

(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2005-34151
(P2005-34151A)

(43) 公開日 平成17年2月10日(2005.2.10)

(51) Int.Cl.⁷

C12Q 1/68
A61K 31/4725
A61K 31/4745
A61K 45/00
A61P 35/00

F 1

C 12 Q 1/68
A 61 K 31/4725
A 61 K 31/4745
A 61 K 45/00
A 61 P 35/00

Z N A A
A 61 K 31/4745
A 61 K 45/00
A 61 P 35/00

テーマコード (参考)
4 B 02 4
4 B 06 3
4 C 08 4
4 C 08 6

審査請求 未請求 請求項の数 47 O L 外国語出願 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2004-195973 (P2004-195973)

(22) 出願日

平成16年7月1日 (2004.7.1)

(31) 優先権主張番号

10/611446

(32) 優先日

平成15年7月1日 (2003.7.1)

(33) 優先権主張国

米国 (US)

(71) 出願人

504129755
ペリデックス リミティド ライアビリティー カンパニー
アメリカ合衆国, ニュージャージー 08869, ラリタン, 1001 ユナイテッド ステイツ ハイウェイ 202

(74) 代理人

100099759
弁理士 青木 篤
100077517
弁理士 石田 敏
100087413
弁理士 古賀 哲次
100129517
弁理士 栗田 博道

最終頁に続く

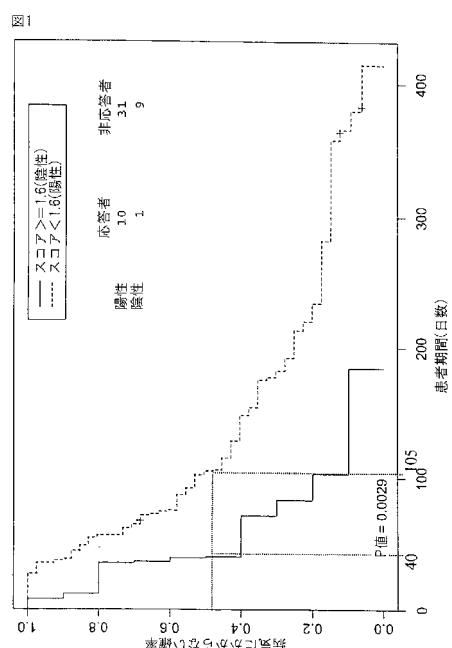
(54) 【発明の名称】癌を評価および治療する方法

(57) 【要約】

【課題】 ファルネシル・トランスフェラーゼ阻害物質 (FTI) による治療に応答するかどうかを判定するために有用な方法および物品を提供する。

【解決手段】 癌、好ましくは造血系の悪性腫瘍、の患者を治療する方法であって、患者の遺伝子発現プロファイル及び/又は分子マーカーを分析して該患者がファルネシル・トランスフェラーゼ阻害物質 (FTI) 、及び任意の他の治療薬、による治療に応答しそうかどうかを決定するステップを含む。この方法はまた、患者の治療をモニターし、治療のコースを選択するのに有用である。FTI治療に対して調節 (modulate) される遺伝子が提供され、プロファイルを作成するのに用いられる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

1 b c 腫瘍遺伝子の存在又は発現を分析することによって、ある患者が F T I による治療に応答するかどうかを決定する方法。

【請求項 2】

さらに、F T I の存在下で調節に差がある遺伝子の発現の分析を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該分析が、1 b c 腫瘍遺伝子の他に 2 つ以上の遺伝子の発現に関する分析であることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

該遺伝子が配列番号 1 ~ 1 8 から成る群より選択されることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

1 b c 腫瘍遺伝子が存在しない又は発現されないと判定された患者が F T I で治療されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

1 b c 腫瘍遺伝子が存在する又は発現していると判定された患者が F T I 以外の物質で治療されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

さらに、F T I への応答を決定するために用いられる患者サンプルが C D 3 3 と C D 3 4 から成る群より選択される細胞表面抗原を含むかどうかを決定するステップを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記表面抗原を有する細胞の存在が F T I 治療への応答を予測させるものであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

さらに、F T I への応答を決定するために用いられる患者サンプルにおける芽細胞を含む細胞のパーセンテージを決定するステップを含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記サンプル中に存在する芽細胞が 60 % 未満であることが F T I への応答を予測させることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

1 b c 腫瘍遺伝子の存在又は発現を分析することによって、F T I により治療される患者の治療をモニターする方法。

【請求項 12】

さらに、F T I の存在下で調節に差がある遺伝子の発現を分析するステップを含む請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 13】

該分析が、1 b c 腫瘍遺伝子以外に 2 つ以上の遺伝子の発現の分析であることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 14】

該遺伝子が、配列番号 1 および配列番号 3 ~ 1 8 から成る群より選択されることを特徴とする請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 15】

1 b c 腫瘍遺伝子が存在しない又は発現されないと判定された患者が該 F T I に応答する患者として治療されることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 16】

さらに、該 F T I への応答を決定するために用いられる患者サンプルが C D 3 3 と C D 3 4 から成る群より選択される細胞表面抗原を含むかどうかを決定するステップを含む請

10

20

30

40

50

求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記表面抗原を有する細胞の存在が C D 3 3 の場合には 1 5 % 未満、 C D 3 4 の場合には 6 0 % 未満であることが F T I 治療への応答を示すことを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記表面抗原を有する細胞が存在しないことが F T I 治療への応答を示すことを特徴とする請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

さらに、該 F T I への応答を決定するために用いられる患者サンプルにおける芽細胞を含む細胞のパーセンテージを決定するステップを含む請求項 1 1 に記載の方法。 10

【請求項 2 0】

前記サンプルにおける芽細胞の存在が 6 0 % 以下であることが F T I 治療への応答を示すことを特徴とする請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記サンプルにおける芽細胞の存在が 6 0 % を超えることが F T I 治療への非応答を示すことを特徴とする請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

1 b c 腫瘍遺伝子が存在すると判定された、又は量が減少せずに発現されると判定された患者が F T I に応答しないとして治療されることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。 20

【請求項 2 3】

該 F T I が (R) - 6 - [アミノ (4 - クロロフェニル) (1 - メチル - 1 H - イミダゾール - 5 - イル) メチル] - 4 - (3 - クロロフェニル) - 1 - メチル - 2 (1 H) - キノリノン) であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 4】

該 F T I が (R) - 6 - [アミノ (4 - クロロフェニル) (1 - メチル - 1 H - イミダゾール - 5 - イル) メチル] - 4 - (3 - クロロフェニル) - 1 - メチル - 2 (1 H) - キノリノン) であることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 5】

患者を治療する方法であつて：
a) 該患者が F T I による治療に応答するかどうかを決定するために、前記患者における遺伝子発現プロフィール又は 1 b c 腫瘍遺伝子の存在を分析するステップ；及び
b) 分析により該患者が応答するということが示された場合に、該患者を F T I で治療するステップ
を含んでなる方法。

【請求項 2 6】

該分析が 2 つ以上の遺伝子の発現に関する分析であることを特徴とする請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

該 F T I がキノリン又はキノリン誘導体から成る群より選択されることを特徴とする請求項 2 5 に記載の方法。 40

【請求項 2 8】

該 F T I が下記：

7 - (3 - クロロフェニル) - 9 - [(4 - クロロフェニル) - 1 H - イミダゾール - 1 - イルメチル] - 2 , 3 - ジヒドロ - 1 H , 5 H - ベンゾ [ij] キノリジン - 5 - オン、
7 - (3 - クロロフェニル) - 9 - [(4 - クロロフェニル) - 1 H - イミダゾール - 1 - イルメチル] - 1 , 2 - ジヒドロ - 4 H - ピロロ [3 , 2 , 1 - ij] キノリン - 4 - オン、
8 - [アミノ (4 - クロロフェニル) (1 - メチル - 1 H - イミダゾール - 5 - イル) 50

メチル] - 6 - (3 - クロロフェニル) - 1 , 2 - ジヒドロ - 4H - ピロロ[3 , 2 , 1 - ij]キノリン - 4 - オン、

8 - [アミノ(4 - クロロフェニル)(1 - メチル - 1H - イミダゾール - 5 - イル)メチル] - 6 - (3 - クロロフェニル) - 2 , 3 - ジヒドロ - 1H , 5H - ベンゾ[ij]キノリジン - 5 - オン、及び

(R) - 6 - [アミノ(4 - クロロフェニル)(1 - メチル - 1H - イミダゾール - 5 - イル)メチル] - 4 - (3 - クロロフェニル) - 1 - メチル - 2(1H) - キノリノン)

から成る群より選択されることを特徴とする請求項27に記載の方法。

【請求項29】

該FTIが(R) - 6 - [アミノ(4 - クロロフェニル)(1 - メチル - 1H - イミダゾール - 5 - イル)メチル] - 4 - (3 - クロロフェニル) - 1 - メチル - 2(1H) - キノリノン)であることを特徴とする請求項28に記載の方法。

【請求項30】

該遺伝子が配列番号1~18を有する核酸配列の1つ以上と相関していることを特徴とする請求項26に記載の方法。

【請求項31】

治療がFTI及び他の治療組成物の投与を含むことを特徴とする請求項25に記載の方法。

【請求項32】

前記他の治療組成物がMAPK / ERKシグナリング経路、TGF、WNT、Rho又はアポトーシス経路を調節することを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項33】

前記他の組成物が、チロシン・キナーゼ阻害物質、MEKキナーゼ阻害物質、PI3キナーゼ阻害物質、MAPキナーゼ阻害物質、アポトーシス調節物質及びそれらの組み合わせから成る群より選択されることを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項34】

FTIによるある患者の治療の有効性を評価するための物品であって、それによりFTI応答を示す患者の遺伝子発現プロフィールが決定される媒体を含んでなる物品。

【請求項35】

該遺伝子発現プロフィールが、配列番号1~18の2つ以上の核酸配列と相関する遺伝子の群より得られることを特徴とする請求項34に記載の物品。

【請求項36】

媒体に固定された遺伝子発現プロフィールの表示を含む請求項34に記載の物品。

【請求項37】

FTI治療への応答を決定するための試薬を含んで成るキット。

【請求項38】

前記試薬が1b c腫瘍遺伝子の存在又は発現を検出するためのものであることを特徴とする請求項37に記載のキット。

【請求項39】

前記試薬が配列番号1~18及びそれらの変異体から成る群より選択される遺伝子の発現を検出するためのものであることを特徴とする請求項38に記載のキット。

【請求項40】

さらに、CD33とCD34から成る群より選択される細胞表面抗原を検出するための試薬を含む請求項37に記載のキット。

【請求項41】

さらに、芽細胞を検出するための試薬を含む請求項37に記載のキット。

【請求項42】

前記試薬がPCRプライマーを含むことを特徴とする請求項37に記載のキット。

【請求項43】

10

20

30

40

50

さらに、プローブを含む請求項43に記載のキット。

【請求項44】

1b c腫瘍遺伝子が存在しない又は発現されないと判定された又はその後に判定される患者を治療する医薬の調製のためのFTIの使用。

【請求項45】

1b c腫瘍遺伝子の存在又は発現がその後モニターされる患者を治療する医薬の調製のためのFTIの使用。

【請求項46】

患者からのサンプルを分析するための診断キットであって、それにより1b c腫瘍遺伝子の存在又は発現が決定されることを特徴とする診断キット。

10

【請求項47】

患者を治療するための組み合わせであって：

該患者がFTIによる治療に応答するかどうかを決定するために前記患者における遺伝子発現プロフィール又は1b c腫瘍遺伝子の存在を決定する手段；及び、

分析により患者が応答することが示しされた場合に前記患者を治療する医薬組成物を調製するためのFTIの使用；

を含んでなる組み合わせ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、分子マーカーの検出及び／又は遺伝子発現の分析に基づく癌の診断、予後予測(prognostic)および治療に関する。

20

【背景技術】

【0002】

癌に関わるいくつかの分子、例えばRas、が、細胞の原形質膜の内側リーフレット(leaflet)と相互作用していろいろなシグナリング経路に関与するようになるためには、ファルネシル・トランスフェラーゼ酵素によってファルネシル化されなければならない。しかし、Rasは、癌に関与するタンパク質で、プレニル化されるCAXボックスを有する唯一のものではない。ファルネシル・トランスフェラーゼ阻害物質(FTIs)は、いろいろなタンパク質のC末端CAXモチーフへの炭素ファルネシル部分の共有結合による付着を阻害する治療物質である。FTIsは、癌及び増殖性疾患、例えば血液の悪性腫瘍、の治療に利用できる。血液の悪性腫瘍、例えば、白血病、リンパ腫、及び骨髄腫(例えば、急性骨髄性白血病；AML)は、FTIsで最も有効に対応できる疾患の例である。乳がんや膠芽細胞腫などの充実性腫瘍もFTIsで治療することができる。

30

【0003】

多くの治療方式の場合に見られることであるが、ある患者たちはFTIsによる治療に応答するが、別の患者たちは応答しない。治療に対して応答しそうもない患者にこの治療を処方することは望ましくない。したがって、薬を投与する前にある患者がその治療にどのように応答すると予期されるかを知ることができれば、非応答者には不必要的治療を施さないようにし、その薬から利益を得られる見込みが最も大きい患者に適切に治療してモニターすることができるので有益であろう。さらに、治療に応答する人たちのうちでも、応答の度合いは様々である。FTIs以外の治療法による治療、又はFTIsに追加される治療法による治療も、FTIsに応答しない患者や、FTIsだけに対する応答が望ましいというほどではない患者には有益なことがある。

40

【発明の開示】

【0004】

本発明は、FTIによって癌患者を治療する方法である。そのような1つの方法では、ある分子マーカーが存在するかどうかによって、その患者がそのFTIに応答しそうかどうかが判定される。患者は、応答しそうであると判定された場合にFTIによって治療される。あるFTIによる治療に患者が応答しそうもない場合、その治療は保留される。本

50

発明のある態様では、F T I 応答の可能性（確率）を決定するための遺伝子の組に関して遺伝子発現プロフィールが得られる。本発明の別の様態では、分子マーカーの存在と遺伝子発現プロフィールを組み合わせて用いて、F T I 治療への応答の可能性を判定する。本発明のさらに別の様態では、遺伝子発現プロフィールを白血球芽細胞数及び／又は白血球細胞抗原発現と組み合わせて用いて、F T I 治療に対する応答の可能性を判定する。本発明のさらに別の様態では、分析で用いられるサンプルが骨髄から得られる。

【0005】

本発明の別の様態では、癌患者はF T I による治療に関してモニターされ、患者の遺伝子発現プロフィール及び／又は分子マーカーの存在を分析して、患者がそのF T I に応答しているかどうかを判定し、患者が望ましい仕方で応答しそうであれば、そのF T I で患者を治療する。

