

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-515513

(P2006-515513A)

(43) 公表日 平成18年6月1日(2006.6.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B O 2 9
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 C O 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2005-501274 (P2005-501274)  
 (86) (22) 出願日 平成15年10月1日 (2003.10.1)  
 (85) 翻訳文提出日 平成17年5月27日 (2005.5.27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/010881  
 (87) 国際公開番号 W02004/035803  
 (87) 国際公開日 平成16年4月29日 (2004.4.29)  
 (31) 優先権主張番号 10245779.4  
 (32) 優先日 平成14年10月1日 (2002.10.1)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)  
 (31) 優先権主張番号 10300096.8  
 (32) 優先日 平成15年1月7日 (2003.1.7)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)  
 (31) 優先権主張番号 10317955.0  
 (32) 優先日 平成15年4月17日 (2003.4.17)  
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

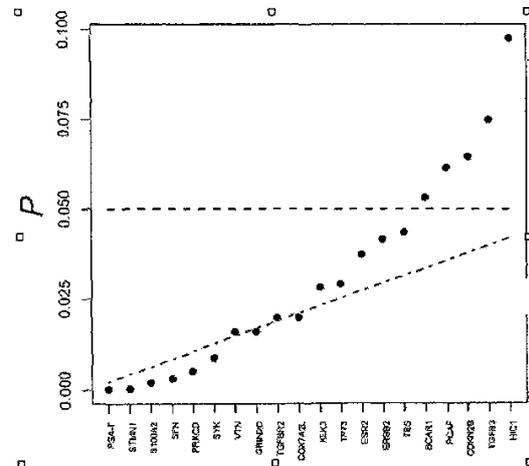
(71) 出願人 500247105  
 エピゲノミクス アーゲー  
 ドイツ国、10178 ベルリン、クライ  
 ネ プレジデntenシュトラッセ 1  
 (74) 代理人 100088904  
 弁理士 庄司 隆  
 (74) 代理人 100124453  
 弁理士 資延 由利子  
 (74) 代理人 100129160  
 弁理士 古館 久丹子  
 (74) 代理人 100135208  
 弁理士 大杉 卓也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳房細胞増殖障害の改良治療方法および核酸

(57) 【要約】

本発明はゲノムDNAのシトシンメチル化状態を検出するための変性およびゲノム配列、オリゴヌクレオチドおよび/またはPNAオリゴマー、ならびにホルモン治療に対する乳房組織の細胞増殖障害を有する被検者の反応を予測する方法に関する。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

エストロゲン受容体経路を標的とするか、あるいはエストロゲン代謝、産生または分泌に関与する1つまたはそれ以上の薬剤を含む治療に対する乳房組織の細胞増殖障害を有する被検者の反応性を予測する方法であって、治療前あるいは治療中に被検者から得た生物学的試料中の前記標的核酸の少なくとも1つを上記物質と接触させることによって、STMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, TP53, PTGS2, FGFR1, SYK, PITX2, GRIN2D, PSA, CGA, CYP2D6, MSMB, COX7A2L, VTN, PRKCD, ONECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF1, PITX2, PSAT1, CGA および PCAFからなる群から選択される遺伝子の1つまたは組合せ、 および/またはそれらの制御領域を含む標的核酸のメチル化パターンを分析することを含む方法。

10

**【請求項 2】**

前記遺伝子はTP53, PTGS2, FGFR1, PSA, CGA, CYP2D6およびMSMBからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記遺伝子はSTMN1, PITX2, PSAおよびCGAからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記遺伝子はSTMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, SYK, GRIN2D, PSA, COX7A2L, VTNおよびPRKCDからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

20

**【請求項 5】**

前記遺伝子はONECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF1, PITX2, PSAT1, CGAおよびPCAFからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記遺伝子はTP53, PTGS2, PITX2, CYP2D6, MSMB, WBP11, TMEFF2, ESR1, PITX2, ERBB2およびPCAFからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記遺伝子はTP53, PTGS2, CYP2D6およびMSMBからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

30

**【請求項 8】**

前記遺伝子はPITX2からなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記遺伝子はWBP11, TMEFF2, ESR1, PITX2, ERBB2およびPCAFからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記遺伝子はSTMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, FGFR1, SYK, GRIN2D, PSA, CGA, COX7A2L, VTN, PRKCD, ONECUT2, CYP2D6, DAG1, S100A2, TFF1, TP53, SYK, RASSF1, PSAT1およびCGAからなる群から選択される請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記遺伝子はFGFR1, PSAおよびCGAからなる群から選択される請求項1に記載の方法。

40

**【請求項 12】**

前記遺伝子はSTMN1, PSAおよびCGAからなる群から選択される請求項1に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記遺伝子はSTMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, SYK, GRIN2D, PSA, COX7A2L, VTNおよびPRKCDからなる群から選択される請求項1に記載の方法。

**【請求項 14】**

前記遺伝子はONECUT2, CYP2D6, DAG1, S100A2, TFF1, TP53, SYK, RASSF1, PSAT1およびCGAからなる群から選択される請求項1に記載の方法。

**【請求項 15】**

50

前記標的核酸は、本質的に配列番号：27, 40, 122, 43, 74, 127, 86, 90, 128, 105, 115, 121, 126, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 127, 130, 124, and 128からなる群から得られる1つまたはそれ以上の配列およびこれらに相補的な配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記標的核酸は、本質的に配列番号：68, 50, 74, 90, 91, 92および99からなる群から得られる1つまたはそれ以上の配列およびこれらに相補的な配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記標的核酸は、本質的に配列番号：27, 83, 90および91からなる群から得られる1つまたはそれ以上の配列およびこれらに相補的な配列を含む、請求項1に記載の方法。 10

【請求項18】

前記標的核酸は、本質的に配列番号：27, 40, 41, 43, 78, 86, 90, 105, 115 および121からなる群から得られる1つまたはそれ以上の配列およびこれらに相補的な配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

前記標的核酸は、本質的に配列番号：126, 137, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 133, 134, 127, 130, 135, 124, 128および136からなる群から得られる1つまたはそれ以上の配列およびこれらに相補的な配列を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

乳房組織の前記細胞増殖障害は、インサイチュ管癌腫、小葉癌腫、膠質癌腫、尿細管癌腫、髄様癌、異形成癌腫、インサイチュ管内癌腫、インサイチュ小葉癌腫およびインサイチュ乳頭癌腫からなる群から選択される、請求項1～19に記載の方法。 20

【請求項21】

前記被検者はエストロゲンおよび/またはプロゲステロン受容体陽性である、請求項1～20に記載の方法。

【請求項22】

前記治療は、乳房組織の再発性または転移性細胞増殖障害の処置のための治療である、請求項1～5および10～14に記載の方法。

【請求項23】

前記治療は補助的治療である、請求項1～9に記載の方法。 30

【請求項24】

前記被検者は化学治療を受けなかった、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

本質的に、配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793および794からなる群から選択される配列およびこれらに相補的な配列のうちの1つによる長さが少なくとも18塩基の配列からなる核酸分子。 40

【請求項26】

本質的に、配列番号：345, 346, 381, 382, 393, 394, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717および718、およびこれらに相補的な配列からなる群から選択される配列のうちの1つによる長さが少なくとも18塩基の配列からなる核酸分子。 50

## 【請求項 27】

本質的に、配列番号：299, 300, 411, 412, 425, 426, 427, 428, 573, 574, 685, 686, 699, 700, 701および 702からなる群から選択される配列およびこれらに相補的な配列のうちの1つによる長さが少なくとも18塩基の配列からなる核酸分子。

## 【請求項 28】

本質的に、配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 401, 402, 417, 418, 425, 426, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 675, 676, 691, 692, 699, 700, 729, 730, 749, 750, 761および762からなる群から選択される配列およびこれらに相補的な配列のうちの1つによる長さが少なくとも18塩基の配列からなる核酸分子。

10

## 【請求項 29】

本質的に、配列番号：489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793および794からなる群から選択される配列およびこれらに相補的な配列のうちの1つによる長さが少なくとも18塩基の配列からなる核酸分子。

## 【請求項 30】

オリゴマー、特にオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸(PNA) - オリゴマーであって、本質的に配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793および 794に記載の核酸配列のうちの1つにハイブリダイズするか、あるいは同一である長さ少なくとも10ヌクレオチドを有する少なくとも1つの塩基配列からなるオリゴマー。

20

30

## 【請求項 31】

オリゴマー、特にオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸(PNA) - オリゴマーであって、本質的に、配列番号：345, 346, 381, 382, 393, 394, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717および718に記載の核酸配列のうちの1つにハイブリダイズするか、あるいは同一である長さ少なくとも10ヌクレオチドを有する少なくとも1つの塩基配列からなるオリゴマー。

## 【請求項 32】

オリゴマー、特にオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸(PNA) - オリゴマーであって、本質的に、配列番号：299, 300, 411, 412, 425, 426, 427, 428, 573, 574, 685, 686, 699, 700, 701および 702に記載の核酸配列のうちの1つにハイブリダイズするか、あるいは同一である長さ少なくとも10ヌクレオチドを有する少なくとも1つの塩基配列からなるオリゴマー。

40

## 【請求項 33】

オリゴマー、特にオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸(PNA) - オリゴマーであって、本質的に、配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 401, 402, 417, 418, 425, 426, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 675, 676, 691, 692, 699, 700, 729, 730, 749, 750, 761および 762に記載の核酸配列のうちの1つにハイブリダイズするかあるいは同一である長さ少なくとも10ヌクレオチドを有する少なくとも1つの塩基配列からなるオリゴマー。

## 【請求項 34】

50

オリゴマー、特にオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸 (PNA) - オリゴマーであって、本質的に、配列番号：489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793および 794 に記載の核酸配列のうちの1つにハイブリダイズするかあるいは同一である長さ少なくとも10ヌクレオチドを有する少なくとも1つの塩基配列からなるオリゴマー。

【請求項35】

塩基配列は少なくとも1つのCpGジヌクレオチドを含む、請求項30～34のいずれか1つに記載されるオリゴマー。 10

【請求項36】

請求項30～35のいずれかに記載される少なくとも2つのオリゴマーを含むオリゴマーのセット。

【請求項37】

少なくとも1つのオリゴヌクレオチドが固体相に結合していることを特徴とする請求項30～36の1つに記載されるオリゴヌクレオチドのセット。

【請求項38】

配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, および794のうちの1つを含む核酸配列およびこれらに相補的な配列の増幅のためのプライマーオリゴヌクレオチドとして使用される、請求項30～36のうちの1つに記載される少なくとも2つのオリゴヌクレオチドのセット。 20

【請求項39】

配列番号：27, 40, 122, 43, 74, 127, 86, 90, 128, 105, 115, 121, 126, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 127, 130, 124および128からなる群から選択された配列およびこれらに相補的な配列内のシトシンメチル化状態および/または単一ヌクレオチド多型 (SNP) を検出するための請求項30～38のいずれかに記載のオリゴマーの少なくとも2つを含むオリゴヌクレオチドのセットの使用。 30

【請求項40】

配列番号：27, 40, 122, 43, 74, 127, 86, 90, 128, 105, 115, 121, 126, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 127, 130, 124および128からなる群のCpGジヌクレオチドのいずれかのメチル化状態の分析によって、エストロゲン受容体経路を標的とするか、またはエストロゲン代謝、産生または分泌に関与する1つまたはそれ以上の薬剤を含む治療に対する乳房組織の細胞増殖障害をもつ被検者の反応性を予測するための担体物質に固定化された異なるオリゴマー (アレー) の配列を製造する方法であって、請求項30～35のいずれかに記載の少なくとも1つのオリゴマーが固体相に結合されている方法。 40

【請求項41】

請求項40において得られうる異なるオリゴマー (アレー) の配列。

【請求項42】

前記オリゴヌクレオチドが四角形または六角形格子形態の平面固体相上に配列されることを特徴とする、請求項41に記載される異なるオリゴヌクレオチド - および/またはPNA - オリゴマー配列のアレー。

【請求項43】

固体相表面はシリコン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、鉄鋼、鉄、銅、ニッケル、銀または金から構成されることを特徴とする、請求項 4 1 または 4 2 のいずれかに記載のアレー。

【請求項 4 4】

請求項 3 0 ~ 3 5 のいずれかに記載される少なくとも 1 つの核酸を含む配列番号：27, 40, 122, 43, 74, 127, 86, 90, 128, 105, 115, 121, 126, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 127, 130, 124 および 128 からなる群の CpG ジヌクレオチドのいずれかのメチル化状態の分析によって、エストロゲン受容体経路を標的とするか、あるいはエストロゲン代謝、産生または分泌に関与する 1 つまたはそれ以上の薬剤を含む治療に対する乳房細胞増殖障害の反応を予測するための DNA - および / または PNA - アレー。

10

【請求項 4 5】

下記工程；

a) ゲノム DNA を含む生物学的試料を得て、

b) ゲノム DNA を抽出し、

c) 5 - 位で非メチル化されているゲノム DNA 試料中のシトシン塩基をウラシルまたは塩基対拳動においてシトシンに類似していない他の塩基に変換し、

d) 前処理されたゲノム DNA の少なくとも 1 つの断片を増幅し、ここで前記断片は、配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793 および 794 からなる群から選択される 1 つまたはそれ以上の配列およびこれらに相補的な配列を含み、そして

20

e) 増幅核酸の分析によって、1 つまたはそれ以上のゲノム CpG ジヌクレオチドのメチル化状態を決定することを含む請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載される方法。

【請求項 4 6】

工程 d) において、前記断片は、配列番号：345, 346, 381, 382, 393, 394, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717 および 718 からなる群から選択される 1 つまたはそれ以上の配列およびこれらに相補的な配列を含むことを特徴とする、請求項 4 5 に記載の方法。

30

【請求項 4 7】

工程 d) において、前記断片は、配列番号：299, 300, 411, 412, 425, 426, 427, 428, 573, 574, 685, 686, 699, 700, 701 および 702、およびこれらに相補的な配列からなる群から選択される 1 つまたはそれ以上の配列を含むことを特徴とする、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 8】

工程 d) において、前記断片は、配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 401, 402, 417, 418, 425, 426, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 675, 676, 691, 692, 699, 700, 729, 730, 749, 750, 761 および 762、およびこれらに相補的な配列からなる群から選択される 1 つまたはそれ以上の配列を含むことを特徴とする、請求項 4 5 に記載の方法。

40

【請求項 4 9】

工程 d) において、前記断片は、配列番号：489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786,

50

787, 788, 789, 790, 791, 792, 793および 794からなる群から選択される1つまたはそれ以上の配列およびこれらに相補的な配列を含むことを特徴とする、請求項45に記載の方法。

【請求項50】

工程e)は、配列番号：1691~1692, 1733~1736, 1925~1932, 1941~1954 および 1965~2142に記載される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって実施することを特徴とする、請求項45に記載の方法。

【請求項51】

工程e)は、配列番号：2011, 2012, 2017~2024, 2031~2035, 2035, 2036, 2036, 2037, 2037, 2038および 2038~2044に記載される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって実施することを特徴とする、請求項45に記載の方法。

10

【請求項52】

工程e)は、配列番号：2003 ~ 2030に記載される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって実施することを特徴とする、請求項45に記載の方法。

【請求項53】

工程e)は、配列番号：2003~2020および2045~2112に記載される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって実施することを特徴とする、請求項45に記載の方法。

【請求項54】

工程e)は、配列番号：1691~1692, 1733~1736, 1925~1932, 1941~1954, 1965~2002, 2011~2025, 2045~2052, 2069~2078および2127~2134に記載される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって実施することを特徴とする、請求項45に記載の方法。

20

【請求項55】

工程e)は、請求項17~21に記載される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって実施することを特徴とする、請求項45に記載の方法。

【請求項56】

工程e)は請求項17~21に記載される少なくとも1つのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションおよび少なくとも1つのヌクレオチド塩基による前記ハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドの伸長によって実施することを特徴とする、請求項45に記載の方法。

30

【請求項57】

工程e)は配列決定によって実施することを特徴とする、請求項45に記載の方法。

【請求項58】

工程d)は特定プライマーのメチル化を使用して実施することを特徴とする、請求項45に記載の方法。

【請求項59】

さらに、工程d)において、配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793および794からなる群から選択される配列およびこれらに相補的な配列に相補的であるか、あるいは中程度に厳密なまたは厳密な条件下にハイブリダイズする長さが少なくとも9ヌクレオチドである近接した配列を各ケースにおいて含む、少なくとも1つの核酸分子またはペプチド核酸分子の使用を含む

40

50

、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 0】

工程 e ) は、請求項 3 8 ~ 4 2 に記載される方法のうち、少なくとも 2 つを組み合わせることを特徴とする、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 1】

治療は重亜硫酸塩、亜硫酸水素塩または二亜硫酸塩の溶液によって実施することを特徴とする、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 6 2】

下記工程；

- a ) ゲノム DNA を含む生物学的試料を得て、
- b ) ゲノム DNA を抽出し、
- c ) 1 つまたはそれ以上のメチル化感受性制限酵素でもって、配列番号： 27, 40, 122, 43, 74, 127, 86, 90, 128, 105, 115, 121, 126, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 127, 130, 124 および 128 からなる群から得た 1 つまたはそれ以上の配列およびこれらに相補的な配列を含むゲノム DNA を消化し、そして
- d ) 工程 c ) の消化において生成した DNA 断片を決定することを、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 つに記載される方法。

【請求項 6 3】

標的配列または 工程 c ) において消化された配列は、配列番号： 68, 50, 74, 90, 91, 92 および 99 からなる群から得た 1 つまたはそれ以上の配列を含むことを特徴とする、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

標的配列または工程 c ) で消化された配列は、配列番号： 27, 83, 90 および 91 からなる群から得た 1 つまたはそれ以上の配列を含むことを特徴とする、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

標的配列または工程 c ) で消化された配列は、配列番号： 27, 40, 41, 43, 78, 86, 90, 105, 115 および 121 からなる群から得た 1 つまたはそれ以上の配列を含むことを特徴とする、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 6】

標的配列または工程 c ) で消化された配列は、配列番号： 126, 137, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 133, 134, 127, 130, 135, 124, 128 および 136 からなる群から得た 1 つまたはそれ以上の配列を含むことを特徴とする、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 7】

DNA 消化物は工程 d ) の前に増幅される、請求項 6 2 ~ 6 6 のいずれか 1 つに記載される方法。

【請求項 6 8】

1 0 0 ~ 2 0 0 塩基対の長さを有する 6 以上の異なった断片が増幅されることを特徴とする、請求項 4 5 ~ 5 4 および 6 7 の 1 つに記載される方法。

【請求項 6 9】

いくつかの DNA セグメントの増幅は 1 つの反応容器中で実施することを特徴とする、請求項 4 5 ~ 5 4 および 6 8 の 1 つに記載される方法。

【請求項 7 0】

ポリメラーゼは耐熱性 DNA ポリメラーゼであることを特徴とする、請求項 4 5 ~ 5 4 および 6 8 の 1 つに記載される方法。

【請求項 7 1】

増幅はポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) によって実施することを特徴とする、請求項 4 5 ~ 5 4 および 7 0 の 1 つに記載される方法。

【請求項 7 2】

増幅産物は検出可能な標識を担持することを特徴とする、請求項 4 5 ~ 5 4 および 6 9 ~ 7 0 の 1 つに記載される方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 7 3】

前記標識は、蛍光標識、放射性ヌクレオチドおよび/または質量分析計で検出できる典型的な質量を有する検出可能な分子断片である、請求項 7 2 に記載の方法。

## 【請求項 7 4】

増幅産物または増幅産物の断片は質量分析計で検出することを特徴とする、請求項 4 5 ~ 5 4 および 6 9 ~ 7 3 の 1 つに記載される方法。

## 【請求項 7 5】

産生した断片は、質量分析計でより良い検出性のための単一正および負総電荷を有することを特徴とする、請求項 7 4 および/または 7 3 の 1 つに記載される方法。

## 【請求項 7 6】

検出はマトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析法 (MALDI) により、またはエレクトロスプレー質量分析法 (ESI) を使用して実施し、かつ可視化することを特徴とする、請求項 7 3 ~ 7 5 の 1 つに記載される方法。

10

## 【請求項 7 7】

ゲノム DNA は、DNA または例えば、セルライン、組織学的スライド、生検、組織包埋パラフィン、乳房組織、血液、血漿、リンパ液、リンパ組織、管細胞、管洗浄液、乳頭吸引液、骨髄およびこれらの組合せを含む DNA 源を含む細胞または細胞性成分から得られることを特徴とする、請求項 4 5 ~ 7 6 の 1 つに記載される方法。

## 【請求項 7 8】

重亜硫酸塩 (= 二亜硫酸塩、亜硫酸水素塩) 試薬ならびに請求項 3 0 ~ 3 8 の 1 つに記載されるオリゴヌクレオチドおよび/または PNA - オリゴマーを含むキット。

20

## 【請求項 7 9】

さらに、MS - SNUPE、MSP、Methyl light、Heavy Methyl、核酸配列決定およびこれらの組合せからなる群から得られるメチル化分析を実施するための標準的試薬を含む、請求項 7 8 に記載のキット。

## 【請求項 8 0】

乳房細胞増殖障害の治療、特性化、分類および/または差別化のための請求項 1 ~ 2 4、4 5 ~ 7 7 の 1 つに記載される方法の使用、請求項 2 5 ~ 2 9 に記載の核酸の使用、請求項 3 0 ~ 3 5 の 1 つに記載されるオリゴヌクレオチドまたは PNA - オリゴマーの使用、請求項 7 8 または 7 9 に記載されるキットの使用、請求項 4 0 ~ 4 4 の 1 つに記載のアレーの使用、請求項 3 9 に記載のアレーを製造する方法の使用、または請求項 3 6 ~ 3 8 の 1 つに記載されるオリゴヌクレオチドのセットの使用。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

分子生物学における近年の方法論的発展によって研究されてきた観察のレベルは、遺伝子そのもの、これらの遺伝子の RNA への翻訳およびその生成タンパクである。個々の発生過程のどの時点でどの遺伝子にスイッチが入るか、また、いかにして特定細胞および組織の特定遺伝子の活性化および阻害が制御されるかの問題は、遺伝子またはゲノムのメチル化の程度および特性に相互に関連している。この点で、病的状態が個々の遺伝子またはゲノムの変化したメチル化パターンにおいて、自らを明らかにするであろう。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

DNA メチル化は、例えば、転写制御、遺伝的刷り込みおよび腫瘍形成においてある役割を演じている。したがって、遺伝情報の 1 構成成分として、5 - メチルシトシンの同定はかなり興味あるものである。しかしながら、5 - メチルシトシンはシトシンと同じ塩基対挙動を有するから、5 - メチルシトシン位置は配列決定によって同定することができない。さらに、5 - メチルシトシンによってもたらされる後成的情報は、PCR 増幅中に完全に失われる。

## 【0003】

50

5 - メチルシトシンのDNA分析のための相対的に新しく、かつ目下、最も頻繁に使用される方法は、シトシンと重亜硫酸塩との特異的な反応に基づく。これはその後のアルカリ加水分解において、その塩基対形成挙動でチミジンに対応するウラシルに変換される。しかしながら、5 - メチルシトシンはこれらの条件下で未変性のまま残存する。その結果、そのハイブリダイゼーション挙動でシトシンと元来、区別され得ないメチルシトシンが、「正常な」分子生物学的技術を使用して、例えば増幅およびハイブリダイゼーションまた配列決定によって、唯一、残存するシトシンとして検出され得るような方法で、元のDNAを変換する。これらの技術の全ては、完全に活用され得る塩基対形成に基づく。感度からみて、先行技術はアガロースマトリックス中で分析されるDNAを包埋する方法に限定され、すなわち、DNAの拡散および再生を阻止し(重亜硫酸塩のみが単鎖DNAと反応する)、そして高速透析で沈殿および精製工程の全てを置換する(オレク(Olek)A, オズワルド(Oswald)J, ウォルター(Walter)J, 「重亜硫酸塩系シトシンメチル化分析のための修正および改良方法」Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15;24(24):5064-6)。本方法を使用すると、個々の細胞を分析することが可能となり、これが本方法の潜在性を示す。しかしながら、目下、長さが約3000塩基対以下の個々の領域のみが分析されるが、数千の可能性あるメチル化事象に関する全体的な細胞分析は可能ではない。しかしながら、本方法は少量のサンプルから得た非常に小さな断片を確実に分析することはできない。これらは拡散を保護するにもかかわらずマトリックス中で失われる。

10

5 - メチルシトシンを検出する別な公知方法に関する概要は、次の総説文献：レイン(Rein)T, デパムフィリス(DePamphilis)M.L, ゾルバス(Zorbas)H, Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255から集めてもよい。

20

#### 【0004】

現在まで、いくつかの例外(例えば、ツェシュニック(Zeschnick)M、リッチ(Lich)C、ビュティング(Buiting)K、ドエルフラー(Doerfler)W、ホルステムケ(Horsthemke)B、「SNRPN座のアレル変異メチル化相違に基づくアンジェルマンおよびプラダー・ウィリー症候群の診断のための単管PCR試験」、Eur J Hum Genet. 1997 Mar-Apr;5(2):94-8)を除いて、重亜硫酸塩技術が唯一、研究において使用されている。しかしながら、いつも公知遺伝子の短い特定断片が重亜硫酸処理に続いて増幅され、いずれかが完全に配列決定されるか(オレク(Olek)A、ウォルター(Walter)J、「H19メチル化刷り込みの移植前個体発生」、Nat Genet. 1997 Nov;17(3):275-6)または個々のシトシン位置がプライマー伸長反応(ゴンザルゴ(Gonzalvo)ML、ジョーンズ(Jones)PA、「メチル化感受性単一ヌクレオチドプライマー伸長(Ms-SNUPe)を使用する特定部位でのメチル化相違の迅速定量」、Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15;25(12):2529-31、WO95/00669)または酵素分解(シオン(Xiong)Z、レアード(Laird)PW、COBRA:「高感度および定量的DNAメチル化分析」、Nucleic Acids Res. 1997 Jun 15;25(12):2532-4)によって検出される。さらに、ハイブリダイゼーションによる検出もまた、記述されている(オレク(Olek)ら、WO99/28498)。

30

#### 【0005】

個々の遺伝子のメチル化検出における重亜硫酸塩技術の使用を扱っている別な刊行物は、グリッグ(Grigg)G、クラーク(Clark)S、「ゲノムDNAの5 - メチルシトシン残基の配列決定」、Bioassays. 1994 Jun;16(6):431-6, 431; ツェシュニック(Zeschnick)M、シュミッツ(Schmitz)B、ディトリッチ(Dittrich)B、ビュティング(Buiting)K、ホルステムケ(Horsthemke)B、ドエルフラー(Doerfler)W、「ヒトゲノム中の刷り込みされたセグメント:ゲノム配列決定法により測定されたプラダー・ウィリー/アンジェルマン症候群領域中の異なったDNAメチル化パターン」、Hum Mol Genet. 1997 Mar;6(3)387-95; フェイル(Feil)R、チャールトン(Charlton)J、バード(Bird)AP、ウォルター(Walter)J、レイク(Reik)W、「個々の染色体上のメチル化分析:重亜硫酸塩ゲノム配列決定の改良プロトコール」、Nucleic Acids Res. 1994 Feb 25;22(4):695-6; マーチン(Martin)V、リビエラス(Ribieras)S、ソン・ウォン(Song-Wang)X、リオ(Rio)MC、ダンテ(Dante)R、「ゲノム配列決定はpS2遺伝子の5'領域中のDNA低メチル化とヒト乳癌セルラインでのその発現

40

50

の相関性を示す」、Gene. 1995 May 19;157(1-2):261-4:W O 9 7 / 4 6 7 0 5、W O 9 5 / 1 5 3 7 3 および W O 9 5 / 4 5 5 6 0 がある。

オリゴマーアレー製造における先行技術の概要は、1999年1月に発行されたNature Geneticsの特別版(Nature Genetics Supplement, Volume21, January 1999)およびそこに引用された文献から集めることができる。

#### 【0006】

蛍光標識されたプローブは、しばしば、固定化DNAアレーのスキャニングに使用される。特異的プローブの5'-OHへのCy3およびCy5染料の単純な結合は、蛍光標識において特に適している。ハイブリダイズされたプローブの蛍光検出は、例えば、共焦点顕微鏡によって実施してもよい。とりわけ、Cy3およびCy5染料は市販されている。

