

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2016-104010

(P2016-104010A)

(43) 公開日 平成28年6月9日(2016.6.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	

審査請求 有 請求項の数 21 O L (全 51 頁)

(21) 出願番号 特願2015-231649 (P2015-231649) (22) 出願日 平成27年11月27日 (2015.11.27) (62) 分割の表示 特願2011-521359 (P2011-521359) の分割 原出願日 平成21年7月31日 (2009.7.31) (31) 優先権主張番号 61/085,175 (32) 優先日 平成20年7月31日 (2008.7.31) (33) 優先権主張国 米国 (US) (31) 優先権主張番号 12/512,585 (32) 優先日 平成21年7月30日 (2009.7.30) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 506321481 ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシテ イー アメリカ合衆国、メリーランド州 2 1 2 1 8、ボルチモア、ノース・チャールズ・ ストリート 3 4 0 0 (74) 代理人 100102978 弁理士 清水 初志 (74) 代理人 100102118 弁理士 春名 雅夫 (74) 代理人 100160923 弁理士 山口 裕孝 (74) 代理人 100119507 弁理士 刑部 俊 最終頁に続く
--	--

(54) 【発明の名称】 腫瘍動態を評価するための循環変異型DNA

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】癌患者の生体サンプル中から、体細胞突然変異である循環腫瘍DNA (ctDNA) を高感度で定量する為の手法、それに基づいた癌の診断、予後診断、治療薬、モニタリングをする技術の提供。

【解決手段】癌患者の血液もしくは糞便の試験サンプル中において、遺伝子突然変異によるDNAフラグメントのコピー数を測定し、該突然変異が、該癌患者の腫瘍組織中には存在するが該患者の正常組織中には存在せず、該コピー数が該患者における腫瘍量の指標とする方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の工程を含む、腫瘍量をモニタリングするための方法：

癌患者の血液もしくは糞便の試験サンプル中において、突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントのコピー数を測定する工程であって、該突然変異が、該癌患者の腫瘍組織中には存在するが該患者の正常組織中には存在せず、該コピー数が、該患者における腫瘍量の指標である、工程。

【請求項 2】

腫瘍組織中の遺伝子における突然変異を検出する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

10

【請求項 3】

正常組織中の遺伝子における突然変異の非存在を決定するために患者の正常組織を試験する工程をさらに含む、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

前記遺伝子が、腫瘍中では突然変異していることが多いが、ヒトの正常組織中では変異していない、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

試験サンプル中の突然変異を有していない遺伝子のDNAフラグメントのコピー数を測定する工程；および

比率を提供するために、該突然変異を有するDNAフラグメントのコピー数を、該試験サンプル中の該突然変異を有していない遺伝子のDNAフラグメントのコピー数で割る工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

20

【請求項 6】

癌患者の試験サンプル中のDNAの総量を測定してDNAの該総量に対する比率を標準化する工程をさらに含む、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から2カ月以内に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から1週間以内に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

30

【請求項 9】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から1日以内に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から2日後に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 11】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から2日後に検出された場合に腫瘍再発を予測する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

40

【請求項 12】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から4時間より後に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 13】

突然変異が、癌患者の腫瘍DNAのヌクレオチドシーケンシングによって検出される、請求項2記載の方法。

【請求項 14】

突然変異が、突然変異特異的核酸プローブへのハイブリダイゼーションによって検出される、請求項2記載の方法。

【請求項 15】

50

突然変異が、APC、KRAS、TP53、およびPIK3CAからなる群から選択される遺伝子内にある、請求項1記載の方法。

【請求項 16】

突然変異が、腫瘍抑制遺伝子または発癌遺伝子内にある、請求項1記載の方法。

【請求項 17】

測定する工程が、対立遺伝子特異的核酸プローブへのハイブリダイゼーションを使用する、請求項1記載の方法。

【請求項 18】

測定する工程が、エマルジョン中のビーズ上での増幅を使用する、請求項1記載の方法。

10

【請求項 19】

DNAフラグメントが、エマルジョン中での増幅の前に増幅させられる、請求項18記載の方法。

【請求項 20】

DNAフラグメントが、対立遺伝子特異的核酸プローブへのハイブリダイゼーションの前に熱変性させられ、かつ塩化テトラメチルアンモニウム (TMAC) の存在下で冷却される、請求項17記載の方法。

【請求項 21】

冷却する工程が、少なくとも0.1 /秒程度に緩徐である、請求項20記載の方法。

【請求項 22】

試験サンプルが血液である、請求項1記載の方法。

20

【請求項 23】

試験サンプルが糞便であり、かつ腫瘍が結腸直腸腫瘍である、請求項1記載の方法。

【請求項 24】

測定する工程が、腫瘍量の増加、減少、または安定性をモニタリングするため複数の時点に実施される、請求項1記載の方法。

【請求項 25】

以下の工程を含む、DNA分析を実施する方法：

第1のプライマーセットおよび第2のネステッドプライマーセットを用いて鋳型DNA分析物を増幅させる工程であって、該第2のネステッドプライマーセットの第1のメンバーが5'側の配列

30

5'- tcccgcgaaattaatacgac (SEQ ID NO: 1)

を含み、かつ該増幅させる工程が高忠実度DNAポリメラーゼを使用する、工程；

水性媒体中で第3のプライマーセットを使用して該増幅鋳型を増幅させる工程であって、該第3のプライマーセットの第1のメンバーが、5'側の配列

5'-tcccgcgaaattaatacgac (SEQ ID NO: 1)

を含み、該第3のプライマーセットの第2のメンバーが、5'側の配列

5'- gctggagctctgcagcta (SEQ ID NO: 2)

40

、および

5'- tcccgcgaaattaatacgac (SEQ ID NO: 1)

オリゴヌクレオチドでコーティングされたストレプトアビジンビーズを含む、工程；

水相としての該水性媒体および油/乳化剤混合物を使用して油中水型エマルジョンを調製する工程；

該ビーズ上で該鋳型を増幅させるために該エマルジョンを熱サイクル処理する工程；

界面活性剤を使用して該エマルジョンを破壊して油相を除去する工程；

該ビーズ上の該増幅鋳型と突然変異特異的プローブ、対応する野生型プローブ、ならび

50

に該突然変異特異的プローブおよび該対応する野生型プローブとは異なる該鋳型の一部分に対して相補的であるアンプリコン特異的プローブとの混合物を形成する工程であって、該プローブの各々が蛍光標識され、該プローブの各々が別個の発光スペクトルを有する、工程；

該混合物中の増幅された鋳型を熱変性させ、かつ該プローブを該鋳型にハイブリダイズさせるために該混合物を塩化テトラメチルアンモニウム（TMAC）の存在下で冷却する工程；

フローサイトメトリーを用いて、該ビーズ上の増幅鋳型にハイブリダイズした蛍光標識プローブ各々の量を検出するために該ハイブリダイズした鋳型を分析する工程。

【請求項 26】

ストレプトアビジンビーズが、
5'-tcccgcgaaattaatacgac (SEQ ID NO: 1)

を含む

5'-tcccgcgaaattaatacgac (SEQ ID NO: 1)

オリゴヌクレオチドでコーティングされる、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

エマルジョンを破壊する工程が3回実施される、請求項25記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、米国政府による財政的支援を用いてなされた。米国政府は、第CA43460号、第CA62924号、および第CA57345号に記載された条件にしたがって本発明に所定の権利を留保するものである。

【0002】

発明の技術分野

本発明は、癌の分野に関する。詳細には、本発明は、癌の診断、予後診断、治療薬およびモニタリングに関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

癌は、細胞増殖を制御する遺伝子の連続的变化の結果として発生する。例えば結腸もしくは乳腺の腫瘍などの充実性腫瘍では、平均するとおよそ80個の遺伝子が、実質的にすべての腫瘍細胞中には存在するが正常細胞中には存在しないわずかな突然変異を持っていることが示されている¹。このことにより、これらの体細胞突然変異は、高度の特異的バイオマーカーとして機能する潜在力を有している。体細胞突然変異は、理論上では、これまでに記載された任意の他のバイオマーカーより新生物にとってはるかに特異的な指標である。このため現代の癌研究にとっての1つの課題は、体細胞突然変異をツールとして活用して疾患の検出を改善し、かつ最終的には個々の転帰に積極的に影響を及ぼすことである。

【0004】

腫瘍細胞は、進行癌を有する個体の循環においてしばしば見いだすことができる^{2,3}。腫瘍由来の変異型DNAは、癌を有する人々の無細胞血液分画中에서도検出できることが示されている⁴⁻⁶。この変異型DNAの大多数は循環腫瘍細胞には由来せず⁴⁻⁶、突然変異の特異性を考慮に入れると、循環変異型DNAフラグメント自体を使用して疾患を追跡できる可能性を生じさせる。しかし、そのような変異型DNAフラグメントを高い信頼性で検出するには課題が多い⁷。詳細には、循環変異型DNAは全循環DNAのほんの一部分にしか相当せず、時には0.01%未満にしか相当しない⁸。

【0005】

10

20

30

40

50

本研究では、本発明者らは、結腸直腸癌を有する被験者から連続的に採取した血漿サンプル中でctDNAを定量するためにBEAMing (Beads, Emulsion, Amplification and Magnetism: ビーズ、エマルジョン、増幅、および磁気学))^{8,9}と呼ばれる技術の修正バージョンを開発した。本発明者らは、そのような測定がこれらの被験者において疾患の経過中の腫瘍量の動態に関する情報を提供できるかどうかを決定することに関心を抱いた。

【0006】

当技術分野においては、患者が癌の再発を経験するか否かをより明確に決定する方法に対して継続的な必要性がある。

【発明の概要】

【0007】

本発明の1つの態様によると、腫瘍量をモニタリングするための方法が提供される。癌患者の試験サンプル中でのDNAフラグメントのコピー数が測定される。当該DNAフラグメントは、患者の腫瘍組織中には存在するが正常組織中には存在しない突然変異を有する。コピー数は、患者における腫瘍量の指数である。

【0008】

別の態様によると、DNA分析を実施するための方法が提供される。以下の工程が含まれる:

a. 鋳型DNA分析物を第1のプライマーセットおよび第2のネステッドプライマーセットを用いて増幅させる工程であって、該第2のネステッドプライマーセットの第1のメンバーが5'側の配列

5'-tcccgcgaaattaatacgcac (SEQ ID NO: 1)

を含み、かつ該増幅させる工程が高忠実度DNAポリメラーゼを使用する、工程;

b. 水性媒体中で第3のプライマーセット、および

5'-tcccgcgaaattaatacgcac (SEQ ID NO: 1)

オリゴヌクレオチドでコーティングされたストレプトアビジンビーズを使用して該増幅鋳型を増幅させる工程であって、

該第3のプライマーセットの第1のメンバーが、5'側の配列

5'- tcccgcgaaattaatacgcac (SEQ ID NO: 1),

を含み、該第3のプライマーセットの第2のメンバーが、5'側の配列

5'-gctggagctctgcagcta (SEQ ID NO: 2)

を含む、工程;

c. 水相としての該水性媒体および油/乳化剤混合物を使用して油中水型エマルジョンを調製する工程;

該ビーズ上で該鋳型を増幅させるために該エマルジョンを熱サイクル処理する工程;

界面活性剤を使用して該エマルジョンを破壊して油相を除去する工程;

d. 該ビーズ上の該増幅鋳型と突然変異特異的プローブ、対応する野生型プローブ、ならびに該鋳型の一部に対して相補的である、該突然変異特異的プローブおよび該対応する野生型プローブとは異なるアンプリコン特異的プローブとの混合物を形成する工程であって、該プローブの各々が蛍光標識され、該プローブの各々が別個の発光スペクトルを有する、工程;

e. 該混合物中の該増幅された鋳型を熱変性させ、かつ該プローブを該鋳型にハイブリダイズさせるために該混合物を塩化テトラメチルアンモニウム (TMAC) の存在下で冷却する工程;

f. フローサイトメトリーを用いて、該ビーズ上の該増幅鋳型にハイブリダイズした蛍光標識プローブ各々の量を検出するために、該ハイブリダイズした鋳型を分析する工程。

【0009】

本明細書を読めば当業者には明白になるであろうこれらの態様および他の態様は、癌患者の管理およびモニタリングのために有用な方法を当技術分野に提供する。

[本発明1001]

以下の工程を含む、腫瘍量をモニタリングするための方法：

癌患者の血液もしくは糞便の試験サンプル中において、突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントのコピー数を測定する工程であって、該突然変異が、該癌患者の腫瘍組織中には存在するが該患者の正常組織中には存在せず、該コピー数が、該患者における腫瘍量の指標である、工程。

[本発明1002]

腫瘍組織中の遺伝子における突然変異を検出する工程をさらに含む、本発明1001の方法 10

[本発明1003]

正常組織中の遺伝子における突然変異の非存在を決定するために患者の正常組織を試験する工程をさらに含む、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記遺伝子が、腫瘍中では突然変異していることが多いが、ヒトの正常組織中では変異していない、本発明1001の方法。

[本発明1005]

試験サンプル中の突然変異を有していない遺伝子のDNAフラグメントのコピー数を測定する工程；および 20

比率を提供するために、該突然変異を有するDNAフラグメントのコピー数を、該試験サンプル中の該突然変異を有していない遺伝子のDNAフラグメントのコピー数で割る工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1006]

癌患者の試験サンプル中のDNAの総量を測定してDNAの該総量に対する比率を標準化する工程をさらに含む、本発明1005の方法。

[本発明1007]

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から2カ月以内に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1008]

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から1週間以内に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1009]

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から1日以内に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1010]

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から2日後に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1011]

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から2日後に検出された場合に腫瘍再発を予測する工程をさらに含む、本発明1001の方法。 40

[本発明1012]

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から4時間より後に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、本発明1001の方法。

[本発明1013]

突然変異が、癌患者の腫瘍DNAのヌクレオチドシーケンシングによって検出される、本発明1002の方法。

[本発明1014]

突然変異が、突然変異特異的核酸プローブへのハイブリダイゼーションによって検出される、本発明1002の方法。 50

[本発明1015]

突然変異が、APC、KRAS、TP53、およびPIK3CAからなる群から選択される遺伝子内にある、本発明1001の方法。

[本発明1016]

突然変異が、腫瘍抑制遺伝子または発癌遺伝子内にある、本発明1001の方法。

[本発明1017]

測定する工程が、対立遺伝子特異的核酸プローブへのハイブリダイゼーションを使用する、本発明1001の方法。

[本発明1018]

測定する工程が、エマルジョン中のビーズ上での増幅を使用する、本発明1001の方法。

[本発明1019]

DNAフラグメントが、エマルジョン中での増幅の前に増幅させられる、本発明1018の方法。

[本発明1020]

DNAフラグメントが、対立遺伝子特異的核酸プローブへのハイブリダイゼーションの前に熱変性させられ、かつ塩化テトラメチルアンモニウム (TMAC) の存在下で冷却される、本発明1017の方法。

[本発明1021]

冷却する工程が、少なくとも0.1 /秒程度に緩徐である、本発明1020の方法。

[本発明1022]

試験サンプルが血液である、本発明1001の方法。

[本発明1023]

試験サンプルが糞便であり、かつ腫瘍が結腸直腸腫瘍である、本発明1001の方法。

[本発明1024]

測定する工程が、腫瘍量の増加、減少、または安定性をモニタリングするため複数の時点に実施される、本発明1001の方法。

[本発明1025]

以下の工程を含む、DNA分析を実施する方法:

第1のプライマーセットおよび第2のネステッドプライマーセットを用いて鋳型DNA分析物を増幅させる工程であって、該第2のネステッドプライマーセットの第1のメンバーが5'側の配列

5'- tcccgcgaaattaatacgac (SEQ ID NO: 1)

を含み、かつ該増幅させる工程が高忠実度DNAポリメラーゼを使用する、工程;

水性媒体中で第3のプライマーセットを使用して該増幅鋳型を増幅させる工程であって、該第3のプライマーセットの第1のメンバーが、5'側の配列

5'-tcccgcgaaattaatacgac (SEQ ID NO: 1)

を含み、該第3のプライマーセットの第2のメンバーが、5'側の配列

5'- gctggagctctgcagcta (SEQ ID NO: 2)

、および

5'- tcccgcgaaattaatacgac (SEQ ID NO: 1)

オリゴヌクレオチドでコーティングされたストレプトアビジンビーズを含む、工程;

水相としての該水性媒体および油/乳化剤混合物を使用して油中水型エマルジョンを調製する工程;

該ビーズ上で該鋳型を増幅させるために該エマルジョンを熱サイクル処理する工程;

界面活性剤を使用して該エマルジョンを破壊して油相を除去する工程;

該ビーズ上の該増幅鋳型と突然変異特異的プローブ、対応する野生型プローブ、ならび

10

20

30

40

50

に該突然変異特異的プローブおよび該対応する野生型プローブとは異なる該鋳型の一部分に対して相補的であるアンプリコン特異的プローブとの混合物を形成する工程であって、該プローブの各々が蛍光標識され、該プローブの各々が別個の発光スペクトルを有する、工程；

該混合物中の増幅された鋳型を熱変性させ、かつ該プローブを該鋳型にハイブリダイズさせるために該混合物を塩化テトラメチルアンモニウム (TMAC) の存在下で冷却する工程；

フローサイトメトリーを用いて、該ビーズ上の増幅鋳型にハイブリダイズした蛍光標識プローブ各々の量を検出するために該ハイブリダイズした鋳型を分析する工程。

[本発明1026]

ストレプトアビジンビーズが、
5'-二重ビオチン-T-スパーサー-18 -5'-tcccgcgaaattaatacgac (SEQ ID NO: 1)

を含む

5'- tcccgcgaaattaatacgac (SEQ ID NO: 1)

オリゴヌクレオチドでコーティングされる、本発明1025の方法。

[本発明1027]

エマルジョンを破壊する工程が3回実施される、本発明1025の方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 0 】

【図 1 A】 ctDNAの測定を示す図である。

【図 1 B】 ctDNAの測定を示す図である。図1Bは、被験者の腫瘍に由来するDNAの従来型Sangerシーケンシング法を描出しており、本分析の第1工程を提示している。

【図 1 C】 ctDNAの測定を示す図である。血漿サンプル中の腫瘍由来DNAを定量するための手法は、図1Cに示した。リアルタイムPCRが血漿中のDNAフラグメントの総数を測定するために使用されている一方、BEAMingは、蛍光プローブであるCy5およびCy3で標識された野生型フラグメントに対する突然変異体の比率を測定する。

【図 2】 図2A～2Dは、BEAMingから得られた典型的なフローサイトメトリーデータを示す図である。4枚のグラフは、治療中の相違する時点に被験者6 (APC G4189T) から入手したデータを例示している。北西四半分のドットおよび南東四半分のドットは、各々野生型および変異型フラグメントに結合したビーズを表す。北東四半分のドットは、野生型および突然変異両方のDNA鋳型を含有していたエマルジョン微液滴中に包含されていた結果として野生型および変異型フラグメント両方に結合したビーズを表す¹⁵。各四半分内の数は、測定した各集団についてのビーズの絶対計数を表す。(図2A) 術前には、変異型DNAフラグメントの割合は13.4%であった。(図2B) 術後(第3日)には、変異型DNAフラグメントの割合は0.015%へ低下した。(図2C) 術後(第48日)には、変異型DNAフラグメントの割合は0.11%へ増加し、疾患の再発を示唆した。(図2D) 第244日に、被験者は進行性疾患を有し、変異型DNAフラグメントの割合はさらに0.66%へ増加した。

【図 3】 図3A～3Bは、ctDNAおよびCEAによって検出される、無再発生存率を示す図である。(図3A) 検出可能な術後ctDNAレベルを有する被験者対検出不能な術後ctDNAレベルを有する被験者における無再発生存率の相違 (P = 0.006、Mantel-Cox対数順位検定による)。(図3B) 検出可能な術後CEAレベルを有する被験者対検出不能な術後CEAレベルを有する被験者における無再発生存率の相違 (P = 0.03、Mantel-Cox対数順位検定による)。

【図 4 A】 個々の試験被験者におけるctDNA、CEAおよびイメージング動態の比較を示す図である。各被験者について、上方、中央、および下方のグラフは、ctDNAレベル、イメージング法によって評価した腫瘍容量、およびCEAレベルを表す。水平の線は正常レベルの上限を表す: ctDNAレベルについてはサンプル1例当たり1個の変異型DNAフラグメント、腫瘍直径については0.0cm、およびCEA存在量については5.0ng/mL。図4A: 患者5は、本試験への登録時点(第0日)に再発性疾患のために左肝切除術を受けた。左上葉内の疑わしい肺

10

20

30

40

50

結節を除いて、手術直後に疾患の証拠は見られなかった。15カ月後、疾患再発が認められ、肝臓および肺の両方に病巣が見いだされた。

【図4B】個々の試験被験者におけるctDNA、CEAおよびイメージング動態の比較を示す図である。各被験者について、上方、中央、および下方のグラフは、ctDNAレベル、イメージング法によって評価した腫瘍容量、およびCEAレベルを表す。水平の線は正常レベルの上限を表す:ctDNAレベルについてはサンプル1例当たり1個の変異型DNAフラグメント、腫瘍直径については0.0cm、およびCEA存在量については5.0ng/mL。図4B:患者11は、S状結腸腺癌および2つの肝転移を有していたので術前に全身性化学療法により治療された(化学療法1)。この被験者は、S状結腸切除術、左肝葉切除術および単発性右側肝病巣のRFA(高周波アブレーション)を受けた(手術1)。2カ月後のイメージング試験は、肝臓での再発を示し、この被験者は右肝切除術を受けた(手術2)。再発の高リスクを考慮して、化学療法が再開された(化学療法2)。8カ月後に、イメージング法は3つの再発性肝病巣および疑わしい腹腔リンパ節を示した。この被験者はこれらの病変へのRFAおよび腹腔リンパ節の切除術を受けた(手術3)。術後、この被験者は追加の化学療法を受けた(化学療法3);しかしその後のイメージング法で多発性肺転移が明らかになった。

