

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6273552号
(P6273552)

(45) 発行日 平成30年2月7日(2018.2.7)

(24) 登録日 平成30年1月19日(2018.1.19)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53		D
C 1 2 Q 1/68	(2018.01)	C 1 2 Q	1/68		A
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 O 1 A	

請求項の数 15 (全 24 頁)

(21) 出願番号	特願2014-559271 (P2014-559271)	(73) 特許権者	510320519
(86) (22) 出願日	平成25年2月28日(2013.2.28)		ユニヴェルシテール ニース ソフィア アンティポリス
(65) 公表番号	特表2015-513369 (P2015-513369A)		UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS
(43) 公表日	平成27年5月11日(2015.5.11)		フランス, エフ-06108 ニース セデックス 2, アヴェニュー ヴァルローズ, 28, グラン シャトー パルク ヴァルローズ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2013/000055		Grand Chateau Parc Valrose, 28, Avenue Valrose, F-06108 Nice Cedex 2, France
(87) 国際公開番号	W02013/128089		
(87) 国際公開日	平成25年9月6日(2013.9.6)		
審査請求日	平成28年2月26日(2016.2.26)		
(31) 優先権主張番号	12/00584		
(32) 優先日	平成24年2月28日(2012.2.28)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アザシチジン耐性を診断する検査

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者がアザシチジン治療耐性であるかを判定する *in vitro* の方法であって、前記患者由来の生体液に含まれる B C L 2 L 1 0 タンパク質、ならびに該 B C L 2 L 1 0 タンパク質と特異的に結合する生体分子を使用し、以下：

・前記患者由来の生体液に含まれる全細胞で B C L 2 L 1 0 タンパク質を発現するパーセンテージを計算する；

・該計算したパーセンテージを参照閾値と比較する、該閾値は 20 ~ 60 % である；および

・前記生体液で該 B C L 2 L 1 0 タンパク質を発現する細胞のパーセンテージが該参照値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると判断する、
ことを特徴とする、方法。

10

【請求項 2】

前記生体液は、骨髄であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記参照閾値は、50%であることを特徴とする、請求項 1 または 2 の 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記生体液中の前記 B C L 2 L 1 0 タンパク質を発現する細胞の前記パーセンテージの前記測定は、フローサイトメトリーにより、疎水性相互作用クロマトグラフィー (H I C

20

)により、または定量的ポリメラーゼ連鎖反応法(qPCR)により、好ましくはフローサイトメトリーにより行なわれることを特徴とする、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記BC₂L₂L₁0タンパク質に特異的に結合する前記生体分子は、前記BC₂L₂L₁0タンパク質に特異的な抗体であることを特徴とする、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

患者がアザシチジン治療耐性であるかを判定する*in vitro*の方法であって、患者由来の生体液に含まれるBC₂L₂L₁0タンパク質の過剰発現を検出することによって行なわれ、以下：

・該BC₂L₂L₁0遺伝子の該過剰発現を検出することにより、前記生体液に含まれる全細胞でBC₂L₂L₁0を発現するパーセンテージを計算する；

・該計算したパーセンテージを参照閾値と比較する、該閾値は20～60%である；および

・前記生体液でBC₂L₂L₁0を発現する細胞のパーセンテージが該参照閾値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると判断する、を特徴とする、方法。

【請求項7】

前記BC₂L₂L₁0遺伝子の前記過剰発現の前記検出は、比較ゲノムハイブリダイゼーションCGH法、フローサイトメトリー法、ELISA法、DNAチップ法、または定量的重合化連鎖反応法(qPCR)により行なわれることを特徴とする、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記BC₂L₂L₁0遺伝子の前記過剰発現の前記検出は、比較ゲノムハイブリダイゼーションCGH法、DNAチップ法、または定量的重合化連鎖反応法(qPCR)により行なわれることを特徴とする、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記BC₂L₂L₁0遺伝子の前記過剰発現の前記検出は、DNAチップ法により、または定量的重合化連鎖反応法(qPCR)により行なわれることを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

患者の生体液由来の細胞中のBC₂L₂L₁0タンパク質と特異的に結合する生体分子を含む、アザシチジン治療耐性を予測するための*in vitro*の分析キットであって、前記生体液中の該BC₂L₂L₁0タンパク質を発現する細胞のパーセンテージが、20～60%の参照閾値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると予測することを特徴とする分析キット。

【請求項11】

前記生体液は、骨髄であることを特徴とする、請求項10に記載の分析キット。

【請求項12】

以下からなる群：

・BC₂L₂L₁0断片を増幅することができる1対のプライマー、および
 ・BC₂L₂L₁0の存在を検出することができるプローブ、
 より選択される少なくとも1種の試薬を含む、*in vitro*分析キットであって、該生体液中のBC₂L₂L₁0を発現する細胞のパーセンテージが、20～60%の参照閾値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると予測することを特徴とする分析キット。

【請求項13】

再発を予測する目的で、アザシチジン治療を観察する方法を実施するための、請求項10から12のいずれか1項に記載のキットの使用。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4】

前記患者の反応に応じて前記治療を適合させることを可能にすることを特徴とする、請求項 1 3 に記載のキットの使用。

【請求項 1 5】

前記患者は、骨髄異形成症候群および/または急性骨髄性白血病であることを特徴とする、請求項 1 3 または 1 4 に記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者のアザシチジン治療耐性を *in vitro* で診断することを可能にする分析方法に関する。本発明は、患者のアザシチジン治療耐性を予測することを可能にする *in vitro* 分析キット、ならびにそのようなキットの使用にも関する。

10

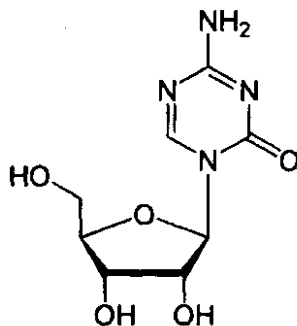
【背景技術】

【0002】

アザシチジンは、以下の式を有する化合物であるが：

【0003】

【化 1】



20

【0004】

造血幹細胞移植対象外の、骨髄異形成症候群 (MDS) および急性骨髄性白血病 (AML) の患者にとって、現在、唯一の承認された治療薬である。アザシチジンは、これらの疾患の治療用に、ピダーザ (登録商標) の商品名でも市販されている

30

【0005】

アザシチジン (AZA) は、これら 2 種の疾患において、40% ~ 60% の反応をひき出す低メチル化剤である。

【0006】

骨髄異形成症候群 (MDS) および急性骨髄性白血病 (AML) は、骨髄幹細胞から生じる骨髄性血液疾患であり、そのような骨髄幹細胞として、白血球に相当する顆粒球系列の前駆体、赤血球に相当する赤芽球系列の前駆体、血小板に相当する巨核球系列の前駆体、および組織球単球系列の前駆体が含まれる。MDS は、顆粒球系列、赤血球系列、および巨核球系列という 3 つの骨髄細胞系列の全てまたはそのうち 1 つの、顕著な成熟障害を特徴とし、この障害が血球減少の原因となっている。MDS は、急性白血病 (AL) にも進展する可能性がある。伝統的に、診断は、細胞遺伝学および分子生物学に基づき血液および骨髄を細胞学的に調査することで行なわれる。MDS として、様々な種類の貧血または難治性血球減少、ならびに 5q-症候群が挙げられる。

40

【0007】

AML は、顆粒球系列、赤血球系列、および巨核球系列という 3 つの系列の骨髄前駆体の急激な増殖を特徴とし、この増殖は、血液および骨髄中の未熟細胞蓄積を引き起こして、正常な造血を破壊する。AML の診断は、MDS と同じ技術に基づいて行なわれる。AML として、未分化型 AML、最未分化型 AML、骨髄芽球性白血病、単芽球性白血病、骨髄単芽球性白血病、ならびに急性赤白血病および急性巨核球性白血病が挙げられる。原

50

発性または続発性AMLは、様々な器官および組織（肌、神経節、乳房、消化管、脾臓など）の腫瘍の原因となり、骨髄肉腫（緑色腫または顆粒球性肉腫とも呼ばれる）を生じさせる可能性がある。骨髄肉腫は、急性白血病として表れる可能性があり、悪性リンパ腫の診断上の難問となっている。

【0008】

アザシチジンで治療されるMDSまたはAMLの患者は、アザシチジン耐性（「AZA耐性」）であるか、またはアザシチジン感受性（「AZA感受性」）である。しかしながら、「AZA感受性」患者であっても、長期間または短期間経過後に、体系的に再発する可能性があると思われる。

【0009】

言い換えると、たとえ、アザシチジンで治療された患者のうち40%が直ちに耐性を示し、患者の60%程度が最初の数ヶ月間は感受性であったとしても、短期または中期のあいだに、患者全員がこの治療に耐性を生じるだろう。この現象は、伝統的に、再発と称されており、患者が以前は感受性を示した治療に対して耐性を獲得することを示す。

