

(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2013-505008

(P2013-505008A)

(43) 公表日 平成25年2月14日(2013.2.14)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 2 9
<b>C 1 2 M 1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 F	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	C 1 2 M 1/00 A	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 37/04 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 151 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-529295 (P2012-529295)	(71) 出願人	305060279
(86) (22) 出願日	平成22年9月17日 (2010.9.17)		グラクソスミスクライン バイオリジカル
(85) 翻訳文提出日	平成24年5月8日 (2012.5.8)		ズ ソシエテ アノニム
(86) 国際出願番号	PCT/EP2010/063751		ベルギー ベー-1330 リクセンサー
(87) 国際公開番号	W02011/033095		ル リュ ドランスティテュ 89
(87) 国際公開日	平成23年3月24日 (2011.3.24)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	61/277,046		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成21年9月18日 (2009.9.18)	(74) 代理人	100118773
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	0917457.4	(74) 代理人	100122389
(32) 優先日	平成21年10月6日 (2009.10.6)		弁理士 新井 栄一
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100111741
(31) 優先権主張番号	61/278,387		弁理士 田中 夏夫
(32) 優先日	平成21年10月6日 (2009.10.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 患者が免疫療法に対するレスポンドーかそうでなきかを同定するための方法

## (57) 【要約】

1つ以上の遺伝子の発現差異に基づき、患者を、療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして特徴付けるための方法が提供される。遺伝子発現プロファイル、遺伝子発現プロファイルを表す核酸配列を含むマイクロアレイ、ならびに新規診断キットおよび治療方法もまた提供される。キットおよび方法は、例えば、MAGE発現腫瘍を患う、遺伝子発現プロファイルにより特徴づけられる癌患者の特定の集団の治療に関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者をある療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして特徴付ける方法であって、

(a) 患者由来のサンプルを、表 1 の 1 つ以上の遺伝子の遺伝子産物の発現差異について分析すること；および

(b) 工程 (a) の結果に基づき、前記サンプルが由来する患者を、レスポンドーまたはノンレスポンドーとして特徴付けることを含み、

前記特徴付け工程は、標準またはトレーニングセットを参照または比較することにより、あるいはパラメータが標準またはトレーニングセットから得られたアルゴリズムを使用することにより実施される、方法。

10

## 【請求項 2】

(a) 患者由来のサンプルの、表 1 の 1 つ以上の遺伝子の遺伝子産物の発現差異について分析を得る工程であって、結果は、患者を免疫療法薬に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして特徴付け、前記特徴付け工程は、標準またはトレーニングセットを参照または比較することにより、あるいはパラメータが標準またはトレーニングセットから得られたアルゴリズムを使用することにより実施されること；および

(b) 前記患者が前記免疫療法薬に対するレスポンドーとして特徴付けられた場合、前記患者を、適切な免疫療法薬の少なくとも 1 つの投与のために選択すること、を含む、患者を治療する方法。

20

## 【請求項 3】

患者が免疫療法薬に対するレスポンドーであるか、またはノンレスポンドーであるかを決定する方法であって、

(a) 患者由来のサンプルを入手すること；および

(b) 前記患者由来のサンプルを表 1 の 1 つ以上の遺伝子の遺伝子産物の発現差異について分析すること

を含み、結果は、前記患者が免疫療法薬に対するレスポンドーか、またはノンレスポンドーとして特徴付けられるかを決定し、前記特徴付け工程は、標準またはトレーニングセットを参照または比較することにより、あるいはパラメータが標準またはトレーニングセットから得られたアルゴリズムを使用することにより実施される、方法。

30

## 【請求項 4】

前記表 1 の 1 つ以上の遺伝子は、表 1 で列挙される少なくとも 63 の遺伝子または表 2、5 もしくは 7 で特定される実質的にすべての遺伝子である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 5】

患者由来のサンプル中で、標的配列が表 3 で示される、1 つ以上の、表 1 に列挙されたプローブセットより認識される遺伝子産物を分析することを含む、患者を療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして特徴付ける方法であって、

前記特徴付け工程は、標準またはトレーニングセットを参照または比較することにより、あるいはパラメータが標準またはトレーニングセットから得られたアルゴリズムを使用することにより実施される、方法。

40

## 【請求項 6】

表 1 の前記 1 つ以上のプローブセットは、表 1 で列挙されるプローブセットの少なくとも 74 または表 2、5 もしくは 7 における遺伝子のためのプローブセット全てである、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

患者をレスポンドーとして同定し、前記患者を療法のために選択する工程をさらに含む、請求項 1、または 3 ~ 6 のいずれかで規定される方法。

## 【請求項 8】

50

前記標準はそれぞれ、公知の臨床成績を有する 1 または複数の患者からの、1 または複数の患者由来のサンプルである、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

前記療法または治療は癌免疫療法、好ましくはメラノーマおよび / または肺癌のための癌免疫療法である、請求項 1 ~ 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

前記癌免疫療法は M A G E である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 M A G E 免疫療法は M A G E A 3 免疫療法である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記表 1 の 1 つ以上の遺伝子は、少なくとも 63、少なくとも 68、少なくとも 70、少なくとも 75、少なくとも 80 または実質的にすべての、表 1 で列挙される遺伝子および / またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 13】

前記表 1 の 1 つ以上のプローブセットは、少なくとも 74、少なくとも 75、少なくとも 80、少なくとも 85、少なくとも 90 または全ての、表 1 で列挙されるプローブセットおよび / またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 5 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

前記 1 つ以上の遺伝子は、それらの正常発現に比べ上方制御される、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 15】

少なくとも 80 % の遺伝子が、それらの正常発現に比べ上方制御される、請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

前記遺伝子産物が上方制御および / または下方制御されたかを決定する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

前記遺伝子産物が上方制御および / または下方制御されたという決定は、レスポンドーを示す、請求項 16 に記載の方法。

30

【請求項 18】

遺伝子は免疫関連遺伝子である、請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載の方法。

【請求項 19】

1 つ以上の遺伝子産物の同定のためのプローブの使用を含む、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

遺伝子発現を分析するためのマイクロアレイキットまたは P C R の使用を含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

患者が療法、例えば癌免疫療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーである可能性があるかどうかの分析を実施するための、少なくとも 63 の、表 1 の遺伝子またはそれから作成されるデータ、あるいは少なくとも 74 の、表 1 のプローブセットまたはそれから作成されるデータの遺伝子リストの使用。

40

【請求項 22】

前記遺伝子リストは、実質的にすべての、表 1 の遺伝子またはプローブセットを含む、またはそれらから構成される、請求項 20 に記載の使用。

【請求項 23】

表 1 で列挙される遺伝子から選択される少なくとも 1 つの遺伝子の遺伝子産物の配列に相補的およびハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドプローブを含み、前記表 1 の遺伝子に相補的およびハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドプローブまたはプローブセットは

50

、前記マイクロアレイ上の少なくとも50%のプローブまたはプローブセットを構成する、マイクロアレイ。

【請求項24】

表1で列挙される遺伝子から選択される少なくとも1つの遺伝子の遺伝子産物の配列に相補的およびハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドプローブを含む、マイクロアレイ。

【請求項25】

表2に列挙される遺伝子の遺伝子産物の配列に相補的およびハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドプローブを含む、請求項23または請求項24に記載のマイクロアレイ。

【請求項26】

発現を測定するための手段、例えば、請求項1~20のいずれか1つの方法を実施するための、表1で列挙される1つ以上の遺伝子の、または表1で列挙される遺伝子の遺伝子産物の、mRNAまたはcDNA遺伝子産物にハイブリダイズするプローブを含む、診断キット。

10

【請求項27】

腫瘍関連抗原を含む組成物を患者に投与することを含む、請求項1~20の方法に従いレスポンドーとして特徴付けられた患者を治療する方法または請求項23~25のマイクロアレイもしくは請求項26の診断キットの使用。

【請求項28】

請求項1~20の方法または請求項23~25のマイクロアレイもしくは請求項26の診断キットの使用に従い、レスポンドーを有すると決定された、またはレスポンドーとして特徴付けられた患者の治療のための、腫瘍関連抗原を含む組成物。

20

【請求項29】

請求項1~20の方法または請求項23~25のマイクロアレイもしくは請求項26の診断キットの使用に従い、レスポンドーを有すると決定された、またはレスポンドーとして特徴付けられた患者の治療のための、薬剤の調製における、腫瘍関連抗原を含む、組成物の使用。

【請求項30】

前記腫瘍関連抗原はMAGE抗原である、請求項27~29のいずれか一項に記載の方法、組成物または使用。

【請求項31】

前記組成物はアジュバントをさらに含む、請求項27~30のいずれか一項に記載の方法、組成物または使用。

30

【請求項32】

少なくとも63の、表1で列挙される遺伝子の複数の検出試薬が結合された固体表面であって、その検出試薬は前記遺伝子の発現または前記遺伝子によりコードされるポリペプチドを検出することができる、固体表面。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

コンパクトディスク上で提出される材料

40

出願人は、本明細書によって、2009年10月6日に出願された米国仮出願第61/278387号において出願された、2009年10月6日に作成された「VR63933P\_pe.txt」(ファイルサイズ23.330MB);および2009年10月6日に作成された「VR63933P\_rq.txt」(ファイルサイズ15.767MB)と名付けられたファイルを含むコンパクトディスクの材料に言及し、その恩典を本明細書で主張する。計2つのコンパクトディスク(複製を含む)が、本パラグラフにおいて言及される。

【0002】

これらのディスク上のpeデータを利用するために、下記コマンドをRセッションで打ち込むことにより、VR63933P\_pe.txt ASCIIファイルをRセッション

50

ンにインポートすること：

```
pe <- read.table("VR63933P_pe.txt")
pe <- unstack(pe)
```

これらのディスク上のrqデータを利用するために、下記コマンドをRセッションで打ち込むことにより、VR63933P\_rq.txt ASCIIファイルをRセッションにインポートすること：

```
rq <- scan("VR63933P_rq.txt")
```

このデータの一般公開は本明細書の他の場所で開示される。

#### 【0003】

発明の分野

本発明は遺伝子発現プロファイル；患者を分類するための方法；マイクロアレイ；および本明細書で記載される方法およびマイクロアレイの使用により選択された患者集団の治療に関する。

#### 【背景技術】

#### 【0004】

メラノーマ表皮内のメラニン細胞に起因する腫瘍である。遠隔転移（癌に関する米国連合委員会（American Joint Commission on Cancer）（AJCC）分類に従いステージIV）において悪性メラノーマを有する患者は1年の生存期間中央値を有し、長期存率は5%にすぎない。ステージIVメラノーマに対する標準化学療法ですら、わずか8~25%の治療奏功率を有するが、全生存には効果はない。局所転移（ステージIII）を有する患者は、原発性および局所転移の十分な外科的制御後であっても、2~3年の生存期間中央値を有し、長期生存のチャンスは非常に低い（Balch et al., 1992）。ステージI~IIIメラノーマを有するほとんどの患者は、腫瘍を外科的に除去しているが、これらの患者は、実質的な再発のリスクを維持している。よって、依然として、メラノーマ進行を防止し、転移性メラノーマに対する改善された治療計画および原発腫瘍が除去された患者のためのアジュバント治療を有することが必要である。

#### 【0005】

2つの型の肺癌が存在する：非小細胞肺癌（NSCLC）および小細胞肺癌（SCLC）。名称は、単純に腫瘍中で見いだされた細胞の型を説明する。NSCLCは、扁平上皮癌、腺癌、および大細胞癌を含み、肺癌の約80%を占める。NSCLCは、治癒が困難で、使用できる治療は、可能な限りの延命と、疾患の症状の軽減を目的とする傾向がある。NSCLCは最も一般的な型の肺癌であり、不良転帰と関連している（Gatzmeier et al., 1994）。すべてのNSCLC患者のうち、約25%のみが診断時に局所疾患を有し、依然として外科的切除の可能性がある（AJCC分類に従いステージIB、IIAまたはIB）。しかしながら、これらの患者の50%超が完全な外科切除後2年以内に再発するであろう。よって、これらの患者のためのより良好な治療を提供する必要がある。

#### 【0006】

従来の化学療法は、有害物質を患者に投与し、ある程度、腫瘍/癌細胞による毒物の積極的な取り込みを期待することに基づく。これらの有害物質は、患者の免疫系に悪影響をし、個体は身体的に弱まり、感染しやすくなる。

#### 【0007】

癌患者がすべて現在の癌治療に应答するわけではないことが知られており、30%以下の癌患者のみがいずれかの一定の治療に应答すると考えられる。治療に应答しない癌は、抵抗性として説明される。多くの場合、患者が治療に应答するかどうかを確立するための信頼できる方法が存在しない。しかしながら、区別することができないので、レスポンドーおよびノンレスポンドーの両方である患者に治療を行うことは、資源の非効率的な使用となり、さらに悪いことに、患者に損害を与える可能性がある。というのは、前に記載したように、多くの癌治療は著しい副作用、例えば重度の免疫抑制、嘔吐および/または脱

10

20

30

40

50

毛症を有するからである。多くの場合、必要ではない場合、または有効ではない場合に、患者は治療を受けると考えられる。

【0008】

抗原、ペプチド、DNAなどに基づく次世代の癌治療は現在、多くのグループにより研究されている。これらの療法の多くの背後にある戦略は、しばしば癌免疫療法と呼ばれ、患者の免疫系を刺激し、癌と闘わせるものである。これらの療法の、そのような治療を受ける副作用が、癌治療を受けている患者が現在遭遇する副作用に比べ、最小に抑えられると予測されるので、好都合である可能性がある。癌免疫療法で使用される抗原は、ASCI、すなわち抗原-特異的癌免疫療法と呼ばれることがある。

【0009】

1980年代初頭には、Van PelおよびBoonは、腫瘍細胞上で提示された抗原に対する細胞傷害性T細胞の発見を発表した。これにより、第1の腫瘍-特異的、共通抗原：メラノーマMAGE-1(MAGE-1、その後MAGE-A1に改名)のキャラクタリゼーションに至った。この後、同じ発現パターンを共有する多くの遺伝子が同定された：これらは広範囲の腫瘍型、例えば、メラノーマ、肺癌、膀胱癌、乳癌、頭頸部癌において発現される。これらは精巣を除く正常細胞では発現されない。しかしながら、精巣におけるこの発現は、これらの生殖系列細胞はMHCクラスI分子を発現しないので、通常は抗原発現に至らない。特有の発現プロファイルから、癌精巣(CT)遺伝子の名称が、これらの遺伝子のために提案された。

【0010】

MAGE抗原は、メラノーマ関連抗原遺伝子(MAGE)のファミリーによりコードされる抗原である。MAGE遺伝子は、メラノーマ細胞(悪性メラノーマを含む)およびいくつかの他の癌、例えばNSCLC(非小細胞肺癌)、頭頸部扁平上皮癌、膀胱移行細胞癌および食道癌上で優位に発現されるが、精巣および胎盤を除く正常組織では検出できない(Gaugler et al Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes J Exp Med. 1994 Mar 1;179(3):921-930); Weynants et al Expression of mage genes by non small cell lung carcinomas Int. J Cancer. 1994 Mar 15;56(6):826-829, Patard et al Int J. Cancer 64: 60, 1995)。MAGE-A3は、69%のメラノーマで発現され(Gaugler, 1994)、44%のNSCLC(Yoshimatsu 1988)、48%の頭頸部扁平上皮癌、34%の膀胱移行細胞癌、57%の食道癌、32%の結腸癌および24%の乳癌(Van Pel, et al Genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes Immunological Reviews 145, 229-250, 1995, 1995)においても検出され得る。MAGEタンパク質を発現する癌はMAGE関連腫瘍として知られている。

【0011】

癌患者の診断および予後を助けるために、例えば、疾患の転移、再発または進行のリスクがないため、さらなる治療を必要としない患者を識別するために、最近では大量の研究がなされている。

【0012】

WO2006/124836は、いくつかの発癌過程にわたるある遺伝子発現サインを同定し、よって、患者の予後およびこれらの過程を標的とする治療薬への感度を規定する。特異的な癌遺伝子はMyc、Ras、E2、S3、Srcおよびカテニンである。

【0013】

US2006/0265138は、一般に、適切な治療を与えることができる原発腫瘍を同定するための、遺伝子プロファイルを作成する方法を開示する。

【0014】

US2006/0240441およびUS2006/0252057は、ある遺伝子の発現差異に基づいて肺癌を診断する方法を記載する。

【0015】

US2006/0234259は、前立腺癌に関連するある遺伝子発現プロファイルの

10

20

30

40

50

同定および使用に関する。

【0016】

WO2006/103442は、エストロゲン受容体(ER)陽性腫瘍のサブセットにおいて発現される遺伝子発現プロファイルに記載し、これは、あるホルモン療法、例えばタモキシフェンおよびある化学療法への応答に対する予測サインとして機能する。

【0017】

WO2006/093507は結腸直腸癌患者を良好な予後または悪い予後を有するものとして特徴付けるのに有用である遺伝子プロファイルに記載し、この場合、良好な予後を有する患者は化学療法に好適である。

【0018】

WO2006/092610は、ある遺伝子の発現差異および疾患に対する新規マーカー、特にTSBY1、CYBAおよびMT2Aに基づきメラノーマ進行をモニタするための方法を記載する。

【0019】

WO2005/049829は、erbB受容体キナーゼ阻害剤、例えばゲフィニチブである化学治療薬へのある癌の感度を予測するために使用され得る、マーカー遺伝子の単離された組を記載する。

【0020】

マイクロアレイ遺伝子プロファイリングは、いずれの治療介入に関係なく、癌患者がある療法に反応するかどうかを予測するため、または疾患の予後を評価するための強力な技術であることが示されている。多くの大規模臨床試験が、乳癌および濾胞性リンパ腫の異なる予後と関連すると考えられるプロファイル立証するために、現在進行中である(Dave, 2004; Hu, 2006; Weigelt, 2005)。

【0021】

腫瘍細胞を含む細胞は、何百もの、実は何千もの遺伝子を発現する。ある療法に反応する患者と反応しない患者の間の遺伝子の発現差異は、反応することができるように、患者への治療の特定の調整を可能にする。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0022】

【特許文献1】WO2006/124836

【特許文献2】US2006/0265138

【特許文献3】US2006/0240441

【特許文献4】US2006/0252057

【特許文献5】US2006/0234259

【特許文献6】WO2006/103442

【特許文献7】WO2006/093507

【特許文献8】WO2006/092610

【特許文献9】WO2005/049829

【非特許文献】

【0023】

【非特許文献1】Balch CM. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol*. 1992 Nov-Dec;8(6):400-14.

【非特許文献2】Gaugler et al Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes *J Exp Med*. 1994 Mar 1;179(3):921-930

【非特許文献3】Weynants et al Expression of mage genes by non small cell lung carcinomas *Int. J Cancer*. 1994 Mar 15;56(6):826-829

【非特許文献4】Patard et al *Int J. Cancer* 64: 60, 1995

【非特許文献5】Van Pel, et al Genes coding for tumor antigens recognized by cyt

10

20

30

40

50

olytic T lymphocytes Immunological Reviews 145, 229-250, 1995, 1995

【非特許文献6】Dave SS, Wright G, Tan B et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. N. Engl. J. Med. 2004;351:2159-2169

【非特許文献7】Hu Z, Fan C, Oh DS et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. BMC. Genomics 2006;7:96.

【非特許文献8】Weigelt B, Hu Z, He X et al. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. Cancer Res. 2005;65:9155-9158.

【発明の概要】

10

【0024】

1つの態様では、本発明は、

(a) 患者由来のサンプルにおける1つ以上の遺伝子の発現レベルを決定する工程であって、遺伝子(複数可)は表1から選択される工程；

(b) パラメータがトレーニングセットにより規定されたアルゴリズムを用いて、(a)の発現レベルに基づき、患者をレスポンドーまたはノンレスポンドー群のいずれかに分類する工程

を含む、患者を適切な免疫療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして分類する方法を提供する。

【0025】

20

1つの態様では、本発明は、

(a) 患者由来のサンプルを、表1の1つ以上の遺伝子の遺伝子産物の発現差異について分析する工程、および

(b) 工程(a)の結果に基づき、サンプルが由来する患者を、レスポンドーまたはノンレスポンドーとして特徴付ける工程であって、標準またはトレーニングセットを参照または比較することにより、あるいはパラメータが標準またはトレーニングセットから得られたアルゴリズムを使用することにより実施される、工程

を含む、患者をある療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして特徴付ける方法を提供する。

【0026】

30

1つの実施形態では、患者由来のサンプルの表1の1つ以上の遺伝子の遺伝子産物の発現差異について分析を得ることにより、患者を治療する方法を提供する。結果は、患者を免疫療法薬に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして特徴付け、特徴付け工程は、標準またはトレーニングセットを参照または比較することにより、あるいはパラメータが標準またはトレーニングセットから得られたアルゴリズムを使用することにより実施される。患者はその後、患者がその免疫療法薬に対するレスポンドーとして特徴付けられた場合、適切な免疫療法薬の少なくとも1つの投与のために選択される。

【0027】

1つの実施形態では、患者由来のサンプルを入手し、患者由来のサンプルを表1の1つ以上の遺伝子の遺伝子産物の発現差異について分析することにより、患者が免疫療法薬に対するレスポンドーであるか、またはノンレスポンドーであるかを決定する方法を提供する。結果は、患者が免疫療法薬に対するレスポンドーか、またはノンレスポンドーとして特徴付けられるかを決定し、特徴付け工程は、標準またはトレーニングセットを参照または比較することにより、あるいはパラメータが標準またはトレーニングセットから得られたアルゴリズムを使用することにより実施される。

40

【0028】

1つの実施形態では、工程(b)は、数学的判別関数または決定木に基づく。決定木は少なくとも1つの二変数分類工程を含み得る。

【0029】

さらなる実施形態では、本発明は、患者由来のサンプル中で、標的配列が表3で示され

50

る表 1 に列挙された 1 つ以上のプローブセットより認識される遺伝子産物を分析することを含み、特徴付け工程は、標準またはトレーニングセットを参照または比較することにより、あるいはパラメータが標準またはトレーニングセットから得られたアルゴリズムを使用することにより実施される、患者を療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして特徴付ける方法を提供する。

【 0 0 3 0 】

例示的な実施形態では、表 1 の 1 つ以上の遺伝子またはプローブセットは、表 1 で列挙される少なくとも 6 3 の遺伝子または表 1 で列挙される少なくとも 7 4 のプローブセットである。

【 0 0 3 1 】

例示的な実施形態では、本発明の方法は、表 2、5、7 または 9 で特定される、遺伝子の発現レベルまたはプローブセットの遺伝子産物の測定結果を決定することを含む。これらの表中の各遺伝子およびプローブセットならびに遺伝子またはプローブセットの群は、本発明の特定の態様を形成する。表 2、5、7 および 9 中の遺伝子およびプローブセットは、表 1 における遺伝子およびプローブセットの特定のサブセットを表す。

【 0 0 3 2 】

M A G E - A 3 A S C I または任意の免疫療法アプローチに対するレスポンドー患者とノンレスポンドー患者の間で区別するために使用することができる予測遺伝子プロファイルもまた提供され、ここで、プロファイルは表 1 で列挙される遺伝子から選択される 1 つ以上の遺伝子を含む。

【 0 0 3 3 】

1 つの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子プロファイルが提供され、ここで、遺伝子は、表 1 で列挙されるプローブセットにより認識される遺伝子である。

【 0 0 3 4 】

さらなる態様では、プロファイルは、表 1 で列挙される遺伝子すべてを含み、またはそれらから構成され、あるいは表 1 で列挙されるプローブセットにより認識され、または標的とされる遺伝子すべてを含み、またはそれらから構成される。

【 0 0 3 5 】

1 つの態様では、本発明は、表 1 で列挙される遺伝子から選択される少なくとも 1 つの遺伝子の遺伝子産物の配列に相補的で、ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドプローブを含むマイクロアレイを提供し、ここで、表 1 の遺伝子に相補的で、ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドプローブまたはプローブセットは、前記マイクロアレイ上のプローブまたはプローブセットの少なくとも 5 0 % を構成する。

【 0 0 3 6 】

1 つの態様では、本発明は、表 1 で列挙される遺伝子から選択される少なくとも 1 つの遺伝子の遺伝子産物の配列に相補的で、ハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドプローブを含むマイクロアレイを提供する。

【 0 0 3 7 】

1 つの態様では、本発明は少なくとも 6 3 の、表 1 で列挙される遺伝子の複数の検出試薬が結合された固体表面を提供し、その検出試薬は、遺伝子または遺伝子によりコードされるポリペプチドの発現を検出することができる。

【 0 0 3 8 】

1 つの態様では、本発明は、表 1 で列挙される 1 つ以上の遺伝子または表 1 で列挙される遺伝子の遺伝子産物の発現を検出するための手段を含む診断キットを提供する。発現は、m R N A または c D N A 遺伝子産物とハイブリダイズするプローブにより検出され得る。

【 0 0 3 9 】

1 つの態様では、本発明は表 1 の 1 つ以上の遺伝子または表 1 で列挙される遺伝子の遺伝子産物の遺伝子産物、例えば m R N A または c D N A、を同定する 1 つ以上のプローブを提供する。

10

20

30

40

50

## 【0040】

1つの態様では、本発明は、表1の1つ以上の遺伝子産物、または本明細書に記載される遺伝子プロファイルの遺伝子産物の発現差異（例えば上方制御）の同定のためのPCR（または他の公知の技術）の使用を提供する。

## 【0041】

さらなる実施形態では、本発明は療法に対するレスポンドーとして特徴付けられた患者を治療する方法であって、本明細書に記載されるように治療を施す、ワクチンまたは免疫原性組成物を患者に投与することを含む方法を提供する。

## 【0042】

さらなる実施形態では、本発明は、本明細書に記載される方法または本明細書に記載される診断キットの使用に従い療法に対するノンレスポンドーとして特徴付けられた患者を治療する方法であって、別の療法または療法の組み合わせを施すことを含む方法を提供し、例えば化学療法および/または放射線療法が本明細書に記載されるワクチンまたは免疫原性組成物の代わりに、またはそれに加えて使用され得る。

10

## 【0043】

さらなる実施形態では、本発明は、本明細書に記載される方法、本明細書に記載されるマイクロアレイの使用、本明細書に記載される遺伝子プロファイルの使用または本明細書に記載される診断キットの使用に従いレスポンドーとして特徴付けられた患者の治療のための薬剤の調製における、腫瘍関連抗原を含む組成物の使用を提供する。

## 【図面の簡単な説明】

20

## 【0044】

【図1】リーブワンアウトクロスバリデーション（Leave One Out Cross Validation）（LOOCV）に対するスキームを示す。

【図2】各グループにおける分類のための最良の100PSを選択するLOOCVの結果を示す。白丸＝ノンレスポンドー、AS02B群。黒丸＝レスポンドー、AS02B群。白三角＝ノンレスポンドー、AS15群。黒三角＝レスポンドー、AS15群。

【図3】プローブセット（PS）が各LOOCVにおける100トッps 2n（信号対ノイズ比）内にある度数（X軸上のPS数）を示す。

【図4】第II相メラノーマ治療におけるすべての患者を用いたアジュバントによる全生存に対するKaplan-Meier曲線（KM）を示す。実線＝AS15群。点線＝AS02B群。

30

【図5】LOOCV分類に基づく遺伝子サインによる全生存に対するKMを示す。実線＝遺伝子サイン陽性（GS+）；点線＝遺伝子サイン陰性（GS-）。

【図6】アジュバントおよびLOOCV分類に基づく遺伝子サインによる全生存Kaplan-Meier曲線を示す。太い実線＝AS15群、GS+。太い点線＝AS15群、GS-。細い実線＝AS02B群、GS+。細い点線＝AS02B群、GS-。

【図7】100PS（リーブワンアウトではない）を用いたサンプルの分類を示す。白丸＝ノンレスポンドー、AS02B群。黒丸＝レスポンドー、AS02B群。白三角＝ノンレスポンドー、AS15群。黒三角＝レスポンドー、AS15群。

【図8】表5で特定されるPCRにより測定された22遺伝子を用いた対応するサンプルのリーブワンアウト分類を示す。白丸＝ノンレスポンドー、AS02B群。黒丸＝レスポンドー、AS02B群。白三角＝ノンレスポンドー、AS15群。黒三角＝レスポンドー、AS15群。

40

【図9】表5で特定される22遺伝子を用いたサンプルの分類を示す（リーブワンアウトではない）。白丸＝ノンレスポンドー、AS02B群。黒丸＝レスポンドー、AS02B群。白三角＝ノンレスポンドー、AS15群。黒三角＝レスポンドー、AS15群。

【図10】NSCLC第II相治療設計を示す。

【図11】NSCLC治療に対する無病期間に対するKM曲線を示す。丸付き実線＝MAGE-A3；四角付き点線＝プラセボ。

【図12】この適用例で使用されるcox-SPCA方法を示す。

50

【図13】PCRにより測定された表6で列挙される23遺伝子を用いたカットオフとしてメジアンを有する、LOOCV分類に基づく遺伝子プロファイルによる生存曲線を示す。太い実線 = MAGE免疫療法、GS+。太い点線 = MAGE免疫療法、GS-。細かい実線 = プラセボ、GS+。細かい点線 = プラセボ、GS-。

【図14】LOOCV分類を用いてPCRにより測定した表6に列挙される23遺伝子を用いた、129NSCLCサンプルにおけるプラセボ（左パネル）およびワクチン群（右パネル）間のリスクスコア分布を示す。黒菱形 = 再発；白菱形 = 非再発。

【図15】表6に列挙される分類指標において、Q-PCRによる23遺伝子を用いた分類に基づく臨床成績を示す（リーブワアウトではない）。太い実線 = MAGE免疫療法、GS+。太い点線 = MAGE免疫療法、GS-。細かい実線 = プラセボ、GS+。細かい点線 = プラセボ、GS-。

10

【図16】表6に列挙される分類指標において、Q-PCRにより23遺伝子を用いた分類に基づくプラセボ（左パネル）およびワクチン群（右パネル）間のリスクスコアを示す（リーブワアウトではない）。黒菱形 = 再発；白菱形 = 非再発。

【図17】表5で列挙される22遺伝子を用いた129NSCLCサンプルにおいてカットオフとしてメジアンを有する、LOOCV分類に基づく遺伝子プロファイルによる生存曲線を示す。太い実線 = MAGE免疫療法、GS+。太い点線 = MAGE免疫療法、GS-。細かい実線 = プラセボ、GS+。細かい点線 = プラセボ、GS-。

【図18】LOOCV分類を用いて表5に列挙される22遺伝子を用いた、129NSCLCサンプルにおけるプラセボ（左パネル）およびワクチン群（右パネル）間のリスクスコア分布を示す。黒菱形 = 再発；白菱形 = 非再発。

20

【図19】表5に列挙される分類指標において、Q-PCRによる22遺伝子を用いた分類に基づく臨床成績を示す（リーブワアウトではない）。太い実線 = MAGE免疫療法、GS+。太い点線 = MAGE免疫療法、GS-。細かい実線 = プラセボ、GS+。細かい点線 = プラセボ、GS-。

【図20】表5に列挙される分類指標において、Q-PCRによる22遺伝子を用いた分類に基づくリスクスコアを示す（リーブワアウトではない）。黒菱形 = 再発；白菱形 = 非再発。

【図21】タンパク質D1/3 - MAGE3 - HISタンパク質を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0045】

配列識別子および表：

下記配列識別子は配列リストに含まれる：

配列番号：1 - 100 - 表3に示されるプローブセット標的配列

配列番号：101 - タンパク質D - MAGE - A3融合タンパク質

配列番号：102 - 106 - CpGオリゴヌクレオチド配列

配列番号：107 - 113 - MAGEペプチド配列

表1：100PSおよび対応する遺伝子リスト

表1A：すべてのサンプルおよびLOOCVにおいて選択される回数を用いて選択された100PS

40

表2：表1からの27PSおよび21遺伝子のサブセット

表3：100PS標的配列

表4：100PS分類指標特徴に対する平均、標準偏差(Sd)およびPC<sub>1</sub>係数

表5：メラノーマにおける22遺伝子の好適なサブセット

表6：メラノーマにおける22遺伝子分類指標特徴に対する平均、標準偏差(Sd)およびPC<sub>1</sub>係数

表7：NSCLCにおける23遺伝子の好適なサブセット

表8：NSCLCにおける23遺伝子分類指標特徴に対する平均、標準偏差(Sd)およびPC<sub>1</sub>係数

表9：NSCLCにおける22遺伝子の好適なサブセット

50

表 10 : NSCLC における 22 遺伝子分類指標特徴に対する平均、標準偏差 ( S d ) および P C 1 係数

表 11 : メラノーマサンプルにおける Q - P C R により測定した個々の遺伝子の分類性能

表 12 : NSCLC サンプルにおける Q - P C R により測定した個々の遺伝子の分類性能

表 13 : メラノーマサンプルにおけるマイクロアレイにより測定した個々の遺伝子の分類性能。

【 0 0 4 6 】

発明の詳細な説明

予測遺伝子プロファイル

外科切除後の、悪性メラノーマを有する患者由来の処置前腫瘍組織に対して実施された分析において、ある遺伝子が療法に应答する可能性がより高い患者 ( レスポンダー ) では、应答する可能性がより低い患者 ( ノンレスポンダー ) と比べて異なって発現されたことを確認した。

【 0 0 4 7 】

本発明者らは、患者の療法に対する应答の可能性を予測する遺伝子プロファイルを発見した。

【 0 0 4 8 】

「遺伝子プロファイル」により、その発現が患者の療法に対する应答と相関する 1 つのまたは 1 組の遺伝子が意図される。というのも、その 1 つのまたは 1 組の遺伝子が療法に対し有利な应答を有する患者と療法に対し不十分な应答を有する患者の間で発現差異を示すからである。本発明の 1 つの実施形態では、「遺伝子プロファイル」という用語は、表 1 で列挙される遺伝子または本明細書に記載される表 1 の遺伝子の任意の選択を示す。

【 0 0 4 9 】

本明細書では、例えば、抗癌治療に対する「有利な应答」(または「有利な臨床应答」)は当業者により、別の治療またはいずれの治療もなしで起こる腫瘍増殖に比べ、腫瘍増殖速度の減少を示すとして認識される生物学的または身体的应答を示す。療法に対する有利な臨床应答としては、被験体が経験する症状の緩和、予測される、または達成される生存期間の増加、腫瘍増殖速度の減少、腫瘍増殖の休止 ( 不変 )、転移性病変の数および質量の退行、および / または全腫瘍質量の退行 ( それぞれ、治療なし、または他の治療に应答して起こるものと比較 ) が挙げられる。アジュバント癌治療の場合、有利な臨床应答としては、再発なし、または再発率の遅延、または無病生存期間もしくは時間間隔の増加が挙げられる。

【 0 0 5 0 】

本発明との関連では、「発現差異」は遺伝子が正常発現に比べ上方制御または下方制御されることを意味する。遺伝子の発現差異を計算するための統計学的方法は本明細書の他の場所で記載される。

【 0 0 5 1 】

いくつかの態様では、本発明は患者を療法に対するレスポンダーまたはノンレスポンダーとして特徴付けるための遺伝子プロファイルを提供し、プロファイルは、表 1 の少なくとも 1 つの遺伝子の発現差異を含み、または、プロファイルは、表 1 で列挙される遺伝子を含むもしくはそれらから構成される。プロファイルはレスポンダーまたはノンレスポンダーを示し得る。1 つの実施形態では、本明細書に記載される遺伝子プロファイルは、レスポンダーを示す。

【 0 0 5 2 】

表 1 のプローブセットにより認識され、または標的とされる遺伝子配列は表 3 で列挙される。

【 0 0 5 3 】

「表 1 の遺伝子」により、表 1、2、5、7 または 9 において「遺伝子名」下で列挙される遺伝子が意味される。「遺伝子産物」により、自然の、または人工的な手段により産生されるかどうかに関わらず、遺伝子の任意の転写または翻訳産物が意味される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 4 】

本発明の1つの実施形態では、本明細書で言及される遺伝子は、「遺伝子名」を示す列で規定される、表1、2、5、7または9で列挙されるものである。別の実施形態では、本明細書で言及される遺伝子は、その産物が表1で列挙されるプローブセットにより認識され得る遺伝子である。

## 【 0 0 5 5 】

理論に束縛されるものではないが、表1で同定される遺伝子サインは、実際、レスポンドーとして指定される患者における免疫/炎症、例えばT細胞浸潤/活性化応答を示し、例えば、サインはT細胞活性化マーカーを表し得ることが仮定される。サインはまた、Th1マーカー、例えば細胞性免疫応答の誘導に有利に働く傾向のあるインターフェロン経路のメンバーを表し得る。この応答の存在は、患者の身体が疾患、例えば癌と闘うのを助けると考えられ、免疫療法の実施後、これによって、患者は前記免疫療法に対しより応答性となる。

10

## 【 0 0 5 6 】

よって、本発明のサインは一般に、関連疾患、例えば癌の診断および/または予後と特定の関連するマーカー/遺伝子、例えば癌遺伝子に焦点を当てておらず、むしろ、患者が適切な免疫療法、例えば癌免疫療法に応答するかどうかを予測する。

## 【 0 0 5 7 】

本明細書で同定された遺伝子プロファイルは、腫瘍の微小環境を示すと考えられる。少なくともこの態様では、腫瘍の正確な微小環境が、患者が適切な癌免疫療法に応答するかどうかへのカギとなると考えられる。

20

## 【 0 0 5 8 】

サインの生物学は、作用のASCIモードと関連する。というのは、T細胞マーカーおよびTh1マーカー、例えばインターフェロン経路のメンバーの上方制御を示すレスポンドー患者の腫瘍における免疫エフェクター細胞の存在に有利に働く特異的な腫瘍微小環境(ケモカイン)の存在を示唆する遺伝子を含むからである。転移性メラノーマにおける最近の遺伝子発現プロファイリング研究は、腫瘍がT細胞関連転写物の存在または非存在に基づき分離され得ることを明らかにした(Harlin, 2009)。腫瘍中のリンパ球の存在は、6つのケモカインのサブセットの発現と相関し(CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9、CXCL10)、これらの6つの遺伝子のうち3つ(CCL5、CXCL9、CXCL10)が表1の100PS中に存在する。

30

## 【 0 0 5 9 】

1つの実施形態では、本発明は1つ以上(例えば、実質的にすべて)の表1で列挙される遺伝子を使用する。好適には、本発明は表1で列挙される少なくとも63の遺伝子または74のプローブセットを使用する。

## 【 0 0 6 0 】

好適には、表1の1つ以上の遺伝子は、少なくとも63、少なくとも64、少なくとも65、少なくとも66、少なくとも67、少なくとも68、少なくとも69、少なくとも70、少なくとも71、少なくとも72、少なくとも73、少なくとも74、少なくとも75、少なくとも76、少なくとも77、少なくとも78、少なくとも79、少なくとも80または実質的にすべての、表1で列挙される遺伝子および/またはそれらの任意の組み合わせである。

40

## 【 0 0 6 1 】

好適には、表1の1つ以上のプローブセットは、少なくとも74、少なくとも75、少なくとも76、少なくとも77、少なくとも78、少なくとも79、少なくとも80、少なくとも81、少なくとも82、少なくとも83、少なくとも84、少なくとも85、少なくとも86、少なくとも87、少なくとも88、少なくとも89、少なくとも90または実質的にすべての、表1で列挙されるプローブセットおよび/またはそれらの任意の組み合わせである。

## 【 0 0 6 2 】

50

遺伝子リストの関連では、実質的にすべては少なくとも90%、例えば95%、特に96、97、98または99%の与えられたリスト中の遺伝子である。

【0063】

1つの態様では本発明は、転移性設定で使用される。

【0064】

レスポンドー（または、ノンレスポンドー）であると考えられる患者において、遺伝子が常に上方制御され、または常に下方制御される場合、閾値が確立され、2つの群の分離が十分であるとすれば、この単一の遺伝子を使用して、患者がレスポンドーであるか、またはノンレスポンドーであるかを確立することができる。

【0065】

1つの態様では、本発明は1つ以上の前記遺伝子を含むレスポンドーを同定するための遺伝子プロファイルを提供し、この場合50、60、70、75、80、85、90、95、99または100%の遺伝子が上方制御される。対照的に、ノンレスポンドーでは、遺伝子/遺伝子群が上方制御されない、または下方制御される。

【0066】

本発明との関連では、サンプルは治療が必要な可能性のある患者由来の任意の生物学的組織または流体とすることができる。サンプルは、痰、血液、尿由来、または固形組織、例えば原発腫瘍もしくは転移からの生検由来、または前に除去した組織の切片由来としてもよい。

【0067】

サンプルは、例えば、針生検、外科切除サンプルまたはリンパ節組織を含む、またはそれらから構成されることができる。これらの方法は、生検を入手することを含み、これは任意で、クリオスタット切片法により分画され、腫瘍細胞が総細胞集団の約80%まで濃縮される。ある実施形態では、これらのサンプルから抽出された核酸は、当技術分野でよく知られた技術を用いて増幅され得る。選択されたマーカーのレベルは、検出することができ、例えばM a g e陽性ノンレスポンドー患者の統計学的に有効な群と比較することができる。

【0068】

癌に関する分析では、生物学的サンプルはサンプルが癌または腫瘍細胞を含む機会を最大にするように得られ、例えば、癌または腫瘍由来とすることができ、例えば新鮮サンプル（凍結サンプルを含む）またはパラフィン中で保存されたサンプルとすることができる。とは言ったものの、パラフィン中で保存されたサンプルは、分解を受ける可能性があり、観察されるプロファイルが変更される可能性がある。当業者は、プロファイルのパラメータを再較正することにより観察されるこれらの変化をうまく補償することができる。

【0069】

1つの態様では、生物学的サンプルは例えば腫瘍または癌組織由来の生検サンプルである。

【0070】

1つの態様では、癌免疫療法は、メラノーマ、肺癌、例えばNSCLC、膀胱癌、頸部癌、結腸癌、乳癌、食道癌および/または前立腺癌、例えば肺癌および/またはメラノーマ、特にメラノーマの治療のためのものである。

【0071】

本発明との関連では、「レスポンドー」は、癌/腫瘍（複数可）が根絶され、減少されまたは改善される（完全レスポンドーまたは部分レスポンドー；混合レスポンドー）あるいは単純に安定化され、疾患が進行しない（「不変」）人間である。癌に関する「完全臨床レスポンドー」は、標的病変がすべて消失した場合である。

【0072】

癌に関して、「部分臨床レスポンドー」または「部分レスポンドー」は、腫瘍/癌のすべてが、治療にある程度応答する場合であり、例えば、前記癌が30、40、50、60%以上減少した場合である。

10

20

30

40

50

## 【0073】

「進行性疾患」は、標的病変のサイズの20%増加または1つ以上の新規病変の出現またはこれらの両方を表す。

## 【0074】

進行性疾患(PD)を有する患者は、さらに非混合応答を有するPDに対する分類指標となり得、または癌に関して、I型またはII型の「混合臨床レスポナー」または「混合レスポナー」を有する進行性疾患は、腫瘍/癌のうち、治療に応答するものもあり、不変なまままたは進行するものもある場合として規定される。

## 【0075】

ノンレスポナー(NR)は、患者が、混合応答を有しない進行性疾患を有する、および少なくとも1つの標的病変の消失を示さない混合応答IIを有する進行性疾患を有する患者として規定される。

10

## 【0076】

レスポナーでは、癌が安定化され、その後、安定期間は、治療を受けていない患者に比べ、生活の質および/または患者の平均余命が増加される(例えば6ヶ月超の間不変)ようなものとなる。

## 【0077】

いくつかの実施形態では、「レスポナー」という用語は、「混合レスポナー」を含まない可能性がある。

## 【0078】

新規患者のレスポナー(遺伝子サイン陽性)またはノンレスポナー(遺伝子サイン陰性)としての予測特徴付けは、「標準」またはトレーニングセットを参照することにより、またはそのパラメータがトレーニングセットから得られた数学的モデル/アルゴリズム(分類指標)を使用することにより実施することができる。標準は、レスポナーまたはノンレスポナーであることが知られている人間/患者(複数可)のプロファイルとしてもよく、またはその代わりに、数値としてもよい。そのような予め決定された標準は、任意の好適な形態、例えば印刷されたリストまたは図表、コンピュータソフトウェアプログラム、または他の媒体で提供され得る。

20

## 【0079】

標準は、好適には公知のレスポナーまたはノンレスポナー状態を有する1または複数の患者における1つまたは複数の遺伝子産物の発現に対する値、またはその関数であり、そのため、標準情報を患者由来のサンプルにおける同じ遺伝子の発現に関する情報と比較することにより、患者においてレスポナーまたはノンレスポナー状態についての結論が引き出される。標準は、表1の1つ以上の遺伝子を用いて、およびレスポナーまたはノンレスポナーであることがわかっている1つ以上の個体の分析から得ることができる。

30

## 【0080】

トレーニングセットから得られるトレーニングデータまたはパラメータの非制限的例は、下記実施例1に記載されるサンプル正規化のために使用される参照データセット、参照分位点、プローブ効果またはRオブジェクトフォーマットデータである。レスポナーまたはノンレスポナーとしての患者の分類におけるこれらの具体例の使用が、本発明の特定の態様を形成する。

