

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-333987
(P2005-333987A)

(43) 公開日 平成17年12月8日(2005.12.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/39	A 6 1 K 39/39		4 B 0 2 9
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 45/00	1 0 1	4 B 0 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00		4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/02	A 6 1 P 35/02		4 C 0 8 5

審査請求 未請求 請求項の数 46 O L 外国語出願 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2005-135284 (P2005-135284)	(71) 出願人	505060347 ベリデックス・エルエルシー Veridex, LLC アメリカ合衆国、07059 ニュージャージー州、ウォレン、テクノロジー・ドライブ 33 33 Technology Drive , Warren, NJ 07059, U.S.A.
(22) 出願日	平成17年5月6日(2005.5.6)	(74) 代理人	100066474 弁理士 田澤 博昭
(31) 優先権主張番号	568635	(74) 代理人	100088605 弁理士 加藤 公延
(32) 優先日	平成16年5月6日(2004.5.6)	(74) 代理人	100123434 弁理士 田澤 英昭
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

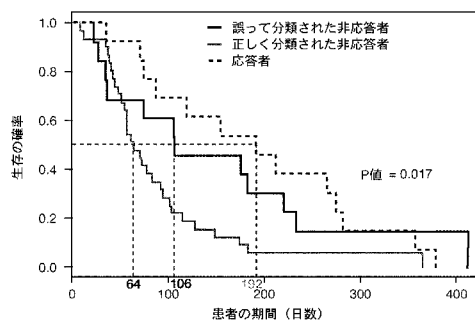
(54) 【発明の名称】 悪性血液疾患の予後

(57) 【要約】

【課題】 患者の状態を決定する方法や、このような患者の全生存を予測する方法を提供すること。

【解決手段】 癌患者、特に悪性血液疾患の患者の治療法であって、患者の遺伝子発現プロファイル及び/または分子マーカーを分析して、患者の状態及び/または予後を決定するステップを含む。本発明はまた、非再発性または非難治性患者がファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、場合によっては他の薬物の治療に対して応答し易いか否かを分析する方法も提供する。この方法は、患者の治療の監視及び治療方法の選択にも有用である。F T I 治療に応答して調節された遺伝子を得て、これをプロファイルの作成に用いることができる。

【選択図】 図 5



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

急性骨髄性白血病（A M L）患者の予後（生存／転帰）を評価する方法であって、

（a）前記患者から生体サンプルを採取するステップと、

（b）（i）配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または（ii）表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記サンプルにおける発現レベルを測定するステップとを含み、

所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが A M L の予後を示していることを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

急性骨髄性白血病（A M L）患者の状態を決定する方法であって、

（a）前記患者から生体サンプルを採取するステップと、

（b）（i）配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または（ii）表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記サンプルにおける発現レベルを測定するステップとを含み、

所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが A M L の状態を示していることを特徴とする方法。

20

【請求項 3】

急性骨髄性白血病（A M L）患者の治療プロトコルを決定する方法であって、

（a）前記患者から生体サンプルを採取するステップと、

（b）（i）配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または（ii）表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記サンプルにおける発現レベルを測定するステップとを含み、

所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、治療に対して患者が応答する可能性を十分に示し、医師が適切な治療の程度及び種類を決定することができることを特徴とする方法。

30

【請求項 4】

急性骨髄性白血病（A M L）患者を治療する方法であって、

（a）前記患者から生体サンプルを採取するステップと、

（b）（i）配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または（ii）表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記サンプルにおける発現レベルを測定するステップであって、所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、前記患者が治療に応答する可能性を示す、前記ステップと、

（c）前記患者が治療に応答しそうな場合に前記患者をアジュバント療法で治療することを特徴とする方法。

40

【請求項 5】

（5）前記患者が再発性または難治性 A M L であることを特徴とする請求項 1、2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記配列番号が 1、5、及び 6 であることを特徴とする請求項 1、2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 7】

更に、前記サンプル中で恒常的に発現している少なくとも 1 種類の遺伝子の発現レベルを測定するステップを含むことを特徴とする請求項 1、2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 8】

50

発現パターンの比較をパターン認識法で行うことを特徴とする請求項 1、2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 9】

前記パターン認識法が Cox 比例ハザード分析の使用を含むことを特徴とする請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記所定のカットオフレベルが、良性細胞または正常組織に対して前記サンプルで少なくとも 1.5 倍の過剰発現または 1.5 分の 1 の過少発現であることを特徴とする請求項 1、2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 11】

前記所定のカットオフレベルが、良性細胞または正常組織に対して、転移細胞を有する前記サンプルで少なくとも統計的に有意な p 値の過剰発現であることを特徴とする請求項 1、2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 12】

前記 p 値が 0.05 未満であることを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記遺伝子発現をマイクロアレイまたは遺伝子チップで測定することを特徴とする請求項 1、2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 14】

前記マイクロアレイが cDNA アレイまたはオリゴヌクレオチドアレイであることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記マイクロアレイまたは前記遺伝子チップが更に、1 または複数の内部コントロール試薬を含むことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

遺伝子発現を、前記サンプルから抽出した RNA のポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で核酸を増幅して決定することを特徴とする請求項 1、2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 PCR が逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) であることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 RT-PCR が更に、1 または複数の内部コントロール試薬を含むことを特徴とする請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

遺伝子発現を、その遺伝子によってコードされるタンパク質を測定または検出して検出することを特徴とする請求項 1、2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 20】

前記タンパク質を、そのタンパク質に特異的な抗体によって検出することを特徴とする請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

遺伝子発現をその遺伝子の特性を測定して検出することを特徴とする請求項 1、2、3、または 4 に記載の方法。

【請求項 22】

前記測定した特性が、DNA 増幅、メチル化、突然変異、及び対立遺伝子変異体からなる群から選択されることを特徴とする請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

急性骨髄性白血病 (AML) 患者の予後患者レポートを作成する方法であって、

(a) 患者から生体サンプルを採取するステップと、

(b) 前記サンプルの遺伝子発現を測定するステップと、

(c) 前記ステップ (b) の結果に再発ハザードスコアを適用するステップと、

10

20

30

40

50

(d) 前記ステップ(c)で得た結果を用いて前記レポートを作成するステップとを含むことを特徴とする方法。

【請求項24】

前記レポートが、前記患者の転帰の評価及び/または患者集団に対するリスクの可能性を含むことを特徴とする請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記患者が再発性または難治性の患者であることを特徴とする請求項23に記載の方法。

【請求項26】

請求項23に従った方法で作成した患者レポート。

10

【請求項27】

配列番号1 22、または表7に示されている配列番号1及び5 22に一致するpsid番号からなる群から選択される少なくとも1つのプローブセットを含むことを特徴とする組成物。

【請求項28】

生体サンプルで急性骨髄性白血病の予後を決定するためのアッセイを行うためのキットであって、

(i) 配列番号1及び5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1及び5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を検出するための物質を含むことを特徴とするキット。

20

【請求項29】

前記配列番号が1、5、及び6であることを特徴とする請求項28に記載のキット。

【請求項30】

更に、マイクロアレイ分析を実施するための試薬を含むことを特徴とする請求項29に記載のキット。

【請求項31】

更に、前記核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部をアッセイするための培地を含むことを特徴とする請求項28に記載のキット。

30

【請求項32】

生体サンプルで急性骨髄性白血病の予後を評価するための製品であって、

(i) 配列番号1及び5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1及び5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を検出するための物質を含むことを特徴とする製品。

【請求項33】

前記配列番号が1、5、及び6であることを特徴とする請求項32に記載の製品。

【請求項34】

更に、マイクロアレイ分析を実施するための試薬を含むことを特徴とする請求項32に記載の製品。

40

【請求項35】

更に、前記核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部をアッセイするための培地を含むことを特徴とする請求項32に記載の製品。

【請求項36】

請求項1、2、3、または4の方法を実施するためのマイクロアレイまたは遺伝子チップ。

【請求項37】

(i) 配列番号1及び5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番

50

号1及び5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を含み、前記組合せが生体サンプルで急性骨髄性白血病の状態または予後を特徴付けるのに十分であることを特徴とする請求項36に記載のマイクロアレイ。

【請求項38】

測定または特徴付けが1.5倍の過剰発現または1.5分の1の過少発現であることを特徴とする請求項36に記載のマイクロアレイ。

【請求項39】

測定により統計的に有意なp値の過剰発現または過少発現が得られることを特徴とする請求項36に記載のマイクロアレイ。 10

【請求項40】

前記p値が0.05未満である特徴とする請求項39に記載のマイクロアレイ。

【請求項41】

cDNAアレイまたはオリゴヌクレオチドアレイを含むことを特徴とする請求項36に記載のマイクロアレイ。

【請求項42】

更に、1または複数の内部コントロール試薬を含むことを特徴とする請求項36に記載のマイクロアレイ。

【請求項43】

診断/予後ポートフォリオであって、 20

(i)配列番号1及び5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1及び5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を含み、

前記組合せが生体サンプルで急性骨髄性白血病の状態または予後を特徴付けるのに十分であることを特徴とする診断/予後ポートフォリオ。

【請求項44】

測定または特徴付けが1.5倍の過剰発現または1.5分の1の過少発現であることを特徴とする請求項43に記載のポートフォリオ。 30

【請求項45】

測定により統計的に有意なp値の過剰発現または過少発現が得られることを特徴とする請求項43に記載のポートフォリオ。

【請求項46】

前記p値が0.05未満である特徴とする請求項45に記載のマイクロアレイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、言及することにより2004年12月17日出願の米国特許出願第60/637,265号を包含するものとする。 40

【0002】

本発明は、分子マーカーの検出及び/または遺伝子発現の分析に基づいた急性骨髄性白血病(AML)の診断、予後、及び治療に関する。

【背景技術】

【0003】

現在は、核型分析が、予後値を得るのに有効であり、生物学的に異なるAMLのサブタイプを同定するのに有用である。加えて、FLT3、cKIT、AML1、GATA1、CEBPA、及びNRASなどの遺伝子の変異は疾患の病因に参与している。FLT3及びCEBPAの変異のスクリーニングにより再発のリスクが異なる複数の群に階層分 50

類できることが明らかである。有効なリスクの階層分類により、同種幹細胞移植や他のアジュバント療法の適切な使用が可能となる。近年発行された2つの研究論文に、新たに診断された成人AML患者の遺伝子発現のプロファイリングと、このプロファイリングを用いた臨床結果の予測が記載されている(プリンガー(Bullinger)ら(2004年)、及びバルク(Valk)ら(2004年))。これらの研究論文には、遺伝子発現プロファイリングにより如何に臨床結果の予測を改善できるかが示されている。

【0004】

バルクら(2004年)は、Affymetrix U133Aチップで285人の患者の骨髓または末梢血を調べた。これらの患者のサンプルには、様々な細胞遺伝学的異常や分子異常が含まれていた。僅か16のクラスターが同定され、AMLが以前に考えられていた程は異種性でないことが示された。複数のクラスターが、細胞遺伝学的及び分子的に決定されたAMLのサブタイプに良く一致するため、これらのクラスターをWHO分類システムに用いることができる。これらのクラスターはまた、プリンガーら(2004年)及び他の既に発行されている研究論文でも見出されている(スコック(Schoch)ら(2002年)、デベルナルディ(Debernardi)ら(2003年)、及びコールマン(Kohlmann)ら(2003年))。驚くべきことではないが、これらのクラスターは、周知の予後の核型に関連しており、予後に相関している。

10

【0005】

プリンガーら(2004年)は、cDNAアレイを用いて116人の成人患者(65の抹消血と54の骨髓)の発現プロファイル調べた。バルクら(2004年)による研究に加えて、プリンガーらは、全ての細胞遺伝学的リスク群の臨床結果を予測するための133遺伝子クラシファイアも開発した。59サンプルの訓練セットと57サンプルの検査セットを用いて、プリンガーらは、133の遺伝子で患者を不良な結果の群と良好な結果の群に分けることができることを示した($p = 0.006$ logランク、オッズ比: 10、95% CI、2.6 29.3)。

20

【0006】

これら両方の研究で同定された遺伝子は、小児白血病で既に同定されている予測遺伝子(predictor gene)と一部が重複することに留意されたい(ヤギ(Yagi)ら(2003年))。また、プリンガーら(2004年)によって同定された予後遺伝子セットと近年同定されたティピファニブ(tipifarnib)に対する応答を予測する3つの遺伝子は重複していない(米国特許出願第10/883,436号)。

30

【0007】

ファルネシルトランスフェラーゼ酵素(FTase)は、カーボンファルネシル部分のC末端CAA(X)(C:システイン、A:脂肪族残基、X:任意のアミノ酸)認識モチーフへの共有結合を仲介する(レイス(Reiss)ら(1990年))。このようなファルネシル化では、3個の末端アミノ酸(AAX)の切断とC末端イソプレニルシステインのメチル化が続く。タンパク質のファルネシル化を阻害すると、タンパク質の作用に必要な正確な細胞内局在化が抑制される。当初は、発癌Rasタンパク質が、癌生物学におけるFTIsの増殖抑制効果のターゲットと考えられていた(ロイター(Reuter)ら(2000年))。しかしながら、Rasファルネシル化の阻害ではティピファニブ(tipifarnib)の全ての作用を説明できないことが示された。例えば、FTIsは、抗腫瘍作用を得るために常に変位Rasタンパク質を必要とするわけではない(カープ(Karp)ら(2001年))。実際に、初期の臨床試験は、進行した結腸直腸癌及び膵臓癌などの高頻度のRas変位の頻度が高い集団に対してデザインされていたが、プラセボと比較した場合に反応率に有意差が見られなかった(ファン・カツエン(Van Cutsem)ら(2004年)、ラオ(Rao)ら(2004年))。

40

【0008】

他の複数のファルネシル化タンパク質は、低分子量GTP加水分解酵素タンパク質RhoB、セントロメアタンパク質CENP E及びCENP F、タンパク質チロシンホスファターゼPTP CAA(X)、及び核膜構造ラミンA及びB(nuclear membrane struc

50

tural lamins A and B) を含む F T I s の腫瘍抑制効果を仲介できる候補ターゲットとして意味付けられた。これらのタンパク質のファルネシル化を阻害すると、F T I s の抗増殖効果が起こり、T G F R I I、M A P K / E R K、P 1 3 K / A K T 2、F a s (C D 9 5)、N F B、及び V E G F を含む複数の重要なシグナル伝達分子を調節的に調節する (アドナン (Adnane) ら (2000年)、モーガン (Morgan) ら (2001年)、ジャン (Jiang) ら (2000年)、ナ (Na) ら (2004年)、タカダ (Takada) ら (2004年)、及びチャン (Zhang) ら (2002年))。これらのシグナル伝達経路の調節により、細胞の成長、増殖、及びアポトーシスが変更される。従って、F T I s は、複数の細胞事象及び細胞経路に対して複雑な抑制効果を有するであろう。

- 【特許文献1】米国特許第5,242,974号明細書 10
- 【特許文献2】米国特許第5,384,261号明細書
- 【特許文献3】米国特許第5,405,783号明細書
- 【特許文献4】米国特許第5,412,087号明細書
- 【特許文献5】米国特許第5,424,186号明細書
- 【特許文献6】米国特許第5,429,807号明細書
- 【特許文献7】米国特許第5,436,327号明細書
- 【特許文献8】米国特許第5,445,934号明細書
- 【特許文献9】米国特許第5,472,672号明細書
- 【特許文献10】米国特許第5,527,681号明細書
- 【特許文献11】米国特許第5,529,756号明細書 20
- 【特許文献12】米国特許第5,532,128号明細書
- 【特許文献13】米国特許第5,545,531号明細書
- 【特許文献14】米国特許第5,554,501号明細書
- 【特許文献15】米国特許第5,556,752号明細書
- 【特許文献16】米国特許第5,561,071号明細書
- 【特許文献17】米国特許第5,571,639号明細書
- 【特許文献18】米国特許第5,593,839号明細書
- 【特許文献19】米国特許第5,599,695号明細書
- 【特許文献20】米国特許第5,624,711号明細書
- 【特許文献21】米国特許第5,658,734号明細書 30
- 【特許文献22】米国特許第5,700,637号明細書
- 【特許文献23】米国特許第6,004,755号明細書
- 【特許文献24】米国特許第6,133,305号明細書
- 【特許文献25】米国特許第6,218,114号明細書
- 【特許文献26】米国特許第6,218,122号明細書
- 【特許文献27】米国特許第6,271,002号明細書
- 【特許文献28】米国特許第6,271,210号明細書
- 【特許文献29】米国特許第6,284,764号明細書
- 【特許文献30】米国特許第6,306,897号明細書
- 【特許文献31】欧州特許第430,402号明細書 40
- 【非特許文献1】アドナン (Adnane) ら著、「ファルネシルトランスフェラーゼの阻害による T G F I I 型受容体の発現の増大及び T G F に対するヒト癌細胞の応答の促進 (Inhibition of farnesyltransferase increases TGFbeta type II receptor expression and enhances the responsiveness of human cancer cells to TGFbeta)」、オンコジーン (Oncogene)、2000年、19:5525-5533
- 【非特許文献2】アルパートソン (Albertson) 著、E M B O ジャーナル (EMBO Journal)、1984年、3:1227-1234
- 【非特許文献3】アルシナ (Alcina) ら著、「ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 F T I - R 1 1 5 7 7 7 が、認められており、疾患を安定させ、多発性骨髄腫の患者のファルネシル化及び発癌及び/または腫瘍の生存経路を阻害する (Farnesyltransferase in 50

hibitor FTI-R115777 is well tolerated, induces stabilization of disease, and inhibits farnesylation and oncogenic/tumor survival pathways in patients with advanced multiple myeloma)」、ヨーロッパ・ジャーナル・オブ・ヒーマトロジー (European Journal of Haematology)、2003年、70:269

【非特許文献4】ブラナー (Brunner)ら著、「ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤：臨床前検査及び臨床検査の結果の概要 (Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations)」、カンサー・リサーチ (Cancer Research)、2003年、63:5656-5668

【非特許文献5】プリンガー (Bullinger)ら著、「遺伝子発現プロファイリングを用いた成人急性骨髄性白血病における予後サブクラスの同定 (Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia)」、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディスン (New England Journal of Medicine)、2004年、350:1605-1616

【非特許文献6】カー (Carr)ら著、「両親媒性ヘリックス結合モチーフを介してcAMP依存性プロテインキナーゼの調節サブユニットとR115777アンカータンパク質との相互作用が起こる (Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif)」、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、1991年、266:14188-14192

【非特許文献7】チャン (Chang)ら著、「乳癌患者におけるドセタキセルに対する治療応答の予測のための遺伝子プロファイリング (Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer)」、ランセット (Lancet)、2003年、362:362-369

【非特許文献8】チョク (Cheek)ら著、「遺伝子発現の治療特異的变化でヒト白血病細胞におけるin vivo薬物応答を識別する (Treatment-specific changes in gene expression discriminate in vivo drug response in human leukemia cells)」、ネイチャー・ジェネティクス (Nature Genetics)、2003年、34:85-90

【非特許文献9】コートス (Cortes)ら著、「慢性骨髄性白血病及び他の悪性血液疾患におけるファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤R115777の効果 (Efficacy of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in chronic myeloid leukemia and other hematologic malignancies)」、ブラッド (Blood)、2003年、101:1692-1697

【非特許文献10】コックス (Cox)ら著、「ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤：可能性と現実 (Farnesyltransferase inhibitors: promises and realities)」、カレント・オピニオン・イン・ファーマコロジー (Current Opinion in Pharmacol.)、2002年、2:388-393

【非特許文献11】デバルナルディ (Debernardi)ら著、「正常な核型の急性骨髄性白血病のゲノム規模の解析により転座仲介融合事象とは異なるホメオボックス遺伝子発現のユニークなパターンが明らかにされた (Genome-wide analysis of acute myeloid leukemia with normal karyotype reveals a unique pattern of homeobox gene expression distinct from those with translocation-mediated fusion events)」、ジーンズ、クロモソームズ・アンド・カンサー (Genes, Chromosomes and Cancer)、2003年、37:149-158

【非特許文献12】エンド (End)ら著、「in vivo及びin vitroでの選択的ファルネシルタンパク質トランスフェラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の特徴づけ (Characterization of the antitumor effects of the selective farnesyl protein transferase inhibitor R115777 in vivo and in vitro)」、カンサー・リサーチ (Cancer Research)、2001年、61:131-137

【非特許文献13】エステバ (Esteva)ら著、「HER2を過剰発現している転移性乳癌患者に対する毎週のドセタキセル及びハーセプチン (trastuzumab) のフェーズ3試験

(Phase III study of weekly docetaxel and trastuzumab for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer)」、ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (Journal of Clinical Oncology)、2003年、20:1800-1808

【非特許文献14】フォイスナー (Foisner) ら著、「プレクチン (plectin) とラミン B (lamin B) 及びビメンチンとのプロテインキナーゼ A 及びプロテインキナーゼ C 調節性相互作用 (Protein kinase A-and protein kinase C-regulated interaction of plectin with lamin B and Vimentin)」、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、1991年、88:3812-3816

10

【非特許文献15】ポール D . ロビンス (Paul D. Robbins) 編集、「遺伝子治療プロトコルズ (Gene Therapy Protocols)」、ニュージャージー州トトワ (Totowa NJ) のヒューマン・プレス (Human press)、1996年

【非特許文献16】アルソー (Harousseau) ら著、「再発性または難治性の急性骨髄性白血病 (AML) 患者における Z a r n e s t r a (商標) (R115777) : 多施設フェーズ2試験の結果 (ZarnestraTM (R115777) in patients with relapsed or refractory acute myelogenous leukemia (AML) : results of a multicenter phase 2 study)」、ブラッド (Blood)、2003年、102:176a . アブストラクト614

【非特許文献17】ホフマン (Hofmann) ら著、「チロシンキナーゼ阻害剤 STI571 に対するショウジョウバエ染色体陽性急性リンパ芽球性白血病の耐性と遺伝子発現プロファイルとの関係 : 遺伝子発現の研究 (Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor ST1571 and gene-expression profiles: a gene-expression study)」、ランセット (Lancet)、2002年、359:481-486

20

【非特許文献18】ジェンセン (Jensen) ら著、「原発性及び再発性乳癌におけるエストロゲン受容体及び増殖マーカー (Estrogen receptors and proliferation markers in primary and recurrent breast cancer)」、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、2001年、98:15197-15202

30

【非特許文献19】ジャン (Jiang) ら著、「ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤誘導性アポトーシスの重要な標的としてのホスホイノシチド3-OHキナーゼ/AKT2経路 (The phosphoinositide 3-OH kinase/AKT2 pathway as a critical target for farnesyltransferase inhibitor-induced apoptosis)」、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Molecular and Cellular Biology)、2000年、20:139-148

【非特許文献20】ジョンストン (Johnston) ら著、「進行した乳癌におけるファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 R115777 の2つの投薬計画の効果及び耐容性のベースII試験 (Phase II study of the efficacy and tolerability of two dosing regimens of the farnesyltransferase inhibitor, R115777, in advanced breast cancer)」、ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (Journal of Clinical Oncology)、2003年、21:2492-2499

