

(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2019-515035

(P2019-515035A)

(43) 公表日 令和1年6月6日(2019.6.6)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 45/06 (2006.01)	A 61 K 45/06	2 G 04 5
G 01 N 33/50 (2006.01)	G 01 N 33/50	P 4 B 06 3
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00	4 C 08 4
A 61 K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	4 C 08 5
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	1 2 1

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-508162 (P2019-508162)	(71) 出願人	518381008 ミラ ディーエックス、 インコーポレイ テッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 900 25, ロサンゼルス, ウィルシェア ブルバード 11600, スイート 410
(86) (22) 出願日	平成29年4月27日 (2017.4.27)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成30年12月20日 (2018.12.20)	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(86) 國際出願番号	PCT/US2017/029938	(74) 代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(87) 國際公開番号	W02017/189906	(74) 代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(87) 國際公開日	平成29年11月2日 (2017.11.2)		
(31) 優先権主張番号	62/328,548		
(32) 優先日	平成28年4月27日 (2016.4.27)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 K R A S バリアントがん患者の免疫ベースの処置

(57) 【要約】

本発明は、免疫療法を、他の従来のがん処置と組み合わせてがん患者に投与する方法を対象とし、前記投与は、K R A S バリアントの存在に依存する。本発明は、がん患者が免疫療法に応答する尤度の増大を、K R A S バリアントの存在に基づいて決定するための診断方法をさらに提供する。本発明は、K R A S バリアントを有する被験体は、免疫系を変化させているという発見に関する。具体的には、本明細書に記載されるように、K R A S バリアント被験体は、成功したがんの処置について利用される、弱化した免疫系を有することが示されている。本明細書に記載されるように、そのような免疫系は、適当な免疫調節剤の投与により、強化または刺激することができる。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

がん被験体を処置する方法であって、免疫療法を、1種または複数の従来のがん処置と組み合わせて前記被験体に投与することを含み、前記投与はK R A S バリアントの存在に依存する、方法。

【請求項 2】

前記被験体が、1種または複数の従来のがん処置で処置されているかまたは前に処置されたことがある、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記1種または複数の従来のがん処置が、化学療法、放射線療法、または手術を含む、請求項1に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記がんが、乳がん、卵巣がん、非小細胞肺がん、結腸直腸がんまたは頭頸部がんである、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

患者試料中のK R A S の1 e t - 7相補性部位6の4位における一塩基多型(S N P)を検出することを含み、前記S N Pの存在が、前記被験体のための免疫療法の有益な効果の増大を示す、請求項1に記載の方法。

【請求項 6】

前記免疫療法が免疫賦活分子の投与を含む、請求項1に記載の方法。 20

【請求項 7】

前記免疫賦活分子が、T細胞活性化因子である、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記免疫賦活分子が、樹状細胞活性化／成熟因子である、請求項6に記載の方法。

【請求項 9】

前記免疫療法が、モノクローナル抗体またはその断片の投与を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 10】

前記モノクローナル抗体が、がん細胞の表面に発現された抗原に特異的である、請求項9に記載の方法。 30

【請求項 11】

前記免疫療法が抗E G F R 抗体療法である、請求項1に記載の方法。

【請求項 12】

前記免疫療法がセツキシマブである、請求項11に記載の方法。

【請求項 13】

前記一塩基多型が、配列番号13の4位におけるGである、請求項5に記載の方法。

【請求項 14】

K R A S バリアントがん被験体のための免疫療法の有益な効果の増大を予測する方法であって、患者試料中のK R A S の1 e t - 7相補性部位6の4位における一塩基多型(S N P)を検出することを含み、前記S N Pの存在が免疫療法から生ずる有益な効果の増大を示す、方法。 40

【請求項 15】

前記がんが、乳がん、卵巣がん、非小細胞肺がん、結腸直腸がんまたは頭頸部がんである、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

免疫系を刺激または強化するようにデザインされた薬物の投与または処置を伴う臨床試験のデザインに適した標的患者または患者の標的亜集団を同定するための方法であって、患者試料または患者試料の集団中のK R A S の1 e t - 7相補性部位6の4位における一塩基多型(S N P)を検出することを含み、前記S N Pの存在が、適した標的患者または患者の亜集団の同定を示す、方法。 50

【請求項 17】

チェックポイント阻害剤として機能する薬物の投与または処置を伴う臨床試験のデザインに適さない標的患者または患者の標的亜集団を同定するための方法であって、患者試料または患者試料の集団中のK R A S の l e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) を検出することを含み、前記 S N P の存在が、適さない標的患者または患者の亜集団の同定を示す、方法。

【請求項 18】

試験薬物の効力が免疫療法の共投与により強化される前記薬物の投与または処置を伴う臨床試験のデザインに適した標的患者または患者の標的亜集団を同定するための方法であって、患者試料または患者試料の集団中のK R A S の l e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) を検出することを含み、前記 S N P の存在が、適した標的患者または患者の亜集団の同定を示す、方法。

10

【請求項 19】

試験薬物の効力がチェックポイント阻害剤として機能する薬物または処置の共投与により強化される前記試験薬物の投与または処置を伴う臨床試験のデザインに適さない標的患者または患者の標的亜集団を同定するための方法であって、患者試料または患者試料の集団中のK R A S の l e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) を検出することを含み、前記 S N P の存在が、適さない標的患者または患者の亜集団の同定を示す、方法。

【請求項 20】

患者における処方された薬物の効力の増大の尤度を検出するための方法であって、前記効力が、K R A S の l e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) の存在に依存し、前記方法が、患者試料中のK R A S の l e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) を検出することを含む、方法。

20

【請求項 21】

K R A S バリアントの存在について患者を試験することが、薬物処置に先立って、医師により開始される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

使用の条件として、診断試験と組み合わせて使用されなければならない薬物の使用に言及する組み合わせ薬物の表示であって、前記診断試験が、患者試料中のK R A S の l e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) を検出するようにデザインされている、組み合わせ薬物の表示。

30

【請求項 23】

がんを処置する低毒性の方法であって、K R A S の l e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) を有すると決定されたがん被験体に、免疫調節がん療法を投与することを含む、方法。

【請求項 24】

被験体において、免疫調節がん療法の毒性を予測する方法であって、前記被験体からの核酸中におけるK R A S の l e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) の存在または不在を検出することを含み、前記多型の存在が、前記被験体における毒性の尤度の低下を示す、方法。

40

【請求項 25】

前記免疫調節がん療法が、放射線療法を含む、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記免疫調節がん療法がチェックポイント阻害剤を含む、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 27】

前記チェックポイント阻害剤が、P D - 1 または P D - L 1 に対する抗体である、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

50

前記一塩基多型が、配列番号 13 の 4 位における G である、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

この出願は、2016年4月27日に出願された米国仮特許出願第62/328,548号（この全体は、参考として本明細書に援用される）に対する優先権およびその利益を主張する。

【0002】

本発明は、免疫調節剤を、それを必要とする患者に投与する方法を対象とし、免疫調節剤の選択は、K R A S バリアントの存在に依存する。本発明の一態様では、免疫系を強化するようにデザインされた免疫調節剤を、他の従来のがん処置と組み合わせてがん患者に投与する方法が提供される。好ましい実施形態では、薬剤は、放射線処置と組み合わせてがん患者に投与される。本発明は、がん患者、または自己免疫患者が、特定の免疫療法に応答する尤度の増大を、K R A S バリアントの存在に基づいて決定するための診断方法をさらに提供する。

10

【背景技術】

【0003】

K R A S バリアントは、がんリスクの増大を予測する、K R A S がん遺伝子における生物学的に機能性のあるマイクロRNA結合部位のバリアントである。重要な成長および生存遺伝子の 3' 非翻訳領域 (3' U T R) におけるマイクロRNA (m i R N A) 結合部位バリアントは、生殖細胞系変異の最近発見された新規なクラスであり、それは、がんリスクおよび処置応答の強力なバイオマーカーである (C i p o l l i n i ら (2014 年) P H A R M G E N O M I C S P E R S M E D 7 卷 : 173 ~ 191 頁)。

20

【0004】

このクラスで最初に発見された変異の 1 つが、K R A S バリアント、K R A S がん遺伝子の 3' U T R 中の 1 e t - 7 結合部位変異である (C h i n ら、(2008 年) C A N C E R R E S 68 卷 : 8535 ~ 40 頁)。この変異により、非小細胞肺がん (同誌)、閉経期前の女性におけるトリプルネガティブ乳がん (T N B C) (P a r a n j a p e ら (2011 年) T H E L A N C E T O N C O L O G Y 12 卷 (4 号) : 377 ~ 386 頁) および卵巣がん (R a t n e r ら (2010 年) C A N C E R R E S E A R C H 15 卷 : 6509 ~ 15 頁; R a t n e r ら (2012 年) O N C O G E N E 31 卷 (42 号) : 4559 ~ 66 頁; P i l a r s k i ら (2012 年) P L O S O N E 7 卷 (5 号) : e37891 頁) を含む数種のがんのリスクの増大が予測される。K R A S バリアントにより、K R A S に依存するシグネチャーならびにエストロゲン陰性、基底細胞様遺伝子の発現パターン (R a t n e r、2012 年、前出; P a r a n j a p e、前出) を示す K R A S バリアント患者における腫瘍に伴う独特的の腫瘍生物学が予測されることも示された。K R A S バリアントを有する女性は、乳房および卵巣がん、ならびに第 3 の独立のがんを含む複数の原発性のがんを、同じ個体で発生させる有意に増大したリスクにあることも見出された (P i l a r s k i、前出)。

30

【0005】

K R A S バリアントが、治療に対する応答のがんバイオマーカーとして作用する実質的な証拠も存在する。これは、卵巣のまたは頭頸部のがんを有する K R A S バリアント患者におけるシスプラチニン耐性 (R a t n e r、2012 年、前出; C h u n g ら (2014 年) A N N O N C O L、7 月 31 日 [印刷前の E p u b])、結腸がん (S a r i d a k i ら (2014 年) C L I N C A N C E R R E S 20 卷 (17 号) : 4499 ~ 510 頁) または頭頸部がん (C h u n g、前出) を有する K R A S バリアント患者におけるセツキシマブ感受性、および非小細胞肺がんを有する K R A S バリアント患者におけるエルロチニブ (e r l o t o n i b) 耐性、ただしソラフェニブ感受性 (N S C L C)

40

50

(Weidhaasら(2014年)J CLIN ONCOL 32巻(52号):補遺;要約8135頁)を含む。細胞系統のデータは、化学療法への曝露に対するK R A S バリアントの独特的応答をさらに支持する(Saridakis、前出)。

【0006】

がんの処置に対する免疫療法の手法は、以前に実施されたことがある。例えば、がん処置において、がん自体に対する免疫応答を引き出すための試みは、行われている。そのような処置は、例えば、がん細胞を特異的に認識してがん細胞の破壊を標的とするモノクローナル抗体およびそれらの断片を含む抗体の投与、免疫系を刺激するようにデザインされた免疫サイトカインまたはチェックポイント阻害剤の投与、および幾つかの場合には、遺伝子操作され、それらの免疫機能を強化され、がん細胞に対する好首尾の免疫応答を引き出すと予想される自家または同種の免疫細胞の投与を、典型的には含む。したがって、当技術分野では、K R A S バリアントを有する被験体におけるがんを予防および処置する方法に対する必要性がある。それに加えて、当技術分野では、正しい処置が適当に投与されるような特定の免疫療法に対して応答する可能性があるこれらのがん被験体を予測する方法が必要である。そのような処置を適当に管理または指示するために、そのような処置から毒性を経験するかまたは経験しない患者を同定する必要性もある。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Cipolliniら、PHARMGENOMICS PERS ME D(2014年)7巻:173~191頁

20

【非特許文献2】Chinら、CANCER RES(2008年)68巻:8535~40頁

【非特許文献3】Paranjapeら(2011年)THE LANCET ONCOLOGY 12巻(4号):377~386頁

【非特許文献4】Ratnerら(2010年)CANCER RESEARCH 15巻:6509~15頁

【非特許文献5】Ratnerら(2012年)ONCOGENE 31巻(42号):4559~66頁

【非特許文献6】Pilariskiら(2012年)PLOS ONE 7巻(5号):e37891頁

30

【非特許文献7】Chungら(2014年)ANN ONCOL、7月31日[印刷前のEpub]

【非特許文献8】Saridakisら(2014年)CLIN CANCER RES 20巻(17号):4499~510頁

【非特許文献9】Weidhaasら(2014年)J CLIN ONCOL 32巻(52号):補遺;要約8135頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、K R A S バリアントを有する被験体は、免疫系を変化させているという発見に関する。具体的には、本明細書に記載されるように、K R A S バリアント被験体は、成功したがんの処置について利用される、弱化した免疫系を有することが示されている。本明細書に記載されるように、そのような免疫系は、適当な免疫調節剤の投与により、強化または刺激することができる。

40

【0009】

したがって、一態様では、本発明は、K R A S バリアントの存在下で、特定の免疫調節剤をがん患者に投与する方法を対象とする。特定の実施形態では、免疫調節剤は、他の従来のがん処置と組み合わせて投与される。そのような場合、K R A S バリアント被験体は、例えば、化学療法、放射線療法、または手術を含む1種または複数の従来のがん処置で

50

、処置されているか、処置されるか、または前に処置されたことがある。より具体的には、本発明は、K R A S の l e t - 7 相補性部位 6 の 4 位に一塩基多型 (S N P) を有する K R A S バリアントがん被験体を処置する、免疫調節剤の投与を含む方法を提供するが、ここで、前記被験体は、化学療法、放射線療法、または手術を含む 1 種または複数の療法で処置されているか、処置されるか、または前に処置されたことがある。

【 0 0 1 0 】

本発明の特定の実施形態では、放射線処置は、免疫調節剤でさらに処置するための増感剤として機能することができ、セツキシマブなどの免疫調節剤の投与は、がん細胞に向けられた免疫応答のさらなる強化に結びつくことができる。したがって、本発明の特定の実施形態では、放射線療法は、例えば、セツキシマブまたはパニツミマブ (p a n i t u m u m a b) などの抗がん抗体とともに、K R A S バリアントがん被験体に共投与される。他の選択肢は、T 細胞療法、または他の免疫強化療法を含むこともできる。

10

【 0 0 1 1 】

方法は、患者試料中の K R A S の l e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) を検出することをさらに含み、前記 S N P の存在は、前記被験体のための特定の免疫調節剤の投与と関連する有益な効果の増大を示す。さらに、K R A S バリアントの存在は、正常組織における放射線療法に対する感受性を増大させるが、転移性疾患の発生を生じさせる全身的免疫応答のないことを示し、放射線療法と免疫強化の共投与の有用性を示す。本発明の実施形態では、がんは、例えば、乳がん、卵巣がん、非小細胞肺がんおよび小細胞肺がん、結腸直腸がん、膵がん、脳がん、胃がん、子宮がん、精巣がん、肉腫、前立腺がん、リンパ腫および頭頸部がんを含む放射線で処置される任意のがんを含むが、これらに限定されない。本発明は、がん被験体が、特定の免疫調節剤の投与に応答する可能性があるか否かを K R A S バリアントの存在に基づいて、決定する方法も提供する。具体的には、本発明は、それを必要とする患者に対する特定の免疫調節剤を選択する方法を対象とし、ここで、投与されるべき免疫調節剤の選択は、K R A S バリアントの存在に依存する。K R A S バリアントの存在下で、弱化した免疫系を最初に刺激するように機能する免疫調節剤は、それらの利益について十分に機能性のある免疫系を利用する薬剤よりも好ましい。K R A S バリアント患者に投与されるべき免疫調節剤は、例えば、抗体、サイトカイン、養子細胞移入を含み、それに対してチェックポイント阻害剤などの薬剤は、それほど好ましくない。より具体的には、本発明は、K R A S バリアントがん被験体に対するそのような投与の有益な効果の増大を予測する、患者試料中の K R A S の l e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) を検出することを含む方法を提供し、前記 S N P の存在は、免疫療法から生ずる有益な効果の増大を示す。それに加えて、K R A S バリアントの存在は、免疫調節剤および放射線療法の共投与と関連する有益な効果の増大を示すことができる。本発明は、方法が、がん被験体が免疫調節剤の投与に応答する可能性があるかどうかを同定する手段を提供するので、顕著な臨床的価値を有する。K R A S バリアントを有すると同定された患者は、免疫療法に応答する可能性が高いと同定され、K R A S バリアントを有しない患者は、免疫調節剤の投与に応答する可能性が低いと同定される。したがって、患者が K R A S バリアントに対して陽性であれば、医師は、最適の処置を選択し、一方無効な処置を回避する手段を提供される。

20

【 0 0 1 2 】

それに加えて、本発明は、臨床試験のデザインに適した標的患者または患者の標的亜集団を同定するための手段を提供する。本発明の特定の実施形態では、K R A S バリアントの存在は、ある標的集団が、1 つのタイプの免疫療法を別のタイプと比較して受けるべきであることを示す。したがって、K R A S のバリアントを有する被験体は、前記処置が免疫系を刺激または強化するようにデザインされた薬物の投与または処置を伴う臨床試験に選択され得るが、それらの利益について十分に機能性のある免疫系を利用する薬剤はそれほど好ましくない。あるいは、K R A S バリアントを有する被験体は、試験薬物の効力が、免疫調節剤の共投与により強化される臨床試験に選択されてもよい。試験被験体のそのような標的とされる選択は、試験のサイズおよび数の低下により薬物承認プロセスを能率

30

40

50

化するのに役立つことができ、それにより迅速な規制当局承認および薬物の上市への前進を容易にする。

【0013】

K R A S バリアントの存在が、試験薬物または処置の効力の増大と関連することが見出された場合には、本発明は、試験 / 承認された薬物の医師による処方の前に、K R A S バリアントの存在について患者を試験する方法をさらに提供する。そのような場合に、薬物の表示は、患者は、薬物または処置の投与の前に、K R A S バリアントの存在について試験されるべきであるという指示を含有することができる。したがって、本発明は、組み合わせ薬物の表示も対象とし、前記表示は、使用の条件として、診断試験と組み合わせて使用されなければならない薬物の使用に言及し、前記診断試験は、前記被験体における K R A S バリアントの存在を検出するようにデザインされている。より具体的には、本発明は、薬物の処方の前に、患者を試験するための診断方法および組み合わせ薬物の表示を提供し、診断試験は、患者試料中の K R A S の 1 e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) を検出することを含み、前記 S N P の存在は、免疫調節剤の投与から生ずる有益な効果の増大を示す。

10

【0014】

別の実施形態では、本発明は、がんを処置する低毒性の方法を提供し、免疫調節がん療法が、K R A S の 1 e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) を有すると決定されたがん被験体に投与される。本発明によれば、免疫調節がん療法は、放射線であるが、別の実施形態では、免疫調節がん療法は、チェックポイント阻害剤、例えば、抗 P D L 1 または抗 P D 1 抗体療法である。

20

【0015】

本発明は、被験体における免疫調節がん療法の毒性を予測する方法も提供する。この方法では、被験体からの核酸中における K R A S の 1 e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) の存在または不在を検出する。多型が患者で検出されれば、それは、被験体における免疫調節がん療法の毒性の尤度の低下を示す。本発明の一実施形態によれば、免疫調節がん療法は、放射線であってもよいが、別の実施形態では、免疫調節がん療法は、チェックポイント阻害剤、例えば、抗 P D L 1 または抗 P D 1 抗体療法であってもよい。

30

【0016】

本出願のファイルは、色で描かれた少なくとも 1 つの図面を含有する。色付き図面（複数可）付きの本特許または特許出願公開のコピーは、請求および必要な料金の支払いがあれば当局により提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図 1 A】図 1 A ~ D は、H N S C C 患者について、K R A S バリアント状態および割り当てられた処置による無増悪生存 (P F S) 、局所領域不全 (L R F) 、遠隔転移 (D M) および全生存 (O S) を表す図である。合計で、413 名の患者のうち 179 名が P F S 不全を経験した（図 1 A）：セツキシマブで処置していない K R A S バリアント群では 38 名のうち 19 名、セツキシマブで処置された K R A S バリアント群では 32 名のうち 13 名、セツキシマブで処置していない非バリアント群では 169 名のうち 74 名、およびセツキシマブで処置された非バリアント群では 174 名のうち 73 名である。合計で、413 名の患者のうち 97 名が局所領域不全を経験した（図 1 B）：セツキシマブで処置していない K R A S バリアント群の 38 名のうち 8 名、セツキシマブで処置された K R A S バリアント群では 32 名のうち 6 名、非バリアントのセツキシマブで処置していない群では 169 名のうち 39 名、および非バリアントのセツキシマブで処置された群では 174 名のうち 44 名である。合計で、413 名の患者のうち 51 名が遠隔転移を経験していた（図 1 C）：セツキシマブで処置していない K R A S バリアント群では 38 名のうち 8 名、セツキシマブで処置された K R A S バリアント群では 32 名のうち 3 名、非バリアントのセツキシマブで処置していない 169 名のうち 21 名、および非バリアントのセツキ

40

50

シマブで処置された群では 174 名のうち 19 名である。合計で、413 名の患者のうち 134 名が、関係する時間枠内で死亡した（図 1 D）：セツキシマブで処置していない K R A S バリアント群では 38 名のうち 14 名、セツキシマブで処置された K R A S バリアント群では 32 名のうち 8 名、非バリアントのセツキシマブで処置していない群では 169 名のうち 58 名、および非バリアントのセツキシマブで処置された群では 174 名のうち 54 名である。

【図 1 B】同上。

【図 1 C】同上。

【図 1 D】同上。

【0018】

10

【図 1 E】図 1 E は、p 16 状態およびセツキシマブ処置による K R A S バリアント患者についての局所不全を表す図である。H P V 陽性（実線）対陰性（破線）。黒色の線はセツキシマブ処置を表す。赤線（中実円でマークした）は、セツキシマブなしを表す。より高い L R F は H P V 陽性患者について観察され（赤実線対破線）、セツキシマブの利益はなかった。p 16 陰性患者についてより良い局所制御が、セツキシマブの利益とともに観察され、L R F はなかった（黒点線）。

【0019】

20

【図 1 F】図 1 F は、p 16 状態およびセツキシマブ処置による K R A S バリアント患者についての遠隔転移を表す図である。H P V 陽性（実線）対陰性（破線）。黒色の線は、セツキシマブ処置を表す。赤線（中実円でマークした）は、セツキシマブなしを表す。より高い遠隔転移が、H P V 陽性（赤実線）および H P V 陰性（赤点線）の両方についてセツキシマブなしで観察された。p 16 陰性について、セツキシマブの影響は時間により左右される。

【0020】

30

【図 2 A】図 2 A～B は、セツキシマブで処置されなかつたかまたは処置された患者について、K R A S 遺伝子型および p 16 状態による無増悪生存を表す図である。実線は、K R A S バリアント患者、点線は非バリアントであり、黒色の線は p 16 陽性を表し、赤線（中実円でマークした）は p 16 陰性を表す。（図 2 A）セツキシマブなしの P F S。K R A S バリアント / p 16 陽性患者（黒実線）は、非バリアント p 16 陽性患者と比較して劣り（ブロック点線）、K R A S バリアントで p 16 陰性の患者（赤実線）は、非バリアント / p 16 陰性患者と比較して改善された転帰を有する（赤点線）。（図 2 B）セツキシマブの 8 週間による P F S。K R A S バリアント / p 16 陽性患者（黒実線）は、非バリアント p 16 陽性患者（黒点線）と同様な P F S を有し、それが 5 年の追跡期間を通して持続する。K R A S バリアント / p 16 陰性患者は、初めは改善された P F S を有するが、3 年後に低下する。

【図 2 B】図 2 A～B は、セツキシマブで処置されなかつたかまたは処置された患者について、K R A S 遺伝子型および p 16 状態による無増悪生存を表す図である。実線は、K R A S バリアント患者、点線は非バリアントであり、黒色の線は p 16 陽性を表し、赤線（中実円でマークした）は p 16 陰性を表す。（図 2 A）セツキシマブなしの P F S。K R A S バリアント / p 16 陽性患者（黒実線）は、非バリアント p 16 陽性患者と比較して劣り（ブロック点線）、K R A S バリアントで p 16 陰性の患者（赤実線）は、非バリアント / p 16 陰性患者と比較して改善された転帰を有する（赤点線）。（図 2 B）セツキシマブの 8 週間による P F S。K R A S バリアント / p 16 陽性患者（黒実線）は、非バリアント p 16 陽性患者（黒点線）と同様な P F S を有し、それが 5 年の追跡期間を通して持続する。K R A S バリアント / p 16 陰性患者は、初めは改善された P F S を有するが、3 年後に低下する。

