

(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2015-512630

(P2015-512630A)

(43) 公表日 平成27年4月30日(2015.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G 0 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 P	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/704 (2006.01)	A 6 1 K 31/704	4 C 0 8 6
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 112 頁)

(21) 出願番号 特願2015-500494 (P2015-500494)
 (86) (22) 出願日 平成25年3月11日 (2013.3.11)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年11月11日 (2014.11.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/030208
 (87) 国際公開番号 W02013/138237
 (87) 国際公開日 平成25年9月19日 (2013.9.19)
 (31) 優先権主張番号 61/609,723
 (32) 優先日 平成24年3月12日 (2012.3.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513099485
 メモリアル スローン-ケタリング キャンサー センター
 アメリカ合衆国 ニューヨーク 10065, ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1275
 (74) 代理人 100090251
 弁理士 森田 憲一
 (74) 代理人 100139594
 弁理士 山口 健次郎
 (74) 代理人 100185915
 弁理士 長山 弘典
 (74) 代理人 100194973
 弁理士 尾崎 祐朗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性骨髄性白血病の診断、予後、及び治療の方法及び組成物

(57) 【要約】

急性骨髄性白血病の、診断、予後、治療、管理に有用な方法が開示される。1つの方法は、急性骨髄性白血病患者の生存を予測することを伴い、前記方法は、細胞遺伝学的異常、並びにFLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、KRAS、PTEN、p53、HRAS、及びEZH2突然変異の少なくとも1つの存在について、患者から単離された遺伝子サンプルを分析する工程を含む。

Cytogenetic Classification	Mutations		Overall Risk
Normal Karyotype or Intermediate-Risk Cytogenetic Lesions	Any		Favorable
	FLT3-ITD negative	NPM1 and IDH1/2 mutant	Intermediate
	FLT3-ITD negative	ASXL1, MLL-PTD, PHF6, and TET2 wildtype	
	FLT3-ITD negative or positive	CEBPB mutant	
	FLT3-ITD positive	MLL-PTD, TET2, and DNMT3A wildtype, and trisomy 8 negative	Unfavorable
	FLT3-ITD negative	TET2, MLL-PTD, ASXL1 or PHF6 mutant	
Unfavorable	FLT3-ITD positive	TET2, MLL-PTD, DNMT3A mutant or trisomy 8	

FIG. 3a

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

急性骨髄性白血病患者の生存を予測する方法であって、

(a) 細胞遺伝学的異常、並びに F L T 3、N P M 1、D N M T 3 A、N R A S、C E B P A、T E T 2、W T 1、I D H 1、I D H 2、K I T、R U N X 1、M L L - P T D、A S X L 1、P H F 6、K R A S、P T E N、P 5 3、H R A S、及び E Z H 2 遺伝子の少なくとも 1 つにおける変異の存在について、前記患者から分離した遺伝子サンプルを分析する工程と、

(b) (i) 変異が、F L T 3、M L L - P T D、A S X L 1、及び P H F 6 遺伝子の少なくとも 1 つにおいて存在する場合には、前記患者の低い生存を予測する工程、又は (i i) 変異が、I D H 2 R 1 4 0 において存在する、及び / 又は C E B P A において存在する場合には、前記患者の良好な生存を予測する工程と、
を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

(i) F L T 3 - I T D、T E T 2、M L L - P T D、D N M T 3 A、A S X L 1、若しくは P H F 6 遺伝子のいずれにおいても変異が存在しない、

(i i) C E B P A 及び F L T 3 - I T D において変異が存在している、又は

(i i i) F L T 3 - I T D において変異が存在しているが、8 トリソミーが存在しない、

場合には、細胞遺伝学的に中間リスクと定義された A M L 患者の中間の生存を予測する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

(i) F L T 3 - I T D 変異の存在しない患者において、T E T 2、A S X L 1、若しくは P H F 6 の変異又は M L L - P T D が存在している、あるいは、

(i i) 患者が F L T 3 - I T D 変異を有し、そして T E T 2、D N M T 3 A、M L L - P T D における変異又は 8 トリソミーを有する、

場合には、前記患者の良好でない生存を予測する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

中間の生存が、約 1 8 ヶ月 ~ 約 3 0 ヶ月の生存である、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 5】

急性骨髄性白血病患者の生存を予測する方法であって、

(a) 遺伝子サンプル中の F L T 3、N P M 1、D N M T 3 A、N R A S、C E B P A、T E T 2、W T 1、I D H 1、I D H 2、K I T、R U N X 1、M L L - P T D、A S X L 1、P H F 6、K R A S、P T E N、P 5 3、H R A S、及び E Z H 2 遺伝子の少なくとも 1 つの変異の存在について、前記患者の血液又は骨髄からの前記遺伝子サンプルをアッセイする工程と、

(b) F L T 3 - I T D、M L L - P T D、A S X L 1、P H F 6 遺伝子の少なくとも 1 つにおいて変異が存在する場合には、前記患者の低い生存を予測する工程、又は、C E B P A において変異が存在する若しくは I D H 2 の R 1 4 0 において変異が存在する場合には、前記患者の良好な生存を予測する工程と、
を含む、前記方法。

40

【請求項 6】

細胞遺伝学的に中間リスクと定義された、F L T 3 - I T D 変異を有する急性骨髄性白血病の患者の中で、以下：8 トリソミー又は T E T 2、D N M T 3 A、若しくは M L L - P T D の変異、の少なくとも 1 つが、前記患者の有害転帰及び低い全生存に関連している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞遺伝学的に中間リスクと定義された、F L T 3 - I T D 変異を有する急性骨髄性白血病の患者の中で、C E B P A 遺伝子における突異が、前記患者の改善された転帰及び全

50

生存に関連している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

細胞遺伝学的に中間リスクと定義された、I D H 1 / I D H 2 の両方及び N P M 1 変異を有する A M L 患者が、I D H 1 及び I D H 2 の両方が野生型で N P M 1 が変異型である患者と比較して、全生存が改善されている、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

急性骨髄性白血病の患者の中で、I D H 2 R 1 4 0 変異が、改善された全生存と関連している、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

患者の低い又は良好でない生存（不利なリスク）が、約 10 ヶ月と等しい又は 10 ヶ月より短い生存である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 11】

患者の良好な生存が、約 32 ヶ月又はそれ以上の生存である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

急性骨髄性白血病患者の生存を予測する方法であって、
(a) A S X L 1 及び W T 1 遺伝子における変異の存在について、前記患者の血液又は骨髓からの遺伝子サンプルをアッセイする工程と、
(b) 変異した A S X L 1 及び W T 1 遺伝子が検出された場合には、前記患者が、原発性不応性急性骨髄性白血病を有すること又は生ずることを決定する工程と、
を含む、前記方法。

20

【請求項 13】

急性骨髄性白血病患者の高用量療法に対する応答性を決定する方法であって、
(a) D N M T 3 A 及び N P M 1 遺伝子における変異の存在並びに M L L の転座の存在について、前記患者から分離した遺伝子サンプルを分析する工程と、
(b) (i) D N M T 3 A 若しくは N P M 1 遺伝子における変異又は M L L の転座が存在する場合には、前記患者が高用量療法に対して応答するであろう患者であると同定する工程；あるいは、
(i i) D N M T 3 A 若しくは N P M 1 における変異又は M L L の転座が非存在の場合には、前記患者が、高用量療法に対して良好に応答しないであろう患者であると同定する工程と、
を含む、前記方法。

30

【請求項 14】

急性骨髄性白血病を患っている患者が、標準用量の化学療法と比較して高用量の化学療法に対してより良好に応答するかどうかを予測する方法であって、
(a) 前記患者の血液又は骨髓から得られた D N A サンプルを得る工程と、
(b) D N M T 3 A 及び N P M 1 遺伝子の変異状態並びに M L L 転座の存在を決定する工程と、
(c) 前記サンプルの D N M T 3 A 若しくは N P M 1 の変異又は M L L 転座が陽性である場合には、被験者が、標準用量の化学療法と比較して、高用量の化学療法に対してより良好に応答することを予測する工程；あるいは、
前記サンプルが D N M T 3 A 若しくは N P M 1 遺伝子の変異及び M L L 転座が存在しない野生型である場合には、被験者が、標準用量の化学療法と比較して、高用量の化学療法に対してより非応答性であることを予測する工程と、
を含む、前記方法。

40

【請求項 15】

高用量のダウノルビシン又は薬学的に許容されるその塩、溶媒和物、若しくはそれらの水和物を用いた治療に対する応答性について、急性骨髄性白血病患者をスクリーニングする方法であって、
前記個体から急性骨髄性白血病細胞を含む遺伝子サンプルを得る工程と；

50

前記サンプルをアッセイし、そしてDNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座の存在を検出する工程と；

DNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座を発見したことと、前記急性骨髄性白血病患者が、高用量のダウノルビシン又は薬学的に許容されるその塩、溶媒和物、若しくはそれらの水和物に対して、変異がない野生型コントロールと比較して、より感受性であることを相互に関連付ける工程と、

を含む、前記方法。

【請求項16】

DNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座が検出された場合には、化学療法後における、前記患者の急性骨髄性白血病再発リスクが低いことを予測する工程をさらに含む、請求項15に記載の方法。

10

【請求項17】

ヒトが、急性骨髄性白血病が生じる又は急性骨髄性白血病が再発する、増加された遺伝的リスクを有するかどうかを決定する方法であって、

(a) FLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及びEZH2の少なくとも1個の遺伝子変異の存在について、前記ヒトの血液又は骨髄から分離された遺伝子サンプルを分析する工程と；

(b) (i) 患者がFLT3-ITD変異を有しないときに、TET2、MLL-PTD、ASXL1、及びPHF6遺伝子の少なくとも1つにおいて変異が検出された場合には、又は(ii) 患者がFLT3-ITD変異を有するときに、TET2、MLL-PTD、及びDNMT3A遺伝子の少なくとも1つにおける変異若しくは8トリソミーが検出された場合には、細胞遺伝学的に中間リスクAMLと定義された前記個体が、前記遺伝子群中に前記の遺伝子変異を有しないコントロールのヒトと比較して、急性骨髄性白血病が生じる又は急性骨髄性白血病が再発する増加された遺伝的リスクを有することを決定する工程と、

20

を含む、前記方法。

【請求項18】

急性骨髄性白血病患者の個人用のゲノムプロファイルの製造方法であって、

(a) 患者からの骨髄吸引液又は血液サンプルから抽出した単核細胞を、遺伝子突然変異解析に供する工程と；

(b) 前記サンプルをアッセイし、そして前記細胞中のFLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及びEZH2からなる群から選択される遺伝子における1つ又はそれ以上の変異、並びに細胞遺伝学的異常を検出する工程と；

遺伝子変異分析により得られたデータの報告を作り出す工程と、

を含み、前記報告は、患者の生存可能性の予測又は治療に対する応答の予測を含んでいる、前記方法。

30

【請求項19】

ASXL1、DNMT3A、NPM1、PHF6、WT1、TP53、EZH2、CEBPA、TET2、RUNX1、PTEN、FLT3、HRAS、KRAS、NRAS、KIT、IDH1、及びIDH2からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子における変異検出用の手段；並びに、前記遺伝子の変異の1つ又はそれ以上の存在に基づく、推奨される治療のための指示書を含む、AML患者の治療決定用のキット。

40

【請求項20】

DNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座の存在に基づく、患者のために推奨される治療のための指示書が、推奨される治療として高用量ダウノルビシンを示す、請求項31に記載のキット。

【請求項21】

50

急性骨髄性白血病の患者を、治療、予防、又は管理する方法であって、

(a) DNMT3A 及び NPM1 遺伝子における変異の存在について、並びに MLL の転座の存在について、前記患者から分離した遺伝子サンプルを分析する工程と；

(b) DNMT3A 若しくは NPM1 における変異又は MLL の転座が存在する場合には、前記患者が、標準用量療法よりも高用量療法に対して、より良好に応答するであろう患者であると同定する工程と；

(c) 高用量療法を前記患者に投与する工程と、
を含む、前記方法。

【請求項 22】

患者が、細胞遺伝学的分析に基づいて、中間リスクとして特徴付けられる、請求項 5、13、14、又は 21 に記載の方法。

10

【請求項 23】

治療が、アントラサイクリンの投与を含む、請求項 14 又は 21 に記載の方法。

【請求項 24】

高用量療法の投与が、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、及びアドリマイシンからなる群から選択される 1 つ又はそれ以上の高用量アントラサイクリン抗生物質の投与を含む、請求項 14 又は 21 に記載の方法。

【請求項 25】

サンプルが、患者からの骨髄又は血液から抽出した DNA である、請求項 13 又は 21 に記載の方法。

20

【請求項 26】

遺伝子サンプルが、患者からの単核細胞 (MNC) から抽出された DNA である、請求項 13 又は 21 に記載の方法。

【請求項 27】

高用量投与が、約 70 mg/m^2 ~ 約 140 mg/m^2 で投与されたダウノルビシン、又は約 10 mg/m^2 ~ 約 20 mg/m^2 で投与されたイダルビシンである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 28】

患者の急性骨髄性白血病の、治療、予防、又は管理用の方法の使用のための高用量化学療法剤であって、前記方法が、

30

(a) DNMT3A 及び NPM1 遺伝子における変異の存在について、並びに MLL の転座の存在について、前記患者から分離した遺伝子サンプルを分析する工程と；

(b) DNMT3A 若しくは NPM1 における変異又は MLL の転座が存在する場合には、前記患者が、標準用量療法よりも高用量療法に対して、より良好に応答するであろう患者であると同定する工程と；

(c) 高用量療法を前記患者に投与する工程と、
を含む、前記化学療法剤。

【請求項 29】

患者が、細胞遺伝学的分析に基づいて、中間リスクとして特徴付けられる、請求項 28 に記載の使用のための化学療法剤。

40

【請求項 30】

化学療法剤が、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、及びアドリマイシンからなる群から任意で選択されるアントラサイクリンである、請求項 28 又は 29 に記載の化学療法剤。

【請求項 31】

遺伝子サンプルが、患者からの骨髄又は血液から前もって抽出された DNA である、請求項 28 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の、使用のための化学療法剤。

【請求項 32】

遺伝子サンプルが、患者からの単核細胞 (MNC) から前もって抽出された DNA である、請求項 28 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の、使用のための化学療法剤。

50

【請求項 3 3】

高用量投与が、約 70 mg/m^2 ~ 約 140 mg/m^2 で投与されたダウノルビン、又は約 10 mg/m^2 ~ 約 20 mg/m^2 で投与されたイダルビンである、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載の、使用のための化学療法剤。

【請求項 3 4】

急性骨髄性白血病の患者の生存を予測する方法であって、

(a) (i) FLT3、MLL - PTD、ASXL1、及び PHF6 遺伝子の少なくとも 1 つ、加えて、任意で NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及び EZH2 遺伝子の 1 つ又はそれ以上の変異；又は

10

(ii) IDH2 及び / 又は CEBPA 遺伝子の、加えて、任意で FLT3、MLL - PTD、ASXL1、PHF6、NPM1、DNMT3A、NRAS、TET2、WT1、IDH1、KIT、RUNX1、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及び EZH2 遺伝子の 1 つ又はそれ以上の変異；

の存在について、前記患者から分離したサンプルを分析する工程と、

b) (i) FET3、MLL - PTD、ASXL1、及び PHF6 遺伝子の少なくとも 1 つにおいて変異が存在する場合には、前記患者の低い生存を予測する工程、又は (ii) IDH2 R140 に変異が存在し、及び / 又は CEBPA に変異が存在する場合には、前記患者の良好な生存を予測する工程と、

20

を含む、前記方法。

【請求項 3 5】

細胞遺伝学的異常の存在について、サンプルを分析する工程をさらに含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

以下の変異：IDH2 R140 Q が、存在する場合には、患者の良好な生存を予測する工程 (ii) をさらに含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

《関連出願に関する相互参照》

30

【0002】

本出願は、米国仮出願第 61 / 609 , 723 号 (2012 年 3 月 12 日出願) の優先権を主張する。前記出願の全開示は参照することにより本明細書に組み込まれる。

【0003】

《配列表》

【0004】

本出願は配列表を含む。配列表は、EFS - Web を介して ASCII 形式のファイルとして提出され、参照によりその全体が本明細書に取り込まれる。前記 ASCII 形式のファイルは、3314 . 002 AWO __ SL . txt のファイル名で 2013 年 3 月 7 日に作成されており、75 , 356 バイトのサイズである。

40

【0005】

《連邦政府による資金提供を受けた研究》

【0006】

本発明は、米国国立がん研究所物理科学腫瘍学センター (National Cancer Institute Physical Sciences Oncology Center) によって授与された契約番号 U54CA14379801 の下で、米国政府支援によりなされたものである。米国政府は、この発明において一定の権利を有する。

【0007】

《発明の分野》

【0008】

50

本明細書に記載の本発明は、癌の診断、治療、及び管理において有用な方法に関する。本発明の分野は、分子生物学、遺伝学、腫瘍学、臨床診断、バイオインフォマティクスである。特に、本発明の分野は、血液癌の診断、予後、及び治療に関する。

【0009】

《発明の背景》

【0010】

本発明の背景の以下の説明は、本発明の理解の一助として単に提供されるものであり、そして本発明に対する先行技術を記載又は構成すると認めるものではない。

【0011】

先進国において、癌は、心血管疾患 (cardiovascular disease) に続く主要な死因である。米国だけでも、100万人以上が毎年癌と診断され、50万人以上の人々はその結果として、毎年死亡している。アメリカ人3人に1人が、一生の間に癌を発症し、5人に1人が癌で死亡すると推定されている。さらには、癌が、死因の第1位としての心血管疾患を、5年以内に上回ることが予測される。このような事情で、少なからぬ努力が、この疾患の治療及び診断を改善することに向けられる。

【0012】

ほとんどのがん患者は、その原発腫瘍によって死亡するのではない。多くの場合、彼らは、転移：元の腫瘍から身を切り離しそして本体を体中、しばしば離れた部位に移動する悪性細胞によって確立された、広範な複数の腫瘍コロニーにより死亡するのである。血液癌においては、病的細胞 (affected cells) の起源及び疾患の経過に応じて4種類のタイプがある。疾患の経過により、急性又は慢性のいずれかにタイプが分類される。病的細胞は、リンパ芽球性の (lymphoblastic) 又はリンパ性の (lymphocytic) 白血病及び骨髄性の (myeloid) 又は骨髄性の (myelogenous) 白血病などに、タイプをさらに分割する。これらの悪性腫瘍は、患者及び状態の詳細に応じて、予後を変化させる。

【0013】

血液は、主に赤血球 (RBC)、白血球 (WBC)、及び血小板から構成されている。赤血球の機能は体に酸素を運ぶことであり、白血球は我々の体を保護し、血小板は負傷後の血液の凝固を手助けする。これらの細胞型の異常は、疾患の種類にかかわらず、血液癌につながる。血液癌の主なカテゴリーには、急性リンパ性又はリンパ芽球性白血病 (ALL)、慢性リンパ性又はリンパ芽球性白血病 (CLL)、急性骨髄性又は骨髄性白血病 (AML)、及び慢性骨髄性又は骨髄性白血病 (CML) が挙げられる。

【0014】

白血病の場合、癌が血液を作る身体能力と干渉するように、骨髄及び血液自体が攻撃される。患者において最も一般的には、これは疲労、貧血、衰弱、及び骨痛の形で現れる。これは、血液細胞の特定のタイプがカウントされる血液検査で診断される。白血病の治療には、癌を殺すための化学療法や放射線、及び時に必要とされる幹細胞移植のような手段が通常含まれる。前記で概説したように、骨髄性白血病には、2つの群：急性骨髄性白血病 (AML) 及び慢性骨髄性白血病 (CML)、に通常分割される、白血病のいくつかの異なるタイプが存在する。

【0015】

AMLは、骨髄中の骨髄細胞数の増加及び成熟の停止により特徴づけられ、結果として頻繁に造血不全をもたらす。米国では、AMLの年間発生率は100,000人あたり約2.4人であり、そして65歳以上では、100,000人あたり約12.6人と、年齢とともに次第に増加する。改善された治療のアプローチにもかかわらず、AMLの予後は、世界中で非常に悪い。65歳未満の患者の5年生存率は、米国ですら40%未満である。この値は、約10年間15であった。同様に、CMLの予後は、臨床医学の進歩にもかかわらず、大変悪いものであった。

【0016】

急性骨髄性白血病 (AML) は、多様な遺伝子異常と臨床的特徴を有する多くの実態を含む、不均質な疾患 (heterogeneous disorder) である。病因は、比較的少ないタイプ

10

20

30

40

50

の白血病について完全に説明される。細胞遺伝学的に中間の及び高いリスクを有する患者が、AMLの大部分を表している；化学療法ベースの養生法（regimens）は、これらの患者の大部分を治療することに失敗しそして幹細胞移植が頻繁に治療の選択となる。同種幹細胞移植はハイリスクの白血病を有する多くの患者のための選択肢ではないので、これらの白血病の生物学の理解を向上させ、改善した治療法を開発する必要性がある。

【0017】

急性骨髄性白血病の病因学、細胞生理学、及び分子遺伝学が、十分に知られているわけではないので、骨髄性白血病、特に急性骨髄性白血病に対する、効果的な新しい薬剤及び新規治療及び／又は予後診断法の開発が、今日のトランスレーショナルオンコロジー研究（translational oncology research）における主要な焦点となっている。しかしながら、癌の診断及び治療には固有の困難性があり、それらには、とりわけ、癌の多くの異なるサブグループの存在、及び陽性患者の転帰（outcome）の可能性を最大化するための適切な治療戦略における同時変化が含まれる。

10

【0018】

一つの比較的新しいアプローチは、癌の遺伝子プロファイル、悪性の表現型を引き起こす遺伝子における摂動を同定することを目的とした取り組みを調査することである。遺伝子の発現及び変異を含むこれらの遺伝子プロファイルは、正常及び病気の細胞における生物学的プロセスに関する貴重な情報を提供する。しかしながら、効果的な治療の開発と同様に治療及び診断における困難性に導く、遺伝子の「署名（signature）」は、癌により広く異なっている。

20

【0019】

ますます多くの、遺伝子の署名（genetic signatures）が識別され、疾患検出のためのみではなく、予後及び治療の成功見込みの評価用ツールとして利用されている。白血病を含む癌の遺伝的プロファイリングは、癌の管理及び／又は治療に、より効果的なアプローチを提供することができる。本発明の背景においては、骨髄芽球の悪性表現型への進行に関与する、特定の遺伝子及びそれらの遺伝子産物並びに遺伝子群及びそれらの遺伝子群産物は、まだほとんど知られていない。このように、急性骨髄性白血病及び他の血液の癌の治療及び診断のための改良された治療薬及びツールを提供するための取り組みにおいて、急性骨髄性白血病の遺伝子プロファイルをより理解することに対しては、大きな必要性がある。急性骨髄性白血病を診断するための及びこの疾患に罹患した患者の予後を決定するための改良された方法に対して、大きな必要性がある。

30

【0020】

《発明の概要》

【0021】

本開示の一観点は、急性骨髄性白血病患者の生存を予測する方法であり、前記方法は、細胞遺伝学的異常、並びにFLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及びEZH2遺伝子の少なくとも1つにおける変異の存在について、前記患者から分離した遺伝子サンプルを分析する工程と、（i）変異が、FLT3、MLL-PTD、ASXL1、及びPHF6遺伝子の少なくとも1つにおいて存在する場合には、前記患者の低い生存（poor survival）を予測する工程、又は（ii）変異が、IDH2R140において存在する、及び／又は変異が、CEBPAにおいて存在する場合には、前記患者の良好な生存（favorable survival）を予測する工程と、を含む。1つの実施態様では、前記方法は、（i）FLT3-ITD、TET2、MLL-PTD、DNMT3A、ASXL1、若しくはPHF6遺伝子のいずれにおいても変異が存在しない場合、（ii）FLT3-ITD変異の存在下において、CEBPA変異が存在している場合、又は（iii）FLT3-ITD変異は存在しているが、8トリソミーが存在しない、場合には、細胞遺伝学的に中間リスクと定義されたAML患者の中間の生存を予測する工程を、さらに含む。1つの実施態様では、前記方法は、（i）FLT3-ITD変異の存在しない患者において、TET2、ASXL1、

40

50

若しくは P H F 6 の変異又は M L L - P T D が存在している場合、あるいは (i i) 患者が、 F L T 3 - I T D 変異を有し、そして T E T 2、 D N M T 3 A、 M L L - P T D における変異又は 8 トリソミーを有する場合には、前記患者の良好でない生存 (unfavorable survival) を予測する工程を、さらに含む。

【 0 0 2 2 】

文脈にその他の要求がない場合には、本発明のこの及び他の観点において、前記変異は下記のタイトル「 A M L 患者において 1 8 遺伝子の配列で同定される、特定の体細胞変異及びこれらの変異の特性」の表に記載されたうちの任意の 1 つである。

【 0 0 2 3 】

1 つの実施態様では、サンプルは D N A であり、患者からの骨髓又は血液から抽出される。抽出はヒストリカル (historical) であってもよく、そして本明細書における全ての態様において、サンプルは本発明で前もって提供されたサンプルを活用してもよく、すなわち、抽出又は分離が前記方法それ自体の一部でなくともよい。関連する実施態様において、遺伝子サンプルは、患者からの単核細胞 (M N C) から単離された D N A である。1 つの実施態様では、患者の低い又は良好でない生存は、約 1 0 ヶ月以下の生存である。別の実施態様では、中間の生存の患者は、約 1 8 ヶ月 ~ 約 3 0 ヶ月の生存である。別の実施態様では、患者の良好な生存は約 3 2 ヶ月以上の生存である。

10

【 0 0 2 4 】

一観点では、本開示は、急性骨髄性白血病患者の生存を予測する方法であり、前記方法は、遺伝子サンプル中の遺伝子 F L T 3、 N P M 1、 D N M T 3 A、 N R A S、 C E B P A、 T E T 2、 W T 1、 I D H 1、 I D H 2、 K I T、 R U N X 1、 M L L - P T D、 A S X L 1、 P H F 6、 K R A S、 P T E N、 P 5 3、 H R A S、及び E Z H 2 の少なくとも 1 つの変異の存在について、前記患者の血液又は骨髓からの前記遺伝子サンプルをアッセイする工程と； F L T 3 - I T D、 M L L - P T D、 A S X L 1、及び P H F 6 遺伝子の少なくとも 1 つにおいて変異が存在する場合には、前記患者の低い生存を予測する工程、又は、変異が C E B P A において若しくは I D H 2 の R 1 4 0 において存在する場合には、前記患者の良好な生存を予測する工程と、を含む。1 つの実施態様において、患者は、細胞遺伝学的分析に基づき中間リスクとして特徴付けられる。

20

【 0 0 2 5 】

1 つの実施態様において、細胞遺伝学的に中間リスクと定義された、 F L T 3 - I T D 変異を有する急性骨髄性白血病の患者の中で、以下： 8 トリソミー又は T E T 2、 D N M T 3 A、若しくは M L L - P T D の変異の少なくとも 1 つは、前記患者の有害転帰及び低い全生存に関連している。別の実施態様において、細胞遺伝学的に中間リスクと定義された、 F L T 3 - I T D 変異を有する急性骨髄性白血病の患者の中で、 C E B P A 遺伝子における突異は、前記患者の改善された転帰及び全生存に関連している。1 つの実施態様において、細胞遺伝学的に中間リスクと定義された、 I D H 1 / I D H 2 の両方及び N P M 1 変異を有する A M L 患者においては、 I D H 1 及び I D H 2 の両方が野生型で N P M 1 が変異型である患者と比較して、全生存が改善されている。1 つの実施態様において、急性骨髄性白血病の患者の中で、 I D H 2 R 1 4 0 変異は、改善された全生存と関連している。患者の低い又は良好でない生存 (不利なリスク) は、1 つの例において、約 1 0 ヶ月以下の生存である。患者の良好な生存は、1 つの例において、約 3 2 ヶ月以上の生存である。

30

40

【 0 0 2 6 】

本開示の一観点は、急性骨髄性白血病患者の生存を予測する方法であり、前記方法は、 A S X L 1 及び W T 1 遺伝子における変異の存在について、前記患者の血液又は骨髓からの遺伝子サンプルをアッセイする工程と；変異した A S X L 1 及び W T 1 遺伝子が検出された場合には、原発性不応性急性骨髄性白血病 (primary refractory acute myeloid leukemia) を有すること又は生ずることを決定する工程と、を含む。

【 0 0 2 7 】

本開示の別の観点は、急性骨髄性白血病患者の高用量療法に対する応答性を決定する方

50

法であり、前記方法は、DNMT3A及びNPM1遺伝子における変異の存在、並びにMLLの転座の存在について、前記患者から分離した遺伝子サンプルを分析する工程と；(i) DNMT3A若しくはNPM1遺伝子における変異又はMLLの転座が存在する場合には、前記患者が、高用量療法に対してより良好に応答するであろう患者であると同定する工程、あるいは(ii) DNMT3A若しくはNPM1における変異、又はMLLの転座が非存在である場合には、前記患者が、高用量療法に対して非応答性の患者であると同定する工程と、を含む。

【0028】

1つの実施態様において、治療は、アントラサイクリンの投与を含む。一例において、アントラサイクリンは、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、及びアドリマイシンからなる群から選択される。特定の例において、アントラサイクリンはダウノルビシンである。1つの実施態様において、高用量投与は、ダウノルビシンを、体表面積の平方メートル当たり60mg(60mg/m²)又はそれ以上、3日間毎日投与される。特定の実施態様において、高用量投与は、ダウノルビシンを、体表面積の平方メートル当たり約90mg(90mg/m²)又はそれ以上、3日間毎日投与される。1つの実施態様において、高用量ダウノルビシンは、約70mg/m²～約140mg/m²で投与される。特定の実施態様において、高用量ダウノルビシンは、約70mg/m²～約120mg/m²で投与される。関連する実施態様において、この高用量投与は、3日間毎日与えられ、すなわち、例えば総量約300mg/m²を3日間にわたり(3×100mg/m²)与えられる。別の例において、この高用量は、2～6日間毎日投与される。他の臨床的状況では、中間用量のダウノルビシンが投与される。1つの実施態様において、中間用量のダウノルビシンは、約60mg/m²で投与される。1つの実施態様において、中間用量のダウノルビシンは、約30mg/m²～約70mg/m²で投与される。さらに、関連するアントラサイクリンは、イダルビシンであり、1つの実施態様において、約4mg/m²～約25mg/m²で投与される。1つの実施態様において、高用量イダルビシンは、約10mg/m²～約20mg/m²で投与される。1つの実施態様において、中間用量イダルビシンは、約6mg/m²～約10mg/m²で投与される。特定の実施態様において、イダルビシンは、約8mg/m²の用量で5日間毎日投与される。別の例において、この中間用量は、2～10日間毎日投与される。

【0029】

一観点において、本開示は、急性骨髄性白血病を患っている患者が、標準用量の化学療法と比較して高用量の化学療法に対してより良好に応答するかどうかを予測する方法であり、前記方法は、前記患者の血液又は骨髄から得られたDNAサンプルを得る工程と；DNMT3A及びNPM1遺伝子の変異状態、並びにMLL転座の存在を決定する工程と；前記サンプルのDNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座が陽性である場合には、被験者が、標準用量の化学療法と比較して高用量の化学療法に対してより良好に応答するかどうかを予測する工程、あるいは、前記サンプルがDNMT3A若しくはNPM1遺伝子の変異及びMLL転座が存在しない野生型である場合には、被験者が、標準用量の化学療法と比較して高用量の化学療法に対して非応答性であることを予測する工程と、を含む。

【0030】

本開示の一観点は、高用量のダウノルビシン又は薬学的に許容されるその塩、溶媒和物、若しくはそれらの水和物を用いた治療に対する応答性について、急性骨髄性白血病患者をスクリーニングする方法であり、前記方法は：前記個体から急性骨髄性白血病細胞を含む遺伝子サンプルを得る工程と；前記サンプルをアッセイし、そしてDNMT3A若しくはNPM1の変異及びMLL転座の存在を検出する工程と；DNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座を発見したことで、前記急性骨髄性白血病患者が、高用量のダウノルビシン又は薬学的に許容されるその塩、溶媒和物、若しくはそれらの水和物に対して、変異がない野生型コントロールと比較して、より良好に応答することを相互に関連付け

る工程と、を含む。1つの実施態様では、前記方法は、DNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座が検出された場合には、化学療法後における、前記患者の急性骨髄性白血病再発リスクが低いことを予測する工程を、さらに含む。

【0031】

本開示の別の観点は、ヒトが急性骨髄性白血病が生じる又は急性骨髄性白血病が再発する増加された遺伝的リスクを有するかどうかを決定する方法であり、前記方法は、FLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及びEZH2の少なくとも1個の遺伝子変異の存在について、前記ヒトの血液又は骨髄から分離された遺伝子サンプルを分析する工程と；(i)患者がFLT3-ITDを有しないときに、TET2、MLL-PTD、ASXL1、及びPHF6遺伝子の少なくとも1つにおいて変異が検出された場合には、又は(ii)患者がFLT3-ITDを有するときに、TET2、MLL-PTD、及びDNMT3A遺伝子の少なくとも1つにおける変異若しくは8トリソミーが検出された場合には、細胞遺伝学的に中間リスクAMLと定義された前記個体が、前記遺伝子群中に前記の遺伝子変異を有しないコントロールのヒトと比較して、急性骨髄性白血病が生じる又は急性骨髄性白血病が再発する、増加された遺伝的リスクを有することを決定する工程と、を含む。

10

【0032】

一観点において、本開示は、急性骨髄性白血病患者の個人用のゲノムプロファイル(personalized genomics profile)の製造方法であって、前記方法は：患者からの骨髄吸引液又は血液サンプルから抽出した単核細胞を、遺伝子突然変異解析に供する工程と；前記サンプルをアッセイし、そして前記細胞中のFLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及びEZH2からなる群から選択される遺伝子における1つ又はそれ以上の変異、並びに細胞遺伝学的異常を検出する工程と；遺伝子変異分析により得られたデータの報告を作り出す工程と、を含み、前記報告は、患者の生存可能性の予測又は治療に対する応答の予測を含む。

20

【0033】

一観点において、本開示は、AML患者の治療決定用のキットであり、前記キットは、ASXL1、DNMT3A、NPM1、PHF6、WT1、TP53、EZH2、CEBPA、TET2、RUNX1、PTEN、FLT3、HRAS、KRAS、NRAS、KIT、IDH1、及びIDH2からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子における変異検出用の手段；並びに、前記遺伝子の変異の1つ又はそれ以上の存在に基づく、推奨される治療のための指示書、を含む。一例では、DNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座の存在に基づく、患者のために推奨される治療のための指示書は、推奨される治療として高用量ダウノルビシンを示す。

30

【0034】

本開示の一観点は、急性骨髄性白血病患者を、治療、予防、又は管理する方法であり、前記方法は、DNMT3A及びNPM1遺伝子における変異の存在について、並びにMLLの転座の存在について、前記患者から分離した遺伝子サンプルを分析する工程と；DNMT3A若しくはNPM1における変異又はMLLの転座が存在する場合には、前記患者が、標準用量療法よりも高用量療法に対して、より良好に応答するであろう患者であると同定する工程と；高用量療法を前記患者に投与する工程と、を含む。患者は、一例においては、細胞遺伝学的分析に基づいて、中間リスクとして特徴付けられる。一例においては、治療は、アントラサイクリンの投与を含む。関連する実施態様において、高用量療法の投与は、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、及びアドリマイシンからなる群から選択される1つ又はそれ以上の高用量アントラサイクリン抗生物質を投与することを含む。

40

【0035】

本開示の一観点は、急性骨髄性白血病患者の生存を予測する方法に関し、前記方法は：

50

(a) (i) F L T 3、M L L - P T D、A S X L 1、及び P H F 6 遺伝子の少なくとも 1 つ、加えて、任意で N P M 1、D N M T 3 A、N R A S、C E B P A、T E T 2、W T 1、I D H 1、I D H 2、K I T、R U N X 1、K R A S、P T E N、P 5 3、H R A S、及び E Z H 2 遺伝子の 1 つ若しくはそれ以上の変異、又は (i i) I D H 2 及び / 又は C E B P A 遺伝子の、加えて、任意で F L T 3、M L L - P T D、A S X L 1、P H F 6、N P M 1、D N M T 3 A、N R A S、T E T 2、W T 1、I D H 1、K I T、R U N X 1、K R A S、P T E N、P 5 3、H R A S、及び E Z H 2 遺伝子の 1 つ若しくはそれ以上の変異の存在について、前記患者から分離したサンプルを分析する工程と (b) (i) F E T 3、M L L - P T D、A S X L 1、及び P H F 6 遺伝子の少なくとも 1 つにおいて変異が存在する場合には、前記患者の低い生存を予測する工程、又は (i i) I D H 2 R 1 4 0 に変異が存在し、及び / 又は C E B P A に変異が存在する場合には、前記患者の良好な生存を予測する工程と、を含む。前記方法は、細胞遺伝学的異常の存在について、サンプルを分析する工程を、さらに含む。前記方法は、以下の変異、すなわち I D H 2 R 1 4 0 Q が存在する場合には、患者の良好な生存を予測する工程を含む。

10

【 0 0 3 6 】

本開示の他の観点は、本明細書に記載の方法における使用のための化学療法剤、又は本明細書に記載の方法で使用された場合の薬剤の調製におけるそれらの使用を含む。

【 0 0 3 7 】

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 8 】

20

図 1 は、A M L の変異の複雑さを示している。デノボ A M L 患者 (de novo AML patients) における変異の相対頻度及び対の共起 (pairwise co-occurrence) を示す C i r c o s 図は、E C O G プロトコル E 1 9 0 0 (パネル A) に登録された。弧長は、第一遺伝子における変異の頻度に相当し、そしてリボンの幅は、第二遺伝子においてもまた変異を有する患者の割合に相当する。変異の対の共起は、一度のみ示され、時計回り方向で第一遺伝子から始まる。対の共起の変異のみが、明確にするために符号化されるので、弧の相対的なサイズ、及び各変異のサブセット内の空きスペースによって表される単一の変異対立遺伝子を有する患者の正しい比率が維持されるように、弧長を調整した。パネル A には、試験コホート (cohort) における変異の頻度が含まれる。パネル B 及び C にはそれぞれ、D N M T 3 A と F L T 3 変異型の患者における変異事象を示している。

30

【 0 0 3 9 】

図 2 は、中間リスク A M L の多変量リスク分類 (multivariate risk classification) を示している。全生存 (O S) のカプラン・マイヤー推定値は、中間リスク A M L のリスク層別化のために示されている (p 値はすべての曲線の比較を表す)。F L T 3 - I T D 陰性については、中間リスクの A M L (パネル A) は 3 種類のジェノタイプがある：T E T 2 又は A S X L 1 又は P H F 6 又は M L L - P T D 変異により定義される高 (poor)、I D H 1 又は I D H 2 変異、及び N P M 1 変異により定義される低 (good)、並びに、他の全てのジェノタイプで定義される中間 (intermediate) である。F L T 3 - I T D 陽性については、中間リスク A M L (パネル B) には C E B P A 変異ジェノタイプがあり、T E T 2 若しくは D N M T 3 A 若しくは M L L - P T D 変異又は 8 トリソミー及び他の全てのジェノタイプにより定義される高 (poor) がある。

40

【 0 0 4 0 】

図 3 は、総合的遺伝分析に基づいた修正された A M L リスク層別化を示している。図 3 A は、統合された細胞遺伝学的及び変異分析に基づいた、修正された A M L リスク層別化を示している。最終的な全生存のリスク群は右側にある。3 B は、A M L 患者の試験コホート (p 値は、すべての曲線の比較を表す) におけるリスク層別化に対する統合された変異分析の影響を示している。黒い曲線は変化しなかった細胞遺伝学的リスク群の患者を示している。緑色の曲線は、中間リスクから良好なリスク (favorable-risk) に再分類された患者を示している。赤い曲線は中間リスクから良好でないリスク (unfavorable-risk) に再分類された患者を示している。図 3 C は、E 1 9 0 0 試験からの 1 0 4 サンプルの独

50

立したコホートにおける遺伝予後スキーマの再現性を確認している（ p 値は、全ての曲線の比較を示す）。

【0041】

図4は、高用量ダウノルビシン導入化学療法（high-dose Daunorubicin induction chemotherapy）に対する応答の分子決定要因を示している。カプラン・マイヤー推定値は、高用量又は標準用量ダウノルビシンを受けた患者のDNMT3A変異状態（パネルA）及びDNMT3A状態に応じて、コホート全体における全生存を推定する（パネルB）。治療群に応じた患者における全生存が、DNMT3A若しくはNPM1変異又はMLL転座を有する患者（パネルC）、及びDNMT3A若しくはNPM1変異又はMLL転座を欠く患者（パネルD）において示される。

10

【0042】

図5は、急性骨髄性白血病（AML）患者の、リスク層別化を改良する総合的な変異プロファイリング及び臨床管理を示している。変異プロファイリングの使用により、著しく異なる予後を有する、細胞遺伝学的に中間リスクと定義された患者のサブセットが詳細に説明され、そして良好な又は良好でないカテゴリーの患者のかなりの割合を再配分する（A）。加えて、変異プロファイリングは、高用量のアントラサイクリン導入化学療法により改善された転帰を有するAML患者のサブセットを定義して識別する（B）。

【0043】

図6は、各遺伝子のCircos図を示す。

【0044】

図7は、細胞遺伝学的に、良好なリスク（パネルA）、中間リスク（パネルB）、及び良好でないリスク（パネルC）であると定義されたサブグループ内の患者における、全ての遺伝子及びいくつかの関連する細胞遺伝学的異常についてのCircos図を示している。2つより多い変異を有し、細胞遺伝学的に各リスクカテゴリーに属する患者の割合は、パネルDに示される。2つ又はそれ以上の体細胞変異を有する中間リスク患者の割合は、他の2つの細胞遺伝学的なサブグループにおける患者よりも有意に大きい。

20

【0045】

図8は、IDH1、IDH2、TET2、及びWT1変異の相互排他性を示すCircos図である。

【0046】

図9は、変異状態に応じた、OSのカプラン・マイヤー推定値を示している：データはPHF6（パネルA）及びASXL1（パネルB）の変異状態に応じて、コホート全体における全生存について示されている。

30

【0047】

図10は、コホート全体における、IDH2（パネルA）、IDH2 R140（パネルB）、IDH1（パネルC）及びIDH2 R172対立遺伝子（パネルD）について示されるカプラン・マイヤー生存推定値を示している。パネルEは、両方のIDH2対立遺伝子を示し、一方パネルFは、3つの全てのIDH対立遺伝子を示している（ p 値はすべての曲線の比較を表す）。これらのデータは、IDH2 R140対立遺伝子がコホート全体における予後関連性を有している唯一のIDH対立遺伝子であることを示している。

40

【0048】

図11は、KIT変異を有しコア結合因子の変異を有する試験コホートからの患者における、KIT野生型の患者に対する全生存のカプラン・マイヤー推定値を示している。コア結合因子の変異を有する患者（ $t(8;21)$ 、 $inv(16)$ 、又は $t(16;16)$ を有する患者）が試験された場合には、KIT変異は全生存の相違とは関連していなかった（A）。対照的に、KIT変異は、特に $t(8;21)$ を有する患者の全生存における有意な減少と関連していた（B）。KIT変異は、 $inv(16)$ 、又は $t(16;16)$ を有する患者の不利な全生存と関連していた。

【0049】

50

図12は、コホートにおいて細胞遺伝学的に中間リスクであると定義された患者における、TET2についての Kaplan-Meier 生存推定値を示している。

【0050】

図13は、コホートにおいて細胞遺伝学的に中間リスクであると定義された NPM1 変異患者についての Kaplan-Meier 生存推定値を示している。付随の IDH 変異を有するもののみが、生存が改善されている。

【0051】

図14は、図3で正常核型の患者についてのみ中間リスク AML と示された、FLT3-ITD の野生型 (A) 及び変異型 (B) のリスク分類スキームを示している。

【0052】

図15は、移植なし (A)、自家移植 (B)、及び同種異系移植 (c) の寛解後療法 (post-remission therapy) にかかわらず、転帰を予測する変異予後スキームを示している (p 値はすべての曲線の比較を表す)。曲線は細胞遺伝学及び変異解析を統合し、全体的なリスクカテゴリーを表すことに注意する (図3Aの最後の列に示されているように)。

【0053】

図16は、高用量又は標準用量ダウノルブチンを与えられている患者における、DNMT3A 変異状態 (パネル A 及び B)、MLL 転座状態 (パネル C 及び D)、又は NPM1 変異状態 (パネル E 及び F) に応じたコホート全体の Kaplan-Meier 推定値を示している。治療群に応じた患者の全生存が、DNMT3A 変異体 (パネル A) 及び野生型 (パネル B) の患者で示されている。パネル C は、高用量又は標準用量ダウノルブチンを与えられている、MLL 転座を有する患者の全生存を示し、一方で、パネル D は、ダウノルブチン用量に応じた、MLL 転座を有しない患者の全生存を示す。治療群に応じた患者の全生存が、同様に NPM1 変異体 (パネル E) 及び野生型 (パネル F) の患者で示されている。

【0054】

表1は、ECOG E1900 試験からの試験、検証、及びコホート全体におけるサンプルのベースライン特性を示す。

【0055】

表2は、総合的遺伝子解析に利用したゲノム DNA プライマー配列を示す。全てのプライマー配列は M13F2 / M13R2 タグで表示される。

【0056】

表3は、試験コホートで同定された全ての変異についての比例ハザード (proportional hazards) の検定の p 値を示している。

【0057】

表4は、全体の及び各細胞遺伝学的リスク群内の、ECOG E1900 コホートにおける患者の遺伝子配列の変異頻度を示している。

【0058】

表5は、ECOG E1900 試験からのデノボ AML を有する AML 患者 398 人の試験コホートにおける、体細胞変異及び細胞遺伝学的異常の共起を示している。

【0059】

表6は、全ての遺伝子異常間の対の相関関係を示している。

【0060】

表7は、頻繁に共起する遺伝子異常を示している。

【0061】

表8は、相互に排他的な遺伝子異常を示している。

【0062】

表9は、ECOG E1900 コホートにおける、全生存に対する個々の遺伝子変異の影響の単変量解析を示している。

【0063】

表10は、ECOG E1900 コホートにおける、中間リスク群に対する個々の遺伝

10

20

30

40

50

子変異の単変量解析を示す。

【0064】

表11は、表示された各遺伝的リスクカテゴリーの頻度と患者数の、総合的遺伝分析に基づいて改訂されたAMLリスク層別化を示している。

【0065】

表12は、遺伝予後スキーマが試験コホートにおける治療に関連した死亡率及び化学療法耐性、並びに分析されたECOG E1900患者のコホート全体とは無関係であることを示している。

【0066】

表13は、AML患者の遺伝子型に基づいた、ダウノルビシン導入化学療法の高用量対標準用量の応答差を示している。

【0067】

発明の詳細な説明

【0068】

本発明の理解を容易にするために、以下の定義が提供される。他に定義されない用語は、当該技術分野において一般に受け入れられるように、それらの意味の1つ又は複数を与えられるべきである、と一般に理解されるべきである。本明細書で使用する用語は特定の態様のみを記載する目的のためであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【0069】

本発明の実施において、分子生物学における多くの従来技術が使用される。これらの技術は、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition, J.F. Sambrook and D.W. Russell, ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001、及びDNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual. D. Bowtell and J. Sambrook, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002により詳細に説明されている。標準のプロトコルに加えて、マイクロアレイプラットフォーム使用の及びサンプル調製のための製造業者の取扱説明書を含む、哺乳動物細胞の変異分析における当業者により使用され及び知られる標準的なプロトコルは、参照により本明細書に組み込まれる。

【0070】

以下の説明において、多数の用語が広く使用されている。以下の定義は発明の理解を容易にするために提供される。特に説明のない限り、「a」、「an」、「the」、及び「at least one」は、互換的に使用され、1つ又は複数を意味している。

【0071】

用語「癌」、「癌の」、又は「悪性の」は、典型的には、腫瘍細胞の無秩序な増殖を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を意味する又は記載する。血液癌の例としては、急性骨髄性白血病があるが、これに限定されない。

【0072】

本明細書で使用する用語「診断する」は、疾患又は障害の兆候及び症状の評価により、哺乳動物における疾患若しくは状況又は疾患若しくは状態の原因を決定又は同定するプロセス又は行動を意味する。通常、疾患又は障害の診断は、疾患の指標となる因子及び/又は症状の評価の1つ以上に基づいている。つまり、診断は、疾患又は状態の存在又は非存在の指標である、因子の存在、非存在、又は量に基づいて行うことができる。特定の疾患の診断用の指標になると考えられる各々の要素又は症状は、前記特定の疾患に対して排他的である必要はない；すなわち、診断要素又は症状から推測することができる鑑別診断(differential diagnoses)が存在する可能性がある。同様に、特定の疾患の指標である要素又は症状が特定の疾患を有しない個体において存在している事例が存在する可能性がある。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 3 】