【0010】

最近では、低メチル化剤で治療された患者の全生存期間を予測および予後診断することを可能にする予後評価システムが登場している。そうしたシステムは、患者の亜集団で査定した予後診断スコアを利用する。患者の核型およびある種の臨床特性の調査により定義されるリスク集団が存在する。しかしながら、そうした評価システムに関連した結果は、反応予測の判断材料としては頼りない。

【0011】

MDSの患者の半数は、正常な核型を有し、同一の染色体異常を持つ患者であっても、臨床的には異質であることが多い。体細胞点変異は、MDSにおいて共通する。遺伝子TP53、EZH2、ETV6、RUNX1、およびASXL1の変異は、他の確立された危険因子とは無関係に、MDS患者の全生存期間が短いと予測させる判断材料である。

【0012】

しかしながら、現在のシステムでは、患者にアザシチジン治療を行なうことなく患者のアザシチジン感受性を診断できるような、適切な結果が得られない。

【0013】

現在のところ、患者がアザシチジン治療に耐性であるかどうかを判断する唯一の既知の方法は、患者にこの治療を少なくとも6ヶ月間行なって治療が有効であるかどうかを判断することである。

【0014】

まさにこの方法を用いて、患者における再発を同定する。実際、現在のところ、患者における再発を同定する唯一の方法は、アザシチジン治療がその患者にとってもはや効果がないという時点を決定的なものである。再発に関連する症候が現れる前にこの再発の時点を予測することを可能にする方法はない。

【0015】

MDSおよび/またはAMLの患者にアザシチジン治療を行なうことが推奨される場合、アザシチジンは、7日間毎日、腕の先、大腿、または腹部から皮下注射され、続いて21日間の休薬期間が取られる。アザシチジン治療は、様々な重篤度の多数の副作用（頭蓋内出血、敗血症、血圧の変化、嗜眠、全身の倦怠感、および抜け毛など）を引き起こす可能性がある。また、アザシチジン治療の費用は、かなりの額になる。その費用は、治療一年あたり80,000ユーロ前後である。したがって、今日、患者がアザシチジン治療に対して感受性なのか耐性なのか、信頼できる診断を安価に下す方法はない。

【0016】

また、現在、アザシチジン治療が有効でないのが投与開始時からなのか数ヶ月後患者が耐性を生じたからなのかに関わらず、有効ではない患者にアザシチジンを投与することを避ける目的で、アザシチジン治療に対する患者の耐性を予測することが求められている。実際、耐性患者にそのような治療を行なうことは、制約があり、患者に危害が及ぶ可能性

10

20

30

40

50

があり、しかも不要な多額の出費を招く可能性がある。このことは、MDSおよび/またはAMLの患者に推奨されるアザシチジン治療の場合にも、全ての治療目的のアザシチジン治療にも当てはまる。実際アザシチジン耐性はアザシチジン分子に関連するものであって、アザシチジンの投与の仕方に関連するのではない。

【0017】

直ちに耐性を示す患者、ならびに最初は感受性を示す患者の再発時点をより迅速に同定することができれば、そうした患者に、臨床症状が悪化する前に他の臨床試験を提案することが可能になるので、やはり有利である。

【0018】

したがって、患者がこの先もアザシチジン治療に感受性であるかどうかを可能なかぎり初期に診断できること、および患者の再発時点を予測できることが、最も重要である。

【0019】

意外にも、本出願人は、患者から採取した生体液試料中のBCL2L10タンパク質の発現レベルとこの患者のアザシチジン治療に対する感受性の関連性を実証するのに成功した。

【0020】

本明細書全体を通じて、BCL2L10という総称は、BCL2L10遺伝子、BCL2L10のRNA転写物、またはBCL2L10タンパク質に相当するとして定義される。

【0021】

BCL2L10遺伝子は、Bcl-2ファミリーの一員であり、*in vitro*で抗アポトーシス効果を有する。BCL2L10タンパク質は、Bcl-2タンパク質ファミリーと、BH1ドメイン、BH4ドメイン、およびBH2ドメインを共有する。BH3ドメインは、Bcl-2ファミリーに特徴的なアポトーシス促進性因子であるが、これはBCL2L10タンパク質には存在しない。しかしながら、BCL2L10がアポトーシス促進性なのか抗アポトーシス性なのかに関して、文献では結果が未だに矛盾しており、これは特に、マウスにおいてBCL2L10の相同分子種と想定されるものが、アポトーシス促進活性を有すると記載されているためである。

【0022】

BCL2L10は、様々な状況でアポトーシスを制御する目的で、Bcl-2ファミリーに属するタンパク質、特にBcl-2、Bcl-xL、およびBaxと相互作用することができる。文献の中には、BCL2L10を抗アポトーシス性遺伝子と表示するものもある(例えば、論文「Loss of BCL2L10 protein expression as prognostic predictor for poor clinical outcome in gastric carcinoma, *Histopathology* 2010, 57, 814-82」(非特許文献1)など)。

【0023】

BCL2L10の過剰発現は、ミトコンドリアのシトクロムC放出を阻害することによりアポトーシスを抑制すると記載されている。

【0024】

最近になって、低メチル化剤デシタピンが、アポトーシス、ならびにBCL2L10を含む多数の遺伝子の正の調節(「上向き調節」とも言う)の引き金を引くことが実証された。今日では、ある種の抗癌治療に対する患者の耐性とBCL2L10遺伝子発現の関連性が実証されており、特に、特開2010-162031号公報(特許文献1)では、BCL2L10遺伝子の増幅が、カンプトテシンを利用した治療に対する癌細胞耐性を検出可能にする可能性があるという事実が記載されている。同様に、米国特許出願公開第2009143236号明細書(特許文献2)は、ある種の遺伝子(特に、BCL2L10など)の増幅調査によりある種の薬物に対する耐性獲得を検出する方法を記載している。しかしながら、これら2つの特許出願において、耐性について評価を受ける抗癌剤は、アザ

10

20

30

40

50

シチジンに関係しない。

【0025】

米国特許出願第2011/0129833号明細書(特許文献3)は、患者においてBcl-2ファミリーの遺伝子の発現が増加することは、その患者が化学療法に反応する見込みが低下することと相関することを示している。しかしながら、この特許出願において、そのような結論がアザシチジンを利用した治療にも当てはまることを示唆するものは、なにもない。

【0026】

論文「Role of BCL2L10 methylation and TET2 mutations in higher risk myelodysplastic, Leukemia. 2011 Dec; 25 (12)」(非特許文献2)には、アザシチジン耐性現象が記載されている。この文書は、BCL2L10遺伝子プロモーターのメチル化とアザシチジン耐性に関連性があると記載する。具体的には、BCL2L10遺伝子プロモーターの過剰メチル化は、胃癌患者の生存率の低下と相関する。この文献は、BCL2L10プロモーターが多くメチル化されている患者は、MDSの危険性が高く、エピジェネティック治療(アザシチジン治療など)に反応する可能性も低いことを教示する。しかしながら、この文献において、BCL2L10タンパク質の発現レベルが高いことも同じ結論に到達すると教示するものは、なにもない。

10

【0027】

そうではなく、この文献は、アザシチジンに反応する可能性が低いことと相関するのはBCL2L10の発現レベルが低いことであると示唆している。また、BCL2L10のメチル化レベルが高いことがアザシチジン治療耐性と本当に関連していたとしても、このデータを、BCL2L10タンパク質の発現レベルと相関させることは不可能であった。実際、遺伝子のメチル化レベルは、その遺伝子に由来するタンパク質の発現と必ずしも関連しない。これは、特にBCL2L10の場合にそうである。

20

【0028】

また、上記の先行技術を考慮すると、BCL2L10タンパク質の発現レベルとアザシチジン耐性現象に関連性があることを示唆するものは、なにもない。さらに、BCL2L10タンパク質の高レベルの発現とアザシチジン耐性に関連性があることを示唆するものにいたっては、まったくない。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0029】

【特許文献1】特開2010-162031号公報

【特許文献2】米国特許出願公開第2009143236号明細書

【特許文献3】米国特許出願第2011/0129833号明細書

【非特許文献】

【0030】

【非特許文献1】Loss of BCL2L10 protein expression as prognostic predictor for poor clinical outcome in gastric carcinoma, Histopathology 2010, 57, 814-82

40

【非特許文献2】Role of BCL2L10 methylation and TET2 mutations in higher risk myelodysplastic, Leukemia. 2011 Dec; 25 (12)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0031】