【0021】

40

【図 3】図 3 A～B は、セツキシマブで処置されなかつたかまたは処置された患者について、K R A S 遺伝子型および p 16 状態による全生存を表す図である。実線は K R A S バリアント患者、点線は非バリアント患者であり、黒色は p 16 陽性であり、赤（中実円で

50

マークした)はp16陰性である。(図3A)セツキシマブなしのOS。KRASバリアント/p16陽性患者(黒実線)は、非バリアント/p16陽性患者(ブラック点線)と比較して劣り、KRASバリアント/p16陰性患者(赤実線)は、非バリアント/p16陰性患者(赤点線)と比較して改善された転帰を有する。(図3B)セツキシマブの8週間によるOS。KRASバリアント/p16陽性患者(黒実線)は、5年の追跡期間を通して持続する改善されたOSを有する。KRASバリアント/p16陰性患者は、初めは改善されたOSを有するが、3年後に低下する。

【0022】

【図4A】図4A～Bは、KRASバリアント対非バリアントHPV陽性のHNSCC患者の免疫プロファイリングを表す図である。(図4A)評価されたリンパおよび骨髄のサブセット、さらにCD4およびCD8サブセットの免疫プロファイリングを示す。有意差がKRASバリアント患者で見出され(赤2番と表示された)、CD4+細胞、主としてエフェクター細胞はより高く、PD1+CD8細胞は境界線でやや低め、CD4/CD8比は変化して、NK細胞はより低い。骨髄のサブセットも有意に変化する。(図4B)KRASバリアント(実線)患者と非バリアント(点線)患者の間の差のグラフによる描写。

【図4B】図4A～Bは、KRASバリアント対非バリアントHPV陽性のHNSCC患者の免疫プロファイリングを表す図である。(図4A)評価されたリンパおよび骨髄のサブセット、さらにCD4およびCD8サブセットの免疫プロファイリングを示す。有意差がKRASバリアント患者で見出され(赤2番と表示された)、CD4+細胞、主としてエフェクター細胞はより高く、PD1+CD8細胞は境界線でやや低め、CD4/CD8比は変化して、NK細胞はより低い。骨髄のサブセットも有意に変化する。(図4B)KRASバリアント(実線)患者と非バリアント(点線)患者の間の差のグラフによる描写。

【0023】

【図5】図5は、二本鎖切断修復およびKRASバリアントを表す図である。正常組織細胞系統(MCF10A、P=親、M=KRASバリアント)で、バリアントは、照射後により高いベースラインDS損傷およびより遅い修復と関連する。腫瘍細胞系統(H1299、P=親、M=KRASバリアント)で、バリアントは、照射後により小さいベースラインDS損傷およびより速い修復と関連する。これらの知見は、KRASバリアント患者の正常組織は、放射線に対して感受性であるが、それらの腫瘍組織は抵抗性であり得ることを示す。

【0024】

【図6】図6は、KRASバリアント細胞系統の放射線感受性を表す図である。試験管内腫瘍細胞感受性試験を実施して、同質遺伝子細胞系統、MCF10AおよびH1299の2対で放射線感受性を評価した。バリアント=KRASバリアント、および非バリアント=親系統。誤差バーは、百分率で示された複製間の標準偏差を表す。正常組織のKRASバリアント系統はより感受性である。

【発明を実施するための形態】

【0025】

序論

本明細書では「LCS6 SNP」または「KRASバリアント」と称するKRASバリアント、KRASの3'非翻訳領域(UTR)中のSNPは、生殖細胞系で、KRASがん遺伝子中の動的に調節されたマイクロRNA結合部位の変異であり、それにより、免疫調節剤の投与に応答するがん患者の尤度の増大が予測される。本発明は、KRASバリアントを有する被験体が、免疫系を変化させているという予想外の発見に基づく。具体的には、本明細書に記載されるように、KRASバリアント被験体は、正常ではがん細胞の破壊に利用される、弱化した免疫系を有することが示され、これは、がんを処置するための免疫調節剤の投与により、強化されまたは刺激され得る。

【0026】

10

20

30

40

50

したがって、本発明は、がん被験体が特定の免疫調節剤の投与に有利に応答する可能性があるかどうかを決定する、K R A S バリアントの存在に基づく方法を提供する。具体的には、本発明は、それを必要とする患者に投与されるべき特定の免疫調節剤を選択する方法を対象とし、投与されるべき免疫調節剤の選択は K R A S バリアントの存在に依存する。K R A S バリアントの存在下で、弱化した免疫系を最初に刺激するように機能する免疫調節剤は、それらの利益について十分に機能性のある免疫系を利用する薬剤よりも好ましい。K R A S 患者に投与されるべき免疫調節剤は、例えば、抗体、サイトカイン、養子細胞移入を含むが、チェックポイント阻害剤などの薬物は、それほど好ましくはない。より具体的には、本発明は、K R A S バリアントがん被験体のための免疫療法の有益な効果の増大を予測する、患者試料中のK R A S の 1 e t - 7 相補性部位 6 の 4 位における一塩基多型 (S N P) を検出することを含み、前記 S N P の存在が、免疫療法から生ずる有益な効果の増大を示す方法を提供する。本発明は、顕著な臨床的価値を有する。なぜなら方法により、がん被験体が、1 つの特定の免疫調節剤の投与に対して、別の免疫調節剤よりも応答する可能性があるかどうかを同定する手段が提供されるからである。K R A S バリアントを有すると同定された患者は、免疫療法に応答する可能性が高いと同定され、K R A S バリアントを有しない患者は、免疫療法に応答する可能性が低いと同定される（例えば、腫瘍に対する免疫応答の開始に役立つ補助的な治療レジメンがない場合）。ある免疫調節剤、例えばチェックポイント阻害剤などについて、K R A S バリアントを有すると同定されたがん患者は、K R A S バリアントを有しない患者よりも、治療に応答する可能性は低い（例えば、腫瘍に対する免疫応答の開始に役立つ補助的な治療レジメンがない場合）。したがって、患者が K R A S バリアントについて試験されれば、医師は、最適の処置を選択し、一方無効の処置を回避する手段を提供される。

10

20

30

40

【 0 0 2 7 】

それに加えて、本発明は、臨床試験のデザインに適した標的患者または患者の標的亜集団を同定するための方法を提供する。したがって、K R A S バリアントを有する被験体は、前記処置が免疫系を刺激するようにデザインされた薬物の投与または処置を伴う臨床試験に選択され得る。あるいは、K R A S バリアントを有する被験体は、試験薬物の効力が免疫療法の共投与により強化され得る臨床試験に選択され得る。そのような標的とされる試験被験体の選択は、試験のサイズおよび数の低下により承認プロセスを能率化するのに役立つことができ、それにより迅速な規制当局承認および薬物の上市への前進を容易にする。

【 0 0 2 8 】

K R A S バリアントの存在が、試験薬物の効力の増大と関連することが見出される場合、本発明は、試験 / 承認された薬物の医師による処方の前に、K R A S バリアントの存在について患者を試験する方法をさらに提供する。そのような場合に、薬物の表示は、患者は、薬物の投与の前に、K R A S バリアントの存在について試験されるべきであるという指示を含有することができる。したがって、本発明は、薬品の表示に関し、前記表示は、使用的条件として、診断試験と組み合わせて使用されなければならない薬物の使用または処置方法に言及し、前記診断試験は K R A S バリアントの存在を検出するようにデザインされている。そのような場合、K R A S バリアントの存在は、前記薬物の用法または処置を示す。

【 0 0 2 9 】

H R A S 、K R A S 、およびN R A S を含む3種のヒトR A S 遺伝子がある。各遺伝子は、それらのm R N A 転写物の3' U T R に複数のm i R N A 相補性部位を含む。具体的には、各ヒトR A S 遺伝子は、複数の1 e t - 7 相補性部位 (L C S) を含む。マイクロR N A (m i R N A) の1 e t - 7 ファミリーは、それらの標的メッセンジャーR N A (m R N A) の3' U T R (非翻訳領域) に結合することによりがん遺伝子の発現を制御するのに重要な包括的な遺伝調節因子である。

【 0 0 3 0 】

具体的には、用語「1 e t - 7 相補性部位」は、1 e t - 7 ファミリーメンバーが、i

50

n v i v o で遺伝子または遺伝子転写物のその領域に結合することができてもできなくても、またはしてもしなくても、let-7 ファミリーの mRNA の配列に相補性の遺伝子または遺伝子転写物の任意の領域を説明することを意図している。用語「相補性」は、各配列中におけるヌクレオチドの大部分が他の配列内のヌクレオチドの大部分に配列をトランスで結合することができる、2つの配列間の結合の閾値を表す。

【0031】

ヒト K R A S 3 ' U T R は、それぞれ L C S 1 ~ L C S 8 と名付けられた 8 種の L C S を含む。以下の配列について、チミン (T) が、ウラシル (U) の代わりに使用されてもよい。L C S 1 は、配列 G A C A G U G G A A G U U U U U U U U C C U C G (配列番号 1) を含む。L C S 2 は、配列 A U U A G U G U C A U C U U G C C U C (配列番号 2) を含む。L C S 3 は、配列 A A U G C C C U A C A U C U U A U U U U C C U C A (配列番号 3) を含む。L C S 4 は、配列 G G U U C A A G C G A U U C U C G U G C C U C G (配列番号 4) を含む。L C S 5 は、配列 G G C U G G U C C G A A C U C C U G A C C U C A (配列番号 5) を含む。L C S 6 は、配列 G A U U C A C C C A C C U U G G C C U C A (配列番号 6) を含む。L C S 7 は、配列 G G G U G U U A A G A C U U G A C A C A G U A C C U C G (配列番号 7) を含む。L C S 8 は、配列 A G U G C U U A U G A G G G A U A U U U A G G C C U C (配列番号 8) を含む。

10

【0032】

ヒト K R A S は、転写物 a および b によりコードされる 2 種の野生型形態を有し、それらは、以下それぞれ配列番号 9 および 10 として提供される。L C S 6 S N P (K R A S バリアント) を含有する各ヒト K R A S 転写物の配列は、以下配列番号 11 および 12 として提供される。

20

【0033】

ヒト K R A S の転写物バリアント a は、以下の mRNA 配列 (N C B I 受託番号 N M _ 0 3 3 3 6 0 および配列番号 9) (非翻訳領域を太字にしてあり、L C S 6 には下線を引いてある) によりコードされる。

【化1】

1 ggccgcggcg gcccggcag cagcggcgcc ggcagtggcg gcggcgaagg tggccggcg
 61 tcggccagta ctccccggccc ccgcatttc ggactgggag cgagcgcggc gcaggcactg
 121 aaggcggcg ggccggccaga ggctcagcgg ctccccagggtg cgggagagag gcctgctgaa
 181 aatgactgaa tataaacttg tggtagttgg agctggtggc gtaggcaaga gtgccttgac
 241 gatacagcta atccagaatc attttgtgga cgaatatgat ccaacaatag aggattctca
 301 caggaagcaa gtagtaattt atggagaaaac ctgtctttt gataatctcg acacagcagg
 361 tcaagaggag tacagtgcaa tgagggacca gtagatgagg actggggagg gctttctttt
 421 tgtatttgcc ataaataata ctaaatcatt tgaagatatt caccattata gagaacaaat
 481 taaaagagtt aaggactctg aagatgtacc tatggctcta gtaggaata aatgtgattt
 541 gccttctaga acatgacaca caaaacaggc tcaggactt gcaagaatgt atggaaattcc
 601 ttttattgaa acatcagcaa agacaagaca gagagtggag gatgctttt atacatttgt
 661 gagggagatc cgacaataca gattaaaaaa aatcagcaaa gaagaaaaaga ctcctggctg
 721 tgtgaaaatt aaaaaatgca ttataatgtt atctgggtgt tgatgatgcc ttctatacat
 781 tagttcgaga aattcgaaaa cataaaagaaaa agatgacaa agatggtaaa aagaagaaaa
 841 agaagtcaaa gacaaagtgt gtaattatgt aaatacaatt tgtactttt tcttaaggca
 901 tactagtaca agtggtaatt tttgtacatt acactaaatt attagcattt gttttagcat
 961 tacctaattt tttcctgct ccatgcagac tgttagctt taccttaat gcttattttt
 1021 aaatgacagt ggaagttttt tttcctcta agtgcagta ttcccagagt tttggttttt
 1081 gaactagcaa tgcctgtgaa aaagaaactg aatacctaag atttctgtct tggggttttt
 1141 ggtgcacatgca gttgattact tcttattttt cttaccaatt gtgaatgtt gtagtggaaaca
 1201 aattaatgaa gctttgaat catccctatt ctgtgtttt tctagtcaca taaatggatt
 1261 aattactaat ttccatgttgg accttctaatt tggtttttac tgaaacattt agggAACACA
 1321 aatttatggg ctccctgatg atgattttt taggcacat gtcctatagt ttgtcatccc
 1381 tgatgaatgt aaagttcac tggccacaaa ggtttgtct cttttccact gctattagtc
 1441 atggtcactc tccccaaat attatatttt ttctataaaa agaaaaaaaaat ggaaaaaaaaat
 1501 tacaaggcaa tggaaactat tataaggcca ttccctttt acattagata aattactata
 1561 aagactccta atagctttt ctttttttgc agacccagta tgaaatgggg attattatag
 1621 caaccatttt gggctatata ttacatgcta ctaatttttt ataataatttggaaaatgggg
 1681 aacaagtata aaaaattctc ataggaattt aatgtgtctt ccctgtgtca gactgcttt
 1741 tcatagtata actttaaatc ttttcttcaa ctttgcgtt tgaagatagt tttaattctg
 1801 cttgtgacat taaaagatta ttggccag ttatagctt ttaggtgtt aagagaccaa
 1861 ggttgcagg ccaggccctg tggccatctt tgagcttca tagagatgggg
 1921 actgtgtccc cacggtcattt ctttttttttgcgtt tgaagatagt tttaattctg
 1981 tagggcagtt tggatagctc aacaagatac aatcttcattc tgggtggtc ctgctgacaa
 2041 atcaagagca ttgtttttgt ttcttaagaa aacaaactctt tttttttttttaa
 2101 atattaaatc aaaaatgttggg attttgggg ggttgcgttca agacatatttattttttt
 2161 taaacaatga agtggaaaaag ttttacaatc tcttaggtttt gcttagtttc ttaacactgg
 2221 ttaaattaaac attgcataaaa cacttttcaa gtctgatcca tatttaataa tgctttaaaa
 2281 taaaataaa aacaatcattt ttgataaaatt taaaatgttta cttttttttttaa aataatgaa
 2341 gtgagatggc atgggtgggtt gaaagtatca ctggactagg aagaaggta ctttaggttct

10

20

30

40

【化2】

2401 agataggtgt cttaggac tctgatttg aggacatcac ttactatcca tttcttcatg
 2461 taaaagaag tcatctcaa ctcttagttt tttttttta caactatgtt atttatattc
 2521 catttacata agatatacact tatttgc当地 gctcagcaca atctgtaaat ttttaaccta
 2581 tggttacacca tcttcagtgc cagtc当地ggg caaaattgtt caagaggta agtttatatt
 2641 tgaatatacca ttctcgaaaa aggactcttcc ttccatatta gtgtcatctt gcctccctac
 2701 cttccacatg ccccatgact tgatgc当地ttt taataacttg taattccctt aaccataaga
 2761 tttactgctg ctgtggatata ctccatgaaag tttcccact gagtcacatc agaaatgccc
 2821 tacatcttat ttccctcaggc ctcaagagaa tctgacagat accataaagg gatttgacct 10
 2881 aatcactaat ttccagggtgg tggctgatgc ttgaacatc tcttgctgc ccaatccatt
 2941 agcgacagta ggattttca aacctggat gaatagacag aaccctatcc agtggaaagga
 3001 gaatttaata aagatagtgc tgaaagaatt ccttaggtt tctataacta ggactactcc
 3061 tggttaacagt aatacattcc attgttttag taaccagaaa tcttcatgca atgaaaaata
 3121 cttaattca tgaagcttac tttttttt tggtgtcaga gtctcgctct tgtcacccag
 3181 gctggaaatgc agtggcgc当地 tctcagctca ctgcaacctc catctccag gttcaagcga
 3241 ttctcggtcc tccgc当地ctt gagtagctgg gattacaggc gtgtgccact acactcaact
 3301 aattttgtt tttttaggag agacggggtt tcacccctt ggccaggctg gtctcgaaact
 3361 cctgacctca atgtgattcac ccaccccttgc ctatcaaacc tggtttgc当地 aactcattt 20
 3421 ttccagcaat atttattttag tgcctaccag atgccagtca ccgcacaagg cactgggtat
 3481 atggtatccc caaacaagag acataatccc ggtccctttagg tagtgcttagt gtggctgtt
 3541 atatcttact aaggcccttgc gtatacggcc cagagataac acgtgc当地 ttttagttt
 3601 gcaaagaagg ggtttggctt ctgtgc当地c tctataattt ttttgctacg attccactga
 3661 aactcttgc当地 tcaagctact ttatgttaat cacttcttgc ttttaagga ataaacttga
 3721 ttatatttgc当地 tttttagtttgc gataactgt gatttttttgc ggacaattac tgtacacatt
 3781 aagggtatgc当地 tcagatatttgc atatttgc当地 aaatgtgtt tattccagg ttc当地tgc当地
 3841 aagtaattaa aatataactt当地 aaaatttata gttttatctg ggtacaata aacagggtcc
 3901 tgaacttagt cacagacaag gaaacttctt当地 tgtaaaaatc actatgattt ctgaatttgc
 3961 atgtgaaact acagatctt ggaacactgt ttaggttaggg ttttaagact tacacagtt
 4021 ctgc当地tctt当地tca cacagagaaa gaaatggcc当地 tacttcaggacttgc ttatgggg
 4081 atattttaggc ctcttgc当地 tttgatgttagt atgggc当地 ttttaaggtt gtggctt当地
 4141 acctttatgtt gaacttttgc当地 tggctt当地aca aaagattttgtt ttttgc当地at ttttaagg
 4201 gggagaatttgc tagaaataaa tggctt当地aca ttattacaggc cttaaaggaca aaaatccctt
 4261 ttggatgtttt ttttaaaaaaaa gctaaatttgc atagacttagt gc当地ttaacat gtttgc当地
 4321 gatatagca gacgtatatttgc gtatcatttgc agtggatgtt cccaaaggtagg catttcttgc
 4381 tctt当地ttaac tggatgttagt gctcataggaa ttttagt当地ttaatc aacttttata ggttatcaaa
 4441 actgttgc当地 ccatttgc当地 aatattatataa tagaaactttt gtggggcatg
 4501 ttaagttaca gtttgc当地tca gttcatctt当地 tttgtatttgc attgatttt ttttcttct
 4561 aaacattttgc tctt当地aca gttatataact ttttttaggg gtttttttgc tagacagca
 4621 aaactatctt当地 aagatttccat tttgtcaaaa agttaatgtt tcttgc当地ttaat tttgttagt
 4681 ttttttttagt aacccaggc当地 ttacccctt当地 gctgaattt当地 ttttagttaa ctttgc当地
 4741 aatactggat agcatgtt当地tcaat ttttttttgc当地tcaat aatgaaactt

【化3】

4801 tctttctaaa gaaagatact cacatgagtt cttaagaat agtcataact agattaagat
 4861 ctgtgttta gtttaatagt ttgaagtgcc tgttggat aatgataagg aatttagatg
 4921 aattnagggg aaaaaaaaaagt tatctcaga tatgttgagg gcccatct ccccccacac
 4981 ccccacagag ctaactgggt tacagtgttt tatccgaaag tttccaattc cactgtcttg
 5041 tgtttcatg ttgaaaatac tttgcattt ttccttgag tgccaattc ttacttagtac
 5101 tatttctaa tgtaacatgt ttacctggaa tgtatTTAA ctatTTTGT atagtgtaaa
 5161 ctgaaacatg cacatTTGT acattgtgt ttctttgtg ggacatatgc agtgtgatcc
 5221 agttgtttc catcatttgg ttgcgctgac ctaggaatgt tggcatatc aaacattaaa
 5281 aatgaccact ctTTTAATTG aaattaacct ttaaatgttt ataggaggat gtgctgtgaa
 5341 gtgatctaaa atttgtataa ttttgcattt gaactgtact actcttaattt attgtatgt
 5401 aataaaaaata gttacagtga caaaaaaaaaaaaaaa

10

【0034】

ヒトK R A S、転写物バリアントbは、以下のmRNA配列（NCBI受入番号NM_004985および配列番号10）（非翻訳領域を太字にしてある、LCS6には下線を引いてある）によりコードされる。

【化4】

1 ggccgcggcg gcggaggcag cagcggcgcc ggcagtggcg gcggcgaaagg tggccggcg
 61 tcggccagta ctccccggccc ccgcatttc ggactggag cgagcgcggc gcaggcactg
 121 aaggcgcgg cggggccaga ggctcagcg ctcccagggt cgggagagag gcctgctgaa
 181 aatgactgaa tataaacttg tggtagttgg agctgggtgc gtaggcaaga gtgccttgac
 241 gatacagcta attcagaatc attttgttga cgaatatgtat ccaacaatag aggattccta
 301 caggaagcaa gtagtaattt atggagaaac ctgtctttg gatattctcg acacagcagg
 361 tcaagaggag tacagtgc当地 tgagggacca gtacatgagg actggggagg gctttcttg
 421 tgtatttgcc ataaataata ctaaatcatt tgaagatatt caccattata gagaacaaat
 481 taaaagagtt aaggactctg aagatgtacc tatggccata gtaggaaata aatgtgattt
 541 gccttcaga acagtagaca caaaacaggc tcaggactta gcaagaatgtt atggattcc
 601 ttttattgaa acatcagcaa agacaagaca gggtgtat gatgccttct atacattatgt
 661 tcgagaaattt cggaaacata aagaaaagat gagcaagat ggtaaaaaga agaaaaagaa
 721 gtcaaagaca aagtgtgtaa ttatgtaaat acaatttgc当地 ctttttctt aaggcataact
 781 agtacaagtgc当地 gtaattttt tacattacac taaatttata gcatTTTGT tagcattacc
 841 taattttttt cctgctccat gcagactgtt agctttacc ttaaatgtt atttaaaat
 901 gacagtggaa gttttttttt cctctaagtgc当地 ccagtattcc cagatTTTG gtttttgaac
 961 tagcaatgcc tggaaaaag aaactgaata cctaagatTTTGT gtttttgggt
 1021 catgcagttt attacttctt atttttctta ccaattgtga atgttgggtt gaaacaaatt
 1081 aatgaagctt ttgaatcatc cttttctgt gtttatcta gtcacataaa tggattaatt
 1141 actaatttca gttgagacct tctaattggg ttactgaa acattgaggg aacacaaatt
 1201 tatggcttc ctgatgtga ttcttcttagg catcatgtcc tatagttgtt catccctgat
 1261 gaatgtaaag ttacactgtt cacaagggtt ttgtctccctt tccactgtca ttatgtcatgg
 1321 tcactctccc caaaatatta tatttttctt ataaaaagaa aaaaatggaa aaaaattaca