【図4C】個々の試験被験者におけるctDNA、CEAおよびイメージング動態の比較を示す図である。各被験者について、上方、中央、および下方のグラフは、ctDNAレベル、イメージング法によって評価した腫瘍容量、およびCEAレベルを表す。水平の線は正常レベルの上限を表す:ctDNAレベルについてはサンプル1例当たり1個の変異型DNAフラグメント、腫瘍直径については0.0cm、およびCEA存在量については5.0ng/mL。図4C:患者8は、S状結腸腺癌および左右両方の肝葉への単発性転移を有していた。この被験者は、S状結腸切除術および左側肝区域切除術を受けた(手術1)。右側の肝転移はそのまま残されたが、被験者は全身性化学療法により治療された(化学療法1)。120日目に、右肝切除術が実施された(手術2)。術後、被験者は4カ月にわたり全身性化学療法により治療された(化学療法2)。

【図5A】結腸直腸癌を有する患者由来の糞便サンプル中で変異型DNAを検出するためのBEAMingに基づく手法を示す略図である。(図5A)全糞便DNAから出発する、本プロセスにおける段階を示す図である。工程1は、変異型および野生型一本鎖DNA分子の配列特異的捕捉の結果を示している。クエリーされた突然変異部位を含む遺伝子フラグメントをPCRにより増幅した後に、当該DNAをPCR産物内の配列に相補的なオリゴヌクレオチド(球体上のスパイク)に結合した磁性ビーズ(球体)と混合する(工程2)。工程3では、この混合物は油中水型エマルジョン中の数十億個の微小区画に分離される。これらの区画の小さな部分は単一ビーズおよび単一DNA鋳型分子を含有するが、大多数の区画はどちらも含有していない(例えば、中央の空の気泡)。工程4においてこれらのエマルジョンに対してPCRが実施されると、個々のDNAフラグメントはそれらを含有する微小区画内で増幅させられ、ビーズの表面に共有結合するようになる。結果として生じるビーズは、同一DNAフラグメントの何万個ものコピーでコーティングされる。工程5では、ビーズはエマルジョンから回収され、結合した当該DNAの配列が、パネルに示したように対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション(ASH)によって判読される(図5B)。

【図5B】結腸直腸癌を有する患者由来の糞便サンプル中で変異型DNAを検出するためのBEAMingに基づく手法を示す略図である。(図5B)BEAMingによって磁性マイクロビーズ上で増幅したDNAは、非共有結合DNAストランドを取り除くために最初に変性させる。様々な標識された蛍光プローブは、ビーズに共有結合した相補的標的DNAにハイブリダイズさせる。次にフローサイトメトリーを使用してビーズを個別に計数し、それによって糞便または血漿サンプル中に最初に存在する変異型対野生型フラグメントの比率を決定する。

【図6】図6A~図6Dは、フローサイトメトリーによって分析したビーズの散布図を示している。正常リンパ球DNA(図6A)または患者4由来の糞便DNA(図6B)を用いたAPC C4132T突然変異についてのBEAMingアッセイ。リンパ球DNAについては分析したビーズの総数(全四半分)は253,723個であり、変異型DNAを含有するビーズはなかった(南西四半分、すなわち第4四半分)。患者4について分析したビーズの総数は192,513個であり、その内747個

10

20

30

40

50

は突然変異体であった。(図6C)患者12由来の糞便DNAを用いたKRAS G38AについてのBEAMingアッセイを示す図であるが、この患者の腫瘍はこの突然変異を含有していなかった。初期増幅のために使用したDNAポリメラーゼによって導入され、陰性と判定された305,449個の分析したピーズ中に5個の変異型ピーズが存在した。(図6D)腫瘍にKRAS G38Aが含有されていた患者7由来の糞便DNAのアッセイを示す図である。計333,630個のピーズを分析したが、その内685個のピーズが変異型であった。

【図7A】CRCを用いて患者の糞便から単離した正常および変異型DNAの質および量を示す図である。(図7A)実験の設計の略図。糞便DNAは、患者特異的DNA突然変異を含む、サイズの相違するプライマー対を用いて増幅させた。リアルタイムPCRを使用して、各アンプリコンサイズに対して得られた糞便DNAフラグメントの総数を決定した。

【図7B】CRCを用いて患者の糞便から単離した正常および変異型DNAの質および量を示す図である。増幅したフラグメントは、引き続いてBEAMingによって分析され、正常(図7B)および変異型(図7C)DNAフラグメントの総数ならびに糞便中に存在する変異型対正常分子の割合(図7D)が決定された(-●-患者2、-■-患者4、-▲-患者7、-▼-患者14)。

【図7C】CRCを用いて患者の糞便から単離した正常および変異型DNAの質および量を示す図である。増幅したフラグメントは、引き続いてBEAMingによって分析され、正常(図7B)および変異型(図7C)DNAフラグメントの総数ならびに糞便中に存在する変異型対正常分子の割合(図7D)が決定された(-●-患者2、-■-患者4、-▲-患者7、-▼-患者14)。

【図7D】CRCを用いて患者の糞便から単離した正常および変異型DNAの質および量を示す図である。増幅したフラグメントは、引き続いてBEAMingによって分析され、正常(図7B)および変異型(図7C)DNAフラグメントの総数ならびに糞便中に存在する変異型対正常分子の割合(図7D)が決定された(-●-患者2、-■-患者4、-▲-患者7、-▼-患者14)。

【図8】糞便DNA内の突然変異およびTNMステージを示す図である。水平のバーは変異型DNAのメジアン(中央値)割合を示している。ひげは、各指定のステージについて見いだされた最小値および最大値を表す。

【図9】糞便DNAおよび血漿DNAの増幅のために使用したプライマー。フォワードプライマーおよびリバースプライマーの対(SEQ ID NO:10~53);Tag 1(SEQ ID NO:54)、Tag 2(SEQ ID NO:55)。

【図10A-1】対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションのためのプローブの配列、SEQ ID NO:56~154。

【図10A-2】対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションのためのプローブの配列、SEQ ID NO:56~154。

【図10B】対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションのためのプローブの配列、SEQ ID NO:56~154。

【図11】フラグメントサイジングのために使用したプライマー、SEQ ID NO:155~182;Tag 1、SEQ ID NO:183。

【図12】感度の概略。

【図13A】SBEおよびシーケンシングによって決定した腫瘍DNAおよび糞便DNA中の突然変異を示す図である。

【図13B】SBEおよびシーケンシングによって決定した腫瘍DNAおよび糞便DNA中の突然変異を示す図である。

【図14】切除後のctDNAクリアランスを示す図である。y軸は、患者9の血漿中のctDNAのレベルを示している。x軸は、切除からの経過時間を表しており、ゼロは腫瘍切除時点である。半減期を計算するために、Marquardt-Levenbergアルゴリズムに基づいてカーブフィッティング($f(t) = a - \lambda t$)を実施したところ、114分間の半減期を得た。

【図15】術前および術後の血漿中の全DNAフラグメントを示す図である。箱ひげ図は、ベースライン時(第0日)、術後(第1日)、退院日(第2~5日)、および初回フォローアップ時(第13~56日)にリアルタイムPCRによって推定した、血漿2mL中のDNAフラグメントの総数を示している。

【図16A-1】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的

10

20

30

40

50

、および放射線学的データを示す図である。

【図16A-2】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図16A-3】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図16B-1】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図16B-2】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図16B-3】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。 10

【図16C-1】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図16C-2】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図16C-3】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図16D-1】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図16D-2】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。 20

【図16D-3】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図16E-1】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図16E-2】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図16E-3】図4に示したデータに加えて、全患者についての分子生物学的、臨床的、および放射線学的データを示す図である。

【図17】同一血漿サンプル中での血漿CEAとctDNAレベルの比較を示す図である。個別クラスターリングについて補正した、CEAおよびctDNAレベルを比較した偏残差プロット (partial residual plot) を示している。この比較には、全患者のCEAおよびctDNA値を使用した。患者内のクラスターリングについて補正した後は、CEAレベルとctDNAレベルとの間に穏当な全相関が見られた ($r^2 = 0.2$ 、 $P < 0.001$)。 30

【図18】血漿採取のスケジュールを示す図である。

【図19】評価した18例の結腸直腸癌患者の特徴を列挙した図である。

【図20A】ダイレクトシーケンシングによって分析した26個のアンプリコンを示す図である。フォワードプライマー (SEQ ID NO:184~235)。リバープライマー (SEQ ID NO:236~287)。Tag 1 (SEQ ID NO:288)。Tag 2 (SEQ ID NO:289)。

【図20B】ダイレクトシーケンシングによって分析した26個のアンプリコンを示す図である。フォワードプライマー (SEQ ID NO:184~235)。リバープライマー (SEQ ID NO:236~287)。Tag 1 (SEQ ID NO:288)。Tag 2 (SEQ ID NO:289)。

【図21】アンプリコンの各試験のBEAMingのために使用したプライマーを示す図である。フォワードプライマー (SEQ ID NO:290~305)。リバープライマー (SEQ ID NO:306~321)。Tag 1 (SEQ ID NO:322)。Tag 2 (SEQ ID NO:323)。

【図22A】アンプリコンの各試験のために使用したプローブを示す図である (各々、SEQ ID NO:324~383)。

【図22B】アンプリコンの各試験のために使用したプローブを示す図である (各々、SEQ ID NO:324~383)。

【図23】本試験の1つにおける患者の特徴を示す図である。 50

【図 2 4 A】相違する患者についてCEAおよびctDNAレベルを比較した図である。

【図 2 4 B】相違する患者についてCEAおよびctDNAレベルを比較した図である。

【図 2 4 C】相違する患者についてCEAおよびctDNAレベルを比較した図である。

【発明を実施するための形態】

【0011】

発明の詳細な説明

結腸直腸癌（CRC）は、米合衆国内の癌関連死の2番目に多い原因である。CRCは、肝臓およびその他の臓器への遠隔転移前の任意の段階で検出された場合、一般には外科的切除によって治癒させることができる。残念なことに約35%の患者は、潜在性もしくは検出可能いずれかのそのような遠隔転移を診断時点に有しており、この疾患からの実質的に全死亡の原因となっている。結腸直腸新生物に対するスクリーニング試験、詳細には大腸内視鏡検査の重要性は、最近数年間における大衆の意識を高める様々な運動において強調されてきた。これはCRC関連死の減少に寄与してきた可能性が高いが、しかし今なお極めて多数の人々が外科的に治癒不能な癌を有すると診断されていることは、この問題に関する現在の努力が不十分であるという事実を証明している。具体的には、大腸内視鏡検査やその他の侵襲性手技を補完することができ、そのような不都合かつ侵襲性の手技を受けることを躊躇する患者に提供することができる非侵襲性試験が、緊急に必要とされている。この必要性は、バーチャル大腸内視鏡検査、血便についての改良されたアッセイ、糞便中の癌細胞もしくはタンパク質についての免疫組織学的試験、および遺伝的もしくはエピジェネティック変化についてのDNAをベースとする試験を含む、早期検出のための新規試験の開発を刺激してきた（Ouyang DL, Chen JJ, Getzenberg RH, Schoen RE. Noninvasive testing for colorectal cancer:a review. Am J Gastroenterol 2005;100:1393-403）。

【0012】

変異型DNA分子は、それらが極めて特異的であるために癌関連バイオマーカーより優れた固有の利点を提供する。突然変異は個別の正常細胞中では低い比率（約 10^{-9} ～ 10^{-10} 突然変異/bp/世代）で発生するが、そのような突然変異は全正常DNA中においてこれまでに記載されてきたあらゆる試験（本試験で使用した試験を含む）の検出限界より数桁低い極めて小さな割合に相当する。特異的体細胞突然変異が任意の臨床サンプル中に感知できる量で存在するのは、唯一の状況である：クローン様式で発生する場合、すなわちこの突然変異が特定集団の全細胞中に存在する場合には、結果として新生腫瘍病変が規定される。

【0013】

幾つかの研究は、変異型DNAがCRC患者の糞便、尿、および血液中で検出できることを証明している（Osborn NK, Ahlquist DA. Stool screening for colorectal cancer:molecular approaches. Gastroenterology 2005;128:192-206）。さらに、そのようなアッセイの感度を限定してきた技術的因子は、徐々に克服されつつある。例えば糞便をベースとする試験についての改良には、排便後のDNA安定化（Olson J, Whitney DH, Durkee K, Shuber AP. DNA stabilization is critical for maximizing performance of fecal DNA-based colorectal cancer tests. Diagn Mol Pathol 2005;14:183-91）、PCR阻害因子および細菌DNAの除去、分析のための十分な量のヒトDNAの対費用効果の高い精製（Whitney D, Skoletsky J, Moore K, Boynton K, Kann L, Brand R, Syngal S, Lawson M, Shuber A. Enhanced retrieval of DNA from human fecal samples results in improved performance of colorectal cancer screening test. J Mol Diagn 2004;6:386-95）および評価可能な変異型遺伝子の連続的描出（Kann L, Han J, Ahlquist D, Levin T, Rex D, Whitney D, Markowitz S, Shuber A. Improved marker combination for detection of de novo genetic variation and aberrant DNA in colorectal neoplasia. Clin Chem 2006;52:2299-302）が含まれる。さらに、各鋳型分子を個別にクエリーする、突然変異を検出するためのアッセイが開発されてきたが、これらのアッセイは信号対雑音比を劇的に増加させる。そのような「デジタル」アッセイは、例えば糞便もしくは血漿などの臨床サンプル中のDNAの分析に特に適合するが、それはそのようなサンプル中の変異型DNAフラグメントの数が正常DNAフラグメントを大きく上回るからである。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

本発明者らは、癌患者における腫瘍量をモニタリングするための方法を開発した。患者における循環腫瘍DNAの検出によって、腫瘍再発に関する予測を立てることができる。この予測に基づいて、治療およびサーベイランスの決定を下すことができる。例えば、将来の再発を予示する循環腫瘍DNAは、追加またはより積極的な療法ならびに追加またはより精巧なイメージングおよびモニタリングを導くことができる。循環DNAは、腫瘍に対して異所性のDNAを意味する。

【 0 0 1 5 】

「循環」腫瘍DNAについてモニタリングできるサンプルには、血液および糞便が含まれる。血液サンプルは、例えば、血清もしくは血漿などの血液の1画分であってよい。同様に、糞便は他の成分から分別してDNAを精製することができる。腫瘍サンプルは、身体他の場所における腫瘍マーカーとして使用できる腫瘍内の体細胞突然変異した遺伝子を同定するために使用される。したがって例えば、腫瘍中の特定の体細胞突然変異は、当技術分野において公知の任意の標準的手段によって同定できる。典型的な手段には、対立遺伝子特異的プローブを使用する腫瘍DNAのダイレクトシーケンシング、対立遺伝子特異的増幅、プライマー伸長などが含まれる。体細胞突然変異が同定されると、身体他の細胞由来のDNAから腫瘍由来DNAを識別するために身体他の区画においてそれを使用できる。体細胞突然変異は、同一患者の身体の正常組織中では発生しないことを決定することによって確認される。この方法でモニタリングできる腫瘍のタイプは、実質的に無限である。血液もしくは糞便または他の体液中に細胞および/またはDNAを投じる (shed) 任意の腫瘍を使用できる。そのような腫瘍には、結腸直腸腫瘍に加えて、乳腺、肺、腎臓、肝臓、膵臓、胃、脳、頭頸部、リンパ管、卵巣、子宮、骨、血液などの腫瘍が含まれる。

10

20

【 0 0 1 6 】

試験サンプル中の全DNAは、当技術分野における任意の手段によって決定できる。全DNAを測定するためには多数の手段がある。以下に詳述するように、使用できる1つの方法は、リアルタイムPCRアッセイである。任意の遺伝子または遺伝子セットを増幅させることができる。LINE-1遺伝子ファミリーが使用されたのは、これが高度に繰り返されており、そのため測定に必要とされるのが小さなサンプルであるためである。全DNAは、患者から相違する時点に採取された腫瘍DNAの測定を標準化できるように測定される。全DNA含有量を表示するための1単位としてゲノム当量を使用できるが、他の測定単位も限定されることがなく使用できる。

30

【 0 0 1 7 】

サンプル中の異所性腫瘍DNAの量は極めてわずかであるので、高感度の測定手段が望ましい。以下で詳細に記載する測定手段は、エマルジョン中のビーズ上での増幅を利用する。BEAMingと呼ばれるこの測定手段は、結腸直腸癌を有する患者由来の糞便および血漿DNA中での突然変異を検出することができる (図5A~5B)。BEAMingは、その構成要素であるビーズ、エマルジョン、増幅、および磁気学にちなんで名付けられており、本質的には単一DNA鋳型分子を該鋳型の数万個の正確なコピーを含有する単一ビーズに変換させる (Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2003;100:8817-22;米国特許出願第10/562,840号)。この方法により、同一患者の血漿もしくは糞便由来のDNAから検出できる突然変異の発生頻度を決定すること、ならびに将来において臨床的に適用できるDNAをベースとする試験を設計する際に有用であろう他のパラメーターを調査することが可能になる。他の測定手段も十分に高感度であれば使用できる。患者の腫瘍DNA中で最初に同定される変異型配列は、例えば血液 (例、血清もしくは血漿) または糞便などの異所性生体サンプル中でアッセイされる。容易に採取されるサンプルが望ましい。異所性生体サンプルは、患者における特定タイプの腫瘍がその中に排出されるであろうサンプルである。他の生体サンプルには、唾液、気管支肺胞洗浄液、リンパ液、乳汁、涙液、尿、脳脊髄液などを含むことができる。

40

50

【0018】

患者の腫瘍DNA中において体細胞突然変異したと同定される配列は、異所性生体サンプル中で特異的に決定される。同様に、患者の他の生体サンプル中で見いだされる対応する配列もまた特異的に決定される。したがって、例えば、遺伝子ABCのヌクレオチドXでの腫瘍突然変異が該腫瘍内のGヌクレオチドおよび他の生体組織内のTヌクレオチドである場合は、遺伝子ABCのヌクレオチドXのGバージョンおよびTバージョンはどちらも異所性生体サンプル中で特異的に測定および定量することができる。これらを評価する1つの手段は、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションプローブを用いる。十分な感度を達成する他の技術も使用できる。

【0019】

変異型配列の数（または変異型配列対非変異型配列の比率）の計算は、任意で総DNA含有量に、例えばゲノム当量に標準化することができる。腫瘍量指数は、試験サンプル中に存在する変異型（腫瘍）DNA分子の数を反映する。サンプル中の非変異型DNA分子の数は、比率を形成するために腫瘍量指数の計算に含めることができる。標準化および/または比率は、専用コンピュータまたは汎用コンピュータまたはヒトの手によって計算することができる。この比率は、紙、磁気記憶媒体、または他のデータ記憶手段上に記録することができる。標準化された数値は、個人の全身における腫瘍量を評価するためのデータポイントである。様々な時点での追加の評価は、増加、減少、または安定性の指標を得るために任意に行うことができる。これらの時点は、手術、化学療法、放射線療法、または他の形態の療法と関連して設定できる。

【0020】

腫瘍切除後、完全に切除された場合は、腫瘍量の劇的な減少が観察される。しかし残存腫瘍が残っている場合は、腫瘍量指数は依然として高いか、または検出可能となる。例えば血液中における異所性DNAの半減期は相当に短いために、この技術を使用すると迅速に手術の結果を評価できる。この手段を用いると、不完全な切除は、2時間後、4時間後、8時間後、12時間後、16時間後、24時間後、2日後、3日後、5日後、7日後、14日後、21日後、28日後、56日後などに検出できる。不完全な腫瘍切除は、モニタリングの増加、追加の手術、追加の化学療法、追加の放射線療法、または治療様式の組み合わせにつながることもある。追加の療法には、用量や頻度の増加、または他の積極的な手段を含むことができる。

【0021】

突然変異を同定できる遺伝子は、患者の腫瘍内で体細胞突然変異を受けている遺伝子である。アッセイの開発を容易にするために、そのような突然変異をしばしば受ける遺伝子を使用できる。これらには、腫瘍抑制因子または癌遺伝子である遺伝子、細胞周期に関係する遺伝子などが含まれる。癌において共通して変異する、使用できる遺伝子のいくつかは、APC、KRAS、TP53、およびPIK3CAである。このリストは、排他的ではない。

【0022】

突然変異を検出する任意の手段を使用できるが、対立遺伝子特異的核酸プローブへのハイブリダイゼーションが有効であることが見いだされている。ハイブリダイゼーション前に、典型的には二本鎖ハイブリダイゼーション試薬が2本の鎖を変性または分離するために加熱され、それらが他方のパートナーへハイブリダイゼーションするのを接近可能および利用可能にする。緩徐な冷却、すなわち少なくとも1 /秒程度に緩徐、少なくとも0.5 /秒程度に緩徐、少なくとも0.25 /秒程度に緩徐、少なくとも0.1 /秒程度に緩徐、または少なくとも0.05 /秒程度に緩徐な冷却が有用であることが見いだされている。さらに、塩化テトラメチルアンモニウム（TMAC）試薬の存在もまた、特にハイブリダイゼーションのパートナーの一方がビーズに付着させられる場合に有用であることが見いだされている。