対象となっている問題の解決策は、患者のアザシチジン治療耐性を診断することを可能にするin vitroの分析方法に関するもので、この患者から採取された生体液試料

50

に含まれる B C L 2 L 1 0 タンパク質、ならびに B C L 2 L 1 0 タンパク質と特異的に結合する生体分子を使用し、以下を特徴とする：

- ・生体液試料を、患者から採取する；
 - ・この生体液に含まれる全細胞で B C L 2 L 1 0 タンパク質を発現するパーセンテージを計算する；
 - ・この計算したパーセンテージを参照閾値と比較する、この閾値は 2 0 ~ 6 0 % である；
- および
- ・この生体液で B C L 2 L 1 0 タンパク質を発現する細胞のパーセンテージがこの参照値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると診断する。

【 0 0 3 2 】

意外にも、出願人は、患者の生体液の B C L 2 L 1 0 タンパク質発現細胞の割合とアザシチジン耐性に関連性があることを実証できた。

【 0 0 3 3 】

このパーセンテージに対する参照閾値（この値を超えると患者はアザシチジン耐性であると結論づけることができる値）の決定は、これまで一度も示唆されてこなかった。

【 0 0 3 4 】

この方法により、アザシチジン分子を患者に投与する前であっても、このアザシチジンに対する患者の耐性を診断することが可能になる。またこの方法により、有利なことに、以前はアザシチジン治療感受性であった患者の再発を予測することも可能になる。

【 0 0 3 5 】

本発明による分析方法により、アザシチジンを用いた患者の治療で不要なものはなんでも回避することができる。したがって、本方法は、患者の健康および適切な治療という点で、ならびに経済的側面から、有利である。本発明の第二の対象は、本発明による *in vitro* 分析方法を行なうことを可能にする *in vitro* 分析用キットに関し、このキットは、患者から採取した生体液から得られる細胞中の B C L 2 L 1 0 タンパク質と特異的に結合する生体分子を含む。

【 0 0 3 6 】

最後に、本発明の第三の対象は、再発を予測する目的でアザシチジン治療を観察する方法を遂行するための、本発明による *in vitro* 分析用キットの使用に関する。

【 0 0 3 7 】

in vitro でのアザシチジン耐性に関連した機構をより深く理解するため、本発明者らは、A Z A - R または S K M 1 - R と称するアザシチジン耐性 S K M 1 骨髄細胞を作成した。対照的に、A Z A - S または S K M 1 - S は、アザシチジン感受性細胞である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 8 】

添付の図面を参照して書かれた、以下の限定ではない説明を読むことで、本発明をより深く理解できるだろう。図において：

【 0 0 3 9 】

【 図 1 】 図 1 は、B c l - 2 タンパク質を発現する S K M 1 細胞株から得られた細胞をスクリーニングした結果を示す。S K M 1 - S 細胞および S K M 1 - R 細胞を 1 μ のアザシチジンで 2 4 時間処理する。次いで、B c l - 2、M c l - 1、B c l - x 1、および B C L 2 L 1 0 タンパク質量を見積もる目的で、ウエスタンブロット実験を行なう。添加対照として、抗 H S P 6 0 抗体を用いた。

【 図 2 】 図 2 は、A M L 細胞株である S K M 1 - S および S K M 1 - R 細胞株における、B C L 2 L 1 0 タンパク質の発現を示す。図 2 では、S K M 1 - S および S K M 1 - R 細胞中の B C L 2 L 1 0 タンパク質レベルを、フローサイトメトリーにより数量化する。

【 図 3 】 図 3 は、A M L 細胞株である S K M 1 - S および S K M 1 - R 細胞株における、B C L 2 L 1 0 タンパク質の発現を示す。図 3 では、S K M 1 - S および S K M 1 - R 細胞中の B C L 2 L 1 0 タンパク質レベルを、フローサイトメトリーにより数量化する。

10

20

30

40

50

【図4】図4は、AML細胞株であるSKM1-SおよびSKM1-R細胞株における、BCL2L10タンパク質の発現を示す。図4では、SKM1-SおよびSKM1-R細胞中のBCL2L10タンパク質レベルを、フローサイトメトリーにより数量化する。

【図5】図5は、AML細胞株であるSKM1-SおよびSKM1-R細胞株における、BCL2L10タンパク質の発現を示す。図5は、逆転写酵素重合化連鎖反応法(RT-PCRとも称する)による、SKM1-SおよびSKM1-R細胞のmRNAの分析結果を示す。

【図6】図6は、AML細胞株であるSKM1-SおよびSKM1-R細胞株における、BCL2L10タンパク質の発現を示す。図6は、SKM1-SおよびSKM1-R細胞中のBCL2L10タンパク質レベルを見てわかるようにする、ウエスタンブロットの結果を示す。

10

【図7】図7は、SKM1-R細胞のアザシチジンに対する再感作、続いてBCL2L10遺伝子の発現の消衰を示す。BCL2L10遺伝子の発現の消失は、一般に「ノックダウン」と称され、この場合はBCL2L10ノックダウンとなる。SKM1-SおよびSKM1-R細胞に、干渉RNA(Luc siRNA、BCL2L10 siRNA、またはBcl-2 siRNA)を形質移入する。形質移入から72時間後、細胞を1μMのアザシチジンで刺激する。図7では、刺激から24時間後にXTT試験(キシロース負荷試験)により、細胞の代謝率を測定する。示される結果は、3つの独立した実験を4回行った平均±標準偏差(±SEM)に対応する。

【図8】図8は、SKM1-R細胞のアザシチジンに対する再感作、続いてBCL2L10遺伝子の発現の消衰を示す。BCL2L10遺伝子の発現の消失は、一般に「ノックダウン」と称され、この場合はBCL2L10ノックダウンとなる。SKM1-SおよびSKM1-R細胞に、干渉RNA(Luc siRNA、BCL2L10 siRNA、またはBcl-2 siRNA)を形質移入する。形質移入から72時間後、細胞を1μMのアザシチジンで刺激する。図8は、1μMのアザシチジンを添加して24時間後、フローサイトメトリーにより示されるカスパーゼ3標識化の結果を示す。

20

【図9】図9は、SKM1-R細胞のアザシチジンに対する再感作、続いてBCL2L10遺伝子の発現の消衰を示す。BCL2L10遺伝子の発現の消失は、一般に「ノックダウン」と称され、この場合はBCL2L10ノックダウンとなる。SKM1-SおよびSKM1-R細胞に、干渉RNA(Luc siRNA、BCL2L10 siRNA、またはBcl-2 siRNA)を形質移入する。形質移入から72時間後、細胞を1μMのアザシチジンで刺激する。図9は、1μMのアザシチジンを添加して24時間後、フローサイトメトリーにより示されるヨウ化プロビジウム(PI)標識化の結果を示す。

30

【図10】図10は、SKM1-R細胞のアザシチジンに対する再感作、続いてBCL2L10遺伝子の発現の消衰を示す。BCL2L10遺伝子の発現の消失は、一般に「ノックダウン」と称され、この場合はBCL2L10ノックダウンとなる。SKM1-SおよびSKM1-R細胞に、干渉RNA(Luc siRNA、BCL2L10 siRNA、またはBcl-2 siRNA)を形質移入する。形質移入から72時間後、細胞を1μMのアザシチジンで刺激する。図10は、BCL2L10およびBcl-2の発現阻害を決定する目的で、1μMのアザシチジンを添加して24時間後に行なわれたウエスタンブロットの結果を示す。

40

【図11】図11において、BCL2L10タンパク質発現は、アザシチジン耐性の患者で特に増加することが示される。図11は、7人の健康な患者、7人のアザシチジン感受性患者、および5人のアザシチジン耐性患者から採取した「新鮮な」骨髓試料で行なったウエスタンブロットにより検出されたBCL2L10、Bcl-2、およびERKタンパク質の発現を示す。ウエスタンブロットの結果は、各サブグループから患者2人ずつについて示す。

【図12】図12において、BCL2L10タンパク質発現は、アザシチジン耐性の患者で特に増加することが示される。図12は、ImageJソフトウェアプログラム(ImageJは、米国国立衛生研究所(NIH)によるJavaで書かれた画像処理用フリー

50

ソフトウェアプログラムである)を用いて分析したBC L 2 L 1 0およびER Kタンパク質の発現、ならびにER K発現に対するBC L 2 L 1 0発現の比の数量化を示す。

【図13】図13において、BC L 2 L 1 0タンパク質発現は、アザシチジン耐性の患者で特に増加することが示される。図13は、Image Jソフトウェアプログラムを用いて分析したBC L 2 L 1 0およびER Kタンパク質の発現の数量化、ならびにER K発現に対するBC L 2 L 1 0発現の比の数量化を示す。

