

(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2006-500944

(P2006-500944A)

(43) 公表日 平成18年1月12日(2006.1.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 B O 2 9
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	4 B O 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-541212 (P2004-541212)	(71) 出願人	504445356 オンコセラピー・サイエンス株式会社 神奈川県川崎市高津区坂戸3丁目2-1
(86) (22) 出願日	平成15年8月12日 (2003.8.12)	(71) 出願人	504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷7丁目3番1号
(85) 翻訳文提出日	平成17年3月24日 (2005.3.24)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(86) 国際出願番号	PCT/JP2003/010256	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(87) 国際公開番号	W02004/031409	(72) 発明者	中村 祐輔 神奈川県横浜市青葉区あざみ野1丁目17番33号
(87) 国際公開日	平成16年4月15日 (2004.4.15)		
(31) 優先権主張番号	60/414,867		
(32) 優先日	平成14年9月30日 (2002.9.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 慢性骨髄性白血病を診断する方法

(57) 【要約】

慢性骨髄性白血病 (CML) を検出および診断する客観的な方法を本明細書において記載する。一つの態様において、本診断法は、CML細胞と正常細胞とを識別するCML関連遺伝子の発現レベルを決定する段階を含む。本発明は、CMLの治療において有用な治療薬剤をスクリーニングする方法、CMLを治療する方法、およびCMLに対するワクチンを被験者に接種する方法をさらに提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者由来の生物学的試料においてCML関連遺伝子の発現レベルを決定する段階を含む、被験者におけるCMLを診断するか、またはCML発症の素因を診断する方法であって、該遺伝子の正常対照レベルと比較して該レベルが増加または減少すれば、該被験者がCMLを罹患しているか、またはCML発症のリスクを有することを示す方法。

【請求項 2】

CML関連遺伝子がCML 1～190からなる群より選択され、正常対照レベルと比較してレベルが増加すれば、被験者がCMLを罹患しているか、またはCML発症のリスクを有することを示す、請求項1記載の方法。

10

【請求項 3】

増加が正常対照レベルより少なくとも10%大きい、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

CML関連遺伝子が、CML 191～296からなる群より選択され、正常対照レベルと比較してレベルが減少すれば、被験者がCMLを罹患しているか、または発症のリスクを有することを示す、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

減少が正常対照レベルより少なくとも10%低い、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

複数のCML関連遺伝子の発現レベルを決定する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

20

【請求項 7】

発現レベルが、以下からなる群より選択されるいずれか一つの方法によって決定される、請求項1記載の方法：

(a) CML関連遺伝子のmRNAを検出する段階；

(b) CML関連遺伝子にコードされるタンパク質を検出する段階；および

(c) CML関連遺伝子にコードされるタンパク質の生物学的活性を検出する段階。

【請求項 8】

発現レベルが、CML関連遺伝子プローブと、患者由来の生物学的試料の遺伝子転写産物とのハイブリダイゼーションによって検出することで決定される、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

ハイブリダイゼーションの段階がDNAアレイ上で行われる、請求項1記載の方法。

30

【請求項 10】

生物学的試料が単核細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

生物学的試料が骨髓細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 12】

生物学的試料がリンパ系細胞を含む、請求項8記載の方法。

【請求項 13】

CML 1～296からなる群より選択される二つまたはそれ以上の遺伝子の遺伝子発現パターンを含む、CML参照発現プロファイル。

40

【請求項 14】

CML 1～190からなる群より選択される二つまたはそれ以上の遺伝子の遺伝子発現パターンを含む、CML参照発現プロファイル。

【請求項 15】

CML 191～296からなる群より選択される二つまたはそれ以上の遺伝子の遺伝子発現パターンを含む、CML参照発現プロファイル。

【請求項 16】

以下の段階を含む、CMLを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法：

a) CML 1～296にコードされるポリペプチドに被験化合物を接触させる段階；

50

- b) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；および
- c) ポリペプチドに結合する化合物を選択する段階。

【請求項 17】

以下の段階を含む、CMLを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法

- a) CML 1～296からなる群より選択される一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる段階；および
- b) CML 1～190からなる群より選択される一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを低下させるか、またはCML 191～296からなる群より選択される一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物を選択する段階。

10

【請求項 18】

以下の段階を含む、CMLを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法

- a) CML 1～296からなる群より選択される遺伝子にコードされるポリペプチドに被験化合物を接触させる段階；
- b) 段階(a)のポリペプチドの生物学的活性を検出する段階；および
- c) 被験化合物の非存在下において検出される生物学的活性と比較して、CML 1～190にコードされるポリペプチドの生物学的活性を抑制するか、または被験化合物の非存在下において検出される生物学的活性と比較して、CML 191～296にコードされるポリペプチドの生物学的活性を増強する化合物を選択する段階。

20

【請求項 19】

被験細胞がCML患者の末梢血から得られる細胞を含む、請求項17記載の方法。

【請求項 20】

以下の段階を含む、CMLを治療または予防するための化合物をスクリーニングする方法

- a) CML 1～296からなる群より選択される一つまたは複数のマーカー遺伝子の転写調節領域と、転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子とを含むベクターが導入されている細胞に候補化合物を接触させる段階；
- b) レポーター遺伝子の活性を測定する段階；および
- c) 対照と比較して、該マーカー遺伝子がCML 1～190からなる群より選択される上方制御されたマーカー遺伝子である場合には、該レポーター遺伝子の発現レベルを低下させる化合物、または該マーカー遺伝子がCML 191～296からなる群より選択される下方制御されたマーカー遺伝子である場合には、該レポーター遺伝子の発現レベルを増強する化合物を選択する段階。

30

【請求項 21】

CML 1～296からなる群より選択される二つもしくはそれ以上の核酸配列、またはそれにコードされるポリペプチドに結合する検出試薬を含むキット。

【請求項 22】

CML 1～296からなる群より選択される二つまたはそれ以上の核酸配列に結合する核酸を含むアレイ。

40

【請求項 23】

CML 1～190からなる群より選択されるコード配列と相補的なヌクレオチド配列を含むアンチセンス組成物を被験者に投与する段階を含む、被験者におけるCMLを治療または予防する方法。

【請求項 24】

CML 1～190からなる群より選択される核酸配列の発現を低下させるsiRNA組成物を被験者に投与する段階を含む、被験者におけるCMLを治療または予防する方法。

【請求項 25】

CML 1～190からなる群より選択されるいずれか一つの遺伝子にコードされるタンパク質に結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を被験者に投与する段階を含む、被験者に

50

おけるCMLを治療または予防する方法。

【請求項 2 6】

CML 1～190からなる群より選択される核酸にコードされるポリペプチドもしくは該ポリペプチドの免疫学的活性断片、またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを被験者に投与することを含む、被験者におけるCMLを治療または予防する方法。

【請求項 2 7】

CML 191～296の発現または活性を増加させる化合物を被験者に投与する段階を含む、被験者におけるCMLを治療または予防する方法。

【請求項 2 8】

請求項16～20のいずれか一項記載の方法によって得られる化合物を投与する段階を含む、被験者におけるCMLを治療または予防する方法。

【請求項 2 9】

CML 191～296からなる群より選択されるポリヌクレオチドまたはそれにコードされるポリペプチドの薬学的有効量を被験者に投与する段階を含む、被験者におけるCMLを治療または予防する方法。

【請求項 3 0】

CML 1～190からなる群より選択されるポリヌクレオチドに対するアンチセンスポリヌクレオチドまたは低分子干渉RNAの薬学的有効量を含む、CMLを治療または予防するための組成物。

【請求項 3 1】

CML 1～190からなる群より選択されるいずれか一つの遺伝子にコードされるタンパク質に結合する抗体またはその断片の薬学的有効量を含む、CMLを治療または予防するための組成物。

【請求項 3 2】

活性成分として請求項16～20のいずれか一項記載の方法によって選択される化合物の薬学的有効量と、薬学的に許容される担体とを含む、CMLを治療または予防するための組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、慢性骨髄性白血病を診断する方法に関する。

【0 0 0 2】

優先権に関する情報

本出願は、2002年9月30日に提出された米国特許仮出願第60/414,867号に対する優先権を主張する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

発明の背景

慢性骨髄性白血病（CML）は、フィラデルフィア（Ph）染色体転座を特徴とするクローン性の骨髄増殖性疾患である（1）。その結果生じるBCR-ABL融合遺伝子は、チロシンキナーゼ活性が構成的に活性化されている細胞質タンパク質をコードする。CMLは、異なる臨床病期を介して進行し；慢性期と呼ばれる最も初期の段階は、最終分化好中球の増加を特徴とする。急性期は加速期および急性転化期（blast crisis）と呼ばれ、過剰数の未分化の骨髄前駆細胞またはリンパ前駆細胞を伴う成熟停止を特徴とする（2）。現在の治療には、造血幹細胞移植（SCT）、およびインターフェロン-α（IFN-α）を含む化学療法が含まれる（3）。IFN-αは、全体的な生存を延長させるが、かなりの副作用を有する。SCTは、治療効果のある唯一の治療であるが、実質有病率に関連し、適したドナーを有する患者に限定される。

10

20

30

40

50

【0004】

ABL選択的チロシンキナーゼ阻害剤STI571（イマニチブ；グリベック；ノバルティス（Novartis）、バーゼル、スイス）が開発されたことは、CMLの管理における著しい進歩である（4,5）。STI571は、しばしばこれらの臨床状況において顕著な血液学および細胞遺伝学的応答を誘導する。しかし、CMLにおけるSTI571による最近の臨床試験では、進行期の多くの患者が良好に応答するものの、その後再発することが示された（6,7）。BCR-ABL遺伝子の発現の増強または変異によるSTI571に対する耐性がCML患者において認められている（8,9）。実際にSTI571による血液学的応答はそれほど頻繁には起こらず、急性転化期でのCML患者ではあまり持続しない。

【0005】

cDNAマイクロアレイ技術によって、正常および悪性細胞における包括的遺伝子発現プロファイルを得て、悪性細胞および対応する正常細胞における遺伝子発現を比較することが可能となった（Okabeら、Cancer Res. 61: 2129~37（2001）；Kitaharaら、Cancer Res. 61: 3544~9（2001）；Linら、Oncogene 21: 4120~8（2002）；Hasegawaら、Cancer Res. 62: 7012~7（2002））。このアプローチにより、癌細胞の複雑な特性を明らかにすることが可能となり、これは発癌のメカニズムを理解するために役立つ。腫瘍において脱制御される遺伝子を同定することによって、個々の癌のより精密で正確な診断を得ることができ、新規治療標的を開発することができる（Bienz and Clevers、Cell 103: 311~20（2000））。ゲノム全体での観点から腫瘍の基礎となるメカニズムを明らかにするため、そして診断のための標的分子の発見および新規治療薬を開発するために、本発明者らは、遺伝子23040個のcDNAマイクロアレイを用いて腫瘍細胞の発現プロファイルを解析している（Okabeら、Cancer Res. 61: 2129~37（2001）；Kitaharaら、Cancer Res. 61: 3544~9（2001）；Linら、Oncogene 21: 4120~8（2002）；Hasegawaら、Cancer Res. 62: 7012~7（2002））。

【0006】

発癌メカニズムを解明するように計画された研究によって、抗腫瘍薬剤の分子標的の同定が既に促進されている。例えば、Rasに関連する増殖-シグナル伝達経路を阻害するように当初開発されたファルネキシルトランスフェラーゼ阻害剤（FTI）（この活性は翻訳後のファルネシル化に依存する）は、動物モデルにおいてRas依存性腫瘍を治療するために有効である（Heら、Cell 99: 335~45（1999））。抗癌剤と、原癌遺伝子受容体HER2/neuに拮抗するための抗HER-2モノクローナル抗体であるトラスツズマブとの組み合わせを用いるヒトに対する臨床試験が実施されており、乳癌患者の臨床応答および総生存率の改善が得られている（Linら、Cancer Res. 61: 6345~9（2001））。bcr-abl融合タンパク質を選択的に不活化するチロシンキナーゼ阻害剤STI-571は、bcr-ablチロシンキナーゼの構成的活性化が白血球の形質転換において重要な役割を果たしている慢性骨髄性白血病を治療するために開発されている。これらの種類の薬剤は、特定の遺伝子産物の発癌活性を抑制するように設計されている（Fujitaら、Cancer Res. 61: 7722~6（2001））。したがって、癌性細胞において一般的に上方制御されている遺伝子産物は、新規抗癌剤を開発するための潜在的な標的として役立つ可能性がある。

【0007】

CD8+細胞障害性Tリンパ球（CTL）は、MHCクラスI分子上に提示された腫瘍関連抗原（TAA）に由来するエピトープペプチドを認識して、腫瘍細胞を溶解することが証明されている。TAAの最初の例としてMAGEファミリーが発見されて以来、免疫学的アプローチを用いて他にも多くのTAAが発見されている（Boon、Int. J. Cancer 54: 177~80（1993）；Boonおよびvan der Bruggen、J. Exp. Med. 183: 725~9（1996）；van der Bruggenら、Science 254: 1643~7（1991）；Brichardら、J. Exp. Med. 178: 489~95（1993）；Kawakamiら、J. Exp. Med. 180: 347~52（1994））。発見されたTAAのいくつかは、現在免疫治療の標的として臨床開発段階にある。これまで発見されたTAAには、MAGE（van der Bruggenら、Science 254: 1643~7（1991））、gp100（Kawakamiら、J. Exp. Med. 180: 347~52（1994））、SART（Shichijoら、J. Exp. Med. 187: 277~88（1998）、およびNY-ESO-

10

20

30

40

50

1 (Chenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1914~8 (1997)) が含まれる。一方、腫瘍細胞において特に過剰発現されることが示されている遺伝子産物は、細胞性免疫応答を誘導する標的として認識されることが示されている。そのような遺伝子産物には、p53 (Umanoら、Brit. J. Cancer 84:1052~7 (2001))、HER2/neu (Tanakaら、Brit. J. Cancer 84:94~9 (2001))、CEA (Nukayaら、Int. J. Cancer 80:92~7 (1999)) 等が含まれる。

【0008】

TAAに関する基礎および臨床研究における著しい進歩にもかかわらず (Rosenbergら、Nature Med. 4:321~7 (1998) ; Mukherjiら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:8078~82 (1995) ; Huら、Cancer Res. 56:2479~83 (1996))、結腸癌を含む腺癌の治療に利用できるのは、ごく限られた数の候補TAAに過ぎない。癌細胞において豊富に発現されると共にその発現が癌細胞に限定されるTAAは、免疫療法の標的として有望な候補薬剤となるであろう。さらに、強力で特異的な抗腫瘍免疫応答を誘導する新規TAAが同定されれば、様々なタイプの癌におけるペプチドワクチン法の臨床利用を促進すると期待される (Boonおよびvan der Bruggen、J. Exp. Med. 183:725~9 (1996) ; van der Bruggenら、Science 254:1643~7 (1991) ; Brichardら、J. Exp. Med. 178:489~95 (1993) ; Kawakamiら、J. Exp. Med. 180:347~52 (1994) ; Shichijoら、J. Exp. Med. 187:277~88 (1998) ; Chenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1914~8 (1997) ; Harris、J. Natl. Cancer Inst. 88:1442~5 (1996) ; Butterfieldら、Cancer Res. 59:3134~42 (1999) ; 10
Visserら、Cancer Res. 59:5554~9 (1999) ; van der Burgら、J. Immunol. 156:3308~14 (1996) ; Tanakaら、Cancer Res. 57:4465~8 (1997) ; Fujieら、Int. J. Cancer 80:169~72 (1999) ; Kikuchiら、Int. J. Cancer 81:459~66 (1999) ; Oisoら、Int. J. Cancer 81:387~94 (1999)) 。

【0009】

特定の健康なドナーからのペプチド刺激された末梢血単核球細胞 (PBMC) は、ペプチドに応答して有意なIFN- γ レベルを産生するが、⁵¹Cr-放出分析においてHLA-A24または-A0201拘束的に腫瘍細胞に対して細胞障害性を発揮することはまれであることは繰り返し報告されている (Kawanoら、Cancer Res. 60:3550~8 (2000) ; Nishizakaら、Cancer Res. 60:4830~7 (2000) ; Tamuraら、Jpn. J. Cancer Res. 92:762~7 (2001))。しかし、HLA-A24およびHLA-A0201はいずれも、白人のみならず、日本人における一般的なHLA対立遺伝子の一つである (Dateら、Tissue Antigens 47:93~101 (1996) ; Kondoら、J. Immunol. 155:4307~12 (1995) ; Kuboら、J. Immunol. 152:3913~24 (1994) ; Imanishiら、Proceeding of the eleventh International Histocompatibility Workshop and Conference、オックスフォード大学出版、オックスフォード、1065 (1992) ; Williamsら、Tissue Antigen 49:129 (1997))。このように、これらのHLAによって提示される癌の抗原性ペプチドは、日本人および白人における癌の治療において特に有用となる可能性がある。さらに、インビトロでの低親和性CTLの誘導は、通常、高濃度のペプチドの使用によって、高レベルの特異的なペプチド/MHC複合体を、CTLを効果的に活性化する抗原提示細胞 (APCs) 上に生成する結果であろうことは知られている (Alexander-Millerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:4102~7 (1996))。 40

【発明の開示】

【0010】

発明の概要

本発明は、CMLに関連した遺伝子発現パターンの発見に基づく。CMLにおいて発現に差のある遺伝子は、本明細書において集合的に「CML核酸」または「CMLポリヌクレオチド」と呼ばれ、対応するコードされたポリペプチドは、「CMLポリペプチド」または「CMLタンパク質」と呼ばれる。

【0011】

したがって本発明は、末梢血試料または骨髓細胞試料のような、患者に由来する生物学的試料においてCML関連遺伝子の発現レベルを決定することによって、被験者におけるCML 50