20

30

40

【化5】

1381 aggcaatgga aactattata aggccatttc ctttcacat tagataaatt actataaaga
 1441 ctcctaatacg ctttcctgt taaggcagac ccagtatgaa atggggatta ttatagcaac
 1501 catttgggg ctatatttac atgctactaa atttttataa taattgaaaa gatttaaca
 1561 agtataaaaa attctcatag gaattaaatg tagtctccct gtgtcagact gctcttcat
 1621 agtataactt taaaatcttt cttcaacttg agtctttaga gatagttta attctgottg
 1681 tgacataaaa agattatttgc ggccagttt agcttatttgc gtgtgaaga gaccaagggtt
 1741 gcaaggccag gccctgtgtg aacctttgag cttcataga gagtttcaca gcatggactg
 1801 tgtccccacg gtcatccagt gttgtcatgc attggtagt caaatgggg agggactagg 10
 1861 gcagtttggaa tagctcaaca agataacaatc tcactctgtg gtggcctgc tgacaaatca
 1921 agagcattgc ttttgggttct taagaaaaaca aactctttt taaaaattac ttttaaatat
 1981 taactcaaaa gttgagattt tgggggtgggtg gtgtgccaag acattaattt tttttttaaa
 2041 caatgaagtg aaaaagttt acaatctcta ggtttggcta gttctctaa cactggtaa
 2101 attaacatttgc cataaaacact tttcaagtct gatccatatt taataatgct taaaaataaa
 2161 aataaaaaaca atccctttga taaatttaaa atgttactta ttttaaataa aatgaagtga
 2221 gatggcatgg tgaggtgaaa gtatcactgg actaggaaga aggtgactta gttcttagat
 2281 aggtgtctt taggactctg attttgggaa catcaacttac tatccatttc ttcatgttaa
 2341 aagaagtcat ctcaaaactct tagttttttt ttttacaac tatgttaattt atattccatt
 2401 tacataagga tacacttatt tgcataagctc agcacaatct gtaaattttt aacctatgtt
 2461 acaccatctt cagtgccagt cttggggaaa attgtgcaag aggtgaagtt tataatttggaa
 2521 tatccatttc cgttttagga ctcttcttcc atattgtgt catcttgcc ccctacccctc
 2581 cacatggccc atgacttgat gcagtttaa tacttgaat tcccctaacc ataagattta
 2641 ctgctgtgtt ggatatctcc atgaagttt cccactgagt cacatcagaa atgccttaca
 2701 tcttatttcc tcagggctca agagaatctg acagatacca taaaggatt tgaccataatc
 2761 actaattttc aggtgggtggc tgatgcttgc aacatcttgc tgctgccc aaatttttttccattagcg
 2821 acagtaggat ttttcaaacc tggtatgaat agacagaacc ctatccagtg gaaggagaat
 2881 ttaataaaga tagtgctgaa agaattcctt aggtaatcta taacttaggac tactcttggt
 2941 aacagtaata cattccatttgc tttagtaac cagaaatctt catgcaatga aaaataactt 30
 3001 aattcatgaa gcttactttt ttttttttgtt gtcagagtct cgctttgtc acccaggctg
 3061 gaatgcagtgc ggcgcatttc agctcaactgc aacccatccatc tcccagggtt aagcgattct
 3121 cgtgcctcgg cctccctgagt agctgggattt acaggcgtgtt gcccactacac tcaactaatt
 3181 tttgtatttt taggagagac ggggtttcac cctgttgcc aggctggctt cgaactccctg
 3241 acctcaagtgc attcaccac cttggctca taaacctgtt ttgcagaact catttattca
 3301 gcaaataattt attgagtgcc taccagatgc cagtcaccgc acaaggcaact gggtatatgg
 3361 tatccccaaa caagagacat aatcccggtc ctttaggtgt gcttagtgg tctgtaatat
 3421 cttactaagg ctttgggtat acgacccaga gataaacacga tgcgtatattt agtttgcaa
 3481 agaagggtt tggctctgtt gccagctcta taattttt gctacgattt cactgaaact
 3541 cttcgatcaa gctactttat gtaaatcact tcattttt aaaggaataa acttgattat
 3601 attgtttttt tatttggcat aactgtgattt cttttaggac aattactgta cacattaagg
 3661 tggatgtcag atattcatat tgacccaaat gtgtatattt ccagtttct ctgcataagt
 3721 aattaaaaata tacttaaaaaa ttaatagttt tatctggta caaataaaca ggtgcctgaa

10

20

30

40

【化6】

3781 ctagttcaca gacaaggaaa cttctatgt aaaaatcaacta tgatttctga attgctatgt
 3841 gaaactacag atctttggaa cactgtttag gtaggggttt aagacttaca cagtacctcg
 3901 tttctacaca gagaaagaaaa tggccatact tcaggaactg cagtgcctat gaggggatat
 3961 ttaggcctct tgaattttt atgttagatgg gcattttttt aaggtagtgg ttaattacct
 4021 ttatgtgaac tttgaatggt ttaacaaaag atttggggggt gtagagatgg taaaggggg
 4081 gaattctaga aataaaatgtt acctaattat tacagccta aagacaaaaa tccttgtga
 4141 agtttttta aaaaaagcta aattacatag acttaggcatt taacatgtt gtggagaat
 4201 atagcagacg tatattgtat catttgagt aatgttcca agtaggcatt ctggctcta 10
 4261 ttaactgag tcacactgca taggaatttta gaacctaact tttataggtt atcaaaactg
 4321 ttgtcaccat tgcacaaattt tgcctaata tatacataga aactttgtgg ggcattttaa
 4381 gttacagttt gcacaagttc atctcattt tattccattt atttttttt tcttcataaac
 4441 attttttctt caaacagtat ataactttt ttaggggatt tttttttaga cagaaaaac
 4501 tatctgaaga tttccattt tcaaaaagta atgatttctt gataattgtg tagtaatgtt
 4561 ttttagaacc cagcagttac cttaaagctg aatttatatt tagtaactt tttgtttaa
 4621 ctggatagca tgaattctgc attgagaaac tgaatagctg tcataaaatg aaactttctt
 4681 tctaaagaaa gatactcaca ttagtttgc aagaatagtc ataacttagat taagatctgt
 4741 gtttttagttt aatagtttgc agtgcctgtt tgggataatg ataggttaatt tagatgaatt
 4801 tagggaaaaaaa aaaagtttac tgcagatatg ttgaggccc atctctcccc ccacaccccc
 4861 acagagctaa ctgggttaca gtgttttac cgaaagttc caattccact gtcttgtt
 4921 ttcatgttga aaatactttt gcattttcc tttgagtgcc aatttcttac tagtactatt
 4981 tcttaatgtt aacatgtttac ctggaatgtt ttttaactat ttttgtatag tgtaaactgt
 5041 aacatgcaca ttttgtacat tttgtggac atatgcagtg tgatccagtt
 5101 gttttccatc atttgggtgc gctgacccatg gaatgttggc catatcaaac attaaaaatg
 5161 accactcttt taattgaaat taactttaa atgtttatag gatgtgtgc tgtgaagtgt
 5221 tctaaaattt gtaatatttt ttttgcataac ttttgcataac ctaattattttaatgttaata
 5281 aaaatagttt cagtgacaaa aaaaaaaaaaa aa

30

20

30

【0035】

L C S 6 S N P (K R A S バリアント) を含むヒト K R A S 、 転写物バリアント a は、以下の m R N A 配列（配列番号 11 ）（非翻訳領域を太字にしてあり、 L C S 6 には下線を引いてある、 S N P は大文字にしてある）によりコードされる。

【化7】

1 ggccgcggcg gggaggcag cagcggcgcc ggcagtggcg gggcgaaagg tggcgccggc
 61 tcggccagta ctcccgcccccc ccgcatttc ggactggag cgagcgcggc gcaggcactg
 121 aaggcggcg cggggccaga ggctcagccgg ctcccaggtt cgggagagag gcctgctgaa
 181 aatgactgaa tataaacttg tggtagttgg agctgggtgc gtggcaaga gtgccttgac
 241 gatacagcta attcagaatc attttgttgc cgaatatgtt ccaacaatag aggattccta 40
 301 caggaagcaa gtagtaattt atggagaaac ctgtctctt gatattctcg acacagcagg
 361 tcaagaggag tacatgtgcaa tgagggacca gtacatgagg actggggagg gcttttttgc
 421 tgtatttgcc ataaataata ctaaatcatt tgaagatatt caccattata gagaacaaat

40

【化 8】

481 taaaagagtt aaggactctg aagatgtacc tatggcccta gtaggaaata aatgtgattt
541 gccttctaga acagtagaca caaaacaggc tcaggactta gcaagaagt atggaattcc
601 ttttattgaa acatcagcaa agacaagaca gagagtggag gatgctttt atacatttgt
661 gagggagatc cgacaataca gattaaaaa aatcagcaa gaagaaaaga cccctggctg
721 tgtaaaaatt aaaaaatgca ttataatgta atctgggtgt tgatgatgcc ttctatacat
781 tagttcgaga aattcgaaaa cataaagaaa agatgagcaa agatggtaaa aagaagaaaa
841 agaagtcaaa gacaaagtgt gtaattatgt aaatacaatt tgtactttt tcttaaggca
901 tactagtaca agtggtaatt ttgtacatt acactaaatt attagcaatt gtttagcat
961 tacctaattt tttcctgct ccatgcagac tgtagctt taccttaaat gcttatttt
1021 aaatgacagt ggaagtttt tttcctcta agtgccagta ttcccagagt tttggtttt
1081 gaactagcaa tgcctgtgaa aaagaaaactg aatacctaag atttctgtct tggggtttt
1141 ggtgcatgca gttgattact tcttattttt cttaccaatt gtgaatgtt ggtgaaaca
1201 aattaatgaa gctttgaat catccctatt ctgtgtttt tctagtcaca taaatggatt
1261 aattactaat ttcaagttgag accttctaatt tggttttac tgaaacattt agggAACACA
1321 aatttatggg cttcctgtatg atgattctt taggcatcat gtcctatagt ttgtcatccc
1381 tgatgaatgt aaagttcacac tgttcacaaa ggtttgcct ccttccact gctattagtc
1441 atggtcactc tccccaaaat attatatttt ttctataaaa agaaaaaaat ggaaaaaaat
1501 tacaaggcaa tggaaactat tataaggcca tttcctttc acattagata aattactata
1561 aagactccata atagctttc ctgttaaggc agacccagta tgaaatgggg attattatag
1621 caaccatttt gggctatat ttacatgcta ctaaattttt ataataattt aaaaattttt
1681 aacaagtata aaaaattctc ataggaatta aatgtatgt ccctgtgtca gactgcttt
1741 tcatagtata actttaaatc tttcttcaa cttgagttt tgaagatagt tttaattctg
1801 cttgtgacat taaaagatta ttggggccag ttatagctt ttaggtgtt aagagaccaa
1861 ggttgcagg ccaggccctg tgtgaacctt tgagcttca tagagagttt cacagcatgg
1921 actgtgtccc cacggtcata cagtggtgtc atgcattttt tagtcaaaaat ggggaggac
1981 tagggcagtt tggatagctc aacaagatac aatctcactc tgggtggcctt ctgctgacaa
2041 atcaagagca ttgctttgt ttcttaagaa aacaaactct tttttaaaaa ttacttttaa
2101 atattaactc aaaaattttt ggtgggtgtc caagacatta atttttttt
2161 taaacaatga agtggaaaaag ttttacaatc tcttaggtttt gctagttctc ttaacactgg
2221 ttaaaattaac attgcataaa cacttttcaa gtctgatcca tatttaataa tgctttaaaa
2281 taaaaataaa aacaatccctt ttgataaatt taaaatgtt cttatTTAA aataaaatgaa
2341 gttagatggc atggtaggtt gaaagtatca ctggacttagg aagaaggta cttaggttct
2401 agatagggtt cttttaggac tctgatTTT aggacatcac ttactatcca tttcttcatg
2461 ttaaaaagaag tcatctcaa ctcttagttt ttttttttcaactatgtt atttatattt
2521 catttacata aggatacact tatttgtcaa gctcagcaca atctgtaaat ttttaacctt
2581 tggtagatcca ttctcgttgc cagttttggg caaaattttt gtaggtgtca agtttatatt
2641 tggatatcca ttctcgtttt aggactcttc ttccatatta gtgtcatctt gcctccctac
2701 ctccacatgt ccccatgact tgatgcgtt ttaatacttca taattccccctt aaccataaga
2761 ttactgtgtc tggatatcttgc cttccatgttggg ttttttttcaactatgtt atttatattt
2821 tacatcttat ttccatcagggtt cttccatgttggg ttttttttcaactatgtt atttatattt

【化9】

2881 aatcactaat tttcaggtgg tggctgatgc tttgaacatc tccttgctgc ccaatccatt
 2941 agcgacagta ggattttca aacctggat gaatagacag aaccctatcc agtggaaagga
 3001 gaatttaata aagatagtgc tgaaaagaatt ccttaggtaa tctataacta ggactactcc
 3061 tggtaacagt aatacattcc attgttttag taaccagaaa tcttcatgca ataaaaata
 3121 cttaattca tgaagcttac tttttttt tgggtcaga gtctcgctct tgtcacccag
 3181 gctggaatgc agtggegccca tctcagctca ctgcaacctc catctcccag gttcaagcga
 3241 ttctcggtcc tcggcctcct gagtagctgg gattacaggc gtgtgccact acactcaact
 3301 aattttgtt tttttaggag agacggggtt tcaccctgtt ggccaggctg gtctcgaaact
 3361 cctgacctca agtgatGcac ccaccttgc ctcataaacc tggtttgcag aactcattta
 3421 ttcagcaaat atttatttag tgcctaccag atgcccagtca ccgcacaagg cactgggtat
 3481 atggtatccc caaacaagag acataatccc ggtccttagg tagtgcgtat gtggtctgt
 3541 atatcttact aaggcctttg gtatacggacc cagagataac acgatgcgtt ttttagttt
 3601 gcaaagaagg ggtttggct ctgtgccagc tctataattt ttttgcacg attccactga
 3661 aactcttcga tcaagctact ttatgttaat cacttcattt ttttaagga ataaacttga
 3721 ttatattgtt ttttattttg gcataactgt gattcttta ggacaattac tgtacacatt
 3781 aaggtgtatg tcagatattc atattgaccc aaatgtgtaa tattccagtt ttctctgcatt
 3841 aagtaattaa aatataactta aaaattaata gttttatctg ggtacaata aacaggtgcc
 3901 tgaactagtt cacagacaag gaaacttcta tgtaaaaatc actatgattt ctgaattgct
 3961 atgtgaaact acagatctt ggaacactgt ttaggttaggg tggtaagact tacacagtag
 4021 ctgcgttcta cacagagaaa gaaatggcca tacttcagga actgcagtgc ttatgggg
 4081 atattnaggc ctcttgaatt tttgatgttag atggcattt ttttaaggta gtggtaatt
 4141 acctttatgt gaactttgaa tggtttaaca aaagattttgt ttttgcgtatg attttaagg
 4201 gggagaattc tagaaataaa tggtaactaa ttattacagc cttaaagaca aaaatccctt
 4261 ttgaagtttt tttaaaaaaaa gctaaattac atagacttag gcatthaacat gtttgcggaa
 4321 gaatatacgca gacgtatatt gtatcattt agtgaatgtt cccaaatgtt cattctaggc
 4381 tctatttaac tgagtcacac tgcataggaa tttagaacct aactttata ggttatcaaa
 4441 actgttgtca ccattgcaca atttgtcct aatataataca tagaaacttt gtggggcatg
 4501 ttaagttaca gtttgcacaa gttcatctca tttgtattcc attgattttt ttttcttct
 4561 aaacattttt tcttcaaaca gtatataact ttttttaggg gatttttttt tagacagcaa
 4621 aaactatctg aagatttcca tttgtcaaaa agtaatgatt tcttgataat tgtgttagt
 4681 tggtttttag aacccagcag ttacctaaa gctgaattt tatttagttt cttctgtgtt
 4741 aatactggat agcatgaatt ctgcattttagg aaactgaata gctgtcataa aatgaaactt
 4801 tctttctaaa gaaagatact cacatgagtt ctggaaatg agtcataact agatataagat
 4861 ctgtgtttta gtttaatagt ttgaagtgc tggggat aatgataggt aatttagatg
 4921 aatttagggg aaaaaaaaaatg tatctgcaga tatgttggg gccccatctt ccccccacac
 4981 ccccacagag ctaactgggt tacagtgtt tatccgaaag tttccaaattc cactgtctt
 5041 tggtttcatg ttgaaaatac ttttgcattt ttcctttagg tgccaaatttcc ttacttagtac
 5101 tatttcttaa tgtaacatgt ttacctggaa tggatttttaa ctatgtttagt atagtgtaaa
 5161 ctgaaacatg cacattttgt acattgtgtt ttctttgtt ggacatatgc agtgtgtatcc
 5221 agttgttttc catcatttgg ttgcgtgac ctaggaatgt tggtcataatc aaacattaaa

10

20

30

40

【化10】

5281 aatgaccact ctttaattt aaatttactt ttaaatgttt ataggagttt gtgtgtgaa
 5341 gtgatctaaa atttgcataa ttttgcattt gaaactgtact actcctaattt attgtatgt
 5401 aataaaaaata gttacagtga caaaaaaaaaaaaa

50

【 0 0 3 6 】

L C S 6 S N P (K R A S バリアント) を含むヒト K R A S 、転写物バリアント b は、以下の m R N A 配列（配列番号 1 2 ）（非翻訳領域を太字にしてあり、 L C S 6 には下線を引いてあり、 S N P は大文字にしてある）によりコードされる。

【化 1 1】

1 ggccgcggcg gcggaggcag cagcggcggc ggcagtggcg gccccgaagg tggccggcgg
61 tcggccagta ctcccggccc ccgccatttc ggactggag cgagcgcggc gcaggcactg
121 aaggcggcgg cggggccaga ggctcagcgg ctcccaggtg cgggagagag gcctgctgaa
181 aatgactgaa tataaacttg tggttagttgg agctggtggc gttaggcaaga gtgccttgac
241 gatacagcta attcagaatc attttgcgaa cgaatatgat ccaacaatag aggattccta
301 caggaagcaa gtagtaatttgcgaa atggagaaac ctgtctttg gatattctcg acacagcagg
361 tcaagaggag tacagtgcgaa tgagggacca gtacatgagg actggggagg gctttcttg
421 tgtatitgcc ataaataata ctaaatcatt tgaagatatt caccattata gagaacaaat
481 taaaagagtt aaggactctg aagatgtacc tatggctta gtaggaaata aatgtgatt
541 gccttcaga acagtagaca caaaacaggc tcaggactt gcaagaagtt atgaaattcc
601 ttttattgaa acatcagcaa agacaagaca gggtgttgc gatgccttct atacattgt
661 tcgagaaatt cgaaaacata aagaaaagat gagcaaagat ggtaaaaaga agaaaaagaa
721 gtcggccatc aagtgtgtaa ttatgttaat acaatttgcgaa ctttttctt aaggcataact
781 agtacaagtgcgaa gtttttttccat gcagactgtt agctttacc ttaaatgcgtt attttttttgc
841 taatttttttccat gcagactgtt agctttacc ttaaatgcgtt attttttttgc
901 gacagtggaa gtttttttccat gcagactgtt ccagtttgcgaa ctttttgc
961 tagcaatgcc ttttttttgcgaa aactgaata cctaaagatccat gtttttttgc
1021 catgcgttgcgaa attacttgcgaa ccaatttgcgaa atgttgggtgt gaaacaaatt
1081 aatgaagctt ttgaatcatc cctattctgt gttttatctt gtcacataaa tggattaatt
1141 actaatttca gtttgcgaa ctttttttgcgaa attttttgcgaa acatttgcgaa aacacaaaatt
1201 tatggccatc ctgtatgcgaa ttcttgcgaa catcatgtcc ttttttttgcgaa attttttgcgaa
1261 gaatgttttttgcgaa ttacacttgcgaa cacaatgcgaa ttgttgcgaa tccactgcgtt ttagtcatgg
1321 tcactctccc ctttttttgcgaa attttttgcgaa aaaaatgcgaa aaaaatttaca
1381 aggcaatgcgaa aactattata aggccatttc ctttttgcgaa attttttgcgaa aaaaatgcgaa
1441 ctttttgcgaa attttttgcgaa aaaaatgcgaa aaaaatttaca
1501 ctttttgcgaa attttttgcgaa aaaaatgcgaa aaaaatttaca
1561 agtataaaaaa attctcatatgcgaa attttttgcgaa aaaaatgcgaa aaaaatttaca
1621 agtataactt taaatcttttctt ctttttgcgaa attttttgcgaa aaaaatgcgaa aaaaatttaca
1681 tgacatttttgcgaa agatttttgcgaa gtttttgcgaa attttttgcgaa aaaaatgcgaa aaaaatttaca
1741 gcaaggccatc gtttttgcgaa aaaaatgcgaa aaaaatttaca
1801 ttttttgcgaa attttttgcgaa aaaaatgcgaa aaaaatttaca
1861 gcaaggccatc gtttttgcgaa aaaaatgcgaa aaaaatttaca

【化12】

1921 agagcattgc ttttgtttct taagaaaaca aactctttt taaaaattac ttttaaatat
 1981 taactcaaaa gttgagattt tgggggtggtg gtgtgccaag acattaattt tttttttaaa
 2041 caatgaagtg aaaaagttt acaatctcta ggttggcta gttctcttaa cactggtaa
 2101 attaacattg cataaaacact tttcaagtct gatccatatt taataatgct ttaaaaataaa
 2161 aataaaaaca atcctttga taaatttaaa atgttactta ttttaaaata aatgaagtga
 2221 gatggcatgg tgaggtgaaa gtatcactgg actaggaaga aggtgactta ggttcttagat
 2281 aggtgtctt taggactctg attttgagga catcaattac tatccatttc ttcatgttaa
 2341 aagaagtcat ctcaaactct tagtttttt ttttacaac tatgtaattt atattccatt
 2401 tacataagga tacacttatt tgtcaagctc agcacaatct gtaaattttt aacstatgtt
 2461 acaccatctt cagtgccagt cttggcaaaa attgtcaag aggtgaagtt tatatttgaa
 2521 tatccattct cgttttagga ctcttcttcc atattagtgt catcttgccc ccctaccttc
 2581 cacatcccccc atgacttgat gcagtttaa tacttgaat tcccctaacc ataagattta
 2641 ctgctgctgt ggatatctcc atgaagttt cccactgagt cacatcagaa atgccttaca
 2701 tcttatttcc tcagggctca agagaatctg acagatacca taaaggatt tgacctaattc
 2761 actaattttc aggtggtggc tgatgcttg aacatcttt tgctgccccaa tccattagcg
 2821 acagtaggat ttttcaaacc tggtatgaat agacagaacc ctatccagtg gaaggagaat
 2881 ttaataaaga tagtgctgaa agaattcattt aggtaatcta taactaggac tactcctggt
 2941 aacagtaata catccattt ttttagtaac cagaaaatctt catgcaatga aaaatacttt
 3001 aattcatgaa gctactttt tttttttgggt gtcagagtct cgtcttgtc acccaggctg
 3061 gaatgcagtg gcccatttc agctcaactgc aacccatc tcccagggtc aagcgattct
 3121 cgtgcctcgg cctcttgagt agctgggatt acaggcgtgt gccactacac tcaactaatt
 3181 tttgtatttt taggagagac ggggtttcac cctgtggcc aggctggctc cgaactcctg
 3241 acctcaagtgtGcaccac cttggcctca taaacctgtt ttgcagaact catttattca
 3301 gcaaataattt attgagtgcc taccagatgc cagtcaccgc acaaggact gggtatatgg
 3361 tatecccaa caagagacat aatccggc cttaggtgt gctagtgtgg tctgtatat
 3421 cttactaagg cttttggat acgaccacaga gataacacga tgcgtatttt agtttgcaaa
 3481 agaagggtt tggctctgt gccagctcta taattttt gctacgattc cactgaaact
 3541 cttcgatcaa gctactttt gtaaatcaact tcattttt aaaggaataa acttgattat
 3601 attgtttttt tatttggcat aactgtgatt cttaggac aattactgta cacattaagg
 3661 tgtatgtcag atattcatat tgacccaaat gtgtatatt ccagtttct ctgcataagt
 3721 aattaaaata tactaaaaaa ttaatagttt tatctggta caaataaaca ggtgcctgaa
 3781 ctagttcaca gacaaggaaa cttctatgta aaaatacta tgatttctga attgtatgt
 3841 gaaactacag atctttggaa cactgttag gttaggggtt aagacttaca cagtagctcg
 3901 tttctacaca gagaaaagaaa tggccatact tcaggaactg cagtgcattt gagggatat
 3961 ttaggcctct tgaattttt atgttagatgg gcattttttt aaggttagtgg ttaattacct
 4021 ttatgtgaac tttgaatggt ttaacaaaag attgtttt gtagagattt taaaggggaa
 4081 gaattctaga aataaatgtt acctaattat tacagcctta aagacaaaaaa tccttggta
 4141 agtttttta aaaaaagcta aattacatag acttaggcatt taacatgtt gtggaaagaat
 4201 atagcagacg tatattgtat catttgagtg aatgttccca agtaggcatt ctaggctcta
 4261 tttaactgag tcacactgca taggaattta gaacctaact tttataggtt atcaaaaactg