【0023】

本発明者らの試験結果は、ctDNAが転移性結腸直腸癌を有する患者における療法の経過を追跡するための前途有望なバイオマーカーであることを証明している。ctDNAは術前の

10

20

30

40

50

全被験者において検出可能であり、連続血液サンプリングにより、手術切除の程度と相関するctDNAのレベルにおける振幅が明らかになった。術後に検出可能なctDNAを有した被験者は、一般に1年以内に再発した。ctDNAは、この患者コホートにおける現行の標準バイオマーカー（CEA）よりはるかに高信頼性かつ高感度の指標であると思われた。

【0024】

本発明者らの試験は、癌、特に進行腫瘍を有する被験者においてctDNAを検出できることを証明した他の研究者らの試験⁶と一致している。しかし、そのような以前の試験の大多数は、本試験において評価した被験者の多数において見出された低レベルのctDNAを検出するために十分に高感度の技術を使用していなかった。さらに、本発明者らの手法の極めて重大で際だった特徴の1つは、ctDNAが検出可能か否かを単純に決定するのではなくctDNAのレベルを正確に測定する能力にある。

10

【0025】

本発明者らの試験の結果は、完全な手術の後にはctDNAレベルが減少し、新規病変が放射線検査により明白になるとときには一般に増加するという点で、ctDNAレベルが総全身腫瘍量を反映することを示唆している。しかし、現時点では全身腫瘍量を測定するための独立した方法が存在しないため、ctDNAレベルが全身腫瘍量と正確に比例するかどうかを明確に決定することはできない。放射線写真は不正確であるが、これはイメージングで観察される病巣が生存新生腫瘍細胞、死滅新生腫瘍細胞および様々な量の非新生腫瘍細胞（間質線維芽細胞、炎症細胞、脈管系など）から構成されるためである¹¹。任意の病巣におけるこれらの細胞タイプの比率は不明である。さらに、総計すると全身腫瘍量に大きく寄与する可能性がある数ミリメートルより小さい微小転移病巣は、ポジトロン放出断層撮影法、コンピュータ断層撮影法または磁気共鳴イメージングスキャン法によって検出することはできない。

20

【0026】

本発明者らの試験で使用した手法は、「個別化ゲノミクス」の1つの形態であると見なすことができる。したがって、この手法は利点と欠点の両方を有する。他のバイオマーカーに比した利点はその特異性にあり、それは、被験者の身体内のどこかに残存腫瘍細胞が存在しない限り、クエリーされた突然変異は決して見いだされないからである。欠点は、各被験者に特異的なマーカーを開発しなければならないことである。これは、予備工程として被験者の腫瘍内での突然変異の同定を必要とする（図1A～1B）。本発明者らはこの工程をパラフィン包埋組織由来DNAのダイレクトシーケンシングを用いて実施してきたが、これは例えば突然変異ホットスポットをクエリーするマイクロアレイなどのより単純な技術を用いて実施することができよう^{12,13}。第2工程である突然変異特異的プローブの設計および試験もまた、現在の技術開発段階ではやはり多大な時間を必要とする。しかしこれもまた、最も多く見られる突然変異を表すプローブのストックを前もって容易に調製することができるという点で、単純化できよう。この戦略はまた、この手法の様々な用途、すなわち突然変異状態が前もって公知ではない場合の健常集団における癌スクリーニングにおいて、特に有用である可能性がある。

30

【0027】

これらをまとめると、本発明者らは、腫瘍動態の尺度として循環腫瘍DNAを使用するための枠組みを提示する。その論理的根拠は、ウイルス核酸が無症候性疾患をモニタリングするために定量的に評価され、そして個々の必要に合わせて療法を調整するために使用される、HIV患者の看護に使用される根拠と同様である。本発明者らは、HIVを有する個人の治療において臨床判断決定に影響を及ぼすのに役立つのと同様に、ctDNAは多数のタイプの癌を非侵襲的にモニタリングするために使用できると想定している。シーケンシング技術が向上するにつれて、実質的にあらゆる癌においてそのような突然変異を同定することが相当に単純になるであろう。実際に、そのような診断用途は、癌ゲノムアトラス（Cancer Genome Atlas）プロジェクトの大きな目標の1つである。

40

【0028】

上記の開示は、本発明を一般的に説明したものである。本明細書に開示した全ての参考

50

文献は、参照により明示的に組み入れられる。例示する目的でのみ本明細書に提供されており、本発明の範囲を限定することは意図されていない下記の特定の実施例を参照することによって、より完全な理解を得ることができる。

【実施例】

【0029】

実施例1: 方法

被験者および試験設計。本試験は、the Johns Hopkins Medical Institutionsの施設内治験審査委員会によって承認された。被験者は、the Johns Hopkins Sidney Kimmel総合癌センターで外科的に治療されている原発性または転移性結腸直腸癌を有する場合に適格であった。2005年10月から2006年7月までの間に、患者31例が結腸直腸癌を有すると診断され、手術の可能性についての術前評価中にスクリーニング検査を受けた。28例の被験者が本試験に参加することに同意したが、これらの内7例は治療の候補者ではないと見なされ、被験者2例はフォローアップ中に死亡し、被験者1例は結腸直腸癌以外の医学的状态を有することが見いだされ、18例の参加者が残った。各被験者は、手術の前後および2007年10月までの彼らの術後経過中の既定間隔中に入手された血漿サンプル中でctDNAを評価する(図18)ことに同意した。本発明者らは、被験者18例から162例の血漿サンプルを予め採取した。ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織が各被験者から入手され、The Johns Hopkins Medical Institutesの外科病理学研究室によって通常の方法を使用して処理された。本発明者らは、臨床評価が完了すると盲検法で腫瘍組織および血漿サンプルの分析を実施した。腫瘍のサイズをコンピュータ断層撮影法を用いて放射線学的に測定し、腫瘍量を推定するためにはcm単位の断面積測定値を使用した。

10

20

【0030】

血漿由来DNAの単離および定量。本発明者らは、末梢血をEDTA試験管(Becton Dickinson社)内に採血した。1時間以内に、これらの試験管を820gで10分間にわたり遠心分離にかけた。血漿のアリコート1mLを1.5mLの試験管に移し、16,000gで10分間にわたり遠心し、残っている細胞破片をベレット化した。上清を新しい試験管に移し、-80℃で保存した。QIAamp MinEluteウイルス真空キット(Qiagen社)を製造業者の取扱説明書にしたがって用いて血漿アリコート2mLから全ゲノムDNAを精製した。本発明者らは、以前に記載したように¹⁴、ヒトLINE-1定量的リアルタイムPCRアッセイの修正バージョンを用いて血漿から単離した全DNAの量を定量した。詳細は、図18に提供されている。

30

【0031】

腫瘍組織由来DNAの突然変異分析。本発明者らは、パラフィン包埋組織から精製したDNA中の遺伝子4個の突然変異状態を決定した。10μmの切片を作製し、H&Eで染色した。これらの切片から新生腫瘍細胞を獲得するためにはレーザーキャプチャーマイクロダイセクションを使用した。切開した材料はプロテイナーゼK(Invitrogen社)を用いて一晩消化させ、QIAamp Microキット(Qiagen社)を用いてそれからゲノムDNAを精製した。全26種のPCR産物は、ダイレクトシーケンシングによって分析した。DNAの増幅およびシーケンシングに関するさらなる詳細は、実施例6に記した。

【0032】

血漿由来DNAの突然変異分析。本発明者らは、血漿中における各被験者の腫瘍組織のシーケンシングによって同定された少なくとも1つの突然変異をクエリーした。手短には、高忠実度DNAポリメラーゼ(New England BioLabs社)を用いた初回増幅工程のために突然変異を含有する領域を増幅させることのできるプライマーを設計した。この増幅産物をその後のBEAMingアッセイにおける鋳型として使用した。各試験のために使用したプライマーおよびプローブの配列は、実施例6に列挙した。BEAMingの実験の基本的特徴は以前に記載されており¹⁵、本試験で使用した修正については実施例6に記載した。血漿2mLから精製したDNAを各BEAMingアッセイのために使用した。各測定は、少なくとも2回繰り返した。

40

【0033】

本発明者らは、陽性コントロールとして各被験者の腫瘍から精製したDNAを使用した。

50

各アッセイにおいて、癌を有していない被験者由来のDNAを用いて実施した陰性コントロールもまた含めた。クエリーされる突然変異に依存して、これらの陰性コントロールサンプル中の変異特異的プローブに結合したビーズのパーセンテージは、0.0061% ~ 0.00023%の間で変動した。この割合は、以前に詳細に説明されたように¹⁶、初回PCR工程中に高忠実度DNAポリメラーゼによって導入された配列エラーを提示した。実験サンプルにおいて陽性と判定されるためには、変異型フラグメントに結合したビーズの割合が陰性コントロールにおいて見出された割合より高くなければならず、サンプル1例当たりの変異型DNAフラグメントの平均値 + 1SD (標準偏差) は > 1.0 でなければならなかった。本発明者らは、BEAMingによって生成されたビーズ集団を各血漿サンプルについて少なくとも2回分析した。

10

【0034】

癌胎児性抗原の測定。本発明者らは、the Johns Hopkins Medical Institutionsの臨床化学研究検査室でAbbott ARCHITECT i2000機器 (Abbott Laboratories社) を用いて2段階化学発光微粒子イムノアッセイによってCEA存在量について分析した。

【0035】

統計的分析。本発明者らは、術後の平均減少率として、ctDNAにおける術後変化をその標準偏差とともに定量した。Studentの対応のないt検定を用いてCEAにおける相対変化をctDNA値と比較した。1標本t検定を用いてベースライン時からの変化を評価した。CEAとctDNAレベルとの間の相関は、患者内クラスタリングを考慮に入れて、線形回帰からの部分残余から計算した。再発は、放射線学のおよび臨床的所見に基づいて規定した。95%水準での全信頼区間を計算した。計算は、JMP 6.0ソフトウェア (SAS Institute社) およびSigmaPlot 10.0.1 (Systat Software社) を使用して実施した。

20

【0036】

実施例2: ctDNAの測定

BEAMingによる循環変異型ctDNAの定量は、癌を有する被験者における疾患を評価するための個別化手法を提示する。このプロセスにおける第1工程は、被験者の腫瘍における体細胞突然変異の同定である (図1A ~ 1B)。図19は、本試験で評価された結腸直腸癌を有する被験者の特徴を列挙している。4種の遺伝子を被験者18例由来の腫瘍におけるダイレクトシーケンシングによって評価すると、腫瘍の各々は少なくとも1つの突然変異を有することが見いだされた (図20)。

30

【0037】

本プロセスにおける第2工程は、リアルタイムPCRによる血漿中のDNAフラグメントの総数の推定である (図1A ~ 1C)。術前 (第0日) には、上述した被験者18例における血漿1mL当たりメジアン4,000個のフラグメントが存在した (第10 ~ 第90パーセンタイルの範囲、DNAフラグメント1,810 ~ 12,639個/mL)。

【0038】

第3の最終工程は、クエリーした突然変異を含有する所定遺伝子のDNAフラグメントの割合の決定である。そのような変異型DNAフラグメントは、循環中の全DNAフラグメントの小さな割合にしか相当しないと予想される。そのような希少な腫瘍由来DNAフラグメントを検出するために必要とされる高感度を達成するために、本発明者らは、BEAMingの改良バージョンを開発した (実施例6に詳述した)。これらの改良により、高い信号対雑音比が達成され、同一条件下での単純なハイブリダイゼーションプローブによって多数の様々な突然変異の検出が可能になった。本発明者らは、被験者18例に対して少なくとも1つの、28種のアッセイを設計することを試みて、各場合において成功が得られた。本試験で評価した95例の陽性サンプル中の変異型DNAフラグメントのメジアンパーセンテージは0.18% (範囲: 第10 ~ 第90パーセンタイル、0.005 ~ 11.7%) であった。代表的被験者から連続的に採取した血漿からの典型的アッセイの実施例は、図2A ~ 2Dに示した。

40

【0039】

分析した血漿量中の遺伝子のDNAフラグメントの総数 (リアルタイムPCRによって決定する) に変異型フラグメントの割合 (BEAMingによって決定する) を掛けると、その血漿量

50

中の変異型フラグメントの数 (ctDNA数) が得られる (図1C)。本試験で評価した95例の陽性サンプル中の変異型DNAフラグメントのメジアン数は39個 (範囲: 第10 ~ 第90パーセンタイル、1.3 ~ 1,833.0個) であった。

【0040】

これらのアッセイの正確度を同一被験者における2種の相違する遺伝子に由来する変異型DNAフラグメントの数の測定によって評価した。本発明者らは、試験被験者9例に由来する43例のサンプル中で2種の相違する遺伝子における突然変異をアッセイすることができた。2種の変異遺伝子に対応するctDNAレベルは、顕著に類似することが見いだされた (相関係数 $R^2 = 0.95$ 、図14)。

【0041】

実施例3: 療法を受けている癌を有する被験者におけるctDNAの動態

本発明者らは、本試験の経過中に計22例の手術後に被験者18例を評価した (図19)。術前 (第0日) に決定したctDNAレベルは、サンプル1例当たり1.3 ~ 23,000個の変異鋳型の範囲内で大きく変動した (サンプル1例当たりメジアン99個の変異鋳型; 範囲: 第10 ~ 第90パーセンタイル、3 ~ 2,837個)。これらの手術中17例は全顕性腫瘍組織の完全切除を含んでいたが、5例は不完全切除であった。完全切除を受けた全被験者では退院日 (手術から2 ~ 10日後) までのctDNAレベルにおける急落が観察され、これはctDNAにおける99.0%のメジアン減少 (範囲: 第10 ~ 第90パーセンタイル、58.9 ~ 99.8%; 図24A ~ 24C) であった。この減少は手術の24時間後に既に明白であった (96.7%のメジアン減少、範囲: 第10 ~ 第90パーセンタイル、31.4 ~ 100.0%)。完全切除後の初期の複数回の時点に血漿がサンプリングされた被験者の評価を通して、本発明者らは、術後のctDNAの半減期が114分間であると推定した (図15)。

【0042】

不完全切除であった5症例では、ctDNAにおける変化は極めて相違していた。これらの症例中2例では、変異型フラグメントの数は24時間後にわずかのみ減少したが (55 ~ 56%)、残り3例では、数は实际的に増加した (141%、329%および794%)。この増加はおそらく、その後のDNAの遊離を伴う、外科手技中の残存腫瘍組織の傷害に起因した。外科的に誘発された組織傷害は血漿中のDNAの総量 (変異型 + 正常) が全被験者において手術直後に増加したという観察所見と一致している (図16A-1 ~ 16E-3)。

【0043】

ctDNAの量は術後には減少したが、大多数の症例において検出不能なレベルへは減少しなかった。血漿サンプルは、20例において初回フォローアップ来院時、手術13 ~ 56日後に入手できた。ctDNAはこれらの20例中16例では依然として検出可能であり、これら16例中の1例を除く全例で再発が発生した (図24A ~ 24C)。極めて対照的に、初回フォローアップ来院時にctDNAが検出不能であった被験者4例では再発は発生しなかった (図24A ~ 24C)。初回フォローアップ時に検出不能なctDNAを有する、および有さない被験者間の再発率の相違は統計的有意であった ($P = 0.006$ 、Mantel-Cox対数順位検定による、図3a)。

【0044】

被験者2例に関する臨床データおよび放射線学データを含むctDNAの代表的な時間経過は図4B ~ 4Cに提供し、その他全被験者に関する類似のデータは図17に示した。被験者8および11は本試験中に2回以上の外科手技を受けたので、腫瘍量の反復制御操作後のctDNAにおける変化を評価するために特別の機会を提供した。これらの被験者はどちらも初回手術における切除が不完全であり、彼らのctDNAレベルは減少しなかった (図4B ~ 4C)。彼らは第2回手術において完全切除を受け、その後にctDNA存在量は急激に減少した。ctDNA存在量はその後、次の数カ月間にわたってより高レベルに上昇した (図4B ~ 4C)。

【0045】

本発明者らのコホート中の11例の被験者は、本試験の経過中に化学療法を受けた。これらの被験者中3例では、ctDNAレベルは治療中に下降した。1つの例は被験者8によって提供される: ctDNAは99.9%より大きく減少したが、腫瘍容積 (間質細胞に加えて生存および死滅新生腫瘍細胞から構成された) はほんのわずかしが減少しなかった (図4A ~ 4C)。被験

10

20

30

40

50

者6例では、被験者8および11における初回化学療法後（図4A～4C）ならびに被験者1、4、10、および12（図17）において明らかであるように、化学療法の中止直後にctDNAの上昇が生じた。

【0046】

実施例4: 癌胎児性抗原との比較

癌胎児性抗原（CEA）は、結腸直腸癌を有する被験者において疾患を追跡するための標準バイオマーカーであり、この疾患の管理において通常使用されている¹⁰。試験登録前には、被験者18例中10例だけが $>5\text{ng/mL}$ （正常範囲の限界値）のCEAレベルを有していた（図23）。2つのアッセイ（ctDNA対CEA）間の感度におけるこの相違は、統計的有意であった；各々56%対100%（ $P=0.008$ 、McNemar検定）。さらに、術前に陽性CEAレベルを有していた被験者においてさえ、完全腫瘍切除はctDNAを用いて観察されたより少ない有意なCEAの減少を生じさせた（各々ctDNA対CEAにおける99.0%対32.5%のメジアン減少； $P<0.001$ 、Studentのt検定）。患者内のクラスタリングについて補正後には、CEA存在量とctDNAレベルとの間に穏当な全相関が見られた（ $r^2=0.20$ 、 $P<0.001$ 、図17）。最後に、第24～48日の初回術後フォローアップ来院時に測定すると、CEAレベルが再発疾患を予測する能力はctDNAレベルの能力ほど顕著ではなかった（ $P=0.03$ 、Mantel-Cox対数順位検定による、図3b）。

【0047】

実施例5: 試験設計および臨床サンプルの採取

本試験のために、以前の試験を通して獲得されていた、結腸直腸癌を有する被験者由来の標本を評価した⁷。被験者は、家族歴によって決定されるCRCに対する平均リスク状態にあり、いずれのタイプの癌についても個人歴は有していなかった。非特異的腹部症状または皮膚の基底細胞癌もしくは扁平上皮癌の病歴を有する患者は除外しなかった。糞便および血液標本は大腸内視鏡検査の6～12日後およびその後の手術のための任意の腸管前処置の前に採取した。本試験には、以前に同定された癌症例40例中25例を含めたが⁷、これは15症例が不適正な量の残留物を有していたからである。患者の特徴は、表1に要約した：患者中7例はステージI、7例はステージII、8例はステージIII、2例はステージIVそして1例はステージ未確定の癌を有していた。血液サンプルは、患者25例中16例からEDTAを含むBD Vacutainer試験管（Becton Dickinson社、米合衆国ニュージャージー州フランクリンレイクス（Franklin Lakes, NJ USA））中に採血した。血漿は、1380gでの30分間にわたる血液の遠心分離によって調製した。上清を新しい試験管に移し、再遠心した。遠心分離後、血漿は、残留している細胞破片を除去するためにMillipore Ultrafree-MC 0.45 μ フィルターデバイス（Millipore社、米合衆国マサチューセッツ州ビルリカ（Billerica, MA, USA））へ移した。フィルターデバイスに1,380gで15分間にわたる遠心分離にかけた。透明になった血漿を新規試験管に移し、処理するまで-20℃で保管した。

【0048】

腫瘍組織中での突然変異の同定

以前に報告されたように、外科的切除後に得られた組織を突然変異分析のために使用した^{5,4}。手短には、急速冷凍またはパラフィン包埋した顕微解剖腫瘍組織は、QIAamp DNA ミニキット（Qiagen社、カリフォルニア州バレンシア（Valencia, CA））を用いて腫瘍DNAを単離するために使用した。全DNAサンプルは、一塩基伸長（SBE）アッセイを用いて、そしてPIK3CAのエクソン9および20、CTNNB1のエクソン3、ならびにAPCのエクソン15についてのシークエンシング手法を用いて、APC、TP53、およびKRASにおける22の共通突然変異を分析した。シークエンシングは、4つの別個のシークエンシング反応において各々がR110標識AcycloTerminatorヌクレオチド（PerkinElmer社）ならびにThermoSequenase（GE社）およびAcycloPol（PerkinElmer社）の混合物を含有する一本鎖DNA鋳型を使用して実施した。結合した2つのマーカーパネルは、本試験のために入手できる24例の腫瘍サンプル中での少なくとも1つの突然変異を同定することができた（表2）。SBEおよびシークエンシングの感度は、各々75%（18/24）および79%（19/24）であった（図13）。

【0049】

糞便DNAの単離および定量

標的遺伝子に富んでいるヒトDNA (APC、TP53、KRAS、およびPIK3CA) は、可逆的電気泳動捕捉親和性プロトコル (RECAP)⁸ を使用して全糞便DNAから精製した。

【0050】

各糞便サンプルから回収した遺伝子フラグメントのコピー数は、iCycler (商標) IQリアルタイムPCR検出システム (Biorad社、米合衆国カリフォルニア州ハーキュリーズ (Hercules, CA, USA)) を用いて定量した。2つずつの反応液 (50 μ L) は、5 μ LのDNA、10 $\times$ PCRバッファー (Takara Bio社; 米合衆国ワイオミング州マディソン (Madison, WI, USA))、0.2mMのdNTP (Promega社、米合衆国ワイオミング州マディソン (Madison, WI, USA))、0.5 μ Mの配列特異的プライマー (要請に応じて入手できる配列) および2.5単位のLATAq DNAポリメラーゼ (Takara Minis Bio社、米合衆国ワイオミング州マディソン (Madison, WI, USA)) から構成された。PCRパラメーターは、変性のためには95 で3.5分間、その後40サイクルの95 で1分間、55 で1分間、および72 で1分間であった。

