

(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2017-532959
(P2017-532959A)

(43) 公表日 平成29年11月9日(2017.11.9)

(51) Int.Cl.	F 1			テーマコード (参考)
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68	Z N A A		4 B 0 6 3
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A		4 C 0 8 4
G 01 N 33/53 (2006.01)	G 01 N 33/53	M		4 C 0 8 6
G 01 N 33/574 (2006.01)	G 01 N 33/574			
A 61 K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00			
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 106 頁) 最終頁に続く				
(21) 出願番号	特願2017-519013 (P2017-519013)	(71) 出願人	307010166	
(86) (22) 出願日	平成27年10月9日 (2015.10.9)		第一三共株式会社	
(85) 翻訳文提出日	平成29年6月5日 (2017.6.5)		東京都中央区日本橋本町三丁目5番1号	
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/079389	(74) 代理人	230104019	
(87) 国際公開番号	W02016/056673		弁護士 大野 聖二	
(87) 国際公開日	平成28年4月14日 (2016.4.14)	(74) 代理人	100119183	
(31) 優先権主張番号	62/061,992		弁理士 松任谷 優子	
(32) 優先日	平成26年10月9日 (2014.10.9)	(74) 代理人	100149076	
(33) 優先権主張国	米国(US)		弁理士 梅田 慎介	
		(74) 代理人	100173185	
			弁理士 森田 裕	
最終頁に続く				

(54) 【発明の名称】MDM2阻害剤に対する感受性の遺伝子シグネチャーに基づく予測因子に関するアルゴリズム

(57) 【要約】

MDM2iまたはMDM2-p53相互作用のアンタゴニストに対するがんまたは腫瘍の感受性を予測する遺伝子シグネチャーが提供される。提供された遺伝子シグネチャーにおける差次的に発現される遺伝子は、MDM2iでの治療または療法に対するがんおよび腫瘍試料の感受性を決定および評価するためのバイオマーカーとして役立つ。仮に全ての参照試料のMDM2i治療に対する感受性が不明であったとしても参照試料および試験試料において、種々のがんおよび腫瘍タイプならびにサブタイプ等の試験試料のMDM2i感受性をMDM2i感受性遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の発現に基づいて決定し、記載された方法の実施に基づいてそれらのがんがMDM2i感受性であると決定される場合、MDM2iで個体を治療する方法も提供される。MDM2i感受性に関する分析を受けている試料に関するTP53遺伝子およびp53タンパク質状態も決定することができる。本発明の方法、プラットフォーム、キット、試薬、および組成物は、記載された方法に従って、対照と比較した遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の差次的発現によって示される、そのがんがMDM2阻害剤に対する感受性を提示するがん患者の個別化されたまたは個人に合わせた治療のための有利な手法およびツールを提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される少なくとも 3 つの遺伝子の発現のレベルを測定することを含む方法。

【請求項 2】

M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、
a) 対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される少なくとも 3 つの遺伝子の発現のレベルを測定すること；および
b) がんまたは腫瘍試料が野生型 T P 5 3 遺伝子を有するかどうかを決定すること
を含む方法。 10

【請求項 3】

図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される遺伝子が、図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子の全てである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される遺伝子が、 B A X 、 C 1 Q B P 、 F D X R 、 G A M T 、 R P S 2 7 L 、 S L C 2 5 A 1 1 、 T P 5 3 、 T R I A P 1 、 Z M A T 3 、 A E N 、 C 1 2 o r f 5 、 G R S F 1 、 E I F 2 D 、 M P D U 1 、 S T X 8 、 T S F M 、 D I S C 1 、 S P C S 1 、 P R P F 8 、 R C B T B 1 、 S P A G 7 、 T I M M 2 2 、 T N F R S F 1 0 B 、 A C A D S B 、 D D B 2 、 F A S 、 G D F 1 5 、 G R E B 1 、 P D E 1 2 、 P O L H 、 C 1 9 o r f 6 0 、 H H A T 、 I S C U 、 M D M 2 、 M E D 3 1 、 M E T R N 、 P H L D A 3 、 C D K N 1 A 、 S E S N 1 および X P C である、請求項 1 または 2 に記載の方法。 20

【請求項 5】

図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される遺伝子が、 R P S 2 7 L 、 F D X R 、 C D K N 1 A および A E N である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

遺伝子の発現のレベルを測定することが m R N A の発現のレベルを測定することを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 7】

遺伝子の発現のレベルを測定することが遺伝子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを測定することを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

M D M 2 i が、スピロオキシンドール誘導体、インドール誘導体、ピロリジン - 2 - カルボキサミド誘導体、ピロリジノン誘導体、イソインドリノン誘導体、またはイミダゾチアゾール誘導体である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 9】

M D M 2 i が、化合物 A もしくはその塩、化合物 B もしくはその塩、 C G M 0 9 7 、 R G 7 3 8 8 、 M K - 8 2 4 2 (S C H 9 0 0 2 4 2) 、 M I - 2 1 9 、 M I - 3 1 9 、 M I - 7 7 3 、 M I - 8 8 8 、 N u t l i n - 3 a 、 R G 7 1 1 2 (R O 5 0 4 5 3 3 7) 、 T D P 5 2 1 2 5 2 、 T D P 6 6 5 7 5 9 、 P X N 7 2 7 、 または P X N 8 2 2 である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

M D M 2 i が、化合物 A もしくはその塩、または化合物 B もしくはその塩である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

がんまたは腫瘍を有する個体を治療する方法であって、
a) M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を評価することであって、対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される少なくとも 3 つの遺伝子の発現のレベルを測定することを含むこと；および
50

b) 評価が、がんまたは腫瘍が M D M 2 i に対して感受性であることを示す場合、個体に有効量の M D M 2 i を投与して、がんまたは腫瘍を治療することを含む方法。

【請求項 1 2】

がんまたは腫瘍を有する個体を治療する方法であって、
 a) M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を評価することであって、対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される少なくとも 3 つの遺伝子の発現のレベルを測定することを含むこと；
 b) がんまたは腫瘍が野生型 T P 5 3 遺伝子を有するかどうかを決定すること；および
 c) 評価 a) が、がんまたは腫瘍が M D M 2 i に対して感受性であることを示し、かつ、がんまたは腫瘍検体が野生型 T P 5 3 遺伝子を有する場合、個体に有効量の M D M 2 i を投与して、がんまたは腫瘍を治療することを含む方法。
 10

【請求項 1 3】

図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される遺伝子が、図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子の全てである、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される遺伝子が、 B A X 、 C 1 Q B P 、 F D X R 、 G A M T 、 R P S 2 7 L 、 S L C 2 5 A 1 1 、 T P 5 3 、 T R I A P 1 、 Z M A T 3 、 A E N 、 C 1 2 o r f 5 、 G R S F 1 、 E I F 2 D 、 M P D U 1 、 S T X 8 、 T S F M 、 D I S C 1 、 S P C S 1 、 P R P F 8 、 R C B T B 1 、 S P A G 7 、 T I M M 2 2 、 T N F R S F 1 0 B 、 A C A D S B 、 D D B 2 、 F A S 、 G D F 1 5 、 G R E B 1 、 P D E 1 2 、 P O L H 、 C 1 9 o r f 6 0 、 H H A T 、 I S C U 、 M D M 2 、 M E D 3 1 、 M E T R N 、 P H L D A 3 、 C D K N 1 A 、 S E S N 1 および X P C である、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。
 20

【請求項 1 5】

図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される遺伝子が、 R P S 2 7 L 、 F D X R 、 C D K N 1 A および A E N である、請求項 1 1 または 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

遺伝子の発現のレベルが、 m R N A の発現である、請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。
 30

【請求項 1 7】

遺伝子の発現のレベルが、遺伝子によってコードされるタンパク質の発現である、請求項 1 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

M D M 2 i が、スピロオキシンドール誘導体、インドール誘導体、ピロリジン - 2 - カルボキサミド誘導体、ピロリジノン誘導体、イソインドリノン誘導体、またはイミダゾチアゾール誘導体である、請求項 1 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

M D M 2 i が、化合物 A もしくはその塩、化合物 B もしくはその塩、 C G M 0 9 7 、 R G 7 3 8 8 、 M K - 8 2 4 2 (S C H 9 0 0 2 4 2) 、 M I - 2 1 9 、 M I - 3 1 9 、 M I - 7 7 3 、 M I - 8 8 8 、 N u t 1 i n - 3 a 、 R G 7 1 1 2 (R O 5 0 4 5 3 3 7) 、 T D P 5 2 1 2 5 2 、 T D P 6 6 5 7 5 9 、 P X N 7 2 7 、または P X N 8 2 2 である、請求項 1 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。
 40

【請求項 2 0】

M D M 2 i が、化合物 A もしくはその塩または化合物 B もしくはその塩である、請求項 1 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される少なくとも 3 つの遺伝子からなる、 M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測するための遺伝子シグネチャ
 50

一。

【請求項 22】

図1A～1Eに列挙された遺伝子から選択される遺伝子が、BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADSB、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1およびXPCである、請求項21に記載の遺伝子シグネチャー。

10

【請求項 23】

図1A～1Eに列挙された遺伝子から選択される遺伝子が、RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAENである、請求項21に記載の遺伝子シグネチャー。

【請求項 24】

MDM2iが、スピロオキシンドール誘導体、インドール誘導体、ピロリジン-2-カルボキサミド誘導体、ピロリジノン誘導体、イソインドリノン誘導体、またはイミダゾチアゾール誘導体である、請求項21～23のいずれか一項に記載の遺伝子シグネチャー。

【請求項 25】

MDM2iが、化合物Aもしくはその塩、化合物Bもしくはその塩、CGM097、RG7388、MK-8242(SCH900242)、MI-219、MI-319、MI-773、MI-888、Nutlin-3a、RG7112(RO5045337)、TDPP521252、TDPP665759、PXN727、またはPXN822である、請求項21～23のいずれか一項に記載の遺伝子シグネチャー。

20

【請求項 26】

図1A～1Eに列挙された少なくとも3つの遺伝子を検出するための複数の核酸プローブを含む組成物。

【請求項 27】

図1A～1Eに列挙された少なくとも3つの遺伝子が、図1A～1Eに列挙された遺伝子の全てである、請求項26に記載の組成物。

30

【請求項 28】

図1A～1Eに列挙された少なくとも3つの遺伝子が、BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADSB、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1およびXPCである、請求項26に記載の組成物。

40

【請求項 29】

図1A～1Eに列挙された少なくとも3つの遺伝子が、RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAENである、請求項26に記載の組成物。

【請求項 30】

複数の核酸プローブがアレイまたはマイクロアレイを含む、請求項26～28のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 31】

MDM2iに対する感受性を示す図1A～1Eに列挙された少なくとも3つの遺伝子の検出のための試薬および使用説明書を含むキット。

【請求項 32】

MDM2iに対するがんまたは腫瘍試料の感受性を予測するためのキットであって、図

50

1 A ~ 1 E に列挙された少なくとも 3 つの遺伝子に対応するスクレオチド配列に特異的に結合する核酸プローブ、および核酸を標識する手段を含むキット。

【請求項 3 3】

M D M 2 i に対するがんまたは腫瘍試料の感受性を予測するためのキットであって、図 1 A ~ 1 E に列挙された少なくとも 3 つの遺伝子によってコードされるポリペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンド、および遺伝子によってコードされるポリペプチドまたはペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを標識する手段を含むキット。

【請求項 3 4】

図 1 A ~ 1 E に列挙された少なくとも 3 つの遺伝子が、図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子の全てである、請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項 3 5】

図 1 A ~ 1 E に列挙された少なくとも 3 つの遺伝子が、B A X、C 1 Q B P、F D X R、G A M T、R P S 2 7 L、S L C 2 5 A 1 1、T P 5 3、T R I A P 1、Z M A T 3、A E N、C 1 2 o r f 5、G R S F 1、E I F 2 D、M P D U 1、S T X 8、T S F M、D I S C 1、S P C S 1、P R P F 8、R C B T B 1、S P A G 7、T I M M 2 2、T N F R S F 1 0 B、A C A D S B、D D B 2、F A S、G D F 1 5、G R E B 1、P D E 1 2、P O L H、C 1 9 o r f 6 0、H H A T、I S C U、M D M 2、M E D 3 1、M E T R N、P H L D A 3、C D K N 1 A、S E S N 1 および X P C である、請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 6】

図 1 A ~ 1 E に列挙された少なくとも 3 つの遺伝子が、R P S 2 7 L、F D X R、C D K N 1 A および A E N である、請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のキット。

20

【請求項 3 7】

M D M 2 i が、スピロオキシンドール誘導体、インドール誘導体、ピロリジン - 2 - カルボキサミド誘導体、ピロリジノン誘導体、イソインドリノン誘導体、またはイミダゾチアゾール誘導体である、請求項 3 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 8】

M D M 2 i が、化合物 A もしくはその塩、化合物 B もしくはその塩、C G M 0 9 7、R G 7 3 8 8、M K - 8 2 4 2 (S C H 9 0 0 2 4 2)、M I - 2 1 9、M I - 3 1 9、M I - 7 7 3、M I - 8 8 8、N u t l i n - 3 a、R G 7 1 1 2 (R O 5 0 4 5 3 3 7)、T D P 5 2 1 2 5 2、T D P 6 6 5 7 5 9、P X N 7 2 7、または P X N 8 2 2 である、請求項 3 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載のキット。

30

【請求項 3 9】

M D M 2 i が、化合物 A もしくはその塩または化合物 B もしくはその塩である、請求項 3 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 4 0】

M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、
a) 前記対象から得られたがんまたは腫瘍試料において、図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される少なくとも 3 つの遺伝子を含む遺伝子の発現レベルを測定することと、
b) ステップ a) において得られた遺伝子の発現レベルをスコア化して対象の感受性スコアを得ることと、

40

c) 少なくとも一部の試料において M D M 2 i 治療に対する感受性が不明である、複数のがん試料または腫瘍試料において前記遺伝子の発現レベルを測定することと、

d) ステップ c) で得られた遺伝子発現レベルをスコア化して各試料における参考スコアを得ることと、参考スコアの分布に基づいて閾値を決定することと、

e) 対象の感受性スコアが閾値を超えたたら当該対象は M D M 2 i 治療に対して感受性であると予測し、対象の感受性スコアが閾値を下回ったら当該対象は M D M 2 i 治療に対して耐性であると予測することと

を含む、方法。

【請求項 4 1】

50

請求項 4 0 に記載の方法であって、

f) ステップ e) において耐性であると予測された対象が M D M 2 の過剰発現を示す場合には当該対象は M D M 2 i 治療に対して感受性であると予測することをさらに含む、方法。

【請求項 4 2】

請求項 4 0 に記載の方法であって、

f) ステップ e) において耐性であると予測された対象が M D M 2 の過剰発現を示し、かつ野生型 T P 5 3 遺伝子を有する場合には当該対象は M D M 2 i 治療に対して感受性であると予測することをさらに含む、方法。

10

【請求項 4 3】

請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法であって、M D M 2 の過剰発現が対象のゲノムにおける M D M 2 遺伝子の増幅によって生じたものである、方法。

【請求項 4 4】

請求項 4 0 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法であって、

ステップ b) および d) が、遺伝子発現レベルの標準化スコア (Z - スコア) を合計して対象の感受性スコアを得ることを含む、方法。

【請求項 4 5】

請求項 4 4 に記載の方法であって、

e) における閾値が、- 0 . 2 ~ 0 . 5 の範囲である、方法。

20

【請求項 4 6】

請求項 4 0 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法であって、

e) における閾値が、試料のうち T P 5 3 変異型試料の参照スコアの第 3 四分位値と最大値との間の範囲であるか；または、試料のうち T P 5 3 野生型試料の参照スコアの第 1 四分位値と最小値との間の範囲である、方法。

【請求項 4 7】

請求項 4 0 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法であって、

閾値が、1 個抜き交叉検証 (L O O C V) 解析によつてもよい、受信者動作特性 (R O C) プロットに基づいて決定される、方法。

30

【請求項 4 8】

請求項 4 7 に記載の方法であって、閾値が、受信者動作特性 (R O C) 曲線の Y o u d e n 指数 ± 0 . 3 の範囲にある、方法。

【請求項 4 9】

請求項 4 0 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法であって、

閾値が二値化アルゴリズムを用いることによって参照スコアの分布の形状から決定される、方法。

【請求項 5 0】

請求項 4 0 ~ 4 4 のいずれか一項に記載の方法であって、

閾値が混合ガウスモデルにより決定される、方法。

40

【請求項 5 1】

請求項 5 0 に記載の方法であって、

閾値が、ステップ d) において混合ガウスモデルにおける 2 つのガウス分布を用いることによって、感受性であると示す遺伝子数の耐性であると示す遺伝子数に対する比に基づいて決定される、方法。

【請求項 5 2】

請求項 5 1 に記載の方法であって、

ステップ e) における閾値が、試料のうち T P 5 3 変異型試料の比の第 3 四分位値と最大値との間に範囲するか；または、試料のうち T P 5 3 野生型試料の比の第 1 四分位値と最小値の間に範囲する、方法。

【請求項 5 3】

50

請求項 40～52 のいずれか一項に記載の方法であって、図 1A～1E に列挙された遺伝子から選択された遺伝子が、図 1A～1E に列挙された全遺伝子である、方法。

【請求項 54】

請求項 40～52 のいずれか一項に記載の方法であって、図 1A～1E に列挙された遺伝子から選択された遺伝子が、BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADSB、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1 および XPC である、方法。
10

【請求項 55】

請求項 40～52 のいずれか一項に記載の方法であって、図 1A～1E に列挙された遺伝子から選択された遺伝子が、RPS27L、FDXR、CDKN1A および AEN である、方法。

【請求項 56】

請求項 40～52 のいずれか一項に記載の方法であって、図 1A～1E に列挙された遺伝子から選択された遺伝子が、RPS27L、FDXR、CDKN1A、AEN および MDM2 である、方法。
20

【請求項 57】

請求項 40～56 のいずれか一項に記載の方法であって、遺伝子の発現レベルの測定が、mRNA の発現レベルの測定を含む、方法。

【請求項 58】

請求項 40～56 のいずれか一項に記載の方法であって、遺伝子の発現レベルの測定が、遺伝子によるコードされるタンパク質の発現レベルの測定を含む、方法。

【請求項 59】

請求項 40～58 のいずれか一項に記載の方法であって、MDM2i が、スピロオキシンドール誘導体、インドール誘導体、ピロリジン-2-カルボキサミド誘導体、ピロリジノン誘導体、イソインドリノン誘導体、またはイミダゾチアゾール誘導体である、方法。
30

【請求項 60】

請求項 40～59 のいずれか一項に記載の方法であって、MDM2i が、化合物 A 若しくはその塩、化合物 B 若しくはその塩、CGM097、RG7388、MK-8242 (SCH900242)、MI-219、MI-319、MI-773、MI-888、Nutlin-3a、RG7112 (RO5045337)、TDP521252、TDP665759、PXN727、または PXN822 である、方法。

【請求項 61】

請求項 60 に記載の方法であって、MDM2i が、化合物 A 若しくはその塩、または化合物 B 若しくはその塩である、方法。
40

【請求項 62】

MDM2i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の少なくとも一部の感受性を予測する方法であって、

a') MDM2i 治療に対する感受性が不明である対象の全てから得られた全てのがんまたは腫瘍試料において、図 1A～1E に列挙された遺伝子から選択されるう少なくとも 3 つの遺伝子を含む遺伝子の発現レベルを測定することと、

b') ステップ a') において得られた遺伝子の発現レベルをスコア化して感受性スコア
50

の分布に基づいて閾値を決定することと、

e) 感受性スコアが閾値を超える対象は MDM2i 治療に対して感受性であると予測し、感受性スコアが閾値を下回る対象は MDM2i 治療に対して耐性であると予測することと、
を含む、方法。

【請求項 6 3】

請求項 6 2 に記載の方法であって、

f) ステップ e) において耐性と予測された対象が MDM2 の過剰発現を示す場合には当該対象は MDM2i 治療に感受性であると予測すること、をさらに含む、方法。

【請求項 6 4】

請求項 6 2 に記載の方法であって、

f) ステップ e) において耐性であると予測された対象が MDM2 の過剰発現を示し、かつ、野生型 TP53 遺伝子を有する場合には当該対象は MDM2i 治療に対して感受性であると予測すること、をさらに含む、方法。

【請求項 6 5】

請求項 6 3 または 6 4 に記載の方法であって、

MDM2 の過剰発現が、対象のゲノムにおける MDM2 遺伝子の増幅によって生じている、方法。

【請求項 6 6】

がんまたは腫瘍を有する対象を治療する方法であって、

a) 請求項 4 0 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の方法によって MDM2i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を評価することと、

b) 評価が MDM2i に対して当該がんまたは腫瘍が感受性であることを示す場合には、当該対象に MDM2i を投与して当該がんまたは腫瘍を治療することと、
を含む方法。

【請求項 6 7】

対象においてがんまたは腫瘍を治療することに用いるための医薬組成物であって、 MDM2i を含み、対象は、請求項 4 0 ~ 6 1 のいずれか一項に記載の方法によって MDM2i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を評価することにより、 MDM2i 治療に感受性であると予測された対象である、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、一般に、臨床適用のための予測的分子ツールを提供する遺伝子シグネチャーおよび遺伝子発現プロファイルに関する。本発明は、がんまたは腫瘍の治療に影響し得る抗がん剤、特に、 MDM2 活性の阻害剤ならびに MDM2 および p53 タンパク質の相互作用のアンタゴニストに対するがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法にも関する。本発明は、さらに、医師および患者のために、有効な個別化されたがんおよび腫瘍治療を行うことを支援する、がんバイオマーカーおよびコンパニオン診断としての遺伝子シグネチャーの使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

がんの治療は、がんと正常細胞の両方に影響する非特異的細胞傷害性薬剤の使用から、より個別化され標的化されたがん療法へと進化している。標的療法には、がん治療および療法を受けている個体にとって毒性がより少なくかつ効力がより大きくなるように方向付けられた治療をもたらすために、がん細胞のユニークな遺伝シグネチャーの決定を含み得る。

【0 0 0 3】

現在まで、がん患者のための治療は通常、典型的には数百人の患者を対象とした無作為化臨床試験において効力が実証された薬剤およびレジメンに頼っている。かかる治療は、

10

20

30

40

50

個々の患者のがんまたは疾患に個別化も標的化もされておらず、結果的にしばしば無効ながん治療になることがある。がん患者のためのかかる不成功なまたは標準以下の治療は、不要な毒性、疾患進行、および患者の死亡、最終的により高額な医療費という結果に至る可能性がある。

【0004】

いくつかの腫瘍およびがんの発生および進行は、最終的に細胞成長の停止と死に影響を及ぼす細胞分子間の相互作用を伴う可能性がある。がんにおいて重要な役割を果たすことが決定された2つの分子は、p53タンパク質およびHuman Double Minute 2 (HDM2) としても公知であるMouse Double Minute 2 (MDM2) タンパク質である。

10

【0005】

p53腫瘍抑制タンパク質 (TP53遺伝子によってコードされる) は、様々な細胞ストレス、例えば、DNA損傷、紫外線照射および低酸素に応答する重要な転写制御因子である。p53タンパク質は、DNA修復、細胞周期進行、血管形成およびアポトーシスなどの生命維持に必要な細胞プロセスを制御しており；その活性化により、影響を受けた細胞中の様々な分子および下流経路が開始され得る。これらのp53依存性経路は、細胞周期停止またはアポトーシスを通して損傷された細胞をシャットダウンする。p53機能および活性の喪失または阻害は、がんの多くの症例において寄与する因子であると信じられている。

20

【0006】

MDM2は、p53腫瘍サプレッサータンパク質の負の制御因子である。90kDaのMDM2タンパク質は、そのN末端にあるp53結合ドメインおよびp53をユビキチン化するE3リガーゼとして機能する、そのC末端にあるRING (Really Interesting New Gene) ドメインを含有する。細胞刺激およびストレスによる野生型p53の活性化は、N末端でMDM2をp53に結合させて、p53の転写活性化を阻害し、ユビキチン-プロテアソーム経路を介したp53の分解を促進する。したがって、MDM2は、p53媒介アポトーシスおよびがん細胞増殖の停止に干渉し、がん細胞中の重要な発癌活性はMDM2に起因する可能性がある。いくつかの場合では、MDM2は、例えばMDM2の代替のスプライス型を有する細胞中において、p53経路に依存しない発癌を引き起こす可能性がある。(H.A. Steinmannら, 2004, J. Biol. Chem., 279(6): 4877~4886)。さらに、ヒトがんの約50%は、TP53遺伝子に変異またはこの欠失を有することが観察されている。MDM2は、例えば、メラノーマ、非小細胞肺がん(NSCLC)、乳がん、食道がん、白血病、非ホジキンリンパ腫および肉腫を含めたいくつかのヒトがんにおいて過剰発現されている。MDM2の過剰発現は、肉腫、神経膠腫および急性リンパ芽球性白血病(ALL)を有する個体における予後不良と正に相關することが報告されている。

30

【0007】

がんための治療を受けているどの個体が所与の治療、薬物、化合物、または療法に応答するまたは応答しないかを同定および決定する能力は、現在および将来のがん治療を成功させるための、より個別化および方向付けられた手法の礎石である。医師および臨床家は、所与の抗がん剤および薬剤にがんおよび腫瘍細胞の感受性または耐性を関連づけて同定する際の遺伝子発現プロファイルまたは遺伝子シグネチャーに関わる診断システムに基づいて、患者のがんまたは腫瘍細胞および組織試料の遺伝子シグネチャーが抗がん剤、薬剤、または化学療法剤に対する感受性または耐性を示すものであるかどうかを決定することによって、がん治療をよりうまく調整することができるうことになる。

40

【0008】

より安全、より効率的で、方向付けられた経済的ながん治療を提供するために、どのがん、およびかかるがんに罹患した個体が所与の治療または薬物に対して感受性または耐性であるかを予測および評価するための対費用効果の高いツールおよび手順が、大いに必要とされる。かかるツール、例えば、薬物感受性に関連する遺伝子シグネチャーによるコン

50

パニオン診断は、患者疾患の様々な段階およびその治療において、例えば薬物治療が開始されるべきであるかどうかを決定する、薬物治療の効力を予測する、またはがんに罹患した個体の治療後状態を評価する等の必要とされるまたは望まれる場合に、一般に患者治療決定のためのより良いガイダンスを提供することにより、臨床家およびがん患者にとって有益である。

【発明の概要】

【0009】

本明細書では、化学療法もしくは抗がん剤、薬物、化合物、またはその併用に対するがんまたは腫瘍の感受性を示す遺伝子シグネチャーおよび遺伝子発現プロファイルを含む方法、システム、プラットフォーム、試薬およびキットが提供される。より具体的には、本発明の遺伝子シグネチャーおよび遺伝子発現プロファイルは、MDM2タンパク質の活性を阻害する薬剤で治療されるがんおよび腫瘍を有する患者の治療応答または生存などの臨床成績を予測するために使用され得る。本明細書では、「MDM2阻害剤」という用語は、「MDM2i」と称され、これと同義である。

10

【0010】

本発明の遺伝子シグネチャーおよび遺伝子シグネチャー内の遺伝子の発現を検出する方法は、MDM2i薬剤または薬物併用に応答し得る、または応答する可能性がある、がん、腫瘍、または新生物に罹患した個体の同定および決定を可能にする。

20

【0011】

本発明の遺伝子シグネチャーおよび遺伝子シグネチャーにおける差次的に発現される遺伝子を検出する方法は、MDM2iでの治療に対するがんおよび腫瘍の感受性を予測する利便性が高く効率的な手段をもたらす。本発明の遺伝子シグネチャーおよび方法は、MDM2iを含む療法またはレジメンでがんまたは腫瘍を有する患者を効率的に治療する見込みを予測し、それによって、より方向付けられ個別化されたがん治療のための情報およびガイダンスを提供することにも有用である。本発明は、MDM2i、または候補のMDM2iを含む治療に対するがんまたは腫瘍の感受性に関し対費用効果が高くかつ正確な結果をもたらすことで、MDM2阻害剤によるカスタマイズされ、個別化されたがん療法レジメンを改善し得る方法およびシステムをさらに提供する。MDM2iが治療可能ながんおよび腫瘍は、白血病、リンパ腫、骨髄腫、メラノーマ、肉腫および癌腫を含むが、これらに限定されない。

30

【0012】

ある態様では、本発明は、がんまたは腫瘍組織、そこから由来する細胞などを含めたがんまたは腫瘍試料中のMDM2の阻害に対する細胞応答と関連する、本明細書で遺伝子発現シグネチャーまたはMDM2i遺伝子感受性シグネチャーとも称される遺伝子シグネチャーを提供する。理論によって束縛されることを望まないが、MDM2の活性を阻害することは、多くの場合、細胞内でp53タンパク質とMDM2タンパク質の相互作用を拮抗阻害することと同義であると考えられ得ることが理解されよう。

【0013】

より詳細には、本発明のMDM2i遺伝子感受性シグネチャーは、がんもしくは腫瘍試料、またはそこから由来する細胞中のその差次的発現が、対照と比較して、MDM2i薬剤または化合物に対するがんまたは腫瘍試料の感受性を予測するまたは示す遺伝子のプロファイル、または遺伝子のサブセットを提供する。MDM2iに対して感受性であるがんまたは腫瘍試料は、一部の実施形態では、本明細書に記載のMDM2i遺伝子感受性シグネチャー内の少なくとも3つまたは少なくとも4つの遺伝子の増加した発現を有することになり、例えば、細胞死、老化、アポトーシス、細胞運動性および/または成長の減少または休止などによって示される阻害剤に対する細胞傷害性応答を最適に提示することになる。

40

【0014】

本発明の一つの態様によれば、図1A～1Eの遺伝子シグネチャーに含有される遺伝子の少なくとも3つの遺伝子、少なくとも4つの遺伝子または全てのがんもしくは腫瘍試料

50

または細胞中の差次の発現は、MDM2iに対する試料または細胞の感受性を予測する。別の態様では、遺伝子BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADS、DB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1およびXPCの少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全てのがんもしくは腫瘍試料または細胞中の差次の発現は、MDM2iに対する試料または細胞の感受性を予測する。これらの40の遺伝子は、本発明のMDM2i感受性遺伝子シグネチャーに含有されており、図1A～1Eに列挙された遺伝子のサブセットを構成する。別の態様では、遺伝子MDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAENの少なくとも3つ、または全てのがんもしくは腫瘍試料または細胞中の差次の発現。別の態様では、遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAENの少なくとも3つ、または全てのがんもしくは腫瘍試料または細胞中の差次の発現は、MDM2iに対する試料または細胞の感受性を予測する。特定の実施形態では、図1A～1Eの遺伝子シグネチャーに含有される少なくとも3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50またはそれ以上の遺伝子のがんもしくは腫瘍試料または細胞中の差次の発現は、MDM2iに対する試料または細胞の感受性を予測する。特定の実施形態では、差次の発現は、がんもしくは腫瘍試料または細胞中で検出されるまたは同定されるmRNAまたはタンパク質の増加した発現レベルである。

10

20

30

【0015】

ある態様では、本発明は、MDM2阻害剤治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図1A～1Eに列挙された遺伝子から選択される少なくとも3つまたは少なくとも4つの遺伝子の発現のレベルを測定することを含む方法を提供する。

【0016】

ある態様では、本発明は、がんまたは腫瘍を有する対象を治療する方法であって、a) MDM2阻害剤治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を評価することであって、対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図1A～1Eに列挙された遺伝子から選択される少なくとも3つまたは少なくとも4つの遺伝子の発現のレベルを測定することを含むこと；およびb) 評価が、がんまたは腫瘍がMDM2阻害剤に対して感受性であることを示す場合、有効量のMDM2阻害剤を対象に投与して、がんまたは腫瘍を治療することを含む方法を提供する。

30

【0017】

一般に、MDM2iでの治療は、がんまたは腫瘍細胞中、特に野生型または非変異p53を含めた機能的p53を有するもの中の、p53腫瘍サプレッサー機能または活性をもたらし、アポトーシス、成長阻害、老化、または腫瘍細胞死などの効果的な抗腫瘍効果につながる。かかる抗腫瘍効果はp53下流経路の活性化に典型的に関わり、カスパーーゼ活性化またはサイクリン依存性キナーゼの阻害を含むが、これらに限定されない。

40

【0018】

したがって、ある態様では、本発明の方法は、対照と比較した、がんまたは腫瘍のMDM2i感受性を示す、本発明の遺伝子シグネチャーに含有される遺伝子の差次の発現を患者のがんまたは腫瘍試料中で検出または測定することを含み、MDM2i感受性分析または評価を受けているがんまたは腫瘍試料中のTP53遺伝子および/またはp53タンパク質の機能的状態の評価をさらに含み得る。本明細書では、「p53」は、サプレッサータンパク質を表し、「TP53」は、p53サプレッサータンパク質をコードする遺伝子を表す。機能的p53タンパク質は、下流分子の発現を転写活性化を通じて上昇させる能力を保持し、これは、腫瘍成長抑制および/またはアポトーシスにつながる。ある態様で

50

は、活性または機能的 p 5 3 タンパク質は、野生型 T P 5 3 遺伝子状態；または p 5 3 タンパク質活性もしくは機能に有害に影響しない変異 T P 5 3 遺伝子状態；または、例えば、ヒトパピローマウイルス E 6 腫瘍性タンパク質 (H P V E 6) などの p 5 3 阻害剤または阻害物質の非存在から生じ得る。別の態様では、T P 5 3 が野生型で活性であるとき、p 5 3 タンパク質は活性で機能的である。別の態様では、M D M 2 i 感受性遺伝子シグネチャー遺伝子の発現、ならびに T P 5 3 遺伝子状態および / または p 5 3 タンパク質状態は、M D M 2 i 感受性に関する評価を受けているがんまたは腫瘍試料中で決定される。

【 0 0 1 9 】

ある態様では、本発明は、M D M 2 阻害剤治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、a) 対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される少なくとも 3 つまたは少なくとも 4 つの遺伝子の発現のレベルを測定することおよび b) がんまたは腫瘍試料が野生型 T P 5 3 遺伝子を有するかどうかを決定することを含む方法も提供する。

10

【 0 0 2 0 】

ある態様では、本発明は、M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、a) 対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される少なくとも 3 つの遺伝子を含む遺伝子群の発現のレベルを測定すること、b) ステップ a) において得られた発現レベルをスコア化して対象の感受性スコアを得ること、c) 複数のがんまたは腫瘍試料における前記少なくとも 3 つの遺伝子の発現レベルを測定すること { ここで、当該試料の少なくとも一部の M D M 2 i 治療に対する感受性は不明である } 、d) ステップ c) において得られた発現レベルをスコア化して各試料の参照スコアを得ることと、参照スコアの分布に基づいて閾値を決定すること、および、e) 対象の感受性スコアが閾値を超える場合には対象は M D M 2 i 治療に対して感受性であり、対象の感受性スコアが閾値を下回る場合には対象は M D M 2 i 治療に対して耐性であると予測すること、を含む方法を提供する。ある特定の実施形態では、ステップ e) は、耐性と予測された対象が M D M 2 の過剰発現を示す場合、好ましくは、野生型 T P 5 3 遺伝子をさらに有している場合には、対象は M D M 2 i 治療に対して感受性であると予測すること、である。ある実施形態では、M D M 2 の過剰発現は、対象のゲノムにおける M D M 2 遺伝子の増幅により生じ得る。ある実施形態では、ステップ b) および d) は、遺伝子発現レベルの正規化スコアを合計して対象の感受性スコアを得ることを含む。ある実施形態では、閾値は、受信者動作特性 (R O C) プロットに基づいて決定され、これは、一個抜き交差検証 (L O O C V) 解析によってもよい。ある実施形態では、閾値は、参照スコアの分布の形状から決定され、例えば、大津法などの二値化アルゴリズムによる。ある態様では、閾値は、混合ガウスモデルにより決定される。ある実施形態では、本発明は、M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、複数の予測を実行することと、ここで、各予測は、上記ステップ a) ~ d) またはステップ a) ~ e) を含み、対象が感受性であると予測される予測の回数が全予測回数の 5 0 % を超える、6 0 % を超える、7 0 % を超える、8 0 % を超える、または 9 0 % を超える場合に対象が M D M 2 i 治療に対して感受性であると評価することを含む。

20

【 0 0 2 1 】

ある態様では、本発明は、M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の少なくとも一部の感受性を予測する方法であって、a ') M D M 2 i 治療に対する感受性が不明である対象の全てから得られた全てのがんまたは腫瘍試料中の図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される少なくとも 3 つの遺伝子を含む遺伝子群の発現レベルを測定することと、b ') ステップ a) で得られた遺伝子発現レベルをスコア化して全ての対象の感受性スコアを得て、感受性スコアの分布に基づいて閾値を決定することと、e) 感受性スコアが閾値を超える対象は、M D M 2 i 治療に対して感受性であると評価し、かつ、感受性スコアが閾値を下回る対象は、M D M 2 i 治療に対して耐性であると予測することを含む、方法が提供される。ある特定の実施形態では、ステップ e) は、耐性であると予測された対象が M D M 2 の過剰発現を示す場合には、好ましくは、野生型 T P 5 3 遺伝子をさらに有

30

40

50

する場合には、対象は M D M 2 i 治療に対して感受性であると評価すること、である。ある実施形態では、M D M 2 の過剰発現は、対象のゲノムにおけるM D M 2 遺伝子の増幅によって生じうる。ある実施形態では、ステップ b') は、遺伝子発現レベルの正規化スコアを合計して対象の感受性スコアを得ることを含む。ある実施形態では、閾値は、受信者動作特性 (R O C) プロットに基づいて決定され、これは、一個抜き交差検証 (L O O C V) 解析によってもよい。ある実施形態では、閾値は、参照スコアの分布の形状から決定され、例えば、大津法などの二値化アルゴリズムによる。ある実施形態では、閾値は、混合ガウスモデルにより決定される。ある態様では、本発明は、M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、複数の予測を実行することと、ここで、各予測は、上記ステップ a') および b') またはステップ a') 、 b') および e) を含み、対象が感受性であると予測される予測の回数が全予測回数の 50 % を超える、60 % を超える、70 % を超える、80 % を超える、または 90 % を超える場合に対象が M D M 2 i 治療に対して感受性であると予測することを含む。

10

【 0 0 2 2 】

ある態様では、本発明は、がんまたは腫瘍を有する対象を治療する方法であって、a) 本発明の感受性を予測する方法によって M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を評価することと、b) もし評価が、がんまたは腫瘍が M D M 2 i に感受性であることを示す場合には、有効量の M D M 2 i を対象に投与してがんまたは腫瘍を治療することとを含む、方法が提供される。

20

【 0 0 2 3 】

ある態様では、本発明は、対象においてがんまたは腫瘍を治療することに用いるための医薬組成物であって、対象は、感受性を予測する本発明の方法により M D M 2 i 治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性が評価されることにより M D M 2 i 治療に対して感受性であると決定された対象である、医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 4 】

ある態様では、本発明は、がんまたは腫瘍を有する対象を治療する方法であって、a) M D M 2 阻害剤治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を評価するステップ (ここで評価するステップは、対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される少なくとも 3 つまたは少なくとも 4 つの遺伝子の発現のレベルを測定するステップを含む) ; b) がんまたは腫瘍が野生型 T P 5 3 遺伝子を有するかどうかを決定するステップ ; および c) ステップ a) の評価が、がんまたは腫瘍が M D M 2 阻害剤に対して感受性であることを示し、かつがんまたは腫瘍検体が野生型 T P 5 3 遺伝子を有する場合、対象に有効量の M D M 2 阻害剤を投与して、がんまたは腫瘍を治療するステップを含む方法を提供する。

30

【 0 0 2 5 】

本発明の上記の方法のそれぞれでは、図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される遺伝子は、図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子のいくつか、例えば、少なくとも 3 つもしくは少なくとも 4 つ、または全てを含み得る。あるいは、図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される遺伝子は、遺伝子 : B A X 、 C 1 Q B P 、 F D X R 、 G A M T 、 R P S 2 7 L 、 S L C 2 5 A 1 1 、 T P 5 3 、 T R I A P 1 、 Z M A T 3 、 A E N 、 C 1 2 o r f 5 、 G R S F 1 、 E I F 2 D 、 M P D U 1 、 S T X 8 、 T S F M 、 D I S C 1 、 S P C S 1 、 P R P F 8 、 R C B T B 1 、 S P A G 7 、 T I M M 2 2 、 T N F R S F 1 0 B 、 A C A D S B 、 D D B 2 、 F A S 、 G D F 1 5 、 G R E B 1 、 P D E 1 2 、 P O L H 、 C 1 9 o r f 6 0 、 H H A T 、 I S C U 、 M D M 2 、 M E D 3 1 、 M E T R N 、 P H L D A 3 、 C D K N 1 A 、 S E S N 1 および X P C の少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、または全てを含む。あるいは、図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される遺伝子は、遺伝子 M D M 2 、 C D K N 1 A 、 Z M A T 3 、 D D B 2 、 F D X R 、 R P S 2 7 L 、 B A X 、 R R M 2 B 、 S E S N 1 、 C C N G 1 、 X P C 、 T N F R S F 1 0 B および A E N の少なくとも 3 つ、または全てを含む。あるいは、図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される遺伝子は、遺伝子 R P S 2 7 L 、 F D X R 、 C D K N 1 A および A E N (および場合によ

40

50

り M D M 2) の少なくとも 3 つ、または全てを含む。方法の実施形態では、記載された遺伝子シグネチャーに含有される少なくとも 3 、 4 、 5 、 10 、 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40 、 45 、 50 以上の遺伝子の発現レベルは、 M D M 2 i に対するがんもしくは腫瘍試料または細胞の感受性を予測する。

【 0 0 2 6 】

上記の方法の実施形態では、遺伝子の発現のレベルを測定することは、 m R N A の発現のレベルを測定することを含む。方法の実施形態では、遺伝子の発現のレベルを測定することは、遺伝子によってコードされるタンパク質の発現のレベルを測定することを含む。方法の実施形態では、遺伝子の発現レベルは、対照と比較した、遺伝子の増加した発現レベルとして測定される。

10

【 0 0 2 7 】

本発明の態様では、 M D M 2 i は、本明細書でさらに定義される小分子化学化合物である。ある実施形態では、 M D M 2 i 化合物は、 M D M 2 を標的とし、 M D M 2 と p 5 3 タンパク質の相互作用を阻害することによって機能する。「他の実施形態では、 M D M 2 i は、抗体、例えば、モノクローナル抗体、ポリペプチド、ペプチド、もしくはリガンド、または M D M 2 機能の核酸エフェクターなどの生物製剤とすることができます。使用に適した M D M 2 阻害剤は、好ましくは、 M D M 2 と p 5 3 タンパク質間の相互作用を直接的または間接的に阻害、遮断、破壊、または妨害する。

【 0 0 2 8 】

本発明のより特定の態様では、 M D M 2 i は、化合物 A : [(5 R , 6 S) - 5 - (4 - クロロ - 3 - フルオロフェニル) - 6 - (6 - クロロピリジン - 3 - イル) - 6 - メチル - 3 - (プロパン - 2 - イル) - 5 , 6 - ジヒドロイミダゾ [2 , 1 - b] [1 , 3] チアゾール - 2 - イル] [(2 S , 4 R) - 2 - { [(6 R) - 6 - エチル - 4 , 7 - ジアザスピロ [2 . 5] オクタ - 7 - イル] カルボニル } - 4 - フルオロピロリジン - 1 - イル] メタノン) およびその塩 (W O 2 0 1 0 / 0 8 2 6 1 2 の実施例 6 および米国特許第 8 , 4 0 4 , 6 9 1 号の実施例 6 を参照されたい) ; または化合物 B : (3 ' R , 4 ' S , 5 ' R) - N - [(3 R , 6 S) - 6 - カルバモイルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] - 6 " - クロロ - 4 ' - (2 - クロロ - 3 - フルオロピリジン - 4 - イル) - 4 , 4 - ジメチル - 2 " - オキソ - 1 " , 2 " - ジヒドロジスピロ [シクロヘキサン - 1 , 2 ' - ピロリジン - 3 ' , 3 " - インドール] - 5 ' - カルボキサミド) およびその塩 (W O 2 0 1 2 / 1 2 1 3 6 1 の実施例 7 0 および米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 6 4 7 3 8 A 号の実施例 7 0 を参照されたい) である。 M D M 2 i は、スピロオキシンドール誘導体、インドール誘導体、ピロリジン - 2 - カルボキサミド誘導体、ピロリジノン誘導体、イソインドリノン誘導体、またはイミダゾチアゾール誘導体とすることもできる。他には、上記の方法では、 M D M 2 i は、本明細書でさらに記載されるように、 C G M 0 9 7 、 R G 7 3 8 8 、 M K - 8 2 4 2 (S C H 9 0 0 2 4 2) 、 M I - 2 1 9 、 M I - 3 1 9 、 M I - 7 7 3 、 M I - 8 8 8 、 N u t l i n - 3 a 、 R G 7 1 1 2 (R O 5 0 4 5 3 3 7) 、 T D P 5 2 1 2 5 2 、 T D P 6 6 5 7 5 9 、 P X N 7 2 7 、または P X N 8 2 2 である。これらの M D M 2 阻害剤の 2 つ以上の組合せも、方法における使用に関して包含される。

20

30

40

【 0 0 2 9 】

ある態様では、本発明は、図 1 A ~ 1 E に列挙された 3 つ以上、または 4 つ以上の遺伝子を検出するための複数の核酸プローブを含む組成物も提供する。ある実施形態では、図 1 A ~ 1 E に列挙された 3 つ以上、または 4 つ以上の遺伝子は、図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子の全てである。ある実施形態では、図 1 A ~ 1 E に列挙された 3 つ以上、または 4 つ以上の遺伝子は、 B A X 、 C 1 Q B P 、 F D X R 、 G A M T 、 R P S 2 7 L 、 S L C 2 5 A 1 1 、 T P 5 3 、 T R I A P 1 、 Z M A T 3 、 A E N 、 C 1 2 o r f 5 、 G R S F 1 、 E I F 2 D 、 M P D U 1 、 S T X 8 、 T S F M 、 D I S C 1 、 S P C S 1 、 P R P F 8 、 R C B T B 1 、 S P A G 7 、 T I M M 2 2 、 T N F R S F 1 0 B 、 A C A D S B 、 D D B 2 、 F A S 、 G D F 1 5 、 G R E B 1 、 P D E 1 2 、 P O L H 、 C 1 9 o r f 6 0 、

50

H H A T、I S C U、M D M 2、M E D 3 1、M E T R N、P H L D A 3、C D K N 1 A、S E S N 1 および X P C である。ある実施形態では、図 1 A ~ 1 E に列挙された遺伝子から選択される 3 以上または 4 以上の遺伝子は、遺伝子 M D M 2、C D K N 1 A、Z M A T 3、D D B 2、F D X R、R P S 2 7 L、B A X、R R M 2 B、S E S N 1、C C N G 1、X P C、T N F R S F 1 0 B および A E N である。ある実施形態では、図 1 A ~ 1 E に列挙された 3 つ以上、または 4 つ以上の遺伝子は、遺伝子 R P S 2 7 L、F D X R、C D K N 1 A および A E N (および場合により M D M 2) である。ある実施形態では、複数の核酸プローブは、アレイまたはマイクロアレイを含む。

【 0 0 3 0 】

ある態様では、本発明は、対照と比較した、がんもしくは腫瘍試料またはそこから由来する細胞中のその差次の発現または発現のパターンが M D M 2 i での治療に対するがんまたは腫瘍の感受性と相関する遺伝的バイオマーカーのセットを提供する。その態様のいくつかでは、本発明は、遺伝子バイオマーカーのセット、すなわち、その発現が本明細書に記載の M D M 2 阻害剤などの M D M 2 i への曝露またはこれまでの治療に対する個体のがんおよび腫瘍細胞の感受性を示す遺伝子シグネチャーを構成する遺伝子または遺伝子のセット、および試験を受けている対象におけるがんおよび腫瘍試料中の遺伝子バイオマーカー発現を検出するためのアッセイプラットフォームを提供する。別の態様では、本発明の遺伝子シグネチャーは、M D M 2 i でのがん治療を受けている患者の臨床成績を評価または予測する方法において使用され得る。臨床成績の評価または予測のためのかかる方法は、本明細書に記載の本発明の遺伝子シグネチャーの遺伝子または遺伝子産物の発現のレベルの検出のためのマイクロアレイ、P C R、核酸プライマーおよび / またはプローブのセット、免疫組織化学的検査、E L I S A などを含む。

【 0 0 3 1 】

その態様のいくつかでは、本発明は、がんまたは腫瘍試料中のその差次の発現が M D M 2 i 感受性および個体のがんまたは腫瘍における p 5 3 腫瘍サブレッサーシグナル伝達経路、例えば、機能的 p 5 3 タンパク質の状態と相関する遺伝的バイオマーカーのセットを提供する。本発明の方法によって検出される遺伝的バイオマーカーの発現パターンまたはレベルは、M D M 2 i での治療またはこれまでの曝露に対して感受性であるかまたは応答する可能性があるがんまたは腫瘍を分類または予測するために使用することができる。