40

【非特許文献21】カリオニエミ (Kallioniemi) 著、「プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、1992年、89:5321-5325

【非特許文献22】カープ (Karp) ら著、「再発性及び難治性急性白血病成人患者におけるファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 R115777 の臨床的及び生物学的活性 : フェーズ1臨床検査質相関性試験 (Clinical and biologic activity of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in adults with refractory and relapsed acute leukemias : a phase 1 clinical-laboratory correlative trial)」、ブラッド (Blood)、200

50

1年、97:3361 3369

【非特許文献23】コールマン (Kohlmann) ら著、「マイクロアレイ技術を用いた急性白血病の分子的特徴づけ (Molecular characterization of acute leukemias by use of microarray technology)」、ジーンズ、クロモソーム・アンド・カンサー (Genes, Chromosomes and Cancer)、2003年、37:396 405

【非特許文献24】カーズロック (Kurzrock) ら著、「脊髄形成異常症候群におけるファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 R115777 のフェーズ2試験 (Phase II study of R115777, a farnesyl transferase inhibitor, in myelodysplastic syndrome)」、ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (Journal of Clinical Oncology)、2004年、22:1287 1292

【非特許文献25】ランセット (Lancet) ら著、「悪性血液疾患におけるファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤: 治療における展望 (Farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies: new horizons in therapy)」、ブラッド (Blood)、2003年、102:3880 3889

【非特許文献26】リ (Li) ら著、「造血特異的 GTP 結合タンパク質 PhoH は GTP 加水分解酵素が不足しており、抑制作用によって他の Rho GTP 加水分解酵素の活性を変化させる (The hematopoiesis-specific GTP-binding protein PhoH is GTPase deficient and modulates activities of other Rho GTPases by an inhibitory function)」、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Molecular and Cellular Biology)、2002年、22:1158 1171

【非特許文献27】リンチ (Lynch) ら著、「ゲフィニチブ (Gefitinib) に対する非小細胞肺癌の反応性の基礎となる上皮成長因子受容体における変異の活性化 (Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to Gefitinib)」、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディスン (New England Journal of Medicine)、2004年、350:2129 2139

【非特許文献28】マックリー (McLean) ら著、「急性骨髄性白血病患者のイマチニブ (imatinib) での治療における細胞遺伝学的応答の薬理ゲノミクス分析 (Pharmacogenomic analysis of cytogenetic response in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib)」、クリニカル・カンサー・リサーチ (Clinical Cancer Research)、2004年、10:155 165

【非特許文献29】クー (Choo) 編集、「in situ ハイブリダイゼーションプロトコルズ (In Situ Hybridization Protocols)」、メソツツ・イン・モレキュラー・バイオロジー (Methods in Molecular Biology)、ニュージャージー州トトワ (Totowa, NJ) のヒューマン・プレス (Humana Press)、第33巻

【非特許文献30】モーガン (Morgan) ら著、「RAS シグナル伝達の阻害による骨髄性白血球細胞系のマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MEK-1/2) の細胞周期依存性の活性化及び成長抑制とアポトーシスの誘導 (Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling)」、ブラッド (Blood)、2001年、97:1823 1834

【非特許文献31】ナ (Na) ら著、「ファルネシルトランスフェラーゼの阻害により、p21 (ras) 依存性 NF- κ B 活性化が抑制され炎症遺伝子発現が下方制御されコラーゲン誘導関節炎が防止される (Inhibition of farnesyltransferase prevents collagen-induced arthritis by down-regulation of inflammatory gene expression through suppression of p21 (ras)-dependent NF- κ B activation)」、ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology)、2004年、173:1276 1283

【非特許文献32】オクツ (Okutsu) ら著、「ゲノム規模 cDNA マイクロアレイ分析によって選択された28の遺伝子の発現レベルに従った急性骨髄性白血病患者の化学的感受性の推測 (Prediction of chemosensitivity for patients with acute myeloid leukemia)

10

20

30

40

50

a, according to expression levels of 28 genes selected by genome-wide complementary DNA microarray analysis)」、モレキュラー・カンサー・セラピューティクス (Molecular Cancer Therapeutics)、2002年、1:1035-1042

【非特許文献33】パエズ (Paez) ら著、「肺癌におけるEGFR変異: ゲフィニチブ (Gefitinib) に対する非小細胞肺癌の反応性の基礎となる上皮成長因子受容体における変異を活性化させるゲフィニチブ治療に対する臨床反応の相関性 (EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to Gefitinib)」、サイエンス (Science)、2004年、304:1497-1500

10

【非特許文献34】パスクアルッチ (Pasqualucci) ら著、「びまん性大細胞性B細胞リンパ腫における複数のプロトオンコジーンの高変異 (Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas)」、ネイチャー (Nature)、2001年、412:341-346

【非特許文献35】ピンケル (Pinkel) 著、「ヒト染色体特異的ライブラリーを用いた蛍光in situハイブリダイゼーション: トリソミー21の検出及び染色体4の転座 (Fluorescence in situ Hybridization with Human Chromosome-Specific Libraries: Detection of Trisomy 21 and Translocations of Chromosome 4)」、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、1988年、85:9138-9142

20

【非特許文献36】ピンケル (Pinkel) ら著、「マイクロアレイに対する競合ゲノムハイブリダイゼーションを用いたDNAコピー数変動の高解像度分析 (High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays)」、ネイチャー・ゲネティクス (Nature Genetics)、1998年、20:207-211

【非特許文献37】ラオ (Rao) ら著、「進行した難治性結腸直腸癌におけるファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤R115777のフェーズ3二重盲検プラセボ対照試験 (Phase III Double-Blind Placebo-Controlled Study of Farnesyl Transferase Inhibitor R115777 in Patients With Refractory Advanced Colorectal Cancer)」、ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (Journal of Clinical Oncology)、2004年、22:3950-3957

30

【非特許文献38】レイス (Reiss) ら著、「Cys'AAXテトラペプチドによる精製されたp21rasファルネシルタンパク質トランスフェラーゼの阻害 (Inhibition of purified p21ras farnesyl: protein transferase by Cys'AAX tetrapeptides)」、セル (Cell)、1990年、62:81-88

【非特許文献39】ロイター (Reuter) ら著、「Rasシグナル伝達経路のターゲッティング: 合理的な機構に基づいた悪性血液疾患の治療 (Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies?)」、ブラッド (Blood)、2000年、96:1655-1669

40

【非特許文献40】サハイ (Sahai) ら著、「RHO-GTP加水分解酵素と癌 (RHO-GTPases and cancer)」、ネイチャー・レビュー・カンサー (Nature Reviews Cancer)、2002年、2:133-142

【非特許文献41】スコッチ (Schoch) ら著、「相互に再編成された急性骨髄性白血病は特殊な遺伝子発現プロファイルで識別できる (Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles)」、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)、2002年、99:10008-10013

50

【非特許文献42】ステルペッチ (Sterpetti) ら著、「形質転換及びターゲティングを調節する延長C末端の切断によるLbc Rho交換因子プロトオンコジーンの活性化 (Activation of the Lbc Rho exchange factor proto-oncogene by truncation of an extended C terminus that regulates transformation and targeting)」、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー (Molecular and Cellular Biology)、1999年、19:1334-1345

【非特許文献43】スターチャン (Starchan) 及びリード (Read) 著、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス (Human Molecular Genetics)、1996年

【非特許文献44】タカダ (Takada) ら著、「タンパク質ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (SCH66336) が、様々な発癌物質及び炎症刺激によって誘導されるNF- κ B活性化を停止し、NF- κ B調節性遺伝子発現が抑制され、アポトーシスが促進される (Protein farnesyltransferase inhibitor (SCH66336) abolishes NF- κ B activation induced by various carcinogens and inflammatory stimuli leading to suppression of NF- κ B-regulated gene expression and up-regulation of apoptosis)」、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、2004年、279:26287-26299

【非特許文献45】テスタ (Testa) ら著、「急性白血病におけるインターロイキン3受容体 (Interleukin-3 receptor in acute leukemia)」、ルキミア (Leukemia)、2004年、18:219-226

【非特許文献46】トーマス (Thomas) ら著、「ファルネシルトランスフェラーゼ (FTI) であるR115777は慢性骨髄性白血病患者に有意な抗白血病活性を有する (R115777, a farnesyl transferase inhibitor (FTI), has significant anti-leukemia activity in patients with chronic myeloid leukemia (CML))」、ブラッド98 (Blood 98)、2001年、

【非特許文献47】ティッセン (Tijssen) 著、「生化学及び分子生物学における検査室手技 (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology)」、ハイブリダイゼーション・ウイズ・ニュークリック・アシッド・プローブス (Hybridization With Nucleic Acid Probes)、第24巻、ニューヨーク州エルスピア (Elsevier, NY)

【非特許文献48】トクソズ (Toksoz) ら著、「シグナル伝達産物に対する異なる相同領域の形質移入によって検出された新規のヒトオンコジーンlbc (Novel human oncogene lbc detected by transfection with distinct homology regions to signal transduction products)」、オンコジーン (Oncogene)、1994年、9:621-628

【非特許文献49】バルク (Valk) ら著、「急性骨髄性白血病の予後に有用な遺伝子発現プロファイル (Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia)」、ニュー・イングランド・ジャーナル・オブ・メディスン (New England Journal of Medicine)、2004年、350:1617-1628

【非特許文献50】ファン・カツエン (Van Cutsem) ら著、「進行膵臓癌におけるゲムシタピン (gemcitabine) とプラセボに対するゲムシタピンとティピファニブのフェーズ3試験 (Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer)」、ジャーナル・オブ・クリニカル・オンコロジー (Journal of Clinical Oncology)、2004年、22:1430-1438

【非特許文献51】ヤギ (Yagi) ら著、「小児AMLの予後に関連した遺伝子発現シグネチャの同定 (Identification of a gene expression signature associated with pediatric AML prognosis)」、ブラッド (Blood)、2003年、102:1849-1856

【非特許文献52】チャン (Zhang) ら著、「ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤によるFas遺伝子発現のRas仲介阻害の逆転 (Farnesyltransferase inhibitors reverse Ras-mediated inhibition of Fas gene expression)」、カンサー・リサーチ (Cancer Research)、2002年、62:450-458

【非特許文献53】チェン (Zheng) ら著、「lbcオンコジーン的作用における低分子

量 G T P 結合タンパク質の直接関与 (Direct involvement of the small GTP-binding protein Rho in lbc oncogene function)」、ジャーナル・オブ・バイオリジカル・ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)、1995年、270:9031-9034

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

現在は、このような患者の状態を決定する方法や、このような患者の全生存を予測する方法が存在しない。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、急性骨髄性白血病患者の予後の予測に1または複数の遺伝子シグネチャを用いる方法である。このような遺伝子シグネチャは、薬物治療の種類によって単独または組み合わせて用いることができる。

【0011】

本発明は、急性骨髄性白血病 (AML) 患者の予後 (生存 / 転帰) を評価する方法を含む。この方法は、患者から生体サンプルを採取するステップと、(i) 配列番号1または5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1または5 22に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子から選択される遺伝子の生体サンプルにおける発現レベルを測定するステップとを含み、所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い遺伝子発現レベルが A M L の予後を示す。

【0012】

本発明は、AML患者の状態を決定する方法を含む。この方法は、患者から生体サンプルを採取するステップと、(i) 配列番号1または5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1または5 22に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子から選択される遺伝子の生体サンプルにおける発現レベルを測定するステップとを含み、所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い遺伝子発現レベルが A M L の状態を示す。

【0013】

本発明は、急性骨髄性白血病 (AML) 患者の治療プロトコルを決定する方法を含む。この方法は、前記患者から生体サンプルを採取するステップと、(i) 配列番号1または5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1または5 22に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子から選択される遺伝子の生体サンプルにおける発現レベルを測定するステップとを含み、所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い遺伝子発現レベルが、治療に対して患者が応答する可能性を十分に示し、医師が適切な治療の程度及び種類を決定することができる。

【0014】

本発明は、急性骨髄性白血病 (AML) 患者を治療する方法を含む。この方法は、患者から生体サンプルを採取するステップと、(i) 配列番号1または5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1または5 22に一致する p s i d 番号から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子から選択される遺伝子の生体サンプルにおける発現レベルを測定するステップであって、所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い遺伝子発現レベルが、患者が治療に応答する可能性を示す、前記ステップと、患者が治療に応答するようであれば、その患者をアジュバント療法で治療するステップとを含む。

【0015】

本発明は、急性骨髄性白血病 (AML) 患者の予後患者レポートを作成する方法を含む。この方法は、患者から生体サンプルを採取するステップ (a) と、その生体サンプルの

10

20

30

40

50

遺伝子発現を測定するステップ (b) と、ステップ (b) の結果に再発ハザードスコアを適用するステップと、ステップ (c) で得た結果を用いてレポートを作成するステップとを含む。

【 0 0 1 6 】

本発明は、配列番号 1 2 2、または表 7 に示されている配列番号 1 及び 5 2 2 に一致する p s i d 番号から選択される少なくとも 1 つのプローブセットを含む組成物を含む。

【 0 0 1 7 】

本発明は、生体サンプルで急性骨髄性白血病の予後を決定するためのアッセイを行うためのキットを含む。このキットは、(i) 配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または (i i) 表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を検出するための物質を含む。

10

【 0 0 1 8 】

本発明は、生体サンプルで急性骨髄性白血病の予後を評価するための製品を含む。この方法は、(i) 配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または (i i) 表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を検出するための物質を含む。

20

【 0 0 1 9 】

本発明は、請求項 1、2、3、または 4 の方法を実施するためのマイクロアレイまたは遺伝子チップを含む。

【 0 0 2 0 】

このマイクロアレイは、(i) 配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または (i i) 表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を含み、この組合せが生体サンプルで急性骨髄性白血病の状態または予後を特徴付けるのに十分である。

30

【 0 0 2 1 】

本発明は、(i) 配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または (i i) 表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を含み、この組合せが生体サンプルで急性骨髄性白血病の状態または予後を特徴付けるのに十分である診断 / 予後ポートフォリオを含む。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 2 】

薬物治療の種類によって単独または組み合わせて用いることができる 1 または複数の遺伝子シグネチャを用いた、急性骨髄性白血病患者の予後を予測する方法が提供される。

40

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 3 】

新たに診断された A M L で予後値を有すると記載した遺伝子のサブセットが、分子標的療法 (Z a r n e s t r a (登録商標)) で治療される再発性及び難治性の A M L 患者に有用であることをここに示す。現在、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤 (Z a r n e s t r a (登録商標) など) に対する応答を予測する方法が存在しない。また、A M L 患者の予後を理解するための現在の方法は、共に臨床結果を決定するには理想的なマーカーではない組織学的サブタイプ及び核型分析に限られている。現在のシグネチャは、予後

50

リスクの高い患者と低い患者に的確に階層分類できるため、その利用がこれらの従来の技術まで拡大している。

【0024】

米国特許出願第10/883,436号で、3遺伝子クラシファイア(AHR、AKAP13、及びMINA53を含む)が低い誤差率でティピファニブ(Zarnestra(登録商標)、R115777)に対する再発性及び難治性AML患者の応答を予測することが実証されている。これは、LOOCV(leave-five-out cross validation)でも確認された。追加の遺伝子が加えられると誤差率が上昇するため、追加の遺伝子がクラシファイアにノイズを導入したと考えられる。3遺伝子クラシファイアの場合、LOOCVにより、感度が86%、特異性が70%、全体の診断精度が74%であることが示された。 Kaplan-Meier分析(Kaplan-Meier analysis)でも、予測された応答者群と非応答者群との間で生存に有意差が示された。更に、誤って分類された非応答者群と正確に分類された非応答者群を比較すると、誤って分類された非応答者群の方が全体的に良好な生存が示された。

10

【0025】

Zarnestra(登録商標)は、*in vitro*及び*in vivo*の両方で様々なヒト腫瘍細胞系の増殖を抑制することが分かっている経口投与できる非ペプチド部分競合ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤(FTI)である(エンド(End)ら(2001年)、コックス(Cox)ら(2002年))。ティピファニブのフェーズ1臨床試験で、再発性または難治性急性骨髄性白血病患者で32%の応答率が実証された(カープ(Karp)ら(2001年))。骨髄異形成症候群(MDS)(カーズロック(Kurzrock)ら(2004年))、多発性骨髄腫(MM)(アルシナ(Alsin)ら(2003年))、及び慢性骨髄性白血病(CML)(コートス(Cortes)ら(2003年))の初期の臨床試験でも作用が確認された。完全な緩解は、骨髄芽細胞が5%未満で、好中球数が1000/ μ L以上、血小板数が100,000/ μ L未満、そして髄外疾患が存在しないと定義する。タンパク質ファルネシル化の阻害によりFTIsが機能することが明らかであるが、悪性造血疾患におけるティピファニブの抗腫瘍効果にどの遺伝子が関与しているのかが未だ分かっていない。マイクロアレイ技術は、数千の遺伝子の安定状態のmRNAレベルの同時測定を可能とするため、FTI作用に相関する遺伝子の同定及び遺伝子経路の強力なツールである。従って、再発性及び難治性AMLにおけるティピファニブのフェーズ2臨床試験で全遺伝子発現の監視をして、悪性造血疾患におけるこのFTIに対する応答を予測する遺伝子を同定した。

20

30

【0026】

本発明は、患者から生体サンプルを採取するステップと、(i)配列番号1または522に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1または522に一致するpsid番号から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子から選択される遺伝子のサンプルにおける発現レベルを測定するステップを含み、所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い遺伝子発現レベルがAMLの予後を示す、AML患者の予後(生存/結果)を評価する方法を含む。

【0027】

本発明は、患者から生体サンプルを採取するステップと、(i)配列番号1または522に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1または522に一致するpsid番号から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子から選択される遺伝子のサンプルにおける発現レベルを測定するステップを含み、所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い遺伝子発現レベルがAMLの状態を示す、AML患者の状態を決定する方法を含む。

40

【0028】

本発明は、患者から生体サンプルを採取するステップと、(i)配列番号1または522に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1または522に一致するpsid番号から選択されるプローブのセットによって認識される、mRNAをコード

50

する遺伝子から選択される遺伝子のサンプルにおける発現レベルを測定するステップを含み、所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い遺伝子発現レベルが、患者が治療に
10 応答する可能性を十分に示し、医師が適切な治療の種類及び程度を決定することができる急性骨髄性白血病（AML）患者の治療プロトコルを決定する方法を含む。

【0029】

本発明は、患者から生体サンプルを採取するステップと、（i）配列番号1または5
22に一致する、または（ii）表7に示されている配列番号1または5 22に一致す
るpsid番号から選択されるプローブのセットによって認識される、mRNAをコード
する遺伝子から選択される遺伝子のサンプルにおける発現レベルを測定するステップであ
って、所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い遺伝子発現レベルが患者が治療に
10 応答する可能性を示す、前記ステップと、患者が応答しそうな場合に患者をアジュバント療
法で治療する急性骨髄性白血病（AML）患者を治療する方法を含む。

【0030】

上記した方法では、再発性または難治性のAML患者、非再発性または非難治性のAML
患者、治療を受けたまたは治療を受けていないAML患者が含まれる。一実施形態では
、患者は非再発性または非難治性AML患者であり、この方法により、患者がFTIでの
治療に
10 応答するか否かを決定することができる。

【0031】

上記した方法では、配列番号は、好ましくは配列番号1、5、及び6、または配列番号
1である。この方法は更に、サンプルで恒常的に発現する少なくとも1種類の遺伝子の発
20 現レベルの測定を含むことができる。

【0032】

上記した方法では、発現パターンの比較は、好ましくはCox比例ハザード分析を用い
てパターン認識法で行うことができる。所定のカットオフレベルは、好ましくは、良性細
胞または正常組織に対してサンプルで少なくとも1.5倍の過剰発現または1.5分の1
の過少発現である。所定のカットオフレベルは、好ましくは、良性細胞または正常組織
に対して転移性細胞を有するサンプルで少なくとも統計的に有意なp値の過剰発現である。
好ましくは、p値は0.05未満である。

【0033】

上記した方法では、遺伝子発現は、限定するものではないが、cDNAアレイまたはオリ
30 ゴヌクレオチドアレイを含むマイクロアレイまたは遺伝子チップで測定することができ
る。このようなマイクロアレイまたは遺伝子チップは、1または複数の内部コントロール
試薬も含むことができる。遺伝子発現はまた、サンプルから抽出したRNAのPCR（ポ
リメラーゼ連鎖反応）によって核酸を増幅して決定することもできる。一実施形態では、
PCRは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）であって、1または複数の内部
コントロール試薬も含むことができる。遺伝子発現はまた、目的のタンパク質に特異的な
抗体などの遺伝子によってコードされるタンパク質を測定または検出して検出すること
もできる。遺伝子発現は更に、DNAの増幅、メチル化、突然変異、及び対立遺伝子変異体
などの遺伝子の特性を測定して検出することもできる。

【0034】

本発明は、患者から生体サンプルを採取するステップ（a）、そのサンプルの遺伝子発
40 現を測定するステップ（b）、ステップ（c）の結果に対して再発ハザードスコアを適用
するステップ（c）、ステップ（c）で得た結果を用いて患者予後レポートを作成するス
テップを含む急性骨髄性白血病（AML）患者予後患者レポートを作成する方法を含む。
このレポートはまた、患者の転帰の評価及び/または患者集団に対するリスクの可能性を
含むことができる。本発明は更に、この方法で作成されたレポートも含む。

【0035】

このようなレポートは、再発性または難治性のAML患者、非再発性または非難治性の
50 AML患者、治療を受けたまたは治療を受けていないAML患者に対して作成するこ
とができる。一実施形態では、患者は、非再発性または非難治性のAML患者であり、この方

法により、患者が F T I での治療に应答するか否かを決定することができる。

【0036】

本発明は、配列番号 1 2 2、または表 7 に示されている配列番号 1 及び 5 2 に一致する p s i d 番号から選択される少なくとも 1 つのプロープセットを含む組成物を含む。

【0037】

本発明は、生体サンプルで急性骨髄性白血病の予後を決定するためのアッセイを行うためのキットを含む。このキットは、(i) 配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または (i i) 表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号から選択されるプロープセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を検出するための物質を含む。好ましくは、配列番号 1、5、及び 6、または配列番号 1 である。このキットは更に、限定するものではないが、マイクロアレイ分析を行うための取扱説明書、試薬、及び前記核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部をアッセイする培地を含む任意の追加物を含むことができる。

10

【0038】

本発明は、生体サンプルで急性骨髄性白血病の予後を評価するための製品を含む。この製品は、(i) 配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または (i i) 表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプロープセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を検出するための物質を含む。好ましくは、配列番号 1、5、及び 6、または配列番号 1 である。この製品は更に、限定するものではないが、マイクロアレイ分析を行うための取扱説明書、試薬、及び前記核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部をアッセイする培地を含む任意の追加物を含むことができる。