40

## 【0081】

1つの態様では、統計的分析は標準またはトレーニングセットを参照することにより実施される。表1の遺伝子リストは、比較群としてトレーニングセットにおける患者の臨床成績(レスポナーおよびノンレスポナー)を用い、各プローブセットの信号対ノイズ比を計算することにより作成された。トレーニングセットから誘導された分類指標パラメータはその後、新規サンプルに対する分類を予測するために使用される。

## 【0082】

本明細書の関連では、トレーニングセットは、臨床成績を遺伝子プロファイルと関連さ

50

せることができ、適切な統計的モデル/プログラムを訓練して、新規サンプルに対しレスポンスおよび/またはノンレスポンスを同定するために使用することができるサンプル群を示すことが意図される。

【0083】

理論に束縛されるものではないが、表1の100遺伝子のうち少なくとも68は、トレーニングセットにおける変化に対し抵抗性であると考えられる。これらの遺伝子はこの発明の特定の態様を形成する。これらの遺伝子は表1Aの列5から同定することができる。

【0084】

1つの態様では、患者をレスポンスまたはノンレスポンスとして特徴付けるために、数学的モデル/アルゴリズム/統計学的方法が使用される。

10

【0085】

特徴付けのためのアルゴリズムは、任意の1つの遺伝子および任意の1つの公知のレスポンスまたはノンレスポンスからの遺伝子発現情報を使用し、好適には、目的変数ありの主成分分析に基づくが、任意の好適な特徴付けアルゴリズム、例えば実施例1~7の任意のアルゴリズムを使用してもよい。

【0086】

特定の、アルゴリズムは、実施例1で示される判別分析アルゴリズムを用いた目的変数ありの主成分分析または実施例3で示されるcox決定規則を用いた目的変数ありの主成分分析を使用して、公知の臨床成績を有する個体またはトレーニングセットから標準を作成してもよい。

20

【0087】

そのため、1つの態様では、本発明はまた新規患者をレスポンスまたはノンレスポンスとして特徴付けるための分類指標の開発に関し、分類指標のパラメータは、公知の臨床成績(レスポンスおよびノンレスポンス)を有するトレーニングセットから得られる。

【0088】

遺伝子リストは、信号対ノイズ比、Baldi分析古典的T検定のバリエーション、および/またはピアソン相関係数(Pearsons Correlation Coefficient)および/または線形判別分析を使用して作成してもよい。例えば、Golub T, Slonim D, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 1999; 286: 531-536. Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature, 415(6871), 530-556を参照されたい。

30

【0089】

分類指標は、目的変数ありの主成分、判別分析、最近接重心、kNN、サポートベクターマシンまたは分類に適切な他のアルゴリズムを使用し;分類のために時間(例えば、生存期間、無病期間)を使用するアルゴリズムを含む。また、分類は、当技術分野でよく知られた他の数学的方法を用いて達成することができる。

40

【0090】

分類指標は、実施例1および/または2で例示されるDA決定規則を有するSPCAまたは実施例3および/または4で例示されるSPCA-cox決定規則を含み得る。いくつかの実施形態では、開示される方法は、50%、60%または70%超の精度、例えば約70%の精度で、レスポンスおよびノンレスポンスを正確に予測する。

【0091】

1つの実施形態では、レスポンスおよびノンレスポンスは、治療不成功までの時間(TTF)/全生存(OS)を参照することにより規定され、これは連続変数であり、例えば数ヶ月で測定され得る。治療不成功までの時間変数が大きい場合、患者はレスポンスであると考えられる。治療不成功までの時間変数が小さい場合、患者はノンレスポンス

50

ーであると考えられる。一般に、このアプローチを使用すると、混合レスポンドーもまた、レスポンドーと同じ群となる。

【0092】

治療不成功は、患者が本明細書で規定されるレスポンドー、部分レスポンドー、混合レスポンドーまたは不変の規定に入らない場合である。

【0093】

1つの態様では、ノンレスポンドーは、6ヶ月以下のTTFを有するものとして規定され得る。

【0094】

1つの態様では、レスポンドーは、6ヶ月超の、例えば7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24以上の月のTTFを有するものとして規定され得る。

10

【0095】

本発明の1つの態様では、治療に対する患者応答は無病期間(DFI)または無病生存率(DFS)であり、これらは連続変数であり、例えば月で測定され得る。DFIおよびDFSは、例えば、アジュバント治療において使用され；これは、腫瘍が除去され、再発を回避または遅延させるため、または同等に無病期間または生存率を延長させるために治療が提供される場合である。

【0096】

DFIおよびDFSは患者の臨床情報または測定された患者のパラメータ、例えばバイオマーカーまたは遺伝子発現プロファイルに相関させることができ、新規患者の応答を予測するための数学的モデルを構築するために使用することができる。

20

【0097】

1つの態様では、本発明の方法は、表1で列挙される遺伝子の発現レベルまたはプローブセットの遺伝子産物の測定値を決定することを含む。

【0098】

1つの態様では、本発明は、肺癌およびメラノーマの両方に対する免疫療法、好適には癌精巢抗原、例えばMAGEに基づく免疫療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして患者を予測または同定するための、表1で列挙される、1つ以上(例えば、実質的にすべて)の遺伝子またはプローブセットの使用を含む。好適には本発明は、表1で

30

【0099】

表1

【表 1】

	Affy ID	R2.9 アノテーションによる 遺伝子記号	Affymetrix アノテーションによる 遺伝子記号
1.1	AFFX-HUMISGF3A/M97 935_MB_at	STAT1	STAT1
1.2	1555852_at	PSMB9	NA
1.3	1562031_at	JAK2	JAK2
1.4	201474_s_at	ITGA3	ITGA3
1.5	202659_at	PSMB10	PSMB10
1.6	203915_at	CXCL9	CXCL9
1.7	204070_at	RARRES3	RARRES3
1.8	204116_at	IL2RG	IL2RG
1.9	204533_at	CXCL10	CXCL10
1.10	205758_at	CD8A	CD8A
1.11	205890_s_at	UBD	GABBRI /// UBD
1.12	207651_at	GPR171	GPR171
1.13	207795_s_at	KLRD1	KLRD1
1.14	208729_x_at	HLA-B	HLA-B
1.15	208885_at	LCP1	LCP1
1.16	208894_at	HLA-DRA	HLA-DRA
1.17	209606_at	CYTIP	CYTIP
1.18	210915_x_at	IL23A	TRBC1
1.19	210972_x_at	TRA@	TRA@ /// TRAC /// TRAJ17 /// TRAV20
1.20	210982_s_at	HLA-DRA	HLA-DRA
1.21	211144_x_at	TARP	TARP /// TRGC2
1.22	211339_s_at	ITK	ITK
1.23	211796_s_at	IL23A	TRBC1 /// TRBC2
1.24	211911_x_at	HLA-B	HLA-B
1.25	212671_s_at	HLA-DQA1	HLA-DQA1 /// HLA-DQA2
1.26	213793_s_at	HOMER1	HOMER1
1.27	215806_x_at	TRGC2	TARP /// TRGC2
1.28	216920_s_at	TARP	TARP /// TRGC2
1.29	217436_x_at	HLA-A	HLA-A /// HLA-A29.1 /// HLA-B /// HLA-G /// HLA-H /// HLA-J
1.30	217478_s_at	HLA-DMA	HLA-DMA
1.31	221875_x_at	HLA-F	HLA-F
1.32	222838_at	SLAMF7	SLAMF7
1.33	223575_at	KIAA1549	KIAA1549
1.34	225996_at	LONRF2	LONRF2
1.35	228362_s_at	FAM26F	FAM26F
1.36	228532_at	Clorf162	Clorf162
1.37	229391_s_at	FAM26F	FAM26F
1.38	229625_at	GBP5	GBP5
1.39	232375_at	STAT1*	NA
1.40	232481_s_at	SLITRK6	SLITRK6
1.41	235175_at	GBP4	GBP4
1.42	235276_at	EPSTI1	EPSTI1

10

20

30

40

	Affy ID	R2.9 アノテーションによる 遺伝子記号	Affymetrix アノテーションによる 遺伝子記号
1.43	244393_x_at	AKR1C2*	NA
1.44	1554240_a_at	ITGAL	ITGAL
1.45	1552613_s_at	CDC42SE2	CDC42SE2
1.46	204556_s_at	DZIP1	DZIP1
1.47	204897_at	PTGER4	PTGER4
1.48	206082_at	HCP5	HCP5
1.49	211149_at	UTY	LOC100130224 /// UTY
1.50	214470_at	KLRB1	KLRB1
1.51	229543_at	FAM26F	FAM26F
1.52	231229_at	HILS1	HILS1
1.53	232234_at	C20orf24	SLA2
1.54	232311_at	B2M	B2M
1.55	236328_at	ZNF285A	ZNF285A
1.56	237515_at	TMEM56	TMEM56
1.57	202531_at	IRF1	IRF1
1.58	209813_x_at	TRGV9	TARP
1.59	238524_at	NA	NA
1.60	205097_at	SLC26A2	SLC26A2
1.61	209774_x_at	CXCL2	CXCL2
1.62	210439_at	ICOS	ICOS
1.63	213193_x_at	IL23A	TRBC1
1.64	1555759_a_at	CCL5	CCL5
1.65	1562051_at	LOC284757	LOC284757
1.66	205685_at	CD86	CD86
1.67	210606_x_at	KLRD1	KLRD1
1.68	211902_x_at	TRA@	TRA@
1.69	1552497_a_at	SLAMF6	SLAMF6
1.70	204529_s_at	TOX	TOX
1.71	206666_at	GZMK	GZMK
1.72	1552612_at	CDC42SE2	CDC42SE2
1.73	1563473_at	PPP1R16B*	NA
1.74	219551_at	EAF2	EAF2
1.75	228492_at	USP9Y	LOC100130216 /// USP9Y
1.76	229390_at	FAM26F	FAM26F
1.77	228316_at	FLJ31438*	C2orf63
1.78	228400_at	SHROOM3	SHROOM3
1.79	202643_s_at	TNFAIP3	TNFAIP3
1.80	204806_x_at	HLA-F	HLA-F
1.81	213539_at	CD3D	CD3D
1.82	226084_at	MAP1B	MAP1B
1.83	205499_at	SRPX2	SRPX2
1.84	223593_at	AADAT	AADAT
1.85	244061_at	ARHGAP15*	NA
1.86	222962_s_at	MCM10	MCM10
1.87	1553132_a_at	TC2N	TC2N
1.88	200615_s_at	AP2B1	AP2B1

10

20

30

40

	Affy ID	R2.9 アノテーションによる 遺伝子記号	Affymetrix アノテーションによる 遺伝子記号
1.89	234907_x_at	GOLGA7*	NA
1.90	207536_s_at	TNFRSF9	TNFRSF9
1.91	239012_at	RNF144B	RNF144B
1.92	209671_x_at	TRA@	TRA@ /// TRAC
1.93	238587_at	UBASH3B	UBASH3B
1.94	209770_at	BTN3A1	BTN3A1
1.95	204224_s_at	GCH1	GCH1
1.96	221081_s_at	DENND2D	DENND2D
1.97	229152_at	C4orf7	C4orf7
1.98	202644_s_at	TNFAIP3	TNFAIP3
1.99	238581_at	GBP5	GBP5
1.100	231577_s_at	GBP1	GBP1

\* : R 2 . 9 においてNAとなるR 2 . 6 からのアノテーション

【 0 1 0 0 】

1 つの態様では、本発明の方法は、表 2 で列挙される、遺伝子の発現レベルまたはプロ  
ーブセットの遺伝子産物の測定値を決定することを含む。

【 0 1 0 1 】

表 2

10

20

【表 2】

プローブセット	遺伝子名 R2.9 アノテーション	Affymetrix アノテーション による遺伝子記号
AFFX-HUMISGF3A/M97935_MB_at	STAT1	STAT1
232375_at	STAT1*	NA
209770_at	BTN3A1	BTN3A1
204556_s_at	DZIP1	DZIP1
228316_at	FLJ31438*	C2orf63
238581_at	GBP5	GBP5
234907_x_at	GOLGA7*	NA
213793_s_at	HOMER1	HOMER1
210439_at	ICOS	ICOS
223575_at	KIAA1549	KIAA1549
207795_s_at	KLRD1	KLRD1
210606_x_at	KLRD1	KLRD1
1562051_at	LOC284757	LOC284757
217436_x_at	HLA-A	HLA-A /// HLA-A29.1 /// HLA-B /// HLA-G /// HLA-H /// HLA-J
225996_at	LONRF2	LONRF2
226084_at	MAP1B	MAP1B
222962_s_at	MCM10	MCM10
238524_at	NA	NA
239012_at	RNF144B	RNF144B
228400_at	SHROOM3	SHROOM3
205097_at	SLC26A2	SLC26A2
232481_s_at	SLITRK6	SLITRK6
238587_at	UBASH3B	UBASH3B
237515_at	TMEM56	TMEM56
207536_s_at	TNFRSF9	TNFRSF9
204529_s_at	TOX	TOX
236328_at	ZNF285A	ZNF285A

\* : R 2 . 9 において NA となる R 2 . 6 からのアノテーション

## 【 0 1 0 2 】

表 1 で列挙されるプローブセットに対する標的配列は、下記で提供される。

## 【 0 1 0 3 】

表 3

【表 3】

プローブセット ID	標的配列
1552497_a_at	[SEQ ID NO:1] Tagcattacccttctgacactctctatgtagcctccctgatcttctttcagctcct ctattaaaggaaaagtctttatgttaattatttacatcttctgcaggccttcc tctgctgctggggctctcctattcttttaggtttaattttaaatgacacctct aagagaaaccttcccagaccactctttctaaaatgaatcttctagcctgggcatgg tggctcacacctgtaatcccagctcttggggaggccaagggggagatcacttgag gtcaggagttcaagaccagcctggccaacttgggtaaaccctctttactaaaa tacaaaaaattagccaggcgtgggtgacccctaaaatcccagctacttgaga gactgaggcaggagaatcgcttgaaccaggagggtggaggtccagtgagccaaaa tcatgccaatgtattccagctctg
1552612_at	[SEQ ID NO:2] tgttctgctctgaagaagatactgtcagacgaatcctgcatttccctcagctggc
1552613_s_at	[SEQ ID NO:3] gcatgcctttggactcatggacagagttcttnggattgtcactgaattttcaatg ttaatcagtatggatctgatcttctgcagatcttttngtgaatgtaacaccat tttgagttttttttctatttttaacatttttcttttactgccgancccnng ccttacgattttatnngaaagcaaggacntgctattatnntntaatttgccat catttatgtatattnngaaaggtatgagaccacacagcacaantgatcattttnat tngtngtngtngtngaaacttcagcagaatagatactgcatgctttatgaangtt gttcttcggtaagagcccatgggatgccagaaattaacatttctttgctgccatg ggntgatgatgctgctattagataaangtttagctgtgnaccaagtcacatcatt ttcatagaaaaagatnactttagcttattttagaagtatgaccttttggctctgtt tga
1553132_a_at	[SEQ ID NO:4] Caggtggcacaataaataccatcttgaagacttcacacattaatttgggtgaagaa cttgacattcttttagaagacttatgatttcaatttgcaccaatgagaagaggca aatcaacaaatttgtcaatttatggggctataattatggtatataatgtatctga tagaaaatttgataagaaaatgtaatgaattttatcagatatacaaagtaaaggaa atgttttaaaactgcaacaagagacacagacagtaaaatcaaagtattattaggat gactaaataaattataaagtctgtgagaatatcaaccatagatagttctttctata ttatgtttttgcttttgtatttttaagctttacttagnatattcaaaacctggtata tcaagctctgttagtactattggcatttagaagactttaccattattcagtgct aggcattattgattaggtcttggctccactgtttacct
1554240_a_at	[SEQ ID NO: 5] Acaattgggttgggtcctcacatctttcacacttccaccagcctgcactactcctc aaagcacacgtcatgtttcttcatcggcagcctggatgtttttccctgtttaat gattgacgtacttagcagctatctctcagtgaaactgtgagggtaaaggctatactt gtcttgttcaacttgggatgatgctcctcatgatatgtcagggcgtgggacatctagt aggtgcttgacataa
1555759_a_at	[SEQ ID NO: 6] cccggtcccacatcaaggagtatttctacaccagtggcaagtgtccaaccagca gtcgtctttgtcaccgaaagaaccgccaagtgtgtgccaaccagagagaagaatg ggttcgggagtacatc

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
1555852_at	[SEQ ID NO: 7] ccattctgagtacttctccgcaaacccttggtttcattaaggactgttttacatga agggtgcaaaagtaggataaaaaatgagaaccctagggtgaaacacgtgacagaaga ataaagactattgaatagtccttctcttaccatggacnttggntttttatatt ngattttaaggaataataacttagtagtaagagatgagcattcaagtcaggcaga cctgaatttgggtcaaggctgcgccactcaaaagctatatgacctctatatgagca gcttattcaacctcttttaacctccattttgtcatctgtagaatgatgataaatgc ctagctcagaaggattcc
1562031_at	[SEQ ID NO: 8] atgttcaactgtatgtgccaaagcctaataatgagagctatgtattatagagtttatgc tacagccctaccttcaggaaacttatactactggcaaaaacaaaaatttcaaatata caaaaaattctaaatcgaacattgtaattatctagcataggcaaatatagacagta acagacaggtttacaattattaagaaagggcagccagg
1562051_at	[SEQ ID NO: 9] Atcgaggaagatatactgccaaagtcaggaagaaaaatccacctgttcagtgattt caggaactgctgaagaaaatcaccagtgagtatcagtttctgcaagagaatctaat gcaggctttgcttctcatcggaatccccagctgggtgcttgggtgactgagagtc tgggggagagggcagagaatggatttattctctgctaggttttaacagtcaagaa gggctgtggtcctaaggggcaactgggtcaaaccttagtgtgcatcagaattatctgg ataaggctaggcacagtggtcagcctgtaatcacagcactttgggaggctgagg cgcgtggatcacctgaggtcagaagttcaagaccagcctggctcttttagtagag
1563473_at	[SEQ ID NO: 10] gaaaattcctggcagtttcaactgtgatagacattgctaacctgttctccaaagag gctgaaccaattttctgtttcctcaacagtgatgactgtttccccatctattctc cagcactgaggattaagtaactttcatttttgcagctctgacagatataaagcaga acatttctgcataaggttctacagtaatttttagattttatgacctttggattat gctacataatgatgatcaaatattcagaaactacattgtacctggccttaggctt ggaattggatacaaaaattaatgaaaccagctttggcctcaggttgatcccatct cctggagttggcagacaaatgaacaaataaaatgagagcaaaactgtatggttcac attgtgctagagaaatgcataagcttagctaactttgtttgataaactctatatt cattaatatcacaatgaattcataaaataccgtatgcattatgtcccaggg
200615_s_at	[SEQ ID NO: 11] Gggcaggacatgctgtaccaatccctgaagctcactaatggcatttggattttggc cgaactacgtatccagccaggaaacccaattacacgctgtcactgaagtgtagag ctctgaagctctctcaatacatctatcaggctctacgacagcattttgaaaaactaa caagactgggtccagtaccttcaaccatgctgtgatcggtgcaagtcagaactct taactggaagaaattgtattgctgcgtagaatctgaacacactgaggccacctagc aaggtagtaactagtctaacctgtgctaacattagggcacaacctgttgatagtt ttagcttctgtgaacatttgaaccactgcttcagtcacctcccacctttgcc cctgctgctgctatctgtccttacttgtgggcttctccatgctgtgccaatggctg gctttttctacacc

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
201474_s_at	<p>[SEQ ID NO:12]</p> <p>Gccacagactgaaactgcagggagtgcagcaggaaggaacaaagacaggcaaacgg  caacgtagcctgggctcaactgtgctggggcatggcgggatcctccacagagaggag  gggaccaattctggacagacagatgltggaggatacagaggagatgccacttctc  actcaccactaccagccagcctccagaaggccccagagagacctgcaagaccag  gagggagccgacacttgaatgtagtaataggcagggggccctgccaccccatccag  ccagaccccagctgaacctatgcgtcagggccctagaggtggagttcttagctatcc  ttggctttctgtccagcctggctctgccctcccccatgggctgtgtcctaagge  ccatttgagaagctgaggctagttccaaaaacctctctg</p>
202531_at	<p>[SEQ ID NO:13]</p> <p>Acaggagtcaagtgtctggcttttctctgagcccagctgctggagagggtctcg  ctgtcaactggctggctcctaggggaacagaccagtgaccccagaaaagcatacac  caatcccagggtggctctgcaactaagcgaattgcactaaatgaatctcgttcc  aaagaactacccttttcagctgagccctggggactgttccaaagccagtgaatgt  gaaggaactcccctccttggggcaatgctccctcagcctcagaggagctctacc  ctgctccctgctttggctgaggggcttgggaaaaaaacttggcacttttctgtgtg  gatcttgccacatttctgatcagaggtgtacactaacattccccgagctcttgg  cctttgcatttatttatacagtgcttgcctggggcccaccaccccctcaagccc  agcagccctcaacaggcccaggagggaagtgtgagcgccttggtatgacttaa</p>
202643_s_at	<p>[SEQ ID NO:14]</p> <p>tctttgggttattactgtctttacttctaaagaagttagcttgaactgaggagtaa  aagtgtgtacatatataatatacccttacattatgtatgagggatttttttaaatt  atattgaaatgctgccttagaagtacaataggaaggctaaataataataacctggt  ttctggttgttggggcatgagcttgtgtatacactgcttgcataaactcaacc  agctgccttttaagggagctctagctccttttgtgtaattcactttatttattt  tattacaaactcaagattatthaagtgaagatatttcttcagctctggggaaat  gccacagtgttctcctgagagaacatccttgccttgagtcaggctgtgggcaagtt  cctgaccacaggagtaaattggcctctttgatacacttttgcttgcctcccagg  aaagaaggaattgcatccaaggtatacatacatattcatcgatgtttcglgcttct  ccttatgaaactccagc</p>
202644_s_at	<p>[SEQ ID NO:15]</p> <p>catccatggtaccctggtattgggacagcaaaagccagtaacctagatgagg  aaatctctttctgttggcttgcttacagtttctctgtgtgctttgtggttgcctgca  tatttgccttagaagaaaaaaaaaaaggaggggaaatgcattttcccagagata  aaggctgccattttggggctctgacttatggcctgaaaaatattgtgatccataa  ctctacacagcctttactcatactattaggcacactttccccttagagcccctaa  gtttttcccagacgaatctttataatttcccttccaaagataccaataaaacttca  gtgttttcatctaattctcttaagttgatattcttaataattttgtgttgatcatta  ttccattcttaatgtgaaaaaagtaatttttatacttattataaaaagtattt  gaaatttgcacatttaattgtccctaaatagaaagccaccttctttgttggat</p>

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
202659_at	<p>[SEQ ID NO:16]</p> <p>Tacacgeggttatctacgggcccgcgagccccgcgtggccacggtcactcgcacacctg  cgccagacgctcttcagggtaccagggccacgtgggtgcatcgctgatcgtgggcg  cgtagacctgactggaccgcagctctacggcggtgcatccccatggctcctacagcc  gtctgcecttcacagccctgggctctgggtcaggacgcggccctggcgggtgctagaa  gaccggttccagccgaacatgacgctggaggctgctcaggggctgctggtggaagc  cgtcaccgcgggatcttgggtgacctgggctccgggggcaatgtggacgcatgtg  tgatcacaagactggcgccaagctgctgcggaactgagctcaccacagagccc  gtgaagaggtctggcgcgtaccactttgtgctggaaccacagctgtcctgaccca  gacagtgaagccactaacctggagctagtggaggaaactgtgcaggctatggagg  tggagta</p>
203915_at	<p>[SEQ ID NO:17]</p> <p>Gattatcaattaccacaccatctcccatgaagaaaggaacgggtgaagtactaagc  gctagaggaagcagccaagtcggttagtggaagcatgattgggtgccagttagcct  ctgcaggatgtggaaacctcctccaggggagggtcagtgaaattgtgtaggagagg  ttgtctgtggcagaatttaaacctatactcactttcccaaattgaaactgctc  acactgctgatgatttagagtctgtccgggtggagatcccaccggaacgtcttacc  taatcatgaaactccctagttccttcattgtaactccctgaaaaatctaagtgttt  cataaatttgagagctctgtgacccacttacc</p>
204070_at	<p>[SEQ ID NO:18]</p> <p>Gaaacgggggcccctggaagatgtggtgggaggctgttgctatcgggtcaacaaca  gcttggaccatgagtagcaaacacggccccgtggaggtagatcagtcctgcaag  gagatggttggtcagaagatgaagtacagtattgtgagcaggaactgtgagcactt  tgtgcccagctgagatattggcaagtcggctgtaaacagggtggaaggaaggccaagg  ttgaagtcgggtgtggccacggcgccttggaaatcctgggtgttggctggatgctctttt  gcgattaggagataccaaaaaaagcaacagcctgaagcagccacaaaatcctgtg  ttagaagcagctgtgggggtcc</p>
204116_at	<p>[SEQ ID NO:19]</p> <p>ttctggctggaacggacgatgccccgaattcccacctgaagaacctagaggatct  tgttactgaataccacgggaacttttcggcctggagtggtgtgctaaaggactgg  ctgagagctctgcagccagactacagtgaacgactctgcctcgtcagtgagattccc  ccaaaaggaggggccccttggggaggggcccctggggcctccccatgcaaccagcatag  ccctactgggccccccatgttacaccctaaagcctgaaacctgaaccccaatcc  cttgacagaagaaccccagggtcctgtagccctaagtggtaactaactttccttcat  tcaaccacctgctctcatactcactcaccacctgtggctgatttgaatttt  gtgccccatgtaagcacc</p>
204224_s_at	<p>[SEQ ID NO:20]</p> <p>Gtgatggttggcttgagtacctttttaaacttagccagatataaacattagcctgc  ttaatatttagacatttataggtagaattctgagcactcaactcatgtttggcatt  ttaagtaaaaacaagtgtgacttcaggaccacaaagaaattgtcagctatacatt  atctttatgaactcatttatattcctttttaaactgactcgttgttctaactttcct  agaagtgtcttataaaggctaatgtatccacaggctgttgtcttattagtaaat  gcaaagtaatgactttgtctgttttactctagtcttttagtactcaaaattacctt  ttcatalccatgatcttgagtcatttgggggatttttaagaatttgatgtatttc  aatacactgttcaaaattaaattgttttaattttatgtatgagtatgtatgttctg  aagttggtcctatatta</p>

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
204529_s_at	<p>[SEQ ID NO: 21]</p> <p>Atggcttgatgtagcagtcataagcaagtttgtaaatagcatctatgttacactctc ctagagtataaaatgtgaatgtttttgtagctaaattgtaattgaaactggctcat tccagtttattgatttcacaataggggttaaattggcaaacattcatatctttact tcatttttaaaacaactgactgatagttctatattttcaaaatatttgaaaataaa aagtattcccaagtgatttttaatttaaaaacaaattggctttgtctcattgatcag acaaaaagaaactagatattaaggggaagcgcaaacacatttattttgtactgcagaa aaattgctttttgtatcactttttgtgtaatggtagtaaatgcatcatttaagtc ttttatgtataaaactgccaaatgcttacctgggtattttattagatgcagaaacag attggaacagctaaattacaacttttacatatggctctgtcttattgtttcttca tactgtgtctgtatttaactcttttttatggaacctgttgcgcctat</p>
204533_at	<p>[SEQ ID NO: 22]</p> <p>Taactctacctggcactataatgtaagctctactgaggtgctatgttcttagtgg atgttctgacctgcttcaaatatttccctcacctttcccatctccaagggtact aaggaatctttctgctttggggtttatcagaattctcagaatctcaaataactaaa aggtatgcaatcaaatctgcttttaagaatgctctttacttcatggacttccac tgccatcctcccaaggggccccaaattctttcagtggtacctacatacaattccaa acacatacaggaaggtagaaatctgaaaatgtatgtgtaagtatcttatttaa tgaaagactgtacaaagtataagcttagatgtatataatttctatattgttttca gtgtacatggaataacatgtaattaagtactatgtatcaatgagtaacaggaaaat tttaaaaatacagatagatatatgctctgcatgttacataagataaatgtgctgaa tggttttcaataaaaaatgaggtactctcctggaaatatt</p>
204556_s_at	<p>[SEQ ID NO: 23]</p> <p>ggaactaatgtccctgagatgtttatcaaaaaagaagaattacaagaactaaagt tgccgatgtggaggatgaagactgggacatacatccctagaggaagagatatctt tgggaaaaaatctgggaaagaacagaaggaaacctccacctgcgaaaaatgaacca cattttgctcatgtgctaaatgcctggggcgcatttaactcctaaggggccaaggg agaaggacttcaagaaaatgaatcaagcacattaaaaagcagcttagtaactgtga ctgattggagcgacacttcagatgtctaatccacatgtcagaagattattccaga agccagcagtatctcagatcacagtgcttcagtaatttgctccatgattctagt gcttctgccttaccgtgtttcccacagcaacacagagactgattcaagaacaatg gtctctttaatggcaccacaatacagattgaaaatcagatcatcaacagtatctc aagcatgtaaaggtgtttaagacttccgctgctgcttataaaaata</p>
204806_x_at	<p>[SEQ ID NO: 24]</p> <p>Cagatcctccaaaggcacagttgcccaccaccccatctctgacctgaggccacc ctgaggtgctgggcccctgggcttctaccctgaggagatcacgctgacctggcagcg ggatggggaggaacagaccaggacacagagcttgtggagaccaggcctgcagggg atggaaccttcagaagtgggccgctgtggtggtgccttctggagaggaacagaga tacacatgccatgtgcagcacaggggctgcccagcccctcatcctgagatggga gcagctccccagcccaccatccccatcgtgggcatcgttgccttgttgtcc ttggagctgtggtcactggagctgtggtcgtctgtgtgatgtggaggaagaagagc tcagatagaaacagaggagctactctcaggctgcagtcactgacagtgcccaggg ctctgggggtgtctctcacagctaataaagtgtgagacagcttccctgtgtgggac</p>

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
204897_at	[SEQ ID NO:25] Agcagcttattgtttctctgaaagtgtgttagttttactttcctaaggaattacc aagaatatcctttaaaatttaaaggatggcaagttgcatcagaaagctttat gagatgtaaaaagattcccaaactggttacattagccattcatgtatgtcagaag tgcagaattggggcacttaatgggtcaccttgaacagttttgtgtaactccagtg atgctgtacacatattgaagggtctttctcaaagaaatattaagcatgtttggt gctcagtgttttgtgaattgcttggttgaattaaattctgagcctgatattgat atg
205097_at	[SEQ ID NO:26] Tactcatgcctttttgtttaggataaataggtaagcacaagagctcttcaaaatc agaaaaacaataggagtccttctctgtctttctgtgatctctgtccttgtttct gagactttctctaccattaagctctattttagcttccagttattctagttgtttc ccatggaatctgtctaaactggtgtttttgtcagtgacagcttggcagtcagca atttctaacagcattttaaatgagtttgatgtacagtaaatattgatgacaatgac agcttttaactcttcaagtcacctaaagctattatgcaggaggatttagaagtcac atcataaaacccaagngctatgggtgtattattcatgatagctggcccacaggtc atgaattgag
205499_at	[SEQ ID NO: 27] Gcggcatgtgaccatcattgaactggtgggacagccacctcaggaggtggggcgca tccgggagcaacagctgtcagccaacatcatcgaggagctcaggcaatttcagcgc ctcaactcgtcctacttcaacatgggtgttgattgacaagcagggtattgaccgaga ccgctacatggaacctgtcacccccgaggaaatcttcacattcattgatgactacc tactgagcaatcaggagttgaccagcgtcgggagcaaggacatatgagagtga acttgagccagggtatggttaaagtaagggaaggctcctctagtttagctgaaac tgggacctataaaaggaggaaatgtttccacagttctagggacaggactctga ggtgggtgagtttgacaaatcctgcagtggtttccaggcatccttttaggactgtgt aatagtttccctagaagctaggttagggactgaggacaggccttgggcagtggtt
205685_at	[SEQ ID NO:28] Gaaggaggttaggactttccactcctggctgagagaggaagagctgcaacggaat taggaagaccaagacacagatcacccgggcttacttagcctacagatgtcctacg ggaacgtgggctggcccagcatagggttagcaaataggattggatgattgtttt gctcaaggcaaccagaggaaacttgacatacagagacagatatactgggagaaatga ctttgaaaacctggctctaaggtgggatcactaagggatggggcagtccttgccca aacataagagaactctggggagcctgagccacaaaaatgttccctttatttatgt aaacctcaagggttatagactgccatgctagacaagcttgccatgtaatatcc catgtttttacctgcccctgcttgattagactcctagcacctggctagtttc
205758_at	[SEQ ID NO:29] Cagcccttgcatgacagaggggccatgaaagaggacaggctaccctttfacaat agaatttgagcatcagtgaggttaaactaaggccctcttgaatctctgaatttgag atacaaacatgttctgggatcactgatgactttttatactttgtaagacaattg ttggagagcccctcacacagccctggcctengctcaactagcagatacagggatga ggcagacctgactctcttaaggaggctgagagcccaactgctgtcccacaacatgc acttcttggcttaaggtatggtacaagcaatgectgccattggagagaaaaact taagtagataaggaaataagaaccactcataattcttccacttaggaataatctcc tgttaatatggtgtacattcttctgattatttctacacatac

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
205890_s_at	<p>[SEQ ID NO:30]</p> <p>Gatcttaaagccacggagaagcctctcatcttatggcattgacaaagagaagacca  tccaccttacctgaaagtgggaagccagtgatgaggagctgcccttgcttctt  gtggagtcaggtgatgaggcaagaggcacctcctccaggtgcaaggtccagctc  agtggcacaagtgaagcaatgatcgagactaagacgggtataatccctgagacc  agattgtgacttcaatggaaagagactggaagatgggaagatgatggcagattac  ggcatcagaaagggaacttactcttctggcatcttattgtattggagggtgacc  accctggggatgggtgttggcaggggtcaaaaagcttatttcttttaattcttta  ctcaacgaacacatcttctgatgatttcccaaaattaatgagaatgagatgagtag  agtaagatttgggtgggatgggtaggatgaagtatattgccaactctatgtttct  ttga</p>
206082_at	<p>[SEQ ID NO:31]</p> <p>Tgaaggatggtagctgcgccatggcctggatctgctgcagtgctcttctctgtgga  ggctccactcaaaagctggcatcctcctatgtcacctagagtggtgggtcaaaagcaat  acacctacatgtagaatgtgatgtcagaactcaaacaggctcaccaggcagtgctgc  ttcttcttgcagtgaggatgcaagatgcaacagttgtcttccattggaaggaca  cccctggatgcccctaaccactagacctgtaaaacttcaactgcagtgggcacttct  gaatctctgtaagggttatttattcttccacctctggagagaagatgttttaccaa  agcctctagtgtaccgtctctcttactcatccatcccagtcacatgatgtttgt  caatgaaataaaggaaatttaataattctatagtatatccaggtctccagatctctt  aagactgtactatagaggcctgggg</p>
206666_at	<p>[SEQ ID NO:32]</p> <p>aaacctctcttagatctggaaccaaagcaaggttactggctggggagccaccgat  ccagattcattaagacctcttgacacctgcgagaagtcactgttactgtcctaag  tcgaaaactttgcaacagccaaagttactacaacggcgacccttttatccaaaag  acatggctctgtgcaggagatgccaaggccagaaggattcctgtaagggtgactca  gggggcccccttgatctgtaagggtgtcttccaogctatagctctgagggtcatga  atgtgggtgttgccacaaagcctggaatctacacctgttaaccaagaaataaccaga  cttgatcaaaagcaacctgtcccgcctcatacaaatgaattacaataatttt  attggatgcacttgcttcttttttccataatgctcgcaggttagagttgggtgta  agtaaagcagagcacatatgggggtccatttttgcaattgta</p>
207536_s_at	<p>[SEQ ID NO:33]</p> <p>agaccagtacaaactactcaagaggaagatggctgtagctgccgatttccagaaga  agaagaaggaggatgtgaaactgtgaaatggaagtcattagggtgttgggacttct  ttgaaaagaagcaaggaaatatgagtcacccgtatcacagctttcaaaagcaaga  acaccatctacataataaccaggatcccccaacacagttcttttctaaatgcc  aatgagttggcctttaaaaatgcaccacttttttttttttttggacagggtctca  ctctgtcaccaggctggagtgagtgaccaccatggctctctgcagccttgac  ctctgggagctcaagtgatcctcctgcctcagtcctctgagtagctggaactaaa  ggaaggccaccacactgactaactttttgtttttgtttgtaaaagatggcatt  tcgcatgttgtacaggctggtctcaactcctaggttcaactttggcctcccaag  tgctgggattacagacatgaactgccaggcccgccaaaataatgcaccact</p>

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
207651_at	[SEQ ID NO:34] ttgccttgtaattcgacagctctacagaaacaagataatgaaaattacccaaatg tgaaaaaggctctcatcaacatacttttagtgaccacgggctacatcatatgcttt gttccttaccacattgtccgaatcccgataccctcagccagacagaagtataac tgattgctcaaccaggatttcaactctcaaagccaaaggctacactgctcctgg ctgtgctgaacctgtgctttgatcctatcctgtactatcacctctcaaagcattc cgctcaaaggctcactgagacttttgctcacctaaagagaccaaggctcagaaaga aaaaataagatgtgaaaataatgcataaaagacaggatTTTTTgtgctaccaattc tggccttactgga
207795_s_at	[SEQ ID NO: 35] Ttctctacttgcctcttggaaacataatttctcatggcagcttttactaaactgagt attgagccagcatttactccaggacccaacatagaactccagaaagactctgactg ctgttcttggcaagaaaaatgggttgggtaccgggtgcaactgttacttcaattcca gtgaacagaaaaacttggaaacgaaagtccgcatctctgtgcttctcagaaatccage ctgcttcagcttcaaaacacagatgaaactggattttatgagctccagtcacaatt ttactggattggactctcttacagtgaggagcacaccgctggttggggagaatg gctctgcactctcccagtatctatttccatcattg
208729_x_at	[SEQ ID NO:36] Gtggcgggagcagctgagagcctacctggaggggcagtgctgagggtggctccgcag atacctggagaacgggaaggagacgctgcagcgcgcggacccccaaagacacacg tgaccaccaccatctctgaccatgaggccacctgaggtgctgggcccctgggc ttctacctgaggagatcacactgacctggcagcgggatggcgaggacaaactca ggacactgagcttgtggagaccagaccagcaggagatagaacctccagaagtggg cagctgtgggtgctccttctggagaagagcagagatacacatgccatgtacagcat gaggggctgccgaagccccctacctgagatgggagccgtcttcccagtcaccgt ccccatcgtgggcattgttctggcctggctgtcctagcagttgttggtcatcggag ctgtggtcgtgctgtgatgttaggaggaagagctcaggtggaaaaggaggagc tactctcaggctg
208885_at	[SEQ ID NO:37] Gaagtaagcctcatcatcagagcctttcctcaaaactggagtcccaaatgtcatca ggttttgttttttccagccactaagaacctctgcttttaactctagaatttgg gcttggaccagatctaactcttgaatactctgcctctagagccttcagccttaa tggaaaggttggatccaaggaggtgtaatggaaatcggaatcaagccactcggcagc atggagctataactaagcactcttagggttctgcctctccaggcattagccctcac attagatctagttactgttggtatggctaatacctgtcaacatttggaggcaatcct acctgcttttctctagagcttagcatatctgattgttgcaggccatattatc aatgtttacttttttggtaactataaaagctttctgccaccctaaactccaggggg gacaatatgtgccaatcaatagcaccctactcacatacacacacactagccagc tgtaagggc
208894_at	[SEQ ID NO:38] Cgatcaccaatgtacctccagaggtaactgtgctcacgaacagccctgtggaactg agagagcccaacgtcctcatctgtttcatagacaagttcacccca

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
209606_at	<p>[SEQ ID NO:39]</p> <p>Gaattgcaaaactgacatcccatttcacagcaatagtgacctttatthtaattggtt  gtgttatagtttatgcttcttaaatcatttttcaacctaaacagccaatttctaag  cagacaggaaaactaaataalaagttaattaataaacaagatgcagggttcctgc  tcattccagtaatgtctttgaaagcaaaactaatatttattttctagattatccct  gtgaataattgagaactttttggagtcagatgaataaagggtgtggcagaatata  ataatctggactattttctataggataattgctgggttataaaatcttaggttgc  ttatgccagtagctcctgcggaggcttaataataggcaattttgaattgttcaa  acctgtaattggcttglaaacaagatgaccatcagctgtttctcacatctatagtg  acaataaagcgggaagtataagatttaataggagggttaagggttcatgagaacca  tggaagatgtggctctgagatgggtgctgcaaagat</p>
209671_x_at	<p>[SEQ ID NO:40]</p> <p>Tctgaaccgaacagcagtgcttccaagataatctttggatcagggaccagactca  gcatccggccaaatatccagaacctgacctgacctgtaccagctgagagactct  aatccagtgacaagctctgtctgcttattcaccgattttgattctcaaaacaatgt  gtcaaaaagtaaggattctgatgtgtatatacagacaaaactgtgctagacatga  ggctctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaatctgacttt  gcatgtgcaaacgcttcaacaacagcattattccagaagacacctcttcccag  cccagaaagtctctgtgatgtcaagctggctcgagaaaagctttgaaacagatacga  acctaaactttcaaacctgtcagtgattgggttccgaatcctcctctgaaagtg  gcccgggtttaatctgctcatgacgctgcccgtgtggctccagctgagatctgcaaga  ttgtaagacagcctgtgctcct</p>
209770_at	<p>[SEQ ID NO: 41]</p> <p>Ggaaatttgatgaaggagctagaagaaatacagggatttttttttttttaag  atggagtcttactctgttgctaggctggagtgcagtggtgcatctcagctccctg  caacctccacctcctgggttcaaaacaattctctgctcagcctcccagtagtgg  gaatataggtgcacgccaccacaccaacaattttgtacttttagtacagatga  gggttcactatgttggccaggatggctctgatctcttgacctcatgatccaccac  ctcggctctcccaaagtgtctgggattacaggcttgagccaccgggtgaccggcttac  agggatatttttaatcccgttatggactctgtctccaggagaggggtctatccacc  cctgctcattgggtgatgttaaccaatattccttcaactgctgctgctagggga  aaaactactctcattatcattattatttattgctctccactgtatcccctctacct  ggcatgtgcttgtcaag</p>
209774_x_at	<p>[SEQ ID NO: 42]</p> <p>Agagagacacagctgcagaggccacctggattgcgctaalglttgagcatcac  ttaggagaagtcttctatthtattttattttattttattttattttgtttgtttaga  agattctatgttaataatthtattgtgtaaaataaggttatgattgaatctacttgca  cactctcccattatthtattgtttatttttaggtcaaaccaggttagttcaatcc  tgattcatatthtaattgaagatagaaggtttgagatattctctagtcatttggt  aatatttcttcgtgatgacatatcacatgtcagccactgtgatagaggctgaggaa  tccaagaaaatggccagtaagatcaatgtgacggcagggaatgtatgtgtgtcta  tttgtactgtaaagatgaatgtcagttgttattttattgaaatgatttcacagtg  tgtggtcaacatttctcatgttgaagctttaagaactaaaatgttctaaatatccc  ttggacattttatgtcttcttgaagatactgccttggttattgttaattatgca  gtgtttccctc</p>

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
209813_x_at	<p>[SEQ ID NO: 43]</p> <p>Aaatgatacactactgctgcagctcacaacacacctctgcatattacatgtacctcc  tctgctcctcaagagtgtggctatTTTTGCCATCATCACTGCTGCTGCTTAGA  agaacggcttctgctgcaatggagagaaatcataacagacgggtggcacaaggagg  ccatcttttctcatcggttattgtccctagaagcgtcttctgaggatctagttgg  gctttcttctggggttgggccatttcagttctcatggtgtactattctatcatt  attgtataacggttttcaaacagtgggcacacagagaacctcactctgtaataac  aatgaggaatagccacggcgatctccagcacaatctctccatgtttccacagct  cctccagccaacccaatagcgcctgctatagtgtagacatcctgcggcttctagc  cttgcctctcttagtgtctttaaatacagataactgcctggaagcctttcatttt  acacgcctgaagcagctcttttgcta</p>
210439_at	<p>[SEQ ID NO: 44]</p> <p>Gcttctgaagcagccaatgctgatgcaacaacatttctaactttaggtaaactggg  attatgtttagttaaacttttctaactgtgtgcttatagtttacaagtgagacc  cgatatgtcattatgcatacttatattatcttaagcatgtgtaatgctggatgtgt  acagtaacagtaacttaacttgaatattgaatctagatgggttctggtttcagctg  acttgacaacctgactggctttgcacaggtgttccctgagttggttgcaggttct  tgtgtgtggggtggggtatggggaggagaaccttcatggtggcccacctggcctgg  ttgtccaagctgtgctcgacacatctcatccaagcatgggacacctcaagatg  aataataattcacaatttctgtgaaatcaaatccagttttaagaggagccactt  atcaaagagat</p>
210606_x_at	<p>[SEQ ID NO: 45]</p> <p>gaaagactctgactgctgttcttggcaagaaaaatgggttgggtaccggtgcaact  gttacttcatttccagtgaaacagaaaacttgaacgaaagtcggcatctctgtgct  tctcagaaatccagcctgcttcagcttcaaacacagatgaactggattttatgag  ctccagtcacaattttactggattggactctcttacagtgaggagcacaccgct  ggttgtgggagaatggctctgcactctcccagtatctatttccatcatttgaact  tttaatacaaagaactgcatagcgtataatccaaatggaaatgctttagatgaatc  ctgtgaagataaaaatcgttatatctgtaagcaacagctcatttaaatgtttcttg  ggcagagaagggtggagagtaaagaccaacattactaacaatgatacagttgcat  gttatattactaattgtctacttctggagtcta</p>
210915_x_at	<p>[SEQ ID NO: 46]</p> <p>aaaggccacactgggtgtcctggccacaggtatcttccctgaccacgtggagctga  gctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacggaccgcagccc  ctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatactgctgagcagccgctgag  ggtctcggccaccttctggcagaacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagt  tctacgggctctcggagaatgacgagtggaccaggatagggccaacccgtcacc  cagatcgtcagcgcgaggcctggggtagagcagactgtggctttacctcgggtgc  ctaccagcaagggtcctgtctgccaccatctctatgagatcctgctaggggaagg  ccaccatgtatgctgtgctggtcagcgccttgtgttgatggccatgggtcaagaga  aaggatttctgaaggcagccctggaagtggagttaggagcttctaaccgctcatgg  ttcaatacacattcttcttttggcagc</p>