【0006】

本発明のさらに別の様態では、遺伝子発現プロフィールが1つ以上の特定遺伝子でF T Iへの応答を示す変化を示した場合に患者をそのF T I で治療する。

【0007】

本発明のさらに別の様態では、遺伝子発現プロフィールが1つ以上の特定遺伝子でF T Iへの応答を示す変化を示すものであり、かつ、骨髄の芽細胞数が0～60%、又はCD33細胞表面抗原のポジティブな発現を示す細胞が60%未満、及び／又はCD34細胞表面抗原のポジティブな発現を示す細胞が10%未満、である場合、患者はF T I で治療される。

【0008】

本発明のさらに別の様態では、分子マーカーは以下の1つ以上である：l b c 腫瘍遺伝子、A H R、D K F Z p 6 6 7 G 2 1 1 0，I D S、G P R 1 0 5，T E M 6，T N F S F 1 3，S V I L、K I A A 0 6 8 0，F R A G 1，D K F Z p 5 6 6 B 2 1 3，K I A A 1 0 3 6，B T G 3，M A P K 8 1 P 3，A R H H、N P T X 2。マーカーは、また、O P N 3及び／又はI L 3 R A と上記の1つ以上との組み合わせであってもよい。

【0009】

本発明のさらに別の様態では、F T I はキノリン又はキノリン誘導体である。

【0010】

本発明のさらに別の様態では、F T I は(R)-6-[アミノ(4-クロロフェニル)(1-メチル-1H-イミダゾール-5-イル)メチル]-4-(3-クロロフェニル)-1-メチル-2(1H)-キノリノンである。

【0011】

この方法を実行するために用いられる物品も本発明の1つの様態である。そのような物品には、遺伝子発現プロフィール又はその表示(representation)も含まれる。表示は、コンピュータで読み取り可能な媒体に固定することができる。本発明によるその他の物品としては、本発明の遺伝子発現プロフィールを決定するために用いられる核酸アレイ、及びその他の核酸検出方法を実行するためのデバイスやコンポーネントが含まれる。

【0012】

キットも本発明の1つの様態である。そのようなキットは、F T I 治療に応答する人と応答しない人を識別する、遺伝子の発現及び／又は分子マーカーの存在を検出する試薬を含む。キットは説明書も含む。

【0013】

本発明の別の様態では、癌患者を治療する方法は、あるF T Iと、M A P K / P E Kシグナリング経路、T G F 、W N T 、R h o 、又はアポトーシス経路、を調節(modulate)する治療組成物とを投与するステップを含む。

【0014】

本発明の別の様態では、患者は、あるF T Iと、チロシンキナーゼ阻害物質(inhibitor)、M E K キナーゼ阻害物質、P I 3 K キナーゼ阻害物質、M A P キナーゼ阻害物質、アポトーシス調節物質(modulator)、及びそれらの組み合わせ、から成る群から選択される

10

20

30

40

50

治療組成物によって治療される。

【0015】

本発明のさらに別の様態では、ある患者の遺伝子発現プロフィール及び／又は分子マークーの存在の有無が分析されて、FTIと別の薬の組み合わせがその患者に利益になりそうか判定される。その後、その患者はその組み合わせで治療されるか、又は、患者がFTIに応答しそうもない場合には、患者は別の薬、例えば、チロシンキナーゼ阻害物質、MEKキナーゼ阻害物質、PI3Kキナーゼ阻害物質、MAPキナーゼ阻害物質、アポトーシス調節物質、及びそれらの組み合わせ、から成る群より選択される別の薬、によって治療される。

【0016】

本発明のさらに別の様態では、ある患者の遺伝子発現プロフィール及び／又は分子マークーの存在を分析して、FTIと別の形態の治療法との組み合わせがその患者にとって利益がありそうかどうか判定される。その後、患者はその組み合わせで治療されるか、又は患者がFTIに応答しそうもない場合には、その患者は、FTIを含まない別の形態の治療法によって治療される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本明細書で言及される治療物質はFTIsである。FTIsは多数の形態があるが、癌及び増殖性疾患に関わるタンパク質のファルネシル化を妨害したり低減させたりする本質的な阻害機能を共有している。好ましくは、FTIsは膠芽細胞腫や乳がんなどの充実性腫瘍の治療に示唆されているものである。さらに好ましくは、FTIsは白血病、リンパ腫、及び骨髄腫など、血液の悪性腫瘍の治療に示唆されているものである。最も好ましくは、FTIsは、AML、骨髄形成異常症候群(MDS)、慢性骨髄性白血病(CML)、慢性骨髄単球性白血病(CMM)、及び多発性骨髄腫(MM)での使用が考えられているものである。血液の悪性腫瘍の場合、FTIに応答する患者は、そのFTIで治療した後で50%を超える芽細胞の減少が見られる患者である。充実性腫瘍の場合、FTIに応答する患者は、腫瘍が成長を停止する患者である。あるいはまた、充実性腫瘍の患者における応答は、腫瘍学において普通に使用されている意味でのRECIST(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)規準にしたがって測定することもできる。

【0018】

多数のFTIsが本発明の範囲内にあり、例えば、Brown et al.への米国特許第5,976,851号；Anthony et al.への米国特許第5,972,984号；deSolmsへの米国特許第5,972,966号；Dinsmore et al.への米国特許第5,968,965号；Venet et al.への米国特許第5,968,952号；Venet et al.への米国特許第6,187,786号；Venet et al.への米国特許第6,169,096号；Venet et al.への米国特許第6,037,350号；Angibaud et al.への米国特許第6,177,432号；Graham et al.への米国特許第5,965,578号；Sebti et al.への米国特許第5,965,539号；Afonso et al.への米国特許第5,958,939号；Anthony et al.への米国特許第5,939,557号；Commercon et al.への米国特許第5,936,097号；Anthony et al.への米国特許第5,891,889号；Baudin et al.への米国特許第5,889,053号；Anthony et al.への米国特許第5,880,140号；deSolmsへの米国特許第5,872,135号；deSolmsへの米国特許第5,869,682号；Baudoinへの米国特許第5,861,529号；Graham et al.への米国特許第5,859,015号；Clercへの米国特許第5,856,439号；Anthony et al.への米国特許第5,856,326号；Graham et al.への米国特許第5,852,010号；Marsters et al.への米国特許第5,843,941号；Dollへの米国特許第5,807,852号；Dinsmore et al.への米国特許第5,780,492号；Dong et al.への米国特許第5,773,455号；Kim et al.への米国特許第5,767,274号；Anthony et al.への米国特許第5,756,528号；Baudoin et al.への米国特許第5,750,567号；Bishop et al.への米国特許第5,721,236号；Doll et al.への米国特許第5,700,806号；Anthony et al.への米国特許第5,661,161号；Sebti et al.への米国特許第5,602,098号；Breslin et al.への米国特許第5,585,359号；Ciccarone et al.への米国特許第5,578,629号；Ciccarone et al.への米国特許第5,534,537号；Marsters et

10

20

30

40

50

al. への米国特許第 5,532,359号 ; Patel et al. への米国特許第 5,523,430号 ; de Solms et al. への米国特許第 5,504,212号 ; de Solms et al. への米国特許第 5,491,164号 ; Brown et al. への米国特許第 5,420,245号 ; Graham et al. への米国特許第 5,238,922号 ; に記載されているものを含む。これらは、それぞれ、参照によって本明細書に組み込まれる。非ペプチドの、いわゆる「小分子」の治療薬が好ましい。さらに好ましいFTIsは、キノリン又はキノリン誘導体であり、例えば、次のようなものである：

7 - (3 - クロロフェニル) - 9 - [(4 - クロロフェニル) - 1H - イミダゾール - 1 - イルメチル] - 2 , 3 - ジヒドロ - 1H , 5H - ベンゾ[ij]キノリジン - 5 - オン、
7 - (3 - クロロフェニル) - 9 - [(4 - クロロフェニル) - 1H - イミダゾール - 1 - イルメチル] - 1 , 2 - ジヒドロ - 4H - ピロロ[3 , 2 , 1 - ij]キノリン - 4 - オン、

8 - [アミノ(4 - クロロフェニル)(1 - メチル - 1H - イミダゾール - 5 - イル)メチル] - 6 - (3 - クロロフェニル) - 1 , 2 - ジヒドロ - 4H - ピロロ[3 , 2 , 1 - ij]キノリン - 4 - オン、

8 - [アミノ(4 - クロロフェニル)(1 - メチル - 1H - イミダゾール - 5 - イル)メチル] - 6 - (3 - クロロフェニル) - 2 , 3 - ジヒドロ - 1H , 5H - ベンゾ[ij]キノリジン - 5 - オン。

【0019】

最も好ましいFTIは、Venet et al. への米国特許第 6,420,387号で(+)鏡像異性体と記載されている(R) - 6 - [アミノ(4 - クロロフェニル)(1 - メチル - 1H - イミダゾール - 5 - イル)メチル] - 4 - (3 - クロロフェニル) - 1 - メチル - 2(1H) - キノリノン)である。

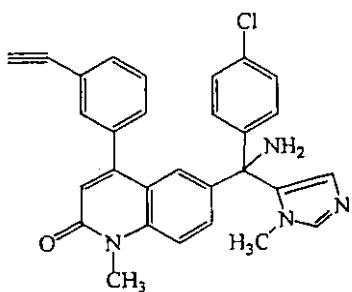
【0020】

もう1つの好ましいFTIは、W0 01/98,302に記載されている(-) - 5 - (3 - クロロフェニル) - - (4 - クロロフェニル) - - (1 - メチル - 1H - イミダゾール - 5 - イル)テトラゾール[1 , 5 - a]キナゾリン - 7 - メタナミン、及び医薬的に受容されるその酸付加塩、である。

【0021】

その他の有用なFTIsとしては、W0-98/28303に記載されているアルグラビン(Arglabin) (すなわち、(R) - 10 - エポキシ - 5(S) , 7(S) - グアイア(guaia) - 3(4) , 11(13) - ジエン - 6 , 12 - オリド ; W0-99/45912に記載されているペリリル(perrillyl)・アルコール；米国特許第 5,874,442号に記載されているSCH - 66336, すなわち、(+) - 4 - [2 - [4 - (3 , 10 - ジブロモ - 8 - クロロ - 5 , 6 - ジヒドロ - 11H - ベンゾ[5 , 6]シクロヘプタ[1 , 2 - b]ピリジン - 11 - イル)ピペリジン - 1 - イル] - 2 - オキソエチル]ピペリジン - 1 - カルボキサミド；L778123, すなわち W0-00/01691に記載されている1 - (3 - クロロフェニル) - 4 - [1 - (4 - シアノベンジル) - 5 - イミダゾリルメチル] - 2 - ピペラジン；W0-94/10138に記載されている化合物、2(S) - [2(S) - [2(R) - アミノ - 3 - メルカプト]プロピルアミノ - 3(S) - メチル] - ペンチルオキシ - 3 - フェニルプロピオニル - メチオニン・スルホン；及びBMS 214662, すなわち W0-97/30992に記載されている(R) - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 1 - (1H - イミダゾール - 4 - イルメチル) - 3 - (フェニルメチル) - 4 - (2 - チエニルスルホニル) - 1H - 1 , 4 - ベンゾジアザビン - 7 - カルボニトリル；CP 609754, すなわち 米国特許第 5,747,498号に記載されているN - (3 - エチニルフェニル) - 6 , 7 - ビス(2 - メトキシエトキシ) - 4 - キナゾリナミン；及び W0-00/12499に記載されている6 - [アミノ - (4 - クロロ - フェニル) - (3 - メチル - 3H - イミダゾール - 4 - イル) - メチル] - 4 - (3 - エチニル - フェニル) - 1 - メチル - 1H - キノリン - 2 - オン；下記式のもの等があげられる。

【化1】



10

【0022】

タンパク質又はペプチドを発現させる能力を有する核酸配列（「遺伝子」）がゲノム内に単に存在するというだけでは、ある細胞でタンパク質又はペプチドが発現されるかどうかは決定されない。タンパク質又はペプチドを発現できる又はRNA転写ができる遺伝子が実際に発現又は転写するかどうか、そしてそのような発現又は転写が起こるとして、どの程度まで起こるか、はいろいろな複雑な因子によって決定される。それでもやはり、遺伝子発現を分析することは、薬又はその他の治療物質の導入といった刺激に対する細胞の応答についての有益な情報を提供する。遺伝子が活性又は不活性になる度合いに関する相対的な情報はそのような遺伝子発現プロフィールに見出される。場合によっては、ある分子マーカーの存在が、それだけで、又は遺伝子発現の情報の利用と合わせて、治療の有効性についての有益な情報となる。本発明の遺伝子発現プロフィールと分子マーカーはFTI治療から利益が得られそうな患者を同定して治療し、この薬又は治療法からほとんど全く有益な応答が見られそうもない患者をFTI治療から除外するために用いられる。

20

【0023】

癌は、血液の悪性腫瘍も含めて、普通、いろいろな遺伝子における突然変異から生ずる。同じタイプの癌が、同じタイプの癌になった別の患者の突然変異と異なる1つ以上の突然変異の結果として、又は一致して、生ずることがある。同じ癌の根底にしばしば複数の分子的な基盤があるという事実は、ある患者には影響を及ぼす治療法が、同じタイプの癌にかかった別の患者には必ずしも同じように影響を及ぼさないという所見と合致する。さらに、診断という見地からは、転位、SNPsなど特定の突然変異の存在は強力な意味を持つことがある。場合によっては、そのような分子マーカーが、それ自体、診断、予後予測、又は治療への応答性についての有益な情報となる。これは特に、分子的な突然変異が特定の治療への応答に関連している場合に当てはまる。本発明では、1b c腫瘍遺伝子（リンパ芽球crisis腫瘍遺伝子）の欠如と合致する癌がFTI治療に対して応答する。したがって、この遺伝子の発現、この遺伝子の発現の欠如、及びそれが存在するかどうか、がFTI治療を実際に処方する前にFTI治療への抵抗の強さを予測するのに有用である。

30

【0024】

1b c腫瘍遺伝子（配列番号2）は、染色体15q上の1b c原腫瘍遺伝子（配列番号23～27）と染色体7qに発する無関係な配列との融合によって得られるキメラである。この原腫瘍遺伝子のC末端における切断（truncation）によって形質転換能力を獲得した遺伝子が生ずる。この切断は、転位以外の他のメカニズムによって生ずる可能性もある。例えば、スプライシングの異常によって、C末端で切断されたRNA転写が生ずる可能性がある。この遺伝子は、mRNAとタンパク質を含めていくつかの発現産物を有する（配列番号29, ヒトLBCタンパク質、Genbank受入番号GI:29791897）。1b c腫瘍遺伝子が機能する詳しい仕方は完全には理解されていないが、それがいろいろな組織、例えば、骨格筋、心臓、肺、前立腺、卵巣、小腸、及び造血細胞など、に存在できることは明らかである。この腫瘍遺伝子が発現できる（しかし、発現されていない）組織に発生する癌の治療は本発明の範囲内にある。

