

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-521110

(P2006-521110A)

(43) 公表日 平成18年9月21日(2006.9.21)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 B O 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2006-507083 (P2006-507083) (86) (22) 出願日 平成16年3月10日 (2004. 3. 10) (85) 翻訳文提出日 平成17年11月10日 (2005. 11. 10) (86) 国際出願番号 PCT/US2004/007451 (87) 国際公開番号 W02004/084804 (87) 国際公開日 平成16年10月7日 (2004. 10. 7) (31) 優先権主張番号 60/457, 261 (32) 優先日 平成15年3月24日 (2003. 3. 24) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 60/502, 995 (32) 優先日 平成15年9月15日 (2003. 9. 15) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 397069329 コリクサ コーポレーション アメリカ合衆国 ワシントン州 シアトル スト 1 1 0 0 9 ス アベニュー 1 9 0 0 (74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策 (74) 代理人 100062409 弁理士 安村 高明 (74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肺癌の検出およびモニタリング

(57) 【要約】

肺癌を診断するための組成物および方法が開示される。このような方法は、初期の腫瘍を検出するために、または適当な病期 / 悪性度分類情報または腫瘍特異性を提供するために有用である。組成物は、1 つまたはそれ以上の肺腫瘍タンパク質、その免疫原性部分、またはそのような部分をコードするポリヌクレオチドを含み得る。そのような組成物を、例えば肺癌の診断および予後を改善するために、および潜在的に N S C L C と S C L C とを識別するために使用し得る。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

患者における癌細胞の存在を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 該患者から生物学的サンプルを得る工程；

(b) 該生物学的サンプルを、互いに関連しない独立のポリヌクレオチド配列に対して特異的な 2 つ以上のオリゴヌクレオチド対と接触させる工程であって、該オリゴヌクレオチド対が、中程度のストリンジェントな条件下で、それぞれのポリヌクレオチドおよびその相補体にハイブリダイズする、工程；

(c) 該ポリヌクレオチドを増幅する工程；ならびに、

(d) 該増幅されたポリヌクレオチドを検出する工程；

10

を包含し、1 つ以上の該増幅されたポリヌクレオチドの存在が、該患者における肺癌細胞の存在を示す、方法。

【請求項 2】

患者における肺癌細胞の存在を決定するための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 該患者から生物学的サンプルを得る工程；

(b) 該患者から得た生物学的サンプルを、2 つ以上の肺腫瘍タンパク質をコードする二つ以上のポリヌクレオチドにハイブリダイズする 2 つ以上のオリゴヌクレオチドと接触させる工程；

(c) 該生物学的サンプル中で、該オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 つにハイブリダイズするポリペプチドの量を検出する工程；

20

(d) 該オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を、所定のカットオフ値と比較する工程であって、そこから該患者における肺癌細胞の存在または非存在を決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項 3】

患者における肺癌の進行をモニタリングするための方法であって、該方法は、以下の工程：

(a) 該患者から 1 番目の生物学的サンプルを得る工程；

(b) 該 1 番目の生物学的サンプルを、肺腫瘍タンパク質をコードする 1 つ以上のポリヌクレオチドにハイブリダイズする 1 つ以上のオリゴヌクレオチドと接触させる工程；

30

(c) 該 1 番目の生物学的サンプル中に、該オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする該ポリヌクレオチドの少なくとも 1 種の量を検出する工程；

(d) その後の時点で該患者から得た 2 番目の生物学的サンプルを使用して、工程 (b) および工程 (c) を繰り返す工程；ならびに、

(e) 工程 (d) で検出されたポリヌクレオチドの量を、工程 (c) で検出された量と比較する工程であって、そこから該患者における肺癌の進行をモニタリングする工程、を包含する、方法。

【請求項 4】

前記ポリヌクレオチドが、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 21 および配列番号 26 からなる群より選択される、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

(発明の技術的分野)

本発明は、一般的に癌診断の分野に関連する。より具体的には、本発明は、異なる型、病期、および悪性度分類の腫瘍を有する患者において肺癌を検出するための方法、組成物、およびキットに関連し、それはオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションおよび/または増幅を採用して、肺癌細胞を含むと疑われる生物学的サンプルにおいて、2 つまたはそれ以上の組織特異的ポリヌクレオチドを同時に検出する。

50

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

(発明の分野)

肺癌は、依然として世界中で大きな健康問題である。伝統的な肺癌治療レジメの失敗は通常、部分的には、疾患の診断の遅れに帰することができる。肺癌診断の領域で顕著な進歩がなされたが、依然として早期で、信頼性の高い、かつ高感度の、肺癌細胞の存在の決定を可能にする、改善された検出方法の必要性が存在する。

【0003】

(関連技術の説明)

肺癌は、あらゆる癌のうち最も高い死亡率を有し、そして早期に診断するのが最も困難なものの1つである。世界中で年間推定100万人がこの疾患のために死亡している。American Cancer Societyによると、2002年のみにおいて、推定169,200件の診断された新規症例および約154,900件の死亡があった。代表的には、肺癌は2つの主な型：扁平上皮癌、腺癌、および大細胞癌を含む非小細胞肺癌(NSCLC)および小細胞肺癌(SCLC)に分類される。これらのグループは、それぞれ全肺腫瘍の約75%および25%を占め、腺癌および扁平上皮癌が最も流行している形式のNSCLCであり、大細胞癌は~10%である。NSCLCのグループ内で、より若い人々、全ての年齢の女性、生涯の非喫煙者、および長期の前喫煙者において、腺癌が現在最も顕著な形式の肺癌である。SCLCは、代表的には2つのサブタイプ、燕麦細胞および中間細胞に分けられる。より通常でない腫瘍は、特にカルチノイドおよび中皮腫を含むが、これらは全ての肺腫瘍のうち低い割合しか占めない。ほとんど全ての症例において、NSCLCの初期診断はわかりにくく、そしてほとんどの肺癌は、検出された時には既に転移している。最初の診断において、16.7%のみしか局在化していない。もし腫瘍が限定されている時点でそれを検出し得るなら、化学療法および放射線の組み合わせが成功の可能性を有するが、全体の5年予後は非常に悪く、10-15%のみの生存率である。SCLCを有する臨床像はさらに厳しく、最初の診断時に6%のみが局在化、および5年生存率は約6%である。

【0004】

胸部および腹部のX線およびコンピューター断層撮影が、肺腫瘍の診断において多くの場合使用されるが、小さい病巣を検出する感受性を欠き、そして通常既に転移した腫瘍を検出する。ハイリスクの個体における可能性のあるスクリーニング方法としての痰細胞学は、部分的に有効なだけであり、そして多くの場合腫瘍の型を明らかにしない。疾患の病期を決定するために、CATスキャン、MRIまたは骨スキャンを使用して、疾患の広がり进行评估する。肺癌の治療は、代表的には外科療法、放射線療法、もしくは化学療法またはその組み合わせであるが、通常疾患の診断が遅いために結果は良くない。

【0005】

現在の肺癌の試験は、初期の腫瘍を検出する臨床的感受性を欠くか、または不適当な病期/悪性度分類情報を提供するか、またはそれらが他の腫瘍型から生じたか、もしくは良性の肺疾患に存在するために、腫瘍特異性を欠くかのいずれかである。従って、肺癌診断および予後を改善し、そして潜在的にNSCLCおよびSCLC間を識別し得る特異的な試験を開発する必要性が存在する。本発明は、組織特異的ポリヌクレオチド、特に腫瘍特異的ポリヌクレオチドの同定に有用な方法、およびその疾患に苦しむ患者における癌細胞の検出およびモニタリングのための抗体および方法、組成物およびキットを提供することによって、これらの目的および他の関連する目的を達成する。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0006】

(発明の概要)

本発明は、患者における肺癌細胞の存在を検出するための方法を提供する。そのような

10

20

30

40

50

方法は、以下の工程を包含する：(a) 患者から生物学的サンプルを得る工程；(b) その生物学的サンプルを、互いに無関係の独立したポリヌクレオチド配列に特異的な、2つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチド対と接触させる工程であって、そのオリゴヌクレオチド対は、中程度にストリンジェントな条件下で、それぞれのポリヌクレオチドおよびそれらの相補鎖にハイブリダイズする、工程；(c) そのポリヌクレオチドを増幅する工程；および(d) 増幅されたポリヌクレオチドを検出する工程であって、ここで1つまたはそれ以上の増幅されたポリヌクレオチドの存在は、患者における肺癌細胞の存在を示す工程。

【0007】

いくつかの実施形態によって、増幅されたポリヌクレオチドの検出は、例えばゲル電気泳動のような分画工程の後に続き得る。あるいは、またはそれに加えて、増幅ポリヌクレオチドの検出を、中程度にストリンジェントな条件下でそのようなポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする標識オリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーションによって達成し得る。オリゴヌクレオチドの標識化を、放射性標識ヌクレオチドを組み込むことによって、または蛍光標識を組み込むことによって達成し得る。

10

【0008】

特定の好ましい実施形態において、特定の組織型の細胞を、検出工程の前に生物学的サンプルから濃縮し得る。濃縮を、細胞捕獲および細胞枯渇からなる群より選択される方法によって達成し得る。例示的な細胞捕獲方法は、イムノキャプチャー (immunocapture) を含み、そして以下の工程を含む：(a) 組織特異的細胞表面に対する抗体を、当該生物学的サンプルの細胞に吸着させる工程；(b) 抗体が吸着した組織特異的細胞を、残りの生物学的サンプルから分離する工程。例示的な細胞枯渇を、赤血球および白血球の架橋、続く架橋細胞を除去する分画工程によって達成し得る。

20

【0009】

本発明の代替的な実施形態は、患者において肺癌の存在または非存在を決定する、以下の工程を含む方法を提供する：(a) 患者から得られた生物学的サンプルを、2つまたはそれ以上の肺腫瘍タンパク質をコードする2つまたはそれ以上のポリヌクレオチドにハイブリダイズする、2つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドと接触させる工程；(b) サンプルにおいてオリゴヌクレオチドにハイブリダイズする、少なくとも1つのポリヌクレオチド (例えば mRNA) のレベルを検出する工程；および(c) オリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドのレベルを、前もって決定したカットオフ値と比較し、そしてそこから患者における肺癌の存在または非存在を決定する工程。特定の実施形態において、mRNAの量を、例えば上記で引用したようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはそのようなポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズする少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応によって検出する。他の実施形態において、mRNAの量を、上記で引用したようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはそのようなポリヌクレオチドの相補体にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを採用する、ハイブリダイゼーション技術を用いて検出する。

30

【0010】

関連する局面において、以下の工程を包含する、患者において肺癌の進行をモニタリングするための方法が提供される：(a) 患者から得られた生物学的サンプルを、肺腫瘍タンパク質をコードする2つまたはそれ以上のポリヌクレオチドにハイブリダイズする、2つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドと接触させる工程；(b) サンプルにおいてオリゴヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドの量を検出する工程；(c) 続く時点で患者から得られた生物学的サンプルを用いて工程(a)および(b)を繰り返す工程；および(d) 工程(c)において検出されたポリヌクレオチドの量を、工程(b)において検出された量と比較し、そしてそれから患者における癌の進行をモニタリングする工程。

40

【0011】

50

本発明の特定の実施形態は、当該最初のポリヌクレオチドおよび当該２番目のポリヌクレオチドの増幅工程を、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって達成することを提供する。

【００１２】

本発明はまた、本発明の検出方法を実施するために適切なキットを提供する。例示的なキットは、オリゴヌクレオチドプライマー対を備え、それらの１つはそれぞれ別のポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。特定の実施形態において、本発明によるキットはまた、核酸ポリメラーゼおよび適当な緩衝液を備え得る。

【００１３】

本発明のこれらおよび他の局面が、以下の詳細な説明および添付された図を参照して明らかとなる。本明細書中で開示される全ての参考文献は、それぞれが個々に組み込まれたように、これによってその全体が参考として参考文献に援用される。

【００１４】

（配列識別名の簡単な説明）

配列番号１は、決定されたcDNA配列L762Pである。

配列番号２は、配列番号１の配列によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号３は、決定されたcDNA配列L984Pである。

配列番号４は、配列番号３の配列によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号５は、決定されたcDNA配列L550Sである。

配列番号６は、配列番号５の配列によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号７は、決定されたcDNA配列L552Sである。

配列番号８は、配列番号７の配列によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号９は、L552S INTフォワードプライマーのDNA配列である。

配列番号１０は、L552S INTリバースプライマーのDNA配列である。

配列番号１１は、L552S TaqmanプローブのDNA配列である。

配列番号１２は、L550S INTフォワードプライマーのDNA配列である。

配列番号１３は、L550S INTリバースプライマーのDNA配列である。

配列番号１４は、L550S TaqmanプローブのDNA配列である。

配列番号１５は、L726P INTフォワードプライマーのDNA配列である。

配列番号１６は、L726P INTリバースプライマーのDNA配列である。

配列番号１７は、L726P TaqmanプローブのDNA配列である。

配列番号１８は、L984P INTフォワードプライマーのDNA配列である。

配列番号１９は、L984P INTリバースプライマーのDNA配列である。

配列番号２０は、L984P TaqmanプローブのDNA配列である。

配列番号２１は、L763Pの決定されたcDNA配列である。

配列番号２２は、配列番号２１の配列によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号２３は、L763P INTフォワードプライマーのDNA配列である。

配列番号２４は、L763P リバースプライマーのDNA配列である。

配列番号２５は、L763P TaqmanプローブのDNA配列である。

配列番号２６は、L587の決定されたcDNA配列である。

配列番号２７は、配列番号２６の配列によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号２８は、L587 INTフォワードプライマーのDNA配列である。

