

(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2017-533714

(P2017-533714A)

(43) 公表日 平成29年11月16日(2017.11.16)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A 4 B 0 6 3
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2017-525392 (P2017-525392)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成27年11月11日 (2015.11.11)</p> <p>(85) 翻訳文提出日 平成29年7月6日 (2017.7.6)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/US2015/060061</p> <p>(87) 国際公開番号 W02016/077408</p> <p>(87) 国際公開日 平成28年5月19日 (2016.5.19)</p> <p>(31) 優先権主張番号 62/078, 921</p> <p>(32) 優先日 平成26年11月12日 (2014.11.12)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> <p>(31) 優先権主張番号 62/083, 432</p> <p>(32) 優先日 平成26年11月24日 (2014.11.24)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p> <p>(31) 優先権主張番号 14/937, 937</p> <p>(32) 優先日 平成27年11月11日 (2015.11.11)</p> <p>(33) 優先権主張国 米国 (US)</p>	<p>(71) 出願人 515244667 ネオゲノミクス ラボラトリーズ, イン コーポレイテッド アメリカ合衆国 フロリダ 33913, フォート マイヤーズ, コモンウェル ス ドライブ 12701, スイート 9</p> <p>(74) 代理人 100169904 弁理士 村井 康司</p> <p>(74) 代理人 100117422 弁理士 堀川 かおり</p> <p>(72) 発明者 マー アルビター アメリカ合衆国, カリフォルニア州 92 082, ヴァリー センター, キアボ ド ライブ 27165</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 末梢血血漿DNAのディープシーケンシングは、骨髄異形成症候群の診断を確認するうえで信頼性が高い

(57) 【要約】

骨髄異形成症候群および他の血液悪性腫瘍を処置、管理、診断、および監視するための方法が提供される。これらの方法は、末梢血血漿または血清由来の無細胞DNAに対して行われる次世代シーケンシング分析を含む。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
TET2	41				6					8	41	28	35		6	
CBL	29			45					73					35		
ASXL1	5						44			10	6				7	
U2AF1	32				6					9	18					
RUNX1			2		8			7							8	
IDH2				50	7					8					7	
SP3B1					8	98				19	19					
EZH2					7				41		7				7	
YTH1		50								18						19
TP53			7							9	7					
ETV6			5							6						
ZRSR2										6						

Fig. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

骨髄異形成症候群（MDS）、白血病、リンパ腫、および骨髄腫からなる群から選択される血液悪性腫瘍を診断および監視する方法であって、

患者の末梢血血漿または血清から無細胞DNAサンプルを得る工程と；

前記無細胞DNAサンプルに対して突然変異分析を実行する工程であって、前記突然変異分析は、次世代シーケンシング（NGS）、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ハイブリッドキャプチャ、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される手順を含む、工程と；

前記突然変異分析が前記無細胞DNAサンプル中に1つまたは複数のDNA突然変異を検出する場合に、前記血液悪性腫瘍が発症していると判定する工程とを含む方法。

10

【請求項 2】

前記突然変異分析は、NGSを用いて、前記無細胞DNAサンプル中のMDS関連遺伝子のパネルにおいて行われ、MDS関連遺伝子の前記パネルの1つまたは複数における1つまたは複数のDNA突然変異の前記検出は、前記血液悪性腫瘍の存在を示す、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記突然変異分析は、ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、ZRSR2、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されるMDS関連遺伝子に対して実行される、請求項1または2に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記患者は、血球減少を表すが、明らかな核型異常を有していない、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記血液悪性腫瘍は、骨髄異形成症候群（MDS）である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記突然変異分析は、前記患者の経過を監視するために周期的に繰り返される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 7】

1つまたは複数の突然変異が前記無細胞DNAサンプル中で誘導される場合に、疾患管理計画を策定する工程を更に含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記疾患管理計画は、成長因子、輸血、デフェロキサミン、エリトロポイエチン、化学療法剤、幹細胞移植、およびそれらの任意の組合せを施すことから選択される手順を含む、請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記化学療法剤は、シタラビン、イダルビシン、トポテカン、およびフルダラビンからなる群から選択される、請求項8に記載の方法。

40

【請求項 10】

MDSの進行を診断および管理するための、ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、およびZRSR2を含むMDS関連遺伝子のパネルの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年11月11日出願の米国特許出願第14/937,937号明細

50

書、2014年11月24日出願の米国仮特許出願第62/083,432号明細書、および2014年11月12日出願の米国仮特許出願第62/078,921号明細書の優先権の利益を主張し、これらの開示の全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、骨髄異形成症候群および他の血液悪性腫瘍の患者を診断、監視、処置、および管理するための組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

骨髄異形成症候群(MDS)は、無効造血および形成異常によって特徴付けられるクローン性血液疾患の異質な群である。MDSにおいて、ゲノム異常が造血幹細胞中に蓄積して、多系列分化障害の結果としての様々な重篤度の末梢血球減少、および初期相では骨髄(BM)アポトーシスの原因となる。疾患の罹患率および死亡率は、血球減少または急性脊髄性白血病への転化に由来し、これらは両方とも、機能障害および血球の減少に起因する重篤な感染症、貧血、または出血の原因となるおそれがある。

10

【0004】

血球減少(低血球数)は、骨髄環境内の高い割合のアポトーシス、および結果として生じる末梢血循環流中への細胞放出の欠如に由来する(Kitamura et al, 2014; Kerbaudy et al, 2007)。MDSの診断は、患者の徴候として芽球が増大しない血球減少が挙げられる初期ステージ中において、とりわけ難しくなり得る。血球減少を引き起こす多数の反応プロセスがあり、薬物反応、栄養欠乏症またはホルモン欠乏症、および自己免疫疾患または慢性の感染症が挙げられる。

