

(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2017-501679

(P2017-501679A)

(43) 公表日 平成29年1月19日(2017.1.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-525610 (P2016-525610)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月23日 (2014.10.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年5月31日 (2016.5.31)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/061981
 (87) 国際公開番号 W02015/061577
 (87) 国際公開日 平成27年4月30日 (2015.4.30)
 (31) 優先権主張番号 61/894,548
 (32) 優先日 平成25年10月23日 (2013.10.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513239243
 オレゴン ヘルス アンド サイエンス
 ユニバーシティー
 アメリカ合衆国 オレゴン 97239,
 ポートランド, エスタブリュー パン
 クロフト ストリート 0690
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳がんの予後を決定する方法

(57) 【要約】

本明細書では、乳腺腫瘍を伴う対象についての診断または予後を決定する方法が開示される。一実施形態では、方法は、試料中のEPS8様1 (EPS8L1) の量 (EPS8L1 核酸またはタンパク質の量など) を決定するステップと、試料中のEPS8L1の量を、対照と比較するステップとを含む。試料中のEPS8L1の量が、対照と比較して増大すれば、対象は、予後不良である (生存の可能性の減少など) と決定される。一部の実施形態では、方法は、Erbb2ターゲティング療法を対象に施すステップなど、処置を、予後不良であると決定された対象に施すステップをさらに含む。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

乳腺腫瘍を伴う対象の予後を決定する方法であって、
該対象に由来する試料中の E P S 8 様 1 (E P S 8 L 1) 核酸またはタンパク質の量を決定するステップと；

該 E P S 8 L 1 核酸またはタンパク質の量を、対照と比較するステップと；

該 E P S 8 L 1 核酸またはタンパク質の量が、該対照と比較して増大していれば、該対象は予後不良であると決定するステップと
を含む方法。

【請求項 2】

前記 E P S 8 L 1 核酸またはタンパク質の量を決定するステップが、E P S 8 L 1 核酸の量を決定するステップを含み、該 E P S 8 L 1 核酸の量が、ゲノム DNA、c DNA、または mRNA の量を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記 E P S 8 L 1 核酸の量を決定するステップが、マイクロアレイ解析、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、逆転写 P C R、リアルタイム逆転写 P C R、in situ ハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼ保護、および比較ゲノムハイブリダイゼーションのうちの 1 または複数を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 E P S 8 L 1 核酸の量を決定するステップが、E P S 8 L 1 の遺伝子コピー数を決定することを含む、請求項 2 または請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 E P S 8 L 1 核酸またはタンパク質の量を決定するステップが、E P S 8 L 1 タンパク質の量を決定するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記 E P S 8 L 1 タンパク質の量を決定するステップが、イムノアッセイを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記イムノアッセイが、ウェスタンブロット法、免疫組織化学、E L I S A、または電気化学イムノアッセイである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記予後不良が、全生存の短縮、無再発生存の短縮、または無転移生存の短縮を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記全生存の短縮が、10 年間を超える生存の短縮を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記全生存の短縮が、5 年間を超える生存の短縮を含む、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記全生存の短縮が、3 年間を超える生存の短縮を含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記対照が、E P S 8 L 1 核酸またはタンパク質の閾値レベルである、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記試料中の E r b B 2 核酸またはタンパク質の量を決定するステップと；

前記 E r b B 2 核酸またはタンパク質の量を、対照と比較するステップであって、E r b B 2 核酸またはタンパク質の量の、前記対照と比較した増大が、前記対象は予後不良であることを示す、ステップと

をさらに含む、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記試料が、前記対象に由来する乳腺腫瘍試料である、請求項 1 から 13 のいずれか一

10

20

30

40

50

項に記載の方法。

【請求項 15】

前記対象に由来する前記腫瘍試料が、組織生検または細針吸引物を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記組織生検が、組織切片を含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記対象に由来する前記腫瘍試料が、新鮮な腫瘍試料、凍結した腫瘍試料、または固定された腫瘍試料を含む、請求項 14 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記試料を前記対象から得るステップをさらに含む、請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

治療剤を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 1 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記治療剤が、ErbB2 特異的薬剤を含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記ErbB2 特異的薬剤が、トラスツズマブまたはラパチニブを含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

乳腺腫瘍を伴う対象の予後を決定する *in vitro* における方法であって、

(i) 該対象に由来する試料中のEPS8様1 (EPS8L1) 核酸またはタンパク質の量を決定し；

該EPS8L1 核酸またはタンパク質の量を、対照と比較するステップと；

(ii) 該対象に由来する該試料中のErbB2 核酸またはタンパク質の量を決定し；

該ErbB2 核酸またはタンパク質の量を、対照と比較するステップと；

(iii) 該EPS8L1 核酸またはタンパク質の量が、該対照と比較して増大しており、該ErbB2 核酸またはタンパク質の量が、該対照と比較して増大していれば、該対象は予後不良であると決定するステップと

を含む方法。

【請求項 23】

前記EPS8L1 核酸もしくはタンパク質および/または前記ErbB2 核酸もしくはタンパク質の量を決定するステップが、EPS8L1 および/またはErbB2 核酸の量を決定することを含み、該EPS8L1 および/またはErbB2 核酸の量が、ゲノムDNA、cDNA、またはmRNAの量を含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記EPS8L1 および/またはErbB2 核酸の量を決定するステップが、マイクロアレイ解析、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、逆転写PCR、リアルタイム逆転写PCR、*in situ* ハイブリダイゼーション、ヌクレアーゼ保護、および比較ゲノムハイブリダイゼーションのうちの1または複数を含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記EPS8L1 核酸の量を決定するステップが、EPS8L1 の遺伝子コピー数を決定するステップを含み、かつ/または前記ErbB2 核酸の量を決定するステップが、ErbB2 の遺伝子コピー数を決定するステップを含む、請求項 23 または請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記EPS8L1 核酸もしくはタンパク質および/または前記ErbB2 核酸もしくはタンパク質の量を決定するステップが、EPS8L1 および/またはErbB2 タンパク質の量を決定するステップを含む、請求項 22 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

前記 E P S 8 L 1 および / または E r b B 2 タンパク質の量を決定するステップが、イムノアッセイを含む、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記イムノアッセイが、ウェスタンブロット法、免疫組織化学、E L I S A、または電気化学イムノアッセイである、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記予後不良が、全生存の短縮、無再発生存の短縮、または無転移生存の短縮を含む、請求項 22 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記試料が、前記対象に由来する乳腺腫瘍試料である、請求項 22 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

治療剤を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 22 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

前記治療剤が、E r b B 2 特異的薬剤を含む、請求項 31 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年10月23日に提出された米国仮特許出願第61/894,548号の最先の出願日の利益を請求し、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、E r b B 2 陽性乳がんについての遺伝子マーカーと、E r b B 2 陽性乳がんの診断および / または予後を決定するための方法とに関する。

【0003】

政府援助の承認

本発明は、米国国立衛生研究所により授与された助成金第U54CA112970号の下での政府援助によりなされた。政府は、本発明において、一定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

乳がんは、全世界の女性において最も一般的ながんであり、全世界の女性におけるがんによる死亡の最も一般的な原因である。しかし、乳がんは、異質性の疾患であり、標準的治療に反応して大きく変動する。乳がん間の分子的特徴の同定により、患者のための予後および処置の改善がなされている。例えば、多くの乳腺腫瘍内のE r b B 2 (H e r 2) の増幅および / または過剰発現を同定する結果として、E r b B 2 陽性腫瘍を伴う患者の、E r b B 2 ターゲティング療法 (トラスツズマブおよび / またはラパチニブなど) による処置がもたらされている。多くの症例では、これらの療法は、有効であるが、一部のE r b B 2 陽性腫瘍は、処置に反応しないか、またはE r b B 2 ターゲティング療法に対して抵抗性となる。したがって、患者のための診断、予後、および / または処置選択肢の改善を提供するための、さらなる分子的特徴付けと、乳腺腫瘍の層別化とが依然として必要とされている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本明細書では、乳腺腫瘍を伴う対象についての診断または予後を決定する方法が開示される。一部の例では、診断を決定することは、腫瘍が良性であるか、悪性であるかを決定することを含む。他の例では、予後を決定することは、乳腺腫瘍を伴う対象のアウトカム (例えば、生存の可能性) を予測することを含む。一実施形態では、方法は、対象に由来

10

20

30

40

50

する試料（乳腺腫瘍試料など）中の、E P S 8 様 1（E P S 8 L 1）核酸および／またはタンパク質の量を決定するステップと、試料中のE P S 8 L 1核酸および／またはタンパク質の量を、対照と比較するステップとを含む。試料中のE P S 8 L 1の量が、対照と比較して増大すれば、対象は、予後不良である（生存の可能性の減少など）と決定される。

【0006】

一部の実施形態では、開示される方法は、対象に由来する試料中のE r b B 2核酸またはタンパク質の量を決定するステップをさらに含む。一部の例では、E P S 8 L 1核酸またはタンパク質の増大に加えて、試料中のE r b B 2核酸またはタンパク質の増大（E r b B 2のm R N A、タンパク質、遺伝子コピー数、および／または遺伝子増幅の増大など）を伴う対象は、特に、アウトカムが不良である。

10

【0007】

さらなる実施形態では、方法は、E r b B 2ターゲティング療法を対象に投与するステップなど、処置を、予後不良であると決定された対象に投与するステップをさらに含む。

【0008】

本開示の前出の特色および他の特色は、添付の図面を参照しながら進められる、以下の詳細な記載から、より明らかとなる。

【0009】

以下の図のうちの少なくとも一部は、カラーで提出される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1A】図1Aは、E r b B 2陽性乳がん細胞株と接触させたところ、成長阻害性およびアポトーシス性応答を引き起こしたs i R N Aの同定を示すヒートマップである。

20

【0011】

【図1B】図1Bは、6つの選択された細胞株内のE P S 8 L 1の発現を他の遺伝子と比べて示すプロットである。4つの遺伝子（S T A R D 3、E R B B 2、D O C K 9、およびR A B 2 0）が表示される。

【0012】

【図2A】図2Aは、The Cancer Genome Atlasによる、表示される充実性腫瘍内のE P S 8 L 1のゲノム異常の頻度を示す棒グラフである。全ての浸潤性乳癌のうちの少なくとも4%は、E P S 8 L 1の変化を有する。

30

【0013】

【図2B】図2Bは、ヒト乳がん細胞株のパネルにわたり、E P S 8 L 1のm R N A発現パターン（中央値を中心とするl o g 2）を示す棒グラフである。細胞株は、b a s a l A（赤、左）、b a s a l B（グレー、中央）、およびl u m i n a l（青、右）亜群に群分けされる。

【0014】

【図2C】図2Cは、表示される分子亜型に従ったE P S 8 L 1 m R N A発現の層別化についての箱ひげ図である。

【0015】

【図3A】図3Aは、2つの異なるE P S 8 L 1 s i R N A（中央右および右端パネル）、ならびに陰性（左端）および陽性（中央左）対照についての経時的成長アッセイを示す4つのプロットのセットである。

