

(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2015-519565  
(P2015-519565A)

(43) 公表日 平成27年7月9日(2015.7.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B O 6 3
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 133 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-511765 (P2015-511765)  
 (86) (22) 出願日 平成25年5月10日 (2013. 5. 10)  
 (85) 翻訳文提出日 平成27年1月6日 (2015. 1. 6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/040585  
 (87) 国際公開番号 W02013/170176  
 (87) 国際公開日 平成25年11月14日 (2013. 11. 14)  
 (31) 優先権主張番号 61/645, 253  
 (32) 優先日 平成24年5月10日 (2012. 5. 10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/780, 252  
 (32) 優先日 平成25年3月13日 (2013. 3. 13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514284671  
 ユートロピクス ファーマシューティカルズ、  
 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2  
 1 3 8, ケンブリッジ, コンコード  
 アベニュー 7 6 7-シー  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がんに対する補助的機能診断テスト

(57) 【要約】

本発明は、種々のがんに関連し、BH3プロファイリング診断方法に対する改善を含む診断方法に関する。一つの実施形態において、患者のためのがん処置を決定するための方法であって、該患者の腫瘍試料またはがん細胞試料についてのBH3プロフィールを決定する工程；該患者の一つまたは複数の臨床因子を決定する工程；および該患者を、一つまたは複数のがん処置に対する臨床応答の可能性について分類する工程；を含み、該一つまたは複数の臨床因子が、臨床応答との関連についての該BH3プロフィールの特異度および/または感度を増大させるように選択される、方法が提供される。

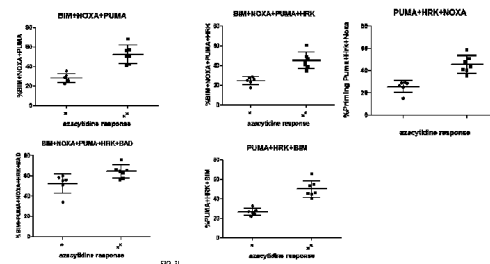


FIG. 3

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者のためのがん処置を決定する方法であって、

該患者の腫瘍試料またはがん細胞試料についての B H 3 プロフィールを決定する工程；

該患者の一つまたは複数の臨床因子を決定する工程；および

該患者を、一つまたは複数のがん処置に対する臨床応答の可能性について分類する工程

；

を含み、該一つまたは複数の臨床因子が、臨床応答との関連について該 B H 3 プロフィールの特異度および / または感度を増大させるように選択される、方法。

## 【請求項 2】

前記がんが、血液がんである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記血液がんが、急性骨髄性白血病 ( A M L )、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病 ( A L L )、慢性リンパ性白血病、および非ホジキンリンパ腫から選択される、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記非ホジキンリンパ腫が、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫から選択される、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記がんが固形腫瘍である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記固形腫瘍が、非小細胞性肺癌 ( non - small lung cell carcinoma )、卵巣がん、および黒色腫から選択される、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

がん処置が、抗がん薬剤、化学療法、外科手術、アジュバント療法、およびネオアジュバント療法のうちの一つまたは複数である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記がん処置が、B H 3 ミメティック、エピジェネティック修飾剤、トポイソメラーゼ阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、およびキネシンスピンドルタンパク質安定剤のうちの一つまたは複数である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記がん処置が、プロテアソーム阻害剤である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記がん処置が、細胞周期制御の調節剤である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 11】

細胞周期制御の前記調節剤が、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤である、請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

がん処置が、細胞のエピジェネティック機構の調節剤である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 13】

エピジェネティック機構の前記調節剤が、ポリノスタットまたはエンチノスタットのうちの一つまたは複数を含む、ヒストンデアセチラーゼ ( H D A C ) の阻害剤である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

エピジェネティック機構の前記調節剤が、アザシチジンである、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 15】

エピジェネティック機構の前記調節剤が、デシタピンである、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 16】

。請求項 12 に記載の方法。

10

20

30

40

50

がん処置が、アントラサイクリンまたはアントラセンジオンである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 17】

前記アントラサイクリンまたはアントラセンジオンが、エピルピシン、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、ダウノルピシン、イダルピシンのうちの一つまたは複数である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

がん処置が、プラチナベースの治療剤である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 19】

前記プラチナベースの治療剤が、カルボプラチン、シスプラチン、およびオキサリプラチンのうちの一つまたは複数である、請求項 18 に記載の方法。

10

【請求項 20】

がん処置が、シタラビンまたはシタラビンベースの化学療法である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 21】

がん処置が、BH3ミメティックである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 22】

前記BH3ミメティックが、BCL2、BCLXL、およびMCL1のうちの一つまたは複数である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

がん処置が、MCL1の阻害剤である、請求項 7 に記載の方法。

20

【請求項 24】

前記BH3プロファイリングが、  
前記患者のがん細胞を透過処理する工程、  
該透過処理した細胞と一つまたは複数のBH3ドメインペプチドとの接触の際に、ミトコンドリア膜電位の変化を決定する工程；および  
ミトコンドリア膜電位の低下を、該細胞のアポトーシス誘導性化学療法剤への化学療法感受性と関連付ける工程  
を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

前記BH3プロファイリングが、ペプチドの使用を含み、該ペプチドが、BIM、BIM2A、BAD、BID、HRK、PUMA、NOXA、BMF、BIK、およびPUMA2Aのうちの一つまたは複数である、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 26】

前記ペプチドが、0.1 μM ~ 200 μMの濃度で使用される、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記試料が、凍結腫瘍組織試料、培養細胞、循環腫瘍細胞、およびホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織試料から選択されるバイオプシーである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 28】

前記試料が、ヒト腫瘍由来の細胞株である、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 29】

前記試料が、がん幹細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 30】

前記試料が、固形腫瘍のバイオプシーに由来する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 31】

前記試料が、直腸結腸、胸部、前立腺、肺、膵臓、腎臓、または卵巣の原発腫瘍のバイオプシーに由来する、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記試料が、上皮起源の試料である、請求項 1 に記載の方法。

50

## 【請求項 3 3】

前記上皮試料が、抗上皮細胞接着分子（E p C A M）、または固体マトリクスもしくはビーズに結合した他の上皮細胞結合抗体を用いた、バイオプシーサンプルからの選択により濃縮される、請求項 3 2 に記載の方法。

## 【請求項 3 4】

前記試料が、間葉起源の試料である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3 5】

前記間葉試料が、神経細胞接着分子（N - C A M）、もしくはニューロピリン、または固体マトリクスもしくはビーズに結合した他の間葉細胞結合抗体を用いた、バイオプシーサンプルからの選択により濃縮される、請求項 3 4 に記載の方法。

10

## 【請求項 3 6】

前記試料が、非固形腫瘍のバイオプシー由来する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3 7】

前記試料が、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、マンツル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、および非ホジキンリンパ腫を有する患者のバイオプシー由来する、請求項 3 6 に記載の方法。

## 【請求項 3 8】

前記試料が、固体マトリクスもしくはビーズに結合した抗 C D 1 3 8 抗体を用いた、バイオプシーサンプルからの選択により濃縮された多発性骨髄腫細胞である、請求項 3 7 に記載の方法。

20

## 【請求項 3 9】

前記がん細胞が、C D 4 5 に対する抗体への結合により濃縮された急性骨髄性白血病である、請求項 3 7 に記載の方法。

## 【請求項 4 0】

前記がん細胞が、非 B 細胞の枯渇により濃縮された慢性リンパ性白血病またはびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫である、請求項 3 7 に記載の方法。

## 【請求項 4 1】

前記試料が、循環腫瘍細胞由来する、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4 2】

前記臨床因子が、年齢、細胞遺伝学的状態、パフォーマンス（performance）、組織学的サブクラス（histological subclass）、性別、および疾患の状態のうちの一つまたは複数である、請求項 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 4 3】

変異の状態、一塩基多型、定常状態のタンパク質レベル、および動的なタンパク質レベル、から選択されるさらなるバイオマーカーの測定をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4 4】

前記患者における臨床応答を予測する工程をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4 5】

前記臨床応答が、少なくとも約 1 年、約 2 年、約 3 年、または約 5 年の無増悪生存 / 無再発生存である、請求項 4 4 に記載の方法。

40

## 【請求項 4 6】

臨床応答の前記可能性が、以下の式：

## 【数 1】

$$\% \text{プライミング} = \left[ 100 * \left( \frac{\text{DMSO AUC} - \text{ペプチド}_1 \text{ AUC}}{\text{DMSO AUC} - \text{CCCP}_{\text{平均}} \text{ AUC}} \right) \right] \text{ペプチド}_1 + \left[ 100 * \left( \frac{\text{DMSO AUC} - \text{ペプチド}_2 \text{ AUC}}{\text{DMSO AUC} - \text{CCCP}_{\text{平均}} \text{ AUC}} \right) \right] \text{ペプチド}_2 + \dots / (n \text{ ペプチド})$$

50

により定義され、

式中：

該 A U C は、曲線下面積またはシグナル強度のいずれかを含み；

該 D M S O は、ベースラインのネガティブコントロールを含み；

該 C C C P (カルボニルシアニド m - クロロフェニルヒドラゾン) は、ミトコンドリア内の電子伝達鎖における電子担体の正常な活性が、ベースラインのポジティブコントロールを含む間に確立されたプロトン勾配の脱共役剤として機能することによる、タンパク質合成のエフェクターを含む、

請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記曲線下面積は、均質な時間分解蛍光 ( H T R F ) により確立される、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記時間が、約 0 分 ~ 約 3 0 0 分から約 0 分 ~ 約 3 0 分のウィンドウの間に生じる、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記曲線下面積は、蛍光活性化細胞選別 ( F A C S ) により確立される、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記シグナル強度が、約 5 分 ~ 約 3 0 0 分の間に生じる単一時点の測定点である、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 5 1】

B H 3 プロフィール、ならびに細胞表面マーカー C D 3 3、細胞表面マーカー C D 3 4、F L T 3 変異状態、p 5 3 変異状態、M E K - 1 キナーゼのリン酸化状態、および B c l - 2 の位置 7 0 におけるセリンのリン酸化のうちの一つまたは複数を決定する工程；ならびに

シタラビンまたはシタラビンベースの化学療法および / またはアザシチジンによる A M L 患者の処置の有効性を相関付ける工程

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 2】

B H 3 プロフィール、ならびに細胞表面マーカー C D 3 3、細胞表面マーカー C D 3 4、F L T 3 変異状態、p 5 3 変異状態、M E K - 1 キナーゼのリン酸化状態、および B c l - 2 の位置 7 0 におけるセリンのリン酸化のうちの一つまたは複数を決定する工程；ならびに

化学療法による M M 患者の処置の有効性を相関付ける工程

を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記がんが、A M L および / または M M であり、前記臨床因子が、年齢プロフィールおよび / または細胞遺伝学的状態である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記がんが、A M L および / または M M であり、前記がん処置が、シタラビンまたはシタラビンベースの化学療法および / またはアザシチジンである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記がん処置が、シタラビンまたはシタラビンベースの化学療法および / またはアザシチジンであり、前記臨床因子が、年齢プロフィールおよび / または細胞遺伝学的状態である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記がん処置が、シタラビンまたはシタラビンベースの化学療法および / またはアザシチジンであり；前記がんが、A M L および / または M M であり；かつ前記臨床因子が、年齢プロフィールおよび / または細胞遺伝学的状態である、請求項 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 57】

患者のためのがん処置を決定する方法であって、  
 該患者の透過処理されたがん細胞を、一つまたは複数のBH3ドメインペプチドと接触させる工程；

該患者のがん細胞の一つまたは複数の臨床因子の存在または非存在を、免疫組織化学、および/または蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)によって決定する工程；ならびに

該患者を、一つまたは複数のがん処置に対する臨床応答の可能性について分類する工程を含む、方法。

## 【請求項 58】

シタラピンおよび/またはアザシチジンに対するAML患者の応答を決定する方法であって、

該患者のAMLがん細胞試料についてのBH3プロフィールを決定する工程；

該患者の一つまたは複数の臨床因子を決定する工程であって、該一つまたは複数の臨床因子が年齢プロフィールおよび/または細胞遺伝学的状態から選択される工程；ならびに  
 該患者を、一つまたは複数のがん処置に対する臨床応答の可能性について分類する工程を含む、方法。

## 【請求項 59】

BH3プロフィールを決定する工程が、前記患者のAMLがん細胞試料をBIMと接触させる工程を含む、請求項58に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

この申請書はアメリカ合衆国仮出願No. 61/645,253、申請日2012年5月10日申請とアメリカ合衆国仮出願No. 61/780,252、申請日2013年3月13日の利益を特許申請するものである。

発明の領域について

## 【0002】

本発明は人体から採取された試料中に存在する腫瘍の評価を行う方法に関するものである。

## 【背景技術】

## 【0003】

背景

癌治療の予防或は予後予見が可能なバイオマーカーは薬剤の開発に要する時間、薬効の改善また、臨床医の治療法新決定に非常に重要な役割を果たすであろう。近年の癌治療法の進歩にもかかわらず、化学療法剤は依然として多くの症例であまり効率的でなく効果もない。この化学療法に余り効果が認められない理由の一つは化学療法薬が患者個人個人の癌に適した選択がなされていない為である事が考えられる。癌の種類に従って個別化された薬剤を使うことができればこの問題は解決できる。

## 【0004】

現在 臨床癌医療領域で使用されているほんの一握りのバイオマーカーしか有用性を認められていない。これは部分的ではあるが感知マーカーがしばしば薬剤の作用機序に相関的であるだけで病因的には関係しない事によっている。もしそのバイオマーカーがある併用治療の薬理学的作用と生物学的に一致したとしても薬剤が患者にどのように作用するかを予測するのは非常に難しいことである。それ以上に、臨床的なバイオマーカー開発への道には患者の利益を考慮して、また検査の値を実際に見る事の出来る臨床化学者の寄与が必須である。

## 【0005】

10

20

30

40

50

BH3プロファイリングは癌細胞の化学療法に対する反応性にとって重要な因子の機能を測定するものである。具体的には、BH3プロファイリングはミトコンドリア上において細胞死を調節する蛋白の機能を測定するものである。多くの化学療法で細胞死のメカニズムを利用しているものは効果がある。このテストからはBH3のみを持つ細胞死誘導性蛋白がミトコンドリア依存性の細胞死を誘導できるかどうかと言う事が明らかにできる。BH3プロファイリングは化学療法に対する反応性について一定の情報を提供できるものではあるが、このプロファイリングに寄ってある特定の癌に対する化学療法に対する反応性の予測能力はない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0006】

発明のサマリー

結果的に、一つの側面として、この発明は患者個人の癌治療方法決定に寄与できる、それは患者の癌組織或は癌細胞の試料を用いてBH3プロファイルを決定する；一つ或はそれ以上の臨床因子の決定と一つ或はそれ以上の癌治療に対する臨床的治療反応性をもって患者を区分できる、つまり、一つ或はそれ以上の臨床因子が選択されそれによって臨床的治療反応性に関連して特異性と感受性の上昇を見る事による。

【0007】

ある実施形態において、ここに示すように、様々な臨床的因子は、それが細胞死と関わっていないくても細胞死と関係ある事が知られていないとに関わらず、BH3プロファイリングの予知的な能力を高める、このテストを予知的にすることはできるがしかしただ単に予後的ではない、テスト。

20

【0008】

ある実施形態において、この方法は細胞遺伝学的にまたは年齢を合わせた白血病患者に対するシタラピン、シタラピン主体の化学療法、或はアザシチジンに対する反応を予知できる。BH3プロファイリングを使った診断学的なテストはミトコンドリア膜電位の変化を測定するようなBimに対するテストである。

【0009】

他の側面として、この発明は患者にふさわしい癌治療方針を決めるものである。これは患者癌細胞用いて一つ以上のBH3ペプチドが細胞膜透過性を亢進させた細胞プライミングの程度を比較する、一つ以上の臨床因子との関連性を免疫染色、FISH法をもちいて決定する、患者が幾つかの癌治療に対して反応するか否かのクラス分けをする事に寄っている。

30

【0010】

他の側面として、この発明は急性骨髄性白血病の患者がシタラピンやアザシチジンに対して反応するか否かを決定する為の方法を規定する、それは以下を包含する：BH3プロファイル患者のAML細胞で調べて幾つかの臨床因子を患者ごとに決定することと、年齢と癌細胞の細胞遺伝学的な性質を比べる事で患者の幾つかの癌治療に対する反応予測でクラス分けする。

【0011】

この発明の詳しい内容は下記に記す通りである。ここで記載する方法や使用する試料はこの発明を臨床或は試験的に使用する場合と同じか類似のものである。方法と試料についてはここで記述する。他にこの発明についての特徴、目的、利点は以下の記述および特許請求の範囲で記される。特許明細書及び、付録の特許請求の範囲では、内容が明らかに決定づけられ無い限り単数形は複数形も含まれる。定義されない限り、すべての技術的科学的な用語はこの発明が含まれている技術に置ける普遍的な記述の一つに寄って普通に理解される意味と同じである。

40

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1-1】図1は、代表的なBH3プロファイリングデータを示す。この図は、高いプ

50

ライミング細胞株対低いライミング細胞株のパターンの違いを示す。MRL - 14は、MRL - 11と比較して、BIM 0.3、PUMA 0.3、およびNOXAについて高度にライミングされる(MTSアッセイによる治療阻害剤活性と相関する)。

【図1-2】図1は、代表的なBH3プロファイリングデータを示す。この図は、高いライミング細胞株対低いライミング細胞株のパターンの違いを示す。MRL - 14は、MRL - 11と比較して、BIM 0.3、PUMA 0.3、およびNOXAについて高度にライミングされる(MTSアッセイによる治療阻害剤活性と相関する)。

【図1-3】図1は、代表的なBH3プロファイリングデータを示す。この図は、高いライミング細胞株対低いライミング細胞株のパターンの違いを示す。MRL - 14は、MRL - 11と比較して、BIM 0.3、PUMA 0.3、およびNOXAについて高度にライミングされる(MTSアッセイによる治療阻害剤活性と相関する)。

【図1-4】図1は、代表的なBH3プロファイリングデータを示す。この図は、高いライミング細胞株対低いライミング細胞株のパターンの違いを示す。MRL - 14は、MRL - 11と比較して、BIM 0.3、PUMA 0.3、およびNOXAについて高度にライミングされる(MTSアッセイによる治療阻害剤活性と相関する)。

【0013】

【図2】図2は治療抑制活性と増殖抑制EC50 MTSアッセーの代表的なデータを示す。

【0014】

【図3-1】図3は8つの接着細胞株でのBH3プロファイル。各々のペプチドと細胞株の4-6のREPLICATESで限定的標準偏差

【図3-2】図3は8つの接着細胞株でのBH3プロファイル。各々のペプチドと細胞株の4-6のREPLICATESで限定的標準偏差

【図3-3】図3は8つの接着細胞株でのBH3プロファイル。各々のペプチドと細胞株の4-6のREPLICATESで限定的標準偏差

【図3-4】図3は8つの接着細胞株でのBH3プロファイル。各々のペプチドと細胞株の4-6のREPLICATESで限定的標準偏差

【0015】

【図4-1】図4は9つの浮遊細胞株でのBH3プロファイル。各々のペプチドと細胞株の4-6のREPLICATESで限定的標準偏差

【図4-2】図4は9つの浮遊細胞株でのBH3プロファイル。各々のペプチドと細胞株の4-6のREPLICATESで限定的標準偏差

【図4-3】図4は9つの浮遊細胞株でのBH3プロファイル。各々のペプチドと細胞株の4-6のREPLICATESで限定的標準偏差

【図4-4】図4は9つの浮遊細胞株でのBH3プロファイル。各々のペプチドと細胞株の4-6のREPLICATESで限定的標準偏差

【図4-5】図4は9つの浮遊細胞株でのBH3プロファイル。各々のペプチドと細胞株の4-6のREPLICATESで限定的標準偏差

【0016】

【図5】図5は浮遊細胞株でのBH3プロファイリング。BIM, BIM\_PUMAモデルはCDK抑制活性を識別する。

【0017】

【図6-1】図6は浮遊細胞株でのBH3プロファイル。BIM, BIM\_PUMAモデルはCDK抑制活性を識別する。

【図6-2】図6は浮遊細胞株でのBH3プロファイル。BIM, BIM\_PUMAモデルはCDK抑制活性を識別する。

【図6-3】図6は浮遊細胞株でのBH3プロファイル。BIM, BIM\_PUMAモデルはCDK抑制活性を識別する。

【図6-4】図6は浮遊細胞株でのBH3プロファイル。BIM, BIM\_PUMAモデルはCDK抑制活性を識別する。

10

20

30

40

50

- 【 0 0 1 8 】  
 【 図 7 - 1 】 図 7 は M C L 1 抑制剤 E C 5 0 と プライミング を 表 して いる、 浮 遊 細 胞 と 個 々の ペ プ チ ド  
 【 図 7 - 2 】 図 7 は M C L 1 抑制剤 E C 5 0 と プライミング を 表 して いる、 浮 遊 細 胞 と 個 々の ペ プ チ ド  
 【 図 7 - 3 】 図 7 は M C L 1 抑制剤 E C 5 0 と プライミング を 表 して いる、 浮 遊 細 胞 と 個 々の ペ プ チ ド
- 【 0 0 1 9 】  
 【 図 8 - 1 】 図 8 は M C L 1 抑制剤 E C 5 0 と プライミング を 表 して いる、 浮 遊 細 胞 と 複 数の ペ プ チ ド 由 来 の アルゴリズ ム。  
 【 図 8 - 2 】 図 8 は M C L 1 抑制剤 E C 5 0 と プライミング を 表 して いる、 浮 遊 細 胞 と 複 数の ペ プ チ ド 由 来 の アルゴリズ ム。  
 【 図 8 - 3 】 図 8 は M C L 1 抑制剤 E C 5 0 と プライミング を 表 して いる、 浮 遊 細 胞 と 複 数の ペ プ チ ド 由 来 の アルゴリズ ム。
- 【 0 0 2 0 】  
 【 図 9 - 1 】 図 9 は M C L 1 抑制剤 E C 5 0 と プライミング を 表 して いる、 浮 遊 細 胞、 接 着 細 胞 株 と 個 々の ペ プ チ ド  
 【 図 9 - 2 】 図 9 は M C L 1 抑制剤 E C 5 0 と プライミング を 表 して いる、 浮 遊 細 胞、 接 着 細 胞 株 と 個 々の ペ プ チ ド  
 【 図 9 - 3 】 図 9 は M C L 1 抑制剤 E C 5 0 と プライミング を 表 して いる、 浮 遊 細 胞、 接 着 細 胞 株 と 個 々の ペ プ チ ド
- 【 0 0 2 1 】  
 【 図 1 0 - 1 】 図 1 0 は M C L 1 抑制剤 と プライミング パーセンテージ を 表 して いる、 浮 遊 細 胞 と 個 々の ペ プ チ ド 由 来 アルゴリズ ム  
 【 図 1 0 - 2 】 図 1 0 は M C L 1 抑制剤 と プライミング パーセンテージ を 表 して いる、 浮 遊 細 胞 と 個 々の ペ プ チ ド 由 来 アルゴリズ ム  
 【 図 1 0 - 3 】 図 1 0 は M C L 1 抑制剤 と プライミング パーセンテージ を 表 して いる、 浮 遊 細 胞 と 個 々の ペ プ チ ド 由 来 アルゴリズ ム
- 【 0 0 2 2 】  
 【 図 1 1 - 1 】 図 1 1 は キネシン 紡錘 蛋 白 抑制剤 ( K S P I N H )、 多 発 性 骨 髄 腫、 白 血 病 細 胞 株  
 【 図 1 1 - 2 】 図 1 1 は キネシン 紡錘 蛋 白 抑制剤 ( K S P I N H )、 多 発 性 骨 髄 腫、 白 血 病 細 胞 株
- 【 0 0 2 3 】  
 【 図 1 2 - 1 】 図 1 2 A - D は B H 3 プロファイイング 代 表 的 な 患 者 デー タ  
 【 図 1 2 - 2 】 図 1 2 A - D は B H 3 プロファイイング 代 表 的 な 患 者 デー タ
- 【 0 0 2 4 】  
 【 図 1 3 】 図 1 3 A - B は シタラビン 治 療 後 の 急 性 骨 髄 性 白 血 病 患 者 ドットプロット、 と R O C プロット は B I M 患 者 反 応 を 表 した
- 【 0 0 2 5 】  
 【 図 1 4 - 1 】 図 1 4 は シタラビン 治 療 後 の 治 療 反 応 な し ( N R ) と 完 全 な 反 応 性 を 有 する ( C R ) 急 性 骨 髄 性 白 血 病 患 者 B H 3 ペ プ チ ド の B H 3 プロファイル  
 【 図 1 4 - 2 】 図 1 4 は シタラビン 治 療 後 の 治 療 反 応 な し ( N R ) と 完 全 な 反 応 性 を 有 する ( C R ) 急 性 骨 髄 性 白 血 病 患 者 B H 3 ペ プ チ ド の B H 3 プロファイル  
 【 図 1 4 - 3 】 図 1 4 は シタラビン 治 療 後 の 治 療 反 応 な し ( N R ) と 完 全 な 反 応 性 を 有 する ( C R ) 急 性 骨 髄 性 白 血 病 患 者 B H 3 ペ プ チ ド の B H 3 プロファイル  
 【 図 1 4 - 4 】 図 1 4 は シタラビン 治 療 後 の 治 療 反 応 な し ( N R ) と 完 全 な 反 応 性 を 有 する ( C R ) 急 性 骨 髄 性 白 血 病 患 者 B H 3 ペ プ チ ド の B H 3 プロファイル
- 【 0 0 2 6 】  
 【 図 1 5 】 図 1 5 は シタラビン 治 療 後 の 急 性 骨 髄 性 白 血 病 患 者 の 多 変 数 解 析 R O C カ ー ブ

【0027】

【図16-1】図16A-HはBH3ペプチド反応性の予測を細胞遺伝学的状況に寄って階層化

【図16-2】図16A-HはBH3ペプチド反応性の予測を細胞遺伝学的状況に寄って階層化

【図16-3】図16A-HはBH3ペプチド反応性の予測を細胞遺伝学的状況に寄って階層化

【図16-4】図16A-HはBH3ペプチド反応性の予測を細胞遺伝学的状況に寄って階層化

【0028】

【図17-1】図17A-Eはシタラピン治療後の急性骨髄性白血病患者のBIM(0.1)プライミングとBIM(BCL2L11)蛋白発現と治療反応予測。

【図17-2】図17A-Eはシタラピン治療後の急性骨髄性白血病患者のBIM(0.1)プライミングとBIM(BCL2L11)蛋白発現と治療反応予測。

【0029】

【図18】図18は全生存期間(OS) EFS 無再発生存と BIM(0.1)のパーセントプライミングによってグループ分けされた 急性骨髄性白血病患者

【0030】

【図19-1】図19はBH3プロファイリング基準の分配 解析、個々のBH3ペプチドモデル。

【図19-2】図19はBH3プロファイリング基準の分配 解析、個々のBH3ペプチドモデル。

【図19-3】図19はBH3プロファイリング基準の分配 解析、個々のBH3ペプチドモデル。

【0031】

【図20】図20はBH3プロファイリング基準の分配 解析、複合BH3ペプチドモデル(2つのペプチド)。

【0032】

【図21-1】図21はBH3プロファイリング基準の分配 解析、複合BH3ペプチドモデル(3/4つのペプチド)。

【図21-2】図21はBH3プロファイリング基準の分配 解析、複合BH3ペプチドモデル(3/4つのペプチド)。

【0033】

【図22-1】図22は BH3プロファイリング基準の連続的変数解析、個々のBH3ペプチドモデル

【図22-2】図22は BH3プロファイリング基準の連続的変数解析、個々のBH3ペプチドモデル

【0034】

【図23】図23は BH3プロファイリング基準の連続的変数解析、複合BH3 ペプチドモデル(2つのペプチド)

【0035】

【図24-1】図24は BH3プロファイリング基準の連続的変数解析、個々のBH3ペプチドモデル(3/4ペプチド)

【図24-2】図24は BH3プロファイリング基準の連続的変数解析、個々のBH3ペプチドモデル(3/4ペプチド)

【0036】

【図25】図25はアザシチジン治療のコホートから代表的な急性骨髄性白血病患者のBH3プロファイリングはプライミング値のfull治療的スケールが使われた事を示す。

【0037】

【図26-1】図26は急性骨髄性白血病患者のアザシチジン反応性のBIM+NOXA

10

20

30

40

50

区別はB I MあるいはN O X A単独よりも良い ( s u p e r i o r ) .

【図26-2】図26は急性骨髄性白血病患者のアザシチジン反応性のB I M + N O X A区別はB I MあるいはN O X A単独よりも良い ( s u p e r i o r ) .

【図26-3】図26は急性骨髄性白血病患者のアザシチジン反応性のB I M + N O X A区別はB I MあるいはN O X A単独よりも良い ( s u p e r i o r ) .

【図26-4】図26は急性骨髄性白血病患者のアザシチジン反応性のB I M + N O X A区別はB I MあるいはN O X A単独よりも良い ( s u p e r i o r ) .

【0038】

【図26-5】表1は細胞株による治療抑制剤反応とB H 3プロファイリングのc o m p i l a t i o nを表す。

【図26-6】表1は細胞株による治療抑制剤反応とB H 3プロファイリングのc o m p i l a t i o nを表す。

【0039】

【図26-7】表2はM C L - 1抑制剤のサポートデータのまとめである

【0040】

【図26-8】表3はシタラピン治療後の急性骨髄性白血病患者の患者コフォーとの為の臨床病理的な変数を表す

【0041】

【図26-9】表4はシタラピン治療後急性骨髄性白血病患者。B H 3プロファイリングバイオマーカー解析と区別反応性の重要性。

【0042】

【図26-10】表5は細胞株でのアザシチジン効果のまとめ、分割或は連続的変数モデル。

【発明を実施するための形態】

【0043】

詳しい記載

この発明の基礎になっているのは、一部であっても、B H 3プロファイリングの感受性や特異性がある特定の臨床因子を含める事に寄って非常に改善するという発見である。

ここに記載する診断的手法はB H 3の反応性を利用する解析法であり、悪性腫瘍に置ける治療の効果を予想する為の臨床的な指標となる、この時B H 3が細胞死の調節因子であるが細胞死とは直接関係ないような臨床因子も含まれる。例えば、この発明は白血病の患者に置けるシタラピンやアザシチジンを元にした化学療法レジメに対する反応性がB H 3プロファイルと年齢、癌の細胞遺伝学的な特徴に寄って予想できる事にある。

【0044】

ある側面として、この発明は患者の癌治療方針を決定する方法になる。患者の癌細胞や癌組織を使ってB H 3プロファイルを決し、一つ以上の臨床因子の決定、患者の一つ以上の癌治療に対する反応性の予測に寄って分類する、これらに従ってB H 3プロファイルによって臨床的治療反応に特異的かつ高い感受性を持つように一つ以上の臨床因子を選択する。

【0045】

他の側面として、この発明は癌治療方針を決定することができる。患者由来の癌細胞を用いてB H 3ペプチドのプライミングの程度決定する、患者の癌細胞を免疫染色やF I S Hを用いて一つ以上の臨床因子の有無を決定する、そして患者が一つ以上の癌治療に対して反応性を有するかどうかの分類をすることが包含される。

【0046】

他の側面として この発明は急性骨髄性白血病の患者がシタラピン或はアザシチジンに対して反応性を有するかどうか決定できる、B H 3プロファイリングを患者の白血病細胞を用いて決定する、一つ以上の臨床因子の決定、一つ以上の臨床因子を年齢と発ガン遺伝子の変異から選ぶ、そして癌患者が臨床的に癌治療に対して反応性を持つのか否かを分類する。

10

20

30

40

50

## 【0047】

他の側面として 癌は血球系の悪性腫瘍、例えば、急性骨髄白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫（マントル細胞リンパ腫、び漫型大細胞型Bリンパ腫）。そのほか、固形癌例えば小細胞型肺癌、卵巣がん、悪性黒色腫。

## 【0048】

ある実施形態において、この発明は癌治療に対する効果有効性を予想できる。一つ以上の抗癌剤、化学療法剤、外科手術、外科手術等の前後に行われるアジュバント治療。ある実施形態においてs, また一つ以上のBH3 mimetics 例えばエピジェネティック修飾薬剤、トポイソメラーゼ抑制剤、サイクリン依存性キナーゼ抑制剤、キネシン紡錘安定剤。ある実施形態においてそのほか、癌治療として、以下のものが含まれる、プロテアソーム抑制剤、細胞周期制御の修飾剤（これらの例に限るわけではないが、サイクリン依存性キナーゼ抑制剤）； 又は/あるいは細胞のエピジェネティックな機構の修飾剤 これらの例に限らないが、一つ以上のHDAC（例えばポリナスタット、エンチノスタット）アザシチジンデシタピン） 又は/あるいはアントラサイクリン、アントラセネジオン（エピルピシン、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、ダウノルピシン、イダルピシン）又は/あるいはプラチナ製剤（カルボプラチン、シスプラチン、オキザリプラチン）、BH3ミメティック（これらの例に限る訳でないが、Bcl2, BclXL or Mcl1） 或はMCL1抑制剤。

10

## 【0049】

ある実施形態において、BH3プロファイリングはBH3ペプチドを用いる事で患者の癌細胞のミトコンドリアの膜ポテンシャルを決定或は定量化することが含まれる。この測定法は臨床因子と合わせる事で各種の治療に対する反応性で患者を区分できる。

20

## 【0050】

これら又は他の実施形態において、BH3プロファイリングはBIM, BIM2A, BAD, BID, HRK, PUMA, NOXA, BMF, BIK, PUMA2Aのペプチドを使う。一つの実施形態において、使用するペプチド濃度は0.1から200µMの範囲で又様々な濃度で用いる。一つの実施形態において、癌細胞の細胞膜の透過性をあげる事でBH3ペプチドがミトコンドリアに結合しやすくなる。これら又は他の実施形態において、BH3プロファイリングは急性骨髄性白血病の白血病細胞をBIMと共存させることでBH3プロファイルが含まれる

30

## 【0051】

ある実施形態において、患者の試料は凍結癌組織、細胞培養した癌細胞、血中に循環している癌細胞、ホルマリン固定パラフィン封埋の癌組織試料（eg. 抗体を用いたBH3プロファイリング）。他の実施形態において、ほかに試料としてヒトの癌由来の細胞株。ほかの実施形態において、他に癌幹細胞。試料は固形癌の生検試料（これらの例に限定するものではないが、例えば、大腸、乳、前立腺、肺、膵臓、腎臓、卵巣癌）。他の実施形態において、試料は上皮由来の試料、例えば、生検組織を上皮の細胞接着因子に対する抗体や他の上皮特異的抗体をビーズ等に結合させたものを使用して上皮細胞を濃縮したもの。他に試料は中胚葉由来のもの、例えば中胚葉性の試料は生検組織をNCAM抗体、ニューロフィリンや他の中胚葉性細胞の表面に結合する抗体をビーズ等に結合させたものを使用する。他の実施形態において、試料は非固形癌の生検もふくむ。試料は多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、マントル細胞リンパ腫、び漫性大球性B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫。他の実施形態において、試料は多発性骨髄腫細胞をビーズ等に結合させたCD138抗体に寄って濃縮したもの。他の実施形態において、急性骨髄性白血病細胞をCD45抗体で濃縮したもの。他の実施形態において他に試料は慢性リンパ球性白血病細胞やび漫性大球性B細胞リンパ腫の非B細胞を除去したもの。また、血中循環癌細胞。

40

## 【0052】

様々な実施形態において、臨床因子として、年齢、細胞遺伝学的状況、動作能力

50

、組織学的分類、性別、臨床的癌のステージ分類。遺伝子変異、SNP、静的蛋白及び動的蛋白レベル、をバイオマーカーとして加える事で特異性又は/あるいは感受性をあげることができる。患者の臨床的な反応性を推測できる。臨床的な反応性は最低でも1年2年3年または5年無進行/無症候性生存率で表すことができる。

【0053】

ある実施形態において、治療に対する反応性はパーセントプライムで決定できる。ある実施形態においてプライミングは以下の数式で定義される。AUCはカーブの下部エリア或はシグナルの強さで表される；DMSOは基準値で陰性対象；CCCP（カルバニルシアニド、mクロロフェニルヒドラゾン）はミトコンドリアの電子伝達系に置く電子キャリアーの正常な活性を見る時のプロトン勾配の脱共役薬として蛋白合成の効果を表す。ある実施形態において、カーブ下部のエリアは均一時間分解蛍光（HTRF）によって規定される。ある実施形態において、時間は約0から約300分、から、約0から30分のあいだ生じる。ある実施形態においてカーブ下部のエリアは蛍光活性化細胞識別（FACS）によって規定される。ある実施形態において、シグナル強度は薬5分又は約300分の間で生じる単一時点の測定点（single time point measurement）に置く測定。

10

【0054】

BH3プロファイリングと細胞表面マーカーCD33，CD34，FLT3変異状況、p53変異、MEK1リン酸化状況，Bcl-2の70番目のアミノ酸セリンのリン酸化状況、とシタラビン系の化学療法やアザシチジンに対する急性骨髄性白血病の患者治療効果の比較する

20

【0055】

他の実施形態において、BH3プロファイリングと一つ又はそれ以上の細胞表面マーカーCD33，CD34，FLT3変異状況、p53変異、MEK1リン酸化状況，Bcl-2の70番目のアミノ酸セリンのリン酸化状況、と多発性骨髄腫の患者の化学療法治療に対する効果を比較する

【0056】

他の実施形態において、癌は急性骨髄性白血病と多発性骨髄腫そして臨床因子は年齢プロファイルと細胞遺伝学的状況；又は癌は急性骨髄性白血病と多発性骨髄腫、癌治療はシタラビン、シタラビン系化学療法やアザシチジン，又はがん治療はシタラビン、シタラビン系化学療法又はアザシチジンまた臨床因子として年齢と細胞遺伝学的状況、又はがん治療はシタラビン、シタラビン系化学療法又はアザシチジン；癌は急性骨髄性白血病又は多発性骨髄腫；臨床因子は年齢プロファイルそれから細胞遺伝学的状況。

30

【0057】

典型的な臨床決定

ある実施形態において、ここで記載する方法は患者の評価をするのに有用である。例えば、予後、診断、治療に対する反応性を評価できる。この発明で固形癌や血液癌を評価できる。評価は治療に対する反応、診断、予後、から選ばれうる。

【0058】

診断とは病気あるいは病的状況である可能性を決定或は同定する為の過程と参照される、つまり、例えば癌である。予後はそのような病気或は病的状況によってもたらせる結果を予測するものである。とても完全な予後診断はしばしば予想される期間、機能、病気の経過，例えば急激な機能低下や間欠的に起きる危機的状況や予測できないが急激に起きうる危機的な状況を含む。治療に対する反応は患者が治療を受けたときにその患者に起こりうる医学的な反応である。治療に対する反応は、この例だけにとどまらないが、例えば病理学的に完全な反応、癌進展が見られない生存、癌が進行するまでの時間、再発の可能性。

40

【0059】

さまざまな実施形態において、この方法を用いると臨床的に患者が特定の治療を受けようかどうかの判断が出来る。一つの実施形態において、この方法はネオアジュバント（

50

外科後治療) 或はアジュバント(外科前治療) 化学療法が効果があるかないかを判断する基準となる。一つの実施形態において、この方法は以下の薬剤に対して効果があるかどうかを予想できる、細胞死誘導型薬剤、細胞死シグナルを介した薬剤、細胞死シグナルを介さない薬剤。或はこれらの薬剤に対して効果がないことも予測できる。様々な実施形態においてこの発明は癌患者の治療方針を決めることができる、例えばどのようなタイプの治療をするべきか止めるのかが明らかになる。

【0060】

一つの実施形態において、この方法は患者が最初に主な治療を始める前にアジュバント治療、単独アジュバント治療も含めて、受けるべきなのか否かといった臨床的治療方針の決定に寄与する。アジュバント治療はアジュバントケアともいわれ主な中心的な最初に受ける治療に追加的に行われる治療である。これらの例に限らないが、アジュバント治療は例えば癌組織が患者から外科手術で除去された後で行われる追加治療である。しかし、この場合統計学的には完全に癌細胞が無くなった訳ではなく再発の可能性がある状態である。

10

【0061】

ある実施形態において、この方法は患者の治療方針、アジュバント治療も含めて、決定に寄与する。例えば、患者がある特定の治療に対して反応性を有すると判断された場合、その治療法がアジュバント治療として使われる。この方法はアジュバント治療を見つける事に寄与する、この例にとどまらないが例えば細胞死を誘導するか又は/或は細胞死の経路の調節による治療法。一つの実施形態においてこの方法はある患者が特定の治療に対して反応性が少ないと言う事を知ることができるそのような患者はそれらの治療法をアジュバント治療として受ける事はないであろう。結果的にある実施形態において、この方法はアジュバント治療に対する患者の反応性を考慮する事でその治療を受けるのか止めるのかを判断する。これに寄って、患者の生活の質の改善と治療コストを抑制することができる。

20

【0062】

様々な実施形態において、この方法でネオアジュバント治療を受けるべきか否かと言う臨床の治療方針を決定できる、その治療は腫瘍を外科腫瘍を行う前に縮小させる為に行う。ある実施形態において、ネオアジュバント治療はここで記載されているようにがん患者に外科手術の前に投与されるものである。ある実施形態において、ネオアジュバント治療が行われる癌の種類に付いては一般的に例えば乳癌、大腸がん、卵巣がん、子宮頸癌、膀胱癌と肺がんである。

30

【0063】

ある実施形態においてこの方法はネオアジュバント治療を含む患者の治療方針を決定できる。例えば、患者がある特定の治療に対して反応性が高いと判断された場合そのような治療がネオアジュバント治療として治療される。この方法はネオアジュバント治療を特定できる、この例にとどまら無いが、例えば細胞死誘導型か又は/或はその経路の調節による治療或は細胞死以外に関連する治療。この方法は患者が特定の治療に対する反応性が少ないかあるのかと言う事が明らかになる、従ってそのようなネオアジュバント治療を患者は受けない。この方法は患者の考えうる反応性に従ってネオアジュバント治療を受けるのか受けないのかの判断に寄与する。これに寄って、患者の生活の質の改善と治療コストを抑制できる。

40

【0064】

ある実施形態においてこの方法は患者がある特定の治療を受けるか否かを決定するのに寄与している。結果的にある実施形態においてこのように、この方法は患者の治療方針を決める為の試験である。

【0065】

ある実施形態においてこの方法は患者がある特定の治療法を受けるのかどうかその反応性についての情報を寄与するものである。ある実施形態において、この方法は治療に対する反応性が高い可能性を示すことができる、それが非常に強力な治療法であるときも含

50

めて。また、この方法は治療法に対する反応性が低い事を示し、強力な治療法も含めて治療の停止を指示するかもしれない。このようなときにはより良い人生の質を求めて効果の少ない化学療法から来る必要の無い毒性を避けることができ、緩和ケアの使用が考えられる。

【0066】

典型的な実施形態において、この方法はある特定の治療に対する反応性があるかどうかを示唆する。例えば、ある実施形態においてこの方法は細胞死誘導剤または/或は細胞死の経路に作用する又は/或は細胞死の経路の蛋白を直接修飾するような薬剤に対する反応性が高いか低いかを示唆できる。様々な実施形態において典型的な細胞死誘導剤または/或は細胞死の経路に作用する或は細胞死の経路の蛋白を直接修飾するような薬剤、A B T 2 6 3 (ノピタクラックス)やオパタクラックス、W E P、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ。この方法は細胞死誘導剤または細胞死の経路に作用、或は細胞死の経路の蛋白を直接修飾しないような薬剤に対する反応性が高いか低いかを示唆できる。この方法は、細胞死に関係ない、例えばキネシン抑制剤、サイクリン依存性キナーゼ抑制剤、ヒ素三酸化剤、M E K抑制剤、ポモリミド、アザシチジン、デシチピン、ポリノスタット、エンチノスタット、チナチクリブ、ジェンツズマブ、B T K抑制剤、P I 3キナーゼデルタ抑制剤、レノリジミド、アントラサイクリン、シタラビン、メルファラン、A K T抑制剤(T Y P O S : A k y)、m T O R抑制剤。

10

【0067】

典型的な実施形態において、この方法は患者が細胞死誘導薬或は細胞死の経路に作用する薬剤で治療されるかどうかを示唆する。典型的な実施形態においてにおいてまた、患者が細胞死以外の経路に作用する薬剤を投与されるのかを示唆する。

20

【0068】

特殊な実施形態において、この方法はがん患者がここに示したような様々な治療法に対して反応性があるのかどうかを予想できる。典型的な実施形態において、この発明はB H 3プロファイルと年齢、細胞遺伝学的因子を評価する事で急性骨髄性白血病の患者がシタラビンやアザシチジンに対して反応性を持つのかどうかを予測できる。

【0069】

様々な実施形態において、今までここで記載した方法で、癌治療を施行するのか否かが決定される。例えば、外科的な除去、放射線療法(ここで記載した薬剤の投与或は放射線感受性亢進剤との併用)化学療法、薬理学的動的治療、標的療法、免疫療法、補助的療法(鎮痛剤、利尿剤、抗利尿剤、抗ウイルス剤、抗生物質、栄養サプリメント、貧血治療、抗凝固剤、骨治療、精神病及び心理学的治療法)。

30

【0070】

典型的な実施形態において、この発明で治療の選択が可能になる。ここで示す例に限らないが、例えば、抗癌剤、化学療法剤、外科治療、補助療法(アジュバント、ネオアジュバント)。ひとつの実施形態において癌治療はB H 3ミメティック、エピジェネティック修飾薬、トポイソメラーゼ抑制剤、サイクリン依存性キナーゼ抑制剤、キネシン安定。ある実施形態において、他に癌治療薬としてプロテアソーム抑制剤、細胞周期制御の修飾剤(ここで挙げる例に限らないが、サイクリン依存性キナーゼ抑制剤);エピジェネティック機構の修飾剤(この例に限らないがH D A C : (たとえばヴォリノスタット、エンチノスタット)、アザシチジン、デシチピン);アントラサイクリン、アントラセネジオン(この例に限らないが、エピルピシン、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、ダウノルピシン、イダルピシン);或はプラチナ製剤(この例に限らないが、カルボプラチン、シスプラチン、オキザリプラチン);シタラビン、シタラビン系化学療法剤、B H 3ミメティック(この例に限らないが、B C L - 2 , B L C X L , M C L 1);M C L 1抑制剤。

40

【0071】

様々な実施形態において、この発明は癌治療に付属するものである、ここで挙げる例に限らず例えばアメリカ特許番号U S 2 0 1 2 - 0 2 2 5 8 5 1或は国際特許番号W O 2 0 1 2 / 1 2 2 3 7 0、ここに内容が組み込まれている。全内容が、ここに参考文献と

50

して引用される．．

【 0 0 7 2 】

様々な実施形態において、この発明は 癌治療に付随するものである、ここで挙げる例に限らず例えば、アルキル化剤、チオテパ、サイトキサン、サイクロフォスファミド、アルキルスルホン酸、例えばブスルファン、インプロスルファン、ピボスルファン；アジリジン例えばベンゾドパ、カルボケオン、メツレドパ、ウレドパ；エチレンイミン、メチラメラミン 例例えばアルトレタミン、トリエチルエネメラミン、トリエチルエネフォスフォラミド、トリエチルエネチオフォスフォラミド、トレチルオロメラミン、アセトゲニン（プラタシン、プラタチノン）；カントテシン（合成類似剤トポテカンを含む）；プリオスタチン；カリ-cally スタチン；CC-1065（アドゼレシン、カルゼレシン、ピゼレシン合成類似薬）；クリプトフィシン（クリプトフィシン1、クリプトフィシン8など）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似薬KW2189，CB1-TM1）；エレウテロピン；パンクラチスタチン；サルコディクチン；スポンギスタチン；ニトロゲンマスタード 例としてクロラムブチル、クロルナファジン、コロフォスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロルエタミン、メクロルエタミン酸化塩酸塩、メルファラン、ノベムピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード、ニトロソウレア例としてカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチン；抗生物質例えばエネジン抗生物質（カリケアミシン、特にカリケアミシガンマIIとカリケマミシムオメガII（参照：Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186（1994））；ディネミシン、ディネミシンAを含む；ビスフォスフォネート例えばクロドロエート；エスペラミシン；ネオカルジノスタチン クロモフォア及び関連したクロモ蛋白エメディン抗生物質クロモフォア）アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ディアゾ5オキソLノルロイシン、アドリアマイシン、ドキシソルピシン（モルフォリノードキシソルピシン、シアノモルフォリノードキシソルピシン、2-ピロリノードキシソルピシン、デオキシドキシソルピシン）、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン（マイトマイシンC等）ミコフェノリック酸、ノガラミシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラミシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、チュベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシン；抗代謝薬例えばメトトレキセートと5-フルオロウラシル；葉酸 補給フロリニック酸；アセグラトン；アルドフォスファミド グリコシド；アミノレプリニック酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブチル；ピサントレン；エダトラクセート；デメコルチン；ディアジクオン；エルフォルミチン；エリプチニウムアセテート；エボチロン；エトグルシド；ガリウムニトレート；ハイドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシノイド メイタンシンとアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモル；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロキキサントロン；ポドフィリニック酸；2エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK多糖複合体（JHSナチュラルプロダクト、ユージン、オレゴン）ラゾキサシン；リゾキサシン；シゾフラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリジクオン；222-トリクロロトリエチルアミン；トリコテエセン（例T2毒、ベラキュリンA、ロドリノA、アンガイディン）；ウレタン；ヴィンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブラニトル；ミトラクトル；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（アラ-C）；シクロフォスファミド；チオテパ；タキソイド，タキソール