本明細書で使用される用語「発現プロファイル (Expression profile)」は、ゲノム発現プロファイルを意味することができる。プロファイルは核酸配列決定用の任意の便利な手段、例えば、マイクロRNA、標識マイクロRNA、増幅マイクロRNA、cRNAなどの定量的ハイブリダイゼーション、定量的PCR、定量用EISAなどであることができる。被験者又は患者の腫瘍サンプル、例えば、細胞又はその回収物、例えば組織が、アッセイされる。サンプルは、当該技術分野で知られている任意の便利な方法によって収集される。

【 0 0 7 4 】

本明細書で使用される「遺伝子」は、転写及び／又は翻訳調節配列及び／又はコード領域、及び／又は非翻訳配列（例えば、イントロン、5' - 及び3' - 非翻訳配列）を含む、天然の（例えば、ゲノムの）遺伝子であることができる。遺伝子のコード領域は、アミノ酸配列又は機能的RNA、例えばtRNA、rRNA、触媒RNA、siRNA、miRNA、若しくはアンチセンスRNAをコードするヌクレオチド配列であることができる。用語「遺伝子」は、当該技術分野において理解されるような意味を持っている。しかしながら、「遺伝子」は当該技術分野において様々な意味を有すると当業者に理解されることが好ましいであろう。それらのいくつかには、遺伝子調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサーなど）及び／又はイントロン配列が含まれ、そして他の物はコード配列に限定される。さらに、「遺伝子」の定義は、タンパク質をコードせず、むしろ機能性RNA分子、例えばtRNAをコードする核酸への言及を含むことが、理解されるであろう。明確化の目的のために、本出願で使用される用語「遺伝子」は、タンパク質をコードする核酸の一部分を一般に指すことを、私たちは注記する；この用語は、必要に応じて調節配列を包含することができる。この定義は、非タンパク質コード発現単位に対する「遺伝子」という用語の適用を排除せず、むしろ、ほとんどの場合、この文書で使用される用語は、タンパク質をコードする核酸を指すことを明確にすることを意図している。

【 0 0 7 5 】

治療 (treatment) 又は治療 (therapy) の目的のための「哺乳動物」とは、ヒト、家畜及び農場動物、並びに動物園の、スポーツ用の、又はペット用の動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを含む哺乳動物として分類される任意の動物を意味する。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【 0 0 7 6 】

「マイクロアレイ」は、基板上の、ハイブリダイズ可能なアレイエレメント、好ましくはポリヌクレオチドプローブの規則正しい配列を意味する。

【 0 0 7 7 】

本発明の方法を実施するための治療剤としては、本明細書において開示若しくは同定された遺伝子発現の若しくは活性の又はそのタンパク質への翻訳の阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。「阻害剤」は、化学的な又は生理学的な反応又は応答を防止又は遅延させる任意の物質である。一般的な阻害剤としては、アンチセンス分子、抗体、及びアントゴニストが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 0 7 8 】

本明細書で使用される用語「悪い (poor)」は、「良好でない (unfavorable)」と互換的に使用することができる。本明細書で使用される用語「良い (good)」は、「良好な (favorable)」を意味することができる。本明細書で使用される用語「悪い応答者 (poor responder)」は、標準治療、例えば放射線療法の間若しくは直後に癌が進行するか、又は癌に起因する臨床的に明らかな衰退を経験する個体を意味する。本明細書で使用される用語「治療に応答する (respond to therapy)」とは、標準治療、例えば放射線療法の間若しくは直後に腫瘍若しくは癌が安定的に維持されているか、又は小さくなる／減少するかのいずれかの個体を意味する。

【 0 0 7 9 】

「プローブ」は天然起源由来又は一本鎖若しくは二本鎖の組み換えの核酸であってもよ

10

20

30

40

50

く、あるいは科学的に合成されてもよい。それらは、同一又は類似の配列の存在を検出するのに有用である。このようなプローブは、ニックトランスレーション法 (nick translation)、Klenow fill-in 反応、PCR、又は当業者に周知のその他の方法を用いて、レポーター分子で標識されることができる。核酸プローブは、特定のタンパク質をコードする DNA 又は RNA が、細胞型、組織、又は器官に存在するか否かを判断するために、サザン法 (southern)、ノーザン法 (northern)、又はインサイチュハイブリダイゼーション法 (in situ hybridizations) において使用されることができる。

【0080】

本明細書中で使用される「予後」は、癌からの回復見込みを含む、癌の推定転帰に関する予測を意味する。本明細書で使用される用語、予後情報 (prognostic information) と予測情報 (predictive information) は、治療の存在下又は非存在下のいずれかにおける、疾患又は状態の経過の任意の観点を予言する (foretell) ために使用することができる任意の情報を指すために、互換的に使用される。このような情報には、患者の平均余命、患者が一定の期間生存する可能性 (例えば、6 ヶ月、1 年、5 年など)、患者が疾患から回復する可能性、患者の疾患が特定の治療に対して応答する可能性 (前記応答は、様々な方法のいずれかで定義されていてもよい) が含まれるが、これらに限定されない。予後及び予測情報は、診断情報の広いカテゴリー内に含まれる。

10

【0081】

本明細書で使用される用語「予後」は、臨床状態又は疾患の推定経過及び転帰の予測を意味する。患者の予後は、疾患の有利な又は不利な経過又は転帰の指標となる疾患の症状又は要素を評価することによって、通常行われる。本明細書で用いられる表現「予後を決定する」は、当業者 (skilled artisan) が、患者の症状の経過又は転帰を予測することができるプロセスを意味する。「予後」という用語は、状態の経過又は転帰を 100 % の精度で予測する能力を指すものではない。代わりに、当業者は、用語「予後」が特定の経過又は転帰が生じる確率が高いことを指すことを理解するであろう；すなわち、状態を示さない個体と比較した場合、与えられた条件を示す患者において、経過又は転帰が発生しやすいということである。予後は、患者が生存すると予想することができる時間の量として表すことができる。あるいは、予後は、疾患が寛解に移行する可能性、又は疾患が寛解に留まることが予想される時間の量を意味することができる。予後は、様々な方法で表現することができる；例えば予後は、患者が 1 年、5 年、10 年などの後も生存するパーセントの確率として表すことができる。あるいは、予後は、状態又は疾患の結果として、患者が生存することを期待できる平均の月数として表すことができる。患者の予後は、最終結果に影響を与える多くの要因による、相対主義 (relativism) の発現として考えることができる。例えば、予後は、特定の条件を有する患者のために、状態が治療可能若しくは回復可能であることができる可能性として、又は疾患が寛解に入るであろう可能性として適切に表すことができるが、一方で、予後は、より厳しい条件を有する患者の、特定期間の生存の可能性としてより適切に表すことができる。

20

30

【0082】

本明細書で使用する用語「良好な予後 (favorable prognosis)」及び「ポジティブな予後 (positive prognosis)」又は「良好でない予後 (unfavorable prognosis)」及び「ネガティブな予後 (negative prognosis)」は、推定の経過及び/又は状態若しくは疾患の転帰可能性の予測のための相対的用語である。良好な又はポジティブな予後は、良好でない、又はネガティブな、又は不利な予後よりも、状態のよりよい結果を予測する。一般的な意味では、「良好な予後」は、特定の状態と関連することができる、他の多くの可能性のある予後よりも、比較的優れている結果であり、一方で、「良好でない予後」は、特定の状態と関連することができる、他の多くの可能性のある予後よりも、比較的悪い結果を予測する。良好な又はポジティブな予後の典型的な例は、よりよい平均回復率 (average cure rate)、転移の低い傾向、より長い期待余命、癌性プロセスから良性プロセスの分化などを含む。例えば、予後は、患者が特定の癌の治療後の回復可能性が 50 % である一方で、同じ癌の平均的な患者の回復可能性が 25 % のみであれば、その患者はポジテ

40

50

ィブな予後を示している。ポジティブな予後は、癌性腫瘍にわたり区別されている場合は、良性腫瘍の診断であることができる。

【 0 0 8 3 】

本願における癌の文脈において使用される用語「再発 (relapse)」又は「回帰 (recurrence)」とは、寛解又は改善の期間後に、癌の徴候及び症状が復帰することを意味する。

【 0 0 8 4 】

本明細書において使用される治療に対する「応答 (response)」は、治療の結果として起こる被験体の状態の任意の有益な変化を意味することができる。そのような変化は、状態の安定化 (例えば、治療の不在で生じたであろう悪化防止)、状態の症状の改善、状態の回復の見通しの改善を含んでもよい。被験者の応答又は腫瘍の応答を意味することもできる。一般に、これらの概念は、本明細書において互換的に使用される。

【 0 0 8 5 】

「治療 (Treatment)」又は「治療 (therapy)」は、両方とも治療的処置及び予防的又は防止的手段を意味する。用語「治療有効量 (therapeutically effective amount)」は、哺乳動物における疾患又は障害を治療するのに有効な薬剤の量を意味する。癌の場合、薬剤の治療有効量は、癌細胞の数を減少させ；腫瘍サイズを減少させ；末梢器官への癌細胞の浸潤 (infiltration) を阻害し (すなわち、ある程度遅延させ、好ましくは停止させる)；腫瘍の転移を阻害し (すなわち、ある程度遅延させ、好ましくは停止させる)；腫瘍増殖をある程度阻害し；及び/又は、障害に関連する症状の1つ又はそれ以上を、ある程度緩和する。

【 0 0 8 6 】

本明細書における数値範囲の記載については、同じ精度を有するそれぞれの介在する番号の間が、明確に予期される。例えば、2 ~ 5 の範囲に対して、数字3と4は、2と5に加えて予期されており、そして範囲2 . 0 ~ 3 . 0 の範囲に対しては、数字2 . 0、2 . 1、2 . 2、2 . 3、2 . 4、2 . 5、2 . 6、2 . 7、2 . 8、2 . 9、及び3 . 0 が明確に予期される。本明細書で使用される場合、用語「約 (about)」X 又は「およそ (approximately)」X は、記載された X の値の $\pm 10\%$ を意味する。

【 0 0 8 7 】

癌の診断及び治療における固有の困難には、とりわけ、癌の多くの異なるサブグループの存在、及びポジティブな患者予後 (positive patient outcome) の可能性を最大化するための適切な治療戦略の同時変化が含まれる。癌治療の現在の方法は、比較的、非選択的である。典型的には、外科手術は、罹患組織を除去するために使用され；放射線療法は、固形腫瘍を縮小するために使用され；そして化学療法は、急速に分裂する細胞を死滅させるために使用される。

【 0 0 8 8 】

血液癌の場合には、血液が主に赤血球 (RBC)、白血球 (WBC)、及び血小板からなることに注目することによって、開始する価値がある。赤血球は身体に酸素を運搬し、白血球は身体の秩序を守り及び保護し、そして血小板は、怪我があった場合に、血液の凝固を促進する。これらの細胞の種類の異常は、血液癌につながる可能性がある。血液癌の主なカテゴリーは、急性リンパ性又はリンパ芽球性白血病 (ALL)、慢性リンパ性又はリンパ芽球性白血病 (CLL)、急性骨髄性又は骨髄性白血病 (AML)、及び骨髄性慢性又は骨髄性白血病 (CML) である。

【 0 0 8 9 】

白血病とリンパ腫の両方は、血液と骨髄の造血器悪性腫瘍 (癌) である。白血病の場合には、癌は、白血球の異常な増殖を特徴とし、そして癌の主要な4タイプのうちの1つである。癌は、血液を作るための身体的能力を妨害し、そして癌は骨髄及び血液自体を攻撃し、このことが、疲労、貧血、衰弱、及び骨痛を引き起こす。白血病は、血液細胞の特定の種類がカウントされる血液検査を用いて診断され；診断された大人約29,000人と子供約2,000人を、米国において毎年計上する。白血病の治療は、典型的には癌を殺

すための化学療法や放射線療法を含み、場合によっては骨髄移植を含むことができる。

【0090】

白血病は、最も顕著に関与する白血球の種類により分類される。急性白血病は、大部分は未分化な細胞集団であり、そして慢性白血病は、より成熟した細胞の形態を有している。急性白血病は、リンパ芽球性 (ALL) 及び非リンパ芽球性 (ANLL) のタイプに分類され、ALL は、主に小児期の疾患である一方で、急性骨髄性白血病 (AML) としても知られる ANLL は、成人の間でより一般的な急性白血病である。

【0091】

AML は、骨髄中の骨髄細胞数の増加及びその成熟停止によって特徴づけられ、結果として、しばしば造血不全を生じる。米国においては、AML の年間発生率は10万人あたり約2.4であり、そしてそれは、65歳以上の10万人当たり年間12.6をピークとして、年齢とともに次第に増加する。改善された治療的アプローチにもかかわらず、AML の予後は、世界中で非常に悪い。米国ですら、65歳未満の患者の5年生存率は40%未満である。

10

【0092】

急性骨髄性白血病 (AML) は、多様な遺伝子異常と臨床的特徴を有する多くの実態を含む、不均質な疾患である。病因は比較的少ない種類の白血病で知られている。細胞遺伝学的に中間の及び高いリスクを有する患者が、AML の大部分を表している；化学療法ベースの養生法は、これらの患者の大部分を治療することに失敗しそして幹細胞移植が頻繁に治療の選択となる。同種幹細胞移植はハイリスクの白血病を有する多くの患者のための選択肢ではないので、これらの白血病の生物学の理解を向上させ、改善した治療法を開発する必要性がある。少なからぬ進歩にもかかわらず、急性骨髄性白血病の、病因学、細胞生理学、及び分子遺伝学は十分に知られていない。このように、骨髄性白血病、特に急性骨髄性白血病に対する、効果的な新しい薬剤及び新規治療及び/又は予後診断法の開発が、今日のトランスレーショナルオンコロジー研究における主要な焦点となっている。

20

【0093】

AML に寄与する可能性がある遺伝因子を含む危険因子の理解における、著しい進歩がなされているが、臨床転帰に対するこれらの因子の関連性は不明なままである。さらに、いくつかのタンパク質の発現レベル及び抗体染色パターンは、転帰及び治療に対する応答可能性を予測することが示されている。しかしながら、個別の患者の臨床転帰は不明のままであり、特定の種類の治療（例えば、特定の薬物又は薬物の種類）から恩恵を受ける可能性がある患者の予測能力はとらえどころのないままである。

30

【0094】

本開示では、AML と診断された患者からの白血病サンプルを得た。骨髄又は末梢血サンプルを、Ficoll-Hypaque (Nygard) 比重遠心法により収集し、調製した。サンプルの細胞遺伝学的分析を、前述したプレゼンテーションで行った (Bloomfield; Leukemia 1992; 6:65-67.21)。基準は、細胞遺伝学的クローンを記載するために使用され、そして核型はInternational System for Human Cytogeneticの提言に準拠した。DNA は、前記の方法を用いて診断用骨髄吸引液サンプル又は末梢血サンプルから抽出した (Zuo et al. Mod Pathol. 2009; 22, 1023-1031)。

40

【0095】

本開示は、高用量又は標準用量ダウノルビシンを含む導入療法を受けるように無作為抽出された、年齢60歳未満のAML患者398人における遺伝子18個の変異解析に基づいている。予後調査結果は、さらに104人の患者の独立したセットで検証した。

【0096】

本出願の発明者は、患者の97.3%において体細胞変異の1つ以上を同定した。これらの出願人は、(1)FLT3-ITD ($p = 0.001$)、MLL-PTD ($p = 0.009$)、ASXL1 ($p = 0.05$)、及びPHF6 ($p = 0.006$) の変異が、減少した全生存 (OS) に関連付けられていること；並びに(2)CEBPA ($p = 0.0$

50

5) 及び IDH2 R140Q ($p = 0.01$) の変異は、改善された全生存に関連していること、を発見した。

【0097】

したがって、本開示の一観点は、急性骨髄性白血病患者の生存を予測する方法であり、前記方法は、細胞遺伝学的異常、並びに FLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及び EZH2 遺伝子の少なくとも1つにおける変異の存在について、前記患者から分離した遺伝子サンプルを分析する工程と、(i) 変異が、FLT3、MLL-PTD、ASXL1、及び PHF6 遺伝子の少なくとも1つにおいて存在する場合には、前記患者の低い生存を予測する工程、又は (ii) 変異が IDH2 R140 (IDH2 R140Q) において存在する、及び/又は変異が、CEBPA において存在する場合には、前記患者の良好な生存を予測する工程と、を含む。1つの実施態様では、前記方法は、(i) FLT3-ITD、TET2、MLL-PTD、DNMT3A、ASXL1、若しくは PHF6 遺伝子のいずれにおいても変異が存在しない場合、(ii) CEBPA 変異が存在し、そして FLT3-ITD 変異が存在している場合、又は (iii) FLT3-ITD 変異は存在しているが、8トリソミーが存在しない場合には、細胞遺伝学的に中間リスクと定義された AML 患者の中間の生存を予測する工程を、さらに含む。1つの実施態様では、前記方法は、(i) FLT3-ITD 変異の存在しない患者において、TET2、ASXL1、又は PHF6、又は MLL-PTD に変異が存在している場合、あるいは (ii) 患者が FLT3-ITD に変異を有しさらに TET2、DNMT3A、MLL-PTD における変異又は 8トリソミーを有する場合には、前記患者の良好でない生存を予測する工程を、さらに含む。

10

20

30

【0098】

遺伝子サンプルは、骨髄吸引液又は患者の血液から得ることができる。いったんサンプルを取得すると、一例では、単核細胞を、フィコール分離を含む公知技術により単離し、そしてそれらの DNA を抽出する。特定の実施態様において、患者の低い生存又は不利なリスクは、約10ヶ月以下の生存である。一方で、1つの実施態様では、患者の低い又は良好でない生存は約10ヶ月以下の生存である。別の実施態様では、中間の生存の患者は、約18ヶ月～約30ヶ月の生存である。別の実施態様では、患者の良好な生存は約32ヶ月以上の生存である。

30

【0099】

その他の観点において、本開示は、急性骨髄性白血病患者の生存を予測する方法を教示し、前記方法は、遺伝子サンプル中の遺伝子 FLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及び EZH2 の少なくとも1つの変異の存在について、前記患者の血液又は骨髄からの前記遺伝子サンプルをアッセイする工程と；変異が、FLT3-ITD、MLL-PTD、ASXL1、及び PHF6 遺伝子の少なくとも1つにおいて存在する場合には、前記患者の低い生存を予測する工程、又は、変異が CEBPA において存在するか若しくは R140 の IDH2 において存在する場合には、前記患者の良好な生存を予測する工程と、を含む。1つの実施態様において、患者は、細胞遺伝学的分析に基づいた中間リスクとして特徴付けられる。

40

【0100】

1つの実施態様では、細胞遺伝学的に中間リスクと定義された、FLT3-ITD 変異を有する急性骨髄性白血病患者の中で、以下：8トリソミー又は TET2、DNMT3A、若しくは MLL-PTD 変異、の少なくとも1つは、患者の有害転帰及び低い全生存に関連している。別の実施態様では、細胞遺伝学的に中間のリスクと定義された、FLT3-ITD 変異を有する急性骨髄性白血病の患者の中で、CEBPA 遺伝子における突異は、前記患者の改善された転帰及び全生存に関連している。1つの実施態様では、細胞遺伝学的に中間リスクと定義された、IDH1 / IDH2 の両方及び NPM1 変異を有する A

50

M L の患者においては、I D H 1 及び I D H 2 の両方が野生型で N P M 1 が変異型である患者と比較して、全生存が改善されている。1つの実施態様においては、急性骨髄性白血病の患者の中で、I D H 2 R 1 4 0 変異は改善された全生存と関連している。患者の低い又は良好でない生存（不利なリスク）は、1つの例においては、約 1 0 ヶ月以下の生存である。患者の良好な生存は、1つの例においては、約 3 2 ヶ月以上の生存である。

【 0 1 0 1 】

1つの実施態様では、N P M 1 変異の良好な影響は、I D H 1 / I D H 2 及び N P M 1 変異の共起を有する患者に限定されていた。さらに、出願人らは、年齢、白血球数、誘導用量、及び寛解後療法を独立させた、A M L のリスク層別化を改善した遺伝的予測因子を同定し、独立したコホートにおいてその意義を検証した。出願人らは、標準用量ダウノルピシンによる治療と比較して、高用量ダウノルピシンが、D N M T 3 A 若しくは N P M 1 変異又は M L L 転座を有する患者の生存を改善したが（ $p = 0 . 0 0 1$ ）、これらの変異を有しない野生型の患者においては改善しないことを発見した（ $p = 0 . 6 7$ ）。

10

【 0 1 0 2 】

これらのデータは、A M L における転帰を予測しそして A M L のリスク層別化を改善する変異の概要を説明することにより、A M L における遺伝的変異の臨床的意義を提供する。出願人は、本明細書中において、A M L における予後及び治療の決定を向上させる変異プロファイリングの有用性を発見しそして実証し、特に、D N M T 3 A 若しくは N P M 1 変異又は M L L 転座は、高用量の導入化学療法による改善された結果を予測している。

20

【 0 1 0 3 】

以前の研究は、急性骨髄性白血病（A M L）の臨床的及び生物学的不均質性を強調している。しかしながら、比較的少数の、細胞遺伝学的な及び分子的な障害が、臨床診療に影響を及ぼすための十分な関連性を有する。細胞遺伝学的異常の予後の関連性は、リスク層別化について細胞遺伝学的に定義された、全生存に有意差を有する3つのリスクグループの幅広い活用につながっている。進歩は A M L 用の予後マーカーを定義してなされたものであるが、かなりの割合の患者は、予後的意義の特定の異常を欠いている。さらに、各リスク群内の個別の患者の転帰に有意な不均一性が存在する。

【 0 1 0 4 】

最近の研究では、A M L の患者における再発した体細胞変異（recurrent somatic mutations）の数を特定した、しかしながら、遺伝子の大きなセットの変異プロファイリングが予後診断を改善するかどうかは、今日まで臨床試験コホートで調査されていない。ここでは、出願人らは、A M L 患者の 5 % より多くにおいて発生している全ての既知の分子変異の総合的な変異解析が、A M L における転帰の新規分子マーカーの同定を可能にし、さらに用量を増大させた導入化学療法からの恩恵を受ける、分子的に定義された患者サブセットの同定を可能にすると考えた。

30

【 0 1 0 5 】

A M L におけるハイスループット変異プロファイリング：総合的遺伝子解析

【 0 1 0 6 】

臨床研究は、急性骨髄性白血病（A M L）がプレゼンテーションに関して及び臨床転帰に関して不均質であることを実証しており、そして研究では、細胞遺伝学が予後診断を改善しそして治療決定を導くために使用されることができていることが示されている。さらに、最近では、遺伝的研究は、A M L の遺伝学的根拠（genetic basis）の理解を改善している。出願人らは、遺伝的病変（genetic lesions）が、A M L 患者のリスク層別化するためにそして治療決定を導くために使用されることができると認識した。しかしながら、多くの遺伝子変異が A M L において著しい頻度で発生するものの、それらの予後の重要性は、大規模な第 I I I 相臨床試験のコホートでは知られていない。

40

【 0 1 0 7 】

出願人らは最初に、均一に処理された臨床コホートにおいて、A M S で有意に（5 % より多い）変異していることが知られている全ての遺伝子の転帰及び治療に対する応答への影響のみならず、これらの全ての遺伝子の変異状態を報告した。出願人らは、ハイスルー

50

ブットリシーケンシングプラットフォーム (high throughput re-sequencing platform) を使用し、E C O G E 1 9 0 0 試験に登録されたデノボ A M L の患者 3 9 8 人からのプレトリートメントゲノム DNA における、F L T 3、N P M 1、D N M T 3 A、N R A S、C E B P A、T E T 2、W T 1、I D H 1、I D H 2、K I T、R U N X 1、M L L - P T D、A S X L 1、P H F 6、K R A S、P T E N、P 5 3、H R A S、及び E Z H 2 のコード領域の全長再配列決定を行った。

【0108】

変異及び細胞遺伝学的異常の両方を含む場合には、出願人らは E 1 9 0 0 コホートにおける全患者の 9 1 . 2 % のクローン性変異 (clonal alteration) を同定することができた；4 2 % は体細胞変異 1 つ、3 6 . 4 % は変異 2 つ、1 1 . 3 % は変異 3 つ、1 . 5 % は変異 4 つを有していた。各患者からの変異のデータは、全生存、無病生存率、及び治療の割付 (標準用量又は高用量ダウノルビシン) と関連していた。出願人らは、F L T 3 (合計 3 7 % ; I T D 3 0 %、T K D 7 %)、D N M T 3 A (2 3 %)、N P M 1 (1 4 %)、C E B P A (1 0 %)、T E T 2 (1 0 %)、N R A S (1 0 %)、W T 1 (1 0 %)、K I T (9 %)、I D H 2 (8 %)、I D H 1 (6 %)、R U N X 1 (6 %)、A S X L 1 (4 %)、P H F 6 (3 %)、K R A S (2 . 5 %)、T P 5 3 (2 %)、P T E N (1 . 5 %) において体細胞変異を発見した；出願人がスクリーニングした中で変異がなかった遺伝子は、H R A S 及び E Z H 2 のみであった。

10

【0109】

出願人らは次に、相関分析を使用して、変異がポジティブに又はネガティブに相関していたかどうかを評価した (図 1)。同定された変異の相関関係 (F L T 3 と N P M 1、K I T と コア 結合 因子 白血病) に加えて、出願人らは、F L T 3 及び A S X L 1 変異が、この大規模コホート ($p = 0 . 0 0 0 8$) において、相互に排他的であることを見出した。さらに、出願人らは、I D H 1 / I D H 2 変異が、T E T 2 ($p = 0 . 0 2$) 及び W T 1 ($p = 0 . 0 1$) 変異の両方と相互に排他的であることを発見しており、これらの事実は、これらの変異が A M L の病因において重複的な役割を持っていることを示唆している。

20

【0110】

出願人らは次に、変異のいずれかが化学療法に対する応答性の欠如に関連していたかどうかの調査に着手した；とりわけ、A S X L 1 ($p = 0 . 0 0 0 2$) と W T 1 ($p = 0 . 0 3$) 変異が、原発不応性 A M L 患者において濃縮されていた。E C O G E 1 9 0 0 試験における結果の変異データの統合は、F L T 3 ($p = 0 . 0 0 0 5$)、A S X L 1 ($p = 0 . 0 0 5$)、及び P H F 6 ($p = 0 . 0 2$) における変異が、減少した全生存と関連しているという重要な影響を明らかにした。また、出願人らは、C E B P A ($p = 0 . 0 4$) における及び I D H 2 ($p = 0 . 0 0 3$) における変異は、改善された全生存と関連していたことを見出した；I D H 1 変異の転帰に対する良好な影響は、I D H 2 R 1 4 0 変異を有する患者において、もっぱら見られた。

30

【0111】

このデータは、均一に処理されたデノボ A M L コホートにおける 1 8 個の遺伝子の総合的変異解析を表し、前記包括的変異解析により、デノボ A M L 内に生じたこの遺伝子の変異頻度、A M L における変異パターンの共同性 (cooperativity)、及び A M L 治療に対する生存及び応答に対する遺伝子変異の臨床的影響を、出願人らが詳細に説明することを可能にする。1 つの実施態様では、出願人らは、A M L の標準導入化学療法に対して応答しなかった患者において著しく濃縮されているものとして A S X L 1 及び W T 1 変異を同定した。このデータは、A M L における遺伝的変異の重要な臨床的意味を提供し、成人 A M L の多段階の病因への見識を提供している。1 つの実施態様では、急性骨髄性白血病は、新たに診断された再発性の又は不応性の急性骨髄性白血病から選択される。

40

【0112】

したがって、本開示の一観点は、急性骨髄性白血病患者の生存を予測する方法であり、前記方法は、A S X L 1 及び W T 1 遺伝子における変異の存在について、前記患者の血液又は骨髄からの遺伝子サンプルをアッセイする工程と；変異した A S X L 1 及び W T 1 遺

50

伝子が検出された場合に、原発性不応性急性骨髄性白血病 (primary refractory acute myeloid leukemia) を有すること又は生ずることを決定する工程と、を含む。サンプルは、骨髄吸引液又は前記患者の血液から得ることができる。さらに、1つの実施態様では、アッセイにおいて使用するために単核細胞を単離することができる。

【0113】

出願人らは、細胞遺伝学的な標準分析とFLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及びEZH2の全長配列とを組み合わせることにより、急性骨髄性白血病の成人における再発のリスクを予測するために使用することができる変異分類器 (mutational classifier) を開発した。本出願の教示は、現在利用可能な技術よりもより正確に、予後と再発のリスクを予測することができる総合的な変異分類器の開発を可能にする。1つの実施態様では、低い又は良好でない生存は約10ヶ月以下の生存である。別の実施態様では、中間の生存の患者は、約18ヶ月～約30ヶ月の生存である。別の実施態様では、患者の良好な生存は約32ヶ月以上の生存である。

【0114】

1つの実施態様では、FLT3-ITD野生型で中間リスクの急性骨髄性白血病患者において、TET2、ASXL1、PHF6、及びMLL-PTD遺伝子変異は、独立して、患者の有害転帰及び不良な全生存と関連することが示された。別の実施態様では、FLT3-ITD変異型で中間リスクの急性骨髄性白血病患者において、CEBPA遺伝子変異は、患者の改善された転帰及び全生存と関連していた。さらに別の実施態様において、FLT3-ITD変異型で中間リスクの急性骨髄性白血病患者においては、8トリソミー、並びにTET2、DNMT3A、及びMLL-PTD変異は、患者の有害転帰及び不良な全生存と関連していた。1つの実施態様において、IDH1/IDH2の両方及びNPM1の変異を有し細胞遺伝学的に中間リスクと定義されたAML患者は、NPM1が変異しておりIDH1とIDH2の両方が野生型である患者と比較して改善された全生存を有している。関連する実施態様において、IDH2R140Q変異はAML患者の全コホートにおいて、改善された全生存と関連している。

【0115】

本開示の一観点は、急性骨髄性白血病患者の生存を予測する方法に関し、前記方法は：(a)(i)FLT3、MLL-PTD、ASXL1、及びPHF6遺伝子の少なくとも1つ、加えて、任意でNPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及びEZH2遺伝子のうちの1つ又はそれ以上の変異、又は(ii)IDH2及び/又はCEBPA遺伝子の、加えて、任意でFLT3、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、NPM1、DNMT3A、NRAS、TET2、WT1、IDH1、KIT、RUNX1、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及びEZH2遺伝子の1つ又はそれ以上の変異の存在について、前記患者から分離したサンプルを分析する工程と、(b)(i)FLT3、MLL-PTD、ASXL1、及びPHF6遺伝子の少なくとも1つにおいて変異が存在する場合には、前記患者の低い生存を予測する工程、又は(ii)IDH2R140に変異が存在し及び/又はCEBPAに変異が存在する場合には、前記患者の良好な生存を予測する工程と、を含む。前記方法は、細胞遺伝学的異常の存在についてサンプルを分析する工程を、さらに含むことができる。：前記方法は、以下の変異、すなわちIDH2R140Qが存在する場合には、患者の良好な生存を予測する工程を、含むことができる。

【0116】

さらに、出願人らは、DNMT3A変異、NPM1変異、又はMLL融合が、用量を増大させた導入療法を含む高用量化学療法による改善された結果を予測することを発見した。本出願の教示は、AML患者の正確なリスク層別化、及びどの患者が、アグレッシブな治療を必要としている高リスクを有する患者であるか、そして強い寛解後療法をあまり必

10

20

30

40

50

要としていない低リスクの患者であるかを決定する能力を提供する。さらに、用量を増大させたアントラサイクリン、例えばダウノルビシンによる誘導から恩恵を受けるであろう患者の遺伝子型が定義されたサブセットを同定することが可能である。本開示は、リスク分類におけるより正確な評価について提供している。現在、高用量ダウノルビシンから利益を受ける、AMLに苦しんでいる患者を決定するための効果的な方法はない。1つの実施態様では、本開示は、応答の予測因子 (predictor of response) と同様に、新規の分類器 (novel classifier) を提供する。

【0117】

したがって、本開示の一観点は、急性骨髄性白血病患者の高用量療法に対する応答性を決定する方法であり、前記方法は、DNMT3AとNPM1遺伝子における変異の存在及びMLLの転座の存在について、患者から分離した遺伝子サンプルを分析する工程と；(i) DNMT3A若しくはNPM1遺伝子における変異又はMLLの転座が存在する場合に、前記患者が、高用量療法に対してより良好に応答するであろう患者であると同定する工程、又は(ii) DNMT3A若しくはNPM1における変異又はMLLの転座が非存在である場合には、前記患者が、高用量療法に対して非応答性の患者であると同定する工程と、を含む。1つの実施態様では、サンプルは、患者からの骨髄又は血液から抽出したDNAである。1つの実施態様では、遺伝子サンプルは、前記患者の血液又は骨髄からの単核細胞(MNC)から分離したDNAであることができる。1つの実施態様では、治療は、アントラサイクリンの投与を含む。アントラサイクリンの例には、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、及びアドリアマイシンが含まれる。特定の例では、アントラサイクリンはダウノルビシンである。

10

20

【0118】

前記方法は、治療開始前、治療中、又は治療完了後の、治療に対する患者の応答を予測するために用いられることができる。例えば、治療を開始する前に、治療に対する患者の応答を予測することにより、患者のための治療の最良の選択肢を決定する際に情報を使用することができる。

【0119】

本発明の1つの実施態様では、急性骨髄性白血病の予後について患者をスクリーニングするための方法に関する。本発明は、患者の生存、患者の予想寿命、及び/又は患者の生存可能性の予測に関する情報を、提供することができる。1つの実施態様では、低い生存は、約10ヶ月以下の生存を一般的に意図し、良好な予後又は長期の生存は、約36ヶ月以上であると考えられる。1つの実施態様では、低い生存は約1~16ヶ月であると考えられ、一方で、よい、良好な、又は長期の生存は約30~42ヶ月の範囲、約46ヶ月以上、又は約60ヶ月以上であると考えられる。1つの実施態様では、良好な生存は、約30ヶ月以上であると考えられる。

30

【0120】

背景にその他の要求がない場合には、本発明の任意の観点において、遺伝子及び/又は細胞遺伝学的異常の以下の組み合わせが分析又はアッセイされる：FLT3及びCEBPA；FLT3及び8トリソミー；FLT3及びTET2；FLT3及びDNMT3A；FLT3及びMLL；FLT3、MLL、ASXL1、及びPHF6、任意で、TET2又はDNMT3A；IDH2及びCEBPA；IDH1、IDH2、及びNPM1；IDH2、ASXL1、及びWT1；DNMT3A、NPM1、及びMLL。これらの組み合わせのいずれかが、「AML患者のゲノムDNAにおける体細胞変異について分析した遺伝子及びそれらの臨床的な関連性」と題した表に示される任意の他の遺伝子の1つ又は複数と組み合わせることができる。必要に応じて、前記の表にリストされた遺伝子の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18又は19個が分析又はアッセイされる。

40

【0121】

本発明はまた、個体が急性骨髄性白血病のための治療1つ又はそれ以上に対して応答するかどうかの決定用の方法に関する。治療は、任意の種類のものであることができるが、

50

特定の実施態様では、化学療法剤、例えば、アントラサイクリン系抗生物質製剤の１種又はそれ以上を含む。１つの実施態様では、化学療法剤は、アントラサイクリンと組み合わせた抗代謝シタラビンを含む。

【０１２２】

本発明の特定の実施態様において、治療は、化学療法、免疫療法、抗体に基づく治療、放射線療法、又は（白血病のために本質的に任意に実行される）支持療法である。特定の実施態様において、治療は、アントラサイクリン抗生物質を含む化学療法剤の投与を含む。前記のアントラサイクリン抗生物質の例としては、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、及びアドリアマイシンが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施態様において、化学療法はグリーベック（Gleevec）又はイダルビシン及びa r a - Cである。特定の実施態様においては、ダウノルビシンが使用される。

【０１２３】

診断アッセイは、しばしば、患者を治療する医師によって指示され、前記診断アッセイは、医師に対してアッセイの結果を報告する技術者により実施され、そして医師は、患者を診断するための基準としてアッセイからのデータを使用する。したがって、本発明の方法の構成要素の工程は、複数の人間によって実施されることができる。

【０１２４】

予後は、患者が特定の期間を存続する可能性の予測、あるいは前記予後は、患者がどのくらい長く生存することができるかの予測、あるいは前記予後は、特許が疾患又は障害から回復させる可能性であることができる。予後を表現することができる多くの方法がある。例えば、予後は、完全寛解率（C R）エントリーから死への時間量である全生存（O S）、C Rから再発まで又は死までの時間量である無病生存（D F S）で表されることができる。１つの実施態様では、患者の、良好な生存の可能性又は全生存では約１８ヵ月以上の患者の生存が含まれる。

【０１２５】

多くの場合に、予後は、予後因子又は指標の１つ又はそれ以上を調査することによって決定される。これらはマーカーであり、患者（又は患者から得られたサンプル）におけるその存在又は量は、与えられた経過又は転帰が生じるであろう確率のシグナルとなる。当業者は、有害転帰への素因（predisposition）を有する予後指標を関連付けることは統計的分析を含むことができることを理解するであろう。さらに、ベースラインレベルからの因子濃度の変化は、患者の予後を反映することができ、そしてマーカーレベルの変化の程度は、有害事象の重症度に関連する可能性がある。統計的有意性は、多くの場合、２つ以上の集団を比較しそして信頼区間及び／又はp値を決定することによって決定される。例えば、Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York, 1983を参照されたい。１つの実施態様では、本発明の信頼区間は、９０％、９５％、９７．５％、９８％、９９％、９９．５％、９９．９％、及び９９．９９％であり、一方で、好ましいp値は、０．１、０．０５、０．０２５、０．０２、０．０１、０．００５、０．００１、及び０．０００１である。有害転帰への素因を有する予後指標を関連付けるための代表的な統計的検定が記載される。

【０１２６】

癌の研究への１つのアプローチは、遺伝子プロファイリングであり、悪性の表現型を引き起こす遺伝子発現及び／又は変異における摂動を同定することを目的とした取り組みである。これらの遺伝子発現プロファイル及び変異状態は、正常及び疾患細胞における生物学的プロセスについての貴重な情報を提供する。しかしながら、癌はその遺伝子の署名において大幅に異なり、このことが、効果的な治療薬の開発における困難性と同様に、診断及び治療における困難性につながっている。近年では、予後診断及び治療の成功の見込みの評価用のみではなく、疾患の検出用のツールとして、遺伝子変異が同定されそして有効に利用されている。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 7 】

本出願の発明者は、急性骨髄性白血病の遺伝子プロファイリングが癌の管理及び／又は治療に対してより効果的なアプローチを提供するであろうという仮説を立てた。本発明者は、遺伝子のパネルの変異が悪性の表現型につながることを確認した。

【 0 1 2 8 】

本発明者らは、課題に対して分子アプローチを使用し、そして急性骨髄性白血病において、全生存と有意に関連している遺伝子変異のセットを特定した。したがって、本発明は、急性骨髄性白血病の予後の評価及び／又は再発を予測するのに有用な遺伝子変異プロファイルに関する。一観点において、本発明は、遺伝子のセットに関連し、骨髄又は血液細胞における、特に単核細胞におけるその変異は、患者の低い生存の可能性と関連する。本発明は、急性骨髄性白血病患者の予後及び／又は治療に応答した転帰に関する。本発明は、いくつかの遺伝子を提供し、その変異は、単独又は組み合わせにおいて、具体的には生存に関して、予後の重要性を有する

10

【 0 1 2 9 】

1つの例において、本開示は、人間が、急性骨髄性白血病が生じる又は急性骨髄性白血病が再発する、増加された遺伝的リスクを有するかどうかを決定する方法であり、前記方法は、FLT3、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及びEZH2の少なくとも1個の遺伝子変異の存在について、人の血液又は骨髄から分離された遺伝子サンプルを分析する工程と；(i) 患者がFLT3-ITD変異を有しないときに、TET2、MLL-PTD、ASXL1、及びPHF6遺伝子の少なくとも1つにおいて変異が検出された場合には、又は(ii) 患者がFLT3-ITDを有するときに、TET2、MLL-PTD、及びDNMT3A遺伝子の少なくとも1つにおける変異若しくは8トリソミーが検出された場合には、細胞遺伝学的に定義された中間リスクのAMLを有する個体が、前記遺伝子群中に前記の遺伝子変異を有しないコントロールの人間と比較して、急性骨髄性白血病が生じる又は急性骨髄性白血病が再発する、増加された遺伝的リスクを有することを決定する工程と、を含む。

20

【 0 1 3 0 】

現在まで、急性骨髄性白血病における転帰を予測し、AML患者を、悪い応答者と対比して良い応答者に層別化でき、さらにとりわけ、高用量化学療法に対してより良好に応答する患者を識別することができる試験は存在しなかった。結果として、いくつかの個体は、最小限の効果を有する不必要な治療を受けるという点で、過剰治療される可能性がある。あるいは、標準用量に対して添加される追加の薬剤が、標準用量のみでは難治性であろうこれらの患者の転帰を改善することができるという点で、いくつかの個体は、完全に治療されていない可能性がある。このように、個別の患者用の治療を最適化するために、標準的な療法に対する非応答者から応答者を、治療開始前に将来を見越して区別することが望ましい。

30

【 0 1 3 1 】

したがって、本開示の一観点は、急性骨髄性白血病を患っている患者が、標準用量の化学療法と比較してより高用量の化学療法に対してより良好に応答するかどうかを予測する方法であり、前記方法は、前記患者の血液又は骨髄から得られたDNAサンプルを得る工程と；DNMT3AとNPM1遺伝子の変異状態及びMLL転座の存在を決定する工程と；前記サンプルのDNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座が陽性である場合には、被験者が、標準用量の化学療法と比較してより高用量の化学療法に対して、より良好に応答することを予測する工程、又は前記サンプルがDNMT3A若しくはNPM1遺伝子の変異及びMLL転座が存在しない野生型である場合においては、被験者が、標準用量の化学療法と比較して、高用量の化学療法に対して、非応答性であることを予測する工程と、を含む。

40

【 0 1 3 2 】

50

1つの実施態様においては、本発明は、急性骨髄性白血病における転帰を予測するのに有用である臨床試験を提供する。変異状態及び／又は特定の遺伝子の1つ又はそれ以上の発現が、サンプル中で測定される。個体は、治療に対して応答しない者に対比して、よく応答する者に層別化されている。試験の結果からの情報は、治療を必要とする患者のための最良の治療を決定することを補助するために使用される。患者は、標準治療により良好な予後を有する者に対比して、予後不良である可能性が高い人たちに層別化している。医療提供者は、行動方針、例えば、治療を必要とする患者用の最良の治療を決定するのを補助するために、試験した結果を使用する。

【0133】

患者からの特定のマーカーは、患者の予後に連続的に関連しているため、予後の決定は、決定されたマーカーの状態を患者の予後に関連付ける統計分析を用いて行われることができる。当業者は、適切な統計的方法を設計することが可能である。例えば、本発明の方法は、カイ二乗検定(chi-squared test)、カプラン・マイヤー法(Kaplan-Meier method)、ログランク検定、多変量ロジスティック回帰分析、コックスの比例ハザードモデル(Cox's proportional-hazard model)等を、予後の決定において使用することができる。コンピュータ及びコンピュータソフトウェアプログラムは、データを整理し、統計分析を実行する際に使用されることができる。

【0134】

1つの実施態様においては、試験は、試料、例えば骨髄又は血液試料により提供され、遺伝子セットについて及び変異プロファイル結果からプロファイルされ、急性骨髄性白血病の治療に対する応答の可能性の推定値が決定される。別の実施態様においては、本発明は、急性骨髄性白血病の個体において、予後、及び／又は標準及び／又は高用量化学療法に対する応答の可能性を予測する方法に関し、前記方法は、患者から得られた遺伝子サンプルにおいて、遺伝子1つ又はそれ以上、とりわけDNMT3A若しくはNPM1遺伝子又はMLL転座の、コントロールの遺伝子に対して規格化された変異状態を決定する工程を含むことができる。合計値は、この遺伝子セットにおける各遺伝子の変異状態から、各個体について計算される。

【0135】

本発明は、治療に対する応答の予測及び治療のための患者の層別化を含む、血液癌の診断、予後、及び治療に関する。本開示は、ECOG E1900第III相臨床試験からの患者398人における総合的変異プロファイリングの変異頻度、予後的意義、及び治療的関連性を教示し、そして、同じ試験における患者104人の独立したコホートにおいて、これらのデータを検証する。以前の研究においては、CEBPA、NPM1、及びFLT3-ITDの変異分析が、中間リスクAML患者のリスク層別化に使用できることが示唆されている。単一の臨床試験で治療された患者の大規模コホートに関する総合的変異解析を行うことにより、より広範囲の変異分析が、AML患者を関連する予後群へより良く区別できることを、出願人は示している(図3)。例えば、FLT3-ITD陰性NPM1/IDH変異患者は、特定の変異遺伝子型により定義される良好なリスクのAMLサブセットを示すが、一方で、IDH同時変異を有しないFLT3-ITD陰性NPM1変異患者は、良好な転帰が、特に、高いリスクの同時変異を有する患者において、はるかに少なくなる。

【0136】

さらに、出願人は、TET2、ASXL1、MLL-PTD、PHF6、及びDNMT3A変異が、FLT3-ITDを有しない細胞遺伝学的に定義された中間リスクAML患者において不利な転帰を有する患者を定義するために使用されることができることを発見した。まとめると、これらのデータにより、遺伝的変異のより大きなセットの変異分析が、AML患者を、全体的な結果において著しい違いを有する、良好な、中間の、又は良好でないリスクの正確なサブセットに区別するために使用できることが示される。このアプローチは、誘導及び強化療法(consolidation therapy)単独で良好な結果を有すると変異により定義される患者の追加のセット、並びに標準のAML療法では不利な結果が与え

られる、遺伝的に良好でないリスクであると定義された同種幹細胞移植又は臨床試験の候補者である患者のセットを定義するために使用されることができる（図5A）。

【0137】

AMLにおけるアントラサイクリン用量強化の利点を検討している最近の二つのランダム化試験（randomized trials）は、より集中的な導入化学療法がAMLの転帰を改善することを実証した（Fernandez et al., N Engl J Med, 2009, 361, 1249-59; Lowenberg et al., N Engl J Med, 2009, 361, 1235-48）。注目すべきことに、我々の患者502人のコホートを使用した元のE1900試験の再評価により、オリジナルの試験の両治療群において、各遺伝的リスクカテゴリー内の患者の均一な分布があったことが明らかになった（ $p = 0.41$ 、ピアソンのカイ二乗検定）。しかしながら、これらの研究の初期報告は、用量強化導入療法が異なるAMLサブグループにおける転帰を向上させたかどうかを識別していない。

10

【0138】

出願人は、アントラサイクリンの用量強化がDNMT3A若しくはNPM1変異又はMLL転座を有する患者において転帰を著しく改善することを発見し、この事実は、用量強化誘導療法からの利益をどの患者が享受するかを決定するために、変異プロファイリングが使用されることができることを示唆している（図5B）。

【0139】

出願人はまた、AML患者において一般的に生じており、追加の変異の相補群が存在することと一致してはほとんど共起しない変異の組み合わせを発見した。例えば、TET2及びIDH変異がこのAMLコホートにおいて相互に排他的であるという見解は、造血変換の共有メカニズムにおいてIDH変異と機能欠失型TET2変異とをリンクする機能的研究につながった。

20

【0140】

多くの治療計画の場合にはそうであるように、化学療法、例えばアントラサイクリン系抗生物質、ダウノルビシンによる治療に対して応答する患者もいるが、応答しない患者もいる。治療に対して応答しにくい患者へ治療を処方することは望ましくない。このように、応答しない者が不必要に治療されないように、そして薬剤から恩恵を受ける最善の機会を有する者が適切に扱われそしてモニタリングされるように、薬物投与前に、そのような治療への患者の応答がどのように期待できるかを知ることが有用であろう。さらに、治療に対して応答した者で、応答の程度を変化させる可能性もある。アントラサイクリン以外の治療剤による治療、又はアントラサイクリン、ダウノルビシンに加えた治療剤による治療は、特定の化学療法に対して応答しないか、又は特定の化学療法、例えばダウノルビシン、若しくは類似のアントラサイクリン抗生物質単独に対して、所望よりも乏しい応答をするであろう患者のために有益であることができる。

30

【0141】

本開示は、AMLの生物学の理解を進めるため、現在の予後モデルを改善するための、及び治療の決定を知らせるための、臨床試験コホートの総合的変異プロファイリングの能力を明示する。特に、これらのデータは、より詳細な遺伝子分析により、改善されたりリスク層別化、及びさらに強化された導入化学療法から利益を享受する患者の同定につながる可能性があることを示している。