40

【0016】

【図3B】図3Bは、表示されるs i R N Aまたは対照の存在下における、E P S 8 L 1発現についてのウェスタンプロット画像である。

【0017】

【図3C】図3Cは、表示される細胞株内のE P S 8 L 1およびE r b B 2を示すウェスタンプロット画像である。

【0018】

【図4A】図4Aは、全ての乳がん腫瘍のE P S 8 L 1発現に基づく全生存（O S）時間

50

についての Kaplan - Myer プロットである。

【0019】

【図4B】図4Bは、Her2 (ErbB2) に富む腫瘍の EPS8L1 発現に基づく全生存 (OS) 時間についての Kaplan - Myer プロットである。

【0020】

【図4C】図4Cは、ER陽性腫瘍の EPS8L1 発現に基づく全生存 (OS) 時間についての Kaplan - Myer プロットである。

【0021】

【図4D】図4Dは、ER陰性の Her2 に富む腫瘍の EPS8L1 発現に基づく全生存 (OS) 時間についての Kaplan - Myer プロットである。

10

【0022】

【図5A】図5Aは、DNAの獲得と増幅とを個別とした、EPS8L1およびErbB2のコピー数に基づく累積生存時間についての Kaplan - Myer プロットである。

【0023】

【図5B】図5Bは、DNAの獲得と増幅とを組み合わせ、EPS8L1およびErbB2のコピー数に基づく累積生存時間についての Kaplan - Myer プロットである。

【発明を実施するための形態】

【0024】

配列表

本明細書で、または添付の配列表内で列挙される任意の核酸およびアミノ酸配列は、37 C.F.R. § 1.822において規定されている、ヌクレオチド塩基およびアミノ酸のための標準的な文字による略記法を使用して示される。少なくとも一部の例では、各核酸配列のうちの1つの鎖だけを示すが、相補鎖は、表示される鎖に対する任意の言及により組み入れられると理解される。

20

【0025】

配列番号1は、例示的な EPS8L1 RNAi の核酸配列である。

【0026】

本明細書では、EPS8L1が、ErbB2陽性乳がんの特に侵襲性の進行形態を検出するための有用なマーカーであることが開示される。本開示は、ErbB2陽性乳がんについての診断および予後のために、乳がんのこの亜型をさらなるサブクラスへと層別化することにより、精度が改善された方法を提供する。ErbB2陽性乳がんについての臨床的層別化の現行の状況では、腫瘍の分子亜型を決定する標準的手順は一般に、病理学的グレード付けと、分子マーカーの限定されたセットとに基づいており、ErbB2のタンパク質発現レベルは、単独で、またはErbB2ゲノム遺伝子座のDNAコピー数の獲得の検出と組み合わせで解析されている。このような実験で得られるデータを、乳がんの分子的特徴付けについての現行の仮定と併せて使用して、腫瘍細胞集団についての理論的臨床挙動を推定する。しかし、これらの手法は、例えば、細胞のうちの相当な割合が分化による変化を経る可能性があり、このため、単一マーカー標識化により看過される場合、がん性細胞の分子的異質性など、腫瘍内複雑性を過小評価するであろう。これに対し、EPS8L1は、乳房組織内のErbBファミリー受容体を介するシグナル伝達への細胞の経路依存性を特徴づけるので、細胞のある特定の生理学的状態を直接反映する。EPS8L1の機能的役割は、いまだ十分に理解されていないが、EPS8L1タンパク質の発現と、細胞の増殖とが密接に関連していることは明らかである。

30

40

【0027】

開示される方法は、EPS8L1を同定するステップと、対象(乳がんを伴う対象など)に由来する試料中のEPS8L1の発現または遺伝子コピー数を決定するステップと、これを対照(健常または非罹患個体に由来する試料中のEPS8L1の発現またはコピー数など)と比較するステップとを含む。EPS8L1の発現または遺伝子コピー数の差異は、対象が、初期にはErbB2陽性とだけ分類される、侵襲性の進行性乳がんて死亡する危険性が增大していることを示す。したがって、一部の例では、開示される方法はまた

50

、対象に由来する試料が、E r b B 2 陽性である（例えば、E r b B 2 の発現量またはコピー数が対照と比較して増大している）かどうかを同定するステップも含む。

【 0 0 2 8 】

I . 用語

そうでないことが注記されない限りにおいて、技術用語は、従来の用法に従い使用される。分子生物学における一般的な用語の定義は、Benjamin Lewin、Genes VII、Oxford University Press刊、2000年（ISBN 019879276X）；Kendrewら（編）、The Encyclopedia of Molecular Biology、Blackwell Publishers刊、1994年（ISBN 0632021829）；Robert A. Meyers（編）、Molecular Biology and Biotechnology:a Comprehensive Desk Reference、Wiley, John & Sons, Inc.刊、1995年（ISBN 0471186341）；およびGeorge P. Redei、Encyclopedic Dictionary of Genetics, Genomics, and Proteomics、第2版、2003年（ISBN:0-471-26821-6）において見出すことができる。

【 0 0 2 9 】

そうでないことが説明されない限りにおいて、本明細書で使用される、全ての技術用語および科学用語は、本開示が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。単数形の用語である「ある（a）」、「ある（an）」、および「その」は、文脈によりそうでないことが明確に指示されない限りにおいて、複数の言及を含む。同様に、「または」という語は、文脈によりそうでないことが明確に指示されない限りにおいて、「および」を含むことを意図する。本開示の実施または試行では、本明細書で記載される方法および材料と類似または同等の方法および材料を使用しうが、下記では、適切な方法および材料が記載される。「～を含む（comprises）」という用語は、「～を含む（includes）」を意味する。本明細書で言及される、全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、それらの全体が参照により組み込まれる。本明細書で言及されるGenBank受託番号と関連する全ての配列は、2013年10月7日現在存在している通りに、適用される規則および/または法律により容認可能な程度において、それらの全体が参照により組み込まれる。利益相反の場合は、用語の説明を含む本明細書が管理する。加えて、材料、方法、および例は、単なる例示的なものであって、限定的であることを意図するものではない。

【 0 0 3 0 】

本開示の多様な実施形態についての再検討を容易とするために、具体的な用語についての以下の説明を提供する。

【 0 0 3 1 】

がん：分化を喪失した退形成、成長速度の増大、周囲組織への浸潤を経て、転移が可能な悪性新生物である。例えば、乳がんとは、乳房組織内で生じるか、または乳房組織から生じる悪性新生物（乳管癌など）である。乳がんはしばしば、luminal A（ER陽性および/またはPR陽性、E r b B 2 陰性、ならびに低Ki67）、luminal B（ER陽性および/もしくはPR陽性およびE r b B 2 陽性、または高Ki67を伴うE r b B 2 陰性）、basal-likeまたはトリプルネガティブ（ER陰性、PR陰性、E r b B 2 陰性、サイトケラチン5/6陽性、および/またはHER1陽性）、またはE r b B 2 陽性（ER陰性、PR陰性、E r b B 2 陽性）として分類される。しかし、乳がんは、個体間および腫瘍内の細胞レベルの両方において異質性の可能性があり、当業者は、乳がんが、分類スキーム内に常に当てはまるとは限らない場合があることを理解するであろう。

【 0 0 3 2 】

残存がんとは、任意の形態の処置を、がんを低減または根絶するように、対象に施した後で、対象において残るがんである。転移がんとは、転移がんが由来するがんの元の部位以外の、体内の1または複数の部位におけるがんである。局所的再発とは、元のがんと同じ部位、例えば、元のがんと同じ組織における、またはこの近傍におけるがんの再発である。

10

20

30

40

50

【0033】

対照：被験試料との比較のために使用される試料または標準物質である。一部の実施形態では、対照とは、健常者から得られた試料、またはがんを伴うと診断された患者から得られた非腫瘍組織試料である。他の実施形態では、対照は、時間的対照または標準的な基準値もしくは値の範囲（予後またはアウトカムが既知のがん患者群など、かつて調べられた対照試料、または非腫瘍組織内のEPS8L1レベルなど、ベースラインもしくは正常値を表す試料群など）である。他の例では、対照は、閾値である。

【0034】

EPS8L1：上皮成長因子受容体キナーゼ基質8様タンパク質1、EPS8関連タンパク質1としてもまた公知の、EPS8様1である。EPS8L1は、上皮成長因子受容体の基質（上皮成長因子受容体経路基質8）と関連する。EPS8L1の機能は、未知である。

10

【0035】

EPS8L1の核酸およびアミノ酸配列は、公開されている。例えば、EPS8L1のゲノムDNAは、GenBank受託番号NC__000019.9（ヌクレオチド55587221～55599291）において開示されており、2013年10月7日現在GenBankで提供されている通りに、参照により組み込まれる。加えて、GenBank受託番号NM__133180、NM__017729、NM__139204、XM__005259020、XM__005259021、およびXM__005259022は、例示的なヒトEPS8L1核酸配列を開示し、GenBank受託番号NP__573441、NP__060199、NP__631943、XP__005259077、XP__005259078、XP__05059079は、例示的なヒトEPS8L1タンパク質配列を開示し、それらの全てが、2013年10月7日現在GenBankで提供されている通りに、参照により組み込まれる。当業者は、さらなるEPS8L1配列およびこれらの変異体を同定することができる。

20

【0036】

ErbB2：v-erb-b2トリ赤芽球性白血病ウイルス性がん遺伝子相同体2、c-erbB2/neu、her2/neu、またはHer2としても公知である。ErbB2は、チロシンキナーゼの上皮成長因子受容体ファミリーのメンバーである。ErbB2は、乳がんおよび卵巣がん含む複数のがん内で増幅され、かつ/または過剰発現する。ErbB2は、リガンド結合性ドメインを有さず、それ自体では、リガンドに結合できない。しかし、ErbB2は、EGF受容体ファミリーの他のメンバーと共にヘテロ二量体化し、リガンド結合性および細胞内シグナル伝達経路のキナーゼ介在型活性化を安定化させる。

30

【0037】

ErbB2の核酸およびタンパク質配列は、公開されている。例えば、ErbB2のゲノムDNAは、GenBank受託番号NC__000017.10（ヌクレオチド37844167～37884915）において開示されており、2013年10月7日現在GenBankで提供されている通りに、参照により組み込まれる。加えて、GenBank受託番号XM__005257139、NM__001005862、NM__004448、およびXM__005257140は、例示的なヒトErbB2核酸配列を開示し、GenBank受託番号XP__005257196、NP__001005862、NP__004439、およびXP__005257197は、それらの全てが、2013年10月7日現在GenBankに存在する通りに、参照により本明細書に組み込まれる、例示的なヒトErbB2アミノ酸配列を開示する。当業者は、さらなるErbB2配列およびこれらの変異体を同定することができる。

40

【0038】

ハイブリダイゼーション：DNA、RNA、またはDNAとRNAとの間の2つの鎖の相補性領域の間で塩基対を形成し、これにより、二重鎖分子を形成することである。特定の程度の厳密性をもたらすハイブリダイゼーション条件は、ハイブリダイゼーション法の

50

性質、ならびにハイブリダイズする核酸配列の組成および長さに応じて変化するのであろう。一般に、ハイブリダイゼーションの温度およびハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度 (Na^+ 濃度など) により、ハイブリダイゼーションの厳密性が決定される。特定の程度の厳密性を達成するためのハイブリダイゼーション条件に関する計算については、Sambrookら (1989年)、Molecular Cloning、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Plainview、NY (9および11章) において論じられている。

