

(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2006-518031
(P2006-518031A)

(43) 公表日 平成18年8月3日(2006.8.3)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)		GO 1 N 33/53	D	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00	1 1 1	
GO 1 N 33/15 (2006.01)		GO 1 N 33/15	Z	
GO 1 N 33/50 (2006.01)		GO 1 N 33/50	Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 38 頁) 最終頁に続く				

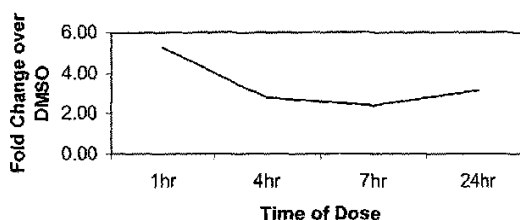
(21) 出願番号	特願2004-540313 (P2004-540313)	(71) 出願人	503211596 バイエル・ファーマシューチカルズ・コーポレーション アメリカ合衆国コネチカット州06516 ウエストヘブン・モーガンレーン400
(86) (22) 出願日	平成15年9月30日 (2003.9.30)	(74) 代理人	100060782 弁理士 小田島 平吉
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月23日 (2005.3.23)	(72) 発明者	イブリー, ティーパ アメリカ合衆国コネチカット州06516 ウエストヘブン・ソレンソンロード81
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/031032	(72) 発明者	テイラー, イアン アメリカ合衆国コネチカット州06433 マディソン・カントリーウエイ149
(87) 国際公開番号	W02004/028352	Fターム(参考)	4C084 AA17 NA20 ZB26 ZC20
(87) 国際公開日	平成16年4月8日 (2004.4.8)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/415,194		
(32) 優先日	平成14年9月30日 (2002.9.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 ガンの予測および予後、ならびにガン治療を監視するための方法

(57) 【要約】

本発明はまた、バイオマーカーおよびガンの予測および予後のためのバイオマーカーの使用ならびにガン処置の効力をモニタリングするためのバイオマーカーの使用に関する。具体的には本発明はRafキナーゼインヒビターのバイオマーカーとしてアドレノメジュリンの使用に関する。

TaqMan Adrenomedullin Gene Expression in MiaPaCa Xenografts +Raf Kinase Inhibitor



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

抗ガン剤を投与することによりガンを処置している患者の応答を監視する方法であって：

(a) 抗ガン剤で処置する前に患者から採取した第 1 の生物学的サンプル中の 1 以上のバイオマーカーの発現レベルを測定し；

(b) 抗ガン剤での初期の処置後に患者から採取した少なくとも 1 つの第 2 の生物学的サンプル中のバイオマーカーの発現レベルを測定し；そして

(c) 第 2 の生物学的サンプル中のバイオマーカーの発現レベルを第 1 の生物学的サンプル中のバイオマーカーの発現レベルと比較する、

工程を含んでなり、第 1 の生物学的サンプル中のバイオマーカーの発現レベルと比較した第 2 の生物学的サンプル中のバイオマーカーの発現レベルの変化が、抗ガン剤による処置の効力の指標となる上記方法。

10

【請求項 2】

ガンが乳ガン、気道のガン、脳のガン、生殖器官のガン、消化管のガン、尿路のガン、目のガン、肝臓ガン、皮膚ガン、頭および首のガン、甲状腺ガン、副甲状腺ガン、リンパ腫、肉腫および白血病からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

上記抗ガン剤が R a f キナーゼインヒビターである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

上記バイオマーカーがアドレノメジュリンである、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

上記生物学的サンプルが血液、尿、骨髄および生検サンプルからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

ガンの処置に有用な化合物の同定法であって：

(a) 化合物での処置前に、細胞または組織サンプル中の 1 以上の遺伝子および / または遺伝子産物の発現レベルを分析し；

(b) 化合物での処置後に、細胞または組織サンプル中の 1 以上の遺伝子および / または遺伝子産物の発現レベルを分析する、

工程を含んでなり、遺伝子および / または遺伝子産物の発現レベルにおける変動が薬剤効力の指標となる上記方法。

30

【請求項 7】

遺伝子または遺伝子産物がアドレノメジュリンである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

ガンの処置に有用な化合物を同定する方法であって：

(a) 化合物での処置前に、細胞または組織サンプル中の 1 以上のポリペプチドの発現レベルを分析し；

(b) 化合物での処置後に、細胞または組織サンプル中の 1 以上のポリペプチドの発現レベルを分析する、

工程を含んでなり、ポリペプチドの発現レベルにおける変動が薬剤効力の指標となる上記方法。

40

【請求項 9】

ポリペプチドがアドレノメジュリンである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも 15 個のヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含んでなる核酸プローブを含んでなる、細胞または組織サンプル中の化合物の効力を監視するためのキット。

【請求項 11】

細胞を懸濁または固定するための溶液、検出可能な標識、ハイブリダイゼーション溶液、細胞を溶解するための溶液、および / または核酸精製のための溶液をさらに含んでなる

50

、請求項 10 に記載のキット。

【請求項 12】

核酸プローブが配列番号 1 のヌクレオチド配列を含んでなる、請求項 10 に記載のキット。

【請求項 13】

タンパク質に特異的な抗体を含んでなる、細胞または組織サンプル中の化合物の効力を監視するためのキット。

【請求項 14】

細胞を懸濁または固定するための溶液、検出可能な標識、ポリペプチドを抗体に結合し易くさせる溶液、細胞を溶解するための溶液、および/またはポリペプチド精製のための溶液をさらに含んでなる、請求項 13 に記載のキット。

10

【請求項 15】

抗体がアドレノメジュリンに特異的である、請求項 13 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2002年9月30日に出願された特許文献1の利益を主張し、この内容は全部、引用により本明細書に編入する。

発明の分野

本発明は、バイオマーカーおよびガンの予測および予後のためのバイオマーカーの使用、ならびにガン処置の効力を監視するためのバイオマーカーの使用に関する。具体的には、本発明は Raf キナーゼインヒビターのバイオマーカーとしてのアドレノメジュリン (adrenomedullin) の使用に関する。

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

多くの疾患状態は、遺伝子 DNA のコピー数の変化、または特定の遺伝子の転写レベルの変化のいずれかを介する (例えばイニシエーションの制御、RNA 前駆体の供給、RNA プロセッシング等を介して) 種々の遺伝子の発現レベルにおける差異が特徴である。例えば遺伝物質の損失および獲得は、悪性の形質転換および進行に重要な役割を果たす。これらの獲得および損失は少なくとも2種類の遺伝子、ガン遺伝子および腫瘍抑制遺伝子により駆動されていると考えられている。ガン遺伝子は腫瘍形成の正のレギュレーターであるが、腫瘍抑制遺伝子は腫瘍形成の負のレギュレーターである (非特許文献1; 非特許文献2)。したがって制御されていない増殖を活性化する1つのメカニズムは、ガン遺伝子タンパク質をコードする遺伝子数を増すこと、またはこれらのガン遺伝子の発現レベルを増すことであり (例えば細胞または環境的变化に応答して)、そして別のメカニズムは腫瘍サプレッサーをコードする遺伝物質を失うこと、または遺伝子の発現レベルを下げることである。このモデルは神経膠腫の進行に関連する遺伝物質の損失および獲得により支持される (非特許文献3)。すなわち特定の遺伝子 (例えばガン遺伝子または腫瘍サプレッサー) の発現 (転写) レベルの変化は、種々のガンの存在および進行の手掛かりとして役立つ。

30

40

【0003】

Raf キナーゼは Ras シグナル伝達経路に関与するタンパク質である。Ras は Raf / Mek / Erk カスケードおよび rac および rho 経路を含め、細胞の形質転換を相乗的に誘導する幾つかの経路を調節する。特に Ras は最初に Raf を形質膜に局在化させることにより Raf / Mek 経路を活性化し、ここで Raf は有糸分裂的キナーゼカスケードを開始する (非特許文献4)。活性化された Raf は Mek (既知の下流の基質) をリン酸化し、そして活性化し、これは次いで Erk をリン酸化し、そして活性化する。次いで活性化された Erk は細胞質から核へと場所を換え、そして転写因子のリン酸化を介して遺伝子発現をモジュレートする。このように Ras の活性化を介する Raf キナ

50

ーゼの活性化は、ガンが発生する重要なメカニズムであると考えられている。

【0004】

多数の実験で、R a fキナーゼの阻害がガン治療の重要な標的になることが示唆された。例えばR a f、M e kまたはE r k活性のドミナントネガティブ変異体は、齧歯類の繊維芽細胞のバックグラウンドにおいて変異体R a sの形質転換能力を有意に下げる。さらにドミナントネガティブM e kを発現しているヒト腫瘍細胞株は、親の細胞株と比べた時、組織培養ならびに足場非依存性増殖アッセイの両方で増殖する能力を欠いていた。またそのような変異体はインビボでヒト腫瘍異種移植の1次および転移性増殖の両方を阻害した。さらにR a fキナーゼを標的とすることの支持は、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた研究から来ている。c - R a fを標的にするように設計されたホスホロチオエートアンチセンスオリゴヌクレオチドであるI S I S 5 1 3 2は、インビボでA 5 4 9ヒト肺異種移植片の増殖を阻害することが見いだされた(非特許文献5)。これらのデータを合わせると、R a fキナーゼタンパク質が活性化されたr a sシグナル伝達により駆動される悪性の表現型の重要な誘因であることが示唆される。さらにまたこのデータは、R a fキナーゼ活性の低分子インヒビターがガンの処置において重要な治療的メカニズムであることも示唆している。

10

【0005】

これらの種々の疾患(例えばガン)を処置するための治療薬として使用される化合物は、これら遺伝子発現の変化の幾つか、またはすべてを恐らく逆行させる。したがってこれら遺伝子の少なくとも幾つかの発現の変化は、そのような治療薬の効力を監視し、またはさらに予測する方法として使用できる。結果としてこれらの遺伝子発現の変化の幾つか、またはすべてはバイオマーカーと考えることができ、そして利用できる。拡大して遺伝子産物もバイオマーカーとして使用できる。治療薬の効力を監視し、または予測するために使用する外に、バイオマーカーは治療薬の投与に正に応答することが予測される患者、および応答無しの状態へ逆戻りしたかもしれない患者を同定するためにも使用することができる。これらの発現の変化の分析は、目的とする標的組織(例えば腫瘍)または幾つかの代理細胞群(例えば末梢血白血球)で行うことができる。後者の場合、遺伝子発現の変化と効力(例えば腫瘍の収縮または非増殖)との相関は、効力のマーカーとして使用される発現の変化のパターンに関して特に強いはずである。

20

【0006】

アドレノメジュリンは、多くのヒト腫瘍型(例えば肺(非小細胞および小細胞)、甲状腺、脳、皮膚、卵巣および子宮)、およびヒト腫瘍細胞株(非特許文献6;非特許文献7)により分泌されることが示された分泌型の生存または増殖因子である。アドレノメジュリンは正常および悪性細胞型に有糸分裂活性を有し、抗アポトーシスおよび脈管形成能を現し(非特許文献8)、そしてその発現は低酸素条件でアップレギュレートされる(非特許文献9)。

30

【0007】

本発明は、アドレノメジュリンとR a fキナーゼとの間の関連を初めて記載する。すなわち、ヒトの異種移植腫瘍モデルでアドレノメジュリンの発現がR a fキナーゼインヒビターにより調節されることが示された(図1および2)。アドレノメジュリン発現のモジュレーションは、R a fキナーゼインヒビターの効力およびその薬物動態学と相関する。したがってアドレノメジュリンは腫瘍の進行および分化の価値あるバイオマーカーとして、そして特にR a fキナーゼインヒビターでの処置の効力を監視するためのバイオマーカーとして役立つことができる。

40

【特許文献1】米国特許仮出願第60/415,194号明細書

【非特許文献1】M a r s h a l l , C e l l 64:313-326,1991

【非特許文献2】W e i n b e r g , S c i e n c e 254:1138-1146,1991

【非特許文献3】M i k k e l s o n , e t a l . , J . C e l l u l a r B i o c h e m . 46:3-8,1991

50

【非特許文献4】Hall, Science 264:1413-1414, 1994

【非特許文献5】Monia, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:15481-15484, 1996

【非特許文献6】Pio, et al., Peptides 22:1719-1729, 2001

【非特許文献7】Miller, et al., J. Biol. Chem. 271:23345-23351, 1996

【非特許文献8】Kato, et al., Endocrinol. 138:2615-2620, 1997

【非特許文献9】Garayoa, et al., Mol. Endocrinol. 14:848-862, 2000 10

【発明の開示】

【0008】

発明の要約

本発明は、バイオマーカーおよびガンの予測および予後に関するバイオマーカーの使用、ならびにガン処置の効力を監視するためのバイオマーカーの使用に関する。特に本発明はRafキナーゼインヒビターのバイオマーカーとしてアドレノメジュリンの使用に関する。

【0009】

加えて、本発明の目的はガンの予測、診断、予後および治療のための方法および試薬を提供することである。 20

【0010】

本発明の1つの態様では、バイオマーカーは薬剤への暴露後に改変された発現を示す1以上の遺伝子および/または遺伝子産物を含んでなる。さらなる態様では、薬剤はRafキナーゼインヒビターであり、そして別の態様ではバイオマーカーはアドレノメジュリンである。

【0011】

本発明の別の態様は、1以上の遺伝子および/または遺伝子産物の発現レベルを分析する工程を含んでなる、組織または細胞サンプルに及ぼす薬剤の効果をスクリーニングする方法であり、ここで組織または細胞サンプル中の遺伝子発現および/または遺伝子産物レベルが薬剤への暴露前および後に分析され、そして遺伝子および/または遺伝子産物の発現レベルの変動が薬剤効果の指標となるか、または患者の診断を提供するか、または処置に対する患者の応答を予測する。さらなる態様では、薬剤はRafキナーゼインヒビターである。別の態様では、遺伝子または遺伝子産物はアドレノメジュリンである。 30

【0012】

本発明の別の観点では、1以上の遺伝子および/または遺伝子産物の発現レベルを分析する工程を含んでなる新規薬剤の探査法であり、ここで細胞の遺伝子発現および/または遺伝子産物レベルが薬剤への暴露前および後に分析され、そして遺伝子および/または遺伝子産物の発現レベルの変動が薬剤効力の指標となる。さらなる観点では、遺伝子または遺伝子産物はアドレノメジュリンである。 40

【0013】

さらに本発明は、ガン患者に試験化合物を投与し、そしてポリペプチドの活性を測定することを含んでなるガンの処置に有用な化合物の同定法を提供し、ここでポリペプチド活性の変化は試験化合物がガンの処置に有用であることの指標となる。さらなる態様では、ポリペプチドはアドレノメジュリンであり、そして別の態様では化合物はRafキナーゼインヒビターである。

【0014】

このように本発明は、例えばアゴニストおよびアンタゴニスト、部分的アゴニスト、逆アゴニスト、アクチベーター、コアクチベーターおよびインヒビターのようなレギュレーターまたはモジュレーターとして作用し得る化合物を同定するために使用することができ 50

る方法を提供する。したがって本発明はガンに関連するポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現を調節する試薬および方法を提供する。ポリヌクレオチドの発現、安定性もしくは量、またはポリペプチドの活性をモジュレートする試薬は、タンパク質、ペプチド、ペプチド模造物、核酸、核酸類似体（例えばペプチド核酸、ロックされた（locked）核酸）、または低分子であることができる。

