平上皮癌の分子サブタイプ (例えば、基底、古典的、分泌性、未分化) が異なるもの) を弁別する特定されたマーカーは、目的のクラス間のバイオマーカーレベルの差の統計的有意性に基づいて選択される。一部の場合では、統計的有意性は、Benjamin Hochberg 法または別の偽発見率 (FDR) 補正法を適用することにより調整される。

【0124】

10

一部の場合では、分類指標アルゴリズムは、その全体があらゆる目的のために参照により組み込まれている、FishelおよびKaufmanら、2007年、Bioinformatics、23巻 (13号) : 1599~606頁に記載されているものなどのメタ解析手法で補完されてもよい。一部の場合では、分類指標アルゴリズムは、反復性解析などのメタ解析手法で補完されてもよい。

【0125】

事後確率を求めこれをバイオマーカーレベルのデータ解析に適用するための方法は、当技術分野で公知であり、例えば、その全体があらゆる目的のために参照により組み込まれている、Smyth, G. K.、2004年、Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.、3巻 : 論文3に記載されている。一部の場合では、事後確率は、分類指標アルゴリズムによりもたらされるマーカーのランク付けのために本発明の方法において使用される場合がある。

20

【0126】

バイオマーカーレベルプロファイリング結果の統計的評価は、扁平上皮癌の分子サブタイプ (基底、古典的、分泌性、未分化) ; 特定の治療介入、例えば血管新生阻害剤療法、化学療法、または免疫療法の成功の尤度のうちの1つまたは複数を示す定量的値 (単数または複数) を提供し得る。一実施形態では、このデータは、患者ケアの指針とするために最も有用な形態で医師に直接提示されるか、または臨床治験における患者集団もしくは所与の医薬のための患者集団を定義するために使用される。分子プロファイリングの結果は、スチューデントT検定、両側T検定、ピアソン順位和解析、隠れマルコフモデル解析、q-qプロットの解析、主成分解析、一元配置分散分析、二元配置分散分析、LIMMAなどを含むがこれらに限定されない、当技術分野に公知のいくつかの方法を使用して統計的に評価することができる。

30

【0127】

一部の場合では、正確度は、元の診断の正確度を判定するために経時的に対象を追跡することによって判定され得る。他の場合では、正確度は、決定論的に確立されてもよく、または統計学的方法を使用して確立されてもよい。例えば、特定レベルの正確度、特異度、陽性予測値、陰性予測値、および/または偽発見率を達成するために最適なアッセイパラメータを判定するために、受信者動作特性 (ROC) 解析が使用され得る。

【0128】

一部の場合では、バイオマーカーレベルプロファイリングアッセイの結果は、分子プロファイリング事業、個人、医療提供者、または保険提供者の代表または代理人がアクセスできるようデータベースに入力される。一部の場合では、アッセイ結果は、医療従事者などの事業の代表、代理人、またはコンサルタントによる試料分類、特定、または診断を含む。他の場合では、コンピュータまたはアルゴリズムによるデータ解析が自動的に提供される。一部の場合では、分子プロファイリング事業は、行った分子プロファイリングアッセイ、コンサルティングサービス、データ解析、結果報告、またはデータベースアクセスのうちの1つまたは複数について、個人、保険提供者、医療提供者、研究者、または政府機関に対価請求する場合がある。

40

【0129】

本発明の一部の実施形態では、バイオマーカーレベルプロファイリングアッセイの結果

50

は、コンピュータスクリーンでのレポートとして提示されるか、または紙による記録として提示される。一部の実施形態では、レポートには、これらに限定されないが、参照試料または参照値と比較した（例えば、コピー数または蛍光強度などによって報告される）バイオマーカーのレベル；バイオマーカーレベル値および肺扁平上皮癌サブタイプならびに提案される療法に基づいて対象が特定の療法にตอบสนองする尤度のうちの1つまたは複数のような情報が含まれ得る。

【0130】

一実施形態では、遺伝子発現プロファイリングの結果は、基底陽性、古典的陽性、分泌性陽性、未分化陽性、基底陰性、古典的陰性、分泌性陰性、未分化陰性；血管新生阻害剤、免疫療法、もしくは化学療法にตอบสนองする可能性が高い；血管新生阻害剤、免疫療法、もしくは化学療法にตอบสนองする可能性が低い；またはそれらの組合せのうちの1つまたは複数に分類され得る。

【0131】

本発明の一部の実施形態では、トレーニングされたアルゴリズムを使用して結果が分類される。本発明のトレーニングされたアルゴリズムには、遺伝子発現値が既知の参照セット、および／または正常試料、例えば、扁平上皮癌の特定の分子サブタイプと診断された個体からの試料を使用して開発されたアルゴリズムが含まれる。一部の 경우에는、遺伝子発現値が既知の参照セットは、扁平上皮癌の特定の分子サブタイプと診断されたことがあり、かつ血管新生阻害剤療法にตอบสนองすること（またはตอบสนองしないこと）が既知の個体から得られる。一部の 경우에는、遺伝子発現値が既知の参照セットは、扁平上皮癌の特定の分子サブタイプと診断されたことがあり、かつ免疫療法にตอบสนองすること（またはตอบสนองしないこと）が既知の個体から得られる。一部の 경우에는、遺伝子発現値が既知の参照セットは、扁平上皮癌の特定の分子サブタイプと診断されたことがあり、かつ化学療法にตอบสนองすること（またはตอบสนองしないこと）が既知の個体から得られる。

【0132】

試料のカテゴリー化に好適なアルゴリズムとしては、k最近傍アルゴリズム、サポートベクターマシン、線形判別解析、対角線形判別解析、上下調整、単純ベイズアルゴリズム、ニューラルネットワークアルゴリズム、隠れマルコフモデルアルゴリズム、遺伝子アルゴリズム、またはそれらの任意の組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0133】

二項分類指標を実際の真値（例えば、生物学的試料由来の値）と比較すると、典型的には、可能性のあるアウトカムは4種ある。予測からのアウトカムがpであり（ここで「p」は欠失または重複症候群の存在などの陽性の分類指標出力である）、実際値もまたpである場合、これは真陽性（TP）と呼ばれる；しかしながら、実際値がnである場合、これは偽陽性（FP）と言われる。逆に、予測アウトカムおよび実際値の両方がnである（ここで「n」は欠失または重複症候群の不在などの陰性の分類指標出力である）場合に真陰性が生じ、偽陰性は、予測アウトカムはnであるが実際値がpであるときである。一実施形態では、ある人物が血管新生阻害剤療法にตอบสนองする可能性が高いかまたは低いかを判定しようとする検定を考慮されたい。この場合の偽陽性は、この人物が試験で陽性を示すが実際にはตอบสนองするときに生じる。一方で偽陰性は、この人物が試験で陰性を示し、ตอบสนองする可能性が低いことが示唆されるものの、実際にはตอบสนองする可能性が高いときに生じる。肺がんサブタイプを分類する際にも同じことが言える。

【0134】

陽性予測値（PPV）、または精度率、または疾患の検査後確率とは、陽性試験結果を有する対象で、ตอบสนองする可能性が高いもしくは低いと正しく診断されたもの、または正しい肺がんサブタイプを診断されたもの、またはそれらの組合せの割合である。これは、試験されている基礎状態を陽性試験が反映する確率を反映する。しかしながら、その値は、様々であり得る疾患の有病率に依存する。一例では、次の特徴が提供される：FP（偽陽性）；TN（真陰性）；TP（真陽性）；FN（偽陰性）。偽陽性率（ α ）= $FP / (FP + TN)$ - 特異度；偽陰性率（ β ）= $FN / (TP + FN)$ - 感度；検出力（Power）

r) = 感度 = $1 - \beta$; 正の尤度比 = 感度 / ($1 -$ 特異度) ; 負の尤度比 = ($1 -$ 感度) / 特異度。陰性予測値 (NPV) は、正しく診断されている陰性試験結果を有する対象の割合である。

【0135】

一部の実施形態では、本方法によるバイオマーカーレベル解析の結果は、所与の診断が正しい統計的信頼レベルを提供する。一部の実施形態では、そのような統計的信頼レベルは、少なくとも約 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 % もしくはそれを超える値であるか、または約 85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 % もしくはそれを超える値よりも高い。

10

【0136】

一部の実施形態では、この方法は、試料中のバイオマーカーレベルと、例えば少なくとも 1 種のトレーニングセットに存在する参照バイオマーカーレベルとの比較に基づいて、肺組織試料を特定の肺がんサブタイプに分類するステップをさらに含む。一部の実施形態では、比較の結果が、例えば、最小一致パーセント、(例えば) カップ統計量などの一致百分率に基づいて算出された統計量の値、最小の相関 (例えばピアソンの相関)、および/または同様のものなどの 1 つまたは複数の基準を満たす場合、肺組織試料が特定のサブタイプに分類される。

【0137】

本明細書に記載される方法は、ソフトウェア (メモリに記憶されたものおよび/もしくはハードウェアで実行されるもの)、ハードウェア、またはそれらの組合せによって行われ得ることが意図される。ハードウェアモジュールは、例えば、汎用プロセッサ、フィールドプログラマブルゲートアレイ (FPGA)、および/または特定用途向け集積回路 (ASIC) を含む得る。ソフトウェアモジュール (ハードウェアで実行されるもの) は、Unix (登録商標) ユーティリティ、C、C++、Java (登録商標)、Ruby、SQL、SAS (登録商標)、R プログラミング言語/ソフトウェア環境、Visual Basic (商標)、および他のオブジェクト指向言語、プロシージャ言語、または他のプログラミング言語を含む様々なソフトウェア言語 (例えばコンピュータコード) ならびに開発ツールにおいて表現され得る。コンピュータコードの例としては、マイクロコードまたはマイクロ命令、機械命令、例えばコンパイラにより生成されるもの、ウェブサービスを作成するために使用されるコード、およびインタープリターを使用してコンピュータにより実行される高レベル命令を含むファイルが挙げられるが、これらに限定されない。コンピュータコードのさらなる例としては、制御信号、暗号化コード、および圧縮コードが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

【0138】

本明細書に記載される一部の実施形態は、コンピュータにより実施される種々の操作および/または本明細書に開示される方法を行うための命令またはコンピュータコードを有する非一時的コンピュータ可読媒体 (非一時的プロセッサ可読媒体またはメモリと呼ばれる場合もある) を備えたデバイスに関する。コンピュータ可読媒体 (またはプロセッサ可読媒体) は、それ自体が一時的伝搬信号 (例えば、空間またはケーブルなどの伝送媒体で情報を伝える伝搬電磁波) を含まないという意味で非一時的である。この媒体およびコンピュータコード (コードと呼ばれる場合もある) は、特定の目的 (単数または複数) のためにデザインされ構築されたものであってもよい。非一時的コンピュータ可読媒体の例としては、ハードディスク、フロッピー (登録商標) ディスク、および磁気テープなどの磁気記憶媒体; コンパクトディスク/デジタルビデオディスク (CD/DVD)、コンパクトディスク読み取り専用メモリ (CD-ROM)、およびホログラフィックデバイスなどの光学式記憶媒体; 光ディスクなどの磁気光学式記憶媒体; 搬送波信号処理モジュール; ならびにプログラムコードを記憶し実行するように特別に構成されたハードウェアデバイス、例えば特定用途向け集積回路 (ASIC)、プログラマブルロジックデバイス (PLD)、読み取り専用メモリ (ROM)、およびランダムアクセスメモリ (RAM) デバイ

40

50

スが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載される他の実施形態は、例えば、本明細書で論じられる命令および／またはコンピュータコードを含み得るコンピュータプログラム製品に関する。

【0139】

一部の実施形態では、単一のバイオマーカー、または約10～約20、約20～約30、約20～約40、約40～約50、約40～約60、約60～約70、約60～約80、約20～約60、約20～約80、約40～約80種のバイオマーカー（例えば、表1に開示されるもの）が、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、最大100%、およびこの間のすべての値の予測成功率で、肺扁平上皮癌のサブタイプを分類することができる。一部の実施形態では、本明細書（例えば、表1）に開示されるバイオマーカーの任意の組合せを使用して、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、最大100%、およびこの間のすべての値の予測成功率を得ることができる。

10

【0140】

一部の実施形態では、単一のバイオマーカー、または約10～約20、約20～約30、約20～約40、約40～約50、約40～約60、約60～約70、約60～約80、約20～約60、約20～約80、約40～約80種のバイオマーカー（例えば、表1に開示されるもの）が、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、最大100%、およびこの間のすべての値の感度または特異度で、肺扁平上皮癌サブタイプを分類することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるバイオマーカーの任意の組合せを使用して、少なくとも約70%、少なくとも約71%、少なくとも約72%、約73%、約74%、約75%、約76%、約77%、約78%、約79%、約80%、約81%、約82%、約83%、約84%、約85%、約86%、約87%、約88%、約89%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、最大100%、およびこの間のすべての値の感度または特異度を得ることができる。

20

30

【0141】

分類指標遺伝子の選択

一実施形態では、本明細書において提供される方法および組成物は、患者由来の試料（例えば、肺組織試料または肺SQ試料）中の一組のバイオマーカーの発現を解析するのに有用であり、一組のバイオマーカーは、肺SQサブタイプを分子的に分類するための当技術分野で公知の方法よりも少ない数のバイオマーカーを含む。一部の 경우에는、一組のバイオマーカーは、250、240、230、220、210、200、150、100、95、または90個未満のバイオマーカーである。一部の 경우에는、一組のバイオマーカーは、表1に列挙される80種一組のバイオマーカーである。一部の 경우에는、一組のバイオマーカーは、表1に列挙されるバイオマーカーのサブセットである。本明細書において提供される方法および組成物において有用なバイオマーカーまたは分類指標遺伝子は、1つまたは複数のデータベースからの1つまたは複数の肺扁平上皮癌データセットから選択してよい。データベースは、公開データベースであってもよい。一実施形態では、肺扁平上皮癌サブタイプを検出または診断するための本明細書において提供される方法および組成物において有用な分類指標遺伝子（例えば、表1および表2に列挙される1つまたは

40

50

複数の遺伝子)は、The Cancer Genome Atlas (TCGA)の肺扁平上皮癌RNAseqデータセットから選択された。一実施形態では、本明細書において提供される方法および組成物に有用な分類指標遺伝子、例えば表1のものは、対象から得られた試料のSQサブタイプを判定するために発現プロファイルが使用され得る遺伝子の最小数を判定するために、分類指標遺伝子の大きなセットをin silicoベースのプロセスにかけることによって選択される。一部の場合では、分類指標遺伝子の大きなセットは、例えば、TCGAなどからの肺SQ RNAseqデータセットであり得る。一部の場合では、分類指標遺伝子の大きなセットは、Wilkersonら(Clin Cancer Res、2010年;16巻(19号):4864~4875頁)において開示される208遺伝子分類指標であってもよく、この208遺伝子分類指標は、至適基準サブタイプを定義する役割を果たし得る。患者由来の試料の肺SQサブタイプを判定するための本明細書において提供される遺伝子カセットを選択するためのin silicoプロセスは、各サブタイプに対して負の相関を示す遺伝子および正の相関を示す遺伝子を同数選択するように改変された最近隣重心へのアレイ分類(CLANC)アルゴリズムを標準的な208分類指標遺伝子に適用または使用することを含み得る。シグネチャーに含める遺伝子の最適な数(例えば、表1に示されるようにサブタイプ当たり20個)の判定に関し、このプロセスは、本明細書において提供されるTCGA肺扁平上皮癌データセットを使用した5分割交差検証を行って、図9に示されるような交差検証曲線を作成することをさらに含み得る。遺伝子分類指標の最終的なリストを得るために、この方法は、至適基準サブタイプ予測強度が最も低い試料の20%を全体から差し引いたTCGAデータセットに、最近隣重心へのアレイ分類(CLANC)を適用するステップと、各サブタイプから同数を除去するステップとをさらに含み得る。

10

20

【0142】

一実施形態では、この方法は、遺伝子分類指標を検証するステップをさらに含む。検証は、いくつかの新鮮冷凍された公的に利用可能なアレイおよびRNAseqデータセットにおいて分類指標の発現を試験し、前記発現レベルに基づいてサブタイプをコールし、その後この発現を、Wilkersonら(Clin Cancer Res 2010;16(19):4864-4875)に開示される過去に公開されている208遺伝子シグネチャーにより定義される至適基準サブタイプコールと比較することを含み得る。次いで、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)扁平上皮癌試料のアーカイブから新たに収集されたRNAseqデータセットにおいて遺伝子シグネチャー(例えば表1)の最終検証を行って、FFPE試料における同等の性能を確かめることができる。一実施形態では、表1の分類指標バイオマーカーは、本明細書に記載されるin silicoのCLANCプロセスに基づいて選択された。遺伝子略号および公式遺伝子名をそれぞれ縦列2および縦列3に列挙する。

30

【0143】

一実施形態では、本発明の方法は、基底、古典的、分泌性、または未分化の肺扁平上皮癌サブタイプを特定するために、患者から得られた肺がん細胞試料(例えば、肺SQがん試料)における、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、または80種の分類指標バイオマーカーの検出を必要とする。本明細書において提供される他の分類指標遺伝子発現データセットについても同じことが当てはまる。

40

【0144】

別の実施形態では、本発明の方法は、基底、古典的、分泌性、または未分化肺扁平上皮癌サブタイプを特定するために、患者から得られた肺がん細胞試料(例えば、肺SQがん試料)における、表1の80種の遺伝子バイオマーカーのうち合計で少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも5種、少なくとも10種、少なくとも20種、少なくとも40

50

種、少なくとも60種、または最大80種の分類指標バイオマーカーの検出を必要とする。本明細書において提供される他の分類指標遺伝子発現データセットについても同じことが当てはまる。

【0145】

一実施形態では、表1のうちの少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、または最大10種のバイオマーカーが、肺扁平上皮癌の特定のサブタイプにおいて「上方制御」される。別の実施形態では、表1のうちの少なくとも1種、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、または最大10種のバイオマーカーが、肺扁平上皮癌の特定のサブタイプにおいて「下方制御」される。本明細書において提供される他の分類指標遺伝子発現データセットについても同じことが当てはまる。

10

【0146】

一実施形態では、本明細書において提供される「上方制御される」バイオマーカーの発現レベルは、約0.5倍、約1倍、約1.5倍、約2倍、約2.5倍、約3倍、約3.5倍、約4倍、約4.5倍、約5倍、およびこの間の任意の値だけ上昇する。別の実施形態では、本明細書において提供される「下方制御される」バイオマーカーの発現レベルは、約0.8倍、約1.4倍、約2倍、約2.6倍、約3.2倍、約3.6倍、約4倍、およびこの間の任意の値だけ低下する。

【0147】

本発明の実践においては、さらなる遺伝子またはタンパク質が使用され得ることが認識されている。概して、肺扁平上皮癌のサブタイプを分類する際に有用な遺伝子は、正常と腫瘍、または異なるクラスもしくはグレードの肺がんの間の弁別を独立して行うことができるものを含む。遺伝子は、受信者動作特性(ROC)曲線下面積がおよそ1である場合、サブタイプ間の弁別を高信頼性で行うことができるとみなされる。

20

【0148】

臨床的／治療的使用

一実施形態では、がんを患う患者の疾患アウトカムまたは予後を判定するための方法が本明細書において提供される。一部の場合では、がんは肺がんである。疾患アウトカムまたは予後は、一定期間または間隔(例えば、0~36か月または0~60か月)にわたって全生存期間を検査することにより測定することができる。一実施形態では、生存期間は、サブタイプ(例えば、肺がんの場合、SQ(基底、古典的、分泌性または未分化))の関数として解析される。無再発生存期間および全生存期間は、標準的なカプラン・マイヤープロットならびにCox比例ハザードモデリングを使用して査定することができる。

30

【0149】

一実施形態では、患者の肺がんサブタイプが判定されたら、この患者は、好適な療法、例えば化学療法、または血管新生阻害剤を用いた薬物療法、または免疫療法のために選択される。一実施形態では、患者の肺がんサブタイプが判定されたら、この患者には、好適な治療剤、例えば化学療法剤、または血管新生阻害剤、または免疫療法剤が投与される。一実施形態では、療法は免疫療法であり、免疫療法剤は、チェックポイント阻害剤、モノクローナル抗体、生体応答修飾因子、治療用ワクチン、または細胞免疫療法である。

40

【0150】

本発明の方法はまた、療法に対する臨床応答を評価するのに加えて、新しい療法の有効性の臨床試験におけるエンドポイントにも有用である。順次の診断的発現プロファイルが正常に向かって移動する程度は、候補療法の有効性の1つの尺度として使用することができる。

【0151】

一実施形態では、本発明の方法はまた、異なる次数の療法に対する応答を肺扁平上皮癌(SQ)のサブタイプに基づいて予測する際に役立つ。例えば、化学療法応答は、腫瘍サブタイプをより正確に割り当てることにより改善され得る。同様に、処置レジメンは、腫

50

瘍サブタイプに基づいて処方され得る。例えば、VEGF阻害剤であるベバシズマブがNSCLCの処置において有効であり得る有力な証拠が臨床試験により示されている。一つの実施形態では、未分化SQサブタイプは、免疫治療に対して向上した応答を有し得る。別の実施形態では、すべてのサブタイプが、化学療法、血管新生阻害剤処置、および免疫療法に対して向上した応答を有し得る。

【0152】

一実施形態では、患者の肺扁平上皮癌サブタイプが判定されたら、この患者は、好適な療法、例えば化学療法、免疫療法、または血管新生阻害剤を用いた薬物療法のために選択される。一実施形態では、本明細書において提供される方法を使用して患者の肺扁平上皮癌サブタイプが判定されたら、好適な治療剤、例えば化学療法剤、免疫療法剤、または血管新生阻害剤が患者に投与される。

10

血管新生阻害剤

【0153】

一実施形態では、患者の肺SQサブタイプが判定されたら、この患者は、血管新生阻害剤を用いた薬物療法のために選択される。患者が血管新生阻害剤療法に応答する可能性が高いかどうかの判定、または血管新生阻害剤療法のための患者の選択が行われたら、一実施形態では、患者に血管新生阻害剤が投与される。血管新生阻害剤は、本明細書に記載される血管新生阻害剤のうちのいずれでもよい。

【0154】

一実施形態では、治療は、血管新生阻害剤治療であり、血管新生阻害剤は、血管内皮増殖因子(VEGF)阻害剤、VEGF受容体阻害剤、血小板由来増殖因子(PDGF)阻害剤、またはPDGF受容体阻害剤である。

20

【0155】

各バイオマーカーパネルは、扁平上皮癌患者が血管新生阻害剤療法に応答する可能性が高いかどうかを査定するため；血管新生阻害剤療法のための扁平上皮癌患者を選択するため；「低酸素スコア」を判定するため、および／または扁平上皮癌試料を基底、古典的、分泌性、もしくは未分化の分子サブタイプにサブタイピングするために分類指標(「分類指標バイオマーカー」とも呼ばれる)により使用可能な、1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、20個、40個、60個、80個、またはそれよりも多くのバイオマーカーを含み得る。本明細書で使用される場合、「分類指標」という用語は、統計的分類のための任意のアルゴリズムを指し得、これは、ハードウェア、ソフトウェア、またはそれらの組合せにおいて実施され得る。分類指標には、2レベル、3レベル、4レベル、またはそれよりも高次の分類を行う能力があり得、これは、分類されるエンティティの性質に依存し得る。本明細書に開示される態様を達成するためには、1つまたは複数の分類指標を用いてよい。

30

【0156】

概して、扁平上皮癌患者が血管新生阻害剤療法に応答する可能性が高いかどうかを判定する方法、または血管新生阻害剤療法のための扁平上皮癌患者を選択する方法が、本明細書において提供される。一実施形態では、この方法は、本明細書に記載される方法を使用して患者の扁平上皮癌サブタイプが基底、古典的、分泌性、または未分化であるかどうかを査定するステップ(例えば、表1の1つまたは複数の分類指標バイオマーカーの発現を査定するステップ)と、RRAGD、FABP5、UCHL1、GAL、PLOD、DDIT4、VEGF、ADM、ANGPTL4、NDRG1、NP、SLC16A3、およびC14ORF58(表3参照)からなる群から選択される少なくとも5種のバイオマーカーのレベルについて患者由来の扁平上皮癌試料を核酸レベルでプローブするステップを含む。さらなる実施形態では、プローブするステップは、試料を、少なくとも5種のバイオマーカーの核酸分子の一部に対して実質的に相補的である5種またはそれよりも多くのオリゴヌクレオチドと、5種またはそれよりも多くのオリゴヌクレオチドをそれらの相補体または実質的な相補体とハイブリダイズさせるのに好適な条件下で混合するステップと、5種またはそれよりも多くのオリゴヌクレオチドと、それらの相補体または実質的

40

50

な相補体との間でハイブリダイゼーションが生じるかどうかを検出するステップと、検出するステップに基づいて試料のハイブリダイゼーション値を得るステップとを含む。試料のハイブリダイゼーション値は、次いで、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットからの参照ハイブリダイゼーション値と比較され、ここで、少なくとも1種のサンプルトレーニングセットは、(i) 少なくとも5種のバイオマーカーを過剰発現するか、もしくは少なくとも5種のバイオマーカーのサブセットを過剰発現する試料からの少なくとも5種のバイオマーカーのハイブリダイゼーション値、(ii) 参照基底、古典的、分泌性もしくは未分化試料からの少なくとも5種のバイオマーカーのハイブリダイゼーション値、または(iii) 扁平上皮癌不含肺試料からの少なくとも5種のバイオマーカーのハイブリダイゼーション値を含む。次いで、患者が血管新生阻害剤療法に応答する可能性が高いかどうかの判定、または血管新生阻害剤のための患者の選択が、(i) 患者の扁平上皮癌サブタイプおよび(ii) 比較の結果に基づいて行われる。

【表3】

表3.低酸素プロファイルに関するバイオマーカー		
名称	略称	GenBank受託番号*
RRAGD	Ras関連GTP結合D	BC003088
FABP5	脂肪酸結合タンパク質5	M94856
UCHL1	ユビキチンカルボキシル末端エステラーゼL1	NM_004181
GAL	ガラニン	BC030241
PLOD	プロコラーゲン-リシン-2-オキシグルタル酸-5-ジオキシゲナーゼリシンヒドロキシラーゼ	M98252
DDIT4	DNA損傷誘導性転写物4	NM_019058
VEGF	血管内皮増殖因子	M32977
ADM	アドレノメデュリン	NM_001124
ANGPTL4	アンジオポエチン様4	AF202636
NDRG1	N-myc下流制御遺伝子1	NM_006096
NP	ヌクレオシドホスホリラーゼ	NM_000270
SLC16A3	溶質担体ファミリー16モノカルボン酸輸送体、メンバー3	NM_004207
C14ORF58	第14染色体オープンリーディングフレーム58	AK000378

*各GenBank受託番号は列挙される遺伝子の代表的または例示的なGenBank受託番号であり、その全体はあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれている。さらに、列挙される代表的または例示的な各受託番号は、特定の受託番号に特許請求の範囲を限定す