【 0 0 3 2 】

ある態様では、本発明は、例えば、対象の腫瘍およびがん細胞中の p 5 3 機能の回復を最終的にもたらし得るような M D M 2 阻害剤によるがん治療および療法とともに使用される診断または予後プラットフォームとしての遺伝子シグネチャーその使用を提供する。かかるプラットフォームは、M D M 2 i 薬剤または特定の M D M 2 i を用いた臨床的使用に予定されているコンパニオン診断 (例えば、検出可能なプローブまたはリガンドのマイクロアレイまたは複数遺伝子同時測定システムなどの利便性の高い、測定が可能なフォーマットにおける診断アッセイまたは試験) を含み得る。M D M 2 i に対して感受性である個体のがんまたは腫瘍試料中の遺伝子発現プロファイルを示す 1 つまたは複数のユニークな遺伝子シグネチャーに関わるコンパニオン診断は、個体が所与の M D M 2 i に応答するかどうかの決定をもたらし、M D M 2 i に対するがんまたは腫瘍の感受性を予測する。したがって、M D M 2 i を含むがんまたは腫瘍治療レジメンは、がん治療を個別化するために、その成功的または効果的な使用から利益を最も得そうである者たちに適合させることができる。この態様に従って、本発明はさらに、本発明の遺伝子シグネチャー内の遺伝子の発現に関して対象からのがんまたは腫瘍試料をアッセイまたは試験し、その後、M D M 2 i 遺伝子感受性シグネチャー内の遺伝子の差次の発現が、対照と比較して、検出された場合、M D M 2 i を対象に投与することによって、M D M 2 i に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性、または M D M 2 i での治療に対する感受性を治療する、診断する、または予後診断する方法を提供する。

【 0 0 3 3 】

当業者によって認識されるように、適した対照は、試料のタイプ、例えば、単離腫瘍細

10

20

30

40

50

胞または腫瘍組織生検試料、および／または行なわれるアッセイに依存することになる。これらに限定されないが、対照は、正常もしくは非がん細胞、またはMDM2iに抵抗性である細胞のアッセイを含んでいてもよく、あるいは対照は、その発現がMDM2iによって影響されないハウスキーピング遺伝子などの1つまたは複数の構成的に発現される遺伝子による正規化、またはより大きい集団もしくはアッセイされた遺伝子の数に対する遺伝子シグネチャーの遺伝子の発現のグローバルノーマライゼーションも含み得る。当業者は認識するように、特にマイクロアレイアッセイプラットフォームに関する正規化は、RNA試料などの試料間の、またはアドレス可能なプロープ間の生物学的差異からよりもむしろ、マイクロアレイ技術における変動から生じる効果に適応するために慣習的に行なわれている。一般に、マイクロアレイまたはGENECHIP(商標)技術におけるグローバルノーマライゼーションは、平均測定値が各アレイ(および各色)に関して同じであるようにデータをスケールすることによって、アレイ全体に影響する誤差に適合するための解決策を提供する。スケーリングは、各アレイに関する平均発現レベルをコンピューター処理し、実際の平均で割った所望の平均に等しいスケール因子を計算し、アレイからの全ての測定値にそのスケール因子を掛けることによって典型的に達成される。所望の平均は、任意であってよいか、またはそれは、アレイのグループの平均からコンピューター処理されてもよい。

10

【0034】

ある態様では、本発明は、試験を受けている対象のがんおよび腫瘍試料由来のまたはこれから培養されたがんおよび腫瘍細胞中のMDM2i阻害剤感受性遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の発現を評価する方法を提供する。本発明は、以下でさらに記載されるように、がんもしくは腫瘍試料のまたは細胞のMDM2iに対する感受性の程度またはレベルを示す遺伝子シグネチャー内の遺伝子の発現レベルに基づく感受性スコアの決定にも関する。ある実施形態では、遺伝子発現を評価する方法は、アレイまたはマイクロアレイフォーマットである。追加の態様では、本発明は、MDM2iでの治療に対する患者のがんまたは腫瘍の感受性を予測するためのMDM2i感受性を示す遺伝子シグネチャーの使用であって、対照と比較した、がんまたは腫瘍試料中で測定または検出される本明細書に記載の遺伝子シグネチャーにおける遺伝子のいくつかまたは全ての差次的発現レベルがMDM2iに対するがんまたは腫瘍の感受性を予測する使用を提供する。

20

【0035】

別の態様では、本発明は、MDM2i治療に対する感受性を予測するまたはがんもしくは腫瘍を有する対象のMDM2iでの成功的な治療の見込みを予後診断する方法であって、対象から得られたがんまたは腫瘍試料が、対照と比較して、図1A～1Eに列挙された遺伝子、またはそのサブセットの少なくとも3～5、6～10、11～20、21～30、31～40、41～50、51～60、61～70、71～80、81～90、91～100、101～120、121～130、131～140、141～150、151～160、161～170、171～180の差次的発現を提示することが決定される方法を提供する。ある実施形態では、遺伝子のサブセットは、遺伝子BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADS B、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1およびXPCの少なくとも3～5、6～10、11～20、21～30、31～40である。ある実施形態では、遺伝子のサブセットは、遺伝子MDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAENの少なくとも3つまたは全てである。ある実施形態では、遺伝子のサブセットは、遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN(および場合によりMDM2)の少なくとも3つまたは全てである。関連する態様では、本発明は、該方法の実

30

40

50

施により、がんまたは腫瘍が M D M 2 i に対して感受性であることが予測される場合、対象にがんまたは腫瘍を治療するのに有効な量で M D M 2 i を投与することを提供する。ある実施形態では、該方法は、遺伝子発現評価を受けているがんまたは腫瘍試料から得られた結果と、同時に評価される、または対照としての M D M 2 i 遺伝子感受性スコアが決定された正常、非がん、もしくは非腫瘍、または M D M 2 i 耐性細胞から得られた結果の比較を含む。別の実施形態では、いろいろながんまたは腫瘍試料が M D M 2 i に対する感受性に関して評価することができ、その発現レベルが M D M 2 i に対する感受性と相關する細胞の遺伝子シグネチャー遺伝子が対照と比較した発現のそれらの程度またはレベルに関してランク付けされ得る。

【 0 0 3 6 】

本発明の態様では、遺伝子シグネチャー発現プロファイルは、例えば、R N A (m R N A)などの核酸、またはコードされたタンパク質を腫瘍試料もしくは検体（例えば、生検試料および検体）から直接的に抽出または単離し、遺伝子シグネチャーにおける遺伝子、またはそこからコードされたタンパク質の差次的発現に関してアッセイすることによって、患者の腫瘍試料または検体から直接的に作成され得る。対照と比較した、遺伝子シグネチャー遺伝子、またはコードされたタンパク質の差次的発現の決定は、試料の M D M 2 i 感受性を示す。ある態様では、患者のがん試料または検体が培養することができる細胞を含む場合、細胞は、培養で濃縮または増やされてもよく、その後、遺伝子シグネチャー発現プロファイルを決定するための分析を受けてもよい。生じた遺伝子シグネチャー発現プロファイルは、患者のがんまたは腫瘍検体から直接的に作成されていても、またはそこから由来するまたはそこから培養された細胞から作成されていても、M D M 2 i に対するがんまたは腫瘍の感受性を予測する本発明の遺伝子シグネチャーにおける遺伝子、またはそのコードされたタンパク質の転写レベル（または「発現レベル」）を含有する。一部の実施形態では、遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の差次的発現は、対照と比較して増加した発現であり、がんまたは腫瘍が M D M 2 i に対して感受性であることを示す。

【 0 0 3 7 】

本発明の態様では、M D M 2 i 感受性を示す遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の発現は、M D M 2 i 薬剤での治療に対するおよび / または M D M 2 i 薬剤での特定の一連の治療に関する、例えば、白血病、リンパ腫、メラノーマ、または骨髄腫、および本明細書に記載の他のものなどのがんの特定のタイプの感受性を予測し得る。M D M 2 i 感受性を示す遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の発現は、個体の生存、または生存期間、治療に対する病理学的完全奏効 (p C R) 、または無増悪生存期間、もしくは腫瘍サイズ、体積などの M D M 2 i での個体の治療結果の別の尺度も予測し得る。本明細書で記載および例証されるように、M D M 2 i 遺伝子感受性シグネチャーは、M D M 2 i に対する i n v i t r o 感受性のレベルをがん細胞中の特定の遺伝子の発現のレベルと関連づけることによって、多数のがん細胞株において同定されてきた。遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の発現プロファイルは、本明細書で実施例に記載された i n v i v o 腫瘍化動物モデル実験において適用される感受性スコアをもたらした。

【 0 0 3 8 】

ある態様では、本発明は、対象のがんもしくは腫瘍試料、またはそこから由来する細胞を M D M 2 i 感受性を示す本発明の遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の発現に関して試験またはアッセイすることに関わる、それを必要とする対象を診断する、予後診断するおよび / または治療する方法を提供する。好ましくは、遺伝子発現は m R N A の産生として検出されるが、タンパク質発現としても検出される。そのがんまたは腫瘍が本発明の遺伝子シグネチャーの遺伝子のいくつかまたは全てを差次的に発現する対象は、M D M 2 i に対して感受性であり、これで治療可能であると考えられる。様々な実施形態では、遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、または全ての発現が、試験またはアッセイにおいて検出され、M D M 2 i 感受性を予測する。ある態様では、対象のがんまたは腫瘍試料を本発明の M D M 2 i 遺伝子感受性シグネチャー内の遺伝子の発現に関してアッセイすることを含む診断、予後診断、および / または治療の方法は、がん

10

20

30

40

50

または腫瘍試料が野生型TP53遺伝子を有するかどうかを決定することをさらに含む。

【0039】

その態様の別ものでは、本発明は、MDM2iに対する感受性を示す図1A～1Eに列挙された少なくとも3つまたは少なくとも4つの遺伝子の検出のための試薬、および使用説明書を含有するキットを提供する。

【0040】

別の態様では、本発明は、MDM2iに対するがんまたは腫瘍試料の感受性を予測するためのキットであって、図1A～1Eに列挙された遺伝子に相当するヌクレオチド配列に特異的に結合する核酸プローブ、および核酸を標識する手段を含むキットを提供する。

【0041】

別の態様では、本発明は、MDM2iに対するがんまたは腫瘍試料の感受性を予測するためのキットであって、図1A～1Eに列挙された少なくとも3つまたは少なくとも4つの遺伝子によってコードされるポリペプチドまたはペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンド、および遺伝子によってコードされるポリペプチドまたはペプチドに特異的に結合する抗体またはリガンドを標識する手段を含むキットを提供する。

【0042】

本発明による上記のキットのそれぞれでは、図1A～1Eに列挙された少なくとも3つまたは少なくとも4つの遺伝子は、図1A～1Eに列挙された遺伝子の全てとすることができます。あるいは、キットのそれぞれでは、図1A～1Eに列挙された遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全ては、BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADSB、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLD A3、CDKN1A、SESN1およびXPCである。あるいは、キットのそれぞれでは、図1A～1Eに列挙された少なくとも3つまたは少なくとも4つの遺伝子は、遺伝子MDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAENである。あるいは、キットのそれぞれでは、図1A～1Eに列挙された少なくとも3つまたは少なくとも4つの遺伝子は、遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2）である。

【0043】

本発明による上記のキットのそれぞれでは、MDM2iは、本明細書に記載の化合物Aおよびその塩形態または化合物Bおよびその塩形態である。他の態様では、キットにおけるMDM2iは、スピロオキシンドール誘導体、インドール誘導体、ピロリジン-2-カルボキサミド誘導体、ピロリジノン誘導体、イソインドリノン誘導体、またはイミダゾチアゾール誘導体である。あるいは、上記のキットのそれぞれでは、MDM2iは、本明細書に記載の化合物Aおよびその塩、化合物Bおよびその塩、CGM097、RG7388、MK-8242(SCH900242)、MI-219、MI-319、MI-773、MI-888、Nutlin-3a、RG7112(RO5045337)、TD P521252、TD P665759、PXN727、またはPXN822とすることができる。MDM2i化合物の1つまたは複数の組合せが本発明のキットに包含される。

【0044】

本発明およびその実施形態の前述のおよび他の態様、特色および利点は、添付の図面の記述および本明細書で提供される実施形態において明らかとなろう。

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1A】図1A～1Eは、本明細書に記載のMDM2i、化合物Aに対して感受性であるがんもしくは腫瘍試料または細胞中で差次的に発現される177遺伝子シグネチャーバ

10

20

30

40

50

イオマーカーを、表を用いたフォーマットで示す図である。図 1 A ~ E に示された表は、遺伝子同定またはGenBank 番号（「レポーター」）；遺伝子名（「遺伝子」）；各試験遺伝子に関する偽陽性率の観点からの統計的有意性の公知の尺度であり、2 クラスのスチューデント t 検定と関連する p 値；複数試験仮説に関する偽発見率の観点からの統計的有意性の公知の尺度である q 値（例えば、J.D.Storeyら,2003,Statistical significance for genome-wide studies,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,100(16):9440-45を参照されたい）；および各試験試料に関するスチューデント 2 クラス t 検定の適用から生じる t 検定値（「t 統計量」）を示す。

【図 1 B】図 1 A ~ 1 E は、本明細書に記載のMDM2i、化合物 A に対して感受性であるがんもしくは腫瘍試料または細胞中で差次的に発現される 177 遺伝子シグネチャーバイオマーカーを、表を用いたフォーマットで示す図である。図 1 A ~ E に示された表は、遺伝子同定またはGenBank 番号（「レポーター」）；遺伝子名（「遺伝子」）；各試験遺伝子に関する偽陽性率の観点からの統計的有意性の公知の尺度であり、2 クラスのスチューデント t 検定と関連する p 値；複数試験仮説に関する偽発見率の観点からの統計的有意性の公知の尺度である q 値（例えば、J.D.Storeyら,2003,Statistical significance for genome-wide studies,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,100(16):9440-45を参照されたい）；および各試験試料に関するスチューデント 2 クラス t 検定の適用から生じる t 検定値（「t 統計量」）を示す。

【図 1 C】図 1 A ~ 1 E は、本明細書に記載のMDM2i、化合物 A に対して感受性であるがんもしくは腫瘍試料または細胞中で差次的に発現される 177 遺伝子シグネチャーバイオマーカーを、表を用いたフォーマットで示す図である。図 1 A ~ E に示された表は、遺伝子同定またはGenBank 番号（「レポーター」）；遺伝子名（「遺伝子」）；各試験遺伝子に関する偽陽性率の観点からの統計的有意性の公知の尺度であり、2 クラスのスチューデント t 検定と関連する p 値；複数試験仮説に関する偽発見率の観点からの統計的有意性の公知の尺度である q 値（例えば、J.D.Storeyら,2003,Statistical significance for genome-wide studies,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,100(16):9440-45を参照されたい）；および各試験試料に関するスチューデント 2 クラス t 検定の適用から生じる t 検定値（「t 統計量」）を示す。

【図 1 D】図 1 A ~ 1 E は、本明細書に記載のMDM2i、化合物 A に対して感受性であるがんもしくは腫瘍試料または細胞中で差次的に発現される 177 遺伝子シグネチャーバイオマーカーを、表を用いたフォーマットで示す図である。図 1 A ~ E に示された表は、遺伝子同定またはGenBank 番号（「レポーター」）；遺伝子名（「遺伝子」）；各試験遺伝子に関する偽陽性率の観点からの統計的有意性の公知の尺度であり、2 クラスのスチューデント t 検定と関連する p 値；複数試験仮説に関する偽発見率の観点からの統計的有意性の公知の尺度である q 値（例えば、J.D.Storeyら,2003,Statistical significance for genome-wide studies,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,100(16):9440-45を参照されたい）；および各試験試料に関するスチューデント 2 クラス t 検定の適用から生じる t 検定値（「t 統計量」）を示す。

【図 1 E】図 1 A ~ 1 E は、本明細書に記載のMDM2i、化合物 A に対して感受性であるがんもしくは腫瘍試料または細胞中で差次的に発現される 177 遺伝子シグネチャーバイオマーカーを、表を用いたフォーマットで示す図である。図 1 A ~ E に示された表は、遺伝子同定またはGenBank 番号（「レポーター」）；遺伝子名（「遺伝子」）；各試験遺伝子に関する偽陽性率の観点からの統計的有意性の公知の尺度であり、2 クラスのスチューデント t 検定と関連する p 値；複数試験仮説に関する偽発見率の観点からの統計的有意性の公知の尺度である q 値（例えば、J.D.Storeyら,2003,Statistical significance for genome-wide studies,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,100(16):9440-45を参照されたい）；および各試験試料に関するスチューデント 2 クラス t 検定の適用から生じる t 検定値（「t 統計量」）を示す。

【図 2】実施例 2 に記載された MDM2 感受性または耐性の細胞株分析から生じる応答表現型の特徴付けを描写する図である。細胞株は、IC₅₀ 値によってランク付けされ、MD

10

20

30

40

50

M2i治療に対して、感受性であるものに関して「S」、中程度であるものに関して「M」、耐性であるものに関して「R」と命名された。IC₅₀値は、それらの間の中程度レスポンダーとともに、2つの一般的な応答表現型、SおよびRを示した。

【図3A】図3A～3Fは、177遺伝子（すなわち、図1A～1Eに示された遺伝子）、175遺伝子（すなわち、EDA2RおよびSPATA18を除く図1A～1Eに示された遺伝子）、40遺伝子（すなわち、本明細書で表1に示された遺伝子）、4遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN）、および3遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXRおよびCDKN1A）の分析から得られる各細胞株のMDM2i遺伝子感受性シグネチャースコアまたは値を示す図である。

【図3B】図3A～3Fは、177遺伝子（すなわち、図1A～1Eに示された遺伝子）、175遺伝子（すなわち、EDA2RおよびSPATA18を除く図1A～1Eに示された遺伝子）、40遺伝子（すなわち、本明細書で表1に示された遺伝子）、4遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN）、および3遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXRおよびCDKN1A）の分析から得られる各細胞株のMDM2i遺伝子感受性シグネチャースコアまたは値を示す図である。

【図3C】図3A～3Fは、177遺伝子（すなわち、図1A～1Eに示された遺伝子）、175遺伝子（すなわち、EDA2RおよびSPATA18を除く図1A～1Eに示された遺伝子）、40遺伝子（すなわち、本明細書で表1に示された遺伝子）、4遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN）、および3遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXRおよびCDKN1A）の分析から得られる各細胞株のMDM2i遺伝子感受性シグネチャースコアまたは値を示す図である。

【図3D】図3A～3Fは、177遺伝子（すなわち、図1A～1Eに示された遺伝子）、175遺伝子（すなわち、EDA2RおよびSPATA18を除く図1A～1Eに示された遺伝子）、40遺伝子（すなわち、本明細書で表1に示された遺伝子）、4遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN）、および3遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXRおよびCDKN1A）の分析から得られる各細胞株のMDM2i遺伝子感受性シグネチャースコアまたは値を示す図である。

【図3E】図3A～3Fは、177遺伝子（すなわち、図1A～1Eに示された遺伝子）、175遺伝子（すなわち、EDA2RおよびSPATA18を除く図1A～1Eに示された遺伝子）、40遺伝子（すなわち、本明細書で表1に示された遺伝子）、4遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN）、および3遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXRおよびCDKN1A）の分析から得られる各細胞株のMDM2i遺伝子感受性シグネチャースコアまたは値を示す図である。

【図3F】図3A～3Fは、177遺伝子（すなわち、図1A～1Eに示された遺伝子）、175遺伝子（すなわち、EDA2RおよびSPATA18を除く図1A～1Eに示された遺伝子）、40遺伝子（すなわち、本明細書で表1に示された遺伝子）、4遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN）、および3遺伝子（すなわち、RPS27L、FDXRおよびCDKN1A）の分析から得られる各細胞株のMDM2i遺伝子感受性シグネチャースコアまたは値を示す図である。

【図4】図4は、MDM2i治療に対する感受性が不明である試料を訓練セットとして用いた予測の結果を示す。予測モデルA～Eは、実施例において詳解される。予測モデルFにおいては、ヒストグラムにおいてスコアの分布が谷間を形成した箇所のスコアの値として閾値が決定された。予測モデルGにおいては、TP53野生型の試料において平均Zスコアの第一四分位の値として閾値が決定された。

【図5】図5は、MDM2i治療に対する感受性が不明である試料を訓練セットとして用いたメラノーマ細胞株における感受性の予測の結果を示す。「wtにおけるスコア」予測モデルでは、TP53野生型の試料において平均Zスコアの第一四分位の値として閾値が決定された。「スコア分布」予測モデルでは、大津法によって、ヒストグラムにおいてスコア分布が谷間を形成した箇所のスコアの値として、閾値が決定された。

【図6】図6は、MDM2i治療に対する感受性が不明である試料を訓練セットとして用

10

20

30

40

50

いた P d × モデルにおける感受性の予測結果を示す。「w t におけるスコア」および「スコア分布」予測モデルは、上記で説明される通りである。

【図 7】図 7 は、MDM2 i 治療に対する感受性が不明である試料を訓練セットとして用いて、訓練セットにおける最適化された閾値の分布に対する、訓練セットにおける p 53 変異の割合の影響を示す。

【図 8】図 8 は、予測の感受性および特異性が訓練セットにおける p 53 変異の割合によらず変動しないことを示す。

【図 9】図 9 は、ゲノム上で MDM2 遺伝子の増幅を伴う細胞株のいくつかで予測精度が影響を受けることを示す。

【図 10】図 10 は、MDM2 の発現レベルが予測精度を改善することを示す。10

【図 11】図 11 は、様々な訓練セットのサイズにおいて MDM2 i 治療に対する感受性が精度良く予測できることを示す。

【図 12】図 12 A ~ 12 K は、実施例で解析された全ての CCL E データセットの細胞株のリストを、その p 53 変異状況および MDM2 i 治療に対する感受性と共に示す。TP 53 カラムにおける「M」および「W」はそれぞれ、「変異体」および「野生型」を表す。S / R カラムにおける「S」および「R」はそれぞれ、「感受性」および「耐性」を示す。

【図 13】図 13 A および 13 B は、実施例において解析された P D × モデルのリストを、その p 53 変異状況および MDM2 i (化合物 B) 治療に対する感受性と共に示す。TP 53 カラムにおける「M」および「W」はそれぞれ、「変異体」および「野生型」を表す。S / R カラムにおける「S」および「R」はそれぞれ、「感受性」および「耐性」を示す。20

【発明を実施するための形態】

【0046】

本発明は、がんおよび腫瘍におけるその発現が MDM2 阻害剤および類似した活性を有する他の化合物または薬剤に対するがんおよび腫瘍の感受性を予測する遺伝子、および遺伝子のセットを含有する遺伝子シグネチャーの発見に関する。本発明の方法において使用されるように、遺伝子シグネチャーは、その発現が MDM2 i に対するおよび MDM2 i 治療に対するがんおよび腫瘍試料、ならびにそこから由来する細胞の感受性を示すバイオマーカー、またはバイオマーカーのセットを提供する。本明細書では、「を示す」という用語は、「に相当する」、「と相関または関連している」、または「を予測する」という用語と互換的にも使用され得る。30

【0047】

遺伝子シグネチャーは、生物学的試料のいろいろな生物学的および臨床的に関連する特徴を分子レベルで明らかにし得る一般的に重要で強力な分子ツールである。遺伝子シグネチャーは、遺伝子バイオマーカーの特定のセットを包含すると考えられ得る。より具体的には、その発現が種々のがんおよび腫瘍のタイプならびにサブタイプの治療に使用される本明細書に記載の MDM2 阻害剤などの臨床的に重要な薬物に対する感受性を示し得る遺伝子を含有する遺伝子シグネチャーが提供される。遺伝子シグネチャーは、がんまたは腫瘍を有する患者を MDM2 i 薬剤で治療することにおいて起こり得る臨床応答または結果を予測するためにさらに利用され得る。40

【0048】

本発明の方法によって提供され、これに従って使用される遺伝子シグネチャーの基本的な特徴は、腫瘍もしくはがん試料または検体中のその発現パターンが MDM2 i 、または他の類似した作用をする化合物に対する腫瘍またはがんの感受性の決定を可能にする、遺伝子、または遺伝子のセットの同定である。本発明の遺伝子シグネチャーは、 MDM2 i 化合物、薬物、またはその組合せに対して感受性である細胞中で発現される、例えば、差次の発現を示す遺伝子を含む。ある実施形態では、本発明は、小分子、低分子量 MDM2 i での治療に対するがんの感受性または応答に関連する遺伝子シグネチャーを提供する。かかる遺伝子感受性シグネチャーは、例えば、 MDM2 i での治療に対する個体のがんの50

感受性を評価する、決定する、診断する、予測または予後診断するための、MDM2i治療および療法と関連した使用のための遺伝的バイオマーカーとしても役立つ。本発明によるMDM2i感受性を示す遺伝子シグネチャーは、本明細書で実施例においてさらに記載されるように、MDM2阻害剤に曝露された多数のがんまたは腫瘍由来細胞株における遺伝子の差次的発現を分析することによって決定された。

用語および定義

【0049】

本明細書で使用される技術的および科学的用語は、別段の指示がない場合、記載された発明が属する当業者に一般的におよび慣習的に公知の意味を有することが意図されている。かかる用語は、当技術分野で公知であり、実行される方法、プロセス、手順、試薬、デバイス、生物学的分子および化合物を包含する。本明細書での用語の定義および説明は、徹底的または限定的ではないものとし、その代わりに、記載された発明の様々な態様および実施形態のレビューを促進するために提供される。

10

【0050】

「MDM2」という用語は、p53を相互作用でき、p53の分解を引き起こすことができるE3ユビキチンリガーゼを言う。本明細書で用いられるMDM2としては、特に限定されないが、マウスマダム2およびヒトMDM2オーソログ（「ヒトdouble minute 2」または「HDM2」とも呼ばれる）が挙げられる。

20

【0051】

「MDM2阻害剤」という用語は、p53分解に対するMDM2機能または活性を阻害する阻害剤を言う。本明細書では、「MDM2i」という用語は、「1以上のMDM2阻害剤」または「MDM2iの組合せ」を包含し得ることが理解される。

20

【0052】

「アレイ」という用語は、本明細書では、表面、マトリックスまたは基板の上またはその中に、別々の割り当てられたアドレス可能な位置に置かれた、生物学的分子、例えば核酸、ポリペプチド、ペプチド、生物学的試料の配置、典型的には秩序のある配置を表す。マイクロアレイは、典型的に顕微鏡的に評価されるまたは分析されるアレイの小型化されたバージョンである。核酸、例えば、RNAまたはDNAアレイは、固体表面またはマトリックス上の割り当てられたアドレス可能な位置における核酸（プローブなど）の配置である。核酸アレイは、cDNAアレイおよびオリゴヌクレオチドアレイおよびマイクロアレイを包含し；それらは、バイオチップ、またはDNA/cDNAチップと称される場合もある。マイクロアレイ、ならびにそれらの構築、試薬構成要素および使用は、当業者に公知である。例として、遺伝子発現状態を決定および測定するのに有用なマイクロアレイ技術は、U.S.2011/0015869に示されている。

30

【0053】

「バイオマーカー」という用語は、その発現レベルがいくつかの条件下で変化する、またはMDM2阻害剤に対して非感受性であるものとは対照的に、MDM2阻害剤に対して感受性である細胞中でなど、いくつかの細胞状況において異なる、遺伝子、その遺伝子に由来する発現された配列タグ（EST）、遺伝子のセット、またはタンパク質もしくはペプチドのセットを一般的に表す。一般に、遺伝子または遺伝子セットの発現レベルがいくつかの条件に相応する場合、遺伝子は、その条件に関する1つまたは複数のバイオマーカーとして役立つ。バイオマーカーは、予後および疾患状況に従って、個体（例えば、がんまたは腫瘍型を有するもの）間で差次的に発現され得；したがって、バイオマーカーは、種々の生存結果、ならびに利益薬物敏感性および感受性を予測し得る。

40

【0054】

「結合」という用語は、ある核酸分子から別のもの（またはそれ自身への）へのハイブリダイゼーションなどの、2つの物質または分子間の相互作用または会合；ポリペプチド、タンパク質、またはペプチドと抗体の会合；または別のタンパク質もしくは核酸分子とタンパク質の会合を一般的に表す。その結合の検出を可能にするのに十分な量のオリゴヌ

50

クレオチド分子がその標的核酸分子と塩基対を形成するかまたはハイブリダイズしている場合、オリゴヌクレオチド分子は、標的核酸分子に結合または安定に結合する。優先的に、結合は、ある分子が別の分子に高親和性で結合し、異種分子に低親和性で結合する関連を表す。結合は、標的 / オリゴヌクレオチド複合体の物理的または機能的性質によってなどの当業者に公知の任意の手順によって検出され得る。例えば、結合は、生合成プロセス、例えば、遺伝子の発現、DNA複製、転写、翻訳などに及ぼす観察可能な効果があるかどうかを決定することによって機能的に検出され得る。

【0055】

「遺伝子」という用語は、本明細書では、RNA転写物として試料中で発現されるDNA配列を表し；遺伝子は、全長遺伝子（タンパク質コードまたは非コード）または発現された配列タグもしくは「EST」などの発現されたその部分とすることができます。したがって、図1A～1Eおよび表1および本明細書の他のところで本発明の遺伝子シグネチャーの構成要素として列挙された遺伝子は、それぞれ独立的に、その発現産物が試料中に存在するか、または発現された配列、例えば、EST配列の部分である、試料中で検出可能である全長遺伝子配列である。本明細書で参照によって組み込まれている、図1A～1Eに列挙された遺伝子およびその配列は、図において提供されたそれらの遺伝子同定名またはEntrez Gene ID名称により、公的に入手可能なGenBankデータベースにおいて見出される。したがって、全てのGenBank同定番号およびそれに関連する配列は、本明細書にその全体が参照によって組み込まれている。

【0056】

「遺伝子シグネチャー」、「遺伝子発現シグネチャー」および「遺伝子感受性シグネチャー」という用語は、それらが本発明に従ってMDM2iに対して感受性であるがんまたは腫瘍における細胞応答を予測する遺伝子の差次的発現などの発現、または発現パターンを表すので、本明細書で互換的に使用される。例えば、ある実施形態では、MDM2iに対する感受性を示す腫瘍またはがん試料は、本発明の遺伝子シグネチャーに含有される遺伝子の発現の対照と比較して増加したまたは上昇したレベルを有する。

【0057】

本発明では、「遺伝子発現」は、遺伝子でコードされた遺伝情報を遺伝子の転写（例えば、RNAポリメラーゼの酵素作用によって媒介される）を通してRNA（例えば、mRNA、rRNA、tRNA、またはsnRNA）に、タンパク質コード遺伝子に関しては、mRNAの「翻訳」を通してタンパク質に変換するプロセスを意味する。遺伝子発現は、DNAからRNA、タンパク質につながる経路における任意のポイントで制御され得る。遺伝子発現の制御は、転写、翻訳、RNA運搬およびプロセシング、ならびにmRNAなどの中間分子の分解の調節を含み得る。制御は、それらが作製された後の特定のタンパク質分子の活性化、不活性化、区画化、または分解にも関わり得る。核酸分子の発現は、正常または野生型核酸分子と比較して、改変され得る。

【0058】

差次的発現などの遺伝子発現の変化は、これらに限定されないが、非がん細胞などの対照と比較した、または正規化された発現レベルに関連した、過剰発現、増加した発現、低発現、または抑制された発現を含み得る。核酸分子の発現の変化は、相当するタンパク質の発現の変化と関連しており、ある場合には、これを引き起こし得る。例証的に、MDM2iを対象に投与する、および/またはMDM2iでの効果的な治療を個別化する、および/または対象の生存時間を予測する目的でMDM2i治療に応答する対象の見込みを予測するために、遺伝子発現を測定して、対象のがんまたは腫瘍試料のMDM2i感受性を示す遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の差次的発現を決定することができる。

【0059】

遺伝子または核酸分子に関連して使用される、上方制御されたまたは活性化された発現とも称され得る発現の増加は、RNAまたはタンパク質の全ての型などの遺伝子産物の產生の増加または上昇を引き起こす、またはもたらす任意のプロセスを表す。増加したまたは上昇した遺伝子発現は、遺伝子の転写またはタンパク質へのmRNAの翻訳を増加させ

10

20

30

40

50

る任意のプロセスを含む。増加した（または上方制御された）遺伝子発現は、遺伝子産物の產生の任意の検出可能なまたは測定可能な增加を含み得る。例証的に、遺伝子産物の產生（図1A～1Eの遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全てなど；または遺伝子シグネチャー遺伝子BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADS B、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1およびXPCの少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全て；遺伝子シグナチャー遺伝子MDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAENの少なくとも3つ、または全て；または遺伝子シグネチャー遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2）の少なくとも3つ、または全てなど）は、測定可能な相対量、例えば、これらに限定されないが、対照と比較して、少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも6～10倍増加する。対照は、正常細胞などの生物学的試料中の遺伝子発現の量、または細胞遺伝子発現の基準値もしくは正規化された値とすることができる。ある例では、対照は、腫瘍を有さない対象に由来する、問題になっている（試験を受けている）対象が有するのと同じ組織型の生検材料における遺伝子発現の相対量である。別の例では、対照は、腫瘍を有し、試験を受けている対象から採取された腫瘍のものと同じ組織型の非腫瘍化組織からの組織生検材料における遺伝子発現の相対量である。

10

20

30

40

50

【0060】

あるいは、遺伝子または核酸分子に関連して使用される、下方制御された発現とも称され得る発現の減少は、RNAまたはタンパク質の全ての型などの遺伝子産物の產生の減少を引き起こす、またはもたらす任意のプロセスを表す。減少したまたは下方制御された遺伝子発現は、遺伝子転写またはタンパク質へのmRNAの翻訳の減少を引き起こす、またはもたらすプロセスを典型的に含む。遺伝子下方制御は、遺伝子産物の產生の任意の測定可能なまたは検出可能な減少、例えば、これらに限定されないが、対照、例えば、正常細胞中の遺伝子発現の量、または基準値と比較しての少なくとも1.5倍、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも6～10倍の減少を含む。

【0061】

「がん」という用語は、本明細書では、治療されない場合、周囲の組織に侵入し、他の器官に広がる、すなわち、悪性になり得る異常な腫瘍または異常に成長している細胞を表す、新生物および腫瘍を包含すると理解される。新生物は、悪性または良性細胞の異常な成長および増殖である新生物形成の結果として形成する細胞からなる組織の異常な腫瘍（または腫瘍）である。新生物および腫瘍は、治療されない場合、正常細胞よりも急速に成長し、成長し続け、正常細胞と栄養素を求めて競争することになる、前がん性およびがん性細胞ならびに組織の異常な腫瘍を含み得る。新生物は、これらに限定されないが、中空または液性腫瘍さらに、血液細胞新生物形成または新生物、例えば、リンパ腫、白血病および骨髄腫などの固形および非固形腫瘍を含み得る。

【0062】

「がん」という用語は、身体内または身体上の様々な起源、様々なタイプおよびサブタイプ、ならびに器官、組織および細胞試料ならびに検体、例えば、その生物学的試料または検体の新生物および腫瘍を包含することも意図されている。例証的に、適切ながん試料または検体は、ヒト、例えば、がんのための治療を受けている患者、または獣医学的対象から得られた臨床試料を含めた、任意の従来の生物学的試料または検体を含む。試料は、組織の疾患したまたは健康な部分である組織の一部、または組織全体を表し得る。組織試

料は、当技術分野で公知であり、実行されている任意の方法または手順を用いることによつて、対象から得ることができる。

【0063】

例示的な試料または検体は、これらに限定されないが、細胞、細胞溶解物、血液塗抹標本、細胞遠心分離調製物、細胞塗抹標本、体液、例えば、末梢血、血液、血漿、血清、尿、唾液、痰、肺胞洗浄液、精液など、組織生検もしくは剖検試料または検体、例えば、新生物生検材料、細針生検材料、細胞擦過物、外科検体、末梢循環腫瘍細胞（C T C）、および／または組織切片、例えば、クライオスタット組織切片および／またはパラフィン包埋組織切片を含む。いくつかの場合では、試料は、全身性または末梢循環腫瘍または新生物細胞を含む。いくつかの例では、腫瘍または新生物試料は、例えば、新鮮または凍結され、直接的に使用されるか、または例えば、例えばホルマリンを使用した固定化、および／またはホルマリン固定もしくはパラフィン包埋組織試料などのワックス中での埋め込みによつて、使用前に操作されてもよい。試料は、対象から採取されたゲノムDNA、RNA（mRNAを含めた）、タンパク質、またはその組合せなどを含有し得る。好ましい実施形態では、試料は、遺伝子シグネチャー内の遺伝子の発現レベルの分析を可能にするためのmRNAを含有する。

【0064】

「対照」という用語は、1つまたは複数の実験または試験試料との比較に関する基礎として使用される試料、基準、または標準を典型的に表す。当該の場合では、実験試料は、MDM2iで治療されたまたは治療されるべき個体から得られた腫瘍検体または試料を含み得る。いくつかの場合では、対照は、健康な、非腫瘍化個体から得られる試料であり；いくつかの場合では、対照は、MDM2iで治療されたまたは治療されるべき腫瘍を有する個体から採取された非腫瘍組織試料である。他の場合では、対照は、標準基準値、または値の範囲、または歴史的対照とすることができます。例として、値の標準範囲は、以前試験された対照試料、例えば、非腫瘍組織におけるMDM2i遺伝子感受性シグネチャーの遺伝子のレベルなどのベースラインまたは正常値を表す試料の群；またはその腫瘍がMDM2iに対して感受性である個体の以前試験された群；またはその腫瘍がMDM2iに非感受性である個体の以前試験された群から得られ得る。さらに、差次の遺伝子発現の決定のための試験試料との比較の標準として役立ち得る対照は、がんまたは腫瘍を有さない対象からなどの正常、すなわち、所望の特徴に関して改変されていないと信じられている試料を含む。実験室値またはin vitro実験から得られた値などの値の範囲も、かかる値は、局所的に決定された実験室条件に基づいてしばしば樹立され、いくらかより可変的でありやすいけれども、対照として使用され得る。さらに、これらに限定されないが、対照は、当業者は理解するように、生物学的試料、または試験集団における遺伝子発現の相対量とすることことができ、本明細書でさらに考察される、DNAアレイ内の全ての遺伝子の発現レベルへの正規化、例えば、グローバルノーマライゼーション、または構成的に発現され、細胞の全てではないとしても大部分の型において一定の発現レベルを提示する1つまたは複数の内部対照遺伝子、例えば、いわゆる「ハウスキーピング遺伝子」の発現レベルへの正規化も包含し得る。

【0065】

ハウスキーピング遺伝子は、典型的に、基本的な細胞機能の維持に必要である構成遺伝子であり、正常および病態生理学的条件下で生物の全ての細胞中で発現される。最適に、ハウスキーピング遺伝子は、大部分の非病理学的状況において比較的一定のレベルで発現され、それらの発現は、異なる実験条件下で著しく変動しない。かかるハウスキーピング遺伝子の例は、これらに限定されないが、アクチン（アクチン；RefSeq ID：NM_001101.3）、グルクロニダーゼ（GUS；RefSeq ID：NM_000181.3）、トランスフェリン受容体（TFR；RefSeq ID：NM_001128148.1）、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（G3PDH；RefSeq ID：NM_002046）、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1（Hprt1；RefSeq ID：NM_000194）、ペプチジルプロリルイソメラーゼ（PPIA；RefSeq

10

20

30

40

50

q ID: NM_021130.3)、18s rRNA (RefSeq ID: NR_003286.2)などを含む。他の例では、対照は、例えば、O. Theilin ら, 1999, J. Biotechnol., 75 (2~3): 291~5に報告されている、アルブミン、チューブリン、シクロフィリン、L32、および28S rRNAなどの1つまたは複数のハウスキーピング遺伝子の発現レベルを含む。

【0066】

いくつかの場合では、開示された遺伝子の発現レベル（図1A～1Eの遺伝子シグネチャーに；表1に列挙された遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも10、または全て；または遺伝子セットRPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2）における遺伝子の少なくとも3つ、または全ての発現など）は、例えば、同じもしくは異なるがんまたは新生生物試料中の1つまたは複数のハウスキーピング遺伝子の発現レベルと比較して、正規化される。集約値は、いくつかの場合では、遺伝子のそれぞれ（例えば、遺伝子シグネチャーにおける遺伝子のそれぞれ）の発現のレベルを計算し、遺伝子が条件（例えば、MDM2i治療に対する感受性または生存リスクスコア）によって正にまたは負に制御されるかどうかに依存して、各遺伝子に関する正または負の加重を使用することによって得られる。ある場合では、遺伝子または遺伝子シグネチャーの正規化された発現、または集約値は、がんまたはがんのタイプのセットに関して、遺伝子または遺伝子シグネチャーの正規化された発現中央値と、または集約値と比較して、増加したまたは減少したと決定される。ある場合では、正規化された発現中央値または集約値は、白血病、リンパ腫、メラノーマ、または骨髄腫がんマイクロアレイデータセットなどの公的に入手可能なマイクロアレイデータセットから得られる。ある例では、遺伝子シグネチャーの発現遺伝子に関する正規化された発現中央値または集約値は、マイクロアレイデータセットを使用して決定される。

10

20

30

【0067】

いくつかの場合では、スコア（感受性スコア）は、正規化された発現レベル測定値から計算される。スコアは、MDM2iに対して感受性である、または感受性である可能性が低いがんもしくは腫瘍および/またはMDM2i治療もしくは療法に対するがんまたは腫瘍を有する対象の低、中、または高感受性などの様々なパラメーターを同定するためのカットオフポイントまたは値を提供するために利用され得る。いくつかの場合では、カットオフポイントは、訓練および検証データセットを使用して、しばしば決定される。他のある場合では、カットオフポイントは、MDM2i感受性データを伴わない訓練データセットのみを用いて決定される。例として、監督された手法が、例えば、レスポンダーおよび非レスポンダーにおける遺伝子シグネチャー発現を比較することによって、MDM2i治療に応答しないものから感受性であるもの（レスポンダー）を区別するカットオフを樹立するために利用され得る。別の例では、無監督の手法が、結果、すなわち、MDM2i治療に対する感受性を予測するカットオフレベル（例えば、上位50%対下位50%、または上位三分位値対下位三分位値）を経験的に決定するために利用され得る。訓練セットにおいて決定されたカットオフは、1つまたは複数の独立的な検証データセットにおいて試験され得る。

30

40

【0068】

「診断する」という用語は、外部試験、評価および分析の使用にしばしば関わる、徵候または症状による疾患または状態の認識または同定を表す。疾患または状態の診断は、疾患または状態を同定するための結論を下すおよび出すことを含む手順の全体の結果として生じる。本発明によれば、MDM2iに対する患者のがんまたは腫瘍の感受性、および患者がMDM2i治療に応答するという見込みは、遺伝子シグネチャー内の遺伝子の発現レベルが測定される記載された方法の実行によって診断され得る。様々な実施形態では、図1A～1Eの遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全ての発現レベルが測定される；または遺伝子シグネチャー遺伝子BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、S

50

P C S 1 、 P R P F 8 、 R C B T B 1 、 S P A G 7 、 T I M M 2 2 、 T N F R S F 1 0 B 、 A C A D S B 、 D D B 2 、 F A S 、 G D F 1 5 、 G R E B 1 、 P D E 1 2 、 P O L H 、 C 1 9 o r f 6 0 、 H H A T 、 I S C U 、 M D M 2 、 M E D 3 1 、 M E T R N 、 P H L D A 3 、 C D K N 1 A 、 S E S N 1 および X P C の少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つ、または全ての発現が測定される；遺伝子シグナチャー遺伝子 M D M 2 、 C D K N 1 A 、 Z M A T 3 、 D D B 2 、 F D X R 、 R P S 2 7 L 、 B A X 、 R R M 2 B 、 S E S N 1 、 C C N G 1 、 X P C 、 T N F R S F 1 0 B および A E N の少なくとも 3 つまたは全ての遺伝子発現；または遺伝子シグネチャー遺伝子 R P S 2 7 L 、 F D X R 、 C D K N 1 A および A E N (および場合により M D M 2) の少なくとも 3 つ、または全ての発現が測定される。例として、 M D M 2 i 感受性を示す試験を受けている対象のがんまたは腫瘍試料中の遺伝子シグネチャー遺伝子の発現は、そのがんまたは腫瘍が M D M 2 i 治療に対して感受性であるものとして対象を診断するのに役立つ。

10

【 0 0 6 9 】

本明細書では、「差次的に発現した」は、 R N A (例えば、 m R N A) への遺伝子コード情報 (M D M 2 i 感受性と関連する遺伝子など) の変換および / またはタンパク質への m R N A の変換の増加または減少などの発現の差異または改変を表す。ある場合では、差異または改変は、対照または基準値と、または対照もしくは基準値の範囲、例えば、 M D M 2 i 治療に対する優れた応答または貧弱な応答を有する対象の群 (例えば、 M D M 2 i 感受性対 M D M 2 i 非感受性集団) などの対象の群または集団の平均発現と比較したものである。ある場合では、差異または改変は、同じ対象または健康な対象からの非腫瘍組織と比較したものとすることができます。差次的発現の検出は、 M D M 2 i 感受性と関連する図 1 A ~ 1 E の遺伝子シグネチャー遺伝子の少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つの発現の変化などの遺伝子またはタンパク質発現の変化を測定することを含み得る。

20

【 0 0 7 0 】

遺伝子産物の発現を検出すること、および遺伝子産物の差次的発現を検出することは、当技術分野で公知の 1 つまたは複数の適した手段によって、例えば、マイクロアレイ分析、 P C R (R T - P C R) 、免疫組織化学的検査、免疫蛍光法、質量分析、ノーザンプロット、ウエスタンプロットなどによって、試料中の核酸またはタンパク質の発現のレベルを定性的にまたは定量的に測定または決定することを表す。

30

【 0 0 7 1 】

「 M D M 2 i 」という用語は、本発明による使用に適したいくつかの低分子量 M D M 2 阻害剤を包含する。より明確には、 M D M 2 阻害剤は、化合物 A (W O 2 0 1 0 / 0 8 2 6 1 2 の実施例 6 および米国特許第 8 , 4 0 4 , 6 9 1 号の実施例 6 : [(5 R , 6 S) - 5 - (4 - クロロ - 3 - フルオロフェニル) - 6 - (6 - クロロピリジン - 3 - イル) - 6 - メチル - 3 - (プロパン - 2 - イル) - 5 , 6 - ジヒドロイミダゾ [2 , 1 - b] [1 , 3] チアゾール - 2 - イル] [(2 S , 4 R) - 2 - { [(6 R) - 6 - エチル - 4 , 7 - ジアザスピロ [2 . 5] オクタ - 7 - イル] カルボニル } - 4 - フルオロピリジン - 1 - イル] メタノンを参照されたい) ならびにその塩および水和物；ならびに化合物 B (W O 2 0 1 2 / 1 2 1 3 6 1 の実施例 7 0 および米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 2 6 4 7 3 8 A 号の実施例 7 0 : (3 ' R , 4 ' S , 5 ' R) - N - [(3 R , 6 S) - 6 - カルバモイルテトラヒドロ - 2 H - ピラン - 3 - イル] - 6 " - クロロ - 4 ' - (2 - クロロ - 3 - フルオロピリジン - 4 - イル) - 4 , 4 - ジメチル - 2 " - オキソ - 1 " , 2 " - ジヒドロジスピロ [シクロヘキサン - 1 , 2 ' - ピロリジン - 3 ' , 3 " - インドール] - 5 ' - カルボキサミドを参照されたい) およびその p トルエンスルホン酸塩を含めたその塩を含む。

40

【 0 0 7 2 】

M D M 2 - p 5 3 結合部位を標的にする M D M 2 阻害剤の例が報告されており、スピロオキシンドール誘導体 (W O 2 0 0 6 / 0 9 1 6 4 6 、 W O 2 0 0 6 / 1 3 6 6 0 6 、 W O 2 0 0 7 / 1 0 4 6 6 4 、 W O 2 0 0 7 / 1 0 4 7 1 4 、 W O 2 0 0 8 / 0 3 4 7 3 6 、 W O 2 0 0 8 / 0 3 6 1 6 8 、 W O 2 0 0 8 / 0 5 5 8 1 2 、 W O 2 0 0 8 / 1 4 1

50

917、WO 2008/141975、WO 2009/077357、WO 2009/080488、WO 2010/084097、WO 2010/091979、WO 2010/094622、WO 2010/121995；J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 10130~10131；J. Med. Chem., 2006, 49, 3432~3435；およびJ. Med. Chem., 2009, 52, 7970~7973；インドール誘導体(WO 2008/119741)；ピロリジン-2-カルボキサミド誘導体(WO 2010/031713)；ピロリジノン誘導体(WO 2010/028862、WO 2010/031713、WO 2011/061139、WO 2011/098398、WO 2012/34954、WO 2012/076513)；イソインドリノン誘導体(WO 2006/024837；およびJ. Med. Chem., 2006, 49, 6209~6221)；および他のもの(WO 2011/076786、WO 2012/175487、WO 2012/175520、WO 2012/066095およびWO 2011/046771)を含む。

【0073】

記載された発明による使用のための好ましいMDM2i化合物の例は、化合物A(WO 2010/082612の実施例6および米国特許第8,404,691号の実施例6)；化合物B(WO 2012/121361の実施例70および米国特許出願公開第2012/0264738A号の実施例70)；CGM097；RG7388；MK-8242(SCH900242)；MI-219；MI-319；MI-773；MI-888；Nutlin-3a；RG7112(R05045337)、(Y. Yuanら, 2011, J. Hematol. Oncol., 4:16)；ベンゾジアゼピンジオン、例えば、TDP521252およびTDP665759；ならびにイソキノリノン、例えば、PXN727およびPXN822(Y. Yuanら, 2011, J. Hematol. Oncol., 4:16；S. Wangら, Top Med Chem 8:57~80, 2012；およびQ. Dingら, J. Med Chem 2013)を含む。スピロオキシインドール含有化合物、ビペリジノン含有化合物、1,4-ジアゼピン化合物、またはイソインドリノン化合物、およびその塩などのMDM2-p53相互作用の他の小分子阻害剤は、例えば、Y. Zhaoら, 2013, BioDiscovery, 8(4):1~15に報告されている。