20

【0039】

本発明は、本発明に含まれる方法を実施するためのマイクロアレイまたは遺伝子チップを含む。このマイクロアレイは、(i) 配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または (i i) 表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプロープセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を含む。この組合せは、生体サンプルで急性骨髄性白血病の状態または予後を決定するのに十分である。マイクロアレイは、少なくとも 1 . 5 倍の過剰発現または 1 . 5 分の 1 の過少発現の測定値または特徴を提供するのが好ましい。マイクロアレイは、統計的に有意な p 値の過剰発現または過少発現での測定値を提供するのが好ましい。好ましくは、p 値は 0 . 0 5 未満である。マイクロアレイは、限定するものではないが、c D N A アレイまたはオリゴヌクレオチドアレイを含む当分野で周知の任意のマイクロアレイとすることができ、更に他のヌクレオチド配列及び 1 または複数の内部コントロール試薬を含むことができる。

30

【0040】

本発明は、(i) 配列番号 1 または 5 2 2 に一致する、または (i i) 表 7 に示されている配列番号 1 または 5 2 2 に一致する p s i d 番号からなる群から選択されるプロープセットによって認識される、m R N A をコードする遺伝子の組合せでの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を含む診断 / 予後ポートフォリオを含む。この組合せは、生体サンプルで急性骨髄性白血病の状態または予後を決定するのに十分である。このポートフォリオは、少なくとも 1 . 5 倍の過剰発現または 1 . 5 分の 1 の過少発現の測定値または特徴を提供するのが好ましい。このポートフォリオは、統計的に有意な p 値の過剰発現または過少発現の測定値を提供するのが好ましい。好ましくは、p 値は、0 . 0 5 未満である。

40

【0041】

タンパク質またはペプチド (遺伝子) を発現する可能性のあるゲノム内の核酸配列の存

50

在だけでは、タンパク質またはペプチドが所定の細胞で発現するか否かを決定できない。タンパク質またはペプチドを発現可能でRNAを転写可能な所定の遺伝子が、実際にタンパク質またはペプチドを発現しRNAを転写するか否か、その場合の発現や転写がどの程度であるかは、様々な複雑な因子によって決まる。しかしながら、遺伝子発現のアッセイにより、薬物や他の治療物質の導入などの所定の刺激に対する細胞内応答についての有用な情報を得ることができる。遺伝子がどの程度活性であるかまたは不活性であるかを、このような遺伝子発現プロファイルで相対的に確認することができる。場合によっては、分子マーカーの存在は、それ自体で、または遺伝子発現情報を用いて、治療の有効性についての有用な情報を得ることができる。本発明の遺伝子発現プロファイル及び遺伝子マーカーを用いてAML患者を識別し治療することができる。

10

【0042】

悪性造血疾患を含む癌は通常、様々な遺伝子の突然変異から起こる。同じ種類の癌は、同じ種類の癌をもつ別の患者の突然変異に一致するまたは異なる1または複数の突然変異で起こり得る。同じ癌の基礎をなす複数の分子機構が頻繁に存在することが、ある治療がある患者には効くが同じ種類の癌をもつ別の患者には必ずしも効かない患者がいることに一致している事実がある。更に、診断の観点から、転座、欠失、またはSNPsなどの特定の突然変異の存在は強力な関連性を有し得る。場合によっては、このような分子マーカーは、それ自体が、診断、予後、または治療応答の決定に有用な指標である。これは、特に、分子の突然変異が特定の治療に対する応答に関連し得る場合に事実である。

【0043】

LBCオンコジーンまたはAKAP13は、染色体15qのLBCプロトオンコジーン（配列番号1）と染色体7qを起源とする非関連配列の融合から得たキメラである。この配列のC末端でのプロトオンコジーンの切断で、遺伝子が形質転換する能力を獲得する。この切断は、転座以外の機構からも起こり得る。例えば、異常なスプライシングで、C末端が切断されたRNA転写物が得られる。この遺伝子は、mRNAやタンパク質などの多数の発現産物を有する。LBCオンコジーンが機能する正確な仕組みは完全には理解できていないが、LBCオンコジーンが骨格筋、心臓、肺、前立腺、卵巣、小腸、及び造血細胞を含む広範な組織に存在できることは明らかである。オンコジーンが存在が明らかな組織（存在しなくても良い）を起源とする癌の治療は本発明の範囲内である。

20

【0044】

遺伝子が切断により得られる産物であり、かつ遺伝子が認識可能な発現産物を発現するため、本発明のアッセイの形式化には高い柔軟性が存在する。この遺伝子またはその産物の非存在を利用できるだけでなく、この遺伝子の発現の変動も検出することができる。従って、遺伝子発現プロファイルはこの遺伝子を含むことができる。この遺伝子の非存在または発現の変動を、以前に治療を受けた患者及び受けていない患者の予後及び状態の指標として用いるのが好ましい。

30

【0045】

任意の好適な検出方法を用いて、分子マーカーとしてLBCオンコジーンを識別することができる。LBCオンコジーンが存在を検出するのに有用な方法には、限定するものではないが、一本鎖DNA高次構造多型法、化学及び熱変性濃度勾配解析、化学的及び酵素的切断法、質量分析法、RFLP及び対立遺伝子特異的増幅、レシオメトリックPCR、ビーズ及びマイクロアレイを用いたシステム、in situハイブリダイゼーション、ヘテロデュプレックス分析、マイクロアレイ解析、ELISA、Western、蛍光活性化細胞選別法(FACS)、抗体を用いた方法、メチル化を用いたPCR、及びSNP検出を含め、既知の突然変異遺伝子または配列を検出するための任意の方法が含まれる。

40

【0046】

LBCオンコジーンが存在または非存在を検出するための最も好適な方法はPCRを用いた方法である。この方法では、まず、通常のサンプル調製法に従って患者から細胞を採取する。末梢血サンプルまたは骨髄サンプルが好ましい。次いで、RNAを一般に受け入れられている方法に従って抽出し、次の要領で増幅する。標的配列を、例えば、250n

50

M プライマーと 250 nM TaqMan (登録商標) プローブを用いて ABI TaqMan (登録商標) 緩衝液で増幅させる。50 で 2 分間、95 で 10 分間のサーマルサイクルを行い、次いで 95 で 15 分間と 62 で 1 分間のサイクルを 50 回行った。プライマーとプローブの例を表 1 に示す。

【0047】

この方法は、サンプル中に存在する LBC 転写物の量を測定する。測定した量を、同じサンプルを用いて HPR T などの内在性コントロール遺伝子を増幅する同様の RT PCR 法で標準化することができる。

【0048】

【表 1】

表 1

名称	配列(5'-3')	配列番号
AKAP13 順方向プライマー	GGTCAGATGTTTGCCAAGGAA	2
AKAP13 逆方向プライマー	TCTTCAGAAACACACTCCCATCAC	3
AKAP13 TaqMan (登録商標) プローブ	TGAAACGGAAGAAGCTTGTA	4

10

【0049】

LBC オンコジーンの有存在または非存在の別の決定方法では RNA 転写物の長さをアッセイする。LBC オンコジーンは 3' 転座を有するため、転写長さは LBC プロトオンコジーン転写物よりも短いはずである。転写物のサイズを決定するために、プロト LBC 転写物及びオンコ LBC 転写物の両方に対して相同な順方向プライマー (例えば、表 1 の AKAP 順方向プライマー) を、RNA 転写物のユニバーサルポリ A 尾部に相同な逆方向プライマーと共に用いる。好ましくは、初めの cDNA の合成は、ポリ A 配列の追加の固有の配列タグ 3' を含み、PCR 反応に追加の特異性を付与する。

20

【0050】

ゲノムの転座を測定したら、LBC オンコジーンに特異的な PCR プライマー及び標準的な方法を用いたゲノム DNA を単離することを含む当分野で周知の任意の方法を用いることができる。例えば、オンコ LBC ジーン及びプロト LBC ジーンの両方に対して相同な順方向プライマーを上記したポリ A 配列と共に用いることができる。別法では、逆方向プライマーを 3' 転座配列に相同とすることができる。読み出しは、オンコジーンの有存在がプロトオンコジーンよりも短い産物に一致する場合はアンプリコンのサイズであり、オンコ LBC 特異的アンプリコンが存在したり存在しなかったりする。

30

【0051】

細胞の LBC オンコジーンの状態のアッセイでも、免疫組織化学法 (IHC) などの方法を用いて診断のために正常 / 異常組織の分布を決定することができる。当分野で周知の任意の方法を用いることができ、例えば、LBC タンパク質の抗体を、IHC による検査のために調製した新鮮凍結パラフィン埋没組織ブロック及びホルマリン固定パラフィン埋没組織ブロックの両方と共に用いることができる。それぞれの組織ブロックは、50 mg の残留微粉腫瘍から構成することができる。

40

【0052】

簡単に述べると、凍結部分は、室温で小さなプラスチックカプセル内のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で凍結微粉腫瘍 50 ng を再水和し、遠心分離して粒子をペレットにし、これらを粘性包埋剤 (OCT) 中で再懸濁し、カプセルを反転させ遠心分離して再びペレットにし、-70 のイソペンタン中でスナップ凍結し、プラスチックカプセルを切断して凍結した柱状組織を取り出し、低温マイクロトームチャック上にこの柱状組織を固定し、無傷の腫瘍組織を含む 25 ~ 50 の連続した部分に切断して調製することができる。

50

【0053】

永久部分は、同様の方法で調製することができる。具体的には、サンプル50mgをプラスチック微量遠心管内で再水和し、ペレットにし、4時間の固定ために10%ホルマリン中で再懸濁し、洗浄してペレットにし、暖かい2.5%寒天内で再懸濁し、ペレットにし、氷水で冷却して寒天を固め、組織/寒天ブロックを微量遠心管から取り出し、そのブロックをパラフィン内に浸潤させて包埋し、最大50の連続した永久部分に切断する。

【0054】

IHCアッセイの場合、これらの部分を、PBSまたは他の阻害剤に溶けた3%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む阻害液で覆う。阻害剤は、非特異的な血清または粉乳を含む。阻害は、室温で1時間行うことができる。抗LBCタンパク質抗体を、3%BSA、0.1%Triton X(商標) 100、及びトクチルフェノキシポリエトキシエタノールで希釈する(1:100の比率)。このサンプル部分に抗体溶液を覆って4で16時間放置する。このような時間及び温度条件は、選択した抗体及び検査する物質によって異なる。最適な条件は経験的に決められる。次いで、抗体で処置した部分をPBS中で各15分間の洗浄を3回行い、結合しなかった抗体を除去し、1:2000の希釈で3%BSAと二次抗体を含むPBSで覆う。この二次抗体は、カラシペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、フルオレセインイソチオシアネート、または他の好適な酵素などの発色酵素に結合することができる。別法では、二次抗体をビオチンに結合させて、これを発色団標識アビジンと共に用いることができる。

【0055】

遺伝子の存在を検出する他の方法の例には、*in situ*ハイブリダイゼーションを用いる方法がある。通常は、*in situ*ハイブリダイゼーションは、(1)分析する組織または生体構造の固定、(2)標的DNAにアクセスしやすくして非特異的結合を減少させる生体構造のプレハイブリダイゼーション処理、(3)核酸混合物と生体構造または組織中の核酸のハイブリダイゼーション、(4)ハイブリダイゼーションで結合しなかった核酸断片を除去するためのハイブリダイゼーション後の洗浄、(5)ハイブリダイズした核酸断片の検出を含む。各ステップで用いる試薬及び用いる条件は適用例によって異なる。

【0056】

この場合、遺伝子にハイブリダイズ可能な(その染色体座で)少なくとも1種類の検出可能な核酸プローブを含むハイブリダイゼーション溶液を、ハイブリダイゼーション条件下で細胞に接触させる。次いで、全てのハイブリダイゼーションを検出し、正常細胞またはコントロール細胞の所定のハイブリダイゼーションパターンと比較する。プローブは動原体プローブであるのが好ましい。このようなプローブは、多数の会社(例えば、バイシス社(Visys Inc.)、ドナーズ・グループIL(Downers Grove, IL))が販売している。好適な実施形態では、ハイブリダイゼーション溶液は、キメラを構成する配列の転座に一致する染色体上のある領域(例えば、15q24 25)に特異的な複数のプローブを含む。

【0057】

本発明の方法に適したハイブリダイゼーションプロトコルは、例えば、アルバートソン(Albertson)(1984年);ピンケル(Pinkel)(1988年);欧州特許第430,402号;「メソツズ・イン・モレキュラー・バイオロジー(Methods in Molecular Biology)」第33巻;「イン・シツ・ハイブリダイゼーション・プロトコルズ(In Situ Hybridization Protocols)」、クー(Choo)編集、ヒューマナ・プレス(Humana Press)、ニュージャージー州トトワ(Totowa)、(1994年)などを参照されたい。好適な一実施形態では、ピンケル(Pinkel)ら(1988年)またはカリオニエミ(Kallioniemi)(1992年)のハイブリダイゼーションプロトコルが用いられる。ハイブリダイゼーション条件を最適化する方法は良く知られている(例えば、ティッセン(Tijssen)著(1993年)、「ラボラトリー・テクニクス・イン・バイオケミストリー・アンド・モレキュラー・バイオロジー(Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular

10

20

30

40

50

Biology)」、第24巻、「核酸プローブを用いたハイブリダイゼーション (Hybridization With Nucleic Acid Probes)」、ニューヨーク州のエルスビア (Elsevier)。

【0058】

好適な実施形態では、背景信号を軽減するために、ハイブリダイゼーションに界面活性剤 (例えば、C T A B) または遮断剤 (例えば、sperm DNA、cot 1 DNA など) を用いて非特異的な結合を減少させる。ハイブリダイゼーションは、約 0.1 mg/ml ~ 0.5 mg/ml の DNA (例えば、cot 1 DNA) の存在下で実施するのが好ましい。

【0059】

プローブは、合成や生物宿主での成長を含め、当分野で周知の任意の方法で調製することができる。合成方法には、限定するものではないが、オリゴヌクレオチド合成、リボプローブ、及び PCR が含まれる。

【0060】

プローブは、当分野で周知の方法で検出可能なマーカーで標識することができる。プローブを標識する方法には、ランダムプライミング、エンドラベリング、PCR、及びニックトランスレーションが含まれる。酵素標識は、核酸ポリメラーゼ、3種類の無標識ヌクレオチド、及び第4のヌクレオチドの存在下で実施する。第4のヌクレオチドには、直接標識が付けられている (標識を取り付けるためのリンカーアームを含む)、或いは標識された結合分子が結合できるハプテンまたは他の分子が取り付けられている。好適な直接標識には、³²P、³H、及び³⁵Sなどの放射線標識や、フルオレセイン、テキサスレッド、A M C A ブルー、ルシファーイエロー、及びローダミンなどの蛍光マーカーなどの非放射線標識や、可視光で検出可能なシアニン色素、及び酵素類などが含まれる。標識はまた、亜硫酸水素仲介アミド基転移によって DNA プローブ内に化学的に組み込む、或いはオリゴヌクレオチド合成の際に直接組み込むことができる。

【0061】

蛍光マーカーは、プローブ内に組み込まれた活性化されたリンカーアームでヌクレオチドに容易に付着させることができる。プローブは、上記した方法で間接的に標識することができる。具体的には、ハプテンまたはビオチンやジゴキシゲニン (digoxigenin) などの他の分子に共有結合したヌクレオチドを組み込み、標識抗体がハプテンまたは他の分子にハイブリダイズするようにサンドイッチハイブリダイゼーションを実施する。ビオチンの場合は、検出可能な標識に結合したアビジンを用いる。抗体及びアビジンは、蛍光マーカーや、アルカリホスファターゼまたはカラシペルオキシダーゼなどの酵素マーカーに結合させて検出可能にできる。結合したアビジンや抗体は、ベクター・ラボラトリーズ (Vector Laboratories) (カリフォルニア州バーリングラム) やベーリンガー・マンハイム (Boehringer Mannheim) (インディアナ州インディアナポリス) などの会社が販売している。

【0062】

酵素は、酵素の基質を用意して比色反応で検出することができる。様々な基質が存在する場合、様々な色が反応で生成され、これらの色を可視化して複数のプローブを別々に検出することができる。当分野で周知の任意の基質を用いることができる。アルカリホスファターゼの好適な基質の例として、5-プロモクロロ-3-インドリルリン酸 (BCIP) 及びニトロブルー-テトラゾリウム (NBT) を挙げるることができる。カラシペルオキシダーゼの好適な基質はジアミノ安息香酸 (DAB) である。

【0063】

本発明の *in situ* ハイブリダイゼーション法に使用するのに適した蛍光標識プローブは、150 ~ 500ヌクレオチドの範囲の長さであるのが好ましい。プローブは、DNA または RNA とすることができるが、DNA が好ましい。

【0064】

検出可能なプローブと細胞のハイブリダイゼーションは、0.1 ng/μl ~ 500 ng/μl、好ましくは 5 ng/μl ~ 250 ng/μl の濃度のプローブで実施する。ハ

10

20

30

40

50

イブリダイゼーション混合物は、ホルムアミドなどの変性剤を含むのが好ましい。一般に、イブリダイゼーションは、25 ~ 45、好ましくは32 ~ 40、最も好ましくは37 ~ 38で実施する。イブリダイゼーションに必要な時間は、約0.25時間 ~ 9.6時間、より好ましくは1時間 ~ 7.2時間、最も好ましくは4時間 ~ 2.4時間である。イブリダイゼーション時間は、hnRNP結合タンパク質、トリアルキルアンモニウム塩、及びラクタムなどの促進物質を含むことができるイブリダイゼーション溶液成分及びプローブの濃度によって異なる。次いで、スライドガラスを、ホルムアミドなどの変性剤を含み塩化ナトリウムの濃度を下げる溶液、または結合していないプローブまたは不適正塩基対を成したプローブを除去する任意の溶液で洗浄する。

【0065】

塩の温度及び濃度は、所望のイブリダイゼーションのストリンジェンシーによって異なる。例えば、高いストリンジェンシーの洗浄は42 ~ 68で実施し、中程度のストリンジェンシーの洗浄は37 ~ 55で実施し、低いストリンジェンシーの洗浄は30 ~ 37で実施することができる。高いストリンジェンシーの洗浄の塩濃度は、0.5 ~ 1 x SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム)、中程度のストリンジェンシーの洗浄の塩濃度は、1 ~ 4 x SSC、低いストリンジェンシーの洗浄の塩濃度は、2 ~ 6 x SSCとすることができる。

【0066】

必要な場合は、検出のためのインキュベーションは、23 ~ 42、より好ましくは25 ~ 38、最も好ましくは37 ~ 38の湿室で行うのが好ましい。標識した試薬は、BSAなどの遮断試薬及び脱脂粉乳などを含む溶液で希釈するのが好ましい。希釈の程度は、1:10 ~ 1:10,000、より好ましくは1:50 ~ 1:5,000、最も好ましくは1:100 ~ 1:1,000である。スライドガラスまたは他の固体支持物は、各インキュベーションステップの間に洗浄して過剰な試薬を除去する。

【0067】

次いで、可視検出マーカースの場合は、スライドガラスを顕微鏡に取り付けて分析し、放射線マーカースの場合は、スライドガラスをオートラジオグラフィフィルムにさらして分析する。蛍光マーカースの場合は、スライドガラスを、退色防止試薬を含む溶液内に取り付け、蛍光顕微鏡で分析するのが好ましい。検出精度を上げるために、複数の核を検査することができる。

【0068】

加えて、LBCオンコジーンの発現産物のアッセイを用いて、LBCオンコジーンの突然変異が起こったか否かを決定することができる。このようなアッセイは、最も好ましくはイムノアッセイである。最も単純で直感的なイムノアッセイは結合アッセイである。ある好適なイムノアッセイは、当分野で周知の様々なタイプの酵素結合免疫吸着法(ELISAs)及びラジオイムノアッセイ(RIA)である。組織部分を用いるIHC検出も、in situイブリダイゼーション及びエンザイムイムノアッセイに特に有用である。

【0069】

例示的なELISAでは、タンパク質特異的抗体を、ポリスチレンマイクロタイタープレート(ウエル)などのタンパク質親和性を有する選択された表面に固定する。次いで、臨床サンプルなどの所望の抗原を含む検査組成物をウエルに添加する。結合した後に洗浄して非特異的に結合した免疫複合体を除去し、結合した抗原を検出することができる。検出は通常、検出可能な標識に結合した所望の抗原に特異的な別の抗体を添加して行うことができる。このタイプのELISAは単に「サンドイッチELISA」である。検出はまた、所望の抗原に特異的な第2の抗体を添加し、次いで第2の抗体に結合親和性を有する検出可能な標識に結合した第3の抗体を添加して行うことができる。

【0070】

様々なELISA法が知られている。このようなある変更例では、所望の抗原を含むサンプルをウエルの表面に固定してから本発明の抗体に接触させる。結合した後に適切に洗

10

20

30

40

50

浄し、結合した免疫複合体を検出する。初めの抗原特異的抗体が検出可能な標識に結合した場合は、免疫複合体を直接検出することができる。ここでも、免疫複合体は、第1の抗原に特異的な抗体に結合親和性を有する、検出可能な標識に結合された第2の抗体を用いて検出することができる。

【0071】

A M Lの予後または状態を決定するために遺伝子発現を検出する本発明の一実施形態では、遺伝子発現のポートフォリオを使用するのが最も好ましい。遺伝子のポートフォリオは、グループ分けされた遺伝子のセットであって、これらについて得た発現情報が、診断、予後、または治療の選択などの臨床的に適切な判断を下す基礎となる。このような場合、遺伝子発現ポートフォリオは、A M L患者の治療の判断に役立つように作成することができる。

10

【0072】

遺伝子発現プロファイル(適切な生物学的経路の詳細に説明できる方法を含む)を作成するための好適な方法では、タンパク質またはペプチドをコードする或いはRNAを転写することができる遺伝子によって産生されたRNAの量を決定する。これは、逆転写PCR(RT PCR)、競合的RT PCR、リアルタイムRT PCR、ディファレンシャル・ディスプレイRT PCR、ノーザンブロット解析、及び他の関連した試験で行うのが最も好ましい。このような方法は個々のPCR反応を用いて行うことが可能であるが、mRNAから得たコピーDNA(cDNA)またはコピーRNA(cRNA)を増幅させ、これをマイクロアレイで分析するのが好ましい。様々な異なったアレイの構造及び製造方法が当業者に周知であり、米国特許第5,445,934号、同第5,532,128号、同第5,556,752号、同第5,242,974号、同第5,384,261号、同第5,405,783号、同第5,412,087号、同第5,424,186号、同第5,429,807号、同第5,436,327号、同第5,472,672号、同第5,527,681号、同第5,529,756号、同第5,545,531号、同第5,554,501号、同第5,561,071号、同第5,571,639号、同第5,593,839号、同第5,599,695号、同第5,624,711号、同第5,658,734号、及び同第5,700,637号などの米国特許に開示されている。