【0015】

また本発明は、1以上の遺伝子および/または遺伝子産物の発現レベルを分析する工程を含んでなる診断を患者に提供する方法を提供し、ここで正常および患者サンプルの遺伝子発現および/または遺伝子産物レベルを分析し、そして患者サンプル中の遺伝子および/または遺伝子産物の発現レベルの変動は疾患の診断である。患者サンプルには限定するわけではないが、血液、羊水、血漿、精液、骨髄および組織生検を含む。さらなる態様では、遺伝子または遺伝子産物はアドレノメジュリンである。

10

【0016】

さらに本発明はガンを有すると推定される個体のポリペプチドの活性を測定することを含んでなる個体のガンの診断法も提供し、ここでガンを有するとは推定されない個体のポリペプチドの活性と比べてポリペプチドの活性において差異があれば、個体はガンを有すると診断される。さらなる態様では、ポリペプチドはアドレノメジュリンである。

【0017】

別の態様では、本発明は患者サンプル中にガンを検出する方法を提供し、ここで患者サンプル中のタンパク質と反応させるために、タンパク質に対する抗体が使用される。さらなる態様では、抗体はアドレノメジュリンに対して特異的である。

20

【0018】

本発明の別の観点は、1以上の遺伝子および/または遺伝子産物の発現レベルを分析する工程を含んでなる正常と疾患状態との間を識別するための方法であり、ここで正常および疾患組織の遺伝子発現および/または遺伝子産物レベルが分析され、そして遺伝子および/または遺伝子産物の発現レベルの変動が疾患状態の指標となる。さらなる観点では、遺伝子または遺伝子産物はアドレノメジュリンである。

【0019】

別の態様では、本発明は正常細胞に対して少なくとも1つの遺伝子の差次的発現（*differential expression*）を検出することを含んでなる細胞の表現型の測定法に関し、ここで遺伝子は少なくとも2の因子、少なくとも5の因子、少なくとも20の因子または少なくとも50の因子により差別的に発現される。さらなる態様では、遺伝子はアドレノメジュリンをコードする。

30

【0020】

さらに別の態様では、本発明は正常細胞に対して少なくとも1つのポリペプチドの差次的発現を検出することを含んでなる細胞の表現型の測定法に関し、ここでタンパク質は少なくとも2の因子、少なくとも5の因子、少なくとも20の因子、少なくとも最高50の因子により差別的に発現される。さらなる態様では、ポリペプチドはアドレノメジュリンである。

【0021】

別の態様では本発明は、少なくとも約10個、少なくとも約15個、少なくとも約25個、または少なくとも約40個の連続するヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含んでなる核酸プローブを準備し、患者から細胞サンプルを得、場合により実質的に全部が非ガン性である第2の細胞サンプルを準備し、核酸プローブをストリンジエントな条件下で該各第1および第2の細胞サンプルのmRNAと接触させ、そして（a）プローブと第1の細胞サンプルのmRNAとのハイブリダイゼーションの量を、（b）プローブと第2の細胞サンプルのmRNAとのハイブリダイゼーションの量と比較することによる患者に由来する細胞の表現型を測定する方法に関し、ここで第2の細胞サンプルのmRNAとのハイブリダイゼーションの量と比べた第1の細胞サンプルのmRNAとのハイブリダイゼーションの量において、少なくとも2の因子、少なくとも5の因子、少なくとも20の因子

40

50

、または少なくとも50の因子の差異は第1細胞サンプル中の細胞の表現型の指標となる。さらなる態様では、核酸プローブはアドレノメジュリンをコードするヌクレオチド配列を含んでなる。

【0022】

別の態様では、本発明は患者から単離した細胞のサンプル中の核酸レベルを測定するためのプローブ/プライマーを含んでなる、ガン細胞または組織の存在を同定するための試験キットを提供する。特定の態様では、このキットはさらにキットを使用するための使用説明書、細胞を懸濁または固定するための溶液、検出可能なタグもしくは標識、核酸をハイブリダイゼーションし易くする溶液、細胞溶解用の溶液、または核酸精製の溶液を含むことができる。さらなる態様では、プローブ/プライマーはアドレノメジュリンをコード

10

【0023】

1つの態様では、本発明はタンパク質に特異的な抗体を含んでなる、ガン細胞または組織の存在を同定するための試験キットを提供する。特定の態様では、このキットはさらにキットを使用するための使用説明書を含む。特定の態様では、このキットはさらに細胞を懸濁または固定するための溶液、検出可能なタグもしくは標識、ポリペプチドを抗体に結合し易くする溶液、細胞溶解用の溶液、またはポリペプチド精製の溶液を含むことができる。さらなる態様では、抗体はアドレノメジュリンに特異的である。

【0024】

別の態様では、本発明は患者から単離した細胞サンプル中の核酸レベルを測定するためのプローブ/プライマーを含んでなる、ガン細胞または組織中の化合物または治療薬の効力を監視するための試験キットを提供する。特定の態様では、このキットはさらにキットを使用するための使用説明書、細胞を懸濁または固定するための溶液、検出可能なタグもしくは標識、核酸をハイブリダイゼーションし易くする溶液、細胞溶解用の溶液、または核酸精製の溶液を含むことができる。さらなる態様では、プローブ/プライマーはアドレノメジュリンをコードするヌクレオチド配列を含んでなる。

20

【0025】

1つの態様では、本発明はタンパク質に特異的な抗体を含んでなる、ガン細胞または組織中の化合物または治療薬の効力を監視するための試験キットを提供する。特定の態様では、このキットはさらにキットを使用するための使用説明書を含む。特定の態様では、このキットはさらに細胞を懸濁または固定するための溶液、検出可能なタグもしくは標識、ポリペプチドを抗体に結合し易くする溶液、細胞溶解用の溶液、またはポリペプチド精製の溶液を含むことができる。さらなる態様では、抗体はアドレノメジュリンに特異的である。

30

発明の詳細な説明

本発明は記載する特定の方法論、プロトコール、細胞株、動物種または属、構築物および試薬に限定されず、そしてそれ自体が変動できると理解される。また本明細書で使用する技術は特定の態様を説明することを目的とするのみであり、そして添付する特許請求の範囲にのみ限定される本発明の範囲を限定するものではないと理解される。

【0026】

本明細書および添付する特許請求の範囲で使用するように、単数形“a”、“and”、および“the”には内容が明確に他を規定しない限り、複数表示も含むことに注意しなければならない。すなわち例えば「遺伝子(a gene)」に関して、これは1以上の遺伝子を指し、そして当業者に既知のその均等物等を含む。

40

【0027】

他に定義しない限り、本明細書で使用するすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野の当業者が通常に理解している意味と同じ意味を有する。本明細書に記載するものに類似または均等な任意の方法、デバイスおよび材料を本発明の実施または試験に使用することができるが、好適な方法、デバイスおよび材料をこれから記載する。

【0028】

50

本明細書に挙げたすべての刊行物および特許明細書は、例えば今、記載する本発明と関連して使用することができる刊行物に記載されている構築物および方法論を説明し、そして開示する目的で、引用により本明細書に編入する。上で、そして本明細書を通して検討する刊行物は、本出願の出願日前のそれらの開示を単に提供するだけである。ここで本発明者に、先行発明によるそのような開示に先行する権利を与えないと認めるものではないと解釈される。

定義

便宜的に、明細書、実施例および添付する特許請求の範囲で使用する特定の用語および句の意味をこれから提供する。

【0029】

アレイ (array) (例えばマイクロアレイ) 上の「アドレス (address)」は、要素、例えばオリゴヌクレオチドがアレイの固体表面に結合している位置を指す。

10

【0030】

本明細書で使用する用語「アゴニスト」は、タンパク質の生物活性を模倣またはアップレギュレート (up-regulate) する (例えば強化または補足する) 作用物質を指すことを意味する。アゴニストは野生型タンパク質または野生型タンパク質の少なくとも1つの生物活性を有するその誘導体であることができる。またアゴニストは、遺伝子の発現をアップレギュレートするか、またはタンパク質の少なくとも1つの生物生物を増加する化合物であることができる。またアゴニストはポリペプチドと別の分子、例えば標的ペプチドまたは核酸との相互作用を上昇させる化合物であることもできる。

20

【0031】

本明細書で使用する「増幅」は、核酸配列のさらなるコピーの生産に関する。例えば増幅は当該技術分野で周知なポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術を使用して行うことができる。(例えば Dieffenbach and Dveksler (1995) PCR プライマー、ラボラトリーマニュアル (PCR Primer, A Laboratory Manual)、コールドスプリングハーバー出版、プレインビュー、ニューヨーク州を参照にされたい)。

【0032】

本明細書で使用する「アンタゴニスト」は、タンパク質の少なくとも1つの生物活性をダウンレギュレート (down-regulate) する (例えば抑制または阻害する) 作用物質を指すことを意味する。例えば Raf キナーゼインヒビターはそのようなアンタゴニストの例である。アンタゴニストはタンパク質と別の分子、例えば標的ペプチドまたは酵素基質との間の相互作用を阻害または減少させる化合物であることもできる。またアンタゴニストは、遺伝子の発現のダウンレギュレートするか、または存在する発現されたタンパク質の量を減少させる化合物であることもできる。

30

【0033】

本明細書で使用する用語「抗体」は、例えば任意のアイソタイプ (IgG、IgA、IgM、IgE 等) の全抗体を含むことを意図し、そして脊椎動物 (例えば哺乳動物) のタンパク質と特異的に反応性でもあるそれらの断片を含む。抗体は通例の技術を使用して断片化することができ、そして断片は全抗体について上に記載した様式と同じ様式で用途についてスクリーニングすることができる。すなわちこの用語には、特定のタンパク質と選択的に反応することができる抗体分子のタンパク質分解的に切断された、または組換え的に調製された部分のセグメントを含む。そのようなタンパク質溶解的および/または組換え断片の非限定的例には、Fab、F(ab')₂、Fab'、Fv およびペプチドリンカーにより連結された V[L] および/または V[H] ドメインを含有する単鎖抗体 (scFv) を含む。scFv's は共有的または非共有的に連結して、2以上の結合部位を有する抗体を形成することができる。本発明は、ポリクローナル、モノクローナル、または抗体の他の精製された調製物および組換え抗体を含む。

40

【0034】

用語「アレイ」または「マトリックス」はアドレス可能な位置の配置、またはデバイス

50

上の「アドレス」を指す。位置は2次元アレイ、3次元アレイまたは他のマトリックス形式に配置することができる。位置の数は数個から少なくとも数十万の範囲であることができる。最も重要なことは、各位置が全く独立した反応部位を表すことである。「核酸アレイ」は、オリゴヌクレオチドまたは遺伝子のより大きな部分のような核酸プローブを含有するアレイを指す。アレイ上の核酸は好ましくは単鎖である。プローブがオリゴヌクレオチドであるアレイは、「オリゴヌクレオチドアレイ」または「オリゴヌクレオチドチップ」と呼ぶ。「マイクロアレイ」も本明細書では「バイオチップ」を指し、または「生物学的チップ」は少なくとも約 $100/cm^2$ 、そして好ましくは少なくとも約 $1000/cm^2$ の個別領域の密度を有する領域のアレイである。マイクロアレイ中の領域は典型的な寸法、例えば約 $10\sim 250\mu m$ の範囲の直径を有し、そしておよそ同じ距離によりアレイ中の他の領域から分かれている。

【0035】

互換的に使用される「生物学的活性」または「生物活性」または「活性」または「生物学的機能」は、本明細書ではポリペプチド（その天然または変性した構造でも）により、またはその任意のサブ配列により直接的または間接的に行われるエフェクターまたは抗原性機能を意味する。生物学的活性にはポリペプチドへの結合、他のタンパク質または分子への結合、DNA結合タンパク質としての、転写レギュレーターとしての活性、損傷したDNAに結合する能力等を含む。生物活性は本ポリペプチドに直接的に影響を及ぼすことによりモジュレートされ得る。あるいは生物活性は対応する遺伝子の発現をモジュレートすることによるように、ポリペプチドのレベルをモジュレートすることにより改変することができる。

【0036】

本明細書で使用する用語「生物学的サンプル」は、生物から、または生物の成分（例えば細胞）から得たサンプルを指す。サンプルは任意の生物学的組織または流体でよい。サンプルは患者に由来するサンプルでよい。そのようなサンプルには限定するわけではないが、唾液、血液、血液細胞（例えば白血球）、組織または生検サンプル（例えば腫瘍生検材料）、尿、腹腔液および胸膜液、またはそれらに由来する細胞を含む。生物学的サンプルは、組織学的目的に採取された凍結切片のような組織の切片も含むことができる。

【0037】

用語「バイオマーカー」または「マーカー」は、広い範囲の細胞内または細胞外の出来事、ならびに全生物学的な生理学的変化を包含する。バイオマーカーは細胞機能の任意の観点、例えば限定するわけではないがシグナル発信分子、転写因子、代謝産物、遺伝子転写産物ならびにタンパク質の翻訳後修飾の生産レベルまたは速度を本質的に表すことができる。バイオマーカーは転写レベルの全ゲノム分析またはタンパク質レベルおよび/または修飾の全プロテオーム分析を含むことができる。

【0038】

またバイオマーカーは、未処置の病んだ細胞と比べて、疾患を有する個体の化合物で処置した病んだ細胞中で、アップまたはダウンレギュレートされる遺伝子または遺伝子産物を指すことができる。すなわち遺伝子または遺伝子産物は処置した細胞に十分に特異的であるので、場合により他の遺伝子または遺伝子産物と共に使用されて低分子の効力を同定、予測または検出することができる。すなわちバイオマーカーは、病んだ細胞中の化合物の効力または化合物による処置に対する病んだ細胞の応答に特徴的な遺伝子または遺伝子産物である。

【0039】

ヌクレオチド配列は、2つの配列の各塩基が対合する場合、すなわちワトソン-クリック塩基対を形成することができる場合、もう1つのヌクレオチド配列に対して「相補的」である。用語「相補的鎖」は、本明細書では用語「相補鎖」と互換的に使用する。核酸鎖の相補鎖は、コード鎖の相補鎖または非コード鎖の相補鎖であることができる。

【0040】

遺伝子の「検出剤」とは、遺伝子またはそれに関連する他の生物学的分子、例えば遺伝

子から転写されたRNAまたは遺伝子によりコードされるポリペプチドを特異的に検出するために使用できる作用物質を指す。例示的な検出剤は、遺伝子に対応する核酸にハイブリダイズする核酸プローブ、および抗体である。

【0041】

用語「ガン」には限定するわけではないが、胸部、気道、脳、生殖器、消化管、尿路、目、肝臓、皮膚、頭および首、甲状腺、副甲状腺のガンのような充実性腫瘍、およびそれらの遠位転移を含む。またこの用語は、リンパ腫、肉腫および白血病も含む。

【0042】

胸部ガンの例には限定するわけではないが、侵襲性腺管ガン、侵襲性小葉ガン、腺管ガン in situ および小葉ガン in situ を含む。

10

【0043】

気道のガンの例には限定するわけではないが、小細胞および非小細胞肺癌腫、ならびに気管支腺腫および胸膜肺芽腫を含む。

【0044】

脳のガンの例には限定するわけではないが、脳幹および下垂体神経膠腫、小脳および大脳星状細胞腫、髄芽腫、上衣腫、ならびに神経外胚葉および松果体腫を含む。

【0045】

男性の生殖器の腫瘍には限定するわけではないが、前立腺および精巣ガンを含む。女性の生殖器の腫瘍には限定するわけではないが、子宮内膜、頸部、卵巣、膣および外陰部のガン、ならびに子宮の肉腫を含む。

