

(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2011-516407

(P2011-516407A)

(43) 公表日 平成23年5月26日(2011.5.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/06 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/06	2 G 0 4 5
<b>G O 1 N 33/50 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/50 Z N A Z	4 B 0 2 4
<b>G O 1 N 33/574 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/50 P	4 B 0 6 3
<b>G O 1 N 33/53 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/574 A	4 C 0 8 4
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	G O 1 N 33/53 Y	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-547187 (P2010-547187)  
 (86) (22) 出願日 平成21年2月20日 (2009. 2. 20)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年10月20日 (2010. 10. 20)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/052027  
 (87) 国際公開番号 W02009/103784  
 (87) 国際公開日 平成21年8月27日 (2009. 8. 27)  
 (31) 優先権主張番号 08380053.2  
 (32) 優先日 平成20年2月21日 (2008. 2. 21)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 507311887  
 パンガエア、バイオテック、ソシエダッド、  
 アノニマ  
 PANGAEA BIOTECH, S.  
 A.  
 スペイン国バルセロナ、サビノ、アラナ、  
 5-19、ウエセペ、インスティトゥト、  
 ウニベルシタリ、デクセウス、デパルタメ  
 ント、デ、オンコロヒア  
 (74) 代理人 100117787  
 弁理士 勝沼 宏仁  
 (74) 代理人 100091487  
 弁理士 中村 行孝  
 (74) 代理人 100107342  
 弁理士 横田 修孝

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B R C A 1 mRNA発現レベルによる、ネオアジュバント化学療法で治療されている乳癌患者の生存期間の予測

## (57) 【要約】

本発明は、B R C A 1 の発現レベルを基に乳癌に罹った患者の臨床転帰を予測する方法であって、B R C A 1 発現レベルが低いことが良い予後を示すものである方法に関する。さらに、本発明は、B R C A 1 の発現レベルを基に、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法に対する乳癌に罹った患者の反応を予測する方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者からの試料における B R C A 1 遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなる、乳癌に罹った患者用の個別化ネオアジュバント療法を選択する方法であって、B R C A 1 遺伝子の発現レベルが基準値に比べて低い場合に、該患者が代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法のための良い候補である、方法。

## 【請求項 2】

プロゲステロン受容体発現を測定することをさらに含んでなり、基準値と比較したとき該プロゲステロン受容体発現が陽性である場合に、前記患者が代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法のための良い候補である、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

リンパ節転移を測定することをさらに含んでなり、リンパ節転移が陰性の場合に、前記患者が代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法のための良い候補である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記試料が腫瘍生検材料である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記 B R C A 1 遺伝子発現レベルが、B R C A 1 遺伝子によってコードされる m R N A のレベルを測定することにより決定される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記プロゲステロン受容体発現が免疫組織化学により測定される、請求項 2 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記代謝拮抗剤がフルオロウラシルである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記挿入剤がエピルピシンである、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記アルキル化剤がシクロホスファミドである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 10】

患者からの試料における B R C A 1 遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなる、乳癌に罹った患者の、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法への臨床反応を決定する方法であって、B R C A 1 遺伝子の発現レベルが基準値に比べて低い場合に、それが該療法への該患者の臨床反応が良好であることを示す、方法。

## 【請求項 11】

プロゲステロン受容体発現を測定することをさらに含んでなり、基準値と比較したとき該プロゲステロン受容体発現が陽性である場合に、それが前記療法への前記患者の臨床反応が良好であることを示す、請求項 10 に記載の方法。

40

## 【請求項 12】

リンパ節転移を測定することをさらに含んでなり、リンパ節転移が陰性の場合に、それが前記療法への前記患者の臨床反応が良好であることを示す、請求項 10 または 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記試料が腫瘍生検材料である、請求項 10 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記 B R C A 1 遺伝子発現レベルが、B R C A 1 遺伝子によってコードされる m R N A のレベルを測定することにより決定される、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の方

50

法。

【請求項 15】

プロゲステロン受容体発現が免疫組織化学により測定される、請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記代謝拮抗剤がフルオロウラシルである、請求項 10 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記挿入剤がエピルピシンである、請求項 10 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記アルキル化剤がシクロホスファミドである、請求項 10 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記臨床反応が無病生存期間として測定される、請求項 10 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記臨床反応が全生存期間として測定される、請求項 10 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

患者からの試料における B R C A 1 遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなる、乳癌に罹った患者の、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法へ反応する素因を評価する方法であって、B R C A 1 遺伝子の発現レベルが低い場合に、それが、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法に反応する該患者の好ましい素因を示す、方法。

【請求項 22】

プロゲステロン受容体発現を測定することをさらに含んでなり、基準値と比較したとき該プロゲステロン受容体発現が陽性である場合に、それが代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法に反応する前記患者の好ましい素因を示す、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

リンパ節転移を測定することをさらに含んでなり、リンパ節転移が陰性の場合に、それが代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法に反応する前記患者の好ましい素因を示す、請求項 21 または 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記試料が腫瘍生検材料である、請求項 21 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記 B R C A 1 遺伝子発現レベルが、B R C A 1 遺伝子によってコードされる m R N A のレベルを測定することにより決定される、請求項 21 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

プロゲステロン受容体発現が免疫組織化学により測定される、請求項 21 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記代謝拮抗剤がフルオロウラシルである、請求項 21 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記挿入剤がエピルピシンである、請求項 21 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記アルキル化剤がシクロホスファミドである、請求項 21 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 30】

B R C A 1 遺伝子の発現レベルが低い乳癌に罹った患者の乳癌治療のためのネオアジュバント療法としての、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せ。

## 【請求項 31】

前記患者がプロゲステロン受容体陽性発現をさらに示す、請求項 30 に記載の組合せ。

## 【請求項 32】

前記患者が陰性リンパ節転移をさらに示す、請求項 31 に記載の組合せ。

## 【請求項 33】

乳癌に罹った患者を分類する方法であって、

i ) B R C A 1 遺伝子の発現レベル；および

i i ) プロゲステロン受容体発現；

を決定することと、

i i i ) 工程 i ) および i i ) の結果に従って該患者を以下のように定義される 4 つの群

- B R C A 1 遺伝子の発現レベルが低く、プロゲステロン受容体発現が陽性；

- B R C A 1 の発現レベルが低く、プロゲステロン受容体発現が陰性；

- B R C A 1 遺伝子の発現レベルが高く、プロゲステロン受容体発現が陽性；および

- B R C A 1 の発現レベルが高く、プロゲステロン受容体発現が陰性；

に分類すること

とを含んでなる方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、診断の分野に関し、特に、個別化ネオアジュバント化学療法を選択し、乳癌患者からの試料における B R C A 1 遺伝子の発現レベルを基に該患者の生存期間を予測する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

世界的に見て、乳癌は 2 番目に多い種類の癌であり ( 10 . 4 % ; 肺癌に次ぐ ) 、 5 番目に多い癌死の原因である ( 肺癌、胃癌、肝癌および結腸癌に次ぐ ) 。世界中の女性の中では、乳癌は最も多い癌死の原因である。2005 年には、世界中で 502 , 000 人が乳癌で死亡している ( 癌死の 7 % ; 全ての死のほぼ 1 % ) 。 1970 年代以来症例数は世界中で著しく増加しており、一部では、西洋諸国における現代的なライフスタイルによる現象だとされている。北アメリカ女性の乳癌の発生率が世界で最も高い。

## 【0003】

胸部は男性も女性も同じ組織で構成されているため、男性でも乳癌は発生する。男性の乳癌発生率は女性の約 100 分の 1 であるが、男性の乳癌患者の統計的な生存率は女性と同じだと考えられている。

## 【0004】

乳癌を T N M システムに従って病期分類する。予後は病期分類の結果と密接に関連しているが、病期分類は、臨床試験および臨床診療の両方において、患者を治療に割り当てるためにも用いられている。病期分類についての情報は以下の通りである。

- T X : 原発性腫瘍が判定不能。T 0 : 腫瘍の兆候なし。T i s : 上皮内癌、浸潤無し

T 1 : 腫瘍が 2 c m 以下 T 2 : 腫瘍が 2 c m より大きく 5 c m 以下 T 3 : 腫瘍が 5 c m より大きい T 4 : 腫瘍のサイズは問わず胸壁もしくは皮膚内に増殖しているもの、または炎症性乳癌

- N X : 隣接リンパ節が判定不能。N 0 : 癌が所属リンパ節には広がっていない。N 1 : 癌が 1 ~ 3 個の腋窩リンパ節または 1 個の内胸リンパ節に広がっている N 2 : 癌が 4 ~ 9 個の腋窩リンパ節または複数の内胸リンパ節に広がっている N 3 : 以下の内 1 つが当てはまる :

癌が 10 個以上の腋窩リンパ節に広がっている、または癌が鎖骨下のリンパ節に広がっ

10

20

30

40

50

ている、または癌が鎖骨上のリンパ節に広がっている、または癌が腋窩リンパ節に転移し内胸リンパ節が肥大している、または癌が4つ以上の腋窩リンパ節に転移し、センチネルリンパ節生検を行なうと内胸リンパ節に微量の癌が認められる。

- M X : 遠隔への広がり(転移)の存在が判定不能。M 0 : 遠隔への広がり無し。M 1 : 遠隔器官(鎖骨上リンパ節を除く)への広がりが発生。

#### 【0005】

腫瘍が局部的の場合の乳癌治療の柱は手術であるが、(タモキシフェンまたはアロマターゼ阻害薬を用いる)アジュバントホルモン療法、化学療法、および/または放射線療法を行なう場合もある。現在、手術後の治療推奨(アジュバント療法)は1つのパターンに従っているが、2年毎にスイスのセントガレンで開かれる世界会議で世界中での多施設試験の実結果について話し合われており、このパターンが変更されることもある。

