

(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2006-516897

(P2006-516897A)

(43) 公表日 平成18年7月13日(2006.7.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	
G O 1 N 33/574 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 54 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-500964 (P2006-500964)	(71) 出願人	504345126
(86) (22) 出願日	平成16年1月14日 (2004.1.14)		ジェノミック ヘルス, インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成17年8月16日 (2005.8.16)		テッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/000985		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(87) 国際公開番号	W02004/065583		63, レッドウッド シティ, ペノ
(87) 国際公開日	平成16年8月5日 (2004.8.5)		ブスコット ドライブ 301
(31) 優先権主張番号	60/440,861	(71) 出願人	505266776
(32) 優先日	平成15年1月15日 (2003.1.15)		ラッシュ ユニバーシティ メディカル
(33) 優先権主張国	米国 (US)		センター
			アメリカ合衆国 イリノイ 60612,
			シカゴ, ダブリュー, ハリソン ス
			トリート 1725
		(74) 代理人	100078282
			弁理士 山本 秀策
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌予後診断のための遺伝子発現マーカー

(57) 【要約】

本発明は、遺伝子セットを提供し、この遺伝子セットの発現は、乳癌の診断および/または予後診断において重要である。1つの局面において、本発明は、乳癌患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法に関する。別の局面において、本発明は、浸潤性乳癌と診断された患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法に関する。さらなる局面において、本発明は、エストロゲンレセプター (ER) 陽性浸潤性乳癌と診断された患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法に関する。なお別の局面において、本発明は、エストロゲンレセプター (ER) 陰性浸潤性乳癌と診断された患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

乳癌患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法であって、該方法は、該患者より得られた乳癌組織サンプルにおける 1 つ以上の予後診断用 R N A 転写物もしくはそれらの発現産物の発現レベルであって、該乳癌組織サンプルにおける全ての R N A 転写物もしくはそれらの発現産物の発現レベルに対して、または R N A 転写物もしくはそれらの発現産物の基準セットの発現レベルに対して正規化される、発現レベルを決定する工程を包含し、ここで、該予後診断用 R N A 転写物は：

【化 1】

TP53BP2, GRB7, PR,

10

CD68, Bcl2, KRT14, IRS1, CTSL, EstR1, Chk1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, STK15, GSTM1, FHIT, RIZ1, AIB1, SURV, BBC3, IGF1R, p27, GATA3, ZNF217, EGFR, CD9, MYBL2, HIF1 α , pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, RAD51C, KRT19, TS, Her2, KLK10, β -カテニン, γ -カテニン, MCM2, PI3KC2A, IGF1, TBP, CCNB1, FBXO5, および DR5,

からなる群より選択される 1 つ以上の遺伝子の転写物であり、
ここで：

【化 2】

GRB7, CD68, CTSL, Chk1, AIB1, CCNB1,

20

MCM2, FBXO5, Her2, STK15, SURV, EGFR, MYBL2, HIF1 α , および TS

のうちの 1 つ以上の発現は、乳癌の再発がない長期生存の可能性の減少を示し、そして：

【化 3】

TP53BP2, PR, Bcl2, KRT14, EstR1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, KLK10, β -カテニン,
 γ -カテニン, DR5, PI3KCA2, RAD51C, GSTM1, FHIT, RIZ1, BBC3, TBP, p27, IRS1, IGF1R,
GATA3, ZNF217, CD9, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, IGF1, および KRT19

30

のうちの 1 つ以上の発現は、乳癌の再発がない長期生存の可能性の増加を示す、方法。

【請求項 2】

少なくとも 2 つの前記予後診断用 R N A 転写物またはそれらの発現産物の発現レベルを決定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも 5 つの前記予後診断用 R N A 転写物またはそれらの発現産物の発現レベルを決定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも 10 個の前記予後診断用 R N A 転写物またはそれらの発現産物の発現レベルを決定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 5】

少なくとも 15 個の前記予後診断用転写物またはそれらの発現産物の発現レベルを決定する工程を包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記乳癌が、浸潤性乳癌である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 1 つ以上の予後診断用 R N A 転写物の発現レベルが決定される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 R N A が、前記患者の、固定蠟包埋乳癌組織検体から単離される、請求項 1 に記載の

50

方法。

【請求項 9】

前記 R N A が、コア生検組織または細針吸引細胞から単離される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

アレイであって、以下の遺伝子：

【化 4】

α -カテニン, AIB1, AKT1, AKT2, β -アクチン, BAG1, BBC3, Bcl2, CCNB1, CCND1, CD68, CD9, CDH1, CEGP1, Chk1, CIAP1, cMet.2, コンティグ 27882, CTSL, DR5, EGFR, EIF4E, EPHX1, ErbB3, EstR1, FBXO5, FHIT1, FRP1, GAPDH, GATA3, G-カテニン, GRB7, GRO1, GSTM1, GUS, HER2, HIF1A, HNF3A, IGF1R, IGFBP2, KLK10, KRT14, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, マスピン, MCM2, MCM3, MDM2, MMP9, MTA1, MYBL2, P14ARF, p27, P53, PI3KC2A, PR, PRAME, pS2, RAD51C, RRB1, RIZ1, STK15, STMY3, SURV, TGFA, TOP2B, TP53BP2, TRAIL, TS, upa, VDR, VEGF, および ZNF217.

10

のうちの 2 つ以上にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、アレイ。

【請求項 11】

前記遺伝子のうちの少なくとも 3 つにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、請求項 10 に記載のアレイ。

20

【請求項 12】

前記遺伝子のうちの少なくとも 5 つにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、請求項 10 に記載のアレイ。

【請求項 13】

前記遺伝子のうちの少なくとも 10 個にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、請求項 10 に記載のアレイ。

【請求項 14】

請求項 10 に記載のアレイであって、以下の遺伝子：

【化 5】

TP53BP2, GRB7, PR, CD68, Bcl2, KRT14, IRS1, CTSL, EstR1, Chk1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, STK15, GSTM1, FHIT, RIZ1, AIB1, SURV, BBC3, IGF1R, p27, GATA3, ZNF217, EGFR, CD9, MYBL2, HIF1 α , pS2, RIZ1, ErbB3, TOP2B, MDM2, RAD51C, KRT19, TS, Her2, KLK10, β -カテニン, γ -カテニン, MCM2, PI3KC2A, IGF1, TBP, CCNB1, FBXO5 および DR5.

30

にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、アレイ。

【請求項 15】

前記ポリヌクレオチドが、cDNA である、請求項 10 または請求項 14 に記載のアレイ。

40

【請求項 16】

前記 cDNA が、約 500 塩基長～約 5000 塩基長である、請求項 15 に記載のアレイ。

【請求項 17】

前記ポリヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドである、請求項 10 または請求項 14 に記載のアレイ。

【請求項 18】

前記オリゴヌクレオチドが、約 20 塩基長～約 80 塩基長である、請求項 17 に記載のアレイ。

50

【請求項 19】

固体表面が、ガラスである、請求項 10 または請求項 14 に記載のアレイ。

【請求項 20】

約 330,000 個のオリゴヌクレオチドを含む、請求項 19 に記載のアレイ。

【請求項 21】

浸潤性乳癌と診断された患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法であって、以下の工程：

(1) 該患者より得られた乳癌組織サンプルにおける、以下：

【化 6 - 1】

- | | | |
|-----|---|----|
| (a) | TP53BP2, Bcl2, BAD, EPHX1, PDGFR β , DIABLO, XIAP, YB1, CA9, および KRT8; | 10 |
| (b) | GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, および WISP1; | |
| (c) | PR, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, IGFBP2, TIMP1, CA9, MMP9, および COX2; | |
| (d) | CD68, GRB7, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, および WISP1; | |
| (e) | Bcl2, TP53BP2, BAD, EPHX1, PDGFR β , DIABLO, XIAP, YB1, CA9, および KRT8; | |
| (f) | KRT14, KRT5, PRAME, TP53BP2, GUS1, AIB1, MCM3, CCNE1, MCM6, および ID1; | 20 |
| (g) | PRAME, TP53BP2, EstR1, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, および VEGFB; | |
| (h) | CTSL2, GRB7, TOP2A, CCNB1, Bcl2, DIABLO, PRAME, EMS1, CA9, および EpCAM; | |
| (i) | EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, および VEGFB; | |
| (k) | Chk1, PRAME, TP53BP2, GRB7, CA9, CTSL, CCNB1, TOP2A, 腫瘍サイズ, および IGFBP2; | 30 |
| (l) | IGFBP2, GRB7, PRAME, DIABLO, CTSL, β -カテニン, PPM1D, Chk1, WISP1, および LOT1; | |
| (m) | HER2, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, EPHX1, TOP2A, TRAIL, CA9, および AREG; | |
| (n) | BAG1, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNB1, PAI1, AREG, 腫瘍サイズ, CA9, および Ki67; | |
| (o) | CEGP1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, および AKT2, および FGF18; | 40 |

【化 6 - 2】

- (p) STK15, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNE1, AKT2, DIABLO, cMet, CCNE2, および COX2;
- (q) KLK10, EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, および BBC3;
- (r) AIB1, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, CD3, p53, CA9, GRB7, および EPHX1
- (s) BBC3, GRB7, CD68, PRAME, TOP2A, CCNB1, EPHX1, CTSL
GSTM1, および APC;
- (t) CD9, GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, CCNB1, CD3, DIABLO, ID1, および PPM1D;
- (w) EGFR, KRT14, GRB7, TOP2A, CCNB1, CTSL, Bcl2, TP, KLK10, および CA9;
- (x) HIF1 α , PR, DIABLO, PRAME, Chk1, AKT2, GRB7, CCNE1, TOP2A, および CCNB1;
- (y) MDM2, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, AIB1, TIMP1, CD3, p53, CA9, および HER2;
- (z) MYBL2, TP53BP2, PRAME, IL6, Bcl2, DIABLO, CCNE1, EPHX1, TIMP1, および CA9;
- (aa) p27, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, AKT2, および ID1;
- (ab) RAD51, GRB7, CD68, TOP2A, CIAP2, CCNB1, BAG1, IL6, FGFR1, および TP53BP2;
- (ac) SURV, GRB7, TOP2A, PRAME, CTSL, GSTM1, CCNB1, VDR, CA9; および CCNE2;
- (ad) TOP2B, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, TIMP1, AIB1, CA9, p53, KRT8, および BAD;
- (ae) ZNF217, GRB7, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, APC4, および β -カテニン,

10

20

からなる群より選択される遺伝子もしくは遺伝子セットのRNA転写物もしくは発現産物の発現レベルであって、該乳癌組織サンプルにおける全てのRNA転写物もしくはそれらの発現産物の発現レベルに対して、またはRNA転写物もしくはそれらの発現産物の基準セットの発現レベルに対して正規化される、発現レベルを決定する工程;

30

(2) 工程(1)において得られたデータを統計学的分析に供する工程; ならびに

(3) 該長期生存の可能性が、増加したかまたは減少したかを決定する工程、を包含する、方法。

【請求項 22】

エストロゲンレセプター(ER)陽性浸潤性乳癌と診断された患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法であって、以下の工程:

(1) 以下:

40

【化 7】

CD68;

CTSL; FBXO5; SURV; CCNB1; MCM2; Chk1; MYBL2; HIF1A; cMET; EGFR; TS;
STK15, IGFR1; BCL2; HNF3A; TP53BP2; GATA3; BBC3; RAD51C; BAG1; IGFBP2; PR;
CD9; RB1; EPHX1; CEGP1; TRAIL; DR5; p27; p53; MTA; RIZ1; ErbB3; TOP2B; EIF4B,

からなる群より選択される遺伝子セットの遺伝子のRNA転写物もしくは発現産物の発現レベルを決定する工程であって、ここで、ER陽性癌における以下の遺伝子:

【化 8】

CD68; CTSL; FBXO5;

SURV; CCNB1; MCM2; Chk1; MYBL2; HIF1A; cMET; EGFR; TS; STK15,

の発現は、手術後の癌の再発がない生存の可能性の減少を示し、そして、以下の遺伝子：

【化 9】

IGFR1; BCL2; HNF3A; TP53BP2; GATA3; BBC3;

RAD51C; BAG1; IGFBP2; PR; CD9; RB1; EPHX1; CEGP1; TRAIL; DR5; p27; p53; MTA;

RIZ1; ErbB3; TOP2B; EIF4E.

10

の発現は、手術後の癌の再発がない生存についてのより良い予後診断用を示す、工程；

(2) 工程(1)において得られたデータを統計学的分析に供する工程；ならびに

(3) 該長期生存の可能性が、増加したかまたは減少したかを決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項 23】

前記統計学的分析が、コックス比例ハザードモデルを使用して行われる、請求項 21 または請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

エストロゲンレセプター (ER) 陰性浸潤性乳癌と診断された患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法であって、以下の遺伝子セット：

20

【化 10 - 1】

CCND1; UPA; HNF3A; CDH1; Her2; GRB7;

AKT1; STMY3; α -カテニン; VDR; GRO1; KT14; KLK10; マスピン, TGF α , および FRP1,

の遺伝子の RNA 転写物もしくは発現産物の発現レベルを決定する工程であって、ここで、以下の遺伝子：

【化 10 - 2】

CCND1; UPA; HNF3A; CDH1; Her2; GRB7; AKT1; STMY3; α -カテニン;

VDR; GRO1,

30

の発現は、癌の再発がない生存の可能性の減少を示し、そして以下の遺伝子：

【化 10 - 3】

KT14; KLK10; マスピン, TGF α , および FRP1.

の発現が、癌の再発がない生存についてのより良い予後を示す、工程を包含する、方法。

【請求項 25】

患者についての個人化ゲノムプロファイルを作成する方法であって、以下の工程：

(a) 該患者より得られた乳房組織から抽出された RNA を遺伝子発現分析に供する工程；

40

(b) 表 1 ~ 表 5 のいずれか 1 つに列挙される乳癌遺伝子セットから選択される 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、ここで、該発現レベルは、制御遺伝子に対して正規化され、必要に応じて、乳癌基準組織セットにおいて見出される量と比較される、工程；および

(c) 該遺伝子発現分析によって得られたデータを要約する報告書を作成する工程、を包含する、方法。

【請求項 26】

前記乳房組織が、乳癌細胞を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記乳房組織が、固定パラフィン包埋生検サンプルから得られる、請求項 26 に記載の方

50

法。

【請求項 28】

前記 RNA が、フラグメント化される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記報告書が、前記患者の長期生存の可能性の予測を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 30】

前記報告書が、前記患者の処置様式についての推奨を含む、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 31】

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による表 5 A および表 5 B に列挙される遺伝子の増幅のための方法であって、表 5 A および表 5 B に列挙されるアンプリコンならびに表 6 A ~ 表 6 F に列挙されるプライマー - プロブのセットを使用することによって、該 PCR を行う工程を包含する、方法。 10

【請求項 32】

表 5 A および表 5 B に列挙される、PCR アンプリコン。

【請求項 33】

表 6 A ~ 表 6 F に列挙される、PCR プライマー - プロブのセット。

【請求項 34】

予後診断方法であって、以下：

(a) 患者より得られた乳癌細胞を含むサンプルを、以下：

【化 11】 20

GRB7, CD68, CTSL, Chk1, AIB1, CCNB1,

MCM2, FBXO5, Her2, STK15, SURV, EGFR, MYBL2, HIF1 α , および TS,

からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子の RNA 転写物またはそれらの産物の発現レベルの定量分析に供する工程、および

(b) 該遺伝子またはそれらの産物の正規化された発現レベルが規定の発現閾値より上に上昇する場合、乳癌の再発がない長期生存の可能性の減少を有する可能性が高いと該患者を同定する工程、
を包含する、方法。 30

【請求項 35】

予後診断方法であって、以下：

(a) 患者より得られた乳癌細胞を含むサンプルを、以下：

【化 12】

TP53BP2, PR, Bcl2, KRT14, EstR1, IGFBP2,

BAG1, CEGP1, KLK10, β -カテニン, γ -カテニン, DR5, PI3KCA2, RAD51C, GSTM1, FHIT,

RIZ1, BBC3, TBP, p27, IRS1, IGF1R, GATA3, ZNF217, CD9, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2,

IGF1, および KRT19, 40

からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子の RNA 転写物の発現レベルの定量分析に供する工程、および

(b) 該遺伝子またはそれらの産物の正規化された発現レベルが規定の発現閾値より上に上昇する場合、乳癌の再発がない長期生存の可能性の増加を有する可能性が高いと該患者を同定する工程、
を包含する、方法。

【請求項 36】

前記遺伝子の RNA 転写物のレベルが、2 つ以上のハウスキーピング遺伝子の RNA 転写物または産物の平均レベルと比較して正規化される、請求項 1 に記載の方法。 50

【請求項 37】

前記ハウスキーピング遺伝子が、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (G A P D H)、C y p 1、アルブミン、アクチン、チューブリン、シクロフィリンヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (H R P T)、L 3 2、2 8 S、および 1 8 S からなる群より選択される、請求項 34 または請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

前記サンプルが、検出限界の上に存在する全ての遺伝子の包括的遺伝子発現分析に供される、請求項 34 または請求項 35 に記載の方法。

【請求項 39】

前記遺伝子の R N A 転写物のレベルが、アッセイされた遺伝子の全てまたはその一部の R N A 転写物または産物の平均シグナルと比較して正規化される、請求項 37 に記載の方法。 10

【請求項 40】

前記 R N A 転写物のレベルが、定量 R T - P C R (q R T - P C R) によって決定され、そして前記シグナルが、C t 値である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

前記アッセイされた遺伝子が、少なくとも 50 の癌関連遺伝子を含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 42】

前記アッセイされた遺伝子が、少なくとも 100 の癌関連遺伝子を含む、請求項 39 に記載の方法 20

【請求項 43】

前記患者が、ヒトである、請求項 34 または請求項 35 に記載の方法。

【請求項 44】

前記サンプルが、固定パラフィン包埋組織 (F P E T) サンプルであるか、または新鮮組織サンプルもしくは凍結組織サンプルである、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 45】

前記サンプルが、細針生検、コア生検、または他の型の生検由来の組織サンプルである、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 46】

前記定量分析が、q R T - P C R によって行われる、請求項 42 に記載の方法。 30

【請求項 47】

前記定量分析が、前記遺伝子産物を定量することによって行われる、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 48】

前記産物が、免疫組織化学またはプロテオミクス技術によって定量される、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 49】

前記患者が、乳癌の再発がない長期生存の可能性の減少を有することを示す報告書を作成する工程をさらに包含する、請求項 34 に記載の方法。 40

【請求項 50】

前記患者が乳癌の再発がない長期生存の可能性の増加を有することを示す、報告書を作成する工程をさらに包含する、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 51】

キットであって、請求項 1、34 および 35 のいずれか 1 項に記載の方法を行うのに適切な、(1) 抽出用緩衝液 / 試薬およびプロトコル ; (2) 逆転写用緩衝液 / 試薬およびプロトコル ; ならびに (3) q P C R 用緩衝液 / 試薬およびプロトコル、のうちの 1 つ以上を備える、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

(発明の背景)

(発明の分野)

本発明は、遺伝子および遺伝子セットを提供し、この遺伝子および遺伝子セットの発現は、乳癌の診断および / または予後診断において重要である。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

(従来技術の説明)

癌専門医は、癌専門医にとって利用可能である多くの処置選択肢を有し、これらの処置選択肢としては、「治療基準」として特徴付けられる化学療法薬物との種々の組み合わせと特定の癌についてラベルクレームを保有しないが、その癌における効力の証拠がある多くの薬物が挙げられる。良い処置結果となる可能性が最も高くなるには、患者が最適の利用可能な癌処置をされ、かつ、この処置が診断後可能な限り早く行われることを必要とする。

10

【 0 0 0 3 】

現在のところ、臨床診断において使用される診断試験は、単一分析物であり、従ってこの診断試験は、数十の異なるマーカー間の関係を知ることについての潜在的価値を獲得しない。さらに、診断試験は、しばしば定量的でなく、免疫組織化学に依存している。この方法は、多くの場合、異なる検査室において異なる結果を生じ、このことは一部に、試薬が規格化されていないからであり、そして一部に、解釈が主観的であり、容易に定量化し得ないからである。RNAベースの試験は、時間に伴うRNA分解の問題から、および分析のために患者から新鮮組織サンプルを得ることが難しいという事実から、あまり使用されていない。固定パラフィン包埋組織は、より容易に利用可能であり、固定組織においてRNAを検出するために、方法が確立されている。しかし、これらの方法は、代表的には、少量の材料由来の多数の遺伝子 (DNA または RNA) の研究を可能にしない。従って、伝統的に、固定組織は、タンパク質の免疫組織化学検出のため以外には、めったに使用されていない。