20

【0046】

消化管の腫瘍には限定するわけではないが、肛門、結腸、結腸直腸、食道、胆嚢、胃、膵臓、直腸、小腸および唾液腺ガンを含む。

【0047】

尿路の腫瘍には限定するわけではないが、膀胱、陰茎、腎臓、腎盤、尿管および尿道ガンを含む。

【0048】

目のガンには限定するわけではないが、眼内メラノーマおよび網膜芽腫を含む。

【0049】

肝臓ガンの例には限定するわけではないが、肝細胞ガン（繊維層板肝細胞ガンバリエーションを含むか、または含まない肝細胞ガン）、胆管ガン（肝臓内胆汁管ガン）、および混合型肝細胞胆管ガンを含む。

30

【0050】

皮膚ガンには限定するわけではないが、扁平上皮ガン、カポジ肉腫、悪性メラノーマ、メルケル細胞皮膚ガン、および非メラノーマ皮膚ガンを含む。

【0051】

頭および首のガンには限定するわけではないが、咽頭/下咽頭/鼻咽頭/口腔咽頭ガン、および唇および口腔ガンを含む。

【0052】

リンパ腫には限定するわけではないが、AIDS関連リンパ、非ホジキンリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、ホジキン病および中枢神経系のリンパ腫を含む。

40

【0053】

肉腫には限定するわけではないが、柔軟組織の肉腫、骨肉腫、悪性線維性組織球腫、リンパ肉腫、および横紋筋肉腫を含む。

【0054】

白血病には限定するわけではないが、急性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病およびヘアリーセル白血病を含む。

【0055】

「ガンの病んだ細胞」とは、ガンを有する患者に存在する細胞を指す。すなわち正常な細胞の修飾された形態であり、そしてガンではない個体には存在しない細胞であるか、あ

50

るいはガンではない個体と比べて、ガンを有する個体に有意に高い、または低い数で存在する細胞である。

【0056】

用語「均等な」とは、機能的に均等なポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むと理解される。均等なヌクレオチド配列には、対立遺伝子バリエーションのような1以上のヌクレオチド置換、付加または欠失により異なる配列を含むことができる。

【0057】

本明細書において「遺伝子発現プロファイル」および細胞の「フィンガープリント」と互換的に使用する用語「発現プロファイル」とは、細胞中の1以上の遺伝子のmRNAレベルを表す1組の値を指す。発現プロファイルは好ましくは少なくとも約10個の遺伝子、好ましくは少なくとも約50、100、200個以上の遺伝子の発現レベルを表す値を含んでなる。また発現プロファイルは多数の細胞および条件（例えばGAPDHのようなハウスキーピング遺伝子）で類似レベルで発現され遺伝子のmRNAレベルを含んでなることができる。例えばガンの病んだ細胞の発現プロファイルとは、病んだ細胞中に10個以上の遺伝子のmRNAレベルを表す1組の値を指す。

10

【0058】

用語「遺伝子」は、ポリペプチドまたは前駆体の生産に必要な制御およびコード配列を含んでなる核酸配列を指す。ポリペプチドは完全長のコード配列により、またはコード配列の任意の部分によりコードされ得る。遺伝子は全体または一部が、植物、真菌、動物、細菌ゲノムもしくはエピソーム、真核生物、核もしくはプラスミドDNA、cDNA、ウイルスDNAまたは化学的に合成されたDNAを含む当該技術分野で知られている任意の起源に由来することができる。遺伝子は、発現産物の生物学的活性または化学的構造、発現の速度、または発現制御の様式に影響を及ぼすことができる1以上の修飾を、コードまたは非翻訳領域のいずれかに含むことができる。そのような修飾には限定するわけではないが、1以上のヌクレオチドの突然変異、挿入、欠失および置換を含む。遺伝子は非切断コード配列を構成することができ、または遺伝子は適切なスプライス部位により結合した1以上のイントロンを含むことができる。

20

【0059】

「ハイブリダイゼーション」は、核酸の鎖が塩基対合を介して相補鎖と結合する任意のプロセスを指す。例えば2つの一本鎖核酸は、それらが二本鎖デュプレックスを形成する時、ハイブリダイズする。二本鎖の領域は、単鎖核酸の1つまたは両方の完全長を、あるいは1つの一本鎖核酸のすべておよびもう1つの一本鎖核酸のサブ配列を含むことができ、あるいは二本鎖の領域は、各核酸のサブ配列を含むことができる。またハイブリダイゼーションは、2つの鎖が二本鎖ヘリックスを形成するならば、特定の誤対合を含むデュプレックスの形成も含む。「ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件」とは、本質的に特異的なハイブリダイゼーションを生じるハイブリダイゼーション条件を指す。

30

【0060】

DNAまたはRNAのような核酸に関連して本明細書で使用する用語「単離された」とは、高分子の天然の起源に存在する他のDNAまたはRNAからそれぞれ分離された分子を指す。本明細書で使用する用語「単離された」とは、細胞性物質、ウイルス性物質、組換えDNA技術により生産された時の培養基、または化学的に合成された時の化学的前駆体または他の化学品を実質的に含まない核酸またはペプチドを指す。さらに「単離された核酸」は、自然には断片として存在せず、そして天然の状態では見いだされない核酸断片を含むことができる。また本明細書で使用する用語「単離された」は、他の細胞性タンパク質から分離されたポリペプチドを指すためにも使用し、そして精製または組換えポリペプチドの両方を包含することを意味する。

40

【0061】

本明細書で使用する用語「標識」および「検出可能な標識」とは、限定するわけではないが放射性同位体、フルオロフォア、化学発光部分、酵素、酵素基質、酵素コファクター、酵素インヒビター、色素、金属イオン、リガンド（例えばビオチンまたはハプテン）等

50

を含む検出することができる分子を指す。用語「蛍光剤」は、検出可能な範囲に蛍光を現すことができる物質またはその部分を指す。本発明に使用することができる標識の特別な例には、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、アンペリフェロン、テキサスレッド、ルミノール、NADPH、アルファ - 、ベータ - ガラクトシダーゼおよび西洋ワサビペルオキシダーゼを含む。

【0062】

本明細書で使用する用語「発現のレベル」とは、所定の核酸の測定可能な発現レベルを指す。核酸の発現のレベルは、当該技術分野で周知な方法により測定される。用語「差別的に発現される」または「差次的発現」は、所定の核酸の測定可能な発現レベルの増加または減少を指す。本明細書で使用するように、「差別的に発現される」または「差次的発現」は、比較に使用する2つのサンプル（両方が同じ正常な標準サンプルに対して比べられる）において、核酸の発現レベルの差異が少なくとも1.4倍以上であることを意味する。また本発明に従い「差別的に発現される」または「差次的発現」は、比較に使用する2つのサンプル中の核酸の発現レベルにおいて、1.4倍以上から2倍、5倍、10倍、20倍、50倍以上までの差異を意味する。また核酸は、検出可能に発現される核酸が+/- 少なくとも1.4倍であれば、2つのサンプルのうちの一つが所定の核酸に検出できる発現を含まない場合でも2つのサンプルで「差別的に発現される」と言う。核酸配列の差次的発現は、比較に使用する2以上のサンプル中の核酸の発現レベルの差異が、もはや少なくとも1.4倍の差ではないように改変されたならば「阻害」されている。核酸の発現レベルの絶対的定量は、既知の濃度（1つまたは複数）の1以上の対照核酸種を含め、対照核酸の量に基づき標準曲線を作成し、そして未知のハイブリダイゼーション強度から「未知」の核酸種の発現レベルを標準曲線に関して外挿することにより達成することができる。

10

20

【0063】

本明細書で使用する用語「核酸」は、デオキシリボ核酸（DNA）および適切ならばリボ核酸（RNA）のようなポリヌクレオチドを指す。またこの用語は、均等物としてヌクレオチド類似体から作られたRNAまたはDNAいずれかの類似体も含むと理解され、そして一本鎖（センスまたはアンチセンス）および二本鎖ポリヌクレオチドとして記載する態様に応用可能である。染色体、cDNA、mRNA、rRNAおよびESTは、核酸と呼ぶことができる分子の代表例である。

30

【0064】

本明細書で使用する用語「オリゴヌクレオチド」は、例えば約10～約1000ヌクレオチドを含んでなる核酸分子を指す。本発明に使用するオリゴヌクレオチドは、好ましくは約15～約150ヌクレオチド、より好ましくは約150～約1000のヌクレオチド長である。オリゴヌクレオチドは自然に存在するオリゴヌクレオチドまたは合成オリゴヌクレオチドでよい。オリゴヌクレオチドはホスホルアミダイト法（Beaucage and Carruthers, Tetrahedron Lett. 22: 1859-62, 1981）により、あるいはトリエステル法（Matteucci, et al., J. Am. Chem. Soc. 103: 3185, 1981）により、あるいは当該技術分野で知られている他の化学的方法により調製することができる。

40

【0065】

本明細書で使用する用語「患者」または「個体」には、哺乳動物（例えばヒトおよび動物）を含む。

【0066】

本明細書で使用するように、アレイに結合した核酸または他の分子は、「プローブ」または「捕捉プローブ」と呼ぶ。アレイが1つの遺伝子に対応する数個のプローブを含む時、これらのプローブを「遺伝子プローブセット」と呼ぶ。遺伝子プローブセットは、例えば約2～約20個のプローブ、好ましくは約2～約10個のプローブ、そして最も好ましくは約5個のプローブを含んでなることができる。

【0067】

50

細胞の生物学的状態の「プロファイル」とは、薬剤処置および細胞の生物学的状態の他の混乱にตอบสนองして変化することが知られている細胞の種々の構成要素のレベルを指す。細胞の構成要素には、例えばRNAのレベル、タンパク質量のレベル、またはタンパク質活性レベルを含む。

【0068】

用語「タンパク質」は本明細書では「ペプチド」および「ポリペプチド」と互換的に使用する。

【0069】

2つのプロファイルにおける遺伝子の発現レベルが十分に類似する時、1つの細胞における発現プロファイルはもう1つの細胞の発現プロファイルに「類似」し、この類似性は共通する特性、例えば細胞が同じ型である指標となる。したがって第1の細胞で発現される遺伝子の少なくとも75%が、第1の細胞に比べて2の因子内のレベルで第2細胞内で発現される時、第1の細胞および第2の細胞の発現プロファイルは類似する。

10

【0070】

本明細書で使用する「低分子」は、約5kD未満、そして最も好ましくは約4kD未満の分子量を持つ組成物を指す。低分子は核酸、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド模造物、炭水化物、脂質または他の有機もしくは無機分子であることができる。多くの製薬会社は化学物質および/または生物学的混合物、しばしば真菌、細菌、または藻類抽出物の徹底的なライブラリーを有し、これらを本発明の任意のアッセイでスクリーニングして、生物活性をモジュレートする化合物を同定することができる。

20

【0071】

鋳型核酸の標的部位に対するプローブの「特異的ハイブリダイゼーション」という用語は、ハイブリダイゼーションシグナルが明らかに翻訳され得るように、標的に主に対するプローブのハイブリダイゼーションを指す。さらに本明細書に記載するように、そのような条件は、相同的な領域の長さ、領域のGC含量およびハイブリッドの融解温度(“T_m”)に依存して変動する特異的なハイブリダイゼーションをもたらす。すなわちハイブリダイゼーション条件は、塩含量、酸性度およびハイブリダイゼーション溶液の温度および洗浄で変動し得る。

【0072】

ポリペプチドの「バリエーション」は、1以上のアミノ酸残基が改変されたアミノ酸配列を有するポリペプチドを指す。バリエーションは「保存的」変化を有してよく、ここで置換されたアミノ酸は類似の構造または化学的特性を有する(例えばロイシンのイソロイシンへの置換)。またバリエーションは「非保存的」変化(例えばグリシンのトリプトファンへの置換)を有してもよい。類似のわずかな変動には、アミノ酸の欠失または挿入、またはその両方を含むことができる。生物学的または免疫学的活性を損なうことなく、どのアミノ酸残基を置換、挿入または欠失させることができるかを定める指針は、当該技術分野で周知のコンピュータープログラム、例えばLASERGENEソフトウェア(DNA STAR)を使用して同定することができる。

30

【0073】

用語「バリエーション」は、ポリヌクレオチド配列と関連して使用する時、特定の遺伝子またはそのコード配列に関連するポリヌクレオチド配列を包含することができる。またこの定義には、例えば「対立遺伝子」、「スプライス」、「種」または「多型」バリエーションを含むことができる。スプライスバリエーションは参照分子に対して有意な同一性を有することができるが、一般にはmRNAプロセッシング中にエキソンの選択的スプライシングにより、より多くの、またはより少ない数のポリヌクレオチドを有するだろう。対応するポリペプチドはさらなる機能的ドメインを有することができ、またはドメインが無い。種のバリエーションは種毎に変動するポリヌクレオチド配列である。生じるポリペプチドは一般に、互いに関連する有意なアミノ酸同一性を有する。多型バリエーションは、所定の種の個体間における特定の遺伝子のポリヌクレオチド配列の変動である。また多型バリエーションにはポリヌクレオチド配列が1塩基毎に変動する「単一ヌクレオチド多形」(SNP)も包含する

40

50

ことができる。SNPの存在は、例えば特定の集団、疾患状態または疾患状態の傾向の指標となることができる。

【0074】

本発明の観点は、異常な増殖を特徴とする細胞の分化および増殖をモジュレートすることができる作用物質の同定を対象とする。より具体的には、本発明は核酸配列の差次的発現を調節する能力について、候補化合物または物質をスクリーニングする方法に関する。すなわち核酸配列がガン細胞中で過剰発現される場合、候補化合物の発現を下げるそれらの能力についてスクリーニングし、そして核酸配列がガン細胞中で不十分に発現される(underexpressed)場合、試験化合物の発現を上げるその能力についてスクリーニングする。さらに本発明は本明細書に記載する差別的に発現される配列によりコードされる1以上のポリペプチドの活性をモジュレートする試験化合物もしくは物質を同定するスクリーニングアッセイに関する。これに関して、本発明はマーカー核酸の発現をモジュレートし、かつ/またはコードされるポリペプチドの生物活性を改変する化合物を測定するアッセイを提供する。

10

差次的発現のモジュレーションに関するスクリーニング

薬剤スクリーニングは、試験化合物(例えばRafキナーゼインヒビター)を細胞のサンプルに加え、そして効果を監視することにより行われる。試験化合物を受けていない平行サンプルも対照として監視する。次いで処置および未処置細胞は、限定するわけではないが顕微鏡分析、生存試験、複製能力、組織学的調査、細胞に付随する特定のRNAまたはポリペプチドのレベル、細胞または細胞ライセートにより発現される酵素活性のレベル、および他の細胞もしくは化合物と相互作用する細胞の能力を含む任意の適切な表現型基準により比較される。処置と未処置細胞との間の差異が、試験化合物に起因する効果を示す。

20

【0075】

試験化合物の望ましい効果には、ガンに関連するマーカー核酸配列により付与される任意の表現型に及ぼす効果を含む。例にはmRNAの過多を制限し、コードされるタンパク質の生産を制限し、またはタンパク質の機能的効果を制限する試験化合物を含む。試験化合物の効果は、処置と未処置細胞との間の結果を比較する時、明らかとなるだろう。