10

#### 【0006】

一方、最終的治療の前に施される補助的療法であるネオアジュバント化学療法は、現代の集学的癌治療において欠くことのできない要素である。ネオアジュバント療法または導入療法が治療転帰に最も寄与しているわけではないが、それらによって結果が実質的によくなることもある。例えば、ネオアジュバント療法によって大きな乳癌の患者が乳房温存手術を受けることが可能になる。局所進行喉頭癌患者は発声機能を持ち続けることができる。直腸癌患者の多くは、この手法を受けた後、永久的結腸瘻造設を回避することができる。さらに、ある特定の癌においては、ネオアジュバント療法が長期生存をさらに改善することもある。Mouret-Reynier et al., Clin Breast Cancer. 2004 Oct;5 (4):303-7 (非特許文献1)では、I~III期の原発性で手術可能な乳癌の女性における、ネオアジュバント化学療法としてのFECの効能が研究され、初期の手術可能な乳癌患者においてFECが有効で忍容性が良好であると結論づけられている。

20

#### 【0007】

過去30年間、臨床腫瘍医は癌患者の転帰を最適化することに集中してきたが、ようやく最近、利用可能な新しい技術によって、異なるグループの癌患者における所定の療法の効果を予測してそれぞれに適合した化学療法にすることを目的とした、多形、遺伝子発現レベルおよび遺伝子突然変異の研究が可能になりつつある。代表的な例としては、TSMRNA発現と抗葉酸剤による反応および生存との関係(欧州特許第1381691号公報(特許文献1)参照)、チューブリンIIImRNAレベルとチューブリン相互作用薬に対する反応との関係、PTENメチル化と対CPT-11耐性との関係、およびSTAT3過剰発現と対EGF相互作用薬耐性との関係が挙げられる。オンコタイプDX(Oncotype DX)のようなPCR試験またはマンマプリント(MammaPrint)のようなマイクロアレイ試験では、遺伝子発現を基に乳癌の再発リスクを予測することができる。2007年2月、マンマプリント試験は食品医薬品局から公式承認を得た初の乳癌予測法となった。これは、初期の乳癌の女性が5年または10年以内に再発するか否かを予測するのに役立つ新しい遺伝子試験であり、どれだけ積極的に初期の腫瘍を治療するかに影響を及ぼすこともある。

30

#### 【0008】

乳癌1(BRCA1)はDNA修復においてきわめて重要な役割を果たしており、散発性および遺伝性乳癌の両方でBRCA1 mRNA発現の減少が確認されている(Kennedy RD, et al., (2002) Lancet, 360, 1007-1014(非特許文献2))。これらの患者は、DNA損傷をベースとした化学療法には反応し得るが微小管阻害薬には反応しない。加えて、DNA損傷をベースとした化学療法によって与えられる生存優位性は、BRCA1変異保有者のほうが変異非保有者に比べると大きい。また、BRCA1 mRNAレベルの低い卵巣癌患者は、BRCA1 mRNAレベルが高い患者に比べると、白金ベースの化学療法後の生存期間が改善されている(Quinn et al., Clin Cancer Res. 2007 Dec 15;13(24):7413-20(非特許文献3))。

40

#### 【0009】

BRCA1は転写と共役したヌクレオチド除去修復(TC-NER)に関与しており、

50

B R C A 1 の発現調節が T C - N E R の調節につながり、それが放射線および化学療法抵抗性につながる。B R C A 1 発現のアプレギュレーションが S K O V - 3 ヒト卵巣癌細胞系におけるシスプラチン耐性の増加につながり (Husain A, et al., Cancer Res. 1998 Mar 15;58(6):1120-3 (非特許文献 4))、B R C A 1 陰性 H C C 1 9 3 7 ヒト乳癌細胞系において B R C A 1 が回復すると放射線抵抗性が回復した。B R C A 1 は、相同組換え修復 (H R R)、および D N A 損傷に应答した非相同末端結合にも関与している。さらに、B R C A 1 は B R C A 1 結合性ゲノムサーベイランス複合体と呼ばれている大きな D N A 修復複合体の構成要素であるが、この複合体には多数のミスマッチ修復タンパク質が含まれており、B R C A 1 がミスマッチ修復において役割を果たしている可能性があることを示している。B R C A 1 および  $\gamma$ -チューブリンが紡錘体の微小管および中心体に共存していることから、B R C A 1 は紡錘体形成の調節因子である可能性もある。最後に、B R C A 1 発現の増加は、シスプラチン誘発性 D N A 損傷によって活性化される c - J u n N 末端キナーゼ経路を介するアポトーシスと関連付けられており、この経路を阻害すると細胞系におけるシスプラチン感受性が増加した。リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - Q P C R) によって測定された、乳癌細胞系における B R C A 1 m R N A 発現の減少によって、シスプラチンおよびエトポシドに対する感受性が増加したが、微小管干渉剤であるパクリタキセルおよびビンクリスチンへの耐性が増加した (Lafarge S, et al., (2001) Oncogene, 20, 6597-6606 (非特許文献 5))。最近では、野生型 B R C A 1 を B R C A 1 陰性 H C C 1 9 3 7 乳癌細胞系に再構成した結果、シスプラチン耐性が 20 倍増加した一方で、抗微小管薬 (パクリタキセルおよびビノレルビン) 感受性が 1000 ~ 10,000 倍増加した。

10

20

## 【 0 0 1 0 】

B R C A 1 を条件的に破壊したマウスモデルでは、ドキシソルピシンおよびガンマ線照射に対する感受性は高かったがタモキシフェンには耐性を示し、B R C A 1 発現と関連した特異な化学感受性についてのさらなる証拠となった。B R C A 1 発現を、散発性乳癌の女性において半定量的 P C R で調べたところ、B R C A 1 m R N A レベルが低い (最低四分位 (bottom quartile)) ことは遠隔転移の頻度が高いことと関連していた (Seery LT, et al., (1999) Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 84, 258-262 (非特許文献 6))。

## 【 0 0 1 1 】

細胞系およびマウスモデルのデータは豊富にあるにもかかわらず、臨床状況における、B R C A 1 および B R C A 2 m R N A 発現と化学療法への反応との相関関係について調べた研究は小さなものが 1 つあるだけである (Egawa C., (2001) Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 95, 255-259 (非特許文献 7))。局所進行性または転移性乳癌をドセタキセル治療している 25 人の女性において、B R C A 1 についてもわずかな違いは観察されたが、非应答者よりも应答者において有意に低かったのは B R C A 2 m R N A レベルのみであった。

30

## 【 0 0 1 2 】

Martin-Richard et al., Oncology, 2004; 66: 388-94 (非特許文献 8) には、乳癌におけるアントラサイクリンによるネオアジュバント化学療法に対する臨床反応を予測する際のトポイソメラーゼ I I (トポ I I) の有用性、および考えられる化学療法後のトポ I I の変化が記載されている。治療前の腫瘍の 31% でトポ I I が過剰発現し、この過剰発現が臨床反応と有意に関連していたという結果が示されている。Kandioler-Eckersberger D. et al., Clin Cancer Res. 2000; 6:50-6 (非特許文献 9) には、F E C (フルオロウラシル、エピルピシンおよびシクロホスファミド) の細胞傷害効果を予測するための p 5 3 の有用性、および進行性乳癌患者における微小管安定化 (パクリタキセル) 化学治療計画が記載されている。F E C の組合せへの反応は乳癌患者における正常 p 5 3 および腫瘍細胞アポトーシスと直接関連していた、という結果が示されている。Knoop J Clin Oncol., 2005; 23:7483-90 (非特許文献 10) には、T O P 2 A が増幅している患者では、C E F (シクロホスファミド、エピルピシンおよびフルオロウラシル) 化学療法と C M F (シクロホスファミド、メトトレキサートおよびフルオロウラシル) 化学療法とで比較

40

50

しながら治療した場合、無再発生存期間および全生存期間がそれぞれ増加しており、TOP2Aが欠失している患者では危険率はほぼ等しかった、ということが記載されている。

【0013】

本発明の目的は、特に乳癌患者について、最適な治療法選択に使用するための有用な臨床ツールとなり得る、化学療法、特にネオアジュバント療法に対する反応の予測方法を提供することである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0014】

【特許文献1】欧州特許第1381691号公報

10

【非特許文献】

【0015】

【非特許文献1】Mouret-Reynier et al., Clin Breast Cancer. 2004 Oct;5 (4):303-7

【非特許文献2】Kennedy RD, et al., (2002) Lancet, 360, 1007-1014

【非特許文献3】Quinn et al., Clin Cancer Res. 2007 Dec 15;13(24):7413-20

【非特許文献4】Husain A, et al., Cancer Res. 1998 Mar 15;58(6):1120-3

【非特許文献5】Lafarge S, et al., (2001) Oncogene, 20, 6597-6606

【非特許文献6】Seery LT, et al., (1999) Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 84, 258-262

【非特許文献7】Egawa C., (2001) Int. J. Cancer (Pred. Oncol.), 95, 255-259

20

【非特許文献8】Martin-Richard et al., Oncology, 2004; 66: 388-94

【非特許文献9】Kandioler-Eckersberger D. et al., Clin Cancer Res. 2000; 6:50-6

【非特許文献10】Knoop J Clin Oncol., 2005; 23:7483-90

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明は、乳癌における、特異な化学感受性の予測およびネオアジュバント化学療法の適合化に使用するためのツールを提供する。

【0017】

本発明者らは、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法によりBRCA1の発現レベルが低い乳癌に罹った患者の生存期間が改善されるという、驚くべき知見を得た。

30

【0018】

したがって、第1の態様において、本発明は、乳癌に罹った患者からの試料におけるBRCA1遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなる、該患者用の個別化ネオアジュバント療法を選択する方法であって、BRCA1遺伝子の発現レベルが基準値に比べて低い場合に、該患者が代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法のための良い候補である方法に関する。

【0019】

第2の態様において、本発明は、乳癌に罹った患者からの試料におけるBRCA1遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなる、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法への前記患者の臨床反応を決定する方法であって、BRCA1遺伝子の発現レベルが基準値に比べて低い場合に、それが該療法への該患者の臨床反応が良好であることを示す方法に関する。

40

【0020】

さらなる態様において、本発明は、乳癌に罹った患者からの試料におけるBRCA1遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなる、該患者の、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法へ反応する素因を評価する方法であって、BRCA1遺伝子の発現レベルが低い場合に、それが、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法に反応する該患者の好ましい素因を示す方

50

法に関する。

【0021】

別の態様において、本発明は、BRCA1遺伝子の発現レベルが低い乳癌に罹った患者における乳癌治療のためのネオアジュバント療法としての、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せに関する。