40

【0142】

特定の観点において、本開示は、高用量のダウノルビシン又は薬学的に許容されるその塩、溶媒和物、若しくはそれらの水和物を用いた治療に対する応答性について、急性骨髄性白血病患者をスクリーニングする方法であり、前記方法は：前記個体から急性骨髄性白血病患者細胞を含む遺伝子サンプルを得る工程と；前記サンプルをアッセイしそしてDNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座の存在を検出する工程と；DNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座の発見と、前記急性骨髄性白血病患者が、高用量のダウノルビシン又は薬学的に許容されるその塩、溶媒和物、若しくはそれらの水和物に対し

50

て、変異がない野生型コントロールと比較して、より良好に応答することとを相互に関連付ける工程とを含む。1つの実施態様では、前記方法は、DNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座が検出された場合に、患者が化学療法後における急性骨髄性白血病再発のより低いリスクを有することを予測する工程を含む。1つの実施態様では、前記方法は、DNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座のいずれかが検出された場合には、患者が化学療法後における急性骨髄性白血病再発のより低いリスクを有することを予測する工程を含む。

【0143】

治療に対する応答を予測するための患者集団の層別化は、癌患者の臨床管理においてますます重要になってきている。例えば、コンパニオン診断は、標的療法、例えば、転移性乳癌におけるトラスツズマブ（ハーセプチン、ジェネンテック）、及び結腸直腸癌におけるセツキシマブ（アービタックス、メルク）により治療されている患者の層別化のために必要とされる。予測的なバイオマーカー（Predictive biomarkers）はまた、消化管間質腫瘍におけるイマチニブ（グリベック、ノバルティス）について、及び肺癌におけるゲフィチニブ（イレッサ、アストラゼネカ）について利用されている。現在、急性骨髄性白血病におけるアントラサイクリン系抗生物質に対する応答を予測するために利用可能な方法は存在しない。アントラサイクリン系抗生物質、特に、ダウノルビシンに対するより敏感な応答性と関連する遺伝子を同定するために、出願人は、前記のように、特定の遺伝子における変異の存在についてアッセイした。

目下開示されている、AML患者のゲノムDNAにおける体細胞変異について分析した遺伝子及びそれらの臨床的関連性

遺伝子	AMLにおける臨床的関連性
FLT3	受容体型チロシンキナーゼFLT3のチロシンキナーゼドメインにおける内部縦列重複又は変異は、細胞遺伝学的に中間リスクAMLであると定義されたAML患者と同様に、AML患者の全コホートの生存を予測するために重要である。
DNMT3A	DNMT3Aの変異は、(a) 細胞遺伝学的に中間リスクであると定義されたAML患者における、FLT3-ITDの存在下での不利な全生存についての予測、並びに(b) ダウノルビシン及びシタラビンを用いた高用量導入化学療法に対する応答性の予測と関連していた。
NPM1	NPM1の突然変異は、(a) 細胞遺伝学的に中間リスクであると定義されたAML患者においてIDH1/2変異が共起した場合の、改善された全生存についての予測、並びに(b) ダウノルビシン及びシタラビンを用いた高用量導入化学療法に対する応答性の予測と関連していた。
NRAS	本調査におけるAML患者の10%で、NRASにおける活性化変異が見られた。
CEBPA	CEBPAの変異は、(a) 細胞遺伝学リスクに関わらず、AML患者の全コホートにおける改善された全生存についての予測、並びに(b) 細胞遺伝学的に中間リスクのAMLであると定義され、及びFLT3ITDが存在する患者における、中間の全生存の予測と関連していた。
TET2	TET2の変異は、FLT3ITDの存在に関わらず、細胞遺伝学的に中間リスクと定義されたAML患者において悪化した全体リスクの予測と関連していた。
WT1	WT1の変異は、本調査の全てのAML患者の8%において存在したが、初期の導入化学療法に対して難治性であった患者において濃縮されていた。
IDH2	IDH2の変異は、(a) 特にアルギニン140に変異が存在していた場合に、細胞遺伝学的リスクに関わらず、AML患者の全コホートにおける改善された全生存の予測；(b) 細胞遺伝学的に中間リスクのAMLであると定義され、及びFLT3ITDが存在せず、NPM1変異が付随して起こった場合の、良好な全生存の予測と関連していた。
IDH1	IDH1の変異は、細胞遺伝学的に中間リスクのAMLであると定義され、及びFLT3ITDが存在せず、NPM1変異が付随して起こった場合の、良好な全生存の予測と関連していた。
KIT	AML患者全体の6%においてKITの変異が見られたが、コア結合因子の転座を有する患者において濃縮されていた。野生型KITを有するt(8;16)AML患者と比較して、KIT変異の存在下においてt(8;16)を有する患者は、悪化した全生存を有していた。
RUNX1	本研究におけるAML患者全体の5%にRUNX1の変異が存在した。
MLL	MLLの部分縦列重複は、(a) 高用量導入化学療法を受けている患者における改善された全生存の予測、及び(b) FLT3における変異に関わらず、細胞遺伝学的に中間リスクと定義された患者の不利な全生存の予測と関連していた。

10

20

30

40

ASXL1	ASXL1の変異は、(a) コホート全体のAML患者における不利な全生存の予測、(b) FLT3ITDを有さず、細胞遺伝学的に中間リスクと定義された患者の不利な全生存の予測と関連し、そして(c) 初期の誘導化学療法に対して応答しない患者において濃縮されていた。
PHF6	ASXL1の変異は、(a) コホート全体のAML患者における不利な全生存の予測、及び(b) FLT3ITDを有さず、細胞遺伝学的に中間リスクAMLと定義された患者の不利な全生存の予測と関連していた。
KRAS	本調査におけるAML患者の2%にKRASの変異が存在した。
PTEN	本調査におけるAML患者の2%にPTENの変異が存在した。
TP53	本調査におけるAML患者の2%にTP53の変異が存在した。
HRAS	本調査におけるAML患者においては、HRASの変異は発見しなかった。
EZH2	本調査におけるAML患者においては、EZH2の変異は発見しなかった。

AML患者における遺伝子18個の配列決定において同定された特異的な体細胞変異、及びこれらの変異の特性

遺伝子	同定された体細胞変異の特性及び種類
FLT3	<p>多数の体細胞の <i>FLT3</i> において、内部縦列重複が同定された。これらは、<i>FLT3</i> シグナル伝達の構成的活性化をもたらすことが示されており、以下にリストされている。加えて、<i>FLT3</i> のチロシンキナーゼドメインにおける突然変異もまた同定され、異常に活発な FLT3 シグナルをもたらすこともまた示された。</p> <p>同定された具体的な内部縦列重複変異は以下の通りであり、FLT3 の膜近傍ドメイン内のヌクレオチドの任意のインフレーム挿入は、内部縦列重複として記録した。</p> <p><i>FLT3</i> p. Q580_V581ins12; <i>FLT3</i> p. D586_N587ins15; <i>FLT3</i> p. F590_Y591ins14; <i>FLT3</i> p. Y591_V592ins23; <i>FLT3</i> p. D593_F594ins12; <i>FLT3</i> p. F594_R595ins14; <i>FLT3</i> p. R595_E596ins12; <i>FLT3</i> p. Y597_E598ins17; <i>FLT3</i> p. E598_Y599ins14; <i>FLT3</i> p. Y599_D600ins14; <i>FLT3</i> p. D600_L601ins21; <i>FLT3</i> p. K602_W603ins14; <i>FLT3</i> p. E604_F605ins15; <i>FLT3</i> p. L610_E611ins11; <i>FLT3</i> p. F612_G613ins30</p> <p>同定されたチロシンキナーゼドメイン変異: <i>FLT3</i> D835Y; <i>FLT3</i> D835E; <i>FLT3</i> D835H; <i>FLT3</i> D835V</p>
DNMT3A	<p><i>DNMT3A</i> における変異は、(1) タンパク質の機能欠失をもたらすと予測される、アウトオブフレーム型挿入／欠失、(2) タンパク質の機能欠失をもたらすと予測される、体細胞ナンセンス変異、及び(3) 体細胞ミスセンス変異として見出された。アウトオブフレーム型挿入／欠失又は体細胞ナンセンス変異は、いずれもアルゴリズムにおける突然変異として記録されることになる。</p> <p>挿入／欠失: FS at amino acid (AA) 296; FS at AA 458; FS at AA 492; FS at AA 537; FS at AA 571; FS at AA 592; FS at AA 639; FS at AA 695; FS at AA 706; FS at AA 731; FS at AA 765; FS at AA 772; FS at AA 804; FS at AA 902.</p> <p>ナンセンス変異: <i>DNMT3A</i> W581C; <i>DNMT3A</i> W581R; <i>DNMT3A</i> Y660X; <i>DNMT3A</i> Q696X; <i>DNMT3A</i> W753X; <i>DNMT3A</i> Q816X; <i>DNMT3A</i> Q886X; <i>DNMT3A</i> S892X.</p> <p>ミスセンス変異: <i>DNMT3A</i> E30A; <i>DNMT3A</i> P76Q; <i>DNMT3A</i> S105N; <i>DNMT3A</i> L125V; <i>DNMT3A</i> W297S; <i>DNMT3A</i> G298W; <i>DNMT3A</i> V328F; <i>DNMT3A</i> G511E; <i>DNMT3A</i> C537Y; <i>DNMT3A</i> W581C; <i>DNMT3A</i> W581R; <i>DNMT3A</i> R635W; <i>DNMT3A</i> V636L; <i>DNMT3A</i> S663P; <i>DNMT3A</i> E664K; <i>DNMT3A</i> R676W; <i>DNMT3A</i> I681T; <i>DNMT3A</i> G699S; <i>DNMT3A</i> S714C; <i>DNMT3A</i> V716I; <i>DNMT3A</i> T727A; <i>DNMT3A</i> F734L; <i>DNMT3A</i> T862N; <i>DNMT3A</i> R882C; <i>DNMT3A</i> R882H; <i>DNMT3A</i> R882S;</p>

10

20

30

40

N P M 1	<p>ヌクレオフォスミンのN末端核小体局在シグナル (N-terminal nucleolar localization signal) を混乱させそしてその代わりに核外移行シグナル (nuclear export signal) を生成する、<i>NPM1</i>における挿入／欠失変異が同定された。</p> <p><i>NPM1</i> p.W288fs*12; <i>NPM1</i> p.W288fs*16; <i>NPM1</i> p.W290fs*8; <i>NPM1</i> p.W290fs*10; <i>NPM1</i> p.W290_K292>CFSK</p>
N R A S	<p><i>NRAS</i>における活性化変異が同定された。</p> <p><i>NRas</i> G12A; <i>NRas</i> G12D; <i>NRas</i> G12S, <i>NRas</i> G13D; <i>NRas</i> G13R; <i>NRas</i> Q61R; <i>NRas</i> Q61E; <i>NRas</i> Q61H; <i>NRas</i> Q61K; <i>NRas</i> Q61R; <i>NRas</i> Q64D</p>
C E B P A	<p><i>CEBPA</i>における変異は、(1) アウトオブフレーム型挿入／欠失、(2) ナンセンス変異、及び(3) 体細胞ミスセンス変異として見出された。これらの全ての変異は、以前に体細胞変異として同定されており、そして改変された機能を有し、より短いと予測されるタンパク質産物をもたらすか、又は<i>CEBPA</i>の二量体化に影響するかのいずれかが示された。</p> <p>挿入／欠失: <i>CEBPA</i> FS at AA 13; <i>CEBPA</i> FS at AA 15; <i>CEBPA</i> FS at AA 20; <i>CEBPA</i> FS at AA 28; <i>CEBPA</i> FS at AA 35; <i>CEBPA</i> FS at AA 50; <i>CEBPA</i> FS at AA 93; <i>CEBPA</i> FS at AA 190; <i>CEBPA</i> FS at AA 195; <i>CEBPA</i> FS at AA 197; <i>CEBPA</i> FS at AA301; <i>CEBPA</i> FS at AA 303; <i>CEBPA</i> FS at AA 305; <i>CEBPA</i> FS at AA 308; <i>CEBPA</i> FS at AA 309; <i>CEBPA</i> FS at AA 311; <i>CEBPA</i> FS at AA 312; <i>CEBPA</i> FS at AA 313; <i>CEBPA</i> FS at AA 315.</p> <p>ナンセンス変異: <i>CEBPA</i> K275X; <i>CEBPA</i> E329X</p> <p>体細胞ミスセンス変異: <i>CEBPA</i> R291C; <i>CEBPA</i> R300H; <i>CEBPA</i> L335R; <i>CEBPA</i> R339P.</p>
T E T 2	<p><i>TET2</i>における変異は、タンパク質の機能欠失をもたらすと予測されるアウトオブフレーム型挿入／欠失、タンパク質の機能欠失をもたらすと予測される体細胞ナンセンス変異、及び体細胞ミスセンス変異として見出された。アウトオブフレーム型挿入／欠失又は体細胞ナンセンス変異は、いずれも我々のアルゴリズムにおいて、変異として記録される。</p> <p>挿入／欠失: <i>TET2</i> FS at AA 270; <i>TET2</i> FS at AA 586; <i>TET2</i> FS at AA 912; <i>TET2</i> FS at AA 921; <i>TET2</i> FS at AA 958; <i>TET2</i> FS at AA 966; <i>TET2</i> FS at AA 1034; <i>TET2</i> FS at AA 1114; <i>TET2</i> FS at AA 1118; <i>TET2</i> FS at AA 1299; <i>TET2</i> FS at AA 1322; <i>TET2</i> FS at AA 1395; <i>TET2</i> FS at AA 1439; <i>TET2</i> FS at AA1448; <i>TET2</i> FS at AA 1893; <i>TET2</i> FS at AA1960.</p> <p>ナンセンス変異: <i>TET2</i> S327X; <i>TET2</i> K433X; <i>TET2</i> R544X; <i>TET2</i> R550X; <i>TET2</i> Q622X; <i>TET2</i> Q891X; <i>TET2</i> Q916X; <i>TET2</i> W1003X; <i>TET2</i> E1405X; <i>TET2</i> S1486X; <i>TET2</i> Q1524X; <i>TET2</i> Y1902X</p> <p>ミスセンス変異: <i>TET2</i> P426L; <i>TET2</i> E452A; <i>TET2</i> F868L; <i>TET2</i> Q1021R; <i>TET2</i> Q1084P; <i>TET2</i> E1141K; <i>TET2</i> H1219Y; <i>TET2</i> N1260K; <i>TET2</i> R1261C; <i>TET2</i> G1283D; <i>TET2</i> W1292R; <i>TET2</i> R1365H; <i>TET2</i> G1369V; <i>TET2</i> R1572W; <i>TET2</i> H1817N; <i>TET2</i> E1851K; <i>TET2</i> I1873T; <i>TET2</i> R1896M; <i>TET2</i> S1898F; <i>TET2</i> P1962L</p>

10

20

30

40

WT 1	<p><i>WT 1</i>における変異は、体細胞ナンセンス変異と同様にアウト・オブ・フレーム型挿入／欠失として同定され、これらの変異の全ては、<i>WT 1</i>の機能を混乱させると予測される。体細胞ミスセンス変異もまた、同定された。</p> <p>挿入／欠失： <i>WT 1</i> FS at AA 95; <i>WT 1</i> FS at AA 123; <i>WT 1</i> FS at AA 303; <i>WT 1</i> FS at AA 368; <i>WT 1</i> FS at AA 369; <i>WT 1</i> FS at AA 370; <i>WT 1</i> FS at AA 371; <i>WT 1</i> FS at AA 377; <i>WT 1</i> FS at AA 380; <i>WT 1</i> FS at AA 381; <i>WT 1</i> FS at AA 390; <i>WT 1</i> FS at AA 395; <i>WT 1</i> FS at AA 409; <i>WT 1</i> FS at AA 420; <i>WT 1</i> FS at AA 471.</p> <p>ナンセンス変異： <i>WT 1</i> E302X; <i>WT 1</i> C350X; <i>WT 1</i> S381X; <i>WT 1</i> K459X</p> <p>ミスセンス変異： <i>WT 1</i> G60R; <i>WT 1</i> M250T; <i>WT 1</i> C350R; <i>WT 1</i> T337R.</p>
IDH 2	<p><i>IDH 2</i>において、機能獲得型点変異 (Gain-of-function point mutations) が見出された。</p> <p><i>IDH2</i> R140Q, <i>IDH2</i> R172K</p>
IDH 1	<p><i>IDH 1</i>において、機能獲得型点変異が見出された。</p> <p><i>IDH1</i> R132C, <i>IDH1</i> R132G, <i>IDH1</i> R132H, <i>IDH1</i> R132S.</p>
KIT	<p><i>KIT</i>シグナリングの異常活性化をもたらす、<i>KIT</i>における体細胞ミスセンス変異が見出された。これらは、816番目のアミノ酸におけるミスセンス変異、又はエキソン8におけるインフレーム欠失として見出された。</p> <p>インフレーム欠失： <i>KIT</i> FS at AA 418; <i>KIT</i> FS at AA 530.</p> <p>体細胞ミスセンス変異： <i>KIT</i> D816Y; <i>KIT</i> D816V.</p>
RUNX 1	<p><i>RUNX 1</i>における変異は、体細胞のアウトオブフレーム型挿入／欠失変異及びナンセンス変異として見出され、これらの全ては機能欠失をもたらすと予測される。体細胞ミスセンス変異もまた見出された。アウトオブフレーム型挿入／欠失又は体細胞ナンセンス変異は、いずれもアルゴリズムにおいて、変異として記録される。</p> <p>体細胞挿入／欠失： <i>RUNX1</i> FS at AA 135.; <i>RUNX1</i> FS at AA 147; <i>RUNX1</i> FS at AA 183; <i>RUNX1</i> FS at AA 185; <i>RUNX1</i> FS at AA 220; <i>RUNX1</i> FS at AA 236; <i>RUNX1</i> FS at AA 321; <i>RUNX1</i> FS at AA 340; <i>RUNX1</i> FS at AA 415.</p> <p>体細胞ナンセンス変異： <i>RUNX1</i> Y140X; <i>RUNX1</i> R204X; <i>RUNX1</i> Q272X; <i>RUNX1</i> E316X; <i>RUNX1</i> Y414X.</p> <p>体細胞ミスセンス変異： <i>RUNX1</i> E8Q; <i>RUNX1</i> G24A; <i>RUNX1</i> V31A; <i>RUNX1</i> L56S; <i>RUNX1</i> W106C; <i>RUNX1</i> F158S; <i>RUNX1</i> D160A; <i>RUNX1</i> D160E; <i>RUNX1</i> R166G; <i>RUNX1</i> S167T; <i>RUNX1</i> G168E; <i>RUNX1</i> D198N; <i>RUNX1</i> R232W.</p>
MLL	<p><i>MLL</i>における部分縦列重複をもたらす体細胞挿入が同定された。</p>

10

20

30

40

ASXL1	<p>ASXL1における変異は、体細胞のアウト・オブ・フレーム型挿入／欠失変異及びナンセンス変異として見出され、これらの全ては機能欠失をもたらすと予測される。体細胞ミスセンス変異もまた見出された。アウトオブフレーム型挿入／欠失又は体細胞ナンセンス変異はいずれも、アルゴリズムにおいて、変異として記録される。</p> <p>ASXL1 FS at AA 590; ASXL1 FS at AA 630; ASXL1 FS at AA 633; ASXL1 FS at AA 634; ASXL1 FS at AA 640; ASXL1 FS at AA 685; ASXL1 FS at AA 890.</p> <p>体細胞ナンセンス変異: ASXL1 C594X; ASXL1 R693X; ASXL1 R1068X</p> <p>体細胞ミスセンス変異: ASXL1 E348Q; ASXL1 M1050V.</p>	10
PHF6	<p>PHF6において、体細胞のアウトオブフレーム型挿入／欠失変異、ミスセンス変異、及びナンセンス変異が見られ、これらの全ては機能欠失をもたらすと予測される。アウトオブフレーム型挿入／欠失又は体細胞ナンセンス変異はいずれも、アルゴリズムにおいて、変異として記録される。</p> <p>挿入／欠失: PHF6 FS at AA 176.</p> <p>ナンセンス変異: PHF6 R274X; PHF6 G291X; PHF6 Y301X.</p> <p>体細胞ミスセンス変異: PHF6 I115K; PHF6 I314T; PHF6 H329L; PHF6 L362P.</p>	20
KRAS	<p>KRASにおける活性化変異が同定された。</p> <p>KRAS G12D; KRAS G12S; KRAS G12V; KRAS G13D; KRAS I36M; KRAS Q61H.</p>	
PTEN	<p>PTENにおいて、PTENの機能欠失をもたらすと予測される体細胞ミスセンス変異が見られた。アウトオブフレーム型挿入／欠失又は体細胞ナンセンス変異はいずれも、アルゴリズムにおいて、変異として記録される。</p> <p>PTEN H75L; PTEN N82Y; PTEN R142W; PTEN R308H; PTEN P339S; PTEN S380C; PTEN D386G</p>	30
TP53	<p>TP53において、体細胞アウトオブフレーム型挿入／欠失、ナンセンス変異、及びミスセンス変異が見られ、これらの全てはTP53の機能欠失をもたらすと予測される。アウトオブフレーム型挿入／欠失又は体細胞ナンセンス変異はいずれも、我々のアルゴリズムにおいて、変異として記録される。</p> <p>挿入／欠失: TP53 FS at AA 30; TP53 FS at AA 31; TP53 FS at AA 45; TP53 FS at AA 93; TP53 FS at AA 337.</p> <p>ナンセンス変異: TP53 R213X</p> <p>ミスセンス変異: TP53 S20L; TP53 F54L; TP53 H193R; TP53 R196Q; TP53 C242Y; TP53 R267Q); TP53 R273H; TP53 T284P; TP53 G356R.</p>	40

【 0 1 4 4 】

現在の調査に基づいて、AML患者用の改訂されたリスク層別化が考案された。まず、FLT3における内部縦列重複、MLLにおける部分縦列重複、又はASXL1若しくはPHF6における変異を有する患者は、細胞遺伝学的な特徴に関わらず、不利な全生存を有すると考えられる。対照的に、IDH2のR140又はCEBPAにおける変異を有す

10

20

30

40

50

る患者は、良好な全体的リスクを有すると予測される。上記の分子変化をいずれも有していない患者について、全体的なリスクを決定するために、次いで、細胞遺伝学的状態が考慮される。細胞遺伝学的状態は、Slovak, M et al. Blood 2000; 96: 4075 - 83による研究に基づいて、この予測アルゴリズムで定義されている。この細胞遺伝学的分類において、良好な細胞遺伝学的リスク($t(8; 21)$, $inv(16)$, $or t(16; 16)$)、又は不利な細胞遺伝学的リスク($del(5q)/25, 27/del(7q)$ 、 $abn 3q, 9q, 11q, 20q, 21q, 17p, t(6; 9)$ 、 $t(9; 22)$ 及び複雑な核型(3個以上の関係のない異常)について予測していると示された細胞遺伝学的変化を有する患者は、良好な全体的リスク又は不利な全体的リスクをそれぞれ有すると予測される。上記の良好な又は不利な細胞遺伝学的変化のいずれかを有していない患者は、次いで、細胞遺伝学的に中間リスクと定義されたAMLを有すると考えられる。細胞遺伝学的に中間リスクと定義されたAMLを有する前記の患者は、全体的リスクを決定するためにFLT3ITD変異の存在又は非存在に基づいてさらに細分される。細胞遺伝学的に中間リスクAMLと定義され、及びFLT3ITD変異を有しない患者は、(1)NPM1及びIDH1/2の両方における変異を有していない場合は良好な全体的リスク、(2)TET2、ASXL1、PHF6のいずれか1つにおける変異又はMLL-PTD変異を有する場合は、良好でない全体的リスク、(3)TET2、ASXL1、PHF6、及びMLL-PTD変異における変異を有さず、並びにIDH1又はIDH2変異の存在下においてNPM1変異を有しない場合は、中間の全体的リスクを有することが予測される。対照的に、細胞遺伝学的に中間リスクAMLと定義され、及びFLT3ITD変異が存在する患者は、(1)CEBPA変異を有する場合は、同様に中間の全体的リスク、(2)TET2若しくはDNMT3Aにおける変異、又はMLL-PTD変異、あるいは8トリソミーを有している場合は良好でない全体的リスク、(3)TET2若しくはDNMT3Aにおける変異を有さず、そしてMLL-PTD変異を有さず、さらに8トリソミーを有しない場合は、中間の全体的リスクを有することが予測される。AML患者の診断時に全体的リスクを予測するために役立つ前記アルゴリズムに加えて、本研究はまた、AML用の高用量導入化学療法に対する応答の分子予測因子(molecular predictors)を同定した。調査のこの部分においては、DNMT3A若しくはNPM1いずれか1個における変異又はMLL転座/再配列(translocation/rearrangement)を有する患者は、DNMT3A若しくはNPM1いずれか1つにおける変異又はMLL転座/再配列を有しない患者と比較して、誘導化学療法後に改善された全生存を有することが見出された。

10

20

30

40

50

【0145】

1つの実施態様において、核酸マーカーの発現は、急性骨髄性白血病の臨床治療パラダイムの選択用に使用される。本明細書に記載の治療の選択肢は、化学療法、放射線療法、アジュバント療法(adjuvant therapy)、又は前記の方法の任意の組み合わせを含むことができるが、これらには限定されない。変化可能な治療の観点は、投与量、投与タイミング、又は継続時間若しくは治療を含むことができるが、これらには限定されず；そして投与量、タイミング、又は継続期間を変更することができる他の治療と組み合わせることができる、又は組み合わせないこともできる。

【0146】

医学分野の当業者は、識別された核酸標的の1つ又はそれ以上の、区別を示す変異微分プロファイル(differential mutational profile)の評価に基づいて、適切な治療パラダイムを決定することができる。1つの実施態様では、前記に教示されるように、急性骨髄性白血病及び予後不良の指標であるマーカーを示す癌は、より積極的な治療法で治療されることができる。別の実施態様においては、治療の1つ又はそれ以上に対する乏しい応答者であることを示す遺伝子変異の位置は、代替療法の1つ又はそれ以上により治療されることができる。

【0147】

1つの実施態様では、サンプルは、静脈切開(phlebotomy)により血液から、又は当該

技術分野における任意の適切な手段、例えば、微細針吸引細胞、例えば、骨髄の細胞から得られる。サンプルは、単核細胞 1 つ又はそれ以上を含むことができる。分析のために必要とされるサンプル数は、1、100、500、1000、5000、10,000 から、50,000、100,000、1,000,000 まで又はさらに多くの細胞の範囲に渡ることができる。適切なサンプルの数は、細胞の組成、及びサンプルの状態、及びこの決定のための標準的な分取手順 (preparative steps) に基づいて決定することができ、そして本発明における使用のための核酸及び / 又はタンパク質のその後の単離は、当業者に周知である。

【0148】

本発明の範囲を限定することなく、当該技術分野で公知の技術の任意の数が、急性骨髄性白血病のプロファイリングのために使用されることができる。1 つの実施態様では、決定工程の 1 又は複数の工程は、シーケンシングアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応アッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ、変異に相補的なプローブを用いたハイブリダイゼーションアッセイ、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション (FISH)、核酸アレイアッセイ、ビーズアレイアッセイ、プライマー伸長アッセイ、酵素ミスマッチ切断アッセイ、分岐ハイブリダイゼーションアッセイ、NASBA アッセイ、分子ビーコンアッセイ、サイクリングプローブアッセイ、リガーゼ連鎖反応アッセイ、インベシブ切断構造アッセイ (invasive cleavage structure assays)、ARMS アッセイ、及びサンドイッチ分岐ハイブリダイゼーションアッセイを含む、検出アッセイの使用を含むが、これには限定されない。いくつかの実施態様においては、検出工程は、細胞溶解物 (cell lysates) を用いて行われる。いくつかの実施態様においては、方法は、第二核酸標的を検出する工程を含むことができる。1 つの実施態様では、第二核酸標的は RNA である。1 つの実施態様では、決定工程は、ポリメラーゼ連鎖反応、マイクロアレイ解析、免疫測定法、又はそれらの組み合わせを含む。

【0149】

現在請求している方法の 1 つの実施態様では、FLT3-ITD、DNMT3A、NPM1、IDH1、TET2、KIT、MLL-PTD、ASXL1、WT1、PHF6、CEBPA、IDH2 遺伝子の 1 つ又はそれ以上における変異は、生存についての及び / 又は治療に対する応答についての情報を提供し、前記遺伝子の 1 つ又はそれ以上における変異は、全生存の変化と関連している。本発明の 1 つの実施態様は、TET2、ASXL1、DNMT3A、PHF6、WT1、TP53、EZH2、RUNX1、PTEN、FLT3、CEBPA、MLL、HRAS、KRAS、NRAS、KIT、IDH1、及び IDH2 からなる群から選択される遺伝子の 1 つ又はそれ以上における変異状態を検出する工程をさらに含む。

【0150】

急性骨髄性白血病の標準的な治療への持続的応答を経験しないであろう個体を正確に識別する予測因子の同定が必要とされている。本願の発明者は、急性骨髄性白血病の患者の転帰に再現性良く関連付けられた、コンセンサス遺伝子プロファイルの必要性を確認した。特に、本出願の発明者らは、低い生存及び患者の転帰と関連した、急性骨髄性白血病患者における特定の遺伝子の変異を発見した。1 つの実施態様では、本方法は、急性骨髄性白血病の予後について、個体をスクリーニングしている。別の実施態様において、本方法は、急性骨髄性白血病の治療に対する個体の応答を、スクリーニングしている。

【0151】

TET2、ASXL1、DNMT3A、PHF6、WT1、TP53、EZH2、NPM1、CEBPA、RUNX1、及び PTEN からなる群から選択される遺伝子の 1 つ又はそれ以上のコード領域、並びに FLT3、HRAS、KRAS、NRAS、KIT、IDH1、及び IDH2 からなる群から選択される遺伝子の 1 つ又はそれ以上のコーディングエクソンが、変異の存在を検出するためにアッセイされる。特定の実施態様においては、FLT3-ITD、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、DNMT3A、IDH2、及び NPM1 の遺伝子の 1 つ又はそれ以上の変異状態から、生存についての及び / 又は

治療に対する応答についての情報が提供される。急性骨髄性白血病が再発性又は難治性急性骨髄性白血病であると、新たに診断されることができる。

【0152】

本発明の1つの実施態様は、AML患者の治療を決定するためのキットに関し、前記キットは、ASXL1、DNMT3A、NPM1、PHF6、WT1、TP53、EZH2、CEBPA、TET2、RUNX1、PTEN、FLT3、HRAS、KRAS、NRAS、KIT、IDH1、及びIDH2からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子における変異を検出する手段；並びに、1つ又はそれ以上の前記遺伝子の変異の存在に基づく、推奨される治療のための指示書を含む。一例では、DNMT3A若しくはNPM1の変異又はMLL転座の存在に基づく、患者のために推奨される治療のための指示書は、推奨される治療として高用量ダウノルビシンを示す。

10

【0153】

本発明のキットは、本発明の方法の少なくとも1部を実施するために任意の適切な試薬を含むことができ、前記キット及び試薬は、適当な容器1つ又はそれ以上の中に収容されている。例えば、キットは、個体から試料を得るための装置、例えば、針、シリンジ、及び/又は外科用メス(scalpel)を含むことができる。キットは他の試薬、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応に適した試薬例えばヌクレオチド、好熱性ポリメラーゼ、緩衝液、及び/又は塩を含んでもよい。キットは、ポリヌクレオチド、例えばマイクロアレイを含む基質を含むことができ、前記マイクロアレイは、ASXL1、DNMT3A、PHF6、NPM1、CEBPA、TET2、WT1、TP53、EZH2、RUNX1、PTEN、FLT3、HRAS、KRAS、NRAS、KIT、IDH1、及びIDH2遺伝子の1つ又はそれ以上を含んでいる。

20

【0154】

別の実施態様においては、アレイは、TET2、ASXL1、DNMT3A、PHF6、WT1、TP53、EZH2、RUNX1、PTEN、FLT3、HRAS、KRAS、NRAS、NPM1、CEBPA、KIT、IDH1、及びIDH2遺伝子の少なくとも2個、又は少なくとも3個、又は少なくとも5個、又は少なくとも8個、又は少なくとも11個、又は少なくとも18個をハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。1つの実施態様においては、アレイは、リストされた遺伝子全てをハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

30

【0155】

前記のように、本発明の薬剤は、遺伝子治療又はアンチセンス治療に関する治療薬であることができる。mRNA配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドは、mRNAの翻訳をブロックするために細胞に導入されることができ、それ故にmRNAをコードする遺伝子の機能をブロックする。遺伝子発現をブロックするオリゴヌクレオチドの使用は、例えば、Strachan and Read, Human Molecular Genetics, 1996に記載されている。これらのアンチセンス分子は、DNA、DNAの安定な誘導体例えばホスホロチオエート若しくは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薬であることができる。アンチセンス分子は、マイクロインジェクション、リポソームカプセル化、又はアンチセンス配列を有するベクターからの発現により細胞に導入されることができ。

40

【0156】

本開示の一観点は、急性骨髄性白血病の患者を、治療、予防、又は管理する方法であり、前記方法は、DNMT3AとNPM1遺伝子における変異の存在及びMLLの転座の存在について、患者から分離した遺伝子サンプルを分析する工程と；DNMT3A若しくはNPM1における変異又はMLLの転座が存在する場合に、前記患者が、標準用量療法よりも高用量療法に対して、より良好に応答するであろう患者であると同定する工程と；高用量療法を患者に投与する工程とを含む。患者は、一例においては、細胞遺伝学的分析に基づいて、中間リスクとして特徴付けられる。一例においては、治療は、アントラサイク

50

リンの投与を含む。関連する実施態様において、高用量療法を投与することは、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ミトキサントロン、及びアドリアマイシンからなる群から選択される1つ又はそれ以上の高用量アントラサイクリン抗生物質を投与することを含む。1つの実施態様では、ダウノルビシン、イダルビシン、及び/又はミトキサントロンが使用される。

【0157】

1つの実施態様では、高用量投与は、体表面積の平方メートル当たり60mg ($60 \text{ mg} / \text{m}^2$) 又はそれ以上のダウノルビシンを、3日間毎日投与される。1つの実施態様では、高用量投与は、ダウノルビシンを、体表面積の平方メートル当たり60mg ($60 \text{ mg} / \text{m}^2$) 又はそれ以上、3日間毎日投与される。特定の実施態様では、高用量投与は、ダウノルビシンを、体表面積の平方メートル当たり約90mg ($90 \text{ mg} / \text{m}^2$) 又はそれ以上、3日間毎日投与される。1つの実施態様では、高用量ダウノルビシンは、約70mg ($70 \text{ mg} / \text{m}^2$) ~ 約140mg ($140 \text{ mg} / \text{m}^2$) で投与される。特定の実施態様では、高用量ダウノルビシンは、約70mg ($70 \text{ mg} / \text{m}^2$) ~ 約120mg ($120 \text{ mg} / \text{m}^2$) で投与される。関連する実施態様では、この高用量投与は、3日間毎日与えられ、すなわち、例えば総量約300mg ($300 \text{ mg} / \text{m}^2$) を3日間にわたり ($3 \times 100 \text{ mg} / \text{m}^2$) 与えられる。別の例では、この高用量は、2~6日間毎日投与される。他の臨床的状況では、中間用量のダウノルビシンが投与される。1つの実施態様では、中間用量のダウノルビシンは、約60mg ($60 \text{ mg} / \text{m}^2$) で投与される。1つの実施態様では、中間用量のダウノルビシンは、約30mg ($30 \text{ mg} / \text{m}^2$) ~ 約70mg ($70 \text{ mg} / \text{m}^2$) で投与される。さらに、関連するアントラサイクリンは、イダルビシンであり、1つの実施態様では、約4mg ($4 \text{ mg} / \text{m}^2$) ~ 約25mg ($25 \text{ mg} / \text{m}^2$) で投与される。1つの実施態様では、高用量イダルビシンは、約10mg ($10 \text{ mg} / \text{m}^2$) ~ 約20mg ($20 \text{ mg} / \text{m}^2$) で投与される。1つの実施態様では、中間用量イダルビシンは、約6mg ($6 \text{ mg} / \text{m}^2$) ~ 約10mg ($10 \text{ mg} / \text{m}^2$) で投与される。特定の実施態様においては、イダルビシンは、約6mg ($6 \text{ mg} / \text{m}^2$) の用量で5日間毎日投与される。別の例では、この中間用量は、2~10日間毎日投与される。

【0158】

別の観点において、本開示は、急性骨髄性白血病患者の個人用のゲノムプロファイルの製造方法であって、前記方法は：患者からの骨髄吸引液の又は血液のサンプルから抽出した単核細胞を、遺伝子変異解析に供する工程と；前記サンプルをアッセイしそして前記細胞中のFLT3ITD、NPM1、DNMT3A、NRAS、CEBPA、TET2、WT1、IDH1、IDH2、KIT、RUNX1、MLL-PTD、ASXL1、PHF6、KRAS、PTEN、P53、HRAS、及びEZH2からなる群から選択される遺伝子における1つ又はそれ以上の変異並びに8トリソミーを検出する工程と；遺伝子変異解析により得られたデータの報告を作成する工程とを含み、前記報告は、患者の生存の可能性の予測又は治療に対する応答の予測を含む。

【0159】

RNA又はタンパク質のモニタリングにより遺伝子発現をモニタリングする方法は、当該技術分野において公知である。RNAレベルは当業者に公知の任意の方法、例えばディファレンシャルスクリーニング、サブトラクティブハイブリダイゼーション、ディファレンシャルディスプレイ、及びマイクロアレイにより測定されることができる。タンパク質に特異的なポリクローナル又はモノクローナル抗体のいずれかを使用した、タンパク質の発現を検出及び測定するための多様なプロトコルは、当該技術分野で公知である。例としては、ウェスタンブロット、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、及び蛍光活性化細胞ソーティング (FACS) が含まれる。

【0160】

実施例

【0161】

本発明の特定の観点及び実施態様の例示のためにのみ含まれる、以下の実施例を参照することにより、一般的に記載されている本発明をより容易に理解することができ、そして任意の方法における発明に限定することを意図しない。

【0162】

各出願及び特許において引用される各資料及び文献（「出願引用文献（application cited documents）」）と同様に本文中に引用される各出願及び特許、並びにこれらの出願及び特許のいずれかからの優先権に対応する及び／又は分節する（paragraphing）各PCT及び外国出願又は特許、並びに各出願引用文献において参照又は引用されている各資料は、参照することにより本明細書に明示的に組み込まれる。より一般的には、文書又は文献は、文献リスト又はテキスト自体のいずれかで引用されており；そして、各々のこれらの資料又は文献（本明細書引用文献（herein-cited references））は、各々の本明細書引用文献において引用されている各資料又は文献（任意の製造業者の仕様書、指示書などを含む）と同様に、参照することにより本明細書に明示的に組み込まれる。

10

【0163】

患者

【0164】

試験（N = 398）及び検証（N = 104）コホートにおけるECOG E1900試験からの診断患者サンプルに対して変異分析を行った。前記試験コホートは、生存可能な凍結細胞が、DNA抽出及び変異プロファイリング用に利用可能である、全てのE1900の患者を含んでいた。検証コホートは、変異研究用のDNA抽出のために使用される、トリゾール中に貯蔵した患者の第二のセットを含んでいた。

【0165】

完全なE1900試験コホートと比較した、試験された患者の臨床学的特徴が表1である。患者の追跡期間中央値（The median follow-up time）は、誘導ランダム化（induction randomization）からの47.4ヶ月の分析を含んでいた。再発性細胞遺伝学的病変に対する、細胞遺伝学的分析、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション、及びRT-PCRを、最初に記載したように、Slovak et alにより行い、そしてECOG細胞遺伝学委員会（Cytogenetics Committee）による中央判定（central review）を事前に活用した（文献16及び17参照）。

20

【0166】

変異分析

【0167】

DNAの供給源は、サンプルの55.2%（277/502）は骨髓、そして44.8%（225/502）は末梢血であった。出願人らは、TET2、ASXL1、DNMT3A、CEBPA、PHF6、WT1、TP53、EZH2、RUNX1、及びPTENの全てのコード領域、並びにFLT3、NPM1、HRAS、KRAS、NRAS、KIT、IDH1、及びIDH2についての前記した変異の領域の配列を決定した。

30

【0168】

本開示で利用される全プライマーのゲノム座標及び配列が、表2に提供される。対の寛解DNA（Paired remission DNA）は、最初の分析コホートにおけるサンプル398個中の241個及び検証コホートにおける104個中の65個において入手可能であった。寛解DNAが入手不可能でありそして体細胞変異の既刊文献からも得られなかったために、真正体細胞変異として検証不可能であった変異体を、特定の遺伝子の変異状態に関して検閲した（censored）。配列決定方法のさらなる詳細を以下に提供する。

40

【0169】

統計学的分析

【0170】

変異の対の相互排他性を、4倍分割表（fourfold contingency tables）及びフィッシャーの直接確率検定によって評価した。変異と細胞遺伝学的リスク分類との間の関連を、カイ二乗検定を用いて試験した。階層的クラスタリング（Hierarchical clustering）を、ランス・ウィリアムス相違式（Lance-Williams dissimilarity formula）及び完全連鎖（complete linkage）を用いて行った。

【0171】

50

生存期間を、ランダム化の日から、死亡した者については死亡日まで及び分析時に生存していた者については最後のフォローアップの日まで測定した。生存可能性を、カプラン・マイヤー法を用いて推定し、そしてログランク検定を用いて変異体及び野生型の患者間で比較した。多変量解析を、前進的選択 (forward selection) による Cox モデルを用いて行った。比較ハザード仮説 (Proportional hazards assumption) を、時間の関数 (functions of time) 上のスケーリングされたショーンフェルド残差 (Schoenfeld residuals) の回帰においてゼロでない傾きを試験することによって確認した (表 3)。

【0172】

必要である場合、例えば、様々なサブセットにおいて実施された分析の場合は、単変量解析の結果を、フォワード変数検索 (forward variable search) に含まれるべき変数を選択するために使用した。最終的な多変量モデルにより、新規なリスク分類ルールの開発が報告された。必要である場合は、帰無仮説が棄却される可能性 (FWER) (family wise error rate) を制御するために、SAS の PROC MULTTEST 又は R¹⁹ の multtest ライブラリを通して得られた再サンプリングにより近似された完全な帰無分布 (null distribution) を使用して、p 値を調節した。これらの調節は、複数の対でのテストが行われたことを考慮し、偽発見 (false discoveries) 1 つ以上を行う確率を調節するために行われた。唯一の例外は、誘導用量に対する応答に及ぼす突然変異の影響に関する試験のための調節であり、これにはステップダウンホルム手順 (step-down Holm procedure) を、複数の試験について補正するために使用した。全ての分析を SAS 9.2 (www.sas.com) 及び R 2.12 (www.r-project.org) を使用して行った。

【0173】

補助的な方法

【0174】

ECOG 1900 臨床試験からの診断サンプル: ECOG E1900 試験に登録している患者 398 人の治療前骨髄サンプルから、DNA を単離した; DNA を、フィコール精製後の単核細胞から単離した。IRB 承認を、ワイルコーネル医科大学及びメモリアルスローンケタリングがんセンターで得た。全てのゲノム DNA サンプルを、29 ポリメラーゼを用いて全ゲノム増幅した。寛解 DNA は、導入化学療法後に完全寛解を達成した患者 241 人から入手可能であった。前記したように、再発細胞遺伝学的病変に対する、細胞遺伝学的分析、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション、及び RT-PCR を、ECOG 細胞遺伝学委員会の中央判定を使用して実施した (Bullinger et al., N Engl J Med 2004, 350, 1605 - 1616)。

【0175】

総合的変異解析: TET2、ASXL1、DNMT3A、PHF6、WT1、TP53、NPM1、CEBPA、EZH2、RUNX1、及び PTEN の全てのコード領域、並びに FLT3、HRAS、KRAS、NRAS、KIT、IDH1、及び IDH2 の既知の体細胞変異変異の分析を、前記したように PCR 増幅及び双方向サンガーシーケンシングを用いて実施した。プライマー配列 13 配列及び PCR 条件が表 1 で提供される。

【0176】

個別の患者サンプル中の標的領域を、標準的な技術及び従来のサンガーシーケンシングを用いて PCR 増幅し、平均品質スコア (average quality score) 20 又はそれ以上を有して読み込んだ全ての整理された配列は、収率 93.3% である。全ての波形を、ミューテーションサーベイヤー (Mutation Surveyor) (Soft Genetics 社、ステートカレッジ、PA) を用いて手動で検討した。全ての変異体を、反復 PCR 増幅及び非増幅診断 DNA のサンガーリシーケンシング (Sanger resequencing) により検証した。体細胞又は生殖細胞のいずれかにおいて以前に報告されていない全ての突然変異を、体細胞の状態を決定するために、入手可能な場合は、一致した寛解 DNA において分析した。体細胞の状態を決定できなかった変異体を有する全ての患者は、特定の遺伝子についての変異状態に関して検閲した。

【0177】

NPM1 / CEBPA 次世代シーケンシング分析：NPM1における標準的なフレームシフト変異近傍のモノヌクレオチド区域 (mononucleotide tract) 及びCEBPA遺伝子の高GC含量により、一次変異コール用 (primary mutation calling) の十分に高い品質のサンガーシーケンストレースを得るための出願人の能力が制限された。したがって、出願人は、SOLiD4システムを使用して、NPM1及びCEBPAについてプールされたアンプリコンのリシーケンシング (pooled amplicon resequencing) を実施した。我々は、PCR増幅を実施し、次いでバーコーディング (20サンプルそれぞれの20のプール) 及びSOLiDシーケンシングを実施した。参照配列中に存在しない全ての変異体を、反復PCR増幅及びサンガーシーケンシングにより、手動で検査及び検証した。

【0178】

変異の共同性のマトリックス：出願人は、AML患者において共起している変異を可視化するためのCircosグラフィカルアルゴリズムを適応させた。弧長は、最初の遺伝子に変異を有する患者の割合に相当し、リボンは第二の遺伝子で同時に起きる (coincident) 変異を有する患者の割合に相当する。変異の対の共起は一度だけ示され、時計回り方向に最初の遺伝子で始まる。明確にするために対の変異のみが符号化されるので、弧長を、弧の相対的サイズ及び各変異のサブセット内の空きスペースによって表される単一の変異対立遺伝子を有する患者の正しい比率を維持するように調整した。

【0179】

統計学的分析：変異の対の相互排他性は、4倍分割表及びフィッシャーの直接確率検定によって評価した。変異と細胞遺伝学的リスク分類との間の相関は、カイ二乗検定を用いて試験した。階層的クラスタリングは、ランス・ウィリアムス相違式と完全連鎖を用いて行った。生存期間を、ランダム化の日から、死亡した者については死亡日まで及び分析時に生存していた者については最後のフォローアップの日まで測定した。生存可能性を、カプラン・マイヤー法を用いて推定し、そしてログランク検定を用いて変異体及び野生型の患者間で比較した。多変量解析を、Coxモデルを用いて行った。比較ハザード仮説を、時間の関数上のスケールリングされたショーンフェルド残差の回帰においてゼロでない傾きを試験することによって確認した。本研究で実施した統計分析の多くは、比較ハザード仮説に依存するCox回帰を使用している。

【0180】

表3は、得られた生存曲線 (各変異の、変異体についての1つの曲線及び野生型についての1つの曲線) が、この仮説を満たしているかどうかを決定するために、各変異について実施された検査の結果を示している。有意なp値により、提案されたハザード仮説からの逸脱が示される。この研究に含まれている27個の変異のうち、1つの変異のみが比例ハザードから有意に逸脱していた (MLL - PTD, $p = 0.04$)。可能な多重検定の問題を考慮し、この表において偶然に1~2の有意性が期待されたであろうゆえに、出願人は、全ての変異についてCox回帰モデルを使用することが許容可能であると結論付けた。フォワードモデル選択 (Forward model selection) を使用した。必要である場合、例えば、様々なサブセットにおいて実施された分析の場合は、単変量解析の結果を、フォワード変数検索に含まれるべき変数を選択するために使用した。最終的な多変量モデルにより、新規なリスク分類ルールの開発が報告された。全ての分析をSAS 9.2 (www.sas.com) 及びR 2.12 (www.r-project.org) を使用して行った。

【0181】

デノボAMLにおける遺伝的変異の頻度。体細胞変異は、患者の97.3%で確認された。図1A - Cは、コホート全体における体細胞変異の頻度、及びCircosプロットを用いて視覚的に表現した様々な変異間の相互関係を示している。全ての分子的なサブセットのデータは、図6及び7並びに表4及び5により提供される。特に、中間リスクAML患者における変異の不均一性は、良好な又は不利なリスクのAML患者におけるものよりも高かった ($p = 0.01$ 、図7D)。