【0076】

このように本発明は、インビトロで核酸マーカーの発現を抑制または強化する作用物質(例えばRafキナーゼインヒビター)をスクリーニングする方法も包含し、この方法は作用物質がmRNAの生産を抑制または強化することができるかどうかを測定するために、マーカー核酸のmRNA(例えばアドレノメジュリン)が培養した細胞中で検出可能である細胞または組織を作用物質に暴露し;そして暴露した細胞または組織中のmRNAのレベルを測定することを含んでなり、ここで作用物質に対して細胞株を暴露した後のmRNAレベルの減少はマーカー核酸mRNA生産の抑制の指標であり、そしてmRNAレベルの上昇はマーカーmRNA生産の強化の指標となる。

30

【0077】

あるいはスクリーニング法にはマーカータンパク質が培養した細胞中で検出可能である、マーカータンパク質の生産を抑制または強化すると思われる作用物質に対して細胞または組織のインビトロスクリーニングを含んでもよく;そして細胞または組織中のマーカータンパク質のレベルを測定し、ここで作用物質に対して細胞または組織を暴露した後のマーカータンパク質レベルの減少はマーカータンパク質生産の抑制の指標であり、そしてマーカータンパク質レベルの上昇はマーカータンパク質生産の強化の指標となる。

40

【0078】

また本発明はマーカー核酸の発現を抑制または強化する作用物質をスクリーニングするインビボ方法を包含し、この方法はマーカーmRNAまたはタンパク質が検出可能である腫瘍細胞を有する個体を、マーカーmRNAまたはタンパク質の生産を抑制または強化すると思われる作用物質に暴露し;そして暴露した哺乳動物の腫瘍細胞中のマーカーmRNAまたはタンパク質のレベルを測定することを含んでなる。作用物質に対する個体の暴露

50

後のマーカー mRNA またはタンパク質レベルの減少は、マーカー核酸発現の抑制の指標であり、そしてマーカー mRNA またはタンパク質レベルの上昇はマーカー核酸発現の強化の指標となる。

【0079】

したがって本発明は、マーカー核酸を発現する細胞を試験化合物とインキュベーションし、そして mRNA またはタンパク質レベルを測定することを含んでなる方法を提供する。さらに本発明は、細胞群中のマーカー核酸の発現レベルを定量的に測定する方法、および作用物質が細胞群中のマーカー核酸の発現レベルを増加または減少できるかどうかを測定する方法を提供する。作用物質が細胞群中のマーカー核酸の発現レベルを増加または減少できるかどうかを測定する方法は、(a) 対照および作用物質で処置した細胞群から細胞抽出物を調製し、(b) 細胞抽出物からマーカーポリペプチドを単離し、そして(c) マーカーポリペプチドと該ポリペプチドに特異的な抗体との間に形成される免疫複合体の量を定量(例えば平行して)する工程を含んでなる。本発明のマーカーポリペプチドは、その生物活性をアッセイすることにより定量することもできる。マーカー核酸発現の上昇を誘導する作用物質は、対照細胞中で形成される免疫複合体の量に比べて、処置細胞中に形成される免疫複合体の量を増加させるそれらの能力により同定することができる。同様の様式で、マーカー核酸の発現を減少させる作用物質は、対照細胞に比べて、処置細胞抽出物中に形成される免疫複合体の量を減少させるそれらの能力により同定することができる。

10

【0080】

本発明はガンで差別的に調節される単離された核酸配列、およびそのような配列の同定法を提供する。本発明はガンを有する個体で差別的に調節されるヌクレオチド配列の同定法を提供し、この方法は：個体から得た RNA に対応する核酸サンプルを、同一性が既知の1以上の核酸分子を含んでなる核酸サンプルとハイブリダイズさせ；そして核酸サンプルの同一性が既知の1以上の核酸分子へのハイブリダイゼーションを測定することを含んでなり、ここでガンではない個体から得た核酸サンプルに比べて、同一性が既知の1以上の核酸分子への核酸サンプルのハイブリダイゼーションにおける2倍の差異は、ガンを有する個体中のヌクレオチド配列の差次的発現の指標となる。

20

【0081】

一般に本発明はガンを有する個体で差別的に調節される核酸配列を同定する方法を提供し、この方法は個体からメッセンジャー RNA を単離し、mRNA サンプルから cRNA を生成し、cRNA をアレイ上の別個の位置に安定に結合した複数の核酸分子を含んでなるマイクロアレイにハイブリダイズさせ、そしてアレイに対する cRNA のハイブリダイゼーションのパターンを同定することを含んでなる。本発明に従い、アレイ上の所定の位置にハイブリダイズする核酸分子は、ハイブリダイゼーションシグナルがガンではない個体から得た核酸サンプルとハイブリダイズした同一のアレイ上の同じ位置でのハイブリダイゼーションシグナルよりも少なくとも2倍高いか、または低い場合、差別的に調節されていると言う。

30

遺伝子の発現レベルを測定するためのマイクロアレイ

遺伝子発現レベルの測定は、マイクロアレイを使用することができる。一般に以下の工程を含むことができる：(a) 個体から mRNA サンプルを得、そしてそれらから標識された核酸を調製し(「標的核酸」または「標的」)；(b) 標的核酸をアレイと、標的核酸がアレイ上の対応するプローブに結合するために十分な条件下、例えばハイブリダイゼーションまたは特異的結合により接触させ；(c) 任意にアレイから非結合標的を除去し；(d) 結合した標的を検出し、そして(e) 例えばコンピューターに基づく分析法を使用して結果を分析する。本明細書で使用する「核酸プローブ」または「プローブ」はアレイに結合した核酸であり、一方、「標的核酸」はアレイにハイブリダイズする核酸である。

40

【0082】

核酸検体は試験される個体から「侵襲的」または「非侵襲的」サンプリング手段のいず

50

れかを使用して得ることができる。サンプリング手段は、動物（マウス、ヒト、ヒツジ、ウマ、ウシ、ブタ、イヌまたはネコ動物を含む）の皮膚または臓器中からの核酸の回収が関与する場合、侵襲的と言う。侵襲的方法の例には、例えば採血、精液回収、針生検、胸膜吸引、臍帯生検を含む。そのような方法の例は、Kim, et al., (J. Virol. 66: 3879 - 3882, 1992); Biswas, et al., (Ann. N.Y. Acad. Sci. 590: 582 - 583, 1990) および Biswas, et al., (J. Clin. Microbiol. 29: 2228 - 2233, 1991) により検討されている。

【0083】

対照的に「非侵襲的」サンプリング手段は、核酸分子が動物の内または外表面から回収される手段である。そのような「非侵襲的」サンプリング手段には、例えば涙、唾液、尿、糞便材料、汗または発汗を綿棒で集めること、および毛髪を含む。

【0084】

本発明の1つの態様では、試験する個体に由来する1以上の細胞が得られ、そして細胞からRNAが分離される。好適な態様では、末梢血白血球（PBL）細胞のサンプルが個体から得られる。個体から細胞サンプルを得、そして次いでサンプルを所望の細胞型に濃縮することも可能である。例えば細胞は、所望の細胞型の細胞表面上のエピトープに結合する抗体を用いた単離のような種々の技術を使用して、他の細胞から単離することができる。所望する細胞が固い組織中にある場合、特定の細胞を例えばミクロ切開により、またはレーザー捕捉ミクロ切開（LCM）により切開することができる（例えば Bonner, et al., Science 278: 1481, 1997; Emmert-Buck, et al., Science 274: 998, 1996; Fend, et al., Am. J. Path. 154: 61, 1999; および Murakami et al., Kidney Int. 58: 1346, 2000を参照にされたい）。

【0085】

RNAは組織または細胞サンプルから種々の方法、例えばチオシアン酸グアニジン溶解、続いてCsCl遠心により抽出することができる（Chirgwin, et al., Biochemistry 18: 5294 - 5299, 1979）。単一細胞からのRNAは、単一細胞からcDNAライブラリーを調製するための方法に記載されているように得ることができる（例えば Dulac, Curr. Top. Dev. Biol. 36: 245, 1998; Jena, et al., J. Immunol. Methods 190: 199, 1996を参照にされたい）。

【0086】

RNAサンプルは特定種についてさらに濃縮することができる。1つの態様では、例えばpoly(A)+RNAをRNAサンプルから単離することができる。別の態様では、RNA群は、プライマー特異的cDNA合成により、またはcDNA合成に基づく多数回の直線増幅および鋳型方向のインビトロ転写により目的の配列について濃縮することができる（例えば Wang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9717, 1989; Dulac, et al., 同上; Jena, et al., 同上を参照にされたい）。さらに特定の種または配列について濃縮された、または濃縮されていないRNA群は、例えばPCR; リガーゼ連鎖反応（LCR）（例えば Wu and Wallace, Genomics 4: 560, 1989; Landegren, et al., Science 241: 1077, 1988を参照にされたい）; 自己-持続型配列複製（self-sustained sequence replication: SSR）（例えば Guatelli, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874, 1990を参照にされたい）; 核酸に基づく配列増幅（NASBA）および転写増幅（例えば Kwoh, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173, 1989を参照にされたい）を含む種々の増幅法によりさらに増幅させることができる。PCR技術に関する方法は当該技術分野では周知である（例えばPCR技法: DNA増幅のための原理および応用（P 40

CR Technology: Principle and Applications for DNA Amplification) (H. A. Erlich 編集、フリーマン出版、ニューヨーク、ニューヨーク州、1992を参照にされたい); PCRプロトコール: 方法および応用へのガイド (PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications) (Innis, et al. 編集、アカデミック出版、サンディエゴ、カリフォルニア州、1990); Mattila, et al., Nucleic Acids Res. 19: 4967, 1991; Eckert, et al., PCR Methods and Applications 1: 17, 1991; PCR (McPherson et al. 編集、IRL出版、オックスフォード); および米国特許第4,683,202号明細書を参照にされたい)。
 増幅法は、例えばOhyama, et al., (BioTechniques 29: 530, 2000); Luo, et al., (Nat. Med. 5: 117, 1999); Hegde, et al., (BioTechniques 29: 548, 2000); Kacharmina, et al., (Meth. Enzymol. 303: 3, 1999); Livesey, et al., Curr. Biol. 10: 301, 2000); Spirin, et al., (Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 40: 3108, 1999); およびSakai, et al., (Anal. Biochem. 287: 32, 2000を参照にされたい)により記載されている。
 RNA増幅およびcDNA合成は、細胞のその場で行うこともできる(例えばEberwine, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 3010, 1992を参照にされたい)。

【0087】

核酸分子は、核酸分子のマイクロアレイへのハイブリダイゼーションの検出を可能とするように標識することができる。すなわちプローブはシグナル生成系の員を含んでなることができるので、直接的に、またはシグナル生成系の1以上のさらなる員と組み合わせた作用を介していずれかで検出可能となる。例えば核酸は蛍光的に標識したdNTP(例えばKricka, 1992, 非同位体DNAプローブ技術(Nonisotopic DNA Probe Techniques)、アカデミック出版、サンディエゴ、カリフォルニア州を参照にされたい)、ビオチン化dNTPまたはrNTP、続いて標識されたストレプトアビジン、化学発光標識または同位体の付加で標識することができる。別の標識の例にはTyagi and Kramer (Nature Biotech. 14: 303, 1996)に記載された「分子ビーコン」を含む。ハイブリダイゼーションは例えばプラスモン共鳴により測定することもできる(例えばThiel, et al., Anal. Chem. 69: 4948, 1997)。

【0088】

1つの態様では、複数(例えば2、3、4、5以上)組の標的核酸を標識し、そして1回のハイブリダイゼーション反応に使用する(「複合分析」)。例えば1組の核酸は1つの細胞に由来するRNAに対応することができる、そして別の組の核酸は別の細胞に由来するRNAに対応することができる。複数組の核酸を種々の標識、例えば異なる発光スペクトルを有するので識別することができる種々の蛍光標識(例えばフルオルセインおよびローダミン)で標識することができる。次いでこの組を混合し、そして1つのマイクロアレイに同時にハイブリダイズさせることができる(例えばShena, et al., Science 270: 467-470, 1995)。

【0089】

本発明に従い使用するためのマイクロアレイには、低分子の効力に特徴的な遺伝子の1以上のプローブを含む。好適な態様では、マイクロアレイはガンでアップレギュレートされる遺伝子およびガンでダウンレギュレートされる遺伝子からなる群から選択される1以上の遺伝子に対応するプローブを含んでなる。マイクロアレイは低分子の効力の特徴的な少なくとも10個、好ましくは少なくとも20個、少なくとも50個、少なくとも100個または少なくとも1000個の遺伝子に対応するプローブを含んでなることができる。

【0090】

マイクロアレイ上には各遺伝子に対応する1プローブ以上が存在してよい。例えばマイクロアレイは1つの遺伝子に対応する2~20個のプローブ、そして好ましくは約5~10個のプローブを含むことができる。プローブは低分子の効力に特徴的な遺伝子の完全長のRNA配列またはその相補鎖に対応することができ、またはプローブはその一部に対応することができ、この一部は特異的ハイブリダイゼーションを可能にするために十分な長さである。そのようなプローブは約50ヌクレオチド~約100、200、500または1000ヌクレオチド、または1000ヌクレオチドより多くを含んでなることができる。本明細書にさらに記載するように、マイクロアレイは約10~50ヌクレオチド、好ましくは約15~30ヌクレオチド、そしてより好ましくは約20~25ヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドプローブを含むことができる。プローブは好ましくは単鎖であり、そして所望するレベルの配列特異的ハイブリダイゼーションを提供するために、その標的に対して十分な相補性を有する。

10

【0091】

典型的には本発明で使用するアレイは、 cm^2 あたり100種より高いプローブの部位密度を有する。好ましくはアレイは $500/\text{cm}^2$ より高い部位密度、より好ましくは約 $1000/\text{cm}^2$ より高く、そして最も好ましくは約 $10,000/\text{cm}^2$ より高い部位密度を有する。好ましくはアレイは1つの支持層上に100種より多いプローブ、より好ましくは約1000種より多いプローブ、さらに一層好ましくは約 $10,000$ 種より多いプローブ、そして最も好ましくは1つの支持層上に $100,000$ 種よりも多いプローブを有する。

20

【0092】

多くの異なるマイクロアレイ形状およびそれらの生産法が当業者には知られており、そして米国特許第5,242,974号；同第5,384,261号；第5,405,783号；同第5,412,087号；同第5,424,186号；第5,429,807号；同第5,436,327号；同第5,445,934号；同第5,556,752号；第5,405,783号；同第5,412,087号；第5,424,186号；同第5,429,807号；第5,436,327号；同第5,472,672号；同第5,527,681号；第5,529,756号；同第5,545,531号；同第5,554,501号；同第5,561,071号；第5,571,639号；同第5,593,839号；同第5,624,711号；同第5,700,637号；同第5,744,305号；第5,770,456号；同第5,770,722号；第5,837,832号；同第5,856,101号；第5,874,219号；同第5,885,837号；同第5,919,523号；第6,022,963号；同第6,077,674号；および同第6,156,501号明細書；Shena, et al., Tibtech 16:301, 1998；Duggan et al., Nat. Genet. 21:10, 1999；Bowtell, et al., Nat. Genet. 21:25, 1999；Lipshutz, et al., 21 Nature Genet. 20-24, 1999；Blanchard, et al., 11 Biosensors and Bioelectronics, 687-90, 1996；Maskos, et al., 21 Nucleic Acids Res. 4663-69, 1993；Hughes, et al., Nat. Biotechnol. (2001) 19:342に開示されている；これらの内容は引用により本明細書に編入する。種々の応用におけるアレイの使用法を記載する特許には：米国特許第5,143,854号；同第5,288,644号；第5,324,633号；同第5,432,049号；同第5,470,710号；第5,492,806号；同第5,503,980号；同第5,510,270号；同第5,525,464号；第5,547,839号；同第5,580,732号；同第5,661,028号；第5,848,659号；および同第5,874,219号明細書を含み、これらの開示は引用により本明細書に編入する。