10

#### 【0007】

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析(MALDI-TOF)は、生物分子の分析には非常に効率的な開発である(カラス(Karas)M、ヒレンカムプ(Hillenkamp)F、「10,000ダルトンを超える分子質量を有するタンパクのレーザー脱離イオン化」、Anal Chem. 1988 Oct 15;60(20):2299-301)。分析物は光吸収性マトリックス中に包埋される。マトリックスを短いレーザーパルスで蒸発させ、未断片化方法で蒸気相中へ分析物分子を輸送する。分析物はマトリックス分子の衝突によってイオン化される。適用された電位がこのイオンをフィールドフリー飛行管中へ加速する。その異なった質量によって、イオンは異なった速度で加速される。より小さなイオンは大きなものよりも早く検出器へ届く。

20

#### 【0008】

MALDI-TOF分光測定は、ペプチドおよびタンパクの分析にきわめて適している。核酸の分析はいくぶんより困難である(グット(Gut)IG、ベック(Beck)S、「DNAおよびマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分光分析」、Current Innovations and Future Trends 1995, 1;147-57)。核酸の感度は、ペプチドよりも約100倍も悪く、断片サイズが大きくなるにつれて反比例して減少する。多重負電荷バックボーンを有する核酸では、マトリックスによるイオン化方法は、かなり効率が低い。MALDI-TOF分光測定では、マトリックスの選択が著しく重要な役割を果たす。ペプチドの脱離には、非常に微細な結晶化を生じるいくつかの効率的なマトリックスが見出されている。DNAに対するいくつかの反応性マトリックスが今では存在するが、しかしながら、感度の相違はまだ減少していない。感度の相違は、ペプチドにより類似するような方法にて、DNAを化学的に変性することによって減少させることができる。バックボーンの通常のリン酸塩がチオリン酸塩で置換されたホスホロチオエート核酸は、簡単なアルキル化化学を使用して電荷中性DNAに変換され得る(グット(Gut)IG、ベック(Beck)S、「選択的DNAアルキル化のための手法と質量分析による検出」、Nucleic Acids Res. 1995 Apr 25; 23(8): 1367-73)。この変性DNAへの電荷タグの結合は、ペプチドにおいて見られた感度と同じ程度に感度が増加する。電荷タギングのさらなる利点は、未変性基質の検出をかなり困難なものとする不純物に対する分析における大きな安定性である。

30

ゲノムDNAは標準方法によって細胞、組織または他の試験試料DNAから得られる。この標準的方法論は、フリッシュ(Fritsch)およびマニアティス(Maniatis)編、Molecular Cloning:「研究室マニュアル」、1989などの参考文献に見られる。

40

#### 【0009】

乳癌は目下、女性の中で第2番目に多いタイプの癌である。2001年には、浸潤性乳癌の190,000以上の新規な症例およびインサイチュ乳癌の47,000以上の付加的な症例が診断された。発生率および死亡率は年齢とともに増加していて、1994年~1998年の期間に、年齢20~24歳の女性の乳癌発生率は、人口100,000人当たり、たった1.5人であった。しかしながら、そのリスクは年齢75~79歳の中では489.7人に増加している。死亡率はここ十年では約5%減少していて、5年生存率に与える要素は、年齢、癌の状態、社会経済的要因および人種を含む。

#### 【0010】

50

乳癌は乳房組織内の細胞の制御されない増殖として定義される。乳房は管によって互いに結合された15～20の葉からなる。癌は管内で最も多く生じるが、炎症性乳癌と呼ばれる最も稀なタイプの癌では葉内でも見出される。

【0011】

乳癌の早期検出、分類および治療の方法を改良する必要性が絶えず存在することは当業者には理解されるであろう。子宮頸癌および皮膚癌などのいくつかの他の多くの癌の検出とは逆に、乳癌を分類および検出するには固有の困難性が存在する。

【0012】

いかなる治療法も第1ステップは、この疾患の定義された分類と対比した患者状態の評価である。しかしながら、このようなシステムの価値は、分類の質に固有に依存している。乳癌はその大きさ、位置および転移の発生により段階付けされる。治療法としては外科手術、放射性治療、化学治療およびホルモン治療が挙げられる。これらはまた、外科手術に対する補助的治療としても使用される。

【0013】

ホルモン治療は癌細胞へのエストロゲンの影響を阻止するか、または血清エストロゲン濃度を減少させるために開発されている。タモキシフェン(TAM)は乳癌患者のための最も広く使用される抗エストロゲン薬剤である。これは乳癌細胞のエストロゲン刺激を阻止し、エストロゲン受容体の転座および核結合を阻害するように作用する。TAMは原発性乳癌患者のための補助的活動環境(setting)および転移性疾患の治療のために使用され、その有効性はいくつかの臨床試験で立証されている。5年間の治療は年間の疾患再発率を47%まで減少させ、年間の死亡率を26%まで減少させていて、この減少は異なった年齢群において類似している。また、これは対側性乳房腫瘍を発生する頻度を減少させる。TAMは最も毒性の少ない抗悪性腫瘍薬であるが、ある組織にはエストロゲン特性を有するので、これはリスクが子宮内膜癌の3倍に増加する。他のホルモン治療としては、アロマターゼ阻害剤が挙げられる。これは脂肪組織(閉経後の女性のエストロゲンの主要な起源)中の酵素、アロマターゼを遮断し、脂肪組織中のエストロゲンが減少あるいは消滅することとなる。また、エストロゲン受容体を遮断または調整する新規な薬剤が開発されていて、それらは一般にSERM=選択的エストロゲン受容体調整剤として要約されている。腫瘍に対して入手可能なエストロゲンの量を減少させるなおも他の方法は、性ホルモン制御のフィードバックループを妨害する薬剤(LH-RH類似体)をより高濃度に投与

【0014】

一般的に、ホルモン治療の副作用は化学療法に比べて害が少ない。しかしながら、ホルモン治療は癌では成長因子としてのエストロゲンを除去あるいは減少させるので、これらは成長因子としてエストロゲンに依存する腫瘍のみに作用する。機能的ER経路を有しない癌の成長は、ホルモン治療によって調整することができない。

【0015】

癌がホルモン治療に対して反応するか否かを決定する現在の方法は、ホルモン受容体の発現を分析することである。ある患者群のみが治療から恩恵を受けるであろうから、ホルモン受容体の状態はいかなるホルモン治療の前にも試験されるべきである。この目的では、ER(エストロゲン受容体)およびPR(プロゲステロン受容体)状態が全ての患者において規定通り試験され、これらは反応の予測マーカー(予測マーカーまたは因子とは特定の治療に対する反応または反応の欠如に関する測定値である)として考慮される。ER状態は、補助的ホルモン治療活動環境およびまた進行した転移性疾患における反応の予測である。

【0016】

目下、ER陽性およびPR陽性患者はTAM治療を受け、患者の残り10%は化学治療を受けている。問題はホルモン治療がホルモン受容体陽性患者の下位群にのみ有効であり、またER陰性患者はTAMに対して最初から反応するようであることにある。それ故、非反応者の下位群はホルモン治療から恩恵を受けないのみならず、その逆効果を受け、代

10

20

30

40

50

わって化学治療を受ける機会を失うであろう。他方、ホルモン治療から恩恵を受けることができたER陰性下位群は、代替りの化学治療を受けるであろう。数種の異なった分析が生化学およびIHC(免疫組織化学)分析を含み、PRおよびERを測定するために入手可能であるが、染色方法の標準化の欠如および研究室間の可変性(variability)が存在する(Clin. Cancer Res 2000, 6:616-621)。

#### 【0017】

目下、数種の予測マーカーが評価中である。現在までにほとんどの患者はホルモン治療としてタモキシフェンを投与されていて、マーカーのほとんどはタモキシフェンに対する反応または抵抗に関与していることが示されている。しかしながら、どれか一方または他方のホルモン治療に対する反応の間には大きな重複が存在すると一般的に想定されている。実際、ERおよびPR発現はいかなるホルモン治療においても患者を選択するために使用される。TAMに関与しているマーカーの中で、反応はbc1-2である。高濃度のbc1-2は、転移性疾患患者におけるTAM治療反応と延命との有望な相関性を示し、ER陰性患者下位群に対して価値ある情報を加えた(J Clin Oncology 1997, 15 5:1916-1922; Endocrine, 2000, 13(1):1-10)。さらに、評価および確認を必要とする進行性乳癌の患者においてc-erbB2(Her2/neu)過剰発現の独立した予測値に関する確信ある証拠が存在する(British J of Cancer 1999, 79 (7/8):1220-1226; J Natl Cancer Inst, 1998,90 (21): 1601-1608)。

10

#### 【0018】

他の予測マーカーとしては、SRC-1(ステロイド受容体活性化補助因子-1)、CGA遺伝子過剰発現、細胞動力学およびS相分画分析(Breast Cancer Res and Treat, 1998, 48:87-92; Oncogene 2001, 20:6955-6959)が挙げられる。近年、uPA(ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子)およびPAI-1(プラスミノゲン活性化因子阻害剤タイプ1)が、互いに予後の悪い患者の下位群と補助的全身治療の恩恵を受ける患者の下位群を明確にするために有用であることを示した(J Clinical Oncology, 2002, 20 n°4)。これらのマーカーの全てはまだ反応の確証されたマーカーではないので、さらに見込みある治験における評価を必要とする。

20

#### 【0019】

多くの癌関連遺伝子は、乳房腫瘍形成中にCpGアイランドの高メチル化によって不活性化されることが示されている。カルシウム結合タンパクS100A2(受託番号NM\_005978)の低下した発現は、乳癌の発症に関連している。この遺伝子のプロモーター領域の高メチル化が新生物細胞中に観察されて、腫瘍細胞中のS100A2抑制が部位特異的メチル化によって仲介されるとの証拠を提供する。

30

#### 【0020】

SYK遺伝子(受託番号NM\_003177)は造血細胞中で多量に発現するタンパクチロシンキナーゼ、Syk(脾臓チロシンキナーゼ)をコードする。Sykは正常乳房管上皮細胞中で発現するが、浸潤性乳癌のサブセットでは発現しない。また、Syk発現の損失は、大きな移動および浸潤などの悪性表現型に関連しているようである。発現の損失はDNA高メチル化の結果として、ユアン(Yuan) Y, メンデツ(Mendez) R, サヒン(Sahin) A およびダイ(Dai) JL(「高メチル化はヒト乳癌のSYK遺伝子のサイレンシングとなる。」Cancer Res. 2001 Jul 15;61(14):5558-61)(非特許文献1)が示すように、転写レベルで生じる。

40

#### 【0021】

TGF- $\beta$ 2型受容体(TGFBR2遺伝子、NM\_003242がコードする)は、セリン/スレオニンキナーゼの複合体を経て膜透過情報伝達経路である役割を果たす。遺伝子の変異は乳房を含めて、いくつかの原発性腫瘍および数種の腫瘍誘導セルライン中に検出されている(ルッケ(Lucke) CD, フィルポット(Philpott) A, メトカルフェ(Metcalf) JC, トンプソン(Thompson) AM, ヒューズ-デイビーズ(Hughes-Davies) L, ケンプ(Kemp) PR, ヘスキース(Hesketh) R「反復性ヒト乳癌のトランスフォーミング成長因子 $\beta$ 2型受容体中の変異阻止」Cancer Res. 2001 Jan 15;61(2):482-5.)(非特許文献2)。

50

## 【 0 0 2 2 】

C O X 7 A 2 L および G R I N 2 D 遺伝子は、C p G - G B S (ゲノム結合部位)法を使用して、ワタナベ(Watanabe)ら、「CpGアイランドライブラリーによるエストロゲン反応性遺伝子の単離」Molec. Cell. Biol. 18: 442-449, 1998.)(非特許文献3)により新規なエストロゲン反応性要素としてともに同定された。C O X 7 A 2 L 遺伝子(受託番号 N M \_ 0 0 4 7 1 8 )はペプチド2-様チトクロームCオキシダーゼサブユニットV I I Aをコードする。ノザンプロット分析は乳癌セルラインのエストロゲン治療後にC O X 7 A 2 Lの上流制御を検出した。G R I N 2 D 遺伝子(受託番号 N M \_ 0 0 0 8 3 6 )はN-メチル-D-アスパルテート、向イオン性、サブユニット2Dグルタメート受容体、神経伝達系に關与するN M D A受容体チャンネルのサブユニットをコードし、さらに、c D N Aの発現は骨肉腫セルライン中に観察されている。V T N 遺伝子(ビトロネクチン受託番号 N M \_ 0 0 0 6 3 8 としても公知である。)はインビトロで動物細胞の付着および拡張を促進し、補体C 5 b - 9複合体により細胞溶解を阻止し、そして血液凝固においてアンチスロンピンIII-スロンピン作用を調整する75kDグリコプロテイン(血清拡張性因子または補体S-プロテインとも呼ばれる)をコードする。さらに、この遺伝子の発現は癌細胞の進行および浸潤に連結している。

10

## 【 0 0 2 3 】

S F N 遺伝子(ストラチフィンとしても公知である)は、14-3-3ファミリー、14-3-3シグマのポリペプチドをコードする。14-3-3ファミリーのタンパクはホスホセリン含有タンパクに結合してシグナル伝達を仲介する。S F N 遺伝子の発現は乳癌では失われ、これは新生物形質転換の初期段階での高メチル化によるようである(ウムブリヒト(Umbricht)CB, エブロン(Evron)E, ガブリエルソン(Gabrielson)E, フェルグソン(Ferguson)A, マークス(Marks)J, スクマー(Sukumar)S. 「14-3-3シグマ(ストラチフィン)の高メチル化は乳癌の初期現象である。」Oncogene. 2001 Jun 7;20(26):3348-53)(非特許文献4)。

20

## 【 0 0 2 4 】

P S A - T としても公知であるP S A 遺伝子(受託番号 N M \_ 0 2 1 1 5 4 )は、前立腺特異的抗原をコードし、その技術的に正しい名称がカリクレイン3であるP S A (受託番号 N M \_ 0 0 1 6 4 8 )として一般に呼ばれる遺伝子と混同されることはない。P S A - T 遺伝子はセリン生合成経路中の第2工程の触媒酵素であるタンパク、ホスホセリンアミノトランスフェラーゼをコードする。遺伝子発現レベルの変化は、m R N A 発現分析によってモニターされ、遺伝子の上流制御が6試料の研究において結腸癌腫中で同定されている(Electrophoresis 2002 Jun;23(11):1667-76 「結腸癌腫における遺伝子発現のm R N A 差別的ディスプレイ」、オヤラ(Ojala)P, サンドストローム(Sundstrom)J, グロンロース(Gronroos)JM, ビルタネン(Virtanen)E, タルピネン(Talvinen)K, ネバライネン(Nevalainen)TJ.)。

30

## 【 0 0 2 5 】

スタチミン遺伝子(N M \_ 0 0 5 5 6 3 )は、微小管動態を制御する保存細胞内可溶質リンタンパク質であるスタチミンとしても公知である腫瘍性タンパク18をコードする。このタンパクは種々のヒト悪性腫瘍で多く発現する。ヒト乳癌では、スタチミン遺伝子は腫瘍のサブセット中で上流制御されることが示されている。

40

## 【 0 0 2 6 】

P R K C D 遺伝子はタンパクキナーゼC酵素ファミリーの一員をコードし、B細胞情報伝達および成長、アポトーシスおよび種々の細胞型の差異の制御に關与している。

## 【 0 0 2 7 】

これらの分子のいくつかはカスケード様方式で相互作用する。S T M N 1を標的とするP R K S D 活性はS F N 結合およびS Y K リン酸化によって調節される。これはともに細胞分割を必要とするチューブリン重合に影響を与える。

## 【 0 0 2 8 】

M S M B 遺伝子(受託番号 N M \_ 0 0 2 4 4 3 )は10q11.2に位置するとされて

50

いる。これは前立腺が分泌する主要なタンパクの1つである - ミクロセミノタンパク (MSP) をコードする。さらに、これは前立腺癌の診断マーカーとして有用である。mRNA 分析を使用すると、低濃度の - MSP mRNA 発現とタンパクがホルモン治療の進行に関連し、かつ、これは潜在的侵襲性前立腺癌の徴候であると推定されている (Sakai) H, ツルサキ (Tsurusaki) T, カンダ (Kanda) S, コージ (Koji) T, スアン (Xuan) J W, サイトウ (Saito) Y. 「前立腺癌における - ミクロセミノプロテイン mRNA 発現の予後的意義」 *Prostate*. 1999 Mar 1;38(4):278-84.)。

#### 【0029】

TP53 遺伝子 (受託番号 NM\_000546) は最もよく特性化されている腫瘍抑制タンパクの1つであるタンパク p53 をコードする。p53 タンパクは転写因子として作用し、細胞サイクルの主要な制御因子として働く。変異によるこの遺伝子の不活性化は、細胞サイクルを破壊し、代わって腫瘍形成を助ける。この遺伝子に関連するメチル化変化は乳癌では有意であると報告されている。サラスワチ (Saraswati)ら、 (Nature 405, 974 - 978 (22 Jun 2000) 「弱められた H O X 5 機能はヒト乳房腫瘍における p53 発現を制限することができる」 (非特許文献 5) は、乳房腫瘍における低濃度の p53 mRNA が H O X A 5 遺伝子のメチル化に関連していると報告している。H O X A 5 遺伝子産物は、p53 のプロモーター領域に結合し、この遺伝子の発現を仲介する。p53 遺伝子そのもののプロモーター領域のメチル化は報告されている (カン (Kang) JH, キム (Kim) SJ, ノー (Noh) DY, パク (Park) IA, コー (Choe) KJ, ヨー (Yoo) OJ, カン (Kang) HS 「p53 プロモーターのメチル化は乳房発癌への補充経路である: インサイチュ管癌腫から浸潤性管癌腫への進行における p53 プロモーターの CpG メチル化と p53 遺伝子の変異との相関性」 *Lab Invest*. 2001 Apr;81(4):573-9.) (非特許文献 6) 。ここで、p53 プロモーター領域の CpG メチル化は乳癌で見出されることが証明され、かつ、p53 プロモーター領域のメチル化は乳房腫瘍の新生物進行への別な経路であると仮定された。タモキシフェンによる治療は p53 遺伝子の発現の程度を減少させることが観察されている (ファクザジイ (Farczadi) E, カスザス (Kaszas) I, バキ (Baki) M, スゼンデ (Szende) B, 「短期間のタモキシフェン治療後の乳房腫瘍におけるアポトーシス、有糸分裂、Her-2、p53 および Bc12 発現の変化」 *Neoplasma*. 2002;49(2):101-3)。

#### 【0030】

CYP2D6 遺伝子 (受託番号 NM\_000106) はヒトチロクローム P450 (CYP) スーパーファミリーの1員である。このファミリーの多くのメンバーは薬剤代謝に関連している (例えば、*Curr Drug Metab*. 2002 Jun;3(3):289-309, ドロリングス (Rodrigues) AD, ラシュモア (Rushmore) TH 参照)。これらのチロクローム P450 のうち、CYP2D6 は最も広範囲に特性化されている。これは非常に多型であり (この遺伝子の 70 以上の変異体が記載されている)、かつ、アレル変異が酵素活性の増加と減少となる。CYP2D6 酵素は抗うつ薬、神経遮断薬、いくつかの抗不整脈薬を含む多数の臨床的に重要な薬剤の代謝を触媒する (Nature 1990 Oct 25;347(6295):773-6 「チロクローム P450 CYP2D6 座位での一次遺伝子欠損の同定」ゲー (Gough) AC, マイルス (Miles) JS, スパー (Spurr) NK, モス (Moss) JE, ゲディック (Gaedigk) A, アイケルバウム (Eichelbaum) M, ウォルフ (Wolf) CR) )。

#### 【0031】

PTGS2 遺伝子 (受託番号 NM\_000963) はプロスタグランジン - エンドパーオキシドシンターゼ (プロスタグランジン - エンドパーオキシドシンターゼ 2) の誘導性アイソザイムをコードする。この遺伝子の異常なメチル化は、肺癌で同定されている (Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2002 Mar;11(3):291-7 「DNA メチル化マーカーを使用する肺癌セルラインの階層的クラスター形成」、ビルマニ (Virmani) AK, ツー (Tsou) JA, シーグムンド (Siegmond) KD, シェン (Shen) LY, ロング (Long) TI, レアード (Laird) PW, ガツダー (Gazdar) AF, レアード - オフリング (Laird-Offringa) IA.)。

#### 【0032】

CGA 遺伝子 (受託番号 NM\_000735) はグリコプロテインホルモンの - ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドをコードする。さらに、これはエストロゲン受容体 (ER) - 反応性遺伝子として同定されていて、その遺伝子の過剰発現は乳癌のER陽性に関連している。ビーチェ (Bieche)らは補助的タモキシフェン治療に続く一次外科手術により治療した125 ER陽性の閉経後乳癌患者におけるこの遺伝子のmRNA濃度を試験した。最初の結果は、CGA遺伝子過剰発現とスカーフ-ブルーム-リチャードソン (Scarff-Bloom-Richardson)組織病理学的グレードI+IIとプロゲステロンおよびエストロゲン受容体陽性と間の有意な関連を示した。これはCGAが腫瘍攻撃性が低いマーカーであることを示唆した(「乳癌の新規なエストロゲン受容体反応性遺伝子としてのCGAの同定: ホルモン治療への反応を予測するための傑出した候補マーカー」Cancer Research, 61, 1652-1658, February 15, 2001, イワンビーチェ (Ivan Bieche), ベアトリスパーフェ (Beatrice Parfait), ビビアンルドウサル (Vivianne Le Doussal), マーチンオリビ (Martine Olivi), マリー-クリスチンリオ (Marie-Christine Rio), ロゼットリデロー (Rosette Lidereau)およびマイケルビドウド (Michel Vidaud) (非特許文献7)。さらに、mRNA発現分析はCGA発現濃度をタモキシフェン反応に関連させ、ERBB2マーカー(反応不良マーカー)分析と組み合わせると、この遺伝子は乳癌のタモキシフェン反応の予測的マーカーとして有用であると推論されている(Oncogene 2001 Oct 18;20(47):6955-9「ER陽性閉経後乳癌患者のホルモン治療に対する反応の新規な予測者であるCGA遺伝子」ビーチェ (Bieche) I, パーフェ (Parfait) B, ノグーズ (Nogues) C, アンドリュウ (Andrieu) C, ビダウド (Vidaud) D, スピラトス (Spyratos) F, リンデロー (Lidereau) R, ビダウド (Vidaud) M) (非特許文献8)。著者達はタモキシフェン治療反応とともにCGA遺伝子の発現に関連する有意なデータを提供している。しかしながら、この分析は全てmRNA発現の相対的濃度分析に焦点を合わせている。これは中または高処理能力に適した方法論ではなく、臨床分析の開発における好適な原理でもない。

#### 【0033】

PITX-2遺伝子(NM\_000325)は眼、歯および脳下垂体前葉などの前方構造の発達中に発現されることが知られている転写因子(PITX-2)をコードする。この遺伝子の発現は細胞分化および増殖に関連しているけれども、これまで発癌での役割またはホルモン治療に対する反応は認識されていない。さらに、この遺伝子のメチル化状態の公知分析は現在まで報告されていない。

#### 【0034】

RASSF1A(Ras関連ドメインファミリー1A)遺伝子は3p21.3での候補腫瘍抑制因子遺伝子である。RasGTPアーゼは細胞増殖および細胞外シグナルに対する反応におけるアポトーシスを制御する分子スイッチのスーパーファミリーである。RASSF1Aは腫瘍抑制因子遺伝子であることが意図され、そして、この遺伝子の後成的変化は種々の癌で観察されている。RASSF1Aのメチル化は原発性非小細胞肺癌の予後不良に関連している(キム(Kim) DH, キム(Kim) JS, ジ(Ji) YI, シム(Shim) YM, キム(Kim) H, ハン(Han) J, パク(Park) J., 「RASSF1Aプロモーターの高メチル化は、原発性非小細胞肺癌では喫煙開始年齢および予後不良の関連する」Cancer Res. 2003 Jul 1;63(13):3743-6.)。これは膀胱癌の発症(クズミン(Kuzmin) I, リウ(Liu) L, ダムマン(Dammann) R, ゲイル(Geil) L, スタンブリッジ(Stanbridge) EJ, ウイルクジンスキー(Wilczynski) SP, レーマン(Lerman) MI, ファイファー(Pfeifer) GP. 「子宮頸癌のRAS関連ドメインファミリー1A遺伝子の不活性化とヒトパピロウイルス感染の役割」Cancer Res. 2003 Apr 15;63(8):1888-93.)ならびにとりわけ睾丸腫瘍および前立腺癌に関連している。この遺伝子のメチル化の癌診断マーカーとしての応用は、米国特許第6,596,488号(特許文献1)に記載されているが、患者の適当な治療法の選択における応用について記載されていない。

#### 【0035】

また、ジストログリカン前駆体遺伝子(ジストロフィン関連グリコプロテイン1)(NM\_004393)は3p21内に位置する。ジストログリカン(DG、DAG1としても公知である)は2つのサブユニット、すなわち-DGおよび-DGを含む接着分子

である。この分子は細胞外マトリックスと細胞質区画の間の重大な相互関係に起因し、それ自体、転移性疾患への進行に寄与するであろうと仮定される。この遺伝子の減少した発現は、大腸、前立腺および乳癌の高い腫瘍程度と段階に関連している。

【0036】

18q21.31に位置するワンカット-2転写因子遺伝子(NM\_004852)は、成人および発達中の肝臓遺伝子発現のホメオ-ドメイン転写因子制御因子である。

【0037】

トレフォイル因子(TFF)2遺伝子(NM\_003225)はタンパクのトレフォイルファミリーの一員である。これらは通常、消化管の粘膜中に最も高濃度で発現するが、乳房を含む他の組織の原発性腫瘍中に異所的にしばしば発現する。TFF1の発現は培養中のエストロゲン反応性乳癌細胞中でエストロゲンにより制御され、その発現はエストロゲン受容体の発現に関連していて、TFF1は腫瘍におけるホルモン反応性のマーカーである。TFF1プロモーターメチル化は非発現性胃癌誘導セルラインおよび組織中に観察されている。

【0038】

TMEFF2(NM\_016192)は上皮成長因子(EGF)様モチーフおよび2つのホリスタチンドメインを含む膜貫通タンパクをコードする。これは前立腺および脳組織中に過剰発現されることが示され、これは前立腺癌細胞の抗増殖性効果を示すアンドロゲン制御因子であることが示唆されている。

【0039】

エストロゲン受容体をコードするESR1遺伝子(NM\_000125)のメチル化は、肺、食道、脳および結腸直腸を含む数種の癌タイプに関連している。エストロゲン受容体(ESR)はホルモン結合、DNA結合および転写活性化において重要な数種のドメインからなるリガンド活性化転写因子である。

【0040】

PCAF(NM\_003884)遺伝子はp300/CBP関連因子(PCAF)をコードする。CBPとp300は細胞成長および/または分化に参与する多くの配列特異的因子に結合する大きな核タンパクである。p300/CBP関連因子はCBPとp300とともにインビボ結合活性を発揮する。このタンパクは核ヒストンおよびヌクレオソーム核粒子とのヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性を有し、これは転写制御において直接的役割を果たす。p300/CBP関連因子もまたNF- $\kappa$ Bp65に関連する。このタンパクはp53のC-末端部分においてLys320のアセチル化によってp53遺伝子の発現を制御することが示されている。

【0041】

WBP11(NM\_016312)遺伝子は核タンパクをコードし、mRNAスプライシング因子および中間径フィラメント含有核周囲ネットワークとともに共存する。これはNpw38、核タンパクのWWドメインに結合する2つのプロリンリッチ領域を含み、従って、このタンパクはNpw38-結合タンパク、NpwBPとも呼ばれている。

【特許文献1】米国特許第6,596,488号

【非特許文献1】Yuan Y, Mendez R, Sahin A および Dai JL Cancer Res. 2001 Jul 15; 61(14):5558-61

【非特許文献2】Lucke CD, Philpott A, Metcalfe JC, Thompson AM, Hughes-Davies L, Kemp PR, Hesketh R Cancer Res. 2001 Jan 15;61(2):482-5.

【非特許文献3】Watanabe, Molec. Cell. Biol. 18: 442-449, 1998.