20

【0005】

MDSを診断するための主な基準は、末梢血球減少および形成異常の存在である。しかしながら、形成異常の評価は主観的であり、かつ骨髄生検なしでは困難となり得る。それでも、適切かつ早期の診断は、MDSの進行を処置および管理するのに非常に重要である。なぜなら、MDSが進行して白血病のステージになる前に検出されれば、寛解の見込みがかなり高いからである。

【0006】

血球減少を呈する患者では、MDSが考えられるべきであるが、診断の確認には、骨髄生検ならびに形態学的評価および細胞遺伝学的評価が必要となる。MDSの診断は、現在、血液学的分析、形態学的分析、および細胞遺伝学的分析を含む多くの専門的アプローチを必要とする。また、この診断は、約半分の患者のみが細胞遺伝学的異常を示すという事実により、宣告するのが困難となり得る。MDSを処置するのに用いられる療法の選択は、疾患の重篤度、およびより一層進行した疾患への進行のリスクに非常に依存する。したがって、予後を正確に策定する能力が患者治療の必須の構成要素となる。

30

【0007】

現在の予後スコアリングシステムは、MDS患者をリスク群に階層化するのに核型異常および特定の臨床的特徴を考慮する。一部の核型異常は、予後を確立する一助となる。また、これは、特定の臨床的表現型と関連し得る。しかしながら、MDS患者の半数超は正常な核型を有し、同一の染色体異常を有する患者は臨床的に異質なままである。核型が正常であり、かつ芽球が増大しない場合、MDSの診断を確認するために主観的な形態学的特徴に依拠するのは極めて困難である。

40

【0008】

分子評価は、異常な突然変異クローンの実証およびMDSの診断の確認のための客観的な手段を提供する一助となり得る(Itzykson et al, 2013; Bejar et al, 2011; Haferlach et al, 2014; Thol et al, 2012; Malcovati et al, 2014)。末梢血中の血球減少により、末梢血球から抽出されるDNAの分子研究は、異常なクローンを十分な感度で同定できないおそれがある。そのため、分子異常を検出し、かつMDSの診断を確認するうえで、骨髄から得られるサンプルはより信頼性が高いと考えられる。

50

【0009】

検出された異常は、予後および療法決定に臨床的な影響を及ぼす。また、予後全体を決定し得るサブクロンの存在を検出することができる感度の高い方法を用いて、患者を試験することが重要である (Bejar et al, 2013)。MDSは、骨髓中のアポトーシスが過剰となる疾患であり、このアポトーシスに由来するDNAは、造血細胞が血中に浸されているため、循環流中で豊富である。これらの細胞は、アポトーシスまたはネクローシスの間、アポトーシス体、エキソソーム、微小血管、またはDNA-タンパク質複合体の形態で内容物を血液中に流し込む (Giles et al, 2007)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0010】

とりわけ初期のステージにおいて、MDSを診断するための信頼性の高い正確な方法が要求されている。そのような方法は、MDSの処置から利益を得ることとなる患者を同定する一助になるであろう。更に、現在の方法は、非常に侵襲性であり、かつ痛みを伴う手順である骨髓生検に依拠しているため、骨髓からサンプルを得ることを必要としない手順によれば、処置および診断法の大きい進歩が達成され得る。

【課題を解決するための手段】

【0011】

一実施形態において、本発明は、骨髓異形成症候群 (MDS) について患者を処置する方法であって、患者の末梢血血漿または血清由来の無細胞DNAに対し、次世代シーケンシング (NGS) を含む突然変異分析を実行することにより、MDS患者として患者を同定する工程を含む方法を提供する。この方法は、患者から骨髓サンプルを得ることなく実行され得る。

20

【0012】

一実施形態は、患者を診断および管理する方法を提供する。この方法は、患者の末梢血血漿または血清から無細胞DNAサンプルを得る工程と；無細胞DNAサンプルに対して突然変異分析を実行する工程であって、突然変異分析は、次世代シーケンシング (NGS)、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、ハイブリッドキャプチャ、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される手順を含む、工程と；突然変異分析が無細胞DNAサンプル中にDNA突然変異を検出する場合に、骨髓異形成症候群 (MDS)、白血病、リンパ腫、および骨髓腫からなる群から選択される血液悪性腫瘍の管理のための処置を患者に施す工程とを含む。

30

【0013】

一実施形態は、MDS患者を診断および管理する方法を提供する。この方法は、患者の末梢血血漿または血清から無細胞DNAサンプルを得る工程と；無細胞DNAサンプルに対して突然変異分析を実行する工程であって、突然変異分析は、次世代シーケンシング (NGS)、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、ハイブリッドキャプチャ、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される手順を含む、工程と；突然変異分析が無細胞DNAサンプル中にDNA突然変異を検出する場合に、骨髓異形成症候群 (MDS)、白血病、リンパ腫、および骨髓腫の管理のための処置を患者に施す工程とを含む。

40

【0014】

方法は、骨髓芽球の増大が健常なコントロールと比較して5%未満である患者が挙げられる、疾患の非常に初期のステージの患者を診断および管理する一助となり得る。方法はまた、血球減少を呈するが、明らかな核型異常を呈さない患者に適している。

【0015】

一部の実施形態において、突然変異分析は、MDS関連遺伝子、例えばASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、ZRSR2、およびそれらの遺伝子の任意の組合せが挙げられる遺伝子に対して実行される。MDSの処置は、無細胞DNAサンプルが、以下の遺伝子の少なくとも1つにおいて突然変異を表す患者に施される：ASX

50

L 1、ETV 6、EZH 2、IDH 1、IDH 2、NRAS、CBL、RUNX 1、SF 3B 1、SRSF 2、TET 2、TP 5 3、U 2AF 1、およびZRSR 2。成長因子、輸血、デフェロキサミン、エリトロポイエチン、化学療法剤、幹細胞移植、およびそれらの任意の組合せが挙げられる種々の処置が用いられ得る。