パクリタキセル（プリストルマイヤーズ スクイブ、プリンストン、ニュージャージー）、アブラキサシン クレモフォルフリー、アルブミン結合ナノ粒子型のパクリタキセル（アメリカン ファーマシューティカル パートナーズ、シャウンバーグ、111）、タキソテレ ドキセタキセル（ローネ ポーレン ローレ、アントニー、フランス；クロランブチル；ゲムザー ゲムシタピン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセ

10

20

30

40

50

ート；プラチナ製剤、シスプラチン、オキザリプラチン、カルボプラチン；ビンブラスチン；プラチナム；エトポシド（VP16）；イソスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ナヴェルビン；ビノレルビン；ノバントロン；テニボシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン（キャンプトサー，CPT-11）（イリノテカンと5FU、ロイコボリン）；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；チルルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイド、レチノイン酸；カペシタビン；コンプレタスタチン；ロイコボリン（LV）；オキザリプラチン，オキザリプラチン治療レジメ（FOLFOX）；ラパチニブ（Tykerb）；PKC-a，Raf，H-Ras，EGFR阻害剤（エルロチニブ（Tarceva））細胞増殖抑制剤VEGF-A、ダコゲン、ヴェルケード、薬理的に使用可能な塩、酸、或は上記の薬剤の派生剤。

10

## 【0073】

## 典型的な検出方法

さまざまな実施形態において，この方法は蛋白或は核酸の有無発現の程度を評価する。さまざまな実施形態において，この方法は核酸或は蛋白の有無発現の程度、それによってBH3プロファイリングの特異性と感受性を高めることができる。ある実施形態において，評価は患者の治療反応性に対するマーカーである。この方法は免疫染色法、ウエスタンブロット法、細胞ウエスタンブロット（CHECK）、免疫蛍光染色、ELISA，細胞ソーティング（FACS），ここに記載されている方法、或は現在確立されている方法。

20

その方法には、癌の試料（eg 生検組織、癌組織、或は体液）を用いて組織或は体液に対する特異抗体で抗原エピトープを検出し又癌の進展状況の指標になる。

## 【0074】

直接法と間接法という二つの方法を用いて体液或は組織における抗原エピトープを検出する。直接法は抗体反応が一段階のもの、癌組織や体液に対する抗原に直接反応する抗体を標識して（FITC conjugated）用いる。間接法は癌組織や体液に対する一次抗体を標識しないで用いる。そして、標識した二次抗体が一次抗体に結合する事で検出できる。抗体の標識は放射性同位元素、蛍光標識法、ハプテン（ビオチン）標識法またはHRP（??）或はアルカリ脱リン酸酵素。これらのアッセー法を用いた方法は広く知られている。Harlow et al（Antibody，Cold Spring Harbor lab，NY 1998），Harlow et al（Using Antibodies，A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor lab，NY 1999），Virella（Medical Immunology，6<sup>th</sup> edition，Informa Health Care，New York，2007），Diamandis et al（Immunoassays，Academic Press，Inc.，New York，1996）。これらのアッセーをするキットは市販されている、例えばクロンテック社から（Mountain View，CA）。

30

## 【0075】

さまざまな実施形態において，抗体は、抗体全体、抗原結合部位のみ（抗原結合部位）、一本差抗体（抗体は2本の重鎖と2本の軽鎖がジスルフィド結合で繋がっている、Fabフラグメントmonovalent fragでVL，VH，CL CH1ドメイン；F(ab)2フラグメント、2価フラグメントで2つのFabフラグメントがヒンジ部位でジスルフィド架橋されている；FdフラグメントVH CH1ドメインでできている；FvフラグメントVL VHドメインの一本）。ポリクローナルとモノクローナル、ヒト由来或はヒト化または機能的な抗体のフラグメントは有用である。

40

## 【0076】

抗体の結合能を評価する標準的なアッセー方法としてはELISA，ウエスタンブロット、RIAがある。結合のキネティクスを測定するにはピアコア等のアッセー法がある。

50

## 【0077】

ある実施形態において、核酸の測定方法、適切なマーカーとしてDNA/RNAの量を測定する方法がある。検査手法を熟知しているものであれば適切なマーカーのDNA/RNAレベルを検出或は定量する幾多の方法を理解する。

## 【0078】

遺伝子の発現を測定する方法は低から中プレックス、この例に限らないが、リポーター遺伝子アッセイ、ノーザンブロット、FISH, RT-PCR. 遺伝子の発現も測定できる、例えば高プレックス技術、この例に限らないが、SAGE, マイクロアレー、タイリングアッセイ, RNAシーケンス/全トランスクリプト-無ショットガンシーケンシング(WTSS), ハイスループットシーケンシング、マルチプレックスPCR, マルチプレックスライゲーション依存性プローブ増幅(MLPA), ライゲーションによるDNAシーケンシング、ルミネックス/XMAP. バイオマーカーに使われるRNAの発現レベルを検出或は測定、マイクロアレー、RT-PCR (qPCRを含む)ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンブロット。

10

典型的な癌と患者

## 【0079】

ある実施形態において、この発明で患者の癌や癌細胞を元に癌治療方針が決められる。癌或は腫瘍は制御不能な細胞増殖、細胞生存の上昇、細胞死の抑制等に寄って、体の器官やシステムの正常な機能が阻害される。癌患者は客観的に測定できるレベルの癌細胞が体内に存在する。この発明には良性、悪性の癌、休眠腫瘍や微細転移も含まれる。癌が原発巣から重要な臓器に転移するとその臓器の機能異常を来し死に至る。

20

## 【0080】

様々な実施形態において、この発明は転移前でも転移癌にも適応できる。転移は癌がその原発巣から体の他の場所に広がる事である。癌細胞は原発巣から遊離しリンパ管や血管に浸潤し、循環系に播種することで全身の正常な組織に転移する。転移は全身或は局所的に起きる。転移は連続的に、つまり原発巣の癌が遊離する事、続いて血流に入り、遠隔で留まる過程から起きる。その新しい場所で細胞が新しい血液供給を受け生命を脅かす固まりを作るようになる。分子的に刺激的或は抑制的経路が転移の過程を制御している、また、腫瘍細胞と転移先の組織の関係も重要である。転移の検出には転移特有の臨床症状の他(MRI)スキャン、コンピュータトモグラフィ(CT), 血液血小板数、肝機能検査、胸部X線検査、骨シンチスキャンの組み合わせで行われる。

30

## 【0081】

ここので記載した方法は、癌の予後、診断、治療、または、診断予後治療予防、また細胞の異常増殖や細胞死の減少による増殖性の疾患、悪性腫瘍の転移進行増殖を改善する。ある実施形態において、癌には血液のがである、この例に留まらないが例えば急性骨髄性白血病、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、非ホジキンリンパ腫例えばマンツル細胞リンパ腫、びまん性大細胞性B細胞リンパ腫が含まれる。ある実施形態において、癌は固形種である、例えばこの例に留まらないが、肺小細胞がん、卵巣がん、悪性肉腫種。

## 【0082】

ある実施形態において、この発明は以下に示す癌に関係する：急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、AIDS関連性癌、肛門癌、虫垂癌、グリア腫瘍星状細胞腫(小児領域の脳小脳腫瘍)、基底細胞種、胆管癌、膀胱癌、骨腫瘍(骨肉腫、悪性線維性組織球種??)脳幹部グリア種、脳腫瘍(小脳アストロサイトーマ、大脳アストロサイトーマ、悪性グリア種、上衣種、髄芽種、テント状未分化型神経外胚葉性腫瘍、視神経及び視床下部グリオーマ)、乳癌、気管支線癌及びカルチノイド、パーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍、中枢神経リンパ腫、大脳アストロサイトーマ、子宮頸癌、慢性リンパ球性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性疾患、結腸がん、皮膚T細胞性リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、子宮体がん、上衣種、食道がん、ユーイング肉腫、脳外胚腫瘍、性腺外肺腫瘍、肝臓外

40

50

胆管癌、眼球腫瘍、胆嚢癌、胃癌、胃腸系間質癌（GIST）、杯腫瘍（脳内、性腺外、卵巣）トロフォブラスト腫瘍、グリア腫瘍（脳幹部、大脳星状細胞腫、視神経、視床下部）、胃カルチノイド、頭頸部腫瘍、心臓腫瘍、肝細胞がん、下咽頭癌、視床下部と視神経グリア腫瘍、眼内黒色種、膵島癌（内分泌膵臓）、腎細胞がん、喉頭がん、白血病（急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ球性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、有毛細胞）、リンパ腫（AIDS関連性癌、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞ホジキンリンパ腫、非ホジキン、中枢神経系原発リンパ腫）、髄芽種、悪性黒色種、メルケル細胞腫、悪性中皮腫、転移性頸部重層扁平上皮癌、口腔癌、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄異形成/骨髄増殖性疾患、骨髄原性白血病、骨髄性白血病、骨髄増殖性疾患、慢性、鼻腔及び副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞は胃がん、口腔癌、口腔咽頭癌、骨肉腫、卵巣がん、膵臓癌、副鼻腔及び鼻腔癌、副甲状腺がん、陰茎癌、喉頭がん、褐色細胞腫、松下腺松果体星状細胞腫、杯腫瘍、松果体芽細胞腫、と、上未分化型神経外胚葉性腫瘍、脳下垂体腺腫、プラズマ細胞腫瘍/多発性骨髄腫、胸膜肺芽腫、中枢神経原発リンパ腫、前立腺癌、腎癌、腎細胞がん、腎盂及び尿管癌、網膜芽腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、肉腫（ユーイング、カポジ、軟部、子宮）、セザリー症候群、皮膚がん（非黒色種、黒色種、メルケル細胞）、小細胞型肺癌、小腸がん、軟部肉腫、扁平上皮癌、頸部扁平上皮癌、胃癌、テント上未分化型神経外胚葉性腫瘍、T細胞性リンパ腫、睾丸癌、喉頭咽頭癌、胸腺腫及び胸線癌、甲状腺癌、絨毛腫瘍、尿管及び腎盂癌、尿道癌、子宮癌、子宮肉腫、膣癌、視神経及び視床下部グリア腫瘍、外陰癌、ワルデンストローム高グロブリン血症、ウイルムス腫瘍

10

20

#### 【0083】

一つの実施形態において、癌は急性骨髄性白血病。急性骨髄性白血病は2番目に多い白血病である、アメリカ合衆国では約1万3千人の新規患者と年間死者は9千人である。認可済み治療が有るが、多くの白血病患者に置いて予後は悪く良好な治療経過を来すものは少ない。現在行われている標準的な治療はシトシンアラビノシド（ara-C）にアントラサイクリン（例えばダウノルビシン、イダルビシンまたはミトキサントロン）を組み合わせたものである。この治療レジメでは普通これに続き高投与量のシタラピン或は骨髄移植が行われる。これらの治療は若い患者に良好な治療結果をもたらした。急性前骨髄球性白血病の治療に置いても進歩が見られた、all-transレチノイン酸（ATRA）または亜ヒ酸を用いる事で非常に良い生存率がえられた。しかし、AMLのほとんどのケースが見られる60歳以上の患者では治療に不可解。65-85%の患者は治療に反応するが、その65%の患者は再発を見る、多くの患者は病気に倒れる。これらの理由及び前述の治療は非常に強い副作用を伴う事から、治療反応性を予測できるテストは治療方針を決める事が出来る。我々の発明が患者と治療の適合性を決定する事で良好な治療法を探し出すことができる。現在急性骨髄性白血病の患者の治療反応性を判断する方法はない。

30

#### 【0084】

用語とsubject、特別に定義されない限り、哺乳動物、つまり、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、犬、猫、馬、牛、ヤギ、豚、または霊長類、猿、チンパンジー、パプーン。用語の患者（subjectとpatientは同じ意味で使用）。

40

典型的な試料

#### 【0085】

この発明は腫瘍の試料、生検材料や外科試料、の測定を含む。試料は凍結腫瘍組織試料、培養細胞、循環腫瘍細胞、フィルムリン固定パラフィン封埋組織試料（抗体でのBH3プロファイリング）。生検はヒト生検である。生検材料は凍結腫瘍組織、培養細胞、循環腫瘍細胞、それからフォルマリン固定パラフィン封埋腫瘍組織試料（抗体でのBH3プロファイリング）。

#### 【0086】

50

腫瘍試料は生検材料である、凍結腫瘍組織（凍結切片）。当技術分野で周知のように凍結切片は凍結切片作成機，冷凍機能の付いた薄切（マイクロトーム）。外科試料はC h u c k （ O C T ? ）と共に-20~-30度で金属性の板に載せて凍結する。試料はポリエチレングリコールやポリビニルアルコールのようなジェル様の液体のを用いて封埋する。凍結標本はクライオスタットで薄切し、ガラススライドに載せた後染色する事もある。

【0087】

腫瘍試料は生検材料である、細胞培養細胞のような。これらの細胞は通常の細胞培養の技術を用いて作製される。これらの細胞は循環癌細胞でもありうる。

【0088】

腫瘍試料は生検材料である、例えばホルマリン固定パラフィン封埋の主要組織。生検試料はカセット容器に入れた後ホルマリン溶液（ホルムアルでハイド水溶液）或は他の溶液で固定する。組織試料は熱せられたパラフィンとともに型に入れて作製する。パラフィンが冷やされると組織片ブロックが出来上がる。このパラフィン封埋された組織はマイクロトームにより薄片切片が作製される。

【0089】

組織試料は100ミリグラムに見えない、また50ミリグラムよりも満たない試料もある。試料は20ミリグラムから50ミリグラム程度の、例えば35ミリグラムの組織も含まれる。

【0090】

組織は例えば一つ以上のニードル生検（14ゲージ或は他の適当なサイズ）。生検は鋭利な針を用いた吸引で行われる、長く細い針は病変が疑わしい領域に挿入し注射シリンジを引く事で液体或は細胞を採取する。生検は針生検、大きな針を用いて病変が考えられる領域から柱状の組織片を吸引する。生検はバキュームを用いて行われる、吸引機が液体或はさいぼうの採取量を増やすことができる。生検は画像を使用したニードル生検でおこなわれることもある、例えば、X線、CT，MRI またはエコー。そのほかマンモトーム生検システムのようなレーザーと吸引を組み合わせたシステムでの乳腺組織の生検が行われる。

【0091】

試料はヒト腫瘍由来の細胞株。試料は癌幹細胞。試料は固形癌の生検試料、例として、結腸直腸癌、乳癌、前立腺癌、肺がん、膵臓癌、腎癌、卵巣原発がん

【0092】

試料は上皮由来である。上皮組織はE p C A M や他の上皮に特異的に結合する抗体を用エンリッチ。

【0093】

中胚葉性の試料はN C A M、好中球や他の中胚葉特異的抗体を用いて濃縮できる。

【0094】

非固形癌例えばここで例を挙げたものいずれも。試料が多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ性白血病、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞性B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫。多発性骨髄腫細胞をCD138抗体ビーズ等で選択したもの。急性骨髄性白血病の試料を抗CD45抗体で選択したもの。慢性リンパ性白血病または、びまん性大細胞性B細胞リンパ腫を非B細胞を除去したもの。

【0095】

試料は循環腫瘍細胞

B H 3 プロファイリング

【0096】

この発明はB H 3 プロファイリングに寄っている。B H 3 プロファイリングは1 - 10種類のB H 3 ペプチドを一度に評価する。この方法で一つのB H 3 ペプチドでなくて多数のB H 3 ペプチドを用いた解析を行う。B H 3 ペプチドパネルを用いて患者の試料のスクリーニングを行う。

10

20

30

40

50

## 【0097】

BH3プロファイリングは次のペプチドを用いる、BIM, BIM2A, BAD, BID, HRK, PUMA, NOXA, BMF, BIK, PUMA2A. BH3プロファイリングはBIM, BIM2A, BAD, BID, HRK, PUMA, NOXA, BMF, BIK, PUMA2Aに対する抗体を用いる、また自然に形成されるBcl-2ファミリー蛋白のヘテロダイマー、first Bcl-2 (Bim, Bid, Bad, Puma, Noxa, Bak, Hrk, Bax or Mule) second Bcl-2 (Mcl-1, Bcl-2, Bcl-XL, Bfl-1、Bcl-w)これはUS 特許番号8168755に記載されている、全内容が、ここに参考文献として引用される。BH3プロファイリングは張り合わせペプチド (STAPLED PEPTIDE) (合成した3Dアルファヘリックス蛋白部位を水素炭素結合を用いてより強く細胞浸透性を有する)たとえば、ベルジン等執筆「細胞内薬剤標的の為に張り合わせペプチド」METHOD IN ENZYMOLOGY, VOLUME 503 (Chap. 1), リファレンス参照。

10

## 【0098】

ペプチドは0.1 - 200  $\mu$ Mの濃度で使用する。他に0.1 - 150, 0.1 - 100, 0.1 - 50, 0.1 - 10, 0.1 - 5, 1 - 150, 1 - 100, 1 - 50, 1 - 10, 1 - 5, 10 - 100  $\mu$ M.他に0.1, 0.5, 1.0, 5, 10, 50, 100, 150, 200  $\mu$ Mのペプチドを使用する。BH3プロファイリングには細胞膜透過処理をしたサンプルを用いる。

20

## 【0099】

BH3プロファイリングと試料についてはUS patent No. 7868133, 8221966, 8168755、US patent publication No. 211/0130309, 内容が、ここに参考文献として引用される

## 【0100】

特定の理論に拘束されるものではないが、細胞死のシグナル経路が働かなくなる事で癌が進行する。細胞死経路の停止は癌細胞がある種の化学療法に対して耐性を持つ原因になる、驚いた事に、他の一部の化学療法に対しては癌細胞がより感受性を高める事も知られている。癌遺伝子中毒という概念はある種の蛋白に依存して細胞生存を獲得する現象である。BH3プロファイリングはこのような癌細胞の細胞生存を決定する細胞死制御分子を検出する。癌細胞は、何時もそうである訳ではないが、細胞死誘導があらかじめ決定されている、細胞死抑制タイプのBcl-2ファミリー蛋白依存性に細胞生存する事による。癌細胞は、何時もそうである訳ではないが細胞死を起こすようにあらかじめ設定される、またこれらの癌細胞は予期せぬ生存のために抗細胞死機能を持ったBcl-2ファミリー蛋白に依存した機能である。この事で癌細胞が治療に対して反応するかどうかという予測できる。

30

## 【0101】

癌細胞は特定の理論に拘束されるものではないが、遺伝子損傷、遺伝的不安定性、増殖因子異常シグナル、細胞外基質の異常か欠損、これらは、内因性(ミトコンドリア性)の細胞死経路を誘導する。しかし細胞死シグナルに反応するよりも、癌細胞は生存するようになる。しばしば、これらの細胞は慢性的な細胞死のシグナルを選択的にブロックすることに依存するようになる。この依存性は癌細胞の細胞生存の機構である、しかし、このような適応性は細胞死誘導療法に対して余り効かない。内因性細胞死の誘導の為に重要なことはミトコンドリアの外膜の透過性(MOMP)を高める事と細胞死誘導型カスパーゼの活性化を促す分子の放出である。非常に多くの例でMOMPで内因性細胞死は非可逆的に進行する。Bcl-2ファミリー蛋白はMOMPの重要な制御分子であり、リンパ球の腫瘍や幾つかの固形癌での化学療法に対する耐性を司る重要な分子であると信じられている。

40

## 【0102】

Bcl-2蛋白は抗細胞死タイプの蛋白-蛋白結合によって制御されている。これらの

50

蛋白結合はBH3を介している。細胞死開始のシグナルは大部分の場合はミトコンドリアの上流に位置しBH3のみを有するBcl-2ファミリー蛋白がミトコンドリアに移動してMOMPの活性化と感受性の増加に寄与する。BH3のみを有する活性化BH3蛋白、Bim, Bidは細胞死誘導型蛋白であるBax Bakと結合し直接活性化する、そして又抗細胞死蛋白であるBcl-2, Mcl-1 Bfl-1, Bcl-w, Bcl-XLを抑制する。感受性増強型BH3蛋白であるBad, Bik, Noxa, Hrk, Bmf, Pumaは抗細胞死型のBcl-2ファミリー蛋白、Bcl-2, Mcl-1 Bfl-1, Bcl-w, Bcl-XL、とだけ結合し、抗細胞死機能を抑制する。特定の理論に拘束されるものではないが、感受性増強型蛋白はユニークな特異性プロファイルを持つ。例えばNoxa (A, B)はMcl-1と高い親和性をもって結合する、BadはBcl-XLとBcl-2とは結合するがMcl-1とは非常に弱くしか結合しない、Pumaはこれら3つの標的に良く結合する。これらの抗細胞死機能は活性型BH3蛋白Bim, Bidを遊離する事による。これらの活性型BH3蛋白が感受性増強型の蛋白に寄って置き換わるとBax/Bak依存性の細胞死が誘導される。これらの蛋白結合は色んな結果を来す、例えばこの例に限らないが、恒常性、細胞死、細胞死に対する感受性の増加、細胞死の抑制。

10

## 【0103】

細胞死のシグナルがブロックされる時の癌細胞の性状を定義すると、ミトコンドリア上でBH3のみを有する活性型蛋白の蓄積であり、抗細胞死蛋白に寄ってこれらの蛋白はミトコンドリアから遊離される。効果目標にたいする蓄積と近接は、BH3プライムドにおいてBcl-2ファミリー蛋白に対して感受性を増加するため説明責任をおう。BH3ペプチドに結合したBcl-2ファミリー蛋白の阻害(もつとながい??文章)

20

## 【0104】

ある実施形態において、細胞がNoxa (A, B)に対する高い細胞死の反応を持つ場合はMcl-1プライムである、一方Badペプチドに対する高い反応性はBcl-XLやBcl-2が細胞死抑制をする事を示唆する。ある実施形態において、Pumaは全Bcl-2ファミリープライムである。これと同じように、Mcl-1又はBcl-XLかその両方の蛋白、或は数種のBcl-2ファミリー蛋白に依存している細胞は直ぐに区別でき、それで適切な治療法が結果的に適合するかもしれない。ミトコンドリアのこれらのペプチドに対する反応性の違いはMcl-1 Bcl-XLによって影響された内因性シグナル経路を介して働くと知られている所の治療の使用法を示唆する。Bcl-2抑制或はMcl-1抑制分子化合物の使用はこのような場合に示唆されるかもしれない。ある実施形態において、現在のこの方法はまたMcl-1 又はBcl-2の上流の物を標的とするような治療を示唆又は示唆しない。

30

## 【0105】

BH3プロファイリングアッセーは癌細胞のプライミングが起こっているかどうか、プライムされているのを検出する。これは予測値となりうる。

典型的な臨床因子と追加的バイオマーカー

## 【0106】

ある実施形態において、この発明は臨床因子の評価が出来る。この発明は患者の反応性を見る為にBH3プロファイリングや臨床因子の評価からなる。BH3プロファイルと患者の反応に関する情報を提供する臨床因子は細胞死にリンクしないかもしれない。臨床因子は細胞死経路の影響を受けない場合もある。

40

## 【0107】

一つの実施形態において、臨床因子は表3に記載

## 【0108】

一つの実施形態において、臨床因子は年齢、遺伝子変異、能力、病理組織分類、性別、病気の経過

## 【0109】

一つの実施形態において 臨床因子は年齢。 一つの実施形態において 患者の年齢

50

プロファイルは10、20、30、40、50、60、70、80歳以上で分類される。

【0110】

一つの実施形態において臨床因子は遺伝子変異。ある種の癌、例えばウィルムス腫瘍と網膜芽細胞腫、例えば、遺伝子欠失、遺伝子不活性化、は癌の進行が始まる事に重要である、つまり癌抑制に関連している染色体領域には普通欠失或は変異がある。例えば、欠失、逆位、転位はグリア腫瘍、非小細胞肺癌、白血病、悪性黒色種で普通9p21領域で検出される。特定の理論に拘束されるものではないが、これらの染色体異常は癌抑制遺伝子サイクリン依存性キナーゼ抑制剤2Aを不活性化する。特定の遺伝子に置くこれらの欠失とともに、大きな染色体領域の欠損が認められることもある。例えば、染色体(1p16q)は固形癌においてしばしば失われている。遺伝子重複や遺伝子コピーの増加も癌に寄与している、また遺伝子発現の解析或は遺伝子コピー数アレーで検出できる。例えば、染色体12q13-q14は多くの肉腫に置いて増幅されている。この染色体はp53結合蛋白のMDM2と言う蛋白の遺伝子がある。MDM2が増幅されているとP53の細胞増殖の制御機能を抑制する事で腫瘍が形成される。ある腫の乳癌はEGFR2蛋白をコードするERBB2遺伝子のコピー数が増加また遺伝子発現の増強と関連している。そのほか、染色体数の増加、例えば染色体1q、3qは癌発症の危険性の増加と関連している。

10

【0111】

遺伝子変異の状態は様々な方法で知ることができる。例えばFISH典型的な染色体検査法また仮想核型分析(比較遺伝子ハイブリダイゼーションアレー(CGH)と単塩基多計アレー)が用いられる。例えば、FISHは特別な領域に置く染色体再構築を調べるのに使われる、またこれらは癌のリスク要因に関連している。遺伝変異状況は好ましい、好ましくない、どちらとも言えないに分類できる。

20

【0112】

一つの実施形態において臨床要因は一般状態である。一般状態は色々なシステムを用いて定量できる。この測定はしばしば患者が化学療法を受けることができるのかどうか、薬剤の量の調節、また緩和ケアの強度について決定する。色々な点数化の方法がある、カルモフスキースコアとズプロッドスコア。パラレルスコアシステムはGAFスコア(全身機能の全体的評価)、これは精神科においては診断と統計学的指針(DSM)の5番目の軸となる。高度一般状態(カルモフスキースコアで最低80又は70%)。例えば、患者は救急的で自己管理できる。ほかに、評価が患者が低い一般状態(カルノフスキースコア50-30-20%以下)、従来型な放射線療法や化学療法に耐性である事。このような場合、患者はほとんど寝たきりか車いす生活で自己管理できない。

30

【0113】

カルモフスキースコアは100から0、100が完璧に健康で0は死。スコアは10ごとに付けられる、つまり100%は正常、合併症が無く、病気のサインが無い。90%は正常の活動が可能だが幾つか病気の症状やサインがある。80%は正常な活動であるが幾つかの困難を伴い幾つかの病気の症状やサインがある。70%は自己管理は出来るが正常の活動や仕事ができない。60%は介助が少し必要でありが大多数の個人的活動は自己管理できる。50%は介護がしばしば必要であり頻繁な医療介護が必要である。40%は障害持ち特別な介護介助がひつようである。30%は高度の障害を持ち入院が必要であるが死の危険性は無い。20%は非常に病状が悪化した状態で緊急の入院が必要で介護と治療が必要。10%消滅、急激に進行する致死的状況。

40

【0114】

ズプロッドスコアで一般状態を表すと：0 完全に活動的、すべての前病一般状態、制限無し。1 物理的に緊張活動に制限があるが歩行可能で軽い或は座って行う性質の仕事が出来る。2、歩行可能ですべての自己管理が出来るが覚醒時の50%以上で仕事活動ができない。3、限定された自己管理しか可能でない、50%以上の時間をベッド或はイスで過ごす。4、完全に障害のある状態自己管理が全く出来ない、寝たきり又は何時も座っている。5、死

50

## 【0115】

一つの実施形態において 臨床因子は組織診断分類。腫瘍の組織試料はE l s t o n & E l l i s , H i s t o p a t h o l o g y 1991, 19:403-10に従ってグレード付けする、その内容は本明細書に参考として組み込まれる

## 【0116】

一つの実施形態において 臨床因子は性別である。性別は男性または女性

## 【0117】

一つの実施形態において 臨床因子は病気のステージである。ステージグループ分けを使用する、ステージI 癌は体内の一カ所に限局している。ステージIIとIII 癌は局所的に進行している。ステージIIとIIIではある特定の癌に置いて異なる。ホジキン病ではステージIIは横隔膜の上か下の一側にあるリンパ球が陽性であり、ステージIIIは上にも下のリンパ節でも陽性である。ステージII, IIIでは特別な診断基準がある。ステージIV 癌転移を認められる、他の臓器への浸潤または全身への転移。

10

## 【0118】

一つの実施形態において 臨床因子は血液病に対するF A B (フランス、アメリカ、英国)分類システム(髄鞘形成, 骨髓芽球と赤血芽球)。急性リンパ球性白血病の為のF A B

はL1-L3又は急性骨髄性白血病はM0-M7.

## 【0119】

ある実施形態において この方法は追加的なバイオマーカーの評価を遺伝子変異、SNP, 蛋白発現の強弱をもとにおこなう。この方法は患者の反応性について予測する。臨床反応は1, 2, 3, 5年に渡る癌の進行或は癌細胞が無い状態での生存。

20

## 【0120】

各種の臨床因子は同定される、年齢プロファイルと一般状態。診断の統計学的な測定法も使用される、例えば遺伝子変異、分子学的な因子、これらの例に限らないが、MLL, AML/ETO, Flt3-ITD, NPM1(NPMc+), CEBPa, IDH1, IDH2, RUNX1, Ras, WT1の変異、またエピジェネティック修飾遺伝子TET2, ASXL, また細胞シグナリング蛋白プロファイル。

## 【0121】

ある実施形態において ここで記載された方法を用いて、予防的手法は癌に寄って苦しめられている患者に対し治療をほどこすことにある。ある実施形態において 患者は癌に寄って苦しめられるf、患者が癌に対してハイリスクであるならば、例えば遺伝子変異等の危険性、癌の既往歴(新規癌又は再発)癌の家族歴、がん誘発剤に対する暴露(環境物質)、薬理遺伝子的(遺伝要因の薬理キネティックまた動的、又治療の効果プロファイル。)

30

## 【0122】

ある実施形態において 患者は癌に対してハイリスクであれば、苦しめられる。ある実施形態において 患者はもし遺伝的に癌になりやすい要因があれば癌によって苦しめられる。ある実施形態において 遺伝的傾向は遺伝的臨床因子になる。ある実施形態において このような臨床因子はHNPCC, MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2, 結腸、子宮、小腸、胃、尿路の癌。患者が以前に癌の既往があれば癌に寄って苦しめられる。患者は1, 2, 3, 4, 5, 6の癌の既往があると苦しめられる。ある実施形態において 患者が癌の家族歴を持っている場合は苦しめられる。患者の、祖父母、兄弟, 叔父叔母、大叔父叔母、従兄弟従姉妹が今まで又は現在癌に苦しめられている。患者はもし癌誘発物質に暴露している場合(環境要因)。ある実施形態において 例えば皮膚の強力な日光への暴露は皮膚がんの臨床因子になる。ある実施形態において 喫煙は胚、喉頭、膀胱、腎臓、や他の臓器のがんの臨床因子になる。

40

## 【0123】

さらに、ある実施形態において 次の臨床因子はここで述べる方法で有用である: 性別, 遺伝的危険因子、家族歴、個人歴、人種、民族性、ある組織の性質、様々な良性疾患

50

(非増殖性病変) ; 以前に受けた胸部 X 線、発がん物質への暴露など。

【0124】

さらに、ある実施形態において以下の臨床因子は有用である：細胞表面抗原マーカー CD33, 細胞表面マーカー CD34, FLT3 変異、p53 変異、MEK1 キナーゼのリン酸化、Bcl-2 のセリン70 のリン酸化。

【0125】

ある実施形態において臨床因子はサイトカインの発現レベルである、これらの例に限らないが IL6. IL6 レベルは多発性骨髄腫の患者の反応性に関連している、予後を左右する。

【0126】

ある実施形態において、治療に対する反応性はパーセントプライムで決定できる。ある実施形態においてプライミングは以下の数式で定義される。AUC はカーブの下部エリア或はシグナルの強さで表される；DMSO は基準値で陰性対象；CCCP (かるバニルシアニド、mクロロフェニルヒドラゾン) はミトコンドリアの電子伝達系に置く電子キャリアーの正常な活性 (normal activity) を見る時のプロトン勾配の脱共役薬として蛋白合成の効果を表す。ある実施形態において、カーブ下部のエリアは均一時間分解蛍光 (HTRF) によって規定される。ある実施形態において、時間は約 0 から約 300 分、から、約 0 から 30 分のあいだ生じる。ある実施形態においてカーブ下部のエリアは蛍光活性化細胞識別 (FACS) によって規定される。ある実施形態において、シグナル強度は薬 5 分又は約 300 分の間で生じる単一時点の測定点に置く測定

10

20

【0127】

ある実施形態において BH3 プロファイリングと細胞表面マーカー CD33, CD34, FLT3 変異状況、p53 変異、MEK1 リン酸化状況, Bcl-2 の 70 番目のアミノ酸セリンのリン酸化状況、とシタラビン又はシタラビン系の化学療法やアザシチジンに対する急性骨髄性白血病の患者治療効果の比較する。(54 参照)

【0128】

ある実施形態において BH3 プロファイリングと細胞表面マーカー CD33, CD34, FLT3 変異状況、p53 変異、MEK1 リン酸化状況, Bcl-2 の 70 番目のアミノ酸セリンのリン酸化状況、とシタラビン又はシタラビン系の化学療法やアザシチジンに対する多発性骨髄腫の患者治療効果の比較する。同じ 55

30

【0129】

他の実施形態において急性骨髄性白血病と多発性骨髄腫に置いて臨床因子は年齢と遺伝子変異状況。急性骨髄性白血病と多発性骨髄腫に置いて治療はシタラビン、シタラビン系化学療法やアザシチジンで臨床因子として年齢と細胞遺伝的状況

【0130】

この発明は腫瘍や癌細胞試料の評価を簡便化できるキットを作る。典型的なキットは様々な試薬を含む、例えば BH3 ペプチドを検出する試薬などである。そのキットは様々な検出方法、例えば抗体をふくむ。そのキットは様々な材料、例えばマルチウエルプレート、シリンジなど。そのキットはラベルや印刷された試薬の使用方法が記載された説明書を含む。そのキットは試験されるべき治療法からなっている

40

【0131】

用語の“約 (about)” は値の平均値からプラスマイナス 10% を示す。例えば約 50 は 45 から 55 のことである。

【0132】

ここで用いられている“含まれる (include)” という言葉とその変形は、限度を示す意図があるわけはなく、

【0133】

定義付けされない限り、すべての技術的、科学的用語は、一般的な技術によって普通理解される言葉と同じである。方法や試料、ここで示されているものと似ている或は同等の

50

ものは、この発明の実際或はテストで使われるのだが、勧められた方法や試料はここで記載された。ここで引用されたすべての出版物、特許と特許の印刷物は引用文献としてここに記載されている。

【0134】

この発明は次の例で示す

【実施例】

【0135】

例1：治療開発に置ける細胞を用いた研究

方法：細胞は一ウエルあたり  $7.5 \times 10^3$  で反応液 (300 mM トレハロース, HEPES-KOH pH 7.4, 80 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.1% BSA, 5 mM コハク酸塩) に浮遊。細胞膜透過の為にジギトニン処理及びカチオンダイ JC-1 及び b-メルカプとエタノールとともにロードする。細胞は384ウエルプレートに分けBH3ペプチド: Bim, Bid, Bad, Noxa, Bim2A, Puma, Bmf, Hrk, Bik を加え置く。このアッセーに使用するペプチドは合成されたものでHPLCによって95%以上の純度。ペプチドは質量分析で確認された。DMSOコントロールをネガティブコントロールとして含む。1 mM FCCP ( ) で処理した細胞を使い完全に膜電位を逆転させ、このサンプルをこのアッセーの標準或はポジティブコントロールとして使う。ペプチド (とFCCP) を加えると膜電位が下がる、適切にブライムされた細胞、これは Tecan Genios プレートリーダーで励起545 発光590を用いJC-1 蛍光の減少で計ることができる。この過程のキネティクスはそれぞれのペプチドで違っている、また最終点はキネティクス追跡で180分後に記録する。それぞれのペプチドでの蛍光減少はFCCP反応で標準化し、それぞれの細胞株に寄って3つずつ測定する。

【0136】

サイクリン依存性キナーゼ抑制剤開発：治療の抑制活性に寄ってピン入れられた細胞株でのBH3プロファイルの関連は細胞死誘導ペプチド識別が細胞周期に影響を及ぼす治療の開発の為

このような細胞株の代表的BH3プロファイリングデータはFig 1に 細胞周期修飾剤の治療効率はFig 2に 示されている。8つの固形癌由来の接着細胞株のBH3プロファイルはFig 3, 非固形癌由来の浮遊細胞株で調べたすべてのペプチドにたいするBH3プロファイルはFig 4。接着及び浮遊細胞株でのサイクリン依存性キナーゼ抑制剤治療効率と定量化したBH3プロファイルは表1にまとめた。特に低濃度Bimペプチドに対するパーセント反応性は浮遊細胞と接着細胞株両方に置いて治療活性と相関する (Figs 5, 6)。NOXA PUMAペプチドに対するパーセント反応は識別、特にBIMと併用 (NOXA + BIM接着細胞; PUMA + BIM浮遊細胞) した場合。

【0137】

細胞周期修飾分子は細胞周期停止又は圧倒的細胞増殖抑制薬剤である。BH3プロファイリングは、一方、細胞死を引き起こす細胞の傾向を測定するようにデザインされている。これに関して、この例に記載されているデータは、とりわけ、細胞死誘導のメカニズムに関係なく薬剤の治療効率を予想する為のBH3プロファイリングアプローチの予期しない診断的使用を表している。

【0138】

BH3ミメティック (MCL-1抑制剤開発)：治療抑制活性によってBinned細胞株のBH3プロファイリングでの相関性は細胞死誘導ペプチドが浮遊細胞 (FIG. 7) と接着細胞 (FIG. 9) 両方に置ける効果 (efficacy) を discriminateする。特に、低BIM, PUMA, NOXA, BAD, HRKペプチドに対するパーセント反応はすべて個々に浮遊細胞株に置ける治療活性に相関している。浮遊細胞に置ける治療効果に相関する多元的マーカーアルゴリズムはBIM + PUMA, BIM + NOXA, PUMA + NOXA, BIM + PUMA + NOXA, BIM + PUMA + NOXA + HRK, BIM + PUMA + NOXA + HRK + BAD (FI

10

20

30

40

50

G . 8 ) . 固形癌由来の接着細胞株に置いて、B I M , P U M A , N X A はそれぞれ個々にM C L - 1 阻害効果と相関がある、一方相関性を示す多元マーカールゴリズムは上に述べた烏有細胞株での相関性と同一である ( B I M + P U M A , B I M + N O X A , P U M A + N O X A , B I M + P U M A + N O X A , B I M + P U M A + N O X A + H R K , B I M + P U M A + N O X A + H R K + B A D ) ( F I G . 1 0 ) .

【 0 1 3 9 】

このデータは、とりわけ、多元的マーカールアプローチが治療効率を予想する上で個々のマーカールにより情報を加えるであろう。この知見はM C L - 1 と予期せず N o x a によって特異的にP U M A ( B C L 2 B C L - X L にも結合する) によって非特異的に修飾される。重み付けはこれらのアプローチのなかで多数のマーカールを含有する事に寄って  
10

【 0 1 4 0 】

キネシン紡錘蛋白 ( K S P ) 阻害剤開発 : K S P 阻害剤は8つの骨髓腫 / 白血病由来のヒト細胞株に対する抗増殖アッセーでテストされた。B H 3 プロファイリングは同時にこれらの細胞に対して行われた。データは 増殖阻害剤を用いた時のB H 3 プロファイリング読み出し ( P U M A B A D それぞれに対する % プライミング ) ( F I G . 1 1 ) .

【 0 1 4 1 】

K S P 阻害剤活性の相関性はM C L 1 蛋白レベルによって修飾されている。もしこれが単一機構によるのであればM C L 1 の調節分子であるN o x a が治療効果の適切な予想因子になるであろう。実際、P U M A ( M C L 1 , B C L 2 , B C L X L の修飾) とB A D ( B C L 2 B C L X L の効果因子) が個々に これらの細胞株に置ける治療効果を識別できるという予期しない結果が得られた。  
20

【 0 1 4 2 】

キネシンスピンドル蛋白阻害剤はマイクロチューブ構造に結合し再構築する事によって抗癌活性を調節する。これらの薬剤の作用がミトコンドリアの反応性やそれに続く細胞死のシグナルに寄って遅うされうる。

例 2 : 腫瘍学患者コホートをを用いた研究、

【 0 1 4 3 】

急性骨髓性リンパ球 ( シタラビン系治療 基本的治療 ) 治療学 : 急性骨髓性リンパ球患者コホート : 新規診断 急性骨髓性リンパ球患者試料は1999年9月から2007年3月の間に化学療法を受ける前の末梢血又は骨髓穿刺吸引 ( B M ) によって得られた。試料は研究査読によって承認された調整とプロトコール ( ラボ 0 1 - 4 7 3 ) に従って日常的診療評価のなかで得られた。インフォームド Consent はヘルシンキ宣言 に従って得られた。ファイコールでの精製の後、混在するT B 細胞をC D 3 / C D 1 9 マーカールを元に除去された。個々の分注された細胞は遠心分離後90% F B S / 10% D M S O に浮かせた後液体窒素で保存する。病理学的分類, 細胞遺伝学的、遺伝子変異解析が得られた ; 臨床指標は補助表及び図に示した。  
30

【 0 1 4 4 】

患者治療 : 患者は標準クライテリアで反応性で区分分けをする。62人の患者のうち48人はシタラビンとアントラサイクリンで治療された、7人の患者はシタラビンとアントラサイクリン以外の薬剤、8人の患者はシタラビンとフルダラビン ( このうち一人はシタラビンとアントラサイクリン以外の薬剤、その後シタラビンとフルダラビンで治療された「どちらのサイクルでも反応なし」)。C R = 骨髓形態が正常、好中球数が1000以上、血小板が10万以上、高ヘモグロビン。原発性不応性 = 白血病細胞の残存が2サイクルの化学療法後にもみられる ( 同じが違う化学療法レジメ)。再発は以前C R であった患者に5%より多くの芽球が骨髓或は末梢血に見られる。  
40

【 0 1 4 5 】

細胞遺伝学的リスクの決定 : 細胞遺伝学的リスクの決定はC L I A 認定された細胞遺伝学ラボ。簡単に記載すると、患者は標準的なグループ分けで区分される。好ましい = i n  
50

v 16, t (8; 21), T (15; 17) 中間 = 二倍体, -y, 不十分な細胞分裂中期, 好ましくない = 他すべて, -5, -7, +8, t (6; 9), 11q, PH1+, misc.