【0182】

AMLにおける変異の相補群。総合的変異解析により、出願人は、E1900患者コホ

10

20

30

40

50

ートにおいて、頻繁に共起している変異及び相互に排他的な変異を同定することが可能となった(表6)。KIT変異とコア結合因子変異 $t(8;21)$ 及び $inv(16)/t(16;16)$ との共起が頻繁にないのに加えて($p < 0.001$)、出願人は、IDH1又はIDH2変異とNPM1変異との($p < 0.001$)、並びにDNMT3AとNPM1、FLT3、及びIDH1対立遺伝子との有意な共起性を見出した(全てについて $p < 0.001$)(表7)。IDH1及びIDH2変異がTET2突然変異と相互に排他的であったことを、出願人は以前に報告した;詳細な変異分析により、IDH1/2変異はまた、WT1変異に対しても排他的であることが明らかになった($p < 0.001$; 図8及び表8)。出願人はまた、DNMT3A変異とMLL転座とが相互に排他的であることを発見した($p < 0.01$)。

10

【0183】

AMLにおける全生存の分子的决定因子。単変量分析により、FLT3内部縦列重複(FLT3-ITD)($p = 0.001$)及びMLL部分縦列重複(MLL-PTD)($P = 0.009$)変異が、不利な全生存と関連していたことが明らかになり(表9)、一方で、CEBPA変異($p = 0.05$)並びにコア結合因子 $t(8;21)$ 及び $inv(16)/t(16;16)$ ($p < 0.001$)が、改善された全生存と関連していた^{2, 23}。加えて、PHF6($p = 0.006$)及びASXL1変異($p = 0.05$)は、減少した全生存と関連していた(図9)。IDH2変異は、コホート全体において、改善された全生存と関連していた(図10)($p = 0.01$; 3年の全生存 = 66%)。IDH2変異の良好な影響は、IDH2 R140Q変異を有する患者においては排他的であった($p = 0.009$; 図10)。単変量解析の全ての調査結果はまた、MLL-PTD、PHF6、及びASXL1変異を除いて、多変量解析($p < 0.05$ に調整)(年齢、白血球数、移植及び細胞遺伝学を考慮)において統計的に有意であった(表9)。KIT変異は、 $t(8;21)$ 陽性AML($p = 0.006$)において減少した全生存と関連していたが、 $inv(16)/t(16;16)$ を有する患者の全生存とは関連していなかった($p = 0.19$)(図11)。

20

【0184】

中間リスクAMLにおける分子変化の予後の値。細胞遺伝学的に中間リスクと定義されたAML(表10)の患者の中で、FLT3-ITD変異は減少した全生存と関連していた($p = 0.008$)。コホート全体へのそれら効果と同様に、ASXL1及びPHF6変異は、減少した生存と関連し、そしてIDH2 R140Q変異は、改善された全生存と関連していた(表10)。また、出願人は、TET2変異が中間リスクAML患者における減少した全生存に関連していることを見出した($p = 0.007$; 図12)。

30

【0185】

多変量統計分析により、FLT3-ITD変異が、中間リスクAML($p < 0.001$ に調整)を有する患者における転帰の主要な予測因子を示すことを明らかにした。出願人は、その後、中間リスクAMLを有する、FLT3-ITD野生型及び変異体患者のそれぞれにおいて、転帰に影響を与える突然変異を同定するために多変量解析を行った。FLT3-ITD野生型で中間リスクAMLの患者においては、TET2、ASXL1、PHF6、及びMLL-PTD変異は、独立して、有害転帰と関連していた。重要なことに、IDH1/IDH2とNPM1の両方の変異(3年の全生存 = 89%)は、この患者のサブセット内の改善された全生存を有していたが、IDH1とIDH2の両方が野生型でNPM1が変異型の患者(3年の全生存 = 31%)は、改善された全生存を有していなかった($p < 0.001$ 、図13)。我々は、次いで、FLT3-ITD野生型で中間リスクAMLの患者を、全生存において著しい違いを有する3つのカテゴリーに分類した($p < 0.001$ に調整、図2A): IDH1/IDH2及びNPM1の変異(3年の全生存 = 89%)、TET2、ASXL1、PHF6、又はMLL-PTDのいずれかの変異(3年の全生存 = 6.3%)、TET2、ASXL1、PHF6、及びMLL-PTDが野生型であり、IDH/NPM1変異が共起していない(3年の全生存 = 46.2%)。正常な核型を有する患者に限定した場合でも、分析では、同様の結果が得られた(図14A)

40

50

。

【0186】

F L T 3 - I T D 変異体で中間リスクの A M L 患者において、C E B P A 変異は改善された結果と関連し、そして 8 トリソミー並びに T E T 2、D N M T 3 A、及び M L L - P T D 変異は有害転帰に関連していた。私たちはこれらのデータを使用して、F L T 3 - I T D 変異体であり中間リスク A M L である患者を 3 つのカテゴリーに分類した。第一のカテゴリーは、8 トリソミー、又は T E T 2、D N M T 3 A、若しくは M L L - P T D 変異であり、有害転帰に関連しており（3 年の全生存 = 14.5%）、C E B P A、T E T 2、D N M T 3 A、及び M L L - P T D が野生型の患者（3 年の全生存 = 35.2%； $p < 0.001$ ）、又は C E B P A 変異を有する患者（3 年の全生存 = 42%； $p < 0.001$ 、図 2 B）よりも有意に悪かった。F L T 3 - I T D 変異体であり中間リスクの A M L であり C E B P A、T E T 2、D N M T 3 A、及び M L L - P T D が野生型である患者は、C E B P A 変異 / F L T 3 - I T D 変異 A M L 患者と相違せず（ $p = 0.34$ ）、これは、良好でないリスクの変異の存在が、C E B P A 変異の非存在単独よりも、より正確に有害転帰を有する F L T 3 - I T D 変異を有する A M L 患者を識別することを示唆している。これらの同じ 3 つのリスク群はまた、F L T 3 - I T D 変異体で正常核型 A M L における有意な予後値を有していた（図 14 B）。

10

【0187】

変異と細胞遺伝学とを統合したプロファイリングを使用した予後スキーム。これらの結果により、我々は、良好な（中央値：3 年に未到達：64%）、中間の（25.4ヶ月、42%）、及び不利な（10.1ヶ月、12%）リスクを有するリスク群 3 つを有する、細胞遺伝学的データ及び総合的変異分析からの、我々の発見を統合する予後スキームを開発した（図 3 A 及び 3 B、表 11）。変異の予後スキームは、多変量解析において、年齢、白血球数、誘導用量、及び移植の状況が独立した転帰について予測した（ $p < 0.001$ に調整）。我々の分類（図 15）は、自己、同種異系、又は強化化学療法単独の寛解後療法に関わらず当てはまった（図 15）。私たちの予後分類の変数の数を考慮して、我々は E C O G 1900 試験からの患者 104 人の独立したコホートにおいて、この予測因子の再現性をテストした。重要なことに、検証コホートの変異分析は、A M L における結果を予測する我々の予後スキームの再現性を確認した（ $p < 0.001$ に調整；図 3 C）。突然変異の予後スキームは、試験コホート内及び組み合わせテスト / 検証コホートにおける、治療関連死亡率（30 日以内の死亡）又は導入化学療法に対する応答の欠如（完全寛解の達成ができないこと）とは無関係であった（表 12）。

20

30

【0188】

導入化学療法に対する応答の遺伝的予測因子。最近の研究において、D N M T 3 A 変異 A M L は、有害転帰に関連していることが指摘された。しかしながら、出願人はここで、その D N M T 3 A 変異は E C O G 1900 コホートにおける不利な結果と関連していなかったことを発見した（図 4 A； $p = 0.15$ ）。E C O G 1900 試験は、シタラビンに加えてダウノルビシン 45 又は 90 mg / m² による誘導療法に対する患者をランダム化した（Fernandez et al. N Eng J Med 2009, 361: 1249 - 1259）。したがって、出願人は、高用量ダウノルビシンが D N M T 3 A 変異を有する A M L 患者における転帰を改善することに着想した。加えて、出願人は、D N M T 3 A 変異状態が用量強化化学療法による結果に大きな影響を与えることを見出した（図 4 B； $p = 0.02$ ）。

40

【0189】

出願人は次いで、治療群に応じた結果に対する D N M T 3 A 変異状態の影響を評価し、そして高用量ダウノルビシンは D N M T 3 A 変異体の患者における生存の改善と関連していたが、（図 16 A、 $p = 0.04$ ）、D N M T 3 A 野生型の患者においては関連していないことが分かった（図 16 B、 $p = 0.15$ ）。D N M T 3 A 変異に加えて、単変量解析により、用量強化療法が M L L 転座（図 16 C 及び 11 D； $p = 0.01$ ；多重検定のために調節された p 値 = 0.06）及び N P M 1 変異（図 16 E 及び 11 F； $p = 0.$

50

0.1 ; 多重検定のために調節された p 値 = 0.1 ; 表 13) を有する AML 患者の結果を改善することが明らかになった。

【0190】

出願人は次いで、我々のコホートの患者を、DNMT3A 若しくは NPM1 における変異又は MLL 転座を有する患者及びこれら 3 個の遺伝子異常が野生型である、2 つの群に分離した。用量強化誘導療法は、DNMT3A / NPM1 / MLL 転座陽性患者の生存における著しい改善と関連していたが (図 4C、 $p = 0.001$)、DNMT3A、NPM1、又は MLL 転座が野生型の患者とは関連していなかった (図 4D、 $p = 0.67$)。この発見は、年齢、白血球数、移植の状態、治療関連死亡率、及び化学療法耐性の臨床的共変数 (clinical co-variates) とは無関係であり (変異型及び野生型患者のそれぞれの調整された p 値 = 0.008、及び p 値 = 0.34)、これは、高用量アントラサイクリン化学療法は、遺伝的に定義された AML のサブグループに利益を提供することを示唆している。

10

【0191】

各々の個別の刊行物又は特許が具体的かつ個別に参照により組み込まれることが示されたかのように、本明細書で言及する全ての刊行物、特許、および特許出願は、その全体が本明細書中で参照として組み込まれる。矛盾する場合は、本明細書中の任意の定義を含む本出願が支配する。本発明のいくつかの観点は、本明細書に記載及び図示されているが、代替的な観点は、同じ目的を達成するために当業者によって行われることができる。当業者は通常の実験、本明細書に説明される特定の実施例の多くの等価物を用いることにより理解し、或いは解明することが可能である。したがって、本発明の真の精神及び範囲内に含まれるような全ての代替の観点をカバーすることが、添付の特許請求の範囲によって意図されている。

20

【表 1 a】

変数	試験コホート (N = 398)	検証コホート (N = 104)	コホート全体 (N=657)
Age			
Group – no (%)			
< 50yr	227 (57.0)	42 (40.8)	360 (54.8)
> 50 yr	171 (43.0)	61 (59.2)	297 (45.2)
Median- yr	46.5	53	48.0
Range- yr	18-60	18-60	17-60
Sex – no. (%)			
Male	207 (52.0)	51 (49.5)	335 (51.0)
Female	191 (48.0)	52 (50.5)	322 (49.0)
末梢血液白血球数			
Level- no. (%)			
< 10,000/mm ³	123 (30.9)	84 (81.6)	306 (46.6)
≥ 10,000/mm ³	275 (69.1)	18 (17.5)	350 (53.3)
Missing data	0 (0)	1 (1)	1 (0.2)
Median- cells/mm ³ x 1000	19.9	2.5	12.3
Range - cells/mm ³ x 1000	1 – 213	1- 117	1 – 366
ヘモグロビン			
Level – no. (%)			
<10g/dl	276 (69.3)	77 (74.8)	464 (70.6)
≥10g/dl	121 (30.4)	25 (24.3)	191 (29.1)
Missing data	1 (0.3)	1 (1)	2 (0.3)
Median – g/dl	9.2	9.2	9.2
Range – g/dl	5 - 30	5-14	5 – 30
末梢血液血小板数			
Level – no. (%)			
<50,000/mm ³	194 (48.7)	43 (41.7)	305 (46.4)
≥50,000/mm ³	204 (51.3)	59 (57.3)	351 (53.4)
Missing data	0 (0)	1 (1)	1 (0.2)
Median – g/dl	50.0	61	50.0
Range – g/dl	1 - 650	6-995	1 – 995
芽球			
末梢血液			
Median %	47.5	8	31
Range %	0-98	0-99	0-99
骨髓			
Median %	68.5	49	64.0
Range %	3 - 100	17-100	3 - 100
白血病分類 – no (%)			
Not reviewed	0 (0)	0	21 (3.2)
最末分化型 A M L	20 (5.0)	5 (4.9)	29 (4.4)

10

20

【表 1 b】

末分化型 A M L	96 (24.1)	22 (21.4)	155 (23.6)
分化型 A M L	61 (15.3)	27 (26.2)	112 (17.0)
急性骨髓単球性白血病	52 (13.1)	7 (6.8)	63 (9.6)
急性骨髓単球性/単芽球性白血病	27 (6.8)	3 (2.9)	40 (6.1)
急性赤白血病	8 (2.0)	6 (5.8)	29 (4.4)
急性巨核芽球性白血病	0 (0)	2 (1.9)	3 (0.5)
細胞遺伝学的プロファイル – no. (%)			
良好	67 (16.8)	10 (9.7)	89 (13.5)
未確定	85 (21.4)	22 (21.4)	176 (26.8)
中間	180 (45.2)	42 (40.8)	267 (40.6)
通常の核型	163 (41.0)	42 (40.4)	244 (37.1)
良好でない	65 (16.3)	29 (28.2)	122 (18.6)
二次性 A M L 患者	11/398 (2.8)	4 (3.9)	22/657 (3.3)
Survival (days)			
Median	535.2	650.9	621

30

40

【表 2】

総合的遺伝分析に利用されたゲノムDNAプライマー配列。

全てのプライマー配列はM13F2/M13R2タグで表示される。

Gene	ターゲット領域の ゲノム座標	Forward Primer Sequence	SEQ ID NO.	Reverse Primer Sequence	SEQ ID NO.
ASXL 1	chr20:3041019 4-30410296	GTAAACGACGGCCAGTGGTCTGTCTCAGTCCCTCA	1	CAGGAAACAGCTATGACCTCTTAAAGGAAGATGGCCCC	166
	chr20:3041784 7-30417930	GTAAACGACGGCCAGTCCAGCGGTACCTCATAGCAT	2	CAGGAAACAGCTATGACCGCGTTAGGCACAATAGAGGC	167
	chr20:3042047 8-30420587	GTAAACGACGGCCAGTTGGATTTTCGGGTATCACATAA	3	CAGGAAACAGCTATGACCTccaagaatcaCTGCACCAA	168
	chr20:3047959 1-30479712	GTAAACGACGGCCAGTTCCCTCTTTTCAAAGCATACA	4	CAGGAAACAGCTATGACCACCCATCCATTAAAGGTCC	169
	chr20:3047978 8-30479886	GTAAACGACGGCCAGTTTGTCTGCACAGAAGGATGC	5	CAGGAAACAGCTATGACCTGTCTCATTCATCTCTCCA	170
	chr20:3048080 1-30480895	GTAAACGACGGCCAGTAATGATGCTTGGCACAGTGA	6	CAGGAAACAGCTATGACCCAGAGCCGAGCACTAGAACCC	171
	chr20:3048136 4-30481517	GTAAACGACGGCCAGTGGTTCTAGTGTGGGCTCTG	7	CAGGAAACAGCTATGACCAAAATAGAGGGCCACCCAAG	172
	chr20:3048278 4-30482948	GTAAACGACGGCCAGTGGTTTGTGGAGCCTGTTCTC	8	CAGGAAACAGCTATGACCAGAAGGATCAAGGGGAAAAA	173
	chr20:3048304 6-30483143	GTAAACGACGGCCAGTGTCAAATGAAGCGCAACAGA	9	CAGGAAACAGCTATGACCGGAGACATGCAACACCACAC	174
	chr20:3048434 3-30484449	GTAAACGACGGCCAGTCAAGGAGTTGCTTGGTCTCA	10	CAGGAAACAGCTATGACCCAGCTTCTGCTGCAATGACT	175
	chr20:3048474 7-30485127	GTAAACGACGGCCAGTCGACAGGAAATGGAGAAGGA	11	CAGGAAACAGCTATGACCTTCTGATCCTTGGGTTCTCTG	176
	chr20:3048512 8-30485381	GTAAACGACGGCCAGTAAAGTGCGCTTGTGTCTCC	12	CAGGAAACAGCTATGACCGGCTGTCTCAAGCAAACCTC	177
	chr20:3048589 5-30486275	GTAAACGACGGCCAGTGAGGTTTCTTGAGACAGCC	13	CAGGAAACAGCTATGACCGAAGGCAGGTCTCTCTCCT	178
	chr20:3048627 6-30486655	GTAAACGACGGCCAGTGGACCTCGCAGACATTAAA	14	CAGGAAACAGCTATGACCTGTTCTGCAGGCAATCAGTC	179
	chr20:3048665 6-30487035	GTAAACGACGGCCAGTGCCATGTCCAGAGCTAGGAG	15	CAGGAAACAGCTATGACCTGGCAGCTCCAGAGTGAAG	180
	chr20:3048703 6-30487415	GTAAACGACGGCCAGTCTTGAACCAAGGCTCTCG	16	CAGGAAACAGCTATGACCCACAAGTGGGTTAGTGGCCT	181
	chr20:3048741 6-30487795	GTAAACGACGGCCAGTCAAGGTGAATGGTGACATGC	17	CAGGAAACAGCTATGACCTGGATGGAGGGAGTCAAAA	182
	chr20:3048779 6-30488175	GTAAACGACGGCCAGTCTGAGTACCAGCCAAGAGCC	18	CAGGAAACAGCTATGACCAAGTGACCCACCACTCCAG	183
	chr20:3048817 6-30488555	GTAAACGACGGCCAGTTTTGACTCCCTCCATCCAG	19	CAGGAAACAGCTATGACCACACTGGAGCGAGATGCTTT	184
	chr20:3048855 6-30488935	GTAAACGACGGCCAGTCTGGAAGTGGTGGGTCACTT	20	CAGGAAACAGCTATGACCTATACCCAGGAAACCCCTCC	185
CEBP a	chr19:3848315 6-38483535	GTAAACGACGGCCAGTGCAAGTATCCGAGCAAAACC	21	CAGGAAACAGCTATGACCGAGAGGGGAGAATTCTTGG	186
	chr19:3848315 6-38483535	GTAAACGACGGCCAGTCCGACGGAGAGTCTCATTTT	22	CAGGAAACAGCTATGACCCCTGCTATAGGCTGGGCTTC	187
	chr19:3848315 6-38483535	GTAAACGACGGCCAGTGGAGAGGCGTGGAAGTAGAG	23	CAGGAAACAGCTATGACCCCTTGGTGCSTCTAAGATGAGG	188
	chr19:3848353 6-38483915	GTAAACGACGGCCAGTTCATAACTCCGTCCCTCTG	24	CAGGAAACAGCTATGACCCCTGGAGCTGACCACTGACAA	189
	chr19:3848391 6-38484295	GTAAACGACGGCCAGTCAATTTCCAAGGCACAAGGTT	25	CAGGAAACAGCTATGACCTGGACAAGAAGCAGCAACGAG	190
	chr19:3848429 6-38484675	GTAAACGACGGCCAGTTTGTCACTGGTCAGCTCCAG	26	CAGGAAACAGCTATGACCCCTTCAACGACGAGTCTCTG	191
	chr19:3848429 6-38484675	GTAAACGACGGCCAGTTTGTCACTGGTCAGCTCCAG	27	CAGGAAACAGCTATGACCCACCTGCAGTTCAGATCG	192
	chr19:3848429 6-38484675	GTAAACGACGGCCAGTCAGTGCATGGTGTCTG	28	CAGGAAACAGCTATGACCATCGACATCAGCGCTACAT	193
	chr19:3848467 6-38485055	GTAAACGACGGCCAGTCTCGTTGCTGTTCTTGTTCCA	29	CAGGAAACAGCTATGACCCGGGAGAACTCTAACTCCCC	194
	chr19:3848467 6-38485055	GTAAACGACGGCCAGTCTCGTTGCTGTTCTTGTTCCA	30	CAGGAAACAGCTATGACCCAGGCTGGAGCCCCTGTA	195
	chr19:3848467 6-38485055	GTAAACGACGGCCAGTCTGTTGGCTTCTCTCTCTC	31	CAGGAAACAGCTATGACCTCGGCCGACTTCTACGAG	196
	chr19:3848505 6-38485160	GTAAACGACGGCCAGTATGTAGGCGCTGATGTCGAT	32	CAGGAAACAGCTATGACCCGGGAGAACTCTAACTCCCC	197

10

20

30

DNMT 3a	chr2:25310489- 25310793	GTAAACGACGGCCAGTCTCTCTCCACCTTTCTC	33	CAGGAAACAGCTATGACCCTGAGTGCCGGTTGTTAT	198
	chr2:25312079- 25312198	GTAAACGACGGCCAGTGGAAACAGTCAGGTGGGA	34	CAGGAAACAGCTATGACCTGGATCTAAGATTGGCCAGG	199
	chr2:25313308- 25313378	GTAAACGACGGCCAGTccactagctggagaagca	35	CAGGAAACAGCTATGACCggggctcttaccctgtgaac	200
	chr2:25315502- 25315588	GTAAACGACGGCCAGTcatggcagagcagctagtca	36	CAGGAAACAGCTATGACCtgtgtgctctgagagaga	201
	chr2:25316674- 25316823	GTAAACGACGGCCAGTAAATACCCAAACCCAGGAGTC	37	CAGGAAACAGCTATGACCCTTCTGTCTGCTCTGTCC	202
	chr2:25317012- 25317103	GTAAACGACGGCCAGTGAAGCCATTAGTGAGCTGGC	38	CAGGAAACAGCTATGACCCAACTTGGTCCGCTTCTGT	203
	chr2:25317934- 25318080	GTAAACGACGGCCAGTTTGCCAAAGTATTGGGAGG	39	CAGGAAACAGCTATGACCCCACTTGGATCCAGAAAGGA	204
	chr2:25320270- 25320355	GTAAACGACGGCCAGTaatctcccttgggataa	40	CAGGAAACAGCTATGACCcagggtgtgtgggtctagga	205
	chr2:25320527- 25320711	GTAAACGACGGCCAGTAGGGTCTTAAGCAGTGAGCA	41	CAGGAAACAGCTATGACCCTGCTTTCCATCCAGGTA	206
	chr2:25320912- 25321025	GTAAACGACGGCCAGT aggtgtgctacctggaalgg	42	CAGGAAACAGCTATGACCcagggtctagctgtgtgag	207
	chr2:25321625- 25321705	GTAAACGACGGCCAGTATCTGGGGACTAAATGGGG	43	CAGGAAACAGCTATGACCCTGGACTCTTTCTGGCTG	208
	chr2:25322392- 25322437	GTAAACGACGGCCAGTAGCAAGGTGAAAGGCTGAA	44	CAGGAAACAGCTATGACCAGCCCAAGGTCAAGGAGATT	209
	chr2:25322532- 25322682	GTAAACGACGGCCAGTTCCAGGCAACAACTTACC	45	CAGGAAACAGCTATGACCgAACAGTTGGAGACAGGC	210
	chr2:25322992- 25323149	GTAAACGACGGCCAGTCTCTCTGAGGAGGAAAGCA	46	CAGGAAACAGCTATGACCCTGTGCCACCCTCACTACT	211
	chr2:25323423- 25323531	GTAAACGACGGCCAGTAGTAGTGAGGGTGGCACAGG	47	CAGGAAACAGCTATGACCCTCTCTTTGCATCGGGTAA	212
	chr2:25323963- 25324122	GTAAACGACGGCCAGTCTTACACTTGAAGCACCCCA	48	CAGGAAACAGCTATGACCCTCTGTGACCACTGTGTAA	213
	chr2:25324409- 25324625	GTAAACGACGGCCAGTCATCCACCAAGACACAATGC	49	CAGGAAACAGCTATGACCCTGTCACTGTTCCGGGTTTT	214
	chr2:25326029- 25326097	GTAAACGACGGCCAGTCTTCTCCACAATTCCCCTG	50	CAGGAAACAGCTATGACCAGGGCCGTGTTCTAGATT	215
	chr2:25328566- 25328684	GTAAACGACGGCCAGTCACTCTTTTCAACCCGGAG	51	CAGGAAACAGCTATGACCggcTAATCTCTCCAGAGC	216
	chr2:25351313- 25351460	GTAAACGACGGCCAGTactgaggccatcactctg	52	CAGGAAACAGCTATGACCcattgtttgaggcgagtg	217
	chr2:25351872- 25351916	GTAAACGACGGCCAGTCTTCCACAGAGGGATGTGT	53	CAGGAAACAGCTATGACCgaaCAGCTAAACGGCCAGAG	218
	chr2:25358585- 25358964	GTAAACGACGGCCAGTTACAATCACCCAGCCCTCTC	54	CAGGAAACAGCTATGACCAGCGGTCAATGATCCAAAC	219
	chr2:25358965- 25359084	GTAAACGACGGCCAGTAGCCAAGTCCCTGACTCTCA	55	CAGGAAACAGCTATGACCAGCGGTCAATGATCCAAAC	220
	chr2:25376511- 25376616	GTAAACGACGGCCAGTTGAAGATGGGGTACCTGC	56	CAGGAAACAGCTATGACCCTGGGGGCATATTACACAG	221
	chr2:25390285- 25390534	GTAAACGACGGCCAGTtgggtcatgcaCTCAGTAT	57	CAGGAAACAGCTATGACCCTCTCTCTCCCCAC	222

EZH2	chr7:14813540- 7-148135731	GTAAACGACGGCCAGTcttcacattcacaggcagl	58	CAGGAAACAGCTATGACCcttcacaggcgtttgtgtg	223
	chr7:14813709- 5-148137180	GTAAACGACGGCCAGTGCGGCATGATATGAGAAGGT	59	CAGGAAACAGCTATGACCcCGCAAGGGTAACAAATTCG	224
	chr7:14813733- 4-148137415	GTAAACGACGGCCAGTtgggtcagtgagcatgaaga	60	CAGGAAACAGCTATGACCtttagatttgggtgagtc	225
	chr7:14813835- 7-148138439	GTAAACGACGGCCAGTCACAAGAGGTGAGGTGAGCA	61	CAGGAAACAGCTATGACCCTGACCCCTTTTGTGCGTT	226
	chr7:14813964- 9-148139745	GTAAACGACGGCCAGTAGCATGCAAAATCCACAAACA	62	CAGGAAACAGCTATGACCCTGTGCCCAATTAAGCTCTT	227
	chr7:14814198- 3-148142162	GTAAACGACGGCCAGTTTTGCCCCAGCTAAATCATC	63	CAGGAAACAGCTATGACCgtacagccctgccagtaT	228
	chr7:14814293- 8-148143064	GTAAACGACGGCCAGTCTGCTCACACACACAGAC	64	CAGGAAACAGCTATGACCCTTGGGGTGGGAGAGTATT	229
	chr7:14814353- 0-148143571	GTAAACGACGGCCAGTCGCTACATCTCAGTCCCAT	65	CAGGAAACAGCTATGACCATTGTAGCTTCCCGCAGAA	230
	chr7:14814470- 8-148144803	GTAAACGACGGCCAGTCCAACAACAGCCCTTAGGAA	66	CAGGAAACAGCTATGACCCCAAGCATCTAGCAGTGTC	231
	chr7:14814524- 6-148145416	GTAAACGACGGCCAGTTGACACTGCTAGATGCTGGG	67	CAGGAAACAGCTATGACCcCGGATTGGATTGAGTTGT	232
	chr7:14814590- 1-148146142	GTAAACGACGGCCAGTACAATCAAATCAAATCGGC	68	CAGGAAACAGCTATGACCTGCCCTGATGTTGACATTTT	233
	chr7:14814762- 0-148147712	GTAAACGACGGCCAGTGAGAGGGGCTTGGGACTAC	69	CAGGAAACAGCTATGACCTGCGCATCAGTTTACTTGC	234
	chr7:14815447- 8-148154657	GTAAACGACGGCCAGTTCAGAGCAATCCTCAAGCAA	70	CAGGAAACAGCTATGACCTTCTTGATAACACCATGCACAA	235
	chr7:14815518- 8-148155291	GTAAACGACGGCCAGTAAAGTGTAGTGGCTCATCCGC	71	CAGGAAACAGCTATGACCTctgcttccagctgctctT	236
	chr7:14815676- 4-148156905	GTAAACGACGGCCAGTccacctacatggccATAAT	72	CAGGAAACAGCTATGACCTGCTTCTTGCCTAACACC	237
	chr7:14815775- 2-148157873	GTAAACGACGGCCAGTGAGCCCTATATGCCACAGA	73	CAGGAAACAGCTATGACCTGCTTATTGGTGAGAGGGGT	238
	chr7:14816065- 8-148160775	GTAAACGACGGCCAGTctgtctgattcaccttgacaat	74	CAGGAAACAGCTATGACCggtacagcttaaggttgcct	239
	chr7:14817449- 4-148174623	GTAAACGACGGCCAGTGGTCAATGATTTCTCCCAA	75	CAGGAAACAGCTATGACCATGGCAATCGTTTCTGTTC	240
	chr7:14817520- 6-148175330	CAGGAAACAGCTATGACCATGGCAATCGTTTCTGTTC	76	CAGGAAACAGCTATGACCgcagcacaaatgagcacct	241

10

20

30

40

FLT3	chr13:2749060-3-27490726	GTAAACGACGGCCAGTCTGAAGTCGAGAAAAACC	77	CAGGAAACAGCTATGACCTCCATCACCAGTACCTCCTA	242
	chr13:2749060-3-27490726	GTAAACGACGGCCAGTGTGACACCCCAATCCACTC	78	CAGGAAACAGCTATGACCGTGACCGGCTCCTCAGATAA	243
	chr13:2750621-8-27506351	GTAAACGACGGCCAGTTTTCCAAAAGCACCTGATCC	79	CAGGAAACAGCTATGACCTCATTGTCGTTTTAACCTGTC	244
HRAS	chr11:523765-523944	GTAAACGACGGCCAGTGATCTGCTCCCTGAGAGGTG	80	CAGGAAACAGCTATGACCAGAGGTGGCTGTGTGAAC	245
	chr11:523765-523944	GTAAACGACGGCCAGTCTCCCTGGTACCTCTCATGC	81	CAGGAAACAGCTATGACCGTGGGTTTGCCTTCAGAT	246
IDH1	chr2:20882133-7-208821629	GTAAACGACGGCCAGTTGTGTGAGATGGACGCCTA	82	CAGGAAACAGCTATGACCGGTGACTCAGAGCCTTCGC	247
IDH2	chr15:8843282-2-88432983	GTAAACGACGGCCAGTCTGCTCTTTGTGGCCTAAG	83	CAGGAAACAGCTATGACCATCTGTTGAAAGATGGCG	248
JAK2	chr9:5063697-5063785	GTAAACGACGGCCAGTGGGTTTCTCAGAACGTTGA	84	CAGGAAACAGCTATGACCTTGACACCTAGCTGTGATCCTG	249
KIT	chr4:55284506-55284621	GTAAACGACGGCCAGTTCTGCCCTTTGAACCTTGCT	85	CAGGAAACAGCTATGACCAAGGCCACATGGCTAGAAAAA	250
	chr4:55288338-55288465	GTAAACGACGGCCAGTCCACACCTCTGTTCACTCCTT	86	CAGGAAACAGCTATGACCTGGCAAACCTATCAAAAGGG	251
	chr4:55293992-55294115	GTAAACGACGGCCAGTTGTGAACATCATTCAAGGCG	87	CAGGAAACAGCTATGACCTGTTGACATACCATGCAAA	252
KRas	chr12:2527143-4-25271613	GTAAACGACGGCCAGTTGCATGGCATTAGCAAAAGAC	88	CAGGAAACAGCTATGACCGGTGCTTAGTGCCATTGT	253
	chr12:2528947-4-25289596	GTAAACGACGGCCAGTCCAAGGAAAGTAAAGTCCCA	89	CAGGAAACAGCTATGACCGCTCTGCAGTCAACTGGAAT	254
NPM1	chr5:17077013-5-170770493	GTAAACGACGGCCAGTCTCGGAGATGAAGTTGGAA	90	CAGGAAACAGCTATGACCACTGACCTAGGCTAGGCTG	255
NRas	chr1:11505794-3-115058122	GTAAACGACGGCCAGTGTGTAACCTCATTTCCTCA	91	CAGGAAACAGCTATGACCGGACAAACAGATAGGCAG	256
	chr1:11506019-3-115060321	GTAAACGACGGCCAGTCAGGTTTGAACCTCAGCAGC	92	CAGGAAACAGCTATGACCATTAATCCGGTGTGTTTTCG	257

PHF6	chrX:13333926-7-133339451	GTAAACGACGGCCAGTggggcttagagtgcttaatt	93	CAGGAAACAGCTATGACCGtctctgttgcgcgggtat	258
	chrX:13333970-0-133339802	GTAAACGACGGCCAGTCTGAAACACAGAAGTGGC	94	CAGGAAACAGCTATGACCGGATTTTGTGCTCAGAGA	259
	chrX:13335519-6-133355330	GTAAACGACGGCCAGTACCAATTTGTTTCTTGACAGA	95	CAGGAAACAGCTATGACCCGAGCAGTACACTTCACCCA	260
	chrX:13335560-4-133355648	GTAAACGACGGCCAGTACCACTGTGCATTGCATGAT	96	CAGGAAACAGCTATGACCTGAAAGTGGCTGAAACGTG	261
	chrX:13337518-3-133375353	GTAAACGACGGCCAGTCTGAAACATTGGGTGGCTTT	97	CAGGAAACAGCTATGACCTTGGGCTTTAGATCACAGGG	262
	chrX:13337551-8-133375662	GTAAACGACGGCCAGTATGAACATGAACCTGGAGCCC	98	CAGGAAACAGCTATGACCTTGGGCTTTAGATCACAGGG	263
	chrX:13337671-1-133376987	GTAAACGACGGCCAGTTAATCTTGGCTCCACACTGG	99	CAGGAAACAGCTATGACCGCTTGCAATGCCTTGAAAT	264
	chrX:13337886-4-133379244	GTAAACGACGGCCAGTttcttgaatacggcttagca	100	CAGGAAACAGCTATGACCCgggcccagtgatgagtt	265
	chrX:13338689-6-133387276	GTAAACGACGGCCAGTCCCATGTTTTAATGGGCAC	101	CAGGAAACAGCTATGACCATGATGCTTGAGGGGAACAC	266
	chr10:8961409-8-89614406	GTAAACGACGGCCAGTatcagctacggccaagtc	102	CAGGAAACAGCTATGACCGcaacctgaccagggttaaa	267
PTEN	chr10:8964376-1-89643846	GTAAACGACGGCCAGTCTCCAGCTATAGTGGGGAAA	103	CAGGAAACAGCTATGACCGTGTATCCCTGAAAGTCCA	268
	chr10:8967524-9-89675294	GTAAACGACGGCCAGTCCATAGAAGGGGTATTTGTTGG	104	CAGGAAACAGCTATGACCTGCCAACATGTTTACCTCA	269
	chr10:8968078-2-89680826	GTAAACGACGGCCAGTAAAGATTGAGCAATGTTTGT	105	CAGGAAACAGCTATGACCTCTCACTCGAATCTGGATGAC	270
	chr10:8968274-9-89682988	GTAAACGACGGCCAGTGAATCCAGTGTCTTTTAAATACC	106	CAGGAAACAGCTATGACCGAAACCCAAATCTGTTTCCA	271
	chr10:8970185-4-89701996	GTAAACGACGGCCAGTGGCTACGACCCAGTTACCAT	107	CAGGAAACAGCTATGACCTAAACCCATTGCTTTTGGC	272
	chr10:8970758-9-89707756	GTAAACGACGGCCAGTGTGCTGAGATCAAGATTGCAG	108	CAGGAAACAGCTATGACCGCCATAAGGCTTTTCTTC	273
	chr10:8971063-0-89710855	GTAAACGACGGCCAGTGAACAGATAACTCAGATTGCC	109	CAGGAAACAGCTATGACCTTTTACGCTGTGTACATTGG	274
	chr10:8971502-3-89715403	GTAAACGACGGCCAGTTGTTCTATCTGCAAAATGGAAT	110	CAGGAAACAGCTATGACCTAAACGGGAAAGTCCATC	275

RUNX1	chr21:3508614-8-35086527	GTAAACGACGGCCAGTCTTCTGTTTCTTTCCAGC	111	CAGGAAACAGCTATGACCCACGCGCTACCACACCTAC	276
	chr21:3508652-8-35086777	GTAAACGACGGCCAGTACCACGCTCGCTCTGGTTC	112	CAGGAAACAGCTATGACCATCCTCGTCTCTTGGGAGT	277
	chr21:3509346-7-35093629	GTAAACGACGGCCAGTAAAGAAATCAGTGATGGGC	113	CAGGAAACAGCTATGACCACTGGTACATAGGCCACA	278
	chr21:3511582-4-35115863	GTAAACGACGGCCAGTTGTTACGACGTTTGCAGAG	114	CAGGAAACAGCTATGACCGGAAGGGAAGGAAATCTTG	279
	chr21:3512857-6-35128768	GTAAACGACGGCCAGTAGTTGGTCTGGGAAGGTGTG	115	CAGGAAACAGCTATGACCGGAAAGACAAGAAAGCCCC	280
	chr21:3515364-0-35153745	GTAAACGACGGCCAGTGCAACTTTTGGCTTACGG	116	CAGGAAACAGCTATGACCGGTAACCTGTGCTGAAGGGC	281
	chr21:3517472-3-35174880	GTAAACGACGGCCAGTCCGAGTTTCTAGGGATTCCA	117	CAGGAAACAGCTATGACCCATTGCTATTCTCTGCAACC	282
	chr21:3518100-9-35181389	GTAAACGACGGCCAGTAGAAAGCTGAGACGAGTGCC	118	CAGGAAACAGCTATGACCGCAGAACCAAGACGTTTCC	283
	chr21:3518709-1-35187130	GTAAACGACGGCCAGTGAATCAGCAGAAACAGCCT	119	CAGGAAACAGCTATGACCAACCACTGCATAAGGAACA	284
	chr21:3534300-8-35343388	GTAAACGACGGCCAGTGGTGAACAAGCTGCCATTT	120	CAGGAAACAGCTATGACCTTTGGCCTCATAAACAACC	285

10

20

30

40

TET2	chr4:10637450 2-106374882	GTAAACGACGGCCAGTCACCCCTTGTCTCCATGACC	121	CAGGAAACAGCTATGACCTGGTTGACTGCTTTACCTG	286
	chr4:10637488 3-106375262	GTAAACGACGGCCAGTAAATGGAGACACCAAGTGGC	122	CAGGAAACAGCTATGACCGAGGTATGCGATGGTGAGT	287
	chr4:10637526 3-106375642	GTAAACGACGGCCAGTATGAGCAGGAGGGGAAAAGT	123	CAGGAAACAGCTATGACCTGGTGTGTAGTGGCAGAAA	288
	chr4:10637564 3-106376022	GTAAACGACGGCCAGTACTACCCATCGCATACCTC	124	CAGGAAACAGCTATGACCAGATAGTGTGTGTGGGGG	289
	chr4:10637602 3-106376402	GTAAACGACGGCCAGTTTCCACAGTTCTCAGCTT	125	CAGGAAACAGCTATGACCGAGAAGTGACCTGGTGTGA	290
	chr4:10637678 3-106377162	GTAAACGACGGCCAGTAAGGCAAGCTTACACCCAGA	126	CAGGAAACAGCTATGACCGTTCCACCTTAATTGGCCT	291
	chr4:10637716 3-106377542	GTAAACGACGGCCAGTATGTCCAAATGGGACTGGA	127	CAGGAAACAGCTATGACCACTGGCCCTGACATTTCAAC	292
	chr4:10637754 3-106377922	GTAAACGACGGCCAGTCCCAGAGGACACTCAAAA	128	CAGGAAACAGCTATGACCCAAATTGCTGCCAGACTCAA	293
	chr4:10637792 3-106378302	GTAAACGACGGCCAGTACTTGATAGCCACACCCAG	129	CAGGAAACAGCTATGACCTTCCCCAACTCATGAAGAC	294
	chr4:10638172 3-106382102	GTAAACGACGGCCAGTgcacaaaaggtagaatgcaa	130	CAGGAAACAGCTATGACCagtggaattcacacaaca	295
	chr4:10638343 9-106383533	GTAAACGACGGCCAGTTTCCCATTTTACCCACAT	131	CAGGAAACAGCTATGACCACCAATTCTCAGGGTCAGA	296
	chr4:10638417 5-106384384	GTAAACGACGGCCAGTAGGGTCAAAGCCACTTTTT	132	CAGGAAACAGCTATGACCTGAGGCCATGTGTTACAGA	297
	chr4:10640022 4-106400375	GTAAACGACGGCCAGTGTGTGGTTATGCCACAGCTT	133	CAGGAAACAGCTATGACCCAAAGAGGAAGTTTTGTTGC	298
	chr4:10640236 4-106402454	GTAAACGACGGCCAGTACCATACGGCTTAATCCCC	134	CAGGAAACAGCTATGACCTGTTACAATTGCTGCCAATGA	299
	chr4:10641021 5-106410353	GTAAACGACGGCCAGTTGTCATTCCATTTTGTCTGG	135	CAGGAAACAGCTATGACCTGCTAAGCTGTCTCAGCC	300
	chr4:10641316 9-106413524	GTAAACGACGGCCAGTCTGGATCAACTAGGCCACC	136	CAGGAAACAGCTATGACCGGGGGGAAAACCAATAAT	301
	chr4:10641565 3-106416033	GTAAACGACGGCCAGTCAAGCAGAGGCATGTTAG	137	CAGGAAACAGCTATGACCTATTTCACCACTTGCTGG	302
	chr4:10641603 4-106416413	GTAAACGACGGCCAGTATCCCATGAACCTTACCC	138	CAGGAAACAGCTATGACCACAGACCTCATGTTGTCC	303
	chr4:10641641 4-106416793	GTAAACGACGGCCAGTATCAGTGGACAAGTCTCCC	139	CAGGAAACAGCTATGACCATGAAACGAGGTAAGTGGG	304
	chr4:10641679 4-106417173	GTAAACGACGGCCAGTATTGGCACTAGTCCAGGGTG	140	CAGGAAACAGCTATGACCACTGTGACCTTCCCCACTG	305

10

TP53	chr17:7505821- 7506057	GTAAACGACGGCCAGTCGGAACCTCTGAGCTGAAAG	141	CAGGAAACAGCTATGACCGCAGGAGAGTTGCTTGAACC	306
	chr17:7510128- 7510287	GTAAACGACGGCCAGTGTGCTGTGTCTGGGATTAC	142	CAGGAAACAGCTATGACCGTCCAGGAGCTGTTCTAGG	307
	chr17:7513585- 7513733	GTAAACGACGGCCAGTCCACAACAAACACCACTGC	143	CAGGAAACAGCTATGACCAAGCATTGGTCAGGGA AAA	308
	chr17:7514651- 7514758	GTAAACGACGGCCAGTTCAACCGAGGAGAACTAAAA	144	CAGGAAACAGCTATGACCATCAGCCAAGATTGCACCAT	309
	chr17:7517249- 7517309	GTAAACGACGGCCAGTaaagcaggtaggctaagctatg	145	CAGGAAACAGCTATGACCaaaggaccagaccagctttca	310
	chr17:7517577- 7517651	GTAAACGACGGCCAGTTGCTTTGAGGCATCACTGC	146	CAGGAAACAGCTATGACCGGCACAGAGGAAGAGAATC	311
	chr17:7517743- 7517880	GTAAACGACGGCCAGTGTGTTCTTCTTTGGCTGG	147	CAGGAAACAGCTATGACCCAAAGGTGTTGGGAGTAGA	312
	chr17:7518223- 7518333	GTAAACGACGGCCAGTggaagaatcggaagagggtg	148	CAGGAAACAGCTATGACCtgctgtgcacaggtctcc	313
	chr17:7518901- 7519014	GTAAACGACGGCCAGTTTGACATCTCATGGGGTTA	149	CAGGAAACAGCTATGACCACTCACAGCAGATGACGGAG	314
	chr17:7519095- 7519475	GTAAACGACGGCCAGTTTACCTGCAATTGGGGCATT	150	CAGGAAACAGCTATGACCGCAGGCTAGGCTAAGCTATGATG	315
	chr17:7520036- 7520315	GTAAACGACGGCCAGTGCCAAAGGGTGAAGAGGAAT	151	CAGGAAACAGCTATGACCGTAAGGACAAGGGTTGGGCT	316
	chr17:7520424- 7520446	GTAAACGACGGCCAGTTCATCTGGACCTGGGCTTC	152	CAGGAAACAGCTATGACCCCTCTGAGTCAGGAACA	317
	chr17:7520563- 7520665	GTAAACGACGGCCAGTAGCCCAACCCCTGTCTTAC	153	CAGGAAACAGCTATGACCCAGCCATTCTTTCTGCTC	318
WT1	chr11:3236704 1-32367301	GTAAACGACGGCCAGTGGGGACATGATCAGCTATGG	154	CAGGAAACAGCTATGACCTCCTTAAGCCCAAGAGGT	319
	chr11:3237009 3-32370186	CAGGAAACAGCTATGACCGCCACGCACTATTCCTTCTC	155	GTAAACGACGGCCAGTGGGAAATCTAAGGGTGAGGC	320
	chr11:3237078 7-32370877	CAGGAAACAGCTATGACCTGTGGGGTGTTCCTTTCT	156	GTAAACGACGGCCAGTGTGGGGATCATCTACCT	321
	chr11:3237437 8-32374529	CAGGAAACAGCTATGACCTAGCAGTGTGAGAGCCTGGA	157	GTAAACGACGGCCAGTGGAGTGTGAATGGGAGTGGT	322
	chr11:3237806 9-32378166	CAGGAAACAGCTATGACCTAAGGAACAAAGGGCCGCT	158	GTAAACGACGGCCAGTCCATCATTCCTCTGATTG	323
	chr11:3239461 1-32394662	CAGGAAACAGCTATGACCGAATAAGAAGAGTGGGGGC	159	GTAAACGACGGCCAGTGGCTTTTCACTGATTCTGG	324
	chr11:3239569 8-32395776	CAGGAAACAGCTATGACCACTAAGGGGAAGAGGA	160	GTAAACGACGGCCAGTCTGTGCAGATCAGTGGGA	325
	chr11:3240807 7-32408180	GTAAACGACGGCCAGTCAGAGACAGGAGATCAGC	161	GTAAACGACGGCCAGTACTGCTAGGGGAATGCAAA	326
	chr11:3240861 8-32408741	GTAAACGACGGCCAGTTGCCATTGGGGTAATGATT	162	CAGGAAACAGCTATGACCAAGGTACATCCAGGGACT	327
	chr11:3240865 1-32408935	GTAAACGACGGCCAGTAGTAAGGCCGAATTTCTGA	163	CAGGAAACAGCTATGACCTCAAGGCCTGTACAAGGAG	328
	chr11:3241282 1-32413201	GTAAACGACGGCCAGTGTGAAGAGCTGCGGTCAAAA	164	CAGGAAACAGCTATGACCTACAGCAGCCAGAGCAGC	329
	chr11:3241320 2-32413581	GTAAACGACGGCCAGTGCTCCTGTTGATGAAGGA	165	CAGGAAACAGCTATGACCGTAAGGAGTTCAAGCAGCG	330

20

30

40

【表 3】

Gene	p-value
DNMT3A	0.17
IDH1	0.24
IDH2	0.59
IDH2R140Q	0.61
IDH2R172K	0.13
TET2	0.92
ASXL1	0.16
FLT3	0.6
NPM1	0.23
PHF6	0.09
KIT	0.24
CEBPA	0.23
WT1	0.68
KRas	0.45
NRas	0.49
P53	0.85
PTEN	0.95
RUNX1	0.09
CBF	0.67
Del(5q)	0.66
EVI	0.9
MLL-PTD	0.04
Split MLL	0.21
Monosomy 7	0.97
t(6;9)	0.36
Trisomy 8	0.89
AML1-ETO	0.08

10

20

30

【表 4】

Gene	全体の頻度 (%)	良好なリスク	中間のリスク	良好でないリスク
FLT3 (ITD, TKD) ¹	37 (30, 7)	8 (3, 5)	52 (42, 7)*	36 (35, 1)
NPM1	29	4	49*	12
DNMT3A	23	4	33*	15
NRAS	10	12	5	2
CEBPA	9	5	12	5
TET2	8	5	8	10
WT1	8	1	12*	5
IDH2	8	3	9	9
IDH1	7	3	9	3
KIT	6	28*	1	0
RUNX1	5	3	6	6
MLL-PTD ²	5	0	5	8
ASXL1	3	0	4	2
PHF6	3	1	2	3
KRAS	2	7	5	3
PTEN	2	1	2	1
TP53	2	0	1	6
HRAS	0	0	0	0
EZH2	0	0	0	0