【図14】図14は、アザシチジン耐性のMDS患者またはAML患者において、骨髄中のBC L 2 L 1 0タンパク質発現細胞のパーセンテージが増加しているという事実を示す。図14では、アザシチジン治療を受けている32人のMDSまたはAMLの患者および8人の健康な患者(全員、コホート1に属する)におけるBC L 2 L 1 0タンパク質発現細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより数量化する。

10

【図15】図15は、アザシチジン耐性のMDS患者またはAML患者において、骨髄中のBC L 2 L 1 0タンパク質発現細胞のパーセンテージが増加しているという事実を示す。図15では、MDSの危険性が低い14人の患者、MDSまたはAMLの危険性が高くアザシチジン治療を受けている31人の患者(全員、コホート2に属する)から採取しDMSOに入れて凍結させた試料におけるBC L 2 L 1 0タンパク質発現細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより数量化する。

【図16】図16は、アザシチジン耐性のMDS患者またはAML患者において、骨髄中のBC L 2 L 1 0タンパク質発現細胞のパーセンテージが増加しているという事実を示す。図16に示すとおり、MDSの危険性が高い、すなわち診断中の16人の患者から採取しDMSOに入れて凍結させた試料におけるBC L 2 L 1 0タンパク質発現細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより数量化する。

20

【図17】図17は、アザシチジン耐性のMDS患者またはAML患者において、骨髄中のBC L 2 L 1 0タンパク質発現細胞のパーセンテージが増加しているという事実を示す。図17に示すとおり、MDSまたはAMLの危険性が高い15人の患者(全員アザシチジン治療を受けている)から採取しDMSOに入れて凍結させた試料におけるBC L 2 L 1 0タンパク質発現細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより数量化する。

【図18a】図18aは、BC L 2 L 1 0タンパク質発現細胞のパーセンテージと治療を受けたMDSまたはAML患者の全生存期間の相関関係を示す。AZAで治療したMDSまたはAML患者の全生存期間、ならびに患者たちの骨髄中のBC L 2 L 1 0発現細胞のパーセンテージについて、移植を行なった場合との比較を、カプラン・マイヤー法により解析した。

30

【図18b】図18bは、BC L 2 L 1 0タンパク質発現細胞のパーセンテージと治療を受けたMDSまたはAML患者の全生存期間の相関関係を示す。AZAで治療したMDSまたはAML患者の全生存期間、ならびに患者たちの骨髄中のBC L 2 L 1 0発現細胞のパーセンテージについて、移植を行なった場合との比較を、カプラン・マイヤー法により解析した。

【図19】図19は、フローサイトメトリーによるBC L 2 L 1 0タンパク質数量化技術の正当性を実証できるものである。図19では、HEK 293株由来の細胞に、N末端部分にMycエピトープタグおよびBC L 2 L 1 0を組み込むDNA3発現プラスミド、またはN末端部分にMycエピトープタグのみを組み込むDNA3発現プラスミドのいずれかで形質移入した。BC L 2 L 1 0タンパク質発現レベルをフローサイトメトリーで数量化した。この実験の結果を図19に示す。

40

【図20】図20は、フローサイトメトリーによるBC L 2 L 1 0タンパク質数量化技術の正当性を実証できるものである。図20では、HEK 293株由来の細胞に、干渉siLuc RNAまたは干渉si-BC L 2 L 1 0 RNAいずれかで形質移入する。BC L 2 L 1 0タンパク質発現レベルをフローサイトメトリーで数量化した。この実験の結果を図20に示す。

【図21】図21は、フローサイトメトリーによるBC L 2 L 1 0タンパク質数量化技術の正当性を実証できるものである。図21は、ウエスタンブロットで検出されたBC L 2

50

L10タンパク質レベルを示す。添加対照として、抗HSP60抗体を用いた。

【図22】図22は、フローサイトメトリーによるBCCL2L10タンパク質数量化技術の正当性を実証できるものである。図22は、ウエスタンブロットで検出されたBCCL2L10タンパク質レベルを示す。添加対照として、抗HSP60抗体を用いた。

【発明を実施するための形態】

【0040】

本発明は、特に、生体液の全細胞によるBCCL2L10タンパク質発現の数量化を行なうことによる、患者のアザシチジン治療耐性を*in vitro*で診断することを可能にする分析方法に関する。

【0041】

本発明に従って、患者はヒトである。有利なことに、本分析方法は、悪性血液疾患（骨髄性の血液疾患など）の患者に特に適している。さらにより具体的には、患者はAMLまたはMDSを患っている。

【0042】

本発明に従って、生体液は、ヒトの身体から得られる液体である。生体液の例として、骨髄、血液、脳脊髄液、および尿が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明による生体液は骨髄である。

【0043】

本発明に従って、「全細胞」という用語は、収集した生体液中に存在する全ての細胞を包含する。収集した生体液が骨髄ならば、全細胞には、特定の造血幹細胞（HSC）および骨髄間質の細胞（造血細胞である）が含まれる。

【0044】

本発明に従って、BCCL2L10タンパク質に特異的に結合する生体分子とは、BCCL2L10タンパク質に特異的に結合することができる分子である。有利なことに、そのような分子は、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体、溶解性受容体、またはアプタマーであり、好ましくはモノクローナルもしくはポリクローナル抗体である。同じく好ましくは、BCCL2L10タンパク質に特異的に結合する生体分子とは、モノクローナル抗体である。BCCL2L10タンパク質に特異的に結合する生体分子として、「Cell Signaling Technologies」社の抗BCCL2L10タンパク質（参照番号#3869）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0045】

本発明に従って、参照閾値（「カットオフ」値とも称する）は、生体液中のBCCL2L10陽性細胞のパーセンテージ、すなわちBCCL2L10タンパク質を発現する細胞のパーセンテージに相当する。

【0046】

採取した生体液の全細胞におけるBCCL2L10タンパク質発現細胞のパーセンテージの値がこの「カットオフ」値よりも大きい場合、検査された患者は、アザシチジン耐性であると診断される。反対に、得られた値がこの「カットオフ」値より小さい場合、検査された患者は、アザシチジン感受性であると診断される。

【0047】

本発明に従って、参照閾値は、20～60%、好ましくは30～55%、より好ましくは、この参照閾値は50%である。

【0048】

本発明による分析方法は、患者のアザシチジン治療耐性を診断することを可能にする。アザシチジンで治療されるこの患者は、一般に、その治療中1ヶ月、3ヶ月、および6ヶ月ごと、その後、3ヶ月ごとに骨髄穿刺を受けなければならない。つまり、従来のアザシチジン治療観察の一部として採取されるこの骨髄を、本発明による分析方法にも用いることができる。したがって、アザシチジン治療耐性を診断する方法に関して、患者に専用の骨髄穿刺を行なうことは必ずしも不可欠ではない。

【0049】

10

20

30

40

50

言い換えると、患者のアザシチジン耐性の診断を可能にする *in vitro* 分析法が、従来の治療法の流れで穿刺された骨髓試料で行なわれることを考慮すると、患者は追加の検査を受ける必要がないのだから、患者にとって有利である。

【0050】

本発明に従って、生体液中の BCL2L10 タンパク質発現細胞のパーセンテージの測定は、フローサイトメトリー（免疫表現型検査）により、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）により、または定量的ポリメラーゼ連鎖反応法（qPCR）により行なわれる。好ましくは、この測定は、フローサイトメトリー（免疫表現型検査）により行なわれる。

【0051】

本発明は、患者から採取された生体液試料に含まれる BCL2L10 遺伝子の過剰発現を検出することによる、患者のアザシチジン治療耐性を診断可能にする *in vitro* 分析方法にも関し、以下を特徴とする：

- ・生体液試料を患者から採取する；
 - ・BCL2L10 遺伝子の過剰発現を検出することにより、この生体液に含まれる全細胞で BCL2L10 を発現するパーセンテージを計算する；
 - ・この計算したパーセンテージを参照閾値と比較する、この閾値は 20 ~ 60 % である；
- および
- ・この生体液で BCL2L10 を発現する細胞のパーセンテージがこの参照閾値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると診断する。

【0052】

好ましくは、BCL2L10 遺伝子の過剰発現の検出は、比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH法）、フローサイトメトリー法、ELISA法、DNAチップ法により、または定量的重合化連鎖反応法（qPCR）により行なわれる。より好ましくは、BCL2L10 遺伝子の過剰発現の検出は、比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH法）により、DNAチップ法により、または定量的重合化連鎖反応法（qPCR）により行なわれる。さらにより好ましくは、BCL2L10 遺伝子の過剰発現の検出は、DNAチップ法により、または定量的重合化連鎖反応法（qPCR）により行なわれる。

【0053】

本発明は、患者から採取された生体液試料由来の細胞中の BCL2L10 タンパク質と特異的に結合する生体分子を含む *in vitro* 分析キットにも関し、本キットにより、この生体液中の BCL2L10 タンパク質を発現する細胞のパーセンテージが、20 ~ 60 % の参照閾値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると予測できる。