るものと解釈されてはならない。

【0157】

前述の13種一組のバイオマーカーまたはそれらのサブセットは、本明細書では「低酸素プロファイル」とも呼ばれる。

【0158】

一実施形態では、本明細書において提供される方法は、対象から得られた扁平上皮癌試料中の、RRAGD、FABP5、UCHL1、GAL、PLOD、DDIT4、VEGF、ADM、ANGPTL4、NDRG1、NP、SLC16A3、およびC14ORF58から選択される少なくとも5種のバイオマーカー、少なくとも6種のバイオマーカー、少なくとも7種のバイオマーカー、少なくとも8種のバイオマーカー、少なくとも9種のバイオマーカー、もしくは少なくとも10種のバイオマーカー、または5～13、6～13、7～13、8～13、9～13、もしくは10～13種のバイオマーカーのレベルを判定するステップを含む。一部の事例では、バイオマーカー発現は、試料中のすべてのRNA転写物もしくはそれらの発現産物の発現レベルに対して、またはRNA転写物もしくはそれらの発現産物の参照セットに対して正規化され得る。随所で説明される参照セットは、扁平上皮癌試料と並行して試験される実際の試料であってもよいし、またはデータベースもしくは記憶されているデータセットの値の参照セットであってもよい。発現レベルは、一実施形態では、コピー数、相対的な蛍光値、または検出された蛍光値として報告される。低酸素プロファイルのバイオマーカーの発現レベルは、本明細書において提供される方法を使用して判定された扁平上皮癌サブタイプと併せて、患者が血管新生阻害剤療法に応答する可能性が高いかどうかを判定するために、本明細書に記載される方法において使用することができる。

【0159】

一実施形態では、13種のバイオマーカー（または上述のようにそれらのサブセット、例えば5種またはそれよりも多く、約5種～約13種）の発現レベルは、すべてのRNA転写物もしくはそれらの非天然cDNA発現産物、または試料中のタンパク質産物、またはRNA転写物の参照セットもしくはそれらの非天然cDNA発現産物の参照セット、または試料中のそれらのタンパク質産物の参照セットの発現レベルに対して正規化される。

【0160】

一実施形態では、血管新生阻害剤処置としては、インテグリンアンタゴニスト、セレクチンアンタゴニスト、接着分子アンタゴニスト、細胞間接着分子（ICAM）-1、ICAM-2、ICAM-3、血小板内皮接着分子（PCAM）、血管細胞接着分子（VCAM）のアンタゴニスト、リンパ球機能関連抗原1（LFA-1）のアンタゴニスト、塩基性線維芽細胞増殖因子アンタゴニスト、血管内皮増殖因子（VEGF）調節因子、血小板由来増殖因子（PDGF）調節因子（例えば、PDGFアンタゴニスト）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0161】

対象がインテグリンアンタゴニストに応答する可能性が高いかどうかを判定する一実施形態では、インテグリンアンタゴニストは、小分子インテグリンアンタゴニスト、例えば、Paolilloら（Mini Rev Med Chem、2009年、12巻、1439～1446頁、その全体は参照により組み込まれている）に記載されているアンタゴニスト、または、その全体が参照により組み込まれている米国特許第6,524,581号に記載されている白血球接着誘導性サイトカインもしくは増殖因子アンタゴニスト（例えば、腫瘍壊死因子α（TNF-α）、インターロイキン-1β（IL-1β）、単球走化性タンパク質-1（MCP-1）および血管内皮増殖因子（VEGF））である。

【0162】

本明細書において提供される方法は、対象が、次の血管新生阻害剤：インターフェロンガンマ1β、インターフェロンガンマ1β（Actimmune（登録商標））とピルフェニドン、ACUHTR028、αVβ5、アミノ安息香酸カリウム、アミロイドP、ANG1122、ANG1170、ANG3062、ANG3281、ANG3298、A

NG4011、抗CTGF RNAi、Aplidin、astragalus membranaceus抽出物とsalviaおよびschisandra chinensis、動脈硬化プラーク遮断薬、Azol、AZX100、BB3、結合組織増殖因子抗体、CT140、ダナゾール、Esbriet、EXC001、EXC002、EXC003、EXC004、EXC005、F647、FG3019、フィブロコリン(Fibrocortin)、フォリスタチン、FT011、ガレクチン-3阻害剤、GKT137831、GMCT01、GMCT02、GRMD01、GRMD02、GRN510、Heberon Alfa R、インターフェロン α -2 β 、ITMN520、JKB119、JKB121、JKB122、KRX168、LPA1受容体アンタゴニスト、MGN4220、MIA2、マイクロRNA 29aオリゴヌクレオチド、MMI0100、ノスカピン、PBI4050、PBI4419、PDGFR阻害剤、PF-06473871、PGN0052、Pirespa、Pirfenex、ビルフェニドン、ブリチデプシン、PRM151、Px102、PYN17、PYN22とPYN17、Relivergen、rhPTX2融合タンパク質、RXI109、セクレチン、STX100、TGF- β 阻害剤、形質転換増殖因子、 β -受容体2オリゴヌクレオチド、VA999260、XV615、またはそれらの組合せのうちの1つまたは複数に応答する可能性が高いかどうかを判定するのにも有用である。

【0163】

別の実施形態では、対象が1つまたは複数の内在性血管新生阻害剤に応答する可能性が高いかどうかを判定するための方法が提供される。さらなる実施形態では、内在性血管新生阻害剤は、エンドスタチン、XVII型コラーゲンに由来する20kDa C末端断片、アンジオスタチン(プラスミンの38kDa断片)、トロンボスポンジン(TSP)タンパク質ファミリーのメンバーである。さらなる実施形態では、血管新生阻害剤は、TSP-1、TSP-2、TSP-3、TSP-4、およびTSP-5である。次の血管新生阻害剤：可溶性VEGF受容体、例えば、可溶性VEGFR-1およびニューロピリン1(NPR1)、アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、バソスタチン、カルレティキュリン、血小板因子-4、組織メタロプロテイナーゼ阻害剤(TIMP)(例えば、TIMP1、TIMP2、TIMP3、TIMP4)、軟骨由来血管新生阻害剤(例えば、ペプチドトロポニンIおよびコンドロモジュリン(chondromodulin)I)、トロンボスポンジンモチーフを有するディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ1、インターフェロン(IFN)、(例えば、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)、ケモカイン、例えば、C-X-Cモチーフを有するケモカイン(例えば、CXCL10、別称インターフェロンガンマ誘導性タンパク質10または低分子誘導性サイトカインB10)、インターロイキンサイトカイン(例えば、IL-4、IL-12、IL-18)、プロトロンビン、アンチトロンビンIII断片、プロラクチン、TNFSF15遺伝子によりコードされるタンパク質、オステオポンチン、マスピン、カンスタチン、プロリフェリン関連タンパク質のうちの1つまたは複数に対する尤度を判定するための方法も提供される。

【0164】

一実施形態では、次の血管新生阻害剤：アンジオポエチン-1、アンジオポエチン-2、アンジオスタチン、エンドスタチン、バソスタチン、トロンボスポンジン、カルレティキュリン、血小板因子4、TIMP、CD41、インターフェロン α 、インターフェロン β 、血管内皮増殖因子阻害剤(VEGI)メター-1、メター-2、プロラクチン、VEGI、SPARC、オステオポンチン、マスピン、カンスタチン、プロリフェリン関連タンパク質(PRP)、レスチン、TSP-1、TSP-2、インターフェロンガンマ1 β 、ACUHTR028、 α V β 5、アミノ安息香酸カリウム、アミロイドP、ANG1122、ANG1170、ANG3062、ANG3281、ANG3298、ANG4011、抗CTGF RNAi、Aplidin、astragalus membranaceus抽出物とsalviaおよびschisandra chinensis、動脈硬化プラーク遮断薬、Azol、AZX100、BB3、結合組織増殖因子抗体、CT140、ダナゾール、Esbriet、EXC001、EXC002、EXC003、EXC

004、EXC005、F647、FG3019、フィブロコリン (Fibrocorin)、フォリスタチン、FT011、ガレクチン-3阻害剤、GKT137831、GMCT01、GMCT02、GRMD01、GRMD02、GRN510、Heberon Alfa R、インターフェロン α -2 β 、ITMN520、JKB119、JKB121、JKB122、KRX168、LPA1受容体アンタゴニスト、MGN4220、MIA2、マイクロRNA 29aオリゴヌクレオチド、MMI0100、ノスカピン、PBI4050、PBI4419、PDGFR阻害剤、PF-06473871、PGN0052、Pirespa、Pirfenex、ピルフェニドン、プリチデブシン、PRM151、Px102、PYN17、PYN22とPYN17、Relivergen、rhPTX2融合タンパク質、RXI109、セクレチン、STX100、TGF- β 阻害剤、形質転換増殖因子、 β -受容体2オリゴヌクレオチド、VA999260、XV615、またはそれらの組合せのうちの1つまたは複数に対する応答の尤度を判定するための方法が提供される。

10

【0165】

さらに別の実施形態では、血管新生阻害剤は、パゾパニブ (Votrient)、スニチニブ (Sutent)、ソラフェニブ (Nexavar)、アキシチニブ (Inlyta)、ボナチニブ (Iclusig)、バンデタニブ (Caprelsa)、カボザニブ (Cometriq)、ラムシルマブ (Cyranza)、レゴラフェニブ (Stivarga)、ziv-アフリベルセプト (Zaltrap)、モテサニブ、またはそれらの組合せを含み得る。別の実施形態では、血管新生阻害剤はVEGF阻害剤である。さらなる実施形態では、VEGF阻害剤は、アキシチニブ、カボザニブ、アフリベルセプト、プリバニブ、チボザニブ、ラムシルマブ、またはモテサニブである。なおもさらなる実施形態では、血管新生阻害剤はモテサニブである。

20

【0166】

一実施形態では、本明細書において提供される方法は、対象が、血小板由来増殖因子 (PDGF) ファミリーのメンバーのアンタゴニスト、例えば、PDGF受容体 (PDGFR) のシグナル伝達および/または活性を阻害、低減、または調節する薬物に対して応答する尤度を判定することに関する。例えば、PDGFアンタゴニストは、一実施形態では、抗PDGFアプタマー、抗PDGF抗体もしくはその断片、抗PDGFR抗体もしくはその断片、または小分子アンタゴニストである。一実施形態では、PDGFアンタゴニストは、PDGFR- α またはPDGFR- β のアンタゴニストである。一実施形態では、PDGFアンタゴニストは、抗PDGF- β アプタマーE10030、スニチニブ、アキシチニブ、ソラフェニブ (sorefenib)、イマチニブ、イマチニブメシル酸塩、ニンテダニブ、パゾパニブHC1、ボナチニブ、MK-2461、ドビチニブ、パゾパニブ、クレノラニブ、PP-121、テラチニブ、イマチニブ、KRN633、CP673451、TSU-68、Ki8751、アムバチニブ、チボザニブ、マシチニブ、モテサニブニリン酸塩、ドビチニブ二乳酸、リニファニブ (ABT-869) である。

30

【0167】

免疫療法

一実施形態では、患者から得られた試料のSQのサブタイプを判定し、SQ肺がんサブタイプに基づいて、患者が免疫療法に応答する可能性が高いかどうかを査定することによる、扁平上皮癌 (SQ) 肺がん患者が免疫療法に応答する可能性が高いかどうかを判定するための方法が、本明細書において提供される。別の実施形態では、患者由来の試料のSQサブタイプを判定し、SQサブタイプに基づいて、免疫療法のための患者を選択することによる、SQを患う患者を免疫療法のために選択する方法が、本明細書において提供される。患者から得られた試料のSQサブタイプの判定は、当技術分野で公知の任意のSQサブタイピング方法を使用して行うことができる。一実施形態では、患者から得られた試料はSQであると過去に診断されており、本明細書において提供される方法が試料のSQサブタイプを判定するために使用される。過去の診断は、組織学的解析に基づき得る。組織学的解析は、1名または複数名の病理学者によって行われてよい。一実施形態では、発

40

50

現プロファイルを生成するためのバイオマーカーのセットもしくはパネルまたはそれらのサブセットの遺伝子発現解析によってS Qサブタイピングが行われる。遺伝子発現解析は、本明細書に記載される公的に利用可能な肺がんデータベースおよび／または本明細書において提供される表1から選択される1つまたは複数のバイオマーカーの存在、非存在、または発現レベルを判定するために、患者から得られた肺がん試料（例えば、肺がんS Q試料）に行われ得る。S Qサブタイプは、未分化、古典的、分泌性および基底からなる群から選択され得る。免疫療法の、本明細書において提供される任意の免疫療法であってよい。一実施形態では、免疫療法は、1つまたは複数のチェックポイント阻害剤を投与することを含む。チェックポイント阻害剤は、本明細書において提供される任意のチェックポイント阻害剤、例えば、PD-1、PD-L1、またはCTLA4を標的とするチェックポイント阻害剤であり得る。

10

【0168】

本明細書において開示されるように、バイオマーカーパネルまたはそのサブセットは、任意の公的に利用可能なS Q遺伝子発現データセット（単数または複数）において開示されているものであってよい。一実施形態では、肺がんはS Qであり、バイオマーカーパネルまたはそのサブセットは、例えば、TCGA肺S Q RNAseq遺伝子発現データセット（n=501）である。一実施形態では、肺がんはS Qであり、バイオマーカーパネルまたはそのサブセットは、例えば、Leeら（Cancer Res、2008年；14巻（22号）：7397～7404頁）に開示されているS Q遺伝子発現データセット（n=75）であり、この文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。一実施形態では、肺がんはS Qであり、バイオマーカーパネルまたはそのサブセットは、例えば、Raponiら（Cancer Res、2006年；66巻（7号）：466～472頁）に開示されているS Q遺伝子発現データセット（n=130）であり、この文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。一実施形態では、肺がんはS Qであり、バイオマーカーパネルまたはそのサブセットは、例えば、Wilkersonら（Clin Cancer Res、2010年；16巻（19号）：4864～4875頁）に開示されているS Q遺伝子発現データセット（n=56）であり、この文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。一実施形態では、肺がんはS Qであり、バイオマーカーパネルまたはそのサブセットは、例えば、表1に開示されているS Q遺伝子発現データセットである。表2中、表の第1の縦列は、基底を弁別するためのバイオマーカーのリストを表す。表の第2の縦列は、古典的に関するバイオマーカーのリストを表す。表の第3の縦列は、未分化を弁別するためのバイオマーカーのリストを表す。表の最後の縦列は、分泌性を弁別するためのバイオマーカーのリストを表す。一部の 경우에는、表2に示されるように、合計80種のバイオマーカーをS Qサブタイプ判定に使用することができる。表2の各S Qサブタイプについて、20種中10種のバイオマーカーは負の相関を示す遺伝子であり得、10種は、特定のS Qサブタイプの遺伝子シグネチャーとして選択され得る正の相関を示す遺伝子であり得る。

20

30

【0169】

一部の実施形態では、肺がんサブタイピング（例えば、S Qサブタイピング）のための方法は、分類指標バイオマーカーセットの発現レベルを検出するステップを含む。分類指標バイオマーカーセットは、公的に利用可能なデータベースからの一組のバイオマーカー、例えば、TCGA肺S Q RNAseq遺伝子発現データセットまたは本明細書において提供される任意の他のデータセットなどであり得る。一部の実施形態では、この検出するステップは、核酸レベルまたはタンパク質レベルにおける表1または本明細書において提供される任意の他のデータセットの分類指標バイオマーカーのすべてを含む。別の実施形態では、表1のうち単一の分類指標バイオマーカーまたは表1もしくは本明細書において提供される任意の他のデータセットの分類指標バイオマーカーのサブセット、例えば、約5種～約20種が検出される。別の実施形態では、表1のうち単一の分類指標バイオマーカーまたは表1および／もしくは本明細書において提供される任意の他のデータセットの分類指標バイオマーカーのサブセット、例えば、約20種～約80種が検出される。別

40

50

の実施形態では、表 1 または本明細書において提供される任意の他のデータセットの分類指標バイオマーカーのすべてが検出される。別の実施形態では、表 1 の分類指標バイオマーカーのうちの少なくとも 1 種またはすべてが、本明細書において提供される任意の他の S Q データセットの 1 つまたは複数の分類指標バイオマーカーと組み合わせて検出される。検出するステップは、RNA-seq、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、マイクロアレイハイブリダイゼーションアッセイ、または別のハイブリダイゼーションアッセイ、例えば、NanoString アッセイ、例えば、分類指標バイオマーカーに特異的なプライマーおよび／もしくはプローブを用いるもの、および／または同様のものを含むがこれらに限定されない、任意の好適な技術によって行うことができる。一部の場合では、増幅方法 (例えば、RT-PCR または qRT-PCR) に有用なプライマーは、単独または組合せて本明細書において提供されるデータセットからの分類指標遺伝子と結合するのに好適な任意のフォワードおよびリバースプライマーである。

10

【0170】

一実施形態では、例えば、S Q 肺試料に関する表 1 を含め、本明細書において提供される S Q 遺伝子発現データセットのうちのいずれかにおけるバイオマーカーのうちの約 1 ～約 5 種、約 5 ～約 10 種、約 5 ～約 15 種、約 5 ～約 20 種、約 5 ～約 25 種、約 5 ～約 30 種、約 5 ～約 35 種、約 5 ～約 40 種、約 5 ～約 45 種、約 5 ～約 50 種、約 5 ～約 55 種、約 5 ～約 60 種、約 5 ～約 65 種、約 5 ～約 70 種、約 5 ～約 75 種、または約 5 ～約 80 種が、本明細書において提供される肺がんサブタイプを判定する方法において検出される。別の実施形態では、例えば、S Q 肺試料に関する表 1 を含め、本明細書において提供される S Q 遺伝子発現データセットのうちのいずれか 1 つからのバイオマーカーの各々が、本明細書において提供される肺がんサブタイプを判定する方法において検出される。

20

【0171】

一実施形態では、本明細書において提供される方法は、S Q サブタイプにおける免疫活性化の存在、非存在、またはレベルを判定するステップをさらに含む。免疫細胞活性化の存在またはレベルは、患者から得られた試料 (例えば、肺がん試料) 中の各 S Q サブタイプに関連する、自然免疫細胞および／または適応免疫細胞に関連する 1 つまたは複数のバイオマーカーの発現プロファイルを作出すること、またはそれらの発現を検出することによって判定することができる。一実施形態では、S Q サブタイプに関連する免疫細胞活性化は、Bindea ら (Immunity、2013 年; 39 巻 (4 号); 782 ～795 頁) の免疫細胞シグネチャーをモニタリングすることによって判定され、この文献の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。一実施形態では、この方法は、単一遺伝子免疫バイオマーカー、例えば、CTLA4、PDCD1 および CD274 (PD-L1)、PDCD1LG2 (PD-L2) ならびに／または IFN 遺伝子シグネチャーを測定するステップをさらに含む。S Q サブタイプに関連する免疫活性化 (自然および／または適応) の存在または検出可能なレベルは、前記 S Q サブタイプを有する患者が免疫療法に適している可能性があることを示すか、または予測することができる。免疫療法は、本明細書において提供されるチェックポイント阻害剤を用いた処置であり得る。一実施形態では、未分化サブタイプの S Q は免疫発現を有する。一実施形態では、患者から得られた試料 (例えば、肺がん S Q 試料) 中の、本明細書において提供される少なくとも 1 種の分類指標バイオマーカーの発現を検出するための本明細書において提供される方法は、本明細書において提供される前記試料中の免疫活性化の検出後に免疫療法剤を投与するステップをさらに含む。

30

40

【0172】

一実施形態では、この方法は、肺がん S Q 試料のサブタイプを判定し、その後、前記サブタイプの免疫細胞活性化のレベルを判定するステップを含む。一実施形態では、サブタイプは、本明細書に記載される配列決定 (例えば、RNAseq)、増幅 (例えば、qRT-PCR)、またはハイブリダイゼーションアッセイ (例えば、マイクロアレイ解析) を使用して 1 つまたは複数の分類指標バイオマーカーの発現レベルを判定することによ

50

て判定される。1つまたは複数のバイオマーカーは、公的に利用可能なデータベース（例えば、TCGA肺SQ RNASeq遺伝子発現データセットまたは本明細書において提供される任意の他の公的に利用可能なSQ遺伝子発現データセット）から選択してよい。一部の実施形態では、表1のバイオマーカーを使用して、患者から得られたSQ肺試料のサブタイプを特異的に判定することができる。一実施形態では、免疫細胞活性化のレベルは、イムノマーカーの遺伝子発現シグネチャーを測定することにより判定される。イムノマーカーは、本明細書に記載される肺がん試料のサブタイピングを行うために使用されるものと同じ試料および／または異なる試料中で測定され得る。測定され得るイムノマーカーは、自然免疫細胞（IIC）および／または適応免疫細胞（AIC）遺伝子シグネチャー、インターフェロン（INF）遺伝子シグネチャー、個々のイムノマーカー、主要組織適合抗原クラスII（MHCクラスII）遺伝子、またはそれらの組合せを含むか、それらからなるか、またはそれらから本質的になる場合がある。IICおよびAICの両方に関する遺伝子発現シグネチャーは、当技術分野で公知の前記細胞型に関するいずれの公知の遺伝子シグネチャーであってもよい。例えば、免疫遺伝子シグネチャーは、Bindeaら（Immunity、2013年、39巻（4号）；782～795頁）に記載のものであってもよい。一実施形態では、本明細書において提供される方法で使用するためのイムノマーカーは、表4Aおよび／または表4Bから選択される。個々のイムノマーカーは、CTLA4、PDCD1、およびCD274（PD-L1）であり得る。一実施形態では、本明細書において提供される方法で使用するための個々のイムノマーカーは、表5から選択される。イムノマーカーは、1つまたは複数のインターフェロン（INF）遺伝子であり得る。一実施形態では、本明細書において提供される方法で使用するためのイムノマーカーは、表6から選択される。イムノマーカーは、1つまたは複数のMHCII遺伝子であり得る。一実施形態では、本明細書において提供される方法で使用するためのイムノマーカーは、表7から選択される。さらに別の実施形態では、本明細書において提供される方法で使用するためのイムノマーカーは、表4A、4B、5、6、7、またはそれらの組合せから選択される。

10

20

【0173】

【表 4 A - 1】

表4A.本明細書において提供される方法で使用するための適応免疫細胞(AIC)遺伝子シグネチャーマーカー。

細胞型						
	B 細胞	T 細胞	T ヘルパー細胞	Tcm	Tem	Th1 細胞
ヒト遺伝子 (遺伝子 名:GenBank 受託番 号*)	ABCB4(ATP 結合 カセットサブファミ リーB メンバー 4;NM_000443)	BCL11B(B 細胞リン パ腫/白血病 11B;AJ404614.1)	ANP32B(酸性核リン タンパク質 32 ファミ リーメンバー B;NM_006401.2)	AQP3(アクアポリン 3;NM_004925.4)	AKT3(AKT セリン/ スレオニンキナー ゼ 3;NM_005465.4)	APBB2(アミロイドベ ータ前駆体タンパク 質結合ファミリーB メンバー 2;NM_001166054.1)
	BACH2(BTB ドメイ ンおよび CNC ホモ ログ 2;NM_021813.3)	CD2(CD2 分 子;NM_001328609.1)	ASF1A(抗サイレン シング機能 1A ヒス トンシヤペロ ン;NM_014034.2)	ATF7IP(活性化転写 因子 7 相互作用タ ンパク 質;NM_181352.1)	C7orf54(ブドウ球菌 ヌクレアーゼおよび tudor ドメイン含有 1(SND1);NG_05119 9.1)	APOD(アポリポタン パク質 D;NM_001647.3)
	BCL11A(B 細胞 CLL/リンパ腫 11A;NM_022893.3)	CD28(CD28 分 子;NM_001243078.1)	ATF2(活性化転写 因子 2;NM_001256093.1)	ATM(ATM セリン/ス レオニンキナー ゼ;NM_000051.3)	CCR2(C-C モチー フケモカイン受容体 2;NM_001123396.1)	ATP9A(リン脂質輸 送 ATP アーゼ 9A;NM_006045.2)
	BLK(BLK 癌原遺伝 子、Src ファミリーチ ロシンキナー ゼ;NM_001715.2)	CD3D(CD3d 分 子;NM_000732.4)	BATF(塩基性ロイシ ンジッパアーATF 様転 写因 子;NM_006399.3)	CASP8(カスパーゼ 8;NM_001228.4)	DDX17(DEAD ポッ クスヘリカーゼ 17;NM_006386.4)	BST2(骨髄間質細 胞抗原 2;NM_004335.3)
	BLNK(B 細胞リンカ ー;NM_013314.3)	CD3E(CD3e 分 子;NM_000733.3)	C13orf34(オーロ ラ;EU834129.1)	CDC14A(細胞分裂 サイクル 14A;NM_003672.3)	EWSR1(EWS RNA 結合タンパク質 1;NM_013986.3)	BTG3(BTG 抗増殖 因子 3;NM_001130914.1)
	CCR9(C-C モチー	CD3G(CD3g 分	CD28(CD28 分		FLI1(Fli-1 癌原遺	CCL4(C-C モチー

10

20

30

40

【表 4 A - 2】

フケモカイン受容体 9;NM_031200.2)	子:NM_000073.2)	子:NM_006139.3)	パク質 68;NM_015147.2)	伝子、ETS 転写因 子:NM_002017.4)	フケモカインリガン ド 4;NM_002984.3)
CD19(CD19 分 子:NM_001178098.1)	CD6(CD6 分 子:NM_006725.4)	DDX50(DEAD ボック スヘリカーゼ 50;NM_024045.1)	CG030(BRCA2 領 域、mRNA 配列 CG030;U50531.1)	GDPD5(グリセロホ スホジェステルホス ホジェステラーゼド メイン含有 5;NM_030792.6)	CD38(CD38 分 子:NM_001775.3)
CD72(CD72 分 子:NM_001782.2)	CD96(CD96 分 子:NM_198196.2)	FAM111A(配列類似 性を有するファミリー 111 メンバー A;NM_022074.3)	GLUAP1(クラスタリ ン関連タンパク質 1;NM_015041.2)	LTK(白血球受容体 チロシンキナー ゼ;NM_002344.5)	CD70(CD70 分 子:NM_001252.4)
COCH(コクリ ン;NM_001135058.1)	GIMAP5(GTP アー ゼ、IMAP ファミリー メンバー 5;NM_018384.4)	FRYL(FRY 様転写 共活性化因 子:NM_015030.1)	CREBZF(CREB/AT F bZIP 転写因 子:NM_001039618.2)	MEFV(地中海 熱;NM_000243.2)	CMAH(シチジンモノ ホスホ-N-アセチル ノイラミン酸ヒドロキ シラーゼ、偽遺伝 子:NR_002174.2)
CR2(補体 C3d 受 容体 2;NM_001006658.2)	ITM2A(膜内在性タ ンパク質 2A;NM_004867.4)	FUSIP1(セリン・アル ギニンリッチスプライ シング因子 10;NM_006625.5)	CYLD(CYLD リジン 63 デュビキチナー ゼ;NM_015247.2)	NFATC4(活性化 T 細胞核内因子 4;NM_001136022.2)	CSF2(コロニー刺激 因子 2;NM_000758.3)
DTNB(ジストロブレ ピンベ タ;NM_021907.4)	LCK(LCK 癌原遺伝 子、Src ファミリーチ ロシンキナー ゼ;NM_001042771.2)	GOLGA8A(ゴルジン A8 ファミリーメンバ ーA;NM_181077.3)	CYorf15B(タキシリン ガンマ偽遺伝子、Y 連鎖;NR_045128.1)	PRKY(タンパク質キ ナーゼ、Y 連鎖、偽 遺伝 子:NR_028062.1)	CTLA4(細胞傷害 性 T リンパ球関連 タンパク質 4;NM_005214.4)
FAM30A(配列類似 性を有するファミリ ー;30 メンバー ANR_026800.2)	NCALD(ニューロカ ルシンデル タ;NM_001040624.1)	ICOS(誘導性 T 細 胞共刺激分 子:NM_012092.3)	DOCK9(細胞質分裂 デドケータ 9;NM_015296.2)	TBC1D5(TBC1 ドメ インファミリーメンバ ー 5;NM_001134381.1)	DGK(ジアシルグリ セロールキナーゼ イオ タ;NM_004717.3)
FCRL2(Fc 受容体 様 2;NM_030764.3)	PRKCQ(タンパク質 キナーゼ C シー タ;NM_006257.4)	ITM2A(膜内在性タ ンパク質 2A;NM_004867.4)	FOXPI1(フォークヘッ ドボックス P1;NM_032682.5)	TBCD(チューブリン フォールディングコ ファクター	DOK5(ドッキングタ ンパク質 5;NM_018431.4)