20

【 0 0 0 4 】

最近、いくつかのグループが、マイクロアレイ遺伝子発現分析による種々の癌型の分類に関する研究を発表した (例えば、Golubら、Science 286:531-537 (1999); Bhattacharjاءら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:13790-13795 (2001); Chen-Hsiangら、Bioinformatics 17 (補遺1): S316-S322 (2001); Ramaswamyら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:15149-15154 (2001) を参照のこと)。遺伝子発現パターンに基づくヒト乳癌の特定の分類もまた、報告されている (Martinら、Cancer Res. 60:2232-2238 (2000)、Westら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:11462-11467 (2001); Sorlieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:10869-10874 (2001); Yanら、Cancer Res. 61:8375-8380 (2001))。しかし、これらの研究は、大部分は、種々の型の癌 (乳癌を含む) のすでに確立された分類を改善および細分することに集中しており、そして一般的には、差次的に発現された遺伝子の関係への新たな洞察を提供せず、癌治療の臨床結果を改善させるための処置戦略に対する知見に結びつかない。

30

40

【 0 0 0 5 】

現代の分子生物学および生化学は、その遺伝子の活性が、腫瘍細胞の挙動、腫瘍細胞の分化の状態、および特定の治療薬に対する腫瘍細胞の感受性または耐性に影響を与える、何百もの遺伝子を明らかにしているが、いくつかの例外があるものの、これらの遺伝子の状態は、薬物処置について慣用的に臨床決定をする目的のためには活用されていない。1つの注目すべき例外は、乳癌におけるエストロゲンレセプター (ER) タンパク質発現の

50

使用であり、抗エストロゲン薬（例えば、タモキシフェン）による処置のための患者を選択する。別の例外的な例は、乳癌におけるErbB2（Her2）タンパク質発現の使用であり、Her2アンタゴニスト薬Herceptin（登録商標）（Genentech, Inc., South San Francisco, CA）を用いる患者を選択する。

【0006】

最近の進歩にも拘らず、癌処置の課題は、病原が異なる腫瘍型に対する特定の処置レジメンを標的にし、そして最終的には、結果を最大限にするために腫瘍処置を個人化することにとどまる。従って、種々の処置選択肢に対する患者の応答に関する予測的情報を同時に提供する試験についての必要性が存在する。これは、その生態がほとんど理解されていない、乳癌について特に当てはまる。いくつかのサブグループ（例えば、ErbB2⁺サブグループ）ならびにエストロゲンレセプター（ER）およびいくつかのさらなる転写因子の低～存在しない遺伝子発現によって特徴付けられるサブグループ（Perouら、Nature 406: 747-752 (2000)）への乳癌の分類は、乳癌の細胞異質性および分子異質性を反映せず、そして患者の応答を最大限にする処置戦略の設計を可能にしないことが明らかである。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0007】

（発明の要旨）

20

本発明は、遺伝子のセットを提供し、この遺伝子セットの発現は、特に病気を有さない生存に関して、予後診断の価値を有する。

【0008】

本発明は、上記セットにおける全てのマーカーのアッセイのために保管されたパラフィン包埋生検材料の使用を提供し、従って本発明は、最も広範に利用可能な型の生検材料に適合する。本発明はまた、例えば、コア生検または細針吸引を介した、腫瘍組織収集のいくつかの異なる方法に適合する。さらに、上記遺伝子セットの各メンバーについて、本発明は、試験に使用され得るオリゴヌクレオチド配列を特定する。

【0009】

1つの局面において、本発明は、乳癌患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法に関し、この方法は、上記患者より得られた乳癌組織サンプルにおける1つ以上の予後診断用RNA転写物もしくはそれらの発現産物の発現レベルであって、この乳癌組織サンプルにおける全てのRNA転写物もしくはそれらの発現産物の発現レベルに対して、またはRNA転写物もしくはそれらの発現産物の基準セットの発現レベルに対して正規化される、発現レベルを決定する工程を包含し、ここで、この予後診断用RNA転写物は：

30

【0010】

【化13】

TP53BP2, GRB7, PR, CD68, Bcl2, KRT14, IRS1, CTSL, EstR1, Chk1, IGF1R, p27, IGFBP2, BAG1, CEGP1, STK15, GSTM1, FHIT, RIZ1, AIB1, SURV, BBC3, IGF1R, p27, GATA3, ZNF217, EGFR, CD9, MYBL2, HIF1 α , pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, RAD51C, KRT19, TS, Her2, KLK10, β -カテニン, γ -カテニン, MCM2, PI3KC2A, IGF1, TBP, CCNB1, FBXO5, および DR5,

40

からなる群より選択される1つ以上の遺伝子の転写物であり、

ここで：

【0011】

【化 1 4】

GRB7, CD68, CTSL, Chk1, AIB1, CCNB1,

MCM2, FBXO5, Her2, STK15, SURV, EGFR, MYBL2, HIF1 α , および TS

のうちの 1 つ以上の発現は、乳癌の再発がない長期生存の可能性の減少を示し、そして：

【0 0 1 2】

【化 1 5】

TP53BP2, PR, Bcl2, KRT14, EstR1, IGFBP2,

BAG1, CEGP1, KLK10, β -カテニン, γ -カテニン, DR5, PI3KCA2, RAD51C, GSTM1, FHIT,

10

RIZ1, BBC3, TBP, p27, IRS1, IGF1R, GATA3, ZNF217, CD9, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2,

IGF1, および KRT19

のうちの 1 つ以上の発現は、乳癌の再発がない長期生存の可能性の増加を示す。

【0 0 1 3】

特定の実施形態において、少なくとも 2 つの、または少なくとも 5 つの、または少なくとも 10 個の、または少なくとも 15 個の予後診断用 RNA 転写物もしくはそれらの発現産物の発現レベルが決定される。別の実施形態において、この方法は、全ての予後診断用 RNA 転写物またはそれらの発現産物の発現レベルの決定を包含する。

【0 0 1 4】

20

別の特定の実施形態において、乳癌は、浸潤性乳癌である。

【0 0 1 5】

さらなる実施形態において、RNA は、患者の固定蠟包埋乳癌組織標本から単離される。単離は、例えば、コア生検組織または細針吸引細胞から、当該分野で公知の任意の技術によって行われ得る。

【0 0 1 6】

別の局面において、本発明は、以下の遺伝子：

【0 0 1 7】

【化 1 6】

 α -カテニン, AIB1, AKT1, AKT2, β -アクチン,

30

BAG1, BBC3, Bcl2, CCNB1, CCND1, CD68, CD9, CDH1, CEGP1, Chk1, CIAP1, cMet.2, コンティグ27882, CTSL, DR5, EGFR, EIF4E, EPHX1, ErbB3, EstR1, FBXO5, FHIT1 FRP1,

GAPDH, GATA3, G-カテニン, GRB7, GRO1, GSTM1, GUS, HER2, HIF1A, HNF3A,

IGF1R, IGFBP2, KLK10, KRT14, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, マスピン, MCM2,

MCM3, MDM2, MMP9, MTA1, MYBL2, P14ARF, p27, P53, PI3KC2A, PR, PRAME, pS2,

RAD51C, 3RB1, RIZ1, STK15, STMY3, SURV, TGFA, TOP2B, TP53BP2, TRAIL, TS,

upa, VDR, VEGF, および ZNF217.

40

の 2 つ以上にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含むアレイに関する。

【0 0 1 8】

特定の実施形態において、このアレイは、上に列挙される遺伝子のうち、少なくとも 3 つ、もしくは少なくとも 5 つ、もしくは少なくとも 10 個、もしくは少なくとも 15 個、もしくは少なくとも 20 個、または全ての遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

【0 0 1 9】

別の特定の実施形態において、このアレイは、以下：

【0 0 2 0】

【化 1 7】

TP53BP2, GRB7, PR, CD68, Bcl2, KRT14, IRS1, CTSL, EstR1, Chk1, IGFBP2, BAG1, CEGP1, STK15, GSTM1, FHIT, RIZ1, AIB1, SURV, BBC3, IGF1R, p27, GATA3, ZNF217, EGFR, CD9, MYBL2, HIF1 α , pS2, RIZ1, ErbB3, TOP2B, MDM2, RAD51C, KRT19, TS, Her2, KLK10, β -カテニン, γ -カテニン, MCM2, PI3KC2A, IGF1, TBP, CCNB1, FBXO5 および DR5.

の遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

【0 0 2 1】

10

このポリヌクレオチドは、cDNA、またはオリゴヌクレオチドであり得、そしてこれらが提示される固体表面は、例えば、ガラスであり得る。

【0 0 2 2】

別の局面において、本発明は、浸潤性乳癌と診断された患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法に関し、この方法は、以下の工程：

(1) 上記患者より得られた乳癌組織サンプルにおける、以下：

【0 0 2 3】

【化 1 8 - 1】

- (a) TP53BP2, Bcl2, BAD, EPHX1, PDGFR β , DIABLO, XIAP, YB1, CA9, および KRT8;
- (b) GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, および WISP1;
- (c) PR, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, IGFBP2, TIMP1, CA9, MMP9, および COX2;
- (d) CD68, GRB7, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, および WISP1;
- (e) Bcl2, TP53BP2, BAD, EPHX1, PDGFR β , DIABLO, XIAP, YB1, CA9, および KRT8;
- (f) KRT14, KRT5, PRAME, TP53BP2, GUS1, AIB1, MCM3, CCNE1, MCM6, および ID1;

20

【0 0 2 4】

【化 18 - 2】

- (g) PRAME, TP53BP2, EstR1, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, および VEGFB;
- (h) CTSL2, GRB7, TOP2A, CCNB1, Bcl2, DIABLO, PRAME, EMS1, CA9, および EpCAM;
- (i) EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, および VEGFB;
- (k) Chk1, PRAME, TP53BP2, GRB7, CA9, CTSL, CCNB1, TOP2A, 腫瘍サイズ, および IGFBP2; 10
- (l) IGFBP2, GRB7, PRAME, DIABLO, CTSL, β -カテニン, PPM1D, Chk1, WISP1, および LOT1;
- (m) HER2, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, EPHX1, TOP2A, TRAIL, CA9, および AREG;
- (n) BAG1, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNB1, PAI1, AREG, 腫瘍サイズ, CA9, および Ki67;
- (o) CEGPi, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, および AKT2, および FGF18; 20
- (p) STK15, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNE1, AKT2, DIABLO, cMet, CCNE2, および COX2;
- (q) KLK10, EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, および BBC3;
- (r) AIB1, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, CD3, p53, CA9, GRB7, および EPHX1
- (s) BBC3, GRB7, CD68, PRAME, TOP2A, CCNB1, EPHX1, CTSL GSTM1, および APC;
- (t) CD9, GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, CCNB1, CD3, DIABLO, ID1, および PPM1D; 30
- (w) EGFR, KRT14, GRB7, TOP2A, CCNB1, CTSL, Bcl2, TP, KLK10, および CA9;
- (x) HIF1 α , PR, DIABLO, PRAME, Chk1, AKT2, GRB7, CCNE1, TOP2A, および CCNB1;
- (y) MDM2, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, AIB1, TIMP1, CD3, p53, CA9, および HER2;
- (z) MYBL2, TP53BP2, PRAME, IL6, Bcl2, DIABLO, CCNE1, EPHX1, TIMP1, および CA9;
- (aa) p27, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, AKT2, および ID1;
- (ab) RAD51, GRB7, CD68, TOP2A, CIAP2, CCNB1, BAG1, IL6, FGFR1, および TP53BP2;
- (ac) SURV, GRB7, TOP2A, PRAME, CTSL, GSTM1, CCNB1, VDR, CA9; および CCNE2; 40
- (ad) TOP2B, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, TIMP1, AIB1, CA9, p53, KRT8, および BAD;

【 0 0 2 5 】

【化 18 - 3】

- (ae) ZNF217, GRB7, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, APC4, および β -カテニン,

の発現レベルであって、上記乳癌組織サンプルにおける全てのRNA転写物もしくはそれらの発現産物の発現レベルに対して、またはRNA転写物もしくはそれらの発現産物の基準セットの発現レベルに対して正規化される、発現レベルを決定する工程；

(2) 工程(1)において得られたデータを統計学的分析に供する工程；ならびに

(3) 上記長期生存の可能性が、増加したかまたは減少したかどうかを決定する工程、を包含する。

【0026】

さらなる局面において、本発明は、エストロゲンレセプター(ER)陽性浸潤性乳癌と診断された患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法に関し、この方法は、以下の工程：

(1) 以下：

【0027】

【化19-1】

CD68; CTSL; FBXO5;

SURV; CCNB1; MCM2; Chk1; MYBL2; HIF1A; cMET; EGFR; TS; STK15; IGFR1; BCL2;

HNF3A; TP53BP2; GATA3; BBC3; RAD51C; BAG1; IGFBP2; PR; CD9; RB1; EPHX1;

CEGP1; TRAIL; DR5; p27; p53; MTA; RIZ1; ErbB3; TOP2B; EIF4E,

からなる群より選択される遺伝子セットの遺伝子のRNA転写物もしくは発現産物の発現レベルを決定する工程であって、ここで、ER陽性癌における以下の遺伝子：

【0028】

【化19-2】

CD68; CTSL; FBXO5; SURV; CCNB1;

MCM2; Chk1; MYBL2; HIF1A; cMET; EGFR; TS; STK15,

の発現は、手術後の癌の再発がない生存の可能性の減少を示し、そして、以下の遺伝子：

【0029】

【化20】

IGFR1; BCL2; HNF3A; TP53BP2; GATA3; BBC3; RAD51C; BAG1;

IGFBP2; PR; CD9; RB1; EPHX1; CEGP1; TRAIL; DR5; p27; p53; MTA; RIZ1; ErbB3;

TOP2B; EIF4E.

の発現は、手術後の癌の再発がない生存についてのより良い予後診断用を示す、工程；

(2) 工程(1)において得られたデータを統計学的分析に供する工程；ならびに

(3) この長期生存の可能性が、増加したかまたは減少したかを決定する工程、を包含する。

【0030】

なお別の局面において、本発明は、エストロゲンレセプター(ER)陰性浸潤性乳癌と診断された患者の、乳癌の再発がない長期生存の可能性を予測する方法に関し、この方法は、以下の遺伝子セットの遺伝子：

【0031】

【化21】

CCND1; UPA;

HNF3A; CDH1; Her2; GRB7; AKT1; STMY3; α -カテニン; VDR; GRO1; KT14; KLK10;

マスピン, TGF α , および FRP1,

のRNA転写物または発現産物の発現レベルを決定する工程を包含し、ここで、以下の遺伝子：

10

20

30

40

50

【 0 0 3 2 】

【 化 2 2 - 1 】

CCND1; UPA; HNF3A; CDH1;

Her2; GRB7; AKT1; STMY3; α -カテニン; VDR; GRO1,

の発現は、癌の再発がない生存の可能性の減少を示し、そして以下の遺伝子：

【 0 0 3 3 】

【 化 2 2 - 2 】

KT14; KLK10; マスピン, TGF α , および FRP1.

10

の発現は、癌の再発がない生存についてのより良い予後を示す。

【 0 0 3 4 】

異なる局面において、本発明は、患者についての個人化ゲノムプロファイルを作成する方法に関し、この方法は、以下の工程：

(a) 上記患者より得られた乳房組織から抽出された R N A を遺伝子発現分析に供する工程；

(b) 表 1 ~ 表 5 のいずれか 1 つに列挙される乳癌遺伝子セットから選択される 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、ここで、この発現レベルは、制御遺伝子に対して正規化され、そして必要に応じて、乳癌基準組織セットにおいて見出される量と比較される、工程；および

20

(c) この遺伝子発現分析によって得られたデータを要約する報告書を作成する工程、を包含する。

【 0 0 3 5 】

この報告書は、例えば、患者の長期生存の可能性の予測および / またはこの患者の処置様式についての推奨を含み得る。

【 0 0 3 6 】

さらなる局面において、本発明は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) による表 5 A および表 5 B に列挙される遺伝子の増幅のための方法に関し、この方法は、表 5 A および表 5 B に列挙されるアンプリコンならびに表 6 A ~ 表 6 F に列挙されるプライマー - プローブのセットを使用することによって、この P C R を行う工程を包含する。

30

【 0 0 3 7 】

よりさらなる局面において、本発明は、表 5 A および表 5 B に列挙される、P C R アンプリコンに関する。

【 0 0 3 8 】

なお別の局面において、本発明は、表 6 A ~ 表 6 F に列挙される、P C R プライマー - プローブのセットに関する。

【 0 0 3 9 】

本発明は、さらに予後診断法に関し、この予後診断法は、以下：

(a) 患者より得られた乳癌細胞を含むサンプルを、以下：

40

【 0 0 4 0 】

【 化 2 3 】

GRB7, CD68, CTSL, Chk1, AIB1, CCNB1, MCM2,

FBXO5, Her2, STK15, SURV, EGFR, MYBL2, HIF1 α , および TS,

からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子の R N A 転写物またはそれらの産物の発現レベルの定量分析に供する工程、および

(b) 上記遺伝子またはそれらの産物の正規化された発現レベルが規定の発現閾値より上に上昇する場合、乳癌の再発がない長期生存の可能性の減少を有する可能性が高いと該

50

患者を同定する工程、
を包含する。

【 0 0 4 1 】

異なる局面において、本発明は、さらに予後診断法に関し、この予後診断法は、以下：

(a) 患者より得られた乳癌細胞を含むサンプルを、以下：

【 0 0 4 2 】

【 化 2 4 】

TP53BP2, PR, Bcl2, KRT14, EstR1, IGFBP2, BAG1,
CEGP1, KLK10, β -カテニン, γ -カテニン, DR5, PI3KCA2, RAD51C, GSTM1, FHIT, RIZ1,
BBC3, TBP, p27, IRS1, IGF1R, GATA3, ZNF217, CD9, pS2, ErbB3, TOP2B, MDM2, IGF1,
および KRT19,

10

からなる群より選択される少なくとも 1 つの遺伝子の R N A 転写物の発現レベルの定量分析に供する工程、および

(b) 上記遺伝子またはそれらの産物の正規化された発現レベルが規定の発現閾値より上に上昇する場合、乳癌の再発がない長期生存の可能性の増加を有する可能性が高いと患者を同定する工程、
を包含する。

【 0 0 4 3 】

本発明は、さらにキットに関し、このキットは、上記方法のいずれかを行うのに適切な、(1) 抽出用緩衝液 / 試薬およびプロトコル；(2) 逆転写用緩衝液 / 試薬およびプロトコル；ならびに(3) q P C R 用緩衝液 / 試薬およびプロトコルのうちの 1 つ以上を備える。

20

【 0 0 4 4 】

(図面の簡単な説明)

表 1 は、遺伝子の一覧であり、これらの遺伝子の発現は、乳癌生存に関する。遡及的臨床試験からの結果。二元統計学的分析 (B i n a r y s t a t i s t i c a l a n a l y s i s) 。

【 0 0 4 5 】

表 2 は、遺伝子の一覧であり、これらの遺伝子の発現は、エストロゲンレセプター (E R) 陽性患者における乳癌生存に関する。遡及的臨床試験からの結果。二元統計学的分析。

30

【 0 0 4 6 】

表 3 は、遺伝子の一覧であり、これらの遺伝子の発現は、エストロゲンレセプター (E R) 陰性患者における乳癌生存に関する。遡及的臨床試験からの結果。二元統計学的分析。

【 0 0 4 7 】

表 4 は、遺伝子の一覧であり、これらの遺伝子の発現は、乳癌生存に関する。遡及的臨床試験からの結果。コックス比例ハザード統計学的分析。

40

【 0 0 4 8 】

表 5 A および表 5 B は、遺伝子の一覧を示し、これらの遺伝子の発現は、乳癌生存に関する。遡及的臨床試験からの結果。この表は、遺伝子についての登録番号、および P C R 増幅に使用されるアンプリコン配列を含む。

