(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2015-513369
(P2015-513369A)
(43)公表日　平成27年5月11日(2015.5.11)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	D	4B063
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	A	
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/543	501A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 30 頁）

(21)出願番号　特願2014-559271 (P2014-559271)
(86)(22)出願日　平成25年2月28日 (2013.2.28)
(85)翻訳文提出日　平成26年10月24日 (2014.10.24)
(86)国際出願番号　PCT/FR2013/000055
(87)国際公開番号　WO2013/128089
(87)国際公開日　平成25年9月6日 (2013.9.6)
(31)優先権主張番号　12/00584
(32)優先日　平成24年2月28日 (2012.2.28)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

(71)出願人　510320519
ウニヴェルシテー　ニース　ソフィア　アンティポリス
UNIVERSITE NICE SOPHIA ANTIPOLIS
フランス，エフ－０６１０８　ニース　セデックス　２，アヴェニュー　ヴァルローズ，２８，グラン　シャトー　パルク　ヴァルローズ
Grand Chateau Parc Valrose, 28, Avenue Valrose, F－06108 Nice Cedex 2, France

最終頁に続く

(54)【発明の名称】アザシチジン耐性を診断する検査

(57)【要約】
本発明は、患者のアザシチジン治療耐性を診断することを可能にするｉｎ　ｖｉｔｒｏの分析方法に関するもので、この患者から採取された生体液試料に含まれるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質、ならびにＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質と特異的に結合する生体分子を使用する。本方法は、以下を特徴とする：生体液試料を、患者から回収する；この生体液に含まれる全細胞でＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質を発現するパーセンテージを計算する；この計算したパーセンテージを参照閾値と比較する、この閾値は２０～６０％である；および、この生体液でＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質を発現する細胞のパーセンテージがこの参照値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると診断する。
【選択図】図１８ｂ

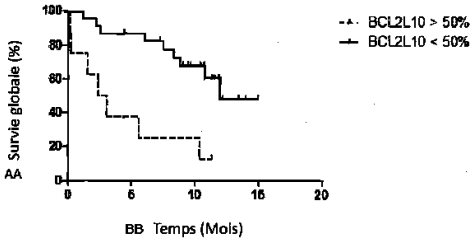


Fig. 18b

AA Overall survival (%)
BB Time (Months)

【特許請求の範囲】
【請求項１】
患者のアザシチジン治療耐性を診断することを可能にするｉｎ　ｖｉｔｒｏの分析方法であって、該患者から採取された生体液試料に含まれるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質、ならびに該ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質と特異的に結合する生体分子を使用し、以下：
・生体液試料を、患者から採取する；
・該生体液に含まれる全細胞でＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質を発現するパーセンテージを計算する；
・該計算したパーセンテージを参照閾値と比較する、該閾値は２０～６０％である；および
・該生体液で該ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質を発現する細胞のパーセンテージが該参照値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると診断する、
を特徴とする、方法。
【請求項２】
前記生体液は、骨髄であることを特徴とする、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記参照閾値は、５０％であることを特徴とする、請求項１または２の１項に記載の方法。
【請求項４】
前記生体液中の前記ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質を発現する細胞の前記パーセンテージの前記測定は、フローサイトメトリーにより、疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）により、または定量的ポリメラーゼ連鎖反応法（ｑＰＣＲ）により、好ましくはフローサイトメトリーにより行なわれることを特徴とする、請求項１から３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質に特異的に結合する前記生体分子は、前記ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質に特異的な抗体であることを特徴とする、請求項１から５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
患者のアザシチジン治療耐性を診断することを可能にするｉｎ　ｖｉｔｒｏの分析方法であって、該患者から採取された生体液試料に含まれるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質の過剰発現を検出することによって行なわれ、以下：
・生体液試料を、患者から採取する；
・該ＢＣＬ２Ｌ１０遺伝子の該過剰発現を検出することにより、該生体液に含まれる全細胞でＢＣＬ２Ｌ１０を発現するパーセンテージを計算する；
・該計算したパーセンテージを参照閾値と比較する、該閾値は２０～６０％である；および
・該生体液でＢＣＬ２Ｌ１０を発現する細胞のパーセンテージが該参照閾値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると診断する、
を特徴とする、方法。
【請求項７】
前記ＢＣＬ２Ｌ１０遺伝子の前記過剰発現の前記検出は、比較ゲノムハイブリダイゼーションＣＧＨ法、フローサイトメトリー法、ＥＬＩＳＡ法、ＤＮＡチップ法、または定量的重合化連鎖反応法（ｑＰＣＲ）により行なわれることを特徴とする、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記ＢＣＬ２Ｌ１０遺伝子の前記過剰発現の前記検出は、比較ゲノムハイブリダイゼーションＣＧＨ法、ＤＮＡチップ法、または定量的重合化連鎖反応法（ｑＰＣＲ）により行なわれることを特徴とする、請求項７に記載の方法。
【請求項９】

前記ＢＣＬ２Ｌ１０遺伝子の前記過剰発現の前記検出は、ＤＮＡチップ法により、または定量的重合化連鎖反応法（ｑＰＣＲ）により行なわれることを特徴とする、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

患者から採取された生体液試料由来の細胞中のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質と特異的に結合する生体分子を含むｉｎ　ｖｉｔｒｏ分析キットであって、該生体液中の該ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質を発現する細胞のパーセンテージが、２０～６０％の参照閾値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると予測することを可能にする分析キット。

【請求項１１】

前記生体液は、骨髄であることを特徴とする、請求項６に記載の分析キット。

【請求項１２】

以下からなる群：

・ＢＣＬ２Ｌ１０断片を増幅することができる１対のプライマー、および

・ＢＣＬ２Ｌ１０の存在を検出することができるプローブ、

より選択される少なくとも１種の試薬を含む、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ分析キットであって、該生体液中のＢＣＬ２Ｌ１０を発現する細胞のパーセンテージが、２０～６０％の参照閾値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると予測することを可能にする分析キット。

【請求項１３】

再発を予測する目的で、アザシチジン治療を観察する方法を実施するための、請求項１０、１１、または１２の１項に記載のキットの使用。

【請求項１４】

前記患者の反応に応じて前記治療を適合させることを可能にすることを特徴とする、請求項１３に記載のキットの使用。

【請求項１５】

前記患者は、骨髄異形成症候群および／または急性骨髄性白血病であることを特徴とする、請求項１３または１４に記載のキットの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

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

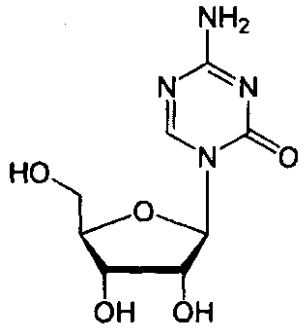
【背景技術】

【０００２】

アザシチジンは、以下の式を有する化合物であるが：

【０００３】

【化１】



【０００４】

造血幹細胞移植対象外の、骨髄異形成症候群（ＭＤＳ）および急性骨髄性白血病（ＡＭＬ

）の患者にとって、現在、唯一の承認された治療薬である。アザシチジンは、これらの疾患の治療用に、ビダーザ（登録商標）の商品名でも市販されている

【０００５】

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

【０００６】

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

【０００７】

ＡＭＬは、顆粒球系列、赤血球系列、および巨核球系列という３つの系列の骨髄前駆体の急激な増殖を特徴とし、この増殖は、血液および骨髄中の未熟細胞蓄積を引き起こして、正常な造血を破壊する。ＡＭＬの診断は、ＭＤＳと同じ技術に基づいて行なわれる。ＡＭＬとして、未分化型ＡＭＬ、最未分化型ＡＭＬ、骨髄芽球性白血病、単芽球性白血病、骨髄単芽球性白血病、ならびに急性赤白血病および急性巨核球性白血病が挙げられる。原発性または続発性ＡＭＬは、様々な器官および組織（肌、神経節、乳房、消化管、脾臓など）の腫瘍の原因となり、骨髄肉腫（緑色腫または顆粒球性肉腫とも呼ばれる）を生じさせる可能性がある。骨髄肉腫は、急性白血病として表れる可能性があり、悪性リンパ腫の診断上の難問となっている。