10

20

30

40

【表 4 A - 3】

GLDC(グリシンデカルボキシラーゼ;NM_000170.2)	SH2D1A(SH2ドメイン含有 1A;NM_002351.4)	LRBA(LPS応答性ベージュ様アンカータンパク 質;NM_001199282.2)	FYB(FYN結合タンパク 質;NM_001465.4)	D;NM_005993.4)	DPP4(ジペプチジルペプチダーゼ 4;NM_001935.3)
GNG7(Gタンパク質サブユニットガンマ 7;NM_052847.2)	SKAP1(srcキナーゼ関連リンタンパク 質 1;NM_001075099.1)	NAP1L4(ヌクレオソーム集合タンパク質 1様 4;NM_005969.3)	HNRPH1(ヘテロ核リボヌクレオタンパク 質 H1(H);NM_001257293.1)	VIL2(エズリン;NM_003379.4)	DUSP5(二重特異性ホスファターゼ 5;NM_004419.3)
HLA-DOB(主要組織適合抗原クラスII, DOペータ;NM_002120.3)	TRA(T細胞受容体アルファデルタ遺伝子座;NG_001332.3)	NUP107(ヌクレオポリン 107;NM_020401.3)	INPP4B(イノシトールポリリン酸-4-ホスファターゼ II 型 B;NM_003866.3)		EGFL6(EGF様ドメイン複合 6;NM_015507.3)
HLA-DQA1(主要組織適合抗原クラスII, DQアルファ 1;NM_002122.3)	TRAC(核受容体コリプレッサー 2;NM_006312.5)	PHF10(PHDフィンガータンパク質 10;NM_018288.3)	KLF12(クルツベル様因子 12;NM_007249.4)		GGT1(ガンマ-グルタミルトランスフェラーゼ 1;NM_013421.2)
IGHA1(免疫グロブリン重遺伝子座;NG_001019.6)	TRAT1(T細胞受容体関連膜貫通アダプター 1;NM_016388.3)	PPP2R5C(タンパク質ホスファターゼ 2制御サブユニットB', ガンマ;NM_001161725.1)	LOC202134(配列類似性を有するファミリー-153メンバー B;NM_001265615.1)		HBEGF(ヘパリン結合EGF様増殖因子;NM_001945.2)
IGHG1(免疫グロブリン重遺伝子座;NG_001019.6)	TRBC1(T細胞受容体ベータ遺伝子座;NG_001333.2)	RPA1(複製タンパク質 A1;NM_002945.3)	MAP3K1(マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼキナーゼ 1, E3 ユビキチンタンパク質リガーゼ;NM_005921.1)		IFNG(インターフェロンガンマ;NM_000619.2)
IGHM(免疫グロブリン重遺伝子)		SEC24C(SEC24ホモログ C, COPIIコ	MLL(リシン(K)特異的メチルトランスフェ		IL12RB2(インターロイキン 12 受容体サ

10

20

30

40

【表 4 A - 4】

座;NG_001019.6)			ート複合体コンポー ネント;NM_004922.3)	ラーゼ 2A;NM_005933.3)		ブユニットベータ 2;NM_001319233.1)
IGKC(免疫グロブリ ンカッパ遺伝子座、 近位 V クラスター および J-C クラスタ ー;NG_000834.1)			SLC25A12(溶質担 体ファミリ-25 メン バー 12;NM_003705.4)	NEFL(ニューロフィラ メント、軽ポリペプチ ド;NM_006158.4)		IL22(インターロイキ ン 22;NM_020525.4)
IGL(免疫グロブリン ラムダ遺伝子 座;NG_000002.1)			TRA(T 細胞受容体 アルファデルタ遺伝 子座;NG_001332.3)	NFATC3(活性化 T 細胞核内因子 3;NM_173165.2)		LRP8(LDL 受容体 関連タンパク質 8;NM_017522.4)
KIAA0125(配列類 似性を有するファミ リ-30 メンバー A;NR_026800.2)			UBE2L3(ユビキチン 結合酵素 E2 L3;NM_003347.3)	PCM1(中心子周辺 物質 1;NM_001315507.1)		LRRN3(ロインシンリッ チリピート神経 3;NM_018334.4)
MEF2C(筋細胞エン ハンサー因子 2C;NM_001308002. 1)			YME1L1(YME1 様 1 ATP アー ゼ;NM_001253866.1)	PCNX(pecanex ホモ ログ 1;NM_014982.2)		LTA(リンホトキシン アルファ 7;NM_000595.3)
MICAL3(微小管関 連モノオキシゲナー ゼ、カルボニンおよ び LIM ドメイン含有 3;NM_001136004.3)				PDXDC2(ピリドキサ ール依存性デカル ボキシラーゼドメイ ン含有 2、偽遺伝 子;NR_003610.1)		SGCB(サルコグリカ ンベータ(43kDa ジ ストロフィン関連糖 タンパク 質);NM_000232.4)
MS4A1(膜貫通 4- ドメイン A1;NM_021950.3)				PHC3(ポリホメオディ ックホモログ 3;NM_001308116.1)		SYNGR3(シナプト ギリ ン 3;NM_004209.5)
OSBPL10(オキシス テロール結合タン パク質様 10;NM_017784.4)				POLR2J2(RNA ポリ メラーゼ II サブユニ ット J2;NM_032959.5)		ZBTB32(ジンクフィ ンガーおよび BTB ドメイン含有 32;NM_014383.2)
PNOC(プレプロノシ				PSPC1(パラスペック		

10

20

30

40

【表 4 A - 5】

セプチン;NM_001284244.1)				ルコンポーネント 1;NM_001042414.2)		
QRSL1(グルタミニル-tRNA シンターゼ(グルタミン加水分解性)様 1;NM_018292.4)				REPS1(RALBP1 関連 Eps ドメイン含有 1;NM_001128617.2)		
SCN3A(ナトリウム電位開口型チャネルアルファサブユニット 3;NM_001081677.1)				RP11-74E24.2(ジクフィンガー-CCCH 型ドメイン含有様 NM_001271675.1)		
SLC15A2(溶質担体ファミリー15 メンバー 2;XM_017007074.1)				RPP38(リボヌクレアーゼ P/MRP サブユニット p38;NM_001265601.1)		
SPIB(Spi-B 転写因子;NM_001244000.1)				SLC7A6(溶質担体ファミリー7 メンバー 6;NM_003983.5)		
TCL1A(T 細胞白血病/リンパ腫 1A;NM_001098725.1)				SNRPN(核内低分子リボ核タンパク質ポリペプチド N;NM_022807.3)		
TNFRSF17(TNF 受容体スーパーファミリーメンバー 17;NM_001192.2)				ST3GAL1(ST3 ペクターガラクトシドアルファ-2,3-シアリルトランスフェラーゼ 1;NM_173344.2)		
				STX16(シンタキシン		

10

20

30

40

【表 4 A - 6】

					16:NM_001204868.1)			
					TIMM8A(ミトコンドリア内膜トランスロカ一ゼ 8 ホモログ A;NM_001145951.1)			
					TRAF3IP3(TRAF3 相互作用タンパク質 3;NM_001320144.1)			
					TXK(TXK チロシンキナーゼ;NM_003328.2)			
					USP9Y(ユビキチン特異的ペプチダーゼ 9、Y 連鎖;NG_008311.1)			

*各 GenBank 受託番号は列挙される遺伝子の代表的または例示的な GenBank 受託番号であり、その全体はあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれている。さらに、列挙される代表的または例示的な各受託番号は、特定の受託番号に特許請求の範囲を限定するものと解釈されてはならない。

【表 4 A－7】

表 4A 続き							
細胞型							
	Th2 細胞	TFH	Th17 細胞	TReg	CD8 T 細胞	Tgd	細胞傷害性細胞
ヒト遺伝子(遺伝子名:GenB	ADCY1(アデニル酸シクラーゼ 1;NM_001281768.1)	B3GAT1(ベーター1,3-グルクロニルトランスフェラーゼ 1;NM_018644.3)	IL17A(インターロイキン 17A;NM_002190.2)	FOXP3(フォークヘッドボックス P3;NM_014009.3)	ABT1(基本転写活性化因子 1;NM_013375.3)	C1orf61(第 1 染色体オーブンリーディングフレーム 61;NM_006365.2)	APBA2(アミロイドベータ前駆体タンパク質結合ファミリーA メンバー

10

20

30

40

【表 4 A - 8】

ank 受託 番号*)	BLR1(c-x-c ケモカ イン受容体型 5:EF444957.1)	IL17RA(インター ロイキン 17 受容 体 A:NM_014339.6)			AES(スプリットのア ミノ末端エンハンサ ー;NM_198969.1)	CD160(CD160 分 子;NM_007053.3)	2:NM_005503.3) APOL3(アポリポ タンパク質 L3:NM_014349.2)
AHI1(Abelson ヘ ルパー組み込み 部位 1:NM_001134831. 1)	BLR1(c-x-c ケモカ イン受容体型 5:EF444957.1)	IL17RA(インター ロイキン 17 受容 体 A:NM_014339.6)			AES(スプリットのア ミノ末端エンハンサ ー;NM_198969.1)	CD160(CD160 分 子;NM_007053.3)	2:NM_005503.3) APOL3(アポリポ タンパク質 L3:NM_014349.2)
AI582773(tn17d0 8.x1 NCI_CGAP_Brn25 Homo sapiens cDNA クロー ン;AI582773.1)	C18orf1(低密度リポ タンパク質受容体ク ラス A ドメイン含有 4:NM_181481.4)	RORC(RAR 関連 オーファン受容体 C:NM_001001523. 1)			APBA2(アミロイドベ ータ前駆体タンパク 質結合ファミリーA メンバー 2:NM_001130414.1)	FEZ1(線維束形 成・伸長タンパク 質ゼータ 1:AF123659.1)	CTSW(カテプシン W;NM_001335.3)
ANK1(アンキリン 1:NM_020476.2)	CDK5R1(サイクリン 依存性キナーゼ 5 制御サブユニット 1:NM_003885.2)				ARHGAP8(Rho GTP アーゼ活性化 タンパク質 8:NM_001198726.1)	TARP(TCR ガン マ代替リーディン グフレームタンパ ク 質;NM_00100380 6.1)	DUSP2(二重特 異性ホスファター ゼ 2:NM_004418.3)
BIRC5(バキキュロ ウイルス IAP リピ ート含有 5:NM_001012271. 1)	CHGB(クロモグラニ ン B;NM_001819.2)				C12orf47(MAPKAP K5 アンチセンス RNA 1:NR_015404.1)	TRD(T 細胞受容 体アルファデルタ 遺伝子 座;NG_001332.3)	GNLY(グラニュリ ン;NM_012483.3)
CDC25C(細胞分 裂サイクル 25C;NM_0013180 98.1)	CHI3L2(キチナーゼ 3 様 2:NM_001025199.1)				C19orf6(膜貫通タ ンパク質 259:NM_001033026. 1)	TRGV9(T 細胞受 容体ガンマ V 領 域 9;X:69385.1)	GZMA(グランザ イム A:NM_006144.3)
CDC7(細胞分裂 サイクル 7:NM_001134420. 1)	CXCL13(C-X-C モ チーフケモカインリ ガンド 13:NM_006419.2)				C4orf15(HAUS オ ーグミン様複合体 サブユニット 3:NM_001303143.1)		GZMH(グランザ イム H:NM_001270781. 1)

10

20

30

40

【表 4 A - 9】

CENPF(セントロ メアタンパク質 F;NM_016343.3)	HEY1(YRPW モチー フを有する hes 関連 ファミリー-bHLH 転 写因子 1;NM_001282851.1)			CAMLG(カルシウム 調節リガン ド;NM_001745.3)	KLRB1(キラ―細 胞レクチン様受 容体 B1;NM_002258.2)
CXCR6(キラ―細 胞レクチン様受 容体 B1;NM_002258.2)	HIST1H4K(ヒストン クラスター1 H4 ファ ミリーメンバー k;NM_003541.2)			CD8A(CD8a 分 子;NM_001768.6)	KLRD1(キラ―細 胞レクチン様受 容体 D1;NM_00111439 6.1)
DHFR(ジヒドロ葉 酸レダクター ゼ;NM_00129035 4.1)	ICA1(島細胞自己抗 原 1;NM_001136020.2)			CD8B(CD8b 分 子;NM_001178100.1)	KLRF1(キラ―細 胞レクチン様受 容体 F1;NM_00129182 2.1)
EVI5(エコトロピッ クウィルス組み 込み部位 5;NM_001308248. 1)	KCNK5(2 細孔ドメイ ンカリウムチャネル サブファミリー-K メン バー5;NM_003740.3)			CDKN2AIP(CDKN2 A 相互作用タンパ ク 質;NM_001317343.1)	KLRK1(キラ―細 胞レクチン様受 容体 K1;NM_007360.3)
GATA3(GATA 結 合タンパク質 3;NM_001002295. 1)	KIAA1324 (KIAA1324; NM_001284353.1)			DNAJB1(DnaJ 熱 ショックタンパク質 ファミリー-(Hsp40)メ ンバー B1;NM_001313964. 1)	NKG7(ナチュラル キラ―細胞顆粒 タンパク質 7;NM_005601.3)
GSTA4(グルタチ オン S-トランスフ ェラーゼアルファ 4;NM_001512.3)	MAF(MAF bZIP 転 写因 子;NM_001031804.2)			FLT3LG(fms 関連 チロシンキナーゼ 3 リガン ド;NM_001278638.1)	RORA(RAR 関連 オーフアン受容体 A;NM_134262.2)
HELLS(ヘリカー	MAGEH1(MAGE フ			GADD45A(増殖停	RUNX3(runt 関連

10

20

30

40

【表 4 A - 1 0】

ゼ、リンパ球特異的;NM_001289074.1)	アミラーゼ H1;NM_014061.4)				止・DNA 損傷誘導性アルブ ア;NM_001199742.1)	転写因子 3;NM_004350.2)
IL26(インターロイキン 26;NM_018402.1)	MKL2(MKL1/ミカ ルディン様 2;NM_014048.4)				GZMM(グランザイ ム M;NM_001258351.1)	SIGIRR(単一 Ig および TIR ドメ イン含 有;NM_001135054.1)
LAIR2(白血球関 連免疫グロブリン 様受容体 2;NM_021270.4)	MYO6(ミオシン VI;NM_001300899.1)				KLF9(クルッペル様 因子 9;NM_001206.2)	WHDC1L1(アクチ ン、ゴルジ膜、お よび微小管偽遺 伝子に関連する WAS タンパク質 ホモログ 3; NR_003521.1)
LIMA1(LIM ドメ インおよびアクチン 結合 1;NM_001243775.1)	MYO7A(ミオシン VIIA;NM_001127179.2)				LEPROTL1(レプ チン受容体重複転写 物様 1;NM_001128208.1)	ZBTB16(ジンクフ インガーおよび BTB ドメイン含 有;NM_001018011.1)
MB(ミオグロビ ン;NM_203377.1)	PASK(PAS ドメ イン含有セリン/スレ オニンキナー ゼ;NM_001252119.1)				LIME1(Lck 相互作 用膜貫通アダプタ ー1;NM_017806.3)	
MICAL2(微小管 関連モノオキシゲ ナーゼ、カルボニ ンおよび LIM ドメ イン含有 2;NM_001282663.1)	PDCD1(プログラム 細胞死 1;NM_005018.2)				MYST3(MYST ヒス トンアセチルトラン スフェラーゼ(単球 性白血 病);3;NM_006766.4)	

10

20

30

40

【表 4 A - 1 1】

NEIL3(nei 様 DNA グリコシラー ゼ 3:NM_018248.2)	POMT1(タンパク質 O-マンノシルトラン スフェラーゼ 1:NM_001136114.1)				PF4(血小板因子 4:NM_002619.3)		
PHEX(リン酸制 御エンドペプチダ ーゼホモログ、X 連 鎖:NM_000444.5)	PTPN13(非受容体 型タンパク質チロシ ンホスファターゼ 13:NM_080685.2)				PPP1R2(タンパク質 ホスファターゼ 1 制 御阻害因子サブユ ニット 2:NM_001291504.1)		
PMCH(プロメラニ ン濃縮ホルモ ン:NM_002674.3)	PVALB(バールブアル ブミ ン:NM_001315532.1)				PRF1(パーフォリン 1:NM_005041.4)		
PTGIS(12 シンタ ー ゼ:NM_000961.3)	SH3TC1(SH3 ドメイ ンおよびテトラトリコ ペプチドリポート 1:NM_018986.4)				PRR5(プロリンリッ チ 5:NM_181333.3)		
SLC39A14(溶質 担体ファミリー39 メンバー 14:NM_00113515 3.1)	SIRPG(シグナル制 御タンパク質ガン マ:NM_018556.3)				RBM3(RNA 結合モ チーフ(RNP1、 RRM)タンパク質 3:NM_006743.4)		
SMAD2(SMAD フ ァミリーメンバー 2:NM_001135937. 2)	SLC7A10(溶質担体 ファミリー7 メンバー 10:NM_019849.2)				SF1(スプライシング 因子 1:NM_004630.3)		
SNRPD1(核内低 分子リボ核タンパ ク質 D1 ポリペプ チ ド:NM_001291916 .1)	SMAD1(SMAD フア ミリーメンバー 1:NM_001003688.1)				SFRS7(セリン・アル ギニンリッチスプラ イシング因子 7:NM_001031684.2)		

10

20

30

40

【表 4 A - 1 2】

WDHD1(WD リピ ート・HMG ボック ス DNA 結合タン パク質 1;NM_001008396. 2)	ST8SIA1(ST8 アル ファ-N-アセチル-ノ イラミニドアルファ- 2,8-シアリルトランス フェラーゼ 1;NM_001304450.1)			SLC16A7(溶質担 体ファミリー-16 メン バー 7;NM_001270622.1)		
	STK39(セリン/スレ オニンキナーゼ 39;NM_013233.2)			TBCC(チューブリン フォールディングコ ファクター C;NM_003192.2)		
	THADA(THADA、ア ルマジロリピート含 有;NM_001271644.1)			THUMP1(THUMP ドメイン含有 1;NM_017736.4)		
	TOX(胸腺細胞選択 関連高移動度群ボ ックス;NM_014729.2)			TMC6(膜貫通チャ ネル様 6;NM_001321185.1)		
	TSHR(甲状腺刺激 ホルモン受容 体;NM_000369.2)			TSC22D3(TSC22ド メインファミリーメン バー 3;NM_001318470.1)		
	ZNF764(ジンクフィン ガータンパク質 764;NM_001172679. 1)			VAMP2(小胞結合 膜タンパク質 2;NM_014232.2)		
				ZEB1(ジンクフィン ガーE ボックス結合 ホメオボックス 1;NM_001128128.2)		
				ZFP36L2(ZFP36 リ ングフィンガータン パク質様)		

10

20

30

40

【表 4 B - 1】

表4B.本明細書において提供される方法で使用するための自然免疫細胞(iIC)遺伝子シグネチャームノマーカー。

ヒト遺伝子(遺伝子名;GenBank受託番号*)	細胞型				iDC
	NK 細胞	NK CD56dim 細胞	NK CD56bright 細胞	DC	
	A ADARB1(RNA 特異的アデノシンデアミナーゼ B1;NM_001112)	EDG8(スフィンゴシン-1-ホスフェート受容体 5;NM_001166215.1)	BG255923(リゾホスファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ 4;NM_153613.2)	CCL13(C-C モチーフケモカインリガンド 13;NM_005408.2)	ABCG2 (ATP 結合カセットサブファミリ- G(WHITE)、メンバー 2(Junior 血液型);NM_001257386.1)
	AF107846(神経内分泌特	FLJ20699(cDNA	DUSP4(二重特異性ホス	CCL17(C-C モチーフケ	

10

20

30

40

【表 4 B - 2】

異的ゴルジタンパク質 p55;AF107846.1)	FLJ20699 fis、クロ ン KAIA2372;AK000706.1)	ファターゼ 4;NM_057158.3)	モカインリガンド 17;NM_002987.2)	クターゼ B;NM_000713.2)
AL080130(cDNA DKFZp434E033(クローン DKFZp434E033 由 来);AL080130.1)	GTF3C1(基本転写因 子 IIIC サブユニット 1;NM_001286242.1)	FOXJ1(フォークヘッドボ ックス J1;NM_001454.3)	CCL22(C-C モチーフケ モカインリガンド 22;NM_002990.4)	CARD9(カスパーゼ動員 ドメインファミリーメンバ 9;NM_052814.3)
ALDH1B1(アルデヒドデヒ ドロゲナーゼ 1 ファミリーメ ンバーB1;NM_000692.4)	GZMB(グランザイム B;NM_004131.4)	MADD(MAP キナーゼ活 性化死ドメイ ン;NM_001135944.1)	CD209(CD209 分 子;NM_001144899.1)	CD1A(CD1a 分 子;NM_001763.2)
ARL6IP2(アトラスチン GTP アーゼ 2;NM_001330461.1)	IL21R(インターロイキ ン 21 受容 体;NM_181079.4)	MPED1(メタロホスホエ ステラーゼドメイン含有 1、 mRNA;NM_001044370.1)	HSD11B1(水酸化ステロ イド 11-ベータデヒドロゲ ナーゼ 1;NM_001206741.1)	CD1B(CD1b 分 子;NM_001764.2)
BCL2(アポトーシス制御因 子(BCL2);NM_000633.2)	KIR2DL3(2種の IgDメ インおよび長い細胞質 側末端をもつキラー細 胞免疫グロブリン様受 容体 3;NM_015868.2)	MUC3B(ムチン 3B 細胞 表面結合 型;JQ511939.1)	NPR1(ナトリウム利尿ペ プチド受容体 1;NM_000906.3)	CD1C(CD1c 分 子;NM_001765.2)
CDC5L(細胞分裂サイクル 5 様;NM_001253.3)	KIR2DS1(2種の IgDメ インおよび短い細胞質 側末端をもつキラー細 胞免疫グロブリン様受 容体 1;NM_014512.1)	NIBP(NIK および IKK ベ ータ結合タンパク 質;AY630619.1)	PPFIBP2(PPFIA 結合タ ンパク質 2;XR_930917.2)	CD1E(CD1e 分 子;NM_001185115.1)
FGF18(線維芽細胞増殖 因子 18;NM_003862.2)	KIR2DS2(2種の IgDメ インおよび短い細胞質 側末端をもつキラー細 胞免疫グロブリン様受 容体 2;NM_001291700.1)	PLA2G6(ホスホリパーゼ A2 グループ VI;NM_001004426.1)		CH25H(コレステロール 25-ヒドロキシラー ゼ;NM_003956.3)

10

20

30

40

【表 4 B - 3】

FUT5(フコシルトランスフェラーゼ 5;NM_002034.2)	KIR2DS5(2種の Igドメインおよび短い細胞質側末端をもつキラー細胞免疫グロブリン様受容体 5;NM_014513.2)	RRAD(Ras 関連解糖阻害因子およびカルシウムチャネル制御因子;NM_001128850.1)	CLEC10A(C 型レクチンドメインファミリー-10 メンバー-A;NM_001330070.1)
FZR1(fizzy/細胞分裂サイクル 20 関連 1;XM_005259573.4)	KIR3DL1(3種の Igドメインおよび長い細胞質側末端をもつキラー細胞免疫グロブリン様受容体 1;NM_013289.2)	SEPT6(セプチン 6;NM_145802.3)	CSF1R(コロニー刺激因子 1 受容体;NM_001288705.1)
GAGE2(G 抗原 2;NM_001127212.1)	KIR3DL2(3種の Igドメインおよび長い細胞質側末端をもつキラー細胞免疫グロブリン様受容体 2;NM_006737.3)	XCL1(X-C モチーフケモカインリガンド 1;NM_002995.2)	CTNS(シスチナジン、リソソームシスチントランスポーター;NM_001031681.2)
IGFBP5(インスリン様増殖因子結合タンパク質 5;NM_000599.3)	KIR3DL3(3種の Igドメインおよび長い細胞質側末端をもつキラー細胞免疫グロブリン様受容体 3;NM_153443.4)		F13A1(第 XIII 因子 a サブユニット;AH002691.2)
LDB3(LIM ドメイン結合 3;NM_001171611.1)	KIR3DS1(3種の Igドメインおよび短い細胞質側末端をもつキラー細胞免疫グロブリン様受容体 1;NM_001083539.2)		FABP4(脂肪酸結合タンパク質 4;NM_001442.2)
LOC643313(仮想タンパク質 LOC284701 と同様;XM_933043.1)	SPON2(スポンジン 2;NM_001199021.1)		FZD2(frizzled クラス受容体 2;NM_001466.3)
LOC730096(仮想タンパク質)	TMEPAI(アンドロゲン誘導性前立腺膜貫通		GSTT1(グルタチオン S-トランスフェラーゼシター

10

20

30

40

【表 4 B - 4】

LOC730096;NC_000022.9)	タンパク質 1;NM_199169.2)			1;NM_001293814.1)
MAPRE3(微小管関連タン パク質 RP/EB ファミリーメ ンバー3;NM_001303050.1)				GUCA1A(グアニル酸シク ラーゼ活性化因子 1A;NM_001319062.1)
MCM3AP(ミニ染色体維持 複合体成分 3 関連タンパ ク質;NM_003906.4)				HS3ST2(ヘパラン硫酸(グ ルコサミン)3-O-スルホト ランスフェラーゼ 2;NM_006043.1)
MRC2(マンノース受容体 C 2 型;NM_006039.4)				LMAN2L(マンノース結合 レクチン 2 様;NM_001322355.1)
NCR1(天然細胞傷害誘発 受容体 1;NM_001242357.2)				MMP12(マトリックスメタロ ペプチダーゼ 12;NM_002426.5)
NM_014114(PRO0097 タン パク質;NM_014114.1)				MS4A6A(膜貫通 4-ドメイ ン A6A;NM_001330275.1)
NM_014274(一過性受容体 電位カチオンチャネル、サ ブファミリー-V、メンバー 6;NM_014274.3)				NM_021941(第 21 染色体 オーブンリーディングフレ ーム 97;NM_021941.1)
NM_017616(KN モチーフお よびアンキリンリピートドメ イン 2;NM_015493.6)				NUDT9(nudix ヒドロラー ゼ 9;NM_001248011.1)
PDLIM4(PDZ および LIM ドメイン 4;NM_003687.3)				PPARG(ペルオキシソー ム増殖剤活性化受容体 ガンマ;NM_005037.5)
PRX(ペリアキシ ン;NM_020956.2)				PREP(プロリルエンドペプ チダーゼ;NM_002726.4)
PSMD4(プロテアソーム 26S サブユニット、非 ATP				RAP1GAP(RAP1 GTP ア ーゼ活性化タンパク