【非特許文献4】Umbricht CB, Evron E, Gabrielson E, Ferguson A, Marks J, Sukumar S. Oncogene. 2001 Jun 7;20(26):3348-53

【非特許文献5】Saraswati, (Nature405, 974 - 978 22 Jun 2000)

【非特許文献6】Kang JH, Kim SJ, Noh DY, Park IA, Choe KJ, Yoo OJ, Kang HS Lab Invest. 2001 Apr;81(4):573-9.

【非特許文献7】Cancer Research, 61, 1652-1658, February 15, 2001, Ivan Bieche,

10

20

30

40

50

Beatrice Parfait, Vivianne Le Doussal, artine Olivi, Marie-Christine Rio, Rosette Lidereau および Michel Vidaud

【非特許文献 8】Oncogene 2001 Oct 18;20(47):6955-9 Bieche I, Parfait B, Nogues C, Andrieu) C, Vidaud D, Spyrtatos F, Lidereau R, Vidaud M

【発明の開示】

【0042】

本発明はホルモン治療に対する乳房組織の細胞増殖障害を有する患者の反応を予測するための方法および核酸を提供する。ここに記載される方法および核酸を使用して、この治療方式に対する患者の反応の統計的に有意なモデルが開発され、治療法選択を決定する患者および医者を助けるために使用され得る。記載される方法は乳房組織の細胞増殖障害を患う患者の治療法としてホルモン治療の適合性を評価するために使用されるべきである。したがって、本発明は現在の治療反応予測方法に関連する問題を減少させるように思える。

10

【0043】

ホルモン治療に関連するリスク、負担および利益について患者および医者に重大な情報を提供するために、ここに記載される方法および核酸を使用して、患者反応性が乳房組織の細胞増殖障害のためのホルモン治療前または中に評価され得る。したがって、これはここに例示される方法および核酸が、患者治療法選択のより正確な評価を患者と医者の双方が可能となることにより、患者の生活の質および治療成功の可能性を改善するために使用され得ると理解されるであろう。

20

【0044】

本発明の目的は、最も好ましくは、xxSTMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, TP53, PTGS2, FGF R1, SYK, PITX2, GRIN2D, PSA, CGA, CYP2D6, MSMB, COX7A2L, VTN, PRKCD, ONECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF1, PITX2, PSAT1, CGA および PCAF (表 1 参照) および / またはそれらの制御領域からなる群から選択される遺伝子の 1 つまたは組合せのメチル化パターンの分析によって達成される。本発明は xxSTMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, TP53, PTGS2, FGFR1, SYK, PITX2, GRIN2D, PSA, CGA, CYP2D6, MSMB, COX7A2L, VTN, PRKCD, ONECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF1, PITX2, PSAT1, CGA および PCAF 群から選択される遺伝子の 1 つまたは組合せの核酸が、目的のゲノム配列内のメチル化および非メチル化 CpG ジヌクレオチドを区別することができる試薬または一連の試薬と接触させることを特徴とする。

30

【0045】

本発明の目的はまた、STMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, TP53, PTGS2, FGFR1, SYK, PITX2, GRIN2D, PSA, CGA, CYP2D6, MSMB, COX7A2L, VTN, PRKCD, ONECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF1, PITX2, PSAT1, CGA および PCAF 遺伝子の群の 1 つまたは複数のサブセットの CpG メチル化の分析によっても達成される。特に下記サブセットが好ましい。

【0046】

-TP53, PTGS2, FGFR1, PSA, CGA, CYP2D6 および MSMB

40

-STMN1, PITX2, PSA および CGA

-STMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, SYK, GRIN2D, PSA, COX7A2L, VTN および PRKCD

-ONECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF1, PITX2, PSAT1, CGA および PCAF

【0047】

本発明はゲノム DNA の遺伝的および / または後成的パラメーターを確認する方法を利用できる。本方法はエストロゲン受容体経路を標的とするか、またはエストロゲン代謝、産生または分泌に関与する 1 つまたはそれ以上の薬剤を含む治療法による治療に対する患者の反応の正確な予測を可能として、乳房細胞増殖障害の改良された治療およびモニタリングに使用される。特に好ましい実施態様では、本発明の方法は前記治療法に反応する患

50

者と反応しない患者の区別を可能とする。

【0048】

本発明の方法はインサイチュ管癌腫、小葉癌腫、膠質癌腫、尿細管癌腫、髓様癌、異形成癌腫、インサイチュ管内癌腫、インサイチュ小葉癌腫およびインサイチュ乳頭癌腫を含む乳房組織の広範囲の細胞増殖障害の分析に使用してもよいが、これらに限定されない。

【0049】

本発明の方法は2つの治療活動環境において前記治療法に対する反応の予測に特に適している。1つの実施態様では、本方法は図1に示されるように、最初の非化学療法治療、例えば外科手術（ここでは補助的活動環境と呼ぶ）への第2治療法としてホルモン経路を標的とする治療を受ける患者に適用する。このような治療はしばしば段階1～3の乳癌を患う患者に処方される。この実施態様では、反応者とは一定期間中に検出可能な乳癌を再発しない人と定義され、非反応者とはこの期間内に再発する人である。

【0050】

さらなる好ましい実施態様では、前記方法は無疾患期間後に一次的手段（好ましくは外科手術）による治療に続いて乳癌の再発を患う患者に適用する。ここで、ホルモン経路標的治療は癌腫再発の検出に対する反応に処方されている。このような治療は特に転移が生じる後期癌腫を患う患者にしばしば処方される。したがって、この臨床的環境はまた、「転移活動環境」とも呼ばれる。この実施態様では、反応者とは部分的または完全な緩解に入った人、すなわちその疾患がさらに転移するか、または上記検出可能なレベルを残す人に対して、その癌が未検出可能レベルまで後退する被検者である。この方法論は本方法がエストロゲンおよび/またはプロゲステロン受容体状態とは別個に、いかなる被検者にも適用される先行技術においてさらに改良を示す。したがって、好ましい実施態様では、被検者はエストロゲンまたはプロゲステロン受容体状態について試験される必要がない。

【0051】

さらに、本方法はシトシンメチル化および前記遺伝子内の単一ヌクレオチド多型の分析を可能とする。

【0052】

本発明の目的はSTMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, TP53, PTGS2, FGFR1, SYK, PITX2, GRIN2D, PSA, CGA, CYP2D6, MSMB, COX7A2L, VTN, PRKCD, ONECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF1, PITX2, PSAT1, CGA および PCAF 遺伝子および/またはそれらの制御領域のうちの1つまたはそれ以上のメチル化パターンの分析によって達成される。特に好ましい実施態様では、前記遺伝子の配列は、配列番号：27, 40, 122, 43, 131, 50, 74, 127, 135, 86, 90, 128, 129, 99, 105, 115, 121, 126, 137, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 133, 134, 127, 130, 135, 124, 128 および 136 およびこれらの相補的配列を含む。

【0053】

本発明の目的はまた、前記遺伝子群のうちの下記サブセットから選択される1つまたはそれ以上の遺伝子のメチル化パターンを分析しても達成される。1つの実施態様では、本発明の目的は、TP53, PTGS2, FGFR1, PSA, CGA, CYP2D6 および MSMBからなる群から選択される1つまたはそれ以上の遺伝子のメチル化パターン分析によって達成され、前記遺伝子の配列が配列番号：68, 50, 74, 90, 91, 92 および 99を含むことがさらに好ましい。さらなる実施態様では、本発明の目的はSTMN1, PITX2, PSA および CGAからなる群から選択される1つまたはそれ以上の遺伝子のメチル化パターン分析によって達成され、前記遺伝子の配列は配列番号：27, 83, 90 および 91を含むことがさらに好ましい。本発明の目的はSTMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, SYK, GRIN2D, PSA, COX7A2L, VTN および PRKCDからなる群から選択される1つまたはそれ以上の遺伝子のメチル化パターン分析によって達成され、前記遺伝子の配列は配列番号：27, 40, 41, 43, 78, 86, 90, 105, 115, 121を含むことがさらに好ましい。目的がONECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF1, PITX2, PSAT1, CGA および PCAFからなる群から選択される1つまたはそれ以上の遺伝子のメチル化パターン分析によって達成されることも

10

20

30

40

50

本発明の一実施態様であり、前記遺伝子の配列は配列番号：126, 137, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 133, 134, 127, 130, 135, 124, 128 および 136を含むことが好ましい。

【0054】

患者が補助的治療としてこの治療を受ける場合、前記遺伝子はTP53, PTGS2, PITX2, CYP2D6, MSMB, WBP11, TMEFF2, ESR1, PITX2 および PCAFからなる群から選択されることが好ましく、そして、前記遺伝子の配列は配列番号：131, 50, 135, 129, 99, 137, 133, 134, 135 および 136を含むことがさらに好ましい。

【0055】

また、この遺伝子群の下記サブセットも好ましい：

TP53, PTGS2, CYP2D6 および MSMB、ここで、この遺伝子の配列は配列番号：68, 50, 92 および 99を含むことがさらに好ましく、

PITX2、ここで、この遺伝子の配列は配列番号：83を含むことがさらに好ましく、WBP11, TMEFF2, ERBB2, ESR1, PITX2 および PCAF、ここで、この遺伝子の配列は配列番号：137, 132, 133, 134, 135 および 136を含むことがさらに好ましい。

【0056】

患者が転移活動環境の反応においてこの治療を受ける場合、前記遺伝子はSTMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, FGFR1, SYK, GRIN2D, PSA, CGA, COX7A2L, VTN, PRKCD, ONECUT2, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, SYK, RASSF1, PSAT1および CGAからなる群から選択されることが好ましく、前記遺伝子の配列は配列番号：27, 40, 122, 43, 74, 127, 86, 90, 128, 105, 115, 121, 126, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 127, 130, 124 および 128を含むことがさらに好ましい。

【0057】

この遺伝子群の下記サブセットもまた好ましい；

FGFR1, PSA および CGA、ここで、これらの遺伝子の配列は配列番号：74, 90 および 91を含むことがさらに好ましく、

STMN1, PSA および CGA、ここで、これらの遺伝子の配列は配列番号：27, 90 および 91を含むことがさらに好ましく、

STMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, SYK, GRIN2D, PSA, COX7A2L, VTN および PRKCD、ここで、これらの配列は配列番号：27, 40, 41, 43, 78, 86, 90, 105, 115, 121を含むことがさらに好ましく、

ONECUT2, CYP2D6, DAG1, S100A2, TFF1, TP53, SYK, RASSF1, PSAT1 および CGA、ここで、これらの遺伝子の配列は配列番号：126, 129, 125, 122, 123, 131, 127, 130, 124 および 128を含むことが好ましい。

【0058】

好ましい実施態様では、本方法は被検者から得た生物学的試料中の前記核酸配列を少なくとも1つの試薬または一連の試薬と接触させることによって達成される。ここで、前記試薬または一連の試薬は標的核酸内のメチル化および非メチル化 CpGジヌクレオチドを区別する。

【0059】

好ましい実施態様では、本方法は下記工程を含む：

本方法の第一工程では、ゲノムDNA試料はDNA、DNA源、例えば、セルライン、組織学的スライド、生検、パラフィン中に包埋された組織、乳房組織、血液、血漿、リンパ液、リンパ組織、管細胞、管洗浄液、乳頭吸引液、骨髄およびこれらの組合せを含む細胞または細胞成分などの起源から単離されなければならない。抽出は当業者にとって標準的である手段によって行う。これらは洗浄剤溶解物、超音波およびガラスビースによるボルテキシングの使用を含む。核酸は一度抽出されると、ゲノム二本鎖DNAが分析に使用される。

【0060】

好ましい実施態様では、DNAは本方法の次工程に先たって分解してもよい。これは特に制限酵素を使用する当該技術分野で標準的な手段によって行ってもよいが、これに限定

されない。

【0061】

本方法の第2工程では、ゲノムDNA試料は5'-位で非メチル化されているシトシン塩基がウラシル、チミンまたはハイブリダイゼーション挙動においてシトシンと類似していない他の塩基に変換されるように処理する。

【0062】

ゲノムDNAの上記処理は、好ましくは重亜硫酸塩（亜硫酸塩、二亜硫酸塩）、そして続いて、非メチル化シトシン核酸塩基をウラシルまたは塩基対形成挙動においてシトシンに類似していない他の塩基に変換することとなるアルカリ加水分解を実施する。もしも重亜硫酸塩溶液が反応に使用されるなら、次いで非メチル化シトシン塩基に付加が生じる。さらに、変性剤または溶媒ならびにラジカル妨害剤が存在しなければならない。次いで、次のアルカリ加水分解は非メチル化シトシン核酸塩基のウラシルへの変換を生じる。変換されたDNAは次いでメチル化シトシンの検出に使用される。

10

【0063】

前処理されたDNA断片はプライマーオリゴヌクレオチドおよび好ましくは熱安定性ポリメラーゼを使用して増幅される。統計的および実際の検討から、長さ100~2000塩基対を有する好ましくは6つ以上の異なった断片が増幅される。数種のDNA断片の増幅は1つの同じ反応容器中で同時に実施することができる。通常、増幅はポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）によって実施される。

【0064】

このようなプライマーの設計は当業者には自明である。これらは付表：配列番号 299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793 および 794に特定される下記塩基配列の少なくとも18塩基対セグメントに対して、それぞれ配列が逆相補的または同一である少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含む。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、好ましくはこれらがCpGジヌクレオチドを含まないことを特徴とする。本方法の特に好ましい実施態様では、前記プライマーオリゴヌクレオチドの配列は、目的の乳房細胞特異的DNAのみに選択的にアニールし、かつ増幅するように設計され、それによってバックグランドまたは非関連DNAの増幅を減少させる。本発明の状況では、バックグランドDNAとは関連組織特異的メチル化パターンを有しないゲノムDNAを意味し、この場合、関連組織とは乳房組織であると解釈される。

20

30

【0065】

本発明では、少なくとも1つのプライマーオリゴヌクレオチドが増幅中に固相に結合していることが好ましい。異なったオリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマー配列は四角形または六角形の格子形態の平面固相に配置され、固相表面は好ましくはシリコン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、鋼、鉄、銅、ニッケル、銀または金からなり、ニトロセルロースまたはプラスチックなどの他の材料も同様に使用することが可能である。

40

【0066】

増幅によって得られた断片は、直接または間接に検出可能な標識を担持していてもよい。標識は蛍光標識、放射性核種、または質量分析計で検出できる典型的な質量を有する検出可能な分子断片の形状が好ましく、産生される断片は質量分析計でより良く検出性されるために1価陽性または陰性電荷を有することが好ましい。検出はマトリックス支援レー

50

ザー脱着 / イオン化質量分析測定 (MALDI) によるかまたは電子線スプレー質量分光測定 (ESI) を使用して実施し、かつ可視化してもよい。

【0067】

次工程では、核酸増幅産物は治療に先たってゲノムDNAのメチル化状態を測定するために分析される。

【0068】

核酸の後処理分析は別な方法を使用して実施してもよい。処理された核酸のメチル化状態特異的分析のためのいくつかの方法は以下に記載され、他の別法は当業者には自明である。

【0069】

分析は本方法の増幅工程中に実施してもよい。1つのこのような実施態様では、xxSTMN 1, SFN, S100A2, TGFBR2, TP53, PTGS2, FGFR1, SYK, PITX2, GRIN2D, PSA, CGA, CYP2D6, MSMB, COX7A2L, VTN, PRKCD, ONECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF1, PITX2, PSAT1, CGA および PCAF 遺伝子および / またはそれらの制御領域内の前選択された CpG 位のメチル化状態は、メチル化特異的プライマーオリゴヌクレオチドを使用して検出してもよい。「MSP」(メチル化特異的PCR)との用語は、ハーマン(Herman)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996, および米国特許 5,786,146号および第6,265,171号に記載される当該技術分野にて認識されているメチル化分析を呼ぶ。重亜硫酸塩処理DNAの増幅のためのメチル化状態特異的プライマーの使用はメチル化核酸と非メチル化核酸の区別を可能とする。MSPプライマー対は重亜硫酸塩処理CpGジヌクレオチドにハイブリダイズする少なくとも1つのプライマーを含む。したがって、前記プライマーの配列は少なくとも1つのCG、TGまたはCAジヌクレオチドを含む。非メチル化DNAに対して特異的なMSPプライマーは、CpGのC位の3'-位に「T」を含む。したがって、本発明では好ましくは、前記プライマーの塩基配列は、配列番号.: 299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793 および794に記載される前処理核酸配列およびこれらに相補的な配列にハイブリダイズする長さ少なくとも9ヌクレオチドを有する配列を含むことを必要とする。ここで前記オリゴマーの塩基配列は少なくとも1つのCG、TGまたはCAジヌクレオチドを含む。

【0070】

本方法の1つの実施態様では、CpG位のメチル化状態はハイブリダイゼーション分析によって測定してもよい。本方法のこの実施態様では、本方法の第2工程で得られた増幅産物は、オリゴヌクレオチドおよび / またはPNAプローブのアレーまたはセットにハイブリダイズさせる。この状況ではハイブリダイゼーションは以下に記載される方法で行なう。ハイブリダイゼーション中に使用されるプローブのセットは、好ましくは少なくとも4オリゴヌクレオチドまたはPNA-オリゴマーからなる。この方法では、増幅産物は固相に既に結合されたオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするプローブとして作用する。非ハイブリダイズ断片は続いて除去する。前記オリゴヌクレオチドは付表に特定される塩基配列のセグメントに逆相補的または同一である長さ10ヌクレオチドを有する少なくとも1つの塩基配列を含み、このセグメントは少なくとも1つのCpGまたはTpGジヌクレオチドを含む。さらなる好ましい実施態様では、CpGジヌクレオチドのシトシン、またはTpGの場合、チアミンは10-マーの5'-末端から5番目~9番目のヌクレオチドである。1つのオリゴヌクレオチドはCpGまたはTpGジヌクレオチドのそれぞれに

10

20

30

40

50

存在する。

【0071】

非ハイブリダイズ増幅産物は次いで除去される。本方法の最終工程では、ハイブリダイズした増幅産物が検出される。この状況では、増幅産物に結合した標識がオリゴヌクレオチド配列が位置する固相の各位置で同定され得る。

【0072】

本方法のさらなる実施態様では、CpG位置のメチル化状態は処理されたDNAをPCR増幅プライマー（ここで、該プライマーはメチル化特異的または標準のいずれであってもよい）にハイブリダイズさせたオリゴヌクレオチドプローブによって測定してもよい。

【0073】

この方法の特に好ましい実施態様は、二重標識蛍光オリゴヌクレオチドプローブ(ABI Prism 7700 Sequence Detection Systemを使用するTaqMan<sup>TM</sup> PCR、Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, California)を使用する蛍光系リアルタイム定量PCR(ハイド(Heid)ら、Genome Res. 6:986-994, 1996)の使用である。TaqMan<sup>TM</sup> PCR反応はフォワード増幅プライマーとリバース増幅プライマーの間に位置するGpC-リッチ配列にハイブリダイズするように設計されたTaqMan<sup>TM</sup> プローブと呼ばれる非伸長性尋問オリゴヌクレオチドを使用する。TaqMan<sup>TM</sup> プローブはさらにTaqMan<sup>TM</sup> オリゴヌクレオチドのヌクレオチドに結合されたリンカー分子(例えば、ホスホアミダイト)に共有結合した蛍光「レポーター分子」および「消光剤分子」を含む。重亜硫酸塩処理に続く核酸内のメチル化分析のために、プローブはMethyl Light 分析としても公知である米国特許第6,331,393号(参考としてここに挿入される)に記載されるように、メチル化特異的であることが必要である。本発明で使用するのに適したTaqMan<sup>TM</sup> 検出方法論の変法としては、二重プローブ技術(Lightcycler<sup>TM</sup>)または蛍光増幅プライマー(Sunrise<sup>TM</sup> 技術)が挙げられる。これらの技術は重亜硫酸塩処理DNAでの使用に適した方法、さらにCpGジヌクレオチド内のメチル化分析において応用してもよい。

【0074】

重亜硫酸塩処理核酸の分析によるメチル化評価でのプローブオリゴヌクレオチドの使用にさらに好適な方法は、ブロッカーオリゴヌクレオチドの使用である。このようなオリゴヌクレオチドの使用は、BioTechniques 23(4), 1997, 714-720 D. ユ(Yu), M.ムカイ(Mukai), Q. リュ(Liu), C. スタインマン(Steinman)に記載される。ブロッキングプローブオリゴヌクレオチドはPCRプライマーとともに目下、重亜硫酸塩処理核酸にハイブリダイズさせる。核酸のPCR増幅はブロッキングプローブの5'-位置で終結し、それによってブロッキングプローブの相補的配列が存在すると、核酸の増幅は抑制される。プローブはメチル化状態特異的方法において重亜硫酸塩処理核酸にハイブリダイズするように設計してもよい。例えば、非メチル化核酸の集団内でのメチル化核酸の検出では、問題の位置で非メチル化されている核酸の増幅の抑制は、「CA」とは反対にある問題の位置の「CG」を含むブロッキングプローブの使用によって実施されるであろう。

【0075】

ブロッカーオリゴヌクレオチドを使用するPCR法では、ポリメラーゼ伸介増幅の有効な中止は、ポリメラーゼにより伸長されないブロッカーオリゴヌクレオチドを必要とする。好ましくはこれは3'-デオキシオリゴヌクレオチドまたは「遊離」ヒドロキシル基よりも3'-位置で誘導化されたオリゴヌクレオチドであるブロッカーの使用により達成される。例えば、3'-O-アセチルオリゴヌクレオチドはブロッカー分子の好ましいクラスの代表である。

【0076】

さらに、ブロッカーオリゴヌクレオチドのポリメラーゼ伸介分解は防止されるべきである。好ましくはこのような防止は5'-3'-エキソヌクレアーゼ活性を欠くポリメラーゼの使用、または例えば、ブロッカー分子をヌクレアーゼ耐性とするその5'-末端でチオエート架橋を有する変性ブロッカーオリゴヌクレオチドの使用のいずれかを含む。特別な応用はブロッカーのこのような5'変性を必要としないであろう。例えば、もしもブロッ

10

20

30

40

50

カー結合部位とプライマー結合部位が重複するなら、それにより、プライマー（例えば過剰ブロッカーとともに）の結合防止、ブロッカーオリゴヌクレオチドの分解が実質的に防止されるであろう。これはポリメラーゼがブロッカーの方に向かって、かつその中へ（5'～3'方向に）プライマーを伸長しないこと、つまり、正常にはハイブリダイズしたブロッカーオリゴヌクレオチドの分解となる方法であるとの理由による。

**【0077】**

本発明の目的において、かつ、ここに実施されるように特に好ましいブロッカー/PCR実施態様はブロッキングオリゴヌクレオチドとしてペプチド核酸(PNA)オリゴマーの使用を含む。このようなPNAブロッカーオリゴマーはそれらがポリメラーゼにより分解も伸長もしないから、理想的に適している。

10

**【0078】**

したがって、好ましくは前記ブロッキングオリゴヌクレオチドの塩基配列は、配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793 および 794 の1つに記載される前処理された核酸配列およびこれらに相補的な配列にハイブリダイズする長さ少なくとも9ヌクレオチドを有する配列を含むことが必要である。ここで、前記オリゴヌクレオチドの塩基配列は少なくとも1つのCpG、TpGまたはCpAジヌクレオチドを含む。

20

**【0079】**

本方法のさらに好ましい実施態様では、CpG位置のメチル化状態の測定はゴンザルゴ(Gonzalgo)およびジョーズ(Jones) (Nucleic Acids Res. 25:2529-2531)に記載されるように、MSSNuPEなどの鑄型定方向オリゴヌクレオチド伸長を使用して実施する。

**【0080】**

本方法のさらなる実施態様では、CpG位置のメチル化状態の測定は本方法の第2工程で生成した増幅産物の配列決定およびその次の配列分析によって可能となる(サンガー(Sanger) F.ら、1977 PNAS USA 74: 5463-5467)。

30

**【0081】**

本発明による方法は、上記手段を組み合わせてもよい。本発明の特に好ましい態様では、リアルタイム検出プローブの使用はMSPおよび/またはブロッカーオリゴヌクレオチドを同時に組み合わせる。

**【0082】**

本発明のさらなる実施態様は、前処理を必要とすることなく、ゲノムDNAのメチル化状態を分析する方法である。この方法の第1および第2工程では、ゲノムDNA試料は組織または細胞起源から得て単離しなければならない。このような起源としてはセルライン、組織学的スライド、体液またはパラフィンに包埋された組織を挙げることができる。抽出は当業者に標準的である手段によって行う。これらの手段としては洗浄剤分解、超音波およびガラスビーズを使用するボルテキシングの使用が挙げられる。核酸は一旦、抽出されるとゲノム2本鎖DNAが分析に使用される。

40

**【0083】**

好ましい実施態様では、DNAは処理前に分解してもよく、これは特に制限エンドヌクレアーゼを使用する当該技術分野で標準的な手段によってもよい。第3工程では、次いでDNAは1つまたはそれ以上のメチル化感受性制限酵素で消化する。消化は制限部位でのDNAの加水分解が特定CpGジヌクレオチドのメチル化状態の情報となるように実施する。

50

## 【 0 0 8 4 】

好ましい実施態様では、制限断片を増幅する。さらに好ましい実施態様では、これはポリメラーゼチェーンリアクションを使用して実施する。

## 【 0 0 8 5 】

最終工程では、増幅産物を検出する。検出は例えば、ゲル電気泳動分析、ハイブリダイゼーション分析、PCR生成物内の検出可能なタグの導入、DNAアレー分析、MALDIまたはESI分析などの当該技術分野で標準的な手段であってもよいが、これらに限定されない。

## 【 0 0 8 6 】

前記方法は、好ましくはゲノムDNAの遺伝的および/または後成的パラメーターを確認するために使用する。 10

## 【 0 0 8 7 】

この方法を可能とするために、本発明はさらに、STMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, TP53, PTGS2, FGFR1, SYK, PITX2, GRIN2D, PSA, CGA, CYP2D6, MSMB, COX7A2L, VTN, PRKCD, 0 NECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF 1, PITX2, PSAT1, CGA および PCAF群から選択される遺伝子の1つまたは組合せの変性DNA、ならびに前記遺伝子内のシトシンメチル化を検出するためのオリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマーを提供する。本発明は遺伝的および後成的パラメーター、および前記ゲノムDNAのシトシンメチル化パターンが乳房細胞増殖障害の改良された治療およびモニタリングに特に適しているとの発見に基づく。 20

## 【 0 0 8 8 】

本発明の核酸はゲノムDNAの遺伝的および/または後成的パラメーターの分析のために使用することができる。

## 【 0 0 8 9 】

本発明のこの目的は、配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793 および 794の1つに記載される前処理されたゲノムDNAおよびこれらに相補的な配列の長さ少なくとも18塩基の配列を含む核酸を使用して達成する。 30

## 【 0 0 9 0 】

開示される本発明の目的は配列番号：345, 346, 381, 382, 393, 394, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717 および 718の1つに記載される前処理されたゲノムDNAおよびこれらに相補的な配列の長さ少なくとも18塩基の配列を含む核酸を使用して達成してもよい。 40

## 【 0 0 9 1 】

開示される本発明の目的は、配列番号：299, 300, 411, 412, 425, 426, 427, 428, 573, 574, 685, 686, 699, 700, 701 および 702の1つに記載される前処理されたゲノムDNAおよびこれらに相補的な配列の長さ少なくとも18塩基の配列を含む核酸を使用して達成してもよい。

## 【 0 0 9 2 】

開示される本発明の目的は配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 401, 402, 417, 418, 425, 426, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 675, 676, 691, 692, 699, 700, 729, 730, 749, 750, 761, 762の1つに記載される前処理されたゲノムDNAおよびこれらに相補的な配列の長さ少なくとも1 50

8塩基の配列を含む核酸を使用して達成してもよい。

【0093】

開示される本発明の目的は配列番号：489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793 および 794の1つに記載される前処理されたゲノムDNAおよびこれらに相補的な配列の長さ少なくとも18塩基の配列を含む核酸を使用して達成してもよい。