【0074】

「予後」という用語は、その疾患または状態の通常の経過から予測される、または対象によって表される特別な特色によって示される、疾患または状態からの予期される生存および回復の予測を表す。予後は、例えば、1つまたは複数の薬物または化合物に関わる所与の療法または治療レジメンに対する患者の応答または感受性に依存して、例えば、患者が所与の期間生存するまたは生存する可能性があることを決定することによって、特定の治療と関連する疾患の経過も予測し得る。したがって、MDM2iに対する患者のがんまたは腫瘍の感受性が記載されたMDM2i感受性遺伝子シグネチャーの遺伝子の発現レベルを測定することによって決定される本発明の方法の実行は、患者がMDM2i治療に応答するまたは応答する可能性があるという予後と関連する。様々な実施形態では、図1A~1Eの遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全ての発現レベルが測定される；または遺伝子シグネチャー遺伝子BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADSB、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1およびXPCの少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全ての発現が測定される；遺伝子シグネチャー遺伝子MDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAENの少なくとも3つまたは全ての発現；または遺

10

20

30

40

50

伝子シグネチャー遺伝子R P S 2 7 L、F D X R、C D K N 1 AおよびA E N（および場合によりM D M 2）の少なくとも3つ、または全ての発現が測定される。

【0075】

本明細書では、「対象」は、典型的に、ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含めた多細胞脊椎動物生物である。「対象」という用語は、個体という用語と本明細書で互換的に使用され得；しばしば、対象または個体は、がん、腫瘍、新生物形成、または新生物状態に罹患した患者である。したがって、本発明の実行は、ヒトおよび獣医学的使用に適している。

【0076】

「治療する」という用語は、一般的な意味では、所望の生理学的および／または薬理的効果を達成するまたは得ることを表し、予防的であるか、療法的であるか、またはその両方であるかを問わない。本明細書では、「治療すること」または「治療」は、非良性もしくは悪性がん、腫瘍、または新生物などの疾患状況、疾患進行、疾患原因物質、または他の異常な状態の有害な効果を予防する、阻害する、治癒させる、逆転させる、減弱する、緩和する、抑止する、最小化する、抑制する、低下させる、減らす、安定化させるまたは排除することを表すことができる。例えば、治療は、必ずしも症状の全てではないが、疾患の症状を緩和すること、または疾患の症状または進行を減弱することに関わる場合もある。がんの治療は、本明細書では、がん転移または悪性腫瘍を含めたがんの進行および／またはがん転移もしくは悪性腫瘍を含めたがんの再発を部分的または完全に阻害する、排除する、遅延させる、逆転させる、低下させる、または予防すること；または哺乳動物、特に、ヒトにおけるがんの発症または発生を予防することを表す場合がある。がんを治療することは、転移の発生を予防することによってまたは腫瘍負荷を小さくすることによってなど、腫瘍または新生物の完全な発生を阻害することを含む場合がある。

10

20

30

40

50

【0077】

それを必要とする対象の治療は、有効量または治療有効量の薬剤、薬物、または化合物、すなわち、本発明のM D M 2 iの使用または投与を典型的に含む。有効量は、対象への投与または送達時に対象における所望の応答を誘発する薬剤の数量（量）を表す。最適には、有効量は、対象において有害作用または細胞障害性がないか、または最低限からゼロで、または達成される治療的利益が有害作用に勝る治療的效果をもたらす。有効量の投与された薬剤に対する所望の応答は、例えば、所望のまたは意義ある量の、例えば、薬剤の非存在下での応答と比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも95%以上、または100%の腫瘍のサイズ、数、または体積の減少とすることができます。代わりに、所望の応答は、例えば、ここでも上記の所望のまたは意義ある百分率量の生存時間または無進行生存の時間の増加であってもよい。

【0078】

「治療結果」に関して、本発明の方法は、M D M 2 iでの治療の結果の予測を助ける。つまり、がんまたは腫瘍試料中の本明細書に記載の遺伝子シグネチャーの遺伝子のいくつか（例えば、少なくとも3つまたは少なくとも4つ）、または全ての発現の検出は、M D M 2 iでの治療時の結果を予測する。結果の定量化は、M D M 2 iでの治療に対する客観的応答、臨床応答、または病理学的応答とすることができます。例えば、結果は、Therassera, 2000, New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors, J. Natl. Cancer Inst. 92(3): 205~207に報告されている固形腫瘍の治療に対する応答を評価するための技法を利用することによって決定され得る。結果を決定するためのかかる技法は、生存（全体的な生存または生存の持続時間を含めた）、無進行間隔、または再発後の生存を評価または測定することを含んでもよい。これらの事象のタイミングまたは持続時間は、おおよそ診断の時間から、またはおおよそM D M 2 iでの治療の開始の時間から決定され得る。代わりに、結果は、腫瘍サイズ、腫瘍体積、または腫瘍代謝の低下に基づき得る、またはそれは、特に、かかるマーカーが疾患状

況（例えば、P S A）において上昇する場合、全体的な腫瘍負荷評価、または血清マーカーのレベルに基づき得る。したがって、結果は、M D M 2 iに対する完全応答（C R）、M D M 2 iに対する部分応答（P R）、安定疾患（S D）、および進行性疾患（P D）と特徴付けられ得るが、これらの用語は慣習的に当技術分野で公知である。

【0079】

本明細書では、「治療に対する感受性」は、最初の、いくつかの場合ではそれに続くまたは進行中の療法または治療に対して応答性である疾患または状態、例えば、がんまたは腫瘍に関する。例として、最初の、それに続く、または進行中の療法または治療に対して統計的に有意に応答性である疾患または状態は、治療に対する感受性を提示すると考えられる。感受性は、治療薬もしくは薬物、例えば、M D M 2 iなどの治療薬もしくは薬物に対する、または薬剤の併用、例えば、1つもしくは複数のM D M 2 阻害剤、および／もしくは他の抗がん薬物の組合せに対する疾患、症状、またはがんもしくはがん細胞の成長などのその進行の応答性を表し得る。例えば、増加した（相対的な）感受性は、がんが、治療に対して感受性でないがんと比較して、所与の療法または治療薬または治療に対してより応答性である状況を表す。

10

【0080】

本明細書では、「感受性スコア」という用語は、試料から得られるスコアであり、M D M 2 i 治療に対する試料の感受性を反映するスコアを言う。感受性スコアは、閾値と比較され、M D M 2 i 治療に対して感受性であるか否かを決定することができる。感受性スコアは、以下に記載される通り、当業者に公知の様々な統計学的手法により得られ得る。

20

【0081】

本明細書では、「閾値」、「カットオフ値」および「カットオフポイント」という用語は、対象の試料の感受性スコアが比較される境界値を意味し、これらは相互互換的に用いられる。対象の試料の感受性スコアが閾値を超える場合には、試料は、M D M 2 i 治療に対して感受性であると予測され得る。対象の試料の感受性スコアが閾値を下回る場合には、試料は、M D M 2 i 治療に対して耐性であると予測され得る。対象の試料の感受性スコアが閾値と同じである場合には、試料は、M D M 2 i 治療に対して感受性であるとも耐性であるとも予測され得る。

【0082】

本明細書では、「訓練セット」という用語は、閾値を決定するために用いられる試料のセットを言う。本明細書では、「試験セット」という用語は、試料のセットにおける各試料がM D M 2 i 治療に対して感受性であるか否かを予測するために本発明の方法に供される試料のセットを言う。訓練セットは、M D M 2 i 治療に対する感受性が知られている試料、M D M 2 i 治療に対する感受性が不明である試料、またはこれらの組合せからなっていてよい。訓練セットは、M D M 2 i 治療に対する感受性が不明である試料のみからなっていてもよいし、後述するようにM D M 2 i 治療に対する感受性が知られた試料との組合せからなっていてもよい。

30

【0083】

本明細書では、「参照スコア」という用語は、訓練セットのそれぞれの試料から得られた感受性スコアを意味し、対象の感受性スコアが計算されるのと同じ方法で計算されうる。閾値は、下記の通り、統計学的手法により訓練セットから得られた参照スコアの分布に基づいて決定され得る。

40

【0084】

統計分野では、閾値が高くなるほど、偽陽性率が低下し、閾値が低くなるほど、偽陰性率が低下する。従って、当業者であれば、本明細書に基づいて閾値を容易にかつ適切に決定することができる。例えば、M D M 2 i 投与に供されるM D M 2 i の非レスポンダー数を減らすことが望まれるならば、閾値を増大させることができる。閾値を増大させると、より多くのレスポンダーがM D M 2 i 治療に供される対象群から除外されるであろう。M D M 2 i 投与に供されるM D M 2 i 応答者数を増加させることが望まれるならば、閾値を低下させることができる。閾値を低下させると、より多くの非レスポンダーがM D M 2 i

50

治療に供される対象群に含まれるであろう。

【0085】

本明細書では、「レスポンダー」という用語は、MDM2i治療に応答する対象を言う。本明細書では、「非レスポンダー」という用語は、MDM2i治療に有意な応答を示さない対象を言う。

【0086】

ある場合では、がんまたは腫瘍の感受性または応答性は、これらに限定されないが、(i)成長速度低下、進行の低下、および完全な成長停止を含めたがん、腫瘍、または新生物成長の阻害の程度；(ii)がん、腫瘍、または新生物細胞の数の低下；(iii)がん、腫瘍、もしくは新生物サイズまたは体積の低下；(iv)隣接する末梢器官および/または組織中へのがん、腫瘍、または新生物細胞浸潤の阻害、例えば、低下、縮小、または完全な休止；(v)転移の阻害、例えば、低下、縮小、または完全な休止；(vi)がん、腫瘍、または新生物の退縮または拒絶を最適にもたらす抗がん、腫瘍、または新生物免疫応答の増強；(vii)がん、腫瘍、または新生物と関連する1つまたは複数の症状のある程度の軽減、；(viii)治療後の生存の持続時間/生存時間の長さの増加；および/または(ix)治療の開始または維持後の減少した死亡率を含めた、対象への利益を示す任意のパラメーターまたはエンドポイントを使用して、評価することができる。10

【0087】

実施形態の記述

MDM2i感受性を予測する遺伝子シグネチャー

本明細書に記載のMDM2阻害剤に対する、または類似した活性を有する化合物に対するがんおよび腫瘍の感受性を予測するための遺伝子シグネチャーおよびバイオマーカーの同定が本発明によって提供される。遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の発現は、MDM2阻害剤に対して感受性であるがんを示すので、かかる遺伝子シグネチャーは、「MDM2i遺伝子感受性シグネチャー」とも称される。対象からのがんもしくは腫瘍試料または検体中の遺伝子感受性シグネチャーにおける発現された遺伝子の同定は、対象、すなわち、対象のがんまたは腫瘍がMDM2i曝露、治療、または療法に対して感受性であるということを予測する。さらに、遺伝子感受性シグネチャーにおける発現された遺伝子の同定は、対象のがんまたは腫瘍を治療するために使用するMDM2iの治療有効量またはMDM2i治療レジメンを判断するおよび決定するために使用することができる。20

【0088】

ある実施形態では、試験を受けている対象からのがんまたは腫瘍試料中の本発明の遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の発現の検出または測定は、MDM2iを用いる療法に対する対象の応答または感受性に関する有益または陽性である可能性がある治療結果または予後を示す。ある実施形態では、遺伝子シグネチャーは、その発現ががんまたは腫瘍を有する対象におけるMDM2-p53相互作用に及ぼすまたは関連するシグナル伝達経路に及ぼすMDM2i治療薬の薬力学的効果と相關する遺伝子を含む。30

【0089】

本発明の遺伝子シグネチャーは、本明細書で定義した小分子MDM2i、化合物Aに対して感受性であるマルチがん細胞株パネル；すなわち、小分子MDM2iに対して感受性ではないがん細胞株と比較して、ある閾値またはp値未満の小分子阻害剤に関するIC₅₀を提示した細胞株のパネルにおいて差次的に発現した遺伝子の同定によって、前臨床適用において得られた。ある例では、差次的発現分析結果は、スチューデント2クラスt検定によるp値による遺伝子のランク付けを可能にした。次いで、細胞株遺伝子シグネチャーデータを、臨床データセットにおける前もって指定された発現、分散および相関閾値を満たす感受性シグネチャー遺伝子の中心的なセットの同定を通して、臨床適用、例えば、がんを有する患者および個体からの組織および細胞試料に関連づけた。(例えば、実施例1および2を参照されたい)。さらに、正常、前臨床および臨床系における野生型TP53を有する腫瘍において上昇し、非がん性細胞および組織と比較して、がん細胞および組織における増加した発現を有した遺伝子を選択した。40

【0090】

より具体的には、177遺伝子をマルチがん細胞株パネル（図1A～1E）から得られたデータから同定した；これらの遺伝子の164を、性染色体によってコードされる遺伝子を除外した後、選択した。遺伝子の数を本来の177遺伝子シグネチャーとのそれらの相関および>28,000臨床検体を含有するU133 Based Expression Reference (Compendia Bioscience, Inc.、Ann Arbor、MI)による目的のがんのタイプ（7腫瘍タイプ）における変動しうる発現に基づいてさらに139に低下させた。これらの139遺伝子のうち、表3に示された38を発現に関するそれらのTP53への依存に基づいて選択した。これらの38遺伝子の37（すなわち、PEBP1を除く表3に示された遺伝子）は、正常組織と比較して、がんにおける上方制御された発現を示した。p53の下流エフェクターである3つの遺伝子、つまり、CDKN1A、SENSN1およびXPCを37遺伝子のこのセットに追加し、これは、表1に示された40遺伝子の最終的な中心的遺伝子セットを構成する。

10

【0091】

本発明に従って、図1A～1E、表1の遺伝子シグネチャー内の少なくとも3つの遺伝子、またはRPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN遺伝子を含有する遺伝子セットは、MDM2iに対するがんまたは腫瘍試料の感受性の予測的バイオマーカーとすることができることが見出された。好ましくは、RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAENを含有する遺伝子セットの少なくとも3つの遺伝子は、MDM2iに対するがんまたは腫瘍試料の感受性の予測的バイオマーカーとすることができます。

20

【0092】

本発明の実施形態によって、がんまたは腫瘍試料中のその中の遺伝子の差次的発現（一般に、増加した発現）がそのがんまたは腫瘍試料のMDM2i感受性を予測する図1A～1Eに示された177遺伝子バイオマーカーを含有する遺伝子シグネチャーが提供される。この遺伝子シグネチャーの遺伝子構成要素のいくつかまたは全ての差次的発現は、MDM2iに対するがんまたは腫瘍試料の感受性を予測し示す。一部の実施形態では、図1A～1Eの遺伝子シグネチャー内の遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全ての発現は、MDM2iに対するがんまたは腫瘍試料の感受性を予測する。一部の実施形態では、図1A～1Eの遺伝子シグネチャー内の遺伝子の少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、10、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、20、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、または177の発現は、MDM2iに対するがんまたは腫瘍試料の感受性を予測し、本発明の遺伝子シグネチャー発現分析においてアッセイされる。ある実施形態では、この遺伝子シグネチャーの遺伝子のいくつかまたは全ては、対照と比較して、がんまたは腫瘍試料中の増加した発現を有する。実施形態では、MDM2iは、本明細書で定義された、化合物Aおよびその塩、または化合物Bおよびその塩である。図1A～1Eの遺伝子シグネチャーは、対照と比較した、MDM2i治療に対して感受性であるがんまたは腫瘍細胞中の差次的（例えば、増加したまたは上昇した）

30

40

50

発現を示す遺伝子を含む。

【0093】

一部の実施形態では、対照または標準値と比較した、がんもしくは腫瘍における、またはがんもしくは腫瘍からの試料中の表1に示された遺伝子シグネチャー内の遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも31、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、少なくとも38、少なくとも39、または少なくとも40の発現、例えば、増加した発現がMDM2iの感受性を予測する。ある実施形態では、標準値は、MDM2阻害剤に対する公知の感受性または耐性を有する細胞株でのアッセイから生成される。ある実施形態では、MDM2i感受性は、本明細書で定義された、化合物Aおよびその塩でのまたは化合物Bおよびその塩での治療に関する。

【0094】

【表1】

表1

遺伝子記号	p値
RPS27L	0.00E+00
FDXR	0.00E+00
CDKN1A	0.00E+00
AEN	1.25E-14
SESN1	1.22E-12
TRIAP1	1.29E-12
DDB2	1.91E-12
XPC	3.41E-10
C12orf5	1.46E-09
BAX	2.67E-09
PHLDA3	3.15E-08
ZMAT3	5.34E-08
MDM2	4.54E-07
C1QBP	1.12E-06
SPAG7	1.75E-06
TNFRSF10B	3.79E-06
SLC25A11	1.11E-05
SPCS1	1.63E-05
GRSF1	2.27E-05
GAMT	2.43E-05
RCBTB1	4.33E-05
GDF15	4.63E-05
C19orf60	5.94E-05
STX8	1.21E-04
MED31	1.33E-04
POLH	1.36E-04
GREB1	1.91E-04
ACADSB	2.84E-04
PDE12	3.49E-04
EIF2D	3.53E-04
TIMM22	3.64E-04
FAS	4.76E-04
TP53	4.83E-04
HHAT	5.46E-04
TSFM	5.55E-04
MPDU1	5.62E-04
ISCU	5.79E-04
METRN	5.89E-04
DISC1	1.07E-03
PRPF8	1.17E-03

10

20

30

40

【0095】

50

本発明は、がんまたは腫瘍試料中のその発現が M D M 2 i に対するがんまたは腫瘍の感受性を示す以下の遺伝子 R P S 2 7 L、F D X R、C D K N 1 A および A E N の少なくとも 3 つ、または全てを含むまたはこれらからなる遺伝子シグネチャーをさらに包含する。ある例では、M D M 2 i は、本明細書で定義された、化合物 A およびその塩または化合物 B およびその塩である。他の実施形態では、M D M 2 i は、スピロオキシンドール誘導体、インドール誘導体、ピロリジン-2-カルボキサミド誘導体、ピロリジノン誘導体、イソインドリノン誘導体、またはイミダゾチアゾール誘導体から選択される。他の実施形態では、M D M 2 i は、C G M 0 9 7、R G 7 3 8 8、M K - 8 2 4 2 (S C H 9 0 0 2 4 2)、M I - 2 1 9、M I - 3 1 9、M I - 7 7 3、M I - 8 8 8、N u t l i n - 3 a、R G 7 1 1 2 (R O 5 0 4 5 3 3 7)、T D P 5 2 1 2 5 2、T D P 6 6 5 7 5 9、P X N 7 2 7、または P X N 8 2 2 の 1 つまたは複数である。10

【 0 0 9 6 】

本発明の遺伝子シグネチャー内の遺伝子の発現は、当業者に公知の任意の適した手段を使用して検出され得る。例として、遺伝子発現の検出は、マイクロアレイを含めたアレイ分析を行なうことによって、および R T - P C R を使用することによって行なわれ得る。遺伝子発現を検出する追加の方法は、当技術分野で公知であり、以下で詳細に記載されている。M D M 2 i 感受性遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の差次的発現（発現の増加または減少など）は、対照と比較した、M D M 2 i および / または M D M 2 i 治療に対する感受性と相関している任意の測定可能な増加または減少とすることができる。20

【 0 0 9 7 】

本発明は、コンパニオン診断としての M D M 2 阻害剤に対するがんまたは腫瘍試料の感受性を示す遺伝子シグネチャーをさらに提供し、これは、がんを有する個体のがん治療、療法レジメン、またはプログラムを監督している医師または臨床家によって使用され得る。コンパニオン診断は、内科医および臨床医（例えば、腫瘍専門医）ならびに医療従事者が療法、特に、M D M 2 i を含む療法に対する最良の応答に基づいてこれらの患者の治療の決定を行なうのを補助し得る。コンパニオン診断は、薬物開発プロセスも補助し得、より安全で、より対費用効果が高く、薬物の特定の型、形、またはクラスから利益を得ることになるもののためのより良い治療効力を有する薬物候補のより迅速な商業化につながる。本発明の遺伝子シグネチャーの使用は、M D M 2 i の投与に関わる治療経過が、個体に有益であるように、がんまたは腫瘍のサイズ、成長、増殖、存在などを低下させる、減らす、軽減する、排除する、抑止する、またはさもなければこれらに影響するかどうかの観点から個体のためになりそうであるかどうかの決定を補助し得る。したがって、コンパニオン診断は、M D M 2 i での様々なタイプのがんおよび腫瘍の治療の決定と一緒に利用される場合、有益で有利であり得る。30

【 0 0 9 8 】

M D M 2 i 感受性遺伝子シグネチャーの使用を含む方法

本発明は、一般に、M D M 2 i での治療が肯定的な結果をもたらすことになるように、がんまたは腫瘍に罹患した個体が M D M 2 i での治療に対して感受性であるかどうかを同定する、決定する、または予測する方法を提供する。方法は、個体の生物学的試料、例えば、がんもしくは腫瘍組織または細胞試料が、対照と比較して、M D M 2 i に対する感受性を示す本明細書に記載の遺伝子感受性シグネチャーの遺伝子を差次的に発現するかどうかの評価に関わる。肯定的な結果は、がんまたはがん細胞の低下、減少、排除、または寛解、およびがん細胞のアポトーシスまたは死の 1 つまたは複数を含し得る。より低い、低下した、または小さくなった腫瘍量も、M D M 2 i 治療の肯定的な結果を示す。40

【 0 0 9 9 】

ある実施形態では、本発明は、個体が M D M 2 i 治療の結果として肯定的な結果を有する可能性があることを決定した後、M D M 2 i でがんまたは腫瘍を有する個体を治療する方法も提供する。方法は、個体に、がんまたは腫瘍を治療するのに治療的に有効な量で、効果的な期間、1 つまたは複数の M D M 2 阻害剤を投与することに関わる。がんまたは腫瘍を有する個体から得られた試料中の本発明の M D M 2 i 遺伝子感受性シグネチャーにお50

ける遺伝子の差次的発現の最初の決定、およびその後の MDM2i での個体の治療は、MDM2i 治療の肯定的な結果と相關する。

【0100】

ある実施形態では、本発明は、がんまたは腫瘍を有する個体が MDM2i での治療によって利益を得る、またはこれに好ましく応答するかどうかを、がんまたは腫瘍を有する個体から得られた試料中の本発明の MDM2i 遺伝子感受性シグネチャーにおける遺伝子の発現を測定することによって予後診断する方法も提供する。したがって、MDM2i 治療に対するがんまたは腫瘍の感受性は、がんまたは腫瘍（またはかかる病態を有する個体）が治療に応答する可能性があるかどうかを決定するために、MDM2i での治療が始まる前に評価される。遺伝子シグネチャーの遺伝子が個体のがんまたは腫瘍試料中で発現されることを決定することは、例えば、試料中の遺伝子発現が、前もって指定された閾値を超えており、がんまたは腫瘍が MDM2i 療法に対して感受性であることを示し予測する、遺伝子感受性シグネチャーから計算された感受性スコアまたは評点を有することを決定することを含み得る。方法の一部の実施形態では、治療を受けている個体に投与される MDM2i は、本明細書で定義された化合物の 1つまたは複数である。特定の実施形態では、MDM2i は、化合物 A およびその塩、または化合物 B およびその塩である。

【0101】

ある実施形態では、感受性スコアの使用は、スコアが、がんまたは腫瘍が MDM2i に対して感受性であるかどうかを定義するための基礎として使用することができ、したがって、MDM2i 感受性がんまたは腫瘍を有する個体が MDM2i 治療に好ましく応答することを予測し得るので、有利であり得る。例えば、MDM2i に対するがんまたは腫瘍試料の感受性を示す感受性スコアの決定に基づいて、医師は、がんまたは腫瘍を有する患者を MDM2i 薬剤または化合物で治療することを選択し得る。あるいは、がんまたは腫瘍試料の MDM2i に対する非感受性を示す感受性スコアの決定に基づいて、医師は、患者が MDM2i 治療から臨床的または医学的利益を受けないと予測されるので、がんまたは腫瘍を有する患者を MDM2i 薬剤または化合物で治療しないことを選択し得る。患者のがんまたは腫瘍の試料が、がん薬物治療または療法の経過中に MDM2i 感受性に関して評価される場合、MDM2i 感受性を示す感受性スコアは、医師が患者のがんもしくは腫瘍治療または療法を継続するもしくは改変するおよび / または MDM2i で治療することを決定するのを補助し得る。

【0102】

本発明によれば、各試料の感受性スコアおよび対象の感受性を予測するための閾値は、MDM2i 治療への感受性が不明である試料からも得られ得る。例え MDM2i 治療への感受性が試料の特定の群において全くまたはほとんど不明であったとしても、本発明ではその対象の MDM2i 治療への感受性が予測し得るため、このことは本発明の非常に重要な特徴の 1つである。例えば、MDM2i の感受性についてのヒト臨床試験データは入手可能ではない。従って、MDM2i 治療に対して誰が耐性であるのか、または誰が MDM2i 治療により処置されるべきでないのかは、誰にも分からないのである。しかし、ある態様では、本発明は、MDM2i 治療への感受性が不明である試料を用いて、対象（好ましくは、ヒト対象）の MDM2i 治療への感受性を予測する方法を提供する。

【0103】

ある実施形態では、閾値は試料の感受性スコアの分布から決定されるが、ここで、この試料の少なくとも一部または全ての MDM2i 治療への感受性は不明である。特に、感受性スコアと閾値は、スコア外挿法、混合ガウスモデル、及びその他の当業者に既知のモデルなどの統計手法を用いて得られ得る。この実施形態においては、閾値が決定される試料の 50 % を超えて、60 % を超えて、70 % を超えて、80 % を超えて、90 % を超えて、または 100 % が、その MDM2i 治療への感受性が不明である試料であり得る。

【0104】

スコア外挿モデルにおいては、試料の感受性スコアは当該試料における各遺伝子の発現レベルの正規化スコア（「標準スコア」、「Z - 値」、「Z - スコア」、「正規スコア」

10

20

30

40

50

または「標準化変数」とも呼ばれる)を合計することにより求められ得るが、以下の式:(正規化スコア)= { (遺伝子発現の生の値) - (分布の平均) } / (分布の標準偏差)から算出することができる。本発明によれば、閾値は、MDM2i治療への感受性が不明である試料から、受信者動作特性(ROC)曲線をプロットすること、および場合によって一個抜き交差検証(LOOCV)解析を行うことにより決定することもできる。ある実施形態では、閾値は、ROC曲線のYouden指数±0.3、±0.2、±0.1の範囲内またはYouden指数であってよく、-0.2~0.5の間、好ましくは-0.02~0.2の間の範囲であってもよく、より好ましくは約-0.02、約0.14または約0.2であってもよい。他の実施形態では、ROC曲線上の真陽性率が1であり、偽陰性率が0である場所に最も近くに位置する点のカットオフ値とすることもできる。ある実施形態では、閾値は、周知のクラスタリングに基づく画像閾値決定法であり、「大津閾値」としても知られる大津法(M. Sezgin and B. Sankur (2004), Journal of Electronic Imaging 13 (1): 146-165, および N. Otsu (1979), IEEE Trans. Sys., Man., Cyber. 9 (1): 62-66参照)などの二値化アルゴリズムによって決定することもできる。ある実施形態では、ステップd)において、閾値が試料中のTP53変異型試料の参照スコアの第3四分位値と最大値との間の範囲であるか;または、閾値が試料中のTP53野生型試料の参照スコアの第1四分位値と最小値との間の範囲である。他の実施形態では、ステップd)において、閾値は、試料中のTP53変異型試料の参照スコアの第3四分位値または最大値として決定してもよい。あるいは、他の実施形態では、閾値は、試料中のTP53野生型試料の参照スコアの第1四分位値または最小値として決定してもよい。試料は、閾値よりもその感受性スコアが高い場合には感受性であると予測され、閾値よりもその感受性スコアが低い場合には耐性であると予測される。本明細書で用いられる用語「第1四分位」および「第3四分位」はそれぞれ、下位25%値および上位25%値を意味する。

【0105】

混合ガウスモデルでは、感受性スコアは、下記の通りに2つのガウス分布をまず決定することにより算出することができる。混合ガウスモデルを生成するために、C. Fraley et al. (Technical Report no. 597, Department of Statistics, University of Washington, June 2012.)により開発された商用利用可能な'mclust'パッケージ(バージョン4.3)をR統計学ソフトウェア(バージョン3.0.2)上で用いることができる。特に、混合ガウスモデルは以下のように生成することができる。感受性細胞株および耐性細胞株からなる細胞株パネルにおいて、シグネチャー遺伝子のmRNA発現の分布は、感受性細胞株に由来する分布と耐性細胞株に由来する分布の混合として記述することができる。分布が正規分布であると想定すれば、混合分布は、混合ガウスモデル:

【数1】

$$p(x|\lambda) = \sum_{i=1}^2 \omega_i g(x|\mu_i, \sigma). \quad (1)$$

{式中、 λ は、パラメーターセット: $\lambda = \{\omega_i, \mu_i, \sigma\}$ 、 $i = 1, 2$ であり、かつ、 ω_i 、 $i = 1, 2$ は、混合重み付け値であり、 $g(x|\mu_i, \sigma)$ 、 $i = 1, 2$ は、ガウス密度成分である。}により記述される。それぞれの密度成分は、平均値 μ_i 、 $i = 1, 2$ を伴う、

【数2】

$$g(x|\mu_i, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{(x-\mu_i)^2}{2\sigma^2}\right), \quad i = 1, 2, \quad (2)$$

の形態のガウス関数である。便宜的に μ_1 は、 $\mu_1 < \mu_2$ の制約を満たすものとする。標準偏差 σ は、感受性細胞株および耐性細胞株の間で共通している、すなわち $\sigma_1 = \sigma_2$ と仮定する。各パラメーターは、最尤推定法(これは訓練データが与えられたモデルの尤度

10

20

30

40

50

を最大化するモデルのパラメーターを見つけることである)により、推定することができる。訓練ベクトル $X = \{x_1, \dots, x_T\}$ の配列に対して、尤度は、

【数3】

$$p(X|\lambda) = \prod_{t=1}^T p(x_t|\lambda). \quad (3)$$

と記載できる。最大尤度パラメーターは、期待値最大化(EM)アルゴリズムにより得ることができる。EMアルゴリズムの基本的アイデアは、

【数4】

$$p(X|\hat{\lambda}) \geq p(X|\lambda)$$

となるように、新しいパラメーター

【数5】

$$\hat{\lambda}$$

10

20

を前のパラメーター λ から推定することである。 $\hat{\lambda}$ は、尤度が極大値に収束するまで繰り返し更新される。

混合ガウスモデルにおいては、閾値は、各種方法により得ることができる。その発現が細胞が感受性であることを示す遺伝子の数は、閾値の決定に有用であり得る。M種類の遺伝子に対して、各遺伝子の発現を、 $c_m, m = 1, \dots, M$ と記述すると、遺伝子 m のクラスは、

【数6】

$$c_m = \operatorname{argmax}_i \{ \omega_i g(x_m | \mu_i, \sigma) \}, \quad i = 1, 2, \quad m = 1, \dots, M, \quad (4)$$

30

{式中、 c_m は、1 または 2 であり、 $c_m = 1$ のとき遺伝子は「低い」(lower)、 $c_m = 2$ のとき「高い」(upper)と呼ばれる}により記述できる。変数:

【数7】

$$u_m^{c_m} = \begin{cases} 0, & c_m = 1 \\ 1, & c_m = 2 \end{cases}, \quad (5)$$

40

は、遺伝子 m が属するクラスを記述するために導入され、「高い方の比率」(upper ratio)は、

【数8】

$$(upper ratio) = \frac{\sum_{m=1}^M u_m^{c_m}}{M}. \quad (6)$$

により与えられる。ある実施形態では、MDM2 阻害剤に対する感受性スコアの閾値は、

50

高い方の比率（upper ratio）（6）を参照することにより決定することができる。例えば、閾値は、試料から選択されたTP53変異型試料の高い方の比率（upper ratio）の第3四分位または最大値のレベルとして決定することができる。代わりに、閾値は、試料から選択されたTP53野生型試料の高い方の比率（upper ratio）の第1四分位または最小値のレベルとして決定することもできる。試料は、その高い方の比率が閾値よりも高ければ感受性であると予測され、その高い方の比率（upper ratio）が閾値よりも低ければ耐性であると予測される。

【0106】

スコア分布モデルでは、閾値は、各遺伝子のスコア分布ヒストグラムの形状に基づいて得ることができる。ある実施形態では、閾値は、スコア分布が谷間（すなわち、ヒストグラムの凹状部の最も低い部分）を形成する場所のスコア値に基づいて、好ましくは大津法により決定することができる。ある実施形態では、スコア分布ヒストグラムは、分析された遺伝子の発現レベルから算出されるZ-スコアを合計することによって得ることができる。試料は、そのスコアが閾値よりも高い場合には感受性であると予測され、そのスコアが閾値よりも低い場合には耐性であると予測される。スコア分布モデルでは、代わりに、閾値は、全てのスコアがTP53野生型試料から得られている場合にはスコア分布ヒストグラムから決定することができ、好ましくは、スコアの第1四分位として決定することができる。

【0107】

ある実施形態では、閾値は、以下式（7）を用いて決定することもできる。

【数9】

$$(Likelihood \cdot ratio) = \prod_{m=1}^M \frac{\omega_2 g(x_m | \mu_2, \sigma)}{\omega_1 g(x_m | \mu_1, \sigma)} \quad (7)$$

目的の試料のMDM2阻害剤に対する感受性は、試料の尤度比（Likelihood ratio）を参照することにより決定することができ、例えば、この比が閾値を超えるなら感受性であると、この比が閾値を下回るなら耐性であると決定することができるが、ここで閾値は、0.2~5、好ましくは0.5~2、より好ましくは0.8~1.25の範囲であり、さらにより好ましくは約1である。

【0108】

他の実施形態では、本発明は、がんに罹患した個体のための治療および治療選択肢の改善に貢献する方法、試薬および情報であって、個体がMDM2i薬剤、薬剤、または化合物での治療または療法から利益を得ることができる方法、試薬および情報を提供する。当業者が認識するように、本発明による治療または治療レジメンにおいてがんを治療すると決定されたまたはこれに必要な薬物、化合物、活性成分、組成物、または薬剤などのMDM2阻害剤が好ましくは使用され、治療有効量で対象に投与されるが、治療上有効量は、治療の量または用量として認定されることが意図されたものである。これは、組み合わせた量が所望の生物学的治療応答を達成することになる、第1および第2の治療の組み合わせた量などの複数のMDM2阻害剤、または複数の治療薬の使用に関わる併用療法を含む。

【0109】

本発明に従って、MDM2iは、薬物投与に慣習的に使用され、当業者に公知の任意の経路によって投与され得る。非限定的な例として、MDM2iは、経口で、非経口で、静脈内に、皮下に、頬側に、唇下に、鼻腔内に、皮内に、舌下に、くも膜下腔内に、筋肉内に、腹腔内に、直腸に、腔内に、胃に、または腸管に投与されてもよい。例えば、錠剤、カプセル剤、または液剤形での経口投与が好ましい。MDM2iは、所望の応答を得るために、単一用量として、または必要に応じて複数用量で投与され得る。当業者によって認

10

20

30

40

50

識されるように、投与のための用量は、治療を受けている個体、治療されている状態の重症度およびタイプならびに投与の様式に依存することになる。

【0110】

本発明の方法は、療法、特に、MDM2iまたはアンタゴニスト療法に対するがんまたは腫瘍の感受性または応答性を決定するために、またはがんまたは新生物を有する対象の予後を決定するために使用することができる。このようにして、本発明は、がんに罹患している患者を治療する方法であって、がんが、がん組織における遺伝子感受性シグネチャーにおける遺伝子の発現の検出に基づいて（または遺伝子シグネチャーの分析によって得られた感受性スコアまたは評点によって）MDM2iに対して感受性である方法を提供する。

10

【0111】

ある実施形態では、本発明は、MDM2iでの治療に対するがん、腫瘍、または新生物を有する対象の感受性を予測する方法であって、対象から得られたがん、腫瘍、または新生物試料中の本発明のMDM2i感受性遺伝子シグネチャーにおける複数の遺伝子の差次の発現を検出することを含み、複数の遺伝子が図1A～1Eに記載された；または遺伝子BAX、C1QB P、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADS B、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1およびXPCを有する遺伝子シグネチャーにおける；または遺伝子MDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAENを有する遺伝子シグネチャーにおける；または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1A、およびAEN（および場合によりMDM2）を有する遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全てを含むまたはこれらからなる；がん、腫瘍、または新生物試料中の遺伝子シグネチャー遺伝子の発現を対照と比較する方法を提供する。方法では、対照と比較した、がん、腫瘍、または新生物試料中の図1A～1Eに記載された；または遺伝子BAX、C1QB P、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADS B、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1およびXPCを有する遺伝子シグネチャーにおける；または遺伝子MDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAENを有する遺伝子シグネチャーにおける；または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1A、およびAEN（および場合によりMDM2）を有する遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全ての発現の増加がMDM2iに対するがん、腫瘍、または新生物の感受性を示し、それによって、MDM2i治療に対する対象の感受性を予測する。例として、一部の実施形態は、基準値、または健康な対象からの、もしくは試験を受けている対象からの非腫瘍化組織試料からの非がん、腫瘍、もしくは新生物組織試料などの対照と比較した、がんまたは腫瘍を有する対象から得られたがんまたは腫瘍試料中のMDM2i感受性シグネチャー遺伝子の3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、または全て（少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または少なくとも40など）の発現レベルにおける差異を検出することを含む。方法の実施形態では、対照と比較した発現の増加は、こ

20

30

40

50

れらに限定されないが、少なくとも約1.5倍、少なくとも約2倍、少なくとも約2.5倍、少なくとも約3倍、少なくとも約3.5倍、少なくとも約4倍、少なくとも約5倍、少なくとも約6倍、少なくとも約8倍、または少なくとも約10倍の増加とができる。

【0112】

本発明は、個体のがんまたは腫瘍がMDM2iでの治療に対して感受性である、または感受性である可能性があるかどうかを決定する方法と、この決定をそのがんがMDM2iを有する阻害剤に対して感受性である個体を治療するために利用する方法をさらに提供する。がんを有する個体がMDM2iでの治療に応答する可能性があるかまたはこれから利益を得る可能性があるかどうかを予測または予後診断する方法も提供される。実施形態によれば、本発明の方法では、例えば、保管された試料または新鮮生検材料の形の患者のがんまたは腫瘍の試料が、MDM2i療法の前に、対照と比較した本明細書に記載のMDM2i感受性遺伝子シグネチャー内の遺伝子の発現レベルに関して分析され、ここで、遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の複合発現レベルが感受性スコアとして報告され得る。当業者によって認識されるように、患者（例えば、MDM2i薬剤を用いた臨床研究における対象）から採取された実際の腫瘍試料から感受性スコアを引き出すことは、前臨床研究からかかるスコアを引き出すこととは異なることもあり得る。例として、臨床試料からの腫瘍試料に関して引き出された感受性スコアは、1つまたは複数の構成的に発現される遺伝子の発現レベルを利用する一方、前臨床研究からの試料では、スコアは、集団における他の試料の遺伝子レベルと比較して引き出され得る。それにもかかわらず、あるカットオフ値を超える感受性スコアを有する腫瘍試料は、MDM2iに応答するより高い見込みを有することになることが予想される。カットオフ値は、公知のTP53遺伝子型判定状態を有する臨床試料を使用した検証研究に基づいてさらに決定され得、さらに、特徴付けられたp53変異体は、低感受性スコアを示すことが予想される。さらに、カットオフ値は、MDM2i、例えば、化合物Bおよびその塩での治療に関わる臨床治験中の腫瘍応答の相関に基づいて調整もされ得る。

【0113】

ある実施形態では、本発明は、対象から得られたがんもしくは腫瘍試料中の図1A～1Eに列挙された遺伝子シグネチャーにおける、またはBAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADS B、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1および／もしくはXPCを含む遺伝子セットにおける、またはMDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAENを含む遺伝子セットにおける、またはRPS27L、FDXR、CDKN1A、およびAEN（および場合によりMDM2）を含む遺伝子セットにおける遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または全ての差次の発現レベル（例えば、対照と比較して増加した発現レベル）を検出し、対照と比較して、がん試料中の遺伝子のいくつかまたは全ての発現のレベルの差異がある場合、または決定された閾値もしくはカットオフ値を超えており、したがって、MDM2iに対する試料の感受性を示す試料の遺伝子感受性シグネチャーから生成された感受性スコアもしくは評点に基づいて、がんまたは腫瘍がMDM2iでの治療に対して感受性であるかどうかを同定することによって、がんまたは腫瘍がMDM2iでの治療に対して感受性であるかどうかを同定する、またはMDM2iに対するがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法を提供する。対象からのがんまたは腫瘍試料中のMDM2i感受性を示す遺伝子の発現のレベルを検出および測定することは、当技術分野で公知であり、本明細書に記載の方法によって行なわれ得る。様々な実施形態では、MDM2iは、化合物Aおよびその塩、化合物Bおよびその塩、ス

10

20

30

40

50

ピロオキシンドール誘導体、インドール誘導体、ピロリジン-2-カルボキサミド誘導体、ピロリジノン誘導体、イソインドリノン誘導体、またはイミダゾチアゾール誘導体、およびその塩である。一部の実施形態では、MDM2iは、CGM097、RG7388、MK-8242 (SCH900242)、MI-219、MI-319、MI-773、MI-888、Nutlin-3a、RG7112 (RO5045337)、TDP521252、TDP665759、PXN727またはPXN822、およびその塩である。

【0114】

一部の実施形態では、本発明は、対照と比較した、がんまたは新生物試料中の図1A～1Eに；表1に；または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2）を含有する遺伝子シグネチャーに列挙された遺伝子シグネチャーバイオマーカー遺伝子の3つ以上、4つ以上、5つ以上（少なくとも6つなど）、または全ての発現のレベルの差異を検出することを含む、がんまたは腫瘍試料に及ぼすMDM2i治療または療法の薬力学的効果を決定する方法を提供する。例として、一部の実施形態は、療法が開始される前に対象から得られた対照がんもしくは腫瘍試料などの対照、または他の適切な対照と比較した、がんまたは腫瘍を有する対象から得られたがんまたは腫瘍試料中のMDM2i感受性シグネチャー遺伝子の3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、または全て（少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、または少なくとも40など）の発現レベルの差異を検出することを含み、ここで、遺伝子は、本明細書で図1A～1Eおよび表1に記載されたものなどの本明細書に記載の遺伝子シグネチャーを含む。

【0115】

方法の実施形態では、分析を受けるがんまたは腫瘍試料はまた、それが野生型TP53遺伝子を有するかどうかを当技術分野で公知の方法によって決定するためにアッセイされてもよい。ある実施形態では、野生型TP53遺伝子は、p53-MDM2タンパク質間相互作用の阻害剤またはアンタゴニストに対する腫瘍細胞の感受性と関連し得るが；しかしながら、かかる薬剤に対する応答におけるいくらかの多様性がTP53野生型がん細胞型および腫瘍モデル間で観察され得る。ある実施形態では、本発明は、個体から得られたがんもしくは腫瘍試料中の本発明の遺伝子シグネチャーにおける、例えば、図1A～1Eにおける；表1における；または遺伝子セットRPS27L、FDXR、CDKN1A、およびAEN（および場合によりMDM2）における遺伝子から選択される少なくとも3つ、もしくは少なくとも4つの遺伝子の発現のレベルを測定することと、がんまたは腫瘍試料が野生型TP53遺伝子を有するかどうかを決定することによって、MDM2iでの治療に対する個体のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法を提供する。

【0116】

別の実施形態では、本発明は、MDM2阻害剤治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、a)対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図1A～1Eに列挙された遺伝子から選択される少なくとも3つまたは少なくとも4つの遺伝子の発現のレベルを測定するステップ、およびb)がんまたは腫瘍試料が野生型TP53遺伝子を有するかどうかを決定するステップを含む方法を提供する。別の実施形態では、本発明は、がんまたは腫瘍を有する対象を治療する方法であって、a)MDM2阻害剤治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を評価するステップであって、対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図1A～1Eに列挙された遺伝子から選択される少なくとも3つまたは少なくとも4つの遺伝子の発現のレベルを測定することを含むステップ；b)がんまたは腫瘍が野生型TP53遺伝子を有するかどうかを決定するステップ；およびc)ステップa)の評価が、がんまたは腫瘍がMDM2阻害剤に対して感受性であることを示し、かつがんまたは腫瘍検体が野生型TP53遺伝子を有する場合、対象に有効量のMDM2阻害剤を投与して、がんまたは腫瘍を治療するステップを含む方法を提供する。

10

20

30

40

50

【0117】

本発明によってもたらされる利点は、MDM2阻害剤に対するがんまたは腫瘍試料の感受性を予測することにおいて、開示された遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の発現レベルを評価する記載された方法がTP53遺伝子型判定単独をしのぐということである。したがって、記載された方法は、がんおよび腫瘍に関するMDM2iでの治療の決定に関する当技術分野における利益および改善を提供する。かかる場合の例示的であるが、非限定的な例は、全体的にみて、p53機能を下方制御するE6腫瘍性タンパク質を産生するヒトバピローマウイルス(HPV)に感染している子宮頸がんに関して生じる。子宮頸がん細胞は、TP53に関して野生型であることがしばしば見出される一方、それらは、典型的に、MDM2阻害に対して非感受性である。例えば、表2に示すように、HPVに感染したTP53野生型C4II、C4I、SiHaおよびHeLa(HPV18:C4IIおよびC4I;HPV16:SiHaおよびHeLa)は、MDM2iに対して非感受性であり、HPVによるそれらの感染およびその関連する細胞内効果とおそらく関連がある結果である、本発明のMDM2i遺伝子シグネチャー内の遺伝子の低発現レベルを示した。したがって、本発明のMDM2i遺伝子感受性シグネチャーおよびそれらの使用を含む方法は、所与のがんまたは腫瘍型がMDM2iでの治療に対して感受性である可能性があるかどうかをより正確に予測するための唯一の手段、または最も信頼できる手段とすることができます。そういうものとして、本発明は、患者治療および個別化された医療のための時間と費用の両方を節約する利益を提供する。

10

【0118】

20

ある態様では、本発明は、対象のがんまたは腫瘍のMDM2i治療への感受性を予測する方法であって、a) 対象から得られたがんまたは腫瘍試料において図1A～1Eに列挙された遺伝子から選択される少なくとも3つの遺伝子の発現レベルを測定することと；b) ステップa)において得られた発現レベルをスコア化して対象の感受性スコアを得ることと；c) 複数のがんまたは腫瘍における前記少なくとも3つの遺伝子の発現レベルを測定することと、ここで、これら試料の少なくとも一部のMDM2i治療への感受性は不明であり；d) ステップc)において得られた発現レベルをスコア化して各試料における参考スコアを得て、参考スコアの分布に基づいて閾値を決定すること；およびe) 対象の感受性スコアが閾値を超えたたら対象はMDM2i治療に対して感受性であると予測し、対象の感受性スコアが閾値を下回ったたら対象はMDM2i治療に対して耐性であると予測すること、を含む方法を提供する。ある実施形態では、ステップc)において測定されるがんまたは腫瘍試料の数は、4以上、6以上、8以上、10以上、15以上、20以上、30以上、40以上、50以上、100以上、200以上、300以上、400以上、500以上、または1000以上とし得る。ある特定の実施形態では、ステップc)において測定されるがんまたは腫瘍試料の数は、6～20の範囲とし得る。

30

ある実施形態では、ステップd)は、試料をTP53野生型の試料群とTP53変異型の試料群とに分けることと、その後、TP53野生型試料および/またはTP53変異型試料の参考スコアの分布に基づいて閾値を決定することを含んでいてもよい。ある特定の実施形態では、本発明の方法のe)における閾値は、試料のうちTP53変異型試料の参考スコアの第3四分位値および最大値の間の範囲である。他の実施形態では、e)における閾値は、試料のうちTP野生型試料の参考スコアの第1四分位値または最小値の間の範囲である。

40

【0119】

50

ある特定の実施形態では、本発明は、ステップf)耐性であると予測された対象がMDM2の過剰発現を示す場合には当該対象はMDM2i治療に対して感受性であると予測することをさらに含む。本発明者らは、MDM2i治療に対して感受性である腫瘍が、時折、本発明のステップa)～d)により耐性であると予測されること、および、この誤った予測が腫瘍におけるMDM2の過剰発現に起因することを見出した。本発明者らはまた、この誤った予測が腫瘍におけるMDM2の過剰発現を決定することにより正しく修正できることを見出した。従って、ある実施形態では、本発明は、MDM2i治療に対する対象

のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、a) 対象から得られたがんまたは腫瘍試料において図1A～1Eに列挙された遺伝子から選択される少なくとも3つの遺伝子の発現レベルを測定することと；b) ステップa)において得られた発現レベルをスコア化して対象の感受性スコアを得ることと；c) 複数のがんまたは腫瘍における前記少なくとも3つの遺伝子の発現レベルを測定することと、ここで、これら試料の少なくとも一部のMDM2i治療への感受性は不明であり；d) ステップc)において得られた発現レベルをスコア化して各試料における参照スコアを得て、参照スコアの分布に基づいて閾値を決定すること；e) 対象の感受性スコアが閾値を超えたたら対象はMDM2i治療に対して感受性であると予測し、対象の感受性スコアが閾値を下回ったら対象はMDM2i治療に対して耐性であると予測すること；およびf) 耐性であると予測された対象がMDM2の過剰発現を示す場合には当該対象はMDM2i治療に対して感受性であると予測すること、を含む方法を提供する。本発明者らはさらにまた、TP53遺伝子が野生型である腫瘍が、時折、本発明のステップa)～d)により耐性であると予測されるが、当該腫瘍は実際にはMDM2i治療に対して感受性であり、この誤った予測が腫瘍におけるMDM2の過剰発現に起因することを見出した。従って、ある実施形態では、ステップf)は、耐性であると予測された対象がMDM2の過剰発現を示し、かつ、野生型TP53遺伝子を有する場合には、当該対象をMDM2i治療に対して感受性であると予測するステップとしもよい。当業者であれば、訓練セット（ここで、試料の少なくとも一部のMDM2i治療への感受性が不明である）におけるMDM2の平均発現レベルと、対象におけるMDM2の発現レベルを比較して、当該対象がMDM2の過剰発現を示しているか否かを決定することができる。当業者であれば、その発現レベルが平均よりも5倍以上、10倍以上、20倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、500倍以上、1000倍以上、2000倍以上、または3000倍以上強いときに、当該対象がMDM2の過剰発現を示していると決定し得る。ある実施形態では、MDM2の過剰発現は、当該対象のゲノムにおけるMDM2遺伝子の増幅により生じ得る。