配列番号２９は、L587 INTリバースプライマーのDNA配列である。

配列番号３０は、L587 TaqmanプローブのDNA配列である。

配列番号３１は、L523の決定されたcDNA配列である。

配列番号３２は、配列番号３１の配列によってコードされるアミノ酸配列である。

配列番号３３は、L523プライマーのDNA配列である。

配列番号３４は、L523プライマーのDNA配列である。

【００１５】

（発明の詳細な説明）

10

20

30

40

50

上記で述べたように、本発明は、一般的に組織特異的ポリヌクレオチドの同定に適した方法、および肺癌の診断およびモニタリングに適した方法、組成物およびキットに関し、特にこのような方法、組成物およびキットは、NSCLCおよびSCLCの診断、識別および/または予後における使用に適している。このような診断方法は、肺組織における肺癌転移を検出、ならびに血液および離れた転移の縦隔リンパ節における足場非依存性肺癌細胞を検出するための、分子診断試験の基礎を形成する。

【0016】

種々の遺伝子が、肺腫瘍、特にNSCLCの扁平上皮癌または腺癌形態または小細胞癌において過剰発現していると同定された。これらとしては、L762P、L984P、L550S/L548S、L552S/L547S、L552/L547S、L200T、L514S、L551S、L587S、L763S、L773P、L801P、L985P、L1058C、L1081C、L523S、OF1783P、B307Dが挙げられるが、これに限定されない(WIPO国際特許出願番号WO99/47674、1999年9月23日公開；WO00/61612、2000年10月19日公開；WO02/00174、2002年1月3日公開；WO02/47534、2002年6月20日公開；WO01/72295、2001年10月4日公開；WO02/092001、2002年11月21日公開；WO01/00828、2001年1月1日公開；WO02/04514、2002年1月17日公開；WO01/92525、2002年12月6日公開；WO02/02623、2002年1月10日公開。Wangら、米国特許第6,482,597号、2002年11月22日発行；Wangら、同第6,518,256号、2003年2月11日発行；Wangら、同第6,426,072号、2002年7月30日発行；Reedら、同第6,210,883号、2001年4月3日発行；Wangら、同第6,504,010号、2003年1月7日発行；Wangら、同第6,509,448号、2003年1月21日発行；Wangら、Oncogene: 21(49): 7598-604、2002(コラーゲンXI型 I))。

【0017】

これらの遺伝子は、PCRおよびcDNAライブラリーサブトラクションおよびそれぞれの腫瘍型を個々に用いた電気的サブトラクションを用いて同定され、そして特徴付けられた。同定されたcDNAを次いでマイクロアレイによって評価し、次いで組織パネルにおけるリアルタイムPCRによって評価して特異的な発現パターンを同定した。表1はこれらの遺伝子のNSCLCの腺癌または扁平上皮癌形態のいずれかまたは両方に関する特異性、および小細胞肺癌に特異的な遺伝子を強調する。いくつかの場合には、大細胞癌との反応性もリアルタイムPCR分析によって同定された。

【0018】

【表 1】

表 1

遺伝子	扁平上皮癌	腺癌	小細胞癌	大細胞癌	正常肺
L762P	+++++	+			-
L984P		+	+++		-
L550S/L548S		+++++	+		-
L552S/L547S	++	+++++			-
L200T	+	++		++	-
L514S	++++	++++			-
L551S		++++		+/-	-
L587S	+	+	+++	+	-
L763P	+++++				-
L773P	+++	+++			-
L801P	++++	++++		++	-
L978P	+	++	+++++	+/-	-
L985P		+	+++++		-
L1058C			++		-
L1081C			++		-
L523S	+++++	+++++	+	++	-
OF 1783P			+++++		-
B307D	++	++		+	-

(組織特異的ポリヌクレオチドの同定)

本発明の特定の実施形態は、異なる型、病期、および悪性度分類の腫瘍を有する患者由来の生物学的サンプルにおいて肺癌細胞を検出する方法、組成物およびキットを提供する。これらの方法は、患者の生物学的サンプルから1つまたはそれ以上の組織特異的ポリヌクレオチドを検出する工程を包含し、そのポリヌクレオチドの過剰発現は、患者の生物学的サンプルにおける肺癌細胞の存在を示す。従って、本発明はまた、組織特異的ポリヌクレオチドの同定に適した方法を提供する。本明細書中で使用される場合、「組織特異的ポリヌクレオチド」または「腫瘍特異的ポリヌクレオチド」という語句は、1つまたはそれ以上のコントロール組織と比較して、少なくとも2倍過剰発現している全てのポリヌクレオチドを含むよう意味する。本明細書中の下記でさらに詳細に議論するように、所定のポリヌクレオチドの過剰発現を、例えばマイクロアレイおよび/または定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (Real-time PCRTM) 方法によって評価し得る。

【0019】

組織特異的ポリヌクレオチドを検出するための例示的な方法は、以下の工程を包含し得る：(a) 遺伝的サブトラクションを実施して、目的の組織からポリヌクレオチドのプールを同定する工程；(b) DNAマイクロアレイ分析を実施して、目的の上記ポリヌクレオチドのプールの最初の部分集合を同定する工程であって、ここで上記最初の部分集合の各ポリヌクレオチドのメンバーは、コントロール組織と比較して目的の上記組織において少なくとも2倍過剰発現している、工程；および(c) 上記最初の部分集合内のポリヌクレオチドに対して定量的ポリメラーゼ連鎖反応分析を実施して、上記コントロール組織と比較して少なくとも2倍過剰発現している2番目の部分集合のポリヌクレオチドを同定する工程。

【0020】

(一般的なポリヌクレオチド)

本明細書中で使用される場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、一般的にDNAまたはRNA分子のいずれかを指す。ポリヌクレオチドは、血液、血清、リンパ節、骨髄、痰、尿、および腫瘍生検サンプルのような生物学的サンプルにおいて通常見出されるように、天然に存在し得る。あるいは、ポリヌクレオチドは、例えば核酸ポリマー化反応によって合成的に得られたものであり得る。当業者によって認識されるように、ポリヌクレオ

チドは1本鎖(コーディングまたはアンチセンス)または2本鎖であり得、そしてDNA分子(ゲノム、cDNAまたは合成)またはRNA分子であり得る。RNA分子としては、イントロンを含み、そしてDNA分子と1対1の様式で対応するHnRNA分子、およびイントロンを含まないmRNA分子が挙げられる。さらなるコード配列または非コード配列が、本発明のポリヌクレオチド内に存在し得るが、必ずしもその必要はなく、そしてポリヌクレオチドは、他の分子および/または支持材料に結合し得るが、必ずしもその必要はない。

【0021】

ポリヌクレオチドは、天然配列(すなわち、肺腫瘍タンパク質のような腫瘍タンパク質、またはその部分をコードする内因性配列)を含み得るか、またはそのような配列の改変体、または生物学的機能性等価物または抗原的機能性等価物を含み得る。ポリヌクレオチド改変体は、下記でさらに説明するように、1つまたはそれ以上の置換、付加、欠失、および/または挿入を含み得る。「改変体」という用語はまた、異種由来の相同的遺伝子を含む。

10

【0022】

ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を比較する場合、下記で記載するように、2つの配列のヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が、最大限の対応で整列した場合に同じである場合、2つの配列は「同一」とされると言われる。2つの配列間の比較を、代表的には比較ウィンドウにわたる配列を比較し、局所領域の配列類似性を同定および比較することによって実施する。本明細書中で使用される場合、「比較ウィンドウ」は、少なくとも約20個の連続する位置、通常30~約75個、40~約50個の断片を指し、その中で2つの配列を最適に整列した後、配列を同じ数の連続する位置の参照配列と比較し得る。

20

【0023】

比較するための配列の最適な整列は、バイオインフォマティクスソフトウェアのLasergene総合ソフトウェア中のMegalignプログラム(DNA STAR, Inc., Madison, WI)を用いて、デフォルトパラメーターを用いて実施し得る。このプログラムは、以下の参考文献で記載されたいくつかの整列スキームを具体化する: Dayhoff, M.O. (編) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC 第5巻、補遺3、345-358頁の、Dayhoff, M.O. (1978) A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships.; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenies, 626-645頁、Methods in Enzymology 第183巻、Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. および Sharp, P.M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. および Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D. (1971) Comb. Theor 11:105; Santou, N. Nes, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. および Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy - the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. および Lipman, D.J. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730。

30

40

【0024】

あるいは、比較するための配列の最適な整列を、SmithおよびWaterman (1981) Add. APL Math 2:482の局所的同一性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:4

50

43の同一性整列アルゴリズムによって、PearsonおよびLipman(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性探索方法によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実行(Wisconsin Genetics Software Package、Genetics Computer Group(GCG)、575 Science Dr.、Madison、WIのGAP、BESTFIT、BLAST、FASTAおよびTFASTA)または検査によって実施し得る。

【0025】

配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントを決定するのに適切な、1つの好ましいアルゴリズムの例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらはそれぞれAltschulら(1977)Nucl. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschulら(1990)J. Mol. Biol. 215:403-410に記載される。BLASTおよびBLAST 2.0を、例えば本明細書中で記載されるパラメーターで使用する、本発明のポリヌクレオチドおよびポリペプチドの配列同一性パーセントを決定し得る。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Informationを通じて公共で入手可能である。1つの説明的な例において、ヌクレオチド配列に関して、パラメーターM(マッチする残基対に対するリワードスコア(reward score); 常に>0)およびN(ミスマッチ残基に対するペナルティスコア(penalty score); 常に<0)を用いて、累積スコアを計算し得る。アミノ酸配列に関して、累積スコアを計算するために、スコアリングマトリックス(scoring matrix)を使用し得る。各方向におけるワードヒット(word hit)の伸長は、累積整列スコアがその最大達成値より量Xだけ下がった場合; 1つまたはそれ以上のネガティブスコアリング残基整列の蓄積のために、累積スコアがゼロまたはそれ以下になった場合; またはどちらかの配列の末端に達した場合、停止する。BLASTアルゴリズムパラメーターW、TおよびXは、整列の感度およびスピードを決定する。(ヌクレオチド配列に対する)BLASTNプログラムは、デフォルトとしてワードの長さ(word length)(W)は11、および期待値(E)は10、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス(scoring matrix)(HenikoffおよびHenikoff(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照のこと)整列(B)は50、期待値(E)は10、M=5、N=-4、および両方の鎖の比較を使用する。

【0026】

好ましくは、「配列同一性のパーセント」を、少なくとも20位置の比較ウィンドウで2つの最適に整列した配列を比較することによって決定し、ここで比較ウィンドウ中のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、2つの配列の最適な整列に関して、参照配列(付加または欠失を含まない)と比較して、20パーセントまたはそれより低い、通常5~15パーセント、または10~12パーセントの付加または欠失(すなわちギャップ)を含み得る。同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列に存在する位置の数を決定してマッチする位置の数を明らかにし、マッチした位置の数を参照配列の位置の全数(すなわちウィンドウサイズ)で割り、そして結果を100倍して配列同一性のパーセントを出すことによって、パーセンテージを計算する。

【0027】

従って、本発明は、本明細書中で開示される配列に対して実質的な同一性を有するポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列、例えば本明細書中で記載された方法(例えば下記に記載するような、標準的なパラメーターを用いたBLAST分析)を用いて本発明のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列と比較して、少なくとも50%の配列同一性、好ましくは少なくとも55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%またはそれより高い、配列同一性を含むものを含む。当業者は、コードの縮重、アミノ酸類似性、リーディングフレー

ムの位置等を考慮に入れて、これらの値を適当に調整して2つのヌクレオチド配列によってコードされるタンパク質の対応する同一性を決定し得ることを認識する。

【0028】

さらなる実施形態において、本発明は、本明細書中で開示される1つまたはそれ以上の配列と同一の、またはそれらと相補的な、種々の長さの連続的な配列の範囲を含む単離されたポリヌクレオチドおよびポリペプチドを提供する。例えば、本明細書中で開示された1つまたはそれ以上の配列の、少なくとも約15、20、30、40、50、75、100、150、200、300、400、500、または1000またはそれ以上、およびその間の全ての中間の長さの連続的なヌクレオチドを含むポリヌクレオチドが、本発明によって提供される。この文脈において、「中間の長さ」は、例えば、16、17、18、19等；21、22、23等；30、31、32等；50、51、52、53等；100、101、102、103等；150、151、152、153等；200-500；500-1000等の間の全ての整数を含むような、引用した値の間のあらゆる長さを意味することが、容易に理解される。

10

【0029】

本発明のポリヌクレオチド、またはそれらのフラグメントは、コード配列自体の長さに関わらず、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、さらなる制限酵素部位、複数のクローニング部位、他のコーディング部分等のような、他のDNA配列と組み合わせ得るので、その全体の長さはかなり異なり得る。従って、ほとんどあらゆる長さの核酸フラグメントを採用し得ることが企図され、全長は好ましくは意図される組換えDNAプロトコールにおける調製および使用の簡便さによって制限される。例えば、約10,000、約5000、約3000、約2,000、約1,000、約500、約200、約100、約50塩基対長等（全ての中間の長さを含む）の全長を有する例示的なDNA部分が、本発明の多くの実行において有用であることが企図される。

20

【0030】

他の実施形態において、本発明は、中程度にストリンジェントな条件下で、本明細書中で提供されたポリヌクレオチド配列、またはそれらのフラグメント、またはそれらの相補配列にハイブリダイズし得るポリヌクレオチドに関する。ハイブリダイゼーション技術は、分子生物学の分野において周知である。説明の目的のために、本発明のポリヌクレオチドの、他のポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを試験するための、適した中程度にストリンジェントな条件としては、5×SSC、0.5%SDS、1.0mMEDTA(pH8.0)の溶液中で前洗浄；50-65℃で、5×SSCで、一晚ハイブリダイズ；続いて0.1%のSDSを含む2×、0.5×および0.2×SSCのそれぞれで、65℃で20分間2回洗浄が挙げられる。

30

【0031】

さらに、遺伝コードの縮重の結果として、本明細書中で記載したようなポリペプチドをコードする多くのヌクレオチド配列が存在することが、当業者によって理解される。これらポリヌクレオチドのいくつかは、いかなる天然遺伝子のヌクレオチド配列とも最低限の相同性しか有さない。それにも関わらず、コドンユーセージにおける違いのために異なるポリヌクレオチドは、本発明によって特に企図される。さらに、本明細書中で提供されるポリヌクレオチド配列を含む遺伝子の対立遺伝子は、本発明の範囲内である。対立遺伝子は、ヌクレオチドの欠失、付加、および/または置換のような、1つまたはそれ以上の変異の結果として変化した内因性遺伝子である。生じるmRNAおよびタンパク質は、変化した構造または機能を有し得るが、必ずしもその必要はない。対立遺伝子を、標準的な技術（例えば、ハイブリダイゼーション、増幅、および/またはデータベース配列比較）を用いて同定し得る。