【0039】

in vitro における決定：例えば、試料中の1または複数の標的を同定する抗体、核酸、および/または標識などの試薬との反応による検査室内での試料 (組織試料など) の変換を必要とする検査室における技法を使用することにより、値または量を決定することである。例えば、*in vitro* における決定により、標的が、試料中で、対照と比べて増大するか、減少するかを示すことができる。*in vitro* における決定は、抽象的な情報の操作を超えたことを要求する。

10

【0040】

標識 (または検出可能な標識)：例えば、ELISA、分光光度法、フローサイトメトリー、または顕微鏡法による検出が可能な薬剤である。例えば、標識は、核酸分子またはタンパク質 (プローブまたは抗体など) に結合させることができ、これにより、標的核酸分子またはタンパク質の検出を可能とする。標識の例は、放射性同位元素、酵素基質、共同因子、リガンド、化学発光剤、フルオロフォア、ハプテン、酵素、およびこれらの組合せを含むがこれらに限定されない。他の例では、標識は、合成 (非自然発生の) 標識である。標識付けのための方法、および多様な目的に適する標識の選択における指針は、例えば、Sambrookら (Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor、New York、1989年) および Ausubelら (Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、New York、1998年) において論じられている。

20

【0041】

オリゴヌクレオチドプローブおよびプライマー：プローブは、検出用標識またはレポーター分子に結合した単離核酸を含む。プライマーとは、短鎖核酸、好ましくは、約15ヌクレオチドまたはこれを超える長さのDNAオリゴヌクレオチドである。プライマーを、核酸ハイブリダイゼーションにより相補性の標的DNA鎖にアニールさせて、プライマーと標的DNA鎖との間でハイブリッドを形成し、次いで、DNAポリメラーゼ酵素により、標的DNA鎖に沿って伸長させることができる。プライマー対は、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、または当技術分野で公知の他の核酸増幅法による核酸配列の増幅のために使用することができる。当業者は、特定のプローブまたはプライマーの特異性は、その長さと共に増大することを理解するのであろう。したがって、例えば、20の連続するヌクレオチドを含むプローブまたはプライマーは、15ヌクレオチドだけの対応するプローブまたはプライマーより高度な特異性で、標的にアニールするのであろう。したがって、より大きな特異性を得るために、約20、25、30、35、40、50、またはこれを超える連続するヌクレオチドを含むプローブおよびプライマーを選択することができる。

30

【0042】

予後：がん (例えば、乳がん) などの疾患の経過についての予測である。予測は、対象が侵襲性の再発性疾患を発症する可能性、1または複数の転移を発症する可能性、特定の長さの時間にわたり生存する可能性 (例えば、対象が、1、2、3、5、10年間またはこれを超えて生存する可能性を決定する)、特定の治療に应答する可能性、またはこれらの組合せを決定することを含みうる。予測はまた、腫瘍が、悪性腫瘍であるか、良性腫瘍であるかを決定することも含みうる。

40

【0043】

試料 (または生物学的試料)：対象から得られた、DNA、RNA (mRNAを含む)、タンパク質、またはこれらの組合せを含有する生物学的検体である。例としては、末梢血、尿、唾液、組織生検、細針吸引物、手術検体、および剖検材料を含むがこれらに限

50

定されない。一部の例では、試料は、新鮮な、凍結された、または固定された腫瘍試料、例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍試料などの腫瘍試料を含む。

【0044】

対象：ヒトおよび獣医科対象などの非ヒト哺乳動物を含む分類である、生きている多細胞脊椎生物である。

【0045】

生存：診断または初回の処置（手術または初回の化学療法など）の日付と、再発、転移、または死亡など、特定のイベントとの間の時間間隔である。全生存とは、診断または初回の処置の日付と、死亡日または最終回の追跡の日付との間の時間間隔である。無再発生存とは、診断または初回の処置の日付と、再発（局所領域的再発など）の診断日または最終回の追跡の日付との間の時間間隔である。無転移生存とは、診断または初回の処置の日付と、転移の診断日または最終回の追跡の日付との間の時間間隔である。

10

【0046】

腫瘍：新生組織形成の産物は、新生物（腫瘍）であり、新生物とは、過剰な細胞分裂から生じる組織の異常な成長である。周囲組織に浸潤したり転移したりしない腫瘍を、「良性」と称する。周囲組織に浸潤し、かつ/または転移しうる腫瘍を、「悪性」と称する。一部の例では、腫瘍は、乳腺腫瘍である。

【0047】

II. いくつかの実施形態についての概観

本明細書では、乳腺腫瘍を伴う対象についての診断または予後を決定する方法が開示される。一部の例では、診断を決定することは、腫瘍が良性であるか、悪性であるかを決定することを含む。他の例では、予後を決定することは、乳腺腫瘍を伴う対象のアウトカム（例えば、生存の可能性）を予測することを含む。一実施形態では、方法は、乳腺腫瘍を伴う対象に由来する試料（腫瘍試料、例えば、乳腺腫瘍試料など）中のEPS8L1の量（EPS8L1核酸またはタンパク質の量など）を決定するステップと、試料中のEPS8L1の量を、対照と比較するステップとを含む。乳腺腫瘍試料中のEPS8L1の量が、対照と比較して増大していれば、対象は、予後不良である（生存の可能性の減少など）と決定される。他の例では、方法は、乳腺腫瘍試料中のEPS8L1の量が、対照と比較して増大していれば、対象は、乳がんを有すると決定するステップを含む。開示される方法はまた、EPS8L1核酸および/またはタンパク質を増大させる、任意の種類腫瘍、例えば、卵巣腫瘍を伴う対象についての診断または予後を決定するのにも使用することができる。

20

30

【0048】

一部の例では、方法は、乳腺腫瘍試料中のEPS8L1核酸の量を決定するステップを含む。EPS8L1核酸は、ゲノムDNA（例えば、試料中のEPS8L1の遺伝子コピー数または遺伝子増幅の存在を決定すること）を含む場合もあり、mRNAまたはcDNA（例えば、試料中のEPS8L1の発現を決定すること）を含む場合もある。他の例では、方法は、乳腺腫瘍試料中のEPS8L1タンパク質の量を決定するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、Erbb2、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、およびKi67を含むがこれらに限定されない、乳腺腫瘍試料中の1または複数のさらなる核酸またはタンパク質を検出するステップをさらに含む。特定の例では、方法は、試料中の、EPS8L1の遺伝子コピー数、EPS8L1の遺伝子増幅の存在、および/またはEPS8L1 mRNAもしくはタンパク質の量を決定するステップと、EPS8L1核酸またはタンパク質の量を、対照と比較するステップと、試料中の、Erbb2の遺伝子コピー数、Erbb2の遺伝子増幅の存在、および/またはErbb2 mRNAもしくはタンパク質の量を決定するステップと、Erbb2核酸またはタンパク質の量を、対照と比較するステップとを含む。EPS8L1核酸および/またはタンパク質の増大と、Erbb2核酸および/またはタンパク質の増大との組合せを伴う対象は、特に予後不良である。一部の例では、EPS8L1のコピー数の獲得およびErbb2の増幅を伴う対象の平均生存時間は、48カ月間未満（42カ月間未満、36カ月間未満、30カ月間

40

50

未満、24カ月間未満、18カ月間未満、12カ月間未満、6カ月間未満、または3カ月間未満など)である。他の例では、E P S 8 L 1のコピー数の喪失およびE r b B 2のコピー数の獲得を伴う対象は、特に予後良好である(5年間を超えるか、7年間を超えるか、10年間を超えるか、12年間を超えるか、15年間を超えるか、またはこれよりなお長い平均生存時間など)。試料中の核酸またはタンパク質の量を決定する方法は、当業者に公知であり、下記で、より詳細に論じられる。

【0049】

一部の実施形態では、開示される方法は、乳腺腫瘍を伴う患者に由来する試料を活用する。他の実施形態では、方法は、E P S 8 L 1核酸および/またはタンパク質を増大させているかまたは増大させていることが疑われる腫瘍を伴う患者(例えば、卵巣腫瘍を伴う患者)に由来する試料を活用する。一部の例では、試料は、腫瘍細胞、例えば、腫瘍試料(乳腺腫瘍試料など)を含む。試料はまた、例えば、腫瘍細胞と隣接するかまたは腫瘍細胞が混在する非腫瘍細胞も含みうる。特定の例では、試料は、対象に由来する組織、生検、または体液(乳腺腫瘍の生検または細針吸引物など)を含む。一部の例では、試料は、新鮮な、凍結された、または固定された腫瘍試料、例えば、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍試料などの腫瘍試料を含む。他の例では、試料は、循環腫瘍細胞(血液試料または血液試料の少なくとも1つの画分を含む試料など)を含む。さらなる例では、試料は、腫瘍細胞を含む試料から単離された核酸(DNA、RNA、mRNA、もしくはcDNAなど)またはタンパク質を含みうる。

10

【0050】

予後不良とは、生存(全生存、無再発生存、または無転移生存など)の可能性(likelihood)の減少、生存時間の短縮(例えば、10年間未満、5年間未満、3年間未満、2年間未満、または1年間未満の予測平均生存)、悪性腫瘍の存在、疾患の重症度の増大、治療に対する応答の減少、腫瘍の再発の増大、転移の増大などであるがこれらに限定されない、任意の陰性の臨床アウトカムを指す場合がある。特定の例では、予後不良とは、生存の見込み(chance)の減少(例えば、診断または初回の処置時から10年間と等しいか、または10年間未満、例えば、9年間未満、8年間未満、7年間未満、6年間未満、5年間未満、4年間未満、3年間未満、24カ月間未満、18カ月間未満、12カ月間未満、6カ月間未満、もしくは3カ月間未満などの予測平均生存時間)である。

20

30

【0051】

方法の一部の実施形態では、試料中の、E P S 8 L 1核酸および/またはタンパク質の量の、対照と比べた変化は、予後不良を示す。一部の例では、E P S 8 L 1の遺伝子コピー数ならびに/またはE P S 8 L 1 mRNAおよび/もしくはタンパク質の量の、対照と比べた増大(統計学的に有意な増大など)は、予後不良を示す。例えば、E P S 8 L 1核酸および/またはタンパク質の量の、対照または基準値(または値の範囲)と比べた増大は、生存の見込みの減少(例えば、全生存、無再発生存、または無転移生存の短縮)などの予後不良を示す。一部の例では、生存の見込みの減少は、診断または初回の処置時から50カ月間と等しいか、または50カ月間未満、例えば、48カ月間未満、42カ月間未満、36カ月間未満、30カ月間未満、24カ月間未満、18カ月間未満、12カ月間未満、9カ月間未満、6カ月間未満、もしくは3カ月間未満などの予測平均生存時間を含む。他の例では、E P S 8 L 1核酸および/またはタンパク質の量の、対照と比べた有意な変化がないことまたは減少は、予後良好(生存の見込みの増大、例えば、全生存、無再発生存、または無転移生存の延長など)を示す。具体例では、E P S 8 L 1核酸および/またはタンパク質の量の、対照と比べた有意な変化がないことまたは減少は、生存の見込みの増大、例えば、診断または初回の処置時から少なくとも5年間、少なくとも6年間、少なくとも7年間、少なくとも8年間、少なくとも9年間、少なくとも10年間、少なくとも12年間またはこれを超えるなど、少なくとも50カ月の予測平均生存時間などの予後良好を示す。

