

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-538436

(P2009-538436A)

(43) 公表日 平成21年11月5日(2009.11.5)

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

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

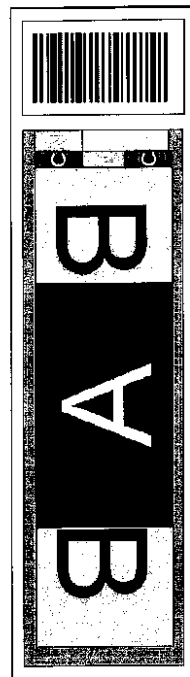
<p>(21) 出願番号 特願2009-513400 (P2009-513400) (86) (22) 出願日 平成19年5月25日 (2007. 5. 25) (85) 翻訳文提出日 平成21年1月26日 (2009. 1. 26) (86) 国際出願番号 PCT/US2007/069771 (87) 国際公開番号 W02007/140316 (87) 国際公開日 平成19年12月6日 (2007. 12. 6) (31) 優先権主張番号 60/803, 347 (32) 優先日 平成18年5月26日 (2006. 5. 26) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 60/869, 283 (32) 優先日 平成18年12月8日 (2006. 12. 8) (33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(71) 出願人 501100582 ボード オブ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ テキサス システ ム アメリカ合衆国 テキサス 78701, オースティン, ウェスト 7ティーエイチ ストリート 201 (74) 代理人 110000855 特許業務法人浅村特許事務所 (74) 代理人 100066692 弁理士 浅村 皓 (74) 代理人 100072040 弁理士 浅村 肇 (74) 代理人 100102897 弁理士 池田 幸弘</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 逆相プロテインアレイ、タンパク質活性化及び発現のサイン並びに関連する方法

(57) 【要約】

タンパク質活性化及び発現のサイン並びに癌の分類、予後及び治療ガイダンスのためにタンパク質活性化及び発現のサインを得、それを使用する方法が提供される。タンパク質活性化及び発現のサインは、プロテインアレイで複数の試料をアッセイするステップと、アッセイした試料をパターンに基づいてクラスター化するステップと、ヒートマップを作成するステップとを含むプロセスによって形成され得る。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プロテインアレイで複数の試料をアッセイするステップと、アッセイした試料をパターンに基づいてクラスター化するステップと、ヒートマップを作成するステップとを含むプロセスによって形成されるタンパク質活性化及び発現のサイン。

【請求項 2】

プロテインアレイが逆相プロテインマイクロアレイである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

タンパク質発現及び活性化のサインを用意するための方法であって、患者からタンパク質試料を得るステップと、測定されるタンパク質に対応する 1 つ又は複数のタンパク質発現レベル及びリン酸化レベルを得るステップと、1 つ又は複数の発現レベル又はリン酸化レベルのパターンに基づいて試料をクラスター化するステップと、クラスター化及び測定されるタンパク質を使用してヒートマップを作成するステップとを含む上記方法。

10

【請求項 4】

1 つ又は複数のタンパク質発現レベル及びリン酸化レベルを得るステップが逆相プロテインマイクロアレイを使用して試料をアッセイするステップを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

癌患者由来の細胞試料におけるタンパク質発現レベル若しくはリン酸化レベル又はその両方を少なくとも 1 つの基準タンパク質発現及び活性化のサインと比較するステップを含む、試料を分析するための方法であって、患者のタンパク質発現レベル若しくはリン酸化レベル又はその両方と、少なくとも 1 つの基準タンパク質発現及び活性化のサインとの間の相違点又は類似点が患者における癌の予後の指標となる上記方法。

20

【請求項 6】

タンパク質がシグナル伝達経路 (S T P) タンパク質、アポトーシス制御タンパク質、細胞周期制御タンパク質、サイトカイン及びケモカインから選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

患者の細胞試料中の 1 つ又は複数のタンパク質のタンパク質発現レベル若しくはリン酸化レベル又はその両方を表すデータを含む第一記憶媒体；少なくとも 1 つの基準タンパク質発現及び活性化のサインを表すデータを含む第二記憶媒体；タンパク質発現レベル若しくはリン酸化レベル又はその両方を少なくとも 1 つの基準タンパク質発現及び活性化サインと比較できるプログラム；並びにプログラムを実行できる処理装置を含むシステム。

30

【請求項 8】

複数の試料又は試料セット、陽性対照及び陰性対照を含むマイクロアレイであって、試料又は試料セットがスライド上に配列されており、各試料又は試料セットが陽性対照若しくは陰性対照又はその両方を伴っている上記マイクロアレイ。

【請求項 9】

マイクロアレイからのシグナルを標準化するための方法であって、複数のシグナルから三次元トポグラフ図を作成するステップと、三次元トポグラフ図中に見出される不規則性を補正するステップとを含み、ここで、複数のシグナルが 1 つ又は複数の陰性対照及び陽性対照由来である上記方法。

40

【請求項 10】

癌の予後及び癌の治療を評価するための方法であって、新たに診断された患者及び疾患の異なる段階にある他の患者由来の癌細胞試料を提供するステップと、試料をプロテインアレイでアッセイするステップと、癌の予後を評価するために細胞試料全般にわたるアッセイの結果を比較するステップと、新たに診断された患者のために個別化された治療法を考案するステップとを含む上記方法。

【請求項 11】

癌細胞が固形腫瘍、転移性癌又は非転移性癌、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病

50

、慢性リンパ性白血病、骨髄異形成、骨髄腫及びリンパ腫由来である、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

表現型効果に関して生物学的試料を分類する方法であって、細胞試料のタンパク質発現及び活性化プロファイルを決定するステップであって、タンパク質発現及び活性化プロファイルが表現型効果に関連しているステップと、表現型効果に関して試料を分類するステップとを含む上記方法。

【請求項13】

表現型効果が疾患の予後と関連する、請求項12に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

政府の権利の記述

本開示は、少なくとも部分的に、Leukemia Society of America助成金番号6089及び国立衛生研究所PO1助成金番号CA-55164からの資金を使用して開発された。米国政府は本発明に一定の権利を有し得る。

【0002】

本出願は、どちらも参照により本明細書に組み込まれている、2006年5月26日に出願した米国仮出願第60/803347号及び2006年12月8日に提出した米国仮出願第60/829283号の優先権を請求するものである。

20

【背景技術】

【0003】

個体由来の生物学的試料の分類は、精密な科学ではない。多くの場合、障害の正確な診断及び安全且つ有効な治療は、身体の特定の領域由来の細胞又は組織の試料における生物学的特徴を識別できることに依存する。個体由来の試料の特定の疾患クラスへの分類は、困難、不正確又は不確実であることがしばしば示されている。組織化学分析、免疫表現型検査及び細胞遺伝学的分析などのいくつかの方法では、試料の1つ又は2つの特徴だけが試料の分類を決定するために分析される。不正確な結果は、不正確な診断及び有効でない又は有害である可能性がある治療を導く場合がある。

【0004】

30

癌の生理学及び病因学の理解は、位置的に異常である、レベルが変化している、又は突然変異を隠す遺伝子の発現を生じるDNAレベルの変化に伝統的に焦点を置いている。癌細胞の表現型を顕著に定める場合もあるタンパク質のレベル及び機能の制御は、転写、mRNA安定性、翻訳制御及び恐らく最も重要には翻訳後修飾（例えば、リン酸化、プレニル化、ユビキチン化など）による、を含む多くの段階において生じる。比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）及び転写プロファイリングなどのハイスループットな技術は、DNA及びRNAレベルについて重要なデータを提供するが、しかしこれらの変化の機能的結果は評価できず、確認のための実験が実施される必要がある。mRNAレベルを測定する発現アレイは、これらの変化のいくつかのために日常的且つ有益であるが、タンパク質発現の実際のレベルを確定することは不可能であり、タンパク質の翻訳後修飾（リン酸化、ファルネシル化、ユビキチン化）を検出することは全く不可能である。確実なプロテオミクス特性評価の開発は、タンパク質レベルでの癌細胞生理学及び病因学のより包括的な理解のために極めて重要である。

40

【0005】

プロテオミクスは、タンパク質の構造、機能及び活性化を含むタンパク質の大規模な研究と定義できる。具体的な課題は：プロテオームは細胞ごとに異なる；経時的動的に変化する；並びに多型、スプライス変異体及び翻訳後修飾物は、各タンパク質について確認できる変数を大きく拡げることである。白血病細胞のプロテオミクス特性評価における試みは、主に、二次元ゲル電気泳動後にMALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離/イオン化-飛行時間）分析を使用している。入手可能な証拠は、少ないが、例えばクラ

50

ス特徴、標的の同定、アポトーシス開始及び幹細胞分析についての白血病のプロテオミクス分析の重要性を支持している。しかし、これらの方法によって特徴付けられるタンパク質は、他の手段によって同定及び特性評価される必要があり、より包括的なプロファイリングは、過大な材料が必要であること及び各分析を実施するために必要な時間によってしばしば妨げられる。これらの技術は、患者の一次試料のハイスループットな分析には不適當である。

【0006】

タンパク質（多くはキナーゼ）における機能部位を対象とする、新たに標的を定めた抗癌剤の作用及び機能的な重要性の理解は、高感度、正確且つ適切な目的の標的のハイスループットな評価を可能にする新規技術も必要とする。同一又は近縁の経路中のタンパク質についての標的作用の評価は、薬物の包括的活性プロファイルの一部となるであろう。機能的プロテオミクス分析の有効性の個々の癌の病状の研究への応用は、したがって、新規、確実な、高感度で、時間 - 、費用 - 及び試料の必要が少ない並びにハイスループットな機能的プロテオミクス技術を必要としている。

10

【0007】

逆相タンパク質（マイクロ）-アレイ（RPPA）は、必要とされる多くの利点を提供する新規、高感度、ハイスループットで、機能的なプロテオミクス技術である。それは、イムノプロットングの能力を活性型（通常リン酸化型又は切断型）及び親タンパク質の差次的発現の定量分析を提供するために拡張する。タンパク質及びその対応するリン酸化タンパク質は、所与のタンパク質の活性化状態/機能性を反映して評価され得る。さらに、細胞周期及びアポトーシスは、サイクリン、p21、p27、サイクリン依存性キナーゼ、リン酸化ヒストン又はPARP切断及び活性型カスパーゼをそれぞれ測定することによって評価され得る。

20

【0008】

RPPAで全ての試料は、同時にスポットされ、本方法を遺伝子マイクロアレイの意図と同様に多数の標本のレトロスペクティブな分析に理想的に適するものにする。細胞 5×10^5 個由来のタンパク質を使用する従来のウェスタンブロット法と比較してRPPAは、タンパク質溶解液数ナノリットルを必要とする（タンパク質のピコからフェムトグラム）。スライド1枚当たり、抗体1種当たりで細胞200個に相当するタンパク質がプリントされる。したがって、細胞5000~20000個だけから調製された試料は、異なる100種の標的タンパク質を分析するために十分であり、以前1回のウェスタンブロットに必要であった材料から、スライド2500枚（理論的には、=抗体2500種）がプリントされ得る。プリントの精密さ及びRPPA技術の確実性は、極めて高く、実験による可変性が低い。これは、主にRPPA内部の要因、並びに試料操作及び調製がWBに類似しているというRPPA技術の優れた正確さによる。スライド/アレイ間の比較も同様に非常に高かった。明らかになった1つの特徴は、試料が1つのアレイ/スライド上で一緒にアッセイされる場合、最も優れた確実性及び最も低い可変性が達成されることである。同一スライド上の同一試料の繰返しプリント間の非常に高い相関関係は、同一スライド上により多くの個々の試料をプリントすることを可能にし、且つ費用を削減するために重複プリントを省略できることを示唆する。これは、各試料からより多数のタンパク質の分析も可能にし、この技術を、幹細胞又は化学療法後に残存した癌細胞などの少数だけ存在する細胞集団の分析に適したものにする。