【0016】

更なる実施形態は、骨髓異形成症候群(MDS)を管理および監視する方法を提供する。この方法は、少なくとも以下の工程：血球減少を呈する患者の群から患者を選択する工程と；患者の血漿または血清から無細胞DNAサンプルを得る工程と；MDS関連遺伝子について、無細胞DNAサンプルに対して突然変異分析を行う工程と；無細胞DNAサンプルがMDS関連遺伝子中に1つまたは複数の突然変異を含む患者に対し、MDSの管理のための処置を施す工程とを含む。MDS関連遺伝子は、ASXL 1、ETV 6、EZH 2、IDH 1、IDH 2、NRAS、CBL、RUNX 1、SF 3B 1、SRSF 2、TET 2、TP 5 3、U 2AF 1、ZRSR 2、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択されてよい。

10

【0017】

一部の実施形態において、患者の末梢血血漿から無細胞DNAサンプルを得る工程、およびMDS関連遺伝子について、無細胞DNAサンプルに対して突然変異分析を行う工程は、処置が始まった後に繰り返され、MDS関連遺伝子中に追加の突然変異が検出される場合に処置が変更される。

【0018】

20

更なる実施形態は、患者において、MDS、白血病、リンパ腫、骨髓腫、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される血液悪性腫瘍を診断および監視する方法を提供する。この方法は、以下の工程：無細胞DNAを患者の末梢血血漿サンプルまたは血清から抽出する工程と；次世代シーケンシングを用いて、無細胞DNA中のMDS関連遺伝子のパネルにおいて突然変異分析を行う工程であって、MDS関連遺伝子のパネルの1つまたは複数における1つまたは複数の突然変異の検出は、血液悪性腫瘍の存在を示す、工程と；1つまたは複数の突然変異の検出に基づいて、患者のための処置プロトコルを決定する工程とを含む。方法の一部の実施形態において、MDS関連遺伝子は、ASXL 1、ETV 6、EZH 2、IDH 1、IDH 2、NRAS、CBL、RUNX 1、SF 3B 1、SRSF 2、TET 2、TP 5 3、U 2AF 1、ZRSR 2、およびそれらの任意の組合せからなる群から選択される。

30

【0019】

更なる実施形態は、MDSを診断するために、患者の末梢血血漿または血清由来の無細胞DNAのディープシーケンシングを利用する。

【0020】

次世代シーケンシング(NGS)を用いて、突然変異について末梢血血漿中の無細胞DNAを分析することにより、骨髓異形成症候群(MDS)について患者を診断および監視する方法も提供される。

【図面の簡単な説明】

【0021】

40

【図1】患者におけるMDS関連遺伝子の突然変異分析である。分析された遺伝子は、左側の列に記載されている。各患者は、第1行目における番号1~16によって同定される。サンガー配列決定法およびNGS分析の両方によって同定された点突然変異が黒色で示されている。NGS分析によって同定されたが、サンガー配列決定法において見落とされた点突然変異は太字であり、かつ下線を引かれている。

【図2】末梢血血漿由来の無細胞DNAサンプルおよび末梢血血漿由来の細胞ベースのDNAサンプルについて、対立遺伝子頻度を比較するプロットである。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明は、骨髓異形成症候群(MDS)の患者を含む患者が、MDSについて非常に初

50

期のステージにおいて診断され得る方法を提供する。試験は、次世代シーケンシング（NGS）を用いて、末梢血血漿または血清由来の無細胞DNAサンプルを検出および分析するものであり、骨髓生検を得る必要なく実行される。更なる実施形態において、NGSは、他の感度の高い試験、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）およびハイブリッドキャプチャと併用されてよい。更なる実施形態において、以下の試験の少なくとも1つが用いられてよい：NGS、PCR、およびハイブリッドキャプチャ。

【0023】

本発明はまた、他の血液悪性腫瘍、例えば白血病、リンパ腫、および骨髓腫の患者が診断され得る方法を提供する。用語「血液悪性腫瘍」は、用語「血液癌」と互換的に用いられる。この方法は、非常に初期のステージにおいて患者を診断することができる。試験は、次世代シーケンシング（NGS）を用いて、末梢血血漿または血清由来の無細胞DNAサンプルを検出および分析するものであり、骨髓生検を得る必要なく実行される。

10

【0024】

更なる実施形態において、NGSは、他の感度の高い試験、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）およびハイブリッドキャプチャと併用されてよい。更なる実施形態において、以下の試験の少なくとも1つが用いられてよい：NGS、PCR、およびハイブリッドキャプチャ。

【0025】

更なる実施形態は、MDSおよび他の血液悪性腫瘍の管理方法または処置方法であって、末梢血血漿または血清由来の無細胞DNAサンプルの突然変異分析を実行する工程を含む方法を提供する。この方法において、突然変異分析は、次世代シーケンシング（NGS）を含み、これは、一部の実施形態において、PCRおよびハイブリッドキャプチャと組み合わせて実行されてよい。

20

【0026】

当業者にとって、用語「処置」は、本開示において広く理解されて、MDSまたは他の血液悪性腫瘍からの全治を必要としないことは明らかであろう。用語「処置」は、用語「管理」と互換的に用いられてよい。患者の症状のあらゆる改善または患者の症状のあらゆる安定化が処置または管理であると考えられる。安定化および/または改善に加えて、処置または管理はまた、たとえ疾患を寛解させるに至らないとしても、MDSまたは他の血液悪性腫瘍の進行の遅延、改善、または制御を含み得る。

30

【0027】

一部の実施形態において、処置または管理は、MDSまたは他のいくつかの血液悪性腫瘍の患者として診断された患者に対し、成長因子、輸血、デフェロキサミン、エリトロポイエチン、化学療法剤、および幹細胞移植片から選択される少なくとも1つの治療剤を投与することを含んでよい。適切な成長因子として、顆粒球コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン-11、およびアンドロゲンが挙げられるが、これらに限定されない。適切な化学療法剤として、シタラビンが挙げられるが、これに限定されない。他の適切な化学療法剤として、イダルビシン、トポテカン、およびフルダリンが挙げられるが、これらに限定されない。適切な幹細胞として、造血幹細胞が挙げられるが、これに限定されない。