に対する素因を診断または決定する方法を特徴とする。CML関連遺伝子とは、正常末梢血細胞と比較して、フィラデルフィア（Ph）染色体転座を含む細胞、またはCMLの臨床症状を示す個体から得られた細胞において発現レベルが異なることを特徴とする遺伝子を意味する。CML関連遺伝子は、CML 1～296の一つまたは複数である。変化、例えば遺伝子の正常対照レベルと比較して遺伝子の発現レベルが増加または減少すれば、被験者がCMLを罹患しているか、または発症のリスクを有することを示している。

【0012】

正常な対照レベルとは、正常な健康個体またはCMLを罹患していないことがわかっている個体集団において検出された遺伝子発現レベルを意味する。対照レベルは、単一の参照集団または複数の発現パターンに由来する単一の発現パターンである。例えば、対照レベルは、既に試験された細胞からの発現パターンのデータベースでありうる。正常な個体は、CMLの臨床症状を有しない個体である。

10

【0013】

正常対照レベルと比較して被験試料においてCML 1～190のレベルの増加が検出されれば、（試料を採取した）被験者がCMLを罹患しているか、または発症するリスクを有することを示している。対照的に、正常な対照レベルと比較して被験試料においてCML 191～296レベルの減少が検出されれば、被験者がCMLを罹患しているか、または発症のリスクを有することを示している。

【0014】

または、試料におけるCML関連遺伝子パネルの発現を、同じ遺伝子パネルのCML対照レベルと比較する。CML対照レベルとは、CMLを罹患している集団において認められるCML関連遺伝子の発現プロファイルを意味する。

20

【0015】

遺伝子発現は、対照レベルと比較して10%、25%、50%増加または減少する。または、遺伝子発現は、対照レベルと比較して1、2、5倍またはそれ以上増加または減少する。発現は、例えばアレイ上で、CML関連遺伝子プローブと患者由来細胞試料の遺伝子転写物とのハイブリダイゼーションによって検出することによって決定される。

【0016】

患者由来細胞試料は、試験被験者、例えばCMLを罹患していることがわかっているかまたは疑われる患者からの任意の細胞である。例えば、試料は末梢血由来の単核細胞の混合物を含む。

30

【0017】

本発明はまた、CML 1～296の二つまたはそれ以上の遺伝子発現レベルのCML参照発現プロファイルを提供する。または、本発明は、CML 1～190またはCML 191～296の二つまたはそれ以上の発現レベルのCML参照発現プロファイルを提供する。

【0018】

本発明はさらに、CML関連遺伝子を発現する被験細胞を被験薬剤に接触させる段階、およびCML関連遺伝子の発現レベルを決定する段階によって、CML関連遺伝子、例えばCML 1～296の発現または活性を阻害または増強する薬剤を同定する方法を提供する。被験細胞は、CML患者の末梢血由来の単核細胞のような単核細胞である。遺伝子の正常な対照レベルと比較してレベルが減少すれば、被験薬剤がCML関連遺伝子の阻害剤であり、CMLの症状、例えばCML 1～190を減少させることを示している。または、遺伝子の正常対照レベルまたは活性と比較してレベルまたは活性が増加すれば、その被験薬剤が、CML関連遺伝子の発現または機能の増強剤であり、CMLの症状を減少させる（例えばCML 191～296を増加させる）ことを示している。

40

【0019】

本発明はまた、二つもしくはそれ以上のCML核酸配列に結合するか、または核酸配列にコードされる遺伝子産物に結合する検出試薬を有するキットを提供する。同様に、二つまたはそれ以上のCML核酸に結合する核酸のアレイも提供する。

【0020】

50

治療法には、被験者にアンチセンス組成物を投与することによって被験者におけるCMLを治療または予防する方法が含まれる。アンチセンス組成物は、特異的標的遺伝子の発現を減少させる。例えばアンチセンス組成物は、CML 1～190からなる群より選択される配列と相補的であるヌクレオチドを含む。もう一つの方法には、短鎖干渉RNA (siRNA) 組成物を被験者に投与する段階が含まれる。siRNA組成物は、CML 1～190からなる群より選択される核酸の発現を減少させる。もう一つの方法において、被験者におけるCMLの治療または予防は、被験者にリボザイム組成物を投与することによって行われる。核酸特異的リボザイム組成物は、CML 1～190からなる群より選択される核酸の発現を減少させる。他の治療法には、CML 191～296の発現またはCML 191～296にコードされるポリペプチドの活性を増加させる化合物を被験者に投与する方法が含まれる。さらに、CMLはCML 191～296にコードされるタンパク質を投与することによって治療することができる。タンパク質は患者に直接投与してもよく、または、例えば対象の下方制御されたマーカー遺伝子を保持する発現ベクターもしくは宿主細胞を投与することによって患者に導入した後、インビボで発現させてもよい。対象遺伝子をインビボで発現させるための適切な機構は、当技術分野において既知である。

10

【0021】

本発明にはまた、ワクチンおよびワクチン接種法が含まれる。例えば、被験者におけるCMLを治療または予防する方法は、CML 1～190からなる群より選択される核酸にコードされるポリペプチドまたはそのようなポリペプチドの免疫学的活性断片を含むワクチンを被験者に投与することによって行われる。免疫学的活性断片は、完全長の天然に存在するタンパク質より長さが短く、免疫応答を誘導するポリペプチドである。例えば、免疫学的活性断片は、長さが少なくとも8残基であって、T細胞またはB細胞のような免疫細胞を刺激する。免疫細胞の刺激は、細胞増殖、サイトカイン（例えば、IL-2）の産生、または抗体の産生を検出することによって測定される。

20

【0022】

特に定義していなければ、本明細書において用いた科学技術用語は全て、本発明が属する当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載の方法および材料と類似または同等の方法および材料を、本発明の実践または試験において用いることができるが、適した方法および材料を下記に記載する。本明細書において言及した全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献はその全体が参照として本明細書に組み入れられる。矛盾する場合には、定義を含めて本明細書が優先する。さらに、材料、方法、および例は、一例に過ぎず、制限することを意図しない。

30

【0023】

本明細書に記載の方法の一つの長所は、最終分化した好中球の増殖のような明白な臨床症状を検出する前に疾患が同定されることである。本発明のその他の特徴および長所は、以下の詳細な説明および特許請求の範囲から明らかとなるであろう。

【0024】

詳細な説明

本発明は、慢性骨髄性白血病（CML）患者の末梢血由来の単核球において、複数の核酸配列の発現パターンの変化を発見したことに一部基づいている。遺伝子発現の差は、包括的cDNAマイクロアレイシステムを用いて同定した。

40

【0025】

遺伝子23,040個を含むcDNAマイクロアレイを用いて、包括的遺伝子発現プロファイルを27例のCMLについて得た。遺伝子296個が、末梢血由来の単核球において発現に差のあることが判明した。結果は、特定の遺伝子がCMLにおいて低いまたは高いレベルで発現されることを示している。患者の血液、血清、または喀痰においてCML関連タンパク質を検出する可能性を有する候補分子マーカーについて選択を行い、CMLにおけるシグナル抑制手法を開発するための潜在的ないくつかの標的を発見した。

【0026】

本明細書において同定された発現差のある遺伝子は、CMLのマーカーとして、およびそ

50

の発現がCMLの症状を治療または軽減するために改変される遺伝子標的として、診断目的のために用いられる。

【0027】

CML患者においてその発現レベルが変動している（すなわち、増加または減少している）遺伝子を、表3～4に要約し、本明細書において集合的に「CML関連遺伝子」「CML核酸」、または「CMLポリヌクレオチド」と呼び、対応するコードされたポリペプチドを「CMLポリペプチド」または「CMLタンパク質」と呼ぶ。特に明記していなければ、「CML」は、本明細書に開示の任意の配列（例えば、CML 1～296）を指すことを意味する。遺伝子は、以前に記載されており、データベースのアクセッション番号とともに示される。

【0028】

細胞試料における様々な遺伝子の発現を測定することによって、CMLが診断される。同様に、様々な薬剤に応答したこれらの遺伝子の発現を測定することによって、CMLを治療するための薬剤を同定することができる。

【0029】

本発明は、表3～4に記載したCML配列の少なくとも一つから全てまでの発現を決定する（例えば、測定する）ことを含む。既知の配列に関するGenBank（登録商標）データベース登録項目に提供された配列情報を用いて、CML関連遺伝子を当業者に周知である技術を用いて検出および測定する。例えば、CML配列に対応する配列データベース登録項目内の配列を用いて、例えばノーザンブロットハイブリダイゼーション解析においてCML RNA配列を検出するためのプローブを構築する。プローブには、参照配列の少なくとも10、20、50、100、200ヌクレオチドが含まれる。もう一つの例として、配列を用いて、例えば、逆転写を利用したポリメラーゼ連鎖反応のような増幅に基づく検出法においてCML配列を特異的に増幅するためのプライマーを構築することができる。

【0030】

次に、被験細胞集団、例えば患者由来の細胞試料におけるCML配列の一つまたは複数の発現レベルを、参照集団における同じ配列の発現レベルと比較する。参照細胞集団には、比較されるパラメータが既知である一つまたは複数の細胞、すなわち、CML細胞または非CML細胞が含まれる。

【0031】

参照細胞集団と比較した被験細胞集団における遺伝子発現がCMLまたはそれに対する素因を示すか否かは、参照細胞集団の組成に依存する。例えば、参照細胞集団が非CML細胞からなる場合、被験細胞集団と参照細胞集団とにおける遺伝子発現パターンが類似であれば、被験細胞集団が非CMLであることを示している。逆に、参照細胞集団がCML細胞で構成されている場合、被験細胞集団と参照細胞集団のあいだの遺伝子発現プロファイルが類似であれば、被験細胞集団にCML細胞が含まれることを示している。

【0032】

被験細胞集団におけるCMLマーカー遺伝子の発現レベルは、発現レベルが、参照細胞集団における対応するCML配列の発現レベルから1.0、1.5、2.0、5.0、10.0倍またはそれ以上参照細胞集団と異なる場合、発現レベルが変化していると見なされる。

【0033】

被験細胞集団と参照細胞集団との遺伝子発現の差を、対照核酸、例えばハウスキーピング遺伝子に対して標準化する。例えば、対照核酸は、細胞のCML状態または非CML状態に応じて差がないことが知られている核酸である。被験核酸および参照核酸における対照核酸の発現レベルを用いて、比較される集団におけるシグナルレベルを標準化することができる。対照遺伝子には、 β -アクチン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、またはリボソームタンパク質P1が含まれる。

【0034】

被験細胞集団を複数の参照細胞集団と比較する。複数の参照集団のそれぞれは、既知のパラメータが異なってもよい。このように、被験細胞集団を、例えばCML細胞を含むことがわかっている第一の参照細胞集団と共に、例えば非CML細胞（正常細胞）を含むことが

10

20

30

40

50

わかっている第二の参照集団と比較してもよい。被験細胞は、CML細胞を含むことがわかっているか、または含むことが疑われる被験者からの組織タイプまたは細胞試料に含まれる。

【0035】

被験細胞は、生体組織または体液、例えば生物学的液体（血液または喀痰）から得る。例えば、被験細胞は組織から精製される。好ましくは、被験細胞集団は単核細胞を含む。

【0036】

参照細胞集団における細胞は、被験細胞と類似の組織タイプに由来する。選択的に、参照細胞集団は、細胞株、例えばCML細胞株（陽性対照）または正常な非CML細胞株（陰性対照）である。または、対照細胞集団は、分析されるパラメータまたは条件が既知である細胞に由来する分子情報のデータベースに由来する。 10

【0037】

被験対象は好ましくは哺乳類である。哺乳類は、例えばヒト、ヒト以外の霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシでありうる。

【0038】

本明細書に開示される遺伝子の発現は、当技術分野において既知の任意の方法を用いてRNAレベルで決定される。例えば、これらの配列の一つまたは複数を特異的に認識するプローブを用いるノーザンハイブリダイゼーション解析を用いて、遺伝子発現を決定することができる。または、発現は、例えば発現に差のある配列に対して特異的なプライマーを用いて、逆転写を利用したPCR分析を用いて測定される。発現はまた、タンパク質レベルで、すなわち本明細書に記載の遺伝子産物にコードされるポリペプチドのレベルまたはその生物学的活性を測定することによって決定される。そのような方法は当技術分野で周知であり、例えば遺伝子にコードされるタンパク質に対する抗体を利用した免疫学的分析が含まれる。遺伝子にコードされるタンパク質の生物学的活性も同様に周知である。 20

【0039】

CMLの診断

CMLは、被験細胞集団（すなわち患者に由来する生物学的試料）からの一つまたは複数のCML核酸配列の発現レベルを測定することによって診断される。好ましくは、被験細胞集団は、単核細胞、例えば末梢血から得た細胞を含む。他の生物学的試料は、タンパク質レベルを測定するために用いることができる。例えば、診断される被験者に由来する血液、または血清におけるタンパク質レベルは、免疫学的分析または生物学的分析によって測定することができる。 30

【0040】

一つまたは複数のCML関連遺伝子、例えばCML 1~296の発現を、被験細胞または生物学的試料において決定して、正常対照レベルの発現と比較する。正常対照レベルは、CMLを罹患していないことがわかっている集団において典型的に認められるCML関連遺伝子の発現プロファイルである。CML関連遺伝子の患者由来組織試料における発現レベルが増加または減少すれば、被験者がCMLを罹患しているか、またはCML発症のリスクを有することを示している。例えば、正常対照レベルと比較して被験集団におけるCML 1~190のレベルが増加すれば、被験者がCMLを罹患しているか、またはCML発症のリスクを有することを示している。逆に、正常対照レベルと比較して被験集団におけるCML 191~296の発現が減少すれば、被験者がCMLを罹患しているか、または発症のリスクを有することを示している。 40

【0041】

一つまたは複数のCML関連遺伝子が、正常対照レベルと比較して被験集団において変化している場合、被験者がCMLを罹患しているか、またはCML発症のリスクを有することを示している。例えば、CML関連遺伝子のパネル（CML 1~190、CML 191~296、またはCML 1~296）の少なくとも1%、5%、25%、50%、60%、80%、90%またはそれ以上が変化している。

【0042】

CML関連遺伝子の発現を阻害または増強する薬剤の同定

CML関連遺伝子の発現または活性を阻害する薬剤は、上方制御されたCML関連遺伝子を発現する被験細胞集団を被験薬剤に接触させ、CML関連遺伝子の発現レベルを決定することによって同定される。対照レベルと比較して（または被験薬剤の非存在下でのレベルと比較して）薬剤の存在下で発現が減少すれば、その薬剤が上方制御されたCML関連遺伝子の阻害剤であり、CMLを阻害するのに有用であることを示している。

【0043】

または、下方制御されたCML関連遺伝子の発現または活性を増強する薬剤は、CML関連遺伝子を発現する被験細胞集団を被験薬剤に接触させ、下方制御されたCML関連遺伝子の発現レベルまたは活性を決定することによって同定される。CML関連遺伝子の対照レベルまたは活性と比較して発現または活性が増加すれば、被験薬剤が下方制御されたCML関連遺伝子の発現または活性を増強することを示している。

10

【0044】

被験細胞集団は、CML関連遺伝子を発現する任意の細胞である。例えば、被験細胞集団は単核細胞を含み、そのような細胞は末梢血から単離される。または、被験細胞は、CML関連遺伝子をトランスフェクトした細胞、またはレポーター遺伝子を制御可能なように連結したCML関連遺伝子の調節配列（例えば、プロモーター配列）をトランスフェクトした細胞である。

【0045】

被験者におけるCML治療の有効性の評価

本明細書において同定された発現差のあるCML配列によって、CMLの治療経過をモニターすることもできる。この方法において、被験細胞集団は、CMLの治療を受けている被験者から提供される。望ましければ、被験細胞集団は、治療前、治療中、または治療後の様々な時点で被験者から得られる。次に、細胞集団における一つまたは複数のCML配列の発現を決定して、CML状態が既知である細胞を含む参照細胞集団と比較する。参照細胞は治療を受けていない。

20

【0046】

参照細胞集団がCML細胞を含まない場合、被験細胞集団と参照細胞集団におけるCML配列の発現が類似であれば、治療が有効であることを示している。しかし、被験集団と正常対照参照細胞集団におけるCML配列の発現に差があれば、あまり好ましくない臨床転帰または予後を示している。

30

【0047】

「有効」とは、治療によって、病理学的に上方制御された遺伝子の発現が減少するか、病理学的に下方制御された遺伝子の発現が増加するか、または被験者における白血病的幹細胞およびその分裂性の後代細胞（すなわち、顆粒球、赤血球、および巨核球の前駆体）が減少することを意味する。治療を予防的に適用する場合、「有効である」とは、臨床的なCMLの症状を遅らせるか、予防することを意味する。例えば、治療によって慢性期、急性期、または加速期の症状を阻害する。CMLの評価は、標準的な臨床プロトコルを用いて行われる。

【0048】

有効性は、CMLを診断または治療するための任意の既知の方法に関連して決定される。CMLは、症候性の異常、例えば、貧血、代謝亢進、疲れやすさ、虚弱、体重減少、および食欲不振を同定することによって診断される。CMLの他の特徴には、脾腫、血小板増加症、および顆粒球におけるアルカリホスファターゼのほぼ完全な欠如が含まれる。患者はまた、白血球数の顕著な増加を示し、循環中の細胞は主に好中球および後骨髄球であったが、好塩基球および好酸球も同様に顕著である可能性がある。さらにPh¹（フィラデルフィア）染色体が、CML患者の約90%の多能性骨髄幹細胞（すなわち、顆粒球前駆体、赤血球前駆体、および巨核球前駆体）およびリンパ系細胞（すなわち、B細胞）の分裂子孫に存在する。

40

【0049】

特定の個体にとって適切なCML治療用の治療薬剤の選択

50

個体における遺伝的構成の差によって、個体が様々な薬剤を代謝する相対的能力に差が起こりうる。被験者において代謝されて抗CML薬剤として作用する薬剤は、被験者の細胞において、CML状態に特徴的な遺伝子発現パターンから非CML状態に特徴的な遺伝子発現パターンへの変化を誘導することによって顕在化しうる。したがって、薬剤が被験者において適した抗CML薬剤であるか否かを決定するために、本明細書に開示される発現差のあるCML配列によって、選択された被験者からの被験細胞集団において、治療効果があるまたは予防効果があると推定されるCML阻害剤が適切かどうかを調べることができる。