【０００８】

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

【０００９】

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

【００１０】

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

【００１１】

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

【００１２】

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

【００１３】

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

【００１４】

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

【００１５】

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

【００１６】

また、現在、アザシチジン治療が有効でないのが投与開始時からなのか数ヶ月後患者が耐性を生じたからなのかに関わらず、有効ではない患者にアザシチジンを投与することを避ける目的で、アザシチジン治療に対する患者の耐性を予測することが求められている。実際、耐性患者にそのような治療を行なうことは、制約があり、患者に危害が及ぶ可能性があり、しかも不要な多額の出費を招く可能性がある。このことは、ＭＤＳおよび／またはＡＭＬの患者に推奨されるアザシチジン治療の場合にも、全ての治療目的のアザシチジン治療にも当てはまる。実際アザシチジン耐性はアザシチジン分子に関連するものであって、アザシチジンの投与の仕方に関連するのではない。

【００１７】

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

【００１８】

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

【００１９】

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

【００２０】

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

【００２１】

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

【００２２】

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

【００２３】

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

【００２４】

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

【００２５】

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

【００２６】

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

【００２７】

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

【００２８】

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

にいたっては、まったくない。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００２９】
【特許文献１】特開２０１０－１６２０３１号公報
【特許文献２】米国特許出願公開第２００９１４３２３６号明細書
【特許文献３】米国特許出願第２０１１／０１２９８３３号明細書
【非特許文献】
【００３０】
【非特許文献１】Ｌｏｓｓ ｏｆ ＢＣＬ２Ｌ１０ ｐｒｏｔｅｉｎ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｓ ｐｒｏｇｎｏｓｔｉｃ ｐｒｅｄｉｃｔｏｒ ｆｏｒ ｐｏｏｒ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｏｕｔｃｏｍｅ ｉｎ ｇａｓｔｒｉｃ ｃａｒｃｉｎｏｍａ，Ｈｉｓｔｏｐａｔｈｏｌｏｇｙ ２０１０，５７，８１４－８２
【非特許文献２】Ｒｏｌｅ ｏｆ ＢＣＬ２Ｌ１０ ｍｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ ａｎｄ ＴＥＴ２ ｍｕｔａｔｉｏｎｓ ｉｎ ｈｉｇｈｅｒ ｒｉｓｋ ｍｙｅｌｏｄｙｓｐｌａｓｔｉｃ，Ｌｅｕｋｅｍｉａ．２０１１ Ｄｅｃ；２５（１２）
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００３１】
対象となっている問題の解決策は、患者のアザシチジン治療耐性を診断することを可能にするｉｎ ｖｉｔｒｏの分析方法に関するもので、この患者から採取された生体液試料に含まれるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質、ならびにＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質と特異的に結合する生体分子を使用し、以下を特徴とする：
・生体液試料を、患者から採取する；
・この生体液に含まれる全細胞でＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質を発現するパーセンテージを計算する；
・この計算したパーセンテージを参照閾値と比較する、この閾値は２０～６０％である；および
・この生体液でＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質を発現する細胞のパーセンテージがこの参照値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると診断する。
【００３２】
意外にも、出願人は、患者の生体液のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞の割合とアザシチジン耐性に関連性があることを実証できた。
【００３３】
このパーセンテージに対する参照閾値（この値を超えると患者はアザシチジン耐性であると結論づけることができる値）の決定は、これまで一度も示唆されてこなかった。
【００３４】
この方法により、アザシチジン分子を患者に投与する前であっても、このアザシチジンに対する患者の耐性を診断することが可能になる。またこの方法により、有利なことに、以前はアザシチジン治療感受性であった患者の再発を予測することも可能になる。
【００３５】
本発明による分析方法により、アザシチジンを用いた患者の治療で不要なものはなんでも回避することができる。したがって、本方法は、患者の健康および適切な治療という点で、ならびに経済的側面から、有利である。本発明の第二の対象は、本発明によるｉｎ ｖｉｔｒｏ分析方法を行なうことを可能にするｉｎ ｖｉｔｒｏ分析用キットに関し、このキットは、患者から採取した生体液から得られる細胞中のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質と特異的に結合する生体分子を含む。
【００３６】
最後に、本発明の第三の対象は、再発を予測する目的でアザシチジン治療を観察する方法を遂行するための、本発明によるｉｎ ｖｉｔｒｏ分析用キットの使用に関する。

【００３７】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのアザシチジン耐性に関連した機構をより深く理解するため、本発明者らは、ＡＺＡ－ＲまたはＳＫＭ１－Ｒと称するアザシチジン耐性ＳＫＭ１骨髄細胞を作成した。対照的に、ＡＺＡ－ＳまたはＳＫＭ１－Ｓは、アザシチジン感受性細胞である。