【0120】

また、本発明は、MDM2i治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、x) 当該対象のがんまたは腫瘍におけるTP53の遺伝子型とMDM2の発現レベルを決定すること、y) TP53が野生型であり、がんまたは腫瘍がMDM2i治療への感受性が不明である試料におけるMDM2の発現の平均を超えてMDM2の過剰発現を示す場合には、治療に感受性であると対象を予測すること、TP53が野生型で、かつMDM2の発現レベルが平均を超える場合でなければ、以下のステップを実施すること：a) 対象から得られたがんまたは腫瘍試料において図1A～1Eに列挙された遺伝子から選択される少なくとも3つの遺伝子の発現レベルを測定することと；b) ステップa)において得られた発現レベルをスコア化して対象の感受性スコアを得ることと；c) 複数のがんまたは腫瘍における前記少なくとも3つの遺伝子の発現レベルを測定することと、ここで、これら試料の少なくとも一部のMDM2i治療への感受性は不明であり；d) ステップc)において得られた発現レベルをスコア化して各試料における参照スコアを得て、参照スコアの分布に基づいて閾値を決定すること；e) 対象の感受性スコアが閾値を超えたたら対象はMDM2i治療に対して感受性であると予測し、対象の感受性スコアが閾値を下回ったら対象はMDM2i治療に対して耐性であると予測すること、を含む方法を提供する。

【0121】

ある実施形態では、ステップb)およびd)は、遺伝子の発現レベルの正規化スコアを合計することを含む。ある実施形態では、閾値は、受信者動作特性(ROC)プロットに基づいて、場合により、一個抜き交差検証(LOOCV)解析を行って決定される。ある特定の実施形態では、閾値は、受信者動作特性(ROC)プロットのYouden指数±0.3、好ましくは±0.2、より好ましくは±0.1の範囲であり、さらに好ましくは、Youden指数と実質的に等価である。

【0122】

10

20

30

40

50

ある実施形態では、閾値は、大津法などの二値化アルゴリズムによって参照スコアの形状から決定される。

【0123】

ある実施形態では、閾値は、混合ガウスモデルにより決定される。ある実施形態では、閾値は、ステップd)の混合ガウスモデルにおける2つのガウス分布を用いることにより、対象が耐性であることを示す遺伝子の数に対する対象が感受性であることを示す遺伝子の数の比に基づいて決定される。ある特定の実施形態では、ステップe)における閾値は、試料のうち、TP53変異型試料の当該割合の第3四分位値と最大値の間か；または試料のうち、TP53野生型試料の当該割合の第1四分位値と最小値の間に範囲する。

ある実施形態では、本発明は、MDM2i治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、複数の予測を実施すること、ここで各予測は上記したステップa)～d)、ステップa)～e)、またはステップa)～f)を含み、かつ、ステップc)におけるがん試料または腫瘍試料の少なくとも一部または全てが予測間で異なり、および、当該対象が感受性であることを示す予測結果の数が実施した総予測数の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、または90%以上である場合に、当該対象がMDM2i治療に対して感受性であると予測し、当該対象が感受性であることを示す予測結果の数が上記パーセンテージを下回る場合に、当該対象がMDM2i治療に対して抵抗性であると予測することを含む、方法を提供する。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、10以上、20以上、30以上、40以上、50以上、60以上、70以上、80以上、90以上、または100以上の予測を実施することを含み、各予測は、上記したステップa)～d)、ステップa)～e)、またはステップa)～f)を含み、ステップc)においてがん試料または腫瘍試料の少なくとも一部または全部が予測間で異なる、方法を提供する。

【0124】

ある態様では、本発明は、がんまたは腫瘍を有する対象を治療する方法であって、a)訓練セットとしてMDM2i治療に対する感受性が不明である試料を用いた本発明の方法によってMDM2i治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を評価することと、b)評価が、がんまたは腫瘍がMDM2iに対して感受性であることを示す場合に、有効量のMDM2iを当該対象に投与してがんまたは腫瘍を治療することとを含む、方法を提供する。

【0125】

ある態様では、本発明は、対象においてがんまたは腫瘍を治療することに用いるための医薬組成物であって、MDM2iを含み、対象は、訓練セットとしてMDM2i治療に対する感受性が不明である試料を用いた本発明の方法によってMDM2i治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測することによって、MDM2i治療に対して感受性であると決定された対象である、医薬組成物を提供する。

【0126】

ある実施形態では、がんまたは腫瘍は、メラノーマである。

【0127】

ある実施形態では、本発明の方法によってもたらされる遺伝子発現／遺伝子シグネチャー分析の結果は、臨床家もしくは他の医療専門家もしくはヘルスケア従事者、実験室職員、または患者などの開業医またはユーザーに分析の結果に関する情報を提供する知覚可能なアウトプットで提供され得る。ある場合には、アウトプットは、書かれたもしくは印刷されたコピー、または図表、グラフ、またはダイヤグラム、またはディスプレイ（例えば、コンピュータースクリーン）上で可視のものなどの紙もしくはグラフィックの形であってもよいし、または可聴のアウトプットのようなものであってもよい。ある実施形態では、アウトプットは、試料中の数値、または対照と比較した、試料中の遺伝子シグネチャー遺伝子の1つまたは複数の相対量である。数値は、例えば、MDM2i感受性に関する本明細書に記載の遺伝子シグネチャーに関する、またはp53状態に関する、または対照値と比較した、例えば、本明細書に記載の遺伝子シグネチャーを含む遺伝子もしくは遺伝子

10

20

30

40

50

のセットの発現レベルに関するものであってもよい。アウトプットがグラフの形である場合、グラフ表示は、検量線に対してプロットされた対象からの試料における、本明細書で遺伝子シグネチャーにおいて記載された遺伝子または遺伝子セットの値、例えば、量または相対量を示すグラフとすることができる。アウトプット、またはグラフィックアウトプットは、がんが M D M 2 i に対して感受性であることを示すカットオフ値またはレベルを実証または提供し得る。アウトプットは、値またはレベルがカットオフ値を超えている場合、対象が M D M 2 i 治療に対してより感受性である可能性があるがんまたは腫瘍を有することを予測し得る。アウトプットは、電子的、可聴または物理的手段によって、例えば、郵便、電子メール、ファクシミリ、電話、または電子的診療記録コミュニケーションによってそれが提供または伝えられることを通してユーザーに伝達され得る。代わりに、アウトプットは、値またはレベルがカットオフ未満である場合、対象のがんまたは新生物が M D M 2 i 治療に対して感受性である可能性が低いことを示し得る。

10

【 0 1 2 8 】

一部の実施形態では、アウトプットは、例えば、物理的、可聴、または電子的手段（例えば、郵便、電話、ファクシミリ送信、電子メール、または電子的診療記録へのコミュニケーションによって）を通してアウトプットを提供することによって、ユーザーに伝達される。アウトプットの様々な型は、定量的情報、例えば、試料中で見出される遺伝子シグネチャーにおける遺伝子もしくは遺伝子のセットのレベルもしくは量、または対照試料もしくは対照値と比較して記載された遺伝子もしくは遺伝子セットの量またはレベルを提供し得る。かかるアウトプットはまた、定性的情報、例えば、M D M 2 i 感受性の決定または M D M 2 i 感受性の予後診断を提供し得る。アウトプットはさらに、対照と比較した、記載された遺伝子または遺伝子セットの 1 つまたは複数、少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つの発現の増加もしくは減少、または対照と比較して、記載された遺伝子または遺伝子セットの 1 つまたは複数間の差異がないことを同定するまたは明らかにするなどの、試料中の遺伝子シグネチャー内の遺伝子の 1 つまたは複数の相対量に関する定性的情報を提供し得る。いくつかの場合では、遺伝子発現分析は、試料中の 1 つまたは複数の追加のがんバイオマーカーの量またはレベルの決定などの他の臨床情報の決定を含み得る。いくつかの場合では、遺伝子発現分析または試験は、オリゴヌクレオチドまたは抗体アレイなどのアレイを含み得、分析または試験のアウトプットは、本発明の遺伝子シグネチャーの開示された遺伝子構成要素の 1 つまたは複数に関する定量的および / または定性的情報、ならびに 1 つまたは複数の追加の遺伝子に関する定量的および / または定性的情報を含み得る。

20

【 0 1 2 9 】

がんおよび腫瘍タイプならびにサブタイプ

M D M 2 i に対する彼 / 彼女のがんまたは腫瘍検体の感受性を決定するための試験を受ける患者は、本質的に任意の組織または器官のがんまたは腫瘍に罹患していてもよく、がんまたは腫瘍検体は、本明細書に記載の M D M 2 i 治療の選択または開始前の手順によって患者から得られ得る。がんまたは腫瘍は、原発性でも再発性でもよく、（本明細書に記載の）任意のタイプ、ステージ（例えば、ステージ I 、 I I 、 I I I 、もしくは I V または他のステージ分類システムの同等のもの）、および / または組織学的検査のものとすることができる。患者は、任意の年齢、性別、活動状態、および / または疾患もしくは寛解の任意の程度および持続時間のものとすることができます。遺伝子発現プロファイルは、外科手術または生検によって患者から除去された腫瘍試料などの腫瘍組織または細胞試料に関して決定され得る。ある場合では、がんもしくは腫瘍試料、またはそこからの細胞は、細胞培養物または免疫欠損動物における異種移植片として樹立され得る。ある場合では、試料は、患者からの除去後に凍結され、後の R N A 単離のために保存され得る。R N A 単離に関する試料は、ホルマリン固定パラフィン包埋（ F F P E ）組織とすることができます。培養物中の悪性細胞を濃縮するまたは増やすためのプロセスは、例えば、米国特許第 5 , 7 2 8 , 5 4 1 号、第 6 , 9 0 0 , 0 2 7 号、第 6 , 8 8 7 , 6 8 0 号および第 6 , 9 3 3 , 1 2 9 号に見出され得る。

30

40

50

【0130】

一部の実施形態では、対象が罹患したおよび／または本発明の方法による評価を受けているがんまたは腫瘍は、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸がん、膵がん、乳がん、肺がん、卵巣がん、前立腺がん、滑膜腫、扁平上皮がん、基底細胞がん、汗腺がん、脂腺がん、乳頭がん、乳頭状腺がん、髄様がん、気管支原性肺がん、腎細胞がん、腺がん、肝がん、肝細胞がん、胆管がん、絨毛がん、ウィルムス腫瘍、子宮頸がん、精巣腫瘍、膀胱がん、ならびに神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聽神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、メラノーマ、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫などの脳および中枢神経系(CNS)腫瘍を含めた、がん腫または肉腫などの固形腫瘍または新生物である。

10

【0131】

他の実施形態では、腫瘍または新生物は、血液がん、例えば、白血病、例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髓球性白血病、急性骨髓性白血病、骨髓芽球性白血病、前骨髓球性白血病、骨髓单球性白血病、单球性白血病および赤白血病；慢性白血病、例えば、慢性骨髓性(顆粒球)白血病、慢性骨髓性白血病、および慢性リンパ球性白血病などの白血病；真性赤血球増加症；リンパ腫；リンパ系腫瘍、ホジキン病；非ホジキンリンパ腫、例えば、バーキットリンパ腫およびマントル細胞リンパ腫を含めた無痛性および高悪性度形；多発性骨髓腫；形質細胞腫；ワルデンシュトロームマクログロブリン血症；重鎖病；骨髓異形成症候群ならびに脊髄形成異常症において生じる異常な細胞増殖を含む。

20

【0132】

特定の実施形態では、MDM2阻害剤が治療として使用され得、本発明の遺伝子シグネチャーおよび関連する方法が特に適用され得るがんまたは腫瘍は、軟部組織腫瘍を含めたいろいろな固形腫瘍、および血液がんを含む。例証的に、これらに限定されないが、本発明の遺伝子シグネチャーが特定の関連性を有し得るがん型(またはサブタイプ)は、骨髓腫、多発性骨髓腫、メラノーマ、リンパ腫、白血病(例えば、ALL、AML)、腎臓、脳および中枢神経系(CNS)、肉腫、胃、頸部、前立腺、乳房、肝臓、腎、膀胱、肺(例えば、NSCLC)、膵臓、頭頸部、結腸直腸、食道、精巣、前立腺、卵巣、頸部、および他のものを含む。ある実施形態では、MDM2阻害剤に対する感受性を示す遺伝子シグネチャーの使用は、メラノーマ、骨髓腫、神経膠芽腫、リンパ腫(例えば、DLBCL)、白血病、脳およびCNSがん、ならびに肉腫などのがんのタイプを治療するのに特に有益である。ある実施形態では、がんまたは腫瘍は、機能的p53タンパク質を有する。

30

【0133】

他の実施形態では、腎ウィルムス腫瘍、顆粒腎細胞癌、腎膨大細胞腫、バーキットリンパ腫、意義不明の単クローニ性免疫グロブリン血症、乳頭状腎細胞癌、メラノーマ、多発性骨髓腫、皮膚骨髓腫、嫌色素性腎細胞癌、皮膚T細胞リンパ腫(例えば、菌状息肉腫およびセザリー症候群)、乏突起膠腫、星状細胞腫、急性骨髓性白血病、急性リンパ球性白血病、神経膠芽腫、子宮内膜混合腺癌、結腸直腸腺腫、副甲状腺腺腫、滑膜肉腫、線維肉腫および甲状腺腫などの特定のがんサブタイプは、MDM2i感受性に関して高いスコアを得、それによってそれらはMDM2阻害剤での治療に関しておよびMDM2i治療に対する可能性のある陽性の応答を達成することに関して特に関連のあるものとなる。これらのがんサブタイプは、本発明の遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の発現を示す可能性があり、MDM2iでの治療に対して感受性である可能性がある。

40

【0134】

特定の実施形態では、本明細書に記載の化合物AおよびBなどのMDM2阻害剤に対する感受性の高頻度を有することが決定されるものに含まれるがんのタイプおよびサブタイプの非限定的な例は、腎腫瘍(例えば、ウィルムス腫瘍)、リンパ腫(例えば、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、メラノーマ(例えば、皮膚メラノーマ)、がん腫(例えば、乳頭状腎細胞がん、嫌色素性腎細胞がん、骨髓腫(例えば、多発性骨髓腫)、白血病(例えば、ALLおよびAML)、神経膠芽腫、星状細胞

50

腫、乏突起膠腫などである。

【 0 1 3 5 】

遺伝子発現および M D M 2 i 感受性

当技術分野で公知であり使用されるいろいろな方法、技術および手順は、本発明の M D M 2 i 遺伝子感受性シグネチャーと関連する遺伝子の発現レベルの検出のために、がん、または非がん細胞、組織もしくは器官試料および検体をアッセイするために用いられ得る。ある実施形態では、試料中の記載されたバイオマーカー遺伝子（本明細書で、図 1 A ~ 1 E に；表 1 に；または遺伝子 R P S 2 7 L、F D X R、C D K N 1 A および A E N（および場合により M D M 2 ）を含有する遺伝子シグネチャーセットに列挙された遺伝子の少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つ、または全てなど）の発現レベルは、各バイオマーカー遺伝子から転写される核酸の量またはレベルを定量化することによって決定され得る。様々な態様では、遺伝子発現プロファイルは、試料中の R N A 転写物レベルを決定するための任意の定量的または半定量的方法を使用して、作成され得る。かかる方法の例は、これらに限定されないが、マイクロアレイ分析および類似したフォーマット（例えば、Whole Genome DASL Assay、Illumina、Inc.、San Diego、CA）などのハイブリダイゼーションに基づくアッセイ、R T - P C R（例えば、T A Q M A N（商標））、またはリアルタイム定量的逆転写 P C R（リアルタイム q R T - P C R）（例えば、In v i t r o g e n；またはLife Technologiesによって商品化されているような）などのポリメラーゼに基づくアッセイ、フラップエンドヌクレアーゼに基づくアッセイ（例えば、IN VADER（商標）アッセイ）、および本明細書でさらに記載される分岐 D N A での直接的な R N A（m R N A）捕獲（QUANTIGENE（商標）View R N A、Affymetrix、Santa Clara, CA）、HYBRID CAPTURE（商標）（Digene, Gaithersburg, MD）、またはN C O U N T E R（商標）Analysis System（NanoString）に関わるマルチプレックスアッセイを含む。あるいは、またはさらに、バイオマーカー遺伝子から転写された m R N A から翻訳された特異的なタンパク質のレベルは、本明細書でさらに記載される方法により、決定してもよい。

【 0 1 3 6 】

アッセイフォーマットは、図 1 A ~ 1 E、表 1 に示された遺伝子シグネチャーに；および遺伝子 R P S 2 7 L、F D X R、C D K N 1 A および A E N（および場合により M D M 2 ）を含有する M D M 2 i 遺伝子感受性シグネチャーに列挙された遺伝子の組合せに関する遺伝子発現レベルを決定することに加えて、試験間の内因性シグナル強度変動などのパラメーターの調節也可能にすることになる。かかる調節は、例えば、バックグラウンドシグナル強度および／または試料プロセシングに関する調節、および／または試料にわたる遺伝子発現定量化に関する他の望ましい調節を含み得る。例えば、試料間の発現レベルは、M D M 2 i 感受性細胞中で高度に発現されるもしくはされない、または集団にわたって類似したレベルで一般に発現される 1 つまたは複数の遺伝子、例えば、少なくとも 3 つまたは少なくとも 4 つの遺伝子の発現レベルを試験することによって調節され得る。かかる遺伝子は、当技術分野で公知であり、本明細書で記載された構成的に発現される遺伝子を含み得る。遺伝子発現レベルを決定するため、したがって遺伝子発現プロファイルおよび薬物感受性を作成するための例示的なアッセイフォーマットが本明細書で記載される。

【 0 1 3 7 】

核酸試料

本発明の方法における核酸検出に関して、核酸試料は、典型的に、試験を受けているがんまたは腫瘍からの細胞、組織、もしくは器官試料または検体から得られたまたは単離された m R N A または逆転写された m R N A（c D N A）の形である。ある実施形態では、試料中の核酸は、一般に、試料内の転写物の表示を片寄らせないように、クローニングまたは増幅され得る。一部の実施形態では、追加のプロセシングステップを回避するために、クローニングまたは増幅なしに、供給源として全 R N A またはポリ A + R N A を使用することが好ましい場合がある。R N A は、市販のキットの使用を含めた当業者に公知の方

10

20

30

40

50

法を使用して、対象からのがん試料、例えば、腫瘍または新生物、例えば、メラノーマ、リンパ腫、または多発性骨髄腫腫瘍もしくは新生物、および／または対象からの隣接する非腫瘍組織の1つまたは複数の試料、正常もしくは健康な対象からの腫瘍のない組織の試料から単離することができる。全mRNAを単離する方法は、当技術分野で公知であり、Ausubelら, Current Protocols of Molecular Biology, John Wiley and Sons (1997)を含めた、詳細なプロトコールおよびガイダンスを提供する分子生物学の標準な教科書に報告されている。パラフィン包埋組織からのRNA抽出に関する方法は、例えば、Rupp and Locker, Biotechniques 6:56~60 (1988)、およびDeAndresら, Biotechniques 18:42~44 (1995)に開示されている。さらに、核酸の単離および精製の方法は、多数の学術的および商業的供給源に報告されているおり、この非限定的な例は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2012, By M.R. Green and J. Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Current Protocols in Molecular Biology (5th Edition), 2002, F.M. Ausubelら, John Wiley & Sons, Inc.; Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24, Chapter 3, Hybridization With Nucleic Acid Probes: Theory and Nucleic Acid Probes, P. Tijsse, Ed., Elsevier Press, New York, 1993(および後の版)を含む。核酸試料は、RNA試料および目的の細胞または検体から単離されたmRNA試料から合成されたcDNAを含む。かかる試料は、cDNAから増幅されたDNA、および増幅されたDNAから転写されたRNAも含む。

【0138】

遺伝子発現検出に関して、図1A～1Eにおける；表1における；または遺伝子セットRPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAENにおける遺伝子などの本発明の遺伝子シグネチャーにおいて列挙された遺伝子またはそのサブセットの少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全てのヌクレオチド配列などのヌクレオチド配列の特定された長さを含む単離された核酸分子、例えば、オリゴヌクレオチドまたはプローブは、本明細書に記載されたように包含される。

【0139】

一例では、RNAの単離は、QIAGEN (Valencia, CA)などの商業的製造者製の精製キット、緩衝液セットおよびプロテアーゼを製造者の説明書に従って使用して、行なうことができる。例えば、がん細胞(例えば、がんを有する対象から得られた)からの全RNAは、QIAGEN RNaseasy (商標)ミニカラムを使用して単離することができる。他の市販のRNA単離キットとしては、MASTERPURE (商標) Complete DNA and RNA Purification Kit (EPI CENTRE (商標) Madison, Wis.)、およびParaffin Block RNA Isolation Kit (Ambion, Inc.)が挙げられる。組織試料からの全RNAは、RNA Stat-60 (Tel-Test)を使用して単離され得る。生物学的試料(がん試料または検体)から調製されたRNAは、例えば、当業者に公知の塩化セシウム密度勾配遠心法によっても単離することができる。本明細書で考観されるように、検出方法のいくつかの例では、1つまたは複数の「ハウスキーピング」遺伝子または「内部対照」の発現レベルも評価され得る。かかる対照は、その存在が開示された遺伝子発現シグネチャーの遺伝子(またはタンパク質)レベルの評価を可能にする任意の構成的にまたは普遍的に発現される遺伝子(またはタンパク質)を含む。かかる評価は、遺伝子転写の全体的な構成レベルの決定およびRNA(またはタンパク質)回収における変動に関する調節を含む。

【0140】

10

20

30

40

40

50

ハイブリダイゼーションに基づくフォーマット、手順およびアッセイ

本発明の遺伝子シグネチャーの遺伝子の発現に関する遺伝子発現プロファイリングは、ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション分析、ポリヌクレオチドの配列決定、および、プロテオミクスをベースとした方法に基づいた方法を使用して、行なわれ得る。一部の実施形態では、試料中のmRNA発現レベルは、ノーザンプロットティングまたはin situハイブリダイゼーション（Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106: 247~283, 1999）；RNase保護アッセイ（Hod, Biotechniques 13: 852~4, 1992）；および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）（Weissら, Trends in Genetics 8: 263~4, 1992）、または定量的リアルタイムPCRなどのPCRに基づく方法を使用して定量化される。代わりに、DNA二本鎖、RNA二本鎖、およびDNA-RNAハイブリッド二本鎖またはDNA-タンパク質二本鎖を含めた特定の二本鎖を認識する抗体が使用され得る。ビーズに基づくマルチプレックスアッセイ、例えば、Luminex xMAP（商標）アッセイも利用され得る。これらに限定されないが、配列決定に基づく遺伝子発現分析の方法は、Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) および大規模並列シグネチャー配列決定 (MPSS) による遺伝子発現分析を含む。一例では、RT-PCRは、正常およびがん組織中などの種々の試料中のmRNAレベルを比較して、遺伝子発現レベルのパターンを特徴付ける、密接に関連するmRNA間を区別する、およびRNA構造を分析するために使用され得る。

10

20

30

【0141】

in situハイブリダイゼーション (ISH) は、核酸ハイブリダイゼーションの技術を単一細胞レベルに適用し外挿する、目的の遺伝子の発現レベルを検出し比較する方法を提供する。細胞化学、免疫細胞化学および免疫組織化学技法と組み合わせて、ISHは、細胞マーカーの形態が維持され同定されることを可能にし、組織および血液試料などの集団内の特定の細胞に対して配列の場所をつきとめることをさらに可能にする。ISHのハイブリダイゼーションは、相補的核酸を利用して、1つまたは複数の特定の核酸配列の場所を組織の部分もしくは切片において、すなわち、in situで、または組織が十分小さい場合、組織全体（ホールマウントISH）においてつきとめる。RNA ISHは、開示された遺伝子の発現レベルなどの組織における発現パターン（mRNA）をアッセイするために使用することができる。本方法では、試料細胞または組織は、遺伝子特異的プローブなどのプローブが細胞に入ることを可能にするために、それらの透過性を増加させるために処理される。プローブは、処理細胞に加えられ、適切な温度でハイブリダイズするようにおかれ、過剰なプローブは、洗い流される。相補的プローブは、例えば、オートラジオグラフィー、蛍光顕微鏡法またはイムノアッセイを使用して、分析を受けている組織においてプローブの位置および量を決定することができるよう標識される。試料は、がん試料または非がん試料などの本明細書に記載の試料のいかなるタイプでもよい。目的の遺伝子の配列は公知であるので、プローブは、プローブが目的の遺伝子に特異的に結合するのを可能にするように適切に設計することができる。

40

【0142】

in situ PCRは、ISH検出の前に行なわれる、標的核酸配列のPCRに基づく增幅である。RNAの検出のために、細胞内逆転写ステップがin situ PCRの前に導入されて、RNA鑄型から相補的DNA (cDNA) が生成される。これは、低コピー数のものであるRNA配列の検出を可能にする。in situ PCRの前に、細胞または組織試料は、形態を保存し、増幅されることになる細胞内配列へのPCR試薬の接近を可能にするために固定され、透過処理される。次いで、標的配列のPCR増幅が懸濁液中の無傷の細胞上で、または直接的にスライドガラス上の細胞遠心機調製物もしくは組織切片において行なわれる。前者の手法では、PCR反応混合物に懸濁された固定された細胞は、従来のサーマルサイクラーを使用して熱的にサイクルされる。PCR増幅後、細胞は、スライドガラス上に細胞遠心分離されて、ISHまたは免疫組織化学的検査

50

による細胞内 PCR 産物の可視化を可能にする。スライドガラス上の細胞または組織試料の *in situ* PCR は、試料を PCR 混合物で覆い、カバースリップを適用し、次いで、反応混合物の蒸発を防ぐために密封することによって行なわれる。サーマルサイクリングは、当業者に公知のように、スライドガラスを従来のまたは特別に設計されたサーマルサイクラーの加熱ブロックの上部に直接的に置くことによってまたはサーマルサイクリングオーブンを使用することによって行なわれる。一般に、細胞内 PCR 産物は、2 つの異なる技法：PCR 産物特異的プローブを使用したISHによる間接的 *in situ* PCR、またはサーマルサイクリング中に PCR 産物中に組み込まれた標識されたヌクレオチド（ジゴキシゲニン - 11-dUTP、フルオレセイン - dUTP、³H - CT P またはビオチン - 16-dUTP など）の直接的検出を通じたISHなしの直接的 *in situ* PCR のうちの 1 つによって検出される。10

【0143】

SAGE 法は、各転写物に関する個々のハイブリダイゼーションプローブを提供する必要がない多数の遺伝子転写物の同時および定量的分析を可能にする。簡潔に述べると、このタイプの方法を実施するために、タグが各転写物内のユニークな位置から得られるという条件で、転写物をユニークに同定するのに十分な核酸配列情報を含有する短い配列タグ（約 10 ~ 14 塩基対）が生成される。次いで、多くの転写物が一緒に連結されて、配列決定され得る長い連続的な分子を形成し、したがって、複数のタグのアイデンティティを同時に提供する。転写物の任意の集団の発現パターンは、個々のタグの存在量を決定し、各タグに相当する遺伝子を同定することによって定量的に評価することができる（例えば、*Velculescu, Science, 270: 484~7, 1995*；および *Velculescu, Cell, 88: 243~51, 1997* を参照されたい）。20

【0144】

ある実施形態では、ハイブリダイゼーションに基づくアッセイは、がんまたは腫瘍試料の MDM2i 感受性遺伝子発現プロファイルを決定するために、または本発明による MDM2i 感受性遺伝子シグネチャーの遺伝子の発現を決定するために使用することができる。核酸ハイブリダイゼーションは、試料中のプローブおよびその相補的標的配列（存在する場合）が相補的塩基対形成を通して安定なハイブリッド二本鎖を形成し得る条件下で、プローブと標的試料を接触させることを含む。分析を受けているがん、腫瘍、または新生物試料から発現プロファイルを作成するための本明細書に記載の遺伝子の配列に基づくプローブは、任意の適した方法によって調製され得る。プローブは、1 つまたは複数のタイプの化学結合を通して、典型的には、相補的塩基対形成および水素結合形成を通して、相補的配列の標的核酸に結合する能力がある核酸である。プローブは、天然のヌクレオチド塩基（すなわち、A、G、U、C、または T）または修飾ヌクレオチド塩基（例えば、7-デアザグアノシン、イノシンなど）、またはロックド核酸（LNA）を含み得る。さらに、プローブを含むヌクレオチド塩基は、結合がハイブリダイゼーションに干渉しない限りは、ホスホジエステル結合以外の結合によって結合され得る。したがって、プローブは、成分塩基がホスホジエステル結合よりもむしろペプチド結合によって結合されているペプチド核酸であってもよい。30

【0145】

ハイブリダイゼーションに基づくアッセイのためのオリゴヌクレオチドプローブは、適切な相補的核酸（例えば、正確にもしくは実質的に相補的な RNA 転写物（mRNA）または cDNA）に特異的にハイブリダイズする（または結合する）のに十分な長さまたは組成（ヌクレオチド類似体を含めた）を有すると予想される。一般に、オリゴヌクレオチドプローブは、直線的であり、長さが少なくとも 8、少なくとも 10、少なくとも 12、少なくとも 14、少なくとも 16、少なくとも 18、少なくとも 20、少なくとも 25、または少なくとも 30 ヌクレオチド（連続したヌクレオチド）であると予想される。いくつかの場合では、例えば、長さが少なくとも 30、少なくとも 40、少なくとも 45、少なくとも 50 ヌクレオチド、または最大約 200 ヌクレオチドのより長いプローブが使用され得る。これらの配列は、開示された遺伝子、例えば、図 1A ~ 1E；表 1 に示された40

10

20

30

40

50

遺伝子の少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、少なくとも 6 つ、少なくとも 7 つ、少なくとも 8 つ、少なくとも 9 つ、少なくとも 10 、または全て；または遺伝子 R P S 2 7 L 、 F D X R 、 C D K N 1 A および A E N (および場合により M D M 2) を含有する遺伝子セットにおける遺伝子の少なくとも 3 つ、もしくは全ての任意の領域から得られ得る。一部の実施形態では、プローブ核酸と標的核酸間の相補的ハイブリダイゼーションは、標的ポリヌクレオチド配列の所望の検出を達成するためにハイブリダイゼーション培地のストリンジエンシーを低下させることによって適応され得る小数のミスマッチ（例えば、1 つ、2 つ、または 3 つのミスマッチ）を含み得る。当然、プローブは、意図された標的プローブ配列との完全なマッチとすることができる、例えば、プローブは、標的配列（例えば、図 1 A ~ 1 E ；表 1 に；または本発明による R P S 2 7 L 、 F D X R 、 C D K N 1 A および A E N (および場合により M D M 2) 遺伝子シグネチャーに列挙された遺伝子の配列に完全に相補的であるプローブ配列をそれぞれ有し得る。

10

【 0 1 4 6 】

ハイブリッド二本鎖を形成しない核酸は、洗い流され、それによって、典型的に、付加された検出可能な標識の検出を通してハイブリダイズした核酸が検出されるのが可能になる。試料核酸に付加された 1 つまたは複数の標識は、ハイブリダイズした核酸を検出するために使用され得る。標識は、当業者に慣習的に公知であるいろいろな手段によって組み込まれ得る。例えば、 U S 2 0 1 2 / 0 2 6 4 6 3 9 を参照されたい。核酸分子の相補鎖の結合を物理的に検出する方法は、これらに限定されないが、 D N A s e I または化学的フットプリントィング、ゲルシフトおよび親和性切断アッセイ、ドットプロット、ノーザンプロット、ならびに光吸収検出方法を含む。ある例示的な方法では、オリゴヌクレオチド（またはその類似体）および標的核酸を含有する溶液の光吸収の変化が、温度増加するにつれて、 2 2 0 から 3 0 0 n m の分光光度的波長で観察される。オリゴヌクレオチドまたは類似体がその標的に結合している場合、吸収の迅速な増加が、オリゴヌクレオチド（または類似体）およびその標的が互いに解離または溶解する特徴的な温度で生じる。別の例では、方法は、シグナル、例えば、1 つまたは両方の核酸分子（または必要に応じて抗体もしくはタンパク質）上に存在する検出可能な標識の検出に関わる。免疫組織化学的またはウエスタンプロット技法などのタンパク質への抗体の結合を検出する方法は、通例である。

20

【 0 1 4 7 】

30

当業者は理解するように、核酸は、核酸を含有する緩衝液の温度を増加させるまたは塩濃度を減少させることによって変性させることができる。低ストリンジエンシー条件（例えば、低い温度および / または高い塩濃度）下で、ハイブリッド二本鎖（例えば、 D N A : D N A 、 R N A : R N A 、または R N A : D N A ）が、アニールした配列が完全に相補的でない場合でさえも形成することになる。したがって、ハイブリダイゼーションの特異性がより低いストリンジエンシーで低下する。逆に、より高いストリンジエンシー（例えば、より高い温度またはより低い塩濃度）で、成功的なハイブリダイゼーションがより少ないミスマッチを許容する。当業者は、ハイブリダイゼーション条件がストリンジエンシーの任意の程度を提供するために選択され得ることを認識するだろう。ハイブリダイゼーションに基づくアッセイは、差異が同定できるように、プローブが他のまたは無関係な配列は非実質的なハイブリダイゼーションのみで、意図された標的サブ配列にハイブリダイズすることになる、いわゆるストリンジエントな条件下で一般的に行なわれる。ストリンジエントな条件は、配列依存的であり、種々の環境下で変動し得る。例えば、より長いプローブ配列は、より高い温度で完全に相補的な配列に一般的にハイブリダイズする（完全に相補的未満の配列に対して）。一般に、ストリンジエントな条件は、定義されたイオン強度および p H での特定の配列に関する熱融点 (T m) よりも約 5 ℃ 低くなるように選択され得る。ストリンジエントな条件の例は、短いプローブ（例えば、 1 0 から 5 0 ヌクレオチド）に関して塩濃度が p H 7 . 0 から 8 . 3 で少なくとも約 0 . 0 1 から 1 . 0 M N a + イオン濃度（または他の塩）であり、温度が少なくとも約 3 0 ℃ であるものを含む。所望のハイブリダイゼーションおよびストリンジエンシー条件は、ホルムアミドまたは

40

50

塩化テトラメチルアンモニウム (TMAc) などの薬剤の追加を通して達成することができる。

【0148】

ある例では、ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーションを保証するために、
 37 (0.005% Triton X-100) で $6 \times \text{SSPET}$ などの低ストリンジエンシー条件下で行なわれ；次いで、後の洗浄がより高いストリンジエンシー条件（例えば、37 で $1 \times \text{SSPET}$ ）下で行なわれて、ミスマッチハイブリッド二本鎖を排除する。連続的な洗浄がハイブリダイゼーション特異性の所望のレベルが得られるまで次第に高くなるストリンジエンシー（例えば、37 から 50 で $0.25 \times \text{SSPET}$ までも低く下がる）で行なわれ得る。ハイブリダイゼーション特異性は、試験プローブへのハイブリダイゼーションを以下に記載された、存在し得る様々な対照（例えば、発現レベル対照、正規化対照、ミスマッチ対照など）へのハイブリダイゼーションと比較することによって評価され得る。当業者は理解することになるように、ハイブリダイゼーション特異性（ストリンジエンシー）とシグナル強度間のトレードオフがしばしばある。したがって、ある例では、洗浄は、一貫した結果を生み出し、バックグラウンド強度の約 10 % を超えるシグナル強度を提供する最も高いストリンジエンシーで行なわれる。ハイブリダイズしたアレイは、連続的に高いストリンジエンシー溶液で洗浄され、各洗浄間で評価され得る。生成されたデータセットの分析は、その上でハイブリダイゼーションパターンが顕著に変化されず、目的の特定のオリゴヌクレオチドプローブに関する十分なシグナルを提供する洗浄ストリンジエンシーを明らかにする。
10

【0149】

ハイブリダイゼーションに基づくアッセイは、標的配列に関する、および / または発現レベル対照に関するもしくは正規化対照に関するミスマッチ対照も用い得る。ミスマッチ対照は、1つまたは複数のミスマッチ塩基の存在を除いて、それらの相当する試験または対照プローブと同一であるように設計されたプローブである。ミスマッチ塩基は、プローブがさもなければ特異的にハイブリダイズする標的配列における相当する塩基に相補的でないよう選択された塩基である。1つまたは複数のミスマッチが、適切なハイブリダイゼーション条件（例えば、ストリンジエントな条件）下で、試験または対照プローブがその標的配列とハイブリダイズすることが予想されるが、ミスマッチプローブはハイブリダイズしない（または著しくより少ない程度までハイブリダイズする）ように選択される。好ましくは、ミスマッチプローブは、中心的なミスマッチを含有する。したがって、例えば、プローブが 20 塩基長である場合では、相当するミスマッチプローブは、位置 6 から 14 のいずれか（中心的なミスマッチ）での単一塩基ミスマッチ（例えば、A を G、C または T と置換する）以外は、同一配列を有することになる。したがって、ミスマッチプローブは、プローブが向けられた標的以外の試料中の核酸への非特異的結合またはクロスハイブリダイゼーションに関する対照を提供する。例えば、標的核酸が試料中に存在する場合、完全にマッチするプローブは、ミスマッチであるプローブよりも強いシグナルを提供するはずである。完全なマッチとミスマッチプローブ間の強度の差異は、ハイブリダイズした材料の濃度の信頼できる尺度を提供するのを助ける。
20

【0150】

複数のハイブリダイゼーションアッセイフォーマットが公知であり、本発明の方法と関連した使用に適している。かかるハイブリダイゼーションに基づくフォーマットは、溶液に基づくおよび固体支持体に基づくアッセイフォーマットを含む。差次的に発現される、例えば、高発現される遺伝子（例えば、図 1A ~ 1E に；表 1 に；および本明細書に記載の構成要素 RPS27L、FDXR、CDKN1A および AEN（および場合により MDM2）を有する遺伝子シグネチャーに列挙された）を検出するように設計されたオリゴヌクレオチドプローブを含有する固体支持体は、フィルター、ポリ塩化ビニルプレート、粒子、ビーズ、微小粒子またはシリコンもしくはガラスに基づくチップなどとすることができる。オリゴヌクレオチドが共有結合的または非共有結合的に、直接的または間接的に結合され得る任意の固体表面が使用できる。ビーズまたはマイクロスフェアに基づくアッセ
40

10

20

30

40

50

イが、例えば、米国特許第6,355,431号、第6,396,995号、および第6,429,027号に報告されている。チップに基づくアッセイが、例えば、米国特許第6,673,579号、第6,733,977号、および第6,576,424号に報告されており、本明細書でさらに記載される。バイオマーカー遺伝子の発現を測定するためのポリヌクレオチドマイクロアレイを調製し、使用するための技法および一般的方法は、例えば、米国特許出願公開U.S.2011/0015869に報告されており、本明細書の他の部分でも記載される。

【0151】

当業者によって認識されるように、バックグラウンドシグナルは、ハイブリダイゼーションに基づくアッセイを使用する場合、調節される必要があり得る。「バックグラウンド」または「バックグラウンドシグナル強度」という用語は、非特異的結合または標識された標的核酸とオリゴヌクレオチドアレイ（例えば、オリゴヌクレオチドプローブ、対照プローブ、アレイ基板など）の構成要素間の他の相互作用から生じるハイブリダイゼーションシグナルを表す。バックグラウンドシグナルは、アレイ構成要素自体の内因性蛍光によっても生み出され得る。単一バックグラウンドシグナルがアレイ全体に関して計算され得る、または異なるバックグラウンドシグナルがアレイの各位置に関して計算され得る。例として、バックグラウンドは、アレイにおけるプローブの最低から5%～10%の平均ハイブリダイゼーションシグナル強度として計算され得る。あるいは、バックグラウンドは、試料中に見出される任意の配列に相補的でないプローブ（例えば、反対のセンスの核酸にまたは試料が哺乳類（ヒト）核酸である場合の細菌遺伝子などの試料中に見出されない遺伝子に向けられたプローブ）へのハイブリダイゼーションによって生み出される平均ハイブリダイゼーションシグナル強度として計算され得る。バックグラウンドは、プローブが全くないアレイの領域または位置によって生み出される平均シグナル強度としても計算され得る。さらに、バックグラウンドハイブリダイゼーションシグナルは、上記の手法の1つまたは組合せを含めた、公知の手法の1つまたは組合せを使用して調節され得る。

10

20

30

【0152】

ハイブリダイゼーションに基づくアッセイは、「試験プローブ」（例えば、例えば図1A～1Eに；表1に；またはRPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2）遺伝子のセットに列挙された本発明の遺伝子シグネチャーにおける遺伝子を含むものなどの目的的配列を結合するもの）に加えて、正規化対照、発現レベル対照、およびミスマッチ対照などの対照プローブの1つまたは組合せを含んでいてもよい。例えば、患者または対照試料中の遺伝子発現のレベルを決定する場合、発現値は、例えばmRNA分析によって、例えば各試料中の1つまたは複数の構成的に発現される遺伝子の発現のレベルを決定することによって試験および対照試料間で対照に正規化され得る。典型的に、発現レベル対照プローブは、薬物感受性試料対薬物非感受性試料において増加した発現を通常提示しない、本明細書で定義された構成的に発現されるヒトハウスキーピング遺伝子のサブ配列に相補的である配列を有する。

【0153】

他の対照は、例えば、アッセイされる核酸試料に加えられた標識された参照オリゴヌクレオチドに相補的であるように設計されたプローブを使用することを含んでいてもよい。ハイブリダイゼーション後に対照から得られるシグナルは、正確なハイブリダイゼーションのシグナルをアレイ間で変動させることができ、ハイブリダイゼーション条件、標識強度、「読み」効率および他の因子における変動に関する対照を提供する。一実施形態では、アレイにおける全ての他のプローブから読まれたシグナル（例えば、蛍光強度）は、対照プローブからのシグナル（例えば、蛍光強度）で除され、それによって測定値を正規化する。正規化に関する例示的なプローブは、アレイに存在する他のプローブ（例えば、試験プローブ）の平均長さを反映するように選択されるが、しかしながら、それらは、長さの範囲をカバーするように選択され得る。対照は、アレイにおける他のプローブの（平均）塩基組成を反映するようにも選択され得る。いくつかの場合では、アッセイは、二次構造を持たず、また、任意の潜在的な標的にハイブリダイズすることなくハイブリダイズす

40

50

るよう選択される1つまたはいくつかの対照プローブを利用することになる。

【0154】

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT - PCR）

一部の実施形態では、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT - PCR）が用いられ得る。RT - PCRは、臨床試料にしばしば存在する豊富ではないmRNAを含むmRNAの検出のための敏感な方法である。適した計測手段と組み合わせた、RT - PCRへの蛍光技法の適用は、閉鎖系において增幅、検出および定量化を組み合わせる定量的RT - PCR方法をもたらした。例えば、2つの通例使用される定量的RT - PCR技法は、Taqman（商標）RT - PCRアッセイ（ABI, Foster City, USA）およびLIGHTCYCLER（商標）アッセイ（Roche Applied Sciences, Indianapolis, IN）である。
10

【0155】

RT - PCRなどのmRNAを定量化する方法は、当技術分野で公知である。例として、抽出されたRNAは、製造者の説明書に従ってGENEAMP（商標）RNA PCR試薬キット（Perkin Elmer, CA, USA）を使用して、逆転写され得る。一部の実施形態では、遺伝子発現レベルは、溶液中のmRNAを測定する遺伝子発現分析技術を使用して決定することができる。かかる遺伝子発現分析技術の例は、RNAscope（商標）、RT - PCR、NANOSTRING（商標）、QUANTIgene（商標）、gNPA（商標）、マイクロアレイ、および配列決定を含むが、これらに限定されない。NANOSTRING（商標）法、例えば、NCOUNTER（商標）Digital Gene Expression System（Seattle, WA）は、個々の標的分子に結合し得る、標識された「ナノレポーター」と称される標識されたレポーター分子を使用する（例えば、米国特許第7,473,767号；Geiss, Nature Biotechnology, 26, 317~325, 2008；WO2007/076128；およびWO2007/076129を参照されたい）。ナノレポーターの標識コードに基づき、標的分子へのナノレポーターの結合は、標的分子の同定をもたらす。
20

【0156】

本発明の実施形態によれば、試料または検体からの患者の遺伝子発現プロファイルの作成、または薬物感受性（または薬物耐性）プロファイルの作成は、試料由来のRNAおよび対照RNAを用いてリアルタイム、定量的PCR（Taqman（商標）qRT - PCR）アッセイを行なうことを含む。Taqman（商標）アッセイは公知であり、当業者に使用される；それは、例えば、Hollandら, 1991, PNAS 88: 7276~7280にも報告されている。さらに、Taqman（商標）アッセイのバージョンが米国特許第5,210,015号（Gelfandら）、および米国特許第5,491,063号（Fisherら）に報告されている。Taqman（商標）RT - PCRは、サーモサイクラー、レーザー、電荷結合素子（CCD）カメラ、およびコンピューターを含み得る市販の方法およびシステムを使用して行なわれ得る。システムは、サーモサイクラー上の96ウェルフォーマットにおいて試料を増幅する。定量的RT - PCRは、二重標識された蛍光発生プローブ（例えば、Taqman（商標）プローブ）を通してPCR産物の蓄積を測定する。増幅中に、レーザー誘発蛍光シグナルが光学纖維ケーブルを通して96ウェル全てに関してリアルタイムで回収され、CCDで検出される。本システムは、機器を動かすためのおよびデータを分析するためのソフトウェアを含む。
30
40

【0157】

Taqman（商標）法および検出アッセイ系は、クロスコンタミネーションのない多数の試料の効率的な取り扱いなどの利点を提供し；結果的に、それは、機械的な試料採取に高度に適用可能である。その利点の別のものは、多重化に関する潜在力である。つまり、種々の蛍光レポーター色素がプローブを構築するために使用され得るので、MDM2i薬剤感受性と関連するいくつかの異なる遺伝子の発現が同じPCR反応でアッセイされ得、それによって、各反応／試験を個々に行なうことと比較して、費用低下につながる。し
50

たがって、T A Q M A N (商標) アッセイフォーマットは、患者の試料からの遺伝子発現プロファイル、および相当するM D M 2 i 感受性プロファイルが、約40以下、または約20以下、または約10以下、または約7以下、または約5以下、または約4以下の遺伝子、例えば、図1A～1E、表1、または本発明の遺伝子シグネチャーを含む遺伝子R P S 2 7 L、F D X R、C D K N 1 A およびA E N (および場合によりM D M 2)の1つまたは複数に列挙された遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全ての発現レベルに関わる場合に好ましい。

【0158】

試料間の変動の誤差および効果を最小化するために、R T - P C R は、内部標準を使用して行なわれ得る。最適には、内部標準は、種々の組織間で一定のレベルで発現され、実験的処理に影響されない。遺伝子発現のパターンを正規化するために使用される典型的なR N A は、G A P D H 、アクチンおよび18SリボソームR N Aなどのハウスキーピング遺伝子のm R N Aである。R T - P C R は、各標的配列に関する内部競合物が正規化に使用される定量的競合的P C Rと試料内に含有される正規化遺伝子、またはハウスキーピング遺伝子がR T - P C Rに関して使用される定量的比較的P C Rの両方に適合性である。(例えば、Heidら, 1996, Genome Research, 6: 986～994)。定量的P C R、関連するプローブおよび定量的増幅手順が、例えば、米国特許第5,538,848号；米国特許第5,716,784号および米国特許第5,723,591号に報告されている。定量的P C Rは、この目的のために設計された機器(P E Applied Biosystems, Foster City, CA)を使用して、マイクロタイタープレートにおいて行うことができる。

10

20

30

40

50

【0159】

遺伝子発現レベルは、例えば、いくつかの刊行物、例えば、Godfreyら, J. Mol. Diag. 2: 84～91, 2000; Spechtら, Am. J. Pathol. 158: 419～29, 2001に報告されているように、m R N A 単離、精製、プライマー伸長および増幅後に固定されたパラフィン包埋組織をR N A 源として使用して、定量化できる。簡潔に述べると、かかるプロセスは、パラフィン包埋がん組織試料または隣接する非がん性組織の切片を約10 μ mの厚さに切断することで始まる。R N A が抽出され、タンパク質およびD N A が除去される。あるいは、R N A ががん試料または他の組織試料から直接単離される。必要なまたは所望の場合、R N A 濃度の分析後、R N A 修復および/または増幅ステップが含まれていてもよく、R N A が遺伝子特異的プロモーターを使用して逆転写され、R T - P C R がこれに続く。