【0146】

BH3プロファイリング：ファイコール分離精製、生存凍結、前治療急性骨髄性白血病試料を融解後FACSバッファー（1% FBS, 2mM EDTA, PBS）とFCRブロッキング試薬（Miltenyi Biotec, Auburn CA）に浮遊し10分氷上、その後CD45-V450（BD Biosciences, San Jose CA）, CD3-ビ落ちん（BD Biosciences, San Jose CA）, CD20-ビオチン（eBiosciences, San Diego, CA）20分氷上。試料はFACSバッファーに浮遊後ストレプトアビジン?APC（BD Biosciences, San Jose, CA）20分氷上。染色後急性骨髄性白血病の試料はジギトニンで細胞膜透過（Sigma-Aldrich, St Louis, MO）シペプチド（BIM 100 $\mu$ M, BIM 0.1 $\mu$ M, PUMA 100 $\mu$ M, PUMA 10 $\mu$ M, NOXA 100 $\mu$ M, BAD 100 $\mu$ M, BMF 100 $\mu$ M, HRK 100 $\mu$ M, PUMA2A 100 $\mu$ M）又はDMSO（ジメチルスルフォキシド 1%）又はCarbonylcyanide m-chlorophenyl hydrazine（CCCP 10 $\mu$ M）をニューマイヤーバッファー（80mMKCl, 10mM HEPES, 40 $\mu$ M EDA, 10 $\mu$ M EGTA, 5mM Succinate, 300mM トレハロース、0.1% BSA, pH 7.4）中で $2 \times 10^5$ 細胞を加えて室温180分インキュベートする。サンプルは充分量のviable細胞が無いとき以外は重複してアッセイを行う。ミトコンドリア膜ポテンシャルの染色剤であるJC-1（Enzo Life Science, Farmingdale NY）を解析の45分前に加えた。

10

20

【0147】

サンプルはFACS Canto II（BD Biosciences, San Jose CA）でBD FACS Divaソフトウェアを用いて解析した。リンパ芽球細胞はCD45 dim, SSC低、CD3-, CD20-。以前にも述べたが、CD45に強く染まる婆は成熟リンパ球である事を表しその場合はこの解析から除外する。ミトコンドリア脱感作を誘導する細胞死誘動型のペプチドの定量化できる傾向はコントロールと相対値でパーセントプライミングとして引用される。リンパ芽球の集団では、これはDMSOをバックグラウンド（ネガティブコントロール）とCCCPを100%プライミング（ポジティブコントロール）としてPEチャンネルノーマライズした中間値のシグナルを用いる事で計算する。

30

【0148】

統計学的解析：BH3プロファイリングバイオマーカーの予期値はバイオマーカー状態（%プライミング）と患者が治療反応性を持つのか否かによって研究がなされた。単変量比較はマン-ホイットニーテストとp値と2サイドを使って行われた。統計的な解析では $p < 0.01$ 擬陽性値である危険性は限られている（ $0.01 < p < 0.05$ の場合は境界値）。マーカーの予期能力はAUC（area under the curve）統計を用いて評価される。生存終点はコックス比例ハザード回帰を用いて解析する。多変数解析はロジスティック回帰を用い、上記のクライテルアを用いた患者の臨床病歴的な情報から重要である調節変数を用いる。OSやEFSはログランクテストをトレンドとしてパーセントプライミングに優位な相関があるかとしてテストされる。解析はSASソフトウェアバージョン9.2（SAS institute INC., Cary, NC）、Rバージョン2.14.2（R Core Team; Vienna, Austria）Graphpad Prismバージョン5.04（La Jolla, CA）。

40

【0149】

50

患者コフォート特性：急性骨髄性白血病患者は臨床病理学的相違に相関してシタラビン系レジメに対する反応性によって階層化される（表3）。マン-ホイットニー解析は臨床的相違点と化学療法に対する反応性の非ランダム関連性をテストする為に行われた。テストされた相違点、患者の年齢プロファイルだけと細胞遺伝的リスク階層化は反応性にたいする非ランダム関連として示される（各々 $P = 0.008$ と $P = 0.006$ ）。これら2つの非確率変数はBH3プロファイリングバイオマーカーとして以下に記載された多変数解析で使用される

#### 【0150】

患者試料のBH3プロファイリング：急性骨髄性白血病患者の62凍結試料を用いてBH3プロファイルがこの研究の一部として行われたうち61で解析可能なデータが得られた。統計学的解析前に除外された一例は充分量の生細胞がトリパンブルーで確認できなかった為である。62の患者のうち61でBH3プロファイルによって解析できたと言う事は技術的に98.4%の成功率だといえる。試料に関する技術的失敗は明らかに細胞の生存率が悪いのが凍結障害に寄っていると言う事は、細胞を解凍したときにすぐに明らかに出た。

10

#### 【0151】

すべてのペプチドはこの研究が始まる前に以前の急性骨髄性白血病患者の試料を使い%プライミング値が動的範囲になう量に実験的に最適化された。特記すべき事は100 $\mu$ MのBIMは大多数のAMO患者の試料では飽和（又は飽和に近い）。しかるに、100 $\mu$ MのBIMに加えて、BIMは0.1 $\mu$ Mでアッセーされる、この濃度は%プライミング値が動的範囲に入っていると決定された。2人のNRと2人のCR患者の代表的なデータはFIG.12で示されている。ここで、留意すべき点は以下である、患者個々の試料を繰り返し使うと全体の変動計数（CV）は一般的に（3-5%）であり、実験間に置ける違いが少なく技術的に強固な解析。

20

#### 【0152】

アッセーされたバイオマーカーペプチドの中で高いBIM（0.1）パーセントプライミング値は非常に高い統計学的重要性（ $p = 0.0000018$ ）で治療反応性と相関している（FIG.13）。そのほかのBH3プロファイリングバイオマーカー解析は表4にしめした。BIM（0.1）でイールドされた統計的重要性に加えて、PUMA（10）は治療反応性に対して大きな重大な関連性を示した（ $p = 0.0064$ ）（FIG.14）。

30

#### 【0153】

個々の患者のBIM（0.1）プライミングスコアが治療反応グループと反応しないグループに分離されたとき明らかな傾向が解る。シタラビン系化学療法に反応する急性骨髄性白血病患者は治療反応性がない患者よりもBH3プロファイリングプライミングが高い傾向がある（反応性あり；パーセントプライミング =  $36.8 \pm 21.2$  [標準偏差]、反応性なし；パーセントプライミング  $13.2 \pm 13.4$  [標準偏差]）。治療に反応する患者と反応しない患者を性格に分離できて、また反応する患者を正しく認識するバイオマーカーの感受性と特異性を確立するには、受信者動作特性（ROC）描写がAUCが0.83を示している[95%CI：0.73, 0.94]（FIG.14），個々の試料を確実に区別する為のバイオマーカーの能力の優れた指標。興味深い事に、一つのバイオマーカーは89.7%の治療反応群を特定できるのに対して治療非反応群は59.1%。感受性カットオフ値が92.3%より少し高いと、特異性は治療非反応群において54.6%になる。

40

#### 【0154】

年齢と細胞遺伝学はこのデータセットに置いて急性骨髄性白血病患者の予後因子となる（表3）。もしBIM（0.1）%プライミングバイオマーカーを加える事が年齢プロファイルと細胞遺伝学以上の情報を加味（added）できるとすると、年齢プロファイルと細胞遺伝学はBIM（0.1）プライミング多変数解析に順次加えられる。BIM（0.1）に患者の年齢プロファイルを加えるとAUCがBIM（0.1）単独の

50

時より0.83から0.89に増加する(FIG. 15)。さらにBIM(0.1)が年齢と細胞遺伝学的リスクで調節されると、AUCは0.91に増加する。後者の調節で治療非反応群が70%より大きいのにたいして90%より大きな感受性が認められる(FIG. 15)。

#### 【0155】

患者は細胞遺伝学的リスク状態によって階層化される、そしてこれらのサブグループはマン-ホイットニーで解析された。中程度のリスクグループ( $n = 33$ )では、BIM(0.1)は治療反応性区分と非常に良く関連している( $p = 0.00017$ )そして治療非反応グループ( $n = 23$ )でBIM(0.1)は未だ良く関連づいている( $p = 0.023$ )(FIG. 16)ここでp値は連結コホートのBIM(0.1)に比べて幾分減少している一方、これは患者のサブグループ化した人数の為に統計的パワーが減少する事による一般的な現象である。興味深い事に、BAD HRK療法の解析が治療反応性区分に優位なp値を生じる、しかしこの事は中程度のリスクグループでのみ観察された事である。治療反応性区分に置けるこれらバイオマーカーROC解析による感受性と特異性評価はAUCとして中程度リスクグループではBIM(0.1)が0.875、BADが0.875、HRKが0.823、好ましくないグループではBIM(0.1)で0.790(FIG. 16)。留意すべき点は独立したサブグループ(中程度リスクグループの8NR, 25CR、好ましくないグループの15NR, 9CR)治療反応型患者と治療非反応型患者としてのやや不均衡グループから利益がある。5人だけの好ましい患者であるので、統計的な解析をすることはできない。

#### 【0156】

BIM(0.1) BH3プロファイリングパーセントプライミングとBIM(BCL2L1)蛋白レベルの比較: BIM BH3プロファイリングの予知能力がただ反復するかどうか評価する為に今回行われた研究で急性骨髄性白血病患者の試料に関連性があるのか無いのか検討した。BIM蛋白レベルとパーセントプライミングには何ら相関性が無いことが解った(FIG. 17)  $R^2 = 0.0396$ で表される。

#### 【0157】

BIM(0.1)のBH3プロファイリングはBH3プロファイリングとRPPAデータが全患者コホートの存在の小集団において優位なp値( $p = 0.0048$ )をしめす(FIG. 17)。留意すべき点としてこの解析のパワーは我々の以前の解析よりも相対的に減少した、サンプルサイズが $n = 62$ から $n = 43$ に減少した事、またRPPAデータがない多くの試料がBH3プロファイリングの最高値を持つ試料の中にあつた事に寄っている。BCL2L1の蛋白レベルのためのこの同じ小集団への反応識別に対するp値は $p = 0.33$ (FIG. 17)。これらのデータはBH3プロファイリングは蛋白レベルとは相関していないまたBH3プロファイリングは急性骨髄性白血病患者のシタラビン反応性を予測する新しい理論的枠組みを示すかもしれない。

例3: 二次的臨床評価項目: 全生存期間 及び無再発生存。

#### 【0158】

BH3プロファイリングバイオマーカーは二次的臨床評価項目 全生存期間 and 無再発生存に相関する為に解析された。コックス比例解析を用いた連続的モデルではBIM(0.1)はEFS( $p = 0.14$ ) or 全生存期間(OS( $p = 0.057$ ))では有為差が無い。NOXAパーセントプライムとEFSのコックス比例ハザード解析は有為差が無い $p = 0.89$ 。すべての他のペプチドも有為差無くOS或はEFSとパーセントプライムの間にも有為差が無い(すべて $p > 0.10$ )。患者の年齢プロファイルと細胞遺伝学的リスク状況等補正変数を用いた多変数解析ではBH3プロファイリングバイオマーカーとOS, EFS臨床的最終点には何ら優位な関連性は認められなかった。

#### 【0159】

興味深い事に分配モデル解析に置いて、患者コホートがBIMパーセントプライミングに寄って三分位数に分割されたときに(高プライミング、中プライミング、低プライ

10

20

30

40

50

ミング)、随伴するOSの中間値は、それぞれ250.7, 168.2, 32.7週間( $p = 0.029$ , ログテスト)(FIG. 18)。この三分位数の同じ解析はEFSの為にされたとき、EFSの中間値は26.1, 71.3, 160.7週間それぞれ低プライミング、中プライミング、高プライミング三分位数( $p = 0.044$ , ログテスト)(FIG. 18)。

#### 【0160】

急性骨髄性白血病とアザシチジン: 13のヒト急性骨髄性白血病由来細胞株がBH3プロファイリングに使われた、またアザシチジン反応性の相関的解析をビトロの系で行った。BH3基準を使った分配モデルは統計学的優位により感受性のある( $IC50 < 2 \mu M$ )と少ない感受性( $IC50 > 2 \mu M$ )にアザシチジン反応性を区別した、急性骨髄性白血病由来の細胞株各々のペプチド由来のモデル(FIG. 19)2つのペプチドモデル(FIG. 20)3つ或はそれ以上のペプチドを使ったモデル(FIG. 21)。持続変数解析を用いて、 $R^2 > 0.7$ 一つ一つのペプチド由来アルゴリズム(FIG. 22)と2ペプチドからなる[log]IC50s 複合BH3ペプチドモデル(FIG. 23)と3かそれより多いペプチド(FIG. 24)Puma ( $p < 0.01$ ) (全プライム指標)が用いられる。統計的に優位なp値はPuma ( $p < 0.01$ )を含むモデル大多数を追跡する。結果は表5にまとめられている。

10

#### 【0161】

アザシチジンはエピゲネティックな修飾剤として知られる抗癌剤のクラスに属するので、細胞死経路の直接的な修飾やミトコンドリア経路に対する効果は確かではない。従って、アザシチジン治療の効用が細胞死の内因性経路やミトコンドリアの生物学調査する為の基準デザインによって予測されるかもしれないと言うのは驚きである。参照、Votantal (Cell. 2012; 151(2): 344-355), アザシチジン効用はBH3由来の基準では予測されないと記載されている。

20

#### 【0162】

データは説得力がある、アザシチジンの結果をモデルする為のBH3プロファイリングの目的で急性骨髄性白血病患者のプライマリーの試料の試験を勧めた。

#### 【0163】

アザシチジンで治療された急性骨髄性白血病患者のBH3メトリクスをから由来のアルゴリズムの為のサポートデータが作成された。N = 28の結合コホート(13(9安定/CR; 4再発/NR)試料と15(すべてNR/再発))。1試料は評価できなかった。すべてで27試料は治療反応性に相対的に解析された(19 NR, 8 R)。このコホートの報告されたスコアの範囲はFIG. 25に示されている、またスコアの範囲は治療反応性であるとか他の臨床最終点、例えばOS (全生存期間)とEFS(無再発生存)が計られて治療の方法として与えられる。

30

#### 【0164】

個々のマーカーとして、BIMとNOXAだけが境界領域で優位さを持って治療反応性と関係している産生された(各々 $p = 0.05$ ,  $p = 0.02$ )。すべての他のバイオマーカーは $p > 0.1$ 。しかし、BIMとNOXAがここで記載された方法に寄って複合された場合、治療反応性に対する相関性は高度に優位である( $p = 0.001$ )。

40

感受性と特異性のROCは0.91である。これは単変数解析でありまた臨床的調節変数が加味される(年齢、細胞遺伝学的状況)であるときに統計学的により強固になるのかもしれない(FIG. 26)。

同様の技術

#### 【0165】

これらの技術は広く知られたものである、また、日常的な実験で確定でき、特異な実施形態において多くの同様な技術があり、それはここで特異的に述べられるもので、このような同様な技術は以下の特許申請に含まれるものである。

参照引用

#### 【0166】

50

すべての特許及び論文は個々で引用している。

【0167】

ここで議論されている論文はこの書類が提出された日より以前に公になったものである。現発明は以前の論文に先んじられて出来たものではない。

【図1 - 1】

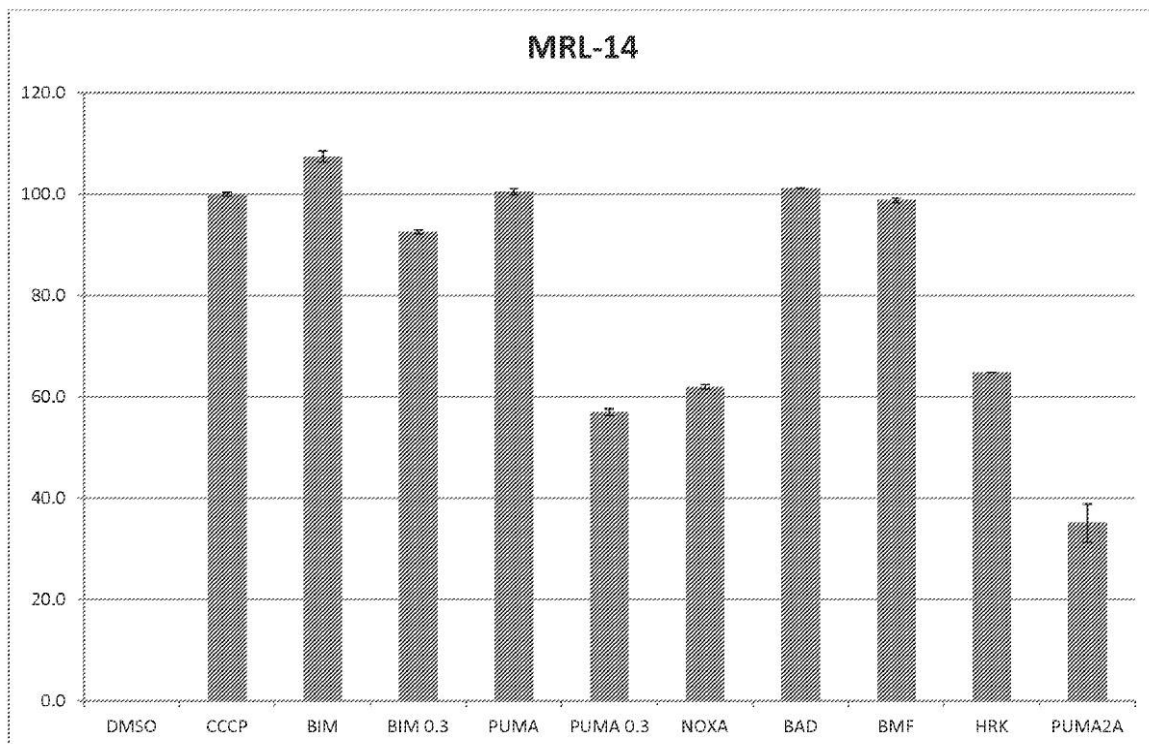


FIG. 1

【 図 1 - 2 】

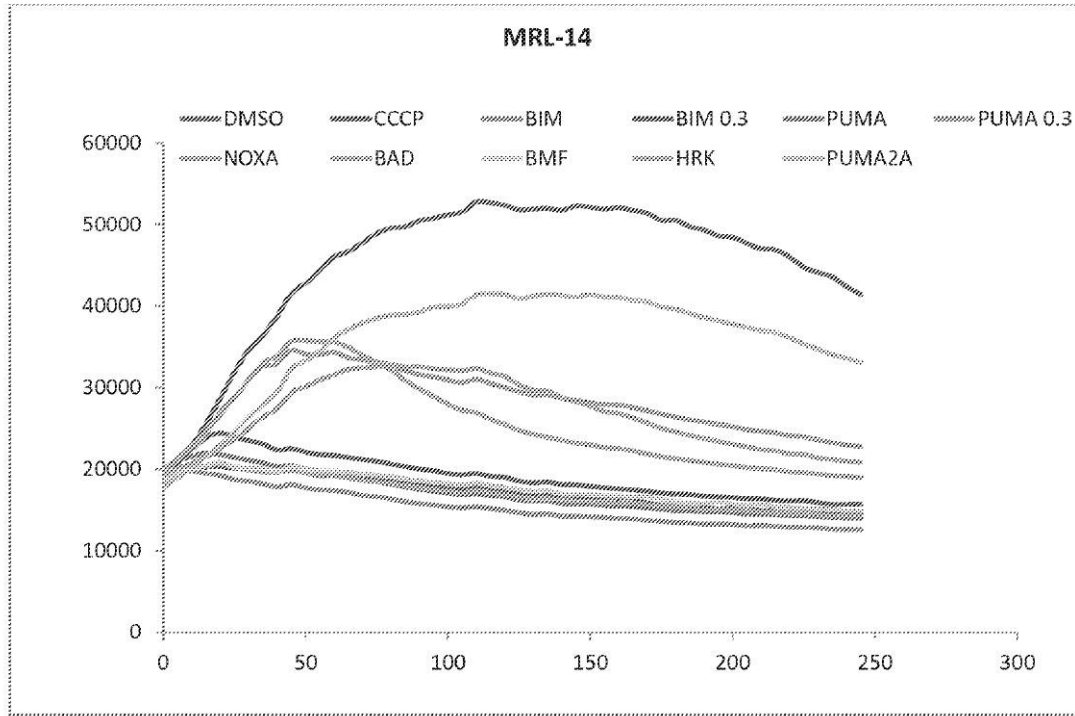


FIG 1, 続き

【 図 1 - 3 】

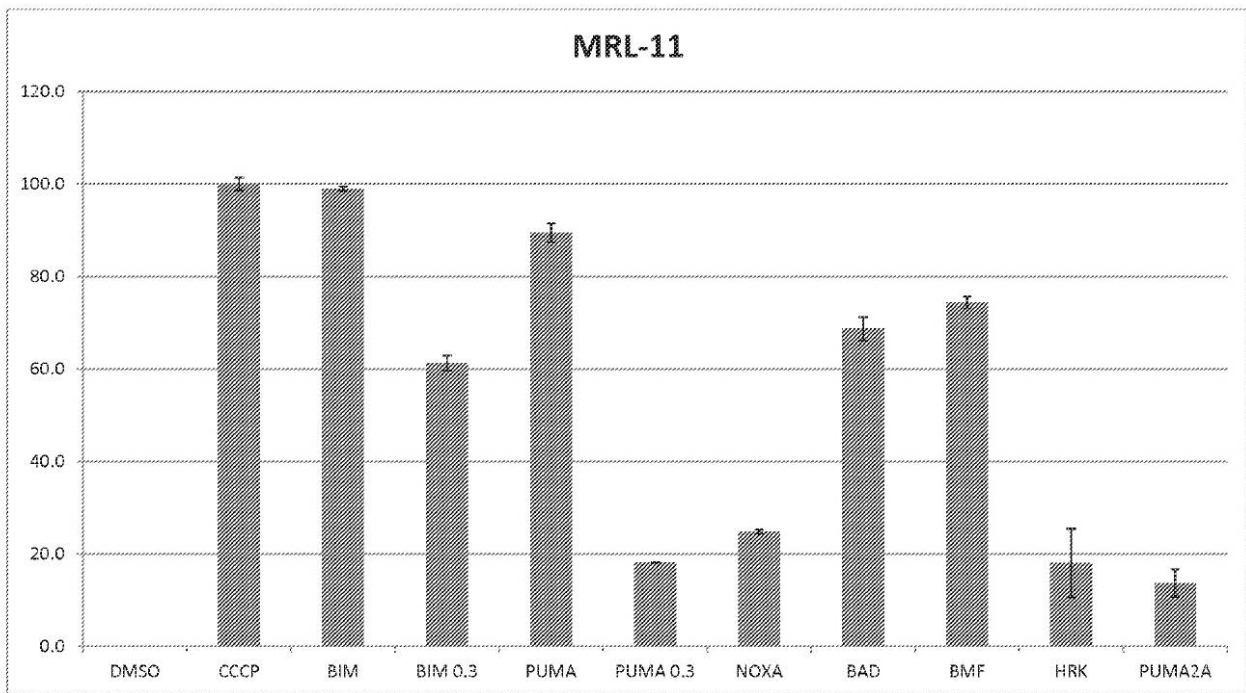


FIG 1, 続き

【 図 1 - 4 】

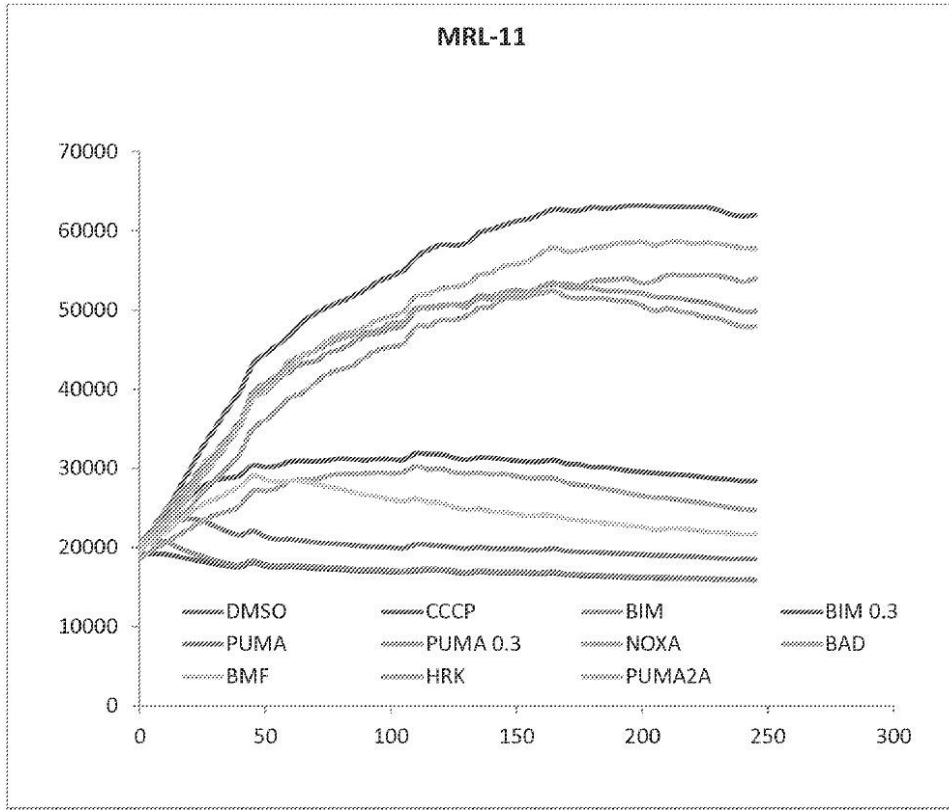


FIG. 1, 続き

【 図 2 】

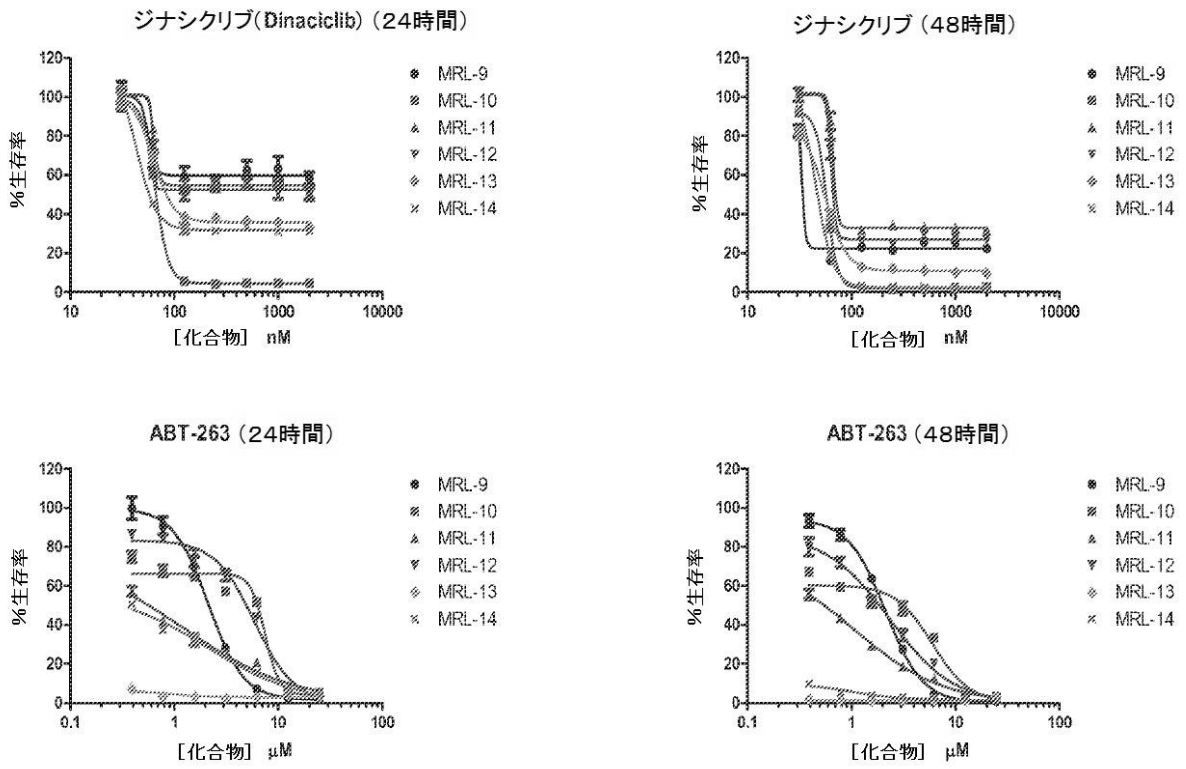


FIG. 2

【 図 3 - 1 】

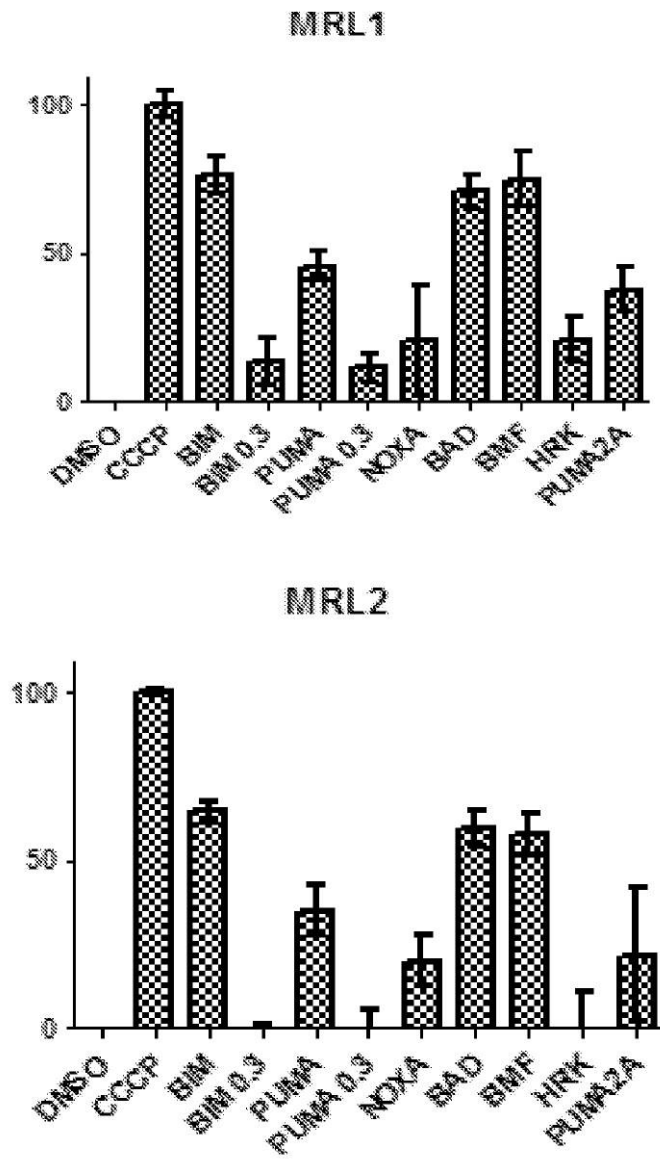


FIG 3

【 図 3 - 2 】

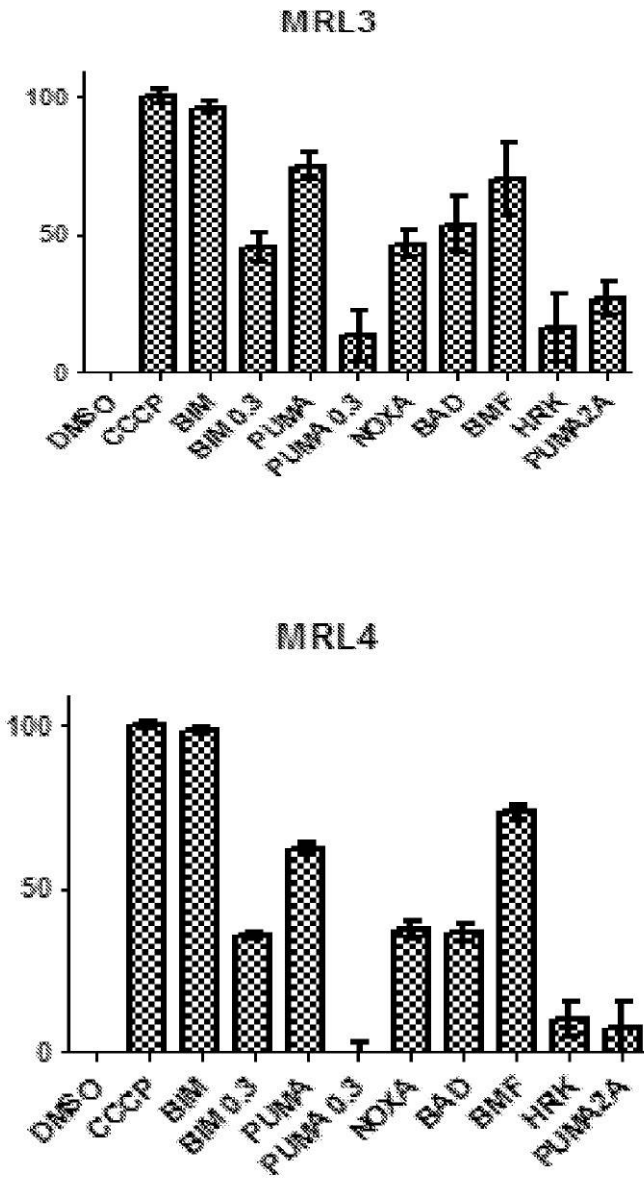


FIG. 3, 続き

【 図 3 - 3 】

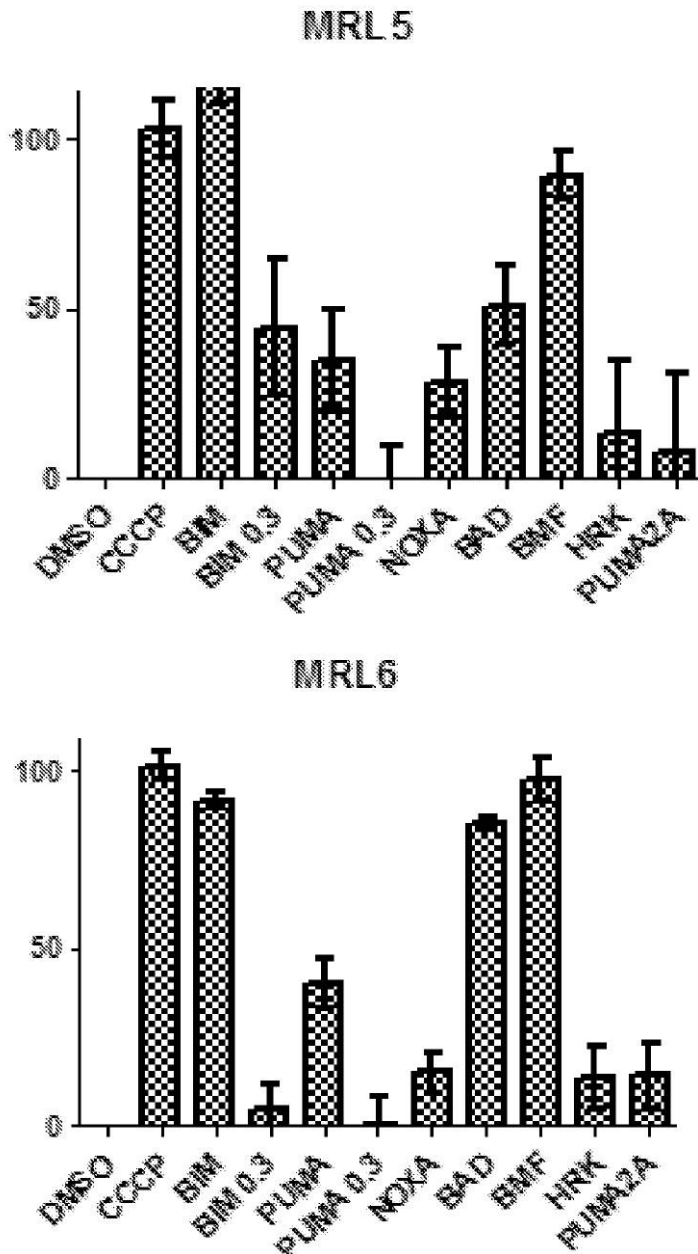


FIG. 3, 続き

【 図 3 - 4 】

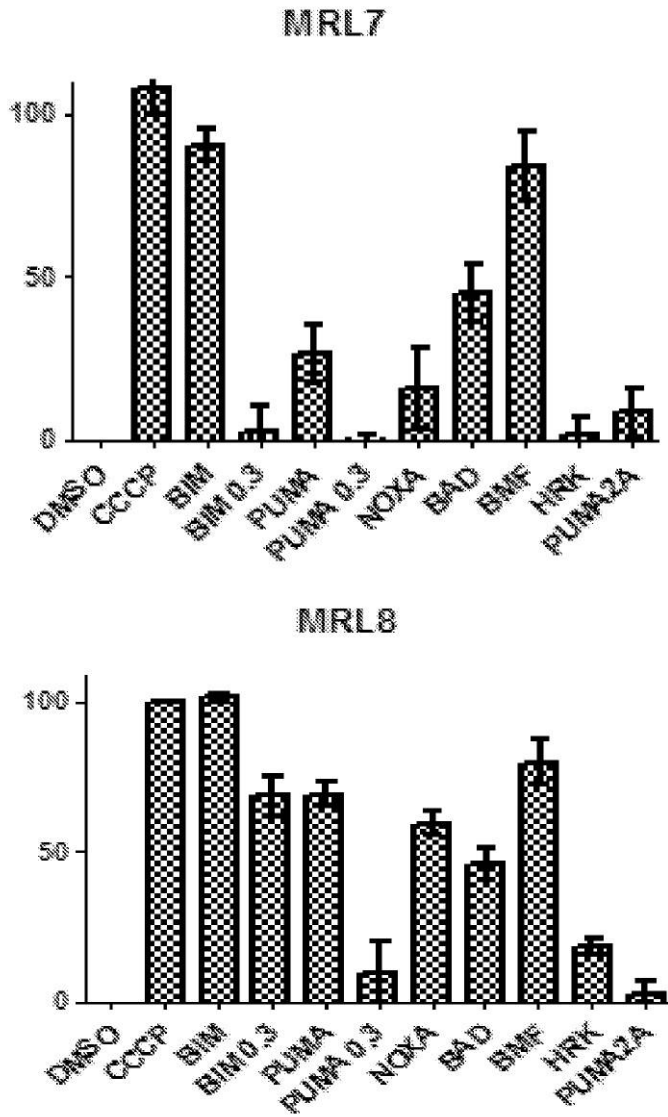


FIG. 3, 続き

【 図 4 - 1 】

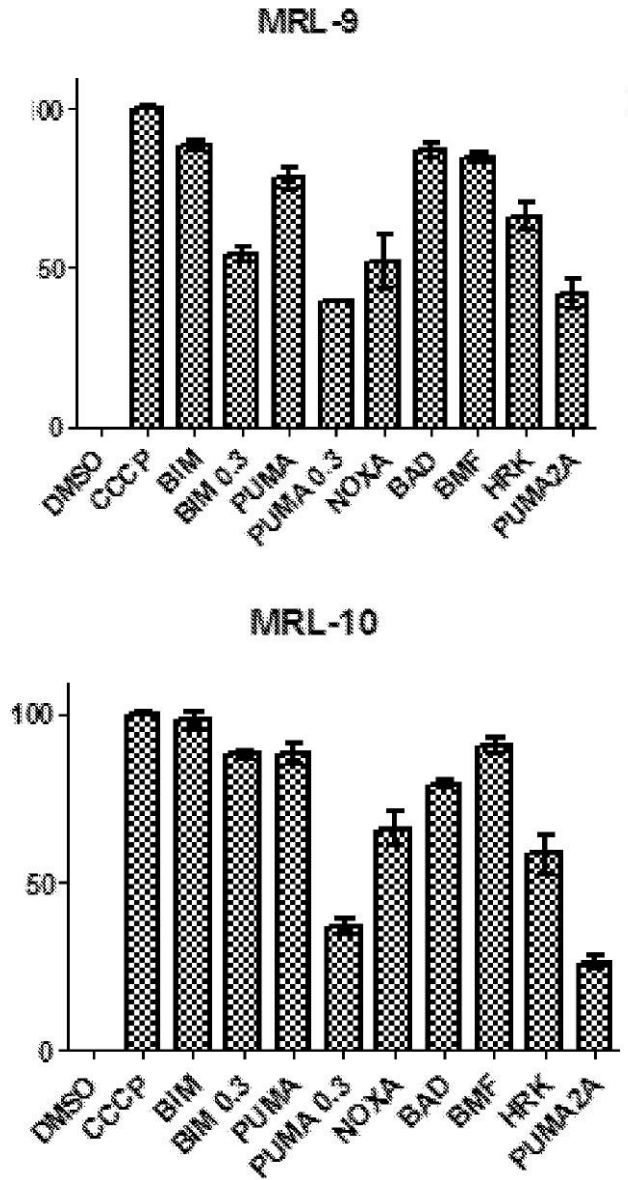


FIG. 4, 続き

【 図 4 - 2 】

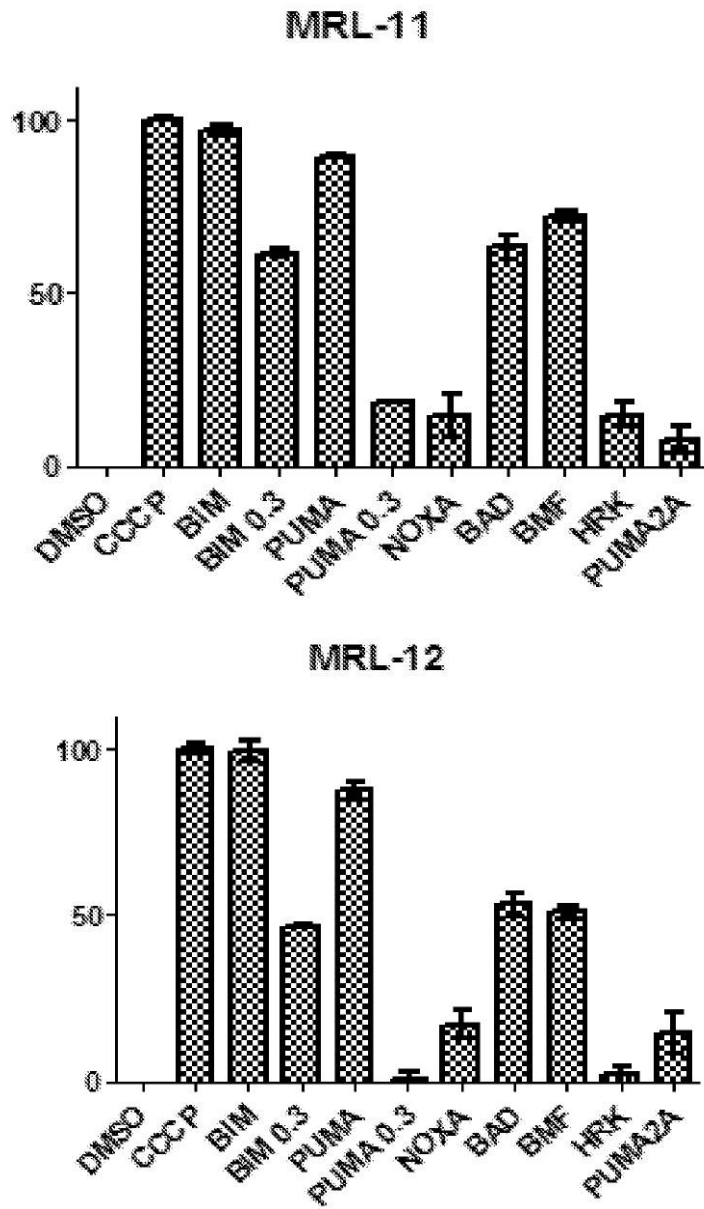


FIG. 4, 続き

【 図 4 - 3 】

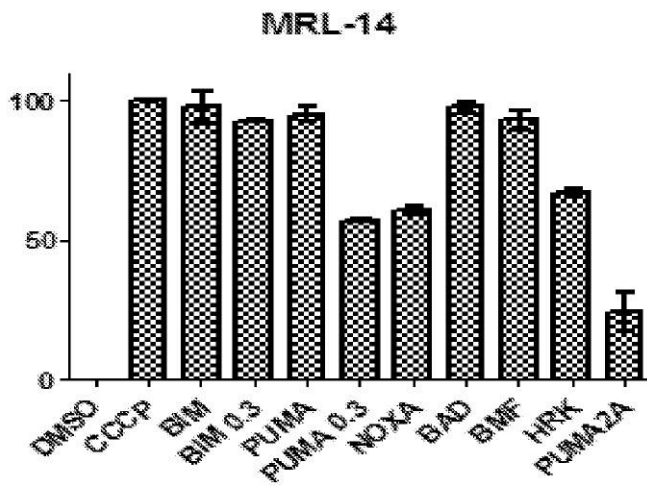
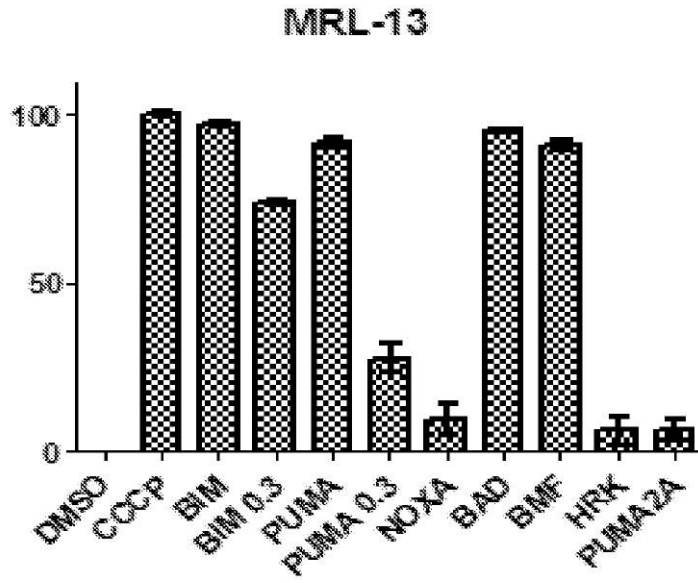


FIG. 4 続き

【 図 4 - 4 】

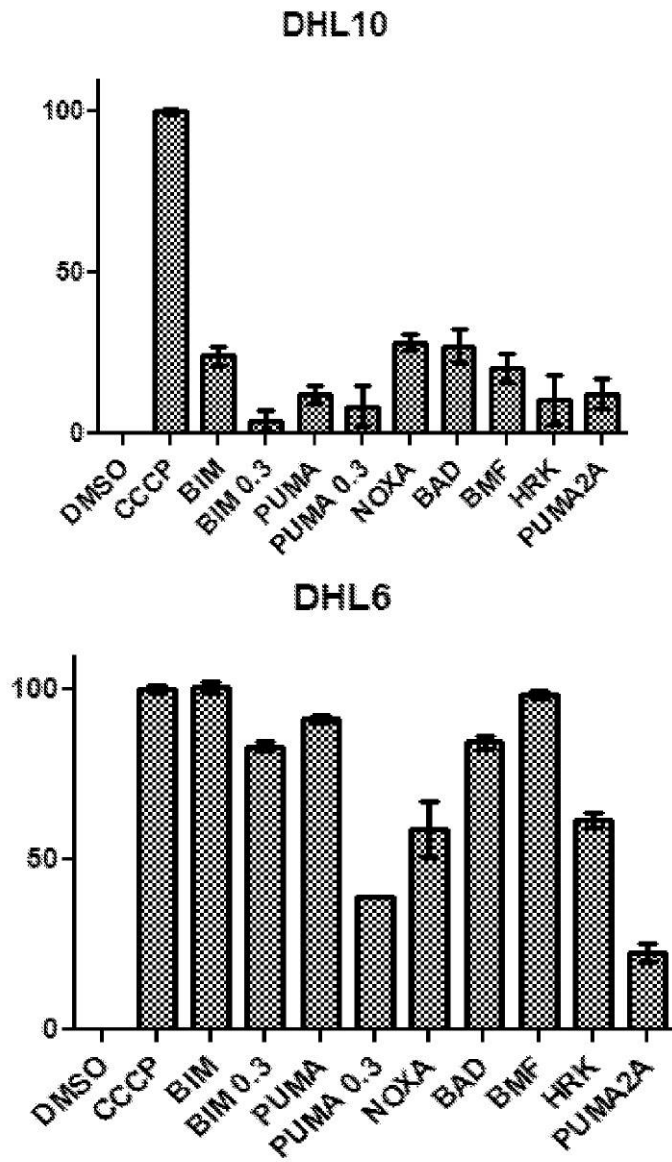


FIG 4, 続き

【 図 4 - 5 】

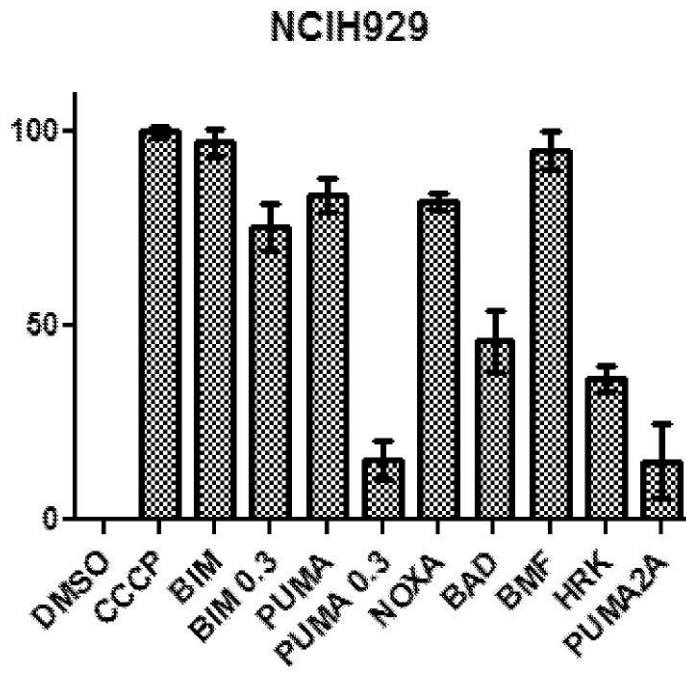


FIG. 4 続き

【 図 5 】

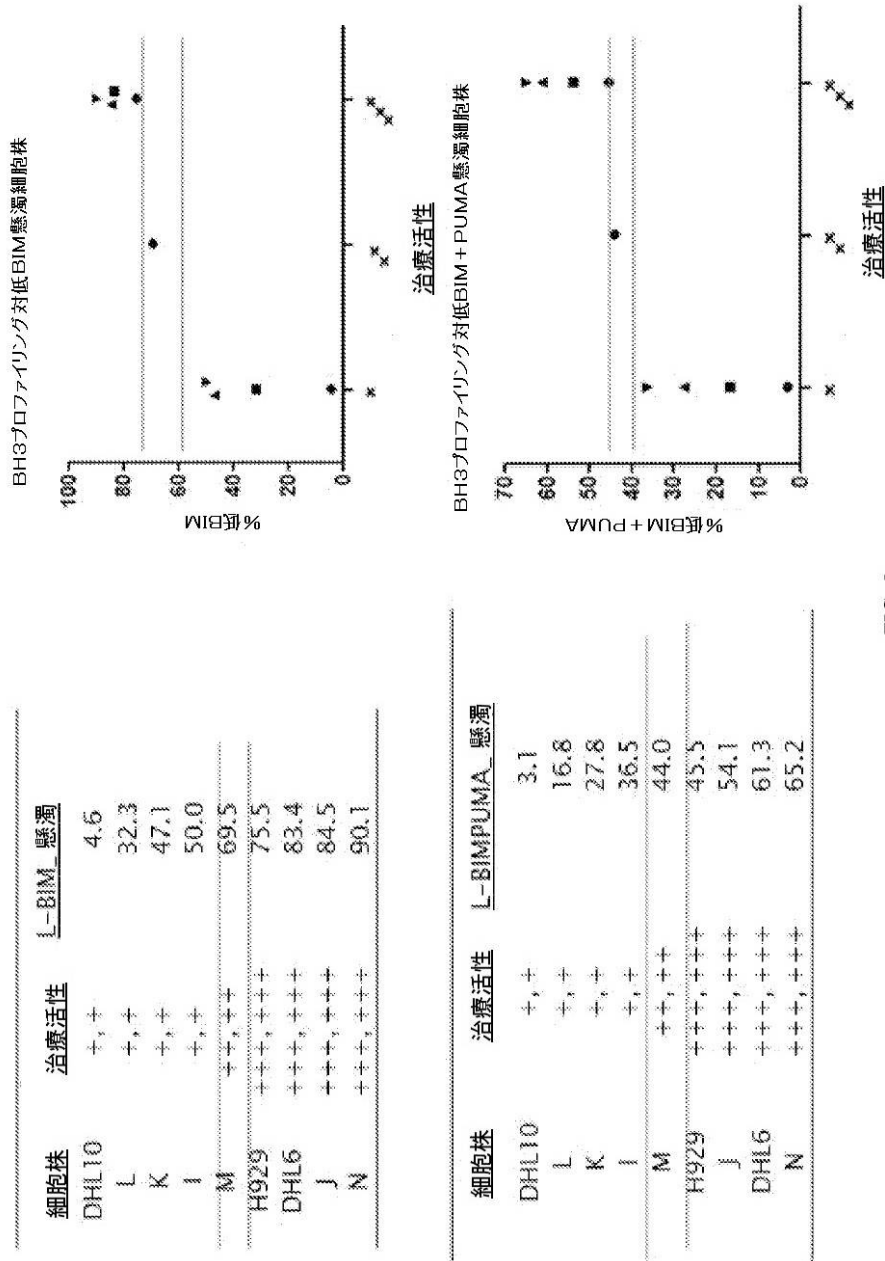
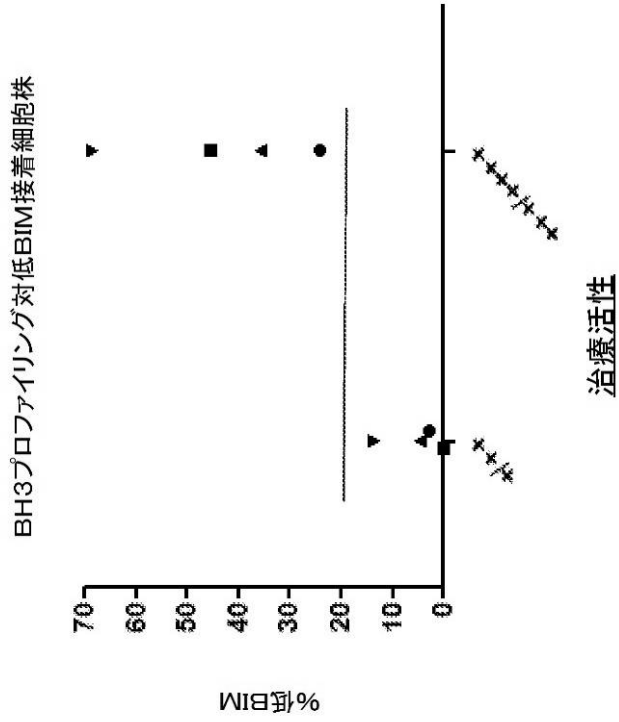