【0094】

したがって、変性核酸は疾患関連遺伝的パラメーターおよび後成的パラメーターの確認に関連していない。

【0095】

本発明の目的はさらに、ゲノムシトシンメチル化状態を検出するための前処理されたDNAの分析のためのオリゴヌクレオチドまたはオリゴマーによって達成し、前記オリゴヌクレオチドは配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793 および 794に記載される前処理されたゲノムDNAにハイブリダイズする長さ少なくとも10ヌクレオチドを有する少なくとも1つの塩基配列を含む。本発明のオリゴマープローブは、ホルモン治療への患者反応に関連した態様について、生物学的試料の分析中に特定遺伝的および後成的パラメーターを確認することを初めて可能とする重要でかつ有効な手段を構成する。前記オリゴヌクレオチドは乳房細胞増殖障害の改良された治療およびモニタリングを可能とする。オリゴマーの塩基配列は好ましくは少なくとも1つのCpGまたはTpGジヌクレオチドを含む。プローブはまた、特に好ましい対形成特性を有するPNA（ペプチド核酸）の形態で存在してもよい。本発明のオリゴヌクレオチドは、CpGジヌクレオチドのシトシンが前記オリゴヌクレオチドの3分の1の中央、13-マーのオリゴヌクレオチドの5'-末端から第5～9番目のヌクレオチド内に存在するか、またはPNA-オリゴマーの場合、CpGジヌクレオチドのシトシンが9-マーの5'-末端から第4～6番目のヌクレオチドのあることが好ましい。

【0096】

本発明のオリゴマーは、通常、配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793 および 794内の少なくとも2つのオリゴマーおよびCpGジヌクレオチドのそれぞれに対する1つまでのオリゴマーを含む、いわゆる「セット」として使用される。

【0097】

本方法の特に好ましい実施態様では、配列番号：1733-1736, 1967-1994, 2003-2024, 2

10

20

30

40

50

031 - 2034, 2045-2134に記載されるオリゴマーが、転移活動環境でのホルモン治療に対する被検者の反応を予測するために使用される。

【0098】

本方法のさらなる実施態様では、配列番号：2011, 2012, 2017 - 2024 および 2031 - 2034に記載されるオリゴマーが転移活動環境でのホルモン治療に対する被検者の反応を予測するために使用される。

【0099】

本方法のさらなる実施態様では、配列番号：2003-2024に記載されるオリゴマーが転移活動環境でのホルモン治療に対する被検者の反応を予測するために使用される。

【0100】

本方法のさらなる実施態様では、配列番号：2003-2020 および 2045-2112に記載されるオリゴマーが転移活動環境でのホルモン治療に対する被検者の反応を予測するために使用される。

【0101】

本方法のさらなる実施態様では、配列番号：1733-1736, 1967-1994, 2011-2025, 2045-2052, 2069-2078 および 2127-2134に記載されるオリゴマーが転移活動環境でのホルモン治療に対する被検者の反応を予測するために使用される。

【0102】

本方法の特に好ましい実施態様では、配列番号：1691-1692, 1925-1932, 1941-1954, 1965-1966, 1995-2002, 2025-2030, 2035 - 2044 および 2135 - 2142に記載されるオリゴマーが補助的活動環境でのホルモン治療に対する被検者の反応を予測するために使用される。

【0103】

本方法のさらなる実施態様では、配列番号：2035- 2044に記載されるオリゴマーが補助的活動環境でのホルモン治療に対する被検者の反応を予測するために使用される。

【0104】

本方法のさらなる実施態様では、配列番号：2025-2030に記載されるオリゴマーが補助的活動環境でのホルモン治療に対する被検者の反応を予測するために使用される。

【0105】

本方法のさらなる実施態様では、配列番号：1691-1692, 1925-1932, 1941-1954, 1965-1966, 1995-2002 および 2135 -2142に記載されるオリゴマーが補助的活動環境でのホルモン治療に対する被検者の反応を予測するために使用される。

【0106】

本発明のオリゴヌクレオチドのセットの場合、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドは固相に結合されていることが好ましい。さらに、1つのセットの全てのオリゴヌクレオチドは固相に結合されていることが好ましい。

【0107】

さらに、本発明は(配列表および表1に詳細に記載されるSTMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, TP53, PTGS2, FGFR1, SYK, PITX2, GRIN2D, PSA, CGA, CYP2D6, MSMB, COX7A2L, VTN, PRKCD, ONECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF1, PITX2, PSAT1, CGA および PCAF遺伝子およびこれらに相補的な配列の)前記配列または前記配列の前処理したものの分析によって、ゲノムDNAのシトシンメチル化状態を検出するために使用される少なくとも2n(オリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマー)のセットに関する。

【0108】

オリゴマーのセットはまた、STMN1, SFN, S100A2, TGFBR2, TP53, PTGS2, FGFR1, SYK, PITX2, GRIN2D, PSA, CGA, CYP2D6, MSMB, COX7A2L, VTN, PRKCD, ONECUT2, WBP11, CYP2D6, DAG1, ERBB2, S100A2, TFF1, TP53, TMEFF2, ESR1, SYK, RASSF1, PITX2, PSAT1, CGA および PCAF遺伝子の前記配列または前記配列の前処理されたものの分析によって単一ヌクレオチド多型(SNP)を検出するために使用してもよい。

10

20

30

40

50

## 【0109】

本発明の方法は、当該技術分野で公知であり、ホルモンまたはホルモン関連経路を標的とする治療の結果の予測として目下、使用されるマーカーおよび臨床的指標の導入によって改良および補充されるであろうことが当業者には自明であろう。さらに好ましくは、前記マーカーとしては結節状態、年齢、閉経状態、程度、エストロゲンおよびプロゲステロン受容体が挙げられる。

## 【0110】

本発明の基礎を形成する遺伝子は、「遺伝子パネル」、すなわち本発明の特別な遺伝子配列および/またはそれらの各情報的メチル化部位を含む集合体を形成するために使用してもよい。遺伝子パネルの形成は、乳癌治療の特定態様の迅速および特異的分析を可能とする。本発明に記載され、かつ使用される遺伝子パネルは、エストロゲン受容体経路を標的とするか、またはエストロゲン代謝、産生または分泌に関与する1つまたはそれ以上の薬剤を含む治療により処置の結果を予測することによって、乳房細胞増殖障害の治療において驚くべき高い効率で使用することができる。このパネルの各遺伝子の分析は患者の反応の評価に寄与するが、しかしながら、好ましい実施態様では患者評価はたった1つの遺伝子の分析によって達成してもよい。「遺伝子パネル」の1メンバーの分析は安価であるが、患者反応を評価するより正確性が低い手段であり、パネルの複数のメンバーの分析は本方法を実施するむしろより高価な手段であるが、より高い正確性(技術的に好ましい解決策)をもたらす。

## 【0111】

本発明の方法の効率は、化学治療により治療されなかった患者に適用した場合、改善される。したがって、本方法が化学治療を受けなかった被検者の評価に使用されることが、この方法の特に好ましい実施態様である。

## 【0112】

本発明では、本発明により入手可能となった異なったオリゴヌクレオチドおよび/またはPNA-オリゴマーの配列(いわゆる「アレー」)が同様に固相に結合されたような方法にて存在することが好ましい。異なったオリゴヌクレオチド-および/またはPNA-オリゴマー配列のアレーは、四角形または六角形格子の形態である固相上に配置されることを特徴とすることができる。固相表面は好ましくはシリコン、ガラス、ポリスチレン、アルミニウム、鋼、鉄、銅、ニッケル、銀または金から構成される。しかしながらペレットまたは樹脂マトリックスの形態で存在することができるニトロセルロースならびにナイロンなどのプラスチックが好適な代替品である。

## 【0113】

したがって、本発明のさらなる主題は、乳房細胞増殖障害の改良された治療およびモニタリングのために担体物質に固定されたアレーを製造する方法である。前記方法では本発明の少なくとも1つのオリゴマーが固相に結合される。このようなアレーを製造する方法は、固相化学および感光性保護基を使用する、例えば米国特許第5,744,305号から公知である。

## 【0114】

本発明のさらなる主題は、乳房細胞増殖障害の改良された治療およびモニタリングのためのDNAチップに関する。DNAチップは本発明の少なくとも1つの核酸を含む。DNAチップは例えば、米国特許第5,837,832号から公知である。

## 【0115】

さらに、本発明の主題は、例えば、重亜硫酸塩含有試薬、配列番号: 299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 7

10

20

30

40

50

62, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793 および 794に特定される塩基配列、および/またはPNA-オリゴマーの18塩基長セグメントにその配列が各場合、対応するか、あるいは相補的である少なくとも2つのオリゴヌクレオチドを含むプライマーオリゴヌクレオチドのセット、ならびに記載される方法を実施し、かつ評価するための指示書から構成されていてもよいキットである。

【0116】

さらに好ましい実施態様では、前記キットはCpG位置特異的メチル化分析を達成するための標準的試薬を含み、前記分析は以下の技術：MS-SNuPE、MSP、Methyl light、Heavy Methylおよび核酸配列決定のうちの1つまたはそれ以上を含む。しかしながら、本発明に従うキットはまた、前記成分の一部のみを含むことができる。

【0117】

Methyl Light（登録商標）分析のための通常の試薬（例えば、通常のMethyl Light（登録商標）系キットに見られるように）は特定遺伝子のためのPCRプライマー（またはメチル化変性DNA配列またはCpGアイランド）；TaqMan（登録商標）プローブ；至適化PCR緩衝液およびデオキシヌクレオチド；およびTaqポリメラーゼを含んでいてもよいが、これらに限定されない。

【0118】

Ms-SNuPE分析のための通常の試薬（例えば、通常、Ms-SNuPE系キットに見られるように）は、特定遺伝子のためのPCRプライマー（またはメチル化変性DNA配列またはCpGアイランド）；至適化PCR緩衝液およびデオキシヌクレオチド；ゲル抽出キット；陽性コントロールプライマー；特定遺伝子のためのMs-SNuPEプライマー；反応緩衝液（Ms-SNuPE反応のための）および放射活性ヌクレオチドを含んでいてもよいが、これらに限定されない。さらに、重亜硫酸塩変換試薬は、DNA変性緩衝液；スルホン化緩衝液；DNA再生試薬またはキット（例えば、沈殿、限外濾過、アフィニティーカラム）；脱スルホン化緩衝液；およびDNA再生成分を含んでいてもよい。

【0119】

MSP分析のための通常の試薬（例えば、通常、MSP系キットに見られるように）は、特定遺伝子のためのメチル化および非メチル化PCRプライマー（またはメチル化変性DNA配列またはCpGアイランド）、至適化PCR緩衝液およびデオキシヌクレオチド、および特定プローブを含んでいてもよいが、これらに限定されない。

【0120】

本発明のオリゴマーまたはそのアレーならびに本発明のキットは、乳房細胞増殖障害の改良された治療およびモニタリングのために使用することが意図される。本発明では、本方法は好ましくは、ゲノムDNA内の重要な遺伝的および/または後成的パラメーターの分析のために、特に乳房細胞増殖障害の改良治療およびモニタリングでの使用に用いられる。

【0121】

本発明の方法はより多くの情報に基づく治療管理を可能とすることによって、乳房細胞増殖障害の改良された治療およびモニタリングに使用される。

【0122】

さらに、本発明は患者または個人にとって不利であるか、または関連性ある事象の診断および/または予知に関し、ゲノムDNA内の重要な遺伝的および/または後成的パラメーター、すなわち本発明の手段により得られた前記パラメーターが、遺伝的および/または後成的パラメーターの他のセットと比べられ、その相違が患者または個人にとって不利であるか、あるいは関連性ある事象の診断および/または予知の基礎として役立つ。

【0123】

本発明の文脈では、「ハイブリダイゼーション」との用語は、二本鎖構造を形成する試

10

20

30

40

50

料DNA中でワトソン-クリック塩基対形成に従って完全に相補的な配列へオリゴヌクレオチドが結合することとして理解されるべきである。

【0124】

本発明の文脈では、「遺伝的パラメーター」とは、ゲノムDNAおよびさらにその制御に必要である配列の変異および多型である。特に、挿入、欠失、点変異、反転および多型性および特に好ましくはSNP（単一ヌクレオチド多型）が変異とされる。

【0125】

本発明の文脈では、「メチル化部位」との用語は目的の核酸に存在するメチル化の程度を意味すると解釈され、これは絶対的または相対的な用語、すなわちパーセントまたは他の数値で、あるいは他の組織との比較として表現され、ここでは高メチル化、低メチル化または有意に類似あるいは同一であるメチル化状態を有するとして記述される。

10

【0126】

本発明の文脈では、遺伝子の「制御領域」との用語は、遺伝子の発現に影響を与えるヌクレオチド配列を意味すると解釈される。この制御領域は前記遺伝子の内、近位または遠位に存在するであろう。この制御領域としては構成プロモーター、組織特異的プロモーター、発生特異的プロモーター、誘導性プロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されない。プロモーター制御要素はまた、遺伝子の転写または翻訳の効率を制御するある種のエンハンサー配列要素を含む。

【0127】

本発明の文脈では、「化学治療」との用語は、癌を治療する薬剤または化学物質の使用を意味すると解釈される。この定義は放射性治療（高エネルギー線または粒子を使用する治療）、ホルモン治療（ホルモンまたはホルモン類似物質（合成置換体）による治療）および外科手術治療を除外する。

20

【0128】

本発明の文脈では、「後成的パラメーター」とは特にシトシンメチル化およびさらにゲノムDNAのDNA塩基およびさらにその制御に必要である配列の変異である。さらに、後成的パラメーターとしては、例えば記述される方法を使用して直接に分析され得ないが、代わってDNAメチル化に関連するヒストンのアセチル化が挙げられる。

【0129】

本発明の文脈では、「補助的治療」は初期非化学治療、例えば外科手術に直ちに続く癌患者の治療を意味すると解釈される。一般的に補助的治療の目的は、補助的治療を行わない場合と比べて再発のリスクが有意により小さなことである。

30

【0130】

本発明の文脈では、「エストロゲンおよび/またはプロゲステロン受容体陽性」との用語は、エストロゲンおよび/またはプロゲステロンの結合を受けやすいその表面受容体上で発現する細胞を意味すると解釈される。

【0131】

以下に、配列、図面および実施例をもとに、より詳細に本発明を説明するが、これらに限定されない。

【0132】

図1は本発明の方法の好ましい応用を示す。X軸は腫瘍塊を示し、線「3」は検出限界を示す。Y軸は時間を示す。したがって、この図は段階1～3の乳癌のホルモン治療の単純化されたモデルを図示す。ここで、初期治療は外科手術（ポイント1）であり、その後、タモキシフェンによる補助的治療であった。最初のシナリオでは、治療（4）の反応者は観察の持続時間中、検出限界以下に留まっているとして示される。治療（5）の非反応者はある期間、無病生存（2）であり、続いて癌腫塊が検出限界に届く再発となった。

40

【0133】

図2は本発明の方法の他の好ましい応用を示す。X軸は腫瘍塊を示し、線「3」は検出性限界を示す。Y軸は時間を示す。したがって、この図は最終段階の乳癌のホルモン治療の単純化されたモデルを図示する。ここで、初期治療は外科手術（ポイント1）であり、

50

その後、タモキシフェンにより治療される再発(2)であった。最初のシナリオでは、治療(4)の反応者は観察持続中、検出限界以下に留まっているとして示される。治療(5)の非反応者は再発から回復しない。

#### 【0134】

図3は実施例1のCpGアイランドのメチル化分析を示す。1遺伝子当たりのCpGアイランドはグループ化され、客観的反応との相関性がホテリング(Hotelling)のT2統計量によって決定された。黒点は示された遺伝子のp-値を示す。20個の最も情報ある遺伝子が、増加するp-値とともに左から右へ並べて示される。上部点線は未補正有意差値( $P < 0.05$ )を示す。下部点線はフォールス・ディスカバリー・レート(false discovery rate)補正25%後の有意差を示す。下部線(この場合、COX7A2L)以下にある最も大きなp-値をもつ遺伝子よりも小さいかまたは同じp-値をもつ全ての遺伝子は有意と考えられる。選択されたFDR補正は同定された遺伝子が75%のチャンス・トルー・ディスカバリー(chance true discoveries)を有することを保証する。

10

#### 【0135】

図4は図3(実施例1)で測定した生存奏効率と有意差に関連する10個の遺伝子の生のCpGジヌクレオチドメチル化データを示す。対象反応者(CR+PR)から得た腫瘍は左側に示され、進行性疾患(PD)の患者から得た腫瘍は右側に示される。灰色陰影は平均値からのCpGジヌクレオチドメチル化状態の相対的距離を示す。CpGジヌクレオチドは1個の遺伝子当たりグループ化される。示された遺伝子は増加する有意差に従い上部から下部へ順序づけられる。明るい灰色は低メチル化CpGジヌクレオチドを示し、濃い灰色は高メチル化CpGジヌクレオチドを示す。メチル化データは個々のCpGジヌクレオチド毎に1つの標準偏差に集中され、かつ、規準化される。

20

#### 【0136】

図12および13はアルゴリズムを使用して、2クラスの組織(転移活動環境のホルモン治療に対する反応者と非反応者)間のCpGメチル化相違による実施例3で得られたデータのランクづけされたマトリックスを示す。これらの図は灰色の段階で示され、最も有意なCpG位置は上部へ向かって減少する有意差を示すマトリックスの下部に存在する。黒色は所与のCpG位置の全メチル化を示し、白色は特定位置の非メチル化を示し、メチル化の程度に従って、明るい灰色(低割合のメチル化)から暗い灰色(高割合のメチル化)で示される。各列は1つの遺伝子内の1つの特定CpG位置を示し、各行は1つの試料における異なったCpGのメチル化プロフィールを示す。左側に遺伝子名を示し、右側に個々のCpG位置のp-値を示す。p-値は観察された分布がデータセット中に偶然に生じた可能性である。

30

#### 【0137】

図14は実施例1(データセット3)の組合せスコアの無増悪生存期間(PFS)曲線を示す。患者のタモキシフェン治療開始後のPFS曲線が示される。これらは伝統的な予測マーカー、年齢、有力な再発部位、無病期間およびER水準に基づく予測的スコア( $\chi^2=14.0$ ; 自由度3)を使用してグループ化される(A)。DNAメチル化に基づくスコア( $\chi^2=27.5$ ; 自由度3)はホスホセリンアミノトランスフェラーゼ(PSA-T)、スタスミン(STMN1)、S100プロテインA2(S100A2、トランスフォーミング成長因子受容体II(TGFR2)およびグルタミン酸受容体2D(GRIND2D)の統計的に独立した予測遺伝子を含んで示される(B)。生存曲線は実施例1で作成され、有意差が実施例1に記載されるように計算された。計算された予測的スコアは50名の患者をそれぞれ4つのグループ(q1~q4)にその値の25、50および75の百分位数を使用して分割した。X軸の下の数は、0、12、24および36ヶ月の示された時点での各グループの危険な状態の患者数を示す。無増悪生存(パーセント)はY軸上にプロットされ、増悪への時間(月)はX軸上にプロットされる。

40

#### 【0138】

図5~12はアルゴリズムを使用して、2クラスの組織間のCpGメチル化相違による実施例1(データセット1)で得られた付加的データのランクづけされたマトリックスを

50

示す。図 5、7、9 および 11 は灰色の段階で示され、ここで、最も有意な CpG 位置は上部へむかって減少する有意差を有するマトリックスの下部に存在する。黒色は所与の CpG 位置の全メチル化を示し、白色は特定位置の非メチル化を示し、メチル化の程度に従って、明るい灰色（低割合のメチル化）から暗い灰色（高割合のメチル化）で示される。各列は 1 つの遺伝子内の 1 つの特定 CpG 位置を示し、各行は 1 つの試料における異なった CpG のメチル化プロフィールを示す。左側に遺伝子名を示し、右側に個々の CpG 位置の p - 値を示す。p - 値は観察された分布がデータセット中に偶然に生じた可能性である。図 6、8、10 および 12 は先の図（即ち、それぞれ図 5、7、9 および 11）の赤色 - 緑色版である。赤色は所与の CpG 位置の全メチル化を示し、緑色は特定位置の非メチル化を示す。

10

## 【0139】

図 15 はログスケールで未修正 p - 値を示す。p - 値は多重ロジスティック回帰モデルからの可能性比率 (LR) テストから計算された。目的の個々のゲノム領域はそれぞれ点で示され、上部点線は 25% フォールス・ディスカバリー・レートにおけるカットオフ点を示し、下部点線はボンフェロニ (Bonferroni) 修正 5% 限界を示す。

## 【0140】

図 16 は実施例 1 で得たデータ (データセット 4) の最もよい 10 個の増幅産物のランクづけされたマトリックスを示す。p - 値は多重ロジスティック回帰モデルからの可能性比率 (LR) テストから計算された。図は灰色段階で示され、ここで最も有意な CpG 位置は上部へ向かって減少する有意差を有するマトリックスの下部に存在する。黒色は所与の CpG 位置の全メチル化を示し、白色は特定位置の非メチル化を示し、メチル化の程度に従って、明るい灰色（低割合のメチル化）から暗い灰色（高割合のメチル化）で示される。各列は 1 つの遺伝子内の 1 つの特定 CpG 位置を示し、各行は 1 つの試料における異なった CpG のメチル化プロフィールを示す。個々の CpG 位置における p - 値は右側に示される。p - 値は観察された分布がデータセット中で偶然に生じた可能性である。

20

## 【0141】

図 17 は ESR1 遺伝子の Kaplan - Meier 計算無病生存曲線を示し、点線 (下部曲線) は非反応者を示し、直線 (上部曲線) は反応者を示す。

## 【0142】

図 18 は PCAF 遺伝子の Kaplan - Meier 計算無病生存曲線を示し、点線 (上部曲線) は非反応者を示し、直線 (下部曲線) は反応者を示す。

30

## 【0143】

図 19 は PITX2 遺伝子の Kaplan - Meier 計算無病生存曲線を示し、点線 (上部曲線) は非反応者を示し、直線 (下部曲線) は反応者を示す。

## 【0144】

図 20 は TMEFF2 遺伝子の Kaplan - Meier 計算無病生存曲線を示し、点線 (上部曲線) は非反応者を示し、直線 (下部曲線) は反応者を示す。

## 【0145】

図 21 は WBP11 遺伝子の Kaplan - Meier 計算無病生存曲線を示し、点線 (下部曲線) は非反応者を示し、直線 (上部曲線) は反応者を示す。

40

## 【0146】

図 21 は ERBB2 遺伝子の Kaplan - Meier 計算無病生存曲線を示し、点線 (下部曲線) は非反応者を示し、直線 (上部曲線) は反応者を示す。

## 【0147】

配列番号: 27, 40, 122, 43, 131, 50, 74, 127, 135, 86, 90, 128, 129, 99, 105, 115, 121, 126, 137, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 133, 134, 127, 130, 135, 124, 128 および 136 は、表 1 の遺伝子の 5' および / または制御領域 および / または CpG リッチ領域を示す。これらの配列は GenBank から誘導され、目下、予期されない配列材料のわずかな変異の全て、例えば、わずかな欠失 および SNP を含むと解釈されるが、これらに限定されない。

50

## 【 0 1 4 8 】

配列番号：299, 300, 325, 326, 327, 328, 331, 332, 345, 346, 381, 382, 393, 394, 401, 402, 411, 412, 417, 418, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 443, 444, 455, 456, 475, 476, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 573, 574, 599, 600, 601, 602, 605, 606, 619, 620, 655, 656, 667, 668, 675, 676, 685, 686, 691, 692, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 717, 718, 729, 730, 749, 750, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793 および 794は、表 1 に記載されるゲノム配列から誘導された D N A の前処理された配列を示す。これらの配列は、目下、予期されない配列材料のわずかな変異の全て、例えば、わずかな欠失および S N P を含むと解釈されるが、これらに限定されない。

## 【 0 1 4 9 】

配列番号：2003, 2003, 2003, 2003, 2004, 2004, 2004, 2004, 2005, 2005, 2005, 2005, 2006, 2006, 2006, 2006, 2007, 2007, 2007, 2007, 2008, 2008, 2008, 2008, 2009, 2009, 2009, 2009, 2010, 2010, 2010, 2010, 2011, 2011, 2011, 2012, 2012, 2012, 2013, 2013, 2014, 2014, 2015, 2015, 2016, 2016, 2017, 2017, 2017, 2018, 2018, 2018, 2019, 2019, 2019, 2020, 2020, 2020, 2021, 2021, 2022, 2022, 2023, 2023, 2024, 2024, 2025, 2025, 2026, 2026, 2027, 2027, 2028, 2028, 2029, 2029, 2030, 2030 - 2035, 2035, 2036, 2036, 2037, 2037, 2038, 2038 - 2045, 2045, 2046, 2046, 2047, 2047, 2048, 2048, 2049, 2049, 2050, 2050, 2051, 2051, 2052, 2052, 2053, 2053, 2054, 2054, 2055, 2055, 2056, 2056, 2057, 2057, 2058, 2058, 2059, 2059, 2060, 2060 - 2073, 2073, 2074, 2074 - 2077, 2077, 2078, 2078 - 2081, 2081, 2082, 2082 - 2095, 2095, 2096, 2096, 2097, 2097, 2098, 2098, 2099, 2099, 2100, 2100, 2101, 2101, 2102, 2102, 2103, 2103, 2104, 2104 - 2109, 2109, 2110, 2110, 2111, 2111, 2112, 2112, 2113, 2113, 2114, 2114 - 2123, 2123, 2124, 2124, 2125, 2125, 2126 および 2126 ~ 2142は、表 2 および 3 に記載される配列番号：1 ~ 配列番号：63のゲノム D N A 内の C p G 位置の分析において有用であるオリゴマーの配列を示す。

## 【 0 1 5 0 】

配列番号 2001 ~ 配列番号 2140は、配列番号：27, 40, 122, 43, 131, 50, 74, 127, 135, 86, 90, 128, 129, 99, 105, 115, 121, 126, 137, 129, 125, 132, 122, 123, 131, 133, 134, 127, 130, 135, 124, 128 および 136に記載されるゲノム D N A の C p G 位置のメチル化状態の分析において特に有用であるオリゴマーの配列を示す。

## 【 0 1 5 1 】

配列番号：54, 配列番号：56 および 配列番号：133は、T M E F F 2 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：349,350,353,354, 511, 623, 624, 627, 628, 785 および 786はそれらの前処理された配列を示す。

## 【 0 1 5 2 】

配列番号：56, 70 および 136は、E S R 1 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：357, 358, 385, 386, 515, 514, 631, 632, 659, 660, 787 および 788はその前処理された配列を示す。

## 【 0 1 5 3 】

配列番号：135 および 配列番号：83は、P I T X 2 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：411, 412, 515, 516, 685, 686, 789 および 790は、その前処理された配列を示す。

## 【 0 1 5 4 】

配列番号：119 および 配列番号：136は、P C A F 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：483, 484, 517, 518, 757, 758, 791, 792はmその前処理された配列を示す。

## 【 0 1 5 5 】

10

20

30

40

50

配列番号：137は、W B P 1 1 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：519, 520, 793 および 794はその前処理された配列を示す。

【0156】

配列番号：27は、S T M N 1 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：299, 300, 573 および 574はその前処理された配列を示す。

【0157】

配列番号：90 および 配列番号：124は、P S A T 1 としても公知である P S A 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：425, 426, 699, 700, 493, 494, 767 および 768はその前処理された配列を示す。

【0158】

配列番号：91 および 配列番号：128は、C G A 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：427, 428, 501, 502, 701, 702, 775 および 776はその前処理された配列を示す。

【0159】

配列番号：74は、F G F R 1 遺伝子のゲノム配列を示し、および 配列番号：393, 394, 667 および 668はその前処理された配列を示す。

【0160】

配列番号：50は、P T G S 2 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：345, 346, 619 および 620はその前処理された配列を示す。

【0161】

配列番号：90は、M S M B 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：443, 444, 717 および 718 はその前処理された配列を示す。

【0162】

配列番号：68 および 配列番号：131は、T P 5 3 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：381, 382, 507, 508, 655, 656, 781 および 782はその前処理された配列を示す。

【0163】

配列番号：92は、C Y P 2 D 6 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：429, 430, 703 および 704はその前処理された配列を示す。

【0164】

配列番号：41 および 配列番号：122は、S 1 0 0 A 2 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：327, 328, 489, 490, 601, 601, 763 および 764はその前処理された配列を示す。

【0165】

配列番号：121は、P R K C D 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：487, 488, 761 および 762はその前処理された配列を示す。

【0166】

配列番号：78 および 配列番号：127は、S Y K 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：401, 402, 499, 500, 675, 676, 773 および 774はその前処理された配列を示す。

【0167】

配列番号：115は、V T N 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：475, 476, 749, 750 はその前処理された配列を示す。