40

50

【0025】

この遺伝子は切断の産物であり、それが認められる発現産物を生ずるので、本発明の分析 (assays) のフォーマット化するのに大きな柔軟性がある。遺伝子又はその産物の欠如を用いるだけでなく、この遺伝子の調節された発現の検出も用いることができる。したがって、遺伝子発現プロフィールはこの遺伝子も含むことができる。好ましくは、遺伝子の欠如又は調節 (modulation) が、血液の悪性腫瘍における、さらに好ましくは白血病、最も好ましくは A M L における、F T I 治療への応答を示す徵候として用いられる。

【0026】

分子マーカーとしての l b c 腫瘍遺伝子の同定が行われる場合、適当などんな検出方法を用いてもよい。分子マーカーの存在は F T I による治療の予後の悪さを示すものであり、それが存在しないことはこの治療に応答する可能性が大きいことを示すものである。l b c 腫瘍遺伝子の存在を検出するのに使用できる方法は、知られている突然変異遺伝子又は配列を検出するための任意の方法を含み、例えば、一本鎖コンフォメーション多形法、化学的及び熱的変性グラジエント分析、化学的及び酵素開裂法、質量分析法、R F L P 及び対立形質特異的増幅、比計測 P C R 、ビーズをベースとする及びマイクロアレイをベースとするシステム、並びに *in situ* ハイブリダイゼーション法、ヘテロ二本鎖分析、及びマイクロアレイ分析、E L I S A 、ウエスタン、F A C S 、抗体をベースとする方法、メチル化をベースとする P C R 、及び S N P 検出、などがあげられるがそれだけに限定されない。

【0027】

l b c 腫瘍遺伝子の存在又は非存在を検出するのに最も好ましい方法は、P C R による方法である。この方法では、まず患者から細胞が、普通のサンプル調製方法によって採取される。悪性腫瘍が血液の腫瘍である場合、単純な末梢血液サンプル又は骨髄サンプルが好ましい。次に、広く受容されている手順に従って R N A が抽出され、次のように増幅される。標的配列は、例えば、250 n M のプライマーと 250 n M の T a q m a n プローブを A B I T a q m a n バッファー中で用いて増幅される。熱サイクリングは 50 度 2 分間、95 度 10 分間行われ、その後に 95 度 15 分間と 62 度 1 分間の 50 サイクルが続く。プライマーとプローブの例は表 1 に示されている。

【0028】

この方法はサンプル中に存在する L B C 転写の量を測定する。測定された量は、同じサンプルを用いて H P R T などの内部発生的な対照遺伝子を増幅する同様な R T - P C R 実験を行うことによって規格化することができる。

【0029】

【表 1】

表 1

名称	配列 (5' - 3')
L B C 順方向	G G T C A G A T G T T G C C A A G G A A
L B C 逆方向	T C T T C A G A A A C A C A C T C C C A T C A C
L B C T a q M a n プローブ	T G A A A C G G A A G A A G C T T G T A

【0030】

L B C 腫瘍遺伝子の存在又は非存在を決定する別の方法は、R N A 転写の長さを分析することである。L B C 腫瘍遺伝子は 3 転位 (translocation) を有するので、転写の長さは L B C 原腫瘍遺伝子の転写よりも短い。このエンドポイントは診断に有利である。転写サイズを診断するには、原腫瘍及び腫瘍遺伝子 L B C 転写の両方に相同な順方向プライマー (例えば、上の表 1 の L B C 順方向プライマー) が、R N A 転写のユニバーサル p o

10

20

30

40

50

1 y A テールと相同な逆方向プライマーと合わせて用いられる。好ましくは、最初の c D N A 合成で、別のユニークな配列である p o l y A 配列のタグ 3' を組み込んで P C R 反応の特異性を高める。

【 0 0 3 1 】

ゲノムの転位が測定されている場合、標準的な方法でゲノム D N A を単離し、1 b c 腫瘍遺伝子に対して特異的な P C R プライマーを用いる。例えば、上述のように、腫瘍及び原・腫瘍 L B C 遺伝子を p o l y A 配列と合わせて用いることができる。あるいはまた、逆方向プライマーが 3' 転位配列と相同であってもよい。読み取られるものは、アンプリコンのサイズであり、腫瘍遺伝子の存在は原腫瘍遺伝子よりも短い産物として示される、すなわち、腫瘍遺伝子 L B C 特異的なアンプリコンの存在又は非存在である。

10

【 0 0 3 2 】

細胞の 1 b c 腫瘍遺伝子の状態の分析は、また、免疫組織化学的分析 (I H C) などの方法を用いて、診断目的で正常 / 異常組織分布を決定することができる。例えば、1 b c タンパク質に対する抗体を、調製された新鮮凍結及びホルマリン固定、パラフィン埋め込み組織ブロックと合わせて用いて、免疫組織化学 (I H C) による分析を行うことができる。各組織ブロックは、50 mg の残留する「粉碎された」腫瘍から構成され得る。

【 0 0 3 3 】

簡単に言うと、凍結切片は、50 ng の凍結粉碎された腫瘍を室温で小さなプラスチック・カプセル内の P B S 中で再水和し；遠心分離によって粒子をペレット化し；それを粘性が高い埋め込み媒体 (O C T) に再懸濁し；カプセルを倒さにして再び遠心分離によってペレット化し；-70° のイソペンタン中で瞬間凍結 (snap-freezing) し；プラスチック・カプセルをカットして凍結した組織の円柱を取り出し；この組織円柱を低温ミクロトーム・チャックに固定し；無傷の腫瘍細胞を含む 25 ~ 50 の連続切片を切り出すことによって調製される。

20

【 0 0 3 4 】

恒久切片は、同様な方法で、50 mg のサンプルをプラスチックのマイクロフュージ (microfuge) ・チューブで再水和し；ペレット化し；10% ホルマリン中に再懸濁させて 4 時間で固定し；洗浄 / ペレット化し；温かい 2 ~ 5% 寒天に再懸濁させ；ペレット化し；氷水で冷却して寒天を硬化させ；チューブから組織 / 寒天ブロックを取り出し；ブロックをパラフィンに浸潤させて埋め込み；50までの連続恒久切片を切り出すことによって調製される。

30

【 0 0 3 5 】

免疫組織化学的分析では、P B S 中に 3% のウシ血清アルブミン (B S A) を含むブロッキング液又はその他のブロッキング試薬を切片の上から加える。ブロッキング試薬は非特異的血清又は粉乳などである。ブロッキング処理はそのまま 1 時間、室温で進行させる。抗 1 b c タンパク質抗体が、3% B S A 、0.1% T R I T O N X . T M . - 1 0 0 , t - オクチルフェノキシポリエトキシエタノール、を 1 : 1 0 0 の比で含む P B S バッファーで希釈される。サンプル切片に、一般に、この抗体溶液が 4° で 16 時間かぶせられる。時間及び温度条件は、選択される抗体とテストされる物質によって変えることができる。最適な条件は、実験的に決定しなければならない。抗体で処理された切片は P B S で 15 分間、3 回洗浄して、結合していない抗体を除去し、3% B S A と二次抗体を 1 : 2 0 0 0 の比で含む P B S がかぶせられる。二次抗体は、ホースラディッシュ・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、などの発色性 (chromogenic) 酵素、又はその他の適当な酵素と結合させることができる。あるいは又、二次抗体はビオチンと接合させて、発色基でラベルされたアビジンと組み合わせて用いることもできる。

40

【 0 0 3 6 】

1 b c 腫瘍遺伝子の存在を検出する別の方法の例は、インシチュ (in situ) ・ハイブリダイゼーションによるものである。一般に、インシチュ・ハイブリダイゼーションは次のような主なステップを含む：(1) 分析する組織又は生物的構造を固定する；(2) 標

50

的DNAへのアクセス可能性を高め、非特異的結合を減少させるために生物的構造をプレ・ハイブリダイゼーション処理する；(3)生物的構造又は組織の核酸に対する核酸混合物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ポスト・ハイブリダイゼーション洗浄；及び(5)ハイブリダイズされた核酸断片の検出。これらの各ステップで用いられる試薬、及び使用条件、は個々の応用によって異なる。

【0037】

この場合、(染色体上のその位置にある)1bc腫瘍遺伝子にハイブリダイズできる少なくとも1つ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が、ハイブリダイゼーション条件下にある細胞に接触させられる。その後、ハイブリダイゼーションが検出され、正常な又は対照の細胞からの予め決定されたハイブリダイゼーション・パターンと比較される。好ましくは、プローブはアルファ-セントロメリック(alpha-centromeric)プローブである。このようなプローブは、いくつかの源から商業的に(例えば、Visys Inc., Downers Grove, IL, から)入手できる。ある好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーション溶液は、キメラを構成している配列の転位に対応する染色体上の部位に特異的な多数のプローブを含む。

【0038】

本発明の方法で用いるのに適したハイブリダイゼーション手順は、例えば、Albertson (1984) EMBO J. 3: 1227-1234; Pinkel (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9138-9142; EPO Pub. No.430,402; Methods in Molecular Biology, Vol. 33; In Situ Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, N.J. (1994), etc.に記載されている。ある特に好ましい実施形態では、Pinkel et al., (1998) Nature Genetics 20: 207-211又はKallioemini (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5321-5325 (1992)のハイブリダイゼーション手順が用いられる。ハイブリダイゼーション条件を最適化する方法は周知である。(例えば、Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Elsenier, N.Y. を見よ)。

【0039】

ある好ましい実施形態では、バックグラウンド信号が、ハイブリダイゼーションの間、洗浄剤(例えば、C-TAB)又はブロッキング剤(精子DNA、cot-1DNA、等)を用いて非特異的な結合を減らして減少される。特に好ましい実施形態では、ハイブリダイゼーションは約0.1乃至約0.5mg/mlのDNA(例えば、cot-1DNA)の存在下で行われる。

【0040】

プローブは、当業者に公知の任意の方法によって、例えば、合成によって、又は生物宿主で増殖させて、調製することができる。合成方法は、オリゴヌクレオチド合成、リボプローブ、及びPCR、を含む。

【0041】

プローブは、当業者に公知の任意の方法によって検出可能なマーカーによってラベルすることができる。プローブにラベルする方法としては、ランダム・プライミング(random priming)、エンド・ラベリング(end labeling)、PCR、及びニック・トランスレーション(nick translation)などがある。酵素ラベリングは、核酸ポリメラーゼ、3つのラベルされないヌクレオチド、及び第四のヌクレオチドの存在下で行われ、第四のヌクレオチドが直接ラベルされるか、ラベルを付着させるリンカー・アームを含むか、又はハプテンやその他の分子に付着し、それにラベルされた結合分子が結合する。適当な直接ラベルとしては、放射性ラベル、例えば³²P、³H、及び³⁵P、など、及び非放射性ラベル、例えば、フルオレセイン、テキサス・レッド、AMCAブルー、ルシファー・イエロー、ローダミン、などの蛍光マーカー；可視光で検出できるシアニン染料；酵素、などがあげられる。ラベルは、重亜硫酸塩もしくはエステル(bisulfite)で媒介されるアミノ基転移(transamination)によって、又はオリゴヌクレオチド合成時に直接にDNAプローブに

10

20

30

40

50

化学的に組み込むこともできる。

【0042】

フルオレセイン・マーカーは、プローブに組み込まれた活性化されたリンカーによって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、上で開示された方法によって、ハプテンやその他の分子、例えばビオチン又はジゴキシゲニン、に共有結合で結び付けられたヌクレオチドを取り込み、そのハプテンその他に分子に向けられたラベルされた抗体と、又はビオチンの場合は検出可能なラベルが接合されたアビジンと、サンドイッチ・ハイブリダイゼーションを行って、間接的にラベルすることもできる。抗体及びアビジンは、フルオレセイン・マーカーや酵素マーカー、例えば、アルカリ・ホスファターゼ、又はホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、と接合させて検出可能にすることができる。接合されたアビジン及び抗体は、Vector Laboratories (Burlingame, Calif.) やBoehringer Mannheim (Indianapolis, Ind.) などの会社から市販されている。10

【0043】

酵素は、その酵素の基質を加えることによって比色定量反応で検出できる。いろいろな基質の存在下で、この反応で異なる色が生じ、この色を視覚化して複数のプローブを別々に検出できる。当業者に公知の任意の基質を用いることができる。アルカリ・ホスファターゼに好ましい基質としては、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート (B C I P) やニトロブルー・テトラゾリウム (N B T) などがある。ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼに好ましい基質は、ジアミノベンゾエート (D A B) である。20

【0044】

本発明のインシチュ・ハイブリダイゼーション法で使用するのに適した蛍光ラベルされたプローブは、好ましくは、長さが 150 ~ 500 ヌクレオチド長の範囲にある。プローブは D N A 又は R N A 、好ましくは D N A 、である。

【0045】

細胞への検出可能なプローブのハイブリダイゼーションは、0.1 ~ 500 n g / . m u . l . 、好ましくは 5 ~ 250 n g / . m u . l . という濃度で行われる。好ましくは、ハ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物質を含む。一般に、ハイブリダイゼーションは 25 ~ 45 で、好ましくは 32 ~ 40 で、さらに好ましくは 37 ~ 38 で行われる。ハイブリダイゼーションに必要な時間は約 0.25 ~ 9.6 時間、さらに好ましくは 1 ~ 7.2 時間、最も好ましくは 4 ~ 24 時間である。ハイブリダイゼーション時間は、プローブ濃度、及び h n R N P 結合タンパク質、トリアルキル・アンモニウム塩、ラクタム、などの促進剤を含むハイブリダイゼーション溶液の含有量によって変えることができる。スライドは、その後、ホルムアミドなどの変性物質及び濃度がだんだん減少する塩化ナトリウムを含む溶液で、又は結合していないミスマッチのプローブを除去する溶液のいずれかで、で洗浄される。30

【0046】

塩の温度及び濃度は、望まれるハイブリダイゼーションのストリンジエンシーによって異なる。例えば、高いストリンジエンシーの洗浄は 4.2 ~ 6.8 で行われるが、中程度のストリンジエンシーの洗浄は 3.7 ~ 5.5 の範囲で、低ストリンジエンシーの洗浄は 3.0 ~ 3.7 の範囲で行われる。高いストリンジエンシーの洗浄の塩濃度は、S S C (0.15 M の N a C l 、 0.015 M の クエン酸ナトリウム) の 0.5 ~ 1 倍であり、中程度のストリンジエンシーの洗浄は S S C の 1 ~ 4 倍、低ストリンジエンシーの洗浄は S S C の 2 ~ 6 倍の塩濃度で行われる。40

【0047】

検出インキュベーション・ステップは、必要な場合、好ましくは湿潤チャンバーで 2.3 ~ 4.2 で、さらに好ましくは 2.5 ~ 3.8 で、最も好ましくは 3.7 ~ 3.8 で行われる。好ましくは、ラベルされた反応物質は、ブロッキング試薬、例えば、ウシ血清アルブミン、脱脂粉乳、などを含む溶液で希釈される。希釈は 1 : 10 ~ 1 : 10,000 の範囲、さらに好ましくは 1 : 50 ~ 1 : 5,000 の範囲、最も好ましくは 1 : 100 ~ 1 : 1,000 の範囲、である。各インキュベーション・ステップの間にスライド又は50