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
210972_x_at	[SEQ ID NO:47] ggaacaagacttcaggctcagctcgatatccagaacctgacctgacctggtgtacca gctgagagactctaaatccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgatt ctcaaacaaatgtgtcacaagtaaggattctgatgtgtatatacagacaaaact gtgctagacatgaggctcatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaa caaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagaca cttcttccccagcccagaaagttcctgtgatgtcaagctggctgagaaaaagcttt gaaacagatacgaacctaaactttcaaacctgtcagtgattgggttccgaatcct cctcctgaaagtggccgggtttaatctgctcatgacgctgcggtgtggtccagct gagatctgcaagattgtaagacagcctgtgctcct
210982_s_at	[SEQ ID NO:48] Gaaggagacggcttggcggcttgaagaatttggacgatttggcagctttgaggctc aaggtgcattggccaacatagctgtggacaaagccaacttggaaatcatgacaaag cgctccaactatactcgcataccaatgacaagttcaccaccagtggtcaatgt cagtggtcttcgaaatggaaaacctgtcaccacaggagtgtcagagacagcttcc tgcccaggaagaccaccttttccgaagttccactatctcccctcctgcctca actgaggacgttacgactgcagggtggagcaactggggcttggatgagcctctct caagcactgggagtttgatgctccaagccctctccagagactacagagaacgtgg tgtgtgccctggcctgactgtgggtctggtgggcatcattattgggaccatc
211144_x_at	[SEQ ID NO:49] aatgatacaactactgctgcagctcacaacacctctgcatattacatgtacctcc tcctgctcctcaagagtgtggtctatTTTgcatcatcactgctgtctgcttggga agaacggctttctgctgcaatggagagaaatcataacagacggtggcacaaggagg ccacttttctcctcctggttattgtccctagaagcgtcttctgaggatctagtgg gctttctttctgggttgggccatctcagttctcatgtgtgtaactattctatcatt attgtataatggTTTTcaaacagtgggcacacagagaacctcagctctgtaataac aatgaggaatagccatggcgcctcaccagccaatctctccatgTTTTccacagct cctccagccaaccaaatagcgcctgctatagtgtagacagcctgcccgttctagc cttgtcctctcttagtgttctttaatcagalaactgcctggaagcctttcatttt acacgccc
211149_at	[SEQ ID NO: 50] Cagaaacctcgatatataattgtatagattttaaagttttattttttacatctat ggtagtttttgagggtgcctattataaagtattacggaagtttgcgtttttaaagt aatgtcttttagtgtgatttataaagttgtagtcaccatagtgatagccataaa taattgctggaaaattgtattttataacagtagaaaacatatagtcagtgaaagtaa atattttaaaggaaacattatataagatttgataaatgttgtttataattaagatt tcttatggaaaagagattcagaatgataaccttttagagaaacaaataagtgact tattttttaaagctagatgacttggaaatgctatactgtcctgcttgtacaacat ggtttggggtgaaggg

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
211339_s_at	[SEQ ID NO:51] ggtgttgcaattggctcttttctaaatcatgtgacgttttgactggccttgagattca gatgcataatTTTTAATTATAATTATTGTGAAGTGGAGAGCCTCAAGATAAACTC TGTCAATCAGAAGATGATTTTACTCAGCTTATCCAAAATTATCTCTGTTACTTTT TAGAATTTGTACATTATCTTTTGGGATCCTTAATTAGAGATGATTTCTGGAACAT TCAGTCTAGAAAGAAAACATTGGAATTGACTGATCTCTGTGGTTTGGTTAGAAAA TTCCCTGTGCATGGTATTACCTTTTCAAGCTCAGATTCATCTAATCCTCAACTG TACATGTGTACATCTTCACCTCTGGTGCCCTATCCCGAAAATGGGCTTCTGTC CTGGTTTTCTCTCTCACATTTTTAAATGGTCCCTGTGTTTGTAGAGAA
211796_s_at	[SEQ ID NO:52] Gccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactgggtgtgctggcca caggtttctaccccgaccacgtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggagggtg cacagtggggtcagcacagaccccgaccccccaaggagcagccccctcaatga ctccagatactgctgagcagccctgagggtctcggccacctcttggcagaacc cccgcaaccacttccgctgtcaagtcagttctacgggctctcggagaatgacgag tggaccaggatagggccaaacctgtcaccagatcgtcagcggcggaggcctgggg tagagcagactgtggcttacctccgagtcttaccagcaaggggtcctgtctgcca ccatcctctatgagatcttgcctaggggaaggccaccttgtatgctgtgctggctcag gccctcgtgctgatggccatgggtcaagagaaagga
211902_x_at	[SEQ ID NO:53] Gaatcgtttctctgtgaacttcagaaagcagccaaatccttcagtctcaagatct cagactcacagctgggggatgccgcgatgtatttctgtgcttataggagtgcatatc tctggggctgggagttaccaactcacttccgggaaggggaccaaactctcgggtcat accaaatataccagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaaatcca gtgacaagtctgtctgcctattcaaccgattttgattctcaaacaaatgtgtcacia agtaaggattctgatgtgtatatacacagacaaaactgtgctagacatgaggtctat ggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtg caaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttcccagcccagaa agttcctgtgatgtcaagctggctcgagaaaagccttgaacagatacgaaccttaa cttcaaacctgtcagtgattgggttccgaatctcctcctgaaagtgccgggt ttaatctgctcatgacgctgcggttgtggtcc
211911_x_at	[SEQ ID NO:54] Ctgagagcctacctggaggcctgtgcgtggagtggctccgcagataacctggagaa cgggaaggagacgctgcagcgcgaccccccaagacacatgtgaccaccacc ccactcttgaccatgaggccacctgagggtgctgggcccctgggcttctacctgag gagatcacactgacctggcagcgggatggcgaggacaaaactcaggacaccgagct tgtggagaccagaccagcaggagatagaacctccagaagtgggcagctgtggtgg tgcttctggagaagagcagagatacacatgccatgtacagcatgaggggctgccg aagccccctaccctgagatgggagccatcttcccagtcaccatccccatcgtggg cattgttgctggcctggctgtcctagcagttgtggtcacgagctgtggctgcta ctgtgatgttaggaggaagagctcaggtggaaaaggaggagctactctcaggct g

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
212671_s_at	[SEQ ID NO: 55] AccaatgaggttccctgaggtcacagtgTTTTCCAAGTCTCCCGTGACACTGGGTCA GCCCAACACCCTCATCTGTCTTGTGGACAACATCTTCTCCTGTGGTCAACATCA CNTGGCTGAGCAATGGGCACTCAGTCACAGAAGGTGTTCTGAGACCAGCTTCTC TCCAAGAGTGATCATTCTCTTCAAGATCAGTTACCTCACCTTCTCCTTCTGN TGATGAGATTTATGACTGCAAGGTGGAGCACTGGGGCCTGGATGAGCCTCTTCTGA AACACTGGGAGCCTG
213193_x_at	[SEQ ID NO: 56] Tgactccagatactgcctgagcagccgctgagggctctcgccaccttctggcaga ACCCCGCAACCCTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAAATGAC GAGTGGACCCAGGATAGGGCAAACCCTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCTG GGGTAGAGCAGACTGTGGCTTTACCTGGTGTCTACCAGCAAGGGGTCCTGTCTG CCACATCCTCTATGAGATCCTGCTAGGGAAGGCCACCCTGTATGCTGTGTGGTC AGNCCCTGTGTTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTTCTGAAGGCAGCCCTG GAAGTGGAGTTAGGAGCTTCTAACCCGTCATGGTTCAATACACATCTTCTTTG CCAGCGCTTCTGAAGAGCTGCTCTCACTCTCTGCAATCCCAATAGATATCCCCA TGTGCAATGCACACTGCACACTCAGGCTGAAATCTCCCTAACCCAGGGGGACCT AGCATGCCTAAGTGA
213539_at	[SEQ ID NO: 57] gggaacactgctctcagacattacaagactggacctgggaaaacgcatcctggacc CACGAGGAATATATAGGTGTAATGGGACAGATATATACAAGGACAAAGAATCTACC GTGCAAGTTCATTATCGAATGTGCCAGAGCTGTGTGGAGCTGGATCCAGCCACCGT GGCTGGCATCATTGTCACTGATGTCACTTGCCTCTGCTCTTGGGAGTCT TCTGCTTGTCTGGACATGAGACTGGAAGGTGTCTGGGGCTGCCACACACAAGCT CTGTTGAGGAATGACCAGGTCTATCAGCCCTCCGAGATCGAGATGATGCTCAGTA CAGCCACCTGGAGGAAACTGGGCTCGGAACAAGTGAACCTGAGACTGGTGGCTC TAGAAGCAGCCATTACCAACTGTACT
213793_s_at	[SEQ ID NO: 58] tgctggagtccactgccaatgtgaaacaatggaaacagcaacttgctgcctatcan GAGGAAGCAGAACGTCTGCACAAGCGGGTGACTGAACTTGAATGTGTTAGTAGCCA AGCAAATGCAGTACATACTCATAAGACAGAATTAATCAGACAATAACAAGANTGN AANNGNCAANGAAANTGAAGGAAGAGGAAATAGAAAGGTTAAACAAGAAATGAT AATGCCAGAGAACTACAAGAACAGAGGGATCTTTGACTCAGAACTACAGGAAGT AGAAATCGGAACAAAGACCTGGAGGGACAACGTCTGACTTAGAGCAACGTCTGG AGAAAAGTCAGAAATGAACAAGAAGCTTTTCGCAATAACCTGAAGACACTCTTAGAA ATTCTGGATGGAAAGATATTTGAAC TAACAGAATTACGAGATAACTTGGCCAAGCT ACTAGANTGCAGCTAAGGAAAGTGAATTTCTNGTGCNATTAATAAAGATAACAC TGTCTCTCTCATAGGACTGTTTAGGCTCTGCAATCA

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
214470_at	<p>[SEQ ID NO: 59]</p> <p>ggttcaccttggcatcaatttgcctgaaacttagctgigctgggattattctcct  tgtcttgggtgttactgggttgagtgttccagtgacatccttaatacagaaatcat  caatagaaaaatgcagtggtgacattcaacagagcaggaataaaacaacagagaga  cgggtctcttaactgcccataatattggcagcaactccgagagaaatgcttgtt  atcttctcacactgtcaaccttggataaacagcttagctgattgtccaccaag  aatccagcctgctgcttattcgagataaggatgaattgatacacacacagaacctg  atacgtgacaaagcaattctgttttggattggattaaatcttctcattatcagaaaa  gaactggaagtgganaaacggctcttttttaattctaattgacttagaaattagag  gtgatgctaaagaaaacagctgtatttccatctcaca</p>
215806_x_at	<p>[SEQ ID NO: 60]</p> <p>Aaatgatacactactgctgcagctcacaacacctctgcatattacatgtacctcc  tctgctcctcaagagtgtggtctatcttggccatcatcacctgctgtctgcntgna  agaacggcnntgctgcaatggagagaantcataacagacgggtggcacaaggagg  cnnentntcctcatcggnnattgtccctagaagcgtcttctgaggatctagttgg  gcttctcttctgggttgggcccatttcagttctcatgtgtgtaactatctatcatt  attgtataatggtttcaaaccagtgggcacacagagaacctcagctctgtaataac  aatgaggaatagccatggcagatctccagcaccatctctccatgtttccacagct  cctccagccaacccaaatagcgcctgctatagtgtaganannctgcggtctctagc  cttgcctctctcttagtgttctttaaatacagataactgcctggaagccittcatttt  acacgcctgaagcagctcttctttgcta</p>
216920_s_at	<p>[SEQ ID NO:61]</p> <p>Cactactgctgcagctcacaacacctctgcatattacatgtacctcctcctgctc  ctcaagagtgtggtctatcttggccatcatcacctgctgtctgcttngaagaacggc  tttctgctgcaatggagagaaalcataacagacgggtggcacaaggaggccatcttt  tctcatcggttattgtccctagaagcgtcnnnnnnnnnnnttgggcttctctt  tctgggttgggcccatttcagttctcatgtgtgtaactattctatctattgtataat  ggtttcaaaccagtgggcacacagagaacctcactctgtaataacaatgaggaat  agccatggcgatctccagcaccatctctccatgttttccacagctcctccagcca  acccaaatagcgcctgctatagtgtagacagcctgcggttcttagccttgtccctc  tcttagtgttctttaaatacagataactgcctggaagcctttcattttacacgcctg  aagcagctcttcttcttagtgaattatgtggtgtgttttccgtaata</p>
217436_x_at	<p>[SEQ ID NO:62]</p> <p>tacctggagggcacctgcatggagtggctccgcagacacctggagaacgggaagga  gacgctgcagcgcgacccccnaagacacacgtgaccacnccctnctct  gaacatgaggcataacgaggtctgggttctgggcttctacctgaggagatcaca  ttgacctggcagcgggatggggaggaccagaccaggacatggagctcgtggagac  caggcccacaggggatggaaccttcagaagtggcggttgtggtagtgcttctg  gagaggaacagagatacacatgcatgtgcagcacaaggggcntgccaagccct  catcctgagatgggagccctctccccagcccaccatccccattgtgggtatcattg  ctggcctggttctccttggagctgtggtcactgnnnnnnnnnnnnnctgtgatg  tggaggaagaagagctcagatagaaaaggaggagctactctcaggctgcaagcag  ccaaagtgccagggtct</p>

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
217478_s_at	[SEQ ID NO:63] ctgttttgcagtaatctcttcccacccatgctgacagtgaactggcagcatcatt ccgtccctgtggaaggatttgggcctacttttgtctcagctgtcgatggactcagc ttccaggccttttcttacttaaacctcacaccagaacctctgacattttctcctg cattgtgactcagaaattgaccgctacacagcaattgcctattgggtaccccgga acgcactgccctcagatctgctggagaatgtgctgtgtggcgtggcctttggcctg ggtgtgctgggcatcatcgtgggcattgttctcatcatctacttccggaagccttg ctgagtgactgattcttccagaccagatttgatgccagcagcttccggcatcca aacagaggatgctcagatttctcacatcctgc
219551_at	[SEQ ID NO:64] Gaacaggtgaccataactctgccaaatatagaaagttgaaggaagtagtaaaattc agtatcgtaaagaacaacagcaacaacaatgtggaattcagccaggactcccaat cttgtaaacatttctccatctgaagataagatgtcccagcatctccaatagatga tatcgaagagaactgaaggcagaagctagtctaatggaccagatgagtagttgtg atagttcatcagattccaaaagttcatcttcaagtagtgaggatagttctagt gactcagaagatgaagattgcaaatctctacttctgatacaggaattgtgtctc aggacatcctaccatgacacagctacaggattcctgatatagatgccagtcataata gatttcgagacaacagtgcccttctgatgaatacttt
221081_s_at	[SEQ ID NO:65] Ttctcacttttcatccaggaagccgagaagagcaagaatcctcctgcaggctattt ccaacagaaaatacttgaatatgaggaacagaagaacagaagaaccaagggaaa aaactgtgaaataagagctgtggtgaataagaatgactagagctacacaccatttc tggacttcagccctgccagtggtggcaggatcagcaaacctgtcagctccaaaat ccatacctcactctgagcttgggtatccaggatttgctcaaactgggtctgag atttggatccctggatttgatttctcaggactttggagggctctgacaccatgctc acagaactgggctcagagctccatttttgcagaggtgacacaggtagaaacagt agtacatgtgtttagacacttgggttagaagctgctgcaactgccctctcccatca ttataacatcttcaacacagaacacacttgtggtcgaaaggctcagcctctctac atgaagtctg
221875_x_at	[SEQ ID NO:66] Tctaccctgaggagatcacgctgacctggcagcgggatggggaggaacagaccag gacacagagcttgtggagaccaggcctgcaggggatggaaccttcagaagtgggc cgctgtggtggtgctnctggagaggaacagagatacacatgccatgtgcagcag agggctgccccagccctcactcctgagatgggagcagctctcccagcccaccatc cccatcgtgggcatcgttggctggccttgttgccttggagctgtggtcactggagc tgtggtcgtcgtgtgatgtggaggaagaagagctcagatagaacagagggagct actctcaggctgcagtgtagacagcttcttgtgtgggactgagaagcaagatat caatgtagcagaattgcacttgtgcctcacgaacata
222838_at	[SEQ ID NO:67] Aacacctgtgctaggtcagctctggcacgtaagatgaacatccctaccaacacagag ctaccatctcttataacttaagtgaaaaacatggggaaggggaaaggggaatggct gcttttgatatgttccctgacacatacttgaatggagacctccctaccaagtgat gaaagtgtgaaaacttaatacaaatgcttgttgggcaagaatgggattgagga ttatctctctcagaaggcattgtgaaggaattgagccagatctctctccctact gcaaaacctattgtagta

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
222962_s_at	[SEQ ID NO:68] Aaactttcccacatcagataatgatgatcacatagctcttgatgtacggacatta gccagattttctcattcaattctgttatctctgttttactctttgaaattgatcaa gccactgaatcactttgcatcagtttatatataatagagagaaagaagggtgctg ctcttacattattgtggagccctgtgatagaaatgtaaaatctcatattttt tttttaattttttattttttatgacagggtctcactatgtcaccctggctggag tgcagtagtgcatcgccgcacactgc
223575_at	[SEQ ID NO:69] Aaatgactgcattcgtctcttttttaaaggtagagattaactgtatagacagcat agggatgaaaggaaccaagcgtttctgtgggattgagactggtagctacgatga acctgctgctttgttttctgagaagaggttgaagacattttattaacagctta tttctcttttactccataggaacttattttaatagtaacattaacaacaagaata ctaagactgtttgggaattttaaaagctactagtgagaaaccaaatgataggtg tagagcctgatgactccaacaagccatcaccgcattcttctctcttctctgg tgctacagctccaaggccctcaccctcatgtctgaaatgg
223593_at	[SEQ ID NO: 70] ggcagctgcagacaagtgggttaactggtttggcagaatggcatgttctctgctgctg gaatgtttttatggattaaagttaaaggcattaatgatgtaaaagaactgattgaa gaaaaggccgttaagatgggggtattaatgctccctggaaatgctttctacgtcga tagctcagctcctagcccttacttgagagcatccttctcttcagcttctccagaac agatggatgtggccttcaggtattagcacaactataaaagaatctttatgaaga aattaaactaggttgggcatgggtgcgtcacacctataatcccagcacttggggagg cagaggaggaggatcactgaaccagggaattcaggctgcagtaagctacgatca caccactgcactctggcctgcactctggcctgcagcagaacaagaccctg tctctaaaaaaagagaaagaatcaactaatcatgtctcat
225996_at	[SEQ ID NO: 71] Acagttcaaccagtgaccgacttctctctcatgctgtttacccacacacaatttc cactcaattctgaaaataagaacctgttaatagggttgaaagctgtgtactctat tcataatattgttcttctcatgctagtgagagtggtgtcattagcatcttaattta gagttgtgaaatgattttaccaattaggaattgaatgtgtattttttctgttta ataagaagagcaaatgtgaataaataagctgggtgtagataaacttaataatcatgc ttttcttgtttggagataggtgatgtgttgcatacctgtgatacaggtcactc atctggccttctgtttctgaagtttaagtctggttgaaatgtaataatactact cagcatttcttgttgcttaagtgagacgaaactaaatgtaatgatatttacttca tgtattcttgtactgttcatttcaat
226084_at	[SEQ ID NO: 72] aatggcttctatgatcagaactgggaaaacagtgnatcttatgggtggaagaggtnc tcagcaagtgtacagtatttaccttcttctgtcttacatnggctttttaatttc cattaattcaacataattatgggaacaaggttacagaagaattttttttaaga tatgtgagaactttcatagatgaactttttaacaatgttttcaatttacaggaaa ttgcaaagaaaattctcaagtgatagcttttttttaagtgtttcgtgaagacaaa aattgaataatgtttttgaagttctggcaagattgaagctctgatattgcagta gatatttataaaaaccataactaccaggaataatgatacctcccacccttgat tcccataacataaaaagtgtacttgagagtgaggagaaatggcatggtaggctact tttcagggccttgacaagtacatcaccagtggtatctacatacttctttcaaga tcttcaaccatgaggtaaaagaccaagttcaagaaccctagcacaatttgc tgg

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
228316_at	[SEQ ID NO: 73] Acagggtcagactcatagggtcatggagtacatacagcagttgaaggactttacta ccgatgacctgttgcagctattaatgtcatgtcccaagttgaattaattcagtg ctactaaagagttgaatgagaaacaaccatctttatcttttggcttctgctatact tcatctgttctctgcagacatgaaaaagttggcattaagctacttcaagaaatca ataaagtgggatagatgcagtagaaagtcttatgataaatgattccttttgctcc atagaaaagtggaagaagtggaatataatgttcacagaatggctttgacaaatt atctaatacacaacgctctattcttcgatctcaggctgcagttacagaaattctg aagaggatgacgcagtcacctaataatggaacatgtgttttggtagttctatatctta accagctgaggagcttgtacaacaccttatg
228362_s_at	[SEQ ID NO: 74] gtactggcccttcggattgaaagtatacagtgatgaaatttgcctcactctttca tgcttggagtggtatattcttttggatgagccctcaaagaaacatttaattc tcttttgccaattcagttgcatgctctgtggctttacttttaaggatctgctgctc ctgttccaaatagattttccagaatttcagctgcagaaaactaactggagatagc atcgggtgacagatgtaaaaatcagaagaatgatgataacaactgctatcaagatc cagcccaac
228400_at	[SEQ ID NO: 75] Aataacttcatttctacaaggtataaaaagtggtcaagtgaatgtgaaggggctt ttctacacaggaatataattatcgggaacaaagtatttctctgctgccttaactctt gggatgcataggataaaatgataaaagaccattttaatatcagaaagggttgtctta ttaatttttaataaaaacttcacatttcttaatggggagctcattcagaaactaaa taatggtttctcaaagtggtcaggatagatctgcacagaatccttggaatgc ttgttaaaaataccaattgctatgacaaaaccaagtctgctggaactgcatttca gcaggtttcccatgttattctgatgtattttaacatttgagagccactaccaatca tctgtacagttcctactg
228492_at	[SEQ ID NO: 76] Aaccaatacacaaaattttcctatgtcagaatgtgggtggagcataatagattgtat ttgggtgtgcttgcgatttttttttccatagaatttattaagtgaagtttctaaaa ctttgccttctcctgatcccggtaggtgtacatcataagaatccatagtaacttga agtaccattgcaccaagatgtctgactgaattcatagtcacacttttatttgaag aaagaattgttagtatttttttctatttctaaaactcttgtgttagatataag atttaattaagatctaagctcctgcttatttaatgtaattctaaggtaccatttta gaaaaaacattgttttaagattccaagaaacctgtgagtttaactatattttaa agagaattggtaaatgtgtgtaataattttggaacctgtttaaaccacaa atatacctgcaaatagatacagcctatcctatactattta
228532_at	[SEQ ID NO: 77] Tgctgctgatagcctttatcttctcctacataaaagagctacagaaaatatactcc aagccccaggccccagatcctcactcagatcctccagccaagcttccatccatccc aggggaatcacttacctatgccagcacaacttcaaactctcagaagnnnnnnnnn nnnnnnnnnnnnnatgctcaaattaaagtaacaaactaactcagcttttccaatg aggettgaatccatttctctcctcagccttatcttccacatcactttcactt tttacaaatttggaccaccctgtgtgaaactgcagtcggagttggttagatg tgatctggcaatgctatccagcatcttggagaccaatggtcagcttttctctggc cagaggaaagattgatggccctcccacttgaactgacagcctgtganncccttggg ggcatagactgccttcttggacccttccaaagtgtgtggtacngagctcagtgca cagagtattcaccagcatcatgaatcaactg

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
229152_at	[SEQ ID NO: 78] tgaagaaagttctcctcctgatcacagccatcttggcagtggtggtttccca gtctctcaagaccaggaacgagaaaaagaagtatcagtgacagcgatgaattagc ttcagggtttttgtgttcccttaccatattccatttgccttccaccaattc catttccaagatttccatggttagacgtaattttcctattccaatacctgaatct gccctacaactccccttctagcgaagtaacaagaaggaaaagtcacgataa acctggtcacctgaaattgaaattgagccacttccctgagaatcaaaattcctgt taataaaagaaaaacaatgtaattgaaatagcacacagcattctctagtcaatat ctttagtgatcttctttaata
229390_at	[SEQ ID NO: 79] gctgatttagcttatggaagaggaaccagaaatttgccttgaataatgnttcccg tgttgggctggatcttgatagcagttgttatcatcattcttctgattttacatct gtcaccgatgcctatctccagttagttttctgcagctgaaattctggaaaatcta tttggaacaggagcagcagatccttaaagtaaagccacagagcatgcaactgaat tggcaaaagagaatattaatgtttctttgagggtcgcctccaaaagaatataac actccaagcatgaaagagtggcagcaaattcctcactgtatactttcaatccgaa gggccagtactacagcatgttgcaaaaatgtcaacagaaaagagaagactcaca gtatcaggctactgaaggagatacgggtgattcctgttcttggctttagattca tctggtataaacagcactcctgagttatgacctttgaaatgagtag
229391_s_at	[SEQ ID NO: 80] Gtgttgggctggatcttgatagcagttgttatcatcattcttctgattttacatc tgtcaccgatgcctatctccagttagttttctgcagctgaaattctggaaaatct atttggaaacaggagcagcagatccttaaagtaaagccacagagcatgcaactgaa ttggcaaaagagaatattaatgtttctttgagggtcgcctccaaaagaatataa cactccaagcatgaaagagtggcagcaaattcctcactgtatactttcaatccga agggccagtactacagcat
229543_at	[SEQ ID NO: 81] tctactcattcaaaaggtcataactcaggagtgtgtttataccagatgaatctac aaagccaagaacaggaatcaccgtatctccttcagtagacctgatactgtgagctc tctctttctgttgacatattgt
229625_at	[SEQ ID NO: 82] tttagctcctcaagcatatctgactggcatgatcctgcattgtggttacctggaagg gaaaaacaaccctgggaattttatccaggaagttggaacaatcacaacaaaagt gggaggcagaaggaannggcacattaatcctnnnnnnnttatcttttctcctna gaggcacaagtgaaagcagaagctgaaaaggctgaagcgcgaaaggttggcggcgat tcaaaggcagaacgagcaaatgatgcaggagaggagagactccatcaggaacaag tgagcaaatggagatagccaaacaaaattggctggcagagcaacagaaaatgcag gaacaacagatgcaggaacaggctgcacagctcagcacaacattccaagctcaaaa tagaagccttctcagtgagctccagcagcccagaggactgtaataacgatgatc catgtgttttactctaaagtgctaaatatgggagtttcttttttactctttgtc actgatgacacaacagaaaagaactgttagaccttgggacaatca

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
231229_at	[SEQ ID NO: 83] Gcactccaaggatgatcctgagggctgtggcggacnaaggggacctgcaagtatnt gtccctgnncaccctgaagaaggctgtttccaccacgggntacgacatggcccga atgcctatacattcaagcgtgtgctcaagggctgggggacaagggtcagcaggt gaccggcanggggctcaggtccttcaccctgggcaagaagcaggcctccaagt ccaagctcaaggtaagaggcaacgacagcagaggtggcgctctgggcagcgcctc ttggacagcacaggtcactactgggctccaaacaggggcacaagcgcttatcaa ggggttcgaagggtggccaagtgccactgcaattaatgaggcaggccaggcaagc agtcaggggtgccaagancgccattggctcagtcagtcaggaa
231577_s_at	[SEQ ID NO: 84] ggaacaggagcaactactaaaagaggatttcaaaaagaaagcagaataatgaaa atgagatacaggatctccagacgaaaatgagacgacgaaaggcatgtaccataagc taaagaccagagccttctgtcaccctaaccaaggcataattgaaacaatttttag aatttggacaagcgtcactacatttgataataattagatcttgcatacacaacc aaaagttataaaggcatgtggtacaatgatcaaaatc
232234_at	[SEQ ID NO: 85] aacacctttaagtctagcacactgcagtgaggccaggcacctcagtgctgggcag gggcatcagaagggtgctaagccctctctccacaatgccaagacggagaccacagcc tacaccaaaccagcccttgatttccctgctgctccataaacagaaagggtctg ctggatccgctaaggatcagggagaggaagaaagagggtggggggaggcacc cctccagtgctcctactggttcccaagctacagggtgggggggaaaggctttatc aggtatcatcaacaggttctcaattaagatttgatttattcaagtatgtgaaaa attctacaatgaaactcttattagatgctgcnnnnnnngtctatggaccagca catacagccatgctgtttcag
232311_at	[SEQ ID NO: 86] acatacctgggttgatccacttaggaacctcagataataacatctgccacgtata gagcaattgctatgtcccaggcactctactagacacttcatacagtttagaaaatc agatgggtgtagatcaaggcaggagcaggaacaaaaagaaaggcataaacataag aaaaaaaaaatggaagggtggnaaacagagtacaataacatgagtaatttgatgggg gctattatgaactgagaaatgaactttgaaaagtatcttggggccaaatcatgtag actcttgagtgatgtgtaaggaatgctatgagtgctgagaggccatcagaagtc ttgagagcctcc
232375_at	[SEQ ID NO: 87] gaatattgaaatctactagtgagtnntagngcatgnttttgcnggnatcctgg aaangcnnncncaaaaagntannntttgccccttcaaaaacatgcacctgaag aagctgtttgtacaggattgggtttattctgttattaagacaaaggcatcatggcc ttgggtgagaggcccgtgtgtgtttgggatttggcaatcagcatnccatctctgt catcaccattattgagaaaatagatggattgggtccctctctgcagtcctgtggag cagttggactgctctctctgctctcaggatgatactgtgagaacaatttaaatg ctaagcacatgtcaggaacagttttgtggtctttggacactcgtgttagccattc cgttccatttcagggtgatt

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
232481_s_at	[SEQ ID NO: 88] gaagtccatcctttggtccaaagcatctggaagaggaagaagagaggaatgagaaa gaaggaagtgatgcaaaacatctccaaagaagcttttggaaacaggaaaatcattc accactcacagggtcaaatatgaaatacaaaaccacgaaccaatcaacagaat tttatccttccaagatgccagctcattgtacagaacat ttttagaaaaaagaaaggaa cttcagcaactgggaatcacagaatacctaaggaaaaacattgctcagctccagcc tgatatggaggcacattatcctggagcccacgaagagctgaagttaatggaaacat taatgtactcacgtccaaggaaggtatttagtggaaacagacaaaaaatgagtat tttgaacttaagctaatttacatgctgaacctgactat ttagaagtcctggagcagca aacatagatggagagtttggaggcttctgcagaaatgctgtgat tctgttttaagt ccataccttgaataagtgcccttacgtgagtggtgcatcaatcagaacctaagc
234907_x_at	[SEQ ID NO: 89] Agaagagattctgctgtctacatcaatacacctgaatagttggacagaaaattgaa atcttttaactaattctaactatgaagcacagtgaatagaaagttaggct
235175_at	[SEQ ID NO: 90] Gacagtgagctggcacagagttagggaattgactgtgtctcatattggctagtg gagtgatctgttggaaattgtatatcaaaat tttaatgtacatacat tttgtctagc aattctactat tgggtatttatatag tacataataat atnaatgtat atgttttagt aaatataact tatagttag taaatatant ttatatct atttag taaatata ctaaatgtc agnntctg agnccaag ctnaagcc atcatat ncctgtg acctgcat gntacat ngtccag atggnet gaagcaag tganntc acaaaa gaagt gaaaat ggctgt ttctg ccttaact gatgac attac ctgtg aaatt cctt ctctc ctggct caaaag ctcccc actaag caact tgtgac cccacc ctctg cccgcag agaaca ccccc ttgact gtaatt tctctt tacc aacca aatc ctgta aatg gtc ccaac ctat ctcc
235276_at	[SEQ ID NO: 91] Accctgactcccaaagat tttgtg cagatg ggtag ttcnt ttttt aaaa atgt gcagat atgg aat tgtg act lact tcat gacc aga act atc taga at atg tgtg ggggt ata aac at ct at gt tagg cag ag gta acc agg aga gaag ca ag act t gct g c t aa ag g ag c c acc at t t t t c ac at t ta ct g cc ag tt ga at ca at t gg aa aa ac ct g ac t g c ag g t g ac ag g aa at cc caa ag tt cc acc at t ct at g ct ta
236328_at	[SEQ ID NO: 92] gaaacctgctcttactatgaaagaacgtagtaccaggttttccatgagatc tctacacaggcaagaagctccatagaagtggcatttgaagggtgtggcagaggcag tgctgtgtttatcacactggttccatttcttgc aaataagaagctat tttccag taaccttgcagttaagagtgtgccatgtgattgagttctagccaatggagtg agcaaaagtgatataagccactttcagggtctagc ctttaca aacat cctcag gctt ctctat ccctg ccaag gtgac cttg gag gctg cttat tccag actg gggt gataga aggtcactacttcatctgtgttga

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
237515_at	[SEQ ID NO: 93] Atgaatcagtggttactaggacttatncagtactttaaataagcaacttggcattctt tattttgttctctggttgttttatttggaggataataaatgtctaagttatttcc attaaaatttgaatgtttgtatactttatgtgtgccattttaaagtatatgcaa gttctaagcaataatctgcatgttatacaaggttgacatatttggcctgaaattt ttagttaacatttcaagaatgataaaatgaacacctgtaaattaccttctcccc ctccccctcatgaaaaccttgggattttcttgtgctagaacacntaccacaatgtg gtgcaaagctttgt
238524_at	[SEQ ID NO: 94] Aaatgtaccttgatttgatgctaatactgtgtatttagggctgaaggaagcacacac taaatactgagtgcttttcagattccatctatgctgaaaaagaatctaggagaat aaacnatttcaattagcccttaanannnnnnnnanaannnnagcccactaaagc ccagtagggcataggagagaacactgcaccaggattcagatctggattctaanttt tgttctgaaaaatagcaagtgacactggcatgccatttaacctctccgggctcaa tttccactatagatagctgctgctgagtaagacaactgatgtaactttgcc aacaagtagaattatccttctctcttggcctgctctgcttagcttttaatactt ggtctgccctaacattttctgtatgtattttctttatcccagatattcgaaacaatt gctagcaaggaaaagtaatgacggattttcatttcccaatatagctggcaaagaa atgaaaggtttacttctctcttggtaattcaat
238581_at	[SEQ ID NO: 95] Acaaatgtgcagcttcaactgggtggaggctgctattctgtggacagtgagatgt ttcttggcactgtcaatagacaatctgcgtagagaaattccaagctgaaagccaa taatgttataataaaatagagattcttcagaagatgaaaggaattaccagcatgga aattgtgctataggttaagggttaaagaagaagccttttctttctgttcacct caccaagagcacaacttaaatagggcattttataacctgaacacaatttataatgg acttaattattatgtgtaatatgtttataatcctttagatcttataaatatgtggt ataaggaatgccatataatgtgccaaaaatctgagtgcaatttaattaatgcttgc ttatagtgcta
238587_at	[SEQ ID NO: 96] gcttctacaagtggtccacatcaatccggtaatgccccagtgttattcacagacag aactttgttctctgtgattttaaataaccgctctgttctccatggaccagagta attggcacattttaaataagcagtgagggtttcattttcccaggctctcttccac atcactgcattggtagctaggagcttattgcttaccaccagtatggagttcagatt acagtgttttccattacatttagattcatagaatctgaatggctgataaatggcc atctgatggctgaaagggggcgtatttttcaactctgtagtgaaggcttggagga gtttctactt
239012_at	[SEQ ID NO: 97] taaaaataagtcgccagctctctcctttataaacagtcttttagactggtttgatc atgccccttgatgtaccagagatagttaaacaacctagttttgttgattctgac aatctcacacacatttaagaatttaccatttttcaggcacttttcaatgttaaaaa aatataatccaattattgaaatcagtttgacaaacaacccccactccatnccc nggnanaaaaaaaaaaaaaanaanaacaaaagcagctaatcagtgatacaaaactc tgaagggtggcaattcccccaactcgccaaggaaatagcacatatttatntctc ccatctttactccaatttgggacctcttctctgataacacagctcttttaggta ctgaaatcagccccatttaagactctttgcggcaccaagc

10

20

30

40

プローブセット ID	標的配列
244061_at	[SEQ ID NO: 98] Gaatggcacattttctggatgtgagagttggtcaaaagatcacaaaaaagtcaa aaaataattctactctgtgaatgaaaaatggatatttngtacttacccataag cattaaagaaaataatgcatgaaattccatagaaatgtgcctatcatgttatact gactcaaaccagaagacctagagatgatattgctaataatacatgtgggggt atgagtggaagtatgtgtgagatttatcattgccatagtgtaaaagagttgaat tagcttccacttgactagatgagagctcttagttcttatt
244393_x_at	[SEQ ID NO: 99] Cccagccgtataacttttaacaattcccatatgtcctttattccactaagatgag tgagatataatttccatctgtccaaggcttctaaatgtagccaangccaagcca acaccagtcacatgatenaatcaaaggcatttggggaatccaggctgtgattca gggaagttccaagtgtctgatgaagtgtttgtttacatctttgtgtcccttgcag gtctagcactgtgctatgtaggtaacatgtgtctcc
AFFX-HUMISGF3A/M979 35_MB_at	[SEQ ID NO: 100] Ctggatatatcaagactgagttgatttctgtgtctgaagttcaccttctagactt cagaccacagacaacctgtccccatgtctcctgaggagtttgacgaggtgtctcg gatagtggctctgtagaattcgacagtatgatgaacacagtatagacatgaatt ttttcatcttctctggcgacagttttcctctcatctgtgattccctcctgctac tctgttcttccatcctgtgtttctagggaaatgaaagaaaggccagcaaattcg ctgcaacctgttgatagcaagtgaatttttctcctaactcagaaacatcagttactc tgaaggcatcatgcatcttactgaaggtaaaattgaaaggcattctctgaagagt gggtttcacaagtgaaaaacatccagatacacccaaagtatcaggacgagaatgag ggctcttgggaaaggagaagtttaagcaacatctagcaaatgttatgcataaagtc agtgcccaactgttataggtgtgtggataaatcagtggttatttagggaactgctt gacgtaggaacggtaaatttctgtgggag

10

20

## 【0104】

1つの態様では、本発明は正規化遺伝子またはプローブセット強度マトリクスを作成する前処理工程を実施し、このマトリクスを信号対ノイズ比統計的分析に供し、異なって発現される遺伝子またはプローブセットを同定し、その後、遺伝子またはプローブセットを最も異なって発現される遺伝子の順でランクづけすることにより、作成された遺伝子プロフィールを提供する。

30

## 【0105】

1つの実施形態では、閾値は、関連遺伝子の発現の測定量または各患者に対する遺伝子強度ベクトルから誘導した「指標」をプロットすることにより確立してもよい。一般に、レスポnderおよびノンレスポnderは、異なる軸/焦点についてクラスタリングされる。閾値は、古典的統計学的方法により、または単純に「最良適合線」をプロットすることにより、2つの群間の中立点を確立することにより、クラスター間のギャップで確立することができる。例えば、予め規定された閾値を超える値は、レスポnderとして指定することができる。例えば、予め指定された閾値未満の値は、ノンレスポnderとして指定することができる。

40

## 【0106】

1つの実施形態では、任意のある分類指標の性能は分析することができる。徹底的な性能分析が、閾値レベルを変化させ、閾値の各値に対し、モデルの予測能力（感度、特異性、陽性および陰性予測値、精度）を計算することによりが実施される。この分析は、ある分類指標のための適切な閾値を選択するのに役立つ可能性がある。

## 【0107】

さらに、分類指標の性能分析は、ある閾値に対し、モデルの感度、特異性、陽性および

50

陰性予測値、ならびに精度を評価するために実施することができる。本発明の1つ以上の態様により提供されるプロファイルの好適な実施形態では、性別に密接に相関する遺伝子の効果は排除される。

【0108】

1つの実施形態では、腫瘍サンプルを、Q-PCRによりメラノーマにおいて判別と見いだされた遺伝子のサブセットを使用して評価されたそれらの遺伝子プロファイルに従い分類する方法が提供される(実施例1)。

【0109】

1つの実施形態では、NSCLC癌腫瘍サンプルを、Q-PCRによりメラノーマにおいて判別と見いだされた遺伝子のすべてまたはサブセットを使用して評価されたそれらの遺伝子プロファイルに従い分類する方法が提供される。

10

【0110】

分類指標は、目的変数ありの主成分分析およびCox比例ハザードモデルの使用を含み；遺伝子発現プロファイルに加えて、このアプローチでは、トレーニングセット中のサンプルの全生存(OS)、DFIまたはDFSが腫瘍ステージおよび外科手術状態と共に使用され、モデルパラメータが計算され、その後試験セット遺伝子発現に基づき、試験セットに対するリスク指標が計算される。

【0111】

遺伝子プロファイルが同定され、サンプルに対する分析が実施された時点で、例えば、レスポnderを1つの色で、ノンレスポnderを別の色で示すヒートマップとして結果を示す方法はたくさんある。それにも関わらず、より多くの定性的情報が、結果を、閾値を有するスペクトルとして示す指標として表すことができ、例えば閾値を超えると、患者はレスポnderであると考えられ、閾値未満だと、患者はノンレスポnderであると考えられる。情報をスペクトルとして表す利点は、医師がノンレスポnderと考えられるが、閾値付近に位置するそれらの患者に治療を提供すべきかどうかを決定することを可能にすることである。

20

【0112】

本発明との関連では、「免疫療法」は、一般的には抗原に対する免疫応答を刺激することに基づく療法を意味し、この場合、応答により、関連する疾患の治療、寛解および/または進行の遅延が得られる。これに関して、治療は通常予防的治療を含まない。

30

【0113】

この明細書の関連では、「癌免疫療法」は癌を治療するための免疫療法を意味する。1つの態様では、免疫療法は、癌精巢抗原、例えばMAGE(下記でより詳細に記載)に基づく。

【0114】

好都合なことに、本発明の新規方法は、適切な免疫療法治療に応答する可能性のある患者の同定を可能にする。これにより、それらから恩恵を受ける患者に対し資源の適切なチャネリングが促進され、さらには、その治療から恩恵を受けない患者が、彼らにとってより有利であり得る別の治療を使用することが可能になる。

【0115】

本発明は、例えば、MAGE-発現癌を有する患者において、適切な免疫療法に応答する可能性のある癌患者、例えばメラノーマ、乳癌、膀胱、肺癌、NSCLC、頭頸部癌、扁平上皮癌、結腸癌および食道癌を有する患者を同定するために使用され得る。一実施形態では、本発明はそのような癌、特に肺およびメラノーマにおいてアジュバント(術後、例えば無病)設定で使用され得る。本発明はまた、転移性設定で癌治療において有用性を見いだしている。

40

【0116】

免疫活性化遺伝子は、適切な免疫応答を促進し、増加させまたは刺激する遺伝子を意味することが意図される。免疫応答遺伝子および免疫活性化遺伝子は本明細書では同じ意味で使用される。

50

## 【0117】

## マイクロアレイ

細胞、例えば癌/腫瘍細胞により発現される遺伝子の分析のために重要な技術は、DNAマイクロアレイ（遺伝子チップ技術としても知られている）であり、この場合、何百以上ものプローブ配列（例えば55、000プローブセット）がガラス表面に結合される。プローブ配列は一般にすべて25塩基長または60塩基長であり、公知の遺伝子由来の配列である。これらのプローブは一般に、任意の特定の遺伝子に対し、1組の11の個々のプローブで配列され（プローブセット）、ガラス表面上で予め規定されたパターンで固定される。適切な生物学的サンプルに暴露されると、これらのプローブは特定の遺伝子の関連RNAまたはDNAにハイブリダイズする。洗浄後、チップは、適切な方法および量、例えば記録された色強度により「読み取られる」。特定の遺伝子の発現差異は、記録された測定値/強度に比例する。この技術は下記でより詳細に記載される。