30

40

【0009】

タンパク全体及びそれに対応するリン酸化タンパク質は、所与のタンパク質の活性化状態/機能性、又は経路全体（例えばシグナル伝達経路）の活性化状態を反映して評価され得る。タンパク質修飾及びネットワーク全体の活性化のより広範な評価は、新たな重要なタンパク質及び既知のタンパク質の経路相互作用を認識する可能性を有し、新たな発見に導き得る。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 1 0 】

特定の実施形態により、本開示は、タンパク質活性化及び発現のサイン並びに癌の分類、予後及び治療ガイダンスのためにタンパク質活性化及び発現のサインを得、それを使用する方法に関する。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

一実施形態により、本開示は、プロテインアレイで複数の試料をアッセイするステップと、アッセイした試料をパターンに基づいてクラスター化するステップと、ヒートマップを作成するステップとを含むプロセスによって形成されるタンパク質活性化及び発現のサインを提供する。本発明は、タンパク質活性化及び発現のサインを用意するための方法であって、患者からタンパク質試料を得るステップと、1つ又は複数のタンパク質発現レベル及び測定されるタンパク質に対応するリン酸化レベルを得るステップと、1つ又は複数の発現レベル又はリン酸化レベルのパターンに基づいて試料をクラスター化するステップと、クラスター化及び測定されるタンパク質を使用してヒートマップを作成するステップとを含む方法も提供する。

10

【 0 0 1 2 】

本開示は、複数の試料又は試料セット、陽性対照、及び陰性対照を含むマイクロアレイであって、試料又は試料セットがスライド上に配置されており、各試料又は試料セットが陽性対照若しくは陰性対照又はその両方を伴っているマイクロアレイも提供する。マイクロアレイ由来のシグナルを標準化するための方法であって、複数のシグナルから三次元トポグラフィ図を作成するステップ及び三次元トポグラフィ図中に見出される不規則性を補正するステップを含み、複数のシグナルが1つ又は複数の陰性対照及び陽性対照由来である方法も提供される。

20

【 0 0 1 3 】

本開示は、試料を分析するための方法であって、癌患者由来の細胞試料におけるタンパク質発現レベル若しくはリン酸化レベル又はその両方を少なくとも1つの基準タンパク質発現及び活性化のサインと比較するステップを含み、患者のタンパク質発現レベル若しくはリン酸化レベル又はその両方と、少なくとも1つの基準タンパク質発現及び活性化のサインとの間の相違点又は類似点が患者における癌の予後の指標となる方法も提供する。

30

【 0 0 1 4 】

患者の細胞試料中の1つ又は複数のタンパク質のタンパク質発現レベル若しくはリン酸化レベル又はその両方を表すデータを含む第一記憶媒体；少なくとも1つの基準タンパク質発現及び活性化のサインを表すデータを含む第二記憶媒体；タンパク質発現レベル若しくはリン酸化レベル又はその両方を少なくとも1つの基準タンパク質発現及び活性化サインと比較できるプログラム；並びにプログラムを実行できる処理装置を含むシステムも提供される。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 5 】

臨床的特徴の類似にもかかわらず、原発性急性骨髄性白血病（AML）の多くの異なる型がある。白血病細胞が身体からのシグナルにどの様に反応するかを支配する、タンパク質の複雑な経路は、細胞がどの様な速さで複製し、死に、又は機能性血液細胞へ成熟するかを制御している。しばしば、これらのタンパク質の量又は活性は、AML細胞において異常であり、治療への反応に影響を与え得る。以前、これらのタンパク質のレベル又は機能は、一度に1種類を研究するだけであったが、しかし、今や本開示の方法は、以前、1種類のタンパク質を研究するために必要であった材料の同じ量を使用して100種類の異なるタンパク質の研究を可能にする。これらのタンパク質の発現レベル又は機能は、疾患のより良い予後及びより有効な治療を支援できる。

40

【 0 0 1 6 】

本開示の方法によりさらに、より多くの試料が1つのアレイ上の同一条件下で操作されて実験的偏りが低減することにより、非常に多数の試料のより良い比較が達成され得る。

50

したがって本開示の方法は、今日までの他のタンパク質技術では達成されていないシステムの再現性、正確性、感度、及び確実性を提供する。

【0017】

タンパク質の発現及び活性化を評価することによって、本開示の方法は、特定の疾患及び疾患の状態に対する新薬のための潜在的標的として役立ち得るタンパク質の発見を支援できる。

【0018】

本発明の特徴及び利点は、以下の実施形態の記載の理解により当業者に容易に明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0019】

本開示のいくつかの具体的な例の実施形態は、以下の記載及び添付の図を部分的に参照することによって理解される。

【0020】

【図1】5名の異なる患者由来の総Stat3（上パネル）及びp-Stat3（Tyr705）（左下パネル）タンパク質発現を示す図である。（最上列）末梢血（PB）及び骨髓（BM）から新たに調製した「透明」細胞溶解液。（第二列）同じ標本の「青色」溶解液。（第三列）白血病細胞系。（第四列）MDA-468+EGF、ジャーカット+FASリガンド刺激。注目すべきは、対照細胞溶解液におけるStat3の変化が少ないか無いことである。p-Stat3（Tyr705）スライドにおける試料の配置は、上パネルと同一である。右下パネルは、異なるスライド上にプリントし、且つp-Akt473について探索した同一の対照細胞試料を示し（同じ実験）、MDA-468細胞（MDA）のEGF刺激でのp-Akt473レベルの増大及びFASリガンドで処理したジャーカット細胞における減少を明白に示している。

【図2】希釈曲線及びMicroVigeneによる対数線形表示を示すグラフである。同じ患者由来の青色及び透明PB溶解液試料についてのMicroVigene由来の典型的曲線の分析。各スポットは、試料の希釈物を表す。標準偏差（上下の青線を伴う最適化曲線（緑線）は、データポイントを通して自動的にプロットされる。ソフトウェアプログラムが希釈曲線に直線（赤直線）を「フィット」し、関数を算出する。前記曲線のEC30又は50は、データの処理のために使用するlog数を与える。

【図3】RPPAの感度を示すグラフである。タンパク質溶解液は、患者2名から、同時に採取された血液及び骨髓試料由来の白血病細胞に富む画分から1nl当たり細胞7及び10個の濃度で調製された。これらの溶解液は、RPPA上にプリントされ、抗体6種でアッセイされた。それぞれの相対シグナルを示す。患者兩名について各タンパク質についてのシグナル強度は、由来にかかわらず同様であった。患者兩名について、1nl当たり細胞7個の試料のシグナル強度は、1nl当たり細胞数10個の試料のそれより一致して低く、RPPAが細胞3個差の量を検出できたことを示している。

【図4】同一のRPPA上に繰返しでプリントされ、抗体6種で探索されたタンパク質溶解液を示すグラフである。繰返し間の相関関係が示されている。平均 $R^2 = 0.9926$; ERK1/2 = 0.9973、pMAPK(42/44) = 0.9919、Stat3 = 0.9825、pStat3(Thr705) = 0.9979、Akt = 0.9920、pAkt(Ser473) = 0.9941

【図5】p-p38について示す、初回調製時と2回の凍結融解サイクル後とで有意差異を示さなかったリン酸化型特異的タンパク質の発現強度の比較を示すグラフである。

【図6】アレイ間（異なるスライド上の同一試料）及び実験間（同一アレイ上の異なる調製の同一試料）の変動性が、全体及びリン酸化型部位特異的ABで試験した8個について6~15%の間の変動係数を有して低かったことを示すグラフである（図2と同じAB及び図3で示すものと同じp38、p-p38）。

【図7】RPPAによるタンパク質の絶対定量を示す図及びグラフである。上パネルは、タンパク質/ペプチド基準RPPAスライド由来の希釈曲線の拡大図を示す。RPPAス

10

20

30

40

50

ライドセクションの下は、logスケールから決定されたタンパク質の量である。図中の各スポットは、試料の希釈スポットのタンパク質濃度に対するデンシトメトリーの吸収数としてプロットされている。精製されたAKT及びp-AKT(S473)ペプチドのタンパク質絶対濃度が、既知であることから、任意の溶解液の未知のタンパク質濃度は、Akt標準曲線によって算出できる。

【図8】RPPAによるHSC分析の例を示す図である。陽性及び陰性AML系列のいくつかの対、並びに正常骨髄(NBM)を表す。

【図9】本開示の一実施形態による試料のプリントを模式的に例示する図である。

【図10】本開示の一実施形態による、リン酸化AKTスレオニン308からの代表的スライドを示す図である。

【図11】タンパク質発現が臨床的特徴に相関しなかったことを示すクラスター図を例示する図である。

【図12】本開示の一実施形態による、疾患状態ごとのタンパク質発現の平均レベルを例示するグラフである。

【図13】本開示の一実施形態による、試料の教師なしクラスター分析を例示する図である。

【図14】本開示の一実施形態による、試料データのブートストラップクラスター化を例示する図である。

【図15】本開示の一実施形態による、FAB分類において評価されたタンパク質発現レベルを示すヒートマップを例示する図である。

【図16】特定の細胞遺伝学的変化に関連して異なるタンパク質サインを有する試料データごとのクラスター化を示す図である。

【図17】本開示の一実施形態によるヒートマップを示し、細胞遺伝学の背景において評価されたタンパク質発現の平均レベルを例示する図である。

【図18】本開示の一実施形態によるヒートマップを示し、7種のタンパク質サインクラスター中の各タンパク質の平均シグナルを例示する図である。タンパク質クラスター10種の構成要素はヒートマップ中に示されている。

【図19】新たな診断から初回再発、原発性不応性、及び2回目以上の再発の疾患状態ごとのタンパク質例の平均レベルを示すグラフであり、青線は、血液、赤線は、骨髄である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

特許又は出願書類は、少なくとも1つの色付きで作製された図を含む。色付きの図を伴う本特許又は特許出願公開の複製は、要請及び必要費用の支払いにより官庁によって提供されるであろう。

【0022】

本開示は、様々な改変及び代替形態を認めるが、具体的な例の実施形態は図において示され、且つ本明細書においてさらに詳細に記載される。しかし、具体的な例の実施形態の記載は、開示された具体的な形態に本発明を限定する目的ではなく、反対に本開示が添付の請求項によって部分的に例示される通り全ての改変及び等価物にわたるものであることは理解されるべきである。

【0023】

特定の実施形態により、本開示は、タンパク質活性化及び発現のサイン並びに癌の分類、予後及び治療ガイダンスのためにタンパク質活性化及び発現のサインを得、それを使用する方法に関する。

【0024】

一般に、本開示は、試料のタンパク質発現及び活性化のサインにより試料を分類するための方法に関する。一実施形態において本開示は、表現型効果、例えば疾患の有無又は予測された治療転帰に関して生物学的試料の分類を対象とし、その分類は、細胞試料のタンパク質発現及び活性化のサインを決定するステップを含み、タンパク質発現及び活性化の

10

20

30

40

50

サインが表現型効果に相関し、それにより試料が表現型効果に関して分類される。本開示の方法により、試料は、目的の疾患を有するか又は、発症し易い個体に属する（すなわち由来する）として分類され得る。

【0025】

別法として、本開示の方法により試料は、治療転帰の特定のクラスに属するとして分類され得る。それは、試料が高リスククラス（例えば、疾患の再発の可能性の高い予後を有するクラス又は治療後の生存について予後不良であるクラス）又は低リスククラス（例えば、再発の可能性の低い予後を有するクラス又は治療後の生存について予後良好であるクラス）に属すると分類され得るということである。病気の期間、症状の重症度及び疾患の根治も、試料の区別又は分類のための基準として使用できる。

10

【0026】

一実施形態において、本開示は、プロテインアレイで複数の試料をアッセイするステップと、アッセイした試料をパターンに基づいてクラスター化するステップと、ヒートマップを作成するステップを含むプロセスによって形成されるタンパク質活性化及び発現のサインを提供する。