その他の固体担体を洗浄して余分の反応物質を除去しなければならない。

【0048】

次にスライドは、可視光で検出可能なマーカーの場合は顕微鏡にマウントされて分析され、放射性マーカーの場合はオートラジオグラフィー・フィルムに曝露されて分析される。蛍光マーカーの場合は、好ましくは、スライドはぼやけ防止試薬を含む溶液に入れて蛍光顕微鏡を用いて分析される。検出精度を高めるために複数の核を検査することもできる。

【0049】

さらに、1b c 腫瘍遺伝子の発現産物の分析を用いて、腫瘍遺伝子に突然変異が起こったかどうかを決定することもできる。免疫分析とは、その最も単純で直接的な意味で、結合分析(binding assay)である。好ましい免疫分析は、当業者に公知のいろいろなタイプの酵素結合免疫吸着測定(ELISA)及び放射性免疫測定(RIA)である。組織切片を用いる免疫組織化学検出法もきわめて有用である。

【0050】

ELISAのある例では、抗腫瘍1b c タンパク質特異的抗体が、選ばれたタンパク質親和性を示す表面、例えば、ポリスチレン・マイクロタイタのウエル、に固定される。次に所望の抗原を含むテスト組成物、例えば臨床サンプル、がそのウエルに加えられる。結合が行われ、非特異的に結合した免疫複合体を除去するための洗浄が行われた後、結合した抗原を検出することができる。検出は、一般に、検出できるラベルに結び付けられた、所望の抗原に特異的な別の抗体を加えることによって達成される。このタイプのELISAは、単純な「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二の抗体を加えた後、第二の抗体に対する結合親和性を有し、検出可能なラベルと結び付けられた第三の抗体を加えることによっても達成される。

【0051】

ELISA法の変法は良く知られている。そのような変法の1つでは、所望の抗原を含むサンプルがウエル表面に固定された後、本発明の抗体と接触させられる。結合及び適当な洗浄の後、結合した免疫複合体が検出される。最初の抗原特異的な抗体が検出可能なラベルとリンクされている場合は、免疫複合体を直接検出することができる。やはり、免疫複合体は、最初の抗原特異的な抗体に結合親和性を有し、検出可能なラベルとリンクされている第二の抗体を用いて検出することもできる。

【0052】

テストサンプルが既知の量のラベルされた抗原又は抗体との結合に関して競合する競合的ELISAも可能である。未知のサンプルにおける反応性分子種の量は、コーティングされたウエルでのインキュベーションの前に、又はその間、サンプルを既知のラベルされた分子種と混合することによって決定される。サンプルにおける反応性分子種の存在がウエルとの結合に利用できるラベルされた分子種の量を減少させ、最終的な信号を減少させる。

【0053】

抗原又は抗体を、プレート、ビーズ、ディップスティック、膜又はカラム・マトリックスなどの固体担体に結合し、分析しようとするサンプルを固定された抗原又は抗体に適用(apply)することもできる。抗原又は抗体でプレートをコーティングする場合、一般に、プレートのウエルを抗原又は抗体の溶液と共に、一晩又はある所定の時間、インキュベートする。次に、プレートのウエルを洗浄して不完全に吸着された物質を除去する。次に、ウエルの利用できる残りの表面を、テスト抗血清に関して抗原的にニュートラルな非特異的タンパク質によって「コーティング」する。それは、例えば、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン及び粉乳の溶液、である。コーティングによって、固定表面の非特異的吸着部位をブロックすることができ、表面への抗血清の非特異的結合によって生ずるバッケグラウンドが減少する。

【0054】

ELISAでは、直接的な検出手順でなく、二次的又は三次的な検出手段を用いること

10

20

30

40

50

は普通である。すなわち、抗原又は抗体をウエルに結合し、バックグラウンドを減らすために非反応性の物質でコーティングし、結合していない物質を除去するために洗浄した後、固定表面に、テストしようとする臨床サンプル又は生物的サンプルを免疫複合体（抗原／抗体）を可能にする効果的な条件の下で接触させる。これは、抗原及び抗体を B S A、ウシ・ガンマ・グロブリン（B G G）、及びリン酸緩衝生理食塩水（P B S）／T w e e n などの溶液で希釈することも含む。これらの添加物質も、非特異的バックグラウンドを減少させる助けになる。その後の免疫複合体の検出には、ラベルされた二次結合リガンド又は抗体、又は二次結合リガンド又は抗体とラベルされた三次抗体又は第三の結合リガンドを合わせたもの、が必要になる。

【0055】

10

E L I S A における全てのインキュベーション・ステップの後に、接触した表面を洗浄して、複合体を形成していない物質を除去するようにする。多くの場合洗浄は、P B S／T w e e n の溶液、又はホウ酸緩衝液による洗浄を含む。最初に結合した物質とテストサンプルとの間で特異的な免疫複合体が形成され、続いて洗浄された後では、微量の免疫複合体の発生も決定できる。

【0056】

検出手段を提供するために、第二又は第三の抗体は検出を可能にするように結合されたラベルを有する。好ましくは、これは酵素、すなわち、適当な発色性の基質とインキュベートしたときに色を発現させる酵素である。例えば、第一又は第二の免疫複合体に、ウレアーゼ、グルコース・オキシダーゼ、アルカリ・ホスファターゼ、ヒドロゲン・ペルオキシダーゼと接合した抗体を接触させて、ある時間、別の免疫複合体の形成を発現させるのに有利な条件の下でインキュベートすることが望まれる。例えば、2時間、室温で、P B S を含む溶液、例えばP B S - T w e e n 、の中でインキュベーションすることが望ましい。

20

【0057】

ラベルされた抗体とのインキュベーション、及びそれに続く洗浄で結合していない物質を除去した後、ラベルの量が定量される、例えば、酵素ラベルとしてのペルオキシダーゼの場合、尿素及びプロモクレゾール・パープル及びH₂O₂などの発色性の基質とのインキュベーションによって定量される。定量は、色の発生の度合いを、例えば可視スペクトル分光光度計を用いて、達成される。あるいは又、ラベルはケミルミネッセント・ラベルであってもよい。このようなラベルの利用は、米国特許第5,310,687号、第5,238,808号、及び第5,221,605号に記載されている。

30

【0058】

F T I s への応答を決定するために遺伝子発現を検出する本発明の実施形態では、遺伝子発現ポートフォリオを用いることが最も好ましい。遺伝子のポートフォリオとは、遺伝子の組であって、それらについて得られる発現情報が、診断、予後予測、又は治療の選択など臨床的に重要な判断を下す根拠を与えるようなものである。この場合、遺伝子発現ポートフォリオを、癌患者におけるF T I s の使用に関する治療決定を下すのに役立つよう構成することができる。

40

【0059】

遺伝子発現プロフィールの一部として、1 b c 腫瘍遺伝子の発現を、発現の差がF T I 治療への応答の確からしさを示す1つ以上の他の遺伝子と共に検出することが最も好ましい。本発明のこの様態では、遺伝子発現プロフィールは1 b c 腫瘍遺伝子（A K A P 1 3 とも呼ばれる）から作られる。1つ以上の以下の遺伝子も、最も好ましくは、1 b c 腫瘍遺伝子と組み合わせて、用いることができる：A H R , D K F Z p 6 6 7 G 2 1 1 0 , I D S , O P N 3 , G P R 1 0 5 , T E M 6 , T N F S F 1 3 , S V I L , I L 3 R A , K I A A 0 6 8 0 , F R A G I 、D K F Z p 5 6 6 B 2 1 3 , K I A A 1 0 3 6 , B T G 3 , M A P K 8 1 P 3 , A R H H , N P T X 2 , (配列番号1, 3~18)。O P N 3 とI L 3 R A は、1つ以上の他の遺伝子と組み合わせて用いられ、好ましくはプロフィールは2つ以上のそれらの遺伝子を含む。最も好ましい遺伝子発現プロフィールは1 b c 腫瘍遺

50

伝子と A H R の発現の差を検出する。前記遺伝子の変異体、例えば、スプライス変異体、もこの用途に使用できる。

【 0 0 6 0 】

遺伝子発現プロフィール（関連生物学的経路の説明のためのものを含む）を確立するために好ましい方法は、タンパク質又はペプチド又は転写（transcribe）RNAをコードする遺伝子によって生成されるRNAの量を決定するステップを含む。これは、逆転写PCR（RT-PCR）、競合RT-PCR、リアルタイムRT-PCR、差動ディスプレーRT-PCR、ノーザン・プロット分析及びその他の方法で最も良く遂行される。個々のPCR反応を用いてこれら的方法を実行することは可能であるが、mRNAから生成されるコピーDNA（cDNA）又はコピーRNA（cRNA）を増幅し、マイクロアレイによってそれを分析することが多い場合望ましい。いくつかの異なるアレイ形態とそれを生成するための方法は、当業者に公知であり、米国特許に、例えば、第5,445,934号；第5,532,128号；第5,556,752号；第5,242,974号；第5,384,261号；第5,405,783号；第5,412,087号；第5,424,186号；第5,429,807号；第5,436,327号；第5,472,672号；第5,527,681号；第5,529,756号；第5,545,531号；第5,554,501号；第5,561,071号；第5,571,639号；第5,593,839号；第5,599,695号；第5,624,711号；第5,658,734号；及び第5,700,637号に記載されている；これらの特許の開示は、参照によって本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 1 】

マイクロアレイ技術は、何千もの遺伝子の定常mRNAレベルを同時に測定することを可能にし、細胞生物学へのFTIsの影響を同定しそれらの影響の分析に基づいて治療の効果を予測するための強力な手段になる。2つのマイクロアレイ方法が現在広く用いられている。第一の方法はcDNAアレイであり、第二の方法はオリゴヌクレオチド・アレイである。これらのチップの構成には違いがあるが、本質的に全ての下流データ分析と出力は同じである。これらの分析の典型的な産物は、マイクロアレイの知られている場所での核酸配列にハイブリダイズするサンプルからのcDNA配列を検出するために用いられるラベルされたプローブからの信号強度の測定値である。普通、信号強度は、cDNAの量、したがってサンプル細胞で発現されるmRNAの量、に比例する。このような方法が多数あり、有用である。遺伝子発現を決定するのに好ましい方法は、Linsley et al.への米国特許第6,271,002号；Friend et al.への米国特許第6,218,122号；Peck et al.への米国特許第6,218,114号；Wang et al.への米国特許第6,004,755号；に見られる。これらの開示は、それぞれ、参照によって本明細書に組み込まれる。

【 0 0 6 2 】

発現レベルの分析は、それらの強度を比較することによって行われる。これは、テストサンプルにおける遺伝子の発現強度と対照サンプルにおける発現強度の比マトリックスを作成することによって行うのがベストである。例えば、ある薬で治療された組織からの遺伝子発現強度をその薬で治療されなかった同じ組織から発生する発現強度と比較することができる。これらの発現強度の比は、テストサンプルと対照サンプルとの間の遺伝子発現の変化倍率（fold change）を表す。

【 0 0 6 3 】

遺伝子発現プロフィールは、また、いろいろな仕方で表示できる。よく用いられる方法は、比マトリックスを、列がテストサンプルを表し、行が遺伝子を表すようなグラフィカル・デンドグラムに配置するものである。データは、同じような発現プロフィールを有する遺伝子が互いに近接するように配置される。各遺伝子の発現比は色によって視覚化される。例えば、1よりも小さな比（ダウン・レギュレーションを示す）は、スペクトルの青の部分で現れ、1よりも大きい比（アップ・レギュレーションを示す）は、スペクトルの赤の部分の色として現れる。このようなデータをディスプレーするには、市販のコンピュータ・ソフトウェアが利用できる、例えば、Silicon Genetics, Inc.からの「GENES PRINT」、及びPartek, Inc.からの「DISCOVERY」と「INFER」などが利用できる。

【 0 0 6 4 】

10

20

30

40

50

発現に差がある遺伝子は、F T Iで治療された病気の細胞で、又は治療の前の応答者、対、非応答者で、上述のような遺伝子発現の評価から導かれるように、アップ・レギュレートされるか又はダウン・レギュレートされる。アップ・レギュレーションとダウン・レギュレーションは、相対的な用語であり、あるベースラインに比べた遺伝子の発現の量に（それを測定するのに用いられるシステムにおけるノイズの寄与を超える）検出可能な差が見出されるということを意味する。この場合、ベースラインは治療されない病気の細胞で測定された遺伝子発現である。治療された病気の細胞で、問題の遺伝子は同じ測定方法を用いて、このベースライン・レベルに対してアップ・レギュレートされるか又はダウン・レギュレートされる。好ましくは、アップ及びダウン・レギュレーションのレベルは、ハイブリダイズされたマイクロアレイ・プローブの強度測定値の変化倍率（fold change）に基づいて区別される。このような区別を行うには、1.5倍の差が好ましい。すなわち、ある遺伝子の発現が、治療されない病気の細胞と比べて治療された病気の細胞で異なっているというためには、治療された細胞が治療されない細胞より1.5倍大きな、又は小さな強度の発現を生ずることが見出されなければならない。1.7倍の差がさらに好ましく、遺伝子発現の測定値に2倍以上の差があることが最も好ましい。

10

20

30

【0065】
本発明のある方法は、いろいろな遺伝子の遺伝子発現プロフィールを比較してある人がある治療物質の使用に応答しそうかどうかを決定するステップを含む。応答者を非応答者から区別する遺伝子発現プロフィールを確立したら、それぞれの遺伝子発現プロフィールが媒体に、例えば、以下で述べるようなコンピュータ読み取り可能な媒体に固定される。次に、病気の細胞（AMLの場合、造血芽細胞）を含む患者サンプルが採取される。最も好ましくは、サンプルは骨髄細胞であり、患者が薬で治療される前に患者の胸骨又は腸骨稜から決まった手順で採取される。好ましくは、骨髄吸引液を処理して、決まった方法で白血球芽細胞を濃縮させる。次に、病気の患者の細胞からサンプルRNAを集めて増幅し、適当なポートフォリオの遺伝子について、遺伝子発現プロフィールを、好ましくは（大きな遺伝子ポートフォリオの場合）マイクロアレイによって、取得する。次に、サンプルの発現プロフィールを、応答者及び非応答者としてすでに決定されたものと比較する。もしもサンプルの発現パターンがF T I応答者の発現パターンと合致したら、（対抗する医学的な考慮事由がない場合）F T Iによる治療を示唆することができる。もしもサンプルの発現パターンがF T I非応答者の発現パターンと合致したら、F T Iによる治療は示唆されない。ポートフォリオで少数の遺伝子しか用いられない場合、例えば、ただ1つの遺伝子、リンパ芽球crisis腫瘍遺伝子（oncogene LBC、配列番号2）、が用いられる場合、単純な核酸増幅及び検出スキームが遺伝子の調節を測定する最も好ましい方法である。このような場合、PCR、NASBA、ローリング・サークル、LCR、及び熟練した当業者に公知のその他の増幅スキーム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、又は他の多くの遺伝子の発現を測定することが望ましい場合、上述の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ことが好ましい。