10

20

30

40

【表 4 B - 5】

アーゼ 4;NM_001330692.1)				質;NM_001330383.1)
RP5-886K2.1(神経線維タ ンパク質 AD7c-				SLC26A6(溶質担体ファミ リー-26 メンバー
NTP;AF010144.1)				6;NM_001281733.1)
SLC30A5(溶質担体ファミ リー-30 メンバー				SLC7A8(溶質担体ファミ リー-7 メンバー
5;NM_001251969.1)				8;NR_049767.1)
SMEK1(タンパク質ホスフ アターゼ 4 制御サブユニッ ト 3A;NM_001284280.1)				SYT17(シナプトタグミン 17;NM_001330509.1)
SPN(シアロホリ ン;NM_003123.4)				TACSTD2(腫瘍関連カル シウムシグナル伝達因子 2;NM_002353.2)
TBXA2R(トロノボキサン A2 受容体;NM_001060.5)				TM7SF4(樹状細胞発現 7 回膜貫通タンパク 質;NM_001257317.1)
TCTN2(tectonic ファミリー メンバー 2;NM_001143850.2)				VASH1(バソヒビン 1;NM_014909.4)
TINAGL1(尿細管間質性 腎炎抗原様 1;NM_001204415.1)				
XCL1(X-C モチーフケモカ インリガンド 1;NM_002995.2)				
XCL2(X-C モチーフケモカ インリガンド 2;NM_003175.3)				
ZNF205(ジンクフィンガー ンパク質 205;NM_001278158.1)				

10

20

30

40

【表 4 B - 6】

	ZNF528<ジンクフィンガー ンパク質 528;NM_032423.2>				
	ZNF747<ジンクフィンガー ンパク質 747;NM_023931.3>				

*各 GenBank 受託番号は列挙される遺伝子の代表的または例示的な GenBank 受託番号であり、その全体はあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれている。さらに、列挙される代表的または例示的な各受託番号は、特定の受託番号に特許請求の範囲を限定するものと解釈されてはならない。

【表 4 B - 7】

表 4B 続き						
細胞型						
	aDC	pDC	好酸球	マクロファージ	マスト細胞	好中球
ヒト遺伝子(遺伝子名; GenBank 受託番号*)	CCL1(ケモカイン(C-C モチーフ))リガンド 1:NM_002981)	IL3RA(インターロイキン 3 受容体サブユニットアルファ; NM_001267713.1)	ABHD2(アブヒドロラーゼドメイン含有) 2:NM_007011.7)	APOE(アポリポタンパク質) E:NM_001302691.1)	ABCC4(ATP 結合カセットサブファミリーCメンバー) 4:NM_001301829.1)	ALPL(アルカリホスファターゼ、肝臓/腎臓; NM_001127501.3)
	EBI3(エプスタイン・バーウイルス誘導性 3; NM_005755.2)		ACACB(アセチル-CoA カルボキシラーゼベータ) タ:NM_001093.3)	ATG7(オートファジー関連) 7:NM_001144912.1)	ADCYAP1(アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド) 1:NM_001117.4)	BST1(骨髄間質細胞抗原 1; NM_004334.2)
	INDO(インドールアミン-ピロロール 2,3 ジオキシゲナーゼ; AY221100.1)		C9orf156(tRNA メチルトランスフェラーゼ) O:NM_001330725.1)	BCAT1(分枝鎖アミノ酸トランスアミナーゼ) 1:NM_001178094.1)	CALB2(カルビンジン) 2:NM_001740.4)	CD93(CD93 分子; NM_012072.3)
	LAMP3(リソソーム)		CAT(カタラーゼ)	CCL7(C-C モチーフ)	CEACAM8(癌胎児抗原)	CEACAM3(癌胎児抗原)

10

20

30

40

【表 4 B - 8】

関連膜タンパク質 3;NM_014398.3)		ゼ;NM_001752.3)	ケモカインリガンド 7;NM_006273.3)	原関連細胞接着分 子 8;NM_001816.3)	原関連細胞接着分子 3;NM_001277163.2)
OAS3(2'-5'-オリゴ アデニル酸シンテ ターゼ 3;NM_006187.3)		CCR3(C-C モチーフ ケモカイン受容体 3;NM_178329.2)	CD163(CD163 分 子;NM_203416.3)	CMA1(キマーゼ 1、マ スト細 胞;NM_001308083.1)	CREB5(cAMP 応答エ レメント結合タンパク 質 5;NM_001011666.2)
		CLC(Charcot- Leyden 結晶ガレクチ ン;NM_001828.5)	CD68(CD68 分 子;NM_001040059.1)	CPA3(カルボキシペ プチダーゼ A3;NM_001870.3)	CRISPLD2(システイ ンリッチ分泌タンパク 質 LCCL ドメイン含有 2;NM_031476.3)
		CYSLTR2(システイニ ルロイコトリエン受容 体 2;NM_001308471.1)	CD84(CD84 分 子;NM_001184881.1)	CTSG(カテプシン G;NM_001911.2)	CSF3R(コロニー刺激 因子 3 受容 体;NM_172313.2)
		EMR1(EGF 様モジュ ール含有ムチン様ホ ルモン受容体様 1;DQ217942.1)	CHI3L1(キチナーゼ 3 様 1;NM_001276.2)	ELA2(好中球エラスタ ーゼ;EU617980.1)	CYP4F3(チトクロム P450 ファミリー-4 サブ ファミリー-F メンバー 3;NM_001199209.1)
		EPN2(エプシン 2;NM_001102664.1)	CHIT1(キチナーゼ 1;NM_001270509.1)	GATA2(GATA 結合タ ンパク質 2;NM_001145661.1)	DYSF(ジスフェリ ン;NM_001130455.1)
		GALC(ガラクトシルセ ラムミダー ゼ;NM_000153.3)	CLEC5A(C 型レクチ ンドメインファミリー-5 メンバー A;NM_001301167.1)	HDC(ヒスチジンデカ ルボキシラー ゼ;NM_002112.3)	FCAR(IgA 受容体の Fc 断 片;NM_133278.3)
		GPR44(オーファン G タンパク質共役受容 体;AF118265.1)	COL8A2(コラーゲン VIII 型アルファ 2 鎖;NM_001294347.1)	HPGD(ヒドロキシプロ スタグランジンデヒド ロゲナーゼ 15- (NAD);NM_001256307 .1)	FCGR3B(IgG 受容体 IIIb の Fc 断 片;NM_001271035.1)
		HES1(hes ファミリー	COLEC12(コレクチ	KIT(KIT 癌原遺伝子	FLJ11151(仮想タン

10

20

30

40

【表 4 B - 9】

	bHLH 転写因子 1;NM_005524.3)	ンサブファミリーメン バー 12;NM_130386.2)	受容体チロシンキナ ーゼ;NM_000222.2)	パク質 FLJ11151;BC006289. 2)
	HIST1H1C(ヒストンク ラスター1 H1 ファミリ ーメンバー c;NM_005319.3)	CTSK(カチプシン K;NM_000396.3)	LOC339524(長い遺 伝子間非タンパク質 コード RNA 1140;NR_026985.1)	FPR1(ホルミルペプチ ド受容体 1;NM_001193306.1)
	HRH4(ヒスタミン受容 体 H4;NM_001143828.1)	CXCL5(C-X-C モチ ーフケモカインリガン ド 5;NM_002994.4)	LOH11CR2A(BCSC- 1 アイソフォー ム;AY366508.1)	FPRL1(ホルミルペプ チド受容体様受容 体;M84562.1)
	IGSF2(免疫グロブリン スーパーファミリー ー、メンバー 2;BC130327.1)	CYBB(チトクロム b- 245 ベーター 鎖;NM_000397.3)	MAOB(モノアミンオキ シダーゼ B;NM_000898.4)	G0S2(G0/G1 スイッチ 2;NM_015714.3)
	IL5RA(インターローイ キン 5 受容体サブユ ニットアルファ A;NM_001243099.1)	DNASE2B(デオキシ リボヌクレアーゼ 2 ベーター;NM_058248.1)	MLPH(メラノフィリ ン;NM_001042467.2)	HIST1H2BC(ヒストン クラスター1 H2B ファ ミリーメンバー c;NM_003526.2)
	KBTBD11(ケルチリピ ートおよび BTB ドメ イン含有 11;NM_014867.2)	EMP1(上皮膜タンパ ク質 1;NM_001423.2)	MPO(ミエロペルオキ シダー ゼ;NM_000250.1)	HPSE(ヘパラナー ゼ;NM_001098540.2)
	KCNH2(カリウム電位 開口型チャネル、サ ブファミリーH(eag 関 連)、メンバー 2;NM_000238.3)	FDX1(フェレドキシン 1;NM_004109.4)	MS4A2(膜貫通 4-ドメ イン A2;NM_001256916.1)	IL8RA(インターローイ キン 8 受容体アルファ A;L19591.1)
	LRP5L(LDL 受容体 関連タンパク質 5 様;NM_001135772.1)	FN1(フィブロネクチ ン 1;NM_001306131.1)	NM_003293(トリプター ゼアルファ/ベータ 1;NM_003294.3)	IL8RB(インターローイ キン 8 受容体型 B;U11878.1)
	MYO15B(ミオシン)	GM2A(GM2 ガングリ ド 2;NM_001306131.1)	NR0B1(核受容体サ ブファミリー 1;NM_001306131.1)	KCNJ15(カリウム電 位依存性 K ⁺ チャンネル 1;NM_001306131.1)

10

20

30

40

【表 4 B - 1 0】

XVB;NM_001309242.1)	オシド活性化因子;NM_000405.4)	ブファミリー0 グループ B メンバー 1;NM_000475.4)	位開口型チャネルサブファミリーJ メンバー 15;NM_001276438.1)
RCOR3(REST コリプレッサー 3;NM_001136224.2)	GPC4(グリピカン 4;NM_001448.2)	PGDS(造血性プロスタグランジン D シンターゼ;NM_014485.2)	KIAA0329(テクトニンベータープロペラリピート含有 2;NM_014844.4)
RNASE2(リボヌクレアーゼ A ファミリーメンバー 2;NM_002934.2)	KAL1(アノスミン 1;NM_000216.3)	PPM1H(タンパク質ホスファターゼ、Mg ²⁺ /Mn ²⁺ 依存性 1H;NM_020700.1)	LILRB2(白血球免疫グロブリン様受容体 B2;NR_103521.2)
RNU2 (U2 snRNA; U57614.1)	MARCO(コラーゲン構造を有するマクロファージ受容体;NM_006770.3)	PRG2(プロテオグリカン2、前駆型好酸球主要塩基性タンパク質;NM_001302927.1)	MGAM(マルターゼ-グルコアミラーゼ;NM_004668.2)
RRP12(リボソームRNA プロセシング 12 ホモログ;NM_001284337.1)	ME1(リンゴ酸酵素 1;NM_002395.5)	PTGS1(プロスタグランジン-エンドペルオキシドシンターゼ 1;NM_000962.3)	MME(膜メタロエンドペプチダーゼ;NM_007289.2)
SIAH1(siah E3 エビキチンタンパク質リガーゼ 1;NM_003031.3)	MS4A4A(膜貫通 4-ドメイン A4A;NM_001243266.1)	SCG2(セクレトグラニン II;NM_003469.4)	PDE4B(ホスホジエステラーゼ 4B;NM_001297440.1)
SMPD3(スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ 3;NM_018667.3)	MSR1(マクロファージスカベンジャー受容体 1;NM_138716.2)	SIGLEC6(シアル酸結合 Ig 様レクチン 6;NM_198845.5)	S100A12(S100 カルシウム結合タンパク質 A12;NM_005621.1)
SYNJ1(シナプトジャーニン 1;NM_001160302.1)	PCOLCE2(プロコラーゲン C-エンドペプチダーゼエンハンサー 1;NM_001160302.1)	SLC18A2(溶質担体 ファミリー18 メンバー A2;NM_003054.4)	SIGLEC5(シアル酸結合 Ig 様レクチン 5;NM_003830.3)

10

20

30

40

【表 4 B - 1 1】

			一2;NM_013363.3)		
		TGIF1(TGFB 誘導性 因子ホモオボックス 1;NM_174886.2)	PTGDS(プロスタグラ ンジン D2 シンター ゼ;NM_000954.5)	SLC24A3(溶質担体 ファミリー-24 メンバー 3;NM_020689.3)	SLC22A4(溶質担体 ファミリー-22 メンバー 4;NM_003059.2)
		THBS1(トロンボスポ ンジン 1;NM_003246.3)	RAI14(レチノイン酸 誘導性 14;NM_001145525.1)	TAL1(T 細胞急性リ ンパ球性白血病 1;X51990.1)	SLC25A37(溶質担体 ファミリー-25 メンバー 37;NM_001317812.1)
		THBS4(トロンボスポ ンジン 4;NM_001306213.1)	SCARB2(スカベンジ ヤー受容体クラス B メンバー 2;NM_001204255.1)	TPSAB1(トリプターゼ アルファ/ベータ 1;NM_003294.3)	TNFRSF10C(TNF 受 容体スーパーファミリ ーメンバー 10c;NM_003841.3)
		TIPARP(TCDD 誘導 性ポリ(ADP-リボ ス)ポリメラ ーゼ;NM_001184718.1)	SCG5(セクレトグラニ ン V;NM_001144757.2)	TPSB2(トリプターゼ ベータ 2;NM_024164.5)	VNN3(パニン 3;NM_001291703.1)
		TKTL1(トランスケトラ ーゼ様 1;NM_001145934.1)	SGMS1(スフィンゴミ エリンシンターゼ 1;NM_147156.3)		
			SULT1C2(スルホトラ ンスフェラーゼファミ リー-1C メンバー 2;NM_176825.2)		

*各 GenBank 受託番号は列挙される遺伝子の代表的または例示的な GenBank 受託番号であり、その全体はあらゆる目的のために参照により本
明細書に組み込まれている。さらに、列挙される代表的または例示的な各受託番号は、特定の受託番号に特許請求の範囲を限定するものと解釈
されてはならない。

【表 5】

表5.本明細書において提供される方法で使用するための個々のイムノマーカー。

遺伝子名	略称	GenBank受託番号*
プログラム死リガンド1	PDL1	NM_014143
プログラム死リガンド 2	PDL2	AY254343
プログラム細胞死1	PDCD1	NM_005018
細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4	CTLA4	NM_005214

*各 GenBank 受託番号は列挙される遺伝子の代表的または例示的な GenBank 受託番号であり、その全体はあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれている。さらに、列挙される代表的または例示的な各受託番号は、特定の受託番号に特許請求の範囲を限定するものと解釈されてはならない。

【 0 1 7 6 】

10

20

【表 6】

表6.本明細書において提供される方法で使用するためのインターフェロン(IFN)遺伝子。

遺伝子名	略称	GenBank受託番号*
ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド10	CXCL10	NM_001565
C-X-Cモチーフケモカインリガンド9	CXCL9	NM_002416
インターフェロンアルファ誘導性タンパク質27	IFI27	NM_001130080
テトラトリコペプチドリピートを有するインターフェロン誘導性タンパク質1	IFIT1	NM_001548
テトラトリコペプチドリピートを有するインターフェロン誘導性タンパク質2	IFIT2	NM_001547
テトラトリコペプチドリピートを有するインターフェロン誘導性タンパク質3	IFIT3	NM_001549
MXダイナミン様GTPアーゼ1	MX1	NM_001144925
MXダイナミン様GTPアーゼ2	MX2	XM_005260983
2'-5'-オリゴアデニル酸シンテターゼ1	OAS1	NM_016816
2'-5'-オリゴアデニル酸シンテターゼ2	OAS2	NM_016817
シグナル伝達因子兼転写活性化因子1	STAT1	NM_007315
シグナル伝達因子兼転写活性化因子2	STAT2	NM_005419

*各 GenBank 受託番号は列挙される遺伝子の代表的または例示的な GenBank 受託番号であり、その全体はあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれている。さらに、列挙される代表的または例示的な各受託番号は、特定の受託番号に特許請求の範囲を限定するものと解釈されてはならない。

【 0 1 7 7 】

【表 7】

表7.本明細書において提供される方法で使用するためのMHCクラスII遺伝子。

名称	略称	GenBank受託番号*
CD74	Homo sapiens CD74 分子(CD74)	NM_001025159
CIITA	クラスII主要組織適合抗原トランス活性化因子	NM_001286402
CTSH	カテプシンH	NM_004390
HLA-DMA	Homo sapiens主要組織適合抗原クラスII、DMアルファ	NM_006120
HLA-DPA1	Homo sapiens 主要組織適合抗原クラスII、DP アルファ 1	NM_033554
HLA-DPB1	ヒト MHC クラス II リンパ球抗原(HLA-DP) ベータ鎖	M83664
HLA-DQA1	Homo sapiens 主要組織適合抗原クラスII、DQ アルファ 1	NM_002122
HLA-DRB1	Homo sapiens 主要組織適合抗原クラスII、DR ベータ 1	NM_002124
HLA-DRB5	Homo sapiens 主要組織適合抗原クラスII、DR ベータ 5	NM_002125
HLA-DRB6	Homo sapiens 主要組織適合抗原クラスII、DR ベータ 6	NR_001298
NCOA1	Homo sapiens 核受容体共活性化因子 1	NM_003743

*各 GenBank 受託番号は列挙される遺伝子の代表的または例示的な GenBank 受託番号であり、その全体はあらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれている。さらに、列挙される代表的または例示的な各受託番号は、特定の受託番号に特許請求の範囲を限定するものと解釈されてはならない。

【0178】

一実施形態では、患者のS/Q肺がんサブタイプの判定が、本明細書において提供される方法および分類指標バイオマーカーパネルまたはそのサブセットのいずれかを使用して単独で、または、本明細書において提供される1つもしくは複数の免疫細胞マーカーの発現の判定と組み合わせて行われたら、その患者は、免疫療法剤を用いた処置のために選択されるか、またはこれを投与される。免疫療法剤は、チェックポイント阻害剤、モノクローナル抗体、生体応答修飾因子、治療用ワクチン、または細胞免疫療法であり得る。

【0179】

別の実施形態では、免疫療法剤はチェックポイント阻害剤である。一部の 경우에는、1

10

20

30

40

50

つまたは複数のチェックポイント阻害剤に対する応答の尤度を判定するための方法が提供される。一実施形態では、チェックポイント阻害剤は、PD-1/PD-L1チェックポイント阻害剤である。PD-1/PD-L1チェックポイント阻害剤は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、ランプロリズマブ、またはアベルマブであり得る。一実施形態では、チェックポイント阻害剤は、CTLA-4チェックポイント阻害剤である。CTLA-4チェックポイント阻害剤は、イピリムマブまたはトレメリムマブであり得る。一実施形態では、チェックポイント阻害剤は、例えば、1つまたは複数のCTLA-4チェックポイント阻害剤と組み合わせて使用される1つまたは複数のPD-1/PD-L1チェックポイント阻害剤の組合せなどの、チェックポイント阻害剤の組合せである。

10

【0180】

一実施形態では、免疫療法剤はモノクローナル抗体である。一部の場合では、1つまたは複数のモノクローナル抗体に対する応答の尤度を判定するための方法が提供される。モノクローナル抗体は、腫瘍細胞に対するもの、または腫瘍産物に対するものであり得る。モノクローナル抗体は、パニツムマブ、マツズマブ、ネシツムマブ (necitumunab)、トラスツズマブ、アマツキシマブ、ベバシズマブ、ラムシルマブ、バビツキシマブ、パトリツマブ、リロツムマブ、セツキシマブ、immu-132、またはデミシズマブであってもよい。

【0181】

さらに別の実施形態では、免疫療法剤は治療用ワクチンである。一部の場合では、1つまたは複数の治療用ワクチンに対する応答の尤度を判定するための方法が提供される。治療用ワクチンは、ペプチドまたは腫瘍細胞ワクチンであり得る。ワクチンは、MAGE-3抗原、NY-ESO-1抗原、p53抗原、サバイビン抗原、またはMUC1抗原を標的とし得る。治療用がんワクチンは、GVAX (GM-CSF遺伝子をトランスフェクトした腫瘍細胞ワクチン)、ベラゲンブマツセル-L (TGF-β2アンチセンスプラスミドで修飾し、放射線照射した4種のNSCLC細胞株を用いて作製された同種腫瘍細胞ワクチン)、MAGE-A3ワクチン (MAGE-A3タンパク質およびアジュバントAS15からなる)、(1)-BLP-25抗MUC-1 (腫瘍細胞で発現するMUC-1を標的とする)、CimaVax EGF (担体タンパク質にコンジュゲートされたヒト組換え上皮増殖因子 (EGF) からなるワクチン)、WT1ペプチドワクチン (4種のウィルムス腫瘍抑制遺伝子アナログペプチドからなる)、CRS-207 (ヒトメソテリンをコードする生弱毒化 *Listeria monocytogenes* ベクター)、Bec2/BCG (抗GD3抗体を誘導する)、GV1001 (ヒトテロメラーゼ逆転写酵素を標的とする)、テルゲンブマツセル-L (tergenpumatu cel-L) (免疫系が強く応答するマウス遺伝子を含むように遺伝子修飾されたヒト肺がん細胞からなる)、TG4010 (MUC1抗原を標的とする)、ラコツモマブ (複数のヒトがんにおいて発現するNGcGM3ガングリオシドを模倣する抗イディオタイプ抗体)、テセモチド (リボソームBLP25; MUC1のタンデムリピート領域から作製されたリボソームベースのワクチン)、またはDRibble (9つのがん抗原に加えてTLRアジュバントから作製されたワクチン) であり得る。

20

30

40

【0182】

一実施形態では、免疫療法剤は生体応答修飾因子である。一部の場合では、1つまたは複数の生体応答修飾因子に対する応答の尤度を判定するための方法が提供される。生体応答修飾因子は、例えば、PF-3512676 (CpG 7909) (toll様受容体9アゴニスト)、CpG-ODN 2006 (Tregを下方制御する)、Bacillus Calmette-Guerin (BCG)、mycobacterium vaccae (SRL172) (現在アジュバントとして頻繁に試験されている非特異的免疫刺激薬) など、炎症を誘発し得る。生体応答修飾因子は、例えば、IL-2+腫瘍壊死因子アルファ (TNF-α) またはインターフェロンアルファ (T細胞増殖を誘導する)、インターフェロンガンマ (腫瘍細胞アポトーシスを誘導する)、またはMda-7

50

(IL-24) (Mda-7/IL-24は、腫瘍細胞アポトーシスを誘導し、腫瘍血管新生を阻害する)などのサイトカイン療法であってもよい。生体応答修飾因子は、例えば顆粒球コロニー刺激因子などのコロニー刺激因子であってもよい。生体応答修飾因子は、例えば、マルチターゲットVEGFR：サリドマイドおよびアナログ、例えばレナリドマイドおよびボマリドミド、シクロホスファミド、シクロスポリン、デニロイキンジフチトクス、タラクトフェリン、トラベクテジン (trabectedin) または全トランス型レチノイン酸 (retinoic acid) などの多面的エフェクターであってもよい。

【0183】

一実施形態では、免疫療法は細胞免疫療法である。一部の場合では、1つまたは複数の細胞治療剤に対する応答の尤度を判定するための方法が提供される。細胞免疫療法剤は、樹状細胞 (DC) (腫瘍抗原が負荷された *ex vivo* で生成された DC ワクチン)、T細胞 (*ex vivo* で生成されたリンホカイン活性化キラー細胞；サイトカイン誘導性キラー細胞；活性化T細胞；ガンマデルタT細胞)、またはナチュラルキラー細胞であり得る。

【0184】

一部の場合では、特定のサブタイプのSQは、異なるレベルの免疫活性化 (例えば、自然免疫および/または適応免疫) を有するため、免疫活性化 (例えば、自然免疫および/または適応免疫) が上昇しているまたは検出可能であるサブタイプが、本明細書に記載される1つまたは複数の免疫療法剤による処置のために選択される。一実施形態では、古典的サブタイプのSQは、他のSQサブタイプまたは肺がんサブタイプと比較して低い免疫活性化を有する。一部の場合では、特定のサブタイプのSQは、高レベルまたは上昇したレベルの免疫活性化を有する。一部の場合では、分泌性サブタイプのSQは、他のSQサブタイプまたは肺がんサブタイプと比較して上昇したレベルの免疫活性化 (例えば、自然免疫および/または適応免疫) を有する。一実施形態では、免疫活性化 (例えば、自然免疫および/または適応免疫) のレベルが低いまたは全くないSQサブタイプは、本明細書に記載される1つまたは複数の免疫療法剤による処置のために選択されない。

【0185】

検出法

一実施形態では、本明細書において提供される方法および組成物は、対象から得られた肺がん試料 (例えば扁平上皮癌の肺がん試料) 中の少なくとも1種の核酸の検出を可能にする。少なくとも1種の核酸は、本明細書において提供される分類指標バイオマーカーであり得る。一実施形態では、本明細書において提供される方法および組成物を使用して検出される少なくとも1種の核酸は、表1から選択される。一実施形態では、対象から得られた肺がん試料中の核酸 (例えば、分類指標バイオマーカー) を検出する方法は、本明細書において提供される方法のうちのいずれかを使用して少なくとも1種または複数のバイオマーカーの発現レベルを測定するステップを含むか、それからなるか、またはそれから本質的になる。バイオマーカーは、表1から選択され得る。一部の場合では、複数のバイオマーカー核酸は、表1の少なくとも2種のバイオマーカー核酸、少なくとも10種のバイオマーカー核酸、少なくとも20種のバイオマーカー核酸、少なくとも30種のバイオマーカー核酸、少なくとも40種のバイオマーカー核酸、少なくとも50種のバイオマーカー核酸、少なくとも60種のバイオマーカー核酸、少なくとも70種のバイオマーカー核酸、または80種すべてのバイオマーカー核酸を含むか、それらから本質的になるか、またはそれらからなる。検出は、核酸レベルでなされてもよい。検出は、本明細書に開示される任意の増幅、ハイブリダイゼーション、および/または配列決定アッセイを使用することによりなされてもよい。

【0186】

別の実施形態では、本明細書において提供される方法および組成物は、対象から得られた肺がん試料 (例えば扁平上皮癌の肺がん試料) 中の少なくとも1種の核酸または複数の核酸の検出を可能にし、その結果、少なくとも1種の核酸または複数の核酸は、表1に列挙されるバイオマーカーから選択され、存在、非存在、および/または発現レベルが免疫

活性化を示す一組のバイオマーカーから少なくとも1種のバイオマーカーの検出が行われる。免疫活性化を示す一組のバイオマーカーは、適応免疫細胞（A I C）（例えば、表4 A）および／または自然免疫細胞（I I C）（例えば、表4 B）、個々の免疫バイオマーカー（例えば、表5）、インターフェロン遺伝子（例えば、表6）、主要組織適合抗原クラスII（M H C I I）遺伝子（例えば、表7）、またはそれらの組合せであり、かつ／またはこれらの遺伝子発現シグネチャーであってもよい。I I CおよびA I Cの両方の遺伝子発現シグネチャーは、例えば、Bindeaら（Immunity、2013年；39巻（4号）；782～795頁）に列挙されている遺伝子シグネチャーなど、当技術分野で公知の任意の遺伝子シグネチャーであってもよい。検出は、核酸レベルでなされてもよい。検出は、本明細書に開示される任意の増幅、ハイブリダイゼーション、および／または配列決定アッセイを使用することによりなされてもよい。

10

【0187】

キット

本発明の方法を実践するためのキットがさらに提供され得る。「キット」とは、本発明のバイオマーカーの発現を特異的に検出するための少なくとも1種の試薬、例えば抗体、核酸プローブまたはプライマーなどを含む任意の製造品（例えば、パッケージまたは容器）を企図する。このキットは、本発明の方法を行うためのユニットとして宣伝されても、配布されても、または販売されてもよい。さらにこのキットは、キットおよびその使用のための方法を説明する添付文書を含んでいてもよい。

【0188】

一実施形態では、本発明の方法を実践するためのキットが提供される。かかるキットには、手動および自動の両方の免疫細胞化学技術（例えば細胞染色）との適合性がある。これらのキットは、目的のバイオマーカーに対する少なくとも1種の抗体と、バイオマーカーに結合する抗体の検出のための化学物質と、対比染色液と、任意選択で、陽性染色細胞の特定を容易にするための青味剤とを含む。本発明の実践においては、抗原-抗体の結合を検出する任意の化学物質を使用してよい。これらのキットは、本発明の方法で使用するための、少なくとも2種、少なくとも3種、少なくとも4種、少なくとも5種、少なくとも6種、少なくとも7種、少なくとも8種、少なくとも9種、少なくとも10種、またはそれよりも多くの抗体を含み得る。