40

【0052】

50

さらなる実施形態では、E P S 8 L 1 核酸および/またはタンパク質の量の、対照と比べた増大 (E P S 8 L 1 の遺伝子コピー数の増大または E P S 8 L 1 の遺伝子増幅など)、ならびに E r b B 2 核酸および/またはタンパク質の量の、対照と比べた増大 (E r b B 2 の遺伝子コピー数の増大または E r b B 2 の遺伝子増幅など) は、生存の見込みの減少などの予後不良を示す。一部の例では、生存の見込みの減少は、診断または初回の処置時から 5 0 カ月間と等しいか、または 5 0 カ月間未満、例えば、4 8 カ月間未満、4 2 カ月間未満、3 6 カ月間未満、3 0 カ月間未満、2 4 カ月間未満、1 8 カ月間未満、1 2 カ月間未満、9 カ月間未満、6 カ月間未満、もしくは 3 カ月間未満などの生存時間を含む。他の例では、試料中の E P S 8 L 1 核酸および/またはタンパク質の量の、対照と比べた減少 (E P S 8 L 1 核酸の喪失など)、ならびに試料中の E r b B 2 核酸および/またはタンパク質の、対照と比べた増大 (E r b B 2 の獲得など) は、生存の見込みの増大などの予後良好を示す。一部の例では、生存の見込みの増大は、診断または初回の処置時から少なくとも 5 0 カ月間と等しいか、または少なくとも 5 0 カ月間を超える (少なくとも 5 年間、少なくとも 6 年間、少なくとも 7 年間、少なくとも 8 年間、少なくとも 9 年間、少なくとも 1 0 年間、少なくとも 1 2 年間、もしくはこれを超えるなど) 生存時間を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 3 】

特定の例では、対照の少なくとも 1 . 2 5 倍 (対照と比較して少なくとも 1 . 5 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 2 . 5 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 1 0 倍、またはこれを超えるなど) の試料中の E P S 8 L 1 核酸またはタンパク質の量は、対象が予後不良であることを示す。他の例では、試料中の、遺伝子コピー数の増大または遺伝子増幅の存在は、対象が予後不良であることを示す。一部の例では、2 を超える (約 2、3、4、5、1 0、2 0 を超えるか、またはこれを上回るなど) E P S 8 L 1 の遺伝子コピー数、または E P S 8 L 1 の遺伝子コピー数の、第 1 9 染色体コピー数に対する、約 2 を超える (約 2、3、4、5、1 0、2 0 を超えるか、またはこれを上回るなど) 比は、対象についての予後不良を示す。

【 0 0 5 4 】

対照は、それに対して腫瘍試料中の E P S 8 L 1 核酸またはタンパク質の量を比較するための任意の適切な対照でありうる。一部の実施形態では、対照試料は、非腫瘍組織である。一部の例では、非腫瘍組織は、腫瘍と隣接する非腫瘍組織など、同じ対象から得られる。他の例では、非腫瘍組織は、健常対照対象から得られる。他の実施形態では、対照は、基準値または値の範囲である。例えば、基準値は、健常対照対象群、またはがん患者群に由来する非腫瘍組織から得られた平均遺伝子コピー数および/または発現値から導出することができる。

【 0 0 5 5 】

さらなる例では、対照は、閾値である。E P S 8 L 1 の閾値レベルは、E P S 8 L 1 核酸の定量化レベル (E P S 8 L 1 m R N A または E P S 8 L 1 遺伝子のコピー数など) または E P S 8 L 1 タンパク質の定量化レベルである。閾値レベルを超える試料中の E P S 8 L 1 核酸またはタンパク質の量により、乳腺腫瘍を伴う対象における、特定の疾患状態またはアウトカム (予後不良など) が予測される。閾値レベルの性質および数値 (存在する場合) は、E P S 8 L 1 核酸の量を決定するのに選択された方法に基づき変化するであろう。当業者は、現在当技術分野で公知であるか、またはこれから開示される核酸またはタンパク質の量を測定する任意の方法を使用して、生存の短縮を予測する試料中の E P S 8 L 1 核酸またはタンパク質の閾値レベルを決定することができる。

【 0 0 5 6 】

一部の例では、E P S 8 L 1 の閾値レベルは、高度、中程度、または低度の生存 (例えば、全生存) の確率など、複数の閾値レベルを含む。他の例では、閾値を下回る試料中の E P S 8 L 1 の量が、対象は予後良好である可能性が高いことを示す低閾値量と、それを上回る E P S 8 L 1 の量が、対象は予後不良であることを示す、別個の高閾値量とが存在しうる。2 つの閾値の間の E P S 8 L 1 の量は、対象の予後に対して決定的ではないとみなされる。一部の例では、複数の閾値を、いわゆる「三分位数」、「四分位数」、または

「五分位数」解析により選択する。これらの方法では、複数の群を併せて、単一の集団とみなし、等しい数の個体を有する、3つまたはこれを超える「ビン」に分ける。これらのビンのうちの2つの間の境界は、対象が、予後不良であるか、または予後不良となる特定のレベルの危険性を示す閾値レベルとみなすことができる。危険性は、被験対象が収まるビンに基づき割り当てることができる。

【0057】

E P S 8 L 1を測定する特定の方法（例えば、R T - P C R、E L I S A、I S H、またはI H C）のための、対象が予後不良であることを示すE P S 8 L 1核酸またはタンパク質の閾値を得るために、E P S 8 L 1の量は、乳腺腫瘍を伴う対象の第1のコホートであって、予後不良であることがわかっているコホートから得られた試料と、予後良好であることがわかっている第2のコホートから得られた試料とを使用して決定する。例示的な実施形態では、第1のコホートは、生存が50カ月間未満の対象を含み、第2のコホートは、生存が50カ月間を超える対象を含む。しかし、当業者は、閾値を決定するのに適する、異なるコホートを選択することができる。E P S 8 L 1核酸またはタンパク質は、両方のコホートで決定し、対象が予後不良であることを意味するE P S 8 L 1の量を、閾値と決定する。一部の例では、閾値は、予後不良を予測する最大の能力をもたらす、検査の選択性および感度の両方を最大化するE P S 8 L 1核酸またはタンパク質の量である。発現の閾値レベルの予測力は、当技術分野で公知のいくつかの統計学的方法受信者動作曲線下面積（R O C A U C）、オッズ比、またはハザード比など）のうちのいずれかにより評価することができる。

【0058】

特定の実施形態では、開示される方法は、処置を、乳腺腫瘍を伴う対象に投与するステップをさらに含む。E P S 8 L 1の増大は、E r b B 2陽性腫瘍において、それらの腫瘍が、E R陽性またはE R陰性の場合であれ、そうでない場合であれ、特に予測的であることが見出されている（下記の実施例4を参照されたい）。したがって、一部の例では、本明細書で開示される方法を使用して予後不良であると同定される（例えば、E P S 8 L 1核酸またはタンパク質を増大させた乳腺腫瘍を有する）対象には、E r b B 2（H e r 2）ターゲティング療法を投与する。E r b B 2ターゲティング療法は、トラスツズマブ、ラパチニブ、ペルツズマブ、またはこれらの組合せを含む。当業者は、現在公知であるか、または将来開発される療法を含む、さらなるE r b B 2ターゲティング療法を選択することができる。一部の例では、対象には、E r b B 2ターゲティング療法と、抗エストロゲン療法との組合せを投与する。他の例では、本明細書で開示される方法を使用して予後良好であると同定される（例えば、E P S 8 L 1核酸またはタンパク質が正常であるか、またはこれを減少させた乳腺腫瘍を有する）対象は、標準的ケア（手術、放射線、および/またはネオアジュバント化学療法など）で処置する。

【0059】

さらなる例では、対象にはまた、タモキシフェン、レトロゾール、トレミフェン、フルベストラント、アナストロゾール、エキセメスタン、またはこれらの組合せなど、1または複数の抗ホルモン療法も投与することができる。対象にはまた、タキサン（パクリタキセルまたはドセタキセルなど）、アントラサイクリン（ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、またはミトキサントロンなど）、シクロホスファミド、カペシタビン、5-フルオロウラシル、メトトレキサート、またはこれらの組合せなど、1または複数のアジュバント化学療法薬も投与することができる。なおさらなる例では、E P S 8 L 1核酸またはタンパク質の増大を伴う対象は、手術により、例えば、さらなる組織を摘出することにより、腫瘍境界部をより広くとることにより、かつ/またはさらなるリンパ節を摘出することにより処置することができる。対象はまた、放射線療法によっても処置することができる。

【0060】

I I I . 核酸またはタンパク質を検出する方法

下記で記載される通り、試料中の核酸またはタンパク質（E P S 8 L 1またはE r b B

2 など)の量は、当技術分野で周知のいくつかの方法のうちのいずれか1つを使用して検出することができる。例示的な方法が提供されるが、本開示は、このような方法に限定されるわけではない。さらに、下記の方法については、EPS8L1を具体的に参照しながら記載するが、当業者であれば、目的の他の核酸またはタンパク質(ErbB2を含むがこれに限定されない)を検出するのに、類似の方法を活用しうることを理解するであろう。

【0061】

A. mRNAまたはcDNAを検出するための方法

遺伝子発現は、EPS8L1など、タンパク質をコードするmRNA(またはcDNA)を検出することにより評価することができる。一部の例では、mRNA(またはcDNA)を定量化する。RNAは、市販のキットを含む、当業者に周知の方法を使用して、対象に由来する試料(乳腺腫瘍を伴う対象に由来する腫瘍試料、対象に由来する隣接する非腫瘍組織試料、正常(健常)対象に由来する腫瘍非含有組織試料、またはこれらの組合せなど)から単離することができる。当技術分野では、mRNA抽出のための一般的な方法が周知であり、Ausubelら、Current Protocols of Molecular Biology、John Wiley and Sons(1997年)を含む、分子生物学の標準的な教科書において開示されている。パラフィン包埋組織からのRNA抽出のための方法は、例えば、RuppおよびLocker、Biotechniques、6巻:56~60頁(1988年);ならびにDe Andresら、Biotechniques、18巻:42~44頁(1995年)において開示されている。一例では、RNAの単離は、RNeasy(登録商標)ミニラム(Qiagen、Valencia、CA)、MASTERPURE(登録商標)Complete DNA and RNA Purification Kit(EPICENTRE(登録商標)Madison、Wis.)、およびParaffin Block RNA Isolation Kit(Ambion、Inc.)など、市販品の製造元による精製キット、緩衝液セットおよびプロテアーゼを使用して実施することができる。組織試料に由来する全RNAは、RNA Stat-60(Tel-Test)を使用して単離することができる。腫瘍または他の生物学的試料から調製されたRNAは、例えば、塩化セシウム密度勾配遠心分離により単離することができる。

【0062】

EPS8L1 mRNA(例えば、EPS8L1の遺伝子発現)を決定する方法は、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション解析に基づく方法、ポリヌクレオチドのシーケンシングに基づく方法、およびプロテオミクスベースの方法を含む。一部の例では、試料中のmRNA発現は、ノーザンブロット法またはin situハイブリダイゼーション(ParkerおよびBarnes、Methods in Molecular Biology、106巻:247~283頁、1999年);RNAアーゼ保護アッセイ(Hod、Biotechniques、13巻:852~4頁、1992年);または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)(Weisら、Trends in Genetics、8巻:263~4頁、1992年)など、PCRベースの方法を使用して定量化する。代替的に、DNA二重鎖、RNA二重鎖、およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖またはDNA-タンパク質二重鎖を含む、特定の二重鎖を認識しうる抗体を利用することができる。シーケンシングベースの遺伝子発現解析のための代表的な方法は、遺伝子発現の逐次解析(SAGE:serial analysis of gene expression)、および大規模並列処理特徴配列決定(MPSS:massively parallel signature sequencing)による遺伝子発現解析を含む。