30

40

【0093】

50

アレイは好ましくは制御および参照核酸を含む。対照の核酸には例えば、bioB、bioCおよびbioDのような原核遺伝子、P1バクテリオファージに由来するcreまたはdap、lys、phe、thrおよびtrpのようなポリA制御を含む。参照核酸は1つの実験からの結果を別の結果に対して標準化させ、そして多数の実験を定量的レベルで比較できるようにする。参照核酸の例には既知の発現レベルのハウスキーピング遺伝子、例えばGAPDH、ヘキソキナーゼおよびアクチンを含む。

【0094】

1つの態様では、オリゴヌクレオチドのアレイを固体支持体上に合成することができる。例示的な固体支持体にはガラス、プラスチック、ポリマー、金属、メタロイド、セラミック、有機物質等を含む。チップマスキング技術および光保護化学を使用して、核酸プローブの規則正しいアレイを作成することが可能である。例えば“DNAチップ”または大変大規模の固定化ポリマーアレイ(“VLSIPS(商標)”アレイ)として知られているこれらのアレイは、約 1 cm^2 ~ 数 cm^2 の面積を有する支持層上に数百万の特定したプローブ領域を含むことができ、これにより数個から数百万のプローブを包含する(例えば米国特許第5,631,734号明細書を参照にされたい)。

10

【0095】

発現レベルを比較するために、標識した核酸はアレイと、標的核酸とアレイ上のプローブとの間の結合に十分な条件下で接触させることができる。好適な態様では、所望のレベルのハイブリダイゼーションの特異性を提供するために、ハイブリダイゼーション条件；すなわち標識した核酸とマイクロアレイ上のプローブとの間でハイブリダイゼーションが

20

【0096】

ハイブリダイゼーションは、本質的に特異的なハイブリダイゼーションを可能とする条件下で行うことができる。核酸の長さおよびGC含量が熱融点、すなわち標的核酸に対するプローブの特異的なハイブリダイゼーションを得るために必要なハイブリダイゼーション条件を決定するだろう。これらの因子は当業者には周知であり、そしてアッセイで試験することもできる。核酸のハイブリダイゼーションに関する徹底的なガイドは、Tijssen, et al., (生物化学および分子生物学におけるラボラトリーテクニック(Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology)、24巻：核酸プローブを用いたハイブリダイゼーション(Hybridization With Nucleic Acid Probes)、P. Tijssen編集、エルセビア、ニューヨーク州(1993))に見いだすことができる。

30

【0097】

上に記載した方法は、アレイ表面上に標識された標的核酸のハイブリダイゼーションパターンの生成をもたらす。標識した核酸の生成しじたハイブリダイゼーションパターンは、標的核酸の特定の標識に基づき選択した特定の検出手法を用いて、種々の方法で視覚化または検出することができる。代表的な検出手法には、シンチレーションカウンティング、オートラジオグラフィ、蛍光測定、比色測定、発光測定、光散乱等を含む。

【0098】

1つのそのような検出手法は、市販されている(アフィメトリックス(Affymetrix)、サンタクララ、カリフォルニア州)アレイスキャナー、例えば417(商標)アレイヤー、418(商標)Arrayスキャナー、またはアギレント(Agilent)のGene Array(商標)スキャナーを利用する。このスキャナーはインターフェイスおよび容易に使用できるソフトウェアツールを用いてシステムコンピュータから制御される。出力は種々のソフトウェアアプリケーションにより直接インポートされるか、または直接読まれる。好適なスキャンングデバイスは、例えば米国特許第5,143,854号および同第5,424,186号明細書に記載されている。

40

【0099】

蛍光標識化プローブに関して、転写アレイの各部位での発光は、好ましくはスキャン

50

ニング共焦点レーザー顕微鏡により検出することができる。あるいは2つのフルオロホアに特異的な波長での同時検体発光を可能にするレーザーを使用することができ、そして2つのフルオロホアからの発光を同時に分析することができる(例えばShalon, et al., Genome Res. 6: 639-645, 1996を参照にされたい)。好適な態様では、アレイはコンピューター制御X-Yステージおよび対物顕微鏡を用いたレーザー蛍光スキャナーでスキャンすることができる。蛍光レーザースキャンングデバイスは、Shalon, et al., 同上に記載されている。

【0100】

遺伝子発現データ、例えば比較を行う種類の分析に、種々のアルゴリズムを利用することができる。特定の態様では、同時に調節される遺伝子をまとめることが望ましい。これにより多数のプロファイルの比較が可能となる。そのような遺伝子群を同定するために好適な態様には、クラスタリングアルゴリズム(clustering algorithm)を含む(クラスタリングアルゴリズムに関する総説に関しては、例えばFukunaga, 1990、統計的パターン認識(Statistical Pattern Recognition)、第2版、アカデミック出版、サンディエゴ; Everitt, 1974, クラスタ分析(Cluster Analysis)、ロンドン:ヘインマン教育書(Heinemann Educ. Books); Hartigan, 1975、クラスタリングアルゴリズム(Clustering Algorithm)、ニューヨーク:ウィリー; Sneath and Sokal, 1973, 数値的分類学(Numerical Taxonomy)、フリーマン; Anderberg, 1973, 応用に関するクラスタ分析(Cluster Analysis for Applications)、アカデミック出版:ニューヨーク)を含む。

バイオマーカー探査

発現パターンを使用して患者における薬剤処置の効力を予測するために使用できるバイオマーカーのパネルを引き出すことができる。バイオマーカーは生物学的サンプルから単離したRNA、腫瘍生検の凍結サンプルから単離したRNAに関するマイクロアレイ実験に由来する遺伝子発現レベル、または質量分析から引き出される血清中のタンパク質の質量からなることができる。

【0101】

データ分析に関する精密なメカニズムはデータの厳密な性質に依存するが、バイオマーカーのパネルを開発する典型的な手順は以下の通りである。データ(遺伝子発現レベルまたは質量スペクトル)を、処置前の各患者について集める。実験が進行した時、患者は薬剤処置に対する彼らの応答; 効力があるか、無いかに従い分類される。多くの効力レベルをデータモデルに適応させることができるが、特に患者群が数百に満たない場合は二値比較が最適であると考えられる。各クラスに十分な患者数を割り当てることにより、タンパク質および/または遺伝子発現データは当該技術分野で知られている多数の技術により分析することができる。この技術の多くは従来の統計学から、ならびに機械学習の分野にも由来する。これらの技術は2つの目的に役立つ:

1. データの次元の縮小 - 質量分析または遺伝子発現マイクロアレイの場合、データは数千の個体データ点から約3~10に減らされる。この減少は集合として取った時のデータ点の予測力に基づく。
2. 訓練 - これら3~10のデータ点は次に、多数の機械学習アルゴリズムを訓練するために使用され、これは次いで、この場合、効力がない薬剤処置から効力がある薬剤処置を識別するタンパク質質量または遺伝子発現のパターンを認識することを「学習」する。すべての患者サンプルを、このアルゴリズムを訓練するために使用することができる。

【0102】

生成された訓練されたアルゴリズムは、次いでそれらの予測力を測定するために試験される。典型的には数百未満の訓練例が利用可能である時、幾つかの交差検定の形式が行われる。具体的に説明するために、10倍の交差検定を考える。この場合、患者サンプルは10個のピンの1つに無作為に割り当てられる。最初の検定で、9個のピン中のサンプル

を訓練に使用し、そして10番目の残るサンプルはアルゴリズムを試験するために使用する。これをさらに9回繰り返し、各回で試験のために異なるビン中のサンプルを残す。10回すべてからの結果(正しい予測および誤り)を合わせ、そして次に予測力を評価する。この試験に関して異なるアルゴリズムならびに異なるパネルを比較することができる。次いで「最高」のアルゴリズム/パネルの組み合わせを選択する。次いでこの「スマート」アルゴリズムを将来の実験で使用して、処置に最も応答する見込みの患者を選択することができる。

【0103】

多くのアルゴリズムが、患者について集めたさらなる情報から利益を得る。例えば性別または年齢は予測力を改善するために使用できる。また標準化および平滑化のようなデータ変換もノイズを減らすために使用することができる。この理由から、結果を最適化するために、多数のアルゴリズムが多くの異なるパラメーターを使用して訓練され得る。予測パターンがデータ中に存在する場合、最適またはほぼ最適な「スマート」アルゴリズムを開発することができるだろう。より多くの患者サンプルが利用できるようになれば、アルゴリズムを再訓練して新たなデータを利用することができる。

10

【0104】

質量分析を使用する例として、血漿(1 μ l)を疎水性SELDI-標的にのせ、水中で徹底的に洗浄し、そして質量分析計のSELDI-Tにより分析することができる。これを100以上の患者サンプルについて繰り返すことができる。各サンプルで約16,000m/z値の強度から生じるタンパク質プロファイルは、薬剤効力の予測である特異的m/z値の組を同定するために統計的に分析される。イオン交換またはIMAC表面のような他のSELDI-標的を使用した同一の実験を行うこともできる。これらは血漿中に存在するタンパク質の異なるサブセットを捕捉するだろう。さらに血漿を変性し、そしてSELDI標的に適用する前に予備分画することができる。

20

診断および予後アッセイ

本発明は、バイオマーカー(例えばアドレノメジュリン)、すなわちガンに関する核酸および/またはポリペプチドマーカーを検出することにより、個体が望ましくない細胞の増殖を特徴とする疾患または状態を発症する危険にあるかどうかを測定するための方法を提供する。

【0105】

臨床的応用では、ヒトの組織サンプルを本明細書で同定するバイオマーカーの存在および/または不存在についてスクリーニングすることができる。そのようなサンプルは針生検コア、外科的切除サンプル、リンパ節組織または血清からなることができる。例えばこれらの方法には、生検材料を得ることを含み、これは場合により低温槽切開により分画して、腫瘍細胞を全細胞群の約80%にまで濃縮する。特定の態様では、これらのサンプルから抽出した核酸を当該技術分野で周知な技術を使用して増幅することができる。検出される選択マーカーのレベルは、統計的に検定された転移性、非転移性悪性、良性または正常組織サンプルの群と比較される。

30

【0106】

1つの態様では、診断法は個体がバイオマーカー(例えばアドレノメジュリン)の異常なmRNAおよび/またはタンパク質レベルを有するかどうかを、ノーザンブロット分析、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、in situハイブリダイゼーション、免疫沈降、ウエスタンブロットハイブリダイゼーションまたは免疫組織化学のように測定することを含んでなる。この方法に従い細胞を個体から得、そしてバイオマーカー、タンパク質のレベル、またはmRNAレベルを測定し、そして健康な個体中のこれらのマーカーのレベルと比較することができる。バイオマーカーポリペプチドの異常なレベルまたはmRNAレベルは、ガンの指標となるだろう。

40

【0107】

したがって1つの観点では本発明は、本明細書に開示する独自の核酸マーカーに特異的なプローブおよびプライマーを提供する。したがって核酸プローブはマーカーの核酸配列

50

のコード配列の一部に相補的な少なくとも10ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド、より好ましくは25ヌクレオチド、そして最も好ましくは少なくとも40ヌクレオチドのヌクレオチド配列、およびコード配列のすべてまたはほぼすべてまでを含んでなる。

【0108】

1つの態様では、この方法は患者に由来する組織中のガン性細胞の存在を測定するために、核酸プローブを使用することを含んでなる。具体的にはこの方法は：

1. 核酸配列のコード配列の一部に相補的な少なくとも10ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド、より好ましくは25ヌクレオチド、そして最も好ましくは少なくとも40ヌクレオチドのヌクレオチド配列、およびコード配列のすべてまたはほぼすべてまでを含んでなり、そして腫瘍細胞中で差別的に発現される核酸プローブを準備し；

10

2. 患者からガン性細胞を含んでなる可能性が高い組織サンプルを得；

3. 実質的にすべてが非ガン性である細胞を含有する第2の組織サンプルを準備し；

4. 核酸プローブをストリンジェントな条件下で、各該第1および第2の組織サンプル中のRNAと接触させ（例えばノーザンブロットまたは i n s i t uハイブリダイゼーションアッセイで）；そして

5. (a) プローブと第1の組織サンプルのRNAとのハイブリダイゼーションの量を、(b) プローブと第2の組織サンプルのRNAとのハイブリダイゼーションの量と比較することを含んでなり；ここで第2の組織サンプルのRNAとのハイブリダイゼーションの量に比べて、第1の組織サンプルのRNAとのハイブリダイゼーションの量における統計的に有意な差異は、第1の組織サンプル中にガン性細胞が存在することの指標となる。

20

【0109】

1つの観点では、この方法は所定のマーカー核酸配列（例えばアドレノメジュリン）に由来するプローブとの i n s i t uハイブリダイゼーションを含んでなる。この方法は標識したハイブリダイゼーションプローブを、ガン性または前ガン性細胞ならびに正常細胞を含有する可能性がある所定の組織型のサンプルと接触させ、そしてプローブが所定の組織型の幾つかの細胞を標識する程度が、プローブが同じ組織型の他の細胞を標識する程度よりも有意に異なるかどうか（例えば少なくとも2の因子、または少なくとも5の因子、または少なくとも20の因子、または少なくとも50の因子）を測定することを含んでなる。

30

【0110】

また本発明内にあるのは、試験細胞のmRNAを、核酸配列のコード配列の一部に相補的な少なくとも12ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも25ヌクレオチド、そして最も好ましくは少なくとも40ヌクレオチド、および配列のすべてまたはほぼすべてであり、そして所定の組織型の正常細胞と比べて腫瘍細胞中で差別的に発現される核酸プローブと接触させ；そしてmRNAに対するプローブのハイブリダイゼーションのおよその量を測定することにより、所定のヒト組織に由来する試験細胞の表現型、例えば細胞が(a)正常、(b)ガン性または前ガン性であるかどうかを測定する方法であり、正常細胞のmRNAで見られるハイブリダイゼーションの量より多いか、または少ないその組織型で現れるハイブリダイゼーションの量は、試験細胞がガン性または前ガン性であることの指標となる。

40

【0111】

あるいは上記診断アッセイは、マーカー核酸配列によりコードされるタンパク質産物（例えばアドレノメジュリン）を検出するための抗体を使用して行うことができる。したがって1つの態様では、アッセイは試験細胞のタンパク質を核酸の遺伝子産物に特異的な抗体と接触させ、マーカー核酸は試験細胞と同じ組織型の正常な細胞中で所定の制御レベルで発現されるものであり、そして抗体および試験細胞のタンパク質により形成された免疫複合体のおよその量を測定することを含んでなり、ここで同じ組織型の正常な細胞に比べて試験細胞中のタンパク質と形成された免疫複合体の量における統計的に有意な差異は、