20

【0073】

マイクロアレイ法は、同時に数千の遺伝子の安定状態のmRNAレベルを測定できるため、A M L患者の遺伝子発現プロファイルを確認するための強力なツールである。2つのマイクロアレイ法が現在広く用いられている。1つはcDNAアレイであり、もう1つはオリゴヌクレオチドアレイである。このようなチップの構造には違いがあるが、実質的に全ての下方制御データ解析及びアウトプットは同じである。このような分析結果は通常、マイクロアレイの既知の位置にある核酸配列にハイブリダイズするサンプルのcDNA配列の検出に用いる標識プローブから受け取る信号の強度の測定値である。通常は、信号強度は、cDNAの量、従ってサンプルの細胞で発現したmRNAの量に比例する。このような多数の有用な方法を利用することができる。好適な方法は、米国特許第6,271,002号、同第6,218,122号、同第6,218,114号、及び同第6,004,755号に開示されている。

30

40

【0074】

発現レベルの分析は、このような強度を比較して行う。これは、コントロールサンプルにおける遺伝子の発現強度に対する検査サンプルの遺伝子の発現強度の比率マトリックスを作成して行うのが最も好ましい。例えば、薬物で処理した組織の遺伝子発現強度を、薬物で処理していない同じ組織から得られた発現強度と比較することができる。このような発現強度の比率は、検査サンプルとコントロールサンプルの遺伝子発現の倍変化を示す。

【0075】

遺伝子発現プロファイルは、様々な方式で表示することができる。一般的な方法では、列が検査サンプルを示し、行が遺伝子を示すグラフィックデンドグラム(graphical dendrogram)に比率マトリックスを配置する。データは、類似の発現プロファイルを有する遺

50

伝子が互いに近接するように配置する。各遺伝子の発現比率を色で示すことができる。例えば、1未満の比率（下方制御を示す）は、スペクトルの青い部分で現れ、1を超える比率（上方制御を示す）はスペクトルの赤い部分の色で現れるようにすることができる。シリコン・ジェネティクス社（Silicon Genetics, Inc.）が販売する「GENSPRINT」及びパーテック社（Partek, Inc.）が販売する「DISCOVERY」及び「INFERR」を含む市販のコンピュータソフトウェアプログラムを用いてこのようなデータを表示することができる。

【0076】

差次的に発現する遺伝子は、上記した遺伝子発現の評価によって導出されるように、病変細胞における上方制御または下方制御される。上方制御及び下方制御は、遺伝子の発現量において、あるベースラインに対して検出可能な差異（測定に用いるシステムのノイズの影響を超える）が見られることを意味する相対的な用語である。このような場合、このベースラインは、正常細胞で測定された遺伝子発現である。次いで、病変細胞における目的の遺伝子がベースラインレベルに対して上方制御されたか或いは下方制御されたかを同じ測定方法で測定する。上方制御及び下方制御のレベルは、ハイブリダイズしたマイクロアレイプローブの強度測定値の倍変化に基づいて区別されるのが好ましい。このような区別には1.5倍の差が好ましい。すなわち、未処理の病変細胞に対して処理した病変細胞で遺伝子が異なって発現する前に、処理した細胞が未処理の細胞よりも少なくとも1.5倍を超える強度、または1.5分の1未満の強度を発生させることが確認された。遺伝子発現の測定値における差は、より好ましくは1.7倍であり、最も好ましくは2.0倍以上である。

10

20

【0077】

本発明のある方法では、様々な遺伝子の遺伝子発現プロファイルと比較して、患者が治療薬に応答しそうであるか否かを決定する。応答者と非応答者を区別する遺伝子発現プロファイルを確立したら、この各遺伝子発現プロファイルを後述するコンピュータ読み取り可能媒体などの媒体に保存する。次いで、病変細胞（AMLの場合は造血芽細胞など）を含む患者のサンプルを採取する。最も好ましくは、サンプルは骨髄であって、通常の方法に従って患者の胸骨または腸骨稜から採取する。好ましくは、通常の方法で骨髄突刺液を処理して白血病芽細胞を増殖する。次いで、サンプルのRNAを患者の病変細胞から抽出して増幅し、好ましくはマイクロアレイを用いて（好適な遺伝子ポートフォリオの場合）、好適なポートフォリオの遺伝子を得るために遺伝子発現プロファイルを作成する。次いで、このサンプルの発現プロファイルを、予後結果のために既に分析したものと比較する。3遺伝子プロファイルを用いる場合のようにポートフォリオに少数の遺伝子を用いる場合、遺伝子調節を測定する最も好ましい方法は、単純に核酸を増幅して検出する方法である。このような場合、PCR、NASBA、ローリングサークル、LCR、及び当業者に周知の他の増幅方法を用いることができるが、PCRが最も好ましい。ポートフォリオが多数の遺伝子を含む場合または他の多数の遺伝子の発現を測定するのが好ましい場合は、上記したようにマイクロアレイの強度測定に基づいて発現パターンを評価するのが好ましい。

30

【0078】

同様の要領で、遺伝子発現プロファイル分析を行って治療の応答を監視することができる。この方法の一態様では、上記したような遺伝子発現分析を、治療期間の任意の期間に任意の好適な治療を受けた患者に対して行う。遺伝子発現パターンが肯定的な結果と一致した場合は患者の治療を継続する。そうでない場合は、患者の治療方法を別の治療法に変更する、用量を変更する、または現在の治療を中止する。このような分析により、検出可能な臨床的な徴候の前、或いはあいまいな臨床的な徴候に直面した際に介入及び治療の変更が可能となる。

40

【0079】

本発明の分子マーカーについて述べると、診断目的のために多数の他の形態や手法を利用することができる。ゲノム領域のメチル化は、遺伝子発現レベルに影響を与え得る。例

50

えば、遺伝子のプロモータ領域の過度のメチル化は遺伝子発現を恒常的に下方制御し、過少のメチル化は安定状態の mRNA レベルを増大させ得る。従って、薬物の反応、予後、または状態を予測する遺伝子に関連したメチル化領域の検出を、遺伝子発現レベルを診断する別の方法として用いることができる。このような方法は当業者には周知である。別法では、プロモータ領域に存在する一塩基多型 (SNPs) も遺伝子の転写活性に影響を及ぼし得る。従って、当業者に周知の方法でのこのような SNP の検出を、予後結果によって異なって発現する遺伝子を検出するための診断として用いることもできる。

【0080】

本発明の製品は、治療、診断、予後、病期、及び他の疾患の評価に有用な遺伝子発現プロファイルの表現である。好ましくは、このような表現は、コンピュータ読み取り可能媒体 (磁気式及び光学式など) などの自動的に読み取ることができる媒体に圧縮することができる。本製品は、このような媒体に記録された遺伝子発現プロファイルを評価するための取扱説明も含み得る。例えば、本製品は、上記した遺伝子のポートフォリオの遺伝子発現プロファイルを比較するためのコンピュータ命令を有する CD ROM を含むことができる。本製品はまた、患者のサンプルから得た遺伝子発現データと比較できるように内部にデジタル形式で記録された遺伝子発現プロファイルも含み得る。別法では、このようなプロファイルは、異なった表現形式で記録することができる。パーテック社 (Partek, Inc.) が販売する「DISCOVERY」や「INFER」ソフトウェアに組み込まれているようなクラスターアルゴリズムは、このようなデータの視覚化に最も役立つであろう。

【0081】

本発明に従った別の製品は、上記したアッセイを実施するためのキットである。このようなキットはそれぞれ、人間または機械が読むことができる取扱説明書及び上記したアッセイに一般的な試薬を含むのが好ましい。このキットはまた、例えば、本発明の遺伝子発現プロファイルを識別できるように構成された上記したような核酸アレイ (例えば、cDNA アレイまたはオリゴヌクレオチドアレイ) を含むことができる。このようなキットはまた、核酸の増幅及び検出を行うために用いる試薬を含むことができる。このような試薬の例として、逆転写酵素、逆転写酵素プライマー、対応する PCR プライマーセット、Taq ポリメラーゼなどの熱安定性 DNA ポリメラーゼや、限定するものではないが、スコピオンプローブ (scorpion probe)、蛍光プローブアッセイ用のプローブ、分子標識プローブ、またはエチジウムプロマイドなどの二本鎖 DNA に特異的な 1 つの染色プライマーまたは蛍光色素などの好適な検出試薬を挙げることができる。表面抗原を検出するためのキットは、染色物質を含む、或いは緩衝液、抗抗原性抗体 (anti-antigenic antibody)、検出酵素、及びカラシベルオキシダーゼやビオチン アビジン系試薬などの基質などの成分を含む抗体系である。芽細胞を検出するためのキットには通常、フローサイトメトリー、芽細胞接着アッセイ、及び他の一般的な芽細胞アッセイを行うための試薬が含まれている。

【0082】

従来 of 抗癌剤には、限定するものではないが、チロシンキナーゼ阻害剤、MEK キナーゼ阻害剤、P13K キナーゼ阻害剤、MAP キナーゼ阻害剤、アポトーシス調節物質、及びこれらの組合せが含まれる。これらの抗癌剤の中で最も好ましい代表的な薬物として、ノバルティス社 (Novartis) の「GLEEVEC」チロシンキナーゼ阻害剤、U0126 MAP キナーゼ阻害剤、PD098059 MAP キナーゼ阻害剤、SB203580 MAP キナーゼ阻害剤、アンチセンスリボザイム、DNA zyme、Bcl-XL、及び抗アポトーシスを挙げることができる。他の有用な薬物の例として、限定するものではないが、米国特許第 6,306,897 号のカラノライド (calanolides)、米国特許第 6,284,764 号の置換二重環 (substituted bicyclcs)、米国特許第 6,133,305 号のインドリン (indolines)、米国特許第 6,271,210 号のアンチセンスオリゴヌクレオチド、シスプラチンやカルボプラチンなどの白金製剤、パクリタキセル及びドセタキセルなどのタキサン製剤、イリノテカンやトポテカンなどのカンプトセシン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、またはビノレルビンなどの抗腫瘍ビンカアルカロイド

10

20

30

40

50

、 5 フルオロウラシル、ゲムシタピン (gemcitabine)、またはカペシタピンなどの抗腫瘍ヌクレオシド誘導体、シクロフォスファミド、クロラムブシル、カルムスチン、またはロムスチンなどのニトロジェンマスタードまたはニトロソウレア・アルキル化剤、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、またはイダルビシンなどの抗腫瘍アントラサイクリン誘導体、トラスツマブ (trastuzumab) などの H E R 2 抗体、エトポシドやテニポシド (teniposide) などの抗腫瘍ポドフィロトキシン誘導体、及び抗エストロゲン薬を挙げることができる。抗エストロゲン薬には、トレミフェン、ドロロキシフェン (droloxifene)、ファスロデックス (faslodex)、及びラロキシフェンなどで好ましくはテモキシフェン (temoxifen) であるエストロゲン受容体拮抗薬すなわち選択的エストロゲン受容体調節物質、またはエキセメスタン (exemestane)、アナストロゾール (anastrozole)、レトラゾール (letrozole)、及びボロゾール (vorozole) などのアロマターゼ阻害剤が含まれる。

10

【 0 0 8 3 】

抗癌剤には、遺伝子治療、アンチセンス治療、または R N A 干渉に用いられる治療物質も含まれ得る。このような治療物質には、限定するものではないが、細胞内に導入して m R N A の転写を阻害してその m R N A をコードする遺伝子の機能を阻害することができる m R N A 配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドも含まれる。オリゴヌクレオチドを使用した遺伝子発現の阻害は、例えば、ヒューマン・モレキュラー・ジェネティクス (Human Molecular Genetics) (ストラチャン (Strachan) 及びリード (Read) 著、1996年) に記載されている。このようなアンチセンス分子は、D N A、ホスホロチオエートやメチルホスホン酸などの D N A の安定誘導体、2' - O アルキル R N A などの R N A の安定誘導体、または他のアンチセンスオリゴヌクレオチド類似物とすることができる。アンチセンス分子は、微量注入、リポソームカプセル化、またはアンチセンス配列を含むベクターからの発現によって細胞内に導入することができる。

20

【 0 0 8 4 】

遺伝子治療では、目的の遺伝子を、レシピエント宿主細胞の感染によって治療用 D N A の導入を仲介するウイルスベクターに結合することができる。好適なウイルスベクターの例として、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、及びポリオウイルスなどを挙げることができる。別法では、治療用 D N A を、リガンド / D N A 複合体またはアデノウイルス / リガンド / D N A 複合体を用いた受容体仲介標的 D N A の導入、リポフェクション膜融合、または直接微量注入を含め、ウイルスを用いずに細胞内に導入して遺伝子治療することができる。このような方法及びその変更例は、*ex vivo* 及び *in vivo* 遺伝子治療に適している。遺伝子と共に使用するのに適した遺伝子治療の分子方法論のプロトコルが、「遺伝子治療プロトコル (Gene Therapy Protocols)」、ポール D ロビンス (Paul D. Robbins) 編集、ニュージャージー州トトワ (Totowa) のヒューマン・プレス (Human Press)、1996年に記載されている。

30

【 0 0 8 5 】

ここに開示した方法に従って特定した化合物は、あらゆる毒性の可能性を最小にすると共に最適な阻害または活性を得るために、通常の試験で決定した適当な用量で単独で使用することができる。加えて、他の薬物との同時投与または連続的な投与も望ましいであろう。

40

【 0 0 8 6 】

本発明は、次の限定目的でない例を用いて詳細に説明する。ここに記載した全ての参考文献は言及することを持って本明細書の一部とする。

【 0 0 8 7 】

例 1

臨床評価及び応答の定義

この検査は、再発性または難治性 A M L 患者を各 28 日サイクルの最初の 21 日間の開始経口投与量 600 mg でティピファニブで治療する、非盲検多施設非競合フェーズ 2 臨床試験 (アルソー (Harrow) ら (2003年)) の一部である。患者は、再発性 A M

50

L患者群と難治性AML患者群の2つの群に分けた。合計で252人の患者(再発性135人、難治性117人)を治療した。80人の患者を選択して、個々にインフォームドコンセントが必要な骨髄サンプルをRNAマイクロアレイ分析のために採取した。この検査では全体の応答率が比較的低かった。従って、遺伝子発現プロファイリングのために、患者をティピファニブに対する応答に対して、病理によって決定される客観的応答のある患者(完全な緩解(CR)、血小板の回復が不完全な完全な緩解(CRp)、または部分的な緩解(PR))、臨床部位によって決定される血液学的応答のある患者(骨髄の白血病芽細胞の50%を超える減少)、または病理及び臨床部位の両方によって決定される安定疾患の患者(血液学的応答はないが疾患が進行していない)に分けた。血小板の回復が不完全な完全な緩解は、輸血を必要としない $100,000/\mu\text{L}$ 未満の血小板数を除いて同様に定義する。部分的な緩解は、骨髄芽細胞が少なくとも50%減少し、好中球($>500/\mu\text{L}$)及び血小板数($>50,000/\mu\text{L}$)が部分的に回復した状態と定義する。応答は、初めの記録から少なくとも4週間後に確認しなければならない。

10

【0088】

サンプルの採取及びマイクロアレイ処理

骨髄サンプルを、ティピファニブで治療する前に患者から採取し、このサンプルをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈し、Ficoll diatrizoateで遠心分離した(1.077g/mL)。この白血球をPBSで2回洗浄し、10%ジメチルスルホキシド(DMSO)を含むウシ胎児血清(FBS)に再懸濁し、直後に -80°C で保存した。この細胞を解凍し、RNeasyキット(カリフォルニア州バレンシアのキアゲン社(Qiagen))で全RNAをこの細胞サンプルから抽出した。RNAの質を、Agilent Bioanalyzer(電気泳動装置)で検査した。Affymetrix(カリフォルニア州クララのサンタ社(Santa))プロトコルに従ってcDNA及びcRNAの合成を行った。

20

【0089】

マイクロアレイ処理

1回の増幅では複数のサンプルのRNA収量がチップハイブリダイゼーションに用いる十分な標識cRNAを得るのに不十分であるため2回の線形増幅を行った。ハイブリダイゼーションのために、 $11\mu\text{g}$ のcRNAを、 40mM Tris酢酸、 $\text{pH}8.1$ 、 100mM 酢酸カリウム、及び 30mM 酢酸マグネシウムで35分間、 94°C でインキュベートしてランダムに断片化した。断片化したcRNAを、 60rpm にセットしたローティッセ・オープン(rotisserie oven)で16時間、 45°C でU133Aアレイにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションの後、このアレイを $6\times\text{SSPE}$ 及びTriton X 100(0.005%)を含む $0.5\times\text{SSPE}$ で洗浄し、次いで、ストレプトアビジン フィコエリトリン(SAPE:オレゴン州ユージーン(Eugene)の分子プローブ(Molecular Probes))で染色した。Agilent G2500A Gene Array スキャナー(カリフォルニア州パロアルトのアジレント・テクノロジーズ社(Agilent Technologies))を用いて結合した標識プローブを定量した。

30

【0090】

それぞれのアレイの合計蛍光強度を一定値600に対して調整した。チップの性能を、SN比(生の平均信号/ノイズ)を計算して定量化した。SN比が5未満のチップは次の解析から除外した。チップの少なくとも10%に存在した場合に遺伝子を次の解析に含めた。11,723のAffymetrixプローブセットがこのカットオフの後に残った。遺伝子発現データの質は更に、主成分分析に基づいたアウトライアーの設定及び遺伝子強度の正規分布の解析(Prték Pro、V5.1)によって調節した。

40

【0091】

統計分析

高い感度の応答が予測される遺伝子を同定するためにパーセントイル解析を利用した。非応答者の少なくとも40%に比べて応答者の100%で上方制御または下方制御された遺伝子を同定した。カイ二乗検定及びスチューデントt-検定を用いて、ras突然変異

50

状態及び遺伝子発現を含む患者の応答性と患者の共変量との相関性の有意性を調べた。自動k平均法及び階層クラスタリングをOmni vizで行った。次いで、選択された遺伝子の予測値を、Leave one out及びLeave five out cross validation法で解析した。ここで、データセットから1つ(または5つ)のサンプルから取り出し、マーカーを11,723の遺伝子から再選択した。次いで、この遺伝子の予測値を、線形判別分析を用いて残りのサンプルに対して調べた。感度を、検査で検出された真陽性の数を真陽性と偽陰性の合計数で除して求めた。特異性は、検査で検出された真陰性の数を真陰性と偽陽性の合計数で除して求めた。陽性の予測値は、真陽性の数を真陽性と偽陽性の合計数で除して求めた。陰性の予測値は、真陰性の数を真陰性と偽陰性の合計数で除して求めた。治療に应答する患者の陽性の尤度比は、感度を1から特性を減じたもので除して得られる。受信者動作曲線(ROC)を用いて、100%の感度を必要とする各クラシファイアの適切な閾値を選択した。このROCにより、診断のためにそれぞれのパラメータの感度及び特異性を計算することができる。

【0092】

リアルタイムPT PCRバリデーション

TaqMan(登録商標)リアルタイムPCRを用いてAHR遺伝子及びAKAP13遺伝子のマイクロアレイの結果を検証した。各1µgのサンプルの増幅したRNAから、製造者(インビトロジェン社(Invitrogen))の取扱説明書に従ってT7オリゴ(dT)プライマー及びSuperscript II逆転写酵素を用いてcDNAを作製した。AKAP13遺伝子及びコントロール遺伝子PBGDのプライマー及びMGBプローブをPrimer Express(アプライド・バイオシステムズ社(Applied Biosystems))を用いてデザインし、AHR遺伝子及びコントロール遺伝子HPRTのプライマー及びプローブは、ABIがAssays on Demandとして販売している。AKAP13のプライマー/プローブの配列は、AKAP13順方向プライマー:5'GGTCAGATGTTTGCCAAAGGA A3'、AKAP13逆方向プライマー:5'TCTTCAGAAACACACTCCCATC 3'、AKAP13プローブ:6FAM TGA AACGGAAGAAGCTTGTA 3'である。全てのプライマー及びプローブは、90%を超える最適な増幅効率であるかについて検査した。相対検量線は、HelacDNA(大抵の場合は、25ng~2.5pgの範囲)の5つの希釈液(それぞれ10倍)から構成されている。RT PCR増幅混合物(25µL)には、100ngの鋳型cDNA、2xTaqMan(登録商標)ユニバーサルPCRマスターミックス(12.5µL:アプライド・バイオシステムズ社(Applied Biosystems))、500nM順方向プライマー及び逆方向プライマー、及び250nMプローブを含む。ABI PRISM 7900HT Sequence Detector(アプライド・バイオシステムズ社)上で反応させた。サイクル条件は、50°Cでの2分間のAmplificationの活性化、95°Cでの10分間のポリメラーゼの活性化、95°Cで15秒間とアニーリング温度(59°Cまたは60°C)で60秒間のサイクルを50回である。それぞれのアッセイでは、目的の遺伝子及びコントロール遺伝子に対して検量線、非鋳型コントロール、及び鋳型cDNAが3つずつ含まれている。それぞれの遺伝子の相対的な量は、検量線に基づいて算出し、コントロール遺伝子の量で標準化した。3つの同じサンプルの平均変動率(算出した量に基づいた)は8%であった。ストックから個々に希釈した鋳型を用いた反復実験間の相関性が0.95を超えていた。同じTaqMan(登録商標)実験が再現性のある結果を示した場合は、サンプルを単にマイクロアレイデータと比較した。

【0093】

細胞系の培養及びAKAP13の過剰発現アッセイ

AKAP13ベクター、オンコLBC、プロトLBC、及びベクターコントロール(pSRalpha-neo)を、ドクター・デニズ・トクソ(Dr. Deniz Toksoz)から入手した(チェン(Zheng)ら(1995年))。HL60細胞系を米国組織培養機関(American Tissue Culture Collection)から入手して、10%FBSを含むRPMI 1640で増殖させた。細胞は、製造者の取扱説明書に従ってEffectene試薬(キアゲン

社)を用いてそれぞれのベクターで一過性に形質移入し、G418(600 μ g/mL)で7日間保存した。次いで、ティピファニブを様々な濃度(0、1.5、3.1、6.3、13、25、50、100、200、1000、及び10,000nM)で同じ培養液(1.5 \times 10⁵細胞/mL)に添加した。細胞数を6日目にカウントした。細胞数を薬物を含まない培養液に対して標準化してコントロール生細胞のパーセントを得た。

【0094】

結果

再発性及び難治性AMLの発現プロファイリング

FTIsはもともと、ファルネシルトランスフェラーゼ酵素(FTase)活性を特異的に阻害して発癌遺伝子ras経路を遮断するようにデザインされている。従って、ras変異の活性化について、再発性または難治性AML患者80人の骨髄からのDNAをまず分析し、ras変異とティピファニブに対する応答との考えられる相関性を調べた。AMLサンプルの26%がNras変異を含み、変異状態は客観的応答や全生存と相関していなかった(アルソー(Harousseau)ら(2003年))。従って、FTIティピファニブに対する応答の予測に用いることができる新規のシグネチャを特定するために遺伝子発現プロファイリングを行った。ティピファニブで治療する前に80人の患者から遺伝子発現分析のために骨髄サンプルを採取した。表2に、患者の情報が示されている。