10

20

30

40

【化13】

4321 ttgtcaccat tgcacaattt tgcctaata tatacataga aactttgtgg ggcatgttaa
 4381 gttacagttt gcacaaggttc atctcatttg tattccattg atttttttt tcttctaaac
 4441 atttttctt caaacagtat ataactttt ttagggatt tttttttaga cagcaaaaac
 4501 tatctgaaga tttccatttg taaaaagta atgatttctt gataattgtg tagtaatgtt
 4561 ttttagaacc cagcagttac cttaaagctg aatttatatt tagtaacttc tgtgttaata
 4621 ctggatagca tgaattctgc attgagaaac tgaatagctg tcataaaaatg aaactttctt
 4681 tctaaagaaa gataactcaca tgagttcttg aagaatagtc ataactagat taagatctgt
 4741 gtttagttt aatagttga agtgccgtt tggataatg atagtaatt tagatgaatt
 4801 tagggaaaaa aaaagttatc tgcagatatg ttgagggccc atctctcccc ccacacccccc
 4861 acagagctaa ctgggttaca gtgtttatc cgaaagttc caattccact gtcttgtt
 4921 ttcatgttga aaatactttt gcattttcc tttgagtgcc aatttcttac tagtactatt
 4981 tcttaatgtt aatgttttac ctggaatgtt ttttaactat ttttgtatag tgtaaactga
 5041 aacatgcaca ttttgtacat tgcgttttgc tttgtggac atatgcagtg tgatccagtt
 5101 gtttccatc atttgggttgc gtcgacccat gaatgttggt catatcaaac attaaaaatg
 5161 accactcttt taattgaaat taactttaa atgtttatag gagtatgtgc tgtgaagtga
 5221 tctaaaattt gtaatatttt tgcattgttgc tgcatttttgc tgcatttttgc tgcatttttgc
 5281 aaaatagttt cagtgcacaaa aaaaaaaaaaa aa

10

20

【0037】

本発明は、K R A S の 3' U T R 内に S N P を包含する。具体的には、この S N P は、L C S 6 の配列番号 6 の 4 位において U の代わりに G を置換した結果である。この L C S 6 S N P (K R A S バリアント) は、配列

【化14】

GAUGCACCCACCUUGGCCUCA

(S N P を強調のために太字にしてある) (配列番号 13) を含む。

【0038】

K R A S バリアントは、K R A S の m i R N A 調節を乱すことにより、変化した K R A S 発現を導く。K R A S バリアントの同定および特徴付けは、国際出願第 P C T / U S O 8 / 6 5 3 0 2 号 (W O 2 0 0 8 / 1 5 1 0 0 4) にさらに記載されており、その内容は参照によりその全体で組み込まれる。

30

【0039】

がんを処置する方法

本発明者らは、K R A S バリアントの存在が、がん患者において、別のタイプよりも、1つの特定のタイプの免疫調節剤の投与に対する応答の相対的尤度を増大させることを発見した。具体的には、本発明は、それを必要とする患者に投与されるべき特定の免疫調節剤を選択する方法を対象とし、投与されるべき免疫調節剤の選択は、K R A S バリアントの存在に依存する。K R A S バリアントの存在下で、弱化した免疫系を最初に刺激するように機能する免疫調節剤は、それらの利益について十分に機能性のある免疫系を利用する薬剤よりも好ましい。K R A S バリアント患者に投与されるべき免疫調節剤は、例えば、抗体、サイトカイン、養子細胞移入を含むが、チェックポイント阻害剤などの薬剤はそれほど好ましくはない。

40

【0040】

したがって、本発明は、免疫調節剤を、それを必要とするがん患者に投与する方法に関し、前記投与は、前記患者における K R A S バリアントの存在に依存する。本発明の実施形態では、方法は、K R A S バリアント被験体に免疫調節剤を、手術、化学療法または放射線療法などの別のがん処置と組み合わせて投与することを含むこともできる。好ましい実施形態では、免疫調節剤は、放射線療法とともに投与される。

50

【0041】

本発明者らは、K R A S バリアントの存在が、免疫療法に対して毒性応答を有するがん患者の尤度を低下させることも発見した。具体的には、本発明は、がんを処置する低毒性の方法を対象とし、免疫調節剤が、それを必要とする患者に投与され、免疫調節剤の投与は、K R A S バリアントの存在に依存する。別の実施形態では、本発明は、患者において免疫調節剤の毒性を予測する方法を対象とし、方法は、K R A S バリアントの存在を検出することを必要とし、K R A S バリアントが検出されれば、K R A S バリアントの存在は被験体における免疫調節剤の毒性の尤度の低下を示すので、免疫調節剤が患者に投与される。

【0042】

10

本明細書において使用する用語「免疫療法」は、がん細胞の阻害または破壊のために、免疫系を刺激するようにデザインされた任意の免疫に基づく治療に関する。本発明の一態様では、免疫療法は、自然免疫ならびに適応免疫を患者で強化する免疫調節剤の投与を含む。

【0043】

20

本明細書において使用する、用語「毒性」または「毒性応答」は、患者が、がん治療、および最も一般的にはがん免疫療法に対する応答で経験することがある、1種または複数の免疫応答の有害な反応（複数可）（i r A E）、特定のクラスの有害な反応の発生を指す。i r A Eは、がん治療による免疫系の刺激の結果として起こると考えられており、これらの治療の投与により誘発される自己免疫の異なる形態、例えば、肺炎、肝炎、膵炎、および大腸炎などを含む。例えば、i r A Eは、チェックポイント阻害剤療法で処置されている患者で特に観察される。i r A Eは、例えば、A b d e l - W a h a b ら、P L O S O N E、11巻（7号）：e 0 1 6 0 2 2 1 頁（2016年）で、さらに十分に論じられている。

【0044】

30

本発明の一態様では、がん細胞を認識してがん細胞の破壊を標的とするようにデザインされた免疫グロブリン分子、またはその断片が投与され得る。そのような免疫グロブリン分子には、例えば、セツキシマブ、パニツムマブ、ベバシズマブ、リツキシマブおよびトラスツズマブなどのモノクローナル抗体が含まれる。例えばアバスチンなどのV E G Fを認識する抗体も使用することができる。がん細胞の生理学に関与する抗原を標的とすることに加えて、投与された抗体は、免疫サーベイランスにとって重要な免疫学的経路を調節するように機能することもできる。

【0045】

40

本発明の別の態様では、免疫系を刺激することが公知であるかまたは免疫系を利用する化学療法剤の投与は、K R A S バリアントを有するがん患者を処置するために特に有用であることもあり有用でないこともある。そのような薬剤には、エルロチニブ、バンデタニブ、シスプラチニン、イリノテカン、エトポシド、タキソール、r a f 阻害剤、例えば、ソラフェニブ、セレコキシブ、セツキシマブおよびパニツミマブが含まれるが、これらに限定されない。薬剤の組み合わせおよび免疫系に対するそれらの影響は、K R A S バリアント患者にとって重要であり、免疫と一緒に強化する、ある組み合わせは有用であり、および免疫を妨げ得る他の組み合わせは、有害であるかまたは有用でない。そのような薬剤は、例えば、以下の免疫賦活特性の1つまたは複数を有することができる：N K（ナチュラルキラー）に対するがん細胞の感受性および/または細胞傷害性Tリンパ球（C T L）に媒介される細胞溶解の強化、成熟樹状細胞（D C）およびC D 8 T細胞数の刺激、D Cおよび腫瘍細胞による免疫抑制の低下、D C、N Kおよび腫瘍特異的C T Lの誘発された活性化、T h 1 細胞免疫の増強、T Y R O 3 の刺激、A X L およびM E R（T A M）受容体タンパク質チロシンキナーゼに媒介される細胞障害性、T リンパ球による認識を可能にするがん細胞抗原の発現の強化、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性（A D C C）および補体に依存する細胞傷害性（C D C）の強化ならびに自然免疫および養子免疫の一般的強化。

【0046】

50

あるいは、免疫系の細胞を活性化するように機能するサイトカインなどの免疫賦活分子を投与することができる。そのような因子には、例えば、T細胞活性化因子または樹状細胞活性化／成熟因子が含まれる。それに加えて、患者のがんに対する天然のまたは遺伝子操作による反応性を有するT細胞が、*in vitro*で発生され、がん患者に移入で戻される養子細胞移入を使用することもできる。それに加えて、患者のT細胞を取り出して、腫瘍抗原を認識するように特化されたT細胞受容体（TCR）遺伝子を発現するように遺伝子操作することもできる。細胞は、次に、がん細胞の標的とされた破壊のために、患者に移入で戻される。

【0047】

別の態様では、本発明は、K R A S バリアントがん被験体が、特定の処置のプロトコール中の特定の時に、1つの免疫療法に、別の免疫療法に対するよりも良く応答できることをさらに提供する。例えば、刺激された免疫系の下流で機能するチェックポイント阻害剤は、初期の免疫系刺激に続いて投与することができる。チェックポイント阻害剤は、T細胞に、がん細胞を含む身体中の他の細胞を攻撃させないことを補助するあるタイプの「オフスイッチ」として通常は作用する。幾つかの場合に、チェックポイント阻害剤は、がん被験体に投与されて「オフスイッチ」を除去し、それによりがん被験体のT細胞のがん細胞に対する応答を強化することができる。そのようなチェックポイント阻害剤は、例えば、C T L A - 4、P D - 1 または P D - L 1 を標的として阻害して、がん細胞に対する免疫応答を高める処置を含む。P D - 1 を標的とする処置の例は、ペンブロリズマブ（Keytruda（登録商標））およびニボルマブ（Opdivo（登録商標））を含む。P D - L 1 を標的とする処置の例は、B M S - 9 3 6 5 5 9 (MDX - 1 1 0 5)、Tecentriq（登録商標）（アテゾリズマブ）、デュルバルマブ（MEDI4736）、およびBavencio（登録商標）（アベルマブ）である。イピリムマブ（Yervoy（登録商標））は、C T L A - 4 を標的とするモノクローナル抗体であり、タンパク質が細胞傷害性Tリンパ球を阻害することを防止する。これは、がん細胞に対する身体の免疫応答を高めることができる。

【0048】

それに加えて、本発明は、臨床試験のデザインに適した標的患者または患者の標的亜集団を同定するための手段を提供する。したがって、K R A S バリアントを有する被験体は、前記処置が免疫系を刺激または強化するようにデザインされた薬物の投与または処置を伴う臨床試験に選択されてもよいが、そのような被験体は、チェックポイント阻害剤を伴う試験から排除される。あるいは、K R A S バリアントを有する被験体は、試験薬物の効力が免疫療法の共投与により強化される臨床試験に選択されてもよい。標的とされる試験被験体のそのような選択は、試験のサイズおよび数の低下により薬物承認プロセスを能率化するのに役立つことができ、それにより迅速な規制当局承認および薬物の上市への前進を容易にする。

【0049】

K R A S バリアントの存在が、試験薬物の効力の増大と関連することが見出された場合、本発明は、試験／承認された薬物の医師による処方の前に、K R A S バリアントの存在について患者を試験する方法をさらに提供する。そのような場合に、薬物の表示は、患者は、薬物の投与の前に、K R A S バリアントの存在について試験されるべきであるという指示を含有することができる。したがって、本発明は、組み合わせ薬物の表示も対象とし、前記表示は、使用の条件として、診断試験と組み合わせて使用されなければならない薬物の使用に言及し、前記診断試験は、前記被験体におけるK R A S バリアントの存在を検出するようにデザインされている。より具体的には、本発明は、薬物の処方の前に、患者を試験するための診断方法および組み合わせ薬物の表示を提供し、診断試験は、患者試料中のK R A S の1 e t - 7 相補性部位6の4位における一塩基多型（S N P ）を検出することを含み、前記S N P の存在は、免疫療法から生ずる有益な効果の増大を示す。

【0050】

本明細書において使用する「処置する」は、疾患に冒されたかまたは疾患を発生するリ

10

20

30

40

50

スクにある被験体に、被験体の状態における（例えば、1種または複数の症状における）改善、疾患の増悪の遅延、症状の発症の遅延または症状の増悪の遅延その他を含む利益を与える任意のタイプの処置または予防を指す。したがって、用語「処置」は、症状の発症を予防するための被験体の予防処置も含む。

【0051】

本明細書において使用する、「処置」および「予防」は、症状の治癒または完全な除去を含むことは意図しない。むしろ、これらは、疾患に冒された患者に、患者の状態における（例えば、1種または複数の症状における）改善、疾患の増悪の遅延、その他を含む利益を与える任意のタイプの処置を指す。

【0052】

本明細書において使用する「処置有効量」は、がんに冒された患者に、患者の状態における（例えば、1種または複数の症状における）改善、疾患の増悪における遅延、その他を含む望ましい効果を生じさせるために十分な免疫療法の量を意味する。

【0053】

本明細書に記載された方法による処置を必要とする被験体は、腫瘍およびがん、例えば、肺、結腸、乳房、脳、肝、前立腺、脾臓、筋肉、卵巣、腋、頭頸部、皮膚（メラノーマを含む）、その他に冒された被験体を含む。腫瘍は、原発性腫瘍、転移性腫瘍、または再発腫瘍であることもある。

【0054】

本明細書において使用する用語「治療剤」、「化学療法剤」、または「薬物」は、がん細胞と相互作用して、それにより細胞の増殖状態を低下させるおよび／または細胞を死滅させることができる化合物またはその誘導体を指す。化学療法剤の例として、アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、イホスファミド）、代謝アンタゴニスト（例えば、メトトレキセート（MTX）、5-フルオロウラシルまたはその誘導体）、抗腫瘍抗生物質（例えば、マイトイシン、アドリアマイシン）、植物から誘導された抗腫瘍剤（例えば、ビンクリスチン、ビンデシン、タキソール）、白金系化学療法剤（例えば、シスプラチニン、カルボプラチニン、オキサリプラチニン、ネダプラチニン、トリプラチニテトラナイトレート、フェナントリプラチニン（phenanthriplatin）、ピコプラチニン、サトラプラチニン）、エトポシドなどが含まれるが、これらに限定されない。そのような薬剤は、抗がん剤トリメトトリキセート（TMTX）、テモゾロミド、ラルチトレキセド（raltritrexed）、S-(4-ニトロベンジル)-6-チオイノシン（NBMPR）、6-ベンジルグアニジン（benzyguanidine）（6-BG）、ビス-クロロニトロソウレア（BCNU）およびカンプトテシン、またはその任意の治療薬の誘導体をさらに含むことができるが、これらに限定されない。

【0055】

本明細書において使用する用語「放射線療法」は、腫瘍を収縮させ、およびがん細胞を死滅させる高エネルギー放射線を使用する放射線療法を指す。X線、ガンマ線、光子および荷電粒子は、がん処置のために使用されるタイプの放射線である。放射線は、身体の外側（外部ビーム放射線療法）から送達され得るか、または身体のがん細胞近くに放射性物質を配置することにより送達され得る（内部放射線療法、近接照射療法とも言われる）。全身的放射線療法は、放射性ヨウ素などの放射性物質を使用して、それが血液中を移動してがん細胞を死滅させる。本明細書に記載されるように、KRASバリアント患者は、それらの正常組織において放射線療法に対して増大した感受性を有することが観察されるが、それらのベースラインの免疫抑制が原因で、遠隔疾患には成功せず、それらの免疫強化に対する必要性が示される。

【0056】

本明細書において使用する用語「治療有効量」は、処置される疾患、状態、または障害の症状の1つまたは複数をある程度軽減する、投与される化合物の量を指す。調節されない細胞分裂に関するがんまたは病理に関して、治療有効量は、（1）腫瘍のサイズを縮小させる、（2）異常な細胞分裂、例えばがん細胞分裂を阻害する（即ち、ある程度まで遅

10

20

30

40

50

延させる、好ましくは停止する)、(3)がん細胞の転移を予防または減少させる、および/または、(4)調節されないかまたは異常な、例えば、がん、または血管新生を含む細胞分裂に関連するかまたは部分的にそれにより引き起こされる病理と関連する1種または複数の症状を、ある程度まで軽減する(または、好ましくは排除する)効果を有する量を指す。

【0057】

疾患(または状態または障害)の「処置すること」または「処置」という本明細書において使用する用語は、疾患に対する素因を有し得るが疾患の症状を未だ経験または示していない動物で疾患が生ずることを予防すること(予防的処置)、疾患を阻害すること(その発生を遅延させるまたは阻止すること)、疾患の症状または副作用からの軽減をもたらすこと(対症的処置を含む)、および疾患を軽減すること(疾患の退行を起こすこと)を指す。がんに関して、これらの用語は、がんに罹った個体の平均余命が増大し得ること、または疾患の症状の1つまたは複数が縮小することも意味する。

10

【0058】

本明細書において使用する用語「被験体」および「患者」は、ヒト、哺乳動物(例えば、ネコ、イヌ、ウマ、その他)、生きている細胞、および他の生きている生物体を含む。

【0059】

本明細書において使用する用語「がん」は、異常細胞が制御なく分裂する疾患のための一般的用語として、その通常の意味を与えられるものとする。がん細胞は、近くの組織に浸潤し得、血流およびリンパ系を通して身体の他の部分に広がることができる。数種類の主要なタイプのがんがあり、例えば、癌腫は、皮膚または内部器官を裏打ちするかまたは覆う組織で始まるがんである。肉腫は、骨、軟骨、脂肪、筋肉、血管、または他の結合組織または支持組織で始まるがんである。白血病は、骨髄などの血液形成組織で始まり、多数の異常血液細胞が産生され、それが血流に侵入することを引き起こすがんである。リンパ腫は、免疫系の細胞で始まるがんである。

20

【0060】

正常細胞が、特殊化された、制御された、および協調する単位として振る舞うそれらの能力を失うときに、腫瘍が形成される。一般的に、 固形腫瘍は、囊胞または液体領域を通常は含有しない組織の異常な塊である(ただし、一部の脳腫瘍は囊胞を有し、中枢壊死領域は液体で満たされる)。 単一の腫瘍は、間違った異なるプロセスで、その中に細胞の異なる集団を有することさえある。 固形腫瘍は、良性(がん性でない)であることも、または悪性(がん性)であることもある。異なるタイプの 固形腫瘍は、それらを形成する細胞のタイプで命名される。 固形腫瘍の例は、肉腫、癌腫、およびリンパ腫である。 白血病(血液のがん)は、一般的に 固形腫瘍を形成しない。

30

【0061】

代表的ながんには、とりわけ、膀胱がん、乳がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、頭頸部がん、白血病、肺がん、リンパ腫、メラノーマ、非小細胞肺がん、卵巣がん、前立腺がん、精巣がん、子宮がん、子宮頸がん、甲状腺がん、胃がん、脳幹神経膠腫、小脳星状細胞腫、大脳星状細胞腫、膠芽腫、上衣腫、ユーイング肉腫ファミリーの腫瘍、生殖細胞腫瘍、頭蓋外がん、ホジキン病、白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髓性白血病、肝がん、髓芽腫、神経芽細胞腫、一般的に脳腫瘍、非ホジキンリンパ腫、骨肉腫、骨の悪性線維性組織球腫、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、一般的に軟組織肉腫、テント上未分化神経外胚葉性および松果体腫瘍、視路および視床下部神経膠腫、ウイルムス腫瘍、急性リンパ球性白血病、成人急性骨髓性白血病、成人非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髓性白血病、食道がん、ヘアリーセル白血病、腎臓がん、多発性骨髓腫、口腔がん、膵がん、原発性中枢神経系リンパ腫、皮膚がん、小細胞肺がんが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0062】

製剤

本開示の医薬組成物(例えば、化学療法剤および/または免疫療法剤)は、当技術分野

50

において周知なように、それらの意図される使用に応じて、種々の手段により投与することができる。例えば、本開示の組成物が経口的に投与されるべきであれば、それらは、錠剤、カプセル、顆粒、散剤またはシロップとして製剤化されてもよい。あるいは、本明細書で開示された製剤は、注射（静脈内、筋肉内または皮下）、点滴注入調製物または坐薬として非経口的に投与されることもできる。これらの製剤は、従来の手段により調製することができ、所望であれば、組成物は、任意の従来の添加剤、例えば賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味矯臭薬、可溶化剤、懸濁助剤、乳化剤またはコーティング剤と混合することもできる。開示された賦形剤は、1つより多い機能で役立つこともある。例えば、充填剤または結合剤は、崩壊剤、流動促進剤（glidant）、抗粘着剤、滑沢剤、甘味料などであってもよい。

10

【0063】

本開示の製剤において、湿潤剤、乳化剤および滑沢剤、例えば、ラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウムなど、ならびに着色剤、放出剤（release agent）、コーティング剤、甘味料、着香料（flavoring）および香料、防腐剤および抗酸化剤は、製剤化された薬剤中に存在してもよい。

20

【0064】

対象組成物は、経口、経鼻（例えば、乾燥粉末製剤または噴霧製剤を使用する吸入による）、局部（バッカルおよび舌下を含む）、肺（エアロゾル投与を含む）、直腸、膣、エアロゾルおよび／または非経口的（例えば、注射、例えば、静脈内または皮下注射による）投与に適する場合がある。製剤は、単位剤形で提示されると便利であり、薬学分野において周知の任意の方法により調製することができる。単一用量を產生するために担体材料と合わせられ得る組成物の量は、処置される被験体、および投与の特定の様式に依存して変わる。

20

【0065】

これらの製剤を調製する方法は、本開示の組成物を担体および、任意選択で、1種または複数の補助成分と会合させるステップを含む。一般的に、製剤は、均一におよび緻密に、薬剤を液体担体、または細かく分割された固体担体または両方と会合させ、次に必要であれば、生成物を形作ることにより調製される。

30

【0066】

経口投与に適した製剤は、活性成分としてそれらの対象組成物の所定の量を各々含有する、カプセル、カシェ剤、丸剤、錠剤、ロゼンジ（香味付けされた基剤、通常スクロースおよびアラビアゴムまたはトラガカントを使用する）、散剤、顆粒の形態で、または水性もしくは非水性液体中の溶液または懸濁物として、または水中油もしくは油中水液体エマルジョンとして、またはエリキシル剤もしくはシロップとして、または香錠として（不活性基剤、例えば、ゼラチンおよびグリセリン、またはスクロースおよびアラビアゴムなどを使用する）であってもよい。本開示の組成物は、ボーラス、舐剤、またはペーストとして投与されてもよい。

30

【0067】

経口投与のための固体剤形（カプセル、錠剤、丸剤、糖衣錠、散剤、顆粒など）では、対象組成物は、1種または複数の薬学的に許容される担体、例えば、クエン酸ナトリウムまたはリン酸二カルシウム、および／または以下のいずれか：（1）充填剤または增量剤、例えばデンプン、デキストロース、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および／またはケイ酸など；（2）結合剤、例えば、セルロース（例えば、微結晶性セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）およびカルボキシメチルセルロース）、アルギネット、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよび／またはアラビアゴムなど；（3）保湿剤（humectant）、例えば、グリセリン；（4）崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、特定のシリケート、および炭酸ナトリウムなど；（5）溶解遅延剤、例えば、パラフィン；（6）吸収促進剤、例えば、第四級アンモニウム化合物；（7）湿潤剤、例えば、セチルアルコールおよびモノステアリン酸グリセロールなど；（

40

50

8) 吸収剤、例えば、カオリンおよびベントナイトクレイなど；(9) 滑沢剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、およびそれらの混合物など；および(10) 着色剤と混合される。カプセル、錠剤および丸剤の場合には、組成物は、緩衝剤を含むこともできる。同様なタイプの固体組成物は、ラクトースまたは乳糖類、ならびに高分子量ポリエチレングリコールなどのような賦形剤を使用する、軟質および硬質の充填されたゼラチンカプセル中の充填剤として使用することもできる。開示された賦形剤は、1つより多い機能で役立つこともある。例えば、充填剤または結合剤は、崩壊剤、流動促進剤、抗粘着剤、滑沢剤、甘味料などであってもよい。

【0068】

10

製剤および組成物は、開示された化合物の微粒子化された結晶を含むこともできる。微粒子化は、化合物の結晶単独で、または結晶と薬学的賦形剤もしくは担体の一部もしくは全部との混合物で実施することができる。開示された化合物の微粒子化された結晶の平均粒子サイズは、例えば約5から約200ミクロン、または約10から約110ミクロンであってもよい。

