

(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2018-508469

(P2018-508469A)

(43) 公表日 平成30年3月29日(2018.3.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	Z N A 2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A 4 C O 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1 4 C O 8 6
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 108 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-533956 (P2017-533956)	(71) 出願人	509012625
(86) (22) 出願日	平成27年12月23日 (2015.12.23)		ジェネンテック, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成29年8月21日 (2017.8.21)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/000237		
(87) 国際公開番号	W02016/105503	(74) 代理人	110002077
(87) 国際公開日	平成28年6月30日 (2016.6.30)		園田・小林特許業務法人
(31) 優先権主張番号	62/096,741	(72) 発明者	チョイ, ユンジョン
(32) 優先日	平成26年12月24日 (2014.12.24)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80-4990, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	カバラ, オマル
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80-4990, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膀胱癌の治療、診断、及び予後判定方法

(57) 【要約】

本発明は、癌、例えば、膀胱癌を治療する、診断する、及び予後判定を提供するための、F G F R 3、T P 5 3、及び/またはE G F Rを含む1つ以上のバイオマーカーの発現を検出するための方法及び組成物を提供する。本発明はまた、本方法における使用のためのキット及び製品を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

膀胱癌に罹患している患者の治療方法であって、治療有効量の抗癌療法剤を前記患者に投与することを含み、前記患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの少なくとも1つの発現レベルが、前記少なくとも1つの遺伝子の基準レベルに対して増加したことが決定されている、前記方法。

【請求項 2】

患者における膀胱癌の診断方法であって、

(a) 前記患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの少なくとも1つの発現レベルを決定するステップと、

(b) 前記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、前記少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、前記基準レベルに対する、前記患者試料中の前記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加が、膀胱癌を有する患者を特定する、前記方法。

【請求項 3】

(c) 膀胱癌を有していることを前記患者に通知することを更に含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

(d) 前記基準レベルに対する、前記患者試料中の前記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加が検出された場合に、前記患者の治療のための抗癌療法剤を選択することを更に含む、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

(e) 治療有効量の抗癌療法剤を前記患者に投与することを更に含む、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

膀胱癌に罹患している患者の予後判定のための方法であって、

(a) 前記患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの少なくとも1つの発現レベルを決定することと、

(b) 前記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、前記少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較することと、

(c) 前記患者の予後を決定することと、を含み、不良な予後が、前記基準レベルに対して増加した、前記患者試料中の前記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルによって示される、前記方法。

【請求項 7】

前記予後が、生存の予後である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記方法が、抗癌療法剤を前記患者に投与する前に実行される、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 9】

(d) 前記患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、抗癌療法剤の投与から利益を享受する可能性があるとして、前記患者を特定することを更に含む、請求項 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

(e) 前記患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、治療有効量の抗癌療法剤を前記患者に投与することを更に含む、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記生存が、無疾患生存または全生存である、請求項 6 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

膀胱癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかの決定方

10

20

30

40

50

法であって、

(a) 前記患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、 F G F R 3、 T P 5 3、及び E G F R のうちの少なくとも 1 つの発現レベルを決定することと、

(b) 前記少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを、前記少なくとも 1 つの遺伝子の基準レベルと比較することと、を含み、前記基準レベルに対する、前記患者試料中の前記少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する、前記方法。

【請求項 1 3】

膀胱癌を有する患者に対する抗癌療法剤の治療効果の最適化方法であって、

(a) 前記患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、 F G F R 3、 T P 5 3、及び E G F R のうちの少なくとも 1 つの発現レベルを決定することと、

(b) 前記少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを、前記少なくとも 1 つの遺伝子の基準レベルと比較することと、を含み、前記基準レベルに対する、前記患者試料中の前記少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する、前記方法。

【請求項 1 4】

(c) 治療有効量の抗癌療法剤を前記患者に投与することを更に含む、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記抗癌療法剤が、 F G F R 3 アンタゴニスト、 T P 5 3 アンタゴニスト、及び/または E G F R アンタゴニストを含む、請求項 1、4、5、または 8 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記抗癌療法剤が、 F G F R 3 アンタゴニスト及び E G F R アンタゴニストを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記 F G F R 3 アンタゴニスト、 E G F R アンタゴニスト、または T P 5 3 アンタゴニストが、抗体またはその機能的断片である、請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 F G F R 3 アンタゴニストが、抗 F G F R 3 抗体またはその機能的断片である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 E G F R アンタゴニストが、抗 E G F R 抗体またはその機能的断片である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 T P 5 3 アンタゴニストが、抗 T P 5 3 抗体またはその機能的断片である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記 F G F R 3 アンタゴニスト、 T P 5 3 アンタゴニスト、または E G F R アンタゴニストが、小分子アンタゴニストである、請求項 1 5 または 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 F G F R 3 アンタゴニストまたは E G F R アンタゴニストが、チロシンキナーゼ阻害剤である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 E G F R アンタゴニストが、エルロチニブ (T A R C E V A (商標)) である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記抗癌療法剤が、(i) 抗新生物剤、化学療法剤、成長阻害剤、及び細胞毒性剤からなる群から選択される薬剤、(i i) 放射線療法剤、または(i i i) それらの組み合わせを更に含む、請求項 1 5 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 25】

前記患者から得られる前記試料中の前記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルが、mRNAを測定することによって決定されている、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

前記患者から得られる前記試料中の前記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)アッセイによって決定されている、請求項25に記載の方法。

【請求項 27】

前記PCRアッセイが、定量的PCRアッセイである、請求項26に記載の方法。

10

【請求項 28】

前記患者から得られる前記試料中の前記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルが、タンパク質を測定することによって決定されている、請求項1～24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記患者から得られる前記試料中の前記少なくとも1つの遺伝子の発現レベルが、免疫組織化学(IHC)法によって決定されている、請求項28に記載の方法。

【請求項 30】

前記患者から得られる前記試料が、腫瘍試料である、請求項1～29のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 31】

前記腫瘍試料が、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)腫瘍試料である、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

前記遺伝子のうちの少なくとも2つの発現レベルを決定することを更に含む、請求項1～31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記遺伝子のうちの3つ全ての発現レベルを決定することを更に含む、請求項32に記載の方法。

【請求項 34】

FGFR3の発現レベルが、基準レベルに対して少なくとも2倍増加したことが決定されている、請求項1～33のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 35】

FGFR3の発現レベルが、基準レベルに対して少なくとも4倍増加したことが決定されている、請求項34に記載の方法。

【請求項 36】

EGFRの発現レベルが、基準レベルに対して少なくとも4倍増加したことが決定されている、請求項1～35のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

EGFRの発現レベルが、基準レベルに対して少なくとも8倍増加したことが決定されている、請求項36に記載の方法。

40

【請求項 38】

前記患者から得られる試料中の、DUSB3、FRS2、TSC1、ERBB3、CDKN1A、CCND1、TP63、MMP2、ZEB2、PIK3CB、PIK3R1、MDM2、SNAI2、AXL、ZEB1、BCL2B、TSC2、RB1、FGFR32、PIK3IP1、MTOR、PIK3CA、PTEN、AKT1、BCL2A、FRS3、ERBB2、FGFR31、FGF1、SNAI1、FGFR34、FGF9、及びFGF2からなる群から選択される少なくとも1つの追加遺伝子の発現レベルを決定することを更に含む、前記少なくとも1つの追加遺伝子の発現レベルは、前記少なくとも1つの追加遺伝子の基準レベルに対して変化している、請求項1～37のいずれか一項に記

50

載の方法。

【請求項 39】

前記膀胱癌が、筋層非侵襲性膀胱癌、筋層侵襲性膀胱癌、または転移性膀胱癌である、請求項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

前記筋層非侵襲性膀胱癌が、再発性筋層非侵襲性膀胱癌である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

膀胱癌に罹患している患者の治療方法であって、カルメット・ゲラン桿菌（BCG）ワクチン以外の治療有効量の抗癌療法剤を前記患者に投与することを含み、前記患者から得られる試料中の TP53 の発現レベルが、TP53 の基準レベルに対して増加したと決定されている、前記方法。

10

【請求項 42】

前記抗癌療法剤が、FGFR3 アンタゴニスト、EGFR アンタゴニスト、及び/または TP53 アンタゴニストを含む、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

前記抗癌療法剤が、FGFR3 アンタゴニスト及びEGFR アンタゴニストを含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記 FGFR3 アンタゴニスト、EGFR アンタゴニスト、または TP53 アンタゴニストが、抗体またはその機能的断片である、請求項 42 または 43 に記載の方法。

20

【請求項 45】

前記 FGFR3 アンタゴニストが、抗 FGFR3 抗体またはその機能的断片である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

前記 EGFR アンタゴニストが、抗 EGFR 抗体またはその機能的断片である、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 47】

前記 TP53 アンタゴニストが、抗 TP53 抗体またはその機能的断片である、請求項 44 に記載の方法。

30

【請求項 48】

前記 FGFR3 アンタゴニスト、TP53 アンタゴニスト、またはEGFR アンタゴニストが、小分子アンタゴニストである、請求項 42 または 43 に記載の方法。

【請求項 49】

前記小分子アンタゴニストが、チロシンキナーゼ阻害剤である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記 EGFR アンタゴニストが、エルロチニブ（TARCEVA（商標））である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

前記抗癌療法剤が、(i) 抗新生物剤、化学療法剤、成長阻害剤、及び細胞毒性剤からなる群から選択される薬剤、(ii) 放射線療法、または (iii) それらの組み合わせを更に含む、請求項 41 ~ 50 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 52】

前記患者から得られる前記試料中の TP53 の発現レベルが、mRNA を測定することによって決定されている、請求項 41 ~ 51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

前記患者から得られる前記試料中の TP53 の発現レベルが、タンパク質を測定することによって決定されている、請求項 41 ~ 51 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、癌、例えば、膀胱癌の治療、診断、及び予後判定の提供方法を対象とする。

【背景技術】

【0002】

癌は、依然としてヒトの健康に対する最も致命的な脅威のうちの1つである。米国において、癌は、毎年約130万人の新たな患者に影響を及ぼし、心疾患に続く第2の主な死亡原因であり、死亡の約4件に1件を占める。固形腫瘍は、そのような死亡の大部分に関与する。悪性腫瘍は転移し、制御されていない様子で急速に成長し、時を得た検出及び治療を極めて困難にする。

10

【0003】

膀胱癌は、世界で5番目に一般的な悪性腫瘍であり、40万件近くの症例が新たに診断され、1年当たり約15万件の関連死が報告されている。膀胱癌患者の約75~80%が、初期診断時に筋層非侵襲性膀胱癌(NMIBC)を提示する。固有層に限定され、典型的に致命的ではないが、NMIBCの約50~80%は再発し、しばしば費用のかかる臨床介入を必要とする。NMIBCは、最も深刻な筋層侵襲性膀胱癌(MIBC)に対して症例の約20~30%において進行し得る。MIBC(T2及びT3)は、新たな症例のうちの約10~15%を占めるに過ぎないが、それらは、転移性膀胱癌(pT4)を発達させる高い危険性をもたらす。転移性膀胱癌は、悲観的な5年生存可能性と関連付けられ、主要な対処されていない医療ニーズを表し、今日まで有効な治療法がほとんどない。

20

【0004】

したがって、癌、例えば、膀胱癌の治療、診断、及び予後判定の提供に有効な手段の必要性が残る。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、癌、例えば、膀胱癌の治療、診断、及び予後判定の提供方法を対象とする。

【0006】

一態様において、本発明は、膀胱癌に罹患している患者の治療方法を特徴とし、本方法は、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含み、当該患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの少なくとも1つの発現レベルが、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルに対して増加したことが決定されている。

30

【0007】

別の態様において、本発明は、患者における膀胱癌の診断方法を特徴とし、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの少なくとも1つの発現レベルを決定するステップと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加が、膀胱癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、本方法は、(c)膀胱癌を有していることを患者に通知することを更に含む。一部の実施形態において、本方法は、(d)基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加が検出された場合に、当該患者の治療のための抗癌療法剤を選択することを更に含む。一部の実施形態において、本方法は、(e)治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含む。

40

【0008】

別の態様において、本発明は、膀胱癌に罹患している患者の予後判定方法を特徴とし、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの少なくとも1つの発現レベルを決定することと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較することと、(c)患者の予後を決定することと、を含み、不良な予後は、基準レベルに対して増加した

50

患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加によって示される。一部の実施形態において、予後は、生存の予後である。一部の実施形態において、本方法は、抗癌療法剤を患者に投与する前に実行される。一部の実施形態において、本方法は、(d)患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、抗癌療法剤の投与から利益を享受する可能性があるとして、患者を特定することを更に含む。一部の実施形態において、本発明は、(e)患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含む。一部の実施形態において、生存は、無疾患生存または全生存である。

【0009】

別の態様において、本発明は、膀胱癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかを決定する方法を特徴とし、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの少なくとも1つの発現レベルを決定することと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、本方法は、(c)治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含む。

10

【0010】

別の態様において、本発明は、膀胱癌を有する患者のための抗癌療法剤の治療効果の最適化方法を特徴とし、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの少なくとも1つの発現レベルを決定することと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、本方法は、(c)治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含む。

20

【0011】

別の態様において、本発明は、膀胱癌に罹患している患者の治療方法を特徴とし、本方法は、カルメット・ゲラン桿菌(BCG)ワクチン以外の治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含み、患者から得られる試料中のTP53の発現レベルが、TP53の基準レベルに対して増加したと決定されている。

30

【0012】

上記態様のうちのいずれか1つの一部の実施形態において、抗癌療法剤は、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、及び/またはEGFRアンタゴニストを含む。一部の実施形態において、抗癌療法剤は、FGFR3アンタゴニスト及びEGFRアンタゴニストを含む。一部の実施形態において、FGFR3アンタゴニスト、EGFRアンタゴニスト、またはTP53アンタゴニストは、抗体またはその機能的断片である。一部の実施形態において、FGFR3アンタゴニストは、抗FGFR3抗体、またはその機能的断片である。一部の実施形態において、EGFRアンタゴニストは、抗EGFR抗体、またはその機能的断片である。一部の実施形態において、TP53アンタゴニストは、抗TP53抗体、またはその機能的断片である。一部の実施形態において、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、またはEGFRアンタゴニストは、小分子アンタゴニストである。一部の実施形態において、FGFR3アンタゴニストまたはEGFRアンタゴニストは、チロシンキナーゼ阻害剤である。一部の実施形態において、EGFRアンタゴニストは、エルロチニブ(TARCEVA(商標))である。一部の実施形態において、抗癌療法剤は、(i)抗新生物剤、化学療法剤、成長阻害剤、及び細胞毒性剤からなる群から選択される薬剤、(ii)放射線療法剤、または(iii)それらの組み合わせを更に含む。

40

【0013】

上記態様のうちのいずれか1つの一部の実施形態において、患者から得られる試料中の

50

少なくとも1つの遺伝子の発現レベルは、mRNAを測定することによって決定される。一部の実施形態において、患者から得られる試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）アッセイによって決定される。一部の実施形態において、PCRアッセイは、定量的PCRアッセイである。

【0014】

上記態様のうちのいずれか1つの一部の実施形態において、患者から得られる試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルは、タンパク質を測定することによって決定される。一部の実施形態において、患者から得られる試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルは、免疫組織化学（IHC）法によって決定される。

【0015】

上記態様のうちのいずれか1つの一部の実施形態において、患者から得られる試料は、腫瘍試料である。一部の実施形態において、腫瘍試料は、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）腫瘍試料である。

【0016】

上記態様のうちのいずれか1つの一部の実施形態において、本方法は、遺伝子のうちの少なくとも2つの発現レベルを決定することを更に含む。一部の実施形態において、本方法は、遺伝子のうちの3つ全ての発現レベルを決定することを更に含む。

【0017】

上記態様のうちのいずれか1つの一部の実施形態において、FGFR3の発現レベルは、基準レベルに対して少なくとも2倍増加したことが決定されている。一部の実施形態において、FGFR3の発現レベルは、基準レベルに対して少なくとも4倍増加したことが決定されている。

【0018】

上記態様のうちのいずれか1つの一部の実施形態において、EGFRの発現レベルは、基準レベルに対して少なくとも4倍増加したことが決定されている。一部の実施形態において、EGFRの発現レベルは、基準レベルに対して少なくとも8倍増加したことが決定されている。

【0019】

上記態様のうちのいずれか1つの一部の実施形態において、本方法は、DUSB3、FRS2、TSC1、ERBB3、CDKN1A、CCND1、TP63、MMP2、ZEB2、PIK3CB、PIK3R1、MDM2、SNAI2、AXL、ZEB1、BCL2B、TSC2、RB1、FGFR32、PIK3IP1、MTOR、PIK3CA、PTEN、AKT1、BCL2A、FRS3、ERBB2、FGFR31、FGF1、SNAI1、FGFR34、FGF9、及びFGF2からなる群から選択される少なくとも1つの追加遺伝子の発現レベルを決定することを更に含み、少なくとも1つの追加遺伝子の発現レベルは、少なくとも1つの追加遺伝子の基準レベルに対して変化している。

【0020】

上記態様のうちのいずれか1つの一部の実施形態において、膀胱癌は、筋層非侵襲性膀胱癌、筋層侵襲性膀胱癌、または転移性膀胱癌である。一部の実施形態において、筋層非侵襲性膀胱癌は、再発性筋層非侵襲性膀胱癌である。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】患者に関する情報、及び実施例の節（例えば、実施例1～6）で解析された膀胱癌腫瘍標本の臨床病理学的特徴を示す表である。

【図2A-2B】図2A及び2Bは、Sjodahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12):3377-3386, 2012からの18,000遺伝子の発現に関する主成分解析（PCA）（図2A）、及び実施例の節に記載されるカスタム膀胱癌Fluidigm遺伝子発現パネルと重複する82遺伝子のみを使用するもの（例えば、表1を参照されたい）を示すグラフである（図2B）。両方の解析は、Sjodahlら（上記）に記載される膀胱癌サブタイプに属する試料の類似の分布を示す。

10

20

30

40

50

【図 2 C - 2 D】図 2 C 及び 2 D は、重心に基づく分類器との交差検証が、1, 0 0 0 遺伝子に基づく (図 2 C) 及びカスタム膀胱癌 Fluidigm 遺伝子発現パネルと重複する 8 2 遺伝子に基づく (図 2 D)、S j o d a h l ら (上記) の膀胱癌サブタイプの類似の分類精度をもたらすことを示すグラフである。図 2 A ~ 2 D に提示されるデータは、カスタム膀胱癌 Fluidigm 遺伝子発現パネルが、膀胱癌を分子的に定義されたサブタイプに正確に分類できることを示す。ラインマーカーは、明確にするためであり、データ点を示してはいない。

【図 3 A - 3 B】図 3 A 及び 3 B は、Fluidigm アッセイ性能が、ユニバーサル RNA (uRNA) 対照の入力量を減少させることにより、FGFR3 (図 3 A) 及び PIK3CA (図 3 B) に関して示されるように、RNA 入力量によって影響されなかったことを示すグラフである。

【図 3 C - 3 D】図 3 C 及び 3 D は、カスタム膀胱癌 Fluidigm 遺伝子発現パネルのラン・トゥ・ランデータ再現性が、臨床組織に関して高かったことを示すグラフである。図 3 C (HP - 5 2 7 1 9) 及び図 3 D (HP - 5 0 3 3 1) は、各々が異なる日からのラン間で > 0.98 の R^2 値を示す、2 つの代表的なホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 由来 RNA 試料を示す。

【図 3 E】カスタム膀胱癌 Fluidigm 遺伝子発現パネルの高いチップ・トゥ・チップデータ再現性を示すグラフである。

【図 4 A】Fluidigm 解析からの転写的に定義された組織クラスタ (組織) 及び同時制御遺伝子の群 (遺伝子) のヒートマップである。緑色、黄色、及び赤色の組織群は、試料の大半を含有していた。

【図 4 B】緑色、黄色、及び赤色組織クラスタ (例えば、図 4 A を参照されたい) が、明確な無疾患生存 (DFS) 可能性と関連付けられることを示すグラフである。赤色群試料は、最良の DFS プロファイルを有し (赤色対黄色: $HR = 0.54$ 、 $P = 0.03$)、緑色群試料は、最悪の DFS 可能性と関連付けられた (赤色対緑色: $HR = 0.29$ 、 $P = 0.004$)。

【図 4 C】緑色群及び赤色群が、大部分の侵襲性組織及び全ての転移を含んでいた黄色群よりも著しく高い頻度の非侵襲性試料を含んでいたことを示す、非侵襲性及び侵襲性/転移組織像のコールを示すグラフである (緑色対赤色: $P = 0.1029$ 、有意でない (NS); 緑色対黄色及び赤色対黄色: 両方の比較の場合、 $P < 0.0001$)。

【図 4 D】3 つの主要な組織クラスタにおける、微小乳頭組織像を有する腫瘍の頻度を示すグラフである。より高い頻度の微小乳頭組織像が、黄色群において観察された (緑色対赤色: $P = 0.2351$ 、NS; 緑色対黄色: $P = 0.1167$ 、NS; 赤色対黄色: $P = 0.0063$)。

【図 4 E】免疫浸潤陽性試料の有病率に関して、緑色群、赤色群、及び黄色群間で有意差がないことを示すグラフである (緑色対赤色: $P = 0.3332$ 、NS; 緑色対黄色: $P = 0.5197$ 、NS; 赤色対黄色: $P = 1$ 、NS)。

【図 4 F】3 つの群の治療頻度分布を示すグラフである。緑色群は、赤色群及び黄色群よりも重度に治療され (両方の比較の場合、 $P < 0.0001$)、赤色群及び黄色群は、同程度で治療された ($P = 0.8836$ 、NS)。治療は、カルメット・ゲラン桿菌 (BCG) ワクチン、化学療法、放射線、またはそれらの組み合わせを含んでいた。

【図 5 A】実施例 2 に記載されるカスタム膀胱癌 Fluidigm 遺伝子発現パネルによる発現解析が、緑色群、黄色群、及び赤色群により表される 3 つの主要な組織のサブセット、ならびに青色群及び紫色群により表される 2 つのマイナーなサブタイプを特定したことを示すヒートマップである。

【図 5 B】実施例 2 に記載されるカスタム膀胱癌 Fluidigm 遺伝子発現パネルによる発現解析が、異なる生態と関連付けられる 4 つの主要な遺伝子発現クラスタを特定したことを示すヒートマップである。矢印は、TP53 及び FGFR3 (ピンク色クラスタ I); ZEB1/2 のような上皮間葉転換 (EMT) 遺伝子及び PIK3CA 及び PIK3R1 等のホスホイノシチド 3 - キナーゼ (PI3K) 遺伝子 (水色クラスタ II); PT

10

20

30

40

50

EN及びAKT1等の他のPI3K遺伝子(マゼンタ色クラスタIII); ならびに線維芽細胞成長因子(FGF)リガンド及び受容体(薄茶色クラスタIV)を含む、各クラスタの代表的な遺伝子を指し示す。

【図5C】図5Aに記載される組織サブタイプが、明確な無疾患生存(DFS)可能性と関連付けられたことを示すグラフである。ラインマーカーは、明確にするためであり、データ点を示してはいない。

【図6A-6B】図6A~6Dは、(図6A)筋層非侵襲性膀胱癌、(図6B)筋層侵襲性膀胱癌、(図6C)リンパ浸潤陽性組織、及び(図6D)微小乳頭組織像を有する膀胱腫瘍の組織学的特徴を示す、代表的なヘマトキシリン&エオシン(H&E)で染色された部分である。スケールバーは、100µmを示す。

10

【図6C-6D】図6A~6Dは、(図6A)筋層非侵襲性膀胱癌、(図6B)筋層侵襲性膀胱癌、(図6C)リンパ浸潤陽性組織、及び(図6D)微小乳頭組織像を有する膀胱腫瘍の組織学的特徴を示す、代表的なヘマトキシリン&エオシン(H&E)で染色された部分である。スケールバーは、100µmを示す。

【図7A】緑色群、赤色群、及び黄色群の標本に関するFGFR3突然変異状態、FGFR3免疫組織化学(IHC)、及び組織病理学コールを示すカラーマップである。

【図7B】FGFR3転写レベルが、Fluidigm遺伝子発現解析によって決定される通り、野生型(WT)試料($P < 0.0001$)と比較して、突然変異体(MT)においてより高かったことを示すグラフである。

【図7C】IHCによって測定される通り、FGFR3突然変異体試料が、野生型組織より高いレベルのタンパク質を発現したことを示すグラフである($P < 0.0001$)。

20

【図7D】FGFR3突然変異率が、赤色群及び侵襲性/転移性黄色群の両方と比較して、緑色群において著しく高かったことを示すグラフである(両方の比較の場合、 $P < 0.0001$)。

【図7E】緑色群の試料が、赤色群及び黄色群の試料よりも著しく高いFGFR3転写レベルを発現したことを示すグラフである(両方の比較の場合、 $P < 0.0001$)。

【図7F】IHCによるFGFR3タンパク質レベルが、赤色群よりも緑色群において高く、黄色群において最低であったことを示すグラフである(緑色対赤色: $P = 0.0343$; 赤色対黄色: $P < 0.0001$)。

【図7G】非侵襲性、侵襲性、及び膀胱癌転移におけるFGFR3発現を示す一連の円グラフである。高タンパク質レベルのFGFR3(IHC 2+/3+)が、66%、32%、及び33%の例でそれぞれ観察された。

30

【図7H】FGFR3-高侵襲性及び低侵襲性腫瘍ならびに膀胱癌転移を有する患者の3年または5年DFS率を示す一連のグラフであり、両方の状況の高発現腫瘍において低いDFS率を明示する(発現カットオフ=50パーセントイル)。

【図7I】3年及び5年における全生存(OS)率が、FGFR3低発現例よりも高発現例において低いことを示す一連のグラフである(発現カットオフ=25パーセントイル; 高FGFR3、 $N = 15$; 低FGFR3、 $N = 24$)。

【図7J】Kim et al. Mol. Cancer 9:3, 2010からの一般に入手可能なデータセットの解析を示し、 Kaplan-Meierプロット(左パネル)ならびに3年及び5年OS率(右パネル)の両方によって、高(「hi」)レベル対低(「lo」)レベルのFGFR3を発現する進行した膀胱癌を有する患者の著しく不良なOSプロファイルを示す(発現カットオフ=75パーセントイル; 高FGFR3、 $N = 10$; 低FGFR3、 $N = 52$)。

40

【図8】INGENUITY(登録商標)ソフトウェア(Qiagen, Redwood City, CA)解析が、p53、PI3K-AKT、EMT、及びERBB、及びFGFR3経路を、非侵襲性の急速に再発する緑色群と、侵襲性の低い赤色群との間で異なって発現されるものとして特定したことを示すグラフである。緑色群と赤色群との間で著しく差次的に発現された45/96遺伝子($P < 0.05$ 、多重試験補正を用いる)を、解析のための入力として使用した。

50

【図9A】緑色群、黄色群、及び赤色群からの試料において、Fluidigm解析(MutMap、Schleifman et al. PLoS One 9:e90761, 2014を参照されたい)によって決定される、次世代シーケンシング(NGS)結果及び突然変異状態のカラーマップである。検証された突然変異は、NGS及びMutMapの両方によって特定されたものであった。

【図9B】は、緑色群、赤色群、及び黄色群の試料においてNGSにより特定されたTP53突然変異を示すTP53遺伝子の概略図(ロリポッププロット)である。色付きのボックスは、組織群の割り当てを示す。類似の番号を有するボックスは、同じ試料中で同時検出された突然変異を指し示す。大部分の突然変異は、DNA結合ドメイン内に密集し、重複していない。

【図9C】良性の赤色群と比較して、急速に再発する緑色群において著しく高いTP53突然変異率が存在したことを示すグラフである($P = 0.03$)。TP53突然変異頻度は、赤色群と黄色群、または緑色群と黄色群との間で著しく異ならなかった($P = 0.1227$ 、NS; 及び $P = 0.3605$ 、NS)。

【図9D】TP53の発現レベルが、Fluidigm遺伝子発現解析によって決定される通り、赤色群及び黄色群の両方と比較して、緑色群において高かったことを示すグラフである(それぞれ $P = 0.0187$ 及び $P = 0.0020$)。

【図9E】TP53転写標的p21の発現レベルが、Fluidigm遺伝子発現解析によって決定される通り、赤色群及び黄色群の両方と比較して、緑色群において著しく高かったことを示すグラフである(両方の比較の場合、 $P < 0.0001$)。

【図9F】突然変異体TP53試料が、IHCによって決定される通り、野生型例よりも高いレベルのTP53タンパク質を発現したことを示すグラフである($P = 0.0201$)。

【図9G】実施例1に記載される膀胱癌群全体からの高TP53例及び低TP53例に関して類似のDFSプロファイルを示す Kaplan-Meierプロットである(全腫瘍病期; $P = 0.4218$; 高TP53、 $N = 53$; 低TP53、 $N = 73$)。Hi、高い; Lo、低い。

【図9H】非侵襲性腫瘍において、高いTP53発現が、不良なDFS可能性に向かう傾向と関連付けられることを示す Kaplan-Meierプロットである($HR = 1.99$; $P = 0.1292$)。

【図9I】非侵襲性腫瘍状況において、高いTP53発現が、BCG治療された患者における著しく不良なDFS可能性と関連付けられることを示す Kaplan-Meierプロットである($HR = 4.2$; $P = 0.0405$)。

【図9J】非侵襲性腫瘍における高いTP53発現が、治療を受けなかった患者の不良なDFS可能性と関連付けられないことを示す Kaplan-Meierプロットである($HR = 0.57$; $P = 0.5749$)。

【図10】膀胱癌標本のサブセットにおけるERBB経路リガンド及び受容体発現、ならびに同じ試料中の重要経路における重複する突然変異及びコピー数変更のFluidigm解析のカラーマップである。ERBB受容体及びリガンドの発現解析、突然変異解析、及びコピー数解析を、カスタムFluidigmパネル上で実行した(Schleifman et al. PLoS One 9:e90761, 2014)。Fluidigm突然変異解析の場合: 暗灰色の棒、突然変異体; 中灰色の棒、技術的理由からコールなし; 白色の棒、該当なし; 明灰色の棒、野生型。Fluidigm DNAコピー数解析の場合: 暗灰色の棒、DNAコピー数増加; 中灰色の棒、技術的理由からコールなし; 明灰色の棒、DNAコピー数変化なし; 白色の棒、該当なし。

【図11A】EGFRが、Fluidigmによって決定される通り、赤色群及び黄色群の両方と比較して、緑色群において著しく高いレベルで発現されたことを示すグラフである(それぞれ $P = 0.012$ 及び $P = 0.0012$)。

【図11B】非侵襲性膀胱癌腫瘍において、高いEGFR発現レベルが、低減した3年及び5年DFS率と関連付けられたことを示すグラフである(発現カットオフ = 25パーセ

10

20

30

40

50

ンタイル、高EGFR、N = 22；低EGFR、N = 66)。

【図11C】高いEGFR発現レベルが、膀胱癌転移を有する患者の低減したDFS率と関連付けられたことを示すグラフである(発現カットオフ = 25パーセントイル；高EGFR、N = 6；低EGFR、N = 4)。

【図11D】膀胱癌転移を有する患者において、高いEGFR発現レベルが、より低い3年及び5年OS率と関連付けられたことを示すグラフである(発現カットオフ = 50パーセントイル；高EGFR、N = 3；低EGFR、N = 7)。

【図11E】Sjodahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12): 3377-3386, 2012からの独立データセットの解析を示すグラフである。このグラフは、高いEGFR発現が、不良な3年及び5年OS頻度と関連付けられたことを示す(発現カットオフ = 50パーセントイル；高EGFR、N = 23；低EGFR、N = 28)。

10

【図11F】Kim et al. Mol. Cancer 9:3, 2010からの独立データセットの解析を示すグラフである。このグラフは、高いEGFR発現が、3年及び5年における低いOS率と関連付けられることを示す(発現カットオフ = 25パーセントイル；高EGFR、N = 48；低EGFR、N = 14)。

【図11G】EGFR阻害剤エルロチニブ(TARCEVA(商標))による膀胱癌細胞株の治療が、25%超の成長阻害(GI)を示す3つの感受性細胞株(UMUC5、UMUC10、及びUMUC17)、ならびに治療に応答して25%未満のGIを示す4つの耐性細胞株(RT112、UMUC3、SW780、及びBFTC905)を特定したことを示すグラフである。

20

【図11H】EGFRが、治療に応答して最小のGIを示す細胞株よりも、エルロチニブ(TARCEVA(商標))に感受性である膀胱癌細胞株(25%超のGI)において、著しく高いレベルで発現されることを示すグラフである(P = 0.0106)。

【図12A】実施例1(例えば、表1)に記載されるカスタム膀胱癌Fluidigm遺伝子発現パネルを含む遺伝子を示すベン図であり、INGENUITY(登録商標)解析に基づく3つの主要経路群、すなわち(1)FGFR、RTK、MAPK、及びPI3K経路；(2)発達及び上皮間葉転換(EMT)軸；ならびに(3)TP53、ゲノム安定性、及び細胞周期制御ネットワークに属する重複及び固有遺伝子を示す。数字は、ベン図の各部分における固有の遺伝子の数に対応する。

30

【図12B】Sjodahlら(上記)によって定義される通り、大きな公開データセットからの試料の無監督の階層クラスタリングの結果、ならびに対応する腫瘍悪性度、病期、及び分子クラスを示すグラフである。

【図12C】カスタム膀胱癌Fluidigm遺伝子発現パネルに対応するプローブと比較して、減少数のIlluminaプローブに基づく、Sjodahlら(上記)データセットからの腫瘍に関する相互検証された誤分類誤差曲線を示す一連のグラフである。各グラフは、総遺伝子のサブセットと共に最近収縮重心分類器を使用して、腫瘍悪性度、TNM病期、または分子クラスの予測を試みる間に生じた分類誤差の量を示す。遺伝子の数は、下x軸に示される対応する「収縮因子」と共に上x軸に沿って示される。

40

【図12D】カスタム膀胱癌Fluidigm遺伝子発現パネルの遺伝子に対応するプローブからのシグナル、及び対応する公開された基底/管腔状態に基づく4つの公開データセットからの試料の無監督の階層クラスタリングを示す一連のグラフである(Damrauer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111:3110-3115, 2014)。

【図13A】増加量の入力量のユニバーサルRNA(uRNA)対照に関して、6つの代表的なアッセイの線形性能及びそれらの原CT値を示す一連のグラフである。

【図13B】異なる日に実行された2つの代表的なFFPE由来RNA試料に関して見られる通り、アーカイブFFPE組織に関するラン・トゥ・ランデータを示す一連のグラフである。

【図14A】公開データセットからの遺伝子及び試料、ならびに実施例1及び図1に記載

50

される膀胱癌 F F P E 組織群からの N M I B C、M I B C、及び転移 (M E T) の無監督のクラスタリングの結果を示すヒートマップである。白色ブロックは、それぞれのデータセットにおいて見出されない遺伝子を表す。

【図 1 4 B】D a m r a u e r ら (上記) の発見試料から計算された膀胱癌パネル遺伝子の基底プロファイル (赤色の棒) 及び管腔プロファイル (青色の棒) を示すグラフである。平均中心及び単位分散正規化を、ログ変換された発現値に適用し、平均ログ正規化発現レベルを、基底及び管腔試料群に関して独立して計算して、最終プロファイルを形成した。

【図 1 4 C】公開データからの基底 / 管腔サインを演算処理し、次いでこれらのサインを膀胱癌パネルデータに適用して、試料の基底 / 管腔類似性を測定するために使用される方法論を示す図である。

【図 1 5 A】膀胱癌パネル遺伝子発現ならびに癌関連遺伝子の対応する B / L スコア、組織像、及び突然変異状態に基づく、204 の F F P E 試料 (実施例 1 及び図 1 を参照されたい) の無監督の階層クラスタリング (平均連結法、1 - ピアソン相関距離メトリック) の結果を示す。追加の詳細については、実施例 6 を参照されたい。

【図 1 5 B - 1 5 C】図 1 5 B ~ 1 5 E は、図 1 5 A における転写的に定義された管腔及び基底クラスタからの試料中の、B / L スコアの統計解析 (図 1 5 B)、N M I B C、M I B C、及び M E T の分布 (図 1 5 C)、F G F R 3 突然変異の有病率 (図 1 5 D)、及び F G F R 3 I H C スコア (図 1 5 E) を示すグラフである。

【図 1 5 D - 1 5 E】図 1 5 B ~ 1 5 E は、図 1 5 A における転写的に定義された管腔及び基底クラスタからの試料中の、B / L スコアの統計解析 (図 1 5 B)、N M I B C、M I B C、及び M E T の分布 (図 1 5 C)、F G F R 3 突然変異の有病率 (図 1 5 D)、及び F G F R 3 I H C スコア (図 1 5 E) を示すグラフである。

【図 1 5 F】図 1 5 A において管腔試料と基底試料との間で著しく差次的に発現された遺伝子の発現に基づく、I N G E N U I T Y (登録商標) 経路活性化スコアを示す。

【図 1 6 A】同じ患者からの原発腫瘍における B / L スコア (X 軸) と、マッチさせた転移における対応する B / L スコア (Y 軸) との間の相関プロットを示すグラフである。ドットの色は、S N P 遺伝子型判定に基づいて同じ患者にマッチさせた試料の有意性を反映する。L o g 1 0 (p 値) = - 4 (P = 0 . 0 0 0 1)、L o g 1 0 (p 値) = - 3 (P = 0 . 0 0 1)、及び L o g 1 0 (p 値) = - 2 (P = 0 . 0 1)。点線は、95% 信頼区間を表し、それを超えて、転移及び原発試料 B / L スコアは、0 . 0 5 の p 値において異なる。

【図 1 6 B】マッチさせた対における B / L 状況の相違に関して、原発腫瘍 (「 p r i 」)、マッチさせた転移 (「 m e t 」) の B / L スコア、及び対応する p 値を示す表である。

【図 1 7 A - 1 7 B】図 1 7 A 及び 1 7 B は、F F P E 組織内の 2 つの群間で著しく差次的に発現された遺伝子に基づいて、基底試料との比較で管腔内のエストロゲン受容体の予測的活性化を示す I N G E N U I T Y (登録商標) 解析の結果を表す図である。