【0050】

特定の被験者にとって適当であるCMLの阻害剤または増強剤を同定するために、被験者からの被験細胞集団を治療薬剤に曝露して、CML 1～296配列の一つまたは複数の発現を決定する。 10

【0051】

被験細胞集団は、CML関連遺伝子を発現するCML細胞を含む。好ましくは、被験細胞は単核細胞である。例えば、被験細胞集団を候補薬剤の存在下でインキュベートし、被験試料の遺伝子発現パターンを測定して、一つまたは複数の参照プロファイル、例えばCML参照発現プロファイルまたは非CML参照発現プロファイルと比較する。

【0052】

CMLを含む参照細胞集団と比較して、被験細胞集団におけるCML 1～190の配列の一つもしくは複数の発現が減少するか、またはCML 191～296の配列の一つもしくは複数の発現が増加すれば、薬剤が治療効果があることを示している。 20

【0053】

被験薬剤はいかなる化合物または組成物であってよい。例えば、被験薬剤は造血性前駆体の増殖および分化を制御する薬剤である。

【0054】

治療薬剤を同定するためのスクリーニング分析

本明細書に開示される発現差のある配列はまた、CMLを治療するための候補治療薬剤を同定するためにも用いることができる。この方法は、候補治療薬剤をスクリーニングし、その薬剤がCML状態に特徴的なCML 1～296の配列の発現プロファイルを非CML状態を示すパターンに変換させるか否かを決定することに基づく。

【0055】

この方法において、細胞を、被験薬剤または被験薬剤の組み合わせ（連続的または結果的に）に曝露して、細胞における一つまたは複数のCML 1～296の配列の発現を測定する。被験集団におけるCML配列の発現プロファイルを、被験薬剤に曝露していない参照細胞集団におけるCML配列の発現レベルと比較する。 30

【0056】

過小発現された遺伝子の発現を刺激するために、または過剰発現された遺伝子の発現を抑制するために有効な薬剤は、臨床上の利益をもたらすと思われ、そのような化合物を、骨髓幹細胞量の増加、または白血病性幹細胞の成熟を予防する能力に関してさらに試験する。

【0057】

さらなる態様において、本発明は、CMLの治療における潜在的な標的である候補薬剤をスクリーニングする方法を提供する。先に詳細に考察したように、マーカー遺伝子の発現レベルまたは活性を制御することによって、CMLの発症および進行を制御することができる。このように、CMLの治療における潜在的な標的である候補薬剤は、マーカー遺伝子の発現レベルおよび活性を指標として用いるスクリーニングによって同定することができる。本発明の状況において、そのようなスクリーニングは、例えば以下の段階を含んでよい： 40

- a) CML 1～296にコードされるポリペプチドに被験化合物を接触させる段階；
 - b) ポリペプチドと被験化合物との結合活性を検出する段階；および
 - c) ポリペプチドに結合する化合物を選択する段階。
- 50

【0058】

または、本発明のスクリーニング法は、以下の段階を含んでもよい：

- a) CML 1～296からなる群より選択される一つまたは複数のマーカー遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させる段階；および
 - b) CML 1～190からなる群より選択される一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを減少させるか、またはCML 191～296からなる群より選択される一つもしくは複数のマーカー遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物を選択する段階。
- マーカー遺伝子を発現する細胞には、例えばCMLから確立された細胞株が含まれ；そのような細胞は本発明の上記のスクリーニングに用いることができる。

【0059】

または、本発明のスクリーニング法は、以下の段階を含んでもよい：

- a) CML 1～296からなる群より選択される遺伝子にコードされるポリペプチドに被験化合物を接触させる段階；
- b) 段階（a）のポリペプチドの生物学的活性を検出する段階；および
- c) 被験化合物の非存在下で検出された生物学的活性と比較して、CML 1～190にコードされるポリペプチドの生物学的活性を抑制するか、または被験化合物の非存在下で検出された生物学的活性と比較して、CML 191～296にコードされるポリペプチドの生物学的活性を増強する化合物を選択する段階。

【0060】

スクリーニングに必要なタンパク質は、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列を用いて、組み換え型タンパク質として得ることができる。マーカー遺伝子の情報に基づいて、当業者は、タンパク質の任意の生物学的活性を選択し、選択された生物学的活性に基づいて、スクリーニングおよび測定法を行うことができる。

【0061】

または、本発明のスクリーニング法は以下の段階を含んでもよい：

- a) CML 1～296からなる群より選択される一つまたは複数のマーカー遺伝子の転写調節領域と、転写調節領域の制御下で発現されるレポーター遺伝子とを含むベクターが導入されている細胞に候補化合物を接触させる段階；
- b) 該レポーター遺伝子の活性を測定する段階；および
- c) 該マーカー遺伝子がCML 1～190からなる群より選択される上方制御されたマーカー遺伝子である場合には、対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを減少させる化合物、または該マーカー遺伝子がCML 191～296からなる群より選択される下方制御されたマーカー遺伝子である場合には、対照と比較して該レポーター遺伝子の発現レベルを増強する化合物を選択する段階。

【0062】

適したレポーター遺伝子および宿主細胞は当技術分野で周知である。スクリーニングのために必要なレポーター構築物は、マーカー遺伝子の転写調節領域を用いて調製することができる。マーカー遺伝子の転写調節領域が当業者に既知である場合、レポーター構築物は、これまでの配列情報を用いて調製することができる。マーカー遺伝子の転写調節領域がまだ同定されていない場合、マーカー遺伝子のヌクレオチド配列情報に基づいて、転写調節領域を含むヌクレオチドセグメントをゲノムライブラリから単離することができる。

【0063】

スクリーニングによって単離された化合物は、マーカー遺伝子にコードされるタンパク質の活性を阻害し、かつCMLの治療または予防に適用することができる候補薬物である。

【0064】

その上、マーカー遺伝子にコードされるタンパク質の活性を阻害する化合物の構造の一部が、付加、欠失、および／または置換によって変換されている化合物も同様に、本発明のスクリーニング法によって得ることができる化合物に含まれる。

【0065】

本発明の方法によって単離された化合物をヒト、ならびにマウス、ラット、モルモット

10

20

30

40

50

、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、ヒヒ、およびチンパンジーのような他の哺乳類のための薬剤として投与する場合、単離された化合物を直接投与してもよく、または既知の薬学的調製法を用いて投与剤形に調製してもよい。例えば、必要に応じて、薬物は、糖衣錠、カプセル剤、エリキシル剤およびマイクロカプセルとして経口摂取されるか、または水もしくは他の任意の薬学的に許容される液体との滅菌溶液もしくは懸濁液の注射剤形で非経口摂取されうる。例えば、化合物は、薬学的に許容される担体または媒体、具体的には滅菌水、生理食塩液、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定化剤、着香料、賦形剤、溶剤、保存剤、結合剤などと共に、一般的に許容される投薬実施に必要な単位投与剤形で混合することができる。これらの調製物における活性成分の量によって、指示範囲内の適した用量を得ることができる。

10

【0066】

錠剤およびカプセル剤に混合することができる添加剤の例は、ゼラチン、コーンスターチ、トラガカントゴム、およびアラビアゴムのような結合剤；結晶セルロースのような賦形剤；コーンスターチ、ゼラチンおよびアルギン酸のような膨張剤；ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤；ショ糖、乳糖、またはサッカリンのような甘味料；ならびにペパーミント、アカモノ油、およびチェリーのような着香料である。単位投与剤形がカプセル剤である場合、油のような液体担体も同様に上記の成分にさらに含めることができる。注射用滅菌組成物は、注射用蒸留水のような溶剤を用いて通常の投薬実施に従って調製することができる。

【0067】

20

生理食塩液、グルコース、ならびにD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、および塩化ナトリウムのような補助剤を含む他の等張液は、注射用水溶液として用いることができる。これらは、アルコール、特にエタノール、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールのような多価アルコール、ポリソルベート80（商標）およびHC0-50のような非イオン性界面活性剤のような適した溶解剤と共に用いることができる。

【0068】

ゴマ油または大豆油を油脂性液体として用いることができ、かつ安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールを溶解剤として共に用いてもよく、リン酸緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液のような緩衝液；塩酸プロカインのような鎮痛剤；ベンジルアルコールおよびフェノールのような安定化剤、ならびに抗酸化剤と共に調製してもよい。調製された注射剤は適したアンプルに充填してもよい。

30

【0069】

当業者に周知の方法を用いて、本発明の薬学的組成物を患者に、例えば動脈内、静脈内、または経皮注射として投与してもよく、同様に鼻腔内、気管支内、筋肉内、または経口投与としても投与してもよい。投与の用量および方法は、患者の体重および年齢ならびに投与法に応じて変化する；しかし、当業者は、適した投与法を日常的に選択することができる。該化合物がDNAによってコードされうる場合、DNAを遺伝子治療のベクターに挿入して、治療を行うためにベクターを患者に投与することができる。投与の用量および方法は、患者の体重、年齢、および症状に応じて変化するが、当業者はそれらを適切に選択することができる。

40

【0070】

例えば、本発明のタンパク質に結合してその活性を調節する化合物の用量は、症状に依存するが、用量は、正常な成人（体重60 kg）に経口投与する場合、約0.1 mg～約100 mg/日、好ましくは約1.0 mg～約50 mg/日、より好ましくは約1.0 mg～約20 mg/日である。

【0071】

正常な成人（体重60 kg）に注射剤形で非経口投与する場合、患者、標的臓器、症状および投与法によって多少の差があるが、約0.01 mg～約30 mg/日、好ましくは約0.1～約20 mg/日、およびより好ましくは約0.1～約10 mg/日を静脈内注射することが都合がよい。同様に、他の動物の場合においても、体重60 kgに変換した量を投与することが可能である。

50

【0072】

CMLを有する被験者の予後の評価

被験細胞集団における一つまたは複数のCML配列の発現を、患者に由来する参照細胞集団における遺伝子の発現と、諸病期について比較することによって、CMLを有する被験者の予後を評価する方法も同様に提供される。被験細胞集団と参照細胞集団における一つもしくは複数のCML配列の遺伝子発現を比較することによって、または被験者に由来する被験細胞集団における経時的な遺伝子発現パターンを比較することによって、被験者の予後を評価することができる。

【0073】

正常対照と比較してCML 191~296の配列の一つもしくは複数の発現の減少、または正常対照と比較してCML 1~190の配列の一つもしくは複数の発現の増加は、予後があまり好ましくないことを示している。CML 191~296の配列の一つまたは複数の発現が増加すれば、より好ましい予後を示し、CML 1~190の配列の発現が減少すれば、被験者にとってより好ましい予後を示している。

【0074】

キット

本発明にはまた、CML検出試薬、例えばオリゴヌクレオチド配列のような一つまたは複数のCML核酸に特異的に結合するか、またはこれを同定する核酸であって、CML核酸の一部と相補的である核酸またはCML核酸にコードされるタンパク質に結合する抗体とが含まれる。試薬は、キットの形で共に包装される。試薬、例えば核酸または抗体（固相マトリクスに結合させるか、またはそれらをマトリクスに結合させるための試薬とは別に包装される）、対照試薬（陽性および／または陰性）、ならびに／または検出標識は異なる容器に包装される。分析を行うための説明書（例えば、書面、テープ、VCR、CD-ROM等）がキットに含まれる。キットの分析フォーマットは、当技術分野で既知のノーザンハイブリダイゼーションまたはサンドイッチELISAである。

【0075】

例えば、CML検出試薬は、少なくとも一つのCML検出部位を形成するために多孔性ストリップのような固相マトリクスに固定する。多孔性ストリップの測定または検出領域には、核酸を含む多数の部位が含まれてもよい。試験ストリップはまた、陰性および／または陽性対照のための部位を含んでもよい。または、対照部位は、試験ストリップとは異なるストリップに存在する。任意で、異なる検出部位は、異なる量の固定された核酸を含んでもよく、すなわち第一の検出部位はより多い量を含み、それに続く部位ではより少ない量を含んでもよい。被験試料を加えると、検出可能なシグナルを示す部位の数が、試料に存在するCMLの量の定量的指標を提供する。検出部位は、任意の適した検出可能な形状で構成されてもよく、典型的に試験ストリップの幅に及ぶバーまたはドットの形状である。

【0076】

または、キットは、一つまたは複数の核酸配列を含む核酸基質アレイを含む。アレイ上の核酸は、CML 1~296によって示される一つまたは複数の核酸配列を特異的に同定する。CML 1~296によって表される配列の2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、40、または50個またはそれ以上の発現は、アレイ試験ストリップまたはチップへの結合レベルによって同定される。基質アレイは、例えば固相基質上、例えば米国特許第5,744,305号に記載される「チップ」上に存在しうる。

【0077】

アレイと複数性

本発明にはまた、一つまたは複数の核酸配列を含む核酸基質アレイも含まれる。アレイ上の核酸は、CML 1~296によって示される一つまたは複数の核酸配列に特異的に対応する。CML 1~296によって表される配列の2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、40、または50個またはそれ以上の発現レベルは、アレイに結合する核酸を検出することによって同定される。

【0078】

10

20

30

40

50

本発明にはまた、単離された複数の核酸配列（すなわち、二つまたはそれ以上の核酸の混合物）が含まれる。核酸配列は、液相または固相に存在し、例えばニトロセルロースメンブレンのような固相支持体に固定される。複数には、CML 1～296によって示される核酸配列の一つまたは複数が含まれる。様々な態様において、複数には、CML 1～296によって表される配列の2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、40、または50個またはそれ以上が含まれる。

【0079】

CMLを阻害する方法

本発明は、CML 1～190の発現もしくは活性を減少させること、またはCML 191～296の発現もしくは活性を増加させることによって、被験者におけるCMLの症状を治療または軽減する方法を提供する。治療化合物は、CMLを罹患しているか、または発症のリスクを有する（または感受性がある）被験者に対して予防または治療目的で投与される。そのような被験者は、標準的な臨床的方法を用いて、または例えばCML 1～296の発現もしくは活性の異常なレベルを検出することによって同定される。治療薬剤には、細胞周期調節、細胞増殖、およびタンパク質キナーゼ活性の阻害剤が含まれる。好ましくは、キナーゼ活性の阻害剤はSTI571ではない。または、STI571はCML1～296の阻害剤の一つまたは複数と共に投与される。

10

【0080】

治療法には、CML細胞が由来する同じ細胞型の正常細胞と比較して、CML細胞において発現が減少している遺伝子（「過小発現遺伝子」）の一つまたは複数の遺伝子産物の発現、機能、またはその両者を増加させることが含まれる。これらの方法において、被験者において過小発現されている遺伝子の一つまたは複数の量を増加させる化合物の有効量によって被験者を治療する。投与は全身または局所的となりうる。治療化合物には、過小発現遺伝子のポリペプチド産物、またはその生物学的活性断片、過小発現遺伝子をコードし、CML細胞における発現を許容する発現制御因子を有する核酸、例えばCML細胞に対して内因性のそのような遺伝子の発現レベルを増加させる（すなわち、1つまたは複数の過小発現遺伝子の発現を上方制御する）薬剤が含まれる。そのような化合物の投与は、被験者の造血細胞における異常に過小発現された遺伝子または複数の遺伝子の効果に対抗して、被験者の臨床状態を改善する。

20

【0081】

本方法にはまた、造血幹細胞を含む造血細胞においてその発現が異常に増加している遺伝子（「過剰発現遺伝子」）の一つまたは複数の遺伝子産物の発現、機能、またはその双方を減少させることが含まれる。発現は、当業者に既知のいくつかの任意の方法によって阻害される。例えば、1つまたは複数の過剰発現された遺伝子の発現を阻害またはこれに拮抗する核酸、例えば1つまたは複数の過剰発現された遺伝子の発現を妨害するアンチセンスオリゴヌクレオチドまたは低分子干渉RNAを被験者に投与することによって発現は阻害される。

30

【0082】

先に述べたように、CML 1～190のヌクレオチド配列に対応するアンチセンス核酸を用いて、CML 1～190の発現レベルを減少させることができる。CMLにおいて上方制御されるCML 1～190に対応するアンチセンス核酸は、CMLの治療において有用である。具体的には、本発明のアンチセンス核酸は、CML 1～190またはそれに対応するmRNAに結合して、それによって遺伝子の転写もしくは翻訳を阻害し、mRNAの分解を促進し、かつ／またはCML 1～190にコードされるタンパク質の発現を阻害して、最終的にタンパク質の機能を阻害することによって作用してもよい。本明細書において用いられる「アンチセンス核酸」という用語は、アンチセンス核酸が標的配列に特異的にハイブリダイズすることができる限り、標的配列と完全に相補的であるヌクレオチドおよび一つまたは複数のヌクレオチドのミスマッチを有するヌクレオチドの双方を含む。例えば、本発明のアンチセンス核酸には、少なくとも15連続ヌクレオチドの長さにわたって少なくとも70%またはそれ以上、好ましくは80%またはそれ以上、より好ましくは90%またはそれ以上、さらにより好ましくは95%また

40

50

はそれ以上の相同性を有するポリヌクレオチドが含まれる。当技術分野で既知のアルゴリズムを用いて相同性を決定することができる。

【0083】

本発明のアンチセンス核酸誘導体は、タンパク質をコードするDNAまたはmRNAに結合し、転写または翻訳を阻害し、mRNAの分解を促進し、かつタンパク質の発現を阻害し、それによってタンパク質の機能を阻害することによって、マーカー遺伝子にコードされるタンパク質を産生する細胞に作用する。

【0084】

本発明のアンチセンス核酸誘導体は、誘導体に対して不活性な適した基剤と混合することによって、リニメントまたは湿布剤のような外用調製物に調製することができる。

10

【0085】

同様に、必要に応じて、誘導体は、賦形剤、等張剤、溶解剤、安定化剤、保存剤、鎮痛剤等を加えることによって、錠剤、粉剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル、注射剤、溶液、点鼻液、および凍結乾燥剤に調製することができる。これらは以下の既知の方法によって調製することができる。