【 0 0 4 9 】

表 6 A ~ 表 6 B は、表 5 A ~ 表 5 B に列挙されるアンプリコンの P C R 増幅に使用される、フォワードプライマーおよびリバースプライマー (それぞれ、 f および r) で示される)、ならびにプローブ (p) で示される) についての配列を含む。

【 0 0 5 0 】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

50

(A. 定義)

他に規定されない限り、本明細書中で使用される科学技術用語は、本発明が属する分野の当業者によって、一般的に理解されるものと同一の意味を有する。Singletonら, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第2版, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994), および March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 第4版, John Wiley & Sons (New York, NY 1992) は、本出願において使用される多くの用語の一般的な指針を、当業者に提供する。

【0051】

10

当業者は、本明細書中に記載されるものと類似または同等である多くの方法および物質（これらは、本発明の実施において使用され得る）を認識する。実際、本発明は、決して記載される方法および物質に限定されない。本発明の目的のために、次の用語が、以下に規定される。

【0052】

用語「マイクロアレイ」は、基板上にハイブリダイズ可能なアレイエレメント（好ましくは、ポリヌクレオチドプローブ）の順序付けられた配列物を言う。

【0053】

用語「ポリヌクレオチド」は、単数または複数で使用された場合、概して、任意のポリリボヌクレオチドまたはポリデオキシリボヌクレオチドを言い、これらは、非修飾のRNAもしくはDNA、または修飾されたRNAもしくはDNAであり得る。従って、例えば、本明細書中で規定されるようなポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖のDNA、一本鎖および二本鎖の領域を含むDNA、一本鎖および二本鎖のRNA、ならびに一本鎖および二本鎖の領域を含むRNA、一本鎖もしくは、より代表的には、二本鎖であり得るか、または一本鎖および二本鎖の領域を含み得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、用語「ポリヌクレオチド」は、本明細書中で使用される場合、RNAもしくはDNA、またはRNAおよびDNAの両方を含む三本鎖領域を言う。このような領域内の鎖は、同一分子または異なる分子由来であり得る。これらの領域は、全ての1つ以上の分子を含み得るが、より代表的には、いくつかの分子の領域しか含まない。三重らせん領域の分子のうちの1つは、しばしば、オリゴヌクレオチドである。具体的には、用語「ポリヌクレオチド」は、cDNAを含む。この用語は、1つ以上の修飾された塩基を含む、DNA（cDNAを含む）およびRNAを含む。従って、安定性または他の理由により修飾された骨格を有するDNAまたはRNAが、この用語が本明細書中で意図される「ポリヌクレオチド」である。さらに、異常な塩基（例えば、イノシン）、または修飾された塩基（例えば、トリチウム化塩基）を含むDNAまたはRNAは、本明細書中で規定されるような用語「ポリヌクレオチド」の範囲内に含まれる。概して、用語「ポリヌクレオチド」は、非修飾のポリヌクレオチドの、全ての化学的、酵素学的および/または代謝的に修飾された形態ならびにウイルスおよび細胞（単細胞および複合細胞を含む）に特徴的なDNAおよびRNAの化学的形態を含む。

40

【0054】

用語「オリゴヌクレオチド」は、比較的短いポリヌクレオチドを言い、比較的短いポリヌクレオチドとしては、一本鎖デオキシリボヌクレオチド、一本鎖リボヌクレオチドまたは二本鎖リボヌクレオチド、RNA:DNAハイブリッドおよび二本鎖DNAが挙げられるが、これらに限定されない。一本鎖DNAプローブオリゴヌクレオチドのようなオリゴヌクレオチドは、例えば、市販の自動オリゴヌクレオチド合成装置を使用する化学的方法によって、しばしば合成される。しかしながら、オリゴヌクレオチドは、種々の他の方法（インビトロ組換えDNA媒介性技術および細胞および生物体におけるDNAの発現による）によって作製され得る。

【0055】

用語「差次的に発現される遺伝子」、「差次的な遺伝子発現」およびそれらの同義語（

50

これらは、交換可能に使用される)は、遺伝子発現が、正常な被験体またはコントロールの被験体における発現と比較して、疾患、特に癌(例えば、乳癌)を罹患した被験体において、より高いかまたはより低いレベルに活性化された遺伝子を含む。この用語はまた、遺伝子発現が、同一の疾患の異なる段階でより高いまたは低いレベルに活性化された遺伝子と言う。差次的に発現される遺伝子は、核酸レベルもしくはタンパク質レベルで活性化または阻害のいずれかがなされてもよく、または選択的スプライシングを受けて種々のポリペプチド産物を生じてもよいこともまた、理解される。このような差異は、例えば、mRNAレベル、ポリペプチドの表面発現、分泌または他の分割(partitioning)における変化によって証明され得る。差次的な遺伝子発現としては、2つ以上の遺伝子もしくはそれらの遺伝子産物間の発現の比較、または2つ以上の遺伝子もしくはそれらの遺伝子産物間の発現の比の比較、またはさらに、同一遺伝子の2つの異なってプロセスされた産物(これらは、正常な被験体と疾患(特に癌)を罹患した被験体との間、または同一の疾患の種々の段階の間で異なる)の比較が挙げられ得る。差次的な発現としては、例えば、正常細胞と病的細胞との間、または種々の疾患事象もしくは疾患段階を被った細胞間で、遺伝子もしくはその発現産物における、時間的発現パターンまたは細胞性発現パターンの量的差異および質的差異の両方が挙げられる。本発明の目的のために、正常な被験体および罹患した被験体において、または罹患した被験体における疾患発生の種々の段階において、所定の遺伝子の発現の間で、少なくとも約2倍、好ましくは、少なくとも約4倍、より好ましくは、少なくとも約6倍、最も好ましくは、少なくとも約10倍の差異がある場合、「差次的遺伝子発現」が、存在すると考えられる。

10

20

【0056】

語句「遺伝子増幅」は、遺伝子または遺伝子フラグメントの複数のコピーが、特定の細胞または細胞株において形成されるプロセスを言う。重複領域(増幅されるDNAの伸長)は、しばしば、「アンプリコン」として呼ばれる。通常、産生されるメッセンジャーRNA(mRNA)の量(すなわち、遺伝子発現のレベル)はまた、特定の発現遺伝子から作製されるコピー数の比率において増加する。

【0057】

用語「診断」は、分子または病理学的状態、病理学的疾患もしくは病理学的条件の同定(例えば、頭頸部癌、結腸癌、または他の型の癌の分子サブタイプの同定)を言うために本明細書中で使用される。

30

【0058】

用語「予後」は、新生物疾患(例えば、乳癌)の癌起因性の死または進行(これらには、再発、転移性拡散、および薬物耐性が挙げられる)の可能性の予測を言うために本明細書中で使用される。

【0059】

用語「予測」は、患者が、薬物または一組の薬物に対して都合よくもしくは都合悪くのいずれかで反応する可能性およびそれらの反応の程度、または患者が、外科的切除もしくは原発腫瘍および/もしくは化学療法の後、癌の再発なく一定の期間生存する可能性を言うために本明細書中で使用される。本発明の予測方法は、任意の特定の患者にとって最も適切な処置様式を選択することによって処置を決定するために臨床的に使用され得る。本発明の予測方法は、患者が、処置レジメン(例えば、外科的介入、所定の薬物または薬物併用を用いた化学療法、および/または放射線療法)に対して好ましく反応する傾向がある場合、手術(surgery)および/または化学療法もしくは他の処置様式の終了の後、患者の長期生存が、見込みあるか否かを予測する際に価値ある手段である。

40

【0060】

用語「長期」生存は、手術または他の処置の後、少なくとも3年間、より好ましくは、少なくとも8年間、最も好ましくは、少なくとも10年間の生存を言うために本明細書中で使用される。

【0061】

用語「腫瘍」は、本明細書中で使用される場合、全ての新生細胞増殖(growth)

50

ならびに新生細胞増殖 (proliferation) (悪性または良性のいずれにしても)、そして全ての前癌性ならびに癌性の細胞および組織を言う。

【0062】

用語「癌」および「癌性」は、代表的に無秩序な細胞増殖によって特徴付けられる哺乳動物における生理学的条件を言うかまたは記載する。癌の例としては、乳癌、結腸癌、肺癌、前立腺癌、肝細胞癌、胃癌、膵癌、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路の癌、甲状腺癌、腎臓癌、癌腫 (carcinoma)、黒色腫、および脳癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0063】

癌の「病理」は、患者の福祉を損なう全ての現象を含む。この癌の「病理」としては、異常または制御不可能な細胞増殖、転移、隣接細胞の正常機能への干渉、異常レベルでのサイトカインまたは他の分泌生成物の放出、炎症性反応または免疫学的反応の抑制または悪化、新生物形成、前悪性腫瘍、悪性腫瘍、周囲または離れた組織または器官 (例えば、リンパ節など) への侵襲が挙げられるが、これらに限定されない。

【0064】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、そして概して、プローブ長、洗浄温度、および塩濃度に依存する経験的計算予測である。概して、適切なアニーリングについて、より長いプローブは、より高い温度を必要とし、一方より短いプローブは、より低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは、概して、相補鎖が、融解温度以下の環境において存在する場合に、変性DNAが再びアニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ可能な配列との間の所望の相同性の程度が高ければ高いほど、使用され得る相対温度は高くなる。結果として、より高い相対温度は反応条件をよりストリンジェントにさせる傾向があり、一方より低い温度は、そうさせない傾向がある。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーのさらなる詳細および説明については、Ausubelら, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照のこと。

【0065】

「ストリンジェントな条件」または「高いストリンジェントな条件」は、本明細書中で規定される場合、代表的に以下の通りである：(1) 洗浄のために低いイオン強度および高い温度 (例えば、50 で 0.015 M 塩化ナトリウム / 0.0015 M クエン酸ナトリウム / 0.1 % ドデシル硫酸ナトリウム) を使用する；(2) ハイブリダイゼーションの間、ホルムアミドのような変性剤 (例えば、42 での 0.1 % ウシ血清アルブミン / 0.1 % Ficoll / 0.1 % ポリビニルピロリドン / 750 mM 塩化ナトリウム、75 mM クエン酸ナトリウムを含む pH 6.5 の 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液を含む 50 % (v/v) ホルムアミド) を使用するか；または (3) 42 で 50 % ホルムアミド, 5 × SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M クエン酸ナトリウム), 50 mM リン酸ナトリウム (pH 6.8), 0.1 % ピロリン酸ナトリウム, 5 × デンハート液, 超音波処理したサケ精子DNA (50 μg/ml), 0.1 % SDS, および 10 % 硫酸デキストランを使用し、0.2 × SSC (塩化ナトリウム / クエン酸ナトリウム) 中 42 および 50 % ホルムアミド中 55 で洗浄し、次いで 55 で EDTA 含有 0.1 × SSC からなる高ストリンジェンシー洗浄を行う。

【0066】

「中程度のストリンジェントな条件」は、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989によって記載されるものと同じであり得、そして上記に記載されるものよりもストリンジェントの低い洗浄液およびハイブリダイゼーションの条件 (例えば、温度、イオン強度および SDS %) の使用を含み得る。中程度のストリンジェントな条件の例は、20 % ホルムアミド, 5 × SSC (150 mM NaCl, 15 mM クエン酸三ナトリウム), 50 mM リン酸ナトリウム (pH

10

20

30

40

50

7.6), 5×デンハート液, 10%硫酸デキストラン, および20mg/ml変性切断されたサケ精子DNAを含む溶液中で37℃で一晩のインキュベーションと、その後の約37~50℃での1×SSC中でのフィルターの洗浄である。当業者は、プローブ長などの要素を適応する必要がある場合、温度、イオン強度などの調整法を認識する。

【0067】

本発明の文脈において、任意の特定の遺伝子セットに列挙される遺伝子の「少なくとも1つ」、「少なくとも2つ」、「少なくとも5つ」などへの言及は、列挙される遺伝子のうちの任意の1つまたは任意および全ての組み合わせを意味する。

【0068】

用語「発現閾値」および「規定された発現閾値」は、交換可能に使用され、そして遺伝子または遺伝子産物が、癌再発なく患者の生存についての予測マーカーとして機能する、上の該当の遺伝子または遺伝子産物のレベルを言う。閾値は、臨床的研究(例えば、以下の実施例において記載されるもの)から経験的に規定される。この発現閾値は、最大感受性、もしくは最大選択性、または最小誤差のいずれかについて選択され得る。任意の状況における発現閾値の決定は、十分に、当業者の知識の範囲内である。

【0069】

(B. 詳細な説明)

本発明の実施は、他に示されない限り、分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、および生化学の慣用的な技術(これらは、当該分野の技術の範囲内である)を使用する。このような技術は、文献(例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, 第2版(Sambrookら, 1989); 「Oligonucleotide Synthesis」(M. J. Gait, (編), 1984); 「Animal Cell Culture」(R. I. Freshney, (編), 1987); 「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc.); 「Handbook of Experimental Immunology」, 第4版(D. M. WeirおよびC. C. Blackwell, (編), Blackwell Science Inc., 1987); 「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」(J. M. MillerおよびM. P. Calos, (編), 1987); 「Current Protocols in Molecular Biology」(F. M. Ausubelら, (編), 1987); および「PCR: The Polymerase Chain Reaction」, (Mullisら, (編), 1994))に完全に説明される。

【0070】

(1. 遺伝子発現プロファイリング)

概して、遺伝子発現プロファイリングの方法は、以下の2つの大きい群に分けられ得る: ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション分析に基づく方法、およびポリヌクレオチドの配列決定に基づく方法。サンプル中のmRNA発現の定量的ための、当該分野で公知の最も一般的に使用される方法としては、ノーザンブロットングおよびインサイチュハイブリダイゼーション(ParkerおよびBarnes, Methods in Molecular Biology 106: 247-283 (1999)); RNAセプロテクションアッセイ(Hod, Biotechniques 13: 852-854 (1992)); および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)(Weisら, Trends in Genetics 8: 263-264 (1992))が挙げられる。あるいは、二重鎖(DNA二重鎖、RNA二重鎖、およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖またはDNA-タンパク質二重鎖を含む)を特異的に認識し得る抗体が、使用され得る。配列決定ベースの遺伝子発現分析のための代表的な方法としては、遺伝子発現の連続分析(Serial Analysis of Gene Expression)(SAGE)、および超並列的シグニチャー配列決定(massively parallel signature sequencing)(MPSS)による遺伝子発現分析

が挙げられる。

【0071】

(2. 逆転写PCR(RT-PCR))

上記に列挙された技術の中で、最も感受性があり、最も順応性のある定量的方法は、RT-PCRであり、これは、薬物処置ありかまたはなしの、正常組織および腫瘍組織における種々のサンプル集団におけるmRNAレベルを比較するため、遺伝子発現のパターンを特徴付けるため、密接な関係があるmRNAを区別するため、およびRNA構造を分析するために使用され得る。

【0072】

第一の工程は、標的サンプルからのmRNAの単離である。開始物質は、代表的に、それぞれヒト腫瘍またはヒト腫瘍細胞株、およびそれに対応する正常組織または正常細胞株から単離された全RNAである。従って、RNAは、健康なドナー由来のプールされたDNAとともに、種々の原発腫瘍(乳房、肺、結腸、前立腺、脳、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、精巣、卵巣、子宮などの腫瘍または腫瘍細胞株を含む)から単離され得る。mRNAの供給源が、原発腫瘍である場合、mRNAは、例えば、凍結または保管されたパラフィン包埋かつ固定された(例えば、ホルマリン固定)組織サンプルから抽出され得る。

【0073】

mRNA抽出の一般的な方法は、当該分野で周知であり、分子生物学の標準的な教科書(Ausubelら, Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley & Sons(1997)が挙げられる)に開示される。パラフィン包埋した組織からのRNA抽出のための方法は、例えば、RuppおよびLocker, Lab Invest. 56: A67(1987), およびDe Andresら, BioTechniques 18: 42044(1995)に開示される。特に、RNA単離は、商業的製造者(例えば、Qiagen)製の精製キット、緩衝液セットおよびプロテアーゼを使用し、製造者の取扱説明書に従って行われ得る。例えば、培養中の細胞からの全RNAは、Qiagen RNeasy ミニ-カラムを使用して単離され得る。他の市販されているRNA単離キットとしては、MasterPureTM Complete DNA and RNA Purification Kit(EPICENTRE(登録商標), Madison, WI), およびParaffin Block RNA Isolation Kit(Ambion, Inc.)が挙げられる。組織サンプルからの全RNAは、RNA Stat-60(Tel-Test)を使用して単離され得る。腫瘍から調製されるRNAは、例えば、塩化セシウム密度勾配遠心分離によって単離され得る。

【0074】

RNAが、PCRのためのテンプレートとして機能し得ない場合、RT-PCRによる遺伝子発現プロファイリングにおける第一の工程は、cDNAへのRNAテンプレートの逆転写と、その後のPCR反応におけるその指数関数的増幅である。2つの最も一般的に使用される逆転写酵素は、鳥類(avillo)骨髄芽球症(myeloblastosis)ウイルス逆転写酵素(AMV-RT)およびモロニーマウス白血病ウイルス逆転写酵素(MMLV-RT)である。逆転写工程は、代表的に、環境および発現プロファイリングの目的に依存して、特異的プライマー、ランダムヘキサマー、またはオリゴ-dTプライマーを使用して準備される。例えば、抽出RNAは、製造者の取扱説明書に従って、GeneAmp RNA PCRキット(Perkin Elmer, CA, USA)を使用して逆転写され得る。次いで、生成されたcDNAは、後のPCR反応におけるテンプレートとして使用され得る。

【0075】

PCR工程は、種々の熱安定性のDNA依存性DNAポリメラーゼを使用し得るが、それは、代表的に、Taq DNAポリメラーゼを使用し、これは、5'-3'ヌクレアーゼ活性を有するが、3'-5'プルーフリーディングエンドヌクレアーゼ活性を欠く。従って、TaqMan(登録商標)PCRは、代表的に、TaqポリメラーゼまたはTth

10

20

30

40

50

ポリメラーゼの 5' -ヌクレアーゼ活性を利用して、その標的アンプリコンに結合したハイブリダイゼーションプローブを加水分解するが、同等の 5'ヌクレアーゼ活性を有する任意の酵素が、使用され得る。2つのオリゴヌクレオチドプライマーは、PCR反応に典型的なアンプリコンを産生するために使用される。第三のオリゴヌクレオチド(すなわち、プローブ)は、2つのPCRプライマー間に位置するヌクレオチド配列を検出するように設計される。このプローブは、Taq DNAポリメラーゼ酵素によって伸長不可能であり、そしてレポーター蛍光色素およびクエンチャー蛍光色素で標識される。レポーター色素からの任意のレーザー誘導性発光は、2つの色素がプローブ上にあり、2つの色素が近くに一緒に位置する場合、消光色素によって消光される。増幅反応の間、Taq DNAポリメラーゼ酵素は、テンプレート依存性様式でプローブを切断する。生じたプローブフラグメントは、溶液中に解離され、そして放出したレポーター色素からのシグナルは、第二のフルオロフォアの消光効果がない。レポーター色素の1つの分子は、合成された新しい分子の各々について遊離され、未消光のレポーター色素の検出は、このデータの定量的解釈の基盤を提供する。

【0076】

TaqMan (登録商標) RT-PCRは、市販されている設備(例えば、ABI PRISM 7700TM Sequence Detection SystemTM (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)、またはLightcycler (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)など)を使用して行われ得る。好ましい実施形態において、5'ヌクレアーゼ手順は、リアル-タイム定量PCRデバイス(例えば、ABI PRISM 7700TM Sequence Detection SystemTM)で行われる。このシステムは、サーモサイ클ラー、レーザー、電荷結合素子(CCD)、カメラおよびコンピュータからなる。このシステムは、サーモサイ클ラー上の96ウェル形式でのサンプルを増幅する。増幅の間、レーザー励起蛍光シグナルは、全ての96ウェルについて、光ファイバーケーブルを介してリアル-タイムで収集され、そしてCCDで検出される。このシステムは、機器を作動させ、データを分析するためのソフトウェアを含む。

【0077】

5' -ヌクレアーゼアッセイデータは、Ct(すなわち、閾値サイクル)として、初めに表される。上で議論したように、蛍光値は、全サイクルの間記録され、そして増幅反応におけるその時点まで増幅された生成物の量を表す。この蛍光シグナルが、統計学的有意差として最初に記録される時点が、閾値サイクル(Ct)である。