【0168】

配列番号：86は、G R I N 2 D 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：417, 418, 691 および 692はその前処理された配列を示す。

【0169】

配列番号：43は、T G F B R 2 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：331, 332, 605 および 606はその前処理された配列を示す。

【0170】

配列番号：105は、C O X 7 A 2 L 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：455, 456, 729 および 730はその前処理された配列を示す。

【0171】

10

20

30

40

50

配列番号：42 および 配列番号：123は、T F F 1 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：329, 330, 491, 492, 603, 604, 765 および 766はその前処理された配列を示す。

【0172】

配列番号：125は、D A G 1 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：495, 496, 769 および 770 はその前処理された配列を示す。

【0173】

配列番号：126は、O N E C U T 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：497, 498, 771 および 772 は、その前処理された配列を示す。

【0174】

配列番号：129は、C Y P 2 D 6 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：503, 504, 777 および 778はその前処理された配列を示す。 10

【0175】

配列番号：59 および 配列番号：130は、R A S S F 1 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：363, 364, 505, 506, 637, 638, 779, 780はその前処理された配列を示す。

【0176】

配列番号：132は、E R B B 2 遺伝子のゲノム配列を示し、配列番号：509, 510, 783 および 784はその前処理された配列を示す。

【実施例】

【0177】

実施例 1

D N A 試料はウィザードキット (Promega) を使用して抽出し、200名の患者から得た試料を分析し、候補マーカを選択して4つのデータ分析を実施した。 20

【0178】

重亜硫酸塩処理とm P C R

全ての試料の全ゲノムD N A を重亜硫酸塩で処理して非メチル化シトシンをウラシルへ変換した。残存するメチル化シトシンはそのままであった。重亜硫酸塩処理はオレク (Olek) ら、(1996) が記載するプロトコルをわずかに変更して実施した。重亜硫酸塩化した後、各D N A 試料10ngを6~8プライマー対を含む次のm P C R 反応に使用した。

【0179】

各反応は下記のものを含んでいた。 30

400 μ M d N T P

2 p m o l 各プライマー

1 U H o t S t a r T a q (Qiagen)

10 n g D N A (重亜硫酸塩処理)

【0180】

さらに、プライマーの詳細は表1に示される。

95 で15分間の変性、続いて55 で45分間のアニーリング、65 で2分間のプライマー伸長を40回、繰り返した。65 で最終伸長を10分間、実施した。

【0181】

ハイブリダイゼーション

次いで、個々の試料のそれぞれから得た全P C R 産物は、分析下の各C p G 位置における固定化された1対のオリゴヌクレオチドを有するガラススライドとハイブリダイズさせた。これらの検出オリゴヌクレオチドは、それぞれ、本来、非メチル化 (T G) またはメチル化 (C G) された1つのC p G 部位のまわりの重亜硫酸塩変換配列にハイブリダイズするように設計されていた。使用したハイブリダイゼーションオリゴヌクレオチドのさらに詳細なことは、表2を参照のこと。ハイブリダイゼーション条件はT G およびC G 変異体間の1つのヌクレオチドの相違を検出できるように選択した。 40

【0182】

各多重P C R 産物5 μ l は、10 × S s a r c 緩衝液 (10 × S s a r c : 230 m l 20 × S S C、180 m l ラウロイルサルコシン酸ナトリウム溶液20%、d H 2 Oで 50

1000 ml に希釈)中に希釈した。次いで、反応混合物を以下のようにして検出オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせた。95 で変性、10 まで冷却、42 で一夜、ハイブリダイゼーション、続いて42 で10 x S s a r c および d H 2 O で洗浄した。さらに、ハイブリダイゼーションオリゴヌクレオチドの詳細は表2に示される。

#### 【0183】

ハイブリダイズした各オリゴヌクレオチドから得た蛍光シグナルは、ジェネピック (gen epix) スキャナーとソフトウェアを使用して検出した。2つのシグナル(各 Cp G 位置を分析するために使用された CG オリゴヌクレオチドと TG オリゴヌクレオチドから得た)の割合は蛍光シグナルの強度比較に基づいて計算した。

#### 【0184】

##### データ分析方法

チップデータの分析：生ハイブリダイゼーション強度からメチル化割合へ；各 Cp G 位置のログメチル化割合 ( $\log (CG / TG)$ ) は下記工程を含む標準化された前処理情報ラインに従って測定した。各スポットでは、中央背景画素強度が中央前景画素強度から差し引かれる(これはハイブリダイゼーション強度を訂正した背景の良い推定値となる)。各 Cp G 位置の CG および TG 検出オリゴヌクレオチドでは、4つの余分なスポット強度の背景補正中央値が採用される。各チップおよび各 Cp G 位置では、 $\log (CG / TG)$  割合が計算される。各試料では、余分なチップ反復以上の  $\log (CG / TG)$  強度が採用される。この割合はハイブリダイゼーションノイズが可能性あるメチル化割合の完全な範囲を越えるおよそ一定の変動を有するとの性質を有する(フーバー (Huber) ら、2002)。

#### 【0185】

##### 主成分分析

主成分分析 (PCA) は新規な座標系上に測定ベクター(例えば、チップデータ、いくつかの Cp G などの上のメチル化プロフィールなど)を描出する。新規な座標軸は主成分として参照される。第1主成分はデータの最も大きな変動の方向をスパンする。次の成分は減少する変動により順序付けられ、互いに直交する。異なった Cp G 位置は、異なったウェイトでもって異なった成分に従うデータクラウドの伸長に寄与する。PCA は未管理技術、すなわちデータポイントの標識を考慮にいない技術である(さらに詳細は、例えばリップレイ (Ripley) (1996) 参照)。

#### 【0186】

PCA は通常、データから高い変動を有する態様を可視化または抽出するために、低次元部分空間上に高次元データ(我々のケースではメチル化 - アレーデータ)を描出するように使用される。本報告では、我々はデータの統計的品質管理のために2次元描出を使用する。我々はチップデータ上の異なったプロセスパラメーターの効果进行调查し、変化するプロセスパラメーターが測定値に大きな変更を生じることを排除する。

#### 【0187】

PCA のローバスト版は、1つの域外値チップを検出し、さらなる分析からこれらを排除するために使用される(モデル (Model) ら、2002)。

#### 【0188】

##### 仮想検定

主たる仕事は、2つのクラス間のメチル化の平均的程度における有意な相違を示すマーカーを同定することである。有意な相違は、2つのクラスの平均的メチル化が同じであるとの帰無仮説が  $p < 0.05$  でもって拒絶され得るときに検出される。我々はこの検定を潜在的マーカーの全体的セットに応用するから、我々は多重検定における  $p$ -値を補正しなければならない。これはフォールス・ディスカバリー・レート (FDR) 法 (デュドワ (Dudoit) ら、2002) を応用して実施された。

#### 【0189】

2つのクラスのメチル化の程度が同じであるとの帰無仮説を検定するために、我々はロジスティック回帰分析モデル(ベネイブルズ (Venables) およびリップレイ (Ripley), 2002) の

10

20

30

40

50

ための尤度比検定を使用した。1つのマーカーのロジスティック回帰分析モデルは関心あるそれぞれのゲノム領域中の全てのCpG位置から得たメチル化測定の一次的組合せである(ROI)。マーカーの有意なp-値はこのROIが2つのクラスによって与えられる関心ある問題に対するいくつかの系統的な補正を有することを意味する。しかしながら、少なくとも正式には、それはマーカーの実際の予測的力について述べていない。

#### 【0190】

管理された学習によるクラス予測

選択マーカーのCpG全体が相違した組織クラス間をいかに十分に差別化することができるかについての信頼性ある評価を与えるために、我々は分類によってその予測の正確性を決定することができる。この目的のために、我々はそれらのクラス標識によってあるセットの組織試料を使用して、メチル化プロファイルに基づく予測機能を計算する。この段階はトレーニングと呼ばれ、それはデータ標識によって示される先の知識を活用する。次いで、この機能の予測正確性は交差検証により、または1設置の独立した試料で検定される。選択方法としては、我々はサポート・ベクター・マシン(SVM)アルゴリズム(デューダ(Duda) (2001), クリスチアンニ(Christiannini) (2000))を使用して、予測機能を学習する。もしも他に言及されていないなら、この報告では、偽陽性または偽陰性分類を伴うリスクがそれぞれのクラスの大きさに等しく関連しているとされる。これは学習アルゴリズムが目的とともにクラス予測機能を得て、独立した試料セットの正確性を至適化することを伴う。したがって、得られた分類物の感度と特異性はおよそ等しいと期待され得る。

10

#### 【0191】

データ分析

データセット1および2(図5~13)

次いでデータはアルゴリズムを使用して2つのクラスの組織間のCpGメチル化相違に従ってランク付けされたマトリックス中に分類する。図5、7、9および11~13は灰色段階で示され、ここで、最も有意なCpG位置は上部に向かって減少する有意差をもつマトリックスの底部に存在する。黒色は所与のCpG位置の全メチル化を示し、白色は特定の位置の非メチル化を示し、メチル化程度は明るい灰色(メチル化の低割合)から暗い灰色(メチル化の高割合)で示される。各列は1つの遺伝子内の1つの特定CpG位置を示し、各欄は1つの試料における異なったCpGのメチル化プロファイルを示す。CpGおよび遺伝子同定物が示される左側には、これは問題の遺伝子および使用された検出オリゴマーを確認するために添付する表(表5)に相互参照されている。p-値は観察された分布がデータセットで偶然に生じた可能性である。図6、8、10および12は先の図(すなわち、それぞれ図5、7、9および11)の元の赤-緑バージョンである。暗い灰色は所与のCpG位置の全メチル化を示し、明るい灰色は特定位置の非メチル化を示す。

20

30

#### 【0192】

データセット1:補助的活動環境

外科手術後、直ちに補助治療としてタモキシフェンで治療した患者試料のメチル化パターン分析(図1)は、図5~8のマトリックス中に示される。この分析では、PTGS2、MSMB、TP53およびCYP2D6遺伝子は2つのクラスの組織(治療に対する反応者と治療に対する非反応者)間で有意に相違してメチル化されていた。

40

#### 【0193】

図3および4に示される分類では、TP53およびMSMB遺伝子は薬剤タモキシフェンに対する非反応者で有意により多くメチル化されていた。ここで、36ヶ月以下の無疾患生存の被検者は非反応者として分類され、60ヶ月以上無疾患生存の被検者は反応者として分類し、この分類は感度0.84および感度0.16でもって実施された。

#### 【0194】

図7および8で示される分類では、PTGS2遺伝子は薬剤タモキシフェンに対する非反応者で有意により多くメチル化された。ここで、24ヶ月以下の無疾患生存の被験者は非反応者として分類し、100ヶ月以上無疾患生存の被検者は反応者として分類した。この分類は感度0.89および感度0.48で実施した。

50

## 【 0 1 9 5 】

## データセット 1 : 転移活動環境

転移活動環境においてタモキシフェンで治療した患者試料のメチル化パターンの分析 (図 2 参照) は図 9 ~ 1 2 のマトリックス中に示される。この分類で分析された被検者は最初の治療に続いて再発し、続いての転移はタモキシフェンで治療した。

## 【 0 1 9 6 】

図 9 および 1 0 に示される分類では、F G F R 1 および P S A 遺伝子は薬剤タモキシフェンに対する非反応者で有意により少なくメチル化されていた。進行性疾患の被検者は非反応者として分類し、部分的または完全に寛解に達した被検者は反応者として分類した。この分類は感度 0 . 4 5 および感度 0 . 8 1 で実施された。

10

## 【 0 1 9 7 】

この分類の感度は、化学治療を受けなかったこれらの患者を分析することのみによって改善され得たであろう。この分類は、図 1 1 および 1 2 に示されるように、F G F R 1、P S A および C G A 遺伝子は薬剤タモキシフェンに対する非反応者において有意により少なくメチル化されていた。それ故、この分類の感度は 0 . 5 4 に、特異性は 0 . 8 5 に改善された。

## 【 0 1 9 8 】

## データセット 2 : 転移活動環境

図 1 2 は非反応者と対比する薬剤の反応者の全試料セットの分析を示す。ここで、薬剤に対する反応者が非反応者と対比され、2つのクラスの組織間にメチル化において有意な相違が S T M N 1 および P S A 遺伝子において観察された。

20

## 【 0 1 9 9 】

付加的治療として化学治療を受けた患者はデータセットから除外した。付加的マーカーは C G A 遺伝子において観察された (図 1 3 参照)。

## 【 0 2 0 0 】

## データセット 2 : 補助的活動環境

各 C p G は、公知予測マーカー N - 段階と腫瘍サイズとともにコックス 比例ハザードモデル中に入れた。最もよいマーカーは P I T X 2 遺伝子であった。

## 【 0 2 0 1 】

最良マーカー (オリゴヌクレオチド番号 3522:2087) におけるコックスモデルは、次の通りである :

30

## 【 0 2 0 2 】

## 【表 1】

	coef	Exp(coef)	Se(coef)	z	P
n段階	1.677	5.35	0.5390	3.11	0.00190
3522:2087	2.885	17.90	0.8211	3.51	0.00044
腫瘍サイズ	0.120	1.13	0.0926	1.30	0.19000

40

## 【 0 2 0 3 】

3522:2087は、n段階と独立して生存時間に関する情報を提供する。腫瘍サイズは予期される生存時間において有意な予測力を示していない。

## 【 0 2 0 4 】

## データセット 4 : 転移活動環境

タモキシフェン治療の成功または失敗を予測する各遺伝子プロモーターの能力を決定するために、測定された個々の C p G をホテリング (Hotelling) の T 2 統計量を使用して遺伝子毎に組み合わせた。いくつかの遺伝子は多重比較において適度保存フォールス・デイスカバリー・レート 2 5 % 補正後、タモキシフェンに対する反応に有意に関連していた (図 3 参照)。この遺伝子は O N E C U T 2、W B P 1 1、C Y P 2 D 6、D A G 1、E

50

R B B 2、S 1 0 0 A 2、T F F 1、T P 5 3、T M E F F 2、E S R 1、S Y K、R A S S F 1、P I T X 2、P S A T 1、C G A および P C A F であつた。

【0205】

図15はログスケールの未修正 p - 値を示す。p - 値は多重ロジスティック回帰モデルの可能性比率 (LR) テストから計算された。目的の個々のゲノム領域はそれぞれ点で示され、上部点線は25%フォールス・ディスカバリー・レートにおけるカットオフ点、下部点線はボンフェロニ (Bonferroni) 修正5%限界を示す。

【0206】

図16は実施例1で得たデータの最もよい11増幅産物のランクづけされたマトリックスを示す (データセット4)。p - 値は多重ロジスティック回帰モデルの可能性比率 (LR) テストから計算された。図は灰色段階で示され、ここで最も有意な CpG 位置は上部へ向かって減少する有意差を有するマトリックスの下部に存在する。黒色は所与の CpG 位置の全メチル化を示し、白色は特定位置の非メチル化を示し、メチル化の程度に従って、明るい灰色 (低割合のメチル化) から暗い灰色 (高割合のメチル化) で示される。各列は1つの遺伝子内の1つの特定 CpG 位置を示し、各行は1つの試料における異なった CpG のメチル化プロフィールを示す。個々の CpG 位置における p - 値は右側に示される。p - 値は観察された分布がデータセット中で偶然に生じた可能性である。

10

【0207】

データセット4：補助的活動環境

各増幅産物において、その増幅産物のための全オリゴ対における平均メチル化が計算され、その集団はその平均メチル化値によって等しい大きさの群に分けられた。その結果は Kaplan - Myer (Kaplan-Meier) 法で推定された無疾患生存曲線として、図17~21に示される。p - 値は、次の通りであつた。

20

【0208】

E S R 1 : p = 0.0371

P C A F : p = 0.0105

P I T X 2 : p = 3e-04

T M E F F 2 : p = 0.0106

W B P 1 1 : p = 0.0366

E R B B 2 : p = 0.018

30

【0209】

データセット3

タモキシフェン治療の成功または失敗を予測する各遺伝子プロモーターの能力を決定するために、測定された個々の CpG をホテリング (Hotelling) の  $T^2$  統計量を使用して遺伝子毎に組み合わせた。潜在的マーカーを同定するには、本発明者らは客観的反応 (CR + PR、45名の患者) または治療開始からまさしく進行性疾患 (PD、78名) のいずれか極度の反応タイプを示した123名の患者について最初の分析を実施した。いくつかの遺伝子は多重比較において適度保存フォールス・ディスカバリー検定25%補正後、タモキシフェンに対する反応に有意に関連していた (図3参照)。この遺伝子は S T M N 1、S F N、S 1 0 0 A 2、T G F B R 2、S Y K、G R I N 2 D、P S A、C O X 7 A 2 L、V T N および P R K C D であつた。

40

【0210】

DNAメチル化データマトリックスから、我々は多数の CpG アイランド遺伝子において、高メチル化がタモキシフェン治療に対する好ましい反応と相関していたが、スタチミン1/腫瘍性タンパク18 (S T M N 1) およびストラフィン/14-3-3タンパク (S F N) では、低メチル化が寛解に関与していたと結論つけた。

【0211】

続いて、中間的なタイプの反応を示す人 (安定な疾患 (SD、6ヶ月以上疾患に変化なし) の59名の患者および6ヶ月以下、安定な疾患の18名の患者) を含めて200名の患者全てをロジスティック回帰分析にて分析した。選択された各遺伝子について、我々は

50

測定された異なった CpGジヌクレオチドの全体的反応 (= 客観的反應 + SD) におけるロジスティック回帰からの推定を遺伝子毎に組み合わせた。全体の同齡集団では、10個の遺伝子全てにおいてタモキシフェン治療に対する奏効率が、その腫瘍が好ましくない状態を有する患者よりも好ましい DNAメチル化状態を有していた患者において、約15~20%高かった(オッズ比(OR)が1.5~3.5の範囲)。従って、マーカー遺伝子では前者群の患者の中央PFSは、後者群(ハザード率(HR)が0.54~0.77)よりも平均して1.8倍長かった。すなわち、完全な同齡集団でもこれらのマーカー遺伝子はタモキシフェン治療後の疾患結果に関連していた。

#### 【0212】

進行型乳癌患者のタモキシフェン治療に対する反応の予測は、伝統的には患者、疾患および腫瘍特性、すなわち、年齢、再発の第一顕性部位、無疾患期間およびER状態に基づく。我々は伝統的予測因子(伝統的因子に基づくスコア)の多変換推定でもって計算した予測的スコアをDNAメチル化データのみ(DNAメチル化に基づくスコア)と対比した。DNAメチル化に基づくスコアでは、我々はそのDNAメチル化状態が互いに独立して反応を予測する遺伝子のみを含めた。これを確定するために、我々はマーカー遺伝子のそれぞれのDNAメチル化状態の情報を多変換ロジスティック回帰モデルに同時に加えた。有意でない遺伝子( $p < 0.05$ )の変数減少後、STMN1、SFN、S100A2、TGFB2、SYK、GRIN2D、PSA、COX7A2L、VTNおよびPRKCD遺伝子は統計的に有意であり、互いに独立して反応を予測した。伝統的な因子に基づくスコアに続いて比べられたDNAメチル化に基づくスコアは、これらの遺伝子の多重変換推定から誘導された。

#### 【0213】

伝統的予測因子またはDNAメチル化状態のいずれかに基づく各腫瘍のスコアは、その25%、50%および75%値によって患者を4つの群に分割するために使用した(表3)。DNAメチル化に基づくスコアは、伝統的因子に基づくスコアよりも全体的反応を伴ったより良い識別強度を示した(表3)。DNAメチル化に基づくスコアの全体的奏効率は、第1四半期(q1)の患者では26%(ORセット1.0)から増加し、第2四半期(q2)では34%(OR=1.5)、第3四半期(q3)では66%(OR=5.5)およびq4の最終四半期では82%(OR=13.0)( $P < 0.001$ )であったが、伝統的因子に基づくスコアでは、その率は、このスコアのq1の36%(OR、セット1.0)から46%(OR=1.5)(q2)を経て、64%(OR=3.2)および62%(OR=2.9)(q3)(q4)へそれぞれ( $P = 0.013$ )増加した(表3)。

#### 【0214】

同様に、DNAメチル化に基づくスコアにおける極端な四半期の中央PFSは、4.2倍異なっていたが(3.8ヶ月から16.1ヶ月へ)、伝統的因子に基づくスコアにおいては2つの極端な四半期間の差異はその半分に過ぎなかった(4.7ヶ月から9.7ヶ月へ)(図14Aの曲線を図14Bと比較)。

#### 【0215】

それゆえに、我々が初めて、たった5つの遺伝子のプロモーター領域のCpGアイランドDNAメチル化状態に基づく後成的プロフィールがタモキシフェン治療により治療されたER-陽性進行型乳癌の患者で治療反応の可能性を予測できることを示した。さらに、この予測は一般的に使用された伝統的予測因子に基づく予測よりもより正確であり、DNAメチル化分析が臨床治療決定に有用であることを示唆した。したがって、腫瘍組織DNAの後成的プロファイリングは十分保存される腫瘍組織材料に大きく依存する長ったらしい(tedious)mRNAプロファイリングに代わる競争力があって、かつ単純な代替であるに違いない。そのうえ、この後成的DNAプロフィールは非常に安定であり、特定部位(遺伝子のプロモーター領域)に局在し、そしてPCRで容易に増幅され得る。それに加えて、DNAメチル化状態測定は所定期間凍結されるか、あるいは容易に入手できるパラフィン包埋された腫瘍組織材料で実施でき、日常的臨床活動環境に広く応用され得る。

#### 【0216】

## 実施例 2 : Lightcycler 分析

以下の実施例では、PSAT1 遺伝子のタモキシフェン反応関連メチル化状態がブロッカーオリゴヌクレオチドおよび Lightcycler プローブを含むリアルタイム分析を使用して、24 名の患者試料の分析によって証明した。

## 【0217】

プライマー: TAGGTTGGTAGGGGTAG (配列番号:2143)

プライマー: AAAACTCACATCCCCATTAA (配列番号:2144)

プローブ: TTTTTTGTATTGATTAATAAATGGGGGTTGAAATAGTA (配列番号:2145)

メチル化特異的プローブ: CGCGAGGAGGAGTAATTGTTTC (配列番号:2146)

メチル化特異的プローブ: TGTGAGGAGGAGTAATTGtTTTGATT (配列番号:2147)

10

## 【0218】

この反応はそれぞれ、以下の分析条件でもって各 DNA 試料について 3 回、実施した。

## 反応溶液:

Qiagen HotStarTaq 5 U

10x PCR 緩衝液 1 x

MgCl<sub>2</sub> 3 mM

プライマー 各 300 nM

プローブ 各 250 nM

dNTPs 各 200 nM

BSA 0.25 mg/ml

鋳型 DNA 10 ng

20

## サイクリングプロフィール:

15 分間、95 変性

55 回: 95 で 10 秒、55 で 20 秒、57 で 3 秒、72 で 20 秒、結果は表 4 に示される。

## 【0219】

【表 2 - 1】

表1

番号	遺伝子	プライマー:	増幅産物長さ:
1	ABCB1 (配列番号: 1)	TAAAGTATGTTGAAAGAAAGATTATTGTAG (配列番号: 795) TAAAACTATCCCATAAATACTCCCAAC (配列番号: 796)	633
2	APOC2 (配列番号: 2)	ATGAGTAGAAGAGGTGATAT (配列番号: 797) CCCTAAATCCCTTCTTACC (配列番号: 798)	533
3	CACNA1G (配列番号: 3)	GGGATTTAAGAGAAATTGAGGTA (配列番号: 799) AAACCCCAAACATCCTTTAT (配列番号: 800)	707
4	EGR4 (配列番号: 4)	AGGGGGATTGAGTGTAAAGT (配列番号: 802) CCCAACATAAACACAAAAT (配列番号: 801)	293
5	AR (配列番号: 5)	GTAGTAGTAGTAGTAAGAGA (配列番号: 803) ACCCCTAAATAATTATCCT (配列番号: 804)	460
6	RB1 (配列番号: 6)	TTAAGTTTGTTTTGTTTTGGT (配列番号: 805) TCCTACTCTAAATCCTCCTCAA (配列番号: 806)	718
7	GP1BB (配列番号: 7)	GGTGATAGGAGAATAATGTTGG (配列番号: 807) TCTCCAACTACAACCAAAC (配列番号: 808)	379
8	WT1 (配列番号: 8)	AAAGGGAAATTAAGTGTGT (配列番号: 810) TAACACCTCAACTCCC (配列番号: 809)	747
9	HLA-F (配列番号: 9)	TTGTTGTTTTAGGGGTTTTGG (配列番号: 811) TCCTCCCATCTCCAAATATC (配列番号: 812)	946
10	ELK1 (配列番号: 10)	AAGTGTTTAGTTTTAATGGGTA (配列番号: 813) CAAACCCAAAACACCTAT (配列番号: 814)	966
11	ARHI (配列番号: 12)	GTGAGTTTTGGGGTGTTA (配列番号: 815) TCAATCTTACTTTCACACTACATAA (配列番号: 816)	442
12	BCL2 (配列番号: 13)	GTATTTTATGTTAAGGGGAAA (配列番号: 817) AAAAACCAATCCTCCC (配列番号: 818)	640
13	BRCA1 (配列番号: 14)	TGGATGGGAATTGTAGTTTT (配列番号: 819) TTAACCAACCAATCTACCC (配列番号: 820)	537
14	CALCA (配列番号: 15)	GTTTTGGAAGTATGAGGGTG (配列番号: 821) CCAAATTCTAAACCAATTCC (配列番号: 822)	614
15	CCND2 (配列番号: 16)	TTTTGGTATGTAGGTTGGATG (配列番号: 823) CCTAACCTCCTCCTTAACT (配列番号: 824)	426
16	CDH1 (配列番号: 17)	GAGGTTGGGGTTAGAGGAT (配列番号: 825) CAAACCTACAAAATCTTACAATC (配列番号: 826)	478
17	CDKN1B (配列番号: 18)	GTGGGGAGGTAGTTGAAGA (配列番号: 827) ATACACCCCTAACCCAAAAT (配列番号: 828)	478
18	CDKN2A (配列番号: 19)	TTGAAAATTAAGGGTTGAGG (配列番号: 829) CACCTCTAATAACCAACCA (配列番号: 830)	598
19	CDKN2A (配列番号: 19)	GGGGTTGGTTGGTTATTAGA (配列番号: 831) AACCTCTACCCACCTAAAT (配列番号: 832)	256
20	CDKN2B (配列番号: 20)	GGTTGGTTGAAGGAATAGAAAT (配列番号: 833) CCCACTAAACATACCCTTATTC (配列番号: 834)	708
21	CD44 (配列番号: 21)	GAAAGGAGAGGTTAAAGGTTG (配列番号: 835) AACTCACTAACTCCAATCCC (配列番号: 836)	696
22	CSPG2 (配列番号: 22)	GGATAGGAGTTGGGATTAAGAT (配列番号: 837) AAATCTTTTCAACACCAAAAAT (配列番号: 838)	414
23	DAPK1 (配列番号: 23)	AACCCTTTCTTCAAATTACAAA (配列番号: 839) TGATTGGGTTTTAGGGAAATA (配列番号: 840)	348
24	GGT1 (配列番号: 24)	GTGAAGGGTGTGAGTTGTTTA (配列番号: 841) CACAAATCAATTCCCAACA (配列番号: 842)	562
25	GSTP1 (配列番号: 25)	ATTTGGGAAAGAGGGAAAAG (配列番号: 843) TAAAACTCTAAACCCATCC (配列番号: 844)	300
26	HIC1 (配列番号: 26)	TGGGTTGGAGAAGAAGTTTA (配列番号: 845) TCATATTTCCAAAAACACACC (配列番号: 846)	280
27	STMN1 (配列番号: 27)	GAGTTTGTATTTAAGTTGAGTGGTT (配列番号: 847) AACAAAACAATACCCTTCTAA (配列番号: 848)	334
28	STK11 (配列番号: 28)	TAAAAGAAGGATTTTGGATTGG (配列番号: 850) CATCTTATTACCTCCCTCCC (配列番号: 849)	528
29	ING4 (配列番号: 29)	ATTAGGGATGAGAGGATTTGTA (配列番号: 851) TCTTCTAACCATACACACTAAC (配列番号: 852)	212
30	MGMT (配列番号: 30)	AAGTTTTAGGGAAGAGTGTTC (配列番号: 853) ACCTTTTCTATCACAAAATAA (配列番号: 854)	636