【0027】

試料は、異なる疾患状態を有する患者由来である。例えば、試料は、新たに診断された、原発性不応性、初回再発及び2回以上の再発並びに完全寛解である患者由来の試料を含み得る。

【0028】

試料は、タンパク質の発現及び活性化のレベルに関する疾患を有する患者の細胞由来であり得る。その様な疾患は、固形腫瘍、転移性癌若しくは非転移性癌などの癌、急性骨髄性白血病（AML）、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ性白血病（CLL）、骨髄異形成（MDS）、骨髄腫及びリンパ腫を非限定的に含む。他の実施形態において、試料は、正常又は悪性の幹細胞、例えばヒト造血幹細胞、白血病細胞、骨髄などの環境下で増殖する細胞又は化学療法への暴露後の残存細胞であり得る。試料は、ヒト癌標本、ヒト白血病標本、保存AML溶解液及び調製された凍結保存細胞を非限定的に含む任意の供給源から得られる。一実施例において試料は、レーザーキャプチャー法によって単離され得る。

20

【0029】

特定の実施形態において、ヒト造血幹細胞をプロテオミクスに基づいた本開示の方法を使用して大規模に分析でき、そのタンパク質発現及び活性化のサインをバルク疾患細胞（例えば白血病細胞）と比較する。抵抗性及び再発は幹細胞集団から生じ易いことから、この少量の集団の分析は、治療に抵抗するために幹細胞によって採用されるメカニズムについての知見を提供でき、且つ治療の標的を示唆できる。さらに、タンパク質のタンパク質発現及び活性化のサインを評価することによって、本開示の方法は、特定の疾患及び疾患の状態に対する新薬のための潜在的標的として役立つタンパク質の発見を支援できる。

30

【0030】

試料は、タンパク質に特異的な抗体を使用するプロテインアレイでアッセイされ得る。適切なタンパク質の例は、シグナル伝達経路（STP）タンパク質、アポトーシス制御タンパク質、細胞周期制御タンパク質、サイトカイン及びケモカインを非限定的に含む。STP及びアポトーシス制御タンパク質の詳細な例は、表1に示される。サイトカイン及びケモカインの詳細な例は表2に示される。

40

表1

【表 1】

シグナル伝達	アポトーシス	その他
AKT, pAKT308 pAKT473	BAD pBAD112 pBAD136 pBAD155	アクチン
ERK2, pERk6	BAK	B-カテニン
MEK, pMEK	BAX	CCND1
p70S, P70S6K	BCL2	DJI
PKCa pPKCa	BCLXL	MTOR,
SRC pSRC527	MCL1	pMTOR
pSTAT1	SMAC	MYC
STAT3, pSTAT3-705 pSTAT3727	サバイビン	NRP1
pSTAT5431	XIAP	S6, pS6.p2211
pSTAT6		pS6RP.240-
PTEN, pPTEN		.244
P38 pP38		SSBP2
p53		SSBP3
GSK3, pGSK3		P27
p53		

10

表 2

【表 2】

サイトカイン	ケモカイン
インターロイキン	エオタキシン
• IL1B, IL1Ra	IP-10
• IL 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 15, 17	IL8
増殖因子	MIP1a
• G-CSF, GM-CSF	MIP1b
血管新生因子	ランテス
• PDGFbb	MCP-1(MCAF)
• FGF	SDF-1 (CXCL12/CXCR4)
• VEGF	
TNF α	
TGF β	
インターフェロン γ	
c-Kit	

20

30

他の例は、m I R、H o x並びにヒストンアセチル化及びメチル化レベルを含む。

【0031】

試料は、R P P Aなどのプロテインアレイを使用してアッセイされ得る。R P P Aは、マイクロドットプロット様の手法を使用し、タンパク質試料をスライド上にプリントし、定量的な結果を生じさせるために1種類の抗体でそれを探索する。全体及びリン酸化タンパク質を測定できる。本技術は、高感度、高ハイスループット並びにスライド間及びスライド内の両方の再現性を提供する。R P P Aは、S T Pタンパク質、アポトーシス制御タンパク質、細胞周期制御タンパク質での使用に特に適している。ゲノムアレイ及び従来のタンパク質処理方法の一定の制限から、R P P Aなどのプロテインマイクロアレイは、癌関連タンパク質の発現レベル及び活性化状態を定量するための新しい手段を提供することによって転写プロファイリングを補う可能性を有する。

40

【0032】

本発明は、プリントされた複数のタンパク質試料又は試料セット、陽性対照及び陰性対照を含むマイクロアレイスライドも提供する。試料又は試料セットは、スライド上に配置されており、各試料又は試料セットは、陽性対照及び陰性対照を伴っている。特定の実施

50

形態において、マイクロアレイは、正常試料、細胞系試料及び精製タンパク質も含み得る。

【0033】

スライドは、陽性対照及び陰性対照を使用してバックグラウンド及び尺度に対して標準化され得る。これらの対照物は、バックグラウンド（例えば、一定でない染色から）を測定するために使用できるスライド上にわたるグリッドを提供する。全てのスライドが、スライド上にわたって完全に一定のバックグラウンドを有するのではなく、グリッドは、スライド上にわたるバックグラウンドを測定するために使用できる。陰性対照を使用することにより、バックグラウンド強度の三次元トポグラフィ図が、作成でき、且つバックグラウンドを補正するために使用できる。このバックグラウンドについての補正は、「トポグラフィ標準化」と称され得る。同様に、陽性対照の三次元グリッドは、尺度補正設定するために使用できる。したがって、本開示は、複数のシグナルから三次元トポグラフィ図を作成するステップ及び三次元トポグラフィ図において発見される不規則性を補正するステップを含むマイクロアレイ由来のシグナルを標準化するための方法であって、複数のシグナルが1つ又は複数の陰性対照及び陽性対照由来である方法も提供する。

10

【0034】

各アッセイ由来のデータは、例えば摂動ブートストラップ検証/クラスター化を使用してパターンに基づいて、クラスター化される。本クラスター化法は、無作為及び誤差を考慮し、且つデータの確実性を増大する偏りの補正を可能にする。追加的に、統計的有意差を算出する場合にボンフェローニ補正を試料及びタンパク質/抗体の数について説明するために実施できる。例えば、クラスター化は細胞遺伝学的変化に基づくことができる。

20

【0035】

一実施例において、アッセイは、タンパク質クラスターを定義するためにピアソン相関の絶対値に基づく主な構成成分のクラスター化を使用してクラスター化され得る。例えばAMLの場合、これは、9個のタンパク質クラスターを生じた。タンパク質サインを定義するために、各患者についての各クラスターに対するスコアが決定され、且つ全体のベクトルが決定された。この総合スコアに基づいて患者をクラスター化すると、7個のタンパク質サイン群が生じた。

【0036】

クラスター化されたデータのヒートマップを作成できる。この様にデータは、予後及び/又は診断情報を提供するように構築され得る。「ヒートマップ」又は「ヒートマップの視覚化」は、タンパク質発現又は活性化の値の表データ構造の視覚的表示であり、色コードは、数値を表示するために使用される。データ表中の各細胞に対する数値は、細胞に対する色としてコードされる。色コードは、例えば遺伝子発現の値について緑から赤へ又は黄色から青へ、1つの色から他に連続的に変化する。データセット中の全ての列及び行に得られた色マトリクスは、色マップを形成し、熱力学的データのモデル化に類似の方法により、しばしば「ヒートマップ」と称される。

30

【0037】

用語「色コード」は、例えば高レベル発現を赤味がかった色として、及び低レベルの遺伝子発現を緑がかった色として表し、これらの色の明暗/強度の変化が、発現の程度の変化を表している、数値又は絶対値を色の値に配置するソフトウェア技術を示す。色コードは、発現レベルへの適用に限定されていないが、それを使用して、定量できる任意のデータを区別して、比較的低い量の値から比較的高い量の値を区別することができる。追加的に、第三の色を比較的中立の値又は中央値のために採用でき、より連続的な色表示スペクトラムを提供するために明暗法を採用できる。

40

【0038】

一実施例において、タンパク質活性化及び発現のサインヒートマップは、FAB分類において評価されたタンパク質発現レベルに基づくことができる。その様なサインデータは、標的治療を使用する時期を示唆するために使用できる。例えば、抗BCL2剤は、レベルが高いM0、M1及びM2において選択的に使用され得るが、それが既に低い他のFA

50

B分類においては使用されない。

【0039】

他の実施例において、タンパク質活性化及び発現のサインヒートマップは、細胞遺伝学的カテゴリーによるタンパク質発現の平均レベルに基づくことができる。その様なサインデータは、標的治療が、特定のタンパク質の発現又は活性化が見出される細胞遺伝学的カテゴリーに選択的に適用される必要があることを示唆するために使用できる。例えば、ヌトリンなどの薬剤は、p53レベルが非常に高い-5又は-7の場合においては有効ではない可能性がある。

【0040】

他の実施例において、AMLについてのタンパク質活性化及び発現のサインヒートマップを作成できる。その様なヒートマップは、7個のタンパク質サインクラスター中でアッセイされた各タンパク質試料の平均シグナルを示すことができる。得られたタンパク質クラスターのいくつかは、正の相関を示す場合があり、一方他の群は正及び負の両方の相関を示す場合がある。したがって、サインは、AMLにおいて観察される独特の、再発パターン又はサインの認識を可能にする。このことは、増強され、個別化された治療計画の選択を支援できる。

10

【0041】

タンパク質活性化及び発現のサインは、タンパク質サイン及び細胞遺伝学によって階層化された患者の反応率を推定するために使用できる。例えばAMLの場合、細胞遺伝学的に良好な全ての患者が寛解に達したのでサインは有益ではなかった；しかし、寛解率及び再発率は、タンパク質発現サインに依存して予後細胞遺伝学に対して変動した。さらに、異なるタンパク質発現サインに関連する異なる寛解率及び再発率は、各細胞遺伝学的カテゴリー中において生存全体に有意差を生じる。

20

【0042】

本開示は、タンパク質発現及び活性化のサインを用意するための方法であって、タンパク質試料を得るステップと、1つ又は複数のタンパク質発現レベル及び測定されるタンパク質に対応するリン酸化レベルを得るステップと、1つ又は複数の発現レベル又はリン酸化レベルのパターンに基づいて試料をクラスター化するステップと、クラスター化及び測定されるタンパク質を使用してヒートマップを作成するステップとを含む方法も提供する。その様な方法は、疾患の予後又は診断を評価するために使用できる。

30

【0043】

さらに、本開示のタンパク質発現及び活性化のサインは、タンパク質発現及び活性化のサインと表現型効果とを相関させ、それにより試料を表現型効果に関して分類するステップを含む、表現型効果、例えばタンパク質マーカーの有無又は予想される治療転帰に関してタンパク質試料を分類するための方法において使用できる。その様な手法は、異なる癌においてしばしば存在する分子欠乏の多くを、多数のシグナル伝達経路を同時にプロファイリングするステップ及び患者に特異的な癌遺伝子的「フィンガープリント」を定義するステップによって明らかにする。試料は、目的の疾患を有するか又は、発症し易い個体に属する（すなわち由来である）として分類され得る。別法として、本開示の方法により試料は、治療転帰の特定のクラスに属するとして分類され得る。それは、試料が高リスククラス（例えば、疾患の再発の可能性の高い予後を有するクラス又は治療後の生存について予後不良であるクラス）、又は低リスククラス（例えば、再発の可能性の低い予後を有するクラス又は治療後の生存について予後良好であるクラス）に属するとして分類され得るということである。病気の期間、症状の重症度及び疾患の根治も、試料の区別及び分類のための基準として使用できる。

40

【0044】

いくつかの実施形態において、型又は反応によって癌を分類するタンパク質発現及び活性化のサインを、同定でき、これは、患者が癌に対する特定の治療にどの様に反応する可能性があるかのより良い予測を支援できる。例えば、従来治療に反応する可能性の低い患者は、治療の初期において新薬又は幹細胞移植で治療され得る。このような実施形態に