30

40

【0066】
同様に、遺伝子発現プロフィール分析を行って治療への応答をモニターすることができる。この方法の1つの様態では、F T I治療を受けている患者について、上述のような遺伝子発現分析が治療過程のいろいろな時期に行われる。遺伝子発現パターンが、応答者のパターンと矛盾しない場合、患者の治療が行われる。そうでない場合、賢者の治療は変更され、チロシン・キナーゼ阻害剤などの治療薬を追加したり、投与量を変えたり、F T Iを治療から除外したりする。この分析によって、検出できるような臨床的な徴候が現れる前に、又はそれなしでは漠然としている臨床的な徴候に対して、介入して治療を調整することが可能になる。

50

【0067】
本発明の分子マーカーに関しては、他のいくつかの形やアプローチが診断の用途に利用できる。ゲノム領域のメチル化が遺伝子発現レベルに影響を及ぼすことがある。例えば、

遺伝子プロモーターの高メチル化は遺伝子発現を構成的に (constitutively) ダウン・レギュレートすることができ、他方、低メチル化は定常的な mRNA レベルの増加に導く。そのようなものとして、薬への応答を予測させる遺伝子に関連したメチル化領域の検出は、遺伝子発現レベルを診断する別 の方法として利用できる。その方法は当業者には公知である。あるいはまた、プロモーター領域に存在する単一ヌクレオチド多形 (SNPs) も、遺伝子の転写活性に影響を及ぼすことができる。したがって、当業者に公知の方法によるこのような SNPs の検出も、応答者と非応答者で発現に差がある遺伝子を検出する診断方法として利用できる。

【0068】

応答者と非応答者の識別は、治療の前に存在する骨髄白血芽球の比率の付加的分析、及び / 又は CD33 及び / 又は CD34 などの細胞表面抗原の存在、によって有利に行うことができる。CD33 及び CD34 表面抗原の発現が低いことは F T I 治療への応答の確からしさを高める。これは、サンプル中のそのような抗原を発現する細胞のパーセントとして最も好適に測定され、応答者では約 60% 以下の細胞が CD33 を発現し、約 15% 以下の細胞が CD34 を発現する。CD33 を発現する細胞のパーセンテージが 60% を超えたり、CD34 抗原を発現する細胞のパーセンテージが 15% を超えたりすることは、その患者が F T I 治療に対する非応答者であるということを確からしくする。さらに、上述のように採取されたサンプルで、芽球である細胞のパーセンテージが約 60% 未満であることは F T I 治療に対して応答する可能性が高く、芽球の数がこのパーセンテージを超える場合はその可能性が低い。CD33+、CD34+ のパーセント、及び芽球の数 (count) は周知の方法のいずれかによって行われ、たいていの臨床検査室で行われている標準的な病理検査及び試料を用いて行うのが最も効率的である。

【0069】

本発明の物品は、病気の治療、診断、予後判定、段階判定、その他の評価に有用な遺伝子発現プロフィールを表現したものである。好ましくは、それはコンピュータ読み取り可能な媒体 (磁気、光学、などの媒体) など自動的に読み取ることができる媒体の形をとる。物品はまた、このような媒体における遺伝子発現プロフィールを評価するための説明書も含む。例えば、物品は、上述の遺伝子ポートフォリオの遺伝子発現プロフィールを比較するためのコンピュータ指示を収めた CD-ROM を含む。また、物品には、患者サンプルからの遺伝子発現データと比較できるように、それにデジタルに記録された遺伝子発現プロフィールも含まれる。あるいはまた、プロフィールは異なる表現形式で記録することもできる。上述の Partek, Inc. からの「DISCOVERY」や「INFER」ソフトウェアに収められているようなクラスター化アルゴリズムはそのようなデータを視覚化するのに最良の助けになる。

【0070】

本発明によるその他の物品として、上述の分析を行うためのキットがある。このような各キットは、好ましくは、人又は機械が読み取ることができる形の説明書、並びに記載されているタイプの分析で典型的な試薬、を含む。これは、例えば、上述のように本発明の遺伝子発現プロフィールを識別するように構成された核酸アレイ (例えば、cDNA 又はオリゴヌクレオチド・アレイ) を含む。また、核酸増幅及び検出を行うための試薬、例えば、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、及び適当な検出試薬、例えば、それだけに限定されないが、スコルピオン・プローブ、蛍光 5' ヌクレアーゼ分析用プローブ、分子ビーコン・プローブ、単一染料プライマー、又は二本鎖 DNA に特異的な蛍光染料プライマー、例えば、臭化エチジウム、などである。表面抗原を検出するためのキットは、染色物質を含む、又は、バッファー、抗抗原抗体、検出酵素と基質、例えば、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ、又はビオチン・アビシン、をベースとする試薬、などの成分を含む抗体をベースとするもの (cased) である。芽細胞を検出するためのキット成分は、一般に、フローサイトメトリー、芽細胞付着分析、及びその他のよく行われる芽細胞分析を行うための試薬を含む。

10

20

30

40

50

【0071】

本発明者が2002年10月30日に出願した、「白血病を評価し治療する方法」という表題の係属中の特許出願（出願ナンバー10/283975）に記載されているように、本発明の好ましい薬としては、FTIsの他に、MAPK/ERKシグナリング経路、TGF、WNT、又はアポトーシス経路、を変化させるものが上げられる。それは例えば、チロシン・キナーゼ阻害物質、MEKキナーゼ阻害物質、PI3Kキナーゼ阻害物質、MAPキナーゼ阻害物質、アポトーシス調節物質、及びそれらの組み合わせ、などであるがそれだけに限定されない。そのうち最も好ましい薬の例としては、Novartisの「GLEEVEC」チロシン・キナーゼ阻害剤、U0216MAPキナーゼ阻害剤、PD-098059MAPキナーゼ阻害剤、SB-203580MAPキナーゼ阻害剤、及びアンチセンス、リボザイム、及びDNAザイム（DNAzyme）、Bcl-XL、及び抗アポトーシス剤、などがあげられる。その他の有用な薬の例としては、米国特許第6,306,897号のカラノライド（calanolide）；米国特許第6,284,764号の置換された二環式化合物；米国特許第6,133,305号のインドリン；及び米国特許第6,271,210号のアンチセンス・オリゴヌクレオチド；などがあげられるが、それだけに限定されない。

【0072】

FTIはまた、他の従来の抗癌剤と組み合わせて、すなわち、プラチナ配位化合物、例えばシスプラチニンやカルボプラチニン、タキサン化合物、例えばパクリタクセルやドセタクセル、カンプトシン化合物、例えばイリノテカンやトポテカン、抗腫瘍ビンカ・アルカロイド、例えばビンブラスチニン、ビンクリスチニン、又はビノレルビン、抗腫瘍ヌクレオシド誘導体、例えば5-フルオロウラシル、ゲムシタビン、又はカペシタビン、ナイトロジエン・マスターード又はニトロソ尿素などのアルキル化剤、例えばシクロホスファミド、クロランブシル、カルムスチニン、又はロムスチニン、抗腫瘍アントラサイクリン誘導体、例えばダウノルビシニン、ドキソルビシニン、又はイダウルビシニン；HER2抗体、例えばトラスツマブ；及び抗腫瘍ポドフィロキシン誘導体、例えばエトポシドやテニポシド；及びエストロゲン受容体アンタゴニストを含む抗エストロゲン剤又は選択的エストロゲン受容体調節物質、好ましくはタモキシフェン、あるいはトレミフェン、ドロロキシフェン、ファスロデクス、及びラロキシフェン、又はアロマターゼ阻害物質、例えば、エクセメスタン、アナストロゾール、レトラゾール及びボロゾール、などから選択される他の従来の抗癌剤と組み合わせて用いることができる。

【0073】

FTIは、放射線と組み合わせて上述のような患者に投与することができる；ファルネシル・トランスフェラーゼ阻害物質は、例えば、国際特許明細書WO 00/01411に記載されているように放射線増感剤として働き、そのような照射の治療効果を高めるので、この治療は、多分、特に有益である。照射とは、電離放射線、特にガンマ線を意味し、特に現在よく用いられる線形加速器や放射性核種によって放出されるものを意味する。放射性核種による腫瘍の照射は外部からの照射又は内部からの照射がある。

【0074】

好ましくはファルネシル・トランスフェラーゼ阻害物質の投与は、腫瘍の照射の1ヶ月前までに、特に10日前、又は1週間前までに開始される。さらに、腫瘍の照射を小分けして、最初の照射セッションと最後の照射セッションの間の区間、ファルネシル・トランスフェラーゼ阻害物質の投与を維持することが有利である。ファルネシル・タンパク質・トランスフェラーゼ阻害物質の量、照射の線量及び照射線量の断続性は、腫瘍のタイプ、その部位、化学療法や放射線療法に対する患者の反応、など一連のパラメータによって決められ、最終的には個別のケースで医師と放射線医によって決定される。すなわち、本発明の方法による癌治療はまた、腫瘍を宿している宿主に対して、腫瘍の近くで前記宿主に放射線を照射する前、その間、及びその後で、放射線感度を高める効果的な量の本発明によるファルネシル・タンパク質トランスフェラーゼ阻害物質を投与するステップを含む。

【0075】

すでに述べたように、本発明の薬は、遺伝子治療又はアンチセンス治療又はRNA干渉

10

20

30

40

50

(interference) に向けられた治療剤とすることができます。mRNA配列と相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを細胞に導入して、mRNAの翻訳をブロックし、そのmRNAをコードしている遺伝子の機能をブロックすることができる。遺伝子発現をブロックするためにオリゴヌクレオチドを使用することは、例えば、Strachan and Read, Human Molecular Genetics, 1996, に記載されており、これは参照によって本明細書に組み込まれる。

【0076】

このようなアンチセンス分子としては、DNA、DNAの安定な誘導体、例えば、ホスホロチオエートやメチルホスホネート、RNA、RNAの安定な誘導体、例えば、2'-O-アルキルRNA、又はその他のアンチセンス・オリゴヌクレオチド模倣体、がある。アンチセンス分子は、マイクロインジェクション、リポゾーム・カプセル、又はアンチセンス配列を宿しているベクターからの発現、によって細胞に導入することができる。

【0077】

遺伝子治療の場合、問題の遺伝子はウイルス・ベクターに結紮(ligate)され、レシピエントの宿主細胞への感染によって治療DNAを送り込む。適当なウイルス・ベクターとしては、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、種痘ウイルス、ポリオ・ウイルス、などがあげられる。あるいはまた、治療DNAは、ウイルスによらない方法で、例えば、リガンド-DNA接合体、又はアデノウイルス-リガンド-DNA接合体を用いるレセプター媒介による標的DNA移入、リポフェクション膜融合、又は直接のマイクロインジェクション、などによって細胞に移入して遺伝子治療を行うことができる。これらの手順及びそのバリエーションは、体外(ex vivo)、並びに体内((in vivo)の遺伝子治療に適している。遺伝子で用いるのに適した遺伝子治療の分子的な方法の手順は、Paul D. Robbins編によるGene Therapy Protocols, Human Press, Totowa NJ, 1996, に記載されている。

【0078】

FTIは、肺癌(例えば腺癌、非小細胞肺癌を含む)、膵臓癌(例えば、外分泌性膵臓癌などの膵臓カルチノーマ)、結腸癌(例えば、結腸腺癌及び結腸アデノーマなどの結腸直腸カルチノーマ)、進行癌を含む前立腺癌、リンパ系の造血組織腫瘍(例えば、急性リンパ性白血病、B細胞リンパ腫、バーキット・リンパ腫)、骨髄性白血病(例えば、急性骨髄性白血病(AML))、甲状腺癌、脊髄形成異常症候群(MDS)、間葉組織起源の腫瘍(例えば、線維肉腫、及び横紋筋肉腫)、黑色腫、奇形癌腫、神経芽細胞腫、グリオーム、良性の皮膚腫瘍(例えば、角化棘細胞腫)、乳腺癌(例えば、進行乳癌)、腎臓癌、卵巣癌、膀胱癌、及び表皮癌、などいろいろなタイプの癌を治療するのに用いられる。

【0079】

本発明の薬を含む医薬的に有用な組成物は、医薬的に受容されるキャリアと混合するなどの公知の方法によって製剤できる。そのようなキャリア及び製剤の方法の例は、レミングトンの薬学(Remington's Pharmaceutical Sciences)に見出される。効果的な投与に適した医薬的に受容される組成物を形成するために、このような組成物は効果的な量の薬を含む。効果的な薬の量は、個人の状態、体重、性別、及び年齢など、いろいろな因子によって異なる。他の因子として投与の様態がある。医薬組成物は、皮下注射、局部施用、経口投与及び筋肉注射など、いろいろなルートによって人に投与される。

【0080】

本発明の薬は、薬の基本分子の化学的な誘導体を含む。すなわち、それらは、通常は基本分子の一部ではない付加的な化学的部分を含む。そのような部分が、基本分子の溶解度、半減期、吸収、などを向上させることがある。あるいはまた、付加的な部分が基本分子の望ましくない副作用を弱めたり、基本分子の毒性を減少させたりする。そのような部分の例は、いろいろなテキスト、例えばRemington's Pharmaceutical Sciencesに記載されている。

【0081】

ここで開示される方法によって同定される化合物は、阻害又は活性を最適なものにする

10

20

30

40

50

と同時に、可能な毒性を最小にするための通常のテストで決められる適当な用量で単独で用いることができる。さらに、他の薬剤の同時投与又は順次投与が望ましいこともある。

【0082】

本発明の薬は、従来の投与用ビヒクルによるきわめて多様な治療投薬形態で投与することができる。例えば、薬は、錠剤、カプセル剤（タイミングを計った放出及び持続的放出の製剤を含む）、丸剤、粉末、顆粒、エリキシル剤、チンキ剤、液剤、懸濁剤、シロップ剤、及びエマルジョン剤などの経口投与形態で、又は注射によって投与することができる。同様に、薬は、静脈内に（巨丸剤と注入剤の両方）、腹腔内に、皮下に、閉塞を含む又は含まない局所施用、及び筋肉内の投与形態で、全て製薬分野の当業者に周知の形態を用いて、投与することができる。効果的な、非毒性量の望ましい化合物を調節物質として用いることができる。