1) ITD – 遺伝子内縦列重複；TKD – チロシンキナーゼドメイン変異

2) PTD – 部分縦列重複

* コホート全体と比較して、特定の細胞遺伝学的リスク群において豊富であった変異を示す (p<0.01 for all)

10

20

【表 5 a】

	DNMT3a	IDH1	IDH2	TET2	ASXL1	FLT3	NPM1	CEBPA	WT1	KRas	NRas	PHF6
DNMT3a		3.3% (13/398)	1.5% (6/398)	1.5% (6/398)	0% (0/398)	13.3% (53/398)	14.3% (57/398)	1.75% (7/398)	0.75% (3/398)	0.75% (3/398)	2.5% (10/398)	0% (0/398)
IDH1	3.3% (13/398)		0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	1% (4/398)	1.5% (6/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.75% (3/398)	0.5% (2/398)
IDH2	1.5% (6/398)	0% (0/398)		0% (0/398)	0.5% (2/398)	2% (8/398)	2% (8/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.75% (3/398)	0% (0/398)
TET2	1.5% (6/398)	0% (0/398)	0% (0/398)		0.75% (3/398)	3% (12/398)	1.5% (6/398)	0.5% (2/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	1% (4/398)	0.25% (1/398)
ASXL1	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	0.75% (3/398)		0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)
FLT3	13.3% (53/398)	1% (4/398)	2% (8/398)	3% (12/398)	0% (0/398)		6.8% (27/398)	3.5% (14/398)	5% (20/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	1% (4/398)
NPM1	14.3% (57/398)	1.5% (6/398)	2% (8/398)	1.5% (6/398)	0.25% (1/398)	6.8% (27/398)		0.5% (2/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	1.3% (5/398)	0% (0/398)
CEBPA	1.75% (7/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0.5% (2/398)	3.5% (14/398)	0.5% (2/398)		1.3% (5/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0.5% (2/398)
WT1	0.75% (3/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	5% (20/398)	0.25% (1/398)	1.3% (5/398)		0% (0/398)	0.75% (3/398)	0% (0/398)
KRas	0.75% (3/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)		0% (0/398)	0% (0/398)
NRas	2.5% (10/398)	0.75% (3/398)	0.75% (3/398)	1% (4/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	1.3% (5/398)	0.5% (2/398)	0.75% (3/398)	0% (0/398)		0% (0/398)
PHF6	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	1% (4/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	
KIT	0.5% (2/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)
TP53	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
PTEN	0.75% (3/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)
RUNX1	0.75% (3/398)	0.25% (1/398)	0.75% (3/398)	0.25% (1/398)	1% (4/398)	1.5% (6/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0.75% (3/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)
CBF	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	1.3% (5/398)	1.3% (5/398)	1.5% (6/398)	0% (0/398)	1% (4/398)	1% (4/398)	0.5% (2/398)	3% (12/398)	0.25% (1/398)
Del (5q)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)
EVI1	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)
MLL-PTD	1% (4/398)	0.5% (2/398)	0.75% (3/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	2.5% (10/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)
Split MLL	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.75% (3/398)	0% (0/398)
Monosomy (7/7q)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
t(6;9)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
Tri(8)	1.5% (6/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	2.26% (9/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
AML1-ETO	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)

10

20

【表 5 b】

KIT	TP53	PTEN	RUNX1	CBF	DeI (5q)	EVI1	MLL- PTD	Split MLL	Monosomy (7/7q)	t(6;9)	Tri(8)	AML1- ETO
0.5% (2/398)	0.25% (1/398)	0.75% (3/398)	0.75% (3/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	1% (4/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	1.5% (6/398)	0% (0/398)
0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.75% (3/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.75% (3/398)	0.5% (2/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	1.3% (5/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	1% (4/398)	1.3% (5/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	1.5% (6/398)	1.5% (6/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	2.5% (10/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	2.26% (9/398)	0% (0/398)
0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)
0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	1% (4/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.75% (3/398)	1% (4/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0.5% (2/398)	3% (12/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.75% (3/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	5.3% (21/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0.5% (2/398)	0.75% (3/398)	0% (0/398)	1% (4/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
5.3% (21/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0.5% (2/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)
0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.75% (3/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	1% (4/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	1% (4/398)	0% (0/398)	1% (4/398)	0% (0/398)	0.5% (2/398)	0.25% (1/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)
0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0.25% (1/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)	0% (0/398)

10

20

30

【表 6 a】

	Abnormality #1	Abnormality #2	M/M ²	WT/M ³	M/W ⁴	WT/WT ⁵
1	DNMT3A	IDH	19	32	70	262
2	DNMT3A	IDH1	13	9	76	286
3	DNMT3A	IDH2	6	23	83	272
4	DNMT3A	IDH2_R140Q	3	18	86	277
5	DNMT3A	IDH2_R172K	3	5	86	290
6	DNMT3A	TET2	6	26	83	266
7	DNMT3A	ASXL1	0	10	88	285
8	DNMT3A	FLT3	52	92	37	204
9	DNMT3A	NPM1	57	57	32	239
10	DNMT3A	PHF6	0	9	88	284
11	DNMT3A	KIT	2	21	87	275
12	DNMT3A	CEBPa	6	26	82	267
13	DNMT3A	WT1	3	26	86	264
14	DNMT3A	KRAS	2	6	87	288
15	DNMT3A	NRAS	10	28	79	267
16	DNMT3A	TP53	1	7	86	283
17	DNMT3A	PTEN	3	2	86	293
18	DNMT3A	RUNX1	3	16	85	267
19	DNMT3A	CBF	1	71	88	225
20	DNMT3A	del5q	1	5	88	291
21	DNMT3A	EV11pos	0	5	89	291
22	DNMT3A	MLLPTD or split MLLPTD	4	13	85	283
23	DNMT3A	splitMLLPTD or split MLL	1	21	88	275
24	DNMT3A	MLLPTD or split MLL	5	32	84	264
25	DNMT3A	Monosomy7	1	2	88	294
26	DNMT3A	t(6;9)	0	2	89	294
27	DNMT3A	trisomy 8	6	9	83	287
28	DNMT3A	AML1ETO	0	1	89	295
29	DNMT3A_R882	IDH	13	38	50	282
30	DNMT3A_R882	IDH1	9	13	54	308
31	DNMT3A_R882	IDH2	4	25	59	296
32	DNMT3A_R882	IDH2_R140Q	2	19	61	302
33	DNMT3A_R882	IDH2_R172K	2	6	61	315
34	DNMT3A_R882	IDH1_IDH2_R172K	11	19	52	302
35	DNMT3A_R882	TET2	4	28	59	290
36	DNMT3A_R882	ASXL1	0	10	62	311
37	DNMT3A_R882	FLT3	41	103	22	219

10

20

30

【表 6 b】

38	DNMT3A_R882	NPM1	43	71	20	251
39	DNMT3A_R882	PHF6	0	9	62	310
40	DNMT3A_R882	KIT	2	21	61	301
41	DNMT3A_R882	CEBPa	4	28	58	291
42	DNMT3A_R882	WT1	0	29	63	287
43	DNMT3A_R882	KRAS	2	6	61	314
44	DNMT3A_R882	NRAS	5	33	58	288
45	DNMT3A_R882	TP53	1	7	60	309
46	DNMT3A_R882	PTEN	2	3	61	318
47	DNMT3A_R882	RUNX1	2	17	61	291
48	DNMT3A_R882	CBF	0	72	63	250
49	DNMT3A_R882	del5q	1	5	62	317
50	DNMT3A_R882	EVI1pos	0	5	63	317
51	DNMT3A_R882	MLLPTD or split MLLPTD	3	14	60	308
52	DNMT3A_R882	splitMLLPTD or split MLL	0	22	63	300
53	DNMT3A_R882	MLLPTD or split MLL	3	34	60	288
54	DNMT3A_R882	Monosomy7	0	3	63	319
55	DNMT3A_R882	t(6;9)	0	2	63	320
56	DNMT3A_R882	trisomy 8	5	10	58	312
57	DNMT3A_R882	AML1ETO	0	1	63	321
58	DNMT3A_other	IDH	6	45	22	310
59	DNMT3A_other	IDH1	4	18	24	338
60	DNMT3A_other	IDH2	2	27	26	329
61	DNMT3A_other	IDH2_R140Q	1	20	27	336
62	DNMT3A_other	IDH2_R172K	1	7	27	349
63	DNMT3A_other	IDH1_IDH2_R172K	5	25	23	331
64	DNMT3A_other	TET2	2	30	26	323
65	DNMT3A_other	ASXL1	0	10	28	345
66	DNMT3A_other	FLT3	12	132	16	225
67	DNMT3A_other	NPM1	15	99	13	258
68	DNMT3A_other	PHF6	0	9	28	344
69	DNMT3A_other	KIT	0	23	28	334
70	DNMT3A_other	CEBPa	2	30	26	323
71	DNMT3A_other	WT1	3	26	25	325
72	DNMT3A_other	KRAS	0	8	28	347
73	DNMT3A_other	NRAS	6	32	22	324
74	DNMT3A_other	TP53	0	8	28	341
75	DNMT3A_other	PTEN	1	4	27	352
76	DNMT3A_other	RUNX1	2	17	25	327

10

20

30

【表 6 c】

77	DNMT3A_other	CBF	1	71	27	286
78	DNMT3A_other	del5q	1	5	27	352
79	DNMT3A_other	EVI1pos	0	5	28	352
80	DNMT3A_other	MLLPTD or split MLLPTD	1	16	27	341
81	DNMT3A_other	splitMLLPTD or split MLL	1	21	27	336
82	DNMT3A_other	MLLPTD or split MLL	2	35	26	322
83	DNMT3A_other	Monosomy7	1	2	27	355
84	DNMT3A_other	t(6;9)	0	2	28	355
85	DNMT3A_other	trisomy 8	1	14	27	343
86	DNMT3A_other	AML1ETO	0	1	28	356
87	IDH	TET2	0	33	56	301
88	IDH	ASXL1	3	7	54	329
89	IDH	FLT3	13	133	44	205
90	IDH	NPM1	31	87	26	251
91	IDH	PHF6	2	7	54	328
92	IDH	KIT	1	22	56	316
93	IDH	CEBPa	1	33	56	302
94	IDH	WT1	0	30	56	303
95	IDH	KRAS	1	7	56	329
96	IDH	NRAS	6	34	51	303
97	IDH	TP53	0	8	57	323
98	IDH	PTEN	2	4	55	333
99	IDH	RUNX1	4	16	52	308
100	IDH	CBF	1	71	56	267
101	IDH	del5q	0	6	57	332
102	IDH	EVI1pos	0	5	57	333
103	IDH	MLLPTD or split MLLPTD	5	13	52	325
104	IDH	splitMLLPTD or split MLL	2	19	55	319
105	IDH	MLLPTD or split MLL	6	31	51	307
106	IDH	Monosomy7	2	2	55	336
107	IDH	t(6;9)	0	2	57	336
108	IDH	trisomy 8	2	13	55	325
109	IDH	AML1ETO	0	1	57	337
110	IDH1	IDH2	0	33	24	338
111	IDH1	IDH2_R140Q	0	24	24	347
112	IDH1	IDH2_R172K	0	9	24	362
113	IDH1	TET2	0	33	24	334

10

20

30

【表 6 d】

114	IDH1	ASXL1	1	9	23	361
115	IDH1	FLT3	4	142	20	230
116	IDH1	NPM1	14	104	10	268
117	IDH1	PHF6	2	7	21	362
118	IDH1	KIT	1	22	23	350
119	IDH1	CEBPa	1	33	23	336
120	IDH1	WT1	0	30	23	337
121	IDH1	KRAS	1	7	23	363
122	IDH1	NRAS	3	37	21	334
123	IDH1	TP53	0	8	24	356
124	IDH1	PTEN	2	4	22	367
125	IDH1	RUNX1	1	19	22	339
126	IDH1	CBF	1	71	23	301
127	IDH1	del5q	0	6	24	366
128	IDH1	EV11pos	0	5	24	367
129	IDH1	MLLPTD or split MLLPTD	2	16	22	356
130	IDH1	splitMLLPTD or split MLL	0	21	24	351
131	IDH1	MLLPTD or split MLL	2	35	22	337
132	IDH1	Monosomy7	1	3	23	369
133	IDH1	t(6;9)	0	2	24	370
134	IDH1	trisomy 8	2	13	22	359
135	IDH1	AML1ETO	0	1	24	371
136	IDH2	ASXL1	2	8	31	353
137	IDH2	FLT3	9	138	24	225
138	IDH2	NPM1	17	101	16	262
139	IDH2	PHF6	0	9	33	350
140	IDH2	KIT	0	23	33	340
141	IDH2	CEBPa	0	34	33	325
142	IDH2	WT1	0	30	33	327
143	IDH2	KRAS	0	8	33	353
144	IDH2	NRAS	3	37	30	325
145	IDH2	TP53	0	8	33	348
146	IDH2	PTEN	0	6	33	356
147	IDH2	RUNX1	3	17	30	331
148	IDH2	CBF	0	72	33	291
149	IDH2	del5q	0	6	33	357
150	IDH2	EV11pos	0	5	33	358
151	IDH2	MLLPTD or split MLLPTD	3	15	30	348
152	IDH2	splitMLLPTD or	2	20	31	343

10

20

30

【表 6 e】

		split MLL				
153	IDH2	MLLPTD or split MLL	4	34	29	329
154	IDH2	Monosomy7	1	3	32	360
155	IDH2	t(6;9)	0	2	33	361
156	IDH2	Trisomy 8	0	15	33	348
157	IDH2	AML1ETO	0	1	33	362
158	IDH2_R140Q	IDH2_R172K	0	9	24	363
159	IDH2_R140Q	TET2	0	33	23	335
160	IDH2_R140Q	ASXL1	1	9	23	361
161	IDH2_R140Q	FLT3	8	139	16	233
162	IDH2_R140Q	NPM1	16	102	8	270
163	IDH2_R140Q	PHF6	0	9	24	359
164	IDH2_R140Q	KIT	0	23	24	349
165	IDH2_R140Q	CEBPa	0	34	24	334
166	IDH2_R140Q	WT1	0	30	24	336
167	IDH2_R140Q	KRAS	0	8	24	362
168	IDH2_R140Q	NRAS	3	37	21	334
169	IDH2_R140Q	TP53	0	8	24	357
170	IDH2_R140Q	PTEN	0	6	24	365
171	IDH2_R140Q	RUNX1	2	18	22	339
172	IDH2_R140Q	CBF	0	72	24	300
173	IDH2_R140Q	del5q	0	6	24	366
174	IDH2_R140Q	EV11pos	0	5	24	367
175	IDH2_R140Q	MLLPTD or split MLLPTD	1	17	23	355
176	IDH2_R140Q	splitMLLPTD or split MLL	2	20	22	352
177	IDH2_R140Q	MLLPTD or split MLL	2	36	22	336
178	IDH2_R140Q	Monosomy7	1	3	23	369
179	IDH2_R140Q	t(6;9)	0	2	24	370
180	IDH2_R140Q	trisomy 8	0	15	24	357
181	IDH2_R140Q	AML1ETO	0	1	24	371
182	IDH2_R172K	TET2	0	33	9	349
183	IDH2_R172K	ASXL1	1	9	8	376
184	IDH2_R172K	FLT3	1	146	8	241
185	IDH2_R172K	NPM1	1	117	8	270
186	IDH2_R172K	PHF6	0	9	9	374
187	IDH2_R172K	KIT	0	23	9	364
188	IDH2_R172K	CEBPa	0	34	9	349
189	IDH2_R172K	WT1	0	30	9	351
190	IDH2_R172K	KRAS	0	8	9	377

10

20

30

【表 6 f】

191	IDH2_R172K	NRAS	0	40	9	346
192	IDH2_R172K	TP53	0	8	9	372
193	IDH2_R172K	PTEN	0	6	9	380
194	IDH2_R172K	RUNX1	1	19	8	353
195	IDH2_R172K	CBF	0	72	9	315
196	IDH2_R172K	del5q	0	6	9	381
197	IDH2_R172K	EVI1pos	0	5	9	382
198	IDH2_R172K	MLLPTD or split MLLPTD	2	16	7	371
199	IDH2_R172K	splitMLLPTD or split MLL	0	22	9	365
200	IDH2_R172K	MLLPTD or split MLL	2	36	7	351
201	IDH2_R172K	Monosomy7	0	4	9	383
202	IDH2_R172K	t(6;9)	0	2	9	385
203	IDH2_R172K	Trisomy 8	0	15	9	372
204	IDH2_R172K	AML1ETO	0	1	9	386
205	TET2	ASXL1	4	6	29	351
206	TET2	FLT3	12	134	21	225
207	TET2	NPM1	10	106	23	253
208	TET2	PHF6	2	7	31	348
209	TET2	KIT	1	22	32	337
210	TET2	CEBPa	2	31	30	325
211	TET2	WT1	3	27	30	326
212	TET2	KRAS	0	8	33	349
213	TET2	NRAS	4	34	29	325
214	TET2	TP53	1	7	32	344
215	TET2	PTEN	1	5	32	353
216	TET2	RUNX1	3	15	29	330
217	TET2	CBF	4	67	29	292
218	TET2	del5q	0	6	33	353
219	TET2	EVI1pos	1	4	32	355
220	TET2	MLLPTD or split MLLPTD	0	18	33	341
221	TET2	splitMLLPTD or split MLL	1	21	32	338
222	TET2	MLLPTD or split MLL	1	37	32	322
223	TET2	Monosomy7	1	2	32	357
224	TET2	t(6;9)	0	2	33	357
225	TET2	Trisomy 8	1	14	32	345
226	TET2	AML1ETO	0	1	33	358
227	ASXL1	FLT3	0	146	10	239

10

20

【表 6 g】

228	ASXL1	NPM1	1	117	9	268
229	ASXL1	PHF6	1	8	9	373
230	ASXL1	KIT	0	22	10	363
231	ASXL1	CEBPa	2	32	8	349
232	ASXL1	WT1	0	30	10	349
233	ASXL1	KRAS	0	8	10	375
234	ASXL1	NRAS	1	38	9	346
235	ASXL1	TP53	0	8	9	370
236	ASXL1	PTEN	0	6	10	378
237	ASXL1	RUNX1	5	15	4	356
238	ASXL1	CBF	0	71	10	314
239	ASXL1	del5q	0	6	10	379
240	ASXL1	EVI1pos	0	5	10	380
241	ASXL1	MLLPTD or split MLLPTD	0	17	10	368
242	ASXL1	splitMLLPTD or split MLL	0	22	10	363
243	ASXL1	MLLPTD or split MLL	0	37	10	348
244	ASXL1	Monosomy7	0	4	10	381
245	ASXL1	t(6;9)	0	2	10	383
246	ASXL1	Trisomy 8	0	15	10	370
247	ASXL1	AML1ETO	0	1	10	384
248	FLT3	NPM1	63	55	84	195
249	FLT3	PHF6	3	6	143	241
250	FLT3	KIT	0	23	147	227
251	FLT3	CEBPa	13	21	131	228
252	FLT3	WT1	18	12	127	234
253	FLT3	KRAS	1	7	146	241
254	FLT3	NRAS	3	37	144	212
255	FLT3	TP53	1	7	144	237
256	FLT3	PTEN	2	4	144	246
257	FLT3	RUNX1	6	14	139	223
258	FLT3	CBF	6	66	141	184
259	FLT3	del5q	1	5	146	245
260	FLT3	EVI1pos	1	4	146	246
261	FLT3	MLLPTD or split MLLPTD	10	8	137	242
262	FLT3	splitMLLPTD or split MLL	2	20	145	230
263	FLT3	MLLPTD or split MLL	11	27	136	223
264	FLT3	Monosomy7	0	4	147	246

10

20

30

【表 6 h】

265	FLT3	t(6;9)	1	1	146	249
266	FLT3	Trisomy 8	9	6	138	244
267	FLT3	AML1ETO	0	1	147	249
268	NPM1	PHF6	0	9	118	266
269	NPM1	KIT	2	21	116	258
270	NPM1	CEBPa	3	31	113	246
271	NPM1	WT1	6	24	111	250
272	NPM1	KRAS	3	5	115	272
273	NPM1	NRAS	14	26	103	253
274	NPM1	TP53	1	7	115	266
275	NPM1	PTEN	3	3	115	275
276	NPM1	RUNX1	4	16	114	248
277	NPM1	CBF	0	72	118	207
278	NPM1	del5q	0	6	118	273
279	NPM1	EVI1pos MLLPTD or split MLLPTD	0	5	118	274
280	NPM1	splitMLLPTD or split MLL	0	18	118	261
281	NPM1	MLLPTD or split MLL	0	22	118	257
282	NPM1	Monosomy7	0	38	118	241
283	NPM1	t(6;9)	0	4	118	275
284	NPM1	Trisomy 8	0	2	118	277
285	NPM1	AML1ETO	2	13	116	266
286	NPM1	PHF6	0	1	118	278
287	PHF6	KIT	0	23	9	361
288	PHF6	CEBPa	2	32	7	348
289	PHF6	WT1	0	30	9	348
290	PHF6	KRAS	0	8	9	374
291	PHF6	NRAS	0	39	9	344
292	PHF6	TP53	0	8	9	368
293	PHF6	PTEN	0	6	9	377
294	PHF6	RUNX1	1	19	8	350
295	PHF6	CBF	1	70	8	314
296	PHF6	del5q	1	5	8	379
297	PHF6	EVI1pos	1	4	8	380
298	PHF6	MLLPTD or split MLLPTD	1	17	8	367
299	PHF6	splitMLLPTD or split MLL	0	22	9	362
300	PHF6	MLLPTD or split MLL	1	37	8	347
301	PHF6	Monosomy7	0	4	9	380

10

20

【表 6 i】

302	PHF6	t(6;9)	0	2	9	382
303	PHF6	Trisomy 8	1	13	8	371
304	PHF6	AML1ETO	0	1	9	383
305	KIT	CEBPa	2	32	21	338
306	KIT	WT1	0	30	22	339
307	KIT	KRAS	0	8	22	365
308	KIT	NRAS	2	38	21	335
309	KIT	TP53	0	8	23	358
310	KIT	PTEN	0	6	23	367
311	KIT	RUNX1	0	20	22	340
312	KIT	CBF	21	51	2	323
313	KIT	del5q	0	6	23	368
314	KIT	EV11pos	0	5	23	369
315	KIT	MLLPTD or split MLLPTD	0	18	23	356
316	KIT	splitMLLPTD or split MLL	0	22	23	352
317	KIT	MLLPTD or split MLL	0	38	23	336
318	KIT	Monosomy7	0	4	23	370
319	KIT	t(6;9)	0	2	23	372
320	KIT	Trisomy 8	0	15	23	359
321	KIT	AML1ETO	0	1	23	373
322	CEBPa	WT1	4	26	28	329
323	CEBPa	KRAS	0	8	34	349
324	CEBPa	NRAS	2	38	32	320
325	CEBPa	TP53	0	8	34	343
326	CEBPa	PTEN	0	6	34	352
327	CEBPa	RUNX1	0	20	33	326
328	CEBPa	CBF	4	68	30	291
329	CEBPa	del5q	0	6	34	353
330	CEBPa	EV11pos	1	4	33	355
331	CEBPa	MLLPTD or split MLLPTD	2	16	32	343
332	CEBPa	splitMLLPTD or split MLL	0	21	34	338
333	CEBPa	MLLPTD or split MLL	2	35	32	324
334	CEBPa	Monosomy7	0	3	34	356
335	CEBPa	t(6;9)	0	2	34	357
336	CEBPa	Trisomy 8	1	14	33	345
337	CEBPa	AML1ETO	0	1	34	358
338	WT1	KRAS	0	8	30	351

10

20

【表 6 j】

339	WT1	NRAS	3	37	27	323
340	WT1	TP53	0	8	30	345
341	WT1	PTEN	0	6	30	354
342	WT1	RUNX1	3	17	26	330
343	WT1	CBF	1	69	29	292
344	WT1	del5q	0	6	30	355
345	WT1	EV11pos	0	4	30	357
346	WT1	MLLPTD or split MLLPTD	2	16	28	345
347	WT1	splitMLLPTD or split MLL	0	22	30	339
348	WT1	MLLPTD or split MLL	2	36	28	325
349	WT1	Monosomy7	0	4	30	357
350	WT1	t(6;9)	1	1	29	360
351	WT1	Trisomy 8	1	14	29	347
352	WT1	AML1ETO	0	1	30	360
353	KRAS	NRAS	0	40	8	346
354	KRAS	TP53	0	8	8	371
355	KRAS	PTEN	0	6	8	380
356	KRAS	RUNX1	1	19	7	353
357	KRAS	CBF	2	68	6	319
358	KRAS	del5q	0	6	8	381
359	KRAS	EV11pos	0	5	8	382
360	KRAS	MLLPTD or split MLLPTD	0	18	8	369
361	KRAS	splitMLLPTD or split MLL	1	21	7	366
362	KRAS	MLLPTD or split MLL	1	37	7	350
363	KRAS	Monosomy7	0	4	8	383
364	KRAS	t(6;9)	0	2	8	385
365	KRAS	Trisomy 8	0	15	8	372
366	KRAS	AML1ETO	0	1	8	386
367	NRAS	TP53	0	8	39	341
368	NRAS	PTEN	2	4	38	351
369	NRAS	RUNX1	2	18	35	326
370	NRAS	CBF	12	60	28	296
371	NRAS	del5q	0	6	40	350
372	NRAS	EV11pos	1	4	39	352
373	NRAS	MLLPTD or split MLLPTD	0	18	40	338
374	NRAS	splitMLLPTD or split MLL	2	20	38	336

10

20

30

【表 6 k】

375	NRAS	MLLPTD or split MLL	2	36	38	320
376	NRAS	Monosomy7	0	4	40	352
377	NRAS	t(6;9)	0	2	40	354
378	NRAS	Trisomy 8	0	15	40	341
379	NRAS	AML1ETO	0	1	40	355
380	TP53	PTEN	1	5	7	375
381	TP53	RUNX1	1	19	7	348
382	TP53	CBF	0	72	8	309
383	TP53	del5q	1	5	7	376
384	TP53	EVI1pos	0	5	8	376
385	TP53	MLLPTD or split MLLPTD	0	17	8	364
386	TP53	splitMLLPTD or split MLL	0	22	8	359
387	TP53	MLLPTD or split MLL	0	37	8	344
388	TP53	Monosomy7	0	4	8	377
389	TP53	t(6;9)	0	2	8	379
390	TP53	trisomy 8	0	15	8	366
391	TP53	AML1ETO	0	1	8	380
392	PTEN	RUNX1	0	20	6	355
393	PTEN	CBF	1	71	5	319
394	PTEN	del5q	0	6	6	384
395	PTEN	EVI1pos	0	5	6	385
396	PTEN	MLLPTD or split MLLPTD	0	18	6	372
397	PTEN	splitMLLPTD or split MLL	0	22	6	368
398	PTEN	MLLPTD or split MLL	0	38	6	352
399	PTEN	Monosomy7	0	4	6	386
400	PTEN	t(6;9)	0	2	6	388
401	PTEN	trisomy 8	0	15	6	375
402	PTEN	AML1ETO	0	1	6	389
403	RUNX1	CBF	2	66	18	296
404	RUNX1	del5q	3	3	17	359
405	RUNX1	EVI1pos	0	4	20	358
406	RUNX1	MLLPTD or split MLLPTD	3	15	17	347
407	RUNX1	splitMLLPTD or split MLL	0	19	20	343
408	RUNX1	MLLPTD or split MLL	3	32	17	330
409	RUNX1	Monosomy7	1	2	19	360

10

20

【表 6 1】

410	RUNX1	t(6;9)	0	2	20	360
411	RUNX1	trisomy 8	0	14	20	348
412	RUNX1	AML1ETO	0	1	20	361
413	CBF	del5q	0	6	72	319
414	CBF	EVI1pos	0	5	72	320
415	CBF	MLLPTD or split MLLPTD	0	18	72	307
416	CBF	splitMLLPTD or split MLL	0	22	72	303
417	CBF	MLLPTD or split MLL	0	38	72	287
418	CBF	Monosomy7	0	4	72	321
419	CBF	t(6;9)	0	2	72	323
420	CBF	trisomy 8	0	15	72	310
421	CBF	AML1ETO	1	0	71	325
422	del5q	EVI1pos	0	5	6	386
423	del5q	MLLPTD or split MLLPTD	0	18	6	373
424	del5q	splitMLLPTD or split MLL	0	22	6	369
425	del5q	MLLPTD or split MLL	0	38	6	353
426	del5q	Monosomy7	0	4	6	387
427	del5q	t(6;9)	0	2	6	389
428	del5q	trisomy 8	0	15	6	376
429	del5q	AML1ETO	0	1	6	390
430	EVI1pos	MLLPTD or split MLLPTD	0	18	5	374
431	EVI1pos	splitMLLPTD or split MLL	0	22	5	370
432	EVI1pos	MLLPTD or split MLL	0	38	5	354
433	EVI1pos	Monosomy7	0	4	5	388
434	EVI1pos	t(6;9)	0	2	5	390
435	EVI1pos	trisomy 8	0	15	5	377
436	EVI1pos	AML1ETO	0	1	5	391
437	MLLPTD or split MLLPTD	Monosomy7	1	3	17	376
438	MLLPTD or split MLLPTD	t(6;9)	0	2	18	377
439	MLLPTD or split MLLPTD	trisomy 8	0	15	18	364
440	MLLPTD or split MLLPTD	AML1ETO	0	1	18	378
441	splitMLLPTD or split MLL	Monosomy7	0	4	22	371

10

20

30

【表 6 m】

442	splitMLLPTD or split MLL	t(6;9)	0	2	22	373
443	splitMLLPTD or split MLL	trisomy 8	0	15	22	360
444	splitMLLPTD or split MLL	AML1ETO	0	1	22	374
445	MLLPTD or split MLL	Monosomy7	1	3	37	356
446	MLLPTD or split MLL	t(6;9)	0	2	38	357
447	MLLPTD or split MLL	trisomy 8	0	15	38	344
448	MLLPTD or split MLL	AML1ETO	0	1	38	358
449	Monosomy7	t(6;9)	0	2	4	391
450	Monosomy7	trisomy 8	0	15	4	378
451	Monosomy7	AML1ETO	0	1	4	392
452	t(6;9)	trisomy 8	0	15	2	380
453	t(6;9)	AML1ETO	0	1	2	394
454	Trisomy 8	AML1ETO	0	1	15	381

- 1) 真正体細胞変異として検出されなかったシングルヌクレオチド変異体は、分析を打ち切った。したがって、全ての事例において、サンプル数は合計で 398 となっていない。
- 2) 遺伝子#1 及び遺伝子#2 の両方が変異を起こしている患者数。
- 3) 遺伝子#1 が野生型であるが遺伝子#2 が変異を起こしている患者数。
- 4) 遺伝子#1 が変異を起こしており、遺伝子#2 が野生型である患者数。
- 5) 両方の遺伝子が野生型である患者数。

10

20

【表 7】

Mutated Gene #1	Mutated Gene #2	M/M ²	WT/M ³	% M/M ⁴	M/WT ⁵	WT/WT ⁶	% M/WT ⁷	p-value ⁸	Adjusted p-value ⁹
ASXL1	RUNX1	5	15	25.0	4	356	1.1	<0.001	<0.001
DNMT3A	NPM1	57	57	50.0	32	239	11.8	<0.001	<0.001
DNMT3A	FLT3 ITD	52	92	36.1	37	204	15.4	<0.001	<0.001
DNMT3A	IDH1	13	9	59.1	76	286	21.0	<0.001	0.008
DNMT3A	IDH1 or IDH2	19	32	37.3	70	262	21.1	0.02	0.91
FLT3 ITD	NPM1	63	55	53.4	84	195	30.1	<0.001	<0.001
FLT3 ITD	WT1	18	12	60.0	127	234	35.2	0.01	0.94
IDH1 or IDH2	NPM1	31	87	26.3	26	251	9.4	<0.001	0.002
IDH1	NPM1	14	104	11.9	10	268	3.6	0.004	0.38
IDH1	PTEN	2	4	33.3	22	367	5.7	0.05	0.69
IDH2	NPM1	17	101	14.4	16	262	5.8	0.01	0.67
IDH2 R140Q	NPM1	16	102	13.6	8	270	2.9	<0.001	0.01
KIT	CBF	21	51	29.2	2	323	0.6	<0.001	<0.001
NRAS	CBF	12	60	16.7	28	296	8.6	0.05	0.1
RUNX1	Del 5q	3	3	50.0	17	359	4.5	0.002	1.0
TET2	ASXL1	4	6	40.0	29	351	7.6	0.006	0.03

- 1) 真正体細胞変異として検出されなかったシングルヌクレオチド変異体は、分析を打ち切った。したがって、全ての事例において、サンプル数は合計で398となっていない。
- 2) 遺伝子#1及び遺伝子#2の両方が変異を起こしている患者数。
- 3) 遺伝子#1が野生型であるが遺伝子#2が変異を起こしている患者数。
- 4) いずれかの遺伝子に変異している全ての患者における、遺伝子#1及び遺伝子#2が変異している患者のパーセンテージ。
- 5) 遺伝子#1が変異を起こしており、遺伝子#2が野生型である患者数。
- 6) 両方の遺伝子が野生型である患者数。
- 7) いずれかの遺伝子が野生型である全ての患者における、いずれかの遺伝子に変異している患者の割合。
- 8) フィッシャーの正確確率検定によるp値。
- 9) 多重比較により調整されたp値。

10

20

【表 8】

Mutated Gene #1	Mutated Gene #2	M/M ²	WT/M ³	% M/M ⁴	M/WT ⁵	WT/WT ⁶	% M/WT ⁷	p-value ⁸	Adjusted p-value ⁹
ASXL1	FLT3	0	146	0	10	239	4.0	0.02	0.94
CBF	MLL 異常	0	38	0	72	287	20.1	<0.001	0.99
CBF	Split MLL	0	22	0	72	303	19.2	0.02	1.0
CBF	MLL PTD	0	18	0	72	307	19.0	0.05	1.0
DNMT3A	CBF	1	71	1.4	88	225	28.1	<0.001	0.11
DNMT3A	Split MLL	1	21	4.6	88	275	24.2	0.04	0.97
DNMT3A R882	WT1	0	29	0	63	287	18.0	0.01	0.92
FLT3	CBF	6	66	8.3	141	184	43.4	<0.001	0.02
FLT3	NRAS	3	37	7.5	144	212	40.5	<0.001	0.008
FLT3	KIT	0	23	0	147	227	39.3	<0.001	0.04
FLT3	Split MLL	2	20	9.1	145	230	38.7	0.005	0.39
IDH1 or IDH2	CBF	1	71	1.4	56	267	17.3	<0.001	0.63
IDH1 or IDH2	TET2	0	33	0	56	301	15.7	0.008	0.97
IDH1 or IDH2	WT1	0	30	0	56	303	15.6	0.01	0.98
IDH1 or IDH2	FLT3	13	133	8.9	44	205	17.7	0.02	1.0
IDH1 or IDH2	CEBPA	1	33	2.9	56	302	15.6	0.04	0.99
IDH1	FLT3	4	142	2.7	20	230	8.0	0.04	1.0
IDH2	CBF	0	72	0	33	291	10.2	0.002	0.99
NPM1	CBF	0	72	0	118	207	36.3	<0.001	0.001
NPM1	MLL 異常	0	38	0	118	241	32.9	<0.001	0.02
NPM1	Split MLL	0	22	0	118	257	31.5	<0.001	0.59
NPM1	MLL PTD	0	18	0	118	261	31.1	0.002	0.59
NPM1	CEBPA	3	31	8.2	113	246	31.5	0.005	0.34
NPM1	KIT	2	21	8.7	116	258	31.0	0.03	0.99
WT1	CBF	1	69	1.4	29	292	9.0	0.03	1.0

- 1) 真正体細胞変異として検出されなかったシングルヌクレオチド変異体は、分析を打ち切った。したがって、全ての事例において、サンプル数は合計で398となっていない。
- 2) 遺伝子#1及び遺伝子#2の両方が変異を起こしている患者数。
- 3) 遺伝子#1が野生型であるが遺伝子#2が変異を起こしている患者数。
- 4) いずれかの遺伝子に変異している全ての患者における、遺伝子#1及び遺伝子#2が変異している患者のパーセンテージ。
- 5) 遺伝子#1が変異を起こしており、遺伝子#2が野生型である患者数。
- 6) 両方の遺伝子が野生型である患者数。
- 7) いずれかの遺伝子が野生型である全ての患者における、いずれかの遺伝子に変異している患者の割合。
- 8) フィッシャーの正確確率検定によるp値。
- 9) 多重比較により調整されたp値。

10

20

30

【表 9 a】

遺伝子/細胞遺伝学的異常	変異状態	患者数	生存中央値 (月)	U V 分析 p-value ²	M V 分析 p-value ³
DNMT3A	Mutant	88	14.1	0.19	0.29
	Wildtype	296	21.3		
DNMT3A	R882 Mutant	63	14.1	0.14	0.26
	Wildtype	321	21.3		
DNMT3A	Non-R882 Mutant	27	18.2	0.90	0.91
	Wildtype	357	18.0		
IDH1/2	Mutant for IDH1 or IDH2	56	42.4	0.009	0.001
	Wildtype	358	16.2		
IDH1	Mutant	23	38.7	0.42	0.59
	Wildtype	372	17.0		
IDH2	Mutant	33	49.4	0.01	0.001
	Wildtype	362	16.3		
IDH2	R140Q Mutant	24	-	0.009	0.001
	Wildtype	371	16.6		
IDH2	R172K Mutant	9	41.3	0.58	0.46
	Wildtype	386	16.9		
TET2	Mutant	33	13.2	0.16	0.61
	Wildtype	358	18.0		
ASXL1	Mutant	10	10.3	0.05	0.22
	Wildtype	384	17.7		
FLT3	Mutant	148	13.8	0.006	0.003
	Wildtype	248	22.0		
NPM1	Mutant	118	22.3	0.07	0.005
	Wildtype	278	16.5		
PHF6	Mutant	9	4.3	0.006	0.08
	Wildtype	383	17.7		
KIT	Mutant	23	57.9	0.08	0.6
	Wildtype	373	16.6		
CEBPa	Mutant	34	31.7	0.05	0.03
	Wildtype	358	16.9		
WT1	Mutant	30	12.2	0.23	0.19
	Wildtype	360	17.7		
KRAS	Mutant	8	-	0.17	0.19
	Wildtype	386	16.9		
NRAS	Mutant	40	21.3	0.13	0.19
	Wildtype	355	16.9		

10

20

30

【表 9 b】

TP53	Mutant	8	12.4	0.14	0.83
	Wildtype	380	18.2		
PTEN	Mutant	6	15.2	0.68	0.68
	Wildtype	389	17.9		
RUNX1	Mutant	20	16.9	0.90	0.63
	Wildtype	361	16.9		
CBF 転座	Present	43	-	0.001	0.47
	Absent	353	16.2		
Del 5q	Present	12	7.0	0.001	0.46
	Absent	384	18.0		
EVI positive	Present	8	2.8	<0.001	0.02
	Absent	388	18.0		
MLL PTD	Present	19	12.6	0.009	0.19
	Absent	377	18.0		
Split MLL	Present	25	11.7	0.05	0.44
	Absent	371	18.2		
任意のMLL異常	Present	39	10.9	<0.001	0.33
	Absent	357	19.7		
Monosomy 7	Present	9	3.5	<0.001	0.18
	Absent	387	18.0		
t(6;9)	Present	2	15.8	0.42	0.81
	Absent	394	17.5		
Trisomy 8	Present	19	10.2	0.06	0.03
	Absent	377	18.0		
t(8;21)	Present	29	47.1	0.02	0.37
	Absent	367	16.5		

1) 全生存の下欄の値が存在しないものは、死亡が観察されなかったことを示す。

2) 一変量分析（UV）のp値（ログランク検定により計算される）。

3) 白血球数（WBC）、年齢、移植、及び細胞遺伝学を考慮に入れた、多変量分析（MV）のp値。

10

20

【表 10 a】

遺伝子/細胞遺伝学的異常	変異状態	患者数	生存中央値 (月)	p-value ²
DNMT3A	Mutant	75	14.08	0.17
	Wildtype	151	22.83	
DNMT3A	R882 Mutant	56	14.08	0.07
	Wildtype	170	22.83	
DNMT3A	Non-R882 Mutant	21	23.52	0.57
	Wildtype	205	17.96	
IDH1/2	Mutant for IDH1 or IDH2	46	-	0.001
	Wildtype	188	15.53	
IDH1	Mutant	21	38.65	0.49
	Wildtype	213	17.53	
IDH2	Mutant	25	-	0.001
	Wildtype	209	16.15	
IDH2	R140Q Mutant	18	-	0.001
	Wildtype	216	16.91	
IDH2	R172K Mutant	7	37.96	0.44
	Wildtype	227	16.94	
TET2	Mutant	17	8.82	0.008
	Wildtype	214	19.08	
ASXL1	Mutant	6	24.42	0.48
	Wildtype	227	17.66	
FLT3	Mutant	120	13.52	0.001
	Wildtype	114	34.31	
NPM1	Mutant	110	23.52	0.04
	Wildtype	124	16.15	
PHF6	Mutant	3	2.53	<0.0001
	Wildtype	229	17.96	
KIT	Mutant	2	-	0.98
	Wildtype	232	17.66	
CEBPa	Mutant	26	31.68	0.14
	Wildtype	207	16.91	
WT1	Mutant	26	10.94	0.12
	Wildtype	205	18.26	
KRAS	Mutant	5	-	0.09
	Wildtype	229	17.53	
NRAS	Mutant	20	-	0.10
	Wildtype	213	16.94	
TP53	Mutant	2	-	0.57
	Wildtype	229	17.89	

10

20

30

【表 10 b】

PTEN	Mutant	4	-	0.99
	Wildtype	229	17.89	
RUNX1	Mutant	13	16.91	0.54
	Wildtype	215	17.89	
EVI positive	Present	2	1.25	<0.0001
	Absent	232	17.89	
MLL PTD	Present	12	16.54	0.04
	Absent	222	18.26	
Split MLL	Present	7	21.71	0.96
	Absent	227	17.77	
任意のMLL異常	Present	17	16.15	0.08
	Absent	217	18.95	
Trisomy 8	Present	19	10.16	0.04
	Absent	215	18.25	

40

1) 全生存の下欄の値が存在しないものは、死亡が観察されなかったことを示す。

2) 一変量分析 (UV) の p 値 (ログランク検定により計算される)。

【表 1 1 a】

細胞遺伝学的 分類	変異		試験 コホート (% (N))	検証 コホート (% (N))	全体的な リスク
Inversion (16), t(8;21)	任意		19.7% (71)	15.5% (13)	良好
正常核型又は 細胞遺伝学的 中間リスク	<i>FLT3</i> -ITD negative	<i>NPM1</i> and <i>IDH1/2</i> mutant	5.8% (21)	7.1% (6)	中間
	<i>FLT3</i> -ITD negative	<i>ASXL1</i> , <i>MLL</i> - PTD, <i>PHF6</i> and <i>TET2</i> - wildtype	35.5% (129)	27.4% (23)	
	<i>FLT3</i> -ITD negative or positive	<i>CEBPA</i> mutant			
	<i>FLT3</i> -ITD positive	<i>MLL</i> -PTD, <i>TET2</i> , and <i>DNMT3A</i> wildtype, and trisomy 8 negative	20.9% (76)	21.4% (18)	
	<i>FLT3</i> -ITD negative	<i>TET2</i> , <i>MLL</i> - PTD, <i>ASXL1</i> , or <i>PHF6</i> mutant			
	<i>FLT3</i> -ITD positive	<i>TET2</i> , <i>MLL</i> - PTD, <i>DNMT3A</i> mutant or trisomy 8			
良好でない	任意		18.2% (66)	28.6% (24)	

【表 1 2】

試験コホート (n=398)			
	危険率	信頼区間	p-value
良好	参照		<0.001
中間	1.88	1.15 – 3.05	
良好でない	6.16	3.83 – 9.88	
コホート全体 (n=502)			
	危険率	信頼区間	p-value
良好	参照		<0.001
中間	1.83	1.18 – 2.85	
良好でない	5.76	3.76 – 8.82	

¹ 化学療法導入開始後30日以内の死亡として定義される、治療に関連した死亡率。

² 治療関連死亡率又は再発を招かないにも関わらず完全寛解に入ることができないものとして定義される、化学療法耐性。

【表 1 3 a】

遺伝子/細胞遺伝学的異常	変異状態	p-value ¹	Adjusted p-value ²
DNMT3A	Mutant	0.01	0.10
	Wildtype	0.14	0.28
IDH1	Mutant	0.62	-
	Wildtype	0.01	-
IDH2	Mutant	0.33	-
	Wildtype	0.05	-
IDH2 R140Q	R140Q Mutant	0.15	1.0
	Wildtype	0.05	0.22
IDH2 R172K	R172K Mutant	0.73	-
	Wildtype	0.02	-
TET2	Mutant	0.45	1.0
	Wildtype	0.006	0.04
ASXL1	Mutant	0.08	0.50
	Wildtype	0.009	0.05
FLT3	Mutant	0.14	0.71
	Wildtype	0.10	0.30
NPM1	Mutant	0.01	0.11
	Wildtype	0.20	0.20
PHF6	Mutant	0.19	0.77
	Wildtype	0.005	0.04
KIT	Mutant	0.12	-
	Wildtype	0.004	-
CEBPa	Mutant	0.56	0.56
	Wildtype	0.003	0.03
WT1	Mutant	0.2	-
	Wildtype	0.02	-
KRAS	Mutant	0.62	-
	Wildtype	0.01	-
NRAS	Mutant	0.15	-
	Wildtype	0.04	-
TP53	Mutant	0.75	-
	Wildtype	0.01	-
PTEN	Mutant	0.78	-
	Wildtype	0.02	-
RUNX1	Mutant	0.47	-
	Wildtype	0.01	-
EVI positive	Present	0.90	-
	Absent	0.03	-
MLL PTD	Present	0.27	-
	Absent	0.01	-

10

20

30

【表 1 3 b】

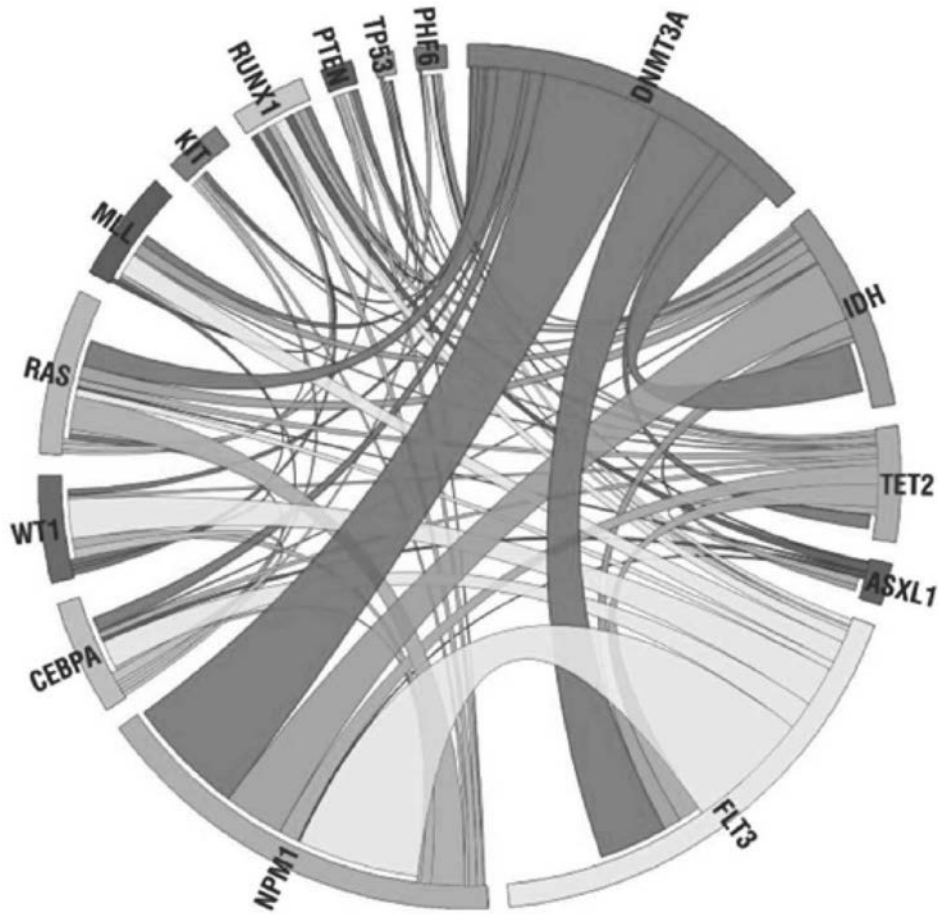
Split MLL	Present	0.007	0.07
	Absent	0.06	0.25