40

【0032】

（マイクロアレイ分析）

本発明の方法による検出に適したポリヌクレオチドを、下記でより詳細に記載するように、組織および/または腫瘍関連発現（例えば、本明細書中で提供される代表的なアッセ

50

イを用いて決定されるような、腫瘍において正常組織より少なくとも2倍多い発現)に関してcDNAのマイクロアレイをスクリーニングすることによって同定し得る。そのようなスクリーニングを、例えばSynteniマイクロアレイ(Palo Alto、CA)を製造会社の指示に従って用いて、(および本質的にはSchenaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10614-10619(1996)およびHellierら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2150-2155(1997)によって記載されたように)実施し得る。

【0033】

マイクロアレイは、多数の遺伝子を評価するために有効な方法であるが、限られた感受性に起因して、少量の遺伝子の完全な組織分布を正確に決定し得ないか、またはシグナルの飽和に起因して、より多量の遺伝子の過剰発現の程度を過小評価し得る。マイクロアレイ発現プロファイリングによって過剰発現を示す遺伝子に関して、より大きな感受性の動的範囲を含む、TaqmanTMプローブ検出に基づく定量的RT-PCRを用いて、さらなる分析を行った。いくつかの異なる正常組織のパネルおよび腫瘍組織のパネル、遠位の転移および細胞株をこの目的のために使用した。

10

【0034】

(定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応)

本発明による適したポリヌクレオチドを、例えばリアルタイムPCR方法のような、定量的PCR方法を採用することによって、さらに特徴付け得るか、またはあるいは、最初に同定し得る。この方法によって、例えば転移腫瘍サンプルのような、組織サンプルおよび/または腫瘍サンプルを、対応する正常組織サンプルおよび/または関連のない正常組織サンプルのパネルと並べて試験し得る。

20

【0035】

リアルタイムPCR(Gibsonら、Genome Research 6:995-1001、1996;Heidら、Genome Research 6:986-994、1996を参照のこと)は、増幅中のPCR産物の蓄積レベルを評価する技術である。この技術は、複数のサンプルにおけるmRNAレベルの定量的評価を可能にする。簡単には、mRNAを腫瘍組織および正常組織から抽出し、そして標準的な技術を用いてcDNAを調製する。

【0036】

例えば、リアルタイムPCRを、ABI 7700 PrismまたはGeneAmp(登録商標)5700配列検出システム(Applied Biosystems、Foster City、CA)のいずれかにおいて行い得る。7700システムは、1つの末端に5'蛍光リポーター色素、および他方の末端に3'クエンチャー色素を有する特異的なプローブ(TaqmanTM)と組み合わせた、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを使用する。リアルタイムPCRを、5'-3'ヌクレアーゼ活性を有するTaq DNAポリメラーゼを用いて行う場合、プローブは切断され、そして蛍光を発し始め、反応を蛍光の増加によってモニターすることが可能になる(リアルタイム)。5700システムは、2本鎖DNAのみに結合する蛍光色素であるSYBR(登録商標)グリーン、および7700装置と同じ前向きおよびリバースプライマーを用いる。マッチするプライマーおよび蛍光プローブを、プライマー発現プログラムによって設計し得る(Applied Biosystems、Foster City、CA)。プライマーおよびプローブの最適な濃度は、当業者によって最初に決定される。コントロール(例えば-アクチン)プライマーおよびプローブを、例えばPerkin Elmer/Applied Biosystems(Foster City、CA)から商業的に得ることができる。

30

40

【0037】

サンプルにおいて特定のRNAの量を定量するために、目的の遺伝子を含むプラスミドを用いて、標準曲線を作成する。標準曲線を、リアルタイムPCRにおいて決定したCt値を用いて作成し、それはアッセイで用いた初期cDNA濃度と関連する。目的の遺伝子

50

の、 10^{-10} コピーの範囲の標準希釈が通常十分である。さらに、標準曲線を、コントロール配列に関して作成する。これは、比較の目的のために、コントロールの量に対する組織サンプルの初期RNA含有量の標準化を可能にする。

【0038】

上記によって、および下記でさらに記載するように、本発明は、配列番号1、3、5、7、21および26で記載される配列を有する、例示的な肺組織および/または腫瘍特異的ポリヌクレオチドL552S、L550S、L762P、L984P、L763P、およびL587、配列番号2、4、6、8、22および27で示されるアミノ酸配列を有し、それによってコードされる例示的なポリペプチドを提供し、それを癌、より具体的には肺癌の検出に適切に採用し得る。

10

【0039】

(癌検出のための方法)

一般的に、患者から得られた生物学的サンプル(例えば血液、リンパ節、骨髄、血清、痰、尿および/または腫瘍生検)の細胞内の1つまたはそれ以上のポリヌクレオチドの存在に基づいて、癌細胞を患者において検出し得る。言い換えれば、そのようなポリヌクレオチドをマーカーとして使用して、例えば肺癌のような癌の存在または非存在を示し得る。

【0040】

本明細書中でさらに詳細に議論するように、本発明は、1つ以上のポリヌクレオチドの同時検出の方法を提供することによって、これらおよび他の関連する目的を達成し、その存在は、生物学的サンプルにおける肺癌細胞の存在の診断である。本明細書中で開示される種々の癌検出方法のそれぞれは、1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブをハイブリダイズする工程を共通に有し、そのハイブリダイゼーションは、腫瘍および/または組織特異的ポリヌクレオチドの存在を示す。企図される正確な適用に依存して、1つまたはそれ以上の、イントロンを貫くオリゴヌクレオチドを採用することが好ましくあり得、それらのオリゴヌクレオチドは、ゲノムDNAのポリヌクレオチドに対しては無効であり、従って、これらのオリゴヌクレオチドは、生物学的サンプル中のゲノムDNAの検出を、実質的に低減および/または排除するのに有効である。

20

【0041】

試験する生物学的サンプルを、1つまたはそれ以上の細胞捕獲および/または細胞枯渇方法に供することによって、これらの検出方法の感度を増強する方法が、本明細書中でさらに開示される。

30

【0042】

本発明の特定の実施形態によって、患者における肺癌細胞の存在を、以下の工程を採用することによって決定し得る：(a)患者から得られた生物学的サンプルを、本明細書中で記載されたような2つまたはそれ以上の肺腫瘍タンパク質をコードする、2つまたはそれ以上のポリヌクレオチドにハイブリダイズする2つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドと接触させる工程；(b)サンプルにおいて、オリゴヌクレオチドにハイブリダイズする少なくとも1つのポリヌクレオチド(例えばmRNA)のレベルを検出する工程；および(c)オリゴヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドのレベルを、前もって決定したカットオフ値と比較し、そしてそれから患者における肺癌の存在または非存在を決定する工程。

40

【0043】

アッセイ条件下でハイブリダイゼーションを可能にするために、オリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブは、少なくとも10ヌクレオチド長、および好ましくは少なくとも20ヌクレオチド長の肺腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドの部分に対して、少なくとも約60%、好ましくは少なくとも約75%、そしてより好ましくは少なくとも約90%の同一性を有するオリゴヌクレオチド配列を含むべきである。好ましくは、オリゴヌクレオチドプライマーは、上記で定義したような中程度にストリンジェントな条件下で、本明細書中で記載したポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイ

50

ズする。本明細書中で記載される診断方法において有用に採用され得るオリゴヌクレオチドプライマーは、好ましくは少なくとも10 - 40ヌクレオチド長である。好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号1、3、5、または7で引用した配列を有するDNA分子の、少なくとも10個の連続したヌクレオチド、より好ましくは少なくとも15個の連続したヌクレオチドを含む。PCRに基づくアッセイおよびハイブリダイゼーションアッセイのどちらについての技術も、当該分野で周知である（例えば、Mullisら、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51:263、1987；Erllich編、PCR Technology、Stockton Press、NY、1989を参照のこと）。

【0044】

10

本発明はまた、患者において肺癌細胞の存在を検出するための、増幅に基づく方法を提供する。例示的な方法は、以下の工程を包含する：（a）患者から生物学的サンプルを得る工程；（b）上記生物学的サンプルを、互いに無関係な独立したポリヌクレオチド配列に特異的な2つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチド対と接触させる工程であって、ここで上記オリゴヌクレオチド対は、中程度にストリンジェントな条件下で、それらのそれぞれのポリヌクレオチドおよびそれらの相補体にハイブリダイズする工程；（c）ポリヌクレオチドを増幅する工程；および（d）増幅したポリヌクレオチドを検出する工程；ここで1つまたはそれ以上の増幅したポリヌクレオチドの存在は、患者における肺癌細胞の存在を示す。

【0045】

20

本発明による方法は、例えば、特に血液、血清、リンパ節、骨髄、痰、尿および腫瘍生検サンプルのような、広範な種々の生物学的サンプルから得られたポリヌクレオチドを同定する工程に適している。

【0046】

本発明の特定の例示的な実施形態は、検出されるポリヌクレオチドが、L762、L984、L550、L552、L763、およびL587からなる群より選択される方法を提供する。あるいは、および/またはそれに加えて、検出されるポリヌクレオチドは、配列番号1、3、5、7、21および26で示されたものからなる群より選択され得る。

【0047】

本発明の方法に従って使用し得る適した例示的なオリゴヌクレオチドプローブおよび/またはプライマーが、本明細書中で開示される。ゲノムDNAのバックグラウンド検出を排除する、特定の好ましい実施形態において、オリゴヌクレオチドはイントロンを貫通するオリゴヌクレオチドであり得る。

30

【0048】

企図される正確な適用に依存して、当業者には、放射性標識を検出する工程、およびフルオロフォアを検出する工程によって、組織および/または腫瘍特異的ポリヌクレオチドを検出することが好ましくあり得る。より具体的には、オリゴヌクレオチドプローブおよび/またはプライマーは、例えば放射性標識および/またはフルオロフォアのような検出可能な部分を含み得る。

【0049】

40

あるいは、またはそれに加えて、本発明の方法はまた、組織および/または腫瘍特異的ポリヌクレオチドの検出の前に、例えばゲル電気泳動のような、分画工程を包含し得る。

【0050】

他の実施形態において、本明細書中で記載された方法を使用して、癌の進行をモニタリングし得る。これらの実施形態によって、肺癌の診断のために提供されたアッセイを、長期にわたって行い得、そして反応性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルの変化を評価する。例えば、アッセイを6ヶ月から1年間の期間にわたって、24 - 72時間ごとに行い、そしてその後は必要に応じて行い得る。一般的に、検出されるポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルが時間と共に増加する患者において、癌は進行している。対照的に、反応性ポリペプチドまたはポリヌクレオチドのレベルが、一定のままであるか

50

、または時間と共に減少する場合は、癌は進行していない。

【0051】

特定のインビボ診断アッセイを、腫瘍に対して直接行い得る。1つのそのようなアッセイは、腫瘍細胞を結合剤と接触させる工程を包含する。結合した結合剤を、次いで直接、またはリポーター基を介して間接的に検出し得る。そのような結合剤をまた、組織学的適用においても使用し得る。あるいは、ポリヌクレオチドプローブを、そのような適用内で使用し得る。

【0052】

上記で述べたように、感度を改善するために、複数の肺腫瘍タンパク質マーカーを、所定のサンプルにおいてアッセイし得る。本明細書中で提供される、異なるタンパク質に特異的な結合剤を、単一のアッセイで合わせ得ることが明らかである。さらに、複数のプライマーまたはプローブを同時に使用し得る。腫瘍タンパク質マーカーの選択は、最適な感度を生じる組み合わせを決定する日常的な実験に基づき得る。それに加えて、またはあるいは、本明細書中で提供される腫瘍タンパク質のアッセイを、他の公知の腫瘍抗原のアッセイと組み合わせ得る。

【0053】

(細胞濃縮)

本発明の他の局面において、本明細書中で開示された種々の検出方法の感度を改善するために、ポリヌクレオチド検出の前に細胞捕獲技術を使用し得る。

【0054】

例示的な細胞濃縮方法は、細胞表面マーカーに対する特異的モノクローナル抗体、または4量体抗体複合体で覆われた免疫磁気ビーズを採用し、この方法をサンプルにおいてまず癌細胞を濃縮または積極的に選択するために使用し得る。Dynabeads (登録商標) Epithelial Enrich (Dynal Biotech, Oslo, Norway)、StemSepTM (StemCell Technologies, Inc., Vancouver, BC) およびRosetteSep (StemCell Technologies) を含む、種々の市販で入手可能なキットを使用し得る。当業者は、他の容易に入手可能な方法およびキットも、望ましい細胞集団を濃縮または積極的に選択するために適切に採用し得ることを認識する。

【0055】

Dynabeads (登録商標) Epithelial Enrich は、正常上皮組織および新生物上皮組織に発現する2つの糖タンパク質膜抗原に特異的なmAbで覆われた磁気ビーズを備える。被覆されたビーズを、サンプルに添加し得、そして次いでそのサンプルを磁石に適用し、それによってビーズに結合した細胞を捕獲する。望ましくない細胞は洗い流され、そして磁氣的に単離された細胞はビーズから溶出され、そしてさらなる分析に使用される。

【0056】

RosetteSep は、血液サンプルから直接細胞を濃縮するために使用され得、そして種々の望ましくない細胞を標的とする4量体抗体の混液からなり、そしてそれらをサンプル中に存在する赤血球(RBC)上のグリコホリンAに架橋し、ロゼットを形成する。Ficollで遠心した場合、標的細胞は遊離RBCと共にペレット化する。