【0069】

20

錠剤は、圧縮または成形により、任意選択で1種または複数の補助成分とともに作製することができる。圧縮錠剤は、結合剤（例えば、ゼラチン、微結晶性セルロース、またはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性希釈剤、防腐剤、崩壊剤（例えば、ナトリウムデンブングリコレートまたは架橋されたナトリウムカルボキシメチルセルロース）、表面活性剤または分散剤を使用して、調製することができる。成形された錠剤は、適切な機械で、不活性液体希釈剤で加湿された対象組成物の混合物を成形することにより作製することができる。錠剤、および他の固体剤形、例えば、糖衣錠、カプセル、丸剤および顆粒などは、任意選択でスコアをつけて、コーティングおよびシェル、例えば、薬学的製剤化技術分野で周知の腸溶コーティングおよび他のコーティングなどを用いて調製することができる。開示された賦形剤は、1つより多い機能で役立つこともある。例えば、充填剤または結合剤は、崩壊剤、流動促進剤、抗粘着剤、滑沢剤、甘味料などであってもよい。

【0070】

30

開示された組成物が、凍結乾燥されたまたはフリーズドライされた、本明細書で開示された化合物を含むことができることは認識されるであろう。例えば、本明細書で開示されるのは、開示された化合物の結晶性および／または非晶質粉末が形成する組成物である。そのような形態は、例えば、水性組成物として使用するために再構成することができる。

【0071】

40

経口投与のための液体剤形は、薬学的に許容される、エマルション、マイクロエマルション、溶液、懸濁物、シロップおよびエリキシル剤を含む。対象組成物に加えて、液体剤形は、当技術分野で一般的に使用される不活性希釈剤、例えば、水または他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、イソプロピルアルコール、エチルカーボネート、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油（特に、綿実油、ビーナッツ油、トウモロコシ油、胚種油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフルルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステル、シクロデキストリンおよびそれらの混合物などを含有してもよい。

【0072】

懸濁物は、対象組成物に加えて、例えば、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶性セルロース、ヒドロキシアルミニウムオキシド、ベントナイト、寒天およびトラガカント、およびそれらの混合物のような懸濁剤を含有することもできる。

【0073】

50

直腸または膣投与のための製剤は、坐薬として提示されてもよく、それは、対象組成物

と例えば、ココアバター、ポリエチレングリコール、坐薬ワックスまたはサリチレートを含む1種または複数の適切な非刺激性の賦形剤または担体とを混合することにより調製することができ、それは、室温では固体であるが、体温で液体であり、それ故、体腔で溶解して活性作用物を放出するであろう。腔投与に適した製剤には、適当であることが当技術分野において公知であるような担体を含有するペッサリー、タンポン、クリーム剤、ゲル、ペースト、フォームまたは噴霧製剤も含まれる。

【0074】

対象組成物の経皮投与のための剤形は、散剤、噴霧、軟膏、ペースト、クリーム剤、ローション剤、ゲル、溶液、およびパッチを含む。活性構成要素は、滅菌条件下で、薬学的に許容される担体、および必要とされることがある任意の防腐剤、緩衝液、または噴霧体と混合することができる。

10

【0075】

軟膏、ペースト、クリーム剤およびゲルは、対象組成物に加えて、賦形剤、例えば、動物および植物の脂肪、油、ワックス、パラフィン、デンブン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルクおよび酸化亜鉛、またはその混合物を含有することができる。

20

【0076】

散剤および噴霧は、対象組成物に加えて、賦形剤、例えば、ラクトース、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウムおよびポリアミド粉末、またはこれらの物質の混合物などを含有することができる。さらに、噴霧は、通例の噴霧体、例えば、クロロフルオロ炭化水素および揮発性非置換炭化水素、例えば、ブタンおよびプロパンなどを含有することもできる。

20

【0077】

本開示の組成物および化合物は、あるいは、エアロゾルにより投与することもできる。これは、化合物を含有する水性エアロゾル、リポソーム調製物または固体粒子を調製することにより達成される。非水性（例えば、フルオロカーボン噴霧体）懸濁物を使用することができる。超音波ネプライザーは、対象組成物に含有される化合物の分解を生じ得る剪断への薬剤の曝露を最小化するので、使用することができる。

30

【0078】

通常、水性エアロゾルは、対象組成物の水溶液または懸濁物を従来の薬学的に許容される担体および安定剤と一緒に製剤化することにより作製される。担体および安定剤は、特定の対象組成物の要件により変化するが、典型的には、非イオン性界面活性剤（Tweens、pluronics、またはポリエチレングリコール）、血清アルブミンのような無害なタンパク質、ソルビタンエステル、オレイン酸、レシチン、グリシンなどのアミノ酸、緩衝液、塩、糖類または糖アルコールを含む。エアロゾルは、一般的に、等張溶液から調製される。

30

【0079】

例として挙げられた賦形剤は、1つより多い機能を有することはあることは注目されるべきである。例えば、充填剤または結合剤は、崩壊剤、流動促進剤、抗粘着剤、滑沢剤、甘味料などであってもよい。

40

【0080】

非経口的投与に適した本開示の医薬組成物は、1種または複数の薬学的に許容される滅菌等張の水溶液または非水溶液、分散物、懸濁物またはエマルション、または滅菌粉末と組み合わされた対象組成物を含み、それは、使用直前に、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質、または懸濁剤もしくは増粘剤を含有していてもよい、滅菌注射用溶液または分散物に再構成することができる。例えば、開示された化合物を含み、例えば、デキストロース（例えば、水中約1から約10重量パーセントのデキストロース、または約5重量パーセントのデキストロース（D5W））をさらに含んでいてもよい水性組成物が、本明細書で提供される。

50

【0081】

本開示の医薬組成物で使用され得る適切な水性および非水性担体の例は、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレン glycole、ポリエチレン glycole など）、および適切なそれらの混合物、植物油、例えばオリーブ油など、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステル、およびシクロデキストリンを含む。適度の流動性は、例えば、コーティング材料、例えばレシチンの使用により、分散物の場合には必要とされる粒子サイズの維持により、および界面活性剤の使用により維持され得る。

【0082】

企図された製剤、例えば、経口製剤（例えば、丸剤または錠剤）は、制御された放出の製剤、例えば、即時放出性製剤、遅延放出性製剤、またはその組み合わせとして製剤化され得ることは認識されるであろう。

10

【0083】

ある特定の実施形態では、被験体化合物は、錠剤、丸剤、カプセルまたは他の適当な摂取可能な製剤（以後「錠剤」と総称する）として製剤化することができる。ある特定の実施形態では、治療用量は、10錠剤またはそれより少數で提供されてもよい。別の例では、治療用量は、50、40、30、20、15、10、5または3錠で提供される。

【0084】

本発明の目的のために、免疫調節剤の量または用量は、例えば、被験体または動物で、妥当な時間枠で、治療または予防的応答をもたらすために十分であるべきである。例えば、免疫調節剤の用量は、被験体において、がん抗原に結合するか、またはがんを検出、処置または予防するために十分であるべきである。用量は、薬剤の効力および処置されるべき被験体（例えばヒト）の状態、ならびに被験体（例えばヒト）の体重により決定されるであろう。投与量を決定するためのアッセイは、当技術分野において周知である。

20

【0085】

免疫調節剤を含有する組成物の用量は、特定の薬剤の投与に伴うことのある何らかの有害な副作用の存在、性質および程度により決定することもできる。典型的には、主治医が、各患者個人を処置するための薬剤の投与量を、種々の要因、例えば、年齢、体重、一般的健康、食事、性別、投与経路、および処置される状態の重症度を考慮に入れて決定するであろう。

【0086】

免疫療法の投与

記載された免疫療法は、抗体に基づく治療であってもよい。一般的に、抗体の治療有効量は、0.1 mg / kg から 100 mg / kg、例えば、1 mg / kg から 100 mg / kg、例えば、1 mg / kg から 10 mg / kg の範囲内である。投与される量は、疾患のタイプおよび程度または処置されるべき適応症、患者の全体的健康、抗体の *in vivo* における有効性、薬学的製剤、および投与の経路などの変数に依存するであろう。初期投与量は、所望の血液レベルまたは組織レベルに急速に達する目的で、上方 (upper) のレベルを超えて増大することができる。あるいは、初期投与量は、最適より少なくすることもでき、投与量を、処置の過程中に漸進的に増大させてもよい。最適の用量は、日常的実験により決定することができる。非経口的投与のためには、0.1 mg / kg と 100 mg / kg の間、あるいは 0.5 mg / kg と 50 mg / kg の間、あるいは、1 mg / kg と 25 mg / kg の間、あるいは 2 mg / kg と 10 mg / kg の間、あるいは 5 mg / kg と 10 mg / kg の間の用量が投与され、例えば、1 処置サイクル当たり 1 週間に 1 回、隔週に 1 回、3 週間毎に 1 回、または 1 カ月に 1 回与えられてもよい。一実施形態では、用量は、3 週間毎に静脈内投与により 200 mg であり、それに対して別の実施形態では、用量は、3 週間毎に静脈内投与により 2 mg / kg である。別の実施形態では、用量は、2 週間毎に静脈内投与により 240 mg であるが、さらに別の実施形態では、用量は、2 週間毎に静脈内投与により 3 mg / kg である。さらに別の実施形態では、用量は、3 週間毎に静脈内投与により 1200 mg である。

30

40

【0087】

免疫療法に対する応答の尤度または免疫療法に対する毒性応答の尤度を予測する方法

50

本発明は、単独の、または1種または複数の従来のがん処置との組み合わせのいずれかにおける、免疫療法に対する応答の尤度の増大を予測する方法も特徴とする。方法は、患者試料中のK R A Sの1 e t - 7相補性部位6の4位における一塩基多型(S N P)を検出することを含み、前記S N Pの存在は、がん被験体における免疫療法に対する応答の尤度の増大を示す。具体的には、検出される変異は、K R A SのL C S 6の4位におけるS N Pであり、それは、ウラシル(U)またはチミン(T)のグアニン(G)への変換を生ずる。ある特定の非限定的な実施形態では、がんは、乳がん、卵巣がん、非小細胞肺がん、結腸直腸がん、メラノーマ、または頭頸部がんである。変異の同定は、免疫療法に対する応答の尤度の増大を示す。

【0088】

10

「尤度の増大」は、K R A Sバリアントを保有している個体が、K R A Sバリアントを保有していない個体と比較して免疫療法に応答する確率の増大を説明することが意図される。ある特定の実施形態では、K R A Sバリアント保有者は、K R A Sバリアントを保有していない個体よりも、1.5×、2×、2.5×、3×、3.5×、4×、4.5×、5×、5.5×、6×、6.5×、7×、7.5×、8×、8.5×、9×、9.5×、10×、20×、30×、40×、50×、60×、70×、80×、90×、または100×高く免疫療法に応答する可能性がある。

【0089】

20

被験体は、好ましくは哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得るが、これらの例に限定されない。被験体は、雄であることも雌であることもできる。

【0090】

30

本発明は、免疫療法に対して毒性応答を有する尤度の低下を予測する方法も特徴とする。方法は、患者試料中のK R A Sの1 e t - 7相補性部位6の4位における一塩基多型(S N P)を検出することを含み、前記S N Pの存在は免疫療法に対する毒性応答を有する患者の尤度の低下を示す。具体的には、検出される変異は、ウラシル(U)またはチミン(T)のグアニン(G)への変換を生ずる、K R A SのL C S 6の4位におけるS N Pである。ある特定の非限定的な実施形態では、がんは、乳がん、卵巣がん、非小細胞肺がん、結腸直腸がん、メラノーマ、または頭頸部がんである。変異の同定は、免疫療法に対する毒性応答を有する尤度の低下を示す。

【0091】

40

「尤度の低下」は、K R A Sバリアントを保有している個体が、K R A Sバリアントを保有していない個体と比較して、免疫療法に対する毒性応答を有する確率が減少していることを説明することが意図される。ある特定の実施形態では、K R A Sバリアント保有者は、K R A Sバリアントを保有していない個体よりも、免疫療法に対する毒性応答を有する可能性が、1.5×、2×、2.5×、3×、3.5×、4×、4.5×、5×、5.5×、6×、6.5×、7×、7.5×、8×、8.5×、9×、9.5×、10×、20×、30×、40×、50×、60×、70×、80×、90×、または100×低い。

【0092】

本発明の関係における「尤度」は、事象が特定の期間にわたって起こるであろう確率に関し、被験体の「絶対」尤度または「相対」尤度を意味する場合がある。絶対尤度は、関係する時間コホートについて測定後の実際の観察に関してか、または関係する期間の間に追跡された統計的に妥当な過去のコホートから生じた指標の値に関してのいずれかで測定することができる。相対尤度は、被験体の絶対尤度を、低尤度のコホートの絶対尤度または臨床尤度因子がどのように査定されたかにより変化し得る平均集団尤度のいずれかと比較した比を指す。オッズ比、即ち、所与の試験結果についての陰性事象に対する陽性事象の比率も、一般的に変換されずに使用される(オッズは、式 $p / (1 - p)$ にしたがい、ここで p は事象の確率であり、 $(1 - p)$ は事象が起こらない確率である)。

【0093】

50

本発明の関係における「尤度評価」または「尤度の評価」は、がん被験体が免疫療法に応答するかまたは免疫療法に対する毒性応答を有する確率、オッズ、または尤度の予測をすることを包含する。そのような評価は、前に測定された集団に関して、絶対的または相対的のいずれかの観点で、未来の臨床パラメーター、伝統的実験室リスク因子の値、またはがんの他の指標の予測を含むこともできる。

【0094】

連鎖不平衡（LD）とは、所与の集団における各対立遺伝子の発生の別々の頻度から予想されるよりも大きい頻度の、2箇所またはそれよりも多い異なるSNP部位における対立遺伝子の共遺伝（例えば、代替的又クレオチド）を指す。独立に遺伝された2つの対立遺伝子の共発生の予想される頻度は、第1の対立遺伝子の頻度に第2の対立遺伝子の頻度を乗じた積である。予想される頻度で共発生する対立遺伝子は、「連鎖平衡」にあると言われる。対照的に、LDとは、2箇所またはそれよりも多い異なるSNP部位における対立遺伝子（複数可）間の任意の非ランダム遺伝的関連を指し、それは、染色体に沿った2つの遺伝子座の物理的近接に一般的に基づく。LDは、2箇所またはそれよりも多いSNP部位が、所与の染色体上で互いに物理的に非常に近接している場合に起こり得、それ故、これらのSNP部位にある対立遺伝子は、複数の世代を通して分離されないままである傾向があり、その結果、1つのSNP部位にある特定の又クレオチド（対立遺伝子）が、近くに位置する異なるSNP部位にある特定の又クレオチド（対立遺伝子）との非ランダム関連を示すであろう。それ故、SNP部位の1つの遺伝子型を決定すると、LDにある他のSNP部位の遺伝子型決定と殆ど同じ情報が得られるであろう。

10

20

30

【0095】

個体を遺伝的障害について（例えば、予後のまたはリスク）スクリーニングする目的で、特定のSNP部位が障害をスクリーニングするために有用であることが見出されれば、当業者は、このSNP部位とLDにある他のSNP部位も、状態をスクリーニングするために有用であろうと認識するであろう。種々の程度のLDが、2箇所またはそれよりも多いSNP間で遭遇され得る結果、幾つかのSNPは他のものより密接に関連する（即ち、より強いLDで）。さらに、LDが染色体に沿って広がる物理的距離は、ゲノムの異なる領域の間で異なり、それ故、LDが起こるために必要な、2箇所またはそれよりも多いSNP部位の間の物理的分離の程度は、ゲノムの異なる領域の間で異なり得る。

【0096】

実際に疾患を惹起する（原因となる）多型ではないが、そのような原因となる多型とLDにある多型（例えば、SNPおよび/またはハプロタイプ）も、スクリーニングに適用するために有用である。そのような場合に、原因となる多型とLDにある多型（複数可）の遺伝子型により、原因となる多型の遺伝子型が予測され、その結果として、原因となるSNP（複数可）により影響される表現型（例えば、疾患）が予測される。したがって、原因となる多型とLDにある多型のマーカーは、マーカーとして有用であり、実際の原因となる多型（複数可）が未知である場合に特に有用である。

40

【0097】

ヒトゲノムにおける連鎖不平衡は：Wall et al. (2003年) NAT REV GENET. 4巻(8号) : 587~97頁; Gamar et al. (2003年) GENET EPIDEMIOL. 24巻(1号) : 57~67頁; Ardlie et al. (2002年) NAT REV GENET. 3巻(4号) : 299~309頁((2002年) NAT REV GENET. 3巻(7号) : 566頁に正誤表); および Remm et al. (2002年) CURR OPIN CHEM BIOL. 6巻(1号) : 24~30頁で概説されている。

50

【0098】

本発明のスクリーニング技法は、試験被験体が、検出可能な形質を発生するリスクの増大または減少と関連するSNPまたはSNPパターンを有するかどうか、または個体が、特定の多型/変異の結果として検出可能な形質に罹患するかどうかを決定する、例えば、ハプロタイプを決定するための個体の染色体の分析、家族の研究、単一精子のDNA分析

、または体細胞ハイブリッドを可能にする方法を含む種々の方法を使用することができる。本発明の診断を使用して分析される形質は、病理および障害で一般的に観察される任意の検出可能な形質であってもよい。

【0099】

S N P 遺伝子型決定方法

どの特定のヌクレオチド（即ち、対立遺伝子）が、1箇所または複数のS N P 位置の各々、例えば、配列番号11、12または13で開示された核酸分子中のS N P の位置などに存在するかを決定するプロセスは、S N P 遺伝子型決定と称される。本発明は、例えば、種々の障害についてのスクリーニング、またはその素因の決定、または処置の形態に対する応答性または予後の決定において、またはゲノムマッピングまたはS N P 関連の分析、その他において、使用するためのS N P 遺伝子型決定の方法を提供する。

10

【0100】

核酸の試料は、どの対立遺伝子（複数可）が、任意の所与の目的の遺伝的領域（例えば、S N P の位置）に存在するかを決定するために、当技術分野において周知の方法により遺伝子型を決定することができる。隣接する配列は、オリゴヌクレオチドプローブなどのS N P 検出試薬をデザインするために使用することができ、それは、キットのフォーマットで、任意選択で実行されてもよい。例示的なS N P 遺伝子型決定方法は、Chenら（2003年）PHARMACOGENOMICS J. 3巻（2号）：77～96頁；Kwokら（2003年）CURR ISSUES MOL. BIOL. 5巻（2号）：43～60頁；Shi（2002年）AM J PHARMACOGENOMICS 2巻（3号）：197～205頁；およびKwok（2001年）ANNU REV GENOMICS HUM GENET 2巻：235～58頁に記載されている。高スループットS N P 遺伝子型決定のための例示的技法は、Mameklos（2003年）CURR OPIN DRUG DISCOV DEVEL. 6巻（3号）：317～21頁に記載されている。一般的なS N P 遺伝子型決定方法は、TaqManアッセイ、分子ビーコンアッセイ、核酸アレイ、対立遺伝子特異的プライマー伸長、対立遺伝子特異的PCR、アレイ型プライマー伸長、ホモジニアスプライマー伸長アッセイ、質量分析法による検出を伴うプライマー伸長、ピロシークエンシング、遺伝子アレイでソーティングされるマルチプレックスプライマー伸長、ローリングサークル増幅を用いるライゲーション、ホモジニアスライゲーション、OLA（米国特許第4,988,167号）、遺伝子アレイでソーティングされるマルチプレックスライゲーション反応、制限断片長多型、単一塩基伸長タグアッセイ、およびインベーダーアッセイを含むが、これらに限定されない。そのような方法は、検出機構、例えば、ルミネッセンスまたは化学発光検出、蛍光検出、時間分解蛍光検出、蛍光共鳴エネルギー移動、蛍光分極、質量分析法、および電気的検出などを組み合わせて使用することもできる。

20

【0101】

多型を検出するための種々の方法は、切断剤からの保護が、RNA / RNA またはRNA / DNA二重鎖中におけるミスマッチ塩基を検出するために使用される方法（Myersら（1985年）SCIENCE 230巻：1242頁；Cottonら（1988年）PNAS 85巻：4397頁；およびSaleebaら（1992年）METHOD ENZYMOLOGY 217巻：286～295頁）、バリアントおよび野生型核酸分子の電気泳動移動度の比較（Orlitaら（1989年）PNAS 86巻：2766頁；Cottonら（1993年）MUTAT. RES. 285巻：125～144頁；およびHayashিら（1992年）GENET. ANAL. TECH. APP. 9巻：73～79頁）、および変性グラジエントゲル電気泳動（DGGE）を使用した、変性剤のグラジエントを含有するポリアクリルアミドゲルにおける多型または野生型断片の移動のアッセイ（Myersら（1985年）、NATURE 313巻：495頁）を含むが、これらに限定されない。特定の位置における配列の変化も、ヌクレアーゼ保護アッセイ、例えばRNアーゼおよびSI保護または化学切断方法により査定することができる。

30

40

50

【0102】

好ましい実施形態では、S N P 遺伝子型決定は、5'ヌクレアーゼアッセイとしても公知の T a q M a n アッセイ（米国特許第 5,210,015 号および第 5,538,848 号）を使用して実施される。T a q M a n アッセイは、P C R 中に特定の増幅生成物の蓄積を検出する。T a q M a n アッセイは、蛍光性レポーター色素およびクエンチャー色素で標識されたオリゴヌクレオチドプローブを利用する。レポーター色素は、適当な波長で照射により励起され、エネルギーを、同じプローブ中のクエンチャー色素に、蛍光共鳴エネルギー移動（F R E T）と呼ばれるプロセスを通して移動させる。プローブに取り付けられたとき、励起されたレポーター色素は、シグナルを放射しない。インタクトなプローブ中のレポーター色素にクエンチャー色素が近づくと、レポーターの蛍光の減少が維持される。レポーター色素およびクエンチャー色素は、それぞれ最も 5' 側の端および最も 3' 側の端にあってもよく、または逆の場合も可能である。あるいは、レポーター色素が、最も 5' 側または最も 3' 側の端にある場合があり、一方クエンチャー色素は、内部のヌクレオチドに取り付けられているか、または逆の場合もある。さらに別の実施形態では、レポーターおよびクエンチャーの両方が、内部のヌクレオチドに、レポーターの蛍光が減少するような互いからある距離で取り付けられていることもある。

【0103】

P C R 中に、D N A ポリメラーゼの 5' ヌクレアーゼ活性がプローブを切断し、それによりレポーター色素とクエンチャー色素を分離して、レポーターの蛍光の増大を生じさせる。P C R 生成物の蓄積は、レポーター色素の蛍光の増大をモニターすることにより直接検出される。D N A ポリメラーゼは、プローブが P C R 中に増幅される標的 S N P 含有錆型にハイブリダイズした場合にのみ、レポーター色素とクエンチャー色素の間でプローブを切断して、プローブは、特定の S N P 対立遺伝子が存在する場合にのみ、標的 S N P 部位にハイブリダイズするようにデザインされている。

【0104】

好ましい T a q M a n プライマーおよびプローブの配列は、本明細書で提供される S N P および関連する核酸配列情報を使用して、容易に決定することができる。P r i m e r E x p r e s s (A p p l i e d B i o s y s t e m s, F o s t e r C i t y, C A) などの多くのコンピュータプログラムを、最適のプライマ-/プローブのセットを迅速に得るために使用することができる。S N P を検出するためのそのような本発明のプライマーおよびプローブは、がんを含む種々の障害について予後のアッセイに有用であり、キットフォーマットに容易に組み込むことができることは、当業者には明らかであろう。本発明は、当技術分野において周知の T a q m a n アッセイの改変、例えば、分子ビーコンプローブの使用（米国特許第 5,118,801 号および第 5,312,728 号）および他のバリアントフォーマット（米国特許第 5,866,336 号および第 6,117,635 号）も含む。

【0105】

多型の正体も、リボプローブ（W i n t e r ら（1985 年）P N A S 82 卷：7575 頁；M e y e r s ら（1985 年）S c i e n c e 230 卷：1242 頁）およびヌクレオチドのミスマッチを認識するタンパク質、例えば E . c o l i m u t S のタンパク質（M o d r i c h（1991 年）A n n . R e v . G e n e t . 25 卷：229～253 頁）を使用する R N A インサート法を含むが、これらに限定されないミスマッチ検出技法を使用して決定することができる。あるいは、バリアントの対立遺伝子は、一本鎖高次構造多型（S S C P）分析（O r i t a ら（1989 年）G e n o m i c s 5 卷：874～879 頁；H u m p h r i e s ら、M o l e c u l a r D i a g n o s i s o f G e n e t i c D i s e a s e s, R . E l l e s 編、321～340 頁、1996 年）または変性グラジエントゲル電気泳動（D G G E）（W a r t e l l ら（1990 年）N u c l . A c i d s R e s . 18 卷：2699～2706 頁；S h e f f i e l d ら（1989 年）P N A S 86 卷：232～236 頁）により同定することができる。