FIG. 5

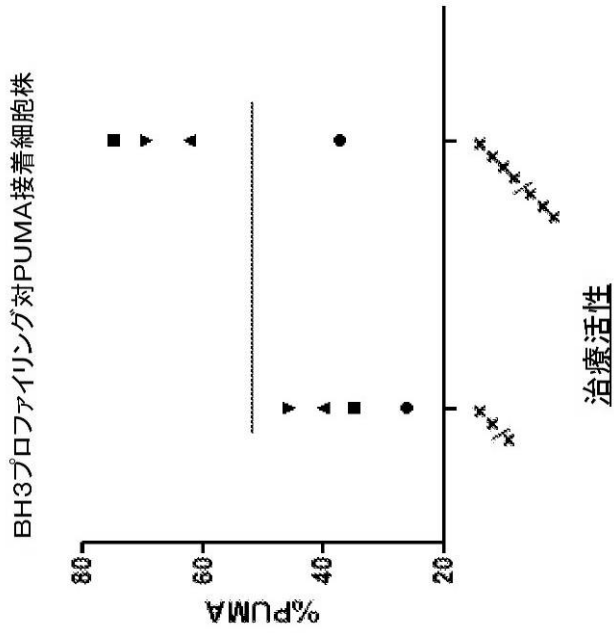
【 図 6 - 1 】



細胞株	治療活性	L-BIM 接着
G	+, +	2.8
B	+, ++	0
F	++, ++	4.5
A	++, ++	13.8
E	+++, ++++	24.3
C	+++, ++++	45.5
D	++++, ++++	35.7
H	++++, ++++	68.6

FIG. 6

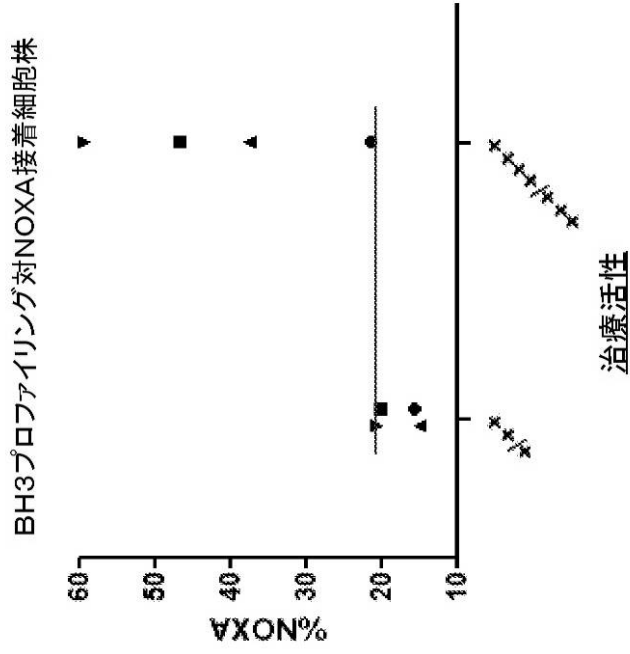
【 図 6 - 2 】



細胞株	治療活性	PUMA 接着
C	+, +	26.2
B	+, ++	35.1
F	++, ++	40
A	++, ++	45.9
E	+++, ++++	37.5
C	+++, ++++	75
D	+++, ++++	62.2
H	+++, ++++	69.4

FIG. 6, 続き

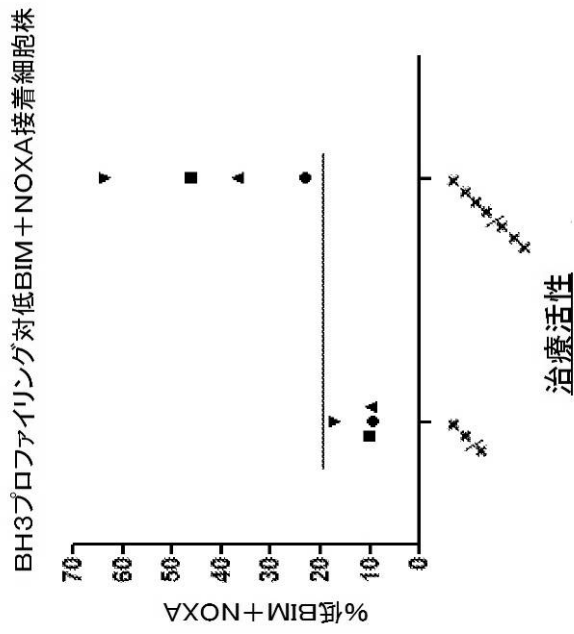
【 図 6 - 3 】



細胞株	治療活性	NOXA 接着
G	+, +	15.8
B	+, ++	20.2
F	++, ++	15.0
A	++, ++	20.7
E	+++, ++++	21.6
C	+++, ++++	46.7
D	+++, ++++	37.6
H	+++, ++++	59.5

FIG. 6, 続き

【 図 6 - 4 】



細胞株	治療活性	L BIMNOXA 接着
G	+, +	9.4
B	+, ++	10.1
F	++, ++	9.8
A	++, ++	17.3
E	+++, ++++	23
C	+++, ++++	46.1
D	+++, ++++	36.7
H	+++, ++++	63.7

FIG. 6, 続き

【 図 7 - 1 】

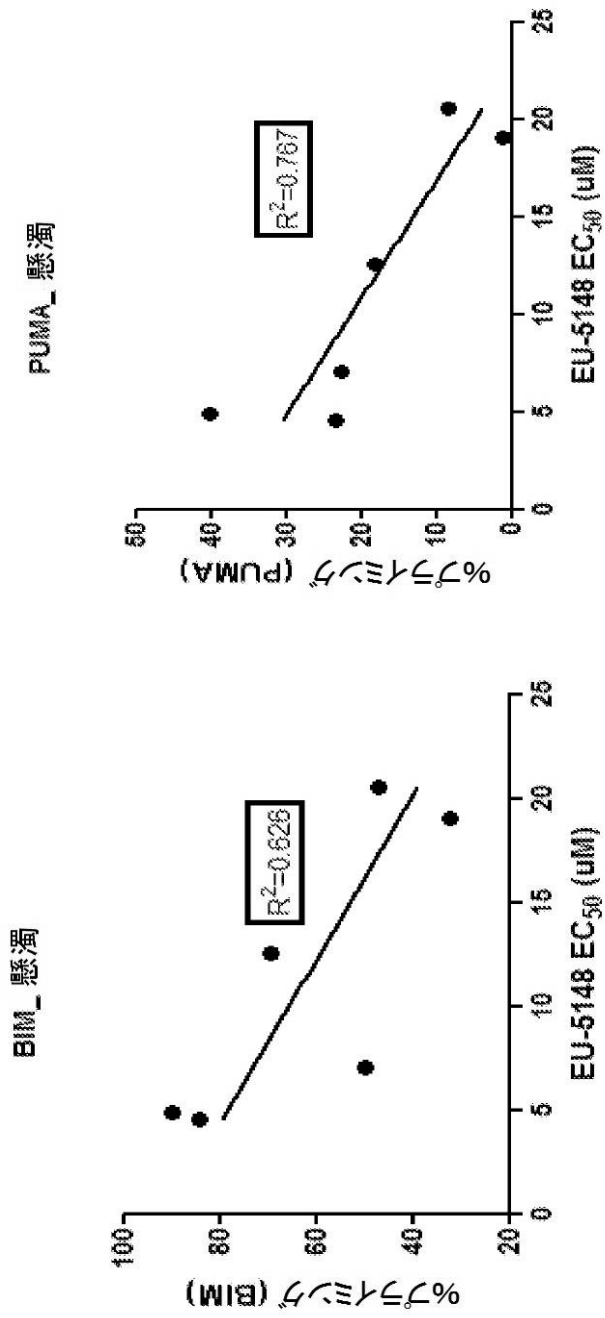


FIG. 7

【 図 7 - 2 】

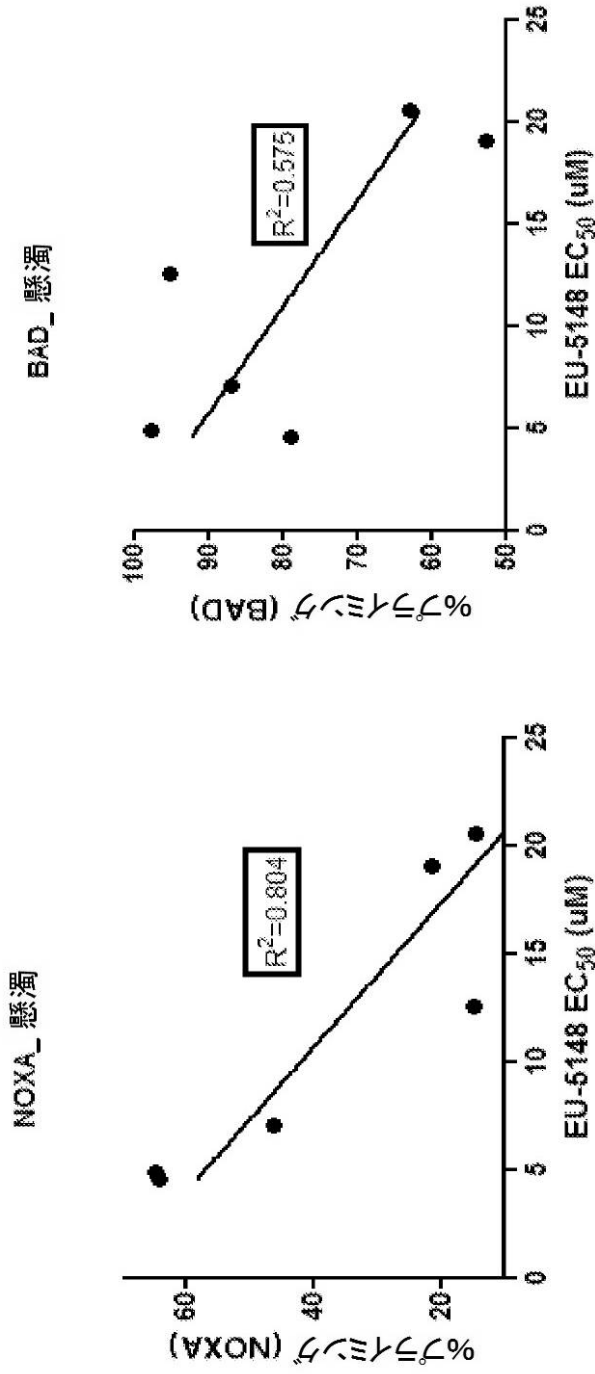


FIG. 7, 続き

【 図 7 - 3 】

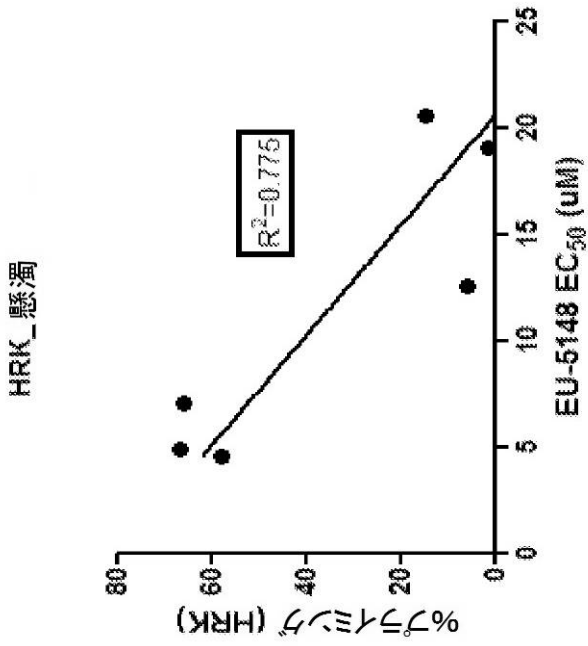


FIG. 7, 続き

【 図 8 - 1 】

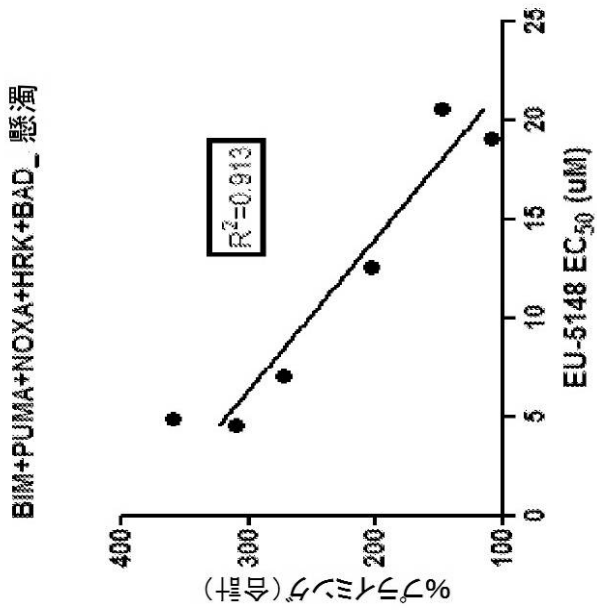
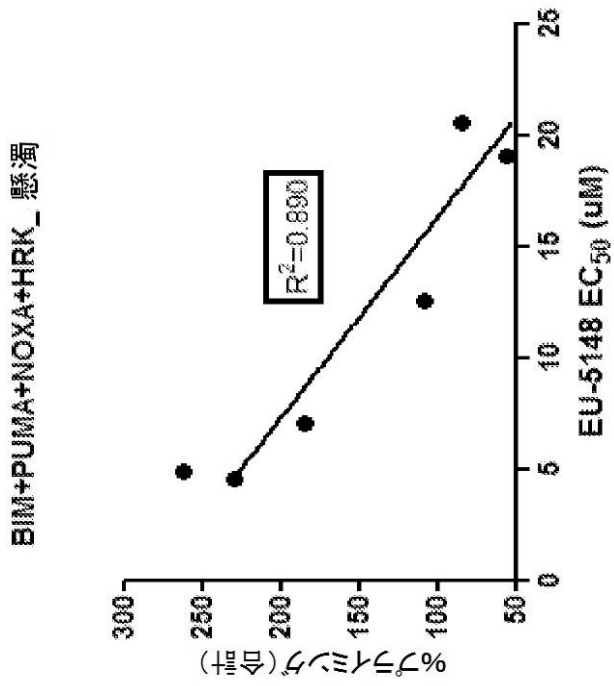


FIG. 8

【 図 8 - 2 】

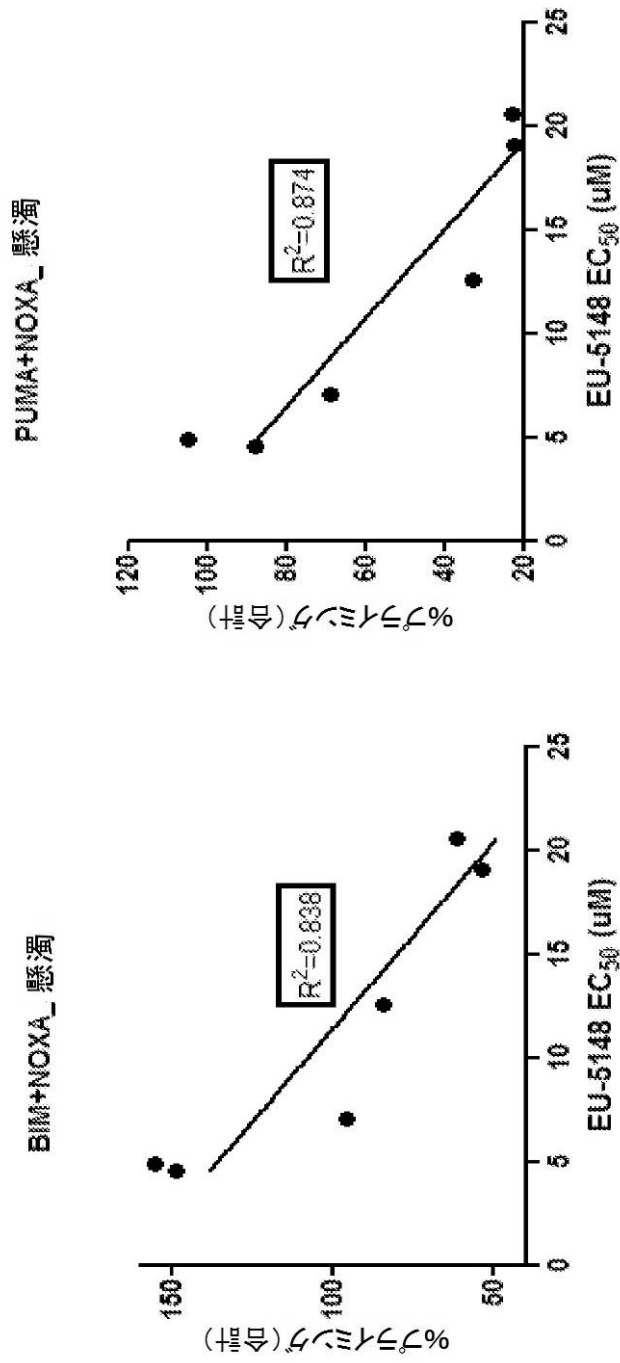


FIG. 8, 続き

【 図 8 - 3 】

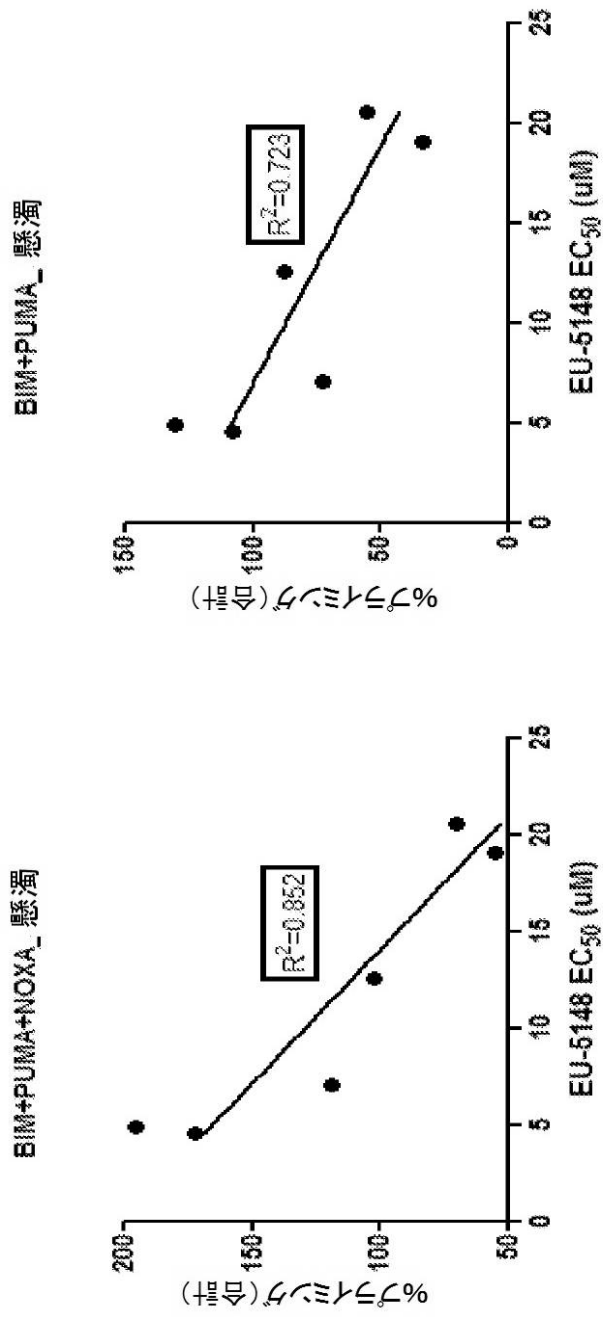


FIG. 8, 続き

【図 9 - 1】

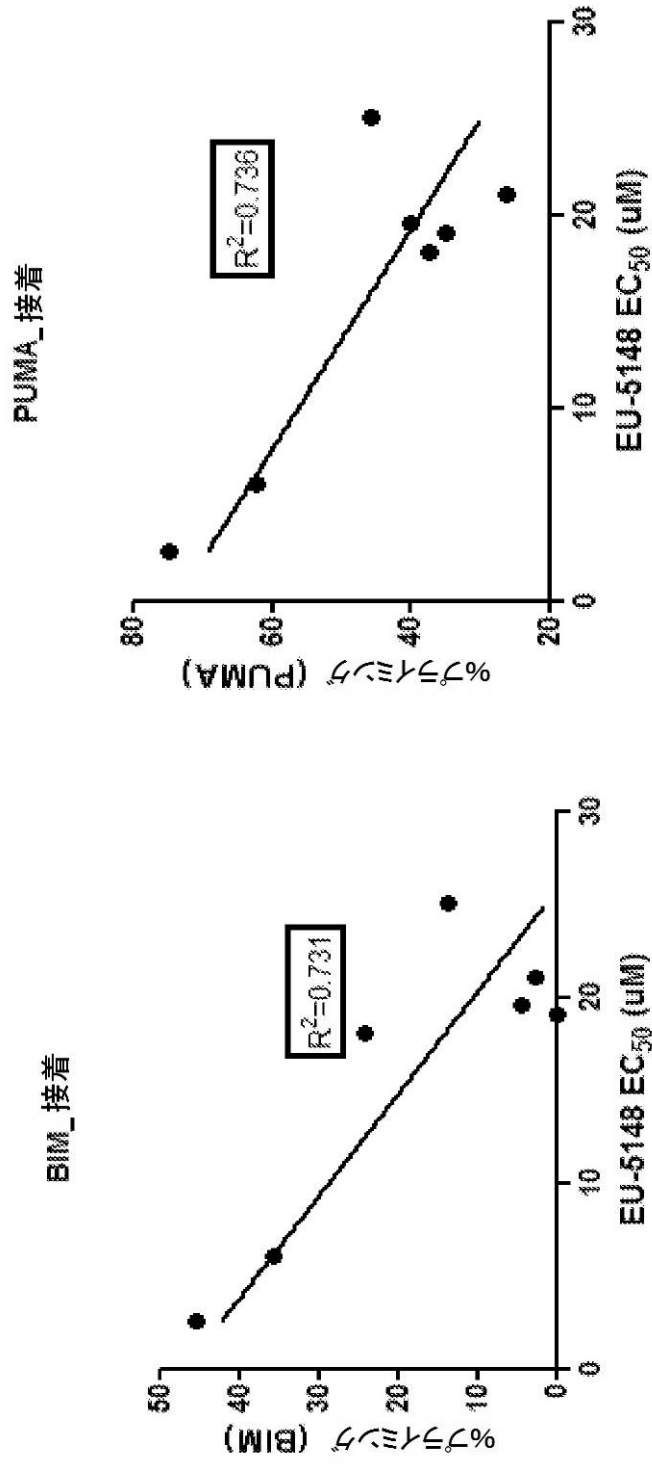


FIG. 9

【 図 9 - 2 】

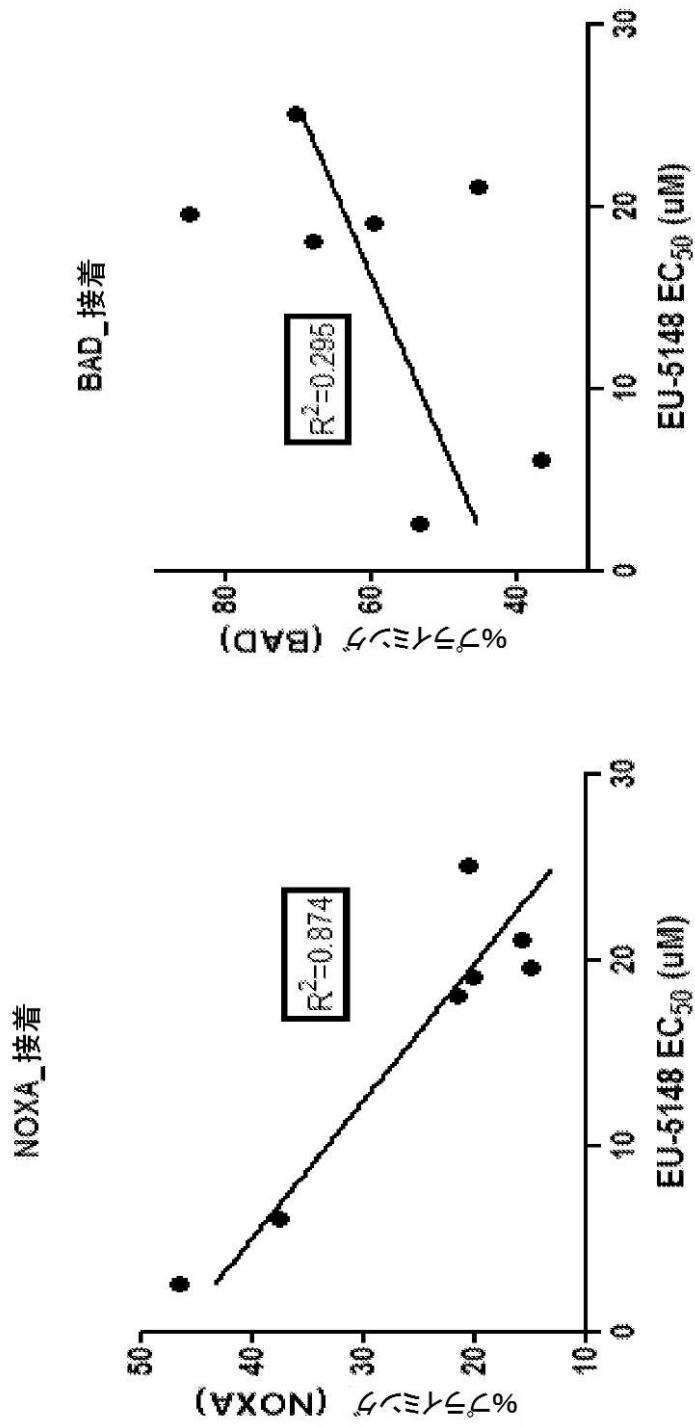


FIG. 9. 続き

【図 9 - 3】

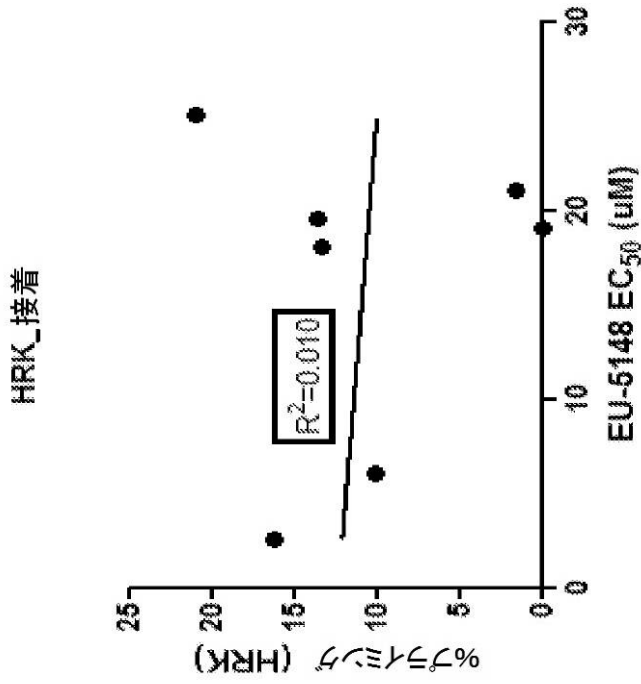


FIG. 9, 続き

【図 10 - 1】

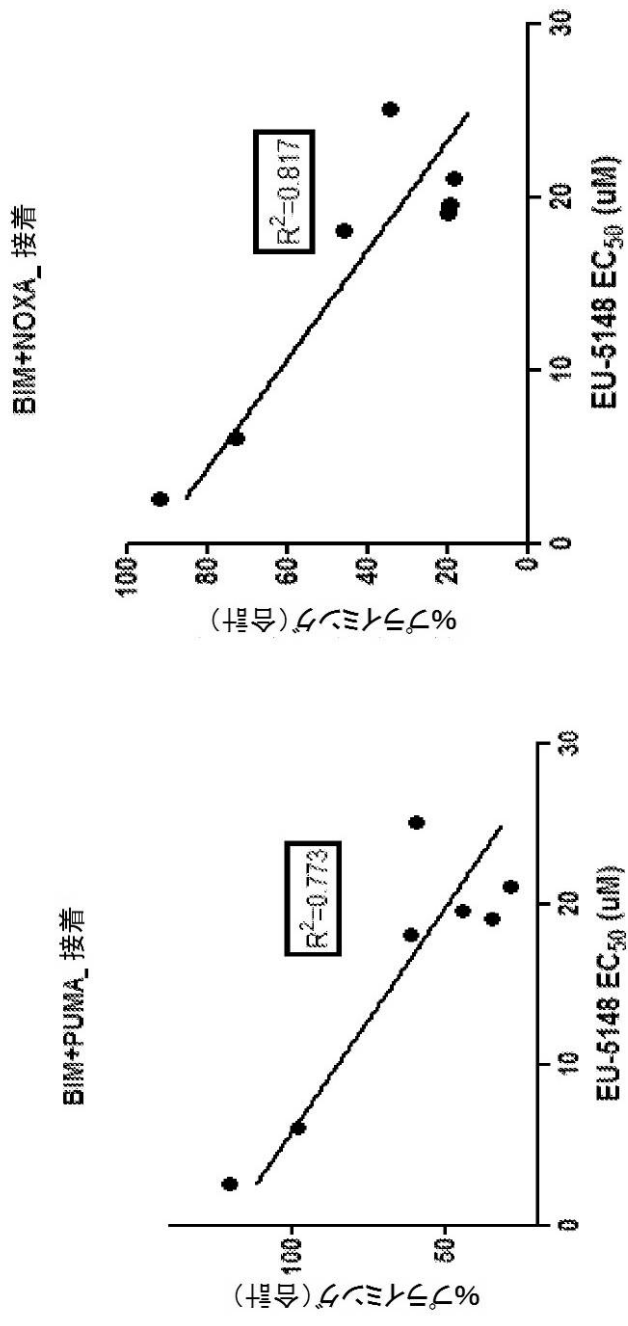


FIG. 10

【 図 1 0 - 2 】

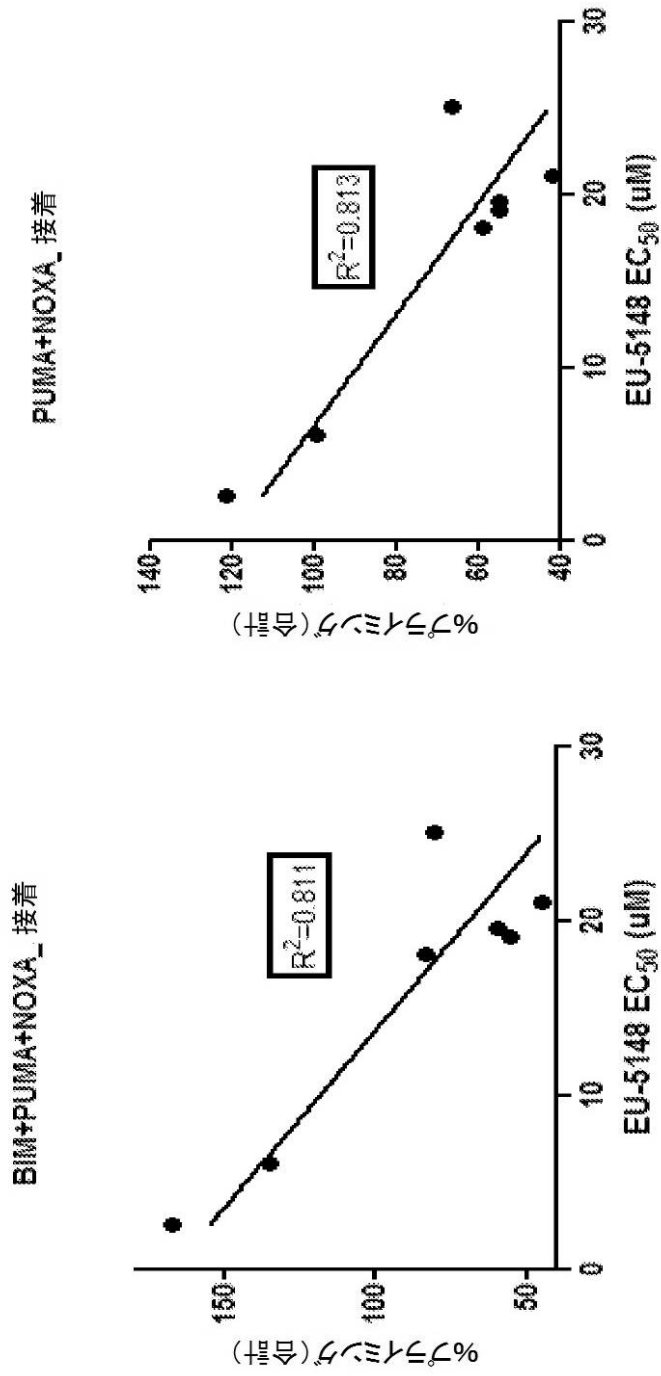


FIG. 10, 続き

【 図 1 0 - 3 】

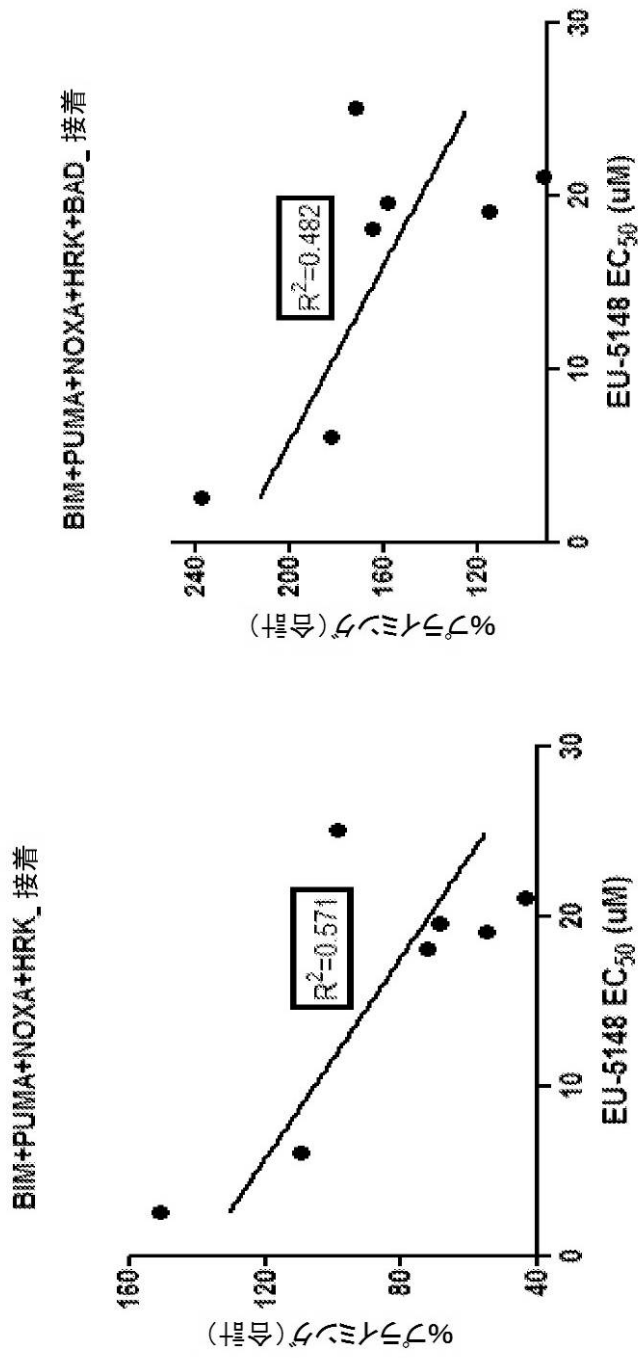


FIG. 10, 続き

【図11-1】

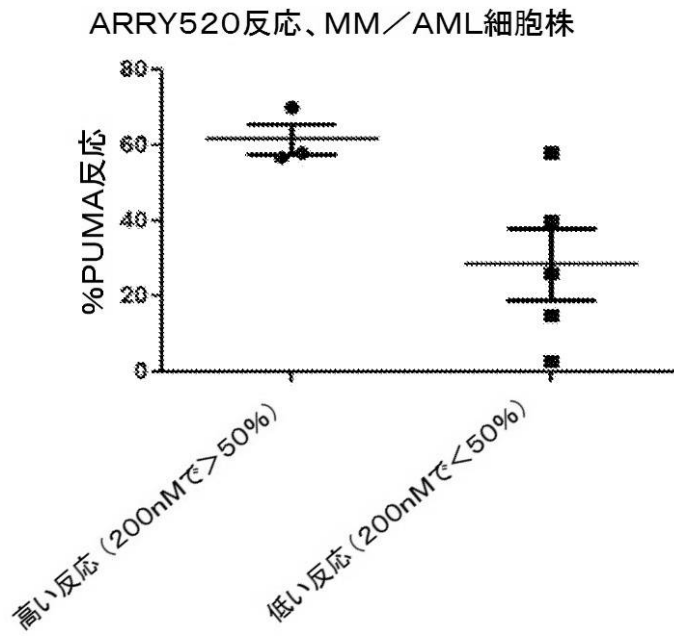
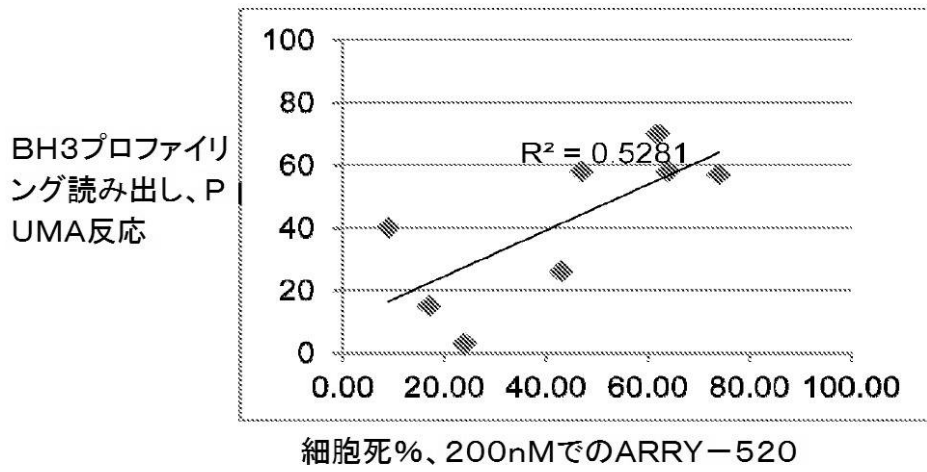
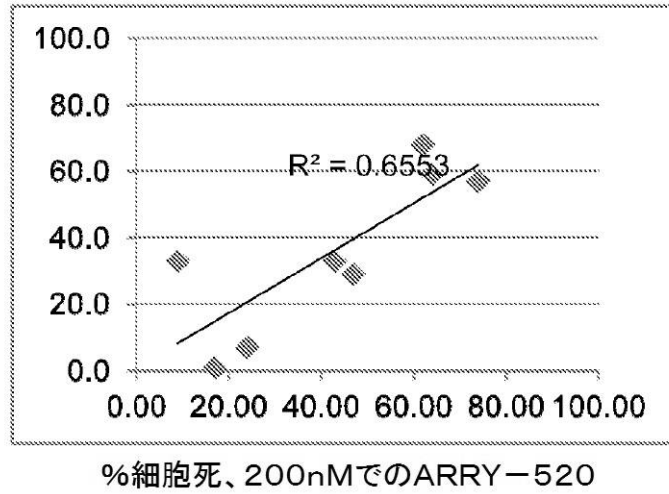


FIG. 11

【 図 1 1 - 2 】

BH3プロファイリング読み出し、BAD反応



ARRY520反応、MM/AML細胞株

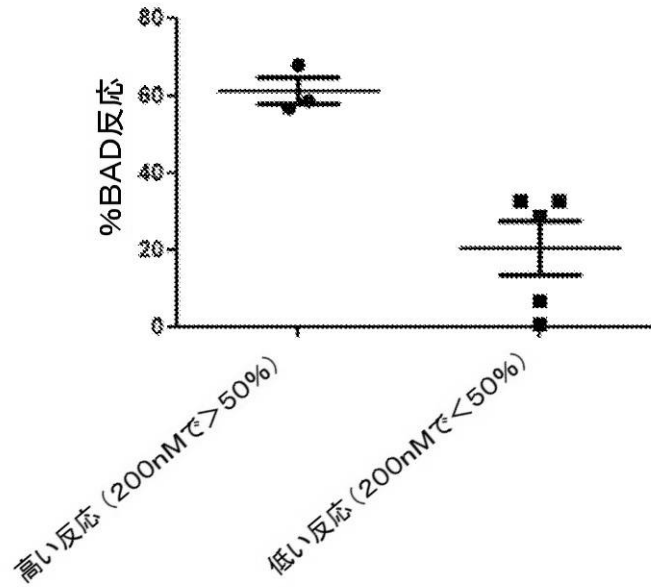


FIG. 11, 続き

【 図 1 2 - 1 】

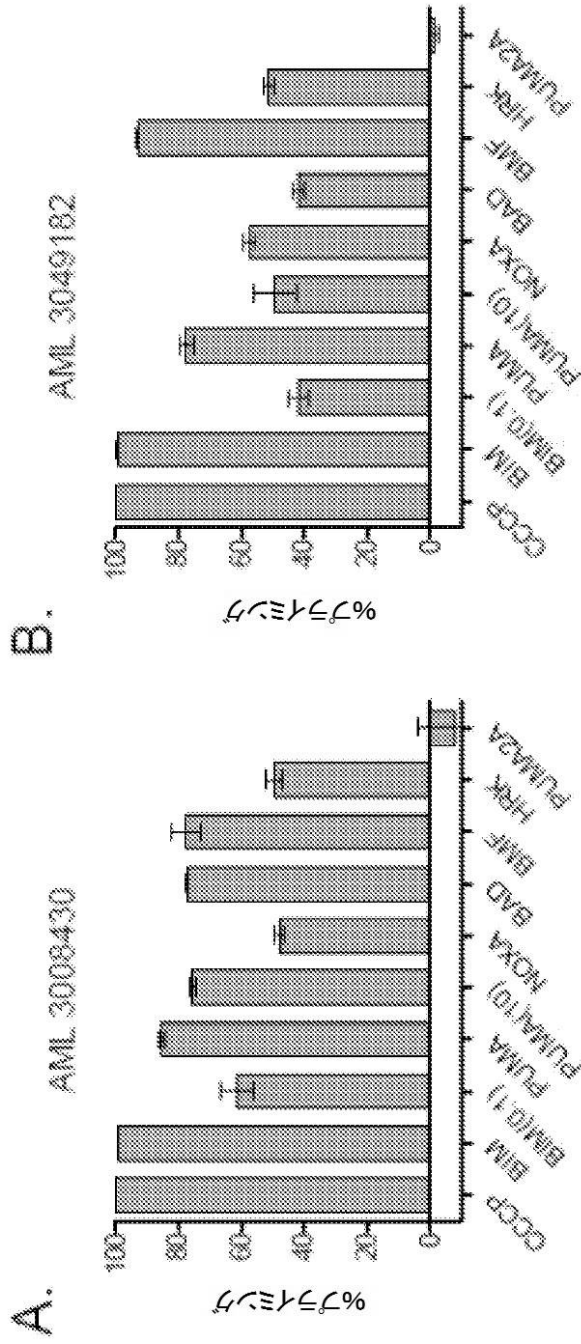


FIG. 12

【 図 1 2 - 2 】

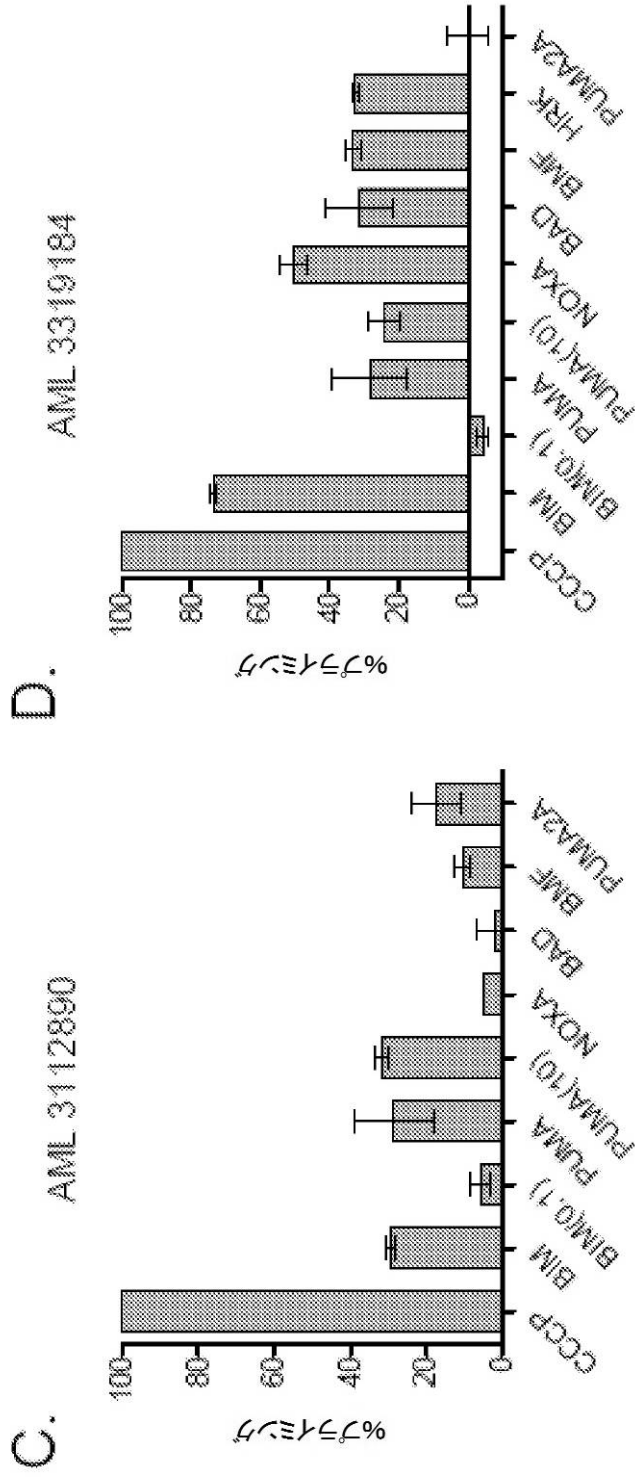
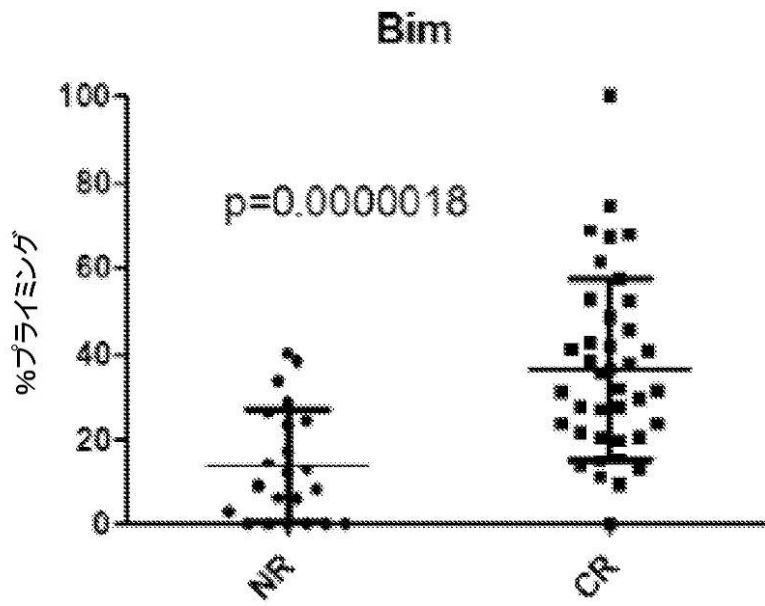


FIG. 12, 続き

【 図 1 3 】

A



B.