40

【0028】

一実施形態において、本方法は、MDSおよび他の血液悪性腫瘍に関連する、遺伝子中の突然変異についてのスクリーニングを含む。そのような遺伝子として、以下の遺伝子の少なくとも1つが挙げられ得る：ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、およびZRSR2。一部の実施形態において、他の遺伝子が、ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、およびZRSR2のいずれかに加えて分析されてよい。

【0029】

50

用語「MDS関連遺伝子」は、広く理解されて、MDS患者において突然変異していることが知られているあらゆる遺伝子が挙げられ、その突然変異がMDSの発症、進行、および/または予後と相関することが示されている遺伝子が挙げられることが理解される。

【0030】

用語「血液癌関連遺伝子」は、広く理解されて、血液悪性腫瘍の患者において突然変異していることが知られているあらゆる遺伝子が挙げられ、その突然変異があらゆる血液癌の発症、進行、および/または予後と相関することが示されている遺伝子が挙げられることが理解される。そのような遺伝子として、ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、およびZRSR2が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0031】

更に、用語「MDSの初期ステージ」は、広く理解されるべきであり、患者が血球減少を呈するが、骨髓芽球の有意な増大が検出されないことを含むことが理解される。そのような患者として、健常なコントロールと比較して、芽球数の増大が5%未満である患者が挙げられる。

【0032】

用語「突然変異」は、広く理解されて、DNAの点突然変異、欠失、挿入、および転座が挙げられる。用語「突然変異分析」は、広く理解されるべきであり、DNA中の以下の突然変異の少なくとも1つを同定することを含む：健常なコントロールと比較したDNA点突然変異、DNA欠失、DNA挿入、およびDNA転座。

20

【0033】

一部の好ましい実施形態において、突然変異分析は、点突然変異について行われるため、本方法は、核型分析手順が用いられる他の方法を上回る技術的利点を有する。なぜなら、核型分析は、点突然変異を検出する見込みがないからである。そのため、本方法は、核型が明らかな異常を示さないが、疾患が点突然変異と関連する患者を診断できる利点を提供する。

【0034】

一部の実施形態において、以下のMDS関連遺伝子の少なくとも1つが点突然変異について分析される：ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、およびZRSR2。これらの遺伝子は、以下の表1中のジーンバンクの登録番号および記載によって同定される。

30

【0035】

【表 1】

表1. MDS関連遺伝子

遺伝子	登録	定義
ASXL1	NM_015338	ヒト(Homo sapiens)付加的性嚙様転写制御因子1(ASXL1)、転写変異体1、mRNA
ETV6	NM_001987	ヒト(Homo sapiens)ets変異体6(ETV6)、mRNA
EZH2	NM_152998	zeste相同体2(ショウジョウバエ(Drosophila)属)(EZH2)のヒト(Homo sapiens)エンハンサ、転写変異体2、mRNA
GNAS	NM_000516	ヒト(Homo sapiens)GNAS複合遺伝子座(GNAS)、転写変異体1、mRNA
IDH1	NM_005896	ヒト(Homo sapiens)イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1(NADP+)、可溶性(IDH1)、転写変異体1、mRNA
IDH2	NM_002168	ヒト(Homo sapiens)イソクエン酸デヒドロゲナーゼ2(NADP+)、ミトコンドリア(IDH2)、転写変異体1、mRNA
NRAS	NM_002524	ヒト(Homo sapiens)神経芽細胞腫RASウィルス(v-ras)オンコジーン相同体(NRAS)、mRNA
CBL	NM_05188	ヒト(Homo sapiens)Cb1プロトオンコジーン、E3ユビキチンタンパク質リガーゼ(CBL)、mRNA
PTPN11	NM_080601	ヒト(Homo sapiens)タンパク質チロシンホスファターゼ、非受容体11型(PTPN11)、転写変異体2、mRNA
RUNX1	NM_001754	ヒト(Homo sapiens)runt関連転写因子1(RUNX1)、転写変異体1、mRNA
SF3B1	NM_012433	ヒト(Homo sapiens)スプライシング因子3b、サブユニット1、155kDa(SF3B1)、転写変異体1、mRNA
SRSF2	NM_001195427	ヒト(Homo sapiens)セリン/アルギニンリッチスプライシング因子2(SRSF2)、転写変異体2、mRNA
TET2	NM_001127208	ヒト(Homo sapiens)tetメチルシトシンジメチル化酵素2(TET2)、転写変異体1、mRNA
TP53	NM_001126113	ヒト(Homo sapiens)腫瘍タンパク質p53(TP53)、転写変異体4、mRNA
U2AF1	NM_1025203	ヒト(Homo sapiens)U2核内低分子RNA補助因子1(U2AF1)、転写変異体b、mRNA
ZRSR2	NM_005089	ヒト亜鉛フィンガー(CCCH型)、RNA結合モチーフ、およびセリン/アルギニンリッチ2(ZRSR2)、mRNA

【0036】

更なる実施形態において、以下のMDS関連遺伝子の少なくとも2つ以上が点突然変異について分析される：ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、およびZRSR2。更なる実施形態において、以下のMDS関連遺伝子のセットが点突然変異について分析される：ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、およびZRSR2。一部の実施形態において、MDS関連遺伝子のセットは、MDSを示す他の遺伝子および/または他の異常、例えば血球減少、低ヘモグロビン、疲労、および/または発熱と組み合わせて分析される。

【0037】

表1中の各MDS関連遺伝子は、Illumina(登録商標)から入手可能なTruSight(商標)Myeloid Sequencing Panel上に含まれている。配列表を含む、表1のMDS関連遺伝子に関する追加情報が国立生物工学情報センタ