【0160】

一部の実施形態では、増幅に使用されるプライマーが、目的の遺伝子のユニークなセグメントを増幅するために選択される(図1A～1Eに；または例えば、遺伝子B A X、C 1 Q B P、F D X R、G A M T、R P S 2 7 L、S L C 2 5 A 1 1、T P 5 3、T R I A P 1、Z M A T 3、A E N、C 1 2 o r f 5、G R S F 1、E I F 2 D、M P D U 1、S T X 8、T S F M、D I S C 1、S P C S 1、P R P F 8、R C B T B 1、S P A G 7、T I M M 2 2、T N F R S F 1 0 B、A C A D S B、D D B 2、F A S、G D F 1 5、G R E B 1、P D E 1 2、P O L H、C 1 9 o r f 6 0、H H A T、I S C U、M D M 2、M E D 3 1、M E T R N、P H L D A 3、C D K N 1 A、S E S N 1、および/またはX P C の少なくとも3つ、4つ、5つ、6つ以上、または全て；または遺伝子M D M 2、C D K N 1 A、Z M A T 3、D D B 2、F D X R、R P S 2 7 L、B A X、R R M 2 B、S E S N 1、C C N G 1、X P C、T N F R S F 1 0 B およびA E N の少なくとも3つまたは全て；または遺伝子R P S 2 7 L、F D X R、C D K N 1 A およびA E N (およびあるいはによりM D M 2)の少なくとも3つ、または全てなどの本発明によって提供される他の遺伝子シグネチャーに列挙された遺伝子シグネチャー遺伝子の少なくとも3つ、4つ、5つ、6つ以上、または全てをコードするm R N A など。一部の実施形態では、他の遺伝子、例えば、1つまたは複数の対照またはハウスキーピング遺伝子の発現レベルも検出される。遺伝子シグネチャーの1つまたは複数を増幅するために使用され得るプライマーは、

市販されているかまたは公知の慣習的に使用される方法に従って設計および合成することができる。代替の定量的核酸増幅手順は、米国特許第5,219,727号に記載されており、それは、試料中の標的配列の量が標的配列および内部標準核酸セグメントを同時に増幅することによって決定される手順に関する。各セグメントから増幅されたDNAの量が決定され、検量線と比較されて、増幅前に試料に存在する標的核酸セグメントの量が決定される。

【0161】

他の実施形態では、本発明による使用に従った方法は、分子指標検出分子と組み合わせられた、核酸配列に基づく増幅(NASBA)を使用したリアルタイムでのRNAレベルの検出および定量化を用い得る。NASBAは、例えば、Compton J., 1991, Nucleic acid sequence-based amplification, Nature, 350(6313):91~2に記載されている。単一ステップ等温RNA特異的増幅方法であるNASBAは、以下を含む：RNA鑄型が反応混合液に導入され、ここで、第1のプライマーが鑄型の3'末端でその相補的部位に付着し；逆転写酵素が逆の、相補的DNA鎖を合成し；RNase HがRNA鑄型を破壊し(RNase Hは、RNA-DNAハイブリッド中のRNAのみを破壊し、一本鎖RNAは破壊しない)；第2のプライマーがDNA鎖の3'末端に付着し、逆転写酵素がDNAの第2の鎖を合成し；T7 RNAポリメラーゼが二本鎖DNAを結合し、1において再び使用され得る相補的RNA鎖を作製する循環反応を提供する。

【0162】

他の実施形態では、アッセイフォーマットは、INVADE R(商標)アッセイ(Hologic(商標))、以前は、Third Wave Technologies, Madison, WIなどのフラップエンドヌクレアーゼに基づくフォーマットとすることができます。簡潔に述べると、INVADE R(商標)法は、2つの同時等温反応からなる。第1の反応では、プローブおよびINVADE R(商標)オリゴヌクレオチドである2つのオリゴヌクレオチドが、患者の腫瘍試料から得られたDNAなどの標的DNAの特定の領域と結合する。所望の配列が存在する場合、重複構造が標的上でプローブおよびIn vader(商標)オリゴヌクレオチドで創出される。専売のCLEAVASE(商標)酵素は、INVADE R(商標)オリゴヌクレオチドを有する重複構造を形成する第1のプローブを特異的に切断し、5'フラップに加えて1つのヌクレオチドを遊離する。より具体的には、第1の反応では、複数のプローブ分子が標的分子ごとに切断され、切断された5'フラップから生成されるシグナルが増幅される。プローブは、標的に付くことと離れることを迅速に繰り返し；毎回、インタクトなプローブ分子がINVADE R(商標)オリゴヌクレオチドの存在下で特定の標的に結合し、重複基質が形成され、切断が生じ得る。放出されるフラップの数は、試料中の標的の量に比例し、遺伝子の定量的検出を可能にする。第1の反応から放出されたフラップは、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)プローブと称される、標識された、合成オリゴヌクレオチド上の第2の、同時の、重複切断反応におけるINVADE R(商標)オリゴヌクレオチドとして役立つ。FRETプローブの切断は、蛍光シグナルの生成をもたらす。非重複フルオロフォアで2つの異なる5'フラップ配列およびそれらの相補的FRETオリゴヌクレオチドを使用することにより、2つの別々の配列が単一ウェルにおいて検出されることが可能になる。第1の反応から放出された5'フラップのそれぞれは、切断されたおよび切断されていないFRETプローブに付くことと離れることを循環し、それによって標的特異的シグナルをさらに増幅するための第2の反応における多くのFRETプローブの切断が可能になる。

【0163】

さらに他の実施形態では、アッセイフォーマットは、分岐DNA(QUANTIGEN E(商標), Affymetrix/Panomics, Santa Clara, CA)またはHYBRID CAPTURE(商標)(Digene Corp., Gaithersburg, MD)での直接的なmRNA捕獲を利用することができる。特定の標的核酸へのハイブリダイズおよび任意の適切な核酸検出アッセイに関する配置に適した適

10

20

30

40

50

切なプローブの設計は、公知であり、当業者によって常法に従って実施される。

【 0 1 6 4 】

アレイおよびマイクロアレイ

一部の実施形態では、遺伝子発現レベルは、マイクロアレイプラットフォームおよび技法を使用して、同定または確認される。アレイおよびマイクロアレイ方法では、目的の核酸配列（cDNAおよびオリゴヌクレオチドを含めた）は、マイクロチップなどの基板上で表面に塗られる、蒔かれる、または並べられる。次いで、並べられた配列は、目的の細胞または組織から単離された核酸（cDNAまたはmRNAなど）とハイブリダイズされる。例として、MDM2i感受性遺伝子シグネチャーにおける発現された遺伝子は、マイクロアレイ技術を使用して、新鮮またはパラフィン包埋がん／腫瘍／新生物組織において測定することができる。

10

【 0 1 6 5 】

RT - PCR方法と類似して、マイクロアレイ技術に関して、mRNA源は、典型的に、がんまたは新生物から、ならびに任意選択で、相当する非がん性組織、および正常組織または細胞株から単離された全RNAである。マイクロアレイ技法の特定の例では、cDNAクローンのPCR増幅挿入断片が高密度なアレイにおける基板に適用される。いくつかの例では、アレイは、図1A～1Eにまたは表1に提供されたものなどの本発明による遺伝子シグネチャーにおける開示された遺伝子の例えは、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、または全てのそれぞれに特異的な少なくとも1つのプローブを含む。一部の態様では、図1A～1E、表1、つまり、BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADS B、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1、および/またはXPCに列挙された遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、少なくとも10、もしくは全て、または遺伝子MDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAENの少なくとも3つまたは全て、または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（およびばあいによりMDM2）の少なくとも3つ、もしくは全てのそれぞれのヌクレオチド配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブが基板上で並べられる。並べられた配列は、これらのヌクレオチド配列を含み得る、本質的にこれらからなり得る、またはこれらからなり得る。マイクロアレイにおける核酸は、例えは、ストリンジエントな条件下でのハイブリダイゼーションに適している。

20

【 0 1 6 6 】

標識されたcDNAプローブは、例えは、目的の組織から抽出されたRNAの逆転写による蛍光ヌクレオチドの組込みを通して生成され得る。アレイに適用される標識されたcDNAプローブは、アレイに適用されたDNAの各スポットに特異的にハイブリダイズする。非特異的に結合した核酸プローブを除去するためのストリンジエントな洗浄後、アレイは、共焦点レーザー顕微鏡法などの適した検出方法によってまたはCCDカメラの使用によってスキャンされる。並べられたエレメントそれぞれのハイブリダイゼーションの定量化は、相当するmRNA存在量が評価されるのを可能にする。二色蛍光を用いて、RNAの2つの供給源から生成された別々に標識されたcDNAプローブがアレイにペアでハイブリダイズされ得る。したがって、各特定された遺伝子に相当する2つの供給源からの転写物の相対的存在量が、同時に決定され得る。ハイブリダイゼーションの小型化されたスケールは、図1A～1E、表1に列挙された遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全て、ならびにその発現が本発明によるMDM2i感受性を示す遺伝子RPS2

30

40

50

7 L、F D X R、C D K N 1 A およびA E N（および場合によりM D M 2）の少なくとも3つ、または全てのがんまたは腫瘍試料中の発現レベルおよび発現レベルパターンの便利で迅速な評価をもたらす。

【0167】

遺伝子発現に関する情報を得るためのハイスループットな方法が、数十、数百から数千以上の固定化核酸試料を含有する顕微鏡スライドなどの透明な支持体がノーザンおよびサザンプロットにおけるハイブリダイゼーションに類似した様式でハイブリダイズされる核酸マイクロアレイによって提供される。最適の支持体は、その表面上への核酸配列（すなわち、プローブ）の効果的な固定化、およびプローブと標的核酸配列の効率的および効果的なハイブリダイゼーションを可能にする。色素でタグを受けられた核酸とのハイブリダイゼーション後、アレイは、支持体上のプローブにハイブリダイズした核酸標的に付着した色素を刺激する（蛍光を発させる）ためのレーザースキャナーを使用して「読まれる」。電動化の段階では、アレイをX方向に順次横切り、次いでY方向に画素幅を進み、双向向的なラスターパターンを作製する、プログラムされたコームスキャンパターンが実行される。色素蛍光の一部は、スキャナー対物レンズによって捕獲され、各それぞれの光電子増倍管（P M T）に経路を定められた赤および緑のシグナルにろ過され、そこでそれらは、アナログデジタル（A / D）変換器によって増幅される、ろ過される、および標本抽出される電気的シグナルに変換される。スキャナーソフトウェアは、A / D変換器アウトプットを、各スポットの画素強度が色素分子の数と、およびアレイ上で標的核酸とハイブリダイズしているプローブ核酸の数と比例する高解像度の画像に変換する。コンピューターは、アレイ上の特定のアドレスを情報、例えば、シグナル強度を含めた、その位置での試料に関するハイブリダイゼーションまたは結合データと関連づけるようにプログラムされ得るという点で、アドレス可能なアレイは、通常、コンピューター可読である。コンピューター可読フォーマットのいくつかの例では、アレイにおける個々の特色は、例えば、コンピューターによるアドレス情報と相關しているデカルト格子パターンで規則的に配置される。

10

20

30

40

【0168】

マイクロアレイ分析は、例えば、Affymetrix GENECHIP（商標）技術（Affymetrix, Santa Clara, CA）またはAgilentマイクロアレイ技術（Agilent Technologies, Santa Clara, CA）で提供される製造者の説明書およびプロトコールに従って、最適な市販のシステム、キットおよび機器を使用して行なうことができる。あるいは、本明細書で他で記載されるように、アッセイフォーマットは、N COUNTER（商標）Analysis System（NanoString（商標）Technologies）および例えば、G. K. Geissら, 2008, Direct Multiplexed Measurement of Gene Expression with Color-Coded Probe Pairs, Nat. Biotechnol., 26(3): 317~25に報告されている手法を用いることができる。システムは、分子「バーコード」技術および單一分子画像処理を使用して、單一反応で数百のユニークなmRNA転写物を検出および計数する。他の方法とは異なり、プロトコールは、バイアスを結果に導入し得る増幅ステップを全く含まない。

【0169】

好みしい実施形態では、がんもしくは腫瘍試料または検体中の図1A~1Eにおける、表1における、またはRPS27L、F D X R、C D K N 1 A およびA E N（および場合によりM D M 2）を含む遺伝子のセットにおける遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全ての発現が、例えば、Affymetrix GENECHIP（商標）DNAマイクロアレイなどのマイクロアレイまたは遺伝子チップ技術を使用して、算定されるか、評価されるか、または測定される。かかるアレイは、チップあたりの高度に特異的な感受性プローブの最大数および優れた検出能力を提供する。当業者によって認識されるように、核

50

酸アレイを使用して比較できる遺伝子発現を作る手順は、グローバルノーマライゼーションの手法を含み得る。この手法では、アレイにわたる発現分布の平均（DNAアレイ内の全ての遺伝子に関する発現レベル）は、等しくなるように設定される。この広範に使用される手法は、試料の遺伝子は、差次的に発現され得る一方、転写の量は、試料にわたって本質的に類似しているという仮説から生じる。したがって、グローバルノーマライゼーションは、マイクロアレイチップ上のプローブの全ての発現シグナルを利用し、チップ間の中央シグナル値に調整される。

【0170】

本発明のMDM2i感受性遺伝子シグネチャーの遺伝子の遺伝子発現の決定および測定は、分析の特定の方法によってもまたは遺伝子発現レベルを正規化するための特定の手法によっても限定されないことが理解されよう。例えば、グローバルノーマライゼーションがアレイ全体の平均遺伝子発現に正規化するために本発明の方法の実行に使用され得る一方、ハウスキーピング遺伝子を使用した正規化も、使用されるハウスキーピング遺伝子の平均発現に正規化するために利用することができる。

10

【0171】

したがって、任意の数のアレイ設計が本発明の実行に適していることが明らかとなる。本発明での使用のためのアレイは、目的の配列に特異的にハイブリダイズするいくつかの試験プローブを典型的に含むことになる。つまり、アレイは、図1A～1E、表1に、または本明細書に記載の遺伝子シグネチャーのいずれかに列挙された遺伝子の任意の領域にハイブリダイズするように設計されたプローブを含むことになる。本発明の遺伝子シグネチャーにおける遺伝子参照がESTであってもよい場合、プローブは、その配列から、または公共の配列データベースのいずれかにおいて入手可能であり得る相当する全長転写物の他の領域から設計され得る。所与の遺伝子のためのプローブを作製する方法は、例えば、US2012/0264639において見出され得る。特定のプローブ配列を設計するためのコンピューターソフトウェアも市販されている。典型的に、アレイは、ミスマッチプローブ、または1つもしくは複数の構成的に発現される遺伝子に特異的なプローブなどの1つまたは複数の対照プローブも含むことになり、それによって、種々のハイブリダイゼーションからのデータが比較されることが可能になる。

20

【0172】

分子の秩序のある配置、すなわち、マイクロアレイの「特色」は、試料に関する一度での非常に多数の分析を可能にする。例えば、いくつかのアレイでは、1つまたは複数の分子（オリゴヌクレオチドプローブまたは抗体など）がアレイ上で複数回（例えば、2回など）生じて、内部対照を提供する。アレイ上のアドレス可能な位置の数は、例えば、少なくとも4から少なくとも9、少なくとも10、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも75、少なくとも100、少なくとも150、少なくとも200、少なくとも300、少なくとも500、少なくとも550、少なくとも600、少なくとも800、少なくとも1000、少なくとも10,000以上まで変動し得る。いくつかの場合では、アレイは、3～40、3～50、または3～177のアドレス可能な位置などの3～200のアドレス可能な位置を含む。特定の例では、アレイは、本発明の遺伝子シグネチャーの遺伝子のいくつかまたは全て、例えば、図1A～1Eにおける遺伝子；遺伝子BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADS、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1および/またはXPC；または遺伝子MDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAEN；または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2）

30

40

50

の少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、または全てに特異的なプローブまたはプライマーまたは抗体（増幅または検出を可能にするものなど）、およびいくつかの例では、さらに 1 から 10 の対照分子（ハウスキーピング遺伝子にアドレス可能なプローブ、プライマー、または抗体など）から本質的になる。

【 0 1 7 3 】

タンパク質に基づくアレイは、タンパク質であるまたはタンパク質を含むプローブ分子、またはタンパク質であるまたはタンパク質を含む標的分子を含む。いくつかの場合では、アレイは、タンパク質が結合している核酸、または、逆も同様に含む。例としては、アレイは、本発明の M D M 2 i 感受性遺伝子シグネチャーの遺伝子と関連する少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、少なくとも 10 の異なる分子に対する抗体、およびいくつかの例では、1 から 10 のハウスキーピング遺伝子も含有する。10

【 0 1 7 4 】

ある実施形態では、ポリヌクレオチドマイクロアレイは、本発明の M D M 2 i 感受性遺伝子シグネチャーの遺伝子バイオマーカーの発現を測定するために使用することができる。本発明によって提供されるマイクロアレイは、対照と比較して、1 つまたは複数の M D M 2 阻害剤に対するがん細胞および試料の感受性を示す、図 1 A ~ 1 E の；表 1 の遺伝子の少なくとも 3 つ、または少なくとも 4 つ、または全て；または R P S 2 7 L、F D X R、C D K N 1 A および A E N (および場合により M D M 2) を含む遺伝子セットの少なくとも 3 つの遺伝子にハイブリダイズ可能（特異的にハイブリダイズ可能）であるオリゴヌクレオチドまたは c D N A プローブを含み得る。遺伝子のそれぞれの発現は、同時に評価してもよい。本発明は、M D M 2 i 治療に対して感受性であるがんおよび腫瘍において差次的に発現される、例えば、発現が増加する、図 1 A ~ 1 E、表 1、および本発明の他の遺伝子シグネチャーの M D M 2 i 遺伝子感受性シグネチャーバイオマーカーを構成する遺伝子または遺伝子のサブセットの少なくとも 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、最大 177 に対するプローブ、および 1 つまたは複数の対照遺伝子に対するプローブを含むポリヌクレオチドアレイを提供する。特定の実施形態では、マイクロアレイは、例えば、A l t s c h u l e r らへの W O 2 0 0 2 / 1 8 6 4 6 に；S c h e r e r らへの W O 2 0 0 2 / 1 6 6 5 0 に；および U S 2 0 1 1 / 0 0 1 5 8 6 9 に報告されている、スクリーニングまたはスキャンニングアレイである。簡潔に述べると、スクリーニングおよびスキャンニングアレイは、発現されるものと発現されないものの両方のゲノム核酸配列由来の規則的間隔の位置的にアドレス可能なプローブを含む。20

【 0 1 7 5 】

一部の実施形態では、アレイは、独立的および包括的に、図 1 A ~ 1 E に；表 1 に列挙された遺伝子シグネチャー構成要素遺伝子の少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、少なくとも 6、少なくとも 8、少なくとも 10、または全て；または、より明確には、以下の遺伝子シグネチャー遺伝子 B A X、C 1 Q B P、F D X R、G A M T、R P S 2 7 L、S L C 2 5 A 1 1、T P 5 3、T R I A P 1、Z M A T 3、A E N、C 1 2 o r f 5、G R S F 1、E I F 2 D、M P D U 1、S T X 8、T S F M、D I S C 1、S P C S 1、P R P F 8、R C B T B 1、S P A G 7、T I M M 2 2、T N F R S F 1 0 B、A C A D S B、D D B 2、F A S、G D F 1 5、G R E B 1、P D E 1 2、P O L H、C 1 9 o r f 6 0、H H A T、I S C U、M D M 2、M E D 3 1、M E T R N、P H L D A 3、C D K N 1 A、S E S N 1、および / または X P C の少なくとも 3 つ、少なくとも 4 つ、少なくとも 5 つ、少なくとも 6、少なくとも 8、少なくとも 10、または全て）；または M D M 2、C D K N 1 A、Z M A T 3、D D B 2、F D X R、R P S 2 7 L、B A X、R R M 2 B、S E S N 1、C C N G 1、X P C、T N F R S F 1 0 B および A E N を含む遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の少なくとも 3 つ、若しくは全て；または R P S 2 7 L、F D X R、C D K N 1 A および A E N (および場合により M D M 2) を含有する遺304050

伝子シグネチャーにおける遺伝子の少なくとも 3 つ、もしくは全て、またはこれらの遺伝子によってコードされるタンパク質に特異的なプローブ、プライマー、または抗体を含有する。一部の実施形態では、アレイは、1 つまたは複数の対照プローブ、プライマー、または抗体をさらに含む。対照プローブの非限定的な例は、G A P D H、アクチンおよび 18 S RNA 遺伝子に関するもの、またはこれらの遺伝子によってコードされるタンパク質を認識する抗体を含む。任意選択で、および / または最適に、がんまたは腫瘍のタイプは、in vitro および in vivo での一貫した T P 53 および / または p 53 依存性発現を示す。

【 0 1 7 6 】

アレイに関する基板

10

アレイ基板または固体支持体は、例えば、有機ポリマーから形成され得る。固体支持体に適した材料は、例えば、米国特許第 5,985,567 号に、および公開された米国出願 U S 2 0 1 1 / 0 2 0 6 7 0 3 におけるように、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリイソブチレン、ポリブタジエン、ポリイソブレン、ポリビニルピロリジン、ポリテトラフルオロエチレン、フッ化ポリビニリデン、ポリフルオロエチレン - プロピレン、ポリエチレンビニルアルコール、ポリメチルペンテン、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリスルホン、水酸化二軸延伸ポリプロピレン、アミノ化二軸延伸ポリプロピレン、チオール化二軸延伸ポリプロピレン、エチレンアクリル酸、エチレンメタクリル酸、およびそのコポリマーの混合物を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 7 7 】

20

固体支持体または基板を形成するのに適した材料の一般的な特徴およびパラメーターは、これらに限定されないが、活性化時に、支持体の表面がオリゴヌクレオチドまたは抗体などの生体分子をそこに共有結合的に付着することができるための表面活性化への従順性；生体分子の「in situ」合成への従順性；オリゴヌクレオチドまたはタンパク質（抗体など）によって占められていない支持体上の領域が非特異的結合に従順ではない、または非特異的結合が生じた場合、かかる材料が、結合した目的のオリゴヌクレオチドまたはタンパク質（抗体など）を除去することなく、表面から容易に除去され得るための化学的不活性を含む。例えば、固体支持体表面として使用される表面活性化有機ポリマーは、高周波プラズマ放電を通してアミノ化されたポリプロピレン材料である。カルボキシル化、水酸化、チオール化、または活性エステル群などの他の反応性群も使用され得る。

30

【 0 1 7 8 】

アレイのフォーマット

いくつかのアレイフォーマットを本発明での使用に用いることができる。アレイフォーマットは、固体支持体が添付され得るもの、例えば、マイクロタイタープレート（例えば、マルチウェルプレート）、試験管、無機シート、ディップスティックなどを含み得る。固体支持体がポリプロピレン糸である場合、1 つまたは複数のポリプロピレン糸がプラスチックディップスティック型デバイスに付着され得る；あるいは、ポリプロピレン膜がスライドガラスに付着され得る。特定のフォーマットは、本質的に必要ではない。最小限、固体支持体は、固体支持体またはそこに吸収された任意の生体高分子の機能的挙動に影響することなく、アレイフォーマットに最適に付着され、フォーマット（ディップスティックまたはスライドなど）は、デバイスが導入される任意の材料（臨床試料および反応溶液など）と非反応性（これらに安定）であるべきである。

40

【 0 1 7 9 】

本発明で使用されるアレイは、いくつかの方法で調製され得る。例として、オリゴヌクレオチドまたはタンパク質配列は、別々に合成され、次いで、固体支持体に付着される（例えば、米国特許第 6,013,789 号を参照されたい）。別の例として、配列は、支持体上に直接的に合成されて、所望のアレイを提供する（例えば、米国特許第 5,554,501 号または U S 2 0 1 1 / 0 2 0 6 7 0 3 を参照されたい）。オリゴヌクレオチドおよびタンパク質を固体支持体に共有結合的にカップリングするためのおよびオリゴヌクレオチドまたはタンパク質を支持体上に直接的に合成するための適した方法は、当業者に

50

公知であり、当業者によって実行されている。ガイダンスのために；適した方法の概要が、例えば、Matsonら, 1994, Anal. Biochem. 217: 306~10に見出され得る。別の例では、オリゴヌクレオチドは、例えば、PCT公開WO85/01051およびWO89/110977、または米国特許第5,554,501号に提供されている、固体支持体上でオリゴヌクレオチドを調製するための従来の化学技法を使用して、支持体上に合成される。

【0180】

例示的であるが、非限定的な例は、当技術分野で一般的にディップスティックと称されるオリゴヌクレオチドまたは抗体バンドの直線的アレイである。別の適したフォーマットは、別々の細胞の二次元パターン（ 64×64 アレイにおける4096区画など）を含む。当業者は理解するように、他のアレイフォーマットは、例えば、米国特許第5,981,185号におけるスロット（長方形）および円形アレイ、またはマルチウェルプレートを含むが、これらに限定されない。別の例として、アレイは、糸、膜またはフィルム（免疫クロマトグラフィー媒体または膜など）であるポリマー媒体上で形成される。有機ポリマー媒体の例は、約1ミル（0.001インチ）から約20ミルの厚さを有するポリプロピレンシートである。フィルムの厚さは、決定的ではなく、かなり広い範囲にわたって変更が可能である。アレイは、二軸延伸ポリプロピレン（BOPP）フィルムを含み得、これは、その耐久性に加えて、低バックグラウンド蛍光を提示する。本明細書での使用に企図されるアレイフォーマットは、フォーマットの様々なタイプを構成し得る。

【0181】

本発明の遺伝子シグネチャーおよびそれに関連するコンパニオン診断での使用に適したアレイは、4つのヌクレオチド塩基に関する前駆体を所定のパターンで横たえることによって、アレイのセルにおいてオリゴヌクレオチドを合成するための自動化されたプロセスおよび／またはデバイスを使用して、生成され得る。簡潔に述べると、例として、複数のチャネル自動化化学送達システムが用いられて、ポリプロピレン支持体などの基板にわたってオリゴヌクレオチドプローブ集団を平行な並び（数において送達システムにおけるチャネルの数に相当する）で創出する。第1の方向でのオリゴヌクレオチド合成の完了後、次いで、基板は、90°回転されて、合成がここで第1のセットに垂直である並びの第2のセット内で進むことを可能にする。このプロセスは、その交差が複数の異なるセルを生成する複数のチャネルアレイを創出する。オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの3'末端を通してまたはオリゴヌクレオチドの5'末端を通してポリプロピレン支持体に結合され得る。ある例では、オリゴヌクレオチドは、3'末端によって固体支持体に結合される。当業者は理解するように、オリゴヌクレオチドの3'末端の使用が固体支持体への結合に適しているかまたは5'末端の使用が適しているかは、当業者によって容易に決定され得る。一般に、3'末端および5'末端の領域におけるオリゴヌクレオチドプローブの内部相補性は、支持体への結合、または結合方向を決定する。本明細書で言及したように、アレイ上のオリゴヌクレオチドプローブまたは抗体は、オリゴヌクレオチドプローブ／標的配列または抗体／タンパク質複合体を含むハイブリダイゼーション複合体の検出を可能にする1つまたは複数の標識を含んでいてもよい。

【0182】

タンパク質発現レベルの検出

一部の態様では、記載されたMDM2i感受性遺伝子シグネチャーに従って開示された遺伝子によってコードされるタンパク質の例えば、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または少なくとも10、または全てのがんまたは腫瘍試料中の発現レベルが分析される。特定の例では、本発明のMDM2i遺伝子感受性シグネチャーにおける遺伝子によってコードされるタンパク質の3つ以上、4つ以上、5つ以上（例えば、6つ以上、10以上、30以上、37以上、38以上、40以上、または全て）の試料中の発現レベルが分析される。ある実施形態では、図1A～1EのMDM2i遺伝子シグネチャー遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または全てによってコード

10

20

30

40

50

されるタンパク質が分析され、これらの遺伝子のタンパク質産物に向けられた抗体が使用される。ある実施形態では、MDM2 i 遺伝子シグネチャー遺伝子BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADS B、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1、および／またはXPCの少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または全てによってコードされるタンパク質が分析され、これらの遺伝子のタンパク質産物に向けられた抗体が使用される。ある実施形態では、遺伝子MDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAENの少なくとも3つ、または全てによってコードされるタンパク質が分析される。ある実施形態では、遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2）の少なくとも3つ、または全てによってコードされるタンパク質が分析され、これらの遺伝子のタンパク質産物に向けられた抗体が使用される。

10

【0183】

タンパク質レベルを検出するための適した試料は、対象のがんまたは腫瘍（例えば、メラノーマまたは多発性骨髄腫腫瘍もしくは新生物など）から、対象の非がん組織から得られたタンパク質、および／またはがんを有さないまたは正常な対象から得られた1つまたは複数の試料から得られたタンパク質を含有する生物学的試料を含む。対象からのがんまたは腫瘍試料中の、対照と比較した、本発明の遺伝子シグネチャー（すなわち、図1A～1Eにおける遺伝子；遺伝子BAX、C1QBP、FDXR、GAMT、RPS27L、SLC25A11、TP53、TRIAP1、ZMAT3、AEN、C12orf5、GRSF1、EIF2D、MPDU1、STX8、TSFM、DISC1、SPCS1、PRPF8、RCBTB1、SPAG7、TIMM22、TNFRSF10B、ACADS B、DDB2、FAS、GDF15、GREB1、PDE12、POLH、C19orf60、HHAT、ISCU、MDM2、MED31、METRN、PHLDA3、CDKN1A、SESN1、および／またはXPC；または遺伝子MDM2、CDKN1A、ZMAT3、DDB2、FDXR、RPS27L、BAX、RRM2B、SESN1、CCNG1、XPC、TNFRSF10BおよびAEN；または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2））内の遺伝子によってコードされるタンパク質の例え、少なくとも3つまたは少なくとも4つ（またはそれ以上、最大全て）のレベルの差異、または量の変化、例え、タンパク質発現レベルの増加を検出することは、対象のMDM2 iに対する感受性、したがって、MDM2 i治療に応答する対象の潜在力を予測するまたは示す。

20

30

【0184】

任意の従来から公知のまたは標準的なイムノアッセイフォーマット、例え、ELISA、ウエスタンプロット、またはRIAアッセイを分析または試験を受ける試料中のタンパク質レベルを測定するために使用することができる。本明細書に記載の遺伝子シグネチャーにおける、例え、図1A～1E、表1における、または遺伝子セットRPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2）における遺伝子によってコードされるタンパク質に特異的な抗体は、例え、HarlowおよびLane（Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988、およびその後の版）に示されたものなどの当技術分野で公知であるいくつかの適したイムノアッセイ方法の1つによるタンパク質の検出および定量化に使用され得る。開示された遺伝子シグネチャーの遺伝子によってコードされるタンパク質に向けられた特異的な抗体は、当業者に公知の標準的な方法を使用して生成され得る。

40

50

【0185】

例えばVentana Medical Systems, Inc., Tucson, AZおよび他の商業的ベンダーから入手可能である自動化されたスライドステイナーは、例えば、任意選択で共に使用されるホルマリン固定、パラフィン包埋(FFPE)スライドを使用した免疫組織化学的/染色技法も遺伝子検出および定量化に利用され得る。これらの技法を行なうための一般的なガイダンスは、例えば、Bancroft and Stevens, 1982, Theory and Practice of Histological Techniques, Churchill Livingstone およびAusubelら, 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 10、およびそれより最近の版に見出され得る。

【0186】

表面増強レーザー脱離イオン化(SELDI)などの定量的分光学的方法は、がんもしくは腫瘍組織または細胞試料、および非がん性細胞または組織、およびがんを有さない対象からの細胞または組織におけるタンパク質発現を分析するために使用することができる。SELDIは、分析物が分析物捕獲または脱離を増強する表面上のエネルギー流に提示される、脱離に関する固相法である。一例では、SELDI飛行時間型(SELDI-TOF)質量分析が、例えば、ProteinChip(商標)(Ciphergen Biosystems, Palo Alto, CA)を使用することによって、タンパク質発現を検出するために使用される。これらのタイプの方法は、当業者に公知であり、当業者によって実行されている。例えば、米国特許第5,719,060号；第6,897,072号；および第6,881,586号を参照されたい。あるいは、抗体は、Fc結合支持体、または細菌Fc結合支持体を使用して、クロマトグラフィー表面上に固定化される。その後、表面は、がん試料などの試料と共にインキュベートされ、表面上の抗体は、試料に存在する抗原を認識し結合し得る。結合していないタンパク質および質量分析干渉化合物は、洗い流され、抗体によって結合され、クロマトグラフィー表面上に保持されたタンパク質がSELDI-TOFなどによって分析され、検出される。試料からの質量分析プロファイルは、特定の分子量のタンパク質の相対的発現レベルがいろいろな統計的技法およびバイオインフォマティクスソフトウェアシステムによって比較される差次的タンパク質発現マッピングを使用して比較され得る。20

【0187】

ある実施形態では、本発明の遺伝子シグネチャー内のMDM2i感受性遺伝子の発現は、組織マイクロアレイを使用して、複数のがんまたは腫瘍組織検体において特徴付けられ得る。(例えば、Kononenら, 1998, Nature Medicine, 4(7): 844~47を参照されたい)。かかる組織アレイでは、例えば、がん、腫瘍、または新生物を有する対象からの複数の組織試料が同じマイクロアレイ上で評価することができる。RNAおよびタンパク質の発現レベルは、in situで検出可能であり、所望の場合、複数の試料が連續した切片において同時に分析することができる。30

【0188】

キットおよび関連する試薬

本発明は、本発明の方法の1つまたは複数を実行するための試薬およびキットを提供する。企図される試薬は、方法を実行することおよび本発明によるMDM2i感受性を示す記載された遺伝子シグネチャーの利用における使用のために設計されたものである。ある例では、試薬は、目的の遺伝子シグネチャー遺伝子が表されたプローブ核酸のアレイである。本明細書で記載されるように、いろいろな異なるアレイフォーマットが当技術分野で公知であり、使用されており、多種多様な異なるプローブ構造体、基質組成物および付着技術を含み得る。ガイダンスのために、これらに限定されないが、代表的なアレイ構造体が米国特許第5,143,854号；第5,288,644号；第5,324,633号；第5,470,710号；第5,492,806号；第5,503,980号；第5,510,270号；第5,525,464号；第5,547,839号；第5,580,50

732号；第5,661,028号；第5,800,992号；第6,489,159号；WO1996/31622；WO1997/10365；およびWO1997/27317に例証されている。ある特定の実施形態では、アレイ上に表されるMDM2i遺伝子感受性シグネチャーの遺伝子の数は、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも10、少なくとも25であり、MDM2i感受性を示す遺伝子シグネチャー遺伝子の少なくとも40、50、100、最大全てとすることができます。

【0189】

MDM2i感受性遺伝子シグネチャー内の遺伝子の発現プロファイルは、本発明のキットの含有物に合わせられた試薬を用いることによって生成され得る。かかる試薬は、任意のアッセイフォーマット、例えば、ポリメラーゼに基づくアッセイ（RT-PCR、Taqman（商標））、例えば、DNAマイクロアレイまたは他の固体支持体を使用したハイブリダイゼーションに基づくアッセイ、核酸配列に基づく増幅アッセイ、またはフラップエンドヌクレアーゼに基づくアッセイ、または他の核酸定量化方法を使用することによって、遺伝子発現レベルを検出することにおける使用のための遺伝子シグネチャー遺伝子を選択的に検出するおよび／または増幅するように設計された遺伝子特異的核酸プライマーおよび／またはプローブの集合物を含む。遺伝子特異的プライマーおよびそれらの使用に関する方法の例は、米国特許第5,994,076号に見出され得る。MDM2i感受性遺伝子シグネチャー遺伝子の少なくとも3、4、5、8、10、または全てに関する、または複数のこれらの遺伝子、例えば、図1A～1Eに；表1に示された遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の例えは、少なくとも25、少なくとも30、40、50、100以上、最大177の包含、または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEIN（および場合によりMDM2）を有する遺伝子シグネチャーサブセットに関する遺伝子特異的プローブおよび／またはプライマーの収集物を含む試薬が特定の目的のものである。遺伝子特異的プローブおよび／またはプライマー収集物は、遺伝子シグネチャー遺伝子のみを含んでいてもよく、またはそれらは、追加の遺伝子に関するプローブおよび／またはプライマーを含んでいてもよい。

10

20

30

40

【0190】

したがって、キットにおいて使用されるプローブおよび／またはプライマーは、特にキットの使用と関連して、MDM2iに対する試験を受ける試料の感受性を予測して示す標的として役立つ、本発明の遺伝子シグネチャーを含む遺伝子バイオマーカーに全体的にまたは部分的に相補的であるオリゴヌクレオチドまたはアンチセンス核酸を包含する。キットは、当該方法を実行するための説明書、および適宜、キットの使用から得られる結果の解釈を可能にするための感受性スコア、カットオフ値、または対照データなどの値およびパラメーターを含むことになることが企図される。留意されるように、説明書は、キットの包装における、添付文書における、ラベルなどにおける1つまたは複数の紙の文書などの適した媒体上に印刷された情報として提供され得る。さらに、説明書は、コンピューター可読媒体、例えば、情報が記録されたディスクケット、CD、DVD、テープなどで提供され得る。あるいは、説明書は、インターネットおよびコンピューターまたは情報に遠くから、もしくは現地外でアクセスするための他の適したデバイスを通してアクセスまたは使用され得るウェブサイトアドレスを通して提供され得る。

【0191】

キットは、MDM2i治療に対する試料の感受性に関連した1つまたは複数の結果の統計的分析のためのソフトウェアパッケージも含んでいてもよく、阻害剤に対する感受性の確率を計算するための参照データベースを含んでいてもよい。キットは、標的核酸を生成するためのプライマー、プレミックスされていてもまたは別々であってもよいdNTPおよび／またはrNTP、ビオチン化またはCyt3もしくはCyt5タグを付けられたdNTPなどの1つまたは複数のユニークに標識されたdNTPおよび／またはrNTP、種々の散乱スペクトルを有する金もしくは銀粒子、または蛍光色素の化学的に活性な誘導体などの他の合成後標識試薬、酵素、例えば、逆転写酵素、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼなど、様々な緩衝媒体、例えば、ハイブリダイゼーションおよび洗浄緩衝液、前

50

もって作られたプローブアレイ、標識されたプローブ精製試薬および構成要素、例えば、スピンカラムなど、シグナル生成および検出試薬、例えば、ストレプトアビジン - アルカリホスファターゼコンジュゲート試薬、化学蛍光もしくは化学発光基質試薬などの様々な方法において用いられる試薬を含んでいてもよい。

【0192】

別の実施形態では、本発明のキットは、本明細書に記載の遺伝子シグネチャーによって包含されるMDM2i感受性遺伝子バイオマーカーのセットを含む。ある実施形態では、キットは、標的ポリヌクレオチド分子へのハイブリダイゼーションの用意が整っているマイクロアレイ、構成要素の使用に関する説明書、および／または以下に記載され、当業者に公知であるコンピューターシステムを使用したデータ分析のためのソフトウェアを含有する。ある実施形態では、キットは、遺伝子シグネチャー（本発明のMDM2i遺伝子感受性シグネチャー遺伝子（および／またはTP53のステータス指標遺伝子）において提供された遺伝子などの複数の遺伝子の対象のがんもしくは腫瘍試料または検体における、または細胞培養物における発現のレベルを決定するための核酸プライマーおよび／またはプローブを含有するプローブアレイを含む。プローブアレイは、本明細書に記載の遺伝子発現シグネチャーおよびプロファイルを同定するためのカスタマイズされたセットを提供するために、例えば、177プローブ以下、または100プローブ以下、または50プローブ以下、または40プローブ以下、または3～10プローブ（それらの間の数を含めた）を含有し得る。ある実施形態では、キットは、MDM2iに対する試料の感受性を評価するためのプライマーおよび／またはプローブ、ならびに発現レベル調節などの必要なまたは適切なアッセイ調節を行なうためのプライマーおよび／またはプローブを含有し得る。

10

20

30

【0193】

別の実施形態では、MDM2i治療に対する患者のがんまたは腫瘍の感受性の予測を可能にする本発明の方法であって、a)図1A～1Eまたは表1にまたは遺伝子セットRPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAENに示されたMDM2i遺伝子感受性シグネチャー内の遺伝子の少なくとも3つの遺伝子、少なくとも4つの遺伝子、少なくとも5つの遺伝子、少なくとも6つの遺伝子、少なくとも10遺伝子、少なくとも20の遺伝子、少なくとも30の遺伝子、少なくとも40の遺伝子、または全ての患者から得られた試料中の発現レベルを分析すること；およびb)試料中の少なくとも3つなどの遺伝子シグネチャー遺伝子の発現レベルを対照発現レベルと比較し；がんまたは腫瘍を公知のMDM2感受性結果の以前分析された患者試料コホートにおいて観察される発現レベルとの相関に基づいてMDM2i感受性であると割り当て、それによって、患者のがんまたは腫瘍をMDM2iに対して感受性であると予測することを含む方法を行なうためのキットが提供される。

【0194】

別の実施形態では、図1A～1E、表1において、または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2）を有する遺伝子シグネチャーにおいて提供された遺伝子シグネチャーの少なくとも3つなどの遺伝子によってコードされるタンパク質産物のタンパク質発現レベルを患者のがんまたは腫瘍試料中で分析するためのキットであって、タンパク質産物またはその断片に免疫学的に特異的な抗体、タンパク質産物と抗体間の免疫複合体形成を検出するための手段および試料のMDM2i感受性と関連する発現レベルの範囲を含む教育的資料を含むキットが提供される。

40

【0195】

別の実施形態では、図1A～1E、表1において、または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2）を有する遺伝子シグネチャーにおいて提供された遺伝子シグネチャー内の遺伝子に相当する核酸またはその情報配列断片の少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つなど、または全ての発現レベルを患者のがんまたは腫瘍試料中で分析するためのキットであって、遺伝子シグネチャー遺伝子の核酸に特異的にハイブリダイズする核酸；ハイブリダイズ核酸間のハイブリダイゼ

50

ーションを検出するための手段；および試料のMDM2感受性と関連する発現レベルまたはカットオフ値の範囲を含む教育的資料を含むキットが提供される。

【0196】

別の実施形態では、本発明は、MDM2iに対する患者のがんまたは腫瘍感受性を評価するためのキットであって、評価が試験装置を用いて行なわれ、キットが患者からの試験試料を採取するための試薬；および患者の試験試料中の、図1A～1Eにおける；表1における；またはRPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN（および場合によりMDM2）遺伝子、もしくはその変異体を有する遺伝子シグネチャーにおける遺伝子などの本発明の遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の少なくとも3つ、少なくとも4つ、または全ての発現を測定するための試薬、ならびにそのための包装および説明書を含むキットを提供する。キットに関する実施形態では、試験試料を採取するための試薬は、血液または組織試料を採取するための試薬である。キットに関する実施形態では、遺伝子シグネチャーの発現プロファイルを測定するための試薬は、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、定量的RT-PCR、アレイもしくはマイクロアレイ、または免疫化学的アッセイもしくは特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションのための試薬である。

10

【0197】

医薬組成物

ある態様では、本発明は、対象においてがんまたは腫瘍を治療することに用いるための医薬組成物であって、上記で定義される少なくとも1つのMDM2iを含み、当該対処は感受性を予測する上記方法のいずれかによって対象のがんまたは腫瘍のMDM2i治療に対する感受性が評価されることにより、MDM2i治療に対して感受性であると決定された対象である、医薬組成物を提供する。

20

【0198】

ある実施形態では、医薬組成物は、メラノーマを治療することに用いられ得る。

【0199】

本発明の医薬組成物を投与する対象を選択するために用いることができる方法は、MDM2i治療に対する対象のがんまたは腫瘍の感受性を予測する方法であって、a) 対象から得られたがんまたは腫瘍試料中の図1A～1Eに列挙された遺伝子から選択される少なくとも3つの遺伝子の発現のレベルを測定すること、b) その発現レベルをスコア化して対象の感受性スコアを得ること、c) 複数のがんまたは腫瘍試料における当該少なくとも3つの遺伝子の発現レベルを測定すること（ここで、当該試料の少なくとも一部のMDM2i治療に対する感受性は不明である）、d) 当該少なくとも3つの遺伝子の発現レベルをスコア化して各試料の参照スコアを得ることと、参照スコアの分布に基づいて閾値を決定すること、および、e) 対象の感受性スコアが閾値を超える場合には対象はMDM2i治療に対して感受性であり、対象の感受性スコアが閾値を下回る場合には対象はMDM2i治療に対して耐性であると予測すること、を含む方法である。

30

【0200】

ある特定の実施形態では、ステップe)は、耐性であると予測された対象がそのゲノムに増幅したMDM2遺伝子を有する場合には、当該対象をMDM2i治療に対して感受性であると予測することである。ある実施形態では、ステップb)およびd)は、遺伝子の発現レベルの正規化スコアを合計することを含む。ある実施形態では、閾値は、受信者動作特性（ROC）プロットに基づいて決定され、1個抜き交差検定（LOOCV）解析がなされてもよい。ある実施形態では、閾値は、参照スコアの分布の形状から決定され、例えば、大津法などの二値化アルゴリズムによってもよい。ある実施形態では、閾値は、上記の通り混合ガウスモデルにより決定される。

40

【0201】

本発明の医薬組成物では、MDM2iは、本明細書に記載されるように、化合物Aおよびその塩、化合物Bおよびその塩、CGM097、RG7388、MK-8242（SC H900242）、MI-219、MI-319、MI-773、MI-888、Nut

50

l i n - 3 a 、 R G 7 1 1 2 (R O 5 0 4 5 3 3 7) 、 T D P 5 2 1 2 5 2 、 T D P 6 6
5 7 5 9 、 P X N 7 2 7 、 P X N 8 2 2 、 並びにその組合せからなる群から選択され得る。
。

【 0 2 0 2 】

コンピューターで促進される分析

ある特定の実施形態では、その態様の1つまたは複数における本発明の実行は、コンピューターならびにその関連システムおよびコンポーネントの使用に関わり得る。かかるコンピューターシステムおよびコンポーネントは、本明細書では、これらに限定されないが、本発明のいくつかの実施形態からの情報を分析および評価するために使用されるハードウェア、ソフトウェアおよびデータ記憶手段を意味する。一部の実施形態では、コンピューターシステムは、中央処理装置（C P U）、ならびにインプット手段、アウトプット手段、およびデータ記憶手段を含む。現在入手可能なコンピューターに基づくシステムの任意の1つ、またはいくつかは、当業者によって認識されるように、本発明による使用に適している。データ記憶手段は、本発明の方法から生成されたデータおよび情報の記録を含む任意の手段もしくはデバイス、またはかかる手段もしくはデバイスにアクセスし得るメモリアクセス手段を含み得る。本発明に適用可能な関連するコンピューター関連情報のかかる記述は、例えば、W O 2 0 1 3 / 0 7 1 2 4 7において見出すことができる。

10

【 0 2 0 3 】

記載された発明の態様と関連する分析的方法を含む比較ステップのいずれかは、コンピューターまたは他の（電子的）情報機械、またはデジタルデバイスにロードされたまたはプログラムされたソフトウェアコンポーネントを用いて行なわれ得る。その場合、適切なコンポーネント、データ、および含まれる情報を用いて、コンピューター、機械、またはデバイスは、1つまたは複数の遺伝子と関連する値（例えば、上記の様式で特定の遺伝子の発現と相關する、またはかかる関連している値を比較するための値）の分析を補助するための必要なステップを行ない得る。1つまたは複数のコンピュータープログラムにおいて具体化された特色は、かかるプログラムを実行する1つまたは複数のコンピューターによって行なわれ得る。一部の実施形態では、本発明に関する分析的方法の実施に適したコンピューターシステムは、内部コンポーネントを含み、これは、主メモリと相互接続されたプロセッサエレメントを含む。コンピューターシステムは、大容量記憶装置（例えば、典型的にプロセッサおよびメモリと一緒にひとまとめにされ、可変性の記憶容量を有する1つまたは複数のハードディスク）；「マウス」、または他のグラフィックのインプットデバイス、および／またはキーボードとすることができるインプット用デバイスと一緒にユーチャーインターフェースデバイス（例えば、モニター）を含む外部コンポーネントにさらに連結されている）。プリンターまたはプリント用デバイスも、コンピューターに付属され得る。典型的に、コンピューターシステムは、W O 2 0 1 3 / 0 7 1 2 4 7にも報告されている、他のローカルコンピューターシステム、リモートコンピューターシステムへの、またはインターネットなどの広域コミュニケーションネットワークへのイーサネット（商標）リンクの一部とすることができる共有ネットワークリンクにも連結されている。

20

【 0 2 0 4 】

そのオペレーションのために、システムは、そのメモリ中に、当技術分野で標準的であり、本明細書に記載のM D M 2 i 感受性遺伝子シグネチャーに特別であるいくつかのソフトウェアコンポーネントを典型的にロードしている。これらのソフトウェアコンポーネントは、集合的に、コンピューターシステムを開示された方法に従って機能させる。一部の実施形態では、ソフトウェアコンポーネントは、大容量記憶装置に保管されている。一部の実施形態では、ソフトウェアコンポーネントは、コンピューターシステムおよびそのネットワーク相互接続の管理を司るオペレーティングシステム（O S）を含む。例えば、O Sは、Microsoft Windowsファミリー、例えば、Windows 7、または旧もしくはより新しいバージョン、または例えば、Appleを含めた他のプロバイダーのものとすることができます。さらに、ソフトウェアコンポーネントは、プログラムが開示された方法を実行するのを補助するためにシステムに好都合に存在する共通言語およ

30

40

50

びファンクションを含む。いくつかの高または低水準コンピューター言語が、分析的方法をプログラムするために使用され得る。命令は、実行時間中に翻訳されるまたはコンパイルされ得る。例示的なコンピューター言語は、これらに限定されないが、C / C ++ 、 F O R T R A N および R a n d J A V A (商標) を含む。ある実施形態では、方法は、方程式の記号的エントリーおよび使用されるアルゴリズムを含めた処理の高水準仕様を可能にし、それによって、個々の方程式またはアルゴリズムのユーザープログラミングを楽にする数学ソフトウェアパッケージでプログラムされる。かかるパッケージは、これらに限定されないが、 M a t h w o r k s 製の M a t l a b (N a t i c k , M a s s .) 、 W o l f r a m R e s e a r c h 製の M a t h e m a t i c a (C h a m p a i g n , I l l .) 、および M a t h S o f t 製の S - P l u s (C a m b r i d g e , M a s s .) を含む。