【0057】

枯渇混液における抗体の組み合わせが、どの細胞を除去するかを決定し、そして従ってどの細胞を回収するかを決定する。利用可能な抗体としては、CD2、CD3、CD4、CD5、CD8、CD10、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD24、CD25、CD29、CD33、CD34、CD36、CD38、CD41、CD45、CD45RA、CD45RO、CD56、CD66B、CD66e、HLA-DR、IgE、およびTCR が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、本発明において、肺腫瘍抗原に特異的なmAbを産生し、そして同様の方式で使用し得ることが企図される。例えば、腫瘍特異的細胞表面抗原に結合するmAbを磁気ビーズに

10

20

30

40

50

結合するか、または4量体抗体複合体に処方し、そしてサンプルから転移性肺腫瘍細胞を濃縮または積極的に選択するために使用し得る。そのような系を使用して、異なる形態の肺癌、特にNSCLCの腺癌形態および扁平上皮癌形態および小細胞癌由来の血液サンプルを、本明細書中で記載されたような本発明の複合PCRアッセイを用いて、循環腫瘍細胞の存在について評価し得る。

【0058】

一旦サンプルが濃縮されるかまたは積極的に選択されると、細胞をさらに分析し得る。例えば、細胞を溶解し、そしてRNAを単離し得る。RNAを、次いで、本明細書中で記載されたようなリアルタイムPCRアッセイにおいて、肺腫瘍特異的複合プライマーを用いたRT-PCR分析に供し得る。

10

【0059】

本発明の別の局面において、細胞捕獲技術をリアルタイムPCRと組み合わせて用いて、肺腫瘍抗原を発現する転移細胞を検出するためのより高感度なツールを提供し得る。

【0060】

採用し得るさらに別の方法は、抗ガングリオシド G_{M1} / G_{M2} 細胞捕獲抗体系である。ガングリオシドは、細胞膜結合グリコスフィンゴ脂質であり、そのいくつかの種は、神経外胚葉および上皮由来のほとんどの癌、特に肺癌の細胞表面に過剰発現することが示された。 G_{M2} の細胞表面発現が、いくつかの型の肺癌、特にSCLCにおいて見られ、それは、モノクローナル抗体に基づく肺癌免疫治療のため、および G_{M1} と組み合わせた捕獲方法として使用するための魅力的な標的である。

20

【0061】

(プローブおよびプライマー)

上記で述べたように、および本明細書中でさらに詳細に記載するように、本発明による特定の方法、組成物およびキットは、肺癌の検出のために2つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対を利用する。そのような核酸プローブの目的の配列に特異的にハイブリダイズする能力が、それらを生物学的サンプルにおける相補的配列の存在を検出するのに有用であることを可能とする。

【0062】

あるいは、他の実施形態において、本発明のプローブおよび/またはプライマーを、核酸ハイブリダイゼーションによる検出のために採用し得る。そういうものとして、検出されるポリヌクレオチドの15ヌクレオチド長の連続する配列と同じ配列を有するか、またはそれと相補的である、少なくとも約15ヌクレオチド長の連続する配列の配列領域を含む核酸部分が特に有用であると見出されることが企図される。より長い連続する同一配列または相補的配列(例えば、約20、30、40、50、100、200、500、1000(全ての中間の長さを含む)および全長配列までのものさえ)も、特定の実施形態において有用である。

30

【0063】

検出されるポリヌクレオチドと同一の、またはそれに相補的な、10-14、15-20、30、50、または100-200ヌクレオチドくらいでさえ長さの(中間の長さも含む)連続的なヌクレオチドからなる配列領域を有するポリヌクレオチドプライマーが、例えばポリメラーゼ連鎖反応(PCR^{T M})のような増幅反応において使用するためのプライマーとして特に企図される。これは、例えば血液、リンパ節および骨髓のような、多様な生物学的サンプルにおいてポリヌクレオチドを分析することを可能にする。

40

【0064】

約15-25ヌクレオチド長のプライマーの使用は、安定かつ選択的でもある2本鎖分子の形成を可能にする。ハイブリッドの安定性および選択性を増加させるために、そしてそれによって得られる特異的ハイブリッド分子の質および程度を改善するために、15塩基長より長い範囲で連続的な相補的配列を有する分子が一般的に好ましい。一般的に15-25、または望ましい場合はより長い、連続的なヌクレオチドの遺伝子相補的な範囲を有するプライマーを設計することが好ましい。

50

【0065】

プライマーを、検出されるポリヌクレオチドのあらゆる部分から選択し得る。必要なことは、プライマーとして利用することが求められる、約15 - 25ヌクレオチド長から全長配列までおよびそれを含む、本明細書中で示した例示的なポリヌクレオチドのような配列、またはその配列のあらゆる連続的な部分を検討することだけである。プライマー配列の選択は、種々の因子によって支配され得る。例えば、全配列の末端から末端へ向かったプライマーを採用することが望ましくあり得る。本明細書中で開示される例示的なプライマーを、配列番号1、3、5、7、21および26で示されたもののよう、目的のポリヌクレオチド全体の相補的な範囲と選択的に2本鎖分子を形成する能力のために、必要に応じて使用し得る。

10

【0066】

本発明はさらに、種々の例示的なオリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブのヌクレオチド配列を提供し、それを、本明細書中でさらに詳細に記載するように、癌検出のために本発明の方法によって使用し得る。

【0067】

本発明によるオリゴヌクレオチドプライマーを、例えば、通常自動化オリゴヌクレオチド合成機を用いて実施されるような化学的手段によってプライマーを直接合成する工程を包含する、当業者に通常利用可能な方法によって、日常的に容易に調製し得る。構想される適用に依存して、代表的には標的配列に対するプローブの選択性の程度を変化させるために、変動するハイブリダイゼーション条件を採用することが望ましい。高い選択性を必要とする適用のために、代表的にはハイブリッドを形成するために比較的ストリンジェントな条件を採用することが望ましく、例えば約50 ~ 約70 の温度で約0.02 M ~ 約0.15 Mの塩濃度によって提供されるような、比較的低塩および/または高温の条件が選択される。そのような選択的な条件は、プローブとテンプレートまたは標的鎖との間に、もしあるとしてもわずかなミスマッチしか許容せず、そして関連配列を単離するために特に適切である。

20

【0068】

(ポリヌクレオチド増幅技術)

肺癌の検出に関して本明細書中で概略を述べた特定の実施形態はそれぞれ、1つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマーおよび/またはプローブのハイブリダイゼーションによる組織および/または腫瘍特異的ポリヌクレオチドの検出を共通に有する。生物学的サンプルに存在する相対的な癌細胞数および/または各肺癌細胞内のポリヌクレオチド発現レベルのような因子に依存して、検出工程を実施する前に増幅工程を実施することが好ましくあり得る。例えば、少なくとも2つのオリゴヌクレオチドプライマーを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づくアッセイにおいて採用し、生物学的サンプルに由来する肺腫瘍cDNAの一部を増幅し得、ここで少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマーが、肺腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドに特異的である(すなわちハイブリダイズする)。増幅したcDNAを、必要に応じて例えばゲル電気泳動のような分画工程に供し得る。

30

【0069】

サンプル中に存在する目的の標的配列を増幅するために、多くのテンプレート依存的プロセスが利用可能である。最もよく知られた増幅方法の1つは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCRTM)であり、それは米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第4,800,159号において詳細に記載される。簡単には、PCRTMにおいて、標的配列の反対の相補鎖の領域に相補的な2つのプライマー配列を調製する。過剰のデオキシヌクレオチド3リン酸を、DNAポリメラーゼ(例えばTaqポリメラーゼ)と共に反応混合物に加える。標的配列がサンプル中に存在する場合、プライマーは標的に結合し、そしてヌクレオチドを加えることによって、ポリメラーゼがプライマーを標的配列にそって伸長させる。反応混合物の温度を上昇および下降させることによって、伸長したプライマーは標的から分離して反応産物を形成し、過剰なプライマーが標的および

40

50

反応産物に結合し、そしてこのプロセスが反復される。好ましくは、増幅された mRNA の量を定量するために、逆転写および PCR^{T M} 増幅手順を行い得る。ポリメラーゼ連鎖反応方法は、当該分野において周知である。

【0070】

ポリヌクレオチド増幅のために好ましい1つの方法は、RT-PCRを採用し、ここでPCRを逆転写と組み合わせて適用する。代表的には、RNAを血液、血清、リンパ節、骨髓、痰、尿および腫瘍生検サンプルのような生物学的サンプルから抽出し、そして逆転写してcDNA分子を産生する。少なくとも1つの特異的なプライマーを用いたPCR増幅はcDNA分子を産生し、それを例えばゲル電気泳動を用いて分離および視覚化し得る。患者から、および癌に罹患していない個体から取った生物学的サンプルに対して増幅を行い得る。増幅反応を、2つの次数の程度に及ぶ、cDNAのいくつかの希釈について行い得る。非癌性サンプルの同じ希釈と比較して、試験患者サンプルのいくつかの希釈における発現において、2倍またはそれより高い増加は、代表的には陽性とみなされる。

10

【0071】

種々の市販で入手可能なキットのいずれかを使用して、増幅工程を行い得る。1つのそのような増幅技術は、インバースPCR (Trigliaら、Nucleic Acids Res. 16:8186、1988を参照のこと)であり、これは制限酵素を使用して遺伝子の既知の領域にフラグメントを産生する。そのフラグメントを次いで分子内ライゲーションによって環状化し、そして既知の領域から得られた多岐にわたる (divergent) プライマーと共にPCRのテンプレートとして使用する。代替的なアプローチにおいて、部分的な配列に隣接する配列を、リンカー配列に対するプライマーおよび既知の領域に特異的なプライマーと共に増幅することによって回収し得る。増幅した配列を、代表的には、同じリンカープライマーおよび既知の領域に特異的な2番目のプライマーと共に2回目の増幅に供する。既知の配列から反対の方向に伸長を始める2つのプライマーを採用する、この手順のバリエーションが、WIPO 国際特許出願番号WO96/38591に記載される。別のこのような技術は、「cDNA末端の迅速な増幅 (rapid amplification of cDNA end)」または「RACE」として知られる。この技術は、内部プライマーおよび外部プライマーの使用を包含し、それはポリA領域またはベクター配列にハイブリダイズして、既知の配列の5'および3'である配列を同定する。さらなる技術としては、キャプチャーPCR (capture PCR) (Lagerstromら、PCR Methods Applic. 1:111-19、1991) およびウォーキングPCR (walking PCR) (Parkerら、Nucleic Acids Res. 19:3055-60、1991) が挙げられる。増幅を採用する他の方法も、全長cDNA配列を得るために採用し得る。

20

30

【0072】

増幅のための別の方法は、欧州特許出願公開番号第320,308号において開示された、リガーゼ連鎖反応 (LCRと呼ばれる) である。LCRにおいて、2つの相補的なプローブ対を調製し、そして標的配列の存在下で、各対が標的の反対の相補鎖に隣接するように結合する。リガーゼの存在下で、2つのプローブ対は連結して単一の単位を形成する。PCR^{T M} におけるような温度サイクルによって、結合し、ライゲーションした単位は標的から分離し、そして次いで過剰なプローブ対のライゲーションのための「標的配列」として作用する。米国特許第4,883,750号は、プローブ対の標的配列への結合に関して、LCRと同様の代替の増幅方法を記載する。

40

【0073】

PCT 国際特許出願公開番号PCT/US87/00880において記載される、Qbet レプリカーゼも、本発明においてさらに別の増幅方法として使用し得る。この方法において、標的の領域と相補的な領域を有するRNAの複製可能な配列を、RNAポリメラーゼの存在下でサンプルに加える。ポリメラーゼは、複製可能な配列をコピーし、それを次いで検出し得る。

【0074】

50

等温増幅方法も、本発明における核酸の増幅に有用であり得、この方法では、制限エンドヌクレアーゼおよびリガーゼを使用して、制限部位の1つの鎖にヌクレオチド5' - [- チオ] リン酸を含む標的分子の増幅を達成する (Walkerら、1992)。

【0075】

鎖置換増幅 (Strand Displacement Amplification) (SDA) は、核酸の等温増幅を行う別の方法であり、それは複数回の鎖置換および合成、すなわちニック翻訳を包含する。修復鎖反応 (Repair Chain Reaction) (RCR) と呼ばれる同様の方法は、本発明において有用であり得る別の増幅方法であり、そして増幅の標的となる領域全体でいくつかのプローブをアニーリングする工程を包含し、続いて4つの塩基のうち2つしか存在しない修復反応が続く。他の2つの塩基を、容易な検出のためにビオチン化誘導体として添加し得る。同様のアプローチを、SDAにおいて使用する。

10

【0076】

サイクリックプローブ反応 (CPR) を用いても配列を検出し得る。CPRにおいて、非標的DNAの3' および5' 配列ならびに標的タンパク質特異的RNAの内部または「中間」配列を有するプローブが、サンプル中に存在するDNAにハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション時に、反応物をRNase Hで処理し、そして消化後に放出されるシグナルを産生することによって、プローブの産物を特有の産物として同定し得る。もとのテンプレートが別のサイクリングプローブにアニーリングし、そして反応が繰り返される。従って、CPRは、プローブの標的遺伝子特異的発現核酸へのハイブリダイゼーションによって産生されるシグナルを増幅する工程を包含する。

20

【0077】

英国特許出願番号第2202328号およびPCT国際特許出願公開番号PCT/US 89/01025において記載される、さらに他の増幅方法を、本発明に従って使用し得る。前者の適用において、「修飾」プライマーを、PCR様のテンプレートおよび酵素依存性合成において使用する。プライマーを、捕獲部分 (例えばビオチン) および/または検出器部分 (例えば酵素) で標識することによって修飾し得る。後者の適用において、過剰の標識プローブを、サンプルに添加する。標的配列の存在下で、プローブは結合し、そして触媒的に切断される。切断後、標的配列はインタクトで放出され、過剰のプローブによって結合される。標識プローブの切断は、標的配列の存在を示す。