ー (NCBI) から一般公開されている。

【0038】

表1のMDS関連遺伝子は、Myeloid Sequencing Panel中の54標的遺伝子から選択された。当業者であれば、追加の遺伝子、または遺伝子の異なる組合せが選択されてよいことを認識するであろう。また、当業者であれば、同様のパネルが、Agilent Technologies (ClearSeq AML)、Integrated DNA Technologies (xGen (登録商標) AML Cancer Panel)、ARUP Laboratories、Life Technologies、およびその他が挙げられる他のいくつかの供給会社から入手可能であることも知っているであろう。

10

【0039】

種々の方法がMDS関連遺伝子中の突然変異を検出するのに適している。一部の特に好ましい実施形態において、適切な方法は、次世代シーケンシング (NGS) と略される、非サンガーベースの高スループットDNA配列決定技術から選択される。NGS突然変異分析の一実施形態において、インプットDNAサンプルは、短い断片に切断されて、アダプターを用いてスライドにアニールされる。PCR反応が実行されて、DNAコピー数が増幅される。その後、スライドは、蛍光標識されたヌクレオチド、ターミネータ、およびDNAポリメラーゼと反応する。重合の1サイクルが完了すると、スライドの画像が撮られる。その後、スライドは、ターミネータを除去することによって次のサイクルのために調製されてから、次の塩基がDNA重合プロセス中に加えられる。プロセスは繰り返されて、各サイクル中に1ヌクレオチドが加えられて、各サイクル後の画像が記録される。その後、コンピュータが用いられて、キャプチャされた画像が処理されて、DNA配列が作成される。

20

【0040】

当業者にとって、NGS分析の他の多くの変更が実行されてよいことは明らかであろう。更に、用語「NGS分析」は、広く理解されて、DNAサンプルを固体の担体に付着させることによって実行され、その長さに従ってDNA分子を電気泳動ゲルによって分離させることのない、あらゆるDNA配列決定法を含むことが理解される。少なくとも一部の実施形態において、NGS分析は、以下のキットの少なくとも1つにより実行されてよい：Illumina, Inc. から入手可能なILLUMINA (SOLEXA) SEQUENCING (商標) Kit、Roche, Inc. から入手可能なROCHE 454 SEQUENCING (商標)、ThermoFisher, Inc. から入手可能なION TORRENT: PROTON/PGM SEQUENCING (商標)、およびThermoFisher, Inc. から入手可能なSOLID SEQUENCING (商標)。

30

【0041】

NGSプロトコルの追加の記載が、R. Luthra, et al., "Next-generation sequencing-based multigene mutational screening for acute myeloid leukemia using MiSeq: applicability for diagnostics and disease monitoring", Haematologica, 2014; 99 (3): 465 - 473; およびM. Fernandez-Mercado, et al., "Targeted re-sequencing analysis of 25 genes commonly mutated in myeloid disorders in del(5q) myelodysplastic syndromes", Haematologica, 2013; 98 (12): 1856 - 1864において見出され得る。NGSの詳細なレビューが、A. Mori, et al., "Next generation sequencing: new tools in immunology and hematology", Blood Res., December 2013; 48 (4): 242 - 249に提供されてい

40

50

る。

【0042】

患者由来の種々のサンプルがMDS関連遺伝子の突然変異分析を実行するのに用いられ得る。そのようなサンプルとして、末梢血血漿由来の細胞、および末梢血血漿または血清から得られる無細胞DNA(cf-DNAと略される)が挙げられ得る。一部の好ましい実施形態において、MDS関連遺伝子の点突然変異分析が、末梢血血漿または血清から得られる無細胞DNAで実行される。そのため、本方法は、血球減少患者に診断、処置、管理、および監視を提供する大きい技術的利点を提供する。なぜなら、本方法は、感度が高く、骨髓サンプルを得ることを必要としないからである。

【0043】

図1に示されるように、予想外にも、末梢血血漿または血清から得られる無細胞DNA上のMDS関連遺伝子のNGS突然変異分析は、MDS処置が必要な患者を同定するためのより正確かつ感度の高い方法であることが発見された。分析されたMDS関連遺伝子が図1の左側の列に示されており、表1に記載されるMDS遺伝子を含む。

【0044】

図1は、16人の患者についてのNGS突然変異分析の結果を報告しており、各患者は、図1における表の第1行目において、番号1~16により同定される。NGS配列決定法およびサンガー配列決定法の両方が、NRASエキソン3、TET2エキソン4および13~16、EZH2エキソン10および11、ならびにTP53エキソン4について実行された。アンプリコンは、各サンプルについて、アガロースゲル上でランさせることによって確認された。サンプルがプールされて、Illumina(登録商標)Experiment Managerを用いてデータシートが作成された。MiSeq(商標)Reporterが分析に用いられ、Variant Studioがコーリングに用いられた。バリエーションコーリングの確認のために、NextGene(SoftGenetics、State College、PA)ソフトウェアが用いられた。コード領域の全体にわたる平均配列カバー率(X)は、配列決定されたアンプリコンの94%で4000であった。これによると、突然変異は、DNAの3%に存在する場合に確実に検出することができる。

【0045】

16人の初期ステージのMDS患者由来の末梢血血漿中の無細胞DNAのNGS配列決定は、MDSの診断を確かめる少なくとも1つまたは複数の突然変異遺伝子を示した。正常なコントロール由来の末梢血血漿中の無細胞DNAは、突然変異の証拠を示さなかった。サンガー配列決定法が用いられて、全血から抽出されたDNAが分析された場合に検出されなかった8(50%)サンプルにおいて、追加の突然変異が検出された(図1)。これらの追加の突然変異は、太字のかつ下線を引かれた数字で示され、サンガー配列決定法およびNGS配列決定法の両方によって検出された突然変異は、通常のフォントで示されている。数字は、DNAサンプル中の突然変異対立遺伝子頻度をパーセントで表している。図1から分かるように、遺伝子ASXL1についての患者1における突然変異対立遺伝子頻度は、5パーセントである。