【0022】

別の態様において、本発明は、乳癌に罹った患者を分類する方法であって、

i) BRCA1遺伝子の発現レベル；および

ii) プロゲステロン受容体発現；

を決定することと、

iii) 工程i)およびii)の結果に従って患者を以下のように定義される4つの群：

- BRCA1遺伝子の発現レベルが低く、プロゲステロン受容体発現が陽性；

- BRCA1の発現レベルが低く、プロゲステロン受容体発現が陰性；

- BRCA1遺伝子の発現レベルが高く、プロゲステロン受容体発現が陽性；および

- BRCA1の発現レベルが高く、プロゲステロン受容体発現が陰性；

に分類すること

とを含んでなる方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、BRCA1についての無病生存期間(DFS)を三分位(terciles)で表した Kaplan-Meier 生存曲線を示す。期間は月で表す。プロットにおいて、小さな垂直のチェックマークはロスを示し、ここで患者データが打ち切りになっている。「打ち切り」という用語は、最終転帰を観察する前のサンプルのロスを示す。

【図2】図2は、BRCA1についての生存期間中央値を三分位で表した Kaplan-Meier 生存曲線を示す。期間は月で表す。プロットにおいて、小さな垂直のチェックマークはロスを示し、ここで患者データが打ち切りになっている。「打ち切り」という用語は、最終転帰を観察する前のサンプルのロスを示す。

【図3】図3は、免疫組織化学で測定したBRCA1タンパク質発現(値0、1、2および3)と、定量PCRにより、FECネオアジュバント療法で治療されている41人の乳癌患者で測定したBRCA1 mRNA発現との相関関係を表すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明者らは、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法で治療されている乳癌に罹った患者の臨床反応はBRCA1の発現レベルと密接な相関関係がある、という驚くべき知見を得た。

【0025】

これにより医師は、リスクと利益との患者にとって適当な妥協点を取りながら、BRCA1発現レベルに従って、最も生存期間を改善する可能性のある治療計画に関してインフォームドディシジョンを行なうことができる。これらの知見に基づき、本発明者らは、以下に詳細に記載する様々な実施形態における本発明の方法を定義した。

【0026】

したがって、第1の態様において、本発明は、乳癌に罹った患者からの試料におけるBRCA1遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなる、該患者用の個別化ネオアジュバント療法を選択する方法であって、BRCA1遺伝子の発現レベルが基準値に比べて低い場合、該患者が代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法のための良い候補である、新規な方法を提供する。

【0027】

「乳癌」という用語は乳房の腫瘍に関し、典型的には腺管癌、小葉癌、血管腫、肉腫等の乳癌に出現するいずれかの組織学的亜型、表在性癌、筋層浸潤性癌または転移性疾患等のいずれかの臨床亜型、およびいずれかのTMN分類を含む。TMN分類には、浸潤癌

10

20

30

40

50

の有無、浸潤癌の大きさおよび乳房の外側の浸潤の有無によって決まる T i s、T 1、T 2、T 3 または T 4、リンパ節内の乳癌細胞沈渣の数、サイズおよび位置によって決まる N 0、N 1、N 2 または N 3、ならびに乳房およびリンパ節以外の場所での乳癌細胞の有無（例えば骨、脳、肺へのいわゆる遠隔転移）によって決まる M 0 または M 1 が含まれる。

#### 【 0 0 2 8 】

本明細書で用いる「試料」という用語は、患者から得ることができる任意の試料に関する。本方法は、生検試料、組織、細胞または体液（血清、唾液、精液、痰、脳脊髄液（C S F）、涙、粘液、汗、乳汁、脳抽出物等）等の、患者からのあらゆるタイプの生物学的試料に適用することができる。特定の実施形態において、該試料は腫瘍組織試料またはその一部である。さらに特定の実施形態において、該腫瘍組織試料は乳癌に罹った患者からの乳房腫瘍組織試料である。該試料は、医療関連分野の当業者に周知の方法を用いて、生検等の従来の方法で得ることができる。生検材料から試料を得る方法としては、肉眼で見える程度の塊の分割もしくは顕微解剖、または当業者に公知のその他の細胞分離法が挙げられる。さらには、腫瘍細胞は穿刺吸引細胞診により得ることができる。試料は、その保存および取扱いを簡素化するために、ホルマリン固定してパラフィン包埋するか、または、まず凍結させ、次いで急速凍結が可能になる超極低温培地への浸漬を経てから O C T コンパウンド等の低温凝固性培地に包埋してもよい。

10

#### 【 0 0 2 9 】

本発明の方法は、B R C A 1 遺伝子の発現レベルを決定することを必要とする。好ましい実施形態において、B R C A 1 遺伝子の発現レベルの決定は、B R C A 1 遺伝子によってコードされる m R N A の発現レベルを測定することによって行なうことができる。この目的のためには、生物学的試料を処理して、組織や細胞構造を物理的または機械的に破壊し、細胞内成分を水溶液または有機溶液中に放出し、さらなる分析のために核酸を作製してもよい。この核酸は当業者に公知の手順で試料から抽出されるが、市販もされている。次いで、当技術分野において一般的ないずれかの方法、例えば、Sambrook, Fischer and Maniatis, Molecular Cloning, a laboratory manual, (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, (1989) によって、R N A が凍結試料または新鮮な試料から抽出される。抽出プロセス中に R N A が分解しないように注意することが好ましい。

20

#### 【 0 0 3 0 】

特定の実施形態において、発現レベルは、ホルマリン固定し、パラフィン包埋した組織試料から得た m R N A を用いて決定される。m R N A は、保存用病理試料または最初に脱パラフィン化した生検試料から単離することができる。典型的な脱パラフィン法には、パラフィン化した試料を例えばキシレン等の有機溶媒で洗浄することが含まれる。脱パラフィン化した試料は、低級アルコールの水溶液で再水和してもよい。好適な低級アルコールとしては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、およびブタノールが挙げられる。脱パラフィン化した試料は、例えば、低級アルコール溶液で、その濃度を下げながら次々と洗浄することで再水和してもよい。あるいは、試料の脱パラフィン化と再水和を同時に行なう。次いで試料を溶解させ、R N A を試料から抽出する。

30

#### 【 0 0 3 1 】

全ての遺伝子発現プロファイリングの手法（R T - P C R、S A G E または T a q M a n）が上述の本発明の態様を実施する際に用いるのに好適であるが、遺伝子 m R N A 発現レベルは、多くの場合逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（R T - P C R）で決定される。検出は、個々の試料または組織マイクロアレイ中に行なうことができる。

40

#### 【 0 0 3 2 】

m R N A 発現の値を異なる試料間で正規化するために、試験用試料中の目的の m R N A の発現レベルとコントロール R N A の発現とを比較することが可能である。本明細書で用いる「コントロール R N A」は、非腫瘍形成性細胞に対し、腫瘍細胞において発現レベルが変化しないか、またはほんのわずかな量しか変化しない R N A に関する。好ましくは、コントロール R N A は、ハウスキーピング遺伝子に由来し、かつ構成的に発現して必須の

50

細胞機能を果たすタンパク質をコードする mRNA である。本発明に用いる好ましいハウスキージング遺伝子としては、 $\beta$ -2-ミクログロブリン、ユビキチン、18-Sリボソームタンパク質、シクロフィリン、GAPDH およびアクチンが挙げられる。好ましい実施形態において、コントロール RNA は  $\beta$ -アクチン mRNA である。一実施形態において、相対的遺伝子発現の定量は、内在性コントロールとして  $\beta$ -アクチンを、キャリブレーターとして市販の RNA コントロールを用いて比較 Ct 法に従って計算した。最終結果は、 $2^{-(\text{Ct}_{\text{試料}} - \text{Ct}_{\text{キャリブレーター}})}$  の式に従って決定し、式中、キャリブレーターおよび試料の CT 値は、 $\beta$ -アクチン遺伝子の値から標的遺伝子の CT 値を引くことによって決定する。

#### 【0033】

BRC A 1 遺伝子の発現レベルの決定には基準値が関連している必要があるが、この基準値は、ネオアジュバント化学療法的治療に先立って癌患者からの生検試料中の腫瘍組織を回収する際に測定される、BRC A 1 の発現レベルの中央値に相当している。この中央値が確定すれば、患者からの腫瘍組織に発現するこのマーカーのレベルとこの中央値とを比較することができ、よって「低」「普通」または「高」のレベルを割り当てることができる。基準レベルの元となる試料の回収物は、同タイプの癌の患者から構成されることが好ましい。例えば、実施例に記載した統計的に代表的な回収物は、乳癌患者からの 41 個の試料から構成されていた。いずれの場合においても、回収物に含まれる試料数は異なり得る。遺伝子試料の発現が「増加」または「減少」しているかを決定するのに用いる基準値は、ネオアジュバント化学療法的治療に先立って癌患者からの生検により得られる各腫瘍試料からそれぞれ同量の RNA をプールすることで得られる RNA 試料において測定される BRC A 1 の発現レベルの中央値に対応して使用される。この中央値が確定すれば、患者からの腫瘍組織に発現するこのマーカーのレベルとこの中央値とを比較することができ、よって「増加」または「減少」のレベルを割り当てることができる。被験者間のバラつき（例えば、年齢、人種等に関する面）により、BRC A 1 の絶対的な基準値を確定することは（事実上不可能とまではいかないが）非常に困難である。したがって、特定の実施形態において、BRC A 1 発現の「増加」または「減少」に対する基準値は、通常の被験者（すなわち乳癌の診断を受けていない人）から単離された試料群の BRC A 1 遺伝子の発現レベルを試験することを含む、従来手段でパーセンタイル（percentile）を計算することにより決定される。こうして「増加」したレベルを割り当てることができるが、BRC A 1 遺伝子の発現レベルが通常の集団において 50 パーセンタイル以上、例えば、通常の集団において 60 パーセンタイル以上、通常の集団において 70 パーセンタイル以上、通常の集団において 80 パーセンタイル以上、通常の集団において 90 パーセンタイル以上、および通常の集団において 95 パーセンタイル以上の発現レベルの試料に対して割り当てることが好ましい。