【0063】

一部の例では、EPS8L1 mRNAは、二重標識蛍光発生プローブ(例えば、TaqMan(登録商標)プローブ)を介して、PCR産物の蓄積を測定する、RT-PCRまたはリアルタイム定量的RT-PCRにより検出する。リアルタイムPCRは、各標的配列についての内部コンペティターを、正規化のために使用する、定量的競合PCR、および試料中に含有される正規化遺伝子、またはRT-PCRのためのハウスキーピング遺

伝子を使用する、定量的比較PCR (quantitative comparative PCR) (Heidら、Genome Research、6巻：986～994頁、1996年を参照されたい)の両方に適合する。定量的PCRについてはまた、米国特許第5,538,848号においても記載されている。関連するプローブおよび定量的増幅手順については、米国特許第5,716,784号および米国特許第5,723,591号において記載されている。定量的PCRをマイクロ滴定プレート内で実行するための装置は、例えば、PE Applied Biosystems (Foster City, CA)から市販されている。

【0064】

一部の例では、EPS8L1発現は、マイクロアレイを使用して同定または確認する。EPS8L1 mRNA (またはcDNA)は、マイクロアレイ技術を使用して、新鮮なまたはパラフィン包埋腫瘍組織中のいずれかで測定することができる。この方法では、アレイは、EPS8L1についての1または複数のプローブを含む。次いで、アレイは、試料から単離された核酸(cDNAまたはmRNAなど)とハイブリダイズさせる。マイクロアレイは、1または複数のハウスキーピング遺伝子についてのプローブなど、1または複数の対照プローブも含みうる。

10

【0065】

in situハイブリダイゼーション (ISH)とは、目的の遺伝子の発現を検出および比較するための別の方法である。ISHは、核酸ハイブリダイゼーションの技術を、単一細胞レベルに適用および外挿し、細胞化学、免疫細胞化学、および免疫組織化学の技術と組み合わせて、形状の維持を可能とし、細胞マーカーの識別の維持および同定を可能とし、組織および血液試料など、集団内の特定の細胞への配列の局在を可能とする。ISHとは、相補性核酸を使用して、1または複数の特異的な核酸配列を、組織の部分または切片内 (in situ)、または、組織が十分に小さい場合は、組織全体 (ホールマウントISH)に局在するハイブリダイゼーションの種類である。RNA ISHを使用して、FFPE乳腺腫瘍試料などの乳腺腫瘍試料中の、または腫瘍マイクロアレイ内のEPS8L1 mRNA発現を、定性的または半定量的に評価することができる。

20

【0066】

検出法の一部の実施形態ではまた、1または複数の「ハウスキーピング」遺伝子または「内部対照」の発現も評価することができる。これらの用語は、それらの存在により、EPS8L1 mRNA、EPS8L1 cDNA、またはEPS8L1タンパク質レベルについての評価が可能となる、任意の構成的またはグローバル発現遺伝子 (または、下記で論じられる通り、タンパク質)を含む。このような評価は、遺伝子転写の全構成的レベルと、RNA (またはタンパク質)回収量の変動についての対照の決定を含む。

30

【0067】

B. 遺伝子コピー数を決定するための方法

開示される方法の一部の例では、遺伝子コピー数 (EPS8L1の遺伝子コピー数または遺伝子増幅など)を決定する。一部の例では、方法は、in situハイブリダイゼーション (蛍光、発色、または銀in situハイブリダイゼーションなど)、比較ゲノムハイブリダイゼーション、またはポリメラーゼ連鎖反応 (リアルタイム定量的PCRなど)を含む。

40

【0068】

特定の例では、遺伝子コピー数を、蛍光in situハイブリダイゼーション (FISH)、発色in situハイブリダイゼーション (CISH)、または銀in situハイブリダイゼーション (SISH)などのin situハイブリダイゼーション (ISH)により決定する。ISH法では、試料をEPS8L1のゲノムDNAプローブと接触させ、プローブの、試料中の染色体または核とのハイブリダイゼーションを、直接的または間接的に検出する。例えば、FISHを使用して、DNAプローブ (EPS8L1プローブなど)を、蛍光色素またはハプテンで標識する。プローブの、染色体または核とのハイブリダイゼーションは、直接的に (蛍光標識プローブの場合)または間接的に (

50

ハプテン標識プローブを検出するための蛍光標識抗ハプテン抗体を使用して)視覚化する。CISHでは、プローブを、ハプテン(ジゴキシゲニン、ビオチン、またはフルオレセインなど)で標識し、適切な基質(DAB、NBT/BCIPなど)の存在下で、ハイブリダイズさせたプローブの部位において有色産物を産生する酵素(西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼなど)にコンジュゲートさせた抗ハプテン抗体により、または酵素にコンジュゲートさせた二次抗体により検出する。同様に、SISHでは、ハプテン標識プローブは、抗体(抗ハプテン抗体または二次抗体のいずれか)にコンジュゲートさせた酵素(西洋ワサビペルオキシダーゼなど)が、ハイブリダイズさせたプローブの部位において、金属ナノ粒子(銀または金など)の沈着を触媒することを除き、抗ハプテン抗体により検出する。EPS8L1のコピー数は、染色体または核上の蛍光スポット、有色スポット、または銀スポットの数をカウントすることにより決定することができる。遺伝子(または染色体)のコピー数は、病理学者などの当業者、または、自動式の方法の場合、コンピュータにより推定されうる。

10

【0069】

他の例では、EPS8L1遺伝子および第19染色体DNA(第19染色体のセントロメアDNAなど)の両方を、例えば、ISHにより、対象に由来する試料中で検出する。EPS8L1および第19染色体コピー数は、染色体または核上の蛍光スポット、有色スポット、または銀スポットの数をカウントすることにより決定することができる。次いで、EPS8L1の遺伝子コピー数の、第19染色体数に対する比を決定する。例えば、SureFISH Chr 19 CEP(Agilent Technologies、Santa Clara、CA)またはSE1/15/19 satellite enumeration probe(Kreatech Diagnostics、Amsterdam、The Netherlands)など、第19染色体のセントロメアプローブが市販されている。

20

【0070】

他の例では、比較ゲノムハイブリダイゼーション(CGH)を使用して、EPS8L1の遺伝子コピー数を決定する。例えば、Kallioniemiら、Science、258巻:818~821頁、1992年;米国特許第5,665,549号および同第5,721,098号を参照されたい。一例では、腫瘍試料および対照組織(非乳腺腫瘍試料などの基準試料)に由来するDNAを、異なる検出可能な標識で標識する。腫瘍DNA試料と基準DNA試料とを混合し、混合物を、正常な中期染色体とハイブリダイズさせる。染色体に沿った蛍光強度比を使用して、腫瘍試料内のDNA獲得または喪失の領域を評価する。

30

【0071】

EPS8L1の遺伝子コピー数はまた、アレイCGH(aCGH)によっても決定することができる。例えば、PinkelおよびAlbertson、Nat. Genet.、37巻:S11~S17頁、2005年;Pinkelら、Nat. Genet.、20巻:207~211頁、1998年;Pollackら、Nat. Genet.、23巻:41~46頁、1999年を参照されたい。aCGHは、標準的CGHと類似するが、aCGHでは、DNA混合物を、何十、何百、または何千もの規定されたDNAプローブ(EPS8L1遺伝子の部分と相同なプローブなど)を含有するスライドとハイブリダイズさせる。アレイ内の各プローブにおける蛍光強度比を使用して、腫瘍試料内のDNA獲得または喪失の領域を評価するが、これらは、蛍光強度の変化を呈示する特定のプローブに基づき、CGHより精細にマッピングされうる。

40

【0072】

別の例では、EPS8L1のコピー数を、TAQMANアッセイを伴うようなりアルタイム定量的PCR(RT-qPCR)により決定する。例えば、米国特許第6,180,349号を参照されたい。EPS8L1のコピー数を、試料中に含有される正規化遺伝子であって、コピー数が既知である正規化遺伝子と比べて決定する(Heidら、Genome Research、6巻:986~994頁、1996年を参照されたい)。定量的PCRについてはまた、米国特許第5,538,848号においても記載されている。

【0073】

50

当業者には、E P S 8 L 1 の遺伝子コピー数を決定するのに使用されうるさらなる方法が公知である。これらの方法は、サザンブロット法、マルチプレックスライゲーション依存型プローブ増幅 (M L P A ; 例えば、Schoutenら、Nucl. Acids Res.、30巻：e 57頁、2002年を参照されたい)、および高密度SNP遺伝子型決定アレイ (例えば、W O 9 8 / 0 3 0 8 8 3 を参照されたい) を含むがこれらに限定されない。

【0074】

C. タンパク質を検出するための方法

一部の例では、タンパク質 (E P S 8 L 1 タンパク質など) の発現を解析する。適切な生物学的試料は、対象の腫瘍 (乳腺腫瘍など)、対象の非腫瘍組織から得られたタンパク質、および/またはがんを有さない対象の1または複数の試料から得られたタンパク質を含有する試料を含む。

10

【0075】

E P S 8 L 1 に特異的な抗体を、HarlowおよびLane (Antibodies, A Laboratory Manual, CSHL, New York, 1988年) で提示されているイムノアッセイ法など、当技術分野で周知である、いくつかのイムノアッセイ法のうちの1つによる、E P S 8 L 1 タンパク質の検出および定量化のために使用することができる。当技術分野では、このような抗体を構築する方法が公知である。加えて、このような抗体は、市販されうる。

【0076】

例示的な市販のE P S 8 L 1 抗体は、Abcam (Cambridge, MA、例えば、カタログ番号ab58687、ab64839、ab129547、およびab169701) 製、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA、例えば、カタログ番号sc-132673、sc-132672、およびsc-101950) 製、ならびにAbnova (Walnut, CA、例えば、カタログ番号H00054869-B01、H00054869-B01P、およびH00054869-A01) 製の抗E P S 8 L 1 抗体を含む。

20

【0077】

任意の標準的なイムノアッセイフォーマット (E L I S A、ウェスタンブロット、またはR I Aアッセイなど) を使用して、E P S 8 L 1 タンパク質レベルを測定することができる。免疫組織化学法も、E P S 8 L 1 タンパク質の検出および定量化のために活用することができる。このような技法に関する一般的な指針は、BancroftおよびStevens (Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone, 1982年) およびAusubelら (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1998年) において見出すことができる。

30

【0078】

E P S 8 L 1 タンパク質を定量化することを目的として、タンパク質 (乳腺腫瘍試料など) を含む、対象の生物学的試料を使用することができる。E P S 8 L 1 タンパク質の量は、試料中で評価することができ、必要に応じて、腫瘍試料中の隣接する非腫瘍組織内で評価することもでき、がんを有さない対象に由来する組織内で評価することもできる。試料中のE P S 8 L 1 タンパク質の量は、がんを有さない対象に由来する細胞内で見出されるタンパク質のレベル、または他の対照 (標準値または基準値など) と比較することができる。量の有意な増大または減少は、当技術分野で公知の統計学的方法を使用して評価することができる。