10

【 0 2 0 5 】

本方法の実行のための実施の例として、ユーザー、例えば、臨床家、医療もしくはヘルスケア技術者、開業医、情報スペシャリスト、またはその組合せは、第1のステップとして、マイクロアレイ実験データをコンピューターシステムにロードする。これらのデータは、ユーザーによってまたはネットワークコネクションによって連結された他のコンピューターシステムから、または C D - R O M 、データ記憶デバイス（例えば、 U S B フラッシュドライブ）、テープドライブ、 Z I P (商標) ドライブなどの携帯型、リムーバブル保存媒体上でまたはネットワークを通して直接的に入力され得る。次いで、ユーザーは、開示された方法を行なう発現プロファイル分析ソフトウェアを実行させる。別の例示的な実施は、マイクロアレイ実験データをコンピューターシステムにロードするユーザーを含む。このデータは、記憶媒体からまたはネットワークを通してダイナミックジーンセットデータベースシステムからなどのリモートコンピューターからメモリにロードされる。次に、ユーザーは、（本明細書に記載の）対照とのがん試料からの遺伝子発現データの比較を行なって、がん試料と対照間の遺伝子発現の差異を検出するソフトウェアを実行する。本発明と関連する分析的方法を実施するための代替のコンピューターシステムおよびソフトウェアは、当業者に公知、かつ、明らかである。

20

【 0 2 0 6 】

したがって、記載された方法のいずれかは、1つまたは複数のコンピューター可読記憶媒体（例えば、1つまたは複数の光媒体ディスク、揮発性メモリコンポーネント（ D R A M または S R A M など）、または不揮発性メモリコンポーネント（ハードドライブなど）などの非一過性コンピューター可読媒体に保存されたコンピューター実行可能命令として実施され、コンピューター（例えば、スマートフォン、 i P a d (商標) など、またはコンピューターハードウェアを含む他のモバイルデバイスを含めた任意の市販のコンピューター）上で実行され得る。開示された技法を実施するためのコンピューター実行可能命令のいずれか、ならびに記載された方法および実施形態の実施中に創出および使用された任意のデータは、1つまたは複数のコンピューター可読媒体（例えば、非一過性コンピューター可読媒体）に保存され得る。コンピューター実行可能命令は、例えば、ウェブブラウザまたは他のソフトウェアアプリケーション（リモートコンピューターアプリケーションなど）を通してアクセスまたはダウンロードされる専用ソフトウェアアプリケーションまたはソフトウェアアプリケーションの一部とすることができます。かかるソフトウェアは、例えば、単一のローカルコンピューター（例えば、任意の適した市販のコンピューター）または1つまたは複数のネットワークコンピューターを使用したネットワーク環境（例えば、インターネット、ワイドエリアネットワーク、ローカルエリアネットワーク、クラウドコンピューティングネットワークなどのクライアントサーバネットワーク、または他のかかるネットワークを通して）で実行され得る。当業者によって認識されるように、ソフトウェアに基づく実施のいくつかの選択された態様のみが記載される。本明細書で記載されていない任意の詳細は、当業者に公知であるおよび / または慣習的である。さらに、本発明の態様に関連した技術は、任意の特定のコンピューターまたはハードウェア型に限定されない。適したコンピューター、ハードウェアおよび関連コンポーネントの特定の

30

40

50

詳細は、公知であり、当業者が有する一般常識を考慮して、本明細書で詳細に記載されない。

【0207】

さらに、例えば、コンピューターに開示された方法のいずれかを行なわせるためのコンピューター実行可能命令を含めたソフトウェアに基づく態様のいずれかは、これらに限定されないが、インターネット、World Wide Web、Cloud、イントラネット、ソフトウェアアプリケーション、ケーブル（光ファイバーケーブルを含めた）、磁気コミュニケーション、電磁気コミュニケーション（RF、マイクロ波および赤外線コミュニケーションを含めた）、電子的コミュニケーションなどを含めたコミュニケーションの適した手段を通してアップロード、ダウンロード、またはリモートアクセスされ得る。さらに、本明細書での使用のコンピューター可読媒体のいずれかは、非一過性（例えば、メモリ、磁気記憶、光学記憶など）とすることができます。方法での使用の記憶操作のいずれかは、1つまたは複数のコンピューター可読媒体（例えば、コンピューター可読記憶媒体または他の有形媒体）で記憶することによって実施され得る。記憶されたもの全ては、本明細書に記載の方法およびシステムが1つまたは複数のコンピューター可読および／または携帯型媒体（例えば、コンピューター可読記憶媒体、記憶デバイス、または他の有形媒体）における（例えば、ここで符号化された）コンピューター実行可能命令によって実施され得るように、1つまたは複数のコンピューター可読媒体（例えば、コンピューター可読記憶媒体または他の有形媒体）にあってもよい。そういうものとして、命令は、コンピューターに方法を行なわせることができ、本明細書に記載の技術は、いろいろなプログラミング言語で実施され得る。10 20

【0208】

本発明の一部の実施形態は、少なくとも部分的にコンピューターシステムによって行なわれる方法を含んでいてもよく、コンピューターシステムは、スクリーン、スクリーン上に遺伝子発現レベルを表示するソフトウェア、ソフトウェアをインターフェースするキーボードおよび／またはマウス、ならびにMDM2i感受性に関する試験、評価、または分析を受けるがん試料または検体中の遺伝子の発現レベルのリストを記憶するメモリを含む。本方法は、例えば、遺伝子の同じ数の発現データセットの対照レベルと比較して、本発明の遺伝子シグネチャーの遺伝子、例えば、図1A～1Eに；表1に；または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1A、およびAEN（および場合によりMDM2）を有する遺伝子シグネチャーに列挙された遺伝子の例え、3つ以上、4つ以上、または5つ以上、または6つ以上など、または全てのがん試料または検体における発現のレベルをMDM2i遺伝子感受性シグネチャーと関連する遺伝子のリストにおいて分析すること；および、対照と比較した、がん、腫瘍、または新生物試料中の遺伝子の特定された数の発現のレベルの増加が予め定義された限界を超える、または感受性スコアもしくはカットオフ値と関連があり得る場合、がん（または腫瘍もしくは新生物）をMDM2iでの治療に対して感受性であると同定することを含む。非限定的な例として、予め定義された限界（すなわち、カットオフ値）は、0.2とすることができます。この場合、>0.2の値は、高スコアまたはカットオフ値と考えられ、MDM2iに対する高感受性を意味する一方、<0.2の値は、低スコアまたはカットオフ値と考えられ、MDM2iに対する低感受性を意味する。30 40

【0209】

ある実施形態では、本発明は、少なくとも部分的にコンピューターによる実施を含む方法であって、図1A～1E、表1、または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1A、およびAEN（および場合によりMDM2）を有する遺伝子シグネチャーの遺伝子シグネチャー遺伝子のそれぞれに関する遺伝子発現レベルを含む遺伝子発現データセット（例えば、遺伝子発現レベルのリスト）が受信される方法を提供する。データセットにおける遺伝子の発現レベルは、同じ遺伝子の対照遺伝子発現レベルと比較され、同じ遺伝子の対照遺伝子発現レベルと比較した、データセットにおける遺伝子の遺伝子発現レベルの差異が計算される。一部の実施形態では、同じ遺伝子の対照遺伝子発現レベルと比較して、ま50

たは対照（ハウスキーピング）遺伝子発現レベルに正規化して計算されたデータセットにおける遺伝子の遺伝子発現レベルの差異は、ユーザーインターフェースに表示される。他の実施形態では、方法は、同じ遺伝子の対照発現レベルと、または正規化された値と比較して、データセットにおける遺伝子の発現レベルの差異がある場合、例えば、データセットにおける遺伝子の発現の感受性スコアまたはカットオフ値がMDM2iに対するがん、腫瘍、または新生物の感受性を示す閾値またはカットオフ値を超える場合、がん、腫瘍、または新生物（またはその試料）をMDM2iでの治療に対して感受性であると同定することをさらに含む。さらなる実施形態では、本明細書に記載の方法の任意の1つまたは複数を行なうためのコンピューター実行可能命令を含む1つまたは複数のコンピューター可読記憶デバイスが提供される。

10

【0210】

ある実施形態では、本発明は、対象のがんまたは腫瘍がMDM2iでの治療に対して感受性であるかどうかを決定するためのコンピュータープログラム製品であって、コンピューターにロードされた場合、コンピュータープログラム製品が対象由来のがんまたは腫瘍試料からの遺伝子発現結果を用いて、対象のがんまたは腫瘍がMDM2i感受性であるかどうかを決定するように構成されており、前記遺伝子発現結果が図1A～1Eに；表1に；または遺伝子RPS27L、FDXR、CDKN1A、およびAENを含有する遺伝子シグネチャーに列挙されたまたはさもなければ本発明によって提供された遺伝子シグネチャーの（例えば、3、4、5、6、8、10以上の）遺伝子の全てまたはサブセットに関する発現データを含む、コンピュータープログラム製品を提供する。

20

【実施例】

【0211】

以下の例は、本発明の特定の特色および／または実施形態を例示するために提供される。例示された特色および／または実施形態は、本発明を例証するのに役立ち、限定することは意図されていない。

【実施例1】

【0212】

この実施例は、マルチがん細胞株パネルにおける細胞の成長に及ぼす代表的な小分子MDM2iの効果の評価を記載する。この実施例では、使用したMDM2阻害剤は、化合物Aおよび化合物B p-トルエンスルホン酸塩であった。パネルは、ハイコンテント薬物スクリーニング分析において評価された250のヒトがん細胞株（Oncopanel（商標），Ricerca Biosciences，Painesville，OH）を含んだ。細胞株に関する相対的IC₅₀値を決定した。

30

【0213】

材料および方法

化合物を電子はかり（AX205，Serial No. 1126051685，Mettler-Toledo K.K.）を使用して秤量し、その市販のOncopanel細胞毒性アッセイにおけるがん細胞株のそのパネルを使用した試験のためにRicerca Biosciencesに提供した。

40

【0214】

Oncopanel（商標）細胞毒性アッセイ

細胞を37で5%CO₂の湿気のある環境で、 RPMI 1640、10%FBS、2mM L-アラニル-L-グルタミン、1mM ピルビン酸ナトリウム、または特別な培地において成長させた。細胞を384ウェルプレートに播種し、37で5%CO₂の加湿環境でインキュベートした。試験化合物を細胞播種後24時間で加えた。同時に、時間ゼロで、非処置細胞プレートを対照として作成した。72時間のインキュベーション期間後、細胞を固定し、核色素で染色して、核の可視化を可能にした。

【0215】

化合物を試料情報の章で特定された最も高い試験濃度から連続的に3.16倍に希釈し、0.1%DMSOの最終アッセイ濃度において阻害剤の10の濃度にわたってアッセイ

40

50

した。自動化された蛍光顕微鏡法を GE Healthcare Incell Analyzer 1000 を使用して行ない、画像を 4 × 対物レンズで回収した。12 ビットの tiff 画像を Incell Analyzer 1000 3.2 を使用して取得し、Developer Toolbox 1.6 ソフトウェアで分析した。

【0216】

組み込まれた核色素のシグナル強度によって細胞増殖を測定した。細胞増殖アッセイアウトプットを、相対的細胞数と称する。細胞増殖エンドポイントを決定するために、細胞増殖データアウトプットを以下の式を使用して対照 (POC) のパーセントに変換する： POC = 相対的細胞数 (化合物ウェル) / 相対的細胞数 (ビークルウェル) × 100。

【0217】

相対的細胞数 IC₅₀ (IC₅₀) は、細胞増殖阻害応答の 50 % または 50 % 細胞毒性レベルを生ずる試験化合物の濃度である。IC₅₀ 値を非線形回帰を使用して計算して、データをシグモイド 4 ポイント、4 パラメーター One-Site 用量応答モデルに合わせた {ここで、y (fit) = A + [(B - A) / (1 + ((C / x) ^ D))] であった}。カーブフィッティング、IC₅₀ 計算および報告書生成をカスタムデータ整理エンジン MathIQ に基づくソフトウェア (AIM) を使用して行なった。さらに、化合物 A が処置細胞の成長を 40.0 μM の最も高い濃度での非処置細胞の半分まで低下させなかつた、および化合物 B p-トルエンスルホン酸塩が処置細胞の成長を 10.0 μM の最も高い濃度での非処置細胞の半分まで低下させなかつた細胞株においては、IC₅₀ 値を計算しなかつた。これらの場合では、IC₅₀ 値を、それぞれ、40 μM および 10 μM と表した (表 2)。

10

20

【表2】

表2

細胞株の名称	化合物A IC ₅₀ (μM)	化合物B IC ₅₀ (μM)
22Rv1	1.31	0.109
5637	40	10
639-V	40	6.39
647-V	40	10
769-P	0.442	0.036
A-673	40	9.21
A101D	0.233	0.0314
A172	0.795	0.0689
A204	0.755	0.0294
A375	0.317	0.0434
A427	1.65	0.143
A431	40	10
A498	1.71	0.119
A549	0.401	0.0769
ACHN	1.068	0.174
AGS	0.139	0.0116
AN3 CA	40	8.75
ARH-77	40	7.61
AU565	23.7	10
AsPC-1	40	10
BC-1	0.464	0.074
BFTC-905	40	8.51
BHT-101	40	10
BPH1	40	10
BT-549	40	10
BT20	40	10
BT474	40	10
BV-173	0.601	0.0873
BxPC-3	40	10
C-33A	40	5.49
C-4 II	40	9.1
C32	40	10
CAL-62	40	10
CAMA-1	40	10
CCF-STTG1	0.541	0.0852
CCRFCEM	40	10
CFPAC-1	40	10
CGTH-W-1	40	8.04
CHL-1	40	9.1
CHP-212	0.196	0.0294
CML-T1	2.38	0.0597
COLO 829	0.289	0.0266
CRO-AP2	0.204	0.0191

10

20

30

40

細胞株の名称	化合物A IC₅₀(μM)	化合物B IC₅₀(μM)
CaOV3	40	10
Caki-1	0.275	0.0387
Cal 27	40	10
Calu1	40	10
Calu6	40	5.38
Capan-1	40	10
Capan-2	40	10
ChaGoK1	40	10
Colo 205	36.7	9.48
Colo 320 HSR	40	10
D283 Med	0.529	0.0819
DB	40	5.98
DBTRG-05MG	0.132	0.0846
DK-MG	0.645	0.0553
DMS114	40	10
DMS53	38.4	10
DOHH-2	0.123	0.0288
DU145	40	7.91
Daoy	40	10
Daudi	0.599	0.132
Detroit 562	40	7.74
DoTc2 4510	39.6	10
EB-3	40	10
EFM-19	40	10
EM-2	40	10
FaDu	40	10
G-401	0.242	0.0354
G-402	0.568	0.0261
H4	0.172	0.024
HCT-116	0.653	0.0505
HCT-15	32	10
HLE	28.9	10
HOS	40	10
HPAF-II	40	5.79
HT	40	10
HT-1080	0.282	0.062
HT-1197	0.235	0.135
HT-29	33.5	5.14
HT-3	40	10
HT1376	38.9	10
HUH-6 Clone 5	0.329	0.0719
Hs 578T	40	10
HuCCT1	40	10
HuP-T4	40	10
J-RT3-T3-5	40	10
J82	40	10
JAR	0.549	0.0861
JEG-3	3.62	0.249
K562	40	10
KATO III	36.6	10
KLE	40	10
L-428	40	10
LS-174T	0.497	0.0615
LS1034	40	10

10

20

30

40

細胞株の名称	化合物A IC ₅₀ (μM)	化合物B IC ₅₀ (μM)
MALME3M	1.04	0.0875
MC-IXC	22.7	8.62
MCF7	0.661	0.0833
MDA MB 231	40	10
MDA MB 453	32.8	9.29
MDA MB 468	36.2	8.12
MEG01	40	9.7
MES-SA	0.529	0.0641
MG-63	40	10
MHH-PREB-1	40	8.3
MOLT-16	0.236	0.0598
MV-4-11	0.372	0.0254
MeWo	40	10
Mia PaCa-2	40	7.22
NALM-6	0.658	0.065
NCI-H292	0.479	0.0347
NCI-H460	0.515	0.0664
NCI-H508	40	10
NCI-H520	40	10
NCI-H596	40	10
NCI-H661	40	6.59
NCI-H747	40	10
NCIH441	40	10
NCIH446	40	10
OVCAR3	40	10
PC-3	40	10
RD	40	7.2
RKO	0.654	0.107
RL95-2	13.8	3.72
RPMI 6666	1.7	0.0793
RPMI 8226	40	0.065
RPMI-7951	40	8.63
Raji	13.8	5.32
SCC-25	40	9.86
SCC-4	40	10
SCC-9	40	10
SH-4	0.59	0.116
SHP-77	40	8.32
SJSA1	0.214	0.0261
SK-LMS-1	40	10
SK-MEL-1	0.207	0.0293
SK-MEL-28	40	10
SK-MEL-3	40	10
SK-N-AS	40	8.29
SK-N-DZ	40	10
SK-N-FI	40	10
SK-NEP-1	40	10
SK-UT-1	40	10
SKMES1	33.8	8.73
SKOV3	40	10
SNB-19	40	10
SNU-423	40	10
SR	0.257	0.0262
ST486	24.3	6.44

10

20

30

40

細胞株の名称	化合物A IC ₅₀ (μM)	化合物B IC ₅₀ (μM)
SW-13	8.33	8.45
SW1088	40	9.02
SW1116	40	10
SW1417	40	10
SW1463	40	10
SW1783	40	10
SW48	1.09	0.125
SW620	40	7.12
SW684	40	10
SW837	40	10
SW872	40	10
SW900	40	10
SW948	40	10
SW954	40	8.33
SW962	40	10
SW982	0.232	0.0209
SaOS2	40	10
SiHa	40	10
T24	40	10
T47D	32.3	7.76
T98G	40	10
TCCSUP	40	10
Thp1	40	10
U-87 MG	0.261	0.0376
U2OS	1.24	0.248
UM-UC-3	40	10
YAPC	40	10
786-O	37.3	0.342
A7	40	3.59
BE(2)C	35.3	9.03
BM-1604	40	10
BeWo	1.49	0.317
C-4 I	40	7.21
C32TG	0.36	0.0329
CEM-C1	33.6	9.37
Caki-2	0.472	0.0821
Colo 201	34.6	7.33
Colo 320DM	40	10
DLD-1	40	8.91
ES-2	14.5	6.3
HCT-8	0.506	0.0516
HEC-1-A	40	10
HEL-92-1-7	40	10
HLF	40	10
HMCB	40	5.49
HS 746T	38.9	5.85
HeLa	40	10
HepG2	0.335	0.0584
Hs 294T	1.23	3.24
Hs 695T	1.28	0.174
Hs 766T	40	10
KHOS-240S	40	10
KPL-1	0.455	0.031
MDA-MB-436	40	10

10

20

30

40

細胞株の名称	化合物A IC ₅₀ (μM)	化合物B IC ₅₀ (μM)
MOLT-3	0.605	0.0332
MT-3	1.13	0.164
NCI-H295R	40	10
OCUG-1	40	10
PANC-1	40	6.73
RKO-AS45-1	0.471	0.074
RKOE6	38.2	7.59
Ramos (RA 1)	40	8.66
SCaBER	40	10
SK-BR-3	27.7	10
SKO-007	40	8.64
SNU-1	0.412	0.135
SNU-16	28.5	9.92
SNU-5	40	10
SU.86.86	40	8.86
SW1353	1.68	0.0853
SW403	40	10
SW480	40	10
SW579	40	9.61
TE 381.T	37.3	9.73
U-138MG	40	10
U266B1	40	10
Wi38	0.171	0.0379
WiDr	34.8	5.58
Y79	1.05	0.159
COR-L105	ND	0.168
COR-L23	ND	8.98
DMS273	ND	9.08
NCI-H69	ND	10
OE19	ND	10
OE33	ND	7.58
OE21	ND	9.81
SJRH30	40	7.24
Jurkat	40	10
LNCaP	0.2704	0.064
MX1	39	9.16
BT-483	13.2	ND
CAL-54	0.602	ND
CRO-AP5	0.22	ND
IMR-32	0.828	ND
MDA-MB-175-VII	40	ND
T84	40	ND
VCaP	40	ND
WM-115	0.564	ND
ZR-75-1	1.5	ND

10

20

30

40

【実施例2】

【0218】

M D M 2 i 感受性に関連する遺伝子発現および遺伝子シグネチャー情報の決定

【0219】

バイオマーカーの発見

50

M D M 2 i 阻害剤の細胞株応答 / 感受性データを分析のために化合物AをCompendia Bioscience Inc., (Ann Arbor, MI)に送った。Oncopanel(商標)データ由来のIC₅₀エンドポイント値を使用して、細胞株をM D M 2 iに対して感受性または非感受性と指定した。IC₅₀値における1 - log 差異がM D M 2 iに対して感受性と指定された細胞または非感受性と指定された細胞間で維持された。実施例1において示したように、IC₅₀エンドポイント値を表2に示す。細胞株を遺伝子変異、遺伝子増幅または欠失、および遺伝子過剰発現に関して特徴付けた。さらに、関連する機能を有する遺伝子の経路をアノテートし、別々のバイオマーカー型として含めた。遺伝子変異データは、240のマルチがん細胞株パネルに存在する186細胞株に関する入手可能であった。遺伝子変異を数百の細胞株における61の選択されたがん関連遺伝子のコードエキソンおよび直接隣接するイントロン配列の配列を決定したWellcome Trust Sanger Institute Cancer Cell Line Projectから精選した。遺伝子変異データを公的に入手可能なSangerデータベースv48(<http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/CellLines>)から抽出した。DNAコピー数データおよび遺伝子発現データは、全ての細胞株に関して入手可能であった。

【0220】

単一ヌクレオチド多形性データを以下の方法を使用してDNAコピー数推定値に変換した。Affymetrix 500Kアレイからの細胞強度ファイルをaroma-affymetrix RパッケージにおいてCRMAv2を使用してプロセシングした。チップ強度値を全ての細胞株にわたって中央レポーター値で割り、次いでlog変換して、log2コピー数比を得た。Log2コピー数比をR/BioconductorからのDNA Copyパッケージからの円形バイナリーセグメント化を使用してプロセシングした。UCSC RefSeq Gene hg18座標由来の遺伝子座標と交差したセグメント座標を使用して、遺伝子レベルコピー数を生成した。各細胞株では、log2コピー数比 > 1 を有する遺伝子を増幅されたとアノテートし、log2コピー数比 < -1 を有する遺伝子を欠失したとアノテートした。

【0221】

遺伝子発現データをGC Robust Multi-array Average(GCRMA)バックグラウンド調整アルゴリズムを使用してプロセシングした。代替のチップ定義ファイル(altaCDF)を使用して、プローブをEntrez Gene識別子と関連するプローブセットに要約した。HG-U133 Plus 2.0 Hs_ENTREZG_alternative CDF(バージョン12.1.0)は、BrainArrayウェブサイト(http://brainarray.mbbni.med.umich.edu/Brainarray/Database/CustomCDF/genomic_curated_CDF.asp)から入手可能であった。このCDFでは、各プローブセットは、Entrez Geneデータベースにおける命名された遺伝子に相当する。altaCDFをHuman Genome U133 Plus 2.0 Array chipに適用することにより、17,545遺伝子が測定された。各遺伝子の中央発現レベルが決定された。各細胞株では、中央値を超えた64倍の発現を有する遺伝子を「Gene Overex」とアノテートした。

【0222】

M D M 2 i 感受性(n=62)および非感受性(n=164)細胞株由来のmRNAデータセットの差次的発現分析を行なって、カスタム遺伝子薬物感受性シグネチャーを作成した。片側スチュードントt検定を行なって、感受性または耐性細胞株内の各遺伝子の差次的上方制御に関するp値を計算した。遺伝子をp値によってランク付けし、M D M 2 i 感受性および非感受性に関するカスタム遺伝子シグネチャーをそれぞれ任意にランク付けされた遺伝子の上位1%に限定した(n=177)。(例えば、図1A~1E)。

【0223】

バイオマーカーとM D M 2 i 応答間の関連の潜在的有意性をバイオマーカー(正または

10

20

30

40

50

負)と薬物応答(感受性または耐性)間の関連なしの帰無仮説で Fisher's Exact Testを使用して特徴付けた。関連試験を感受性(n=62)および/または耐性(n=164)細胞株における2細胞株(n=6,996)で正と称される全ての候補ゲノムバイオマーカーに関してコンピューター処理した。薬物応答と関連していたバイオマーカーを最初にp値およびオッズ比によってランク付けした。Q値を、行なわれた多数の関連試験による偽発見率の尺度として計算した。Q値を(p値/p値ランク)*各バイオマーカータイプ内の測定されたバイオマーカーの数として計算した。

【0224】

臨床集団分析

有意なin vitro遺伝子変異バイオマーカーをコンセプト分析を用いて20,000+臨床腫瘍試料にわたって特徴付けられたバイオマーカーに位置づけた。遺伝子シグネチャーの有意な関連を特定のがんサブタイプで同定した。より明確には、in vitro薬物感受性または耐性と関連するバイオマーカープロファイルを臨床ゲノムデータにわたって調べた。Oncoline Integrated Gene BrowserおよびMutation Browser Power Toolsを使用して、広くがんのタイプ超えて選択されたバイオマーカー遺伝子の変異、過剰発現および増幅の頻度を捕らえた。Power Toolsは、OncolineおよびCOSMICからのデータを組み込んだ。変異頻度を測定された変異/試料を含有する試料の数によって決定した。過剰発現頻度を10×中央発現/試料の数の発現値を有する試料の数によって決定した。増幅頻度を推定のコピー数値4/試料の数を有する試料の数によって決定した。

10

20

【0225】

Fisher's Exact Testを使用して、Oncolineにおける臨床検体由来の>13,000の存在する遺伝子シグネチャーのそれぞれとのカスタム遺伝子シグネチャーの関連を計算した。計算における空集合は、Oncolineデータベースにおける全てのEntrez遺伝子のリストであった。p値を遺伝子リスト間の関連なしの帰無仮説でOncolineにおいて計算した。Q値を(p値/p値ランク)*Oncolineにおける遺伝子リストの数として決定した。

30

【0226】

感受性および耐性シグネチャーを個々のOncolineデータセット内で患者試料においてスコア化し、シグネチャー発現をがんサブタイプ、分子サブタイプ、組織学的グレード、または患者結果などのメタデータによって定義された患者サブセットにおいて特徴付けた。がんタイプにわたる相対的シグネチャー発現を特徴付けるために、Affymetrix U133マイクロアレイフォーマットプラットフォーム上で測定された全てのOncolineデータセット(>15,000患者腫瘍試料)を組み合わせたカスタムデータセットを創出した。種々のデータセットからの試料にわたる遺伝子発現分布を正規化するために、遺伝子発現データを分位正規化した。シグネチャーにおける各遺伝子の寄与を正規化するために、シグネチャー遺伝子をZ-スコア正規化(各遺伝子の平均発現値を各試料内の値から引き算し、差を標準偏差で割る)に供した。分位正規化されたデータセットにわたるシグネチャースコアを各シグネチャー遺伝子のZ-スコア正規化発現値の非加重平均を決定することによって作成した。シグネチャースコアをがん型およびがんサブタイプによって要約した。薬物応答とのin vitro関連由来の感受性および耐性スコアに関する閾値を臨床腫瘍データに適用して、がんタイプおよびサブタイプにわたるシグネチャー発現の頻度を作成した。

40

【0227】

MDM2i化合物Aに対する選択的応答

細胞株をIC₅₀値によってランク付けし、MDM2iに対して感受性(S)、中程度(M)および耐性(R)と称した。IC₅₀値による細胞株応答の特徴付けは、2つの一般的応答表現型を示した。細胞株の約25%は、<1μMのIC₅₀値を有し、約70%は、>10μMのIC₅₀値を有した。細胞株IC₅₀値は、0.12から>50μMに及んだ。細胞株をIC₅₀ウォーターフォールプロット上の最も急な勾配の領域にわたる110g IC

50

$I_{C_{50}}$ の中程度ビンに中心を置くカスタムビンニング戦略に基づいて、感受性または非感受性と称した。中程度ビンと比較して低 $I_{C_{50}}$ 値を有する 62 の細胞株を感受性と称し、中程度ビンを超える $I_{C_{50}}$ 値を有する 164 細胞株を耐性と称した。(図2)。関連分析を感受性 ($n = 62$) および耐性 ($n = 164$) 細胞株名称とほぼ 7,000 候補ゲノムバイオマーカー(正または負として分類される)との間で行なった。TP53 遺伝子変異は、化合物 A MDM2i (p 3E-24, Q 8E-23)に対する耐性と強く関連しており、高度に感受性 (0.87) であり、ほぼ完璧に特異的であった (0.94)。

【0228】

多変量決定木分析

単一木帰納的分類アルゴリズム (Accelyrs) または Spotfire (Decision Tree Analysis in Spotfire Decision Site) を通した区分化を使用して、どのように MDM2i 感受性および非感受性 / 耐性と関連する複数のバイオマーカーが組み合わされて薬物応答に関して最も効果的に濃縮され得るのかを調査した。決定木インプットは、0.5 の Q 値閾値を満たす全てのマルチがんバイオマーカーを含んだ。オッズ比および p 値を Fisher's Exact Test によってコンピューター処理した。TP53 変異を第1の区分化ノードとして選択した。後のノードは、さらなる濃縮を達成するための遺伝子変異バイオマーカーまたはカスタム遺伝子シグネチャーの使用を実証した。

【0229】

がんサブタイプにおけるバイオマーカー頻度

がんサブタイプにわたる TP53 変異の頻度および感受性シグネチャースコア 0.2 を比較した。がんサブタイプにわたる TP53 変異の頻度を Oncomine Power tool Mutation Browser v2.0 から得た。独立的に、感受性シグネチャー(シグネチャースコア 0.2)の発現の頻度を Compendia's カスタム Affymetrix U133 データセットを使用し決定した。独立的な患者コホートを Oncomine Power tool Mutation Browser およびカスタム Affymetrix U133 データセットにおいて表した。低頻度 TP53 変異および高頻度 MDM2i 感受性遺伝子シグネチャー遺伝子発現を有するがんサブタイプは、MDM2i 感受性を予測するバイオマーカーに関して濃縮された患者集団を表す。

【0230】

TP53 野生型細胞株における訓練セットの受信者動作特性および 1つ抜き交差検定 (LOOCV) 感受性シグネチャー

LOOCV 分析を全ての感受性 ($n = 62$) および耐性 ($n = 164$) 細胞株に行なった。感受性または非感受性 / 耐性と称される全ての細胞株に関して、1つ抜き (LOO) シグネチャーを、残りの感受性と耐性系間の差次的発現分析を行なうことによって構築した。各細胞株を各 LOO シグネチャーに関してスコア化し、レフトアウト試料のクラスを、レフトアウト試料スコアを残りの感受性および耐性試料の平均シグネチャースコアと比較することによって予測し；レフトアウト試料スコアが耐性平均値よりも感受性平均値に近い場合、レフトアウト試料を感受性と分類した。レフトアウト試料におけるシグネチャースコアが感受性を予測する能力を受信者動作特性 (ROC) 分析を使用して評価した。

【0231】

ROC プロットを真陽性率 (y 軸) 対偽陽性率 (x 軸) を TP53 野生型細胞株における化合物 A 訓練セットおよび LOOCV 感受性スコアに関してプロットすることによって作成した。Wilcoxon p 値をシグネチャースコア対真の感受性コール状態のそれぞれに関して計算し、有意であると見出された。訓練セットスコアおよび LOOCV スコアは、それぞれ、 8.3×10^{-7} (すなわち、 8.3×10^{-7}) および 2.4×10^{-4} (すなわち、 2.4×10^{-4}) の p 値、ならびに 0.92 および 0.8 の AUC 値を有した。この分析は、化合物 A MDM2i に対する感受性を示す遺伝子シグネチャーにおける遺伝子の発現の予測能力を支持する。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 2 】

上記の結果を以下のように要約する：図 1 A ~ 1 E に示された 177 遺伝子の 139 遺伝子が多発がんを含めた目的のがん型における明瞭な可変性の発現（すなわち、 $R > 0.2$ ；分散 > 0.2 ）を示した。表 3 に示された 38 の遺伝子は、例えば、前臨床動物腫瘍モデルにおける *in vitro* と *in vivo* の両方での一貫した TP53 依存性発現を示し；37 の遺伝子（すなわち、PEBP1 を除く表 3 における遺伝子）は、正常組織と比較して、がん組織における増加した発現を示した。表 3 では、「全て」は、以下のがんタイプ：急性リンパ球性白血病（ALL）、急性骨髓性白血病（AML）、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）、神経膠芽腫（GBM）、メラノーマ、多発がんおよび骨髓腫を表す。

【表3】

表3

遺伝子シグネチャーコンポーネント	正常と比較して正の発現を有するがんのタイプ
BAX	全て
C1QBP	全て
FDXR	ALL、ALM、DLBCL、メラノーマ、骨髄腫、多発がん
GAMT	ALL、ALM、GBM、骨髄腫
RPS27L	DLBCL、GBM、メラノーマ、骨髄腫、多発がん
SLC25A11	DLBCL、メラノーマ、骨髄腫
TP53	全て
TRIAP1	全て
ZMAT3	全て
AEN	全て
C12orf5	全て
GRSF1	全て
EIF2D	ALL、ALM、DLBCL、メラノーマ、骨髄腫、多発がん
MPDU1	AML、DLBCL、メラノーマ
STX8	全て
TSFM	DLBCL、骨髄腫
DISC1	ALL、ALM、GBM、メラノーマ、骨髄腫、多発がん
PEBP1	なし
SPCS1	全て
PRPF8	ALL、ALM、DLBCL、GBM、メラノーマ、多発がん
RCBTB1	全て
SPAG7	AML、骨髄腫

10

20

30

40

遺伝子シグネチャー構成要素遺伝子	正常と比較して正の発現を有するがんのタイプ	
TIMM22	ALL、GBM、メラノーマ、骨髄腫	
TNFRSF10B	全て	
ACADSB	ALL、ALM、メラノーマ、骨髄腫、多発がん	10
DDB2	ALL、ALM、DLBCL、メラノーマ、骨髄腫、多発がん	
FAS	AML、DLBCL、GBM	
GDF15	GBM、メラノーマ	
GREB1	ALL、GBM、メラノーマ、骨髄腫、多発がん	20
PDE12	ALL、AML、メラノーマ、骨髄腫、多発がん	
POLH	全て	
C19orf60	骨髄腫	
HHAT	ALL、AML、メラノーマ、多発がん	
ISCU	骨髄腫	30
MDM2	全て	
MED31	ALL、AML、骨髄腫	
METRN	GBM、メラノーマ	
PHLDA3	メラノーマ	

【実施例3】

40

【0233】

MDM2i感受性と関連する遺伝子発現プロファイルの洗練化

【0234】

いろいろながん型 / サブタイプにおける MDM2i 感受性と高く相関する遺伝子セットを決定する目的で、MDM2i に対する感受性を示す遺伝子シグネチャーをさらに洗練した。コンピューターソフトウェア、アルゴリズムおよびバイオインフォマティクスの手法を利用した。

【0235】

当業者によって認識されるように、Random Forest は、分類および回帰分析のための L. Breiman (2001, Machine Learning, 45,

50

5～32)によって報告されている機械学習アルゴリズムである。アルゴリズムは、元のデータから繰り返しランダムに選択されたサンプルおよび変数からなる多くの決定木を構築することによって機能する。Random Forestモデルが構築された後、モデルは、分類に重要ではない変数を除外することによって単純化され得る。変数選択方法がR.Diaz-Uriarteら(2006, BMC Bioinformatics, 7(3):1471～1421)によって開発され、変数減少法と変数重要度スコアに基づく選択の両方を使用して、Random Forestモデルから重要な変数を選択し得る。これらの技法をOncopanel(商標)、例えば、実施例2における細胞株の感受性データに適用して、それらの感受性の効果的な分類に寄与する遺伝子セットを選択した。

10

【0236】

最初の遺伝子セットとして、Compendiaによって提供された350遺伝子を使用した。これらの遺伝子は、実施例1に記載されたMDM2i化合物Aの分析から同定された175の総遺伝子から感受性および耐性シグネチャー遺伝子として選択された遺伝子である。感受性スコアを「感受性」および「耐性」として二値化し；2μM(2μM)以下のIC₅₀値を有する70細胞株を感受性と定義し、20μM(20μM)以上のIC₅₀値を有する163細胞株を耐性と定義した。境界の感受性を有する、すなわち、2μMから20μMのIC₅₀値を有する7細胞株を分析から除外した。これもRicerca Biosciencesによって提供されたメッセンジャーRNA(mRNA)発現値を説明変数として使用した。

20

【0237】

Random ForestモデルをR統計ソフトウェア(ver. 2.13)の商用利用可能な「randomForest」パッケージ(ver. 4.6)によって構築した。木の数に関するパラメーターを5000に設定した。変数選択アルゴリズムをRの「varSelRF」パッケージ(ver. 0.7)において実施した。最初のデータを使用してrandomForestのオブジェクトをいったん構築すると、続けてvarSelRF方法がそれに適用された。結果として、8つの遺伝子(BAX、CDKN1A、DDB2、EDA2R、FDXR、MDM2、RPS27L、およびSPATA18)をMDM2i感受性分類に関する重要な遺伝子として選択した。BAX、CDKN1A、DDB2、FDXR、MDM2およびRPS27L遺伝子は、表3に示された38遺伝子の遺伝子セットにも含まれる。8つの遺伝子が細胞株をMDM2iに対して感受性であると分類するのに十分であるかどうかを評価するために、アウトオブバッグ(OOB)誤差推定値を元の350遺伝子を使用して構築されたモデルと選択された8つの遺伝子間で比較した。350-遺伝子モデルのOOB誤差率は10%であった一方、8-遺伝子モデルの誤差率は、9.4%であり、遺伝子の数を350から8に減少させることは、予測モデルがMDM2i感受性を予測する能力に影響しなかったことを示している。

30

【実施例4】

【0238】

遺伝子シグネチャーは、in vivoヒト腫瘍移植片モデル研究において腫瘍化動物のMDM2i処置に対する感受性を予測する

40

【0239】

この実施例は、本発明に基づく遺伝子シグネチャーおよびそれに関連する感受性シグネチャースコアが、かかる腫瘍を有し、MDM2iで処置された動物における特定のMDM2iに対する様々な腫瘍型の感受性を予測するのに効果的であることを実証する腫瘍化動物モデルを使用したin vivo実験を記載する。

【0240】

材料および方法

患者由来異種移植片モデル(Champions Tumor Graft(商標)；Champions Oncology, Inc., Hackensack, NJ)を使用した。Champions Tumor Grafts(商標)は、高度に集中された、促

50

進的なトランスレーショナルプラットフォームを提供し、これは、本来のヒト腫瘍の生物学的特徴を保存するような様式での免疫不全マウスにおける原発性ヒト腫瘍の移植、それに続く少ない継代数でのChampions Tumor Grafts（商標）の増殖に基づく。その企業によって提供される情報によれば、組織学および分子研究は、Champions Tumor Graft（商標）モデルががん幹細胞およびストローマを含めた本来の腫瘍の基礎的な遺伝子型および表現型特色を維持し；がんの遺伝的な不均質性を表し；患者における腫瘍学的薬物の有効性を予測し；高度に応答性の患者集団の同定を可能にし；複数の継代にわたって遺伝的に変化せず；本来の患者腫瘍と遺伝的に相関し；標準薬剤に対する一貫した増殖および応答を示すことを明らかにした。Tumor Grafts（商標）モデルは、マイクロアレイ発現分析によって患者のがん試料およびChampions Tumor Graft（商標）試料の遺伝子発現分析の比較を可能にする。多数（例えば、30,000）の遺伝子を分析する。ピアソン相関は、腫瘍移植片におけるがん遺伝子発現と本来の腫瘍におけるがん遺伝子発現間の相関を高い割合（例えば、94%）で示す。

10

【0241】

動物

6～9週齢の雌の免疫不全nu/nuマウス（Harlan）を個々のHEPA換気ケージ（Innocage（商標）IVC, Innovative USA）中の放射線照射済みのペーパーツイスト強化1/8インチコーンコブ床敷（Shepherd）に収容し、68～74°F（20～23°C）および30～70%湿度での12時間明暗周期で保った。動物に適宜、水（逆浸透、2ppmCl₂）ならびに19%のタンパク質、9%の脂肪、および4%の繊維からなる放射線照射されたTest齧歯動物の食事（Teklad 2919）を与えた。

20

【0242】

感受性スコア計算

感受性および耐性シグネチャーをChampions Tumor Graft（商標）モデルにおいてスコア化した。モデル内の相対的シグネチャー発現の特徴を明らかにするために、Affymetrix U219マイクロアレイフォーマットプラットフォーム上で測定された全てのChampions Tumor Graft（商標）モデル(>145モデル)を結合したカスタムデータセットを構築した。遺伝子発現データをGC Robust Multi-array Average (GCRMA) バックグラウンド調整アルゴリズムを使用してプロセシングした。代替のチップ定義ファイル (altCDF) を使用して、プロープをEntrez Gene識別子と関連するプロープセットに集約した。当業者は認識するように、以下のインターネットアドレス（すなわち、http://brainarray.mbnimed.umich.edu/Brainarray/Database/CustomCDF/genomic_curated_CDF.asp）を通して入手可能およびダウンロード可能であるHGU219_Hs_ENTREZG_alternative_CDF（バージョン15.1.0）を利用した。シグネチャーにおける各遺伝子の寄与を正規化するために、シグネチャー遺伝子をZ-スコア正規化（各遺伝子の平均発現値を各試料内の値から引き、差を標準偏差で割る）に供した。モデルにわたるシグネチャースコアを各シグネチャー遺伝子のZ-スコア正規化発現値の非加重平均を決定することによって生成した。

30

【0243】

腫瘍モデルの記述

いくつかのヒト腫瘍組織型に関する動物腫瘍モデルを以下に記載したように作製し、以下に示す表5に示した。NSCLCは、非小細胞肺がんを表す。シグネチャースコアは、研究において使用されたMDM2i、つまり、この実施例における化合物B(3'R,4'S,5'R)-N-[(3R,6S)-6-カルバモイルテトラヒドロ-2H-ピラン-3-イル]-6"-クロロ-4'-(2-クロロ-3-フルオロピリジン-4-イル)-4,4-ジメチル-2"-オキソ-1",2"-ジヒドロジスピロ[シクロヘキサン-

40

50

1, 2' - ピロリジン - 3', 3" - インドール] - 5' - カルボキサミド、および化合物B p-トルエンスルホン酸塩に対する各腫瘍型の感受性のレベルと相関する、177遺伝子（図1A～1Eに表された遺伝子）、175遺伝子（EDA2RおよびSPATA18を除く図1A～1Eに表された遺伝子）、40遺伝子（表1に表された遺伝子）、4遺伝子（RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN）および3遺伝子（（RPS27L、FDXRおよびCDKN1A）の分析から得られた代表的なMDM2i遺伝子感受性シグネチャースコアまたは値である。

【0244】

腫瘍移植

動物に、それぞれ特定の継代ロットの腫瘍化宿主動物から収集された腫瘍断片を両側側腹部領域に移植した。研究前の腫瘍体積を各実験に関して記録し、これをその推定開始日約1週間前に開始した。腫瘍が約125～250mm³に達した時、動物を腫瘍体積によって処置および対照群に当てはめ、投薬を開始した（第0日）。全ての研究における動物にタグを付け、実験を通して個々にフォローした。

10

【0245】

投薬レジメン

標準薬剤に関する最初の投薬を第0日に開始し；全ての群における動物に体重によって投薬した（グラムあたり0.01ml；10ml/kg）。各群に関する用量濃度、投与の経路およびスケジュールを実験デザイン項に列挙し、ここで、「p.o./qd×10」は、10日間の毎日の経口（口による）を示す。

20

【0246】

実験デザイン

ヒト腫瘍移植片モデル研究の実験デザインを以下の表4に示す。「n」は、群あたりの動物の数を示し；「ROA」は、試験薬剤、すなわち、MDM2i薬剤の投与の経路を示す。

【表4】

表4

MDM2i、化合物B p-トルエンスルホン酸塩で処置されたヒトメラノーマ、NSCLC、結腸直腸、および肺がんのChampions TumorGraft(商標)モデル

30

群	-n-	薬剤	用量 (mg/kg/用量)	ROA/スケジュール
1	10	ビーグル対照	--	p.o./qd×10
2	10	化合物B p-トルエンスルホン酸塩	100	p.o./qd×10

40

【0247】

試験薬剤効力の評価

腫瘍成長阻害（TGI）：第0日に開始し、腫瘍寸法をデジタルカリパスで週2回測定し、個々のおよび平均の推定腫瘍体積（Mean TV±SEM）を含むデータを各群に関して記録した。腫瘍体積を式（1）：TV = 幅² × 長さ × 0.52を使用して計算した。研究完了時に、パーセント腫瘍成長阻害（%TGI）値を最初の（i）および最終（f）腫瘍測定値ならびに式（2）：%TGI = 1 - T_f - T_i / C_f - Cを使用して各処置群（T）対対照（C）に関して計算し、報告した。最後の投与に最も近くスケジュールされた日の腫瘍成長阻害（TGI）値を以下の表5に要約した。この例では、研究期間をビーグル対照の腫瘍サイズによって定義した。いくつかの場合では、例えば、表5におけるC

50

T G - 0 2 1 3 は、腫瘍が閾値サイズに達するのにより長い期間を必要とした。結果として、M D M 2 i 化合物 B で処置された試験動物は長い期間、C T G - 0 2 1 3 の場合は40日、M D M 2 i 未処置の状態に置かれた。M D M 2 i 処置のない時間の長さは、C T G - 0 2 1 3 動物のいくつかにおいて腫瘍の再成長を引き起こした。したがって、T G I の評価を第7～11日あたり（第9日あたり）などの処置期間の最後近くに設定した。

【0 2 4 8】

表5における%T G Iとシグネチャースコア値の比較は、高シグネチャースコアを有する腫瘍型がT G I評価時の腫瘍成長阻害の高百分率と相關したことを示している。

【表5】

表5

モデル名称	腫瘍組織型	シグネチャースコア値					研究期間 (日)	TGI評価	%TGI
		177	175	40	4	3			
CTG-0201	メラノーマ	0.0	0.0	-0.5	-0.6	-1.0	17	第10日	-10
CTG-0204	メラノーマ	0.8	0.7	0.9	0.7	0.6	17	第10日	51
CTG-0213	メラノーマ	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3	49	第7日	87
CTG-0500	メラノーマ	0.3	0.3	0.0	0.6	0.1	13	第7日	104
CTG-0501	メラノーマ	0.6	0.5	0.9	0.7	0.3	18	第11日	101
CTG-0069	結腸直腸	-0.3	-0.2	-0.5	-0.8	-0.8	20	第11日	19
CTG-0093	結腸直腸	0.4	0.4	0.6	1.0	1.2	23	第9日	53
CTG-0159	NSCLC	-0.2	-0.2	-0.2	-1.5	-1.6	18	第11日	-13
CTG-0502	NSCLC	0.6	0.6	0.9	0.9	0.8	18	第10日	122
CTG-0282	膵臓	0.2	0.2	0.6	1.2	1.0	19	第11日	-30
CTG-0292	膵臓	-0.2	-0.2	-0.4	-0.7	-0.7	21	第11日	54
CTG-0203	メラノーマ	0.7	0.7	0.6	0.6	0.7	25	第11日	98

10

20

30

40

50

【実施例5】

【0 2 4 9】

訓練セットとしてM D M 2 i 感受性が不明である20の試料を用いることによるM D M 2 i 処理に対する感受性の予測

【0 2 5 0】

C C L E データセット

訓練セットとして薬理データを有しない試料から、がん細胞株のM D M 2 阻害剤処理に対する感受性を予測するために、発明者らは、Broad Institute、Novartis Institutes for Biomedical Research、およびそのGenomics Institute of the Novartis Research Foundationにより提供されるCancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)による細胞株のm R N A 発現データを使った。発明者らは、M D M 2 i 感受性データを持つ185の細胞株、M D M 2 i 感受性データを持たない242のp 5 3 野生型細胞株、および、M D M 2 i 感受性データを持たない512のp 5 3 変異型細胞株をC C L E データセット中に見出した。本予測に用いたC C L E データベースの細胞株は、図12に示されている。

【0 2 5 1】

患者由来異種移植モデル (Champions TumorGraft (商標) ; Champions Oncology, Inc., Hackensack, NJ)

図13に列挙したP D x モデルは、Champions Oncology, Inc.から購入した。P D x モデルは、患者腫瘍と良く似た特性を有するが、ヒト体内における腫瘍に対して同様の効果を奏する高い蓋然性をもって目的の薬物の効果を調べるために開発された。特に、従来の腫瘍モデルは、患者の腫瘍から樹立された腫瘍細胞株をマウスに移植して生み出され、移植した腫瘍細胞株の特性を強く反映させるのに対して、P D x モデルは、マウスに対してストローマおよびがん幹細胞を含む患者の腫瘍を移植することにより生み出されるものであり、それ故に患者の腫瘍に良く類似する。本予測で用いられたP D x モデルは図13に

示されている。PDXモデルは、MDM2i感受性データを伴う12のモデルと、MDM2i感受性データを伴わない105のp53野生型モデルと、MDM2i感受性データを伴わない103のp53変異型モデルを含んでいた。