【0054】

本発明は、以下からなる群より選択される少なくとも 1 種の試薬：

- ・BCL2L10 断片を増幅することができる 1 対のプライマー、および
- ・BCL2L10 の存在を検出することができるプローブ、

を含む、*in vitro* 分析キットにも関し、本キットにより、この生体液中の BCL2L10 タンパク質を発現する細胞のパーセンテージが、20 ~ 60 % の参照閾値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると予測できる。

【0055】

本発明の別の対象は、再発を予測する目的で、アザシチジン治療を観察する方法を実施するための、本発明によるキットまたは方法の使用に関する。

【0056】

本発明の特定の実施形態に従って、本発明によるキットまたは方法の使用により、患者の反応に基づいて治療を適合させることもできる。

【0057】

本発明の特定の実施形態に従って、患者、特に骨髓異形成症候群および/または急性骨髄性白血病の患者がアザシチジン治療耐性であると診断された場合、少なくとも 1 種の抗腫瘍剤および/または抗炎症剤を含む代替療法も、この患者に投与される。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 8 】

好ましくは、アルキル化剤、代謝拮抗剤、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、および抗腫瘍性抗生物質から選択される抗腫瘍化合物が、この患者に投与される。

【 0 0 5 9 】

本発明により使用することができる抗腫瘍剤の例として、特に、アカデシン（アカデシン誘導体の5 - アミノイミダゾール - 4 - カルボキサミド - 1 - - D - リボフラノシドはA I C A Rとも称される）、アクチノマイシンD、アムサクリン、アントラサイクリン（ドキシソルピシンまたはダウノルピシンなど）、アラシチン、A T R A（オールトランスレチノイン酸）、プレオマイシン、ボルテゾミブ、プスルファン、カンプトテシン誘導体、シスプラチン、カルボプラチン、クロラムブシル、デシタピン、デパキン、ドセタキセル、エピポドフィロトキシシン誘導体、エルロチニブ、エトポシド、5 - フルオロウラシル（5 F U）、フルダラビン、ハイドレア、イホスファミド、ヒストンデアセチラーゼ（H D A C）阻害剤、レナリドミド、メトトレキセート、マイトマイシンC、パクリタキセル、プリカマイシン、プリントール、チオテパ、ピンクリスチン、ピンブラスチン、およびビノレルピンを挙げることができるが、これらに限定されない。同じく例として、異なる腫瘍病態に用いられるチロシンキナーゼ阻害剤（T K I）、例えば、イマチニブ、ダサチニブ、ニロチニブ、およびスニチニブなどを挙げることができる。

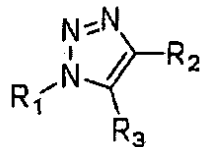
10

【 0 0 6 0 】

使用可能なアカデシン誘導体は、好ましくは、以下の一般式：

【 0 0 6 1 】

【 化 2 】



20

【 0 0 6 2 】

式中：

- ・ R₁ は、以下から選択され
 - ・ フラン型の環状五炭糖基で、含有するOH基は、遊離型であるか、あるいは1つ以上の、モノ -、ビ -、もしくはトリリン酸基（またはそのプロドラッグ）、アセチル、イソプロピリデン、ベンゾイル、またはp - トルオイルで随意に置換される、
 - ・ ピラン型の六炭糖で、含有するOH基は、遊離型であるか、あるいは1つまたは複数のモノ -、ビ -、もしくはトリリン酸基（またはそのプロドラッグ）またはアセチルで随意に置換される、
 - ・ ナフチル基、この基は、炭素原子を1 ~ 4個有する1つ以上の置換アルキルまたはアミノ基で随意に置換される、
 - ・ ベンジル基、この基は、炭素原子を1 ~ 4個有する1つ以上の置換アルキルまたはアミノ基で随意に置換される、
 - ・ フェニル基、ビフェニル基、およびヘテロアリール基；
- ・ R₂ は、以下から選択され
 - ・ アミド基である - C O N H₂、- C O N H M e、- C O N H E t、- C O N (M e)₂、- C O N (E t)₂、
 - ・ 酸もしくはエステル基である - C O₂ H、C O₂ M e、C O₂ E t、シアノもしくはアミジン基である - C N、- C (N H₂) N H、- C (N H M e) N H、- C (N H E t) N H、
 - ・ フェニル基、この基は、C l、B r、I、およびFから選択されるハロゲンで随意に置換される、
 - ・ チオフェン基、
 - ・ 炭素原子を3 ~ 10個有する直鎖または分岐の炭素鎖、または

30

40

50

- ・メトキシナフタレン基；かつ
- ・ R₃ は、以下から選択される：
 - ・ハロゲン基、
 - ・フランもしくは -CO-フラン基、
 - ・チオフェンもしくは -CO-チオフェンもしくは -C(C)-チオフェン基、
 - ・トルオイル基、
 - ・アセチレン基、
 - ・ -CO-(CH₂)_n-CH₃ 基、ただし n は 2 ~ 9 である、
 - ・フェニルもしくは -C(C)-フェニル基、この基はハロゲンで随意に置換される、
 - ・ -C(C)-CO₂Me、-C(C)-CO₂Et、-C(C)-CONH₂ 基、
 - ・ -C(C)-(CH₂)₆CH₃ 基、または
 - ・ -C(C)-2-メトキシナフタレン基；

10

を有するもの、そのラセミ体、鏡像異性体、およびジアステレオ異性体、ならびにその混合物、その互変異性体、ならびにその薬学的に許容可能な塩である。

【0063】

より好ましくは、アカデシン誘導体は、以下の一般式：

【0064】

【化3】

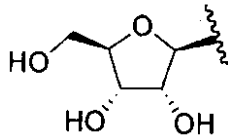
20

【0065】

式中、R₁ は、

【0066】

【化4】



30

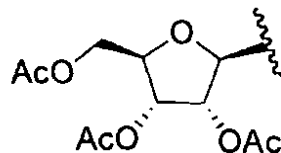
【0067】

- D - リボース

または

【0068】

【化5】



40

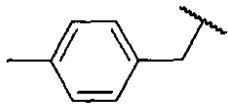
【0069】

トリ - O - アセチル - - D - リボース

または

【0070】

【化6】



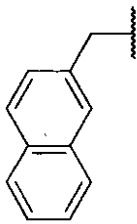
【0071】

4 - メチルベンジル

または

【0072】

【化7】



【0073】

2 - ナフチル (ナフタレン - 2 - イルメチル)

であり、かつ

・ R 1 が - D - リボース基の場合：

・ R 2 = C O N H ₂ かつ R 3 = C 1、C O - フラン、C O - チオフェンもしくはトルオ
イル；

または

・ R 2 = C O ₂ M e かつ R 3 = I もしくはアセチレン；

または

・ R 2 = フェニルかつ R 3 = I であり；

・ R 1 がトリ - O - アセチル - - D - リボース基の場合：

・ R 2 = C O ₂ E t かつ R 3 = C O - (C H ₂) ₅ - C H ₃、C O - フラン、トルオ
イル、- C C - C O ₂ E t、チオフェンもしくはフェニル；

または

・ R 2 = フェニルかつ R 3 = - C C - フェニル；

または

・ R 2 = チオフェンかつ R 3 = - C C - チオフェン；

または

・ R 2 = (C H ₂) ₆ C H ₃ かつ R 3 = - C C - (C H ₂) ₆ C H ₃ ；

または

・ R 2 = p - フルオロフェニルかつ R 3 = - C C - p - フルオロフェニル；

または

・ R 2 = 2 - メトキシナフタレンかつ R 3 = - C C - 2 - メトキシナフタレンであり

；

・ R 1 が 4 - メチルベンジル基の場合：

・ R 2 = C O ₂ E t かつ R 3 = - C C - C O ₂ E t ；

または

・ R 2 = フェニルかつ R 3 = - C C - フェニルであり；

・ R 1 が 2 - ナフチル (ナフタレン - 2 - イル - メチル) 基の場合：

・ R 2 = C O ₂ E t かつ R 3 = I ；

または

・ R 2 = C O ₂ E t かつ R 3 = - C C - C O ₂ E t ；

10

20

30

40

50

または

・ R₂ = フェニルかつ R₃ = - C(=O) - フェニルである；
を有する化合物、そのラセミ体、鏡像異性体、およびジアステレオ異性体、ならびにその混合物、その互変異性体、ならびにその薬学的に許容可能な塩である。