40

【0079】

さらなる例では、E P S 8 L 1 タンパク質は、電気化学イムノアッセイ法を使用して、試料中で検出することができる。例えば、Yuら、J. Am. Chem. Soc.、128巻：11199~11205頁、2006年；Maniら、ACS Nano、3巻：585~594頁、2009年；Malhotraら、Anal. Chem.、82巻：3118~3123頁、2010年を参照されたい。この方法では、抗体 (抗E P S 8 L 1 抗体など) を、伝導性表面に結合させた、末端カルボキシル化シングルウォールカーボンナノチューブ (S W N T)、マルチウォールカーボンナノチューブ (M W C N T)、または金ナノ粒子 (A u N P) にコンジュ

50

ゲートさせる。SWNT、MWCNT、またはAuNPを試料と接触させると、試料中のEPS8L1タンパク質は、一次抗体に結合する。レドックス酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼなど）に直接的または間接的にコンジュゲートさせた二次抗体は、一次抗体またはEPS8L1タンパク質に結合する（例えば、「サンドイッチ」アッセイでは）。シグナルは、酵素基質（例えば、酵素がHRPである場合は、過酸化水素）を、センサーを浸漬させ、触媒性還元によりもたらされる電流を測定する溶液に添加することにより発生させる。

【0080】

SELDIなど、定量的分光法を使用して、試料（腫瘍組織、非がん性組織、およびがんを有さない対象に由来する組織など）中のEPS8L1タンパク質の発現を解析することができる。一例では、表面増強レーザー脱離イオン化飛行時間（SELDI-TOF）質量分析を使用して、例えば、ProteinChip（商標）（Ciphergen Biosystems、Palo Alto、CA）を使用することにより、タンパク質発現を検出する。当技術分野では、このような方法が周知である（例えば、米国特許第5,719,060号；米国特許第6,897,072号；および米国特許第6,881,586号を参照されたい）。SELDIとは、解析物を、解析物の捕捉または脱離を増強する表面上のエネルギー流へと提示する脱離のための固相法である。

10

【実施例】

【0081】

以下の実施例は、開示される方法を例示するものである。本開示に照らして、当業者は、過度な実験なしに、開示される方法についての、これらの実施例および他の実施例の变化形が可能であることを認識するであろう。

20

【0082】

（実施例1）

ERBB2陽性乳がん細胞株にわたる、ERBB2サブセット特異性を伴う、成長阻害性およびアポトーシス誘導性RNAi標的の同定

乳がん細胞のHer2陽性（Erbb2陽性）亜群の成長および生存に不可欠な遺伝子を同定するために、セルスポットマイクロアレイ（CSMA）RNAiプラットフォーム（Rantalaら、BMC Genomics、12巻：162頁（2011年）；参照により本明細書に組み込まれる）を使用して、一連のsiRNAのスクリーニングを実施した。同じ乳がん亜型内の腫瘍であれば、それらの成長（増殖および/または生存）のための分子的機構を共有すると仮定して、Cancer Genome Atlas networkによる、乳がんについての概要（参照により本明細書に組み込まれる、The Cancer Genome Atlas Network、Nature、490巻：61～70頁、2012年）に従い、乳がんの臨床的Her2陽性亜群において最も高頻度で増幅される遺伝子を含む特注のsiRNAライブラリーを開発した。

30

【0083】

それらの公知のゲノム亜型に基づき、合計6つの細胞株を、スクリーニング実験のために選択した。これらの6つの細胞株は、HCC1569、BT474、21NT、JIMT1、HCC202、およびHCC1954であった。利用可能な場合は、各遺伝子について、単一の機能的に検証されたsiRNAを選択し、それについてあらかじめ検証されたsiRNAが利用可能でない各遺伝子については、2つのsiRNAを選択した。非ターゲット配列を伴う陰性対照のsiRNA（Qiagen AllStar（登録商標）Negative Control）を、トランスフェクション陰性対照として使用した。CSMA上のトランスフェクションの72時間後、切断型PARPの抗体ベースの検出、およびEdU組込みについての蛍光検出アッセイ（Invitrogen）を使用して、細胞成長およびRNAiによる遺伝子サイレンシングの結果としてのアポトーシスの誘導を評価した。全ての被験細胞株にわたり、それらの下方調節により、2標準偏差を超える（zスコア<-2）増殖の平均値低減、または2標準偏差を超える（zスコア>2）cPARPシグナルの増大が引き起こされる場合に、RNAiによりターゲットングさ

40

50

れた遺伝子を、Her2陽性亜群特異的成長促進遺伝子とみなした(図1A)。配列AAGCCCTCCGTGCTTAGCA(配列番号1; Qiagen、Hs__EPS8L1__14)をターゲティングするsiRNAである、EPS8L1のRNAiは、6つのHer2陽性乳がん細胞株全てにわたり、最強の成長阻害性siRNAの中から同定した(図1B)。

【0084】

(実施例2)

乳がんにおけるEPS8L1のゲノム異常および発現パターンについての解析

EPS8L1のゲノム異常ならびに臨床がん試料および乳がん細胞株にわたる発現パターンについての解析を、The Cancer Genome Atlas(TCGA; World Wide Webのcbioportal.org/public-portalで利用可能)から公表されているデータセット、および補遺データ(Neveら、Cancer Cell、10巻、515~527頁(2006年); 参照により本明細書に組み込まれる)のそれぞれに基づき実施した。

【0085】

図2Aは、TCGAデータの充実性腫瘍にわたる、EPS8L1異常の頻度を示す。図2Bは、51の個別の乳がん細胞株にわたる、中央値を中心とするEPS8L1の発現であって、Affymetrix U133A(登録商標)プラットフォームを使用して解析され、既に記載されている(参照により本明細書に組み込まれる、Staafら、2010年、J. Clin. Oncol.、28巻:1813~1820頁)通りに処理された発現を示す。細胞株は、basal A(赤、左)、basal B(グレー、中央)、およびluminal(青、右)亜群(Neveら)に群分けする。図2Cは、Neveらによる注釈データに基づき、臨床亜型:トリプルネガティブ(TN)、HER2陽性(HER2)、およびホルモン受容体陽性(HR)に群分けされた、図2Bの51の細胞株内のEPS8L1についての発現を表示する。ヒト乳がんのモデル細胞株内のEPS8L1発現のこの層別化により、ESR1(エストロゲン受容体アルファ)発現状態に従い区分されるのであれ、ErbB2の増幅および/または過剰発現状態に従い区分されるのであれ、EPS8L1が、luminal由来の細胞内で最も高度に発現することが示される。

【0086】

(実施例3)

EPS8L1発現のサイレンシングの、細胞成長および生存率に対する効果

siRNAによる、EPS8L1の細胞成長および生存率に対する効果についての検証実験を、生細胞イメージングにより実施した。EPS8L1 siRNA(Qiagen; Hs__EPS8L1__2およびHs__EPS8L1__14)を、JIMT1乳がん細胞と接触させ、成長を測定した。細胞は、透明底96ウェルプレート(ウェル1つ当たりの細胞10,000個)および12ウェルプレート(ウェル1つ当たりの細胞 2×10^5 個)上で培養し、siLentFect(登録商標)(Bio-Rad)を使用して、17nMのsiRNA構築物(Qiagen)を、1:600(v/v)の比でトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞についての時系列イメージングは、20倍の対物レンズ(Essen Instruments、Ann Arbor、MI)を使用する、Incucyte(登録商標)HD生細胞イメージング顕微鏡により実施した。画像は、2時間ごとに2日間にわたり収集した。細胞成長の尺度としてのウェルコンフルエンスについての比較解析により、細胞に、EPS8L1 siRNAであるHs__EPS8L1__14をトランスフェクトする結果として、非ターゲティング対照と比較して80%を超える成長阻害がもたらされるのに対し、siRNAであるHs__EPS8L1__2は、非ターゲティングsiRNAによるトランスフェクション対照と比較して15%の成長阻害がもたらされることが示された(図3A)。

【0087】

EPS8L1 siRNAが、EPS8L1タンパク質の発現を阻害することを確認するウェスタンブロットを、図3Bおよび図3Cに示す。全細胞溶解物を、SDSポリアク

10

20

30

40

50

リルアミドゲル上で分画し、ニトロセルロース膜 (Whatman Inc) に転写した。5% のスキムミルクを使用して、フィルターを、非特異的結合に対してブロッキングした。膜は、抗体 (EPS8L1; 1:1000; Abcam, Cambridge, MA; カタログ番号 Ab58687) により、4 で一晚にわたりプローブした。同じフィルターを、チューブリンに対する非特異的抗体 (1:5000, Abcam) でプロービングすることにより、等量ローディングを確認した。シグナルは、フィルターを、西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス IgG 二次抗体およびヤギ抗ウサギ抗体 (1:1000; Sigma) と共にインキュベートすることにより明らかにした。図 3 B は、EPS8L1 特異的 siRNA による EPS8L1 のサイレンシングを示す。図 3 C は、表示されるヒト乳がん細胞株内の、EPS8L1 特異的 siRNA による EPS8L1 サイレンシングを示す。ベータアクチンを、ローディング対照として使用した。

10

【0088】

(実施例 4)

臨床乳がん試料亜群内の高 EPS8L1 発現により、全生存の不良が予測される

公表供給源からプールされた、1881 例の試料による乳腺腫瘍セットについての、遺伝子発現データおよび注釈データを含むデータセットを使用して、EPS8L1 発現の臨床的関連性を評価した。1881 例の試料による乳腺腫瘍セットは、Affymetrix U133A アレイを使用して解析された 11 の公表データセット (表 1) を含む。

20

【表 1】

表 1. 1881 例の試料による乳腺腫瘍セットについての概要

GEO ID	試料数		DMFS		平均 DMFS	平均 OS		平均 RFS		中央値年齢 (年)	平均サイズ (mm)	
	ER-/+	LN-/+	(0/1)	(年)	OS (0/1)	(年)	RFS	(年)	ケート:1/2/3			
GSE7390	198	64/134	198/0	136/62	10.8+/-5.4	142/56	11,463.7	107/91	9,365.6	30/83/83	4667	22+/-8
GSE3494	251	34/213	158/84	NA	NA	132/119	7,964.1	155/96	5,563.4	67/128/54	64614	22+/-13
GSE1456	159	29/130	94/60	NA	NA	119/40	6,461.9	119/40	6,262.3	28/58/61	56614	22+/-12
GSE2034	286	77/209	286/0	179/107	6.5+/-3.5	NA	NA	NA	NA	6/42/139*	53612*	10+/-6
GSE2603	99	42/57	34/65	55/27	5.2+/-2.3	NA	NA	NA	NA	NA	56614	3+/-17
GSE6532	327	45/262	221/85	225/68	6.3+/-3.7	NA	NA	195/111	6,363.7	65/145/60	60,5612	23+/-12
GSE4922	40	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0/40/0	NA	NA
GSE12093	136	0/136	136/0	116/20	7.7+/-3.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GSE5327	58	58/0	NA	47/11	6.8+/-3.1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
GSE11121	197	NA	197/0	153/44	7.8+/-4.2	NA	NA	NA	NA	29/135/33	NA	21+/-10
Chn	130	46/84	59/71	102/27	5.7+/-4	84/45	6,463.7	NA	NA	14/46/65	51615	27+/-14
合計	1681	395/1225	1383/365	1013/366	7.2+/-4.2	477/260	8,264.4	576/338	6,764.2	239/677/495	55613	20+/-12