【0046】

16人の患者のうちの5人(31%)は、全血DNAにおいて全く異常を示さなかった。これらのサンプルは、サンガー配列決定法が全血に実行された場合、正常であると偽同定される可能性が高い。NGS突然変異分析によって末梢血血漿中に検出された突然変異は、<15%の頻度であった。これは、一般に、たとえ全血DNA中に同じ頻度で存在するとしても、サンガー配列決定法の検出レベルを下回っている。しかしながら、殆どの場合において、全血DNA中の突然変異DNAの頻度レベルは、NGS突然変異分析によって試験されたサンプルにおいて確認されたように有意に低くなる。

【0047】

図2に更に示されるように、予想外にも、末梢血血漿無細胞DNAに対して突然変異分析を行うことは、末梢全血由来のDNAに対して突然変異分析を行うことと比較して、か

10

20

30

40

50

なり感度の高い方法であることも発見された。

【0048】

図2に示されるように、NGS突然変異分析は、末梢全血から抽出された5つのDNAサンプルに対して実行された。5つのサンプルのうちの4つは、末梢血血漿無細胞DNAから検出された結果と同一の結果を示した。しかしながら、1つのサンプルは、RUNX1中の突然変異が無細胞末梢血血漿DNAにおいて7%検出され、NGSによる全血DNAでは示されなかった。

【0049】

より重要なことに、NGS分析によって検出されたように、検出された突然変異の頻度、血漿中の対立遺伝子頻度は、末梢血血漿由来の無細胞DNAにおいて有意に($P = 0.008$)高かったことから、腫瘍性DNAによるより高い感度および血漿の富化が示唆される(図2)。

10

【0050】

一実施形態において、本発明は、MDS患者を管理する方法であって、あまり複雑でなく、侵襲が最小限であり、かつ感度が増した、MDSのスクリーニング試験を含む方法を提供する。また、試験を実行するのに必要な時間は、従来の試験と比較して短くなる。

【0051】

更なる実施形態において、本発明は、MDSの患者を監視する方法であって、あまり複雑でなく、侵襲が最小限であり、かつ感度が増した、MDSのスクリーニング試験を含む方法を提供する。また、試験を実行するのに必要な時間は、従来の試験と比較して短くなる。用語「監視」は、広く理解されるべきであり、患者の疾患の状態を判定するための処置と同時に、または処置の完了後に試験を行うことを含む。監視方法により、医者は、処置プロトコルが機能しているか、および追加のまたは異なる処置が必要とされ得るかを判定することができる。

20

【0052】

更なる実施形態によれば、徴候を和らげ、疾患の進行を遅らせ、かつ/または疾患を潜在的に治療するのに有効な治療を提供するのに適切な処置プロトコルを、より迅速に同定しかつ開始することが可能となる。

【0053】

NGS突然変異分析によって診断された患者に施され得る既知の処置として、輸血療法、赤血球生成促進剤、抗生物質、薬物療法、幹細胞療法の有無に拘らない化学療法、臨床試験へのエントリ、またはそれらの組合せが挙げられる(A. M. Zeidan, et al., "Current therapy of myelodysplastic syndromes", Blood Rev. 2013 September; 27(5): 243 - 259)。

30

【0054】

本発明の方法は、患者が追加の骨髓穿刺手順を経験する必要なく、処置中かつ/または処置の変更中の患者の進行の正確かつより高頻度の監視を容易にする。処置の完了後のフォローアップ試験も本発明の方法によって大いに向上する。

【0055】

いくつかのMDS関連遺伝子を用いた末梢血血漿または血清中の無細胞DNAのNGS分析は、MDS患者として患者を同定または確認するための客観的な試験を提示する。末梢血血漿がMDS患者において腫瘍特異的DNAで富化されていることが発見された。更に、血漿中の無細胞DNAの突然変異分析は、突然変異を有するサブクローンを検出することができ、かつ新しいクローンの出現を予測することができる。NGSを用いた末梢血血漿中の無細胞DNAの分析は、腫瘍量に関する重要なデータを提供する。これは、療方を監視し、かつ進行を予測するために用いられ得、かつまた骨髓生検を実行する必要性を減らすものである。

40

【0056】

末梢血血漿または血清由来の無細胞DNAの突然変異分析に基づく本方法の以前には、

50

MDS が疑われる患者における分子異常の検出は、骨髓生検を実行することなく達成することが困難であった。骨髓中の芽球数が正常範囲内である場合、診断は主観的となり、細胞遺伝学的研究または分子研究によって分子異常が実証されることはない。

【0057】

末梢血中の血球減少により、末梢血球中の分子異常の検出は、非常に感度の高い方法が用いられる場合ですら、とりわけ初期の疾患において困難となり得る。本発明の方法の評価は、NGS 突然変異分析が用いられる場合ですら、末梢血球中の突然変異の検出を見落とす可能性があることを示している。対照的に、NGS 突然変異分析において末梢血血漿由来の無細胞DNAを用いると、突然変異がより確実に検出される。

【0058】

末梢血血漿または血清は、容易にアクセス可能であり、MDS を診断または確認するのにこれを用いることができるため、骨髓生検の必要性は大いに低減され得る。

【0059】

理論に拘束されることを望むものではないが、末梢血血漿が腫瘍性DNAで富化されているという事実は、MDS における腫瘍細胞の比較的高いアポトーシスによると考えられる。これらの腫瘍細胞は、骨髓中で死んで、DNA を血流中に放出する。殆どの場合において、このDNAは、アポトーシス体、微小血管、またはタンパク質-DNA複合体の形態である。

【0060】

MDS を示し得る徴候のある患者における分子異常の実証は、診断、予後、および治療アプローチの選択の確認のために非常に重要である。これは特に、初期のMDS患者（骨髓中の芽球<5%）に関して重要である。患者のこの群において、骨髓穿刺および生検を実行した後ですら、しばしば診断は疑わしいままである。形態学的変化は微妙であり得、細胞遺伝学的異常は存在しないことがあり得る。