【0078】

サンプル-サンプル間の変化の誤差および効果を最小にするため、RT-PCRは、通常、内部標準を使用して行われる。理想の内部標準は、異なる組織間で一定レベルにて発現され、実験処理によって影響されない。遺伝子発現のパターンを規準化するために最も頻繁に使用されるRNAは、ハウスキーピング遺伝子グリセルアルデヒド-3-ホスフェート-デヒドロゲナーゼ(GAPDH)およびβ-アクチンについてのmRNAである。

【0079】

RT-PCR技術のより最近のバリエーションは、リアルタイム定量PCRであり、これは、二重標識した蛍光発生プローブ(すなわち、TaqMan(登録商標)プローブ)を介して、PCR産物の蓄積を測定する。リアルタイムPCRは、定量的な競合PCR(各標的配列についての内部競合物が、規準化のために使用される)およびサンプル中に含まれる規準化遺伝子または、RT-PCRのためのハウスキーピング遺伝子を使用した定量的な比較PCRの両方に対応する。さらなる詳細については、Heldら, Genome Research 6:986-994(1996)を参照のこと。

【0080】

RNA供給源として固定されパラフィン包埋された組織を使用する遺伝子発現のプロファイリングのための代表的プロトコルの工程は、mRNA単離、精製、プライマー伸長お

10

20

30

40

50

よび増幅を包含し、種々の刊行された学術誌論文に示される{例えば：T. E. Godfreyら, J. Molec. Diagnostics 2: 84 - 91 [2000]; K. Spechtら, Am. J. Pathol. 158: 419 - 29 [2001]}。簡潔には、代表的なプロセスは、パラフィン包埋された腫瘍組織サンプルの約10 μ m厚切片の切断から始める。次いで、RNAが抽出され、そしてタンパク質およびDNAは、除去される。RNA濃度の分析後、必要に応じて、RNAの修復工程および/または増幅工程が包含され、そしてRNAは、遺伝子特異的プロモーターを使用して逆転写され、次いでRT-PCRが続く。

【0081】

本発明の一面によると、PCRプライマーおよびプローブは、増幅されるべき遺伝子内に存在するイントロン配列に基づき設計される。本実施形態において、プライマー/プローブ設計における第一の工程は、遺伝子内のイントロン配列の描写である。これは、公に入手可能なソフトウェア(例えば、Kent, W. J., Genome Res. 12(4): 656 - 64 (2002)によって開発されたDNA BLASTソフトウェア)、またはそのバリエーションを含むBLASTソフトウェアによってなされ得る。次の工程は、PCRプライマーおよびプローブ設計の十分に確立された方法に続く。

【0082】

非特異的シグナルを回避するため、プライマーおよびプローブを設計する際に、イントロン内の繰り返し配列をマスクすることが重要である。これは、Baylor College of Medicineを通じてオンラインで入手可能なRepeat Maskerプログラム(これは、繰り返しエレメントのライブラリーに対してDNA配列をスクリーニングし、繰り返しエレメントがマスクされたクエリー配列を戻し返す)を使用することによって容易に達成され得る。次いで、マスクされたイントロン配列は、任意の市販されているまたは他に公に入手可能なプライマー/プローブ設計パッケージ(Primer Express (Applied Biosystems); MGB assay-by-design (Applied Biosystems); Primer3 (Krawetz S, Misener S (編) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365 - 386の一般使用者および生物学者プログラマーのためのWWW上のSteve RozenおよびHelen J. Skaletsky (2000) Primer3)を使用してプライマーおよびプローブの配列を設計するために使用され得る。

【0083】

PCRプライマー設計の際に考えられる最も重要な因子としては、プライマー長、融解温度(T_m)、およびG/C含量、特異性、相補プライマー配列、および3'-末端配列が挙げられる。概して、最適なPCRプライマーは、一般的に、17~30塩基長であり、そして約20%~80%(例えば、約50%~60%など)のG+C塩基を含む。50と80との間(例えば、約50~70)の T_m が、代表的に好ましい。

【0084】

PCRプライマーおよびプローブのためのさらなる指針については、例えば、PCR Primer, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1995, pp. 133 - 155のDieffenbach, C. W.ら, 「General Concepts for PCR Primer Design」; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, CRC Press, London, 1994, pp. 5 - 11のInnisおよびGelfand, 「Optimization of PCRs」; およびPlasterer, T. N. Primerselect: Primer and probe design. Methods Mol. Biol. 70: 520 - 527 (1997)(これらの全体の開示が、本明細書中に参考として明白に援用される)を参照のこと。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 5 】

(3 . マイクロアレイ)

差次的遺伝子発現はまた、マイクロアレイ技術を使用して同定または確認され得る。従って、乳癌関連遺伝子の発現プロファイルは、マイクロアレイ技術を使用して、新しい腫瘍組織またはパラフィン包埋された腫瘍組織のいずれかにおいて測定され得る。この方法では、目的のポリヌクレオチド配列 (c D N A およびオリゴヌクレオチドを含む) は、マイクロチップ基板上にプレートされるか、またはアレイされる。次いで、アレイされた配列は、目的の細胞または組織由来の特異的 D N A プローブを用いてハイブリダイズされる。ちょうど R T - P C R 法のように、m R N A の供給源は、代表的に、ヒト腫瘍またはヒト腫瘍細胞株および対応する正常組織または正常細胞株から単離される全 R N A である。従って、R N A は、種々の原発腫瘍または腫瘍細胞株から単離され得る。m R N A の供給源が、原発腫瘍である場合、m R N A は、例えば、凍結組織サンプルまたは保管されパラフィン包埋かつ固定 (例えば、ホルマリン固定) された組織サンプルから抽出され得、これらは、通常の臨床的慣例で、慣例的に調製され、かつ保存される。

10

【 0 0 8 6 】

マイクロアレイ技術の特定の実施形態において、c D N A クローンの P C R 増幅された挿入物は、密集したアレイの基板に適用される。好ましくは、少なくとも 1 0 , 0 0 0 個のヌクレオチド配列が、基板に適用される。このマイクロアレイされた遺伝子は、各 1 0 , 0 0 0 個のエレメントでマイクロチップ上に固定化され、ストリンジェントな条件下でハイブリダイゼーションに適している。蛍光標識 c D N A プローブは、蛍光ヌクレオチドを取り込んで、目的の組織から抽出された R N A を逆転写することにより、産生され得る。チップ上に適用された標識 c D N A プローブは、アレイ上の各 D N A スポットに対して特異的にハイブリダイズする。非特異的な結合プローブを除くためのストリンジェントな洗浄の後、チップは、共焦点レーザー顕微鏡または別の検出方法 (例えば、C C D カメラ) によって走査される。各アレイされたエレメントのハイブリダイゼーションの定量は、対応する m R N A 存在量の評価を可能とする。二重色蛍光を用いて、R N A の 2 つの供給源から産生された別々に標識された c D N A プローブは、アレイに対でハイブリダイズされる。従って、各特定の遺伝子に対応する 2 つの供給源由来の転写物の相対存在量が、同時に決定される。ハイブリダイゼーションの小型化スケールは、大量の遺伝子についての発現パターンの簡便性かつ迅速な評価をもたらす。このような方法は、まれな転写物 (これらは、1 細胞当たり小さいコピーで発現される) を検出するため、そして発現レベルにおいて少なくともおよそ 2 倍の差異を、再現性をもって検出するために必要とされる感度を有することが、示されている (S c h e n a ら , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 3 (2) : 1 0 6 - 1 4 9 (1 9 9 6)) 。マイクロアレイ分析は、市販されている設備により、製造者のプロトコルに従って (例えば、A f f y m e t r i x G e n C h i p 技術, または I n c y t e のマイクロアレイ技術を使用することによって) 行われ得る。

20

30

【 0 0 8 7 】

遺伝子発現の大規模な分析のためのマイクロアレイ法の開発は、癌分類の分子マーカーおよび種々の腫瘍タイプにおける結果予測を系統的に検索することを可能にする。

40

【 0 0 8 8 】

(4 . 遺伝子発現の連続分析 (S A G E))

遺伝子発現の連続分析 (S A G E) は、各転写物についての個々のハイブリダイゼーションプローブを提供する必要なしに、多数の遺伝子転写物の同時定量分析を可能にする方法である。まず、短い配列タグ (約 1 0 ~ 1 4 b p) が、各転写物内の固有の位置から得られるという条件で、転写物を一意的に同定するための十分な情報を含むように作製される。次いで、多くの転写物は、共に結合され配列決定され得る長い連続する分子を形成し、多重タグの同一性を同時に明らかにする。転写物の任意の集合の発現パターンは、個々のタグの存在量を決定し、各タグに対応する遺伝子を同定することによって、定量的に評価され得る。より詳細については、例えば、V e l c u l e s c u ら、S c i e n c e

50

270:484-487(1995);およびVelculescuら、Cell 88:243-51(1997)を参照のこと。

【0089】

(5. Mass ARRAY技術)

Mass ARRAY (Sequenom, San Diego, California) 技術は、検出のための質量分析 (MS) を用いる自動化された高処理の遺伝子発現分析の方法である。この方法に従って、RNAの単離、逆転写およびPCR増幅に続いて、cDNAはプライマー伸長に供される。このcDNA由来プライマー伸長生成物は、精製され、MALTI-TOF MSサンプル調製のために必要とされる成分と一緒にプレロードされるチップアレイ上に分配される。反応において存在する種々のcDNAは、質量分析中で得られるピーク領域を分析することによって定量化される。

【0090】

(6. 超並列的遺伝子ピースクローン解析法 (MPSS) による遺伝子発現分析)

Brennerら、Nature Biotechnology 18:630-634(2000)により記載されるこの方法は、非ゲルベースのシグニチャー (signature) 配列決定を、分離した5μm直径マイクロピース上の何百万のテンプレートのインビトロクロニングと結合させる配列決定のアプローチである。まず、DNAテンプレートのマイクロピースライブラリーが、インビトロクロニングによって構築される。この後、高密度 (代表的には、 3×10^6 マイクロピース/cm² を超える) におけるフローセル中のテンプレート含有マイクロピースのプレナー・アレイの集合が続く。各マイクロピース上のクロニングされたテンプレートの遊離端は、DNAフラグメント分離を必要としない蛍光ベースのシグニチャー配列決定方法を用いて、同時に分析される。この方法は、一回の操作で、酵母cDNAライブラリー由来の何十万の遺伝子シグニチャー配列を同時かつ正確に提供することが示されている。

【0091】

(7. 免疫組織化学)

免疫組織化学方法はまた、本発明の予後マーカーの発現レベルを検出するために適切である。従って、各マーカーについての特異的な抗体または抗血清 (好ましくはポリクローナル抗血清、および最も好ましくはモノクローナル抗体) が、発現を検出するために使用される。これらの抗体は、抗体自身を直接標識することによって検出され得る。標識には、例えば、放射性標識、蛍光標識、ハプテン標識 (例えば、ビオチンまたは酵素 (例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼ) が用いられる。あるいは、未標識の一次抗体が、一次抗体に特異的な抗血清、ポリクローナル抗血清またはモノクローナル抗体を含む標識された二次抗体と結合して用いられる。免疫組織化学プロトコールおよびキットは、当該分野で周知であり、市販されている。

【0092】

(8. プロテオミクス)

用語「プロテオーム」は、特定の時点においてサンプル (例えば、組織、器官または細胞培養物) 中に存在するタンパク質の全体として定義される。プロテオミクスは、とりわけ、サンプル中のタンパク質発現の全体的な変化の研究を含む (「発現プロテオミクス」としても称される)。プロテオミクスは、代表的に以下の工程を包含する: (1) サンプル中の個々のタンパク質を、2-Dゲル電気泳動 (2-D PAGE) によって分離する工程; (2) ゲルから回収した個々のタンパク質を (例えば、質量分析またはN末端配列決定によって) 同定する工程、および (3) バイオインフォマティクスを用いてデータを分析する工程。プロテオミクス方法は、遺伝子発現プロファイリングの他の方法に対して有用な補足物であり、単独または他の方法と組み合わせて、本発明の予後マーカーの生成物を検出するために使用され得る。

【0093】

(9. mRNA単離、精製および増幅の概要)

遺伝子発現をプロファイルするための代表的なプロトコールの工程は、RNA供給源と

して固定パラフィン包埋組織を用い、mRNA単離、精製、プライマー伸長および増幅を含む。これらの工程は、種々の刊行された学術誌の論文において提供される{例えば：T . E . GodfreyらJ . Molec . Diagnostics 2 : 84 - 91 [2000] ; K . Spechtら , Am . J . Pathol . 158 : 419 - 29 [2001] }。手短には、代表的なプロセスは、パラフィン包埋された腫瘍組織サンプルの厚さ約10 μ mの切片を切断することから開始する。次いで、RNAは抽出され、タンパク質およびDNAが除去される。RNA濃縮の分析の後、RNA修復および/または増幅工程が包含され得、必要な場合、RNAは、遺伝子特異的プロモーターを用いて逆転写され、続いてRT-PCRを行う。最後に、このデータは分析され、試験される腫瘍サンプル中で同定される特徴的な遺伝子発現パターンに基づいて、患者に対して利用可能な最良の処置選択肢を同定する。 10

【0094】

(10. 乳癌遺伝子セット、アッセイされる遺伝子サブ配列、および遺伝子発現データの臨床的適用)

本発明の重要な局面は、乳癌組織によって予後情報を提供するために、特定の遺伝子の測定された発現を使用することである。この目的のために、アッセイされるRNAの量における差と使用されるRNAの質における差異との両方を補正する(標準化する)ことが必要である。従って、このアッセイは代表的に、特定の標準化遺伝子発現(周知のハウスキーピング遺伝子(例えば、GAPDHおよびCyp1)を含む)を測定し、組み込む。あるいは、標準化は、すべてのアッセイされる遺伝子もしくはこれらの大きなサブユニットの平均値シグナルまたは中央値シグナル(Ct)(全体的な標準化アプローチ)に基づき得る。遺伝子ごとに、測定される患者腫瘍mRNAの標準化量は、乳癌組織の基準セット中で見出される量と比較される。この基準セット中の乳癌組織の数(N)は、異なる基準セットが(全体として)本質的に同じ様式で挙動することを確実にするために十分大きくなければならない。この条件が満たされる場合、特定のセット中に存在する個々の乳癌組織の同定は、アッセイされる遺伝子の相対量に顕著な影響を与えない。通常は、乳癌組織の基準セットは、少なくとも約30の、好ましくは少なくとも約40の異なるFPE乳癌組織標本からなる。他に記述されない限り、各mRNA/試験された腫瘍/患者についての標準化発現レベルは、基準セットにおいて測定される発現レベルのパーセンテージとして表される。より詳細には、十分多い数(例えば、40)の腫瘍の基準セットは、各mRNA種の標準化レベルの分布を与える。分析される特定の腫瘍サンプル中で測定されるレベルは、数パーセント点の範囲内に収まり、このレベルは、当該分野で周知の方法によって決定され得る。他に記述されない限り、このことは下に常には明示的に述べられないが、遺伝子の発現レベルの言及は、基準セットと比較した標準化発現を前提とする。 20 30

【0095】

本発明のさらなる詳細は、以下の非限定な実施例において記載される。

【実施例】

【0096】

(79の悪性乳癌中の遺伝子発現の第II相研究)

パラフィン包埋し、固定した浸潤性乳腺管癌の組織サンプル中の遺伝子発現を分子的に特徴付け、そしてこのような分子プロファイルと病気でない生存との間の相関を調査するという主要な目的で、遺伝子発現研究を計画し、行った。 40

【0097】

(研究設計)

浸潤性乳癌と診断された79人の個々の患者から得られた、パラフィン包埋し、ホルマリン固定した主要な乳癌組織上で、分子アッセイを実施した。この研究のすべての患者は、10以上の陽性結節を有した。平均年齢は57歳であり、平均臨床腫瘍サイズは4.4cmであった。材料および方法の節において記載のように実施した組織病理学的評価が、腫瘍組織の適当な量および均質な病理学を示した場合のみ患者を本研究に含めた。

【0098】

(材料および方法)

各代表的な腫瘍ブロックを、診断、半定量的な腫瘍量の評価、および腫瘍段階について、標準的な組織病理学により特徴付けた。全部で6個の切片(各々、厚さ10ミクロン)を調製し、2つのCostar Brand Microcentrifuge Tube(ポリプロピレン、1.7mLチューブ、透明;各チューブに3切片)中に配置した。この腫瘍が全標本領域の30%未満を構成する場合、全体の顕微解剖を用いて、病理学者がそのサンプルを粗く解体し得、直接的にCostar tube中に腫瘍組織を配置し得る。

【0099】

外科的手順の一部として2以上の腫瘍ブロックを得た場合は、病理学的により代表的なブロックを、分析のために使用した。 10

【0100】

(遺伝子発現分析)

固定したパラフィン包埋の組織サンプルからmRNAを抽出し、精製し、そして上の9節に記載される遺伝子発現分析のために調製した。

【0101】

ABI PRISM 7900TM Sequence Detection SystemTM (Perkin-Elmer-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて、RT-PCRによって、定量的遺伝子発現の分子アッセイを実施した。ABI PRISM 7900TMは、熱サイクラー、レーザー、電荷結合素子(CCD)、カメラおよびコンピューターからなる。このシステムは、熱サイクラー上の384ウェルのフォーマット中のサンプルを増幅する。増幅の間、レーザー誘導された蛍光シグナルを、すべての384ウェルについての光ファイバーケーブルを介して、リアルタイム(real-time)で収集し、CCDで検出した。このシステムは、機器を作動するための、およびデータを分析するためのソフトウェアを含む。 20

【0102】

(分析および結果)

185の癌関連遺伝子および7の基準遺伝子について、腫瘍組織を分析した。各患者についての閾値サイクル(threshold cycle)(CT)値を、特定の患者についての7の基準遺伝子の中央値に基づいて標準化した。臨床的な結果のデータは、記載データの総説および選択された患者の病歴から、すべての患者について利用可能であった。 30

【0103】

結果を以下のように分類した:

- 0 乳癌もしくは不明の原因によって死亡、または乳癌再発を伴って生存;
- 1 乳癌再発を伴わずに生存、または乳癌以外の原因によって死亡。

【0104】

分析は、以下のように行った:

- 1. 標準化遺伝子発現と0または1の二元の結果との間の関係の分析。

【0105】

2. 乳癌再発を伴わずに生存した患者または乳癌以外の原因によって死亡した患者の場合の標準化遺伝子発現と結果(上に定義したように、0または1)までの時間との間の関係の分析を行った。このアプローチを用いて、個々の遺伝子の予後の影響および複数の遺伝子のセットの予後の影響もまた評価した。 40

【0106】

(二元アプローチによる浸潤性乳癌を有する患者の分析)

第一の(二元)アプローチにおいて、浸潤性乳癌を有する79人の患者すべてに関して、分析を実施した。再発がなく、かつ3年において乳癌に関連する死亡がないと分類された患者の群の、再発、すなわち3年において乳癌に関連する死亡として分類された患者の群に対するt検定を実施した。そして各遺伝子について群の間での差異について、p値 50

を計算した。

【 0 1 0 7 】

表 1 は、群の間の差異についての p 値が、 < 0.10 である 47 遺伝子を列挙する。平均発現値の第一の縦列は、転移性再発を有さず乳癌で死亡していない患者に関する。平均発現値の第二の縦列は、転移性再発を有したか、または乳癌で死亡したかのどちらかの患者に関する。

【 0 1 0 8 】

【 表 1 - 1 】

表 1							
	平均値	平均値	t-値	df	p	有効 N	有効 N
Bcl2	-0.15748	-1.22816	4.00034	75	0.000147	35	42
PR	-2.67225	-5.49747	3.61540	75	0.000541	35	42
IGF1R	-0.59390	-1.71506	3.49158	75	0.000808	35	42
BAG1	0.18844	-0.68509	3.42973	75	0.000985	35	42
CD68	-0.52275	0.10983	-3.41186	75	0.001043	35	42
EstR1	-0.35581	-3.00699	3.32190	75	0.001384	35	42
CTSL	-0.64894	-0.09204	-3.26781	75	0.001637	35	42
IGFBP2	-0.81181	-1.78398	3.24158	75	0.001774	35	42
GATA3	1.80525	0.57428	3.15608	75	0.002303	35	42
TP53BP2	-4.71118	-6.09289	3.02888	75	0.003365	35	42
EstR1	3.67801	1.64693	3.01073	75	0.003550	35	42
CEGP1	-2.02566	-4.25537	2.85620	75	0.005544	35	42
SURV	-3.67493	-2.96982	-2.70544	75	0.008439	35	42
p27	0.80789	0.28807	2.55401	75	0.012678	35	42
Chk1	-3.37981	-2.80389	-2.46979	75	0.015793	35	42
BBC3	-4.71789	-5.62957	2.46019	75	0.016189	35	42