【0086】

アンチセンス核酸誘導体は、患部に直接適用することによって、または患部に達するように血管に注入することによって、患者に投与される。アンチセンス封入剤も、持続性および膜透過性を増加するために用いることができる。例としては、リポソーム、ポリ-L-リジン、脂質、コレステロール、リポフェクチンまたはこれらの誘導体である。

20

【0087】

本発明のアンチセンス核酸誘導体の用量は、患者の病態に応じて適切に調節して、所望の量で用いることができる。例えば、0.1~100 mg/kg、好ましくは0.1~50 mg/kgの用量範囲を投与することができる。

【0088】

本発明のアンチセンス核酸は、本発明のタンパク質の発現を阻害するので、本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制するのに有用である。同様に、本発明のアンチセンス核酸を含む発現阻害剤は、それらが本発明のタンパク質の生物学的活性を阻害できることから有用である。

【0089】

本発明のアンチセンス核酸には、修飾オリゴヌクレオチドが含まれる。例えば、チオエート型オリゴヌクレオチドを用いて、オリゴヌクレオチドにヌクレアーゼ抵抗性を付与してもよい。

30

【0090】

同様に、マーカー遺伝子に対するsiRNAを用いて、マーカー遺伝子の発現レベルを減少させることができる。「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を防止する二本鎖RNA分子を意味する。DNAがRNAを転写する鋳型となる技術を含む、siRNAを細胞に導入する標準的な方法が用いられる。本発明の状況において、siRNAは、CML 1~190のような、上方制御されたマーカー遺伝子に対するセンス核酸配列およびアンチセンス核酸配列を含む。siRNAは、単一の転写物が、標的遺伝子からのセンス配列および相補的アンチセンス配列の双方を有するように、例えばヘアピンを有するように構築される。

40

【0091】

この方法は、例えば細胞の悪性形質転換の結果として上方制御された細胞内の発現を変化させるために用いられる。標的細胞におけるCML 1~190の一つに対応する転写物に対するsiRNAの結合によって、細胞によるタンパク質産生の減少が起こる。オリゴヌクレオチドの長さは少なくとも10ヌクレオチドであり、天然に存在する転写物と同じ長さであってもよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、長さが19~25ヌクレオチドである。最も好ましくは、オリゴヌクレオチドが長さが75、50、25ヌクレオチド未満である。

【0092】

siRNAのヌクレオチド配列は、アンビオン (Ambion) のウェブサイト (<http://www.ambi>

50

on.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) から入手できるsiRNA設計コンピュータプログラムを用いて設計した。コンピュータプログラムは、以下のプロトコールに基づいてsiRNA合成のためのヌクレオチド配列を選択する。

【0093】

siRNA標的部位の選択：

1. 対象となる転写物のAUG開始コドンから始めて、AAジヌクレオチド配列を求めて下流にスキャンする。潜在的なsiRNA標的部位として、各AAおよび3'隣接ヌクレオチド19個の出現を記録する。Tuschlらは、5'および3'非翻訳領域（UTR）および開始コドン近傍（75塩基以内）の領域が、調節タンパク質結合部位により富んでいる可能性があることから、これらに対してsiRNAを設計しないことを推奨している。UTR-結合タンパク質および／または翻訳開始複合体は、siRNAエンドヌクレアーゼ複合体の結合を妨害する。
2. 潜在的な標的部位をヒトゲノムデータベースと比較して、他のコード配列と有意な相同性を有する如何なる標的配列も検討から除外する。相同性検索は、NCBIサーバー、www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/において認められうるBLASTを用いて行うことができる。
3. 合成のために適格な標的配列を選択する。アンピオンでは、好ましくは、評価する遺伝子の長さに沿っていくつかの標的配列を選択することができる。

10

【0094】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAは、本発明のポリペプチドの発現を阻害するので、本発明のポリペプチドの生物学的活性を抑制するのに有用である。同様に、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む発現阻害剤は、それらが本発明のポリペプチドの生物学的活性を阻害できるという点において有用である。したがって、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはsiRNAを含む組成物は、CMLを治療するのに有用である。

20

【0095】

または、過剰発現された遺伝子の一つまたは複数の遺伝子産物の機能は、遺伝子産物に結合する化合物、さもなければ遺伝子産物の機能を阻害する化合物を投与することによって阻害される。例えば、化合物は、1つまたは複数の過剰発現された遺伝子産物に結合する抗体である。

【0096】

本発明は、抗体、特に上方制御されたマーカー遺伝子にコードされるタンパク質に対する抗体、または抗体の断片を用いることに言及する。本明細書において用いられるように、「抗体」という用語は、抗体を合成するために用いられる抗原（すなわち、上方制御されたマーカー遺伝子産物）またはそれに近縁の抗原のみと相互作用する（すなわち結合する）、特異的構造を有する免疫グロブリン分子を指す。さらに抗体は、それがマーカー遺伝子にコードされるタンパク質の一つまたは複数に結合する限り、抗体断片または修飾抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')₂、Fv、またはHおよびL鎖からのFv断片が適当なリンカーによって連結されている一本鎖Fv（scFv）であってもよい（Huston, J.S.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5879~5883 (1988)）。より詳しく述べると、抗体断片は、抗体をパパイニンまたはペプシンのような酵素によって処理することによって産生してもよい。または、抗体断片をコードする遺伝子を構築して、発現ベクターに挿入し、適当な宿主細胞において発現させてもよい（例えば、Co M.S.ら、J. Immunol. 152: 2968~2976 (1994)；Better M.およびHorwitz A.H.、Methods Enzymol. 178: 476~496 (1989)；Pluckthun A.およびSkerra A.、Methods Enzymol. 178: 497~515 (1989)；Lamoyi E.、Methods Enzymol. 121: 652~663 (1986)；Rousseaux J.ら、Methods Enzymol. 121: 663~669 (1986)；Bird R.E.およびWalker B.W.、Trends Biotechnol. 9: 132~137 (1991)を参照されたい）。

30

40

【0097】

抗体は、ポリエチレングリコール（PEG）のような多様な分子に結合させることによって修飾してもよい。本発明は、そのような修飾抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学修飾することによって得ることができる。これらの修飾法は、当技術分野で常套的である

50

。

【0098】

または、抗体は、ヒト以外の抗体に由来する可変領域とヒト抗体に由来する定常領域とのキメラ抗体として、またはヒト以外の抗体に由来する相補性決定領域（CDR）、ヒト抗体に由来するフレームワーク領域（FR）、および定常領域を含むヒト化抗体として得てもよい。そのような抗体は、既知の技術を用いて調製することができる。

【0099】

癌細胞において起こる特異的な分子変化に対する癌治療は、進行乳癌を治療するためのトラスツズマブ（ヘルセプチン）、慢性骨髄性白血病のためのイマチニブメチレート（グリーベック）、非小細胞肺癌（NSCLC）のためのゲフィチニブ（イレッサ）、ならびにB細胞リンパ腫およびマントル細胞リンパ腫のためのリツキシマブ（抗CD20 mAb）のような抗癌剤の臨床開発および規制認可によって確認されている（Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. Clin Cancer Res. 2001 10月；7(10)：2958～70. Review.；Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med. 2001 3月15日；344(11)：783～92.；Rehwald U, Schulz H, Reiser M, Sieber M, Staak JO, Morschhauser F, Driessen C, Rudiger T, Muller-Hermelink K, Diehl V, Engert A. Treatment of relapsed CD20+ Hodgkin lymphoma with the monoclonal antibody rituximab is effective and well tolerated: results of a phase 2 trial of the German Hodgkin Lymphoma Study Group. Blood. 2003 1月15日；101(2)：420～424.；Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann SおよびBhalla KN. (2000). Blood, 96, 2246～2253.）。これらの薬剤は、形質転換した細胞のみを標的とすることから、臨床的に有効であり、従来の抗癌剤より許容性が良好である。したがって、そのような薬剤は、癌患者の生存および生活の質を改善するのみならず、分子標的癌治療の考え方が正当であることを証明している。さらに、標的特異的薬剤は、標準的な化学療法と併用して用いた場合に、その有効性を増強することができる（Gianni, L. (2002)、Oncology 63 補遺1、47～56；Kleijman A., Rushen L., Morriane A., Slupianek AおよびSkorski T. (2002)、Oncogene 21：5868～5876）。したがって、将来の癌治療はおそらく、従来の薬剤を血管新生および浸潤性のような腫瘍細胞の異なる特徴をねらった標的特異的薬剤と併用することを含むであろう。

【0100】

これらの調節法は、エクスピボまたはインビトロで（例えば、細胞を薬剤と共に培養することによって）、またはインビボで（例えば被験者に薬剤を投与することによって）行われる。この方法は、発現差のある遺伝子の異常な発現または活性を相殺する治療として、タンパク質もしくはタンパク質の組み合わせ、または核酸分子もしくは核酸分子の組み合わせを投与することを含む。

【0101】

遺伝子のレベルまたは生物学的活性の増加（疾患または障害を有しない被験者と比較して）を特徴とする疾患または障害は、1つまたは複数の過剰発現された遺伝子の活性に拮抗する（すなわち、減少または阻害する）治療物質によって治療してもよい。活性に拮抗する治療物質を治療または予防目的で投与する。

【0102】

利用してもよい治療物質には、例えば、（i）過剰発現または過小発現された配列または複数の配列のポリペプチド、またはその類似体、誘導体、断片、もしくは相同体、（ii）過剰発現または過小発現された配列または複数の配列に対する抗体、（iii）過剰発現または過小発現された配列または複数の配列をコードする核酸、（iv）アンチセンス核酸または「機能欠損」核酸（すなわち、一つまたは複数の過剰発現または過小発現配列のコード配列内への異種挿入による）；（v）低分子干渉RNA（siRNA）；または（vi）調節因

子（すなわち、過剰／過小発現ポリペプチドとその結合パートナーとの相互作用を変化させる阻害剤、アゴニスト、およびアンタゴニスト）。機能欠損アンチセンス分子は、相同的組み換えによってポリペプチドの内因性の機能を「ロックアウト」するために利用される（例えば、Capecci, Science 244:1288~1292 (1989) を参照されたい）。「siRNA」という用語は、標的mRNAの翻訳を防止する二本鎖RNA分子を指す。siRNAを細胞に導入するためには、RNAを転写するための鋳型としてDNAが用いられる技法を含む標準的な技法が用いられる。siRNAは、CML 1~190遺伝子の任意の一つのセンス核酸配列およびアンチセンス核酸配列を含む。siRNAは、単一の転写物（二本鎖RNA）が、標的遺伝子からのセンス配列と相補的アンチセンス配列の双方を有するように、例えばヘアピンとなるように構築される。

10

【0103】

レベルまたは生物学的活性の減少（疾患または障害を有しない被験者と比較して）を特徴とする疾患および障害は、活性を増加させる（すなわちアゴニストである）治療物質によって治療してもよい。活性を上方制御する治療物質は、治療または予防目的で投与してもよい。利用してもよい治療物質には、ポリペプチド（またはその類似体、誘導體、断片もしくは相同体）または生物学的利用能を増加させるアゴニストが含まれるがこれらに限定されない。

【0104】

レベルの増加または減少は、ペプチドおよび／またはRNAを定量することによって、患者の細胞試料を得て、これをRNAまたはペプチドレベル、発現されたペプチドの構造および／または活性（またはその発現が変化している遺伝子のmRNA）に関してインビトロで分析することによって、容易に検出することができる。当技術分野において周知である方法には、免疫学的分析（例えば、ウェスタンブロット解析、免疫沈降後のドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動、免疫細胞化学等）、および／またはmRNAの発現を検出するハイブリダイゼーション分析（例えば、ノーザン分析、ドットブロット、インサイチューハイブリダイゼーション等）が含まれるがこれらに限定されない。

20

【0105】

予防目的の投与は、疾患もしくは障害が予防されるように、またはその進行が遅れるように、疾患の明白な臨床症状が発現する前に行われる。

【0106】

治療法には、発現差のある遺伝子の遺伝子産物の活性の一つまたは複数を調節する薬剤に細胞を接触させることが含まれる。タンパク質活性を調節する薬剤には、核酸またはタンパク質、これらのタンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、または他の小分子の、天然に存在する同起源のリガンドが含まれる。例えば、薬剤は、一つまたは複数の異なるように過小発現された遺伝子の一つまたは複数のタンパク質活性を刺激する。

30

【0107】

本発明はまた、CML 1~190からなる群より選択される核酸にコードされるポリペプチド、もしくは該ポリペプチドの免疫学的活性断片、またはポリペプチドもしくはその断片をコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを被験者に投与する段階を含む、被験者におけるCMLを治療または予防する方法にも関する。ポリペプチドの投与は、被験者において抗腫瘍免疫を誘導する。抗腫瘍免疫を誘導するために、CML 1~190からなる群より選択される核酸にコードされるポリペプチド、もしくは該ポリペプチドの免疫学的活性断片、またはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与する。ポリペプチドまたはその免疫学的活性断片はCMLに対するワクチンとして有用である。場合によっては、タンパク質またはその断片は、T細胞受容体（TCR）に結合した形で投与してもよく、またはマクロファージ、樹状細胞（DC）、もしくはB-細胞のような抗原提示細胞（APC）によって提示された形で投与してもよい。DCの強い抗原提示能のため、APCの中では、DCを用いることが最も好ましい。

40

【0108】

本発明において、CMLに対するワクチンとは、動物に接種すると抗腫瘍免疫を誘導する

50

機能を有する物質を指す。本発明によると、CML 1～190にコードされるポリペプチドまたはその断片は、CML 1～190を発現するCML細胞に対して強力かつ特異的な免疫応答を誘導する可能性があるHLA-A24またはHLA-A*0201拘束性エピトープであることが示唆された。このように、本発明はまた、ポリペプチドを用いて抗腫瘍免疫を誘導する方法も含む。一般的に、抗腫瘍免疫には、以下のような免疫応答が含まれる：

- －腫瘍に対する細胞障害性リンパ球の誘導、
- －腫瘍を認識する抗体の誘導、および
- －抗腫瘍サイトカイン産生の誘導。

【0109】

したがって、あるタンパク質が、動物への接種時にこれらの免疫応答のいずれか一つを誘導する場合、そのタンパク質は、抗腫瘍免疫誘導効果を有すると判定される。タンパク質による抗腫瘍免疫の誘導は、宿主におけるタンパク質に対する免疫系の反応をインビボまたはインビトロで観察することによって検出することができる。

【0110】

例えば、細胞障害性Tリンパ球の誘導を検出する方法は周知である。生体内に入る外来物質は、抗原提示細胞（APC）の作用によってT細胞およびB細胞に提示される。APCによって提示された抗原に対して抗原特異的に応答するT細胞は、抗原による刺激によって細胞障害性T細胞（または細胞障害性Tリンパ球；CTL）に分化した後増殖する（これはT細胞の活性化と呼ばれる）。したがって、あるペプチドによるCTL誘導は、APCによるT細胞へのペプチドの提示およびCTLの誘導を検出することによって評価することができる。さらに、APCは、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、マクロファージ、好酸球、およびNK細胞を活性化する効果を有する。CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞も同様に抗腫瘍免疫において重要であることから、ペプチドの抗腫瘍免疫誘導作用は、これらの細胞の活性化効果を指標として用いて評価することができる。

【0111】

APCとして樹状細胞（DC）を用いてCTLの誘導作用を評価する方法は、当技術分野で周知である。DCは、APCの中でも最も強力なCTL誘導作用を有する代表的なAPCである。この方法では、被験ポリペプチドをまずDCに接触させて、このDCをT細胞に接触させる。DCに接触させた後に、対象細胞に対して細胞障害作用を有するT細胞が検出されれば、被験ポリペプチドが細胞障害性T細胞の誘導活性を有することを示している。腫瘍に対するCTLの活性は、例えば⁵¹Cr標識腫瘍細胞の溶解を指標として用いて検出することができる。または、³H-チミジン取り込み活性またはLDH（乳糖デヒドロゲナーゼ）放出を指標として用いて腫瘍細胞の損傷の程度を評価する方法も同様に周知である。

【0112】

DCとは別に、末梢血単核球（PBMC）も同様にAPCとして用いてもよい。CTLの誘導は、GM-CSFおよびIL-4の存在下でPBMCを培養することによって増強されることが報告されている。同様に、CTLは、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびIL-7の存在下でPBMCを培養することによって誘導されることが示されている。

【0113】

これらの方法によってCTL誘導活性を有することが確認された被験ポリペプチドは、DC活性化効果およびその後のCTL誘導活性を有するポリペプチドである。したがって、腫瘍細胞に対してCTLを誘導するポリペプチドは、腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、ポリペプチドに接触させることによって腫瘍に対するCTLの誘導能を獲得したAPCは、腫瘍に対するワクチンとして有用である。さらに、APCによるポリペプチド抗原の提示により細胞障害性を獲得したCTLも同様に、腫瘍に対するワクチンとして用いることができる。APCおよびCTLによる抗腫瘍免疫を用いるそのような腫瘍の治療法は、細胞免疫療法と呼ばれる。

【0114】

一般的に、細胞免疫療法のためにポリペプチドを用いる場合、CTL誘導効率は、異なる構造を有する複数のポリペプチドを組み合わせ、それらをDCに接触させることによって

増加することが知られている。したがって、DCをタンパク質断片によって刺激する場合、複数のタイプの断片の混合物を用いることが有利である。

【0115】

または、ポリペプチドによる抗腫瘍免疫の誘導は、腫瘍に対する抗体産生の誘導を観察することによって確認することができる。例えば、ポリペプチドに対する抗体が、そのポリペプチドで免疫した実験動物において誘導される場合、そして腫瘍細胞の増殖がそれらの抗体によって抑制される場合、ポリペプチドは、抗腫瘍免疫の誘導能を有すると判定することができる。