【図 1 8】少なくとも 100 倍の読み取り範囲及び 10% 超の頻度で全ての変異型部位における対立遺伝子頻度を比較する、次世代シーケンシング (N G S) A M P L I S E Q (商標) データを使用するピアソン相関マトリックスである (平均して、120 部位を任意の 2 つの試料間で比較した)。

【発明を実施するための形態】

【0022】

I . 序文

本発明は、癌、例えば、膀胱癌のための治療、診断、及び予後判定方法ならびに組成物を提供する。本発明は、F G F R 3、T P 5 3、及び / または E G F R を含む、表 1 に記載の遺伝子の少なくとも 1 つの発現レベル (例えば、基準試料に対して変化した発現レベル) の決定が、癌に罹患している患者を治療するため、癌に罹患している患者の予後を決定するため、癌を有する患者が抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかを決

10

20

30

40

50

定するため、及び/または癌を有する患者に対する抗癌療法剤の治療効果を最適化するために有用であるという発見に基づいている。一部の実施形態において、次いで、抗癌療法剤が患者に対して選択され得、更に、抗癌療法剤は、任意選択で患者に投与され得る。

【0023】

II. 定義

「発現レベル」、「発現のレベル」、または「レベル」は、交換可能に使用され、概して、生物試料中のポリヌクレオチド（例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）またはアミノ酸産生物若しくはタンパク質の量を指す。「発現」は、概して、遺伝子コードされた情報が、細胞内に存在し、作動する構造体内に転換されるプロセスを指す。したがって、本発明によると、遺伝子の「発現」は、ポリヌクレオチド（例えば、mRNA）への転写、ポリペプチド（例えば、タンパク質）への翻訳、または更にポリペプチドの翻訳後修飾を指し得る。転写されたポリヌクレオチドの断片、翻訳されたポリペプチド、または翻訳後修飾されたポリペプチドも、それらが、代替的なスプライシングにより生成された転写産物若しくは劣化した転写産物、または例えば、タンパク質分解によるタンパク質の翻訳後処理を起源とするかどうかにかかわらず、発現されたと見なされよう。「発現遺伝子」には、mRNAとしてポリヌクレオチドへと転写され、次いでタンパク質へと翻訳されるものと、また、RNAへと転写されるがタンパク質へと翻訳されないもの（例えば、トランスファーRNA及びリボソームRNA）とが含まれる。

10

【0024】

「マーカー」及び「バイオマーカー」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、DNA、RNA、タンパク質、炭水化物、または糖脂質系分子マーカーを指し、対象または患者の試料におけるその発現または存在は、標準方法（または本明細書に開示される方法）によって検出され得、例えば、患者における膀胱癌を診断するため、膀胱癌に罹患している患者の予後を決定するため、膀胱癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかを決定するため、膀胱癌を有する抗癌患者の治療効果を最適化するため、及び/またはかかるマーカーの発現レベルを決定することを必要とする治療方法において有用である。かかるバイオマーカーには、表1に記載される遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態において、遺伝子は、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの一つ以上であり得る。一部の実施形態において、遺伝子は、FGFR3である。一部の実施形態において、遺伝子は、TP53である。一部の実施形態において、遺伝子は、EGFRである。他の実施形態において、遺伝子（複数可）は、DUSB3、FRS2、TSC1、ERBB3、CDKN1A、CCND1、TP63、MMP2、ZEB2、PIK3CB、PIK3R1、MDM2、SNAI2、AXL、ZEB1、BCL2B、TSC2、RB1、FGFR32、PIK3IP1、MTOR、PIK3CA、PTEN、AKT1、BCL2A、FRS3、ERBB2、FGFR31、FGF1、SNAI1、FGFR34、FGF9、またはFGF2から選択されてもよい。かかるバイオマーカーの発現は、患者から得られる試料中で基準レベルよりも高いか、または低いかを決定することができる。少なくとも一つの遺伝子の基準発現レベルを超えるか、またはそれより低い発現レベルを有する個体は、膀胱癌に罹患している対象/患者として、特定の予後（例えば、良好な予後若しくは不良な予後）を有する患者として、または抗癌療法剤での治療に応答する可能性がある者として特定され得る。

20

30

40

【0025】

ある特定の実施形態において、本明細書における「基準レベル」という用語は、既定値を指す。熟練者であれば理解するであろう通り、基準レベルは既定され、例えば、特異性及び/または感受性に関する要件を満たすように設定されている。これらの要件は、例えば、規制機関ごとに異なり得る。例えば、アッセイの感受性または特異性はそれぞれ、ある特定の制限、例えば、80%、90%、95%、または99%に設定される必要があり得る。これらの要件は、正または負の予測値に関して定義されてもよい。それにも関わらず、本発明において付与される教示に基づいて、それらの要件を満たす基準レベルに達することが常に可能となるであろう。一実施形態において、基準レベルは、健康な個体にお

50

いて決定される。一実施形態において、この基準レベルは、患者が属する疾病単位（例えば、膀胱癌等の癌タイプ、または膀胱癌のサブタイプ）において規定されていた。ある特定の実施形態において、基準レベルは、調査される疾病単位における値の全体分布の20～95パーセントイルの間の任意のパーセントイル（例えば、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95パーセントイル）に設定され得る。特定の実施形態において、基準レベルは、調査される疾病単位における値の全体分布の25パーセントイルに設定される。他の特定の実施形態において、基準レベルは、調査される疾病単位における値の全体分布の50パーセントイルに設定される。他の実施形態において、基準レベルは、例えば、調査される疾病単位における、または所与の集団における値の全体分布から決定されるメジアン、三分位値、四分位値、または五分位値に設定され得る。他の実施形態において、基準レベルは、調査される疾病単位における、または所与の集団における値の全体分布から決定される平均に設定され得る。

10

【0026】

ある特定の実施形態において、「増加」または「より上」という用語は、基準レベルでのレベルを指すか、または基準試料からのレベルと比較して、本明細書に記載される方法によって検出されるマーカー（例えば、FGFR3、TP53、若しくはEGFR）のレベルにおいて、5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、若しくはそれ以上の全体増加を指す。

20

【0027】

ある特定の実施形態において、「減少」または「より下」という用語は、基準レベルより下のレベルを指すか、または基準試料からのレベルと比較して、本明細書に記載される方法によって検出されるマーカー（例えば、FGFR3、TP53、若しくはEGFR）のレベルにおいて、5%、10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、若しくはそれ以上の全体低減を指す。

【0028】

ある特定の実施形態において、「基準レベルで」という用語は、基準試料からの、本明細書に記載される方法によって検出されるレベルと同じであるマーカー（例えば、FGFR3、TP53、及び/またはEGFR）のレベルを指す。

30

【0029】

「診断」という用語は、分子的または病理学的状態、疾患、または病態（例えば、膀胱癌を含む癌）の特定または分類を指すために本明細書で使用される。例えば、「診断」は、特定タイプの癌の特定を指し得る。「診断」はまた、例えば、病理組織学的基準による、または分子的特徴による、特定のサブタイプの癌の分類（例えば、バイオマーカー（例えば、特定の遺伝子または該遺伝子によってコードされるタンパク質）のうちの1つまたは組み合わせの発現によって特徴付けられるサブタイプ）を指す場合もある。一部の実施形態において、癌のサブタイプは、筋層非侵襲性膀胱癌（NMIBC；T0、T1）、筋層侵襲性膀胱癌（MIBC；T2、T3）、または転移性膀胱癌であり得る。

40

【0030】

治療または療法剤、例えば、有効量の抗癌療法剤（例えば、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、及び/若しくはEGFRアンタゴニストを含む抗癌療法剤）を含む治療に対する患者の「応答」または患者の「応答性」は、治療から、または治療の結果として、癌（例えば、膀胱癌）の危険性があるか、またはそれを有する患者に付与される臨床的または治療的利益を指す。かかる利益には、細胞または生物学的応答、完全応答、部分応答、安定した疾患（進行若しくは再発がない）、またはアンタゴニストでの治療から、または治療の結果として患者の晩期再発を伴う応答が含まれ得る。熟練者であれば、患者が応答性であるかどうかを決定するような立場に容易に置かれるであろう。例え

50

ば、膀胱癌に関して、応答は、膀胱癌による苦痛の減少、例えば、減退した及び/または停止した腫瘍増殖、腫瘍のサイズの低減、及び/または膀胱癌の1つ以上の症状の改善、例えば、血尿（血尿症）、排尿の変化、他の泌尿器症状、腰痛、または骨盤痛によって反映され得る。一部の実施形態において、応答は、癌の転移性変換の指標または癌の指標の減少または減退、例えば、転移の形成の予防または転移の数若しくはサイズの低減によって反映され得る。例えば、応答は、基準レベルに対して増加レベルまたは減少レベルの、表1に記載されるバイオマーカー（FGFR3、TP53、及びEGFR）のうちの1つを発現していると診断された患者における、低減した腫瘍サイズ、無疾患生存、無進行生存、または全生存であり得る。

【0031】

「試料」及び「生物試料」という用語は、体液、体組織（例えば、腫瘍組織）、細胞、または他の源を含む個体から得られた任意の生物試料を指すために交換可能に使用される。体液は、例えば、リンパ、血清、全生血、末梢血単核細胞、凍結された全血、血漿（生または凍結を含む）、尿、唾液、精液、滑液、及び髄液である。試料には、乳房組織、腎組織、結腸組織、脳組織、筋組織、滑膜組織、皮膚、毛包、骨髄、及び腫瘍組織も含まれる。哺乳動物からの組織生検標本及び体液の入手方法は、当該技術分野において周知である。

【0032】

本明細書における「腫瘍試料」は、患者の腫瘍に由来するかまたはその腫瘍細胞を含む試料である。本明細書における腫瘍試料の例には、腫瘍生検標本、循環腫瘍細胞、循環血漿タンパク質、腹水、腫瘍に由来するかまたは腫瘍の様な特性を示す初代細胞培養物または細胞株、ならびにホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍試料または凍結腫瘍試料等の保管された腫瘍試料が含まれるが、これらに限定されない。

【0033】

関心対象のポリペプチドの「アンタゴニスト」（交換可能に「阻害剤」と呼ばれる）は、関心対象のポリペプチドの活性化または機能を干渉する、例えば、関心対象のポリペプチドによって媒介される生物活性を部分的にまたは完全に遮断、阻害、または中和する薬剤である。例えば、ポリペプチドXのアンタゴニストは、ポリペプチドXによって媒介される生物活性を部分的にまたは完全に遮断、阻害、または中和する任意の分子を指す。阻害剤の例には、抗体、リガンド抗体、小分子アンタゴニスト、アンチセンス、及び阻害性RNA（例えば、shRNA）分子が含まれる。好ましくは、阻害剤は、関心対象のポリペプチドに結合する抗体または小分子である。特定の実施形態において、阻害剤は、約1,000 nM以下の関心対象のポリペプチドに対する結合親和性（解離定数）を有する。別の実施形態において、阻害剤は、約100 nM以下の関心対象のポリペプチドに対する結合親和性を有する。別の実施形態において、阻害剤は、約50 nM以下の関心対象のポリペプチドに対する結合親和性を有する。特定の実施形態において、阻害剤は、関心対象のポリペプチドに共有結合される。特定の実施形態において、阻害剤は、1,000 nM以下の最大半量阻害濃度（IC50）で関心対象のポリペプチドのシグナル伝達を阻害する。別の実施形態において、阻害剤は、500 nM以下のIC50で関心対象のポリペプチドのシグナル伝達を阻害する。別の実施形態において、阻害剤は、50 nM以下のIC50で関心対象のポリペプチドのシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態において、アンタゴニストは、関心対象のポリペプチドの発現レベルまたは生物活性を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、またはそれ以上低減するか、または阻害する。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、FGFR3またはFGFR3のリガンドである。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、EGFRまたはFGFR3のリガンドである。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、TP53である。

【0034】

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、別途指定されない限り、霊長類（例えば、ヒト）及び齧歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む、任意の

10

20

30

40

50

脊椎動物源由来の関心対象の任意の天然ポリペプチド（例えば、タンパク質）を指す。この用語は、「完全長」未処理のポリペプチド、ならびに細胞内の処理から生じるポリペプチドの任意の形態を包含する。この用語は、ポリペプチドの天然に存在する変異型、例えば、スプライス変異型または対立遺伝子変異型も包含する。一部の実施形態において、ポリペプチドは、F G F R 3である。他の実施形態において、ポリペプチドは、T P 5 3である。他の実施形態において、ポリペプチドは、E G F Rである。

【 0 0 3 5 】

本明細書で交換可能に用いられる、「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNA及びRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド若しくは塩基、及び/またはそれらの類似体、あるいはDNAまたはRNAポリメラーゼによりポリマーに組み込むことができる任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体等の修飾ヌクレオチドを含んでよい。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーの組み立て前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分により中断され得る。ポリヌクレオチドは、例えば標識との複合により、合成後に更に修飾され得る。他のタイプの修飾には、例えば、天然に存在するヌクレオチドのうちの一つ以上を類似体と置換する「キャップ」、ヌクレオチド間修飾、例えば、非電荷性結合（例えば、メチルホスホン酸塩、ホスホトリエステル、ホスホアミデート、カルバメート等）によるもの、及び電荷性結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート等）によるもの、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リシン等）の懸垂部分を含むもの、挿入剤（例えば、アクリジン、ソラーレン等）によるもの、キレート剤（例えば、金属、放射活性金属、ホウ素、酸化金属等）を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾結合（例えば、アノマー核酸等）によるもの、ならびにポリヌクレオチド（複数可）の未修飾形態が含まれる。更に、糖内に通常存在するヒドロキシル基のうちの一つは、例えば、ホスホン酸基、リン酸基により置換されるか、標準保護基により保護されるか、若しくは活性化されて追加のヌクレオチドへの追加の結合を調製し得るか、または固体若しくは半固体支持体に複合されてもよい。5'及び3'末端OHをリン酸化するか、またはアミン若しくは1~20個の炭素原子の有機キャッピング基部分と置換することができる。他のヒドロキシルは、標準保護基に誘導体化されてもよい。ポリヌクレオチドには、一般に当該技術分野において既知のリボースまたはデオキシリボース糖の類似形態を含むこともでき、例えば、2'-O-メチル-、2'-O-アシル、2'-フルオロ-または2'-アジド-リボース、炭素環式糖類似体、-アノマー糖、エピマー糖、例えば、アラビノース、キシロース、またはリキソース、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環式類似体、及び脱塩基ヌクレオチド類似体、例えば、メチルリボシドも含まれる。1つ以上のホスホジエステル結合は、代替連結基に置き換えられてもよい。これらの代替連結基には、限定されないが、リン酸塩がP(O)S（「チオエート」）、P(S)S（「ジチオエート」）、(O)NR₂（「アミデート」）、P(O)R、P(O)OR、COまたはCH₂（「ホルムアセタール」）に置き換えられる実施形態が含まれ、各RまたはR'は、独立してHであるか、または置換若しくは非置換アルキル（1-20C）（任意にエーテル（-O-）結合を含む）、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、またはアラジルである。ポリヌクレオチド内のすべての結合が同一である必要はない。前述の説明は、RNA及びDNAを含む、本明細書で言及される全てのポリヌクレオチドに適用する。

【 0 0 3 6 】

「小分子」という用語は、約2000ダルトン以下、好ましくは約500ダルトン以下の分子量を有する任意の分子を指す。

【 0 0 3 7 】

「抗体」という用語は、本明細書で最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重

10

20

30

40

50

特異性抗体)、及び抗体断片を含むが、これらに限定されない、種々の抗体構造を包含する。

【0038】

「関心対象の抗ポリペプチド抗体」及び関心対象のポリペプチド「に結合する抗体」という用語は、その抗体が診断剤及び/または療法剤として関心対象のポリペプチドを標的とすることに有用となるような十分な親和性で関心対象のポリペプチドに結合することができる抗体を指す。一実施形態において、関心対象のタンパク質の無関係の非ポリペプチドへの関心対象の抗ポリペプチド抗体の結合の程度は、例えば、放射免疫測定法(RIA)によって測定した場合に、関心対象のポリペプチドへの抗体の結合の約10%未満である。ある特定の実施形態において、関心対象のポリペプチドに結合する抗体は、 $1\mu\text{M}$ 、 100nM 、 10nM 、 1nM 、 0.1nM 、 0.01nM 、または 0.001nM (例えば、 10^{-8}M 以下、例えば、 $10^{-8}\text{M}\sim 10^{-13}\text{M}$ 、例えば、 $10^{-9}\text{M}\sim 10^{-13}\text{M}$)の解離定数(Kd)を有する。ある特定の実施形態では、関心対象の抗ポリペプチド抗体は、異なる種に由来する関心対象のポリペプチド間で保存されている関心対象のポリペプチドのエピトープに結合する。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、FGFR3である。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、EGFRである。一部の実施形態において、関心対象のポリペプチドは、TP53である。

10

【0039】

「遮断抗体」または「アンタゴニスト抗体」は、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害または低減するものである。好ましい遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を実質的にまたは完全に阻害する。

20

【0040】

「親和性」は、分子(例えば、抗体)の単一の結合部位とその結合パートナー(例えば、抗原)との間の、非共有性相互作用の総和の強度を指す。別途指定されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば、抗体及び抗原)間の1:1の相互作用を反映する、本来の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、一般に解離定数(Kd)によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含む、当該技術分野において既知の一般的な方法によって測定することができる。

30

【0041】

「抗体断片」は、無傷抗体が結合する抗原に結合する、無傷抗体の一部を含む無傷抗体以外の分子を指す。「機能的断片」は、完全長抗体の機能を維持する抗体断片である。抗体断片の例には、Fv、Fab、Fab、Fab-SH、F(ab)₂;二重特異性抗体;線状抗体(LINEAR ANTIBODIES);一本鎖抗体分子(例えば、scFv);及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【0042】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び/または軽鎖の一部が特定の源または種に由来し、重鎖及び/または軽鎖の残りの部分が異なる源または種に由来する抗体を指す。

40

【0043】

「完全長抗体」、「無傷抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書において、天然抗体構造と実質的に類似する構造を有するか、またはFc領域を含む重鎖を有する抗体を指すために交換可能に使用される。

【0044】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指す。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、同一であり、かつ/または同じエピトープに結合するが、例えば、自然発生突然変異を含有する、またはモノクローナル抗体調製物の産生中に発生する、想定される変異型抗体を除いて、かかる変異形は一般に少量で存在する。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典

50

型的に含む、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象とする。したがって、「モノクローナル」という修飾語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体の特徴を示しており、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、組み換えDNA法、ファージディスプレイ法、及びヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法、例えば、モノクローナル抗体を作製するためのかかる方法及び他の例示的な方法を含むが、これらに限定されない、多様な技法によって作製されてもよい。

【0045】

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生された、またはヒト抗体レパトリーを利用する非ヒト源に由来する、抗体のアミノ酸配列、または他のヒト抗体コード配列に対応する、アミノ酸配列を保有するものである。このヒト抗体の定義は、具体的に、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

【0046】

「ヒト化」抗体は、非ヒト超可変領域(HVR)由来のアミノ酸残基及びヒトフレームワーク(FR)由来のアミノ酸残基を含む、キメラ抗体を指す。ある特定の実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、そのHVR(例えば、相補性決定領域(CDR))の全てまたは実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、そのFRの全てまたは実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意に、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでもよい。抗体、例えば非ヒト抗体の、「ヒト化形態」は、ヒト化を経た抗体を指す。

【0047】

「免疫複合体」は、細胞毒性剤を含むが、これに限定されない1つ以上の異種性分子(複数可)に複合される抗体である。

【0048】

本明細書で使用される「線維芽細胞成長因子受容体3」及び「FGFR3」という用語は、別途指定されない限り、霊長類(例えば、ヒト)及び齧歯類(例えば、マウス及びラット)等の哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源由来の任意の天然FGFR3を指す。この用語は、「完全長」未処理のFGFR3、ならびに細胞内の処理から生じるFGFR3の任意の形態を包含する。この用語は、FGFR3の天然に存在する変異型、例えば、スプライス変異型または対立遺伝子変異型も包含する。ヒトFGFR3ポリペプチドの例示的な野生型配列は、P22607-1またはP22607-2のUniProtデータベースからのアミノ酸配列を含む。

【0049】

本明細書で使用される場合、「FGFR3アンタゴニスト」及び「FGFR3阻害剤」という用語は、現在当該技術分野において既知であるか、または今後特定されるであろう任意のFGFR3アンタゴニストを指し、患者への投与時に、他の方法でその天然リガンドのFGFR3への結合から生じる下流生物学的作用のうちのいずれかを含む、患者におけるFGFR3の活性化と関連付けられる生物活性の阻害をもたらす任意の化学実体を含む。かかるFGFR3アンタゴニストには、FGFR3活性化、または患者における癌の治療に関連するFGFR3活性化の下流生物学的作用のうちのいずれかを遮断することができる任意の薬剤が含まれる。かかるアンタゴニストは、受容体の細胞内ドメインに直接結合し、そのキナーゼ活性を阻害することによって作用することができる。代替として、かかるアンタゴニストは、FGFR3受容体のリガンド結合部位またはその一部分を占拠することによって作用することができ、それにより、受容体をその天然リガンドにアクセスできないようにして、その正常な生物活性が予防または低減される。代替として、かかるアンタゴニストは、FGFR3ポリペプチドの二量体化、若しくはFGFR3ポリペプチドと他のタンパク質との相互作用を調整することによって作用し得るか、またはFGF

10

20

30

40

50

R3のユビキチン化及びエンドサイトーシス分解を強化し得る。FGFR3アンタゴニストには、小分子阻害剤、抗体または抗体断片、アンチセンス構築体、小阻害性RNA（すなわち、dsRNAによるRNA干渉；RNAi）、及びリボザイムが含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、FGFR3アンタゴニストは、ヒトFGFR3に特異的に結合する小分子または抗体である。例示的なFGFR3アンタゴニスト抗体は、例えば、米国特許第8,410,250号に記載され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、米国特許第8,410,250号は、FGFR3アンタゴニスト抗体クローン184.6、184.6.1、及び184.6.1N54Sを説明している（これらのクローンは、「R3 Mab」とも称される）。

【0050】

「上皮成長因子受容体（EGFR）」、「ErbB1」、「HER1」、及び「EGFRキナーゼ」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、例えば、Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56:881-914 (1987)に開示される通りEGFRと称され、その天然に存在する突然変異体形態を含む（例えば、Humphrey et al. PNAS (USA) 87:4207-4211 (1990)にあるような欠失突然変異体EGFR）。EGFRまたはERBB1は、EGFRタンパク質産物をコードする遺伝子を指す。例示的なヒトEGFRタンパク質のアミノ酸配列は、例えば、UniProt受入番号P00533で見出され得る。

【0051】

本明細書で使用される場合、「EGFRアンタゴニスト」及び「EGFR阻害剤」という用語は、現在当該技術分野において既知であるか、または今後特定されるであろう任意のEGFRアンタゴニストを指し、患者への投与時に、他の方法でその天然リガンドのEGFRへの結合から生じる下流生物学的作用のうちのいずれかを含む、患者におけるEGFR受容体の活性化と関連付けられる生物活性の阻害をもたらす任意の化学実体を含む。かかるEGFRアンタゴニストには、EGFR活性化、または患者における癌の治療に関連するEGFR活性化の下流生物学的作用のうちのいずれかを遮断することができる任意の薬剤が含まれる。かかるアンタゴニストは、受容体の細胞内ドメインに直接結合し、そのキナーゼ活性を阻害することによって作用することができる。代替として、かかるアンタゴニストは、EGFR受容体のリガンド結合部位またはその一部分を占拠することによって作用することができ、それにより、受容体をその天然リガンドにアクセスできないようにして、その正常な生物活性が予防または低減される。代替として、かかるアンタゴニストは、EGFRポリペプチドの二量体化、若しくはEGFRポリペプチドと他のタンパク質との相互作用を調整することによって作用し得るか、またはEGFRのユビキチン化及びエンドサイトーシス分解を強化し得る。EGFRアンタゴニストには、小分子阻害剤、抗体または抗体断片、アンチセンス構築体、小阻害性RNA（すなわち、dsRNAによるRNA干渉；RNAi）、及びリボザイムが含まれるが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、EGFRアンタゴニストは、ヒトEGFRに特異的に結合する小分子または抗体である。

【0052】

本発明での使用に適した例示的なEGFRアンタゴニストには、例えば、小分子EGFRアンタゴニストが含まれ、キナゾリンEGFRキナーゼ阻害剤、ピリド-ピリミジンEGFRキナーゼ阻害剤、ピリミド-ピリミジンEGFRキナーゼ阻害剤、ピロロ-ピリミジンEGFRキナーゼ阻害剤、ピラゾロ-ピリミジンEGFRキナーゼ阻害剤、フェニルアミノ-ピリミジンEGFRキナーゼ阻害剤、オキシンドールEGFRキナーゼ阻害剤、インドロカルバゾールEGFRキナーゼ阻害剤、フトラジンEGFRキナーゼ阻害剤、イソフラボンEGFRキナーゼ阻害剤、キナロンEGFRキナーゼ阻害剤、及びチルホスチンEGFRキナーゼ阻害剤、例えば、以下の特許公開に記載されるもの、ならびにEGFRキナーゼ阻害剤の全ての薬学的に許容される塩及び溶媒和物が含まれる。国際特許公開第WO96/33980号、同第WO96/30347号、同第WO97/30034号、同第WO97/30044号、同第WO97/38994号、同第WO97/4968

10

20

30

40

50

8号、同第WO98/02434号、同第WO97/38983号、同第WO95/19774号、同第WO95/19970号、同第WO97/13771号、同第WO98/02437号、同第WO98/02438号、同第WO97/32881号、同第WO98/33798号、同第WO97/32880号、同第WO97/3288号、同第WO97/02266号、同第WO97/27199号、同第WO98/07726号、同第WO97/34895号、同第WO96/31510号、同第WO98/14449号、同第WO98/14450号、同第WO98/14451号、同第WO95/09847号、同第WO97/19065号、同第WO98/17662号、同第WO99/35146号、同第WO99/35132号、同第WO99/07701号、及び同第WO92/20642号、欧州特許出願第EP520722号、同第EP566226号、同第EP787772号、同第EP837063号、及び同第EP682027号、米国特許第5,747,498号、同第5,789,427号、同第5,650,415号、及び同第5,656,643号、ならびにドイツ特許出願第DE19629652号。小分子EGFRアンタゴニストの追加の非限定例には、Traxler, Exp. Opin. Ther. Patents 8(12):1599-1625(1998)に記載されるEGFRキナーゼ阻害剤のうちのいずれかが含まれる。

10

【0053】

本発明に従って使用され得る小分子EGFRアンタゴニストの特定の好ましい実施例には、[6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)-4-キナゾリン-4-イル]- (3-エチニルフェニル)アミン(OSI-774、エルロチニブ、またはTARCEVA(商標)(エルロチニブHCl)、OSI Pharmaceuticals/Genentech/Rocheとしても知られている)(米国特許第5,747,498号;国際特許公開第WO01/34574号、及びMoyer et al. Cancer Res. 57:4838-4848(1997))、CI-1033(以前はPD183805として知られていた;Pfizer)(Sherwood et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 40:723(1999))、PD-158780(Pfizer)、AG-1478(University of California)、CGP-59326(Novartis)、PKI-166(Novartis)、EKB-569(Wyeth)、GW-2016(GW-572016またはラパチニブジトシラートとしても知られている;GSK)、及びゲフィチニブ(ZD1839またはIRESSA(商標)としても知られている;Astrazeneca)(Woodburn et al., Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 38:633(1997))が含まれる。本発明に従って使用され得る特定の好ましい小分子EGFRキナーゼ阻害剤は、[6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)-4-キナゾリン-4-イル]- (3-エチニルフェニル)アミン(すなわち、エルロチニブ)、その塩酸塩(すなわち、エルロチニブHCl、TARCEVA(商標))、または他の塩形態(例えば、エルロチニブメシラート)である。

20

30

【0054】

例示的なEGFRアンタゴニスト抗体には、Modjtahedi, et al., Br. J. Cancer 67:247-253(1993)、Teramoto et al., Cancer 77:639-645(1996)、Goldstein et al., Clin. Cancer Res. 1:1311-1318(1995)、Huang, et al., Cancer Res. 15:59(8):1935-40(1999)、及びYang et al., Cancer Res. 59:1236-1243(1999)が含まれる。したがって、一部の実施形態において、EGFRアンタゴニスト抗体は、モノクローナル抗体Mab E7.6.3(Yang et al. Cancer Res. 59:1236-43(1999))、またはMab C225(ATCC受入番号HB-8508)、またはその結合特異性を有する抗体若しくは抗体断片であり得る。好適なモノクローナルEGFRアンタゴニスト抗体には、IMC-C225(セツキシマブまたはERBITUX(商標)としても知られている;Imclone

40

50

Systems)、ABX-EGF (Abgenix)、EMD 72000 (Merck KgaA, Darmstadt)、RH3 (York Medical Bioscience Inc.)、及びMDX-447 (Medarex/Merck KgaA)が含まれるが、これらに限定されない。

【0055】

本明細書で交換可能に使用される「TP53」、「細胞腫瘍抗原p53」、及び「p53」という用語は、393アミノ酸リントタンパク質をコードする強力な腫瘍抑制タンパク質を指す。TP53は、多くの癌において負の制御を受けるか、または突然変異される。TP53の不在または不活化は、癌に寄与し得る。多種多様なTP53突然変異が存在する。一部の例において、癌は、TP53、特にTP53の突然変異体バージョンを過剰発現し得る。「野生型」TP53は、正常(すなわち、非癌性細胞)において見出されるTP53、または癌に相関する突然変異を有しないTP53である。試料のTP53状況(例えば、試料が野生型TP53を含むか、または突然変異体TP53を含むか)は、例えば、Vogelsteinらに発行された米国特許第6,090,566号に記載される通り、または例えば本明細書に記載されるか、若しくは当該技術分野において既知の標準技術を使用して評価され得る。TP53分子には、制限なしに、例えば、UniProt受入番号P04637に記載されるものと実質的に同一の配列を含むポリペプチド、及びそれらの配列によってコードされる核酸分子が含まれ得る。

10

【0056】

「チロシンキナーゼ阻害剤」は、EGFR受容体またはFGFR3受容体等のチロシンキナーゼのチロシンキナーゼ活性をある程度阻害するアンタゴニスト分子である。

20

【0057】

「カルメット・ゲラン桿菌(BCG)ワクチン」は、結核(TB)の危険性が高い人々またはTBが流行している場所においてTBを予防するために使用されるワクチンを指す。それは、TBを引き起こす細菌と類似している、ウシ型結核菌(カルメット・ゲラン桿菌)と呼ばれる細菌の脆弱化形態から作製される。このワクチンは、身体の免疫系がTB細菌を破壊するための抗体を作製するのを助けることができる。また免疫系が癌細胞を殺滅するのを助けることもでき、例えば、膀胱癌における治療として使用される。

【0058】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には制御されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態をさすか、または説明する。この定義には、良性癌及び悪性癌が含まれる。「早期癌」または「早期腫瘍」とは、侵襲性若しくは転移性でないか、または0期、I期、若しくはII期癌として分類される癌を意味する。癌の例には、癌種、リンパ腫、芽細胞腫(髄芽細胞腫及び網膜芽細胞腫を含む)、肉腫(脂肪肉腫及び滑液細胞肉腫を含む)、神経内分泌腫瘍(カルチノイド腫瘍、ガストリン産生腫瘍、及び島細胞癌を含む)、中皮腫、シュワン細胞腫(聴神経腫瘍を含む)、髄膜腫、腺癌、黒色腫、ならびに白血病またはリンパ球腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。かかる癌のより具体的な例には、膀胱癌、扁平上皮細胞癌(例えば、上皮系扁平上皮細胞癌)、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌を含む肺癌、腹膜の癌、肝細胞癌、消化管癌を含む胃癌(gastric cancer)または胃癌(stomach cancer)、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝臓癌、乳癌(転移性乳癌を含む)、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌(kidney cancer)または腎臓癌(renal cancer)、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌、肛門癌、陰茎癌、精巣癌、食道癌、胆管の腫瘍、ならびに頭頸部癌及び多発性骨髄腫が含まれる。

30

40

【0059】

「前癌性」という用語は、典型的に癌に進行するか、または発達する病態または成長を指す。「前癌性」成長は、異常な細胞周期制御、増殖、または分化を特徴とする細胞を有し、細胞周期制御、細胞増殖、または分化のマーカーによって決定され得る。

【0060】

50

本明細書で使用される「腫瘍」は、悪性か良性かを問わず、全ての腫瘍性細胞の成長及び増殖、ならびに全ての前癌性及び癌性細胞ならびに組織を指す。「癌」、「癌性」、「細胞増殖性障害」、及び「腫瘍」という用語は、本明細書で言及される場合、相互排他的ではない。

【0061】

「転移」とは、その原発部位から体内の他の場所への癌の広がりを意味する。癌細胞は、原発性腫瘍から抜け出し、リンパ管及び血管に浸透し、血流を通して循環し、体内の他の場所の正常組織内にある遠隔の病巣内で成長する（転移する）ことができる。転移は、局所または遠隔であり得る。転移は、腫瘍細胞が原発性腫瘍から抜け出し、血流を通過して移動し、遠隔部位で止まることを条件とする、逐次的プロセスである。この新しい部位において、細胞は、血液供給を確立し、成長して、生命を脅かす腫瘍を形成し得る。腫瘍細胞内の刺激性と阻害性との両方の分子経路がこの挙動を制御し、遠隔部位における腫瘍細胞と宿主細胞との間の相互作用もまた重要である。

10

【0062】

「非転移性」とは、良性であるか、または原発部位に滞留し、リンパ管または血管系若しくは原発部位以外の組織に浸透しなかった癌を意味する。一般に、非転移性癌は、0期、I期、またはII期癌、及び場合によってIII期癌である任意の癌である。

【0063】

「抗癌療法剤」という用語は、癌の治療において有用な療法剤を指す。抗癌療法剤の例には、細胞毒性剤、化学療法剤、成長阻害剤、放射線療法で使用される薬剤、抗血管新生剤、アポトーシス剤、抗チューブリン剤、及び癌を治療するための他の薬剤、抗CD20抗体、血小板由来成長因子阻害剤（例えば、GLEEVEC（商標）（イマチニブメシル酸塩））、COX-2阻害剤（例えば、セレコキシブ）、インターフェロン、サイトカイン、以下の標的Erbb2、Erbb3、Erbb4、PDGFR、BlyS、APRIL、BCMA、またはVEGF受容体（複数可）、TRAIL/Apo2、ならびに他の生物活性及び有機化学剤等のうちの1つ以上に結合するアンタゴニスト（例えば、中和抗体）が含まれるが、これらに限定される。特定の実施形態において、アンタゴニストは、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、またはEGFRアンタゴニストである。これらの組み合わせも、本発明に含まれる。

20

【0064】

「放射線療法」とは、正常に機能する細胞の能力を限定するため、または細胞全体を破壊するために、細胞に対して十分な損傷を誘発するための、定方向の線または線の使用を意味する。投薬量及び治療の持続時間を決定するための、当該技術分野で既知の多くの方法が存在することは理解されるであろう。典型的な治療は、1回投与として与えられ、典型的な投薬量は、1日当たり10～200単位（グレイ）の範囲である。

30

【0065】

本明細書で使用される場合、「治療」、「治療する」、またはその他の文法上の変形は、治療されている個体の自然経過を変えることを目的とした臨床介入を指し、予防のために、または臨床病理過程中的のいずれかに行うことができる。治療の望ましい効果には、疾患の発生または再発の予防、症状の緩和、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の予防、疾患進行速度の低減、病状の寛解または緩和、及緩和または予後の改善が含まれる。一部の実施形態において、抗癌療法剤（例えば、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、及び/またはEGFRアンタゴニストを含む抗癌療法剤）を使用して、疾患または傷害の発達を遅延させる。

40

【0066】

「有効量」は、所望の治療結果または予防結果を達成するために必要な投薬量及び期間で有効な量を指す。

【0067】

本発明の物質/分子、アゴニスト、またはアンタゴニストの「治療有効量」は、個体の疾患状態、年齢、性別、及び体重等の要因、ならびに個体における所望の応答を引き出す

50

物質/分子、アゴニスト、またはアンタゴニストの能力により変動し得る。治療有効量は、治療上有益な効果が、物質/分子、アゴニスト、またはアンタゴニストの任意の毒性または有害効果を上回るものでもある。「治療有効量」という用語は、哺乳動物（例えば、患者）における疾患または障害を「治療する」のに有効な本発明の抗体、ポリペプチド、またはアンタゴニストの量を指す。癌の場合、薬物の治療有効量は、癌細胞の数を低減する；腫瘍サイズまたは重量を低減する；末梢器官への癌細胞浸潤を阻害する（すなわち、ある程度の遅延及び好ましくは停止させる）；腫瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度の遅延及び好ましくは停止）；腫瘍成長をある程度阻害する；ならびに/または癌と関連付けられた症状のうちの一つ以上をある程度緩和することができる。薬物が既存の癌細胞の成長の予防及び/またはそれらの殺滅を行うことができる限り、この薬物は細胞増殖抑制性及び/または細胞毒性であり得る。一実施形態において、治療有効量は、成長阻害量である。癌療法剤に関して、インビボでの有効度は、例えば生存期間、疾患進行までの期間（TTP）、無疾患生存期間（DFS）、無進行生存期間（PFS）、応答率（RR）、応答期間、及び/または生活の質を評価することにより測定され得る。

10

【0068】

「生存」という用語は、患者が生存していることを指し、全生存、ならびに無疾患生存を含む。

【0069】

「全生存」という用語は、患者が、診断または治療の時点から1年、5年等の定義された期間にわたってもなお生存していることを指す。

20

【0070】

本発明の文脈において、「無進行生存」という表現は、治療中及び治療後の時間の長さを指し、その間に、治療している医師または調査者の評価に従い、患者の疾患は悪化しない（すなわち、進行しない）。当業者であれば理解するであろう通り、患者の無進行生存は、患者がより長い時間の長さを経験する場合に改善または強化され、その間に、疾患は、類似の状況にある患者の対照群の平均または平均無進行生存期間と比較して進行しない。