#### 【0034】

好ましい実施形態において、BRC A 1 発現値は三分位（terciles）に分割される。一例としては、リアルタイム定量 PCR を用いて、ネオアジュバント FEC 化学療法を受けた乳癌患者からの 41 個の腫瘍生検材料における BRC A 1 mRNA レベルを決定し、その遺伝子発現値を三分位に分割した。結果が転帰（DFS および MS）と相関関係にある場合、BRC A 1 レベルが最低三分位（第 1 三分位）（tercile 1）の患者は、最高および中三分位の患者に比べて、再発リスクが有意に減少し（DFS）、生存期間が有意に改善した（MS）ことが観察された（図 1 および 2 参照）。

#### 【0035】

別の実施形態において、BRC A 1 遺伝子の発現レベルは、BRC A 1 タンパク質の発現を測定することにより決定される。BRC A 1 タンパク質の発現レベルの決定は、例えば、ELISA、ウェスタンブロットまたは免疫蛍光法等の免疫学的手法により行なうことができる。ウェスタンブロットは、あらかじめ変性条件下にてゲル電気泳動で分解し、特異的な抗体および展開系（例えば化学発光系）と一緒にインキュベーションすることにより膜（通常はニトロセルロース）上に固定化したタンパク質を検出することが基本とな

10

20

30

40

50

っている。免疫蛍光法による分析では、顕微鏡検査によって発現および細胞内局在を分析するために、標的タンパク質に特異的な抗体を使用することが必要である。通常、研究中の細胞は、あらかじめパラホルムアルデヒドで固定され非イオン洗剤で透過処理されている。E L I S Aは酵素で標識した抗原または抗体を用いることが基本となっているため、標的抗原と標識抗体の間で結合体 (conjugate) が形成されることで、酵素的に活性な複合体が形成されることになる。構成要素の一方 (抗原または標識抗体) が支持体上に固定化されるため抗体 - 抗原複合体が支持体上に固定化されることになり、そのため、酵素によって例えば分光測光法または蛍光光度法で検出可能な産物へと変換される基質を添加することによって、これを検出することができる。この手法では標的タンパク質の正確な位置確認やその分子量の決定はできないが、種々の生物学的試料 (血清、血漿、組織ホモジネート、ポスト核 (postnuclear) 上清、腹水等) 中の標的タンパク質を非常に特異的に、かつ高感度に検出することができる。好ましい実施形態において、B R C A 1タンパク質は、コーティングしたスライド上に固定化された生物学的試料の薄片を用いて免疫組織化学 (I H C) 分析によって検出される。次いでこの薄片は、パラフィン化した組織試料由来の場合には脱パラフィン化され、抗原を回収するように処理される。検出は、個々の試料または組織マイクロアレイ中で行うことができる。

10

#### 【0036】

標的タンパク質の量を検出するためには、標的タンパク質に高親和性に結合することが知られているいずれの抗体または試薬を用いてもよい。とは言うものの、ポリクローナル血清、ハイブリドーマ上清またはモノクローナル抗体等の抗体; F v、F a b、F a b'、F (a b')<sub>2</sub>、S c F v等の抗体断片; ジアボディ (diabodies); トリアボディ (triabodies); テトラボディ (tetrabodies) およびヒト化抗体を使用することが好ましい。

20

#### 【0037】

さらに別の実施形態において、B R C A 1タンパク質発現レベルの決定は、集めた患者試料を含有する組織マイクロアレイ (T M A) を構築し、免疫組織化学の手法でB R C A 1タンパク質の発現レベルを決定することによって行なうことができる。免疫染色強度は、この方法の再現性を維持するために、2つの異なる病理学者によって評価し、一律で明確なカットオフ基準を用いて記録してもよい。不一致は、同時に再評価することで解決できる。簡単に言うと、免疫染色の結果は、腫瘍細胞における発現および各マーカーに対する特異的カットオフを考慮に入れつつ、陰性発現 (0) 対陽性発現、ならびに低発現 (1+) 対中 (2+) および高 (3+) 発現として記録してもよい。カットオフは、全般的な基準としては再現性を促進するために、可能であれば生物学的事象を解釈するために選択した。

30

#### 【0038】

本発明者らは、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法で治療されている乳癌に罹った患者の生存期間はプロゲステロン受容体の発現レベルとも相関関係にあることをさらに示している。よって、B R C A 1発現およびプロゲステロン受容体発現の測定値は両方とも、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法で治療されている乳癌に罹った患者の臨床転帰の予測マーカーとして用いることができる。したがって、本発明の特定の実施形態において、また乳癌患者の生存率をさらに改善するため、かつ本発明に従ってより有効な治療選択肢を提供するため、本方法はプロゲステロン受容体発現を測定することをさらに含んでなり、ここで、基準値と比較したときプロゲステロン受容体発現が陽性である場合に、該患者は代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法のための良い候補である。特定の実施形態において、プロゲステロン受容体の発現レベルは、プロゲステロン受容体タンパク質の発現を測定することにより決定される。プロゲステロン受容体タンパク質の発現レベルの決定は、先に記載のいずれかの免疫学的方法で行なうことができる。さらに特定の実施形態において、プロゲステロン受容体タンパク質の発現レベルの決定は、免疫組織化学の手法によりプロゲステロン受容体タンパク質の発現レベルを決定す

40

50

る、組織マイクロアレイ ( T M A ) により行なわれる。よって、P R 発現測定 of 例示的、非限定的な例として、例えばMohsin et al. (Modern Pathology; 2004 17, 1545-1554) が記載しているように、P R の免疫組織化学的発現は、試料中の P R 陽性核の数を定量することによって、免疫組織化学の手法で定量される。ここで、10%以上の P R 陽性核を示す腫瘍試料が P R 陽性とみなされる。

【0039】

本発明者らは、リンパ節転移、すなわちリンパ管侵襲の程度が、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法で治療されている乳癌に罹った患者の臨床転帰の予測マーカーとして使用できることも見出した。したがって、別の実施形態において、本発明の方法はリンパ節転移を測定することをさらに含んでなり、ここで、リンパ節転移が陰性である場合に、該患者は代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法のための良い候補である。

10

【0040】

本明細書で用いる「リンパ節転移」( lymph node involvement ) という表現は、腫瘍細胞が、腫瘍を含んだ組織の近くにあるリンパ節および血管へ広がることと理解される。

【0041】

本発明の方法で用いられる化学療法ネオアジュバント剤は、一般に臨床的に使用されている用量で投与される。こうした用量は、例えば体表面積を基に、通常のやり方で算出される。

【0042】

本発明の代謝拮抗薬としては、5 - フルオロウラシル、シタラビン、ゲムシタビン、アミノプテリン、メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、クラドリビン、クロファラビン、フルダラビン、メルカプトプリン、ペントスタチン、チオグアニン、カペシタビン、フロクスウリジン等を用いることができる。

20

【0043】

アルキル化剤としては、クロラムブシル、クロルメチン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン、カルムスチン、フォテムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン、サトラプラチン、プスルファン、ダカルバジン、プロカルバジン、テモゾロマイド、チオテバ、トレオスルファンおよびウラムスチンが挙げられる。

30

【0044】

挿入剤としては、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、ピクサントロン、バルルビシンが挙げられる。

【0045】

本発明の特定の実施形態において、前記乳癌患者に施されるネオアジュバント化学療法は、代謝拮抗剤であるフルオロウラシルの投与を含んでなる。

【0046】

5 - F U (フルオロウラシル) は何通りかに作用するが、主にチミジル酸シンターゼ阻害剤として作用する。この酵素の作用を遮断することにより、DNA複製に必要とされるヌクレオチドであるピリミジンチミジンの合成がブロックされる。チミジル酸シンターゼはデオキシウラシルーリン酸 ( d U M P ) をメチル化してデオキシチミンーリン酸 ( d T M P ) にする。多くの抗癌剤と同様、5 - F U の効果は全身に感じられるが、ヌクレオチド合成機構を盛んに利用している、急速に分裂している細胞にもっとも大きな効果を及ぼす。ピリミジン類似体として、5 - F U は細胞内で様々な細胞毒性代謝産物に変換され、次いでDNAおよびRNAに組み込まれ、細胞のDNA合成能を阻害することにより最終的に細胞周期停止およびアポトーシスを誘導する。5 - F U はS期特異的薬剤であり、特定の細胞周期の間のみ活性である。DNAおよびRNAに組み込まれるほか、この薬剤は、エキソリボヌクレアーゼ複合体であるエキソソーム複合体の、細胞生存に不可欠な活性を阻害することが示されている。

40

【0047】

50

本発明の別の特定の実施形態において、前記挿入剤はエピルピシンである。

【0048】

エピルピシンはDNA鎖にインターカレートすることで作用する。インターカレーションによって複合体形成が起き、それがDNAおよびRNA合成を阻害する。またインターカレーションはトポイソメラーゼIIによるDNA開裂を誘発し、細胞死を招くメカニズムを引き起こす。細胞膜および血漿タンパク質への結合が化合物の細胞障害効果に關与している可能性がある。またエピルピシンは細胞およびDNAの損傷を引き起こすフリーラジカルも生成する。エピルピシンは副作用をあまり起こさないとされるので、いくつかの化学治療計画においては、最も普及しているアントラサイクリンであるドキソルピシンよりも好まれている。エピルピシンは糖の4'炭素にいろいろな空間定位のヒドロキシル基を有するが、そのことがエピルピシンの排泄の速さおよび毒性の低さの原因である可能性がある。エピルピシンは、主に乳癌および卵巣癌、胃癌、肺癌、ならびにリンパ腫に対して使用される。

10

【0049】

本発明の別の特定の実施形態において、前記アルキル化剤はシクロホスファミドである。

【0050】

シトホスファンとしても知られるシクロホスファミドは、オキサゾフォリン基由来のナイトロジェンマスタードアルキル化剤である。シクロホスファミドは「プロドラッグ」であり、肝臓で化学療法的活性を有する活性型に変換される。シクロホスファミドは、肝臓で混合機能オキシダーゼ酵素によって活性代謝産物に変換される。主な活性代謝産物は4-ヒドロキシシクロホスファミドである。4-ヒドロキシシクロホスファミドは、その互変異性体であるアルドホスファミドと平衡して存在している。ほとんどのアルドホスファミドは酵素であるアルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)によって酸化され、カルボキシホスファミドとなる。ごく一部のアルドホスファミドはホスホラミドマスタードおよびアクロレインに変換される。アクロレインは膀胱上皮に対して毒性があり、出血性膀胱炎を引き起こす恐れがある。これは、積極的な水分補給および/またはメスナ(Mesna)を使用することで防ぐことができる。