【0116】

抗腫瘍免疫は本発明のワクチンを投与することによって誘導され、抗腫瘍免疫の誘導によって、CMLを治療および予防することができる。癌の治療または癌の発症の予防には、癌性細胞の増殖の阻害、癌の退縮、および癌の発生抑制のような段階のいずれかが含まれる。癌を有する個体の死亡率の低下、血液中の腫瘍マーカーの減少、癌に伴う検出可能な症状の軽減等も同様に、癌の治療または予防に含まれる。そのような治療および予防効果は好ましくは統計学的に有意である。例えば、細胞増殖疾患に対するワクチンの治療または予防効果を、ワクチン投与を行わない対照と比較する観察において、5%またはそれ未満は有意水準である。例えば、スチューデントのt-検定、マン-ホイットニーのU検定、またはANOVAを統計解析に用いてもよい。

【0117】

免疫学的活性を有する上記のタンパク質またはそのタンパク質をコードするベクターをアジュバントと併用してもよい。アジュバントは、免疫学的活性を有するタンパク質と共に（または連続して）投与した場合にタンパク質に対する免疫応答を増強する化合物を指す。アジュバントの例には、コレラ毒素、サルモネラ毒素、ミョウバン等が含まれるがこれらに限定されない。さらに、本発明のワクチンは、薬学的に許容される担体と適当に組み合わせてもよい。そのような担体の例は、滅菌水、生理食塩液、リン酸緩衝液、培養液等である。さらに、ワクチンは必要に応じて、安定化剤、懸濁剤、保存剤、界面活性剤等を含んでもよい。ワクチンは、全身または局所投与される。ワクチン投与は、1回投与によって行ってもよく、または複数回投与によって追加刺激してもよい。

【0118】

本発明のワクチンとしてAPCまたはCTLを用いる場合、腫瘍を例えばエキスピボ法によって治療または予防することができる。より詳しく述べると、治療または予防を受ける被験者のPBMCを採取して、細胞をエキスピボでポリペプチドに接触させて、APCまたはCTLの誘導後、細胞を被験者に投与してもよい。APCはまた、ポリペプチドをコードするベクターをエキスピボでPBMCに導入することによって誘導することができる。インビトロで誘導されたAPCまたはCTLは、投与前にクローニングすることができる。標的細胞を障害する高い活性を有する細胞をクローニングして増殖させることによって、細胞免疫療法をより効率よく行うことができる。さらに、このようにして単離されたAPCおよびCTLを用いて、細胞が由来する個体に対してのみならず、他の個体からの類似のタイプの腫瘍に対する細胞免疫療法のために用いてもよい。

【0119】

さらに、本発明のポリペプチドの薬学的有効量を含む、癌のような細胞増殖疾患を治療または予防するための薬学的組成物が提供される。薬学的組成物は、抗腫瘍免疫を惹起するために用いてもよい。

【0120】

CMLを阻害するための薬学的組成物

薬学的製剤には、経口、直腸内、鼻腔内、局所（口腔内および舌下を含む）、腔内、もしくは非経口（筋肉内、皮下、および静脈内を含む）投与に適した製剤、または吸入もしくは吹入による投与に適した製剤が含まれる。好ましくは、投与は静脈内である。製剤は任意で個別の用量単位に包装される。

【0121】

経口投与に適した薬学的製剤には、それぞれが活性成分の規定量を含むカプセル剤、カ
シェ剤、または錠剤が含まれる。製剤にはまた、粉剤、顆粒剤、または溶液、懸濁液、ま
たは乳液が含まれる。活性成分は、任意でボラス舐剤またはペーストとして投与される
。経口投与用の錠剤およびカプセル剤は、結合剤、充填剤、潤滑剤、崩壊剤、または湿潤
剤のような通常の賦形剤を含んでもよい。錠剤は、任意で一つまたは複数の製剤成分との
圧縮または成形によって作製してもよい。圧縮錠は、粉剤または顆粒剤のような流動状の
活性成分を、任意で結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、潤滑剤、表面活性剤、または分散剤
と混合して、適した装置において圧縮することによって調製してもよい。成形錠剤は、不
活性液体希釈剤によって湿らせた粉末化合物の混合物に適した機械において成形すること
によって作製してもよい。錠剤は、当技術分野で周知の方法に従ってコーティングしても
よい。経口液体調製物は、例えば、水性もしくは油性懸濁液、溶液、乳液、シロップ剤、
もしくはエリキシル剤の形であってもよく、または使用前に水もしくは他の適した溶剤に
よって構成するための乾燥製品として提供してもよい。そのような液体調製物は、懸濁剤
、乳化剤、非水性溶剤（食用油が含まれてもよい）、または保存剤のような通常の添加剤
を含んでもよい。錠剤は任意で、活性成分の徐放または制御放出を提供するように調製し
てもよい。錠剤の包装は、毎月服用される錠剤1錠を含んでよい。薬剤の製剤および用量
は、段階（慢性期、加速期、または急性転化期）に対して変化する。

10

【0122】

非経口投与用製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤および意図するレシピエントの血液
と製剤を等張にする溶質を含んでもよい水性および非水性滅菌注射剤、ならびに懸濁剤お
よび濃化剤を含んでもよい水性および非水性滅菌懸濁液が含まれる。製剤は、単位用量ま
たは複数回用量容器、例えば密封アンプルおよびバイアルに入れてもよく、滅菌液体担体
、例えば生理食塩液、注射用水を使用直前に加えるだけでよい凍結乾燥状態で保存しても
よい。または、製剤は、連続注入用であってもよい。即時調合注射溶液および懸濁液は、
以前に記載された種類の滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調製してもよい。

20

【0123】

直腸投与用製剤には、カカオバターまたはポリエチレングリコールのような標準的な担
体を含む坐剤が含まれる。口内への、例えば口腔内または舌下への局所投与用製剤には、
ショ糖およびアカシアまたはトラガカントのような着香基剤に活性成分を含むトローチ剤
、ならびにゼラチンとグリセリンまたはショ糖とアカシアのような基剤に活性成分を含む
香錠が含まれる。鼻腔内投与の場合、本発明の化合物を液体スプレー、もしくは分散性の
粉末として、または点鼻剤の形態で用いてもよい。点鼻剤は、一つまたは複数の分散剤、
溶解剤、または懸濁剤も含む水性または非水性基剤によって調製してもよい。

30

【0124】

吸入による投与の場合、吸入器、ネブライザー、加圧パックまたはエアロゾルスプレー
を送達するための他の都合のよい手段によって化合物を送達することが都合がよい。加圧
パックは、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフル
オロエタン、二酸化炭素、または他の適したガスのような適した噴射剤を含んでもよい。
加圧エアロゾルの場合、用量単位は、一定量を送達するための弁を提供することによって
決定してもよい。

40

【0125】

あるいは、吸入または吹入による投与の場合、化合物は、乾燥粉末組成物、例えば化合
物と、乳糖またはデンプンのような適した粉末基剤との粉末混合物の形状をとってもよい
。粉末組成物は、単位投与剤形、例えば、粉末が吸入器または吹入器を利用して投与され
うるカプセル剤、カートリッジ、ゼラチンまたはブリストアパックの形としてもよい。

【0126】

他の製剤には、治療薬剤を放出する埋め込み可能装置および接着パッチが含まれる。

【0127】

望ましければ、活性成分を持続的に放出するように適合された上記の製剤を用いてもよ
い。薬学的組成物はまた、抗菌剤、免疫抑制剤、または保存剤のような他の活性成分を含

50

んでもよい。

【0128】

上記で特に言及した成分の他に、本発明の製剤には、当該製剤のタイプに関して当技術分野において通常の他の薬剤が含まれてもよいと理解すべきであり、例えば経口投与に適した製剤は着香料を含んでもよい。

【0129】

好ましい単位投与製剤は、下記に引用するように、活性成分またはその適当な分画の有効量を含む製剤である。

【0130】

上記の条件のそれぞれに関して、組成物、例えばポリペプチドおよび有機化合物は、約 0.1～約250 mg/kg/日の用量で経口または注射によって投与される。成人ヒトの用量範囲は一般的に、約5 mg～約17.5 g/日、好ましくは約5 mg～約10 g/日、および最も好ましくは約100 mg～約3 g/日である。錠剤または個別の単位で提供される他の単位投与剤形は、便宜上、同一単位量を複数回投与した量で有効性を示すような単位量、例えば約5 mg～約500 mg、通常約100 mg～約500 mgを含むうる。

【0131】

用いられる用量は、被験者の年齢および性別、治療される正確な障害、およびその重症度を含む多数の要因によって左右されると考えられる。同様に、投与経路も、病態およびその重症度に依存して変化してもよい。

【0132】

本発明はさらに、添付の請求の範囲に記載される本発明の範囲を制限しない以下の実施例において説明される。以下の実施例は、CML細胞において発現に差のある遺伝子の同定および特徴付けを説明する。

【0133】

実施例1：被験試料の調製

疾患状態、例えばCMLにおいて発現に差のある遺伝子を同定するために、疾患を有する細胞および正常細胞、例えば末梢血由来の単核細胞から得た試料を評価した。分析は以下のように実施した。

【0134】

患者および試料

末梢血試料は、STI571による治療前にCML患者27人から得た。次に、各患者を、STI571の第二相試験に登録した。CML細胞の特徴を調べるために、bcr/abl融合遺伝子を検出するFISH解析(13)によって、65%を超える細胞が治療前にPh染色体陽性であった試料27例からのmRNAを、cDNAマイクロアレイシステムによって解析した。27例中、2例は加速期であり、3例は急性転化期であった(表1)。健康なボランティア11人の末梢血由来の単核細胞混合物を対照として用いた。

【0135】

(表1) 被験患者の臨床病理学的特徴

10

20

30

患者 ID	年齢(歳)	性別	Ph (+) (%) a	段階
CML002	71	F	78	慢性
CML003	66	M	69	慢性
CML004	55	F	75.5	慢性
CML008	61	F	75	慢性
CML009	68	M	80.5	慢性
CML010	56	M	65.5	慢性
CML013	59	F	87	慢性
CML014	47	M	83.5	慢性
CML015	63	F	72	慢性
CML018	57	M	83.5	慢性
CML019	23	M	79	慢性
CML021	57	M	79.5	慢性
CML022	69	M	72.5	慢性
CML023	68	F	76	慢性
CML025	44	M	76	慢性
CML027	35	M	75.5	慢性
CML029	45	F	73	慢性
CML030	61	M	65.5	慢性
CML033	56	M	66	慢性
CML036	48	M	77	慢性
CML047	32	F	85.5	慢性
CML054	32	M	71	慢性

10

20

30

【0136】

RNA調製とT7ベースのRNA増幅

単核細胞は、フィコール（アマシャムバイオサイエンス（Amersham Biosciences）、バッキンガムシャー、イギリス）を用いて調製し、TRIzol（ライフテクノロジーズインク（Life Technologies, Inc.）、グランドアイランド、ニューヨーク州）を用いて製造元の説明書に従って全RNAを抽出した。DNアーゼI（ニッポンジーン、東京、日本）による処理後、T7ベースのRNA増幅を行った（14）。開始材料として全RNA 2 μ gを用いた2ラウンドの増幅によって、増幅RNA（aRNA）40～100 μ gが得られた。健康なボランティアからの対照試料についても、T7ベースのRNA増幅を2ラウンド行い、十分量のaRNAを得た。この方法によって増幅されたRNAは、半定量的逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）実験によって確認したところ、当初のRNA源における比率を正確に反映しており、全RNAまたは増幅されたaRNAのいずれを鋳型として用いても、マイクロアレイからのデータは、RT-PCRの結果と一致した（14）。

40

【0137】

cDNAマイクロアレイの調製とハイブリダイゼーション

ゲノム全体に及ぶcDNAマイクロアレイを、米国国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）のUniGeneデータベース（ビルド#131）から選択したcDNA 23,040個から作製した。スライドガラス上にスポットするcDNAを得るために、以前に記載されているように各遺伝子に関してRT-PCRを行った（15）。PCR産物をMicroarray Spotter Generation III（アマ

50

シヤムバイオサイエンス)を用いてタイプ7スライドガラス(アマシヤムバイオサイエンス)上にスポットした。遺伝子4,608個を1枚のスライドガラス上に2個ずつスポットした。異なる5組のスライドガラス(全体で遺伝子23,040個)を調製して、そのそれぞれの上と同じハウスキーピング遺伝子52個と陰性対照遺伝子2個も同様にスポットした。標識、ハイブリダイゼーション、洗浄、スキャニング、およびシグナルの定量は、全工程を自動スライドプロセッサによって行ったことを除き(15)、以前に記載されている通りに実施した(14)。

【0138】

シグナルの定量とデータ解析

各ハイブリダイゼーションシグナルの強度を、Array Visionコンピュータプログラム(アマシヤムバイオサイエンス)を用いて光度によって計算した。各スライドガラスは、ハウスキーピング遺伝子52個を含み、ハウスキーピング遺伝子のパネルのCy5/Cy3比の平均が1.0となるように、各遺伝子発現に関するCy5/Cy3比を調整した。分散分析を用いて、各マイクロアレイスライドガラスにカットオフ値を設定した。Cy3およびCy5シグナル強度の双方がカットオフ値より低い場合、その試料中の対応する遺伝子の発現レベルはなしと評価された。他の遺伝子に関して、Cy5/Cy3比は、各試料の生データを用いて計算した。

【0139】

実施例2: CML関連遺伝子の同定

各遺伝子の相対的発現比(Cy5/Cy3強度比)を四つのカテゴリーの一つに分類した: (1)非常に上方制御されている(情報が得られた症例のうち50%より多い症例において発現比が5.0より大きい); (2)非常に下方制御されている(情報が得られた症例のうち50%より多い症例において発現比が0.2より小さい); (3)低い発現(情報が得られた症例の50%より多い症例において発現比が0.2~5.0); および(4)発現されない(またはわずかに発現されているが検出のカットオフレベルより低い)。これらのカテゴリーを用いて、発現比の変化が試料間で共通していると同時に特定のサブグループに対して特異的である遺伝子の組を検出した。CML細胞において一般的に上方制御または下方制御されている候補遺伝子を検出するために、遺伝子23,040個の全体的な発現パターンをスクリーニングして、5.0より大きいかまたは0.2未満の発現比がCML症例の慢性期の50%より多くに存在し、(1)、(2)、または(3)として分類された遺伝子を選択した。

【0140】

CML細胞において臨床的に関連する発現パターンを有する遺伝子の同定

CML細胞において遺伝子約23,000個の発現パターンをcDNAマイクロアレイを用いて調べた。Cy5およびCy3シグナルの双方がカットオフ値より下であった場合には、個々のデータを除外した。コンピュータ解析により、CML細胞において一般的に高度に上方制御または下方制御された遺伝子が同定された; 遺伝子190個は、情報が得られた症例の50%を超える症例において発現比が>5.0であることが判明し、遺伝子106個は、情報が得られた症例の50%を超える症例において発現比が<0.2であることを示した。

【0141】

遺伝子190個は、非常に上方制御されることが判明した。上方制御された遺伝子には、細胞周期の調節、増殖促進、および転写の活性化に関与するタンパク質、ならびにタンパク質キナーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子が含まれた。それらの多くは、他の癌において過剰発現されることが示された。例えば、急性白血病を引き起こし、造血細胞のみを形質転換する転写活性化因子であるMYB(16)は、慢性期のCML細胞の90%を超える細胞において高度に発現された。同じく内皮細胞におけるエンドセリン-1遺伝子発現を調節する転写活性化因子であるGATA結合タンパク質2(GATA2)は、急性骨髄性白血病(AML)の93%、急性リンパ芽球性白血病(ALL)の70%、およびCMLの83%において活性化されていると報告された(18)。特に、遺伝子28個、例えばリボヌクレアーゼRNアーゼAファミリー3(RNASE3)、殺菌/透過性増加タンパク質(BP1)、デフェンシンα1、骨髄関連配列(DEF1)、アミノレブリン酸、δ-シンターゼ1(ALAS1)、エラスターゼ2、好中球(ELA2)、カテプシンG(CTSG)、マトリクスメタロプロテアーゼ9(MMP-9)、ハブ

トグロビン関連タンパク質 (HPR)、ウロキナーゼプラスミノーゲン活性化因子 (UPLA)、ハプトグロビン (HP)、H3ヒストンファミリー、メンバーJ (H3FJ)、およびヘモグロビン、 ζ (HBZ) は、本研究において情報が得られる試料の全てにおいて過剰発現された (表3を参照されたい)。IV型コラーゲンを分解する酵素であるMMP-9は、遊走ならびに組織および血管の細胞外基質構造の分解に関連すると考えられる。MMP-9の発現は、CML患者の単核細胞において増強された (19)。その上、初代ヒトPh⁺細胞は、MMP-9を含む様々な血管新生因子を分泌すると報告された (20)。このように、MMP-9の過剰発現は、CMLの発病において重要な役割を有する可能性がある。さらに、ヘモグロビンファミリーメンバー、例えば、 ζ (HBZ)、 β (HBB)、 γ G (HBG2)、 δ (HBD)、および α 2 (HBA2) は、情報が得られた症例の80%を超える症例において過剰発現された。さらに、ハプトグロビン (HP) およびハプトグロビン関連タンパク質 (HPR) も同様に、情報が得られた症例全てにおいて発現の増強を示した。最近の研究は、bcr/abl発現が、HL-60/BCR-Abl細胞またはCML細胞においてヘモグロビン (Hb) 産生を誘導することを示した (21、22)。このことは、構成的に活性化されたチロシンキナーゼbcr-ablが、造血前駆細胞の生存および増殖を増強したことを示唆している。