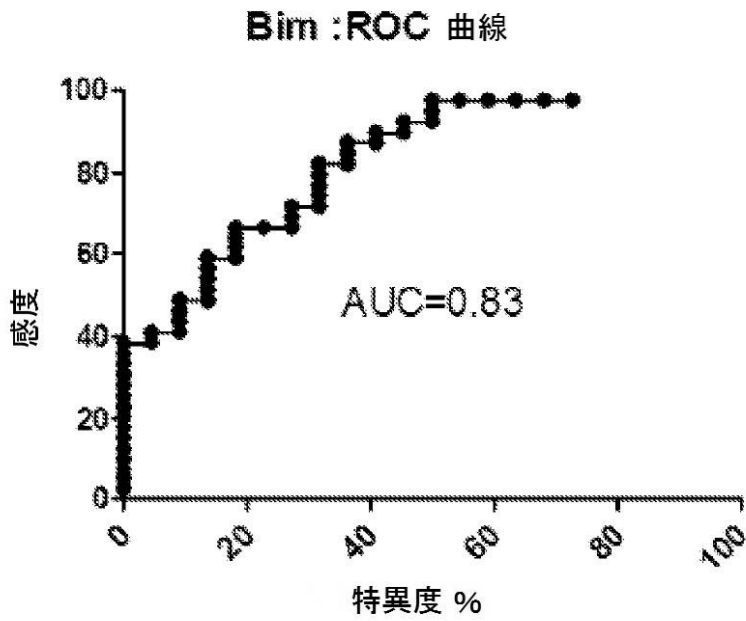


FIG. 13

【 図 14 - 1 】

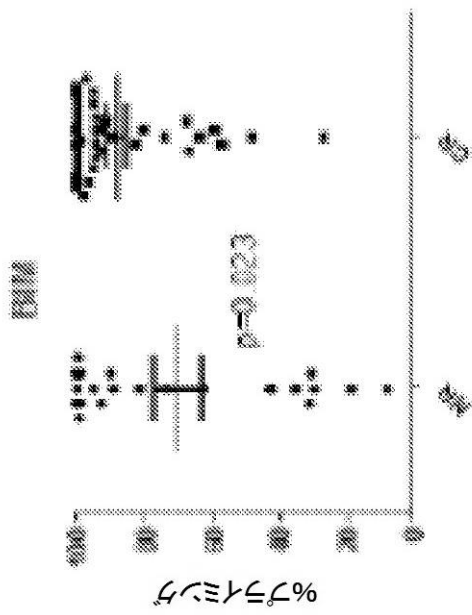
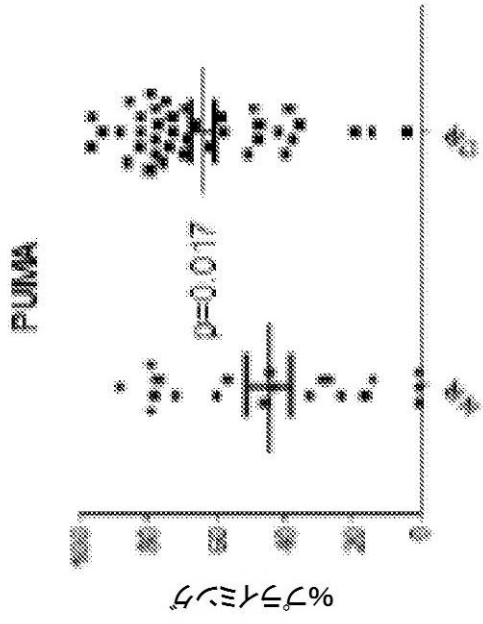


FIG. 14

【 図 1 4 - 2 】

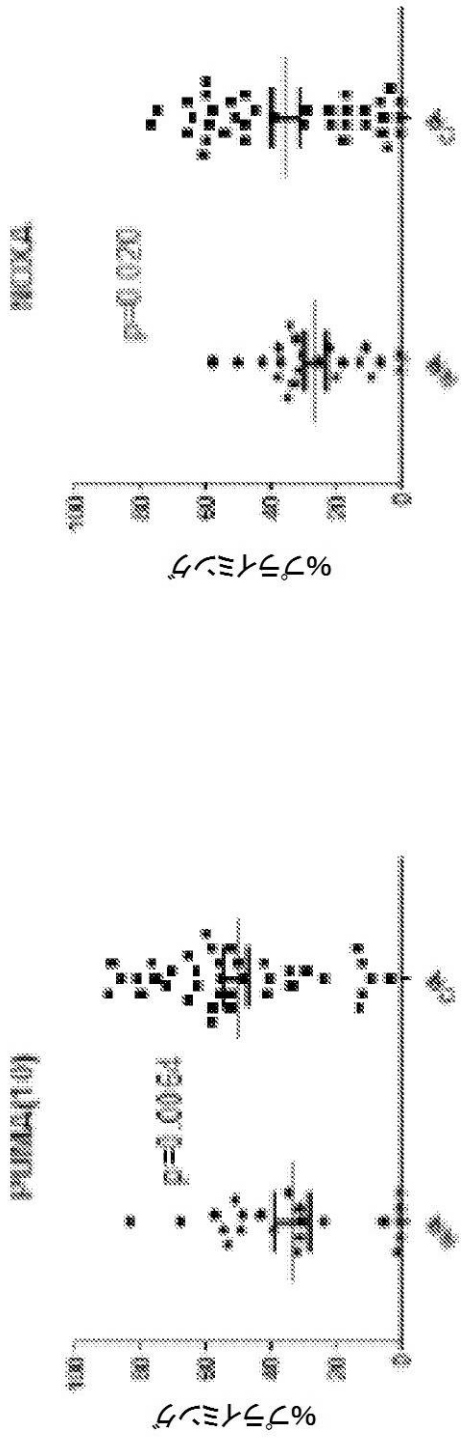


FIG. 14, 続き

【 図 1 4 - 3 】

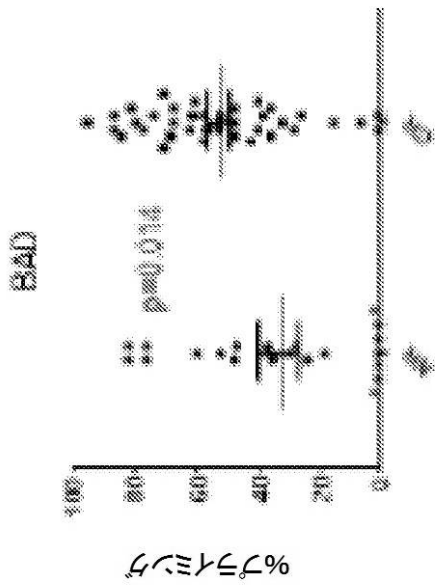
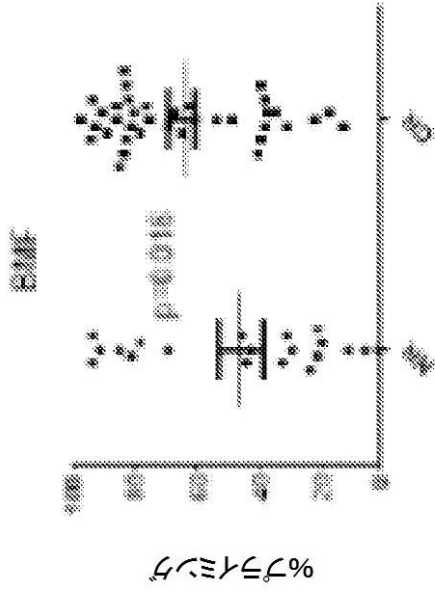


FIG. 14, 続き

【 図 1 4 - 4 】

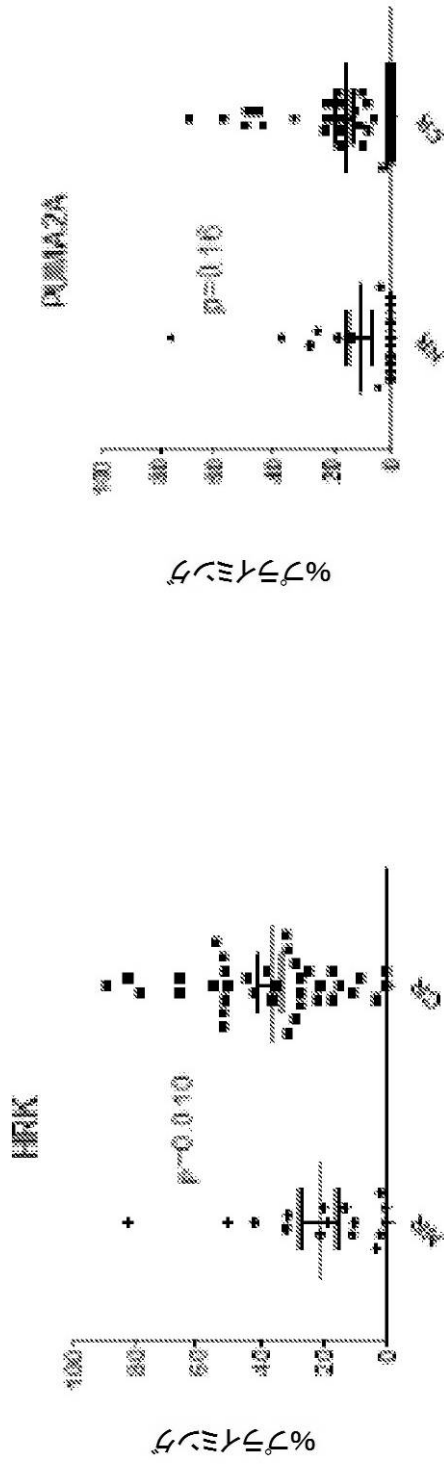


FIG. 14, 続き

【 図 1 5 】

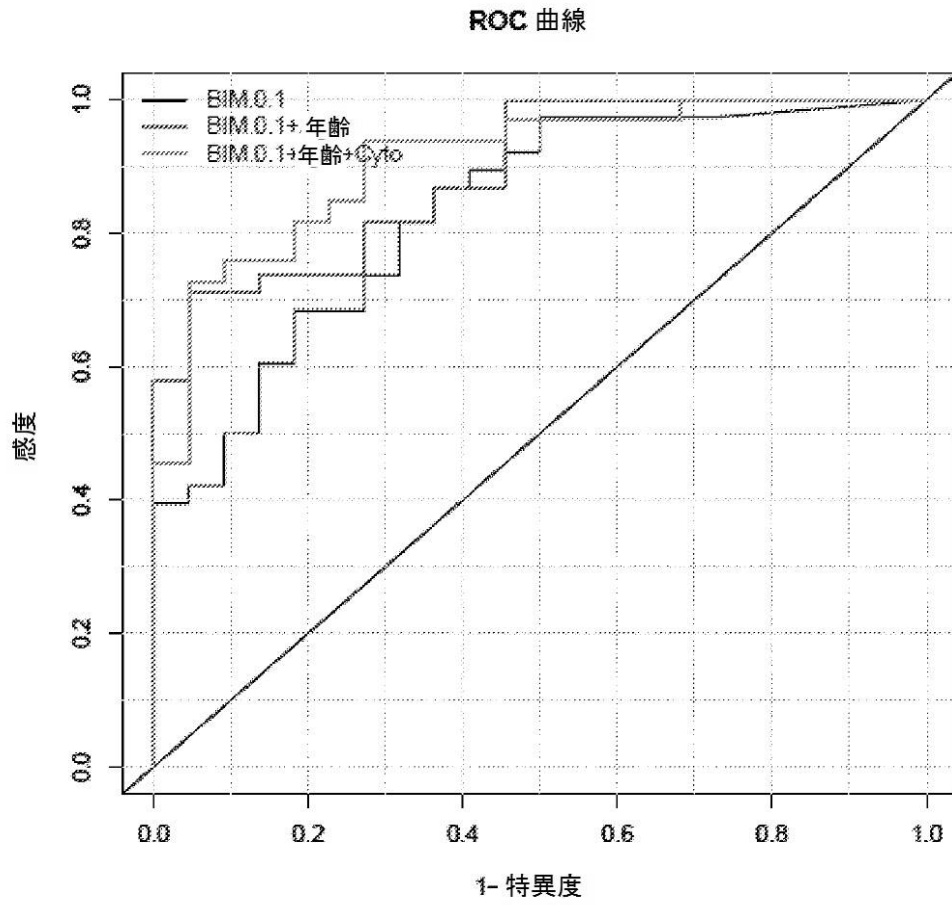


FIG. 15

【 図 1 6 - 1 】

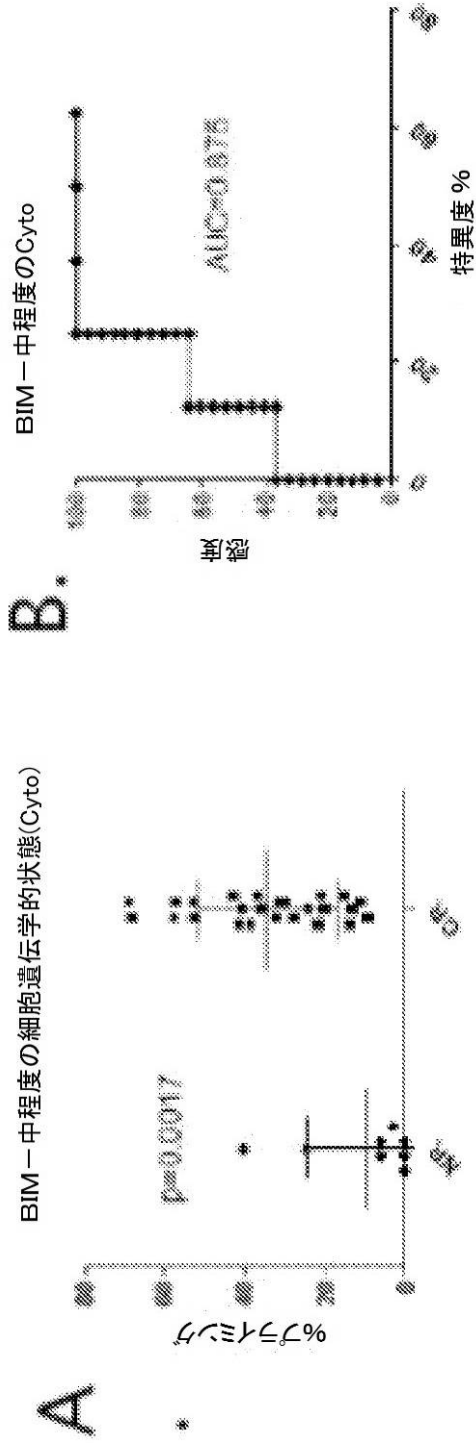


FIG. 16

【図 16 - 2】

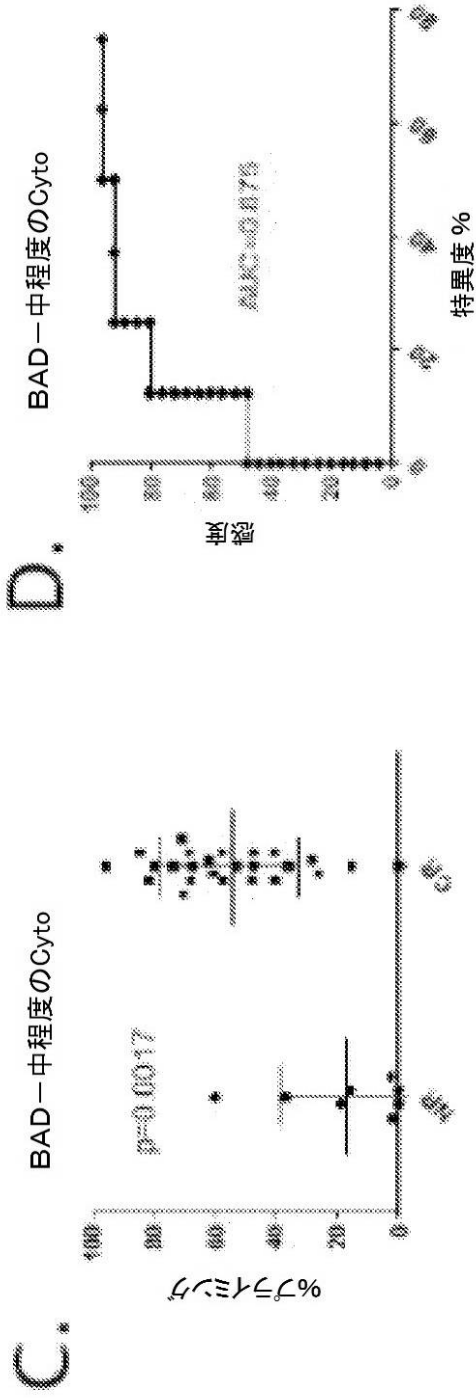


FIG. 16, 続き

【 図 1 6 - 3 】

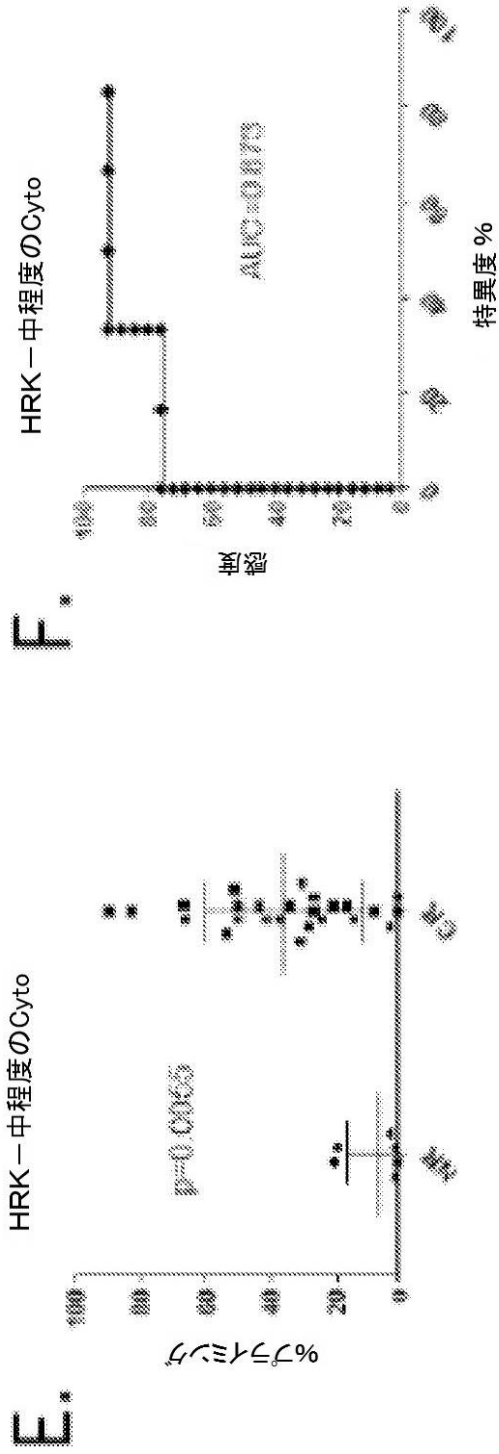


FIG. 16, 続き

【 図 1 6 - 4 】

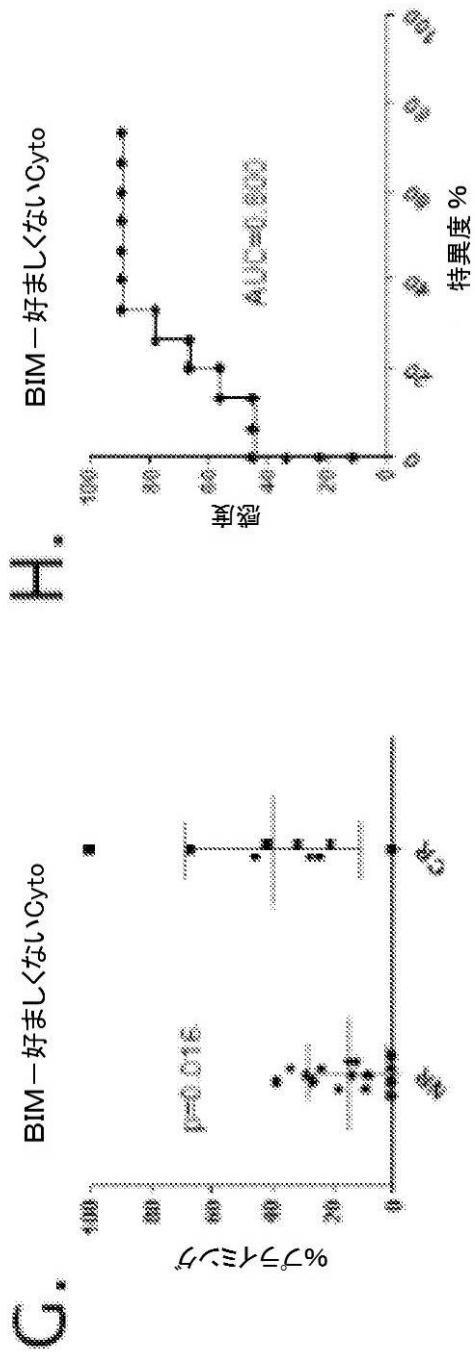


FIG. 16, 続き

【 図 17 - 1 】

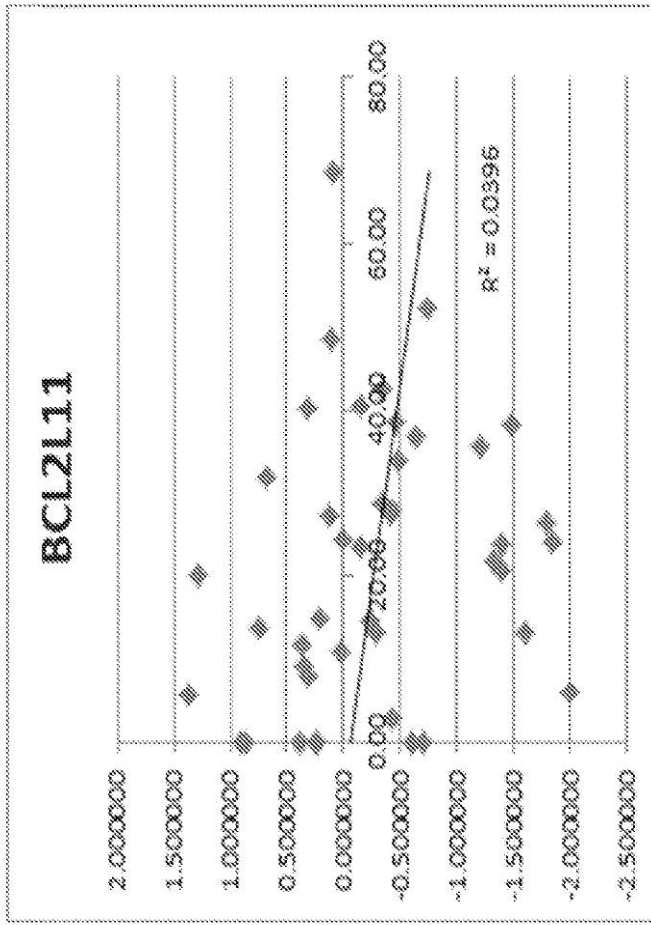
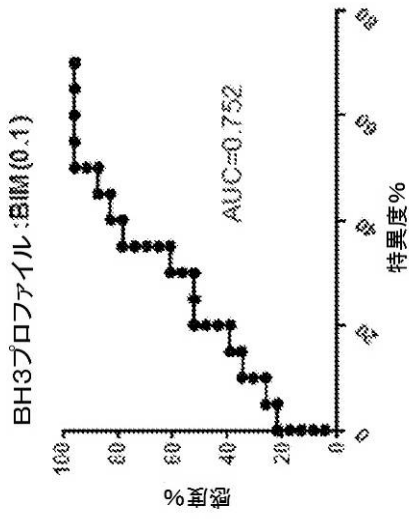
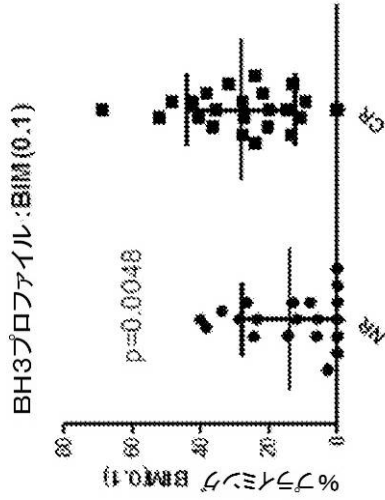


FIG. 17

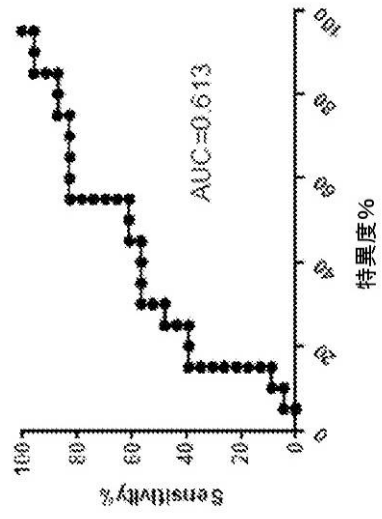
【 図 17 - 2 】



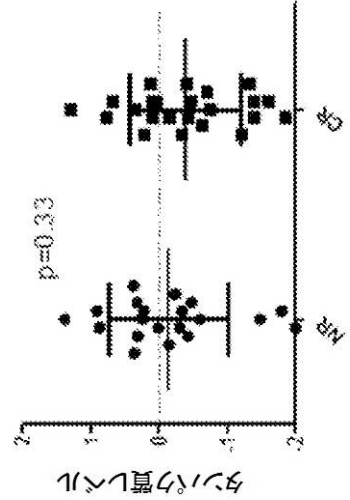
C.



B.



E.



D.