【0071】

「無疾患生存（DFS）」という表現は、癌の一次治療が、癌のいかなる兆候または症状もなく患者が生存するという結果になった後の時間の長さを指す。

30

【0072】

「生存期間が延長すること」とは、未処置の患者と比べて（すなわち、抗癌療法剤（例えば、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、及び/またはEGFRアンタゴニストを含む抗癌療法剤）で治療されていない患者と比べて）、または指定された基準レベルでFGFR3、TP53、及び/またはEGFRを発現しない患者と比べて治療される患者において、生存期間、例えば全生存期間または無疾患生存期間が増加することを意味する。

【0073】

本明細書に使用される「細胞毒性剤」という用語は、細胞の機能を阻害若しくは阻止する、及び/または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射活性アイソトープ（例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、及びLuの放射活性アイソトープ）、化学療法剤、例えば、メトトレキサート、アドリアミシン、ピンカルカロイド（ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド）、ドキシソルピシン、メルファラン、ミトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルピシン、または他の挿入剤、酵素及びその断片、例えば、核酸分解酵素、抗生物質、及び細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素的に活性な毒素等の毒素（その断片及び/または変異型を含む）、ならびに下に開示される様々な抗腫瘍または抗癌剤を含むことを意図する。他の細胞毒性剤が下に記載される。殺腫瘍剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

40

【0074】

50

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学化合物である。化学療法剤の例には、チオテ
 パ及びCYTOXAN（登録商標）シクロスホスファミド等のアルキル化剤；ブスルファン、
 インプロスルファン、及びピボスルファン等のアルキルスルホネート；ベンゾドパ（
 benzodopa）、カルボコン、メツレドパ（meturedopa）、及びウレド
 パ（uredopa）等のアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエ
 チレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、及びトリメチローロメラミン
 （trimethylolomelamine）を含むエチレンイミン及びメチルアメラ
 ミン；アセトゲニン（特にプラタシン及びプラタシノン）；デルタ-9-テトラヒドロカ
 ナピノール（ドロナピノール、MARINOL（登録商標）；ラパコン；ラパコー
 ル；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成アナログトポテカン（HYCAMT
 IN（登録商標）、CPT-11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標）、ア
 セチルカンプトテシン、スコボレクチン（scopolectin）、及び9-アミノカ
 ンプトテシンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレ
 シン、カルゼレシン、及びビゼレシン合成アナログを含む）；ポドフィロトキシ
 ン；ポド
 フィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1及びクリプトフィ
 シン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログ、KW-2189及びCB
 1-TM1を含む）；エリュテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポン
 ジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン（chloronaphazine）、コ
 ロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファ
 ミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン（
 novembichin）、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウ
 ラシルマスタード等の窒素マスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、
 ロムスチン、ニムスチン、及びラニムヌスチン（ranimnustine）等のニトロ
 スレア；エンジン抗生物質（例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシン 1I及び
 カリケアミシン I1（例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl.,
 33:183-186（1994）を参照されたい）；ダイネミシンAを含む、ダイネミ
 シン；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチンクロモフォア及び関連色素タンパ
 ク質エンジン抗生物質クロモフォア）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アン
 トラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノ
 マイシン、カルジノフィリン、クロモマイシニス、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、
 デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN（登
 録商標）ドキシソルピシン（モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピ
 シン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、及びデオキシドキシソルピシンを含む）、エビルピ
 シン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、ミトマイシンC等のミトマイシ
 ン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロ
 マイシン、ピュロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレ
 プトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシン；メトトレキサ
 ート及び5-フルオロウラシル（5-FU）等の抗代謝物；デノプテリン、メトトレキサ
 ート、プテロプテリン、トリメトトレキサート等の葉酸類似体；フルダラビン、6-メルカ
 プトプリン、チアミプリン、チオグアニン等のプリン類似体；アンシタピン、アザシチジ
 ン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリ
 ジン、エノシタピン、フロキシウリジン等のピリミジン類似体；カルステロン、プロピオ
 ン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン等のアン
 ドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン等の抗副腎；フロリン酸等の葉
 酸補液；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラ
 シル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトレキサート；デフォファミ
 ン；デメコルシン；ジアジコン；エルフォルニチン；酢酸エリブチニウム；エポチロン；
 エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン；マイタン
 シン及びアンサミトシン等のマイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピ
 ダンモル；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメト；ピラルピシン；ロソキサントロ

10

20

30

40

50

ン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK（登録商標）多糖錯体（JHS Natural Products, Eugene, OR）；ラゾキサン；リゾキシソ；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2, 2-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT-2毒素、ベラキュリンA、ロリジンA、及びアングイジン）；ウレタン；ビンデシン（ELDISINE（登録商標）、FILDESIN（登録商標））；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Ara-C」）；チオテバ；タキソイド、例えばTAXOL（登録商標）パクリタキセル（Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）、ABRAXANE（商標）クレモホールを含有しない、アルブミン操作されたパクリタキセルのナノ粒子製剤（American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois）、及びTAXOTERE（登録商標）ドセタキセル（Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロラムブシル（chlorambucil）；ゲムシタピン（GEMZAR（登録商標））；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン及びカルボプラチン等の白金類似体；ピンブラスチン（VELBAN（登録商標））；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン（ONCOVIN（登録商標））；オキサリプラチン；ロイコボピン（leucovorin）；ビノレルビン（NAVELBINE（登録商標））；ノバントロン（novantrone）；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイン酸等のレチノイド；カペシタピン（XELODA（登録商標））；上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびにCHOP（シクロホスファミド、ドキシロピシン、ピンクリスチン、及びブレドニゾロンの併用療法の略語）；及びFOLFOX（5-FU及びロイコボピンと組み合わせたオキサリプラチン（ELOXATIN（商標））を用いた治療計画の略語）等の上記の2つ以上の組み合わせが含まれる。追加の化学療法剤には、例えばマイタンシノイド（例えば、DM1）、ならびにオーリスタチンMMAE及びMMAF等の抗体薬物複合体として有用な細胞毒性剤が含まれる。

【0075】

「化学療法剤」には、癌の成長を促進し得るホルモンの有効性を制御、低減、遮断、または阻害するために作用し、しばしば全身性または体全体の治療の形態にある「抗ホルモン剤」も含まれる。それら自体がホルモンであってもよい。例には、例えばタモキシフェン（NOLVADEX（登録商標）タモキシフェンを含む）、EVIISTA（登録商標）ラロキシフェン、ドロキシフェン、4-ドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、及びFARESTON（登録商標）トレミフェンを含む抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体修飾薬（SERM）；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方制御薬（ERD）；卵巣を抑制するかまたは閉鎖させるように機能する薬剤、例えばLUPRON（登録商標）及びELIGARD（登録商標）ロイプロリド酢酸塩、ゴセレリン酢酸塩、プセレリン酢酸塩、ならびにトリプテリン等の黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニスト；フルタミド、ニルタミド、及びピカルタミド等の他の抗アンドロゲン；更に例えば、4（5）-イミダゾール、アミノグルテチミド、MEGASE（登録商標）メゲストロール酢酸塩、AROMASIN（登録商標）エキセメスタン、ホルメスタイン、ファドロゾール、RIVISOOR（登録商標）ボロゾール、FEMARA（登録商標）レトロゾール、及びARIMIDEX（登録商標）アナストロゾール等の、副腎内のエストロゲン産生を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤が含まれる。加えて、化学療法剤のかかる定義には、クロドロネート（例えば、BONEFOS（登録商標）またはOSTAC（登録商標））、DIDROCAL（登録商標）エチドロネート、NE-58095、ZOMETAX（登録商標）ゾレドロ酸/ゾレドロネート、FOSAMAX（登録商標）アレンドロネート、AREDIA（登録商標）パミドロネート、SKELID（登録商標）チルドロネー

ト、またはACTONEL（登録商標）リセドロネート等のビスホスホネート；ならびにトロキサシタピン（1, 3 - ジオキソランヌクレオシドシミアナログ）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、例えばPKC - 、Raf、H - Ras、及び表皮成長因子受容体（EGFR）等の異所（aberrant）細胞増殖に関係があるとされるシグナル伝達系路における遺伝子の発現を阻害するもの；THERATOPE（登録商標）ワクチン及び遺伝子治療ワクチン、例えばALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、及びVAXID（登録商標）ワクチン等のワクチン；LURTOTECAN（登録商標）トポイソメラーゼ1阻害剤；ABARELIX（登録商標）rmRH；ジトシル酸ラパチニブ（別名GW572016、ErbB - 2及びEGFR二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤）；ならびに上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が含まれる。

10

【0076】

「成長阻害剤」は、本明細書で使用される場合、インビトロまたはインビボのいずれかで細胞（例えば、膀胱癌細胞）の成長及び/または増殖を阻害する化合物または組成物を指す。したがって、成長阻害剤は、S相における細胞のパーセンテージを著しく低減するものであってよい。成長阻害剤の例には、G1停止及びM相停止を誘導する薬剤等の細胞周期進行を（S相以外の場所で）遮断する薬剤が含まれる。従来のM相遮断剤には、アントラサイクリン抗生物質ドキソルピシン（（8S - シス） - 10 - [（3 - アミノ - 2, 3, 6 - トリデオキシ - L - リキソ - ヘキサピラノシル）オキシ] - 7, 8, 9, 10 - テトラヒドロ - 6, 8, 11 - トリヒドロキシ - 8 - （ヒドロキシアセチル） - 1 - 20
メトキシ - 5, 12 - ナフタセンジオン）、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びブレオマイシン等のピンカ（ピンクリスチン及びピンブラスチン）、タキサン、及びトポイソメラーゼII阻害剤が含まれる。G1を停止させるそのような薬剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキサート、5 - フルオロウラシル、及びara - C等のDNAアルキル化剤はまた、S相停止へと波及する。更なる情報は、The Molecular Basis of
Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995
30
), 特に13頁に見出すことができる。タキサン（パクリタキセル及びドセタキセル）は、いずれもイチイの木由来の抗癌薬である。ヨーロッパイチイ由来のドセタキセル（TAXOTERE（登録商標）、Rhône - Poulenc Rorer）は、パクリタキセルの半合成類似体（TAXOL（登録商標）、Bristol - Myers Squibb）である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管のアセンブリを促進し、脱重合を防止することによって微小管を安定させ、細胞内の有糸分裂の阻害をもたらす。

20

30

【0077】

本明細書で使用される場合、「患者」または「対象」という用語は、交換可能に使用され、治療が所望される任意の単一の動物、より好ましくは哺乳動物（例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウサギ、動物園の動物、雌ウシ、ブタ、ヒツジ、及び非ヒト霊長類等のかかる非ヒト動物を含む）を指す。最も好ましくは、本明細書における患者はヒトである。

40

【0078】

本明細書で使用される場合、「投与すること」は、対象（例えば、患者）への化合物（例えば、アンタゴニスト）または薬学的組成物（例えば、アンタゴニストを含む薬学的組成物）の投薬量の供与方法を意味する。投与することは、非経口的、肺内、及び鼻腔内、ならびに局所的治療が所望される場合は、病変内投与を含む任意の好適な手段によることができる。非経口的注入には、例えば、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。投薬は、任意の好適な経路により、例えば、投与が短時間であるか、または慢性的であるかに部分的に応じた、静脈内注射または皮下注射等の注射により、行うこ

50

とができる。単回または様々な時点にわたる複数回投与、ポーラス投与、及びパルス注入を含むがこれらに限定されない様々な投薬スケジュールが本明細書で企図される。

【0079】

「有効量」という用語は、障害を治療するため、例えば、癌を治療するために有効な医薬品の量を指す。

【0080】

「医薬製剤」という用語は、医薬品の生物活性が有効になるような形態であり、製剤が投与されることになる対象にとって許容できないほど有毒である追加の構成成分を何ら含有しない滅菌調製物を指す。

【0081】

「滅菌」製剤は、無菌であるか、または全ての生きた微生物及びそれらの孢子を含まない。

【0082】

「添付文書」は、かかる治療薬若しくは薬品の適応症、使用法、投薬量、投与、禁忌症についての情報、パッケージ製品と組み合わせられる他の治療薬、及び/またはその使用に関する警告を含有する、治療薬または薬品の商用のパッケージに通例含まれる指示書を指すように使用される。

【0083】

「キット」は、少なくとも1つの試薬、例えば、癌（例えば、膀胱癌）の治療のための薬品、または本発明のバイオマーカー遺伝子若しくはタンパク質を特異的に検出するためのプローブを含む、任意の製品（例えば、パッケージ若しくは容器）である。この製品は、好ましくは、本発明の方法を行うためのユニットとして奨励、分配、または販売される。

【0084】

「標識」という単語は、本明細書で使用されるとき、核酸プローブ等の試薬または抗体に直接的または間接的に複合または融合され、試薬に複合または融合して試薬の検出を容易にする化合物または組成物を指す。標識は、それ自体が検出可能であり得るか（例えば、放射性同位標識または蛍光標識）、または酵素標識の場合、検出可能である基質化合物若しくは組成物の化学改変を触媒化し得る。この用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体に結合すること（すなわち、物理的に連結すること）によるプローブまたは抗体の直接的標識化、ならびに直接的に標識化される別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的標識化を包含することを意図する。間接的標識化の例には、蛍光的に標識された二次抗体を使用した一次抗体の検出、及びそれが蛍光的に標識されたストレプトアビジンを用いて検出され得るようなビオチンを有するDNAプローブの末端標識化が含まれる。

【0085】

III. 治療法

本発明は、癌に罹患している患者の治療方法を提供する。癌という用語は、前癌性成長、良性腫瘍、及び悪性腫瘍を含むがこれらに限定されない、増殖性障害の集合を包含する。良性腫瘍は、依然として起源部位に位置し、遠隔部位へと浸潤、侵襲、または転移する能力を有しない。悪性腫瘍は、それらの周りの他の組織を侵襲及び損傷することになる。それらはまた、起源部位から離脱する能力を得て、通常は血流を通して、またはリンパ節が位置するリンパ系を通して体内の他の部分に広がる（転移する）ことができる。原発腫瘍は、それらが生じる組織のタイプによって分類され、転移性腫瘍は、癌細胞が由来する組織タイプによって分類される。経時的に、悪性腫瘍の細胞は、より異常になり、正常細胞のようには見えない。癌細胞の外観のこの変化は、腫瘍悪性度と呼ばれ、癌細胞は、良好に分化している（低悪性度）、中度に分化している、不良に分化している、または未分化（高悪性度）であると記載される。良好に分化した細胞は、比較的正常な外観であり、それらが起源とする正常細胞に類似する。未分化細胞は、異常になったため、もはや細胞の起源を特定することができない細胞である。特定の実施形態において、本発明は、膀胱

10

20

30

40

50

癌の治療方法を提供する。

【 0 0 8 6 】

癌病期分類システムは、癌が解剖学的にどれだけ広がったかを説明し、類似の予後及び治療を有する患者を同じ病期群に入れることを目的とする。生検、ならびに胸部×線、マンモグラフ、骨走査、CT走査、及びMRI走査等のある特定の撮像検査を含むいくつかの検査を行って、癌の病期分類を助けることができる。血液検査及び臨床評価も使用して、患者の全体健康状態を評価し、癌がある特定の臓器に広がっているかどうかを検出する。

【 0 0 8 7 】

癌を病期分類するために、対癌米国合同委員会は、最初に、癌、特に固形腫瘍を、TNM分類システムを使用して文字カテゴリーに分ける。癌は、文字T（腫瘍サイズ）、N（触知可能な結節）、及び/またはM（転移）で指定される。T1、T2、T3、及びT4は、増加サイズの原発病変を説明し、N0、N1、N2、N3は、次第に進行する結節の関与を示し、M0及びM1は、遠隔転移の不在または存在を反映する。

10

【 0 0 8 8 】

全病期グループ分けまたはローマ数字病期分類としても知られる第2の病期分類法において、癌は、病期0～IVに分割され、原発病変のサイズならびに結節の広がり及び遠隔転移の存在を組み込む。このシステムにおいて、症例は、ローマ数字I～IVによって示される4つの病期にグループ分けされるか、または「再発」として分類される。一部の癌の場合、0期は、「上皮内」または「Tis」、例えば、乳癌の場合は上皮内腺管癌または上皮内小葉癌と称される。高悪性度腺腫は、0期として分類することもできる。一般にI期癌は、通常は治療可能な小さな限局性癌であるが、IV期は、通常は手術不可能な癌または転移性癌を表す。II期及びIII期癌は、通常は限局的に進行し、かつ/または局所リンパ節の関与を示す。一般に、より高い病期数は、より広範な疾患を示し、より大きい腫瘍サイズ及び/または付近のリンパ節及び/若しくは原発腫瘍に隣接する臓器への癌の広がりを含む。これらの病期は、正確に定義されるが、この定義は、各種の癌に関して異なり、熟練者に既知である。

20

【 0 0 8 9 】

NCIの監視、疫学、最終結果プログラム（SEER）等の多くの癌レジストリは、要約病期分類を使用する。このシステムは、全ての癌タイプに使用される。癌症例を5つの主要カテゴリーにグループ分けする。

30

【 0 0 9 0 】

上皮内癌は、それが開始する細胞の層にのみ存在する早期癌である。

【 0 0 9 1 】

限局性癌は、広がりの証拠なしに、それが開始する臓器に限定される癌である。

【 0 0 9 2 】

局所癌は、元の（原発）部位を越えて付近のリンパ節または臓器及び組織に広がった癌である。

【 0 0 9 3 】

遠隔癌は、原発部位から遠隔臓器または遠隔リンパ節に広がった癌である。

40

【 0 0 9 4 】

不明は、病期を示すのに十分な情報がない症例を説明するために使用される。

【 0 0 9 5 】

加えて、原発腫瘍が除去されてから数ヶ月または数年後に癌が再発することが一般的である。全ての目に見える腫瘍が根絶された後に再発する癌は、再発性疾患と呼ばれる。原発腫瘍の領域で再発する疾患は、限局的に再発し、転移として再発する疾患は、遠隔再発と称される。

【 0 0 9 6 】

腫瘍は、固形腫瘍または非固形若しくは軟組織腫瘍であり得る。軟組織腫瘍の例には、白血病（例えば、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、成人急性リンパ芽球性白血病、

50

急性骨髄性白血病、成熟B細胞急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ性白血病、前リンパ球性白血病、若しくは毛様細胞白血病)またはリンパ腫(例えば、非ホジキンリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、若しくはホジキン病)が含まれる。固形腫瘍には、血液、骨髄、またはリンパ系以外の体組織の任意の癌が含まれる。固形腫瘍は、上皮細胞起源のもの、非上皮細胞起源のものに更に分割され得る。上皮細胞固形腫瘍の例には、膀胱、消化管、結腸、乳房、前立腺、肺、腎臓、肝臓、膵臓、卵巣、頭頸部、口腔、胃、十二指腸、小腸、大腸、肛門、堪能、口唇、鼻咽頭、皮膚、子宮、男性器、泌尿器、及び皮膚が含まれる。非上皮起源の固形腫瘍には、肉腫、脳腫瘍、及び骨腫瘍が含まれる。腫瘍の他の例は、定義部分に記載されている。

【0097】

一部の実施形態において、本発明の方法は、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含み、患者から得られる試料の本発明のバイオマーカー(例えば、表1に列挙されるバイオマーカー)のうち少なくとも1つの発現レベルが、本発明のバイオマーカーの基準レベルに対して変化したと決定されている。例えば、一部の実施形態において、本発明は、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含む、癌(例えば、膀胱癌)の治療方法を提供し、表1に列挙される少なくとも1つの遺伝子(例えば、表1に列挙される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、または96遺伝子)の発現レベルが、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルに対して変化したと決定されている。

【0098】

別の実施例では、一部の実施形態において、本発明は、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含む、癌(例えば、膀胱癌)の治療方法を提供し、表4に列挙される少なくとも1つの遺伝子(例えば、表4に列挙される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、または48遺伝子)の発現レベルが、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルに対して変化したと決定されている。一部の実施形態において、変化は増加である。他の実施形態において、変化は減少である。

【0099】

特定の実施形態において、本発明の方法は、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含み、患者から得られる試料中の以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及び/またはEGFRのうち少なくとも1つの発現レベルが、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルに対して増加したことが決定されている。本発明のバイオマーカーの(例えば、表1に列挙される遺伝子、例えば、FGFR3、TP53、及び/またはEGFR)の発現レベルは、本明細書に記載される方法またはアッセイ(例えば、本発明の詳細な説明の第IV節または実施例に記載される方法またはアッセイ)のうちいずれかを使用して決定され得る。一部の実施形態において、膀胱癌は、NMIBCである。他の実施形態において、膀胱癌は、MIBCである。更に他の実施形態において、膀胱癌は、転移性膀胱癌である。患者は、任意選択で、進行性、難治性、再発性、及び/または化学療法耐性形態の癌を有し得る。例えば、一部の実施形態において、患者は、再発性膀胱癌、例えば、再発性NMIBCを有し得る。

【0100】

本発明の上記方法のうちいずれかにおいて、患者から得られる試料中の本発明のバイ

10

20

30

40

50

オマーカー（例えば、表 1 に列挙される遺伝子、例えば、FGFR3、TP53、及び/またはEGFR）の発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、またはそれ以上変化し得る。例えば、一部の実施形態において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、またはそれ以上増加し得る。他の実施形態において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、またはそれ以上減少し得る。

10

【0101】

特定の実施形態において、患者から得られる試料中の以下、FGFR3、TP53、及び/またはEGFRのうちの少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、または3つ）の発現レベルは、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルに対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、またはそれ以上増加し得る。例えば、FGFR3の発現レベルは、FGFR3の基準レベルに対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、またはそれ以上増加し得る。別の例において、TP53の発現レベルは、TP53の基準レベルに対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、またはそれ以上増加し得る。更に別の例において、EGFRの発現レベルは、EGFRの基準レベルに対して少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、2倍、3倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、またはそれ以上増加し得る。

20

30

【0102】

一部の実施形態において、基準レベルは、例えば、所与の癌タイプ（例えば、膀胱癌）におけるバイオマーカー（例えば、FGFR3、TP53、またはEGFR）の発現レベルの全体分布の20~99パーセントイルの間の任意のパーセントイル（例えば、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または99パーセントイル）に設定され得る。特定の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布の25パーセントイルに設定され得る。他の特定の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布の50パーセントイルに設定され得る。他の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布のメジアンであり得る。

40

【0103】

一部の実施形態において、本発明の方法は、以下、FGFR3アンタゴニスト、TP53、及び/またはEGFRアンタゴニストのうちの1つ以上（例えば、1つ、2つ、または3つ）を含む抗癌療法剤を患者に投与することを含む。例えば、一部の実施形態において、本発明の方法は、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、またはEGFRアンタゴニストを含む抗癌療法剤を投与することを含む。他の事例において、本方法は、FGFR3アンタゴニスト及びEGFRアンタゴニストを含む抗癌療法剤を投与することを含み得る。他の事例において、本方法は、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、及びEGFRアンタゴニストを含む抗癌療法剤を投与することを含み得る。

50

【0104】

上記方法のうちのいずれかにおいて、FGFR3アンタゴニストは、FGFR3アンタゴニスト抗体または小分子FGFR3アンタゴニストであり得る。例示的なFGFR3アンタゴニスト抗体、例えば、184.6、184.6.1、及び184.6.1N54Sは、例えば、米国特許第8,410,250号に記載され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一部の実施形態において、小分子FGFR3アンタゴニストは、チロシンキナーゼ阻害剤である。

【0105】

上記方法のうちのいずれかにおいて、TP53アンタゴニストは、TP53アンタゴニスト抗体、または小分子TP53アンタゴニストであり得る。

10

【0106】

上記方法のうちのいずれかにおいて、EGFRアンタゴニストは、EGFRアンタゴニスト抗体または小分子EGFRアンタゴニストであり得る。一部の実施形態において、小分子FGFR3アンタゴニストは、チロシンキナーゼ阻害剤である。特定の実施形態において、小分子FGFR3アンタゴニストは、エルロチニブ(TARCEVA(商標))である。

【0107】

本発明の方法で使用され得る例示的なEGFRアンタゴニストには、例えば、小分子EGFRアンタゴニストが含まれ、キナゾリンEGFRキナーゼ阻害剤、ピリド-ピリミジンEGFRキナーゼ阻害剤、ピリミド-ピリミジンEGFRキナーゼ阻害剤、ピロロ-ピリミジンEGFRキナーゼ阻害剤、ピラゾロ-ピリミジンEGFRキナーゼ阻害剤、フェニルアミノ-ピリミジンEGFRキナーゼ阻害剤、オキシンドールEGFRキナーゼ阻害剤、インドロカルバゾールEGFRキナーゼ阻害剤、フトラジンEGFRキナーゼ阻害剤、イソフラボンEGFRキナーゼ阻害剤、キナロンEGFRキナーゼ阻害剤、及びチルホスチンEGFRキナーゼ阻害剤、例えば、以下の特許公開に記載されるもの、ならびにEGFRキナーゼ阻害剤の全ての薬学的に許容される塩及び溶媒和物が含まれる。国際特許公開第WO96/33980号、同第WO96/30347号、同第WO97/30034号、同第WO97/30044号、同第WO97/38994号、同第WO97/49688号、同第WO98/02434号、同第WO97/38983号、同第WO95/19774号、同第WO95/19970号、同第WO97/13771号、同第WO98/02437号、同第WO98/02438号、同第WO97/32881号、同第WO98/33798号、同第WO97/32880号、同第WO97/3288号、同第WO97/02266号、同第WO97/27199号、同第WO98/07726号、同第WO97/34895号、同第WO96/31510号、同第WO98/14449号、同第WO98/14450号、同第WO98/14451号、同第WO95/09847号、同第WO97/19065号、同第WO98/17662号、同第WO99/35146号、同第WO99/35132号、同第WO99/07701号、及び同第WO92/20642号、欧州特許出願第EP520722号、同第EP566226号、同第EP787772号、同第EP837063号、及び同第EP682027号、米国特許第5,747,498号、同第5,789,427号、同第5,650,415号、及び同第5,656,643号、ならびにドイツ特許出願第DE19629652号。小分子EGFRアンタゴニストの追加の非限定例には、Traxler, Exp. Opin. Ther. Patents 8(12):1599-1625(1998)に記載されるEGFRキナーゼ阻害剤のうちのいずれかが含まれる。

20

30

40

【0108】

本発明の方法で使用され得る小分子EGFRアンタゴニストの特定の好ましい実施例には、[6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)-4-キナゾリン-4-イル]- (3-エチルフェニル)アミン(OSI-774、エルロチニブ、またはTARCEVA(商標))(エルロチニブHCl)、OSI Pharmaceuticals/Genentech/Roche)(米国特許第5,747,498号;国際特許公開第WO01/3

50

4574号、及びMoyer et al., Cancer Res. 57:4838-4848 (1997)、CI-1033 (以前はPD183805として知られていた; Pfizer) (Sherwood et al., 1999, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 40:723)、PD-158780 (Pfizer)、AG-1478 (University of California)、CGP-59326 (Novartis)、PKI-166 (Novartis)、EKB-569 (Wyeth)、GW-2016 (GW-572016またはラパチニブジトシラートとしても知られている; GSK)、及びゲフィチニブ (ZD1839またはIRESSA (商標)としても知られている; AstraZeneca) (Woodburn et al., 1997, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 38:633) が含まれる。

10

【0109】

本発明の方法で使用され得る例示的なEGFRアンタゴニスト抗体には、Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 67:247-253 (1993)、Teramoto et al., Cancer 77:639-645 (1996)、Goldstein et al., Clin. Cancer Res. 1:1311-1318 (1995)、Huang, et al., Cancer Res. 15:59(8):1935-40 (1999)、及びYang et al., Cancer Res. 59:1236-1243 (1999)に記載されるものが含まれる。したがって、一部の実施形態において、EGFRアンタゴニスト抗体は、モノクローナル抗体Ma 20
b E7.6.3 (Yang et al., Cancer Res. 59:1236-43 (1999))、またはMab C225 (ATCC受入番号HB-8508)、またはその結合特異性を有する抗体若しくは抗体断片であり得る。好適なモノクローナルEGFRアンタゴニスト抗体には、IMC-C225 (セツキシマブまたはERBITUX (商標)としても知られている; Imclone Systems)、ABX-EGF (Abgenix)、EMD 72000 (Merck KgaA, Darmstadt)、RH3 (York Medical Bioscience Inc.)、及びMDX-447 (Medarex/Merck KgaA)が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0110】

ある特定の実施形態において、癌は、FGFR3、増幅FGFR3、転座FGFR3、及び/または突然変異FGFR3を発現する。ある特定の実施形態において、癌は、活性化FGFR3を発現する。ある特定の実施形態において、癌は、転座FGFR3 (例えば、t(4;14)転座)を発現する。ある特定の実施形態において、癌は、構成的FGFR3を発現する。一部の実施形態において、構成的FGFR3は、チロシンキナーゼドメイン及び/または膜近傍ドメイン及び/またはリガンド結合ドメイン内に突然変異を含む。ある特定の実施形態において、癌は、リガンド独立型FGFR3を発現する。一部の実施形態において、癌は、リガンド依存型FGFR3を発現する。

30

【0111】

一部の実施形態において、癌は、FGFR3 - IIIb^{S248C}に対応する突然変異を含むFGFR3を発現する。一部の実施形態において、癌は、FGFR3 - IIIb^{S248C}及び/またはFGFR3 - IIIc^{S248C}を発現する。

40

【0112】

一部の実施形態において、癌は、FGFR3 - IIIb^{K652E}に対応する突然変異を含むFGFR3を発現する。一部の実施形態において、癌は、FGFR3 - IIIb^{K652E}及び/またはFGFR3 - IIIc^{K650E}を発現する。

【0113】

FGFR3 - IIIb^{S249C}に対応する突然変異を含むFGFR3。一部の実施形態において、癌は、FGFR3 - IIIb^{S249C}及び/またはFGFR3 - IIIc^{S249C}を発現する。

50

【0114】

一態様において、癌は、FGFR3 - IIII b^{G 3 7 2 C}に対応する突然変異を含むFGFR3を発現する。一部の実施形態において、癌は、FGFR3 - IIII b^{G 3 7 2 C}及び/またはFGFR3 - IIII c^{G 3 7 0 C}を発現する。

【0115】

一態様において、癌は、FGFR3 - IIII b^{Y 3 7 5 C}に対応する突然変異を含むFGFR3を発現する。一部の実施形態において、癌は、FGFR3 - IIII b^{Y 3 7 5 C}及び/またはFGFR3 - IIII c^{Y 3 7 3 C}を発現する。

【0116】

一部の実施形態において、癌は、(a) FGFR3 - IIII b^{K 6 5 2 E}、ならびに (b) FGFR3 - IIII b^{R 2 4 8 C}、FGFR3 - IIII b^{Y 3 7 5 C}、FGFR3 - IIII b^{S 2 4 9 C}、及びFGFR3 - IIII b^{G 3 7 2 C}のうちの1つ以上を発現する。

10

【0117】

一部の実施形態において、癌は、(a) FGFR3 - IIII b^{R 2 4 8 C}、ならびに (b) FGFR3 - IIII b^{K 6 5 2 E}、FGFR3 - IIII b^{Y 3 7 5 C}、FGFR3 - IIII b^{S 2 4 9 C}、及びFGFR3 - IIII b^{G 3 7 2 C}のうちの1つ以上を発現する。

【0118】

一部の実施形態において、癌は、(a) FGFR3 - IIII b^{G 3 7 2 C}、ならびに (b) FGFR3 - IIII b^{K 6 5 2 E}、FGFR3 - IIII b^{Y 3 7 5 C}、FGFR3 - IIII b^{S 2 4 9 C}、及びFGFR3 - IIII b^{R 2 4 8 C}のうちの1つ以上を発現する。

20

【0119】

一部の実施形態において、癌は、FGFR3 - IIII b^{R 2 4 8 C}、FGFR3 - IIII b^{K 6 5 2 E}、FGFR3 - IIII b^{Y 3 7 5 C}、FGFR3 - IIII b^{S 2 4 9 C}、及びFGFR3 - IIII b^{G 3 7 2 C}を発現する。

【0120】

ある特定の実施形態において、癌は、対照試料(例えば、正常組織の試料)またはレベルに対して増加したレベルのホスホ - FGFR3、ホスホ - FRS2、及び/またはホスホ - MAPKを発現する。

30

【0121】

抗癌療法剤、例えば、アンタゴニスト(例えば、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、及び/またはEGFRアンタゴニスト)を含む抗癌療法剤を含む組成物は、良質な医療実践と一致する形で製剤、投薬、及び投与される。この文脈における考慮の要因には、治療されている特定タイプの癌、治療されている特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的病態、癌の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール管理、及び医療従事者に知られている他の要因が含まれる。投与されるアンタゴニストの有効量は、このような考慮によって管理される。

【0122】

本発明の療法剤は、ポラスとしての静脈内投与または一定期間にわたる連続注入による、筋内、腹腔内、脳髄内、皮下、関節内、滑液嚢内、髄腔内、経口、局所、または吸入経路による等の既知の方法に従い、ヒト患者に投与される。体外戦略を治療用途に使用することもできる。体外戦略は、対象から得られる細胞を、アンタゴニストをコードするポリヌクレオチドで形質移入または形質導入することを含む。次いで、形質移入または形質導入された細胞を対象に戻す。これらの細胞は、限定なしに、造血細胞(例えば、骨髄細胞、マクロファージ、単球、樹状細胞、T細胞、またはB細胞)、線維芽細胞、上皮細胞、内皮細胞、角化細胞、または筋細胞を含む広範囲のタイプのうちのいずれかであり得る。

40

【0123】

50

例えば、抗癌療法がアンタゴニスト抗体（例えば、FGFR3アンタゴニスト抗体、TP53アンタゴニスト抗体、またはEGFRアンタゴニスト抗体）を含む場合、抗体は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、及び鼻腔内投与、ならびに局所免疫抑制治療で所望される場合の病変内投与を含む、任意の好適な手段によって投与される。非経口注入には、筋肉内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。加えて、抗体は、パルス注入によって、特に抗体の用量を低下させながら好適に投与される。好ましくは、投薬は、投与が短時間であるか慢性的であるかに部分的に応じて、最も好ましくは静脈内または皮下注射等の注射によって付与される。

【0124】

別の例において、アンタゴニスト化合物は、腫瘍の障害または場所が許す場合、例えば、直接注射によって局所的に投与され、注射は定期的に繰り返すことができる。アンタゴニストは、局所再発または転移を予防または低減するために、対象に全身的に、または腫瘍の外科的切開に続いて腫瘍細胞、例えば、腫瘍若しくは腫瘍床に直接送達することもできる。

10

【0125】

抗癌療法剤は、併用療法として、併用医薬製剤または投与計画において、抗癌特性を有する少なくとも1つの追加の化合物と組み合わせられ得る。併用医薬製剤または投与計画の少なくとも1つの追加の化合物は、好ましくは、それらが互いに悪影響を及ぼさないように、アンタゴニスト組成物に対して相補的な活性を有する。

【0126】

抗癌療法剤は、化学療法剤、細胞毒性剤、サイトカイン、成長阻害剤、抗ホルモン剤、及びそれらの組み合わせを含み得る。かかる分子は、意図する目的に有効な量で組み合わせられて適切に存在する。例えば、アンタゴニスト（例えば、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、及び/またはEGFRアンタゴニスト）を含有する医薬組成物はまた、治療有効量の抗新生物剤、化学療法剤、成長阻害剤、細胞毒性剤、またはそれらの組み合わせを含んでもよい。

20

【0127】

療法剤の組み合わせ投与は、典型的に、定義された期間（選択される組み合わせに応じて通常は数分、数時間、数日、または数週間）にわたって行われる。併用療法は、これらの療法剤の逐次的投与（つまり、各療法剤が異なる時間に投与される）、ならびにこれらの療法剤または療法剤のうちの少なくとも2つの実質的に同時投与を包含することを意図する。

30

【0128】

療法剤は、同じ経路または異なる経路によって投与され得る。例えば、アンタゴニスト抗体の組み合わせは、静脈内注射によって投与されるのに対し、化学療法剤の組み合わせは、経口投与され得る。代替として、例えば、特定の療法剤に応じて、療法剤の両方が経口投与され得るか、または両方の療法剤が静脈内注射によって投与され得る。療法剤が投与される順序もまた、特定の薬剤に応じて異なる。

【0129】

疾患の種類及び重症度に応じて、例えば、1回以上の別個の投与によるか、または連続注入によるかを問わず、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ の各療法剤が、患者に投与するための初回候補投薬量である。典型的な日用量は、上述の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ 、またはそれ以上の範囲に及び得る。数日間またはそれ以上にわたる反復投与については、病態に応じて、上記の方法によって測定して、癌が治療されるまで治療が継続される。しかしながら、他の投薬計画も有用であり得る。抗癌療法剤、例えば、1つ以上のアンタゴニスト（例えば、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、及び/またはEGFRアンタゴニスト）、化学療法剤等を含む抗癌療法剤の組成の調製及び投薬スケジュールは、製造元の指示に従うか、または熟練した医師によって経験的に決定される通り使用されてもよい。かかる化学療法剤の調製及び投薬スケジュールは、Chemotherapy Service, Ed., M.C. Perry, W

40

50

Williams & Wilkins, Baltimore, Md (1992)にも記載されている。

【0130】

併用療法は、「相乗効果」をもたらし、「相乗性」を証明することができる。つまり、活性成分が一緒に使用される場合に達成される効果は、化合物を別個に使用することから生じる効果の総和を超える。相乗効果は、活性成分が、(1)共製剤及び投与されるか、若しくは組み合わされた単位投与製剤で同時に送達される場合、(2)別個の製剤として交互に、若しくは平行して送達される場合、または(3)いくつかの他の計画による場合に達成され得る。代替療法で送達される場合、相乗効果は、化合物が逐次的に投与または送達される場合、例えば、別個の注射器での異なる注射によって達成され得る。概して、交互療法の間、各活性成分の有効な投薬量は、逐次的に、すなわち、連続的に投与され、一方、併用療法においては、2つ以上の活性成分の有効な投薬量は、一緒に投与される。