【0083】

薬の一日の投与量は、患者あたり1日に0.01mgから1,000mgまで広く変えられる。経口投与の場合、組成物は、治療する患者への投与量を症状に応じて調整するために、好ましくは0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、及び50.0ミリグラムの活性成分を含む、スコア付き又は付かない錠剤の形で提供される。効果的な量の薬は、通常1日に体重1kgあたり約0.0001mgから約100mgまでの投与量レベルで供給される。この範囲は、特に1日に体重1kgあたり約0.001mgから約10mgまでである。投与量は、全体として所望の効果を達成するように調整される。他方、これらのいろいろな物質の投与量は独立に最適化され、相乗効果を達成するように組み合わされて、どれかの物質を単独で用いた場合に比べて病状が良くなるようにすることができる。

【0084】

有利な形として、本発明で用いられる化合物又は調節物質(modulator)は、一日に一回の投与量で投与されるか、又は一日の全投与量を、一日に二回、三回、又は四回の分割投与量で投与することができる。さらに、本発明の化合物又は修飾物質は、適当な鼻腔内ビヒクルの局所施用による鼻腔内投与の形で投与することも、又は当業者には周知の経皮スキンパッチの形を用いた経皮ルートで投与することもできる。経皮送達システムの形で投与される場合、用量の投与は、当然、投与体制の間、断続的でなく連続的に行われる。

【0085】

2つ以上の活性成分による組み合わせ治療で、活性物質が別々の投与製剤になっている場合、活性物質は同時に投与することもできるし、又はそれを食い違った別々の時間に投与することもできる。

【0086】

本発明の化合物又は修飾物質を用いる投与方式は、患者のタイプ、種、年齢、体重、性別、及び医学的な状態；治療される病状の重篤さ；投与様態；患者の腎臓及び肝臓の機能；及び用いる特定の薬、などのいろいろな因子に従って選択される。通常の技能を持つ医師又は獣医であれば、病気を予防し、その進行に対抗し、又は進行を停止させるために必要な効果的な薬の量を容易に決定できる。毒性なしに効力を発揮する範囲内で薬の濃度を最適の精度で実現するためには、標的部位への薬の供給に関する動力学に基づいた投与方式が必要である。このためには、薬の分布、平衡、及び排出に関する考察が必要である。

【0087】

本発明の薬は活性成分となり、普通、意図する投与形態、すなわち、経口錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、シロップ剤など、を考慮し、従来の製薬方法と合致して適当に選択される適当な希釈剤、賦形剤、キャリア（ここでは全体をまとめて「キャリア」物質と呼ぶ）と混合されて投与される。

【0088】

例えば、錠剤やカプセルの形の経口投与では、活性な薬成分は、経口投与用の無毒の医薬的に受容される不活性なキャリア、例えば、エタノール、グリセリン、水、などと組み合わせられる。さらに、望む場合又は必要な場合、適当な結合剤、滑剤、崩壊剤、及び着

10

20

30

40

50

色剤を混合物に組み込むことができる。適当な結合剤としては、澱粉、ゼラチン、天然の砂糖、例えば、グルコースや - ラクトース、コーン甘味料、天然及び合成のガム、例えば、アカシア、トラガカント、又はアルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、ポリエチレン・グリコール、ワックス、などがあげられるが、それだけに限定されない。これらの投薬形態で用いられる滑剤としては、オレイン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、安息香酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、などがあげられるが、それだけに限定されない。崩壊剤としては、澱粉、メチルセルロース、寒天、ベントナイト、キサンタン・ガム、などがあげられるが、それだけに限定されない。

【0089】

10

液体形態では、活性薬成分は、適当なフレーバーの懸濁剤又は分散剤、例えば、合成及び天然のガム、例えば、トラガカント、アカシア、メチルセルロース、などで、組み合わせることができる。用いることができる他の分散剤としては、グリセリンなどがあげられる。非経口投与には、無菌の懸濁液や溶液が好ましい。静脈内への投与が望ましい場合は、一般に適当な防腐剤を含む等張製剤 (isotonic preparation) が用いられる。

【0090】

本発明の薬は、また、リポゾーム送達システムで、例えば、小さな単層胞 (unilamellar vesicle)、大きな単層胞、及び多層胞、などで投与することもできる。リポゾームは、コレステロール、ステアリルアミン、又はホスファチジルコリンなどのリン脂質から形成することができる。

20

【0091】

本発明の薬は、また、化合物分子が結合される個別キャリアとしてのモノクローナル抗体を用いて送達することもできる。本発明の薬は、また、標的に向けられる薬剤キャリアとしての可溶性ポリマーに結合することもできる。そのようなポリマーとしては、ポリビニル・ピロリドン、ピラン・コポリマー、ポリヒドロキシ-エチルアスパルタミドフェノール、パルミトイル残基で置換されたポリエチル-エネオキシドポリシンなどがあげられる。さらに、本発明の薬は、薬の制御された放出を実現するのに有用な生分解性ポリマー、例えば、ポリ乳酸 (polylactic acid)、ポリ - カプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルソエステル、ポリアセタール、ポリジヒドロ・ピラン、ポリシアノアクリレート、及びハイドロゲルの架橋又は両親媒性プロック・コポリマー、などに結合することができる。

30

【0092】

経口投与では、薬はカプセル、錠剤、又は巨丸剤 (bolus) 形態で投与でき、あるいはまた、飼料に混入することもできる。カプセル、錠剤、及び巨丸剤は、活性成分を適当なキャリア・ビヒクル、例えば澱粉、タルク、ステアリン酸マグネシウム、又はリン酸二カルシウム、などと組み合わせて構成される。このようなユニット投薬形態は、活性成分を、希釈剤、充填剤、崩壊剤、及び / 又は結合剤などの適当な細かいパウダーにした不活性成分と、均一な混合物が得られるように良く混合して調製される。不活性成分は、薬と反応せず、治療しようとする動物に無毒なものである。適当な不活性成分としては、澱粉、ラクトース、タルク、ステアリン酸マグネシウム、植物ガム及びオイル、などがあげられる。製剤は、治療しようとする動物種のサイズとタイプ、及び感染のタイプと重篤さ、など多くの因子に依存して大きく変化する量の活性及び不活性な成分を含む。活性成分はまた、単純に化合物を飼料に混入して、又は化合物を飼料の表面に適用 (apply) することによって投与することができる。

40

【0093】

あるいはまた、化合物や修飾物質は、不活性な液体キャリアに溶解された活性成分から成る製剤を注入することによって非経口的に投与することができる。注入は、筋肉内、腔内、気管内、又は皮下に行われる。注入できる製剤は、活性成分を適当な不活性の液体キャリアと混合したものである。許容される液体キャリアとしては、ピーナツ・オイル、綿実油、ゴマ油、などの植物油、並びにソルケタール、グリセロール・ホルムアルデヒドな

50

どの有機溶媒、があげられる。あるいはまた、水性の非経口製剤を用いることもできる。植物油が液体キャリアとして好ましい。製剤は、活性成分を液体キャリアに溶解又は懸濁させて、最終的な製剤が重量で0.005乃至10%の活性成分を含むようにして調製される。

【0094】

本発明は、以下の非限定的な実施例によってさらに詳しく説明される。

【実施例】

【0095】

非予測的な(nonprophetic)実施例では、AML患者が、600mgの(R)-6-[アミノ(4-クロロフェニル)(1-メチル-1H-イミダゾール-5-イル)メチル]-4-(3-クロロフェニル)-1-メチル-2(1H)-キノリン)(ザルネストラ(Zarnestra)と呼ぶ)を、AMLの各28日サイクルの最初の21日間、600mg、1日2回という開始経口用量で投与された。被験者は2つのコホート、再発性AMLの患者、と難治性AMLの患者に登録された。全部で257人の患者(再発性135人と難治性117人)が治療を受けた。

【0096】

ザルネストラ(Zarnestra)治療に対する応答は、中央検査又は臨床部位で測定して、表2に示されるような客観的な応答(CR、CRp、又はPR)があった患者、又は安定性疾患及び抗白血球(anti-leukemic)活性(白血球芽細胞の50%を超える減少)を示した患者、として定義された。抗白血球(anti-leukemic)活性は、骨髄の芽細胞数が5%未満、又は骨髄芽細胞が少なくとも半分の減少、と定義される。

【0097】

【表2】

表2

応答	規準
完全応答(CR)	好中球数>1,000/ μ Lかつ 骨髄吸引液の芽細胞<5%かつ 血小板数>100,000/ μ Lおよび 髓外造血疾患なし
完全応答 血小板回復が不完全(CRp)	100,000/ μ Lまでの血小板回復を除き、CRの全ての規準に合致するが、十分な骨髄回復は血小板輸液に依存しない
部分応答(PR)	骨髄芽細胞が少なくとも50%減少かつ 好中球数の部分回復(>500/ μ L)かつ 血小板数>50,000/ μ L
安定性疾患(SD)	CR、CRp、PR又はPD規準に合致しない応答かつ 臨床的な低下なし
進行性疾患(PD)	>50%の増加が骨髄芽細胞 または 循環する芽細胞 または 循環する芽細胞のインターバル発生が少なくとも連続して二回持続 または 髓外造血疾患のインターバル発生(interval development)

10

20

30

40

【0098】

実施例1.マイクロアレイ分析

同意した患者から、骨髄サンプルが、ザルネストラ(Zarnestra)FTI(活性成分、(R)-6-[アミノ(4-クロロフェニル)(1-メチル-1H-イミダゾール-5-イル)メチル]-4-(3-クロロフェニル)-1-メチル-2(1H)-キノリン)で治療される前後に採取され、PBSで希釈され、フィコール-ジアトリゾ酸(1.077g/m1)と共に遠心分離された。白血球細胞はPBSで二回洗浄され、10%DMSOを

50

含む F B S に再懸濁され、 - 80 でただちに凍結された。サンプルは 37 で解凍され、 20% F B S を含む 10X 量の R P M I が 5 分間にわたって一滴ずつ加えられた。細胞は 500 g で 10 分間遠心分離され、 2 mM の E D T A と 0.5% B S A を含む 10 ml の P B S に再懸濁された。次に、サンプルは 70 μ M フィルター (Becton Dickinson Lab ware, Franklin Lakes, NJ) を通して細胞の塊が除かれた。細胞生存率が、トリパンブルー色素排除分析によって決定された。解凍された骨髄サンプルの平均生存率は 35% であった (範囲は 0 - 96%)。存在する生存細胞の数が比較的少なかったので、サンプルはそれ以上骨髄細胞を濃縮されなかった。約 2×10^5 個の細胞が C D 33 - F I T C 及び C D 34 - P E 抗体 (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) で二重ラベルされ、 F A C S が行われた。

10

【 0099 】

全 R N A が RNeasy キット (Qiagen, Santa Clarita, CA) を用いて全ての細胞サンプルから抽出された。c D N A と c R N A の合成は、Affymetrix (Santa Clarita, CA) プロトコルに従って行われた。いくつかのサンプルで R N A 収量は 1 μ g 未満だったので、2 ラウンドの線形増幅が行われた。ハイブリダイゼーションのために、11 μ g の c D N A が、94 で 35 分間、 40 mM の T r i s - アセテート、p H 8.1, 100 mM の酢酸カリウム、及び 30 mM の酢酸マグネシウム中でインキュベーションすることによってランダムに断片化された。断片化された c D N A は、60 rpm にセットされたロティッセリー (rotisserie) ・オーブン中で 45 で 16 時間、 U 133 A アレイにハイブリダイズされた。ハイブリダイゼーションの後、アレイは洗浄され (6 \times S S P E と T r i t o n X - 100 を含む 0.5 \times S S P E を用いて)、ストレプトアビシン - フィコエリスリン (S A P E ; Molecular Probe, Eugene, OR) で染色された。結合したラベルされたプローブの定量は、Agilent G2500A GeneArray スキャナー (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) を用いて行われた。

20

【 0100 】

各アレイの全蛍光強度は 600 という一様な値にスケールされた。チップの性能は、信号対雑音比 (生平均信号 / 雜音) を計算して定量化された。チップは、その信号対雑音比が 5 未満である場合はそれ以上の分析から除外された。遺伝子は、少なくとも 10% のチップで「存在する」といわれた場合にのみ、その先の分析に含められた。このカットオフの後、約 12,000 の Affymetrix プローブ組が残った。遺伝子発現データの質は、さらに主成分分析に基づいてかけ離れた孤立値を同定し、遺伝子強度の正規分布を分析することによってコントロールされた。

30

【 0101 】

カイニ乗検定とスチュードントの t - 検定を用いて、患者の応答と患者の共変量、突然変異ステータス、 C D 33 と C D 34 抗原発現、白血芽球細胞数、及び遺伝子発現の間の相関が同定された。応答を高い感度で予測できそうな遺伝子を同定するためにパーセンタイル (percentile) 分析が用いられた。例えば、比応答者の少なくとも 40% に対して、全ての応答者でアップ - 又はダウン - レギュレートされた遺伝子が同定された。両側のスチュードント t - 検定 (不等分散) に基づいて有意な p 値 ($P < 0.05$) を示さなかった遺伝子は除かれた。トップ遺伝子の予測力 (predictive value) は、一点除外交差検証法 (leave-one-out cross validation method) によって分析された。ここで、1 つのサンプルをデータ組から除外して、マーカーが 12,000 の遺伝子から再選択された。この遺伝子の予測力は、線形識別分析を用いて除外されたサンプルについてテストされた。感度は、真陽性を、真陽性プラス偽陰性の和で割った数として計算された。特異性は、真陰性を、真陰性プラス偽陽性の和で割った数として計算された。陽性予測力は、真陽性を、真陽性プラス偽陽性の和で割った数として計算された。陰性予測力は、真陰性を、真陰性プラス偽陰性の和で割った数として計算された。

40

【 0102 】

单変量の C o x 比例ハザード・モデルを用いて、各パラメータ (遺伝子又は芽細胞数) と患者の生存結果を評価した。C o x モデルからの各パラメータの係数推定値はそのよう

50

な相関の強さを表す。2つ以上の遺伝子が用いられる場合、多変量ハザード・モデルが採用される。応答者を非応答者から区別する分類子(classifier)は次のように定義される:

$$b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 + \dots$$

ここで、 b_1 , b_2 , b_3 は、 $\text{Co}\times$ モデルからの係数推定値であり、 x_1 , x_2 , x_3 は標準化されたパラメータ値(芽細胞数や遺伝子発現の値の \log_{10})である。

【0103】

レシーバ・オペレータ特性曲線(ROC)を用いて適当な閾値を選び、少なくとも90%の感度を要求した。ROC診断は各パラメータについて感度と特異性を計算する。さらに、遺伝子マーカーは最初、29のランダムに選ばれたサンプルから成るトレーニング組を用いて良い結果を悪い結果から層化する能力についてランク付けされた。次に、各遺伝子の予測力が残る29サンプルでテストされた。これによって、最も堅牢な予測力を有する遺伝子を同定することができた。