【0074】

使用可能なアカデシン誘導体の例として、以下の化合物を挙げることができるが、それらに限定されない：

- ・ 1' - (4 - エトキシカルボニル - 5 - ヨード - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 2', 3', 5' - トリ - O - アセチル - D - リボフラノース；
- ・ 1' - (4 - カルバモイル - 5 - ヨード - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - D - リボフラノース；
- ・ 1' - (4 - メトキシカルボニル - 5 - エチニル - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - D - リボフラノース；
- ・ 1 - (ナフチル - 2 - メチル) - 4 - エトキシカルボニル - 5 - ヨード - 1, 2, 3 - トリアゾール；
- ・ 1 - (ナフチル - 2 - メチル) - 4 - エトキシカルボニル - 5 - エチルプロピオラート - 1, 2, 3 - トリアゾール；
- ・ 1' - (4 - エトキシカルボニル - 5 - エチルプロピオラート - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 2', 3', 5' - トリ - O - アセチル - D - リボフラノース；
- ・ 1' - (4 - エトキシカルボニル - 5 - (2 - チエニル) - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 2', 3', 5' - トリ - O - アセチル - D - リボフラノース；
- ・ 1' - (4 - エトキシカルボニル - 5 - フェニル - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 2', 3', 5' - トリ - O - アセチル - D - リボフラノース；
- ・ 1 - (4 - メチルベンジル) - 4 - エトキシカルボニル - 5 - エチルプロピオラート - 1, 2, 3 - トリアゾール；
- ・ 1' - (4 - ヘプチル - 5 - (ノナ - 1 - イン - 1 - イル) - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 2', 3', 5' - トリ - O - アセチル - D - リボフラノース；
- ・ 1' - (4 - エトキシカルボニル - 5 - エチルプロピオラート - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 2', 3', 5' - トリ - O - ベンゾイル - L - リボフラノース；
- ・ 2' - デオキシ - 1' - (4 - エトキシカルボニル - 5 - エチルプロピオラート - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 3', 5' - ジ - O - (p - トルオイル) - D - リボフラノース；
- ・ 1' - (4 - エトキシカルボニル - 5 - エチルプロピオラート - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 2', 3', 4', 6' - テトラ - O - アセチル - D - グルコピラノース；
- ・ 1' - (4 - エトキシカルボニル - 5 - エチルプロピオラート - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 2', 3' - O - イソプロピリデン - D - リボフラノース；
- ・ 1' - (4 - エトキシカルボニル - 5 - エチルプロピオラート - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 2', 3' - O - イソプロピリデン - 5' - O - アセチル - D - リボフラノース；
- ・ 1' - (4 - エトキシカルボニル - 5 - (2 - チエニル) - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 2', 3' - O - イソプロピリデン - D - リボフラノース；および
- ・ 1' - (4 - エトキシカルボニル - 5 - (2 - チエニル) - [1, 2, 3] - トリアゾール - 1 - イル) - 2', 3' - O - イソプロピリデン - 5' - O - アセチル - D - リボフラノース。

【0075】

研究を行なうことで、本発明の利点がいくつか実証された。それら研究の結果を以下の実施例に示す。

【実施例 1】

【0076】

BCL2L10の検出に関するサイトメトリー技法の検証。

アポトーシスおよびオートファジープロセスの両方が不完全であるアザシチジン(AZA)耐性のSKM1細胞(「SKM1-R」と称する)を製造した。それらのAZA感受性同族体(「SKM1-S」と称する)と比較したところ、SKM1-R細胞は、Bcl-2ファミリーの中で抗アポトーシス性であるBCL2L10タンパク質(Bcl-B)の発現増加を示すが、Bcl-2、Bcl-xL、およびMcl-1タンパク質について、SKM1-R細胞とSKM1-S細胞は、同等なレベルを示す(図1に示すとおり)。

10

【0077】

BCL2L10タンパク質発現の増加は、限界希釈法を行なう前のSKM1-R細胞の塊でも見られ、このことは、BCL2L10の過剰発現が、アザシチジン(AZA)耐性と関連性があるのであって、クローン効果によるものではないことを示している。BCL2L10のタンパク質発現を分析するため、HEK293細胞でのサイトメトリー試験法を構築した。

【0078】

このため、HEK293細胞を、最初にMycタグ付きBCL2L10構築物「Myc-BCL2L10」で形質移入し、抗Myc抗体を用いて形質移入の効率を見積もった(図19に示すとおり)。BCL2L10タンパク質の発現は、抗BCL2L10モノクローナル抗体を用いてウエスタンブロットにより確認した(図21に示すとおり)。

20

【0079】

フローサイトメトリー実験を検証するため、特異的siRNAを用いて、HEK293細胞におけるBCL2L10遺伝子の発現を消失させた。

【0080】

この条件下では、BCL2L10タンパク質の発現もBCL2L10の標識化も、それぞれウエスタンブロットまたはフローサイトメトリーにより検出されなかった(それぞれ図22および図20に示すとおり)。このことは、BCL2L10タンパク質の検出に基づく本発明者らのサイトメトリー実験の有効性を実証する。

30

【実施例 2】

【0081】

SKM1細胞のアザシチジン耐性に関与するBCL2L10の過剰発現。

図19~図22に記載したアッセイを用いて、BCL2L10タンパク質を発現するのが、SKM1-S細胞では39%だけであるのに比べて、SKM1-R細胞では73%であることがはっきりした(図2~図4に示すとおり)。BCL2L10のmRNAおよびBCL2L10タンパク質の発現の増加は、RT-PCRおよびウエスタンブロットによっても検出された(それぞれ、図5および図6に示すとおり)。

【0082】

BCL2L10過剰発現がアザシチジン耐性の結果ではなく原因であるのかどうかを決めるため、SKM1-S細胞およびSKM1-R細胞を、対照siRNAまたはBCL2L10タンパク質とBcl-2タンパク質の一方もしくは他方を指向するsiRNAで形質移入し、次いでアザシチジン有無のいずれかで24時間処理してから、細胞生存率およびアポトーシスを測定した。図7は、アザシチジンがSKM1-S細胞で細胞代謝の減少を導いたことを示すが、SKM1-R細胞では導かなかった(図5に示すとおり)。BCL2L10遺伝子発現の消衰は、SKM1-R細胞のアザシチジン感受性を回復させ、このことは、アザシチジン耐性現象におけるBCL2L10の重要な役割を示唆する。また、アポトーシスは、BCL2L10遺伝子発現の消衰が、活性カスパーゼ3の量の増加によるアザシチジン感作を可能にするための主要な機構であった。

40

50

【0083】

また、ヨウ化プロピジウム (PI) での標識化が、BCL2L10 siRNAで処理したSKM1-R細胞で検出された (図8および図9に示すとおり)。この効果は、BCL2L10に特異的であった、なぜならBcl-1タンパク質を指向するsiRNAでは、同一条件下でそうできなかったからである (図8および図9に示すとおり)。最後に、図10では、2つのsiRNAがそれぞれの標的の発現を非常に効果的に遮断することが、ウエスタンブロットにより実証された。まとめると、本発明者らのデータにより、BCL2L10タンパク質の過剰発現は、SKM1-R細胞のアザシチジン耐性の原因であると確立することができた。

【実施例3】

10

【0084】

BCL2L10の過剰発現によりMDS患者のアザシチジン耐性を予測することができる。

BCL2L10発現を、患者から採取した試料の量が分析するのに十分な場合に、その試料のウエスタンブロットによっても分析した。図11~図13に示す結果から、BCL-2レベルに対するBCL2L10レベルは、患者によって様々であることがわかる。ERKタンパク質を、各患者試料の内部標準に用いた。これにより、ERKに対するBCL2L10のタンパク質発現は、健康な患者では非常に低いことを示すことができた (図12に示すとおり)。反対に、Bcl-2タンパク質の発現は、3つの群の患者で有意差がない (図13に示すとおり)。この結果は、BCL2L10の発現により、MDS患者のアザシチジン耐性を予測することができることを示唆する。

20

【実施例4】

【0085】

BCL2L10タンパク質発現はMDS患者のアザシチジン耐性の生体マーカーである。

8人の健康な患者、24人のアザシチジン感受性患者、および8人のアザシチジン耐性患者の骨髄におけるBCL2L10タンパク質発現細胞のパーセンテージを、コホート1でフローサイトメトリー実験を行なうことにより求めた。各患者の臨床的特徴を、以下の表1、表2A、および表2Bに示す：

【0086】

30

表1 (感受性患者) :

【表 1】

10

20

30

40

【0087】

表 2 A (耐性患者) :

【表 2】

10

【0088】

表 2 B (健康な患者) :