10

【0051】

血漿DNAのDNA単離および定量

DNAは、QIAamp MinEluteウイルス真空キット (Qiagen社) を製造業者が推奨するとおりを使用して2mLの血漿から精製した。DNAは、EBバッファー (Qiagen社) 中に溶出させ、-20 で保存した。以前に記載したように⁹、血漿から単離した全DNAの量は、ヒトLINE-1定量的リアルタイムPCRアッセイの修正バージョンを用いて定量した。詳細は、実施例6に記載した。

20

【0052】

BEAMingによる突然変異分析

血漿および糞便DNAをBEAMingによって体細胞突然変異について分析した。総計すると、33種の相違する突然変異分析のために18の増幅プライマーセットを設計した。各糞便サンプルについて、計30,000のゲノム当量を分析した。1ゲノム当量は3.3pgのゲノムDNAであると規定され、半数体細胞中に存在するDNA量と同等である。2mLの血漿から精製されたDNAに対応する量を各BEAMingアッセイのために使用した。初回増幅は、各々が250 μ Lの血漿と同等の鋳型DNAまたは糞便DNAの3,750ゲノム当量を含有する、複数の50 μ LのPCR反応液中で実施した。各反応は、5 $\times$ Phusion高忠実度バッファー、1.5単位のHotstart Phusionポリメラーゼ (どちらもNEB社)、0.2 μ Mの各プライマー、0.25mMの各dNTP、および0.5mMのMgCl₂ から構成された。ネステッドPCR反応は、選択した標的領域のために実施した; 第2回増幅のためには、2 μ Lの初回PCRを、相違するプライマーを使用した以外は上記に記載したものと同一の構成の20 μ LのPCR反応液に加えた。プライマー配列およびサイクリング条件は図9に列挙した。PCR産物をプールし、希釈し、PicoGreen dsDNAアッセイ (Invitrogen社) を使用して定量した。BEAMing方法については以前に記載されており¹⁰、本試験において使用した修正については本明細書に記載した。

30

【0053】

高スループットオートサンプラーを装備したLSR IIフローサイトメトリーシステム (BD Bioscience社) を各ビーズ集団の分析のために使用した。平均すると、5 $\times$ 10⁶個のビーズを各血漿サンプルについて分析した。フローサイトメトリーデータをゲートしたので、分析のためには伸長産物 (コントロールプローブによって指示される) を備える単一ビーズだけを使用した。突然変異頻度は変異型配列に付着したゲートビーズの数を、変異型もしくは野生型配列のいずれかを含有するビーズの数で割ることによって計算した。アッセイを陽性であると判定するためには、2つの基準を満たさなければならなかった。第一に、変異型ビーズの割合は、増幅中に発生するポリメラーゼエラーから発生するバックグラウンドより高くなければならなかった。本発明者らは、Poisson分布を使用して、正常リンパ球DNAに由来するDNA鋳型を用いて観察されるバックグラウンドにおいて予測される変動を推定した。「陽性」アッセイは、割合が0.01%より高かったアッセイとして判定された。第2の基準は、分析のために使用した鋳型中の変異型配列の算定数が 1でなければならぬというものであった。例えば、サンプル中で1,000ゲノム当量しか分析されなかった

40

50

場合、それでも変異型配列に結合したビーズの算定割合は0.05% (2,000個中1個) であったが、このサンプルは、変異型分子の数は1未満である0.5 (0.05% × 1,000) に過ぎなかったため陰性と判定された。

【0054】

BEAMingによる体細胞突然変異の検出

本発明者らは、APC(20)、KRAS(4)、PIK3CA(4)、またはTP53(5)のいずれかにおける33種の相違する塩基変化を検出するためのBEAMingの性能を評価した。BEAMing法は、対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション (ASH) 手法がビーズ結合DNAの分析のために開発されたという重要な相違以外は以前に記載されたとおりに実施した (図1A~1C)。ハイブリダイゼーションは、固定化した野生型もしくは変異型DNA配列に相補的な、等モル濃度の蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いて実施した。全33種の塩基変化についての最適対立遺伝子識別には、初期変性工程、その後の塩化テトラメチルアンモニウム (TMAC) をベースとするバッファー中での緩徐な冷却プロセス¹¹によって達した。本発明者らが評価することを試みた全突然変異 (1~5bpの範囲内の転位、塩基転換、挿入または欠失) は、この単一TMACに基づくハイブリダイゼーション法を使用すると、高い信号対騒音比で上首尾で検出された。

【0055】

BEAMingによって生成されたビーズに適用されたASHの例は、図6に示した。陽性コントロールDNA集団は、中心に突然変異を伴う、ゲノム配列を表す長いオリゴヌクレオチドを使用して調製した。陰性コントロールは、健常ドナーのリンパ球から単離したDNAから調製した。ポリメラーゼは完全にエラーがないわけではないので、初期増幅工程中に導入された突然変異は、変異型DNAがサンプルDNA中に存在しない場合でさえ変異型DNA配列を備える少数のビーズを作り出す¹²。本試験では、試験したあらゆる市販されている酵素の中で最低エラー率を有することが証明されていたので、Phusion DNAポリメラーゼ (NEB) を使用した¹²。このバックグラウンドは、本試験において分析された各突然変異について個別に決定した。正常リンパ球DNAにおけるポリメラーゼエラーから起こる突然変異のメジアンバックグラウンドは、0.0009% (範囲: 0.01% ~ 0.00013%) であった。バックグラウンド率における変動は遺伝子間および遺伝子内で観察されたが、これはおそらくポリメラーゼエラーの非ランダムな性質を反映している。したがって、所定のサンプルについてのアッセイは、突然変異の割合が保存的および統計的有意な境界によってバックグラウンドより高かった場合にのみ「突然変異について陽性」とであると判定された (方法の項を参照)。さらに、サンプルは、変異型配列に結合したビーズの算定数が、方法の項においてより詳細に説明するように、本アッセイで使用したゲノム当量によって規定される閾値より高かった場合にのみ陽性と判定された。

【0056】

糞便から精製したDNAの量および質

BEAMingは変異型DNAを検出するためだけではなくそれらの存在量を精密に定量するためにも使用できるので、CRC患者の糞便中に存在する無細胞変異型および正常DNAの量および質の両方を決定するために使用できた。このため本発明者らは、CRC患者の糞便中に存在する変異型DNAフラグメントのサイズを分析することによって本試験を開始した。このために、6つのPCRプライマーセットは、局所性結腸直腸癌を有する患者4例において見出された様々なAPC突然変異を含むDNAフラグメントの増幅のために設計された。患者中2例はステージIの癌を有し、2例はステージIIの癌を有していた (図11)。これらのプライマーを用いて得られたアンプリコンのサイズは104bp~1,197bpの間で変動し、突然変異は各アンプリコンの中央に位置した (図7A)。各アッセイにおいて等質量 (181mg) の糞便から精製したDNAを使用した。変異型もしくは正常型分子の数は、変異型もしくは正常DNA配列に結合したビーズの各割合に定量的リアルタイムPCRによって測定したDNA濃度を掛けることによって計算した。全4例の患者において、増幅可能な正常DNAフラグメントの数は、アンプリコンのサイズが増加するにつれて減少した。患者2では、この減少は3倍に過ぎなかったが、他の3例の患者ではこの減少は1,000倍までとより激しかった (図7B)。変

異型DNAフラグメントはサイズとともに、類似ではあるが同一ではない方法で減少した（図7C）。結果として、変異型DNAフラグメントの割合は最小アンプリコン中で最高であった（図7D）；患者4および14では、最大アンプリコンサイズ（1200bp）が使用された場合には変異型DNAフラグメントを検出できなかった。これらの知見は、糞便DNA中の突然変異についての試験の感度が小さなアンプリコンを使用することによって最適化できることを示唆した点で重要であった。この結果に基づいて、本試験のその後の段階で使用了全BEAMingアッセイは、可能である場合は必ず約100bpの、そして決して126bpを超えないアンプリコンを用いて実施した（図9）。

【0057】

BEAMingによる糞便DNA中の突然変異の検出

10

本試験に含まれた患者25例の臨床病理学的特徴を表1にまとめた。

【0058】

（表1）患者の特徴

特徴	数値 (n=25)
年齢（歳）	
平均値	67
中央値 （範囲）	66 (50-84)
性別	
女性	15
男性	10
病期	
I	7
II	7
III	8
IV	2
不明	1
分化型	
高分化	12
中分化	9
低分化	3
不特定	1
腫瘍組織中の突然変異の数	
0	0
1	7
2	15
3	3

20

30

40

【0059】

腫瘍のサイズは12～80mmの範囲内で、平均サイズは41mm（メジアン40mm）であった。14例（56％）の患者は初期（第IまたはII期）、10例（40％）は後期（第IIIまたはIV期）にあり、患者1例のステージは不明であった。上記に略述したように、腫瘍組織を入手できた患者24例中、全例が原発性腫瘍中に少なくとも1つの突然変異を有していた（図13）。組織を入手できなかった患者25については、SBEアッセイによって糞便DNA中で2つの突然変異が同定された（図13）。

【0060】

45例のBEAMingアッセイは、これらのサンプル中での33種の相違する突然変異を評価するために実施した（患者13例は別の患者において見出された少なくとも1つの突然変異を

50

有していた；表2）。患者25例中、23例（92%、CI:74%、99%）は、彼らの糞便サンプル中で検出可能なレベルの変異型DNAを有していた。突然変異は、後期癌（第III期および第IV期）を有する患者におけるように、初期結腸直腸癌（ステージIおよびステージII）において容易に検出された（図12）。興味深いことに、変異型DNAフラグメントを糞便中で検出できなかった患者2例中1例では、正常DNAの量が極めて高かった（患者5）。

【0061】

糞便サンプル中に存在する変異型DNAのメジアン割合は0.32%であったが、広く変動した（範囲、0.0062%～21.1%；表2）。

【0062】

（表2）

患者	性別/ 年齢(歳)	腫瘍 ステージ (TNM)	組織学 ¹	部位 ²	サイズ (mm)	遺伝子	突然変異(コドン)	糞便DNA 全DNA フラグメント数	変異型 DNA , %	判定	血漿DNA 血漿中全DNAフラグメント数	変異型DNA, %	判定
1	M/66	I(T1N0M0)	Mod	R	50	APC	C2628T(876)	50,600	4.0	+			
2	F/64	I(T2N0M0)	Mod	Sig	30	APC	G3964T(1322)	398,000	0.87	+	3676	0.000	-
3	F/70	I(T2N0M0)	Mod	C	45	TP53	G818A(273)	302,000	0.20	+			
4	F/67	I(T1N0M0)	Well	Tr	40	APC	4237-4240delATGG(1413)	1,808	0.71	+	2397	1.88	+
5	M/69	I(T2N0M0)	Well	Rs	24	APC	C4132T(1378)	8,460	0.39	+	9317	0.013	+
						APC	4359delT(1453)	1,030,000	0.00	-	3365	0.000	-
6	M/84	I(T2N0M0)	Mod	R	25	KRAS	G35X(12) ³	1,030,000	0.00	-			
						APC	C2628T(876)	252,000	0.32	+			
						APC	4485delT(1489)	252,000	0.78	+			
7	F/58	I(T2N0M0)	Well	Sig	12	TP53	C742T(248)	252,000	1.0	+			
						APC	4297delC(1433)	13,840	1.0	+			
						PIK3CA	C3075T(1025)	8,260	21	+			
8	M/80	II(T3N0M0)	Well	Sig	25	APC	4497delA(1499)	7,420	0.00	-			
						KRAS	G38A(12)	7,420	0.21	+			
9	M/70	II(T3N0M0)	Well	Sf	50	APC	C3960G(1327)	59,600	15.0	+	10652	0.002	-
						TP53	G524A(175)	59,600	0.3	+			
10	F/58	II(T3N0M0)	Well	Tr	80	APC	4467 delA(1489)	113,800	1.17	+	4530	0.002	-
11	F/65	II(T3N0M0)	Well	C	50	APC	4681-4682insA(1554)	106,600	1.09	+			
12	F/75	II(T3N0M0)	Well	R	25	APC	G4135T(1379)	540,000	0.37	+	4850	0.42	+
13	M/80	II(T3N0M0)	Well	As	65	APC	C2628T(876)	264,000	0.06	+			
						APC	4189-4190delGA(1397)	264,000	0.04	+			
14	M/66	II(T3N0M0)	Mod	R	45	PIK3CA	C4348T(1450)	15,740	0.2	+	3690	0.005	-
						APC	G1624A(542)	5,340	0.3	+			
15	F/50	III(T4N1M0)	Mod	R	25	APC	C4285T(1429)	22,600	0.13	+	6422	0.062	+
						KRAS	G35A(12)	22,600	0.2	+			
16	M/64	III(T3N1M0)	Poor	Sig	30	TP53	G524A(175)	6,920	0.00	-	7047	0.033	+
17	M/74	III(T3N2M0)	Well	R	30	APC	4126-4127insT(1376)	7,140	0.05	+	2679	0.17	+
						KRAS	G38A(12)	7,140	0.07	+			
18	M/57	III(T3N1M0)	Mod/ Poor	Sig	70	PIK3CA	G1624A(542)	7,140	0.05	+			
						APC	3934delG(1312)	18,700	0.28	+			
19	F/65	III(T3N2M0)	Mod/ Poor	As	50	TP53	G733A(245)	17,460	1.3	+			
						APC	C2628T(876)	5,920	0.18	+	11716	0.002	-
20	M/59	III(T3N1M0)	Well	Tr	40	KRAS	G35C(12)	3,320	0.23	+			
						TP53	C817T(273)	3,320	0.10	+			
						APC	4661-4662insA(1554)	11,320	0.00	+			
21	M/73	III(T2N1M0)	Mod	Tr	42	KRAS	G35A(12)	11,320	0.3	+			
						APC	C4348T(1450)	10,280	0.05	+	5043	0.007	-
22	F/61	III(T3N1M0)	Mod	R	NR	KRAS	G35A(12)	7,200	0.23	+			
						APC	3980-3983delCAC(1327)	62,800	0.23	+	4206	0.001	-
23	M/67	IV (T3N2M1)	Mod	Sig	60	KRAS	G35A(12)	62,800	4.43	+			
						PIK3CA	C1636A(546)	138,000	0.06	+	29233	6.6	+
24	M/65	IV (T3N1M1)	Well	As	30	APC	G4189T(1397)	254,000	0.62	+	4084	0.44	+
25	M/64	NR	NR	R	35	PIK3CA	A3140G(1047)	254,000	1.33	+			
						APC	3927-3931delAAAGA(1309)	356,000	0.90	+			
						TP53	G524A(175)	356,000	10.2	+			

NR: 導引せず
¹組織学のタイプ: Well: 高分化腺癌; Mod: 中分化腺癌; Poor: 低分化腺癌
²所在場所: R: 直腸; Sig: S状結腸; C: 盲腸; Tr: 横行結腸; As: 上行結腸; Rs: 直腸S状部; Sf: 腸造口部
³G35Xは、G35A、G35C、またはG35Tを意味する(特定塩基の変化は決定しなかった)。

【0063】

2つの突然変異を同一糞便サンプル中で評価できた症例の大多数では、変異型DNA分子の割合は類似であった。しかし4症例(患者7、8、20および25)では、別の遺伝子中の変異型DNAフラグメントと比較して1つの遺伝子由来の変異型DNAフラグメントの割合における5倍を超える相違が存在した。

10

20

30

40

50

【0064】

別の重要な観察は、糞便サンプル中の変異型DNAフラグメントのメジアン割合が患者の腫瘍のステージを超えて統計的有意には変動しなかったことであった；ステージI、ステージII、ステージIII、およびステージIV各々について0.83%、0.31%、0.20%、および0.62%（図8）。

【0065】

最後に、これらの糞便サンプル中でのBEAMingアッセイの結果を以前に入手したサンプルと、修正シーケンシング手法⁵および一塩基伸長法（SBE）⁷を使用して比較することは興味深かった（図13）。本試験で評価した患者25例中、結合したこれらのアッセイは患者15例（分析した25例中で60%）中でしか少なくとも1つの突然変異を検出できなかったが、BEAMingは23例（同一患者25例の92%）で検出した。この相違は、統計的有意であった（表2、 $p = 0.008$ 、精密McNemar検定）。APC、TP53、およびKRASにおける22の特異的突然変異を評価する市販されているDNA試験の構成要素を含むSBEアッセイは単独で、シーケンシングをベースとするアッセイとほぼ同様に機能した（60%（12/20）対56%（10/18））。本発明者らのデータはさらに、BEAMingと比較してSBEおよびシーケンシング試験の感度が低いことについての潜在的根拠も解明した。これらの試験では検出されなかった突然変異は、分析したフラグメントの $0.11\% \pm 3.0\%$ を構成した。これとは対照的に、SBEまたはシーケンシングを用いて検出可能であった突然変異は、9倍以上豊富であった（メジアン $1.0\% \pm 5.0\%$ ）。

【0066】

BEAMingによる糞便DNAおよび血漿DNA中の突然変異の検出

血液および血漿の16対の適合サンプルを分析のために入手できた。各サンプルについて、患者の腫瘍内で見いだされた突然変異の1つを分析のために選択した。表2において認められるように、これらの患者16例中14例（87.5%）は、検出可能なレベルで突然変異を含有していた。変異型DNAフラグメントは血漿サンプルの小さな比率で見いだされた（16例中8例[50%]；血漿および糞便アッセイにおける陽性患者の数間の相違についてのp値は、精密McNemar検定によると0.07であった）。両方の試験について陰性であったのは患者1例（患者5）だけで、患者1例は陰性糞便試験結果を有したが、血漿試験結果は陽性であった（患者16）。陽性と判定された患者では、変異型DNAのメジアン割合は糞便（0.37%）および血漿（0.42%）中で類似であった。

【0067】

以前の多数の試験が糞便DNA中の突然変異の存在について報告しているが、本試験は、それらを初めて高度の感度および定量的方法で分析した。同様に、他の刊行物は血漿または血清中での遺伝子変化の同定について報告しているが、同一技術を使用して循環DNAについて得られた結果を糞便DNAについて得られた結果と比較したものはなかった。本明細書に報告した比較および定量は、将来結腸直腸腫瘍のための高感度かつ特異的な非侵襲性スクリーニング試験の開発を誘導するために重要である。

【0068】

糞便DNAの定量的分析は、この分野における今後の研究のために重要な幾つかの問題を浮き彫りにした。第一に、アンプリコンが小さい場合、最適には100bp未満である場合に最高感度が実現された（図7A~7D）。これは明白に、インサイチューでアポトーシスもしくは壊死を受ける癌細胞、またはそれらが糞便流内に放出された後のいずれかに発生するDNA分解に起因する。血漿中では、DNA変異検出についての類似のサイズ依存性が記載されている¹³。この観察は、結腸直腸のマーカーとしてDNA完全性の増加を使用できることを証明している試験¹⁴とは矛盾しないことに留意されたい。癌患者の糞便中に存在する変異型DNAは全DNAのほんのわずかな割合（メジアン0.32%；平均1.89%）を表すので、このため全（変異型 + 正常）DNAの完全性の測定にはほとんど影響を及ぼさない。癌患者において観察されるDNA完全性の増加は、腫瘍環境内の正常細胞から糞便流内へのより大きなDNAフラグメントの遊離によって誘発される可能性が極めて高い。実際に、最近の試験結果は、癌は、正常配列の相当に大きなDNAフラグメントに帰すことができると考えられる特定

タイプの炎症細胞で通常は浸潤されることを証明している¹⁵。

【0069】

第二に、本試験の結果は、BEAMingによって提供される感度を実現するために入手しなければならないDNA鋳型分子の数が極めて少ないことを明白にしている。分析される突然変異のいずれかについてのBEAMingの感度は、少なくとも1つの変異鋳型を10,000個の正常鋳型から検出できる(0.01%)ほどの感度である。一部の突然変異に対しては、感度は800,000個の正常鋳型間で1個の変異鋳型(0.0013%)というほど高い。この感度は、初回増幅で使用されるポリメラーゼのエラー率によってのみ限定される¹²。この高い技術的感度を利用するには、実際には適正数のDNA鋳型を必要とする。例えば、1アッセイ当たり2,000個の鋳型しか使用されない場合は、達成できる最高感度は0.01%ではなく0.05%である。この数の鋳型を入手することは糞便サンプルを用いた場合は問題ではないが、血漿については問題となることが多い。本試験では、2mLの血漿はメジアン4,590のDNAのゲノム当量含有していた。これは、血漿をベースとするアッセイ(60%)が同一患者における糞便をベースとするアッセイ(88%)より感度が低かった理由である可能性がある。血漿から30,000個(糞便をベースとするアッセイで使用された数)のゲノム当量を通常の方法で入手するためには、50mLの血液が必要となるであろう。これは将来のプロスペクティブ試験では実行可能かも知れないが、本発明者らの試験などのレトロスペクティブ試験では入手できる可能性が低い。