10

## 【0118】

マイクロアレイは、互いに分離され、典型的には約100/cm<sup>2</sup>~1000/cm<sup>2</sup>の間の密度で配列されるが、より大きな密度、例えば10000/cm<sup>2</sup>で配列され得る、別々の領域、典型的には核酸のアレイである。マイクロアレイ実験の原理は、ある細胞株または組織由来のmRNAを使用して、「標的」と呼ばれる標識サンプル、典型的には標識cDNAを作成し、これは、規則配列で固体表面上に固定された多くの核酸配列、典型的にはDNA配列に同時にハイブリダイズするというものである。

20

## 【0119】

何万もの転写物種が同時に検出され、定量され得る。多くの異なるマイクロアレイシステムが開発されており、今日最も普通に使用されるシステムは、配列させた材料に従い2つの群に分けることができる：相補DNA（cDNA）およびオリゴヌクレオチドマイクロアレイ。配列された材料は一般に、プローブと呼ばれるが、ノーザンブロット分析で使用されるプローブと同等であるからである。cDNAアレイのためのプローブは通常、ベクター特異的または遺伝子特異的プライマーのいずれかを使用して、cDNAライブラリまたはクローンコレクションから作成されたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）産物であり、スライドガラスまたはナイロン膜上にスポットとして規定された位置にプリントされる。スポットは典型的には10-300μmのサイズであり、大体同じ距離だけ離されている。この技術を使用して、30,000を超えるcDNAから構成されるアレイを、従来の顕微鏡スライドの表面上に固定することができる。オリゴヌクレオチドアレイでは、短い20-25塩基長は、シリコンウエハ上へのフォトリソグラフィ（Affymetrixからの高密度オリゴヌクレオチドアレイ）あるいはインクジェット技術（Rosetta Inpharmaticsにより開発され、Agilent Technologiesにライセンス供与されている）のいずれかによりインサイチューで合成される。また、予め合成されたオリゴヌクレオチドを、スライドガラス上にプリントさせることができる。合成オリゴヌクレオチドに基づく方法は、利点を提供する。というのは配列情報のみが、配列されるDNAを作成するのに十分であり、cDNA源の時間のかかる処理は必要とされないからである。また、プローブは、ある転写物の最も特有の部分を表すように設計することができ、密接に関係する遺伝子またはスプライスバリエーションの検出を可能にする。短いオリゴヌクレオチドは、より特異性の低いハイブリダイゼーションまたは減少した感度となる可能性があるが、予め合成されたより長いオリゴヌクレオチド（50-100塩基長）の配列が最近開発され、これらの不利を中和している。

30

40

## 【0120】

よって、患者が本発明の遺伝子サインを示すかどうかを確認するためにマイクロアレイを実施する際には、下記工程が実施される：サンプルからmRNAを入手し、核酸標的を調製すること、アレイを、典型的にはマイクロアレイの製造者により示唆される条件下で（好適にはストリンジェントハイブリダイゼーション条件、例えば3XSSC、0.1%SDS、50）接触させ、アレイ上の対応するプローブに結合させること、必要であれば、洗浄して結合していない核酸標的を除去すること、および結果を分析すること。

50

## 【 0 1 2 1 】

mRNAは対象の配列、例えば表1におけるものに対して、当技術分野で知られている方法、例えばプライマー特異的cDNA合成により濃縮され得ることは、認識されるであろう。例えば、PCR技術を使用することにより、集団はさらに増幅され得る。標的またはプローブは標識され、標的分子のマイクロアレイへのハイブリダイゼーションの検出が可能になる。好適な標識としては、プローブ中に組み込むことができる同位体または蛍光標識が挙げられる。

## 【 0 1 2 2 】

標的遺伝子/プロファイルが同定されると、マイクロアレイに代わるいくつかの別の分析方法を使用して、遺伝子(複数可)が異なって発現されるかどうかを測定することができる。

10

## 【 0 1 2 3 】

1つの態様では、本発明は表1で列挙される遺伝子から選択される少なくとも1つの遺伝子の遺伝子産物の配列に相補的およびハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドプローブを含むマイクロアレイを提供する。好適には、表1の遺伝子に相補的およびハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドプローブまたはプローブセットは前記マイクロアレイ上の少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または実質的にすべてのプローブまたはプローブセットを構成する。

## 【 0 1 2 4 】

好適には、マイクロアレイは、表2に列挙される遺伝子の遺伝子産物の配列に相補的およびハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドプローブを含む。

20

## 【 0 1 2 5 】

好適には、本発明による検出試薬またはマイクロアレイを有する固体表面は、例えば、表1の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、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82または83遺伝子から発現されるmRNAまたはcDNAを検出することができる検出試薬またはプローブを含む。

30

## 【 0 1 2 6 】

場合によっては、PCRは、マイクロアレイよりもより感度の高い技術であり、よってより低レベルの異なって発現される遺伝子を検出することができる。

## 【 0 1 2 7 】

別の実施形態では、患者は、PCR技術、特に定量PCR(再検討のために、Ginzinger D Experimental haematology 30 (2002) p 503 - 512 and Giuliette et al Methods, 25 p 386 (2001)を参照されたい)に基づく診断キットを用いて、彼の/彼女の腫瘍が本発明の遺伝子サインを発現するかどうかを確認するために診断され得る。

## 【 0 1 2 8 】

分析技術としては、定量実時間ポリメラーゼ連鎖反応(QRT-PCRまたはQ-PCR)とも呼ばれる実時間ポリメラーゼ連鎖反応が挙げられ、これは、サンプル中に存在するあるDNA分子の特定の部分を同時に定量および増幅するために使用される。

40

## 【 0 1 2 9 】

手順は、ポリメラーゼ連鎖反応の一般的なパターンに従うが、DNAは、各増幅ラウンド後に定量される(「実時間」態様)。3つの普通の定量方法は、(1)二本鎖DNAとインターカレートする蛍光染料、(2)相補DNAとハイブリダイズすると蛍光を発する修飾DNAオリゴヌクレオチドプローブおよび(3)蛍光染料を放出する伸長中にDNAポリメラーゼによりハイブリダイズされる増幅配列に相補的なTaqmanプローブの使用である。

## 【 0 1 3 0 】

50

実時間ポリメラーゼ連鎖反応の後ろにある基本理念は、サンプル中に存在する特定の cDNA (および、よって mRNA) が豊富なほど、増幅の反復サイクル中に検出されるのが早くなる。DNA の増幅を追跡する様々なシステムが存在し、それらはしばしば、実時間増幅中に新たに合成された DNA 分子中に組み込まれる蛍光染料の使用を含む。実時間ポリメラーゼ連鎖反応装置は、熱サイクルプロセスを制御するものであり、その後、蛍光 DNA の存在量を、よって、あるサンプルの増幅進行を検出することができる。典型的には、ある cDNA の時間に伴う増幅は、初期平坦期、続いて対数期を有する曲線に従う。最後に、実験試薬が使い切られると、DNA 合成が遅くなり、対数曲線が平坦になり、プラトーとなる。

【0131】

また、標的遺伝子 (複数可) の mRNA またはタンパク質産物は、ノーザンブロット分析、ウエスタンブロットおよび / または免疫組織化学的検査により測定され得る。

【0132】

1つの態様ではプロファイル / サインを同定するための分析は、癌精巢抗原が発現される患者サンプルに対し実施される。

【0133】

単一の遺伝子が例えば、Q-PCRにより分析されると、遺伝子発現は、一定のままである遺伝子、例えば、正規化で使用するのに好適であり得る、記号 H3F3A、EIF4G2、HNRNPC、GUSB、PGK1、GAPDH または TERC を有する遺伝子を参照することにより正規化することができる。正規化は、一定の遺伝子に対し得られる値を、検討中の遺伝子に対して得られる Ct 値から減算することにより実施することができる。

【0134】

遺伝子の発現差異を定量するのに使用される 1つのパラメータは、2つの異なる実験条件間での遺伝子の mRNA - 発現レベルを比較するためのメトリックであるフォールドチェンジである。その演算定義は研究者間で異なる。しかしながら、フォールドチェンジが高いほど、関連遺伝子の発現差異が十分分離される可能性が高くなり、患者がどのカテゴリ (レスポンドーまたはノンレスポンドー) に入るかを決定するのがより容易になる。

【0135】

フォールドチェンジは、例えば、少なくとも 2、少なくとも 10、少なくとも 15、少なくとも 20 または 30 であってもよい。

【0136】

発現差異を定量するために使用される別のパラメータは、「p」値である。p 値が低いほど、異なって発現される遺伝子が多くなる可能性があり、これにより、本発明のプロファイルにおいて使用するための良好な候補者となると考えられる。P 値は、例えば 0.1 以下、例えば 0.05 以下、特に 0.01 以下を含み得る。本明細書では P 値は、校正された「P」値および / または校正されていない「P」値を含む。

【0137】

サンプル分類のために使用することができる遺伝子を同定するための別のパラメータは、信号対ノイズ比であり、このアルゴリズムは、群内の標準偏差の和により加重して比較される 2つの群間の発現レベルの差を測定する。よって、低い群内分散で、群間で最も高い発現差異を有する遺伝子をランク付けするのに使用され得る。

【0138】

本発明はまた、本明細書に記載される構成要素 / 要素を含み、それらから実質的に構成され、またはそれらから構成される、本明細書に記載される本発明に従う別個の実施形態に及ぶ。

【0139】

本発明は、例えば遺伝子の階層的な分類により特徴付けられるように、例えば、Wu et al 2007 (Hierarchical classification of equivalent genes in prokaryotes-Nucleic Acid Research Advance Access) により記載されるように本明細書で列挙される遺伝子の

10

20

30

40

50

機能等価物に及ぶ。

【 0 1 4 0 】

理論に束縛されるものではないが、サインの特徴を示すのは正確な意味においては必ずしも遺伝子ではなく、むしろ、基本的に重要な遺伝子機能であると考えられる。よって、免疫活性化遺伝子に対し機能的に等価な遺伝子、例えば表 1 で列挙されるものはサイン中で使用され得、例えば、Journal of the National Cancer Institute Vol 98, No. 7 April 5 2006を参照されたい。

【 0 1 4 1 】

遺伝子は特異的プローブにより同定され、よって、当業者は上記遺伝子の説明は何がプローブにハイブリダイズするかの現在の理解に基づく説明であることを理解するであろう。しかしながら、遺伝子のために使用される命名法に関わらず、所定の条件下での関連プローブへのハイブリダイゼーションを繰り返すことにより、必要な遺伝子が同定され得る。

10

【 0 1 4 2 】

本発明は、患者を、免疫療法、例えば癌免疫療法、例えば癌精巣免疫療法、特に、とりわけメラノーマのための M a g e 免疫療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして予測または同定するための、本発明によるプロファイル（複数可）の使用に及ぶ。

【 0 1 4 3 】

よって、本発明は、サンプルが由来する患者を、本発明による免疫療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして特徴付ける目的で、本発明によるプロファイル/遺伝子（複数可）の発現に基づき、患者由来のサンプルを分析する方法を含む。

20

【 0 1 4 4 】

1つの態様では、本発明は、サンプルが由来する患者が、免疫療法、例えば本発明による癌免疫療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとなる可能性があるかを同定する目的で、サンプル中の、本明細書で同定された遺伝子由来のポリヌクレオチドの発現レベルを測定するための方法であって、

サンプルから R N A を単離する工程、

任意で前記遺伝子に対しサンプルから c D N A のコピーを増幅させる工程、および

サンプル中の c D N A レベルを定量する工程

を含む方法を提供する。

30

【 0 1 4 5 】

いくつかの実施形態では、本発明は、患者由来のサンプルに対し本発明によるプロファイルと同定するための分析を実施するための少なくとも1つの構成要素を含み、その結果が、サンプルが由来する患者を免疫療法に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーとして指定するために使用され得る診断キットを提供する。

【 0 1 4 6 】

キットは、P C R（例えば Q P C R）、マイクロアレイ分析、免疫組織化学的検査または1つ以上の遺伝子の発現差異にアクセスするために使用され得る他の分析技術のための材料/試薬を含み得る。

【 0 1 4 7 】

本発明はまた、1つ以上、例えば少なくとも5つの、本発明に関連して本明細書に記載される遺伝子の m R N A または c D N A にハイブリダイズすることができる1組のプローブを含む診断キット、例えば少なくとも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、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82または83の、表1の遺伝子の m R N A またはその c D N A にハイブリダイズすることができる1組のプローブを含む診断キットを提供する。

40

50

## 【0148】

別の実施形態では、本発明は診断キットに関する。例えば、診断キットはそのようなマイクロアレイを含み、マイクロアレイは、マイクロアレイ基板、および本発明の遺伝子サインを示すことができる、例えば、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、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82または83の、表1の遺伝子から発現されたmRNAまたはcDNAにハイブリダイズすることができるプローブを含む。

10

## 【0149】

1つの態様では、本発明は、本発明によるサインの同定のために適合されたマイクロアレイを提供する。

## 【0150】

いくつかの実施形態では、本発明はまた、基板および、本発明において使用される1つ以上の遺伝子、例えば表1から発現されるmRNAまたはcDNA部分にハイブリダイズするのに好適なプローブに及ぶ。

## 【0151】

市販のマイクロアレイは、分析の精度を支援するためにどの時点においても、検討中の遺伝子の発現差異を特徴付けるのに必要とされるものよりはるかに多くのプローブを含む。よって、1つ以上のプローブセットが同じ遺伝子を認識し得る。

20

## 【0152】

よって、1つの実施形態では、複数のプローブまたはプローブセットが、発現差異、例えば、本明細書に記載される本発明の任意の態様に従う遺伝子の上方制御を同定するために使用される。

## 【0153】

診断キットは、例えばプローブを含んでもよく、これはマイクロアレイに配列される。

## 【0154】

特に、例えば、本明細書に記載される1つ以上のプローブセットを含む、調製されたマイクロアレイは、Affymetrixなどの会社により容易に調製され得、よって、本発明による、プロファイルの同定するための特異的なテストおよび任意で試薬が提供される。

30

## 【0155】

一実施形態では、マイクロアレイまたは診断キットはさらに、遺伝子、例えばMAGE遺伝子を発現する関連癌精巢抗原の存在の有無に対し試験することができる。

## 【0156】

よって、1つの態様では、本発明は、適切な条件下での、前記ハイブリダイゼーションに好適なプローブおよび/またはプローブセットを提供する。本発明はまた、本発明による遺伝子プロファイルの同定のための、例えば本明細書に記載されるプローブ、またはその機能等価物の使用に及ぶ。

40

## 【0157】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される本発明は前記サインの同定のための、本明細書で列挙されるプローブ（またはその機能的類似体）のすべての並べ替えの使用に及ぶ。

## 【0158】

1つの態様では、本発明は、本発明による遺伝子プロファイルが患者由来のサンプル中に存在するかどうかを確立するための、免疫活性化遺伝子の少なくとも1つの遺伝子産物の発現差異を同定するためのプローブの使用を提供する。

## 【0159】

50

ハイブリダイゼーションが使用される本発明の実施形態では、ハイブリダイゼーションは一般に、ストリンジェント条件下、例えば3 X S S C、0.1% S D S、50 で実施される。

【0160】

標的遺伝子（複数可）/プロファイルが同定されると、同じ標的にハイブリダイズする別のプローブを設計することは十分熟練者の能力の範囲内である。そのため、本発明はまた、記載されるサイン/プロファイルを提供するために、適切な条件下で、本発明の遺伝子（複数可）の同じ発現差異を測定するプローブに及ぶ。

【0161】

本発明はまた、癌患者が適切な免疫療法による治療に対するレスポンドーまたはノンレスポンドーであるかの分析における関連プローブの使用に及ぶ。

10

【0162】

本発明はまた、本発明によるサインの同定のための公知のマイクロアレイの使用（およびこれを使用するプロセス）に及ぶ。

【0163】

核酸プローブは、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、50、75、100以上のヌクレオチドの長さであってもよく、全長遺伝子を含んでもよい。本発明において使用するためのプローブは、ストリンジェント条件下、表1で列挙される遺伝子から発現されるmRNA（またはそのcDNA）に特異的にハイブリダイズすることができるものである。

20

【0164】

本発明はさらに、本明細書に記載される本発明の任意の実施形態を使用して、薬物治療前後に、発現プロファイル进行分析する工程を含む、組織または細胞サンプルに対する薬物の効果をスクリーニングする方法に関する。そのため、本発明は、遺伝子プロファイルを、例えば、M a g e 抗原特異的癌免疫療法を用いた治療後に改善された生存期間を有する患者のものに変え（すなわち、遺伝子プロファイルをレスポンドーのものに変える）、患者が、例えば、M a g e 抗原特異的癌免疫療法から利益を得るようにすることができる、薬物のためのスクリーニング方法を提供する。

【0165】

本発明はさらに、例えば、本明細書に記載される本発明の任意の実施形態による発現プロファイル进行分析し、これを標準と比較し、患者がM a g e 特異的免疫療法から利益が得られるかどうかを診断する工程を含む、患者診断の方法を提供する。

30

【0166】

本発明は、患者により提供された腫瘍組織サンプルから本発明の任意の実施形態による発現プロファイル进行分析し、例えば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、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82または83の表1の前記遺伝子が発現されるかどうかを評価する工程を含む、患者診断の方法を含む。

40

【0167】

よって、臨床適用では、ヒト患者由来の組織サンプルは、本明細書に記載される本発明の任意の実施形態の発現の存在の有無に対し、スクリーニングされ得る。

【0168】

別の態様では、本発明はどの抗原（複数可）が腫瘍によって発現されたかを決定するために腫瘍由来サンプル进行分析し、よって治療的有効量の適切な抗原特異的癌免疫療法薬の投与を可能にする工程をさらに含む方法を提供し、例えば腫瘍がM A G E（例えばM a g e A 3）陽性であることが見いだされた場合、適切な治療は、例えば、M a g e A 3

50

抗原特異的免疫療法の実施を含み得る。

【0169】

患者の腫瘍組織などのサンプルは、本発明の任意の実施形態の1つ以上の遺伝子、例えば実質的にすべての遺伝子が異なって発現され（例えば上方制御）、マイクロアレイ分析または他の適切な分析により、例えば本明細書に記載されるように検出され得る場合、本発明の遺伝子サインを示すと考えられる。

【0170】

さらなる特定のな実施形態は下記で実施される。

【0171】

いくつかの実施形態では、方法は下記を含む：

1. 患者由来のサンプルを、表1の1つ以上の遺伝子の遺伝子産物の発現について分析する工程；

2. 遺伝子産物の発現レベルの正規化工程；

3. 正規化された発現レベルを標準と比較する工程であって、ここで、標準は、公知のレスポンドーまたはノンレスポンドー状態を有する1または複数の患者における表1の1つまたは複数の遺伝子産物の発現の値または関数であり、よって、標準情報を患者由来のサンプルの同じ遺伝子の発現に関する情報と比較すると患者においてレスポンドーまたはノンレスポンドー状態についての結果が引き出され得る、工程；

4. サンプルが由来する患者をレスポンドーまたはノンレスポンドーとして特徴付ける工程；および

5. 任意で、免疫療法薬に対するレスポンドーとして特徴付けられた場合、少なくとも1つの適切な免疫療法薬の投与のための患者を選択する工程を含む。

【0172】

1つの態様では、正規化は、「内部」参照、例えば同じサンプル由来の1つまたは複数のハウスキーピング遺伝子の発現を用いて実施される。1つの態様では、正規化は、外部参照、例えば1または複数の異なる個体から誘導されたものを用いて実施される。

【0173】

1つの態様ではサンプルの特徴付けはマイクロアレイを用いて実施される。1つの態様では、サンプルの特徴付けは、核酸増幅技術、例えばPCRを用いて実施される。

【0174】

1つの態様ではマイクロアレイに基づく技術を使用する新規サンプルの特徴付けは、標準またはトレーニングセットに匹敵する遺伝子発現値を生成させるためのサンプルおよび遺伝子正規化の前処理工程を含む。サンプル正規化は、付属書類1に例示されたGCRM Aアルゴリズム(Wu, 2004)を使用して、例えば好適なトレーニングデータから計算された参照GCRM Aパラメータを用いて実施され得る。トレーニングデータで計算され得るパラメータの例は、参照分位点およびプローブ効果である。遺伝子正規化は、Z-スコア計算を用いて実施することができ、この場合、プローブセット特異的平均が、プローブセット値から減算され、この平均を中心とする発現値がその後、プローブセット特異的標準偏差により加重される。

【0175】

1つの態様では、Q-PCRを用いた新規サンプルの特徴付けは、ある参照またはハウスキーピング遺伝子を用いた患者生データの正規化の前処理工程を含む。Z-スコア計算は、標準またはトレーニングセットからのパラメータを用いて実施され得る。

【0176】

1つの態様では、メラノーマ患者を比較し、特徴付ける工程は、下記アルゴリズムを用いて、患者をレスポンドー(R)もしくは遺伝子サイン(GS)+またはノンレスポンドー(NR, GS-)として特徴付けるために、表1で列挙される100プローブセットまたは83遺伝子を使用する。：

10

20

30

40

## アルゴリズム 1

ライブラリ (ジーンフィルタ)

#### 分類するために testset をロード (正規化されたマイクロアレイデータ)

ロード("testset.RData") #### 分類するためのサンプルを含む ExpressionSet

testset<-data ####(バッチ番号に従い xx を修正)

10

### トレーニングセットパラメータをロード #####

ロード("M8.train.parameters.RData")

PS<-M8.train.parameters[[1]]

M8.train.means<-M8.train.parameters[[2]]

20

M8.train.sd<-M8.train.parameters[[3]]

M8.train.U<-M8.train.parameters[[4]]

```
M8.trainPC1barRs<-M8.train.parameters[[5]]
```

```
M8.trainPC1sdRs<-M8.train.parameters[[6]]
```

```
M8.trainPC1barNRs<-M8.train.parameters[[7]]
```

```
M8.trainPC1sdNRs<-M8.train.parameters[[8]]
```

10

```
##### テストセット上での SPCA の使用 -  
#####
```

```
testset<-testset[PS,]
```

```
test<-(exprs(testset)-M8.train.means)/M8.train.sd
```

```
PCtest<-t(test) %*% M8.train.U
```

```
PC1test<-PCtest[,1]
```

20

```
distanceR<-c()
```

```
distanceNR<-c()
```

```
probR<-c()
```

```
probNR<-c()
```

```
SPCAclass<-c()
```

```
for (i in 1:ncol(test)) {
```

```
distancesR<-abs(PCtest[i,1]-M8.trainPC1barRs)/M8.trainPC1sdRs
```

```
distancesNR<-abs(PCtest[i,1]-M8.trainPC1barNRs)/M8.trainPC1sdNRs
```

30

```
distanceR<-c(distanceR, distancesR)
```

```
distanceNR<-c(distanceNR, distancesNR)
```

```
probRs<-exp(-distancesR/2)/(exp(-distancesR/2)+exp(-distancesNR/2))
```

```
probNRs<-exp(-distancesNR/2)/(exp(-distancesR/2)+exp(-distancesNR/2))
```

```
probR<-c(probR, probRs)
```

```
probNR<-c(probNR, probNRs)
```

40

```
}
```

```
cutoff=0.43
```

```
clust<-ifelse(as.vector(probR)>cutoff, R, NR)
```

```
【 0 1 7 7 】
```

50

ここで、

`testset` は、100PS に対する正規化マイクロアレイデータを含む 100 行を有するマトリクスである。

【0178】

`M8.train.parameters` は、下記を含むクラスリストのオブジェクトである：

1. 100PS の文字リスト
2. トレインセット中の各 PS に対する 100 平均値のベクトル
3. トレインセット中の各 PS に対する 100 *sd* 値のベクトル
4. トレインマトリクスの *svd* 分解の U マトリクスを含む 100 行および 56 列のマトリクス 10
5. トレイン中のレスポナー群の PC1 平均値
6. トレイン中のレスポナー群の PC1 *sd* 値
7. トレイン中のノンレスポナー群の PC1 平均値
8. トレイン中のノンレスポナー群の PC1 *sd* 値

トレーニングセット中の各群の平均および *sd* (有効 3 桁まで四捨五入) は下記の通りである：

【表 4】

平均_PC <sub>1R</sub>	-4.622
sd_PC <sub>1R</sub>	5.727
平均_PC <sub>1NR</sub>	2.991
sd_PC <sub>1NR</sub>	7.051

20

【0179】

100PS 分類指標特徴に対する平均、標準偏差 (*Sd*) および PC1 係数

【表 5】

	平均	Sd	PC1
213793_s_at	6.638	1.437	0.0827
223593_at	4.245	1.721	0.0698
225996_at	5.369	2.116	0.0625
204556_s_at	3.515	1.49	0.0594
223575_at	5.664	1.785	0.0556
205097_at	7.907	1.526	0.0553
231229_at	6.464	1.711	0.0504
1562051_at	3.576	1.847	0.0503
244393_x_at	4.702	1.444	0.0494
200615_s_at	6.286	1.232	0.0407
228316_at	5.362	1.369	0.0402
201474_s_at	4.506	1.331	0.0376
222962_s_at	5.177	1.139	0.0372
236328_at	7.034	1.936	0.0339
232481_s_at	3.731	2.053	0.0328
228400_at	3.458	1.437	0.0279
211149_at	4.061	2.272	0.0266
228492_at	4.538	2.983	0.0254
237515_at	5.513	1.86	0.0245
226084_at	9.153	1.388	0.0234
205499_at	4.675	1.719	0.0002
234907_x_at	3.95	1.465	-0.0051
1553132_a_at	4.068	1.29	-0.0504
239012_at	6.533	1.694	-0.0656
238587_at	6.039	1.292	-0.0717
219551_at	4.637	1.569	-0.0789
AFFX-HUMISGF3A/M97935_MB_at	7.445	1.504	-0.0819
1562031_at	6.386	1.521	-0.0871
238524_at	4.961	1.623	-0.0883
217436_x_at	8.377	1.127	-0.0891
1552612_at	7.216	1.841	-0.0929
244061_at	6.081	1.918	-0.0935
209774_x_at	6.653	1.952	-0.0953
221081_s_at	6.805	2.062	-0.0956
206082_at	6.505	2.038	-0.0988
209770_at	10.821	1.153	-0.1002
232375_at	8.732	1.379	-0.1007
211911_x_at	10.865	1.461	-0.1042
1552613_s_at	7.491	1.275	-0.1043
221875_x_at	10.907	1.258	-0.1044
214470_at	6.927	1.801	-0.1049
232311_at	7.001	1.484	-0.105
208729_x_at	10.389	1.419	-0.106
207536_s_at	4.073	1.75	-0.1061
204806_x_at	10.065	1.283	-0.1062
1554240_a_at	4.02	1.761	-0.1068

10

20

30

40

	平均	Sd	PC1
207795_s_at	3.698	1.803	-0.1073
202659_at	6.944	1.284	-0.1077
210606_x_at	3.915	1.892	-0.1083
235276_at	7.632	1.905	-0.1084
208885_at	10.544	1.865	-0.1084
202643_s_at	5.855	1.381	-0.1087
204533_at	8.875	3.111	-0.1088
229152_at	6.925	3.232	-0.1092
1563473_at	7.07	2.31	-0.1112
204529_s_at	7.139	2.08	-0.1115
235175_at	8.682	2.268	-0.1118
204897_at	9.206	1.692	-0.1123
204070_at	8.233	2.205	-0.1125
210439_at	4.539	1.825	-0.1131
1555759_a_at	4.213	1.638	-0.1133
204224_s_at	9.809	1.798	-0.1137
202644_s_at	8.64	1.472	-0.114
231577_s_at	8.659	1.996	-0.114
210982_s_at	11.946	1.662	-0.1145
1555852_at	6.989	1.89	-0.1149
209813_x_at	4.135	1.808	-0.1152
205685_at	6.927	1.728	-0.1153
238581_at	4.289	1.801	-0.1158
229543_at	8.937	2.328	-0.1159
229390_at	9.644	2.315	-0.1159
208894_at	11.493	1.628	-0.1161
222838_at	7.302	2.672	-0.1164
228532_at	8.693	1.684	-0.1165
209606_at	5.957	2.038	-0.1168
217478_s_at	9.575	1.559	-0.1173
229391_s_at	9.135	2.228	-0.1175
211144_x_at	4.32	1.949	-0.1179
228362_s_at	8.288	2.398	-0.1179
212671_s_at	8.72	2.387	-0.1182
203915_at	9.242	3.331	-0.1191
229625_at	7.32	2.116	-0.1197
211902_x_at	7.387	1.956	-0.1197
209671_x_at	5.905	2.044	-0.1197
1552497_a_at	4.827	2.195	-0.1205
215806_x_at	4.544	1.973	-0.1215
216920_s_at	5.641	1.862	-0.1221
210972_x_at	7.322	2.354	-0.1224
205890_s_at	8.864	2.983	-0.1225
232234_at	6.877	2.249	-0.1228
207651_at	7.222	2.531	-0.1229
202531_at	7.451	1.809	-0.1234
206666_at	6.816	2.698	-0.1242

10

20

30

40

	平均	Sd	PC1
213193_x_at	6.825	2.768	-0.1257
204116_at	6.106	2.683	-0.126
213539_at	7.398	2.851	-0.1263
211339_s_at	5.602	2.061	-0.1266
210915_x_at	6.533	2.733	-0.1267
211796_s_at	6.946	2.921	-0.1271
205758_at	7.338	3.285	-0.1275

10

## 【0180】

1つの態様では、メラノーマ患者を比較し、特徴付ける工程は、単一の遺伝子発現値が第1の主成分(PC1)の代わりに使用される、上記で特定されるアルゴリズムを用いて患者を特徴付けるために、それぞれ、表13で言及される100プローブセットまたは83遺伝子のいずれか1つを使用する。

## 【0181】

1つの態様では、メラノーマ患者を比較し、特徴付ける工程は、下記アルゴリズムを用いて、患者をレスポonder(R)もしくは遺伝子サイン(GS)+またはノンレスポonder(NR, GS-)として特徴付けるために、表5で列挙される22遺伝子を使用する:

## アルゴリズム 2

```
### テストサンプル新たな転移性メラノーマ TLDA2 22 遺伝子の分類のためのスクリプト
### Mage008TLDA.SPCA.DA.Me14patent.Rに基づく
### M8.train.parameters.22genes.TLDA2.RData を必要とする (トレーニングセットパラメータ)
ライブラリ (ジーンフィルタ)
#### 分類するために testset をロード (対数スケール正規化 PCR データ)
ロード("testset.RData") ### 分類するためのサンプルを含む ExpressionSet
### トレーニングセットパラメータをロード #####
ロード("M8.train.parameters.22genes.TLDA2.RData")
PS<-M8.train.parameters[[1]]
M8.train.means<-M8.train.parameters[[2]]
M8.train.sd<-M8.train.parameters[[3]]
M8.train.U<-M8.train.parameters[[4]]
M8.trainPC1barRs<-M8.train.parameters[[5]]
M8.trainPC1sdRs<-M8.train.parameters[[6]]
M8.trainPC1barNRs<-M8.train.parameters[[7]]
```

10

20

30

```

M8.trainPC1sdNRs<-M8.train.parameters[[8]]

##### テストセット上での SPCA の使用 - #####
testset<-testset[PS,]

test<-(exprs(testset)-M8.train.means)/M8.train.sd

PCtest<-t(test) %% M8.train.U
PC1test<-PCtest[,1]

distanceR<-c()
distanceNR<-c()
probR<-c()
probNR<-c()
SPCAclass<-c()

for (i in 1:ncol(test)) {
distancesR<-abs(PCtest[i,1]-M8.trainPC1barRs)/M8.trainPC1sdRs

distancesNR<-abs(PCtest[i,1]-M8.trainPC1barNRs)/M8.trainPC1sdNRs

distanceR<-c(distanceR, distancesR)
distanceNR<-c(distanceNR, distancesNR)

probRs<-exp(-distancesR/2)/(exp(-distancesR/2)+exp(-distancesNR/2))

probNRs<-exp(-distancesNR/2)/(exp(-distancesR/2)+exp(-distancesNR/2))

probR<-c(probR, probRs)
probNR<-c(probNR, probNRs)
}

cutoff=0.47
clust<-ifelse(as.vector(probR)>cutoff, R, NR)

#####

###(バッチ番号に従い xx 次の行を修正)
write.table(cbind(pData(testset), probR), file="testset_batch_xx_TLDA2_22genes_classification.txt", sep="\t")

```

【 0 1 8 2 】

ここで、

Testset.RData は、22 遺伝子に対する正規化対数スケール PCR データを含む 22 行を有するマトリクスである。

【 0 1 8 3 】

M8.train.parameters は、下記を含むクラスリストのオブジェクトで

50

ある：

1. 22 遺伝子名の文字リスト
  2. トレーンセット中の各遺伝子に対する 22 平均値のベクトル
  3. トレーンセット中の各遺伝子に対する 22 sd 値のベクトル
  4. トレーンマトリクス of s v d 分解の U マトリクスを含む 22 行および 22 列のマトリクス
  5. トレーン中のレスポナー群の PC1 平均値
  6. トレーン中のレスポナー群の PC1 sd 値
  7. トレーン中のノンレスポナー群の PC1 平均値
  8. トレーン中のノンレスポナー群の PC1 sd 値
- 22 遺伝子分類指標特徴に対する平均、標準偏差 ( S d ) および PC1 係数

10

【表 6】

遺伝子	平均	Sd	PC1 係数
C4orf7	-1.397	1.244	-0.1834
CCL5	-0.545	0.691	-0.2441
JAK2	-1.105	0.354	-0.1636
IRF1	-0.430	0.500	-0.2345
CXCL9	-0.276	0.923	-0.2349
IL2RG	-0.657	0.721	-0.2444
CXCL10	-0.830	0.896	-0.2181
SLC26A2	-0.745	0.307	0.0660
CD86	-1.504	0.461	-0.2272
CD8A	-1.342	0.879	-0.1881
UBD	-0.570	0.945	-0.2385
GZMK	-1.470	0.734	-0.2414
GPR171	-1.683	0.698	-0.2180
PSCDBP	-1.335	0.647	-0.2212
CXCL2	-2.163	0.633	-0.1437
ICOS	-1.714	0.697	-0.2029
TRBC1	-2.714	1.313	-0.2026
TRA@;TRAJ17;TRDV2;TRAC;TRAV20	-0.762	0.666	-0.2464
TARP;TRGC2	-2.405	0.877	-0.1904
ITK	-1.862	0.896	-0.2178
CD3D	-1.478	0.806	-0.2452
HLA-DMA	-0.380	0.470	-0.2284

20

30

【0184】

トレーニングセット中の各群の平均および s d (有効 3 桁まで四捨五入) は下記の通りである：

40

【表 7】

平均_PC <sub>1R</sub>	-2.055
sd_PC <sub>1R</sub>	2.920
平均_PC <sub>1NR</sub>	1.210
sd_PC <sub>1NR</sub>	3.951

【0185】

50

1つの態様では、メラノーマ患者を比較し、特徴付ける工程は、単一の遺伝子発現値が第1の主成分(PC1)の代わりに使用される、上記で特定されるアルゴリズムを用いて患者を特徴付けるために、それぞれ、表11で言及される22遺伝子のいずれか1つを使用する。

【0186】

1つの態様では、NSCLC患者を比較し、特徴付ける工程は、下記アルゴリズムを用いて、患者をレスポナー（非再発もしくは遺伝子サイン+ (GS+), 1) またはノンレスポナー（再発, GS-, 0) として特徴付けるために、表7で列挙される23遺伝子を使用する：

## アルゴリズム 3

```
### テストサンプル新たな切除NSCLC TLDAmERGE 23遺伝子の分類のためのスクリプト
```

```
### Mage004.SPCA.Cox.classifier.construction.TLDAmERGE.23genes.DFI.Squamous.Rに基づく
```

```
### M4.train.parameters.23genes.TLDAmERGE.RDataを必要とする(トレーニングセットパラメータ)
```

```
ライブラリ(ジーンフィルタ)
```

```
#### 分類するために testset をロード (対数スケール正規化 PCR データ)
```

```
ロード("testset.RData") #### 分類するためのサンプルを含む ExpressionSet
```

```
### トレーニングセットパラメータをロード #####
```

```
ロード("M4.train.parameters.23genes.TLDAmERGE.RData")
```

```
PS<-M4.train.parameters[[1]]
```

```
M4.train.means<-M4.train.parameters[[2]]
```

```
M4.train.sd<-M4.train.parameters[[3]]
```

```
M4.train.U<-M4.train.parameters[[4]]
```

```
M4.train.Btreatment<-M4.train.parameters[[5]]
```

```
M4.train.Binteraction<-M4.train.parameters[[6]]
```

```
M4.train.medianHR<-M4.train.parameters[[7]]
```

```
##### テストセット上での SPCA の使用 -  
#####
```

```
testset<-testset[PS, ]
```

```
test<-(exprs(testset)-M4.train.means)/M4.train.sd
```

```
PCtest<-t(test) %*% M4.train.U
```

```
PC1test<-PCtest[, 1]
```

10

20

30

40

```
HR=M4.train.Btreatment+PC1test*M4.train.Binteraction
classification=ifelse(HR<M4.train.medianHR,1,0)

#####

###(バッチ番号に従い xx 次の行を修正)
write.table(cbind(pData(testset),probR),file="testset_batch_xx_M4_TLDAmerge_23genes_classification.txt",sep="\t")
```

10

【 0 1 8 7 】

ここで、

`Testset.RData`は、23遺伝子に対する正規化対数スケールPCRデータを含む23行を有するマトリクスである。

【 0 1 8 8 】

`M4.train.parameters`は、下記を含むクラスリストのオブジェクトである：

1. 23遺伝子名の文字リスト
  2. トレインセット中の各遺伝子に対する23平均値のベクトル
  3. トレインセット中の各遺伝子に対する23sd値のベクトル
  4. トレインマトリクスのsvd分解のUマトリクスを含む23行および23列のマトリクス
  5. リスクスコア計算における `B_treatment`
  6. リスクスコア計算における `B_PC1interaction`
  7. トレインにおけるメジアンリスクスコア
- 23遺伝子分類指標特徴に対する平均、標準偏差 (Sd) およびPC1係数

20

【表 8】

遺伝子	平均	sd	PC1 係数
C4orf7	-2.35768	1.455544	-0.12114
CCL5	-0.9599	0.350039	-0.23097
JAK2	-1.36811	0.260374	-0.19931
IRF1	-0.52347	0.276644	-0.2256
CXCL9	-0.87804	0.563437	-0.21386
IL2RG	-0.83528	0.358042	-0.24997
CXCL10	-1.36857	0.615177	-0.17136
SLC26A2	-1.44043	0.255169	-0.05637
CD86	-1.7699	0.499237	-0.13267
CD8A	-1.33733	0.375334	-0.25173
UBD	-0.71367	0.546652	-0.21295
GZMK	-1.77411	0.529496	-0.24628
GPR171	-1.81327	0.32409	-0.19376
PSCDBP	-1.17746	0.387117	-0.24162
CXCL2	-1.16947	0.696255	-0.09696
ICOS	-2.15436	0.403522	-0.23497
TRBC1	-2.62512	1.013281	-0.12679
TRA@;TRAJ17;TRDV2;TRAC;TRAV20	-1.19671	0.3944	-0.25817
TARP;TRGC2	-2.22752	0.481252	-0.19299
ITK	-1.85777	0.394118	-0.26077
CD3D	-1.64584	0.397626	-0.25514
HLA-DMA	-0.81144	0.380465	-0.22948
SLAMF7	-1.33744	0.464338	-0.21762

10

20

30

## 【0189】

ここで、 $B_{treatment} = 0.2429033$

および  $B_{pc1interaction} = 0.1720062$  は、トレーニングセットから得られた。

## 【0190】

新規サンプルのリスクスコアは、トレーニングセットのメジアンリスクスコア =  $-0.323947288$  と比較され、リスクスコアがこの値より低い場合、サンプルは  $GS+$  (レスポナー, 非再発, 1) と分類される。

## 【0191】

1つの態様では、NSCLC患者を比較し、特徴付ける工程は、単一の遺伝子発現値が第1の主成分(PC1)の代わりに使用される、上記で特定されるアルゴリズムを用いて患者を特徴付けるために、それぞれ、表12で言及される23遺伝子のいずれか1つを使用する。

40

## 【0192】

1つの態様では、NSCLC患者を比較し、特徴付ける工程は、下記アルゴリズムを用いて、患者をレスポナー (非再発もしくは遺伝子サイン+ ( $GS+$ ), 1) またはノンレスポナー (再発,  $GS-$ , 0) として特徴付けるために、表9で列挙される22遺伝子を使用する:

## アルゴリズム 4

###テストサンプル新たな切除NSCLC TLDAm e r g e 22 遺伝子の分類のためのスクリプト

### Mage004. SPCA. Cox. classifier. contruction. DFI. Squamous. R に基づく

```
### M4. train. parameters. 22genes. TLDA2. Rdata を必要とする (トレーニングセットパラメータ)
```

```
ライブラリ (ジーンフィルタ)
```

```
#### 分類するために testset をロード (対数スケール正規化 PCR データ)
```

```
ロード("testset.RData") ### 分類するためのサンプルを含む ExpressionSet
```

10

```
### トレーニングセットパラメータをロード #####
```

```
ロード("M4. train. parameters. 22genes. TLDA2. RData")
```

```
PS<-M4. train. parameters[[1]]
```

```
M4. train. means<-M4. train. parameters[[2]]
```

```
M4. train. sd<-M4. train. parameters[[3]]
```

20

```
M4. train. U<-M4. train. parameters[[4]]
```

```
M4. train. Btreatment<-M4. train. parameters[[5]]
```

```
M4. train. Binteraction<-M4. train. parameters[[6]]
```

```
M4. train. medianHR<-M4. train. parameters[[7]]
```

30

```
##### テストセット上での SPCA の使用 -  
#####
```

```
testset<-testset[PS, ]
```

```
test<-(exprs(testset)-M4. train. means)/M4. train. sd
```

```
PCtest<-t(test) %% M4. train. U
```

```
PC1test<-PCtest[, 1]
```

40

```
HR=M4. train. Btreatment+PC1test*M4. train. Binteraction
```

```
classification=ifelse(HR<M4. train. medianHR, 1, 0)
```

```
#####
```

```
### (バッチ番号に従い xx 次の行を修正)
```

```
write.table(cbind(pData(testset), probR), file="testset_batch_xx_M4_TLDA2_22genes_classification.txt", sep="\t")
```

```
【 0 1 9 3 】
```

50

ここで、

`Testset.RData`は、22遺伝子に対する正規化対数スケールPCRデータを含む22行を有するマトリクスである

`M4.train.parameters`は、下記を含むクラスリストのオブジェクトである：

1. 22遺伝子名の文字リスト
2. トレーンセット中の各遺伝子に対する22平均値のベクトル
3. トレーンセット中の各遺伝子に対する22sd値のベクトル
4. トレーンマトリクスのsvd分解のUマトリクスを含む22行および22列のマトリクス
5. リスクスコア計算における `B_treatment`
6. リスクスコア計算における `B_PC1interaction`
7. トレーンにおけるメジアンリスクスコア。

【0194】

22遺伝子分類指標特徴に対する平均、標準偏差(Sd)およびPC1係数

【表9】

遺伝子	平均	Sd	PC1 係数
C4orf7	-2.37682	1.432191	-0.12613
CCL5	-0.97196	0.363545	-0.23868
JAK2	-1.38351	0.272662	-0.20067
IRF1	-0.5328	0.284196	-0.23035
CXCL9	-0.88518	0.561561	-0.21758
IL2RG	-0.84755	0.369696	-0.25893
CXCL10	-1.38526	0.608373	-0.17545
SLC26A2	-1.45138	0.259368	-0.06122
CD86	-1.78136	0.493304	-0.1445
CD8A	-1.35019	0.38214	-0.26018
UBD	-0.72426	0.545598	-0.21573
GZMK	-1.7857	0.526042	-0.25378
GPR171	-1.81382	0.353983	-0.1875
PSCDBP	-1.19407	0.398912	-0.24969
CXCL2	-1.17377	0.679063	-0.10145
ICOS	-2.16745	0.40877	-0.24479
TRBC1	-2.63145	0.999466	-0.12889
TRA@;TRAJ17;TRDV2;TRAC;TRAV20	-1.20289	0.392963	-0.26276
TARP;TRGC2	-2.27109	0.528402	-0.19113
ITK	-1.87391	0.405727	-0.26852
CD3D	-1.66653	0.409356	-0.26013
HLA-DMA	-0.81888	0.400541	-0.23598

【0195】

ここで、`B_treatment = -0.193146993`および`B_PC1interaction = -0.163704817`は、トレーニングセットから得られた。

【0196】

新規サンプルのリスクスコアは、トレーニングセットのメジアンリスクスコア =  $-0.25737421$ と比較され、リスクスコアがこの値より低い場合、サンプルはGS+(レスポナー, 非再発, 1)と分類される。