【0104】

実施例2：白血球細胞の抗原発現

白血球芽細胞は表面抗原CD33とCD34を発現することが知られている。患者骨髄の白血球細胞の95%及び55%が、それぞれ、CD33及びCD34に関して陽性であった。各サンプルでこの抗原を発現している細胞の平均パーセンテージは、CD34で13%、CD33で43%であった。カイニ乗検定を行って、抗原発現レベルと患者の結果との相関を調べた。CD34及びCD33レベルについて、それぞれ、15%及び60%というカットオフを選択した。CD33とCD34の低発現(細胞集団の約15%未満がCD34に関して陽性及び細胞集団の約60%未満がCD33に関して陽性)は、ザルネストラ(ZarnestraTM)に対する患者の応答と相関していた(それぞれ、 $p = 0.137$, $p = 0.052$)。両方の抗原の高発現(細胞集団の約15%より多くがCD34に関して陽性及び細胞集団の約60%より多くがCD33に関して陽性)もまた、芽細胞数と正に相関していた。Kaplan-Meier分析もCD33の高発現が全体生存率の低さと相関していることを示した(図1)。

【0105】

実施例3：白血球芽細胞数

CD33及びCD34抗原発現の分析は、白血球芽細胞のレベルが患者の応答と相関することを示唆した。部位及びDCL芽細胞数測定の平均値が計算され、芽細胞数がAML患者における患者応答と相関しているかどうかを調べるために、スチュードントのt検定が行われた。全部で199人の評価可能な患者のうち、24人がCR、CRp、PR、又はSDであったが、芽細胞のパーセンテージが患者の結果と有意に相関していた($p = 0.0006$)。応答者は、芽細胞の数(平均34%)が、疾患が進行する患者(平均51%)に比べて少なかった。24人の全応答者のうち1人だけ(SDを示すとされた)が芽細胞数が60%を超えていた。全ての評価可能な患者についてのカイニ乗検定からも、高い芽細胞数と治療に対する抵抗の間の有意な相関を認められた($\chi^2 = 9.53$)。

【0106】

Kaplan-Meier分析は、芽細胞数が低レベル(<60%)の患者は、芽細胞数が高い患者に比べて、全体生存率が有意に高いことを見出した(図2)。この分析は、芽細胞数が約60%より高い患者はザルネストラ(ZarnestraTM)に応答する可能性が小さいことを示している。

【0107】

実施例4：応答者と非応答者で発現に差がある遺伝子の同定

薬による治療の前に80人の患者から骨髄サンプルが採取された。この80のベースライン・サンプルのうち、14は評価不可能な患者から得られたものだったので分析から除外された。サンプルは、骨髄細胞が濃縮され、処理されてメッセンジャーRNA(遺伝子特有のタンパク質をコードしている分子)が採取され、Affymetrix U133A遺伝子チップにハイブリダイズされた。66のサンプルのうち58は、U133Aチップへのハイブリダイゼ

10

20

30

40

50

ーションの後、別のクオリティコントロール手段をパスした。遺伝子発現データを臨床的情報と統合し、後ろ向き分析を行って、高い感度で非応答者から応答者を層化できそうな遺伝子を同定した。ザルネストラ(ZarnestraTM)に対する応答を予測するのに役立ついくつかの遺伝子マーカーが同定された(表3)。リンパ芽球crisis腫瘍遺伝子(oncogene LBC)の場合、この遺伝子の予測力は一点除外交差検証法を用いてデータセットについて計算された(表3)。oncogene LBC遺伝子発現レベルは、臨床的に同定された応答者を全て捕捉することができ、非応答者の半数以上を除外した。

【0108】

【表3】

表3：応答者において非応答者と異なる発現を示す遺伝子

名称	遺伝子記号	t検定	比*	Ref配列	配列No.
アリール炭化水素レセプター	AHR	2.55E-06	0.39	NM_001621	1
Aキナーゼ(PRKA) アンカーランパク質13(oncoLBC)-	AKAP13	6.13E-05	0.51	NM_006738	2
仮想タンパク質DKFZp667G2110	DKFZp667G2110	6.93E-05	0.71	NM_153605	3
Iduronate2-スルファターゼ(ハンター症候群)	IDS	0.00024	0.36	NM_000202	4
オプシン3(encephalopsin,panopsin)	OPN3	0.000643	0.54	NM_014322	5
Gタンパク質結合レセプター105	GPR105	0.000876	0.34	NM_014879	6
腫瘍内皮マーカー6	TEM6	0.001031	0.62	NM_022748	7
腫瘍壊死因子(リガンド)スーパーファミリー、メンバー13	TNFSF13	0.001042	0.59	NM_003808	8
Supervillin	SVIL	0.001457	0.62	NM_003174	9
インターロイキン3レセプター、アルファ(低親和性)	IL3RA	0.001984	0.40	NM_002183	10
KIAA0680遺伝子産物	KIAA0680	0.002616	0.57	NM_014721	11
FGFレセプター活性化タンパク質1	FRAGI	0.00299	1.24	NM_014489	12
cDNA DKFZp566B213	DKFZp566B213	0.012011	1.50		13
KIAA1036タンパク質	KIAA1036	0.012621	0.72	NM_014909	14
BTGファミリー、メンバー3	BTG3	0.016594	1.48	NM_006806	15
ミトゲン活性化プロテインキナーゼ8相互作用タンパク質3	MAPK8IP3	0.018174	1.39	NM_015133	16
Ras相同遺伝子ファミリー、メンバーH	ARHH	0.027219	1.64	NM_004310	17
神経ペントラキシンII	NPTX2	0.033468	0.14	NM_002523	18

*比は、非応答者と比べた応答者における変化倍率(fold-change)を表す。

10

20

30

40

【0109】

【表4】

表4：応答マーカーとしてo n c o L B Cを用いる一点除外交差検証

		G o l d S t d.	
		応答	非応答
テスト	応答を予測	1 4	2 0
	非応答を予測	0	2 4
	合計	1 4	4 4

感度 = 100%

特異性 = 55%

陽性予測力 = 41%

陰性予測力 = 100%

10

20

30

【0110】

生存率分析は、o n c o L B C 発現に基づいて応答者と分類された患者（図3A、p = 0.00841）は、臨床データを用いる患者分類（図3B、p = 0.0827）に比べて有意に成績が優れていることを示した。これは、o n c o L B C マーカーが全体的な生存率が高い非応答者のサブセットを同定していたためである。C o x ハザード・モデルに基づいて、o n c o L B C と第二の遺伝子マーカー、アリール炭化水素レセプター（A H R）を組み合わせると、特異性及び陽性予測力が、それぞれ、75%及び56%に增加了（図3C）。これらの結果は、o n c o L B C を単独で、又はA H R 遺伝子と組み合わせて用いるとザルネストラ（ZarnestraTM）治療に対する応答を予測するための効果的なアレイが得られることを示した。

【0111】

o n c o L B C とアリール炭化水素レセプター（A H R）をマーカーとして用いる一点除外交差検証も行われた。カットオフを用いて最高の感度及び最良の特異性を同定すると、P P Vと感度は同じままであった。その他の遺伝子の組み合わせについての一点除外交差検証の結果は表5に示されている。これは、マーカーの組み合わせによってこの方法の予測力が改善されることを示している。

【0112】

【0113】

【表5】

表5

マーカー	感度	特異性	PPV	NPV	事前確率*
LBC, AHR, カタニン, IDS, DKFZp667G2110	100	73	54	100	0.32
LBC, カタニン, DKFZp667G2110	100	70	52	100	0.47
LBC, AHR, DKFZp667G2110	100	66	48	100	0.23
LBC, AHR, IDS, DKFZp667G2110	100	66	48	100	0.28
LBC, AHR, IDS	100	61	45	100	0.2
LBC, カタニン	100	61	45	100	0.41
LBC, DKFZp667G2110	100	57	42	100	0.2
カタニン	100	56	42	100	0.49
LBC	100	55	41	100	0.4
LBC, AHR	100	55	41	100	0.19
LBC, IDS, カタニン	100	55	41	100	0.38
LBC, AHR, カタニン	100	52	40	100	0.18
LBC, IDS	100	50	39	100	0.38
IDS	100	50	39	100	0.42
DKFZp667G2110	100	45	37	100	0.39
AHR	100	45	37	100	0.17
AHR, カタニン	100	43	36	100	0.17

【0113】

さらに、LBC及びAHR分類子を用いる患者の層化は、oncologic遺伝子又は臨床的な応答の定義を用いたときと比べて、2つの患者集団の間で生存時間の中央値に同様な差を示した(図4C)。これらの結果は、oncologicだけ、又はAHR遺伝子との組み合わせ、が、現在のデータセットでザルネストラ(Zarnestra)への応答を予測するための効果的なバイオマーカーとして利用できることを示した。

【0114】

Coxハザード・モデルを用いて、他のマーカーの組み合わせによる優れた生存者から劣った生存者の層化を分析した(表6)。ここでは、51人の患者からのデータが用いられた。それは、この数の患者だけがCD33及びCD34抗原レベルが測定されていたからである。マーカーに関する適当なカットオフを決める際、90%を超える感度が用いられた。複数のマーカーを使用すると、2つの生存者グループ間の生存時間の中央値の差が改善できる。

【0115】

10

20

30

40

【表6】

表6

マーカー*	p 値	生存時間 中央値 劣 (日)	生存時間 中央値 優 (日)	デル タ (日)	感度 (Sens) (%)	特異性 (Spec) (%)
LBC	0.0098	64	177	113	91	65
CD33	0.0029	40	105	65	91	23
CD34	0.643	64	103	39	91	35
AHR	0.12	59	106	47	91	53
%芽細胞 [#]	0.1241	60	103	43	91	38
LBC+%芽細胞	0.00223	59	154	95	93	61
LBC+AHR	0.0111	71	171	100	91	73
LBC+ CD33	0.00266	71	182	111	91	73
LBC+ CD34	0.00038	64	192	128	91	80
LBC+AHR+ CD34	0.003	71	213	142	91	83
LBC+AHR+ CD33	0.00062	64	192	128	91	80

10

20

30

【0116】

実施例5：抗体（予測的）

1b c 腫瘍遺伝子で誘導されるペプチドが合成され、キーホール・リンペット・ヘモシアニンに結合され、それを用いてウサギを免疫化してポリクローナル抗体を產生させる。ELISAによって、対応するペプチドに対する血清の反応性がテストされ、陽性のバッヂがアフィニティー（親和性）精製される。精製された抗体は、組織切片で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、対応するペプチドを抗体と同時に加えた場合の信号の完全な消滅によって検証される。このポリクローナル抗体は免疫組織化学で十分良く働くが、その他に、タンパク質を自然な畳まれた形（natural fold）で検出できるモノクローナル抗体も產生される。モノクローナル抗体を產生するには、哺乳類細胞で自然な畳まれた形及び翻訳後修飾を保証するように產生される、精製された抗原が作られる。抗原、1b c 腫瘍タンパク質-IgG定常領域融合タンパク質、がマウス骨髄腫細胞で発現され、タンパク質がFc部を餌（bait）として用いて精製される。この精製された抗原は、C末端ポリクローナル抗体によってウエスタン・プロットで認識される。この抗原を用いて、1b c ペプチドに対するマウス・モノクローナル抗体が、陽性のクローンからIgG定常部でなく1b c ペプチドに対して反応するものを選び出すことによって生成される。

【0117】

1b c 腫瘍遺伝子の臨床的な同定のためのキットは、これらの抗体や同様な抗体を用いて容易に構成できる。そのようなキットは、1b c ペプチド（したがって、1b s 腫瘍遺伝子）の同定に向けられた抗体、適當な指示試薬（例えば、酵素、ラベル、など）、及び（任意的に）希釈バッファー、安定剤、その他のこのような分析に普通用いられる物質などのようなキットの臨床的応用に有用な他の試薬を含む。

【0118】

実施例6：インシチュ・ハイブリダイゼーション（予測的）

ホルマリンで固定されパラフィンに埋め込まれた組織サンプルが5～7μmの厚さの切片にカットされ、シラン・コーティングされたガラス・スライドにマウントされ、37度で一晩、そして65度で30分間インキュベートされた後、キシレン中で10分間2回パラフィンを除去する。その後、サンプルは、段階的な一連のエタノール溶液（100～75%

40

50

0 %) によって再水和されリン酸緩衝食塩水 (PBS、pH 7.0) で 5 分間 2 回リーンされ、PBS 中 0.1 mol/L のグリシンで 5 分間 2 回処理され、PBS 中 0.3% Triton X-100 で 15 分間透過性にされる。切片は、37°で 30 分間、プロテイナーゼ K (Finnzymes, Helsinki, Finland) 処理 (μ g/ml、TE バッファー中、100 mmol/L の Tris-HCl、50 mmol/L の EDTA、pH 8.0) によって処理され、4°で 5 分間 PBS 中の 3% パラホルムアルデヒドでポスト固定され、PBS 中で 2 回リーンされる。正電荷は、スライドを 0.25% (v/v) 無水酢酸、100 mmol/L トリエタノールアミン、pH 8.0, に 5 分間 2 回浸すことによってブロックされる。スライドは、37°の 4 × SSC、50% (v/v) イオン除去されたホルムアミド中で 10 分間平衡化される。

10

【0119】

プローブは、TA クローニング・キット (Invitrogen, San Diego, CA, USA) を用いて、PCR 増幅された 0.4 kb の 1bc 腫瘍遺伝子 cDNA インサートを PCR-II ベクターに結紮して調製される。1bc 腫瘍遺伝子センス又はアンチセンス RNA プローブのテンプレートは、適当なベクター構築物 (construct) を (それぞれ、3' から 5' 方向へ、又は 5' から 3' 方向へ) 直線化して生成される。RNA ラベリング・キット (Boehringer Mannheim) を用いて in vitro 転写によってジゴキシゲニン標識された RNA が生成される。ハイブリダイゼーションは、1 × Denhart's 溶液 (0.2 g/L Ficoll Type 400, Pharmacia)、0.2 g/L のポリビニルピロリドン、0.2 g/L のウシ血清アルブミン (分画 V; Sigma)、40% ホルムアミド、10% デキストラン・スルフェート、4 × SSC、10 mmol/L のジチオスレイトル、1 mg/ml の酵母 tRNA、1 mg/ml のニシン精子 DNA、及び 300 ng/ml のジゴキシゲニン標識 RNA プローブ、を含むハイブリダイゼーション混合物を用いて 45°で一晩行われる。ハイブリダイゼーション後、組織切片は 37°で、2 × SSC 中で 5 分間 2 回、60% ホルムアミド、0.2 × SSC 中で 15 分間 1 回洗浄され、室温において 2 × SSC 中で 5 分間 2 回リーンされ、100 mmol/L の Tris-HCl、pH 8.0, 150 mmol/L の NaCl 中で 10 分間 2 回洗浄される。信号検出は、1:250 のアルカリ・ホスファターゼ接合ヒツジ抗ジゴキシゲニン fab 断片 (Boehringer Mannheim) を用いて行われる。信号は、NBT/BCIP ストック溶液 (Boehringer Mannheim) と共に 1.5 時間インキュベートすることによって可視化される。