30

【0078】

他の核酸増幅手順としては、核酸配列に基づく増幅 (NASBA) および3SRを含む、転写に基づく増幅システム (TAS) (Kwohら、1989; PCT国際特許出願公開番号WO 88/10315) が挙げられる。NASBAにおいて、DNAおよびRNAの単離に関しては標準的なフェノール/クロロホルム抽出、サンプルの熱変性、溶解緩衝液およびミニスピナラムによる処理、またはRNAの塩酸グアニジン抽出によって、核酸を増幅のために調製し得る。これらの増幅技術は、標的配列に特異的な配列を有するプライマーをアニーリングする工程を包含する。ポリマー化に続いて、DNA/RNAハイブリッドをRNase Hで消化し、一方2本鎖DNA分子を再び熱変性させる。いずれの場合においても、1本鎖DNAは、2番目の標的特異的なプライマーの添加、続くポリマー化によって完全に2本鎖になる。次いでこの2本鎖DNA分子を、T7またはSP6のようなポリメラーゼによって転写し、増加させる。等温循環反応において、RNAはDNAに逆転写され、そして再びT7またはSP6のようなポリメラーゼによって転写される。生じた産物は、切断されたか、または完全であるかのいずれにせよ、標的特異的な配列を示す。

40

【0079】

欧州特許出願公開番号第329,822号は、1本鎖RNA (「ssRNA」)、ssDNA、および2本鎖DNA (dsDNA) の周期的な合成を含む核酸増幅プロセスを開示し、それは、本発明によって使用され得る。ssRNAは、最初のプライマーのオリゴヌクレオチドに対する最初のテンプレートであり、これは逆転写酵素 (RNA依存性DN

50

Aポリメラーゼ)によって伸長される。次いで、リボヌクレアーゼH(RNase H、DNAまたはRNAのいずれかとの2本鎖におけるRNAに特異的なRNase)の作用によって、RNAを、生じたDNA:RNA 2本鎖から除去する。生じたssDNAは、2番目のプライマーに対する2番目のテンプレートであり、それは、そのテンプレートに対する相同性に対して5'に、RNAポリメラーゼプロモーター(T7 RNAポリメラーゼによって例示される)の配列も含む。このプライマーは次いでDNAポリメラーゼ(E. coli DNAポリメラーゼIの大きな「クレノウ」フラグメントによって例示される)によって伸長され、プライマー間の元のRNAの配列と同じ配列を有し、そしてさらに1つの末端においてプロモーター配列を有する、2本鎖DNA(「dsDNA」)分子を生じる。このプロモーター配列を適切なRNAポリメラーゼによって使用して、DNAの多くのRNAコピーを作製し得る。これらのコピーを次いで周期に再び入れて、非常に迅速な増幅を引き起こし得る。酵素の適切な選択によって、この増幅を各周期で酵素を添加することなく等温で行い得る。このプロセスの周期的性質のために、開始配列は、DNAまたはRNAいずれかの形式であるよう選択し得る。

10

【0080】

PCIT国際特許出願公開番号WO89/06700は、標的1本鎖DNA(「ssDNA」)に対するプロモーター/プライマー配列のハイブリダイゼーション、続く配列の多くのRNAコピーの転写に基づいた核酸配列増幅スキームを開示する。このスキームは循環しない、すなわち新しいテンプレートは、生じたRNA転写物から産生されない。他の増幅方法としては、当業者に周知である、「RACE」(Frohman、1990)、および「ワンサイドPCR(one-sided PCR)」(Ohara、1989)が挙げられる。

20

【0081】

(癌検出のための組成物およびキット)

本発明はさらに、上記の診断方法のいずれかで使用するためのキットを提供する。このようなキットは、代表的には診断的アッセイを行うために必要な2つまたはそれ以上の構成要素を備える。構成要素は、化合物、試薬、容器および/または装置であり得る。例えば、キット中の1つの容器は、肺腫瘍タンパク質に特異的に結合するモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含み得る。このような抗体またはフラグメントを、上記で記載したように支持材料に結合して提供し得る。1つまたはそれ以上のさらなる容器が、試薬または緩衝液のような、アッセイで使用する要素を封入し得る。このようなキットはまた、またはあるいは、抗体結合の直接的または間接的検出に適したリポーター基を含む、上記で記載したような検出試薬を含み得る。

30

【0082】

本発明はまた、本発明の検出方法を実施するために適したキットを提供する。例示的なキットは、オリゴヌクレオチドプライマー対を含み、それらのそれぞれ1つは別のポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。特定の実施形態において、本発明によるキットはまた、核酸ポリメラーゼおよび適した緩衝液を含み得る。本発明のキットに適した例示的なオリゴヌクレオチドプライマーが、本明細書中で開示される。本発明のキットに適した例示的なポリヌクレオチドが、本明細書中で開示される。

40

【0083】

あるいは、生物学的サンプルにおいて、肺腫瘍タンパク質をコードするmRNAのレベルを検出するために、キットを設計し得る。このようなキットは一般的に、上記で記載したような、少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプローブまたはプライマーを含み、それは肺腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズする。そのようなオリゴヌクレオチドを、例えばPCRまたはハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用し得る。そのようなキットに存在し得るさらなる構成要素は、肺腫瘍タンパク質をコードするポリヌクレオチドの検出を促進するために、2番目のオリゴヌクレオチドおよび/または診断試薬または容器を含む。

【0084】

50

他の関連する局面において、本発明はさらに、本明細書中で開示される方法において有用な組成物を提供する。例示的な組成物は、2つまたはそれ以上のオリゴヌクレオチドプライマー対を含み、それらのそれぞれ1つは別のポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズする。本発明の組成物に適した例示的なオリゴヌクレオチドプライマーが、本明細書中で開示される。本発明の組成物に適当な、典型的なポリヌクレオチドが、本明細書中で開示される。

【0085】

以下の実施例が、限定のためではなく、例証のために提供される。

【実施例】

【0086】

10

(実施例1)

(肺腫瘍の複合検出)

4つの肺癌特異的遺伝子：L762（配列番号1）、L984（配列番号3）、L550（配列番号5）、およびL552（配列番号7）の発現を同時に検出するために、複合リアルタイムPCRアッセイを確立した。単一の肺癌特異的遺伝子の発現分析に依存する検出アプローチと対照的に、この複合アッセイは試験した全ての肺腫瘍サンプルを検出し、そして腺癌、扁平上皮癌、小細胞および大細胞肺腫瘍における、それらの合わせたmRNA発現プロファイルを分析することができた。L552SおよびL550Sは、主に腺癌の検出においてお互いに補完し、L762Sは、扁平上皮癌を検出し、そしてL984Pは小細胞癌を検出する（表1を参照のこと）。

20

【0087】

ゲノムDNAとのあらゆる反応性を完全に除去するために、プライマーおよびプローブはイントロンを貫くように設計し（エキソン特異的）、そのためDNAアーゼでmRNAサンプルを処理する必要がなく、血液サンプルにおいて使用するために適切であった。それらをまた、必要な場合、最終産物のゲル分別を可能にするために、異なるサイズの単位複製配列を生成するよう設計した。

【0088】

アッセイを、以下のように行った：L552S（配列番号7）、L550（配列番号5）、L762（配列番号1）、L984（配列番号3）、および特異的プライマー、および特異的Taqmanプローブを使用して、肺腫瘍におけるそれらの組み合わせたmRNA発現プロファイルを分析した。そのプライマーおよびプローブを以下に示す：

30

L552S：フォワードプライマー（配列番号9）：5' GACGGGCATGAGCGACACACA。リバースプライマー（配列番号10）：5' CCATGTCGCGCACTGGGATC。プローブ（配列番号11）（FAM-5'-3'-TAMRA）：CTGAAGAATCGGGATCCTACACCTGGGCA。

【0089】

L550P：フォワードプライマー（配列番号12）：5' GGCCACCGTCTGGATTCTTC。リバースプライマー（配列番号13）：5' GAAGAAATCCAGACGGTGGCC。プローブ（配列番号14）（FAM-5'-3'-TAMRA）：CCGCCCCCAAGATCAAAATCCACAAACC。

40

【0090】

L762S：フォワードプライマー（配列番号15）：5' ATGGCAGAGGCTGACAGACTC。リバースプライマー（配列番号16）：5' TTCAACCCACCTCAAAATCCTTTCTTA。プローブ（配列番号17）（FAM-5'-3'-TAMRA）TCGACAGCAAGGAGAGATCAGAGCCCC。

【0091】

L984P：フォワードプライマー（配列番号18）：5' TTACGACCCGCTCAGCCC。リバースプライマー（配列番号19）：5' CTCCCAACGCCACTGACAA。プローブ（配列番号20）（FAM-5'-3'-TAMRA）：CCAGGCCGAGCCCCCTCAGAACCC。

50

【0092】

アッセイ条件は、以下のようであった：

Taqman プロトコル (7700 Perkin Elmer)：

25 μ l の最終容量において：1 \times 緩衝液 A、5 mM の MgCl₂、0.2 mM の dCTP、0.2 mM の dATP、0.4 mM の dUTP、0.2 mM の dGTP、0.01 U / μ l の AmpErase UNG、0.0375 U / μ l の TaqGold、8% (v/v) のグリセロール、0.05% (v/v) (Sigma)、ゼラチン、0.05% (v/v) (Sigma)、Tween20 0.1% v/v (Sigma)、L762P のフォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ 300 mM、(L552S、L984P、L550S、L984P) からフォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ 50 mM、各遺伝子特異的 Taqman プローブ (L552S、L550S、L984P) をそれぞれ 2 pmol、およびテンプレート cDNA。PCR 反応を、95 で 10 分間を 1 サイクル、続いて 95 で 15 秒間、60 で 1 分間、および 68 で 1 分間を 50 サイクル行った (ABI Prism 7900 HD Sequence Detection System、Foster City、CA)。

【0093】

複合アッセイにおいて各プライマーのセットは固有の長さのバンドを生じるので、目的の 4 つの遺伝子の発現シグナルを、アガロースゲル分析によって個々に測定した。4 つの遺伝子全ての組み合わせた発現シグナルも、ABI 7700 Prism 配列検出システム (Applied Biosystems、Foster City、CA) においてリアルタイムで測定し得る。特定のプライマーを本明細書中で記載したが、異なるプライマー配列、異なるプライマーまたはプローブ標識および異なる検出システムを、この複合アッセイを行うために使用し得る。例えば、2 番目の蛍光発生リポーター色素を、リアルタイム PCR による参照遺伝子の同時検出のために組み込み得る。または、例えば SYBR Green 検出システムを、Taqman プローブアプローチの代わりに使用し得る。表 2 は、異なる肺腫瘍型および正常肺組織での複合 PCR の反応性を示す。

【0094】

(表 2 肺腫瘍および正常肺における肺癌複合遺伝子 (L762P、L552S、L550S、L984P) の発現)

【0095】

【表 2】

肺腫瘍型	陽性サンプル／試験したサンプル
腺癌	21/24
扁平上皮癌	17/18
大細胞癌	5*/5
小細胞癌	5/6
正常肺組織	0/12
全腫瘍	48/53
腫瘍陽性%	90.57%

カットオフ値 = 平均正常肺 + 3SD = 0.901

* 1 つの試料はカットオフ上

(実施例 2)

(肺腫瘍の複合検出)

認められた肺抗原：L762 (配列番号 1)、L984 (配列番号 3)、L550 (配列番号 5)、L552 (配列番号 7)、L763 (配列番号 21)、および L587 (配列番号 26) の様々な組み合わせの発現を同時に検出するために、6 つのさらなる複合リ

アルタイムPCRアッセイを確立した。上記6つの群は以下からなる：

群1：L762、L552、L550およびL984

群2：L763、L552、L550およびL984

群3：L763、L552、L587およびL984

群4：L763、L550、L587およびL984

群5：L763、L550およびL587

群6：L762、L984、L550およびL587

上記の実施例1で記載したアッセイを行って、肺腫瘍における組み合わせたmRNA発現プロファイル进行分析した。L552S、L550P、L762S、L984Pのプライマーおよびプローブは、実施例1で記載した通りである。L763およびL587のプライマーおよびプローブを、以下に記載する：

10

L763S：フォワードプライマー（配列番号23）：5'ATTCCAGGCGACATCCTCACT。リバープライマー（配列番号24）：5'GTTTATCCCTGAGTCCCTGTTTCCA。プローブ（配列番号25）（FAM-5'-3'-TAMRA）：TGTTGCACCATTTGGCTTCTAGGCACTCC。

【0096】

L587：フォワードプライマー（配列番号28）：5'CCCAGAGCTGTGTATAAGGGATC。リバープライマー（配列番号29）：5'GTTAAGCGGGAATTTCAATGTACGA。プローブ（配列番号30）（FAM-5'-3'-TAMRA）：AGAACCTGAACCCGTAAAGAAAGCCTCCC。

20

【0097】

6つの複合アッセイを構成する肺抗原は、試験した全ての肺腫瘍サンプルを検出することができ、そして腺癌、扁平上皮癌、小細胞および大細胞肺腫瘍におけるそれらの組み合わせたmRNA発現プロファイル进行分析した。これらのアッセイの結果を表3に示す。

【0098】

（表3 肺腫瘍および正常肺における、肺癌複合遺伝子の発現）

【0099】

【表3-1】

30

肺腫瘍型	陽性サンプル／試験したサンプル					
	群 1	群 2	群 3	群 4	群 5	群 6
腺癌	21/24	21/24	20/24	22/24	22/24	22/24
扁平上皮癌	17/18	17/18	18/18	18/18	18/18	18/18
大細胞癌	5/5	3/5	4/5	3/5	3/5	4/5
小細胞癌	1/2	1/2	1/2	2/2	1/2	2/2
その他	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
正常肺組織	0/12	0/12	0/12	0/13	0/13	0/13

40

【0100】

【表 3 - 2】

全腫瘍	46/51	44/51	45/51	47/51	46/51	48/51
陽性腫瘍%	90.20%	86.27%	88.24%	92.16%	90.20%	94.12%
	CO= 0.9	CO=4.7	CO=1.08	CO=1.88	CO=2.2	CO=5.5

カットオフ値 (CO) = 平均正常肺 + 3SD

10

群 1、4 および 6 を用いた複合アッセイを次に使用して、種々の型の処置を受けている 17 人の肺癌患者由来の末梢血液サンプルにおいて、循環腫瘍細胞を検出した。さらに、肺抗原 L523 (配列番号 31) を用いた単一遺伝子アッセイを、配列番号 33 および 34 において記載したプライマーを用いて同時に行った。6 人の正常なドナーをコントロールとして含めた。アッセイを、上記の実施例 1 で記載したように行った。アッセイにおける検出のカットオフ値は、正常肺サンプルの平均 + 3 標準偏差である。

【0101】

群 1 抗原は、試験した 5 / 17 サンプル中で検出された。群 4 抗原は、4 / 17 サンプル中で検出され、そして群 6 抗原は 8 / 17 サンプル中で検出された。L523 は、試験した 7 / 17 サンプル中で単一遺伝子として検出された。群 6 の抗原の組み合わせが、試験した群の組織および血液における肺腫瘍検出に対して最も感受性が高かった。

20

【0102】

前述のものから、本発明の特定の実施形態が説明の目的のために本明細書中で記載されたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、種々の改変をし得ることが理解される。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲による以外に制限されない。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Zehentner-Wilkinson, Barbara K.
 Hayes, Dawn
 Houghton, Raymond L.