【図面の簡単な説明】
【００３８】
添付の図面を参照して書かれた、以下の限定ではない説明を読むことで、本発明をより深く理解できるだろう。図において：
【００３９】
【図１】図１は、Ｂｃｌ－２タンパク質を発現するＳＫＭ１細胞株から得られた細胞をスクリーニングした結果を示す。ＳＫＭ１－Ｓ細胞およびＳＫＭ１－Ｒ細胞を１μＭのアザシチジンで２４時間処理する。次いで、Ｂｃｌ－２、Ｍｃｌ－１、Ｂｃｌ－ｘｌ、およびＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質量を見積もる目的で、ウエスタンブロット実験を行なう。添加対照として、抗ＨＳＰ６０抗体を用いた。
【図２】図２は、ＡＭＬ細胞株であるＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞株における、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質の発現を示す。図２では、ＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞中のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質レベルを、フローサイトメトリーにより数量化する。
【図３】図３は、ＡＭＬ細胞株であるＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞株における、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質の発現を示す。図３では、ＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞中のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質レベルを、フローサイトメトリーにより数量化する。
【図４】図４は、ＡＭＬ細胞株であるＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞株における、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質の発現を示す。図４では、ＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞中のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質レベルを、フローサイトメトリーにより数量化する。
【図５】図５は、ＡＭＬ細胞株であるＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞株における、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質の発現を示す。図５は、逆転写酵素重合化連鎖反応法（ＲＴ－ＰＣＲとも称する）による、ＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞のｍＲＮＡの分析結果を示す。
【図６】図６は、ＡＭＬ細胞株であるＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞株における、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質の発現を示す。図６は、ＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞中のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質レベルを見てわかるようにする、ウエスタンブロットの結果を示す。
【図７】図７は、ＳＫＭ１－Ｒ細胞のアザシチジンに対する再感作、続いてＢＣＬ２Ｌ１０遺伝子の発現の消衰を示す。ＢＣＬ２Ｌ１０遺伝子の発現の消失は、一般に「ノックダウン」と称され、この場合はＢＣＬ２Ｌ１０ノックダウンとなる。ＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞に、干渉ＲＮＡ（Ｌｕｃ　ｓｉＲＮＡ、ＢＣＬ２Ｌ１０　ｓｉＲＮＡ、またはＢｃｌ－２　ｓｉＲＮＡ）を形質移入する。形質移入から７２時間後、細胞を１μＭのアザシチジンで刺激する。図７では、刺激から２４時間後にＸＴＴ試験（キシロース負荷試験）により、細胞の代謝率を測定する。示される結果は、３つの独立した実験を４回行った平均±標準偏差（±ＳＥＭ）に対応する。
【図８】図８は、ＳＫＭ１－Ｒ細胞のアザシチジンに対する再感作、続いてＢＣＬ２Ｌ１０遺伝子の発現の消衰を示す。ＢＣＬ２Ｌ１０遺伝子の発現の消失は、一般に「ノックダウン」と称され、この場合はＢＣＬ２Ｌ１０ノックダウンとなる。ＳＫＭ１－ＳおよびＳＫＭ１－Ｒ細胞に、干渉ＲＮＡ（Ｌｕｃ　ｓｉＲＮＡ、ＢＣＬ２Ｌ１０　ｓｉＲＮＡ、またはＢｃｌ－２　ｓｉＲＮＡ）を形質移入する。形質移入から７２時間後、細胞を１μＭのアザシチジンで刺激する。図８は、１μＭのアザシチジンを添加して２４時間後、フローサイトメトリーにより示されるカスパーゼ３標識化の結果を示す。
【図９】図９は、ＳＫＭ１－Ｒ細胞のアザシチジンに対する再感作、続いてＢＣＬ２Ｌ１０遺伝子の発現の消衰を示す。ＢＣＬ２Ｌ１０遺伝子の発現の消失は、一般に「ノックダウン」と称され、この場合はＢＣＬ２Ｌ１０ノックダウンとなる。ＳＫＭ１－ＳおよびＳ

ＫＭ１－Ｒ細胞に、干渉ＲＮＡ（Ｌｕｃ　ｓｉＲＮＡ、ＢＣＬ２Ｌ１０　ｓｉＲＮＡ、またはＢｃｌ－２　ｓｉＲＮＡ）を形質移入する。形質移入から７２時間後、細胞を１μＭのアザシチジンで刺激する。図９は、１μＭのアザシチジンを添加して２４時間後、フローサイトメトリーにより示されるヨウ化プロピジウム（ＰＩ）標識化の結果を示す。

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

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

【図１２】図１２において、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現は、アザシチジン耐性の患者で特に増加することが示される。図１２は、ＩｍａｇｅＪソフトウェアプログラム（ＩｍａｇｅＪは、米国国立衛生研究所（ＮＩＨ）によるＪａｖａで書かれた画像処理用フリーソフトウェアプログラムである）を用いて分析したＢＣＬ２Ｌ１０およびＥＲＫタンパク質の発現、ならびにＥＲＫ発現に対するＢＣＬ２Ｌ１０発現の比の数量化を示す。

【図１３】図１３において、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現は、アザシチジン耐性の患者で特に増加することが示される。図１３は、ＩｍａｇｅＪソフトウェアプログラムを用いて分析したＢＣＬ２Ｌ１０およびＥＲＫタンパク質の発現の数量化、ならびにＥＲＫ発現に対するＢＣＬ２Ｌ１０発現の比の数量化を示す。

【図１４】図１４は、アザシチジン耐性のＭＤＳ患者またはＡＭＬ患者において、骨髄中のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージが増加しているという事実を示す。図１４では、アザシチジン治療を受けている３２人のＭＤＳまたはＡＭＬの患者および８人の健康な患者（全員、コホート１に属する）におけるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより数量化する。

【図１５】図１５は、アザシチジン耐性のＭＤＳ患者またはＡＭＬ患者において、骨髄中のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージが増加しているという事実を示す。図１５では、ＭＤＳの危険性が低い１４人の患者、ＭＤＳまたはＡＭＬの危険性が高くアザシチジン治療を受けている３１人の患者（全員、コホート２に属する）から採取しＤＭＳＯに入れて凍結させた試料におけるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより数量化する。

【図１６】図１６は、アザシチジン耐性のＭＤＳ患者またはＡＭＬ患者において、骨髄中のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージが増加しているという事実を示す。図１６に示すとおり、ＭＤＳの危険性が高い、すなわち診断中の１６人の患者から採取しＤＭＳＯに入れて凍結させた試料におけるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより数量化する。

【図１７】図１７は、アザシチジン耐性のＭＤＳ患者またはＡＭＬ患者において、骨髄中のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージが増加しているという事実を示す。図１７に示すとおり、ＭＤＳまたはＡＭＬの危険性が高い１５人の患者（全員アザシチジン治療を受けている）から採取しＤＭＳＯに入れて凍結させた試料におけるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージを、フローサイトメトリーにより数量化する。

【図１８ａ】図１８ａは、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージと治療を受けたＭＤＳまたはＡＭＬ患者の全生存期間の相関関係を示す。ＡＺＡで治療したＭＤＳ

またはＡＭＬ患者の全生存期間、ならびに患者たちの骨髄中のＢＣＬ２Ｌ１０発現細胞のパーセンテージについて、移植を行なった場合との比較を、カプラン・マイヤー法により解析した。

【図１８ｂ】図１８ｂは、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージと治療を受けたＭＤＳまたはＡＭＬ患者の全生存期間の相関関係を示す。ＡＺＡで治療したＭＤＳまたはＡＭＬ患者の全生存期間、ならびに患者たちの骨髄中のＢＣＬ２Ｌ１０発現細胞のパーセンテージについて、移植を行なった場合との比較を、カプラン・マイヤー法により解析した。

【図１９】図１９は、フローサイトメトリーによるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質数量化技術の正当性を実証できるものである。図１９では、ＨＥＫ２９３株由来の細胞に、Ｎ末端部分にＭｙｃエピトープタグおよびＢＣＬ２Ｌ１０を組み込むＤＮＡ３発現プラスミド、またはＮ末端部分にＭｙｃエピトープタグのみを組み込むＤＮＡ３発現プラスミドのいずれかで形質移入した。ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現レベルをフローサイトメトリーで数量化した。この実験の結果を図１９に示す。

【図２０】図２０は、フローサイトメトリーによるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質数量化技術の正当性を実証できるものである。図２０では、ＨＥＫ２９３株由来の細胞に、干渉ｓｉＬｕｃ　ＲＮＡまたは干渉ｓｉ－ＢＣＬ２Ｌ１０　ＲＮＡいずれかで形質移入する。ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現レベルをフローサイトメトリーで数量化した。この実験の結果を図２０に示す。

【図２１】図２１は、フローサイトメトリーによるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質数量化技術の正当性を実証できるものである。図２１は、ウエスタンブロットで検出されたＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質レベルを示す。添加対照として、抗ＨＳＰ６０抗体を用いた。

【図２２】図２２は、フローサイトメトリーによるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質数量化技術の正当性を実証できるものである。図２２は、ウエスタンブロットで検出されたＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質レベルを示す。添加対照として、抗ＨＳＰ６０抗体を用いた。

【発明を実施するための形態】

【００４０】

本発明は、特に、生体液の全細胞によるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現の数量化を行なうことによる、患者のアザシチジン治療耐性をｉｎ　ｖｉｔｒｏで診断することを可能にする分析方法に関する。