20

【表 3】

細胞の種類	BCL2L10陽性細胞の%
PNN	1
CD34	18
PBMC	1
PNN	2
PBMC	0
単球	3
PBMC	1
単球	0

30

【0089】

図 1 4 に示すとおり、健康な患者およびアザシチジン感受性患者から単離したばかりの骨髄試料について、BCL2L10タンパク質を発現する細胞の平均値は、それぞれ、0% (値の範囲は0~18%)、および8% (値の範囲は0~40%)であるが、一方アザシチジン耐性患者の骨髄細胞については、BCL2L10タンパク質を発現する細胞の平均値は、85% (値の範囲は57%~99%)であり、p値は0.0001未満である (図 1 1 に示すとおり)。14人の低リスクMDS患者から採取した試料を、21人のアザシチジン感受性患者および10人のアザシチジン耐性患者の試料それぞれと比較した場合 (全てコホート2の患者)、低リスクMDS患者は、BCL2L10発現細胞の中央値が0%であり、最低最高値は0および11%であることがわかる。図 1 5 はまた、アザシチジン耐性患者のBCL2L10タンパク質発現細胞のパーセンテージがもっとずっと高く、感受性患者が10%であるのに比べて、33% (p<0.0001)になることも示す。また、図 8 に記載の患者の群に基づいて、分析のサブグループを作る。「最初から」アザシチジン難治性であった10人の検査患者は、BCL2L10発現細胞のパーセンテージが29%であり、診断でアザシチジン感受性であった6人の検査患者の値 (10%)より高い。これらの結果を図 1 6 に示す (p=0.023)。再発時、「最初から」アザシチジン感受性であった4人の検査患者は、BCL2L10タンパク質発現細胞のパーセンテージが23%である、すなわち、アザシチジン感受性で治療中の11人の検査患者 (B

40

50

C L 2 L 1 0 タンパク質発現細胞のパーセンテージは 1 4 % である) と比べて高いことを示す (図 1 7 に示すとおり) ($p = 0 . 0 0 0 2$) 。

【実施例 5】

【0090】

B C L 2 L 1 0 タンパク質発現細胞のパーセンテージは、M D S 患者および A M L 患者の全生存期間を予測する。

生体液の全細胞のうち B C L 2 L 1 0 タンパク質発現細胞は 5 0 % であるという参照閾値 (「カットオフ」 値とも呼ぶ) を用いると、本検査により、優れた正負の予測を行なうことができる。一般に、本検査の感度および特異性は、それぞれ、8 0 % および 8 5 % であった。

10

【0091】

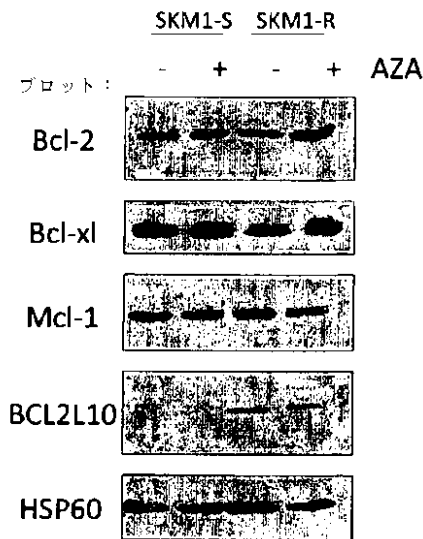
中央値 4 ヶ月 (最短最長期間は 0 . 1 および 7 . 5 ヶ月) の観察期間で、B C L 2 L 1 0 の数量化データから、コホート 1 についての全生存期間 (O S) は、B C L 2 L 1 0 発現の少ないサブグループにおいての方が、B C L 2 L 1 0 発現の多いサブグループにおいてよりも有意に良好であった ($p = 0 . 0 0 1 6$) (図 1 8 a に示すとおり) 。図 1 8 b に示すグラフから、さらに長期間 (6 ヶ月程度に対して 1 5 ヶ月程度) にわたって、B C L 2 L 1 0 発現細胞のパーセンテージとアザシチジン治療を受けた M D S または A M L 患者の全生存期間 (O S) に相関があることがわかる。この図 1 8 b は、骨髓中の B C L 2 L 1 0 発現細胞のパーセンテージが 5 0 % 超か未満かで 2 つの群に分けた、A Z A 治療を受けた M D S または A M L 患者の、それぞれの群の全生存期間のカプラン・マイヤー曲線を示す。

20

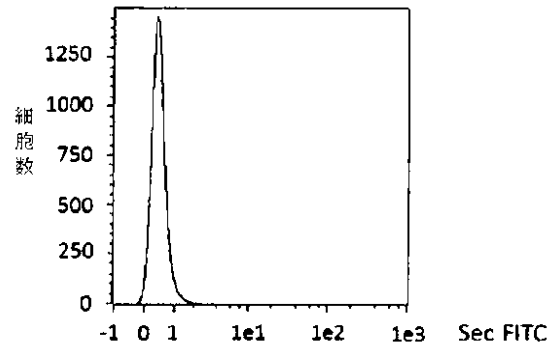
【0092】

3 ヶ月の全生存期間は、B C L 2 L 1 0 発現の少ないサブグループにおいて 9 5 % と見積もられたのに対して、B C L 2 L 1 0 発現の多いサブグループについては 5 1 % であった。B C L 2 L 1 0 発現の多いサブグループの患者全員について、疾患は進行した。

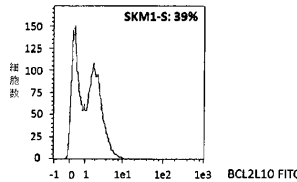
【図 1】



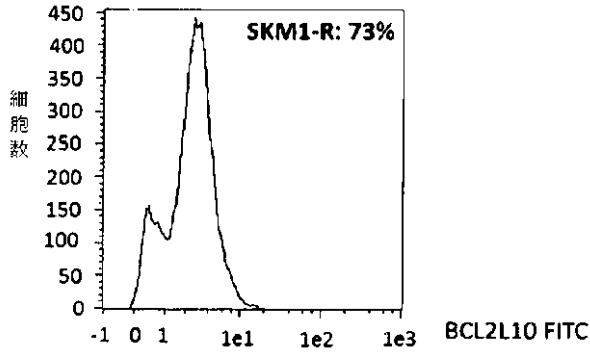
【図 2】



【図 3】



【 図 4 】



【 図 5 】

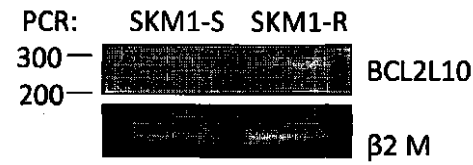
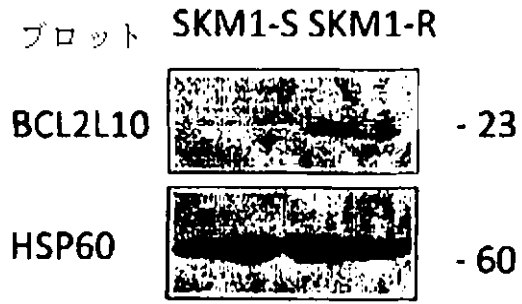
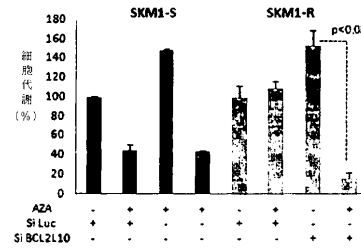