20

【実施例】

【0189】

以下の実施例を参照することにより本発明をさらに例示する。しかしながら、これらの実施例は上述の実施形態のように例示的であり、本発明の範囲をいかようにも制限するものと解釈されてはならないことに留意されたい。

30

【0190】

（実施例1）

肺扁平上皮癌内因性サブタイプ間の免疫細胞活性化の差およびCD274（PD-L1）発現との変動のある相関。

序論

肺扁平上皮癌（SQ）における遺伝子発現ベースのサブタイピングは、変動のある生物学的および臨床的特徴を有する異なるサブタイプにSQ腫瘍を分類する。遺伝子発現ベースのサブタイピングは、肺SQの4つのサブタイプである未分化、古典的、基底、および分泌性（1、2）を一貫して特定した（図1参照）。SQサブタイプは、ゲノム変化、腫瘍ドライバー、予後、および種々の療法に対する可能性の高い応答における肝要な差を明示する（1～2）。

40

【0191】

方法

過去に公開されているBindeaら（3）の免疫細胞遺伝子シグネチャー（合計24種）およびSQサブタイピング遺伝子発現シグネチャー（1～2）を使用し、SQサブタイプに関連する免疫細胞の特徴について、いくつかの公的に利用可能な肺SQデータセット（1

50

～2および4～5)、ならびに最近収集された1つの遺伝子発現データセット(図2参照)を検査した。このサブタイプによる免疫の差の精査では、各々異なる数の遺伝子を有し、適応または自然免疫細胞シグネチャーと分類されたBindeaら[3]の24種の免疫細胞遺伝子シグネチャー(表4A～4B参照)を使用した。適応免疫細胞(AIC)シグネチャー(表4A)は、T細胞、セントラルメモリーT細胞(Tcm)、エフェクターメモリーT細胞(Tem)、Tヘルパー細胞(Th)、1型Tヘルパー細胞(Th1)、2型Tヘルパー細胞(Th2)、濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)、Tヘルパー17細胞(Th17)、制御性T細胞(Treg)、ガンマデルタT細胞(Tgd)、CD8 T細胞、細胞傷害性T細胞、B細胞を含み、自然免疫細胞(IIC)シグネチャー(表4B)は、ナチュラルキラー(NK)、NK CD56dim細胞、NK CD56bright細胞、樹状細胞(DC)、未成熟樹状細胞(iDC)、樹状細胞(pDC)、活性化樹状細胞(aDC)、マスト細胞、好酸球、マクロファージ、および好中球を含んだ。自然免疫細胞(IIC)および適応免疫細胞(AIC)の両方の遺伝子発現シグネチャーに加えて、13遺伝子IFNシグネチャー(IFN;表6)、13遺伝子MHCクラスIIシグネチャースコア(Forero[6];表7)、ならびに表5の単一遺伝子免疫バイオマーカー(CTLA4、PDCD1、CD274(PD-L1)、およびPDCD1LG2(PD-L2))を4種のSQブタイプ(未分化、古典的、分泌性、基底)において検査した。

【0192】

SQについては、TCGA[2]、Leeら[4]、Raponiら[5]、およびWilkersonら[1]を含む、合計762人の患者の肺扁平上皮癌試料の4つの公開されている遺伝子発現データセットを使用した。TCGAについては、上位分位点正規化RSEMデータをFirehoseからダウンロードし、log2変換した。Leeら[4](GSE8894)およびRaponiら[5](GSE4573)に関しては、正規化されたAffyアレイデータをGEOからダウンロードし、Wilkersonら[1](GSE17710)に関しては、正規化されたAgilentアレイデータをGEOからダウンロードした。

【0193】

扁平上皮癌サブタイプ(基底、古典的、未分化、分泌性)を判定するために、過去にWilkersonら[1]において記載された公開されている208遺伝子最近隣重心分類指標を使用した。シグネチャー中の遺伝子の中央値センタリングを行った後、相関(ピアソン)が最大であった重心に対応するサブタイプを各試料に割り当てた。

【0194】

扁平上皮癌のTCGAデータを使用し、マーカーを階層的クラスタリングにより順序付けしたペアワイズのスピアマン順位相関係数行列をプロットすることにより、30種のマーカー間の相関を査定した(図4参照)。サブタイプによる全体的な免疫性マーカーの傾向を精査するため、試料をサブタイプにより並べ、Bindeaら[3]における順序付けに従ってマーカーをグループ分けした発現ヒートマップをプロットした(図3参照)。サブタイプ間の免疫性マーカーの差の再現性を評価するため、各データセットで正規化されたT細胞シグネチャーをサブタイプ別にプロットした(図5参照)。

【0195】

線形回帰を使用し、腫瘍サブタイプおよびCD274発現との免疫細胞シグネチャーの関連性を評価した。より明確に述べると、免疫マーカーの予測因子としてのサブタイプの予測強度をPD-L1のものと比べて査定するために、サブタイプを唯一の予測因子とし、そしてまたPD-L1を唯一の予測因子として、各シグネチャーの線形回帰モデルをTCGAデータセットに当てはめた。PD-L1発現は、各群内で等しい割合の低/中/高のカテゴリー変数として扱った。PD-L1が予測因子である場合にサブタイプが調整済み決定係数に対する予測因子であるときの調整済み決定係数の散布プロットを、全体的な傾向について調べた(図6参照)。

【0196】

TCGA扁平上皮癌の補足情報(Lawrence、2013年)において入手可能なMb当たりの非サイレント突然変異量データを使用し、突然変異量-T細胞発現の関連性を、それ

10

20

30

40

50

ぞれクラスカルウォリス検定およびスピアマン相関係数を使用して精査した。TCGA扁平上皮癌について、クラスカルウォリス検定を使用してNF E 2 L 2 サブタイプの関連性を評価した。SQのNF E 2 L 2 がサブタイプに合わせた調整後に関連性の証拠を示したかどうかを試験するため、SQのNF E 2 L 2 発現を唯一の予測因子として用いたT細胞発現の線形モデルの当てはめを行い、サブタイプに合わせた調整後に再度行った。

【0197】

リスト（表7）中のすべての遺伝子の平均として算出された、13遺伝子MHCクラスIIシグネチャー [Forero [6] ; 表7とサブタイプおよび免疫シグネチャーの関連性を、クラスカルウォリス検定を使用して精査した。免疫シグネチャー-MHCクラスIIの関連性については、スピアマン相関係数を算出した。

10

【0198】

免疫シグネチャーの階層的クラスタリングおよびペアワイズのシグネチャーの相関も解析した。各データセットにおいて異なるベースラインハザードを可能にする層別cox比例ハザードモデルを用い、ステージI~III試料の生存期間とシグネチャーの関連性を評価した。より明確に述べると、cox比例ハザードモデルを使用して、TCGAデータセットにおける免疫マーカー生存期間の関連性を、全体的に、また各サブタイプ内で別々に試験した。平均0および分散1となるように免疫マーカーのセンタリングおよびスケールリングを行い、ステージIV患者は除外した。特定のサブタイプ内の評価はステージに合わせて調整し、全体的評価はステージおよびサブタイプの両方に合わせて調整した。各シグネチャーについてハザード比および信頼区間を示すフォレストプロットを作成した（図7Aおよび7B参照）。統計解析はすべて、R 3.2.0ソフトウェア (<http://www.R-project.org>) を使用して遂行した。

20

【0199】

結果

免疫細胞遺伝子シグネチャーのヒートマップ解析および教師なし階層的クラスタリングにより、SQの内因性サブタイプが分離された（図3および4参照）。免疫細胞遺伝子シグネチャー（AICおよびIICの両方）ならびに個々の免疫遺伝子マーカーの検査により、SQサブタイプ間の明らかな差が明らかになった（図3参照）。

【0200】

SQサブタイプの中でも分泌性サブタイプは、未分化および分泌性の両方が同等の発現を有したTh2シグネチャーという1つの例外を除いては、自然免疫細胞および適応免疫細胞の両方の一貫して高い免疫細胞発現を示した（図21）。古典的サブタイプは、すべてのSQサブタイプの中で最も低い免疫細胞発現を明示した。ADサブタイプの場合とは異なり、SQサブタイプにおけるCD274（PD-L1）発現は他の免疫細胞の発現と相関しなかった。これは、他の免疫細胞の発現が比較的低いにもかかわらずCD274（PD-L1）発現が高かった古典的サブタイプにおいてとりわけ明白である（図3および図21参照）。全体的に、免疫活性化は、自然免疫細胞ならびに適応免疫細胞の両方の活性化を明示した分泌性サブタイプのSQにおいて最も顕著であった。対照的に、古典的サブタイプのSQは、より低い免疫活性化を明示した。

30

【0201】

階層的クラスタリングを使用すると、相関行列により、適応免疫細胞および自然免疫細胞のクラスタリングが明らかになった（図4参照）。SQでは、T細胞、細胞傷害性細胞、CD8細胞、Th1細胞、PD CD 1、CTLA 4、およびTregなどの適応免疫特徴は高いペアワイズの相関を有し、iDC、DC、マクロファージ、好中球、マスト細胞、および好酸球を含む自然免疫細胞も同様に相関している（図4）。さらに、SQにおいてNK CD 56 dim細胞（細胞溶解活性）は自然免疫細胞よりも適応免疫細胞との強い相関を示した（図4参照）。加えて、SQにおいてTFHおよびB細胞は適応免疫特徴とのより強い相関を示した（図4参照）。

40

【0202】

適応免疫細胞シグネチャーとCD274（PD-L1）発現の関連性強度をSQサブタ

50

イブと比較した。図 6 に示されるように、S Q 腫瘍において、検査したすべての適応免疫細胞で、サブタイプは、C D 2 7 4 (P D - L 1) 発現よりも免疫細胞発現の良好な予測因子であった (F 検定 p 値の中央値および調整済み決定係数は、サブタイプでは 2.16×10^{-24} および 0.20 に対し、C D 2 7 4 では 1.86×10^{-9} および 0.07 であった)。

【0203】

免疫細胞シグネチャーは、T C G A データセットにおいて主に評価したが、免疫細胞シグネチャーにより測定された S Q サブタイプの免疫の差は複数のデータセット間で極めて再現性が高いことが見出された (図 5 参照)。S Q サブタイプ別の T 細胞における免疫細胞シグネチャー発現のサブタイプ別差は、冷凍試料および F F P E 試料の両方に由来する様々な遺伝子発現データセット間で、また R N A s e q (I l l u m i n a , S a n D i e g o , C A) ならびに A f f y m e t r i x (S a n t a C l a r a , C A) および A g i l e n t (S a n t a C l a r a , C A) の両方のマイクロアレイを含む様々な遺伝子発現プラットフォームを用いて、再現性が非常に高かった。全体的に、免疫細胞シグネチャー遺伝子発現パターンは、複数の S Q (図 5 参照) データセット間で一貫していた。

【0204】

S Q では、非サイレント突然変異量はサブタイプ間で有意差がなかった (図 2 2 参照)。突然変異量は、S Q データセットにおける T 細胞免疫細胞発現と強い相関を示さなかった (S Q におけるスピアマン相関 = -0.08)。

【0205】

S Q における K E A P / N F E 2 L 2 変異 (H a s t [7]) などのいくつかの他のゲノム特徴が、N S C L C における免疫応答の低減に寄与する可能性のある因子として示唆されている。酸化ストレス経路に影響する K E A P / N F E 2 L 2 変異は、S Q 古典的サブタイプに集中していた (図 2 2)。S Q における N F E 2 L 2 発現の増大により測定されるシクロオキシゲナーゼ 2 (C O X 2) 経路における変異はより低い免疫細胞発現に関連していたが、線形回帰を使用してサブタイプに合わせて調整した後の N F E 2 L 2 は有意な予測因子であった (サブタイプに合わせた調整後の S Q における N F E 2 L 2 発現 $p = 1.2 \times 10^{-7} \sim p = 0.47$)。

【0206】

公開されている 13 遺伝子 M H C クラス I I シグネチャー (Forero [6]) を使用し、S Q 肺がんにおける免疫細胞発現の M H C クラス I I 遺伝子との関連性を精査した。M H C クラス I I 遺伝子発現は、T 細胞発現 (S Q におけるスピアマン相関 = 0.86)、B 細胞発現 (S Q におけるスピアマン相関 = 0.69)、および D C 発現 (S Q におけるスピアマン相関 = 0.76) を含め、S Q におけるいくつかの免疫細胞と強い相関を示した。M H C クラス I I 遺伝子発現は、腫瘍と比較して、腫瘍に隣接した正常な肺組織において著しく高く、腫瘍サブタイプ間で発現に差があった (図 2 2)。T 細胞免疫細胞発現の予測因子としての M H C クラス I I シグネチャーの線形モデルでは、M H C クラス I I は、S Q サブタイプに合わせた調整後にも依然として有意であった (M H C I I に対する $p < 1 \times 10^{-50}$)。

【0207】

c o x 比例ハザードモデルを使用し、発現増大の 1 単位当たりのサブタイプ特異的ハザード比 (H R) を算出した。サブタイプ特異的 H R を病理学的ステージに合わせて調整し、信頼区間 (C I) を算出した。少なくとも 1 種のサブタイプに対して有意 (名目 p 値 < 0.05) であったマーカーに関するハザード比および信頼区間を図 7 A ~ 7 B に示す。サブタイプのうちの 1 つまたは複数に対して有意な生存期間の関連性を示した細胞シグネチャーまたは遺伝子の H R および C I を図 7 A ~ 7 B に示す。S Q サブタイプの中で、T h 1、T h 2、T F H、D C、マクロファージ、マスト細胞、および M H C クラス I I の発現における 1 単位の増大は、未分化サブタイプにおける生存期間の改善と有意な関連性を示した (図 7 A ~ 7 B)。興味深いことに、分泌性サブタイプは生存期間との有意な関

連性を示さず、これはおそらく、分泌性サブタイプにおける免疫細胞の均一に高い発現により、1単位の増大当たりの漸増する生存期間の利益の明示が妨げられたためである。S Qでは、未分化サブタイプのみが生存期間の改善と免疫細胞発現の有意な関連性 ($p < 0.01$) を明示した (図7A~7B参照)。

【0208】

結論

肺S Q遺伝子発現サブタイプはそれらの免疫ランドスケープにおいて異なる。内因性の生物学的S Qサブタイプは免疫細胞活性化における肝要な差を明らかにし、これはCD274発現と常に相関するとは限らず、生存期間との変動のある関連性を明示した。S Q腫瘍サブタイプの中でも分泌性サブタイプは上昇した免疫発現を示したが、S Q古典的サブタイプは最小限の免疫浸潤 (抑制された免疫細胞発現) を示し、immunorxに対する応答の低減が示唆された。S Qでは、サブタイプは、CD274 (PD-L1) よりも良好な免疫浸潤の予測因子であるようであった。S QにおけるCD274発現は、AIC発現にも生存期間の改善にも関連していなかった。S Q未分化サブタイプは、生存期間の改善と関連する免疫特徴の発現を示した。さらに、非サイレント突然変異量は、サブタイプをまたいだ免疫細胞発現との相関を示さなかったが、MHCクラスII遺伝子発現は高い相関を示した。免疫およびMHC II遺伝子発現の増大は、未分化サブタイプのS Qにおける生存期間の改善と関連していた。

【0209】

参照による組み込み

以下の参考文献は、参照によりそれらの全体があらゆる目的のために組み込まれている。

【0210】

1.) Wilkerson MDら、Clin Cancer Res 2010; 16(19): 4864-75. PMID 20643781

【0211】

2.) TCGA Lung SQCC. Nature 2012; 489(7417): 519-525. PMID 22960745

【0212】

3.) Bindea et al., Immunity 2013; 39(4): 782-95. PMID 24138885

【0213】

4.) Lee ESら、Cancer Res 2008; 14(22): 7397-7404. PMID 19010856

【0214】

5.) Raponi Mら、Cancer Res 2006; 66(7): 466-72. PMID 16885343

【0215】

6.) Forero A, Li Y, Dongquan Cら、Expression of the MHC class II pathway in triple negative breast cancer tumor cells is associated with a good prognosis and infiltrating lymphocytes. Cancer Immunol Res 2016; 4(5):390-399.

【0216】

7.) Hast BE, Cloer EW, Goldfarb Dら、Cancer-derived mutations in KEAP1 impair NRF2 degradation but not ubiquitination. Cancer Res 2014; 74(3): 808-817.

【0217】

(実施例2)

肺扁平上皮癌サブタイピングシグネチャーの開発および検証

目的

肺扁平上皮癌 (S Q) サブタイピングは主に、新鮮な冷凍肺腫瘍からのRNAの抽出に続いて200個を超える遺伝子の定量的遺伝子発現を使用した最近隣重心予測因子の適用を含む研究プロトコルに制限されている。扁平上皮癌サブタイピングによる予後および予測的な利益の証拠があるにもかかわらず、新鮮冷凍組織の必要性や、>200個の遺伝

10

20

30

40

50

子の遺伝子発現の要件は、複雑な生物情報学解析と相まって、薬物開発および／または診療所におけるS Qサブタイピングの応用を妨げてきた。この研究の目標は、扁平上皮癌の4つのサブタイプ（すなわち、基底、古典的、分泌性、または未分化サブタイプ）を区別するためのロバストで効率的な遺伝子シグネチャー（より少ない遺伝子を必要とする）を開発することであった。新しい効率的な遺伝子シグネチャーは、新鮮冷凍またはFFPE腫瘍試料からS Qを高信頼性でサブタイピングするのに役立ち得るため、利用可能な定量的RNAプラットフォーム（qRT-PCR、RNAseq、AffymetrixまたはAgilentアレイ）のうち任意のものを使用した診断用途および／または薬物開発に適している。扁平上皮癌のサブタイプを区別するための80遺伝子シグネチャーの開発は、本明細書の方法において記載したように行った。

10

【0218】

方法

最近隣重心へのアレイ分類（CLaNC）[1] アルゴリズムを用い、S Qサブタイピング遺伝子シグネチャーに含めるのに最適な遺伝子数を判定するために、いくつかの手法を試験した。1つの手法（図8の単純手法）では、CLaNCを改変せずにTCGA肺S Q RNAseq遺伝子発現データセット（ $n=501$ ）に適用した。第2の手法（図8および9の50-50高低）では、各S Qサブタイプに対して負の相関を示す遺伝子および正の相関を示す遺伝子を同数選択するように改変されたCLaNCをTCGA肺S Q RNAseq遺伝子発現データセット（ $n=501$ ）に使用した。第3の手法（図8の50-50但し20k）では、各S Qサブタイプに対して負の相関を示す遺伝子および正の相関を示す遺伝子を同数選択するように改変されたCLaNCをトランスクリプトームデータセット（ $n=20,000$ ）に使用した。最後の手法（図8のハイブリッド手法）では、基底および分泌性のS Qサブタイプに対して負の相関を示す遺伝子および正の相関を示す遺伝子を同数と、未分化S Qサブタイプに対して負の相関を示すいくつかの遺伝子と、古典的S Qサブタイプに対して正の相関を示すいくつかの遺伝子とを選択するように改変されたCLaNCをTCGA肺S Q RNAseq遺伝子発現データセット（ $n=501$ ）に使用した。S Qシグネチャーに含めるのに最適な遺伝子数の検査は、上述の各手法の5分割交差検証曲線（図8参照）の評価に基づいて選択した。最終的には、S Qサブタイピング遺伝子シグネチャーに含めるのに最適な遺伝子数を判定するための手法として50-50高低手法を選択した。この手法は、S Q試料を正確にサブタイピングするためにサブタイプ当たり20種の遺伝子または合計80種の遺伝子の発現パターンの検査が使用され得ることを示した。

20

30

【0219】

トレーニングのためのTCGA肺S Q RNAseq遺伝子発現データセット（ $n=501$ ）と、至適基準サブタイプを定義するための208遺伝子分類指標とを使用して、いくつかの独立した試験セットに適用したときに低い誤分類率を維持する80遺伝子シグネチャーを開発した。標準的な208分類指標遺伝子から開始し、上述のように各サブタイプに対して負の相関を示す遺伝子および正の相関を示す遺伝子を同数選択するように改変された最近隣重心へのアレイ分類（CLaNC）[1] アルゴリズムを使用した。TCGA肺S Qデータセットを使用して行った5分割交差検証曲線（図8および9参照）に基づいて、シグネチャーに含める遺伝子の最適な数（サブタイプ当たり20個）を選択した。予測因子のトレーニングのためのプロトタイプ試料（図10）の選択は、至適基準サブタイプ予測強度が最も低い試料の20%を全体から差し引いたTCGAデータセットにCLaNCを適用し、各サブタイプから同数を除去することを伴った。至適基準の208遺伝子分類指標[2]における80遺伝子シグネチャーの遺伝子の遺伝子ランクは、図11で確認することができる。

40

【0220】

次いで、いくつかの新鮮冷凍された公的に利用可能なアレイおよびRNAseqデータセット[2、3、4、5]において80遺伝子シグネチャーを試験し、この結果を、過去に公開されている208遺伝子シグネチャー[2]により定義される至適基準サブタイプ

50

コールと比較した。次いで、FFPE扁平上皮癌試料のアーカイブから新たに収集されたRNAseqデータセットにおいて80遺伝子シグネチャー（表1）の最終検証を行って、FFPE試料における同等の性能を確かめた。

【0221】

選択された80遺伝子シグネチャーの一貫した性能を検証するため、新たに収集されたFFPE試料は、University of North Carolina in Chapel Hill、NCにてIRB認可済みのプロトコールのもと収集された肺扁平上皮癌（SQ）の残存するアーカイブ試料（主に外科的試料）であった。病理学者により試料を腫瘍細胞について点検し、3種の10 μ m組織切片のマイクロダイセクションを行ってから腫瘍細胞を集中させるための抽出を行った。RNAを定量化し、試料毎に100ngをインプットした。トランスクリプトームを集中させるIllumina RNA-Accessキットを使用して配列決定ライブラリーを構築した。配列決定ライブラリーはBAアナライザーを使用することによる品質管理下におき、qPCRを使用して数量化した。Illumina HiSeqプラットフォーム（50bp PE、2千万～3千万リード）において配列データを生成し、fastQCを使用することによる品質管理下においた。STARアライナーを使用して配列結果をhg19参照配列に対してアラインし、Cufflinks[6]を使用してトランスクリプトームを構築した。Cuffcompareを使用してトランスクリプトームのアノテーションを行い、発現した種々の遺伝子の計数を算出した。RSEM発現計数推定値の上位分位点正規化を行い、Cancer Genome Atlas肺扁平上皮癌解析において使用された手法に従ってlog2変換した[3、7]。

結果

【0222】

この研究において開発した80遺伝子シグネチャー遺伝子リストは表2に示されており、各SQサブタイプに関する80遺伝子シグネチャー遺伝子リストのT統計量は表1で確認することができる。各SQサブタイプ（基底、古典的、未分化、または分泌性）について選択された20種の遺伝子の遺伝子発現中央値を、それぞれ図12、13、14、および15に示す。図16には、いくつかの異なる試験データセットにおける、80遺伝子シグネチャーを使用したサブタイプコールと、公開されている208遺伝子シグネチャーサブタイプコールとの一致率を示す。新たに開発された80遺伝子シグネチャーは、他の4つの試験データセット（図16）および新たに収集されたFFPE試料（図16）において0.84～0.91の範囲の一致率を明示した。以下は、試験データセット、RNAプラットフォームのタイプ、および使用した扁平上皮癌試料の数の要旨である。

【表12】

参照	RNAプラットフォーム	扁平上皮癌試料
TCGA 扁平上皮癌	RNAseq	501
Lee	Affymetrix アレイ	75
Raponi	Affymetrix アレイ	130
UNC	RNAseq	56
新たに収集された GeneCentric FFPE 試料	RNAseq	46

【0223】

結論

SQサブタイピングのための効率的な80遺伝子シグネチャーの開発および検証について記載した。結果として得られた80遺伝子シグネチャーは、いくつかの独立した試験セ

ットに適用したとき、低い誤分類率を維持する。したがって、この新しいシグネチャーは、新鮮冷凍またはFFPE腫瘍試料からSQを高信頼性でサブタイピングし、RNAseqおよびアレイを含む様々なプラットフォームから生成された遺伝子発現データを使用して高信頼性で機能することができる。

【0224】

参照による組み込み

以下の参考文献は、参照によりそれらの全体があらゆる目的のために組み込まれている。

【0225】

1.) Dabney AR. ClaNC: Point-and-click software for classifying microarrays to nearest centroids. *Bioinformatics*. 2006;22: 122-123. doi:10.1093/bioinformatics/bti756 10

【0226】

2.) Wilkerson MDら、*Clin Cancer Res* 2010; 16(19): 4864-75. PMID 20643781

【0227】

3.) TCGA Lung SQCC. *Nature* 2012; 489(7417): 519-525. PMID 22960745

【0228】

4.) Lee ESら、*Cancer Res* 2008; 14(22): 7397-7404. PMID 19010856

【0229】

5.) Raponi Mら、*Cancer Res* 2006; 66(7): 466-72. PMID 16885343 20

【0230】

6.) Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJら、Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology* 2010;28(5):511-5.