50

試験細胞がガン性または前ガン性であることの指標となる。好ましくは抗体はアドレノメジュリンに対して特異的である。

【0112】

本発明に有用なポリペプチドに特異的に結合するポリクローナルおよび/またはモノクローナル抗体を生産する方法は当業者に知られており、そして例えば Dymeccki, et al., (J. Biol. Chem. 267: 4815, 1992); Boersma & Van Leeuwen, (J. Neurosci. Methods 51: 317, 1994); Green, et al., (Cell 28: 477, 1982); および Arnheiter, et al., (Nature 294: 278, 1981) に見いだすことができる。

10

【0113】

別のそのような方法には：マーカー核酸配列の遺伝子産物に特異的な抗体を準備し、この遺伝子産物は同じ組織型の非ガン性組織中の遺伝子産物のレベルよりも多いレベルまたは少ないレベルで所定の組織型のガン性組織中に存在し；患者から所定の組織型の第1の組織サンプルを得、このサンプルはガン性細胞を含む可能性があり；同じ組織型の第2の組織サンプルを準備し（これは同じ患者に由来するか、または正常な対照、例えば別の個体または培養した細胞に由来するものでよい）、第2のサンプルは正常細胞を含有し、そして本質的には非ガン性細胞であり；抗体を第1および第2のサンプルのタンパク質（これは部分的に精製され、溶解されているが、分画されていない細胞、または in situ でよい）と、抗体とサンプル中に存在するマーカー核酸配列産物との間で免疫複合体の形成ができるような条件下で接触させ；そして（a）第1のサンプル中での免疫複合体形成の量を、（b）第2のサンプル中での免疫複合体形成の量と比較する工程を含み、ここで第2サンプル中での免疫複合体形成の量に比べて、少ない第1のサンプル中での免疫複合体形成の量における統計的に有意な差異は、組織の第1のサンプル中にガン性細胞が存在する指標となる。

20

【0114】

さらに本発明は個体から得た細胞サンプルが異常な量のマーカーポリペプチドを有するかどうかを測定する方法を提供し、これは（a）個体から細胞サンプルを得、（b）そのように得られたサンプル中のマーカーポリペプチドの量を定量的に測定し、そして（c）個体から得た細胞サンプルが異常な量のマーカーポリペプチドを有するかどうかを決定するために、そのように測定したマーカーポリペプチドの量を既知の標準と比較することを含んでなる。そのようなマーカーポリペプチドは免疫組織化学アッセイ、ドット-プロットアッセイ、ELISA等により検出することができる。

30

【0115】

免疫アッセイは通常、細胞サンプル中のタンパク質レベルを定量するために使用され、そして多くの他のイムノアッセイ技術が当該技術分野で知られている。本発明は特定のアッセイ手順に制限されず、したがって均一および不均一な手順の両方を含む。本発明に従い行うことができる例示的なイムノアッセイには、蛍光偏光イムノアッセイ（FPIA）、蛍光イムノアッセイ（FIA）、酵素イムノアッセイ（EIA）、比濁阻害イムノアッセイ（nephelometric inhibition immunoassay: NIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA）を含む。指示部分または標識群は主題の抗体に結合され、そしてアッセイ装置の利用性および適用可能なイムノアッセイ法によりしばしば決められる様々な方法の用途の必要性に合うように選択される。上に記載した種々のイムノアッセイを行うために使用される一般技術は当業者には周知である。

40

【0116】

別の態様では、患者の生物学的流体（例えば血液または尿）中のコードされた産物のレベルあるいはポリペプチドのレベルは、患者の細胞中のマーカー核酸配列の発現レベルを監視する方法として測定することができる。そのような方法には、患者から生物学的流体のサンプルを得、サンプル（またはサンプル由来のタンパク質）を、コードされるマーカ

50

ーポリペプチドに特異的な抗体と接触させ、そして抗体による免疫複合体形成の量を測定する工程を含み、免疫複合体形成の量がサンプル中でコードされるマーカーのレベルの指標となる。この測定は、正常個体から採取した対照サンプル中または同じ人から事前に、またはその後得た1以上のサンプル中の同じ抗体による免疫複合体形成の量と比べた時、特に有益である。

【0117】

別の態様では、この方法は細胞中に存在するマーカーポリペプチドの量を測定するために使用することができ、これを次に高増殖性障害の進行と関連させることができる。マーカーポリペプチドのレベルは、細胞のサンプルが形質転換した細胞であるか、または形質転換した細胞になる傾向がある細胞を含むかどうかを評価するために予測的に使用することができ、さらに本方法は形質転換したことが分かる細胞の表現型を評価するために使用することができ、表現型決定の結果は特定の治療法の計画に有用である。例えばサンプル細胞中の大変高レベルのマーカーポリペプチドは、ガンの有力な診断および予後マーカーである。マーカーポリペプチドレベルの観察は、例えばより積極的な治療の使用に関する決定に利用することができる。

10

【0118】

上で説明したように本発明の1つの観点は、患者から単離した細胞の内容において、マーカーポリペプチドレベルがサンプル細胞中で有意に減少しているかどうかを決定するための診断アッセイに関する。用語「有意に減少している」とは、細胞が同じ組織起源の正常細胞に比べて減少したマーカーポリペプチドの細胞量を有する細胞の表現型を指す。例えば細胞は正常な対照細胞に比べて、約50%、25%、10%または5%未満のマーカーポリペプチドを有することができる。特にこのアッセイは試験細胞中のマーカーポリペプチドレベルを評価し、そして好ましくは測定したレベルを少なくとも1つの対照細胞、例えば正常細胞および/または既知の表現型の形質転換した細胞中で検出されるマーカーポリペプチドで測定したレベルと比較する。

20

【0119】

本発明で特に重要であるのは、正常または異常なマーカーポリペプチドレベルに関連する細胞数により測定されるマーカーポリペプチドのレベルを定量する能力である。特定のマーカーポリペプチドの表現型を持つ細胞数は、次いで患者の予後と関連させることができる。本発明の1つの態様において、損傷のマーカーポリペプチドの表現型は、マーカーポリペプチドが異常に高い/低いレベルを有すると見いだされた生検材料中の細胞の割合として測定される。そのような発現は免疫組織化学アッセイ、ドット-プロットアッセイ、ELISA等により検出することができる。

30

【0120】

組織サンプルを使用する場合、免疫組織化学的染色を使用してマーカーポリペプチドの表現型を有する細胞数を測定することができる。そのような染色には、マルチブロックの組織を生検材料または他の組織サンプルから採取し、そしてプロテアーゼKまたはペプシンのような作用物質を使用するタンパク質分解的加水分解にかけることができる。特定の態様では、サンプル細胞から核画分を単離し、そして核画分中のマーカーポリペプチドのレベルを検出することが望ましいかもしれない。

40

【0121】

組織サンプルはホルマリン、グルタルアルデヒド、メタノール等のような試薬で処理することにより固定される。次いでサンプルを抗体、好ましくはマーカーポリペプチドに結合特異性を有するモノクローナル抗体とインキュベーションする。この抗体は後に結合を検出するために標識に結合させることができる。サンプルは免疫複合体の形成に十分な時間、インキュベーションされる。次いで抗体の結合が抗体に結合した標識により検出される。抗体が非標識である場合、例えば抗-マーカーポリペプチド抗体のアイソタイプに特異的な第2の標識抗体を使用することができる。使用できる標識の例には、放射性核種、蛍光物質、化学発光物質、酵素等を含む。

【0122】

50

酵素を使用する場合、酵素の基質をサンプルに加えて発色または蛍光産物を提供することができる。結合物に使用するために適当な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、マレイン酸デヒドロゲナーゼ等を含む。市販されていない場合、そのような抗体-酵素結合物は当業者に知られている技術により容易に生成される。

【0123】

1つの態様では、アッセイはドットプロットアッセイにより行われる。ドットプロットアッセイは、予め定めた数の細胞から生産される無細胞抽出物中のマーカポリペプチドの量と相関させることにより、1つの細胞に付随するマーカポリペプチドの平均量の測定を可能とすることができるので、組織サンプルが使用される場合に特定の応用が見いだされる。

10

【0124】

ガンに関する文献では、同型の腫瘍細胞（例えば胸部および/または結腸腫瘍細胞）は、個々のガン遺伝子の均一に増加した発現、または個々の腫瘍抑制遺伝子の均一に減少した発現を示すことができないことが十分に確立している。所定の型のガンの細胞間でも所定のマーカ遺伝子の発現レベルが変動するかもしれないので、単一の試験よりもむしろ一群の試験に頼る必要性がさらに強調される。したがって1つの観点では、診断試験の信頼性および/または精度を向上するために、本発明は本発明の多数のプロープを使用する一群の試験を提供する。

【0125】

1つの態様では、本発明は核酸プロープが整列したアレイ中のDNAチップ上に固定化されている方法も提供する。オリゴヌクレオチドはリトグラフィーを含む種々の手法により固体支持体上に結合させることができる。例えばチップは250,000ものオリゴヌクレオチドを保持することができる。これらの核酸プロープは、マーカ核酸配列のコード配列の一部に相補的であり、そして腫瘍細胞中で差別的に発現される配列の少なくとも約12ヌクレオチド長、好ましくは少なくとも15ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも約25ヌクレオチド、そして最も好ましくは少なくとも40ヌクレオチド、およびすべてまたはほぼすべての配列を含んでなる。本発明は1つのチップ上に核酸マーカのアレイを提供することにより試験の信頼性が上がるので、種々なガンに関して利用可能な試験に優る有意な利点を提供する。

20

【0126】

この方法は、全細胞群の約80%に腫瘍細胞を濃縮するために低温槽切開により場合によっては分画される生検材料を得ることを含んでなる。次いでDNAまたはRNAを抽出し、増幅し、そしてDNAチップを用いてマーカ核酸配列の存在または不存在を測定する。

30

【0127】

1つの態様では、核酸プロープを支持体上で2次元マトリックスまたはアレイにスポットする。核酸のサンプルは標識することができ、そして次いでプロープとハイブリダイズする。プロープ核酸に結合した標識されたサンプル核酸を含んでなる2重鎖核酸は、いったんサンプルの非結合部分を洗い出せば検出することができる。

【0128】

プロープ核酸は、ガラス、ニトロセルロース等を含む支持体上にスポットすることができる。次いでプロープは、共有結合または疎水性相互作用のような非特異的相互作用によるいずれかで支持体に結合することができる。サンプル核酸は放射性標識、フルオロホア、クロモホア等を使用して標識することができる。

40

【0129】

アレイを構築する技術およびこれらのアレイを使用する方法は、例えば欧州特許第0799897号明細書；国際公開第97/29212号；同第97127317号パンフレット；欧州特許第0785280号明細書；国際公開第97/02357号パンフレット；米国特許第5,593,839号；同第5,578,832号明細書；欧州特許第0728520号明細書；米国特許第5,599,695号明細書；欧州特許第07210

50

16号明細書；米国特許第5,556,752号明細書；国際公開第95/22058パンフレット；および米国特許第5,631,734号明細書に記載されている。

【0130】

さらにアレイは遺伝子の差次的発現を調査するために使用することができ、そして遺伝子の機能を測定するために使用することができる。例えば核酸配列のアレイは核酸配列が正常細胞とガン細胞との間で差別的に発現されるかどうかを測定するために使用できる。対応する正常細胞で観察されないガン細胞中の特定のメッセージの上昇した発現は、ガンに特異的なタンパク質を示すかもしれない。

【0131】

1つの態様では核酸分子は、並べた核酸分子が正常細胞または組織とガン性細胞または組織との間で核酸が差別的に発現されるのかどうかを測定するために使用できるように、固体表面（例えば膜）上にマイクロアレイを作成するために使用することができる。1つの態様では本発明の核酸分子はcDNAでよく、または続いてPCRにより増幅され、そしてナイロン膜上にスポットされるcDNA分子を生成するために使用することができる。次いで膜を、ガン性および正常組織または細胞の同等サンプルから得た放射標識された標的核酸分子と反応させることができる。cDNAの作成およびマイクロアレイの調製法は当業者には知られており、そして例えばBertucci, et al., (Hum. Mol. Genet. 8:2129, 1999); Nguyen et al., (Genomics 29:207, 1995); Zhao, et al., (Gene 156:207); Gress, et al., (Mammalian Genome 3:609, 1992); Zhumabayeva, et al., (Biotechniques 30:158, 2001); およびLennon, et al., (Trends Genet. 7:314, 1991)に見いだすことができる。

【0132】

さらに別の態様では、本発明は本発明のマーカーポリペプチドに対して生成される抗体のパネルを使用することを企図する。好ましくは抗体はアドレノメジュリンに対して生成される。そのような抗体のパネルは、ガンに関する信頼性のある診断用プローブとして使用することができる。本発明のアッセイは、細胞、例えば肺細胞を含有する生検サンプルを、1以上のコードされる産物に対する抗体のパネルと接触させてマーカーポリペプチドの存在または不存在を測定することを含んでなる。

【0133】

本発明の診断法は、処置の追跡としても使用することができ、例えばマーカーポリペプチドレベルの定量は、現在または過去に使用したガン治療の効力ならびに患者の予後に及ぼすこれら治療の効果の指標となることができる。

【0134】

加えてマーカー核酸またはマーカーポリペプチドは、初期の検出、追跡スクリーニング、再発の検出および化学療法または外科的処置について処置後を監視するために、診断パネルの一部として利用することができる。

【0135】

したがって本発明は、例えば細胞の腫瘍形成性形質転換から生じる増殖性障害の診断および表現型の決定を援助するために、細胞に由来するマーカーポリペプチドの獲得および/または損失を検出するために診断アッセイおよび試薬を利用できるようにする。

【0136】

上記の診断アッセイは予後アッセイとしても使用できるように適合させることができる。そのような応用は、腫瘍の進行の特徴的な段階で起こる出来事に対する本発明のアッセイの感度を利用する。例えば所定のマーカー遺伝子は大変早い段階、恐らく細胞が悪性に進化することを不可逆的に定められる(committed)前に、アップまたはダウンレギュレートされることができるが、別のマーカー遺伝子はもっと遅い段階でのみ特徴的にアップまたはダウンレギュレートされ得る。そのような方法には、試験細胞のmRNAを、腫瘍進行の種々の段階でガン性または前ガン性細胞中で異なる特徴的なレベルで発現

される所定のマーカー核酸に由来する核酸プローブと接触させ、そして細胞の mRNA に対するプローブのハイブリダイゼーションのおよその量を測定する工程を含み、そのような量は細胞中の遺伝子発現レベルの指標となり、すなわち細胞の腫瘍の進行段階の指標となり；あるいはアッセイは所定のマーカー核酸の遺伝子産物に特異的な抗体を用いて行うことができ、試験細胞中のタンパク質と接触させる。そのような一群の試験は腫瘍の存在および場所を開示するだけでなく、医師が腫瘍に最も適切な処置の様式を選択できるようにし、そしてまたその処置が成功する見込みを予測できるようにする。

【0137】

また本発明の方法は、腫瘍の臨床経過を追跡するためにも使用することができる。例えば本発明のアッセイは患者に由来する組織サンプルに適用し；ガンについて患者を処置した後に、別の組織サンプルを採取し、そして試験を繰り返す。成功裏の処置はガン性または前ガン性細胞に特徴的な差次的発現を示すすべての細胞の除去、あるいはこれら細胞中の遺伝子の発現に恐らく正常レベルに近づくか、または超える実質的な上昇のいずれかをもたらす。