【0061】

MDS の分子特性評価における最近の進歩により、MDS の診断は、異常なクローンの存在を検出する際に、分子試験により一層依拠するようになっている。更に、検出された分子異常のタイプは、予後を予測し、かつ臨床経過および療法を判断するための重要な情報を提供し得る。

【0062】

他方では、MDS 診断を疑う主な徴候である血球減少がいくつかの反応プロセスにおいて見られ得、かつ骨髓生検が必要とされるか否かを判定する際の診断ジレンマを表す。

【0063】

末梢血球を用いた分子分析の実行は、MDS の存在を確認することが可能なアプローチである。しかしながら、末梢血における血球減少により、末梢血球における分子異常の検出は、感度の高い試験を必要とし、NGS 突然変異分析は、サンガー配列決定法よりかなり良好な感度を提供する。陰性結果が、MDS の存在を常に除外するわけではない。

【0064】

芽球数が5%未満であるMDS患者から同意により得られたサンプルにおいて、本NGS突然変異分析は、全ての症例において異常を検出することから、本NGS突然変異分析は、疾患のより早期のステージにおいてすら、MDS患者として患者を同定するための非常に正確かつ感度の高い方法であるという結論が支持される。

【0065】

無細胞DNAを用いて実行される場合のNGS突然変異分析は、末梢血細胞DNAのサンガー配列決定法と比較して、より正確かつ高感度である。また、血漿の無細胞DNAによるNGS突然変異分析が、分子異常を検出し、かつMDS診断を確認する際に、細胞DNAに実行されるNGS突然変異分析と比較して、より正確かつ高感度であると判定された。また、予想外にも、無細胞DNAは、正常な細胞DNAによってあまり薄められず、かつMDS特異的DNAによってより富化されていることが見出された。この発見は、図2に示されるように、NGS突然変異分析を用いた細胞DNAと比較して、無細胞DNA

10

20

30

40

50

において検出される有意に高い突然変異対立遺伝子によって支持される ($P = 0.008$)。

【0066】

以前の研究 (Ma et al, 2009; Yeh et al, 2009; Ma et al, 2008; Ma et al, 2007; Rogers et al, 2004; Ahmed et al, 2003; Jilani et al, 2003) は、より進行した MDS 患者がより循環する無細胞 DNA を有することを示しているため、MDS の診断を確認する分子異常の検出は、この場合、より容易なはずである。

【0067】

芽球数が 5% 未満である場合であっても、MDS 患者において分子異常を検出する際に、末梢血細胞 DNA よりも無細胞 DNA が信頼できると判定された。更に、NGS 突然変異分析は、サンガー配列決定法よりも正確であり、および MDS 患者として患者を同定しかつ MDS 処置を施す際の、無細胞 DNA を分析するための選択方法として考えられるべきである。

【実施例】

【0068】

実施例 1. 患者およびサンプル

骨髄評価によって MDS に罹患していることを確認した 16 人の患者、および年齢を合わせた正常な 4 人のコントロールから、末梢血 (PB) サンプルを収集した。全ての患者は、芽球が < 5% であった。

【0069】

末梢血血漿から無細胞 DNA を、および PB 細胞から細胞 DNA を抽出した。患者の特性を表 2 に記載する。

【0070】

【表 2】

表2.患者集団

		数
細胞遺伝学	二倍体	13
	欠失(6)(q21)	1
	トリソミー8	1
	複合	1
性別	雌	7
	雄	9
	メジアン	範囲
WBC	3.5	2.0-16.4
HGB	10.5	9.6-12.6
MCV	102.8	91-106
血小板	103	74-194
リンパ球%	26.9	14.3-52.4
単球%	9.1	6.3-19.9
多形核%	59.7	37-77
年齢	73	53-92

【0071】

実施例 2. DNA の単離

NuccliSens 抽出キット (BioMerieux Inc., Durham, NC) を用いて、メーカーの説明書に従って血漿から全核酸を単離した。QIAamp D

NA Blood Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、メーカーの説明書に従ってPB細胞からDNAを単離した。

【0072】

実施例3．遺伝子の配列決定

サンガー配列決定法およびNGSを用いて、以下の遺伝子中の突然変異を分析した：ASXL1、ETV6、EZH2、IDH1、IDH2、NRAS、CBL、RUNX1、SF3B1、SRSF2、TET2、TP53、U2AF1、およびZRSR2。サンガー配列決定法は、標準的なプロトコルを用いて実行した。これらの遺伝子中の報告されている突然変異の>90%を包含するように、プライマー対を設計した。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)産物を精製し、ABI PRISM 3730XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて、フォワード方向およびリバース方向の両方に配列を決定した。配列決定分析ソフトウェアを用いて、配列決定データをベースコールし、およびSeqScapeソフトウェア(Applied Biosystems)によりアセンブルして分析した。

10

【0073】

Illumina MiSeqシステム(San Diego, CA)を用いてNGSを実行した。メーカーによって推奨されるように、NGS、増幅、およびインデクシングを実行した。各サンプルについて、アンプリコンをアガロースゲルでのランによって確認した。サンプルをプールし、Illumina Experiment Managerを用いて実験シートを作成した。分析にMiSeq Reporterを用い、コーリングにVariant Studioを用いた。バリエーションコーリングの確認のために、NextGeneソフトウェア(SoftGenetics, State College, PA)を用いた。コード領域の全体にわたる平均配列カバー率は、配列決定したアンプリコンの94%で4,000であった。これによると、突然変異は、突然変異DNAの少なくとも3%に存在する場合に確実に検出することができる。