10

【0131】

上記の伝統的経路による患者への抗癌療法剤の投与とは別に、本発明は、遺伝子療法による投与を含む。アンタゴニストをコードする核酸のこのような投与は、「有効量の抗癌療法剤を投与する」という表現によって包含される。例えば、細胞内抗体を生成するための遺伝子療法の使用に関しては、WO 1996/07321を参照されたい。かかる方法は、例えば、TP53等の細胞内タンパク質を標的とするのに有用であり得る。

【0132】

核酸(任意選択でベクターに含有される)を患者の細胞にインビボ及び体外で入れ込むための2つの主なアプローチが存在する。インビボ送達の場合、核酸は、通常はアンタゴニストが必要とされる部位において患者に直接注射される。体外治療の場合、患者の細胞が除去され、これらの単離された細胞に核酸が導入され、修飾された細胞が患者に直接投与されるか、または例えば、患者に埋め込まれる多孔質膜内に被包される(例えば、米国特許第4,892,538号及び同第5,283,187号を参照されたい)。核酸を生きた細胞に導入するために使用可能な様々な技法が存在する。これらの技法は、意図される宿主の細胞において、インビトロまたはインビボで、核酸が培養された細胞に移行したかどうかに応じて異なる。インビトロでの哺乳動物細胞への核酸の移行に適した技法には、リポソームの使用、電気穿孔、微量注入、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法等が含まれる。遺伝子の体外送達に一般に使用されるベクターは、レトロウイルスである。

20

30

【0133】

現在好ましいインビボ核酸移行技法には、ウイルスベクター(例えば、アデノウイルス、I型単純ヘルペスウイルス、またはアデノ関連ウイルス)による形質移入、及び脂質系システム(遺伝子の脂質媒介性移行に有用な脂質は、例えば、DOTMA、DOPE、及びDC-Cholである)が含まれる。一部の状況において、核酸源を、標的細胞に特異的な薬剤、例えば、標的細胞上の細胞表面膜タンパク質に特異的な抗体、標的細胞上の受容体のためのリガンド等と共に提供することが望ましい。リポソームが用いられる場合、エンドサイトーシスと関連付けられた細胞表面膜タンパク質に結合するタンパク質は、例えば、特定の細胞タイプに向性のカプシドタンパク質またはその断片、循環中の内部化を受けるタンパク質の抗体、及び細胞内限局化を標的とし、細胞内半減期を強化するタンパク質を標的とするため、及び/またはそれらの取り込みを促進するために使用され得る。受容体媒介性エンドサイトーシスの技法は、例えば、Wu et al., J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987)、及びWagner et al., PNAS USA 87: 3410-3414 (1990)によって記載されている。遺伝子マーキング及び遺伝子療法プロトコルは、例えば、Anderson et al., Science 256: 808-813 (1992)及びWO 1993/25673に記載されている。

40

【0134】

IV. 診断及び予後判定方法

50

本発明は、癌に罹患している患者を診断するため、癌に罹患している患者の予後を決定するため、癌を有する患者が抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかを決定するため、及び癌を有する患者に対する抗癌療法剤の治療効果を最適化するための方法を提供すること、を特許請求の範囲とする。これらの方法は、特に、癌のサブタイプを診断するため、治療転帰を予測するため、及び患者への抗癌療法剤の投与が有効となる可能性を増加させるために有用である。いくつかの実施形態において、これらの方法は、患者から得られる試料中の、本発明のバイオマーカー（例えば、表1に列挙されるバイオマーカー）のうちの少なくとも1つの発現レベルを決定することと、その発現レベルを、本発明のバイオマーカーの基準レベルと比較することと、を含む。特定の実施形態において、これらの方法は、患者から得られる試料中の以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及び/またはEGFRのうちの少なくとも1つの発現レベルを決定することと、この発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較することと、を含む。本発明のバイオマーカー（例えば、FGFR3、TP53、及び/またはEGFR）の発現レベルは、下記の方法若しくはアッセイのうちのいずれかを使用するか、または当該技術分野において既知の任意の方法若しくはアッセイによって決定され得る。特定の実施形態において、癌は、膀胱癌である。一部の実施形態において、膀胱癌は、NMIBCである。他の実施形態において、膀胱癌は、MIBCである。更に他の実施形態において、膀胱癌は、転移性膀胱癌である。患者は、任意選択で、進行性、難治性、再発性、及び/または化学療法耐性形態の癌を有し得る。例えば、一部の実施形態において、患者は、再発性膀胱癌、例えば、再発性NMIBCを有し得る。

10

20

【0135】

例えば、一部の実施形態において、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、表1に列挙される遺伝子（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、または96遺伝子）の発現レベルを決定するステップと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルが、癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。例えば、特定の実施形態において、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、または3つ）の発現レベルを決定するステップと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加が、癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

30

40

【0136】

一部の事例において、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中のFGFR3の発現レベルを決定するステップと、(b)FGFR3の発現レベルをFGFR3の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中のFGFR3の発現レベルの増加が、癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【0137】

一部の事例において、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、(a)

50

患者から得られる試料中の T P 5 3 の発現レベルを決定するステップと、(b) T P 5 3 の発現レベルを T P 5 3 の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の T P 5 3 の発現レベルの増加が、癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【 0 1 3 8 】

一部の事例において、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、(a) 患者から得られる試料中の E G F R の発現レベルを決定するステップと、(b) E G F R の発現レベルを E G F R の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の E G F R の発現レベルの増加が、癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

10

【 0 1 3 9 】

別の実施例において、一部の実施形態では、本発明は、患者における癌の診断方法を提供し、本方法は、(a) 患者から得られる試料中の、表 4 に列挙される遺伝子 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、または 48 遺伝子) の発現レベルを決定するステップと、(b) 少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも 1 つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する患者試料中の少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルの変化が、癌を有する患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

20

【 0 1 4 0 】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、(c) 癌を有していることを患者に通知することを更に含み得る。上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、(d) 試料に対する、患者試料中の少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルの増加が検出された場合に、患者の治療のための抗癌療法剤を選択することを更に含み得る。上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、例えば、本発明の詳細な説明の第 I I I 節に記載される通り、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含み得る。

【 0 1 4 1 】

他の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、(a) 患者から得られる試料中の、表 1 に列挙される遺伝子 (例えば、表 1 に列挙される 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、または 96 遺伝子) のうちの少なくとも 1 つの発現レベルを決定することと、(b) 少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも 1 つの遺伝子の基準レベルと比較することと、(c) 患者の予後を決定することと、を含み、基準レベルに対して変化した患者試料中の少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルによって、不良な予後が示される。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

30

40

【 0 1 4 2 】

例えば、一部の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、(a) 患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、F G F R 3、T P 5 3、及び E G F R のうちの少なくとも 1 つの発現レベルを決定することと、(b) 少なくとも 1 つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも 1 つの遺伝子の基準レベルと比較することと

50

、(c)患者の予後を決定することと、を含み、不良な予後は、基準レベルに対して増加した患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加によって示される。

【0143】

一部の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中のFGFR3の発現レベルを決定することと、(b)FGFR3の発現レベルを、FGFR3の基準レベルと比較することと、(c)患者の予後を決定することと、を含み、基準レベルに対して増加した患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加によって、不良な予後が示される。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【0144】

他の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中のTP53の発現レベルを決定することと、(b)TP53の発現レベルを、TP53の基準レベルと比較することと、(c)患者の予後を決定することと、を含み、基準レベルに対して増加した患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加によって、不良な予後が示される。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【0145】

例えば、一部の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中のEGFRの発現レベルを決定することと、(b)EGFRの発現レベルを、EGFRの基準レベルと比較することと、(c)患者の予後を決定することと、を含み、基準レベルに対して増加した患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加によって、不良な予後が示される。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【0146】

他の事例において、本発明は、癌に罹患している患者の予後判定方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、表4に列挙される遺伝子(例えば、表4に列挙される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、または48遺伝子)のうちの少なくとも1つの発現レベルを決定することと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較することと、(c)患者の予後を決定することと、を含み、基準レベルに対して変化した患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルによって、不良な予後が示される。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【0147】

上記方法のうちのいずれかにおいて、予後は、生存の予後であり得る。一部の事例において、本方法は、抗癌療法剤を患者に投与する前に実行される。他の実施形態において、本方法は、抗癌療法剤を患者に投与している間に実行される。他の実施形態において、本方法は、抗癌療法剤を患者に投与した後に実行される。

【0148】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、抗癌療法剤の投与から利益を享受する可能性があるとして、患者を特定することを更に含み得る。他の事例において、本方法は、患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、抗癌療法剤の投与から利益を享受する可能性が低いとして、患者を特定することを更に含み得る。

【0149】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、例えば、本発明の詳細な説明の第I I節に記載される通り、患者が不良な生存予後を有すると決定された場合に、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含み得る。

10

20

30

40

50

【0150】

上記方法のうちのいずれかにおいて、生存は、無疾患生存、無進行生存、または全生存であり得る。

【0151】

他の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に应答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、表1に列挙される遺伝子(例えば、表1に列挙される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、または96遺伝子)のうちの少なくとも1つの発現レベルを決定するステップと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの変化が、抗癌療法剤を含む治療に应答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

10

20

【0152】

例えば、一部の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に应答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの少なくとも1つの発現レベルを決定することと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に应答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【0153】

例えば、一部の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に应答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中のFGFR3の発現レベルを決定するステップと、(b)FGFR3の発現レベルをFGFR3の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中のFGFR3の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に应答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

30

【0154】

他の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に应答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中のTP53の発現レベルを決定するステップと、(b)TP53の発現レベルをTP53の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中のTP53の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に应答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

40

【0155】

更に他の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に应答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中のEGFRの発現レベルを決定するステップと、(b)EGFRの発現レベルをEGFRの基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中のEGFRの発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に应答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【0156】

50

他の事例において、本発明は、癌を有する患者が、抗癌療法剤での治療に応答する可能性があるかどうかの決定方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、表4に列挙される遺伝子(例えば、表4に列挙される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、または48遺伝子)のうちの少なくとも1つの発現レベルを決定するステップと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの変化が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

10

【0157】

一部の事例において、本発明は、癌を有する患者のための抗癌療法剤の治療効果の最適化方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、表1に列挙される遺伝子(例えば、表1に列挙される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、または96遺伝子)のうちの少なくとも1つの発現レベルを決定するステップと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの変化が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

20

【0158】

例えば、一部の事例において、本発明は、癌を有する患者のための抗癌療法剤の治療効果の最適化方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、以下の遺伝子、FGFR3、TP53、及びEGFRのうちの少なくとも1つ(例えば、1つ、2つ、または3つ)の発現レベルを決定することと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

30

【0159】

一部の事例において、本発明は、癌を有する患者のための抗癌療法剤の治療効果の最適化方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中のFGFR3の発現レベルを決定するステップと、(b)FGFR3の発現レベルをFGFR3の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する、患者試料中のFGFR3の発現レベルの増加が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

40

【0160】

一部の事例において、本発明は、癌を有する患者のための抗癌療法剤の治療効果の最適化方法を提供し、本方法は、(a)患者から得られる試料中の、表4に列挙される遺伝子(例えば、表4に列挙される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、

50

13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、または48遺伝子)のうちの少なくとも1つの発現レベルを決定するステップと、(b)少なくとも1つの遺伝子の発現レベルを、少なくとも1つの遺伝子の基準レベルと比較するステップと、を含み、基準レベルに対する患者試料中の少なくとも1つの遺伝子の発現レベルの変化が、抗癌療法剤を含む治療に応答する可能性がある患者を特定する。一部の実施形態において、変化は、増加であり得る。他の実施形態において、変化は、減少であり得る。一部の実施形態において、癌は、膀胱癌である。

【0161】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、DUSB3、FRS2、TSC1、ERBB3、CDKN1A、CCND1、TP63、MMP2、ZEB2、PIK3CB、PIK3R1、MDM2、SNAI2、AXL、ZEB1、BCL2B、TSC2、RB1、FGFR32、PIK3IP1、MTOR、PIK3CA、PTEN、AKT1、BCL2A、FRS3、ERBB2、FGFR31、FGF1、SNAI1、FGFR34、FGF9、及びFGF2からなる群から選択される少なくとも1つの追加遺伝子の発現レベルを決定することを更に含むことを更に含む得る。

【0162】

一部の事例において、本発明は、膀胱癌に罹患している患者の治療方法を提供し、本方法は、カルメット・ゲラン桿菌(BCG)ワクチン以外の治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを含み、患者から得られる試料中のTP53の発現レベルが、TP53の基準レベルに対して増加したと決定されている。

【0163】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本方法は、例えば、本発明の詳細な説明の第II節に記載される通り、治療有効量の抗癌療法剤を患者に投与することを更に含む得る。

【0164】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本発明のバイオマーカー、例えば、表1に列挙される遺伝子、例えば、FGFR3、TP53、及び/またはEGFRの発現レベルは、例えば、下記の通り、または当該技術分野において既知の方法によってメッセンジャーRNA(mRNA)を測定することにより決定され得る。一部の事例において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)アッセイによって決定される。一部の実施形態において、PCRアッセイは、定量的PCRアッセイである。一部の実施形態において、定量的PCRアッセイは、TAQMAN(登録商標)アッセイである。一部の実施形態において、アッセイは、Fluidigmアッセイを使用して行われる。

【0165】

上記方法のうちのいずれかにおいて、本発明のバイオマーカー、例えば、表1に列挙される遺伝子、例えば、FGFR3、TP53、及び/またはEGFRの発現レベルは、例えば、下記の通り、または当該技術分野において既知の方法によってタンパク質を測定することにより決定され得る。一部の事例において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、免疫組織化学法によって決定される。

【0166】

免疫組織化学によってFGFR3の発現レベルの例示的な決定方法は、下に提供される。同様のアッセイを本発明の他のバイオマーカーに使用することができる。

【0167】

一実施形態において、FGFR3過剰発現は、IHCによって解析され得る。腫瘍生検組織からのパラフィン包埋組織断片は、IHCアッセイに供され、以下のようなFGFR3タンパク質染色強度基準に一致し得る。

スコア0：染色が観察されないか、または膜染色が腫瘍細胞の10%未満で観察される。

。

10

20

30

40

50

スコア 1 + : かすかな / ほとんど認識不可能な膜染色が、腫瘍細胞の 10 % 超で検出される。細胞は、それらの膜の一部が染色されるだけである。

スコア 2 + : 弱 ~ 中度の完全膜染色が、腫瘍細胞の 10 % 超で観察される。

スコア 3 + : 中 ~ 強度の完全膜染色が、腫瘍細胞の 10 % 超で観察される。

【 0 1 6 8 】

一部の実施形態において、FGFR3 過剰発現アセスメントの 0 または 1 + スコアを有する腫瘍は、FGFR3 を過剰発現しないと特徴付けられ得るが、2 + または 3 + スコアを有する腫瘍は、FGFR3 を過剰発現すると特徴付けられ得る。

【 0 1 6 9 】

一部の実施形態において、FGFR3 を過剰発現する腫瘍は、1 細胞当たり発現される FGFR3 のコピー数に対応する免疫組織化学スコアによって評価されてもよく、生化学的に決定され得る。

0 = 0 ~ 90 コピー / 細胞、

1 + = 少なくとも約 100 コピー / 細胞、

2 + = 少なくとも約 1000 コピー / 細胞、

3 + = 少なくとも約 10,000 コピー / 細胞。

【 0 1 7 0 】

一部の事例において、患者から得られる試料は、腫瘍試料である。

【 0 1 7 1 】

本発明の上記方法のうちいずれかにおいて、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカー（例えば、表 1 に列挙される遺伝子）の発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、2 倍、3 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、またはそれ以上変化し得る。例えば、一部の実施形態において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、2 倍、3 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、またはそれ以上増加し得る。他の実施形態において、患者から得られる試料中の本発明のバイオマーカーの発現レベルは、バイオマーカーの基準レベルに対して少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、2 倍、3 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、またはそれ以上減少し得る。

【 0 1 7 2 】

特定の実施形態において、患者から得られる試料中の以下、FGFR3、TP53、及び / または EGFR のうちの少なくとも 1 つ（例えば、1 つ、2 つ、または 3 つ）の発現レベルは、少なくとも 1 つの遺伝子の基準レベルに対して少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、2 倍、3 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、またはそれ以上増加し得る。例えば、FGFR3 の発現レベルは、FGFR3 の基準レベルに対して少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、2 倍、3 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、またはそれ以上増加し得る。別の例において、TP53 の発現レベルは、TP53 の基準レベルに対して少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、2 倍、3 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、またはそれ以上増加し得る。更に別の例において、EGFR の発現レベルは、EGFR の基準レベルに対して少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、100 %、2 倍、3 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、11 倍、12 倍、13 倍、14 倍、15 倍、16 倍、またはそれ以上増加し得る。

10

20

30

40

50

【0173】

一部の実施形態において、基準レベルは、例えば、所与の癌タイプ（例えば、膀胱癌）におけるバイオマーカー（例えば、FGFR3、TP53、またはEGFR）の発現レベルの全体分布の20～99パーセントイルの間の任意のパーセントイル（例えば、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または99パーセントイル）に設定され得る。特定の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布の25パーセントイルに設定され得る。他の特定の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布の50パーセントイルに設定され得る。他の実施形態において、基準レベルは、膀胱癌における値の全体分布のメジアンであり得る。

10

【0174】

開示される方法及びアッセイは、便利で効率的、かつ恐らくは費用効果がある手段を提供し、患者を治療するための適切な、または有効な療法剤を評価する際に有用なデータ及び情報入手する。例えば、患者は、特定の癌または癌のサブタイプの診断のための試料（例えば、腫瘍生検組織または血液試料）を提供することができる。一部の事例において、診断は、膀胱癌に関し得る。他の事例において、診断は、膀胱癌のサブタイプ、例えば、NMIBC、MIBC、または転移性膀胱癌に関し得る。他の事例において、患者は、抗癌療法剤での治療前に試料（例えば、腫瘍生検組織または血液試料）を提供することができ、試料は、様々なインビトロアッセイによって調べて、患者の細胞が抗癌療法剤、例えば、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、及び/またはEGFRアンタゴニストを含む抗癌療法剤に感受性があるかどうかを決定することができる。

20

【0175】

特に診断検査の適用及び療法剤での治療に関する医術の分野における当業者は、生物系がある程度変動性であり、常に全体的に予測可能であるとは限らないため、多くの良好な診断検査または療法剤が効果的でない場合があることを認識するであろう。したがって、最終的には、検査結果、患者の病態及び病歴、及び担当医自身の経験に基づいて、個々の患者に最も適切な治療過程を決定するのは担当医の判断次第である。例えば、診断検査からまたは他の基準からのデータに基づいて、患者がVEGFアンタゴニストに対して特に感受性であることが予測されない場合、特に他の明らかな治療オプションの全て若しくは大部分が失敗した場合、または別の治療と共に付与される場合にいくらかの相乗効果が期待される場合であっても、医師は、抗癌療法剤、例えば、アンタゴニスト（例えば、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、及び/またはEGFRアンタゴニスト）を含む抗癌療法剤で患者を治療することを選ぶことになる場合もあり得る。

30

【0176】

試料は、癌（例えば、膀胱癌）を有することが疑われるか、若しくは有すると診断された、したがって、治療を必要とする可能性がある患者から、またはいかなる障害をも有することが疑われない正常な個体から採取され得る。マーカー発現のアセスメントの場合、細胞、またはこれらの細胞によって産生されるタンパク質若しくは核酸を含有するもの等の患者試料が、本発明の方法で使用されてもよい。本発明の方法において、バイオマーカーのレベルは、試料、好ましくは組織試料（例えば、生検組織等の腫瘍組織試料）中のマーカーの量（例えば、絶対量または濃度）を評価することによって決定され得る。加えて、バイオマーカーのレベルは、検出可能なレベルのバイオマーカーを含有する体液または分泌物中で評価され得る。本発明における試料として有用な体液または分泌物には、例えば、血液、尿、唾液、便、胸水、リンパ液、痰、腹水、前立腺液、脳髄液（CSF）、または任意の他の体分泌物若しくはそれらの誘導体が含まれる。血液という単語は、全血、血漿、血清、または血液の任意の誘導体を含むことを意味する。かかる体液または分泌物中のバイオマーカーのアセスメントは、侵襲的な試料採取法が不適切であるか、または不便である状況において好ましい場合があり得る。しかしながら、試料が体液である場合において、本明細書で検査される試料は、好ましくは血液、滑膜組織、または滑膜液であり、最も好ましくは血液である。

40

50

【0177】

試料は、冷凍、生鮮、固定（例えば、ホルマリン固定）、遠心分離、及び/または包埋（例えば、パラフィン包埋）等であり得る。細胞試料は、試料中のマーカの量を評価する前に、当然のことながら、種々の周知の収集後調製及び保管技法（例えば、核酸及び/またはタンパク質抽出、固定、保管、冷凍、超濾過、濃縮、蒸発、遠心分離等）に供され得る。同様に、生検組織は、収集後調製及び保管技法、例えば、固定に供されてもよい。

【0178】

上記の通り、上記方法のうちのいずれかは、任意選択で、患者への投与のための抗癌療法剤の選択を含み得、任意選択で、患者への抗癌療法剤の投与を更を含み得る。

【0179】

A. 遺伝子発現の検出

本明細書に記載される遺伝的バイオマーカーは、当該技術分野において既知の任意の方法を使用して検出され得る。例えば、哺乳動物からの組織または細胞試料は、例えば、関心対象の遺伝的バイオマーカーからの mRNA または DNA に関して、ノーザン、ドットプロット、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）解析、アレイハイブリダイゼーション、RNA-seq 保護アッセイを使用するか、または DNA マイクロアレイスナップショットを含む、市販の DNA SNP チップマイクロアレイを使用して、便宜的にアッセイされ得る。例えば、定量的 PCR アッセイ等のリアルタイム PCR（RT-PCR）アッセイは、当該技術分野において周知である。本発明の例示の実施形態において、生物試料中の関心対象の遺伝的バイオマーカーからの mRNA の検出方法は、少なくとも1つのプライマーを使用する逆転写によって試料から cDNA を産生することと、増幅 cDNA の存在を検出することと、を含む。加えて、かかる方法は、生物試料中の mRNA のレベルを決定するのを可能にする（例えば、アクチンファミリーメンバー等の「ハウスキーピング」遺伝子の比較対照 mRNA 配列のレベルを同時に調べることによって）、1つ以上のステップを含み得る。任意選択で、増幅 cDNA の配列が決定され得る。FGFR3 の発現レベルの例示的な決定方法は、例えば、米国特許出願公開第 2014/0030259 号、及び米国特許第 8,410,250 号に提供され、両方が参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0180】

1. 核酸の検出

1つの特定の実施形態において、表1に記載される遺伝子の発現は、RT-PCR 技術によって行われ得る。PCR に使用されるプローブは、検出可能なマーカー、例えば、放射線同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤、または酵素等で標識されてもよい。かかるプローブ及びプライマーを使用して、試料中の表1に記載される発現遺伝子の存在を検出することができる。熟練者によって理解されるであろう通り、非常に多くの異なるプライマー及びプローブが、本明細書に提供されるシーケンスに基づいて調製され、それらを有効に使用して、表1及び/または表4に記載される発現遺伝子の存在及び/またはレベルを増幅、クローン化、及び/または決定することができる。一部の実施形態において、RT-PCR は、定量的 RT-PCR であり得る。一部の事例において、定量的 RT-PCR は、微小流体デバイス、例えば、Fluidigm BIOMARK（商標）BMK-M-96.96 プラットフォームにおいて行われてもよい。

【0181】

他の方法には、マイクロアレイ技術により、組織または細胞試料中の、表1に記載の遺伝子（例えば、FGFR3、TP53、及びEGFR mRNA）のうちの少なくとも1つからの mRNA を調べるか、または検出するプロトコルが含まれる。核酸マイクロアレイを使用して、検査及び対照組織試料からの検査及び対照 mRNA 試料を逆転写及び標識化して、cDNA プローブを生成する。次いで、プローブは、固体支持体上に固定された核酸のアレイにハイブリダイズされる。このアレイは、該アレイの各メンバーの配列及び位置が既知であるように構成される。例えば、ある特定の疾患状態において発現される可

10

20

30

40

50

能性がある遺伝子の抜粋が、固体支持体上に配置され得る。特定のアレイメンバーによる標識化プローブのハイブリダイゼーションは、プローブが由来する試料が当該遺伝子を発現することを示す。疾患組織の差次的遺伝子発現解析は、有益な情報を提供し得る。マイクロアレイ技術は、核酸ハイブリダイゼーション技術及びコンピューター技術を用いて、単一実験内で数千の遺伝子のmRNA発現プロファイルを評価する（例えば、WO2001/75166を参照されたい）。例えば、アレイ成形加工の考察については、米国特許第5,700,637号、米国特許第5,445,934号、及び米国特許5,807,522号、Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680(1996)、及びCheung et al., Nature Genetics 21(Suppl):15-19(1999)を参照されたい。

10

【0182】

加えて、EP1753878に記載されるマイクロアレイを利用するDNAプロファイリング及び検出方法が用いられてもよい。この方法は、短いタンDEM反復(STR)解析及びDNAマイクロアレイを利用する異なるDNA配列を迅速に特定し、区別する。ある実施形態において、標識化されたSTR標的配列は、相補性プローブを担持するDNAマイクロアレイにハイブリダイズされる。これらのプローブは、想定されるSTRの範囲を網羅するように長さが異なる。DNAハイブリッドの標識化された一本鎖領域は、ハイブリダイゼーション後酵素消化を利用するマイクロアレイ表面から選択的に除去される。不明な標的内の反復の数は、マイクロアレイにハイブリダイズされたままの標的DNAのパターンに基づいて推測される。

20

【0183】

マイクロアレイプロセッサの一例は、Affymetrix GENECHIP(登録商標)システムであり、これは商業的に入手可能であり、ガラス表面上のオリゴヌクレオチドの直接合成によって成形加工されたアレイを含む。他のシステムは、当業者に既知のように使用され得る。

【0184】

RT-PCR以外のバイオマーカーのレベルを決定するための他の方法、または別のPCRベースの方法には、プロテオミクス技法、ならびに分子レベルでの患者応答に基づいて癌を治療するために必要な個別化された遺伝的プロファイルが含まれる。本明細書における特殊化されたマイクロアレイ、例えば、オリゴヌクレオチドマイクロアレイまたはcDNAマイクロアレイは、1つ以上の抗癌療法剤に対する感受性または耐性のいずれかと相関する発現プロファイルを有する1つ以上のバイオマーカーを含み得る。本発明における使用のための、核酸を検出するために使用され得る他の方法は、例えば、RNAseq等のRNAベースのゲノム解析を含む、高スループットRNA配列発現解析を必要とする。

30

【0185】

多くの参考文献が、上記技法を適用する際にガイダンスを提供するために入手可能である(Kohler et al., Hybridoma Techniques(Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1980)、Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays(Elsevier, Amsterdam, 1985)、Campbell, Monoclonal Antibody Technology(Elsevier, Amsterdam, 1984)、Hurrell, Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications(CRC Press, Boca Raton, FL, 1982)、及びZola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158(CRC Press, Inc., 1987))。ノーザンブロット解析は、当該技術分野において周知の従来技法であり、例えば、Molecular Cloning, a Laboratory Manual, second edition, 1989, Sambrook, Fritsch, Ma

40

50

niatis, Cold Spring Harbor Press, 10 Skyline Drive, Plainview, NY 11803-2500に記載されている。遺伝子及び遺伝子産生物の状態を評価するための典型的なプロトコルは、例えば、Ausubel et al. eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Units 2 (ノーザンブロッティング)、4 (サザンブロッティング)、15 (イムノブロッティング)、及び18 (PCR解析)に見出される。

【0186】

2. タンパク質の検出

表1に列挙されるもの等のタンパク質バイオマーカーの検出に関して(例えば、FGFR3、TP53、及び/またはEGFR)、例えば、抗体ベースの方法、ならびに質量分光法及び当該技術分野において既知の他の類似手段を含む、様々なタンパク質アッセイが使用可能である。抗体ベースの方法の場合において、例えば、試料は、抗体-バイオマーカーの錯体が形成し、次いで当該錯体を検出するのに十分な条件下で、当該バイオマーカーに特異的な抗体と接触させてもよい。タンパク質バイオマーカーの存在の検出は、ウェスタンブロッティング(免疫沈降の有無を問わず)、二次元SDS-PAGE、免疫沈降、蛍光活性化細胞分類(FACS)、フローサイトメトリー、及び血漿または血清を含む多種多様な組織及び試料をアッセイするためのELISA手順等の多くの方法において達成され得る。かかるアッセイ形式を使用する広範囲のイムノアッセイ技法が使用可能であり、例えば、米国特許第4,016,043号、同第4,424,279号、及び同第4,018,653号を参照されたい。これらには、非競合型の単一部位及び二部位、または「サンドイッチ」アッセイ、ならびに伝統的な競合結合アッセイの両方が含まれる。これらのアッセイにはまた、標的バイオマーカーへの標識された抗体の直接結合が含まれる。

【0187】

サンドイッチアッセイは、最も有用で一般に使用されるアッセイに含まれる。サンドイッチアッセイ技法の多くの変型が存在し、全ては、本発明によって包含されるものとする。簡潔に言えば、典型的な順方向アッセイにおいて、標識化されていない抗体を固体基質上に固定し、検査される試料を、結合された分子と接触させる。適切なインキュベーション期間後に、抗体-抗原錯体の形成を可能にするのに十分な期間にわたって、検出可能なシグナルを産生することができるレポーター分子で標識化された抗原に特異的な第2の抗体を次いで添加し、インキュベートして、抗体-抗原標識化された抗体の別の錯体の形成に十分な時間を許す。任意の未反応の材料が洗い流され、抗原の存在は、レポーター分子により産生されるシグナルの観察によって決定される。これらの結果は、視覚シグナルの単純な観察によって定量的であり得るか、または既知量のバイオマーカーを含有する対照試料と比較することによって定量化され得るかのいずれかである。

【0188】

順方向アッセイの変型には、試料と標識化された抗体の両方が、結合された抗体に同時に添加される、同時アッセイが含まれる。これらの技法は、当業者には周知であり、容易に明らかとなるように任意のわずかな変型を含む。典型的な順方向サンドイッチアッセイにおいて、バイオマーカーに対する特異性を有する第1の抗体は、共有的または受動的のいずれかで固体表面に結合される。固体表面は、典型的に、ガラスまたはポリマーであり、最も一般に使用されるポリマーは、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンである。固体支持体は、管、ビーズ、マイクロプレートの円板の形態、またはイムノアッセイを行うのに適した任意の他の表面であってもよい。結合プロセスは、当該技術分野において周知であり、一般に、共有結合または物理的吸着を架橋することからなり、ポリマー-抗体錯体は、検査試料の調製において洗浄される。次いで、検査される試料のアリコート、固相錯体に添加し、十分な期間(例えば、2~40分またはより好都合であれば終夜)にわたって、適切な条件下(例えば、室温~40、25と32を含めて25~32等)でインキュベートして

、抗体内に存在する任意のサブユニットの結合を可能にする。インキュベーション期間に続いて、抗体サブユニット固相は、洗浄及び乾燥され、バイオマーカの一部分に特異的な第2の抗体でインキュベートされる。第2の抗体は、分子マーカへの第2の抗体の結合を示すために使用されるレポーター分子に結合される。

【0189】

代替方法は、試料中の標的バイオマーカを固定することと、次いで、レポーター分子で標識されてもされなくてもよい特定の抗体に固定された標的を曝露することを含む。標的の量及びレポーター分子シグナルの強度に応じて、結合された標的は、抗体との直接標識化によって検出可能であり得る。代替として、第1の抗体に特異的な第2の標識された抗体を、標的 - 第1の抗体錯体に曝露して、標的 - 第1の抗体 - 第2の抗体三級錯体を形成する。この錯体は、レポーター分子により放出されたシグナルによって検出される。「レポーター分子」とは、本明細書で使用される場合、その化学的性質により、抗原結合された抗体の検出を可能にする解析的に特定可能なシグナルを提供する分子を意味する。このタイプのアッセイにおける最も一般に使用されるレポーター分子は、酵素、フルオロフォア、または放射線核種含有分子（すなわち、放射線同位体）、及び化学発光分子のいずれかである。

10

【0190】

酵素イムノアッセイの場合において、酵素は、一般にグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩によって第2の抗体に複合される。しかしながら、容易に認識されるであろう通り、熟練者には容易に使用可能な多種多様な異なる複合技法が存在する。一般に使用される酵素には、特に西洋わさびペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、及びアルカリホスファターゼが含まれる。特定の酵素と共に使用される基質は、一般に、対応する酵素による加水分解時に、検出可能な色変化の産生のために選択される。好適な酵素の例には、アルカリホスファターゼ及びペルオキシダーゼが含まれる。上記の色素原基質ではなく蛍光産生物をもたらす、蛍光原基質を用いることも可能である。全ての場合において、酵素標識された抗体は、第1の抗体 - 分子マーカ錯体に添加され、結合させられた後、過剰な試薬が洗い流される。次いで、適切な基質を含有する溶液が、抗体 - 抗原 - 抗体の錯体に添加される。基質は、第2の抗体に結合された酵素と反応して、定性的視覚シグナルを付与し、これを通常は分光光度的に更に定量化して、試料中に存在していたバイオマーカの量の指標を付与することができる。代替として、フルオレセイン及びローダミン等の蛍光化合物は、それらの結合能力を変えことなく抗体に化学的に結合され得る。特定波長の光での照明により活性化された場合、蛍光色素で標識された抗体は、光エネルギーを吸着し、分子内の励起性状態を誘導するのに対して、光顕微鏡で視覚的に検出可能な特徴的な色での光の放射を誘導する。EIAと同様に、蛍光標識された抗体は、第1の抗体 - 分子マーカ錯体に結合することが許される。未結合試薬を洗い流した後、次いで、残留する三級錯体を適切な波長の光に曝露し、観察された蛍光は、関心対象の分子マーカの存在を示す。免疫蛍光及びEIA技法の両方は、当該技術分野で十分に確立されている。しかしながら、放射線同位体または生物発光分子等の他のレポーター分子が用いられてもよい。

20

30

【0191】

B. キット

バイオマーカの検出における使用の場合、製造元のキットまたは製品もまた本発明により提供される。かかるキットを使用して、例えば、癌（例えば、膀胱癌）に罹患しているか、または罹患していると疑われる患者を診断すること、癌、例えば、膀胱癌に罹患している患者の予後判定を提供すること、及び/または癌（例えば、膀胱癌）を有する患者が、抗癌療法剤に対して有効に応答性となるかどうかを決定することができる。これらのキットは、厳重な管理下で、バイアル、管等の1つ以上の容器手段を受容するように区分化された担体手段を備えてよく、容器手段のそれぞれは、本方法で使用される別個の要素のうちの1つを含む。例えば、容器手段のうちの1つは、検出可能に標識されるか、または検出可能に標識され得るプローブを備えてよい。かかるプローブは、タンパク質または

40

50

メッセージにそれぞれ特異的な抗体またはポリヌクレオチドであってもよい。キットが核酸ハイブリダイゼーションを用いて標的核酸を検出する場合、キットは、標的核酸配列の増幅のためのヌクレオチド（複数可）を含む容器、及び/または酵素、蛍光、若しくは放射性同位元素標識等のレポーター分子に結合されるアビジン若しくはストレプトアビジン等のビオチン結合タンパク質等のレポーター手段を含む容器も有し得る。

【0192】

かかるキットは、典型的に、上記の容器と、緩衝剤、希釈剤、フィルター、針、シリンジ、及び使用上の指示を伴う添付文書を含む、商業的及びユーザーの視点から望ましい材料を含む1つ以上の他の容器と、を備える。標識は、組成物が特定の用途に用いられることを示すために容器上に提示され得、上記のもの等のインビボ使用またはインビトロ使用のいずれかに関する指示も示し得る。

10

【0193】

本発明のキットは、多くの実施形態を有する。典型的な実施形態は、容器と、当該容器上のラベルと、当該容器内に収容された組成物と、を備えるキットであり、組成物は、タンパク質または自動抗体バイオマーカーに結合する一次抗体を含み、当該容器上のラベルは、組成物を使用して、試料中のこのようなタンパク質または抗体の存在を評価できることを示し、このキットは、特定試料タイプにおけるバイオマーカータンパク質の存在を評価するために、抗体を使用するための指示を含む。このキットは、試料を調製し、抗体を試料に適用するための指示及び材料のセットを更に備え得る。このキットは、一次抗体及び二次抗体の両方を含んでもよく、二次抗体は、ラベル、例えば、酵素ラベルに複合される。

20

【0194】

別の実施形態は、容器と、当該容器上のラベルと、当該容器内に収容された組成物と、を備えるキットであり、組成物は、厳しい条件下で表1に記載されるバイオマーカーの相補体にハイブリダイズする1つ以上のポリヌクレオチドを含み、当該容器上のラベルは、組成物を使用して、試料中の表1に記載されるバイオマーカーの存在を評価できることを示し、このキットは、特定試料タイプにおけるバイオマーカーRNAまたはDNAの存在を評価するために、ポリヌクレオチド（複数可）を使用するための指示を含む。

【0195】

キットの他の任意の構成要素には、1つ以上の緩衝剤（例えば、ブロック緩衝剤、洗浄緩衝剤、基質緩衝剤等）、酵素標識により化学的に改変される基質（例えば、クロモゲン）等の他の試薬、エピトープ抽出溶液、対照試料（正及び/または負の対照）、対照スライド（複数可）等が含まれる。キットはまた、当該キットを使用して得られる結果を解釈するための説明書を含むことができる。

30

【0196】

更に特定の実施形態において、抗体ベースのキットの場合、キットは、例えば、(1)バイオマーカータンパク質に結合する第1の抗体（例えば、固体支持体に付着される）と、任意選択で(2)タンパク質または第1の抗体のいずれかに結合し、検出可能な標識に複合される第2の異なる抗体と、を含み得る。