10

【0095】

【表 2 - 1】

表 2. 患者の情報

患者ID	AMLの種類	性別	年齢	最も良い応答*	生存期間	応答
A30009	難治性	男性	70	CR	358	yes
A30011	再発性	男性	70	PR	154	yes
A30059	難治性	女性	62	SD	119	yes
A30095	難治性	男性	61	CR	380	yes
A30177	再発性	女性	63	SD	75	yes
A30192	再発性	男性	67	SD	266	yes
A30235	再発性	女性	58	CR	276	yes
A30246	難治性	男性	74	HI	213	yes
A30353	再発性	女性	36	HI	192	yes
A30355	再発性	女性	44	HI	87	yes
A30360	難治性	男性	80	HI	35	yes
A30364	再発性	女性	54	HI	67	yes
A30379	再発性	女性	63	SD	282	yes
A30380	難治性	女性	71	HI	71	yes
A30007	難治性	女性	54	NR	106	no
A30008	難治性	男性	52	NR	27	no
A30053	再発性	男性	51	NR	48	no
A30057	難治性	男性	74	NR	102	no
A30060	難治性	女性	33	NR	175	no
A30096	難治性	男性	69	NR	182	no
A30179	難治性	女性	70	NR	148	no
A30182	難治性	男性	70	NR	92	no
A30190	再発性	女性	54	NR	51	no
A30191	再発性	女性	67	NR	78	no
A30245	再発性	男性	63	NR	366	no
A30300	再発性	男性	47	NR	414	no
A30302	再発性	男性	62	NR	234	no
A30308	再発性	男性	66	NR	71	no
A30311	再発性	女性	61	NR	115	no
A30377	再発性	男性	68	NR	364	no
A30047	再発性	女性	63	NR	94	no
A30055	再発性	女性	71	NR	56	no
A30063	再発性	男性	46	NR	220	no
A30090	難治性	女性	85	NR	56	no
A30091	難治性	女性	67	NR	56	no
A30092	難治性	女性	54	NR	40	no
A30111	難治性	女性	71	NR	38	no
A30112	再発性	女性	61	NR	12	no
A30113	難治性	男性	75	NR	177	no
A30119	難治性	男性	19	NR	36	no
A30153	再発性	女性	68	NR	105	no
A30176	難治性	男性	75	NR	54	no

10

20

30

40

【表 2 - 2】

A30178	再発性	女性	70	NR	39	no
A30180	難治性	男性	62	NR	72	no
A30183	難治性	男性	63	NR	64	no
A30244	再発性	女性	34	NR	35	no
A30247	難治性	女性	72	NR	35	no
A30248	再発性	男性	46	NR	61	no
A30304	再発性	男性	65	NR	44	no
A30306	再発性	女性	28	NR	74	no
A30349	難治性	男性	58	NR	22	no
A30354	難治性	女性	31	NR	103	no
A30359	再発性	男性	65	NR	8	no
A30363	再発性	男性	64	NR	37	no
A30376	再発性	女性	24	NR	383	no
A30378	再発性	女性	76	NR	184	no
A30381	難治性	女性	70	NR	128	no
A30395	難治性	男性	61	NR	83	no

*第3者調査員によって確認された場合にのみ安定疾患（SD）が含まれる

HI =血液学的改善

CR =完全な応答

PR =部分的な応答

NR =応答なし

10

20

【0096】

80サンプルの内の58サンプルが、RNAの質及びチップの性能を含む品質管理基準をパスした。年齢、性別、AMLの種類（再発性、難治性）、細胞発生リスク因子、基準芽細胞数、応答、及びこれらの58人の患者と臨床試験の残りの患者（表3ではN = 194）との間の全生存には有意差がなかった。

【0097】

【表 3】

表 3

共変量	58人の サブセット	残りの患者194人	p値
応答	14	28	0.1237
男性	28	119	0.1055
平均年齢	60	56	0.1046
再発性	31	104	0.8977
細胞遺伝学的リスク	34	5	0.1503
平均芽細胞	55%	50%	0.1629

30

40

【0098】

高い感度で応答者と非応答者とを区別できる遺伝子を同定するために、遺伝子発現データを臨床情報と統合してレトロスペクティブ分析をした。差次的に発現する遺伝子を同定する前に、これらのデータを複数回フィルタリングした。まず、少なくとも10%のサンプルで発現していない遺伝子は排除した。これにより、遺伝子の数が約22,000から11,723に減少した。自動分析の場合、データベース全体で発現の変動を殆ど示さない遺伝子（変動率がサンプル全体で45%未満）も排除し、残りの5,728の遺伝子を四分標準化（quantile normalization）した。この段階で、自動k平均クラスタリング

50

分析を実施して、全遺伝子発現プロファイルに基づいて患者間の全ての差を確認した。この方法で、患者の6つの主要なクラスターを同定した。応答者と非応答者との間には差が観察されなかった(図1)。ほんの一部の遺伝子がFTI sの抗腫瘍効果に関連していると考えられる。例えば、FTI生物学に關与する1つの遺伝子の差次的な発現が臨床応答に影響を与えるが、他の11,722の遺伝子からのノイズによってこの影響が隠されてしまう可能性がある。

【0099】

例2

応答者と非応答者の間で差的に発現する遺伝子の同定

次に、全ての応答者と少なくとも40%の非応答者との間で差的に発現する遺伝子を同定するために遺伝子発現データを用いて管理下で解析を行った。このような基準は、可能な最高レベルの感度でティピファニブに対する応答を予測できる遺伝子を同定するために選択した。応答者と非応答者とを分類でき(表5)、t検定で有意なp値($p < 0.05$)が得られる合計19の遺伝子(表4)を11,723の遺伝子から同定した。シグナル伝達、アポトーシス、細胞増殖、発癌、及び場合によってはFTI生物学に關与する遺伝子も含まれている(ARHH、AKAP13、IL3RA)

【0100】

【表4】

表4. ティピファニブに対する応答を予測する上位19の遺伝子リスト

配列番号	遺伝子記号	遺伝子ID	機能的な説明
5	AHR	NM_001621	アポトーシス、細胞周期、シグナル伝達
1	AKAP13	NM_006738	低分子量GTP加水分解酵素仲介シグナル伝達、発癌
6	MINA53	NM_032778	細胞増殖
7	IDS	NM_000202	グリコサミノグリカンの分解
8	OPN3	NM_014322	Gタンパク質共役受容体タンパク質シグナル伝達
9	GPR105	NM_014879	Gタンパク質共役受容体タンパク質シグナル伝達
10	TENC1	NM_22748	シグナル伝達
11	TNFSF13	NM_003808	細胞増殖
12	SVIL	NM_003174	細胞骨格の固着
13	IL3RA	NM_002183	受容体シグナル伝達
14	C6orf56	NM_014721	-
15	FRAG1	NM_014489	癌抑制
16	GOSR1	NM_004871	内部ゴルジ輸送体
17	KIAA1036	NM_014909	-
18	BTG3	NM_006806	細胞周期の調節
29	MAPK8IP3	NM_015133	JNKカスケードの調節
20	LILRB3	NM_006864	免疫応答
21	ARHH	NM_004310	低分子量GTP加水分解酵素仲介シグナル伝達
22	NPTX2	NM_002523	好中球細胞付着

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5. ティピファニブに対する応答を予測する上位 19 の遺伝子の結果

配列番号	遺伝子記号	特異性	P 値
5	AHR	0.52	0.00000255
1	AKAP13	0.63	0.00006133
6	MINA53	0.50	0.00006934
7	IDS	0.50	0.00023964
8	OPN3	0.40	0.00064297
9	GPR105	0.43	0.00087608
10	TENC1	0.43	0.0010309
11	TNFSF13	0.40	0.00104219
12	SVIL	0.45	0.00145723
13	IL3RA	0.40	0.00198392
14	C6orf56	0.40	0.00261553
15	FRAG1	0.45	0.00298989
16	GOSR1	0.45	0.01201057
17	KIAA1036	0.43	0.01262079
18	BTG3	0.47	0.01659402
19	MAPK8IP3	0.40	0.01817428
20	LILRB3	0.41	0.02374898
21	ARHH	0.40	0.02721922
22	NPTX2	0.45	0.03346833

10

20

【0101】

30

遺伝子マーカーのリアルタイム RT-PCR バリデーション

マイクロアレイ遺伝子発現データを検証するために、マイクロアレイハイブリダイゼーションに用いる標識標的 cRNA の作製に用いた cDNA に対して TaqMan (登録商標) リアルタイム RT-PCR を実施した。遺伝子発現データを検証するために 2 つの遺伝子を選択した。AHR 遺伝子及び AKAP13 遺伝子が、応答者に対して最高レベルの特異性が得られたため選択した。相関率は、AHR が 0.74、AKAP13 が 0.94 であり、マイクロアレイ遺伝子発現データが PCR によって認証されたことを意味する (図 2)。

【0102】

40

耐性マーカーとしての AKAP13 遺伝子の同定

AKAP13 が、ティピファニブに対して耐性のある患者で過剰発現した。この遺伝子の予測値を、Leave one out cross validation 法 (LOOCV、図 3 の A) で 58 のサンプルについて計算した。AKAP13 遺伝子の発現は、96% の負の予測値 (NPV) の非応答、43% の正の予測値 (PPV) の低発現レベル仲介応答を予測した ($\chi^2 = 13.7$ 、 $P = 0.0022$)。全体的な診断精度は 69% であり、応答の正の尤度比が 2.4 であった。従って、AKAP13 遺伝子の発現に基づいたこの患者集団の分類により、応答率が全群の 24% (14/58) から遺伝子発現率の低い患者群の 43% (13/30) に増大した。各患者における AKAP13 遺伝子の発現の値が図 3 の B に示されている。生存を Kaplan-Meier 分析 (Kaplan-Meier analysis) で分析すると、この遺伝子の発現が低い患者の平均生存期間は発現レベルが高い患

50

者よりも90日長かった ($P = 0.008$ 、図3のC)。

【0103】

3つの遺伝子マーカーの最小セットの同定

A K A P 1 3 単独よりも優れた精度でティピファニブに対する応答を予測できる遺伝子マーカーの候補のセットを同定するために L O O C V を用いた。クラシファイアを、 t 検定の P 値に基づいた遺伝子数の増大を用いて作成し、このようなクラシファイアの誤差率を L O O C V で計算し、予測する応答感度を 100% に維持する (図4のA)。3 遺伝子クラシファイアは、低い誤差率で応答を予測できる (図4のA)。これは、Leave five out cross validation を実施した時に確認された。遺伝子を追加すると誤差率が上昇するため、追加の遺伝子がクラシファイアにノイズを付与することを示している。3 遺伝子クラシファイアの場合、L O O C V により、NPV が 94%、PPV が 48%、全体的な診断精度が 74%、正の尤度比が 2.9 であることが実証された (図4のB)。各患者における3 遺伝子の発現値の組合せが図4のCに示されている。従って、この遺伝子シグネチャをもつ患者群の場合、ティピファニブに対する応答率が、この患者集団における 24% (14 / 58) に対して 48% (12 / 25) であった。

10

【0104】

3 遺伝子シグネチャ (A H R、A K A P 1 3、及び M I N A 5 3) を用いることにより、 Kaplan-Meier 分析 (Kaplan-Meier analysis) で予測された応答者群と非応答者群との間に生存の有意差が示された (図4のD)。応答者として誤って分類された 13 人の患者は、比応答者として正しく分類された 31 人の患者よりも生存期間が長かった。興味深いことに、非応答者として誤って分類された 2 人の患者が、血液学的改善のみを示し、全生存期間が比較的短かった (71日と87日)。

20

【0105】

A K A P 1 3 の過剰発現により A M L のティピファニブに対する耐性が増大する

A K A P 1 3 遺伝子は、ティピファニブに対する耐性の最も強力なマーカーである。従って、HL60細胞系でこの遺伝子のオンコBC変異体変異体及びプロトLBC変異体を過剰発現させてFTI生物学におけるその関与を調べた。次いで、一過性形質移入体をティピファニブに対する感度について検査した。このAML細胞系モデルにおける両方のA K A P 1 3 変異体の過剰発現により、コントロール細胞に比べてティピファニブに対する耐性が約20倍増大した (図3)。LBCオンコジーンとLBCプロトオンコジーンの両方が、ティピファニブに対する耐性を同程度に増大させたのが、コントロールに比べて2以上のlog単位、死滅曲線の右方向へ平行移動していることで分かる。

30

【0106】

考察

近年、2つのグループが、臨床結果の予測に有用な新たに診断された成人AML患者の遺伝子発現プロファイルを確認した (プリンガー (Bullinger) ら (2004年)、バルク (Valk) ら (2004年))。これらのプロファイルは、核型分析などの現在用いられている診断マーカーよりも強力なようである。更に、発現プロファイルで、標準的な化学療法薬 (チャン (Chang) ら (2003年)、オクツ (Okutsu) ら (2002年)、及びチョコ (Chok) ら (2003年)) 及び新規の選択抗癌剤を含む抗癌剤に対する応答性を予測できることが分かった (ホフマン (Hofmann) ら (2004年)、マックリー (McLean) ら (2004年))。同様に、遺伝薬理学的プロファイルが、チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブ (gefitinib) に対する患者の応答に相関することが分かった (パエズ (Paez) ら (2004年) 及びリンク (Lynch) ら (2004年))。この研究で、非小細胞肺癌患者の亜群が、標的治療に対する臨床応答に相関する標的上皮細胞成長因子受容体内で変異を起こしていることが分かった。

40

【0107】

再発性及び難治性AML患者のフェーズ2試験で、新規のファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤であるティピファニブに対する応答を予測する遺伝子発現プロファイルを確認

50

した。この種の化合物は、悪性血液疾患（カーブ（Karp）ら（2001年）、カーズロック（Kurzrock）ら（2004年）、アルシナ（Alsina）ら（2003年）、コーテス（Cortes）ら（2003年）、トーマス（Thomas）ら（2001年））、及び乳癌（ジョンストン（Johnston）ら（2003年））や再発性神経膠腫（ブラナー（Brunner）ら（2003年））などの充実性腫瘍の治療に有望であることを示されている。しかしながら、臨床応答は実証されているが、薬物に対して最も応答しそうな患者（このため治療の最適な候補者となる）を特定する患者に合った治療の要望が大きくなっている。更に、*ras*がこの種の薬物の主な標的と見なされているが、複数の臨床試験により、このような薬物が*ras*変異の頻度が高い集団に必ずしも有効ではないことが示された（ファン・カツセン（Van Cutsem）ら（2004年）及びラオ（Rao）ら（2004年））。

10

【0108】

複数の遺伝子マーカーがティピファニブに対する応答を予測する可能性があることが確認された。このようなマーカーのサブセットは、薬物応答を予測でき、かつFTI生物学に關与する可能性もある。マイクロアレイの実験により見出された上位候補の1つがリンパ芽細胞発症癌遺伝子（lymphoid blast crisis oncogene）（オンコLBCまたはAKAP13）である。この遺伝子は、Rhoタンパク質のグアニンヌクレオチド交換因子（チェン（Zheng）ら（1995年））として機能し、かつプロテインキナーゼAアンカータンパク質として機能する（カー（Carr）ら（1991年））。AKAP13は、ラミンB（Lamin B）と相互作用することが知られている。ヘリカルドメインに相同な領域を含む（フォイスナー（Foisner）ら（1991年））。これに関連して、ラミンBがプロ

20

【0109】

FTI生物学に關与している可能性がある複数の遺伝子（ARHH、AKAP13、IL3RA）の同定により、複数の経路の相互作用がこのAML患者集団でFTIがどのような機能するかに影響を与え得るといふ考えが支持される（図7）。これらの遺伝子は、*ras*、*rho*、及び場合によってはラミンBを含む複数のファルネシル化タンパク質と相互作用する。Rhoタンパク質は、FTIsの重要な抗腫瘍形成標的の可能性はある（サハイ（Sahai）ら（2002年）及びランセット（Lancet）ら（2003年））。RhoB、RhoA、及びRhoCは、複数の種類の癌で過剰発現することが分かっている（サハイ（Sahai）ら（2002年））。加えて、RhoH（ARHH）が骨髄起源の腫瘍で頻繁に再編成され、これにより過剰発現することがある（パスクアルッチ（Pasqualucci）ら（2001年））。これらRhoタンパク質の殆どがゲラニルゲラニル化（geranylated）するが、互いに密接に相互作用し、ファルネシル化した*ras*、RhoE、及びRhoB低分子量GTP加水分解酵素とも相互作用する（サハイ（Sahai）ら（2002年）及びリ（Li）ら（2002年））。更に、RhoH、RhoB、及びRhoEが、RhoA及びRhoGの形質転換能力に対して拮抗するように作用し得る（リ（Li）ら（2002年））。RhoA及び場合によっては関連する低分子量GTP加水分解酵素の活性が、グアニンヌクレオチド交換因子リンパ芽細胞発症癌遺伝子（AKAP13）によって増大する（ステルベッチ（Sterpetti）ら（1999年）及びトクソズ（Toksoz）ら（1994年））。加えて、AKAP13は、プロテインキナーゼAによるラミンBの活性化によって分裂活性が増大し得る（フォイスナー（Foisner）ら（1991年））。IL3受容体が*ras*経路を活性化させることも良く知られている（テスト（Testa）ら（2004年））。従って、図7に示されているように、IL3RA及びAKAP13の活性の増大とRhoHの発現の減少により、形質転換の細胞プロファイルが増大し得る。これにより、白血病芽細胞が、代償性経路によってFTIsの抗腫瘍形成効果に打ち勝つことができる。これとは対照的に、IL3RA及びAKAP13の発現が過少になると、R

30

40

50

h o H 活性が増大し、F T I s がより効率的にこのよう経路を遮断できる。

【0110】

最後に、A K A P 1 3 (オンコ L B C 変異体とプロト L B C 変異体の両方) の過剰発現により H L 6 0 A M L 細胞系の I C ₅₀ が約 2 0 倍増大することを実証した。これは、A K A P 1 3 の過剰発現が、耐性の適切なマーカーであり、ティピファニブに耐性のある患者の有用な代替薬物標的となり得ることを示唆している。

【0111】

全体的にみて、我々の発見により、ティピファニブに応答しそうな患者を識別する遺伝子発現を用いた診断アッセイを開発することが可能である。この情報を用いて、適切な患者集団をより直接的に治療することができる。生存をゴールドスタンダードとして用い、
10
遺伝子シグネチャにより、従来の臨床の応答基準では予測できなかった治療に対する応答のレベルを予測することができる。これにより、F T I 治療に対する応答を予測するための遺伝子シグネチャが F T I 療法に関係なく予後値を有するか否かの問題が起こる。従って、従来の化学療法で治療した新たに診断された A M L 患者で既に同定された予後シグネチャを評価した (ブリンガー (Bullinger) ら (2 0 0 4 年)) 。このシグネチャは現在の患者集団に有用性を示したが、我々の 3 遺伝子シグネチャでは不良な予後群と良好な予後群に更に階層分類することができ、この 3 遺伝子シグネチャが F T I s に対する応答の予測要素であることを示している。

【0112】

例 3

A M L 予後遺伝子シグネチャの分析

この 3 遺伝子シグネチャは、薬物治療の種類に関係なく予後を予測することができる。これを確認するために、まず従来の化学療法で治療した新たに診断された A M L 患者で最近同定された遺伝子発現シグネチャを評価した (ブリンガー (Bullinger) ら (2 0 0 4 年)) 。このシグネチャは、c D N A アレイを用いて定義した。従って、まずこれらの遺伝子を A f f y m e t r i x 遺伝子チップ上のプローブに一致させた。ブリンガー (Bullinger) らによって同定された 1 3 3 の予測遺伝子の内、1 6 7 のプローブセット (1 0 3 個の遺伝子に対応する) が A f f y m e t r i x U 1 3 3 A チップに一致した。我々の分析で同定したこの 3 つの遺伝子は、ブリンガー (Bullinger) らの 1 3 3 遺伝子リスト (配列番号 2 3 1 8 9) に含まれていない。これらの 1 6 7 のプローブセットを用いて階層クラスタリングにより 2 つの主要な患者群に分類した (図 8 の A) 。 Kaplan-Meier analysis) により、これらのクラスターを良好な予後の患者と不良な予後の患者に明確に階層分類した (図 8 の B 、 P = 0 . 0 0 0 0 2 1 9) 。従って、我々のデータが、ブリンガー (Bullinger) ら (2 0 0 4 年) によって同定された 1 3 3 遺伝子予後シグネチャのサブセットを患者の再発性及び難治性の集団に使用できることを示している。従って、これが、予後遺伝子プロファイルが様々なマイクロアレイプラットフォーム及び様々な種類の A M L に対して驚くほど強力であることを示している。
20
30

【0113】

予後遺伝子シグネチャによって決定されたクラスターは何れも、それ程多くの応答者を有していない。しかしながら、ティピファニブの 3 遺伝子シグネチャを用いて良好な予後群と不良な予後群に分ける場合、ティピファニブに応答した患者を両方の予後群から更に階層分類することができる (図 8 の C) 。従って、3 遺伝子シグネチャは、予後シグネチャとは別の有用性を有し、この患者集団の F T I 治療に対して特定の意味を持つ。
40

【0114】

例 4

臨床評価及び応答の定義

現在の試験は、A M L における各 2 8 日サイクルの最初の 2 1 日間の開始経口投与量 6 0 0 m g (1 日 2 回) で単一薬剤としてティピファニブが投与されたファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤の有効性及び安全性について調べる非盲検多施設非競合フェーズ 2 試験である。患者は、再発性 A M L と難治性 A M L の 2 つの集団に分けた。合計で 2 5 2 人
50

の患者（再発性135人、難治性117人）を治療した。遺伝子発現プロファイリングのために、ティピファニブに対する応答を、事後の任意の時点で病理または臨床部位によって、客観的応答（上記したCR、CRp、またはPR）のある患者、安定疾患であると確認された患者、または血液学的応答（白血球芽細胞の50%を超える減少）のある患者に分けた。

【0115】

サンプルの採取及びマイクロアレイ処理

全てのサンプルを、前述の処理及び分析に同意した患者から採取した。骨髓サンプルを、ティピファニブで治療する前に患者から採取し、このサンプルをPBSで希釈し、Ficoll diatrizoateで遠心分離した（1.077g/mL）。この白血球をPBSで2回洗浄し、10% DMSOを含むFBSに再懸濁し、直後に-80で保存した。この細胞を解凍し、RNeasyキット（カリフォルニア州バレンシアのキアゲン社（Qiagen））で全RNAをこの細胞サンプルから抽出した。RNAの質を、Agilent Bioanalyzerで検査した。Affymetrix（カリフォルニア州クララのサンタ社（Santa））プロトコルに従ってcDNA及びcRNAの合成を行った。1回の増幅では複数のサンプルのRNA収量がチップハイブリダイゼーションに用いる十分な標識cRNAを得るのに不十分であるため2回の線形増幅を行った。

【0116】

ハイブリダイゼーションのために、11µgのcRNAを、40mM Tris酢酸、pH 8.1、10mM 酢酸カリウム、及び30mM 酢酸マグネシウムで35分間、94でインキュベートしてランダムに断片化した。断片化したcRNAを、60rpmにセットしたローティッセ・オープン（rotisserie oven）で16時間、45でU133Aアレイにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションの後、このアレイを6×SSPE及びTriton X 100（0.005%）を含む0.5×SSPEで洗浄し、次いで、ストレプトアビジン フィコエリトリン（SAPE：オレゴン州ユージーン社（Eugene）の分子プローブ（Molecular Probes））で染色した。Agilent G2500A Gene Array スキャナー（カリフォルニア州パロアルトのアジレント・テクノロジーズ社（Agilent Technologies））を用いて結合した標識プローブを定量した。