20

【0074】

実施例4．無細胞DNAを用いた腫瘍性の異常MDSクローンの存在の確認

骨髓サンプルの調査、ならびに徹底した細胞遺伝学的評価および分子評価を通して、16人の患者がMDSに罹患していることを確認した。患者の特性を表2に記載する。

【0075】

16人の患者のうちの1人は、慢性骨髓単球性白血病(CMML)に罹患しており、残りは不応性貧血に罹患していた。9人の患者(56%)が男性であった。16人の患者は全て、不応性貧血に罹患しており、2人は輪状鉄芽球を有した。骨髓の細胞遺伝学的データは、1人の患者が複合異常、1人がトリソミー8、および1人が第6染色体の長腕に欠失を有することを示した。血漿無細胞DNAのNDS突然変異分析と同時に、16人の患者は全て、少なくとも1つの突然変異遺伝子を示し、MDSと整合する異常クローンの存在が確認された。正常なコントロール個体由来の4つのサンプルのいずれにおいても、異常は検出されなかった。

30

【0076】

8人の患者(50%)は、1つの遺伝子において突然変異を示し、残りの8人の患者(50%)は、2つ以上の遺伝子において突然変異を示した(図1)。

40

【0077】

実施例5．無細胞DNAのNGSは、末梢血細胞DNAのサンガー配列決定よりも感度が高い

16人の患者のうちの5人(31%)は、無細胞DNAのNGSによって突然変異が検出されたが、末梢血細胞DNAのサンガー配列決定は、突然変異の証拠を示さなかった。これらの患者は、細胞DNAのサンガー配列決定法が用いられた場合、MDSについて陰性であると考えられたであろう。残りの11人の患者のうちの3人(27%)は、サンガー配列決定法によって検出されない追加の突然変異を示した。全体として、16人の患者のうちの8人(50%)は、サンガー配列決定法によって全血DNA中に検出されなかつ

50

た血漿無細胞DNA中の突然変異をNGSによって示した。

【0078】

細胞DNAにおいてサンガー配列決定法によって検出されずにNGSによって無細胞DNA中で検出された全突然変異は、対立遺伝子頻度が<20%であった(図1)。これは、サンガー配列決定法による検出の不全を説明し得る。一般に、サンガー配列決定法の検出レベルは、15~20%であるが、NGS配列決定法はおおよそ5%である(Chen et al、2015)。

【0079】

実施例6．NGSは、細胞DNAの使用と比較して、無細胞DNAを使用するとより感度が高い

NGSの検出レベルは、サンガー配列決定法よりもかなり良好であるため、NGSを用いて末梢血細胞DNAを試験して、5つのサンプルにおける無細胞DNAで得られた結果と比較した。5つの対のうちの4つ(80%)は同一の結果を示し、1つのサンプルは、無細胞DNAにおけるRUNX1中に7%の突然変異を示し、これは、細胞DNA由来のDNAにおいて検出されなかった。

【0080】

殆どの場合において、これは、腫瘍特異的DNAによる血漿の相対的な富化を反映している。これを確認するために、無細胞DNAにおいて検出した突然変異対立遺伝子頻度を、末梢血細胞DNAにおいて検出した頻度と比較した。図2に示されるように、無細胞DNA中の突然変異対立遺伝子のレベルは、末梢血球由来の細胞DNA中のレベルよりも有意に高い($P=0.008$)。これは、血漿中の腫瘍性DNAのより高い感度および富化を示唆している(図2)。

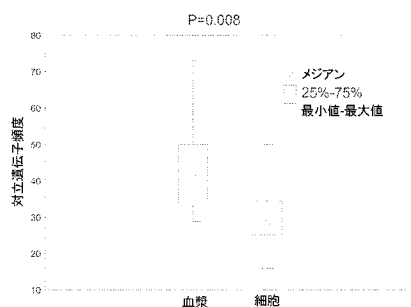
10

20

【図1】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
TET2	41				6					8	41	38	35		6	
CBL	29			45					73					35		
ASXL1	5						44			10	6				7	
U2AF1	32				6					9	18					
RUNX1			7		8			7							8	
IDH2				50	7					8					7	
SF3B1					5	38				19	10					
EZH2					7				41	7					7	
IDH1		50								13						19
TP53			7							9	7					
ETV6			5							6						
ZRSR2										6						

【図2】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCI/US 15/60061
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68, G01N 33/574 (2016.01) CPC - C12Q1/6827, C12Q1/68, C12Q1/6886 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): C12Q 1/68, G01N 33/574 (2016.01) CPC: C12Q1/6827, C12Q1/68, C12Q1/6886 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC: C12Q1/6883, C12Q2600/118, G01N2800/52 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google Web, search terms: diagnosing, monitoring, hematologic malignancy, myelodysplastic syndrome, leukemia, lymphoma, myeloma, cell-free DNA, blood, plasma, serum, next-generation sequencing (NGS), polymerase chain reaction (PCR), panel, ASX1, ETV6, EZH2, IDH1, IDH2, NKAS, CBL, RUNX1, SF3B1, SRSF2, TET		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Thangavelu et al. Molecular profiling in diagnosis and determining prognosis of "early" myelodysplastic syndrome. Poster Abstract 3380S, Presented at the 64th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, 19 October 2014, [retrieved on 14 January from http://abstracts.ashg.org/cgi-bin/2014/ashg14s.pl?abst=myelodysplastic%20syndrome&sort=ptimes&button=Detail&absno=140122959&sid=589023], abstract	1-3, 10
Y	WO 2013/159035 A2 (MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN, INC.) 24 October 2013 (24.10.2013), pg 1, para 1, pg 6, para 2, pg 7, para 7, pg 23, para 2, pg 30, para 3	1-3, 10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14 January 2016		Date of mailing of the international search report 05 FEB 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 15/80061

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-9
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, 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, 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, KN, KP, KR, 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, UA, UG, US

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QA19 QQ03 QQ08 QQ12 QQ42 QQ58
QR32 QR55 QR62 QS25 QS34 QX02