【0252】

TP53の変異情報

TP53の変異情報は、Broad-Novartis Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (<http://www.broadinstitute.org/ccle/home>)、Sanger COSMIC Cell Line Project (CLP) (http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cell_lines/)、および International Agency for Research on Cancer (IARC) (<http://www.iarc.fr/>)のウェブサイトからダウンロードした。CCLEのハイブリッドキャプチャー配列データは、2012年5月2日版であり、CLPは、バージョン69であり、IARC TP53データベースは、バージョンR17であった。これらのデータベース間でいくつかの不整合が存在したので、これら全てのデータベースで一貫した変異情報を有する場合にのみ、各細胞株に対して発明者らは「野生型」(wt)および「変異型」(mut)をラベルした。例えば、ある細胞株は、CLPおよびIARCでは「変異型」であったが、CCLEでは「野生型」であったとき、その変異情報は不明と決定した。1つまたは2つのデータベースにおいて情報がない細胞株の場合は、その細胞株の変異ステータスは、残りのデータベースに基づいて決定した。例えば、ある細胞株がCCLEおよびIARCの両方で「野生型」であり、CLPにおいて情報がない場合には、その細胞株は、「野生型」であるとラベルされた。

10

20

【0253】

MDM2阻害剤に対する感受性

細胞増殖の50%の抑制が観察される濃度であるIC₅₀は、Ricerca Biosciences (Eurosins)により決定された。MDM2阻害剤に対する感受性は、本実施例では、IC₅₀を参照することにより、IC₅₀ = 1 μMのとき感受性であり、IC₅₀ > 1 μMのとき耐性であると決定された。

30

【0254】

予測

MDM2i処理に対する感受性は、MDM2i感受性データを伴う185の細胞株のそれぞれで予測した。本予測は、MDM2i感受性データを伴わない細胞株からランダムにピックアップされた訓練セットとしての20の細胞株において4または40の遺伝子の発現プロファイルを用いて行った。本予測は、毎回異なる訓練セットを用いて100回反復実施した。その後、予測結果は、予測が正確か否かを知るために、実験的に決定された感受性データと比較された。予測精度においてTP53変異の効果を検証するために、各訓練セットは、各図において指定されたTP53野生型細胞株とTP53変異型細胞株の数を有するように、TP53野生型細胞とTP53変異型細胞の数が選択された。

30

【0255】

予測精度

FPRおよびFNRに加えて、予測精度が算出された。感受性細胞株が感受性であると予測され、または耐性細胞株が耐性であると予測されたとき、予測は正しいと評価された。100回のシミュレーションの後、正しい予測のパーセンテージを各細胞株に対して算出した。

40

【0256】

メラノーマ

メラノーマ細胞株に焦点を当てるために、10のTP53変異型メラノーマ細胞株と10のTP53野生型メラノーマ細胞株を、CCLEデータベースからランダムにピックアップし、20のメラノーマ細胞株セットを作成した。CCLEデータセットは、MDM2i感受性データを伴う185の細胞株と、感受性データを伴わない29のp53野生型細胞株と、感受性データを伴わない14のp53変異型細胞株とを含んだ。

【0257】

リンパ腫

50

リンパ腫細胞株に対する予測性を検証するため、10のTP53変異型リンパ腫細胞株と10のTP53野生型リンパ腫細胞株を、CCL Eデータベースからランダムにピックアップし、20のリンパ腫細胞株セットを作成した。CCL Eデータセットは、MDM2_i感受性データを伴う185の細胞株と、感受性データを伴わない44のp53野生型細胞株と、感受性データを伴わない60のp53変異型細胞株とを含んだ。

【0258】

スコア外挿モデル

細胞株における遺伝子の発現プロファイルを取得した後に、各遺伝子の発現量を平均が0となり、標準偏差(SD)が1となるように正規化し、各遺伝子の正規化スコアを得た。試料のスコアは、解析した全ての遺伝子の正規化スコアを平均することによって算出した。目的の試料が感受性か耐性かを予測するために、真陽性率を最大化し、偽陽性率を最小化する最適化閾値を、受信者動作特性(ROC)プロットをプロットし、一個抜き交差検定(LOOCV)解析を実施することにより決定した。 -0.02 (LOOCVから)および 0.2 (元の解析から)が閾値として得られ、それぞれ「fixed(-0.02)」および「fixed(0.2)」と呼ばれる。閾値は、大津法(M. Sezgin and B. Sankur (2004), Journal of Electronic Imaging 13 (1): 146-165, および N. Otsu (1979), IEEE Trans. Sys., Man., Cyber. 9 (1): 62-66参照)によっても決定され、これは図中では"score distribution"モデルと呼ばれる。閾値は、試料のうち、TP53野生型試料の参照スコアの第1四分位値としても決定され、これは図中では"score in wt"と呼ばれる。

10

20

30

【0259】

混合ガウスモデル(以後、"high-percentage models"とも呼ばれる)

混合ガウスモデルを作成するために、C. Fraley et.al. (Technical Report no. 597, Department of Statistics, University of Washington, June 2012.)により開発された、商用利用可能な'mclust'パッケージ(バージョン4.3)を、R統計ソフトウェア(バージョン3.0.2)上で用いた。混合ガウスモデルは以下のように作成することができる。感受性細胞株と耐性細胞株とからなる細胞株パネルにおいては、シグネチャー遺伝子のmRNA発現の分布を感受性細胞株および耐性細胞株から由来する分布の混合として記述することができる。分布が正規分布であると推定すると、混合した分布は、混合ガウスモデルとして記述される：

【数10】

$$p(x|\lambda) = \sum_{i=1}^2 \omega_i g(x|\mu_i, \sigma). \quad (1)$$

{式中、 λ は、パラメーターセット： $\lambda = \{\omega_i, \mu_i, \sigma\}$ 、 $i = 1, 2$ であり、かつ、 $\omega_i, i = 1, 2$ は、混合重み付け値であり、 $g(x|\mu_i, \sigma)$ 、 $i = 1, 2$ は、ガウス密度成分である。}。それぞれの密度成分は、平均値 $\mu_i, i = 1, 2$ を伴う、

【数11】

40

$$g(x|\mu_i, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left(-\frac{(x-\mu_i)^2}{2\sigma^2}\right), \quad i = 1, 2, \quad (2)$$

の形態のガウス関数である。便宜的に μ_1 は、 $\mu_1 < \mu_2$ の制約を満たすものとする。標準偏差 σ は、感受性細胞株および耐性細胞株の間で共通している、すなわち $\sigma_1 = \sigma_2$ と仮定する。各パラメーターは、最尤推定法(これは訓練データが与えられたモデルの尤度を最大化するモデルのパラメーターを見つけることである)により、推定することができる。訓練ベクトル $X = \{x_1, \dots, x_n\}$ の配列に対して、尤度は、

【数12】

$$p(X|\lambda) = \prod_{t=1}^T p(x_t|\lambda). \quad (3)$$

と記載できる。最大尤度パラメーターは、期待値最大化（EM）アルゴリズムにより得ることができる。EMアルゴリズムの基本的アイデアは、

【数13】

$$p(X|\hat{\lambda}) \geq p(X|\lambda)$$

10

となるように、新しいパラメーター

【数14】

$$\hat{\lambda}$$

を前のパラメーターから推定することである。は、尤度が極大値に収束するまで繰り返し更新される。M種類の遺伝子に対して、各遺伝子の発現を、 c_m , $m = 1, \dots, M$ であると記述すると、遺伝子mのクラスは、

20

【数15】

$$c_m = \operatorname{argmax}_i \{\omega_i g(x_m|\mu_i, \sigma)\}, \quad i = 1, 2, \quad m = 1, \dots, M, \quad (4)$$

{式中、 c_m は、1または2であり、 $c_m = 1$ のとき遺伝子は「低い」（lower）、 $c_m = 2$ のとき「高い」（upper）と呼ばれる}により記述できる。変数：

【数16】

$$u_m^{c_m} = \begin{cases} 0, & c_m = 1 \\ 1, & c_m = 2 \end{cases},$$

30

(5)

は、遺伝子mが属するクラスを記述するために導入され、「高い方の比率」（upper ratio）は、

【数17】

$$(upper ratio) = \frac{\sum_{m=1}^M u_m^{c_m}}{M}. \quad (6)$$

40

により与えられる。MDM2阻害剤に対する感受性スコアの閾値は、高い方の比率（upper ratio）(6)を参照することにより決定することができる。この戦略は、TP53変異を伴う細胞株のほとんどがMDM2阻害剤に対して耐性であるため、可能である。閾値は、TP53変異型細胞株がその高い方の比率（upper ratio）に基づいて並べられたときに、高い方の比率（upper ratio）の第3四分位値（「High%[quartile]」または単に「quantile」）、または最大値（「High %[max]」または単に「max」）として決定された。細胞株は、高い方の比率（upper ratio）が閾値よりも高い場合には感受性であると予測され、高い方の比率（upper ratio）が閾値よりも低い場合には耐性であると予測される。

50

【数18】

$$(Likelihood \cdot ratio) = \prod_{m=1}^M \frac{\omega_2 g(x_m | \mu_2, \sigma)}{\omega_1 g(x_m | \mu_1, \sigma)} \quad (7)$$

M D M 2 阻害剤に対する感受性はまた、尤度比(7)を参照することによって、前記比1なら感受性であると、前記比<1なら耐性であると決定され、図中では、"distribution-only"モデルと呼ばれる。

【0260】

10

シミュレーション

20の細胞株の各セットに対して、2つの予測モデルを作成した：1つはT P 5 3変異型細胞株の最大値から感受性閾値を決定するモデル("max"モデル)およびもう1つはT P 5 3変異型細胞株の75パーセンタイル(第3四分位)から感受性閾値を決定するモデル("quartile"モデル)であった。各予測モデルは、185の細胞株に適用され、偽陽性率(F P R)と偽陰性率(F N R)とが以下の通り算出された：

【数19】

$$FPR = FP / (FP + TN) \quad (8)$$

$$FNR = FN / (TP + FN) \quad (9) \quad 20$$

{式中、T Pは、真陽性件数、T Nは真陰性件数、F Pは偽陽性件数、F Nは偽陰性件数である。}。このシミュレーションも100回繰り返され、結果は、X軸およびY軸がそれぞれF P RおよびF N Rを表すグラフ上にプロットされた。

【0261】

結果

図4に示されるように、M D M 2 i処理への感受性は、訓練セット中のいずれの細胞株の感受性も不明である訓練セットを用いたいずれの予測モデルによっても良好に予測された。「fixed(0.2)」モデルは、M D M 2 i処理への感受性を、用いた訓練セットによらず、T P 5 3変異によらず、最も良好に予測した。わずか4遺伝子を用いた予測もまた、M D M 2 i処理に対するがん細胞の感受性を良好に予測した(データ掲載省略)。

30

【0262】

訓練セットとしてメラノーマ細胞株のみを用いたメラノーマ細胞株の感受性の予測結果は、図5Aに示された。メラノーマ細胞株においては、全ての予測モデルがメラノーマ細胞株の感受性を精度高く予測した。これらの結果は、予測精度が他のがん種を除外することによって改善しうること、およびメラノーマにおいてM D M 2 i治療に対する感受性が正確に予測できることを示す。

【0263】

40

訓練セットとしてリンパ腫細胞株を用いた、または特定の種類の細胞株を用いない場合のリンパ腫細胞株の感度の予測結果は、図5Bに示された。図5Bに示されるように、全ての予測モデルがリンパ腫細胞株の感度を正確に予測した。これらの結果もまた、予測精度が他のがん種を除外することによって改善しうることを示している。

【0264】

これらの結果を検証するため、M D M 2 i処理に対する感受性をP D Xモデルにおいて予測した。図6に示されるように、全ての予測モデルが、インビボのがん環境を有するP D Xモデルにおいて腫瘍の感受性を正確に予測した。

【実施例6】

【0265】

M D M 2 i治療に対するその感受性の予測性に対するがんにおけるp 5 3変異の影響

50

【0266】

20のがん細胞株がCCL Eデータセットからランダムにピックアップされ、訓練セットとして用いられた。予測性に対するがんにおけるp53変異の影響を評価するために、p53変異を伴う0、5、10、15、または20のがん細胞株を各訓練セットに含ませた。偽陽性率を最小化し、真陽性率を最大化する最適化閾値が各訓練セットにおいてLOCV解析により決定された。各最適化閾値は100の異なる訓練セットから繰り返し得られた。これらの最適化閾値は、図7にプロットされた。

【0267】

図7に示されるように、閾値の分布は、訓練セットが増加した数のp53変異を含むと増加する傾向がある。感受性は、その後、最適化閾値のそれぞれを用いることによって実施例5に記載されたスコア外挿モデルを用いて予測された。驚くべきことに、感受性は、訓練セットにおけるp53変異の割合によらず正確に予測された。これらの結果は、訓練セットにおけるp53変異の割合は閾値には影響しうるが、予測精度には影響しないことを示す(図8)。

10

【0268】

本実施例は、感受性が、感受性が不明である細胞株を用いて予測できることも示している。

【実施例7】

【0269】

MDM2i治療に対する感受性の予測性に対するがんにおけるMDM2遺伝子増幅の影響

20

【0270】

実施例5に記載の通り、スコア外挿モデルおよび混合ガウスモデルにより予測を実施した。予測マーカーとして図1A～1Eの上位4、上位40、上位175または上位177の遺伝子を用いると、良好な感受性の予測が得られた(図9参照)。しかし、SJS A - 1およびCCF - STTG1などの感受性細胞株のいくつかでは、図9において耐性であると予測された。

20

【0271】

感受性の予測性に対するMDM2遺伝子増幅(または続く当該遺伝子の過剰発現)の影響を評価するために、発明者らは、100の訓練セットにおいて、線形判別分析による説明変数として4遺伝子(RPS27L、FDXR、CDKN1AおよびAEN)の遺伝子発現値にMDM2の発現値を加えた場合と加えなかった場合の結果から算出される予測精度を比較した。図9で列挙された23の細胞株の1個抜き交叉検証がなされ、各細胞は、感受性である(感受性である可能性0.5)、または、耐性である(感受性である可能性<0.5)と予測された。

30

【0272】

発明者らはまた、前記4つの予測マーカーにMDM2を加えることが予測精度を顕著に改善することを発見した(図10A～10D参照)。発明者らはまた、SJS A - 1およびCCF - STTG1細胞株がMDM2の増幅をそのゲノム上に有していること、および、SJS A - 1およびCCF - STTG1細胞株におけるMDM2の発現レベルが残りの細胞株における発現レベルを遙かに超えていることを見出した(図9)。予測精度が、ゲノム上でMDM2の増幅を有するSJS A - 1およびCCF - STTG1細胞株以外の、残りのすべての細胞株についても改善されたことは注目すべきである。

40

【実施例8】

【0273】

MDM2i治療に対する感受性の予測精度に対する訓練セットの規模の影響

【0274】

本実施例では、訓練セットの規模がMDM2i処理に対する感受性の予測精度に影響するか否かを確かめた。図11A～11Cに示されるように、TP53野生型とTP53変異型細胞株を同数ずつ含む、記載された数のCCL E細胞株をランダムに選択し、訓練セ

50

ットとして用いて、各予測において、high %[max]モデル、high %[quantile]モデル、およびdistribution-onlyモデルなどの予測モデルにおいて閾値を得た。閾値の取得後、図に示された15の細胞株の感受性を各モデルにおいて予測した。各細胞株の感受性は、各予測において細胞株からランダムに選択された100の異なる訓練セットを用いて100回予測された。その後、予測精度(%)がその結果から算出された。

【0275】

図11A～11C～11Cに示されるように、精度は、全ての予測モデルにおいて、様々な訓練セットの規模において良好に保たれた。特に、いずれの予測モデルにおいても、訓練セットの規模として4細胞で良好な結果を得るに十分であることが実証された。訓練セットの規模が6細胞以上であったときに訓練セットの規模への明確な依存性は何ら観察されなかった(図11A～11C)。

10

【0276】

適した方法および材料が実施形態の実行のために本明細書で記載されるが；しかしながら、本明細書に記載のものと類似したまたは同等の方法および材料が本発明および記載された実施形態の実行または試験に使用され得ることが理解されるべきである。本明細書で言及した公共利用が可能なGenBank登録番号に対応する核酸配列は、その全体が参照により組み込まれている。

【0277】

本明細書で言及した全ての刊行物、特許出願、特許、および他の公開された参考文献は、その全体が参照により組み込まれている。

20

【図1A】

レポーター (Entrez Gene ID)	遺伝子	p 値	q 値	t 統計値
51065	RPS27L	0	0	10.52658
2232	FDXR	0	0	9.570161
1026	CDKN1A	0	0	11.2817
64782	AEN	1.25E-14	5.50E-11	8.375916
50484	RRM2B	8.15E-13	2.86E-09	7.590494
27244	SESN1	1.22E-12	3.56E-09	7.634982
51499	TRIAP1	1.29E-12	3.22E-09	7.517954
1643	DDB2	1.91E-12	4.18E-09	7.389049
900	CCNG1	2.55E-10	4.97E-07	6.512725
7508	XPC	3.41E-10	5.97E-07	6.509363
200916	RPL22L1	1.13E-09	1.80E-06	6.308972
57103	C12orf5	1.46E-09	2.14E-06	6.267534
8493	PPM1D	2.60E-09	3.50E-06	6.219334
581	BAK	2.67E-09	3.35E-06	6.19513
282991	BLOC1S2	9.59E-09	1.12E-05	5.580249
23612	PHLDA3	3.15E-08	3.45E-05	5.731726
79142	PHF23	3.43E-08	3.54E-05	5.595957
64393	ZMAT3	5.34E-08	5.20E-05	5.665522
26263	FBXO22	5.73E-08	5.29E-05	5.529363
132671	SPATA18	1.98E-07	1.73E-04	5.597446
4193	MDM2	4.54E-07	3.79E-04	5.30776
26999	CYFIP2	7.50E-07	5.97E-04	4.96624
708	C1QBP	1.12E-06	8.52E-04	4.868632
9552	SPAG7	1.75E-06	1.28E-03	4.764979
57805	KIAA1967	2.00E-06	1.40E-03	4.734026
60401	EDA2R	2.84E-06	1.91E-03	4.746488
8795	TNFRSF10B	3.79E-06	2.46E-03	4.614281
94241	TP53INP1	3.81E-06	2.38E-03	4.664147
6341	SCO1	4.42E-06	2.67E-03	4.568465
283489	ZNF828	6.09E-06	3.56E-03	4.476846
2055	CLN8	6.12E-06	3.46E-03	4.565635
56061	UBFD1	7.55E-06	4.14E-03	4.448178
59	ACTA2	8.56E-06	4.55E-03	4.429173
8402	SLC25A11	1.11E-05	5.72E-03	4.351489
80349	WDR61	1.20E-05	5.99E-03	4.319033
125150	ZSWIM7	1.42E-05	6.89E-03	4.292225
125144	NCRNA00188	1.57E-05	7.45E-03	4.252244

【図1B】

レポーター (Entrez Gene ID)	遺伝子	p 値	q 値	t 統計値
28972	SPCS1	1.63E-05	7.51E-03	4.242991
4089	SMAD4	1.88E-05	8.46E-03	4.216489
25819	CCRN4L	1.96E-05	8.58E-03	4.258531
11331	PHB2	2.12E-05	9.07E-03	4.186715
2926	GRSF1	2.27E-05	9.47E-03	4.167679
2593	GAMT	2.43E-05	9.91E-03	4.213717
5481	PPID	2.71E-05	1.08E-02	4.119282
55330	CNO	2.91E-05	1.14E-02	4.114757
58505	OSTC	3.02E-05	1.15E-02	4.093427
5694	PSMB6	3.14E-05	1.17E-02	4.080917
23505	TMEM131	3.41E-05	1.25E-02	4.084536
7298	TYMS	3.50E-05	1.25E-02	4.05366
57050	UTP3	3.85E-05	1.35E-02	4.03416
23484	LEPROTL1	4.07E-05	1.40E-02	4.019239
80020	FOXRED2	4.27E-05	1.44E-02	4.03868
1977	EIF4E	4.29E-05	1.42E-02	4.002279
55213	RCBTB1	4.33E-05	1.40E-02	4.0138
151194	FAM119A	4.46E-05	1.42E-02	3.996426
9518	GDF15	4.63E-05	1.45E-02	4.014801
84975	MFS5D	4.85E-05	1.49E-02	4.003211
27113	BBC3	5.62E-05	1.70E-02	3.956705
55049	C19orf60	5.94E-05	1.76E-02	3.934814
10330	CNPY2	6.01E-05	1.76E-02	3.928271
51768	TM7SF3	6.23E-05	1.79E-02	3.916221
26225	ARL5A	7.51E-05	2.12E-02	3.873823
25940	FAM98A	8.18E-05	2.28E-02	3.836806
9352	TXNL1	8.40E-05	2.30E-02	3.828612
23245	ASTN2	8.52E-05	2.30E-02	3.853942
518	ATPG53	8.78E-05	2.33E-02	3.817589
84229	CCDC135	8.84E-05	2.31E-02	3.829767
5311	PKD2	8.93E-05	2.30E-02	3.821966
6754	SSTR4	9.06E-05	2.30E-02	3.826988
731139	LOC731139	9.24E-05	2.31E-02	3.823148
116969	ART5	9.31E-05	2.30E-02	3.818129
5037	PEBP1	9.88E-05	2.41E-02	3.786189
285521	COX18	1.01E-04	2.44E-02	3.785543

【図1C】

レポーター (Entrez Gene ID)	遺伝子	p 値	q 値	t 統計値
7326	UBE2G1	1.04E-04	2.46E-02	3.772472
35	ACADS	1.08E-04	2.52E-02	3.77945
5889	RAD51C	1.12E-04	2.58E-02	3.773715
6895	TARBP2	1.12E-04	2.55E-02	3.754214
411	ARSB	1.16E-04	2.60E-02	3.805079
9482	STX8	1.21E-04	2.69E-02	3.735765
84912	SLC35B4	1.26E-04	2.77E-02	3.730944
53343	NUDT9	1.27E-04	2.76E-02	3.735334
51003	MED31	1.33E-04	2.83E-02	3.710416
5429	POLH	1.36E-04	2.87E-02	3.71255
84271	POLDIP3	1.66E-04	3.47E-02	3.653663
51146	A4GNT	1.70E-04	3.51E-02	3.651462
5864	RAB3A	1.78E-04	3.62E-02	3.64681
6299	SALL1	1.79E-04	3.61E-02	3.688559
6416	MAP2K4	1.82E-04	3.63E-02	3.621177
4200	ME2	1.89E-04	3.72E-02	3.619065
9687	GREB1	1.91E-04	3.71E-02	3.638211
2395	FXN	1.95E-04	3.76E-02	3.611727
65080	MRPL44	2.12E-04	4.03E-02	3.594791
51649	MRPS23	2.18E-04	4.12E-02	3.578648
23587	C17orf81	2.20E-04	4.11E-02	3.574528
60676	PAPPA2	2.34E-04	4.32E-02	3.557934
51020	HDDC2	2.38E-04	4.34E-02	3.548793
9390	SLC22A13	2.47E-04	4.46E-02	3.545038
84467	FBN3	2.47E-04	4.42E-02	3.537354
9848	MFAP3L	2.50E-04	4.43E-02	3.550474
29090	C18orf55	2.67E-04	4.68E-02	3.516295
36	ACADSB	2.84E-04	4.93E-02	3.522617
7301	TYRO3	3.09E-04	5.30E-02	3.533709
81619	TSPAN14	3.15E-04	5.36E-02	3.484747
84316	LSMD1	3.21E-04	5.42E-02	3.46761
8603	FAM193A	3.22E-04	5.38E-02	3.469764
1017	CDK2	3.25E-04	5.38E-02	3.469841
27292	DIMT1L	3.28E-04	5.37E-02	3.463943
253512	SLC25A30	3.29E-04	5.34E-02	3.470913
83866	TTTY11	3.33E-04	5.36E-02	3.458862
196513	DCP1B	3.41E-04	5.44E-02	3.462432

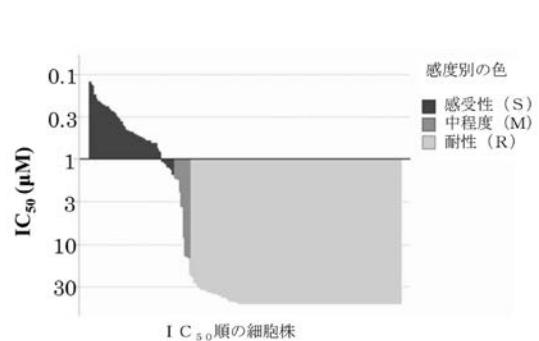
【図1D】

レポーター (Entrez Gene ID)	遺伝子	p 値	q 値	t 統計値
201626	PDE12	3.49E-04	5.52E-02	3.447241
1939	EIF2D	3.53E-04	5.52E-02	3.435996
284217	LAMA1	3.54E-04	5.49E-02	3.481685
29928	TIMM22	3.64E-04	5.60E-02	3.428545
1352	COX10	3.68E-04	5.60E-02	3.429142
2731	GLDC	3.73E-04	5.64E-02	3.462199
80146	UXS1	3.83E-04	5.74E-02	3.43471
28316	CDH20	4.01E-04	5.95E-02	3.408516
5173	PDYN	4.05E-04	5.97E-02	3.400807
3996	LLGL1	4.07E-04	5.95E-02	3.397442
11337	GABARAP	4.08E-04	5.91E-02	3.398251
5198	PFAS	4.09E-04	5.87E-02	3.398986
5616	PRKY	4.11E-04	5.85E-02	3.407265
10935	PRDX3	4.14E-04	5.85E-02	3.392672
55181	C17orf71	4.16E-04	5.83E-02	3.395575
54805	CNNM2	4.37E-04	6.08E-02	3.398609
200373	PCDP1	4.39E-04	6.06E-02	3.385247
400569	MED11	4.46E-04	6.11E-02	3.377958
7391	USF1	4.50E-04	6.12E-02	3.400698
9361	LONP1	4.61E-04	6.22E-02	3.362705
400629	TEX19	4.64E-04	6.20E-02	3.463415
25900	IFFO1	4.64E-04	6.16E-02	3.370477
4673	NAP1L1	4.64E-04	6.12E-02	3.357075
355	FAS	4.76E-04	6.22E-02	3.366755
84313	VPS25	4.80E-04	6.24E-02	3.351102
7157	TP53	4.83E-04	6.23E-02	3.345342
6975	TECTB	5.07E-04	6.48E-02	3.340863
57613	KIAA1467	5.14E-04	6.52E-02	3.363178
6300	MAPK12	5.22E-04	6.58E-02	3.336044
8738	CRADD	5.24E-04	6.56E-02	3.350862
643659	LOC643659	5.29E-04	6.57E-02	3.332069
4708	NDUFB2	5.35E-04	6.61E-02	3.322833
58485	TRAPP1	5.36E-04	6.57E-02	3.319088
55733	HHAT	5.46E-04	6.64E-02	3.351168
9801	MRPL19	5.50E-04	6.65E-02	3.317109
497661	C18orf32	5.55E-04	6.66E-02	3.306153

【図1E】

レポーター (Entrez Gene ID)	遺伝子	p 値	q 値	t 統計値
10102	TSFM	5.55E-04	6.62E-02	3.338328
8602	NOP14	5.58E-04	6.61E-02	3.312047
9526	MPDU1	5.62E-04	6.62E-02	3.304267
53831	GPR84	5.69E-04	6.65E-02	3.322799
7311	UBA52	5.74E-04	6.66E-02	3.299597
23479	ISCU	5.79E-04	6.68E-02	3.297363
3562	IL3	5.87E-04	6.73E-02	3.291649
79006	METRN	5.89E-04	6.70E-02	3.308553
154881	KCTD7	5.92E-04	6.69E-02	3.302552
155054	ZNF425	6.08E-04	6.83E-02	3.296845
284161	GDPD1	6.18E-04	6.90E-02	3.277136
100129857	LOC100129857	6.21E-04	6.89E-02	3.273423
64236	PDLIM2	6.22E-04	6.86E-02	3.279111
155061	ZNF746	6.22E-04	6.82E-02	3.286269
6574	SLC20A1	6.29E-04	6.85E-02	3.275017
8744	TNFSF9	6.41E-04	6.93E-02	3.29855
9086	EIF1AY	6.45E-04	6.94E-02	3.277228
283659	PRTG	6.60E-04	7.06E-02	3.254766
25828	TXN2	6.77E-04	7.19E-02	3.259042
84074	QRICH2	6.79E-04	7.17E-02	3.265049
10289	EIF1B	6.85E-04	7.19E-02	3.242911
8079	MLF2	6.88E-04	7.18E-02	3.245
29887	SNX10	6.97E-04	7.23E-02	3.252149
51258	MRPL51	6.97E-04	7.19E-02	3.237888
283373	ANKRD52	6.99E-04	7.16E-02	3.264678
83460	TMEM93	7.31E-04	7.45E-02	3.224042
84190	C12orf26	7.31E-04	7.41E-02	3.250139
51728	POLR3K	7.34E-04	7.40E-02	3.223315
54059	C21orf57	7.37E-04	7.38E-02	3.225705
27185	DISC1	1.07E-03	9.23E-02	3.125624
10594	PRPF8	1.17E-03	9.23E-02	3.078441

【図2】



【図3A】

細胞株名	スコア[177]	スコア[175]	スコア[40]	スコア[04]	スコア[03]
22RV1	0.276434	0.276157	0.309258	0.066458	0.105289
5637	-0.47317	-0.46036	-0.65935	-0.44009	0.06311
639-V	0.242456	0.21752	0.417603	-0.78937	-0.72227
647-V	-0.19558	-0.18943	-0.00584	0.027827	0.064743
769-P	0.331184	0.330028	0.331484	0.912788	0.896107
A-673	-0.53288	-0.56244	-0.51328	-0.42543	-0.44614
A101D	0.045837	0.067274	0.400419	0.828411	1.102721
A172	0.234612	0.23691	0.34709	0.543144	0.882392
A204	0.301558	0.305792	0.351156	0.238072	0.374934
A375	0.251157	0.248693	0.479117	0.752683	0.526968
A427	0.368	0.367445	0.721254	0.585722	0.786386
A431	-0.52761	-0.50533	-0.70248	-0.34821	0.363162
A498	0.665516	0.665302	0.780951	1.22616	1.304999
A549	0.52742	0.44669	0.848385	1.182484	1.229455
ACHN	0.447198	0.444664	0.654053	1.042164	1.256796
AGS	0.017506	0.022527	0.253597	0.1045091	1.062175
AN3 CA	0.23148	0.237884	0.037804	-0.04034	-0.25596
ARH-77	-0.05815	-0.03777	-0.32763	-0.14241	-0.17853
AU565	-0.52528	-0.52331	-0.40229	-0.48277	-0.89539
AsPC-1	-0.82411	-0.74849	-0.78682	-0.07244	0.192523
BC-1	0.481791	0.480228	0.675436	0.935792	0.882392
BFTC-905	-0.1362	-0.15072	0.20882	0.54231	0.318355
BHT-101	0.033657	0.053849	0.205305	-0.00546	-0.35694
BPH1	-0.09024	-0.11467	0.262102	0.419847	0.813966
BT-549	-0.04919	-0.04304	-0.02398	-0.13646	0.007369
BT20	-0.27501	-0.24713	-0.24407	-0.97187	-0.86376
BT474	-0.29859	-0.30409	-0.50545	-1.0723	-1.39511
BV-173	0.387886	0.376297	0.509172	-0.09793	-0.37413
BxPC-3	-0.2676	-0.25876	-0.1143	0.097257	0.321789
C-33A	0.314887	0.33573	0.188349	-0.62823	-0.99658
C-4 II	-0.56013	-0.53973	-0.26344	-0.41869	-0.20473
C32	0.113127	0.087746	0.250952	1.57374	1.654958
CAL-62	0.159833	0.115268	0.280311	0.382714	0.354361
CAMA-1	-0.57557	-0.57211	-0.40541	-0.42662	-0.26287
CCF-STTG1	-0.24814	-0.24536	0.073966	0.219187	0.930395
CCRFCEM	0.01242	0.017266	-0.09079	-0.69433	-0.92697
CFPAC-1	-0.50577	-0.51178	-0.47379	0.101048	0.049886
CGTH-W-1	-0.16034	-0.18472	-0.18384	-1.0442	-1.15326
CHL-1	0.042931	0.041555	-0.12279	-1.07896	-1.17487
CHP-212	0.555219	0.518203	0.635598	0.540698	0.63552
CML-T1	-0.21172	-0.17768	-0.33545	-1.12249	-1.10379
COLO 829	0.36025	0.347319	0.624777	1.167621	0.854962
CRO-AP2	0.267599	0.316129	0.37978	0.837527	0.786386
CaOV3	-0.20523	-0.20917	-0.2183	-0.52679	-0.2353
Caki-1	0.41575	0.397887	0.763594	1.62194	1.72713

【図3B】

細胞株名	スコア[177]	スコア[175]	スコア[40]	スコア[04]	スコア[03]
Cal 27	-0.26421	-0.26352	-0.15871	-0.07036	0.106911
Calu1	-0.07618	-0.09316	0.076519	-0.22635	-0.17853
Calu6	-0.10671	-0.09596	0.021776	-0.72328	-1.08263
Capan-1	-0.52011	-0.51179	-0.42898	0.062115	0.059487
Capan-2	-0.33103	-0.34327	-0.16581	-0.10338	0.032307
ChaGoK1	-0.23898	-0.22005	-0.31665	-1.64531	-1.47114
Colo 205	-0.08581	-0.07769	0.189821	0.189561	0.122576
Colo 320 HSR	0.076204	0.089611	-0.04412	-0.45297	-0.14624
D283 Med	0.677399	0.616422	0.644012	1.666235	1.33499
DB	-0.36533	-0.31008	-1.05192	-0.87027	-1.22973
DBTRG-05MG	0.537114	0.536939	1.046253	1.827346	1.970406
DK-MG	-0.2184	-0.19842	0.223505	0.562381	1.184124
DMS114	0.087543	0.087787	0.028259	0.206749	0.159256
DMS53	-0.11434	-0.13242	0.02886	-0.27066	-0.55967
DOHH-2	-0.75327	-0.70734	-0.7467	-0.108925	-1.45348
DU145	0.066107	0.073411	0.08984	0.009531	0.073411
Daoy	-0.02398	-0.02476	0.081258	-0.55061	-0.24362
Daudi	0.17799	0.163835	0.248091	0.441184	0.332347
Detroit 562	-0.01339	-0.02153	0.306648	-0.08898	-0.60762
DoTc2 4510	-0.2444	-0.2808	0.107426	0.856543	1.310722
EB-3	0.42196	0.41465	0.46983	-0.15417	-0.33139
EFM-19	-0.17013	-0.1507	-0.09006	-0.44888	-0.53208
EM-2	-0.01484	-0.02628	-0.305	-0.2912	-0.01243
FaDu	0.159149	0.140041	0.342815	0.148283	0.056634
G-401	0.65077	0.684241	0.820906	0.993529	0.690381
G-402	0.457524	0.409532	0.617852	0.735697	0.827531
H4	0.359128	0.29145	0.505747	1.400361	1.410871
HCT-116	0.46749	0.452485	0.510059	0.90925	1.325601
HCT-15	0.034302	0.040922	0.063324	-0.43105	-0.60427
HLE	-0.15832	-0.15613	-0.13514	-0.41689	-0.38214
HOS	-0.04388	-0.01654	0.037464	-0.54678	-0.79645
HPAF-II	-0.44994	-0.39719	-0.45199	-0.551135	-0.27569
HT	0.309753	0.292008	0.108128	-0.58814	-0.82052
HT-1080	0.440193	0.448541	1.002536	1.688078	1.451417
HT-1197	0.044946	0.020349	0.764968	1.410156	1.646038
HT-29	-0.42996	-0.41393	-0.35204	0.073753	-0.09713
HT-3	-0.28441	-0.23636	-0.13119	0.270209	0.498369
HT1376	-0.49187	-0.52001	-0.31355	-0.3479	0.026483
HUH-6 Clone 5	0.557367	0.537102	0.700471	1.320569	1.153912
Hs 578T	-0.18685	-0.17019	-0.21016	-0.19482	0.435334
HuCCT1	-0.18118	-0.15105	-0.11601	-0.04263	0.018471
HuP-T4	-0.41711	-0.41352	-0.23084	-0.82056	-0.64887
J-RT3-T3-5	0.464038	0.46096	0.389754	-0.23319	-0.27653
J82	-0.0814	-0.08179	-0.17637	-0.41745	-0.77699
JAR	0.605385	0.597492	0.728032	1.331049	1.088118

【図3C】

細胞株名	スコア[177]	スコア[175]	スコア[40]	スコア[04]	スコア[03]
JEG-3	0.526927	0.47663	0.600655	1.584899	1.44471
K562	-0.10751	-0.09944	-0.28468	0.25838	-0.22853
KATO III	-0.24395	-0.2272	-0.42425	-0.6561	-1.05027
KLE	-0.43783	-0.38531	-0.68161	-1.51167	-1.4233
L-428	0.205307	0.200046	0.270554	-0.3381	-0.07766
LS-174T	0.486651	0.440193	0.64882	1.062384	1.11894
LS1034	-0.08868	-0.08471	-0.03658	0.059856	-0.18664
MALME3M	-1.06639	-1.06059	-1.10389	-0.54131	-0.80678
MC-IXC	0.037882	-0.00637	-0.17936	-0.85311	-0.88685
MCF7	0.241156	0.21789	0.529905	1.029918	0.854962
MDA MB 231	-0.13038	-0.12992	-0.11834	-0.09024	0.081431
MDA MB 453	-0.38374	-0.33417	-0.43793	-0.96666	0.58066
MDA MB 468	-0.36366	-0.41024	-0.49907	0.103403	0.381002
MEG01	-0.03625	-0.06867	-0.3772	-0.65713	-0.85257
MES-SA	0.659964	0.664002	0.459464	0.285406	0.506069
MG-63	-0.26204	-0.26992	-0.57534	-0.37366	-0.68941
MHH-PREB-1	0.443517	0.461583	0.20363	0.108156	0.060821
MOLT-16	0.860479	0.860047	0.911421	1.202942	1.170409
MV-4-11	0.526226	0.503824	0.787859	1.166345	1.36242
MeWo	0.151592	0.144535	0.443466	0.471784	0.381308
Mia PaCa-2	0.214417	0.241183	0.308648	0.226802	0.421548
NALM-6	0.339794	0.360459	0.08725	-0.01837	-0.14406
NCI-H292	0.332158	0.289111	0.552379	0.552755	0.57589
NCI-H460	0.497859	0.455214	0.48138	0.492018	0.420737
NCI-H508	-0.2484	-0.228	-0.28589	-0.17642	0.045771
NCI-H520	-0.57906	-0.57569	-0.66897	-1.06505	-1.23715
NCI-H596	-0.34626	-0.34448	-0.19148	0.073576	0.285162
NCI-H661	-0.27137	-0.21933	-0.14397	-0.81486	-0.74797
NCI-H747	-0.65761	-0.65568	-0.70312	-0.8959	-0.76077
NCI-H441	-0.16075	-0.1722	-0.03596	-0.67317	-0.48057
NCI-H446	-0.03017	-0.02456	-0.06037	0.334311	0.908101
OVCAR3	-0.15779	-0.16553	-0.53835	-1.08784	-1.09163
PC-3	-0.14908	-0.156	-0.07964	-0.35525	-0.31801
RD	-0.0352	-0.06366	0.104623	-0.62674	-0.72227
RKO	0.395929	0.391092	0.395929	0.772422	0.400766
RL95-2	0.017852	0.017571	-0.0861	0.137786	0.723543
RPMI 6666	0.028998	0.070873	-0.42443	0.028145	-0.7301
RPMI 8226	0.481209	0.410086	0.747651	1.310507	1.485856
RPMI-7951	-0.19559	-0.19234	-0.19559	0.08508	-0.2799
Raji	-0.01416	-0.00456	0.240241	0.206022	0.128352
RKO	0.395929	0.391092	0.395929	0.772422	0.400766
RL95-2	0.017852	0.017571	-0.0861	0.137786	0.723543

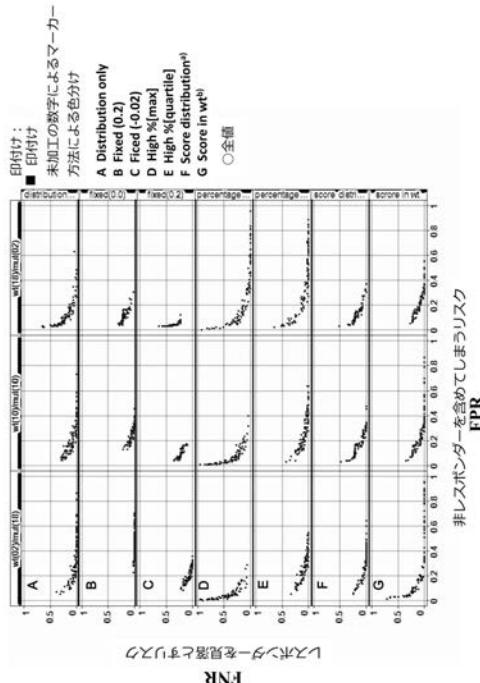
【図3E】

細胞株名	スコア[177]	スコア[175]	スコア[40]	スコア[04]	スコア[03]
BE(2)C	-0.06209	-0.04481	-0.41165	-1.20764	-1.25716
BM-1604	-0.00201	0.001282	-0.05113	-0.23851	-0.17042
BeWo	0.298309	0.304737	0.374635	1.370674	1.159486
C-4 I	-0.49737	-0.45575	-0.29874	0.024751	0.099737
C32TG	0.114992	0.106145	0.101923	1.123258	1.03144
CEM-C1	0.381776	0.399197	0.421307	-0.05503	-0.38672
Caki-2	-0.41224	-0.43077	-0.39106	0.027554	0.443509
Colo 201	-0.0673	-0.11289	0.000532	0.077795	-0.58512
Colo 320DM	0.265097	0.25346	0.206665	-0.35788	-0.25596
DLD-1	0.227465	0.218958	0.176476	-0.17705	-0.34511
ES-2	-0.1432	-0.11833	-0.36668	-0.67395	-1.53682
HCT-8	0.398852	0.394078	0.359523	0.897397	0.912402
HEC-1-A	0.053013	0.06047	-0.36195	-0.87838	-1.3806
HEL-92-1-7	0.176825	0.174827	0.231307	0.028512	-0.22876
HLF	-0.13526	-0.11866	0.09218	-0.21215	0.171847
HMCB	0.054755	0.04544	-0.19379	-1.00344	-0.1446
HS 746T	-0.56431	-0.54662	-0.18591	-0.28171	0.63482
HeLa	-0.04872	-0.06508	0.075526	0.564294	1.062059
HepG2	0.344769	0.333972	0.447516	1.049594	1.088118
Hs 294T	0.262016	0.26139	0.724392	1.101019	1.270529
Hs 695T	0.184623	0.093426	0.289111	0.453218	0.274813
Hs 766T	-0.1929	-0.20215	0.031193	-0.11761	0.094014
KHOS-240S	-0.12398	-0.11266	-0.15844	-0.37875	-0.74841
KPL-1	0.255758	0.219499	0.849003	1.267011	1.005828
MDA-MB-436	0.054917	0.031648	0.092742	-0.00323	-0.41175
MOLT-3	0.34813	0.297721	0.488353	0.525126	0.477797
MT-3	0.425899	0.418838	0.566537	1.020787	0.908101
NCI-H295R	-0.25514	-0.27621	-0.37615	0.398241	0.421548
OCUG-1	-0.01998	-0.02397	0.363294	1.143988	1.388165
PANC-1	-0.14216	-0.13546	-0.17397	0.10546	-0.03304
RKO-AS45-1	0.528741	0.526672	0.556349	0.964312	0.526672
RKOE6	0.750562	0.739097	0.879069	1.140897	1.005411
Ramos (RA 1)	-0.0834	-0.03004	-0.02766	-0.66262	-1.17763
SCaBER	-0.62179	-0.61298	-0.60274	-0.36853	-0.05593
SK-BR-3	-0.36219	-0.3705	-0.55124	-0.34207	-0.55075
SKO-007	0.004128	0.051252	-0.00836	-0.00836	-0.04879
SNU-1	0.474722	0.471966	0.809062	0.892559	0.937252
SNU-16	-0.4101	-0.40354	-0.69638	-0.1092	0.016088
SNU-5	-0.28788	-0.25659	-0.44162	-0.30735	-0.3794
SU.86.86	-0.2808	-0.30251	-0.26418	-0.34382	-1.19595
SW1353	-0.12359	-0.1209	-0.03433	0.508557	0.964865
SW403	-0.30106	-0.27894	-0.37045	-0.32493	-0.34511
SW480	0.072341	0.064537	0.361315	0.260632	0.287451
SW579	-0.20548	-0.24527	-0.22588	-0.32249	-0.54831
TE 381.T	-0.08716	-0.11053	-0.17605	0.12052	0.027628

【図3F】

細胞株名	スコア[177]	スコア[175]	スコア[40]	スコア[04]	スコア[03]
U-138MG	-0.10469	-0.11075	0.106208	1.071735	1.379245
U266B1	-0.18256	-0.13449	-0.28741	-0.43084	-0.44797
Wi38	-0.03505	-0.01912	0.425997	0.854163	1.307559
WiDr	-0.39488	-0.34471	-0.51924	-0.47495	-1.00938
Y79	0.197075	0.179475	0.594679	1.246389	1.033258
COR-L105	-0.08289	-0.05261	0.251722	1.033049	1.060688
COR-L23	-0.21748	-0.18632	-0.23071	-0.86791	-1
DMS273	-0.0369	-0.02149	-0.06486	-0.27736	0.082568
NCI-H69	-0.39629	-0.37394	-0.4419	-0.17987	0.374934
OE19	-0.55623	-0.53896	-0.60037	-0.49872	-0.59884
OE33	-0.40114	-0.39832	-0.49628	-0.3376	-0.3684
OE21	-0.07634	-0.02466	-0.16582	-0.09355	0.170702
SJRH30	-0.43355	-0.39384	-0.47942	-0.30706	-0.13799
Jurkat	0.28008	0.270858	0.241933	-0.20343	-0.27653
LNCaP	0.416108	0.409594	0.557536	0.947816	1.457094
MX1	-0.4282	-0.42162	-0.56795	-1.30335	-1.43708
BT-483	-0.18793	-0.2018	-0.04258	0.10201	0.108861
CAL-54	0.403784	0.401735	0.540733	1.241372	1.318532
CRO-AP5	0.560488	0.546881	0.812875	0.568763	0.745917
IMR-32	0.426856	0.413076	0.348419	0.353666	0.321445
MDA-MB-175-VII	-0.84161	-0.83301	-0.46297	0.106361	0.413439
T84	-0.33845	-0.29936	-0.30915	0.088593	0.169207
VCaP	-0.22893	-0.21056	-0.20406	0.225755	0.721589
WM-115	0.157729	0.164317	0.381695	0.664812	1.197839
ZR-75-1	-0.19602	-0.19436	-0.06752	0.753686	0.657464

【図4】



4.0 遺伝子を用いた予測の精度

【図5A】

CCLEデータセットを用いたメラノーマ細胞株のMDM2阻害剤に対する感受性の予測

細胞	IC ₅₀	感受性	p53	予測精度 (%)					
				score in wt	score distribution	Fixed (0.2)	fixed (-0.02)	High % [max]	High % [quartile]
A101D	0.0314	感受性	wt	100	100	100	100	100	100
A375	0.0434	感受性	wt	100	100	100	82	100	100
C32	10	耐性	wt	0	0	0	9	0	0
CHL1	9.1	耐性	mut	100	100	100	100	100	100
COLOR29	0.0266	感受性	wt	100	100	100	100	100	100
MALME3M	0.0875	感受性	-	100	100	100	100	100	100
MEWO	10	耐性	mut	100	96	100	91	100	96
RPMI7951	8.63	耐性	mut	100	100	100	100	100	100
SH4	0.116	感受性	wt	68	90	68	100	56	100
SKMEL1	0.0293	感受性	wt	100	100	100	100	77	100
SKMEL28	10	耐性	mut	100	100	100	100	97	56
SKMEL3	10	耐性	mut	0	0	0	0	25	0
HMCB	5.49	耐性	wt	100	100	100	100	100	100
HS294T	3.24	耐性	wt	0	0	0	0	0	0
HS695T	0.174	感受性	wt	65	70	35	100	74	100

【図5B】

細胞株	感受性	リンパ腫 (トレーニングセットとして選択された)			非特異的種類の癌細胞株 (トレーニングセットとして選択された)		
		High % [max]	High % [quartile]	Distribution-only	High % [max]	High % [quartile]	Distribution-only
DAUDI	感受性	25	91	40	49	98	98
DB	耐性	100	100	100	99	76	94
DOHH2	感受性	20	88	36	41	92	94
HT	耐性	92	29	88	64	9	20
JURKAT	耐性	100	99	100	96	62	97
L428	耐性	91	30	43	70	9	5
MOLT16	感受性	0	11	5	15	61	42
NALM6	感受性	1	19	5	15	71	58
RAJI	耐性	34	1	8	19	0	0
RPMI8226	感受性	1	13	0	7	50	24
ST486	耐性	91	25	76	63	8	17
U266B1	耐性	100	100	100	95	70	78