<120> METHODS, COMPOSITIONS AND KITS FOR THE DETECTION
 AND MONITORING OF LUNG CANCER

<130> 609WO

<140> PCT

<141> 2004-03-10

<150> US 60/457,261
 US 60/502,995

10

<151> 2003-03-24
 2003-09-15

<160> 34

<170> Corixa Invention Disclosure Database

<210> 1

<211> 3951

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

tctgcatcca tattgaaaac ctgacacaat gtatgcagca ggctcagtg gagtgaactg 60
gaggcttctc tacaacatga cccaaaggag cattgcagggt cctatttgca acctgaagtt 120
tgtgactctc ctggttgcc taaagttcaga actcccatc ctgggagctg gagtacagct 180
tcaagacaat gggatataatg gattgctcat tgcaattaat cctcaggtag ctgagaatca 240
gaacctcctc tcaaacatta aggaaatgat aactgaagct tcattttacc tatttaatgc 300
taccagagag agagtatttt tcagaaatat aaagatttta atacctgcca catggaaaagc 360
taataataac agcaaaaataa aacaagaatc atatgaaaag gcaaatgtca tagtgactga 420
ctgggtatggg gcacatggag atgatccata caccctacaa tacagagggt gtggaaaaga 480
gggaaaatac attcatttca cacctaattt cctactgaat gataacttaa cagctgggcta 540
cggatcacga ggccgagtggt ttgtccatga atgggcccac ctccgttggg gtgtgttcga 600
tgagtataac aatgacaaac cttttctacat aaatgggcaa aatcaaatta aagtgacaag 660
gtgttcatct gacatcacag gcatttttgt gtgtgaaaaa ggtccttgcc cccaagaaaa 720
ctgtattatt agtaagcttt ttaaagaagg atgcacctt atctacaata gcacccaaaa 780
tgcaactgca tcaataatgt tcatgcaaag tttatcttct gtgggtgaat tttgtaatgc 840
aagtaccac aaccaagaag caccaaacct acagaaccag atgtgcagcc tcagaagtgc 900
atgggatgta atcacagact ctgctgactt tcaccacagc tttcccatga acgggactga 960
gttccacct cctccacat tctcgttgt agaggctggt gacaaagtgg tctgtttagt 1020
gctggatgtg tccagcaaga tggcagaggc tgacagactc cttcaactac aacaagccgc 1080
agaattttat ttgatgcaga ttgttgaaat tcataacctc gtgggcattg ccagtttcga 1140
cagcaaaagg gagatcagag cccagctaca ccaaattaac agcaatgatg atcgaaagtt 1200
gctggtttca tatctgcca ccaactgtatc agctaaaaa gacatcagca tttgttcagg 1260
gcttaagaaa ggatttgagg tgggtgaaaa actgaatgga aaagcttatg gctctgtgat 1320
gatattagtg accagcggag atgataagct tcttggcaat tgcttaccga ctgtgctcag 1380
cagtggttca acaattcact ccattgccct gggttcatct gcagcccaa atctggagga 1440
attatcacgt cttacaggag gtttaagtt ctttgttcca gatatatcaa actccaatag 1500
catgattgat gcttccagta gaatttcctc tggaaactgga gacattttcc agcaacatat 1560
tcagcttgaa agtacaggty aaaatgtcaa acctcaccat caattgaaaa acacagtgc 1620
tgtggataat actgtgggca acgacactat gtttctagtt acgtggcagg ccagtgggtcc 1680

```

20

30


```

tcttgagatt atattatattg atcctgatgg acgaaaatac tacacaaata attttatcac 1740
caatcctaact ttctggacag ctagtctttg gattccagga acagctaagc ctggggcactg 1800
gacttacacc ctgaacaata cccatcatte tctgcaagcc ctgaaagtga cagtgcctc 1860
tcggcgcctcc aactcagctg tgccccagc cactgtggaa gcctttgttg aaagagacag 1920
cctccatttt cctcatcctg tgatgattta tgccaatgtg aaacagggat tttatcccat 1980
tcttaatgcc actgtcactg ccacagttga gccagagact ggagatcctg ttacgctgag 2040
actccttgat gatggagcag gtgctgatgt tataaaaaat gatggaattt actcgaggta 2100
ttttttctcc ttgtgtgcaa atggttagata tagcttgaat gtgcatgtca atcactctcc 2160
cagcataagc accccagccc actctattcc agggagtcac gctatgtatg taccagggtta 2220
cacagcaaac ggtaatatcc agatgaatgc tccaaggaaa tcagtaggca gaaatgagga 2280
ggagcgaaag tggggcttta gccgagtcag ctcaggaggg tccttttcag tgctgggagt 2340
tccagctggc cccaccctg atgtgtttcc accatgcaaa attattgacc tggagagctgt 2400
aaaagtagaa gaggaattga ccttatcttg gacagcacct ggagaagact ttgatcaggg 2460
ccaggctaca agctatgaaa taagaatgag taaaagtcta cagaatatcc aagatgactt 2520
taacaatgct attttagtaa atacatcaaa gcgaaatcct cagcaagctg gcatcaggga 2580
gatattttacg ttctcaccac aaatttccac gaatggacct gaacatcagc caaatggaga 2640
aacacatgaa agccacagaa tttatgttgc aatacagca atggtatagga actccttaca 2700
gtctgctgta tctaaccattg cccaggcgcc tctgtttatt cccccaatt ctgatcctgt 2760
acctgccaga gattatctta tattgaaagg agttttaaca gcaatggggt tgataggaat 2820
catttgctct attatagttg tgacacatca tactttaagc aggaaaaaga gaggcagaca 2880
gaaagagaat ggaacaaaat tattataaat aaatatccaa agtgtcttcc ttcttagata 2940
taagaccat ggccttcgac tacaaaaaca tactaacaat gtcaaattaa catcaaaact 3000
gtattaaaaat gcattgagtt ttgtacaat acagataaga tttttacatg gtagatcaac 3060
aaattctttt tgggggtaga ttgaaaaacc cttacacttt ggctatgaac aaataataaa 3120
aattattctt taaagttaag tctttaaagg caaagggaag ggtaaagtcg gaccagtgtc 3180
aaggaaagtt tgttttattg aggtggaaaa atagcccaa gcagagaaaa ggagggtagg 3240
tctgcattat aactgtctgt gtgaagcaat catttagtta ctttgattaa tttttctttt 3300
ctccttatct gtgcagaaca ggttgcttgt ttacaactga agatcatgct atatttcata 3360
tatgaagccc ctaatgcaaa gctctttacc tcttgctatt ttgttatata tattacagat 3420
gaaatctcac tgctaagtct cagagatctt ttttactgt aagaggtaac ctttaacaat 3480
atgggtakta cctttgtctc ttcataccgg ttttatgaca aaggtctatt gaatttattt 3540
gtttgtaagt ttctactccc atcaaagcag ctttttaagt tattgccttg gttattatgg 3600
atgatatgta tagcccttat aatgccttaa ctaagggaaga aaagatgtta ttctgagttt 3660
gttttaatac atatatgaac atatagtttt attcaattaa accaaagaag aggtcagcag 3720
ggagatacta acctttggaa atgattagct ggctctgttt ttgggttaaa taagagtctt 3780
taatcctttc tccatcaaga gttacttacc aagggcaggg gaagggggat atagaggtcc 3840
caaggaaata caaatcatct ttcatcttta attttactcc ttctctctat ttttttaaaa 3900
gattatcgaa caataaaatc atttgccttt ttaattaaaa acataaaaaa a 3951

```

<210> 2
<211> 943
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

<400> 2
Met Thr Gln Arg Ser Ile Ala Gly Pro Ile Cys Asn Leu Lys Phe Val
1 5 10 15
Thr Leu Leu Val Ala Leu Ser Ser Glu Leu Pro Phe Leu Gly Ala Gly
20 25 30
Val Gln Leu Gln Asp Asn Gly Tyr Asn Gly Leu Leu Ile Ala Ile Asn
35 40 45
Pro Gln Val Pro Glu Asn Gln Asn Leu Ile Ser Asn Ile Lys Glu Met
50 55 60
Ile Thr Glu Ala Ser Phe Tyr Leu Phe Asn Ala Thr Lys Arg Arg Val
65 70 75 80
Phe Phe Arg Asn Ile Lys Ile Leu Ile Pro Ala Thr Trp Lys Ala Asn
85 90 95
Asn Asn Ser Lys Ile Lys Gln Glu Ser Tyr Glu Lys Ala Asn Val Ile

```

10

20

30

30

20

30

[illegible]

```

ggccagccct cagggggcgg tcacaagtca gcgccaagc aagtcaagcg acagcgctcg 300
tcttcgccc aactgatgcg ctgcaaagcg cggctcaact tcagcggctt tggctacagc 360
ctgcccgcagc agcagccggc cgccgtggcg cgccgcaacg agcgcgagcg caaccgcgtc 420
aagttgggtca acctggggctt tgccaccctt cgggagcagc tccccaacgg cgcggccaac 480
aagaagatga gtaaggtgga gacactgcgc tcggcggtcg agtacatccg cgcgctgcag 540
cagctgctgg acgagcatga cgcggtgagc gccgccttcc aggcaggcgt cctgtcgccc 600
accatctccc ccaactactc caacgaattg aactccatgg ccggctcgcc ggtctcatcc 660
tactcgtcgg acgagggctc ttacgaccgg ctcagccccg aggcagcagga gcttctcgac 720
ttcaccaact ggttctgagg ggctcgccct ggtcaggccc tgggtcggaat ggactttgga 780
agcag

```

<210> 4
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

```

<400> 4
Met Glu Ser Ser Ala Lys Met Glu Ser Gly Gly Ala Gly Gln Gln Pro
1 5 10 15
Gln Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Leu Pro Pro Ala Ala Cys Phe Phe
20 25 30
Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln
35 40 45
Ser Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ala Pro
50 55 60
Gln Leu Arg Pro Ala Ala Asp Gly Gln Pro Ser Gly Gly Gly His Lys
65 70 75 80
Ser Ala Pro Lys Gln Val Lys Arg Gln Arg Ser Ser Ser Pro Glu Leu
85 90 95
Met Arg Cys Lys Arg Arg Leu Asn Phe Ser Gly Phe Gly Tyr Ser Leu
100 105 110
Pro Gln Gln Gln Pro Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg
115 120 125
Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Ala Thr Leu Arg Glu His
130 135 140
Val Pro Asn Gly Ala Ala Asn Lys Lys Met Ser Lys Val Glu Thr Leu
145 150 155 160
Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Gln Leu Leu Asp Glu
165 170 175
His Asp Ala Val Ser Ala Ala Phe Gln Ala Gly Val Leu Ser Pro Thr
180 185 190
Ile Ser Pro Asn Tyr Ser Asn Asp Leu Asn Ser Met Ala Gly Ser Pro
195 200 205
Val Ser Ser Tyr Ser Ser Asp Glu Gly Ser Tyr Asp Pro Leu Ser Pro
210 215 220
Glu Glu Gln Glu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Trp Phe
225 230 235

```

20

<210> 5
 <211> 1633
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

```

<400> 5
cgtggaggca gctagcgcga ggctggggag cgctgagccg cgcgtcgtgc cctgcgctgc 60
ccagactagc gaacaataca gtccggatgg ctaaagggtga cccaagaaa ccaaggggca 120
agacgtccgc ttatgccttc ttgtgcaga catgcagaga agaacataag aagaaaaacc 180
cagaggtccc tgtcaatttt gcggaatttt ccaagaagtg ctctgagagg tggaagacgg 240

```

```

tgtccgggaā agagaaatcc aaatttgatg aaatggcaaa ggcagataaa gtgcgctatg 300
atcgggaaat gaaggattat ggaccagcta agggaggcaa gaagaagaag gatcctaagt 360
ctcccaaaag gccacgtctt ggattcttcc tgttctgttc agaattccgc cccaagatca 420
aatccacaaa ccccggtatc tctattggag acgtggcaaa aaagctgggt gagatgtgga 480
ataattttaa tgacagttaa aagcagcctt acatcactaa ggcggcaaa ctgaaggaga 540
agtatgagaa ggaagtgtgt gactataagt cgaaaggaaa gtttgatggt gcaaagggtc 600
ctgctaagt tgcccgaaa aaggtggaag aggaagatga agaacaggag gaggaagaag 660
aggaggagga ggaggaggag gatgaataaa gaaactgttt atctgtctcc ttgtgaatac 720
ttagagtagg ggagcgccgt aattgacaca tctcttattt gagaagtgtc tgttgccctc 780
attaggttta attacaaaat ttgatcacga tcatattgta gtctctcaaa gtgctctaga 840
aattgtcagt gggttacatg aagtggccat gggtgtctgg agcacccctga aactgtatca 900
aagttgtaca tatttccaaa catttttaa atgaaaaggc actctcgtgt tctcctcact 960
ctgtgcactt tgctgttggt gtgacaaggc atttaaagat gtttctggca ttttcttttt 1020
atttgaagg tggtggtaac tatggttatt ggctagaaat cctgagtttt caactgtata 1080
tatctatagt ttgtaaaaag aacaaaacaa ccgagacaaa ccttgatgac tcttctctcg 1140
gcgttgaggc tgtggggaag atcccttttg ggagaggctg tagctcaggc cgtgcactgt 1200
gaggctggac ctgttgactc tgcagggggc atccatttag cttcaggttg tcttgtttct 1260
gtatatagt acatagcatt ctgctgccat cttagctgtg gacaaaaggg ggtcagctgg 1320
catgagaata ttttttttta agtgcggtag tttttaaact gtttgttttt aaacaaacta 1380
tagaactcct cattgtcagc aaagcaaaga gtcactgcat caatgaaagt tcaagaacct 1440
cctgtactta aacacgattc gcaacgttct gttatttttt ttgtatgttt agaatgctga 1500
aatgtttttg aagttaaata aacagtatta catttttaga actcttctct actataacag 1560
tcaatttctg actcagacga gtgaacaaac cccactccg ttgtatttgg agactggcct 1620
ccctataaat gtg 1633