50

において、型又は反応によって癌を分類する発現パターンは、鍵となるシグナル伝達経路、アポトーシス、細胞周期調節タンパク質、サイトカイン及びケモカインの異なる活性化状態である可能性がある。

【0045】

タンパク質発現及び活性化のサインは、患者のために個別化された治療法を考案するために使用することもできる。この様に、治療薬は、特定の患者についての発現又は活性化サインに応じて患者に合理的に配分され得る。さらに、標的治療が利用可能になると、活性タンパク質経路の決定は、個々の患者の分類及びタンパク質発現サインに基づいて最も有効である可能性がある標的治療を選択するために利用できる。

【0046】

本発明のより良い理解を促進するために、以下の具体的な実施形態の実施例が示される。以下の実施例は、本発明の範囲全体を限定する又は定義すると理解されるべきではない。

【実施例】

【0047】

AML患者の85%において、導入化学療法開始14日後に採取した骨髄は、「計測するには少なすぎる細胞」である空の骨髄を明らかにする。この「空の」骨髄にもかかわらず、いくつかの患者は、数週間以内に白血病の再増殖を示し、他は後に再発するが寛解に達する。この再発は化学療法後に残ったわずかな白血病細胞（「残存細胞」）から生じるに違いないし、且つこれらの細胞は、幹細胞の特徴を有しているはずである。これは、幹細胞において観察される発現/活性化パターンがバルク白血病細胞のパターンに類似しているか又は異なるかという疑問を生じる。

【0048】

末梢血、白血球搬出又は骨髄の標本は、The University of Texas M.D. Anderson Cancer Centerで評価された新たに診断されたAMLを有する患者から1999年9月1日から2004年1月1日の間に前向きに採取した。試料は、M.D. AndersonのInvestigational Review Boardによって認められた規則及び手順に従って日常診断評価において採取された。

【0049】

白血病細胞に富む画分の作製

試料は、採取後ただちに氷上に置き、採取の2時間以内で新鮮に処理された。白血病細胞に富む画分は、以前記載された通りFicoll-Hypaque separation (Mediatech、Hearndon、バージニア州)によって単核細胞画分を単離し、続いてmagnetic antibody-conjugated sorting (Miltenyi Biotec、Auburn、カリフォルニア州)によるCD3+/CD19+ B-細胞及びT-細胞の除去によって作製された。細胞は、ウェスタンブロット法又はRPPAアレイのための全細胞溶解液を作製するために新鮮に使用された。リン酸化エピトープの安定性を評価するために、凍結保存細胞を融解し、室温に2時間置き、且つ一定分量をRPPAのために溶解した。残りの細胞は、再凍結した。同じサイクルをもう一度繰り返した。次いで細胞を、RPPAのための通常の方法で調製した。

【0050】

CD34+/CD38-「幹細胞」画分の作製

「幹細胞」に富む画分を単離するために、CD34+細胞をMACS (Miltenyi、Biotec Inc.、Auburn、カリフォルニア州)によって、上記の白血病細胞に富む画分から精製し、次いで抗CD34抗体、抗CD38抗体及びIgG対照 (Beckton Dickinson、San Jose、カリフォルニア州)とのインキュベーション後にフロー選別によってCD34+/CD38-画分とCD34+/CD38+画分とに分離した。対照よりも強い蛍光強度を示している細胞を、陽性とみなし

10

20

30

40

50

た。選別した細胞の一定分量を純度について再分析した。選別し、且つ分離した細胞を、以下に記載の通り R P P A 溶解緩衝液中に可溶化した。

【 0 0 5 1 】

細胞系

A T C C から得た白血病細胞系 (U 9 3 7、H L 6 0、O C I - A M L 3、K G - 1、M o 7 e、T F 1) を 0 . 5 % 又は 1 0 % ウシ胎児血清、ペニシリン / ストレプトマイシン 1 0 0 m g / n L、4 n M グルタミン酸 (全て G i b c o、米国) を補充した R P M I 1 6 4 0 培地中で増殖させた。細胞は、回収までコンフルエントレベル以下で維持し、次いで氷冷リン酸緩衝食塩水 (P B S) で 2 回洗浄し、上記溶解緩衝液のいずれかで 2 0 ~ 3 0 分間可溶化し、1 4 0 0 0 R P M で遠心分離し、沈殿物は廃棄した。細胞溶解液は、以下の R P P A 節に記載の通り希釈した。

10

【 0 0 5 2 】

ウェスタンブロット

ウェスタンイムノブロット分析を、細胞 4 ~ 5 × 1 0 ⁵ 個由来の材料及び B i o r a d C r i t e r i o n s y s t e m (B i o r a d、H e r c u l e s、カリフォルニア州) を使用して、対照細胞系 (K 5 6 2 及びジャーカット細胞) 及び分子量マーカーと同一のブロット上に添加した骨髓及び末梢血の試料で、以前に記載の通り実施した。多数のウェスタンブロット研究は、これらの試料がタンパク質分解を受けず (アクチンのラダゲ化が無いことによって評価された) 且つ、リン酸化タンパク質状態が少なくとも 1 0 年間安定に残ること (網膜芽タンパク質について) を示している。

20

【 0 0 5 3 】

抗体の検証

タンパク質生化学における制限要因の 1 つは、抗体 (A B) の有効性及び品質である。各候補抗体は、R P P A による使用のために承認される前に、ストリンジェントな検証手順の対象となった。A B は、細胞系及び患者試料に対して W B において主要な単一のバンドを有し、いかなる非特異的バンドも有さない必要がある。それは、A B が、切断、突然変異又は欠失によるサイズ変異体を含む既知の細胞特性を認識する場合には容認される。リン酸化されたエピトープに対する抗体は、タンパク質のリン酸化された又はリン酸化されていない形態を生じる、刺激された (例えば増殖因子) 又は阻害された (特異的阻害剤) 試料に対する特異性を示す必要があった。別法として、遺伝子的に改変された細胞 (例えばトランスフェクトされた又は s i R N A 阻害された) 及び細胞系は、A B を検証するために使用できた。最後に、上記基準に合格した抗体について、R P P A による結果は、W B によって認められるそれと同等である必要があった。

30

【 0 0 5 4 】

R P P A

定量の目的でタンパク質細胞溶解液をアレイの調製の直前に 9 8 ウェルプレートで追加の溶解緩衝液で系列希釈 (6 又は 8 系列希釈 : 完全強度、1 / 2、1 / 4、1 / 8、1 / 1 6、1 / 3 2、1 / 6 4、1 / 1 2 8) した。希釈は、マルチチャンネルピペットで手作業で行った。希釈試料を、3 8 4 ウェルプレートに移し、1 0 分間、9 5 °C で加熱した。これらのプレートから溶解液材料を a u t o m a t e d r o b o t i c G e n e T a c a r r a y e r (G e n o m i c S o l u t i o n s、I n c .、N o r t h B e l l e r i c a、A n n A r b o r、ミシガン州) で、ニトロセルロースで覆ったガラススライド (F A S T S l i d e s、S c h l e i c h e r & S c h u e l l B i o S c i e n c e、I n c . 米国、K e e n e、ニューハンプシャー州) 上にプリントした。2 4 枚までの同一のスライドを一度にプリントできる。採用された R P P A トランスファー法は、アレイピンの接触 1 回当たりタンパク質溶解液約 1 n L (完全強度タンパク質溶解液からの細胞 1 0 個当量に相当) がニトロセルロースガラススライドに移される非接触法である。ガラススライド上にスポットされるタンパク質濃度は、試料セットの中の元のタンパク質濃度に応じて、ピンの接触回数をドットスポット 1 つ当たり 5 から 1 0 回 (8 倍系列希釈後の細胞 1 0 0 から 0 . 8 個当量に相当する) に変化させることによ

40

50

って調整できる。1152個までの個々のドットを、スライド1枚にプリントできる。アレイスライド上の各スポットは、具体的な試料の溶解液の一定の希釈物を表している。6倍系列希釈ステップを使用する場合、試料192個程度を単一のスライド上にスポットできる。一度プリントするとスライドは、-80℃で安定であり、少なくとも6~12ヵ月間染色可能である。希釈したタンパク質をプリントするプレート(384ウェルプレート)は、-80℃で少なくとも12~18ヵ月間保存可能であり、同じ元の試料からの新たなアレイスライドの複数回の反復プリントプロセスに使用できる。

【0055】

探索

スライドのプリント後、スライドのブロッキング、プロットング及び抗体のインキュベーションについてイムノプロットングのために使用するのと同じストリンジェントな条件を適用する。最初にマイクロアレイスライドを、一次抗体の添加の前に内在性ペルオキシダーゼ、アビジン、及びビオチンタンパク質活性についてブロックした。D A K O (C o p e n h a g e n、デンマーク)シグナル増幅システムをA B結合強度の検出及び増幅のために使用した。この市販で入手可能な触媒系キットは、3,3'-ジアミノベンジジンテトラクロライド(D A B)を使用し、一次抗体によって検出されるシグナルを増幅するために基質のレポーター沈着を触媒した。ビオチン化された二次抗体(抗マウス又は抗ウサギ)を、シグナル増幅のための開始点として使用する。二次抗体に付着したストレプトアビジン-ビオチン複合体及びこの複合体上のビオチン-チラミド沈着は、反応を増幅するために使用される。チラミド結合西洋ワサビペルオキシダーゼは、D A Bを切断し、優れた信号雑音比を有する安定な茶色の沈澱物を生じる。本技術は、フェムトモル感度範囲まで高感度且つ再現可能である。

10

20

【0056】

シグナル強度は、スライドをImage Quant (Molecular Dynamics、カリフォルニア州)で走査することによって測定し、MicroVigene (商標) automated RPPA module (VigeneTech Inc.、マサチューセツ州)を使用して定量した。MicroVigeneソフトウェアを使用して各スポットの強度を算出し、強度濃度曲線を傾き及び切片で算出する。これは、発現強度を対照溶解液から作製した基準標準曲線と比較する場合に、各試料の相対的定量を可能にし、絶対的定量は、精製ペプチドの既知の量との比較によって決定できる。リン酸化と非リン酸化抗体とからのシグナル強度の比は、試料における所与のタンパク質の活性化状態の相対的定量を可能にする。添加時の差異は、評価され、結果の節において記載の通り発現強度の標準化によって補正される。差次的に制御されるタンパク質については、イムノプロットング(WB)を結果を確認するために実施した。RPPA分析のためのヒト白血病細胞系及び一次標本の使用を確立するために、我々は、RPPAの各実験ステップに体系的に取り組み、且つ確証した。MDACCのLeukemia Sample Bank (LSB)は、過去15年間にわたり数百のAML患者のタンパク質試料を体系的に保存している。完全な転帰データが入手可能である。したがって、我々は既存のLSBタンパク質試料をRPPAで試験した。

30

【0057】

RPPAの有用性及び感度

LSBにおける細胞溶解液を、1nL当たり細胞10個当量の細胞濃度にプロモフェノールブルーを含むWB溶解緩衝液を使用して調製する(「青色」溶解液と称する)。試料は、凍結前に使い捨てバイアルに50µlずつ分注する。調製され、保存され且つ使用可能なWB青色溶解液がRPPAによって分析可能であるかどうかを評価するために、我々は、これらを同じ患者から同日に1nL当たり細胞7又は10個のいずれかの濃度で調製された凍結保存標本を使用して新たに調製した細胞溶解液(「透明溶解液」)と比較した。「青色」及び「透明」溶解液の両方は、データ評価(図1)のために分析可能であった希釈曲線の直線部分において強いシグナルを生じた(図2)。「透明」及び「青色」溶解液の間の患者内の可変性は、極少であった。図1のスライドは、Stat3及びp-St