10

20

30

40

【表 2 - 2】

31	MLH1 (配列番号: 31)	TAAGGGGAGAGGAGGAGTTT (配列番号: 855) ACCAATTCTCAATCATCTCTTT (配列番号: 856)	545
32	MYC (配列番号: 33)	AGAGGGAGTAAAAGAAAATGGT (配列番号: 857) CCAAATAAACAAAATAACCTCC (配列番号: 858)	712
33	N33 (配列番号: 35)	TTTTAGATTGAGGTTTTAGGGT (配列番号: 859) ATCCATTCTACCTCCTTTTCT (配列番号: 860)	497
34	PAX6 (配列番号: 36)	GGAGGGGAGAGGGTTATG (配列番号: 861) TACTATACACACCCCAAAACAA (配列番号: 862)	374
35	X51730 PGR (配列番号: 67)	TTTTGGGAATGGGTTGTAT (配列番号: 921) CTACCTTAACCTCCATCCCTA (配列番号: 922)	369
36	PTEN (配列番号: 38)	TTTTAGGTAGTTATATGGGTATGTT (配列番号: 865) TCAACTCTCAAACCTCCATCA (配列番号: 866)	346
37	RARB (配列番号: 39)	TGTTGGGAGTTTTAAGTTTT (配列番号: 867) CAAATTCTCTCCAAATAAAT (配列番号: 868)	353
38	SFN (配列番号: 40)	GAAGAGAGGAGAGGGAGGTA (配列番号: 870) CTATCCAACAAACCCAACA (配列番号: 869)	489
39	S100A2 (配列番号: 41)	GTTTTTAAGTTGGAGAAGAGGA (配列番号: 1031) ACCTATAAATCACAACCCACTC (配列番号: 1032)	460
40	TGFBR2 (配列番号: 43)	GTAATTTGAAGAAAAGTTGAGGG (配列番号: 873) CCAACAATAAACAAAACCTCT (配列番号: 874)	296
41	TIMP3 (配列番号: 44)	TGAGAAAATTGTTGTTGAAAGT (配列番号: 875) CAAAAATACCTAAAAACCACTC (配列番号: 876)	306
42	VHL (配列番号: 45)	TGTAATAATGAATAAAGTTAATGAGTG (配列番号: 877) TCCTAAATTCAAATAATCCTCCT (配列番号: 878)	362
43	CDKN1C (配列番号: 46)	GGGGAGGTAGATATTTGGATAA (配列番号: 879) AACTACACCATTTATATCCAC (配列番号: 880)	300
44	CAV1 (配列番号: 47)	GTTAGTATGTTGGGGGTAAT (配列番号: 882) ATAAATAACACTTCCACCCTA (配列番号: 881)	435
45	CDH13 (配列番号: 48)	TTTGTATTAGTTGGAAGTGGT (配列番号: 883) CCCAATAAATCAACAACAACA (配列番号: 884)	286
46	NDRG1 (配列番号: 49)	GGTTTTGGGTTTGTGTTAAAT (配列番号: 886) AACTTTCATAACTCACCTTTC (配列番号: 885)	416
47	PTGS2 (配列番号: 50)	GATTTTTGGAGAGGAAGTTAAG (配列番号: 888) AAAACATAAAACCAACCCATA (配列番号: 887)	381
48	THBS1 (配列番号: 51)	TGGGGTAGTTTAGGATAGG (配列番号: 889) CTTAAAAACATAAACTTCTCAA (配列番号: 890)	398
49	TMEFF2 (配列番号: 52)	TTGTTGGGTTAATAAATGGA (配列番号: 891) CTTCTCTCTTCCCTCTC (配列番号: 892)	295
50	PLAU (配列番号: 53)	TATTATAGGAGGATTGAGGAGG (配列番号: 893) CCCATAAAATCATACCACTTCT (配列番号: 894)	499
51	TMEFF2 (配列番号: 54)	TGTTGGTTGTTGTTGTTGTT (配列番号: 1037) CTTTCTACCCATCCCAAAA (配列番号: 1038)	319
52	DNMT1 (配列番号: 55)	TCCCATCACACCTAAAA (配列番号: 897) GGGAGGAGGGGATGTATT (配列番号: 898)	210
53	ESR1 (配列番号: 70)	AGGGGGAATTAATAAGAAAGAG (配列番号: 927) CAATAAAACCATCCCAATACT (配列番号: 928)	662
54	APAF1 (配列番号: 57)	AGATATGTTTGGAGATTTAGGA (配列番号: 901) AACTCCCCACCTTAATTCTAT (配列番号: 902)	674
55	HOXA5 (配列番号: 58)	AAACCCCAACAACCTCTAT (配列番号: 904) GAAGGGGAAAGTTATTTAGTTA (配列番号: 903)	392
56	RASSF1 (配列番号: 59)	ACCTCTCTACAAATTACAAATCA (配列番号: 905) AGTTGGGTTAGTTGGGTT (配列番号: 906)	347
57	BRCA2 (配列番号: 60)	ACCCACCCAAACCTAACT (配列番号: 908) GGTTGGTAGAGATAAAAGGGTA (配列番号: 907)	388
58	CCND1 (配列番号: 61)	GATTATAGGGGAGTTTGTGTA (配列番号: 909) CACCTCAACATCCAAATA (配列番号: 910)	404
59	EDNRB (配列番号: 62)	TCAAAACATCCTCTATCTCTCC (配列番号: 912) ATAATTGGGGTTGTATGTATT (配列番号: 911)	484
60	EGFR (配列番号: 63)	GGGTTTGGTTGTAATATGGATT (配列番号: 913) CCCAACACTACCCCTCTAA (配列番号: 914)	732

10

20

30

40

【表 2 - 3】

61	ERBB2 (配列番号: 64)	GAGGTAGAGGTTGTGGTGAGT (配列番号: 915) TCCCAACTTCACTTCTCC (配列番号: 916)	528
62	FOS (配列番号: 65)	ATCCTCCACTTTCTACTTCCA (配列番号: 918) TTTTAGGGTTATAGGAAAGGT (配列番号: 917)	500
63	NFKB1 (配列番号: 66)	TTTGTAGAATGAAAAGTAGAGTGTG (配列番号: 919) ACCTTAAAAACCCCAACAAT (配列番号: 920)	485
64	X51730 PGR (配列番号: 67)	TTTTGGGAATGGGTTGTAT (配列番号: 921) CTACCCTTAACCTCCATCCTA (配列番号: 922)	369
65	TP53 (配列番号: 68)	GAGTAGGTAGTTGTTGGGTTTC (配列番号: 923) ACCCCTAATTAACTTCTCA (配列番号: 924)	702
66	TP73 (配列番号: 69)	AGTAAATAGTGGGTGAGTTATGAA (配列番号: 925) GAAAAACCTCTAAAACTACTCTCC (配列番号: 926)	607
67	ESR1 (配列番号: 70)	AGGGGAATTAATAGAAAGAG (配列番号: 927) CAATAAAACCATCCCAAATACT (配列番号: 928)	662
68	SERPINE1 (配列番号: 71)	GGGTATAGAGAGAGTTTGGAT (配列番号: 929) ACAATTAAACAAACCCCAATAA (配列番号: 930)	492
69	CALM1 (配列番号: 72)	AAAACTCTAACCCCTTCTCAA (配列番号: 932) TATTTTACTTTGGGGTGTGT (配列番号: 931)	414
70	CSNK2B (配列番号: 73)	TACCCCTCACCATTACTCTAAC (配列番号: 934) TAGTTTGTGTTTATTGGGTGA (配列番号: 933)	437
71	FGFR1 (配列番号: 74)	AGGGAGTTAGTGGTGTGGTAT (配列番号: 935) CCTTACCCTTCTCAAATCTAA (配列番号: 936)	367
72	MKI67 (配列番号: 75)	CCAATACTCTACAACCATCAA (配列番号: 938) GGGAAGTTGAAGTAGGAAGAT (配列番号: 937)	499
73	NPM1 (配列番号: 76)	AAGGAAGGAGGAAGTAATTTGT (配列番号: 939) TTACACCAACCCCTAAACTAAC (配列番号: 940)	454
74	MAPK1 (配列番号: 77)	TTTAGATAATTTTAGGATGGGG (配列番号: 941) TTCTCATTACAAAAACAAAAA (配列番号: 942)	743
75	SYK (配列番号: 78)	GTGGGTTTGGGTAGTTATAGA (配列番号: 1041) TAACCTCCTCTCCTTACCAA (配列番号: 1042)	485
76	TK2 (配列番号: 79)	ATACAACCTCAAATCCTATCCA (配列番号: 946) AGGGAGAAGGAAGTTATTTGTT (配列番号: 945)	485
77	HSPB1 (配列番号: 80)	CCTACCTCTACCCTTCTCAAT (配列番号: 948) AAGAGGGTTTACTTTTATTTGG (配列番号: 947)	216
78	TES (配列番号: 81)	AGGTTGGGGATTTAGTTTTT (配列番号: 949) ACCTTCTTCACTTTATTTTCCA (配列番号: 950)	448
79	SDC4 (配列番号: 82)	CCTAACTACCCTCATTCTTTT (配列番号: 952) AGTTGGGGAAATTAAGGTTTAG (配列番号: 951)	269
80	PITX2 (配列番号: 83)	TCCTCAACTCTACAACCTAAAA (配列番号: 1056) GTAGGGGAGGGAAGTAGATGT (配列番号: 1055)	408
81	GPR37 (配列番号: 84)	ACTTATTTTCTTTTCTCTAAAAAC (配列番号: 956) TATGGTTTGGTGAGGTATATT (配列番号: 955)	489
82	FGF1 (配列番号: 85)	AGTTGTGTTTAATTGGGAAGAG (配列番号: 957) CTTATCCCATCCACTATACCAT (配列番号: 958)	420
83	GRIN2D (配列番号: 86)	ATAGTTTGTGGTTTGGATTTTT (配列番号: 959) AAAACCTTCCCTAACTTCAAT (配列番号: 960)	435
84	CTSB (配列番号: 87)	AAAATTCCATCAAATAACCATAA (配列番号: 962) AAAAAGGAAGGTAGTAGGATTGT (配列番号: 961)	450
85	CTSD (配列番号: 88)	ATACAACCCCTCAACCTTCTAC (配列番号: 964) AAGGGGTTTTTAAGGAAATG (配列番号: 963)	498
86	PLAUR (配列番号: 89)	TGGTTAAAAATGGAGGTTTAAAT (配列番号: 965) CCCCAAATTACCTAAATACAAA (配列番号: 966)	348
87	PSA (配列番号: 90)	TAAGAGAGAGGAGTTGAGGTTT (配列番号: 967) CCAAAATTAACCACCTACCTAA (配列番号: 968)	478
88	CGA (配列番号: 91)	TAGTGGTATAAGTTTGGAAATGTT (配列番号: 1047) TCCACCTACATCTAAACCCTAA (配列番号: 1048)	364
89	CYP2D6 (配列番号: 92)	TAAGGGTTTGGAGTAGGAAGTA (配列番号: 971) CACATACAACAAAATTACCCAA (配列番号: 972)	403
90	CYP3A4 (配列番号: 93)	TATCACCACTTCCCATATTTA (配列番号: 974) GTTTGATGAATGGATTGTATGA (配列番号: 973)	484

10

20

30

40

【表 2 - 4】

91	TK1 (配列番号: 94)	ACCTCTACAAACATCTTATTCCA (配列番号: 976) TTGGGGGAGTTAGGTAGTATAG (配列番号: 975)	487
92	RENBP (配列番号: 95)	TTTGGTAGGGTTAAGGTTTTTA (配列番号: 977) CTTACTCATCCCTCCTACTCC (配列番号: 978)	350
93	F12 (配列番号: 96)	TAGGTTTAGGAGGGTACTTTGA (配列番号: 979) CTCTCACAAACCCAAAAATACA (配列番号: 980)	450
94	REN (配列番号: 97)	ACCTACTCCAAAAATCACAAAA (配列番号: 982) TATGTGGAAAACTTAGGGTGT (配列番号: 981)	489
95	EBAG9 (配列番号: 98)	CCAAAACTCATTAACTCCCA (配列番号: 984) AATGTTTTAGAGGTTAGGGTTG (配列番号: 983)	463
96	MSMB (配列番号: 99)	GTTTTGTAGGATGGTTTGATTT (配列番号: 985) TATATTTACCTTATCCCCACCC (配列番号: 986)	324
97	X15323 アシナリノカクシ遺伝子の領域およびエクソン1 (配列番号: 100)	AAACTCTCCCCTACCTCTAC (配列番号: 988) GATGGAGTTGTTTTTAGGTTGT (配列番号: 987)	374
98	ZNF147 (配列番号: 101)	TTTGTCTAAATAAGATGTGGGA (配列番号: 989) TAAACCCCTACAAAACTACCAA (配列番号: 990)	484
99	EBBP (配列番号: 102)	GTATTTGTTTTTGGTGAGGGT (配列番号: 991) ATCATCTTCTAAACATCCAA (配列番号: 992)	482
100	CALR (配列番号: 103)	TAAATCACAACCATTAAACAAA (配列番号: 994) ATAAGAGGGGAGGAAGGTTTA (配列番号: 993)	490
101	BCAR1 (配列番号: 104)	AATTCCTCCTTCTATCTCCCTC (配列番号: 996) TTTATTTTTGGGAAGGTTGTT (配列番号: 995)	499
102	COX7A2L (配列番号: 105)	AATCCTAAAAACCCTAACTTTTAAT (配列番号: 998) GGAGGTGTAAGGAGAATAGAGA (配列番号: 997)	398
103	AF174646 線状カクシ心遺伝子の領域および部分配列 (配列番号: 106)	CCAATTCATCATTCAACATCTA (配列番号: 1000) ATTTATTTGGGAGGATAGTGG (配列番号: 999)	325
104	KLK3 (配列番号: 107)	TTGGAGTGTAAAGGATTTAGGT (配列番号: 1001) AACCCACATAATAACACAACCTCT (配列番号: 1002)	387
105	AKR1B1 (配列番号: 108)	CAACAAAAACATTCTTCTAAACTC (配列番号: 1004) AGGTATTTAATTTTTAGGATGGGT (配列番号: 1003)	446
106	TGM4 (配列番号: 109)	AATCCTAACTTTTAATCACCCA (配列番号: 1006) GAGAGGTAATGTTTTAGGTA (配列番号: 1005)	435
107	AR (配列番号: 110)	AATATAGGGAGGTTTAGGGTTT (配列番号: 1007) TAACCATACATTTCTCATCCAA (配列番号: 1008)	424
108	HSPA1A (配列番号: 111)	AACCTTTCAAATTCAATCA (配列番号: 1010) GGATTTATTGGAGGGATAG (配列番号: 1009)	495
109	FKBP4 (配列番号: 112)	TTTTTAAGTAGGGAAGGGTTT (配列番号: 1011) TCCTTCTAACTACCTACCCCC (配列番号: 1012)	308
110	ESR2 (配列番号: 113)	AAACCTTCCCAATAACCTCTTA (配列番号: 1014) TAGAGGGGAGTAGTGTGAGT (配列番号: 1013)	471
111	IGF1 (配列番号: 114)	TACCTTCTCCCAAAATAATAA (配列番号: 1016) GTATTAAGGAATATGGGGAT (配列番号: 1015)	402
112	VTN (配列番号: 115)	GTTATTTGGGTTAATGTAGGGA (配列番号: 1017) TCTATCCCTCAAACCTTAAAAA (配列番号: 1018)	492
113	CTSL (配列番号: 116)	CTACCCACCCTTAAATAAAA (配列番号: 1020) TTAGTGGATTTGGAGGAAGTAG (配列番号: 1019)	328
114	TGFB3 (配列番号: 117)	CCTACTAAAAATCAAACCCAA (配列番号: 1022) AAGGTGGTGAAGTGGATAGAG (配列番号: 1021)	369
115	MAPKAPK5 (配列番号: 118)	AAACCTACCTCCCAACTAA (配列番号: 1024) ATTTTTGGTTTTAGGGTTGTA (配列番号: 1023)	495
116	PCAF (配列番号: 119)	GGATAAATGATTGAGAGGTTGT (配列番号: 1057) CCTCCCTAATTTCTCCTACC (配列番号: 1058)	369
117	NCOA3 (配列番号: 120)	AAGGGGTGTTTTGTTAGATT (配列番号: 1027) CCTAACCTACCTTAATTTTTT (配列番号: 1028)	330
118	PRKCD (配列番号: 121)	CTTAACCCATCCCAATCA (配列番号: 1030) GATAGAAGGATTTAGTTTTATTGTT (配列番号: 1029)	322
119	S100A2 (配列番号: 41)	GTTTTTAAGTTGGAGAAGGGA (配列番号: 1031) ACCTATAAATCAACCCACTC (配列番号: 1032)	460
120	PSA (配列番号: 90)	GTAGGTGTTAATTTTTGGGTT (配列番号: 1033) CTCATTACACTATATCCATTCA (配列番号: 1034)	500

10

20

30

40

【表 2 - 5】

121	ESR1 (配列番号: 70)	CTATCAATTCCTCCCACTACT (配列番号: 1036) TTGTTGGATAGAGGTTGAGTTT (配列番号: 1035)	349
122	TMEFF2 (配列番号: 54)	TGTTGGTTGTTGTTGTTGTT (配列番号: 1037) CTTCTACCCATCCCAAAA (配列番号: 1038)	319
123	TP53 (配列番号: 68)	TTGATGAGAAGAAAGATTAGT (配列番号: 1039) TCAAATTCAAATCAAAACTTACC (配列番号: 1040)	496
124	SYK (配列番号: 78)	GTGGGTTTGGGTAGTTATAGA (配列番号: 1041) TAACCTCCTCCTTACCAA (配列番号: 1042)	485
125	DAG1 (配列番号: 125)	AATACCAACCCAAACATCTACC (配列番号: 1044) TTTGGTTATGTGGAGTTTATTGT (配列番号: 1043)	315
126	ONECUT2 (配列番号: 126)	TTTGTGGGATTTGTTAGGAT (配列番号: 1045) AAACATTTTACCCCTCTAAACC (配列番号: 1046)	467
127	CGA (配列番号: 91)	TAGTGGTATAAGTTTGGAAATGTT (配列番号: 1047) TCCACCTACATCTAAACCCTAA (配列番号: 1048)	364
128	CYP2D6 (配列番号: 129)	AATTCCTAACCCACTATCCTC (配列番号: 1050) ATTTGTAGTTTGGGGTGATTT (配列番号: 1049)	379
129	RASSF1 (配列番号: 59)	AGTGGGTAGGTTAAGTGTGTTG (配列番号: 1051) CCCCAAAATCCAACTAAA (配列番号: 1052)	319
130	ERBB2 (配列番号: 64)	GGAGGGGGTAGAGTTATTAGTT (配列番号: 1053) TATACTTCTCAAACAACCCTC (配列番号: 1054)	258
131	PITX2 (配列番号: 83)	TCCTCAACTCTACAAACCTAAAA (配列番号: 1056) GTAGGGGAGGGAAAGTAGATGT (配列番号: 1055)	408
132	PCAF (配列番号: 119)	GGATAAATGATTGAGAGTTGT (配列番号: 1057) CCTCCCTTAATTCTCCTACC (配列番号: 1058)	369
133	WBP11 (配列番号: 137)	AAGAGGTGAGGAAGAGTAGTAAAT (配列番号: 1059) CTCCCAACAACCTAAATCAAAAT (配列番号: 1060)	437

10

20

【 0 2 2 0 】

【表 3 - 1】

表2

番号	遺伝子	オリゴ
1	STMN1 (配列番号: 27)	GTTATCGGTTCCGGGAATT (配列番号: 2001)
2	STMN1 (配列番号: 27)	GTTATTGGTTTGGGAATT (配列番号: 2002)
3	STMN1 (配列番号: 27)	GTTATCGGTTCCGGGAATT (配列番号: 2001)
4	STMN1 (配列番号: 27)	GTTATTGGTTTGGGAATT (配列番号: 2002)
5	STMN1 (配列番号: 27)	GTAAGAACGTATATAGTGAG (配列番号: 2003)
6	STMN1 (配列番号: 27)	GTAAGAATGTATATAGTGAG (配列番号: 2004)
7	STMN1 (配列番号: 27)	GTAAGAACGTATATAGTGAG (配列番号: 2003)
8	STMN1 (配列番号: 27)	GTAAGAATGTATATAGTGAG (配列番号: 2004)
9	STMN1 (配列番号: 27)	AGAAATTACGATGATGTTAT (配列番号: 2005)
10	STMN1 (配列番号: 27)	AGAAATTATGATGATGTTAT (配列番号: 2006)
11	STMN1 (配列番号: 27)	AGAAATTACGATGATGTTAT (配列番号: 2005)
12	STMN1 (配列番号: 27)	AGAAATTATGATGATGTTAT (配列番号: 2006)
13	STMN1 (配列番号: 27)	ATGGGTGATACGTCGGTG (配列番号: 2007)
14	STMN1 (配列番号: 27)	ATGGGTGATATGTTGGTG (配列番号: 2008)
15	STMN1 (配列番号: 27)	ATGGGTGATACGTCGGTG (配列番号: 2007)
16	STMN1 (配列番号: 27)	ATGGGTGATATGTTGGTG (配列番号: 2008)
17	PSA (配列番号: 90)	TTTCGATTCGGTTAGA (配列番号: 2009)
18	PSA (配列番号: 90)	AATTGTTTTGATTTGGTT (配列番号: 2010)
19	PSA (配列番号: 90)	TAATGGGGCCTCGATT (配列番号: 2011)
20	PSA (配列番号: 90)	TTAATGGGGTGTGATT (配列番号: 2012)
21	PSA (配列番号: 90)	TATCGTAGCGGTTAGG (配列番号: 2013)
22	PSA (配列番号: 90)	TATTGTAGTGGTTAGGAA (配列番号: 2014)
23	PSA (配列番号: 90)	AGGAACGTTAGTCGTT (配列番号: 2015)
24	PSA (配列番号: 90)	TAGGAATGTTAGTTGTTT (配列番号: 2016)
25	PSA (配列番号: 90)	GGTCGTCGTATTATGGA (配列番号: 2017)
26	PSA (配列番号: 90)	TGGTTGTTGATTATGGA (配列番号: 2018)
27	CGA (配列番号: 91)	TAAATTGACGTTATGGTA (配列番号: 2019)
28	CGA (配列番号: 91)	AAATTGATGTTATGGTAAA (配列番号: 2020)
29	CGA (配列番号: 91)	AATTGACGTTATGGTAAT (配列番号: 2021)
30	CGA (配列番号: 91)	TAAAAATTGATGTTATGGT (配列番号: 2022)
31	PITX2 (配列番号: 83)	AGTCGGGAGAGCGAAA (配列番号: 2023)
32	PITX2 (配列番号: 83)	AGTTGGGAGAGTGAAA (配列番号: 2024)
33	PITX2 (配列番号: 83)	AGTCGGGAGAGCGAAA (配列番号: 2023)
34	PITX2 (配列番号: 83)	AGTTGGGAGAGTGAAA (配列番号: 2024)
35	PITX2 (配列番号: 83)	AAGAGTCGGGAGTCGGA (配列番号: 2025)
36	PITX2 (配列番号: 83)	AAGAGTTGGGAGTTGGA (配列番号: 2026)
37	PITX2 (配列番号: 83)	AAGAGTCGGGAGTCGGA (配列番号: 2025)
38	PITX2 (配列番号: 83)	AAGAGTTGGGAGTTGGA (配列番号: 2026)
39	PITX2 (配列番号: 83)	GGTCGAAGAGTCGGGA (配列番号: 2027)
40	PITX2 (配列番号: 83)	GGTTGAAGAGTTGGA (配列番号: 2028)
41	PITX2 (配列番号: 83)	GGTCGAAGAGTCGGGA (配列番号: 2027)
42	PITX2 (配列番号: 83)	GGTTGAAGAGTTGGA (配列番号: 2028)
43	FGFR1 (配列番号: 74)	GTATTCGTTGGTTAAGT (配列番号: 2029)
44	FGFR1 (配列番号: 74)	GTGTATTTTGGTTGTTAA (配列番号: 2030)
45	FGFR1 (配列番号: 74)	ATGTGAACGAAGTTAAG (配列番号: 2031)
46	FGFR1 (配列番号: 74)	ATGTGAATGAAGTTAAGA (配列番号: 2032)
47	PSA (配列番号: 90)	TTTCGATTCGGTTAGA (配列番号: 2009)
48	PSA (配列番号: 90)	AATTGTTTTGATTTGGTT (配列番号: 2010)
49	PSA (配列番号: 90)	AGGAACGTTAGTCGTT (配列番号: 2015)
50	PSA (配列番号: 90)	TAGGAATGTTAGTTGTTT (配列番号: 2016)
51	PSA (配列番号: 90)	GGTCGTCGTATTATGGA (配列番号: 2017)
52	PSA (配列番号: 90)	TGGTTGTTGATTATGGA (配列番号: 2018)
53	CGA (配列番号: 91)	TAAATTGACGTTATGGTA (配列番号: 2019)
54	CGA (配列番号: 91)	AAATTGATGTTATGGTAAA (配列番号: 2020)
55	CGA (配列番号: 91)	AATTGACGTTATGGTAAT (配列番号: 2021)
56	CGA (配列番号: 91)	TAAAAATTGATGTTATGGT (配列番号: 2022)
57	PTGS2 (配列番号: 50)	TTTATCGGGTTTACGTAATT (配列番号: 2033)
58	PTGS2 (配列番号: 50)	TTTATGGGTTTATGTAATT (配列番号: 2034)
59	PTGS2 (配列番号: 50)	TTTATCGGGTTTACGTAATT (配列番号: 2033)
60	PTGS2 (配列番号: 50)	TTTATGGGTTTATGTAATT (配列番号: 2034)