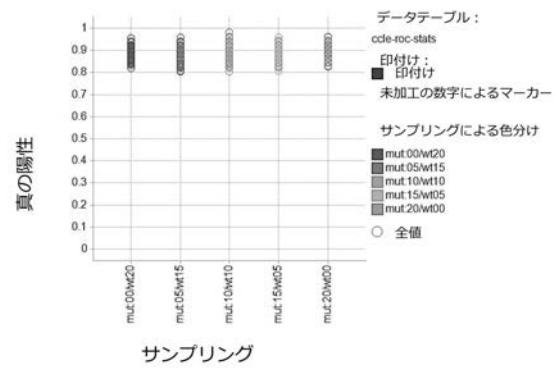
【図6】

PDxモデルにおけるMDM2阻害剤の感受性の予測

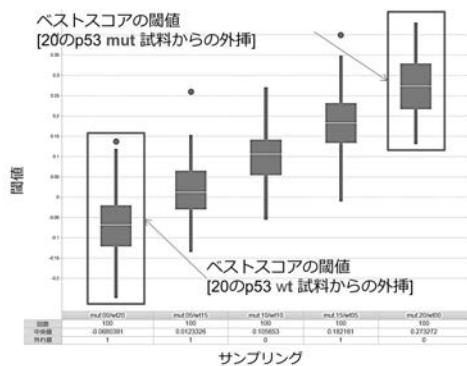
PDxモデル	腫瘍の種類	TGI	p53	感受性	予測精度 (%)						
					score in wt	score distribution	fixed (0.2)	fixed (-0.02)	High % [max]	High % [quartile]	distribution only
CTG-0204	メラノーマ	66%	wt	感受性	100	100	100	100	99	100	100
CTG-0213	メラノーマ	87%	G199F	感受性	99	54	14	99	12	74	31
CTG-0500	メラノーマ	104%	wt	感受性	100	86	90	100	27	86	72
CTG-0201_P7	メラノーマ	103%	wt	感受性	100	100	100	100	100	100	100
CTG-0093	メラノーマ	98%	wt	耐性	94	100	100	100	100	100	100
CTG-0502	メラノーマ	122%	wt	感受性	100	100	100	100	100	100	100
CTG-0159	NSCLC	12%	wt	耐性	62	100	100	99	100	91	99
CTG-0093	直腸結腸	53%	wt	感受性	100	100	100	100	97	100	95
CTG-0069	直腸結腸	44%	wt	耐性	90	100	100	100	100	100	100
CTG-0292	膀胱	54%	W91*	感受性	2	0	0	0	0	0	0
CTG-0282	膀胱	35%	wt	耐性	0	2	0	0	14	1	7

【図8】

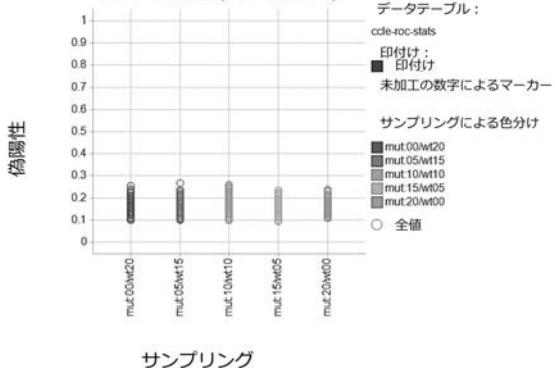
高い真の陽性(感度)



【図7】



低い偽陽性 (高い特異性)



130の耐性細胞株と52の感受性細胞株

【図9】

名前	種類	感受性 (Best 10%)				内部GeneChipからのスコア				"High" GeneChipのバー%セントージ (ハイライト基準60%)				高MDM2
		GIS0.u0f	GIS0.u0f (R&S)	内蔵化合物0	Score (177)	Score (175)	Score (40)	Score (04)	177	175	40	4	Y/N (Y>3000)	
MV-4-11	細胞株 骨髄单球性白血病	0.0106	感受性 感受性	0.32	0.32	0.38	0.45	67.8%	68.0%	70.0%	75.0%	N		
SGA-1	細胞株 骨髄单球性白血病	0.0003	感受性 感受性	0.05	0.06	0.18	0.11	57.6%	57.7%	62.5%	50.0%	Y		
U-87MG	細胞株/CNS	0.0236	感受性 感受性	-	0.25	0.32	0.26	0.42	66.7%	66.9%	70.0%	75.0%	N	
A375	細胞株 皮膚癌	0.0395	感受性 感受性	-	0.33	0.32	0.47	0.34	68.4%	68.0%	67.5%	75.0%	N	
HCT116	細胞株 大腸癌	0.0207	感受性 感受性	-	0.28	0.27	0.30	0.29	64.0%	64.0%	70.0%	75.0%	N	
HT-29	細胞株 大腸癌	0.0219	感受性 感受性	-	0.28	0.27	0.30	0.29	75.7%	76.4%	73.5%	75.0%	N	
CF-STTG1	細胞株 CNS	0.0531	-	-	-0.09	-0.08	-0.17	-0.16	52.0%	52.6%	47.5%	50.0%	Y	
NCI-H82	細胞株 肺癌	0.0008	感受性 感受性	0.31	0.32	0.41	0.88	68.4%	68.6%	70.0%	75.0%	N		
A549	細胞株 肺癌	0.0065	感受性 感受性	0.65	0.66	0.89	1.65	74.0%	73.7%	77.5%	100.0%	N		
S205	細胞株 肉腫	0.0204	耐性 耐性	-	0.13	0.14	0.02	1.11	61.0%	61.7%	55.0%	100.0%	N	
MDA-MB-175-VII	細胞株 乳癌	0.00008	-	-	0.09	0.10	0.07	0.04	48.6%	52.0%	50.0%	50.0%	N	
HT-29	細胞株 子宮頸癌	0.1729	耐性 耐性	-	0.38	0.35	0.10	1.00	62.7%	62.7%	50.0%	50.0%	N	
HT-29	細胞株 結腸癌	0.1729	耐性 耐性	-	0.36	0.35	0.40	0.27	42.9%	43.4%	42.5%	50.0%	N	
SK-N-A3	細胞株 CNS	0.17	-	-	-0.08	-0.07	-0.51	-1.12	55.4%	56.0%	32.5%	0.0%	N	
C-4-11	細胞株 子宮頸癌	0.17	-	-	-0.42	-0.47	-0.45	-0.54	39.5%	39.4%	52.5%	25.0%	N	
SU345	細胞株 前立腺癌	0.21	-	-	0.01	0.05	-0.05	-0.39	57.1%	57.7%	47.5%	25.0%	N	
COL205	細胞株 結腸癌	0.165	-	-	-0.14	-0.16	-0.06	-0.29	44.1%	44.6%	50.0%	50.0%	N	
HT-29	細胞株 子宮頸癌	0.1729	耐性 耐性	-	0.38	0.35	0.10	1.00	62.7%	62.7%	50.0%	50.0%	N	
CaCo-2	細胞株 結腸癌	0.17	耐性 耐性	-	-0.47	-0.47	-0.54	-0.14	35.6%	36.0%	35.0%	50.0%	N	
HTPC-3	細胞株 結腸癌	0.17	耐性 耐性	-	-0.50	-0.51	-0.32	-0.05	39.0%	39.4%	37.5%	50.0%	N	
MDA-MB-331	細胞株 乳癌	0.17	耐性 耐性	-	-0.23	-0.24	-0.23	-0.46	49.2%	48.6%	45.0%	50.0%	N	
NCI-H520	細胞株 肺癌	0.17	-	-	-0.31	-0.30	-0.72	-1.47	45.8%	46.3%	32.5%	0.0%	N	
HT-2	細胞株 子宮頸癌	0.17	-	-	0.07	0.07	-0.05	-0.23	57.1%	57.1%	60.0%	75.0%	N	

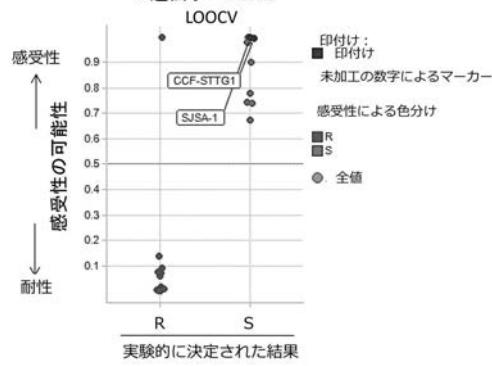
【図10 B】

実験的観測

R S
R 9 2
S 4 8
誤り率 = 26%

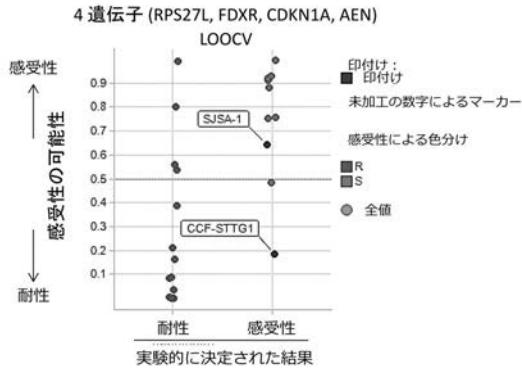
【図10 C】

4遺伝子 + MDM2



【図10 A】

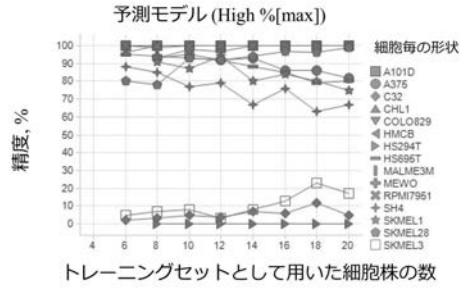
4遺伝子 (RPS27L, FDXR, CDKN1A, AEN)



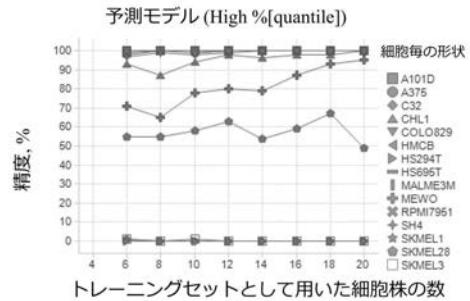
【図 10 D】



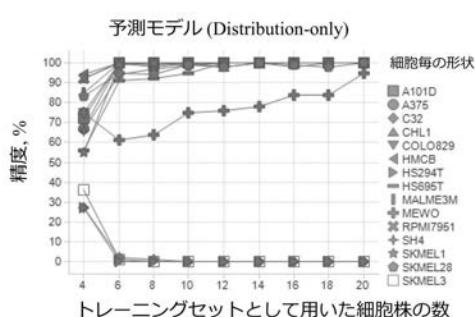
【図 11 A】



【図 11 B】



【図 11 C】



【図 12 A】

CCLE 名	TP 53	S/ R	CCLE 名	TP 53	S/ R	CCLE 名	TP 53	S/ R
1321N1_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M	-	AGS_STOMACH	W	S	BV173_HAEMATOPHOID_TISSUE	W	S
143B_BONE	M	-	ALEXANDERCELLS_LIVER	M	-	BXP3_PANCREAS	M	R
22RV1_PROSTATE	M	S	ALLSIL_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	W	-	C2BBE1_LARGE_INTESTINE	M	-
2313287_STOMAC_H	W	-	AM305_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	W	-	C32_SKIN	W	R
253JU_UNRINARY_TRACT	W	-	AML93_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-	C3A_LIVER	W	-
253JBV_UNRINARYTRACT	W	-	42MGBA_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M	-	CA46_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
5637_UNRINARYTRACT	M	R	5637_UNRINARYTRACT	M	R	CADOE51_BONE	W	-
59M_OVARY	M	-	ASPC1_PANCREAS	M	R	CAK11_KIDNEY	W	S
639V_UNRINARYTRACT	M	R	AU565_BREAST	M	R	CAK12_KIDNEY	W	S
647V_UNRINARYTRACT	M	R	AZ521_STOMACH	W	-	CAL120_BREAST	M	-
697_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	W	-	BC3C_UNRINARYTRACT	W	-	CAL127_LUNG	M	-
769P_KIDNEY	W	S	BCP1_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-	CAL148_BREAST	M	-
786Q_KIDNEY	M	S	BCPAP_THYROID	M	-	CAL27_UPPER_AERODIGESTIVE_TRACT	M	R
8305C_THYROID	M	-	BCDM_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	W	-	CA129_UNRINARYTRACT	M	-
8505C_THYROID	M	-	BECKER_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M	-	CAL33_UPPER_AERODIGESTIVE_TRACT	M	-
8MGBA_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M	-	BEN_LUNG	M	-	CAL51_BREAST	W	-
A101D_SKIN	W	S	BFTC905_UNRINARYTRACT	M	R	CAL54_KIDNEY	W	-
A1207_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	W	-	BFTC909_KIDNEY	M	-	CAL62_THYROID	M	R
A172_CENTRAL_NEUROV рУССЫ	-	S	BHT101_THYROID	M	R	CAL78_BONE	M	-
A204_SOFT_TISSUE	W	S	BHY_UPPER_AERODIGESTIVE_TRACT	-	-	CAL851_BREAST	M	-
A2058_SKIN	M	-	BICR16_UPPER_AERODIGESTIVE_TRACT	M	-	CALU1_LUNG	-	R
A253_SALIVARY_GLAND	M	-	BICR17_UPPER_AERODIGESTIVE_TRACT	W	-	CALU3_LUNG	M	-
A2780_OVARY	W	-	BICR22_UPPER_AERODIGESTIVE_TRACT	W	-	CALU6_LUNG	M	R
A375_SKIN	W	S	BHTERT_SKIN	M	-	CAMA1_BREAST	M	R
A3KAW_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	W	-	BICR31_UPPER_AERODIGESTIVE_TRACT	M	-	CAOV3_OVARY	M	R
A449_KIDNEY	W	S	BICR32_UPPER_AERODIGESTIVE_TRACT	M	-	CAOV4_OVARY	M	-
A4AFUK_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-	BICR6_UPPER_AERODIGESTIVE_TRACT	M	-	CAPAN1_PANCREAS	M	R
A549_LUNG	W	S	BT20_BREAST	M	R	CAPAN2_PANCREAS	-	R
A673_BONE	-	R	BT47A_BREAST	M	R	CAS1_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M	-
A704_KIDNEY	-	-	BT483_BREAST	M	-	CCFTG1_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	W	S
ABC1_LUNG	M	-	BT549_BREAST	-	R	CCK81_LARGE_INTESTINE	M	-
ACCMESOT_PLEURA	W	-				CFPPAC1_PANCREAS	M	R
ACHN_KIDNEY	W	S				CGTHW1_THYROID	M	R
						CH157MN_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M	-

【図12B】

CCL名	TP S3	S/ R	CCL名	TP S3	S/ R
CHAGOK1_LUNG	M	R	CORL23_LUNG	W	R
CH11_SKIN	M	R	CORL24_LUNG	M	-
CHP126_AUTONO	W	-	CORL279_LUNG	M	-
MIC_GANGLIA			CORL311_LUNG	M	-
CHP212_AUTONO	W	S	CORL47_LUNG	M	-
MIC_GANGLIA			CORL51_LUNG	M	-
C11_HAEMATOPOI	M	-	DNU41_HAEMATOPOI	M	-
TIC_AND LYMPHOI			OETIC_AND LYMPHOID TISSUE	M	-
D_TISSUE			DOHH2_HAEMATOPOI		
CIM_SKIN	M	-	POETIC_AND LYMPHOID TISSUE	-	S
CL11_LARGE_INTES	M	-	DU145_PROSTATE	M	R
TINE			DU4475_BREAST	W	-
CL14_LARGE_INTES	M	-	DV90_LUNG	W	-
TINE			E81_HAEMATOPOI		
CL34_LARGE_INTES	M	-	ETIC_AND LYMPHOI		
TINE			ID_TISSUE	M	-
CL40_LARGE_INTES	M	-	EB2_HAEMATOPOI		
TINE			ETIC_AND LYMPHOI		
CMK1_HAEMATOPOI	M	-	ID_TISSUE	M	-
OETIC_AND LYMPHOI			EBC1_LUNG	M	-
ID_TISSUE			ECC10_STOMACH	-	-
CMK115_HAEMATO	M	-	ECC12_STOMACH	M	-
Poietic_and_lym			ECG110_OESOPHAG	M	-
phoid_tissue			EFE184_ENDOMETRIUM	M	-
CMK86_HAEMATOPOI	M	-	GII_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M	-
OETIC_AND LYMPHOI			GMS10_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M	-
ID_TISSUE			GOV1_CENTRAL_NEURON_VOUS_SYSTEM	M	-
CMK116_HAEMATO	M	-	GP2D_LARGE_INTESTINE	M	-
Poietic_and_lym			GRANTAS19_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
phoid_tissue			HCC4005_LUNG	W	-
CMK117_HAEMATOPOI	M	-	HCC44_LUNG	M	-
OETIC_AND LYMPHOI			HCC56_LARGE_INTESTINE	M	-
ID_TISSUE			HCC64_LUNG	M	-
COLOD1_LARGE_I	R	-	HCC366_LUNG	M	-
NTESTINE			HCC38_BREAST	M	-
COLOD205_LARGE_I	R	-	HCC4006_LUNG	W	-
NTESTINE			HCC441_LUNG	M	-
COLOD207_LARGE_I	R	-	HCC561_LARGE_INTESTINE	M	-
NTESTINE			HCC70_BREAST	M	-
COLOD209_LARGE_I	R	-	HCC78_LUNG	M	-
NTESTINE			HCC827_LUNG	M	-
COLOD679_SKIN	W	-	HCC827GR5_LUNG	M	-
			HCC95_LUNG	-	-
COLOD680N_OESOP	M	-	HCT116_LARGE_INTESTINE	W	S
HAGUS			HCT115_LARGE_INTESTINE	M	R
COLOD684_ENDOME	W	-	HCT8_LARGE_INTESTINE	M	S
TRIUM			HCC1195_LUNG	M	-
COLO704_OVARY	W	-	HCC1359_LUNG	M	-
			HCC1395_BREAST	M	-
COLO741_SKIN	M	-	HCC1419_BREAST	M	-
			HCC1428_BREAST	W	-
COLO757_HAEMATO	M	-	HCC1438_LUNG	M	-
Poietic_and_lym			HCC151_LUNG	M	-
phoid_tissue			HCC1500_BREAST	W	-
COLO783_SKIN	M	-	HCC1569_BREAST	M	-
COLO792_SKIN	W	-			
COLO800_SKIN	M	-			
COLO818_SKIN	M	-			
COLO829_SKIN	W	S			
COLO849_SKIN	W	-			
CORL105_LUNG	W	S			

【図12C】

CCL名	TP S3	S/ R	CCL名	TP S3	S/ R
FTC238_THYROID	-	-	HCC1588_LUNG	M	-
FU97_STOMACH	M	-	HCC1599_BREAST	M	-
FUV1_OVARY	M	-	HCC1806_BREAST	-	-
G292CLONEA141B1	M	-	HCC1833_LUNG	M	-
G361_SKIN	W	-	HCC1897_LUNG	M	-
G401_SOFT_TISSUE	W	S	HCC1937_BREAST	M	-
G402_SOFT_TISSUE	W	S	HCC1954_BREAST	M	-
GA10_HAEMATOPOI	M	-	HCC202_BREAST	M	-
ETIC_AND LYMPHOI			HCC2108_LUNG	M	-
ID_TISSUE			HE19217_HAEMATOPOI	M	R
GAMG_CENTRAL_N	M	-	HEP3B217_LIVER	M	-
ERVOUS_SYSTEM			HEPG2_LIVER	W	S
GB1_CENTRAL_NER	M	-	HEYA8_OVARY	W	-
VOUS_SYSTEM			HGC27_STOMACH	M	-
GCY1_STOMACH	M	-	HH_HAEMATOPOIE	M	-
GCT_SOFT_TISSUE	M	-	TIC_AND LYMPHOI		
GDMM1_HAEMATO	M	-	ID_TISSUE		
OETIC_AND LYMPHOI			GRM_SKIN	W	-
ID_TISSUE			GSS_STOMACH	M	-
GJ2_CENTRAL_NER	M	-	GSU_STOMACH	M	-
VOUS_SYSTEM			H4_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	W	S
GOV1_CENTRAL_NE	M	-	HARA_LUNG	M	-
RVOUS_SYSTEM			HCC33_LUNG	M	-
GP2D_LARGE_INTE	M	-	HCC364_LUNG	M	-
STINE			HCC38_BREAST	M	-
GRANTAS19_HAEM	M	-	HCC4006_LUNG	W	-
ATOPOETIC_AND_LY			HCC44_LUNG	M	-
MPHOID_TISSUE			HCC561_LARGE_INTESTINE	M	-
HEDB_HAEMATOPOI	M	-	HCC70_BREAST	M	-
OETIC_AND LYMPHOI			HCC78_LUNG	M	-
ID_TISSUE			HCC827_LUNG	M	-
HEMC27GR5_LUNG	M	-	HCC827GR5_LUNG	M	-
HMC95_LUNG	-	-	HCT116_LARGE_INTESTINE	W	S
HCT1171_LUNG	M	-	HCT115_LARGE_INTESTINE	M	R
HCC1187_BREAST	-	-	HCT8_LARGE_INTESTINE	M	S
HCC1195_LUNG	M	-	HDC80_HAEMATOPOI	-	-
HCC1359_LUNG	M	-	HDM2_HAEMATOPOI	-	-
HCC1395_BREAST	M	-	HDM3_HAEMATOPOI	-	-
HCC1419_BREAST	M	-	HDM4_HAEMATOPOI	-	-
HCC1428_BREAST	W	-	HDP1_BREAST	M	-
HCC1438_LUNG	M	-	HES10_ENDOMETRIUM	-	-
HCC151_LUNG	M	-	HES151_ENDOMETRIUM	M	-
HCC1569_BREAST	W	-	HES151_ENDOMETRIUM	M	R
HES151_ENDOMETRIUM	W	-	HES151_ENDOMETRIUM	M	R
HES151_ENDOMETRIUM	M	-	HES172T_urinary_tract	W	-
HES297_LUNG	W	-	HS2297_LUNG	W	-
HES551_LARGE_INTE	W	-	HS255T_LARGE_INTESTINE	W	-
STINE			HS259T_LARGE_INTESTINE	W	-
HES671T_LARGE_INTE	W	-	HS281T_BREAST	W	-
STINE			HS294T_SKIN	W	R
HS343T_BREAST	W	-	HS343T_BREAST	W	-

【図12D】

CCL名	TP S3	S/ R	CCL名	TP S3	S/ R
HS5717_OVARY	M	-	HS939T_SKIN	W	-
HS5787_BREAST	M	R	HS940T_SKIN	-	-
HS6007_SKIN	W	-	IPC298_SKIN	M	-
HS604T_HAEMATO	M	-	ISHIKAWAHERAKLI_OZIKER_ENDOMETRIUM	M	-
POETIC_AND LY			ITSMES1_PLEURA	W	-
PHOID_TISSUE			ITSMES2_PLEURA	M	-
HS6067_BREAST	W	-	J82_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	R
			JEKO1_HAEMATOPOI		
HS611T_HAEMATO	M	-	ETIC_AND LYMPHOID_TISSUE		
POETIC_AND LY			KARPSA529_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
PHOID_TISSUE			KARPSA529_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS615T_HAEMATO	M	-	KARPSA529_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
POETIC_AND LY			KARPSA529_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
PHOID_TISSUE			KASUMI1_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS618T_LUNG	W	-	KASUMI2_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KASUMI2_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS619T_LARGE_INTE	W	-	KASUMI2_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
STINE			KATOIIH_STOMACH	-	R
HS675T_LARGE_INTE	W	-	KC1MOHI_PANCREAS	-	R
STINE			KL1C1_LUNG	M	-
HS683_CENTRAL_N	M	-	KLC22_HAEMATOPOI		
ERVOUS_SYSTEM			OETIC_AND LYMPHOID_TISSUE		
HS688AT_SKIN	W	-	KLH28_BILIA		
			BILIA_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE		
HS695T_SKIN	W	S	KM521BM_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE		
			KM521BM_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE		
HS698T_LARGE_INTE	W	-	KM521BM_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE		
STINE			KM521BM_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE		
HS706T_BONE	W	-	KM521BM_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE		
			KN581_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M	-
HS7295_SOFT_TISSU	M	-	KN581_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M	-
E			KO29AX_SKIN	W	-
HS737T_BONE	W	-	KMS61_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	R
			KMS61_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	R
HS739T_BREAST	-	-	KMS62_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS742T_BREAST	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS746T_STOMACH	M	R	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS751T_HAEMATO	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
POIETIC_AND LY			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
PHOID_TISSUE			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS766T_PANCREAS	-	R	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS819T_BONE	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS821T_BONE	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS822T_BONE	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS834T_SKIN	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS839T_SKIN	M	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS840T_UPPER_AE	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
RODIGESTIVE_TRA			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
C			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS852T_SKIN	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS863T_BONE	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS870T_BONE	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS888T_BONE	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS895T_SKIN	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS934T_SKIN	-	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS936T_SKIN	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
HS937T_SKIN	W	-	KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-
			KM521_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M	-

【図12E】

CCL名	TP S3	S/ R	CCL名	TP S3	S/ R
KMRC20_KIDNEY	M	-	KVSE140_OESOPHAG	M	-
KMRC20_KIDNEY	W	-	KYSE151_OESOPHAG	M	-
KMS11_HAEMATO	M	R	KYSE180_OESOPHAG	M	-
OETIC_AND LYMP			K		

【 义 1 2 F 】

CCLC 名	TP 53	S/ R	CCLC 名	TP 53
LN2038_CENTRAL NERVOUS SYSTEM	-	-	MCE1_HAEMATOP OETIC AND LYMP HOID TISSUE	M
LOUCY_HAEMATOP OETIC AND LYMP HOID TISSUE	M	-	MCE2_HAEMATOP OETIC AND LYMP HOID TISSUE	M
LOUNH9_LUNG	M	-	MFG01_HAEMATO POETIC AND LYMP HOID TISSUE	M
LOVO_LARGE_INT -STINE	W	-	MELHO_SKIN	W
LOXIMV1_SKIN	W	-	MELIUSO_SKIN	W
LP1_HAEMATOPOIE TIC AND LYMPHOI D TISSUME	M	-	MESSA_SOFT_TISSU E	W
LS1034_LARGE_INT ESTINE	M	R	MEWO_SKIN	W
LS1237_LARGE_INT -STINE	M	-	MFE280_ENDOMET RIUM	M
LS180_LARGE_INT -STINE	W	-	MFE296_ENDOMET RIUM	M
LS411N_LARGE_INT ESTINE	M	-	MFE319_ENDOMET RIUM	M
LS513_LARGE_INT -STINE	W	-	MGG3_BONE	-
LU65_LUNG	M	-	MHICHL2_HAEMA TOPOETIC AND LY MPHOID TISSUE	W
LU99_LUNG	W	-	MHICHL3_HAEMA TOPOETIC AND LY MPHOID TISSUE	W
LUDLU1_LUNG	M	-	MHICHL4_HAEMA TOPOETIC AND LY MPHOID TISSUE	W
LXF289_LUNG	M	-	MHHES1_BONE	M
M059K_CENTRAL NERVOUS SYSTEM	M	-	MHHBN11_AUTON OMIC GANGLIA	W
MD745_HAEMATOP OETIC AND LYMP HOID TISSUE	W	-	MIAPAC2_PANCRE AS	M
MALM33M_SKIN	-	S	MINO_HAEMATOP OETIC AND LYMP HOID TISSUE	M
MC116_HAEMATOP OETIC AND LYMP HOID TISSUE	M	-	MJ_HAEMATOP OETIC AND LYMPHOI D TISSUE	W
MCAS_OVARY	W	-	MKN1_STOMACH	M
MCF7_BREAST	W	S	MKN45_STOMACH	-
MDAMB134V1_BRE AST	-	-	MKN7_STOMACH	M
MDAMB57_BREAS T	M	-	MKN74_STOMACH	M
MDAMB175V1_BRE AST	W	-	MLL_THYROID	-
MDAMB231_BREAS T	M	R	MMIS_HAEMATOP OETIC AND LYMP HOID TISSUE	W
MDAMB361_BREAS T	M	-	MOGGCCM_CENT RAL_NERVOUS_SYST EM	M
MDAMB415_BREAS T	M	-	MOGGUWV_CENT RAL_NERVOUS_SYST EM	M
MDAMB435S_SKIN	M	-	MOLW13_HAEMAT OPOTIC AND LY MPHOID TISSUE	W
MDAMB436_BREAS T	-	R	MOLW16_HAEMAT OPOTIC AND LY MPHOID TISSUE	M
MDAMB453_BREAS T	-	R	MOLMG_HAEMATO POETIC AND LYMP HOID TISSUE	M
MDAMB468_BREAS T	-	R		
MDAPCA22_PROST ATE	W	-		
MDST8_LARGE_INT ESTINE	W	-		
ME1_HAEMATOPOI ETIC AND LYMPHOI D TISSUE	-	-		

【 図 1 2 G 】

CCLE 名	TP 53	S/ R	CCLE 名	TP 53	S/ R	CCLE 名	TP 53	S/ R
NCIH1373_LUNG	M	-	NCIH2023_LUNG	M	-	NCIH446_LUNG	M	R
NCIH1385_LUNG	W	-	NCIH2029_LUNG	M	-	NCIH460_LUNG	W	S
NCIH1395_LUNG	W	-	NCIH2030_LUNG	M	-	NCIH508_LARGE_IN TESTINE	-	R
NCIH1435_LUNG	M	-	NCIH2052_PLEURA	W	-	NCIH101_LUNG	M	-
NCIH1436_LUNG	M	-	NCIH2066_LUNG	M	-	NCIH520_LUNG	M	R
NCIH1437_LUNG	M	-	NCIH2081_LUNG	W	-	NCIH522_LUNG	M	-
NCIH146_LUNG	-	-	NCIH2085_LUNG	W	-	NCIH524_LUNG	M	-
NCIH1563_LUNG	W	-	NCIH2087_LUNG	M	-	NCIH526_LUNG	M	-
NCIH1568_LUNG	M	-	NCIH209_LUNG	M	-	NCIH596_LUNG	M	R
NCIH1573_LUNG	M	-	NCIH2106_LUNG	M	-	NCIH647_LUNG	M	-
NCIH1581_LUNG	-	-	NCIH211_LUNG	M	-	NCIH650_LUNG	M	-
NCIH1618_LUNG	M	-	NCIH2110_LUNG	M	-	NCIH660_PROSTAT E	-	-
NCIH1623_LUNG	M	-	NCIH2122_LUNG	M	-	NCIH661_LUNG	M	R
NCIH1648_LUNG	M	-	NCIH2126_LUNG	-	-	NCIH684_LIVER	M	-
NCIH1650_LUNG	M	-	NCIH2141_LUNG	M	-	NCIH69_LUNG	M	R
NCIH1651_LUNG	M	-	NCIH2170_LUNG	M	-	NCIH716_LARGE_IN TESTINE	M	-
NCIH1666_LUNG	W	-	NCIH2171_LUNG	M	-	NCIH727_LUNG	M	-
NCIH1693_LUNG	M	-	NCIH2172_LUNG	-	-	NCIH747_LARGE_IN TESTINE	M	R
NCIH1694_LUNG	M	-	NCIH2196_LUNG	M	-	NCIH810_LUNG	M	-
NCIH1703_LUNG	M	-	NCIH2227_LUNG	M	-	NCIH82_LUNG	-	-
NCIH1734_LUNG	M	-	NCIH2228_LUNG	M	-	NCIH838_LUNG	-	-
NCIH1755_LUNG	-	-	NCIH226_LUNG	-	-	NCIH841_LUNG	M	-
NCIH1781_LUNG	M	-	NCIH2286_LUNG	M	-	NCIH854_LUNG	M	-
NCIH1792_LUNG	M	-	NCIH2291_LUNG	M	-	NCIH889_LUNG	M	-
NCIH1793_LUNG	M	-	NCIH23_H	M	-	NCIH923_HAEMAT OPOIETIC_AND LY MPHOID_TISSUE	W	-
NCIH1836_LUNG	M	-	NCIH2342_LUNG	M	-	NCIN87_STOMACH	M	-
NCIH1838_LUNG	M	-	NCIH2347_LUNG	-	-	NC02_HAEMATOP OIETIC_AND LY MPHOID_TISSUE	M	-
NCIH1869_LUNG	M	-	NCIH2405_LUNG	-	-	NHO_AUTONOMIC _GANGLIA	W	-
NCIH1876_LUNG	M	-	NCIH2444_LUNG	M	-	NOHVCAR3_OVAR Y	M	-
NCIH1915_LUNG	M	-	NCH2452_PLEURA	W	-	NMCG1_CENTRAL NERVOUS_SYSTEM	W	-
NCIH1930_LUNG	M	-	NCIH28_PLEURA	W	-	NOHOM1_HAEMAT OPOIETIC_AND LY MPHOID_TISSUE	M	-
NCIH1944_LUNG	W	-	NCIH292_LUNG	W	S	NUDHBL_HAEMAT OPOIETIC_AND LY MPHOID_TISSUE	M	-
NCIH196_LUNG	M	-	NCIH322_LUNG	M	-	NUDHBL_HAEMAT OPOIETIC_AND LY MPHOID_TISSUE	M	-
NCIH1963_LUNG	M	-	NCIH3255_LUNG	M	-	NUDUL11_HAEMAT OPOIETIC_AND LY MPHOID_TISSUE	M	-
NCIH1975_LUNG	-	-	NCIH358_LUNG	-	-	NUGUC2_STOMACH	M	-
NCIH2009_LUNG	M	-	NCIH441_LUNG	M	R			

【図12H】

CCLC 名	TP 53	S/ R
NUGC3_STOMACH	M	-
NUGC4_STOMACH	W	-
OAW28_OVARY	-	-
OAW42_OVARY	W	-
OC314_OVARY	M	-
OC315_OVARY	M	-
OC316_OVARY	-	-
OC1AM2_LYHAEMATOPOIETICANDLYMPHOIDTISSUE	W	-
OC1AM3_LYHAEMATOPOIETICANDLYMPHOIDTISSUE	W	-
OC1AM4_LYHAEMATOPOIETICANDLYMPHOIDTISSUE	W	-
OC1LY10_HAEMATOPOIETICANDLYMPHOIDTISSUE	-	-
OC1LY11_HAEMATOPOIETICANDLYMPHOIDTISSUE	W	-
OC1LY12_HAEMATOPOIETICANDLYMPHOIDTISSUE	W	-
OC1LY13_HAEMATOPOIETICANDLYMPHOIDTISSUE	W	-
OC1M1_HAEMATOPOIETICANDLYMPHOIDTISSUE	M	-
OC1UM1_STOMACH	-	-
OE19_ESOPHAGUS	M	R
OE33_ESOPHAGUS	M	R
OELE_OVARY	M	-
ONCDG1_OVARY	M	-
ONS76_CENTRAL_NEUROVÜS SYSTEM	W	-
OPMZ_HAEMATOPOIETICANDLYMPHOIDTISSUE	M	-
OSRC2_KIDNEY	W	-
OUMS23_LARGE_INTESTINE	M	-
OUMS27_BONE	W	-
OV56_OVARY	-	-
OV7_OVARY	-	-
OV90_OVARY	M	-
OVCAR4_OVARY	M	-
OVCAR8_OVARY	M	-
OVISE_OVARY	W	-
OVK18_OVARY	M	-
OVKATE_OVARY	M	-

【 図 1 2 I 】

CCLC 名	TP 53	S/ R
PL21_HAEMATOPOI ETIC_AND_LYMPHO ID_TISSUE	M	-
PL45_PANCREAS	M	-
PLCPRF5_LIVER	M	-
PRECLH_Prostate	M	-
PSN1_PANCREAS	M	-
QGP1_PANCREAS	-	-
RAJ1_HAEMATOPOI ETIC_AND_LYMPHO ID_TISSUE	M	R
RCC101ORG_KIDNEY	W	-
RCC4_KIDNEY	W	-
RCHAC19_HAEMATO POIETIC_AND_LYM PHOID_TISSUE	W	-
RCM1_LARGE_INTE -STINE	M	-
RD_SOFT_TISSUE	M	R
RDES_BONE	M	-
REC11_HAEMATOPOI ETIC_AND_LYMPHO ID_TISSUE	-	-
REH_HAEMATOPOI ETIC_AND_LYMPHO ID_TISSUE	-	-
RERFCG1B_STOMA CH	M	-
RERFLCAD1_LUNG	M	-
RERFLCAD2_LUNG	M	-
RERFLCA1_LUNG	W	-
RERFLCK1_LUNG	M	-
RERFLCMS_LUNG	M	-
RERFLCSQ1_LUNG	-	-
RH18_SOFT_TISSUE	W	-
RH30_SOFT_TISSUE	M	-
RH41_SOFT_TISSUE	M	-
RIL_HAEMATOPOIE TIC_AND_LYMPHOI D_TISSUE	M	-
RKN_SOFT_TISSUE	M	-
RKO_LARGE_INTEST INE	-	S
RL_HAEMATOPOIET IC_AND_LYMPHOID TISSUE	M	-
RL95Z2_ENDOMETRI UM	M	R
RMGL_OVARY	W	-
RMUGS_OVARY	M	-
RPM17951_SKIN	M	R

【図12J】

CCL名	TP S/ R
SNU489_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M -
SNU5_STOMACH	M R
SNU503_LARGE_INTESTINE	M -
SNU520_STOMACH	W -
SNU601_STOMACH	-
SNU61_LARGE_INTESTINE	M -
SNU620_STOMACH	W -
SNU626_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M -
SNU668_STOMACH	M -
SNU685_ENDOMETRIUM	M -
SNU719_STOMACH	W -
SNU738_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M -
SNU761_LIVER	-
SNU8_OVARY	M -
SNU81_LARGE_INTESTINE	M -
SNU840_OVARY	W -
SNU860_BILIARYTRACT	-
SNU878_LIVER	M -
SNU886_LIVER	M -
SNU899_UPPER_AERODIGESTIVE_TRACT	W -
SNUC1_LARGE_INTESTINE	M -
SNUC2_LARGE_INTESTINE	M -
SNUC3_LARGE_INTESTINE	M -
SNUC5_LARGE_INTESTINE	M -
SQ1_LUNG	W -
S786_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M -
S7486_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M R
SU8686_PANCREAS	M R
SUDH11_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	-
SUDH10_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M -
SUDH14_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M -
SUDH5_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	W -

CCL名	TP S/ R
SUDH16_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M -
SUDH21_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M -
SUIT2_PANCREAS	M -
SUPB11_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	W -
SUPHD1_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M -
SUPM1_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	W -
SUPT1_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M -
SUPT11_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M -
SW1088_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M R
SW1101_LARGE_INTESTINE	M R
SW1271_LUNG	M -
SW1352_BONE	M S
SW1417_LARGE_INTESTINE	M R
SW1463_LARGE_INTESTINE	M R
SW1573_LUNG	W -
SW1770_urinary tract	M -
SW1783_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M R
SW1990_PANCREAS	-
SW403_LARGE_INTESTINE	M R
SW48_LARGE_INTESTINE	- S
SW480_LARGE_INTESTINE	- R
SW579_THYROID	M R
SW620_LARGE_INTESTINE	- R
SW780_urinary tract	W -
SW837_LARGE_INTESTINE	M R
SW900_LUNG	M R
SW948_LARGE_INTESTINE	- R
T173_BONE	W -
T24_urinary tract	W R
T3M10_LUNG	M -
T3M4_PANCREAS	M -
T47D_BREAST	M R
T84_LARGE_INTESTINE	M -
CTG-018	M -
CTG-019	M -
CTG-020	M -
CTG-021	M -
CTG-022	M -
CTG-023	M -
CTG-024	M -
CTG-025	M -
CTG-026	M -
CTG-027	M -
CTG-028	M -
CTG-029	M -
CTG-030	M -
CTG-031	M -
CTG-032	M -
CTG-033	M -
CTG-034	M -
CTG-035	M -
CTG-036	M -
CTG-037	M -
CTG-038	M -
CTG-039	M -
CTG-040	M -
CTG-041	M -
CTG-042	M -
CTG-043	M -
CTG-044	M -
CTG-045	M -
CTG-046	M -
CTG-047	M -
CTG-048	M -
CTG-049	M -
CTG-050	M -
CTG-051	M -
CTG-052	M -
CTG-053	M -
CTG-054	M -
CTG-055	M -
CTG-056	M -
CTG-057	M -
CTG-058	M -
CTG-059	M -
CTG-060	M -
CTG-061	M -
CTG-062	M -
CTG-063	W -
CTG-064	M -
CTG-065	M -
CTG-066	M -
CTG-067	W -
CTG-068	W -
CTG-069	W R
CTG-075	W -
CTG-079	W -
CTG-080	W -
CTG-081	M -
CTG-082	-
CTG-083	-
CTG-084	M -
CTG-087	W -
CTG-088	M -
CTG-089	W -
CTG-090	W -
CTG-092	M -
CTG-093	W S
CTG-0101	M -
CTG-0102	M -
CTG-0103	M -
CTG-0104	M -

【図12K】

CCL名	TP S/ R
TYKNU_OVARY	M -
U118MG_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M -
U138MG_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M R
U78_CENTRAL_NE_RVOUS_SYSTEM	M -
U251MG_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M -
U26681_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M R
U205_BONE	W S
U343_CENTRAL_NE_RVOUS_SYSTEM	W -
U87MG_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	W S
U937MG_CENTRAL_NERVOUS_SYSTEM	M -
UACCG257_SKIN	W -
UACCG62_SKIN	W -
UACC812_BREAST	W -
UACC893_BREAST	M -
UBLCC1_urinary tract	M -
UMRCK2_KIDNEY	M -
UMRCK6_KIDNEY	M -
UMUC1_urinary tract	M -
UMUC3_urinary tract	- R
UOK101_KIDNEY	-
U77_HAEMATOPOIETIC_AND_LYMPHOID_TISSUE	M -
VACP_PROSTATE	M -
VMCUB1_urinary tract	M -
VMRCLCD_LUNG	M -
VMRCLCP_LUNG	M -
VMRCRW_KIDNEY	-
VMRCRZ_KIDNEY	-
WM115_SKIN	W -
WM1799_SKIN	W -
WM2664_SKIN	W -
WM793_SKIN	W -
WM88_SKIN	W -
WM9838_SKIN	M -

【図13A】

モデル	TP S/ R
CTG-0009	W -
CTG-0011	W -
CTG-0012	M -
CTG-0017	M -
CTG-0018	M -
CTG-0052	W -
CTG-0058	M -
CTG-0061	M -
CTG-0062	M -
CTG-0063	W -
CTG-0064	M -
CTG-0065	M -
CTG-0066	M -
CTG-0067	W -
CTG-0068	W -
CTG-0069	W R
CTG-0075	W -
CTG-0079	W -
CTG-0080	W -
CTG-0081	M -
CTG-0082	-
CTG-0083	-
CTG-0084	M -
CTG-0087	W -
CTG-0088	M -
CTG-0089	W -
CTG-0090	W -
CTG-0092	M -
CTG-0093	W S
CTG-0101	M -
CTG-0102	M -
CTG-0103	M -
CTG-0104	M -

【図13B】

モデル	TP S/ R
CTG-0009	W -
CTG-0369	W -
CTG-0370	W -
CTG-0374	M -
CTG-0375	M -
CTG-0379	W -
CTG-0381	W -
CTG-0382	W -
CTG-0383	M -
CTG-0387	W -
CTG-0401	M -
CTG-0403	W -
CTG-0406	M -
CTG-0411	W -
CTG-0419	M -
CTG-0432	W -
CTG-0434	W -
CTG-0435	W -
CTG-0437	M -
CTG-0701	W -
CTG-0438	M -
CTG-0439	W -
CTG-0440	M -
CTG-0454	M -
CTG-0487	W -
CTG-0488	M -
CTG-0492	W -
CTG-0494	W -
CTG-0500	W S
CTG-0501	W S
CTG-0497	W -
CTG-0499	W -
CTG-0502	W S
CTG-0727	M -

モデル	TP S/ R
CTG-0009	W -
CTG-0851	-
CTG-0851	-
CTG-0860	W -
CTG-0869	M -
CTG-0871	M -
CTG-0888	M -
CTG-0891	W -
CTG-0923	-
CTG-0009	W -
CTG-0743	M -
CTG-0759	M -
CTG-0765	W -
CTG-0767	W -
CTG-0768	M -
CTG-0771	W -
CTG-0774	M -
CTG-0775	W -
CTG-0666	M -
CTG-0784	M -
CTG-0657	W -
CTG-0670	M -
CTG-0672	-
CTG-0674	W -
CTG-0676	W -
CTG-0679	M -
CTG-0681	M -
CTG-0684	M -
CTG-0689	M -
CTG-0701	W -
CTG-0703	M -
CTG-0706	M -
CTG-0707	-
CTG-0454	M -
CTG-0709	-
CTG-0711	M -
CTG-0712	M -
CTG-0714	-
CTG-0496	M -
CTG-0717	M -
CTG-0497	W -
CTG-0719	W -
CTG-0722	W -
CTG-0723	W -
CTG-0727	M -
CTG-0849	M -

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/JP2015/079389

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68 A61K31/499
ADD.

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)
C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/020502 A2 (NOVARTIS AG [CH]; GAULIS SWANN [CH]; JEAY SEBASTIEN [CH]) 6 February 2014 (2014-02-06) the whole document ----- X ASFAR AZMI ET AL: "Network modeling of MDM2 inhibitor-oxaliplatin combination reveals biological synergy in wt-p53 solid tumors.", ONCOTARGET, vol. 2, no. 5, 1 May 2011 (2011-05-01), pages 378-392, XP055137107, United States ISSN: 1949-2553 figures 5-11 ----- -/-	1-46, 49-67 47,48

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* 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

Date of mailing of the international search report

21 January 2016

28/01/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gabriels, Jan

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/JP2015/079389

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/065760 A1 (AGENCY SCIENCE TECH & RES [SG]) 1 May 2014 (2014-05-01) claims 34-36 -----	67
X	EP 2 380 892 A1 (DAIICHI SANKYO CO LTD [JP]) 26 October 2011 (2011-10-26) example 6 -----	67
X	WO 2012/121361 A1 (DAIICHI SANKYO CO LTD [JP]; SUGIMOTO YUUICHI; UOTO KOUICHI; MIYAZAKI M) 13 September 2012 (2012-09-13) example 70 -----	67
X,P	WO 2015/000945 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 8 January 2015 (2015-01-08) claim 1 -----	1,2,6-9, 11,12, 16-19, 21,24, 25, 30-33, 37,38, 40-46, 52, 57-60, 62-67
A	C. SADDLER ET AL: "Comprehensive biomarker and genomic analysis identifies p53 status as the major determinant of response to MDM2 inhibitors in chronic lymphocytic leukemia", BLOOD, vol. 111, no. 3, 25 October 2007 (2007-10-25), pages 1584-1593, XP055139885, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2007-09-112698 the whole document -----	2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/JP2015/079389

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014020502 A2	06-02-2014	CN 104520714 A EP 2880447 A2 JP 2015526078 A US 2014038986 A1 US 2015159222 A1 WO 2014020502 A2	15-04-2015 10-06-2015 10-09-2015 06-02-2014 11-06-2015 06-02-2014
WO 2014065760 A1	01-05-2014	NONE	
EP 2380892 A1	26-10-2011	AU 2010205201 A1 CA 2750009 A1 CN 102356085 A CO 6420347 A2 DK 2380892 T3 EP 2380892 A1 ES 2463820 T3 HR P20140409 T1 JP 5520236 B2 KR 20110119641 A PT 2380892 E RU 2011134283 A SG 173028 A1 SI 2380892 T1 SM T201400082 B TW 201030011 A US 2011301176 A1 US 2013172362 A1 WO 2010082612 A1	04-08-2011 22-07-2010 15-02-2012 16-04-2012 30-06-2014 26-10-2011 29-05-2014 06-06-2014 11-06-2014 02-11-2011 09-06-2014 27-02-2013 29-08-2011 30-05-2014 08-09-2014 16-08-2010 08-12-2011 04-07-2013 22-07-2010
WO 2012121361 A1	13-09-2012	AU 2012226890 A1 CA 2829188 A1 CN 103635473 A CO 6781539 A2 EP 2684880 A1 JP 5792279 B2 KR 20140059161 A NZ 614218 A RU 2013145310 A SG 193002 A1 TW 201249842 A US 2012264738 A1 US 2014121196 A1 WO 2012121361 A1	19-09-2013 13-09-2012 12-03-2014 31-10-2013 15-01-2014 07-10-2015 15-05-2014 28-08-2015 20-04-2015 30-09-2013 16-12-2012 18-10-2012 01-05-2014 13-09-2012
WO 2015000945 A1	08-01-2015	CA 2912547 A1 WO 2015000945 A1	08-01-2015 08-01-2015

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 31/4439 (2006.01)	A 6 1 K 31/4439	
A 6 1 K 31/407 (2006.01)	A 6 1 K 31/407	
A 6 1 K 31/404 (2006.01)	A 6 1 K 31/404	
A 6 1 K 31/40 (2006.01)	A 6 1 K 31/40	
A 6 1 K 31/4015 (2006.01)	A 6 1 K 31/4015	
A 6 1 K 31/4035 (2006.01)	A 6 1 K 31/4035	
A 6 1 K 31/429 (2006.01)	A 6 1 K 31/429	

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR), OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72) 発明者 ツェ ガイチウ アーチー

アメリカ合衆国 1 1 1 0 1 ニューヨーク州 ロングアイランドシティ, フィフティファースト
アヴェニュー 2 - 1 7 , # 1 1 0 5

(72) 発明者 中丸 健治

東京都品川区広町一丁目2番58号 第一三共株式会社内

(72) 発明者 田崎 康一

東京都品川区広町一丁目2番58号 第一三共株式会社内

(72) 発明者 渡辺 賢司

東京都品川区広町一丁目2番58号 第一三共株式会社内

(72) 発明者 関 剛彦

東京都品川区広町一丁目2番58号 第一三共株式会社内

F ターム(参考) 4B063 QA19 QQ42 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS36 QX02
4C084 AA17 NA05 NA14 ZB261 ZC412
4C086 AA01 AA02 BC07 BC08 BC10 BC13 CB03 CB27 MA01 MA04
NA05 NA14 ZB26 ZC41