1) p 値はログランク検定により計算される。

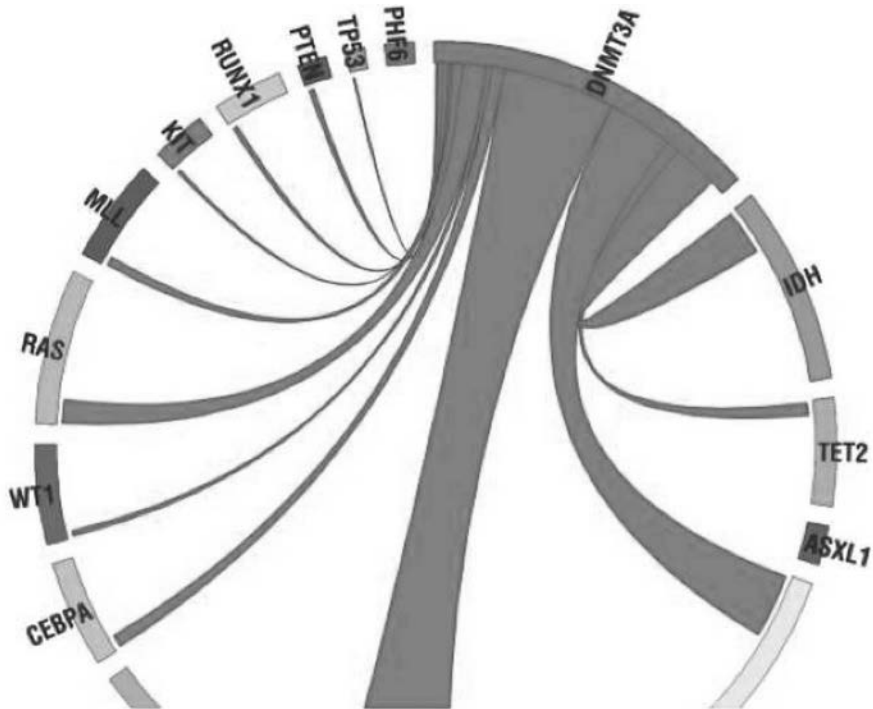
2) ステップダウンHolm法による多重検定により調整された p 値（補助データ参照）。

“－” は、p 値調整が実施されないことを示す。

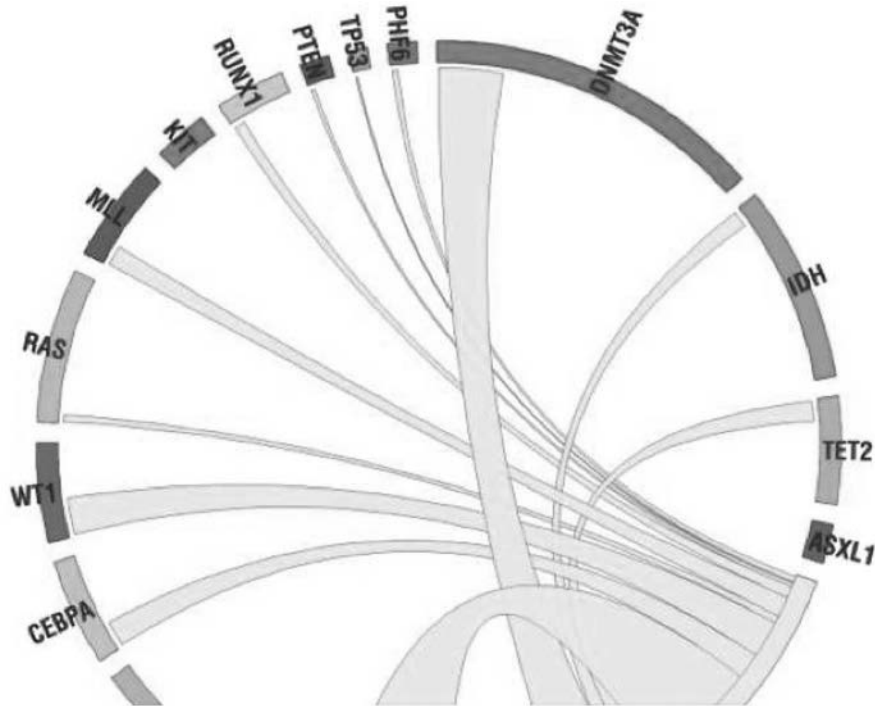
【図 1 a】



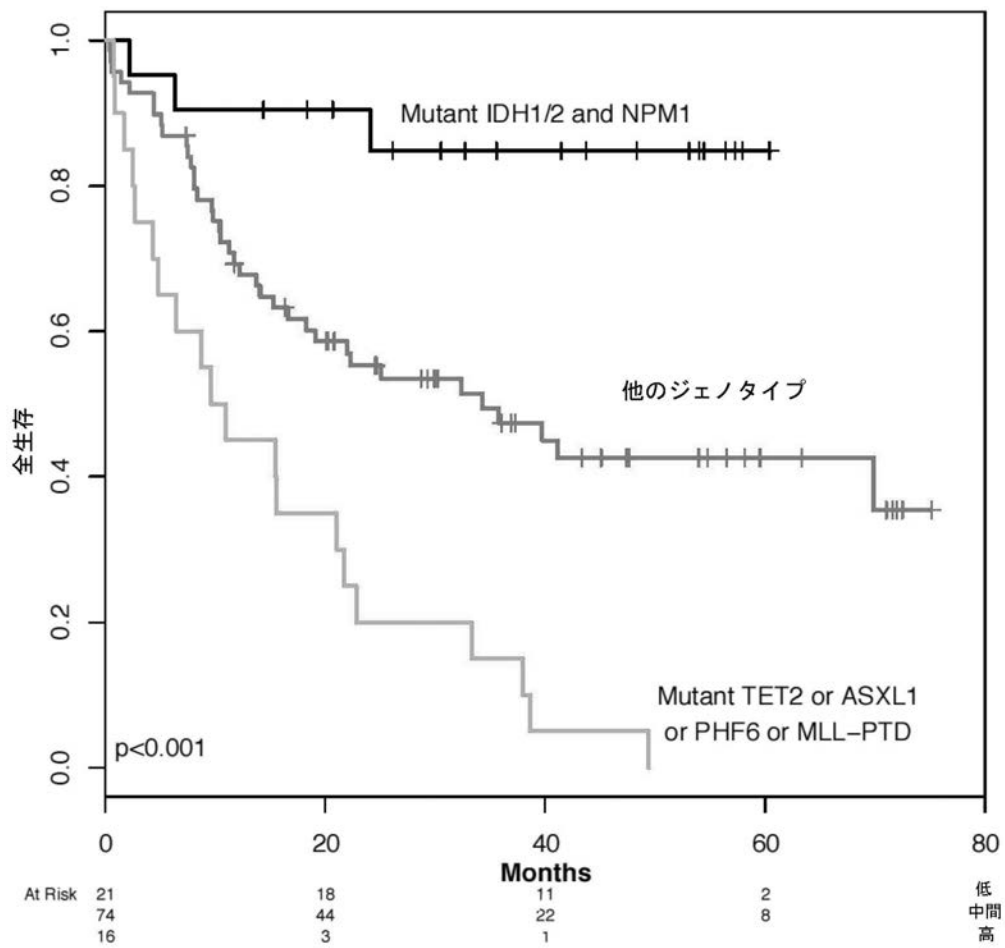
【図 1 b】



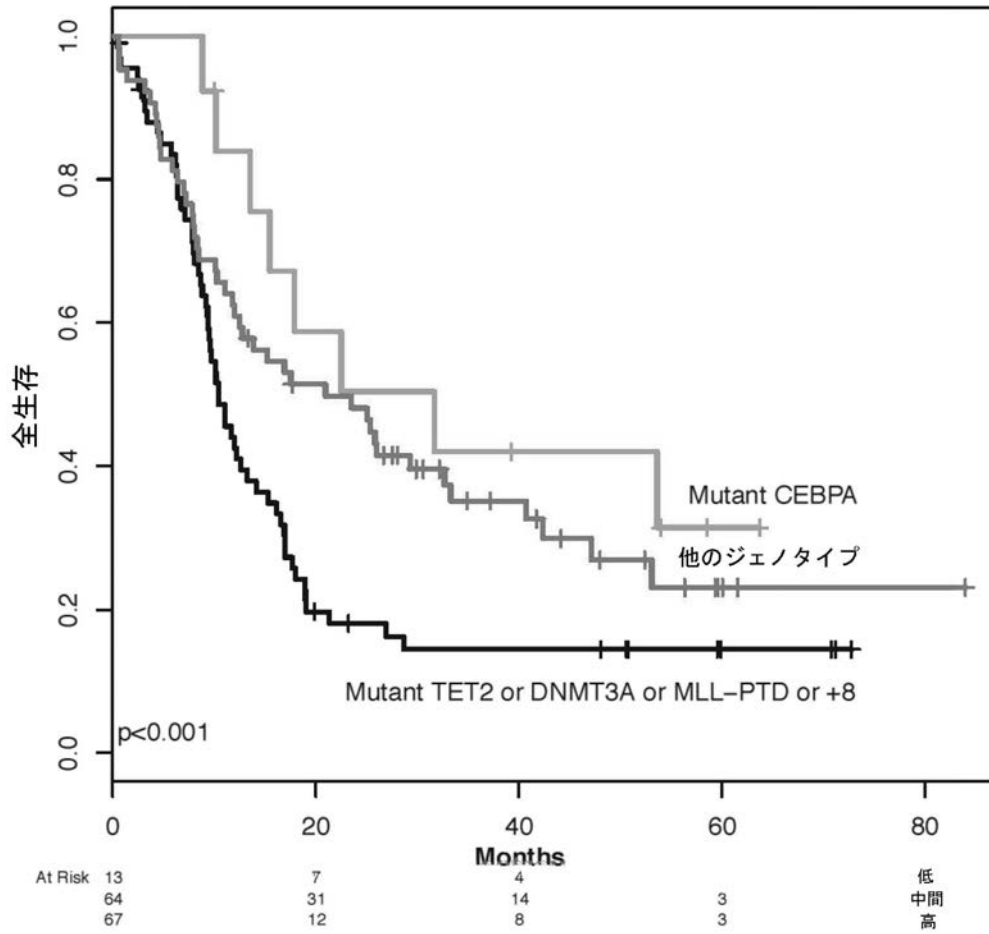
【図 1 c】



【図 2 a】



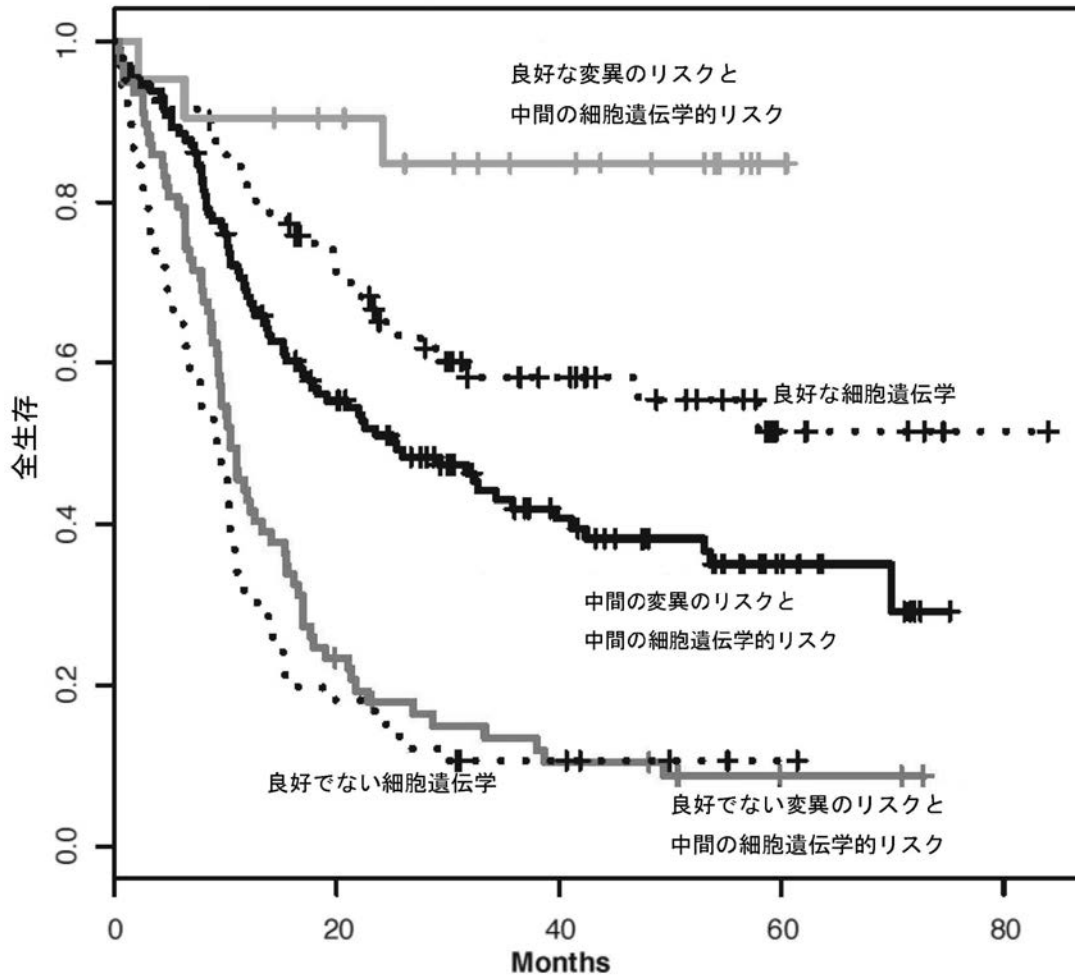
【図 2 b】



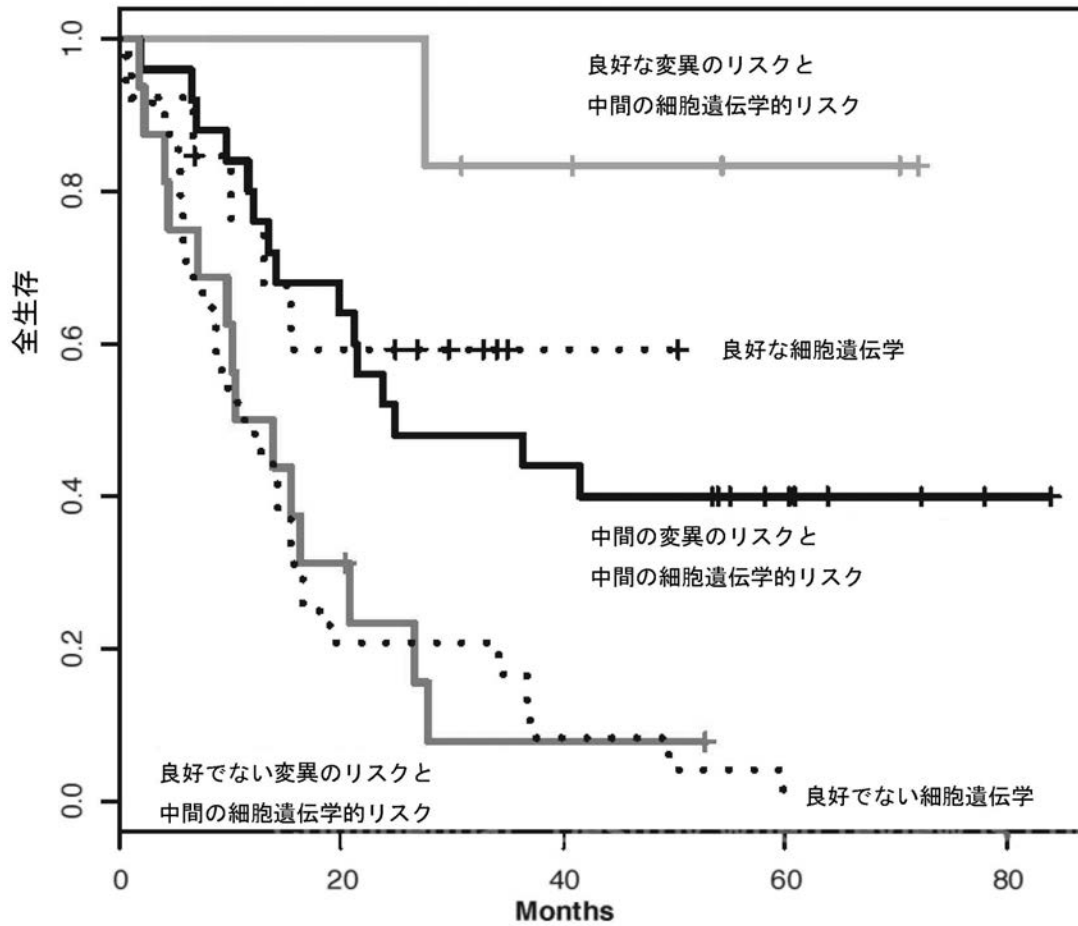
【 図 3 a 】

細胞遺伝学的分類	変異		全生存リスク
inv(16)/t(16;16) t(8;21)	任意		良好
正常な核型又は 細胞遺伝学的障害の 中間のリスク	<i>FLT3</i> -ITD negative	<i>NPM1</i> and <i>IDH1/2</i> mutant	中間
	<i>FLT3</i> -ITD negative	<i>ASXL1</i> , <i>MLL</i> -PTD, <i>PHF6</i> , and <i>TET2</i> wildtype	
	<i>FLT3</i> -ITD negative or positive	<i>CEBPA</i> mutant	
	<i>FLT3</i> -ITD positive	<i>MLL</i> -PTD, <i>TET2</i> , and <i>DNMT3A</i> wildtype, and trisomy 8 negative	良好でない
	<i>FLT3</i> -ITD negative	<i>TET2</i> , <i>MLL</i> -PTD, <i>ASXL1</i> or <i>PHF6</i> mutant	
	<i>FLT3</i> -ITD positive	<i>TET2</i> , <i>MLL</i> -PTD, <i>DNMT3A</i> mutant or trisomy 8	
良好でない			

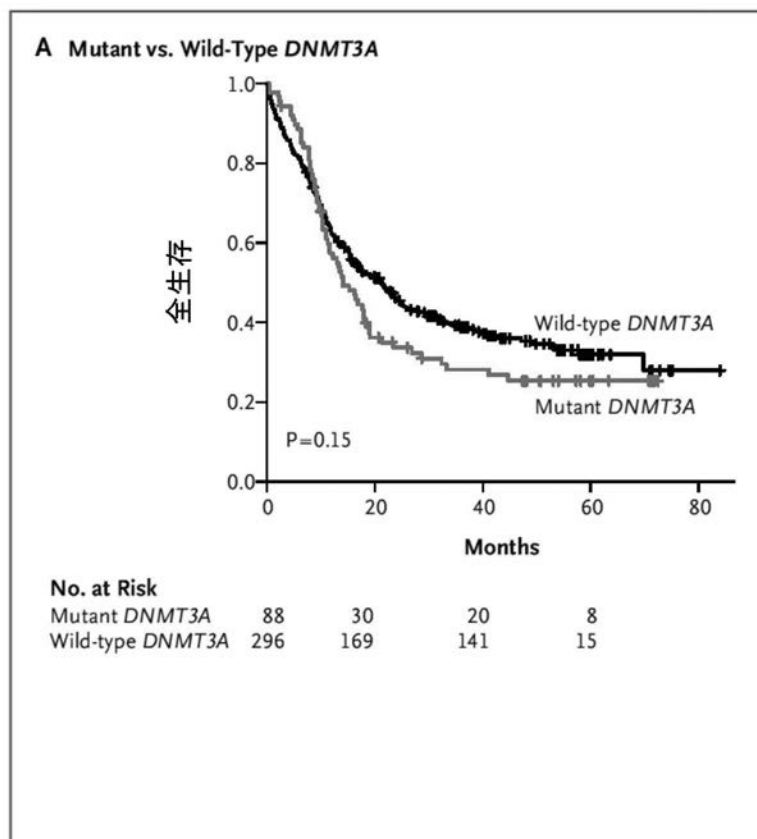
【図 3 b】



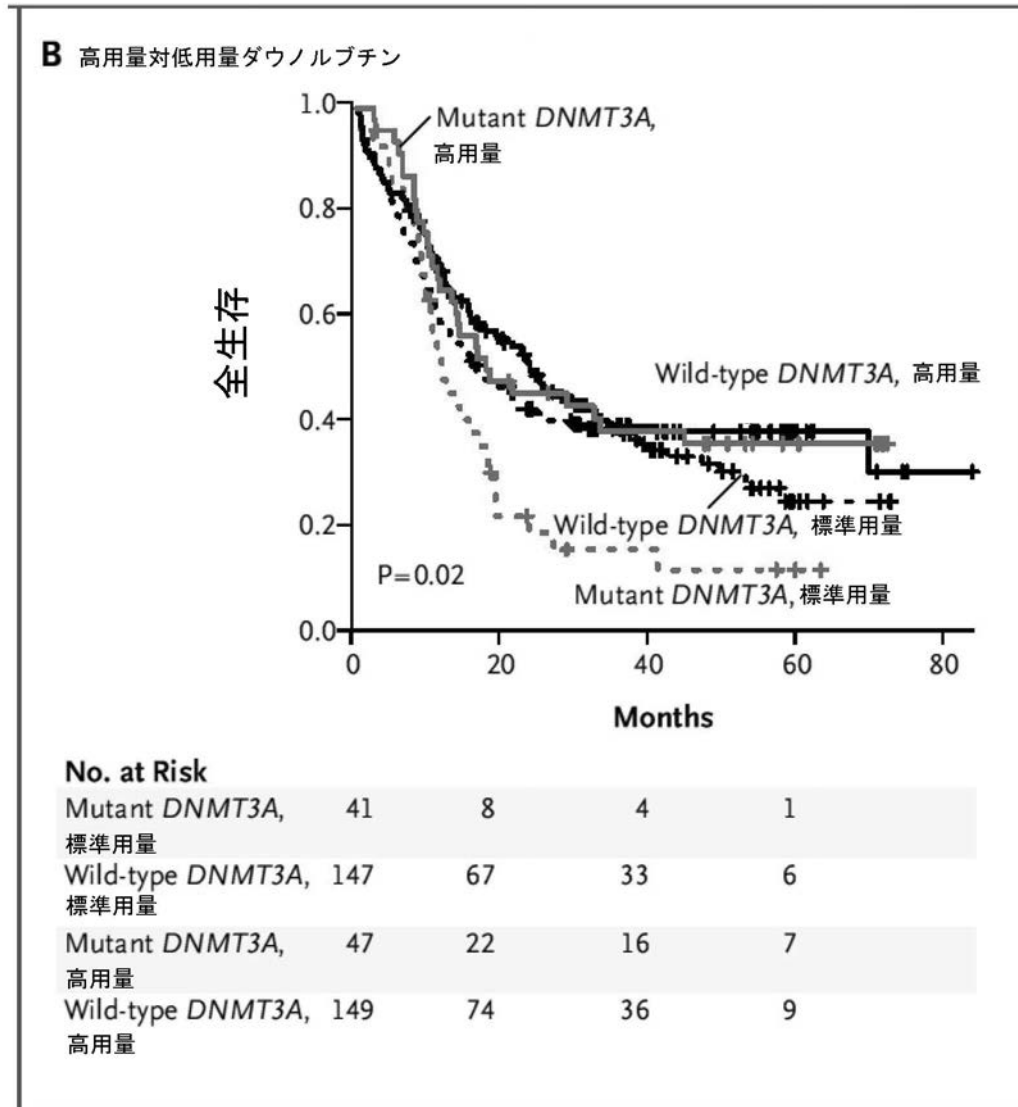
【図 3 c】



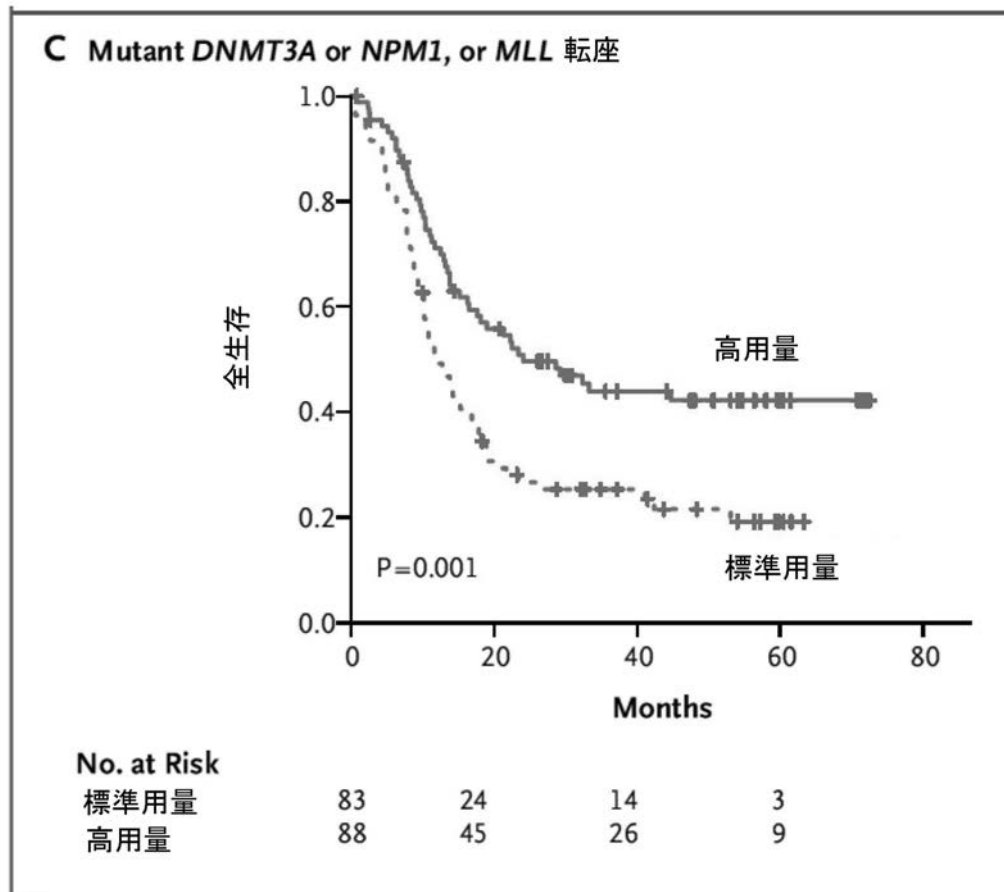
【図 4 a】



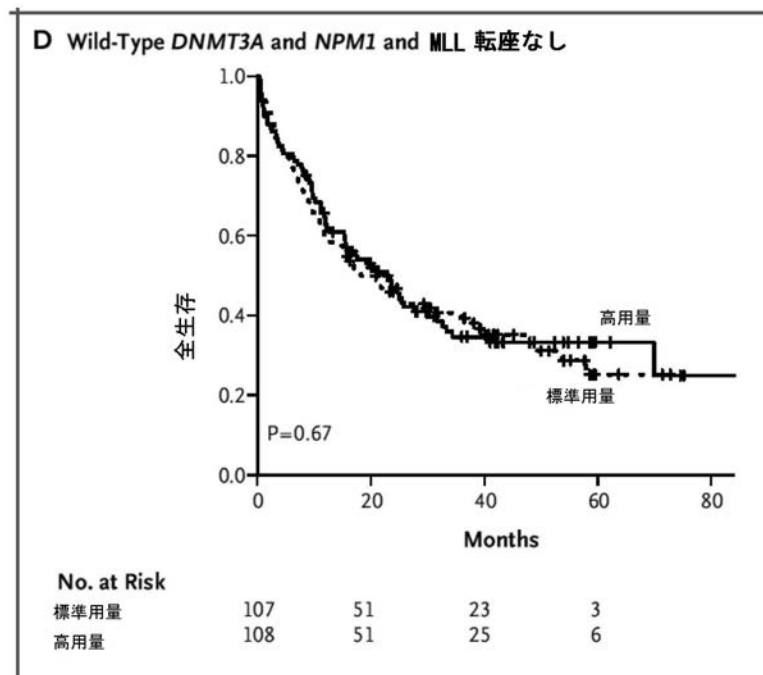
【図 4 b】



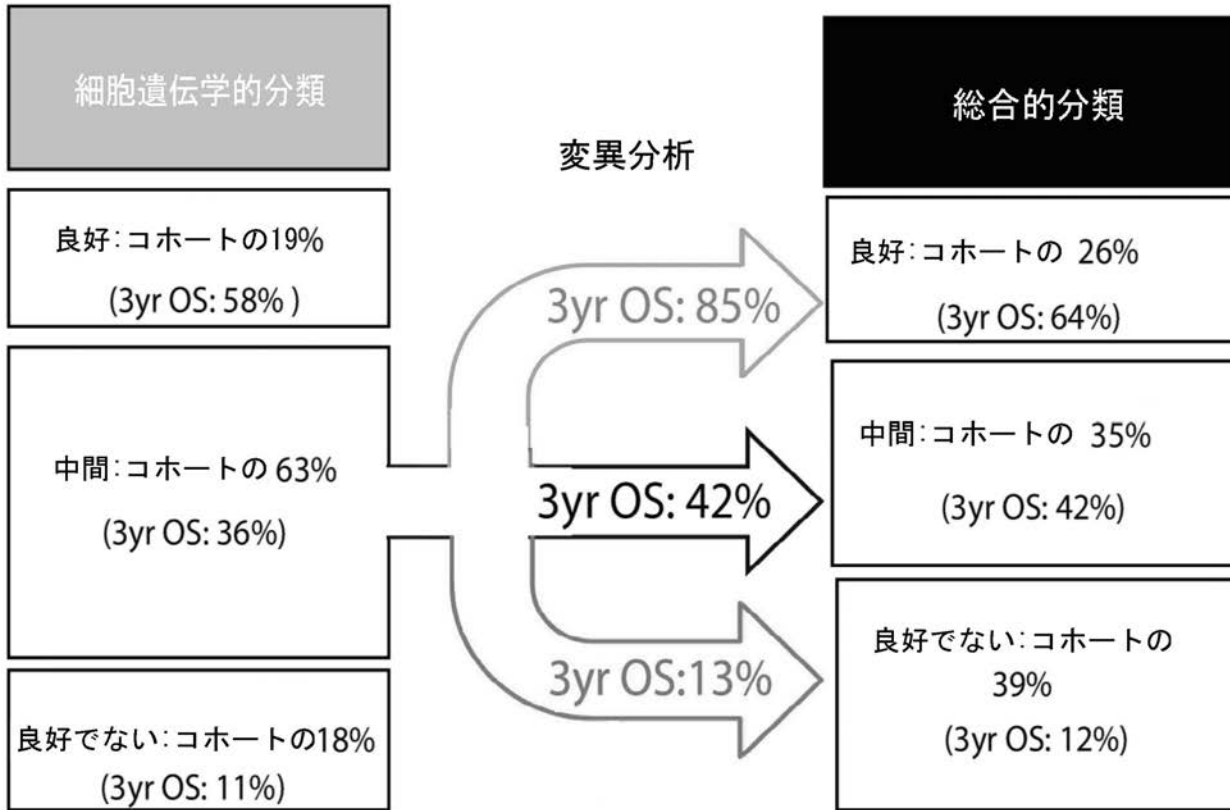
【図 4 c】



【図 4 d】



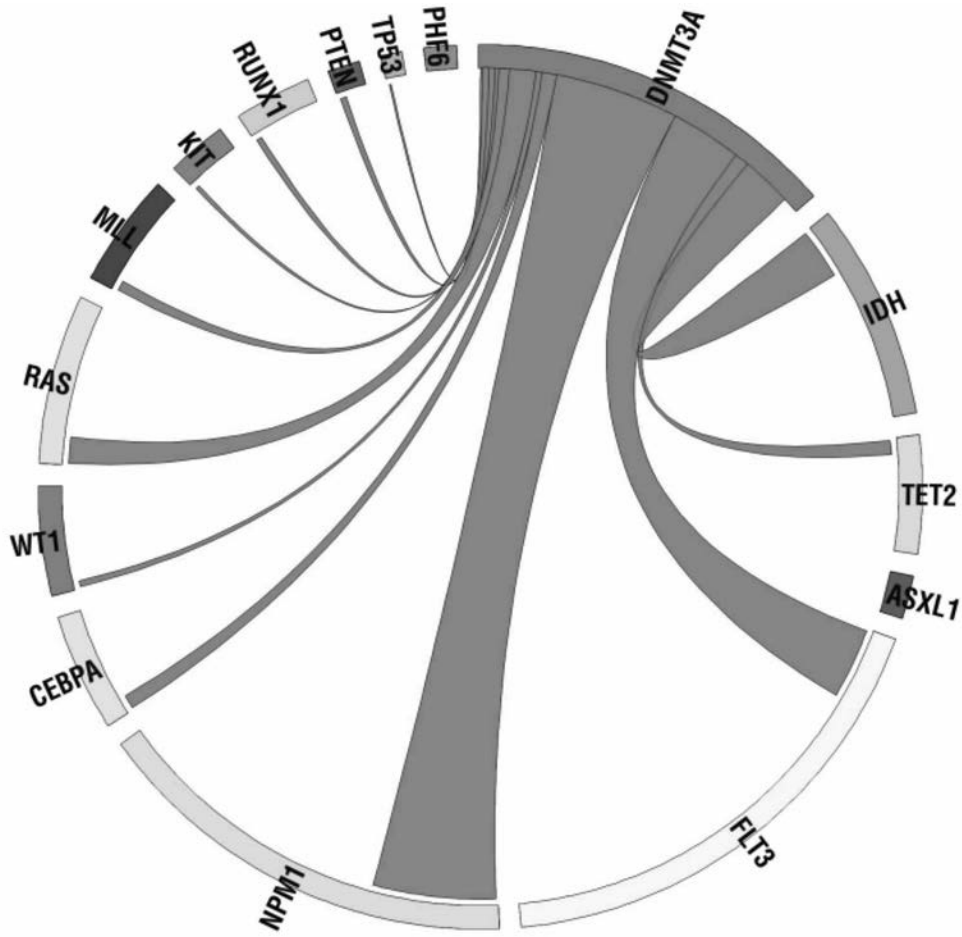
【図 5 a】



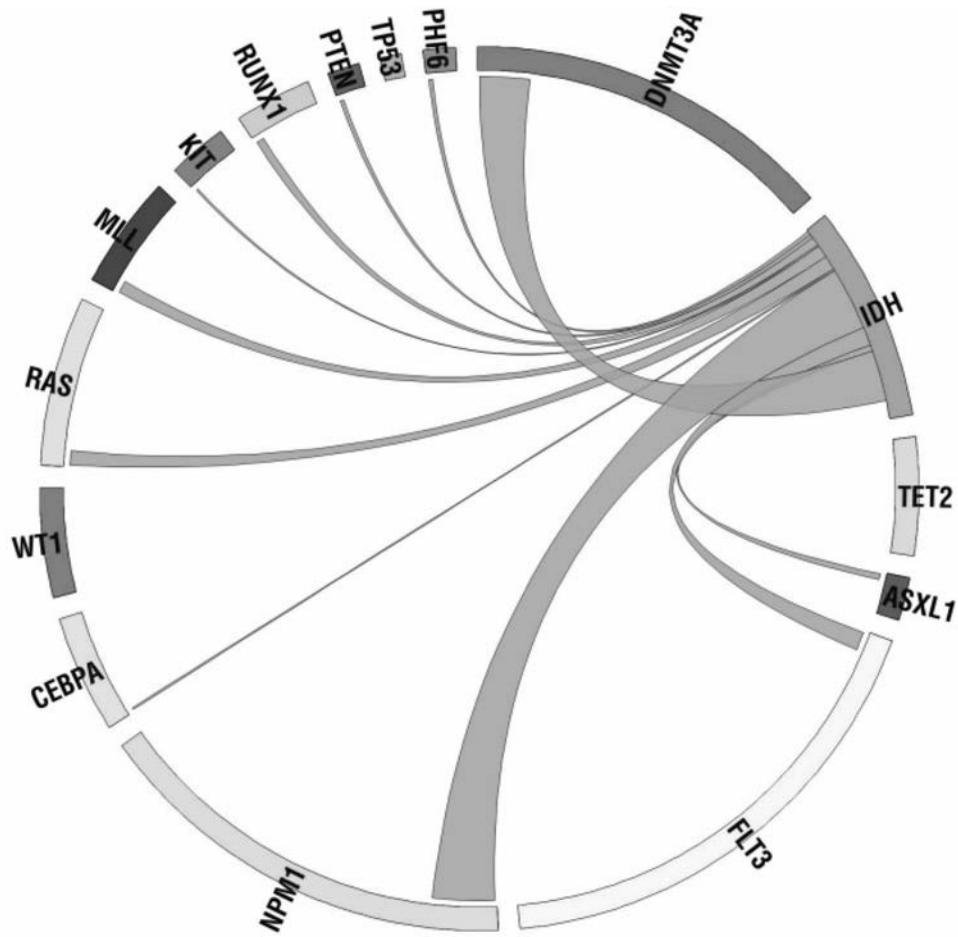
【図 5 b】

	<i>DNMT3A</i> or <i>NPM1</i> mutant or <i>MLL</i> 転座	他の全ての ジェノタイプ
高用量	3yr OS: 44%	3yr OS: 35%
標準用量	3yr OS: 25%	3yr OS: 39%