20

【0051】

最近の臨床研究によると、シクロホスファミドは養子免疫療法において有益な免疫調節性効果を誘導することが示されている。シクロホスファミドの主作用は、その代謝産物であるホスホラミドマスタードによるものである。この代謝産物はALDHのレベルが低い細胞でしか形成されない。ホスホラミドマスタードは、グアニンのN-7位にてDNA鎖間(ストランド間架橋)およびDNA鎖内(ストランド内架橋)でDNA架橋を形成し、これが細胞死を招く。ALDHは骨髄幹細胞、肝臓および腸管上皮に比較的高濃度に存在するため、シクロホスファミドの典型的な化学療法毒性は比較的少ない。ALDHは、アルドホスファミドを毒性代謝産物(ホスホラミドマスタードおよびアクロレイン)を生じることのないカルボキシホスファミドに変換することによって、これらの活発に増殖している組織をホスホラミドマスタードおよびアクロレインの毒作用から保護する。

30

【0052】

従来のFEC療法は、5-フルオロウラシル $600\text{mg}/\text{m}^2$ 、エピルピシン $60\text{mg}/\text{m}^2$ 、シクロホスファミド $600\text{mg}/\text{m}^2$ からなる。しかしながら、この用量は患者の要求に従って変更することも可能である。例えばエピルピシンの用量は、用量強度を25~70パーセントの間で増やせば、50パーセントより多く増やしてもよい。さらに、シクロホスファミドの用量は、患者に対する毒性の増加が重度でなければ、100パーセントより多く増やしてもよい。

40

【0053】

本発明者らは、BRCA1発現が、乳癌に罹った患者の生存期間の良い予測マーカーとして使用できることを見出した。したがって、別の態様において、本発明は、乳癌に罹った患者からの試料におけるBRCA1遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなる、

50

代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法への該患者の臨床反応を決定する方法であって、BRCA1遺伝子の発現レベルが基準値に比べて低い場合に、それが該療法への該患者の臨床反応が良好であることを示す方法に関する。

【0054】

臨床反応の予測は、腫瘍学において用いられ、かつ当業者に公知の任意の終点測定法を用いて行なうことができる。病気の進行を記述するための有用な終点パラメータとして、以下のものが挙げられる。

- 無病進行。これは、本明細書で用いるように、研究期間中に病気が再発していない、完全寛解状態の患者の割合を記述する。
- 奏功。これは、本発明で用いるように、治療を受けた人の中で完全奏功または部分奏功が認められた人の割合を記述する。
- 腫瘍制御。これは、本発明で用いるように、治療を受けた人の中で完全奏功、部分奏功、やや有効または6カ月以上の安定病態が認められた人の割合に関する。
- 無病生存期間(DFS)。これは、本明細書で用いるように、治療後に患者が癌の増殖の兆候を示すことなく生存する期間の長さ、と定義される。
- 6カ月無憎悪生存率またはPFS6"率。これは、本明細書で用いるように、治療開始後の最初の6カ月間に進行がない人の割合に関する。
- 生存期間中央値(MS)。これは、本明細書で用いるように、研究に参加した患者の半数が依然として生存している期間に関する。

10

【0055】

特定の実施形態において、臨床反応の予測は無病生存期間および生存期間中央値を測定することにより行なわれる。

20

【0056】

「試料」という用語は既に定義されており、患者からのあらゆるタイプの生物学的試料に適用することができる。特定の実施形態において、該試料は腫瘍組織試料またはその一部である。さらに特定の実施形態において、該腫瘍組織試料は乳癌に罹った患者からの乳房腫瘍組織試料またはホルマリン包埋した乳房組織試料である。好ましい実施形態において、該試料は組織生検材料である。

【0057】

特定の実施形態において、BRCA1遺伝子の発現レベルの決定は、BRCA1遺伝子によってコードされるmRNAの発現レベルを測定すること、または前述のいずれかの手順を用いてBRCA1遺伝子産物の発現レベルを測定することによって行なわれる。

30

【0058】

前にも説明したように、BRCA1発現のほか、プロゲステロン受容体発現の測定を、DFSおよびMSの良い予測マーカーとして使用することができる。したがって、特定の実施形態において、本方法はプロゲステロン受容体発現を測定することも含んでなり、ここで、基準値と比較したときプロゲステロン受容体発現が陽性である場合に、前記療法への前記患者の臨床反応が良好であることを示す。

【0059】

特定の実施形態において、プロゲステロン受容体の発現レベルは、プロゲステロン受容体タンパク質の発現を測定することにより決定される。プロゲステロン受容体タンパク質の発現レベルの決定は、先に記載のいずれかの免疫学的方法により行なうことができる。

40

【0060】

さらに特定の実施形態において、プロゲステロン受容体タンパク質の発現レベルの決定は、免疫組織化学の手法によりプロゲステロン受容体タンパク質の発現レベルを決定する、組織マイクロアレイ(TMA)により行なわれる。

【0061】

別の特定の実施形態において、臨床反応を予測する本方法はリンパ節転移を測定することをさらに含んでなり、ここで、リンパ節転移が陰性の場合に、前記療法への前記患者の

50

臨床反応が良好であることを示す。

【0062】

本発明の方法で用いられる化学療法ネオアジュバント剤は、一般に臨床的に使用されている用量で投与される。本発明の特定の実施形態において、前記乳癌患者に施されるネオアジュバント化学療法は、代謝拮抗剤であるフルオロウラシルの投与を含んでなる。別の特定の実施形態において、前記挿入剤はエピルピシンである。別の特定の実施形態において、前記アルキル化剤はシクロホスファミドである。

【0063】

本発明者らの研究結果により、BRCA1の発現と、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント化学療法に患者が反応する可能性とが相関関係にある、乳癌に罹った患者のための個別化治療の開発が可能になる。したがって、別の態様において、本発明は、乳癌に罹った患者からの試料におけるBRCA1遺伝子の発現レベルを決定することを含んでなる、該患者の、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法へ反応する素因を評価する方法であって、BRCA1遺伝子の発現レベルが低い場合、それが、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法に反応する該患者の好ましい素因を示す方法に関する。

10

【0064】

本発明の特定の実施形態において、かかる試料は生検試料である。

【0065】

別の特定の実施形態において、BRCA1遺伝子の発現レベルの決定は、BRCA1遺伝子によってコードされるmRNAの発現レベルを測定すること、または前述の手順のいずれかを用いてBRCA1遺伝子産物の発現レベルを測定することによって行なわれる。

20

【0066】

本発明者らは、BRCA1発現が低いこと以外にも、プロゲステロン受容体発現が陽性であることと、患者が代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント化学療法に反応する可能性とが相関関係にある、ということを示した。したがって、特定の実施形態において、本方法は先に説明したようにプロゲステロン受容体発現を測定することも含んでなり、ここで、基準値と比較したときプロゲステロン受容体発現が陽性である場合に、それは代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法に反応する該患者の好ましい素因を示す。

30

【0067】

NR3C3（核受容体サブファミリー3、グループC、メンバー3）としても知られるプロゲステロン受容体（PR）は、プロゲステロンに特異的に結合する細胞内ステロイド受容体である。

【0068】

特定の実施形態において、プロゲステロン受容体の発現レベルは、プロゲステロン受容体タンパク質の発現を測定することにより決定される。プロゲステロン受容体タンパク質の発現レベルの決定は、先に記載のいずれかの免疫学的な方法により行なうことができる。

【0069】

さらに特定の実施形態において、プロゲステロン受容体タンパク質の発現レベルの決定は、免疫組織化学の手法によりプロゲステロン受容体タンパク質の発現レベルを決定する、組織マイクロアレイ（TMA）により行なわれる。

40

【0070】

別の特定の実施形態において、乳癌に罹った患者の、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法へ反応する素因を評価する本方法は、リンパ節転移を測定することをさらに含んでなり、ここで、リンパ節転移が陰性の場合に、それは代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せによるネオアジュバント療法に反応する該患者の好ましい素因を示す。

【0071】

50

本発明の方法で用いられる化学療法ネオアジュバント剤は、一般に臨床的に使用されている用量で投与される。本発明の特定の実施形態において、前記乳癌患者に施されるネオアジュバント化学療法は、代謝拮抗剤であるフルオロウラシルの投与を含んでなる。別の特定の実施形態において、投与される前記挿入剤はエピルピシンである。別の特定の実施形態において、前記アルキル化剤はシクロホスファミドである。

【0072】

別の態様において、本発明は、BRCA1遺伝子の発現レベルが低い乳癌に罹った患者の乳癌治療のためのネオアジュバント療法としての、代謝拮抗剤、挿入剤およびアルキル化剤の組合せに関する。

【0073】

先に説明した同じ理由で、本発明の特定の実施形態において、前記患者はプロゲステロン受容体陽性発現をさらに示し、また別の特定の実施形態において、前記患者は陰性リンパ節転移をさらに示す。

【0074】

別の態様において、本発明はさらに、

i) BRCA1遺伝子の発現レベル；および

ii) プロゲステロン受容体発現；

を決定することと、

iii) 工程 i) および ii) の結果に従って患者を以下のように定義される4つの群：

- BRCA1遺伝子の発現レベルが低く、プロゲステロン受容体発現が陽性；
- BRCA1の発現レベルが低く、プロゲステロン受容体発現が陰性；
- BRCA1遺伝子の発現レベルが高く、プロゲステロン受容体発現が陽性；および
- BRCA1の発現レベルが高く、プロゲステロン受容体発現が陰性；