10

【0070】

糞便はDNAのほぼ無制限の供給を提供するが、アッセイ結果に影響を及ぼす他の技術的問題がある。例えば、糞便は様々なPCR阻害因子および極めて過剰の細菌DNAを含有しているので、ヒトゲノムDNAの配列特異的捕捉を不可欠にする。そのような捕捉のための対費用効果の高い方法は開発されており、本試験において使用された。しかしそれらの方法は関心対象の突然変異を含有する小さなDNAフラグメントを単離するためには未だ最適化されていない。図7A~7Dに示したように、特異的遺伝子領域に対応する正常および変異型DNAフラグメントのサイズは、必ずしも同一ではない。サイズの関数としての変異型フラグメントの割合は、患者特異的方法での特定突然変異に伴って変動する可能性が高いが、これは正常DNAの起源ならびに腫瘍DNAフラグメントの変性の程度の両方に左右されるからである。この問題は、2つの方法で本発明者らの試験結果に影響を及ぼした可能性がある。第一に、一部の被験者(例えば、表2における患者7)における2つの相違する遺伝子内で観察された変異型フラグメントの割合間の広汎な変動の原因となったであろう。第二に、本発明者らが一部の患者において突然変異を検出できなかった理由を説明してくれるであろう。例えば、これらの2例の患者中1例(患者5)は、糞便中の極めて多数の正常フラグメントを有しており、これは任意の他の患者の正常フラグメントの2倍を超えていた。捕捉プローブの最適化は、将来において感度を本試験で得られた92%より上に増加させることができよう。

20

30

【0071】

新規の結果はさらにまた、初期検出のための糞便対血漿の相対的利点および欠点に関する考察も与えてくれる。上述したように、血漿より糞便からの方が十分量のDNAを入手することが容易である。しかし、血漿は通常の来院中に入手できるので実際の観点からは採取するのがより便宜的であり、糞便よりも血漿からの方がDNAを精製するのが容易である。結腸直腸癌患者由来の血漿中で突然変異を検出する感度(50%)は糞便中におけるより低い。これはおそらく各アッセイにおいてより多くの血漿を使用することによって増加させることができよう。しかし血漿と比較して糞便の最大の利点は、様々なステージの腫瘍を有する患者の糞便中で観察された突然変異の相対的割合にある。図8および12に示したように、早期患者の糞便中における突然変異の割合は、後期患者と同様に高かった。これとは対照的に、本発明者らの以前の試験は、早期患者の血漿中の突然変異の割合は後期患者より相当に低いことを証明している(本試験では、陽性血漿サンプルを有する患者数が少数であったために明白ではない)¹³。さらに、この状態は大きな腺腫を有する患者においてはいっそう顕著である可能性が高いが、それは変異型DNAはこれらの良性であるが

40

50

臨床的に重要な新生腫瘍を有する患者の糞便中におけるより血漿中で検出することがはるかに困難であるからである。

【 0 0 7 2 】

本発明者らの試験は現在市販で利用できるよりも高い感度および定量的アッセイの臨床的実行に向かう新規の工程を表しているが、この目標を実現するためには幾つかの追加の工程が必要となるであろう。様々なステージの結腸直腸腫瘍を有する多人数の患者および同等に多人数のコントロールを使用する臨床試験に加えて、克服すべき技術的問題が依然としてある。詳細には、BEAMingを用いて1パネルの遺伝子マーカーをクエリーするための対費用効果の高い方法が開発されなければならない。これに関連して、本試験において全25例の患者における突然変異が相当に少数の共通突然変異の試験によって解明されたことは注目に値する。本発明者らは、結腸直腸癌または大きな腺腫のいずれかを有する患者の86%近くは、最も一般的な突然変異100種中の少なくとも1つを持っているであろうと想定している。そのようなアッセイの実行は、約10エクソンの同時捕捉および引き続いてのこれらのDNAフラグメントの多重PCR増幅を含むであろう。突然変異検出のための新規に記載されたハイブリダイゼーションをベースとする手法もまた、容易に自動化できるという点で利点を有する。次世代シーケンシングは、この手法をいっそう単純化できる可能性を有する。BEAMingによって得られたビーズは、フローサイトメトリーではなくむしろシーケンシングによって分析できる¹⁶。さらに、突然変異マーカーパネルは、エピジェネティックマーカーを含めることによってサイズを減少させることができよう¹⁷。実際に、本試験から学んだ貴重な経験は、メチル化をベースとするBEAMingまたは将来開発される腫瘍特異的DNA変動に対する任意の他の試験のために定量的アッセイを最適化するために適用できよう。

【 0 0 7 3 】

実施例5のための参考文献（ここに挙げた参考文献は全部が明示的に本明細書に組み入れられる）

1. Ouyang DL, Chen JJ, Getzenberg RH, Schoen RE. Noninvasive testing for colorectal cancer: a review. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1393-403.
2. Osborn NK, Ahlquist DA. Stool screening for colorectal cancer: molecular approaches. *Gastroenterology* 2005;128:192-206.
3. Olson J, Whitney DH, Durkee K, Shuber AP. DNA stabilization is critical for maximizing performance of fecal DNA-based colorectal cancer tests. *Diagn Mol Pathol* 2005;14:183-91.
4. Whitney D, Skoletsky J, Moore K, Boynton K, Kann L, Brand R, Syngal S, Lawson M, Shuber A. Enhanced retrieval of DNA from human fecal samples results in improved performance of colorectal cancer screening test. *J Mol Diagn* 2004; 6:386-95.
5. Kann L, Han J, Ahlquist D, Levin T, Rex D, Whitney D, Markowitz S, Shuber A. Improved marker combination for detection of de novo genetic variation and aberrant DNA in colorectal neoplasia. *Clin Chem* 2006; 52:2299-302.
6. Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8817-22.; U.S. Serial No. 10/562,840

7. Itzkowitz SH, Jandorf L, Brand R, Rabeneck L, Schroy PC, 3rd, Sontag S, Johnson D, Skoletsky J, Durkee K, Markowitz S, Shuber A. Improved fecal DNA test for colorectal cancer screening. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007;5:111-7.
8. Kent Moore J, Smith JA, Whitney DH, Durkee KH, Shuber AP. An electrophoretic capture method for efficient recovery of rare sequences from heterogeneous DNA. *Biotechniques* 2008;44:363-74.
9. Rago C, Huso DL, Diehl F, Karim B, Liu G, Papadopoulos N, Samuels Y, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW, Diaz LA, Jr. Serial Assessment of Human Tumor Burdens in Mice by the Analysis of Circulating DNA. *Cancer Res* 2007;67:9364-9370. 10
10. Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW, Vogelstein B, Dressman D. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods* 2006;3:551-9.
11. Wood WI, Gitschier J, Lasky LA, Lawn RM. Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:1585-8. 20
12. Li M, Diehl F, Dressman D, Vogelstein B, Kinzler KW. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods* 2006;3:95-7.
13. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA, Jr., Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:16368-16373.
14. Boynton KA, Summerhayes IC, Ahlquist DA, Shuber AP. DNA integrity as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. *Clin Chem* 2003;49:1058-65. 30
15. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoue F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313:1960-4.
16. Shendure J, Porreca GJ, Reppas NB, Lin X, McCutcheon JP, Rosenbaum AM, Wang MD, Zhang K, Mitra RD, Church GM. Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 2005;309:1728-32. 40
17. Chen WD, Han ZJ, Skoletsky J, Olson J, Sah J, Myeroff L, Platzer P, Lu S, Dawson D, Willis J, Pretlow TP, Lutterbaugh J, Kasturi L, Willson JK, Rao JS, Shuber A, Markowitz SD. Detection in fecal DNA of colon cancer-specific methylation of the nonexpressed vimentin gene. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:1124-32.

【 0 0 7 4 】

実施例6:ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 腫瘍組織からのDNAの単離

50

18例の腫瘍標本を肝臓または結腸手術後に採取し、ホルマリン中で固定し、パラフィン中に包埋した。10 μ mの切片を作製し、PEN膜スライド (Palm GmbH社、独国ベルンリート (Bernried, Germany)) 上に載せた。切片は脱パラフィン化し、ヘマトキシリン & エオシンで染色した。全標本について、MicroBeamレーザー顕微解剖機器 (Palm社) を用いて完全に乾燥させた標本から切除した腫瘍組織の存在を確認するために組織学検査を実施した。切除した腫瘍組織は15 μ LのATLバッファー (Qiagen社) および10 μ LのプロテイナーゼK (20mg/mL; Invitrogen社) 中で一晩かけて60 $^{\circ}$ Cで消化させた。DNAは、QIAamp DNAマイクロキット (Qiagen社) を製造業者のプロトコルにしたがって使用して単離した。単離したDNAは、以下に記載するようにhLINE-1定量的PCRによって定量した。

【0075】

腫瘍組織から単離したDNAのPCR増幅およびダイレクトシーケンシング

腫瘍組織から単離した全DNAサンプルをAPC(19)の26領域、KRAS(1)の1領域、PIK3CA(2)の2領域、およびTP53(4)の4領域においてダイレクトSangerシーケンシングを使用して突然変異について分析した。FFPE組織中のDNAの変性に起因して、アンプリコンサイズは、長さ74~132bpとなるように選択した。初回PCRは、鋳型DNAの50~100ゲノム当量 (GE) (1GEは3.3pgのヒトゲノムDNAと同等である)、0.5単位のPlatinum Taq DNAポリメラーゼ (Invitrogen社)、1 $\times$ PCRバッファー (67mMのTris-HCl、pH8.8、67mMのMgCl₂、16.6mMの(NH₄)₂SO₄、および10mMの2-メルカプトエタノール)、2mMのATP、6% (v/v) のDMSO、1mMの各dNTP、ならびに0.2 μ Mの各プライマーを含有する10 μ Lの反応容量中で実施した。プライマーセットの配列は、図20に列挙した。増幅は、以下の条件下で実施した: 94 $^{\circ}$ Cで2分間; 94 $^{\circ}$ Cで15秒間、68 $^{\circ}$ Cで30秒間、70 $^{\circ}$ Cで15秒間の3サイクル; 94 $^{\circ}$ Cで15秒間、65 $^{\circ}$ Cで30秒間、70 $^{\circ}$ Cで15秒間の3サイクル; 94 $^{\circ}$ Cで15秒間、62 $^{\circ}$ Cで30秒間、70 $^{\circ}$ Cで15秒間の3サイクル; 94 $^{\circ}$ Cで15秒間、59 $^{\circ}$ Cで30秒間、70 $^{\circ}$ Cで15秒間の40サイクル。次に1 μ Lの初回増幅液を、相違するプライマーを使用した以外は上記に記載したものと同一構成の第2の10 μ LのPCR反応混合液に加えた (図10)。第2回 (ネステッド) PCR反応は、以下の条件を使用して温度サイクル処理にかけた: 94 $^{\circ}$ Cで2分間; 95 $^{\circ}$ Cで15秒間、58 $^{\circ}$ Cで30秒間、70 $^{\circ}$ Cで15秒間の15サイクル。PCR産物はAMPureシステム (Agencourt社、マサチューセッツ州ベバリー (Beverly, MA)) を使用して精製し、BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems社) を使用して両方向からシーケンシングした。シーケンシングに使用したプライマーは、最初の30塩基についての配列の質を向上させるために5'側先端に付着した30bpのpolyTタグを有していた (Tag 1プライマー:

5'-(dT)₃₀- tcccgcgaattaatacagac; SEQ ID NO: 1

;M13プライマー:

5'-(dT)₃₀-gtaaaacgacggccagt; SEQ ID NO: 3

)。シーケンシング反応は、自動96-キャピラリーDNAシーケンサー (Spectrumedix社、ペンシルベニア州ステートカレッジ (State College, PA)) 上で分解させた。データ分析は、Mutation Explorer (SoftGenetics社、ペンシルベニア州ステートカレッジ (State College, PA)) を用いて実施した。

【0076】

定量的リアルタイムPCRによる全血漿DNAの定量

血漿サンプルから単離した全DNAの量は、ヒトLINE-1定量的リアルタイムPCRアッセイの修正バージョン¹を用いて定量した。ヒトLINE-1ファミリーの最も豊富なコンセンサス領域内のサイズが様々に相違する領域を増幅させるために3種のプライマーセットを設計した (79bpのフォワード:

5'-agggacatggatgaaattgg; SEQ ID NO: 4

、79bpのリバー:

10

20

30

40

5'-tgagaatatgcggtgtttg; SEQ ID NO: 5

;97bpのフォワード:

5'-tggcacatatacaccatggaa; SEQ ID NO: 6

、97bpのリバー:

5'-tgagaatgatggtttccaatttc; SEQ ID NO: 7

;127bpのフォワード:

5'- acttggaccaacccaaatg; SEQ ID NO: 8

、127bpのリバー:

5'-tcattccatgtccctacaaagg; SEQ ID NO: 9

)。PCRは、2 μ Lの血漿と同等の鋳型DNA、0.5単位のPlatinum Taq DNAポリメラーゼ、1 $\times$ PCRバッファー（上記参照）、6%（v/v）のDMSO、1mMの各dNTP、1:100,000の希釈率のSYBR Green I（Invitrogen社）、および0.2 μ Mの各プライマーからなる25 μ Lの反応容量で実施した。増幅は、iCycler（Bio-Rad社）内で以下のサイクリング条件を使用して実施した: 94 で1分間; 94 で10秒間、67 で15秒間、70 で15秒間の2サイクル; 94 で10秒間、64 で15秒間、70 で15秒間の2サイクル; 94 で10秒間、61 で15秒間、70 で15秒間の2サイクル; 94 で10秒間、59 で15秒間、70 で15秒間の35サイクル。標準として保存するために、各プレート構成には様々な希釈率の正常ヒトリンパ球DNAを組み入れた。閾値サイクル数は、Bio-Rad分析ソフトウェアを使用してPCRベースライン値を減じて決定した。各定量は、2回ずつ実施した。全DNAは、突然変異について評価されるアンプリコンのサイズに最も近いLINE-1アンプリコンを用いて計算した（図11）。アンプリコンが2つの相違するLINE-1アンプリコンへ同等に近い場合は、平均濃度を使用した。血漿を用いたコントロール実験では、本発明者らは、LINE配列のアッセイによって評価されたゲノム当量の数にAPC、KRAS、PIK3CA、またはRASのゲノム当量（GE）の数と高度に相関することを見いだした。GEを測定するためにこれらの個別遺伝子ではなくむしろLINE配列をベースとするアッセイを選択したのは、ゲノム内での高度の繰返しの性質のゆえに、後者の方が前者よりも、GEを測定するのに必要な血漿がはるかに少量であったためである。

【0077】

BEAMing

20個の突然変異を分析するために、相違する12種のプライマーセットを設計した（図11）。2mLの血漿から精製されたDNAを各BEAMingアッセイのために使用した。高忠実度DNAポリメラーゼを用いた初回増幅は、8つの別個の50 μ LのPCR反応液中で実施したが、これらは各々250 μ Lの血漿からの鋳型DNA、5 $\times$ Phusion高忠実度PCRバッファー（NEB社）、1.5単位のHotstart Phusionポリメラーゼ（NEB社）、0.2 μ Mの各プライマー、0.25mMの各dNTP、および0.5mMのMgCl₂を含有していた。温度サイクル処理は、図11に記載したように実施した。図11に列挙したプライマーを使用して、第2回PCR（ネステッド）は、最初の構成と同一構成の20 μ LのPCR反応液に2 μ Lの初回増幅液を加えることによって実施した。PCR産物をプールし、希釈し、PicoGreen dsDNAアッセイ（Invitrogen社）を使用して定量した。蛍光強度はCytoFluorマルチウエルプレートリーダー（PE Biosystems社）を使用して測定し、DNA量は λ ファージDNA参照標準を用いて計算した。

【0078】

エマルジョンPCRは、以前に記載されたように実施した²。手短には、18pgの鋳型DNA、40単位のPlatinum Taq DNAポリメラーゼ（Invitrogen社）、1 $\times$ PCRバッファー（上記参照）、0.2mMのdNTPs、5mMのMgCl₂、0.05 μ MのTag 1

(5'-lcccgcgaaattaatacgac; SEQ ID NO: 1)

10

20

30

40

50

、8 μ MのTag 2

(5'-gctggagctctgcagcta; SEQ ID NO: 2)

およびTag 1オリゴヌクレオチド

(5'二重ビオチン-T-スパーサー18- tcccgcgaaattaatacagac; SEQ ID NO: 1)

がコーティングされた約 6×10^7 の磁性ストレプトアビジンビーズ (MyOne、Invitrogen社) を含有する150 μ LのPCR混合液を調製した。150 μ LのPCR反応液、600 μ Lの油/乳化剤ミックス (7%のABIL WE09、20%の鉱油、73%のTegosoft DEC (Degussa Goldschmidt Chemical社、バージニア州ホープウェル(Hopewell, VA))、および1個の5mm径スチール製ビーズ (Qiagen社) を96ディープウェルプレート1.2mL (Abgene社) に加えた。エマルジョンは、このプレートをTissueLyser (Qiagen社) 内において15Hzで10秒間、次に17Hzで7秒間攪拌することによって調製した。エマルジョンは、8個のPCRウェル内に分注し、94 で2分間; 94 で10秒間、68 で45秒間、70 で75秒間の3サイクル; 94 で10秒間、65 で45秒間、70 で75秒間の3サイクル、94 で10秒間、62 で45秒間、70 で75秒間の3サイクル; 94 で10秒間、59 で45秒間、70 で75秒間の50サイクルで温度サイクル処理にかけた。

【0079】

エマルジョンを破壊するために、150 μ Lの破壊バッファー (10mMのTris-HCl (pH7.5)、1%のTriton-X 100、1%のSDS、100mMのNaCl、1mMのEDTA) を各ウェルに添加し、TissueLyserを20Hzで20秒間にわたり用いて混合した。ビーズは、懸濁液を3,200gで2分間回転させ、油相を除去することによって回収した。破壊工程は、2回繰り返した。8個のウェルからの全ビーズを統合し、150 μ Lの洗浄バッファー (20mMのTris-HCl (pH8.4)、50mMのKCl) で洗浄した。ビーズ上のDNAは、0.1MのNaOHを用いて5分間にわたり変性させた。最後に、ビーズを150 μ Lの洗浄バッファーで洗浄し、150 μ Lの同一バッファー中に再懸濁させた。

【0080】

ビーズに結合したDNAの突然変異状態を対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーションによって決定した。変異型および野生型DNA配列に対して相補的な蛍光標識プローブを、20個の相違する突然変異に対して設計した。プローブのサイズは、標的領域のGC含有量に依存して15bp~18bpの範囲に及んだ。全変異プローブは5'側末端上でCy5 (商標) 蛍光体を用いて合成し、全野生型プローブはCy3 (商標) 蛍光体に結合させた (Integrated DNA Technologies社、アイオワ州コラルビル(Coralville, IA)、またはBiomers社、独国ウルム(Ulm, Germany))。さらに、アンプリコン内の別個の場所に結合したオリゴヌクレオチドは陽性コントロールとしてのあらゆる伸長したPCR産物を標識するために使用した。これらのアンプリコン特異的プローブは、それらの5'側末端に付着したROX (商標) 蛍光体を用いて合成した。プローブ配列は、図12に列挙した。各対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション反応液は、30 μ Lの洗浄バッファー (上記参照) 中に存在する約 1×10^7 個のビーズ、6 μ Lの $1.5 \times$ ハイブリダイゼーションバッファー (4.5Mの塩化テトラメチルアンモニウム、75mMのTris-HCl (pH7.5)、6mMのEDTA)、および4 μ Lの、各々がTEバッファー中で5 μ Mである変異型、野生型、および遺伝子特異的蛍光プローブの混合液を含有していた。ハイブリダイゼーション混合液は70 へ10秒間加熱し、35 へ緩徐に (0.1 /秒) 冷却した。35 で2分間インキュベートした後、この混合液を室温へ冷却した (0.1 /秒)。ビーズは磁石を用いて採取し、未結合プローブを含有する上清はピペットを使用して除去した。ビーズは100 μ Lの $1 \times$ ハイブリダイゼーションバッファー中に再懸濁させ、48 へ5分間加熱して未結合プローブを除去した。加熱工程後、ビーズは再び磁石によって分離し、100 μ Lの洗浄バッファーを用いて1回洗浄した。最終工程で、上清を除去し、フローサイトメトリー分析のためにビーズを200 μ LのTEバッファー中に再懸濁させた。

【0081】

高スループットオートサンプラーを装備したLSR IIフローサイトメトリーシステム (BD 50

Bioscience社)を各ビーズ集団の分析のために使用した。平均 5×10^6 個のビーズを各血漿サンプルに対して分析した。伸長産物を含まないビーズは、分析から除外した。癌を有していない患者由来のDNAを用いて実施した陰性コントロールを各アッセイに含めた。クエリーされる突然変異に依存して、これらの陰性コントロールサンプル中の変異特異的プローブに結合したビーズの割合は、0.0061% ~ 0.00023%の間で変動した。この割合は、以前に詳細に説明されたように³、初回PCR工程中に高忠実度DNAポリメラーゼによって導入された配列エラーを提示した。実験サンプルにおいて陽性と判定されるためには、(i)変異型フラグメントに結合したビーズの割合が陰性コントロールにおいて見出された割合より高くなければならず、そして(ii)サンプル1例当たりの変異型DNAフラグメントの平均値 + 1SD(標準偏差)は > 1.0でなければならなかった。BEAMingによって生成したビーズ集団は、各血漿サンプルに対して少なくとも2回分析した。

10

【0082】

実施例6だけのための参考文献(ここに挙げた参考文献は全部が明示的に本明細書に組み入れられる)

1. Rago, C. et al. Serial Assessment of Human Tumor Burdens in Mice by the Analysis of Circulating DNA. *Cancer Res* **67**, 9364-9370 (2007).
2. Diehl, F. et al. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods* **3**, 551-9 (2006).
3. Li, M., Diehl, F., Dressman, D., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat Methods* **3**, 95-7 (2006).