【0197】

免疫療法薬

10

20

30

40

50

さらなる態様では、本発明は、適切な免疫療法、例えば、それに対するレスポンドーとして同定した後の癌免疫療法、例えば癌精巢免疫療法を用いてレスポンドー患者を治療する方法を提供する。

【0198】

よって、いくつかの実施形態では、本発明は、例えば患者由来のサンプルの適切な分析により示されるように、少なくとも1つの免疫活性化遺伝子の発現差異に基づき、患者をレスポンドーとして最初に特徴付けた後、治療的有効量の適切な免疫療法（例えば癌免疫療法、例えばM a g e 癌免疫療法）を投与する工程を含む、患者を治療する方法を提供する。特に、この場合、患者は、本明細書に記載される1つ以上の実施形態に基づいてレスポンドーとして特徴付けられる。

10

【0199】

1つの態様では、免疫療法は適切なアジュバント（免疫賦活剤）を含み、下記記載を参照されたい。

【0200】

本発明のさらに別の実施形態では、例えば、M a g e 発現腫瘍を患う患者を治療する方法が提供され、この方法は、患者が本発明の遺伝子サインを発現するかどうかを決定し、その後、例えば、M a g e 特異的免疫療法薬を投与することを含む。さらなる実施形態では、患者は、治療、例えば、任意の腫瘍の外科手術による切除または他の化学療法もしくは放射線療法治療を最初に受けた後、疾患の再発を防止または寛解するために例えば、M a g e 特異的免疫療法薬を用いて治療される。

20

【0201】

本発明のさらなる態様は、M a g e 発現腫瘍を患う患者を治療する方法であり、本方法は、患者の腫瘍が、患者により与えられた生物学的サンプルから、本発明の任意の実施形態によるプロファイルを発現するかどうかを決定し、その後、M a g e 特異的免疫療法薬を前記患者に投与することを含む。

【0202】

M a g e 発現腫瘍が除去/治療されるように処置されている、M a g e 発現腫瘍の再発を起こしやすい患者を治療する方法もまた、提供され、本方法は、患者により与えられた生物学的サンプルから、患者の腫瘍が本発明の任意の実施形態より選択された1つ以上の遺伝子を発現するかどうかを決定し、その後、M a g e 特異的免疫療法薬を投与することを含む。

30

【0203】

本発明はまた、治療または使用方法として下記の使用を提供する：

M A G E 抗原またはそのペプチドを含むM a g e 特異的免疫療法薬、

M A G E - A 3 タンパク質またはペプチドを含むM A G E 抗原、

ペプチドE V D P I G H L Y を含むM A G E 抗原、

運搬体タンパク質に融合またはコンジュゲートされたM A G E 抗原またはペプチド、例えばこの場合、運搬体タンパク質は、タンパク質D、N S 1もしくはC L y t A またはそれらの断片から選択される、および/または

さらに、アジュバントを含む、M a g e 特異的免疫療法薬、例えば、この場合、アジュバントは下記のうちの1つ以上またはそれらの組み合わせを含む：3 D - M P L ; アルミニウム塩 ; C p G 含有オリゴヌクレオチド ; サポニン含有アジュバント、例えばQ S 2 1 またはI S C O M ; 水中油型エマルジョン ; およびリボソーム。

40

【0204】

本発明はまた、レスポンドーとして指定された患者、例えば癌患者の治療のための薬剤の製造における、免疫療法、例えば癌免疫療法、特にM a g e 免疫療法の使用に及ぶ。

【0205】

最初にノンレスポンドーとして特徴付けられた一人の患者がその後、放射線療法後、レスポンドーとして特徴付けられたことが観察された。興味深いことに、本発明者らもまた、例えば患者を放射線療法に供する、または、炎症刺激薬薬、例えばインターフェロンま

50

たは TLR3 (例えば、WO 2006/054177 に記載)、4、7、8 もしくは TLR9 アゴニスト (例えば CpG モチーフを含む、特に高用量、例えば 0.1 ~ 75 mg / Kg が、例えば毎週投与される) を投与することにより、少なくとも幾人かのノンレスポonderにおいてレスポonderプロファイルを誘導する可能性があると考えている。例えば Krieg, A. M., Efler, S. M., Wittpoth, M., Al Adhami, M. J. & Davis, H. L. Induction of systemic TH1-like innate immunity in normal volunteers following subcutaneous but not intravenous administration of CPG 7909, a synthetic B-class CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonist. J. Immunother. 27, 460-471 (2004) を参照されたい。

【0206】

高用量の CpG は、例えば吸入され、または皮下投与され得る。

【0207】

本発明はさらに、MAGE 発現腫瘍を患う患者または MAGE 発現腫瘍を除去 / 治療するために治療 (例えば、外科手術、化学療法または放射線療法) を受けた患者の治療のための薬剤の製造における MAGE 特異的免疫療法の使用を提供し、前記患者は、本発明の遺伝子サインを発現する。

【0208】

その後、免疫療法は、例えばレスポonderに、またはレスポonderプロファイルが誘導された時点で、実施され得る。

【0209】

1つの態様では、本発明は、MAGE 発現腫瘍を患う患者の治療のための薬剤の製造における MAGE 特異的免疫療法の使用を提供し、前記患者は、本発明の任意の実施形態から選択される1つ以上の遺伝子を発現するそれらの腫瘍により特徴付けられる。

【0210】

本発明はまた、MAGE 発現腫瘍から再発しやすい患者の治療のための薬剤の製造における MAGE 特異的免疫療法の使用を提供し、前記患者は、本発明の任意の実施形態から選択される1つ以上の遺伝子を発現するそれらの腫瘍により特徴付けられる。

【0211】

好都合なことに、本発明により、治療提供者は、適切な免疫療法を受けることから臨床的利益を得るそれらの患者集団を標的とすることが可能になる。スクリーニング後、レスポonderとして判断 / 特徴付けされた少なくとも60%の患者、例えば70、75、80、85%以上の患者が、免疫療法から臨床的利益を受け、これは療法、例えば癌療法を用いて、一般的に観察される現在のレベルを超えて著しく増加することが予測される。

【0212】

好都合なことに、癌免疫療法が化学療法と同時に、またはその後と与えられる場合、化学療法により減少する可能性のある患者の免疫応答の上昇を支援することができる。

【0213】

さらなる実施形態では、免疫療法は外科手術、化学療法および / または放射線療法前に与えられ得る。

【0214】

本発明において使用するのに好適な抗原特異的癌免疫療法薬 (ASCI) としては、例えば MAGE 特異的免疫応答を上昇させることができるものが挙げられる。そのような免疫療法薬は、MAGE 遺伝子産物、例えば MAGE - A 抗原、例えば MAGE - A3 に対する免疫応答を上昇させることができる。免疫療法薬は一般に、MAGE 遺伝子産物由来の少なくとも1つのエピトープを含む。そのようなエピトープは、任意で担体に共有結合により結合され、任意でアジュバントの存在下、ペプチド抗原として存在し得る。また、より大きなタンパク質断片が使用され得る。例えば、本発明において使用するための免疫療法薬は、MAGE - A1 のアミノ酸 195 - 279 に対応する、またはそれらを含む抗原を含み得る。しかしながら、使用するための断片およびペプチドは、好適に提供される場合、MAGE 特異的免疫応答を上昇させることができなければならない。本発明で使用

10

20

30

40

50

され得るペプチドの例としては、MAGE - 3 . A 1 ノナペプチド EVDPIGHLY [ 配列番号 ] (Marchand et al., International Journal of Cancer 80(2)、219 230を参照されたい)、および下記 MAGE - A 3 ペプチドが挙げられる :

FLWGPRA LV ; [ 配列番号 : 1 0 7 ]  
 MEVDPIGHLY ; [ 配列番号 : 1 0 8 ]  
 VHFLL LKYRA ; [ 配列番号 : 1 0 9 ]  
 LVHFLL LKYR ; [ 配列番号 : 1 1 0 ]  
 LKYRAREPVT ; [ 配列番号 : 1 1 1 ]  
 ACYEF LWGPRA L VETS ; および [ 配列番号 : 1 1 2 ]  
 TQHFVQENYLEY ; [ 配列番号 : 1 1 3 ]。

【0215】

別の ASCI としては、癌精巢抗原、例えば NY - ESO 1、LAGE 1、LAGE 2 が挙げられ、例えばこれらの詳細は、www.cancerimmunity.org/CTdatabase から得ることができる。ASCI はまた、癌精巢特異的でない他の抗原、例えば PRAME および WT 1 を含む。

【0216】

癌免疫療法は、例えば、下記で記載される 1 つ以上の抗原に基づいてもよい。

【0217】

本発明の 1 つの実施形態では、使用される抗原は、MAGE 腫瘍抗原、例えば、MAGE 1、MAGE 2、MAGE 3、MAGE 4、MAGE 5、MAGE 6、MAGE 7、MAGE 8、MAGE 9、MAGE 10、MAGE 11 または MAGE 12 から構成されてもよく、またはそれらを含んでもよい。これらの MAGE 抗原をコードする遺伝子は、染色体 X 上に配置され、互いにそれらのコード配列において 64 ~ 85 % ホモロジーを共有する (De Plaen, 1994)。これらの抗原は時として MAGE A 1、MAGE A 2、MAGE A 3、MAGE A 4、MAGE A 5、MAGE A 6、MAGE A 7、MAGE A 8、MAGE A 9、MAGE A 10、MAGE A 11 および / または MAGE A 12 (MAGE A ファミリー) として知られている。1 つの実施形態では、抗原は MAGE A 3 である。

【0218】

1 つの実施形態では、2 つの別の MAGE ファミリーのうちの 1 つからの抗原が使用され得る : MAGE B および MAGE C グループ。MAGE B ファミリーは、MAGE B 1 (MAGE Xp 1、および DAM 10 としても知られている)、MAGE B 2 (MAGE Xp 2 および DAM 6 としても知られている) MAGE B 3 および MAGE B 4 を含み - MAGE C ファミリーは現在、MAGE C 1 および MAGE C 2 を含む。

【0219】

一般論として、MAGE タンパク質は、タンパク質の C 末端に向かって配置されたコア配列サインを含むものとして規定することができる (例えば MAGE A 1 309 アミノ酸タンパク質に関しては、コアサインはアミノ酸 195 - 279 に対応する)。

【0220】

よって、コアサインのコンセンサスパターンは、下記のように記載され、ここで、x は任意のアミノ酸を表し、小文字残基は保存され (保存パラントが許容される) 大文字残基は完全に保存される。

【0221】

コア配列サイン

L i x v L ( 2 x ) I ( 3 x ) g ( 2 x ) a p E E x i W e x l ( 2 x ) m ( 3 - 4 x )  
 G x e ( 3 - 4 x ) g x p ( 2 x ) l l t ( 3 x ) V q e x Y L x Y x q V P x s x P ( 2 x )  
 y e F L W G p r A ( 2 x ) E t ( 3 x ) k v

保存的置換はよく知られており、一般に配列アライメントコンピュータプログラムにおいてデフォルトスコアマトリクスとして設定される。これらのプログラムは、PAM 25

10

20

30

40

50

0 (Dayhoff M.O. et al., (1978), "A model of evolutionary changes in proteins", In "Atlas of Protein sequence and structure" 5(3) M.O. Dayhoff (ed.), 345-352)、National Biomedical Research Foundation、Washington、およびBlosom62(Steven Henikoff and Jorja G. Henikoff (1992), "Amino acid substitution matrices from protein blocks"), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (Biochemistry): 10915-10919を含む。

#### 【0222】

一般論として、下記群内の置換は保存的置換であるが、群間での置換は、非保存であると考えられる。群は下記の通りである：

- i) アスパラギン酸/アスパラギン/グルタミン酸/グルタミン
- ii) セリン/スレオニン
- iii) リシン/アルギニン
- iv) フェニルアラニン/チロシン/トリプトファン
- v) ロイシン/イソロイシン/バリン/メチオニン
- vi) グリシン/アラニン。

10

#### 【0223】

一般に、および本発明の関連では、MAGEタンパク質は、このコア領域では、MAGE A1のアミノ酸195～279と約50%以上同一、例えば70、80、90、95、96、97、98または99%同一である。

#### 【0224】

MAGEタンパク質誘導体もまた、当技術分野で知られており、WO99/40188を参照されたい。そのような誘導体は、様々な腫瘍型の治療のために好適である治療ワクチン製剤(免疫療法薬)において使用するのに好適である。

20

#### 【0225】

いくつかのCTLエピトープがMAGE-3タンパク質上で同定されている。1つのそのようなエピトープ、MAGE-3.A1は、MHCクラスI分子HLA.A1との関連で提示された場合、CTLに対し特異的なエピトープを構成するMAGE-3タンパク質のアミノ酸168と176の間に配置されるノナペプチド配列である。近年、2つの追加のCTLエピトープが、メラノーマ細胞および自己リンパ球の混合培養においてCTL応答を開始する能力により、MAGE-3タンパク質のペプチド配列上で同定されている。これらの2つのエピトープはそれぞれ、HLA.A2(Van der Bruggen, 1994)およびHLA.B44(Herman, 1996)アレルに対し特異的な結合モチーフを有する。

30

#### 【0226】

本発明のさらなる実施形態では、腫瘍抗原は、下記抗原のうちの1つ、または抗原に対し免疫応答を誘導することができるその免疫原性部分を含む、またはそれから構成され得る：SSX-2；SSX-4；SSX-5；NA17；MELAN-A；チロシナーゼ；LAGE-1；NY-ESO-1；PRAME；P790；P510；P835；B305D；B854；CASB618(WO00/53748において記載)；CASB7439(WO01/62778において記載)；C1491；C1584；およびC1585。

40

#### 【0227】

1つの実施形態では、抗原は、P501S(プロステインとしても知られている)を含んでもよく、またはこれから構成されてもよい。P501S抗原は、P501Sタンパク質の大部分を肺炎球菌(*Streptococcus pneumoniae*)のタンパク質LytaのC末端部分を含む細菌融合タンパク質と組み合わせた組換えタンパク質であってもよく、この場合、WO03/104272において記載されるように、破傷風トキソイドのP2ユニバーサルTヘルパーペプチドが挿入されており、すなわちCLyta-P2-CLyta(「CPC」融合パートナー)を含む融合物である。

#### 【0228】

50

1つの実施形態では、抗原は、W i l m腫瘍遺伝子により発現されたW T - 1、または約または大体アミノ酸1 - 249を含むそのN末端断片W T - 1 F ; H e r - 2 / n e u遺伝子により発現された抗原、またはその断片を含んでもよく、またはそれらから構成されてもよい。1つの実施形態では、H e r - 2 / n e u抗原は、W O O O / 44899に記載される、下記融合タンパク質の1つであってもよい。

【0229】

さらなる実施形態では、抗原は、「E C D - I C D」または「E C D - I C D融合タンパク質」とも呼ばれる「H E R - 2 / n e u E C D - I C D融合タンパク質」を含んでもよく、またはそれらから構成されてもよく、これはH E R - 2 / n e uタンパク質の細胞外ドメイン（またはその断片）および細胞内ドメイン（またはその断片）を含む融合タンパク質（またはその断片）を示す。1つの実施形態では、このE C D - I C D融合タンパク質は、H E R - 2 / n e u膜貫通ドメインの実質的な部分は含まず、またはH E R - 2 / n e u膜貫通ドメインのいずれも含まない。

10

【0230】

さらなる実施形態では、抗原は、「E C D - P D」または「E C D - P D融合タンパク質」とも呼ばれる「H E R - 2 / n e u E C D - P D融合タンパク質」あるいは「E C D - P D」または「E C D - P D融合タンパク質」とも呼ばれる「H E R - 2 / n e u E C D - P D融合タンパク質」を含んでもよく、またはそれらから構成されてもよく、これはH E R - 2 / n e uタンパク質の細胞外ドメイン（またはその断片）およびリン酸化ドメイン（またはその断片、例えば、P D）を含む融合タンパク質（またはその断片）を示す。1つの実施形態では、E C D - P DおよびE C D - P D融合タンパク質は、H E R - 2 / n e u膜貫通ドメインの実質的な部分は含まず、またはH E R - 2 / n e u膜貫通ドメインのいずれも含まない。

20

【0231】

1つの実施形態では、抗原はM a g eまたは免疫学的融合物または発現エンハンサーパートナーに結合された他の適切なタンパク質を含んでもよい。融合タンパク質は、ある疾患に関連する2つ以上の抗原を含有するハイブリッドタンパク質を含んでもよく、または抗原および発現エンハンサーパートナーのハイブリッドであってもよい。

【0232】

1つの実施形態では、M A G E抗原は全長M A G Eタンパク質を含んでもよい。別の実施形態ではM a g e抗原は、M A G E抗原のアミノ酸3 ~ 312を含み得る。

30

【0233】

別の実施形態で、M A G E抗原はM A G Eタンパク質由来の100、150、200、250または300のアミノ酸を含んでもよく、ただし、抗原が、免疫療法治療において使用される場合、M A G Eに対する免疫応答を発生させることができることを条件とする。

【0234】

抗原およびパートナーは化学的にコンジュゲートされてもよく、または組換え融合タンパク質として発現され得る。抗原およびパートナーが組換え融合タンパク質として発現される一実施形態では、これによって、非融合タンパク質に比べ、発現系で生成されるレベルの増加が可能になる。よって、融合パートナーは、Tヘルパーエpiteープ、好ましくはヒトによって認識されるTヘルパーエpiteープの提供を支援する（免疫学的融合パートナー）、および/または天然組換えタンパク質よりも高い収率でタンパク質を発現するのを支援することができる（発現エンハンサー）。1つの実施形態では、融合パートナーは、免疫学的融合パートナーおよび発現増強パートナーの両方となり得る。

40

【0235】

本発明の1つの実施形態では、使用され得る免疫学的融合パートナーは、タンパク質D、グラム陰性菌ヘモフィルス・インフルエンザエ(H a e m o p h i l u s i n f l u e n z a ) B ( W O 9 1 / 18926)の表面タンパク質またはその誘導体から誘導される。タンパク質D誘導体は、そのタンパク質の最初の1/3、またはそのタンパク質の最

50

初の大体もしくは約 1 / 3 を含み得、特に最初の N 末端 1 0 0 - 1 1 0 アミノ酸または大体、最初の N 末端 1 0 0 - 1 1 0 アミノ酸を含み得る。

【 0 2 3 6 】

1 つの実施形態では、融合タンパク質は最初の 1 0 9 残基（またはそれから 1 0 8 残基）またはタンパク質 D のアミノ酸 2 0 ~ 1 2 7 を含む。

【 0 2 3 7 】

使用され得る他の融合パートナーとしては、インフルエンザウイルス由来の非構造タンパク質、NS 1（ヘマグルチニン）が挙げられる。典型的には、NS 1 の N 末端 8 1 アミノ酸が使用され得るが、T - ヘルパーエピトープを含むならば、異なる断片が使用され得る。

10

【 0 2 3 8 】

別の実施形態では、免疫学的融合パートナーは Ly t A として知られているタンパク質である。Ly t A は、N - アセチル - L - アラニンアミダーゼ、アミダーゼ Ly t A、（Ly t A 遺伝子によりコードされる（Gene、43（1986）page 265 272）ペプチドグリカン骨格中のある結合を特異的に分解する自己溶菌酵素を合成する肺炎球菌に由来する。Ly t A タンパク質の C 末端ドメインは、コリンまたはいくつかのコリン類似体、例えば DEAE に対する親和性に関与する。この特性が、融合タンパク質の発現に有用な大腸菌 C - Ly t A 発現プラスミドの開発に利用された。そのアミノ末端に C - Ly t A 断片を含むハイブリッドタンパク質の精製は記載されている（Biotechnology：10、（1992）page 795 798）。1 つの実施形態では、分子の C 末端部分が使用され得る。実施形態は、残基 1 7 8 で開始する C 末端で見られる Ly t A 分子の繰り返し部分を使用し得る。1 つの実施形態では、Ly t A 部分は残基 1 8 8 - 3 0 5 を組み込むことができる。

20

【 0 2 3 9 】

本発明の 1 つの実施形態では、M a g e タンパク質は、誘導体化遊離チオールを含み得る。そのような抗原は WO 9 9 / 4 0 1 8 8 において記載されている。特に、カルボキシアミド化またはカルボキシメチル化誘導体が使用され得る。

【 0 2 4 0 】

本発明の 1 つの実施形態では、腫瘍関連抗原は、M a g e - A 3 - タンパク質 D 分子を含む。この抗原および下記で要約されたものは、WO 9 9 / 4 0 1 8 8 においてより詳細に記載される。

30

【 0 2 4 1 】

本発明のさらなる実施形態では、腫瘍関連抗原は、下記融合タンパク質のいずれかを含み得る：リポタンパク質 D 断片、M A G E 1 断片、およびヒスチジンテールの融合タンパク質；NS 1 - M A G E 3、およびヒスチジンテールの融合タンパク質；C L Y T A - M A G E 1 - ヒスチジンの融合タンパク質；C L Y T A - M A G E 3 - ヒスチジンの融合タンパク質。

【 0 2 4 2 】

本発明のさらなる実施形態は、核酸免疫療法薬の使用を含み、これは、本明細書で記載される M a g e 特異的腫瘍関連抗原をコードする核酸分子を含む。そのような配列は好適な発現ベクターに挿入され、DNA / RNA ワクチン接種のために使用され得る。核酸を発現する微生物ベクターもまた、ベクター化された送達免疫療法薬として使用され得る。そのようなベクターとしては、例えば、ボックスウイルス、アデノウイルス、アルファウイルスおよびリステリアが挙げられる。

40

【 0 2 4 3 】

核酸配列を得るための従来組換え技術、および発現ベクターの作成は Maniatis et al .、Molecular Cloning - A Laboratory Manual；Cold Spring Harbor、1982 1989 において記載される。

【 0 2 4 4 】

タンパク質に基づく免疫療法薬では、本発明のタンパク質は、液体形態または凍結乾燥

50

形態で提供される。

【0245】

各ヒト用量は、1～1000 μgのタンパク質、例えば30～300 μg、例として25、30、40、50、60、70、80または90 μgを含むことが一般的に予測される。

【0246】

本明細書に記載される方法（複数可）は、ワクチンアジュバント、および/または免疫賦活性サイトカインまたはケモカインをさらに含む組成物を含み得る。

【0247】

本発明において使用するのに好適なワクチンアジュバントは市販されており、例えば、Freund不完全アジュバントおよび完全アジュバント（Difco Laboratories, Detroit, MI）；Merckアジュバント65（Merck and Company, Inc., Rahway, NJ）；AS-2（SmithKline Beecham, Philadelphia, PA）；アルミニウム塩、例えば水酸化アルミニウムゲル（alum）またはリン酸アルミニウム；カルシウム、鉄または亜鉛の塩；アシル化チロシンの不溶性懸濁液；アシル化糖；カチオンまたはアニオン誘導体化多糖；ポリホスファゼン；生分解性マイクロスフェア；モノホスホリルリピドAおよびクィルAである。サイトカイン、例えばGM-CSFまたはインターロイキン-2、-7、または-12、およびケモカインもまた、アジュバントとして使用され得る。

10

【0248】

製剤においては、アジュバント組成物は、主にTh1型の免疫応答を誘導することが望ましい。高レベルのTh1型サイトカイン（例えば、IFN-、TNF、IL-2およびIL-12）は投与された抗原に対する細胞性免疫応答の誘導を助ける傾向がある。応答が主にTh1型である1つの実施形態によれば、Th1型サイトカインのレベルは、Th2型サイトカインのレベルより大きな程度まで増加するであろう。これらのサイトカインのレベルは、標準アッセイ法を用いて容易に評価され得る。サイトカインファミリーの再検討のために、Mosmann and Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7: 145-173、1989を参照されたい。

20

【0249】

したがって、主にTh1型応答を誘発するために使用され得る好適なアジュバントとしては、例えばモノホスホリルリピドA、例えば3-デオ-アシル化モノホスホリルリピドA（3D-MPL）のアルミニウム塩との組み合わせが挙げられる。3D-MPLまたは他のツール様受容体4（TLR4）リガンド、例えばアミノアルキルグルコサミニドホスフェート（WO98/50399、WO01/34617およびWO03/065806において開示される）もまた、主にTh1型応答を生成させるために単独で使用され得る。

30

【0250】

優先的にTh1型免疫応答を誘導し得る他の公知のアジュバントとしては、TLR9アゴニスト、例えば非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドが挙げられる。オリゴヌクレオチドは、CpGジヌクレオチドが非メチル化であることを特徴とする。そのようなオリゴヌクレオチドはよく知られており、例えばWO96/02555において記載される。

40

【0251】

好適なオリゴヌクレオチドは下記を含む：

【表 10】

SEQ ID NO:102	TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT (CpG 1826)
SEQ ID NO:103	TCT CCC AGC GTG CGC CAT (CpG 1758)
SEQ ID NO:104	ACC GAT GAC GTC GCC GGT GAC GGC ACC ACG
SEQ ID NO:105	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT (CpG 2006, CpG 7909)
SEQ ID NO:106	TCC ATG ACG TTC CTG ATG CT (CpG 1668)

## 【0252】

10

CpG含有オリゴヌクレオチドはまた、単独で、または他のアジュバントと組み合わされて使用され得る。例えば、増強された系は、CpG含有オリゴヌクレオチドおよびサポニン誘導体の組み合わせ、特にWO00/09159およびWO00/62800において開示されるCpGとQS21の組み合わせを含む。

## 【0253】

製剤はさらに、水中油型エマルジョンおよび/またはトコフェロールを含み得る。

## 【0254】

単独で、または他のアジュバントと組み合わされて使用され得る別の好適なアジュバントはサポニン、例えばQS21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA)である。例えば、増強された系は、モノホスホリルリピドAおよびサポニン誘導体の組み合わせ、例えばWO94/00153に記載されるQS21と3D-MPLの組み合わせ、またはWO96/33739において記載されるように、QS21がコレステロールで反応停止される反応源性の低い組成物を含む。他の好適な製剤は水中油型エマルジョンおよびトコフェロールを含む。QS21、3D-MPLおよびトコフェロールを、例えば、水中油型エマルジョン中に含む特に強力なアジュバント製剤はWO95/17210に記載される。

20

## 【0255】

別の実施形態では、アジュバントは、リポソーム組成物で製剤化され得る。

## 【0256】

使用される3D-MPの量は一般に少ないが、免疫療法製剤に依存し、1用量あたり1 - 1000 μg、例えば1用量あたり1 - 500 μg、例として1用量あたり1 ~ 100 μg、特に1用量あたり25、30、40、50、60、70、80または90 μgの領域とすることができる。

30

## 【0257】

一実施形態では、アジュバント系は、3つの免疫賦活剤：CpGオリゴヌクレオチド、3D-MPLおよびQS21を含み、リポソーム製剤または水中油型エマルジョンのいずれかで提示され、例えばWO95/17210において記載される。

## 【0258】

本発明のアジュバントまたは免疫療法薬中のCpGまたは免疫賦活性オリゴヌクレオチドの量は、一般に少ないが、免疫療法製剤に依存し、1用量あたり1 - 1000 μg、例えば1用量あたり1 - 500 μgの領域とすることができる。

40

## 【0259】

本発明のアジュバント中で使用するためのサポニンの量は、1用量あたり1 - 1000 μg、例えば1用量あたり1 - 500 μg、例として1用量あたり1 ~ 100 μg、特に1用量あたり25、30、40、50、60、70、80または90 μgの領域とすることができる。

## 【0260】

一般に、各ヒト用量は、0.1 - 1000 μgの抗原、例えば0.1 - 500 μg、例として0.1 - 100 μg、特に0.1 ~ 50 μg、とりわけ25または50 μgを含むことが予測される。特定の免疫療法薬のための最適量は、ワクチン接種した被験体にお

50

る適切な免疫応答の観察を含む標準研究により確認することができる。最初のワクチン接種後、被験体は、1回または数回の追加免疫を十分間隔をあけて受けることができる。

【0261】

他の好適なアジュバントとしてはMontanide ISA 720 (Seppic, France)、SAF (Chiron, California, United States)、ISCOMS (CSL)、MF-59 (Chiron)、Ribi Detox、RC-529 (GSK, Hamilton, MT)および他のアミノアルキルグルコサミニド4-ホスフェート (AGPs) が挙げられる。

【0262】

したがって、本明細書で開示される抗原およびアジュバントを含む、本発明の方法において使用するための免疫原性組成物が提供され、ここで、アジュバントは1つ以上の3D-MPL、QS21、CpGオリゴヌクレオチドまたはこれらのアジュバントの2つ以上の組み合わせを含む。免疫原性組成物内の抗原は、水中油型または水中油型エマルジョンビヒクルまたはリポソーム製剤中で提示され得る。

10

【0263】

1つの実施形態では、アジュバントは1つ以上の3D-MPL、QS21および免疫賦活性CpGオリゴヌクレオチドを含み得る。一実施形態では3つの免疫賦活剤すべてが存在する。別の実施形態では3D-MPLおよびQS21が水中油型エマルジョン中、CpGオリゴヌクレオチドなしで提示される。

【0264】

本発明の方法において使用するための組成物は、本明細書に記載される腫瘍関連抗原、またはその融合タンパク質、および薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を含み得る。

20

【0265】

この明細書の関連では、含む (comprising) という用語の使用は、非制限的であることを意図し、すなわち、含んでいる (including) ことを意味する。

【0266】

実施形態は特定の想定され、この場合、ある1つまたは複数の要素を含む本発明の様子は、別の実施形態として、関連する要素から構成される、またはそれらから本質的に構成される前記態様に限定される。

30

【0267】

下記実施例は、方法を説明するために示されており、これらは、本発明の粒子を調製するために使用され得る。

【0268】

本明細書における文書の詳解は、本発明に背景を与え、本発明の理解を助けることを意図する。文書およびコメントは知られており、または関連分野では普通の一般知識であることを認めることを決して意図しない。

【0269】

1つ以上の態様では、本発明は、下記パラグラフ1~101のいずれか1つに記載される実施形態を提供する。

40

【0270】

1) よって、本発明は表1からの1つ以上の遺伝子を使用し得る。

【0271】

2) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号STAT1を有し、任意で表1で同定される1.2~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0272】

3) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号PSMB9を有し、任意で表1で同定される1.1および1.3~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

50

## 【0273】

4) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号JAK2を有し、任意で表1で同定される1.1~1.2および1.4~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0274】

5) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号ITGA3を有し、任意で表1で同定される1.1~1.3および1.5~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

10

## 【0275】

6) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号PSMB10を有し、任意で表1で同定される1.1~1.4および1.6~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0276】

7) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CXCL9を有し、任意で表1で同定される1.1~1.5および1.7~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

20

## 【0277】

8) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号RARRES3を有し、任意で表1で同定される1.1~1.6および1.8~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0278】

9) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号IL2RGを有し、任意で表1で同定される1.1~1.7および1.9~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

30

## 【0279】

10) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CXCL10を有し、任意で表1で同定される1.1~1.8および1.10~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0280】

11) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CD8Aを有し、任意で表1で同定される1.1~1.9および1.11~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

40

## 【0281】

12) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号UBDを有し、任意で表1で同定される1.1~1.10および1.12~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0282】

13) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号GPR171を有し、任意で表1で同定される1.1~1.11および1.13~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

50

## 【0283】

14) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号KLRD1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.12および1.14~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0284】

15) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-Bを有し、任意で表1で同定される1.1~1.13および1.15~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

10

## 【0285】

16) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号LCP1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.14および1.16~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0286】

17) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-DRAを有し、任意で表1で同定される1.1~1.15および1.17~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

20

## 【0287】

18) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CYTIPを有し、任意で表1で同定される1.1~1.16および1.18~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0288】

19) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号IL23Aを有し、任意で表1で同定される1.1~1.17および1.19~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

30

## 【0289】

20) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TRA@を有し、任意で表1で同定される1.1~1.18および1.20~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0290】

21) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-DRAを有し、任意で表1で同定される1.1~1.19および1.21~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

40

## 【0291】

22) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TARPを有し、任意で表1で同定される1.1~1.20および1.22~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0292】

23) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号ITKを有し、任意で表1で同定される1.1~1.21および1.23~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

50

## 【0293】

24) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号を有し、遺伝子はプローブセット211796\_s\_atにより同定されるものであり、任意で表1で同定される1.1~1.22および1.24~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0294】

25) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-Bを有し、任意で表1で同定される1.1~1.23および1.25~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

10

## 【0295】

26) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-DQA1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.24および1.26~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0296】

27) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HOMER1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.25および1.27~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

20

## 【0297】

28) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TRGC2を有し、任意で表1で同定される1.1~1.26および1.28~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0298】

29) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプローブセット216920\_s\_atにより同定されるものであり、任意で表1で同定される1.1~1.27および1.29~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

30

## 【0299】

30) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-Aを有し、任意で表1で同定される1.1~1.28および1.30~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0300】

31) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-DMAを有し、任意で表1で同定される1.1~1.29および1.31~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

40

## 【0301】

32) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-Fを有し、任意で表1で同定される1.1~1.30および1.32~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0302】

33) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号SLAMF7を有し、任意で表1で同定される1.1~1.31および1.33~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

50

## 【0303】

34) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号K I A A 1 5 4 9を有し、任意で表1で同定される1.1~1.32および1.34~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0304】

35) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号L O N R F 2を有し、任意で表1で同定される1.35~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0305】

36) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号F A M 2 6 Fを有し、任意で表1で同定される1.1~1.34および1.36~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0306】

37) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号C 1 o r f 1 6 2を有し、任意で表1で同定される1.1~1.35および1.37~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0307】

38) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号F A M 2 6 Fを有し、任意で表1で同定される1.1~1.36および1.38~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0308】

39) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号G B P 5を有し、任意で表1で同定される1.1~1.37および1.39~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0309】

40) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプロープセット2 3 2 3 7 5 \_ a tにより同定されるものであり、任意で表1で同定される1.1~1.38および1.40~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0310】

41) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号S L I T R K 6を有し、任意で表1で同定される1.1~1.39および1.41~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0311】

42) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号G B P 4を有し、任意で表1で同定される1.1~1.40および1.42~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0312】

43) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号E P S T I 1を有し、任意で表1で同定される1.1~.41および1.43~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0313】

10

20

30

40

50

44) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号AKR1C2を有し、任意で表1で同定される1.1~1.42および1.44~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0314】

45) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号ITGALを有し、任意で表1で同定される1.1~1.43および1.45~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0315】

46) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CDC42SE2を有し、任意で表1で同定される1.1~1.44および1.46~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0316】

47) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号DZIP1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.45および1.47~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0317】

48) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号PTGER4を有し、任意で表1で同定される1.1~1.46および1.48~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0318】

49) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HCP5を有し、任意で表1で同定される1.1~1.47および1.49~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0319】

50) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号UTYを有し、任意で表1で同定される1.1~1.48および1.50~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0320】

51) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号KLRB1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.49および1.51~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0321】

52) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号FAM26Fを有し、任意で表1で同定される1.1~1.50および1.52~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0322】

53) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HILS1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.51および1.53~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0323】

10

20

30

40

50

54) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号C20orf24を有し、任意で表1で同定される1.1~1.52および1.54~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0324】

55) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号B2Mを有し、任意で表1で同定される1.1~1.53および1.55~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0325】

56) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号ZNF285Aを有し、任意で表1で同定される1.1~1.54および1.56~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0326】

57) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TMM56を有し、任意で表1で同定される1.1~1.55および1.57~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0327】

58) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号IRF1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.56および1.58~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0328】

59) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TRGV9を有し、任意で表1で同定される1.1~1.57および1.59~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0329】

60) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプローブセット238524\_atにより同定される記号NAを有し、任意で表1で同定される1.1~1.58および1.60~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0330】

61) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号SLC26A2を有し、任意で表1で同定される1.1~1.59および1.61~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0331】

62) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CXCL2を有し、任意で表1で同定される1.1~1.60および1.62~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0332】

63) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号ICOSを有し、任意で表1で同定される1.1~1.61および1.63~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0333】

10

20

30

40

50

64) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプローブセット213193\_x\_atにより同定されるものであり、任意で表1で同定される1.1~1.62および1.64~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0334】

65) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CCL5を有し、任意で表1で同定される1.1~1.63および1.65~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0335】

66) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号LOC284757を有し、任意で表1で同定される1.1~1.64および1.66~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0336】

67) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CD86を有し、任意で表1で同定される1.1~1.65および1.67~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0337】

68) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号KLRD1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.66および1.68~4.488として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0338】

69) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプローブセット211902\_x\_atにより同定されるものであり、任意で表1で同定される1.1~1.67および1.69~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0339】

70) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号SLAMF6を有し、任意で表1で同定される1.1~1.68および1.70~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0340】

71) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TOXを有し、任意で表1で同定される1.1~1.69および1.71~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0341】

72) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号GZMKを有し、任意で表1で同定される1.1~1.70および1.72~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0342】

73) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CDC42SE2を有し、任意で表1で同定される1.1~1.71および1.73~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0343】

10

20

30

40

50

74) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号PPP1R16Bを有し、任意で表1で同定される1.1~1.72および1.74~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0344】

75) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号EAF2を有し、任意で表1で同定される1.1~1.73および1.75~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0345】

76) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号USP9Yを有し、任意で表1で同定される1.1~1.74および1.76~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0346】

77) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号FAM26Fを有し、任意で表1で同定される1.1~1.75および1.77~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0347】

78) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号FLJ31438を有し、任意で表1で同定される1.1~1.76および1.78~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0348】

79) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号SHROOM3を有し、任意で表1で同定される1.1~1.77および1.79~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0349】

80) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TNFAIP3を有し、任意で表1で同定される1.1~1.78および1.80~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0350】

81) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-Fを有し、任意で表1で同定される1.1~1.79および1.81~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0351】

82) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CD3Dを有し、任意で表1で同定される1.1~1.80および1.82~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0352】

83) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号MAP1Bを有し、任意で表1で同定される1.1~1.81および1.83~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0353】

10

20

30

40

50

84) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号SRPX2を有し、任意で表1で同定される1.1~1.82および1.84~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0354】

85) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号AADATを有し、任意で表1で同定される1.1~1.83および1.85~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0355】

86) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号ARHGAP15を有し、任意で表1で同定される1.1~1.84および1.86~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0356】

87) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号MCM10を有し、任意で表1で同定される1.1~1.85および1.87~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0357】

88) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TC2Nを有し、任意で表1で同定される1.1~1.86および1.88~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0358】

89) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号AP2B1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.87および1.89~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0359】

90) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号GOLGA7を有し、任意で表1で同定される1.1~1.88および1.90~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0360】

91) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TNFRSF9を有し、任意で表1で同定される1.1~1.89および1.91~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0361】

92) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号RNF144Bを有し、任意で表1で同定される1.1~1.90および1.92~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0362】

93) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプロンプセット209671\_x\_atにより同定されるものであり、任意で表1で同定される1.1~1.91および1.93~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0363】

10

20

30

40

50

94) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号UBASH3Bを有し、任意で表1で同定される1.1~1.92および1.94~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0364】

95) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号BTN3A1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.93および1.95~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0365】

96) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号GCH1を有し、任意で表1で同定される1.1~1.94および1.96~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0366】

97) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号DENND2Dを有し、任意で表1で同定される1.1~1.95および1.97~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0367】

98) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号C4orf7を有し、任意で表1で同定される1.1~1.96および1.98~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0368】

99) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TNFAIP3を有し、任意で表1で同定される1.1~1.97および1.99~1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0369】

100) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号GBP5を有し、任意で表1で同定される1.100として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0370】

101) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号GBP1を有し、任意で1.1~1.99として標識される遺伝子からなる群より選択される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0371】

1つ以上の態様では、本発明は、下記パラグラフ1~101のいずれか1つに記載される実施形態を提供する。パラグラフ3~101における「遺伝子」という表現は、パラグラフ2~100のいずれか1つに言及する場合、パラグラフ2~100で言及した特定の遺伝子を置換することを意図せず、それに追加することを意図する。

【0372】

1) よって、本発明は表1からの1つ以上の遺伝子を使用し得る。

【0373】

2) 別の態様では、本発明はパラグラフ1に従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号STAT1を有し、任意で表1で同定される1.2~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0374】

3) 別の態様では、本発明はパラグラフ1または2に従い1つ以上の遺伝子を使用し、こ

10

20

30

40

50

ここで、遺伝子は記号 P S M B 9 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 3 ~ 1 . 1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 3 7 5 】

4 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 3 に従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、  
遺伝子は記号 J A K 2 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 4 ~ 1 . 1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 3 7 6 】

5 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 4 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子  
を使用し、ここで、遺伝子は記号 I T G A 3 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 5 ~ 1 .  
1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

10

【 0 3 7 7 】

6 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 5 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子  
を使用し、ここで、遺伝子は記号 P S M B 1 0 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 6 ~ 1 .  
1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 3 7 8 】

7 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 6 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子  
を使用し、ここで、遺伝子は記号 C X C L 9 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 7 ~ 1 .  
1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 3 7 9 】

8 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 7 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子  
を使用し、ここで、遺伝子は記号 R A R R E S 3 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 8 ~  
1 . 1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

20

【 0 3 8 0 】

9 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 8 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子  
を使用し、ここで、遺伝子は記号 I L 2 R G を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 9 ~ 1 .  
1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 3 8 1 】

1 0 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 9 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子  
を使用し、ここで、遺伝子は記号 C X C L 1 0 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 1 0  
~ 1 . 1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

30

【 0 3 8 2 】

1 1 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 1 0 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺  
伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 C D 8 A を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 1 1 ~  
1 . 1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 3 8 3 】

1 2 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 1 1 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺  
伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 U B D を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 1 2 ~ 1 .  
1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 3 8 4 】

1 3 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 1 2 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺  
伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 G P R 1 7 1 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 1  
3 ~ 1 . 1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

40

【 0 3 8 5 】

1 4 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 1 3 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺  
伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 K L R D 1 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 1 4  
~ 1 . 1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 3 8 6 】

1 5 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 1 4 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺  
伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 H L A - B を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 1 5  
~ 1 . 1 0 0 とし  
て標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

50

## 【0387】

16) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-15のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号LCP1を有し、任意で表1で同定される1.16~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0388】

17) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-16のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-DRAを有し、任意で表1で同定される1.17~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0389】

18) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-17のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CTIPを有し、任意で表1で同定される1.18~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

10

## 【0390】

19) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-18のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号IL23Aを有し、任意で表1で同定される1.19~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0391】

20) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-19のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TRA@を有し、任意で表1で同定される1.20~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

20

## 【0392】

21) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-20のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はHLA-DRAを有し、任意で表1で同定される1.21~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0393】

22) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-21のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TARPを有し、任意で表1で同定される1.22~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0394】

23) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-22のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号ITKを有し、任意で表1で同定される1.23~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

30

## 【0395】

24) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-23のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプローブセット211796\_s\_atにより同定されるものであり、任意で表1で同定される1.24~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0396】

25) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-24のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-Bを有し、任意で表1で同定される1.25~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

40

## 【0397】

26) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-25のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-DQA1を有し、任意で表1で同定される1.26~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0398】

27) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-26のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HOMER1を有し、任意で表1で同定される1.27~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0399】

50

28) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 27のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TRGC2を有し、任意で表1で同定される1.28 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0400】

29) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 28のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプロブセット216920\_s\_atにより同定されるものであり、任意で表1で同定される1.29 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0401】

30) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 29のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA - Aを有し、任意で表1で同定される1.30 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

10

【0402】

31) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 30のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA - DMAを有し、任意で表1で同定される1.31 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0403】

32) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 31のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA - Fを有し、任意で表1で同定される1.32 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

20

【0404】

33) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 32のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号SLAMF7を有し、任意で表1で同定される1.33 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0405】

34) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 33のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号KIAA1549を有し、任意で表1で同定される1.34 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0406】

35) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 34のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号LONRF2を有し、任意で表1で同定される1.35 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

30

【0407】

36) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 35のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号FAM26Fを有し、任意で表1で同定される1.36 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0408】

37) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 36のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号Corf162を有し、任意で表1で同定される1.37 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

40

【0409】

38) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 37のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号FAM26Fを有し、任意で表1で同定される1.38 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0410】

39) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 38のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号GBP5を有し、任意で表1で同定される1.39 ~ 1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0411】

40) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 39のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝

50

子を使用し、ここで、遺伝子はプローブセット 2 3 2 3 7 5 \_ a t により同定されるものであり、任意で表 1 で同定される 1 . 4 0 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 1 2 】

4 1 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 4 0 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 S L I T R K 6 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 4 1 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 1 3 】

4 2 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 4 1 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 G B P 4 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 4 2 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

10

【 0 4 1 4 】

4 3 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 4 2 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 E P S T I 1 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 4 3 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 1 5 】

4 4 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 4 3 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 A K R 1 C 2 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 4 4 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 1 6 】

4 5 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 4 4 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 I T G A L を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 4 5 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

20

【 0 4 1 7 】

4 6 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 4 5 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 C D C 4 2 S E 2 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 4 6 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 1 8 】

4 7 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 4 6 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 D Z I P 1 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 4 7 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

30

【 0 4 1 9 】

4 8 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 4 7 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 P T G E R 4 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 4 8 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 2 0 】

4 9 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 4 8 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 H C P 5 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 4 9 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 2 1 】

5 0 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 4 9 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 U T Y を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 5 0 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