に分類すること

とを含んでなる、乳癌に罹った患者を分類する方法に関する。

【0075】

以下の実施例は単に例示的なものであり、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0076】

材料および方法

4サイクルのネオアジュバントFEC（フルオロウラシル、エピルピシンおよびシクロホスファミド）化学療法で治療した局所進行乳癌患者86人から、腫瘍生検材料を得た。

【0077】

10

20

30

【表 1】

表 1 : 患者 86 人の基本的な臨床的特徴

変数	N (%)
年齢 ; 中央値 (最低-最高)	54 (31-79)
臨床的腫瘍サイズ (c m)	6 (2.50-12)
閉経	
後 (Yes)	50(58.1)
前 (No)	36(41.9)
臨床状態	
IIA	2(2.3)
IIB	22(25.6)
IIIA	23(26.7)
IIIB	37(43)
IIIC	1(1.2)
IV	1(1.2)
初期治療	
手術	1(1.2)
術前臨床化学療法	85(98.8)
サイクル (中央値、範囲)	4 (4-10)
術前臨床CTに対する臨床反応	
CR	0
PR	66(76.7)
SD	18(20.9)
PD	2(2.3)
術前臨床CTに対する病理反応	
CR	5(5.8)
PR	44(51.2)
SD	35(40.7)
PD	2(2.3)
手術	
乳房切除+排出 (emptying)	74(86.1)
乳房切除+見張り節 (sentry node)+排出 (emptying)	4(4.7)
腫瘍摘出-生検	1(1.2)
腫瘍摘出+排出 (emptying)	7(8.1)
術前ChTのサイクル (中央値、範囲)	4(4-10)

10

20

30

40

表 1 (続き)

病理状態		
	0	1(1.2)
	I	8(9.3)
	IIA	13(15.1)
	IIB	19(22.1)
	IIIA	22(25.6)
	IIIB	2(2.3)
	IIIC	19(22.1)
	IV	1(1.2)
腫瘍サイズ (中央値、範囲) c m		3 (0-12)
組織構造		
	非浸潤性乳管癌	2(2.3)
	粘液癌	1(1.2)
	扁平上皮への分化を伴う乳管癌	1(1.2)
	浸潤性乳管癌	75(87.2)
	浸潤性小葉癌	5(5.8)
	髄様癌	1(1.2)
分化度		
	I	5(5.8)
	II	32(37.2)
	III	30(34.9)
	NC	19(22.1)
リンパ節転移		
	陽性	69(80.2)
	陰性	17(19.8)
罹患神経節の数 (中央値、範囲)		3(0-26)
乾燥神経節の数 (中央値、範囲)		12(0-32)
エストロゲン受容体		
	0-4%	35(40.7)
	5-50%	6(7)
	50-100%	45(52.4)
プロゲステロン受容体		
	0-4%	59(68.6)
	5-50%	5(5.8)
	50-100%	22(25.6)

10

20

30

40

表1 (続き)

免疫組織化学によるBRCA1	0	7(8.2)	
	1	1(32.9)	
	2	34(40)	
	3	16(18.8)	
BRCA1 (mRNA) : N ; 中央値 (範囲)		N=41; 16.68 (2.93-187.40)	
免疫組織化学によるハンチンチン	0	11(13.3)	10
	1	40(48.2)	
	2	25(30.1)	
	3	7(8.4)	
免疫組織化学によるHer2	0	48(55.8)	
	1	12(14)	
	2	10(11.6)	20
	3	16(18.6)	
CISHTS (CISHによるHER2)	増幅	14(16.7)	
	低増幅	3(3.6)	
	増幅無し	67(79.8)	
評価不能		2	
ビメンチン	陰性	72(84.7)	
	陽性	11(12.9)	
	陽性病巣	2(2.4)	30
評価不能		1	
サイトケラチン6 / 7	陰性	66(78.6)	
	陽性	11(13.1)	
	陽性病巣	7(8.4)	
評価不能		2	
グループ	Her2 陽性	11(13.1)	
	ルミナルA	45(53.6)	40
	ルミナルB	6(7.1)	
	トリプルネガティブ	22(26.2)	
分類無し		2	

表1 (続き)

トリプルネガティブの患者22人	
CK6/7およびビメンチン陽性	6(28.6)
CK6/7およびビメンチン陰性	7(33.3)
CK6/7ならびに/またはビメンチン陽性および /もしくは陰性	8(38.1)
CK6/7陽性およびビメンチン評価不能	1

CT: 化学療法; CR: 完全奏功; PR: 部分奏功; SD: 安定病態;

PD: 進行性疾患

#### 【0078】

エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR)、HER2、サイトケラチン6/7、ビメンチン、ハンチンチン相互作用タンパク質1 (HIP1) およびBRCA1の発現を組織マイクロアレイで調べた。またHER2を化学発色in situハイブリダイゼーション (CISH) で評価し、BRCA1 mRNAを定量PCRにより患者41人の試料で分析した。BRCA1遺伝子発現は、Specht K, et al. (2001) (Am. J. Pathol., 158, 419-429) およびKrafft AE, et al. (1997) Mol. Diagn. 3, 217-230によって先に記載されているように測定した。キシレンおよびアルコールを用いて標準組織試料を脱パラフィン化した後、トリス-クロリド、EDTA、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) およびプロテイナーゼKを含む緩衝液中に試料を溶解させた。次いでRNAをフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコールで抽出し、その後、グリコーゲンおよび酢酸ナトリウムの存在下にて、イソプロパノールで沈殿させた。RNAをRNA保存液 (アンピオン社; オースティン、テキサス州、米国) 中に再懸濁させ、DNAの混入を避けるためにDNアーゼIで処理した。M-MLVレトロトランスクリプターゼ酵素を用いてcDNAを合成した。各遺伝子に対して特異的なプライマーおよびプローブを含む12.5-μlの反応系中のTaqman Universal Master Mix (AB; アプライドバイオシステムズ社、フォスターシティ、カリフォルニア州、米国) に、鋳型cDNAを加えた。プライマーとプローブのセットは、Primer Express 2.0 Software (AB) を用いて設計した。遺伝子発現の定量は、ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (AB) を用いて行なった。BRCA1 mRNA発現分析用のプライマーおよびプローブは、参照配列NM\_007294 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>) に従って設計した。フォワードプライマーはエクソン8 (4292 bp ~ 4317 bp位置) に、リバースプライマーはエクソン9 (4336 bp ~ 4360 bp位置) に、プローブはエクソン8/9ジャンクション (4313 bp ~ 4333 bp位置) に位置する。これらのプライマーと一緒に生成されたPCR産物のサイズは69 bpであった。プライマーおよび5'標識蛍光レポーター色素 (6FAM) プローブは以下の通りであった: -アクチン: フォワード5' TGA GCG CGG CTA CAG CT T 3' (配列番号1)、リバース5' TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT T 3' (配列番号2)、プローブ5' ACC ACC ACG GC C GAG CGG 3' (配列番号3); BRCA1: フォワード5' GGC TAT CCT CTC AGA GTG ACA TTT TA 3' (配列番号4)、リバース5' GCT TTA TCA GGT TAT GTT GCA TGG T 3' (配列番号5)、プローブ5' CCA CTC AGC AGA GGG 3' (配列番号6)。相対的遺伝子発現の定量は、内在性コントロールとして -アクチンを、キャリブレーターとして市販のRNAコントロール (ストラタジーン社、ラ・ホーヤ、カリフォルニア州) を用いて比較Ct法によって計算した。最終結果は以下のように決定した: 2<sup>- (Ct試料 - Ctキャリブレーター)</sup>、式中、キャリブレーターおよび試

10

20

30

40

50

料の  $C_T$  値は、 $\beta$ -アクトチン遺伝子の値から標的遺伝子の  $C_T$  値を引くことによって決定する。全ての実験において、 $C_T$  値の標準偏差 (SD) が  $< 0.20$  である三つ組のみを採用した。加えて、分析したそれぞれの試料について、ゲノムDNAの混入が無いことを確実にするために、コントロールを差し引いたレトロトランスクリプターゼを同一プレートで使用した。

【0079】

【表2】

表2：患者41人の基本的な臨床的特徴

変数	N (%)
年齢；中央値（最低－最高）	55(31-79)
腫瘍臨床サイズ (cm)	6.48(2.50-12)
閉経	
後 (Yes)	22(53.7)
前 (No)	19(46.3)
臨床状態	
IIA	0
IIB	10(24.4)
IIIA	11(26.8)
IIIB	20(48.8)
IIIC	0
IV	0
補助的CTのサイクル（中央値、範囲）	4(0-6)
術前初期CTに対する臨床反応	
CR	0
PR	31(75.6)
SD	9(22)
PD	1(2.4)
術前初期CTに対する病理反応	
CR	1(2.4)
PR	21(51.2)
SD	18(43.9)
PD	1(2.4)
手術	
乳房切除＋排出 (emptying)	37(90.2)
乳房切除＋見張り節 (sentry node)＋排出 (emptying)	2(4.9)
腫瘍摘出－生検	0
腫瘍摘出＋排出 (emptying)	2(4.9)
術前CTのサイクル（中央値、範囲）	4(4-10)

10

20

30

40

表 2 (続き)

病理状態		
	0	0
	I	3(7.3)
	IIA	4(9.8)
	IIB	8(19.5)
	IIIA	14(34.1)
	IIIB	2(4.9)
	IIIC	9(22)
	IV	0

10

変数	N (%)
組織構造	
非浸潤性乳管癌	0
粘液癌	0
扁平上皮への分化を伴う乳管癌	1(2.4)
浸潤性乳管癌	36(87.8)
浸潤性小葉癌	2(4.9)
髄様癌	1(2.4)
組織構造	
I	0
II	14(34.1)
III	20(48.8)
NC	7(17.1)
リンパ節転移	
陽性	35(85.4)
陰性	6(14.6)
罹患神経節の数 (中央値、範囲)	6(0-26)
乾燥神経節の数 (中央値、範囲)	15(0-32)
エストロゲン受容体	
0-4%	19(47.5)
5-50%	1(2.5)
50-100%	20(50)
プロゲステロン受容体	
0-4%	27(65.9)
5-50%	3(7.3)
50-100%	11(26.8)

20

30

40

表 2 (続き)

免疫組織化学によるBRCA1	0	4(10)	
	1	15(37.5)	
	2	12(30)	
	3	3(7.5)	
BRCA1 (RNA) : N ; 中央値 (範囲)		41; 16.68(2.93-187.40)	
免疫組織化学によるハンチンチン	0	4(10)	10
	1	21(52.5)	
	2	12(30)	
	3	3(7.5)	
免疫組織化学によるHer2	0	22(53.7)	
	1	8(19.5)	
	2	3(7.3)	
	3	8(19.5)	
CISHTS (CISHによるHER2)			20
	増幅	8(20)	
	低増幅	0	
	増幅無し	32(80)	
評価不能	1		
	変数	N (%)	
ビメンチン	陰性	35(87.5)	
	陽性	3(7.5)	
	陽性病巣	2(5)	30
評価不能		1	
サイトケラチン6/7	陰性	31(75.6)	
	陽性	6(14.6)	
	陽性病巣	4(9.7)	
グループ	Her2 陽性	6(15)	
	ルミナルA	20(50)	
	ルミナルB	2(5)	40
	トリプルネガティブ	12(30)	
分類無し		1	