10

【0138】

さらに別の態様では本発明は、個体がポリペプチド、好ましくはアドレノメジュリンの異常な活性を伴うガン発症の傾向のような疾患を発症する危険性があるどうかを測定する方法を提供し、ここでポリペプチドの異常な活性は (a) マーカーポリペプチドをコードする遺伝子の完全性に影響を及ぼす改変、または (b) コード核酸の誤発現の少なくとも一つを特徴とする遺伝子損傷の存在または不存在を検出することにより特徴づけられる。具体的に説明すると、そのような遺伝的損傷は、(i) 核酸配列から1以上のヌクレオチドの欠失、(ii) 核酸配列への1以上のヌクレオチドの付加、(iii) 核酸配列の1以上のヌクレオチドの置換、(iv) 核酸配列の全体的な (gross) 染色体再編成、(v) 核酸配列のメッセンジャー RNA 転写レベルにおける全体的改変、(vi) ゲノム DNA のメチル化パターンのような核酸配列の異常な修飾、(vii) 遺伝子のメッセンジャー RNA 転写の非野生型スプライシングパターンの存在、(viii) マーカーポリペプチドの非野生型レベル、(ix) 遺伝子の対立遺伝子損失および/または (x) マーカーポリペプチドの不適切な翻訳後修飾の少なくとも一つの存在を確認することにより検出することができる。

20

【0139】

本発明はコード核酸配列中の損傷を検出するためのアッセイ技術を提供する。これらの方
法には限定するわけではないが、配列分析、サザンブロットハイブリダイゼーション、制限酵素部位マッピングが関与する方法、および分析すべき核酸とプローブとの間のヌクレオチド対合の不存在の検出が関与する方法を含む。

30

【0140】

特異的な疾患または障害、例えば遺伝的疾患または障害は、特定遺伝子の多型領域の特異的な対立遺伝子パリアントが関係し、これは突然変異したタンパク質を必ずしもコードしない。すなわち個体の遺伝子の多型領域の特異的な対立遺伝子パリアントの存在により、その個体は特異的な疾患または障害を発症し易くなるかもしれない。遺伝子の多型領域は、個体群で遺伝子のヌクレオチド配列を決定することにより同定することができる。多型領域が同定されれば、特定疾患との関連は特別な個体群、例えばガンのような特異的な疾患を発症した個体を研究することにより測定できる。多型領域は遺伝子の任意の領域、例えばエキソン、エキソンのコードもしくは非コード領域、イントロンおよびプロモーター領域に位置し得る。

40

【0141】

例示的態様では、遺伝子のセンスもしくはアンチセンス配列、または自然に存在するその変異体、または 5' もしくは 3' フランキング配列、または主題の遺伝子に自然に付随するイントロン配列、または自然に存在するその変異体にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列の領域を含む核酸プローブを含んでなる核酸組成物を提供する。細胞の核酸をハイブリダイゼーションし易くし、プローブをサンプルの核酸と接触させ、そし

50

てプローブのサンプル核酸へのハイブリダイゼーションを検出する。そのような技術を使用して、欠失、置換等を含むゲノムまたはmRNAレベルのいずれかで損傷または対立遺伝子バリエーションを検出し、ならびにmRNA転写レベルを測定することができる。

【0142】

好適な検出法は、突然変異または多型部位が重複し、そして突然変異または多型領域周辺の約5、10、20、25または30ヌクレオチドを有するプローブを使用した対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションである。本発明の好適な態様では、対立遺伝子バリエーションに特異的にハイブリダイズすることができる幾つかのプローブを固相支持体、例えば「チップ」に結合させる。「DNAプローブアレイ」とも呼ばれるオリゴヌクレオチドを含んでなるこれらのチップを使用した突然変異検出分析は、例えばCronin, et al., (Human Mutation 7:244, 1996)に記載されている。1つの態様ではチップは遺伝子の少なくとも1つの多型領域のすべての対立遺伝子バリエーションを含んでなることができる。次いで固相支持体を試験核酸と接触させ、そして特異的プローブに対するハイブリダイゼーションを検出する。したがって1以上の遺伝子の多数の対立遺伝子バリエーションの同一性を、単純なハイブリダイゼーション実験で同定することができる。

10

【0143】

特定の態様では、損傷の検出にはアンカーPCRまたはRACE PCR、またはリガーゼ連鎖反応(LCR)(例えばLandegran, et al., Science 241:1077-1080, 1988; Nakazawa, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-364, 1994を参照にされたい)のようなポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(例えば米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号明細書を参照にされたい)で、プローブ/プライマーを利用することを含んでなり、後者は遺伝子の点突然変異を検出するために特に有用となり得る(例えばAbravaya, et al., Nuc. Acid. Res. 23:675-685, 1995を参照にされたい)。説明的な態様では、この方法には(i)患者から細胞サンプルを集め、(ii)細胞サンプルから核酸(例えばゲノム、mRNAまたは両方)を単離し、(iii)核酸サンプルを、核酸配列に特異的にハイブリダイズする1以上のプライマーと、核酸のハイブリダイゼーションおよび増幅が(存在する場合には)起こる条件下で接触させ、そして(iv)増幅産物の存在または不存在を検出するか、または増幅産物のサイズを検出し、そして対照サンプルに対して長さを比較する工程を含んでなる。PCRおよび/またはLCRは、本明細書に記載する突然変異を検出するために使用する任意の技術と一緒に予備増幅工程として使用することが望ましいかもしれないと予想する。

20

30

【0144】

代替的な増幅法には：自己持続型配列複製(Guatelli, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878, 1990)、転写増幅系(Kwoh, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177, 1989)、Q-ベータレプリカーゼ(Lizardi, et al., Bio/Technology 6:1197, 1988)、または他の核酸増幅法、続いて増幅した分子の当業者に周知な技術の使用による検出が含まれる。これらの検出スキームは、核酸分子が大変少数で存在する場合にそのような分子の検出に特に有用である。

40

予測アッセイ

所定の抗ガン剤からの臨床的利益を予測することができる研究室基準のアッセイは、ガン患者の臨床的管理を大きく強化するだろう。この効果を評価するために、処置の前、最中および後に抗ガン剤に関連するバイオマーカーを生物学的サンプル中(例えば腫瘍サンプル、血漿)で分析することができる。

【0145】

例えばアドレノメジュリンのmRNAおよびタンパク質の発現は、異種移植したヒト腫

50

瘍を持つ実験動物で R a f キナーゼインヒビターを用いた処置により改変される。賦形剤での処置群に比べて、アドレノメジュリン m R N A およびタンパク質の発現は、R a f キナーゼインヒビター処置群で最初に上昇した。R a f キナーゼインヒビターの血漿濃度が上昇すると、アドレノメジュリンの発現は減少した。アドレノメジュリンの発現は血漿 R a f キナーゼインヒビターレベルが下降すると回復した。アドレノメジュリンは全身の循環に分泌され、そして血漿および尿で検出することができる。すなわち R a f キナーゼインヒビターで処置した後のアドレノメジュリンの血漿および尿濃度の変化を、ガン患者で監視することができる。加えて、アドレノメジュリンのタンパク質レベルは、パラフィンで包埋した腫瘍生検材料を使用した定量的免疫組織化学により監視することができる。

【0146】

10

処置を監視する別の取り組みは、血清のプロテオームスペクトルの評価である。具体的には血清サンプルを質量分光器（例えば表面-強化レーザー脱着およびイオン化）にかけることができ、そしてプロテオームスペクトルを各患者について作成することができる。処置前および最中の患者に由来する血漿の分析から引き出された1組のスペクトルは、反復サーチアルゴリズムにより分析することができ、これは未処置サンプルから処置サンプルを完全に区別するプロテオームパターンを同定することができる。次いで生成したパターンを、処置後の臨床的利益を予測するために使用することができる。

【0147】

生物学的サンプル（例えば腫瘍生検サンプル、血液サンプル）の包括的遺伝子発現プロファイリングおよびバイオインフォマティクスから引き出されたパターン同定は、臨床的利益および感度ならびに抗ガン剤に対する耐性の発生を予測するために利用することができる。例えば処置前および最中の患者からの全血に由来する細胞から単離された R N A は、アフメトリックスの G e n e C h i p 技術およびアルゴリズムを使用して、血液細胞の遺伝子発現プロファイルを作成するために使用することができる。次いでこれらの遺伝子発現プロファイルは、特定の抗ガン剤を用いた処置からの臨床的利益を予測することができる。

20

【0148】

$1D^1H$ -NMR（核磁気共鳴）による尿の生化学的組成の分析も、予測アッセイとして利用することができる。パターン認識技術を使用して抗ガン剤での処置に対する代謝的応答を評価し、そしてこの応答と臨床的終点とを相関させることができる。尿に排出される生化学的または内因性代謝産物は、正常個体についてプロトン N M R により十分に特徴付けられて来た（Z u p p i , e t a l . , C l i n . C h i m A c t a 265 : 85 - 97 , 1997）。これらの代謝産物（約30~40）は、クエン酸および尿素サイクルのような主要な代謝経路の副産物を表す。薬剤-、疾患-および遺伝的-刺激は、ベースラインの尿プロファイルに、刺激に対する代謝的応答のタイムラインおよび規模の指標となる代謝特異的な変化を生じることが示された。これらの分析は多変量（m u l t i - v a r i a n t）であり、したがってパターン認識技術を使用してデータの解釈を改善する。尿の代謝的プロファイルは臨床的終点と相関させて、臨床的利益を決定することができる。

30

〔実施例〕

40

本明細書に記載する構造、材料、組成物および方法は本発明の代表例であることを意図しており、そして本発明の範囲は実施例の範囲により制限されないと理解される。当業者は本発明が開示した構造、材料、組成物および方法に変更を実施できると認識し、そしてそのような変更は本発明の範囲内と見なす。

【実施例1】

【0149】

腫瘍の異種移植遺伝子発現プロファイリングプロトコール

A . 腫瘍移植および摘出

11~19週齢で、約18~25グラムの平均体重のメスのヌードマウスをこの実験に使用した。別にヒト膵臓癌腫（M i a P a C a）および肺（W C I - H 4 6 0）ガン細胞

50

株を組織培養で約70%の集密度まで成長させた。細胞を移植の日に回収し(5×10^6 細胞/マウス)、そしてハンスバラン塩溶液に回収時から移植時まで懸濁し、移植の時点で各マウスは適切な細胞接種の細胞懸濁液の0.2ml注射を受けた。細胞は各マウスの右脇腹の皮下に注射され、そして腫瘍の成長を監視した。ステージング(staging)(投与)の時期は、腫瘍が75~125mgのサイズに達した時に決めた(移植から5日~9日)。Rafキナーゼインヒビターに使用する賦形剤は、12.5%エタノール、12.5%Cremafor ELおよび水であった。MiaPaCaおよびWCI-H460異種移植の両方について、経口投与は9日間、1日1回の80mg/kgであった。9日の投与から1、4、7、24時間後にマウスを安楽死させ、そして3種の薬剤処置および3種の賦形剤処置腫瘍を回収し、そして素早く凍結した。

10

B. RNA抽出およびcRNA調製

全RNAはTRIzol試薬(ライフテクノロジーズ(Life Technologies)、メリーランド州)を使用して、RNeasyプロトコール(キアゲン(Qiagen)、カリフォルニア州)を利用する改良した販売元のプロトコールに従い、腫瘍のエキスプラントから抽出した。ブリンクマン(Brinkmann)のPolytron PT10/35(ブリンクマン、スイス)で均一化し、そしてクロロホルムで相分離した後、サンプルをRNeasyカラムにのせた。RNAサンプルはRnaseを含まないDNaseセット(キアゲン、カリフォルニア州)を使用してDNase Iで処理した。

【0150】

溶出し、そしてUV分光計により定量した後、各サンプルはRT-PCR用のギブコ(Gibco)Superscript IIチョイスシステムを使用して、販売元のプロトコール(インビトロジェン(Invitrogen)、カリフォルニア州)に従い二本鎖cDNAに逆転写した。

20

【0151】

サンプルは有機的に抽出し、そしてエタノール沈殿した。次いで約1μgのcDNAをインビトロ転写反応に使用して、RNAラベリングキット(エンゾダイアグノスティクス(Enzo Diagnostics)、ニューヨーク州)を使用してビオチン化ヌクレオチドを包含させた。生成したcRNAをRNeasyクリーン-アッププロトコールで処理し、次いでUV分光計を使用して定量した。cRNA(15μg)をMgOAcおよびKOAcの存在下、94°Cで断片化した。断片化したRNA(10μg)を、アレイあたり1cRNAサンプルで各アレイにのせた。アレイは45°Cで16時間、60rpmで回転させながらアフメトリックスのGeneChipハイブリダイゼーションオープン640中でハイブリダイズさせた。

30

C. Microarray Suite 5.0分析

ハイブリダイゼーション後、アレイはフィコエリスリン(Phycocerythrin)-結合ストレプトアビジンで染色し、アジレント(Agilent)のGeneArrayスキャナーに置き、次いで488nmのレーザーに暴露し、フィコエリスリンの励起を引き起こした。Microarray Suite 5.0ソフトウェアは、アレイにより放出される光の強度を遺伝子発現のレベルの数値的指標にデジタルで転換する。各アレイは1つの動物サンプルを表すので、処置した動物を賦形剤の動物と比較し、そして遺伝子の相対的变化倍率(hold change)を得た。少なくとも2倍数の変化まで上昇または減少した遺伝子を有意であると考え、そしてさらなる分析に使用した。

40

D. TaqMan分析用のcDNA調製

各RNAサンプルは、RT-PCR用のGibcoBRL Superscript II第1鎖合成系を販売元のプロトコール(ライフテクノロジーズ、メリーランド州)に従い使用して逆転写した。反応混合物中の最終RNA濃度は50ng/μLであった。逆転写は50ngのランダムヘキサマーを使用して行った。

E. 蛍光プローブを使用したTaqMan定量分析

アドレノメジュリン(配列番号1および7)に特異的なプライマーおよびプローブは、PEアプライドバイオシステムズ(Applied Biosystems)の推薦に従

50

い設計し、そして以下に列挙する：

フォワードプライマー：5' - (G T G A A T G T C T C A G C G A G G T G T A A) -
3' (配列番号：2)

リバースプライマー：5' - (C C T T C T T C C A C A C A G G A G G T A A T C) -
3' (配列番号：3)

プローブ：5' - (F A M) - T T C G C C G C G T G G A A T G T G A G T G T - (T
A M R A) - 3' (配列番号：4)

ここで F A M = 6 - カルボキシ - フルオレセインおよび T A M R A = 6 - カルボキシ - テ
トラメチル - ロードミン。

【 0 1 5 2 】

10

定量的実験は各サンプルから逆転写した 25 ng の RNA で行った。対照として 18 S
リボゾーム RNA は、Pre - Developed TaqMan アッセイ試薬 (P D A
R) (P E アプライドバイオシステムズ、カリフォルニア州) を使用して測定した。アッ
セイの反応混合物は以下の通りである：

	最終濃度	
TaqMan ユニバーサル PCR マスターミックス (2 x) (P E アプライドバイオシステムズ、カリフォルニア州)	1 x	
P D A R 対照 - 18 S RNA (20 x)	1 x	
フォワードプライマー	300 nM	
リバースプライマー	300 nM	20
プローブ	200 nM	
c D N A	25 ng	
水	加えて 25 μL	