【0106】

ポリメラーゼに媒介されるプライマー伸長方法は、多型（複数可）を同定するためにも使用することができる。いくつかのそのような方法は、特許および科学文献に記載されており、「遺伝子ビット分析」方法（WO 92/15712）およびリガーゼ／ポリメラーゼに媒介される遺伝子ビット分析（米国特許第5,679,524号）を含む。関連する方法が、WO 91/02087、WO 90/09455、WO 95/17676、米国特許第5,302,509号、および第5,945,283号に開示されている。多型を含有する伸長されたプライマーは、米国特許第5,605,798号に記載されたように質量分析法により検出することができる。別のプライマー伸長方法は、対立遺伝子特異的PCRである（Ruanoら（1989年）NUCL. ACIDS RES. 17巻：8392頁；Ruanoら（1991年）NUCL. ACIDS RES. 19巻、6877～6882頁；WO 93/22456；Turkiら（1995年）J CLIN. INVEST. 95巻：1635～1641頁）。それに加えて、複数の多型部位を、Wallaceら（WO 89/10414）に記載された対立遺伝子特異的プライマーのセットを使用して、核酸の複数の領域を同時に増幅させることにより調べることもできる。

【0107】

本発明のSNPの遺伝子型を決定するための別の好ましい方法は、OLAで2つのオリゴヌクレオチドプローブを使用することである（例えば、米国特許第4,988,617号を参照されたい）。この方法では、1つのプローブが、標的核酸のセグメントにSNP部位と整列した最も3'側の端でハイブリダイズする。第2のプローブが、第1のプローブに対してすぐ3'側で標的核酸分子の隣接するセグメントにハイブリダイズする。2つの並列したプローブは標的核酸分子へハイブリダイズし、第1のプローブの最も3'側のヌクレオチドとSNP部位の間に完全な相補性があれば、リガーゼなどの連結剤の存在でライゲーションされる。ミスマッチがあれば、ライゲーションは起こらないであろう。反応後、ライゲーションされたプローブは標的核酸分子から分離され、SNPの存在の指示薬として検出される。

【0108】

全て参照により本明細書に組み込まれる、以下の特許、特許出願、および公開された国際特許出願は、種々のタイプのOLAを実施するための技法に関する追加の情報を提供する：米国特許第6,027,889号、第6,268,148号、第5,494,810号、第5,830,711号、および第6,054,564号は、SNP検出を実施するためのOLA戦略を記載している；WO 97/31256およびWO 00/56927は、zipコード配列がハイブリダイゼーションプローブの1つに導入されてもよく、生じた生成物または増幅生成物が、ユニバーサルzipコードアレイにハイブリダイズする、ユニバーサルアレイを使用してSNP検出を実施するためのOLA戦略を記載している；米国特許出願PCT/US01/17329（および出願番号09/584,905）は、OLA（またはLDR）とそれに続くPCRを記載しており、そこでzipコードはOLAプローブに組み込まれて、増幅されたPCR生成物は、電気泳動またはユニバーサルzipコードアレイの読み出しにより決定される；米国特許出願第60/427,818号、第60/445,636号、および第60/445,494号は、SNPlex方法およびOLAとそれに続くPCRを使用するマルチブレックス化SNP検出のためのソフトウェアを記載しており、そこではzipコードがOLAプローブに組み込まれて、増幅されたPCR生成物がzipchute試薬とハイブリダイズされ、SNPの正体がzipchuteの電気泳動読み出しから決定される。一部の実施形態では、OLAは、PCR（または核酸増幅の別の方）に先立って実施される。他の実施形態では、PCR（または核酸増幅の別の方）は、OLAに先立って実施される。

【0109】

SNP遺伝子型決定のための別の方は、質量分析法に基づく。質量分析法は、DNAの4種のヌクレオチドの各々の固有の質量を利用する。別のSNP対立遺伝子を有する核

10

20

30

40

50

酸の質量の差を測定することにより、S N P の遺伝子型を質量分析法により一義的に同定することができる。M A L D I - T O F (マトリクス補助レーザー脱離イオン化 - 飛行時間) 質量分析法の技術は、例えばS N P などの極めて精密な分子量の決定のために好ましい。S N P 分析に対する多数の手法が質量分析法に基づいて開発されている。S N P 遺伝子型決定の質量分析法に基づく好ましい方法は、プライマー伸長アッセイを含み、その方法も、伝統的なゲルに基づくフォーマットおよびマイクロアレイなどの他の手法と組み合わせて利用することができる。

【0110】

典型的には、プライマー伸長アッセイは、プライマーをデザインして、標的S N P の位置から上流(5'側)の鑄型P C Rアンプリコンにアニーリングすることを含む。ジデオキシヌクレオチド三リン酸(d d N T P)および/またはデオキシヌクレオチド三リン酸(d N T P)の混合物を、鑄型(例えば、典型的にはP C Rなどにより増幅されたS N P 含有核酸分子)、プライマー、およびD N Aポリメラーゼを含有する反応混合物に加える。プライマーの伸長は、混合物中のd d N T Pの1つに相補性のヌクレオチドが存在する、鑄型中の最初の位置で停止する。プライマーは、直ぐ隣接する(即ち、プライマーの3'末端にあるヌクレオチドが、標的S N P部位の隣のヌクレオチドにハイブリダイズする)かまたはS N Pの位置から2個またはそれよりも多いヌクレオチドだけ隔たった位置のいずれかにあり得る。プライマーが、標的S N Pの位置から数ヌクレオチド隔たっている場合、唯一の制限は、プライマーの3'末端とS N Pの位置の間の鑄型配列が、検出されるべきものと同じタイプのヌクレオチドを含有することができないこと、またはこのことが、伸長プライマーの早すぎる停止の原因となることである。あるいは、4種全てのd d N T Pのみが、d N T Pなしで、反応混合物に加えられる場合、プライマーは、常に、標的S N Pの位置に相当する1ヌクレオチドしか伸長されない。この場合には、プライマーは、S N Pの位置から1ヌクレオチド上流に結合するようにデザインされる(即ち、プライマーの3'末端にあるヌクレオチドが、標的S N P部位の5'側で標的S N P部位に直ぐ隣接するヌクレオチドにハイブリダイズする)。ほんの1ヌクレオチドの伸長は、伸長されたプライマーの全体的質量を最小化して、それにより別のS N Pヌクレオチドとの間の質量差の分解能を増大させて、好み。さらに、質量タグ付きのd d N T Pは、プライマー伸長反応で、改変されていないd d N T Pの代わりに使用することができる。これは、これらのd d N T Pで伸長されたプライマー間の質量差を増大させて、それにより向上した感度および精度を提供して、ヘテロ接合の塩基位置の型を決定するために特に有用である。質量タグ付けは、集約的な試料調製手順の必要性を緩和して、質量分析計の必要な分解能も減少させる。

【0111】

伸長されたプライマーは、次に精製され、M A L D I - T O F 質量分析法により分析され、標的S N P の位置に存在するヌクレオチドの正体を決定することができる。分析の1つの方法で、プライマー伸長反応からの生成物は、マトリクスを形成する光を吸収する結晶と組み合わされる。マトリクスは、次に、レーザーなどのエネルギー供給源に衝突され、核酸分子をイオン化して気相中に脱離させる。イオン化された分子は、次に飛行管中に射出され、検出器に向かって管内で加速される。レーザーパルスなどイオン化事象と検出器と分子の衝突との間の時間が、その分子の飛行時間である。飛行時間は、イオン化分子の電荷に対する質量の比(m/z)と精密に相関される。m/zがより小さいイオンは、m/zがより大きいイオンよりも速く管を移動して、それ故、より軽いイオンが、より重いイオンの前に検出器に到達する。次に、飛行時間は、対応するおよび高度に精密なm/zに変換される。この様式で、S N Pは、単一の塩基位置に異なるヌクレオチドを有する核酸分子に固有の質量の僅かな差、および対応する飛行時間差に基づいて同定され得る。S N P 遺伝子型決定のためのM A L D I - T O F 質量分析法に関連するプライマー伸長アッセイの使用に関するさらなる情報については、例えば、W i s eら、「A standard protocol for single nucleotide primer extension in the human genome using ma

10

20

30

40

50

trix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry」、RAPID COMMUN MASS SPECTROM. 2003年；17巻(11号)：1195～202頁を参照されたい。

【0112】

以下の参考文献は、SNP遺伝子型決定のための質量分析法に基づく方法を記載するさらなる情報を提供する：Bocker (2003年) BIOINFORMATICS 19巻の補遺1巻：144～153頁；Stormら (2003年) METHODS MO_L. BIOL. 212巻：241～62頁；Jurinkeら (2002年) ADV BIOCHEM ENG BIOTECHNOL. 77巻：57～74頁；およびJurinkeら (2002年) METHODS MO_L. BIOL. 187巻：179～92頁。

【0113】

SNPは、直接DNA配列決定によりスコアをつけることもできる。質量分析法による配列決定（例えば、PCT国際公開第WO94/16101号；Cohenら (1996年) ADV. CHROMATOGR. 36巻：127～162頁；およびGriffiinら (1993年) APPL. BIOCHEM. BIOTECHNOL. 38巻：147～159頁を参照されたい）を含む種々の自動化された配列決定手順を利用することができる（(1995年) BIOTECHNIQUES 19巻：448頁）。本発明の核酸配列は、当業者が、そのような自動化された配列決定手順のための配列決定プライマーを容易にデザインすることを可能にする。Applied Biosystems 377、3100、3700、3730、および3730×1 DNA Analyzer（Foster City, Calif.）などの市販の計器類が、当技術分野で自動化された配列決定のために一般的に使用される。

【0114】

本発明のSNPの遺伝子型を決定するために使用することができる他の方法は、一本鎖高次構造多型（SSCP）、および変性グラジエントゲル電気泳動（DGGE）（Myersら (1985年) NATURE 313巻：495頁）を含む。SSCPは、Oritaら、PROC. NAT. ACADE. に記載されたように、一本鎖のPCR生成物の電気泳動移動における変化により塩基差を同定する。一本鎖のPCR生成物は、二本鎖のPCR生成物を加熱するかまたは他の方法で変性させることにより発生させることができる。一本鎖の核酸は、塩基配列に部分的に依存する二次構造を再びフォールディングするかまたは形成することができる。一本鎖の增幅生成物の異なる電気泳動移動度は、SNPの位置における塩基-配列差と関連する。DGGEは、異なる配列に依存する安定性および多型DNAに固有の融解特性および変性グラジエントゲルにおける電気泳動移動パターンにおける対応する差に基づいて、SNPの対立遺伝子を識別する（Erlich編、PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification, W. H. Freeman and Co, New York, 1992年、第7章）。

【0115】

配列特異的リボザイム（米国特許第5,498,531号）は、リボザイム切断部位の発生または喪失に基づいて、SNPにスコアをつけることにより使用することもできる。完全にマッチした配列は、ヌクレアーゼ切断消化アッセイにより、または融解温度の差により、ミスマッチ配列と区別することができる。SNPが制限酵素切断部位に影響するならば、SNPは、制限酵素消化パターンにおける変化により同定することができ、核酸断片の長さにおける対応する変化はゲル電気泳動により決定される。

【0116】

SNP遺伝子型決定は、例えば、ヒト被験体からの生物学的試料（例えば、組織、細胞、体液、分泌物、その他の試料）を収集するステップ、試料の細胞から核酸（例えば、ゲノムDNA、mRNAまたは両方）を単離するステップ、標的核酸領域のハイブリダイゼ

10

20

20

30

30

40

50

ーションおよび増幅が起こるような条件下で、核酸を、標的S N Pを含有する単離された核酸の領域に特異的にハイブリダイズする1種または複数のプライマーと接触させるステップ、および目的のS N Pの位置に存在するヌクレオチドを決定するステップを含むことができる、または、幾つかのアッセイでは、増幅生成物の存在または不在を検出することを含むことができる（アッセイは、ハイブリダイゼーションおよび／または増幅が、特定のS N P対立遺伝子が存在するかまたは存在しない場合にのみ起こるようにデザインすることができる）。幾つかのアッセイでは、増幅生成物のサイズが検出され、対照試料の長さと比較される；例えば、欠失および挿入は、正常遺伝子型と比較した増幅生成物のサイズにおける変化により検出することができる。

【0117】

10

S N P 遺伝子型決定のための生物学的試料は、核酸を含有する任意の組織または流体であってもよい。種々の実施形態は、パラフィン包埋組織、凍結された組織、手術用の細い注射針による吸引物、および乳房、子宮内膜、卵巣、子宮、または子宮頸部の細胞を含む。他の実施形態は、流体試料、例えば、末梢血のリンパ球、リンパ液、腹水、漿液、痰、および糞便または膀胱洗浄液および尿などの泌尿器検体を含む。

【実施例】

【0118】

(実施例1)

K R A S バリアント (r s 6 1 7 6 4 3 7 0, G G / T G, L C S 6) は、K R A S 中の 1 e t - 7 のマイクロR N A 結合部位における生殖細胞系変異であり、それは、K R A S 経路のシグナル伝達および 1 e t - 7 マイクロR N A レベルを変化させる。下で示すように、K R A S バリアントは、放射線およびセツキシマブを用いてまたは用いずに化学療法で処置された局所的に進行した頭頸部扁平上皮細胞癌 (H N S C C) を有する患者において、変化した応答のバイオマーカーとして作用することができる。ヒトパピローマウイルス (H P V) 陽性であった患者における転帰に対するK R A S バリアントの影響も調べた。

20

【0119】

下で詳細に説明するように、試験された 4 1 3 名の患者のうち、7 0 名 (1 6 . 9 %) がK R A S バリアントを有した。全体として、セツキシマブで処置されたK R A S バリアント患者について、最初の1年の間ににおける無増悪生存 (P F S) に (H R 0 . 3 1, p = 0 . 0 4)、および 1 ~ 2 年における全生存 (O S) (H R 0 . 1 9, p = 0 . 0 3) に有意の改善があったが、非K R A S バリアント群におけるセツキシマブ処置には利益がなかった。セツキシマブなしで処置された患者について、K R A S バリアントと p 1 6 状態との有意の相互作用があった (p = 0 . 0 4)。K R A S バリアントおよび p 1 6 陽性であった患者は、非バリアント患者と比較して、より劣るP F S (H R 2 . 5 9) および O S (H R 2 . 4 8) を有したが、それでもK R A S バリアントおよび p 1 6 陰性であった患者は、非バリアント患者よりも良いP F S および O S を有した（それぞれH R 0 . 6 2 および 0 . 6 1）。セツキシマブの添加は、K R A S バリアント / p 1 6 陽性患者について、P F S (H R 0 . 6 0) および O S (H R 0 . 2 1) を改善するように思われた。H P V 陽性のH N S C C 患者の免疫プロファイリングにより、K R A S バリアント / p 1 6 陽性患者は、免疫が抑制されたベースラインと矛盾しない免疫の変化を有することが示され、それが彼らを非K R A S バリアント患者と区別した。

30

【0120】

40

プロトコールおよび患者

N R G 腫瘍学R T O G 0 5 2 2 は、H N S C C が進行した患者について、同時にシスプラチンを含む放射線療法にセツキシマブを加えることを試験する第I I I 相試験であった。2名の適格患者が、病理学的に証明された中咽頭、下咽頭、または喉頭の扁平上皮細胞癌を有し、選択されたステージI I I またはI V 疾患 (T 2 N 2 ~ 3 M 0 またはT 3 ~ 4 任意のN M 0)、Z u b r o d パフォーマンスステータス 0 ~ 1、年齢 1 8 歳、および十分な骨髄、肝、および腎機能を有した。H P V 状態は、以前に記載したように

50

¹、²、p 16 発現により評価した。

【0121】

U C L A C C R O - 0 2 2 は、ヒトパピローマウイルスと関連する局所的に進行した H N S C C についての、2サイクルの誘発パクリタキセルおよびカルボプラチニ化学療法とそれに続く放射線およびパクリタキセルの第 I I 相試験であった。適格患者は、中咽頭、下咽頭または喉頭のステージ I I I または I V の M 0 扁平上皮がんを有する、p 16 陽性の患者であった。Z u b r o d パフォーマンスステータス 0 ~ 1 、年齢 18 歳、および十分な骨髄、肝、および腎機能も要求された。

【0122】

K R A S バリアントの試験

末梢血単核細胞または全血から、ゲノム D N A を、遺伝子型決定について以前に記載されたように³ ¹ 单離して、1 0 0 n g を C L I A 認証を受けた実験室で、K R A S バリアントについて分析した (M i r a D x 、N e w H a v e n 、C T) 。これらの分析のために、ホモ接合体の (G G) 患者をヘテロ接合の (T G) 患者とグループ化した。

10

【0123】

統計方法

局所領域不全 (L R F) 、遠隔転移 (D M) 、無増悪生存 (P F S) 、および全生存 (O S) は、N R G 腫瘍学 R T O G 0 5 2 2 のプロトコールで定義された通りである。L R F および D M 率は、累積発生率法³ ² により推定した。P F S および O S 率は、K a p l a n - M e i e r の方法³ ³ により推定した。ハザード比は、C o x モデル³ ⁴ により推定した。有害事象は、C o m m o n T e r m i n o l o g y C r i t e r i a f o r A d v e r s e E v e n t s (C T C A E) バージョン 3 . 0 により等級づけた。オッズ比は、ロジスティック回帰により推定した。患者の特徴は、フィッシャーの正確検定 (カテゴリー的変数) またはウィルコクソン順位和検定 (序数または連続変数) により比較した。全ての分析は、S A S バージョン 9 . 4 を使用して実施した。

20

【0124】

C C R O H N S C C 患者の免疫表現型決定

C C R O 研究の一部であった 2 6 名の H N S C C 患者からの血液試料を分析した。放射線処置前に、4 0 m l までの血液を採取してヘパリン処理された B D v a c u u t a i n e r (登録商標) チューブ (B D 、F r a n k l i n L a k e s 、N J) に入れた。末梢血単核細胞 (P B M C) を血液採取の 3 時間以内に F i c o l l グラジエント遠心分離により単離して、アリコートで 1 0 % (v / v) D M S O を含有するウシ胎仔血清 (F B S) 中で、- 8 0 に制御された速度で凍結した後、アッセイまで液体窒素に移しておいた。

30

【0125】

患者からの P B M C を、予め加温した、1 0 % (v / v) F B S を含む R P M I - 1 6 4 0 培地で希釈することにより解凍し、D N A ニーズで処理して洗浄した。各被験体からの 4 × 1 0 ⁶ のアリコートを、固定可能な生存度染色液 5 1 0 (B D H o r i z o n) を用いて、メーカーの指示に従って調製した後、リンパパネルおよび骨髄パネルの部分として表面マーカーについてアッセイした。リンパパネルを、F I T C 抗ヒト C D 4 (クローン R P A - T 4) 、P E 抗ヒト C D 2 5 (クローン M - A 2 5 1) 、P E - C F 5 9 4 抗ヒト C X C R 3 (クローン I C 6) 、P e r C P - C y 5 . 5 抗ヒト C D 3 (クローン U C H T 1) 、P E - C y 7 抗ヒト C D 1 2 7 (クローン H I L - 7 R - M 2 1) 、A P C 抗ヒト C D 4 5 R A (クローン H I 1 0 0) 、A l e x a F l o u r 7 0 0 抗ヒト C D 8 (クローン R P A - T 8) 、B V 4 2 1 抗ヒト P D - 1 (クローン E H 1 2 . 2 H 7) および B V 6 5 0 抗ヒト C C R 6 (クローン 1 1 A 9) を含有するブリリアント染色緩衝液 (B D H o r i z o n / B D B i o s c i e n c e s) 中で予め混合した。大部分の試料について、1 ~ 2 × 1 0 ⁶ 細胞を、B V 6 0 5 抗ヒト C C R 7 (クローン 3 D 1 2) 単独の存在下に 3 7 で、1 0 分予備的に加熱活性化した後、5 0 μ l の 2 % F B S / P B S 染色緩衝液 (B D P h a r m i n g e n 、S a n D i e g o 、C A) 中で 2

40

50

0分間室温で染色した。細胞を洗浄して $300\mu l$ のPBSに再懸濁して2時間以内にフローサイトメトリーにより分析した。可能であれば、 2×10^5 事象を、LSR Fortessa(BD Biosciences, San Jose, CA)でUltraComp eBeads compensation(eBioscience, Inc., San Diego, CA)を用いて累積させた。

【0126】

分析は、FlowJo, LLC(Ashland, OR)で、以下のゲーティング戦略を使用して行なった：1)ダブルット(doublet)を排除するFSC-H/FSC-Aドットプロット；2)生存度ゲートを設定するFVS510-A/FSC-Aドットプロット；3)リンパ球にゲートを設けるSSC-A/FSC-Aドットプロット；4)CD3⁺T細胞のためにゲートを設定するCD3/FSC-Aドットプロット；5)CD3⁺CD8⁺およびCD3⁺CD4⁺T細胞を選択するCD8/CD4ドットプロット；5)ナイーブ、エフェクター、セントラルメモリーおよびエフェクターメモリーサブセットを詳細に分析するために、CCD7/CD45RA発現^{3 5}ならびにそれらのPD1レベルについて個々にチェックされるCD3⁺CD8⁺およびCD3⁺CD4⁺T細胞；7)制御性T細胞(Treg)はCD25^{hi}CD127^{lo}状態に従ってCD3⁺CD4⁺T細胞ゲート内で規定され、それに対してCXCR3とCCR6の組み合わせは、Tヘルパー系統間の区別を導いた。品質制御は、全ての得られたデータが、生存度50%およびCD3⁺CD8⁺およびCD3⁺CD4⁺T細胞2,000であることを要求した。

【0127】

骨髓パネルは、ブリリアント染色緩衝液中で上記のように予め混合されたFITC抗ヒトHLA-DR(クローンG46-6)、PE抗ヒトCD14(クローンMQP9)、PE-CF594抗ヒトCD56(クローンBI59)、PerCP-Cy5.5抗ヒトCD11b(クローンICRF44)、PE-Cy7抗ヒトCD19(クローンHIB19)、APC抗ヒトCD15(クローンHI98)、Alexa Fluor700抗ヒトCD11c(クローンB-1y6)、APC-H7抗ヒトCD20(クローン2H7)、BV421抗ヒトCD123(クローン7G3)、BV510抗ヒトCD3(クローンUCHT1)、およびBV650抗ヒトCD16(クローン3G8)を含んだ。1~2×10⁶の細胞を、50μlの2%FBS/PBS染色緩衝液中で、30分間室温で染色し、洗浄して上記のように分析した。ゲーティング戦略は以下の通りであった：1)ダブルットをゲートにより排除するFSC-H/FSC-Aドットプロット；2)CD3⁺リンパ球および死細胞を排除する510-A/FSC-Aドットプロット；3)生きているCD3⁻CD19⁻細胞および生きているCD3⁻CD19⁺細胞をCD20の同時発現に基づいて最終的にB細胞を生じさせるCD19⁺サブセットとともに選択するCD19/FSC-Aドットプロット；4)CD19⁻サブセットを、HLA-DR⁺骨髄系統とHLA-DR⁻骨髄系統の間を識別するために使用した；6)DR⁺細胞は、古典的、中間および非古典的単球のためのCD14/CD16発現により単球のサブセットに導かれた、7)それと反対にDR⁻細胞は、本発明者らをCD11b⁺CD14⁻/CD15^{hi}顆粒球性骨髄から誘導されたサプレッサー細胞(gMDS)に導いた；8)生きているCD3⁻CD19⁻細胞を、CD11b⁺DR¹/CD14⁺単球系骨髄から誘導されたサプレッサー細胞(mMDS)、CD14⁻CD56⁺CD16⁺/NFK細胞ならびに骨髄(CD11c^{hi}/CD14⁻)変種(flavov)の樹状細胞および形質細胞様(CD123^{hi}/CD14⁻)変種の樹状細胞にゲートさせるために使用した^{3 5}。