CT : 化学療法 ; CR : 完全奏功 ; PR : 部分奏功 ; SD : 安定病態 ;

PD : 進行性疾患

【 0 0 8 0 】

#### 結果

患者の 57% で病理反応が得られた。無病生存期間 (DFS) 中央値は 30 カ月 (m) で生存期間中央値 (MS) は 41 カ月であった。

表 3 に、三分位 ( T 1、T 2 および T 3 ) に分類した B R C A 1 発現と患者の臨床的特徴との関係を示す。

【 0 0 8 1 】

【 表 3 】

表 3

	T1	T2	T3	p
閉経				0.52
0	5(26.3)	8(42.1)	6(31.6)	
1	9(40.9)	6(27.3)	7(31.8)	
年齢	59(45-73)	51(32-79)	54(31-74)	0.25
腫瘍サイズ	6(4-10)	7(2.50-12)	6(4-11)	0.60
サイトケラチン 6 / 7				0.10
陰性	11(35.5)	8(25.8)	12(38.7)	
陽性	3(30)	6(60)	1(10)	
C I S HによるHER 2				0.43
C I S HによるHER 2 陽性	3(37.5)	4(50)	1(12.5)	
C I S HによるHER 2 陰性	11(34.4)	10(31.3)	11(34.4)	
エストロゲン受容体				0.79
陰性	7(36.8)	7(36.8)	5(26.3)	
陽性	7(31.8)	7(31.8)	8(36.4)	
プロゲステロン受容体				0.18
陰性	10(37)	11(40.7)	6(22.2)	
陽性	4(28.6)	3(21.4)	7(50)	
ビメンチン				0.74
陰性	13(37.1)	12(34.3)	10(28.6)	
陽性	1(20)	2(40)	2(40)	
免疫組織化学によるハンチンチン				0.71
0	1(25)	1(25)	2(50)	
1	6(28.6)	9(42.9)	6(28.6)	
2	5(41.7)	4(33.3)	3(25)	
3	1(33.3)	0	2(66.7)	
HIP1				0.64
陰性 (0+1)	7(28)	10(40)	8(32)	
陽性 (2+3)	6(40)	4(26.7)	5(33.3)	
グループ				0.43
HER2 陽性	3(50)	2(33.3)	1(16.7)	
ルミナルA	7(35)	5(25)	8(40)	
ルミナルB	0	2(100)	0	
トリプルネガティブ	4(33.3)	5(41.7)	3(25)	

10

20

30

40

表 3 (続き)

リンパ節転移	陰性	2(33.3)	2(33.3)	2(33.3)	0.99
	陽性	12(34.3)	12(34.3)	11(31.4)	
病理反応	CR	0	0	1(100)	0.32
	PR	10(47.6)	6(28.6)	5(23.8)	
	SD	4(22.2)	7(38.9)	7(38.9)	
	PD	0	1(100)	0	
病理反応	CR+PR	10(45.5)	6(27.3)	6(27.3)	0.26
	SD+PD	4(21.1)	8(42.1)	7(36.8)	
臨床反応	PR	12(38.7)	9(29)	10(32.3)	0.56
	SD	2(22.2)	4(44.4)	3(33.3)	
	PD	0	1(100)	0	

CT : 化学療法 ; CR : 完全奏功 ; PR : 部分奏功 ; SD : 安定病態 ;

PD : 進行性疾患

10

20

## 【 0 0 8 2 】

図 1 に D F S の Kaplan-Meier 生存プロットを示す。B R C A 1 mRNA 発現結果 (第 1 三分位 (Tercile 1)、第 2 三分位 (Tercile 2) および第 3 三分位 (Tercile 3)) に従って患者を 3 つのグループに分けた。「第 1 三分位」のグループが、B R C A 1 mRNA 発現がより低いグループである。B R C A 1 発現が高い乳癌患者 (第 2 および第 3 三分位) よりも、ネオアジュバント F E C 療法で治療されて B R C A 1 発現が低い患者 (第 1 三分位) の D F S の方がよいことが結果からわかる。図 1 は、生存期間中央値 (M S) の Kaplan-Meier 生存プロットである。生存期間中央値についても B R C A 1 発現が低い患者 (第 1 三分位) の方がよい、ということが図 2 で示されている。

30

## 【 0 0 8 3 】

一方、図 3 および表 4 に示されるように、クラスタル - ワリス (K l u s t a l - W a l l i s) 検定 ( $p = 0.522$ ) によって、免疫組織化学で測定した B R C A 1 タンパク質発現と、定量 P C R で測定した B R C A 1 mRNA 発現との間に有意な相関関係は無いことが示された。

## 【 0 0 8 4 】

【表4】

表4

	BRCA1免疫組織化学					BRCA1免疫陽性/陰性		
	0	1	2	3	p	0+1	2+3	p
BRCA1定量的中央値	28.37	15.24	19.43	30.32	0.52	15.24	20.39	0.45
中央値より下のBRCA1	2(10)	10(50)	6(30)	2(10)	0.40	12(60)	8(40)	0.21
中央値より上のBRCA1	2(10)	5(25)	9(45)	4(20)		7(35)	13(65)	
BRCA1四分位					0.30			0.12
Q1	0	4(40)	4(40)	2(20)		4(40)	6(60)	
Q2	2(20)	6(60)	2(20)	0		8(80)	2(20)	
Q3	0	4(40)	4(40)	2(20)		4(40)	6(60)	
Q4	2(20)	1(10)	5(50)	2(20)		3(30)	7(70)	

10

## 【0085】

DFSおよびMSの多変量解析(表5)では、低レベルのBRCA1 mRNAならびに陽性のPRおよび陰性のリンパ節転移から有意な再発リスクの低下(DFS)が予測される一方で、有意な生存期間の改善と関連する変数は低レベルのBRCA1 mRNAおよび陽性のPRのみだということが示されている。

20

## 【0086】

## 【表5】

表5: DFSおよび生存期間の多変量解析

	N	DFS		生存期間	
		HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
BRCA1の三分位					
第1三分位	13	1		1	
第2三分位	14	8.15(2.43-27.29)	0.001	4.50(1.43-14.16)	0.01
第3三分位	12	4.58(1.41-14.90)	0.01	2.68(0.87-8.30)	0.09
HIP1					
陰性 (0+1)	24	1.19(0.50-2.84)	0.70	0.65(0.26-1.65)	0.37
陽性 (2+3)	15	1		1	
RE					
陰性	18	1.24(0.42-3.66)	0.70	1.38(0.46-4.11)	0.56
陽性	21	1		1	
PR					
陰性	26	4.36(1.03-18.51)	0.05	2.43(0.62-9.52)	0.20
陽性	13	1		1	
CISHによるHER2					
陰性	31	1		1	
陽性	8	0.61(0.20-1.89)	0.40	0.84(0.28-2.51)	0.75
リンパ節の状態					
陰性	6	1		1	
陽性	33	15.17(1.82-126.15)	0.01	3.19(0.70-14.60)	0.14

30

40

50

【 0 0 8 7 】

【 表 6 】

表 6 : D F S および生存期間の一変量解析

		DFS		SURVIVAL		
		N	HR (95% CI)	p	HR (95% CI)	p
B R C A 1 の三分位			1		1	
第 1 三分位	14					
第 2 三分位	14	4.55(1.61-12.85)	0.004	3.90(1.34-11.38)	0.01	
第 3 三分位	13	2.42(0.87-6.76)	0.09	2.41(0.82-7.09)	0.11	
HIP1						
0	11	2.99(0.93-9.67)	0.07	2.34(0.73-7.49)	0.15	
1	40	1.05(0.36-3.07)	0.93	0.80(0.27-2.37)	0.69	
2	25	1.10(0.36-3.39)	0.87	1.22(0.40-3.70)	0.73	
3	7	1		1		
HIP1						
陰性 (0+1)	51	1.23(0.68-2.23)	0.49	0.91(0.50-1.64)	0.74	
陽性 (2+3)	32	1		1		
RE						
陰性	35	2.25(1.28-3.95)	0.005	2.51(1.41-4.47)	0.002	
陽性	51	1		1		
PR						
陰性	59	1.40(0.76-2.58)	0.28	1.74(0.90-3.36)	0.10	
陽性	27	1		1		
CISH による HER2						
陰性	67	1		1		
陽性	17	1.38(0.70-2.71)	0.35	1.53(0.78-3.03)	0.22	
神経節の状態						
陰性	17	1		1		
陽性	69	2.25(0.95-5.28)	0.06	2.03(0.86-4.78)	0.11	