FIG. 17, 続き

【 図 1 8 】

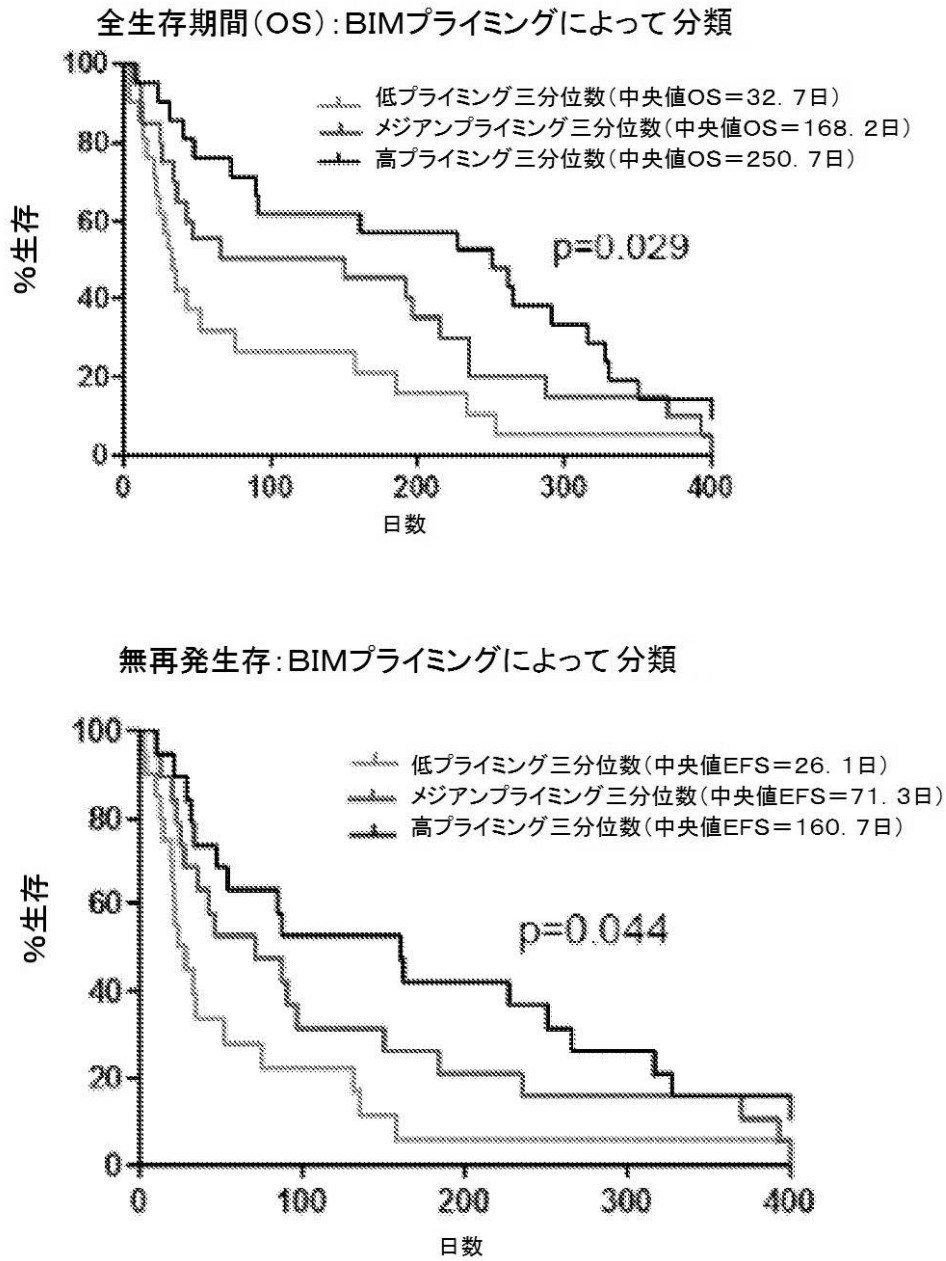


FIG. 18

【図 19 - 1】

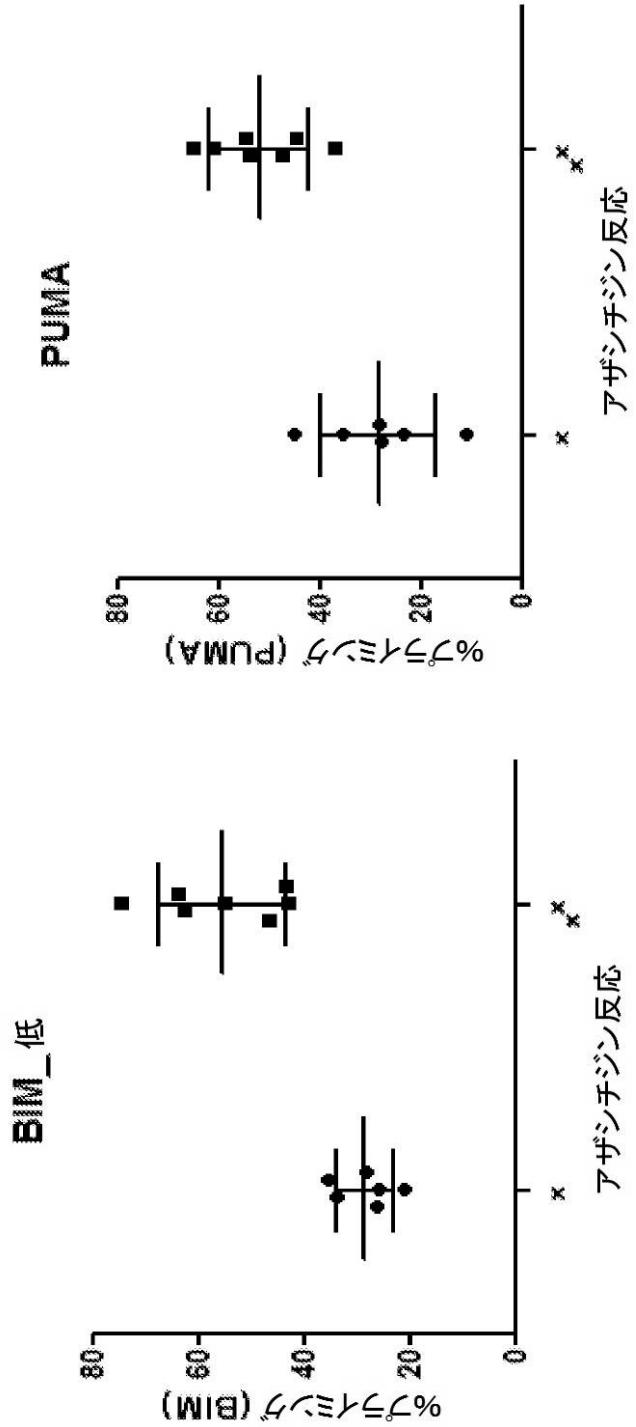


FIG. 19

【図 19 - 2】

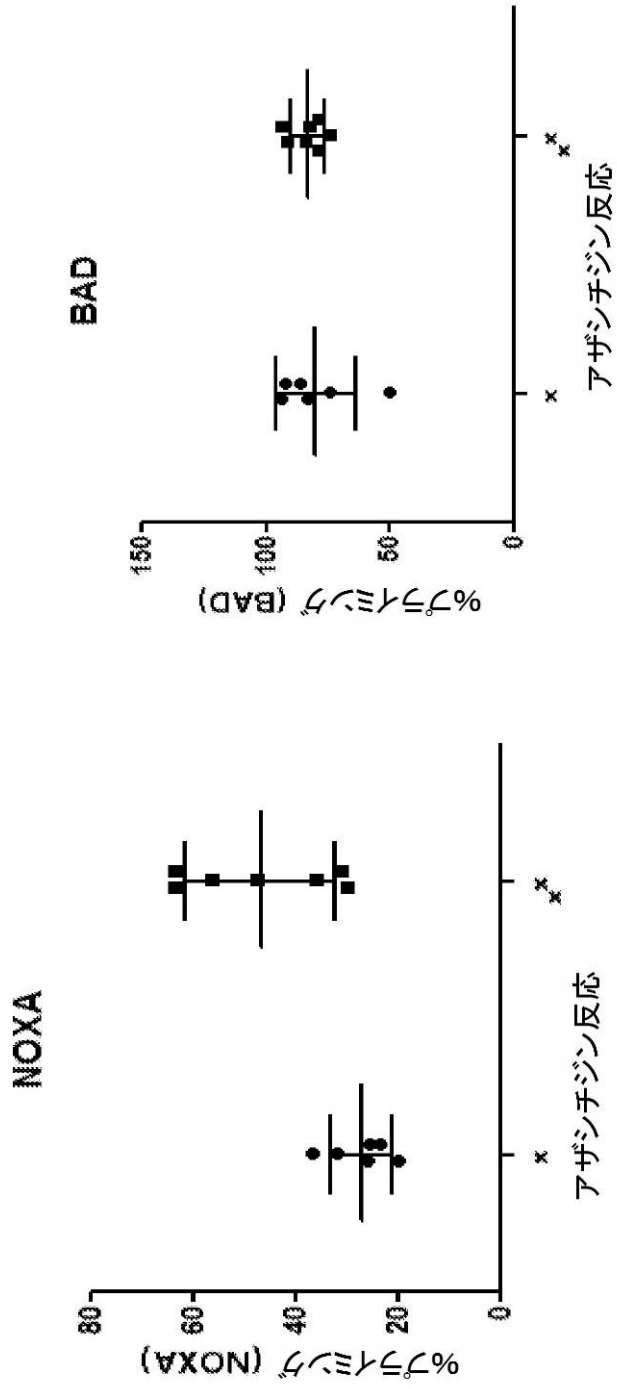


FIG. 19, 続き

【 図 19 - 3 】

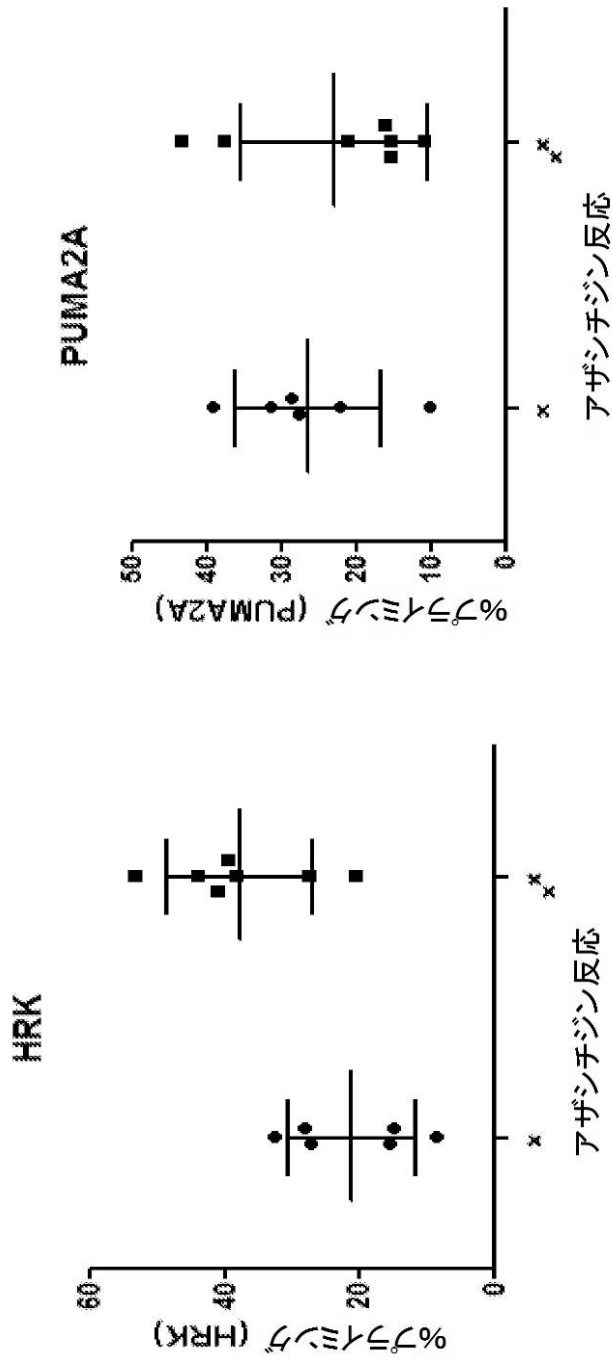


FIG. 19, 続き

【 図 2 0 】

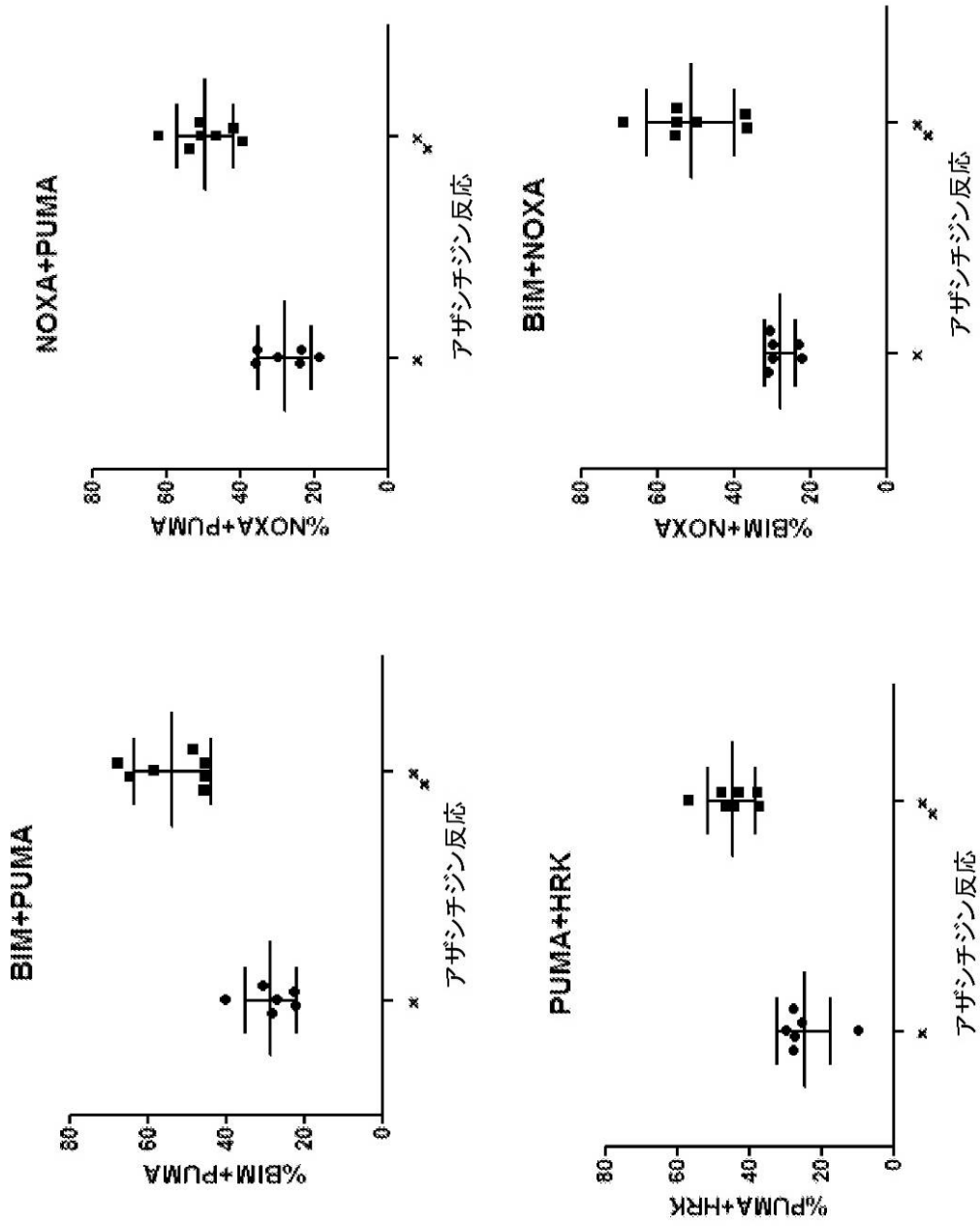


FIG. 20

【 図 2 1 - 1 】

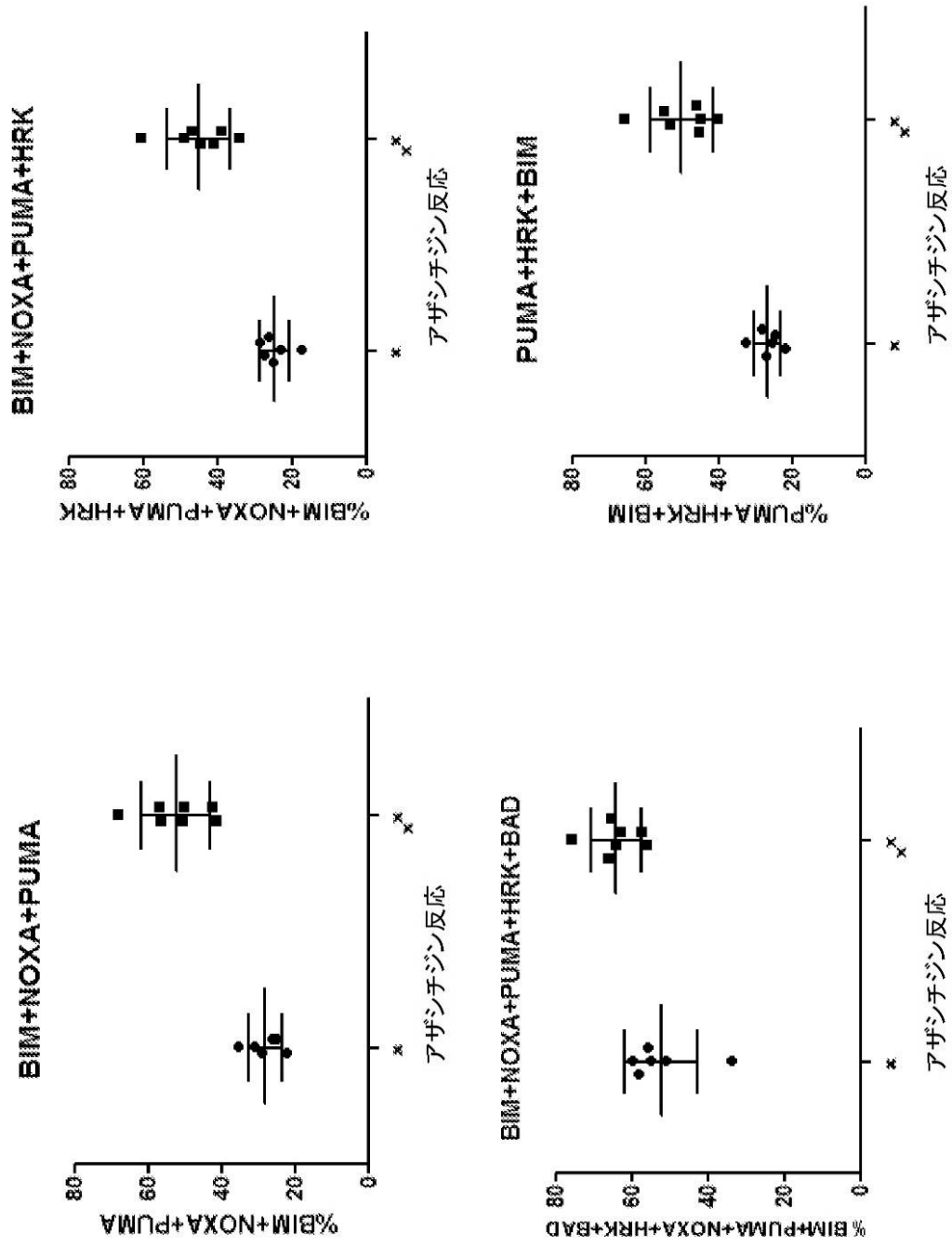


FIG. 21

【 図 2 1 - 2 】

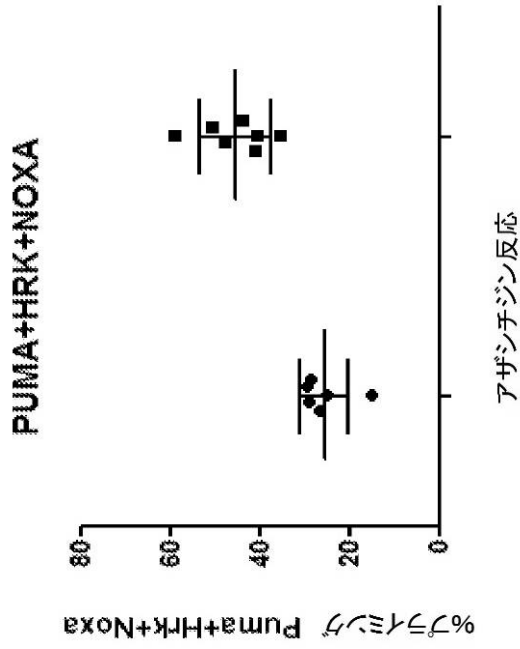


FIG. 21, 続き

【 図 2 2 - 1 】

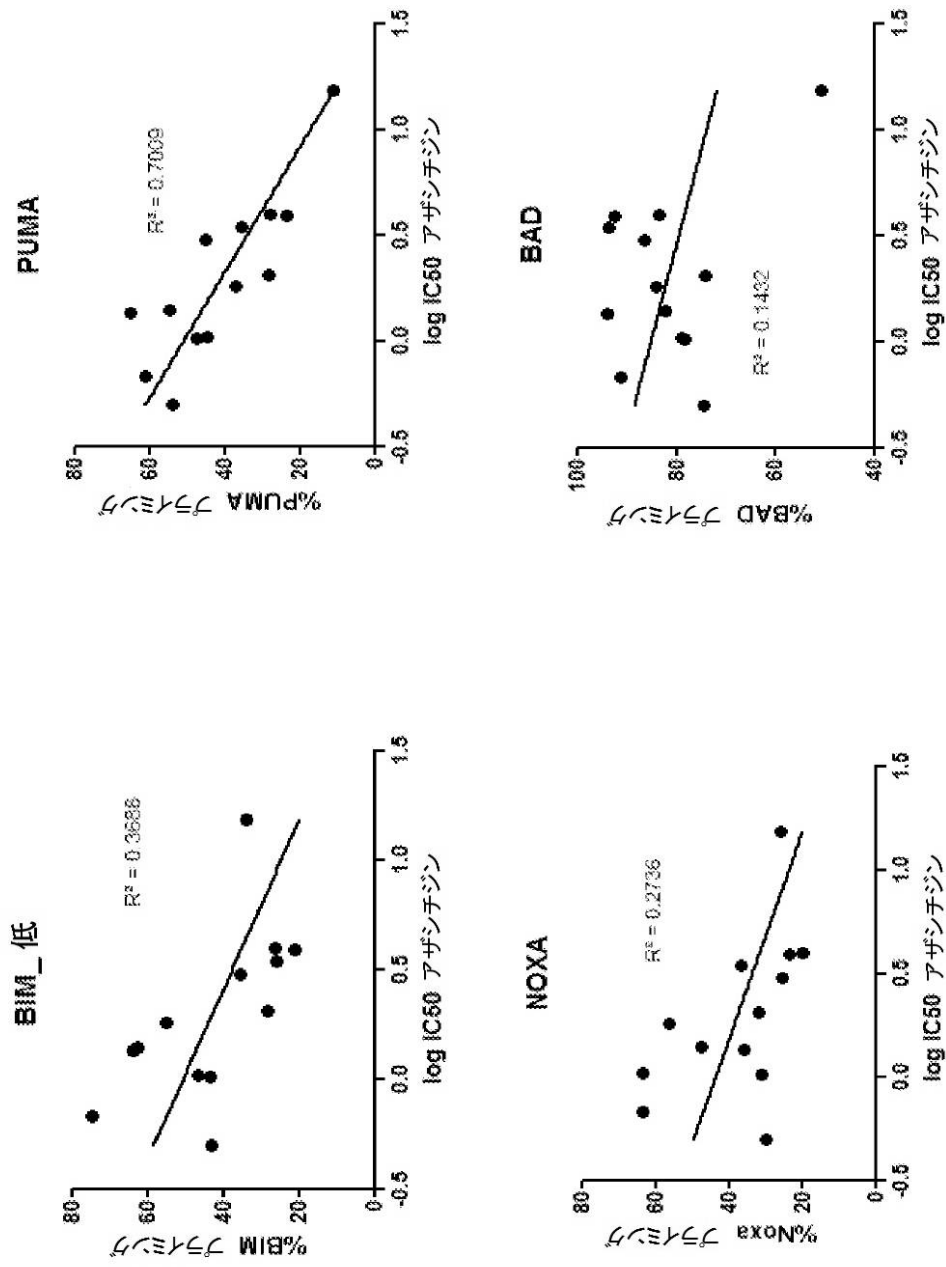


FIG. 22

【 図 2 2 - 2 】

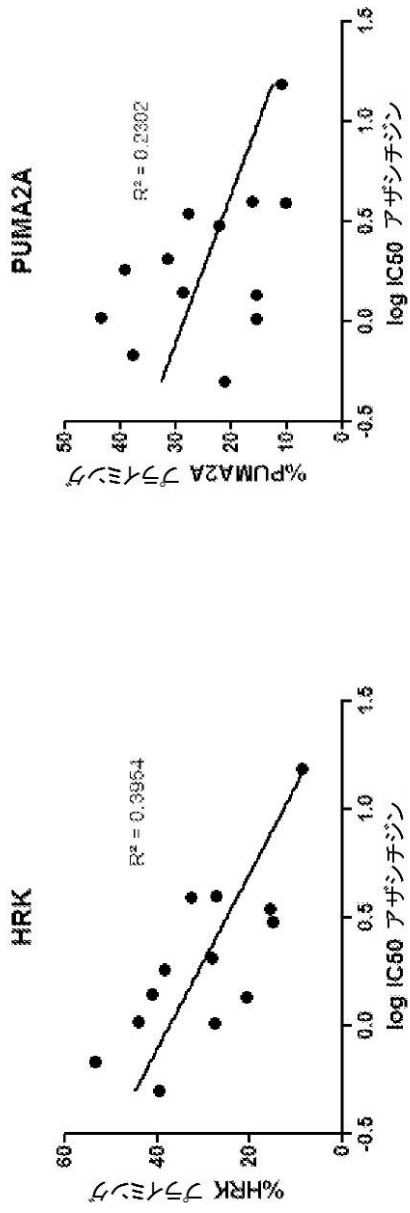


FIG. 22, 続き

【 図 2 3 】

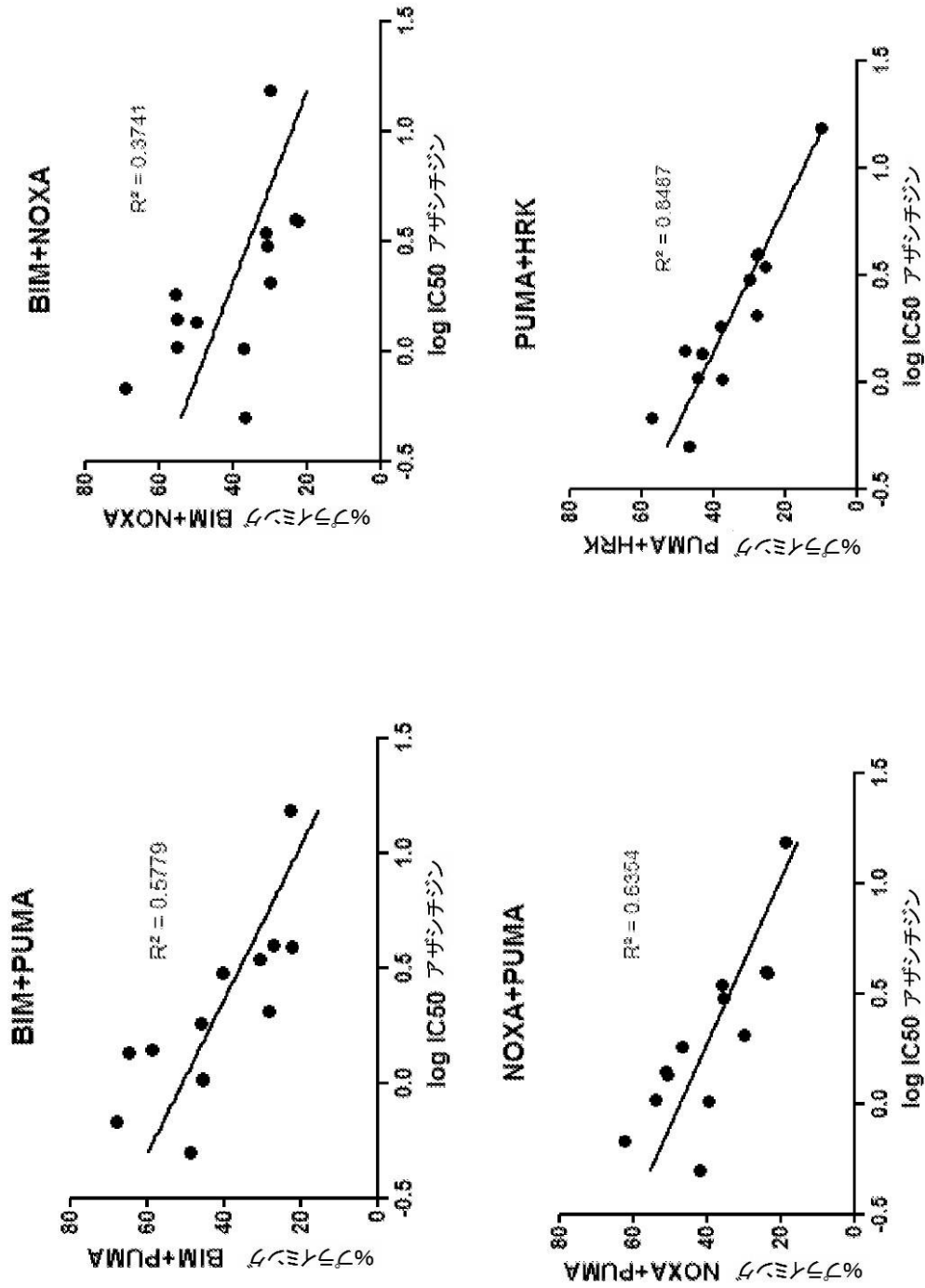


FIG. 23

【 図 2 4 - 1 】

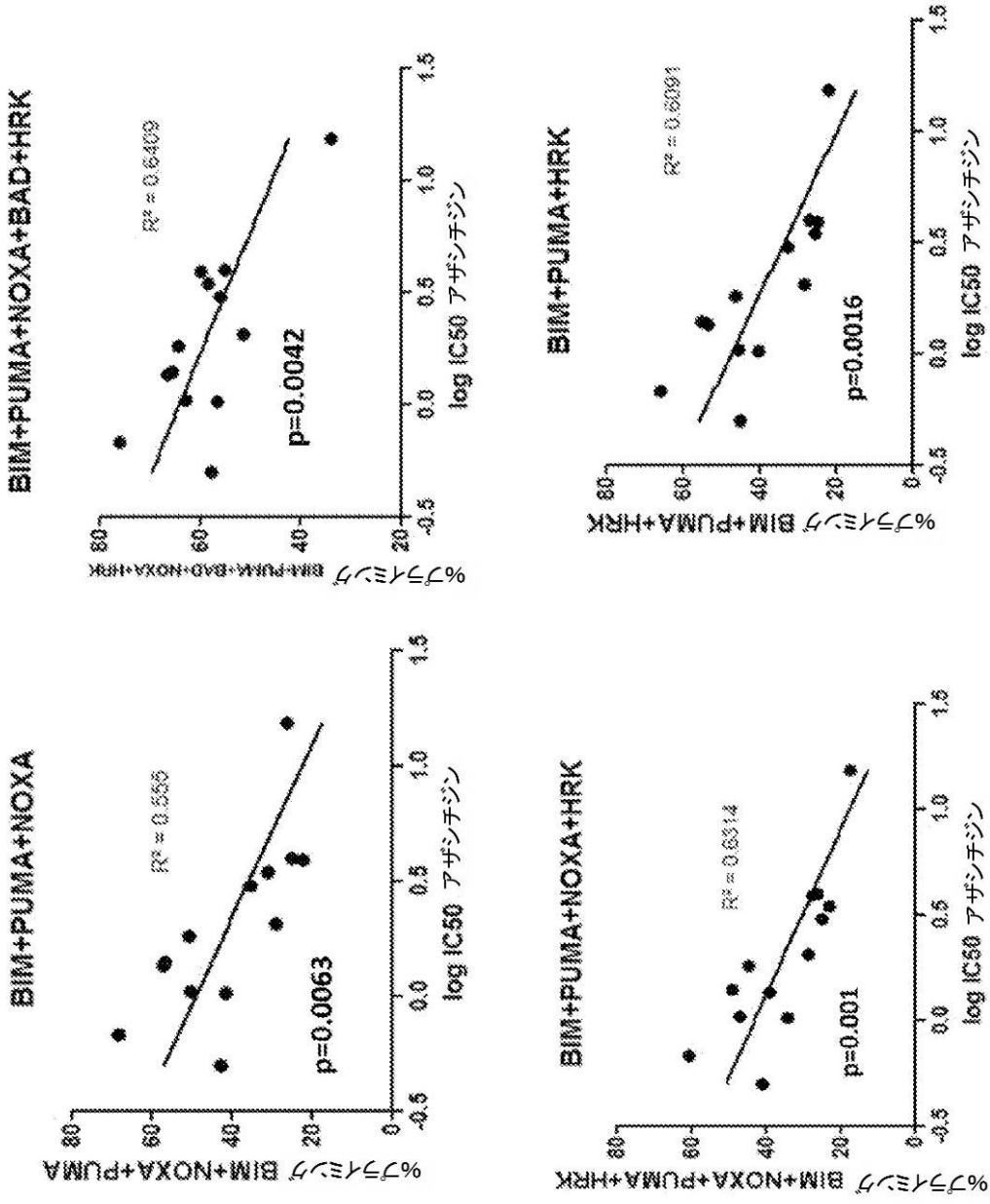


FIG. 24

【 図 2 4 - 2 】

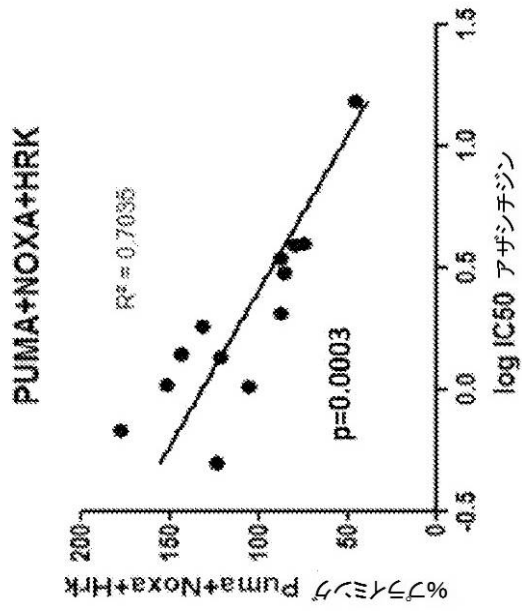


FIG. 24, 続き

【 図 2 5 】

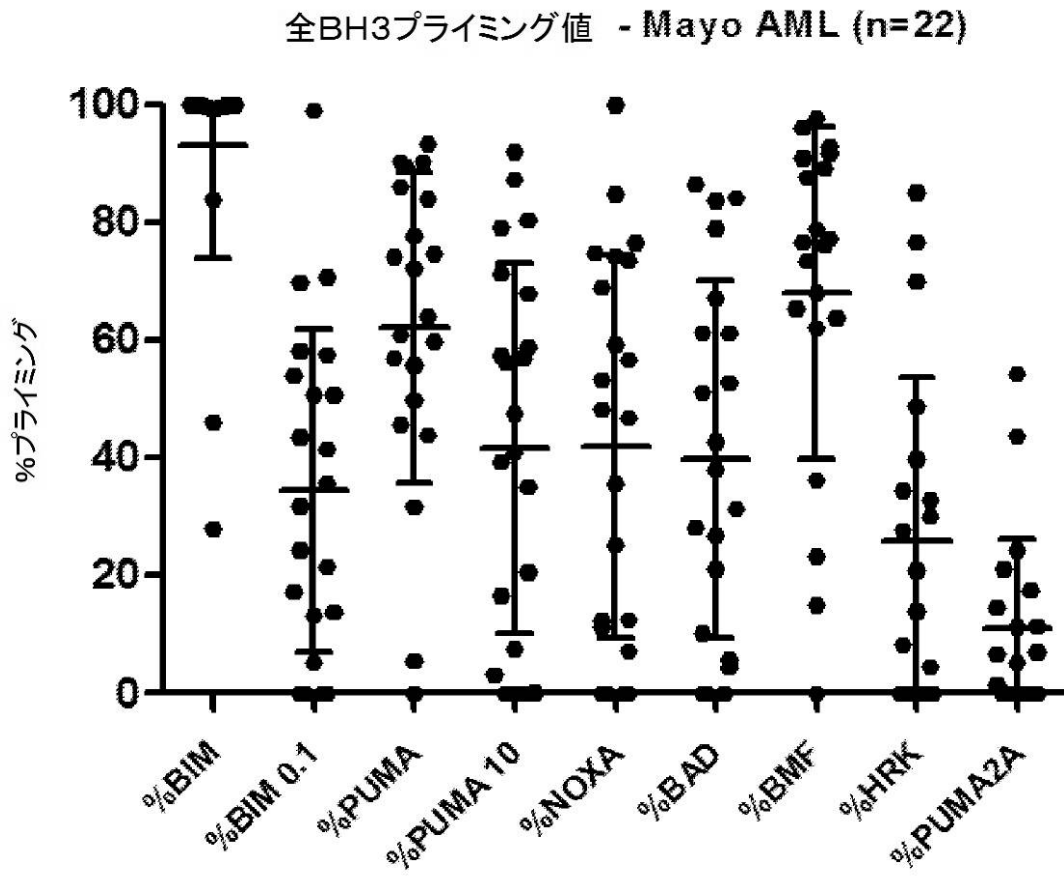


FIG. 25

【図 26 - 1】

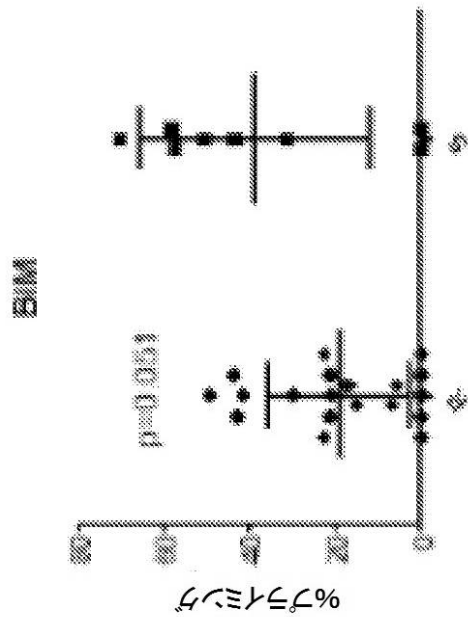
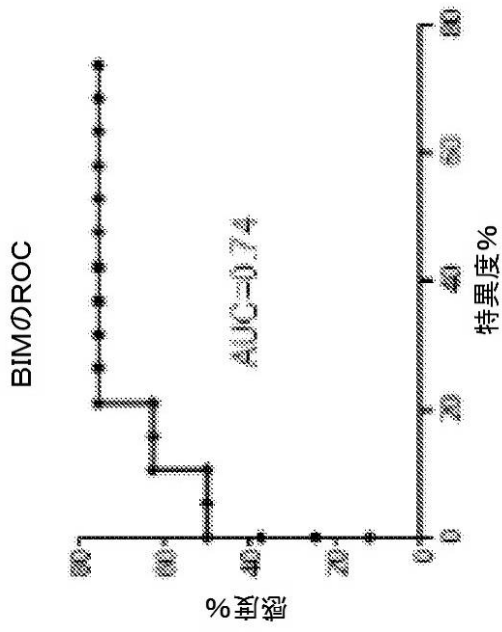


FIG. 26

【 図 2 6 - 2 】

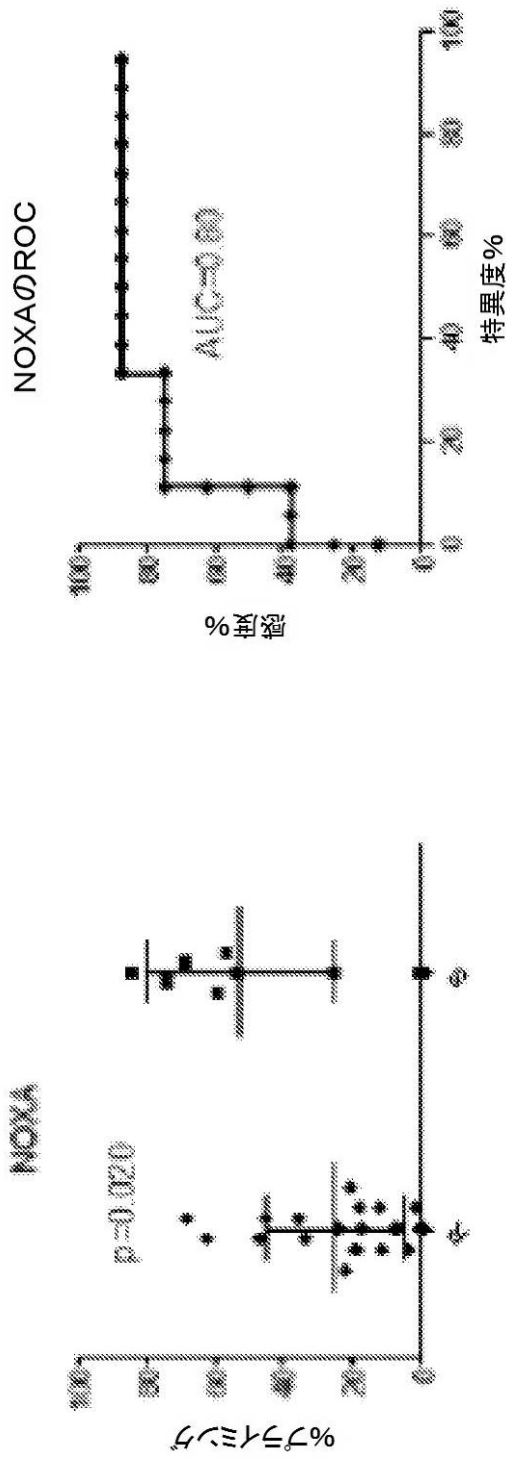


FIG. 26, 続き

【 図 2 6 - 3 】

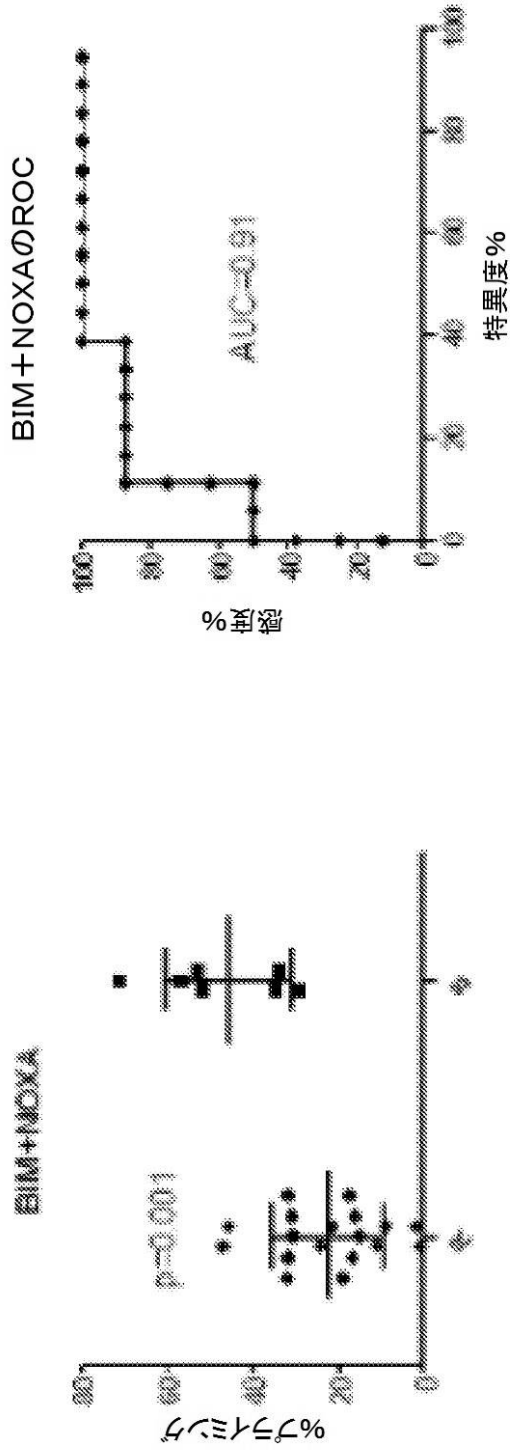


FIG. 26, 続き

【 図 2 6 - 4 】

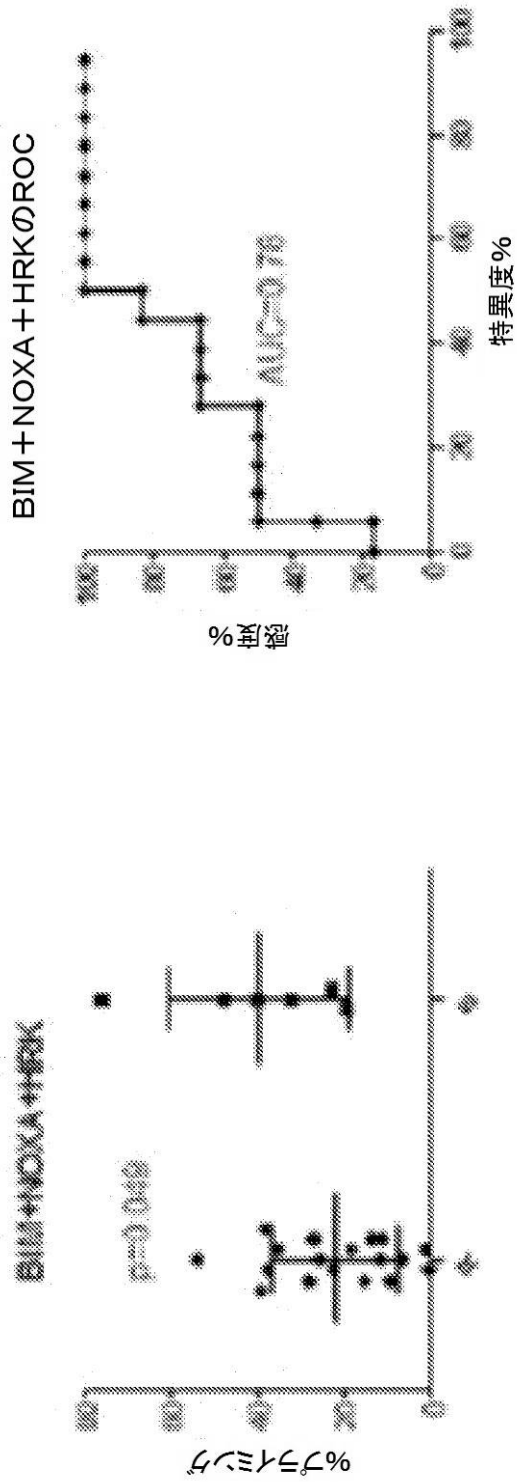


FIG. 26, 続き

【 図 2 6 - 5 】

	EC50 (nM) - 48時間、5%血清		BH3プロファイリング (コントロールに対する%プライミング)							
	治療活性	コントロール 化合物	BIM	L-BIM	PUMA	L-PUMA	NOXA	BAD	HRK	
接着										
A	++, ++	13.5	76.6	13.8	45.9	11.6	20.7	70.6	21	
B	+, ++	10	64.6	0	35.1	0	20.2	59.7	0	
C	+++, ++++	16	96.2	45.5	75.0	13.3	46.7	53.6	16.3	
D	++++, ++++	7.5	98.6	35.7	62.2	0	37.6	36.7	10.1	
E	+++, ++++	12	103.5	24.3	37.5	0	21.6	68.1	13.4	
F	++, ++	6	91.8	4.5	40.0	0.5	15.0	85.2	13.6	
G	+, +	18.5	90.5	2.8	26.2	0	15.8	45.2	1.6	
H	++++, ++++	14	101.3	68.6	69.4	9.8	59.5	46.1	18.5	

表1

【 図 2 6 - 6 】

懸濁	EC50 (uM) = 48時間、5%血清																					
I	+, +	2	87.5	50.0	77.5	22.9	46.2	87.0	65.9													
J	+++, +++	1.7	99.0	84.5	89.3	23.6	64.4	79	58.2													
K	+, +	0.6	96.9	47.1	88.1	8.5	14.7	63.1	14.7													
L	+, +	2	96.3	32.3	81.0	1.3	21.5	52.9	1.8													
M	++, ++	<0.4	98.1	69.5	92.9	18.4	14.9	95.3	5.9													
N	+++, +++	<0.4	99.3	90.1	96.7	40.2	65.0	97.7	67.0													
DHLI0	+	20 uM	30.1	4.6	10.3	1.6	19.1	24	0.8													
DHL6	+++	0.4 uM	100.8	83.4	91.3	39.2	59	84.6	61.7													
H929	+++	10 uM	97.2	75.5	83.8	15.4	82.1	46.1	36.6													

表1 (続き)

【図 26 - 7】

	R <sup>2</sup> 値 (EC <sub>50</sub> 対 % プライミング)		
	懸濁	接着	平均
BIM	0.626	0.731	0.679
PUMA	0.767	0.736	0.752
NOXA	<b>0.804</b>	<b>0.874</b>	<b>0.839</b>
BAD	0.575	0.295	0.435
HRK	0.775	0.010	0.393
BIM+PUMA	0.723	0.773	0.748
BIM+NOXA	<b>0.838</b>	<b>0.817</b>	<b>0.828</b>
NOXA+PUMA	<b>0.874</b>	<b>0.813</b>	<b>0.844</b>
BIM+PUMA+NOXA	<b>0.852</b>	<b>0.811</b>	<b>0.832</b>
BIM+PUMA+NOXA+HRK	<b>0.890</b>	0.571	0.731
BIM+PUMA+NOXA+HRK+BAD	<b>0.913</b>	0.482	0.698

R<sup>2</sup> 値 > 0.8 は太字で示した

表 2

	平均 (SD)	反応者 (n=40)	非反応者 (n=22)	p値
年齢	53.1 (15.0)	63.3 (12.7)	0.008	
性別				
男性	16	11	0.55	
女性	24	12		
FAB				
M0	0	2	0.29	
M1	7	2		
M2	9	9		
M4	10	6		
M5	11	2		
M7	1	0		
RAEBT	1	2		
細胞遺伝学				
好ましい	4	0	0.006	
中程度	26	8		
好ましくない	9	15		
Ras変異				
陽性	4	4	0.44	
陰性	19	13		
パフォーマンス状態 (Performance Status)				
0	4	8	0.11	
1	22	12		
2+	14	3		
FLT3				
ITDまたはD835変異	12	7	0.97	
ITDもD835も変異なし	28	16		
バイオプシー材料の供給源				
骨髄	14	7	0.65	
PBMC	24	16		

表3

BH3ペプチド	平均%プライミング +/- SD		p値 *	AUC [95%CI]
	NR	CR		
BIM	70.1 ± 32.6	88.2 ± 17.6	0.023	0.68 [0.53,0.82]
BIM(0.1)	13.8 ± 13.4	36.8 ± 21.2	0.0000018	0.83 [0.72,0.93]
PUMA	44.7 ± 29.5	64.0 ± 22.7	0.017	0.69 [0.54,0.84]
PUMA(10)	33.3 ± 24.3	50.4 ± 23.7	0.0064	0.71 [0.58,0.85]
NOXA	26.3 ± 15.5	35.1 ± 24.9	0.20	0.60 [0.46,0.75]
BAD	33.2 ± 29.6	52.7 ± 24.3	0.014	0.70 [0.55,0.85]
BMF	45.6 ± 31.6	64.4 ± 24.9	0.016	0.69 [0.53,0.84]
HRK	20.8 ± 22.4	36.6 ± 22.4	0.010	0.72 [0.57,0.88]
PUMA2A	10.8 ± 19.5	16.1 ± 18.9	0.16	0.61 [0.45,0.78]

\* マン-ホイットニー解析により $p < 0.01$ として確立された統計学的有意性

表4

【 図 2 6 - 1 0 】

	分割解析		連続的変数解析	
	p値(マン-ホイットニー)	R <sup>2</sup> 値 (log)	R <sup>2</sup> 値 (log)	p-値
	-JAK2 (N=13)	-JAK2 (N=13)		
Bim	p=0.0011	0.37	0.37	p=0.0278
Puma	p=0.0046	0.70	0.70	p=0.0004
Noxa	p=0.022	0.27	0.27	p=0.0662
Hrk	p=0.022	0.40	0.40	p=0.0036
Bad	p=1	0.14	0.14	p=0.2012
Puma2A	p=0.53	0.23	0.23	p=0.0967
BimPuma	p=0.0011	0.58	0.58	p=0.0026
BimNoxa	p=0.0011	0.37	0.37	p=0.0261
PumaNoxa	p=0.0011	0.64	0.64	p=0.0011
BimPumaNoxa	p=0.0011	0.56	0.56	p=0.0063
BimPumaNoxaHrk	p=0.0011	0.63	0.63	p=0.001
BimPumaNoxaHrkBad	p=0.0011	0.64	0.64	p=0.0042
PumaHrk	p=0.0011	0.85	0.85	p<0.0001
BimPumaHrk	p=0.0011	0.61	0.61	p=0.0016
PumaNoxaHrk	p=0.0011	0.70	0.70	p=0.0003

表5

【 誤 訳 訂 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 27 年 4 月 3 日 (2015.4.3)

【 誤 訳 訂 正 1 】

【 訂 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 訂 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 訂 正 方 法 】 変 更

【 訂 正 の 内 容 】

【 発 明 の 詳 細 な 説 明 】

【 技 術 分 野 】

【 0 0 0 1 】

本 出 願 は ア メ リ カ 合 衆 国 仮 出 願 N o . 6 1 / 6 4 5 , 2 5 3 ( 出 願 日 2 0 1 2 年 5 月 1

0日)とアメリカ合衆国仮出願No. 61/780,252(出願日2013年3月13日)の利益を特許請求するものであり、これらの出願は、それぞれその全体が本明細書中に参考として援用される。

#### 発明の領域

##### 【0002】

本発明は人体から採取された試料中に存在する腫瘍の評価を行うのに有用な方法に関するものである。

#### 【背景技術】

##### 【0003】

#### 背景

標的とするがん治療と対をなす予防および予後予見が可能なバイオマーカーの使用は薬剤の開発に要する時間の低減、薬効の改善また、臨床意思決定に非常に重要な役割を果たすであろう。近年のがん処置法の進歩にもかかわらず、化学療法は依然として多くの症例であまり効率的でなくあまり有効でない。この化学療法に余り効果が認められない理由の一つは処置が患者個人個人の疾患に適した選択がなされていないことが多いということである。正確な診断と治療を組み合わせた医療のアプローチがこの問題は解決できる。

##### 【0004】

現在臨床腫瘍医療領域で使用されているほんの一握りのバイオマーカーしか有用性を認められていない。これは部分的ではあるが感知マーカーがしばしば薬剤の作用機序に相関的であるだけで病因的には関係しない事によっている。もしその「バイオマーカー」がコンパニオン治療の薬理学的作用と生物学的に一致したとしても薬剤が患者にどのように作用するかを予測するのは非常に難しいことである。それ以上に、臨床開発への道には検査の値を理解し、かつそれが患者に利益をもたらすことを考える医師-科学者の関与が必須である。

##### 【0005】

BH3プロファイリングはがん細胞の化学療法に対する反応性にとって重要な原因因子の機能を測定するものである。具体的には、BH3プロファイリングはミトコンドリアの表面にあってアポトーシスを調節するタンパク質の機能を測定するものである。多くの化学療法でアポトーシスのメカニズムを利用してものは効果がある。このテストからはBH3のみを持つ前アポトーシスタンパク質のBH3ドメインに対するミトコンドリアの反応性を提供する。BH3プロファイリングは化学療法に対する感受性または反応性について一般的意味を提供することは公知ではあるが、このプロファイリングに寄ってある特定の薬剤およびがんの種類に対する医師の意思決定を支持するための予測能力はこれまでにない。

#### 【発明の概要】

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【0006】

#### 発明のサマリー

従って、一つの側面として、この発明は患者個人のがん処置を選択する方法を提供する、それは患者の腫瘍或はがん細胞の検体を用いてBH3プロファイルを決定する；一つ或はそれ以上の患者の臨床因子の決定と一つ或はそれ以上のがん処置に対する臨床的反応性をもって患者を区分する、つまり、一つ或はそれ以上の臨床因子が選択されそれによって臨床的反応性に関連してBH3プロファイルの特異性および/または感度を上昇させる。

##### 【0007】

ある実施形態において、ここに示すように、様々な臨床的因子は、それがアポトーシスと関わってなくてもアポトーシスと関係ある事が知られていないと関わらず、BH3プロファイリングの予測検出力を高め、このテストを予測的であってしかただ単に予後的ではないテストに変換する。

##### 【0008】

ある実施形態において、本明細書の記載された方法は細胞遺伝子学的プロファイルもし

くは状態をおよび/または特定の年齢のそれを合わせた白血病患者に対するシタラピン、またはシタラピンに基づく化学療法、および/或はアザシチジンに対する反応を予測できる診断学的なテストを提供する。ある実施形態において、BH3プロファイリングを含む診断学的なテストはBMIに反応するミトコンドリア膜電位の変化を測定することを包含する。

【0009】

他の側面として、この発明は患者にふさわしいがん処置を決める方法を提供する。この方法は透過性を上げた患者がん細胞を、一つ以上のBH3ドメインペプチドと接触させてプライミングの程度を決定すること、患者のがん細胞の一つ以上の臨床因子の存在または非存在を免疫組織化学、および/または蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)をもちいて決定すること、および一つ以上のがん処置に対する臨床的反応の可能性について患者をクラス分けする事を包含する。

【0010】

他の側面として、この発明は急性骨髄性白血病の患者がシタラピンおよび/またはアザシチジンに対して反応するかを決定する為の方法を提供する、それは以下を包含する：BH3プロファイルを患者のAML癌細胞検体で決定すること；一つ以上の臨床因子を患者ごとに決定すること（ここで、一つ以上の臨床因子は年齢プロファイルおよび/または細胞遺伝学的状況から選択される）；および一つ以上のがん処置に対する臨床的反応の可能性について患者をクラス分けすること。

【0011】

この発明の詳しい内容は下記に記す通りである。本明細書に記載する方法や材料と類似のまたは同等の方法および材料はこの発明を実施或は試験に使用することができるが、例示の方法と材料についてはここで記述する。他にこの発明の他の特徴、目的、および利点は以下の記述および特許請求の範囲から明らかである。特許明細書及び、添付の特許請求の範囲では、内容が明らかに他を示さない限り単数形は複数形も含まれる。他が定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的科学的な用語はこの発明が属する技術における当業者によって普通に理解される意味と同じである。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1-1】図1は、代表的なBH3プロファイリングデータを示す。この図は、高いプライミング細胞株対低いプライミング細胞株のパターンの違いを示す。MRL-14は、MRL-11と比較して、BIM 0.3、PUMA 0.3、およびNOXAについて高度にプライミングされる(MTSアッセイによる治療阻害剤活性と相関する)。

【図1-2】図1は、代表的なBH3プロファイリングデータを示す。この図は、高いプライミング細胞株対低いプライミング細胞株のパターンの違いを示す。MRL-14は、MRL-11と比較して、BIM 0.3、PUMA 0.3、およびNOXAについて高度にプライミングされる(MTSアッセイによる治療阻害剤活性と相関する)。

【図1-3】図1は、代表的なBH3プロファイリングデータを示す。この図は、高いプライミング細胞株対低いプライミング細胞株のパターンの違いを示す。MRL-14は、MRL-11と比較して、BIM 0.3、PUMA 0.3、およびNOXAについて高度にプライミングされる(MTSアッセイによる治療阻害剤活性と相関する)。

【図1-4】図1は、代表的なBH3プロファイリングデータを示す。この図は、高いプライミング細胞株対低いプライミング細胞株のパターンの違いを示す。MRL-14は、MRL-11と比較して、BIM 0.3、PUMA 0.3、およびNOXAについて高度にプライミングされる(MTSアッセイによる治療阻害剤活性と相関する)。

【0013】

【図2】図2は治療阻害剤活性対従来の増殖阻害EC50 MTSアッセイの代表的なデータを示す。

【0014】

【図3-1】図3は8つの接着細胞株でのBH3プロファイルを示す。各々のペプチド

と細胞株の4-6の反復 (REPLICATES)での限定的標準偏差

【図3-2】図3は8つの接着細胞株でのBH3プロファイルを示す。各々のペプチドと細胞株の4-6の反復 (REPLICATES)での限定的標準偏差

【図3-3】図3は8つの接着細胞株でのBH3プロファイルを示す。各々のペプチドと細胞株の4-6の反復 (REPLICATES)での限定的標準偏差

【図3-4】図3は8つの接着細胞株でのBH3プロファイルを示す。各々のペプチドと細胞株の4-6の反復 (REPLICATES)での限定的標準偏差

【0015】

【図4-1】図4は9つの浮遊細胞株でのBH3プロファイルを示す。各々のペプチドと細胞株の4-6の反復 (REPLICATES)での限定的標準偏差

【図4-2】図4は9つの浮遊細胞株でのBH3プロファイルを示す。各々のペプチドと細胞株の4-6の反復 (REPLICATES)での限定的標準偏差

【図4-3】図4は9つの浮遊細胞株でのBH3プロファイルを示す。各々のペプチドと細胞株の4-6の反復 (REPLICATES)での限定的標準偏差

【図4-4】図4は9つの浮遊細胞株でのBH3プロファイルを示す。各々のペプチドと細胞株の4-6の反復 (REPLICATES)での限定的標準偏差

【図4-5】図4は9つの浮遊細胞株でのBH3プロファイルを示す。各々のペプチドと細胞株の4-6の反復 (REPLICATES)での限定的標準偏差

【0016】

【図5】図5は浮遊細胞株でのBH3プロファイリングを示す。BIM、PUMAモデルはCDK阻害活性を識別する。

【0017】

【図6-1】図6は接着細胞株でのBH3プロファイリングを示す。BIM、PUMAおよびNOXAでのモデルはCDK阻害活性を識別する。

【図6-2】図6は接着細胞株でのBH3プロファイリングを示す。BIM、PUMAおよびNOXAでのモデルはCDK阻害活性を識別する。

【図6-3】図6は接着細胞株でのBH3プロファイリングを示す。BIM、PUMAおよびNOXAでのモデルはCDK阻害活性を識別する。

【図6-4】図6は接着細胞株でのBH3プロファイリングを示す。BIM、PUMAおよびNOXAでのモデルはCDK阻害活性を識別する。

【0018】

【図7-1】図7はMCL1阻害剤のEC50対浮遊細胞株の個々のペプチドについてのプライミングを表している。

【図7-2】図7はMCL1阻害剤のEC50対浮遊細胞株の個々のペプチドについてのプライミングを表している。

【図7-3】図7はMCL1阻害剤のEC50対浮遊細胞株の個々のペプチドについてのプライミングを表している。

【0019】

【図8-1】図8はMCL1阻害剤のEC50対浮遊細胞株の複数のペプチド由来のアルゴリズムについてのプライミングのパーセンテージを表している。

【図8-2】図8はMCL1阻害剤のEC50対浮遊細胞株の複数のペプチド由来のアルゴリズムについてのプライミングのパーセンテージを表している。

【図8-3】図8はMCL1阻害剤のEC50対浮遊細胞株の複数のペプチド由来のアルゴリズムについてのプライミングのパーセンテージを表している。

【0020】

【図9-1】図9はMCL1阻害剤のEC50対接着細胞株の個々のペプチドについてのプライミングのパーセンテージを表している。

【図9-2】図9はMCL1阻害剤のEC50対接着細胞株の個々のペプチドについてのプライミングのパーセンテージを表している。

【図9-3】図9はMCL1阻害剤のEC50対接着細胞株の個々のペプチドについての

プライミングのパーセンテージを表しているド。

【0021】

【図10-1】図10はMCL1阻害剤対浮遊細胞株の複数のペプチド由来のアルゴリズムについてのプライミングのパーセンテージを表している。

【図10-2】図10はMCL1阻害剤対浮遊細胞株の複数のペプチド由来のアルゴリズムについてのプライミングのパーセンテージを表している。

【図10-3】図10はMCL1阻害剤対浮遊細胞株の複数のペプチド由来のアルゴリズムについてのプライミングのパーセンテージを表している。

【0022】

【図11-1】図11はキネシンスピンドルタンパク質阻害剤 (KSP INH)、多発性骨髄腫、白血病細胞株を示す。

【図11-2】図11はキネシンスピンドルタンパク質阻害剤 (KSP INH)、多発性骨髄腫、白血病細胞株を示す。

【0023】

【図12-1】図12 A - DはBH3プロファイニングの代表的な患者データを示す。

【図12-2】図12 A - DはBH3プロファイニングの代表的な患者データを示す。

【0024】

【図13】図13 A - Bはシタラビン処置後の急性骨髄性白血病患者の、BIM患者反応について描写するドットプロットとROCプロットを表す。

【0025】

【図14-1】図14はシタラビン処置後の反応なし (NR) と著効 (CR) の急性骨髄性白血病患者におけるBH3ペプチドのBH3プロファイリングを示す。

【図14-2】図14はシタラビン処置後の反応なし (NR) と著効 (CR) の急性骨髄性白血病患者におけるBH3ペプチドのBH3プロファイリングを示す。

【図14-3】図14はシタラビン処置後の反応なし (NR) と著効 (CR) の急性骨髄性白血病患者におけるBH3ペプチドのBH3プロファイリングを示す。

【図14-4】図14はシタラビン処置後の反応なし (NR) と著効 (CR) の急性骨髄性白血病患者におけるBH3ペプチドのBH3プロファイリングを示す。

【0026】

【図15】図15はシタラビン処置後の急性骨髄性白血病患者の多変数解析ROCカーブ

【0027】

【図16-1】図16 A - HはBH3ペプチド反応の予測を細胞遺伝学的状態によって階層化したものを示す。

【図16-2】図16 A - HはBH3ペプチド反応の予測を細胞遺伝学的状態によって階層化したものを示す。

【図16-3】図16 A - HはBH3ペプチド反応の予測を細胞遺伝学的状態によって階層化したものを示す。

【図16-4】図16 A - HはBH3ペプチド反応の予測を細胞遺伝学的状態によって階層化したものを示す。

【0028】

【図17-1】図17 A - Eはシタラビン処置後の急性骨髄性白血病患者のBIM (0.1) プライミングおよびBIM (BCL2L1) タンパク質レベルの反応予測との相関を示す。

【図17-2】図17 A - Eはシタラビン処置後の急性骨髄性白血病患者のBIM (0.1) プライミングおよびBIM (BCL2L1) タンパク質レベルの反応予測との相関を示す。

【0029】

【図18】図18は全生存期間 (OS) および無再発生存 (EFS 無疾患生存) 対 BIM (0.1) のパーセントプライミングによってサブグループ分けされた急性骨髄性白血病患者の三分位値 (tertile) を示す。

【0030】

【図19-1】図19はBH3プロファイリング測定の分配解析であって、個々のBH3ペプチドモデルについてのものを示す。

【図19-2】図19はBH3プロファイリング測定の分配解析であって、個々のBH3ペプチドモデルについてのものを示す。

【図19-3】図19はBH3プロファイリング測定の分配解析であって、個々のBH3ペプチドモデルについてのものを示す。

【0031】

【図20】図20はBH3プロファイリング測定の分配解析であって、組み合わせたBH3ペプチドモデル(2つのペプチド)についてのものを示す。

【0032】

【図21-1】図21はBH3プロファイリング測定の分配解析であって、組み合わせたBH3ペプチドモデル(3/4つのペプチド)についてのものを示す。

【図21-2】図21はBH3プロファイリング測定の分配解析であって、組み合わせたBH3ペプチドモデル(3/4つのペプチド)についてのものを示す。

【0033】

【図22-1】図22はBH3プロファイリング測定の連続的変数解析であって、個々のBH3ペプチドモデルについてのものを示す。

【図22-2】図22はBH3プロファイリング測定の連続的変数解析であって、個々のBH3ペプチドモデルについてのものを示す。

【0034】

【図23】図23はBH3プロファイリング測定の連続的変数解析であって、組み合わせたBH3ペプチドモデル(2つのペプチド)についてのものを示す。

【0035】

【図24-1】図24はBH3プロファイリング測定の連続的変数解析であって、組み合わせたBH3ペプチドモデル(3/4ペプチド)についてのものを示す。

【図24-2】図24はBH3プロファイリング測定の連続的変数解析であって、組み合わせたBH3ペプチドモデル(3/4ペプチド)についてのものを示す。

【0036】

【図25】図25はアザシチジン処置のコホートから代表的な急性骨髄性白血病患者のBH3プロファイリングを示し、それはプライミング値のfull治療的スケールが使われた事を示す。

【0037】

【図26-1】図26は急性骨髄性白血病患者のアザシチジン反応のBIM+NOXA区別はBIMあるいはNOXA単独よりも良い(superior)ことを示す。

【図26-2】図26は急性骨髄性白血病患者のアザシチジン反応のBIM+NOXA区別はBIMあるいはNOXA単独よりも良い(superior)ことを示す。

【図26-3】図26は急性骨髄性白血病患者のアザシチジン反応のBIM+NOXA区別はBIMあるいはNOXA単独よりも良い(superior)ことを示す。

【図26-4】図26は急性骨髄性白血病患者のアザシチジン反応のBIM+NOXA区別はBIMあるいはNOXA単独よりも良い(superior)ことを示す。

【0038】

【図26-5】表1は細胞株による治療阻害剤反応とBH3プロファイリングの収集(compilation)を表す。

【図26-6】表1は細胞株による治療阻害剤反応とBH3プロファイリングの収集(compilation)を表す。

【0039】

【図26-7】表2はMCL-1阻害剤のサポートデータのまとめである。

【0040】

【図26-8】表3はシタラビン処置後の急性骨髄性白血病患者の患者コホートの為の臨

床病理的な変数を表す。

【0041】

【図26-9】表4はシタラピン処置後急性骨髄性白血病患者を示す。BH3プロファイリングバイオマーカーが解析され、反応の識別において有意であった。

【0042】

【図26-10】表5は細胞株でのアザシチジン効果のまとめであって、分配および連続的変数モデルについて示すものである。

【発明を実施するための形態】

【0043】

詳しい記載

この発明の基礎になっているのは、一部であっても、BH3プロファイリング測定値の感度および/または特異性がある特定の臨床因子との関係において有意に改善され得ると言う発見である。本明細書に記載する診断的手法はひとそりのBH3の反応および臨床的な指標の解析を可能とし、それには、ヒトの悪性腫瘍における治療の効果を予想する為の、アポトーシスとは直接関係ないようなものが含まれる。例えば、この発明者らは白血病の患者におけるシタラピンやアザシチジンを基にした化学療法レジメに対する反応がBH3プロファイリングと年齢プロファイル、および細胞遺伝学的状況によって予想できる事を発見した。