20

【0083】

個々の患者の概要

図16A-1 ~ 16E-3も参照されたい。

患者1は、最初は直腸癌のために低位前方切除術を受けたが、PET/CTスキャンを用いて複数の肝転移を有することが見いだされた。この患者は5-フルオロウラシル、オキサリプラチン(FOLFOX)およびペバシズマブを用いる術後化学療法(化学療法)を2サイクルにわたり受けたところ、反復イメージングによって良好な応答が明らかになった。本試験登録時に、この患者は右肝切除術および左肝葉楔状切除術および胆嚢摘出術を受け(手術)、その後5-フルオロウラシル、ロイコボリン、オキサリプラチンおよびペバシズマブを用いる化学療法を受けた(化学療法)。反復イメージングは、複数の新規肺病巣および2つの新規肝病巣を明らかにした。様々な他の化学療法レジメンを利用したが、疾患の継続的進行が生じた。この患者は現在は第I相臨床試験に参加することが検討されている。

30

【0084】

患者2は、最初はT3N0M0結腸腺癌であると診断され、左半結腸切除術を受けた。本試験登録時、この患者は右肝葉切除術および転移性疾患のために部分隔膜切除術を受けた(手術)。反復イメージングは、この肝葉切除術の3カ月後に進行性疾患を明らかにし、この患者はその後まもなく疾患が原因で死亡した。

【0085】

患者3は、最初は単一肝転移を伴う転移性粘液性結腸腺癌T2N1M1を有することが見いだされ、肝切除の計画を伴う右半結腸切除術を受けた(手術)。しかしこの患者は、手術時に広汎性腹膜病変(peritoneal implant)を有することが見いだされたので、肝切除は実施されなかった。術後CTスキャンにより、拡大中の肝病巣および新規肺結節を有する進行性疾患の証拠が明らかになった。患者は対症療法だけを進めることを選択し、手術のおよそ1年後に疾患が原因で死亡した。

40

【0086】

患者4は、転移性結腸腺癌を有すると診断された。初回手術の12カ月後であった本試験登録時に、患者は5-フルオロウラシル、オキサリプラチンおよびペバシズマブを用いる術前化学療法を受けた。この患者はその後、再発性転移性腺癌を併発する病理を伴う境界部の高周波アブレーションとともに2つの肝病巣の部分肝切除術を受けた(手術)。その

50

後のCTスキャンは、現在まで疾患再発の証拠を明らかにしていない。

【0087】

患者6は、最初にT3N1M1結腸腺癌を示し、試験登録時点に右肝切除術および右肺下葉楔状切除術を受けた（手術）。フォローアップCTスキャンは疾患の証拠を明らかにせず、患者は化学療法を開始した。8カ月後、反復イメージングは、新規な肝転移を明らかにした。この患者はその後、イリノテカン、5-フルオロウラシルおよびベパシズマブに切り換えたが（化学療法1）、4カ月間の治療にもかかわらず、フォローアップCTスキャン上では持続性疾患を有していた。患者はその後、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、オキサリプラチンおよびベパシズマブを開始した（化学療法2）。

【0088】

患者7は、以前にT3N2M1直腸S状結腸腺癌切除歴を有していた。本試験登録時に、この患者は2つの再発性肝病巣の外科的切除を受け、さらに4つの肝病巣は高周波アブレーションを用いて治療された（手術）。術後イメージングは疾患の証拠を明らかにしなかったが、3カ月後のイメージングは新規な肝疾患および新規な肺転移を明らかにした。この患者はイリノテカン、セツキシマブ、およびベパシズマブ療法を開始した（化学療法）。化学療法にも関わらず、フォローアップイメージングでは、患者は持続性および進行性疾患を有することが認められた。

【0089】

患者9は、最初はT3N1M0結腸腺癌を示し、アジュバントの5-フルオロウラシルおよびロイコボリンによって治療された。本試験登録時に、単発性肝病巣が認められ、この患者は右肝切除術を受けたが、病理検査で再発性腺癌が明らかになった（手術）。この患者には術後5-フルオロウラシル、オキサリプラチンおよびベパシズマブ（化学療法）が与えられ、フォローアップイメージングは、疾患再発の証拠を明らかにせず、完全に再生した肝臓の証拠が得られた。

【0090】

患者10は、最初は肝臓への転移性結腸直腸腺癌を有すると診断され、5-フルオロウラシル、オキサリプラチンおよびベパシズマブを用いて4カ月間治療された（化学療法）。右肝切除術および右半結腸切除術が実施された（手術1）。肝切除は、境界陽性であった。術後イメージングは、疾患の証拠を明らかにしなかった。3カ月後に実施された反復イメージングは、3つの新規な左肝病巣を明らかにし、この患者はその後境界部への高周波アブレーションを伴う左肝切除術を受けた（手術2）。術後イメージングは、疾患の証拠を明らかにしなかった。2カ月後のフォローアップ時に、この女性患者はT7圧迫骨折を伴う骨転移を有することが見いだされ、そのためにこの女性患者は外照射療法を受けた。

【0091】

患者12は、最初は転移性結腸腺癌を有すると診断された。本試験登録時に、患者は、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、およびオキサリプラチン（化学療法）を用いて疾患のある程度の安定化が達成された後に、高周波アブレーションを伴う反復部分肝切除術を受けた（手術）。術後スキャンは、肝臓内の疾患の証拠を明らかにしなかった。しかし、胸部のCTスキャンは多数の新規の肺病巣を明らかにし、フォローアップPETは同様に新規な肝病巣を明らかにした。この患者はその後、第I相臨床試験を紹介された。

【0092】

患者13は、S状結腸、肝臓および剣状突起から切除された転移性結腸癌の病歴を有した。最初の診断からおよそ14カ月後、CTスキャンは肝臓内の1cmの病巣を明らかにし、フォローアップPETスキャンは左肝葉近くで2つの隣接疾患病巣を証明した。3カ月後に実施されたCTスキャンは、肝病巣のサイズの増加および新規な腹膜病変を証明した。その後部分肝切除術、部分胃切除術、および部分大網切除術により再発性疾患の切除術を受けた（手術）。手術の1年後に実施されたフォローアップCTスキャンは、肝臓および大網の再発を証明した。

【0093】

患者14は、CTスキャンを用いたスクリーニング大腸内視鏡検査で結腸腺癌を有すること

10

20

30

40

50

が見いだされたが、遠隔転位の証拠は証明されなかった。患者はS状結腸切除術を受け（手術）、病理検査でT3N0M0腫瘍が明らかになった。アジュバント化学療法は行われず、連続CTスキャンで追跡された。最終CTスキャンは、疾患の証拠を示さなかった。

【0094】

患者15は、T3N1Mx盲腸腫瘍（mass）および臍部再発の完全切除術歴を有していた。原発性腫瘍の切除の3年後、腹部のCTスキャンは単発性肝転移を明らかにした。この患者は右肝切除術を受けた（手術）。1カ月後のフォローアップCTスキャンは疾患の証拠を明らかにしなかったが、患者は再発性転移性疾患からおよそ1年後に疾患が原因で死亡した。

【0095】

患者16は、直腸からの鮮紅色の出血のための精密検査を受けた後のCTで直腸S状部の腫瘍を有することが明らかになり、S状結腸切除術を受けた（手術）。この女性患者は、5-フルオロウラシル、ロイコボリンおよびオキサリプラチンを開始し、これをその後5カ月間継続した（化学療法）。療法完了後のフォローアップCTスキャンは、疾患再発の証拠を示さなかった。

10

【0096】

患者17は、右葉に孤立性肝転移を有することがPET CTによって見いだされた結腸直腸癌の切除歴を有する患者であった。患者は右肝切除術を受け（手術）、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、オキサリプラチンおよびアバスチンを用いる術後化学療法を受けた（化学療法）。この女性患者は、手術7カ月後に再発を有することが見いだされた。

【0097】

20

患者18は、直腸腫瘍に対する低位前方切除術を受けた後にT3N1Mx腺癌を有することが見いだされた。3年後、患者はCTスキャンイメージングで発見された左肝葉病巣を有することが認められた。この患者は腹腔鏡下肝切除術を受けた（手術）。患者は追加の化学療法を受けず、現在は疾患を有していない。

【0098】

実施例5および6を除く本出願のための参考文献

ここに挙げた各参考文献の開示は、明示的に本明細書に組み入れられる。

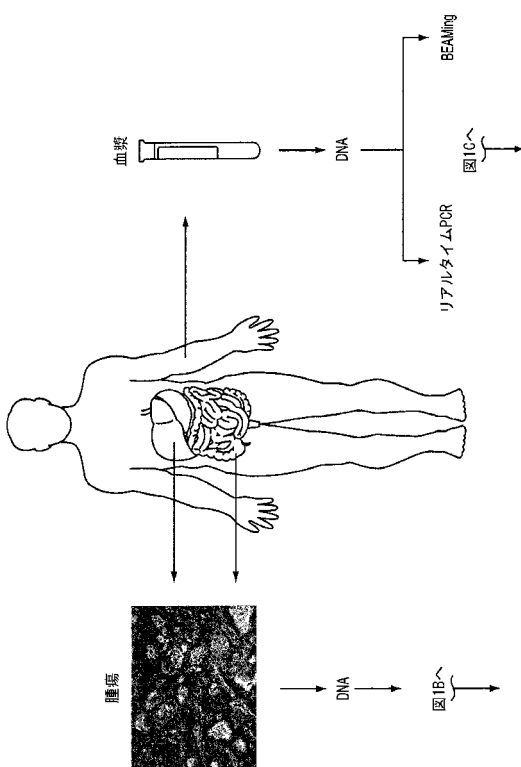
1. Wood, L.D. *et al.* The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* **318**, 1108–1113 (2007).
2. Nagrath, S. *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* **450**, 1235–1239 (2007).
3. Cristofanilli, M. *et al.* Circulating tumor cells, disease progression and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 781–791 (2004). 10
4. Sidransky, D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 210–219 (2002).
5. Goebel, G., Zitt, M., Zitt, M. & Muller, H.M. Circulating nucleic acids in plasma or serum (CNAPS) as prognostic and predictive markers in patients with solid neoplasias. *Dis. Markers* **21**, 105–120 (2005).
6. Fleischhacker, M. & Schmidt, B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. *Biochim. Biophys. Acta* **1775**, 181–232 (2007). 20
7. Gormally, E., Caboux, E., Vineis, P. & Hainaut, P. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat. Res.* **635**, 105–117 (2007).
8. Diehl, F. *et al.* Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 16368–16373 (2005).
9. Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 8817–8822 (2003). 30
10. Goldstein, M.J. & Mitchell, E.P. Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer. *Cancer Invest.* **23**, 338–351 (2005).

11. Li, H., Fan, X. & Houghton, J. Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J. Cell. Biochem.* **101**, 805–815 (2007).
12. Hacia, J.G. & Collins, F.S. Mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *J. Med. Genet.* **36**, 730–736 (1999).
13. Shendure, J., Mitra, R.D., Varma, C. & Church, G.M. Advanced sequencing technologies: methods and goals. *Nat. Rev. Genet.* **5**, 335–344 (2004).
14. Rago, C. *et al.* Serial Assessment of human tumor burdens in mice by the analysis of circulating DNA. *Cancer Res.* **67**, 9364–9370 (2007).
15. Diehl, F. *et al.* BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat. Methods* **3**, 551–559 (2006).
16. Li, M., Diehl, F., Dressman, D., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nat. Methods* **3**, 95–97 (2006).
17. WO 05/10145 A3