40

【 0 4 2 2 】

5 1 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 5 0 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 K L R B 1 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 5 1 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 2 3 】

5 2 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 5 1 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 F A M 2 6 F を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 5

50

2 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0424】

53) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 52のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号H I L S 1を有し、任意で表1で同定される1 . 53 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0425】

54) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 53のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号C 2 0 o r f 2 4を有し、任意で表1で同定される1 . 54 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0426】

55) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 54のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号B 2 Mを有し、任意で表1で同定される1 . 55 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0427】

56) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 55のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号Z N F 2 8 5 Aを有し、任意で表1で同定される1 . 56 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0428】

57) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 56のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号T M E M 5 6を有し、任意で表1で同定される1 . 57 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0429】

58) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 57のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号I R F 1を有し、任意で表1で同定される1 . 58 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0430】

59) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 58のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号T R G V 9を有し、任意で表1で同定される1 . 59 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0431】

60) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 59のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプロープセット2 3 8 5 2 4 \_a tにより同定される記号N Aを有し、任意で表1で同定される1 . 60 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0432】

61) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 60のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号S L C 2 6 A 2を有し、任意で表1で同定される1 . 61 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0433】

62) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 61のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号C X C L 2を有し、任意で表1で同定される1 . 62 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0434】

63) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 62のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号I C O Sを有し、任意で表1で同定される1 . 63 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0435】

64) 別の態様では、本発明はパラグラフ1 - 63のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプロープセット2 1 3 1 9 3 \_x \_a tにより同定されるものであり、任意で表1で同定される1 . 64 ~ 1 . 1 0 0として標識される1つ以上の遺

10

20

30

40

50

伝子と組み合わせられる。

【0436】

65) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-64のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CCL5を有し、任意で表1で同定される1.65~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0437】

66) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-65のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号LOC284757を有し、任意で表1で同定される1.66~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0438】

67) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-66のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CD86を有し、任意で表1で同定される1.67~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0439】

68) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-67のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号KLRD1を有し、任意で表1で同定される1.68~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0440】

69) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-68のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプロンプセット211902\_x\_atにより同定されるものであり、任意で表1で同定される1.69~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0441】

70) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-69のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号SLAMF6を有し、任意で表1で同定され1.70~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0442】

71) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-70のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TOXを有し、任意で表1で同定される1.71~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0443】

72) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-71のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号GZMKを有し、任意で表1で同定される1.72~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0444】

73) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-72のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CDC42SE2を有し、任意で表1で同定される1.73~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0445】

74) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-73のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号PPP1R16Bを有し、任意で表1で同定される1.74~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0446】

75) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-74のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号EAF2を有し、任意で表1で同定される1.75~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【0447】

76) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-75のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号USP9Yを有し、任意で表1で同定される1.1.76~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

10

20

30

40

50

## 【0448】

77) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-76のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号FAM26Fを有し、任意で表1で同定される1.77~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0449】

78) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-77のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号FLJ31438を有し、任意で表1で同定される1.78~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0450】

79) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-78のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号SHROOM3を有し、任意で表1で同定される1.79~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

10

## 【0451】

80) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-79のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TNFAIP3を有し、任意で表1で同定される1.80~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0452】

81) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-80のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号HLA-Fを有し、任意で表1で同定される1.81~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

20

## 【0453】

82) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-81のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号CD3Dを有し、任意で表1で同定される1.82~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0454】

83) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-82のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号MAP1Bを有し、任意で表1で同定される1.83~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0455】

84) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-83のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号SRPX2を有し、任意で表1で同定される1.84~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

30

## 【0456】

85) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-84のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号AADATを有し、任意で表1で同定される1.85~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0457】

86) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-85のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号ARHGAP15を有し、任意で表1で同定される1.86~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

40

## 【0458】

87) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-86のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号MCM10を有し、任意で表1で同定される1.87~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0459】

88) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-87のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号TC2Nを有し、任意で表1で同定される1.88~1.100として標識される1つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

## 【0460】

89) 別の態様では、本発明はパラグラフ1-88のいずれか1つに従い1つ以上の遺伝

50

子を使用し、ここで、遺伝子は記号 A P 2 B 1 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 8 9 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 6 1 】

9 0 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 8 9 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 G O L G A 7 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 9 0 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 6 2 】

9 1 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 9 0 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 T N F R S F 9 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 9 1 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

10

【 0 4 6 3 】

9 2 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 9 1 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 R N F 1 4 4 B を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 9 2 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 6 4 】

9 3 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 9 2 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子はプローブセット 2 0 9 6 7 1 \_ x \_ a t により同定されるものであり、任意で表 1 で同定される 1 . 9 3 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 6 5 】

9 4 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 9 3 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 U B A S H 3 B を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 9 4 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

20

【 0 4 6 6 】

9 5 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 9 4 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 B T N 3 A 1 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 9 5 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 6 7 】

9 6 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 9 5 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 G C H 1 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 9 6 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

30

【 0 4 6 8 】

9 7 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 9 6 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 D E N N D 2 D を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 9 7 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 6 9 】

9 8 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 9 7 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 C 4 o r f 7 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 9 8 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 7 0 】

9 9 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 9 8 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 T N F A I P 3 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 9 9 ~ 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

40

【 0 4 7 1 】

1 0 0 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 - 9 9 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 G B P 5 を有し、任意で表 1 で同定される 1 . 1 0 0 として標識される 1 つ以上の遺伝子と組み合わせられる。

【 0 4 7 2 】

1 0 1 ) 別の態様では、本発明はパラグラフ 1 ~ 1 0 0 のいずれか 1 つに従い 1 つ以上の遺伝子を使用し、ここで、遺伝子は記号 G B P 1 を有する。

50

## 【0473】

(実施例)

## 実施例1

MAGE008 Mageメラノーマ臨床試験：

この進行中の治験では、recMAGE-A3タンパク質（組換えmage融合タンパク質）は、2つの異なる免疫アジュバントと組み合わせられる：AS02B（QS21、MPL）またはS15（QS21、MPLおよびCpG7909）のいずれか。目的は、安全性プロファイル、臨床応答および免疫応答の観点からアジュバントを区別することであった。

## 【0474】

この実験では、2つのアジュバント組成物は2つの免疫賦活剤の混合物で構成されている：

1. QS21（南アメリカの樹木キラヤサポナリアモリーナ（*Quillaja Saponaria Molina*）由来の精製された天然サポニン分子）、および
2. MPL（3デ-O-アセチル化モノホスホリルリピドA-S・ミネソタ（*minnesota*）LPS由来の、リピドAの解毒誘導体）。

## 【0475】

AS02Bは、QS21およびMPLの水中油型エマルジョンである。

## 【0476】

動物モデルでは、これらのアジュバントは、体液性およびTH1型の細胞性免疫応答の両方、例えばIFNを産生するCD4およびCD8T細胞を誘導することがうまく示されている。（Moore et al., 1999; Gerard et al., 2001）。さらに、この型のアジュバント中で製剤化された組換えタンパク質の注入により、全身性抗腫瘍応答の誘導に至り：実際、ワクチン接種された動物は、腫瘍抗原を発現するように遺伝子操作されたマウス腫瘍細胞による攻撃に対し保護されることが示され、退行性腫瘍は、CD8、CD4およびNK細胞により、およびマクロファージにより高度に浸潤されることが示された。

## 【0477】

第2のアジュバント系はAS15であり：それは第3の免疫賦活剤、すなわちCpG7909（別名CpG2006上記として知られている）を、MPLおよびQS21の他にリポソーム製剤中に含む。動物モデル（主にマウス）では、CpG7909の追加はさらに、誘導される免疫および抗腫瘍応答を改善することが示されている（Krieg and Davis, 2001; Ren et al., 2004）。CpGオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）は直接、TLR9トリガーにより樹状細胞活性化を刺激する。さらに、マウスでは、CpG7909の全身適用は移入されたT細胞の腫瘍中への浸潤を著しく増加させる（Meidenbauer et al., 2004）。

## 【0478】

## 研究概観

## 1. 設計

MAGE008治験は、下記の通りである：

オープン

無作為

2群（AS02B対AS15）

総計68の患者。

## 【0479】

上記のように、recMAGE-A3タンパク質は、AS02BまたはAS15アジュバント系のいずれかと組み合わせられる。

## 【0480】

## 2. 患者集団

recMAGE-A3タンパク質は、局所または遠隔皮膚および/またはリンパ節病変

10

20

30

40

50

(切除不能ステージIIIおよびステージIV M1a)を有する進行性転移性メラノーマの患者に投与される。腫瘍によるMAGE-A3遺伝子の発現は、定量PCRにより評価した。選択された患者は、メラノーマに対する前処置を受けず(recMAGE-A3が一次治療として与えられる)、内臓疾患を有さなかった。

#### 【0481】

##### 3. 免疫化スケジュール

##### 治療スケジュールの方法

MAGE008臨床試験において従った免疫化スケジュールは下記とした：

#### 【表11】

サイクル1：	2週間隔で6ワクチン接種(週1、3、5、7、9、11)	10
サイクル2：	3週間隔で6ワクチン接種(週15、18、21、24、27、30)	
サイクル3：	6週間隔で4ワクチン接種(週34、40、46、52)	
長期治療：	3ヶ月間隔で4ワクチン接種、その後、例えば 6ヶ月間隔で4ワクチン接種	

#### 【0482】

上記治療計画の両方に対し、追加のワクチン接種が要求に応じ治療後に与えられ得る。

#### 【0483】

上記臨床試験において可能性のある参加者をスクリーニングするために、我々は免疫化の前に腫瘍の生検を受理した。RNAを、MAGE-A3定量PCRのために生検から抽出し、このRNAはまた、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングのために使用した。目標は、ワクチン接種前生検において臨床応答と関連する遺伝子セットを同定し、患者の臨床成績を予測する数学的モデルを開発することであり、そのためこの抗原特異的癌免疫療法薬から利益を得る可能性のある患者が、適正に同定され、選択される。遺伝子プロファイリング分析は、マイクロアレイ分析に対するインフォームドコンセントに署名した患者由来の生検に対してのみ実施した。

10

20

#### 【0484】

##### 1. 材料および方法

##### 1.1. 腫瘍標本およびRNA精製

65の患者由来のワクチン接種前に得られた65の腫瘍生検を、MAGE008 MAGE-3メラノーマ臨床試験から使用した。これらはRNA安定化溶液RNAlater中で新鮮凍結保存した。

30

#### 【0485】

全RNAをTripure方法(Roche Cat. No. 1667165)を使用して精製した。提案されたプロトコルに続いて、DNase処置を有するRNeasy Miniキット-浄化プロトコル(Qiagen Cat. No. 74106)を使用した。メラニン量が高い(外観検査により決定)サンプルからのRNAをさらに、CSCl遠心分離を用いて処理した。

#### 【0486】

RNAの定量は、260nmでの光学密度およびQuant-IT Ribogreen RNAアッセイキット(Invitrogen-分子プローブR11490)を用いて最初に完了した。

40

#### 【0487】

##### 1.2. マイクロアレイ分析のためのRNAラベリングおよび増幅

臨床研究中に受理された生検サイズが小さいために、増幅方法を、マイクロアレイ分析のためにRNAのラベリングと共に使用した：Nugen 3'ovationピオチンキット(50ngのRNAのラベリング-OvationピオチンシステムCat; 2300-12、2300-60)。50ngの全RNAの開始入力を使用した。

#### 【0488】

##### 1.3. マイクロアレイチップ、ハイブリダイゼーションおよびスキャニング

Affymetrix HG-U133.Plus 2.0遺伝子チップを標準Aff

50

y m e t r i x プロトコルに従い、ハイブリダイズさせ、洗浄し、スキャンした。

【0489】

1.1.1 遺伝子サイン分析のために使用される患者の定義

バイナリ分類アプローチを使用して、患者を遺伝子サイン (GS) 陽性 (GS+) または GS 陰性 (GS-) 群に割り当てた。トレーニングセットは遺伝子サイン分析に対するインフォームドコンセントを与え、良質のマイクロアレイデータおよび少なくとも 6 回のワクチン接種を有する 56 の評価可能患者から構成した。

【0490】

この遺伝子サイン分析のために、レスポナー (R) は、臨床活性の客観的徴候を提示する患者として規定し、これらは下記を含んだ；客観的応答 (完全応答 (CR)、部分応答 (PR)、不変 (SD)、混合応答 (MR))。ノンレスポナー (NR) は、進行性疾患 (PD) として規定した。

10

【0491】

少なくとも 6 回のワクチン接種を有する評価可能患者のみを遺伝子プロファイル分析のために使用したが、これが大体免疫応答が検出された時であるからである。

【0492】

遺伝子プロファイル分析に対するレスポナー (R) は、生物学的活性の徴候を示す患者であり、これらは下記を含む：完全および部分レスポナー (CR、PR)、不変 (SD)、混合応答 1 (MxR1) を有する進行性疾患 (PD) および少なくとも 1 つの標的病変の消失を有する PD MxR2。

20

【0493】

ノンレスポナー (NR) : PD No MxR、少なくとも 1 つの標的病変の消失を示さなかった PD MxR2 および進行性疾患 No MxR。

【0494】

この臨床研究における 2 群でのトレーニングセット分布 (2 つの免疫アジュバントを比較する) は、22R (AS15 群で 14 および AS02B 群で 8) および 34NR (13AS15、21AS02B) から構成された。

【0495】

サンプル正規化

RNA の増幅およびラベリング後、HG-U133 plus2 Affymetrix GeneChip へのハイブリダイゼーションを実施した。スキャン後に得られた CEL ファイルを Bioconductor からの gcrma パッケージにおける GCRMA アルゴリズム (Wu, 2004) の修正版を用い、すべての患者を使用し、良質マイクロアレイデータ (換算係数および gcrma 正規化に基づく) を用いて正規化した。アルゴリズムは、このアレイセットを用いて得られた前処理パラメータを保存するように適合させた。パラメータは 2 つの型を有する：分位点正規化に必要な平均経験分布、およびプロブセット (PS) 要約を実施するためのプロブ特異的効果。これらのパラメータを、65 サンプルから得、トレーニングセット中の 56 サンプルに適用し、各プロブセットに対する要約値を得た。

30

【0496】

1.4. 非存在/存在および非特異的フィルタリング

正規化のために使用された 65 サンプル全てにおいて非存在と呼ばれた Affymetrix プロブセット (PS) を、PANP プログラム (1.8.0 ソフトウェアバージョン) の R 実行を用いて除去した。これにより、データセットが 54,613 から約 28,100 PS まで減少する。

40

【0497】

正規化ハイブリダイゼーションサンプルの四分位範囲 (IQR) フィルタリングプロブセット (PS) を、各サンプルに関連する結果とは関係なくフィルタリングさせる。この非特異的フィルタリングの目的は、ほとんど識別力をしない傾向があるので (Heidebreck et al., 2004)、サンプル全体にわたって大体一定の発現を示

50

す遺伝子を取り除くことである。

【0498】

トレーニングセット(56サンプル)の発現マトリクスにおいて1.7以上の四分位範囲を有するPSのみを保持する四分位フィルタを実行した。この工程により、PSサイズが28,100から約5045に減少した。

【0499】

特徴正規化

要約およびフィルタリングしたPSをその後、Z-スコア計算を用いて正規化した。各それぞれの患者発現PS値に対するZ-スコアは、下記のように計算する：PS特異的平均をPS値から減算し、この平均中心発現値をその後、PS特異的標準偏差により加重させる。Z-スコア計算に關与するPS特異的平均および標準偏差は、トレーニングセットから計算されたものである。

10

【0500】

特徴選択

臨床成績患者データの分類において特徴として使用される関連PSの選択は、信号対ノイズ比にあり、トレーニングセットにおける56サンプルに対する正規化、Z-スコア発現マトリクスを用いて得られる：

【数1】

$$s2n = \frac{\bar{x}_R - \bar{x}_{NR}}{sd_R + sd_{NR}}$$

20

$\bar{x}_R$  = レスポンダーの平均

$\bar{x}_{NR}$  = ノンレスポンダーの平均

$sd_R$  = 標準偏差レスポンダー

$sd_{NR}$  = 標準偏差ノンレスポンダー

【0501】

最も高い絶対信号対ノイズ比スコアを有する100PSを分類指標特徴(表1)として選択した。この数は、適切であると評価した。というのも、別の技術(すなわちQ-R-T-PCR)を用いて測定するのに実行可能な遺伝子数であるからである。

30

【0502】

遺伝子選択の上記方法を、次のセクションで記載される交差検定により試験した。

【0503】

分類方法のリーブワナウトクロスバリデーション(LOOCV)

方法の性能の推定値を得、分類指標のための適切なカットオフを得るために；分類スキームを開発し、リーブワナウトによる交差検定を使用し、各交差検定ループでのレポーターリストの再計算を用いて試験した。

【0504】

最初に、四分位範囲(IQR)が1.7未満である(~5000PSが、各交差検定に残っている)プローブセット(PS)を廃棄する非特異的フィルタを適用した。その後、Z-スコア正規化を、各トレーニングセット内で実施し、テストサンプルに適用した。Golubら(Golub, 1999)により記載されるように信号対ノイズ比( $s2n$ )を用いて遺伝子をランク付けし、最良の100PS(絶対 $s2n$ スコア)を分類指標特徴として選択した。

40

【0505】

目的変数ありの主成分-判別分析(SPCA)に基づく分類アルゴリズムを、選択されたPSを用いて構築した(Bair and Tibshirani, PLOS Biol 2004 and Tibshirani et al., PNAS 2002)。

分類指標は、分類指標特徴として選択されたPSのみを用いたトレーニングセットの発現

50

マトリクスの特異値分解に基づく。第1の主成分 ( $PC_1$ ) におけるトレーニングセットの各群 (RおよびNR) の平均および標準偏差を計算する。テストサンプルを分類するために、そのZ-スコア発現値をトレーニングセットにより規定される  $PC_1$  に与え、 $PC_1$  における各群の平均までの距離を使用して、サンプルがレスポンドーまたはノンレスポンドー群に属する確率を計算する。分類指標結果は、サンプルがレスポンドー ( $GS+$ ) である確率である指標であり、0~1の範囲である。

【0506】

図1/21は、LOOCVのためのスキームを示す。

【0507】

図2/21は、各グループにおける分類のための最良の100PSを選択するLOOCVの結果を示す。

10

【0508】

感度 ( $Se$ ) および特異性 ( $Sp$ ) を性能指標として使用した。 $Se$  は、レスポンドーとして予測されるサンプル中の真陽性 ( $TP$ ) の割合として規定され、 $Sp$  はノンレスポンドーとして予測される患者中の真陰性 ( $TN$ ) の割合として規定される。

【0509】

0.41と0.47の間のいずれの値も同じ感度および特異性を有することが図2/21から見ることができる。0.43のカットオフをとることを決定した。このカットオフは、32/56サンプルをレスポンドー (R) として分類し、感度は17/22 (0.77) であり、特異性は19/34 (0.56) である。特に、AS15群では感度および特異性のみがより高く、;それぞれ、0.79および0.69である。重要なことには、すべての客観的レスポンドー (CRおよびPR) は正確に分類される。

20

【0510】

LOOCVにより構築された56分類指標の各々における選択された特徴の安定性を、すべてのサンプルを使用して選択した特徴と比較した。

【0511】

表1A. すべてのサンプルを使用して選択された100PSおよびLOOCVにおいて選択された回数

【表 1 2】

	Affy ID	R2.9 アノテーション による遺伝子記号	Affymetrix アノテーション による遺伝子記号	LOOCVにおいて 選択された回数
1.1	1554240_a_at	ITGAL	ITGAL	56
1.2	1555852_at	PSMB9	NA	56
1.3	1562031_at	JAK2	JAK2	56
1.4	201474_s_at	ITGA3	ITGA3	56
1.5	202659_at	PSMB10	PSMB10	56
1.6	203915_at	CXCL9	CXCL9	56
1.7	204070_at	RARRES3	RARRES3	56
1.8	204116_at	IL2RG	IL2RG	56
1.9	204533_at	CXCL10	CXCL10	56
1.1	205758_at	CD8A	CD8A	56
1.11	205890_s_at	UBD	GABBR1 /// UBD	56
1.12	207651_at	GPR171	GPR171	56
1.13	207795_s_at	KLRD1	KLRD1	56
1.14	208729_x_at	HLA-B	HLA-B	56
1.15	208885_at	LCP1	LCP1	56
1.16	208894_at	HLA-DRA	HLA-DRA	56
1.17	209606_at	CYTIP	CYTIP	56
1.18	210915_x_at	IL23A	TRBC1	56
1.19	210972_x_at	TRA@	TRA@ /// TRAC /// TRAJ17 /// TRAV20	56
1.20	210982_s_at	HLA-DRA	HLA-DRA	56
1.21	211144_x_at	TARP	TARP /// TRGC2	56
1.22	211339_s_at	ITK	ITK	56
1.23	211796_s_at	IL23A	TRBC1 /// TRBC2	56
1.24	211911_x_at	HLA-B	HLA-B	56
1.25	212671_s_at	HLA-DQA1	HLA-DQA1 /// HLA-DQA2	56
1.26	213793_s_at	HOMER1	HOMER1	56
1.27	215806_x_at	TRGC2	TARP /// TRGC2	56
1.28	216920_s_at	TARP	TARP /// TRGC2	56
1.29	217436_x_at	HLA-A	HLA-A /// HLA-A29.1 /// HLA-B /// HLA-G /// HLA-H /// HLA-J	56
1.30	217478_s_at	HLA-DMA	HLA-DMA	56
1.31	221875_x_at	HLA-F	HLA-F	56
1.32	222838_at	SLAMF7	SLAMF7	56
1.33	223575_at	KIAA1549	KIAA1549	56
1.34	225996_at	LONRF2	LONRF2	56
1.35	228362_s_at	FAM26F	FAM26F	56
1.36	228532_at	C1orf162	C1orf162	56
1.37	229391_s_at	FAM26F	FAM26F	56
1.38	229625_at	GBP5	GBP5	56

10

20

30

40

	Affy ID	R2.9 アノテーション による遺伝子記号	Affymetrix アノテーション による遺伝子記号	LOOCVにおいて 選択された回数
1.39	232375_at	STAT1*	NA	56
1.40	232481_s_at	SLITRK6	SLITRK6	56
1.41	235175_at	GBP4	GBP4	56
1.42	235276_at	EPSTI1	EPSTI1	56
1.43	244393_x_at	AKRIC2*	NA	56
1.44	AFFX-HUMISGF3A/ M97935_MB_at	STAT1	STAT1	56
1.45	1552613_s_at	CDC42SE2	CDC42SE2	55
1.46	204556_s_at	DZIP1	DZIP1	55
1.47	204897_at	PTGER4	PTGER4	55
1.48	206082_at	HCP5	HCP5	55
1.49	211149_at	UTY	LOC100130224 /// UTY	55
1.50	214470_at	KLRB1	KLRB1	55
1.51	229543_at	FAM26F	FAM26F	55
1.52	231229_at	HILS1	HILS1	55
1.53	232234_at	C2orf24	SLA2	55
1.54	232311_at	B2M	B2M	55
1.55	236328_at	ZNF285A	ZNF285A	55
1.56	237515_at	TMEM56	TMEM56	55
1.57	202531_at	IRF1	IRF1	54
1.58	209813_x_at	TRGV9	TARP	54
1.59	238524_at	NA	NA	54
1.60	205097_at	SLC26A2	SLC26A2	53
1.61	209774_x_at	CXCL2	CXCL2	53
1.62	210439_at	ICOS	ICOS	53
1.63	213193_x_at	IL23A	TRBC1	53
1.64	1555759_a_at	CCL5	CCL5	52
1.65	1562051_at	LOC284757	LOC284757	52
1.66	205685_at	CD86	CD86	50
1.67	210606_x_at	KLRD1	KLRD1	50
1.68	211902_x_at	TRA@	TRA@	50
1.69	1552497_a_at	SLAMF6	SLAMF6	48
1.70	204529_s_at	TOX	TOX	48
1.71	206666_at	GZMK	GZMK	48
1.72	1552612_at	CDC42SE2	CDC42SE2	47
1.73	1563473_at	PPP1R16B*	NA	45
1.74	219551_at	BAF2	BAF2	45
1.75	228492_at	USP9Y	LOC100130216 /// USP9Y	44
1.76	229390_at	FAM26F	FAM26F	43
1.77	228316_at	FLJ31438*	C2orf63	42
1.78	228400_at	SHROOM3	SHROOM3	42
1.79	202643_s_at	TNFAIP3	TNFAIP3	41
1.80	204806_x_at	HLA-F	HLA-F	41

10

20

30

40

	Affy ID	R2.9 アノテーション による遺伝子記号	Affymetrix アノテーション による遺伝子記号	LOOCVにおいて 選択された回数
1.81	213539_at	CD3D	CD3D	41
1.82	226084_at	MAP1B	MAP1B	41
1.83	205499_at	SRPX2	SRPX2	40
1.84	223593_at	AADAT	AADAT	40
1.85	244061_at	ARHGAP15*	NA	40
1.86	222962_s_at	MCM10	MCM10	39
1.87	1553132_a_at	TC2N	TC2N	38
1.88	200615_s_at	AP2B1	AP2B1	38
1.89	234907_x_at	GOLGA7*	NA	38
1.90	207536_s_at	TNFRSF9	TNFRSF9	36
1.91	239012_at	RNF144B	RNF144B	34
1.92	209671_x_at	TRA@	TRA@ /// TRAC	32
1.93	238587_at	UBASH3B	UBASH3B	31
1.94	209770_at	BTN3A1	BTN3A1	27
1.95	204224_s_at	GCH1	GCH1	25
1.96	221081_s_at	DENND2D	DENND2D	25
1.97	229152_at	C4orf7	C4orf7	24
1.98	202644_s_at	TNFAIP3	TNFAIP3	19
1.99	238581_at	GBP5	GBP5	17
1.100	231577_s_at	GBP1	GBP1	15

\* : R 2 . 9においてNAとなるR 2 . 6からのアノテーション

10

20

30

40

50

#### 【 0 5 1 2 】

図 3 / 2 1 は、各 L O O C Vにおいて P Sが 1 0 0トッps 2 n内にあった度数を示す。全てのサンプルを用いて選択された P Sは黒色で示される。全てのサンプルを用いて選択された 1 0 0 P Sのうち 6 8はまた、L O O C Vの少なくとも 5 0で選択され、全てのサンプルを用いて選択された 1 0 0 P Sのリストは、独立した患者の応答を予測するのに使用される分類指標特徴となるであろう（表 1）。

#### 【 0 5 1 3 】

全生存（OS）に対する遺伝子サインの影響

C o x回帰では、ハザードは、イベント（死、疾患進行）が期間中に起こる確率を表す。ベースラインハザードは、全てのサンプルにより共有されると仮定され、ハザードに効果を有する説明変数である共変量が、モデルに追加される。ハザード比は共変量がハザードに対して有する効果を定量化する。これは変数の相対リスクを反映する。

#### 【 0 5 1 4 】

例えば、下記表 2におけるように 0 . 4のハザード比を有する治療は、遺伝子サイン陽性患者が、遺伝子サイン陰性患者に比べ、ある期間あたり 6 0 %の減少した死のリスクを有することを意味する。0 . 4は、予測される H Rの平均であり、9 5 %の信頼区間もまた、モデルにおいて推定されることに注意されたい。

#### 【 0 5 1 5 】

図 4 / 2 1 は、第 I I相メラノーマ治療において、全ての患者を用いてアジュバントによる OSに対する K a p l a n - M e i e r 曲線（KM）を示す；ハザード比（HR）：0 . 5 5（9 5 % C I [ 0 . 2 8 ; 1 . 0 6 ]）。トレーニングセット中の 5 6 患者のみを使用する場合の推定ハザード比は 0 . 4 1（9 5 % C I [ 0 . 1 9 1 ; 0 . 8 8 ]）である。全生存（OS）に対する G Sの影響を推定するために、L O O C Vにより 0 . 4 3のカットオフを用いて得られた分類を使用した（セクション 1 . 4）；図 5 / 2 1のグ

ラフはGSによるOSに対するKMを示す。

【0516】

多変量Cox-モデルを、共変量としてアジュバントおよびGSを用いてフィッティングすると、GSに対し下記HRが得られる：

【表13】

	HR	下 0.95	上 0.95
GS+ 対 GS-	0.4	0.197	0.813

【0517】

GSによる推定生存期間中央値は下記である：

【表14】

	生存期間 中央値 (月)	下 0.95	上 0.95
GS-	16.2	9.4	Inf
GS+	28	20.5	Inf

【0518】

LOOCV分類に基づくアジュバントおよび遺伝子サインによる全生存Kaplan-Meier曲線を図6/21に示し、HRは下記の通りである。

【表15】

	HR	下 0.95	上 0.95
AS15 GS+ 対 GS-	0.268	0.080	0.896
AS02B GS+ 対 GS-	0.433	0.165	1.140

【0519】

上記のように、MAGE-A3 ASCIに対する臨床応答を予測するためのある遺伝子発現プロファイルに基づく分類指標が開発され、第II相メラノーマ治験(GSK249553/008)において交差検定された。分類指標性能は、LOOCVを用いて推定され、0.77の感度および0.56の特異性が得られた。AS15群のみでの特異性は0.79であり、感度は0.69である。この分類により、GS+集団における全生存に対するハザード比が著しく減少し、AS15群ではより重要な効果が得られた。

【0520】

分類指標特徴選択の安定性もまた評価し、トレーニングセット中の1つのサンプルを取り除くことに対しロバストであることが見いだされた。MAGE-A3-ASCIの臨床効果に連結されたサインの生物学(s2nによる、トレーニングセットにおける全ての56患者を用いたトップ100PS;表1)は、ASCI作用様式に関連し、というのも、これは、T細胞マーカーの上方制御を示すレスポナー患者の腫瘍における免疫エフェクター細胞の存在に有利である特異的腫瘍微小環境(ケモカイン)の存在を示唆する遺伝子を含むからである。転移性メラノーマにおける最近の遺伝子発現プロファイリング研究は、腫瘍は、T細胞関連転写物の存在の有無に基づき分離され得ることを明らかにした(Harlin, 2009)。腫瘍中のリンパ球の存在は6つのケモカインのサブセット(CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CXCL9、CXCL10)の発現と関連し、これらの6つの遺伝子のうちの3つ(CCL5、CXCL9、CXCL10)が100PSに存在する。興味深いことに、HLA分子もまた、レスポナー患者において上方制御されることが見いだされた。腫瘍細胞におけるHLA分子の下方制御は、免疫監視を逃

10

20

30

40

50

れる機構であることが仮定されている (A p t s i a u r i , 2 0 0 8 ) 。

【 0 5 2 1 】

インジェヌイティパスウェイアナリシス ( I n g e n u i t y P a t h w a y A n a l y s i s ) からのトップの生物学的機能は、100PSサイン中での免疫関連遺伝子の濃縮を確認した ( p - 値は、補助機能に対して得られた範囲である ) :

【表 1 6】

生物学的機能	p-値	遺伝子数
抗原提示	5.53E-14 - 5.06E-03	27
細胞-細胞シグナリングおよび相互作用	5.40E-13 - 7.60E-03	28
細胞発達	1.58E-11 - 6.75E-03	27
細胞死	1.18E-09 - 5.80E-03	28
細胞移動	3.56E-08 - 7.60E-03	19
細胞性免疫応答	5.53E-14 - 7.60E-03	32
体液性免疫応答	5.53E-14 - 7.60E-03	29
血液系発達および機能	4.44E-13 - 7.60E-03	32
組織形態	4.44E-13 - 7.60E-03	23
免疫細胞輸送	6.77E-13 - 7.60E-03	23

10

【 0 5 2 2 】

4 . 新規サンプルの臨床成績予測

臨床成績予測を実施するためにここで記載する工程は、Rスクリプトとして書かれている。ある患者に対して臨床成績予測を実施する前に、患者 A f f y m e t r i x ジーンチップデータの2つの連続正規化に取り組む；サンプルおよび遺伝子正規化。これらの正規化の目標は、予測スキームが開発されたトレーニングセットデータに正確にスケールリングすることにより、匹敵する患者に対し遺伝子発現値を生成させることである。トレーニングセットは、第 I I 相メラノーマ治験からの56サンプルから構成される。トレーニングセットおよびサンプル正規化に関する詳細は、前のセクションに記載されており、下記パラグラフでより詳細に記載される。

20

【 0 5 2 3 】

4 . 1 サンプル正規化

前処理としても知られているサンプル正規化は、各サンプルに対する C E L ファイルをはじめとして実施され、下記態様を処理する：

30

1 . バックグラウンド生 A f f y m e t r i x オリゴヌクレオチドプローブ強度に対して較正すること；

2 . バックグラウンド較正されたプローブ強度を、分位点正規化手順を用いて正規化すること。

【 0 5 2 4 】

3 . チップ定義ファイル ( C D F ) において規定されるプローブ - P S マッピングに従い、プローブ強度を単一プローブセット強度に変換すること。C D F ファイルは、A f f y m e t r i x により使用され、提供されるジーンチップアレイ ( h g u 1 3 3 p l u s 2 ) に特異的である。この最後の工程は要約と呼ばれる。

40

【 0 5 2 5 】

この工程の目標は、未知の患者データのプローブセット ( P S ) 強度の分布を、トレーニングセットの P S 強度分布に対しフィッティングさせることである。これは、G C R M A アルゴリズム ( W u , 2 0 0 4 ) を用いて実施される。このアルゴリズムは、参照マイクロアレイデータセット上で規定される前処理パラメータを説明するように適合させた。パラメータは2つの型を有する：分位点正規化に必要な平均経験分布、および P S 要約を実施するためのプローブ特異的効果。

【 0 5 2 6 】

50

参照 GCRMA パラメータは、第 I I 相メラノーマ治験からの 65 サンプルを用いて構築し、これらを新規患者サンプルに、`refplus` R パッケージに基づくコードを用いて適用する。

#### 【0527】

付属書類 1 コードチャンクは、`Bioconductor` において入手される `RefPlus` R パッケージ (`Harbrone et al., 2007`) に含まれるコードの修正である。`RefPlus` コードは、参照データセットから計算された正規化パラメータを考慮して、あるサンプルハイブリダイゼーションの GCRMA 正規化を実施するように修正される。参照データセットは前のセクションで記載されるデータセットである (65 患者)。`RefPlus` は最初に、参照データセット正規化のために設計されるが、GCRMA ではなく RMA アルゴリズムを使用する。RMA と GCRMA の間の唯一の差異は、バックグラウンド較正工程にある。`RefPlus` は、`rmaplus` R 関数に埋め込まれた `bg.correct.rma` R 関数を、`bg.adjust.gcrma` R 関数により置き換えることにより、GCRMA バックグラウンド較正を実施することができた。`RefPlus` コード修正は、2007 年 10 月に実施され、`GlaxoSmithKline` から入手可能である。サンプルを付属書類 1 の GCRMA 対応の修正 `RefPlus` コードを用いて正規化するために、パラメータとして、正規化するデータ (`AffyBatch` クラスの)、参照データセットについて計算されている参照分位点 (`r.q` オプション) およびプローブ効果 (`p.e` オプション) に加えて、GCRMA バックグラウンド較正対応 `rmaplus` 関数を呼び出さなければならない。参照分位点およびプローブ効果は、`GSK` から入手可能で、`USPTO` に、上記で参照されるコンパクトディスク上で提出される、`rq.txt` および `pe.txt` ファイルに含まれる。

10

20

30

40

#### 【0528】

サンプルを付属書類 1 の GCRMA 対応、修正 `RefPlus` コードを用いて正規化するために (図 5)、パラメータとして、正規化するデータ (`AffyBatch` クラスの)、参照データセットについて計算されている参照分位点 (`r.q` オプション) およびプローブ効果 (`p.e` オプション) に加えて、GCRMA バックグラウンド較正対応 `rmaplus` 関数を呼び出さなければならない。参照分位点およびプローブ効果は、`GSK` の企業知的財産の長から入手可能で、それぞれ `VR63933P_rq.txt` および `VR63933P_pe.txt` と名付けられた、`rq.txt` および `pe.txt` ファイルに含まれる。これらのファイルはまた、2009 年 10 月 6 日に出願された米国優先出願番号第 61/278387 号に関してコンパクトディスク上で `USPTO` に提出され、米国出願番号第 61/278387 号のファイル履歴を `USPTO` から、入手可能な時に注文することにより入手可能である。

#### 【0529】

その一方で、これらのファイルはまた、`https://sites.google.com/site/vr63933/vr63933r_files` で `zip` ファイルとして入手可能である (`https` アドレス中、文字「`r`」と単語「`files`」の間に「`_`」があることに注意されたい)。ウェブサイト上のファイルはそれぞれ、`VR63933P_rq.zip` および `VR63933P_pe.zip` と名付けられる。これらの 2 つのファイルのコピーを入手するために、このパラグラフにおいて提供されるアドレスにナビゲートし、各ファイルに対し、ハイパーテキスト「`Download`」を選択すること。プロンプトで「`Save`」オプションを選択し、所望の場所に保存すること。普通に `zip` ファイルを開くようにファイルを開き、`ASCII (.txt)` ファイルとして所望の場所に保存すること。その後、本出願の最初の 2 つのパラグラフの指示に従うこと。

#### 【0530】

要約されたプローブセット (`PS`) を、その後、`Z`-スコア計算を用いて正規化し；これは分類指標特徴として選択された `PS` に適用する。この第 2 の正規化工程の目標はデータを通して同様の発現パターンを共有するが、異なる絶対発現値範囲を有する遺伝子を同一とすることである。

50

【 0 5 3 1 】

各個々の患者発現 P S 値に対する Z - スコアを下記の通り計算する： P S 特異的平均を P S 値から減算し、この平均中心発現値をその後、 P S 特異的標準偏差により加重する。 Z - スコア計算に關与する P S 特異的平均および標準偏差は、トレーニングセットから計算されたものである（表 4）。

【 0 5 3 2 】

患者生データをトレーニングセットパラメータを用いて正規化させた時点で、患者に対する臨床成績の予測のための決定規則（分類指標または分類スキーム）に供することができる。

【 0 5 3 3 】

4 . 2 新規サンプルの分類のためのアルゴリズム

正規化された患者 P S に基づき患者臨床成績を予測するために、目的変数ありの主成分（ S P C A ） - 判別分析（ D A ）決定規則を、適用する（ B a i r、 2 0 0 4； T i b s h i r a n i、 2 0 0 2 から適合）。 S P C A - D A ワークを呼び出す予測プロセスは下記のように機能する：

分類のために使用されるプローブセットは、分類指標特徴（ 1 0 0 P S ）のみであり、トレーニングセットに基づくモデル開発中に同定された（表 1）

分類する患者の正規化された発現プロファイル（分類指標特徴）は、分類指標特徴の線形結合を用いて、トレーニングセットにより規定された第 1 の主成分（ P C 1 ）空間において提示される（線形結合における各特徴に対する係数は、トレーニングセットの特異値分解により得られ、それらは表 4 で提供される）

P C 1 におけるテストサンプルのレスポンドーおよびノンレスポンドー群の平均までの標準化距離は、下記式を用いて得られる：

【 数 2 】

$$d_{iK} = \frac{|PC_{1i} - \text{平均} - PC_{1K}|}{sd\_PC_{1K}}$$

【 0 5 3 4 】

i = テストサンプル

K = レスポンドー（ R ）またはノンレスポンドー（ N R ）

平均\_P C 1 K = トレーニングセットにおける R または N R 群の P C 1 平均

s d \_ P C 1 K = トレーニングセットにおける R または N R 群の P C 1 標準偏差

トレーニングセット中の各群の平均および s d (有効 3 桁まで四捨五入) は下記の通りである：

【 表 1 7 】

平均_PC <sub>1R</sub>	-4.622
sd_PC <sub>1R</sub>	5.727
平均_PC <sub>1NR</sub>	2.991
sd_PC <sub>1NR</sub>	7.051

【 0 5 3 5 】

各サンプルに対する指標(サンプルがレスポンドーである確率)は下記を用いて得られる：

【数 3】

$$P_R = \frac{e^{-\frac{d_{iR}}{2}}}{e^{-\frac{d_{iR}}{2}} + e^{-\frac{d_{iNR}}{2}}}$$

【0536】

$P_R$  が 0.43 より大きい場合、サンプルは遺伝子サイン陽性（レスポナー，R）として分類される

方法を例示する目的でこの分類指標をトレーニングセットに適用すると、図7/21が生成する。 10

【0537】

新規サンプルを予測するためのアルゴリズム

ライブラリ(ジーンフィルタ)

#### 分類するためにtestsetをロード (正規化 マイクロアレイ データ)

ロード("testset.RData") ### 分類するためのサンプルを含むExpressionSet 20

testset<-data ###(バッチ番号に従いxx を修正)

### トレーニングセットパラメータをロード #####

ロード("M8.train.parameters.RData")

PS<-M8.train.parameters[[1]] 30

M8.train.means<-M8.train.parameters[[2]]

M8.train.sd<-M8.train.parameters[[3]]

M8.train.U<-M8.train.parameters[[4]]

M8.trainPC1barRs<-M8.train.parameters[[5]]

M8.trainPC1sdRs<-M8.train.parameters[[6]] 40

M8.trainPC1barNRs<-M8.train.parameters[[7]]

M8.trainPC1sdNRs<-M8.train.parameters[[8]]

##### テストセット上でのSPCAの使用 - #####  
#####

testset<-testset[PS,]

```
test<-(exprs(testset)-M8.train.means)/M8.train.sd
```

```
PCtest<-t(test) %*% M8.train.U
```

```
PC1test<-PCtest[,1]
```

```
distanceR<-c()
```

```
distanceNR<-c()
```

```
probR<-c()
```

```
probNR<-c()
```

```
SPCAclass<-c()
```

```
for (i in 1:ncol(test)) {
```

```
distancesR<-abs(PCtest[i,1]-M8.trainPC1barRs)/M8.trainPC1sdRs
```

```
distancesNR<-abs(PCtest[i,1]-M8.trainPC1barNRs)/M8.trainPC1sdNRs
```

```
distanceR<-c(distanceR,distancesR)
```

```
distanceNR<-c(distanceNR,distancesNR)
```

```
probRs<-exp(-distancesR/2)/(exp(-distancesR/2)+exp(-distancesNR/2))
```

```
probNRs<-exp(-distancesNR/2)/(exp(-distancesR/2)+exp(-distancesNR/2))
```

```
probR<-c(probR,probRs)
```

```
probNR<-c(probNR,probNRs)
```

```
}
```

```
cutoff=0.43
```

```
clust<-ifelse(as.vector(probR)>cutoff, R,NR))
```

ここで、

`testset` は、100PS に対する正規化マイクロアレイデータを含む 100 行を有するマトリクスである。

【0538】

`M8.train.parameters` は、下記を含むクラスリストのオブジェクトである：

1. 100PS の文字リスト
2. トレインセット中の各 PS に対する 100 平均値のベクトル
3. トレインセット中の各 PS に対する 100 sd 値のベクトル
4. トレインマトリクスの svd 分解の U マトリクスを含む 100 行および 56 列のマトリクス
5. トレイン中のレスポナー群の PC1 平均値
6. トレイン中のレスポナー群の PC1 sd 値
7. トレイン中のノンレスポナー群の PC1 平均値
8. トレイン中のノンレスポナー群の PC1 sd 値

表 4 : 100PS 分類指標特徴に対する平均、標準偏差 (Sd) および PC<sub>1</sub> 係数

【表 1 8】

	平均	Sd	PC1
213793_s_at	6.638	1.437	0.0827
223593_at	4.245	1.721	0.0698
225996_at	5.369	2.116	0.0625
204556_s_at	3.515	1.49	0.0594
223575_at	5.664	1.785	0.0556
205097_at	7.907	1.526	0.0553
231229_at	6.464	1.711	0.0504
1562051_at	3.576	1.847	0.0503
244393_x_at	4.702	1.444	0.0494
200615_s_at	6.286	1.232	0.0407
228316_at	5.362	1.369	0.0402
201474_s_at	4.506	1.331	0.0376
222962_s_at	5.177	1.139	0.0372
236328_at	7.034	1.936	0.0339
232481_s_at	3.731	2.053	0.0328
228400_at	3.458	1.437	0.0279
211149_at	4.061	2.272	0.0266
228492_at	4.538	2.983	0.0254
237515_at	5.513	1.86	0.0245
226084_at	9.153	1.388	0.0234
205499_at	4.675	1.719	0.0002
234907_x_at	3.95	1.465	-0.0051
1553132_a_at	4.068	1.29	-0.0504
239012_at	6.533	1.694	-0.0656
238587_at	6.039	1.292	-0.0717
219551_at	4.637	1.569	-0.0789
AFFX-HUMISGF3A/M97935_MB_at	7.445	1.504	-0.0819
1562031_at	6.386	1.521	-0.0871
238524_at	4.961	1.623	-0.0883
217436_x_at	8.377	1.127	-0.0891
1552612_at	7.216	1.841	-0.0929
244061_at	6.081	1.918	-0.0935
209774_x_at	6.653	1.952	-0.0953
221081_s_at	6.805	2.062	-0.0956
206082_at	6.505	2.038	-0.0988
209770_at	10.821	1.153	-0.1002
232375_at	8.732	1.379	-0.1007
211911_x_at	10.865	1.461	-0.1042
1552613_s_at	7.491	1.275	-0.1043
221875_x_at	10.907	1.258	-0.1044
214470_at	6.927	1.801	-0.1049
232311_at	7.001	1.484	-0.105
208729_x_at	10.389	1.419	-0.106
207536_s_at	4.073	1.75	-0.1061
204806_x_at	10.065	1.283	-0.1062
1554240_a_at	4.02	1.761	-0.1068

10

20

30

40

	平均	Sd	PCI
207795_s_at	3.698	1.803	-0.1073
202659_at	6.944	1.284	-0.1077
210606_x_at	3.915	1.892	-0.1083
235276_at	7.632	1.905	-0.1084
208885_at	10.544	1.865	-0.1084
202643_s_at	5.855	1.381	-0.1087
204533_at	8.875	3.111	-0.1088
229152_at	6.925	3.232	-0.1092
1563473_at	7.07	2.31	-0.1112
204529_s_at	7.139	2.08	-0.1115
235175_at	8.682	2.268	-0.1118
204897_at	9.206	1.692	-0.1123
204070_at	8.233	2.205	-0.1125
210439_at	4.539	1.825	-0.1131
1555759_a_at	4.213	1.638	-0.1133
204224_s_at	9.809	1.798	-0.1137
202644_s_at	8.64	1.472	-0.114
231577_s_at	8.659	1.996	-0.114
210982_s_at	11.946	1.662	-0.1145
1555852_at	6.989	1.89	-0.1149
209813_x_at	4.135	1.808	-0.1152
205685_at	6.927	1.728	-0.1153
238581_at	4.289	1.801	-0.1158
229543_at	8.937	2.328	-0.1159
229390_at	9.644	2.315	-0.1159
208894_at	11.493	1.628	-0.1161
222838_at	7.302	2.672	-0.1164
228532_at	8.693	1.684	-0.1165
209606_at	5.957	2.038	-0.1168
217478_s_at	9.575	1.559	-0.1173
229391_s_at	9.135	2.228	-0.1175
211144_x_at	4.32	1.949	-0.1179
228362_s_at	8.288	2.398	-0.1179
212671_s_at	8.72	2.387	-0.1182
203915_at	9.242	3.331	-0.1191
229625_at	7.32	2.116	-0.1197
211902_x_at	7.387	1.956	-0.1197
209671_x_at	5.905	2.044	-0.1197
1552497_a_at	4.827	2.195	-0.1205
215806_x_at	4.544	1.973	-0.1215
216920_s_at	5.641	1.862	-0.1221
210972_x_at	7.322	2.354	-0.1224
205890_s_at	8.864	2.983	-0.1225
232234_at	6.877	2.249	-0.1228
207651_at	7.222	2.531	-0.1229
202531_at	7.451	1.809	-0.1234
206666_at	6.816	2.698	-0.1242

10

20

30

40

	平均	Sd	PC1
213193_x_at	6.825	2.768	-0.1257
204116_at	6.106	2.683	-0.126
213539_at	7.398	2.851	-0.1263
211339_s_at	5.602	2.061	-0.1266
210915_x_at	6.533	2.733	-0.1267
211796_s_at	6.946	2.921	-0.1271
205758_at	7.338	3.285	-0.1275

10

## 【0539】

実施例2.