20

【0120】

癌患者の腫瘍形成細胞中に見られる 1bc 腫瘍遺伝子陽性細胞は、FTI への応答がありそうもないことを示す。

【0121】

実施例 7：免疫組織化学（予測的）

1bc 腫瘍遺伝子の C 末端ペプチドに対するアフィニティー精製されたポリクローナル抗体が、1bc 腫瘍遺伝子の免疫組織化学的な検出と位置決定に用いられる。ホルマリン固定されパラフィンに埋め込まれた正常及び腫瘍組織の 4 μ m 切片が、3-アミノプロピル-トリエトキシ-シラン (APEX、Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) でコーティングされたスライドに取り付けられる。切片は、段階的な濃度のエタノールでパラフィン除去され、再水和され、室温で 30 分間、メタノール過酸化物 (無水メタノール中 0.5% の過酸化水素) で処理されて、内部発生的なペルオキシダーゼの活性がブロックされる。抗原回復 (antigen retrieval) は、マイクロ波オーブン中で 5 分間 (650W) 2 回行われる。Elite ABC キット (Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA, U.S.A.) が免疫ペルオキシダーゼ染色に用いられる。1bc ペプチド抗体が 1:2000 という最適希釈で用いられる。ビオチン化された第二の抗体とペルオキシダーゼ標識されたアビジン-ビオチン複合体が切片上で 30 分間インキュベートされる。希釈は PBS (pH 7.2) 中で行われ、全てのインキュベーションは室温の湿潤チャンバ内で行われる。異なる染色ステップの間にスライドは PBS で 3 回リーンされる。ペルオキシダーゼ染色は、室温で 15 分間、3-アミノ-9-エチルカルバゾール (Sigma) 溶液 (0.03% 過酸化

40

50

水素を含む 0.05 M アセテート・バッファー、pH 5.0、の中で 0.2 mg / ml) によって可視化される。最後に、切片は、マイヤー (Mayer) のヘマトキシリンで軽く対比染色され、水性のマウンティング媒体 (Aquamount, BDH) によってマウントされる。対照実験では、一次抗体が正常なウサギ血清の 1 g G フラクションで置き換えられる、又は一次抗体は 1 b c ペプチドで前吸収された (preabsorbed)。これらの染色は細胞のサブセットにおける 1 b c 腫瘍遺伝子の存在を示す。

【0122】

実施例 8：酵素免疫分析（予測的）

1 b c タンパク質又は 1 b c 腫瘍遺伝子に関連した特徴的なタンパク質についての免疫分析が準備される。（免疫ペルオキシダーゼ染色によって抗原を含むことが示された）結腸腫瘍試料のダイジェストを含む抗原標準が用いられる。AML 患者からのヒト白血球細胞。試料はプールされ、0.2% (w/v) デオキシコール酸ナトリウムを含む 10 体積の 10 mM の Tris バッファー、pH 7.4、中において 4 でホモジナイズされる。ホモジネートはただちに 37 にされ、以下の試薬（最終濃度）が攪拌しながら加えられる：1 mM のシステイン (Sigma)、1 mM の EDTA (Sigma)、及びパパイン (0.8 単位 / ml) (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)。5 分後、5 mM のヨードアセトアミド (Sigma) を加えて消化が停止される。ホモジネートは 4 で 1 時間、100,000 × g で遠心分離され、フェニルメチルスルホニル・フルオライドとアミノカプロン酸、各 10 mM、を含む 10 mM の Tris / 0.9% NaCl 溶液バッファー、pH 7.4、に対して十分に透析される。ホモジネートは、タンパク質 0.5 mg / ml という濃度で小分けした分量で凍結される。

【0123】

1 b c タンパク質又はペプチドを測定する免疫分析手順のために生成される量 - 応答曲線は、100 ng ~ 100 µg / ml の間の抗原インプットで直線性を示す。血清分析の場合、これらのサンプルは分析の前に 10 倍に希釀されるので、この範囲は 1 ng から 1000 ng / ml となる。

【0124】

上の実施例で述べた抗体の固相プレパラートは CNBr 活性化 Sepharose (Pharmacia) を用いて調製される。マイクロタイター・プレート (Nunc I Immunoplates; Grand Island Biological Co., Grand Island, N.Y.) は、4 C の 50 mM の炭酸 - 重炭酸バッファー、pH 9.6、中の抗体で (200 µl / ウエル) コーティングされる。抗体溶液を除去した後、200 µl の分析バッファー [1% のウサギ血清と 1% (w/v) のウシ・アルブミンを含む PBS] を加えて、プラスチック上に残っているタンパク質結合部位をプロックする。室温で 1 時間インキュベートした後、コーティングされたプレートがただちに分析手順で用いられる。

【0125】

分析を行うには、分析バッファーで希釀された 200 µl のサンプルが 37 C で 1 - 5 時間加えられる。分析バッファーを用いて 3 回洗浄した後、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (Sigma, Type VI) に共有結合で接合された 200 µl の抗体が、37 C で各ウエルに 1.5 時間加えられる。接合物は、10% (v/v) マウス血清を含む PBS 1 ml あたり 0.5 µg の免疫グロブリンという濃度に希釀される。上記のような洗浄手順の後、ウエルあたり 200 µl の基質が室温で 0.5 時間加えられる。基質溶液は pH 5.0 のクエン酸バッファーと 0.003% 過酸化水素の 1 ml あたり 0.4 mg の o - フェニレンジアミンを含む。反応は 50 µl の 2 N 硫酸を加えて停止され、酵素分析プレート・リーダー (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, Pa) を用いて吸収率が 488 nm でモニターされる。

【0126】

結合した酵素接合物のパーセンテージは次の式によって計算される：

$$(B - B_0) (B_1 - B_0) (100)$$

ここで、B = サンプルの吸収率、B₁ = 最大吸収率、そして B₀ = ブランクの吸収率、であ

10

20

30

40

50

る。分析は、標準ダイジェストと分析バッファーで26倍に希釈された希釈血清サンプルを用いて三重複で行われる。免疫分析の特異性は、無関係なタンパク質及び非免疫ウサギ血清に対する抗体を含むいろいろな抗体試薬を固体相で置換することによって調べられる。固体相の抗体のうち、上記の実施例に従って調製された抗体だけが高い希釈度で抗原に結合する。

【0127】

血清1b cタンパク質のレベルが正常な対照被験者、良性及び悪性の造血疾患の患者、について検出される。

【0128】

明らかに健康な人から得られた血清は1b cタンパク質を示さない。検出限界以上の血清抗原を発現するのはサンプルの5%だけであり、この値が高い血清レベルのカットオフとして選ばれる。このカットオフよりも低い癌患者はFTIによる治療に応答する可能性が大きい。

【図面の簡単な説明】

【0129】

【図1】CD33抗原発現の高い患者と低い患者のKaplan-Meier分析を示すグラフである。

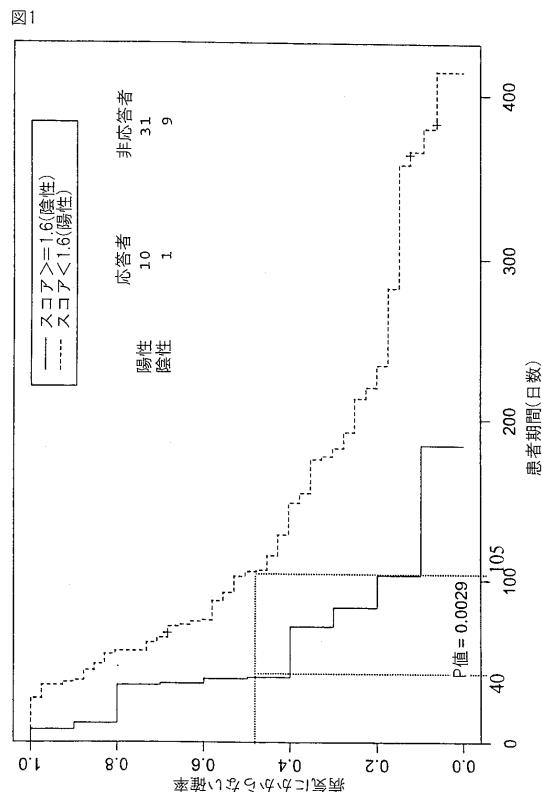
【図2】芽細胞数が高い患者と低い患者のKaplan-Meier分析を示すグラフである。

【図3A】臨床的応答分類を用いた患者のKaplan-Meier生存率分析を示すグラフである。

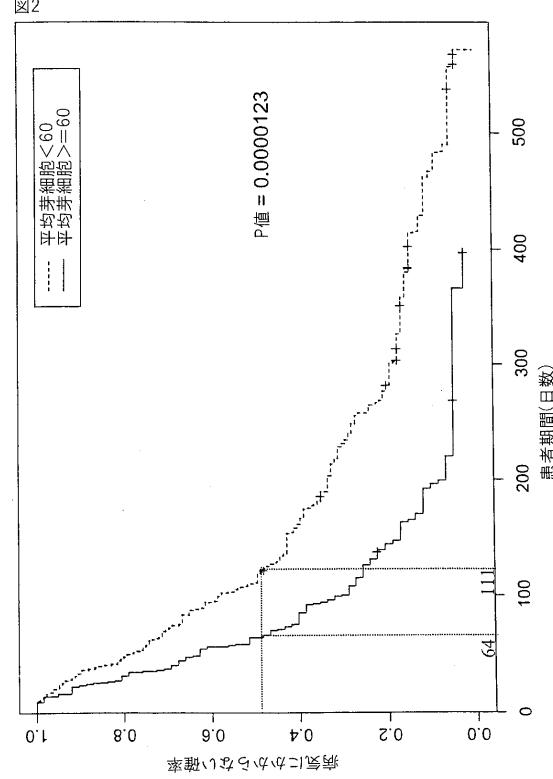
【図3B】患者を分類するために腫瘍LBC遺伝子発現を用いた患者のKaplan-Meier生存率分析を示すグラフである。

【図3C】患者を分類するために腫瘍LBC及びAHR遺伝子発現を用いた患者のKaplan-Meier生存率分析を示すグラフである。

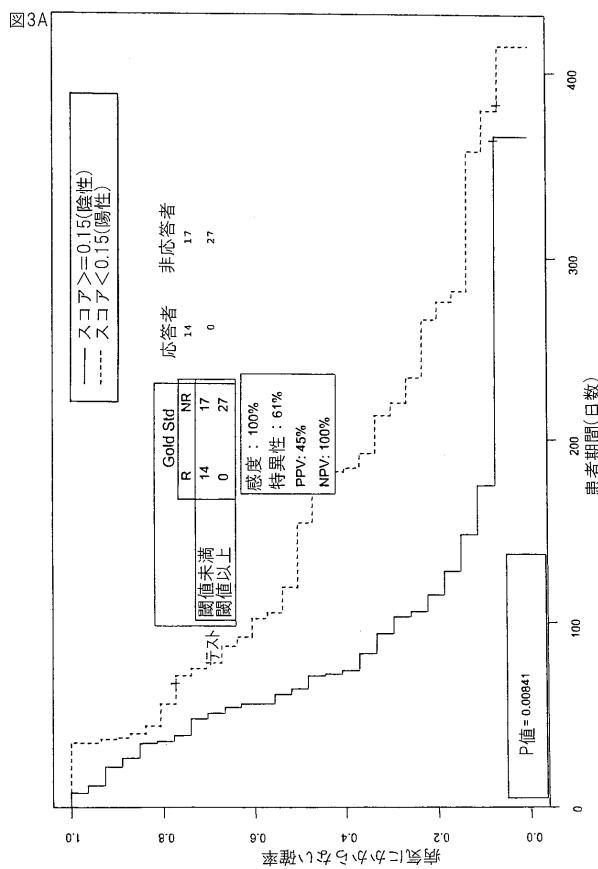
【図1】



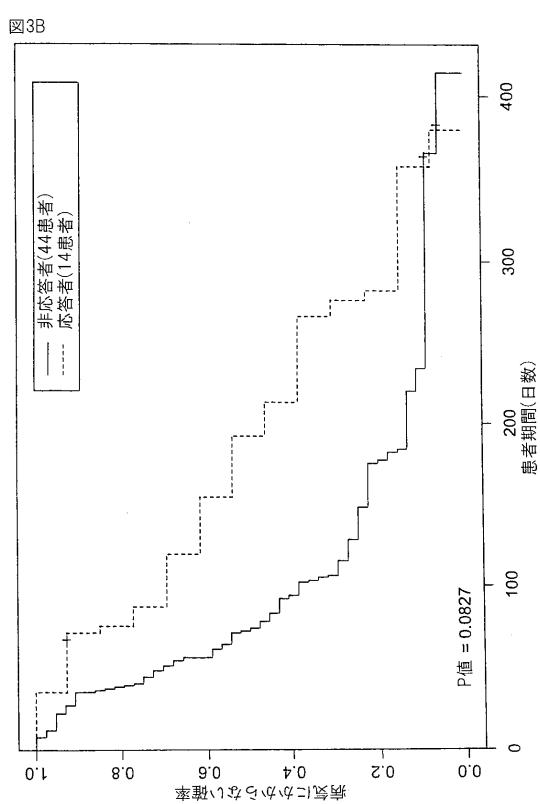
【図2】



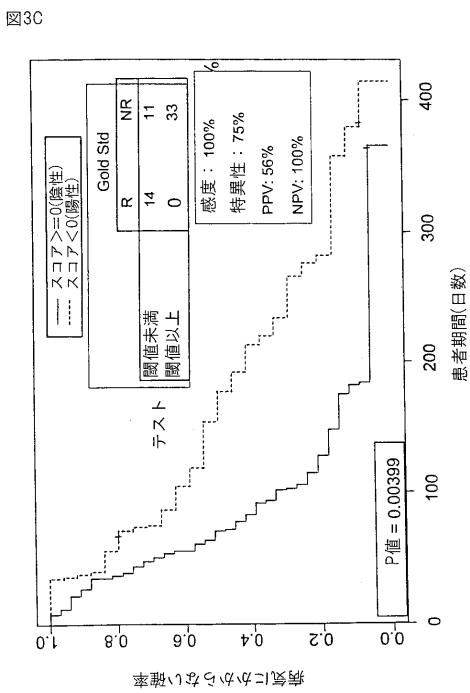
【図3A】



【図3B】



【図3C】



【配列表】

2005034151000001.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 35/02	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ミッチ ラポーニ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 92101, サン デイエゴ, ケットナー ブールバード ナンバー 408 1750

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 CA09 CA12 HA12
4B063 QA19 QQ02 QQ53 QQ79 QQ96 QR08 QR32 QR42 QR48 QR55
QR62 QS25 QS33 QS34 QX01
4C084 AA19 MA16 MA17 MA22 MA23 MA34 MA35 MA37 MA41 MA52
MA55 MA56 MA66 ZB262 ZB272 ZC202
4C086 AA01 AA02 BC38 CB05 GA07 GA16 MA01 MA02 MA04 NA05
ZB26 ZB27 ZC20

【外國語明細書】

2005034151000001.pdf