【0128】

全てのデータは、Studentのt-検定を用いて統計有意性について分析した。統計有意性は5%水準であった。

【0129】

結果

KRASバリアントを有するおよび有しない患者の臨床特徴

10

20

30

40

50

940名の患者をN R G腫瘍学R T O G 0522に登録し、そのうち891名(94.8%)は、プロトコール分析のために適格であり、413名は、K R A Sバリエントの試験に利用可能な生物学的試料を有した(46.4%)。K R A Sバリエントについて試験されなかった患者は、K R A Sバリエントについて試験された患者よりも有意に低年齢($p = 0.02$)であったが、差の中央値は僅か2年であった(56歳対58歳)(表1)。P F SおよびO Sも、K R A Sバリエントについて試験された患者および試験されなかった患者について同様であった[P F Sハザード比0.92(95% C I 0.76から1.13); O Sハザード比0.99(95% C I 0.78から1.25)]。

【表1-1】

表1:KRAS遺伝子型が既知であるか否かによる前処置の特徴

	既知のKRAS遺伝子型		p値
	あり (n=413)	なし (n=478)	
割り当てられた処置			1.0000 [2]
セツキシマブなし	207 (50.1%)	240 (50.2%)	
セツキシマブ	206 (49.9%)	238 (49.8%)	
年齢(歳)			0.0159 [3]
平均	57.5	56.3	
標準偏差	7.88	8.36	
中央値	58	56	
最低～最高	31 - 77	34 - 79	
Q1 - Q3	52 - 63	50 - 62	
性別			0.7554 [2]
男性	366 (88.6%)	420 (87.9%)	
女性	47 (11.4%)	58 (12.1%)	
人種			0.1306 [2]
白人	382 (92.5%)	428 (89.5%)	
非白人	31 (7.5%)	50 (10.5%)	
Zubrodパフォーマンスステータス			0.0895 [2]
0	260 (63.0%)	327 (68.4%)	
1	153 (37.0%)	151 (31.6%)	
喫煙歴:パック・年[1]	(n=367)	(n=404)	0.9281 [3]
平均	27.4	27.8	
標準偏差	27.50	28.75	
中央値	23.5	20.7	
最小～最大	0 - 162	0 - 150	
Q1 - Q3	1 - 42	0.1 - 44.9	
原発部位			0.2404 [2]
中咽頭	298 (72.2%)	327 (68.4%)	
下咽頭/喉頭	115 (27.8%)	151 (31.6%)	
p16状態(中咽頭のみ)	(n=188)	(n=133)	0.3731 [2]
p16陰性	54 (28.7%)	32 (24.1%)	
p16陽性	134 (71.3%)	101 (75.9%)	
Tステージ			0.3274 [3]
T2	170 (41.2%)	181 (37.9%)	
T3	149 (36.1%)	180 (37.7%)	
T4	94 (22.8%)	117 (24.5%)	

10

20

30

40

【表1-2】

表1:KRAS遺伝子型が既知であるか否かによる前処置の特徴

Nステージ	既知のKRAS遺伝子型		p値 0.7947 [3]
	あり (n=413)	なし (n=478)	
N0	46 (11.1%)	53 (11.1%)	
N1	36 (8.7%)	45 (9.4%)	
N2a	37 (9.0%)	41 (8.6%)	
N2b	139 (33.7%)	154 (32.2%)	10
N2c	137 (33.2%)	159 (33.3%)	
N3	18 (4.4%)	26 (5.4%)	

Std.Dev.=標準偏差;Q1=第1四分位;Q3=第3四分位。

[1]パック・年は、1年間1日当たり1パックのタバコを喫煙するのに相当する量と定義した。

[2]フィッシャーの正確検定。

[3]ウィルコクソンの順位和検定。

【0130】

分析時に、生存患者についての追跡期間の中央値は4.8年であった（範囲は0.2から6.9年）。KRASバリアントについて試験された413名の研究参加者のうち、5名（1.2%）がホモ接合（GG）および65名（15.7%）がヘテロ接合（TG）であり、この患者集団における全体的有病率は16.9%という結果であった。KRASバリアントとp16陽性の関連はなく、KRASバリアントは、p16陰性患者の17.4%およびp16陽性患者の16.0%に見出され、以前の研究と一致した^{2,3}。

【0131】

セツキシマブで処置された群 対 処置されなかった群における臨床特徴

KRASバリアントコホート内の、セツキシマブで処置されたサブセットは、セツキシマブを受けなかったサブセットより多くのp16陽性で中咽頭腫瘍を有する患者を有し（86.7%対50.0%、p=0.05）、白色人種の患者はより少なかった（87.5%対100%、p=0.04；表2）。非バリアントコホート内の、セツキシマブで処置されたサブセットは、セツキシマブを受けなかったサブセットよりも有意に年齢が低くかったが、差の中央値は2年に過ぎなかった（59歳対57歳、p=0.05）。

10

20

30

【表2-1】

表2:KRAS遺伝子型による前処置の特徴および割り当てられた処置

	非バリアント(TT)		KRASバリアント(GG/TG)		
	セツキシマブ なし (n=169)	セツキシマブ なし (n=174)	セツキシマブ なし (n=38)	セツキシマブ なし (n=32)	
年齢(歳)		p=0.05		p=0.22	
平均	56.7	58.5	57.6	55.6	
標準偏差	8.19	7.59	8.29	6.81	10
中央値	57	59	58	54.5	
最低～最高	31 - 77	41 - 76	38 - 75	42 - 69	
Q1 - Q3	52 - 62	53 - 64	53 - 63	51 - 61	
性別		p=0.31		p=0.44	
男性	146 (86.4%)	157 (90.2%)	33 (86.8%)	30 (93.8%)	
女性	23 (13.6%)	17 (9.8%)	5 (13.2%)	2 (6.3%)	
人種		p=0.69		p=0.04	
白人	157 (92.9%)	159 (91.4%)	38 (100.0%)	28 (87.5%)	
非白人	12 (7.1%)	15 (8.6%)	0 (0.0%)	4 (12.5%)	20
Zubrod パフォーマンスステータス		p=0.74		p=1.00	
0	109 (64.5%)	109 (62.6%)	23 (60.5%)	19 (59.4%)	
1	60 (35.5%)	65 (37.4%)	15 (39.5%)	13 (40.6%)	
喫煙歴:パック・年[1]		p=0.69		p=0.14	
平均	(n=150)	(n=154)	(n=35)	(n=28)	
標準偏差	26.5	26.7	35.1	26.8	
中央値	26.08	29.24	26.52	26.10	
最小～最大	27.25	17.8	34	20.5	
Q1 - Q3	0 - 150	0 - 162	0 - 90	0 - 110	30
p16状態(中咽頭のみ)		p=0.47		p=0.79	
中咽頭	118 (69.8%)	128 (73.6%)	29 (76.3%)	23 (71.9%)	
下咽頭/喉頭	51 (30.2%)	46 (26.4%)	9 (23.7%)	9 (28.1%)	
p16状態(全部位)		p=0.29		p=0.05	
p16陰性	(n=77)	(n=82)	(n=14)	(n=15)	
p16陽性	25 (32.5%)	20 (24.4%)	7 (50.0%)	2 (13.3%)	
p16陰性	52 (67.5%)	62 (75.6%)	7 (50.0%)	13 (86.7%)	40
p16陽性					
		p=0.59		p=0.14	
	(n=108)	(n=118)	(n=22)	(n=23)	
p16陰性	50 (46.3%)	50 (42.4%)	13 (59.1%)	8 (34.8%)	
p16陽性	58 (53.7%)	68 (57.6%)	9 (40.9%)	15 (65.2%)	

【表2-2】

表2:KRAS遺伝子型による前処置の特徴および割り当てられた処置

	非バリアント(TT)		KRASバリアント(GG/TG)		10
	セツキシマブなし (n=169)	セツキシマブ(n=174)	セツキシマブなし (n=38)	セツキシマブ(n=32)	
Tステージ		p=0.39		p=0.24	
T2	64 (37.9%)	74 (42.5%)	16 (42.1%)	16 (50.0%)	
T3	64 (37.9%)	62 (35.6%)	11 (28.9%)	12 (37.5%)	
T4	41 (24.3%)	38 (21.8%)	11 (28.9%)	4 (12.5%)	
Nステージ		p=0.07		p=0.12	
N0	11 (6.5%)	23 (13.2%)	5 (13.2%)	7 (21.9%)	
N1	19 (11.2%)	14 (8.0%)	1 (2.6%)	2 (6.3%)	
N2a	11 (6.5%)	19 (10.9%)	4 (10.5%)	3 (9.4%)	
N2b	57 (33.7%)	58 (33.3%)	12 (31.6%)	12 (37.5%)	20
N2c	63 (37.3%)	54 (31.0%)	13 (34.2%)	7 (21.9%)	
N3	8 (4.7%)	6 (3.4%)	3 (7.9%)	1 (3.1%)	

Q1=第1四分位;Q3=第3四分位。

[1]パック・年は、1年間1日当たり1パックのタバコを喫煙するのに相当する量と定義した。
年齢、パック・年、Tステージ、およびNステージに対するP値は、ウィルコクソン順位和検定による。

性別、人種、Zubrodパフォーマンスステータス、原発部位、およびp16状態に対するP値はフイッシャーの正確検定による。

30

【0132】

KRASバリアント状態、セツキシマブおよび無増悪生存

KRASバリアント群において、セツキシマブ処置の有意の陽性効果が、最初の1年にPFSについて見出された(ハザード比0.31、95%CI 0.10から0.94、p=0.04)が、しかし1年後には有意差は見出されなかった(ハザード比1.76、95%CI 0.62から4.95、p=0.28)。KRASバリアント患者について、セツキシマブ処置の効果は、時間をわたり有意に変化した[処置と無増悪生存時間の間の相互作用についてp=0.02(>1年)]。非バリアント群では、セツキシマブのPFSに対する影響はなく、処置効果のハザード比[セツキシマブ/セツキシマブなし]は1.00であった(95%CI 0.72から1.38、p=0.98)。KRASバリアント状態および割り当てられた処置によるPFSを図1Aに示す。KRASバリアントおよび非バリアント患者の両方を含む多変量解析(表3)で、処置、時間(>1年)およびKRAS群の間で相互作用は依然有意であり(p=0.02)、KRASバリアント群では処置と時間との間に相互作用があるが、非バリアント群ではないことを示す。最初の1年におけるKRASバリアント群についての処置効果は、0.42(p=0.12)であり、その後1.22(p=0.64)であった(相互作用についてp=0.10)。非バリアント群では、処置効果は、最初の1年およびその後に、それぞれ1.20(p=0.39)および0.79(p=0.38)であった(相互作用についてp=0.21)。

40

【表3】

表3 PFSおよびOSの多変量解析(n=413)

	PFS (179事象)		OS (134事象)	
	HR(95%CI)	p値	HR(95%CI)	p値
処置×時間×KRAS	--	0.02	--	0.04
KRASバリアントの場合の処置×時間	--	0.10	--	0.05
非バリアントの場合の処置×時間	--	0.21	--	0.80
早期の場合[1]の処置×KRAS	--	0.07	--	0.13
後期の場合の処置×KRAS	--	0.36	--	0.29
KRASバリアントの場合の早期処置の効果[1]	0.42 (0.14-1.26)	0.12	0.27 (0.06-1.21)	0.09
KRASバリアントの場合の後期処置の効果	1.22 (0.53-2.80)	0.64	1.47 (0.53-4.03)	0.46
非バリアントの場合の早期処置の効果[1]	1.20 (0.80-1.80)	0.39	0.89 (0.56-1.41)	0.62
非バリアントの場合の後期処置の効果	0.79 (0.47-1.33)	0.38	0.81 (0.45-1.48)	0.49
PFS、無増悪生存;OS、全生存;HR、ハザード比;CI、信頼区間。 [1] PFSについて最初の1年、OSについて最初の2年。 処置(セツキシマブ対セツキシマブなし)、処置×PFS/OS時間の相互作用、KRAS(バリアント対非バリアント)、処置×KRAS相互作用、処置×PFS/OS時間×KRASの相互作用、年齢、Zubrodパフォーマンスステータス(1対0)、原発部位(中咽頭対その他)、Tステージ(T4対T2~3)、およびNステージ(N2b~3対N0~2a)を含むCoxモデルから推定したハザード比。				

【0133】

[0124] 不全のパターンの多変量解析は、LRFよりもむしろDMが、KRASバリアント患者についてPFSにおける差に貢献している可能性があること：KRASバリアント群では、DMについての処置効果は、0.45であり(95%CI 0.12から1.70)およびLRFについては0.84(95%CI 0.29から2.42)であることを示す。非バリアント群では、DMおよびLRFについての処置効果は、それぞれ、0.90(95%CI 0.48から1.70)および1.24(95%CI 0.80から1.92)である。KRASバリアント状態および割り当てられた処置によるLRFおよびDMを、図1Bおよび1Cに示す。

【0134】

KRASバリアント状態、セツキシマブおよび全生存

KRASバリアント患者について、OSに対して、最初の2年には8週間のセツキシマブ処置の有意にポジティブな影響もあったが(ハザード比0.19、95%CI 0.04から0.86、p=0.03)、その後はなかった(ハザード比2.34、95%CI 0.58から9.41、p=0.23)。処置効果と生存時間(>2年)の間の相互作用は有意であり(p=0.02)、最初の2年とその後では異なる処置効果を示した。非バリアント群では、セツキシマブ処置の全生存に対する影響はなかった(処置効果ハザード比[セツキシマブ/セツキシマブなし]0.90(95%CI 0.62から1.30、p=0.56))。KRASバリアント状態および割り当てられた処置によるOSを、図1Dに示す。KRASバリアント患者および非バリアント患者の両方を含む多変量解析(表3)において、処置、時間(>2年)、およびKRAS群の間の相互作用は有意であり(p=0.04)、KRASバリアント群では処置と時間との間に相互作用があるが、非バリアント群ではそれがないことが示された。KRASバリアント群についての最初の2年における処置効果は0.27(p=0.09)であり、その後は1.47(p=0.4)

10

20

30

40

50

6)である(相互作用について $p = 0 . 05$)。非バリアント群では、処置効果は、最初の2年では0 . 89($p = 0 . 62$)であり、その後0 . 81($p = 0 . 49$)(相互作用について $p = 0 . 80$)である。

【0135】

K R A S バリアント患者および毒性の転帰

K R A S バリアント患者は、セツキシマブを用いなくても用いてもグレード3 ~ 4の同様なレベルの粘膜炎(47 . 4 %対50 . 0 %)を有し、差は有意でないようと思われた[OR 1 . 11(95 %CI 0 . 43から2 . 85)、 $p = 0 . 83$]。対照的に、セツキシマブの添加は、非バリアント患者におけるグレード3 ~ 4粘膜炎を37 . 9 %から50 . 6 %に増大させ、差は有意であった(OR 1 . 68 [95 %CI 1 . 09から2 . 58]、 $p = 0 . 02$)(表4A)。しかしながら、K R A S バリアントの状態、セツキシマブ処置および粘膜炎の間の相互作用の検定は、有意でなかった($p = 0 . 43$)。K R A S バリアント患者も、セツキシマブを用いなくても用いても、門脈内側にグレード3 ~ 4の同様なレベルの皮膚反応を有した、18 . 4 %対15 . 6 %(OR 0 . 82 [95 %CI 0 . 23から2 . 89]、 $p = 0 . 76$)(表4B)。対照的に、非バリアント患者について、セツキシマブの添加は、門脈内側のグレード3 ~ 4の皮膚反応を11 . 2 %から21 . 8 %に増大させ、差は有意であった(OR 2 . 21 [95 %CI 1 . 21から4 . 01]、 $p = 0 . 05$)が、やはり相互作用の検定は有意でなかった($p = 0 . 16$)。非バリアント患者およびK R A S バリアント患者の両方とも、セツキシマブで増大した門脈外側の皮膚反応を発生させた(非バリアントのOR 50 . 15、 $p < 0 . 001$; K R A S バリアントのOR 8 . 54、 $p = 0 . 05$)(表4C)。K R A S バリアント患者は、粘膜および門脈内側の皮膚の両方で、非バリアント患者と比較してより高いベースラインの毒性を有するようと思われたが、これらの差は、おそらく試料サイズのために、統計的に有意ではなかった。

【表4】

表4A: KRAS バリアントおよび割り当てられた処置による、グレード3~4の処置が関連する[1]放射線粘膜炎

KRAS	割り当てられた処置	患者	事象	オッズ比 (95%信頼区間)
非バリアント	セツキシマブなし	169	64 (37.9%)	参照
	セツキシマブ	174	88 (50.6%)	1.68 (1.09-2.58) p=0.02
	セツキシマブなし	38	18 (47.4%)	参照
	セツキシマブ	32	16 (50.0%)	1.11 (0.43-2.85) p=0.83
合計		413	186 (45.0%)	相互作用 p=0.43

表4B: KRAS バリアントおよび割り当てられた処置による、グレード3~4の処置が関連する[1]門脈内側の皮膚反応[2]

非バリアント	セツキシマブなし	169	19 (11.2%)	参照
バリアント	セツキシマブ	174	38 (21.8%)	2.21 (1.21-4.01) p=0.01
	セツキシマブなし	38	7 (18.4%)	参照
合計	セツキシマブ	32	5 (15.6%)	0.82 (0.23-2.89) p=0.76
		413	69 (16.7%)	相互作用 p=0.16

表4C: KRAS バリアントおよび割り当てられた処置による、グレード3~4の処置が関連する[1]門脈外側の皮膚反応[3]

非バリアント	セツキシマブなし	169	1 (0.6%)	参照
バリアント	セツキシマブ	174	40 (23.0%)	50.15 (6.81-369.54) p<0.001
	セツキシマブなし	38	1 (2.6%)	参照
合計	セツキシマブ	32	6 (18.8%)	8.54 (0.97-75.20) p=0.05
		413	48 (11.6%)	相互作用 p=0.24

共変量 KRAS(バリアント対非バリアント)、処置(セツキシマブ対セツキシマブなし)および KRAS と処置の相互作用を用いて、ロジスティック回帰モデルから推定したオッズ比。

[1]決定的に、多分、または可能性として、プロトコール処置に関連する。

[2]放射線皮膚炎 NOS; 放射線リコール症候群。

[3]そう痒症; 剥脱性皮膚炎 NOS; ざ瘡 NOS; 手指障害 NOS。

【0136】

K R A S バリアント、セツキシマブ、および p 1 6

セツキシマブで処置された群における p 1 6 および境界線上の不均衡の既知の予後値のために、p 1 6 の状態を考慮して、K R A S バリアント患者における転帰を評価した。P F S については、セツキシマブ処置、K R A S 、および p 1 6 (p = 0 . 2 0) の間に 3 通りの相互作用について幾つかの証拠がある。セツキシマブを用いずに処置された患者では、K R A S と p 1 6 の間の 2 通りの相互作用が有意であった (p = 0 . 0 4) 。 K R A S バリアント / p 1 6 陽性患者は、非バリアント / p 1 6 陽性患者と比較してより劣る P F S (H R 2 . 5 9) を有した。反対の効果が、K R A S バリアント / p 1 6 陰性患者で見られ、彼らは、非バリアント / p 1 6 陰性患者と比較して、改善された P F S を有した

10

20

30

40

50

(H R 0 . 6 2) (図 2 A)。

【 0 1 3 7 】

対照的に、8週間のセツキシマブ処置は、K R A S バリアント患者について、P F S に対する p 1 6 の差次的な効果を除くように思われた (p 1 6 陽性に対して H R 0 . 8 9 および p 1 6 隆性に対して 0 . 7 7 ; p = 0 . 8 4) (図 2 B)。セツキシマブ処置効果は、非バリアント / p 1 6 陽性患者の 1 . 7 4 (処置と K R A S の間の相互作用について p = 0 . 1 4) と比較して、K R A S バリアント / p 1 6 陽性患者では 0 . 6 0 であるので、セツキシマブのポジティブな影響は、主として K R A S バリアント / p 1 6 陽性患者に限定されるように見えた。p 1 6 隆性患者では、処置効果は、K R A S バリアントおよび非バリアント患者について同様であるが、時間により影響され得る (H R 1 . 1 0 および 0 . 8 8 、相互作用について p = 0 . 7 5)。

10

【 0 1 3 8 】

O S について、セツキシマブ処置、K R A S バリアントの状態、および p 1 6 (p = 0 . 0 2) の間に、有意の 3 通りの相互作用がある。セツキシマブを用いずに処置された患者 (p = 0 . 1 0) とセツキシマブを用いて処置された患者で (p = 0 . 1 1) 、 p 1 6 による K R A S の差次的な効果があり得る。セツキシマブを用いずに処置された場合、K R A S バリアント / p 1 6 陽性患者は、非バリアント / p 1 6 陽性患者と比較してより劣った O S (H R 2 . 4 8) を有した。反対の効果が K R A S バリアント / p 1 6 隆性患者で見られ、彼らは、非バリアント / p 1 6 隆性患者と比較して改善された O S を有した (H R 0 . 6 1) (図 3 A)。

20

【 0 1 3 9 】

O S について、8週間のセツキシマブ処置は、K R A S バリアント患者について転帰に影響し続けるように思われ、K R A S バリアント / p 1 6 陽性患者は、非バリアント / p 1 6 陽性患者よりも良い O S を有した (H R 0 . 2 2) (図 3 B)。p 1 6 陽性患者では、処置効果は、非バリアント患者の 2 . 3 6 (処置と K R A S の間の相互作用について p = 0 . 0 5) と比較して、K R A S バリアント患者では 0 . 2 1 である。反対の効果が、K R A S バリアント / p 1 6 隆性患者で見られ、彼らは、セツキシマブ添加 (H R 1 . 4 3) でより劣る O S を有するように思われたが、それらの O S は時間をわたり劇的に減少した。p 1 6 隆性患者では、処置効果は、非バリアント患者における 0 . 6 2 と比較して、K R A S バリアント患者で 1 . 4 7 である (p = 0 . 2 4)。

30

【 0 1 4 0 】

セツキシマブが、K R A S バリアント患者に対して、P F S および O S にどのように有意に影響したかを理解するために、K R A S バリアント患者について、局所不全および遠隔不全を、8週間のセツキシマブ処置のみをともなって、またはそれをともなわずに評価した。K R A S バリアント / p 1 6 隆性患者では、セツキシマブは、これらの患者が局所不全を有しなかったので、局所不全を減少させるように思われる。K R A S バリアント / p 1 6 陽性患者では、セツキシマブの添加で局所不全にいかなる改善も生じなかったように思われる (図 1 E)。セツキシマブは、p 1 6 陽性または隆性のいずれであっても、K R A S バリアント患者については、遠隔転移性不全の率を減少させるように思われ、それが、p 1 6 陽性患者については長く持続したが、p 1 6 隆性患者では続かなかった (図 1 F)。

40

【 0 1 4 1 】

K R A S バリアントおよび免疫学的展望

K R A S バリアント / p 1 6 陽性患者が、セツキシマブの添加で有意に改善された O S を有したが、セツキシマブを用いない場合、おそらく遠隔転移性疾患における変化により有意に劣ったという事実は、K R A S バリアント患者は、放射線に対して不十分な免疫応答を有し得、セツキシマブは何らかの形でそれを克服することに役立つことを示す。それ故、K R A S バリアント患者で、照射前のベースライン免疫における差を評価するために、p 1 6 陽性 H N S C C 患者で免疫系を評価した。

【 0 1 4 2 】

50

p 16 陽性の進行した H N S C C 患者のコホートで、本発明者らは、放射線処置の開始前に、ベースライン免疫のプロファイリングを実施した。男性と女性とは、彼らの免疫学的構成が実質的に異なり得るという事実のために、また被験体の大部分（26名のうち21名；81%）は、この研究において男性であったので、分析は、男性のみを含めて能率化した。このコホート中の K R A S バリアントを有する男性（3/21）におけるベースライン免疫は、その残りとは、比較的多くの C D 4⁺ P B M C (p = 0.034) ならびより高い C D 4 / C D 8 比 (p = 0.036) を有することにより、有意に異なった。対照的に、ナチュラルキラー細胞（N K、p = 0.017）および顆粒球性骨髓から誘導されたサブレッサー細胞（g M D S C、p = 0.029）は、K R A S バリアント患者で有意に少なかった（図4A）。C D 4 系統内で、C D 4 5 R A⁺ C C R 7⁻ エフェクター細胞は、たとえ統計的に有意でなくても、C D 4 5 R A⁺ C C R 7⁺ ナイーブおよび C D 4 5 R A⁻ C C R 7⁺ セントラルメモリーサブセットの利点になることはより頻度が少ない（p = 0.006）。それ故、K R A S バリアント患者は、リンパおよび骨髓系統の両方に影響する免疫の均衡が大きくシフトしているようであり、そのことはベースライン免疫の欠損と矛盾しないようである（図4B）。