40

50

a t 3 (T y r 7 0 5) について染色した患者試料由来のリン酸化タンパク質染色の例を示している。5名の異なる患者から同日に採取した末梢血 (P B) 及び骨髓 (B M) 試料を異なる行に、第一列は新たに調製した「透明」溶解液で、及び第二列は既存の「青色」溶解液で、プリントした。最上列と比較して、第二列におけるより強いシグナルは、透明溶解液に対して青色溶解液の元の試料中の n L 当たりの細胞数がより多いためである。結論として、W B 溶解緩衝液中のプロモフェノールブルーは、図 1 に例示する通りシグナル検出及び分析に影響せず、L S B における既存のタンパク質溶解液を R P P A のために使用できることを示唆している。

【 0 0 5 8 】

細胞数の検出可能な最少差異の見地からの解像度及び感度の限界を検出するために、我々は、1 n L 当たり細胞 7 及び 1 0 個当量での細胞溶解液をそれぞれ調製した。図 3 に示す通り、アレイを 1 0 回接触でプリントし、且つ 6 種の異なる抗体で探索した。P B 又は B M 由来の材料からの曲線は、以前報告された通り元の材料の等価性を示唆して重なっている。2つの試料の間の 1 n L 当たり細胞 7 及び 1 0 個の調製物間の 1 n L 当たり細胞 3 個の最少差 (1 ドット当たり細胞 3 0 個に等しい) は、アッセイの定量的性質を確認して 6 種の異なる A B 全てについて全試料において容易に検出できた。最も濃縮された試料が 1 ドット当たり細胞 1 0 0 0 又は 5 0 0 個当量のいずれかを有し、且つ 8 回希釈物がそれぞれ細胞 8 及び 4 個由来のタンパク質を含む実験において、我々はシグナル強度の差異を検出できた。タンパク質が確実性をもって検出される最少細胞数は細胞 3 個であった。

【 0 0 5 9 】

R P P A の感度を、既知の精製タンパク質標準調製物との比較を使用して、フェムトモル範囲までのレベルの一次試料におけるタンパク質発現を検出する能力によって示した。患者試料 1 0 0 0 個の定量のために十分である 1 0 0 個の異なるリン酸化及び全ペプチドを採取した。ペプチドは、各アレイからペプチド曲線を参照できるように各スライド上に配置できる。細胞 3 個当量程度の少量の発現を検出し、且つ細胞 3 個程度の小さな発現強度の差異を確実に検出する能力は、R P P A 系の頑健性及び感度を示す。W B 又は M A L D I - T O F のいずれもラジスケールにおいてこの感度を達成していない。免疫組織化学は、単一細胞を評価するが、多数のタンパク質についての多数の細胞のラジスケールでの比較には適さない。固定化及びタンパク質安定性は、議論されており、プロテオーム全体は、R P P A での様に確実には表されていない。R P P A は、補足的な、ハイスループットスクリーニングツールであり、個々の結果は、I H C 又は他の方法で確認され、且つ発展され得る。

【 0 0 6 0 】

タンパク質 - 及びリン酸化エピトープ安定性

リン酸化エピトープの安定性を評価するために、我々は、タンパク質を生成するために使用する細胞の操作がリン酸化タンパク質の検出に影響するかどうかを試験した。患者から同じ日に採取し、凍結保存した血液及び骨髓由来の細胞のバイアルを融解し、一部を全細胞溶解液を作製するために移し、残りの細胞を再凍結した。これを 2 回繰り返し、その後第二の溶解液を調製した。これらの凍結融解標本を、新鮮に調製した溶解液と共にスライド上にプリントし、且つ 8 種の全体及びリン酸化タンパク質 : E R K 1 / 2 、 p - M A P K 4 2 / 4 4 、 S t a t 3 、 p - S t a t 3 (T h r 7 0 5) 、 A k t 、 p - A k t (S e r 4 7 3) 、 p 3 8 、 p - p 3 8 (T h r 1 8 0 / T y r 1 8 2) で探索した。新鮮に調製した青色溶解液と、1 回目又は 3 回目の融解からの凍結保存由来試料 (P B 又は B M のいずれか) から調製された試料との間にリン酸化エピトープ発現強度における統計的有意差はなかった。(図 5 及び図 6)。W B 又はフローサイトメトリーを使用する我々の発見と一致して、(リン酸化) - タンパク質と同程度のレベルの発現が P B 及び B M 試料 (患者 5 を除く) において観察され、白血病細胞に富む P B 及び B M 試料を、どちらか一方のみが入手可能である場合には同じ分析において使用できることを示している。上記観察は、同時に回収された P B 及び B M 試料を有する A M L 試料 2 3 個の第三の試料セットにおいてさらに確認された。これらの標本の発現プロファイルは、教師なし階層的クラス

10

20

30

40

50

ター分析において同じ患者由来のPBとBMの間において統計的有意差を示さなかった(23試料及び37抗体について $p = 0.67$)。

【0061】

リン酸化エピトープの経時的安定性を、凍結保存細胞から新鮮に調製されたタンパク質試料を、同一の標本から数年前に調製され調製後-70で保存されたタンパク質試料と比較した場合から得られた同様の発見によって示した。さらに、これらの結果は、凍結保存細胞中のリン酸化タンパク質エピトープが繰返しの凍結-融解及び標本処理の可変性について比較的安定であることを示した。AMLプロファイリングの結果における信頼を増大することからこれを知ることは重要である。

【0062】

プリント/スポッティングの再現性及び正確性

RPPAの再現性及び可変性を評価するために、溶解調製物間の変動さらにはプレート及び実験準備並びにアレイ実施の間の変動を試験した(サンプル間及びサンプル内並びにアレイ内及びアレイ間の変動)。

【0063】

最初に、アレイ準備及び調製の影響を試験するために、同じ溶解物を2回調製し(アレイプレート2枚)、且つ同一のアレイスライド上にプリント(プレート間調製)した。高い相関関係($R^2 = 0.89 \sim 0.97$)が観察された。我々は、次いで同一の白血病標本からの新たな溶解液の調製の可変性(実験間)を試験した。再び、同一のアレイ上にプリントした場合、高い相関関係が観察され(全体で $R^2 = 0.79 \sim 0.96$ から)、タンパク質溶解液作製における再現性を示している。最後に、アレイ間の比較(異なるスライド上にスポットされた同一試料)は、変動係数15%を有して高い。全ての実験においてアッセイされたタンパク質は: p38、p-p38、Stat3、p-Stat3(Tyr705)、ERK、p-MAPK40/42、m-Tor、p-mTOR(Ser2448)、p-AktS473、p-p70S6キナーゼ(Thr389)である。

【0064】

重複スポッティング(1枚のプレートから同じ試料を同一スライド上に2回プリントする)は、ほとんどの群において使用されるが、1枚のスライド上にプリントできる異なる試料の数を減少させる。重複スポット間の相関関係を、6種の異なる抗体について試験し、非常に高い一致が観察された(平均 $R^2 = 0.9926$; ERK1/2 = 0.9973、pMAPK(42/44) = 0.9919、Stat3 = 0.9825、pStat3(Thr705) = 0.9979、Akt = 0.9920、pAkt(Ser473) = 0.9941)(図4)。可変性の欠如は、重複が必要ではないことを示唆する。

【0065】

タンパク質量

試料中のタンパク質の絶対濃度を正確に決定するために、今回我々は、タンパク質濃度が不明である試料との比較のために、既知の濃度の精製タンパク質又は組換えペプチドに対する標準シグナル強度-濃度曲線を作製する。これらのペプチド標準-基準曲線を使用して、各試料/溶解液の未知のタンパク質濃度を算出できる。最初に、各スライド上にプリントされた対照細胞溶解液(例えば、U937、HL60、ジャーカット)のタンパク質濃度を、「スライド」のシグナル強度についての基準点として役立てるために決定する。次いで各スライドは、対照細胞溶解液のタンパク質発現強度について標準化できる。それから、絶対タンパク質濃度をペプチド標準曲線を読み取って決定できる。一例を図7に示す。精製した活性化Aktタンパク質及びp-Akt473ペプチドをRPPAによって配置した。シグナル強度(Y軸)対タンパク質濃度(タンパク質(pg))logスケールをプロットした。精製した活性化AKT及びリン酸化AKTペプチドとシグナル強度との間には直線関係があった。RPPAアッセイは、活性化AKTタンパク質をピコグラムレベルまで、リン酸化AKTペプチドをフェムトグラムレベルまで検出し、細胞数又はタンパク質濃度の最少差異を検出する能力についての我々の観察を補完する。

【0066】

R P P Aによる造血幹細胞の分析

白血病細胞におけるタンパク質発現の分析のほとんどは、希少な幹細胞集団よりも、骨髓又は血液中の白血病細胞のバルク集団を利用する。未解決の疑問は、幹細胞中のタンパク質発現は、白血病細胞のバルク集団のそれと同様であるか又は異なっているかである。実際には $10 \sim 20000$ 個のLSC又はHSCだけが、試料から単離できることから(細胞 1×10^7 個の $0.001\% =$ 幹細胞 10000 個)、伝統的方法(WB、フロー)は、幹細胞におけるタンパク質発現を分析できていない。対照的に、R P P A分析のためのスライド1枚は、8倍希釈系列について細胞約 200 個のタンパク質当量物を必要とするだけであり、R P P Aを、少量細胞集団の分析に理想的に適するものにし、且つ幹細胞 $10 \sim 20000$ 個は、一試料から 50 から 200 枚のスライドのプリント(50 から 200 の異なるA Bに相当)を可能にする十分な溶解液を提供するであろう。この数は、各スライドに蛍光色素プローブCy3及びCy5を使用して2倍にできた。実験的に我々は、単離されたCD34+/CD38-幹細胞、CD34+/CD38+細胞、CD34+細胞及びバルク白血病細胞集団からタンパク質溶解液を作製した。図8は、R P P Aによってアッセイし、且つ様々なA Bで探索した陽性及び陰性(CD34/38)HSC系列のいくつかの例を示す。結果は、HSCは正常SCと比較して異なるタンパク質サイン有することを示している(データ未記載)。

10

【0067】

R P P Aとウェスタンブロット法及び免疫組織化学との相関関係

R P P Aと従来技術との相関関係をヒト白血病細胞系U937及びNB4において評価した。細胞を、様々な用量のシタラピン単独又はイダルビシンとの組合せでインキュベートした。細胞を様々な時点で溶解し、分析し、且つR P P A及びWBによって探索した。R P P Aでの発現レベルは、ウェスタンブロット法によって決定した発現レベルと高度に相関した。WBとR P P Aの結果の間には、相関係数がAkt、p-Akt(473)、Erk、p-Erk(42/44)、Bcl-2については $R^2 = 0.89 \sim 0.98$ の間である優れた相関関係があった(データ未記載)。

20

【0068】

データの標準化及び添加量管理のための手法

アレイ間比較。アレイ分析における1つの課題は、アレイ間の可変性及び染色の比較可能性である(アレイ間)。スライド間を増大させる1つの手法は、各スライド上で未刺激、刺激された及び阻害された細胞溶解液(例えばMDA-468±EGF、U937、HL60、ジャーカット±FAS又は細胞溶解液の混合物)からなる陽性対照を実施することである。これらは、「スライド」のシグナル強度に対する基準点として役立つ。個々の試料は、平均スライド強度との比較で、及び異なる抗体で染色したスライド上の特定の試料の強度との関係において比較できる。したがって、異なるアレイ由来の試料及び抗体の相互比較を比較できる。

30

【0069】

試料のシグナル強度(変動パラメータについて補正された)が一度決定されると、絶対濃度をELISAアッセイと同様にペプチド標準曲線から決定できる。別法として、相対タンパク質発現レベルだけを比較し、タンパク質濃度の絶対値が必要でない場合には、試料/スライド/実験のセットを対照細胞溶解液だけとのシグナル強度の差異に対する補正に基づいて比較できる。我々は、具体的な課題に応じて両方の手法を日常的に使用する。