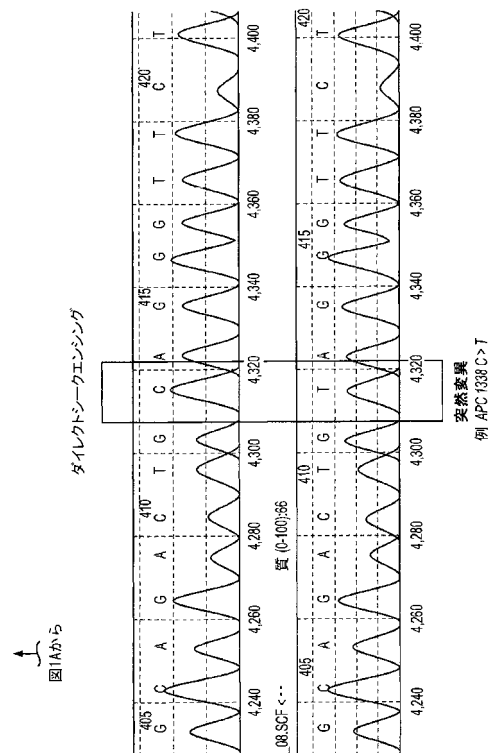
10

20

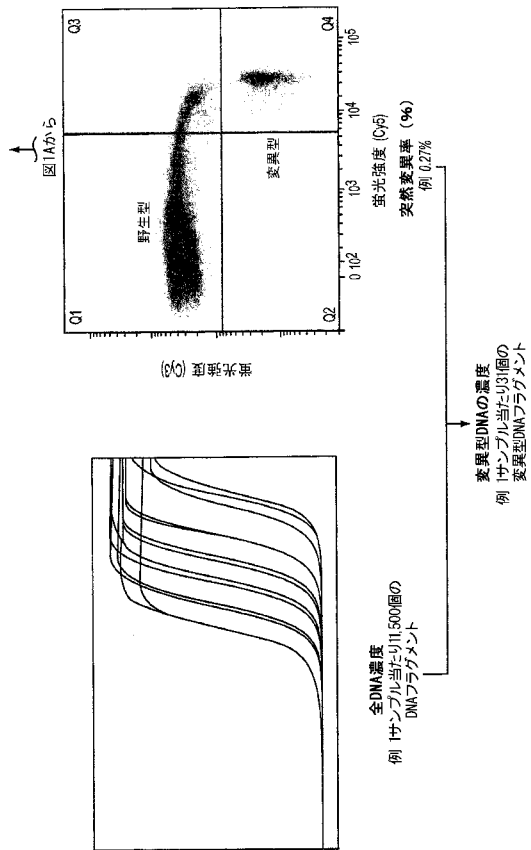
【図 1 A】



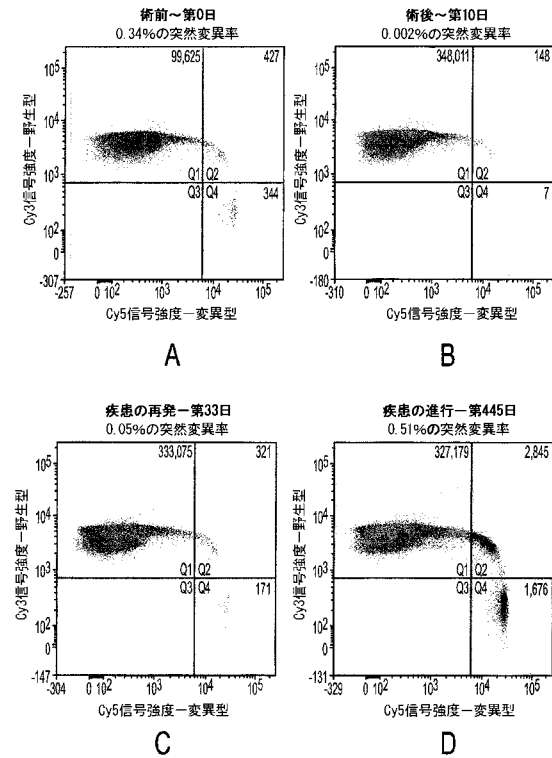
【図 1 B】



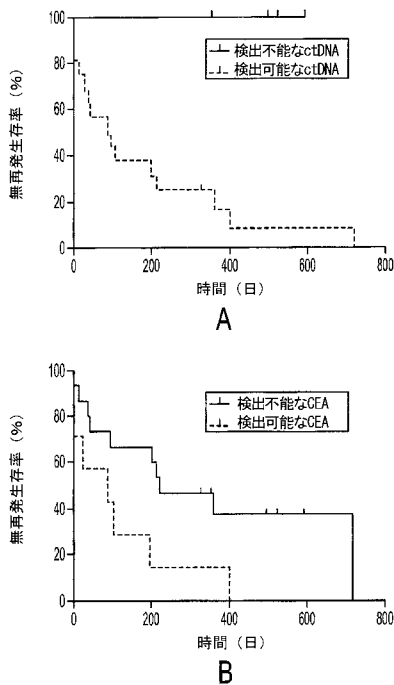
【図1C】



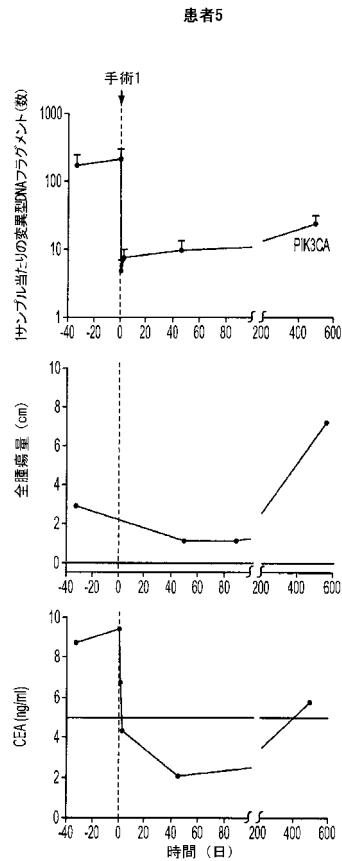
【図2】



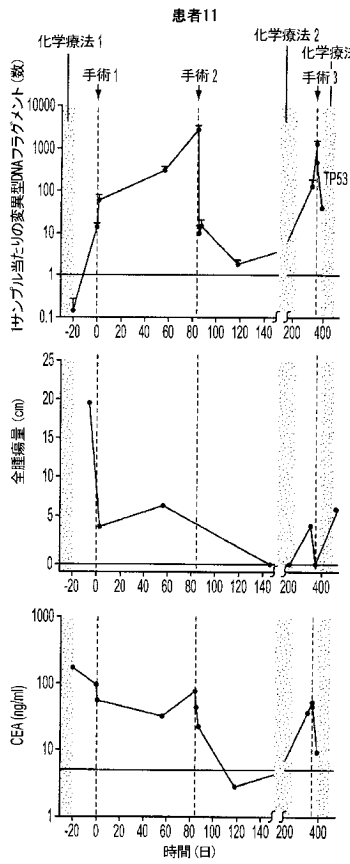
【図3】



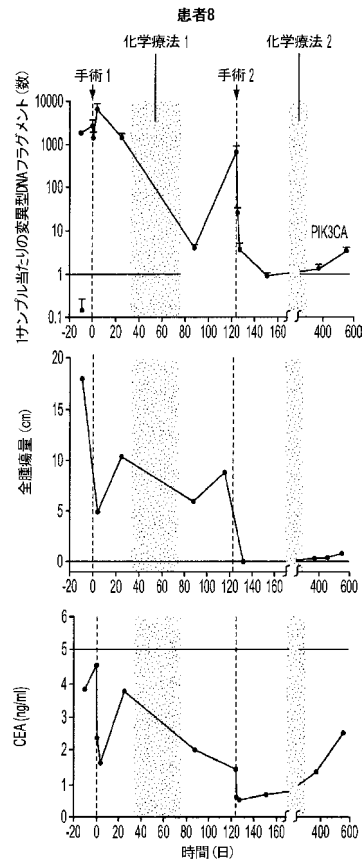
【図4A】



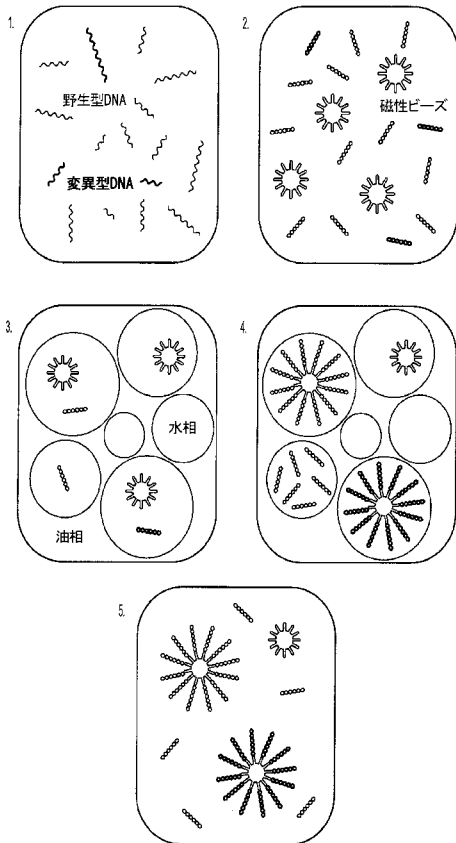
【図 4 B】



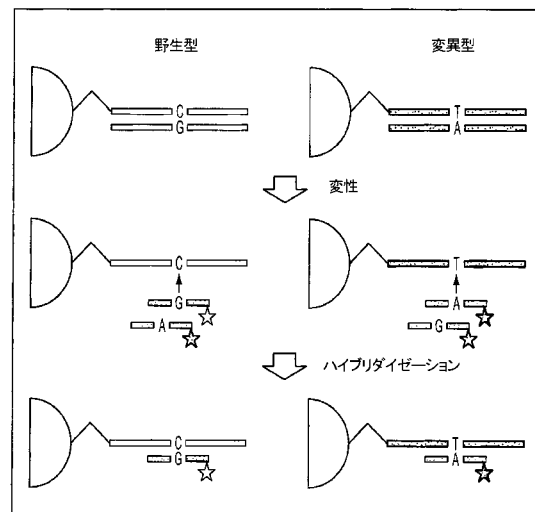
【図 4 C】



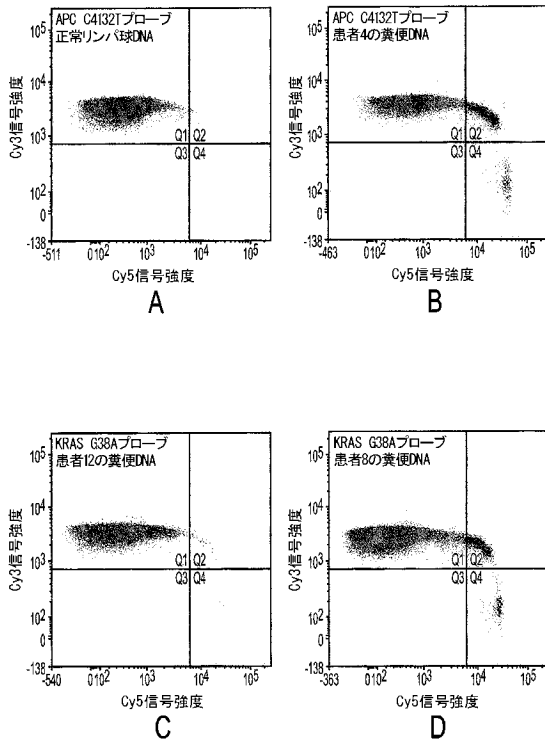
【図 5 A】



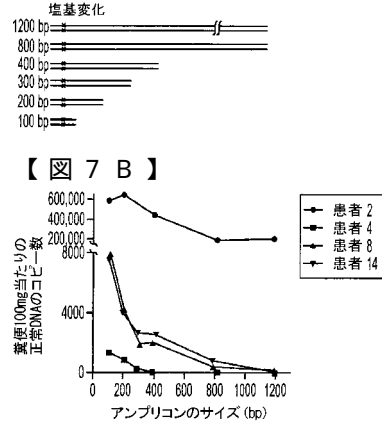
【図 5 B】



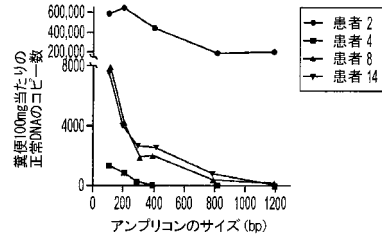
【 図 6 】



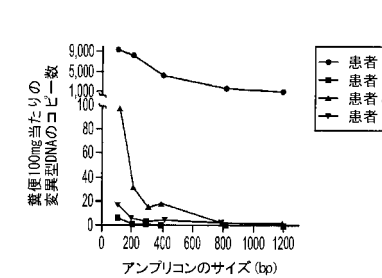
【 図 7 A 】



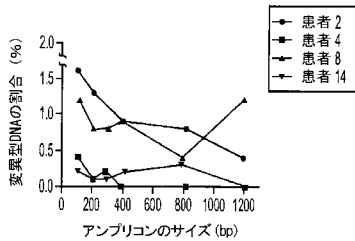
【 図 7 B 】



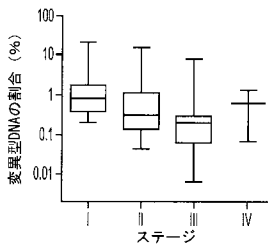
【 図 7 C 】



【 図 7 D 】



【图 8】



【 図 9 】

[illegible]¹PCR条件.

A、98℃、30秒間:35×(98℃、10秒間:71℃、10秒間)
B、98℃、30秒間:35×(98℃、10秒間:69℃、10秒間)
C、98℃、30秒間:3×(98℃、10秒間:70℃、10秒間:72℃、10秒間):
3×(98℃、10秒間:67℃、10秒間:72℃、10秒間)、3×
D、98℃、30秒間:4×(98℃、10秒間:71℃、10秒間)

【図 10A - 1】

遺伝子	突然変異	患者	アンプリコン	プローブ	プローブ配列 5' - 3'
APC	C262T	1, 6, 13, 19	APC - 1	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-agcaacagaaatccagga Cy3-ctcaaaagcgaggtttg Cy5-ctcaaaagcgaggtttg
APC	3927-3931 del AAAGA	25	APC - 2	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-cttcgctcacagalcctc Cy3-ctctttcttttWttctg ¹ Cy5-ttcaatcttttWttctg ¹
APC	3934delG	18	APC - 2	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-cttcgctcacagalcctc Cy3-actagttccaatcttt Cy5-gacctagttccaatcttt
APC	G3964T	2	APC - 3	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-cagctcgtcgtgatttggt Cy3-tggaactctgctcacag Cy5-tggaactctgctcacag
APC	3980-3983 delCAC	22	APC - 3	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-cagctcgtcgtgatttggt Cy3-ggtgctgtgacactgc Cy5-agggtgctacactgc
APC	C3980G	9	APC - 3	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-cagctcgtcgtgatttggt Cy3-ggtgctgtgacactgc Cy5-ggtgctgtgacactgc
APC	4126-4127 insT	17	APC - 4	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-gctcagacacccaaagtc Cy3-gaacactatgttcaggag Cy5-gaacactatgttcaggag
APC	C4132T	4	APC - 4	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-gctcagacacccaaagtc Cy3-cactatgttcaggagacc Cy5-cactatgttcaggagacc
APC	G4135T	12	APC - 4	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-gctcagacacccaaagtc Cy3-tatgttcaggagaccacac Cy5-tatgttcaggagaccacac
APC	G4189T	24	APC - 5	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-aactgacagaagtcacat Cy3-acgactctcaaaactat Cy5-acgactctcaaaactat
APC	4189-4190 delGA	13	APC - 5	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-aactgacagaagtcacat Cy3-acgactctcaaaactat Cy5-aacgactcaaaactatc
APC	4237-4240 delATGG	3	APC - 6	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-aagcccagtgatctcca Cy3-cagtggatgtgtaagtg Cy5-tgcagtgataagtggc

↓
図 10A - 2 へ

【図 10A - 2】

患者	遺伝子	突然変異	適用	サイズ (bp)	プライマー、5' - 3'
APC	C4285T	15	APC - 7	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-aagcccagtgatctcca Cy3-ccctggacaacacatg Cy5-ccctggataaacacatg
APC	4297delC	7	APC - 7	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-aagcccagtgatctcca Cy3-catgcccacaagcaga Cy5-ccatgcccacaagcaga
APC	C4348T	14, 21	APC - 8	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-cagaagtaaaacacdtcca Cy3-aaaccaagcgagaagta Cy5-aaaccaagcgagaagta
APC	4359delT	5	APC - 9	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-cclactcgtgaaaagagag Cy3-tgaagtaacctaaataaaa Cy5-tgaagtaacctaaataaaa
APC	4465delT	6	APC - 10	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-tcagagggtccaggttctt Cy3-tactttatcattttg Cy5-atactttatcattttg
APC	4467delA	10	APC - 10	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-tcagagggtccaggttctt Cy3-actttatcattttg Cy5-tactttatcattttg
APC	4497delA	8	APC - 10	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-tcagagggtccaggttctt Cy3-cagatgtattttctg Cy5-tcagatgtattttctg
APC	4661-4662 insA	11, 20	APC - 11	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-aatgaaaacagagagaaa Cy3-agaggcagaaaaaacta Cy5-agaggcagaaaaaacta

図 10A - 1 から
↓

【図 10B】

患者	遺伝子	突然変異	適用	サイズ (bp)	プライマー、5' - 3'
KRAS	G35A	5, 15, 20, 21, 22	KRAS	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-tgacgacagctaatcca Cy3-ggagctgtggcgcta Cy5-ggagctgtggcgcta
KRAS	G35C	5, 19	KRAS	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-tgacgacagctaatcca Cy3-ggagctgtggcgcta Cy5-ggagctgtggcgcta
KRAS	G35T	5	KRAS	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-tgacgacagctaatcca Cy3-ggagctgtggcgcta Cy5-ggagctgtggcgcta
KRAS	G38A	8, 17	KRAS	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-tgacgacagctaatcca Cy3-tgctgtggcgtaggc Cy5-tgctgtggcgtaggc
PIK3CA	G1624A	14, 17	PIK3CA エクソン 9	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-actgtgactcatagaaa Cy3-agtgattcagagagag Cy5-agtgattcagagagag
PIK3CA	C1636A	23	PIK3CA エクソン 9	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-actgtgactcatagaaa Cy3-cttctctcctcagtgta Cy5-cttctctcctcagtgta
PIK3CA	C3075T	7	PIK3CA エクソン 20-1	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-ctttgagcattgagccta Cy3-cgaagacacctagcctt Cy5-cgaagacacctagcctt
PIK3CA	A3140G	24	PIK3CA エクソン 20-2	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-ccaatcatttttggtgc Cy3-caacatgtgtgcatca Cy5-caacatgtgtgcatca
TP53	G524A	16, 9, 25	TP53 エクソン 5	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-gtactctgagcgcgtcca Cy3-aggggcagcgccctac Cy5-aggggcagcgccctac
TP53	G733A	18	TP53 エクソン 7	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-acacatgtagtgtgagtg Cy3-ttcatgtccgccatgc Cy5-ttcatgtccgccatgc
TP53	C742T	6	TP53 エクソン 7	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-acacatgtagtgtgagtg Cy3-tggcctccggttcatgc Cy5-tggcctccggttcatgc
TP53	C817T	19	TP53 エクソン 8	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-cctggagagacccggcgca Cy3-tgagtgctgtgttttg Cy5-tgagtgctgtgttttg
TP53	G818A	2	TP53 エクソン 8	ユニバーサル 野生型 変異型	ROX-cctggagagacccggcgca Cy3-tgagtgctgtgttttg Cy5-tgagtgctgtgttttg

¹ SNPI に起因する野生型混合塩基 a および t

【図 11】

患者	遺伝子	突然変異	適用	サイズ (bp)	プライマー、5' - 3'
2	APC	C3964T	第 1 回 PCR フォワード	105 205 250 399 815 1189	ccctgcaaatagcagaataaaa ccaatatttttcaagatgagtc aagtgctcagctcaaaagg gacaaagcagtaaacagca tgagcaaaagcaatcaaggaa tcggaataatcaatagagca
			第 1 回 PCR リバース エマルジョン PCR		TAG1-tgcgtgtttgtctcagg ttggaactagctacggaaga
4	APC	C4132T	第 1 回 PCR フォワード	105 203 286 389 815 1197	ccaaagtgctcagaca ccctagaacaaatccagca ccctgcaaatagcagaataaaa tccatatttttcaagatgagtc aagccagctttgtgtcagaa gtcaatccagcagcacta
			第 1 回 PCR リバース エマルジョン PCR		TAG1-caaaactcactgaactcagaca gctcagacacccaagctcc
7	APC	4297delC	第 1 回 PCR フォワード	114 207 307 391 790 1193	ccatgacgtggaatglaag caggagacccacatgtt agaatcagccagccacaaag tgaagatccgtgtgaggaag tgccacagatattctcattc gggaagacccaacacala
			第 1 回 PCR リバース エマルジョン PCR		TAG1-aggctgtgagagtggtg cttcagatagccctggaca
14	APC	C4348T	第 1 回 PCR フォワード	104 195 296 413 786 1192	gcccggacaacacatgc ttgagatgtcttctgctgc ccaaagtgctcagaca ttcagcagctgtcagacac aagagttatctgacaaagca tgagcaaacacaaaggaag
			第 1 回 PCR リバース エマルジョン PCR		TAG1-aggagagctctattttagg gacaacacatgcacaaag

Tag1, tcccggaaatattacgac

【図 1 2】

ステージ	患者 (n=25)	突然変異 (n=45)
I	6/7	10/12
II	7/7	9/11
III	7/8	16/17
VI	2/2	3/3
不明	1/1	2/2
合計	23/25 (92%)	41/45 (92%)

【図 1 3 A】

患者	遺伝子	突然変異(コドン)	腫瘍DNAの状態		糞便DNAの状態		BEAMING
			SBE ¹	シーケエンシング ²	SBE ³	シーケエンシング ²	
1	APC	C2626T (876)	POS	-	POS	-	POS
2	APC TP53	G3964T (1322) G818A (273)	- POS	POS -	- POS	POS -	POS POS
3	APC	4237-4240delATGG (1413)	-	POS	-	NEG	POS
4	APC	C4132T (1378)	POS	POS	POS	POS	POS
5	APC KRAS	4359delT (1453) G35X (12) ⁴	- POS	POS -	- NEG	NEG -	NEG NEG
6	APC APC TP53	C2626T (876) 4485delT (1488) C742T (248)	POS - POS	- POS -	POS - POS	- NEG -	POS POS POS
7	APC PIK3CA	4297delC (1433) C3075T (1025)	- -	POS POS	- -	POS POS	POS POS
8	APC KRAS	4497delA (1489) G38A (12)	- POS	POS -	- NEG	NEG -	NEG POS
9	APC TP53	C3960G (1327) G524A (175)	- NEG	POS -	- POS	NEG -	POS POS
10	APC	4467 delA (1488)	-	POS	-	POS	POS
11	APC	4661-4662insA (1554)	POS	-	POS	-	POS
12	APC	G4135T (1379)	POS	POS	POS	POS	POS
13	APC APC	C2626T (876) 4189-4190delGA (1397)	POS -	- POS	POS -	- NEG	POS POS
14	APC PIK3CA	C4348T (1450) G1624A (542)	POS -	POS POS	POS -	POS NEG	POS POS
15	APC KRAS	C4285T (1429) G35A (12)	- POS	POS -	- NEG	NEG -	POS POS
16	TP53	G524A (175)	POS	-	NEG	-	NEG

図13Bへ

【図 1 3 B】

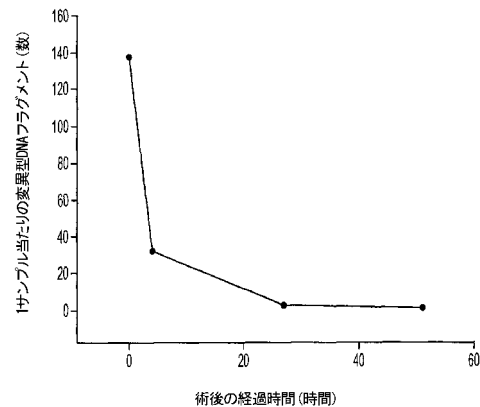
図13Aから

17	APC KRAS PIK3CA	4126-4127insT (1376) G39A (12) G1624A (542)	- POS -	POS POS	- NEG -	NEG NEG	POS POS POS
18	APC TP53	3834delG (1312) G733A (245)	POS POS	POS -	POS POS	NEG -	POS POS
19	APC KRAS TP53	C2626T (876) G35C (12) G817T (273)	POS POS POS	- - -	NEG NEG -	- -	POS POS POS
20	APC KRAS	4661-4662insA (1554) G35A (12)	POS POS	- -	NEG NEG	- -	POS POS
21	APC KRAS	C4348T (1450) G35A (12)	POS POS	POS -	NEG NEG	NEG -	POS POS
22	APC KRAS	3990-3993delCAC (1327) G35A (12)	- POS	POS -	- POS	POS -	POS POS
23	PIK3CA	C1636 (546)	-	POS	-	NEG	POS
24	APC PIK3CA	G4188T (1397) A3140G (1047)	- -	POS POS	- -	NEG POS	POS POS
25 ⁵	APC TP53	3927-3931 delAAAGA (1309) G524A (175)	- -	- POS	POS POS	- -	POS POS

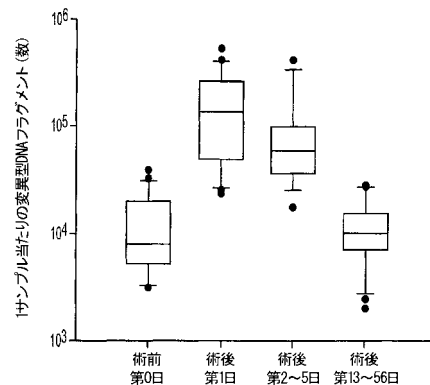
POS、陽性アッセイ; NEG、陰性アッセイ; -, 分析しなかった

¹WHITNEY et al. (参考文献4) による一塩基伸長²KANN et al. (参考文献5) によるシーケエンシング³IZKOWITZ ET AL (参考文献7) による研究で報告されたWHITNEY et al. (参考文献4) による一塩基伸長⁴G35Xは、G35A、G35C、またはG35T (特定塩基の変化は決定しなかった) を意味する。⁵腫瘍組織を受領しなかった。