【0197】

オリゴヌクレオチドベースのキットの場合、キットは、例えば、(1)オリゴヌクレオチド、例えば、バイオマーカータンパク質をコードする核酸配列にハイブリダイズする、検出可能に標識されたオリゴヌクレオチド、または(2)バイオマーカー核酸分子を増幅させるために有用な一対のプライマーを含み得る。このキットはまた、例えば、緩衝剤、保存剤、またはタンパク質安定化剤を含み得る。このキットは、検出可能なラベルを検出するために必要な構成要素（例えば、酵素または基質）を更に含み得る。このキットはまた、アッセイされ、検査試料と比較され得る、対照試料または一連の対照試料を含有し得る。キットの各構成要素は、個々の容器内に封入され得、様々な容器の全ては、キットを使用して行われるアッセイの結果を解釈するための説明書と共に、単一パッケージ内であり得る。

40

50

【0198】

一部の実施形態において、キットは、本明細書に記載されるヌクレオチド配列のうちのいずれか、例えば、配列番号1～51のうちの1つ以上を含む。

【0199】

V. 医薬製剤

本発明に従って使用される、本発明に記載される抗癌療法剤（例えば、FGFR3アンタゴニスト、TP53アンタゴニスト、及び/またはEGFRアンタゴニスト等のアンタゴニストを含む抗癌療法剤）の療法剤（複数可）の治療製剤は、所望の純度を有する療法剤（複数可）を、凍結乾燥された製剤または水溶液の形態にある任意選択の薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤と混合することにより、保管のために調製される。製剤に関する一般情報については、例えば、Gilman et al., (eds.) (1990), The Pharmacological Bases of Therapeutics, 8th Ed., Pergamon Press, A. Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Science, 18th Edition, (1990), Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, Avis et al., (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, New York, Lieberman et al., (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, New York, 及び Lieberman et al., (eds.) (1990), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, New York, Kenneth A. Walters (ed.) (2002) Dermatological and Transdermal Formulations (Drugs and the Pharmaceutical Sciences), Vol 119, Marcel Dekkerを参照されたい。

10

20

【0200】

許容される担体、賦形剤、または安定剤は、受容者に対し、利用される用量及び濃度で非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸等の緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール等）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、若しくは免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、若しくはリジン等のアミノ酸；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、若しくはデキストリンを含む他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；ショ糖、マンニトール、トレハロース、若しくはソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び/またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、またはポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤を含む。

30

40

【0201】

皮下投与のために適合された凍結乾燥製剤は、例えば、米国特許第6,267,958号（Andyara）に記載されている。かかる凍結乾燥製剤は、好適な希釈剤により高タンパク質濃度に再構成されてもよく、この再構成された製剤は、本明細書で治療される哺乳動物に皮下投与され得る。

【0202】

療法剤（複数可）の結晶化形態も企図される。例えば、US2002/0136719A1を参照されたい。

【0203】

50

本明細書の製剤は、複数の活性化合物（上記の第2の薬品）、好ましくは、互いに影響を不利に及ぼさない相補的活性を有するものも含有してもよい。かかる薬品の種類及び有効量は、例えば、製剤中に存在する療法剤（複数可）の量及び種類、ならびに対象の臨床的パラメータに依る。好ましいこのような第2の薬品は上に記載される。

【0204】

活性成分は、例えばコアセルベーション技法または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース若しくはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル中に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及びナノカプセル）中に、またはマクロ乳濁液中に取り込まれてもよい。かかる技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

10

【0205】

持続放出調製物が調製されてもよい。持続放出調製物の好適な例には、アンタゴニストを含有する固体の疎水性ポリマーの半透性マトリクスが含まれ、そのマトリクスは、成品、例えばフィルムまたはマイクロカプセルの形態にある。持続放出マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、例えばLUPRON DEPOT（商標）等の分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア）、ならびにポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。

20

【0206】

インビボ投与のために使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、無菌ろ過膜によるろ過により容易に果たされる。

【実施例】

【0207】

以下の実施例は例示するために提供され、本件で請求される発明を限定するものではない。

【0208】

実施例1．材料及び方法

30

腫瘍試料

204ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)膀胱癌腫瘍試料の集合は、サンクトペテルブルグ市臨床腫瘍学病院の倫理委員会の承認及び書面によるインフォームドコンセントの適切な確認に続いて、Cureline, Inc. (South San Francisco, CA)から、または施設内審査委員会(スターリング施設内審査委員会)の承認に続いて、The MT Group (Van Nuys, CA)から入手した。臨床試料は、膀胱癌において典型的に観察される約80%/20%の予想男性/女性比を忠実に再現し、筋層非侵襲性膀胱癌(NMIBC; T0、T1)、筋層侵襲性膀胱癌(MIBC; T2、T3)、及び転移の割合は、それぞれ約75%及び約25%であり(図1)、膀胱癌集団におけるこれらの病期の臨床発症率と一致していた(Jemal et al. CA Cancer J. Clin. 61(2): 69-90, 2011、Henry, Urol. Clin. North Am. 19(3): 429-433, 1992、Hall et al. Urology 52(4): 594-601, 1998)。症例のサブセットは、それぞれの群に関して予想された臨床パラメータと同様に、付随の治療情報、無疾患生存(DFS)、及び全生存(OS)の注釈を有していた(図1、表3)。

40

【0209】

ヘマトキシリン&エオシン(H&E)染色された断片を、2人の独立した病理学者が評価したところ、1人の病理学者が、マクロ切開の場合、70%未満の新生物細胞性を有す

50

る症例の腫瘍面積に注目した。全体として、腫瘍含有率は、70～90%の範囲であった。RNA及びDNAは、前述の通り、マクロ切開された試料から抽出された(Schleifman et al. PLoS One 9(3): e90761, Schleifman et al. PLoS One 9(2): e88401)。

【0210】

発現解析

遺伝子発現解析は、前述の通り、ENVIRENE(商標)による脱パラフィン化後に、高純度FFPE RNAマイクロキット(Roche Diagnostics, Indianapolis, IN)を使用してマクロ切開されたFFPE腫瘍試料から抽出されたRNA上で行った(Schleifman et al. PLoS One 9(2): e88401)。膀胱癌関連遺伝子の96の固有のmRNA転写産物の遺伝子発現解析(表1を参照されたい)は、SUPERSCRIPT(登録商標)III/PLATINUM(登録商標)Taq及び前置増幅反応ミックス(Invitrogen, Carlsbad, CA)を使用し、単一反応においてcDNAに逆転写され、前置増幅された合計100ngのRNAから開始して患者標本上で行った。全96のTAQMAN(登録商標)プライマー/プローブのセットは、元のTAQMAN(登録商標)アッセイ濃度(Applied Biosystems, Foster City, CA)の0.05倍の最終希釈での前置増幅反応に含まれた。熱循環条件は、以下の通りであった。50で15分間の1サイクル、70で2分間の1サイクル、95で15秒間の14サイクル、及び60で4分間の1サイクル。前置増幅されたcDNAを2倍に希釈し、次いで、製造元の指示に従い、TAQMAN(登録商標)ユニバーサルPCRマスターミックス(Applied Biosystems, Foster City, CA)を、BIOMARK(商標)BMK-M-96.96プラットフォーム(Fluidigm, South San Francisco, CA)上で使用して増幅させた。全ての試料を3回アッセイした。サイクル閾値(Ct)を、 2^{-Ct} 法を使用して相対発現に変換し(Livak et al. Methods 25(4): 402-408, 2001)、式中、Ctは、標的遺伝子の平均からそれぞれの患者標本に関して計算された96Ct値の平均を引いたものである。表2は、指示された遺伝子に関して使用されたカスタムTAQMAN(登録商標)プローブ及びオリゴヌクレオチドのヌクレオチド配列を示す。

表1. カスタム膀胱癌マイクロフルイディクスパネル及び対応するアッセイ

10

20

30

遺伝子記号	ヒトゲノム機構 (HUGO) 遺伝子命名法	H G N C I D	遺伝子座	A p p l i e d B i o s y s t e m s プローブ I D
A C E R 3	アルカリセラミダーゼ 3	1 6 0 6 6	1 1 q 1 3 . 5	H s 0 0 2 1 8 0 3 4 _ m 1
A C V R L 1	アクチビン A 受容体 I I 型様 1	1 7 5	1 2 q 1 3 . 1 3	カスタム
A D A M 9	A D A M メタロペプチダーゼドメイン 9	2 1 6	8 p 1 1 . 2 3	H s 0 1 1 0 6 1 0 1 _ m 1
A K T 1	v - a k t マウス胸腺腫ウイルス癌遺伝子ホモログ 1	3 9 1	1 4 q 3 2 . 3 2 - q 3 2 . 3 3	H s 0 0 1 7 8 2 8 9 _ m 1
A K T 1 S 1	A K T 1 基質 1 (プロリンに富む)	2 8 4 2 6	1 9 q 1 3 . 3 3	H s 0 0 2 6 0 7 1 7 _ m 1
A R A F	v - r a f マウス肉腫 3 6 1 1 ウイルス癌遺伝子ホモログ	6 4 6	X p 1 1 . 3 - p 1 1 . 2 3	H s 0 0 1 7 6 4 2 7 _ m 1
A X L	A X L 受容体チロシンキナーゼ	9 0 5	1 9 q 1 3 . 1	H s 0 1 0 6 4 4 4 4 _ m 1
B C L 2	α アイソフォーム : B 細胞 C L L / リンパ腫 2	9 9 0	1 8 q 2 1 . 3	カスタム
B C L 2	β アイソフォーム : B 細胞 C L L / リンパ腫 2	9 9 0	1 8 q 2 1 . 3	カスタム
B C L 2 L 1	B C L 2 様 1	9 9 2	2 0 q 1 1 . 2 1	カスタム
B I D	B H 3 相互作用ドメイン死アゴニスト	1 0 5 0	2 2 q 1 1 . 2	カスタム
B M P 2	骨形態形成タンパク質 2	1 0 6 9	2 0 p 1 2	H s 0 0 1 5 4 1 9 2 _ m 1
B M X	B M X 非受容体チロシンキナーゼ	1 0 7 9	X p 2 2 . 2	H s 0 1 1 0 7 4 0 7 _ m 1

10

20

30

40

遺伝子号	ヒトゲノム機構 (HUGO) 遺伝子命名法	H G N C I D	遺伝子座	A p p l i e d B i o s y s t e m s プ ロ ー ブ I D
B S G	ベイズジン (Ok 血液型)	1 1 1 6	1 9 p 1 3 . 3	H s 0 0 9 3 6 2 9 5 _ m 1
C B L B	C b 1 プロト癌遺伝子、E 3 ユビキチンタンパク質リガーゼ B	1 5 4 2	3 q	H s 0 0 1 8 0 2 8 8 _ m 1
C C N D 1	サイクリン D 1	1 5 8 2	1 1 q 1 3	H s 0 0 7 6 5 5 5 3 _ m 1
C C N D 2	サイクリン D 2	1 5 8 3	1 2 p 1 3	H s 0 0 1 5 3 3 8 0 _ m 1
C D C 2 0	細胞分割サイクル 2 0 ホモログ (出芽酵母)	1 7 2 3	1 p 3 4 . 1	H s 0 0 4 1 5 8 5 1 _ g 1
C D H 1	カドヘリン 1、1 型、E-カドヘリン (上皮)	1 7 4 8	1 6 q 2 2 . 1	H s 0 1 0 2 3 8 9 4 _ m 1
C D H 2	カドヘリン 2、1 型、N-カドヘリン (ニューロン)	1 7 5 9	1 8 q 1 2 . 1	H s 0 0 9 8 3 0 5 6 _ m 1
C D K N 1 A	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 1 A (p 2 1、C i p 1)	1 7 8 4	6 p 2 1 . 1	H s 0 0 3 5 5 7 8 2 _ m 1
C D K N 2 A	サイクリン依存性キナーゼ阻害剤 2 A	1 7 8 7	9 p 2 1	H s 0 2 9 0 2 5 4 3 _ m H
C S K	c - s r c チロシンキナーゼ	2 4 4 4	1 5 q 2 4 . 1	H s 0 1 0 6 2 5 8 5 _ m 1
C X C L 1	ケモカイン (C-X-C モチーフ) リガンド 1 (黒色腫増殖刺激活性、α)	4 6 0 2	4 q 1 3 . 3	H s 0 0 2 3 6 9 3 7 _ m 1
D U S P 1	二重特異性ホスファターゼ 1	3 0 6 4	5 q 3 5 . 1	H s 0 0 6 1 0 2 5 6 _ g 1

10

20

30

40

遺伝子記号	ヒトゲノム機構 (HUGO) 遺伝子命名法	H G N C I D	遺伝子座	A p p l i e d B i o s y s t e m s プ ロ ー ブ I D
D U S P 3	二重特異性ホスファターゼ 3	3 0 6 9	1 7 q 2 1	H s 0 1 1 1 5 7 7 6 _ m 1
D U S P 6	二重特異性ホスファターゼ 6	3 0 7 2	1 2 q 2 2 - q 2 3	H s 0 0 7 3 7 9 6 2 _ m 1
E I F 4 E B P 1	真核生物翻訳開始因子 4 E 結合タンパク質 1	3 2 8 8	8 p 1 2	H s 0 0 6 0 7 0 5 0 _ m 1
E P A S 1	内皮 P A S ドメインタンパク質 1	3 3 7 4	2 p 2 1 - p 1 6	H s 0 1 0 2 6 1 4 9 _ m 1
E R B B 2	v - e r b - b 2 赤芽球形白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ 2、神経/神経膠芽腫由来癌遺伝子ホモログ (鳥類)	3 4 3 0	1 7 q 1 1 . 2 - q 1 2	カスタム
E R B B 3	v - e r b - b 2 赤芽球形白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ 3 (鳥類)	3 4 3 1	1 2 q 1 3	H s 0 0 1 7 6 5 3 8 _ m 1
F G F 1	線維芽細胞成長因子 1 (酸性)	3 6 6 5	5 q 3 1 . 3 - q 3 3 . 2	H s 0 0 2 6 5 2 5 4 _ m 1
F G F 1 0	線維芽細胞成長因子 1 0	3 6 6 6	5 p 1 3 - p 1 2	H s 0 0 6 1 0 2 9 8 _ m 1
F G F 2	線維芽細胞成長因子 2 (塩基性)	3 6 7 6	4 q 2 6	H s 0 0 2 6 6 6 4 5 _ m 1
F G F 7	線維芽細胞成長因子 7	3 6 8 5	1 5 q 2 1 . 2	H s 0 0 9 4 0 2 5 3 _ m 1
F G F 9	線維芽細胞成長因子 9 (グリア活性化因子)	3 6 8 7	1 3 q 1 1 - q 1 2	H s 0 0 1 8 1 8 2 9 _ m 1

10

20

30

40

遺伝子記号	ヒトゲノム機構 (HUGO) 遺伝子命名法	H G N C I D	遺伝子座	A p p l i e d B i o s y s t e m s プローブ I D
F G F R 1	線維芽細胞成長因子受容体 1	3 6 8 8	8 p 1 2	H s 0 0 2 4 1 1 1 1 _ m 1
F G F R 2	線維芽細胞成長因子受容体 2	3 6 8 9	1 0 q 2 5 . 3 - q 2 6	H s 0 1 5 5 2 9 2 6 _ m 1
F G F R 3	Cアイソフォーム：線維芽細胞成長因子受容体 3	3 6 9 0	4 p 1 6 . 3	カスタム
F G F R 3	Bアイソフォーム：線維芽細胞成長因子受容体 3	3 6 9 0	4 p 1 6 . 3	カスタム
F G F R 3	線維芽細胞成長因子受容体 3	3 6 9 0	4 p 1 6 . 3	カスタム
F G F R 4	線維芽細胞成長因子受容体 4	3 6 9 1	5 q 3 3 - q t e r	H s 0 1 1 0 6 9 0 8 _ m 1
F L T 1	f m s 関連チロシンキナーゼ 1 (血管内皮成長因子 / 血管透過性因子受容体)	3 7 6 3	1 3 q 1 2	H s 0 1 0 5 2 9 6 1 _ m 1
F N 1	フィブロネクチン 1	3 7 7 8	2 q 3 4	H s 0 1 5 4 9 9 7 6 _ m 1
F O S L 1	F O S 様抗原 1	1 3 7 1 8	1 1 q 1 3	H s 0 0 7 5 9 7 7 6 _ s 1
F R S 2	線維芽細胞成長因子受容体基質 2	1 6 9 7 1	1 2 q 1 5	H s 0 0 1 8 3 6 1 4 _ m 1
F R S 3	線維芽細胞成長因子受容体基質 3	1 6 9 7 0	6 p 2 1 . 1	H s 0 0 1 8 3 6 1 0 _ m 1
G A T A 3	G A T A 結合タンパク質 3	4 1 7 2	1 0 p 1 5	H s 0 0 2 3 1 1 2 2 _ m 1

10

20

30

40

遺伝子記号	ヒトゲノム機構 (HUGO) 遺伝子命名法	H G N C I D	遺伝子座	A p p l i e d B i o s y s t e m s プ ロ ー ブ I D
GLI1	GLIファミリー重鉛フィンガー1	4 3 1 7	1 2 q 1 3 . 2 - q 1 3 . 3	H s 0 1 1 1 0 7 6 6 __m 1
HIF1A	低酸素誘導因子1、 α サブユニット (塩基性らせんループ-らせん転写因子)	4 9 1 0	1 4 q 2 3 . 2	H s 0 0 1 5 3 1 5 3 __m 1
HPS1	ヘパラナーゼ	5 1 6 4	4 q 2 1 . 3	H s 0 0 9 3 5 0 3 6 __m 1
JAG1	鋸歯状1	6 1 8 8	2 0 p 1 2 . 1 - p 1 1 . 2 3	H s 0 0 1 6 4 9 8 2 __m 1
MAP2K2	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ2	6 8 4 2	1 9 p 1 3 . 3	H s 0 0 3 6 0 9 6 1 __m 1
MAPK14	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ14	6 8 7 6	6 p 2 1 . 3 - p 2 1 . 2	H s 0 0 1 7 6 2 4 7 __m 1
MDM2	Mdm2、p53 E3ユビキチンタンパク質リガーゼホモログ (マウス)	6 9 7 3	1 2 q 1 3 - q 1 4	H s 0 0 2 3 4 7 5 3 __m 1
MEIT	metプロト癌遺伝子 (肝細胞成長因子受容体)	7 0 2 9	7 q 3 1	カスタム
MMMP2	マトリックスメタロペプチダーゼ2 (ゼラチナーゼA、72kDaゼラチナーゼ、72kDa IV型コラゲナーゼ)	7 1 6 6	1 6 q 1 3 - q 2 1	H s 0 1 5 4 8 7 2 7 __m 1
MMMP9	マトリックスメタロペプチダーゼ9 (ゼラチナーゼB、92kDaゼラチナーゼ、92kDa IV型コラゲナーゼ)	7 1 7 6	2 0 q 1 2 - q 1 3	H s 0 0 2 3 4 5 7 9 __m 1

10

20

30

40

遺伝子記号	ヒトゲノム機構 (HUGO) 遺伝子命名法	H G N C I D	遺伝子座	A p p l i e d B i o s y s t e m s プローブ I D
M T O R	ラパマイシンの機構的標的 (セリン/トレオニンキナーゼ)	3 9 4 2	1 p 3 6	H s 0 0 2 3 4 5 2 2 __m 1
M Y C	v - m y c 骨髄細胞腫症ウイルス癌遺伝子ホモログ (鳥類)	7 5 5 3	8 q 2 4	H s 0 0 9 0 5 0 3 0 __m 1
N F 1	ニューロフィブロミン 1	7 7 6 5	1 7 q 1 1 . 2	H s 0 1 0 3 5 1 0 8 __m 1
N O T C H 1	ノッチ 1	7 8 8 1	9 q 3 4 . 3	カスタム
N O T C H 2	ノッチ 2	7 8 8 2	1 p 1 3 - p 1 1	H s 0 1 0 5 0 7 0 2 __m 1
P I K 3 C A	ホスファチジルイノシトール-4, 5-ビスホスフェート 3-キナーゼ、触媒サブユニット α	8 9 7 5	3 q 2 6 . 3	カスタム
P I K 3 C B	ホスファチジルイノシトール-4, 5-ビスホスフェート 3-キナーゼ、触媒サブユニット β	8 9 7 6	3 q 2 1 - q t e r	H s 0 0 1 7 8 8 7 2 __m 1
P I K 3 I P 1	ホスホイノシチド-3-キナーゼ相互作用タンパク質 1	2 4 9 4 2	2 2 q 1 2 . 2	H s 0 1 0 1 8 2 0 6 __m 1
P I K 3 R 1	ホスホイノシチド-3-キナーゼ、制御サブユニット 1 (α)	8 9 7 9	5 q 1 3 . 1	H s 0 0 3 8 1 4 5 9 __m 1
P O U 5 F 1	P O U クラス 5 ホメオボックス 1	9 2 2 1	6 p 2 1 . 3 3	H s 0 0 9 9 9 6 3 2 __g 1
P T C H 1	パッチ状 1	9 5 8 5	9 q 2 2 . 1 - q 3 1	H s 0 0 1 8 1 1 1 7 __m 1

10

20

30

40

遺伝子号	ヒトゲノム機構 (HUGO) 遺伝子命名法	H G N C I D	遺伝子座	A p p l i e d B i o s y s t e m s プローブ I D
P T E N	ホスファターゼ及びテンシンホモログ	9 5 8 8	1 0 q 2 3	H s 0 2 6 2 1 2 3 0 _ s 1
P T G S 2	プロスタグランジン-エンドペルオキシド合成酵素 2 (プロスタグランジン G/H 合成酵素及びシクロオキシゲナーゼ)	9 6 0 5	1 q 2 5 . 2 - q 2 5 . 3	H s 0 0 1 5 3 1 3 3 _ m 1
P T P 4 A 1	タンパク質チロシンホスファターゼ I V A 型、メンバー 1	9 6 3 4	6 q 1 2	H s 0 0 7 4 8 5 9 1 _ s 1
P T P N 1	タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体 1 型	9 6 4 2	2 0 q 1 3 . 1 - q 1 3 . 2	H s 0 0 1 8 2 2 6 0 _ m 1
R B 1	網膜芽細胞腫 1	9 8 8 4	1 3 q 1 4 . 2	H s 0 1 0 7 8 0 6 6 _ m 1
R P S 6	リボソームタンパク質 S 6	1 0 4 2 9	9 p 2 1	H s 0 1 0 5 8 6 8 5 _ g 1
S 1 P R 1	スフィンゴシン-1-リン酸受容体 1	3 1 6 5	1 p 2 1	H s 0 0 1 7 3 4 9 9 _ m 1
S M O	スムーズンド、f r i z z l e d ファミリー受容体	1 1 1 1 9	7 q 3 2 . 1	H s 0 1 0 9 0 2 4 2 _ m 1
S N A I 1	s n a i l ホモログ 1 (ドロソフィラ)	1 1 1 2 8	2 0 q 1 3 . 2	H s 0 0 1 9 5 5 9 1 _ m 1
S N A I 2	s n a i l ホモログ 2 (ドロソフィラ)	1 1 0 9 4	8 q 1 1 . 2 1	H s 0 0 9 5 0 3 4 4 _ m 1
S P 2	ハウスキーピング酵素 : S p 2 転写因子	1 1 2 0 7	1 7 q 2 1 . 3 - q 2 2	カスタム

10

20

30

40

遺伝子記号	ヒトゲノム機構 (HUGO) 遺伝子命名法	H G N C I D	遺伝子座	A p p l i e d B i o s y s t e m s プローブ I D
S P H K 1	スフィンゴシンキナーゼ 1	1 1 2 4 0	1 7 q 2 5 . 2	H s 0 0 1 8 4 2 1 1 _ m 1
S P R Y 1	s p r o u t y ホモログ 1、FGFシグナル伝達のアнтаゴニスト (ドロソフィラ)	1 1 2 6 9	4 q	H s 0 1 0 8 3 0 3 6 _ s 1
S R C	v - s r c 肉腫 (S c h m i d t - R u p p i n A - 2) ウイルス癌遺伝子ホモログ (鳥類)	1 1 2 8 3	2 0 q 1 2 - q 1 3	H s 0 1 0 8 2 2 4 6 _ m 1
T I M P 1	T I M P メタロペプチダーゼ阻害剤 1	1 1 8 2 0	X p 1 1 . 3 - p 1 1 . 2 3	H s 0 0 1 7 1 5 5 8 _ m 1
T I M P 2	T I M P メタロペプチダーゼ阻害剤 2	1 1 8 2 1	1 7 q 2 5	H s 0 0 2 3 4 2 7 8 _ m 1
T P 5 3	腫瘍タンパク質 p 5 3	1 1 9 9 8	1 7 p 1 3 . 1	カスタム
T P 6 3	腫瘍タンパク質 p 6 3	1 5 9 7 9	3 q 2 7 - q 2 9	カスタム
T P 7 3	腫瘍タンパク質 p 7 3	1 2 0 0 3	1 p 3 6 . 3	カスタム
T S C 1	結節性硬化症 1	1 2 3 6 2	9 q 3 4	H s 0 1 0 6 0 6 4 8 _ m 1
T S C 2	結節性硬化症 2	1 2 3 6 3	1 6 p 1 3 . 3	H s 0 1 0 2 0 3 8 7 _ m 1
U S P 7	ユビキチン特異的ペプチダーゼ 7 (ヘルペスウイルス関連)	1 2 6 3 0	1 6 p 1 3 . 3	H s 0 0 9 3 1 7 6 3 _ m 1

10

20

30

40

遺伝子記号	ヒトゲノム機構 (HUGO) 遺伝子命名法	H G N C I D	遺伝子座	A p p l i e d B i o s y s t e m s プ ロ ー ブ I D
VEGF A	血管内皮成長因子 A	1 2 6 8 0	6 p 1 2	H s 0 0 9 0 0 0 5 5 _ m 1
VP S 3 3 B	ハウスキーピング酵素：液胞タンパク質選別 3 3 ホモログ B	1 2 7 1 2	1 5 q 2 6 . 1	カスタム
WNT 2	ウイングレス型 MMTV 統合部位ファミリーメンバー 2	1 2 7 8 0	7 q 3 1	H s 0 1 1 2 8 6 5 2 _ m 1
ZEB 1	亜鉛フィンガー E-ボックス結合ホメオボックス 1	1 1 6 4 2	1 0 p 1 1 . 2 2	H s 0 0 2 3 2 7 8 3 _ m 1
ZEB 2	亜鉛フィンガー E-ボックス結合ホメオボックス 2	1 4 8 8 1	2 q 2 2 . 3	H s 0 0 2 0 7 6 9 1 _ m 1

10

20

H G N C = H U G O 遺伝子命名委員会

表 2 : カスタム T A Q M A N (登録商標) プローブ及びプライマーのオリゴヌクレオチド配列

遺 伝 子 記 号	カスタムプローブ	順方向プライマー	逆方向プライマー
A C V R L 1	C T G G C T G C A G A C C C G G T C C T (配列番 号 1)	A G G T G G T G T G T G T G G A T C A G (配列番 号 2)	C C G C A T C A T C T G A G C T A G G (配列番号 3)
B C L 2 (α ア イ ソ フ オ ー ム)	T G C A C A C C T G G A T C C (配列番号 4)	C C T G T G G A T G A C T G A G T A C C T G A A (配列番号 5)	G G G C C G T A C A G T T C C A C A A A (配列番 号 6)
B C L 2 (β ア イ ソ フ オ ー ム)	A G G C T G G G T A G G T G C A (配列番号 7)	A C C T G C A C A C C T G G A T C C A (配列番号 8)	G C C C A G A C T C A C A T C A C C A A (配列番 号 9)
B C L 2 L 1	C G G C T G G G A T A C T T (配 列番号 10)	A A T G A C C A C C T A G A G C C T T G G A (配 列番号 11)	C T C G G C T G C T G C A T T G T T C (配列番号 12)
B I D	A G A G G C A G A T T C T G (配 列番号 13)	C A C T C C C G C T T G G G A A G A A (配列番号 14)	C C T G G C A A T A T T C C G G A T G A (配列番 号 15)
E R B B 2	T T T G G A C C G G A G G C T G (配列番号 16)	G A G T G T C A G C C C C A G A A T G G (配列番 号 17)	G T G G G C A C A G G C C A C A C A (配列番号 1 8)
F G F R 3 (C ア イ ソ フ オ ー ム)	T T A G C G C C C G C C G T C T T G A G (配列番 号 19)	G A C G G C A C A C C C T A C G T T A C (配列番 号 20)	T C T A G C T C C T T G T C G G T G G T (配列番 号 21)

10

20

30

40

遺 伝 子 記 号	カスタムプローブ	順方向プライマー	逆方向プライマー
F G F R 3 (B ア イ ソ フ オ ー ム)	C G T C C C G C T C C G A C A C A T T G (配列番 号 2 2)	C T C A A G T C C T G G A T C A G T G A G A (配 列番号 2 3)	G G T G G C T C G A C A G A G G T A C T (配列番 号 2 4)
F G F R 3	C C T C G G G A G A T G A C (配 列番号 2 5)	A C T T C A G T G T G C G G G T G A C A (配列番 号 2 6)	C C T C G T C C T C C C C G T C T T (配列番号 2 7)
M E T	T G T C T G C C T G C A A T C (配列番号 2 8)	C G G G A C A T G G A C T C A A C A G A (配列番 号 2 9)	T G C A C T A T T T G G G A A A A C C T T G T (配列番号 3 0)
N O T C H 1	T C T G C A T G C C C G G C T A C G A G (配列番 号 3 1)	C A C C T G C C T G G A C C A G A T (配列番号 3 2)	G T C T G T G T T G A C C T C G C A G T (配列番 号 3 3)
P I K 3 C A	T T C G A C A C T C T T C A A G C C T G A (配列 番号 3 4)	C C C T G C T C A T C A A C T A G G A A A C C (配列番号 3 5)	C A A T T C A A C C A C A G T G G C C T T T T (配列番号 3 6)
S P 2	T G G A G C A G C T T C C T (配 列番号 3 7)	G G C T C G A G A C C A G C T C A T C T A (配列 番号 3 8)	G A G A T C T G C C T C A A T G A A T A A A T C C (配列番号 3 9)
T P 5 3	C A G A T A G C G A T G G T C T G (配列番号 4 0)	G C T G C C C C C A C C A T G A G (配列番号 4 1)	C C T T C C A C T C G G A T A A G A T G C T (配 列番号 4 2)
T P 6 3	A C C T G G A C G T A T T C C (配列番号 4 3)	G T C G A G C A C C G C C A A G T C (配列番号 4 4)	G C A A T T T G G C A G T A G A G T T T C T T C A (配列番号 4 5)
T P 7 3	C T G G A C G T A C T C C C (配 列番号 4 6)	C C A G C A C G G C C A A G T C A (配列番号 4 7)	C T T G G C G A T C T G G C A G T A G A G (配列 番号 4 8)

10

20

30

40

遺 伝 子 記 号	カスタムプローブ	順方向プライマー	逆方向プライマー
V P S 3 3 B	A G A A G A G G T C T G G A G A G C (配列番号 4 9)	C C T G C A C G T G T C C C A A C T G (配列番号 5 0)	G G C A C A C G T G C T T C T T C T T G (配列番 号 5 1)

【 0 2 1 1 】

10

突然変異解析及び次世代シーケンシング

突然変異解析は、ENVIRENE (商標) による脱パラフィン化後に、QIAAMP (登録商標) FFPEキット (Qiagen, Valencia, CA) を使用してマクロ切開されたFFPE組織から抽出されたゲノムDNA上で実行した (Schleifman et al. PLoS One 9 (3) : e90761)。PIK3CA、EGFR、KRAS、NRAS、HRAS、FGFR3、MET、BRAF、KIT、AKT1、FLT3における突然変異は、前述される通り、突然変異特異的qPCRを使用して検出した (Schleifman et al. PLoS One 9 (3) : e90761)。次世代シーケンシング (NGS) は、ION AMPLISEQ (商標) 癌ホットスポットパネルv2 (Life Technologies, Carlsbad, CA) を使用するION TORRENT (商標) 次世代シーケンシングを使用し、製造元のガイドラインに従って実行した (例えば、Tsongalis et al. Clin. Chem. Lab. Med. 52 (5) : 707 - 714, 2014を参照されたい)。表3は、膀胱癌試料 (WT、野生型; MUT、突然変異体) のNGS突然変異解析の結果の要約を示す。

20

表3 : 膀胱癌試料のNGS突然変異解析

試料 I D	遺伝子	NGS コール	NGS 突然変異
H P - 3 2 2 7 8	P I K 3 C A	M U T	H 1 0 4 7 R
H P - 3 2 2 7 8	F G F R 3	M U T	Y 3 7 3 C
H P - 4 4 2 3 6	E R B B 2	M U T	V 8 4 2 I
H P - 4 4 2 4 2	K R A S	M U T	G 1 2 D
H P - 5 0 3 3 0	V H L	M U T	P 8 6 S
H P - 5 0 3 3 1	V H L	M U T	P 8 6 S
H P - 5 0 3 3 2	K R A S	M U T	G 1 2 A
H P - 5 0 3 3 5	F G F R 3	W T	
H P - 5 0 3 3 6	F G F R 3	M U T	S 2 4 9 C
H P - 5 0 3 3 7	F G F R 3	M U T	S 2 4 9 C
H P - 5 0 6 8 4	F G F R 3	M U T	S 2 4 9 C
H P - 5 0 6 8 5	P I K 3 C A	M U T	Q 5 4 6 R
H P - 5 0 6 8 5	F G F R 3	M U T	S 2 4 9 C
H P - 5 0 6 8 6	F G F R 3	W T	
H P - 5 0 6 8 6	E G F R	M U T	G 7 2 1 S
H P - 5 0 6 8 6	V H L	M U T	P 8 1 S Q 9 6 *
H P - 5 0 6 8 6	K R A S	N C	N C
H P - 5 0 6 8 8	F G F R 3	W T	
H P - 5 0 6 9 9	F G F R 3	M U T	S 2 4 9 C
H P - 5 0 6 9 9	E G F R	M U T	G 7 3 5 S A 7 6 7 V

10

20

30

40

試料 I D	遺伝子	NGS コール	NGS 突然変異
HP - 5 0 6 9 9	ERBB4	MUT	S341L
HP - 5 0 7 0 7	FGFR3	WT	
HP - 5 0 7 0 7	EGFR	MUT	A698T
HP - 5 0 7 1 3	FGFR3	MUT	S249C
HP - 5 0 7 1 3	EGFR	MUT	R108K
HP - 5 0 7 1 3	PIK3CA	MUT	T1025T
HP - 5 0 7 1 4	FGFR3	WT	
HP - 5 0 7 1 5	FGFR3	MUT	R248C
HP - 5 0 7 1 5	EGFR	MUT	H870Y
HP - 5 0 7 1 5	VHL	MUT	W88*
HP - 5 0 7 1 5	KRAS	MUT	G12D
HP - 5 0 7 2 2	PIK3CA	MUT	E542K
HP - 5 0 7 2 2	FGFR3	MUT	R248C
HP - 5 0 7 2 7	KRAS	MUT	G13D
HP - 5 0 7 2 8	PIK3CA	MUT	R88Q
HP - 5 0 7 3 7	PIK3CA	MUT	H1047R
HP - 5 0 7 3 7	FGFR3	MUT	R248C
HP - 5 0 7 3 7	KRAS	WT	
HP - 5 0 7 3 7	VHL	MUT	Q96*
HP - 5 0 7 4 2	FGFR3	MUT	Y373C

10

20

30

40

試料 I D	遺伝子	NGS コール	NGS 突然変異
H P - 5 0 8 8 5	F G F R 3	M U T	R 2 4 8 C
H P - 5 0 8 8 8	H R A S	M U T	Q 6 1 R
H P - 5 0 8 9 2	F G F R 3	M U T	Y 3 7 3 C
H P - 5 0 8 9 3	P I K 3 C A	M U T	E 5 4 5 K
H P - 5 0 8 9 3	F G F R 3	M U T	G 3 7 0 C
H P - 5 0 8 9 4	F G F R 3	M U T	G 3 7 0 C
H P - 5 0 9 0 0	P I K 3 C A	M U T	H 1 0 4 7 R
H P - 5 0 9 0 0	F G F R 3	M U T	S 2 4 9 C
H P - 5 0 9 0 6	H R A S	M U T	Q 6 1 K
H P - 5 0 9 0 7	F G F R 3	M U T	Y 3 7 3 C
H P - 5 0 9 0 8	P I K 3 C A	M U T	E 5 4 2 K
H P - 5 0 9 1 2	F G F R 3	M U T	S 2 4 9 C
H P - 5 0 9 1 4	F G F R 3	M U T	S 2 4 9 C
H P - 5 0 9 1 8	F G F R 3	M U T	R 2 4 8 C
H P - 5 0 9 2 0	F G F R 3	M U T	S 2 4 9 C
H P - 5 0 9 2 2	F G F R 3	M U T	S 3 7 1 C
H P - 5 0 9 2 3	P I K 3 C A	M U T	E 5 4 5 K
H P - 5 0 9 2 3	F G F R 3	M U T	S 2 4 9 C
H P - 5 0 9 2 7	F G F R 3	W T	
H P - 5 0 9 2 7	I D H 2	M U T	R 1 4 0 W

10

20

30

40

試料 I D	遺伝子	NGS コール	NGS 突然変異
HP - 509 28	FGFR3	MUT	G370C
HP - 509 36	FGFR3	MUT	S249C
HP - 509 42	PIK3CA	MUT	E542K
HP - 509 42	FGFR3	MUT	S249C
HP - 509 42	KRAS	MUT	G12V
HP - 509 49	FGFR3	MUT	S249C
HP - 512 23	FGFR3	MUT	Y373C
HP - 512 23	IDH2	MUT	G171D
HP - 512 23	PIK3CA	MUT	E545K
HP - 512 27	FGFR3	MUT	S249C
HP - 512 27	PIK3CA	MUT	E542K
HP - 512 27	IDH2	MUT	G171D
HP - 519 30	FGFR3	MUT	K650E
HP - 527 10	PIK3CA	MUT	K111E
HP - 527 15	FGFR3	WT	
HP - 527 16	FGFR3	WT	
HP - 527 17	PIK3CA	MUT	E545K
HP - 527 24	PIK3CA	MUT	R108H
HP - 527 24	VHL	MUT	W117* C16 2Y Q164*