```

```

<210> 6
<211> 200
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 6
Met Ala Lys Gly Asp Pro Lys Lys Pro Lys Gly Lys Met Ser Ala Tyr
1 5 10 15
Ala Phe Phe Val Gln Thr Cys Arg Glu Glu His Lys Lys Lys Asn Pro
20 25 30
Glu Val Pro Val Asn Phe Ala Glu Phe Ser Lys Lys Cys Ser Glu Arg
35 40 45
Trp Lys Thr Met Ser Gly Lys Glu Lys Ser Lys Phe Asp Glu Met Ala
50 55 60
Lys Ala Asp Lys Val Arg Tyr Asp Arg Glu Met Lys Asp Tyr Gly Pro
65 70 75 80
Ala Lys Gly Gly Lys Lys Lys Asp Pro Asn Ala Pro Lys Arg Pro
85 90 95
Pro Ser Gly Phe Phe Leu Phe Cys Ser Glu Phe Arg Pro Lys Ile Lys
100 105 110
Ser Thr Asn Pro Gly Ile Ser Ile Gly Asp Val Ala Lys Lys Leu Gly
115 120 125
Glu Met Trp Asn Asn Leu Asn Asp Ser Glu Lys Gln Pro Tyr Ile Thr
130 135 140
Lys Ala Ala Lys Leu Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Asp Val Ala Asp Tyr
145 150 155 160
Lys Ser Lys Gly Lys Phe Asp Gly Ala Lys Gly Pro Ala Lys Val Ala
165 170 175
Arg Lys Lys Val Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
180 185 190
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu
195 200

```

10

20

30

<210> 7
 <211> 781
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 ggggaggagc tgtgagccgg cgactcgggt ccctgagggtc tggattcttt ctccgctact 60
 gagacacggc gggtaggtcc acaggcagat ccaactggga gttgaagtgt gaggtagagt 120
 gaagaggaac cagcaggctt ccggagggtt gtgtgggtcag tgactcagag tgagaaggcc 180
 ctggaagtcg tcgtccctct catgagggtgc cagcccatg gaccttcttg tctcgtcacg 240
 gccataacta gggagggaag agggccgagg agtggagggtg ctcaggcgaa gctgggggtgc 300
 tgttgggggt atccgagtc cagaagcacc tggaaacccg acagaagatt ctggactccc 360
 cagacgggac caggagaggg acggcatgag cgacacacac aaacacagaa ccacacagcc 420
 agtcccagga gccagtaat ggagagcccc aaaaagaaga accagcagct gaaagtcggg 480
 atcctacacc tgggcagcag acagaagaag atcaggatac agctgagatc ccagtgcgcg 540
 acatggaagg tgatctgcaa gagctgcatc agtcaaacac cggggataaa tctggatttg 600
 ggttccggcg tcaaggtgaa gataatacct aaagaggaac actgtaaaat gccagaagca 660
 ggtgaagagc aaccacaagt ttaaatgaag acaagctgaa acaacgcaag ctggttttat 720
 attagatatt tgacttaaac tatctcaata aagttttgca gctttcacca aaaaaaaaaa 780
 a 781

10

<210> 8
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 Met Arg Cys His Ala His Gly Pro Ser Cys Leu Val Thr Ala Ile Thr
 1 5 10 15
 Arg Glu Glu Gly Gly Pro Arg Ser Gly Gly Ala Gln Ala Lys Leu Gly
 20 25 30
 Cys Cys Trp Gly Tyr Pro Ser Pro Arg Ser Thr Trp Asn Pro Asp Arg
 35 40 45
 Arg Phe Trp Thr Pro Gln Thr Gly Pro Gly Glu Gly Arg His Glu Arg
 50 55 60
 His Thr Gln Thr Gln Asn His Thr Ala Ser Pro Arg Ser Pro Val Met
 65 70 75 80
 Glu Ser Pro Lys Lys Lys Asn Gln Gln Leu Lys Val Gly Ile Leu His
 85 90 95
 Leu Gly Ser Arg Gln Lys Lys Ile Arg Ile Gln Leu Arg Ser Gln Cys
 100 105 110
 Ala Thr Trp Lys Val Ile Cys Lys Ser Cys Ile Ser Gln Thr Pro Gly
 115 120 125
 Ile Asn Leu Asp Leu Gly Ser Gly Val Lys Val Lys Ile Ile Pro Lys
 130 135 140
 Glu Glu His Cys Lys Met Pro Glu Ala Gly Glu Glu Gln Pro Gln Val
 145 150 155 160

20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 gacggcatga gcgacacaca

20

<210> 10

30

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 ccatgtcgcg cactgggac 20

<210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 ctgaaagtcg ggatcctaca cctgggca 28

10

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 ggccaccgctc tggattcttc 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 gaagaatcca gacggtggcc 20

20

<210> 14
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 ccgcccccaag atcaaatacca caaacc 26

<210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 atggcagagg ctgacagact c 21

<210> 16
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<400> 16
 ttcaaccacc tcaaatacctt tctta 25

<210> 17
 <211> 27
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 17

tcgacagcaa aggagagatc agagccc

27

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 18

ttacgacccg ctcagccc

18

<210> 19

<211> 19

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

ctcccaacgc cactgacaa

19

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

ccaggccgag ccctcagaa cc

22

<210> 21

<211> 1800

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gcgcctcatt gccactgcag tgactaaagc tgggaagacg ctgggtcagtt cacctgcccc 60
 actgggttgtt ttttaaacaa attctgatac aggcgacatc ctcactgacc gagcaaagat 120
 tgacattcgt atcatcactg tgcaccattg gcttctaggg actccagtgg ggtaggagaa 180
 ggagggtctga aaccctcgca gagggatctt gccctcattc tttgggtctg aaacactggc 240
 agtcgttggga aacaggactc agggataaac cagcgcaatg gattggggga cgctgcacac 300
 tttcatcggg ggtgtcaaca aacactccac cagcatcggg aagggtgtgga tcacagtcac 360
 ctttattttc cgagtcatga tcctagtggg ggctgcccag gaagtgtggg gtgacgagca 420
 agaggacttc gtctgcaaca cactgcaacc gggatgcaaa aatgtgtgct atgaccactt 480
 tttcccggtg tcccacatcc ggctgtgggc cctccagctg atcttctgtc cacccccagc 540
 gctgctgggt gccatgcatt tggcctacta caggcacgaa accactcgca agttcaggcg 600
 aggagagaag aggaatgatt tcaaagacat agaggacatt aaaaagcaca aggttcggat 660
 agaggggtcg ctgtgggtga cgtacaccag cagcatcttt tccggaatca tctttgaagc 720
 agcctttatg tatgtgtttt acttccttta caatgggtac cacttgcctt ggggtgttga 780
 atgtgggatt gacccctgcc ccaaccttgt tgactgcttt atttctaggg caacagagaa 840
 gaccgtgttt accattttta tgatttctgc gtctgtgatt tgcattgctg ttaacgtggc 900
 agagttgtgc tacctgtctg tgaaagtgtg ttttaggaga tcaaagagag cacagacgca 960
 aaaaaatcac cccaatcatg cctaagagga gagtaagcag aatgaaatga atgagctgat 1020
 ttcatagatg ggtcaaaatg caatcacagg tttcccaagc taaacatttc aaggtaaaat 1080
 gtagctgctg cataaggaga cttctgtctt ctccagaagg caataccaac ctgaaaagttc 1140
 cttctgtagc ctgaagagtt tgtaaatgac tttcataata aatagacact tgagtttaact 1200
 tttttaggga tacttgctcc attcatacac aacgtaatca aatatgtggg ccatctctga 1260
 aaacaagaga ctgcttgaca aaggagcatt gcagtcactt tgacagggtt cttttaagtg 1320
 gactctctga caaagtgggt actttctgaa aatttatata actgttgggtg ataaggaaca 1380

10

20

30


```

tttatccagg aattgatacg tttattagga aaagatatatt ttataggctt ggatgttttt 1440
agttccgact ttgaatttat ataaagtatt tttataatga ctggtcttcc ttacctggaa 1500
aaacatgcga tgtagtattt agaattacac cacaagtatc taaatttcca acttacaaag 1560
ggtccatctc tgtaaatatt gttttgcatt gtctgttggc aaatttgtga actgtcatga 1620
tacgcttaag gtgggaaagt gttcattgca caatatattt ttactgcttt ctgaatgtag 1680
acggaacagt gtggaagcag aaggcttttt taactcatcc gtttggccga tcgttgcaga 1740
ccactgggag atgtggatgt ggttgcctcc ttttgctcgt ccccgaggct taacccttct 1800

```

```

<210> 22
<211> 261
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 22
Met Asp Trp Gly Thr Leu His Thr Phe Ile Gly Gly Val Asn Lys His
1      5      10      15
Ser Thr Ser Ile Gly Lys Val Trp Ile Thr Val Ile Phe Ile Phe Arg
20     25     30
Val Met Ile Leu Val Val Ala Ala Gln Glu Val Trp Gly Asp Glu Gln
35     40     45
Glu Asp Phe Val Cys Asn Thr Leu Gln Pro Gly Cys Lys Asn Val Cys
50     55     60
Tyr Asp His Phe Phe Pro Val Ser His Ile Arg Leu Trp Ala Leu Gln
65     70     75     80
Leu Ile Phe Val Ser Thr Pro Ala Leu Leu Val Ala Met His Val Ala
85     90     95
Tyr Tyr Arg His Glu Thr Thr Arg Lys Phe Arg Arg Gly Glu Lys Arg
100    105    110
Asn Asp Phe Lys Asp Ile Glu Asp Ile Lys Lys His Lys Val Arg Ile
115    120    125
Glu Gly Ser Leu Trp Trp Thr Tyr Thr Ser Ser Ile Phe Phe Arg Ile
130    135    140
Ile Phe Glu Ala Ala Phe Met Tyr Val Phe Tyr Phe Leu Tyr Asn Gly
145    150    155    160
Tyr His Leu Pro Trp Val Leu Lys Cys Gly Ile Asp Pro Cys Pro Asn
165    170    175
Leu Val Asp Cys Phe Ile Ser Arg Pro Thr Glu Lys Thr Val Phe Thr
180    185    190
Ile Phe Met Ile Ser Ala Ser Val Ile Cys Met Leu Leu Asn Val Ala
195    200    205
Glu Leu Cys Tyr Leu Leu Leu Lys Val Cys Phe Arg Arg Ser Lys Arg
210    215    220
Ala Gln Thr Gln Lys Asn His Pro Asn His Ala Leu Lys Glu Ser Lys
225    230    235    240
Gln Asn Glu Met Asn Glu Leu Ile Ser Asp Ser Gly Gln Asn Ala Ile
245    250    255
Thr Gly Phe Pro Ser
260

```

```

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 23
attccaggcg acatcctcac t

```

10

20

30

21

40

<210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 gtttatccct gagtcctgtt tcca 24

<210> 25
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 tgtgcacccat tggcttctag gcactcc 27

<210> 26
 <211> 2257
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 attttgttta cagagtcctcg tctcaccatc ctgggcttcc aacggagact ggggtatccg 60
 cggtctggaga ccagcggcg agtagccttt tgcctccgga cggacttgag aggcctaaag 120
 gatggcctcg tcagatctgg aacaattatg ctctcatggt aatgaaaaga ttggcaatat 180
 taagaaaacc ttatcattaa gaaactgtgg ccaggaaact accttgaaaa ctgtattaaa 240
 taaaatagga gatgagatca ttgtaataaa tgaacttcta aataaattgg aattggaaat 300
 tcagtatcaa gaacaaacca acaattcact caaggaaact tgtgaatctc ttgaagaaga 360
 ttacaaagac atagaacatc ttaaagaaaa cgttccttcc catttgctc aagtaacagt 420
 aacccagagc tgtgttaagg gatcagatct tgatcctgaa gaaccaatca aagttgaaga 480
 acctgaacc gtaaagaagc ctcccaaga gcaaagaagt attaaggaaa tgccatttat 540
 aacttgtgat gagttcaatg gtgttcttcc gtacatgaaa tcccgcttaa cctataatca 600
 aattaatgat gttattaaag aaatcaacaa ggcagtaatt agtaaatata aaatcctaca 660
 tcagccaaaa aagtcctatga attctgtgac cagaaatctc tatcacagat ttattgatga 720
 agaaaacgaag gatcccaaaag gtcgttattt tatagtggaa gctgacataa aggagttcac 780
 aactttgaaa gctgacaaga agtttcacgt gttactgaat attttacgac actgcggag 840
 gctatcagag gtccgagggg gaggacttac tcgttatggt ataacctgag tcccttgta 900
 acttttgaaac ataccaacag ggtatagagt atagaggcta tttctataat tttcttatat 960
 ataatttttt taacttttaa tctttttgt ttcctttttt ttttttttga gacaggatct 1020
 tgctttgtca ccaggggct tgctttgtca cgcaggctag agtgagtggt cgcaaacatg 1080
 gctcactgca gcctcaacct ccagggtcca agtgatcctc ccacctcagc cccctgaatg 1140
 gctgggacta caagcgtgct ccacctgccc tggctaattt ttgtattttt tggagagatg 1200
 ggttttcacc atgttgctta ggctggctt gagctcctga gctcaaaaaa tccacctcc 1260
 tcagcctccc aaagtgtctg gattacaggg ttgagccaac acacctgacc tattcttgtt 1320
 tcttataaaa ataaaacttt ttgggataaa gcttatttct tgtttttttc ttttctttt 1380
 tttttttttt tcgagactcc atctcagaaa aaaagaaaaa aagactgggt acagatgtga 1440
 tattggaaga aaaagatcaa gctgatgagg ttaggatacc caggcccttt ggacttaaag 1500
 atcactagtg tctaaattcc atcgatggca ttctagctta taggtaaact tccctggaagc 1560
 tggatttga gacagtttat catctgatta ttgggctttc gtataggtcc ttagggagca 1620
 gcttacctga aatgcattta gtgtacacca gtctgtaaac ttcaacctgt aatgaaagt 1680
 taataaatgt acattgagtt gatgtgataa tgtgatataa taagaaatat atatttgatc 1740
 ttccatctta gttccttgtt cagagctcct aaaacccttg taattttcaa agtgatggag 1800
 tacatctttt gttctagtat ttggctcttt accccagttc ctgacacaaa gctcctaaat 1860
 tcttttaaat tttccagtga tagggagaatt ttttgttcta atgaggtcac tcttgatggg 1920
 cactggata actcaggatg ggggctgctc acaaagacca catcatgatt ggaagtttca 1980
 aactttcagt ctcccacctc cagagagggg agaggggctg gagattttgt tcaataatcc 2040
 atcaggccta tgtcaacaag acataatccg ttaactatgg agttcaggga gcttcagggt 2100