【００４１】

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

【００４２】

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

【００４３】

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

【００４４】

本発明に従って、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質に特異的に結合する生体分子とは、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質に特異的に結合することができる分子である。有利なことに、そのような分子は、モノクローナルもしくはポリクローナル抗体、溶解性受容体、またはアプタマーであり、好ましくはモノクローナルもしくはポリクローナル抗体である。同じく好ましくは、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質に特異的に結合する生体分子とは、モノクローナル抗体である。ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質に特異的に結合する生体分子として、「Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ」社の抗ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質（参

照番号＃３８６９）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００４５】

本発明に従って、参照閾値（「カットオフ」値とも称する）は、生体液中のＢＣＬ２Ｌ１０陽性細胞のパーセンテージ、すなわちＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質を発現する細胞のパーセンテージに相当する。

【００４６】

採取した生体液の全細胞におけるＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージの値がこの「カットオフ」値よりも大きい場合、検査された患者は、アザシチジン耐性であると診断される。反対に、得られた値がこの「カットオフ」値より小さい場合、検査された患者は、アザシチジン感受性であると診断される。

【００４７】

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

【００４８】

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

【００４９】

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

【００５０】

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

【００５１】

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

・生体液試料を患者から採取する；

・ＢＣＬ２Ｌ１０遺伝子の過剰発現を検出することにより、この生体液に含まれる全細胞でＢＣＬ２Ｌ１０を発現するパーセンテージを計算する；

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

・この生体液でＢＣＬ２Ｌ１０を発現する細胞のパーセンテージがこの参照閾値よりも高い患者を、アザシチジン治療耐性であると診断する。

【００５２】

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

【００５３】

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

【００５４】

本発明は、以下からなる群より選択される少なくとも１種の試薬：

・ＢＣＬ２Ｌ１０断片を増幅することができる１対のプライマー、および

・ＢＣＬ２Ｌ１０の存在を検出することができるプローブ、

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

【００５５】

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

【００５６】

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

【００５７】

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

【００５８】

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

【００５９】

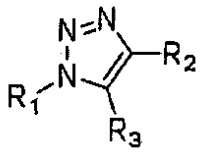
本発明により使用することができる抗腫瘍剤の例として、特に、アカデシン（アカデシン誘導体の５－アミノイミダゾール－４－カルボキサミド－１－β－Ｄ－リボフラノシドはＡＩＣＡＲとも称される）、アクチノマイシンＤ、アムサクリン、アントラサイクリン（ドキソルビシンまたはダウノルビシンなど）、アラシチン、ＡＴＲＡ（オールトランスレチノイン酸）、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、カンプトテシン誘導体、シスプラチン、カルボプラチン、クロラムブシル、デシタビン、デパキン、ドセタキセル、エピポドフィロトキシン誘導体、エルロチニブ、エトポシド、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、フルダラビン、ハイドレア、イホ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

【００６０】

使用可能なアカデシン誘導体は、好ましくは、以下の一般式：

【００６１】

【化２】



【００６２】

式中：

・R_1は、以下から選択され

・フラン型の環状五炭糖基で、含有するＯＨ基は、遊離型であるか、あるいは１つ以上の、モノー、ビー、もしくはトリリン酸基（またはそのプロドラッグ）、アセチル、イソプロピリデン、ベンゾイル、またはｐ－トルオイルで随意に置換される、
・ピラン型の六炭糖で、含有するＯＨ基は、遊離型であるか、あるいは１つまたは複数のモノー、ビー、もしくはトリリン酸基（またはそのプロドラッグ）またはアセチルで随意に置換される、
・ナフチル基、この基は、炭素原子を１～４個有する１つ以上の置換アルキルまたはアミノ基で随意に置換される、
・ベンジル基、この基は、炭素原子を１～４個有する１つ以上の置換アルキルまたはアミノ基で随意に置換される、
・フェニル基、ビフェニル基、およびヘテロアリール基；
・R_2は、以下から選択され
・アミド基である－$CONH_2$、－ＣＯＮＨＭｅ、－ＣＯＮＨＥｔ、－$CON(Me)_2$、－$CON(Et)_2$、
・酸もしくはエステル基である－CO_2H、CO_2Me、CO_2Et、シアノもしくはアミジン基である－ＣＮ、－$C(NH_2)NH$、－$C(NHMe)NH$、－$C(NHEt)NH$、
・フェニル基、この基は、Ｃｌ、Ｂｒ、Ｉ、およびＦから選択されるハロゲンで随意に置換される、
・チオフェン基、
・炭素原子を３～１０個有する直鎖または分岐の炭素鎖、または
・メトキシナフタレン基；かつ
・R_3は、以下から選択される：
・ハロゲン基、
・フランもしくは－ＣＯ－フラン基、
・チオフェンもしくは－ＣＯ－チオフェンもしくは－Ｃ≡Ｃ－チオフェン基、
・トルオイル基、
・アセチレン基、
・－ＣＯ－$(CH_2)_n$－CH_3基、ただしｎは２～９である、
・フェニルもしくは－Ｃ≡Ｃ－フェニル基、この基はハロゲンで随意に置換される、
・－Ｃ≡Ｃ－CO_2Me、－Ｃ≡Ｃ－CO_2Et、－Ｃ≡Ｃ－$CONH_2$基、
・－Ｃ≡Ｃ－$(CH_2)_6CH_3$基、または
・－Ｃ≡Ｃ－２－メトキシナフタレン基；
を有するもの、そのラセミ体、鏡像異性体、およびジアステレオ異性体、ならびにその混合物、その互変異性体、ならびにその薬学的に許容可能な塩である。

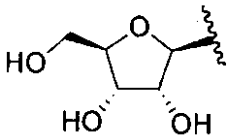
【００６３】
より好ましくは、アカデシン誘導体は、以下の一般式：

【００６４】
【化３】

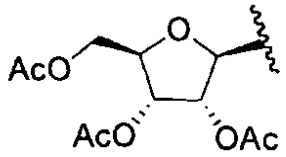
【００６５】
式中、Ｒ１は、

【００６６】

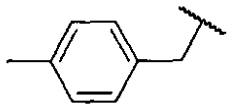
【化４】



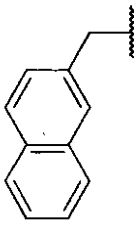
【００６７】
β－Ｄ－リボース
または
【００６８】
【化５】



【００６９】
トリ－Ｏ－アセチル－β－Ｄ－リボース
または
【００７０】
【化６】



【００７１】
４－メチルベンジル
または
【００７２】
【化７】



【００７３】
２－ナフチル（ナフタレン－２－イルメチル）
であり、かつ
・Ｒ１がβ－Ｄ－リボース基の場合：
・Ｒ２＝ＣＯＮＨ$_2$かつＲ３＝Ｃｌ、ＣＯ－フラン、ＣＯ－チオフェンもしくはトルオイル；
または
・Ｒ２＝ＣＯ$_2$ＭｅかつＲ３＝Ｉもしくはアセチレン；
または
・Ｒ２＝フェニルかつＲ３＝Ｉであり；
・Ｒ１がトリ－Ｏ－アセチル－β－Ｄ－リボース基の場合：
・Ｒ２＝ＣＯ$_2$ＥｔかつＲ３＝ＣＯ－（ＣＨ$_2$）$_5$－ＣＨ$_3$、ＣＯ－フラン、トルオイ