10

20

30

40

【0212】

FGFR3 免疫組織化学

免疫組織化学 (IHC) は、Ventana DISCOVERY (登録商標) XT 自

50

動染色器プラットフォーム (Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ) を使用して、厚さ $4\ \mu\text{m}$ の FFPE 組織断片上で行った。FGFR3 の検出の場合、スライドは、CC1 伸長された抗原抽出に続いて、抗 FGFR3、 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈されたクローン 15C3 (Genentech) 一次抗体での染色を用いる前処置を受け、室温で 60 分間インキュベートされた。FGFR3 シグナルの増幅の場合、複合されていないウサギ抗マウスリンカー抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) を、 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ で適用し、室温で 32 分間インキュベートした。これに続いて、抗ウサギ OMNIMAP (商標) 西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) キット (Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ) を用いた。

10

【0213】

断片をヘマトキシリンで対染色し、脱水し、清澄化して、見るためにカバーガラスを置いた。

【0214】

細胞株生存性研究

膀胱癌細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC, Manassas, VA) から、または Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany) から入手した。細胞株は、Genentech 細胞バンクにおける早期部分に記録保管され、多重短タンDEM 反復アッセイによるか、または前述の通りのいずれかで認証された (O'Brien et al. Clin. Cancer Res. 16 (14): 3670 - 3683, 2010)。全ての細胞株は、10% 胎仔血清 (Sigma, St. Louis, MO)、非必須アミノ酸、及び $2\ \text{mmol}/\text{L}$ L-グルタミンで補充された RPMI 1640 または DMEM 中で維持した。

20

【0215】

エルロチニブ (TARCEVA (商標)) は、EGFR の選択的かつ有能な阻害剤である。その構造、選択性、及び生物学的特性の詳細は、以前に説明されている (Stamos et al. J. Biol. Chem. 277 (48): 46265 - 46272, 2002)。細胞生存性研究は、前述の通り行った (O'Brien et al. Clin. Cancer Res. 16 (14): 3670 - 3683, 2010)。正常な成長培地内の 384 ウェルプレートにおいて、1 ウェル当たり 2,500 細胞の密度で 4 回細胞をプレートに置き、終夜接着させた。エルロチニブ用量応答は、 $5\ \mu\text{M}$ 用量から開始して、3 倍希釈シリーズに基づき、10 の濃度で処理することによって決定した。細胞生存性は、72 時間後に、CELLTITER-GLO (登録商標) 蛍光細胞生存性アッセイ (Promega, Madison, WI) を使用して測定した。各濃度での生存率は、DMSO のみで処理された対照と比較して計算した。

30

【0216】

統計解析

組織試料クラスタ (下位群) を特定するために、ユークリッド距離及び完全連結法を使用して、無監督の階層クラスタリングを行った。ノンパラメトリック・マン・ホイットニー検定 (例えば、Mann and Whitney, Annals of Mathematical Statistics 18 (1): 50 - 60, 1947 を参照されたい)、及びボンフェローニ補正 (例えば、Bonferroni, Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze 8: 3 - 62, 1936、及び Miller, Simultaneous Statistical Inference, 2nd Ed., Springer Verlag, pages 6 - 8, 1981 を参照されたい) を適用して、膀胱試料クラスタの中で差次的に発現された遺伝子を更に特定した。DFS は、手術日から再発または死亡日までの時

40

50

間として定義した。OSは、手術日から死亡日までの時間として同様に定義した。生存転帰は、患者が無再発であるか（DFSの場合）、または生存であるか（OSの場合）が分かった最新の観察時点で打ち切られた。カプラン・マイヤー推定（例えば、Kaplan and Meier, Journal of the American Statistical Association 53(282):457-481, 1958を参照されたい）を使用して、DFS可能性及び生存可能性を経時的に推定した。3年及び5年DFS率及び生存率もまた、カプラン・マイヤーDFS/OS曲線推定から計算した。クラスタ間の差次的突然変異頻度の有意性に関して、フィッシャーの直接検定を行った。フィッシャーの直接検定（例えば、Fisher, Journal of the Royal Statistical Society 85(1):87-94, 1922を参照されたい）及び両側T検定（例えば、Student, Biometrika 6(1):1-25, 1908を参照されたい）を、統計比較に関して示される通り使用した。

【0217】

実施例2：カスタムマイクロフルイディクス膀胱癌遺伝子発現パネルの開発及びアーカイブ膀胱癌臨床試料を階層化することにおけるその適用

ゲノム解析が、膀胱癌の分子的基礎に関する価値ある洞察を提供したが、以前の研究の大半は、高品質の核酸を産生し、一般に臨床治験からのアーカイブ標本の特徴付けには十分に適していない冷凍組織の使用に依存する。しかしながら、臨床治験からのアーカイブ標本は、多くの場合、付随する治療情報、無疾患生存（DFS）及び全生存（OS）情報、ならびにそれらを癌ゲノム解析のための優れたプラットフォームにする他の情報と関連付けられる。ここで、我々は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織の解析のために最適化されたマイクロフルイディクスに基づく膀胱癌遺伝子発現パネルを開発した。カスタム膀胱癌Fluidigmパネルは、膀胱癌生物学の重要な属性を捕捉するように選択された96の遺伝子からなる（表1を参照されたい）。表1に記載されるカスタム膀胱癌Fluidigmパネルは、91の固有の膀胱癌関連遺伝子と共に、データ品質制御及び正規化のための2つのハウスキーピング遺伝子を含む（図12Aを参照されたい）。

【0218】

カスタム膀胱癌Fluidigmパネルが、大きな一般に入手可能なデータセットにおいて膀胱癌サブタイプを良好に特定する能力を評価した（Sjodahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12):3377-3386, 2012）。Sjodahlら（上記）からの18,000遺伝子の発現に基づく主成分解析（PCA）プロットと、カスタム膀胱癌Fluidigmパネルからの82重複遺伝子を使用するPCAプロットとの比較は、試料分離の比較パターンを示した（図2A~2B）。次に、対角線形判別解析（DLDA）解析（Diaz-Uriarte et al. BMC Bioinformatics 7:3, 2006）を行い、Sjodahl研究から膀胱癌を正確に分類することにおける当パネルの精度を評価した。Sjodahlら（上記）からの18000遺伝子のうちの約200が、それらの研究において報告された大部分のサブタイプを80%超の精度で正確に分類する必要があることを見出した（図2C）。比較において、膀胱癌Fluidigmパネルからわずか20遺伝子のみが、Sjodahlデータセットを80%超の精度で正確に分類した（図2D）。これは、パネル上の慎重に選択された遺伝子が、疾患の重要な転写クラスを高い精度で捕捉することを示した。

【0219】

FFPE試料中の遺伝子発現を測定することにおけるカスタム膀胱癌Fluidigmパネルの頑強性及び再現性を確認するために、一連の品質制御実験を行った（図3A~3E）。第1に、連続希釈を行って、96アッセイの各々の性能を評価し、必要に応じて、アッセイを再設計して、全ての検査に関する線形標準希釈曲線を得た（図3A及び3B）。第2に、FFPE由来のRNA試料のセットを実行し、異なる日に実行された複製試料に関する結果において高い一致を観察した（図3C及び3D; $R^2 > 0.98$ ）。第3に、各々7回の独立ランに含めた対照RNA試料に関する高度のチップ・トゥ・チップデー

タ再現性を認めた(図3E; $R^2 > 0.92$)。まとめると、我々の定性的及び定量的評価からの結果は、カスタム膀胱癌 Fluidigm パネルが、転写的に定義された膀胱癌に対して頑強かつ生物学的に関連するプラットフォームを提供することを示す。

【0220】

204のFFPE膀胱癌組織のセットの解析において、カスタム膀胱癌 Fluidigm パネルを用いた(実施例1及び図1を参照されたい)。Fluidigm 遺伝子発現データの無監督の階層解析は、明確なDFS可能性と関連付けられた5つの転写的に定義された膀胱癌組織クラスタを明らかにした(図4A~4F、図5A及び5C)。組織クラスタリングを駆動するのは、線維芽細胞成長因子(FGFR)及び上皮成長因子(EGF)経路メンバー等の受容体チロシンキナーゼ(RTK)シグナル伝達遺伝子を含む共制御された遺伝子、腫瘍抑制遺伝子TP53を含むアポトーシス遺伝子、ならびに上皮間葉転換(EMT)遺伝子(図5B)の5つの主要な群であった。

10

【0221】

3つの主要な組織クラスタは、患者試料の大半を含んでいたためそれらに注目し、これ以降それらを緑色群、黄色群、及び赤色群と称する(図4A)。 Kaplan-Meier解析は、赤色群が、黄色群より良好なDFS可能性と関連付けられたことを明らかにし(図4B; HR = 0.54、P = 0.03)、黄色群は、緑色群より著しく良好なDFSプロファイルを有していた(図4B; HR = 0.29、P = 0.004)。膀胱癌組織像と患者転帰との十分に確立された関連を考慮して(Nargund et al. Semin. Oncol. 39(5): 559-572, 2012、Resnick et al. Curr. Opin. Oncol. 25(3): 281-288, 2013)、次に緑色、赤色、及び黄色組織群の組織病理学的属性を調べた。予想通り、最良のDFSプロファイルと関連付けられた赤色群の試料の大半は、NMIBC組織像であることを観察した(図4B及び4C、図6A~D)。黄色群は、赤色群よりも著しく高い割合のMIBC症例からなり、監督下解析のいかなる必要性もなしに、転移症例を排他的にこの群にクラスタ化した(図4C)。

20

【0222】

驚くべきことに、最悪のDFS可能性と関連付けられた緑色群は、典型的に非侵襲性のNMIBC組織像の試料からほぼ全体的に構成される(図4B及び4C、図6A~D)。これは、カスタム Fluidigm パネルが、綿密な臨床モニタリング及び治療的介入から利益を享受し得る、急速に再発するNMIBCを有する患者の群を特定したことを示唆する驚くべき観察であった。緑色群が、侵襲性の組織学的変型を表し得る可能性を除外するために、緑色群、赤色群、及び黄色群からの組織の包括的試験を行った(例えば、図4D及び4Eを参照されたい)。予想通り、NMIBC赤色群と比較して、MIBC及び転移性黄色群において前侵襲性微小乳頭組織像の著しく高い発症率が見られた(図4D; P = 0.0063、図6A~6D)。しかしながら、赤色群と比較して、侵襲性NMIBC緑色群の微小乳頭組織像の発症率において統計的に有意な差を観察しなかった(図4D; P = 0.2351、図6A~6D)。3つの組織群において、膀胱癌患者の臨床転帰と関連付けられることが報告された免疫浸潤も調べたが(Otto et al. World J. Urol. 30(6): 875-877, 2012)、それらの間に有意差は認められなかった(図4E)。緑色群及び赤色群に属する試料の腫瘍病期及び悪性度に有意差はなかった。したがって、転写的に定義された緑色群は、好ましい転帰の赤色群とは組織学的に異なる疾患サブタイプを表すとは思われない。

30

40

【0223】

次に、緑色群において観察された急速な疾患再発が、この患者集団の不適切な治療に起因し得るかどうかを決定した。3つの転写的に定義された群において、カルメット・ゲラン桿菌(BCG)ワクチン、化学療法、または放射線、ならびにそれらの組み合わせによる治療の頻度を調べた(図4F)。治療を受けたNMIBC赤色群及び侵襲性/転移性黄色群からの患者の比較分率(>60%) (図4F; P = 0.8836)。急速に再発するNMIBC緑色群の患者は、赤色群及び黄色群の両方よりも著しく高い割合で治療された

50

(図4F;両方の比較の場合、 $P < 0.0001$)。これらの結果は、緑色群からの急速な再発例が不適切な補助剤治療に起因しなかったこと、及びこのNMIBCサブタイプからの侵襲性腫瘍の分子的駆動因子が存在し得ることを示した。

【0224】

したがって、カスタム膀胱癌Fluidigmパネルは、アーカイブ膀胱癌組織を定義するための頑強なプラットフォームを提供する。このパネルに関する臨床的に注解された膀胱癌試料の組の解析は、不良なDFS可能性と関連付けられたNMIBC緑色群を含む3つの転写的に別個の膀胱癌サブタイプを明らかにした。

【0225】

実施例3:FGFR3は、急速に再発するNMIBCにおいて高頻度突然変異及び過剰発現され、浸潤性及び転移性腫瘍のサブセットにおける高発現は、不良な臨床転帰と関連付けられる。

NMIBCの特徴的機能のうちの1つは、それらが、症例の約60~70%において線維芽細胞成長因子受容体3(FGFR3)に体細胞活性化突然変異を担持することである(van Rhijn et al. J. Pathol. 198(2):245-251、Tomlinson et al. J. Pathol. 213(1):91-98, 2007、Martinez-Torrecuadrada et al. Clin. Cancer Res. 11(17):6280-6290, 2005、Kompier et al. PLoS One 5(11):e13821, 2010、Juanpere et al. Hum. Pathol. 43(10):1573-1582, 2012、Gust et al. Mol. Cancer Ther. 12(7):1245-1254, 2013、Cappellen et al. Nat. Genet. 23(1):18-20, 1999、Ah-Ahmadie et al. J. Pathol. 224(2):270-279, 2011)。FGFR3突然変異の大半は、細胞外または膜近傍ドメイン内のミスセンス置換であり、リガンド独立型受容体二量体化及び後次の活性化につながる(Tomlinson et al. 上記、Cappellen et al. 上記)。侵襲性及び転移性疾患におけるFGFR3における突然変異頻度が、11~16%に低下するという事実は、FGFR3が進行した疾患において腫瘍化を駆動し続けるかどうか、またはその腫瘍化の役割が、膀胱癌発達の早期にほぼ限定されるかどうかに関する不確実性につながった(Tomlinson et al. 上記、Al-Ahmadie et al. 上記、Qing et al. J. Clin. Invest. 119(5):1216-1229, 2009、Liu et al. Genet. Mol. Res. 13(1):1109-1120, 2014)。

【0226】

既知のFGFR3突然変異の大半を捕捉したカスタム多重PCRパネルを使用して、FGFR3の突然変異状態を評価した(Schleifman et al. PLoS One 9(3):e90761)。赤色群のNMIBC試料の解析は、約60%の予想されたFGFR3突然変異の頻度が、期待通り、MIBC及び転移性黄色群の試料が、約15%の著しく低いFGFR3突然変異の頻度を示したことを明らかにした(図7A)。FGFR3の突然変異は、より高いFGFR3の発現レベルを駆動することが報告された(Tomlinsonら、上記)。これらの報告と一致して、転写及びタンパク質レベルの両方に関して野生型試料と比較して、突然変異体内の著しく高いFGFR3発現レベルを検出した(図7B及び7C;両方の比較の場合、 $P < 0.0001$)。我々は、緑色群のFGFR3突然変異の高頻度の存在が、それがNMIBCサブタイプに属することの更なる確認であり得ると納得した。実際に、急速に再発するNMIBC緑色群において頻繁なFGFR3突然変異を観察した(図7A)。しかしながら、驚くべきことに、緑色群からの試料の大半は、NMIBC赤色群において観察されるものよりも著しく高い頻度で、FGFR3に突然変異を内包していた(図7A及び7D; $P < 0.0001$)。緑色群における高頻度FGFR3突然変異は、転写(図7E;両方の比較の場合、 $P < 0.0001$)及びタンパク質レベル(図7F;緑色対赤色の場合、 $P = 0.0343$ 、及び赤色対黄色

10

20

30

40

50

の場合、 $P < 0.0001$) の両方に関してNMIBC赤色群及び侵襲性/転移性黄色群よりも著しく高いFGFR発現と関連付けられた。

【0227】

上記のデータは、FGFR3発現の高頻度突然変異及び同時過剰発現が、急速に再発するNMIBCと相関することを示す。FGFR3は、疾患の後期に癌駆動因子として作用し続ける場合、次いで、上昇したFGFR3発現は、少なくとも症例のサブセットにおいて、膀胱癌発達中に維持されるべきである。これがその例であったかどうかを決定するために、RNA及びタンパク質両方のレベルにおいて、FGFR3の発現レベルを調べ、NMIBCの66%が、免疫組織化学(IHC)によって決定される通り、高レベルのFGFR3を発現したことを見出した(図7G)。高いFGFR3発現例の発症率が、MIBC及び膀胱癌転移において低減されたが、これらのより進行した病期の腫瘍の30%超が、FGFR3の高い発現レベルを維持し(図7G、IHCスコア2+/3+)、進行した疾患におけるFGFR3の継続的要件と一致する。

10

【0228】

当研究の全体膀胱癌群において、高FGFR3発現例に関して好ましいDFS及びOS生存可能性を観察し、これは、以前に公開された報告と一致する(Sjodahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12):3377-3386, 2012; Dyrskjot et al. Nat. Genet. 33(1):90-96, 2003; Kim et al. Mol. Cancer 9:3, 2010)。しかしながら、想定外に、MIBC及び転移性状況の両方における高いFGFR3発現は、減少した3年及び5年DFS可能性と関連付けられた(図7H)。更に、当試料シリーズにおいて進行した疾患(MIBC及び転移性膀胱癌)における高いFGFR3発現は、低減した3年及び5年OS可能性に関連していた(図7I)。これらの観察を検証するために、FGFR3発現及びOSデータの両方を提供したいいくつかの公開データセットを調べた(Sjodahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12):3377-3386, 2012; Kim et al. Mol. Cancer 9:3, 2010)。高レベルのFGFR3は、当データセットにおける観察と同様に、それら2つの研究において、全体集団で良好な予後を付与したが、上記のKimらによる研究からの低いFGFR3発現侵襲性/転移性膀胱癌と比較して高い、著しく不良なOS可能性を認め、故に我々の見出に関する独立した確認を提供する(図7J)。Sjodahlら(上記)による研究から、進行した病期の低FGFR3腫瘍に対して、高FGFR3腫瘍における不良なOSの傾向も観察した。

20

30

【0229】

まとめると、これらのデータは、FGFR3の急速に再発するNMIBCの駆動因子として、ならびに浸潤性(MIBC)及び転移性状況における侵襲性疾患の促進因子としての役割を支持する。いくつかの研究は、FGFR3の阻害が、高FGFR3発現膀胱癌の腫瘍成長を、インビトロ及びインビボで抑制することを明示した(Martinez-Torrecuadrada et al. Clin. Cancer Res. 11(17):6280-6290, 2005; Gust et al. Mol. Cancer Ther. 12(7):1245-1254, 2013; Qing et al. J. Clin. Invest. 119(5):1216-1229, 2009; Gomez-Roman et al. Clin. Cancer Res. 11(2 Pt 1):459-465, 2005; Lamont et al. Br. J. Cancer 104(1)75-82, 2011; Tomlinson et al. Oncogene 26(40):5889-5899, 2007)。したがって、癌が高FGFR3を発現する、高リスク膀胱癌患者(例えば、急速に再発するNMIBC、MIBC、または転移性膀胱癌を有する患者)は、FGFR3アンタゴニストでの治療の良好な候補を表す。

40

【0230】

実施例4:腫瘍抑制因子TP53は、急速に再発するNMIBCにおいて、突然変異され、過剰発現される。

50

カスタム膀胱癌 Fluidigm パネルは、NMIBC の転写的に定義された侵襲性サブセットを特定した。比較発現解析は、45 / 96 遺伝子 (47%) が、急速に再発する NMIBC 緑色群と、より良性の赤色群との間で著しく差次的に発現されたことを示した ($P < 0.05$ 、多重試験補正を伴う)。差次的に発現された遺伝子は、上記の通り、FGFR3 経路に属し、また腫瘍抑制因子 TP53、鳥類の赤芽球症発癌遺伝子 B (ERBB)、上皮間葉転換 (EMT)、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ、及びタンパク質キナーゼ B (PI3K-AKT) 経路にも属する (図 8)。

【0231】

突然変異レベルで当試料を更に特徴付けるために、NGS 解析を行った (Tsongalis et al. Clin. Chem. Lab. Med. 52 (5): 707-714, 2014)。予想通り、NGS データは、上記の FGFR3 突然変異の存在を確認し、図 7A に提示される (図 9A、表 3)。追加として、NGS 解析は、特に TP53、PIK3CA、KRAS、VHL、EGFR、PTEN、及び IDH2 を含むいくつかの他の遺伝子における突然変異を明らかにした (図 9A、表 3)。TP53 における突然変異は、浸潤性及び転移性膀胱癌において、またより低い程度で表層疾患において報告されてきた (George et al. J. Clin. Oncol. 25 (34): 5352-5358, 2007)。侵襲性 / 転移性黄色群、及びより少ない NMIBC 赤色群において、TP53 突然変異の存在を認めた (図 9A)。しかしながら、驚くべきことに、急速に再発する NMIBC 緑色群において、高頻度の TP53 突然変異を観察した (図 9A)。3 例を除く全ての症例において、TP53 の DNA 結合ドメインにマップされた突然変異、及び黄色群、赤色群、緑色群の各々における TP53 突然変異部位は、ほとんど重複していなかった (図 9B)。

【0232】

TP53 における突然変異が、緑色群において観察された不良な DFS 可能性に寄与すると仮定した。これと一致して、我々は、赤色群と比較して急速に再発する緑色群の NMIBC において、著しく高い頻度の TP53 突然変異を認めたが、侵襲性 / 転移性黄色群において観察されたものとは統計的に異なっていた (図 9C; それぞれ $P = 0.03$ 及び $P = 0.3605$)。TP53 の発現レベルはまた、赤色群及び黄色群よりも緑色群において著しく高かった (図 9D; それぞれ $P = 0.0187$ 及び $P = 0.002$)。TP53 転写標的 p21 の発現レベルもまた、他の 2 つの群と比較して、緑色群において著しく高く、TP53 の増加した発現レベルを更に確認する (図 9E、両方の比較の場合、 $P < 0.0001$)。研究群から得た野生型試料と比較して、突然変異体において著しく高い TP53 タンパク質レベルを観察した (図 9F、 $P = 0.0201$)。これらの見出しは、TP53 遺伝子が、緑色群の急速に再発する NMIBC において突然変異し、優先的に過剰発現されることを示す。

【0233】

次に、当患者群における TP53 過剰発現の臨床影響を決定した。全体膀胱癌集団において、高い TP53 発現レベルを有する腫瘍は、低発現腫瘍よりも好ましい DFS プロファイルを有する傾向があることを見出した (図 9G、 $P = 0.4218$)。興味深いことに、高 TP53 発現とより良い DFS 可能性との間のこの関係は、NMIBC 群における TP53 発現を他の群とは別個に見た場合、逆であった (図 9H)。NMIBC 群において、上昇したレベルの腫瘍抑制因子が、低発現例と比較して、たとえ統計的に有意でないとしても不良な DFS 可能性を付与したことを見出した (図 9H、 $HR = 1.99$ 、 $P = 0.1292$)。TP53 サインは、侵襲性膀胱癌状況において化学療法への耐性と関連付けられることが示された (Choi et al. Cancer Cell 25 (2): 152-165, 2014)。当研究群の NMIBC サブセットにおいて、高 TP53 発現は、一般に膀胱癌患者に投与される治療である BCG で治療された患者において著しく不良な DFS と関連付けられた (図 9I、 $HR = 4.2$ 、 $P = 0.0405$)。しかしながら、NMIBC における高 TP53 発現と不良な DFS との間のこの関係は、未治療の患者 (すなわち、治療を受けていない患者) において見られなかった (図 9J、 HR

10

20

30

40

50

= 0.57、 $P = 0.5749$)。当データは、高頻度のTP53突然変異が、NMIBCを有する患者において侵襲性腫瘍挙動に寄与し得ること、及びこれが、この患者集団におけるBCGの逆効果に一部起因し得ることを示唆する。

【0234】

実施例5：高EGFR発現は、不良な臨床転帰と関連付けられ、膀胱癌細胞株においてエルロチニブに対する感受性を付与する。

ERBB2における突然変異は、侵襲性微小乳頭組織像の腫瘍において報告されてきた(Ross et al. Clin Cancer Res. 20(1):68-75, 2014)。当患者群において、ERBB2突然変異は検出されなかったが、より良性の表層赤色群から、または侵襲性/転移性黄色群からの腫瘍ではなく、急速に再発するNMIBC緑色群からの腫瘍において、EGFR内の突然変異を特定した(図3A)。ERBBファミリーリガンド及び受容体のより詳細なゲノム解析を行い、膀胱癌の駆動因子としてのこの経路の潜在的役割を調査した(図10)。黄色群からの試料の2/39(約5%)においてEGFRコピー数、及び4/39(約10%)においてERBB2の増加を観察するとともに、赤色群からの1/30(約3%)の試料においてERBB2コピー数の増加を観察した(図10)。これらの見出は、以前の報告と一致しており(Weinstein et al. Nature 507(7492):315-322, 2014、Capellen et al. Nat. Genet. 23(1):18-20, 1999)、この経路が膀胱癌生成において役割を果たし得ることを示す。

【0235】

急速に再発するNMIBCにおけるERBBファミリーメンバーのDNAコピー数の変化を検出しなかったが、Fluidigmデータ解析は、EGFRの発現レベルが、より良性のNMIBC赤色群ならびに侵襲性/転移性黄色群からの試料の両方と比較して、急速に再発するNMIBC緑色群において著しく高いことを明らかにした(図11A、それぞれ $P = 0.012$ 及び $P = 0.0012$)。EGFRが、NMIBCにおける侵襲性膀胱癌挙動に少なくとも部分的に寄与し得る可能性を調査するために、腫瘍が高レベルのEGFRを発現した患者と低レベルのEGFRを発現した患者のDFS可能性を調べた。非浸潤性状況において、高レベルのEGFRを発現したNMIBCを有する患者は、低発現悪性腫瘍を有する患者と比較して、3年ならびに5年DFS可能性を低減していた(図11B)。進行した転移性状況において、高EGFR発現レベルは、減少した3年及び5年DFS可能性とも関連した(図11C)。更に、転移性疾患を有する当群からの患者における高EGFR発現は、低発現例と比較して、好ましくない3年及び5年OS可能性と関連付けられた(図11D)。

【0236】

これらの見出を検証するために、2つの独立したデータセットにおけるEGFR発現レベルの予後値を評価した(Sjodahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12):3377-3386, 2012、Kim et al. Mol. Cancer 9:3, 2010)。これら2つの研究からの侵襲性/転移性症例において、高EGFR発現が、3年及び5年両方のフォローアップ時間枠において、低減したOS可能性を伴うことを観察した(図11E及び11F)。したがって、当群からのデータならびに2つの独立した研究からのデータは、高EGFR発現が、膀胱癌の侵襲的挙動に少なくとも部分的に寄与し得ることを示唆する。

【0237】

膀胱癌における抗EGFR両方剤への応答に関する予測的バイオマーカーとしてのEGFR発現レベルを評価するために、膀胱癌細胞株のパネルを、EGFR小分子阻害剤エルロチニブへの感受性についてスクリーニングした(Stamos et al. J. Biol. Chem. 277(48):46265-46272, 2002)。UMUC-5、UMUC-10、及びUMUC-17細胞株は、エルロチニブに対して異なる程度の感受性を示し、UMUC-5に対する75%超の成長阻害(GI)~UMUC-17に対する約40%GIの範囲であった(図11G)。一方、4つの細胞株(RT-112、UM

UC - 3、SW780、及びBFTC905)は、エルロチニブ治療への応答において最小GIを示した(図11G)。次に、当細胞株におけるEGFR発現のレベルを調べた。感受性でない膀胱癌細胞株と比較して、感受性の細胞株(>25% GI)著しく高いレベルのEGFRを発現した(最小GI<25%) (図11H、P=0.0106)。これらの結果は、膀胱癌におけるEGFRの発現レベルが、EGFR経路阻害剤(例えば、エルロチニブ)へのその感受性を予測することを示す。

【0238】

実施例6：カスタム膀胱癌Fluidigmパネルは、膀胱癌試料を基底及び管腔サブタイプに正確に分類する。

この実施例は、アーカイブFFPE膀胱癌臨床試料を含む、膀胱癌の転写解析のためのカスタム膀胱癌Fluidigmパネルの追加の開発及びインシリコ検証を説明する。実施例1及び2に記載される通り、パネルの遺伝子には、FGFR、ERBB、MET、PI3K/AKT、及びMAPK軸等の受容体チロシンキナーゼ(RTK)の構成要素；TP53等の細胞周期及びゲノム安定性遺伝子；ならびに細胞分化及び発達の制御、ならびに上皮間葉転換(EMT)に關与する遺伝子が含まれる(図12A)。

【0239】

インシリコで、カスタム膀胱癌Fluidigmパネル(表1を参照されたい)が、大きな公開データセットからの試料の重要な分子的及び組織学的属性を捕捉する能力を評価した(Sjodahl et al. Clin. Cancer Res. 18(12): 3377-3386, 2012)。カスタム膀胱癌Fluidigmパネルに対応する125プローブの発現に基づく無監督の階層クラスタリングは、2つの主な分岐を明らかにした(図12B)。左分岐は、Sjodahl et al. (上記)に定義される通り、低悪性度(G1/G2)腫瘍、T1期の癌、及びMS1分子クラスに關して増強された(図12B)。右分岐下で、G3/G4腫瘍の優勢、及びT3/T4悪性腫瘍の増強、膀胱癌のMS2aクラスの共クラスタリング、及びSjodahl定義された分子サブタイプからのMS2b腫瘍の分離を認めた(図12B)。

【0240】

次に、Sjodahl et al. (上記)により定義される通り、24,394のIlluminaプローブセット全てを使用するか、またはカスタム膀胱癌Fluidigmパネルの内容と重複する125プロ-ブセットを使用するかのいずれかで、腫瘍悪性度、TNM病期、及び転写クラスの誤分類エラー率を計算し、重心分類器において使用され、相互検証により評価される場合、遺伝子サブセットを減少させる能力の予測を決定した(Tibshirani et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 6567-6572, 2002) (図12C)。腫瘍悪性度及びTNM病期に關して約40%の比較誤分類エラー率、ならびにMS1、MS2a、及びMS2bクラスに關して約20%の誤分類エラー頻度を見出した(図12C)。誤分類エラー率の同様の増加は、プローブの数が低減された場合に両方の例において觀察された(図12C)。これらの結果は、Sjodahl et al. (上記)において使用されるIlluminaマイクロアレイの内容全体を使用して、カスタム膀胱癌Fluidigmパネルの遺伝子が、分子クラスを高い精度で、ならびに腫瘍悪性度及びTNM病期を同様の有効性で捕捉することを示唆する。

【0241】

膀胱癌の最近説明された基底及び管腔サブタイプの生物学的及び臨床的關連を考慮して(Damrauer et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 111: 3110-3115, 2014、Choi et al. PLoS One 7: e30206, 2012)、カスタム膀胱癌Fluidigmパネルが、いくつかの公開データセットにおけるこれらの2つの分子下位群を区別する能力を調べた。Damrauerら(上記)及びChoiら(Cancer Cell 25: 152-165, 2014)により発見及び検証群において決定された基底/管腔割り当てを使用して、膀胱癌Fluidigmパネル内の遺伝子に対応するプローブの発現に基づいて試料を階層的に

10

20

30

40

50

クラスタ化する無監督アプローチを用いた(図12D)。このアプローチは、Sjodahlら(上記)データセットからの管腔試料の39/44(80%)及び基底試料の42/47(89%)、ならびにKim群からの管腔腫瘍の10/12(83%)及び基底腫瘍の17/18(94%)を正確に分類した(Kim et al. Molecular Cancer 9:3, 2010)(図12D)。更に、このアプローチは、Damrauer発見セット(Damrauerら、上記)からの標本を、それぞれ症例の33/33(100%)及び23/28(82%)で管腔及び基底サブタイプに正確に分類した(図12D)。最後に、カスタム膀胱癌Fluidigmパネルの遺伝子は、Choi発見データセット(Choi et al. 2012、上記)からの管腔及び基底状態に基づいて、試料を、それぞれ23/24(96%)及び23/23(100%)の事例において正しく分類することができた。まとめると、このインシリコ解析からの見出しは、カスタム膀胱癌Fluidigmパネルにおける慎重に選択された遺伝子が、4つの公開データセット内で基底/管腔状態を正確に検出することを明示する。

10

【0242】

カスタム膀胱癌Fluidigmパネルの頑強性及びFFPE試料における遺伝子発現を測定する際の再現性を評価するために、一連の品質制御実験を行った。第1に、連続希釈を行って、アッセイの各々の性能を評価し、必要に応じてプライマーを再設計して、全ての検査に関する線形標準希釈曲線を得た(図13A)。FFPE由来のRNA試料のセットも実行したところ、異なる日に実行された複製試料からのパネル上の各遺伝子の正規化された発現において高い一致を観察した(図13B、 R^2 範囲 = 0.98 ~ 0.99)。

20

最後に、各々7回の独立ランに含めたユニバーサルヒトRNA対照に対して、高度のチップ・トゥ・チップデータ再現性を認めた(図3E; R^2 範囲 = 0.91 ~ 0.98)。

【0243】

まとめると、我々の定性的及び定量的評価からの結果は、カスタム膀胱癌Fluidigmパネルが、技術的に頑強であり、転写的に定義されたFFPE膀胱癌組織に対して使用され得ることを示す。FFPE組織の転写特徴付けのためのカスタム膀胱癌Fluidigmパネルの実用性を更に明示するために、実施例1及び表1において上述される、原発性NMIBC、MIBC、ならびにリンパ節及び遠位METで構成される204試料のセットを解析した。これらの試料が、基底/管腔転写特徴に関していくつかの公開データベースからの試料とどのように比較されるかを調べた。予想通り、当パネル上の遺伝子に対応するプローブからのメジアン中心発現を使用する、4つの公開データベース(Damrauer et al. 2014, 上記、Kim et al. 2010, 上記、Sjodahl et al. 2012, 上記、及びChoi et al. 2014, 上記)からの試料の無監督の階層クラスタリングは、試料の明確な分離を明らかにした(図14A)。顕著に、Kim管腔試料は、3つの他のデータセットからの基底試料と共にクラスタ化され、故にこの解析において外れ値であった(図14A)。実施例1及び図1に記載される膀胱癌群のNMIBCは、管腔試料と共にクラスタ化されたことを観察したが、MIBC及びMETは、より基底であるように思われ、公開データセットからの基底試料と共にクラスタ化された(図14A)。

30

【0244】

実施例1及び図1に記載される204FFPE試料の基底/管腔(B/L)転写サインを更に評価するために、次に、これらの腫瘍の各々に関するB/L類似性スコアの計算方法を確立した。最初に、公開データセットにおけるカスタム膀胱癌Fluidigmパネルの遺伝子に対応する全てのプロ・ブの発現をメジアンで中心化し、基底群及び管腔群における平均遺伝子発現値を、Damrauer et al. (上記)及びChoiら(上記)により指定される通りに計算した(図14B)。これにより、公開データセットからの管腔群及び基底群におけるこれらの遺伝子の各々の発現の平均図を得ることができた(図14B及び14C)。例えば、FGFR3は、当パネル上のいかなる他の遺伝子よりも管腔試料中で最高の平均発現値を有し、この平均FGFR3発現レベルは、公開データセットからの基底試料中で最も低いものの1つであった(図14B)。次いで、公開され

40

50

た基底及び管腔プロファイルに対する相関を計算することによって、各 F F P E 試料の B / L 類似性スコアを得た (図 1 4 C) 。

【 0 2 4 5 】

実施例 1 及び図 1 に記載される 2 0 4 F F P E 試料の無監督の階層クラスタリングは、遺伝子発現の別個のパターンを有する 2 つの主な分岐、(1) 低 B / L 類似性スコアを有する試料 (管腔様) が共クラスタ化された右分岐、及び (2) 高 B / L スコアを有する試料で構成された左分岐 (基底様) を示した (図 1 5 A) 。統計解析は、管腔状態を示す左分岐において著しく低い B / L スコア、及び階層ツリーの右アーム下の基底状態と一致する著しく高い B / L スコアを確認した (図 1 5 B 、上左) 。基底群と比較して、管腔群において N M I B C の著しく高い分率を観察した (図 1 5 B 、上右) 。M I B C は、基底群及び管腔群の両方で表されたが、著しく高い比率の M I B C が基底群において観察された (図 1 5 B) 。興味深いことに、ほぼ全ての M E T は、階層ツリーの基底アーム下でクラスタ化し、実施例 1 及び図 1 に記載される膀胱癌群における M E T の大半が、基底転写プロファイルを示したことを示唆する (図 1 5 A 及び 1 5 C) 。

10

【 0 2 4 6 】

上記の通り、N M I B C の特徴的機能のうちの一つは、それらが、症例の約 6 0 ~ 8 0 % において F G F R 3 に体細胞活性化突然変異を担持することであり、M I B C 及び M E T では、約 1 5 % のはるかに低い頻度が報告されている。カスタム対立遺伝子特異的 P C R パネルを使用する群からの試料中の F G F R 3 及び癌関連遺伝子の突然変異状態を評価した (S c h l e i f m a n e t a l . 上記、T o m l i n s o n e t a l . 上記、v a n R h i j n e t a l . 上記、M a r t i n e z - T o r r e c u a d r a d a e t a l . 上記、C a p p e l l e n e t a l . 上記、1 9 9 9、及び A l - A h m a d i e e t a l . 上記) 。予想通り、腫瘍の約 7 5 % が管腔標識下で共クラスタ化したことを見出し、約 2 0 % よりも著しく高い分率が、基底群からの試料において観察された (図 1 5 A 及び 1 5 D) 。F G F R 3 における突然変異は、より高い F G F R 3 タンパク質の発現レベルを駆動することが報告されてきた。これらの報告と一致して、基底群からの試料と比較して管腔群からの試料において、I H C により測定される通り、著しく高い F G F R 3 タンパク質のレベルを認めた (図 1 5 A 及び 1 5 D) 。F G F R 3 突然変異及び発現データは、当試料の管腔及び基底状態の分子の確認を提供する。