10

20

30

40

【表 3 - 2】

61	PTGS2 (配列番号: 50)	GTACGAAAAGCGGAAAAG (配列番号: 2035)
62	PTGS2 (配列番号: 50)	GTATGAAAAGGTGGAAAAG (配列番号: 2036)
63	PTGS2 (配列番号: 50)	GTACGAAAAGCGGAAAAG (配列番号: 2035)
64	PTGS2 (配列番号: 50)	GTATGAAAAGGTGGAAAAG (配列番号: 2036)
65	MSMB (配列番号: 99)	ATAGGGCGAAGGTTTA (配列番号: 2037)
66	MSMB (配列番号: 99)	ATAGGGTGAAGGTTTAG (配列番号: 2038)
67	TP53 (配列番号: 68)	TTTTACGACGGTGAT (配列番号: 2039)
68	TP53 (配列番号: 68)	TGTTTTTATGATGGTGA (配列番号: 2040)
69	CYP2D6 (配列番号: 92)	AAGTAGCGGTAAGGAT (配列番号: 2041)
70	CYP2D6 (配列番号: 92)	GAAAGTAGTGTAAGGAT (配列番号: 2042)
71	STMN1 (配列番号: 27)	GTTATCGGTTCCGGAATT (配列番号: 2001)
72	STMN1 (配列番号: 27)	GTTATGGTTTGGGAATT (配列番号: 2002)
73	STMN1 (配列番号: 27)	GTTATCGGTTCCGGAATT (配列番号: 2001)
74	STMN1 (配列番号: 27)	GTTATGGTTTGGGAATT (配列番号: 2002)
75	STMN1 (配列番号: 27)	GTAAGAACGTATATAGTGAG (配列番号: 2003)
76	STMN1 (配列番号: 27)	GTAAGAAATGTATATAGTGAG (配列番号: 2004)
77	STMN1 (配列番号: 27)	GTAAGAACGTATATAGTGAG (配列番号: 2003)
78	STMN1 (配列番号: 27)	GTAAGAAATGTATATAGTGAG (配列番号: 2004)
79	STMN1 (配列番号: 27)	AGAAATTACGATGATGTTAT (配列番号: 2005)
80	STMN1 (配列番号: 27)	AGAAATTATGATGATGTTAT (配列番号: 2006)
81	STMN1 (配列番号: 27)	AGAAATTACGATGATGTTAT (配列番号: 2005)
82	STMN1 (配列番号: 27)	AGAAATTATGATGATGTTAT (配列番号: 2006)
83	STMN1 (配列番号: 27)	ATGGGTGATACGTCGGTG (配列番号: 2007)
84	STMN1 (配列番号: 27)	ATGGGTGATATGTTGGTG (配列番号: 2008)
85	STMN1 (配列番号: 27)	ATGGGTGATACGTCGGTG (配列番号: 2007)
86	STMN1 (配列番号: 27)	ATGGGTGATATGTTGGTG (配列番号: 2008)
87	PSA (配列番号: 90)	TTTCGATTCGGTTTAGA (配列番号: 2009)
88	PSA (配列番号: 90)	AATTGTTTTGATTTGGTT (配列番号: 2010)
89	PSA (配列番号: 90)	TAATGGGGCGTCGATT (配列番号: 2011)
90	PSA (配列番号: 90)	TTAATGGGGTGTGATT (配列番号: 2012)
91	PSA (配列番号: 90)	TATCGTAGCGGTTAGG (配列番号: 2013)
92	PSA (配列番号: 90)	TATTGTAGTGGTTAGGAA (配列番号: 2014)
93	PSA (配列番号: 90)	AGGAACGTTAGTCGTT (配列番号: 2015)
94	PSA (配列番号: 90)	TAGGAATGTAGTTGTTT (配列番号: 2016)
95	PSA (配列番号: 90)	GGTCGTCGTAATTATGGA (配列番号: 2017)
96	PSA (配列番号: 90)	TGGTTGTGTATTAATGGA (配列番号: 2018)
97	S100A2 (配列番号: 41)	TTTAATTGCGGTTGTGTG (配列番号: 2043)
98	S100A2 (配列番号: 41)	TTTAATTGCGGTTGTGTG (配列番号: 2044)
99	S100A2 (配列番号: 41)	TTTAATTGCGGTTGTGTG (配列番号: 2043)
100	S100A2 (配列番号: 41)	TTTAATTGCGGTTGTGTG (配列番号: 2044)
101	S100A2 (配列番号: 41)	TATATAGGCGTATGTATG (配列番号: 2045)
102	S100A2 (配列番号: 41)	TATATAGGTGATGTATG (配列番号: 2046)
103	S100A2 (配列番号: 41)	TATATAGGCGTATGTATG (配列番号: 2045)
104	S100A2 (配列番号: 41)	TATATAGGTGATGTATG (配列番号: 2046)
105	S100A2 (配列番号: 41)	TATGTATACGAGTATTGGAT (配列番号: 2047)
106	S100A2 (配列番号: 41)	TATGTATATGAGTATTGGAT (配列番号: 2048)
107	S100A2 (配列番号: 41)	TATGTATACGAGTATTGGAT (配列番号: 2047)
108	S100A2 (配列番号: 41)	TATGTATATGAGTATTGGAT (配列番号: 2048)
109	S100A2 (配列番号: 41)	AGTTTTAGCGTGTGTTTA (配列番号: 2049)
110	S100A2 (配列番号: 41)	AGTTTTAGTGTGTGTTTA (配列番号: 2050)
111	S100A2 (配列番号: 41)	AGTTTTAGCGTGTGTTTA (配列番号: 2049)
112	S100A2 (配列番号: 41)	AGTTTTAGTGTGTGTTTA (配列番号: 2050)
113	SFN (配列番号: 40)	GAGTAGGTCGAACGTTAT (配列番号: 2051)
114	SFN (配列番号: 40)	GAGTAGGTTGAATGTTAT (配列番号: 2052)
115	SFN (配列番号: 40)	GAGTAGGTCGAACGTTAT (配列番号: 2051)
116	SFN (配列番号: 40)	GAGTAGGTTGAATGTTAT (配列番号: 2052)
117	SFN (配列番号: 40)	TTTGCGAAGAGCGAAAATT (配列番号: 2053)
118	SFN (配列番号: 40)	TTTGTGAAGAGTGAAAATT (配列番号: 2054)
119	SFN (配列番号: 40)	TTTGCGAAGAGCGAAAATT (配列番号: 2053)
120	SFN (配列番号: 40)	TTTGTGAAGAGTGAAAATT (配列番号: 2054)

10

20

30

40

【表 3 - 3】

121	SFN (配列番号: 40)	TAACGAGGAGGGTTCGGA (配列番号: 2055)
122	SFN (配列番号: 40)	TAATGAGGAGGGTTTGGGA (配列番号: 2056)
123	SFN (配列番号: 40)	TAACGAGGAGGGTTCGGA (配列番号: 2055)
124	SFN (配列番号: 40)	TAATGAGGAGGGTTTGGGA (配列番号: 2056)
125	SFN (配列番号: 40)	GTTTCGAGGTGCGTGAGTA (配列番号: 2057)
126	SFN (配列番号: 40)	GTTTCGAGGTGCGTGAGTA (配列番号: 2058)
127	SFN (配列番号: 40)	GTTTCGAGGTGCGTGAGTA (配列番号: 2057)
128	SFN (配列番号: 40)	GTTTCGAGGTGCGTGAGTA (配列番号: 2058)
129	PRKCD (配列番号: 121)	ATTTATTTTTTCGTTGTAGG (配列番号: 2059)
130	PRKCD (配列番号: 121)	TATTTATTTTTTGTGTAGG (配列番号: 2060)
131	PRKCD (配列番号: 121)	TTTCGAAACGGGAAT (配列番号: 2061)
132	PRKCD (配列番号: 121)	TAGTTTTGGAAATGGGA (配列番号: 2062)
133	PRKCD (配列番号: 121)	GGACGGAGTTATCGGT (配列番号: 2063)
134	PRKCD (配列番号: 121)	GGATGGAGTTATTGGTA (配列番号: 2064)
135	PRKCD (配列番号: 121)	GTTTAGCGGAGGGATA (配列番号: 2065)
136	PRKCD (配列番号: 121)	TGTTTAGTGGAGGGAT (配列番号: 2066)
137	SYK (配列番号: 78)	GAAAGTTATCGCGTTGG (配列番号: 2067)
138	SYK (配列番号: 78)	AGAAGTTATTGTGTGG (配列番号: 2068)
139	SYK (配列番号: 78)	GATCGATGCGGTTTAT (配列番号: 2069)
140	SYK (配列番号: 78)	GGGATTGATGTGGTTTA (配列番号: 2070)
141	SYK (配列番号: 78)	GTTTCGGCGGAGGAGA (配列番号: 2071)
142	SYK (配列番号: 78)	GTTTGGTGGGAGGAGA (配列番号: 2072)
143	SYK (配列番号: 78)	GTTTCGGCGGAGGAGA (配列番号: 2071)
144	SYK (配列番号: 78)	GTTTGGTGGGAGGAGA (配列番号: 2072)
145	SYK (配列番号: 78)	AGTCGATTTTCGTTTAG (配列番号: 2073)
146	SYK (配列番号: 78)	TAGTTGATTTTTGTAGT (配列番号: 2074)
147	SYK (配列番号: 78)	GGAAGAGTCGCGGTT (配列番号: 2075)
148	SYK (配列番号: 78)	GGAAGAGTTGTGGTT (配列番号: 2076)
149	SYK (配列番号: 78)	GGAAGAGTCGCGGTT (配列番号: 2075)
150	SYK (配列番号: 78)	GGAAGAGTTGTGGTT (配列番号: 2076)
151	VTN (配列番号: 115)	GGTGGTATCGATTGAT (配列番号: 2077)
152	VTN (配列番号: 115)	TGGTGGTATTGATTGAT (配列番号: 2078)
153	VTN (配列番号: 115)	TAGTGATTCGCGGGGA (配列番号: 2079)
154	VTN (配列番号: 115)	TAGTGATTTGTGGGA (配列番号: 2080)
155	VTN (配列番号: 115)	TAGTGATTCGCGGGGA (配列番号: 2079)
156	VTN (配列番号: 115)	TAGTGATTTGTGGGA (配列番号: 2080)
157	VTN (配列番号: 115)	TTATGTCGGAGGATGA (配列番号: 2081)
158	VTN (配列番号: 115)	ATTATGTTGAGGATGA (配列番号: 2082)
159	VTN (配列番号: 115)	ATACGGTTTATGACGAT (配列番号: 2083)
160	VTN (配列番号: 115)	ATATGGTTTATGATGATGG (配列番号: 2084)
161	GRIN2D (配列番号: 86)	GAGAGTCGGGATGATT (配列番号: 2085)
162	GRIN2D (配列番号: 86)	GGAGAGTTGGGATGAT (配列番号: 2086)
163	GRIN2D (配列番号: 86)	AGAGATTTTCGATTGGA (配列番号: 2087)
164	GRIN2D (配列番号: 86)	AAGAGATTTTGAATTGGA (配列番号: 2088)
165	GRIN2D (配列番号: 86)	TAGGGTCGAGATTGG (配列番号: 2089)
166	GRIN2D (配列番号: 86)	TTAGGGTTGAGATTGG (配列番号: 2090)
167	GRIN2D (配列番号: 86)	AGTGTGGCGAATATTG (配列番号: 2091)
168	GRIN2D (配列番号: 86)	GTGTGGTGAATATTGAA (配列番号: 2092)
169	TGFBR2 (配列番号: 43)	GAAAACTGGACGTTTTT (配列番号: 2093)
170	TGFBR2 (配列番号: 43)	GAAAACTGGATGTTTTT (配列番号: 2094)
171	TGFBR2 (配列番号: 43)	GAAAACTGGACGTTTTT (配列番号: 2093)
172	TGFBR2 (配列番号: 43)	GAAAACTGGATGTTTTT (配列番号: 2094)
173	TGFBR2 (配列番号: 43)	ATTTGGAGCGAGGAATTT (配列番号: 2095)
174	TGFBR2 (配列番号: 43)	ATTTGGAGTGAGGAATTT (配列番号: 2096)
175	TGFBR2 (配列番号: 43)	ATTTGGAGCGAGGAATTT (配列番号: 2095)
176	TGFBR2 (配列番号: 43)	ATTTGGAGTGAGGAATTT (配列番号: 2096)
177	TGFBR2 (配列番号: 43)	AGTTGAAAGTCGGTTAAA (配列番号: 2097)
178	TGFBR2 (配列番号: 43)	AGTTGAAAGTTGGTTAAA (配列番号: 2098)
179	TGFBR2 (配列番号: 43)	AGTTGAAAGTCGGTTAAA (配列番号: 2097)
180	TGFBR2 (配列番号: 43)	AGTTGAAAGTTGGTTAAA (配列番号: 2098)

10

20

30

40

【表 3 - 4】

181	TGFBR2 (配列番号: 43)	AAAGTTTTCGGAGGGGTT (配列番号: 2099)
182	TGFBR2 (配列番号: 43)	AAAGTTTTGGAGGGGTT (配列番号: 2100)
183	TGFBR2 (配列番号: 43)	AAAGTTTTCGGAGGGGTT (配列番号: 2099)
184	TGFBR2 (配列番号: 43)	AAAGTTTTGGAGGGGTT (配列番号: 2100)
185	TGFBR2 (配列番号: 43)	GGTAGTTACGAGAGAGTT (配列番号: 2101)
186	TGFBR2 (配列番号: 43)	GGTAGTTATGAGAGAGTT (配列番号: 2102)
187	TGFBR2 (配列番号: 43)	GGTAGTTACGAGAGAGTT (配列番号: 2101)
188	TGFBR2 (配列番号: 43)	GGTAGTTATGAGAGAGTT (配列番号: 2102)
189	COX7A2L (配列番号: 105)	TTGTTCGAAGATCGTT (配列番号: 2103)
190	COX7A2L (配列番号: 105)	GTTGTTGAAGATTGTT (配列番号: 2104)
191	COX7A2L (配列番号: 105)	TAGCGTAAGGATTCGGT (配列番号: 2105)
192	COX7A2L (配列番号: 105)	TTAGTGTAAGGATTTGGT (配列番号: 2106)
193	COX7A2L (配列番号: 105)	AGAGTTCGGTTTTTCGTA (配列番号: 2107)
194	COX7A2L (配列番号: 105)	AGAGTTGGTTTTTTGTA (配列番号: 2108)
195	COX7A2L (配列番号: 105)	AGAGTTCGGTTTTTCGTA (配列番号: 2107)
196	COX7A2L (配列番号: 105)	AGAGTTGGTTTTTTGTA (配列番号: 2108)
197	COX7A2L (配列番号: 105)	ATTCGTATTTGCGGGTTA (配列番号: 2109)
198	COX7A2L (配列番号: 105)	ATTTGTATTTGTGGGTTA (配列番号: 2110)
199	COX7A2L (配列番号: 105)	ATTCGTATTTGCGGGTTA (配列番号: 2109)
200	COX7A2L (配列番号: 105)	ATTTGTATTTGTGGGTTA (配列番号: 2110)
201	DAG1 (配列番号: 125)	TTTCGTGGCGGAGAAT (配列番号: 2111)
202	DAG1 (配列番号: 125)	TTTTGTGGTGGAGAAT (配列番号: 2112)
203	DAG1 (配列番号: 125)	TTTCGTGGCGGAGAAT (配列番号: 2111)
204	DAG1 (配列番号: 125)	TTTTGTGGTGGAGAAT (配列番号: 2112)
205	DAG1 (配列番号: 125)	TACGGATATTCGGTT (配列番号: 2113)
206	DAG1 (配列番号: 125)	AATTATGGATATTTGGTT (配列番号: 2114)
207	DAG1 (配列番号: 125)	TTACGATTCGTAGGTT (配列番号: 2115)
208	DAG1 (配列番号: 125)	TATTATTATGATTTGTAGGT (配列番号: 2116)
209	ONECUT2 (配列番号: 126)	TACGTAGTTGCGCGTT (配列番号: 2117)
210	ONECUT2 (配列番号: 126)	GTATGTAGTTGTGTGT (配列番号: 2118)
211	ONECUT2 (配列番号: 126)	TTTTGTGCGTACGGAT (配列番号: 2119)
212	ONECUT2 (配列番号: 126)	TTTTGTGTGTATGGAT (配列番号: 2120)
213	ONECUT2 (配列番号: 126)	TTAAGCGGGCGTTGAT (配列番号: 2121)
214	ONECUT2 (配列番号: 126)	TTAAGTGGGTGTTGAT (配列番号: 2122)
215	ONECUT2 (配列番号: 126)	TTAAGCGGGCGTTGAT (配列番号: 2121)
216	ONECUT2 (配列番号: 126)	TTAAGTGGGTGTTGAT (配列番号: 2122)
217	ONECUT2 (配列番号: 126)	TAGAGGCGGGTTAT (配列番号: 2123)
218	ONECUT2 (配列番号: 126)	TAGAGGTGTGGTTAT (配列番号: 2124)
219	ONECUT2 (配列番号: 126)	TAGAGGCGGGTTAT (配列番号: 2123)
220	ONECUT2 (配列番号: 126)	TAGAGGTGTGGTTAT (配列番号: 2124)
221	CYP2D6 (配列番号: 129)	GAGATCGCGTTTTCGT (配列番号: 2125)
222	CYP2D6 (配列番号: 129)	AGAGATTGTGTTTTGT (配列番号: 2126)
223	CYP2D6 (配列番号: 129)	ATTCGCGGCAGGATA (配列番号: 2127)
224	CYP2D6 (配列番号: 129)	GATTTGTGGTGAGGAT (配列番号: 2128)
225	CYP2D6 (配列番号: 129)	GTCGTTTCGGGGACGT (配列番号: 2129)
226	CYP2D6 (配列番号: 129)	GTTGTTTTGGGATGTG (配列番号: 2130)
227	CYP2D6 (配列番号: 129)	TAAGTAGCGTCGATAG (配列番号: 2131)
228	CYP2D6 (配列番号: 129)	AAGTAGTGTGATAGGG (配列番号: 2132)
229	WBP11 (配列番号: 137)	TTACGAGAAGCGGGTA (配列番号: 2133)
230	WBP11 (配列番号: 137)	ATTATGAGAAGTGGGA (配列番号: 2134)
231	WBP11 (配列番号: 137)	AGGGGCGATTTTCGG (配列番号: 2135)
232	WBP11 (配列番号: 137)	TAGGGGTGATTTTTGG (配列番号: 2136)
233	WBP11 (配列番号: 137)	TTAGCGTCGTTTGATT (配列番号: 2137)
234	WBP11 (配列番号: 137)	TTTTAGTGTGTTTGATT (配列番号: 2138)
235	WBP11 (配列番号: 137)	AGTTCGTTTTATTGCGT (配列番号: 2139)
236	WBP11 (配列番号: 137)	GAGTTGTTTTATTGTTG (配列番号: 2140)

10

20

30

40

【 0 2 2 1 】

【表4】

表3 反応における予測スコア<sup>a</sup>

因子	n	P	OR <sup>b</sup>	(95% CI) <sup>c</sup>
伝統的因子に基づくスコア <sup>d</sup> , ( $\chi^2=10.9$ , 3 自由度)				
q1 q2 q3 q4	50 50 50 50	0.018	11.51 3.16 2.90	(0.68-3.38) (1.40-7.11) (1.29-6.53)
メチル化に基づくスコア <sup>e</sup> , ( $\chi^2=44.3$ , 3 自由度)				
q1 q2 q3 q4	50 50 50 50	<0.001	11.47 5.52 13.0	(0.62-3.47) (2.34-13.11) (4.97-33.8)

10

【0222】

<sup>a</sup> , ロジスティック回帰は、タモキシフェン治療に対する反応タイプと因子の関係の強度を検定するために使用した; <sup>b</sup> , オッズ比; <sup>c</sup> , 95%信頼区間、<sup>d</sup> , 伝統的因子、年齢 (>70歳、55~70歳、41~55歳対40歳)、再発の顕性部位(内臓または骨対軟部組織への再発)、無疾患間隔(>12ヶ月対12ヶ月)およびlogER値の多変換分析に基づくスコア。スコアは25%、50%および75%値に基づく群(q1~q4)に分割した。<sup>e</sup> , 5つの独立した予測遺伝子、PSA-T、STMN1、GRIN2D、TGFB2およびS100A2のDNAメチル化状態に基づくスコア。スコアは伝統的因子に基づくスコアの場合と同じく、q1~q4の群に分割した。

20

【0223】

【表5】

表4

試料	反応	LC分析メチル化%	チップ
1	緩解	80	+
2	緩解	27	+
3	緩解(はずれ値)	3	-
4	緩解	88	+
5	緩解	68	+
6	緩解	62	+
7	緩解	60	+
8	緩解	83	+
9	緩解	56	+
10	緩解(はずれ値)	0	-
11	緩解	0	+
12	緩解	0	+
13	進行性疾患	0	-
14	進行性疾患	0	-
15	進行性疾患	4	-
16	進行性疾患	7	-
17	進行性疾患(はずれ値)	0	+
18	進行性疾患	0	-
19	進行性疾患	0	-
20	進行性疾患	0	-
21	進行性疾患	0	-
22	進行性疾患	0	-
23	進行性疾患(はずれ値)	0	+
24	進行性疾患	0	-

30

40

【図面の簡単な説明】

【0224】

【図1】本発明の方法の好ましい応用を示した図である。

【図2】本発明の方法の他の好ましい応用を示した図である。

50

【図 3】実施例 1 の CpG アイランドのメチル化分析を示した図である。

【図 4】図 3 (実施例 1) で測定した生存率と有意差に関連する 10 個の遺伝子の CpG ジヌクレオチドメチル化データを示した図である。

【図 5】アルゴリズムを使用して、2 クラスの組織間の CpG メチル化相違による実施例 1 (データセット 1) で得られた付加的データのランクづけされたマトリックスを示した図である。

【図 6】アルゴリズムを使用して、2 クラスの組織間の CpG メチル化相違による実施例 1 (データセット 1) で得られた付加的データのランクづけされたマトリックスを示した図である。

【図 7】アルゴリズムを使用して、2 クラスの組織間の CpG メチル化相違による実施例 1 (データセット 1) で得られた付加的データのランクづけされたマトリックスを示した図である。 10

【図 8】アルゴリズムを使用して、2 クラスの組織間の CpG メチル化相違による実施例 1 (データセット 1) で得られた付加的データのランクづけされたマトリックスを示した図である。

【図 9】アルゴリズムを使用して、2 クラスの組織間の CpG メチル化相違による実施例 1 (データセット 1) で得られた付加的データのランクづけされたマトリックスを示した図である。

【図 10】アルゴリズムを使用して、2 クラスの組織間の CpG メチル化相違による実施例 1 (データセット 1) で得られた付加的データのランクづけされたマトリックスを示した図である。 20

【図 11】アルゴリズムを使用して、2 クラスの組織間の CpG メチル化相違による実施例 1 (データセット 1) で得られた付加的データのランクづけされたマトリックスを示した図である。

【図 12】アルゴリズムを使用して、2 クラスの組織 (転移活動環境のホルモン治療に対する反応者と非反応者) 間の CpG メチル化相違による実施例 3 で得られたデータのランクづけされたマトリックスを示した図である。

【図 13】アルゴリズムを使用して、2 クラスの組織 (転移活動環境のホルモン治療に対する反応者と非反応者) 間の CpG メチル化相違による実施例 3 で得られたデータのランクづけされたマトリックスを示した図である。 30

【図 14 A】実施例 1 (データセット 3) の組合せスコアの無増悪生存期間 (PFS) 曲線を示した図である。

【図 14 B】実施例 1 (データセット 3) の組合せスコアの無増悪生存期間 (PFS) 曲線を示した図である。

【図 15】ログスケールで未修正 p - 値を示した図である。

【図 16】実施例 1 で得たデータ (データセット 4) の最もよい 10 個の増幅産物のランクづけされたマトリックスを示した図である。

【図 17】ESR1 遺伝子の Kaplan-Meier 計算無病生存曲線を示し、点線 (下部曲線) は非反応者を示し、直線 (上部曲線) は反応者を示した図である。

【図 18】PCAF 遺伝子の Kaplan-Meier 計算無病生存曲線を示し、点線 (上部曲線) は非反応者を示し、直線 (下部曲線) は反応者を示した図である。 40

【図 19】PITX2 遺伝子の Kaplan-Meier 計算無病生存曲線を示し、点線 (上部曲線) は非反応者を示し、直線 (下部曲線) は反応者を示した図である。

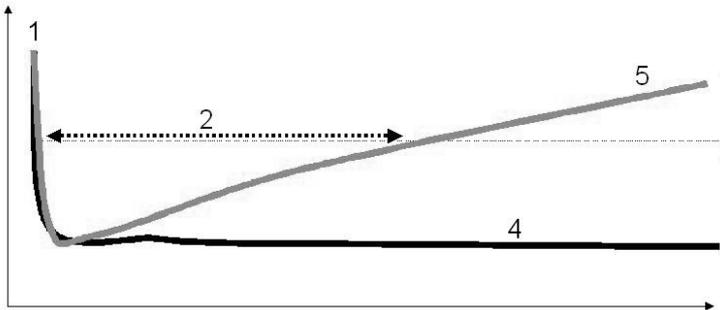
【図 20】TMEFF2 遺伝子の Kaplan-Meier 計算無病生存曲線を示し、点線 (上部曲線) は非反応者を示し、直線 (下部曲線) は反応者を示した図である。

【図 21】WBP11 遺伝子の Kaplan-Meier 計算無病生存曲線を示し、点線 (下部曲線) は非反応者を示し、直線 (上部曲線) は反応者を示した図である。

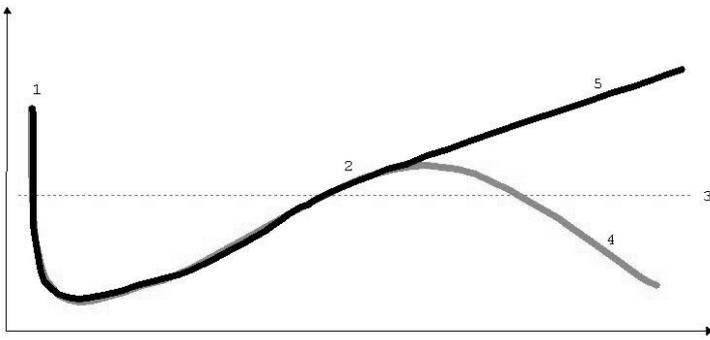
。 50

【図22】 E R B B 2 遺伝子の Kaplan - マイヤー ( Kaplan - Meier ) 計算無病生存曲線を示し、点線 ( 下部曲線 ) は非反応者を示し、直線 ( 上部曲線 ) は反応者を示した図である。