【0231】

7.) Li B, and Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 2011, 12:323 doi:10.1186/1471-2105-12-323 30

【0232】

(実施例3)

実施例2の肺扁平上皮癌サブタイピング80遺伝子シグネチャーを使用して判定された肺扁平上皮癌内因性サブタイプ間の免疫細胞活性化の差。

方法

過去に公開されているBindeaら(1)の免疫細胞遺伝子シグネチャー(合計24種)および実施例2に記載したSQのサブタイピングのための肺SQサブタイピング遺伝子シグネチャーを使用し、SQサブタイプに関連する免疫細胞の特徴について、いくつかの公的に利用可能な肺SQデータセット(2~5;図2参照)を検査した。自然免疫細胞(IIC)および適応免疫細胞(AIC)の両方の遺伝子発現シグネチャー、13遺伝子IFNシグネチャー(IFN)、ならびに単一遺伝子免疫バイオマーカー(CTLA4、PDCD1、およびCD274(PD-L1)、PDCDLG2(PD-L2))を4種のSQサブタイプ(基底、古典的、未分化および分泌性)において検査した。線形回帰を使用し、腫瘍サブタイプおよびCD274発現との免疫細胞シグネチャーの関連性を評価した。免疫シグネチャーの階層的クラスタリングおよびペアワイズのシグネチャーの相関も解析した。各データセットにおいて異なるベースラインハザードを可能にする層別cox比例ハザードモデルを用い、ステージI~III試料の生存期間とシグネチャーの関連性を評価した。 40

【0233】

結果

TCGA SQデータセットおよび実施例2の80遺伝子SQサブタイピングシグネチャーを使用すると、免疫細胞遺伝子シグネチャーのヒートマップ解析および教師なし階層的クラスタリングにより、実施例1で観察されたものと同様の様式でSQの内因性サブタイプが分離された(図3および図17参照)。さらに、免疫細胞シグネチャー遺伝子発現パターンは、実施例1で観察されたものと同様(図5参照)、複数のSQ(図18参照)データセット間で一貫していた。実施例1の通り、適応免疫細胞シグネチャーとCD274(PD-L1)発現の関連性強度をSQサブタイプと比較した。図19に示されるように(図6と同様)、SQ腫瘍において、検査したすべての適応免疫細胞で、サブタイプは、CD274(PD-L1)発現よりも免疫細胞発現の良好な予測因子であった。

【0234】

実施例1に記載したように、cox比例ハザードモデルを使用し、発現増大の1単位当たりのサブタイプ特異的ハザード比を算出した。サブタイプ特異的HRを病理学的ステージに合わせて調整し、信頼区間を算出した。サブタイプのうちの1つまたは複数に対して有意な生存期間の関連性を示した細胞シグネチャーまたは遺伝子のHRおよびCIを図20に示す。SQサブタイプの中で、Th1、Th2、TFH、DC、マクロファージ、およびマスト細胞の発現における1単位の増大は、実施例1によく似て、未分化サブタイプにおける生存期間の改善と有意な関連性を示した(図7A~7Bおよび図20参照)。興味深いことに、分泌性サブタイプは生存期間との有意な関連性を示さず、これはおそらく、分泌性サブタイプにおける免疫細胞の均一に高い発現により、1単位の増大当たりの漸増する生存期間の利益の明示が妨げられたためである。全体的に、SQでは、未分化サブタイプのみが生存期間の改善と免疫細胞発現の有意な関連性を明示した(図7A~7Bおよび図20参照)。

【0235】

結論

実施例2に記載したSQサブタイピングのための80遺伝子シグネチャーは、肺SQサブタイプの免疫ランドスケープがどのように異なるかを示すという点で、実施例1で使

用したSQサブタイピング遺伝子シグネチャーと同様の結果を示す。実施例1のSQサブタイピング遺伝子シグネチャーと一致して、この実施例で使

用したSQサブタイピング遺伝子シグネチャーは、肺SQ遺伝子発現サブタイプが免疫ランドスケープにおいて異なることを示す。内因性の生物学的SQサブタイプは免疫細胞活性化における肝要な差を明らかにし、これはCD274発現と常に相関するとは限らず、生存期間との変動のある関連性を明示した。SQ古典的、サブタイプは最小限の免疫浸潤を示し、immunorxに対する応答の低減が示唆された。SQでは、サブタイプは、CD274(PD-L1)よりも良好な免疫浸潤の予測因子であるようであった。SQにおけるCD274発現は、AIC発現にも生存期間の改善にも関連していなかった。SQ未分化サブタイプは、生存期間の改善と関連する免疫特徴の発現を示した。

【0236】

参照による組み込み

以下の参考文献は、参照によりそれらの全体があらゆる目的のために組み込まれている。

【0237】

1.) Bindeaら、Immunity 2013; 39(4): 782-95. PMID 24138885

【0238】

2.) Wilkerson MDら、Clin Cancer Res 2010; 16(19): 4864-75. PMID 20643781

【0239】

3.) TCGA Lung SQCC. Nature 2012; 489(7417): 519-525. PMID 22960745

【0240】

4.) Lee ESら、Cancer Res 2008; 14(22): 7397-7404. PMID 19010856

【0241】

10

20

30

40

50

5.) Raponi Mら、Cancer Res 2006; 66(7): 466-72. PMID 16885343

【0242】

(実施例4)

扁平上皮癌の発現サブタイプは異なる免疫ランドスケープおよび独特の体細胞遺伝学的特徴を明らかにし、複数の薬物標的に対する差次的な応答を示唆する

序論：肺扁平上皮癌（SQ）における遺伝子発現ベースのサブタイピングは、変動のあるアウトカムおよび療法への応答の可能性を有する異なるサブタイプにSQ腫瘍を分類する。遺伝子発現ベースのサブタイピングは、肺SQの4つのサブタイプである未分化、古典的、基底、および分泌性（1、2）を一貫して特定した（図1参照）。SQサブタイプは、ゲノム変化、腫瘍ドライバ、予後、および種々の療法に対する可能性の高い応答における肝要な差を明示する（1～2）。

【0243】

方法：実施例1において遂行した実験のフォローアップとして、図2に示したTCGA肺がん遺伝子発現データセット（SQ n = 501）²を使用して判定された、実施例1の肺SQサブタイプにおける差次的な薬物標的遺伝子発現を評価した。過去に公開されているSQサブタイプ（未分化、古典的、分泌性または基底）は、実施例1で遺伝子発現パターンを使用して定義した。この実施例では、実施例1で行った免疫細胞遺伝子シグネチャー（Bindeaらの24種の免疫細胞タイプ）⁴、単一免疫遺伝子バイオマーカー（CTLA4、PDCD1（PD-1）、およびCD274（PD-L1））の発現、増殖（11遺伝子シグネチャー；表9参照）⁵、および非サイレント突然変異量の検査への補足として、臨床腫瘍学固形腫瘍突然変異パネル（322遺伝子、表8参照）³からの遺伝子の変動のある発現を実施例1のSQサブタイプとの関連で検査した。差次的遺伝子発現は、ボンフェローニ補正を用いたクラスカルーウォリス（KW）検定を使用して査定し、非サイレント突然変異量、腫瘍サブタイプ、およびCD274（PD-L1）発現の免疫細胞発現との関連性を評価するためには線形回帰およびスピアマン相関を使用した。

【0244】

結果：図24に示されるように、SQサブタイプにおいて208/322の腫瘍パネル遺伝子244/322（76%）の変動のある発現が観察された（KWボンフェローニ閾値 $p < 0.000155$ ）。SQにおいてSOX2、TGFB β 2、SMO、CSF1R、PIK3CA、およびHGFを含むがこれらに限定されないほとんどの薬物標的遺伝子がサブタイプ間で強い差次的発現を呈した（ $p < 1E-28$ ）。さらに、SQサブタイプ間で差次的遺伝子発現を示す臨床腫瘍学固形腫瘍突然変異パネルの322種の遺伝子のうち上位25種の遺伝子は、表10で確認することができる。免疫細胞発現も、サブタイプ間で高度に変動があった（図3参照）。SQ分泌性サブタイプは最も高い免疫細胞発現を明示し、一方で古典的サブタイプのSQは免疫細胞の低発現を明示した（図3参照）。SQ腫瘍において、サブタイプは、CD274（PD-L1）よりも良好な適応免疫細胞発現の予測因子であった（F検定p値の中央値および調整済み決定係数は、サブタイプでは $2.16e-24$ および 0.20 に対し、CD274では $1.86e-09$ および 0.07 であった）（図6参照）。非サイレント突然変異量は、免疫細胞発現と強い相関を示さなかった（SQにおけるスピアマン相関 = -0.08 ）。全体的に、図23に示されるように、増殖、非サイレント突然変異量、ならびに肝要な薬物標的のCD274（PD-L1）、PDCD1（PD-1）、およびCTLA4において、SQサブタイプの有意差が存在した。SQサブタイプは、多くの薬物標的腫瘍パネル遺伝子および免疫細胞発現において有意差を明示したが、突然変異量の差は明示しなかった。

【0245】

結論：肺SQの分子サブタイプは、臨床的固形腫瘍配列決定パネルに含まれる肝要な薬物標的遺伝子の過半数の発現において異なる。肺SQの分子サブタイプは、宿主免疫応答および免疫標的の差次的発現を明らかにした。薬物感受性の潜在的なバイオマーカーとしてのサブタイプの評価は、単独で、また免疫細胞特徴および肝要な突然変異標的との組合せで精査されるべきである。

10

20

30

40

50

【0246】

参照による組み込み

以下の参考文献は、参照によりそれらの全体があらゆる目的のために組み込まれている。

【0247】

1.) Wilkerson MDら、Clin Cancer Res 2010; 16(19): 4864-75. PMID 20643781

【0248】

2.) TCGA Lung SQCC. Nature 2012; 489(7417): 519-525. PMID 22960745

【0249】

3.) Foundation Medicine Solid Tumor Mutation Panel accessed October 2014.

【0250】

4.) Bindeaら、Immunity 2013; 39(4): 782-95. PMID 24138885

【0251】

5.) Neilson TOら、Clin Cancer Res 2010; 16(21): 522-5232. PMID 20837693.

【0252】

(実施例5)

肺扁平上皮癌の発現サブタイプは異なる免疫ランドスケープおよび独特の体細胞遺伝学的特徴を明らかにし、複数の薬物標的に対する差次的な応答を示唆する

導入：ちょうど実施例4のように、この実施例の目的は、過去に定義された扁平上皮癌（SQ）の遺伝子発現サブタイプ間での臨床的に重要な遺伝子の差次的発現を査定することであった。実施例1に記載したTCGA肺がん遺伝子発現データセット（SQ n = 501）²を使用してSQ遺伝子発現ベースのサブタイピングを行った実施例4とは対照的に、この実施例における遺伝子発現ベースのSQサブタイピングは、実施例2に記載した80遺伝子セットを使用して行った。さらに、臨床的に重要な遺伝子は、治療管理に影響するゲノム変化の特定および／または標的薬物臨床試験への適格性の判定のために腫瘍学患者の管理に使用される臨床的固形腫瘍突然変異配列決定パネルを構成した322種の遺伝子（表8参照）であった。ちょうど実施例4のように、11遺伝子増殖シグネチャー（表9参照）を使用してSQサブタイプ間の腫瘍増殖の差も査定した。

【0253】

方法：TCGA肺がん遺伝子発現データセット（扁平上皮癌（SQ）n = 501）¹を使用し、肺SQサブタイプにおける差次的な薬物標的遺伝子発現を評価した。これまでに記載したClanc80 SQサブタイプ（実施例2および本明細書の記載を参照のこと）（最近隣重心予測）³を使用してSQのサブタイプを定義した。未分化、古典的、分泌性、基底のSQサブタイプを検査した。臨床腫瘍学固形腫瘍突然変異パネル（322種の遺伝子）⁴からの遺伝子の変動のある発現を、SQサブタイプとの関連において検査した。差次的遺伝子発現は、ボンフェローニ補正を用いたクラスカルーウォリス（KW）検定を使用して査定した。さらに、11遺伝子PAM50増殖シグネチャー⁵において利用可能な遺伝子の平均発現（log2（RSEM+1））として増殖スコアを算出した。クラスカルーウォリス検定を使用してサブタイプ増殖の関連性を試験した。

【0254】

結果：図32と同様に、図25は、SQサブタイプ間にまたがって227／322の腫瘍パネル遺伝子（70%）の変動のある発現が観察されたことを示した（KWボンフェローニ閾値p < 0.000155）。さらに、ちょうど図23の実施例4のように、増殖におけるSQサブタイプの有意差が存在した（図26参照）。さらに、表11に見られるSQサブタイプ間で差次的遺伝子発現を示す臨床腫瘍学固形腫瘍突然変異パネルの322種の遺伝子のうち上位25種の遺伝子は、表10に見られるものと酷似している。

【0255】

10

20

30

40

50

結論：ちょうど実施例 4 のように、肺 S Q の分子サブタイプは、臨床的固形腫瘍配列決定パネルに含まれる肝要な薬物標的遺伝子の過半数の発現において異なる。肺 S Q の分子サブタイプは、宿主免疫応答および免疫標的の差次的発現を明らかにした。

【 0 2 5 6 】

参照による組み込み

以下の参考文献は、参照によりそれらの全体があらゆる目的のために組み込まれている。

【 0 2 5 7 】

1.) TCGA Lung SQCC. Nature 2012; 489(7417): 519-525. PMID 22960745

【 0 2 5 8 】

2.) Wilkerson MD ら、Clin Cancer Res 2010; 16(19):4864-75. PMID 20643781

【 0 2 5 9 】

3.) Foundation Medicine Solid Tumor Mutation Panel accessed October 6, 2014.

【 0 2 6 0 】

4.) Neilson TO, Parker JS, Leung S ら、Clin Cancer Res 2010; 16(21): 5222-5232. PMID 20837693

【表 8 - 1】

表8. 臨床的固形腫瘍突然変異配列決定パネルの322種の遺伝子 ⁵⁾								
ABL1	C11orf30 (EMSY)	DDR2	FGFR4	IL7R	MET	PIK3CA	SDHD	TSHR
ABL2	CARD11	DICER 1	FH	INHBA	MITF	PIK3CB	SETD2	U2AF1
ACVR1 B	CBFB	DNMT3 A	FLCN	INPP4B	MLH1	PIK3CG	SF3B1	VEGF A
AKT1	CBL	DOT1L	FLT1	IRF2	MPL	PIK3R1	SLIT2	VHL
AKT2	CCND1	EGFR	FLT3	IRF4	MRE11A	PIK3R2	SMAD2	WISP3
AKT3	CCND2	EP300	FLT4	IRS2	MSH2	PLCG2	SMAD3	WT1

10

20

30

【表 8 - 2】

ALK	CCND3	EPHA3	FOXL2	JAK1	MSH6	PMS2	SMAD4	XPO1
AMER1 (FAM123B)	CCNE1	EPHA5	FOXP1	JAK2	MTOR	POLD1	SMARCA4	ZBTB2
APC	CD274	EPHA7	FRS2	JAK3	MUTYH	POLE	SMARCB1	ZNF217
AR	CD79A	EPHB1	FUBP1	JUN	MYC	PPP2R1A	SMO	ZNF703
ARAF	CD79B	ERBB2	GABRA6	KAT6A (MYST3)	MYCL (MYCL1)	PRDM1	SNCAIP	ETV4
ARFRP1	CDC73	ERBB3	GATA1	KDM5A	MYCN	PREX2	SOCS1	ETV5
ARID1A	CDH1	ERBB4	GATA2	KDM5C	MYD88	PRKAR1A	SOX10	ETV6
ARID1B	CDK12	ERG	GATA3	KDM6A	NF1	PRKCI	SOX2	ETV1

10

20

30

40

【表 8 - 3】

ARID2	CDK4	ERRF1	GATA4	KDR	NF2	PRKDC	SOX9	NFKBIA
ASXL1	CDK6	ESR1	GATA6	KEAP1	NFE2L2	PRSS8	SPEN	
ATM	CDK8	EZH2	GID4 (C17orf39)	KEL	NFKBIA	PTCH1	SPOP	
ATR	CDKN1A	FAM46C	GLI1	KIT	NKX2-1	PTEN	SPTA1	
ATRX	CDKN1B	FANCA	GNAI1	KLHL6	NOTCH1	PTPN11	SRC	
AURKA	CDKN2A	FANCC	GNAI3	KMT2A (MLL)	NOTCH2	QKI	STAG2	
AURKB	CDKN2B	FANCD2	GNAQ	KMT2C (MLL3)	NOTCH3	RAC1	STAT3	
AXIN1	CDKN2C	FANCE	GNAS	KMT2D (MLL2)	NPM1	RAD50	STAT4	
AXL	CEBPA	FANCF	GPR124	KRAS	NRAS	RAD51	STK11	

10

20

30

40

【表 8 - 4】

BAP1	CHD2	FANCG	GRIN2 A	LMO1	NSD1	RAF1	SUFU	
BARD1	CHD4	FANCL	GRM3	LRP1B	NTRK1	RANBP 2	SYK	
BCL2	CHEK1	FAS	GSK3B	LYN	NTRK2	RARA	TAF1	
BCL2L 1	CHEK2	FAT1	H3F3A	LZTR1	NTRK3	RB1	TBX3	
BCL2L 2	CIC	FBXW7	HGF	MAGI2	NUP93	RBM10	TERC	
BCOR	CREBBP	FGF10	HNF1A	MAP2K 1	PAK3	RET	TERT (プロモーターのみ)	
BCORL 1	CRKL	FGF14	HRAS	MAP2K 2	PALB2	RICTOR	TET2	
BLM	CRLF2	FGF19	HSD3B 1	MAP2K 4	PARK2	RNF43	TGFBR 2	

10

20

30

40

【表 8 - 5】

BRAF	CSF1R	FGF23	HSP90 AA1	MAP3K 1	PAX5	ROS1	TNFAIP 3	
BRCA1	CTCF	FGF3	IDH1	MCL1	PBRM1	RPTOR	TNFRS F14	
BRCA2	CTNNA1	FGF4	IDH2	MDM2	PDCD1L G2	RUNX1	TOP1	
BRD4	CTNNB1	FGF6	IGF1R	MDM4	PDGFRA	RUNX1 T1	TOP2A	
BRIP1	CUL3	FGFR1	IGF2	MED12	PDGFRB	SDHA	TP53	
BTG1	CYLD	FGFR2	IKBKE	MEF2B	PDK1	SDHB	TSC1	
BTK	DAXX	FGFR3	IKZF1	MEN1	PIK3C2B	SDHC	TSC2	

10

20

30

【表 9】

表9. 11種の遺伝子増殖遺伝子シグネチャー			
BIRC5	CDCA1 (NUF2)	MKI67	TYMS
CCNB1	CEP55	PTTG1	UBE2C
CDC20	KNTC2 (NDC80)	RRM2	

40

【 0 2 6 1 】

【表 10】

表10.実施例4で判定されたSQ発現サブタイプに
関する322腫瘍パネル³の上位25種の分化遺伝子。

SQ 遺伝子	KW p 値
NTRK2	2.41E-55
SOX2	1.64E-54
NFE2L2	1.05E-49
TGFBR2	4.97E-40
SMO	7.91E-40
KEAP1	1.14E-38
GATA3	1.02E-37
JAK1	7.23E-37
JAK3	1.34E-36
CSF1R	3.16E-36
FOXP1	4.18E-35
AXL	3.32E-34
PTCH1	2.00E-33
STAT4	2.61E-32
TNFRSF14	6.17E-32
ESR1	4.46E-31
BTK	5.65E-31
FLT4	1.13E-30
IKZF1	9.11E-30
PIK3CA	4.49E-29
HGF	6.64E-29
LRP1B	1.63E-28
FANCC	2.57E-28
PIK3CG	9.86E-28
GATA6	5.03E-27

10

20

30

40

【 0 2 6 2 】

【表 1 1】

表11.実施例5で判定されたSQ発現サブタイプに
関する322腫瘍パネル³の上位25種の分化遺伝子。

SQ 遺伝子	KW p 値
NTRK2	7.84E-59
SOX2	4.41E-58
NFE2L2	1.26E-48
KEAP1	1.83E-41
SMO	2.52E-41
GATA3	6.38E-35
FOXP1	2.88E-34
JAK1	3.30E-34
PTCH1	3.79E-34
PIK3CA	7.26E-33
LRP1B	9.39E-32
JAK3	2.75E-31
ESR1	1.40E-29
GNA13	2.31E-29
ETV4	6.10E-29
FANCC	1.44E-28
PRKCI	2.06E-28
ERRFI1	1.75E-26
AXL	3.74E-26
TNFRSF14	6.69E-26
TGFBR2	8.42E-26
EZH2	3.56E-25
FLT4	1.70E-24
CSF1R	2.28E-24
FGFR2	1.76E-23

10

20

30

40

【0 2 6 3】

上述の種々の実施形態は、さらなる実施形態を提供するように組み合わせることができる。本明細書において言及され、かつ／または出願データシートに列挙される米国特許、米国特許出願公開、米国特許出願、外国特許、外国特許出願、および非特許公開文献はすべて、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれている。種々の特許、出願、および公開文献の概念を用いて、なおもさらなる実施形態を提供するために必要な場合は、諸実施形態の態様を改変してもよい。

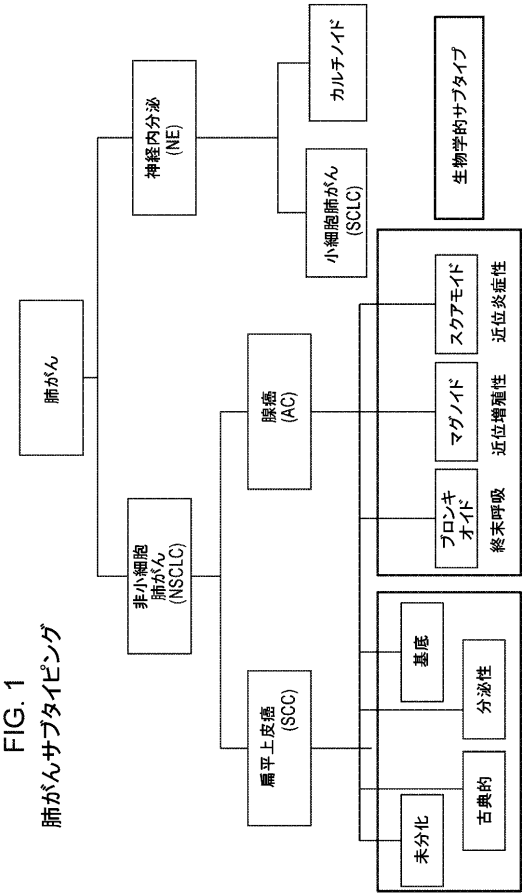
【0 2 6 4】

上記の詳細な記載を踏まえ、これらのおよび他の変更を諸実施形態に行うことができる

50

。概して、続く特許請求の範囲において、使用される用語は、本明細書および特許請求の範囲において開示される特定の実施形態に特許請求の範囲を限定するものと解釈されてはならず、かかる特許請求の範囲が権利とする均等物の全範囲と併せて可能性のあるすべての実施形態を含むものと解釈されるべきである。したがって、特許請求の範囲は本開示によって限定されない。

【 図 1 】

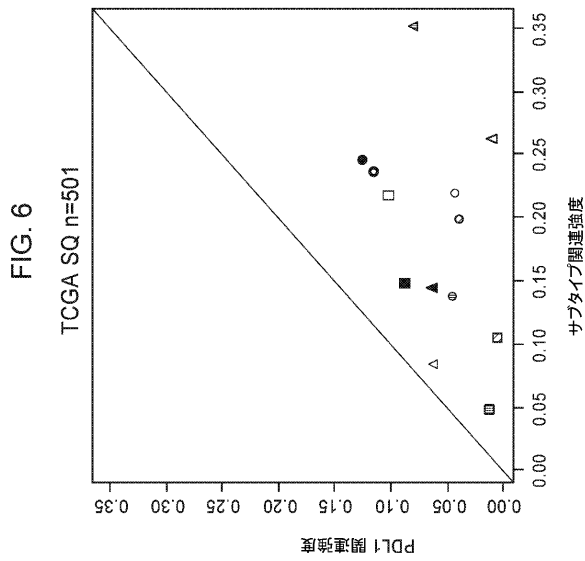


【 図 2 】

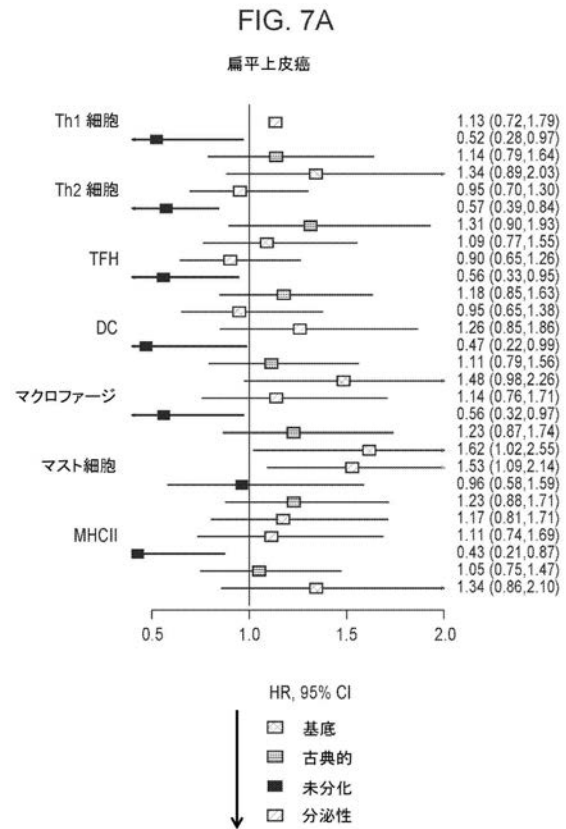
FIG. 2

特徴	TCGA ⁴	Lee ⁸	Raponi ⁹	UNC ³
試料総数	501	75	129	56
組織保存法	新鮮冷凍	新鮮冷凍	新鮮冷凍	新鮮冷凍
サブタイプ				
基底	137	13	35	12
古典的	170	31	42	21
未分化	73	12	23	9
分泌性	121	19	29	14
性別				
女性／男性／該当せず	125/363/13	5/70/0	47/82/0	24/32/0
診断時の年齢				
中央値／(範囲)	68/(39-90)	65/(41-82)	68/(42-91)	67/(41-85)
年齢不明	22	0	0	0
ステージ				
I	241	0	73	34
II	152	0	33	19
III	85	0	23	3
IV	7	0	0	0
ステージ不明	16	75	0	0
喫煙経歴				
あり	416	0	119	56
なし	0	0	4	0
喫煙ステータス不明	85	75	6	0