10

【0142】

遺伝子106個が、CMLの慢性期において有意に下方制御されることが判明した (表4を参照されたい)。機能が既知である遺伝子には、情報が得られた症例の90%超において発現が抑制された、SH3-ドメインGRB2様2 (SH3GL2)、PCAF関連因子65 β (PAF65B)、ヘパラン硫酸6-0-スルホトランスフェラーゼ (HS6ST)、免疫グロブリン重鎖定常 γ 3 (IGHG3)、熱ショック27 kDタンパク質2 (HSPB2)、およびプロスタグランジンDシンターゼ遺伝子 (PTGDS) が含まれた。DNA依存性タンパク質キナーゼ触媒性サブユニット相互作用タンパク質2 (KIP2) のような多くの転写陰性調節因子も同様に含まれた。KIP2は、細胞増殖の負の調節因子であり、G1期で細胞増殖を停止させる。KIP2は、情報が得られたCML症例の約60%において下方制御された。したがって、その下方制御は、白血病細胞に持続的な増殖特性を付与する可能性がある。

20

【0143】

有意に下方制御された遺伝子のいくつかは、細胞型における差を反映し、免疫成分、例えば免疫グロブリンおよび補体成分2 (C2)、ならびにCD7、CD3E、CD79A、CD3Z、CD6、CD4、およびCD79B抗原のようなリンパ球マーカー、インターフェロン調節因子4 (IRF4)、およびインターロイキン7受容体 (IR7R) をコードする遺伝子のようなリンパ球特異的遺伝子 (表4を参照されたい) である。本試験において用いた慢性期のCML細胞に含まれる多数の細胞は、骨髓系統の芽球細胞に相当する。普遍的な対照 (universal control) として用いられる末梢血の白血球は、骨髓およびリンパ球系統の双方の細胞を含んだが、リンパ球は試料中の細胞のほんの一部を占めるに過ぎなかった。これは、CML患者におけるリンパ球集団が健康な個体の血液と比較して減少したことを表す可能性がある。

30

【0144】

(表3) 上方制御された遺伝子

CML 割付	比(%) 1)	情報が得ら れた症例	比>5 2)	アクセッ ション番号	シンボル	遺伝子名	
1	100	22	22	X16545	RNASE3	リボヌクレアーゼ、RNアーゼ A フ ァミリー、3 (好酸球陽イオンタンパ ク質)	
2	100	22	22	J04739	BPI	殺菌/透過性増加タンパク質	
3	100	22	22	M21130	DEFA1	デフェンシン、 α 1、骨髄関連配 列	
4	100	22	22	X56351	ALAS1	アミノレブリン酸、 δ -, シンターゼ 1	10
5	100	21	21	M16117	CTSG	カテプシン G	
6	100	21	21	M34379	ELA2	エラスターゼ 2、好中球	
7	100	20	20	J05070	MMP9	マトリクスメタロプロテナーゼ 9 (ゼ ラチナーゼ B、92 kDa ゼラチナー ゼ、92 kD IV 型コラゲナーゼ)	
8	100	20	20	K03431	HPR	ハプトグロビン関連タンパク質	
9	100	20	20	F21002	EST		
10	100	19	19	X17042	PRG1	プロテオグリカン 1、分泌顆粒	20
11	100	19	19	M14502	ARG1	アルギナーゼ、肝臓	
12	100	18	18	L06895	MAD	MAX 二量体形成タンパク質	
13	100	18	18	M69199	G0S2	推定のリンパ球 G0/G1 スイッチ遺 伝子	
14	100	17	17	K01763	HP	ハプトグロビン	
15	100	16	16	H23213	EST		
16	100	16	16	Z98744	H3FJ	H3 ヒストンファミリー、メンバー J	
17	100	15	15	M24173	HBZ	ヘモグロビン、 ζ	
18	100	15	15	X02419	PLAU	プラスミノゲン活性化因子、ウロ キナーゼ	30
19	100	15	15	H48537	EST		
20	100	15	15	AA191449	KIAA1254	KIAA1254 タンパク質	
21	100	15	15	AI022380	EST		
22	100	15	15	T03595		ヒト(Homo sapiens) cDNA FLJ126 88 fis、クローン NT2RM4002534	
23	100	14	14	X57129	H1F2	H1 ヒストンファミリー、メンバー 2	
24	100	14	14	AA382504	EST		40
25	100	13	13	R26792	GCL	グランカルシン	
26	100	12	12	AA815247	EST		
27	100	11	11	M81637	GCL	グランカルシン	

28	100	11	11	AA446449	EST		
29	95.45	22	21	M83202	LTF	ラクトトランスフェリン	
30	95.45	22	21	V00497	HBB	ヘモグロビン、 β	
31	95.45	22	21	U01317	HBD	ヘモグロビン、 δ	
32	95.24	21	20	AA489915	HBG2	ヘモグロビン、 γ G	
33	95	20	19	AI023753	EST		
34	94.74	19	18	X83006	LCN2	リポカリン 2 (腫瘍遺伝子 24p3)	
35	93.75	16	15	AI040591	EST		
36	93.33	15	14	AA855085	NCOA4	核受容体活性化補助因子 4	10
37	91.67	12	11	M65085	FSHR	卵胞刺激ホルモン受容体	
38	91.67	12	11	AA398536	EST		
39	91.67	12	11	AA843554	EST		
40	90.91	22	20	S81914	IER3	前初期応答 3	
41	90.91	22	20	M27717	CPA3	カルボキシペプチダーゼ A3 (肥満細胞)	
42	90.91	22	20	U22376	MYB	v-myb トリ骨髄芽球症ウイルス腫瘍遺伝子相同体	
43	90.91	11	10	U32315	STX3A	シンタキシン 3A	20
44	90.91	11	10	AA774546	NXF3	核 RNA 核外輸送因子 3	
45	90.48	21	19	AI015633		溶質担体ファミリー 26、メンバー 8	
46	89.47	19	17	M33987	CA1	カーボニックアンヒドラーゼ I	
47	88.89	18	16	AA004412	EST		
48	88.89	18	16	AI056326	EST		
49	88.24	17	15	AA825819	LOC55871	COBW 様タンパク質	
50	86.67	15	13	X65614	S100P	S100 カルシウム結合タンパク質 P	
51	86.67	15	13	L27711	CDKN3	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 3 (CDK2 関連二重特異性ホスファターゼ)	30
52	86.67	15	13	AA418448	EST		
53	86.67	15	13	AA235222	LOC51053	ゲミニン (geminin)	
54	86.36	22	19	M62831	ETR101	前初期タンパク質	
55	86.36	22	19	L01664	CLC	シャロット-レイデン (Charot-Leyden) 結晶タンパク質	
56	86.36	22	19	V00493	HBA2	ヘモグロビン、 α 2	
57	86.36	22	19	X00637	HP	ハプトグロビン	
58	86.36	22	19	W63676	EST		40
59	85.71	21	18	U01317	HBD	ヘモグロビン、 δ	
60	85.71	14	12	N52485	DKFZP434 O125	DKFZP434O125 タンパク質	
61	85.71	14	12	AI335266	FER1L3	fer (線虫 (C. elegans)) 様 3 (ミオフィーリン (myoferlin))	

62	85	20	17	Z83821	ALAS2	アミノレブリン酸、 δ -, シンターゼ 2 (担鉄赤芽球性貧血 / 低色素性貧血)	
63	85	20	17	AA318275	FTH1	フェリチン、重鎖ポリペプチド 1	
64	84.62	13	11	M16827	ACADM	アシル補酵素 A デヒドロゲナーゼ、C-4 から C2 の直鎖	
65	83.33	12	10	AA355657	CTSG	カテプシン G	
66	81.82	22	18	D14874	ADM	アドレノメジュリン	
67	81.82	22	18	M69043	NFKBIA	B 細胞阻害因子における κ 軽ポリペプチド遺伝子エンハンサーの核因子、 α	10
68	81.82	22	18	X55656	HBG2	ヘモグロビン、 γ G	
69	81.82	22	18	X68277	DUSP1	二重特異性ホスファターゼ 1	
70	81.82	22	18	W76477	JUN	v-jun トリ肉腫ウイルス 17 腫瘍遺伝子相同体	
71	81.82	22	18	X56351	ALAS1	アミノレブリン酸、 δ -, シンターゼ 1	
72	81.82	11	9	AI168658	FECH	フェロキラーターゼ (プロトポルフィリン症)	20
73	81.82	11	9	AA256671	FLJ21939	5-アザシチジン誘導性遺伝子 2 に類似性を示す仮説上のタンパク質 FLJ21939	
74	80	15	12	AI819724	COL1A1	コラーゲン、I 型、 α 1	
75	78.95	19	15	M96839	PRTN3	プロテナーゼ 3 (セリンプロテナーゼ、好中球、ウェゲナー肉芽腫症自己抗原)	
76	78.95	19	15	R78436	GATA2	GATA 結合タンパク質 2	30
77	78.57	14	11	AA449950	KIAA1016	KIAA1016 タンパク質	
78	77.78	18	14	AA456242	FSP-2	フィブラシーシン (fibrousheathin) I	
79	77.78	18	14	AI357641	CDKN2C	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 2C (p18、CDK4 を阻害)	
80	77.78	18	14	M13692	ORM1	オロソムコイド 1	
81	77.78	18	14	D90145	SCYA3L1	低分子誘導性サイトカイン A3-様 1	
82	77.78	18	14	AA903016	HM74	推定のケモカイン受容体; GTP 結合タンパク質	40
83	77.27	22	17	AI128538	LOC51312	ミトコンドリア溶質担体	
84	76.92	13	10	AF041245	HCRTR2	ヒポクレチン (オレキシン) 受容体 2	
85	76.47	17	13	D13752	CYP11B2	チトクローム P450、サブファミリー XIB (ステロイド 11- β -ヒドロキシラ	

ーゼ)、ポリペプチド 2

86	76.47	17	13	AI360412	ALS2CR2	筋萎縮性側索硬化症 2(若年性) 染色体領域、候補 2	
87	76.47	17	13	N30414		EST	
88	76.19	21	16	AA126620	C8FW	分裂促進経路によって調節される リン蛋白質	
89	75	20	15	M33492	TPSB1	トリプターゼ β 1	
90	75	20	15	AF043584	IGL	免疫グロブリン λ 鎖	10
91	75	16	12	AI000650		EST	
92	75	16	12	AW337343	PTP4A1	タンパク質チロシンホスファターゼ IVA 型、メンバー 1	
93	73.68	19	14	AA043835	DAPP1	ホスホチロシンと 3-ホスホイノシチ ドとの二重アダプター	
94	73.33	15	11	AA449227		EST	
95	72.73	22	16	U21847	TIEG	TGFB 誘導性初期増殖応答	
96	72.73	11	8	U77942	STX7	シンタキシン 7	
97	72.73	11	8	AA345854	ITGA3	インテグリン、 α 3 (抗原 CD49C、 VLA-3 受容体の α 3 サブユニッ ト)	20
98	72.73	11	8	AA314457	LOC56994	コリンホスホトランスフェラーゼ 1	
99	72.73	11	8	AI718618	BIRC2	バキュロウイルス IAP リピート含有 2	
100	72.73	11	8	AI276054	FRAT2	進行性 T 細胞リンパ腫において 頻繁に再配列される 2	
101	72.22	18	13	D86724	ARG2	アルギナーゼ、II 型	
102	72.22	18	13	X06233	S100A9	S100 カルシウム結合タンパク質 A 9(カルグラニユリン B)	30
103	72.22	18	13	AA973757	STX3A	シンタキシン 3A	
104	72.22	18	13	AF068754	HSBP1	熱ショック因子結合タンパク質 1	
105	71.43	14	10	H97976		EST	
106	70.59	17	12	D14657	KIAA0101	KIAA0101 遺伝子産物	
107	70	20	14	AI056641	FLJ22833	仮説上のタンパク質 FLJ22833	
108	70	20	14	AA677931		EST	
109	69.23	13	9	AB003476	AKAP12	A キナーゼ (PRKA) アンカータン パク質 (グラビン) 12	40
110	68.75	16	11	AA854469	RNF6	リングフィンガータンパク質 (C3H2 C3 型) 6	
111	68.18	22	15	AA327207		EST	
112	66.67	21	14	AA772709		ヒト cDNA FLJ13522 fis、クローン PLACE1005884	
113	66.67	21	14	U46254		EST	

114	66.67	21	14	AI087002		EST	
115	66.67	18	12	AW237266	ASAH	N-アシルスフィンゴシンアミドヒドローラーゼ(酸セラミダーゼ)	
116	66.67	12	8	H53099	NDUFA10	NADH デヒドロゲナーゼ(ユビキノン)1 α サブ複合体、10(42 kD)	
117	66.67	12	8	T03044		EST	
118	65	20	13	W96110	ZNF281	ジンクフィンガータンパク質 281	
119	64.71	17	11	AA629596	DKFZP564D177	DKFZP564D177 タンパク質	10
120	64.29	14	9	M23161	THE1	ヒトトランスポゾン様エレメント mRNA	
121	64.29	14	9	D20186	DKFZp762O076	仮説上のタンパク質 DKFZp762O076	
122	64.29	14	9	H80325	BAZ1A	ジンクフィンガードメインに隣接するブロモドメイン、1A	
123	63.64	22	14	U21847	TIEG	TGFB 誘導性初期増殖応答	
124	63.64	11	7	M31452	C4BPA	補体成分 4-結合タンパク質、 α	
125	63.64	11	7	U39231	GIPR	胃抑制ポリペプチド受容体	20
126	63.64	11	7	AI262031	ATP10D	ATP アーゼ、クラス V、タイプ 10 D	
127	63.64	11	7	AF022385	PDCD10	プログラム細胞死 10	
128	63.64	11	7	N58488		EST	
129	63.64	11	7	AI016419		EST	
130	62.5	16	10	H71303	KIAA0481	KIAA0481 遺伝子産物	
131	62.5	16	10	H06819	FLJ10846	仮説上のタンパク質 FLJ10846	
132	62.5	16	10	W93000		EST	
133	62.5	16	10	W37916	HCF-2	宿主細胞因子 2	30
134	61.9	21	13	AF016833	MGAM	マルターゼ-グルコアミラーゼ(α グルコシダーゼ)	
135	61.54	13	8	X00948	RLN2	リラキシシン 2(H2)	
136	61.54	13	8	U55206	GGH	γ グルタミルヒドローラーゼ(コンジュガーゼ、ホリルポリ γ グルタミルヒドローラーゼ)	
137	61.54	13	8	AA308062	S100P	S100 カルシウム結合タンパク質 P	
138	61.54	13	8	AA731746		EST	
139	60	20	12	AI078178		EST	
140	60	15	9	M95809	GTF2H1	基本転写因子 II H、ポリペプチド 1(62 kD サブユニット)	40
141	60	15	9	AA401589		EST	
142	59.09	22	13	M93056	SERPINB1	セリン(またはシステイン)プロテナーゼ阻害因子、クレード B(卵アルブミン)、メンバー1	

143	59.09	22	13	AA436509	IER5	前初期応答 5	
144	58.82	17	10	L10101	SRY	性決定領域 Y	
145	58.33	12	7	W87690		ヒト cDNA: FLJ23173 fis、クローン LNG10019	
146	57.89	19	11	AK025906		ヒト cDNA: FLJ22253 fis、クローン HRC02763	
147	57.89	19	11	AA548765	SMARCB1	染色質の SWI/SNF 関連、マトリクス 関連、アクチン依存性調節因子、 サブファミリー b、メンバー 1 EST	10
148	57.14	21	12	AI014551		ヒト cDNA FLJ11838 fis、クローン HEMBA1006624、DNA/パントテ ン酸代謝フラボタンパク質相同体 に弱い類似性を示す	
149	57.14	21	12	AA313441		糖タンパク質 M6A	
150	57.14	14	8	D49958	GPM6A	EST	
151	57.14	14	8	AA778025		ヒト cDNA: FLJ22756 fis、クローン KAIA0791	20
152	57.14	14	8	AA047169		ets 変異体遺伝子 3	
153	56.25	16	9	L16464	ETV3	セリン/トレオニンキナーゼ 15	
154	56.25	16	9	AF011468	STK15	第 11 染色体オープンリーディン グフレーム 15	
155	56.25	16	9	AI188389	C11ORF15	コロニー刺激因子 2 受容体、 β 、 低親和性 (顆粒球-マクロファージ)	
156	55	20	11	AA847136	CSF2RB	クルツペル (Kruppel) 様因子 7 (遍 在)	30
157	55	20	11	AI025297	KLF7	増殖停止および DNA 損傷誘導 性、 α	
158	54.55	22	12	M60974	GADD45A	アミノレブリン酸、 δ -, シンターゼ 1	
159	54.55	22	12	X56351	ALAS1	ポリメラーゼ (RNA) III (DNA 依存 性) (39 kD)	
160	54.55	11	6	U93869	RPC39	仮説上のタンパク質 FLJ10260	
161	54.55	11	6	AA551628	FLJ10260	EST	
162	54.55	11	6	AI268502		KIAA0707 タンパク質	40
163	54.55	11	6	AI768505	KIAA0707	EST	
164	54.55	11	6	W70293		アミラーゼ、 α 2A; 膵臓	
165	53.85	13	7	M28443	AMY2A	ディジョージ症候群遺伝子 A	
166	53.85	13	7	L77571	DGS-A	EST	
167	53.85	13	7	AA101229		骨 γ -カルボキシグルタメート (gl a) タンパク質 (オステオカルシン)	
168	53.33	15	8	X51699	BGLAP		