30

【0089】

EPS8L1 の遺伝子発現レベルの、アウトカムとの関連付けは、評価項目としての全生存 (OS) および 10 年間の打切りを使用して実施した。1881 例の試料によるセット内の試料は、EPS8L1 発現レベル (log2 による発現) に基づく 3 つの分位区間: EPS8L1_low (中央値である 0 と比べた、-5.204 ~ -0.295 の範囲の発現); EPS8L1_medium (中央値である 0 と比べた、-0.295 ~ 0.472 の発現); および EPS8L1_high (中央値である 0 と比べた、0.472 ~ 3.707 の発現) に層別化した後、亜群内で Kaplan-Meier 生存解析 (参照により本明細書に組み込まれる、Ringner ら、PLoS One、6 巻: e17911 頁、2011 年) を行った。ログランク P 値は、-log10 (P 値) として示す。図 4 A ~ 4 D は、EPS8L1 発現により、EPS8L1_high 発現を伴う全ての腫瘍内の全生存が予測され、それらの腫瘍が、ER 陽性または ER 陰性の場合であれ、そうでない場合であれ、HER2 陽性腫瘍内の全生存が特に予測されることを示す (図 4 B ~ 4 D)。

40

【0090】

(実施例 5)

ゲノム DNA 内の高 EPS8L1 コピー数により、乳がん患者における全生存の不良が予測される

178 例の原発性乳がん症例に由来する EPS8L1 についてのコピー数変化を、Hu-244A CGH マイクロアレイ (Agilent Technologies) から抽出した。腫瘍は、Oslo University Hospital Ulleva

50

1、Norwayにおいて、1990年～1994年にわたり、12～16年間にわたる観察期間により、逐次的に回収された、212例の原発性乳がん症例のコホート（Langerod Aら、2009年、Breast Cancer Res.、9巻（3号）：R30頁；参照により本明細書に組み込まれる）の一部である。試料は、標識前の増幅ステップを伴わずに、標準的プロトコール（Barrett Mら、2004年、Proc Natl Acad Sci USA、101巻（51号）：17765～17770頁；参照により本明細書に組み込まれる）によりプロファイリングした。スキャンされたマイクロアレイ画像を読み取り、線形正規化を含む、aCGH前処理のためのプロトコール（CGHv4__95__Feb07およびCGH-v4_91_2）を伴う、Feature Extraction（登録商標）v9.5（Agilent Technologies）により解析した。データは、Kmin = 5および = 25の設定で、PCF（Piecewise Constant Fit）アルゴリズムを使用してセグメント化した。異常は、閾値：0.3；獲得 > 0.3および喪失 < -0.3（第19染色体の遺伝子シグナルと比較したlog₂スケール）によりスコア付けした。EPS8L1のコピー数変化と生存との統計学的関連付けは、SPSS 16.0（SPSS, Inc、Chicago、IL）により実施した。FISHを使用してErb B2の増幅を規定するためのASCOガイドライン（2.2を超えるErb B2遺伝子シグナルの、第17染色体シグナルに対する比；Wolffら、Arch. Pathol. Lab. Med.、131巻：18～43頁、2007年）を使用して、Erb B2およびEPS8L1が、コピー数の獲得 > 0.9（log₂スケール）で増幅される腫瘍を規定した。

10

20

【0091】

図5AおよびBは、EPS8L1のコピー数に基づく、全生存時間についての Kaplan-Meier 解析を示す2つのプロットのセットである。図5Aでは、DNAの獲得と増幅とを個別とするのに対し、図5Bでは、DNAの獲得と増幅とを組み合わせた。EPS8L1の獲得を伴う対象の生存時間は、短縮され（図5AおよびB）、Erb B2（HER2）の増幅およびEPS8L1の喪失の両方を伴う対象の累積生存時間は、とりわけ不良であった（図5B）。興味深いことに、Erb B2（HER2）の獲得およびEPS8L1の喪失を伴う対象の生存は、特に良好であり（図5AおよびB）、良性腫瘍または進行の非常に遅い腫瘍を有する可能性さえあった。これらの結果は、EPS8L1 DNA コピー数の変化の検出の、単一のマーカーとしての、またはErb B2 コピー数状態の検出と組み合わせた、臨床予後のための適用可能性を示す。

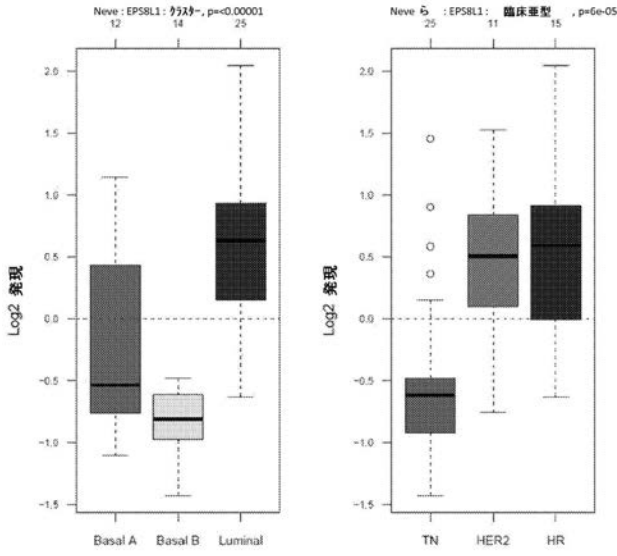
30

【0092】

本開示の原理が適用されうる多くの可能な実施形態を考慮して、例示される実施形態は、単なる例であって、本発明の範囲を限定するものとしては考えるべきではないことを認識されたい。そうではなく、本発明の範囲は、以下の特許請求の範囲により規定される。したがって、本発明者らは、これらの特許請求の範囲および精神の中に収まる全てのものを、本発明として主張する。

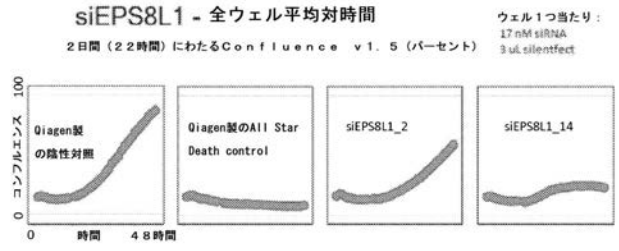
【 図 2 C 】

FIG. 2C

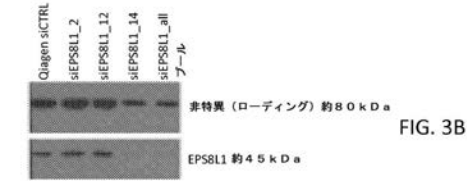


【 図 3 A 】

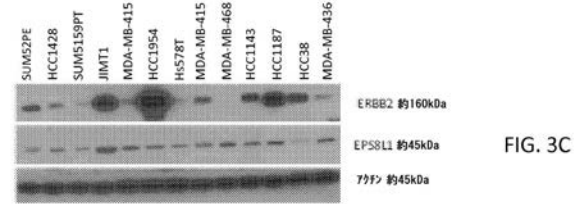
FIG. 3A



【 図 3 B 】

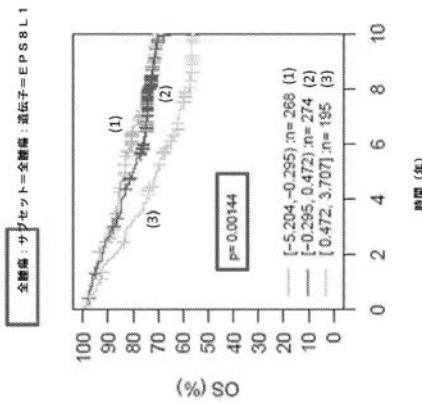


【 図 3 C 】



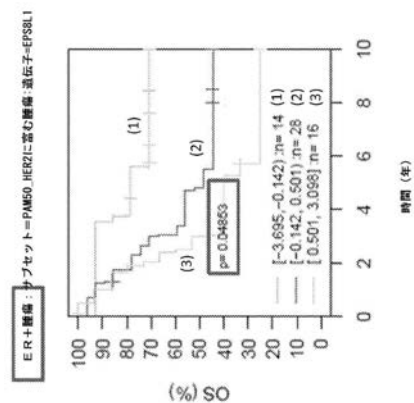
【 図 4 A 】

FIG. 4A



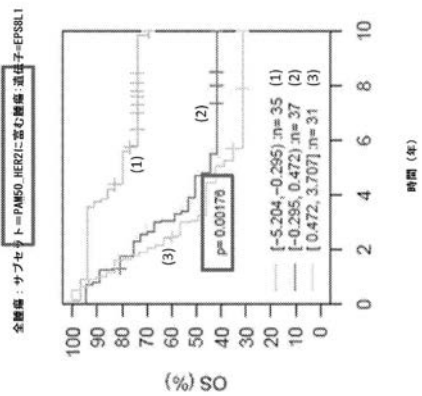
【 図 4 C 】

FIG. 4C



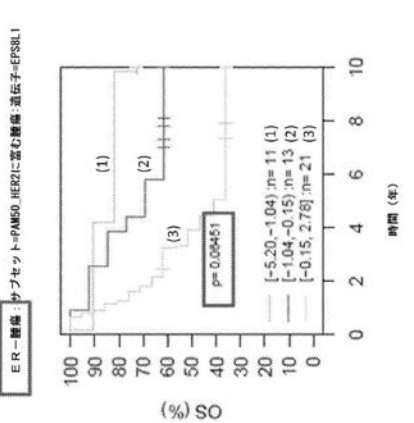
【 図 4 B 】

FIG. 4B


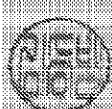


【 図 4 D 】

FIG. 4D



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2014/061981
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
G01N 33/53(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/53; G06F 19/00; G01N 33/58; C12Q 1/68; G01N 33/574		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: prognosis, breast cancer, EPS8-like 1, ErbB2, bio-marker		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009-126966 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 15 October 2009 See claims 1, 6-7; and paragraphs [0010], [0041], [0044], [0073].	1-7
Y		22-28
Y	US 7526387 B2 (BAKER et al.) 28 April 2009 See claims 1, 11.	22-28
A	WO 2011-056489 A2 (ABBOTT LABORATORIES) 12 May 2011 See claims 1, 4, 12.	1-7, 22-28
A	THRIVENI et al., `Diagnostic Significance of CA15-3 with Combination of HER-2/neu Values at 85th Percentiles in Breast Cancer` Indian Journal of Clinical Biochemistry, Vol.28, No.2, pp.136-140 (2012) See abstract.	1-7, 22-28
A	US 8163499 B2 (SINGH et al.) 24 April 2012 See claims 54, 61, 63.	1-7, 22-28
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 January 2015 (30.01.2015)		Date of mailing of the international search report 02 February 2015 (02.02.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR  International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82 42 472 3473		Authorized officer KIM, Seung Beom  Telephone No. +82-42-481-3371

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2014/061981

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

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

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

2. Claims Nos.: 9-11,15-16,20-21,32
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 9-11, 15-16, 20-21 and 32 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. Claims Nos.: 8,12-14,17-19,29-31
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