40

【0070】

タンパク質添加量補正/標準化

タンパク質の添加量はシグナル強度に影響する。プリント、A B結合/検出及び染色の可変性を補正するために、我々は、タンパク質添加量補正法の開発を目指した。この必要性は、異なる試料セット(細胞系、一次試料、幹細胞)の教師なし階層的クラスター分析が、その対応するセットに応じて試料を配置するという観察によって支持される。試料は、個々のタンパク質発現強度についてのその実際の値よりもそのタンパク質添加量に応じ

50

てクラスター化する。

【0071】

したがって、タンパク質添加量/標準化手法を、96個の一次AML試料セットにおいて開発した。驚くべきことに、一般に使用されるアクチン及びGAPDHなどのWB「ハウスキーピング」タンパク質は、試料において大きな変動を示した。これは、我々がWBによってアクチン及びGAPDHについて分析した白血病試料で同様の観察を得たこと程には驚くべきことではない。可能な説明は、WB膜がアクチン及びGAPDHを含むタンパク質で飽和されているということである。添加された豊富な抗体は、WBにおいて均一で濃いバンドを生じる。より高感度なRPPAは、log範囲3~4にわたる差異を検出できるが、典型的なWBでは範囲はlog1.5である。RPPAでは、タンパク質-A

10

【0072】

転写アレイと同様に、我々は、新たなハウスキーピングタンパク質を使用する添加量補正の異なる方法の比較を目指した。経験的に、我々は、5つのABが試料全体で、スライド全体で比較的安定な発現を示したことを観察した(mTor、Erk、JNK、GSK、p38)。しかし、これらのタンパク質は機能的制御及び変化を受け得ることから、我々は、最も少なく制御されるタンパク質(「ハウスキーピング」タンパク質)が、より良い標準化手法となり得、発現強度の変動が最少のタンパク質の1/3について補正すると仮定した。最後に確認された手法は、全てのタンパク質の平均に対して標準化することである。3種全ての手法は、0.82~0.92の間の相関関係(R^2)で同様の結果をもたらした。AML試料96個の教師なしクラスター分析における試料の分布は、3種全ての手法について等しかった。我々は通常1アレイセット当たりスライド1~2枚を我々のハウスキーピングタンパク質に対するABで染色する。

20

【0073】

別法として、タンパク質の絶対濃度を決定する必要がない場合、対応するタンパク質全体についてのリン酸化の割合を確立することは、試料間の発現結果を比較するための別の手段である。割合は、タンパク質添加量を考慮から外し、その特定のタンパク質の総量と比較したタンパク質の活性における変化を反映する。次いで補正值又は割合値のいずれかを階層的クラスター分析又はデータ分析及び表示の他の手段ために使用できる。

30

【0074】

最後に、新たな手法は、プロテオミクス分析におけるいくつかの標準化及び定量の障害を克服するために計画されている。全ての試料が利用可能なタンパク質濃度又は細胞数を有し得ないことから、タンパク質添加手順は、不均一な添加の可能性について補正される必要がある。各スポット/試料を5~8種の安定に発現されるタンパク質(ハウスキーピング)の平均又は全タンパク質に対して補正することは、全体及びリン酸化タンパク質が差次的に制御されている場合に、データを分析する前でまだ検出が可能である時に、プリント、検出及び染色の可変性を大部分考慮から外すことができる。同時に、これは、タンパク質試料の採取及び処理の規格化の必要性を強調する。容量当たり同じ細胞数と推定されるAML試料96個については、最近10~15年間に溶解された。

40

【0075】

統計的分析

本データセットは、遺伝子発現アレイの分析に対して使用されたものと同じのプログラム及びアルゴリズムを使用して分析する。データは、差次的タンパク質発現に基づくクラスターの存在について、統計的ソフトウェアを使用するモネセティック(二値変数)クラスター化法によって分析される。連続性補正カイ2乗検定を統計的分析のために使用する。様々なクラスター化法(階層的クラスター分析、K-平均、独立成分分析、相互情報量及びジーンシェーピングを含む)を、試料を統計的に類似の群に分類するために使用する。これらの群の頑健性及び統計的有意性は、データのブートストラップリサンプリングに

50

よって評価される。追加的に、この分類のドライバーは、*pathway analysis software* (Ingenuity Syst.、Mountain View、カリフォルニア州)を使用して、活性化される経路を分析することによって決定できる。患者試料は、患者の特徴(細胞遺伝学的、年齢性別、FAB型、血液病前歴、芽球百分率を含む)及び転帰データ(治療への反応、治療の型、寛解期間など)を含むLeukemia Sample Bank Databaseに関連している。これらのデータは、フィッシャーの直接確率計算法、分散分析及び再発までの期間についてのコックス比例ハザードモデルを含む標準的統計的方法を使用してRPPAクラスターと関連させ得る。この様に、我々は、RPPAによって作製された患者試料のクラスターが臨床的有意性を有するか、及び細胞遺伝学、化学療法型などの特定のエンドポイントと関連するかどうかを決定できる。差異を決定するための適切な能力は、患者試料約80個の「トレーニングセット」及び独立した「試験及び検証セット」としての少なくとも患者試料120個を必要とする。分析される患者試料320個が高い情報内容を提供する任意の研究における転写プロファイリングによって分析されるいかなるものより多いことを強調することは、重要である。MDACC Leukemia Sample bankは、十分な数を超える液体窒素保存患者試料及び迅速な処理に利用できる使用準備済みのウェスタンブロット溶解液を保有している(我々は、トレーニングセット試料80~100個及び試験セット試料240個を既に同定している)。

10

【0076】

Aml及びMds患者試料におけるサイトカイン及びケモカインの発現

20

本開示の特定の実施形態による方法を、急性骨髄性白血病(AML)及び骨髄異形成(MDS)患者試料の多量のセットを、それらのサイトカイン及びケモカインの発現について試験するために既存の技術と共に使用し、発現のパターンを決定し、臨床成績と関連付けた。タンパク質発現及び活性化は、骨髄異形成(MDS)及び急性骨髄性白血病(AML)において白血病細胞の病態生理を決定し、内在性の変化(例えば突然変異、メチル化)及び、ストローマ相互作用、サイトカイン(CTKN)及びケモカイン由来の外因性シグナルに依存する。

【0077】

26種のCTKN(IL-1RA、1B、2、45、6、7、8、9、10、12、13、15、17、エオタキシン、FGFB、G-CSF、GM-CSF、IFN、IP10、MCP1、MIP1、MIP1、PDGF、TNF及びVEGF)のレベルを、AML176個(未治療138個(新規)、再発38個(REL))及びMDS患者114個(新規97個、生物学的治療後10個、REL7個)並びに正常(NL)対象19個由来の血清試料においてmultiplex cytometry(Bioplex(商標)、Biorad)を使用して測定した。個々のCTKN発現は、臨床特徴(例えば、年齢、性別、細胞遺伝学、FAB、HB、WBC、血小板など)と相関しなかった。NLと比較したAML/MDSにおいて、IL-1、4、5、6、7、10、12、13、17、IFN、FGFB及びMIP1のレベルは有意に低く、IL-8及び15は高かった。AML及びMDSの発現プロファイルは、個別に又は教師なし階層的クラスター分析によって分析されたかどうかにかかわらず、IL-8及び13(AMLにおいて高い)並びにVEGF(MDSにおいて高い)を除いて統計的に識別できなかった。

30

40

【0078】

新規AMLのケースにおいて個別にCTKNを評価した場合、IL4、5及び10の高いレベルは、寛解達成と有意に相関し、IL8、I11Ra、IP-10、Mip1、VEGF及びILRの高いレベルは、より短い生存に有意に相関した。MDSにおいて寛解達成又は生存を予測したCTKNは、無かった。他のCTKN発現と比較したCTKN発現のピアソン相関及び群平均を使用する教師なし階層的ブートストラップクラスター分析は、1種のCTKNの高いレベルが他の高い発現と相関する場合に、6種の高度に再現的な発現パターン: 1) IL-1、4、7、10、12、13、G-CSF、IFN、MIP1及びPDGF 2) IL-1ra、6、8エオタキシン、IP-10、MI

50

P 1 及び V E G F、3) I L 2、9、1 5 及び G M C S F、4) I L 5 5) I L - 7、F G F - B a s i c、T N F 及び 6) M C P 1 を明らかにした。

【 0 0 7 9 】

群平均を使用する C T K N 発現に基づく試料の同様の教師なしクラスター分析は、5 つの疾患クラスター及び N L 試料クラスター (全 1 9 N L 試料を含む) も明らかにした。これら 5 つのクラスターにおける各 C T K N の平均発現レベルは、N L 試料においては高い発現を示すほとんどの C T K N の発現の消失を示し、各群は、N L と比較して異なる C T K N サブセットにおける発現の増大を示す。寛解達成は、サイトカインのサインに強く関連した (P = 0 . 0 0 5) 。要約すると、ほとんどの C T K N は、N L と比較して A M L 及び M D S において異なる発現を示した ; 興味深いことに A M L 及び M D S における C T K N 発現は、類似していた ; 多数の C T K N は、個々の転帰に予測的である ; C T K N サインは、患者群を区別し、且つ転帰に予測的である ; プロテオミクスプロファイリングとの相関は、活性化された経路に最大に影響するために他の標的治療との組合せにおいて、標的にするための C T K N を示唆できる。

10

【 0 0 8 0 】

R P P A 分析及び関連する発現サイン分析

R P P A 上記に記載の通りフォーマットした R P P A スライドを、5 2 種のタンパク質及びリン酸化タンパク質で患者試料 5 5 0 個を分析するために使用した。患者由来試料は、白血球細胞に富む C D 3 / C D 1 9 を除いた血液又は骨髄からの 1 マイクロリットル当たり細胞約 1×10^4 個の細胞濃度で作製した全血細胞溶解液であった。これらの試料を、繰返してプリントし、1 つの群は、「 A 」と表記したスポットに、他方は、その両側に逆向きで割り当て、上下逆の「 B 」で表した。標準化のために、1 1 個の細胞系の混合物からなる陽性対照及びタンパク質可溶化緩衝液からなる陰性対照を使用した。発現管理のために、ベースライン及び、文字「 C 」によって模式的に示される増殖因子又はサイトカイン刺激バージョン並びに文字「 N 」で示される 1 8 個の正常末梢血試料を含む 1 8 個の細胞系を使用した。シグナル強度の定量を可能にするために、測定することが予想される多くのタンパク質にわたる 1 3 8 種の精製ペプチド (患者試料を囲む紫色のバンドで示す) を含めた。プリントの模式図を例示する図を図 9 に例示する。

20

【 0 0 8 1 】

アレイは、c u s t o m 1 7 5 m i c r o n p i n s を使用して A u s h o n B i o S y s t e m s 2 4 7 0 a r r a y e r 上でプリントした。各スライドは、プリントされた 7 9 6 8 個のドットを有した。各試料の 1 から 3 希釈 5 系列を、ドットが細胞約 8 5 個当量のタンパク質から細胞 1 個当量のタンパク質の推定範囲を有するように、プリントした。患者試料の各列の最後には、ポジティブ又は陰性対照のいずれかをプリントした。これらは、交互の赤色及び黒色ドットによって示される、スライド全体にわたるグリッドを形成する。図 1 0 は、このプロセスを使用して作製された代表的なスライドを例示する。

30

【 0 0 8 2 】

希釈 - 濃度 - 発現曲線及び発現レベル分析。タンパク質発現強度は、M i c r o V i g e n e と称する自動化ソフトウェアプログラムで測定した。試料の希釈系列は、曲線の直線部分から読み取ることができ、且つデータ処理に使用される値を示す希釈 - 濃度 - 発現曲線を提供する。図 2 は、その様な曲線を示す。データを、トポグラフィック標準化を使用して規格化し、摂動ブートストラップ検証 / クラスター化を実施した。このクラスター化法は、無作為及び誤差を考慮し、且つ偏りの補正を可能にする。これは、データの確実性及び信頼性を非常に増大させる。統計的有意性を算出する場合に試料及びタンパク質 / 抗体の数について明らかにするボンフェローニ補正を実施した。