10

20

【 0 1 0 9 】

【表 1 - 2】

ZNF217	1.10038	0.62730	2.42282	75	0.017814	35	42
EGFR	-2.88172	-2.20556	-2.34774	75	0.021527	35	42
CD9	1.29955	0.91025	2.31439	75	0.023386	35	42
MYBL2	-3.77489	-3.02193	-2.29042	75	0.024809	35	42
HIF1A	-0.44248	0.03740	-2.25950	75	0.026757	35	42
GRB7	-1.96063	-1.05007	-2.25801	75	0.026854	35	42
pS2	-1.00691	-3.13749	2.24070	75	0.028006	35	42
RIZ1	-7.62149	-8.33750	2.20226	75	0.030720	35	42
ErbB3	-6.89508	-7.44326	2.16127	75	0.033866	35	42
TOP2B	0.45122	0.12665	2.14616	75	0.035095	35	42
MDM2	1.09049	0.69001	2.10967	75	0.038223	35	42
PRAME	-6.40074	-7.70424	2.08126	75	0.040823	35	42
GUS	-1.51683	-1.89280	2.05200	75	0.043661	35	42
RAD51C	-6.85618	-6.71334	2.04575	75	0.044288	35	42
AIB1	-3.08217	-2.28784	-2.00600	75	0.048462	35	42
STK15	-3.11307	-2.59454	-2.00321	75	0.048768	35	42
GAPDH	-0.35829	-0.02292	-1.94326	75	0.055737	35	42
FHIT	-3.00431	-3.67175	1.86927	75	0.065489	35	42
KRT19	2.52397	2.01694	1.85741	75	0.067179	35	42
TS	-2.83607	-2.29048	-1.83712	75	0.070153	35	42
GSTM1	-3.69140	-4.38623	1.83397	75	0.070625	35	42
G- カテニン	0.31875	-0.15524	1.80823	75	0.074580	35	42
AKT2	0.78858	0.46703	1.79276	75	0.077043	35	42
CCNB1	-4.26197	-3.51628	-1.78803	75	0.077810	35	42
PI3KC2A	-2.27401	-2.70265	1.76748	75	0.081215	35	42
FBXO5	-4.72107	-4.24411	-1.75935	75	0.082596	35	42
DR5	-5.80850	-6.55501	1.74345	75	0.085353	35	42
CIAP1	-2.81825	-3.09921	1.72480	75	0.088683	35	42
MCM2	-2.87541	-2.50683	-1.72061	75	0.089445	35	42
CCND1	1.30995	0.80905	1.68794	75	0.095578	35	42
EIF4E	-5.37657	-6.47156	1.68169	75	0.096788	35	42

10

20

前述の表 1 において、陰性の t 値は、より悪い結果に関連するより高い発現を示し、そして逆に、より高い（陽性）t 値は、よりよい結果と関連するより高い発現を示す。従って、例えば、CD68 遺伝子の上昇した発現（t 値 = -3.41、生存の CT 平均値 < 死亡の CT 平均値）は、疾患のない生存の減少した可能性を示す。同様に、BC12 遺伝子の上昇した発現（t 値 = 4.00；生存の CT 平均値 > 死亡の CT 平均値）は、疾患のない生存の増加した可能性を示す。

30

【0110】

表 1 に示されたデータに基づいて、定義した発現閾値を上回る乳癌中の以下の遺伝子のいずれの発現も、外科手術後の癌再発を伴わない生存の減少した可能性を示す：Grb7、CD68、CTSL、Chk1、Her2、STK15、AIB1、SURV、EGFR、MYBL2、HIF1α。

【0111】

表 1 に示されたデータに基づいて、定義した発現閾値を上回る乳癌中の以下の遺伝子のいずれの発現も、外科手術後の癌再発を伴わない生存についてのよりよい予後を示す：TP53BP2、PR、Bcl2、KRT14、EstR1、IGFBP2、BAG1、CEGP1、KLLK10、βカテニン、GSTM1、FHIT、Riz1、IGF1、BBC3、IGFR1、TBP、p27、IRS1、IGF1R、GATA3、CEGP1、ZNF217、CD9、pS2、ErbB3、TOP2B、MDM2、RAD51、および KRT19。

40

【0112】

（二元アプローチによる ER 陽性患者の分析）

エストロゲンレセプター（ER）について標準化の CT > 0 を有する 57 人の患者（すなわち、ER 陽性患者）を、別々の分析に供した。再発がなく、かつ 3 年において乳癌に

50

関連する死亡がないと分類された患者群、または再発もしくは3年において乳癌関連する死亡として分類された患者群の2つの群に対して、t検定を実施した。そして各遺伝子についての群の間での差異について、p値を計算した。下の表2は、群の間の差異についてのp値が、 < 0.105 であった遺伝子を列挙する。平均発現値の第一の縦列は、転移性再発を有さず乳癌で死亡していない患者に関する。平均発現値の第二の縦列は、転移性再発を有したか、または乳癌で死亡したかのどちらかの患者に関する。

【0113】

【表2-1】

表 2								
	平均値	平均値	t-値	df	p	有効 N	有効 N	
IGF1R	-0.13975	-1.00435	3.65063	55	0.000584	30	27	10
Bcl2	0.15345	-0.70480	3.55488	55	0.000786	30	27	
CD68	-0.54779	0.19427	-3.41818	55	0.001193	30	27	
HNF3A	0.39617	-0.63802	3.20750	55	0.002233	30	27	
CTSL	-0.66726	0.00354	-3.20692	55	0.002237	30	27	
TP53BP2	-4.81858	-6.44425	3.13698	55	0.002741	30	27	
GATA3	2.33386	1.40803	3.02958	55	0.003727	30	27	
BBC3	-4.54979	-5.72333	2.91943	55	0.005074	30	27	
RAD51C	-5.63363	-6.94841	2.85475	55	0.006063	30	27	
BAG1	0.31087	-0.50669	2.61524	55	0.011485	30	27	
IGFBP2	-0.49300	-1.30983	2.59121	55	0.012222	30	27	20
FBXO5	-4.86333	-4.05564	-2.56325	55	0.013135	30	27	
EstR1	0.68368	-0.66555	2.56090	55	0.013214	30	27	
PR	-1.89094	-3.86602	2.52803	55	0.014372	30	27	
SURV	-3.87857	-3.10970	-2.49622	55	0.015579	30	27	
CD9	1.41691	0.91725	2.43043	55	0.018370	30	27	
RB1	-2.51662	-2.97419	2.41221	55	0.019219	30	27	
EPHX1	-3.91703	-5.85097	2.29491	55	0.025578	30	27	
CEGP1	-1.18600	-2.95139	2.26608	55	0.027403	30	27	
CCNB1	-4.44522	-3.35763	-2.25148	55	0.028370	30	27	30
TRAIL	0.34893	-0.56574	2.20372	55	0.031749	30	27	
EstR1	4.60346	3.60340	2.20223	55	0.031860	30	27	
DR5	-5.71827	-6.79088	2.14548	55	0.036345	30	27	
MCM2	-2.96800	-2.48458	-2.10518	55	0.039857	30	27	
Chk1	-3.46968	-2.85708	-2.08597	55	0.041633	30	27	
p27	0.94714	0.49656	2.04313	55	0.045843	30	27	
MYBL2	-3.97810	-3.14837	-2.02921	55	0.047288	30	27	
GUS	-1.42486	-1.82900	1.99758	55	0.050718	30	27	

【0114】

【表2-2】

P53	-1.08810	-1.47193	1.92087	55	0.059938	30	27	40
HIF1A	-0.40925	0.11688	-1.91278	55	0.060989	30	27	
cMet	-6.36835	-5.58479	-1.88318	55	0.064969	30	27	
EGFR	-2.95785	-2.28105	-1.86840	55	0.067036	30	27	
MTA1	-7.55365	-8.13656	1.81479	55	0.075011	30	27	
RIZ1	-7.52785	-8.25903	1.79518	55	0.078119	30	27	
ErbB3	-6.62488	-7.10826	1.79255	55	0.078545	30	27	
TOP2B	0.54974	0.27531	1.74888	55	0.085891	30	27	
EIF4E	-5.06603	-6.31426	1.68030	55	0.098571	30	27	
TS	-2.95042	-2.36167	-1.67324	55	0.099959	30	27	
STK15	-3.25010	-2.72118	-1.64822	55	0.105010	30	27	

各遺伝子について、分類アルゴリズムを利用し、臨床的結果を予測する際に各遺伝子を単独で使用するための最良の閾値(CT)を同定した。

【0115】

表2に記載されたデータに基づいて、規定した発現レベルを上回るER陽性癌中の以下

の遺伝子の発現は、外科手術後の癌再発を伴わない生存の可能性の減少を示す：CD68；CTSL；FBXO5；SURV；CCNB1；MCM2；Chk1；MYBL2；HIF1A；cMET；EGFR；TS；STK15。これらの遺伝子の多く（CD68、CTSL、SURV、CCNB1、MCM2、Chk1、MYBL2、EGFR、およびSTK15）をまた、以前の分析における予後不良の指標として同定した。これらは、ER陽性乳癌に限定されない。表2に記載されたデータに基づいて、規定した発現レベルを上回るER陽性癌中の以下の遺伝子の発現は、外科手術後の癌再発を伴わない生存のよりよい予後を示す：IGFR1；BC12；HNF3A；TP53BP2；GATA3；BBC3；RAD51C；BAG1；IGFBP2；PR；CD9；RB1；EPHX1；CEGP1；TRAIL；DR5；p27；p53；MTA；RIZ1；Erbb3；TOP2B；EIF4E。後者の遺伝子のうち、IGFR1；BC12；TP53BP2；GATA3；BBC3；RAD51C；BAG1；IGFBP2；PR；CD9；CEGP1；DR5；p27；RIZ1；Erbb3；TOP2B；EIF4Eをまた、以前の分析における良好な予後の指標として同定した。これらは、ER陽性乳癌に限定されない。

10

【0116】

（二元のアプローチによるER陰性患者の分析）

エストロゲンレセプター（ER）について正規化CT<1.6を有する20人の患者（すなわち、ER陰性患者）を、分離分析に供した。再発がなく、かつ3年において乳癌に関連する死亡なし、または再発もしくは3年において乳癌に関連する死亡ありのどちらかとして分類した2つの群の患者に関して、t検定を実施した。そして各遺伝子についての群の間での差異について、p値を計算した。表3は、これらの群の間の差異についてのp値が、<0.118である遺伝子を記載する。平均発現値の第一の列は、転移性再発を有さず乳癌で死亡してもいない患者に関する。平均発現値の第二の列は、転移性再発を有したか、または乳癌で死亡したかのどちらかの患者に関する。

20

【0117】

【表 3】

表 3

	平均値	平均値	t-値	df	p	有効 N	有効 N
KRT14	-1.95323	-6.69231	4.03303	18	0.000780	5	15
KLK10	-2.68043	-7.11288	3.10321	18	0.006136	5	15
CCND1	-1.02285	0.03732	-2.77992	18	0.012357	5	15
Upa	-0.91272	-0.04773	-2.49460	18	0.022560	5	15
HNF3A	-6.04780	-2.36469	-2.43148	18	0.025707	5	15
マスピン	-3.56145	-6.18678	2.40169	18	0.027332	5	15
CDH1	-3.54450	-2.34984	-2.38755	18	0.028136	5	15
HER2	-1.48973	1.53108	-2.35826	18	0.029873	5	15
GRB7	-2.55289	0.00036	-2.32890	18	0.031714	5	15
AKT1	-0.36849	0.46222	-2.29737	18	0.033807	5	15
TGFA	-4.03137	-5.67225	2.28546	18	0.034632	5	15
FRP1	1.45776	-1.39459	2.27884	18	0.035097	5	15
STMY3	-1.59610	-0.26305	-2.23191	18	0.038570	5	15
コンティグ 27882	-4.27585	-7.34338	2.18700	18	0.042187	5	15
A-カテニン	-1.19790	-0.39085	-2.15624	18	0.044840	5	15
VDR	-4.37823	-2.37167	-2.15620	18	0.044844	5	15
GRO1	-3.65034	-5.97002	2.12286	18	0.047893	5	15
MCM3	-3.86041	-5.55078	2.10030	18	0.050061	5	15
B-アクチン	4.69672	5.19190	-2.04951	18	0.055273	5	15
HIF1A	-0.64183	-0.10566	-2.02301	18	0.058183	5	15
MMP9	-8.90613	-7.35163	-1.88747	18	0.075329	5	15
VEGF	0.37904	1.10778	-1.87451	18	0.077183	5	15
PRAME	-4.95855	-7.41973	1.86668	18	0.078322	5	15
AIB1	-3.12245	-1.92934	-1.86324	18	0.078829	5	15
KRT5	-1.32418	-3.62027	1.85919	18	0.079428	5	15
KRT18	1.08383	2.25369	-1.83831	18	0.082577	5	15
KRT17	-0.69073	-3.56536	1.78449	18	0.091209	5	15
P14ARF	-1.87104	-3.36534	1.63923	18	0.118525	5	15

10

20

表 3 に記載されたデータに基づいて、規定した発現レベルを上回る E R 陰性癌中の以下の遺伝子の発現は、癌再発を伴わない生存の可能性の減少を示す ($p < 0.05$): CCND1; UPA; HNF3A; CDH1; Her2; GRB7; AKT1; STMY3; α -カテニン; VDR; GRO1。これらの遺伝子の 2 つのみ (Her2 および Grb7) をまた、以前の分析における予後不良の指標として同定した。これらは、E R 陰性乳癌に限定されない。表 3 に記載されたデータに基づいて、規定した発現レベルを上回る E R 陰性癌中の以下の遺伝子の発現は、癌再発を伴わない生存についてのよりよい予後を示す: KRT14; KLK10; マスピン、TGFA、および FRP1。後者の遺伝子のうち、KLK10 のみをまた、以前の分析における良好な予後の指標として同定した。これは、E R 陰性乳癌に限定されない。

30

【0118】

(複数の遺伝子の分析および結果の指標)

40

複数の遺伝子を用いることが結果の間のよりよい識別能を提供するか否かを決定するために、2 つのアプローチを行った。

【0119】

まず、フォワードステップワイズアプローチ (forward stepwise approach) を用いて、判別分析を実施した。任意の 1 つの遺伝子単独で得られたものを超える識別能を有する結果を分類するモデルを作製した。

【0120】

第二のアプローチ (時間事象 (time-to-event) アプローチ) に従って、各遺伝子についてコックス比例ハザードモデル (例えば、Cox, D.R., および Oakes, D. (1984), Analysis of Survival Data, C

50

hapman and Hall, London, New Yorkを参照のこと)を、再発または死までの時間を従属変数とし、遺伝子の発現レベルを独立変数として定義した。コックスモデルにおいて、 p 値 < 0.10 を有する遺伝子を同定した。各遺伝子について、このコックスモデルは、遺伝子発現における単位変化 (unit change) について再発または死の相対危険度 (RR) を提供する。測定した発現の任意の閾値 (CT スケールで) においてサブグループに分割するために、患者を選択し得る。その遺伝子が、予後不良 ($RR > 1.01$) であるかまたは予後良好 ($RR < 1.01$) の指標であるかに依存して、閾値を上回る発現値を有するすべての患者は、より高い危険を有し、閾値を下回る発現値を有するすべての患者は、より低い危険を有する。逆もまた同じである。従って、任意の閾値が、それぞれ増大する危険性または減少した危険性を有する患者のサブグループを定義する。この結果を、表 4 に要約する。表題: exp (係数) の第三の列は、RR 値を示す。

10

【 0 1 2 1 】

【 表 4 】

表 4

遺伝子	係数	exp(係数)	se(係数)	z	p
TP53BP2	-0.21892	0.803386	0.068279	-3.20625	0.00134
GRB7	0.235697	1.265791	0.073541	3.204992	0.00135
PR	-0.10258	0.90251	0.035864	-2.86018	0.00423
CD68	0.465623	1.593006	0.167785	2.775115	0.00552
Bcl2	-0.26769	0.765146	0.100785	-2.65603	0.00791
KRT14	-0.11892	0.887877	0.046938	-2.53359	0.0113
PRAME	-0.13707	0.871912	0.054904	-2.49649	0.0125
CTSL	0.431499	1.539564	0.185237	2.329444	0.0198
EstR1	-0.07686	0.926018	0.034848	-2.20561	0.0274
Chk1	0.284466	1.329053	0.130823	2.174441	0.0297
IGFBP2	-0.2152	0.806376	0.099324	-2.16669	0.0303
HER2	0.155303	1.168011	0.072633	2.13818	0.0325
BAG1	-0.22695	0.796959	0.106377	-2.13346	0.0329
CEGP1	-0.07879	0.924236	0.036959	-2.13177	0.033
STK15	0.27947	1.322428	0.132762	2.105039	0.0353
KLK10	-0.11028	0.895588	0.05245	-2.10248	0.0355
B.カテニン	-0.16536	0.847586	0.084796	-1.95013	0.0512
EstR1	-0.0803	0.922842	0.042212	-1.90226	0.0571
GSTM1	-0.13209	0.876266	0.072211	-1.82915	0.0674
TOP2A	-0.11148	0.894512	0.061855	-1.80222	0.0715
AIB1	0.152968	1.165288	0.086332	1.771861	0.0764
FHIT	-0.15572	0.855802	0.088205	-1.7654	0.0775
RIZ1	-0.17467	0.839736	0.099464	-1.75609	0.0791
SURV	0.185784	1.204162	0.106625	1.742399	0.0814
IGF1	-0.10499	0.900338	0.060482	-1.73581	0.0826
BBC3	-0.1344	0.874243	0.077613	-1.73163	0.0833
IGF1R	-0.13484	0.873858	0.077889	-1.73115	0.0834
DIABLO	0.284336	1.32888	0.166556	1.707148	0.0878
TBP	-0.34404	0.7089	0.20564	-1.67303	0.0943
p27	-0.26002	0.771033	0.1564	-1.66256	0.0964
IRS1	-0.07585	0.926957	0.046096	-1.64542	0.0999

20

30

40

二元分析および時間事象分析は、ほとんど例外なしに予後マーカーとして同じ遺伝子を同定した。例えば、表 1 と表 4 との比較は、10 遺伝子が、両方のリストにおける上位 15 遺伝子を表したことを示す。さらに、両方の分析が $[p < 0.10]$ で同じ遺伝子を同定した場合 (これは 21 遺伝子について起こった)、これらは、生存 / 再発の相関の方向 (陽性サインまたは陰性サイン) に関して常に一致した。全体的に、これらの結果は、同定したマーカーが、有意な予後値を有するという結論を強化する。

【 0 1 2 2 】

50

3以上の遺伝子を含むコックスモデル(多変数モデル)について、各個々の遺伝子のモデルへの段階的エントリーを実施した。エントリーした第一の遺伝子を、有意な一変量p値を有する遺伝子の中から前選択する。続く各工程におけるモデルへのエントリーのために選択する遺伝子は、モデルのデータへの適合を最もよく改善する遺伝子である。この分析は、任意の総数の遺伝子で実施され得る。下に示す結果の分析において、段階的エントリーを10遺伝子までについて実施した。

【0123】

多変量分析を、以下の方程式を用いて実施した：

$$RR = \exp [\text{coef}(\text{遺伝子A}) \times Ct(\text{遺伝子A}) + \text{coef}(\text{遺伝子B}) \times Ct(\text{遺伝子B}) + \text{coef}(\text{遺伝子C}) \times Ct(\text{遺伝子C}) + \dots]$$