【0044】

ある側面として、この発明は患者のがん処置を決定する方法を提供する。それには、患者の腫瘍またはがん細胞の検体のBH3プロファイルを決定し、一つ以上の患者の臨床因子の決定、および一つ以上のがん処置に対する臨床的反応の可能性について患者を分類することが含まれ、臨床的反応に関係するBH3プロファイルの高い特異性および感度を持つように一つ以上の臨床因子を選択する。

【0045】

他の側面として、この発明は患者のがん処置を決定するための方法を提供する。それには、患者由来の透過性を上げたがん細胞を、一つ以上のBH3ドメインペプチドと接触させてプライミングの程度決定すること、免疫組織化学および/または蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)を用いて患者の癌細胞の一つ以上の臨床因子の有無を決定すること、および一つ以上のがん治療に対する臨床的反応の可能性について患者を分類することが包含される。

【0046】

他の側面としてこの発明はシタラピンおよび/またはアザシチジンに対して反応する急性骨髄性白血病患者を決定するための方法であって、BH3プロファイリングを患者の白血球細胞検体について決定すること、患者の一つ以上の臨床因子を決定すること(ここで、一つ以上の臨床因子を年齢プロファイルおよび/または細胞遺伝学的状態から選ぶ)、および一つ以上のがん処置に対する臨床的反応の可能性について患者を分類することを含む、方法を提供する。

【0047】

他の側面の特定の実施形態として、がんは血球系の癌であって、それには、例えば、急性骨髄性白血病(AML)、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病、および非ホジキンリンパ腫(例えば、マンツル細胞リンパ腫、および、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫)が挙げられる。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍、例えば非小細胞肺癌、卵巣がん、悪性黒色腫が挙げられる。

【0048】

ある実施形態において、この発明はがん処置に対する有効性を予想する。がん処置として、一つ以上の抗がん剤、化学療法、外科手術、(例えば、外科手術の前の)アジュバント治療および、(例えば、外科手術後の)ネオアジュバント治療を挙げることができる。別の実施形態において、がん処置は一つ以上のBH3ミメティック(mimetics)、エピジェネティック修飾薬剤、トポイソメラーゼ阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害

剤、およびキネシンスピンドルタンパク質安定剤を含む。さらに別の実施形態において、がん処置として、以下のものが含まれる：プロテアソーム阻害剤、および/または細胞周期制御の調節剤（これらの例に限るわけでないが、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤）；および/または細胞のエピジェネティックな機構の調節剤（これらの例に限らないが、一つ以上のヒストンデアセチラーゼ（HDAC）（例えばポリナスタット、エンチノスタットのうちの1つ以上）アザシチジン、デシタピン） および/またはアントラサイクリン、またはアントラセネジオン（非限定的例として、エビルピシン、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、ダウノルピシン、イダルピシン） および/またはプラチナベースの治療剤（非限定的例として、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチンのうちの1つ以上）、シタラピンまたはシタラピンベースの化学療法、BH3ミメティック（これらの例に限る訳でないが、BCL2、BCLXLまたはMCL1のうちの1つ以上） および MCL1阻害剤。

【0049】

ある実施形態において、BH3プロファイリングは患者のがん細胞の透過性を上げること、透過性を上げた細胞を1つ以上のBH3ドメインペプチドと接触させる事によるミトコンドリアの膜ポテンシャルの変化を決定或は定量化することが含まれる。この測定値は本明細書に記載の臨床因子と合わせる事で各種の治療に対する患者の反応および患者を区分することを助ける。

【0050】

これら又は他の実施形態において、BH3プロファイリングはBIM、BIM2A、BAD、BID、HRK、PUMA、NOXA、BMF、BIK、PUMA2Aのうちの1つ以上のペプチドの使用を含む。一つの実施形態において、使用するペプチド濃度は0.1 μMから200 μMの範囲で又その中の様々な濃度で用いる。一つの実施形態において、BH3プロファイリングは、検体の透過性をあげる事でミトコンドリアへの接近を可能にすることを含む。これら又は他の実施形態において、BH3プロファイリングは急性骨髄性白血病のがん細胞検体をBIMと接触させることを含むBH3プロファイルを決定することが含まれる

【0051】

ある実施形態において、患者の検体は凍結腫瘍組織検体、培養した細胞、血中に循環している腫瘍細胞、およびホルマリン固定パラフィン包埋の腫瘍組織検体（例えば、抗体を用いたBH3プロファイリング）から選択される生検である。他の実施形態において、検体はヒトの腫瘍由来の細胞株である。ほかの実施形態において、検体はがん幹細胞である。検体は固形腫瘍の生検（これらの例に限定するものではないが、例えば、結腸直腸、乳、前立腺、肺、膵臓、腎臓、卵巣原発腫瘍の1つ以上）に由来する。他の実施形態において、検体は上皮由来の検体であって、それには、例えば、生検試料から、上皮細胞接着分子（EpCAM）に対する抗体または他の上皮細胞結合抗体を固体マトリックスまたはビーズに結合させたものを使用して選択することにより濃縮される上皮細胞が含まれる。他の実施形態では、検体は中胚葉由来のものであり、それには、例えば中胚葉性の検体であって、生検試料から、神経細胞接着分子（NCAM）、またはニューロフィリンまたは他の中胚葉性細胞結合抗体を固体マトリックスまたはビーズに結合させたものを使用して選択することにより濃縮される中胚葉性の検体が含まれる。他の実施形態において、検体は非固形腫瘍の生検に由来する。他の実施形態において、検体は多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性リンパ性白血病、マンツル細胞リンパ腫、びまん性細胞型B細胞リンパ腫、および非ホジキンリンパ腫を有する患者の生検に由来する。他の実施形態において、検体は多発性骨髄腫細胞であり、それは生検試料から、固体マトリックスまたはビーズに結合させた抗CD138抗体を用いて選択により濃縮したものである。他の実施形態において、がん細胞は、急性骨髄性白血病細胞であり、それはCD45に対する抗体に結合させることにより濃縮したものである。またその上他の実施形態において、がん細胞は、慢性リンパ球性白血病細胞またはびまん性大細胞型B細胞リンパ腫であり、それは非B細胞を除去して濃縮されたものである。他の実施形態において、検体は、

血中循環腫瘍細胞に由来する。

【0052】

様々な実施形態において、臨床因子として、年齢、細胞遺伝学的状態、パフォーマンス、組織学的サブクラス、性別、および疾患ステージの1つ以上である。他の実施形態において、方法は、変異の状況、一塩基多型、定常状態のタンパク質レベル及び動的タンパク質レベルから選択される追加のバイオマーカーの測定を含み、それにより、テストの特異性および/または感度をあげることができる。他の実施形態において、方法は、患者の臨床的な反応を推測することをさらに含む。他の実施形態において、臨床的な反応は、少なくとも約1年、約2年、約3年または約5年の無進行/無症候性生存である。

【0053】

ある実施形態においてプライミングは以下の数式で定義される。

【化1】

$$\% \text{プライミング} = \left[ 100 * \left( \frac{\text{DMSO AUC} - \text{ペプチド}_1 \text{ AUC}}{\text{DMSO AUC} - \text{CCCP}_{\text{avg}} \text{ AUC}} \right) \right] \text{ペプチド}_1 + \left[ 100 * \left( \frac{\text{DMSO AUC} - \text{ペプチド}_2 \text{ AUC}}{\text{DMSO AUC} - \text{CCCP}_{\text{avg}} \text{ AUC}} \right) \right] \text{ペプチド}_2 + \dots / (n \text{ ペプチド})$$

式中、AUCは、曲線下面積或はシグナル強度を含む；DMSOはベースラインの陰性対照を含む；CCCP（カルボニルシアニドm-クロロフェニルヒドラゾン）はミトコンドリアの電子伝達鎖における電子担体の正常な活性の間に確立されたプロトン勾配の脱共役薬として働くことによるタンパク質合成のエフェクターを含み、それはベースラインの陽性対照を含む。ある実施形態において、曲線下面積は均一時間分解蛍光（HTRF）によって確立される。ある実施形態において、時間は約0から約300分、から、約0から300分のあいだのウィンドウにわたって生じる。ある実施形態において曲線下面積は蛍光活性化細胞識別（FACS）によって確立される。ある実施形態において、シグナル強度は約5分および約300分の間で生じる単一時間点の測定値（single time point measurement）である。

【0054】

他の実施形態において、方法は、BH3プロファイリングアッセイを実施すること、および細胞表面マーカーCD33、細胞表面マーカーCD34、FLT3変異状態、p53変異状態、MEK1キナーゼのリン酸化状態、およびBcl-2の70番目のセリンのリン酸化の1つ以上を、シタラビンもしくはシタラビン系の化学療法および/またはアザシチジンによる急性骨髄性白血病の患者処置効果に相関させることを含む。

【0055】

他の実施形態において、方法は、BH3プロファイリングを実施すること、および一つ又はそれ以上の細胞表面マーカーCD33、細胞表面マーカーCD34、FLT3変異状態、p53変異状態、MEK1キナーゼのリン酸化状態、およびBcl-2の70番目のセリンのリン酸化を、多発性骨髄腫の患者の化学療法処置に対する効果と相関させることを含む。

【0056】

ある実施形態において、がんは急性骨髄性白血病および/または多発性骨髄腫であり、そして臨床因子は年齢プロファイルおよび/または細胞遺伝学的状態であり；又はがんは急性骨髄性白血病および/または多発性骨髄腫であり、がん処置はシタラビンもしくはシタラビン系化学療法および/またはアザシチジンであるか、又はがん処置はシタラビンもしくはシタラビン系化学療法および/またはアザシチジンであり、また臨床因子として年齢プロファイルおよび/または細胞遺伝学的状態であるか、又はがん処置はシタラビンもしくはシタラビン系化学療法および/またはアザシチジンであり；がんは急性骨髄性白血病および/または多発性骨髄腫であり；臨床因子は年齢プロファイルおよび/または細胞遺伝学的状態である。

## 【0057】

典型的な臨床決定

ある実施形態において、ここで記載する方法は患者の評価をするのに有用である。例えば、診断、予後、および処置に対する反応を評価する上で有用である。様々な態様では、この発明は腫瘍または血液がんを評価することを含む。様々な実施形態では、評価は診断、予後、および処置に対する反応から選ばれうる。

## 【0058】

診断とは、例えばがんなどの病気あるいは障害の可能性を決定或は同定する為の試みの過程を指す。予後は、例えばがんなどの病気或は障害によってもたらされる可能性のある結果を予測することを指す。完全な予後はしばしば予想される期間、機能、病気の経過の記述、例えば進行性の機能低下や間欠的に起きる危機的状況または予測できないが突然の危機的な状況を含む。処置に対する反応は患者が処置を受けたときにその患者に起こりうる医学的な予測である。処置に対する反応は、この例だけにとどまらないが、例えば病理学的著効、生存、およびがん進展が見られない生存、がんが進行するまでの時間、再発の可能性であり得る。

## 【0059】

さまざまな実施形態において、本発明の方法を用いると臨床的に患者が特定の処置を受けるかどうかの判断が出来る。一つの実施形態において、この方法はネオアジュバントおよび/またはアジュバント化学療法に陽性の反応であるか、またはネオアジュバントおよび/またはアジュバント化学療法に反応しないかを予測する。一つの実施形態において、本発明の方法は以下の薬剤に対する陽性の反応を予測する：アポトーシス促進薬剤、またはアポトーシスを介して働く薬剤、および/またはアポトーシスを介して働かないかアポトーシスのエフェクター薬剤に無反応の薬剤および/またはアポトーシスを介して働かない薬剤。様々な実施形態においてこの発明はがん患者の処置を導く、それには、例えばどのようなタイプの処置をするべきか止めるのかを含む。

## 【0060】

一つの実施形態において、この方法は、患者が一次の主なまたは最初の処置を始めた後にアジュバント治療、限定されないが、単一単独アジュバント治療も含めて、受けるべきかといった臨床的決定を導く。アジュバント治療はアジュバントケアともいわれ主な中心的なまたは最初の処置に加えて行われる処置である。これらの例に限らないが、アジュバント治療は通常全ての検出可能な疾患が除去されたが、不顕性疾患のため再発の統計的リスクが依然として存在する外科手術の後で行われる追加処置であり得る。

## 【0061】

ある実施形態において、この方法は患者の処置、アジュバント治療も含めて、を導く。例えば、患者がある特定の処置に対して反応性を有すると評価された場合、その患者は、その処置をアジュバント治療として受ける。さらに、この方法は、非限定的な例として、アポトーシス促進的方法で、誘導するおよび/もしくは働く処置として、または、そうではない処置として、アジュバント治療の正体 ( i d e n t i t y ) を導き得る。一つの実施形態においてこの方法はある患者が特定の処置に対して反応するもしくは反応がが少ない事を示すことができ、それゆえ、そのような患者はそのような処置をアジュバント治療として受けなくてよい。従って、ある実施形態において、この方法は、起こり得る患者の反応に従い、アジュバント治療を与えるのか与えないのかを提供する。このように、患者の生活の質の改善と治療コストを抑制することができる。

## 【0062】

様々な実施形態において、この方法は、患者がネオアジュバント治療、例えば、外科手術前に腫瘍を縮小させる、および/または悪性度を下げる治療を受けるべきかと言う臨床決定を導く。ある実施形態において、ネオアジュバント治療はがん患者に外科手術の前に投与される化学療法を意味する。ある実施形態において、ネオアジュバント治療は、がん患者に外科手術の前に投与される、本明細書に記載の薬剤を含む薬剤を意味する。ネオアジュバント化学療法一般に考慮されるがんの種類については例えば乳がん、結腸直腸がん

、卵巣がん、子宮頸がん、膀胱がんと肺がんである。

【0063】

ある実施形態においてこの方法はネオアジュバント治療を含む患者の処置を導く。例えば、ある特定の処置に対して反応すると評価される患者は、そのような処置がネオアジュバント治療として受けることができる。さらに、この方法は、非限定的例として、アポトーシス促進的方法で、誘導および/もしくは働く処置として、またはそうではない処置として、ネオアジュバント治療の正体 ( i d e n t i t y ) を導き得る。一つの実施形態において、この方法は患者が特定の処置に対する反応がないもしくは反応が少ない事を示し得、従ってそのような患者は、ネオアジュバント治療としてそのような治療を受けなくてよい。従って、ある実施形態では、この方法は、起こり得る患者の反応に従ってネオアジュバント治療を与えるのか与えないのかを提供する。このように、患者の生活の質の改善と治療コストを抑制できる。

【0064】

ある実施形態においてこの方法は、患者がある特定の種類の処置を受けるかに関する臨床的決定を導く。従って、ある実施形態において、この方法は患者の処置の為の手引きの試験である。

【0065】

ある実施形態において、この方法は、患者がある特定の処置を受けるべきである、起こり得る反応についての情報を提供するものである。ある実施形態において、この方法は、反応が高い可能性を提供し、積極的処置を含む処置を導くことができる。ある実施形態において、この方法は、反応が低い可能性を提供し、積極的処置を含む処置の停止を導き得、より良い生活の質を求めて効果の少ない化学療法から来る必要の無い毒性を避けるための、緩和ケアの使用を導き得る。

【0066】

典型的な実施形態において、この方法はある特定の処置に対する反応の可能性を示す。例えば、ある実施形態においてこの方法はアポトーシス促進剤および/またはアポトーシスを介して作用する薬剤および/またはタンパク質を直接調節することによって駆動されるアポトーシスを介する薬剤に対する反応が高いか低いかの可能性を示す。様々な実施形態において典型的なアポトーシス促進剤および/またはアポトーシスを介して作用する薬剤および/または直接タンパク質を調節することによって駆動されるアポトーシスを介して作用する薬剤としては、ABT263 (ノビトクラックス) やオバトクラックス、WEP、ボルテゾミブ、およびカルフィルゾミブが挙げられる。ある実施形態において、この方法は、アポトーシスを介して作用しない薬剤、および/または直接タンパク質を調節することによって駆動されるアポトーシスを介して作用しない薬剤に対する反応が高いか低いかの可能性を示す。様々な実施形態では、アポトーシスを介して作用しない例示的薬剤として、例えばキネシンスピンドルタンパク質阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、三酸化ヒ素剤 ( T R I S E N O X )、MEK阻害剤、ポモリドミド、アザシチジン、デシチピン、ポリノスタット、エンチノスタット、ジナシクリブ、ゲムツズマブ、BTk阻害剤、PI3キナーゼデルタ阻害剤、レノリジミド、アントラサイクリン、シタラピン、メルファラン、Aky阻害剤、mTOR阻害剤が挙げられる。

【0067】

典型的な実施形態において、この方法は患者がアポトーシス促進薬或はアポトーシスを介して作用する薬剤でがん処置されるべきかどうかを示す。別の典型的な実施形態においてに、本方法は、患者がアポトーシスを介して作用しない薬剤を投与されるべきかを示す。

【0068】

特殊な実施形態において、この方法はここに記載した任意の処置 ( 薬剤を含む ) に対するがん患者の反応を推定するのに有用である。典型的な実施形態において、この発明は、シタラピンおよびアザシチジンに対する急性骨髄性白血病の患者の反応の可能性を予測し、かつ、患者のBH3プロファイル、年齢プロファイル、および細胞遺伝学的因子を評価

する事を含む。

【0069】

様々な実施形態において、ここで記載した方法に基づき、がん処置を施行するのかまたは与えない。例示的な処置は、外科的な除去、放射線療法（ここで記載した化合物の使用、或は放射線増感剤との併用を含む）化学療法、薬力学的治療、標的療法、免疫療法、および補助的療法（例えば、鎮痛剤、利尿剤、抗利尿剤、抗ウイルス剤、抗生物質、栄養サプリメント、貧血治療、血液凝固治療、骨治療、精神医学及び心理学的治療）を含む。

【0070】

典型的な実施形態において、この発明で処置薬剤が選択される。そのような薬剤の例としては、ここで示す例に限らないが、例えば、抗がん剤、化学療法、外科手術、アジュバント療法およびネオアジュバント療法の1つ以上が挙げられる。ひとつの実施形態においてがん処置はBH3ミメティック、エピジェネティック修飾薬、トポイソメラーゼ阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、およびキネシンスピンドルタンパク質安定化剤の1つ以上である。別の実施形態において、がん処置は、プロテアソーム阻害剤、および/または細胞周期制御の調節剤（ここで挙げる例に限らないが、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤）；および/または細胞エピジェネティック機構の調節剤（この例に限らないがヒストンデアセチラーゼ（HDAC）（たとえばヴォリノスタット、またはエンチノスタット）、アザシチジン、デシタピン）；および/またはアントラサイクリン、またはアントラセネジオン（この例に限らないが、エピルピシン、ドキシソルピシン、ミトキサントロン、ダウノルピシン、イダルピシンの1つ以上）；および/またはプラチナベースの治療剤（この例に限らないが、カルボプラチン、シスプラチン、およびオキザリプラチンの1つ以上）；シタラピン、もしくはシタラピン系化学療法剤、BH3ミメティック（この例に限らないが、BCL2、BLCXL、またはMCL1）；およびMCL1阻害剤である。

【0071】

様々な実施形態において、この発明は、がん処置に付属するものであり、ここで挙げる例に限らず例えば米国特許公開番号US2012-0225851および国際特許公開番号WO2012/122370（それらの内容は、その全体がここに参考文献として組み込まれている）に記載されているものが挙げられる。

【0072】

様々な実施形態において、この発明は、がん処置に付属するものであり、ここで挙げる例に限らず例えば、アルキル化剤、例えばチオテバ、およびサイトキサン（シクロフォスファミド）、アルキルスルホン酸塩、例えばブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファン；アジリジン例えばベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、およびウレドパ；エチレンイミンおよび、メチラメラミン、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトロメチルオロメラミン、アセトゲニン（例えば、プラタシン、およびプラタシノン）；カンプトテシン（合成類似剤トポテカンを含む）；プリオスタチン；カリー（cally）スタチン；CC-1065（アドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類似薬を含む）；クリプトフィシン（クリプトフィシン1、およびクリプトフィシン8など）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似薬KW2189、およびCB1-TM1を含む）；エレウテロピン；パンクラチスタチン；サルコディクチン；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード 例としてクロラムブチル、クロルナファジン、コロフォスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、酸化メクロレタミン塩酸塩、メルファラン、ノベムピチン、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード、ニトロソウレア例としてカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン；抗生物質例えばエンジイン抗生物質（例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシガンマIIとカリケマミシンオメガII（参照：例えば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183-186（1994））；ディネミシン、ディネミシンAを含む；ピスホスホネート例えばクロドロネート；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチン クロモ

フォア及び関連したクロモタンパク質エンジイン抗生物質クロモフォア) アクラシノマイシ  
 シン、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマ  
 イシン、カラピシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマ  
 イシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、  
 アドリアマイシン、ドキシソルピシン (モルフォリノ - ドキシソルピシン、シアノモルフォリ  
 ノ - ドキシソルピシン、2 - ピロリノ - ドキシソルピシン、およびデオキシドキシソルピシンを  
 含む)、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシ  
 ン (マイトマイシンC等)、ミコフェノール酸、ノガラミシン、オリボマイシン、ペプ  
 ロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラミシン、ロドルピシン、スト  
 レプトニグリン、ストレプトゾシン、チュベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、  
 ゾルピシン；抗代謝薬例えばメトトレキセートと5 - フルオロウラシル (5 - FU)；葉  
 酸類似体 (例えば、デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトレキセ  
 ート)；プリン類似体 (例えば、フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、  
 チオグアニン)；ピリミジン類似体 (例えば、アンシタピン (ancitabine)、  
 アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ド  
 キシフルリジン、エノシタピン、フロクスウリジン；アンドロゲン (例えば、カルステロ  
 ン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラク  
 トン；抗副腎剤 (anti - adrenal) (例えば、アミノグルテチミド (mino  
 glutethimide)、ミトタン、トリロスタン)；葉酸補給物、例えばフロリン  
 酸；アセグラトン；アルドフォスファミド グリコシド；アミノレプリン酸；エニルウラ  
 シル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラキセート；デメコルシ  
 ン；ジアジコン；エルフォルミチン；エリプチニウムアセテート；エポチロン；エトグルシ  
 ド；ガリウムニトレート；ハイドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシ  
 ノイド 例えばメイタンシンとアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モビ  
 ダンモル；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサント  
 ロン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK多糖複合体 (J  
 HSナチュラルプロダクト、ユージン、オレゴン)ラゾキササン；リゾキシシン；シゾフラン  
 ；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2, 2', 2'' - トリクロロト  
 リエチルアミン；トリコテセン (例T - 2毒素、ベラキュリンA、ロリジンA、およびア  
 ングイディン)；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニト  
 ール；ミトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド (「アラ - C」)；シ  
 クロフォスファミド；チオテパ；タキソイド、例えばタキソール パクリタキセル (プリ  
 ストルマイヤーズ スクイブ オンコロジー、プリンストン、ニュージャージー)、アブ  
 ラキササン クレモフォール - フリー、アルブミン加工ナノ粒子型のパクリタキセル製剤 (ア  
 メリカン ファーマシューティカル パートナース、シャウンバーグ、111)、およ  
 びタキソテール ドキセタキセル (ローヌ ブーラン ローラー、アントニー、フランス  
 ；クロランブシル；ゲムザール ゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；  
 メトトレキセート；プラチナ類似体、例えばシスプラチン、オキサリプラチン、およびカ  
 ルボプラチン；ピンブラスチン；プラチナ；エトポシド (VP - 16)；イホスファミド  
 ；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ナベルピン；ピノレルピン；ノバントロン；テニ  
 ポシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネ  
 ート；イリノテカン (カンプトサー、CPT - 11) (イリノテカンと5FU、およびロ  
 イコボリンとの処置レジメを含む)；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオ  
 ロメチルオルニチン (DMFO)；レチノイド、例えばレチノイン酸；カペシタピン；コ  
 ンプレタスタチン；ロイコボリン (LV)；オキサリプラチン、オキサリプラチン処置レ  
 ジメを含む (FOLFOX)；ラパチニブ (Tykerb)；PKC - a、Raf、H -  
 Ras、EGFRの阻害剤 (例えば、エルロチニブ (Tarceva)) および細胞増殖  
 を低減するVEGF - A、ダコゲン、ベルケード、および薬学的に受容可能な塩、酸、或  
 は上記の薬剤の誘導体のうちの1つ以上を含む。

【0073】

#### 典型的な検出方法

さまざまな実施形態において、この方法はタンパク質および/または核酸の有無またはレベルを評価することを含む。さまざまな実施形態において、この方法は、BH3 プロファイリングの特異性および/または感度を高めることができるタンパク質および/または有無またはレベルを評価することを含む。ある実施形態において、評価は患者の反応についてのマーカーの評価である。ある実施形態において、この方法は免疫組織染色法、ウエスタンブロット法、細胞ウエスタンブロット、免疫蛍光染色、ELISA、および蛍光活性化細胞ソーティング(FACS)、またはここに記載されている、或は当該技術で公知の任意の他の方法の1つ以上を用いる測定を含む。

その方法は、腫瘍の検体(例えば、生検、またはがん組織、または体液)に抗体を接触させて組織または体液に特異的なエピトープを同定することを含み得、そしてそれががんの状況の指標になる。

#### 【0074】

一般的に、直接法と間接法という二つの方法を用いて体液或は組織における抗原上のエピトープを検出する。直接法は一段階の染色を含み、体液または組織試料中の抗原に直接反応する標識抗体(例えば、FITCをコンジュゲートした抗血清)が関与し得る。間接法は体液または組織抗原反応する非標識の一次抗体および一次抗体と反応する標識二次抗体を含む。標識は放射性標識、蛍光標識、ハプテン標識、例えばビオチン、または酵素、例えば西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリホスファターゼを含み得る。これらのアッセイを実施する方法は当該技術分野で広く知られている。例えば、Harlow et al. (Antibody, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 1998), Harlow et al. (Using Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, NY 1999), Virella (Medical Immunology, 6<sup>th</sup> edition, Informa HealthCare, New York, 2007), および Diamandis et al. (Immunoassays, Academic Press, Inc., New York, 1996)を参照。これらのアッセイをするキットは、例えばクロンテックラボラトリーズ社(Mountain View, CA)から市販されている。

#### 【0075】

さまざまな実施形態において、抗体は、抗体全体、および/または任意の抗原結合フラグメント(例えば、抗原結合部分)、および/またはこれらの一本鎖(例えば、ジスルフィド結合で相互に接続された少なくとも2本の重(H)鎖と2本の軽(L)鎖を含む抗体、 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ および $C_H1$ ドメインからなる一価フラグメントであるFabフラグメント；ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結した2つのFabフラグメントを含む二価フラグメントである $F(ab)_2$ フラグメント； $V_H$ および $C_H1$ ドメインでできているFdフラグメント；抗体のシングルアームの $V_L$ および $V_H$ ドメインからなるFvフラグメントなど)。様々な実施形態において、ポリクローナルとモノクローナル抗体は、ヒトまたはヒト化抗体、またはその機能的なフラグメントが単離されるので、有用である。

#### 【0076】

様々な種の標的に向けた抗体の結合能を評価する標準的なアッセイは、例えばELISA、ウエスタンブロット、RIAを含め当該技術で公知である。抗体の結合キネティクス(例えば、結合親和性)は、ピアコア解析等による当該技術分野で公知の標準的なアッセイによって評価することができる。

#### 【0077】

別の実施形態において、測定は、核酸の存在、非存在、またはレベルを評価することを含む。当業者であれば適切なマーカーのDNA/RNAレベルを検出或は定量するのに使用できる幾多の方法を理解する。

## 【0078】

遺伝子の発現は、例えば、低から中プレックスの技術、この例に限らないが、リポータージーンアッセイ、ノーザンプロット、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH)および逆転写PCT(RT-PCR)を含めた、技術を用いて測定することができる。遺伝子の発現も、例えば高プレックス技術、この例に限らないが、遺伝子発現の連続分析(SAGE)、DNAマイクロアレイ、タイリングアレイ、RNAシーケンス/全トランスクリプトームショットガンシーケンシング(WTSS)、ハイスループットシーケンシング、マルチプレックスPCR、マルチプレックスライゲーション依存性プロンプ増幅(MLPA)、ライゲーションによるDNAシーケンシング、およびルミネックス/XMAP。バイオマーカーに使われるRNAの発現レベルを検出或は測定、マイクロアレー、RT-PCR(qPCRを含む)ヌクレアーゼプロテクションアッセイ、ノーザンプロットを含む技術を用いて測定することができる。

典型的ながんと患者

## 【0079】

ある実施形態において、この発明は、がん処置を決定するための方法を提供し、かつ、患者の腫瘍またはがん細胞の検体を含む。がん或は腫瘍は制御不能な細胞増殖、および/または細胞生存の異常な上昇、および/または体の器官やシステムの正常な機能を損なうアポトーシスの阻害を指す。がんまたは腫瘍を有する被験体は客観的に測定できるレベルのがん細胞が被験体の体内に存在する被験体である。この発明には良性および悪性のがん、ならびに休止状態の腫瘍または微細転移も含まれる。がんが原発巣から移動して重要な臓器に播種すると影響を受けた臓器の機能悪化によって最終的には被験体に死をもたらす。

## 【0080】

様々な実施形態において、この発明は転移前のがんでも転移がんにも適応できる。転移はがんがその原発巣から体の他の場所に広がる事である。がん細胞は原発腫瘍から遊離しリンパ管や血管に浸潤し、血流によって循環し、身体他の場所の正常組織の遠隔巣で成長する(転移する)。転移は局所或は遠位に起きる。転移は、原発腫瘍から腫瘍細胞が偶発的に遊離する事、続いて血流によって移動して、遠隔部位で留まる連続的過程である。その新しい場所で細胞が血液供給を確立し、成長して生命を脅かす固まりを作るようになる。腫瘍細胞内の刺激的および阻害的分子経路が転移の過程を制御している、また、腫瘍細胞と遠隔部位の宿主細胞の間の相互作用も重要である。転移の検出には多くの場合、特有の症状のモニタリングの他、磁気共鳴画像法(MRI)のスキャン、コンピュータトモグラフィ(CT)のスキャン、血液血小板数、肝機能検査、胸部X線検査、骨スキャンの単独または組み合わせを用いて行われる。

## 【0081】

ここで記載した方法は、がんの予後、がんの診断、がんの処置、および/または、細胞生存の増加またはアポトーシスの阻害と関連する悪性腫瘍および増殖性障害の診断、予後、処置、予防、または、成長、進行および/もしくは転移の改善に向けられる。ある実施形態において、がんは血液のがんであり、それには、この例に留まらないが例えば急性骨髄性白血病(AML)、多発性骨髄腫、濾胞性リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病、および非ホジキンリンパ腫(例えば限定されないがマントル細胞リンパ腫、およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫が含まれる)が含まれる。ある実施形態において、がんは固形腫瘍であり、例えばこの例に留まらないが、非小細胞肺癌、卵巣がん、および悪性黒色腫が含まれる。

## 【0082】

ある実施形態において、この発明は以下に示すがんの1つ以上に関係する：急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、副腎皮質癌、AIDS関連がん、肛門がん、虫垂がん、星状細胞腫(例えば、小児の小脳または大脳)、基底細胞癌、胆管がん、膀胱がん、骨腫瘍(例えば、骨肉腫、悪性線維性組織球腫)脳幹部グリア腫、脳がん、脳腫瘍(例えば、小脳アストロサイトーマ、大脳アストロサイトーマ/悪性グリア

腫、上衣腫、髓芽腫、テント上未分化型神経外胚葉性腫瘍、

視路及び視床下部グリオーマ)、乳がん、気管支腺腫/カルチノイド、パーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍、中枢神経系リンパ腫、小脳アストロサイトーマ、子宮頸がん、慢性リンパ球性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、

慢性骨髄増殖性疾患、結腸がん、皮膚T細胞性リンパ腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、

子宮体がん、上衣腫、食道がん、ユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管がん、眼球腫瘍、胆嚢がん、胃(胃)がん、胃腸系間質腫瘍(GIST)、杯腫瘍(例えば、頭蓋外、性腺外、卵巣)妊娠性トロフォブラスト腫瘍、グリア腫瘍(例えば、脳幹部、大脳星状細胞腫、視路および視床下部)、胃カルチノイド、頭頸部腫瘍、心臓がん、肝細胞(肝臓)がん、下咽頭がん、視床下部と視路グリア腫瘍、眼内黒色腫、膵島細胞癌(内分泌膵臓)、腎臓がん(腎細胞がん)、喉頭がん、白血病(例えば、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、有毛細胞)、口唇および口腔がん、脂肪肉腫、肝がん、肺がん(例えば、非小細胞肺がん、小細胞肺がん)、リンパ腫(例えば、AIDS関連リンパ腫、パーキットリンパ腫、皮膚T細胞ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、中枢神経系原発リンパ腫)、髓芽腫、黒色腫、メルケル細胞癌、中皮腫、転移性頸部扁平上皮がん、口腔がん、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄異形成/骨髄増殖性疾患、骨髄性白血病、骨髄性白血病、骨髄性白血病、骨髄増殖性疾患、慢性鼻腔及び副鼻腔がん、鼻咽頭癌、神経芽腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺がん、口腔がん、口腔咽頭がん、骨肉腫、卵巣がん、膵臓がん、膵臓がん、副鼻腔及び鼻腔がん、副甲状腺がん、陰茎がん、喉頭がん、褐色細胞腫、松果体星状細胞腫、および/または胚細胞腫、松果体芽細胞腫およびテント上未分化型神経外胚葉性腫瘍、脳下垂体腺腫、プラズマ細胞腫瘍/多発性骨髄腫、胸膜肺芽腫、中枢神経系原発リンパ腫、前立腺がん、腎がん、腎細胞癌(腎臓がん)、腎盂及び尿管がん、網膜芽腫、横紋筋肉腫、唾液腺がん、肉腫(例えば、ユーイングファミリー、カポジ、軟部組織、子宮)、セザリー症候群、皮膚がん(例えば、非黒色腫、黒色腫、メルケル細胞)、小細胞肺がん、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、頸部扁平上皮がん、胃がん、テント上未分化型神経外胚葉性腫瘍、T細胞性リンパ腫、睾丸がん、咽喉がん、胸腺腫及び胸腺癌、甲状腺がん、栄養膜腫瘍、尿管及び腎盂がん、尿道がん、子宮がん、子宮肉腫、膣がん、視路及び視床下部グリア腫瘍、外陰がん、ワルデンストロームマクログロブリン血症、およびウイルス腫瘍。

【0083】

一つの実施形態において、がんは急性骨髄性白血病である。急性骨髄性白血病は2番目に多い一般的な白血病であり、アメリカ合衆国では年間に約1万3千人の新規に診断された症例と死者は9千人である。承認済み治療が有るが、多くの白血病患者において予後は悪く良好な処置経過を来すものは少ない。現在行われているAMLに対する標準的な治療はシトシンアラビノシド(arab-C)にアントラサイクリン剤(例えばダウノルビシン、イダルビシンまたはミトキサントロンなど)を組み合わせたものである。この治療レジメでは普通高用量のシタラピンおよび/または幹細胞移植がその後に行われる。これらの処置は若い患者に良好な治療結果をもたらした。急性前骨髄球性白血病の処置においても進歩が見られ、オールトランスレチノイン酸(ATRA)または三酸化ヒ素を用いる標的化治療で非常に良い生存率がえられた。しかし、AML症例のほとんどを代表する60歳以上の患者集団では治療が不可解なままである。65-85%の患者は最初に既存の処置に反応するが、その応答者の65%は再発を経験し、多くの患者は病気に倒れる。少なくともこれらの理由及び前述の処置は非常に強い副作用を伴い得る事から、治療反応を予測できるテストは、これらの訴訟を緩和する処置の使用を手引きする事が出来る。ある実施形態では、本発明は、我々の発明が患者と処置の適合性を合わせる事で成功する処置の可能性を改善する。さらに、現在急性骨髄性白血病の患者の処置に対する反応性を推測する試験はない。

【0084】

本明細書で使用される用語被験体は、特別に定義されない限り、哺乳動物、例えば、

ヒト、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、犬、猫、馬、牛、ヤギ、豚、または非ヒト霊長類、例えば猿、チンパンジー、またはバブーンである。用語「被験体」および「患者」は交換可能に使用される。

典型的な検体

【0085】

ある実施形態において、この発明は腫瘍検体（生検または外科検体の試料を含む）の測定を含む。ある実施形態において、検体は凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、およびホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体（例えば、抗体ベースのBH3プロファイリング）から選択される。ある実施形態において、生検はヒト生検である。様々な実施形態において、生検材料は凍結腫瘍組織検体、培養細胞、循環腫瘍細胞、およびホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織検体（例えば、抗体ベースのBH3プロファイリング）である。

【0086】

ある実施形態において、腫瘍検体は生検試料、例えば、凍結腫瘍組織（凍結切片）検体である。当技術分野で公知のように凍結切片には低温槽（冷凍器内にマイクロトームを含む）を使用することができる。外科検体は金属の組織ディスク上に置き、次にチャック（c h u c k）内に固定して約-20\_\_~約-30\_\_まで急速凍結する。検体は例えばポリエチレングリコールおよびポリビニルアルコールからなるゲル様の媒体に包埋する。凍結組織はクライオスタットのマイクロトーム部分で凍結切断し、切片を必要に応じてガラスライドに載せた後染色する。

【0087】

ある実施形態において、腫瘍検体は生検試料、例えば、培養細胞である。これらの細胞は当該技術分野で公知である通常の細胞培養の技術を用いて処理され得る。これらの細胞は循環腫瘍細胞でありうる。

【0088】

ある実施形態において、腫瘍検体は生検試料、例えばホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）の腫瘍組織検体であり得る。当該技術分野で公知のように、生検検体はホルマリン（水およびホルムアルデヒドの混合物）或は他の流体を含む容器に入れ、それを保存することができる。組織試料は熱せられたパラフィンろうを含む型に入れることができる。このろうが冷やされると組織を保護する固体ブロックが形成される。包埋組織を含むパラフィンろうはマイクロトームの上に置かれ、非常に薄い組織切片が作製される。

【0089】

特定の実施形態において、組織検体（または生検）は100ミリグラム未満の組織を含有し、または、特定の実施形態において、約50ミリグラム以下の組織を含有する。腫瘍検体（または生検）は約20ミリグラムから50ミリグラムの組織、例えば約35ミリグラムの組織を含有し得る。

【0090】

組織は例えば一つ以上の（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ）針生検（例えば、14ゲージの針或は他の適当なサイズの針を用いて）として得ることができる。ある実施形態において、生検はカッピングチップを有する長い針をコア針生検の間に使用して、疑わしい領域から柱状の組織を取り出す、コア針生検である。ある実施形態において、生検は、吸引デバイスが、針を介して抜き取られる流体および細胞の量を増加させる、真空支援生検である。ある実施形態において、生検は、針生検を画像化手順、例えば、X線、コンピューター断層撮影（CT）、磁気共鳴画像法（MRI）または超音波などと組み合わせた画像誘導生検である。他の実施形態において、マンモトーム（登録商標）生検システムのようなデバイス（乳房生検のための、レーザー誘導、真空支援の生検システムである）を介して得ることができる。

【0091】

特定の実施形態において、検体はヒト腫瘍由来の細胞株である。特定の実施形態において、検体はがん幹細胞である。他の実施形態において、検体は固形腫瘍の生検、例とし

て、結腸直腸原発腫瘍、乳腺原発腫瘍、前立腺原発腫瘍、肺原発腫瘍、膵臓原発腫瘍、腎臓原発腫瘍、または卵巣原発腫瘍などに由来する。

【0092】

特定の実施形態において、検体は上皮由来である。ある実施形態において、上皮検体は、固体マトリックスまたはビーズに結合させた抗上皮細胞接着分子（E p C A M）または他の上皮細胞結合抗体を用いて生検試料からの選択によって濃縮する。

【0093】

特定の実施形態において、検体は、間葉起源の検体である。特定の実施形態において、間葉の検体は、神経細胞接着分子（N - C A M）またはニューロピリン、または他の間葉細胞結合抗体を用いて生検試料からの選択によって濃縮される。

【0094】

特定の実施形態において、検体は、非固形腫瘍の生検、例えば本明細書に記載したがんのいずれかなどに由来する。具体的な実施形態において、検体が多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ性白血病、マンツル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、および非ホジキンリンパ腫を有する患者の生検に由来する。具体的な実施形態において、検体は、固体マトリックスまたはビーズに結合させた抗CD138抗体ビーズを用いて生検試料からの選択により濃縮される多発性骨髄腫細胞である。具体的な実施形態において、検体は、の試料をCD45に向けた抗体に結合させることによって濃縮する急性骨髄性白血病細胞である。具体的な実施形態において、検体は、非B細胞の除去のより濃縮される慢性リンパ性白血病または、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫である。

【0095】

ある実施形態において、検体は循環腫瘍細胞に由来する。

BH3プロファイリング

【0096】

様々な実施形態において、この発明はBH3プロファイリングを含む。様々な実施形態において、本発明は、少なくとも2種、または3種、または4種、または5種、または6種、または7種、または8種、または9種、または10種のBH3ペプチドを一度に評価する、BH3プロファイリングを含む。ある実施形態において、本発明の方法は、単一のBH3ペプチドの評価とは対照的に、マルチペプチド解析を含む。ある実施形態において、BH3ペプチドのパネルを単一患者検体に対してスクリーニングする。

【0097】

ある実施形態において、BH3プロファイリングはペプチドの使用を含み、ここで、該ペプチドは、BIM、BIM2A、BAD、BID、HRK、PUMA、NOXA、BMF、BIK、およびPUMA2Aのうちの一つ以上である。ある実施形態において、BH3プロファイリングは、BIM、BIM2A、BAD、BID、HRK、PUMA、NOXA、BMF、BIK、およびPUMA2Aの一つ以上に対する抗体、ならびに2つのBcl-2タンパク質、例えば、第1のBcl-2タンパク質（例えば、Bim、Bid、Bad、Puma、Noxa、Bak、Hrk、BaxまたはMule）および第2のBcl-2タンパク質（例えば、Mcl-1、Bcl-2、Bcl-XL、Bfl-1、またはBcl-w）の間に形成される天然に存在するヘテロダイマーの使用を含み、これは米国特許第8168755号に記載されているとおりであり、該特許の全内容が、ここに参考文献として援用される。ある実施形態において、BH3プロファイリングは張り合わせペプチド（STAPLED PEPTIDE）（例えば、タンパク質をより強固にし細胞に浸透できるようにするための、3Dアルファヘリックスタンパク質部分を、炭化水素結合を用いて合成的強化することにより生成したペプチド）（たとえば、ベルジン等執筆「細胞内薬剤標的の為に張り合わせペプチド」METHOD IN ENZYMOLOGY, VOLUME 503 (Chap. 1), (その内容は全てが参考文献によりここに援用される))の使用を含む。

【0098】

1つの実施形態において、ペプチドは約0.1~200 μMの濃度で使用する。ある実施形態において、約0.1~約150、または約0.1~約100、または約0.1~約50、または約0.1~約10、または約0.1~約5、約1~約150、または約1~約100、約1~約50、約1~約10、約1~約5 μM、または約10~約100 μMのペプチドが使用される。ある実施形態において、約0.1、または約0.5、または約1.0、または約5、または約10、または約50、または約100、または約150、または約200 μMのペプチドの濃度を使用する。1つの実施形態において、BH3プロファイリングは検体を透過処理することを含む。

【0099】

BH3プロファイリングとかかる方法に有用な試薬については米国特許第7868133号、同第8221966号、および同第8168755号、ならびに米国特許公開第211/0130309号(その内容が、全体としてここに参考文献として援用される)に記載される。

【0100】

簡潔には、理論に拘束されるものではないが、異常な表現型の結果として、がん細胞は、アポトーシス経路におけるブロックを誘発させる。これらのブロックにより、がん細胞をある種の療法に対して耐性にし、かつ、驚いた事に、他の療法に対して一部のがん細胞を感受性にする。「癌遺伝子中毒」という概念は、がん細胞が生存のためにある種のタンパク質に対する依存性、または、それへの嗜好性を獲得する現象を記載する。BH3プロファイリングは、所与のがん細胞に特定のアポトーシス制御タンパク質へのかかる依存性が生じるかを決定し、そしてその依存性タンパク質を同定する。がん細胞は、何時もそうである訳ではないが、アポトーシスを受けるようにあらかじめ設定されている可能性があり、また、これは、これらの細胞が、別段の偶然の生存のため、抗アポトーシスのBcl-2ファミリータンパク質のいずれかまたは全てに依存性であるという機能である。この事でがん細胞が処置に対して反応の可能性の予測を提供する。

【0101】

がん細胞は、理論に拘束されるものではないが、DNA損傷、遺伝的不安定性、増殖因子異常シグナル伝達、および異常か欠損したマトリックスの相互作用(これらのいずれかは、典型的には内因性(ミトコンドリア性)のアポトーシス経路を介してアポトーシスを誘導するはずである)などの異常を示す。しかしこれらのアポトーシスシグナルに反応するよりはむしろ、がん細胞は生存する。そうすることで、しばしば、これらの細胞は慢性的なアポトーシスシグナルに対する選択的ブロックに高度に依存するようになる。この適応はがん細胞に生存の仕組みを与えるが、しかし、このような適応は特定のアポトーシス誘導療法に対してがん細胞を感受性にもし得る。細胞を内因性アポトーシスによる死へ付す極めて重要な事象は、ミトコンドリア外膜の透過性(MOMP)およびエフェクターであるカスパーゼを活性化する分子の放出である。多くの例で、MOMPは内因性アポトーシス経路における戻りのない小領域である。Bcl-2ファミリータンパク質はMOMPの重要な制御分子であり、それらの活性は、リンパ系のがんや幾つかの固形腫瘍のがんと関連しており、多くのがんでは、化学治療に対する耐性を司る重要な媒介物質であると考えられている。

【0102】

Bcl-2タンパク質は生存促進(抗アポトーシス)メンバーおよびアポトーシス促進メンバーの間の識別可能なタンパク質-タンパク質相互作用によって制御されている。これらの相互作用は、主にBH3(Bcl-2ホモロジドメイン-3)媒介性結合を介して起こる。アポトーシス開始のシグナル伝達は大部分の場合はミトコンドリアの上流で起こり、短いBH3のみを有するBcl-2ファミリーメンバーがミトコンドリアに移動して、そこでMOMPを活性化する、またはそれを感受性にする。活性型BH3のみを有するタンパク質、Bim、およびBidはエフェクターであるアポトーシス促進タンパク質、BaxおよびBakと結合し直接活性化する、そして又抗アポトーシスBcl-2ファミリータンパク質、Bcl-2、Mcl-1、Bfl-1、Bcl-w、およびBcl-

xLに結合してそれを阻害する。感受性増強型BH3タンパク質であるBad、Bik、Noxa、Hrk、Bmf、およびPumaは抗アポトーシス型のBcl-2ファミリータンパク質、Bcl-2、Mcl-1、Bfl-1、Bcl-w、およびBcl-xL、とだけ結合し、それらの抗アポトーシス機能をブロックする。理論に拘束されるものではないが、各感受性増強型タンパク質はユニークな特異性プロファイルを持つ。例えばNoxa(AおよびB)はMcl-1と高い親和性をもって結合し、BadはBcl-xLとBcl-2とは結合するがMcl-1とは非常に弱くしか結合せず、Pumaはこれら3つの標的全てに良く結合する。これらのタンパク質の抗アポトーシス機能は活性型BH3タンパク質BimおよびBidの分離である。これらの活性型BH3タンパク質を感受性増強型のペプチドによって置き換えるとBax/Bak媒介性のアポトーシスの決定がもたらされる。これらの相互作用は様々な結果を有し得、例えばこの例に限らないが、恒常性、細胞死、アポトーシスに対する感受性の増加、およびアポトーシスの妨害が挙げられる。

#### 【0103】

アポトーシスのシグナル伝達がブロックされるがん細胞の性状を定義すると、ミトコンドリア表面でBH3のみを有する活性型タンパク質の蓄積であり、抗アポトーシスタンパク質によってこれらのタンパク質は分離される結果となる。それらのエフェクター標的にたいする蓄積と近接は、「BH3を活性化した」状況においてBcl-2ファミリータンパク質のアンタゴニスト作用に対して感受性を増加する原因となる。