40

【 0 0 8 3 】

血液及び骨髄から調製された白血球細胞に富む試料におけるタンパク質発現レベルを分析した。全てのクラスター化は差異を明らかにしなかったが、5 2 種のタンパク質の内 8 種には、統計的有意差があった。4 種は、血液において高く、4 種は、骨髄において高か

50

った。差異は、統計的に有意であったが、倍数の差は全て低かった。このことから、血液及び骨髄試料を同じ分析に使用できることが結論できる。差異を有する8種のタンパク質について尺度は、標準化された。表3は、血液及び骨髄試料に関するこの分析の結果を例示する。

表3：血液及び骨髄から調製された白血病細胞に富む試料におけるタンパク質発現レベル【表3】

骨髄から調製された試料において発現が高かったタンパク質	
タンパク質	倍数
pMTOR	1.076
pS6RP.p240-244	1.321
S6.p2211	1.239
サバイピン	1.071

10

血液から調製された試料において発現が高かったタンパク質	
タンパク質	倍数
BAD	1.070
BAK	1.051
SRC	1.154
pSRCp527	1.169

20

【0084】

図11において青色で示すタンパク質発現レベルは、図11において赤色で示す通り、年齢、性別、感染、全身状態又は血液学的パラメーターを含む任意の伝統的な臨床的相関と相関しなかった。図11において例示する通り、これらの基準は、本クラスター図上で分かれていた。

30

【0085】

タンパク質発現は、52種のタンパク質の10%について疾患の状態に依存して異なっていた。10種のタンパク質の発現は、新たに診断されたものと再発との間で異なっていた。これらは：pAKTp308、BCL2、pERK2、MTOR、pMTOR、PTEN、pPTEN、SMAC、pSRC、p572及びSSBP2を含む。

【0086】

図12は、新たに診断されてから、原発性不応性、初回再発及び2回目以上の再発への疾患状態ごとに体系化する、特定のタンパク質についてのタンパク質発現の平均レベルを示す。いくつかのタンパク質は、抵抗性の増大と共に増大し、他は減少する様々なパターンが存在した。いくつかの場合において、新規と再発との間に大きな変化があり、他では新規と原発性不応性との間にあった。これは、いくつかのタンパク質の関連性が白血病の進展期において変化することを示唆し、且つこれは、これらのタンパク質を標的にする薬剤がより有効であるか又は有効でない可能性があるかどうかに影響し得る。

40

【0087】

図13は、タンパク質発現レベルの教師なしクラスター分析を示す。教師なしクラスター分析は、4クラスターを明らかにした。1番目は、大部分リン酸化STPで、2番目及び3番目は、主にアポトーシス関連タンパク質で、最後はリン酸化stataタンパク質で構成されていた。

【0088】

ブートストラップクラスタリングを実施し、図14において示す通りこれら4つのクラ

50

スターが高度に再現性があることが示された。明るい黄色は100%相関を示し、青色は、2つのタンパク質が全く相関しないことを示す。

【0089】

F A B分類。次いでタンパク質発現レベルをF A B分類について評価した。23種のタンパク質について有意差が示された。図15において示す通り、これら23種のタンパク質のタンパク質発現サインは、患者を分類するために使用できる。このデータは、標的治療を使用する時期を示唆するために使用できる。例えば、抗BCL2剤をレベルが高いM0、M1及びM2において選択的に使用し、且つレベルが既に低い他のF A B分類においては使用しないことは、望ましい可能性がある。

【0090】

細胞遺伝学。タンパク質発現サインを、細胞遺伝学の背景においてさらに評価した(図16)。患者は、特定の細胞遺伝学的変化に関連する異なるタンパク質発現サインで再度クラスター化され得た。注目すべきことは、図16の右側で染色体5及び7を含む変化の全ては、個々に又は組合せで、11q23異常を有するものを除いて、同一のクラスター中に見出された。明白に、どちらもコア結合因子に影響する良好な細胞遺伝学的変化、逆位16及び転座8 21は、互いにクラスター化しない。図17は、前述の樹状図と同じ順序で配置した、細胞遺伝学的カテゴリーによるタンパク質発現の平均レベルを示すヒートマップを示す。予想された通り、二倍体及び混合物は多言語的な変化を示し易く、大部分のタンパク質について平均的発現を有した。図17は、標的治療は、特定のタンパク質の発現及び活性化が見出されるこれらの細胞遺伝学的カテゴリーに選択的に適用される必要があることを示唆する。例えば、ヌトリンなどの薬剤は、p53レベルが非常に高い、-5又は7の場合においては有効ではない可能性がある。

【0091】

ピアソン相関の絶対値に基づく主な構成成分のクラスター化をタンパク質クラスターを定義するために使用した。これは、最初に10クラスターを示唆した。患者に対する総スコア又は「サイン」を各タンパク質クラスターについてのスコアの合計を取ることで決定した。タンパク質サインを定義するために、各患者に対する各クラスターについてのスコアを決定し、全体のベクトルを決定した。患者をこの総合的なスコアに基づいてクラスター化した場合、7つのタンパク質サイン群が生じた。

【0092】

図18は、7つのタンパク質クラスター中の各タンパク質の平均シグナルを示すヒートマップを例示する。10個のタンパク質クラスターの構成成分及び各群中の各タンパク質の平均発現を示す。いくつかの群においてタンパク質は、全て一般に正の相関を示すが、一方他の群においては、正及び負の両方の相関を有するタンパク質がある。これは、AMLにおいて観察される独特の再発パターン又はサインがあることを示す。

【0093】

これら7つのタンパク質サインクラスターにおいて患者は、細胞遺伝学に基づいて均一に分けられていなかった。表4は、細胞遺伝学的群の患者がどの様に7つのサインに分けられたかを示す。いくつかの群は、群の中に過剰提示、又は提示不足を有した。

表4：細胞遺伝学ではタンパク質サイン群中で不均一に分布する

10

20

30

40

【表 4】

群	良好	中間	不良
1	22.7%	23.5%	20.2%
2	9%	12.1%	10%
3	4.5%	7.3%	10%
4	4.5%	8.9%	16%
5	18.2%	29.2%	18.4%
6	31.8%	16.2%	7.5%
7	9%	2.4%	17.6%

10

【0094】

表5は、患者をタンパク質サイン及び細胞遺伝学によって階層化した場合の反応率を示す。細胞遺伝学的に良好な全ての患者が寛解に達したことから、サインは有益ではないが、寛解率は、タンパク質発現サインに依存して中間及び不良な予後の細胞遺伝学の両方について大きく変化した。タンパク質サイン及び細胞遺伝学による患者の同じ階層化を再発率を分析するために使用した。これは、タンパク質サインは、細胞遺伝学的グループ内において異なる再発率に顕著に関連することを明らかにした。以下の表6は、これらの発見

20

表5：タンパク質サイン群及び細胞遺伝学による反応率

【表 5】

群	良好	中間	不良
1	100%	78%	42%
2	100%	71%	50%
3	100%	71%	50%
4	100%	30%	53%
5	100%	59%	35%
6	100%	63%	75%
7	100%	0%	37%

30

表6：タンパク質サイン群及び細胞遺伝学についての再発率

【表 6】

群	良好	中間	不良
1	60%	34%	63%
2	50%	60%	40%
3	0%	20%	80%
4	0%	33%	63%
5	50%	50%	67%
6	29%	75%	0%
7	50%	NA	100%

10

【0095】

タンパク質発現サインは、予後の徴候である。

A M L 患者 73 名を本開示の特定の実施形態による方法を使用して評価した。タンパク質 22 種及びリン酸化タンパク質 15 種を測定した。異なるタンパク質発現サインが存在し、予後の徴候であった。異なる反応率及び異なる再発率が、存在した。各サイン群についての反応率、原発性不応性又は抵抗性率及び再発率を表 7 に示す。C R 及び抵抗性率が群ごとに異なる一方で、総再発率は群 7 を除いて全ての群において同様であった。

20

【0096】

これらの 7 種のタンパク質サインクラスターにおいて患者は、細胞遺伝学に基づいて均一に分けられていなかった。表 8 は、各サインで、大きな 3 つの細胞遺伝学的群それぞれが構成する百分率を示す。いくつかの群は、赤色で示す過剰提示を、又は黄色で示す提示不足を群内に有した。

表 7：群ごとの C r、抵抗率及び再発率

【表 7】

群	#	%CR	%不調+抵抗性	%再発
1	47	66	34	45
2	27	66	34	50
3	18	61	39	45
4	26	46	54	50
5	55	54.5	45.5	53
6	30	73	26.6	50
7	21	47.6	53.4	80

30

40

表 8：細胞遺伝学ではタンパク質サイン群中に不均一に分布した

【表 8】

群	良好 (%)	中間 (%)	不良 (%)
1	8.6	50	41.4
2	6.7	50	40%
3	4.5	40.9	54.5
4	3.2	35.5	61.3
5	6.3	57.1	34.9
6	19.4	55.6	25
7	10.7	7.1	75

10

【0097】

図19は、新たに診断されてから、初回再発、原発性不応性及び2回目以上の再発への疾患状態ごとの平均レベルを示す。青色線は、血液であり、赤は骨髄である。いくつかのタンパク質は抵抗性の増大と共に増大し、他は減少する様々なパターンが存在することが理解できる。いくつかの場合において、新規と再発との間に大きな変化があり、他では新規と原発性不応性との間にあった。これは、特定のタンパク質の重要性が白血病の進展期において変化することを示唆し、且つこれらのタンパク質を標的にする薬剤がより有効であるか又は有効でない可能性がある時期に影響し得る。

20

【0098】

したがって、RPPA発現アレイは：FAB、細胞遺伝学、反応率、抵抗性、及び再発率に関連する異なるタンパク質発現サインを定義する。サインは、より大きな効力を生じ得る設定へ標的治療を導き得る。

【0099】

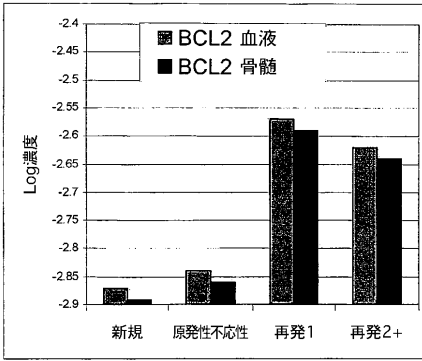
本発明の広い範囲に向けて設定する数値範囲及びパラメーターは、概算であるが、特定の実施例における数値設定は、可能な限り正確に報告される。しかし、いずれの数値も、その個々の試験測定において確認される標準偏差から必然的に生じる一定の誤差を本来的に含んでいる。

30

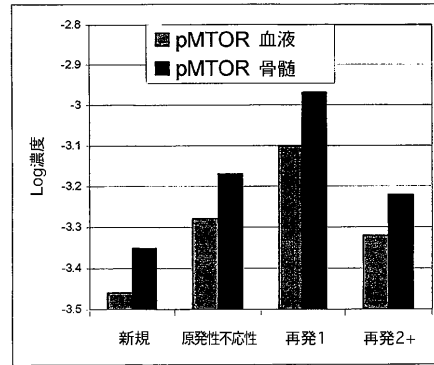
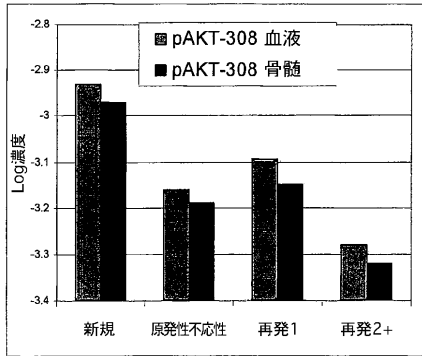
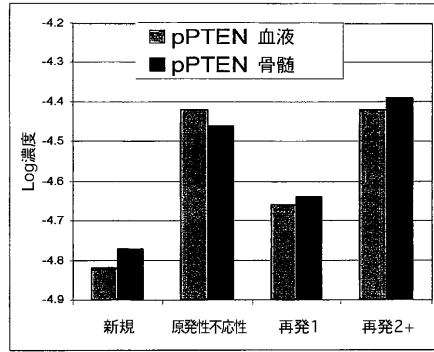
【0100】