10

この方程式において、有益な結果の予報値である遺伝子についての係数は、陽性の数であり、好ましくない結果の予報値である遺伝子についての係数は、陰性の数である。この方程式中の「Ct」値は ΔCt であり、すなわち、母集団の平均正規化Ct値と当該の患者で測定された正規化Ctとの間の差異を反映する。この分析で使用される慣習は、母集団の平均を下回る ΔCt および上回る ΔCt は、それぞれ陽性サインおよび陰性サインを有するということである(より多いmRNA存在量またはより少ないmRNA量を反映する)。この方程式を解くことで計算される相対危険度(RR)は、患者が癌再発を伴わない長期生存の機会の増加または減少を有するか否かを示す。

【0124】

(浸潤性乳癌を有する79人の患者の多変量遺伝子分析)

20

浸潤性乳癌を有する79人の患者すべてについて得た遺伝子発現データに関して、コックス比例ハザードモデルを用いた多変量段階的分析を実施した。以下の10遺伝子のセットを、患者の生存の特に強力な予測値を有するように、この分析によって同定した：

【0125】

【化25-1】

- (a) TP53BP2, Bcl2, BAD, EPHX1, PDGFR β , DIABLO, XIAP, YB1, CA9, および KRT8
- (b) GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, および WISP1
- (c) PR, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, IGFBP2, TIMP1, CA9, MMP9, および COX2
- (d) CD68, GRB7, TOP2A, Bcl2, DIABLO, CD3, ID1, PPM1D, MCM6, および WISP1
- (e) Bcl2, TP53BP2, BAD, EPHX1, PDGFR β , DIABLO, XIAP, YB1, CA9, および KRT8
- (f) KRT14, KRT5, PRAME, TP53BP2, GUS1, AIB1, MCM3, CCNE1, MCM6, および ID1
- (g) PRAME, TP53BP2, EstR1, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, および VEGFB
- (h) CTSL2, GRB7, TOP2A, CCNB1, Bcl2, DIABLO, PRAME, EMS1, CA9, および EpCAM

30

【0126】

40

【化 2 5 - 2】

- (i) EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, BBC3, および VEGFB
- (k) Chk1, PRAME, p53BP2, GRB7, CA9, CTSL, CCNB1, TOP2A, 腫瘍サイズ, および IGFBP2
- (l) IGFBP2, GRB7, PRAME, DIABLO, CTSL, β -カテニン, PPM1D, Chk1, WISP1, および LOT1
- (m) HER2, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, EPHX1, TOP2A, TRAIL, CA9, および AREG 10
- (n) BAG1, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNB1, PAI1, AREG, 腫瘍サイズ, CA9, および Ki67
- (o) CEGP1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, および AKT2, および FGF18
- (p) STK15, TP53BP2, PRAME, IL6, CCNE1, AKT2, DIABLO, cMet, CCNE2, および COX2
- (q) KLK10, EstR1, TP53BP2, PRAME, DIABLO, CTSL, PPM1D, GRB7, DAPK1, および BBC3 20
- (r) AIB1, TP53BP2, Bcl2, DIABLO, TIMP1, CD3, p53, CA9, GRB7, および EPHX1
- (s) BBC3, GRB7, CD68, PRAME, TOP2A, CCNB1, EPHX1, CTSL, GSTM1, および APC
- (t) CD9, GRB7, CD68, TOP2A, Bcl2, CCNB1, CD3, DIABLO, ID1, および PPM1D
- (w) EGFR, KRT14, GRB7, TOP2A, CCNB1, CTSL, Bcl2, TP, KLK10, および CA9
- (x) HIF1 α , PR, DIABLO, PRAME, Chk1, AKT2, GRB7, CCNE1, TOP2A, および CCNB1
- (y) MDM2, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, AIB1, TIMP1, CD3, p53, CA9, および HER2
- (z) MYBL2, TP53BP2, PRAME, IL6, Bcl2, DIABLO, CCNE1, EPHX1, TIMP1, および CA9 30
- (aa) p27, TP53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, STK15, AKT2, および ID1
- (ab) RAD51, GRB7, CD68, TOP2A, CIAP2, CCNB1, BAG1, IL6, FGFR1, および TP53BP2
- (ac) SURV, GRB7, TOP2A, PRAME, CTSL, GSTM1, CCNB1, VDR, CA9, および CCNE2
- (ad) TOP2B, TP53BP2, DIABLO, Bcl2, TIMP1, AIB1, CA9, p53, KRT8, および BAD
- (ae) ZNF217, GRB7, p53BP2, PRAME, DIABLO, Bcl2, COX2, CCNE1, APC4, および β -カテニン 40

本発明は、特定の実施形態であるとみなされるものを参照して記載されたが、本発明が、このような実施形態に限定されないことが理解される。反対に、本発明は添付された特許請求の範囲の精神および範囲内に含まれる種々の改変ならびに等価物を網羅することが意図される。例えば、本開示は、種々の乳癌関連遺伝子および遺伝子セットの同定、ならびに乳癌の個別化された予後に焦点を当てるが、他の型の癌に係る類似の遺伝子、遺伝子セットおよび方法は、明確に本発明の範囲内である。

【 0 1 2 7 】

【表 5 A】

50

【 0 1 2 9 】

【 表 5 B 】

表 5B

SURV NM_001168 TGTTTTGATTCCCGGGCTTACCAGGTGAGAAGTGAGGGAGGAAGAAGCAGTGTCCCTTTTGCTAGAGCTGACAGCTTTG
 T8P NM_003194 GCCCGAAACGCCGAATATAATCCCAAGCGGTTTGCTGCGGTAAATCATGAGGATAAGAGAGCCACG
 TGFA NM_003236 GGTGTGCCACAGACCTTCCTACTTGGCCTGTAATCACCTGTGCAGCCTTTTGTGGCCCTTCAAAACTCTGTCAAGAACTCGGT
 TIMP1 NM_003254 TGCCCTGCGGTGCCAGATAGCCTGAATCCTGCCCGGAGTGGAACCTGAAGCCTGCACAGTGTCCACCCCTGTTCGCCAC
 TOP2A NM_001067 AATCCAAGGGGGAGAGTGATGACTTCCATATGGACTTTGACTCAGCTGTGGCTCCTCGGGCAAAATCTGTAC
 TOP2B NM_001068 TGTGGACATCTTCCCTCAGACTTCCCTACTGAGCCACCTTCTCTGCCACGAACCGGTCCGGGTAG
 TP NM_001953 CTATATGCAGCCAGAGATGTGACAGCCACCGTGBACAGCCTGCCACTCATCAGCCTCCATTCTCAGTAAGAACTCGTGG
 TP53BP2 NM_005428 GGGCCAAATATTGAGAAGCTTTTATATCAGAGGACCACCATAGCGGCCATGGAGACCATCTCTGCCATCATACCCATCC
 TRAIL NM_003810 CTTCACAGTGCTCCTGCAGTCTCTGTGTGTGGCTGTAACTTACGTGTACTTTACCAACGAGCTGAAGCAGATG
 TS NM_001071 GCGTCGCTGTGCTTTCAACATCGCCAGCTAGCGCCTGTCTACAGAGAGTCTCACACTTCTTACCCTGGATCCGGCAG
 Upa NM_002558 GTGATGTGCCCTGAAGGACAAGCCAGGCGTCTACACGAGAGTCTCACACTTCTTACCCTGGATCCGGCAG
 VDR NM_000376 GCGCTGGATTTGAGAAAGAGCCAAAGTCTGGATCTGGGACCCCTTCCCTTCCCTGGCTGTAACT
 VEGF NM_003378 CTGCTGTCTTGGGTGCACTTGGAGCCTTGCCCTTGCCTTACCTCCACCATGCCAAGTGGTCCAGGCTGC
 VEGFB NM_003377 TGACGATGGCCTGGAGTGTGTGCCCACTGGGCGAGCACCAAGTCCGGATGCAGATCCTCATGATCCGGTACC
 WISP1 NM_003882 AGAGGATCCATGAATTCACACTTGGCGGCTGCATCAGCACACGCTCCTATCAACCCAAAGTACTGTGGAGTTTG
 XIAP NM_001167 GCAGTTGCAAGACACAGGAAGTATCCCAAAATGGAGATTTATCAACGGCTTTATCTTGAATAAGTGCCACGCA
 YB-1 NM_004569 ACAGCTGTGAGTTTGTATGTTGAAGGAGAAAAGGCTGGCGAGGACGCAAAATGTTACAGSTCCTGTGTGTCTCC
 ZNF217 NM_006526 ACCCAGTAGCAAGGAGAAAGCCCACTCACTGCTCCGAGTGGCGGAAGCTTTCAGAACCTACCACCAAGCTG

10

【 0 1 3 0 】

【表 6 A】

遺伝子	登録	プローブの名称	配列	長さ
AIB1	NM_006534	S1994/AIB1.f3	GCGGCGAGTTTCCGATTTA	19
AIB1	NM_006534	S1995/AIB1.r3	TGAGTCCACCATCCAGCAAGT	21
AIB1	NM_006534	S5055/AIB1.p3	ATGGCGGCGGGAGGATCAAAA	21
AKT1	NM_005163	S0010/AKT1.f3	CGCTTCTATGGCGCTGAGAT	20
AKT1	NM_005163	S0012/AKT1.r3	TCCCGGTACACCACGTTCTT	20
AKT1	NM_005163	S4776/AKT1.p3	CAGCCCTGGACTACCTGCACTCGG	24
AKT2	NM_001626	S0828/AKT2.f3	TCCTGCCACCCTTCAAACC	19
AKT2	NM_001626	S0829/AKT2.r3	GGCGGTAAATTCATCATCGAA	21
AKT2	NM_001626	S4727/AKT2.p3	CAGGTCACGTCCGAGGTCGACACA	24
APC	NM_000038	S0022/APC.f4	GGACAGCAGGAATGTGTTTC	20
APC	NM_000038	S0024/APC.r4	ACCCACTCGATTGTTTCTG	20
APC	NM_000038	S4888/APC.p4	CATTGGCTCCCCGTGACCTGTA	22
AREG	NM_001657	S0025/AREG.f2	TGTGAGTGAAATGCCTTCTAGTAGTGA	27
AREG	NM_001657	S0027/AREG.r2	TTGTGGTTCGTTATCATACTCTTCTGA	27
AREG	NM_001657	S4889/AREG.p2	CCGTCTCGGGAGCCGACTATGA	23
B-アクチン	NM_001101	S0034/B-acti.f2	CAGCAGATGTGGATCAGCAAG	21
B-アクチン	NM_001101	S0036/B-acti.r2	GCATTTGCGGTGGACGAT	18
B-アクチン	NM_001101	S4730/B-acti.p2	AGGAGTATGACGAGTCCGGCCCC	23
B-カテニン	NM_001904	S2150/B-Cate.f3	GGCTCTTGTCGTACTGTCTT	22
B-カテニン	NM_001904	S2151/B-Cate.r3	TCAGATGACGAAGAGCACAGATG	23
B-カテニン	NM_001904	S5046/B-Cate.p3	AGGCTCAGTGATGTCTTCCCTGTCAACCAG	29
BAD	NM_032989	S2011/BAD.f1	GGGTCAGGTGCCTCGAGAT	19
BAD	NM_032989	S2012/BAD.r1	CTGCTCACTCGGCTCAAACCTC	21
BAD	NM_032989	S5058/BAD.p1	TGGCCCCAGAGCATGTTCCAGATC	24
BAG1	NM_004323	S1386/BAG1.f2	CGTTGTGACGACTTGGAATACAA	23
BAG1	NM_004323	S1387/BAG1.r2	GTTCAACCTCTTCTGTGGACTGT	24
BAG1	NM_004323	S4731/BAG1.p2	CCCAATTAACATGACCCGGCAACCAT	28
BBC3	NM_014417	S1584/BBC3.f2	CCTGGAGGGTCCTGTACAAT	20
BBC3	NM_014417	S1585/BBC3.r2	CTAATTGGGCTCCATCTCG	19
BBC3	NM_014417	S4890/BBC3.p2	CATCATGGGACTCCTGCCCTTACC	24
Bcl2	NM_000633	S0043/Bcl2.f2	CAGATGGACCTAGTACCCACTGAGA	25
Bcl2	NM_000633	S0045/Bcl2.r2	CCTATGATTTAAGGGCATTTTTCC	24
Bcl2	NM_000633	S4732/Bcl2.p2	TTCCACGCCGAAGGACAGCGAT	22
CA9	NM_001216	S1398/CA9.f3	ATCCTAGCCCTGGTTTTTGG	20
CA9	NM_001216	S1399/CA9.r3	CGCTCTTCTCATCTGCACAA	20
CA9	NM_001216	S4938/CA9.p3	TTTGCTGTACCCAGCGCTCGC	20
CCNB1	NM_031966	S1720/CCNB1.f2	TTCAGGTTGTTGCAGGAGAC	20
CCNB1	NM_031966	S1721/CCNB1.r2	CATCTTCTTGGGCACACAAT	20
CCNB1	NM_031966	S4733/CCNB1.p2	TGTCTCCATTATTGATCGGTTTCATGCA	27
CCND1	NM_001758	S0058/CCND1.f3	GCATGTTCTGTGGCCTTAAGA	21
CCND1	NM_001758	S0060/CCND1.r3	CGGTGTAGATGCACAGCTTCTC	22
CCND1	NM_001758	S4986/CCND1.p3	AAGGAGACCATCCCCCTGACGGC	23
CCNE1	NM_001238	S1446/CCNE1.f1	AAAGAAGATGATGACCGGGTTTAC	24
CCNE1	NM_001238	S1447/CCNE1.r1	GAGCCTCTGGATGGTGCAAT	20
CCNE1	NM_001238	S4944/CCNE1.p1	CAAACCTCAACGTGCAAGCCTCGGA	24
CCNE2	NM_057749	S1458/CCNE2.f2	ATGCTGTGGCTCCTTCTTAAT	22
CCNE2	NM_057749	S1459/CCNE2.r2	ACCCAAATTGTGATATACAAAAGGTT	27
CCNE2	NM_057749	S4945/CCNE2.p2	TACCAAGCAACCTACATGTCAAGAAAGCCC	30
CD3z	NM_000734	S0064/CD3z.f1	AGATGAAGTGGAAGGCGCTT	20
CD3z	NM_000734	S0066/CD3z.r1	TGCCTCTGTAATCGGCAACTG	21
CD3z	NM_000734	S4988/CD3z.p1	CACCGCGGCCATCCTGCA	18
CD68	NM_001251	S0067/CD68.f2	TGGTTCACAGCCCTGTGT	18
CD68	NM_001251	S0069/CD68.r2	CTCCTCCACCCTGGGTTGT	19
CD68	NM_001251	S4734/CD68.p2	GTCCAAGCCCAGATTTCAGATTTCAGTCA	28
CD9	NM_001769	S0686/CD9.f1	GGGCGTGGAAACAGTTTATCT	20
CD9	NM_001769	S0687/CD9.r1	CACGGTGAAGGTTTCGAGT	19
CD9	NM_001769	S4792/CD9.p1	AGACATCTGCCCCAAGAAGGACGT	24
CDH1	NM_004360	S0073/CDH1.f3	TGAGTGTCCCCCGGTATCTTC	21
CDH1	NM_004360	S0075/CDH1.r3	CAGCCGCTTTTCAGATTTTCAT	21
CDH1	NM_004360	S4990/CDH1.p3	TGCCAATCCCGATGAAATTGGAAATTT	27
CEGP1	NM_020974	S1494/CEGP1.f2	TGACAATCAGCACACCTGCAT	21

【表 6 B】

CEGP1	NM_020974	S1495/CEGP1.r2	TGTGACTACAGCCGTGATCCTTA	23
CEGP1	NM_020974	S4735/CEGP1.p2	CAGGCCCTCTTCCGAGCGGT	20
Chk1	NM_001274	S1422/Chk1.f2	GATAAATTGGTACAAGGGATCAGCTT	26
Chk1	NM_001274	S1423/Chk1.r2	GGGTGCCAAGTAACTGACTATTCA	24
Chk1	NM_001274	S4941/Chk1.p2	CCAGCCCACATGTCTGATCATATGC	26
CIAP1	NM_001166	S0764/CIAP1.f2	TGCCTGTGGTGGGAAGCT	18
CIAP1	NM_001166	S0765/CIAP1.r2	GGAAAATGCCTCCGGTGT	19
CIAP1	NM_001166	S4802/CIAP1.p2	TGACATAGCATCATCCTTTGGTCCAGTT	30
clAP2	NM_001165	S0076/clAP2.f2	GCATATTTCCGTGGCTCTTATTCA	24
clAP2	NM_001165	S0078/clAP2.r2	CTTCTCATCAAGGCAGAAAAATCTT	25
clAP2	NM_001165	S4991/clAP2.p2	TCTCCATCAAATCCTGTAACTCCAGAGCA	30
cMet	NM_000245	S0082/cMet.f2	GACATTTCCAGTCCGTGCAGTCA	22
cMet	NM_000245	S0084/cMet.r2	CTCCGATCGCACACATTTGT	20
cMet	NM_000245	S4993/cMet.p2	TGCCTCTCTGCCCCACCCCTTGT	23
コンテグ27882	AK000618	S2633/Contig.f3	GGCATCCTGGGCCAAAAGT	18
コンテグ27882	AK000618	S2634/Contig.r3	GACCCCTCAGCTGGTAGTTG	21
コンテグ27882	AK000618	S4977/Contig.p3	CCCAAATCCAGGCGGCTAGAGGC	23
COX2	NM_000963	S0088/COX2.f1	TCTGCAGAGTTGGAAGCACTCTA	23
COX2	NM_000963	S0090/COX2.r1	GCCGAGGCTTTTCTACCAGAA	21
COX2	NM_000963	S4995/COX2.p1	CAGGATACAGCTCCACAGCATCGATGTC	28
CTSL	NM_001912	S1303/CTSL.f2	GGGAGGCTTATCTCACTGAGTGA	23
CTSL	NM_001912	S1304/CTSL.r2	CCATTGCAGCCTTCATTGC	19
CTSL	NM_001912	S4899/CTSL.p2	TTGAGGCCAGAGCAGTCTACCAGATTCT	29
CTSL2	NM_001333	S4354/CTSL2.f1	TGTCTCACTGAGCGAGCAGAA	21
CTSL2	NM_001333	S4355/CTSL2.r1	ACCATTGCAGCCCTGATTG	19
CTSL2	NM_001333	S4356/CTSL2.p1	CTTGAGGACGCGAACAGTCCACCA	24
DAPK1	NM_004938	S1768/DAPK1.f3	CGCTGACATCATGAATGTTCT	22
DAPK1	NM_004938	S1769/DAPK1.r3	TCTCTTTGAGCAACGATGTGTCTT	24
DAPK1	NM_004938	S4927/DAPK1.p3	TCATATCCAAACTCGCCTCCAGCCG	25
DIABLO	NM_019887	S0808/DIABLO.f1	CACAATGGCGGCTCTGAAG	19
DIABLO	NM_019887	S0809/DIABLO.r1	ACACAAACACTGTCTGTACCTGAAGA	26
DIABLO	NM_019887	S4813/DIABLO.p1	AAGTTACGCTGCGCGACAGCCAA	23
DR5	NM_003842	S2551/DR5.f2	CTCTGAGACAGTGCTTCGATGACT	24
DR5	NM_003842	S2552/DR5.r2	CCATGAGGCCCAACTTCCT	19
DR5	NM_003842	S4979/DR5.p2	CAGACTTGGTGCCCTTTGACTCC	23
EGFR	NM_005228	S0103/EGFR.f2	TGTGATGGACTTCCAGAAC	20
EGFR	NM_005228	S0105/EGFR.r2	ATTGGGACAGCTTGGATCA	19
EGFR	NM_005228	S4999/EGFR.p2	CACCTGGGCAGCTGCCAA	18
EIF4E	NM_001968	S0106/EIF4E.f1	GATCTAAGATGGCGACTGTGCGAA	23
EIF4E	NM_001968	S0108/EIF4E.r1	TTAGATTCCGTTTTCTCCTCTTCTG	25
EIF4E	NM_001968	S5000/EIF4E.p1	ACCACCCCTACTCCTAATCCCCGACT	27
EMS1	NM_005231	S2663/EMS1.f1	GGCAGTGTCAGTGAATCCTTGA	22
EMS1	NM_005231	S2664/EMS1.r1	TGCACTGTGCGTCCCAAT	18
EMS1	NM_005231	S4956/EMS1.p1	ATCCTCCCCTGCCCGCG	18
EpCAM	NM_002354	S1807/EpCAM.f1	GGGCCCTCCAGAACATGAT	20
EpCAM	NM_002354	S1808/EpCAM.r1	TGCACTGCTTGGCCTTAAAGA	21
EpCAM	NM_002354	S4984/EpCAM.p1	CCGCTCTCATCGCAGTCAGGATCAT	25
EPHX1	NM_000120	S1865/EPHX1.f2	ACCGTAGGCTCTGCTCTGAA	20
EPHX1	NM_000120	S1866/EPHX1.r2	TGGTCCAGGTGGAAAATTC	20
EPHX1	NM_000120	S4754/EPHX1.p2	AGGCAGCCAGACCCACAGGA	20
ErbB3	NM_001982	S0112/ErbB3.f1	CGGTTATGTCATGCCAGATACAC	23
ErbB3	NM_001982	S0114/ErbB3.r1	GAAGTGAAGCCCACTGAAGAAAGG	24
ErbB3	NM_001982	S5002/ErbB3.p1	CCTCAAAGGTACTCCCTCCTCCCGG	25
EstR1	NM_000125	S0115/EstR1.f1	CGTGGTGCCCTCTATGAC	19
EstR1	NM_000125	S0117/EstR1.r1	GGCTAGTGGGCGCATGTAG	19
EstR1	NM_000125	S4737/EstR1.p1	CTGGAGATGCTGGACGCC	19
FBXO5	NM_012177	S2017/FBXO5.r1	GGATTGTAGACTGTCACCGAAATTC	25
FBXO5	NM_012177	S2018/FBXO5.f1	GGCTATTCTCATTTTCTCTACAAAGTG	28
FBXO5	NM_012177	S5081/FBXO5.p1	CCTCCAGGAGGCTACCTTCTTCATGTTAC	30
FGF18	NM_003862	S1665/FGF18.f2	CGGTAGTCAAGTCCGGATCAA	21
FGF18	NM_003862	S1666/FGF18.r2	TCTGGCCTTTGCGGTTCA	18
FGF18	NM_003862	S4914/FGF18.p2	CAAGGAGACGGAATTCTACCTGTGC	25