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

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/061981

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009-126966 A2	15/10/2009	WO 2009-126966 A3	30/12/2009
US 7526387 B2	28/04/2009	AU 2004-258085 A1	27/01/2005
		AU 2004-258085 B2	27/05/2010
		CA 2531967 A1	27/01/2005
		CA 2531967 C	16/07/2013
		EP 1644858 A2	12/04/2006
		EP 1644858 A4	13/05/2009
		JP 04906505 B2	28/03/2012
		JP 2007-527220 A	27/09/2007
		US 2005-0048542 A1	03/03/2005
		US 2009-0280490 A1	12/11/2009
		US 7939261 B2	10/05/2011
		WO 2005-008213 A2	27/01/2005
		WO 2005-008213 A3	24/03/2005
WO 2011-056489 A2	12/05/2011	AU 2006-320334 A1	07/06/2007
		AU 2007-349827 A1	02/10/2008
		AU 2007-351403 A1	23/10/2008
		AU 2008-206239 A1	24/07/2008
		AU 2010-315600 A1	10/05/2012
		CA 2632584 A1	07/06/2007
		CA 2670450 A1	02/10/2008
		CA 2670810 A1	24/07/2008
		CA 2670901 A1	17/07/2008
		CA 2777169 A1	12/05/2011
		CA 2778004 A1	12/05/2011
		CA 2778005 A1	12/05/2011
		CN 101322164 A	10/12/2008
		CN 101563705 A	21/10/2009
		CN 101632011 A	20/01/2010
		CN 101632099 A	20/01/2010
		CN 102656281 A	05/09/2012
		CN 102656458 A	05/09/2012
		EP 1960811 A2	27/08/2008
		EP 2097868 A2	09/09/2009
		EP 2098885 A2	09/09/2009
		EP 2098885 A3	21/10/2009
		EP 2098885 B1	25/07/2012
		EP 2103961 A2	23/09/2009
		EP 2103961 A3	02/12/2009
		EP 2104847 A1	30/09/2009
		EP 2111541 A1	28/10/2009
		EP 2122559 A2	25/11/2009
		EP 2310877 A2	20/04/2011
		EP 2401636 A2	04/01/2012
		EP 2494071 A1	05/09/2012
		EP 2494076 A1	05/09/2012
		EP 2494360 A2	05/09/2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/061981

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		EP 2682482 A1	08/01/2014
		IL 219405 D0	28/06/2012
		JP 04601713 B2	22/12/2010
		JP 05134009 B2	30/01/2013
		JP 2009-531649 A	03/09/2009
		JP 2010-511153 A	08/04/2010
		JP 2010-517013 A	20/05/2010
		JP 2010-517015 A	20/05/2010
		JP 2013-507987 A	07/03/2013
		JP 2013-507988 A	07/03/2013
		JP 2013-507989 A	07/03/2013
		KR 10-1078389 B1	01/11/2011
		KR 10-1113094 B1	17/02/2012
		KR 10-2009-0097896 A	16/09/2009
		KR 10-2009-0101380 A	25/09/2009
		KR 10-2012-0093982 A	23/08/2012
		KR 10-2012-0101016 A	12/09/2012
		MX 2012004908 A	14/06/2012
		RU 2012121820 A	10/12/2013
		TW 201122480 A	01/07/2011
		US 2006-0157654 A1	20/07/2006
		US 2006-0261942 A1	23/11/2006
		US 2007-0211248 A1	13/09/2007
		US 2007-0225946 A1	27/09/2007
		US 2008-0048872 A1	28/02/2008
		US 2008-0105824 A1	08/05/2008
		US 2008-0125976 A1	29/05/2008
		US 2009-0101826 A1	23/04/2009
		US 2009-0125241 A1	14/05/2009
		US 2009-0236531 A1	24/09/2009
		US 2009-0236538 A1	24/09/2009
		US 2009-0294678 A1	03/12/2009
		US 2009-0299694 A1	03/12/2009
		US 2010-0078570 A1	01/04/2010
		US 2010-0224783 A1	09/09/2010
		US 2010-0224788 A1	09/09/2010
		US 2010-0226580 A1	09/09/2010
		US 2010-0282969 A1	11/11/2010
		US 2010-0283619 A1	11/11/2010
		US 2010-0294415 A1	25/11/2010
		US 2010-0294943 A1	25/11/2010
		US 2011-0015886 A1	20/01/2011
		US 2011-0105341 A1	05/05/2011
		US 2011-0130295 A1	02/06/2011
		US 2012-0153162 A1	21/06/2012
		US 2012-0175525 A1	12/07/2012
		US 2012-0264635 A1	18/10/2012
		US 2012-0267540 A1	25/10/2012
		US 7005982 B1	28/02/2006
		US 7142109 B1	28/11/2006

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/061981

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 7269527 B1	11/09/2007
		US 7592601 B2	22/09/2009
		US 7668681 B2	23/02/2010
		US 7759649 B2	20/07/2010
		US 7760103 B2	20/07/2010
		US 7851766 B2	14/12/2010
		US 7864061 B2	04/01/2011
		US 7868295 B2	11/01/2011
		US 7994482 B2	09/08/2011
		US 8110808 B2	07/02/2012
		US 8183538 B2	22/05/2012
		US 8247781 B2	21/08/2012
		US 8304740 B1	06/11/2012
		US 8330115 B2	11/12/2012
		WO 2007-065004 A2	07/06/2007
		WO 2007-065004 A3	21/12/2007
		WO 2008-086246 A1	17/07/2008
		WO 2008-089304 A1	24/07/2008
		WO 2008-118219 A2	02/10/2008
		WO 2008-118219 A3	12/03/2009
		WO 2008-127440 A2	23/10/2008
		WO 2008-127440 A3	19/02/2009
		WO 2009-120674 A1	01/10/2009
		WO 2009-139959 A2	19/11/2009
		WO 2009-139959 A3	07/01/2010
		WO 2009-143122 A2	26/11/2009
		WO 2009-143122 A3	25/02/2010
		WO 2009-143131 A2	26/11/2009
		WO 2009-143131 A3	25/02/2010
		WO 2009-154974 A2	23/12/2009
		WO 2009-154974 A3	22/04/2010
		WO 2010-006295 A2	14/01/2010
		WO 2010-006295 A3	14/05/2010
		WO 2010-006295 A4	14/01/2010
		WO 2010-039298 A2	08/04/2010
		WO 2010-039298 A3	05/08/2010
		WO 2010-039298 A9	08/04/2010
		WO 2010-091003 A2	12/08/2010
		WO 2010-091003 A3	02/12/2010
		WO 2010-099331 A2	02/09/2010
		WO 2010-099331 A3	13/01/2011
		WO 2010-099334 A2	02/09/2010
		WO 2010-099334 A3	06/01/2011
		WO 2010-099346 A2	02/09/2010
		WO 2010-099346 A3	20/01/2011
		WO 2010-141125 A2	09/12/2010
		WO 2010-141125 A3	24/03/2011
		WO 2011-056489 A3	25/08/2011
		WO 2011-056490 A1	12/05/2011
		WO 2011-056505 A1	12/05/2011

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2014/061981

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 8163499 B2	24/04/2012	AU 2009-219437 A1	03/09/2009
		CA 2716826 A1	03/09/2009
		CN 102016581 A	13/04/2011
		CN 102016581 B	30/07/2014
		CN 103399144 A	20/11/2013
		DK 2250498 T3	04/02/2013
		EP 2250498 A1	17/11/2010
		EP 2250498 B1	31/10/2012
		EP 2602623 A2	12/06/2013
		EP 2602623 A3	16/10/2013
		EP 2618146 A2	24/07/2013
		EP 2618146 A3	06/11/2013
		ES 2398618 T3	20/03/2013
		IL 207637 A	30/04/2013
		IL 207637 D0	30/12/2010
		IL 222872 D0	31/12/2012
		JP 05414701 B2	12/02/2014
		JP 2011-514522 A	06/05/2011
		JP 2013-174616 A	05/09/2013
		MX 2010009140 A	20/12/2010
		NZ 587420 A	27/07/2012
		NZ 600339 A	20/12/2013
		US 2010-0167945 A1	01/07/2010
		US 2013-045880 A1	21/02/2013
		US 8609349 B2	17/12/2013
		WO 2009-108637 A1	03/09/2009

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
	G 0 1 N	37/00	1 0 2

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

(74) 代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72) 発明者 ランタラ, ユハ

フィンランド国 20880 トゥルク, バスキトルベンカトゥ 13

(72) 発明者 グレイ, ジョー ダブリュー.

アメリカ合衆国 オレゴン 97034-3724, レイク オスウィーゴ, ノース ショア
ロード 1115

F ターム(参考) 4B063 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35
QR48 QR62 QR72 QR77 QS02 QS07 QS25 QS33 QS34 QX01
4C084 AA17 NA14 ZB261 ZC411
4C085 AA14
4C086 AA01 AA02 BC46 GA02 GA07 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZC41

专利名称(译)	如何确定乳腺癌的预后		
公开(公告)号	JP2017501679A	公开(公告)日	2017-01-19
申请号	JP2016525610	申请日	2014-10-23
[标]申请(专利权)人(译)	俄勒冈健康与科学大学		
申请(专利权)人(译)	俄勒冈健康与科学大学		
[标]发明人	ランタラ ユハ グレイジョーダブリュー		
发明人	ランタラ, ユハ グレイ, ジョーダブリュー.		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K45/00 A61K39/395 A61K31/517 A61P35/00 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/118 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/57415 G01N2333/912 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61K45/00 A61K39/395.N A61K31/517 A61P35/00 G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS02 4B063/QS07 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZC411 4C085/AA14 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC46 4C086/GA02 4C086/GA07 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZC41		
代理人(译)	夏木森下 飯田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/894548 2013-10-23 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文公开了确定患有乳房肿瘤的受试者的诊断或预后的方法。在一个实施方案中，该方法包括确定样品中EPS 8的量（如EPS 8 L1核酸或蛋白质的量），并将样品中EPS 8 L1的量与对照。如果样品中EPS 8 L1的量与对照相比增加，则确定受试者预后不良（例如生存可能性降低）。在一些实施方案中，该方法进一步包括对被确定具有不良预后的受试者施用治疗的步骤，例如使受试者接受ErbB2靶向治疗的步骤。

(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2017-501679 (P2017-501679A)
		(43) 公表日 平成29年1月19日(2017.1.19)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 Z N A A	4 B 0 6 3
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00	4 C 0 8 4
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 N	4 C 0 8 5
A61K 31/517 (2006.01)	A61K 31/517	4 C 0 8 6
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全31頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号	特願2016-525610(P2016-525610)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成26年10月23日(2014.10.23)	513239243
(85) 翻訳文提出日	平成28年5月31日(2016.5.31)	オレゴンヘルスアンドサイエンス ユニバーシティ
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/061981	アメリカ合衆国 オレゴン 97239, ポートランド, エスタブリュー ハン クロフト ストリート 0690
(87) 国際公開番号	W02015/061577	(74) 代理人
(87) 国際公開日	平成27年4月30日(2015.4.30)	100078282
(31) 優先権主張番号	61/894,548	弁理士 山本 秀敏
(32) 優先日	平成25年10月23日(2013.10.23)	100113413
(33) 優先権主張国	米国(US)	弁理士 森下 夏樹
		100181674
		弁理士 飯田 貴敏
		100181641
		弁理士 石川 大輔
		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳がんの予後を決定する方法