ル、－Ｃ≡Ｃ－ＣＯ$_2$Ｅｔ、チオフェンもしくはフェニル；
または
・Ｒ２＝フェニルかつＲ３＝－Ｃ≡Ｃ－フェニル；
または
・Ｒ２＝チオフェンかつＲ３＝－Ｃ≡Ｃ－チオフェン；
または
・Ｒ２＝（ＣＨ$_2$）$_6$ＣＨ$_3$かつＲ３＝－Ｃ≡Ｃ－（ＣＨ$_2$）$_6$ＣＨ$_3$；
または
・Ｒ２＝ｐ－フルオロフェニルかつＲ３＝－Ｃ≡Ｃ－ｐ－フルオロフェニル；
または
・Ｒ２＝２－メトキシナフタレンかつＲ３＝－Ｃ≡Ｃ－２－メトキシナフタレンであり；
・Ｒ１が４－メチルベンジル基の場合：
・Ｒ２＝ＣＯ$_2$ＥｔかつＲ３＝－Ｃ≡Ｃ－ＣＯ$_2$Ｅｔ；
または
・Ｒ２＝フェニルかつＲ３＝－Ｃ≡Ｃ－フェニルであり；
・Ｒ１が２－ナフチル（ナフタレン－２－イル－メチル）基の場合：
・Ｒ２＝ＣＯ$_2$ＥｔかつＲ３＝Ｉ；
または
・Ｒ２＝ＣＯ$_2$ＥｔかつＲ３＝－Ｃ≡Ｃ－ＣＯ$_2$Ｅｔ；
または
・Ｒ２＝フェニルかつＲ３＝－Ｃ≡Ｃ－フェニルである；
を有する化合物、そのラセミ体、鏡像異性体、およびジアステレオ異性体、ならびにその混合物、その互変異性体、ならびにその薬学的に許容可能な塩である。

【００７４】
使用可能なアカデシン誘導体の例として、以下の化合物を挙げることができるが、それらに限定されない：
・１’－（４－エトキシカルボニル－５－ヨード－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－２’，３’，５’－トリ－Ｏ－アセチル－β－Ｄ－リボフラノース；
・１’－（４－カルバモイル－５－ヨード－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－β－Ｄ－リボフラノース；
・１’－（４－メトキシカルボニル－５－エチニル－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－β－Ｄ－リボフラノース；
・１－（ナフチル－２－メチル）－４－エトキシカルボニル－５－ヨード－１，２，３－トリアゾール；
・１－（ナフチル－２－メチル）－４－エトキシカルボニル－５－エチルプロピオラート－１，２，３－トリアゾール；
・１’－（４－エトキシカルボニル－５－エチルプロピオラート－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－２’，３’，５’－トリ－Ｏ－アセチル－β－Ｄ－リボフラノース；
・１’－（４－エトキシカルボニル－５－（２－チエニル）－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－２’，３’，５’－トリ－Ｏ－アセチル－β－Ｄ－リボフラノース；
・１’－（４－エトキシカルボニル－５－フェニル－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－２’，３’，５’－トリ－Ｏ－アセチル－β－Ｄ－リボフラノース；
・１－（４－メチルベンジル）－４－エトキシカルボニル－５－エチルプロピオラート－１，２，３－トリアゾール；
・１’－（４－ヘプチル－５－（ノナ－１－イン－１－イル）－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－２’，３’，５’－トリ－Ｏ－アセチル－β－Ｄ－リボフラノース；
・１’－（４－エトキシカルボニル－５－エチルプロピオラート－［１，２，３］－トリ

アゾール－１－イル）－２’，３’，５’－トリ－Ｏ－ベンゾイル－β－Ｌ－リボフラノース；
・２’－デオキシ－１’－（４－エトキシカルボニル－５－エチルプロピオラート－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－３’，５’－ジ－Ｏ－（ｐ－トルオイル）－α－Ｄ－リボフラノース；
・１’－（４－エトキシカルボニル－５－エチルプロピオラート－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－２’，３’，４’，６’－テトラ－Ｏ－アセチル－β－Ｄ－グルコピラノース；
・１’－（４－エトキシカルボニル－５－エチルプロピオラート－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－２’，３’－Ｏ－イソプロピリデン－β－Ｄ－リボフラノース；
・１’－（４－エトキシカルボニル－５－エチルプロピオラート－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－２’，３’－Ｏ－イソプロピリデン－５’－Ｏ－アセチル－β－Ｄ－リボフラノース；
・１’－（４－エトキシカルボニル－５－（２－チエニル）－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－２’，３’－Ｏ－イソプロピリデン－β－Ｄ－リボフラノース；および
・１’－（４－エトキシカルボニル－５－（２－チエニル）－［１，２，３］－トリアゾール－１－イル）－２’，３’－Ｏ－イソプロピリデン－５’－Ｏ－アセチル－β－Ｄ－リボフラノース。

【００７５】

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

【実施例１】

【００７６】

ＢＣＬ２Ｌ１０の検出に関するサイトメトリー技法の検証。

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

【００７７】

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

【００７８】

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

【００７９】

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

【００８０】

この条件下では、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質の発現もＢＣＬ２Ｌ１０の標識化も、それぞれウエスタンブロットまたはフローサイトメトリーにより検出されなかった（それぞれ図２２および図２０に示すとおり）。このことは、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質の検出に基

づく本発明者らのサイトメトリー実験の有効性を実証する。

【実施例２】

【００８１】

ＳＫＭ１細胞のアザシチジン耐性に関与するＢＣＬ２Ｌ１０の過剰発現。

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

【００８２】

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

【００８３】

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

【実施例３】

【００８４】

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

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

【実施例４】

【００８５】

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

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

【００８６】

表１（感受性患者）：
【表１】

【００８７】
表２Ａ（耐性患者）：

【表２】

【００８８】
表２Ｂ（健康な患者）：
【表３】

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

【００８９】
図１４に示すとおり、健康な患者およびアザシチジン感受性患者から単離したばかりの骨髄試料について、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質を発現する細胞の平均値は、それぞれ、０％（値の範囲は０～１８％）、および８％（値の範囲は０～４０％）であるが、一方アザシチジン耐性患者の骨髄細胞については、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質を発現する細胞の平均値は、８５％（値の範囲は５７％～９９％）であり、ｐ値は０．０００１未満である（図１１に示すとおり）。１４人の低リスクＭＤＳ患者から採取した試料を、２１人のアザシチジン感受性患者および１０人のアザシチジン耐性患者の試料それぞれと比較した場合（全てコホート２の患者）、低リスクＭＤＳ患者は、ＢＣＬ２Ｌ１０発現細胞の中央値が０％であり、最低最高値は０および１１％であることがわかる。図１５はまた、アザシチジン耐性患者のＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージがもっとずっと高く、感受性患者が１０％であるのに比べて、３３％（ｐ＜０．０００１）になることも示す。また、図８に記載の患者の群に基づいて、分析のサブグループを作る。「最初から」アザシチジン難治性であった１０人の検査患者は、ＢＣＬ２Ｌ１０発現細胞のパーセンテージが２９％であり、診断でアザシチジン感受性であった６人の検査患者の値（１０％）より高い。これらの結果を図１６に示す（ｐ＝０．０２３）。再発時、「最初から」アザシチジン感受性であった４人の検査患者は、ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージが２３％である、すなわち、アザシチジン感受性で治療中の１１人の検査患者（Ｂ

ＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージは１４％である）と比べて高いことを示す（図１７に示すとおり）（ｐ＝０．０００２）。

【実施例５】

【００９０】

ＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞のパーセンテージは、ＭＤＳ患者およびＡＭＬ患者の全生存期間を予測する。

生体液の全細胞のうちＢＣＬ２Ｌ１０タンパク質発現細胞は５０％であるという参照閾値（「カットオフ」値とも呼ぶ）を用いると、本検査により、優れた正負の予測を行なうことができる。一般に、本検査の感度および特異性は、それぞれ、８０％および８５％であった。

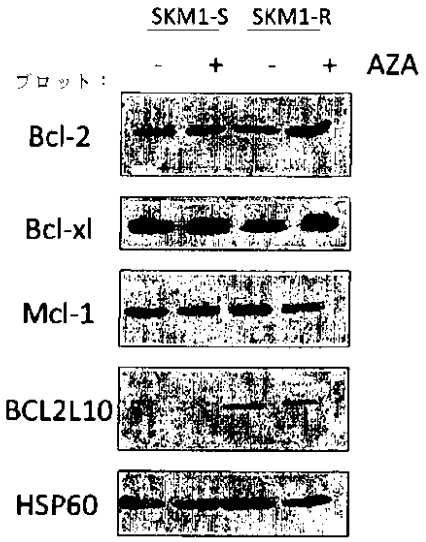
【００９１】

中央値４ヶ月（最短最長期間は０．１および７．５ヶ月）の観察期間で、ＢＣＬ２Ｌ１０の数量化データから、コホート１についての全生存期間（ＯＳ）は、ＢＣＬ２Ｌ１０発現の少ないサブグループにおいての方が、ＢＣＬ２Ｌ１０発現の多いサブグループにおいてよりも有意に良好であった（ｐ＝０．００１６）（図１８ａに示すとおり）。図１８ｂに示すグラフから、さらに長期間（６ヶ月程度に対して１５ヶ月程度）にわたって、ＢＣＬ２Ｌ１０発現細胞のパーセンテージとアザシチジン治療を受けたＭＤＳまたはＡＭＬ患者の全生存期間（ＯＳ）に相関があることがわかる。この図１８ｂは、骨髄中のＢＣＬ２Ｌ１０発現細胞のパーセンテージが５０％超か未満かで２つの群に分けた、ＡＺＡ治療を受けたＭＤＳまたはＡＭＬ患者の、それぞれの群の全生存期間のカプラン・マイヤー曲線を示す。

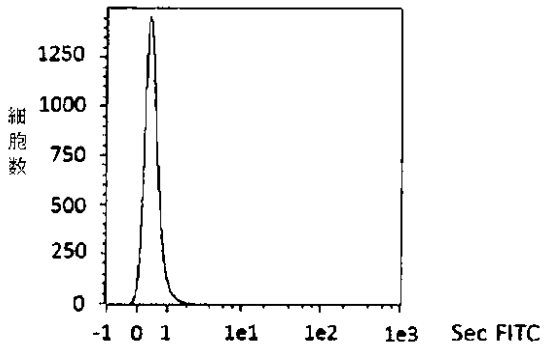
【００９２】

３ヶ月の全生存期間は、ＢＣＬ２Ｌ１０発現の少ないサブグループにおいて９５％と見積もられたのに対して、ＢＣＬ２Ｌ１０発現の多いサブグループについては５１％であった。ＢＣＬ２Ｌ１０発現の多いサブグループの患者全員について、疾患は進行した。

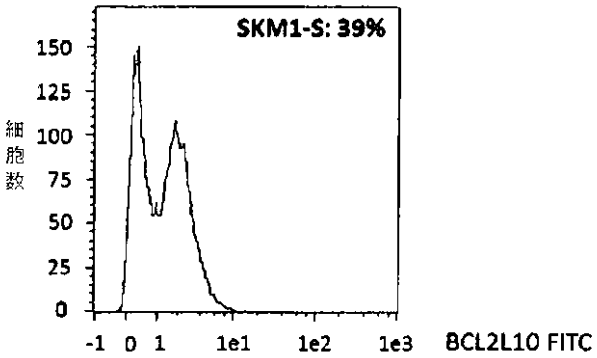
【図１】



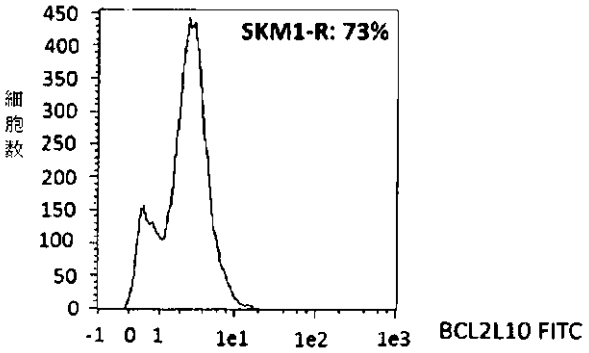
【図２】



【図３】



【図４】



【図５】

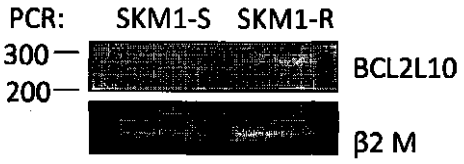
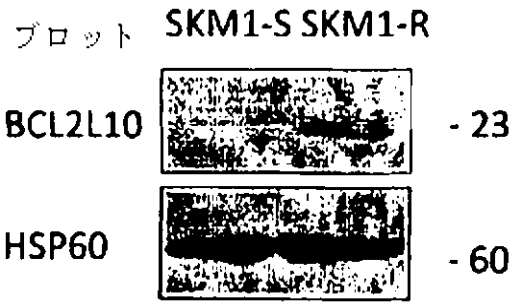
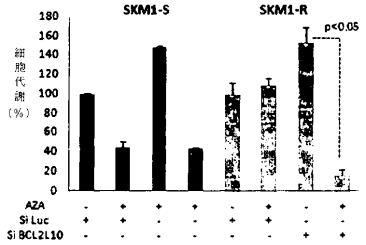