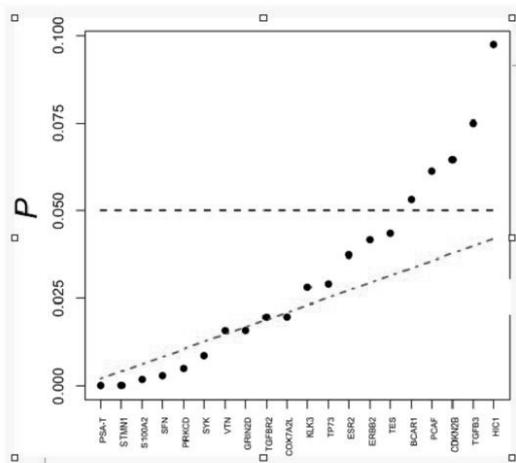
【図1】



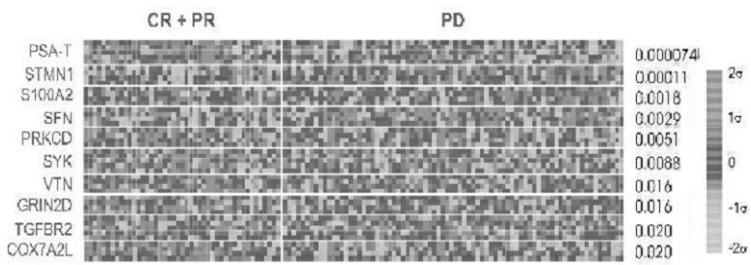
【 図 2 】



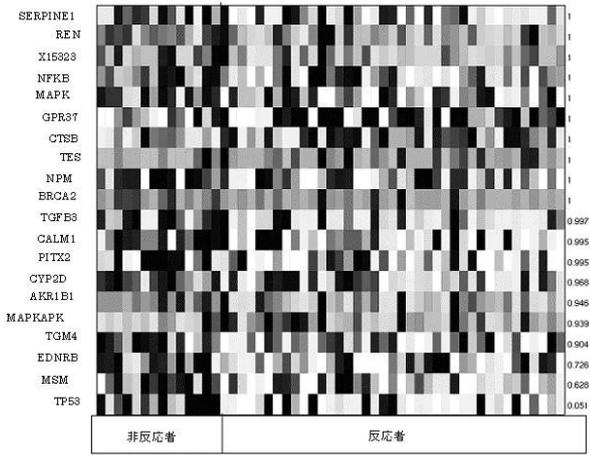
【 図 3 】



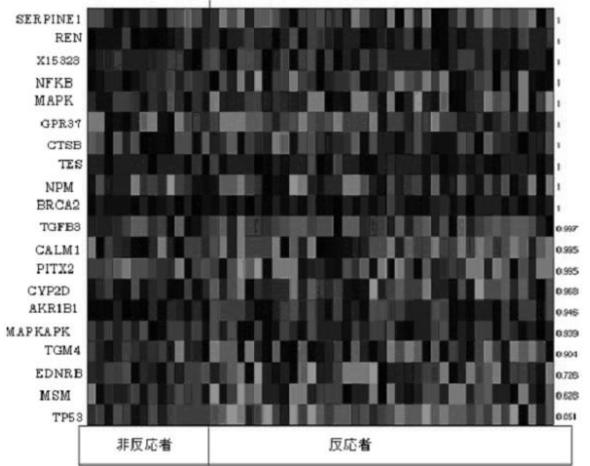
【 図 4 】



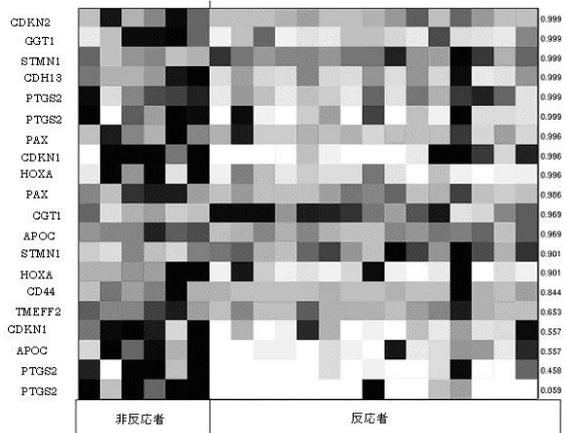
【 図 5 】



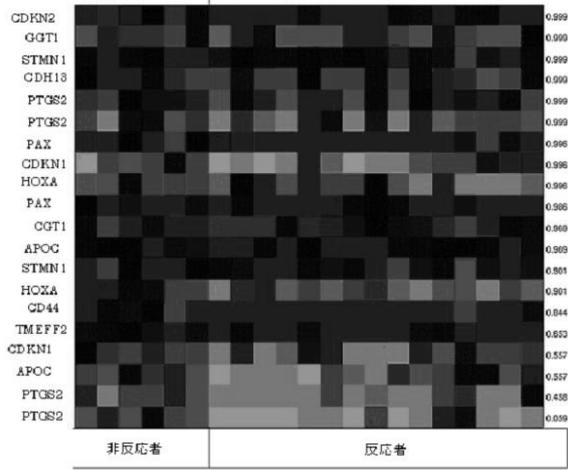
【 図 6 】



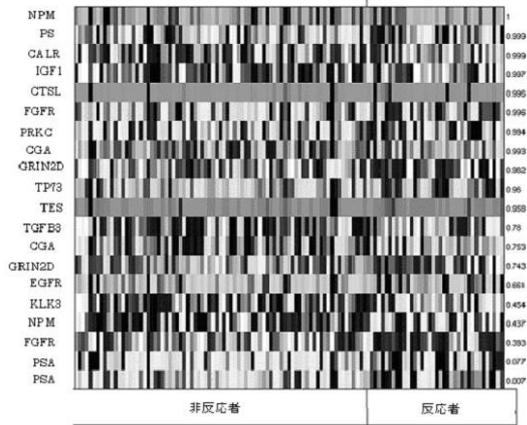
【 図 7 】



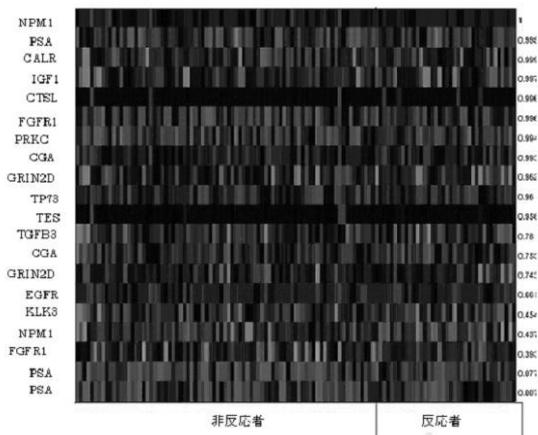
【 図 8 】



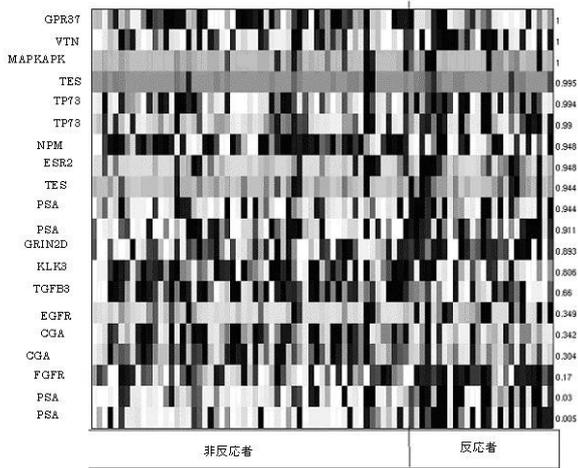
【 図 9 】



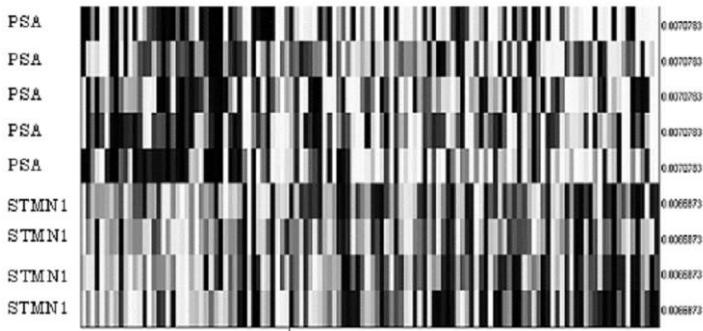
【 図 10 】



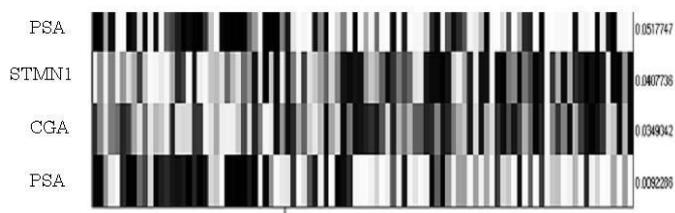
【 図 1 1 】



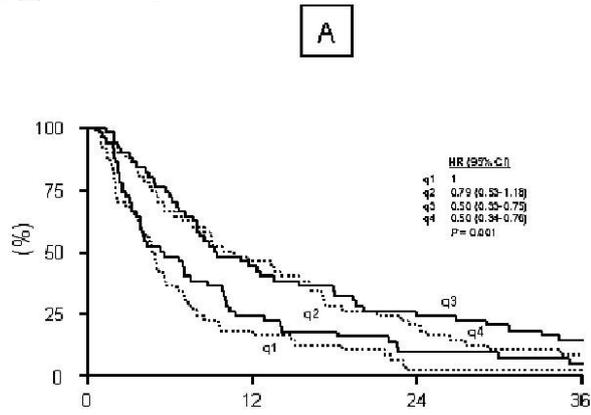
【 図 1 2 】



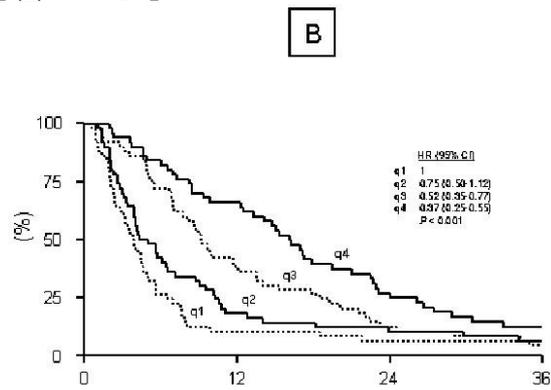
【 図 1 3 】



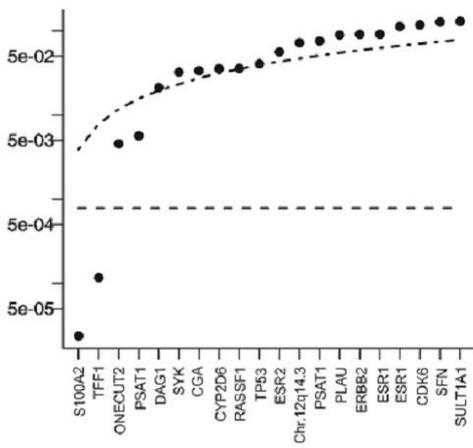
【 図 1 4 A 】



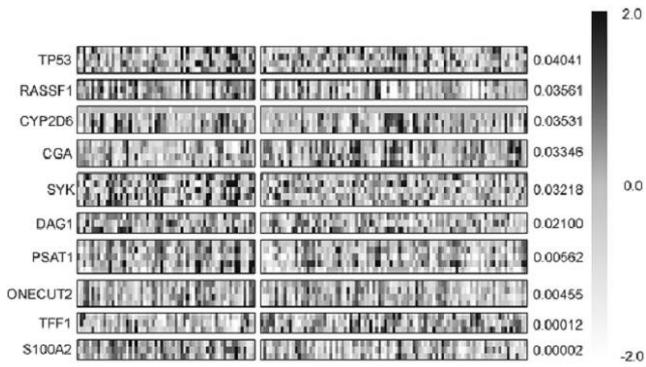
【 図 1 4 B 】



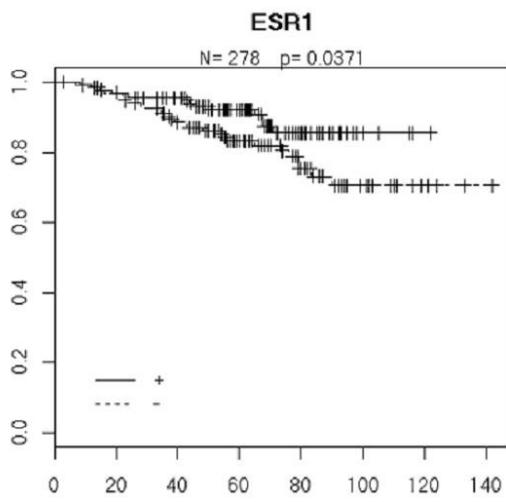
【 図 1 5 】



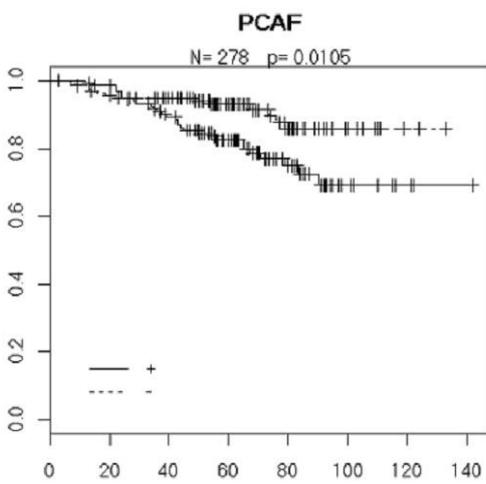
【 図 1 6 】



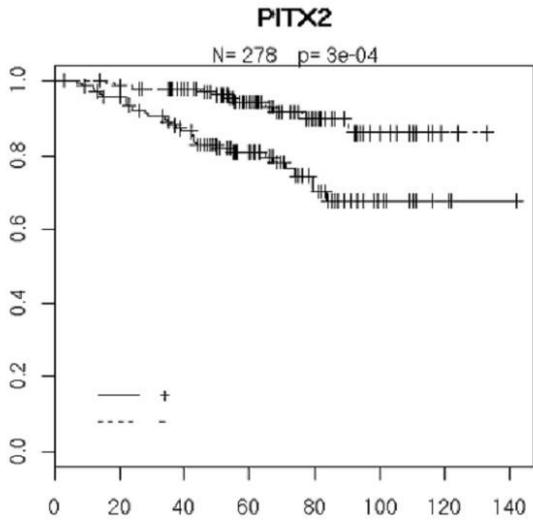
【 図 1 7 】



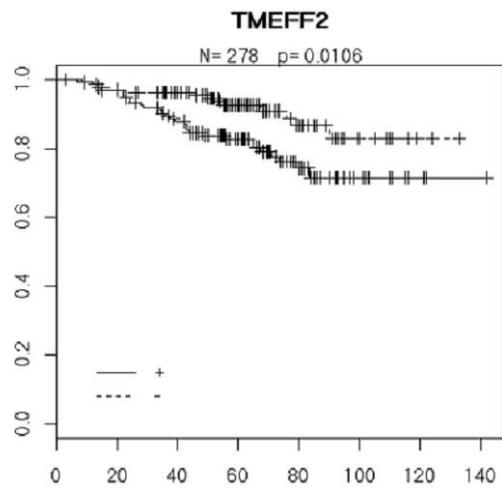
【 図 1 8 】



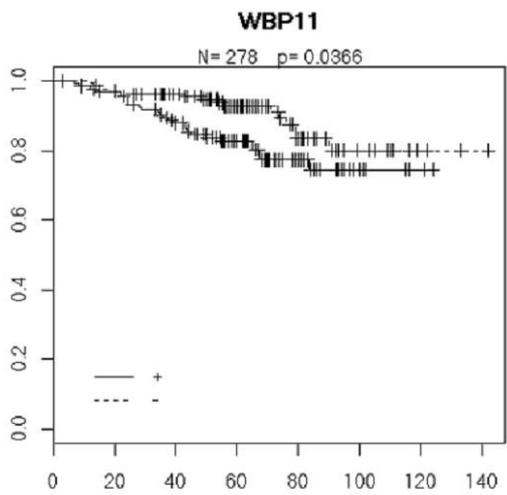
【 図 19 】



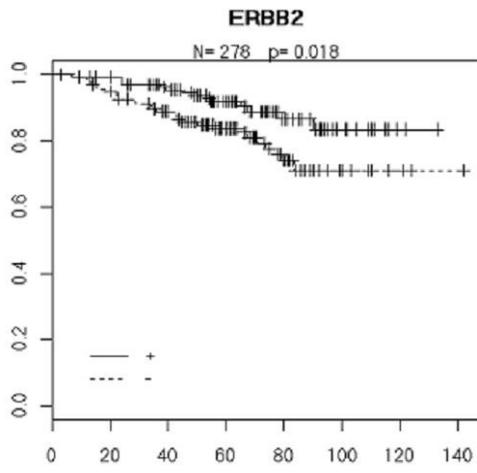
【 図 20 】



【 図 21 】



【 図 2 2 】



【 配列表 】

[2006515513000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/10881

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/68912 A (PIEPENBROCK CHRISTIAN ; BERLIN KURT (DE); EPIGENOMICS AG (DE); OLEK AL) 20 September 2001 (2001-09-20) SEQ ID NO: 131 is a bisulphite-treated DNA corresponding to SEQ ID NO: 27 of the present application. claims 1-32	25-44, 78-80
Y	EP 1 167 975 A (UNIV PARIS DESCARTES) 2 January 2002 (2002-01-02) the whole document	1-24, 45-77
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search  18 May 2004		Date of mailing of the international search report  04 08 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Pinta, V

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/10881

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CURMI P A ET AL: "Overexpression of stathmin in breast carcinomas points out to highly proliferative tumours" BRITISH JOURNAL OF CANCER, LONDON, GB, vol. 82, no. 1, 2000, pages 142-150, XP002908452 ISSN: 0007-0920 the whole document	1-24, 45-77
A	----- WO 02/059347 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED) 1 August 2002 (2002-08-01) the whole document examples 3,7; table 4	
A	----- BRATTSAND G: "Correlation of oncoprotein 18/stathmin expression in human breast cancer with established prognostic factors." BRITISH JOURNAL OF CANCER. AUG 2000, vol. 83, no. 3, August 2000 (2000-08), pages 311-318, XP002280240 ISSN: 0007-0920 the whole document	
A	----- LAPIDUS R G ET AL: "Methylation of estrogen and progesterone receptor gene 5' CpG islands correlates with lack of estrogen and progesterone receptor gene expression in breast tumors." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. MAY 1996, vol. 2, no. 5, May 1996 (1996-05), pages 805-810, XP008030590 ISSN: 1078-0432 the whole document	
A	----- OTTAVIANO Y L ET AL: "Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells" CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US, vol. 54, no. 10, 15 May 1994 (1994-05-15), pages 2552-2555, XP000999429 ISSN: 0008-5472 the whole document	

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/10881

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>HUANG TIM HUI-MING ET AL: "Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells"  HUMAN MOLECULAR GENETICS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB,  vol. 8, no. 3, March 1999 (1999-03), pages 459-470, XP002175857  ISSN: 0964-6906  the whole document</p> <p>-----</p>	
A	<p>YAN P S ET AL: "Dissecting complex epigenetic alterations in breast cancer using CpG Island microarrays"  CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, BALTIMORE, MD, US,  vol. 61, no. 23,  1 December 2001 (2001-12-01), pages 8375-8380, XP002243660  ISSN: 0008-5472  the whole document</p> <p>-----</p>	
A	<p>GITAN RAAD S ET AL: "Methylation-specific oligonucleotide microarray: a new potential for high-throughput methylation analysis"  GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US,  vol. 12, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 158-164, XP002208051  ISSN: 1088-9051  the whole document</p> <p>-----</p>	
P,A	<p>WO 03/052135 A (NIMMRICH INKO ; BURGER MATTHIAS (DE); EPIGENOMICS AG (DE); GENC BUELEN) 26 June 2003 (2003-06-26)  SEQ ID NO: 28 is 100% identical to SEQ ID NO: 27 of the present application; SEQ ID NO: 648-651 are 100% identical in 17-18 nt overlap with SEQ ID NO: 2005-2008 of the present application.</p> <p>-----</p>	
L	<p>MARTENS J W M ET AL: "Epigenetic signature predicts failure of endocrine therapy in patients with recurrent breast cancer."  BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT, vol. 82, no. Supplement 1, 2003, page S72, XP008030522  26th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium; San Antonio, TX, USA; December 03-06, 2003  ISSN: 0167-6806 (ISSN print)  the whole document</p> <p>-----</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 03/10881**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

see additional sheet

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
  
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
  
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-80 (partially)

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/ EP 03/10881

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: claims 1-80 (all partially)

The subject-matter of claims 1-80 as far as it involves STMN1, and SEQ ID NO: 2003-2010.

1.1. claims: 1-80 (all partially)

The subject-matter of claims 1-80 as far as it involves the sequence first mentioned in the claims, namely:

- SEQ ID NO: 27.

---

Inventions 2-27: claims 1-80 (all partially)

The subject-matter of claims 1-80 as far as it involves:

- SFN, and SEQ ID NO: 2053-2060, for invention 2;
- S100A2, and SEQ ID NO: 1967-1968, 2045-2052, for invention 3;
- TGFBR2, and SEQ ID NO: 2095-2104, for invention 4;
- TP53, and SEQ ID NO: 1987-1986, 2041-2042, for invention 5;
- PTGS2, and SEQ ID NO: 2035-2038, for invention 6;
- FGFRL1, and SEQ ID NO: 2031-2034, for invention 7;
- SYK, and SEQ ID NO: 2069-2078, for invention 8;
- PITX2, and SEQ ID NO: 1691-1692, 2025-2030, for invention 9;
- GRIN2D, and SEQ ID NO: 2087-2094, for invention 10;
- PSA, and SEQ ID NO: 1975-1976, 2011-2020, for invention 11;
- CGA, and SEQ ID NO: 1733-1736, 1977-1980, 2021-2024, for invention 12;
- CYP2D6, and SEQ ID NO: 2043-2044, 2127-2134, for invention 13;
- MSMB, and SEQ ID NO: 2039-2040, for invention 14;
- COX7A2L, and SEQ ID NO: 2105-2112, for invention 15;
- VTN, and SEQ ID NO: 2079-2086, for invention 16;
- PRKCD, and SEQ ID NO: 2061-2068, for invention 17;
- ONECUT2, and SEQ ID NO: 2119-2126, for invention 18;
- WBP11, and SEQ ID NO: 2135-2142, for invention 19;
- DAG1, and SEQ ID NO: 2113-2118, for invention 20;
- ERBB2, and SEQ ID NO: 1995-2002, for invention 21;
- TFF1, and SEQ ID NO: 1969-1974, for invention 22;
- TMEFF2, and SEQ ID NO: 1941-1946, for invention 23;
- ESR1, and SEQ ID NO: 1947-1954, for invention 24;
- RASSF1, and SEQ ID NO: 1981-1986, for invention 25;
- PSAT1, for invention 26;
- PCAF, and SEQ ID NO: 1925-1932, 1965-1966, for invention 27.

---

Inventions 28-159: claims 1-80 (all partially)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/ EP 03/10881

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

- The subject-matter of claims 1-80 as far as it involves:
- SEQ ID NO: 299-300, for inventions 28-29, respectively;
  - SEQ ID NO: 325-328, for inventions 30-33, resp.;
  - SEQ ID NO: 331-332, for inventions 34-35, resp.;
  - SEQ ID NO: 345-346, for inventions 36-37, resp.;
  - SEQ ID NO: 381-382, for inventions 38-39, resp.;
  - SEQ ID NO: 393-394, for inventions 40-41, resp.;
  - SEQ ID NO: 401-402, for inventions 42-43, resp.;
  - SEQ ID NO: 411-412, for inventions 44-45, resp.;
  - SEQ ID NO: 417-418, for inventions 46-47, resp.;
  - SEQ ID NO: 425-430, for inventions 48-53, resp.;
  - SEQ ID NO: 443-444, for inventions 54-55, resp.;
  - SEQ ID NO: 455-456, for inventions 56-57, resp.;
  - SEQ ID NO: 475-476, for inventions 58-59, resp.;
  - SEQ ID NO: 487-520, for inventions 60-93, resp.;
  - SEQ ID NO: 573-574, for inventions 94-95, resp.;
  - SEQ ID NO: 599-602, for inventions 96-99, resp.;
  - SEQ ID NO: 605-606, for inventions 100-101, resp.;
  - SEQ ID NO: 619-620, for inventions 102-103, resp.;
  - SEQ ID NO: 655-656, for inventions 104-105, resp.;
  - SEQ ID NO: 667-668, for inventions 106-107, resp.;
  - SEQ ID NO: 675-676, for inventions 108-109, resp.;
  - SEQ ID NO: 685-686, for inventions 110-111, resp.;
  - SEQ ID NO: 691-692, for inventions 112-113, resp.;
  - SEQ ID NO: 699-704, for inventions 114-119, resp.;
  - SEQ ID NO: 717-718, for inventions 120-121, resp.;
  - SEQ ID NO: 729-730, for inventions 122-123, resp.;
  - SEQ ID NO: 749-750, for inventions 124-125, resp.;
  - SEQ ID NO: 761-794, for inventions 126-159, resp.

---

Inventions 160-191: claims 1-80 (all partially)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/ EP 03/10881

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

The subject-matter of claims 1-80 as far as it involves:

- SEQ ID NO: 40, for invention 160;
- SEQ ID NO: 122, for invention 161;
- SEQ ID NO: 43, for invention 162;
- SEQ ID NO: 74, for invention 163;
- SEQ ID NO: 127, for invention 164;
- SEQ ID NO: 86, for invention 165;
- SEQ ID NO: 90, for invention 166;
- SEQ ID NO: 128, for invention 167;
- SEQ ID NO: 105, for invention 168;
- SEQ ID NO: 115, for invention 169;
- SEQ ID NO: 121, for invention 170;
- SEQ ID NO: 126, for invention 171;
- SEQ ID NO: 129, for invention 172;
- SEQ ID NO: 125, for invention 173;
- SEQ ID NO: 132, for invention 174;
- SEQ ID NO: 123, for invention 175;
- SEQ ID NO: 131, for invention 176;
- SEQ ID NO: 130, for invention 177;
- SEQ ID NO: 124, for invention 178;
- SEQ ID NO: 68, for invention 179;
- SEQ ID NO: 50, for invention 180;
- SEQ ID NO: 91, for invention 181;
- SEQ ID NO: 92, for invention 182;
- SEQ ID NO: 99, for invention 183;
- SEQ ID NO: 83, for invention 184;
- SEQ ID NO: 41, for invention 185;
- SEQ ID NO: 78, for invention 186;
- SEQ ID NO: 137, for invention 187;
- SEQ ID NO: 133, for invention 188;
- SEQ ID NO: 134, for invention 189;
- SEQ ID NO: 135, for invention 190;
- SEQ ID NO: 136, for invention 191.

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/10881

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0168912	A	20-09-2001	DE 10013847 A1	27-09-2001
			DE 10019058 A1	20-12-2001
			DE 10032529 A1	07-02-2002
			AU 4835201 A	24-09-2001
			AU 5038101 A	24-09-2001
			AU 5460101 A	24-09-2001
			WO 0168910 A2	20-09-2001
			DE 20121973 U1	24-12-2003
			DE 20121977 U1	24-12-2003
			WO 0168911 A2	20-09-2001
			WO 0168912 A2	20-09-2001
			EP 1283905 A2	19-02-2003
			EP 1268855 A2	02-01-2003
			EP 1292707 A2	19-03-2003
			JP 2004507213 T	11-03-2004
			JP 2004507214 T	11-03-2004
			US 2004029123 A1	12-02-2004
			US 2004048254 A1	11-03-2004
			AU 5478801 A	23-10-2001
			AU 5479401 A	23-10-2001
			AU 7384001 A	23-10-2001
			AU 7566301 A	23-10-2001
			AU 7633001 A	23-10-2001
			AU 7633101 A	23-10-2001
			AU 7748701 A	23-10-2001
			AU 7842001 A	07-11-2001
			AU 8960001 A	11-12-2001
			WO 0177373 A2	18-10-2001
			DE 20121960 U1	15-01-2004
			DE 20121964 U1	15-01-2004
			DE 20121965 U1	24-12-2003
			DE 20121968 U1	18-12-2003
			DE 20121969 U1	24-12-2003
			DE 20121970 U1	24-12-2003
			DE 20121972 U1	24-12-2003
			DE 20121974 U1	24-12-2003
			WO 0177375 A2	18-10-2001
			WO 0177164 A2	18-10-2001
			WO 0177376 A2	18-10-2001
			WO 0177377 A2	18-10-2001
			WO 0181622 A2	01-11-2001
			WO 0192565 A2	06-12-2001
			WO 0177378 A2	18-10-2001
			WO 0176451 A2	18-10-2001
			EP 1268857 A2	02-01-2003
			EP 1272670 A2	08-01-2003
			EP 1278892 A1	29-01-2003
			EP 1278893 A2	29-01-2003
			EP 1274865 A2	15-01-2003
			EP 1274866 A2	15-01-2003
EP 1167975	A	02-01-2002	EP 1167975 A1	02-01-2002
WO 02059347	A	01-08-2002	US 2003017454 A1	23-01-2003
			WO 02059347 A2	01-08-2002
			US 2003138783 A1	24-07-2003
WO 03052135	A	26-06-2003	DE 10161625 A1	10-07-2003

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 03/10881

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03052135 A		WO 03052135 A2	26-06-2003

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>G 0 1 N 27/62 (2006.01)</b>		G 0 1 N 27/62	V	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/138 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	F	
		A 6 1 K 31/138		

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

(72) 発明者 フォエケンズ, ヨーン  
オランダ, エンエル - 2 9 0 8 イクスアー ロッテルダム, フィロソフェントウイン 3 5

(72) 発明者 ハルベック, ナディア  
ドイツ連邦共和国, 8 3 6 2 4 オッターフィング, パルンカマー シュトラーセ 4 9

(72) 発明者 ケーニヒ, トーマス  
ドイツ連邦共和国, 1 0 9 9 9 ベルリン, スカリッツァー シュトラーセ 1 8

(72) 発明者 マイアー, サビン  
ドイツ連邦共和国, 1 2 1 6 3 ベルリン, マルケルシュトラーセ 6 0

(72) 発明者 マーテンス, ヨーン  
オランダ, エンエル - 3 0 3 3 ベーカー ロッテルダム, シーカデ 1 2 1 ハー

(72) 発明者 モデル, ファビアン  
ドイツ連邦共和国, 1 2 6 8 3 ベルリン, デデンツェアシュトラーセ 7 3

(72) 発明者 ニムリッヒ, インコ  
ドイツ連邦共和国, 1 0 4 0 7 ベルリン, ハイツ - カペレ - シュトラーセ 9

(72) 発明者 ルハン, タマス  
ドイツ連邦共和国, 1 3 1 8 9 ベルリン, ヴィネタエステーエル. 7

(72) 発明者 シュミット, アーミン  
ドイツ連邦共和国, 1 2 2 0 3 ベルリン, ホーテンシエンシュトラーセ 2 9

(72) 発明者 シュミット, マンフレッド  
ドイツ連邦共和国, 8 1 6 6 9 ミュンヘン, ホーヘナシャウアーシュトラーセ 1 0

(72) 発明者 ルーク, マクスイーメ, ペー  
オランダ, エンエル - 1 0 9 8 フェーエス アムステルダム, スターデ デ コロンベス 5 5

(72) 発明者 マルクス, アルムス  
ドイツ連邦共和国, 1 0 4 3 9 ベルリン, ヴィツヒェルシュトラーセ 4 5

(72) 発明者 ヘフラー, ハインツ  
ドイツ連邦共和国, 8 1 6 7 5 ミュンヘン, イスマニンゲルシュトラーセ 6 4

F ターム (参考) 2G041 CA01 DA04 DA05 FA11 JA03  
4B024 AA11 AA12 CA01 CA02 CA04 CA05 CA09 CA20 DA03 HA09  
HA12 HA20  
4B029 AA07 BB20 CC03 FA12  
4B063 QA05 QA19 QQ08 QQ42 QR08 QR14 QR32 QR55 QR62 QS25  
QS34  
4C084 AA17 NA14 ZB26  
4C206 AA01 FA23 NA14 ZB26