Q - R T - P C Rデータを用いたメラノーマ分類指標

マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングのために使用されるRNAを、100PS(83遺伝子)からの22遺伝子および正規化のための5参照遺伝子(GUSB、PGK1、H3F3A、EIF4G2、HNRNPC)(表3)を含むカスタムTaqman Low Density Array(ABI、PN4342259)において試験した。

## 【0540】

この分析のために；総数54のメラノーマサンプルを含んだ(52はまた、マイクロアレイ分析のために使用し、2の追加のものでは、マイクロアレイハイブリダイゼーションが良質ではなかった)。

20

## 【0541】

表5.メラノーマサンプルにおいてPCRに基づく分類指標を構築するために使用される22遺伝子+参照遺伝子に対するABI Taqman Assay番号

【表 19】

PCRにより測定した 100PS における 22 遺伝子		
遺伝子記号	遺伝子名	Taqman Assay
CCL5	ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド 5	Hs00174575_m1
JAK2	ヤヌスキナーゼ 2 (タンパク質チロシンキナーゼ)	Hs01078136_m1
IRF1	インターフェロン制御因子 1	Hs00971960_m1
CXCL9	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 9	Hs00171065_m1
IL2RG	インターロイキン 2 受容体, $\gamma$ (重篤な複合免疫不全)	Hs00173950_m1
CXCL10	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 10	Hs00171042_m1
SLC26A2	溶質輸送体ファミリー 26 (硫酸輸送体), メンバー 2	Hs00164423_m1
CD86	CD 86 分子	Hs01567025_m1
CD8A	CD 8 a 分子	Hs00233520_m1
UBD	ユビキチン D	Hs00197374_m1
GZMK	グランザイム K (グランザイム 3 ; トリプターゼ II)	Hs00157878_m1
GPR171	Gタンパク質共役型受容体 171	Hs00664328_s1
PSCDBP (シノニム: CYTIP)	プレクストリン相同, Sec 7 およびコイルドコイルドメイン, 結合タンパク質	Hs00188734_m1
CXCL2	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 2	Hs00236966_m1
ICOS	誘導 T 細胞共刺激分子	Hs99999163_m1
TRBC1	T 細胞受容体 $\beta$ 定常部 2	Hs00411919_m1
TRA@;TRAJ17;TRDV2;TRAC;TRAV20	T 細胞受容体 $\alpha$ 座位	Hs00948942_m1
TARP;TRGC2	TCR $\gamma$ 代替リーディングフレーム タンパク質; T 細胞 受容体 $\gamma$ 定常部 2	Hs00827007_m1

10

20

30

40

PCRにより測定した100PSにおける22遺伝子		
遺伝子記号	遺伝子名	Taqman Assay
ITK	I L 2 - 誘導 T 細胞キナーゼ	Hs00950634_m1
C4orf7	染色体4 オープンリーディングフレーム7	Hs00395131_m1
CD3D	CD3 d 分子, $\delta$ (CD3-TCR複合体)	Hs00174158_m1
HLA-DMA	主要組織適合抗原, クラス I I, DM $\alpha$	Hs00185435_m1
PGK1	ハウスキーピング遺伝子	Hs99999906_m1
GUSB	ハウスキーピング遺伝子	Hs99999908_m1
HNRNPC	ハウスキーピング遺伝子	Hs01028910_g1
EIF4G2	ハウスキーピング遺伝子	Hs01034743_g1
H3F3A	ハウスキーピング遺伝子	Hs02598545_g1

10

20

## 【0542】

500 ng (OD<sub>260</sub>測定)の全RNAからのcDNA合成を、1x第一鎖緩衝液、0.5 mMの各dNTP、10 mMのジチオスレイトール、20 UのrRNase阻害剤(Promega cat. N2511)、250 ngのランダムヘキサマーおよび200 UのM-MLV逆転写酵素(Life Technologies cat. 28025-013)を含む20  $\mu$ lの混合物中、1時間30分間、42 で実施した。200 ngの全RNAに対応するcDNAを、TaqMan緩衝液、5 mMのMgCl<sub>2</sub>、0.4 mMのdUTP、0.625 UのAmpli Taq Gold DNAポリメラーゼ、0.05 UのUNGを含む200  $\mu$ lの総体積中で混合し、製造者勧告に従いTaqMan Low Density Arrayにロードした。TaqMan Low Density Arrayを、Applied Biosystem 7900HT上で動作させた。増幅プロファイルは50 で2分の1サイクル、94.5 で10分の1サイクルならびに97 で30秒および59.7 で1分の40サイクルとした。生データをSDS 2.2ソフトウェア(ABI)を用いて分析した。Ct値を、自動ベースラインおよび閾値としての0.15を用いて得た。

30

## 【0543】

22遺伝子Q-PCRデータを用いたSPCA-DA分類のリーブワナアウトクロスバリデーション:

40

分類スキームを開発し、リーブワナアウトによる交差検定を使用し、Q-PCRにより測定した22遺伝子全てを使用して(すなわち、分類指標特徴再計算なし)、試験した。

## 【0544】

最初に、Z-スコア正規化を、各トレーニングセットを用いて実施し、テストサンプルに適用した。次に、目的変数ありの主成分-判別分析(SPCA-DA)に基づくマイクロアレイデータに適用された同じ分類アルゴリズムを構築し、そのループ内で除外されたサンプルの各々に適用した(Bair and Tibshirai, PLOS Biol 2004 and Tibshirani et al., PNAS 2002)。

## 【0545】

50

マイクロアレイから 0.43 カットオフを使用して、33 / 54 サンプルを GS+ として分類し、感度は 85% (17 / 20) であり、特異性は 53% (18 / 34) である。マイクロアレイのように、AS15 群は、より良好な性能、92% 感度および 57% 特異性を有する。

【0546】

PCR データについて計算された 0.47 のカットオフを用いて、31 / 54 サンプルを GS+ として分類し、感度は 85% (17 / 20) であり、特異性は 59% (20 / 34) である。

【0547】

PCR で試験した 52 サンプルはマイクロアレイモデル中にあった。我々は 100 PS (特徴選択を有する) を用いる LOO SPCA - DA マイクロアレイおよび 22 遺伝子を用いる LOO SPCA - DA PCR (特徴選択なし) について対応するサンプルの分類を比較し、どちらも 0.43 の確率のカットオフを用いた。リーブワンアウトモデル間のサンプル分類の一致は、両方の分類で同じラベルを有する 52 サンプル中 49 である (ボーダーラインサンプルが誤分類された)。

10

【0548】

図 8 / 21 は、LOO SPCA - DA PCR により 22 遺伝子を用いて得られた分類指標を示す (特徴選択なし)。

【0549】

トレーニングセットから誘導されたパラメータを用いた新規サンプルの分類

20

分類指標における 22 遺伝子に対する Q - PCR 発現レベルに基づく新規患者臨床成績の予測のために、実施例 1 のマイクロアレイに基づく分類指標に対して前に示したように、目的変数ありの主成分 (SPCA) - 判別分析 (DA) 決定規則を適用する (Bair, 2004; Tibshirani, 2002 から適合)。

【0550】

患者生データを参照遺伝子を用いて正規化させ、対数変換させた時点 (これは発現マトリクスと呼ばれる) で、患者に対する臨床成績の予測のための決定規則 (分類指標または分類スキーム) に供することができる。

【0551】

発現マトリクスはトレーニングセットからの平均および標準偏差 (Sd) を用いて Z - スコア化される (表 6)

30

分類する患者の Z - スコア化された正規化発現プロファイル (分類指標特徴) は、分類指標特徴の線形結合を用いて、トレーニングセットにより規定された第 1 の主成分 (PC1) 空間において提示される (線形結合における 22 の特徴の各々に対する係数は、トレーニングセットの特異値分解により得られ、それらは表 6 で提供される)

表 6 : 22 遺伝子分類指標特徴に対する平均、標準偏差 (Sd) および PC1 係数

【表 2 0】

遺伝子	平均	Sd	PC1 係数
C4orf7	-1.397	1.244	-0.1834
CCL5	-0.545	0.691	-0.2441
JAK2	-1.105	0.354	-0.1636
IRF1	-0.430	0.500	-0.2345
CXCL9	-0.276	0.923	-0.2349
IL2RG	-0.657	0.721	-0.2444
CXCL10	-0.830	0.896	-0.2181
SLC26A2	-0.745	0.307	0.0660
CD86	-1.504	0.461	-0.2272
CD8A	-1.342	0.879	-0.1881
UBD	-0.570	0.945	-0.2385
GZMK	-1.470	0.734	-0.2414
GPR171	-1.683	0.698	-0.2180
PSCDBP	-1.335	0.647	-0.2212
CXCL2	-2.163	0.633	-0.1437
ICOS	-1.714	0.697	-0.2029
TRBC1	-2.714	1.313	-0.2026
TRA@;TRAJ17;TRDV2;TRAC;TRAV20	-0.762	0.666	-0.2464
TARP;TRGC2	-2.405	0.877	-0.1904
ITK	-1.862	0.896	-0.2178
CD3D	-1.478	0.806	-0.2452
HLA-DMA	-0.380	0.470	-0.2284

10

20

## 【0552】

PC1におけるテストサンプルのレスポナーおよびノンレスポナー群の平均までの標準化距離は、下記式を用いて得られる：

30

## 【数 4】

$$d_{iK} = \frac{|PC_{1i} - \text{平均} - PC_{1K}|}{sd\_PC_{1K}}$$

## 【0553】

i = テストサンプル

K = レスポナー (R) またはノンレスポナー (NR)

平均\_PC<sub>1K</sub> = トレーニングセットにおけるRまたはNR群のPC<sub>1</sub>平均

d\_PC<sub>1K</sub> = トレーニングセットにおけるRまたはNR群のPC<sub>1</sub>標準偏差

40

トレーニングセット中の各群の平均およびsd(有効3桁まで四捨五入)は下記の通りである：

## 【表 2 1】

平均_PC <sub>1R</sub>	-2.055
sd_PC <sub>1R</sub>	2.920
平均_PC <sub>1NR</sub>	1.210
sd_PC <sub>1NR</sub>	3.951

50

【 0 5 5 4 】

各サンプルに対する指標(サンプルがレスポンドである確率)は下記を用いて得られる  
:

【 数 5 】

$$P_R = \frac{e^{-\frac{d_{IR}}{2}}}{e^{-\frac{d_{IR}}{2}} + e^{-\frac{d_{INR}}{2}}}$$

【 0 5 5 5 】

$P_R$  が 0.47 より大きい場合、サンプルは遺伝子サイン陽性(レスポンド, R)として分類される

この分類指標をトレーニングセットに適用すると、69%一致に対し、0.85(17/20)の感度のおよび0.59(20/34)特異性で、22遺伝子がトレーニングセットを分類することができることを示す図9/21が生成する。

【 0 5 5 6 】

成績予測コード

```
### テストサンプル新たな転移性メラノーマ TLDA 2 22 遺伝子の分類のためのスクリプト
```

```
### Mage008TLDA.SPCA.DA.Mel4patent.Rに基づく
```

```
### M8.train.parameters.22genes.TLDA2.RDataを必要とする (トレーニングセットパラメータ)
```

```
ライブラリ(ジーンフィルタ)
```

```
#### 分類するためにtestsetをロード (対数スケール 正規化 PCR データ)
```

```
ロード("testset.RData") ### 分類するためのサンプルを含むExpressionSet
```

```
###トレーニングセットパラメータをロード#####
```

```
ロード("M8.train.parameters.22genes.TLDA2.RData")
```

```
PS<-M8.train.parameters[[1]]
```

```
M8.train.means<-M8.train.parameters[[2]]
```

```
M8.train.sd<-M8.train.parameters[[3]]
```

```
M8.train.U<-M8.train.parameters[[4]]
```

```
M8.trainPC1barRs<-M8.train.parameters[[5]]
```

```
M8.trainPC1sdRs<-M8.train.parameters[[6]]
```

```
M8.trainPC1barNRs<-M8.train.parameters[[7]]
```

10

20

30

40

50

```
M8.trainPC1sdNRs<-M8.train.parameters[[8]]
```

```
##### テストセット上でのSPCAの使用 - #####
testset<-testset[PS,]
```

```
test<-(exprs(testset)-M8.train.means)/M8.train.sd
```

```
PCtest<-t(test) %*% M8.train.U
```

```
PC1test<-PCtest[,1]
```

10

```
distanceR<-c()
distanceNR<-c()
probR<-c()
probNR<-c()
SPCAclass<-c()
```

```
for (i in 1:ncol(test)) {
  distancesR<-abs(PCtest[i,1]-M8.trainPC1barRs)/M8.trainPC1sdRs
```

20

```
  distancesNR<-abs(PCtest[i,1]-M8.trainPC1barNRs)/M8.trainPC1sdNRs
```

```
  distanceR<-c(distanceR,distancesR)
  distanceNR<-c(distanceNR,distancesNR)
```

```
  probRs<-exp(-distancesR/2)/(exp(-distancesR/2)+exp(-distancesNR/2))
```

```
  probNRs<-exp(-distancesNR/2)/(exp(-distancesR/2)+exp(-distancesNR/2))
```

```
  probR<-c(probR,probRs)
  probNR<-c(probNR,probNRs)
```

30

```
}
cutoff=0.47
clust<-ifelse(as.vector(probR)>cutoff,R,NR)
```

```
#####
```

```
###(バッチ番号に従いxx次の行を修正)
```

40

```
write.table(cbind(pData(testset),probR),file="testset_batch_xx_TLDA2_22genes_classification.txt",sep="¥t")
```

ここで、

Testset.RDataは、22遺伝子に対する正規化対数スケールPCRデータを含む22行を有するマトリクスである

M8.train.parametersは、下記を含むクラスリストのオブジェクトである：

1. 22遺伝子名の文字リスト
2. トレインセット中の各遺伝子に対する22平均値のベクトル
3. トレインセット中の各遺伝子に対する22sd値のベクトル

50

4. トレインマトリクスの s v d 分解の U マトリクスを含む 2 2 行および 2 2 列のマトリクス

5. トレイン中のレスポナー群の P C 1 平均値

6. トレイン中のレスポナー群の P C 1 s d 値

7. トレイン中のノンレスポナー群の P C 1 平均値

8. トレイン中のノンレスポナー群の P C 1 s d 値。

【 0 5 5 7 】

実施例 3

P C R により評価された 2 3 遺伝子のサブセットを用いた N S C L C サンプルの分類

バックグラウンド：N S C L C 第 I I 相臨床試験

これは、腫瘍の完全外科切除後の、M A G E - A 3 陽性、ステージ I B および I I N S C L C 患者における二重盲検プラセボ対照概念証明治験である ( C P M S 2 4 9 5 5 3 / 0 0 4 ) 。 A S C I 薬 ( 抗原特異的癌免疫療法薬 ) は、タンパク質 - D および H i s t - テールとの融合物における組換え M A G E - A 3 融合タンパク質である。これは、A S 0 2 B 免疫アジュバントと組み合わせられる。A S 0 2 B は、Q S 2 1 および M P L の水中油型エマルジョンである。Q S 2 1 は、南アメリカの樹木キラヤサポナリアモリーナ由来の精製された天然サポニン分子であり、M P L は、3 デ - O - アセチル化モノホスホリルリピド A - S . ミネソタ L P S 由来の、リピド A の解毒誘導体である。この二重盲検、無作為化、プラセボ対照治験は、再発までの時間を評価するように設計した ( 図 1 1 / 2 1 ) 。

【 0 5 5 8 】

図 1 0 / 2 1 は、N S C L C 第 I I 相治験設計を示す。M A G E - A 3 - 陽性の、完全に切除された、ステージ I B または I I N S C L C を有する総計 1 8 2 の患者を、2 年にわたり登録し、無作為に M A G E - A 3 を標的とする A S C I またはプラセボ ( 2 : 1 比 ) のいずれかを受けるように割り当てた。最大 1 3 用量を、2 7 ヶ月の期間にわたり投与した。主分析を切除日から 2 8 ヶ月のメジアン追跡調査期間後に実施し、2 0 0 6 年 1 1 月に公開した。

【 0 5 5 9 】

この治験は、この患者集団における癌免疫療法に対する活性の証拠を最初に提供した。主分析時に、6 7 の患者は疾患再発を示した：r e c M A G E - A 3 + A S 0 2 B A S C I 群で 4 1 ( 3 3 . 6 % ) およびプラセボ群で 2 6 ( 4 3 . 3 % ) 。 C o x 回帰分析を使用して、各患者の個々の時間事象を考慮しながら、無病期間 ( D F I ) の相対的な改善を計算した。結果は、プラセボと比べた場合、A S C I を受けた群における、2 8 ヶ月メジアン追跡調査後の癌再発リスクの 2 7 % 相対減少を示す ( ハザード比 = 0 . 7 3 ; C I = 0 . 4 4 - 1 . 2 ; p = 0 . 1 0 8 、片側ログラंक検定 ) ( 図 1 1 / 2 1 ) 。

【 0 5 6 0 】

無病生存率 ( D F S ) および全生存 ( O S ) に対するハザード比は、それぞれ、0 . 7 3 ( C I : 0 . 4 5 - 1 . 1 6 ) 、および 0 . 6 6 ( C I = 0 . 3 6 - 1 . 2 0 ) であった。

【 0 5 6 1 】

これらの結果を、最終分析時にさらに確認した ( 2 0 0 7 年 1 2 月 - 4 4 ヶ月のメジアン追跡調査 ) : D F I では H R 0 . 7 5 ( C I = 0 . 4 6 - 1 . 2 3 ) 、D F S では 0 . 7 6 ( C I = 0 . 4 8 - 1 . 2 1 ) および O S では 0 . 8 1 ( C I = 0 . 4 7 - 1 . 4 0 ) 。

【 0 5 6 2 】

図 1 1 / 2 1 は、N S C L C 治験に対する無病期間の間の K a p l a n - M e i e r 曲線を示す。この研究からのサンプルを使用してこの患者集団における A S C I - 治療臨床応答を予測する可能なバイオマーカーとしてのメラノーマサインの使用を決定した。

【 0 5 6 3 】

P C R データを用いた N S C L C サンプルの分類

10

20

30

40

50

100PS (表1)からの23遺伝子のサブセットを、MAGE-A3 NSCLC臨床試験(MAGE004; GlaxoSmithKline)からのサンプルを用いてLOO分類指標を構築するために使用した。

【0564】

表7. NSCLCサンプルにおいてPCRに基づく分類指標を構築するために使用される23遺伝子に対するABI Taqman Assay番号(実施例2におけるメラノーマ分類指標と同じ参照遺伝子)

【表 2 2】

PCRにより測定された 100PS における 23 遺伝子		
遺伝子記号	遺伝子名	Taqman Assay
CCL5	ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド 5	Hs00174575_m1
JAK2	ヤヌスキナーゼ 2 (タンパク質チロシンキナーゼ)	Hs01078136_m1
IRF1	インターフェロン制御因子 1	Hs00971960_m1
CXCL9	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 9	Hs00171065_m1
IL2RG	インターロイキン 2 受容体, $\gamma$ (重篤な複合免疫不全)	Hs00173950_m1
CXCL10	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 10	Hs00171042_m1
SLC26A2	溶質輸送体ファミリー 26 (硫酸輸送体), メンバー 2	Hs00164423_m1
CD86	CD 86 分子	Hs01567025_m1
CD8A	CD 8 a 分子	Hs00233520_m1
UBD	ユビキチン D	Hs00197374_m1
GZMK	グランザイム K (グランザイム 3 ; トリプターゼ I I)	Hs00157878_m1
GPR171	G タンパク質共役型受容体 171	Hs00664328_s1
PSCDBP	プレクストリン相同, Sec 7 およびコイルドコイルドメイン, 結合タンパク質	Hs00188734_m1
CXCL2	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 2	Hs00236966_m1
ICOS	誘導 T 細胞共刺激分子	Hs99999163_m1
TRBC1	T 細胞受容体 $\beta$ 定常部 2	Hs00411919_m1
TRA@;TRAJ17;TRD V2;TRAC;TRAV20	T 細胞受容体 $\alpha$ 座位	Hs00948942_m1
TARP;TRGC2	T C R $\gamma$ 代替リーディングフレームタンパク質 ; T 細胞 受容体 $\gamma$ 定常部 2	Hs00827007_m1

10

20

30

40

PCRにより測定された100PSにおける23遺伝子		
遺伝子記号	遺伝子名	Taqman Assay
ITK	IL2-誘導T細胞キナーゼ	Hs00950634_m1
C4orf7	染色体4オープンリーディングフレーム7	Hs00395131_m1
CD3D	CD3d分子, $\delta$ (CD3-TCR複合体)	Hs00174158_m1
HLA-DMA	主要組織適合抗原, クラスII, DM $\alpha$	Hs00185435_m1
SLAMF7	SLAMファミリーメンバー7	Hs00900280_m1

10

## 【0565】

## 方法

129腫瘍標本(ワクチン接種前)を、MAGE-A3 NSCLC臨床試験(MAGE004; GlaxoSmithKline)から使用した。これらはRNAlater、RNA安定化溶液中で保存された新鮮凍結サンプルであった。全RNAをTripure方法(Roche Cat.No.1667165)を使用して精製した。提案されたプロトコルに続いて、DNase処置を有するRNeasy Miniキット-浄化プロトコル(Qiagen Cat.No.74106)を使用した。RNAの定量は、260nmでの光学密度を用いて最初に完了した。

20

## 【0566】

500ngの全RNAからのcDNA合成を、1x第一鎖緩衝液、0.5mMの各dNTP、10mMのジチオスレイトール、20UのrRNase阻害剤(Promega cat.N2511)、250ngのランダムヘキサマーおよび200UのM-MLV逆転写酵素(Life Technologies cat.28025-013)を含む20 $\mu$ lの混合物中、1時間30分間、42 $^{\circ}$ Cで実施した。

## 【0567】

200ngの全RNAに対応するcDNAを、TaqMan緩衝液、5mMのMgCl<sub>2</sub>、0.4mMのdUTP、0.625UのAmpli Taq Gold DNAポリメラーゼ、0.05UのUNGを含む200 $\mu$ lの総体積中で混合し、製造者勧告に従いTaqMan Low Density Arrayにロードした。

30

## 【0568】

TaqMan Low Density Arrayを、Applied Biosystem 7900HT上で動作させた。増幅プロファイルは50 $^{\circ}$ Cで2分の1サイクル、94.5 $^{\circ}$ Cで10分の1サイクルならびに97 $^{\circ}$ Cで30秒および59.7 $^{\circ}$ Cで1分の40サイクルとした。生データをSDS2.2ソフトウェア(ABI)を用いて分析した。Ct値を、自動ベースラインおよび閾値としての0.15を用いて得た。

## 【0569】

23遺伝子Q-PCRデータを用いたSPCA-Cox分類のリーワンアウトクロスバリデーション:

40

この臨床試験はプラセボおよび処置群を含み、Cox比例ハザードモデルに基づき、共変量として治療、遺伝子プロファイル、ステージ、外科手術および組織学的型に加えて治療と遺伝子プロファイルの間の交互作用項(主成分1として要約)を用いて、リスクスコアを推定するために無病期間(DFI)を使用する分類指標を開発した。

## 【0570】

各遺伝子に対するCt値を、5参照遺伝子の幾何平均を用いて正規化し、対数変換させた。その後、遺伝子を各トレーニングセットにおいてZ-スコアより正規化し、これらのパラメータをテストセットに適用した。

## 【0571】

50

Z - スコア正規化後、特異値分解 (SVD) をトレーニングセットにおいて実施し、第 1 の主成分 (PC1) を得た。この第 1 成分を、処置との交互作用項を有する Cox 回帰において使用し、トレインセットにおける共変量係数を推定し; Cox 回帰を外科手術効果の組織診断、ステージおよび型のために調整する。この回帰からの係数を使用して、トレーニングセットおよびテストサンプル (除外されたサンプル) におけるリスクスコアを計算する。トレインセットのメジアンリスクスコアをカットオフ値として使用し、患者を遺伝子サイン (GS) + または遺伝子サイン (GS) - と分類する。この方法は Cox - SPCA と呼ばれ、図 12 / 21 において説明される。

【0572】

図 13 / 21 および 14 / 21 は、それぞれ、プラセボおよびワクチン群中での、カットオフとしてのメジアンおよびリスクスコア分布を有する、LOOCV 分類に基づく遺伝子プロファイルによる生存曲線を示す。リスクスコア分布は下記の通りである：

【表 23】

HR に対する GS の影響		
	HR 処置	CI
GS+	0.466	[0.187;1.162]
GS-	1.216	[0.555;2.67]

10

20

【0573】

Cox - SPCA アルゴリズムを用いた新規サンプルの分類

分類指標における 23 遺伝子に対する Q - PCR 発現レベルに基づく新規患者臨床成績の予測のために、目的変数ありの主成分 (SPCA) - Cox 決定規則を適用する：患者生データを参照遺伝子を用いて正規化し、対数変換させた時点で、患者に対する臨床成績の予測のための決定規則 (分類指標または分類スキーム) に供することができる。

【0574】

発現マトリクスはトレーニングセットからのパラメータを用いて Z - スコア化する (表 8)

30

表 8 : 23 遺伝子分類指標特徴に対する平均、標準偏差 (Sd) および PC1 係数

【表 2 4】

遺伝子	平均	sd	PC1 係数
C4orf7	-2.35768	1.455544	-0.12114
CCL5	-0.9599	0.350039	-0.23097
JAK2	-1.36811	0.260374	-0.19931
IRF1	-0.52347	0.276644	-0.2256
CXCL9	-0.87804	0.563437	-0.21386
IL2RG	-0.83528	0.358042	-0.24997
CXCL10	-1.36857	0.615177	-0.17136
SLC26A2	-1.44043	0.255169	-0.05637
CD86	-1.7699	0.499237	-0.13267
CD8A	-1.33733	0.375334	-0.25173
UBD	-0.71367	0.546652	-0.21295
GZMK	-1.77411	0.529496	-0.24628
GPR171	-1.81327	0.32409	-0.19376
PSCDBP	-1.17746	0.387117	-0.24162
CXCL2	-1.16947	0.696255	-0.09696
ICOS	-2.15436	0.403522	-0.23497
TRBC1	-2.62512	1.013281	-0.12679
TRA@;TRAJ17;TRDV2;TRAC;TRAV20	-1.19671	0.3944	-0.25817
TARP;TRGC2	-2.22752	0.481252	-0.19299
ITK	-1.85777	0.394118	-0.26077
CD3D	-1.64584	0.397626	-0.25514
HLA-DMA	-0.81144	0.380465	-0.22948
SLAMF7	-1.33744	0.464338	-0.21762

## 【0575】

分類する患者の Z - スコア化された正規化発現プロファイル（分類指標特徴）は、トレーニングセットにより、分類指標特徴の線形結合を用いて規定された第 1 の主成分（PC<sub>1</sub>）空間において提示される（線形結合における 23 の特徴の各々に対する係数は、トレーニングセットの特異値分解により得られ、それらは表 8 で提供される）

新規サンプルに対するリスクスコアは下記式を用いて計算される：

## 【数 6】

$$\log \frac{h_i(t)}{h_0(t)} = \hat{\beta}_{\text{treatment}}(1) + \hat{\beta}_{PC1\text{interaction}}(1)PC1_{ik}$$

## 【0576】

ここで、 $B_{\text{treatment}} = -0.232051457$  および  $B_{PC1\text{interaction}} = 0.176736586$  は、トレーニングセットから得られた

新規サンプルのリスクスコアは、トレーニングセットのメジアンリスクスコア = -0.315324195 と比較され、リスクスコアがこの値より低い場合、サンプルは GS +（レスポナー、非再発、1）と分類される。

## 【0577】

図 15 / 21 および 16 / 21 は、分類指標における 23 遺伝子に対する Q - PCR 発現レベルに基づく臨床成績を示す。HR に対する GS の影響は下記の通りである：

【表 2 5】

HR に対する GS の影響		
	HR 処置	CI
GS+	0.426	[0.167;1.090]
GS-	1.248	[0.572;2.720]

【 0 5 7 8 】

成績予測コード

```
### テストサンプル新たな切除 NSCLC TLDAmERGE 23 遺伝子の分類のための
### スクリプト
```

```
### Mage004.SPCA.Cox.classifier.construction.TLDAmERGE.23genes.DFI.Squamous.Rに基
### づく
```

```
### M4.train.parameters.23genes.TLDAmERGE.Rdataを必要とする(トレーニングセットパ
### ラメータ)
```

```
ライブラリ(ジーンフィルタ)
```

```
#### 分類するためにtestsetをロード(対数スケール正規化PCRデータ)
```

```
ロード("testset.RData") ### 分類するためのサンプルを含むExpressionSet
```

```
### トレーニングセットパラメータをロード #####
```

```
ロード("M4.train.parameters.23genes.TLDAmERGE.RData")
```

```
PS<-M4.train.parameters[[1]]
```

```
M4.train.means<-M4.train.parameters[[2]]
```

```
M4.train.sd<-M4.train.parameters[[3]]
```

```
M4.train.U<-M4.train.parameters[[4]]
```

```
M4.train.Btreatment<-M4.train.parameters[[5]]
```

```
M4.train.Binteraction<-M4.train.parameters[[6]]
```

```
M4.train.medianHR<-M4.train.parameters[[7]]
```

```
##### テストセット上でのSPCAの使用 - #####
#####
```

```
testset<-testset[PS,]
```

```
test<-(exprs(testset)-M4.train.means)/M4.train.sd
```

10

20

30

40

50

```
PCtest<-t(test) %*% M4.train.U
```

```
PC1test<-PCtest[,1]
```

```
HR=M4.train.Btreatment+PC1test*M4.train.Binteraction
classification=ifelse(HR<M4.train.medianHR,1,0)
```

```
#####
```

```
###(バッチ番号に従いxx次の行を修正)
```

```
write.table(cbind(pData(testset),probR),file="testset_batch_xx_M4_TLDAmerge_23genes_classification.txt",sep="¥t")
```

ここで、

`Testset.RData`は、23遺伝子に対する正規化対数スケールPCRデータを含む23行を有するマトリクスである

`M4.train.parameters`は、下記を含むクラスリストのオブジェクトである：

1. 23遺伝子名の文字リスト
2. トレインセット中の各遺伝子に対する23平均値のベクトル
3. トレインセット中の各遺伝子に対する23sd値のベクトル
4. トレインマトリクスのsvd分解のUマトリクスを含む23行および23列のマトリクス
5. リスクスコア計算における `B_treatment`
6. リスクスコア計算における `B_PC1interaction`
7. トレインにおけるメジアンリスクスコア。

【0579】

実施例4

PCRにより評価された22遺伝子のサブセットを用いたNSCLCサンプルの分類：

100PS(表1)からの22遺伝子のサブセットを、MAGE-A3 NSCLC臨床試験(MAGE004; GlaxoSmithKline)からのサンプルを用いてLOO分類指標を構築するために使用した。

【0580】

表9. NSCLCサンプルにおいてPCRに基づく分類指標を構築するために使用される22遺伝子に対するABI Taqman Assay番号(実施例2におけるメラノーマ分類指標と同じ参照遺伝子)

10

20

30

【表 2 6】

PCRにより測定された100PSにおける22遺伝子		
遺伝子記号	遺伝子名	Taqman Assay
CCL5	ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド5	Hs00174575_m1
JAK2	ヤヌスキナーゼ2 (タンパク質チロシンキナーゼ)	Hs01078136_m1
IRF1	インターフェロン制御因子1	Hs00971960_m1
CXCL9	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド9	Hs00171065_m1
IL2RG	インターロイキン2受容体, $\gamma$ (重篤な複合 免疫不全)	Hs00173950_m1
CXCL10	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド10	Hs00171042_m1
SLC26A2	溶質輸送体ファミリー26 (硫酸輸送体), メンバー2	Hs00164423_m1
CD86	CD86分子	Hs01567025_m1
CD8A	CD8a分子	Hs00233520_m1
UBD	ユビキチンD	Hs00197374_m1
GZMK	グランザイムK (グランザイム3 ; トリプターゼII)	Hs00157878_m1
GPR171	Gタンパク質共役型受容体171	Hs00664328_s1
PSCDBP (CYTIP)	プレクストリン相同, Sec7およびコイルドコイルドメイン, 結合タンパク質	Hs00188734_m1
CXCL2	ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド2	Hs00236966_m1
ICOS	誘導T細胞共刺激分子	Hs99999163_m1
TRBC1	T細胞受容体 $\beta$ 定常部2	Hs00411919_m1
TRA@;TRAJ17;TRDV2 ;TRAC;TRAV20	T細胞受容体 $\alpha$ 座位	Hs00948942_m1
TARP;TRGC2	TCR $\gamma$ 代替リーディングフレームタンパク質 ; T細胞 受容体 $\gamma$ 定常部2	Hs00827007_m1
ITK	IL2-誘導T細胞キナーゼ	Hs00950634_m1
C4orf7	染色体4オープンリーディングフレーム7	Hs00395131_m1
CD3D	CD3d分子, $\delta$ (CD3-TCR複合体)	Hs00174158_m1
HLA-DMA	主要組織適合抗原, クラスII, DM $\alpha$	Hs00185435_m1

## 【0581】

## 方法

137腫瘍標本(ワクチン接種前)を、MAGE-A3 NSCLC臨床試験(MAGE004; GlaxoSmithKline)から使用した。これらはRNA later、RNA安定化溶液中で保存した新鮮凍結サンプルであった。

## 【0582】

全RNAをTripure方法(Roche Cat. No. 1667165)を使用して精製した。提案されたプロトコルに続いて、DNase処置を有するRNeasy Miniキット-浄化プロトコル(Qiagen Cat. No. 74106)を使用した。RNAの定量は、260nmでの光学密度を用いて最初に完了した。

## 【0583】

500ngの全RNAからのcDNA合成を、1x第一鎖緩衝液、0.5mMの各dN

10

20

30

40

50

TP、10 mMのジチオスレイトール、20 UのrRNase阻害剤 (Promega cat. N2511)、250 ngのランダムヘキサマーおよび200 UのM-MLV逆転写酵素 (Life Technologies cat. 28025-013)を含む20  $\mu$ lの混合物中、1時間30分間、42 で実施した。

【0584】

200 ngの全RNAに対応するcDNAを、TaqMan緩衝液、5 mMのMgCl<sub>2</sub>、0.4 mMのdUTP、0.625 UのAmpli Taq Gold DNAポリメラーゼ、0.05 UのUNGを含む200  $\mu$ lの総体積中で混合し、製造者勧告に従いTaqMan Low Density Arrayにロードした。

【0585】

TaqMan Low Density Arrayを、Applied Biosystem 7900HT上で動作させた。増幅プロファイルは50 で2分の1サイクル、94.5 で10分の1サイクルならびに97 で30秒および59.7 で1分の40サイクルとした。生データをSDS 2.2ソフトウェア (ABI)を用いて分析した。Ct値を、自動ベースラインおよび閾値としての0.15を用いて得た。

10

【0586】

22遺伝子Q-PCRデータを用いたSPCA-Cox分類のリーブワンアウトクロスバリデーション:

この臨床試験はプラセボおよび処置群を含み、Cox比例ハザードモデルに基づき、共変量として治療、遺伝子プロファイル、ステージ、外科手術および組織学的型に加えて治療と遺伝子プロファイルの間の交互作用項 (主成分1として要約)を用いて、リスクスコアを推定するために無病期間 (DFI)を使用する分類指標を開発した。

20

【0587】

各遺伝子に対するCt値を、5参照遺伝子の幾何平均を用いて正規化し、対数変換させた。その後、遺伝子を各トレーニングセットにおいてZ-スコアより正規化し、これらのパラメータをテストセットに適用した。

【0588】

Z-スコア正規化後、特異値分解 (SVD)をトレーニングセットにおいて実施し、第1の主成分 (PC1)を得た。この第1成分を、処置との交互作用項を有するCox回帰において使用し、トレインセットにおける共変量係数を推定し; Cox回帰を外科手術効果の組織診断、ステージおよび型のために調整する。この回帰からの係数を使用して、トレーニングセットおよびテストサンプル (除外されたサンプル)におけるリスクスコアを計算する。トレインセットのメジアンリスクスコアをカットオフ値として使用し、患者を遺伝子サインGS+またはGS-と分類する。この方法は別の文書でCox-SPCAと呼ばれる。この方法は図12/21において説明される。

30

【0589】

図17/21および18/21は、それぞれ、プラセボおよびワクチン群中での、カットオフとしてのメジアンおよびリスクスコア分布を有する、LOOCV分類に基づく遺伝子プロファイルによる生存曲線を示す。

【0590】

リスクスコア分布

40

【表27】

HR に対する GS の影響		
	HR 処置	CI
GS+	0.460	[0.193;1.097]
GS-	1.197	[0.564;2.541]

50

## 【0591】

Cox-SPCAアルゴリズムを用いた新規サンプルの分類

分類指標における22遺伝子に対するQ-PCR発現レベルに基づく新規患者臨床成績の予測のために、目的変数ありの主成分(SPCA)-Cox決定規則を適用する：患者生データを参照遺伝子を用いて正規化し、対数変換させた時点で、患者に対する臨床成績の予測のための決定規則(分類指標または分類スキーム)に供することができる。

## 【0592】

発現マトリクスはトレーニングセットのパラメータを用いてZ-スコア化される(表10)

表10：22遺伝子分類指標特徴に対する平均、標準偏差(Sd)およびPC1係数【表28】

10

遺伝子	平均	Sd	PC1 係数
C4orf7	-2.37682	1.432191	-0.12613
CCL5	-0.97196	0.363545	-0.23868
JAK2	-1.38351	0.272662	-0.20067
IRF1	-0.5328	0.284196	-0.23035
CXCL9	-0.88518	0.561561	-0.21758
IL2RG	-0.84755	0.369696	-0.25893
CXCL10	-1.38526	0.608373	-0.17545
SLC26A2	-1.45138	0.259368	-0.06122
CD86	-1.78136	0.493304	-0.1445
CD8A	-1.35019	0.38214	-0.26018
UBD	-0.72426	0.545598	-0.21573
GZMK	-1.7857	0.526042	-0.25378
GPR171	-1.81382	0.353983	-0.1875
PSCDBP	-1.19407	0.398912	-0.24969
CXCL2	-1.17377	0.679063	-0.10145
ICOS	-2.16745	0.40877	-0.24479
TRBC1	-2.63145	0.999466	-0.12889
TRA@;TRAJ17;TRDV2;TRAC;TRAV20	-1.20289	0.392963	-0.26276
TARP;TRGC2	-2.27109	0.528402	-0.19113
ITK	-1.87391	0.405727	-0.26852
CD3D	-1.66653	0.409356	-0.26013
HLA-DMA	-0.81888	0.400541	-0.23598

20

30

## 【0593】

分類する患者のZ-スコア化された正規化発現プロファイル(分類指標特徴)は、トレーニングセットにより、分類指標特徴の線形結合を用いて規定された第1の主成分(PC1)空間において提示される(線形結合における22の特徴の各々に対する係数は、トレーニングセットの特異値分解により得られ、それらは表10で提供される)

40

新規サンプルに対するリスクスコアは下記式を用いて計算される：

【数7】

$$\log \frac{h_i(t)}{h_0(t)} = \hat{\beta}_{\text{treatment}}(1) + \hat{\beta}_{\text{PC1interaction}}(1)PC1_{ik}$$

## 【0594】

ここで、 $B_{\text{treatment}} = -0.193146993$  および  $B_{\text{PC1interaction}} = 0.163704817$  は、トレーニングセットから得られた。

50

## 【 0 5 9 5 】

新規サンプルのリスクスコアは、トレーニングセットのメジアンリスクスコア = - 0 . 0 . 2 5 7 3 7 4 2 1 と比較され、リスクスコアがこの値より低い場合、サンプルはGS + (レスポナー, 非再発, 1) と分類される。

## 【 0 5 9 6 】

図 1 9 / 2 1 および 2 0 / 2 1 は、分類指標における 2 2 遺伝子に対する Q - P C R 発現レベルに基づく臨床成績を示す。

## 【表 2 9】

HR に対する GS の影響		
	HR 処置	CI
GS+	0.474	[0.1990;1.130]
GS-	1.143	[0.542;2.438]

10

## 【 0 5 9 7 】

成績予測コード

###テストサンプル新たな切除NSCLC TLDAmerge 22 遺伝子の分類のためのスクリプト

### Mage004.SPCA.Cox.classifier.construction.DFI.Squamous.Rに基づく

20

### M4.train.parameters.22genes.TLDA2.Rdataを必要とする(トレーニングセットパラメータ)

ライブラリ(ジーンフィルタ)

#### 分類するためにtestsetをロード(対数スケール正規化PCRデータ)

ロード("testset.RData") ### 分類するためのサンプルを含むExpressionSet

30

### トレーニングセットパラメータをロード #####

ロード("M4.train.parameters.22genes.TLDA2.RData")

PS<-M4.train.parameters[[1]]

M4.train.means<-M4.train.parameters[[2]]

M4.train.sd<-M4.train.parameters[[3]]

40

M4.train.U<-M4.train.parameters[[4]]

M4.train.Btreatment<-M4.train.parameters[[5]]

M4.train.Binteraction<-M4.train.parameters[[6]]

M4.train.medianHR<-M4.train.parameters[[7]]

50

```
##### テストセット上でのSPCAの使用 - #####
#####
```

```
testset<-testset[PS,]
```

```
test<-(exprs(testset)-M4.train.means)/M4.train.sd
```

```
PCtest<-t(test) %*% M4.train.U
```

10

```
PC1test<-PCtest[,1]
```

```
HR=M4.train.Btreatment+PC1test*M4.train.Binteraction
```

```
classification=ifelse(HR<M4.train.medianHR,1,0)
```

```
#####
```

```
###(バッチ番号に従いxx次の行を修正)
```

```
write.table(cbind(pData(testset),probR),file="testset_batch_xx_M4_TLDA2_22genes_
classification.txt",sep="¥t"))
```