Fig. 5

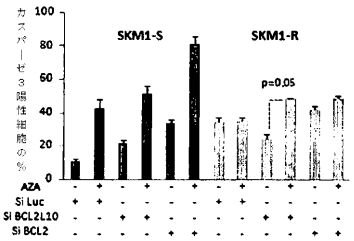
【図６】



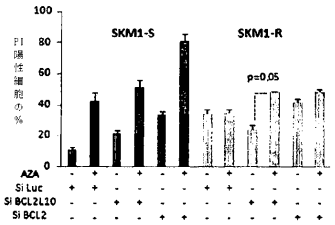
【図７】



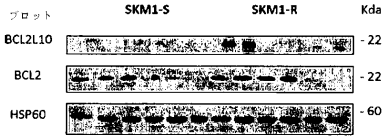
【図８】



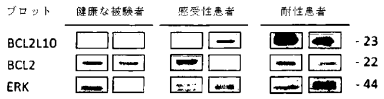
【図９】



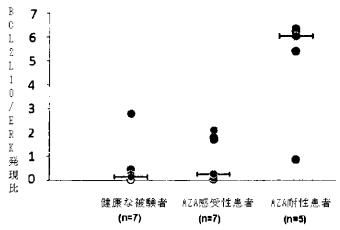
【図１０】



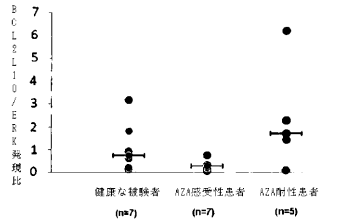
【図１１】



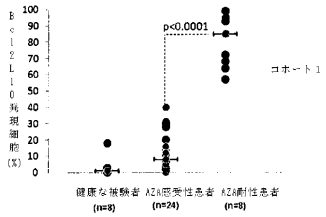
【図１２】



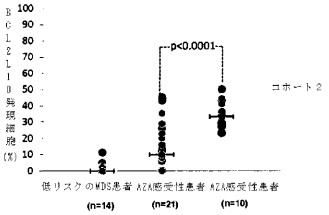
【図１３】



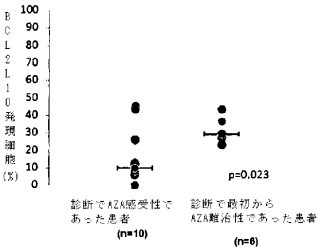
【図１４】



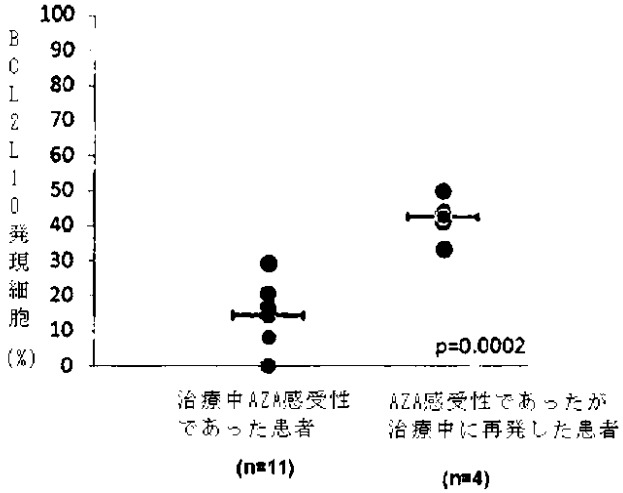
【図１５】



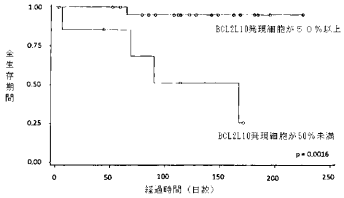
【図１６】



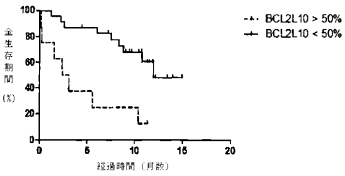
【図１７】



【図１８ａ】



【図１８ｂ】



【図１９】

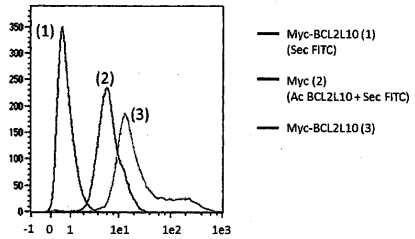


Fig. 19

【図２０】

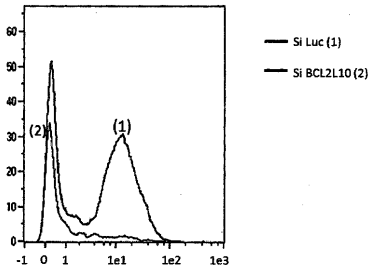


Fig. 20

【図２１】

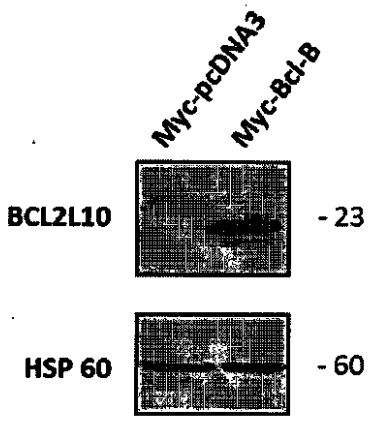


Fig. 21

【図２２】

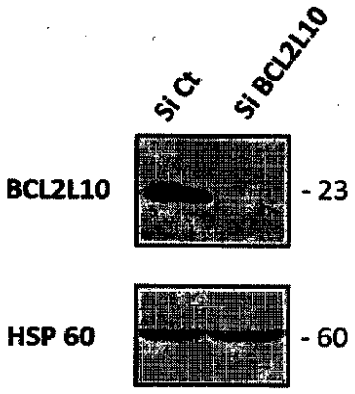


Fig. 22

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2013/000055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. G01N33/50
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)
G01N

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, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BOUMELA IMENE ET AL: "Involvement of BCL2 family members in the regulation of human oocyte and early embryo survival and death: gene expression and beyond", REPRODUCTION (CAMBRIDGE), vol. 141, no. 5, May 2011 (2011-05), pages 549-561, XP002685818, ISSN: 1470-1626 the whole document ----- -/--	6,7

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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
3 May 2013	17/05/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hoff, Céline

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2013/000055

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	S.-J. YOON ET AL: "Role of Bcl2-like 10 (Bcl2l10) in Regulating Mouse Oocyte Maturation", BIOLOGY OF REPRODUCTION, vol. 81, no. 3, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 497-506, XP055061771, ISSN: 0006-3363, DOI: 10.1095/biolreprod.108.073759 Paragraph on northern blot analysis	12
A	JP 2010 162031 A (INASAWA JOJI; BML INC) 29 July 2010 (2010-07-29) the whole document	1-15
A	EP 1 715 041 A1 (BML INC [JP]; INAZAWA JOHJI [JP]) 25 October 2006 (2006-10-25) the whole document	1-15
A	VOSO M T ET AL: "Role of BCL2L10 methylation and TET2 mutations in higher risk myelodysplastic syndromes treated with 5-azacytidine.", LEUKEMIA : OFFICIAL JOURNAL OF THE LEUKEMIA SOCIETY OF AMERICA, LEUKEMIA RESEARCH FUND, U.K DEC 2011 LNKD- DOI:10.1038/LEU.2011.170 PUBMED:21760590, vol. 25, no. 12, December 2011 (2011-12), pages 1910-1913, XP002685819, ISSN: 1476-5551 the whole document	1-15
A	WO 2005/100606 A2 (GENOMIC HEALTH INC [US]; BAKER JOFFRE B [US]; SHAK STEVEN [US]; GIANNI) 27 October 2005 (2005-10-27) the whole document	1-15
T	CLUZEAU THOMAS ET AL: "BCL2L10 is a predictive factor for resistance to Azacitidine in MDS and AML patients", ONCOTARGET, vol. 3, no. 4, April 2012 (2012-04), pages 490-501 URL, XP002685820, the whole document	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2013/000055

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2010162031 A	29-07-2010	NONE	
EP 1715041 A1	25-10-2006	EP 1715041 A1	25-10-2006
		US 2009143236 A1	04-06-2009
		WO 2005078100 A1	25-08-2005
WO 2005100606 A2	27-10-2005	AU 2005233593 A1	27-10-2005
		AU 2010241525 A1	09-12-2010
		CA 2563074 A1	27-10-2005
		EP 1737980 A2	03-01-2007
		EP 2163650 A1	17-03-2010
		EP 2270232 A1	05-01-2011
		IL 178508 A	30-11-2011
		IL 214994 A	28-02-2013
		JP 2007532113 A	15-11-2007
		US 2005260646 A1	24-11-2005
		US 2011129833 A1	02-06-2011
		WO 2005100606 A2	27-10-2005