F . S Y B R グリーンを使用した TaqMan 定量分析

アドレノメジュリンに特異的なプライマーおよびプローブは、P E アプライドバイオシ
ステムズの Primer Express プログラムの推薦に従い設計し、そして以下に
列挙する：

フォワードプライマー：5' - (G T G A A T G T C T C A G C G A G G T G T A A) -
3' (配列番号：5)

リバースプライマー：5' - (C C T T C T T C C A C A C A G G A G G T A A T C) -
3' (配列番号：6)

30

プローブ：S Y B R グリーン

定量的実験は各サンプルから逆転写した 25 ng の RNA で行った。対照として 18 S
リボゾーム RNA は、Pre - Developed TaqMan アッセイ試薬 (P D A
R) (P E アプライドバイオシステムズ、カリフォルニア州) を使用して測定した。アッ
セイの反応混合物は以下の通りである：

	最終濃度	
TaqMan S Y B R グリーン PCR マスターミックス (2 x) (P E アプライドバイオシステムズ、カリフォルニア州)	1 x	
フォワードプライマー	300 nM	40
リバースプライマー	300 nM	
c D N A	25 ng	
水	加えて 25 μL	

G . P C R 条件

1 回： 50 で 2 分
95 で 10 分
40 サイクル： 95 で 15 秒
60 で 1 分

実験は A B I P r i s m 7 7 0 0 配列検出器 (P E アプライドバイオシステムズ、カ
リフォルニア州) で行った。実験の終わりに、P C R 中に得た蛍光データは、A B I P

50

r i s m 7 7 0 0 ユーザーマニュアルに記載されているように処理した。変化倍率はデルタ - デルタ C T 法を使用して計算し、18 S 値に対して標準化した。表 1 および図 1 および 2 は、R a f キナーゼインヒビターに対する暴露に反応したアドレノメジュリン遺伝子の発現の変化を表す。Y 軸は賦形剤で処理した腫瘍を持つ動物に対して、化合物で処置した腫瘍を持つ動物におけるアドレノメジュリン発現の変化倍率を表す。X 軸は腫瘍サンプルを取った処置後 9 日の時間を時間 (h o u r s) で表す。R a f 2 はこの特定実験に関するコード名であり、そして F C は変化倍率を表す。A f f y m e t r i x および T a q M a n 遺伝子発現分析法の両方に関するデータをプロットした。

【 0 1 5 3 】

【表 1】

10

表 1

時間				
方法	1時間	4時間	7時間	24時間
A f f y m e t r i x	4.49	3.00	2.20	4.79
T a q M a n	5.27	2.78	2.38	3.13

【実施例 2】

【 0 1 5 4 】

20

ガンを処置した患者の反応の監視

血液サンプル (1 0 m l) は、スクリーニング (試験薬を開始する 7 日前)、サイクル 1 の 1 5 日、サイクル 2、4、6 等の 1 日および最終来院時に集める。血液サンプルは静脈穿刺またはボルタ - カテーテルを介して、カリウム E D T A を含有するバキュテイナー (v a c u t a i n e r) に引き抜き、そして数回、穏やかに上下して抗凝固剤と混合した。採血から 1 0 ~ 1 5 分後以内に、血液サンプルを冷蔵 (4) 遠心機で 1 0 分間遠心して血漿を分離した。血漿サンプルを質量分析に供し、そしてプロテオミックスペクトルを各タイムコースについて作成する。スペクトルはプロテオームパターンを同定し、そして作成する反復サーチアルゴリズムにより分析する。次いでプロテオームパターンを分析して処置の効力をモニタリングする。

30

【実施例 3】

【 0 1 5 5 】

腫瘍生検サンプルを対象とした処置の反応の監視

軽く凍結した腫瘍サンプルを R N A 単離およびアフィメトリックスの G e n e C h i p マイクロアレイ遺伝子発現分析に使用する。パラフィンで包埋した腫瘍サンプルは、定量的な免疫組織化学を使用してアドレノメジュリンタンパク質レベルについて分析する。腫瘍の生検サンプルは処置を始める前のベースライン、およびさらにサイクル 2 中のサンプルについて集める。両サンプルは同じ腫瘍部位から集める。

軽い凍結サンプル

滅菌条件下で、生きている悪性組織を細い針による吸引により、またはパンチ、コアもしくはは切除生検により得る。腫瘍組織の一部を即座に軽く凍結する。R N A をサンプルから単離し、そして次いで実施例 1 に記載した方法により遺伝子発現プロファイルを作成するために使用する。次いで遺伝子発現プロファイルを分析して、処置効力を監視する。

40

パラフィン包埋サンプル

生検材料の別の部分 (少なくとも 0 . 5 c m x 0 . 5 c m x 0 . 5 c m) を、パラフィンブロックに固定する。サンプルは採取から 3 0 分以内に中性緩衝化ホルマリン中に固定する。サンプルは少なくとも 2 時間固定する。次いでサンプルをホルマリンから取り出し、そして処理前に流水ですすぐ。組織の多段階処理は以下の通りである：

工程 1	7 0 % エタノール	1 5 分
工程 2	8 0 % エタノール	1 5 分

50

工程 3	95%エタノール	15分
工程 4	100%エタノール	15分
工程 5	100%エタノール	15分
工程 6	100%エタノール	15分
工程 7	50%キシレン / 100%エタノール	15分
工程 8	全部キシレン	15分
工程 9	全部キシレン	15分
工程 10	パラフィン	60 で 30分間
工程 11	パラフィン	60 で 30分間
工程 12	パラフィン	60 で 30分間
工程 13	パラフィン	60 で 30分間

10

次いで各サンプルをパラフィンに埋め、そして固体化した。次いでサンプルは定量的な免疫組織化学を使用してアドレノメジュリントンパク質レベルについて分析する。

【実施例 4】

【0156】

尿サンプルを対象とした処置の応答の監視

尿サンプルは、スクリーニング（試験薬を開始する7日前）、サイクル1の15日、サイクル2、4、6等の1日および最終来院時に集める。回収から15分後以内に、5~10mLの尿サンプルを15mLのポリプロピレン試験管に移し、そして-70にて直立で凍結する。サンプルの生化学的組成を $1D^1H$ NMRにより分析し、そして尿の代謝

20

【図面の簡単な説明】

【0157】

【図1】 Rafキナーゼインヒビターに対する暴露に応答するアドレノメジュリン遺伝子の発現の変化を、アフィメトリックスの遺伝子発現分析法を使用して表す。Y軸は賦形剤で処理した腫瘍を持つ動物に対して、化合物で処置した腫瘍を持つ動物におけるアドレノメジュリン発現の変化倍率を表す。X軸は腫瘍サンプルを取った処置後9日の時間を時間（hours）で表す。

【図2】 Rafキナーゼインヒビターに対する暴露に応答するアドレノメジュリン遺伝子の発現の変化を、TaqManの遺伝子発現分析法を使用して表す。Y軸は賦形剤で処理した腫瘍を持つ動物に対して、化合物で処置した腫瘍を持つ動物におけるアドレノメジュリン発現の変化倍率を表す。X軸は腫瘍サンプルを取った処置後9日の時間を時間（hours）で表す。

30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer Pharmaceuticals Corporation
Eveleigh, Deepa
Taylor, Ian

<120> METHODS FOR PREDICTION AND PROGNOSIS OF CANCER, AND MONITORING
CANCER THERAPY

<130> 5138

<150> US 60/415,194

<151> 2002-09-30

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 1449

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1
ctggatagaa cagctcaagc cttgccactt cgggcttctc actgcagctg ggcttggact 60
tcggagtttt gccattgccg gtgggacgtc tgagactttc tccitcaagt acttggcaga 120
tcactctctt agcaggggtct gcgcttcgca gccgggatga agctggtttc cgtcgccctg 180
atgtacctgg gttcgcctgc cttcctaggc gctgacaccg ctcggtttga tgtcgcgtcg 240
gagtttcgaa agaagtggaa taagtgggct ctgagtcgtg ggaagagggg actgcggatg 300
tccagcagct accccaccgg gctcgtctgac gtgaaggccg ggccctgcca gacccttatt 360
cggcctccagg acatgaaggg tgcctctcga agcccgaag acagcagtcg ggatgcccgc 420
cgcatccgag tcaagcgtc cgcagagagc atgaacaact tccagggcct cgggagcttt 480
ggctgcccgt tcgggacgtg cacggtgcag aagctggcac accagatcta ccagttcaca 540
gataaggaca aggacaacgt cgcctccagg agcaagatca gcccacaggg ctacggccgc 600
cggcgcgggc gctccctgcc cgaggccggc ccgggtcgga ctctggtgtc ttctaagcca 660
caagcacacg gggctccagc cccccggagt ggaagtgtc cccactttct ttaggattta 720
ggcgcctatg gtacaaggaa tagtcgcgca agcatcccgc tgggtccctc cgggacgaag 780
gacttcccga gcggtgtggg gaccgggtc tgacagccct gcggagaccg tgagtccggg 840
aggcaccgtc cggcggcgag ctctggcttt gcaagggccc ctcttcttgg gggcttcgct 900
tccttagcct tgcctaggtg caagtgtccc agggggcggg gtgcagaaga atccgagtgt 960
ttgccaggct taaggagagg agaaactgag aatgaatgc tgagacccc ggagcagggg 1020
tctgagccac agccgtgctc gccacaaaac tgatttctca cggcgtgtca ccccaccagg 1080
gcgcaagcct cactattact tgaactttcc aaaacctaaa gaggaaaagt gcaatgcgtg 1140
ttgtacatac agaggttaact atcaatattt aagtttgttg ctgtcaagat ttttttgta 1200
acctcaataa tagagatatt tttgtacgtt atatatgtg ttaagggcat tttaaaagca 1260
attatattgt cctcccctat ttttaagcgt gaatgtctca gcgaggtgta aagttgttcg 1320
ccgcgtggaa tgtgagtggt tttgtgtgca tgaagagaa agactgatta cctcctgtgt 1380

10

20

30

ggaagaagga aacaccgagt cctcgrataa tctatttaca taaaatgggt gatatgcgaa 1440
 cagcaaacc 1449

<210> 2
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Primer

<400> 2
 gtgaatgtct cagcgaggtg taa 23

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Primer 10

<400> 3
 ccttcttcca cacaggaggt aatc 24

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Primer

<400> 4
 ttcgccgct ggaatgtgag tgt 23

<210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Primer 20

<400> 5
 gtgaatgtct cagcgaggtg taa 23

<210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Primer

<400> 6
 ccttcttcca cacaggaggt aatc 24

<210> 7
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens 30

<400> 7
 Met Lys Leu Val Ser Val Ala Leu Met Tyr Leu Gly Ser Leu Ala Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Ala Asp Thr Ala Arg Leu Asp Val Ala ser Glu Phe Arg Lys
 20 25 30
 Lys Trp Asn Lys Trp Ala Leu Ser Arg Gly Lys Arg Glu Leu Arg Met
 35 40 45

Ser Ser Ser Tyr Pro Thr Gly Leu Ala Asp Val Lys Ala Gly Pro Ala
 50 55 60

Gln Thr Leu Ile Arg Pro Gln Asp Met Lys Gly Ala Ser Arg Ser Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ala Ala Arg Ile Arg Val Lys Arg Tyr Arg
 85 90 95

Gln Ser Met Asn Asn Phe Gln Gly Leu Arg Ser Phe Gly Cys Arg Phe
 100 105 110

Gly Thr Cys Thr Val Gln Lys Leu Ala His Gln Ile Tyr Gln Phe Thr
 115 120 125

Asp Lys Asp Lys Asp Asn Val Ala Pro Arg Ser Lys Ile Ser Pro Gln
 130 135 140

Gly Tyr Gly Arg Arg Arg Arg Ser Leu Pro Glu Ala Gly Pro Gly
 145 150 155 160

Arg Thr Leu Val Ser Ser Lys Pro Gln Ala His Gly Ala Pro Ala Pro
 165 170 175

Pro Ser Gly Ser Ala Pro His Phe Leu
 180 185

10

20

【 図 1 】

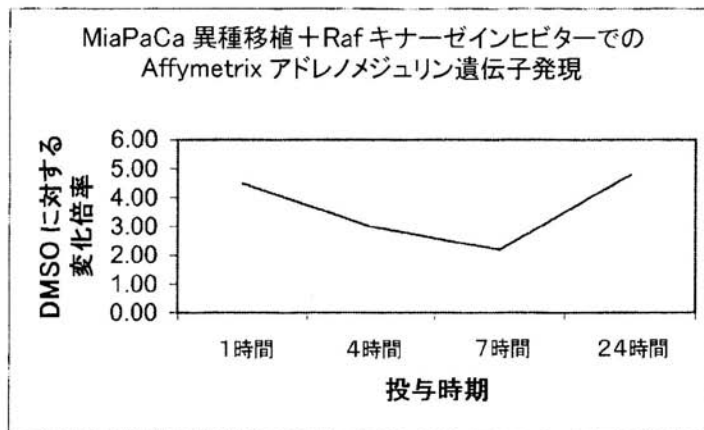


Fig. 1

【 図 2 】

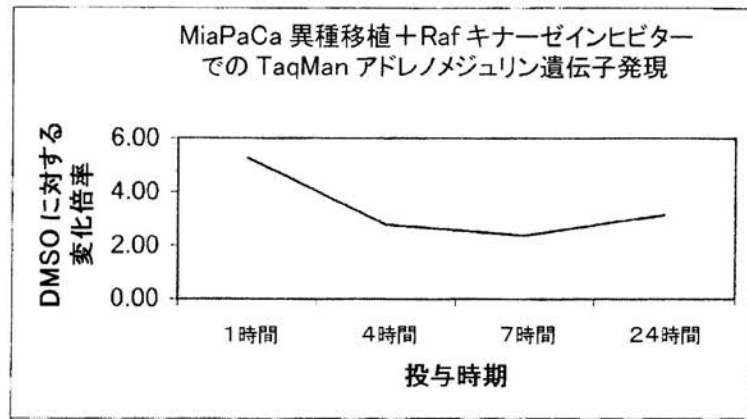


Fig. 2

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01) A 6 1 K 45/00

(81) 指定国 AP(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, 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, 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

专利名称(译)	癌症的预测和预后，癌症治疗的监测方法		
公开(公告)号	JP2006518031A	公开(公告)日	2006-08-03
申请号	JP2004540313	申请日	2003-09-30
[标]申请(专利权)人(译)	拜耳杉更好的用户蒂卡尔的企业庸率		
申请(专利权)人(译)	拜耳杉机俞蒂卡尔的企业庸率		
[标]发明人	イブリーデーパ テイラーイアン		
发明人	イブリー,デーパ テイラー,イアン		
IPC分类号	G01N33/53 A61P35/00 A61P43/00 G01N33/15 G01N33/50 A61K45/00 A61B A61B1/00 C12Q1/68 G01N33/574		
CPC分类号	A61P35/00 A61P43/00 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/5011 G01N2333/575 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D A61P35/00 A61P43/00.111 G01N33/15.Z G01N33/50.Z A61K45/00		
F-TERM分类号	4C084/AA17 4C084/NA20 4C084/ZB26 4C084/ZC20		
优先权	60/415194 2002-09-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明还涉及生物标志物以及生物标志物在癌症的预测和预后中的用途，以及生物标志物在监测癌症治疗的功效中的用途。具体地，本发明涉及肾上腺髓质素作为Raf激酶抑制剂的生物标记物的用途。