Fig. 5

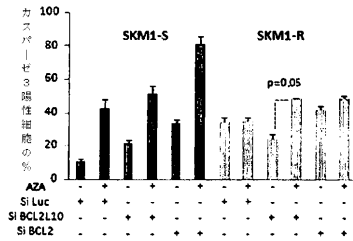
【 図 6 】



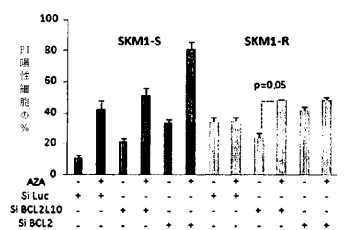
【 図 7 】



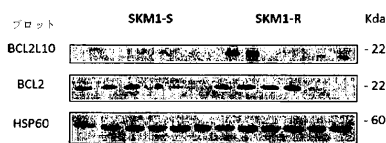
【 図 8 】



【 図 9 】



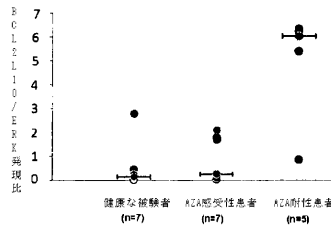
【 図 10 】



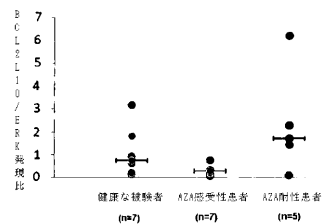
【 図 11 】



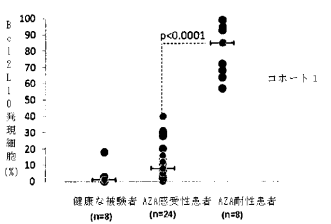
【 図 12 】



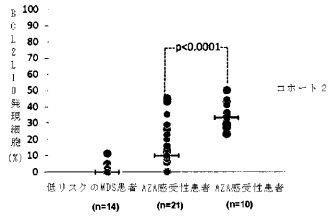
【 図 13 】



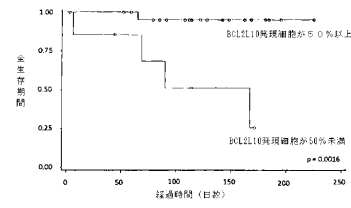
【 図 14 】



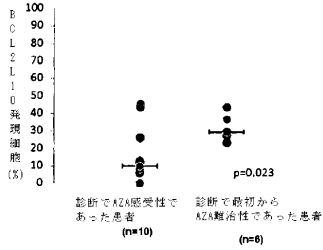
【 図 15 】



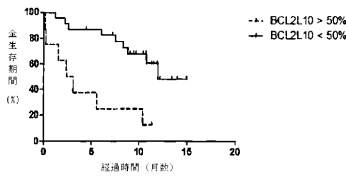
【 図 18 a 】



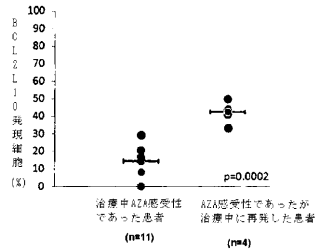
【 図 16 】



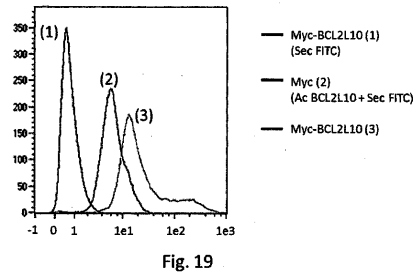
【 図 18 b 】



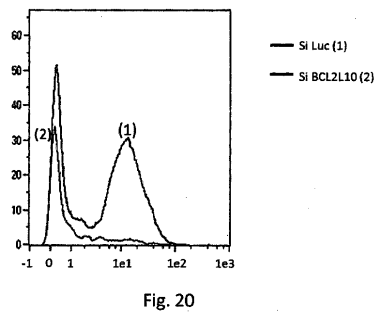
【 図 17 】



【 図 19 】



【 図 20 】



【 図 21 】

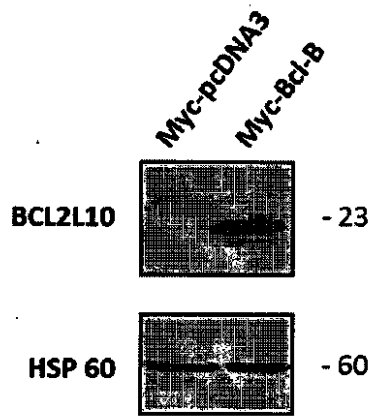


Fig. 21

【 2 2 】

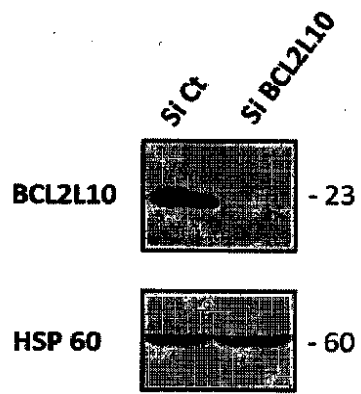


Fig. 22

フロントページの続き

(73)特許権者 514217037

センター オスピタリエ ウニヴェルシテール ド ニース
フランス国 エフ - 0 6 0 0 3 ニース セデックス 01, ビー . ピー . 1 1 7 9 , アヴェニュー
ド シミーズ, 4, オピタル ド シミーズ

(73)特許権者 504006489

インスティチュート ナショナル デ ラ サンテ エ デ ラ ルシェルシュ メディカル (
インセルム)
フランス国 パリ リュー ド トルビア 1 0 1

(74)代理人 100091683

弁理士 吉 川 俊雄

(74)代理人 100179316

弁理士 市川 寛奈

(72)発明者 クルゾー, トマス

フランス国 エフ - 0 6 2 0 0 ニース, レジデンス クロス ファブロン パティモン ビー 2
, 5 1 ブールバード ド モントレル

(72)発明者 オーバーガー, パトリック

フランス国 エフ - 0 6 1 0 0 ニース, ル ロンザール, 3 0 ヴィオ シェミン ド ガイロ

(72)発明者 ロベルト, ギヨーム

フランス国 エフ - 0 6 1 0 0 ニース, 3 アヴェニュー ミラソル

(72)発明者 ルチアーノ, フレデリック

フランス国 エフ - 0 6 0 0 0 ニース, パット ケー スド, 1 4 0 シェミン ド ラ コス
ティール

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特開 2 0 1 0 - 1 6 2 0 3 1 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 0 9 9 1 0 9 (U S , A 1)

FABIANI E et al. , Leuk Lymphoma , 2 0 1 0 年 1 2 月 , 51(12) , 2275-2284

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

C 1 2 Q 1 / 6 8

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

專利名称(译)	测试诊断阿扎胞苷耐药性		
公开(公告)号	JP6273552B2	公开(公告)日	2018-02-07
申请号	JP2014559271	申请日	2013-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	センターオスピタリエウニヴェルシテールドニース 研究所国家德拉桑特等拉尔宫格哈德·贝医疗客栈CELM		
申请(专利权)人(译)	Univerushite尼斯索菲亚 - 安提波利斯 中心Osupitarie海胆威赛牛油果尾尼斯 研究所国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (Inserumu)		
当前申请(专利权)人(译)	Univerushite尼斯索菲亚 - 安提波利斯 中心Osupitarie海胆威赛牛油果尾尼斯 研究所国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗 (Inserumu)		
[标]发明人	クルゾートマス オーバーガーパトリック ロベルトギヨーム ルチアーノフレデリック		
发明人	クルゾー,トマス オーバーガー,パトリック ロベルト,ギヨーム ルチアーノ,フレデリック		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5014 G01N33/5044 G01N2333/47 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33/57426 G01N33/5748 G01N2333/82 G01N2800/52 G01N2800/54		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/68.A G01N33/543.501.A		
优先权	2012000584 2012-02-28 FR		
其他公开文献	JP2015513369A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用从患者采集的生物体液样品中所含的BCL2L10蛋白质以及特异性结合BCL2L10蛋白质的生物分子来预测患者对阿扎胞苷治疗的抗性的体外分析方法。其特征在于从患者中回收生物流体的样本;计算表达BCL2L10蛋白的所述生物流体中的总细胞的百分比;将该计算的百分比与参考阈值进行比较,该阈值在20%和60%之间;并且在所述生物流体中表达BCL2L10蛋白的细胞百分比大于所述参考值的患者中诊断对阿扎胞苷治疗的耐药性。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6273552号 (P6273552)
(45) 発行日 平成30年2月7日 (2018. 2. 7)	(24) 登録日 平成30年1月19日 (2018. 1. 19)	
(51) Int. Cl.	F I	
G 0 1 N 3 3 / 5 3 (2006. 01)	G 0 1 N 3 3 / 5 3	D
C 1 2 Q 1 / 6 8 (2018. 01)	C 1 2 Q 1 / 6 8	A
G 0 1 N 3 3 / 5 4 3 (2006. 01)	G 0 1 N 3 3 / 5 4 3	5 0 1 A
請求項の数 15 (全 24 頁)		
(21) 出願番号 特願2014-559271 (P2014-559271)	(73) 特許権者 510320519	ユニヴェルシテール ニース ソフィア アンティポリス UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS フランス, エフ-06108 ニース セデックス 2, アヴェニュー ヴァルローズ, 28, グラン シャトー バルク ヴァルローズ Grand Chateau Parc Valrose, 28, Avenue Valrose, F-06108 Nice Cedex 2, France
(86) (22) 出願日 平成25年2月28日 (2013. 2. 28)		
(65) 公表番号 特表2015-513369 (P2015-513369A)		
(43) 公表日 平成27年5月11日 (2015. 5. 11)		
(86) 国際出願番号 PCT/FR2013/000055		
(87) 国際公開番号 W02013/128089		
(87) 国際公開日 平成25年9月6日 (2013. 9. 6)		
審査請求日 平成28年2月26日 (2016. 2. 26)		
(31) 優先権主張番号 12/00584		
(32) 優先日 平成24年2月28日 (2012. 2. 28)		
(33) 優先権主張国 フランス (FR)		

(54) 【発明の名称】 アザシチジン耐性を診断する検査

最終頁に続く