10

20

30

tggcaaacat ttgatgtgc caggaaggtg acgcactcca gctttatgaa gtcagcaagt 2160
 cctgtgctca ggatgcttyt ggaccttgcc ccagggtaccc attcatgtgg ctgttggtca 2220
 tctgtatcct ttgtagtagc cttaaaataa actgtta 2257

<210> 27
 <211> 255
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Met Ala Ser Ser Asp Leu Glu Gln Leu Cys Ser His Val Asn Glu Lys
 1 5 10 15
 Ile Gly Asn Ile Lys Lys Thr Leu Ser Leu Arg Asn Cys Gly Gln Glu
 20 25 30
 Pro Thr Leu Lys Thr Val Leu Asn Lys Ile Gly Asp Glu Ile Ile Val
 35 40 45
 Ile Asn Glu Leu Leu Asn Lys Leu Glu Leu Glu Ile Gln Tyr Gln Glu
 50 55 60
 Gln Thr Asn Asn Ser Leu Lys Glu Leu Cys Glu Ser Leu Glu Glu Asp
 65 70 75 80
 Tyr Lys Asp Ile Glu His Leu Lys Glu Asn Val Pro Ser His Leu Pro
 85 90 95
 Gln Val Thr Val Thr Gln Ser Cys Val Lys Gly Ser Asp Leu Asp Pro
 100 105 110
 Glu Glu Pro Ile Lys Val Glu Glu Pro Glu Pro Val Lys Lys Pro Pro
 115 120 125
 Lys Glu Gln Arg Ser Ile Lys Glu Met Pro Phe Ile Thr Cys Asp Glu
 130 135 140
 Phe Asn Gly Val Pro Ser Tyr Met Lys Ser Arg Leu Thr Tyr Asn Gln
 145 150 155 160
 Ile Asn Asp Val Ile Lys Glu Ile Asn Lys Ala Val Ile Ser Lys Tyr
 165 170 175
 Lys Ile Leu His Gln Pro Lys Lys Ser Met Asn Ser Val Thr Arg Asn
 180 185 190
 Leu Tyr His Arg Phe Ile Asp Glu Thr Lys Asp Thr Lys Gly Arg
 195 200 205
 Tyr Phe Ile Val Glu Ala Asp Ile Lys Glu Phe Thr Thr Leu Lys Ala
 210 215 220
 Asp Lys Lys Phe His Val Leu Leu Asn Ile Leu Arg His Cys Arg Arg
 225 230 235 240
 Leu Ser Glu Val Arg Gly Gly Gly Leu Thr Arg Tyr Val Ile Thr
 245 250 255

10

20

<210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30

<400> 28
 cccagagctg tgtaaaggga tc

22

<210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 29
gttaagcggg atttcatgta cga

23

<210> 30
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 30
agaacctgaa cccgtaaaga agcctccc

28

<210> 31
<211> 1740
<212> DNA
<213> Homo sapiens

10

<400> 31
atgaacaaac tgtatatcgg aaacctcagc gagaacgccc cccctcggga cctagaaagt 60
atcttcaagg acgccaagat cccgggtgtc ggacccttcc tgggtgaagac tggctacgcg 120
ttcgtggact gcccgagcga gagctggggc ctcaaggcca tcgaggcgct ttcaggtaaa 180
atagaactgc acgggaaacc catagaagtt gagcactcgg tcccaaaaag gcaaaggatt 240
cggaaacttc agatacgaaa tatcccgccct catttacagt gggaggtgct ggatagtta 300
ctagtccagt atggagtggg ggagagctgt gagcaagtga acactgactc gaaaactgca 360
gttgtaaatg taacctattc cagtaaggac caagctagac aagcactaga caaactgaat 420
ggatcttcagt tagagaattt caccttgaaa gtacccata tccctgatga aacggccgcc 480
cagcaaaacc ccttgacgca gccccgaggt cgcggggggc ttgggcagag gggctcctca 540
aggcaggggt ctccaggatc cgtatccaag cagaaacccat gtgatttgcc tctgcgcctg 600
ctgggttccca cccaatttgt tggagccatc ataggaaaag aaggtgccac cattcggaac 660
atcaccaaac agaccagtc taaaatcgat gtccaccgta aagaaaatgc gggggctgct 720
gagaagtcca ttactatcct ctctactcct gaaggcacct ctgcggcttg taagtctatt 780
ctggagatta tgcataagga agctcaagat ataaaattca cagaagagat ccccttgaag 840
atcttagctc ataataactt tgttggacgt cttattggta aagaagggaag aaatcttaaa 900
aaaattgagc aagacacaga cactaaaatc acgatatctc cattgcagga attgacgctg 960
tataatccag aacgcactat tacagttaaa ggcaatgttg agacatgtgc caaagctgag 1020
gaggagatca tgaagaaaat cagggagtct tatgaaaatg atattgcttc tatgaatctt 1080
caagcacatt taattcctgg attaaatctg aacgccttgg gtctgttccc acccacttca 1140
gggatgccac ctcccacctc agggccccct tcagccatga ctctcccta cccgcagttt 1200
gagcaatcag aaacggagac tgttcacatg tttatcccag ctctatcagt cggtgccatc 1260
atcggcaagc agggccagca catcaagcag ctttctcgtc ttgctggagc ttcaattaag 1320
attgctccag cggaagcacc agatgctaaa gtgaggatgg tgattatcac tggaccacca 1380
gaggctcagt tcaaggctca ggggaagaatt tatggaaaaa ttaagaaga aaactttgtt 1440
agtccataag aagaggtgaa acttgaagct catatcagag tgccatcctt tgctgctggc 1500
agagttattg gaaaaggagg caaaacggtg aatgaacttc agaatttgtc aagtgcagaa 1560
gttggtgtcc ctctgaccca gacacctgat gagaatgacc aagtgggtgt caaaataact 1620
ggtcacttct atgcttgcca ggttgcccag agaaaaattc aggaattctt gactcaggta 1680
aagcagcacc aacaacagaa ggctctgcaa agtggaccac ctctagtcag acggaagtaa 1740

20

30

<210> 32
<211> 579
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Met Asn Lys Leu Tyr Ile Gly Asn Leu Ser Glu Asn Ala Ala Pro Ser

1	5	10	15
Asp Leu Glu Ser Ile Phe Lys Asp Ala Lys Ile Pro Val Ser Gly Pro			
20	25	30	
Phe Leu Val Lys Thr Gly Tyr Ala Phe Val Asp Cys Pro Asp Glu Ser			
35	40	45	
Trp Ala Leu Lys Ala Ile Glu Ala Leu Ser Gly Lys Ile Glu Leu His			
50	55	60	
Gly Lys Pro Ile Glu Val Glu His Ser Val Pro Lys Arg Gln Arg Ile			
65	70	75	80
Arg Lys Leu Gln Ile Arg Asn Ile Pro Pro His Leu Gln Trp Glu Val			
85	90	95	
Leu Asp Ser Leu Leu Val Gln Tyr Gly Val Val Glu Ser Cys Glu Gln			
100	105	110	
Val Asn Thr Asp Ser Glu Thr Ala Val Val Asn Val Thr Tyr Ser Ser			
115	120	125	
Lys Asp Gln Ala Arg Gln Ala Leu Asp Lys Leu Asn Gly Phe Gln Leu			
130	135	140	
Glu Asn Phe Thr Leu Lys Val Ala Tyr Ile Pro Asp Glu Thr Ala Ala			
145	150	155	160
Gln Gln Asn Pro Leu Gln Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gly Leu Gly Gln			
165	170	175	
Arg Gly Ser Ser Arg Gln Gly Ser Pro Gly Ser Val Ser Lys Gln Lys			
180	185	190	
Pro Cys Asp Leu Pro Leu Arg Leu Leu Val Pro Thr Gln Phe Val Gly			
195	200	205	
Ala Ile Ile Gly Lys Glu Gly Ala Thr Ile Arg Asn Ile Thr Lys Gln			
210	215	220	
Thr Gln Ser Lys Ile Asp Val His Arg Lys Glu Asn Ala Gly Ala Ala			
225	230	235	240
Glu Lys Ser Ile Thr Ile Leu Ser Thr Pro Glu Gly Thr Ser Ala Ala			
245	250	255	
Cys Lys Ser Ile Leu Glu Ile Met His Lys Glu Ala Gln Asp Ile Lys			
260	265	270	
Phe Thr Glu Glu Ile Pro Leu Lys Ile Leu Ala His Asn Asn Phe Val			
275	280	285	
Gly Arg Leu Ile Gly Lys Glu Gly Arg Asn Leu Lys Lys Ile Glu Gln			
290	295	300	
Asp Thr Asp Thr Lys Ile Thr Ile Ser Pro Leu Gln Glu Leu Thr Leu			
305	310	315	320
Tyr Asn Pro Glu Arg Thr Ile Thr Val Lys Gly Asn Val Glu Thr Cys			
325	330	335	
Ala Lys Ala Glu Glu Ile Met Lys Lys Ile Arg Glu Ser Tyr Glu			
340	345	350	
Asn Asp Ile Ala Ser Met Asn Leu Gln Ala His Leu Ile Pro Gly Leu			
355	360	365	
Asn Leu Asn Ala Leu Gly Leu Phe Pro Pro Thr Ser Gly Met Pro Pro			
370	375	380	
Pro Thr Ser Gly Pro Pro Ser Ala Met Thr Pro Pro Tyr Pro Gln Phe			
385	390	395	400
Glu Gln Ser Glu Thr Glu Thr Val His Leu Phe Ile Pro Ala Leu Ser			
405	410	415	
Val Gly Ala Ile Ile Gly Lys Gln Gly Gln His Ile Lys Gln Leu Ser			
420	425	430	
Arg Phe Ala Gly Ala Ser Ile Lys Ile Ala Pro Ala Glu Ala Pro Asp			
435	440	445	
Ala Lys Val Arg Met Val Ile Ile Thr Gly Pro Pro Glu Ala Gln Phe			
450	455	460	
Lys Ala Gln Gly Arg Ile Tyr Gly Lys Ile Lys Glu Glu Asn Phe Val			

10

20

30

10

20

30

<400> 34
ctgagaaaag ctctggcctt aaac 24

【手続補正書】
【提出日】平成18年4月17日(2006.4.17)
【手続補正1】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】配列表
【補正方法】追加
【補正の内容】
【配列表】

2006521110000001.app

【 国際調査報告 】

		International application No. PCT/US04/07451
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07H 21/04; C12P 19/34 US CL : 435/6, 91.1, 91.2 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/6, 91.1, 91.2		
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) WEST, MEDLINE, ISSUED PATENTS, PUBLISHED APPLICATIONS, EST, GENEMBL, GENESEQ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02.02623 A2 (WANG et al) 10 January 2002 (10.01.2002), see entire reference, especially pages 28-47, 110-112, example 1 and SEQ ID NO: 453.	1-4
X	WO 02/004514 A2 (WANG et al) 17 January 2002 (17.01.2002), see entire reference, especially pages 7-8, 56, 78-81, 86-89, 95-98 and 143-149 and SEQ ID NO: 1868.	1-4
X	US 6,482,597 B1 (WANG et al) 19 November 2002 (19.11.2002), see column 1-50, 213-220, 251 and 252, especially columns 3-4, 35-36 and SEQ ID NO: 158 and 160.	1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 21 January 2005 (21.01.2005)		Date of mailing of the international search report 22 APR 2005
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. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Mama H. Wilder</i> Cynthia B. Wilder, Ph.D. Telephone No. (571) 272-1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US04/074314

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐

In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

フロントページの続き

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

(72)発明者 ツェーエントナー - ウィルキンソン, バーバラ ケー.
アメリカ合衆国 ワシントン 98370, ポールスパー, エヌイー ハーバー ビュー ド
ライブ 7770

(72)発明者 ヘーズ, ドーン シー. ジェイ.
アメリカ合衆国 ワシントン 98050, プレストン, 308ティーエイチ アベニュー
エスイー 8309

(72)発明者 ホートン, レイモンド エル.
アメリカ合衆国 ワシントン 98021, ボセル, 242エヌディー プレイス エスイー
- 2636

F ターム(参考) 4B024 AA12 CA04 CA05 CA06 CA09 CA12 GA18 HA08 HA09 HA12
HA14
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ53 QQ58 QR08 QR32
QR36 QR42 QR55 QR62 QR66 QR77 QS10 QS12 QS16 QS25
QS34 QS36 QX02 QX07