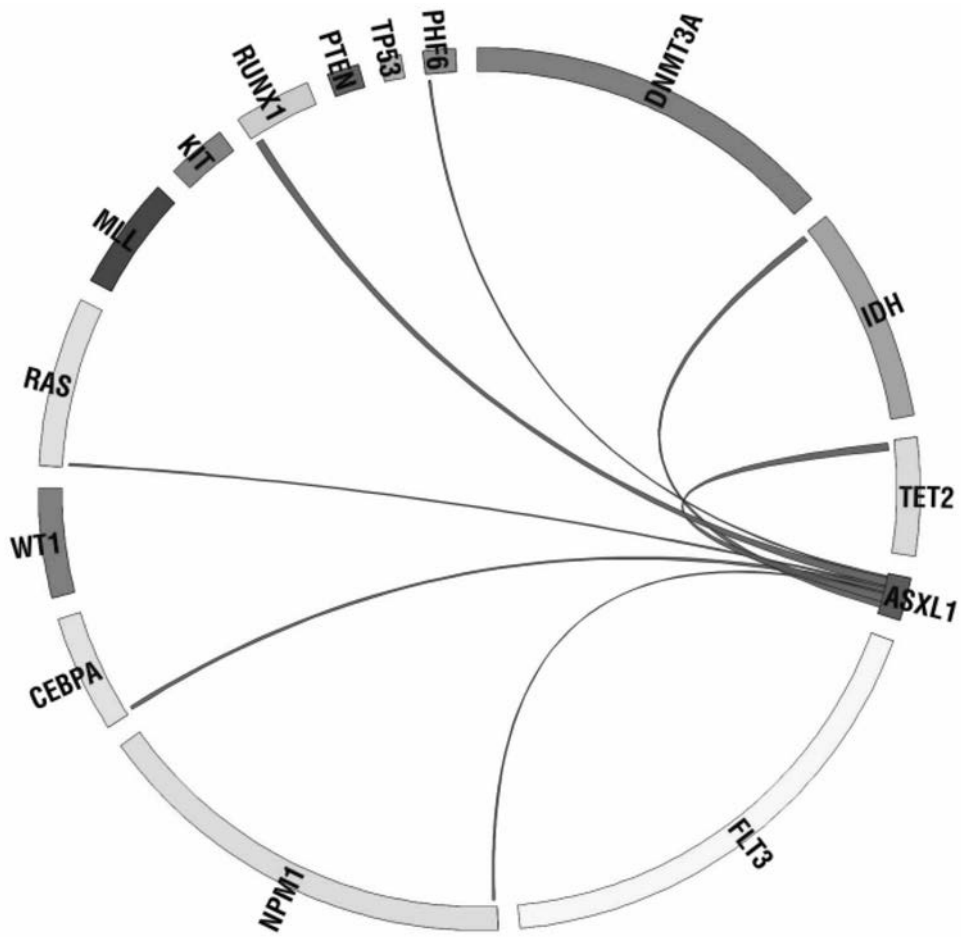
【図 6 a】



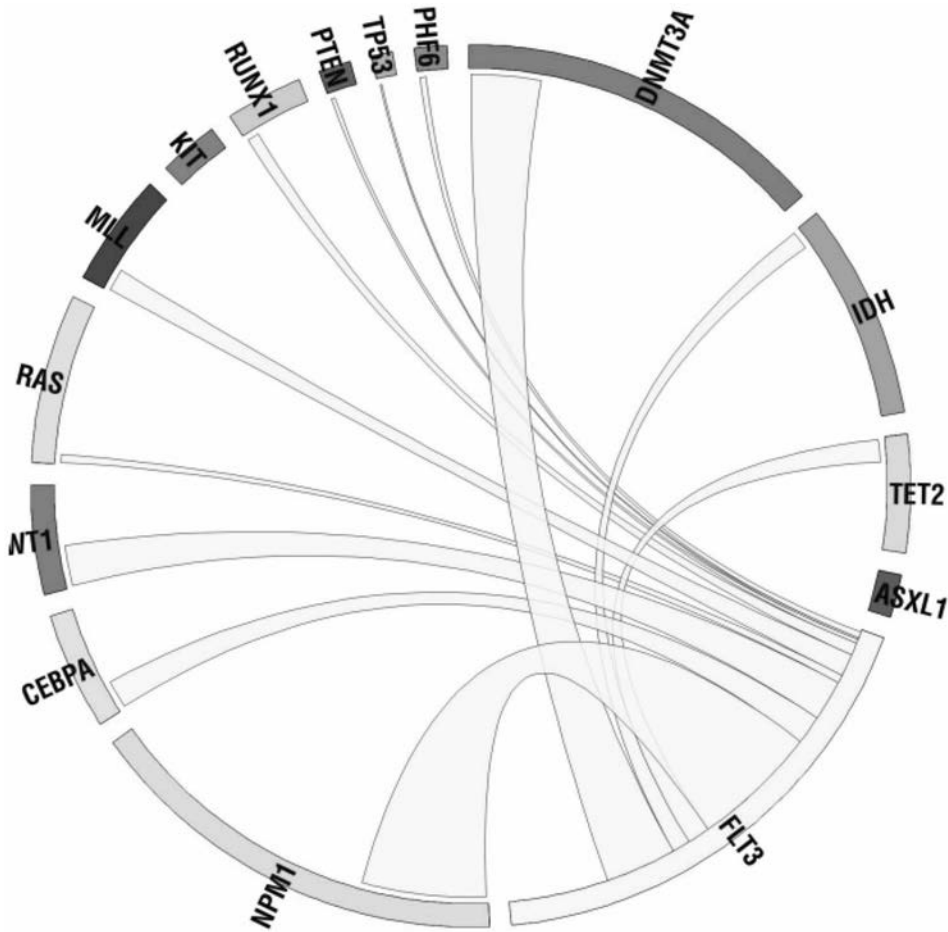
【 図 6 b 】



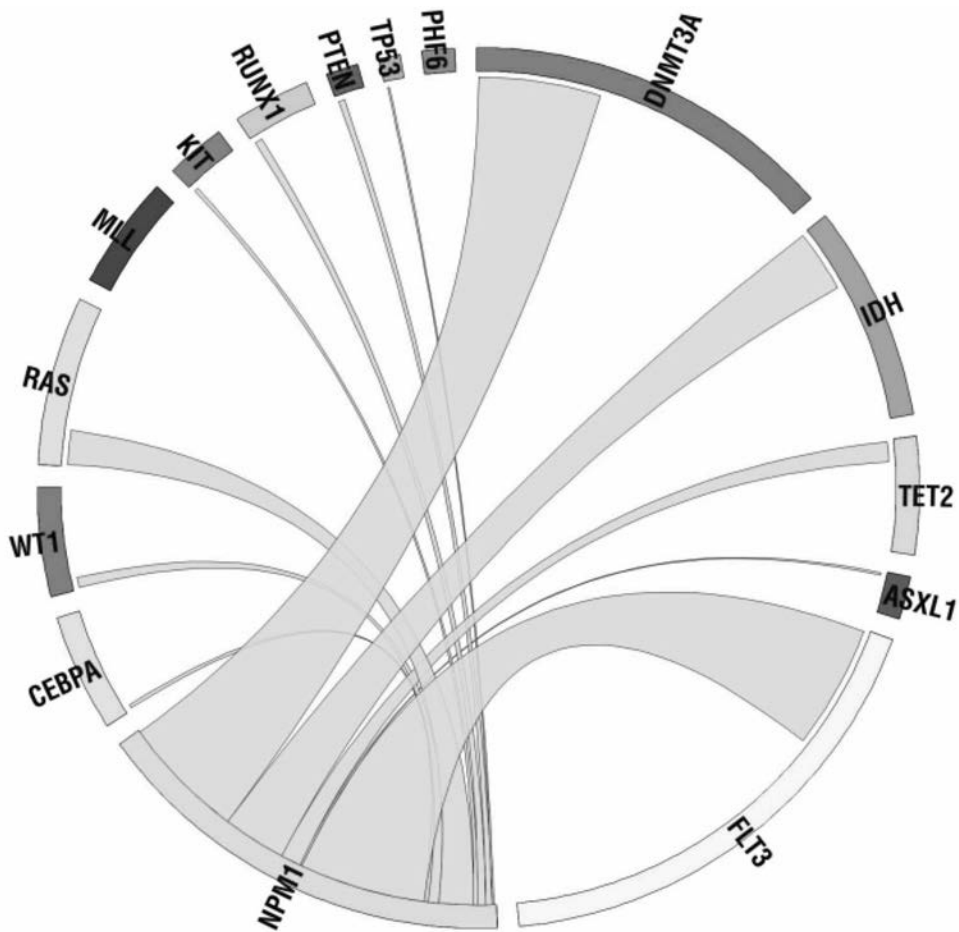
【図 6 c】



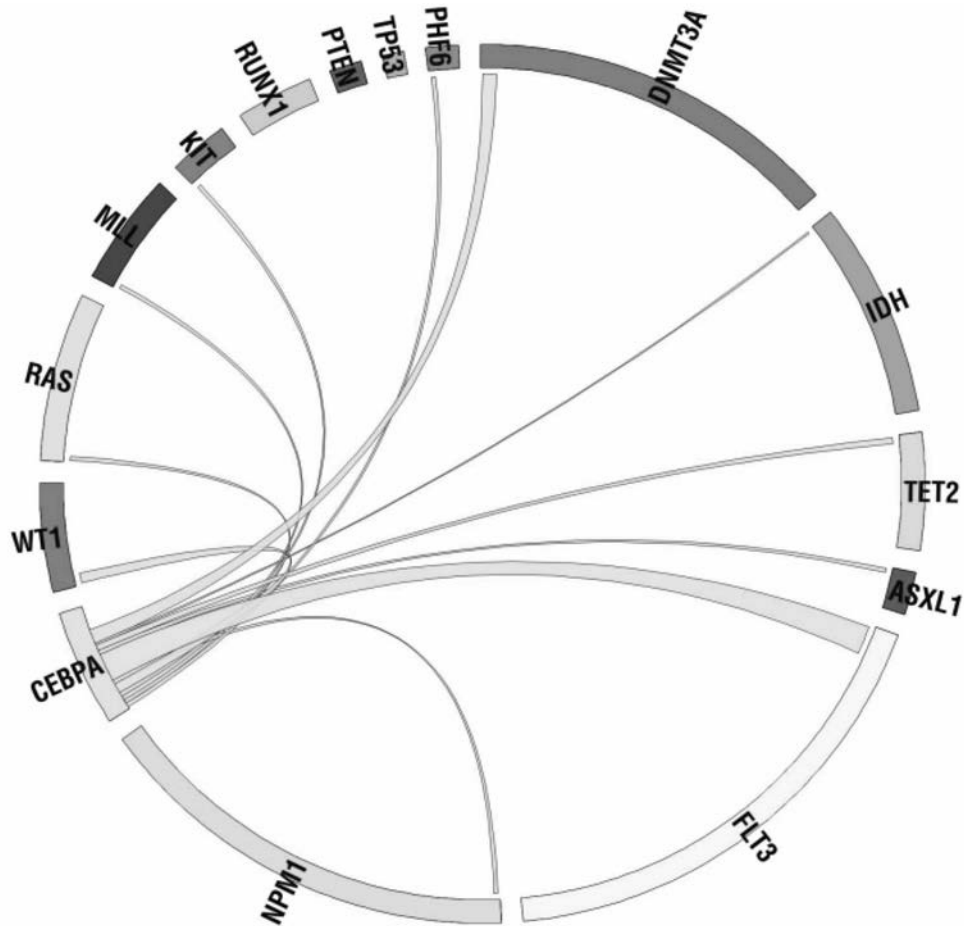
【 図 6 d 】



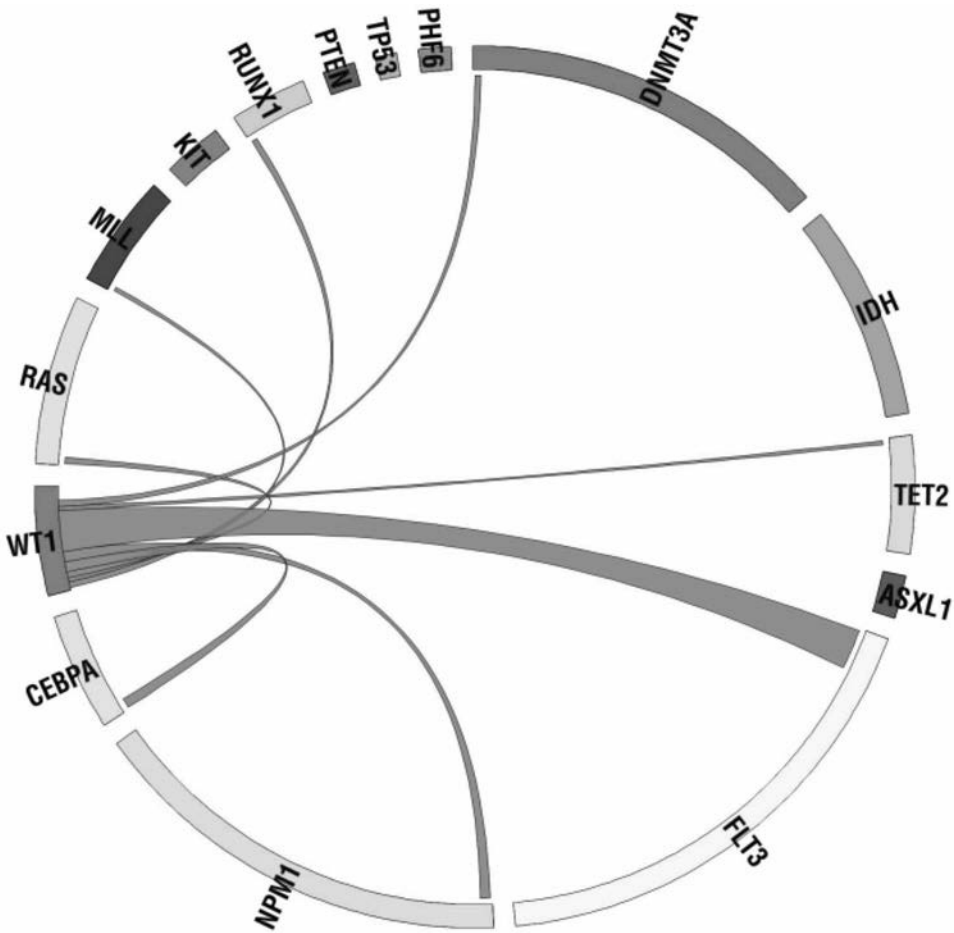
【 図 6 e 】



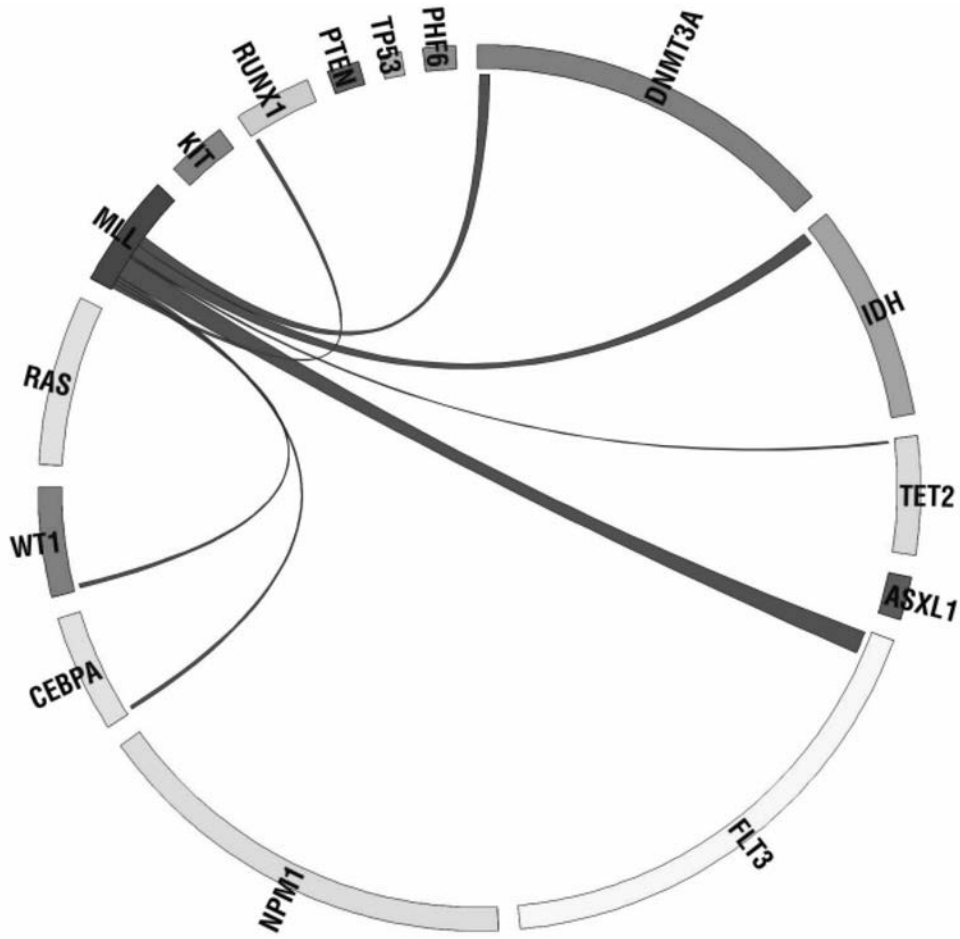
【 図 6 f 】



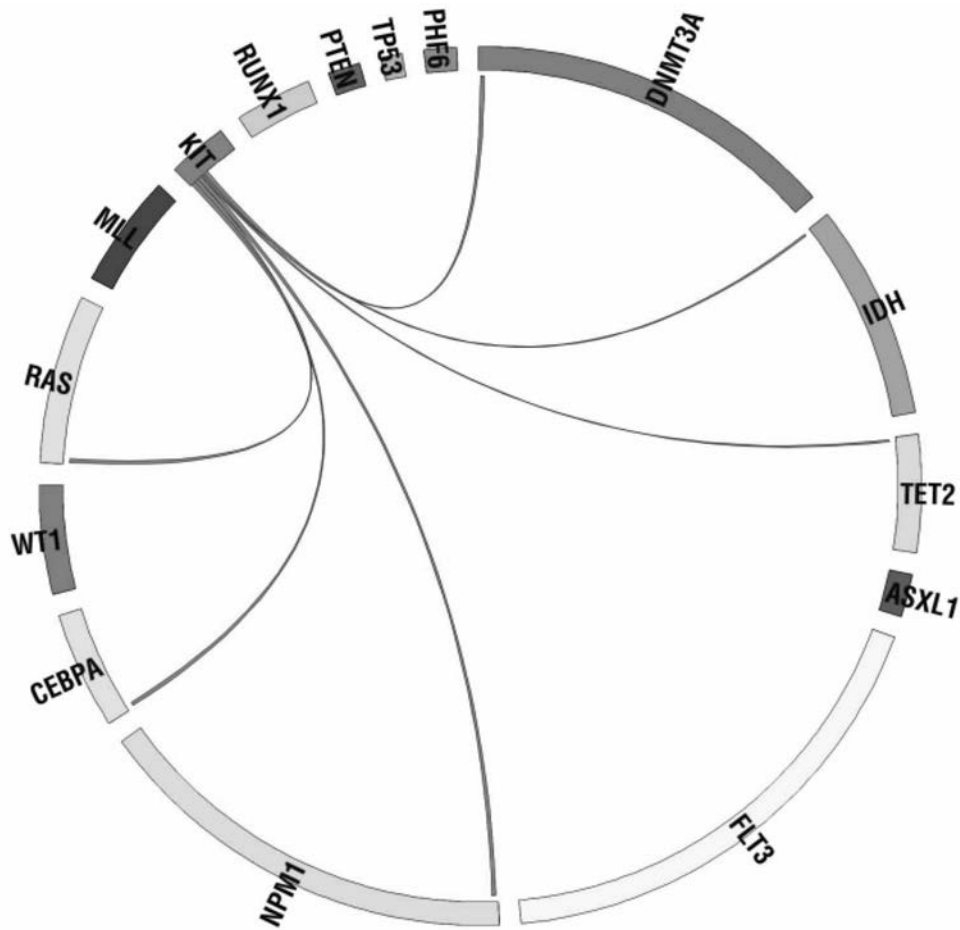
【 図 6 g 】



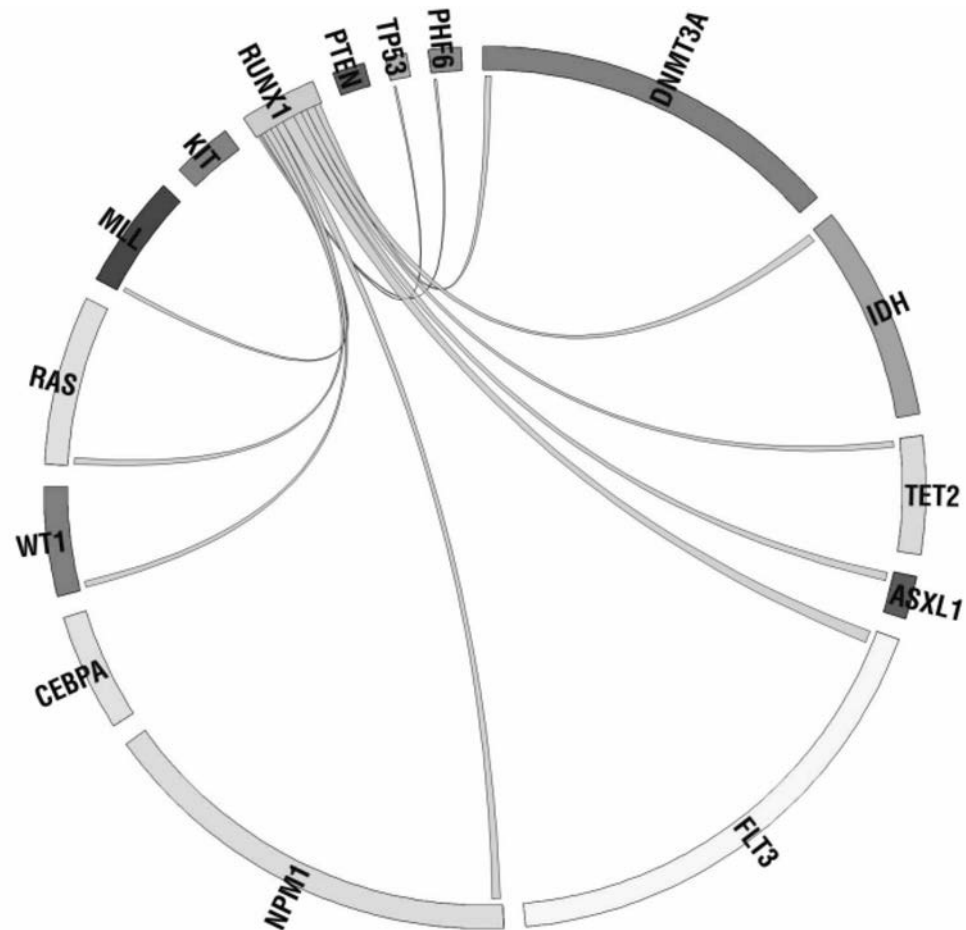
【 図 6 h 】



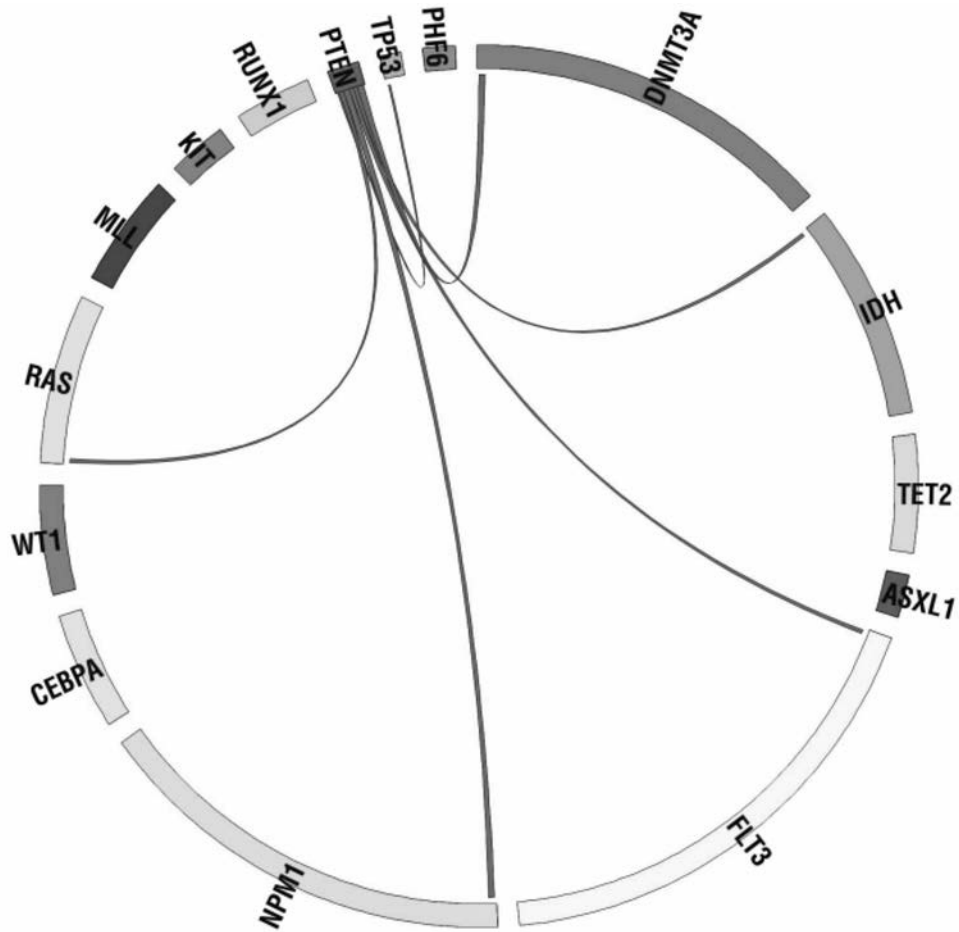
【図 6 i】



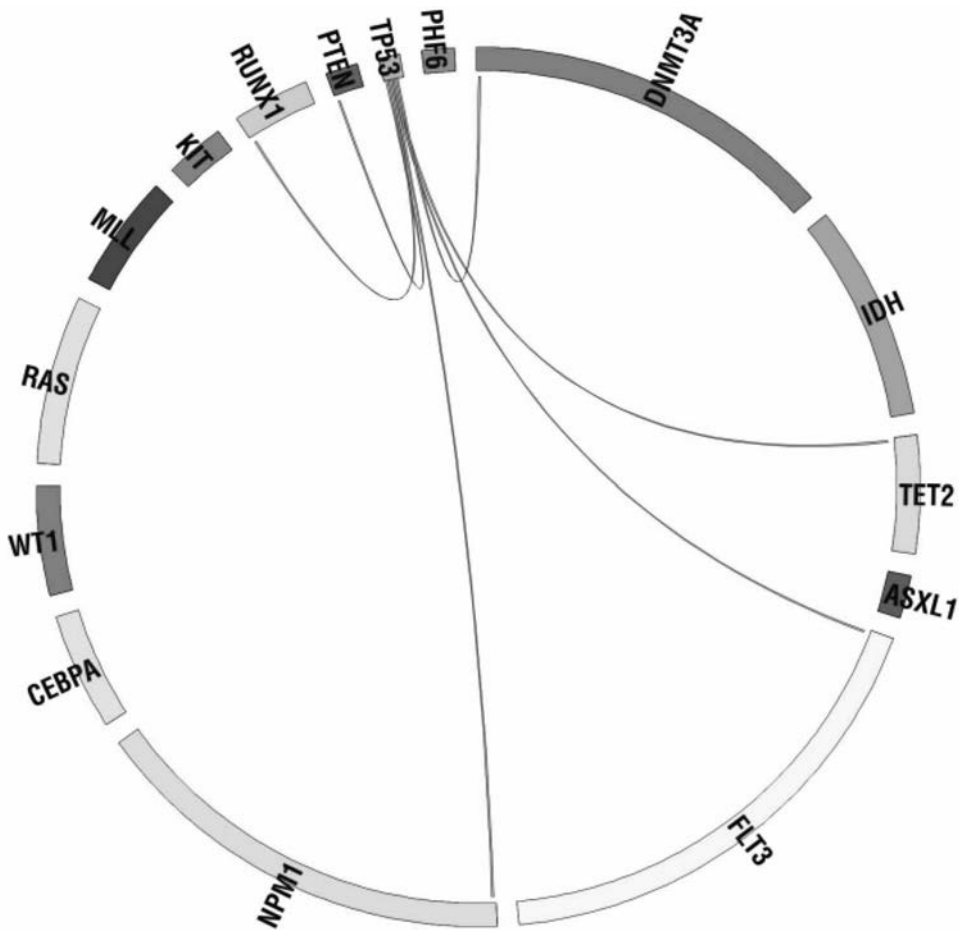
【図 6 j】



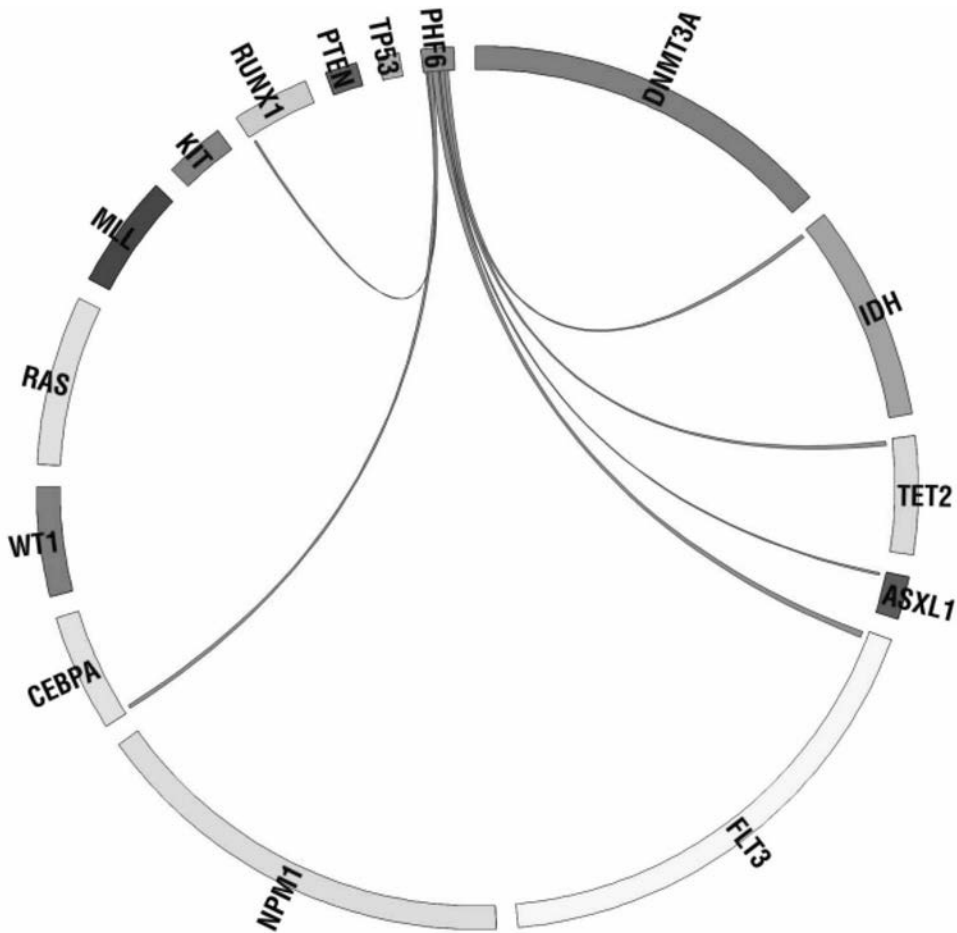
【図 6 k】



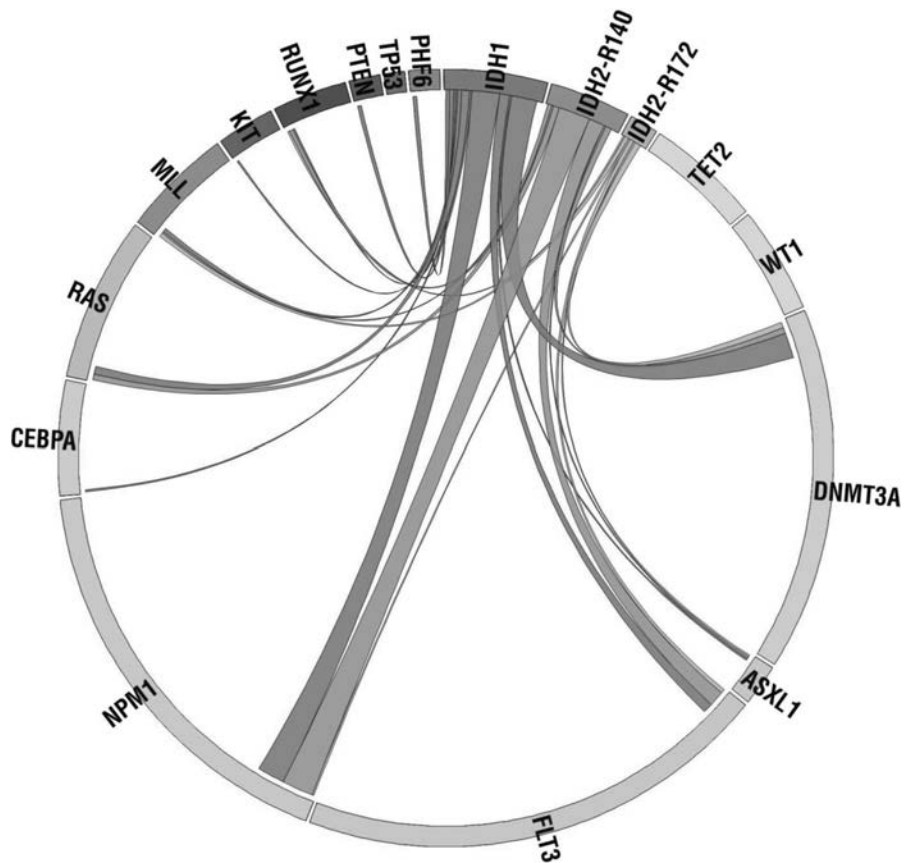
【図 6 l】



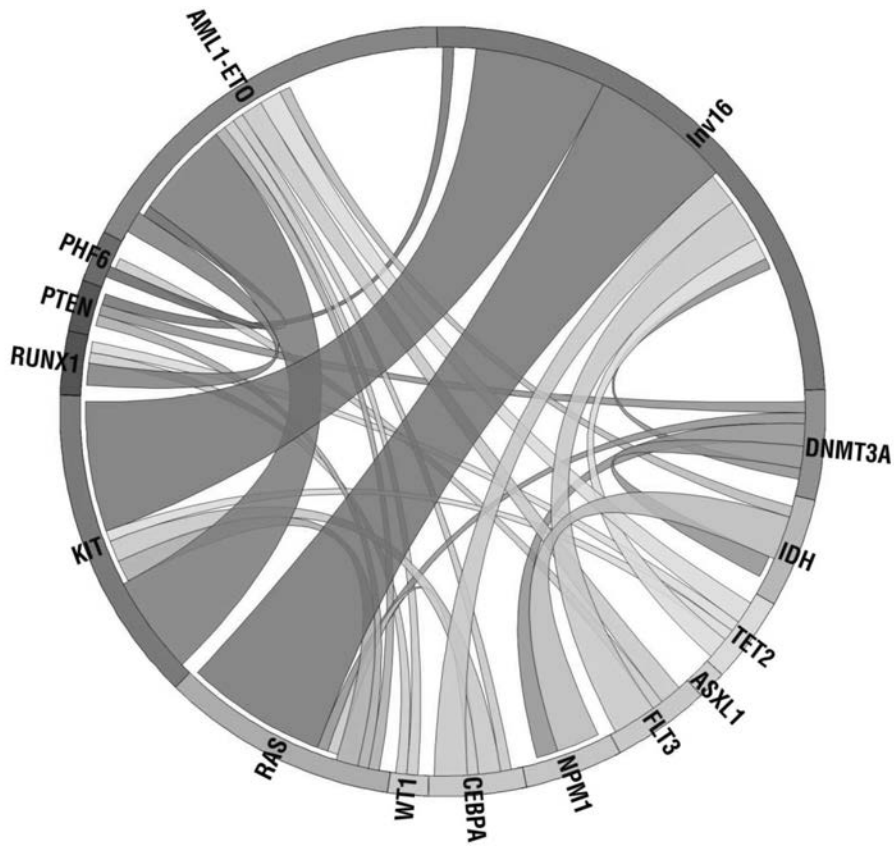
【 図 6 m 】



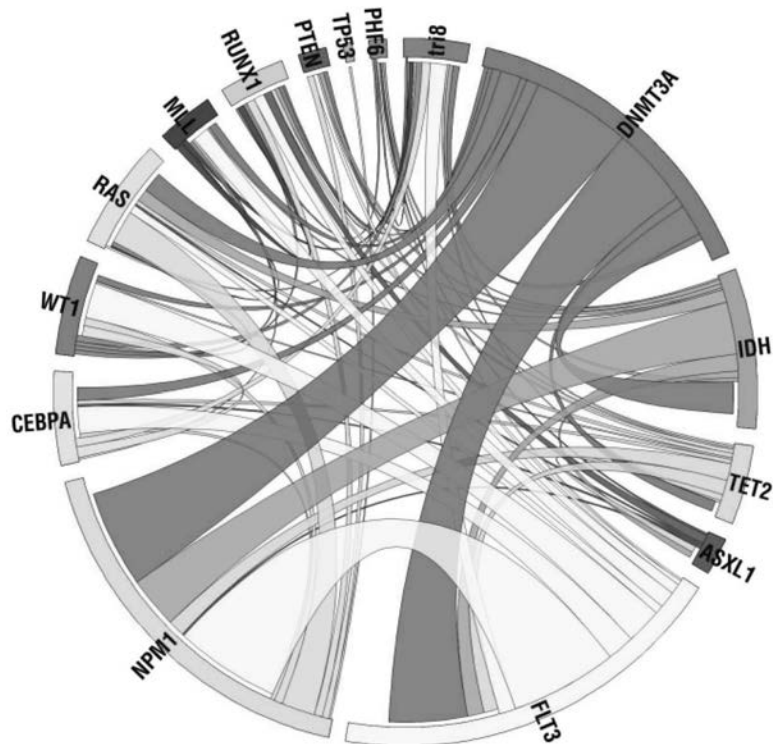
【 図 6 n 】



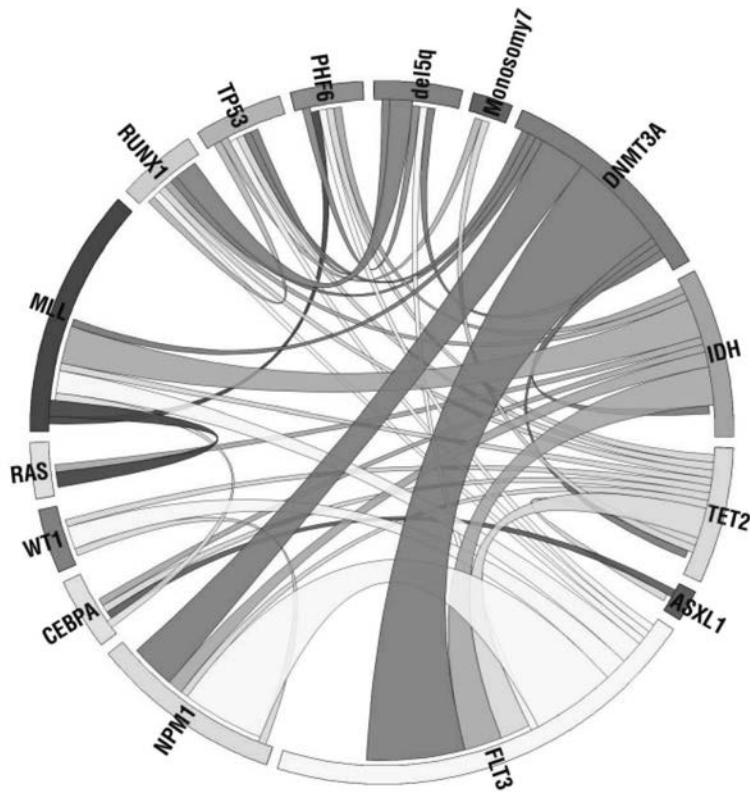
【図 7 a】



【図 7 b】



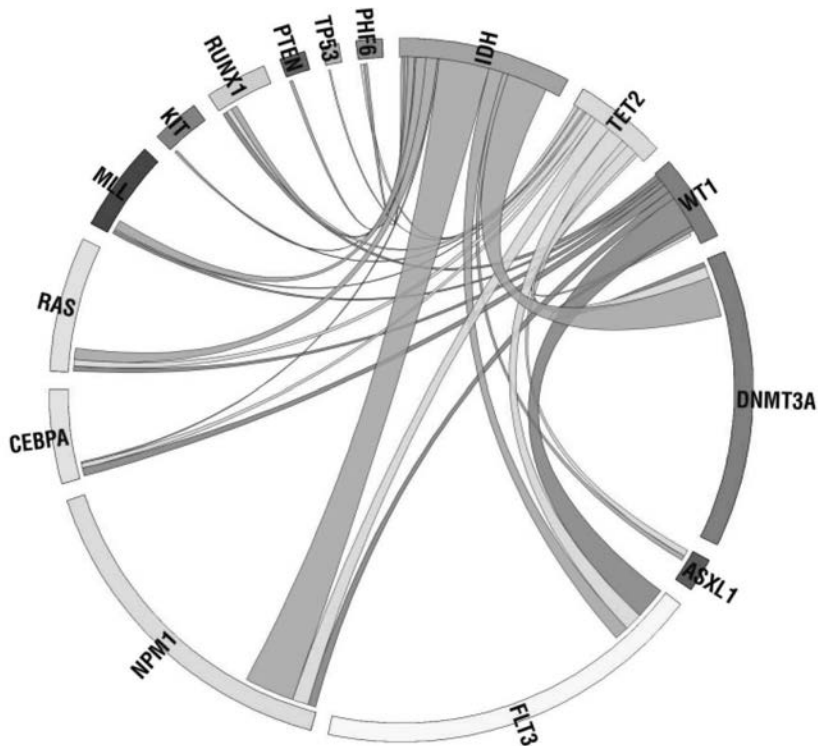
【図 7 c】



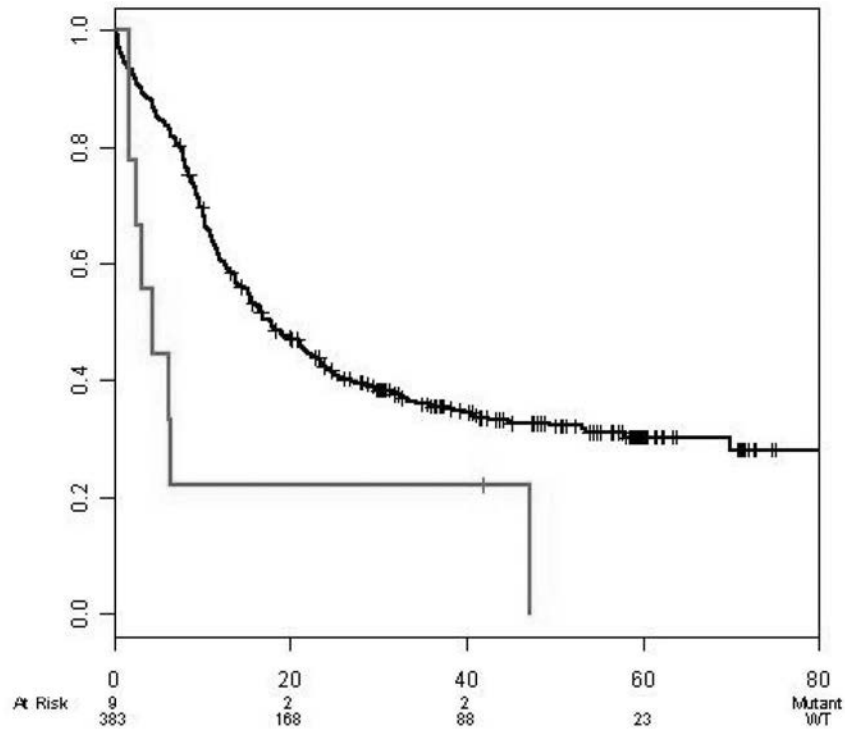
【図 7 d】

細胞遺伝学的 リスクカテゴリー	2以上の変異を有する サンプルのパーセンテージ
良好	15.5%
中間	69.8%
良好でない	24.2%

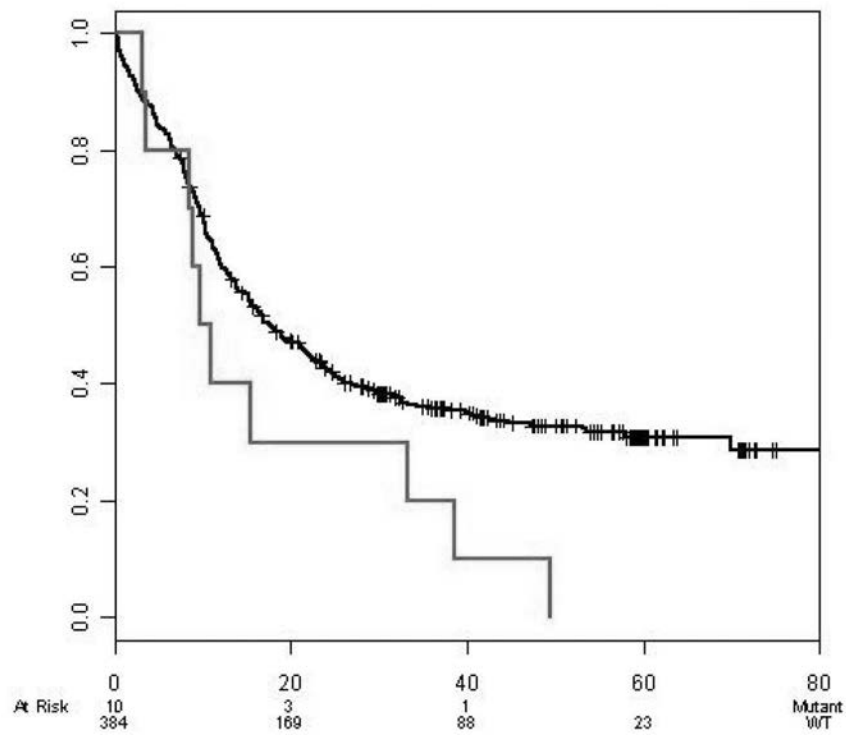
【図 8 a】



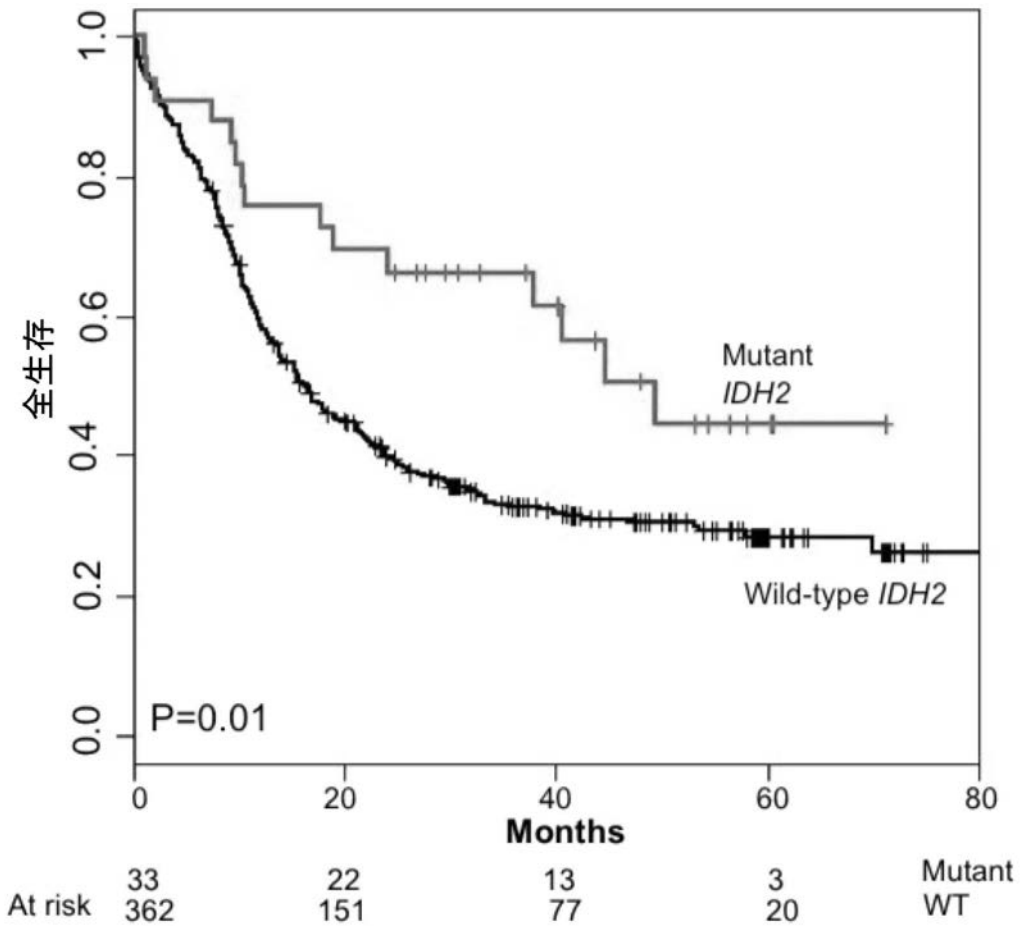
【図 9 a】



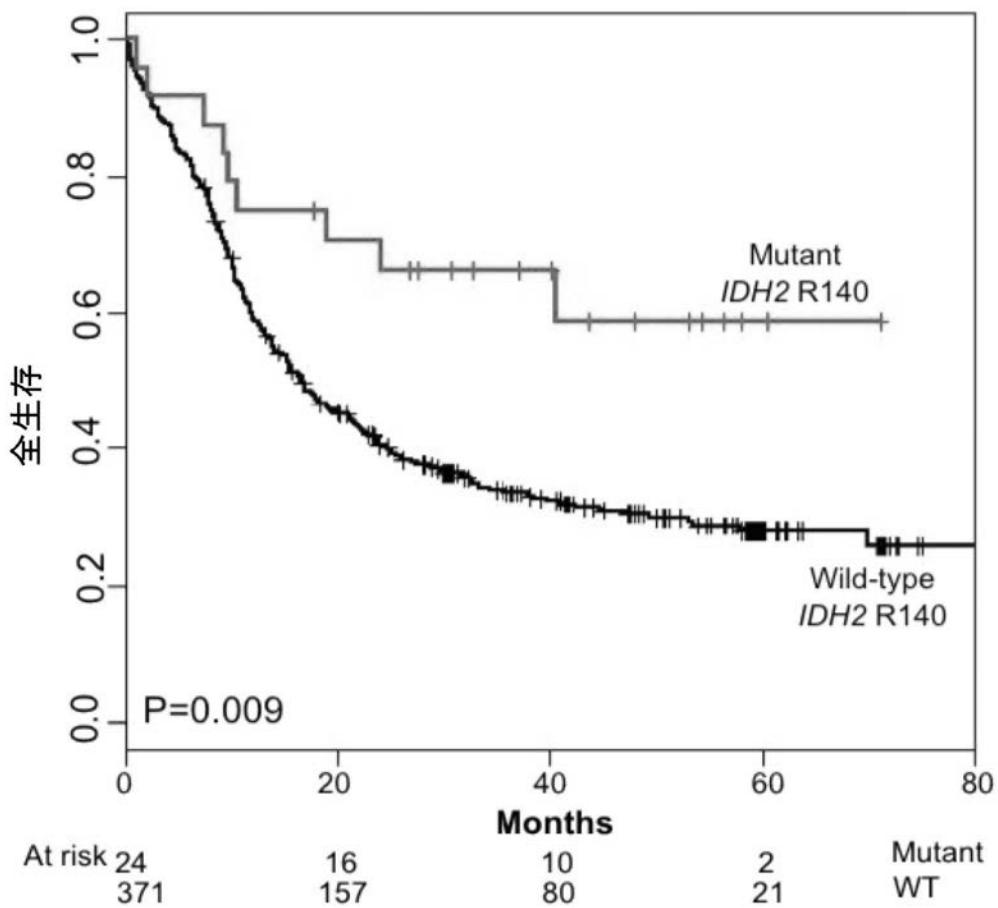
【図 9 b】



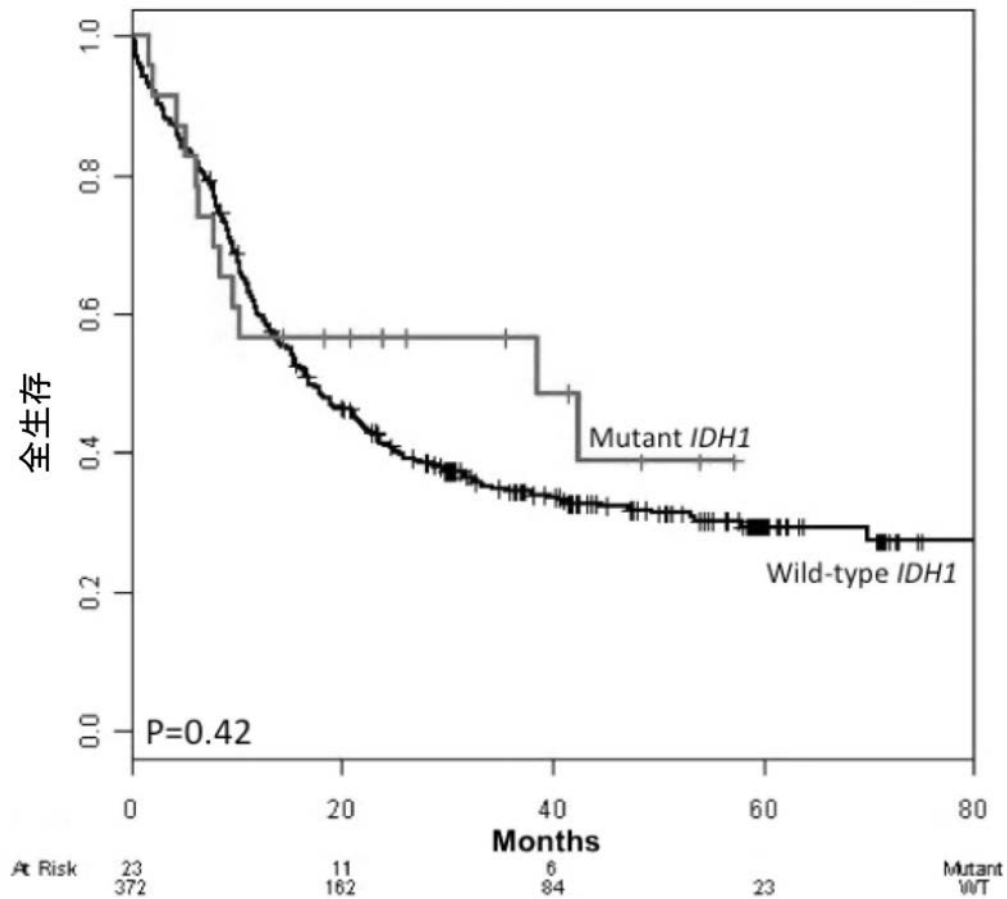
【図 10 a】



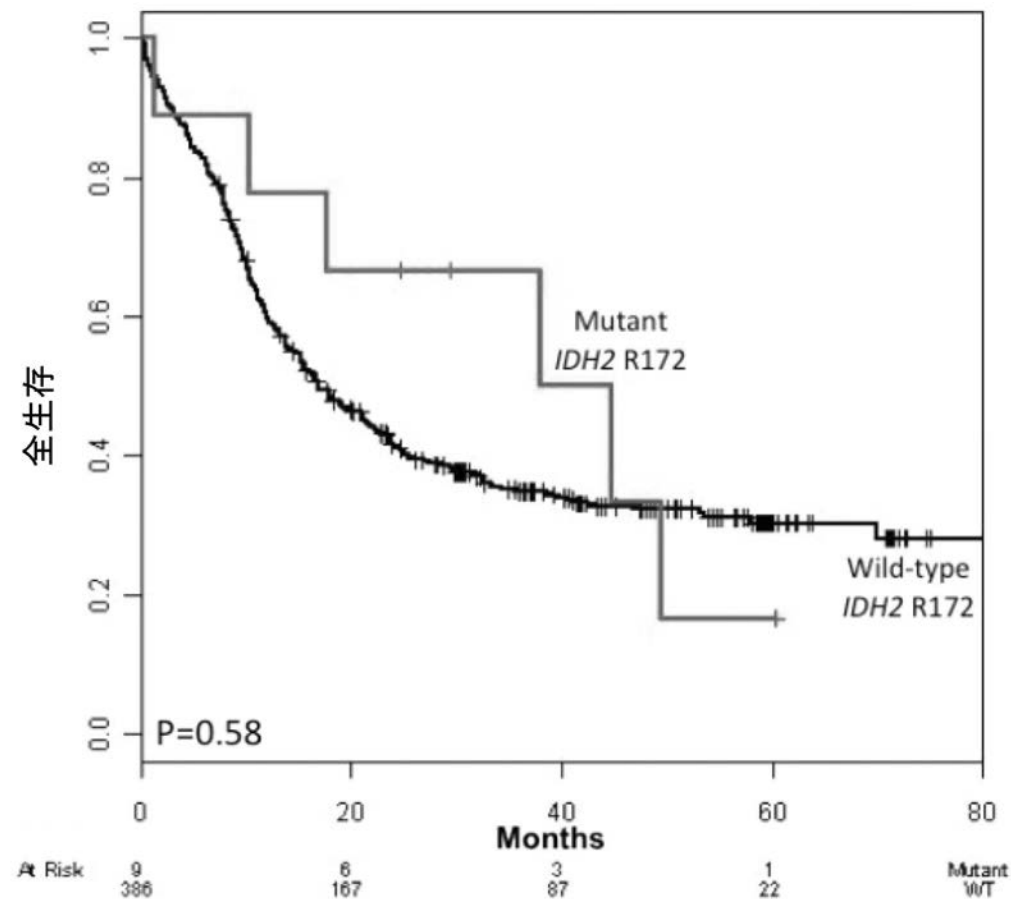
【図 10 b】



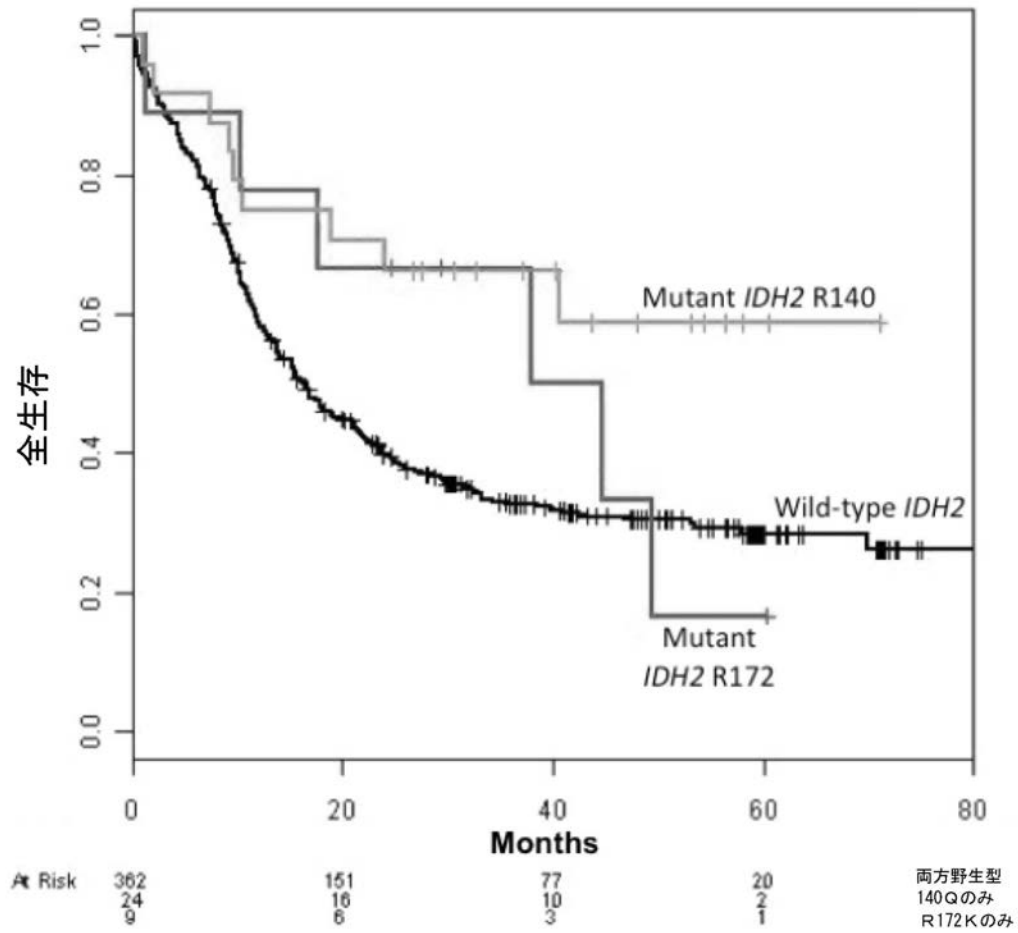
【図 10 c】



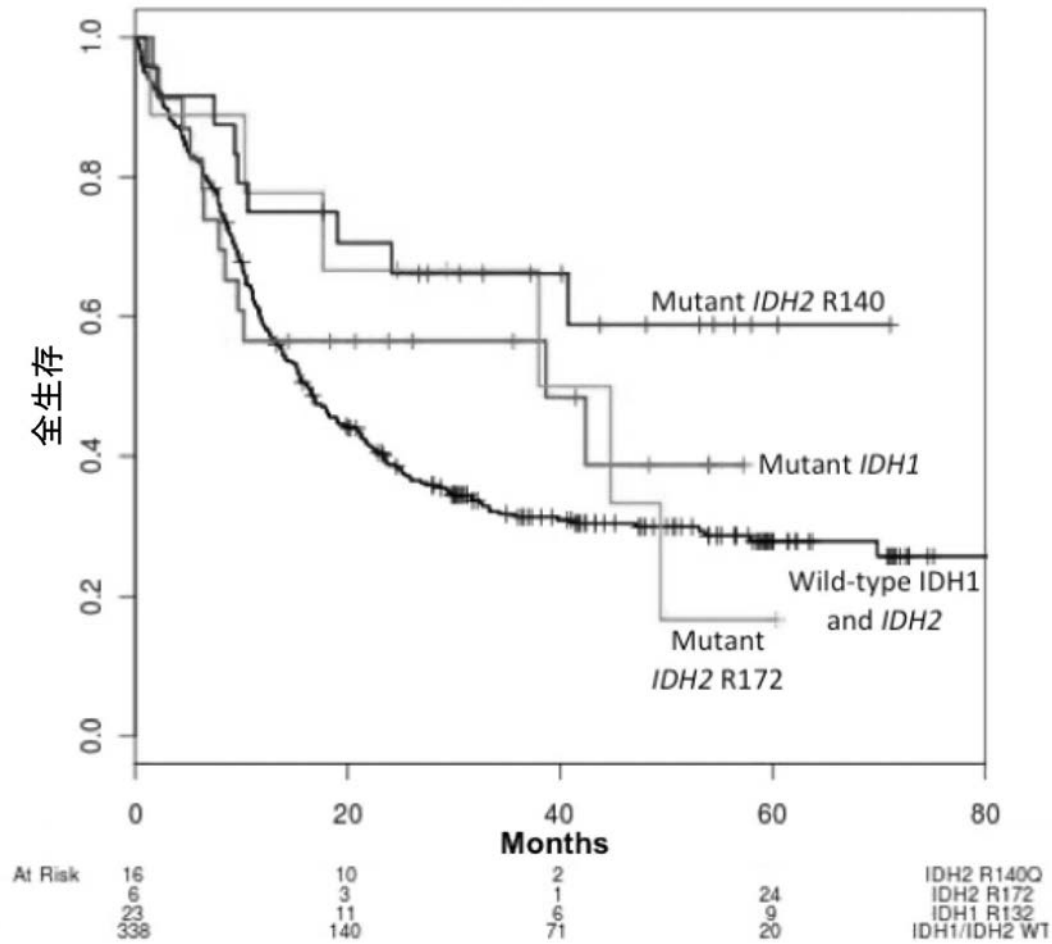
【図 10 d】



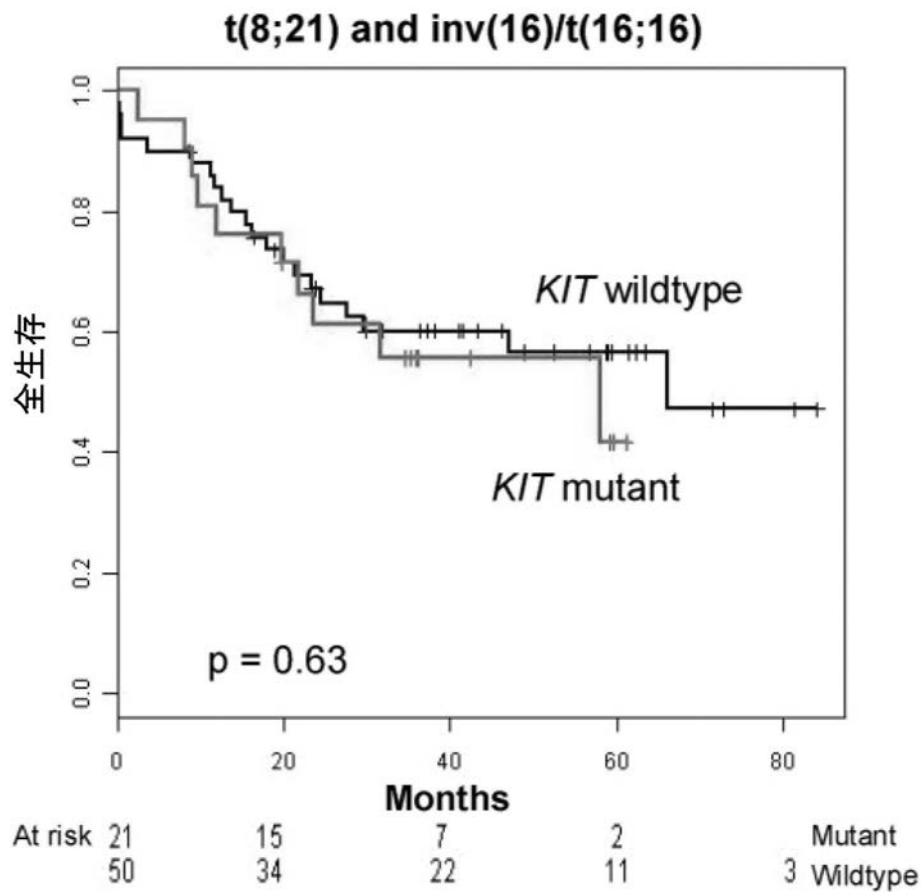
【図 10 e】



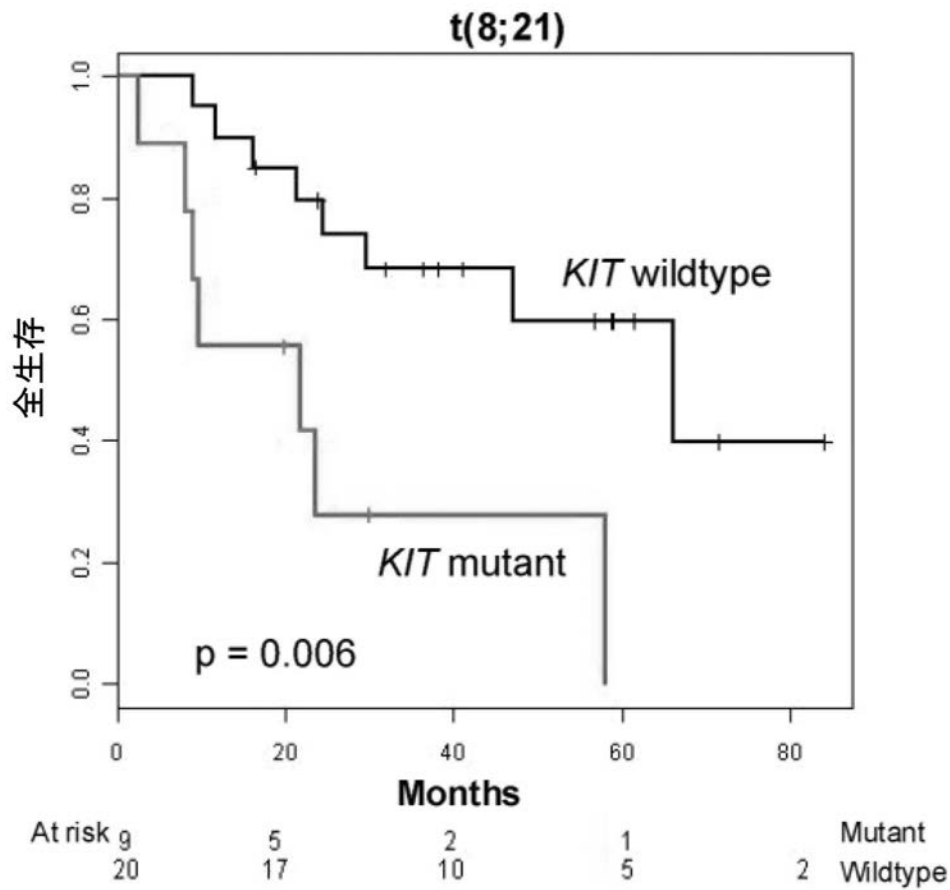
【図 10 f】



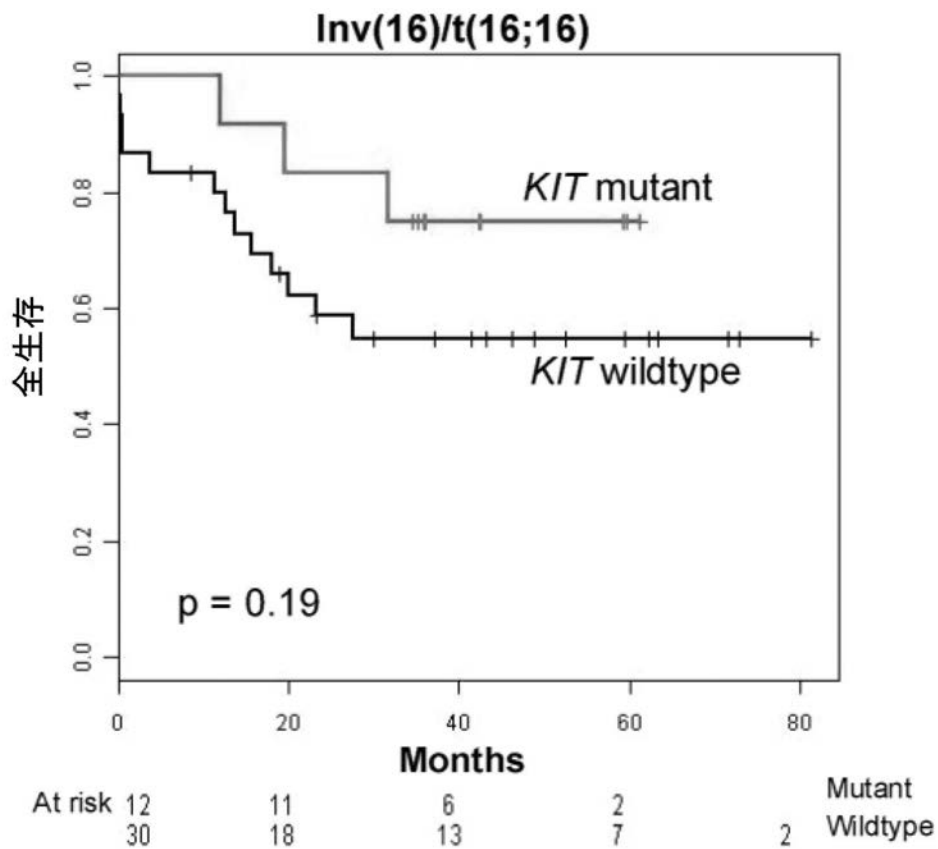
【図 11 a】



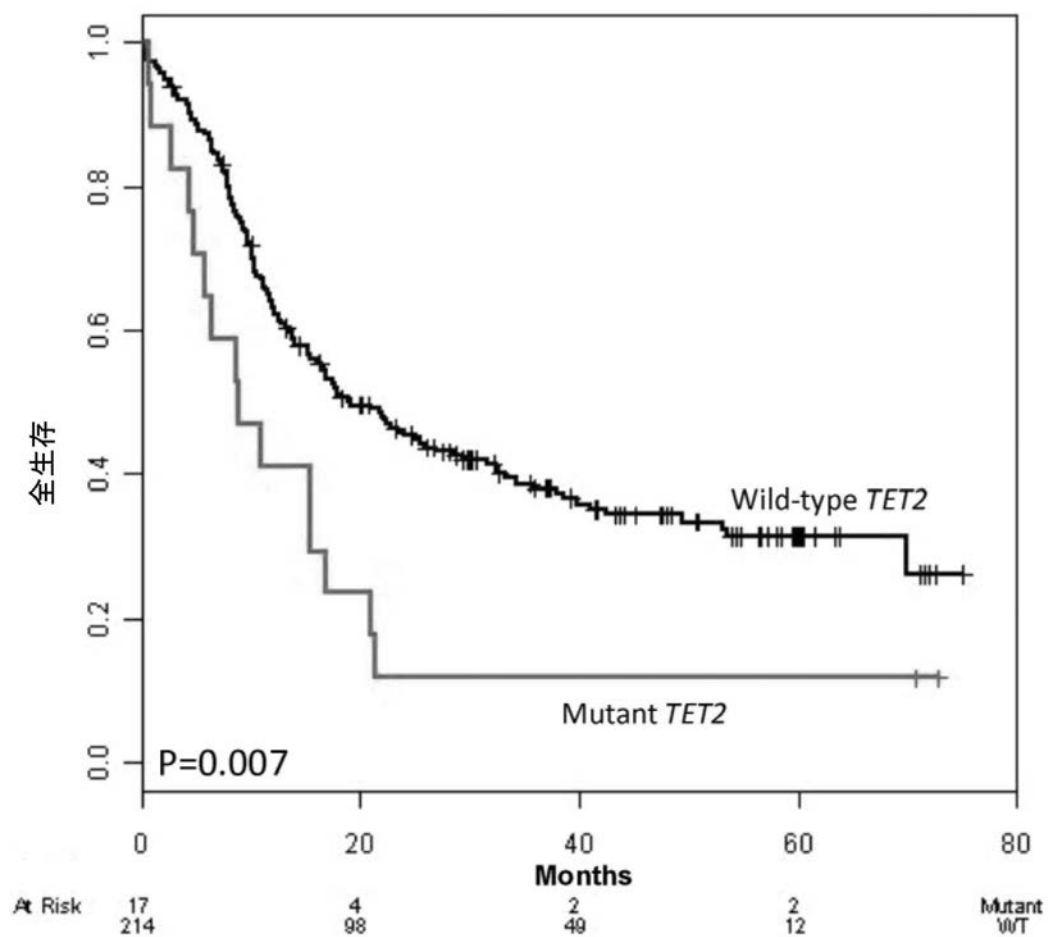
【図 1 1 b】



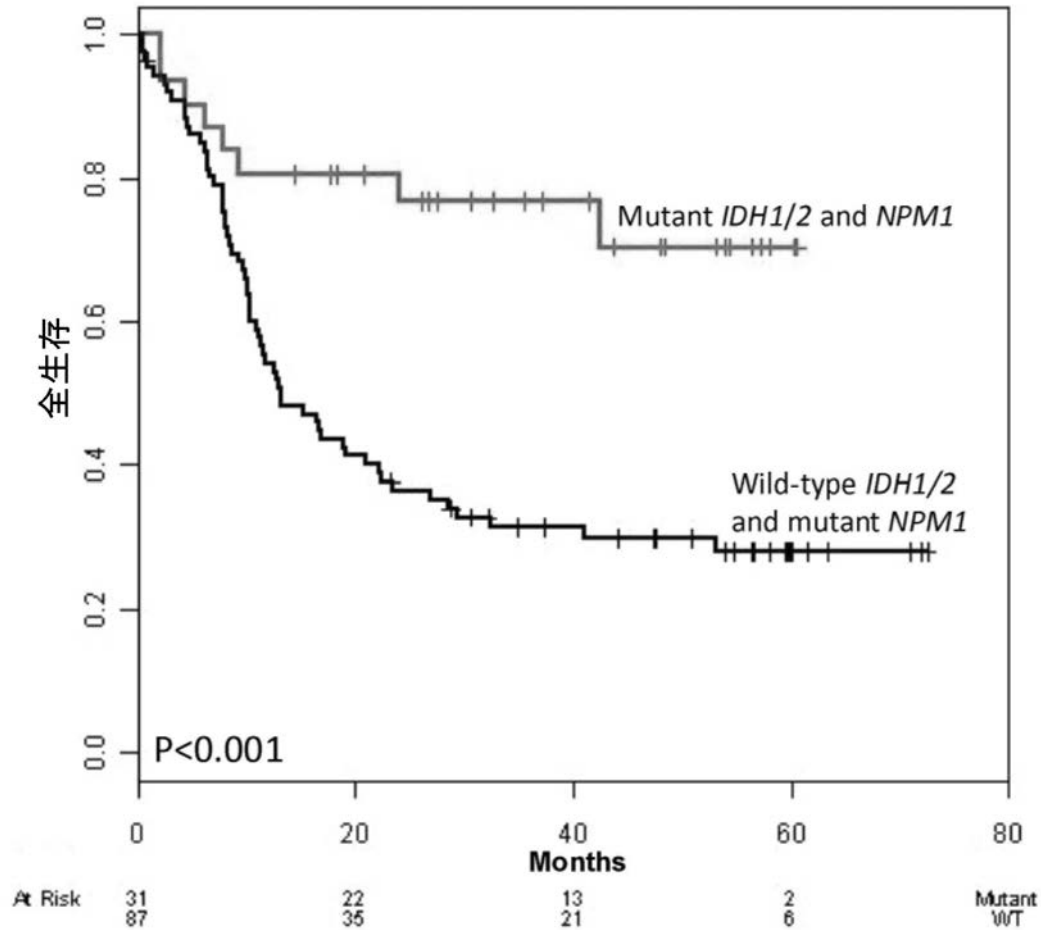
【図 1 1 c】



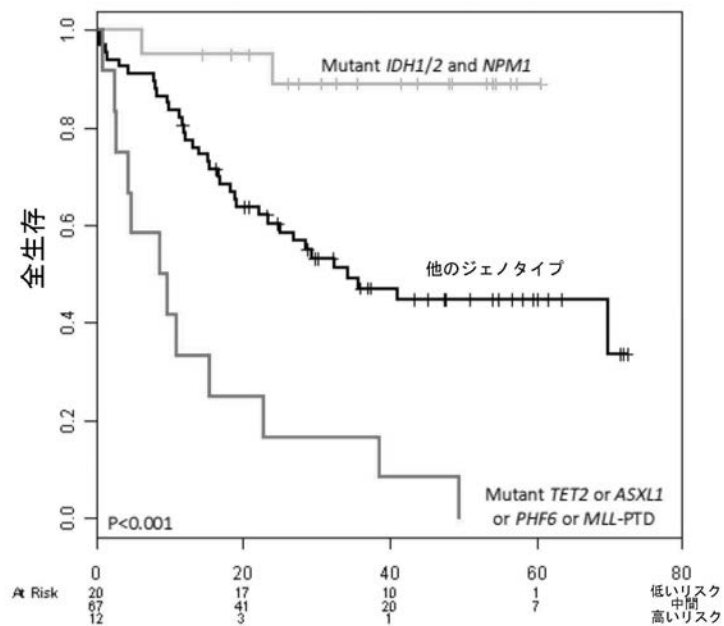
【図 1 2 a】



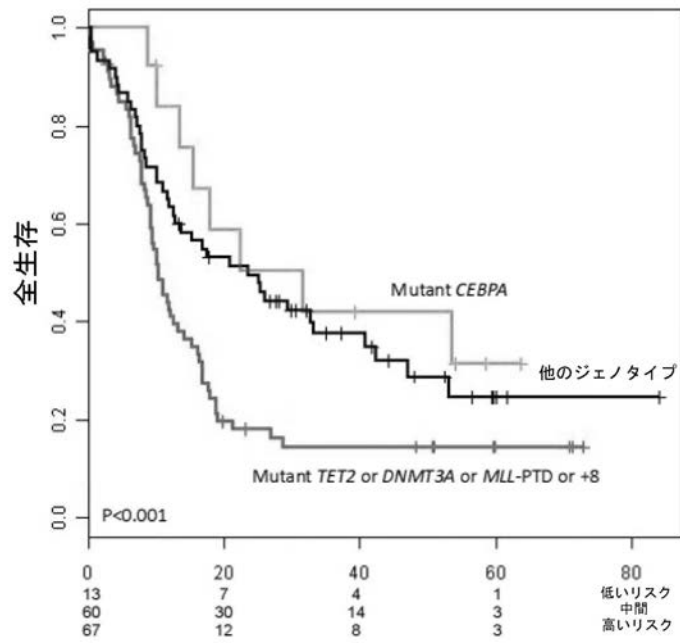
【図 1 3 a】



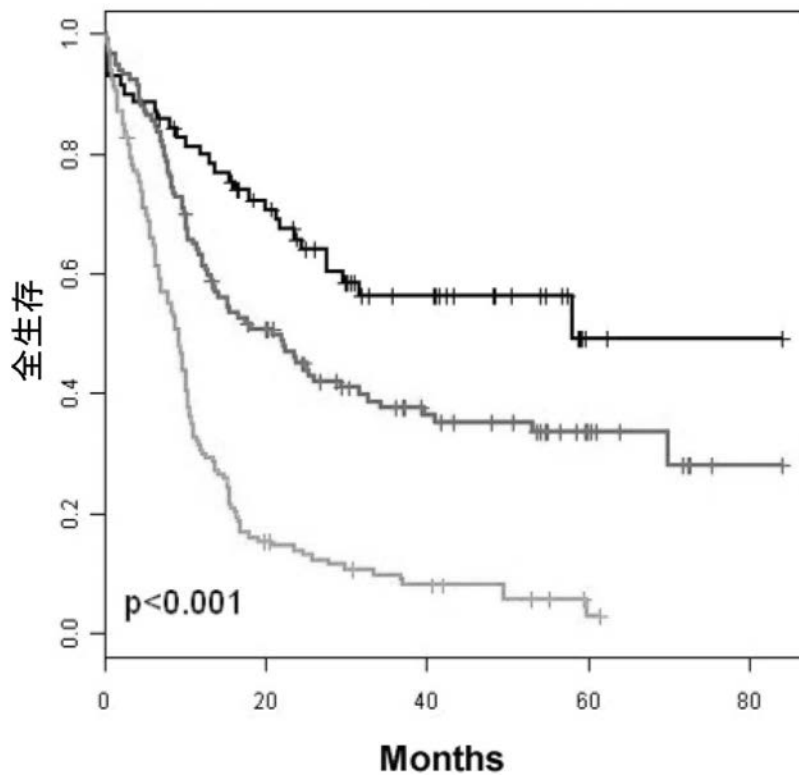
【図 1 4 a】



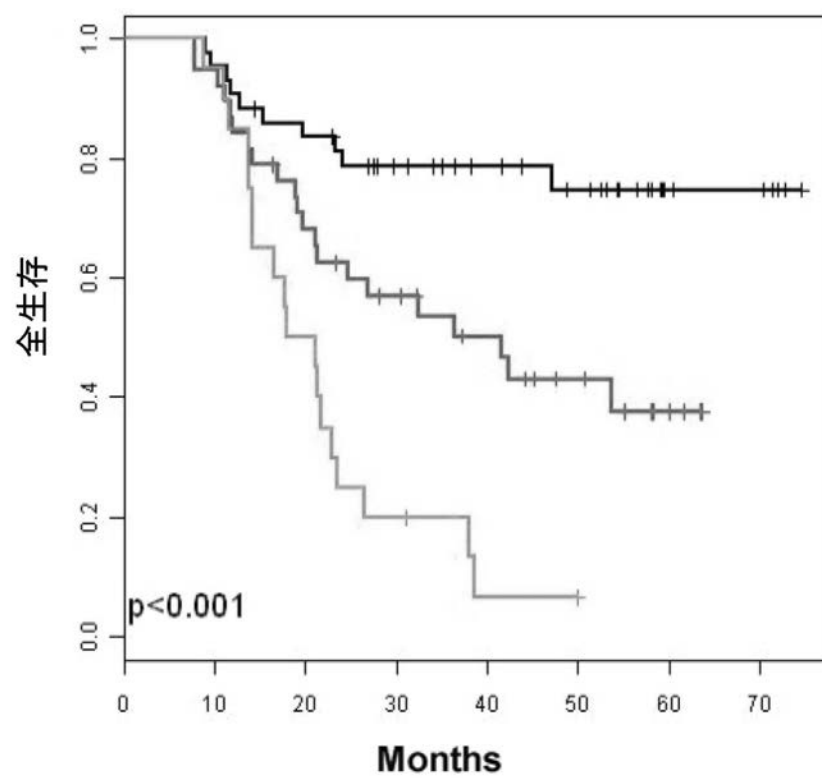
【図 14 b】



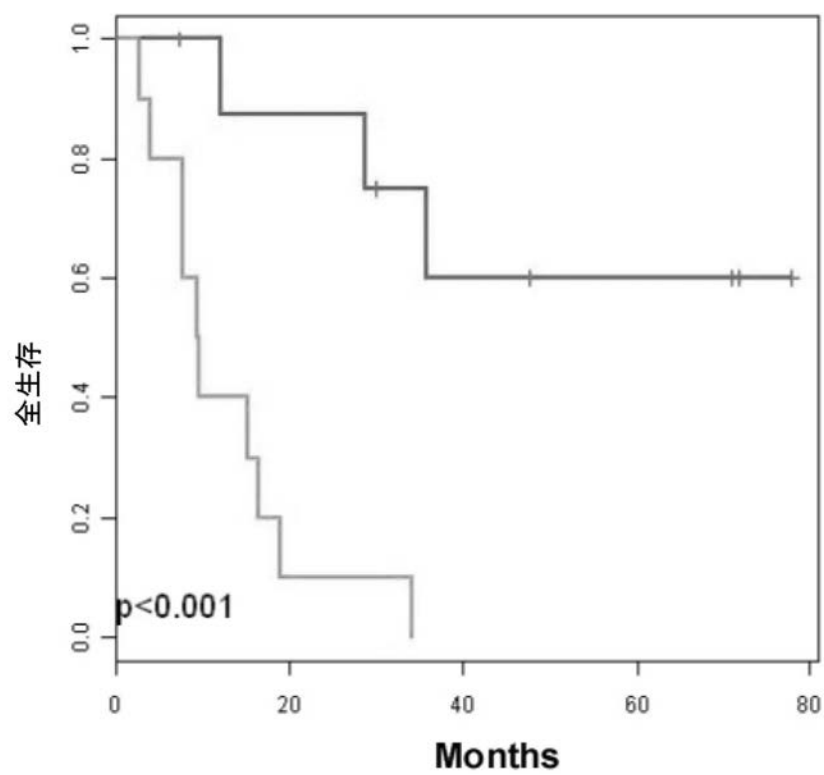
【図 15 a】



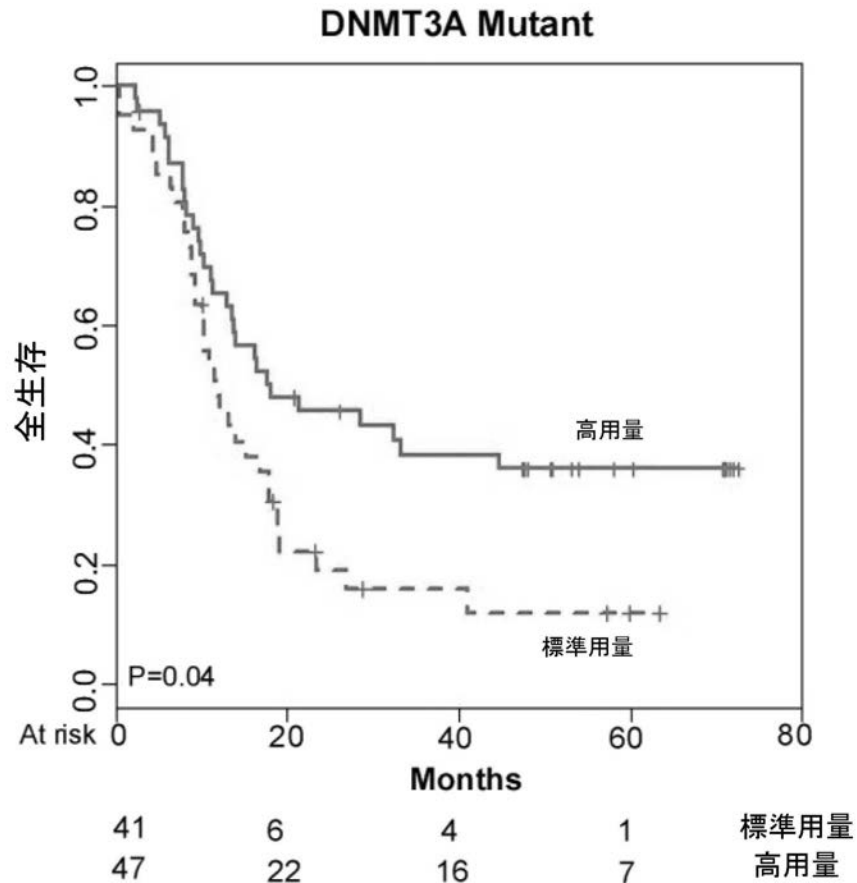
【図 15 b】



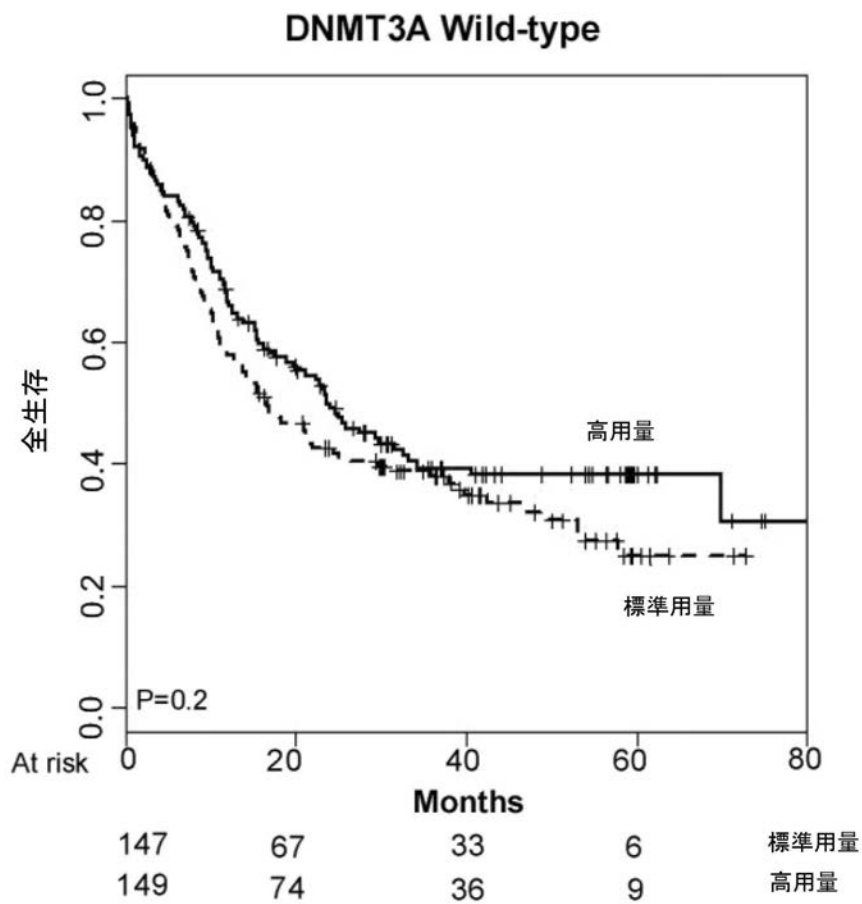
【図 15 c】



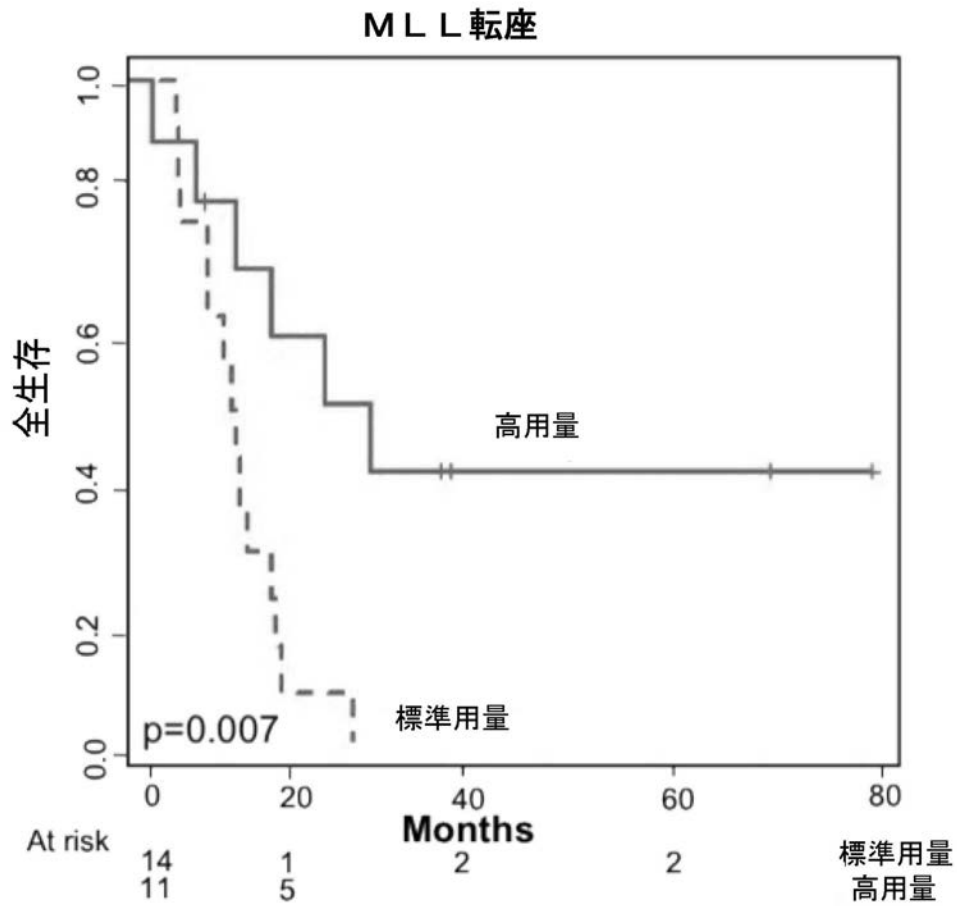
【図 16 a】



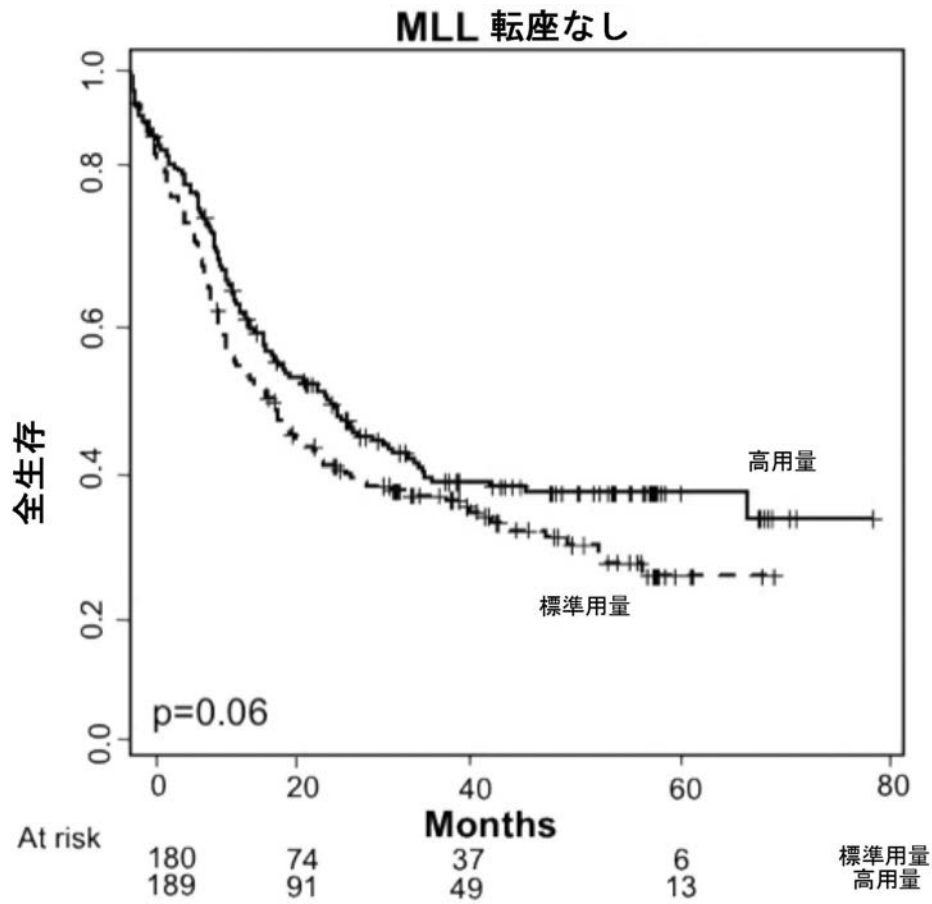
【図 16 b】



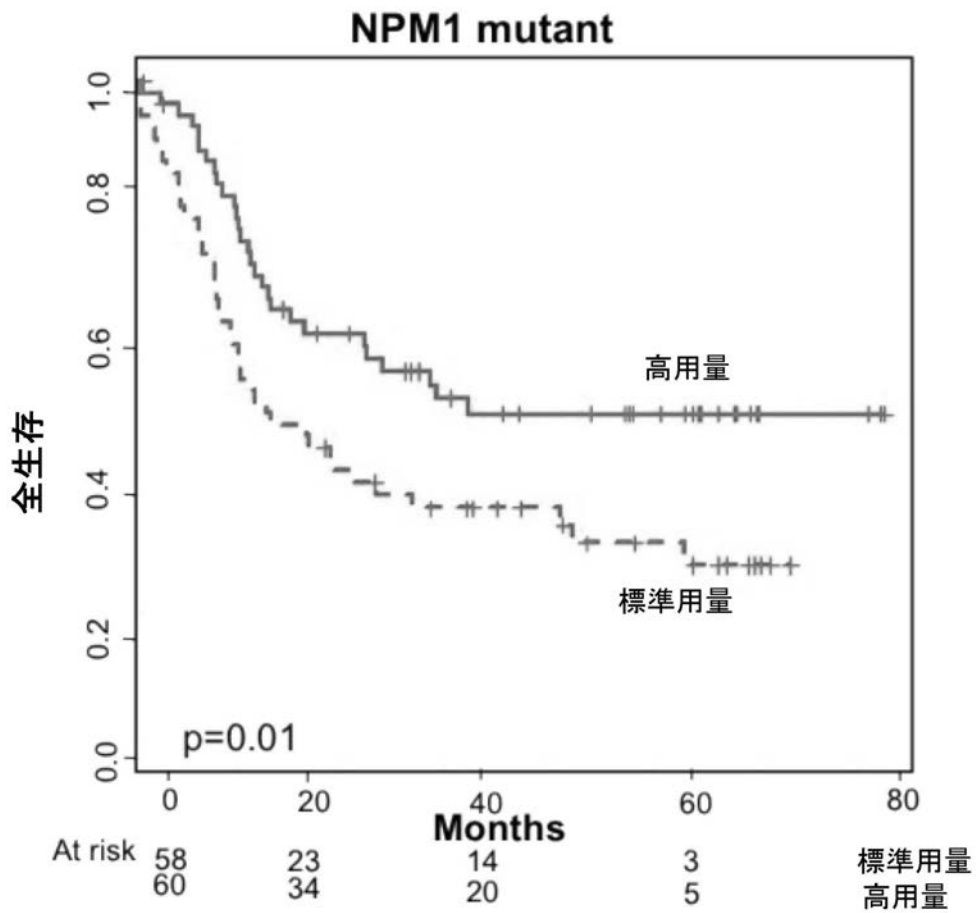
【図 1 6 c】



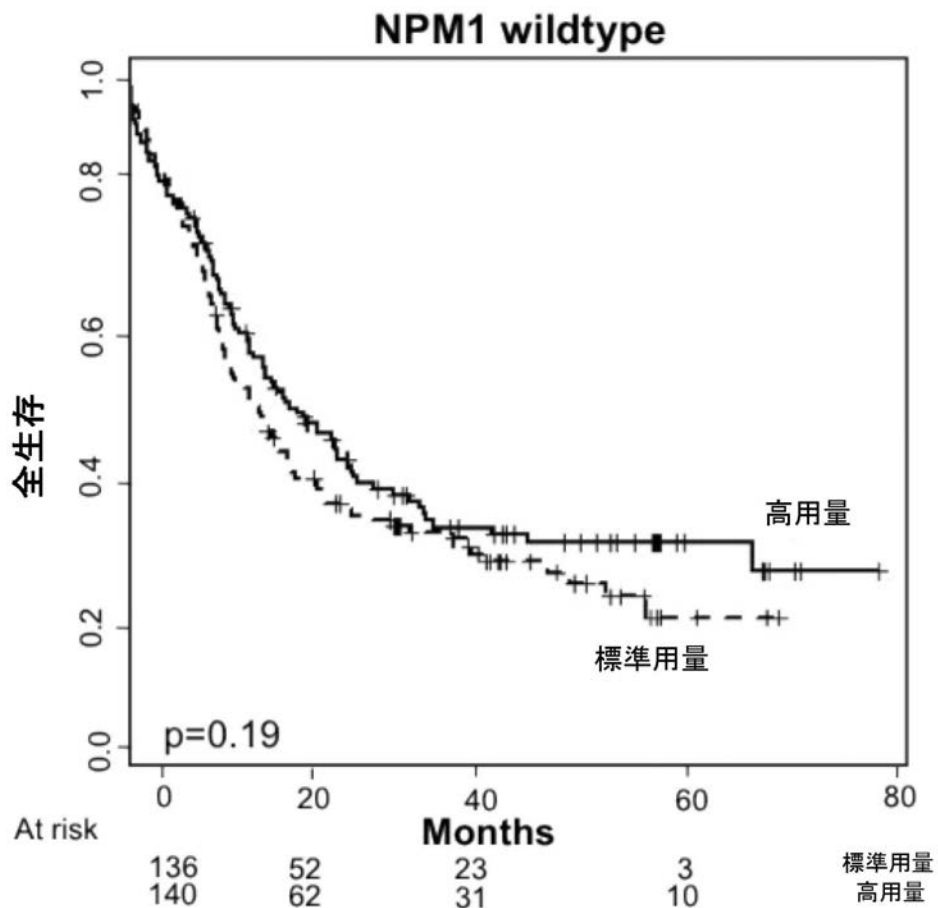
【図 1 6 d】



【図 1 6 e】



【図 1 6 f】



【配列表】

2015512630000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 13/30208

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68 (2013.01) USPC - 435/6.11 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12Q 1/68 (2013.01) USPC: 435/6.11 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/6.14, 435/6.12 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Scholar, PubWEST: Acute myeloid leukemia, AML, leukemia, survival, prognosis, response, sensitivity, relapse, recur, risk, mutation, translocation, cytogenetic, chemotherapy, daunorubicin, daunomycin, FLT3, FLT3-ITD, NPM1, DNMT3A, NRAS, CEBPA, TET2, WT1, IDH1, IDH2, KIT, RNX1, MLL-PTD, ASXL1, PHF6, KRAS, PTEN, P53, HRAS, EZH2, kit		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	VAN WAALWIJK VAN DOORN-KHOSROVANI et al., Biallelic mutations in the CEBPA gene and low CEBPA expression levels as prognostic markers in intermediate-risk AML. Hematology J., 2003, Vol. 4, No. 1, ps 31-40. Especially abstract, p 35, col 2, para 1-2	1-2, 4-5, 7, (10-11)/(1-2, 4-5, 7), 22(5), 34-35 3, 6, 8, 9, (10-11)/(3, 6, 8, 9), 36
X — Y	SHEN et al., Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. Blood, 17 November 2011 (published 31 August 2011), Vol 118, No 20, ps 5593-5603. Especially p 5602, col 1, para 3; p 5602, col 2, para 2	13-15, 19-21, 22/(13, 14, 21), (23-24)/(14, 21), 25/(13, 21), 26/(13, 21), 27-29, 30/(28, 29) 16 18