【0117】

それぞれのアレイの合計蛍光強度を一定値600に対して調整した。チップの性能を、SN比（生の平均信号/ノイズ）を計算して定量化した。SN比が5未満のチップは次の解析から除外した。チップの少なくとも10%に存在した場合に遺伝子を次の解析に含めた。薬12,000のAffymetrixプローブセットがこのカットオフの後に残った。遺伝子発現データの質は更に、主成分分析に基づいたアウトライアーの設定及び遺伝子強度の正規分布の解析（Prtek Pro、V5.1）によって調節した。

【0118】

統計分析

自動階層クラスタリング及びクラスタリングをOmniVizで実施した。SPPlusを用いて Kaplan-Meier 分析（Kaplan-Meier analysis）を実施した。

【0119】

例5

新たなAMLで同定した予後シグネチャは再発性及び難治性の患者に有用である

近年発行された2つの研究論文に、新たに診断された成人AML患者の遺伝子発現のプロファイリング、及びこのプロファイリングの臨床結果の予測への使用が記載されている（プリンガー（Bullinger）ら著（2004年）及びバルク（Valk）ら著（2004年））。Affymetrix U133A 遺伝子チップを用いて再発性及び難治性のAML患者58人のプロファイリングを行った。プリンガー（Bullinger）らによって同定された133の予測遺伝子の内、167のプローブセット（103個の遺伝子に対応する）がU133Aチップで同定された（図9）。この167のプローブセットを配列表に記載し、配列番号23 189を付した。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 0 】

これらの167のプロブセットを用いて階層クラスタリングにより患者を2つの主要な群に分類した(図10のA)。 Kaplan-Meier analysis)により、これらのクラスターを良好な予後の患者と不良な予後の患者に明確に階層分類した(図10のB、 $P = 0.0000219$)。従って、我々のデータが、プリンガー (Bullinger)ら(2004年)によって同定された133遺伝子予後シグネチャの103個の遺伝子のサブセットを患者の再発性及び難治性の集団に使用できることを示している(表6)。従って、これが、予後遺伝子プロファイルが様々なマイクロアレイプラットフォーム、様々な種類のAML、及び様々な治療方法に対して驚くほど強力であることを示している。

【 0 1 2 1 】

【表 6 - 1】

表 6

配列番号	クラスター 1 の平均	クラスター 2 の平均	比率	良好な予後群
23	2.101613636	0.980102944	2.144278466	上昇
24	1.574545244	0.899302214	1.750852182	上昇
25	2.459568465	1.161727897	2.117163987	上昇
26	1.752902097	0.968494897	1.809923937	上昇
27	2.395730325	0.72630844	3.298502667	上昇
28	1.319861385	1.36567127	0.96645614	低下
29	1.269874887	1.430330507	0.8878192	低下
30	0.986377684	1.432950683	0.688354244	低下
31	1.177005842	1.428309412	0.824055231	低下
32	1.095239589	0.99028255	1.105986962	上昇
33	1.798024918	0.806182842	2.230294202	上昇
34	5.041411016	0.60238936	8.369024013	上昇
35	1.159807609	1.639962342	0.707216001	低下
36	1.300310388	1.324114868	0.982022345	低下
37	1.342190037	2.306688065	0.581868896	低下
38	1.320735142	1.367135334	0.966060279	低下
39	3.891659096	1.14773151	3.390739962	上昇
40	1.519690498	1.219697115	1.245957278	上昇
41	1.328167684	1.250925424	1.061748094	上昇
42	4.052024058	0.844109372	4.800354307	上昇
43	2.091653255	0.964077201	2.169591038	上昇
44	1.991638259	1.045332875	1.905267027	上昇
45	2.231280889	0.889145566	2.509466362	上昇
46	1.815199475	0.992602441	1.828727596	上昇
47	1.3198052	1.283492456	1.028292136	上昇
48	2.222738653	0.801693589	2.772553857	上昇
49	1.591280353	1.037860182	1.533231913	上昇
50	1.050088807	1.267434876	0.828515	低下
51	1.07046517	1.621321185	0.660242511	低下
52	1.768390061	0.83169323	2.126252803	上昇
53	1.253048826	1.17309932	1.068152376	上昇
54	1.24240959	1.057597528	1.174747063	上昇
55	1.039468561	1.565715718	0.663893546	低下
56	0.897290104	2.462204436	0.364425509	低下
57	2.042794407	1.039120916	1.965887103	上昇
58	2.935364557	1.109613717	2.645393178	上昇
59	0.771931017	1.585630652	0.486829021	低下
60	1.206470925	1.279664724	0.942802363	低下
61	1.099482264	1.491611294	0.737110445	低下
62	4.901329448	0.871582063	5.623485909	上昇
63	2.346190152	0.930016604	2.522740069	上昇
64	0.774893647	2.117870914	0.365883323	低下

10

20

30

40

【表 6 - 2】

65	8.626480573	0.518118436	16.64963061	上昇
66	2.002466652	2.360710711	0.84824737	低下
67	1.031573096	1.410790966	0.731201943	低下
68	1.236611762	1.579356606	0.782984512	低下
69	4.252841813	1.038446727	4.095387566	上昇
70	2.330630017	0.740455045	3.147564506	上昇
71	1.271065192	1.275443314	0.996567372	低下
72	4.079291876	0.770236845	5.296152606	上昇
73	1.613398862	1.053542946	1.531403032	上昇
74	2.462533188	0.694618451	3.54515948	上昇
75	1.736866874	1.312450625	1.323376926	上昇
76	0.973964566	1.442647881	0.675122862	低下
77	2.146894817	1.117648799	1.920902898	上昇
78	1.121767102	1.496868758	0.749409122	低下
79	1.09122088	1.120796083	0.973612325	低下
80	1.563910635	1.102945516	1.417940063	上昇
81	1.473673649	1.474149259	0.999677367	低下
82	1.148794849	1.399237842	0.821014709	低下
83	1.350310245	1.327639719	1.017075812	上昇
84	1.44906906	1.424150806	1.017496921	上昇
85	1.790625889	1.255091645	1.426689354	上昇
86	1.423005429	1.45961841	0.97491606	低下
87	1.09603256	1.181485007	0.927673693	低下
88	1.125580943	1.178287994	0.955268108	低下
89	0.891946685	1.753005455	0.508809988	低下
90	1.2942793	2.776461422	0.466161456	低下
91	1.102290438	1.391074208	0.792402326	低下
92	1.186998217	2.302906551	0.515434817	低下
93	0.79821098	1.919103099	0.415929181	低下
94	1.236023874	1.187331666	1.041009778	上昇
95	1.087313678	1.212772631	0.896551959	低下
96	1.820970134	1.219911387	1.492706891	上昇
97	0.893432913	1.529980396	0.583950563	低下
98	1.076214323	1.702252048	0.632229713	低下
99	1.407137316	1.229815501	1.144185705	上昇
100	2.943883289	0.906317573	3.248180746	上昇
101	1.666394606	0.87032571	1.914679281	上昇
102	1.499937462	0.921725287	1.627315083	上昇
103	1.035229803	1.508152041	0.686422705	低下
104	1.317050838	1.350558887	0.975189495	低下
105	1.481608791	1.161107338	1.276030856	上昇
106	1.177285398	1.293627618	0.910065139	低下
107	1.328716012	1.354505535	0.980960194	低下
108	1.245636653	1.388354047	0.897203891	低下
109	1.057630522	1.407147783	0.751612968	低下

10

20

30

40

【表 6 - 3】

110	1.394737541	1.22633541	1.137321429	上昇
111	1.194410314	1.007530697	1.185482803	上昇
112	1.653993358	1.201194991	1.37695659	上昇
113	1.318561503	1.233384342	1.069059707	上昇
114	1.045812959	1.463795973	0.714452682	低下
115	1.721871636	1.213128563	1.419364517	上昇
116	1.437978693	1.211203408	1.18723138	上昇
117	1.480402866	1.289306967	1.148215983	上昇
118	1.750186104	1.199777316	1.458759122	上昇
119	1.987020453	2.331667877	0.852188458	低下
120	1.419274906	1.587359923	0.894110331	低下
121	1.412275401	1.410313065	1.001391419	上昇
122	1.339345508	1.331753924	1.005700441	上昇
123	1.747595879	1.473302004	1.186176272	上昇
124	1.237925661	1.240617377	0.997830341	低下
125	1.176676928	1.14697739	1.025893743	上昇
126	1.256304659	1.357899094	0.925182633	低下
127	2.013680769	0.801461983	2.512509405	上昇
128	1.405740421	1.158990553	1.212900673	上昇
129	1.346444485	1.136343796	1.184891835	上昇
130	9.592759013	1.560596128	6.146855576	上昇
131	1.768393033	1.23257422	1.434715252	上昇
132	1.40453464	1.860231401	0.755032218	低下
133	1.673447728	3.930927905	0.425713157	低下
134	1.283792446	1.501667999	0.85491097	低下
135	1.214492279	1.091382628	1.11280155	上昇
136	1.561740275	1.228333636	1.271430033	上昇
137	1.734251715	1.844252606	0.940354759	低下
138	1.408580649	1.582858413	0.889896807	低下
139	1.1383915	1.741970797	0.653507798	低下
140	1.079716972	1.450127515	0.744566917	低下
141	1.783529874	1.314108612	1.357216487	上昇
142	1.136773942	1.003606776	1.132688588	上昇
143	1.220645614	1.113413039	1.096309789	上昇
144	1.183017496	1.211183566	0.976745003	低下
145	1.113306085	1.067417158	1.042990621	上昇
146	1.211346488	1.1871952	1.020343148	上昇
147	0.998901987	1.654269584	0.60383265	低下
148	1.133736575	1.914231031	0.592267368	低下
149	1.412382921	1.384849519	1.019881873	上昇
150	3.988440713	0.965026485	4.132985753	上昇
151	1.187128423	1.462785203	0.81155348	低下
152	3.691405839	0.765303503	4.823453473	上昇
153	2.216130138	0.848821568	2.610831558	上昇
154	2.199861346	0.773086467	2.845556663	上昇

10

20

30

40

【表 6 - 4】

155	1.67633492	1.194585675	1.403277265	上昇
156	7.743976211	0.841225224	9.205592025	上昇
157	2.591731743	1.08342825	2.392158173	上昇
158	1.273363236	1.097292728	1.160459013	上昇
159	1.095879149	1.302490014	0.8413724	低下
160	0.987046127	2.124625445	0.464574181	低下
161	2.103990301	0.929475745	2.263631205	上昇
162	1.439273076	1.211738853	1.187774967	上昇
163	1.121983318	1.251788385	0.896304305	低下
164	1.197910138	1.34693432	0.889360468	低下
165	1.144102989	1.261720239	0.906780246	低下
166	1.078544278	1.162115183	0.928087244	低下
167	1.46401688	0.960152377	1.524775561	上昇
168	1.262437604	1.105379077	1.142085669	上昇
169	1.349621283	1.10729713	1.218842935	上昇
170	1.203037349	1.068047506	1.126389361	上昇
171	1.395352279	1.172354292	1.190213819	上昇
172	1.131210862	1.399636303	0.80821772	低下
173	0.859929427	1.37477642	0.625504929	低下
174	0.72293765	2.343345902	0.308506588	低下
175	1.340847351	1.601484153	0.837252962	低下
176	1.259818484	1.213892186	1.037833918	上昇
177	0.60640428	2.092078796	0.289857285	低下
178	1.099549227	1.166865002	0.942310572	低下
179	1.615399946	1.733324276	0.931966378	低下
180	0.734401434	2.496195783	0.294208267	低下
181	2.158835355	0.765517273	2.82010012	上昇
182	0.957971846	1.386779118	0.690789061	低下
183	0.982131268	1.162818279	0.844612856	低下
184	2.421692274	0.791473723	3.059725425	上昇
185	1.268020946	0.973474927	1.302571757	上昇
186	1.054213523	1.147045848	0.91906834	低下
187	1.251020003	1.271391137	0.983977288	低下
188	1.122443987	1.153661375	0.972940597	低下
189	1.301034813	1.029185966	1.264139675	上昇

10

20

30

予後シグネチャは、ティピファニブに対する応答性を予測する3遺伝子シグネチャとは無関係である。

40

【0122】

我々は以前に、再発性及び難治性のAML患者においてティピファニブに対する応答を予測する3遺伝子シグネチャ(AHR、AKAP13、MINA53)を同定した。これらの遺伝子は、良好な予後結果群と不良な予後結果群に患者を階層分類できる(図11のB、 $p = 0.002$)。この遺伝子シグネチャがFTI治療に対する応答を予測するのか或いは単に概ね良好な予後の患者を識別するだけなのかという問題が起こる。この3遺伝子シグネチャを用いて良好な予後群及び不良な予後群に分ける場合、応答者を予後群から更に階層分類することができる(図11のC、 $p = 0.000003$)。両方の遺伝子シグネチャを適用すると、ティピファニブに反応せず、かつ治療の種類に関係なく予後が不良な患者群を明確に階層分類することができる(図11のD、 $p = 0.0000005$)

50

。従って、3 遺伝子シグネチャは、この患者集団における F T I 治療に特異的で既に同定された予後シグネチャに関係ないようである。従って、患者の治療のより良い管理のために、予後シグネチャを薬物特異的シグネチャ（ティピファニブ予測プロファイルなど）と共に使用することを提案する。

【 0 1 2 3 】

例 6

応答者と非応答者（安定疾患の患者は含まない）との間で差次的に発現する遺伝子の同定

4 人の患者が安定疾患であると分類されたが、これらの患者は応答者または非応答者に明確に区別できないため分析から除外した。安定疾患の患者を分析に含めると、薬物治療に関係なく予後に関連した遺伝子選択の分析が偏ってしまう恐れがある。従って、10 人の応答者を 44 人の非応答者と比較することになった。選択される遺伝子は、40% の特異性を有し、最小の平均の変化が 2 倍である必要がある。このような基準は、可能な限り高レベルの感度でティピファニブに対する応答を予測できる遺伝子を同定するために選択した。11, 723 の遺伝子から、応答者と非応答者とを階層分類でき、かつ t 検定で有効な P 値 ($P < 0.05$) が得られた合計 8 個の遺伝子を同定した (表 6-5)。これらの遺伝子の中には、シグナル伝達、アポトーシス、細胞増殖、発癌、及び場合によっては F T I 生物学に關与する遺伝子が含まれている。

【 0 1 2 4 】

A K A P 1 3 は最も強力なマーカーである

次に、8 つの選択された遺伝子から最適な診断精度が得られる最小の遺伝子のセットを同定する。クラシファイアは、受信者動作曲線 (R O C) 解析で得た A U C 値に基づいて遺伝子の増大数を用いて作成し、応答を予測する感度を 100% に維持したまま、これらのクラシファイアの誤差率を L O O C V を用いて計算した (図 12 の A)。A K A P 1 3 遺伝子は、40% 未満の最低の誤差率で応答を予測することができる (図 12 の A)。3 つ以上の遺伝子をクラシファイアに用いる場合、誤差率が 50% 超に増大する。A K A P 1 3 の場合、L O O C V により、N P V が 93%、P P V が 31%、全診断精度が 63%、陽性の可能性の比率が 2.0 であることが示された (図 12 の B)。各患者における A K A P 1 3 の発現の値が図 12 の C に示されている。従って、A K A P 1 3 の発現率が低い患者群の場合、ティピファニブに対する応答率は、現在の患者集団の 18% (10 / 54) に対して 31% (8 / 26) である。A K A P 1 3 遺伝子を用いると、カプラン マイヤー分析 (Kaplan-Meier analysis) により、予測された応答者群と予測された非応答者群の生存に有意差が示された (図 12 の D)。

【表 6 - 5】

表 6 a. ティピファニブに対する応答を予測する上位 8 つの遺伝子リスト

PSID	遺伝子名	記号	AUC	倍変化	P 値	機能的な説明
208325_s_at	Aキナーゼ (PRKA) アンカータンパク質 13	AKAP13	0.830	0.491	0.00007	細胞内シグナル伝達、発癌
202820_at	アリアル炭化水素受容体	AHR	0.807	0.446	0.00019	シグナル伝達、アポトーシス
204362_at	s r cファミリー関連リンタンパク質	SCAP2	0.777	0.431	0.00007	シグナル伝達
213479_at	ニューロンペントラキシン 2 (neuronal pentraxin II)	NPTX2	0.738	0.115	0.02934	細胞接着
212384_at	H L A - B 関連転写物 1	BAT1	0.725	0.458	0.00097	細胞内生合成
206148_at	インターロイキン 3 受容体、 α (低親和性)	IL3RA	0.705	0.375	0.00226	受容体シグナル伝達
210666_at	イズロネート 2 - スルファターゼ (ハンター症候群)	IDS	0.645	0.395	0.00069	代謝
206637_at	プリン受容体 P 2 Y、G タンパク質結合、14	P2RY14	0.627	0.369	0.00145	シグナル伝達

A U C は、R O C 解析の曲線の下側の領域であり、全診断精度を示す。

【 0 1 2 5 】

例 7

抗体 (予言的)

ポリクローナル抗体の作製のために、L B C オンコジーン由来ペプチドを合成し、キー

10

20

30

40

50

ホールリンペットヘモシニアンに結合し、これを用いてウサギを免疫化した。この血清が対応するペプチドに対して反応するかをELISAで検査し、陽性のバッチを親和精製した。精製した抗体は、組織部分にエピトープを有するペプチドを特異的に検出する。これは、抗体と対応するペプチドが同時に添加された場合に信号が完全に消滅することで確認できる。IHCで良く機能するこのポリクローナル抗体に加えて、自然の折りたたみ状態のタンパク質を検出できるモノクローナル抗体も作製した。モノクローナル抗体を作製するために、自然の折りたたみ及び翻訳後修飾が確実となるように哺乳動物細胞で産生された精製された抗原を作製した。この抗原、すなわちLBCオンコプロテイン IgG定常部分融合タンパク質をマウス骨髄腫細胞で発現させ、このタンパク質をおとり(bait)としてFc部分を用いて精製した。この精製された抗原を、C末端ポリクローナル抗体によりウエスタンブロットで確認した。この抗原を用いて、IgG定常部分ではなくLBCペプチドに対して作用する抗体を産生する陽性クローンから選択してLBCペプチドに対するマウスモノクローナル抗体を得た。LBCオンコジーンを臨床で同定するためのキットを、これらの抗体または類似の抗体を用いて容易に作製することができる。このようなキットは、LBCペプチド(従ってLBCオンコジーン)同定用の抗体、適切な標識試薬(例えば、酵素及びラベルなど)、並びにこのようなキットの臨床用途に有用な、希釈用緩衝液、安定剤、及びこのようなアッセイに一般的に用いられる他の物質などの他の試薬(オプション)を含むことができる。

10

【0126】

例8

20

免疫組織化学(予言的)

LBCオンコジーンのC末端ペプチドに対する親和精製されたポリクローナル抗体をIHCの検出及びLBCオンコジーンの局在化に用いた。ホルマリン固定してパラフィンに埋め込んだ正常及び腫瘍組織から得た4µmの切片を、3-アミノプロピル トリエトキシ シラン(APE S、ミズーリ州セントルイスのシグマ(Sigma))がコーティングされたスライドガラスに載せた。これらの切片を、段階的濃度のエタノールで脱パラフィン化して再水和し、室温で30分間、メタノールペルオキシド(methanolic peroxide)(絶対メタノールに溶かした0.5%過酸化水素)で処理して、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。抗原の回収は、電子レンジで5分間(650W)、2回行った。Elite ABCキット(Vector Laboratories)を用いて免疫ペルオキシダーゼ染色を行った。LBCペプチド抗体は、1:2000の最適な希釈で使用した。ビオチン標識二次抗体及びペルオキシダーゼ標識アビジン ビオチン複合体の両方を切片上で30分間インキュベートした。PBS(pH7.2)で希釈液を作製し、全てのインキュベーションを室温の湿室で行った。ある染色ステップと別の染色ステップの間にスライドガラスをPBSで3回洗浄した。ペルオキシダーゼ染色は、3-アミノ 9-エチルカルバゾール(3-amino-9-ethylcarbazole)(シグマ(Sigma))溶液(0.03%過酸化水素を含む0.05M酢酸緩衝液中に0.2mg/mlの濃度、pH5.0)を用いて室温で15分間、見えるようにした。最後に、切片を、マイヤーのヘマトキシリンで軽く後染色し、水溶性封入剤(Aquamount、BDH)で封入した。コントロール実験では、一次抗体を正常なウサギの血清のIgG断片で置換する、或いは一次抗体をLBCペプチドで予め吸収する。このような染色は、細胞のサブセットにLBCオンコジーンが存在することを示している。

30

40

【0127】

本発明をより良く理解できるように図及び例を用いて詳細に説明したが、このような説明及び例は本発明の範囲を限定するものではない。

【0128】

【表 7 - 1】

表 7. 各配列の説明

配列番号	psid	説明
1	208325_s_at	A K A P 1 3 Aキナーゼ (P P K A) アンカータンパク質
2		A K A P 1 3 順方向プライマー
3		A K A P 1 3 逆方向プライマー
4		A K A P 1 3 プローブ
5	202820_at	アリアル炭化水素受容体
6	213188_s_at	M y c 誘導核抗原、5 3 k D a
7	210666_at	イズロネート 2 - スルファターゼ (ハンター症候群)
8	219032_x_at	オプシン 3 (エンセファロプシン (encephalopsin)、パノプシン (panopsin))
9	206637_at	Gタンパク質結合受容体 1 0 5
10	217853_at	テンシン様 S H 2 ドメイン含有 1 (Tensin-like SH2 domain-containing 1)
11	209500_x_at	腫瘍壊死因子 (リガンド) スーパーファミリー、メンバー 1 3
12	202565_s_at	スーパービリン (supervillin)
13	206148_at	インターロイキン 3 受容体、 α (低親和性)
14	204049_s_at	染色体 6 オープンリーディングフレーム 5 6
15	41858_at	F G F 受容体活性化タンパク質 1
16	213020_at	ゴルジ S N A P 受容体複合体メンバー 1
17	203940_s_at	KIAA1036
18	213134_x_at	B T G ファミリー、メンバー 3
19	213178_s_at	ミトジェン活性化プロテインキナーゼ 8 相互作用タンパク質 3
20	211133_x_at	白血球免疫グロブリン様受容体、サブファミリー B、メンバー 3
21	204951_at	r a s 相同遺伝子ファミリー、メンバー H
22	213479_at	ニューロンペントラキシン 2 (neuronal pentraxin II)
23	201042_at	染色体 2 0 q 1 1 . 2 2 - 1 2 上のクローン R P 5 - 1 0 5 4 A 2 2 の A L O 3 1 6 5 1 . 3 3 がトランスグルタミナーゼ 2 (Cポリペプチド、プロテイン - グルタミン - γ - グルタミルトランスフェラーゼ) の T G M 2 遺伝子、新規遺伝子、推定新規遺伝子、E S T s、S T S s、G S S s、及び C p G アイランド、完全配列を含む
24	201195_s_at	AB018009.1 L型アミノ酸トランスポーター 1、完全 c d s
25	201212_at	D55696.1 システインプロテアーゼ、完全 c d s
26	201249_at	NM_006516.1 溶質担体ファミリー 2 (促進グルコース輸送体)、メンバー 1 (S L C 2 A 1)
27	201250_s_at	NM_006516.1 溶質担体ファミリー 2 (促進グルコース輸送体)、メンバー 1 (S L C 2 A 1)
28	201445_at	NM_001839.1 カルボニン 3、酸性 (C N N 3)
29	201621_at	NM_005380.1 神経芽細胞腫、腫瘍形成能の抑制 1 (N B L 1)
30	201910_at	BF213279.1 c D N A クローン I M A G E : 4 0 7 0 2 0 3 5', m R N A 配列
31	201911_s_at	NM_005766.1 F E R M、R h o G E F (A R H G E F) 及びプレクストリン (plekstrin) ドメインタンパク質 1 (軟骨細胞由来) (F A R P 1)
32	201934_at	N92524.1 S o a r e s_副甲状腺_腫瘍_N b H P A ホモサピエンス c D N A クローン I M A G E : 3 0 4 8 9 9 3'
33	202154_x_at	NM_006086.1 チューブリン、 β 、4 (T U B B 4)
34	202219_at	NM_005629.1 溶質担体ファミリー 6 (神経伝達物質、クレアチン)、メンバー