169	53.33	15	8	R86067		EST、KIA A1353 タンパク質[ヒト] に弱い類似性を示す	
170	53.33	15	8	U57961	13CDNA73	推定の遺伝子産物	
171	53.33	15	8	AI025822		EST	
172	53.33	15	8	AI150469		EST	
173	52.94	17	9	M23204	OAT	オルニチンアミノトランスフェラーゼ(脳回転状萎縮)	
174	52.63	19	10	L04270	LTBR	リンフォトキシン β 受容体(TNFRスーパーファミリー)、メンバー3	10
175	52.63	19	10	AW511361	SLC29A1	溶質担体ファミリー29(ヌクレオシド輸送体)、メンバー1	
176	52.63	19	10	AA027229		EST、F45E12.5[線虫]に弱く類似	
177	52.63	19	10	AI201982		ヒト cDNA FLJ11516 fis、クローン HEMBA1002328	
178	52.38	21	11	AA706319		EST	
179	52.38	21	11	W05688		EST	
180	50	20	10	X56741	MEL	mel 形質転換腫瘍遺伝子(細胞株 NK14 に由来)-RAB8 相同体	20
181	50	18	9	AI032402		EST	
182	50	16	8	F10728		EST	
183	50	16	8	AA576399		EST	
184	50	16	8	T36260	SEC23B	Sec23(出芽酵母(<i>S. cerevisiae</i>)) 相同体 B	
185	50	16	8	AJ250075	CH1	膜タンパク質 CH1	
186	50	12	6	AI187066		EST	
187	50	12	6	AA586974	PI3	プロテアーゼ阻害因子 3、皮膚由来(SKALP)	
188	50	14	7	AA639599	SLC12A2	溶質担体ファミリー12(ナトリウム／カリウム／塩素輸送体)、メンバー2	30
189	50	14	7	AA807551		EST	
190	50	14	7	AA503224		EST	

アクセッション番号および遺伝子シンボルは、UniGeneデータベース（ビルド#131）から検索した。

【0145】

（表4）下方制御された遺伝子

CML 割付	比(%) 1)	情報が得ら れた症例	比<5 2)	アクセシヨ ン番号	シンボル	遺伝子名	
191	100	16	16	AF036268	SH3GL2	SH3-ドメイン GRB2-様 2	
192	94.74	19	18	AF069736	PAF65B	PCAF 関連因子 65 β	
193	93.75	16	15	AB006179	HS6ST	ヘパラン硫酸 6-O-スルホトランスフェ ラーゼ	
194	93.33	15	14	AA806043	IGHG3	免疫グロブリン重鎖定常 γ 3 (G3m マ ーカー)	
195	90.91	11	10	D89617	HSPB2	熱ショック 27 kD タンパク質 2	10
196	90.48	21	19	M61900	PTGDS	プロスタグランジン D シンターゼ遺伝 子	
197	88.24	17	15	M73780	ITGB8	インテグリン、 β 8	
198	88.24	17	15	M60450	KCNA4	カリウム電位依存性チャンネル、シェ ーカー (shaker) 関連サブファミリー、 メンバー4	
199	87.5	16	14	U28369	SEMA3B	semaドメイン、免疫グロブリンドメイン (Ig)、短い塩基性ドメイン、分泌型 (セマフォリン) 3B	20
200	86.67	15	13	M13149	HRG	ヒスチジンリッチ糖タンパク質	
201	86.67	15	13	AI089023	FXYD7	FXYDドメイン含有鉄輸送調節因子 7	
202	86.36	22	19	D00749	CD7	CD7 抗原	
203	85	20	17	M88468	MVK	メバロン酸キナーゼ (メバロン酸尿 症)	
204	84.62	13	11	AF040723	HAP1	ハンチンチン関連タンパク質 1 (ニュー ーロアン (neuroan) 1)	
205	84.21	19	16	M24405	TCF3	転写因子 3 (E2A 免疫グロブリンエン ハンサー結合因子 E12/E47)	30
206	82.35	17	14	M81886	GRIA1	グルタメート受容体、イオン調節型、 AMPA1	
207	82.35	17	14	M25809	ATP6B1	ATP アーゼ、H ⁺ 輸送性、リソソーム (空胞プロトンポンプ)、 β ポリペプチ ド、56/58 kD、アイソフォーム 1	
208	81.82	22	18	R72651		EST、PLK ヒトプロテオグリカンリンク タンパク質前駆体[ヒト]に弱い類似性 を示す	
209	81.82	22	18	X97229	KIR2DL4	キラー細胞免疫グロブリン様受容 体、二つのドメイン、長い細胞質テール、4	40

210	81.82	22	18	D87465	KIAA0275	KIAA0275 遺伝子産物	
					5		
211	81.82	11	9	S77410	AGTR1	アンジオテンシン受容体 1	
212	81.82	11	9	U52112	ARD1	N-アセチルトランスフェラーゼ、出芽酵母 ARD1 の相同体	
213	81.25	16	13	U18468	PSG4	妊娠特異的 β 糖タンパク質 4	
214	80	20	16	D29990	SLC7A2	溶質担体ファミリー7(陽イオン、アミノ酸輸送体、y+系)、メンバー2	
215	80	15	12	M23323	CD3E	CD3E 抗原、 ϵ ポリペプチド	10
216	78.95	19	15	M30607	ZFY	ジンクフィンガータンパク質、Y-結合型	
217	78.95	19	15	M98833	FLI1	フレンド白血病ウイルス組込 1	
218	77.27	22	17	X67292	IGHM	免疫グロブリン重鎖定常領域 μ	
219	76.92	13	10	AA543086		ヒト cDNA: FLJ23270 fis、クローン C OL10309、ヒト正常ケラチノサイト mRNA に高い類似性を示す	
220	75	20	15	L13258	SLC34A1	溶質担体ファミリー34(リン酸ナトリウム)、メンバー1	20
221	75	12	9	D00174	SERPINF2	セリン(またはシステイン)プロテナーゼ阻害因子、クレード F(α -2 抗プラスミン、色素上皮由来因子)、メンバー2	
222	73.68	19	14	U05227	SEC4L	出芽酵母 SEC4 と相同な GTP 結合タンパク質	
223	73.33	15	11	U79240		ヒト PAS-セリン/トレオニンキナーゼ mRNA、部分 cds	
224	73.33	15	11	X07994	LCT	ラクターゼ	30
225	72.73	22	16	M80462	CD79A	CD79A 抗原(免疫グロブリン関連 α)	
226	71.43	21	15	J04132	CD3Z	CD3Z 抗原、 ζ ポリペプチド(TiT3 複合体)	
227	70.59	17	12	U97145	GFRA2	GDNF ファミリー受容体 α 2	
228	69.23	13	9	U05321	SLC16A2	溶質担体ファミリー16(モノカルボン酸輸送体)、メンバー2(推定の輸送体)	
229	69.23	13	9	M24405	TCF3	転写因子 3 (E2A 免疫グロブリンエンハンサー結合因子 E12/E47)	40
230	69.23	13	9	U02619	GTF3C1	基本転写因子 IIIC、ポリペプチド 1 (α サブユニット、220 kD)	
231	68.75	16	11	J04599	BGN	バイグリカン	
232	68.42	19	13	X80818	GRM4	グルタメート受容体、代謝調節型 4	
233	68.42	19	13	X70991	NAB2	NGFI-A 結合タンパク質 2 (ERG1 結	

					合タンパク質 2)		
234	68.42	19	13	J00269	KRT6A	ケラチン 6A	
235	68.18	22	15	AA778161	RPL26	リボソームタンパク質 L26	
236	66.67	18	12	AI123516		EST	
237	66.67	15	10	U34623	CD6	CD6 抗原	
238	66.67	12	8	AA421322	IGL@	免疫グロブリン λ 座	
239	66.67	12	8	M91196	ICSBP1	インターフェロンコンセンサス配列結合タンパク質 1	
240	66.67	12	8	M12807	CD4	CD4 抗原 (p55)	10
241	66.67	12	8	D52745	KIAA0821	レクトメジン-2	
242	64.29	14	9	S82807	TSHR	甲状腺刺激ホルモン受容体	
243	64.29	14	9	AI027554	DKFZP586J1624	タンパク質 86J1624	
244	63.64	22	14	U52682	IRF4	インターフェロン調節因子 4	
245	63.64	22	14	X03066	HLA-DOB	主要組織適合性複合体、クラス II、D O β	
246	63.64	22	14	M15800	MAL	mal、T 細胞分化タンパク質	20
247	63.64	22	14	AI366242		EST	
248	63.64	22	14	X54101	GNLY	グラヌリシン	
249	63.64	22	14	T04932		ヒト cDNA: FLJ21545 fis、クローン C OL06195	
250	63.64	22	14	AI248183	PAX5	ペアボックス遺伝子 5 (B 細胞系統特異的活性化タンパク質)	
251	63.64	11	7	AF064804	SUPT3H	Ty (出芽酵母) 3 の抑制物質の相同体	
252	63.64	11	7	D28769	PBX2	プレ-B 細胞白血病転写因子 2	30
253	63.64	11	7	AA620287		EST	
254	61.9	21	13	X62071	CDK2	サイクリン依存性キナーゼ 2	
255	61.9	21	13	AI271678		EST	
256	61.9	21	13	X82240	TCL1A	T 細胞白血病/リンパ腫 1A	
257	61.54	13	8	X78677	KHK	ケトヘキソキナーゼ (フルクトキナーゼ)	
258	61.11	18	11	M75106	CPB2	カルボキシペプチダーゼ B2 (血漿)	
259	59.09	22	13	M74161	INPP5B	イノシトールポリホスフェート-5-ホスファターゼ、75 kD	
260	59.09	22	13	AI214175	KIAA0655	ハンチンチン相互作用タンパク質関連	40
261	58.82	17	10	X15218	SKI	v-ski トリ肉腫ウイルス腫瘍遺伝子相同体	
262	57.89	19	11	AA252866	KIP2	DNA-依存性タンパク質キナーゼ触媒サブユニット相互作用タンパク質 2	

263	57.14	21	12	L19711	DAG1	ジストログリカン 1 (ジストロフィン関連糖タンパク質 1)	
264	55.56	18	10	AA648810	VCP	バロシン含有タンパク質	
265	55	20	11	L13203	FOXI1	フォークヘッドボックス I1	
266	55	20	11	U14534	NR1H2	核受容体サブファミリー1、グループ H、メンバー2	
267	54.55	22	12	M29696	IL7R	インターロイキン 7 受容体	
268	54.55	22	12	M14745	BCL2	B 細胞 CLL/リンパ腫 2	
269	54.55	22	12	AI341482	RNB6	RNB6	10
270	54.55	11	6	U79255	APBA2	アミロイド β (A4) 前駆体タンパク質結合性、ファミリー A、メンバー2 (X11 様)	
271	54.55	11	6	U22526	LSS	ラノステロールシンターゼ (2,3-オキシドスクアレン-ラノステロールシクラーゼ)	
272	54.55	11	6	S59049	RGS1	G-タンパク質シグナル伝達の調節因子 1	
273	54.55	11	6	M83651	GALGT	UDP-N-アセチル- α -D-ガラクトサミン: (N-アセチルノイラミニル)-ガラクトシルグルコシルセラミド N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ (GalNAc-T)	20
274	53.85	13	7	L02867	HUMPP A	腫瘍随伴性抗原	
275	53.85	13	7	M35533	LBP	リポ多糖類結合タンパク質	
276	53.85	13	7	AI015930	STMN3	スタスミン様 3	
277	53.85	13	7	U11276	KLRB1	キラー細胞レクチン様受容体サブファミリー B、メンバー1	30
278	53.33	15	8	M89957	CD79B	CD79B 抗原 (免疫グロブリン関連 β)	
279	52.63	19	10	AL009179	H3FK	H3 ヒストンファミリー、メンバー K	
280	52.38	21	11	D89618	KPNA3	カリオフェリン α 3 (インポーチン α 4)	
281	50	22	11	M87790	IGL λ	免疫グロブリン λ 座	
282	50	22	11	X72475	IGKC	免疫グロブリン κ 定常領域	
283	50	22	11	AF037261	SCAM	ビネキシン β (SH3 含有アダプター分子)	40
284	50	22	11	M17016	GZMB	グランザイム B (グランザイム 2、細胞障害性 T リンパ球関連セリンエステラーゼ 1)	
285	50	22	11	AA813912	KIAA0130	KIAA0130 遺伝子産物	
286	50	22	11	AI366182	EST		

287	50	20	10	L31801	SLC16A1	溶質担体ファミリー16(モノカルボン酸輸送体)、メンバー1
288	50	20	10	D26309	LIMK1	LIMドメインキナーゼ1
289	50	18	9	X68149	BLR1	バーキットリンパ腫受容体1、GTP結合タンパク質
290	50	14	7	D86479	AEBP1	AE-結合タンパク質1
291	50	14	7	M88338	MSE55	血清成分タンパク質
292	50	14	7	U73036	IRF7	インターフェロン調節因子7
293	50	14	7	AI336233		EST、カルニチン／アシルカルニチントランスポーターゼ[ヒト]に弱い類似性を示す
294	50	12	6	M19713	TPM1	トロポミオシン1(α)
295	50	12	6	AJ002309	SYNGR3	シナプトジリン(synaptogyrin)3
296	50	12	6	M73531	RDS	網膜変性、緩徐(色素性網膜炎7)

10

アクセッション番号および遺伝子シンボルは、UniGeneデータベース（ビルド#131）から検索した。

20

【0146】

半定量的RT-PCRによる確認

マイクロアレイ解析によって示される発現差の信頼性を確認するために、情報が得られた試料の全てにおいて高度に上方制御された遺伝子11個（RNASE3、CTSG、MMP9、HP、HPR、H3FJ、HBZ、PLAU、KIAA1254、および二つのEST（アクセッション番号H23213およびH48537））について、半定量的RT-PCR実験を行った。それぞれの試料からのaRNAのアリコート3 μ gを、ランダムプライマー（ロシュ（Roche））およびSuperscript II（ライフテクノロジーズインク）を用いて一本鎖cDNAに逆転写した。各cDNA混合物は、標的DNAまたは β -アクチン特異的反応に調製された同じプライマーの組を用いるその後のPCR増幅のために希釈した。プライマー配列を表2に記載する。 β -アクチンの発現を内部対照とした。PCR反応のサイクル数を、増幅の直線相に産物の強度がくるように最適化した。RT-PCRの結果は、被験症例の大多数においてマイクロアレイ解析の結果に非常に良く一致した（図1を参照されたい）。これらのデータは、CML細胞において一般的に上方制御された遺伝子を同定する本発明者らの手法の信頼性を証明した。

30

【0147】

（表2）半定量的RT-PCR実験のプライマー配列

CML 割付	アクセシ ョン番号	シンボル	フォワード プライマー	配列 番号	リバースプライマー	配列 番号
1	X16545	RNASE3	5'-GTTCCAAAA CTGTTCACTTCC C-3'	No.1	5'-GGTATGGAGA CTGATGAGGACA G-3'	No.2
5	M16117	CTSG	5'-CTTCTGCTGG CCTTTCTCCTA C-3'	No.3	5'-TGTGGACGTT TATTAAGGCTCT G-3'	No.4
7	J05070	MMP9	5'-GAACCAGCT GTATTTGTTCA AGG-3'	No.5	5'-AAAACAAAGG TGAGAAGAGAG GG-3'	No.6
8	K03431	HPR	5'-TCCTGAATGT GAAGCAGTATG TG-3'	No.7	5'-AGCCTTG CAT TAGTTCTCAGCT A-3'	No.8
15	H23213	EST	5'-GTCCCAAGA TGCATATTTTCC T-3'	No.9	5'-CCGAGCCCAT TAATACTGATAG A-3'	No.10
16	Z98744	H3FJ	5'-ACTTTCTGAC TTAGGCCACAG GT-3'	No.11	5'-ACAGAGTGCT CAGTTCTTCCGT A-3'	No.12
17	M24173	HBZ	5'-TCTCTGACCA AGACTGAGAGG AC-3'	No.13	5'-GAGGATACGA CCGATAGGA ACT T-3'	No.14
18	X02419	PLAU	5'-CAGTCACAC CAAGGAAGAGA ATG-3'	No.15	5'-CAGTGAGGAT TGGATGAACTAG G-3'	No.16
19	H48537	EST	5'-GTGTGATTAT CAAAAGGGAGT GG-3'	No.17	5'-AATAGTGCCT ATTTAAGGCCG- 3'	No.18
20	AA19144 9	KIAA1254	5'-TCCTACTTTG GCCAAGTTTGT T-3'	No.19	5'-ACTAAGCTGG TACATGGAATGG A-3'	No.20
57	K01763	HP	5'-AAGGAGATG GAGTGACACC TAAA-3'	No.21	5'-TGATTGACTC AGCAATGCAGG- 3'	No.22
	V00478	ACTB	5'-CATCCACGA AACTACCTTCA ACT-3'	No.23	5'-TCTCCTTAGA GAGAAGTGGGG TG-3'	No.24

10

20

30

40

【0148】

産業上の利用可能性

ゲノム全体にわたるcDNAマイクロアレイによって得られた、本明細書に記載されるCMLの遺伝子発現解析により、癌の予防および治療の標的となる特異的遺伝子が同定された。これらの発現差のある遺伝子サブセットの発現に基づいて、本発明は、CMLを同定または検出するための分子診断マーカーを提供する。

【0149】

本明細書に記載される方法はまた、CMLを予防、診断、および治療するためのさらなる分子標的の同定において有用である。本明細書において報告されたデータは、CMLの包括的な理解を増大させて、新規診断手法の開発を促進し、かつ治療薬および予防薬剤のため

50

の分子標的を同定する手がかりを提供する。そのような情報は、CMLの腫瘍発生に関するより深い理解に寄与し、CMLを診断、治療、および究極的には予防するための新規手法を開発するための指標を提供する。

【0150】

本明細書で引用した特許、特許出願、および刊行物は全て、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。さらに、本発明をその具体的な態様を参照して詳細に説明してきたが、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく様々な変更および改変を本発明に加えることができることは当業者に明らかであると考えられる。

【0151】

参考文献

1. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., and Kantarjian, H. M. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 341: 164-172., 1999.
2. Sawyers, C. L. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 340: 1330-1340., 1999.
3. Silver, R. T., Woolf, S. H., Hehlmann, R., Appelbaum, F. R., Anderson, J., Bennett, C., Goldman, J. M., Guilhot, F., Kantarjian, H. M., Lichtin, A. E., Talpaz, M., and Tura, S. An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood*, 94: 1517-1536., 1999.
4. Buchdunger, E., Matter, A., and Druker, B. J. Bcr-Abl inhibition as a modality of CML therapeutics. *Biochim Biophys Acta*, 1551: M11-18., 2001.
5. Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., Zimmermann, J., and Lydon, N. B. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*, 2: 561-566., 1996.
6. Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., Capdeville, R., and Talpaz, M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and a acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*, 344: 1038-1042., 2001.
7. Sawyers, C. L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J. M., Miller, C. B., Ottmann, O. G., Schiffer, C. A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M. W., Fischer, T., O'Brien, S. G., Stone, R. M., Gambacorti-Passerini, C. B., Russell, N. H., Reiffers, J. J., Shea, T. C., Chapuis, B., Coutre, S., Tura, S., Morra, E., Larson, R. A., Saven, A., Peschel, C., Gratwohl, A., Mandelli, F., Ben-Am, M., Gathmann, I., Capdeville, R., Paquette, R. L., and Druker, B. J. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*, 99: 3530-3539., 2002.
8. Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., and Sawyers, C. L. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 293: 876-880., 2001.
9. von Bubnoff, N., Schneller, F., Peschel, C., and Duyster, J. BCR-ABL gene mutations in relation to clinical resistance of Philadelphia-chromosome-positive leukemia to STI571: a prospective study. *Lancet*, 359: 487-491., 2002.
10. Armstrong, S. A., Staunton, J. E., Silverman, L. B., Pieters, R., den Boer, M. L., Minden, M. D., Sallan, S. E., Lander, E. S., Golub, T. R., and Korsmeyer, S. J. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that disti

10

20

30

40

50

inguishes a unique leukemia. *Nat Genet*, 30: 41-47., 2002.