#### 【0104】

ある実施形態において、細胞がNoxa(AまたはB)に対する高いアポトーシスの反応を持つ場合はMcl-1が活性化されており、一方Badペプチドに対する高い反応はBcl-xLまたはBcl-2がアポトーシスブロックをする事を示唆する。ある実施形態において、Pumaは全Bcl-2ファミリープライミングを反映する。このように、Mcl-1又はBcl-xLのいずれかに、その両方のタンパク質に、或は数種のBcl-2ファミリーメンバーに依存している細胞は容易に区別でき、それで適切な処置が結果的に適合するようにし得る。ミトコンドリアのこれらのペプチドに対する反応の違いは、Mcl-1またはBcl-xLによって影響された内因性シグナル伝達経路に送り込む経路を介して働くと知られている所の治療の使用を手引きする。Bcl-2阻害或はMcl-1阻害化合物の使用はこのような場合に示され得る。ある実施形態において、本発明の方法はまたMcl-1又はBcl-xLの上流の実体を標的とするような治療を示すか又は禁忌とする。

#### 【0105】

BH3プロファイリングアッセイはがん細胞がプライミングの状態にある、ならびにプライミングが起こっている構造にあるときを識別し、これは予測値を有する。

典型的な臨床因子と追加的バイオマーカー

#### 【0106】

ある実施形態において、この発明は臨床因子の評価を含む。ある実施形態において、この発明は、BH3プロファイリングおよび/または患者の反応を評価するための臨床因子の評価を含む。ある実施形態において、BH3プロファイリング研究と患者の反応に関する情報を提供する臨床因子との組み合わせはアポトーシスに関連しないかもしれない。ある実施形態において、臨床因子はアポトーシス以外に影響を与える。

#### 【0107】

一つの実施形態において、臨床因子は表3に示される。

#### 【0108】

一つの実施形態において、臨床因子は年齢、細胞遺伝学的状態、パフォーマンス、組織学的サブクラス、性別、および病期のうちの1つ以上である。

#### 【0109】

一つの実施形態において臨床因子は年齢である。一つの実施形態において患者の年齢プロファイルは約10歳以上、または約20歳以上、または約30歳以上、または約40歳

以上、または約 50 歳以上、または約 60 歳以上、または約 70 歳以上、または約 80 歳以上で分類される。

【0110】

一つの実施形態において臨床因子は細胞遺伝学的状態である。ある種のがん、例えばウイルス腫瘍と網膜芽細胞腫では、例えば、遺伝子欠失、または遺伝子不活性化は、がんの進行が始まる事に重要である、つまり腫瘍抑制に関連している染色体領域には普通欠失或は変異があるからである。例えば、欠失、逆位、および転位はグリア腫瘍、非小細胞肺がん、白血病、および黒色腫において普通染色体 9 p 21 領域で検出される。理論に拘束されるものではないが、これらの染色体変化は腫瘍サプレッサーのサイクリン依存性キナーゼ阻害 2A を不活性化する。特定の遺伝子におけるこれらの欠失とともに、大きな染色体領域の欠損が認められることもある。例えば、染色体 1 p および 16 q は固形腫瘍細胞において一般に失われている。遺伝子重複や遺伝子コピー数の増加もがんに寄与し得、また転写解析或はコピー数変動アレイで検出できる。例えば、染色体領域 12 q 13 - q 14 は多くの肉腫において増幅されている。この染色体領域は p 53 と呼ばれる腫瘍サプレッサーに結合することが公知の MDM2 と呼ばれる結合タンパク質をコードする。MDM2 が増幅されると P 53 による細胞増殖の制御を抑制する事で腫瘍が形成され得る。さらに、ある腫瘍の乳がんはヒト表皮増殖因子受容体 2 の過発現およびヒト表皮増殖因子受容体 2 をコードする E R B B 2 遺伝子のコピー数の増加と関連している。そのほか、染色体数の増加、例えば染色体 1 q および 3 q はまたがんの危険性の増加と関係している。

【0111】

細胞遺伝学的状態は当該技術分野で公知の様々な方法で測定することができる。例えば、FISH、典型的な核型分析および仮想核型分析（例えば、比較ゲノムハイブリダイゼーションアレイ（CGH）と一塩基多型アレイ）が用いられ得る。例えば、FISHは特定の遺伝子座における染色体再構成を調べるのに使われ得、またこれらの現象は疾患のリスク状態に関連している。ある実施形態において、細胞遺伝学的状態は好ましい、好ましくない、どちらとも言えないである。

【0112】

一つの実施形態において臨床因子はパフォーマンスである。パフォーマンスステータスは色々なシステムを用いて定量でき、患者のパフォーマンスステータスをスコア化するための方法は当該技術分野で公知である。この測定はしばしば患者が化学療法を受けることができるのかどうか、用量調節の調節、また緩和ケアの強度について決定するために使用される。色々な点数化の方法があり、それらとしては、カルノフスキースコアとズブロッツスコアが挙げられる。パラレルスコアリングシステムは全身機能の全体的評価（GAF）スコア（これは精神科においては診断と統計学的指針（DSM）の5番目の軸として組み込まれている）が挙げられる。高度パフォーマンスステータス（例えば、カルノフスキースコアを用いて少なくとも80又は少なくとも70%）は、疾患状態の進行を防止するための、および、化学療法および/または放射線処置を受ける患者の能力を増強するための処置を示し得る。例えば、これらの実施形態において、患者は外来であり自己管理できる。他の実施形態において、評価が、患者が低いパフォーマンスステータス（例えば、カルノフスキースコアリングシステムを用いて50%未満、30%未満、または20%未満）であることを示し、従来の放射線療法および/または化学療法に耐性を可能にすべき事を示す。これらの実施形態において、患者はほとんど寝たきりか車いす生活で自己管理できない。

【0113】

カルノフスキースコアは100から0に及び、100が「完全な」健康で0は死である。スコアは10の間隔で付けられ得る、つまり100%は正常、合併症が無く、病気の徴候が無い。90%は正常の活動が可能だが幾つか病気の症状または徴候がある。80%は正常な活動であるが幾つかの困難を伴い幾つかの症状または徴候がある。70%は、自己管理は出来るが正常の活動や仕事ができない。60%は介助が少し必要であり大多数の個人的要件は自己管理できる。50%は介助がしばしば必要であり頻繁な医療介護が必要で

ある。40%は障害を持ち、特別な介護が必要である。30%は高度の障害を持ち入院が示唆されるが死の危険性は無い。20%は非常に病状が悪化した状態で緊急の入院が必要で支持処置 (supportive measure) または処置 (treatment) が必要である。10%は瀕死の急激に進行する致死的疾患過程である。

【0114】

パフォーマンスステータスについてのズブロッドスコアリングシステムは以下を包含する：0 完全に活動的、制限なしにすべての前病パフォーマンスを実行できる。1 身体的に激しい活動に制限があるが歩行可能で軽い或は座って行う性質の仕事、例えば、軽度の家での仕事、オフィスワークが出来る。2、歩行可能ですべての自己管理が出来るが覚醒時間の約50%以上であらゆる仕事活動ができない。3、限定された自己管理しか可能でなく、覚醒時間の50%超をベッド或はイスで過ごす。4、完全に障害のある状態で、自己管理が全く出来ず、寝たきり又は何時も座っている。5、死。

【0115】

一つの実施形態において臨床因子は組織学的サブクラスである。ある実施形態において、腫瘍の組織試料はElston & Ellis, Histopathology 1991, 19:403-10 (その内容はその全体として本明細書に参考として組み込まれる) に従ってグレード付けする。

【0116】

一つの実施形態において臨床因子は性別である。一つの実施形態において、性別は男性である。他の実施形態において性別は女性である。

【0117】

一つの実施形態において臨床因子は病期である。非限定的例として、ステージグループ分けを使用すると、ステージI がんは体内の一方所に局在している。ステージIIとIII がんは局所的に進行している。がんがステージIIとしてまたはステージIIIとして指定されるかは、がんの特定の種類に依存する。一つの実施形態において、ホジキン病ではステージIIは横隔膜の上か下の一方のみのリンパ節が影響を受け、一方、ステージIIIは上および下のリンパ節が影響を受けたことを示す。ステージIIおよびIII がんについての特別な診断基準は、それゆえ診断によって異なる。ステージIV がんは多くの場合転移が認められ、他の臓器へのまたは全身へ拡散している。

【0118】

ある実施形態において臨床因子は血液病に対するフランス - 米国 - 英国 (FAB) 分類システム (例えば、骨髄発生不全の存在ならびに骨髄芽球および赤血芽球の定量を示す) である。一つの実施形態において、急性リンパ芽球性白血病のFABはL1 - L3であるが、又は急性骨髄性白血病についてはM0 - M7である。

【0119】

別の実施形態においてこの方法は変異状態、一塩基多型、定常状態のタンパク質レベル、および動的タンパク質レベルから選択される追加的なバイオマーカーの測定をさらに含む。別の実施形態において、この方法は患者の臨床的反応を予測することをさらに含む。別の実施形態において、臨床反応は約1、約2、約3、または約5年に渡る進行/発症が無い状態での生存である。

【0120】

各種の臨床因子、例えば年齢プロファイルおよびパフォーマンスステータスが同定されている。いくつかの診断の統計学的な測定法も使用されており、それらとしては、例えば細胞遺伝学および分子事象 (これらの例に限らないが、遺伝子MLL、AML/ETO、FLT3-ITD、NPM1 (NPMc+)、CEBPa、IDH1、IDH2、RUNX1、ras、およびWT1の変異、およびエピジェネティック修飾遺伝子TET2およびASXLにおける変異、ならびに細胞シグナリングタンパク質プロファイルが挙げられる) が挙げられる。

【0121】

ある実施形態において本明細書に記載された方法により手引きされるとおり、本予防

的手法は、がんによって苦しめられている可能性のある患者に対し処置をほどこすことを含む。ある実施形態において、被験体ががんに対してハイリスク、がんの遺伝的素因（例えば遺伝の危険因子）、がんの既往歴（例えば、新規がんおよび/または再発）、がんの家族歴、がん誘発剤に対する暴露（例えば、環境物質）および薬理遺伝学的情報（遺伝型の薬物動態、薬力学に対する効果、または治療薬の効果プロファイル）のうちの1つ以上の特徴を示す場合、被験体はがんを罹患している可能性がある。

【0122】

ある実施形態において被験体はがんに対してハイリスクを特徴とする場合、被験体はがんに苦しめられる可能性がある。ある実施形態において被験体はもしがんに対する遺伝的素因の特徴を示すならば、がんに苦しめられる可能性がある。ある実施形態においてがんに対する遺伝的素因は、当該技術分野で公知なように、遺伝的臨床因子である。このような臨床因子は、例として、少なくとも結腸がん、子宮がん、小腸がん、胃がん、尿路がんについてのHNPCC、MLH1、MSH2、MSH6、PMS1、PMS2を含み得る。ある実施形態において、被験体が以前のがんの発症によって特徴づけられる場合、被験体はがんによって苦しめられる可能性がある。ある実施形態において、被験体は1、または2、または3、または4、または5、または6回のがんの以前の発症に苦しめられていた。ある実施形態において被験体のがんの家族歴によって特徴づけられる場合、被験体のがんに苦しめられる可能性がある。ある実施形態において、および/または祖父母および/または同胞および/または叔母/叔父および/または大叔父/大叔母、および/または従兄弟従姉妹が今まで又は現在がんに苦しめられている。ある実施形態において、被験体はもしがん誘発物質（例えば、環境物質）に暴露されることを特徴とする場合、がんに苦しめられる可能性がある。例えば皮膚の強力な日光への暴露は皮膚癌の臨床因子である。例として、喫煙は肺、口、喉頭、膀胱、腎臓、およびいくつかの他の臓器のがんの臨床因子である。

【0123】

さらに、ある実施形態において次の臨床因子の任意の1つはここで述べる方法で有用であり得る：性別、遺伝的危険因子、家族歴、個人歴、人種、民族性、特定の組織の性質、様々な良性状態（例えば、非増殖性病変）；以前に受けた胸部X線、発癌物質への暴露など。

【0124】

さらに、ある実施形態において以下の臨床因子の任意の1つは本明細書に記載する方法において有用であり得る：細胞表面抗原マーカーCD33、細胞表面マーカーCD34、FLT3変異状態、p53変異状態、MEK1キナーゼのリン酸化状態、およびBcl-2の70位のセリンのリン酸化のうちの1つ以上。

【0125】

ある実施形態において臨床因子はサイトカインの発現レベルであり、これらの例に限らないがインターロイキン-6を含む。ある実施形態において、インターロイキン-6レベルは多発性骨髄腫の患者の反応の可能性に関連しており、それらとしては、患者の不良な予後または患者の良好な予後を含む。

【0126】

特定の実施形態において、反応の可能性はプライミングのパーセントで決定される。特定の実施形態においてプライミングは以下の数式で定義される。

【化2】

$$\% \text{プライミング} = \left[ 100 * \left( \frac{\text{DMSO AUC} - \text{ペプチド}_1 \text{ AUC}}{\text{DMSO AUC} - \text{CCCP}_{\text{avg}} \text{ AUC}} \right) \right] \text{ペプチド}_1 + \left[ 100 * \left( \frac{\text{DMSO AUC} - \text{ペプチド}_2 \text{ AUC}}{\text{DMSO AUC} - \text{CCCP}_{\text{avg}} \text{ AUC}} \right) \right] \text{ペプチド}_2 + \dots / (n \text{ ペプチド})$$

式中、AUCは曲線下面積或はシグナル強度のいずれかを含む；DMSOはベースライン

の陰性対照を含む；CCC P（カルボニルシアニドm-クロロフェニルヒドラゾン）はミトコンドリアの電子伝達鎖における電子担体の正常な活性（normal activity）の間に確立されたプロトン勾配の脱共役薬として働くことによるタンパク質合成エフェクターを含み、それはベースラインの陽性対照を含む。ある実施形態において、曲線下面積は均一時間分解蛍光（HTRF）によって確立される。ある実施形態において、時間は約0から約300分、から、約0から30分の間のウインドウにわたって生じる。ある実施形態において曲線下面積は蛍光活性化細胞識別（FACS）によって確立される。ある実施形態において、シグナル強度は約5分および約300分の間で生じる単一時間点の測定値である。

【0127】

別の実施形態において本方法は、BH3プロファイリングアッセイおよび細胞表面マーカーCD33、細胞表面マーカーCD34、FLT3変異状態、p53変異状態、MEK1キナーゼのリン酸化状態、およびBcl-2の70番目のセリンのリン酸化の1つ以上を測定すること、ならびにシタラビン又はシタラビン系の化学療法および/もしくはアザシチジンによる急性骨髄性白血病の患者の処置効果に相関させることを含む。

【0128】

別の実施形態において、本方法は、BH3プロファイリングアッセイおよび細胞表面マーカーCD33、細胞表面マーカーCD34、FLT3変異状態、p53変異状態、MEK1キナーゼのリン酸化状態、およびBcl-2の70番目のセリンのリン酸化の1つ以上を測定すること、ならびに化学療法による多発性骨髄腫の患者処置の効果に相関させることを含む。

【0129】

さらに他の実施形態においてがんは急性骨髄性白血病および/または多発性骨髄腫であり、臨床因子は年齢プロファイルおよび/または細胞遺伝学的状態であるか、またはがんは急性骨髄性白血病および/または多発性骨髄腫であり、がん処置はシタラビンもしくはシタラビン系化学療法および/またはアザシチジンであるか、またはがん処置はシタラビンもしくはシタラビン系化学療法および/またはアザシチジンであり、臨床因子は年齢プロファイルおよび/または細胞遺伝学的状態であるか、または、がん処置はシタラビンもしくはシタラビン系化学療法および/またはアザシチジンであり、がんは急性骨髄性白血病および/または多発性骨髄腫であり、臨床因子は年齢プロファイルおよび/または細胞遺伝学的状態である。

【0130】

この発明はまた腫瘍またはがん細胞検体の評価を簡便化できるキットを提供する。本発明の典型的なキットは様々な試薬、例えばBH3ペプチドを検出する1つ以上の剤を含む。キットはまた様々な検出方法で有用な試薬、例えば抗体などをふくむ、検出のための1つ以上の試薬を含み得る。そのキットはウエルのあるプレート、シリンジなどを含む、評価に必要な材料をさらに含み得る。そのキットはラベルまたは記載の試薬の使用方法が記載された印刷された説明書をさらに含み得る。そのキットは試験されるべき処置をさらに含み得る。

【0131】

用語の「約（about）」は参照される数の表示と関係して使用される場合、参照される数の表示にその参照される数の表示の最大10%を加算または減算したものを意味する。例えば「約50」という言語は45から55の範囲を網羅する。

【0132】

本明細書で使用される場合、用語「含む」およびその変形は、一覧における項目の言及が、本技術の材料、組成物、デバイス、および方法においてまた有用であり得る他の同様の項目の除外に対するものではないように、非限定的であることが意図される。同様に、用語「できる（can）」および「し得る（may）」、およびそれらの変形は、ある実施形態が特定の要素または特徴を含むことができるかまたは含み得るという記載が、これらの要素または特徴を含まない本技術の他の実施形態を除外しないように、非限定的であ

ることが意図される。含む、含有する、または有するなどの用語と同語である、オープンエンド型用語「含む」は、本発明、本発明の技術またはその実施形態を記載および特許請求するために本明細書で使用されるが、より限定的な用語（例えば、引用された成分「からなる」または「から本質的になる」）を用いて代替的に記載され得る。

#### 【0133】

定義付けされない限り、すべての技術的、および科学的用語は、本明細書では、本発明が属する当業者によって一般的に理解される用語と同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似または同等の、任意の方法および材料は、この発明の実施或は試験で使用するができるが、好ましい方法および材料は本明細書に記載されている。ここで引用されたすべての出版物、特許および特許公開は、全ての目的のため、その全体が引用文献として本明細書に記載されている。

#### 【0134】

この発明は次の非限定的実施例でさらに例示する。

#### 【実施例】

#### 【0135】

##### 実施例1：治療開発での細胞ベースの研究

方法：試験細胞については、一ウェルあたり  $7.5 \times 10^3$  細胞を、反応緩衝液（30 mM トレハロース，HEPES-KOH pH 7.4，80 mM KCl，1 mM EGTA，1 mM EDTA，0.1% BSA，および 5 mM コハク酸塩）に懸濁させた。細胞を、ジギトニンで透過処理し、陽イオン性色素 JC-1 及び -メルカプトエタノールで負荷した。次に、細胞を 384 ウェルプレートのウェルに等分し、BH3ドメインペプチド：Bim、Bid、Bad、NoxaA、Bim2A、Puma、Bmf、Hrk および Bik のうちの1つとともにインキュベートした。このアッセイに使用するペプチドは合成されたもので HPLC によって決定された場合 95% を超えて純粋であった。ペプチドの本質は質量分析で確認された。DMSO ビヒクルコントロールをネガティブコントロールとして含んだ。完全なミトコンドリア膜脱分極を、この細胞を 1 mM FCCP (p-トリフルオロメトキシカルボニルシアニドフェニルヒドラゾン) で処理することによって測定し、この試料をアッセイの標準およびポジティブコントロールとして役立てた。ペプチド（と FCCP）を加えると、適切にプライムされた細胞において膜電位が下がり、これは Tecan Genios プレートリーダーで励起 545 nm 発光 590 nm を用い JC-1 蛍光の減少で測定される。この過程のキネティクスはそれぞれのペプチドで違っており、またエンドポイントは、180 分の時間経過にわたるキネティクストレースから達成し、記録した。それぞれのペプチドでの蛍光減少は FCCP 反応に対して正規化され、膜電位の損失パーセント (%DYm) として記録した。各実験は、それぞれの細胞株について三連で実行した。

#### 【0136】

サイクリン依存性キナーゼ阻害剤開発：治療阻害剤活性によってピンに入れられた細胞株との BH3 プロファイリングの相関は、アポトーシス促進性ペプチド識別が、細胞周期に影響を及ぼす開発中の治療薬に対する応答を識別するために細胞株に対して利用されてきたことを示す。このような細胞株からの代表的 BH3 プロファイリングデータは図1に示され、この細胞株に対する細胞周期調節剤の治療効果は図2に示されている。固形腫瘍悪性疾患に由来する8つの接着細胞株のパネルの完全な BH3 プロファイルは、図3に示され、一方、非固形腫瘍に由来する浮遊細胞株で試験したすべてのペプチドについての BH3 プロファイルは図4に示される。接着及び浮遊細胞株の両方でのサイクリン依存性キナーゼ阻害剤についての治療効果ならびに定量化した BH3 プロファイリング測定基準は表1にまとめている。特に低濃度 BIM ペプチドに対するパーセント反応は浮遊細胞株と接着細胞株両方において治療活性と相関する（図5，6）。NOXA ペプチドおよび PUMA ペプチドに対するパーセント反応は、特に BIM と併用（NOXA + BIM 接着細胞； PUMA + BIM 浮遊細胞）した場合、識別に向かった傾向を有した。

#### 【0137】

細胞周期調節剤は、細胞周期を乱し、それゆえ主として細胞増殖阻害剤として働くように固有に設計されている。他方、BH3プロファイリングは、アポトーシス促進性の指示を引き起こす細胞の傾向を測定するようにデザインされている。したがって、この実施例に記載されているデータは、とりわけ、アポトーシス促進性の指示と機構的に関連しない薬剤の治療効果を予想する為のこのBH3プロファイリングアプローチの予期しない診断的使用を表している。

【0138】

BH3ミメティック(MCL-1阻害剤開発)：治療阻害剤活性によってピンに入れられた細胞株とのBH3プロファイリングの相関は、アポトーシス促進性ペプチドが浮遊細胞(図7)と接着細胞(図9)両方における効果(efficiency)を識別することを示す。特に、低BIM、PUMA、NOXA、BADおよびHRKペプチドに対するパーセント反応はすべて個々に浮遊細胞株における治療活性に相関している。浮遊細胞株における治療効果に相関する多元的マーカーアルゴリズムはBIM+PUMA、BIM+NOXA、PUMA+NOXA、BIM+PUMA+NOXA、BIM+PUMA+NOXA+HRKおよびBIM+PUMA+NOXA+HRK+BADを含む(図8)。固形腫瘍由来の接着細胞株において、BIM、PUMAおよびNOXAはそれぞれ個々にMCL-1阻害剤効果と相関がある、一方相関性を示す多元マーカーアルゴリズムは、浮遊細胞株での相関性について上に述べたものと同一である(BIM+PUMA、BIM+NOXA、PUMA+NOXA、BIM+PUMA+NOXA、BIM+PUMA+NOXA+HRKおよびBIM+PUMA+NOXA+HRK+BAD)(図10)。

【0139】

このデータは、とりわけ、多元的マーカーアプローチが治療効果を予想する上で個々のマーカーよりも情報を加えるであろうことを示す。この知見は、MCL-1が、主に、Noxaによって特異的に、そしてPUMA(BCL2およびBCL-xLにも結合する)によって非特異的に調節されることを鑑みると予想されないものである。これらのアプローチのなかで多数のマーカーを含有する事によって付与される重み付けは、MCL-1阻害剤個々より治療効果に相関している。治療効果とBH3プロファイリングの個々のマーカーアルゴリズムおよび多元的マーカーアルゴリズムについてのデータは表2に提供される。

【0140】

キネシンスピンドルタンパク質(KSP)阻害剤開発：KSP阻害剤は8つの多発性骨髄腫/白血病由来のヒト細胞株に対する抗増殖アッセイでテストされた。BH3プロファイリングは同時にこれらの細胞株に対して行われた。データは、化合物の抗増殖特性とBH3プロファイリング読み出し(個々にPUMAおよびBADに対する%プライミング)との間に強力な相関を与える(図11)。

【0141】

KSP阻害剤活性の相関性は、MCL1タンパク質のレベルによって調節され得る。もしこれが単一機構であるならば、MCL1の調節因子としてのNoxaが効果の適切な予想因子になるであろうことを予想し得る。実際、PUMA(MCL1、BCL2およびBCLx1の調節)とBAD(BCL2およびBCLx1のエフェクター)が独立してこれらの細胞株における治療効果を識別できるという予期しない結果が得られた。

【0142】

キネシンスピンドルタンパク質阻害剤は、微小管構造と相互作用し、それを再構築する事によって抗がん活性を調節する。このような作用機構は、これらの薬剤の作用がミトコンドリアの反応、そしてそれに続くアポトーシスのシグナル伝達によって予想され得ることを驚くべきものにする。

実施例2：腫瘍学患者ベースのコホートをを用いた研究

【0143】

AML(シタラピンベースの処置[標準的処置])方法：AML患者コホート：新たに診断されたAML患者試料は、1999年9月から2007年3月の間に導入補助化学療

法施与前の末梢血採血又は骨髓穿刺液（BM）の収集によって得られた39。検体は、研究審査委員会によって承認された規制とプロトコール（ラボ01-473）に従って慣例的診断評価のなかで得られた。インフォームドコンセントはヘルシンキ宣言に従って得られた。フィコール精製の後、CD3/CD19細胞枯渇により、混入しているT細胞およびB細胞を除去した。細胞の個々のアリコートをし、遠心分離し、90%FBS/10%DMSOに再懸濁し、液体窒素中で凍結保存した。病理学的分類、細胞遺伝学分析および変異状態が得られた；臨床指標は、補助表及び図に示す。

【0144】

患者処置：患者を、標準的診断基準により反応について分類した。62人の患者のうち48人はシタラピンとアントラサイクリンで処置された、7人の患者はシタラピンとアントラサイクリン以外の薬剤、8人の患者はシタラピンとフルダラピン（このうち一人はシタラピンとアントラサイクリン以外の薬剤、次に、その後のサイクルでシタラピンとフルダラピンで処置された「どちらのサイクルでも反応なし」）。CR = 骨髓形態が正常、絶対好中球数が1000超、血小板数が10万超、高ヘモグロビン。原発性不応性 = 2サイクルの導入補助化学療法（同じか違うレジメであり得る）後の残存白血病。再発は、以前CRであった患者において、骨髓中の5%より多くの芽球、或は末梢血中の芽球である。

【0145】

細胞遺伝学的リスク状態の決定：細胞遺伝学的リスクの決定はCLIA認定された細胞遺伝学ラボによって実行された。簡単に記載すると、患者は標準的なグループ分けで分類された：好ましい = inv16, t(8;21), T(15;17) 中間 = 二倍体, -y, 不十分な細胞分裂中期, 好ましくない = 他すべて, -5, -7, +8, t(6;9), 11q, PH1+, misc。

【0146】

BH3プロファイリング：フィコール精製され、生存可能に凍結された、前処置AML検体を解凍し、FCRプロッキング試薬（Miltenyi Biotec, Auburn CA）を含むFACSバッファー（1%FBS, 2mMEDTA, PBS）中に10分間、氷上で再懸濁し、その後抗体CD45-V450（BD Biosciences, San Jose CA）、CD3-ビオチン（BD Biosciences, San Jose CA）およびCD20-ビオチン（eBiosciences, San Diego, CA）を用いて20分間氷上で染色した。試料を、二次抗体ストレプトアビジン-APC（BD Biosciences, San Jose, CA）を含むFACSバッファー中に20分間氷上で再懸濁した。染色後、AML検体を、ジギトニン（Sigma-Aldrich, St Louis, MO）で透過処理し、室温においてニューマイヤーバッファー（80mMKCl, 10mMHEPES, 40μMEDTA, 40μMEGTA, 5mMコハク酸塩, 300mMトレハロース, 0.1%BSA, pH7.4）中、チューブあたり $2 \times 10^5$ 細胞で、ペプチド（BIM 100μM, BIM 0.1μM, PUMA 100μM, PUMA 10μM, NOXA 100μM, BAD 100μM, BMF 100μM, HRK 100μMまたはPUMA2A 100μM）とともに、あるいはジメチルスルホキシド（DMSO[1%]）またはカルボニルシアニドm-クロロフェニルヒドラゾン（CCCP[10μM]）とともに180分間インキュベートした。試料は充分量の生存可能な細胞が利用可能でないとき以外は二連で試行した。電位差JC-1ミトコンドリア色素（Enzo Life Science, Farmingdale NY）を解析の45分前に加えた。

【0147】

試料はFACS CantoII（BD Biosciences, San Jose CA）でBD FACS Divaソフトウェアを用いて解析した。芽球集団を、CD45 dim, SSC低、CD3およびCD20ネガティブとして同定した。以前にも述べたが、成熟リンパ球を示す強く染色されたCD45細胞は、この解析から除外した。脱共役試薬コントロールと比較したミトコンドリア脱分極を誘導するアポトーシス促

進性ペプチドの定量化できる傾向を、パーセントプライミングという。芽球集団では、これはDMSOをバックグラウンド（ネガティブコントロール）として、およびCCCPを100%プライミング（ポジティブコントロール）として正規化されたPEチャンネルのメジアンシグナル強度を用いる事で計算した。

#### 【0148】

統計学的解析：BH3プロファイリングバイオマーカーの予期値を、バイオマーカー状態（%プライミング）と患者が反応者または非反応者と特徴付けられるかとの間の関連を試験することによって研究した。単変量比較を、マン-ホイットニー検定を用いて行い、全ての報告されたp値は、両側のものである。統計学的解析は、擬陽性の結果の危険性を限定するために $p < 0.01$ の有意性についての閾値で計画する（ $0.01 < p \text{ 値} < 0.05$ は、有意な境界とみなされた）。マーカーの予測能力は、曲線下面積（AUC）統計量を用いて評価された。生存エンドポイントはコックス比例ハザード回帰を用いて解析した。多変量解析は、ロジスティック回帰を用いて実行し、上記の診断基準を用いた患者の臨床病理的な情報から重要である調節変数を用いた。OSおよびEFSは、傾向についてのログランクテストによってパーセントプライミングとの有意な相関について試験された。解析はSASソフトウェアバージョン9.2（SAS institute INC., Cary, NC）、Rバージョン2.14.2（R Core Team; Vienna, Austria）および/またはGraphpad Prismバージョン5.04（LaJolla, CA）を使用して行った。

#### 【0149】

R患者コホート特徴：AML患者は臨床病理学的変数と比較してシタラビンベースのレジメの反応状態によって階層化された（表3）。マン-ホイットニー解析は臨床変数と化学療法の反応の非ランダム関連性をテストする為に行われた。テストされた変数のうち、患者の年齢プロファイルおよび細胞遺伝的リスク階層化のみが、反応に対する非ランダム関連性を示した（各々 $P = 0.008$ および $P = 0.006$ ）。これら2つの非ランダム変数は、次にBH3プロファイリングバイオマーカーについて以下に記載された多変量解析で利用された。

#### 【0150】

患者検体のBH3プロファイリング：この研究の一部としてBH3プロファイリングされた生存可能に保存された62個のAML患者検体のうち、61個が解析可能なデータを提供した。統計学的解析前に考察から除外された一試料は、トリバンプルー排除によって同定された生細胞が解析を継続するのに十分ではないプロファイルを生じた。62の患者検体のうち61をBH3プロファイリングによってアッセイできたことは、全体で98.4%の技術的な成功を示す。さらに、本発明者らがこの検体に関係した技術的失敗は、明らかに凍結障害と合致する。なぜなら、乏しい細胞生存率が、解凍直後に記述されたからである。

#### 【0151】

すべてのペプチドは、以前のAML検体を用いたこれらの研究が始まる前に、ダイナミックレンジの%プライミング値を与えるように、経験的に最適化された。もっとも特記すべきことは、 $100 \mu\text{M}$ のBIMは、大多数のAML患者の検体では飽和（又は飽和に近い）ことが見出されたことである。それゆえ、 $100 \mu\text{M}$ のBIMに加えて、BIMは、ダイナミックレンジの%プライミング値を提供すると決定された濃度である $0.1 \mu\text{M}$ でもアッセイされた。2人のNR患者と2人のCR患者の代表的なデータは図12で示されている。個々の患者からの反復試料についての全体の変動係数（CV）は一般的に3~5%であり、試行間の変動性が限定された技術的に強固なアッセイを示すことに留意すること。

#### 【0152】

アッセイされたバイオマーカーペプチドの中で、より高いBIM（0.1）パーセントプライミングスコアは、高い程度の統計学的有意性（ $p = 0.0000018$ ）で反応と相関していた（図13）。アッセイされたそのほかのBH3プロファイリングバイオマ-

カー解析は表4に示す。BIM(0.1)によって得られた統計学的有意性に加えて、PUMA(10)は反応に対して有意な関連性を示した( $p = 0.0064$ ) (図14)。

#### 【0153】

個々の患者のBIM(0.1)プライミングスコアが反応者群と非反応者群とに分離されたとき(図2)、明らかな傾向が現れた。シタラビンベースの療法への反応を示す可能性が高いAML患者は、反応しない可能性が高い患者(パーセントプライミング =  $13.2 \pm 13.4$  [SD])よりも、BH3プロファイリングプライミングが高い傾向がある(パーセントプライミング =  $36.8 \pm 21.2$  [SD])。可能性が高い反応者を正確に同定する一方、同時に非反応者を正確に分離することにおいてこのバイオマーカの感度と特異性を確立するには、受信者動作特性(ROC)のプロット図が0.83のAUC(個々の検体を正確に識別するバイオマーカの能力の優れた指標)を示している[95%CI: 0.73、0.94] (図14)。興味深い事に、これらの数の中で、単一のバイオマーカは、89.7%の反応者の同定、一方で同時に、反応しない可能性が高い患者のうち59.1%の同定を達成できる。所望される感度カットオフが92.3%より少し高いと、特異性は、可能性の低い反応者の54.6%を依然として達成する。

#### 【0154】

年齢および細胞遺伝学は、このデータセットにおいてもAMLの予後因子であることが示された(表3)。もしBIM(0.1)%プライミングバイオマーカの追加が、年齢プロファイルと細胞遺伝学の情報を超えた予後情報を加えたかどうかを決定するために、年齢プロファイルと細胞遺伝学を、BIM(0.1)%プライミング多変量解析に順次加えられた。BIM(0.1)に患者の年齢プロファイルを加えると、以前のBIM(0.1)AUC = 0.83単独から、AUCを0.89に増大させる(図15)。さらにBIM(0.1)が、患者の年齢プロファイルと細胞遺伝学的リスクに対して調節されると、AUCは0.91にさらに増加する。後者の調節で、可能性が高い非反応者の70%超の分離と同時の同定において、90%超の感度が達成される(図15)。

#### 【0155】

患者は細胞遺伝学的リスク状態によって階層化され、そしてこれらのサブグループは、反応者と非反応者との同定における有意性についてマン-ホイットニーで解析された。中程度のリスク( $n = 33$ )サブグループでは、BIM(0.1)は、反応をさらに識別することと非常に有意に関連し( $p = 0.00017$ )そして好ましくないグループ( $n = 23$ )では、BIM(0.1)は依然として有意であった( $p = 0.023$ ) (図16)。ここでp値は組み合わせたコホートのBIM(0.1)解析に比べて幾分減少している一方、これは、一般的に患者のサブグループ化した数の為に統計学的検出力が減少する現象である。興味深い事に、BADおよびHRK両方の解析が、反応識別に興味深い有意なp値を生じた(それぞれ、 $p = 0.0017$ および $p = 0.0055$ )。しかしこの事は、中程度のリスクグループでのみ観察された(図16)。反応識別におけるこれらバイオマーカのROC解析による感度と特異性の評価は、中程度グループではBIM(0.1)には0.875のAUC、BADには0.875のAUC、HRKには0.823のAUC、そして好ましくないグループではBIM(0.1)には0.790のAUCを与える(図16)。留意すべき点は、これらのAUCが、独立したサブグループにおいて、反応者対非反応者について幾分不均衡なサブグループ分けから利益を受け得ることである(中程度のものについて8NR、25CR、そして好ましくないものについて15NR、9CR)。5人の好ましい患者についてのデータしかないので、このグループについて、統計学的な解析をすることはできなかった。

#### 【0156】

BIM(0.1)BH3プロファイリングパーセントプライミングとBIM(BCL2L11)タンパク質レベルの比較: BIM BH3プロファイリングの予測検出力が、BIMタンパク質レベルを単に要約しているかどうか評価する為に、本研究内でのAML患者検体に、相関または相関の欠如が存在するか否かの評価を行った。BIMタンパク質レベルとパーセントプライミングには何ら相関性が無いことが解り(図17)、ここでは、

$R^2 = 0.0396$ を得た。

【0157】

BIM(0.1)のBH3プロファイリングは、BH3プロファイリングとRPPAデータの両方が全患者コホートに存在する小集団において有意なp値( $p = 0.0048$ )を維持する(図17)。試料サイズが $n = 62$ から $n = 43$ に減少し、またRPPAデータがない多くの試料の多くが最も高いスコアを出したBH3プロファイリング検体の中にあつたので、この解析の検出力が、本発明者らの以前の解析と比べて減少することにここで留意のこと。BCL2L11のタンパク質レベルに関して検体のこの同じ小集団についての反応識別に対するp値は、 $p = 0.33$ である(図17)。これらのデータは、BH3プロファイリングが全体のタンパク質レベルとは相関しておらず、またBH3プロファイリングがAML患者のシタラピン反応性を予測する新しい理論的枠組みを提供し得ることの強力な証拠を提供する。

実施例3：二次的臨床エンドポイント：全生存期間及び無再発生存

【0158】

BH3プロファイリングバイオマーカーをまた、二次的臨床エンドポイントである全生存期間(OS)および無再発生存(EFS)への相関について解析した。コックス比例解析を用いた連続変数モデルは、BIM(0.1)が、EFS( $p = 0.14$ )にもOS( $p = 0.057$ )にも有意ではなかったことを示した。NOXAパーセントプライミングとEFSとの間のコックス比例ハザード解析も有意ではなかった( $p = 0.089$ )。試験したすべての他のペプチドは、OS或はEFSのいずれかとパーセントプライミングとの間に有意な相関も傾向も生じなかった(すべて $p > 0.10$ )。さらに、患者の年齢プロファイルと細胞遺伝学的リスク状態の調節変数を用いた多変量解析は、BH3プロファイリングバイオマーカーおよびOS臨床エンドポイントおよびEFS臨床エンドポイントの間に有意な相関は生じなかった。

【0159】

興味深い事に、分配モデル解析において、患者コホートがBIMパーセントプライミングによって三分位数に分割されたときに(高プライミング、中プライミングおよび低プライミング)、対応するOSは、それぞれ250.7週間、168.2週間および32.7週間のメジアン( $p = 0.029$ 、傾向についてログランクテスト)を得た(図18)。これらの三分位数の同じ解析をEFSについて実行したとき、メジアンEFSは、低プライミング三分位数、中プライミング三分位数、高プライミング三分位数についてそれぞれ26.1週間、71.3週間および160.7週間( $p = 0.044$ 、傾向についてログランクテスト)であつた(図18)。

【0160】

AMLとアザシチジン：13のヒトAML由来細胞株をBH3プロファイリングし、またインビトロアザシチジン反応性についての相関的解析を行った。BH3測定基準を使った分配モデルは、個々のペプチド由来のモデル(図19)ならびに2つのペプチドモデル(図20)および3つ或はそれより多いペプチドを含むモデル(図21)を使用して、より感受性のあるAML由来細胞株( $IC50 < 2 \mu M$ )とより感受性が乏しいAML由来細胞株( $IC50 > 2 \mu M$ )との間で、統計学的有意性( $p < 0.01$ )をもってアザシチジン反応性を識別した。連続変数解析を用いて、Puma(汎プライミング指標)を用いる場合、 $[\log] IC50$ に対する個々のペプチド由来アルゴリズム(図22)ならびに2つのペプチド(図23)および3つまたはそれより多いペプチド(図24)を含む組み合わせさせたBH3ペプチドモデルについて、 $R^2 > 0.7$ 。統計学的に有意なp値( $p < 0.01$ )は、たいていPumaを含むモデルに付随する。結果は表5にまとめられている。

【0161】

アザシチジンはエピゲネティックな修飾剤として知られる抗がん剤のクラスに属するので、アポトーシスの直接的な調節およびミトコンドリアの生物学に対する効果は疑わしい。従って、アザシチジン治療の効果がアポトーシスの内因性経路やミトコンドリアの生物

学を調査するために設計された測定基準によって予測され得ることは驚くべきことである。例えば、Vo et al (Cell, 2012; 151(2): 344-355)を参照のこと、ここでは、アザシチジンの効果はBH3由来の測定基準では予測されないと報告された。

【0162】

データは、アザシチジンの結果をモデル化する為のBH3プロファイリングの目的のために、原発性AML患者検体の試験を進めるよう強く促した。

【0163】

アザシチジンで処置されたAML患者のBH3測定基準由来のアルゴリズムの為のサポートデータが作成された。N = 28の組み合わせたコホート(13(9安定/CR; 4治療抵抗性/NR)検体と15(すべてNR/治療抵抗性))を含む研究。1検体は評価できなかった。すべてにおいて、27検体を、反応性に対して解析した(19 NR、8 R)。このコホートの報告されたスコアの範囲は図25に示され、またスコアの範囲が、反応および他の臨床エンドポイント(例えば、全生存期間(OS)と無再発生存(EFS))を測定し得る治療ウィンドウを提供することを例示する。

【0164】

個々のマーカーについては、BIMとNOXAだけが、反応との境界線での有意な関係を生じた(それぞれ、 $p = 0.05$ および $p = 0.02$ )。すべての他のバイオマーカーは $p$ 値 $> 0.1$ 。しかし、BIMとNOXAがここで記載されたアプローチによって組み合わせた場合、反応との相関は高度に有意であった( $p = 0.001$ )。さらに、感度と特異性のROCは0.91であった。これは、単変量解析のみであり、また臨床的調節変数(例えば、年齢、細胞遺伝学的状態など)を重みづけする場合、統計学的により強力になり得る(図26)。

等価物

【0165】

当業者は、本明細書に具体的に記載された特定の実施形態に対する多くの等価物を認識し、たんに慣例的な実験を使用してそれらを確認することができる。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲内に包含されることが意図される。

参照による引用

【0166】

本明細書で引用されたすべての特許及び刊行物は、それらの全体が参考として本明細書で援用される。

【0167】

本明細書で議論されている刊行物は、本出願の出願日前におけるそれらの開示についてのみ提供される。本発明が先の発明という理由でこのような刊行物に先行する資格がないことの承認とみなされるものは、本願明細書には存在しない。

【 国際調査報告 】

61500190046

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2013/040585-01-10-2013



International application No.

PCT/US13/40585

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(B) - G01N 33/574 (2013.01) USPC - 435/7.23, 7.21 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(B): G01N 33/574 (2013.01) USPC: 435/7.23, 7.21, 7.20, 7.1, 4 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) MicroPatent (US-G, US-A, EP-A, EP-B, WO, JP-bib, OE-C,B, DE-A, DE-T, DE-U, GB-A, FR-A); ScienceDirect; IP.com; Google; Google Scholar; 'BH3,' 'BCL-2,' clinical, chemotherapy, diagnosis, mitochondria, priming, depolarization, cancer, lymphoma, tumor		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	CHONGHAILE, TN et al. Pretreatment Mitochondrial Priming Correlates With Clinical Response To Cytotoxic Chemotherapy. <i>Science</i> . 25 November 2011, Vol. 334, pp 1129-1133; entire document. DOI: 10.1126/science.1206727.	1-12, 16-22, 24-28, 30-34, 36-39, 42-45, 53-56, 58, 59 13-15, 23, 29, 35, 40, 41, 51, 52, 57 46-50
Y	MILLER, et al. Therapeutic Strategies To Enhance The Anticancer Efficacy Of Histone Deacetylase Inhibitors. <i>Journal of Biomedicine and Biotechnology</i> . 2011, Vol. 2011, pp 1-17; page 2, right column, second paragraph; Article ID 5142561. DOI: 10.1155/2011/514261.	13-15
Y	STEWART, ML et al. The MCL-1 BH3 Helix Is An Exclusive MCL-1 Inhibitor And Apoptosis Sensitizer. <i>Nat Chem Biol</i> . 2010 August, Vol. 6, No. 8, pp. 595-601; abstract; page 6, first paragraph. DOI: 10.1038/nchembio.391.	23
Y	RAYCHAUDHURI, S. Low Probability Bid-Bax Reaction Generates Heterogeneity In Apoptosis Resistance Of Cancer And Cancer Stem Cells. Department of Biomedical Engineering, Biophysics Graduate Group, Graduate Group In Applied Mathematics, University of California, Davis. 10 August 2011, pp 1-17; page 6, first paragraph. <a href="http://arxiv.org/abs/1108.2091v1">http://arxiv.org/abs/1108.2091v1</a> .	29
Y	PODE-SHAKKED, N et al. Developmental Tumorigenesis: NCAM As A Putative Marker For The Malignant Renal Stem/Progenitor Cell Population. <i>J. Cell. Mol. Med</i> . 2009, Vol. 13, No. 8B; pp 1792-1780B; page 1794. DOI:10.1111/j.1582-4934.2008.00607.x.	35
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 September 2013 (23.09.2013)		Date of mailing of the international search report <b>01 OCT 2013</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 <b>25.3.2015</b>

21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US2013/040585 01-10-2013

International application No.

PCT/US13/40585

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PAOLUZZI, L et al. The BH3-only Mimetic ABT-737 Synergizes The Antineoplastic Activity Of Proteasome Inhibitors In Lymphoid Malignancies. <i>Blood</i> . 01 October 2008, Vol. 112, No. 7; pp 2906-2916; page 2907, left column, second paragraph. DOI: 10.1182/blood-2007-12-130781.	40
Y	WENIGER, MA et al. Treatment-Induced Oxidative Stress And Cellular Antioxidant Capacity Determine Response To Bortezomib In Mantle Cell Lymphoma. <i>Clin Cancer Res</i> . 01 August 2011, Vol. 17, No. 15, pp. 5101-5112; page 5107, left column, first paragraph. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-3367.	41
Y	KASPER, S et al. Targeting MCL-1 Sensitizes FLT-3-ITD-Positive Leukemias To Cytotoxic Therapies. <i>Blood Cancer Journal</i> . 9 March 2012, Vol. 2, e60; entire document. DOI: 10-1038/bcj/2012.5.	51
Y	BODET, L et al. BH3-Only Protein Bcl-2 Is Involved In Both Apoptosis Induction And Sensitivity To Oxidative Stress In Multiple Myeloma. <i>British Journal of Cancer</i> . 2010, Vol. 103, pp 1808-1814; entire document. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605981.	52
Y	VALENICA, A et al. A New Reliable Fluorescence In Situ Hybridization Method For Identifying Multiple Specific Cytogenetic Abnormalities In Acute Myeloid Leukemia, Leukemia & Lymphoma. April 2010, Vol. 51, No. 4; pp 680-685; entire document. DOI: 10.3109/10428191003682775.	57

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
G 0 1 N 33/483 E

(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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ピアーシル, ウィリアム

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01776, サドベリー, ストーン ルート レーン  
26

(72)発明者 カーダン, マイケル エイチ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02125, ドーチェスター, グランピアン ウェイ  
60

Fターム(参考) 2G045 AA26 CB02 DA36 FA34 GC19

4B063 QA07 QA19 QQ02 QQ03 QQ42 QR48 QR56 QS07 QS32 QX05

专利名称(译)	癌症的辅助功能诊断测试		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015519565A</a>	公开(公告)日	2015-07-09
申请号	JP2015511765	申请日	2013-05-10
申请(专利权)人(译)	Yutoropikusu制药公司		
[标]发明人	ピアールウィリアム カーダンマイケルエイチ		
发明人	ピアール, ウィリアム カーダン, マイケル エイチ.		
IPC分类号	G01N33/68 C12Q1/04 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/483		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/57407 G01N33/57426 G01N2800/52 G16H50/20 G01N21/6486		
FI分类号	G01N33/68 C12Q1/04 G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/53.M G01N33/483.E		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/FA34 2G045/GC19 4B063/QA07 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS07 4B063/QS32 4B063/QX05		
代理人(译)	夏木森下 飯田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/645253 2012-05-10 US 61/780252 2013-03-13 US		
其他公开文献	JP2015519565A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

<b>摘要(译)</b> 本发明涉及与各种癌症相关的诊断方法，并且包括对BH3概况分析诊断方法的改进。	(21) 出願番号	特願2015-511765 (P2015-511765)	(71) 出願人	514284671
	(86) (22) 出願日	平成25年5月10日 (2013. 5. 10)		ヌートロピクス ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド
	(85) 翻訳文提出日	平成27年1月6日 (2015. 1. 6)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02138, ケンブリッジ, コンコード
	(86) 国際出願番号	PCT/US2013/040585		アベニュー 767-シー
	(87) 国際公開番号	WO2013/170176		
	(87) 国際公開日	平成25年11月14日 (2013. 11. 14)		
	(31) 優先権主張番号	61/645, 253		(74) 代理人 100078282
	(32) 優先日	平成24年5月10日 (2012. 5. 10)		弁理士 山本 秀策
	(33) 優先権主張国	米国 (US)		(74) 代理人 100113413
	(31) 優先権主張番号	61/780, 252		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成25年3月13日 (2013. 3. 13)		(74) 代理人 100181674	
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敬	
			(74) 代理人 100181641	
			弁理士 石川 大輔	