10

20

30

40

【表 7 - 2】

		8 (SLC6A8)	
35	202242_at	NM_004615.1 膜貫通4スーパーファミリーメンバー2 (TM4SF2)	
36	202285_s_at	J04152.1 HUMGA733A ヒト胃腸腫瘍関連抗原GA733-1タンパク質遺伝子、完全c d s、クローン05516	
37	202286_s_at	J04152.1 HUMGA733A ヒト胃腸腫瘍関連抗原GA733-1タンパク質遺伝子、完全c d s、クローン05516	
38	202287_s_at	NM_002353.1 腫瘍関連カルシウムシグナル伝達物質2 (TACSTD2)	
39	202310_s_at	NM_000088.1 コラーゲン、I型、 α 1 (COL1A1)	
40	202311_s_at	NM_000088.1 コラーゲン、I型、 α 1 (COL1A1)	
41	202312_s_at	NM_000088.1 コラーゲン、I型、 α 1 (COL1A1)	10
42	202411_at	NM_005532.1 インターフェロン、 α 誘導タンパク質27 (IFI27)	
43	202458_at	NM_007173.1 プロテアーゼ、セリン、23 (SPUVE)	
44	202468_s_at	NM_003798.1 カテニン (カドヘリン関連タンパク質)、 α 様1 (CTNNAL1)	
45	202478_at	NM_021643.1 トリブルズ (tribbles) 相同体2 (ショウジョウバエ) (TRIB2)	
46	202481_at	NM_004753.1 短鎖デヒドロゲナーゼ/リダクターゼ1 (SDR1)	
47	202712_s_at	NM_020990.2 クレアチンキナーゼ、ミトコンドリア1 (偏在性) (CKMT1)	
48	202723_s_at	AW117498.1 Soares_NFL_T_GBC_S1 cDNAクローンIMAGE: 26050983', gb: U02368 PAIRED BOX PROTEIN PAX-3に類似	20
49	202724_s_at	NM_002015.2 フォークヘッドボックスO1A (横紋筋肉腫) (FOXO1A)	
50	202759_s_at	BE879367.1 cDNAクローンIMAGE: 38872625'	
51	202760_s_at	NM_007203.1 Aキナーゼ (PRKA) アンカータンパク質2 (AKAP2)	
52	202789_at	AL022394.3 染色体20q11.2-12上のクローンRP3-511B24がトポイソメラーゼ (DNA) IのTOP1遺伝子の3'末端、ホスホリパーゼC γ 1のPLCG1遺伝子、可能なホメオボックスタンパク質の遺伝子KIAA0395、60Sリボソームタンパク質L23A (RPL23A) 偽遺伝子、ESTs、STSs、GSSs、及びCpGアイランドを含む	
53	202834_at	NM_000029.1 アンジテンシノーゲン (セリン (またはシステイン)) プロテイナーゼ阻害物質、クレード (clade) A (α 1抗プロテイナーゼ、抗トリプシン)、メンバー8、(AGT)	30
54	202860_at	NM_014856.1 KIAA0476遺伝子産物 (KIAA0476)	
55	202889_x_at	T62571.1 ストラタジーン社の肺 (#937210) cDNAクローンIMAGE: 797293'	
56	202890_at	T62571.1 ストラタジーン社の肺 (#937210) cDNAクローンIMAGE: 797293'	
57	202947_s_at	NM_002101.2 グリコホリンC (ガービッチ血液型) (GYPC)、転写変異体1	
58	202949_s_at	NM_001450.1 4個半のLIMドメイン2 (FHL2)	
59	203139_at	NM_004938.1 死関連プロテインキナーゼ1 (DAPK1)	
60	203287_at	NM_005558.1 ラジニン (ladinin) 1 (LAD1)	
61	203886_s_at	NM_001998.1 フィブリン (fibulin) 2 (FBLN2)	40
62	204014_at	NM_001394.2 二重特異性ホスファターゼ4 (DUSP4)	
63	204015_s_at	BC002671.1 二重特異性ホスファターゼ4 (DUSP4)、クローンMGC:	

【表 7 - 3】

		3713 IMAGE:3605895	
64	204082_at	NM_006195.1 プレB細胞白血病転写因子3 (PBX3)	
65	204141_at	NM_001069.1 チュープリン、βポリペプチド (TUBB)	
66	204351_at	NM_005980.1 S100カルシウム結合タンパク質P (S100P)	
67	204361_s_at	AB014486.1 RA70のmRNA	
68	204362_at	NM_003930.1 srcファミリー関連リンタンパク質2 (SCAP2)	
69	204416_x_at	NM_001645.2 アポリポタンパク質C-1 (APOC1)	
70	204642_at	NM_001400.2 内皮分化、スフィンゴ脂質Gタンパク質結合受容体、1 (EDG1)	
71	204694_at	NM_001134.1 α-フェトプロテイン (AFP)	10
72	204698_at	NM_002201.2 インターフェロン刺激遺伝子 (20kD) (ISG20)	
73	204729_s_at	NM_004603.1 シンタキシン1A (脳) (STX1A)	
74	204777_s_at	NM_002371.2 mal、T細胞分化タンパク質 (MAL)、転写変異体a	
75	204863_s_at	BE856546.1 Soares_NSF_F8_9W_OT_PA_P_S1_cDNAクローンIMAGE:3299420 3'、SW:IL6B_ヒトP40189インターロイキン6受容体ベータ鎖前駆体に類似	
76	204864_s_at	NM_002184.1 ホモサピエンスインターロイキン6シグナル伝達物質 (gp130、オンコスタチンM受容体) (IL6ST)、mRNA	
77	204881_s_at	NM_003358.1 UDPグルコースセラミドグルコシルトランスフェラーゼ (UGCG)	
78	204885_s_at	NM_005823.2 メソセリン (mesothelin) (MSLN)、転写変異体1	20
79	204950_at	NM_014959.1 カスパーゼ補充ドメインファミリー、メンバー8 (CARD8)	
80	204955_at	NM_006307.1 sushi反復含有タンパク質、第10染色体 (SRPX)	
81	204966_at	NM_001703.1 脳特異的腫瘍形成阻害物質2 (BAI2)	
82	204989_s_at	BF305661.1 NIH_MGC_17cDNAクローンIMAGE:4139065 5'	
83	204990_s_at	NM_000213.1 インテグリン、β4 (ITGB4)	
84	205108_s_at	NM_000384.1 アポリポタンパク質B (Ag(x)抗原を含む) (APOB)	
85	205336_at	NM_002854.1 パルプアルブミン (PVALB)	
86	205453_at	NM_002145.1 ホメオボックスB2 (HOXB2)	
87	205600_x_at	AI052747.1 Soares_全胎児_Nb2HF8_9w_ホモサピエンスcDNAクローンIMAGE:1676553 3'、gb:M92299ホメオボックスタンパク質HOX-B5に類似	30
88	205601_s_at	NM_002147.1 ホメオボックスB5 (HOXB5)	
89	205608_s_at	U83508.1 アンジオポイエチン-1 mRNA、完全cds	
90	205609_at	NM_001146.1 アンジオポイエチン1 (ANGPT1)	
91	206289_at	NM_002141.1 ホメオボックスA4 (HOXA4)	
92	206298_at	NM_021226.1 RhoGTP加水分解酵素活性化タンパク質2 (RhoGAP2)	
93	206674_at	NM_004119.1 fms関連チロシンキナーゼ3 (FLT3)	
94	207111_at	NM_001974.1 egf様モジュール含有、ムチン様、ホルモン受容体様配列1 (EMR1)	
95	207826_s_at	NM_002167.1 DNA結合阻害物質3、ドミナントネガティブヘリックス-ループ-ヘリックスタンパク質 (ID3)	40
96	207935_s_at	NM_002274.1 ケラチン13 (KRT13)	
97	208130_s_at	NM_030984.1 トロンボキサンAシンターゼ1 (血小板、チトクロムP450、	

【表 7 - 4】

		ファミリー5、サブファミリーA) (TBXAS1)、転写変異体TXS-1
98	208414_s_at	NM_002146.1 ホメオボックスB3 (HOXB3)
99	208621_s_at	NM_003379.2 ピリン (villin) 2 (エズリン) (VIL2)
100	208622_s_at	NM_003379.2 ピリン (villin) 2 (エズリン) (VIL2)
101	208623_s_at	J05021.1 HUMVIL2 ヒトサイトピリン (cytovillin) 2 (VIL2)、完全c d s
102	208977_x_at	BC004188.1 チューブリン、 β 、2、クローンMGC: 2826 IMAGE: 2964559
103	209119_x_at	AV703465.1 cDNAクローンADBCHG08 5'
104	209120_at	AV703465.1 cDNAクローンADBCHG08 5'
105	209122_at	BC005127.1 脂肪分化関連タンパク質、クローンMGC: 10598 IMAGE: 3844174
106	209191_at	BC002654.1 チューブリン β MGC4083、mRNA (cDNAクローンMGC: 4083 IMAGE: 3605559)
107	209209_s_at	AW469573.1 hd29e09. x Soares_NFL_T_GBC_S1 cDNA IMAGE: 2910952 3', TR: Q14840Q14840マイトジェン誘導遺伝子MIG-2に類似
108	209210_s_at	Z24725.1 マイトジェン誘導遺伝子 mig-2
109	209227_at	AU158251.1 PLACE1 cDNAクローンPLACE1011740 3'
110	209228_x_at	U42349.1 N33 mRNA、完全c d s
111	209239_at	M55643.1 HUMNFKB34 ヒト因子KBF1 mRNA、完全
112	209270_at	L25541.1 HUMLAMBIK ラミニンSB3鎖 (LAMB3) mRNA、完全c d s
113	209289_at	AI700518.1 we37d09. x NCI_CGAP_Lu24 cDNAクローンIMAGE: 2343281 3'
114	209309_at	D90427.1 HUMZA2G 亜鉛- α 2-糖癌前駆体、完全c d s
115	209324_s_at	BF304996.1 601888511F1 NIH_MGC_17 cDNAクローンIMAGE: 4122242 5'
116	209325_s_at	U94829.1 網膜に豊富なGタンパク質シグナル伝達hRGS-rの制御因子 (hRGS-r)
117	209372_x_at	BF971587.1 602239834F1 NIH_MGC_46 cDNAクローンIMAGE: 4328385 5'
118	209443_at	J02639.1 HUMCINHP 血漿セリンプロテアーゼ (タンパク質C) 阻害物質
119	209560_s_at	U15979.1 ヒト (dik) mRNA
120	209679_s_at	BC003379.1 クローン643からの仮定上のタンパク質、mRNA (cDNAクローンMGC: 5115 IMAGE: 2984805)
121	209730_at	U38276.1 セマフォリン (semaphorin) IIIファミリー相同体
122	209810_at	J02761.1 HUMPSPBA肺表面活性物質関連タンパク質B (SP-B)
123	210139_s_at	L03203.1 HUMGAS3X 末梢ミエリンタンパク質22 (GAS3)
124	210347_s_at	AF080216.1 C2H2型Znフィンガータンパク質
125	210510_s_at	AF145712.1 可溶性ニューロピリン (neuropilin) - 1
126	210615_at	AF280547.1 ニューロピリン (neuropilin) - 1 可溶性アイソフォーム11 (NRP1)、選択的にスプライシング
127	210854_x_at	U17986.1 GABA/ノルアドレナリン輸送体
128	211000_s_at	AB015706.1 リウマチ様関節炎抗原性ペプチド含有可溶型のgp130のため

10

20

30

40

【表 7 - 5】

		(g p 1 3 0 - R A P S)	
129	211535_s_at	M60485.1 HUMFGFAA 線維芽細胞成長因子受容体	
130	211743_s_at	BC005929.1 プロテオグリカン2、骨髄 (ナチュラルキラー細胞活性化因子、好酸球顆粒主要塩基性タンパク質)、(cDNAクローン MGC:14537 IMAGE:4043815)	
131	211915_s_at	U83110.1 HUMTUB4Q02 β -チューブリン (TUB4q)	
132	212012_at	AF200348.1 黒色腫関連抗原 MG50	
133	212013_at	AF200348.1 黒色腫関連抗原 MG50	
134	212283_at	AF016903.1 アグリン前駆体	
135	212285_s_at	AF016903.1 アグリン前駆体	10
136	212298_at	BE620457.1 601483690F1 NIH_MGC_69 cDNAクローン IMAGE:3886055 5'	
137	212382_at	AK021980.1 cDNA FLJ11918 fis、クローンHEM BB1000272	
138	212385_at	AK021980.1 cDNA FLJ11918 fis、クローンHEM BB1000272	
139	212386_at	AK021980.1 cDNA FLJ11918 fis、クローンHEM BB1000272	
140	212387_at	AK021980.1 cDNA FLJ11918 fis、クローンHEM BB1000272	
141	212531_at	NM_005564.1 リポカリン2 (オンコジーン24p3) (LCN2)	20
142	212570_at	AL573201.2 胎盤COT25 - 標準化cDNAクローンCSODI043YM013'	
143	212573_at	AL573201.2 胎盤COT25 - 標準化cDNAクローンCSODI043YM013'	
144	212664_at	AL567012.3 胎児脳クローンCS0DF028YP033-PRIME	
145	212740_at	BF740111.1 7n12e08. x INCI_CGAP_Brn23 ホモサピエンスcNDAクローン IMAGE:3564398 3'、TR:Q99570 Q99570 ADAPTOR PROTEINに類似	
146	212771_at	AU150943.1 NT2RP2 cDNAクローンNT2RP2003984 3'	
147	213147_at	NM_018951.1 ホメオボックスA10 (HOXA10)	
148	213150_at	NM_018951.1 ホメオボックスA10 (HOXA10)	
149	213231_at	L19267.1 HUMDNA59A ホモサピエンス59タンパク質 mRNA、3'末端	30
150	213338_at	BF062629.1 7h62h07. x INCI_CGAP_Co16 クローンIMAGE:3320605 3'	
151	213423_x_at	A1884858.1 w185f06. x INCI_CGAP_Brn25 cDNAクローンIMAGE:2431715 3'、TR:Q14911 Q14911 N33 PROTEIN FORM 1. [2]TR:Q14912に類似	
152	213539_at	NM_000732.1 CD3D抗原、 δ ポリペプチド (Tit3複合体) (CD3D)	
153	213553_x_at	W79394.1 Soares_胎児_心臓_NbHH19Wクローン:IMAGE:346956 3'、gb:X00570 APOLIPOPROTEIN C-I PRECURSOR (HUMAN) に類似	
154	213843_x_at	AW276522.1 AW276522 xr15a02. x INCI_CGAP_Lu28 cDNAクローン IMAGE:2760170 3'、SW:NTCS_HUMANP53796 SODIUM- AND CHLORIDE-DEPENDENT	40

【表 7 - 6】

		NT CREATINE TRANSPORTER 2に類似
155	214292_at	AA808063.1 AA808063 of 50 f 09. s I N C I _ C G A P _ C N S 1 cDNAクローン IMAGE: 1427657 3', gb: X53587 インテグリンβ4サブユニット受容体に類似
156	214433_s_at	NM_003944.1 セレン結合タンパク質1 (SELENBP1)
157	214696_at	AF070569.1 AF07569クローン24659
158	214721_x_at	AL162074.1 DKFZ p762L106 (クローンDKFZ p762L106 から)
159	215073_s_at	AL554245.3 胎盤COT25 - 標準化cDNAクローンCS0DI082YA 025'
160	215446_s_at	L16895.1 HUMX7LOX リジロオキシダーゼ (LOX) 遺伝子、エキソン7
161	215812_s_at	U41163.1 クレアチン輸送体 (SLC6A10) 遺伝子、部分c d s
162	216641_s_at	U58994.1 HSU58994 ラジニン (ladinin) (LAD) 遺伝子、完全c d s
163	216899_s_at	AC003999.2 7からのPACクローンRP5-1139P1、完全配列
164	217013_at	AC004522.3 7からのPACクローンRP4-604G5、完全配列
165	217014_s_at	AC004522.3 7からのPACクローンRP4-604G5、完全配列
166	217293_at	AF209975.1 組織の種類: 大動脈
167	217410_at	AK021586.1 cDNA FLJ11524 f i s、クローンHEMBA1002547、アグリン前駆体mRNAに高度に類似
168	217419_x_at	AK021586.1 cDNA FLJ11524 f i s、クローンHEMBA1002547、アグリン前駆体mRNAに高度に類似
169	217875_s_at	NM_020182.1 膜貫通、前立腺アンドロゲン (androgen) 誘導RNA (TMEPAI)
170	218062_x_at	NM_012121.2 Cdc42エフェクタータンパク質4、Rho GTP加水分解酵素の結合物質4 (CEP4)
171	218368_s_at	NM_016639.1 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー12A (TNFRSF12A)
172	218801_at	NM_020121.2 UDP-グルコースセラミドグルコシルトランスフェラーゼ様2 (UGCGL2)
173	219008_at	NM_021925.1 仮定上のタンパク質FLJ21820 (FLJ21820)
174	219218_at	NM_024696.1 仮定上のタンパク質FLJ23058 (FLJ23058)
175	219452_at	NM_022355.1 ジペプチダーゼ2 (DPEP2)
176	220386_s_at	NM_019063.1 棘皮動物微小管関連タンパク質様4 (EML4)
177	220416_at	NM_024837.1 ATP分解酵素、クラスI、8B型、メンバー4 (ATP8B4)
178	220558_x_at	NM_005705.1 全造血発現 (pan-hematopoietic expression) (PHEMX)
179	221009_s_at	NM_016109.1 アンジオポイエチン-様4 (ANGPTL4)
180	221942_s_at	AI719730.1 as92b12. x I Barstead大動脈HPLRB6 cDNAクローン IMAGE: 2353055 3', gb: X66534_cds1 グアニル酸シクラーゼ可溶性、α3鎖に類似
181	222108_at	AC004010.1 12からのBACクローンGS1-99H8、完全配列
182	222192_s_at	AK021672.1 ホモサピエンスcDNA FLJ11610 f i s、クローンHEMBA1003985
183	222193_at	AK021672.1 cDNA FLJ11610 f i s、クローンHEMBA1003985
184	33304_at	U88964.1 HSU88964 HEM45 mRNA、完全c d s

10

20

30

40

【表 7 - 7】

185	33768_at	L19267.1 HUMDNA59A59タンパク質mRNA、3'末端
186	35666_at	U38276.1 HSU38276 セマフォリン (semaphorin) IIIファミリー相同体mRNA、完全c d s
187	37004_at	J02761.1 HUMPSPBA 肺表面活性物質関連タンパク質B (SP-B)
188	37005_at	D28124.1 HUMZAPII 既知の産物のmRNA、完全c d s
189	37996_s_at	L08835.1 HUMDMKIN DMR-N9、部分c d s、筋緊張性ジストロフィーキナーゼ (DMキナーゼ) 遺伝子

【0129】

10

本発明の実施態様は以下の通りである。

(1) 急性骨髄性白血病 (AML) 患者の予後 (生存 / 転帰) を評価する方法であって

(a) 前記患者から生体サンプルを採取するステップと、

(b) (i) 配列番号1または5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1または5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記サンプルにおける発現レベルを測定するステップとを含み、

所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い前記遺伝子発現レベルがAMLの予後を示していることを特徴とする方法。

20

(2) 急性骨髄性白血病 (AML) 患者の状態を決定する方法であって、

(a) 前記患者から生体サンプルを採取するステップと、

(b) (i) 配列番号1または5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1または5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記サンプルにおける発現レベルを測定するステップとを含み、

所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い前記遺伝子発現レベルがAMLの状態を示していることを特徴とする方法。

(3) 急性骨髄性白血病 (AML) 患者の治療プロトコルを決定する方法であって、

(a) 前記患者から生体サンプルを採取するステップと、

(b) (i) 配列番号1または5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1または5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記サンプルにおける発現レベルを測定するステップとを含み、

所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、治療に対して患者が応答する可能性を十分に示し、医師が適切な治療の程度及び種類を決定することができることを特徴とする方法。

30

(4) 急性骨髄性白血病 (AML) 患者を治療する方法であって、

(a) 前記患者から生体サンプルを採取するステップと、

(b) (i) 配列番号1または5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1または5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の前記サンプルにおける発現レベルを測定するステップであって、所定のカットオフレベルよりも高いまたは低い前記遺伝子発現レベルが、前記患者が治療に応答する可能性を示す、前記ステップと、

40

(c) 前記患者が治療に応答しそうな場合に前記患者をアジュバント療法で治療することを特徴とする方法。

(5) 前記患者が再発性または難治性AMLであることを特徴とする実施態様(1)、(2)、(3)、または(4)に記載の方法。

【0130】

50

(6) 前記配列番号が 1、5、及び 6 であることを特徴とする実施態様 (1)、(2)、(3)、または (4) に記載の方法。

(7) 更に、前記サンプル中で恒常的に発現している少なくとも 1 種類の遺伝子の発現レベルを測定するステップを含むことを特徴とする実施態様 (1)、(2)、(3)、または (4) に記載の方法。

(8) 発現パターンの比較をパターン認識法で行うことを特徴とする実施態様 (1)、(2)、(3)、または (4) に記載の方法。

(9) 前記パターン認識法が C o x 比例ハザード分析の使用を含むことを特徴とする実施態様 (8) に記載の方法。

(1 0) 前記所定のカットオフレベルが、良性細胞または正常組織に対して前記サンプルで少なくとも 1 . 5 倍の過剰発現または 1 . 5 分の 1 の過少発現であることを特徴とする実施態様 (1)、(2)、(3)、または (4) に記載の方法。 10