20

【 0 2 4 7 】

B / L 転写特徴以外に、膀胱癌の発現に関与することが知られている経路、例えば、T P 5 3 経路、P I 3 K / A K T 経路、E R K / M A P K 経路、及び細胞周期シグナル伝達軸の構成要素に属する遺伝子の発現の測定におけるカスタム膀胱癌 F l u i d i g m パネルの実用性を評価した。順列調節された p 値を使用して、複数仮説検証を制御し、4 9 / 9 1 の固有遺伝子を、基底群と管腔群との間で著しく差次的に発現されたと特定し (表 4) 、I N G E N U I T Y (登録商標) ソフトウェアを使用してこれらの遺伝子を経路にマッピングした (図 1 5 F) 。

30

表 4 : 基底群と管腔群との間で差次的に発現された遺伝子

遺 伝 子	指 標	原 値	P	調 節 さ れ た 値	P	管 腔 平 均 遺 伝 子	管 腔 標 準 偏 差 遺 伝 子	基 底 平 均 遺 伝 子	基 底 標 準 偏 差 遺 伝 子
A C V R L 1	4 . 4 7 0 9 9 2	1 . 0 0 0 4		6 . 0 0 0 4		- 0 . 3 7 7 3 9 2	0 . 8 9 7 9 6 0	0 . 2 0 2 9 6 6	0 . 8 5 0 9 1 2
A D A M 1 2	1 0 . 7 1 4 6 3 2	1 . 0 0 0 4		1 . 0 0 0 4		- 1 . 0 0 7 1 4 8	1 . 1 3 2 8 1 8	1 . 0 7 3 6 0 8	1 . 5 2 9 7 3 6
A R A F	- 5 . 3 1 5 8 4 3	1 . 0 0 0 4		2 . 0 0 0 4		0 . 1 8 7 8 3 6	0 . 4 1 8 5 8 7	- 0 . 1 5 9 5 4 6	0 . 4 7 2 9 9 4
A X L	7 . 4 0 2 3 4 8	1 . 0 0 0 4		1 . 0 0 0 4		- 0 . 5 6 8 4 5 0	0 . 8 6 4 1 2 9	0 . 4 6 8 4 4 9	1 . 0 5 2 8 3 8
B C L 2	3 . 3 2 7 7 9 7	0 . 0 0 1 2		0 . 0 3 9 2		- 0 . 5 9 9 4 6 1	2 . 5 6 1 6 3 7	0 . 4 7 6 4 9 0	1 . 5 2 9 9 3 4
B M P 2	- 5 . 5 0 6 1 0 6	1 . 0 0 0 4		2 . 0 0 0 4		0 . 5 1 1 0 5 5	1 . 3 8 8 4 5 3	- 0 . 8 4 2 7 0 3	1 . 9 8 2 2 0 1
B M X	3 . 8 6 9 3 3 2	3 . 0 0 0 4		0 . 0 0 7		- 0 . 3 6 5 6 8 6	1 . 1 2 5 4 0 7	0 . 4 3 2 2 7 0	1 . 6 9 9 4 6 2
C C N D 1	- 6 . 6 4 8 1 4 1	1 . 0 0 0 4		1 . 0 0 0 4		0 . 6 1 4 0 6 5	1 . 3 0 2 0 0 3	- 0 . 8 2 8 5 9 3	1 . 6 7 1 4 7 0
C D H 1	- 6 . 1 8 6 0 1 0	1 . 0 0 0 4		1 . 0 0 0 4		0 . 3 0 8 2 0 9	0 . 6 2 6 9 2 7	- 0 . 5 5 4 3 7 8	1 . 2 5 5 8 2 5
C D H 2	6 . 7 6 7 3 3 1	1 . 0 0 0 4		1 . 0 0 0 4		- 0 . 9 0 2 2 1 6	1 . 4 7 7 8 4 1	0 . 7 8 9 5 9 8	1 . 9 4 9 0 9 3

10

20

30

40

C D	— 6 .	1 .	1 .	0 . 3	0 . 9	— 0 .	1 . 1
K N	3 0 2	E —	E —	7 9 4	4 8 5	5 6 9	0 9 3
1 A	9 6 7	0 4	0 4	2 9	1 5	7 6 1	4 0
C X	6 . 1	0 0	0 0	— 3 .	5 . 2	0 . 5	2 . 9
C L	0 1 0	E —	E —	4 2 7	3 3 3	5 6 6	5 0 0
1	3 1	0 4	0 4	8 4 1	7 2	9 5	7 8
D U	8 . 8	0 0	0 0	— 0 .	1 . 0	1 . 1	1 . 6
S P	9 4 0	E —	E —	5 6 9	5 0 1	9 4 4	6 2 7
1	1 6	0 4	0 4	1 8 5	0 8	7 3	0 5
D U	— 4 .	0 0	0 0	0 . 4	1 . 1	— 0 .	1 . 3
S P	4 6 5	E —	E —	1 7 0	0 7 0	3 7 2	0 9 0
6	4 2 9	0 4	0 4	1 0	9 5	1 8 5	1 6
E R	— 6 .	0 0	0 0	0 . 3	0 . 7	— 0 .	1 . 4
B B	9 8 7	E —	E —	8 9 2	6 6 7	7 5 3	5 0 4
3	2 7 8	0 4	0 4	5 6	4 2	4 0 0	7 5
F G	4 . 8	0 0	0 0	— 0 .	1 . 0	0 . 3	1 . 3
F 1	8 5 5	E —	E —	5 4 0	1 3 0	1 8 6	9 7 2
F 1	5 2	0 4	0 4	1 6 5	7 8	7 7	6 5
F G	7 . 9	0 0	0 0	— 2 .	2 . 8	0 . 6	1 . 7
F 1	5 3 4	E —	E —	1 5 5	3 5 2	9 3 1	0 0 1
0	0 2	0 4	0 4	4 1 3	5 4	1 4	2 4
F G	4 . 8	0 0	0 0	— 0 .	1 . 5	0 . 4	1 . 0
F 2	1 1 1	E —	E —	5 7 3	7 8 1	1 6 8	8 8 2
F 2	5 8	0 4	0 4	7 4 2	8 3	3 7	0 9
F G	1 0 .	0 0	0 0	— 3 .	3 . 2	1 . 2	2 . 3
F 7	0 9 2	E —	E —	0 6 1	7 8 9	8 3 6	1 7 2
F 7	0 4 5	0 4	0 4	2 4 6	2 2	6 4	2 4
F G	9 . 6	0 0	0 0	— 0 .	1 . 2	0 . 5	0 . 8
F R	8 0 5	E —	E —	9 5 1	0 4 4	7 2 3	3 5 6
1	7 1	0 4	0 4	2 3 1	7 0	5 2	3 9

10

20

30

40

F G	- 4 .	2 .	0 .	0 .	0 .	0 .	- 0 .	1 .
F R	3 3 1	0 0	0 0	0 0	9 7 8	8 3 1	5 2 9	0 3 2
2	4 8 2	0 4	1 3	1 9	5 4	5 8 0	6 6	
F G	- 8 .	1 .	1 .	0 .	0 .	1 .	- 1 .	2 .
F R	4 0 4	0 0	0 0	0 .	8	1 .	4	- 1 .
3	2 5 2	0 4	0 4	8 6	9 9	3 6 3	2 9	
F N	8 .	1 .	1 .	- 1 .	1 .	0 .	0 .	1 .
1	5 9 5	0 0	0 0	0 2 6	9 8 5	2 7 4	5 0 2	
	8 0	0 4	0 4	1 9 5	3 7	3 7	0 5	
G A	- 5 .	1 .	2 .	0 .	1 .	- 0 .	2 .	
T A	2 2 8	0 0	0 0	0 2 7	6 1 4	9 2 2	0 5 7	
3	8 6 6	0 4	0 4	3 2	5 6	9 1 9	8 4	
H P	7 .	1 .	1 .	- 0 .	1 .	0 .	1 .	
S E	7 9 5	0 0	0 0	7 1 5	2 8 4	2 8 7	3 2 5	
	7 2	0 4	0 4	9 9 2	2 9	5 1	3 9	
J A	- 4 .	1 .	0 .	0 .	0 .	- 0 .	1 .	
G 1	0 3 6	0 0	0 0	5 5 6	7 8 6	2 8 9	7 4 3	
	3 1 7	0 4	3 4	7 3	5 8	8 2 3	8 4	
K D	- 4 .	1 .	0 .	0 .	0 .	- 0 .	1 .	
R	3 2 5	0 0	0 0	5 8 1	5 3 9	3 9 4	0 8 1	
	8 7 4	0 4	1 3	8 0	5 4	8 0 9	7 2	
M E	- 5 .	1 .	2 .	0 .	0 .	- 0 .	1 .	
T	0 0 5	0 0	0 0	5 5 4	1 6 4	3 5 0	3 6 4	
	4 1 9	0 4	0 4	2 0	8 4	7 4 6	2 8	
M M	8 .	1 .	1 .	- 2 .	2 .	1 .	1 .	
P 9	2 4 2	0 0	0 0	0 4 1	3 6 5	1 2 7	1 1 5	
	1 2	0 4	0 4	1 8 5	0 7	3 5	9 5	
N F	- 6 .	1 .	1 .	0 .	0 .	- 0 .	0 .	
1	6 4 1	0 0	0 0	2 7 0	1 8 2	2 4 8	6 2 6	
	9 7 3	0 4	0 4	3 3	6 2	1 6 2	2 6	

10

20

30

40

N O T C H 1	- 4 . 4 6 7 0 7 1	1 . 0 0 E - 0 4	6 . 0 0 E - 0 4	0 . 3 3 0 6 2 3	0 . 9 9 6 0 8 4	- 0 . 2 9 6 3 8 5	0 . 8 8 2 3 3 0
P I K 3 C B	- 4 . 9 8 2 9 8 7	1 . 0 0 E - 0 4	3 . 0 0 E - 0 4	0 . 2 0 2 1 9 7	0 . 4 5 9 3 5 3	- 0 . 1 5 8 9 9 2	0 . 5 3 0 6 1 5
P I K 3 I P 1	- 4 . 3 9 9 2 2 6	1 . 0 0 E - 0 4	0 . 0 0 1	0 . 2 1 7 7 9 1	0 . 7 4 3 9 3 6	- 0 . 3 3 3 8 8 8	0 . 9 7 4 9 5 4
P O U 5 F 1	- 4 . 8 8 1 4 6 6	1 . 0 0 E - 0 4	3 . 0 0 E - 0 4	0 . 4 3 2 5 9 6	0 . 8 2 7 8 1 5	- 0 . 2 5 3 5 5 1	1 . 0 9 9 1 1 9
R B 1	- 4 . 5 1 1 6 3 4	1 . 0 0 E - 0 4	6 . 0 0 E - 0 4	0 . 4 3 3 9 5 4	0 . 9 9 0 3 2 0	- 0 . 2 5 0 4 7 5	1 . 0 7 4 8 6 9
S 1 P R 1	3 . 3 4 7 3 7 6	8 . 0 0 E - 0 4	0 . 0 3 6 8	- 0 . 9 3 6 4 0 0	2 . 0 9 8 2 0 7	0 . 1 1 5 3 1 3	2 . 1 6 4 6 4 7
S M O	4 . 1 0 8 0 3 7	2 . 0 0 E - 0 4	0 . 0 0 2 9	- 0 . 5 7 0 2 1 5	1 . 3 1 6 3 7 6	0 . 2 3 2 3 2 3	1 . 3 3 0 0 6 1
S N A I 1	9 . 7 2 0 1 2 1	1 . 0 0 E - 0 4	1 . 0 0 E - 0 4	- 0 . 7 3 8 7 0 6	0 . 8 2 6 9 7 9	0 . 6 9 3 2 5 5	1 . 1 9 2 4 8 6
S P H K 1	9 . 3 9 0 9 2 1	1 . 0 0 E - 0 4	1 . 0 0 E - 0 4	- 1 . 0 7 3 2 6 2	1 . 3 3 1 0 3 6	0 . 7 9 8 3 8 6	1 . 3 7 3 0 5 0
S R C	- 8 . 4 0 9 1 5 1	1 . 0 0 E - 0 4	1 . 0 0 E - 0 4	0 . 4 4 0 5 5 9	0 . 6 1 6 6 5 3	- 0 . 5 8 8 2 2 8	1 . 0 5 2 0 3 8

10

20

30

40

T I M P 1	5 . 7 8 9 3 4 6	1 . 0 0 0 4	1 . 0 0 0 4	- 0 . 4 4 0 9 9 5	0 . 7 7 7 2 3 8	0 . 4 2 4 3 8 2	1 . 2 6 5 6 7 8
T I M P 2	7 . 9 9 7 4 4 8	1 . 0 0 0 4	1 . 0 0 0 4	- 0 . 6 9 3 0 6 8	0 . 9 9 4 6 0 8	0 . 5 6 2 7 5 9	1 . 1 5 0 1 3 4
T P 5 3	- 6 . 7 5 6 8 8 4	0 0 E - 0 4	0 0 E - 0 4	0 . 2 8 3 2 0 2	0 . 5 8 5 3 4 5	- 0 . 3 5 9 8 2 3	0 . 7 1 7 2 3 5
T P 6 3	- 9 . 0 3 6 7 3 1	0 0 E - 0 4	0 0 E - 0 4	0 . 5 4 1 0 6 6	1 . 0 5 8 8 4 3	- 1 . 7 2 5 5 6 7	2 . 3 0 4 4 7 5
T P 7 3	- 3 . 2 6 4 0 9 0	0 . 0 0 1 4	0 . 0 4 7 7	0 . 3 5 5 6 2 6	1 . 5 2 9 6 3 4	- 0 . 4 1 3 4 1 0	1 . 6 7 9 9 6 0
T S C 1	- 4 . 2 8 9 1 7 5	0 0 E - 0 4	0 . 0 0 1 5	0 . 2 3 9 0 6 9	0 . 6 8 6 5 4 2	- 0 . 1 9 6 5 4 0	0 . 6 8 8 4 3 6
Z E B 1	6 . 6 8 1 0 4 0	0 0 E - 0 4	0 0 E - 0 4	- 0 . 4 5 1 1 4 6	0 . 8 0 7 0 5 7	0 . 3 1 0 8 7 1	0 . 7 2 0 6 1 4
Z E B 2	9 . 8 5 1 3 3 1	0 0 E - 0 4	0 0 E - 0 4	- 0 . 7 1 8 7 8 4	0 . 9 5 6 3 1 5	0 . 6 3 2 4 8 8	0 . 8 8 8 2 3 6

10

20

30

40

50

【 0 2 4 8 】

管腔腫瘍において著しい活性化スコアを示した経路には、NF - B、TP53、ERK / MAP、G1 / S細胞周期チェックポイント、HGF、及びVEGFシグナル伝達経路が含まれた（図15F）。一方で、基底群において著しく活性化された経路には、PTEN、PI3K / AKT、セラミド、及び細胞周期制御シグナル伝達経路が含まれた（図15F）。INGENUITY（登録商標）ソフトウェアを使用する上流経路活性化解析はまた、管腔群に属する試料が、高レベルのFGFR3、GATA3、CCND1、及びERBB3、低レベルのAXL1、CXCL1、FGFR1、及びBCL2、ならびにSNAI1及びZEB1等の低発現レベルのEMT遺伝子を含む、エストロゲン受容体（ER）活性化と一致する発現プロファイルを有していたことを明らかにした（図17A）。対照的に、基底群に属する試料は、これらの遺伝子に対して反対の発現プロファイルを示した（図17B）。これらの見出は、当パネルが、FFPE組織内の膀胱癌関連経路の転写状態を測定するために有益である。

【0249】

原発膀胱癌の組織病理学的特徴は、膀胱癌患者に対して病歴的に促される臨床管理決定を有する。膀胱癌の遺伝的駆動因子に関する理解が高まると共に、疾患の分子的属性に基づく治療介入のための新たな道が敷かれている。しかしながら、しばしば原発腫瘍の分子的特徴を使用して、転移状況において開発されている薬物の場合でも、標的薬剤の臨床決定をガイドする。原発腫瘍の重要な分子的特徴が、転写レベルで膀胱癌転移のものを代表するかどうかを述べるために、同じ患者からの9対のマッチさせた原発腫瘍/METのB/Lスコアを比較した。最初に、次世代シーケンシング(NGS)データを調べ、9対の原発/転移からの変異型が高度に相関していたことを見出し、故にマッチさせた腫瘍が、実際に同じ患者からのものであることを確認した(図16A及び18)。原発腫瘍とマッチさせたMETとのB/Lスコア間の相関解析は、5/9対が、ほぼ同一のB/Lスコアを有し、2/9がそれらのB/L状況にわずかな差を示したことを示した(図17A及び17B)。興味深いことに、2/9例においてB/Lスコアの著しい変化を観察し、それらの両方は、管腔原発腫瘍及び基底METを有すると特徴付けられた(図17A及び17B)。これらの見出しは、原発腫瘍のB/L状態が、転移性病変において観察されるものを常に反映しているとは限らないことを示唆し、膀胱癌転移の分子的特徴付けが、診療所における治療決定をより正確に導くことが保証され得る。

10

【0250】

実施例6の追加の材料及び方法

公開データセットの解析

いくつかの公開データセットを使用して、カスタム膀胱癌Fluidigmパネル遺伝子が腫瘍病期、悪性度、基底/管腔状態等の疾患の重要な転写特徴を捕捉する能力を保証した。Sjodahl IlluminaヒトHT-12 V3.0遺伝子発現データ(Sjodahl et al. 2012、上記)を、遺伝子発現オムニバス(GEO)ウェブサイト(ncbi.nlm.nih.gov/geo/GSE32894)からダウンロードした。発現データは、メジアンポリッシュを使用して正規化した(Tukey et al. Exploratory Data Analysis, Addison-Wesley, publishers, 1977)。無監督の階層クラスタリング解析を、平均連結法、1-ピアソン相関距離メトリックを使用して適用し、試料のグループ分けを見出し、試料腫瘍の悪性度、TMN病期、及び分子クラスを報告した(Sjodahl et al. 2012、上記)。重心分類器アプローチを使用して決定された腫瘍悪性度、TNM病期、及び分子クラスを正確に特定するために、カスタム膀胱癌Fluidigmパネルの91の固有の遺伝子の能力を評価した。相互検証誤分類エラー曲線は、PAMRライブラリを使用し(Tibshirani et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 6567-6572, 2002)、Sjodahl et al. (上記)発現データセットの全アレイまたは対応する125プローブサブセットを使用して作成した。カスタム膀胱癌Fluidigmパネルの遺伝子が、転写プロファイリングを通じて基底様及び管腔様試料を特定する能力を、4つの文献データセット(GSE32894、GSE5287、GSE13507、GSE48075)において評価した。

20

30

40

【0251】

これらの公開データ上で行われた基底または管腔分類は、Damrauer et al. (上記)により記載される通りであった。手短かに言えば、Damrauer et al. (上記)発見試料(N=30、AffymetrixヒトゲノムU133Aアレイ)を、NCBI遺伝子発現オムニバス(GSE5287)からダウンロードした。カスタム膀胱癌Fluidigmパネル上の遺伝子に対応するAffymetrixプローブセットを使用した。次いで、ログ変換された発現データの残りのサブセットを平均値で中心化し、単位変数に正規化した。次いで、平均遺伝子発現値を、管腔様として分類された12試料の91の固有遺伝子に関して、及び基底様として分類された18試料に関して計算して(著者対応により受領された分類)、基底及び管腔発現プロファイルを産生した。こ

50

のプロセスを、3つの他の公開データセット (G S E 3 2 8 9 4、G S E 1 3 5 0 7、G S E 4 8 0 7 5) に対して繰り返した。

【 0 2 5 2 】

腫瘍

実施例 1 に記載される 2 0 4 のホルマリン固定パラフィン包埋 (F F P E) 膀胱腫瘍試料の集合を、本実施例に記載される実験で使用した。RNA 及び DNA は、実施例 1 に記載されるマクロ切開された試料から抽出した。

【 0 2 5 3 】

FFPE 腫瘍の Fluidigm 発現解析

遺伝子発現解析は、前述される通り、ENVIRENE (登録商標) による脱パラフィン化後に、高純度 FFPE RNA マイクロキット (Roche Diagnostic s , I n d i a n a p o l i s , I N) を使用して、マクロ切開された FFPE から抽出した RNA 上で実行した (O B r i e n e t a l . C l i n . C a n c e r R e s . 1 6 : 3 6 7 0 - 3 6 8 3 , 2 0 1 0) 。膀胱癌関連遺伝子の 9 6 の固有の mRNA 転写産物の遺伝子発現解析は、Superscript III / Platinum T a q 及び前置増幅反応ミックス (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A) を使用し、単一反応において cDNA に逆転写され、前置増幅された合計 1 0 0 n g の RNA から開始して患者標本上で行った。全 9 6 の Taqman プライマー / プロブのセットは、元の TAQMAN (登録商標) アッセイ濃度 (Applied Biosystem s , F o s t e r C i t y , C A) の 0 . 0 5 倍の最終希釈での前置増幅反応に含まれた。熱循環条件は、以下の通りであった。5 0 で 1 5 分間の 1 サイクル、7 0 で 2 分間の 1 サイクル、9 5 で 1 5 秒間の 1 4 サイクル、及び 6 0 で 4 分間。前置増幅された cDNA を 2 倍に希釈し、次いで、製造元の指示に従い、TAQMAN (登録商標) ユニバーサル PCR マスターミックス (Applied Biosystem s , F o s t e r C i t y , C A) を、BIOMARK (商標) BMK - M - 9 6 . 9 6 プラットフォーム (Fluidigm , S o u t h S a n F r a n c i s c o , C A) 上で使用して増幅させた。全ての試料を 3 回アッセイした。サイクル閾値 (Ct) を、Ct 法 (O B r i e n ら、上記) を使用して相対発現に変換し、式中、Ct は、標的遺伝子の平均からそれぞれの患者標本に関して計算された基準遺伝子の幾何学平均を引いたものであった。カスタム膀胱癌 Fluidigm パネル上で評価された遺伝子の場合、サイクル閾値 (Ct) は、メジアンポリッシュを使用して正規化した (T u k e y ら、上記) 。差次的に発現された遺伝子の階層クラスタリングは、距離メトリックとして 1 - ピアソン相関を使用する平均連結法を用いて、正規化されたデータ上で実行し、後次に R を使用して可視化した。

【 0 2 5 4 】

突然変異解析

突然変異解析は、ENVIRENE (登録商標) による脱パラフィン化後に、QIA amp FFPE キット (Qi a g e n , V a l e n c i a , C A) を使用してマクロ切開された FFPE 組織から抽出されたゲノム DNA 上で実行した (L i n d g r e n e t a l . P L o S O n e 7 : e 3 8 8 6 3 , 2 0 1 2) 。PIK3CA、EGFR、KRAS、NRAS、HRAS、FGFR3、MET、BRAF、KIT、AKT1、FLT3 における突然変異は、前述される通り、突然変異特異的 qPCR を使用して検出した (S c h l i e f m a n e t a l . P L o S O n e 9 : e 8 8 4 0 1 , 2 0 1 4) 。

【 0 2 5 5 】

免疫組織化学

免疫組織化学は、実施例 1 に記載の通り行った。

【 0 2 5 6 】

基底 / 管腔類似性スコアの計算、マッチさせた原発腫瘍及び転移の解析、ならびに統計解析

10

20

30

40

50

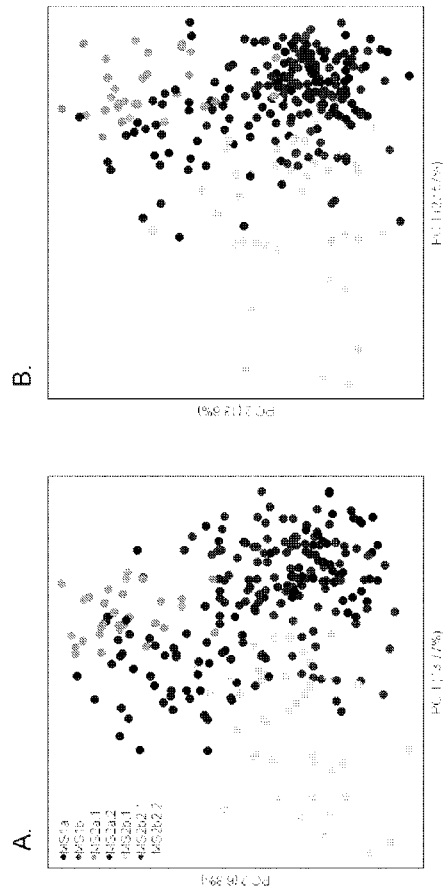
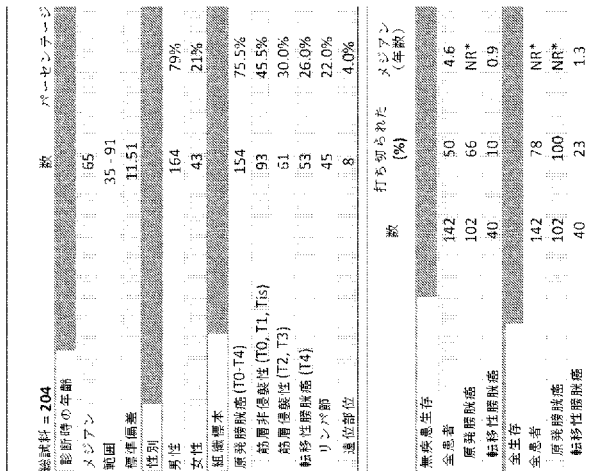
実施例 1 に記載される 204 の膀胱癌群 F F P E 試料からの試料の基底 / 管腔類似性スコアは、前述される通り、公開された Damrauer らの発見データセットから基底 / 管腔発現プロファイルを最初に派生させることによって決定した (Damrauer ら、上記) 。次に、各プロファイルと平均値で中心化された単位変数により正規化された各 F F P E 試料との間の基底及び管腔ピアソン相関を決定した。これら 2 つの相関スコアを組み合わせて、全体 B / L 類似性スコアを産生した。B / L スコア = (基底プロファイル相関 - 管腔プロファイル相関) / 2 . 0 。この B / L スコアは、 + 1 . 0 ~ - 1 . 0 の範囲を有し、ゼロより上のスコアは、基底様試料を示し、ゼロ以下のスコアは、管腔様試料を示す。同様に、9 つのマッチさせた原発及び転移試料の B / L 類似性スコアも同様に計算した。マッチさせた試料が同じ患者からのものであることを確認するために、次世代シーケンシング (NGS) を、 I O N A M P L I S E Q (商標) 癌ホットスポットパネル v 2 (L i f e T e c h n o l o g i e s , C a r l s b a d , C A) を使用し、製造元のガイドライン (T s o n g a l i s e t a l . C C L M / F E S C C 5 2 : 7 0 7 - 7 1 4 , 2 0 1 4) に従って実行し、ピアソン相関を、両方の試料が少なくとも 1 0 0 倍の読み取り範囲を有し、少なくとも 1 つの試料が 1 0 % 超の対立遺伝子頻度を有していた全ての変異型部位における対立遺伝子の頻度を比較することによって計算した (平均して、任意の 2 つの試料間で 1 2 0 箇所を比較した) 。原発 - 転移試料がミスマッチであった可能性は、それらの相関スコアを、ランダム試料対合の 3 , 5 0 0 相関と比較することによって見出した。プライマーとマッチさせた転移との間の B / L スコアの差を、典型的なシステムエラーに起因すると予想される差と比較した。システムエラーの推定は、ランダムに選択された試料の置換と共に、カスタム膀胱癌 F l u i d i g m パネルからの遺伝子をサンプリングし、 1 0 0 , 0 0 0 置換において B / L スコアを再計算することにより得た。クラスタ間の差次的突然変異頻度の有意性に関して、フィッシャーの直接検定を行った。フィッシャーの直接検定及び両側 t 検定を、全ての他の統計比較に使用した。