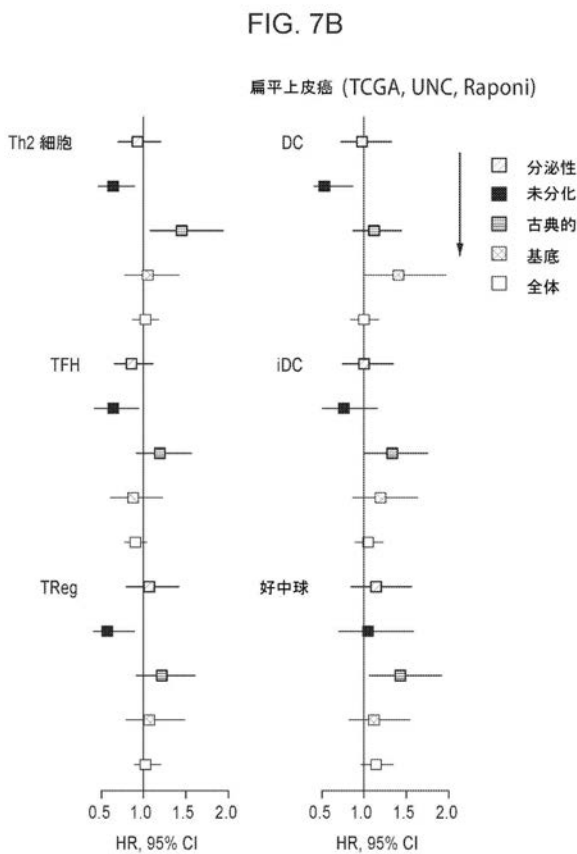
【図 6】



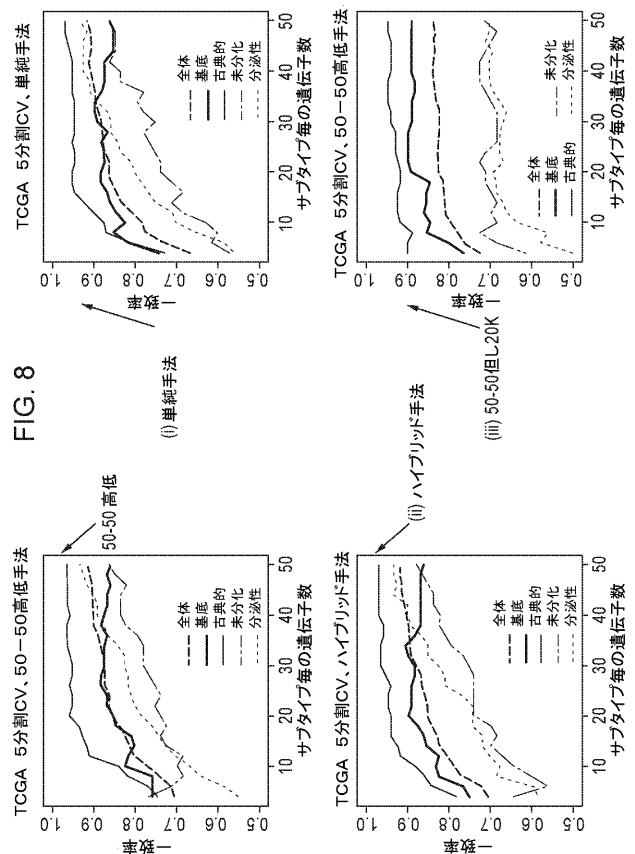
【図 7 A】



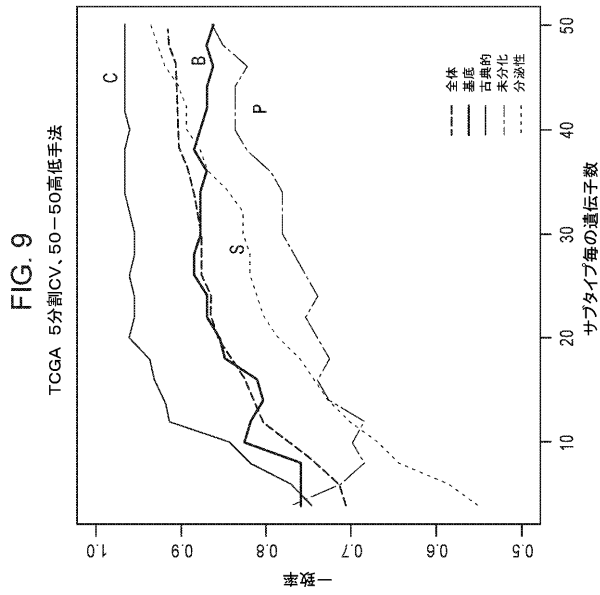
【図 7 B】



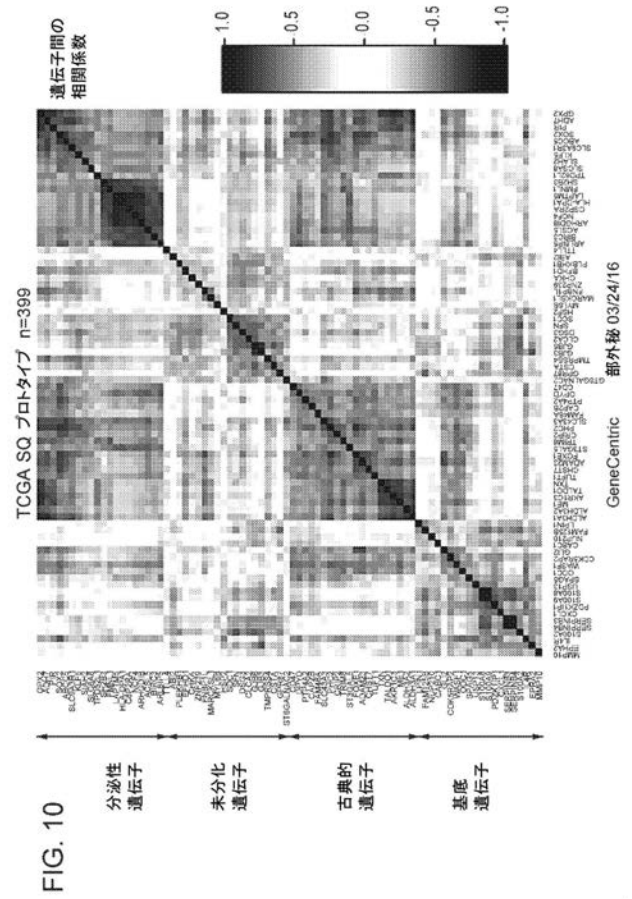
【図 8】



【図 9】

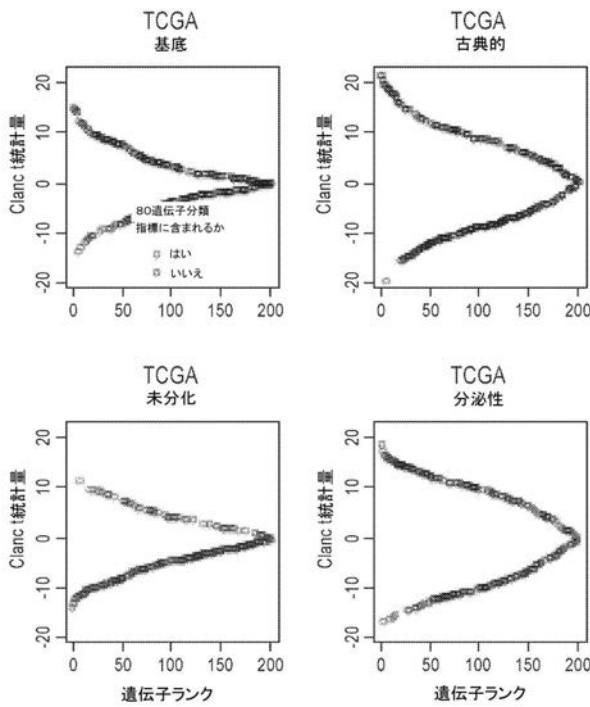


【図 10】

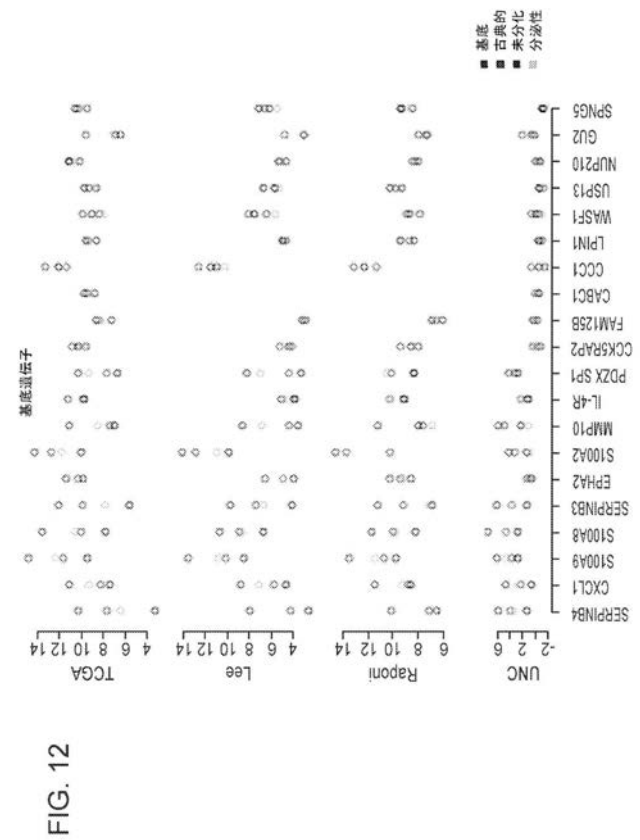


【図 11】

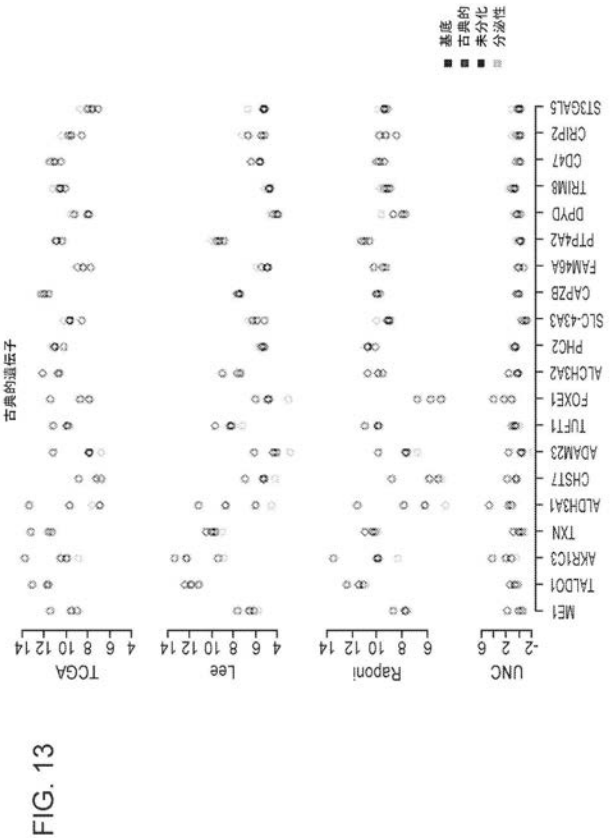
FIG. 11



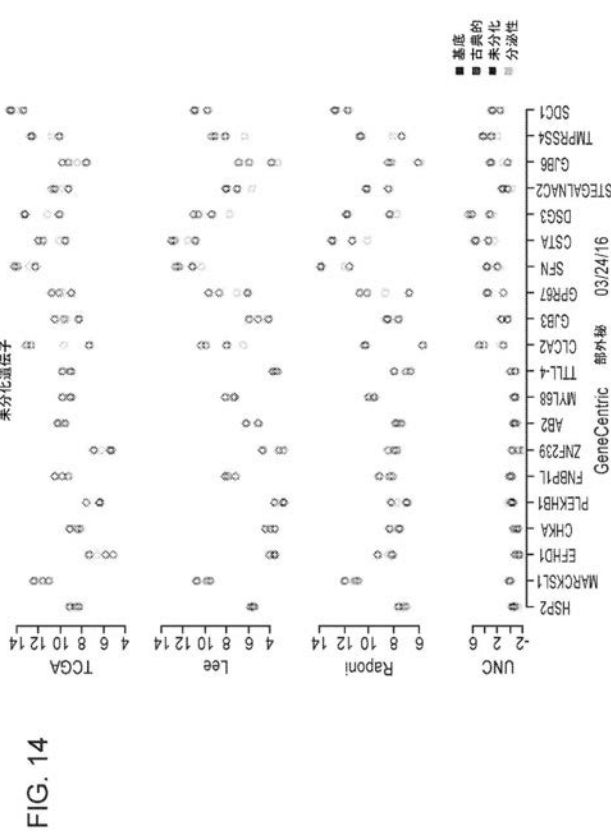
【図 12】



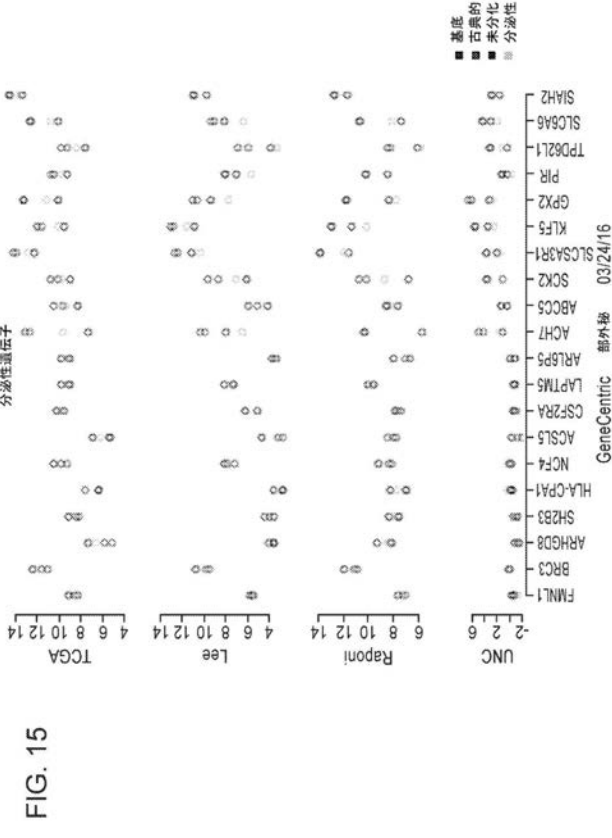
【図 1 3】



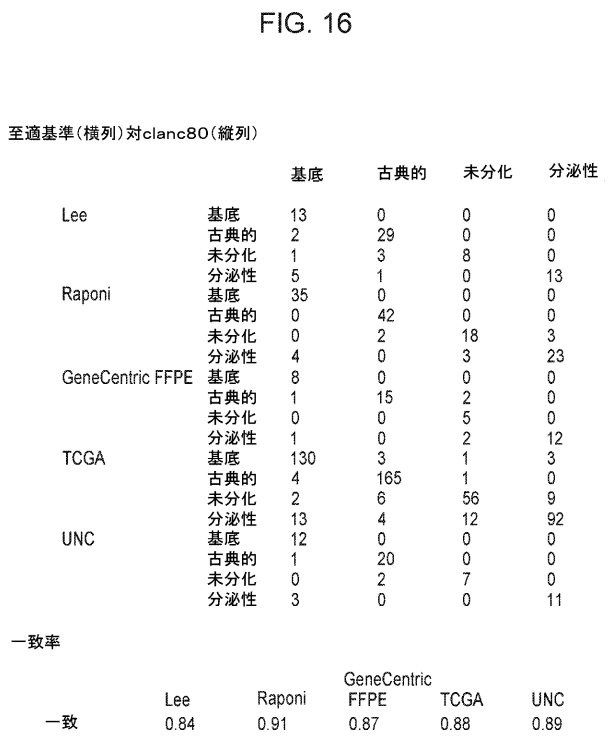
【図 1 4】



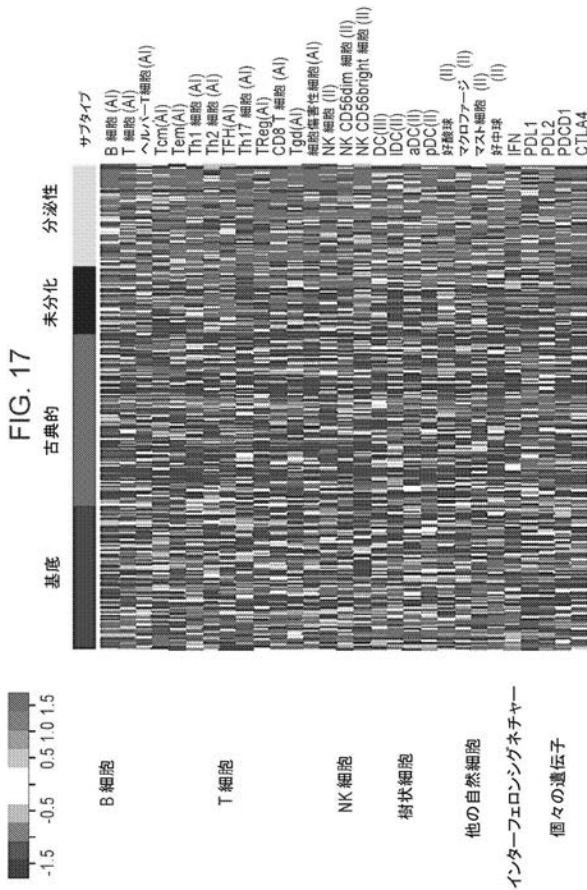
【図 1 5】



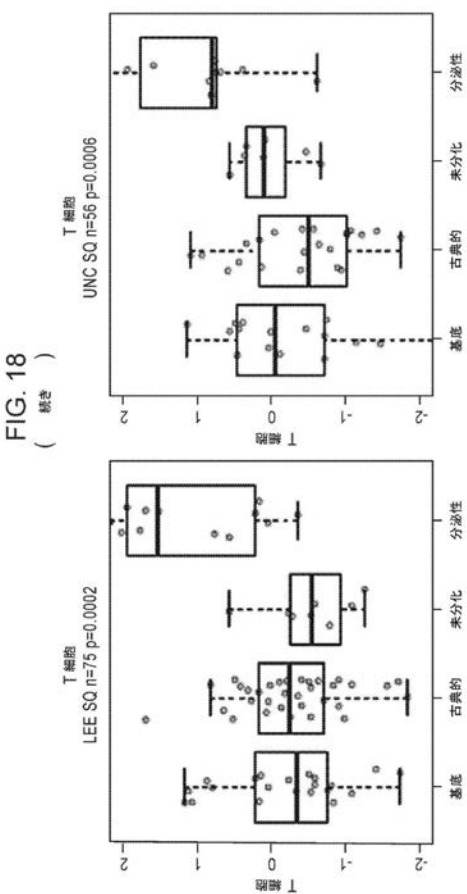
【図 1 6】



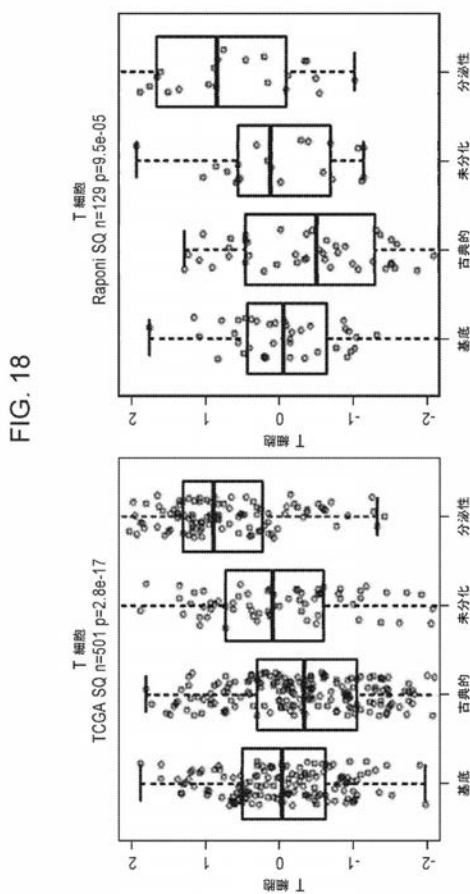
【図 17】



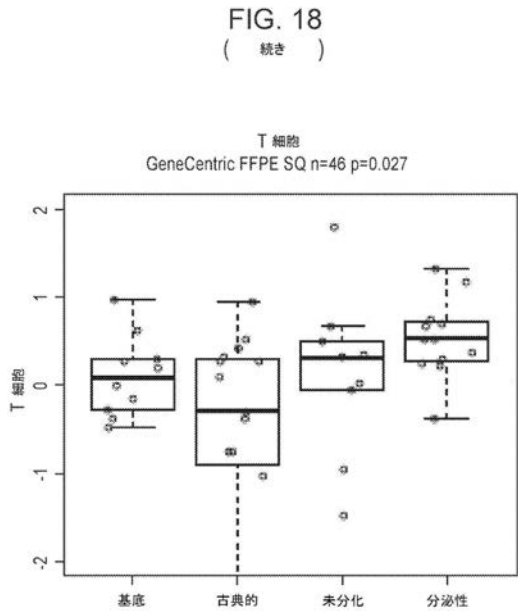
【図 18 - 2】



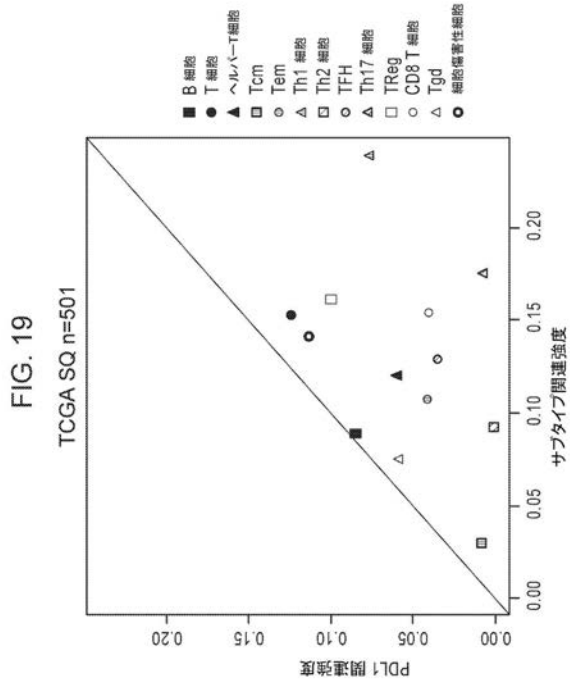
【図 18 - 1】



【図 18 - 3】

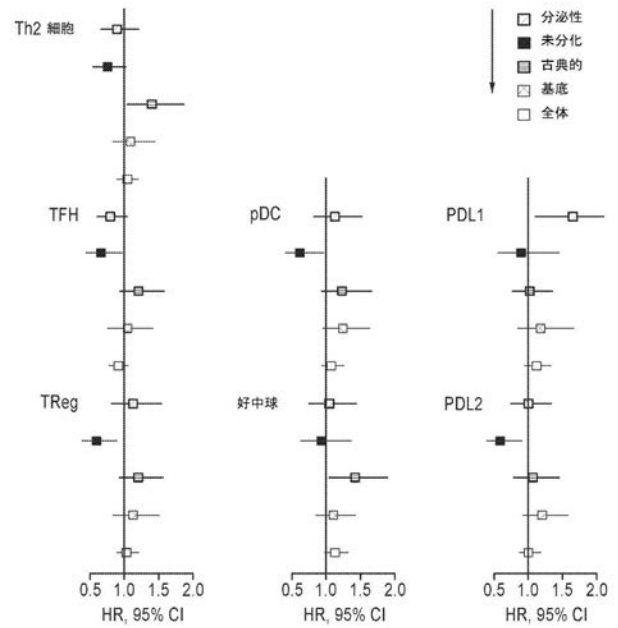


【図 19】



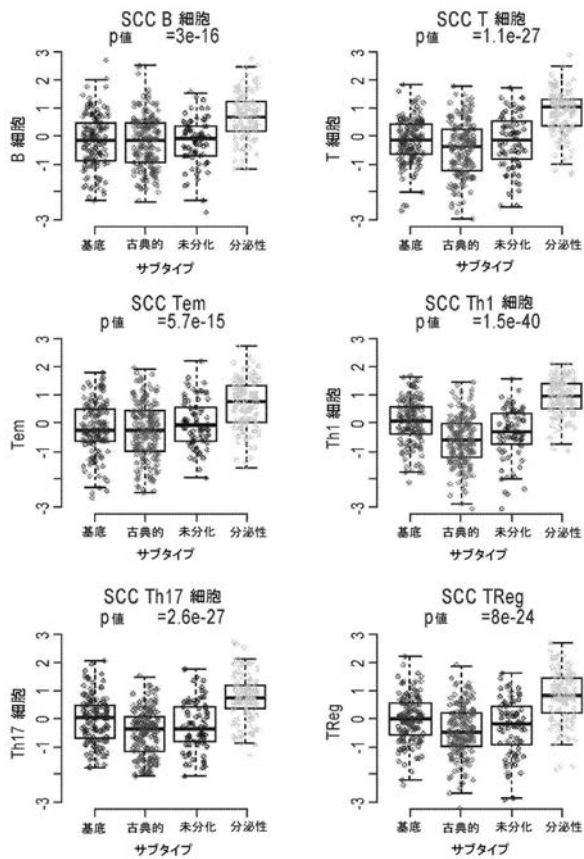
【図 20】

FIG. 20



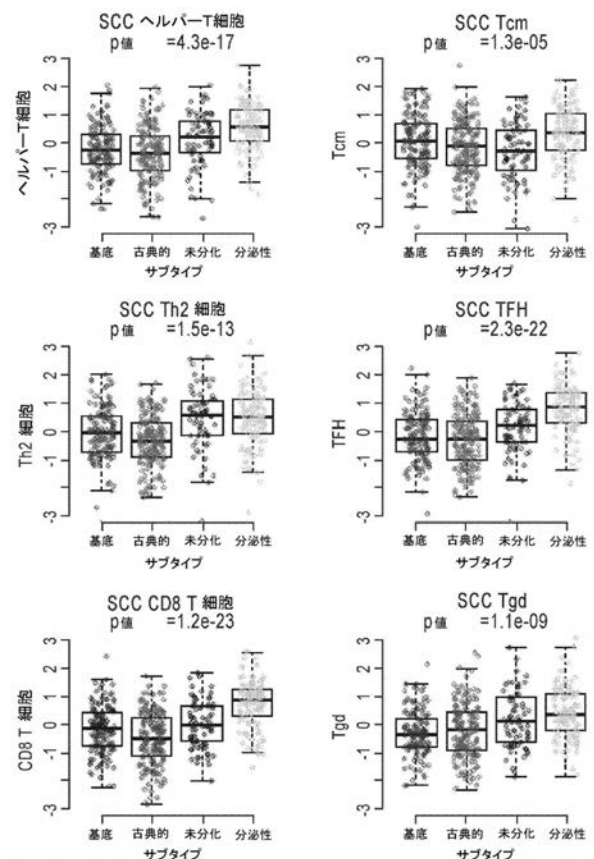
【図 21 - 1】

FIG. 21



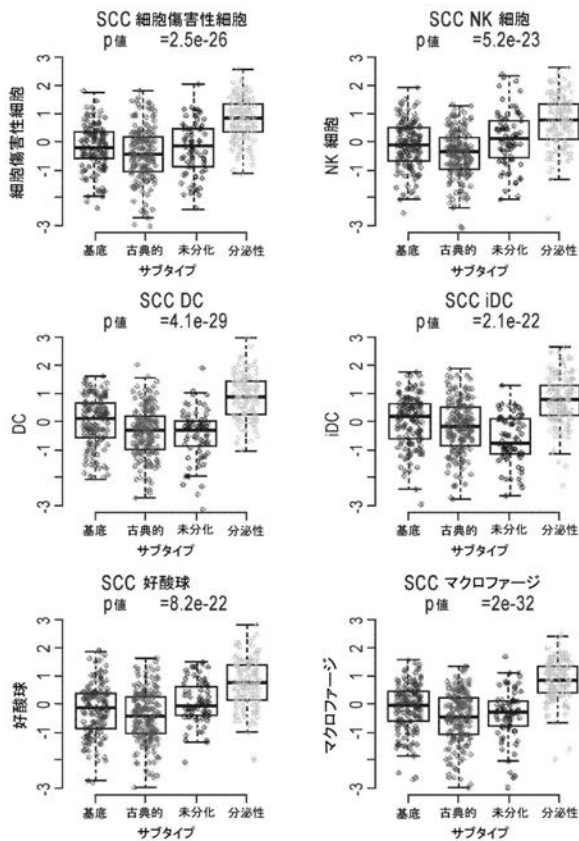
【図 21 - 2】

FIG. 21(続き)



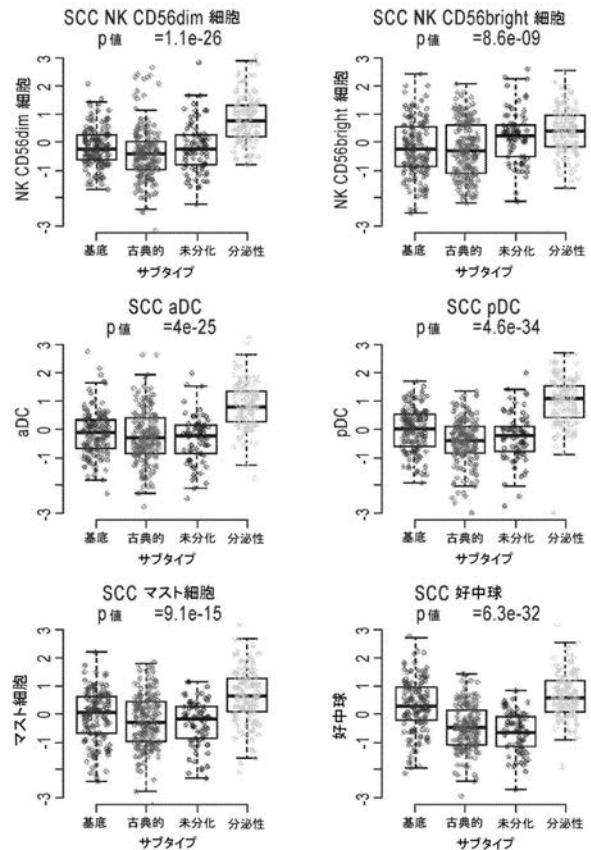
【図 2 1 - 3】

FIG. 21(続き)