X	VALK et al., Prognostically Useful Gene-Expression Profiles in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med, 15 April 2004, Vol. 350, No 16, ps 1617-28. Especially abstract, p 1617, col 2, para 1; p 1618, col 2, para 3; p 1621, col 1, para 3 and 4; p 1621, col 2, para 1	12
X	CHOU et al., Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. Blood, 18 November 2010 (published online 6 August 2010), Vol. 116, No. 20, ps 4086-4094. Especially abstract, p 4086, col 1, para 2; p 4089, col 2, para 2	
<input checked="" 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 May 2013 (04.05.2013)		Date of mailing of the international search report 21 MAY 2013
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 QSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/30208

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHOU et al., TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. Blood, 6 October 2011 (published online 9 August 2011), Vol. 118, No. 14, ps 3803-3810. Especially abstract	17
Y	DICKER et al., Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. Leukemia, August 2010 (published 3 June 2010), Vol. 24, No. 8, ps 1528-1532. Especially abstract	3, 6, 10/(3,6), 11/(3,6)
Y	GREEN et al., The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation. Blood, 14 July 2011 (published online 19 May 2011), Vol. 118, No. 2, ps 409-412. Especially abstract, p 409, col 2, para 2	8, 9, (10-11)/(8,9), 36
Y	THIEDE et al., Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). Blood, 15 May 2006 (published online 2 February 2006), Vol. 107, No. 10, ps 4011-4020. Especially abstract	16
Y	GREEN et al., The prognostic significance of IDH1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia is dependent on FLT3/ITD status. Blood, 14 October 2010 (published online 22 July 2010), Vol. 116, No. 15, pp 2779-2780. Especially abstract	8, (10-11)/(8)
A	MARUCCI et al., IDH1 and IDH2 Gene Mutations Identify Novel Molecular Subsets Within De Novo Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. Journal of Clinical Oncology, 10 May 2010, Vol. 28, No. 14, ps 2348-2355. Especially p 2350, col 1, para 1	8
A	KOTTARIDIS et al., Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 inhibitors mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3. Blood, 1 October 2002, Vol. 100, No. 7, ps 2393-2398. Especially abstract	17
A	LOWENBERG et al., High-Dose Daunorubicin in Older Patients with Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med, 24 September 2009, Vol. 361, No. 13, ps 1235-1248. Especially abstract	27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 13/30208

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 31-33
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 レヴァイン ロス エル .

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 0 0 6 5 , ニューヨーク, イースト 6 3 ストリート 5
0 4 , アpartment 2 2 P

(72)発明者 アブドゥル - ワッハーブ オマー

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 0 0 6 5 , ニューヨーク, イースト 6 3 ストリート 4
3 0 , アpartment 7 K

(72)発明者 バテール ジェイ ピー .

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 1 7 8 2 , セイビル, レイクランド アベニュー 2 2 0 ,
アpartment J 5

(72)発明者 ゲーネン ミタ

アメリカ合衆国, ニューヨーク州 1 0 0 6 5 , ニューヨーク, ヨーク アベニュー 1 1 6 1 ,
8 - J

F ターム(参考) 2G045 AA26 CA25 DA13

4B024 AA11 CA01 CA09 CA20 HA08 HA11

4B063 QA17 QA19 QQ42 QR08 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02

4C086 AA01 AA02 EA10 MA01 MA04 NA20 ZB27