10

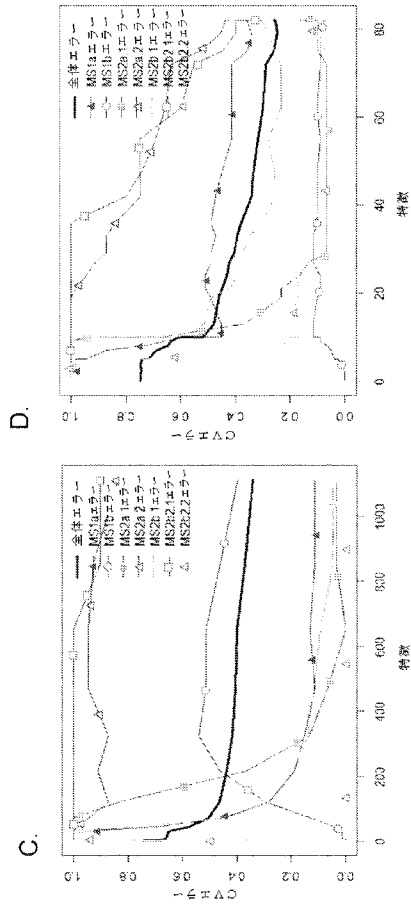
20

【 図 1 】

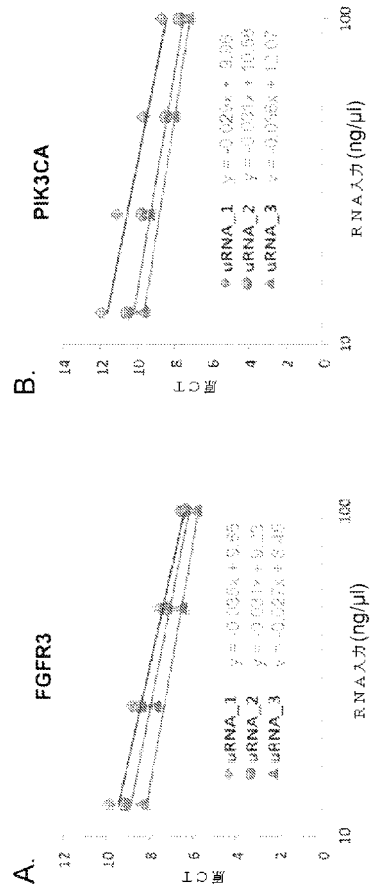
【 図 2 A - 2 B 】



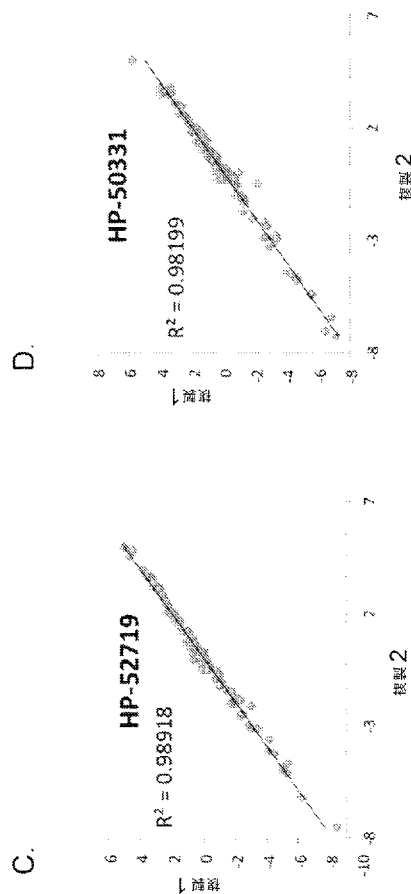
【図 2 C - 2 D】



【図 3 A - 3 B】



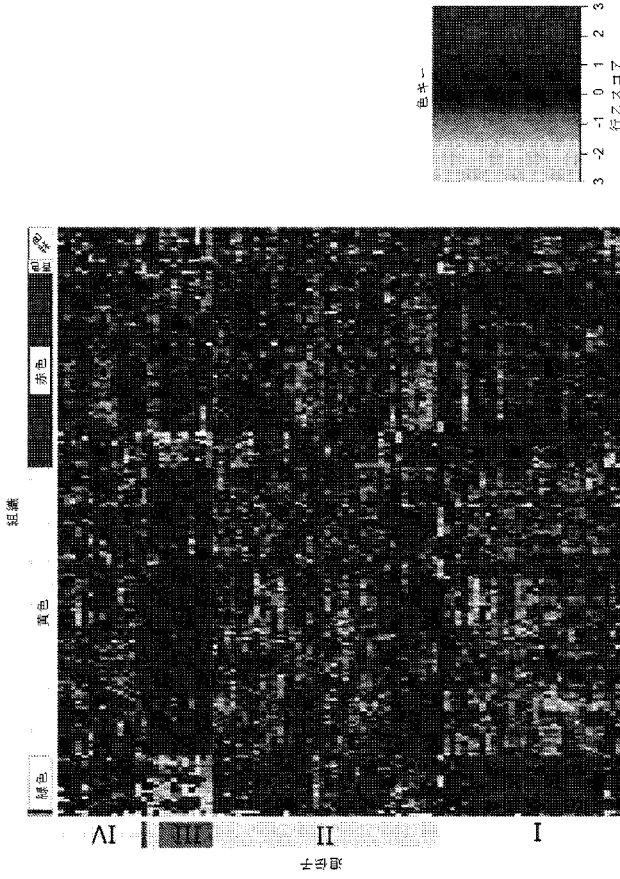
【図 3 C - 3 D】



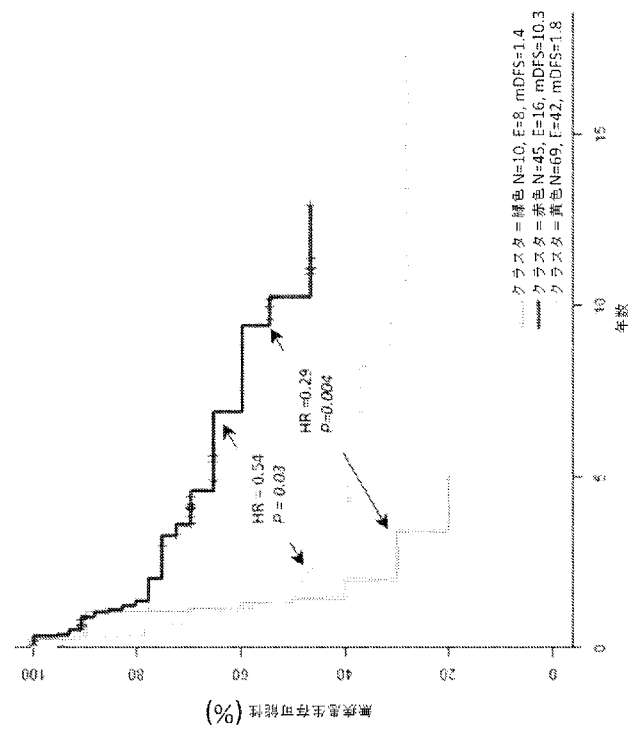
【図 3 E】



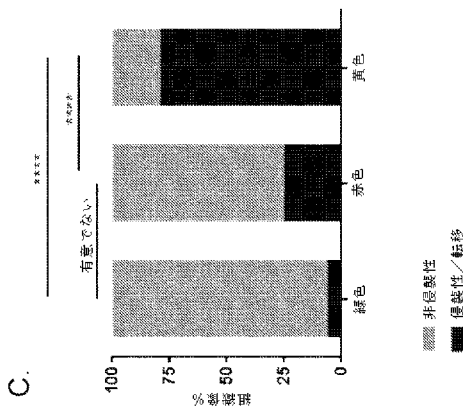
【図 4 A】



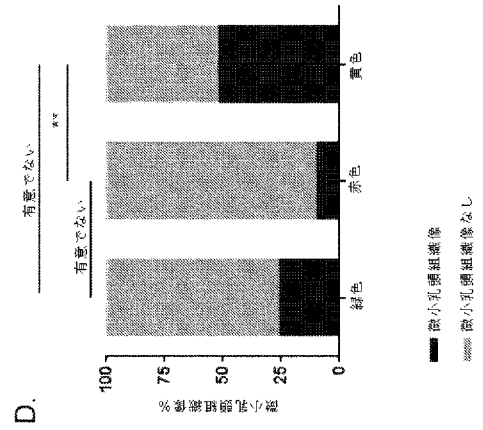
【図 4 B】



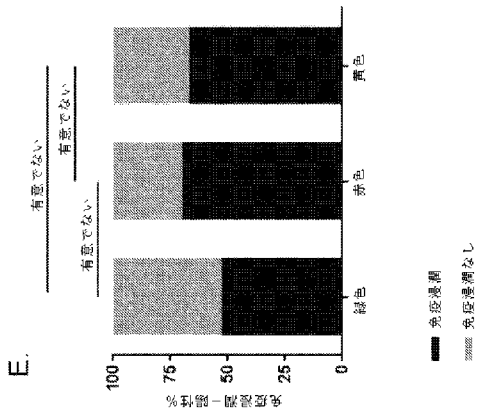
【図 4 C】



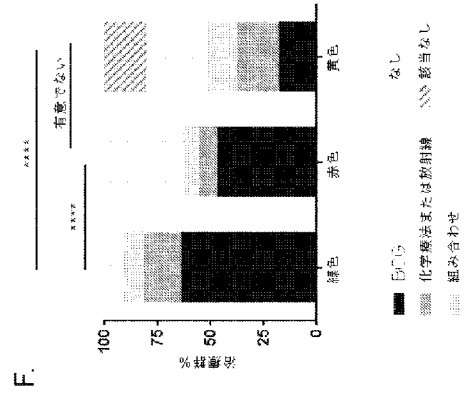
【図 4 D】



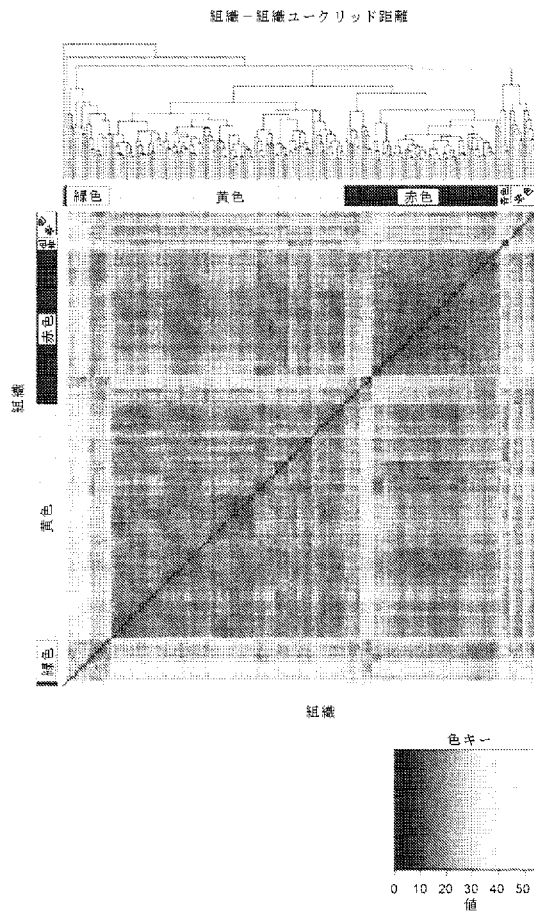
【 図 4 E 】



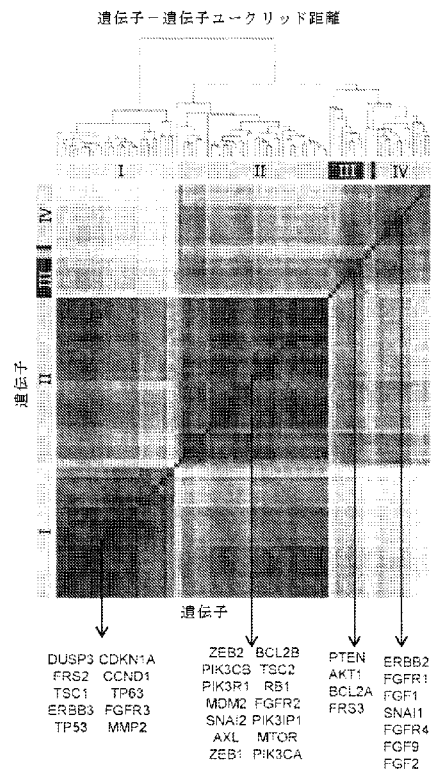
【 図 4 F 】



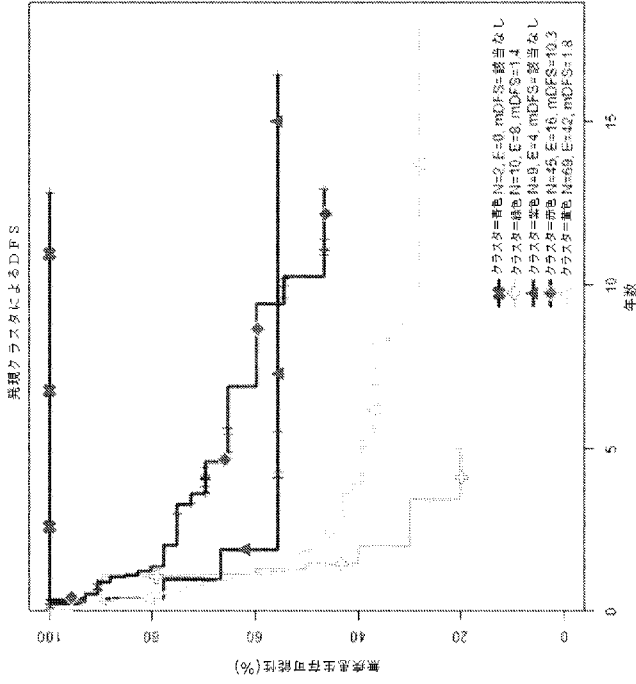
【 図 5 A 】



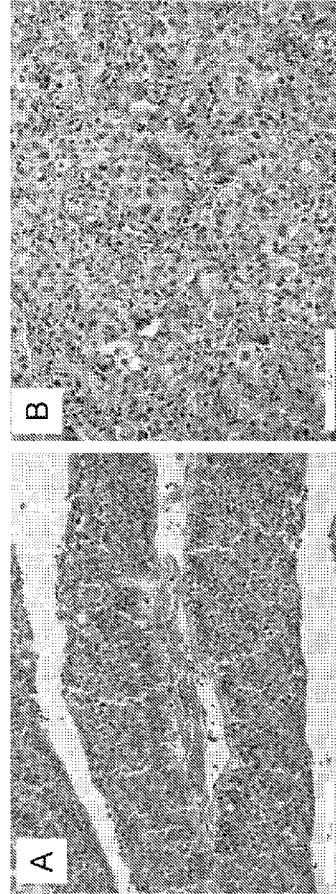
【 図 5 B 】



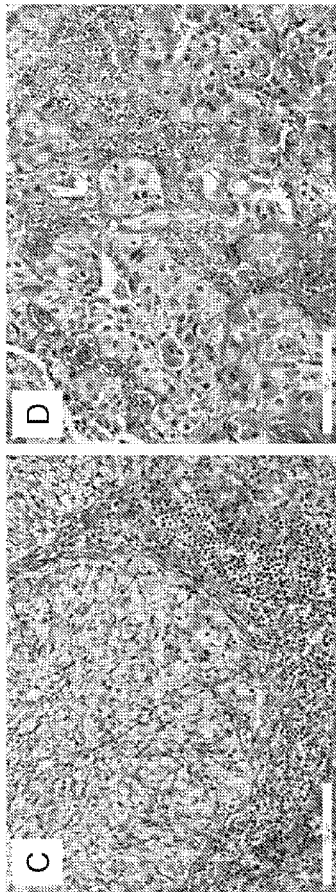
【図 5 C】



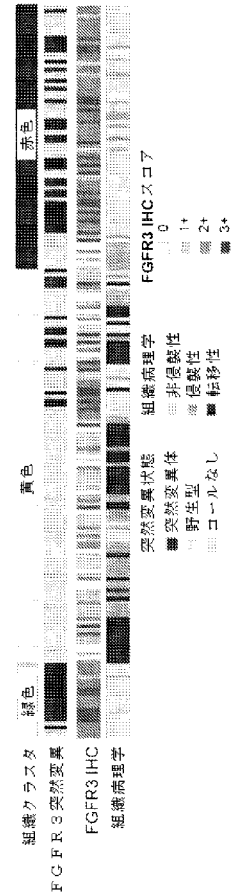
【図 6 A - 6 B】



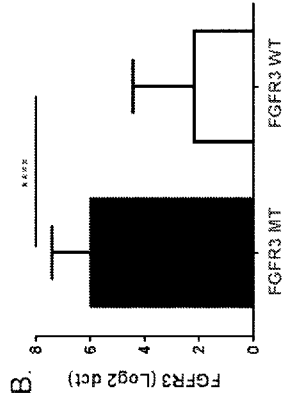
【図 6 C - 6 D】



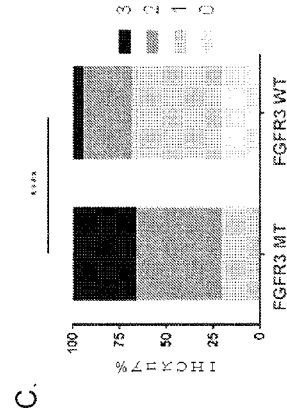
【図 7 A】



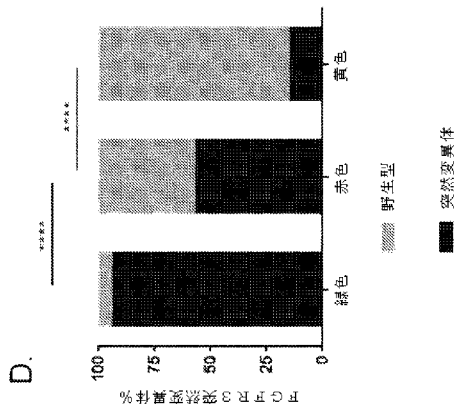
【 図 7 B 】



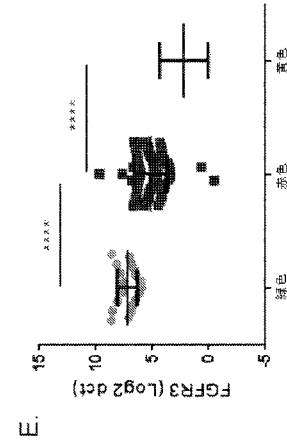
【 図 7 C 】



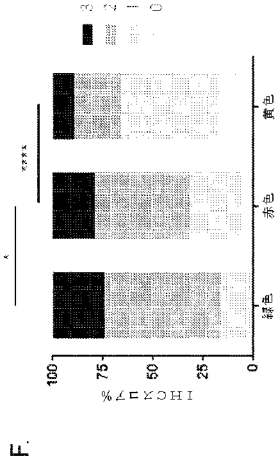
【 図 7 D 】



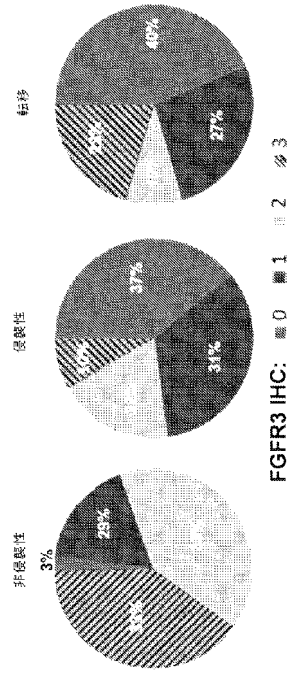
【 図 7 E 】



【 図 7 F 】

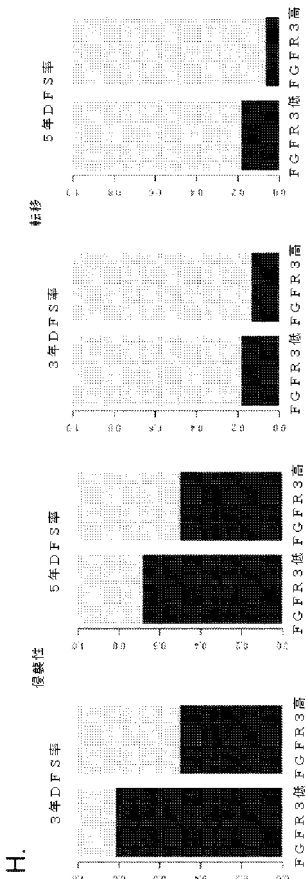


【 図 7 G 】



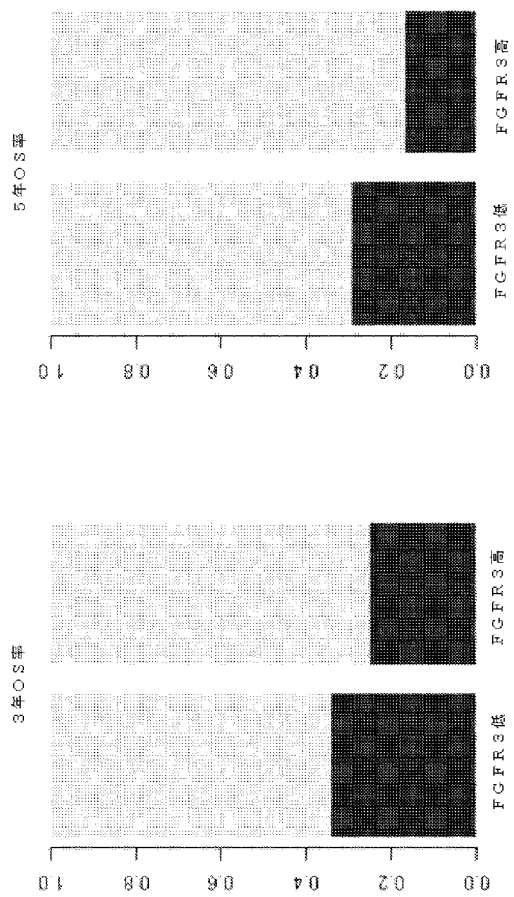
G.

【 図 7 H 】

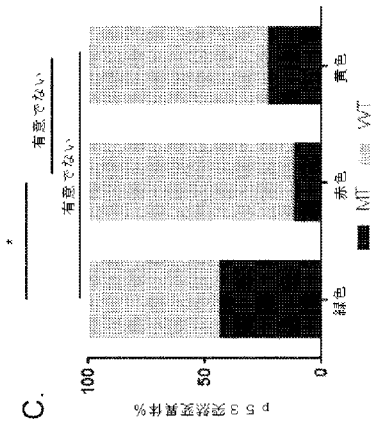


H.

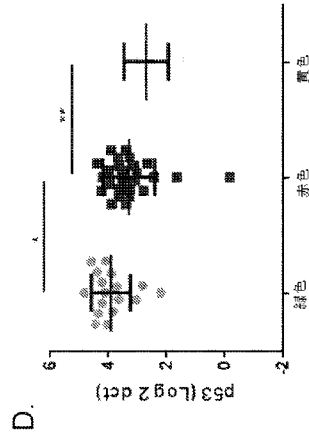
【 図 7 I 】



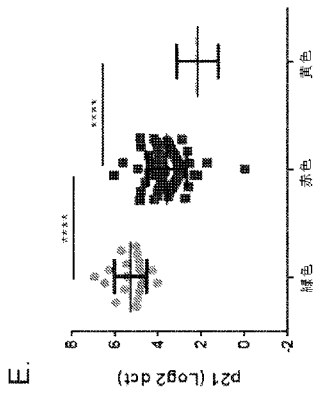
【図 9 C】



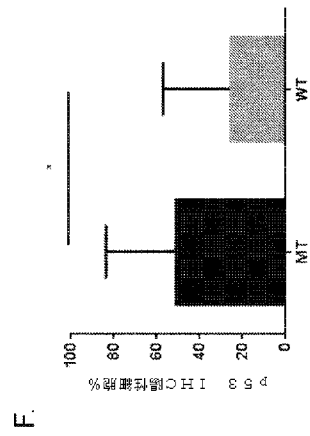
【図 9 D】



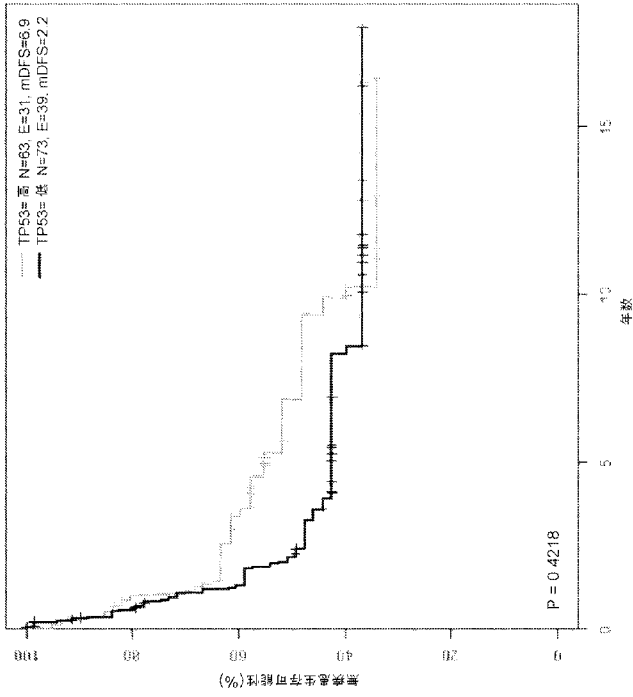
【図 9 E】



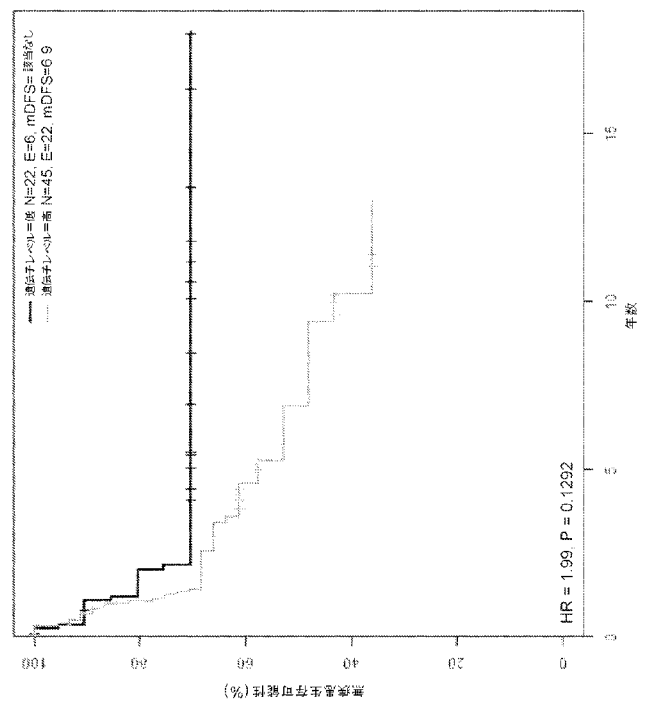
【図 9 F】



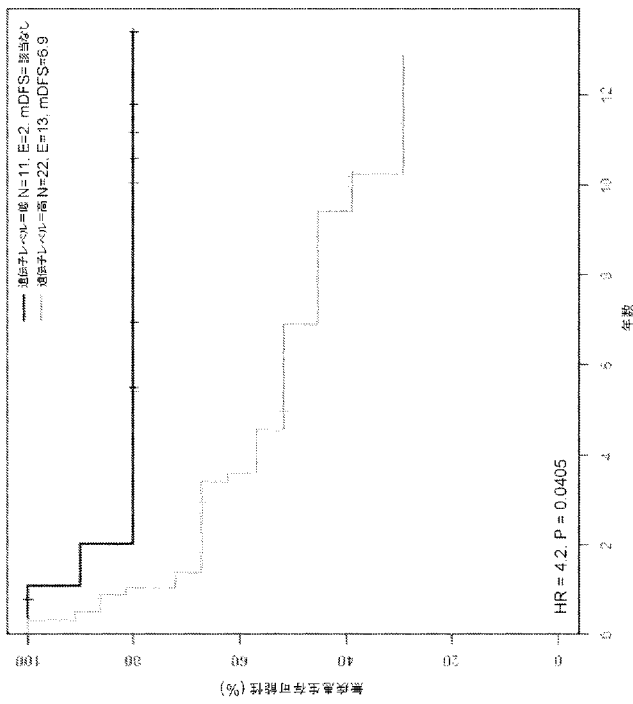
【 図 9 G 】



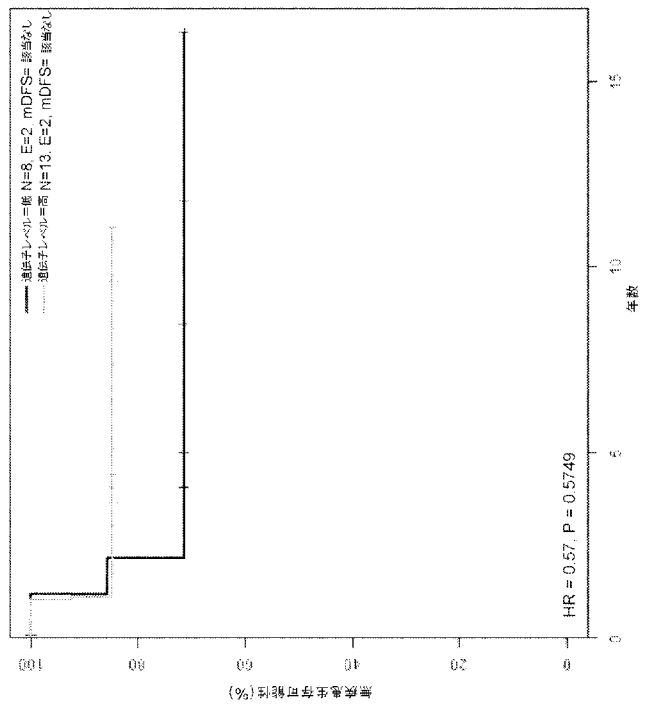
【 図 9 H 】



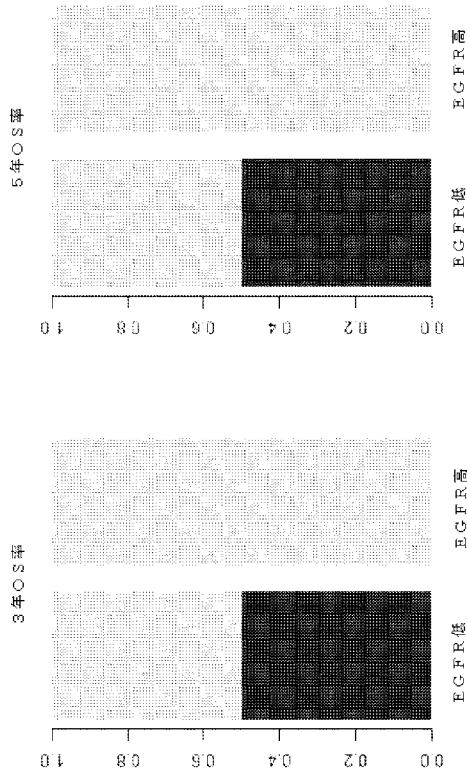
【 図 9 I 】



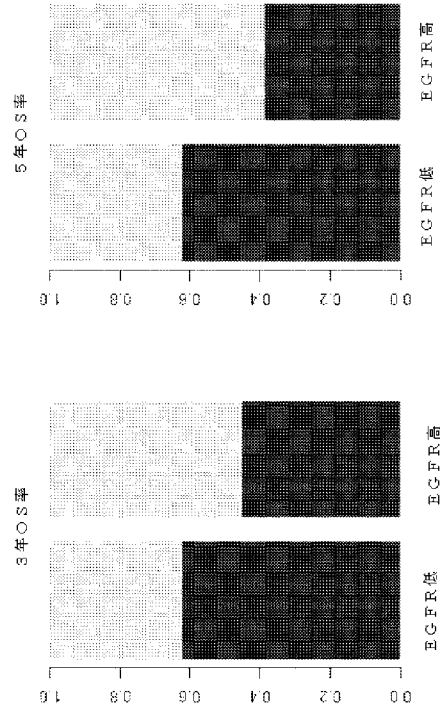
【 図 9 J 】



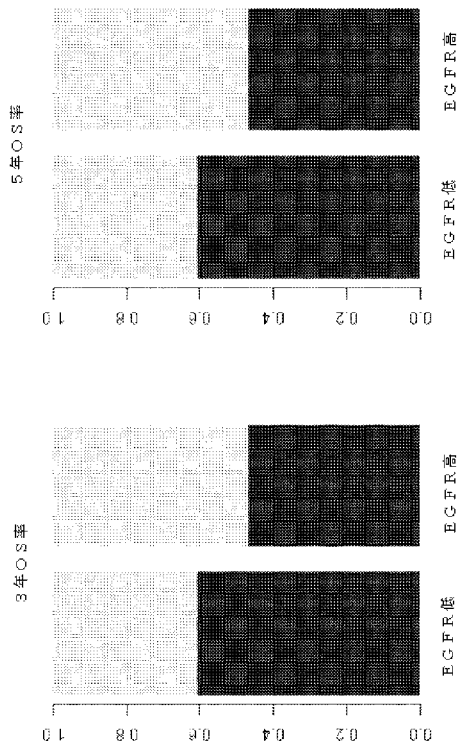
【図 1 1 D】



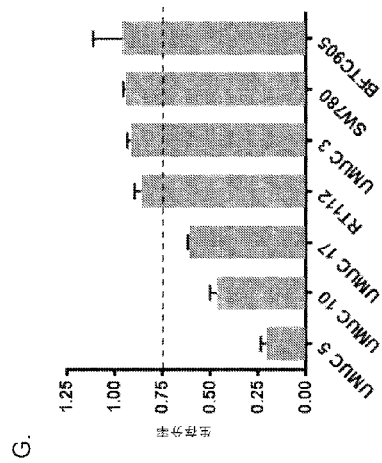
【図 1 1 E】



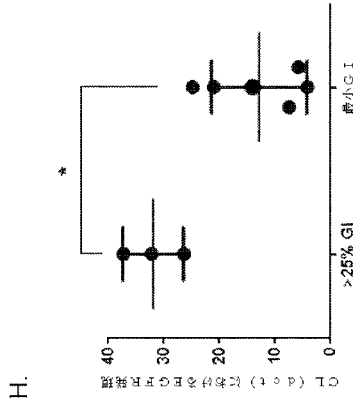
【図 1 1 F】



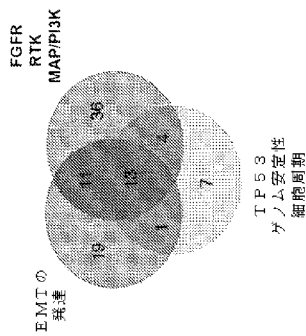
【図 1 1 G】



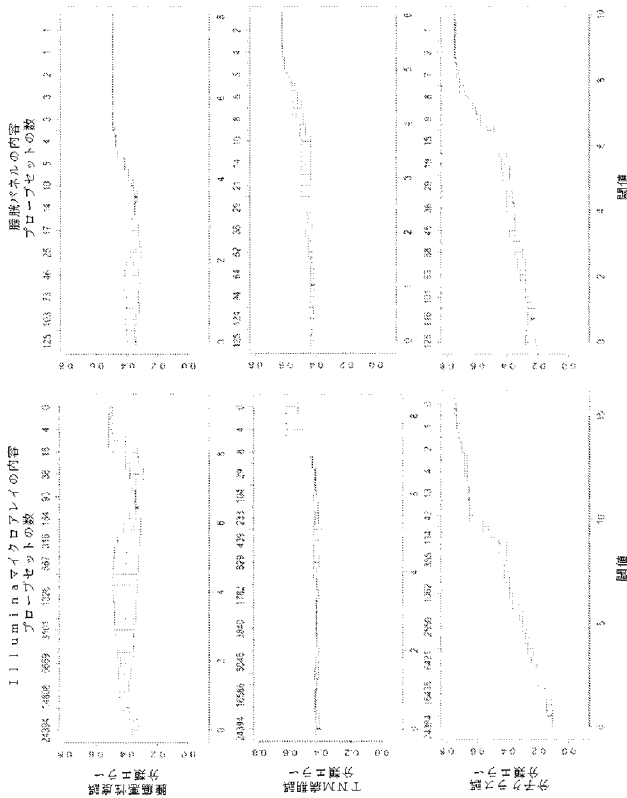
【図 1 1 H】



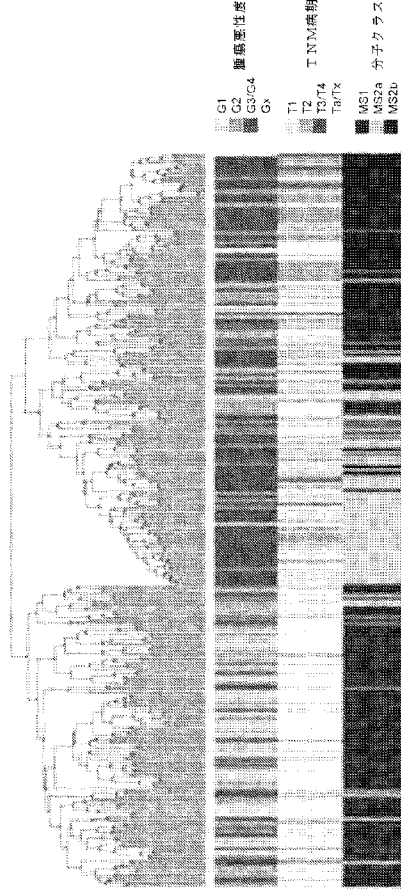
【図 1 2 A】



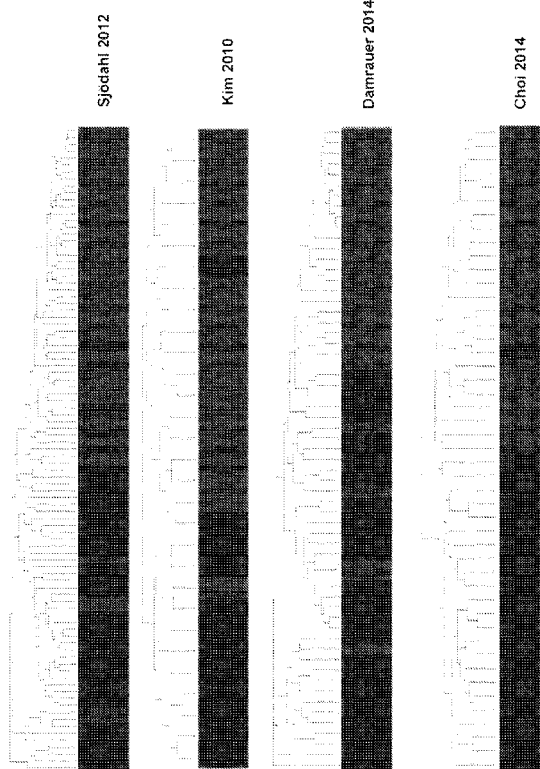
【図 1 2 C】



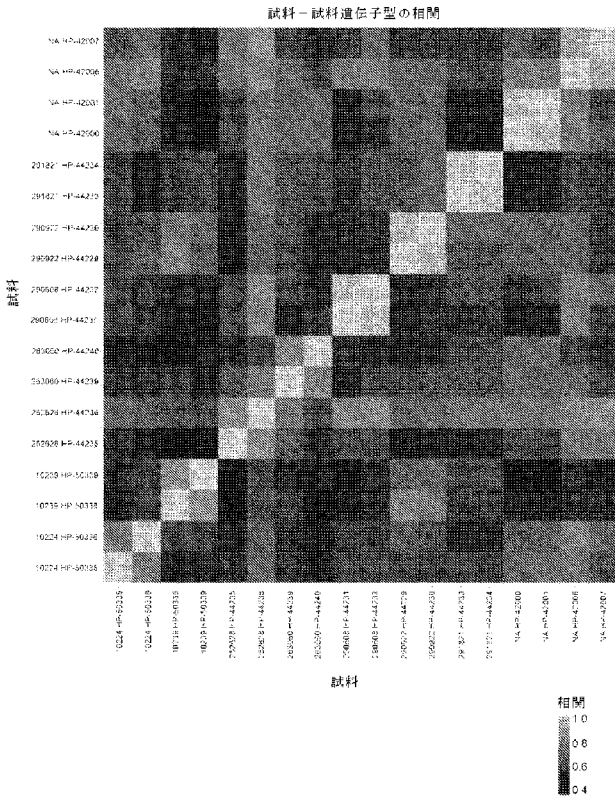
【図 1 2 B】



【図 1 2 D】



【 図 1 8 】



【 配 列 表 】

201850846900001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/000237

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2015/000237

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOOSO BENJAMIN A ET AL: "The role of EGFR family inhibitors in muscle invasive bladder cancer: a review of clinical data and molecular evidence.", THE JOURNAL OF UROLOGY JAN 2015, vol. 193, no. 1, 23 August 2014 (2014-08-23), pages 19-29, XP029113056, ISSN: 1527-3792 the whole document ----- -/--	1-17,19, 21-31, 36,37,39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier 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		Date of mailing of the international search report
15 April 2016		28/04/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Botz, Jürgen

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2015/000237

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PARK JINSUNG ET AL: "Do molecular biomarkers have prognostic value in primary T1G3 bladder cancer treated with bacillus Calmette-Guerin intravesical therapy?", UROLOGIC ONCOLOGY AUG 2013, vol. 31, no. 6, August 2013 (2013-08), pages 849-856, XP002756572, ISSN: 1873-2496 the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1-17, 19, 21-31, 36, 37, 39</p>
X	<p>KIM WUN-JAE ET AL: "A four-gene signature predicts disease progression in muscle invasive bladder cancer." MOLECULAR MEDICINE (CAMBRIDGE, MASS.) 2011 MAY-JUN, vol. 17, no. 5-6, May 2011 (2011-05), pages 478-485, XP002756573, ISSN: 1528-3658 the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1-6, 8-11</p>
X	<p>WO 2014/135655 A1 (INST CURIE [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]) 12 September 2014 (2014-09-12)</p> <p>the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1-17, 19, 21-31, 36, 37, 39, 40, 42-44, 46, 48-51</p>
X	<p>CHAKRAVARTI A ET AL: "Expression of the epidermal growth factor receptor and Her-2 are predictors of favorable outcome and reduced complete response rates, respectively, in patients with muscle-invading bladder cancers treated by concurrent radiation and cisplatin-based chemotherapy: A report from the Radiation Therapy 0", INTERNATIONAL JOURNAL OF RADIATION: ONCOLOGY BIOLOGY PHYSICS, PERGAMON PRESS, USA, vol. 62, no. 2, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 309-317, XP025262773, ISSN: 0360-3016, DOI: 10.1016/J.IJROBP.2004.09.047 [retrieved on 2005-06-01] the whole document</p> <p>-----</p>	<p>1-17, 19, 21-31, 36, 37, 39, 40, 42-44, 46, 49-51</p>

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2015/000237

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHINOHARA ASANO ET AL: "Association of TP53 and MDM2 polymorphisms with survival in bladder cancer patients treated with chemoradiotherapy", CANCER SCIENCE, vol. 100, no. 12, December 2009 (2009-12), pages 2376-2382, XP002756574, ISSN: 1347-9032 the whole document	1-14,25, 30,31, 41,51-53
X	MAZZOLA CLARISSE R ET AL: "Dovitinib: rationale, preclinical and early clinical data in urothelial carcinoma of the bladder", EXPERT OPINION ON INVESTIGATIONAL DRUGS, vol. 23, no. 11, November 2014 (2014-11), pages 1553-1562, XP002756575, the whole document	1-18,21, 22, 25-27, 30,34-37
X	GUST KILIAN M ET AL: "Fibroblast Growth Factor Receptor 3 Is a Rational Therapeutic Target in Bladder Cancer", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 12, no. 7, July 2013 (2013-07), pages 1245-1254, XP002756576, the whole document	1-18,21, 22, 25-27, 30,34-37
X	GAKIS GEORGIOS ET AL: "Current status of molecular markers for prognostication and outcome in invasive bladder cancer", BJU INTERNATIONAL, vol. 110, no. 2, July 2012 (2012-07), pages 233-237, XP002756577, the whole document	1-11,41, 51-53
X	LIANG CHENG ET AL: "Bladder cancer: translating molecular genetic insights into clinical practice", HUMAN PATHOLOGY, SAUNDERS, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 42, no. 4, 8 July 2010 (2010-07-08), pages 455-481, XP028367813, ISSN: 0046-8177, DOI: 10.1016/J.HUMPATH.2010.07.007 [retrieved on 2010-08-11] the whole document	1-53

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/000237

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014135655	A1	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N 4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	P
	G 0 1 N 33/68	
	G 0 1 N 33/53	Y
	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/53	M
	C 0 7 K 16/28	
	C 0 7 K 16/18	

(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

(72) 発明者 キム, ドリス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 - 4 9 9 0, サウス サンフランシスコ, デイ
ーエヌエー ウェイ 1

F ターム(参考) 2G045 AA26 CB01 DA14 DA36
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR36 QR55
QR62 QR72 QR77 QS25 QS34 QS36 QX02
4C084 AA17 AA20 NA05 NA14 ZB261 ZC201 ZC421 ZC75
4C085 AA13 AA14 BB41 BB43 CC23
4C086 AA01 AA02 BC46 MA01 MA04 NA14 ZB26 ZC42 ZC75
4H045 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50

专利名称(译)	膀胱癌的治疗, 诊断和预后判定方法		
公开(公告)号	JP2018508469A	公开(公告)日	2018-03-29
申请号	JP2017533956	申请日	2015-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司		
[标]发明人	チヨイユンジョン カバラオマル キムドリス		
发明人	チヨイ, ユンジョン カバラ, オマル キム, ドリス		
IPC分类号	A61K45/00 C12Q1/68 C12N15/09 A61P35/00 A61P43/00 A61K39/395 A61K31/517 A61P35/04 A61K45/06 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/53 C07K16/28 C07K16/18		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/118 A61P35/00 A61P35/04 A61P43/00 C12Q2600/158 G01N33/57407 G01N2333/4748 G01N2333/71 G01N2800/52 A61K31/517 A61K39/39558 A61K45/06 C07K16/18 C07K16/2863 C07K16/3038 C12Q2600/106		
FI分类号	A61K45/00.ZNA C12Q1/68.A C12N15/00.A A61P35/00 A61P43/00.111 A61K39/395.N A61K39/395.D A61K39/395.E A61K39/395.T A61K31/517 A61P35/04 A61P43/00.121 A61K45/06 G01N33/50.P G01N33/68 G01N33/53.Y G01N33/53.D G01N33/53.M C07K16/28 C07K16/18		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB01 2G045/DA14 2G045/DA36 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA17 4C084/AA20 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZB261 4C084/ZC201 4C084/ZC421 4C084/ZC75 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB41 4C085/BB43 4C085/CC23 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC46 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZC42 4C086/ZC75 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50		
优先权	62/096741 2014-12-24 US		
其他公开文献	JP2018508469A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明提供了检测包含FGFR3, TP53和/或EGFR的一种或多种生物标志物的表达的方法, 用于提供癌症(例如膀胱癌)的治疗, 诊断和预后。及其组合物。本发明还提供了用于本发明方法的试剂盒和产品。【选择图】无

(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2018-508469 (P2018-508469A)
		(43) 公表日 平成30年3月29日(2018.3.29)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
A61K 45/00 (2006.01)	A61K 45/00 ZNA	2G045
C12Q 1/68 (2018.01)	C12Q 1/68 A	4B063
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4C084
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4C085
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 111	4C086
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 108 頁) 最終頁に続く	
(21) 出願番号 特願2017-533956(P2017-533956)	(71) 出願人 ジェネンテック、インコーポレイテッド	509012625
(86) (22) 出願日 平成27年12月23日(2015.12.23)	アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌイー ウェイ 1	
(85) 翻訳文提出日 平成29年8月21日(2017.8.21)		
(86) 国際出願番号 PCT/US2015/000237	(74) 代理人 園田・小林特許業務法人	110002077
(87) 国際公開番号 W02016/105503	チョイ, ユンジョン	
(87) 国際公開日 平成28年6月30日(2016.6.30)	アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80-4990、サウス サンフランシスコ、ディーエヌイー ウェイ 1	
(31) 優先権主張番号 62/096,741	(72) 発明者	
(32) 優先日 平成26年12月24日(2014.12.24)	カバラ, オマル	
(33) 優先権主張国 米国(US)	アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 80-4990、サウス サンフランシスコ、ディーエヌイー ウェイ 1	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】膀胱癌の治療、診断、及び予後判定方法		