したがって、本発明は、記載された及びそれに固有の目的及び利益に達するために十分に適合する。多数の変更が当業者によって行われ得るが、その様な変更は、添付の請求項によって部分的に例示される通り本発明の意図に包含される。

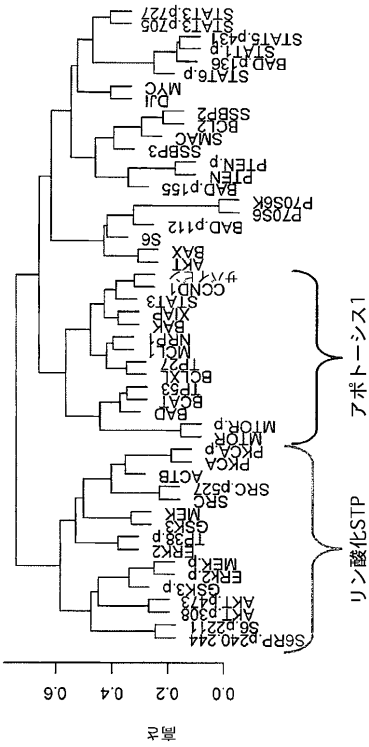
【 図 1 2 - 1 】



【 図 1 2 - 2 】



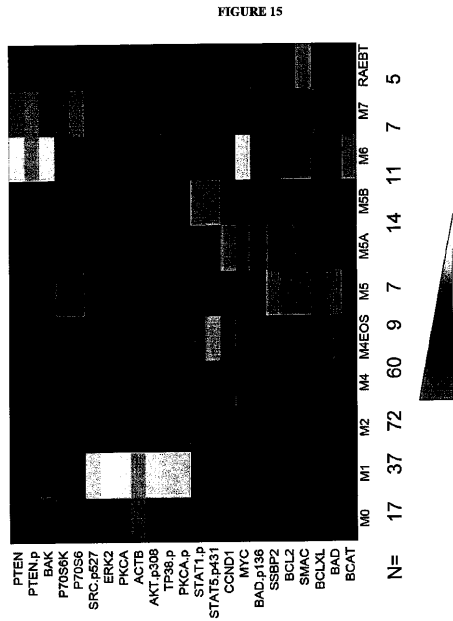
【 図 1 3 】



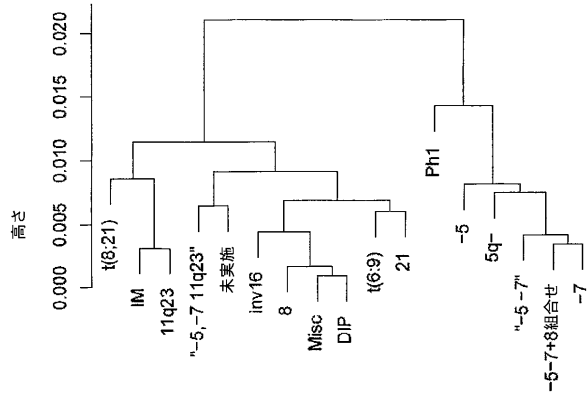
【 図 1 4 】



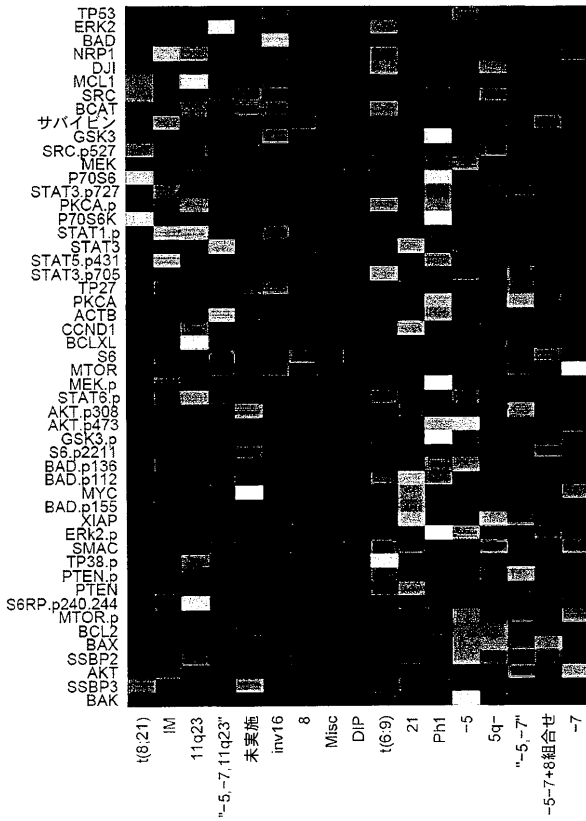
【 図 1 5 】



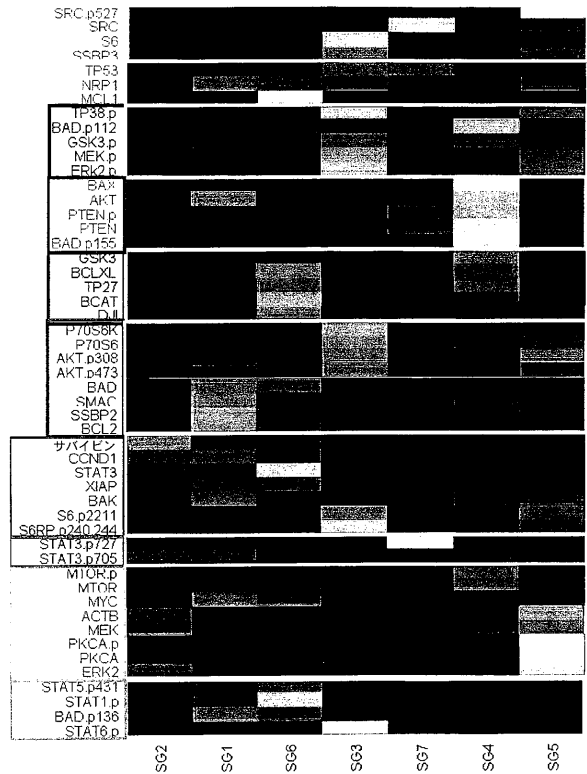
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

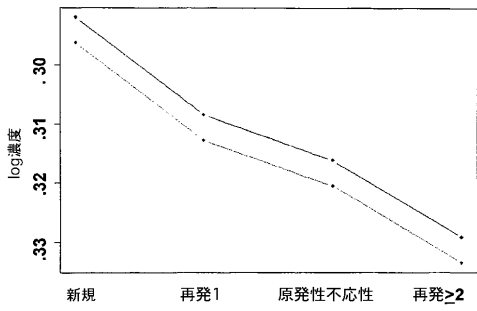


【 図 1 8 】



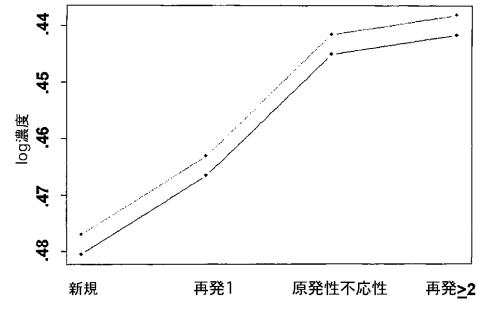
【 図 19 - 1 】

pAKT-p30%8

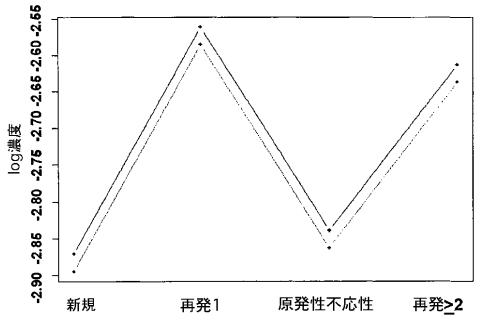


【 図 19 - 2 】

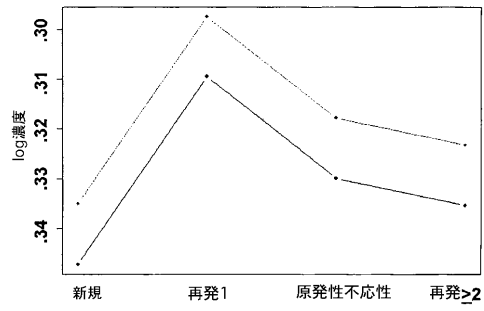
pPTEN



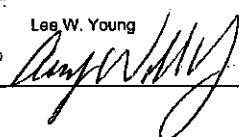
p21



pMTOR



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 07/69771
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53 (2007.01) USPC - 435/7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 435/7.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/194, 330 (see search terms below)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWest: PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; Google Scholar; Google Patents Text: reverse phase protein microarray; cluster (-ing); heat map; topograph (-y, -ical); prognosis; positive control; negative control; phenotype; storage; processor; compare; program		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	PETRICOIN et al. Mapping molecular networks using proteomics: a vision for patient-tailored combination therapy. J Clin Oncol. 20 May 2005, Vol 23, No 15, pg. 3614-21, esp. pg. 3615-3617	1-6, 10-11 ----- 7
X ----- Y	SHEEHAN et al. Use of reverse phase protein microarrays and reference standard development for molecular network analysis of metastatic ovarian carcinoma. Mol Cell Proteomics, April 2005, Vol 4, No 4, pg 346-55, esp. pg. 349 and 351	8, 12-13 ----- 9
Y	US 2005/0244821 A1 (ZIK et al.) 03 November 2005 (03.11.2005) para [0170]	9
Y	US 2003/0134320 A1 (BARRUS et al.) 17 July 2003 (17.07.2003) para [0008], [0011], [[0037], [0069]-[0072] [0099]	7
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 October 2007 (01.10.2007)		Date of mailing of the international search report 05 NOV 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 

フロントページの続き

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

(74)代理人 100088926

弁理士 長沼 暉夫

(74)代理人 100097870

弁理士 梶原 齋子

(74)代理人 100140556

弁理士 新村 守男

(74)代理人 100114719

弁理士 金森 久司

(74)代理人 100143258

弁理士 長瀬 裕子

(74)代理人 100124969

弁理士 井上 洋一

(72)発明者 コーンブラウ、スティーブン

アメリカ合衆国、テキサス、ナッソー ベイ、ポート ロイヤル 2014

(72)発明者 クームズ、ケビン

アメリカ合衆国、テキサス、ウェスト ユニバーシティ、 ウェストチェスター アベニュー 6
624

专利名称(译)	反相蛋白质阵列，蛋白质激活和表达的特征以及相关方法		
公开(公告)号	JP2009538436A	公开(公告)日	2009-11-05
申请号	JP2009513400	申请日	2007-05-25
申请(专利权)人(译)	得克萨斯系统大学董事会董事会		
[标]发明人	コーンブラウステイブン クームズケビン		
发明人	コーンブラウ、ステイブン クームズ、ケビン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/6803 B01J2219/00659 B01J2219/00702 B01J2219/00725 G01N33/54366 G01N33/574 G01N33/57426		
FI分类号	G01N33/53.D G01N37/00.102		
代理人(译)	池田幸 新村守男 井上洋一		
优先权	60/803347 2006-05-26 US 60/869283 2006-12-08 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

获得蛋白质活化和表达的特征并用于蛋白质活化和表达的特征以及癌症分类，预后和治疗指导。蛋白质激活和表达特征可以通过用蛋白质阵列测定多个样品，以模式为基础聚类测定的样品来确定，从而产生热图如图1所示。