20

ここで、

`Testset.RData`は、22遺伝子に対する正規化対数スケールPCRデータを含む22行を有するマトリクスである

`M4.train.parameters`は、下記を含むクラスリストのオブジェクトである：

1. 22遺伝子名の文字リスト
2. トレインセット中の各遺伝子に対する22平均値のベクトル
3. トレインセット中の各遺伝子に対する22sd値のベクトル
4. トレインマトリクスのsvd分解のUマトリクスを含む22行および22列のマトリクス

30

5. リスクスコア計算における `Btreatment`

6. リスクスコア計算における `Bpc1interaction`

7. トレインにおけるメジアンリスクスコア。

【0598】

実施例5

メラノーマサンプルにおけるQ-PCRにより測定した個々の遺伝子の分類性能

実施例2からの22遺伝子の各々を、第1の主成分の代わりに、単一の遺伝子発現値を使用する、メラノーマサンプルにおける多変量分類に適用されたアルゴリズムを用いることにより、一変量分類性能に対して評価した。

【0599】

40

参照遺伝子を用いて発現値を正規化し、Z-スコアを実施した後、各それぞれの遺伝子に対する発現レベルを、トレーニングセットにおける全てのサンプルを使用して分類指標を構築するために、使用した。トレーニングセットにおける各遺伝子の発現差異に対するt検定p-値およびレスポナー対ノンレスポナーのフォールドチェンジを計算した。トレーニングセットにおける各サンプルがレスポナーである確率を得、臨床ラベルとの一致を最大化することにより、最良のカットオフを各遺伝子に対して決定し、結果を次の表に示す：

表11

【表 3 0】

遺伝子	一致 (%)	t 検定 p-値	フォールドチェンジ
CCL5	72	0.003	3.7
JAK2	67	0.010	1.8
IRF1	72	0.004	2.5
CXCL9	76	0.010	4.6
IL2RG	69	0.006	3.5
CXCL10	69	0.004	5.2
SLC26A2	63	0.030	0.7
CD86	67	0.049	1.8
CD8A	74	0.095	2.6
UBD	70	0.001	7.0
GZMK	67	0.023	2.9
GPR171	65	0.084	2.2
PSCDBP	65	0.005	3.1
CXCL2	83	0.003	3.3
ICOS	67	0.004	3.5
C4orf7	74	0.008	8.2
TRA@;TRAJ17;TRDV2;TRAC;TRAV20	72	0.001	4.1
TARP;TRGC2	70	0.003	5.1
ITK	76	0.062	3.0
TRBC1	74	0.076	4.5
CD3D	69	0.011	3.7
HLA-DMA	70	0.012	2.1

10

20

## 【0600】

個々の遺伝子に対して得られた結果は、実施例 2 における全ての遺伝子を用いた多変量分類において得られた 69% の % 一致に匹敵する。

## 【0601】

## 実施例 6

NSCLC サンプルにおける Q - PCR により測定した個々の遺伝子の分類性能

実施例 3 からの 23 遺伝子の各々を、第 1 の主成分の代わりに、単一の遺伝子発現値を使用する、NSCLC サンプルにおける多変量分類に適用されたアルゴリズム ( Cox - SPCA ) を用いることにより、分類性能に対して評価した。

30

## 【0602】

参照遺伝子を用いて発現値を正規化し、Z - スコアを実施した後、各それぞれの遺伝子に対する発現レベルを、実施例 3 で記載されるように分類指標を構築するために使用した。トレーニングセットにおける各サンプルに対するリスクスコアを得、サンプルを異なるカットオフに基づき、GS + または GS - に割り当てた。各カットオフの性能を、各 GS + および GS - 群におけるこのカットオフと関連する処置 HR を計算することにより評価した。1 遺伝子あたりの最良のカットオフを、分類の交互作用項係数を最大化する、すなわち、GS + および GS - における処置 HR 間の差を最大化することにより個々に決定した。下記表は、この最適化プロセスを用いて得られた GS + および GS - における処置 HR およびそれらの HR と関連する p - 値を示す。

40

## 【0603】

表 1 2

【表 3 1】

遺伝子	GS+ HR	GS+ p-値	GS- HR	GS- p-値
C4orf7	0.182	0.03	1.133	0.71
CCL5	0.169	0.04	1.061	0.86
JAK2	0.427	0.091	0.992	0.98
IRF1	0.521	0.088	1.567	0.46
CXCL9	0.166	0.027	1.040	0.91
IL2RG	0.244	0.056	1.162	0.66
CXCL10	0.648	0.2	1.607	0.57
SLC26A2	0.680	0.25	1.910	0.35
CD86	0.479	0.13	1.159	0.7
CD8A	0.209	0.024	1.204	0.6
UBD	0.230	0.016	1.413	0.37
GZMK	0.086	0.0082	1.364	0.37
GPR171	0.402	0.045	1.715	0.23
PSCDBP	0.340	0.025	1.514	0.28
CXCL2	0.635	0.16	2.476	0.26
ICOS	0.585	0.13	2.122	0.2
TRBC1	0.387	0.12	1.101	0.78
TRA@;TRAJ17;TRDV2;TRAC;TRAV20	0.288	0.026	1.413	0.36
TARP;TRGC2	0.747	0.51	1.003	1
ITK	0.152	0.039	1.167	0.65
CD3D	0.217	0.033	1.202	0.59
HLA-DMA	0.394	0.17	1.094	0.79
SLAMF7	0.354	0.029	1.222	0.63

10

20

## 【0604】

## 実施例7

メラノーマサンプルにおけるマイクロアレイにより測定した個々の遺伝子の分類性能

実施例1からの100PSの各々を、第1の主成分の代わりに、単一の遺伝子発現値を使用する、メラノーマサンプルにおける多変量分類に適用されたアルゴリズムを用いることにより、一変量分類性能に対して評価した。

30

## 【0605】

発現値 (gcrma) を正規化し、Z-スコアを実施した後、各それぞれのPSに対する発現レベルを、トレーニングセットにおける全てのサンプルを用いて分類指標を構築するために使用した。トレーニングセットにおける各PSの発現差異に対するt検定p-値およびレスポナー対ノンレスポナーのフォールドチェンジを計算した。トレーニングセットにおける各サンプルがレスポナーである確率を得、臨床ラベルとの一致を最大化することにより、最良のカットオフを各遺伝子に対して決定し、結果を次の表に示す：

表13

40

【表 3 2】

プローブセット	一致 (%)	p-値 t 検定	FC
225996_at	71	0.0002	0.2
205890_s_at	75	0.0002	7.4
223575_at	75	0.0002	0.3
232481_s_at	73	0.0011	0.3
213793_s_at	77	0.0004	0.4
217436_x_at	77	0.0004	2.1
228400_at	70	0.0025	0.4
204116_at	73	0.0005	5.4
232375_at	75	0.0005	2.4
244393_x_at	70	0.0007	0.4
215806_x_at	75	0.0004	3.6
221875_x_at	75	0.0005	2.2
1555852_at	79	0.0010	3.1
208729_x_at	75	0.0007	2.4
204806_x_at	75	0.0006	2.2
211144_x_at	75	0.0006	3.4
222838_at	73	0.0018	4.6
211911_x_at	79	0.0008	2.4
208894_at	71	0.0018	2.6
203915_at	71	0.0023	6.5
226084_at	79	0.0007	0.4
216920_s_at	75	0.0010	3.1
236328_at	75	0.0008	0.3
1562031_at	77	0.0012	2.5
212671_s_at	71	0.0018	3.9
204533_at	68	0.0018	6.0
207795_s_at	75	0.0009	3.0
217478_s_at	73	0.0020	2.4
209606_at	73	0.0014	3.3
201474_s_at	71	0.0037	0.5
211796_s_at	73	0.0019	5.3
204070_at	71	0.0017	3.6
204556_s_at	68	0.0031	0.4
1554240_a_at	75	0.0012	2.9
235276_at	71	0.0022	2.9
202659_at	73	0.0018	2.1
210982_s_at	71	0.0028	2.5
205758_at	70	0.0020	6.5
211149_at	66	0.0042	0.3
237515_at	68	0.0024	0.4
210972_x_at	68	0.0019	3.8
231229_at	71	0.0018	0.4
208885_at	68	0.0031	2.8
211339_s_at	71	0.0022	3.2
235175_at	73	0.0026	3.5
229391_s_at	73	0.0037	3.3

10

20

30

40

プローブセット	一致 (%)	p-値 t 検定	FC
214470_at	64	0.0030	2.7
210915_x_at	73	0.0031	4.5
AFFX-HUMISGF3A/M97935_MB_at	71	0.0033	2.3
206082_at	75	0.0027	3.1
228362_s_at	73	0.0040	3.6
1562051_at	63	0.0076	0.4
205097_at	68	0.0028	0.4
229625_at	70	0.0032	3.2
228532_at	70	0.0044	2.4
222962_s_at	71	0.0036	0.5
209774_x_at	73	0.0032	2.9
238524_at	73	0.0030	2.4
202643_s_at	66	0.0034	2.1
232234_at	73	0.0030	3.4
204897_at	68	0.0044	2.4
232311_at	70	0.0037	2.2
229543_at	73	0.0051	3.3
202531_at	71	0.0031	2.7
210606_x_at	71	0.0028	2.8
207651_at	75	0.0036	3.9
209813_x_at	73	0.0028	2.7
228492_at	64	0.0059	0.2
219551_at	71	0.0031	2.4
1555759_a_at	75	0.0031	2.4
205499_at	66	0.0063	0.4
1552613_s_at	66	0.0048	1.9
228316_at	70	0.0041	0.5
210439_at	70	0.0042	2.6
234907_x_at	77	0.0029	2.2
211902_x_at	70	0.0035	2.9
205685_at	71	0.0049	2.5
213193_x_at	73	0.0044	4.3
1552612_at	70	0.0054	2.6
1552497_a_at	70	0.0034	3.3
223593_at	75	0.0068	0.4
200615_s_at	71	0.0041	0.5
206666_at	66	0.0050	4.1
204529_s_at	70	0.0037	3.1
1563473_at	66	0.0050	3.3
1553132_a_at	73	0.0033	2.0
229390_at	71	0.0064	3.2
213539_at	68	0.0058	4.3
244061_at	66	0.0043	2.8
209770_at	68	0.0047	1.8
238587_at	66	0.0088	1.9
207536_s_at	71	0.0037	2.6
221081_s_at	64	0.0070	2.8

10

20

30

40

プローブセット	一致 (%)	p-値 t 検定	FC
209671_x_at	71	0.0041	3.0
239012_at	68	0.0069	2.3
229152_at	68	0.0052	5.3
202644_s_at	66	0.0065	2.1
238581_at	71	0.0048	2.6
231577_s_at	75	0.0065	2.7
204224_s_at	64	0.0091	2.4

10

## 【 0 6 0 6 】

個々のPSに対して得られた結果は、実施例 1 における全ての遺伝子を用いた多変量分類において得られた 68% の % 一致に匹敵する。

## 【 0 6 0 7 】

## 参考文献

Dave SS, Wright G, Tan B et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N.Engl.J.Med.* 2004 ;351:2159-2169

Hu Z, Fan C, Oh DS et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC.Genomics* 2006;7:96.

20

Weigelt B, Hu Z, He X et al. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res.* 2005;65:9155-9158.

Golub T, Slonim D, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286: 531-536

30

Bair E, Tibshirani R. Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data. *PLoS Biology* 2004;2(4):511-522.

Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B et al. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *PNAS* 2002; 99(10): 6567-6572

Harlin H, Meng Y, Peterson AC et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Res.* 2009;69(7):3077-85. Epub 2009 Mar 17

40

Wu H, Mao F, Olman V, Xu Y Hierarchical classification of functionally equivalent genes in prokaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(7):2125-40. Epub 2007 Mar 11.

Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, et al. (2002)

Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415(6871), 530-556.

50

Ginzinger DG. ,Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream *Exp Hematol*. 2002 Jun;30(6):503-12. Review.

Balch CM. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol*. 1992 Nov-Dec;8(6):400-14.

Weynants P, Lethe B, Brasseur F, Marchand M, Boon T. Expression of mage genes by non-small-cell lung carcinomas. *Int J Cancer*. 1994 Mar 15;56(6):826-9.

Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio JJ, De Plaen E, Lethe B, Brasseur F, Boon T. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1994 Mar 1;179(3):921-30. 10

Patard JJ, Brasseur F, Gil-Diez S, Radvanyi F, Marchand M, Francois P, Abi-Aad A, Van Cangh P, Abbou CC, Chopin D, et al. Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Cancer*. 1995 Feb 20;64(1):60-4. Moore A, McCarthy L, Mills KH. The adjuvant combination monophosphoryl lipid A and QS21 switches T cell responses induced with a soluble recombinant HIV protein from Th2 to Th1. *Vaccine*. 1999 Jun 4;17(20-21):2517-27. 20

Gerard CM, Baudson N, Kraemer K, Bruck C, Garcon N, Paterson Y, Pan ZK, Pardoll D. Therapeutic potential of protein and adjuvant vaccinations on tumour growth. *Vaccine*. 2001 Mar 21;19(17-19):2583-9.

Maniatis et al., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor, 1982-1989.

Krieg AM, Davis HL. Enhancing vaccines with immune stimulatory CpG DNA. *Curr Opin Mol Ther*. 2001 Feb;3(1):15-24. Review. 30

Ren J, Zheng L, Chen Q, Li H, Zhang L, Zhu H. Co-administration of a DNA vaccine encoding the prostate specific membrane antigen and CpG oligodeoxynucleotides suppresses tumor growth. *J Transl Med*. 2004 Sep 9;2(1):29.

Wu Z, Irizarry RA, Gentleman R, Martinez-Murillo F, Spencer F. A model-based background adjustment for oligonucleotide expression arrays. *J Am Stat Ass*. 2004; 99: 909-917

付属書類 1 - G C R M A 対応、修正 R e f P l u s R コード

```
require(affyPLM)
pe <- read.table("VR63933P_pe.txt")
pe <- unstack(pe)
rq <- scan("VR63933P_rq.txt ")
gcrmaplus <- function (Future, gcrmapara, r.q, p.e, bg = TRUE)
{
  if (missing(r.q) & (missing(gcrmapara))) {
    stop("Missing Reference Quantiles")
  }
  if (missing(p.e) & (missing(gcrmapara))) {
    stop("missing Probe Effects")
  }
}
```

40

50

```

}
if (!missing(gcrmapara)) {
  r.q = gcrmapara[[1]]
  p.e = gcrmapara[[2]]
  cat("Use gcrmapara. ¥n")
}
else {
  cat(Use Reference.Quantiles and Probe.Effects.¥n")
}
if (bg == TRUE)
  Future <- bg.adjust.gcrma(Future)
PM = pm(Future)
pm(Future) <- normalize.quantiles2 (PM, r.q)
rm(PM)
future <- gcrmaref.predict(Future, p.e)
return(future)
}
gcrmaref.predict <- function (Future, p.e)
{
  PMindex <- pmindex(Future)
  PM <- log2(pm(Future))
  PM <- sweep(PM, 1, unlist(p.e))
  pm(Future) <- PM
  PMList <- lapply(PMindex, function(x, y) intensity(y)[x,
    ], Future)
  future <- t(sapply(PMList, colMedians))
  colnames(future) <- sampleNames(Future)
  return(future)
}
normalize.quantiles2 <- function (X, Reference.Quantiles)
{
  apply(X, 2, function(x, y) y[rank(x)], Reference.Quantiles)
}
colMedians <- function (mat) rowMedians(t(mat))

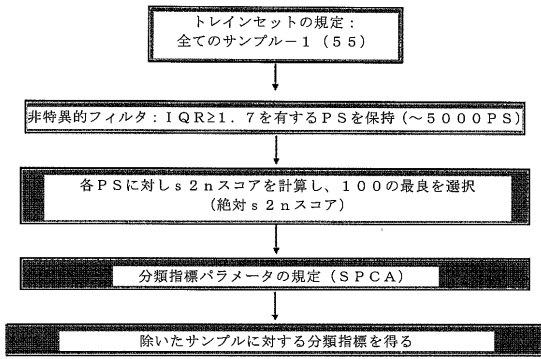
```

10

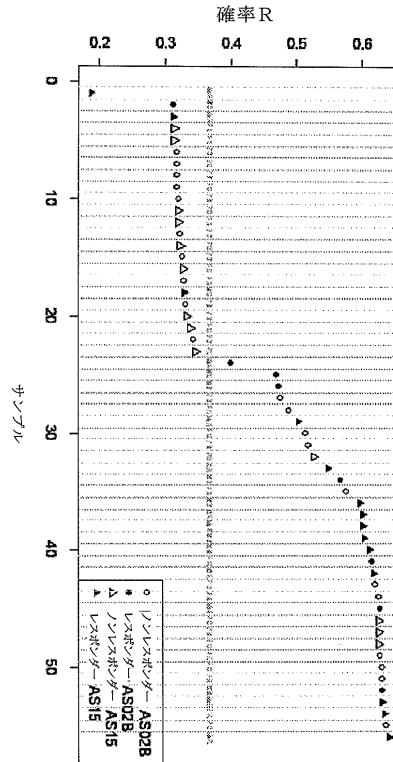
20

30

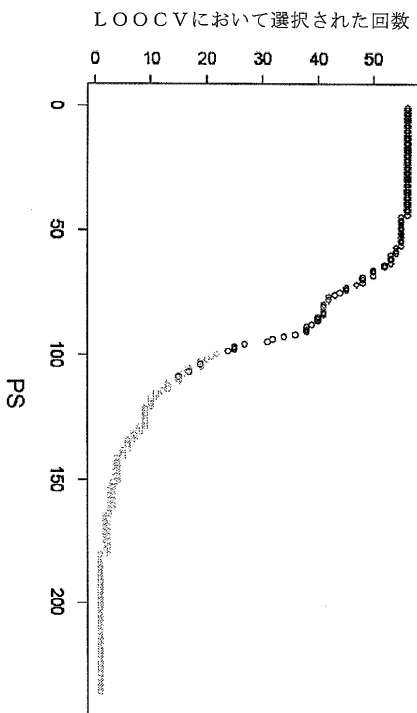
【 図 1 】



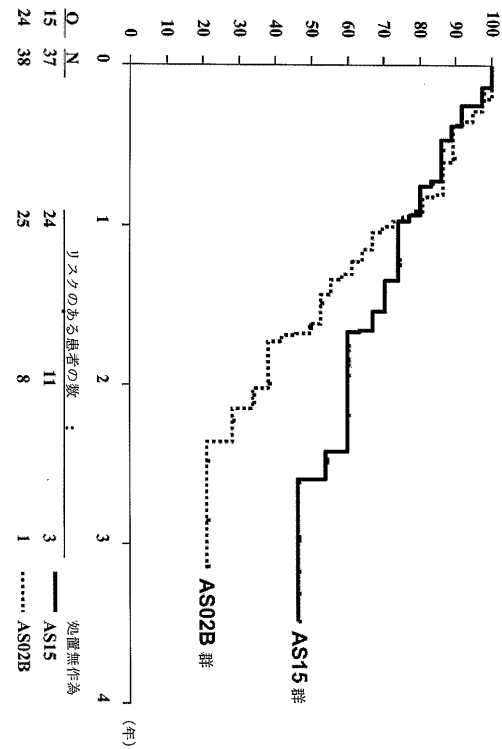
【 図 2 】



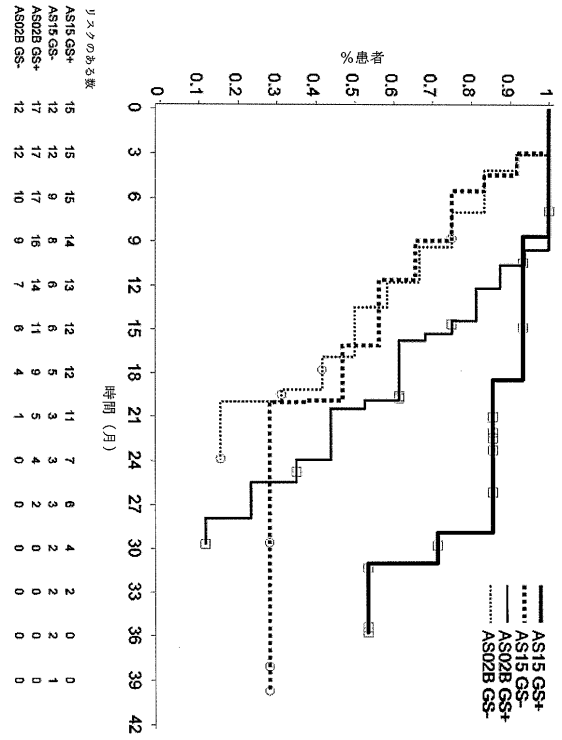
【 図 3 】



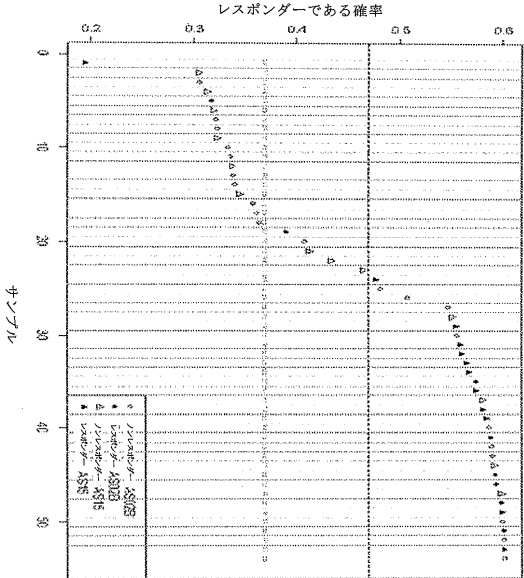
【 図 4 】



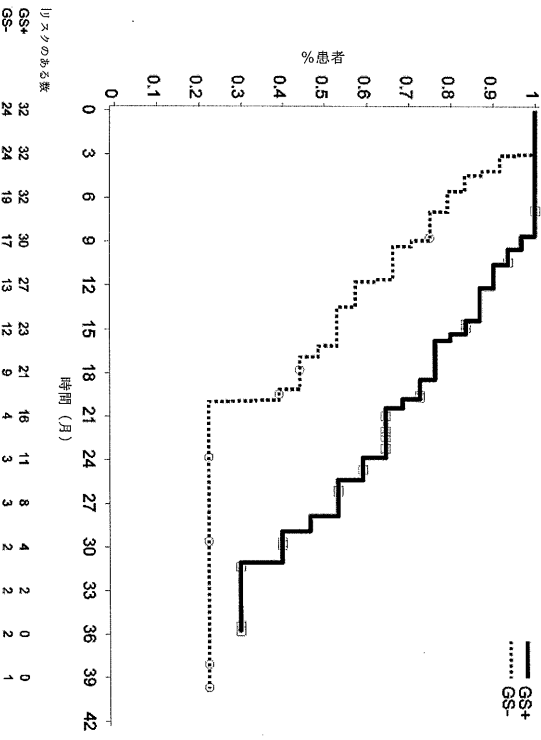
【 図 6 】



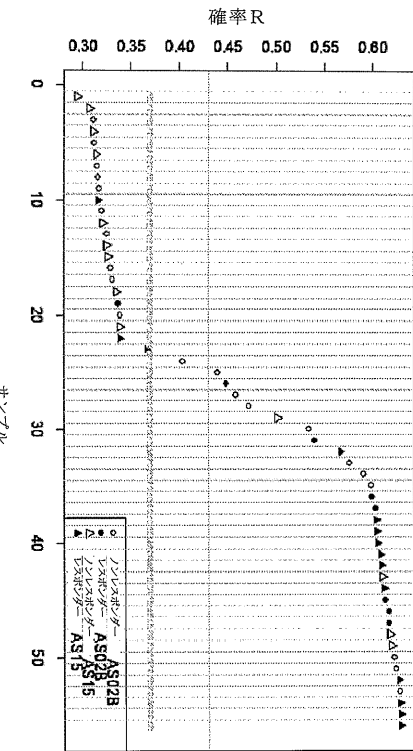
【 図 8 】



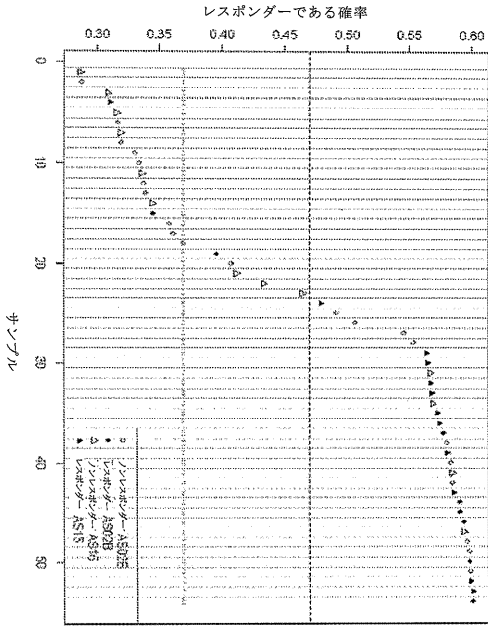
【 図 5 】



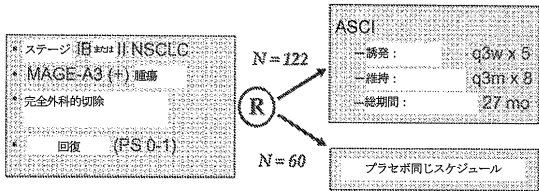
【 図 7 】



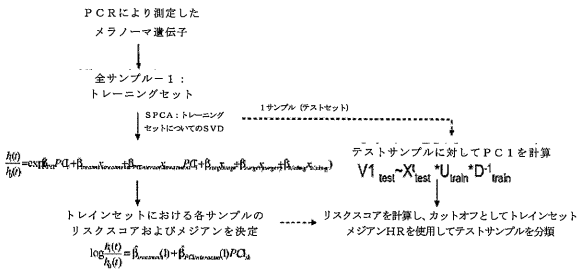
【図 9】



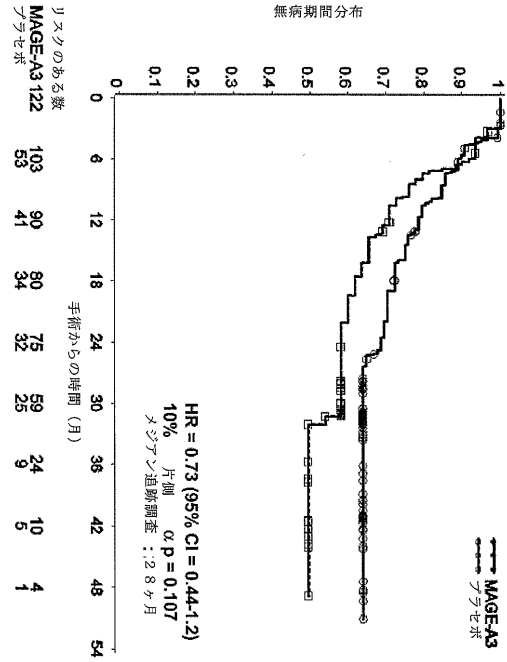
【図 10】



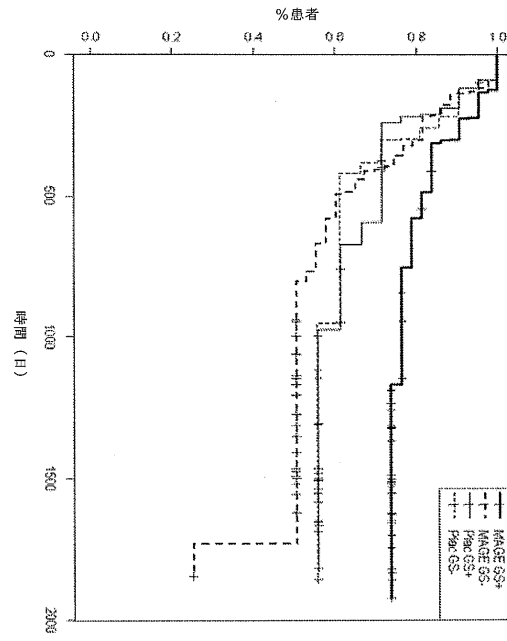
【図 12】



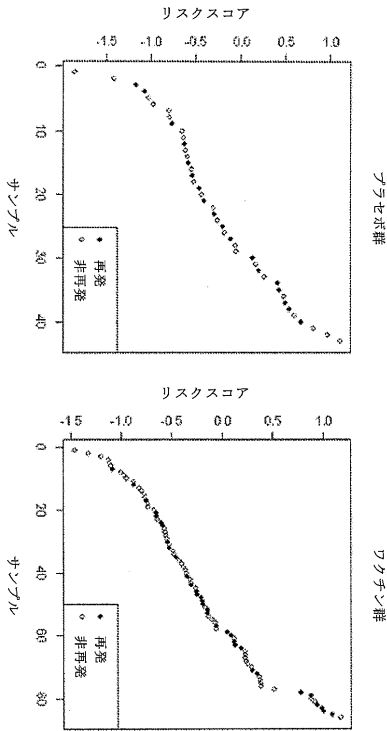
【図 11】



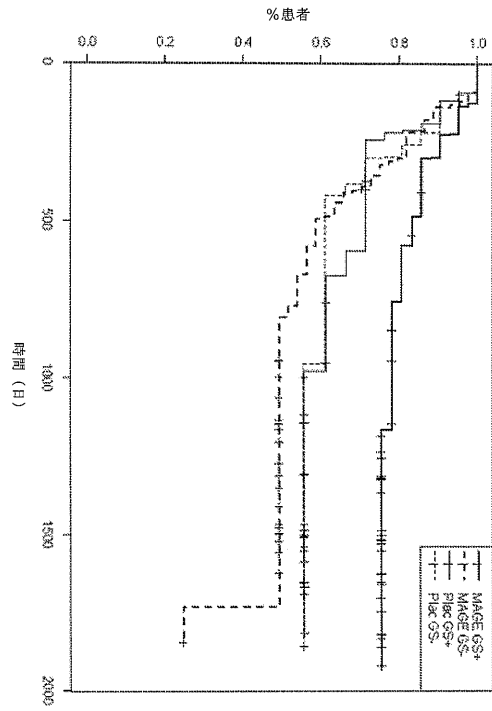
【図 13】



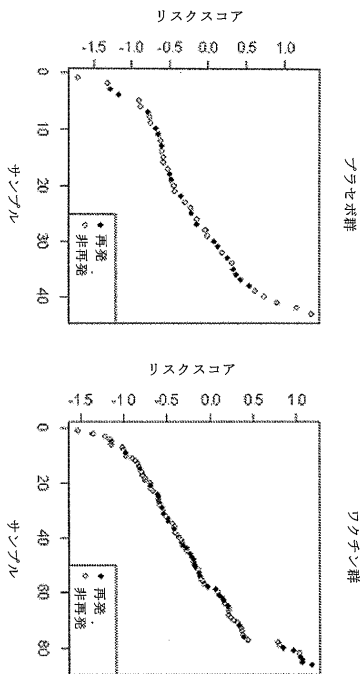
【 図 1 4 】



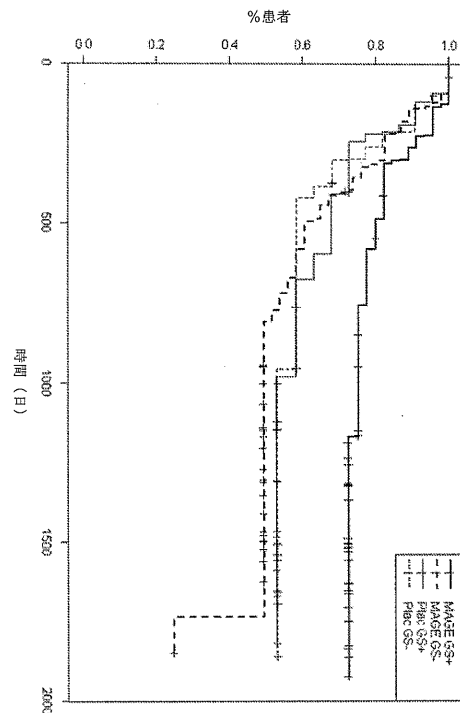
【 図 1 5 】



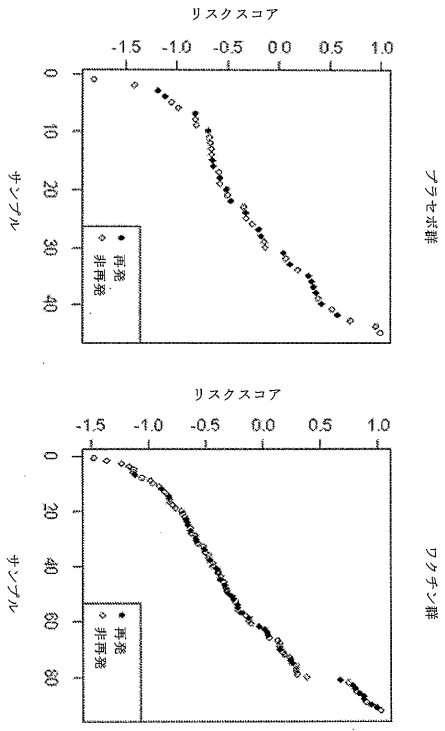
【 図 1 6 】



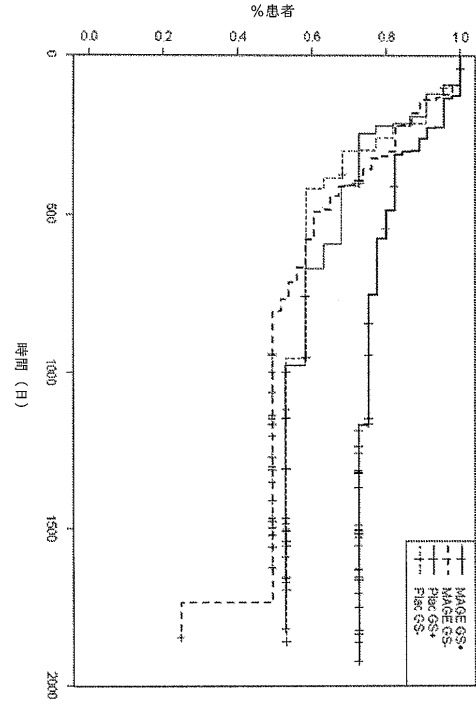
【 図 1 7 】



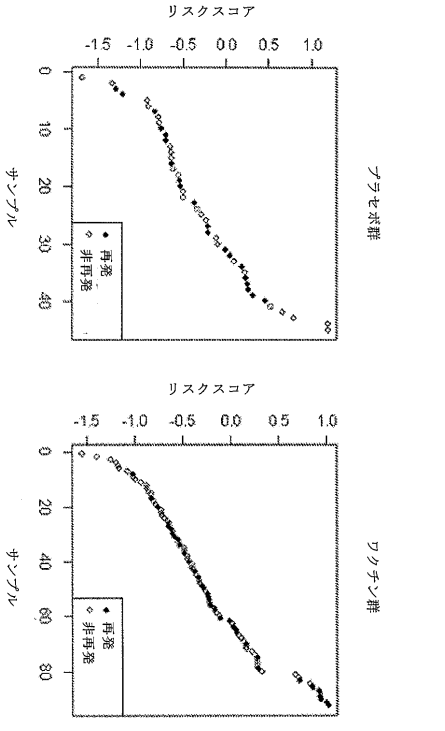
【 図 18 】



【 図 19 】



【 図 20 】



【 図 21 】

タンパク質D 1/3 - MAGE3 - HIS タンパク質:

N term MDP	protD 1/3	MD	MAGE-A3	GG 7xHis	C term
	2	124	3	314	

配列番号: 101

```

MDPKTLALSLLAAGVLGCSRSSNNANTOMKSKLITAH: 40
RGASGVLPFERTLESKALFAQAQADYLEDLANTKDGRIVV: 80
IHDHFLDGLIDVAKKFPRRHRKGRVYVIDRTLKEIQSLR: 120
MTENFETMDLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPAT: 160
EEQEAASSSTLVEVTLGEVPAAESPDPPQSQGASSLPT: 200
TMNYPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLESEFQAALSRKV: 240
AELVHFLLKRYRAREPVTKAEMLGSVVGNWQYFPPVIFSK: 280
ASSLQLVFGIELMEVDPIGHLVIFATCLGLSYDGLLGDN: 320
QIMPKAGLLIIVLAIAREGDCAFEEKIWEELSVLEVFEG: 360
REDSILGDPKKLLTQHFQENYLEYRQVPGSDPACYEFLW: 400
GPRALVETSYVKVLHHMVKISGGPHISYPPLHEWVLRGE: 440
EGGHHHHHHH. 451
  
```

太字=シグナル配列 15aa

~~強調された文字~~=タンパク質Dの最初の109アミノ酸

二重下線=関係のないアミノ酸

\* (インフルエンザのMDP最初のaa)

\* (クローニング部位を作成するためのaa128-129でのMet-Asp)

\* (442-443でのGly-Gly)

下線=MAGE3のフラグメント、MAGE3のアミノ酸3-314 (総312aa)

HHHHHHH = 7テール

【配列表】

2013505008000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2010/063751

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/140958 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BRICHARD VINCENT [BE]; CLARK JAMES SCO) 13 December 2007 (2007-12-13) page 85 - page 103; examples 1-4 claims 1-10, 12-13, 17, 22-26 -----	1-32
X	WO 2009/068621 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; COCHE THIERRY [BE]; GAULIS SWANN [BE];) 4 June 2009 (2009-06-04) page 49 - page 62; examples 1-6 claims 1-19 ----- -/--	1-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
5 November 2010	24/02/2011	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Persson, Anna	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/063751

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LANDOLFO S ET AL: "Chronic myeloid leukemia cells resistant to interferon-alpha lack STAT1 expression." THE HEMATOLOGY JOURNAL : THE OFFICIAL JOURNAL OF THE EUROPEAN HAEMATOLOGY ASSOCIATION / EHA 2000 LNKD-PUBMED:11920164, vol. 1, no. 1, 2000, pages 7-14, XP002608316 ISSN: 1466-4860 the whole document</p> <p>-----</p>	1-3,5, 7-9,16, 19,20, 23,24,26
X	<p>WO 2005/108610 A2 (US GOV HEALTH &amp; HUMAN SERV [US]; MARTIN ROLAND [US]; STUERZEBECKER CLA) 17 November 2005 (2005-11-17) claims 7, 9, 10, 19</p> <p>-----</p>	1-3,5,7, 8,14-17, 19,20, 24,26
X	<p>WO 2009/034055 A1 (NOVARTIS FORSCHUNGSSTIFTUNG [CH]; UNIV HOSPITAL BASEL [CH]; CHRISTEN V) 19 March 2009 (2009-03-19) claims 14-15 page 19, paragraph 4-5</p> <p>-----</p>	5,7,8
X	<p>WANG SHUO ET AL: "Stat1 phosphorylation determines Ras oncogenicity by regulating p27 kip1." PLOS ONE 2008 LNKD- PUBMED:18941537, vol. 3, no. 10, 2008, page E3476, XP002608317 ISSN: 1932-6203 the whole document</p> <p>-----</p>	5,7-9
X	<p>WO 2007/124578 A1 (UNIV MONTREAL [CA]; BIOSYSTEMIX LTD [CA]; PERREAULT CLAUDE [CA]; BARON) 8 November 2007 (2007-11-08) claims 38,47</p> <p>-----</p>	23
A	<p>BRICHARD ET AL: "GSK's antigen-specific cancer immunotherapy programme: Pilot results leading to Phase III clinical development" VACCINE, ELSEVIER LTD, GB LNKD- DOI:10.1016/J.VACCINE.2007.06.038, vol. 25, 3 October 2007 (2007-10-03), pages B61-B71, XP022282961 ISSN: 0264-410X the whole document</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-32

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2010/063751

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WANG ENA ET AL: "Prospective molecular profiling of melanoma metastases suggests classifiers of immune responsiveness"            CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US LNKD-            DOI:10.1007/0-306-47822-6_1,            vol. 62, no. 13, 1 July 2002 (2002-07-01),            pages 3581-3586, XP002389350            ISSN: 0008-5472            the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-32
A	<p>MOCELLIN S ET AL: "Dissecting tumor responsiveness to immunotherapy: the experience of peptide-based melanoma vaccines"            BBA - REVIEWS ON CANCER, ELSEVIER SCIENCE BV, AMSTERDAM, NL LNKD-            DOI:10.1016/S0304-419X(03)00032-5,            vol. 1653, no. 2,            5 December 2003 (2003-12-05), pages 61-71,            XP004475892            ISSN: 0304-419X            the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-32
A	<p>WANG E ET AL: "Gene profiling of immune responses against tumors"            CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, OXFORD, GB LNKD-            DOI:10.1016/J.COI.2005.05.007,            vol. 17, no. 4,            1 August 2005 (2005-08-01), pages 423-427,            XP025299753            ISSN: 0952-7915 [retrieved on 2005-08-01]            the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-32

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2010/063751

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in 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/EP2010/063751**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.:  
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:

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional 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.:  
1-32 (partially)

**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 Application No. PCT/ EP2010/ 063751

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

Invention: 1; Claims: 1-32(partially)

Methods of characterising a patient as a responder or non-responder to a therapy comprising analysing (the differential expression of) the gene products of one or more genes of Table 1, wherein one gene is the first gene of Table 1; STAT1. Related uses, methods of treatment, microarrays, kits, compositions and solid surfaces.

---

Invention: 2; Claims: 1-32(partially)

As for Invention 1, but wherein one gene is the second gene of Table 1; PSMB9.

---

Inventions: 3-100; Claims: 1-32(partially)

As for Invention 1, but wherein one gene is respectively each of genes 3-100 of Table 1.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2010/063751

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007140958 A2	13-12-2007	AR 061136 A1 AU 2007256383 A1 CA 2653949 A1 CL 15712007 A1 EA 200802242 A1 EP 2032719 A2 EP 2258874 A1 JP 2009538607 T KR 20090017655 A PE 07422008 A1 US 2010021424 A1	06-08-2008 13-12-2007 13-12-2007 16-05-2008 28-08-2009 11-03-2009 08-12-2010 12-11-2009 18-02-2009 06-08-2008 28-01-2010
WO 2009068621 A1	04-06-2009	EP 2227558 A1 US 2010247580 A1	15-09-2010 30-09-2010
WO 2005108610 A2	17-11-2005	US 2007237717 A1	11-10-2007
WO 2009034055 A1	19-03-2009	CN 101821629 A EP 2191274 A1 US 2010167302 A1	01-09-2010 02-06-2010 01-07-2010
WO 2007124578 A1	08-11-2007	CA 2650507 A1 EP 2021534 A1 JP 2009538599 T US 2007264272 A1 US 2010248254 A1	08-11-2007 11-02-2009 12-11-2009 15-11-2007 30-09-2010

## 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 37/04	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 37/00	1 0 2

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

- (72) 発明者 プリシャール, ヴァンサン  
ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール リュ ドランスティテュ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72) 発明者 ディジエ, バンジャマン, ジョルジュ, エリー, レア, ジスラン  
ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール リュ ドランスティテュ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72) 発明者 グルセル, オリヴィエ  
ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール リュ ドランスティテュ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72) 発明者 ルアヘッド, ジャミラ  
ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール リュ ドランスティテュ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム
- (72) 発明者 ウロア - モントヤ, フェルナンド  
ベルギー ベー - 1 3 3 0 リクセンサール リュ ドランスティテュ 8 9 , グラクソスミスク  
ライン バイオロジカルズ ソシエテ アノニム

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA04 CA09 HA14  
4B029 AA07 AA23 BB20 CC01 FA15  
4B063 QA01 QQ53 QR08 QR55 QR62 QS25 QS34  
4C084 AA17 NA14 ZB09 ZB26  
4C085 AA03 BB01 EE01 EE06 FF24

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2013505008A5</a>	公开(公告)日	2013-11-07
申请号	JP2012529295	申请日	2010-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	葛兰素史密丝克莱恩生物有限公司		
申请(专利权)人(译)	葛兰素史克生物制品兴业ANONYME		
[标]发明人	ブリシャールヴァンサン ディジエバンジャマンジョルジュエリーレアジスラン グルセルオリヴィエ ルアヘッドジャミラ ウロアモントヤフェルナンド		
发明人	ブリシャール,ヴァンサン ディジエ,バンジャマン,ジョルジュ,エリー,レア,ジスラン グルセル,オリヴィエ ルアヘッド,ジャミラ ウロア-モントヤ,フェルナンド		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12M1/00 A61K45/00 A61P37/04 A61P35/00 A61K39/00 A61K39/39 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6809 C12Q2600/106		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C12N15/00.F C12M1/00.A A61K45/00 A61P37/04 A61P35/00 A61K39/00.H A61K39/39 G01N33/53.M G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB09 4C084/ZB26 4C085/AA03 4C085/BB01 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF24		
代理人(译)	荒井英一		
优先权	61/277046 2009-09-18 US 2009017457 2009-10-06 GB 61/278387 2009-10-06 US		
其他公开文献	JP2013505008A		

#### 摘要(译)

提供了基于一种或多种基因的差异表达来表征作为应答者或对治疗无应答者的患者的方法。还提供了基因表达谱，包含代表基因表达谱的核酸序列的微阵列，以及新的诊断试剂盒和治疗方法。所述试剂盒和方法涉及治疗例如癌症患者的特定群体，其特征在于其基因表达谱，其患有表达MAGE的肿瘤。