【 0 1 3 1 】

(1 1) 前記所定のカットオフレベルが、良性細胞または正常組織に対して、転移細胞を有する前記サンプルで少なくとも統計的に有意な p 値の過剰発現であることを特徴とする実施態様 (1)、(2)、(3)、または (4) に記載の方法。

(1 2) 前記 p 値が 0 . 0 5 未満であることを特徴とする実施態様 (1 1) に記載の方法。

(1 3) 前記遺伝子発現をマイクロアレイまたは遺伝子チップで測定することを特徴とする実施態様 (1)、(2)、(3)、または (4) に記載の方法。 20

(1 4) 前記マイクロアレイが c D N A アレイまたはオリゴヌクレオチドアレイであることを特徴とする実施態様 (1 3) に記載の方法。

(1 5) 前記マイクロアレイまたは前記遺伝子チップが更に、1 または複数の内部コントロール試薬を含むことを特徴とする実施態様 (1 3) に記載の方法。

【 0 1 3 2 】

(1 6) 遺伝子発現を、前記サンプルから抽出した R N A のポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) で核酸を増幅して決定することを特徴とする実施態様 (1)、(2)、(3)、または (4) に記載の方法。

(1 7) 前記 P C R が逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (R T P C R) であることを特徴とする実施態様 (1 6) に記載の方法。 30

(1 8) 前記 R T P C R が更に、1 または複数の内部コントロール試薬を含むことを特徴とする実施態様 (1 7) に記載の方法。

(1 9) 遺伝子発現を、その遺伝子によってコードされるタンパク質を測定または検出して検出することを特徴とする実施態様 (1)、(2)、(3)、または (4) に記載の方法。

(2 0) 前記タンパク質を、そのタンパク質に特異的な抗体によって検出することを特徴とする実施態様 (1 9) に記載の方法。

【 0 1 3 3 】

(2 1) 遺伝子発現をその遺伝子の特性を測定して検出することを特徴とする実施態様 (1)、(2)、(3)、または (4) に記載の方法。 40

(2 2) 前記測定した特性が、D N A 増幅、メチル化、突然変異、及び対立遺伝子変異体からなる群から選択されることを特徴とする実施態様 (2 1) に記載の方法。

(2 3) 急性骨髄性白血病 (A M L) 患者の予後患者レポートを作成する方法であって、

(a) 患者から生体サンプルを採取するステップと、
 (b) 前記サンプルの遺伝子発現を測定するステップと、
 (c) 前記ステップ (b) の結果に再発ハザードスコアを適用するステップと、
 (d) 前記ステップ (c) で得た結果を用いて前記レポートを作成するステップとを含むことを特徴とする方法。

(2 4) 前記レポートが、前記患者の転帰の評価及び / または患者集団に対するリスク 50

の可能性を含むことを特徴とする実施態様(23)に記載の方法。

(25)前記患者が再発性または難治性の患者であることを特徴とする実施態様(23)に記載の方法。

【0134】

(26)実施態様(23)に従った方法で作成した患者レポート。

(27)配列番号1 22、または表7に示されている配列番号1及び5 22に一致するpsid番号からなる群から選択される少なくとも1つのプローブセットを含むことを特徴とする組成物。

(28)生体サンプルで急性骨髄性白血病の予後を決定するためのアッセイを行うためのキットであって、

(i)配列番号1及び5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1及び5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を検出するための物質を含むことを特徴とするキット。

(29)前記配列番号が1、5、及び6であることを特徴とする実施態様(28)に記載のキット。

(30)更に、マイクロアレイ分析を実施するための試薬を含むことを特徴とする実施態様(29)に記載のキット。

【0135】

(31)更に、前記核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部をアッセイするための培地を含むことを特徴とする実施態様(28)に記載のキット。

(32)生体サンプルで急性骨髄性白血病の予後を評価するための製品であって、

(i)配列番号1及び5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1及び5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を検出するための物質を含むことを特徴とする製品。

(33)前記配列番号が1、5、及び6であることを特徴とする実施態様(32)に記載の製品。

(34)更に、マイクロアレイ分析を実施するための試薬を含むことを特徴とする実施態様(32)に記載の製品。

(35)更に、前記核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部をアッセイするための培地を含むことを特徴とする実施態様(32)に記載の製品。

【0136】

(36)実施態様(1)、(2)、(3)、または(4)の方法を実施するためのマイクロアレイまたは遺伝子チップ。

(37)(i)配列番号1及び5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1及び5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を含み、前記組合せが生体サンプルで急性骨髄性白血病の状態または予後を特徴付けるのに十分であることを特徴とする実施態様(36)に記載のマイクロアレイ。

(38)測定または特徴付けが1.5倍の過剰発現または1.5分の1の過少発現であることを特徴とする実施態様(36)に記載のマイクロアレイ。

(39)測定により統計的に有意なp値の過剰発現または過少発現が得られることを特徴とする実施態様(36)に記載のマイクロアレイ。

(40)前記p値が0.05未満である特徴とする実施態様(39)に記載のマイクロアレイ。

【0137】

10

20

30

40

50

(41) cDNAアレイまたはオリゴヌクレオチドアレイを含むことを特徴とする実施態様(36)に記載のマイクロアレイ。

(42) 更に、1または複数の内部コントロール試薬を含むことを特徴とする実施態様(36)に記載のマイクロアレイ。

(43) 診断/予後ポートフォリオであって、

(i) 配列番号1及び5 22に一致する、または(ii)表7に示されている配列番号1及び5 22に一致するpsid番号からなる群から選択されるプローブセットによって認識される、mRNAをコードする遺伝子からなる群から選択される遺伝子の組合せの単離された核酸配列、それらの相補体、またはそれらの一部を含み、

前記組合せが生体サンプルで急性骨髄性白血病の状態または予後の特徴付けるのに十分であることを特徴とする診断/予後ポートフォリオ。 10

(44) 測定または特徴付けが1.5倍の過剰発現または1.5分の1の過少発現であることを特徴とする実施態様(43)に記載のポートフォリオ。

(45) 測定により統計的に有意なp値の過剰発現または過少発現が得られることを特徴とする実施態様(43)に記載のポートフォリオ。

【0138】

(46) 前記p値が0.05未満である特徴とする実施態様(45)に記載のマイクロアレイ。

【図面の簡単な説明】

【0139】

【図1】再発性及び難治性AML患者の自動クラスタリングを示す図である。このデンドログラム(dendrogram)は、58人の再発性及び難治性AML患者の自動k平均クラスタリングを示している。各列は患者を表し、各行は遺伝子を表している。各遺伝子の発現率は、患者のその遺伝子の発現レベルを他の全患者の平均で除して求めた。カラーバーは、倍変化(\log_2)を示している。赤色は上方制御を示し、青色は下方制御を示している。白色は変化がないことを示している。6つの主要ラスターの存在が示されている。

【図2】2つの遺伝子のリアルタイムRT-PCRを示す図である。AHR及びAKAP13をリアルタイムRT-PCRで測定した。HPRTまたはPBGDコントロール遺伝子を用いて遺伝子発現値を標準化した。エラーバーは標準偏差である。得られた値を、対応するマイクロアレイデータに対してプロットし、線形回帰分析を行った。 30

【図3】AKAP13遺伝子の予測値を示す図である。パネルAは、応答者(R)及び非応答者(NR)に対するクラシファイアとしてAKAP13の発現を用いて行ったLOCVから作成した2x2テーブルを示している。パネルBは、同じ58人の患者のAKAP13の発現値を示している。P値は、各応答群の平均値間の遺伝子発現の有意差を示している。パネルCは、応答者及び非応答者であるとAKAP13遺伝子によって分類された患者から作成した Kaplan-Meier 曲線を示している。

【図4】予測マーカーの最小セットを示す図である。パネルAでは、100%の感度を用いてLOCVを行った。1~19の遺伝子を含む個々のクラシファイアを検査した。得られた誤差率をプロットした。パネルBは、応答者(R)及び非応答者(NR)に対するクラシファイアとして3遺伝子シグネチャを用いて行ったLOCVから作成した2x2 40
テーブルを示している。パネルCは、3遺伝子クラシファイアから作成したスコアを示している。p値は、応答群間の遺伝子発現の有意差を示している。パネルDは、3遺伝子シグネチャによって応答者及び非応答者に分類された患者から作成した Kaplan-Meier 曲線を示している。平均生存期間も示している。

【図5】3遺伝子シグネチャによって応答者及び非応答者に分類された患者に対して行った Kaplan-Meier 分析を示す図である。臨床では非応答者であると決定されたが3遺伝子シグネチャでは応答者であると分類された患者の生存曲線を示している。平均生存期間も示している。

【図6】AML細胞系でのAKAP13の過剰発現を示す図である。細胞数は、コントロールの百分率を得るために薬物を含まない培地(-12 log単位として示している) 50

に対して標準化した。エラーバーは平均の標準誤差を示している。中が開いたデータ点は、高い濃度の薬物を試す第2の実験結果を示している。

【図7】再発性または難治性AMLにおけるFTI作用のモデルを示す図である。Aでは、応答者でIL3RA遺伝子及びAKAP13遺伝子がゆっくり発現し、ras、RhoA、及びラミンBの経路の下方制御が可能である。RhoHの上方制御により、細胞内形質転換経路の阻害が大きくなる。これにより、FTI抗腫瘍形成の効果が増大する。Bでは、非応答者で反対の遺伝子発現プロファイルが見られ代償経路の発生が可能である。

【図8】Zarnestra予測遺伝子シグネチャが単独の予後遺伝子シグネチャよりも有用であることを示す図である。パネルAでは、列が再発性または難治性患者からのAMLサンプルを表し、行は、階層クラスタリングによって順番が決められたプリンガー（Bullinger）らによって同定された133の予後遺伝子の内の103に一致する167のプロブセットを表している。パネルBは、クラスターで決定された患者群のカプランマイヤー生存推定を示している。パネルCでは、3遺伝子クラシファイアを用いて、ティピファニブの応答者をプリンガーシグネチャ（Bullinger signature）によって決まる良好な予後群と不良な予後群に区別した。カプランマイヤー生存曲線は、良好（Zn+、クラスター1）な予後群及び不良（Zn+、クラスター2）な予後群のティピファニブに対する応答者に区別された患者を示している。各群の平均生存期間も示している。

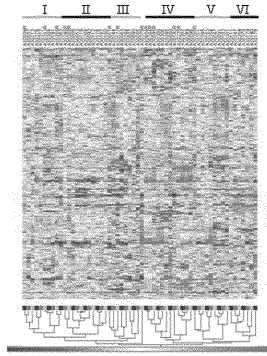
【図9】プリンガー（Bullinger）ら（2004年）の遺伝子をAffymetrix U133Aチップ上の167のプロブセット（103個の遺伝子）にどのように一致させるかを示すフローチャートである。

【図10】再発性または難治性AML患者における167のプロブセットの有用性を示す図である。パネルAでは、列が再発性または難治性患者からのAMLサンプルを表し、行は、階層クラスタリングによって順番が決められたプリンガー（Bullinger）ら（2004年）によって同定された133の予後遺伝子の内の103に一致する167のプロブセットを表している。パネルBは、クラスターで決定された患者群のカプランマイヤー生存推定を示している。

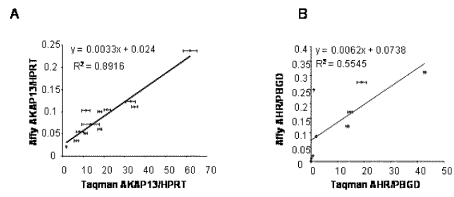
【図11】予後遺伝子シグネチャとZarnestra予測遺伝子シグネチャとの比較を示す図である。パネルAは、プリンガー（Bullinger）ら（2004年）の103の遺伝子のサブセットによって決められた良好な予後クラスターと不良な予後クラスターのカプランマイヤー生存曲線を示している。パネルBは、Zarnestraに対する応答を予測する3遺伝子シグネチャによって決められた良好な予後クラスターと不良な予後クラスターのカプランマイヤー生存曲線を示している。パネルCは、3遺伝子Zarnestraシグネチャによって更に階層分類されたパネルAの良好な予後クラスターと不良な予後クラスターのカプランマイヤー生存曲線を示している。パネルDは、残りの患者に対する予後が不良でZarnestraに反応しない患者のカプランマイヤー生存曲線を示している。

【図12】予測マーカーの最小セットの決定を示す図である。パネルAは、感度が100%、特異性が40%、変化が2倍を超える遺伝子を選択するためにLOOCVを実施し、AUIによって順位が付けられた1~8の遺伝子を含む個々のクラシファイアを検査し、得られた誤差率のプロットを示している。パネルBは、クラシファイアとしてAKAP13を用いて応答者（R）及び非応答者（NR）に対して行ったLOOCVから作成した2x2テーブルを示している。パネルCは、AKAP13の遺伝子発現値を示している。P値は、応答群間の遺伝子発現における有意差を示している。パネルDは、AKAP13によって応答者及び非応答者に分類された患者から作成したカプランマイヤー曲線を示している。平均生存期間も示している。

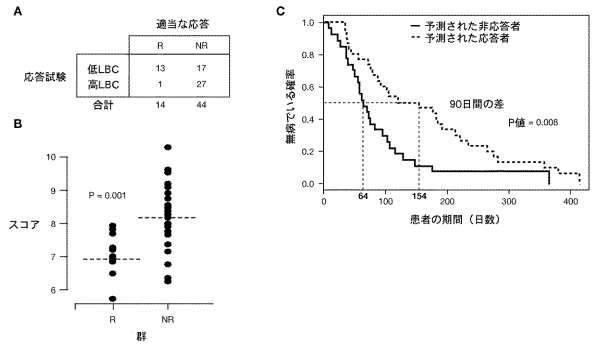
【 図 1 】



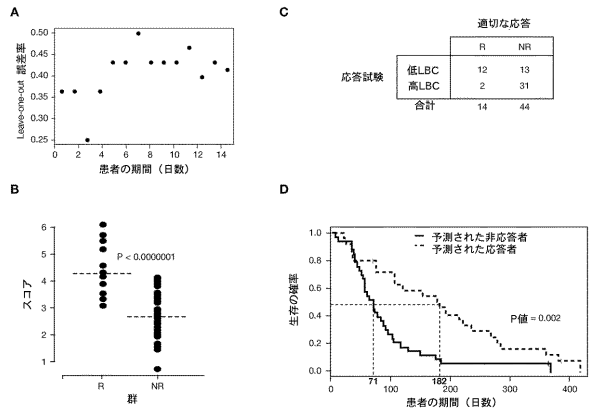
【 図 2 】



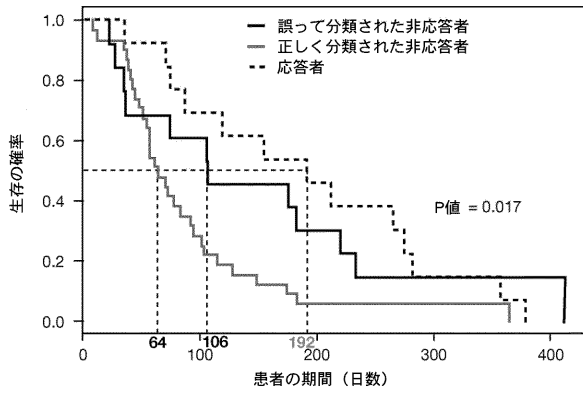
【 図 3 】



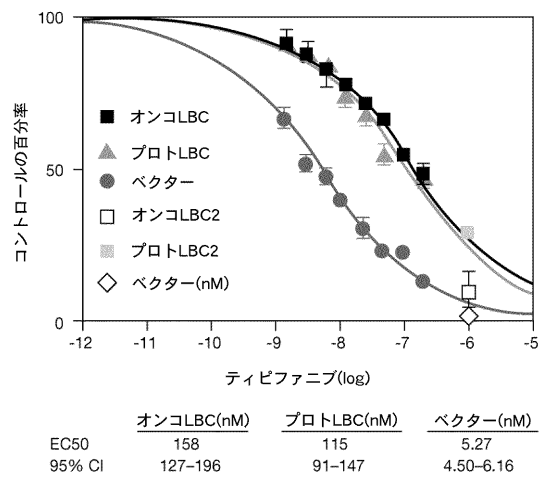
【 図 4 】



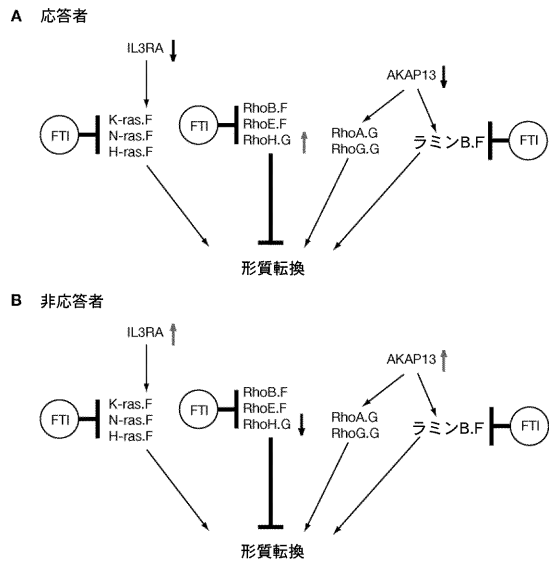
【 図 5 】



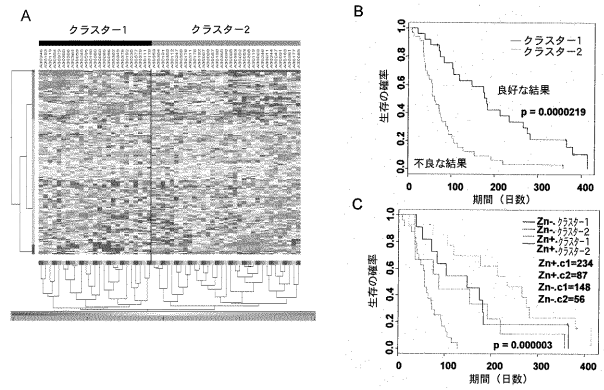
【 図 6 】



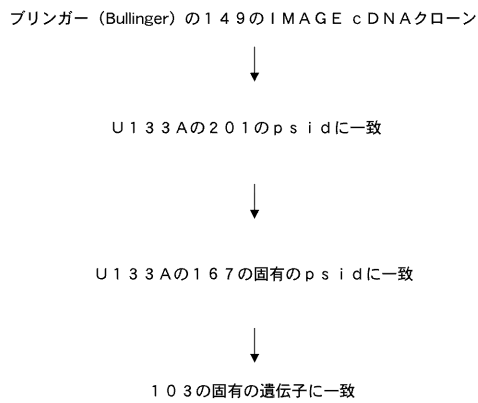
【図7】



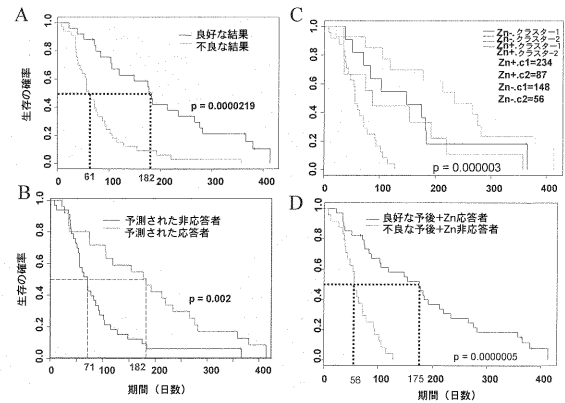
【図8】



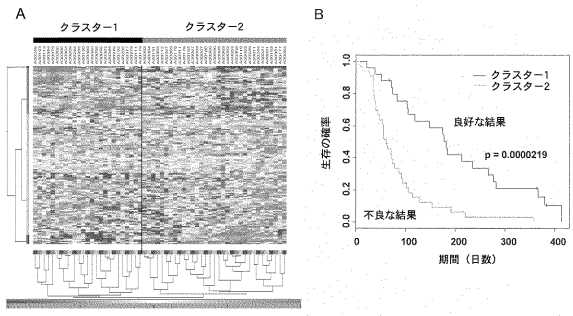
【図9】



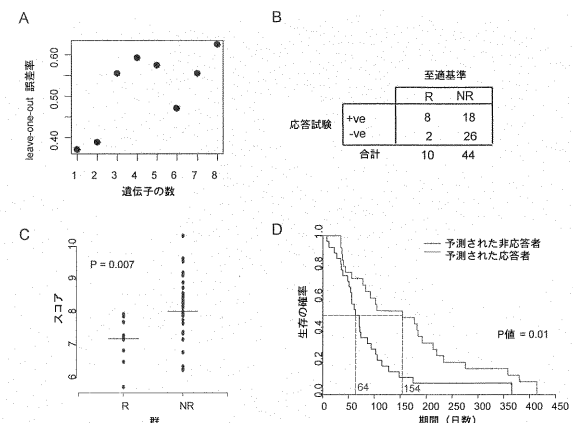
【図11】



【図10】



【図12】



【配列表】

2005333987000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 37/00	1 0 2

(74)代理人 100101133

弁理士 濱田 初音

(72)発明者 ミッチ・ラボニ

アメリカ合衆国、9 2 1 0 1 カリフォルニア州、サン・ディエゴ、ケトナー・ブルバード・ナン
バー・4 0 8 1 7 5 0

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA02 CA09 HA12

4B029 AA07 AA23 BB20 CC03 FA02 FA10

4B063 QA19 QQ02 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS34 QX01

4C084 AA13 AA14 AA17 NA05 ZB012 ZB271 ZB272 ZC202 ZC511

4C085 AA38 BB01 CC03 EE06

【外国語明細書】

2005333987000001.pdf

专利名称(译)	恶性血液病的预后		
公开(公告)号	JP2005333987A	公开(公告)日	2005-12-08
申请号	JP2005135284	申请日	2005-05-06
[标]申请(专利权)人(译)	维里德克斯有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	贝里指数有限责任公司		
[标]发明人	ミッチラポニ		
发明人	ミッチ・ラポニ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/39 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C12M1/00 C12N15/09 C12Q1/00 C12Q1/68 G01N37/00		
CPC分类号	A61P35/00 A61P35/02 A61P43/00 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/154 C12Q2600/158 G01N33/49 G01N33/57426		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/39 A61K45/00.101 A61K48/00 A61P35/02 A61P43/00.111 C12M1/00.A C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA02 4B029/FA10 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01 4C084/AA13 4C084/AA14 4C084/AA17 4C084/NA05 4C084/ZB012 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C084/ZC202 4C084/ZC511 4C085/AA38 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/EE06		
优先权	10/568635 2004-05-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供确定患者状况的方法和预测这种患者的总体存活的方法。一种治疗癌症患者，特别是患有恶性血液病的患者的方法，包括分析患者的基因表达谱和/或分子标志物以确定患者的病症和/或预后。本发明还提供了一种分析非复发性或非难治性患者是否可能对法尼基转移酶抑制剂和可能的其他药物治疗有反应的方法。该方法对于监测患者治疗和选择治疗方法也是有用的。响应于FTI处理，可以获得受调节的基因并用于产生概况。 点域5