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2013/000055

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. G01N33/50
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BOUMELA IMENE ET AL: "Involvement of BCL2 family members in the regulation of human oocyte and early embryo survival and death: gene expression and beyond", REPRODUCTION (CAMBRIDGE), vol. 141, no. 5, mai 2011 (2011-05), pages 549-561, XP002685818, ISSN: 1470-1626 le document en entier ----- -/--	6,7

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
3 mai 2013	17/05/2013

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Hoff, Céline

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2013/000055

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	S.-J. YOON ET AL: "Role of Bcl2-like 10 (Bcl2l10) in Regulating Mouse Oocyte Maturation", BIOLOGY OF REPRODUCTION, vol. 81, no. 3, 1 septembre 2009 (2009-09-01), pages 497-506, XP055061771, ISSN: 0006-3363, DOI: 10.1095/biolreprod.108.073759 Paragraph on northern blot analysis	12
A	JP 2010 162031 A (INASAWA JOJI; BML INC) 29 juillet 2010 (2010-07-29) le document en entier	1-15
A	EP 1 715 041 A1 (BML INC [JP]; INAZAWA JOHJI [JP]) 25 octobre 2006 (2006-10-25) le document en entier	1-15
A	VOSO M T ET AL: "Role of BCL2L10 methylation and TET2 mutations in higher risk myelodysplastic syndromes treated with 5-azacytidine.", LEUKEMIA : OFFICIAL JOURNAL OF THE LEUKEMIA SOCIETY OF AMERICA, LEUKEMIA RESEARCH FUND, U.K DEC 2011 LNKD- DOI:10.1038/LEU.2011.170 PUBMED:21760590, vol. 25, no. 12, décembre 2011 (2011-12), pages 1910-1913, XP002685819, ISSN: 1476-5551 le document en entier	1-15
A	WO 2005/100606 A2 (GENOMIC HEALTH INC [US]; BAKER JOFFRE B [US]; SHAK STEVEN [US]; GIANNI) 27 octobre 2005 (2005-10-27) le document en entier	1-15
T	CLUZEAU THOMAS ET AL: "BCL2L10 is a predictive factor for resistance to Azacitidine in MDS and AML patients", ONCOTARGET, vol. 3, no. 4, avril 2012 (2012-04), pages 490-501 URL, XP002685820, le document en entier	1-15

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2013/000055

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
JP 2010162031	A	29-07-2010	AUCUN			
EP 1715041	A1	25-10-2006	EP	1715041	A1	25-10-2006
			US	2009143236	A1	04-06-2009
			WO	2005078100	A1	25-08-2005
WO 2005100606	A2	27-10-2005	AU	2005233593	A1	27-10-2005
			AU	2010241525	A1	09-12-2010
			CA	2563074	A1	27-10-2005
			EP	1737980	A2	03-01-2007
			EP	2163650	A1	17-03-2010
			EP	2270232	A1	05-01-2011
			IL	178508	A	30-11-2011
			IL	214994	A	28-02-2013
			JP	2007532113	A	15-11-2007
			US	2005260646	A1	24-11-2005
			US	2011129833	A1	02-06-2011
			WO	2005100606	A2	27-10-2005

フロントページの続き

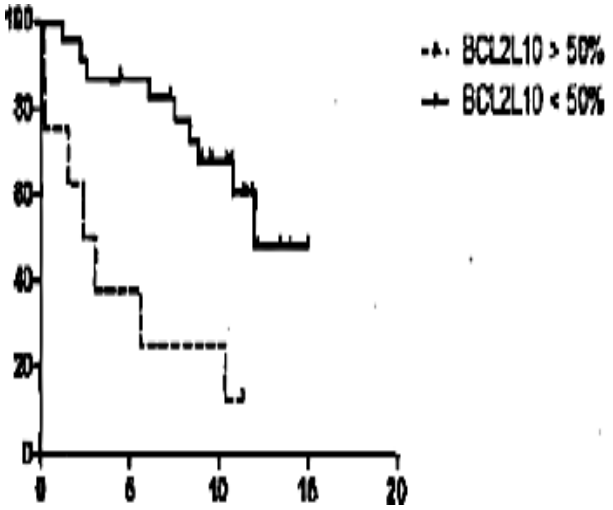
(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,G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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＪＡＶＡ

(71)出願人 514217037
センター オスピタリエ ウニヴェルシテール ド ニース
フランス国 エフ－０６００３ ニース セデックス ０１，ビー．ピー．１１７９，アヴェニュ ド シミーズ，４，オピタル ド シミーズ
(71)出願人 504006489
インスティチュート ナショナル デ ラ サンテ エ デ ラ ルシェルシュ メディカル （インセルム）
フランス国 パリ リュー ド トルビア １０１
(74)代理人 100091683
弁理士 ▲吉▼川 俊雄
(74)代理人 100179316
弁理士 市川 寛奈
(72)発明者 クルゾー，トマス
フランス国 エフ－０６２００ ニース，レジデンス クロス ファブロン バティモン ビー２，５１ ブールバード ド モントレル
(72)発明者 オーバーガー，パトリック
フランス国 エフ－０６１００ ニース，ル ロンザール，３０ ヴィオ シェミン ド ガイロ
(72)発明者 ロベルト，ギヨーム
フランス国 エフ－０６１００ ニース，３ アヴェニュ ミラソル
(72)発明者 ルチアーノ，フレデリック
フランス国 エフ－０６０００ ニース，バット ケー スド，１４０ シェミン ド ラ コスティール

Ｆターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR08 QR32 QR35
QR55 QR62 QS25 QS33 QS34 QX01

专利名称(译)	测试诊断阿扎胞苷耐药性		
公开(公告)号	JP2015513369A	公开(公告)日	2015-05-11
申请号	JP2014559271	申请日	2013-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	センターオスピタリエウニヴェルシテールドニース 研究所国家德拉桑特等拉尔宫格哈德·贝医疗客栈CELM		
申请(专利权)人(译)	Univerushite尼斯索菲亚 - 安提波利斯 中心Osupitarie海胆威赛牛油果尾尼斯 研究所国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗（Inserumu）		
[标]发明人	クルゾートマス オーバーガーパトリック ロベルトギヨーム ルチアーノフレデリック		
发明人	クルゾー,トマス オーバーガー,パトリック ロベルト,ギヨーム ルチアーノ,フレデリック		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5014 G01N33/5044 G01N2333/47 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/118 C12Q2600/158 G01N33/57426 G01N33/5748 G01N2333/82 G01N2800/52 G01N2800/54		
FI分类号	G01N33/53.D C12Q1/68.A G01N33/543.501.A		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01		
优先权	2012000584 2012-02-28 FR		
其他公开文献	JP6273552B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及使用取自所述患者的生物流体样品中含有的BCL2L10蛋白质以及特异性结合BCL2L10蛋白质的生物分子，预测患者对阿扎胞苷治疗的抗性的体外分析方法。其特征在于从患者回收生物流体的样本;计算表达BCL2L10蛋白的所述生物流体中的总细胞的百分比;将该计算的百分比与参考阈值进行比较，该阈值在20％和60％之间;并且在具有表达所述生物流体中的BCL2L10蛋白的细胞百分比大于所述参考值的患者中诊断对阿扎胞苷治疗的耐药性。