【表 6 C】

FGFR1	NM_023109	S0818/FGFR1.f3	CACGGGACATTCCACCACATC	20
FGFR1	NM_023109	S0819/FGFR1.r3	GGGTGCCATCCACTTCACA	19
FGFR1	NM_023109	S4816/FGFR1.p3	ATAAAAAGACAACCAACGGCCGACTGC	27
FHIT	NM_002012	S2443/FHIT.f1	CGAGTGGAGCGCTTCCAT	18
FHIT	NM_002012	S2444/FHIT.r1	CTCTCTGGGTGCTCTGAAACAA	22
FHIT	NM_002012	S2445/FHIT.p1	TGGGCCACTTCATCAGGACGCAG	23
FHIT	NM_002012	S4921/FHIT.p1	TGGGCCACTTCATCAGGACGCAG	23
FRP1	NM_003012	S1804/FRP1.f3	TTGGTACCTGTGGGTTAGCA	20
FRP1	NM_003012	S1805/FRP1.r3	CACATCCAAATGCAAACTGG	20
FRP1	NM_003012	S4983/FRP1.p3	TCCCCAGGGTAGAATTCAATCAGAGC	26
G-カネニン	NM_002230	S2153/G-Cate.f1	TCAGCAGCAAGGGCATCAT	19
G-カネニン	NM_002230	S2154/G-Cate.r1	GGTGGTTTTCTTGAGCGTGTACT	23
G-カネニン	NM_002230	S5044/G-Cate.p1	CGCCCGCAGGCCTCATCCT	19
GAPDH	NM_002046	S0374/GAPDH.f1	ATTCCACCCATGGCAAATTC	20
GAPDH	NM_002046	S0375/GAPDH.r1	CGTGGGATTTCATTGATGACA	22
GAPDH	NM_002046	S4738/GAPDH.p1	CCGTCTCAGCCTTGACGGTGC	22
GATA3	NM_002051	S0127/GATA3.f3	CAAAGGAGCTCACTGTGGTGTCT	23
GATA3	NM_002051	S0129/GATA3.r3	GAGTCAGAAATGGCTTATTCACAGATG	26
GATA3	NM_002051	S5005/GATA3.p3	TGTTCCAACCACTGAATCTGGACC	24
GRB7	NM_005310	S0130/GRB7.f2	CCATCTGCATCCATCTTGTT	20
GRB7	NM_005310	S0132/GRB7.r2	GGCCACCAGGGTATTATCTG	20
GRB7	NM_005310	S4726/GRB7.p2	CTCCCCACCCTTGAGAAAGTGCCT	23
GRO1	NM_001511	S0133/GRO1.f2	CGAAAAGATGCTGAACAGTGACA	23
GRO1	NM_001511	S0135/GRO1.r2	TCAGGAACAGCCACCAGTGA	20
GRO1	NM_001511	S5006/GRO1.p2	CTTCTCTCCCTTCTGGTCAGTTGGAT	28
GSTM1	NM_000561	S2026/GSTM1.r1	GGCCACGCTTGAATTTTTCA	20
GSTM1	NM_000561	S2027/GSTM1.f1	AAGCTATGAGGAAAAGAAGTACACGAT	27
GSTM1	NM_000561	S4739/GSTM1.p1	TCAGCCACTGGCTTCTGTCATAATCAGGAG	30
GUS	NM_000181	S0139/GUS.f1	CCCACTCAGTAGCCAAGTCA	20
GUS	NM_000181	S0141/GUS.r1	CACGCAGGTGGTATCAGTCT	20
GUS	NM_000181	S4740/GUS.p1	TCAGTAAACGGGCTGTTTTCAAACA	27
HER2	NM_004448	S0142/HER2.f3	CGGTGTGAGAAGTGACAGCAA	20
HER2	NM_004448	S0144/HER2.r3	CCTCTCGCAAGTGCTCCAT	19
HER2	NM_004448	S4729/HER2.p3	CCAGACCATAGCACACTCGGGCAC	24
HIF1A	NM_001530	S1207/HIF1A.f3	TGAACATAAAGTCTGCAACATGGA	24
HIF1A	NM_001530	S1208/HIF1A.r3	TGAGGTTGGTTACTGTGGTATCATATA	28
HIF1A	NM_001530	S4753/HIF1A.p3	TTGCACTGCACAGGCCACATTCAC	24
HNF3A	NM_004496	S0148/HNF3A.f1	TCCAGGATGTTAGGAACTGTGAAG	24
HNF3A	NM_004496	S0150/HNF3A.r1	GCGTGTCTGCGTAGTAGCTGTT	22
HNF3A	NM_004496	S5008/HNF3A.p1	AGTCGCTGGTTTCATGCCCTTCCA	24
ID1	NM_002165	S0820/ID1.f1	AGAACCAGCAAGGTGAGCAA	19
ID1	NM_002165	S0821/ID1.r1	TCCAACTGAAGGTCCCTGATG	21
ID1	NM_002165	S4832/ID1.p1	TGGAGATTCTCCAGCACGTATCGAC	26
IGF1	NM_000618	S0154/IGF1.f2	TCCGGAGCTGTGATCTAAGGA	21
IGF1	NM_000618	S0156/IGF1.r2	CGGACAGAGCGAGCTGACTT	20
IGF1	NM_000618	S5010/IGF1.p2	TGTATTGCGCACCCCTCAAGCCTG	24
IGF1R	NM_000875	S1249/IGF1R.f3	GCATGGTAGCCGAAGATTTC	21
IGF1R	NM_000875	S1250/IGF1R.r3	TTTCCGGTAATAGTCTGTCTCATAGATATC	30
IGF1R	NM_000875	S4895/IGF1R.p3	CGCGTCATACCAAAATCTCCGATTTTGA	28
IGFBP2	NM_000597	S1128/IGFBP2.f1	GTGGACAGCACCATGAACA	19
IGFBP2	NM_000597	S1129/IGFBP2.r1	CCTTCATACCCGACTTGAGG	20
IGFBP2	NM_000597	S4837/IGFBP2.p1	CTTCCGGCCAGCACTGCCTC	20
IL6	NM_000600	S0760/IL6.f3	CCTGAACCTTCCAAAGATGG	20
IL6	NM_000600	S0761/IL6.r3	ACCAGGCAAGTCTCCTCATT	20
IL6	NM_000600	S4800/IL6.p3	CCAGATTGGAAGCATCCATCTTTTCA	27
IRS1	NM_005544	S1943/IRS1.f3	CCACAGCTCACCTTCTGTCA	20
IRS1	NM_005544	S1944/IRS1.r3	CCTCAGTGCCAGTCTCTTCC	20
IRS1	NM_005544	S5050/IRS1.p3	TCCATCCCAGCTCCAGCCAG	20
KI-67	NM_002417	S0436/KI-67.f2	CGGACTTTGGGTGCGACTT	19
KI-67	NM_002417	S0437/KI-67.r2	TTACAACTCTTCCACTGGGACGAT	24
KI-67	NM_002417	S4741/KI-67.p2	CCACTTGTGCAACCACCGCTCGT	23
KLK10	NM_002776	S2624/KLK10.f3	GCCCAGAGGCTCCATCGT	18

10

20

30

40

【表 6 D】

KLK10	NM_002776	S2625/KLK10.f3	CAGAGGTTTGAACAGTGCAGACA	23
KLK10	NM_002776	S4978/KLK10.p3	CCTCTTCTCCCCAGTGGCTGA	23
KRT14	NM_000526	S1853/KRT14.f1	GGCCTGCTGAGATCAAAGAC	20
KRT14	NM_000526	S1854/KRT14.r1	GTCCACTGTGGCTGTGAGAA	20
KRT14	NM_000526	S5037/KRT14.p1	TGTTCTCAGGTCCTCAATGGTCTTG	26
KRT17	NM_000422	S0172/KRT17.f2	CGAGGATTGGTTCTTCAGCAA	21
KRT17	NM_000422	S0174/KRT17.r2	ACTCTGCACCAGCTCACTGTTG	22
KRT17	NM_000422	S5013/KRT17.p2	CACCTCGCGGTTTCAGTTCTCTGT	24
KRT18	NM_000224	S1710/KRT18.f2	AGAGATCGAGGCTCTCAAGG	20
KRT18	NM_000224	S1711/KRT18.r2	GGCCTTTTACTTCTCTCTCG	20
KRT18	NM_000224	S4762/KRT18.p2	TGGTTCTTCTTCATGAAGAGCAGCTCC	27
KRT19	NM_002276	S1515/KRT19.f3	TGAGCGGCAGAAATCAGGAGTA	21
KRT19	NM_002276	S1516/KRT19.r3	TGCGGTAGGTGGCAATCTC	19
KRT19	NM_002276	S4866/KRT19.p3	CTCATGGACATCAAGTCGCGGCTG	24
KRT5	NM_000424	S0175/KRT5.f3	TCAGTGGAGAAGGAGTTGGA	20
KRT5	NM_000424	S0177/KRT5.r3	TGCCATATCCAGAGGAAACA	20
KRT5	NM_000424	S5015/KRT5.p3	CCAGTCAACATCTCTGTTGTCACAAGCA	28
KRT8	NM_002273	S2588/KRT8.f3	GGATGAAGCTTACATGAACAAGGTAGA	27
KRT8	NM_002273	S2589/KRT8.r3	CATATAGCTGCTGAGGAAGTTGAT	25
KRT8	NM_002273	S4952/KRT8.p3	CGTCGGTCAGCCCTTCCAGGC	21
LOT1 改変体 1	NM_002656	S0692/LOT1 v.f2	GGAAAGACCACCTGAAAAACCA	22
LOT1 改変体 1	NM_002656	S0693/LOT1 v.r2	GTACTTCTTCCCACACTCCTCACA	24
LOT1 改変体 1	NM_002656	S4793/LOT1 v.p2	ACCCACGACCCCAACAAAATGGC	23
Maspin	NM_002639	S0836/Maspin.f2	CAGATGGCCACTTTGAGAACATT	23
Maspin	NM_002639	S0837/Maspin.r2	GGCAGCATTAAACACAAGGATT	22
Maspin	NM_002639	S4835/Maspin.p2	AGCTGACAACAGTGTGAACGACCAGACC	28
MCM2	NM_004526	S1602/MCM2.f2	GACTTTTGCCCGCTACCTTTC	21
MCM2	NM_004526	S1603/MCM2.r2	GCCACTAACTGCTTCAGTATGAAGAG	26
MCM2	NM_004526	S4900/MCM2.p2	ACAGCTCATTGTTGTACGCGCGGA	24
MCM3	NM_002388	S1524/MCM3.f3	GGAGAACAATCCCCTTGAGA	20
MCM3	NM_002388	S1525/MCM3.r3	ATCTCCTGGATGGTGATGGT	20
MCM3	NM_002388	S4870/MCM3.p3	TGGCCTTTCTGTCTACAAGGATCACCA	27
MCM6	NM_005915	S1704/MCM6.f3	TGATGGTCTATGTGTACATTCA	24
MCM6	NM_005915	S1705/MCM6.r3	TGGGACAGGAAACACACCAA	20
MCM6	NM_005915	S4919/MCM6.p3	CAGGTTTCATACCAACACAGGCTTCAGCAC	30
MDM2	NM_002392	S0830/MDM2.f1	CTACAGGGAAGCCATCGAA	19
MDM2	NM_002392	S0831/MDM2.r1	ATCCAACCAATCACCTGAATGTT	23
MDM2	NM_002392	S4834/MDM2.p1	CTTACACCAGCATCAAGATCCGG	23
MMP9	NM_004994	S0856/MMP9.f1	GAGAACCAATCTCACCGACA	20
MMP9	NM_004994	S0857/MMP9.r1	CACCCGAGTGTAACCATAGC	20
MMP9	NM_004994	S4760/MMP9.p1	ACAGGTATTCTCTGCCAGCTGCC	24
MTA1	NM_004689	S2369/MTA1.f1	CCGCCCTCACCTGAAGAGA	19
MTA1	NM_004689	S2370/MTA1.r1	GGAAATAAGTTAGCCGCGCTTCT	22
MTA1	NM_004689	S4655/MTA1.p1	CCCAGTGTCCGCCAAGGAGCG	21
MYBL2	NM_002466	S3270/MYBL2.f1	GCCGAGATCGCCAAGATG	18
MYBL2	NM_002466	S3271/MYBL2.r1	CTTTTGATGGTAGAGTTCCAGTGATTG	27
MYBL2	NM_002466	S4742/MYBL2.p1	CAGCATTGTCTGTCTCCCTGCEA	24
P14ARF	S78535	S2842/P14ARF.f1	CCCTCGTGCTGATGCTACT	19
P14ARF	S78535	S2843/P14ARF.r1	CATCATGACCTGGTCTTCTAGG	22
P14ARF	S78535	S4971/P14ARF.p1	CTGCCCTAGACGCTGGCTCCTC	22
p27	NM_004064	S0205/p27.f3	CGGTGGACCACGAAGAGTTAA	21
p27	NM_004064	S0207/p27.r3	GGCTCGCCTCTTCCATGTC	19
p27	NM_004064	S4750/p27.p3	CCGGGACTTGGAGAAGCACTGCA	23
P53	NM_000546	S0208/P53.f2	CTTTGAACCCCTTGCTTGCAA	20
P53	NM_000546	S0210/P53.r2	CCCGGACAAAGCAAATG	18
P53	NM_000546	S5065/P53.p2	AAGTCCTGGGTGCTTCTGACGCACA	25
PAI1	NM_000602	S0211/PAI1.f3	CCGCAACGTGGTTTCTCA	19
PAI1	NM_000602	S0213/PAI1.r3	TGCTGGGTTTCTCCTCCTGTT	21
PAI1	NM_000602	S5066/PAI1.p3	CTCGGTGTTGGCCATGCTCCAG	22
PDGFRb	NM_002609	S1346/PDGFRb.f3	CCAGCTCTCCTTCCAGTAC	20
PDGFRb	NM_002609	S1347/PDGFRb.r3	GGGTGGCTCTCACTTAGCTC	20
PDGFRb	NM_002609	S4931/PDGFRb.p3	ATCAATGTCCCTGTCCGAGTGCTG	24

10

20

30

40

【表 6 E】

PI3KC2A	NM_002645	S2020/PI3KC2.r1	CACACTAGCATTTTCTCCGCATA	23
PI3KC2A	NM_002645	S2021/PI3KC2.f1	ATACCAATCACCGCACAAACC	21
PI3KC2A	NM_002645	S5062/PI3KC2.p1	TGCGCTGTGACTGGACTTAACAAATAGCCT	30
PPM1D	NM_003620	S3158/PPM1D.f1	GCCATCCGCAAAGGCTTT	18
PPM1D	NM_003620	S3160/PPM1D.r1	GGCCATTCCGCCAGTTTC	18
PPM1D	NM_003620	S4856/PPM1D.p1	TGCTTGTGACCTTGCCATGTGG	23
PR	NM_000926	S1336/PR.f3	GCATCAGGCTGTCAATTATGG	20
PR	NM_000926	S1337/PR.r6	AGTAGTTGTGCTGCCCTTCC	20
PR	NM_000926	S4743/PR.p6	TGTCCTTACCTGTGGGAGCTGTAAGGTG	28
PRAME	NM_006115	S1985/PRAME.f3	TCTCCATATCTGCCTTGCAGAGT	23
PRAME	NM_006115	S1986/PRAME.r3	GCACGTGGGTGAGATTGCT	19
PRAME	NM_006115	S4756/PRAME.p3	TCCTGCAGCACCTCATCGGGCT	22
pS2	NM_003225	S0241/pS2.f2	GCCCTCCAGTGTGCAAAAT	19
pS2	NM_003225	S0243/pS2.r2	CGTCGATGGTATTAGGATAGAAGCA	25
pS2	NM_003225	S5026/pS2.p2	TGCTGTTTCGACGACACCGTTCC	23
RAD51C	NM_058216	S2606/RAD51C.f3	GAACCTCTTGAGCAGGAGCATACC	24
RAD51C	NM_058216	S2607/RAD51C.r3	TCCACCCCAAGAATATCATCTAGT	25
RAD51C	NM_058216	S4764/RAD51C.p3	AGGGCTTCATAATCACCTTCTGTTC	25
RB1	NM_000321	S2700/RB1.f1	CGAAGCCCTTACAAGTTTCC	20
RB1	NM_000321	S2701/RB1.r1	GGACTCTTCAGGGGTGAAAT	20
RB1	NM_000321	S4765/RB1.p1	CCCTTACGGATTCTGGAGGGAAC	24
RIZ1	NM_012231	S1320/RIZ1.f2	CCAGACGAGCGATTAGAAGC	20
RIZ1	NM_012231	S1321/RIZ1.r2	TCCTCCTCTTCTCCTCCTC	20
RIZ1	NM_012231	S4761/RIZ1.p2	TGTGAGGTGAATGATTTGGGGGA	23
STK15	NM_003600	S0794/STK15.f2	CATCTTCCAGGAGGACCACT	20
STK15	NM_003600	S0795/STK15.r2	TCCGACCTTCAATCATTTCA	20
STK15	NM_003600	S4745/STK15.p2	CTCTGTGGCACCTGGAACATACC	24
STMY3	NM_005940	S2067/STMY3.f3	CCTGGAGGCTGCAACATACC	20
STMY3	NM_005940	S2068/STMY3.r3	TACAATGGCTTTGGAGGATAGCA	23
STMY3	NM_005940	S4746/STMY3.p3	ATCCTCCTGAAGCCCTTTTCGCAGC	25
SURV	NM_001168	S0259/SURV.f2	TGTTTTGATTCCCGGGCTTA	20
SURV	NM_001168	S0261/SURV.r2	CAAAGCTGTGAGCTCTAGCAAAAG	24
SURV	NM_001168	S4747/SURV.p2	TGCCCTTCTTCTCCTCCTCCTCCTC	28
TBP	NM_003194	S0262/TBP.f1	GCCCCAAACGCCGAATATA	19
TBP	NM_003194	S0264/TBP.r1	CGTGGCTCTCTTATCCTCATGAT	23
TBP	NM_003194	S4751/TBP.p1	TACCGCAGCAAACCGCTTGGG	21
TGFA	NM_003236	S0489/TGFA.f2	GGTGTGCCACAGACCTTCTCT	20
TGFA	NM_003236	S0490/TGFA.r2	ACGGAGTTCTTGACAGAGTTTGA	24
TGFA	NM_003236	S4768/TGFA.p2	TTGGCCTGTAATCACCTGTGCAGCCTT	27
TIMP1	NM_003254	S1695/TIMP1.f3	TCCCTGCGGTCCAGATAG	19
TIMP1	NM_003254	S1696/TIMP1.r3	GTGGGAACAGGGTGGACACT	20
TIMP1	NM_003254	S4918/TIMP1.p3	ATCCTGCCCGGAGTGGAACTGAAGC	25
TOP2A	NM_001067	S0271/TOP2A.f4	AATCCAAGGGGGAGAGTGAT	20
TOP2A	NM_001067	S0273/TOP2A.r4	GTACAGATTTTGCCCGAGGA	20
TOP2A	NM_001067	S4777/TOP2A.p4	CATATGGACTTTGACTCAGCTGTGGC	26
TOP2B	NM_001068	S0274/TOP2B.f2	TGTGGACATCTTCCCTCAGA	21
TOP2B	NM_001068	S0276/TOP2B.r2	CTAGCCCGACCGGTTCTGT	18
TOP2B	NM_001068	S4778/TOP2B.p2	TTCCCTACTGAGCCACCTTCTCTG	24
TP	NM_001953	S0277/TP.f3	CTATATGCAGCCAGAGATGTGACA	24
TP	NM_001953	S0279/TP.r3	CCACGAGTTTCTTACTGAGAATGG	24
TP	NM_001953	S4779/TP.p3	ACAGCCTGCCACTCATCACAGCC	23
TP53BP2	NM_005426	S1931/TP53BP.f2	GGGCCAAATATTCAGAAAGC	19
TP53BP2	NM_005426	S1932/TP53BP.r2	GGATGGGTATGATGGGACAG	20
TP53BP2	NM_005426	S5049/TP53BP.p2	CCACCATAGCGGCCATGGAG	20
TRAIL	NM_003810	S2539/TRAIL.f1	CTTCACAGTGCTCCTGCAGTCT	22
TRAIL	NM_003810	S2540/TRAIL.r1	CATCTGCTTCAGCTCGTTGGT	21
TRAIL	NM_003810	S4980/TRAIL.p1	AAGTACAGTAAGTTACAGCCACACA	26
TS	NM_001071	S0280/TS.f1	GCCTCGGTGTGCCTTTCA	18
TS	NM_001071	S0282/TS.r1	CGTGATGTGCGCAATCATG	19
TS	NM_001071	S4780/TS.p1	CATGCCAGCTACGCCCTGCTC	22
upa	NM_002658	S0283/upa.f3	GTGGATGTGCCCTGAAGGA	19
upa	NM_002658	S0285/upa.r3	CTGCCGATCCAGGGTAAGAA	20