10

20

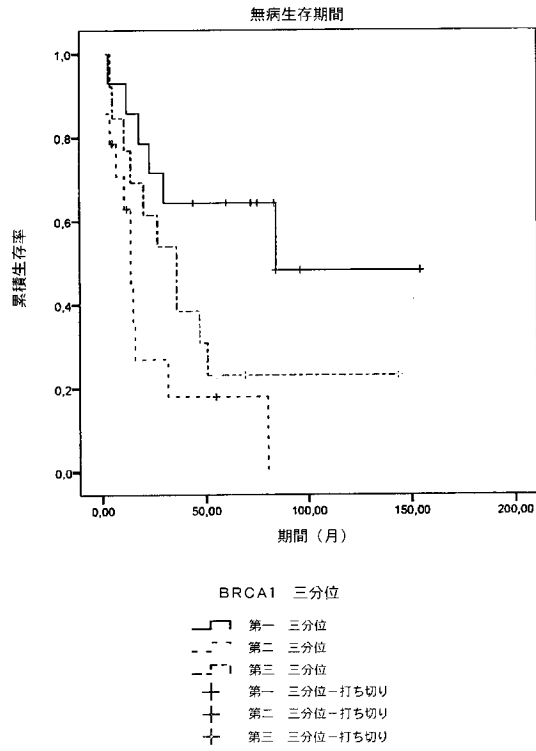
30

【 0 0 8 8 】

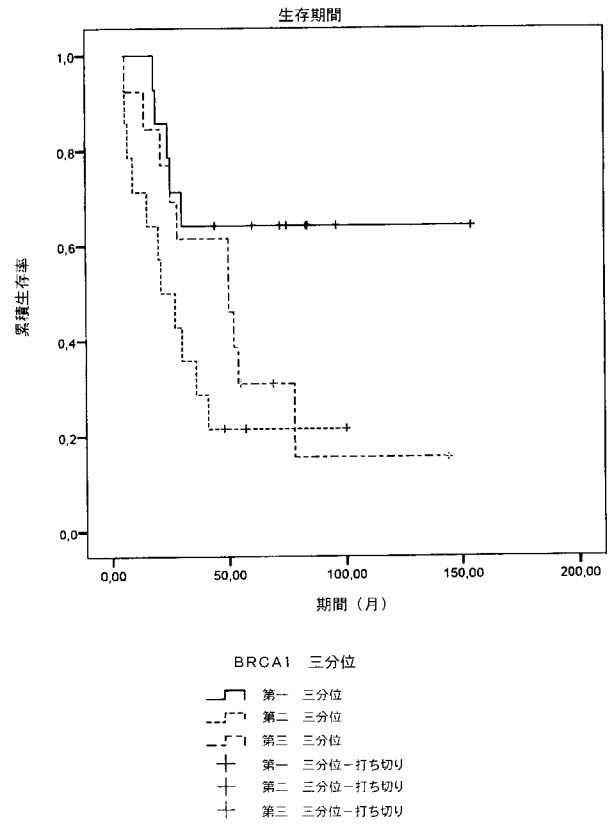
結論

本発明者らは、乳癌における D F S および M S の予測マーカーとしての B R C A 1 遺伝子発現の主要な役割を支持する証拠を提供した。これらの知見は化学療法を個別化するのに有用であり得る。

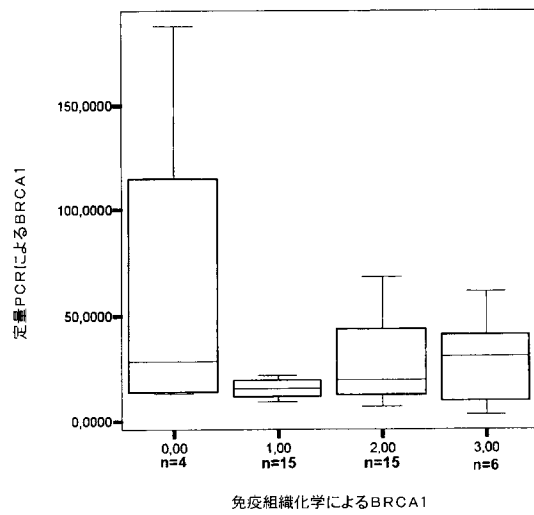
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【配列表】

2011516407000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2009/052027

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/574 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EGAWA CHIYOMI ET AL: "Increased expression of BRCA1 mRNA predicts favorable response to anthracycline-containing chemotherapy in breast cancers" 1 March 2003 (2003-03-01), BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, NIJHOFF, BOSTON, PAGE(S) 45 - 50 , XP002426612 ISSN: 0167-6806	1-19, 22-32
Y	pages 45,49	33
X	US 2003/224374 A1 (DAI HONGYUE [US] ET AL) 4 December 2003 (2003-12-04) paragraphs [0180], [0228]	1-19, 22-33
X	WO 02/083945 A (IMP COLLEGE INNOVATIONS LTD [GB]; DISS JAMES KENNETH JOSEPH [GB]; COOM) 24 October 2002 (2002-10-24) p. 19, 32-33	1-19, 22-33
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*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
*E* earlier document but published on or after the international filing date		*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
*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)		*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.
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*&* document member of the same patent family
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
29 April 2009	11/05/2009	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél (+31-70) 340-2040; Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Steinheimer, K	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No  
 PCT/EP2009/052027

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	QUINN J ET AL: "BRCA1 Functions as a Differential Modulator of Chemotherapy-induced Apoptosis" 1 October 2003 (2003-10-01), CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, PAGE(S) 6221 - 6228 , XP002990885 ISSN: 0008-5472 p. 6221, 6228	1-19, 22-33
Y	WO 03/082072 A (HARBECK NADIA [DE]; KATES RONALD E [DE]; SCHMITT MANFRED [DE]; FOEKENS) 9 October 2003 (2003-10-09) pages 33, 39-44	1-19, 22-33
Y	WO 2007/028146 A (PREC THERAPEUTICS INC [US]; GABRIN MICHAEL [US]; BROWER STACEY [US]; M) 8 March 2007 (2007-03-08) claims 37-40	1-19, 22-33
X	WO 98/53103 A (CLONTECH LAB INC [US]; CHENCHIK ALEX [US]; JOKHADZE GEORGE [US]; BIBIL) 26 November 1998 (1998-11-26) table 2	20,21
X	US 6 727 063 B1 (LANDER ERIC S [US] ET AL) 27 Apr 11 2004 (2004-04-27) paragraphs [0157], [0167]	20,21
X	US 2006/141493 A1 (WEST MIKE [US] ET AL) 29 June 2006 (2006-06-29) paragraphs [0266], [0278]	20,21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/052027

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003224374 A1	04-12-2003	US 2004058340 A1	25-03-2004
WO 02083945 A	24-10-2002	CA 2443968 A1	24-10-2002
		EP 1377680 A2	07-01-2004
		JP 2004533239 T	04-11-2004
		US 2009074665 A1	19-03-2009
		US 2004146877 A1	29-07-2004
WO 03082072 A	09-10-2003	AU 2003237779 A1	13-10-2003
		AU 2008203388 A1	21-08-2008
		CA 2476352 A1	09-10-2003
		EP 1563302 A2	17-08-2005
		US 2006084056 A1	20-04-2006
WO 2007028146 A	08-03-2007	AU 2006287175 A1	08-03-2007
		CA 2620936 A1	08-03-2007
		EP 1929306 A2	11-06-2008
		JP 2009506777 T	19-02-2009
		US 2008085519 A1	10-04-2008
WO 9853103 A	26-11-1998	AU 742342 B2	20-12-2001
		AU 7593398 A	11-12-1998
		CA 2290738 A1	26-11-1998
		EP 0988398 A1	29-03-2000
		JP 2002504812 T	12-02-2002
US 6727063 B1	27-04-2004	US 2005244834 A1	03-11-2005
US 2006141493 A1	29-06-2006	NONE	

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.			F I	テーマコード (参考)	
<b>A 6 1 P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>		C 1 2 Q 1/68		A
C 1 2 N 15/09	(2006.01)		A 6 1 P 35/00		
			C 1 2 N 15/00		A

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

(74) 代理人 100111730

弁理士 伊藤 武泰

(72) 発明者 ミゲル、タロン、ロカ

スペイン国バルセロナ、サビノ、アラナ、5 - 19、ウエセペ、インスティトゥト、ユニベルシタリオ、デクセウス、デパルタメント、デ、オンコロヒア、パンガエア、ピオテック、ソシエダッド、アノニマ

(72) 発明者 ラファエル、ロセル、コスタ

スペイン国バルセロナ、サビノ、アラナ、5 - 19、ウエセペ、インスティトゥト、ユニベルシタリオ、デクセウス、デパルタメント、デ、オンコロヒア、パンガエア、ピオテック、ソシエダッド、アノニマ

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA26 BB24 CB01 DA14 DA36 DA44 FA16 FB02 FB03  
 4B024 AA12 CA09 CA12 CA20 HA08 HA11  
 4B063 QA01 QA19 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02  
 4C084 AA24 MA02 NA05 ZB261 ZB262 ZC511

专利名称(译)	根据BRCA1 mRNA表达水平预测新辅助化疗治疗乳腺癌患者的生存时间		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011516407A</a>	公开(公告)日	2011-05-26
申请号	JP2010547187	申请日	2009-02-20
申请(专利权)人(译)	パンガ空气, ビオテック, ソシエダッド, アノニマ		
[标]发明人	ミゲルタロンロカ ラファエルロセルコスタ		
发明人	ミゲル、タロン、ロカ ラファエル、ロセル、コスタ		
IPC分类号	A61K45/06 G01N33/50 G01N33/574 G01N33/53 C12Q1/68 A61P35/00 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/57415 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/118		
FI分类号	A61K45/06 G01N33/50.ZNA.Z G01N33/50.P G01N33/574.A G01N33/53.Y C12Q1/68.A A61P35/00 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA44 2G045/FA16 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA12 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA24 4C084/MA02 4C084/NA05 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZC511		
代理人(译)	中村KoTakashi		
优先权	2008380053 2008-02-21 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及基于BRCA1的表达水平预测患有乳腺癌的患者的临床结果的方法，其中低BRCA1表达水平指示良好的预后。此外，本发明涉及基于BRCA1表达水平的患有乳腺癌的患者的抗代谢物，嵌入剂和烷化剂的组合来预测对新辅助疗法的反应的方法。

変数	N (%)
年齢；中央値（最低－最高）	54 (31-79)
臨床的腫瘍サイズ（cm）	6 (2.50-12)
閉経	
後（Yes）	50(58.1)
前（No）	36(41.9)
臨床状態	
IIA	2(2.3)
IIB	22(25.6)
IIIA	23(26.7)
IIIB	37(43)
IIIC	1(1.2)
IV	1(1.2)
初期治療	
手術	1(1.2)
術前臨床化学療法	85(98.8)
サイクル（中央値、範囲）	4 (4-10)
術前臨床CTに対する臨床反応	
CR	0
PR	66(76.7)
SD	18(20.9)
PD	2(2.3)
術前臨床CTに対する病理反応	
CR	5(5.8)
PR	44(51.2)
SD	35(40.7)
PD	2(2.3)
手術	
乳房切除＋排出（emptying）	74(86.1)
乳房切除＋見張り節（sentry node）＋排出（emptying）	4(4.7)
腫瘍摘出－生検	1(1.2)
腫瘍摘出＋排出（emptying）	7(8.1)
術前ChTのサイクル（中央値、範囲）	4(4-10)