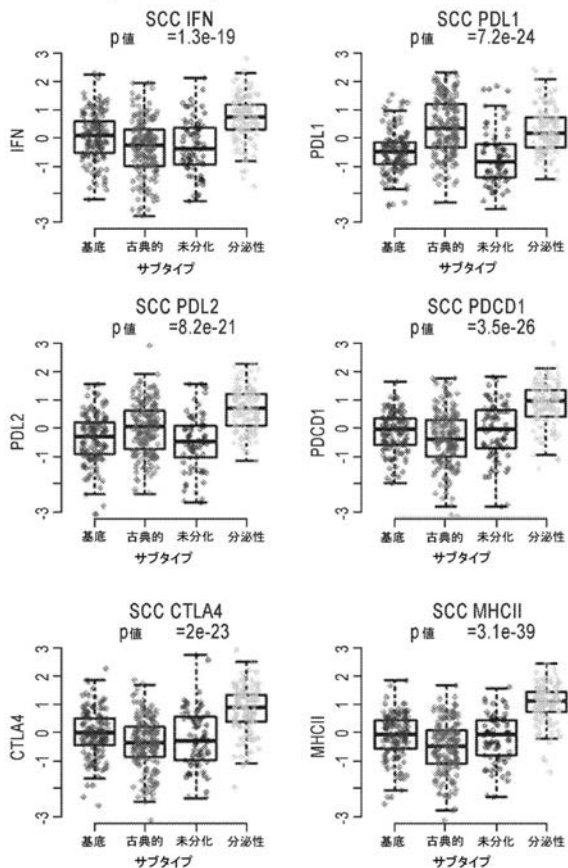
【図 2 1 - 4】

FIG. 21(続き)



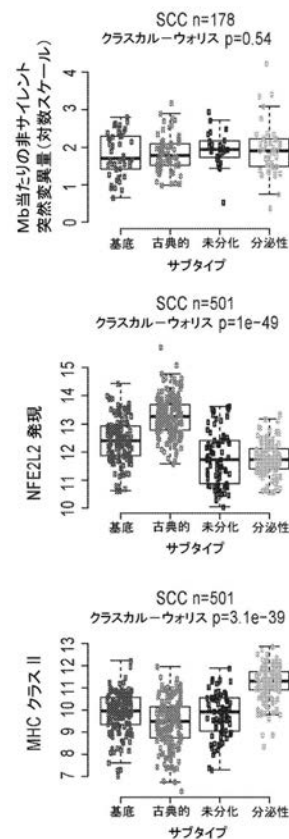
【図 2 1 - 5】

FIG. 21(続き)

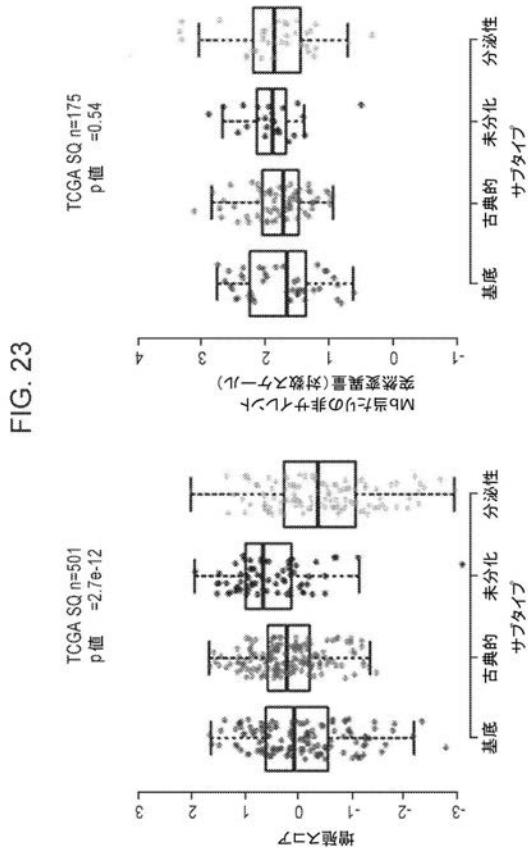


【図 2 2】

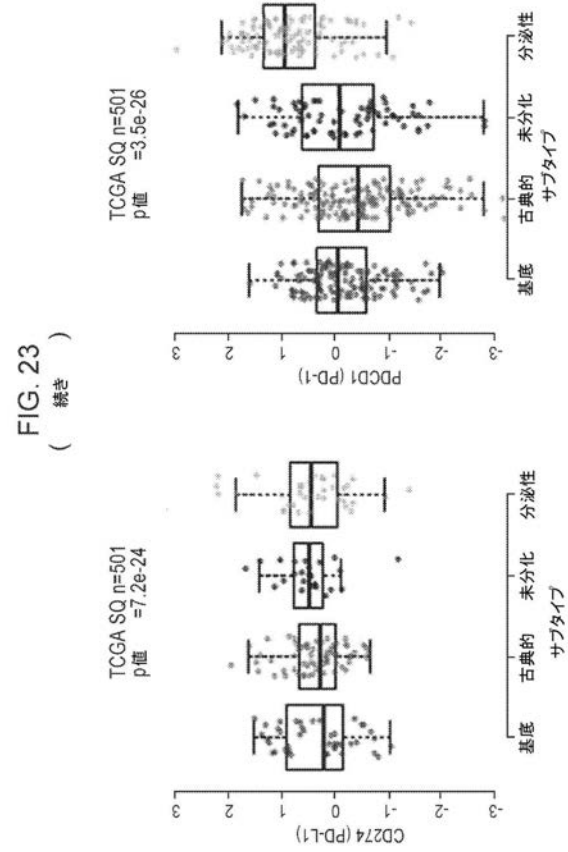
FIG. 22



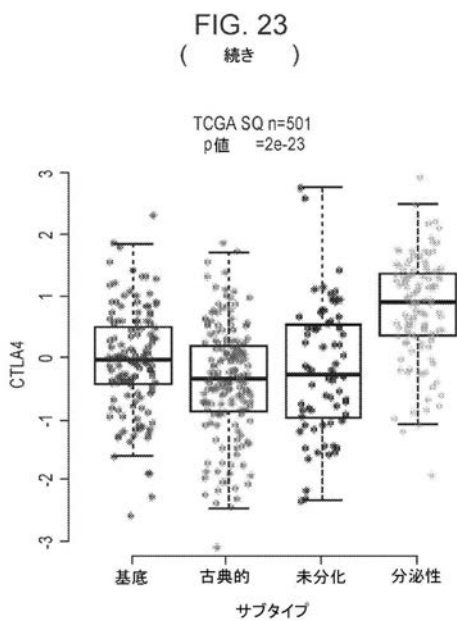
【図 2 3 - 1】



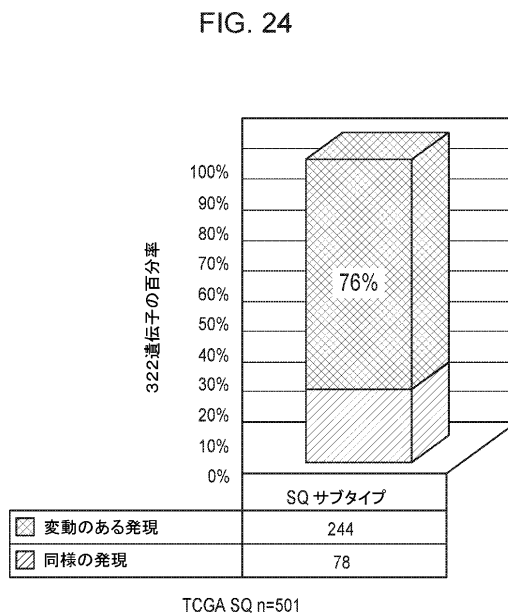
【図 2 3 - 2】



【図 2 3 - 3】

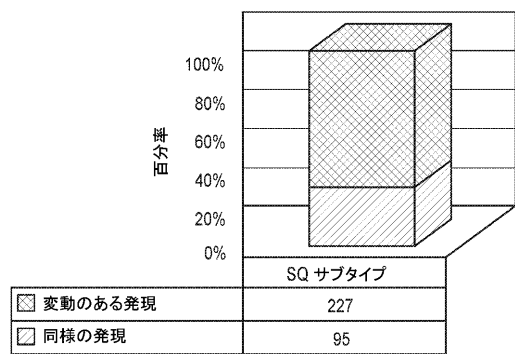


【図 2 4】



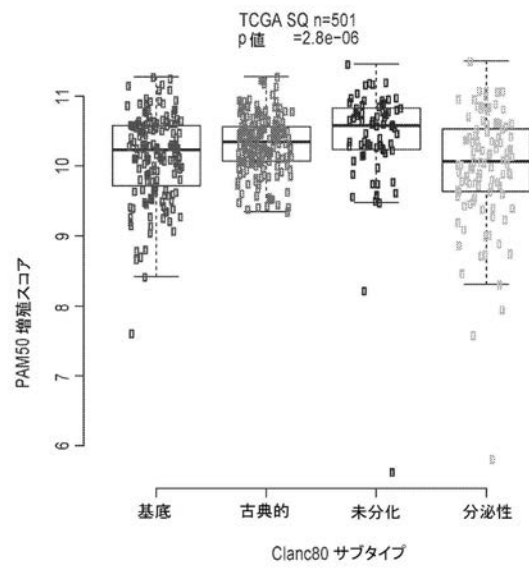
【 図 2 5 】

FIG. 25



【 図 2 6 】

FIG. 26



【 配 列 表 】

2019516406000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/33107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - C12Q 1/68; C07K 16/30, 14/81 (2017.01) CPC - C12Q 1/68, 1/6806, 1/6809, 1/6813, 1/6816, 1/6844, 1/6851, 1/686, 1/6869, 1/6886; C07K 16/30, 14/8121 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) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	(CALABRESE, F et al.) Serpin B4 Isoform Overexpression is Associated with Aberrant Epithelial Proliferation and Lung Cancer in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Pathology. April, 2012; Vol. 44, No. 3; pages 192-198; page 192, column 2, paragraph 2 – page 193, column 1, paragraph 1; DOI: 10.1097/PAT.0b013e3283511b81	28-29, 31/28-29, 32/31/28-29, 33/32/31/28-29, 38-39, 41/38-39, 42/41/38-39, 43/42/41/38-39, 48-49, 51/48-49, 52/51/48-49, 53/52/51/48-49
Y		30, 31/30, 32/31/30, 33/32/31/30, 40, 41/40, 42/41/40, 43/42/41/40, 50, 51/50, 52/51/50, 53/52/51/5
X	(VERMEULEN,) Pediatric Primitive Neuroectodermal Tumors of the Central Nervous System Differentially Express Granzyme Inhibitors. PLoS One. 10 March, 2016; Vol. 11, No. 3; pages 1-8; page 5/8, paragraph 3; Genbank supplement pages 1-4; DOI: 10.1371/journal.pone.0151485	28-29, 31/28-29, 32/31/28-29, 33/32/31/28-29, 38-39, 41/38-39, 42/41/38-39, 43/42/41/38-39, 48-49, 51/48-49, 52/51/48-49, 53/52/51/48-49
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 27 September 2017 (27.09.2017)		Date of mailing of the international search report 23 OCT 2017
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/33107

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/33107

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6-13, 20-27, 34-37, 44-47, 54-57, 65-78, 84-102
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

Please See Supplemental Page

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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Groups I+, Claims 1-5, 14-19, 28-33, 38-43, 48-53, 58-64, 79-83, 103-105; SEQ ID NO: 1 (Classifier Biomarker)

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/33107

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	(MUKHOPADHYAY, S) Utility of Small Biopsies for Diagnosis of Lung Nodules: Doing More with Less. Modern Pathology. January 2012; Vol. 25, Supplement 1; pages S43-S47; page S44, column 1, paragraph 2 – column 2, paragraph 1	30, 31/30, 32/31/30, 33/32/31/30, 40, 41/40, 42/41/40, 43/42/41/40, 50, 51/50, 52/51/50 and 53/52/51/50
A	(WILKERSON, MD et al.) Lung Squamous Cell Carcinoma mRNA Expression Subtypes are Reproducible, Clinically Important and Correspond to Different Normal Cell Types. Clinical Cancer Research. 19 July, 2010; Vol. 16, No. 19; pages 1-19; page 3, paragraph 2; page 4, paragraphs 3-4; page 8, paragraph 2; page 10, paragraph 2; table 2; DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0199	1-3, 4/1-3, 5/4/1-3, 14-16, 17/14-16, 18/17/14-16, 19/18/17/14-16, 58-59, 60/58-59, 61/60/58-59, 62/60/58-59, 63/61/60/58-59, 64/62/60/58-59, 79-81, 82/79-81, 83/82/79-81, 103-104, 105/103-104
A	(PRASAD, NB et al.) Differential Expression of Degradome Components in Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. Modern Pathology. 20 December, 2013; Vol. 27, No. 7; pages 1-26; page 8, paragraph 3 – page 9, paragraph 1; page 11, paragraph 1; DOI: 10.1038/modpathol.2013.217	1-3, 4/1-3, 5/4/1-3, 14-16, 17/14-16, 18/17/14-16, 19/18/17/14-16
A	US 2015/0140017 A1 (YALE UNIVERSITY) 21 May, 2015; paragraphs [0008], [0019], [0022]	58-59, 60/58-59, 61/60/58-59, 62/60/58-59, 63/61/60/58-59, 64/62/60/58-59, 79-81, 82/79-81, 83/82/79-81, 103-104, 105/103-104
P	(FARUKI, H et al.) Lung Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma Gene Expression Subtypes Demonstrate Significant Differences in Tumor Immune Landscape. Journal of Thoracic Oncology. June 2017; Vol. 12, No. 6; pages 943-953; whole document; DOI: 10.1016/j.jtho.2017.03.010	58-59, 60/58-59, 61/60/58-59, 62/60/58-59, 63/61/60/58-59, 64/62/60/58-59, 79-81, 82/79-81, 83/82/79-81, 103-104, 105/103-104

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/US17/33107

---Continued from Box No. III: Observations where unity of invention is lacking---

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid. Groups I+, Claims 1-5, 14-19, 28-35, 38-43, 48-53, 58-64, 79-83, 103-105; SEQ ID NO: 1 (Classifier Biomarker) are directed toward methods and compositions for determining a subtype of lung squamous cell carcinoma (SQ) of an individual by detecting the expression level of at least one classifier biomarker; determining the response of an individual with a squamous cell carcinoma subtype to a immunotherapy.

The methods and compositions will be searched to the extent that they encompasses SEQ ID NO:1 (first exemplary classifier biomarker). Applicant is invited to elect additional classifier biomarker(s), with specified SEQ ID NO: for each, to be searched. Additional biomarker(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1 (in-part), 2 (in-part), 3 (in-part), 4 (in-part), 5 (in-part), 14 (in-part), 15 (in-part), 16 (in-part), 17 (in-part), 18 (in-part), 19 (in-part), 28 (in-part), 29 (in-part), 30 (in-part), 31 (in-part), 32 (in-part), 33 (in-part), 38 (in-part), 39 (in-part), 40 (in-part), 41 (in-part), 42 (in-part), 43 (in-part), 48 (in-part), 49 (in-part), 50 (in-part), 51 (in-part), 52 (in-part), 53 (in-part), 58-64, 79 (in-part), 80 (in-part), 81 (in-part), 82 (in-part), 83 (in-part), 103 (in-part), 104 (in-part) and 105 (in-part) encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 1 (Classifier Biomarker). Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected classifier biomarker(s). Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be a classifier biomarker encompassing SEQ ID NO: 2 (first exemplary elected classifier biomarker).

No technical features are shared between the biomarker sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: a method for determining a squamous cell carcinoma (SQ) subtype of a lung tissue sample obtained from a patient, the method comprising detecting an expression level of at least one classifier biomarker of Table 1, wherein the detection of the expression level of the classifier biomarker specifically identifies a basal, classical, secretory or primitive SQ subtype; a method for determining a squamous cell carcinoma (SQ) subtype of a lung tissue sample obtained from a patient comprising detecting an expression level of at least one nucleic acid molecule that encodes a classifier biomarker having a specific expression pattern in lung cancer cells, wherein the classifier biomarker is selected from the group consisting of the classifier genes set forth in Table 1, the method comprising: (a) isolating nucleic acid material from a lung tissue sample from a patient; (b) mixing the nucleic acid material with oligonucleotides that are substantially complementary to portions of nucleic acid molecule of the classifier biomarker; and (c) detecting expression of the classifier biomarker; a method of detecting a biomarker in a lung tissue sample obtained from a patient, the method comprising measuring the expression level of a plurality of biomarker nucleic acids selected from Table 1 using an amplification, hybridization and/or sequencing assay; a method of detecting a biomarker in a lung tissue sample obtained from a patient, the method consisting essentially of measuring the expression level of a plurality of biomarker nucleic acids selected from Table 1 using an amplification, hybridization and/or sequencing assay; a method of detecting a biomarker in a lung tissue sample obtained from a patient, the method consisting of measuring the expression level of a plurality of biomarker nucleic acids selected from Table 1 using an amplification, hybridization and/or sequencing assay; a method of determining whether a squamous cell carcinoma patient is likely to respond to immunotherapy, the method comprising, determining the squamous cell carcinoma subtype of a lung tissue sample from the patient, wherein the squamous cell carcinoma subtype is selected from the group consisting of primitive, classical, secretory and basal; and based on the subtype, assessing whether the patient is likely to respond to immunotherapy; a method for selecting a squamous cell carcinoma patient for immunotherapy, the method comprising, determining a squamous cell carcinoma subtype of a lung tissue sample from the patient, based on the subtype; and selecting the patient for immunotherapy; a method of treating lung cancer in a subject, the method comprising: measuring the expression level of at least one biomarker nucleic acid in a lung cancer sample obtained from the subject, wherein the at least one biomarker nucleic acid is selected from a set of biomarkers listed in Table 1, wherein the presence, absence and/or level of the at least one biomarker indicates a subtype of the lung cancer; and administering an immunotherapeutic agent based on the subtype of the lung cancer.

However, these shared technical features are previously shared by WO 2015/184461 A1 to Faruki, et al. (hereinafter 'Faruki') in view of the publication entitled 'Lung Squamous Cell Carcinoma mRNA Expression Subtypes are Reproducible, Clinically Important and Correspond to Different Normal Cell Types' by Wilkerson, et al. (hereinafter 'Wilkerson') and US 2015/0140017 A1 (YALE UNIVERSITY).

--- Continued Within the Next Supplemental Rn: ---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/33107

-***Continued from Previous Supplemental Box-***

Faruki discloses a method for determining a cancer subtype of a lung tissue sample obtained from a patient (a method for determining a cancer subtype of a lung tissue sample obtained from a patient; claim 1), including squamous cell carcinoma (claim 1), the method comprising detecting an expression level of at least one classifier biomarker (the method comprising detecting an expression level of at least one classifier biomarker; claim 1), wherein the detection of the expression level of the classifier biomarker specifically identifies the cancer subtype (claim 1); a method for determining a cancer subtype of a lung tissue sample obtained from a patient (a method for determining a cancer subtype of a lung tissue sample obtained from a patient; claim 1) including squamous cell carcinoma (claim 1) comprising detecting an expression level of at least one nucleic acid molecule that encodes a classifier biomarker having a specific expression pattern in lung cancer cells (comprising detecting an expression level of at least one nucleic acid molecule that encodes a classifier biomarker having a specific expression pattern in lung cancer cells; paragraphs [0012], [0045]; claim 1), the method comprising: (a) isolating nucleic acid material from a lung tissue sample from a patient (the method comprising: (a) isolating nucleic acid material from a lung tissue sample from a patient; abstract; claim 5); (b) mixing the nucleic acid material with oligonucleotides that are substantially complementary to portions of nucleic acid molecule of the classifier biomarker (mixing the nucleic acid material with oligonucleotides that are substantially complementary to portions of nucleic acid molecule of the classifier biomarker; paragraph [0006]; claim 1); and (c) detecting expression of the classifier biomarker ((c) detecting expression of the classifier biomarker; paragraphs [0006], [0012]; claim 1); a method of detecting a biomarker in a lung tissue sample obtained from a patient (a method of detecting a biomarker in a lung tissue sample obtained from a patient; claim 1), the method comprising measuring the expression level of a plurality of biomarker nucleic acids using an amplification; paragraph [0015]; claim 1); a method of detecting a biomarker in a lung tissue sample obtained from a patient (a method of detecting a biomarker in a lung tissue sample obtained from a patient; abstract; claim 1), the method consisting essentially of measuring the expression level of a plurality of biomarker nucleic acids (the method consisting essentially of measuring the expression level of a plurality of biomarker nucleic acids; claim 1) using an hybridization assay (claim 1); a method of detecting a biomarker in a lung tissue sample obtained from a patient (a method of detecting a biomarker in a lung tissue sample obtained from a patient; claim 1), the method consisting of measuring the expression level of a plurality of biomarker nucleic acids (the method consisting of measuring the expression level of a plurality of biomarker nucleic acids; claim 1) using an hybridization assay (abstract); a method for selecting a squamous cell carcinoma patient for immunotherapy (a method for selecting a squamous cell carcinoma patient for immunotherapy; paragraph [0089]), the method comprising, determining a cancer subtype of a lung tissue sample from the patient (the method comprising, determining a cancer subtype of a lung tissue sample from the patient; claim 1), including squamous cell carcinoma (claim 1), based on the subtype (paragraph [0089]); and selecting the patient for immunotherapy (paragraphs [0089], [0091]); a method of treating lung cancer in a subject (a method of treating lung cancer in a subject; paragraph [0089]), the method comprising: measuring the expression level of at least one biomarker nucleic acid in a lung cancer sample obtained from the subject (the method comprising: measuring the expression level of at least one biomarker nucleic acid in a lung cancer sample obtained from the subject; claim 1), wherein the presence, absence and/or level of the at least one biomarker indicates a subtype of the lung cancer (wherein the presence, absence and/or level of the at least one biomarker indicates a subtype of the lung cancer; paragraph [0089]; claim 1); and administering an immunotherapeutic agent based on the subtype of the lung cancer (following treatment (administering) with an immunotherapeutic agent based on the subtype of the lung cancer; paragraphs [0015], [0089], [0091]).

Faruki does not disclose determining a squamous cell carcinoma (SQ) subtype of a lung tissue, the method comprising detecting an expression level of at least one classifier biomarker of Table 1, wherein the detection of the expression level of the classifier biomarker specifically identifies a basal, classical, secretory or primitive SQ subtype; a method of determining whether a squamous cell carcinoma patient is likely to respond to immunotherapy, and assessing whether the patient is likely to respond to immunotherapy.

Wilkerson discloses determining a squamous cell carcinoma (SQ) subtype of a lung tissue (a squamous cell carcinoma (SQ) subtype of a lung tissue; abstract) of a lung tissue sample from the patient (abstract), the method comprising detecting an expression level of at least one classifier biomarker of Table 1 (the method comprising detecting an expression level of at least one classifier biomarker such as FOXE1; abstract; page 5, third paragraph; figure 2), wherein the detection of the expression level of the classifier biomarker specifically identifies a basal, classical, secretory or primitive SQ subtype (wherein the detection of the expression level of the classifier biomarker specifically identifies a basal, classical, secretory or primitive SQ subtype; abstract).

Yale University discloses a method of determining whether a squamous cell carcinoma patient is likely to respond to immunotherapy (a method of determining whether a squamous cell carcinoma patient is likely to respond to immunotherapy; abstract; paragraphs [0021], [0118]; claim 1), and assessing whether the patient is likely to respond to immunotherapy (abstract; paragraphs [0008], [0084]).

It would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Faruki, to include determining a squamous cell carcinoma (SQ) subtype of a lung tissue, the method comprising detecting an expression level of at least one classifier biomarker, wherein the detection of the expression level of the classifier biomarker specifically identifies a basal, classical, secretory or primitive SQ subtype, as previously disclosed by Wilkerson, in order to provide a superior method for distinguishing SQ subtypes to effectively treat the disease. Furthermore, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art at the time of the invention to modify the disclosure of Faruki, to include a method of determining whether a squamous cell carcinoma patient is likely to respond to immunotherapy, and assessing whether the patient is likely to respond to immunotherapy, as previously disclosed by Yale, in order to provide effective therapy to a patient in need thereof.

Since none of the special technical features of the Groups 1+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Faruki, Wilkerson, and Yale references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 U
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
			C 1 2 N	15/09 Z

(31)優先権主張番号 62/420,836

(32)優先日 平成28年11月11日(2016.11.11)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 62/425,717

(32)優先日 平成28年11月23日(2016.11.23)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ファルキ, ハワジン

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27709, リサーチ トライアングル パーク, ティーダブリュー アレクサンダー ドライブ 79, リサーチ コモンズ 4401, スイート 105, ジーンセントリック セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ライーゴールドマン, マイラ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27709, リサーチ トライアングル パーク, ティーダブリュー アレクサンダー ドライブ 79, リサーチ コモンズ 4401, スイート 105, ジーンセントリック セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 メイヒュー, グレグ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27709, リサーチ トライアングル パーク, ティーダブリュー アレクサンダー ドライブ 79, リサーチ コモンズ 4401, スイート 105, ジーンセントリック セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 セロディー, ジョナサン

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27709, リサーチ トライアングル パーク, ティーダブリュー アレクサンダー ドライブ 79, リサーチ コモンズ 4401, スイート 105, ジーンセントリック セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ペロウ, チャールズ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27709, リサーチ トライアングル パーク, ティー
ダブリュー アレクサンダー ドライブ 79, リサーチ コモンズ 4401, スイート
105, ジーンセントリック セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ヘイズ, デイビッド ニール

アメリカ合衆国 ノースカロライナ 27709, リサーチ トライアングル パーク, ティー
ダブリュー アレクサンダー ドライブ 79, リサーチ コモンズ 4401, スイート
105, ジーンセントリック セラピューティクス, インコーポレイテッド 気付

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ52 QR08 QR62 QS25 QS36 QX02
4C084 AA17 NA05 ZB261 ZB262
4C085 AA14 BB01 CC23 EE01

专利名称(译)	肺鳞状细胞癌亚型分类方法		
公开(公告)号	JP2019516406A	公开(公告)日	2019-06-20
申请号	JP2019512943	申请日	2017-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学查珀尔希尔分校		
申请(专利权)人(译)	北卡罗来纳大学教堂山分校		
[标]发明人	ファルキハワジン ライゴールドマンマイラ メイヒューグレッグ ペロウチャールズ ヘイズデイビッドニール		
发明人	ファルキ, ハワジン ライ-ゴールドマン, マイラ メイヒュー, グレッグ セロディー, ジョナサン ペロウ, チャールズ ヘイズ, デイビッド ニール		
IPC分类号	C12Q1/6886 G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/6851 A61K45/00 A61P35/00 A61K39/395 C12N15/09		
CPC分类号	C07K14/47 C07K14/705 C07K14/81 C12N9/00 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/158 G16B40/10 G16H50/30		
FI分类号	C12Q1/6886.Z G01N33/574.Z G01N33/53.M C12Q1/6851.Z A61K45/00 A61P35/00 A61K39/395.U A61K39/395.T C12N15/09.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC23 4C085/EE01		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/337645 2016-05-17 US 62/379402 2016-08-25 US 62/396587 2016-09-19 US 62/420836 2016-11-11 US 62/425717 2016-11-23 US		
其他公开文献	JP2019516406A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过检测选自肺腺癌基因特征组的至少一种分类学生物标志物的表达水平来测定个体的肺鳞状细胞癌 (SQ) 亚型的方法和组合物提供。本文还提供了用于确定具有某种鳞状细胞癌亚型的个体对治疗 (例如免疫疗法) 的反应的方法和组合物。一种用于确定从患者获得的肺组织样品的鳞状细胞癌 (SQ) 亚型的方法, 所述方法包括检测表1的至少一种分类指示生物标志物的表达水平。一种方法, 其中所述检测所述分类学生物标志物的所述表达水平特异性地鉴定基础, 经典, 分泌或未分化的SQ亚型。

FIG. 1
Lung Cancer Subtyping