10

20

30

40

【表 6 F】

表 6F

upa	NM_002858	S4769/upa.p3	AAGCCAGGCGTCTACACGAGAGTCTCAC	28
VDR	NM_000376	S2745/VDR.f2	GCCCTGGATTTCAGAAAGAG	20
VDR	NM_000376	S2746/VDR.r2	AGTTACAAGCCAGGGAAGGA	20
VDR	NM_000376	S4862/VDR.p2	CAAGTCTGGATCTGGGACCCCTTCC	25
VEGF	NM_003376	S0286/VEGF.f1	CTGCTGTCTTGGGTGCATTG	20
VEGF	NM_003376	S0288/VEGF.r1	GCAGCCTGGGACCACTTG	18
VEGF	NM_003376	S4782/VEGF.p1	TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCACCA	25
VEGFB	NM_003377	S2724/VEGFB.f1	TGACGATGGCCTGGAGTGT	19
VEGFB	NM_003377	S2725/VEGFB.r1	GGTACCGGATCATGAGGATCTG	22
VEGFB	NM_003377	S4960/VEGFB.p1	CTGGGCAGCACCAAGTCCGGA	21
WISP1	NM_003882	S1671/WISP1.f1	AGAGGCATCCATGAACTTCACA	22
WISP1	NM_003882	S1672/WISP1.r1	CAAACCTCCACAGTACTTGGGTGA	24
WISP1	NM_003882	S4915/WISP1.p1	CGGGCTGCATCAGCACACGC	20
XIAP	NM_001167	S0289/XIAP.f1	GCAGTTGGAAGACACAGGAAAGT	23
XIAP	NM_001167	S0291/XIAP.r1	TGCGTGGCACTATTTTCAAGA	21
XIAP	NM_001167	S4752/XIAP.p1	TCCCCAAATTGCAGATTTATCAACGGC	27
YB-1	NM_004559	S1184/YB-1.f2	AGACTGTGGAGTTTGATGTTGTTGA	25
YB-1	NM_004559	S1195/YB-1.r2	GGAAACACCACCAGGACCTGTAA	22
YB-1	NM_004559	S4843/YB-1.p2	TTGCTGCCTCCGCACCCCTTTTCT	23
ZNF217	NM_006526	S2739/ZNF217.f3	ACCCAGTAGCAAGGAGAAGC	20
ZNF217	NM_006526	S2740/ZNF217.r3	CAGCTGGTGGTAGGTTCTGA	20
ZNF217	NM_006526	S4961/ZNF217.p3	CACTCACTGCTCCGAGTGCCG	21

10

【配列表】

2006516897000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/US2004/000985
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 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) IPC 7 C12Q C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EP0-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SGROI D C ET AL: "IN VIVO GENE EXPRESSION PROFILE ANALYSIS OF HUMAN BREAST CANCER PROGRESSION" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 59, no. 22, 15 November 1999 (1999-11-15), pages 5656-5661, XP000994514 ISSN: 0008-5472 abstract	10,25, 26,51
Y	figure 2; table 1 page 5657, column 1, paragraph 4 ----- -/--	1-9, 11-23, 27-33, 35-50
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in 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 11 November 2004		Date of mailing of the international search report 02 DEC 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Aguilera, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/000985

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAMUELS-LEV YARDENA ET AL: "ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53" MOLECULAR CELL, vol. 8, no. 4, October 2001 (2001-10), pages 781-794, XP002202189 ISSN: 1097-2765	25,26,51
Y	abstract page 789, column 2, paragraph 3 - page 791, column 1, paragraph 1; table 1	1-9, 11-23, 27-33, 35-50
Y	WO 02/10436 A (BAAK JAN ; BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL (US)) 7 February 2002 (2002-02-07) abstract page 2, lines 7-20 page 7, lines 8-10 page 3, line 8 - page 4, line 13 page 6, line 28 - page 7, line 14 example 1	1-9, 11-24, 27-50
A	GUERIN M ET AL: "STRUCTURE AND EXPRESSION OF C-ERBB-2 AND EGF RECEPTOR GENES IN INFLAMMATORY AND NON-INFLAMMATORY BREAST CANCER: PROGNOSTIC SIGNIFICANCE" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 43, 1989, pages 201-208, XP002935671 ISSN: 0020-7136 abstract page 202, column 2, paragraph 2 - page 203, column 1, paragraph 1	1-23, 25-33, 35-51
A	MURRAY P A ET AL: "The prognostic significance of transforming growth factors in human breast cancer" BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 67, no. 6, 1993, pages 1408-1412, XP008031811 ISSN: 0007-0920 abstract	1-23, 25-33, 35-51

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/US2004/000985

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SENS MARY ANN ET AL: "Metallothionein isoform 3 overexpression is associated with breast cancers having a poor prognosis" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 159, no. 1, July 2001 (2001-07), pages 21-26, XP002285193 ISSN: 0002-9440 abstract page 22, column 1, paragraph 2 page 23, column 1, paragraph 4 - column 2, paragraph 1	1-23, 25-33, 35-51
A	SCHORR K ET AL: "BCL-2 GENE FAMILY AND RELATED PROTEINS IN MAMMARY GLAND INVOLUTION AND BREAST CANCER" JOURNAL OF MAMMARY GLAND BIOLOGY AND NEOPLASIA, PLENUM PRESS, NEW YORK, NY,, US, vol. 4, no. 2, April 1999 (1999-04), pages 153-164, XP000973885 ISSN: 1083-3021 the whole document	1-23, 25-33, 35-51
P,X	WO 03/078662 A (BAKER JOFFRE B ; GENOMIC HEALTH (US); SHAK STEVE (US); CRONIN MAUREEN) 25 September 2003 (2003-09-25) claims 1-45	1-23, 25-33, 35-51
Y	VEER VAN 'T L J ET AL: "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 415, no. 6871, 31 January 2002 (2002-01-31), pages 530-536, XP002259781 ISSN: 0028-0836 the whole document	1-9, 11-51
X	WO 02/46467 A (BERTUCCI FRANCOIS ; IPSOGEN (FR); VIENS PATRICE (FR); BIRNBAUM DANIEL) 13 June 2002 (2002-06-13) page 46; claims 2,27 pages 7,19-25; figures 2,3	10,25,26

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/000985

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BORRESEN-DALE A-L: "GENETIC PROFILING OF BREAST CANCER: FROM MOLECULAR PORTRAITS TO CLINICAL UTILITY" INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MARKERS, WICHTIG EDITORE, MILAN, IT, vol. 18, no. 1, 20 September 2002 (2002-09-20), pages 54-56, XP008036675 ISSN: 0393-6155 page 54, column 2 - page 55, column 2	10,25,26
Y	page 55, column 1	1-9, 11-24, 27-51
Y	----- US 6 001 583 A (MARGOLIS BENJAMIN LEWIS) 14 December 1999 (1999-12-14) column 31	1-9, 11-24, 27-51
X	----- WO 00/55180 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; ROSEN CRAIG A (US); RUBEN STEVEN M (US)) 21 September 2000 (2000-09-21) page 311, line 19 - line 28; sequence 50	10
X	----- LEEK R D ET AL: "ASSOCIATION OF MACROPHAGE INFILTRATION WITH ANGIOGENESIS AND PROGNOSIS IN INVASIVE BREAST CARCINOMA" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 56, 15 October 1996 (1996-10-15), pages 4625-4629, XP002056968 ISSN: 0008-5472	25,26
Y	Abstract page 4626, column 1, paragraph 6 page 4625, column 2, paragraph 4	1-9, 11-23, 27-34, 36-50
X	----- UENO T ET AL: "Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. AUG 2000, vol. 6, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 3282-3289, XP002304930 ISSN: 1078-0432	25,26
Y	Abstract page 3283, column 1, paragraph 2	1-9, 11-23, 27-34, 36-50
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US2004/000985

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/75160 A (VYSIS INC) 11 October 2001 (2001-10-11) page 43, line 19 - line 21; table 1 page 46, line 4 -----	10
X	FOROZAN FARAHNAZ ET AL: "Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: A basis for interpreting complementary DNA microarray data" CANCER RESEARCH, vol. 60, no. 16, 15 August 2000 (2000-08-15), pages 4519-4525, XP002304931 ISSN: 0008-5472 page 4520, column 1, paragraph 1 page 4523, column 1, paragraph 2	10
Y	-----	1-9, 11-23, 27-33, 35-51
Y	RASCHELLA GIUSEPPE ET AL: "Expression of B-myb in neuroblastoma tumors is a poor prognostic factor independent from MYCN amplification" CANCER RESEARCH, vol. 59, no. 14, 15 July 1999 (1999-07-15), pages 3365-3368, XP002304932 ISSN: 0008-5472 abstract -----	1-9, 11-23, 27-33, 35-51
X	WO 00/55173 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ; ROSEN CRAIG A (US); RUBEN STEVEN M (US)) 21 September 2000 (2000-09-21) page 301; sequences 22,118,132 -----	10
X	WO 02/059271 A (ORR MICHAEL S ; DIGGANS JAMES C (US); GENE LOGIC INC (US); NATION MICH) 1 August 2002 (2002-08-01) claims 24-30; sequence 1226 -----	10
Y	CHENARD M-P ET AL: "HIGH LEVELS OF STROMELYSIN-3 CORRELATE WITH POOR PROGNOSIS IN PATIENTS WITH BREAST CARCINOMA" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 69, no. 6, 1996, pages 448-451, XP008036913 ISSN: 0020-7136 abstract -----	1-9, 11-33, 36-48,51
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US2004/000985

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ENGEL G ET AL: "CORRELATION BETWEEN STROMELYSIN-3 MRNA LEVEL AND OUTCOME OF HUMAN BREAST CANCER" INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, NEW YORK, NY, US, vol. 58, no. 6, 1994, pages 830-835, XP008036912 ISSN: 0020-7136 abstract -----	1-9, 11-33, 36-48,51
Y	AHMAD A ET AL: "STROMELYSIN 3: AN INDEPENDENT PROGNOSTIC FACTOR FOR RELAPSE-FREE SURVIVAL IN NODE-POSITIVE BREAST CANCER AND DEMONSTRATION OF NOVEL BREAST CARCINOMA CELL EXPRESSION" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 152, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 721-728, XP001073488 ISSN: 0002-9440 abstract -----	1-9, 11-33, 36-48,51

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/US2004/000985
Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

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

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

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
 1-51 (all partially)

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.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2004/000985

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-23, 25-33 and 35-51 (all partially)

Invention 1:Methods for predicting the likelihood of long-term survival of a breast cancer patient without recurrence comprising determining the mRNA expression level of gene TP53BP2. Kit comprising reagents to carry out said methods. Arrays comprising probes for said gene. Methods of preparing a personalized genomics profile for a patient comprising determining the expression level of said gene. Method for amplification of said gene by PCR, primers for use in such methods and amplicons obtained as defined by SEQ ID NOs: 100, 408, 409 and 410.

2. claims: 1-51 (all partially)

Inventions 2-46:Methods for predicting the likelihood of long-term survival of a breast cancer patient without recurrence comprising determining the mRNA expression level of gene GRB7 Kit comprising reagents to carry out said methods. Arrays comprising probes for said gene. Methods of preparing a personalized genomics profile for a patient comprising determining the expression level of said gene. Method for amplification of said gene by PCR, primers for use in such methods and amplicons obtained. [idem. for every one of the 46 genes listed in claim 1]

3. claims: 1-51 (all partially)

Inventions 47-110:Methods for predicting the likelihood of long-term survival of a breast cancer patient without recurrence comprising determining the mRNA expression level of gene GRB7 Kit comprising reagents to carry out said methods. Arrays comprising probes for said gene. Methods of preparing a personalized genomics profile for a patient comprising determining the expression level of said gene. Method for amplification of said gene by PCR, primers for use in such methods and amplicons obtained. [idem. for every one of the 110 genes listed in Tables 5A and 5B not included in the previous inventions]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/000985

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0210436	A	07-02-2002	WO 0210436 A2 US 6703204 B1	07-02-2002 09-03-2004
WO 03078662	A	25-09-2003	WO 03078662 A1 US 2003225528 A1	25-09-2003 04-12-2003
WO 0246467	A	13-06-2002	US 2003143539 A1 AU 3479902 A CA 2430981 A1 EP 1353947 A2 WO 0246467 A2	31-07-2003 18-06-2002 13-06-2002 22-10-2003 13-06-2002
US 6001583	A	14-12-1999	US 6037134 A US 6630318 B1 AU 1980995 A WO 9524205 A1	14-03-2000 07-10-2003 25-09-1995 14-09-1995
WO 0055180	A	21-09-2000	AU 3395900 A AU 3617600 A AU 3617700 A AU 3619400 A AU 3619500 A AU 3869400 A CA 2364567 A1 CA 2364590 A1 CA 2364629 A1 CA 2366130 A1 CA 2366174 A1 CA 2366195 A1 EP 1168917 A2 EP 1165588 A1 EP 1169469 A1 EP 1165589 A1 EP 1159420 A1 EP 1163358 A1 JP 2003512815 T JP 2003512816 T JP 2003513610 T JP 2003514510 T JP 2004508001 T JP 2003514511 T WO 0055173 A1 WO 0055350 A1 WO 0055351 A1 WO 0055180 A2 WO 0055174 A1 WO 0055320 A1 US 2003054421 A1 US 2002081659 A1 US 2002039764 A1 US 2002055627 A1 US 2002151681 A1 US 2002052308 A1 US 2002044941 A1	04-10-2000 04-10-2000 04-10-2000 04-10-2000 04-10-2000 04-10-2000 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000 09-01-2002 02-01-2002 09-01-2002 02-01-2002 05-12-2001 19-12-2001 08-04-2003 08-04-2003 15-04-2003 22-04-2003 18-03-2004 22-04-2003 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000 21-09-2000 20-03-2003 27-06-2002 04-04-2002 09-05-2002 17-10-2002 02-05-2002 18-04-2002
WO 0175160	A	11-10-2001	AU 8928301 A CA 2402320 A1 EP 1268860 A1	15-10-2001 11-10-2001 02-01-2003

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/000985

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0175160	A	WO 0175160 A1	11-10-2001
WO 0055173	A	21-09-2000	
		AU 3395900 A	04-10-2000
		AU 3617600 A	04-10-2000
		AU 3617700 A	04-10-2000
		AU 3619400 A	04-10-2000
		AU 3619500 A	04-10-2000
		AU 3869400 A	04-10-2000
		CA 2364567 A1	21-09-2000
		CA 2364590 A1	21-09-2000
		CA 2364629 A1	21-09-2000
		CA 2366130 A1	21-09-2000
		CA 2366174 A1	21-09-2000
		CA 2366195 A1	21-09-2000
		EP 1168917 A2	09-01-2002
		EP 1165588 A1	02-01-2002
		EP 1169469 A1	09-01-2002
		EP 1165589 A1	02-01-2002
		EP 1159420 A1	05-12-2001
		EP 1163358 A1	19-12-2001
		JP 2003512815 T	08-04-2003
		JP 2003512816 T	08-04-2003
		JP 2003513610 T	15-04-2003
		JP 2003514510 T	22-04-2003
		JP 2004508001 T	18-03-2004
		JP 2003514511 T	22-04-2003
		WO 0055173 A1	21-09-2000
		WO 0055350 A1	21-09-2000
		WO 0055351 A1	21-09-2000
		WO 0055180 A2	21-09-2000
		WO 0055174 A1	21-09-2000
		WO 0055320 A1	21-09-2000
		US 2003054421 A1	20-03-2003
		US 2002081659 A1	27-06-2002
		US 2002039764 A1	04-04-2002
		US 2002055627 A1	09-05-2002
		US 2002151681 A1	17-10-2002
		US 2002052308 A1	02-05-2002
		US 2002044941 A1	18-04-2002
WO 02059271	A	01-08-2002	
		WO 02059271 A2	01-08-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/574		A
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, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 コブレイ, メロディー エー.

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 5 4 6, リバーサイド, ミシヨー ロード 1 0 5

(72)発明者 シャク, スティーブ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, ヒルズバラ, フェアウェイ サイクル 6 4 8

(72)発明者 ベイカー, ジョフリ ピー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 3 7, モンタラ, ピー.オー. ボックス 3 7 1 2 1 2

(72)発明者 クロニン, モウリーン ティー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 2 4, ロス アルトス, アンダーソン ドライブ 7 7 1

F ターム(参考) 4B024 AA12 CA11 HA14

4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03 CC08 FA15

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ52 QR08 QR32 QR56 QR62 QR84

QS25 QS34 QX02

专利名称(译)	基因表达标志物用于诊断乳腺癌预后		
公开(公告)号	JP2006516897A	公开(公告)日	2006-07-13
申请号	JP2006500964	申请日	2004-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	拉什大学医学中心		
申请(专利权)人(译)	基因组Health公司 拉什大学医学中心		
[标]发明人	コブレイメロディーエー シャクスティーブ ベイカージョフリビー クロニンモウリーンティー		
发明人	コブレイ, メロディー エー. シャク, スティーブ ベイカー, ジョフリ ビー. クロニン, モウリーン ティー.		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12M1/00 C12Q1/02 G01N33/574 G01N33/53 G01N37/00 B60G9/02 B60K17/04 C12N		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12M1/00.A C12N15/00.F C12Q1/02 G01N33/574.A G01N33/53.M G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA11 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR84 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/440861 2003-01-15 US		
其他公开文献	JP2006516897A5 JP4723472B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了基因组，其表达在乳腺癌的诊断和/或预后中是重要的。