10

【0143】

（実施例2）

以下の例は、K R A S バリアント患者における増大した放射線感受性を示す。臨床的に変化した放射線感受性の生物学的および機構的根拠を研究するために、一連の正常およびがんのマッチした、同質遺伝子のK R A S バリアントを有する細胞系統と有しない細胞系統を、標的化ゲノム編集により創り出した（表5）。

20

【表5】

細胞系統名	KRAS バリアントの遺伝子型	組織型(起源)
MCF10A WT	TT(野生型)	正常(乳腺上皮)
MCF10A MT1	TG(バリアント)	正常(乳腺上皮)
MCF10A MT2	TG(バリアント)	正常(乳腺上皮)
MCF10A WT + P53 ノックアウト	TT(野生型)	正常(乳腺上皮)
MCF10A MT + P53 ノックアウト	TG(バリアント)	正常(乳腺上皮)
H1299 WT	TT(野生型)	がん(非小細胞肺)
H1299 MT	TG(バリアント)	がん(非小細胞肺)
HCC1937 WT	TT(野生型)	がん(トリプルネガティブ乳房)
HCC1937 MT	TG(バリアント)	がん(トリプルネガティブ乳房)
SKOV3 WT	TT(野生型)	がん(卵巣)
SKOV3 MT	TG(バリアント)	がん(卵巣)

30

【0144】

K R A S バリアントの位置的ヘテロ接合の挿入を、各同質遺伝子対で、D N A およびR N A の配列決定により確認した。対立遺伝子特異的m R N A 発現およびウェスタンプロットによるK R A S タンパク質発現の分析により、各同質遺伝子対について、K R A S の遺伝子座における2対立遺伝子の発現を確認した。最終的に、各同質遺伝子細胞系統の真正性を G e n e t i c a L a b o r a t o r i e s におけるS T R 分析により証明した。

40

【0145】

二本鎖（D S）切断修復は、K R A S バリアント腫瘍組織と比較してK R A S バリアント正常組織で非効率的である。ベースライン、ならびに同質遺伝子対で、放射線をともなうおよび放射線をともなわない残存二本鎖切断を評価するために、H 2 A X アッセイを

50

実施した。K R A S バリアントを有するかまたは有しない正常および腫瘍組織を代表する M C F 1 0 A および H 1 2 9 9 細胞系統を評価した。細胞を 5 G y で照射して、ベースライン、放射線後 3 0 分および 4 時間に、F I T C コンジュゲート H 2 A X の免疫蛍光分析を、フローサイトメトリーによりて実施した(図 5)。正常組織(M C F 1 0 A、1 番と表示された青のバーおよび 2 番と表示された赤のバー)では、全ての時点で、K R A S バリアント細胞系統においてより多くの二本鎖切断があった(赤対青、2 つの別のバリアント系統の平均、標準偏差を含む)ことが見出された。対照的に、腫瘍組織(H 1 2 9 9、3 番と表示された緑色のバーおよび 4 番と表示された紫色)では、ベースラインおよび 4 時間で、K R A S バリアント系統では二本鎖切断がより少なかったことが見出された(紫色対緑色)。これらの知見は、腫瘍組織と比較して K R A S バリアント正常組織におけるより劣ったDNA維持および修復を示す。

10

【0146】

K R A S バリアントの同質遺伝子正常組織(M C F 1 0 A)および腫瘍(H 1 2 9 9)細胞系統の放射線感受性を、正常および腫瘍両方の同質遺伝子のK R A S バリアントを有するかまたは有しない細胞系統におけるクローニ原性の細胞生存アッセイを使用して評価した。K R A S バリアントの正常組織細胞系統は、その姉妹非バリアント系統と比較して、劇的に放射線感受性であることが観察された。その非バリアント姉妹と比較して、K R A S バリアント腫瘍系統における適度な放射線感受性が観察された(図 6)。

20

【0147】

(実施例 3)

以下の例は、K R A S バリアント患者が、免疫療法に対する毒性応答、即ち、免疫に関連する有害な事象(i r A E)を経験する尤度の統計的に有意な低下を有することを示す。i r A E は、例えば、A b d e l - W a h a b ら、P L O S O N E、11巻(7号):e 0 1 6 0 2 2 1 頁(2 0 1 6 年)で論じられている。

30

【0148】

抗 P D 1 抗体療法 Keytruda(登録商標)(ペンプロリズマブ)またはO p d i v o(登録商標)(ニボルマブ)で、または抗 P D L 1 抗体療法のT E C E N T R I Q(登録商標)(アテゾリズマブ)で処置された 8 8 名の患者からデータを集めた。表 6 に示したように、処置を受けた 8 8 名の患者のうち、5 7 名の患者は、処置に対する応答で毒性を経験しなかったが、3 1 名の患者が、毒性応答を経験した。毒性を経験しない 5 7 名の患者のうち、1 4 名がK R A S バリアントを有した。毒性を経験した 3 1 名の患者のうち、2 名がK R A S バリアントを有した。表 6 に示したこれらのデータのカイ 2 乗分析に基づいて、4 . 4 2 6 8 のカイ 2 乗値および 0 . 0 3 5 3 7 8 の p 値(p < 0 . 0 5 が有意である)を考慮すると、K R A S バリアントを保有している患者は、免疫療法を用いる処置に対して、K R A S バリアントを保有していない患者と比較して、毒性応答の尤度の統計的に有意な低下を有することが示された。したがって、K R A S バリアントを保有している患者は、免疫療法、例えば、チェックポイント阻害剤療法に対する無毒性応答を有する可能性が非常に高い。

【表6】

表6.毒性:KRASについての独立カイ2乗検定

	KRASバリアント	KRASなし	全患者
無毒性	14 ¹ (10.36) ² [1.28] ³	43 ¹ (46.64) ² [0.28] ³	57
毒性	2 ¹ (5.64) ² [2.35] ³	29 ¹ (25.36) ² [0.52] ³	31
全患者	16	72	88(総計)

¹観察された患者の合計数²予想された患者の合計数³カイ2乗統計

10

【0149】

したがって、この例に基づいて、医師は、患者がK R A Sバリアントを保有しているかどうかを決定することにより、患者に対して特定の免疫療法を投与するか否かを決定することができる。K R A Sバリアントの存在は、患者が治療に対する無毒性応答を有している可能性があること、および患者が治療を安全に続けると予想することができるることを示すであろう。これは、医師が、患者のがんを処置するのに適した処置レジメンを決定する際に、考慮に入れるための1つの重要な要因である。対照的に、患者中におけるK R A Sバリアントの不在は、患者の免疫療法に対する予測される毒性を確定するものではない。

20

【0150】

等価物

本発明は、本発明の精神または必須の特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で具体化することもできる。それ故、前述の実施形態は、本明細書に記載された本発明に対する限定を課すものではなく、全ての点で例示と考えられるべきである。したがって、本発明の範囲は、前述の記載によらず、添付の特許請求の範囲により示され、特許請求の範囲の等価の意味および範囲内に入る全ての変化は本発明の内に包含されることが意図される。

30

【0151】

参照による組み込み

本出願で引用された全ての刊行物および特許文献は、恰も、個々の各刊行物または特許文献の内容全体が、本明細書に組み込まれたかの如く、同じ程度で、全ての目的のために、それらの全体で、参照により組み込まれる。

参照文献

【化 1 5】

1. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al: Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 363:24-35, 2010
2. Ang KK, Zhang Q, Rosenthal DI, et al: Randomized Phase III Trial of Concurrent Accelerated Radiation Plus Cisplatin With or Without Cetuximab for Stage III to IV Head and Neck Carcinoma: RTOG 0522. *J Clin Oncol*, 2014
3. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al: Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354:567-78, 2006
4. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, et al: Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359:1116-27, 2008
5. Fakhry C, Westra W, Li S, et al: Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100:261-269, 2008
6. Chung C, Zhang Q, Kong C, et al: p16 protein expression and human papillomavirus status as a prognostic biomarker of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 32:3930-8, 2014
7. Chung Y, Lee M, Horng C, et al: Use of combined molecular biomarkers for prediction of clinical outcomes in locally advanced tonsillar cancers treated with chemoradiotherapy alone. *Head Neck* 31:9-20, 2009
8. Spanos W, Nowicki P, Lee D, et al: Immune Response During Therapy with Cisplatin or Radiation for Human Papillomavirus-Related Head and Neck Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 135:1137-1146, 2009
9. Pogorzeiski M, Ting S, Gaur T, et al: Impact of human papilloma virus infection on the response of head and neck cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapy. *Cell Death Dis* 5, 2014
10. Rosenthal D, Harari P, Giralt J, et al: Association of Human Papillomavirus and p16 Status with outcomes in the IMCL-9815 Phase III registration trial for patients with locoregionally advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radiotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol* Dec 15, 2015
11. Saridaki Z, Weidhaas J, Lenz H-J, et al: A let-7 microRNA-binding site polymorphism in KRAS predicts improved outcome in metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with salvage cetuximab/panitumumab monotherapy. *Clin Cancer Res* 20:4499-510, 2014
12. Chin L, Ratner E, Leng S, et al: A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 68:8535-40, 2008

10

20

30

【化 1 6】

13. Paranjape T, Heneghan H, Lindner R, et al: A 3'-untranslated region KRAS variant and triple-negative breast cancer: a case-control and genetic analysis. *Lancet Oncol* 12:377-86, 2011
14. Ratner E, Lu L, Boeke M, et al: A KRAS-variant in Ovarian Cancer Acts as a Genetic Marker of Cancer Risk. *Cancer Research* 15:6509-15, 2010
15. Pilarski R, Patel D, Weitzel J, et al: A KRAS-variant is associated with risk of developing double primary breast and ovarian cancer. *PLoS ONE* 7:e37891, 2012
16. Ratner E, Keane F, Lindner R, et al: A KRAS-variant is a Biomarker of Poor Outcome, Platinum Chemotherapy Resistance and a Potential Target for Therapy in Ovarian Cancer. *Oncogene* Dec 5, 2011 10
17. Weidhaas J, Kim E, Herbst R, et al: The KRAS-variant and treatment response in BATTLE-1. *J Clin Oncol* 32:suppl; abstr 8135, 2014
18. Graziano F, Canestrari E, Loupakis F, et al: Genetic modulation of the Let-7 microRNA binding to KRAS 3'-untranslated region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage cetuximab-irinotecan. *Pharmacogenomics J* 10:458-64, 2010
19. Zhang W, Winder T, Ning Y, et al: A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of KRAS gene predicts response in wild-type KRAS patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. *Ann Oncol* 22:104-9, 2011 20
20. Ganzinelli M, Rulli E, Caiola E, et al: Role of KRAS-LCS6 polymorphism in advanced NSCLC patients treated with erlotinib or docetaxel in second line treatment (TAILOR). *Sci Rep* 5:16331, 2015
21. Sclafani F, Chau I, Cunningham D, et al: Prognostic role of the LCS6 KRAS variant in locally advanced rectal cancer: results of the EXPERT-C trial. *Annals of Oncology* 26:9, 2015
22. Christensen B, Moyer B, Avissar M, et al: A let-7 microRNA binding site polymorphism in the KRAS 3'UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis* 30:1003-7, 2009
23. Chung CH, Lee JW, Slebos RJ, et al: A 3'UTR KRAS variant is associated with cisplatin resistance in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Oncol*, 2014 30
24. De Ruyck K, Duprez F, Ferdinand L, et al: A let-7 microRNA polymorphism in the KRAS 3'UTR is prognostic in oropharyngeal cancer. *Cancer Epidemiol*. 38:591-8, 2014
25. Srivastava R, Lee S, Andrade Filho P, et al: Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 19:1858-72, 2013
26. Stephenson R, Lim C, Matthews M, et al: TLR8 stimulation enhances cetuximab-mediated natural killer cell lysis of head and neck cancer cells and dendritic cell cross priming of EGFR-specific CD8+ T cells. *Cancer Immunol Immunother* 62:1347-1357, 2013
27. Yang X, Zhang X, Mortenson E, et al: Cetuximab-mediated Tumor Regression Depends on Innate and Adaptive Immune Responses. *Molecular Therapy* 21:91-100, 2012 40
28. Paranjape T, Heneghan H, Lindner R, et al: A 3'-untranslated region KRAS variant and triple-negative breast cancer: a case-control and genetic analysis. *Lancet Oncology* 12:377-86, 2011

【化17】

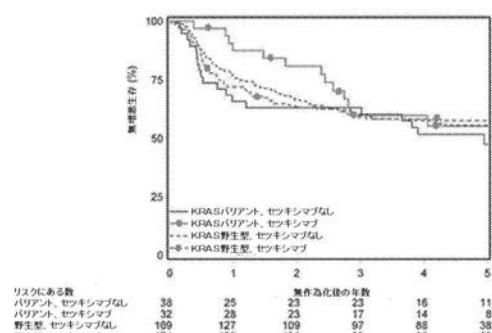
29. Smakman N, Veenendaal L, van Diest P, et al: Dual effect of KRAS(K12) knockdown on tumorigenesis: increased immune-mediated tumor clearance and abrogation of tumor malignancy. *Oncogene* 24:8338-42, 2005
30. Sathe A, Ayyar K, Reddy K: MicroRNA let-7 in the spotlight: Role in innate immunity. *Inflammation & Cell Signaling* e109:1-8, 2014
31. Chin L, Ratner E, Leng S, et al: A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3'UTR Increases Non-Small Cell Cancer Risk. *Cancer Research* 68:8535-40, 2008
32. Kalbfleisch J, Prentice R: *The Statistical Analysis of Failure Time Data*. New York, Wiley, 1980
33. Kaplan E, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Stat Assoc* 53:457-481, 1958
34. Cox D: Regression models and life tables. *J Royal Stat Soc, Series B* 34:187-229, 1972
35. Maecker H, McCoy J, Nussenblatt R: Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 12:471, 2012
36. Sebio A, Pare L, Paez D, et al: The LCS6 polymorphism in the binding site of let-7 microRNA to the KRAS 3'-untranslated region: its role in the efficacy of anti-EGFR-based therapy in metastatic colorectal cancer patients. *Pharmacogenet Genomics* 23:142-7, 2013
37. John-Aryankalayil M, Palayoor ST, Cerna D, et al: Fractionated radiation therapy can induce a molecular profile for therapeutic targeting. *Radiat Res* 174:446-58, 2010

10

20

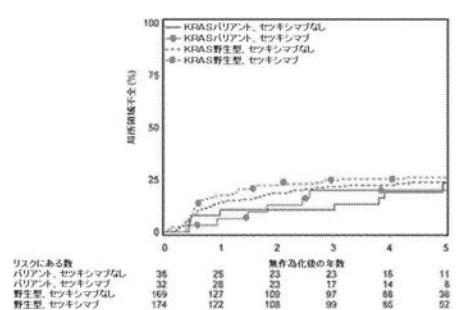
【図1A】

Figure 1A



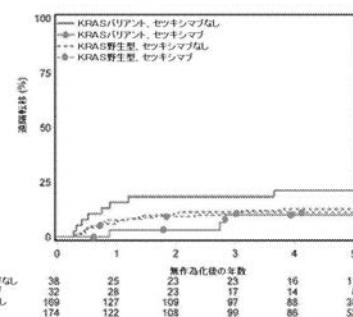
【図1B】

Figure 1B



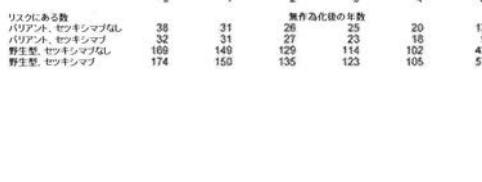
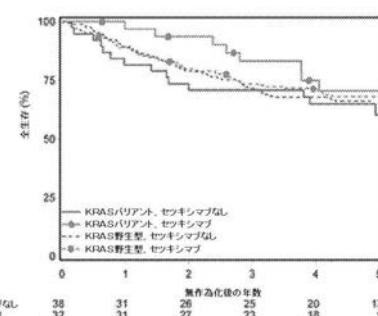
【図1C】

Figure 1C



【図1D】

Figure 1D



(四 1 E)

(义 1 F)

Figure 1E

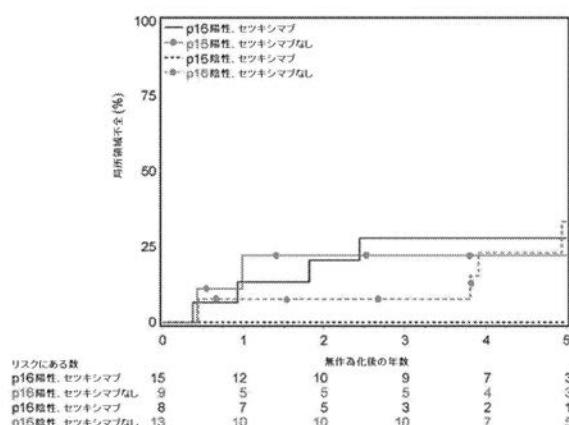
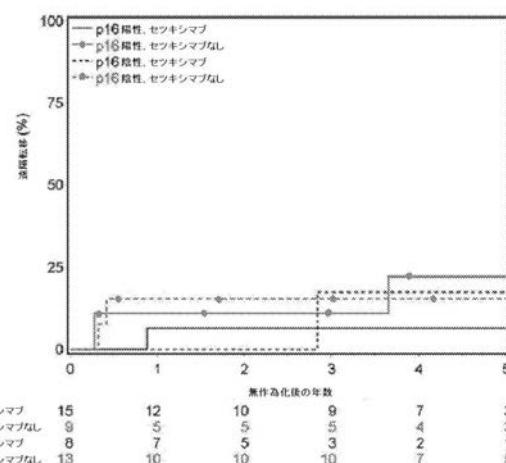


Figure 1F



(2 A)

〔 図 3 〕

FIGURE 2A

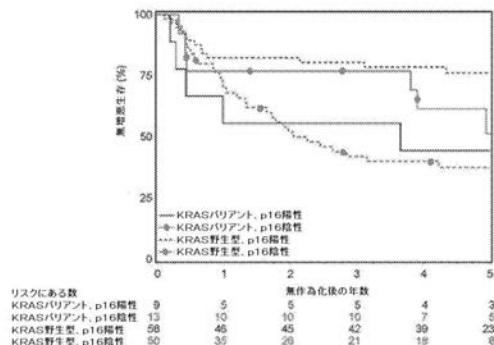
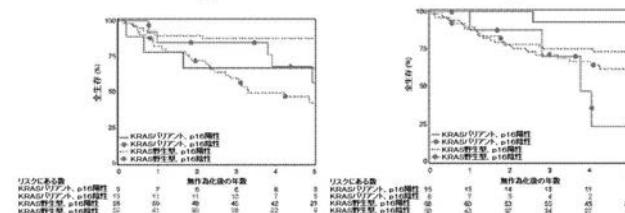


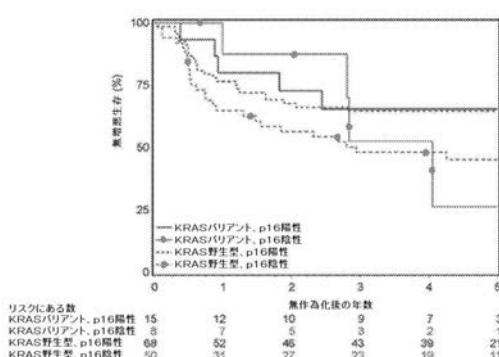
Figure. 3A

Figure. 3B



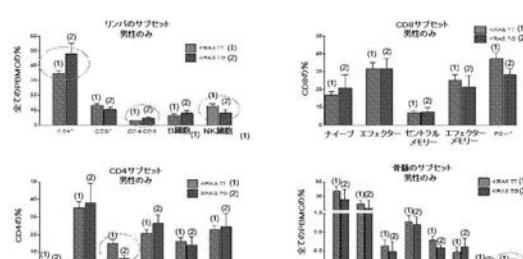
〔図2B〕

Figure 2B



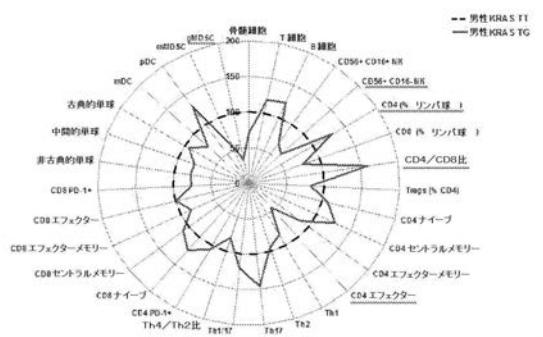
〔圖 4-A〕

Figure 1A



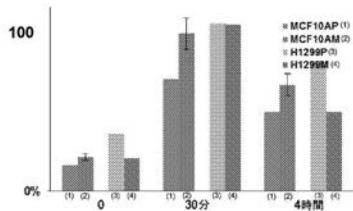
【図4B】

Figure 4B.



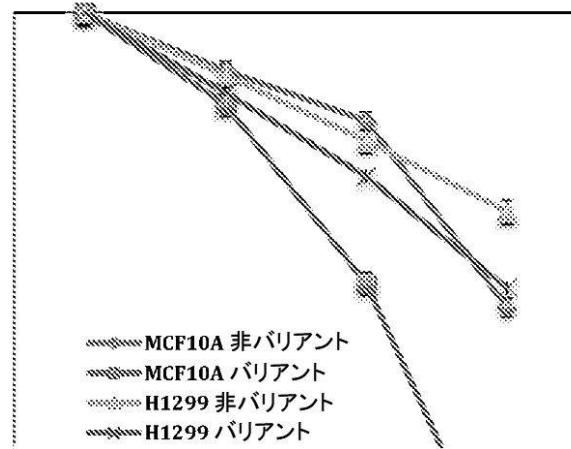
【図5】

Figure 5.



【図6】

Figure 6



【配列表】

2019515035000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2017/029938
Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)	
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:</p> <p>a. <input type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input checked="" type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/029938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 ADD.
--

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/193937 A1 (UNIV YALE [US]) 4 December 2014 (2014-12-04) the whole document -----	1-13,23
X	WO 2012/129352 A1 (UNIV YALE [US]; WEIDHAAS JOANNE B [US]) 27 September 2012 (2012-09-27) the whole document -----	1-5, 9-15,20
X	CN 103 547 683 A (UNIV YALE) 29 January 2014 (2014-01-29) the whole document ----- -/-	1-5, 9-13,22

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report
--

8 September 2017

20/09/2017

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

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

Cornelis, Karen

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2017/029938

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Z. SARIDAKI ET AL: "A let-7 microRNA-Binding Site Polymorphism in KRAS Predicts Improved Outcome in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with Salvage Cetuximab/Panitumumab Monotherapy", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 20, no. 17, 1 September 2014 (2014-09-01), pages 4499-4510, XP055404510, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0348 the whole document -----	14-21
A	XIN DAI ET AL: "Let-7 Sensitizes KRAS Mutant Tumor Cells to Chemotherapy", PLOS ONE, vol. 10, no. 5, 6 May 2015 (2015-05-06), page e0126653, XP055404530, DOI: 10.1371/journal.pone.0126653 -----	1-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2017/029938

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2014193937 A1	04-12-2014	NONE	
WO 2012129352 A1	27-09-2012	AU 2012203968 A1 EP 2689030 A1 US 2014065615 A1 WO 2012129352 A1	11-10-2012 29-01-2014 06-03-2014 27-09-2012
CN 103547683 A	29-01-2014	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	A 6 1 K 39/395	T
	C 1 2 Q 1/68	Z N A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,C1,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ウェイドハース, ジョアン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90025, ロサンゼルス, ウィルシェア ブールバード
11600, スイート 410

Fターム(参考) 2G045 AA26 DA13

4B063 QA05 QA13 QA19 QQ43 QR32 QX02 QX10
4C084 AA19 AA20 NA05 NA06 NA07 ZB021 ZB022 ZB072 ZB091 ZB092
ZB222 ZB261 ZB262 ZC412 ZC421 ZC751
4C085 AA14 CC23 EE01 EE03 GG02 GG04 GG08 GG10