11. Golub, T. R., Slonim, D. K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J. P., Coller, H., Loh, M. L., Downing, J. R., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D., and Lander, E. S. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*, 286: 531-537., 1999.
12. Hofmann, W. K., de Vos, S., Elashoff, D., Gschaidmeier, H., Hoelzer, D., Koefler, H. P., and Ottmann, O. G. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet*, 359: 481-486., 2002. 10
13. Yanagi, M., Shinjo, K., Takeshita, A., Tobita, T., Yano, K., Kobayashi, M., Terasaki, H., Naoe, T., Ohnishi, K., and Ohno, R. Simple and reliably sensitive diagnosis and monitoring of Philadelphia chromosome-positive cells in chronic myeloid leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization of peripheral blood cells. *Leukemia*, 13: 542-552., 1999.
14. Ono, K., Tanaka, T., Tsunoda, T., Kitahara, O., Kihara, C., Okamoto, A., Ochiai, K., Takagi, T., and Nakamura, Y. Identification by cDNA microarray of genes involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res*, 60: 5007-5011., 2000.
15. Okabe, H., Satoh, S., Kato, T., Kitahara, O., Yanagawa, R., Yamaoka, Y., Tsunoda, T., Furukawa, Y., and Nakamura, Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res*, 61: 2129-2137., 2001. 20
16. Lipsick, J. S. and Wang, D. M. Transformation by v-Myb. *Oncogene*, 18: 3047-3055., 1999.
17. Nagai, T., Harigae, H., Ishihara, H., Motohashi, H., Minegishi, N., Tsuchiya, S., Hayashi, N., Gu, L., Andres, B., Engel, J. D., and et al. Transcription factor GATA-2 is expressed in erythroid, early myeloid, and CD34+ human leukemia-derived cell lines. *Blood*, 84: 1074-1084., 1994.
18. Wang, L., Dong, L., Liu, G., and et al. [GATA-2 gene expression in leukemia patients and its significance]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 22: 27-29., 2001. 30
19. Ries, C., Loher, F., Zang, C., Ismail, M. G., and Petrides, P. E. Matrix metalloproteinase production by bone marrow mononuclear cells from normal individuals and patients with acute and chronic myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res*, 5: 1115-1124., 1999.
20. Janowska-Wieczorek, A., Majka, M., Marquez-Curtis, L., Wertheim, J. A., Turner, A. R., and Ratajczak, M. Z. Bcr-abl-positive cells secrete angiogenic factors including matrix metalloproteinases and stimulate angiogenesis in vivo in Matrigel implants. *Leukemia*, 16: 1160-1166., 2002.
21. Fang, G., Kim, C. N., Perkins, C. L., Ramadevi, N., Winton, E., Wittmann, S., and Bhalla, K. N. CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood*, 96: 2246-2253., 2000. 40
22. Ghaffari, S., Kitidis, C., Fleming, M. D., Neubauer, H., Pfeffer, K., and Lodish, H. F. Erythropoiesis in the absence of janus-kinase 2: BCR-ABL induces red cell formation in JAK2(-/-) hematopoietic progenitors. *Blood*, 98: 2948-2957., 2001.
23. Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., Lydon, N. B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., and Sawyers, C. L. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase 50

in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med, 344: 1031-1037., 2001.

24. Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gamba corti-Passerini, C., Niederwieser, D., Resta, D., Capdeville, R., Zoellner, U., Talpaz, M., and Druker, B. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. N Engl J Med, 346: 645-652., 2002.

25. Blanke, C. D., Eisenberg, B. L., and Heinrich, M. C. Gastrointestinal stromal tumors. Curr Treat Options Oncol, 2: 485-491., 2001.

26. van Oosterom, A. T., Judson, I., Verweij, J., Stroobants, S., Donato di Paola, E., Dimitrijevic, S., Martens, M., Webb, A., Sciot, R., Van Glabbeke, M., Silberman, S., and Nielsen, O. S. Safety and efficacy of imatinib (STI571) in metastatic gastrointestinal stromal tumours: a phase I study. Lancet, 358: 1421-1423., 2001.

10

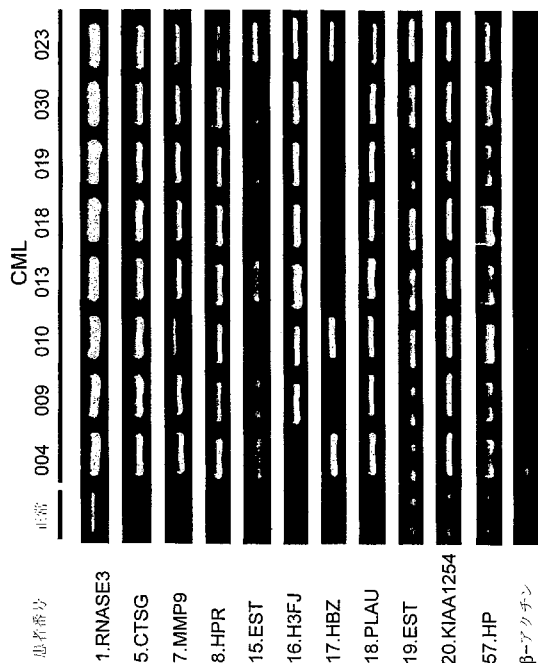
【図面の簡単な説明】

【0152】

【図1】増幅したRNAから調製したcDNAを用いて、半定量的RT-PCRによって調べた代表的な遺伝子11個およびβ-アクチンの発現を示すDNAアガロースゲルの写真である。第一のレーンは、正常な個体におけるそれぞれの遺伝子の発現レベルを示す。残りの8個のレーンはそれぞれ、異なるCML患者における遺伝子の発現レベルを示す。機能が既知または推測されている遺伝子には、遺伝子シンボルを記載し、ESTにはアクセッション番号を記載する。

20

【図1】



【配列表】

2006500944000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 03/10256A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 G01N33/50 A61K35/00 A61K38/00 A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q G01N 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 practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI HUIYU ET AL: "CDNA microarray analysis of chronic myeloid leukemia." INTERNATIONAL JOURNAL OF HEMATOLOGY. IRELAND MAY 2002, vol. 75, no. 4, May 2002 (2002-05), pages 388-393, XP009020831 ISSN: 0925-5710 the whole document	1
X	OHMINE K ET AL: "CHARACTERIZATION OF STAGE PROGRESSION IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA BY DNA MICROARRAY WITH PURIFIED HEMATOPOIETIC STEM CELLS" ONCOGENE, BASINGSTOKE, HANTS, GB, vol. 20, no. 57, 2001, pages 8249-8257, XP002952628 ISSN: 0950-9232 the whole document	1

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in 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 document 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.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2003

Date of mailing of the international search report

25.05.04

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Rutz, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP 03/10256

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 10 August 1993 (1993-08-10), XP002261375 retrieved from EBI Database accession no. X16545 cited in the application abstract	21,22
A	----- MAEDA TAKASHI ET AL: "Growth inhibition of mammalian cells by eosinophil cationic protein." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY / FEBS. GERMANY JAN 2002, vol. 269, no. 1, January 2002 (2002-01), pages 307-316, XP002261370 ISSN: 0014-2956 abstract; table 1	26
A	----- KANETA YASUYUKI ET AL: "Prediction of sensitivity to STI571 among chronic myeloid leukemia patients by genome-wide cDNA microarray analysis." JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH: GANN. JAPAN AUG 2002, vol. 93, no. 8, August 2002 (2002-08), pages 849-856, XP002260979 ISSN: 0910-5050	
A	----- DELILIERIS GIORGIO LAMBERTENGHI ET AL: "Effect of inositol hexaphosphate (IP(6)) on human normal and leukaemic haematopoietic cells." BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY. ENGLAND JUN 2002, vol. 117, no. 3, June 2002 (2002-06), pages 577-587, XP002261371 ISSN: 0007-1048	
A	----- COHEN N ET AL: "Subgroup of patients with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia characterized by a deletion of 9q proximal to ABL gene: expression profiling, resistance to interferon therapy, and poor prognosis." CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS. UNITED STATES 15 JUL 2001, vol. 128, no. 2, 15 July 2001 (2001-07-15), pages 114-119, XP002261372 ISSN: 0165-4608 ----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/JP 03/10256

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MIYAZATO A ET AL: "IDENTIFICATION OF MYELODYSPLASTIC SYNDROME-SPECIFIC GENES BY DNA MICROARRAY ANALYSIS WITH PURIFIED HEMATOPOIETIC STEM CELL FRACTION" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPAGNY, ORLANDO, FL, US, vol. 98, no. 2, 15 July 2001 (2001-07-15), pages 422-427, XP002952629 ISSN: 0006-4971	
A	MUKAI H Y ET AL: "Elevated serum levels of eosinophil major basic protein in patients with myeloproliferative disorders without eosinophilia." INTERNATIONAL JOURNAL OF HEMATOLOGY. IRELAND AUG 1997, vol. 66, no. 2, August 1997 (1997-08), pages 197-202, XP009021081 ISSN: 0925-5710	
A	WO 97/46885 A (PETERSON CHRISTER ;PHARMACIA & UPJOHN AB (SE); VENGE PER (SE)) 11 December 1997 (1997-12-11)	
P,X	QIAN ZHIJIAN ET AL: "Expression profiling of CD34+ hematopoietic stem/ progenitor cells reveals distinct subtypes of therapy-related acute myeloid leukemia." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. UNITED STATES 12 NOV 2002, vol. 99, no. 23, 12 November 2002 (2002-11-12), pages 14925-14930, XP002261373 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-3
P,X	NOWICKI MICHAL OSKAR ET AL: "Chronic myelogenous leukemia molecular signature." ONCOGENE. ENGLAND 19 JUN 2003, vol. 22, no. 25, 19 June 2003 (2003-06-19), pages 3952-3963, XP002261374 ISSN: 0950-9232 the whole document	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/JP 03/10256

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13-15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 23-29 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 21, 27, 28, 32
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 6-12, 16-26, 28, 30-32 (all partially)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ JP 03 /10256

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 23-29 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 13-15

Rule 39.1(v) PCT - Presentation of information

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 21,27,28,32

Present claims 21, 27, 28 and 32 relate to an extremely large number of possible compounds. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to antisense polynucleotides, small interfering RNA and antibodies.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

International Application No. PCT/ JP 03/10256

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-3, 6-12, 16-26, 28, 30-32 (all partially)

method for diagnosing CML, comprising determining the level of expression of the CML-associated gene CML 1 in a patient, wherein an increase in said level compared to a normal control indicates that said subject suffers from or is at risk of developing CML; method of screening for a compound, which binds, reduces expression or suppresses biological activity of CML 1; methods of treatment and pharmaceutical compositions comprising CML 1 or antisense molecules, siRNAs or antibodies against CML 1

Inventions 2-190: claims 1-3, 6-12, 16-26, 28, 30-32 (all partially)

method for diagnosing CML, comprising determining the level of expression of the CML-associated gene CML 2-190 in a patient, wherein an increase in said level compared to a normal control indicates that said subject suffers from or is at risk of developing CML; method of screening for a compound, which binds, reduces expression or suppresses biological activity of CML 2-190; methods of treatment and pharmaceutical compositions comprising CML 2-190 or antisense molecules, siRNAs or antibodies against CML 2-190

Inventions 191-296: claims 1, 4-12, 16-22, 27-29, 32 (all partially)

method for diagnosing CML, comprising determining the level of expression of the CML-associated gene CML 191-296 in a patient, wherein a decrease in said level compared to a normal control indicates that said subject suffers from or is at risk of developing CML; method of screening for a compound, which binds, elevates expression or enhances biological activity of CML 191-296; methods of treatment and pharmaceutical compositions comprising CML 191-296 or a compound that increases expression of CML 191-296

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/JP 03/10256

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9746885	A	11-12-1997	EP 0927354 A1	07-07-1999
			JP 2000516702 T	12-12-2000
			WO 9746885 A1	11-12-1997

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 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	4 C 0 8 6
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A 4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	F
	C 0 7 K 16/18	

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

(72)発明者 片桐 豊雅

東京都品川区東五反田 2-10-11-305

Fターム(参考) 2G045 AA34 AA35 CB01 DA13 DA36 FB03
 4B024 AA01 AA12 CA01 CA04 CA11 HA14
 4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC03 CC08 FA15
 4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ13 QQ43 QQ52 QR08
 QR32 QR56 QR62 QR69 QR77 QR80 QR84 QS25 QS34 QX02
 4C084 AA13 AA17 MA17 MA23 MA35 MA37 MA38 MA52 MA56 MA59
 MA60 MA63 MA66 NA14 ZB272
 4C085 AA03 AA14 AA16 BB01 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 MA17 MA23 MA35 MA37
 MA38 MA52 MA56 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZB27
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA41 DA76 EA28 EA51 FA72

专利名称(译)	诊断慢性粒细胞白血病的方法		
公开(公告)号	JP2006500944A	公开(公告)日	2006-01-12
申请号	JP2004541212	申请日	2003-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	肿瘤疗法科学股份有限公司 国立大学法人 东京大学		
申请(专利权)人(译)	ONCO疗法科学股份有限公司 东京大学		
[标]发明人	中村祐輔 片桐豊雅		
发明人	中村 祐輔 片桐 豊雅		
IPC分类号	C12Q1/68 A61K31/7088 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P35/02 C12M1/00 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00 C12N15/09 C07K16/18 A61K38/00 C07K14/47 C12N15/12 G01N33/574		
CPC分类号	C12Q1/6883 A61K39/0011 C07K14/47 C12Q1/6886 C12Q2600/136 C12Q2600/158 G01N33/57426 G01N2500/04		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/00.H A61K39/395.T A61K45/00 A61K48/00 A61P35/02 C12M1/00.A C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.F C07K16/18		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/CC08 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR84 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA38 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZB272 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/MA17 4C086/MA23 4C086/MA35 4C086/MA37 4C086/MA38 4C086/MA52 4C086/MA56 4C086/MA59 4C086/MA60 4C086/MA63 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZB27 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA41 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA72		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/414867 2002-09-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文描述了用于检测和诊断慢性髓性白血病 (CML) 的客观方法。在一个实施方案中, 诊断方法包括确定区分CML细胞和正常细胞的CML相关基因的表达水平的步骤。本发明进一步提供了筛选可用于治疗CML的治疗剂的方法, 治疗CML的方法, 以及将受试者接种于抗CML疫苗的方法。

プロット	10	4レ/200000	60	1000000		
1	100	22	22	X16545	RNASE3	リボヌクレアーゼ、RNアーゼ Aファミリー、3 (好酸球腸イオンタンパク質)
2	100	22	22	J04739	BPI	殺菌/透過性増加タンパク質
3	100	22	22	M21130	DEFA1	デフェンシン、α 1、骨髄関連配列
4	100	22	22	X56351	ALAS1	アミノレブリン酸、δ -, シンターゼ 1
5	100	21	21	M16117	CTSG	カタプシン G
6	100	21	21	M34379	ELA2	エラスターゼ 2、好中球
7	100	20	20	J05070	MMP9	マトリクスメタロプロテナーゼ 9 (ゼラチナーゼ B, 92 kDa, ゼラチナーゼ、92 kD IV 型コラゲナーゼ)
8	100	20	20	K03431	HPR	ハプトグロビン関連タンパク質
9	100	20	20	F21002	EST	EST
10	100	19	19	X17042	PRG1	プロテオグリカン 1、分泌顆粒
11	100	19	19	M14502	ARG1	アルギナーゼ、肝臓
12	100	18	18	L06895	MAD	MAX 二量体形成タンパク質
13	100	18	18	M69199	G0S2	推定のリンパ球 G0/G1 スイッチ遺伝子
14	100	17	17	K01763	HP	ハプトグロビン
15	100	16	16	H23213	EST	EST
16	100	16	16	Z98744	H3FJ	H3 ヒストンファミリー、メンバー J
17	100	15	15	M24173	HBZ	ヘモグロビン、ζ
18	100	15	15	X02419	PLAU	プラスミノゲン活性化因子、ウロキナーゼ
19	100	15	15	H48537	EST	EST
20	100	15	15	AA191449	KIAA1254	KIAA1254 タンパク質
21	100	15	15	AI022380	EST	EST
22	100	15	15	T03595		ヒト(Homo sapiens) cDNA FLJ126888 ns、クローニン NT2RM4002534
23	100	14	14	X57129	H1F2	H1 ヒストンファミリー、メンバー 2
24	100	14	14	AA382504	EST	EST
25	100	13	13	R26792	GCL	グラシカルシン
26	100	12	12	AA815247	EST	EST
27	100	11	11	M81637	GCL	グラシカルシン