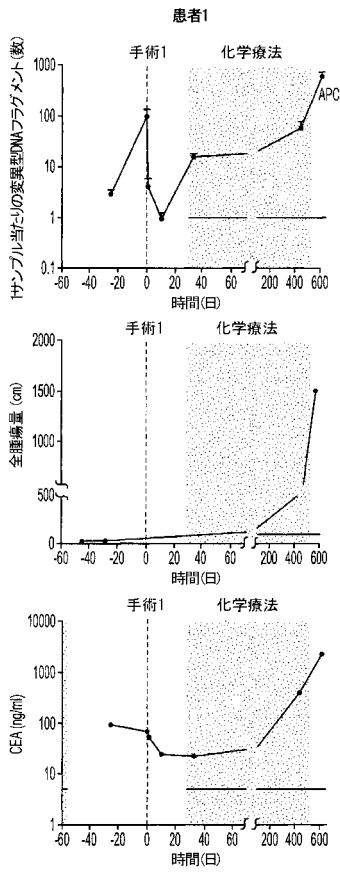
【図 1 4】



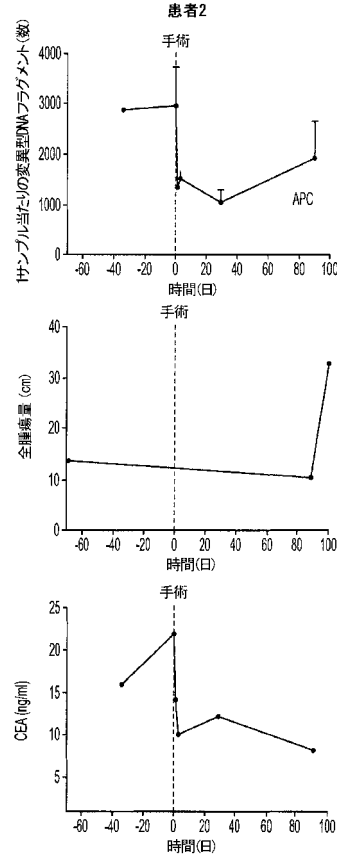
【図 1 5】



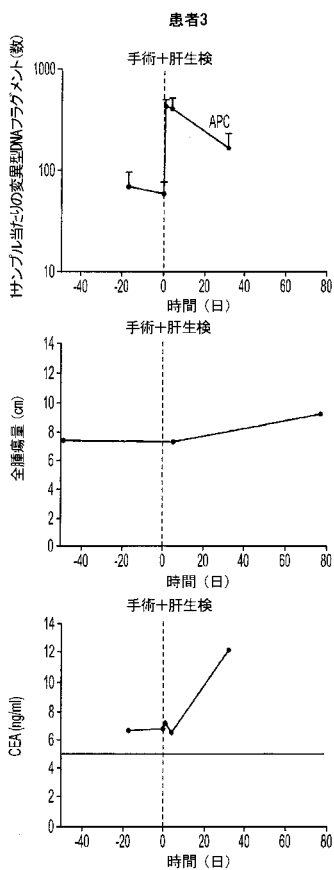
【図 16 A - 1】



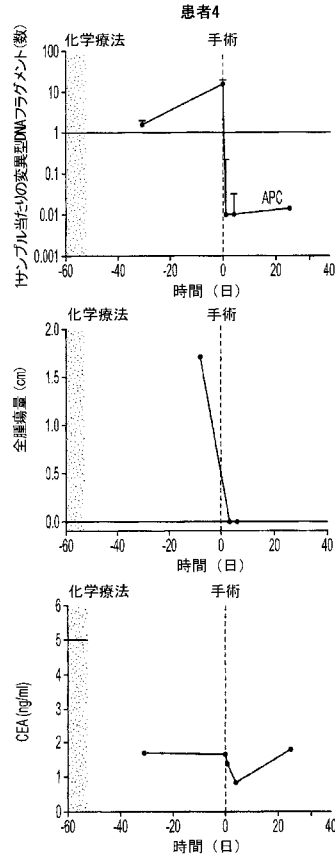
【図 16 A - 2】



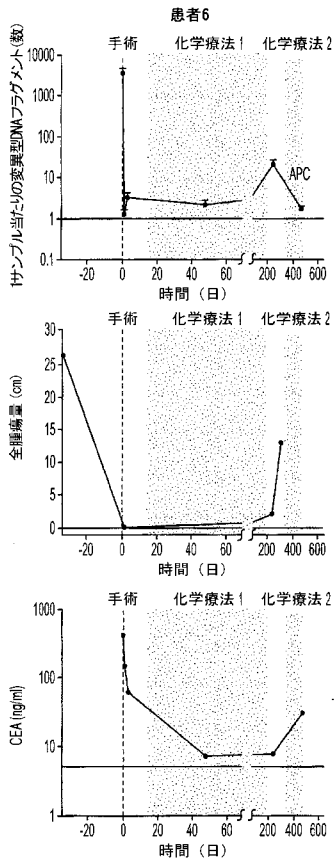
【図 16 A - 3】



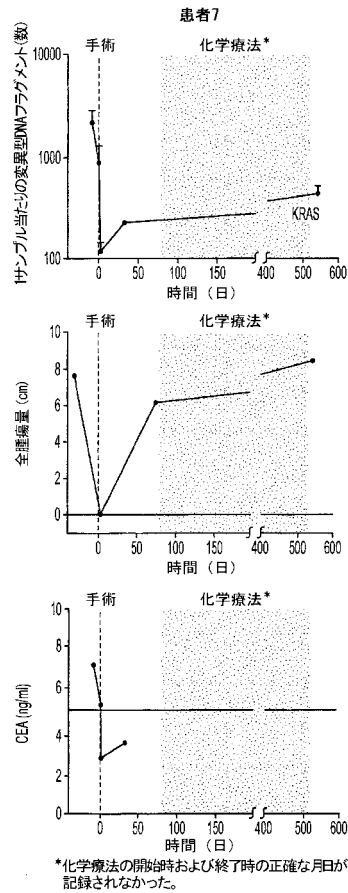
【図 16 B - 1】



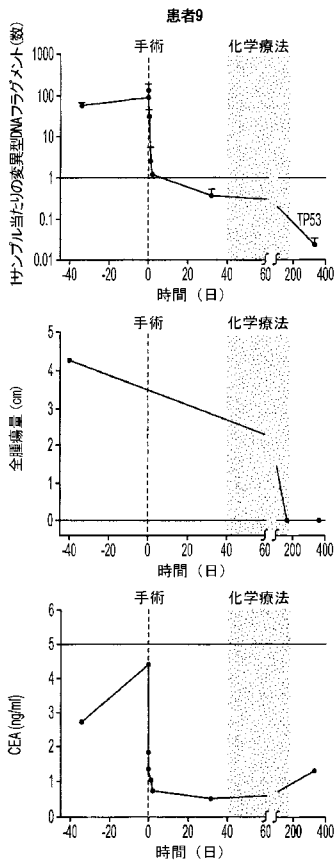
【図 16 B - 2】



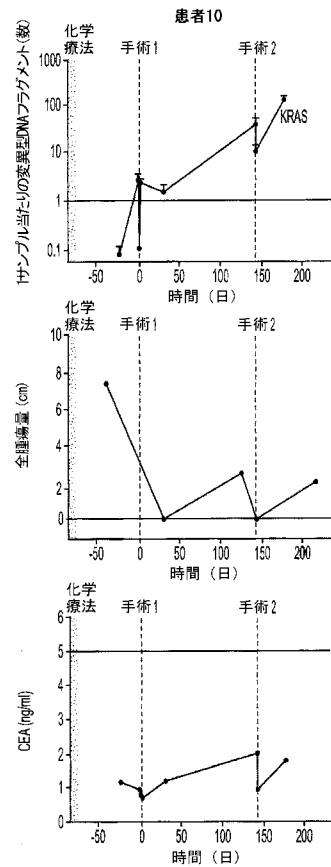
【図 16 B - 3】



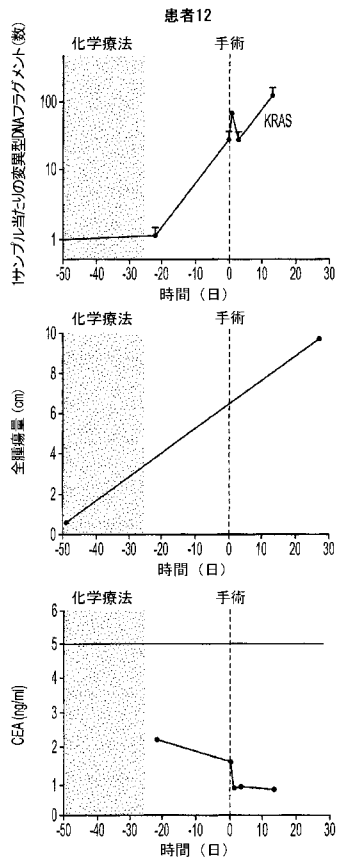
【図 16 C - 1】



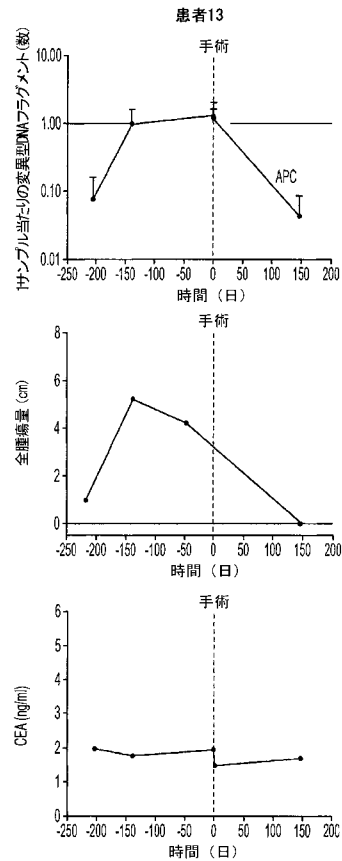
【図 16 C - 2】



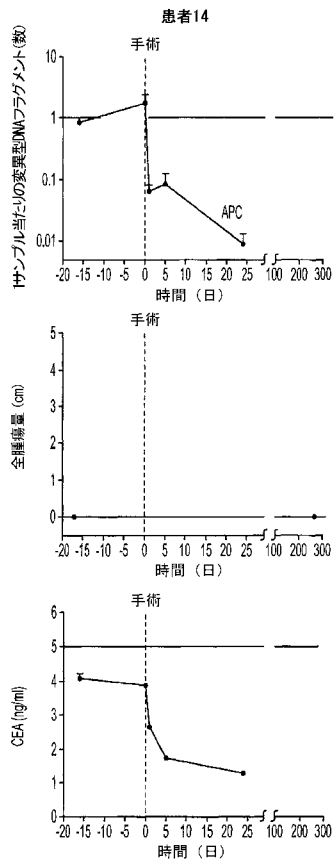
【図 16C - 3】



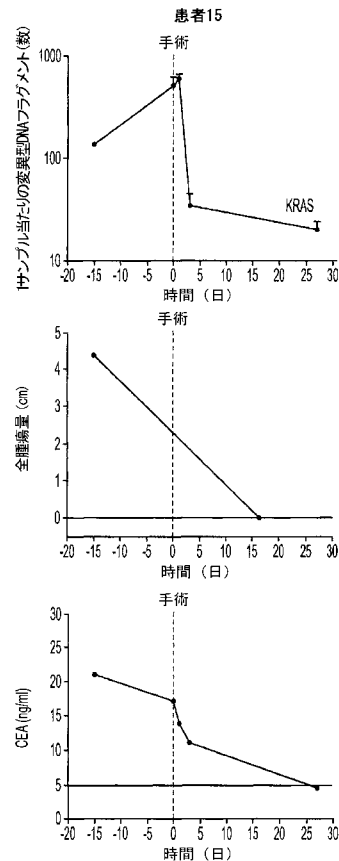
【図 16D - 1】



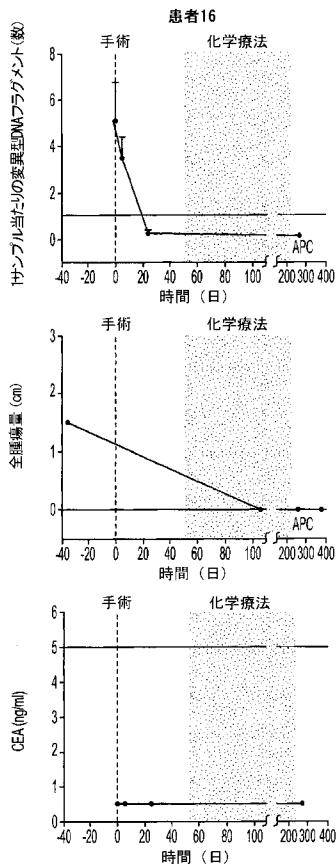
【図 16D - 2】



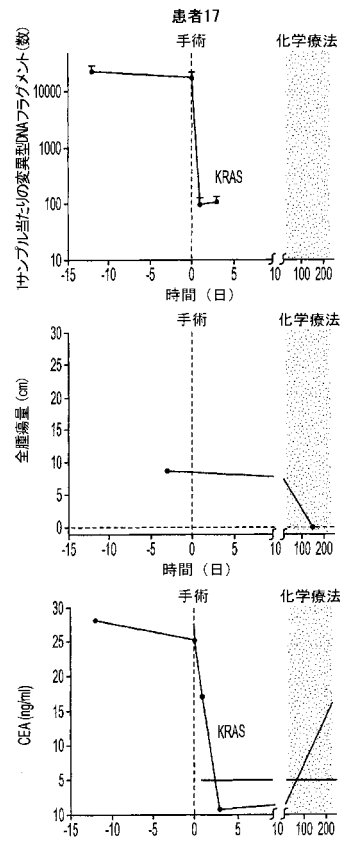
【図 16D - 3】



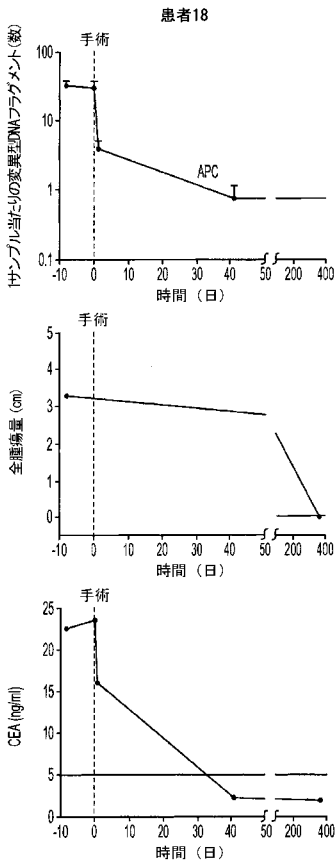
【図 16 E - 1】



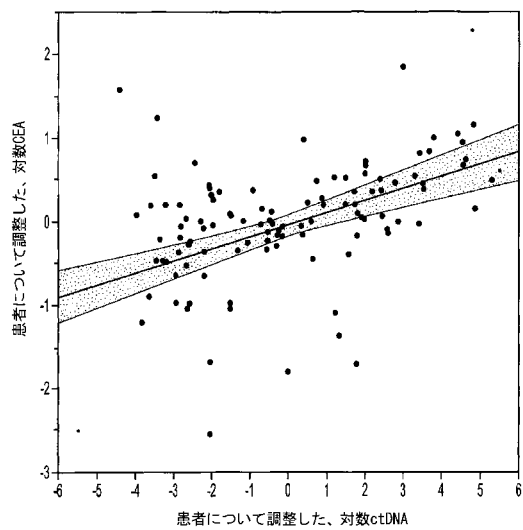
【図 16 E - 2】



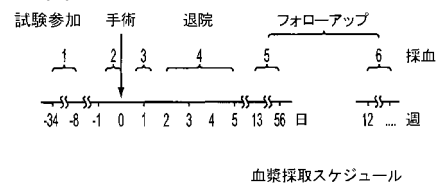
【図 16 E - 3】



【図 17】



【図 18】



【図 19】

患者番号	遺伝子	突然変異(コドン)	血漿の分析
1	APC KRAS TP53	4461del (1487) G38A (13) C817T (273)	はい はい はい
2	APC	C4031A (1344)	はい
3	APC KRAS TP53	C4348T (1450) G35C (12) G733A (245)	はい はい はい
4	APC KRAS TP53	4465-4468del TTAC (1489) G38A (13) G730A (244)	はい はい はい
5	PIK3CA TP53	G1624A (542) C844T (282)	はい はい
6	APC KRAS TP53	G4189T (1397) G35A (12) G743A (248)	はい はい はい
7	KRAS	G35T (12)	はい
8	PIK3CA TP53	G1624A (542) G818A (273)	はい はい
9	TP53	C535T (179)	はい
10	APC KRAS	C4067A (1356) G35A (12)	はい はい
11	TP53	C817T (273)	はい
12	PIK3CA KRAS	A314G (1047) G38A (13)	はい はい
13	APC	G3862T (1288)	はい
14	APC	3877-3889del ACACAGGAAACAG	はい
15	KRAS	G35T (12)	はい
16	APC TP53	3905del T (1302) C844T (282)	はい はい
17	APC KRAS	C2626T (876) G35A (12)	はい はい
18	APC	C4012T (1338)	はい

【図 20A】

アンブレ 番号	遺伝子	エクソン	PCR 番号	フォワードプライマー-5'-3'	リバースプライマー-5'-3'
1	APC	5	第1回 第2回	tgagcaaggcaacacaggt M13-caaacacagagctgcatgga	tcgtgttttacttagaaca TAG1-tcgtgttttacttagaaca
2	APC	6	第1回 第2回	acatacactaaggcttctgtttatt M13-acatacactaaggcttctgtttatt	ccctgtctgtctgtg TAG1-tcgtgttgaactgtaaaagctg
3	APC	15	第1回 第2回	ggcaactaacatcagcaac M13-tccagcaacagaaatccag	atcgtgtgtcagtggtg TAG1-atcgtgtgtcagtggtg
4	APC	15	第1回 第2回	tggttctccatcagctcag M13-gtccagctcagctcag	tggttctccatcagctcag TAG1-tggttctccatcagctcag
5	APC	15	第1回 第2回	tccaatagtgttttcaagagtgatg M13-tccaatagtgttttcaagagtgatg	cagaactgtgtgtgtg TAG1-tcgtgtgtgtgtgtg
6	APC	15	第1回 第2回	ctgaagatgaataggatgaatcagac TAG1-ctgaagatgaataggatgaatcagac	ctcagctgaactgttccatc M13-ctcagctgaactgttccatc
7	APC	15	第1回 第2回	cagatctgtatataccctgcaa TAG1-cagatctgtatataccctgcaa	agggtgtgtgtgtgtg M13-agggtgtgtgtgtgtg
8	APC	15	第1回 第2回	tggactactagctcagctgaaga TAG1-tggactactagctcagctgaaga	gaagataaactagacccctcagtc M13-gaagataaactagacccctcagtc
9	APC	15	第1回 第2回	gattctgtgtgtgtgtgtgtgt M13-agggtgtgtgtgtgtgtgt	tggtgtgtgtgtgtgtgt TAG1-tggtgtgtgtgtgtgtgt
10	APC	15	第1回 第2回	cagcagctcagctcagctcag M13-cagcagctcagctcagctcag	gtcgtgtgtgtgtgtgtgt TAG1-cactgtgtgtgtgtgtgtgt
11	APC	15	第1回 第2回	tcctcagcagcagcagcagc TAG1-tcctcagcagcagcagcagc	gtcgtgtgtgtgtgtgtgt M13-gtctgtgtgtgtgtgtgtgt
12	APC	15	第1回 第2回	ccaaaagtggtgtgtgtgtgt M13-gtctgtgtgtgtgtgtgtgt	caaaaactcagcagcagcagc TAG1-caaaaactcagcagcagcagc
13	APC	15	第1回 第2回	gacccacacacacacacac TAG1-gacccacacacacacacac	tgccactcactcactcactc M13-cactcactcactcactcactc

↓
図20Bへ

【図 20B】

患者番号	遺伝子	エクソン	PCR 番号	フォワードプライマー-5'-3'	リバースプライマー-5'-3'
14	APC	15	第1回 第2回	agtggtgtgtgtgtgtgtgt M13-gtggtgtgtgtgtgtgtgt	cagtggtgtgtgtgtgtgtgt TAG1-cagtggtgtgtgtgtgtgtgt
15	APC	15	第1回 第2回	ccatgcagctgtgtgtgtgtgt M13-gtggtgtgtgtgtgtgtgt	gggtgtgtgtgtgtgtgtgt TAG1-gggtgtgtgtgtgtgtgtgt
16	APC	15	第1回 第2回	ggcctgtgtgtgtgtgtgtgt M13-gtggtgtgtgtgtgtgtgt	agcgtgtgtgtgtgtgtgtgt TAG1-agcgtgtgtgtgtgtgtgtgt
17	APC	15	第1回 第2回	cactcctgtgtgtgtgtgtgtgt M13-tcctcagcagcagcagcagc	gcagcgtgtgtgtgtgtgtgt TAG1-gcagcgtgtgtgtgtgtgtgt
18	APC	15	第1回 第2回	gcagtaaatgtgtgtgtgtgtgt M13-cagtggtgtgtgtgtgtgtgt	tcaatcactcactcactcactc TAG1-cactcagcgtgtgtgtgtgtgt
19	APC	15	第1回 第2回	ggcctgtgtgtgtgtgtgtgt M13-caaatgtgtgtgtgtgtgtgt	atcctcactcactcactcactc TAG1-atcctcactcactcactcactc
20	PIK3CA	9	第1回 第2回	gcaattgtgtgtgtgtgtgtgt TAG1-gcaattgtgtgtgtgtgtgtgt	tcaattgtgtgtgtgtgtgtgt M13-tcaattgtgtgtgtgtgtgtgt
21	PIK3CA	20	第1回 第2回	ctgagcagcagcagcagcagc TAG1-ctgagcagcagcagcagcagc	tggtgtgtgtgtgtgtgtgt M13-tcctcagcagcagcagcagcagc
22	TP53	5	第1回 第2回	ggcctgtgtgtgtgtgtgtgt TAG1-ggcctgtgtgtgtgtgtgtgt	ctcactgtgtgtgtgtgtgtgt M13-ctcactgtgtgtgtgtgtgtgt
23	TP53	6	第1回 第2回	tggtgtgtgtgtgtgtgtgt M13-ggcctgtgtgtgtgtgtgtgt	cagtggtgtgtgtgtgtgtgt TAG1-cagtggtgtgtgtgtgtgtgt
24	TP53	7	第1回 第2回	agtggtgtgtgtgtgtgtgt TAG1-agtggtgtgtgtgtgtgtgt	tctcagtggtgtgtgtgtgtgt M13-ctcagtggtgtgtgtgtgtgt
25	TP53	8	第1回 第2回	atcctcagcagcagcagcagc M13-atcctcagcagcagcagcagc	ccctcgtgtgtgtgtgtgtgt TAG1-ctcgtgtgtgtgtgtgtgt
26	KRAS	1	第1回 第2回	tttatataagcgtgtgtgtgtgt TAG1-ttatataagcgtgtgtgtgtgt	tggtgtgtgtgtgtgtgtgt M13-gtgtgtgtgtgtgtgtgtgt

TAG 1:5'-tcccgcaaatatcagc
M13:5'-gtcaagcagcagcagc

【図 21】

アンブレ 番号	遺伝子	エクソン	PCR 番号	フォワードプライマー-5'-3'	リバースプライマー-5'-3'	PCR 条件	サイズ (bp)
3	APC	15	第1回	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	A	A
5	APC	15	第1回	tggtgtgtgtgtgtgtgtgt	tggtgtgtgtgtgtgtgtgt	E	97 & 127
6	APC	15	第1回	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	A	127
9	APC	15	第1回	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	A	97
10	APC	15	第1回	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	A	97 & 127
13	APC	15	第1回	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	A	97 & 127
16	APC	15	第1回	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	C	97
18	APC	15	第1回	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	A	97 & 127
20	PIK3CA	9	第1回	tggtgtgtgtgtgtgtgtgt	tggtgtgtgtgtgtgtgtgt	A	97
22	TP53	5	第1回	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	A	79 & 97
25	TP53	8	第1回	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	A	97
26	KRAS	1	第1回	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	TAG1-tcgtgtgtgtgtgtgtgtgt	C	97

TAG1: 5'-tcccgcaaatatcagc
TAG2: 5'-gtcaagcagcagcagc

A、98℃、30秒間: 37 × (98℃、10秒間: 71℃、10秒間)
B、98℃、30秒間: 35 × (98℃、10秒間: 69℃、10秒間)
C、98℃、30秒間: 3 × (98℃、10秒間: 70℃、72℃、10秒間)、
3 × (98℃、10秒間: 67℃、10秒間: 72℃、10秒間)、
3 × (98℃、10秒間: 64℃、72℃、10秒間)
28 × (98℃、10秒間: 61℃、10秒間: 72℃、10秒間)、
D、98℃、30秒間: 4 × (98℃、10秒間: 71℃、10秒間)
E、98℃、30秒間: 4 × (98℃、10秒間: 69℃、10秒間: 71℃、10秒間)

【図 2 2 A】

遺伝子	突然変異	患者 番号	アンブレ 番号	プローブ	プローブ配列5'-3'
APC	C262T	17	3	ユニバーサル 野生型	ROX-agcaacagaaatccagg Cy3-ctcaaacgaggggttg Cy5-ctcaaacgaggggttg
APC	G362T	13	5	ユニバーサル 野生型	ROX-glgttcattatcatctt Cy3-ctgaataggatgtaac Cy5-ctgaataggatgtaac
APC	3877-3889 del ACACA GGAAGCAG	14	6	ユニバーサル 野生型	ROX-tagttcaatcttttctt Cy3-attctctctctgtgtg Cy5-tagcagaatctgtgtg
APC	3905delT	16	6	ユニバーサル 野生型	ROX-tagttcaatcttttctt Cy3-attctctctctgtgtg Cy5-tagcagaatctgtgtg
APC	C4012T	18	9	ユニバーサル 野生型	ROX-cacagacccctagaacaa Cy3-agcagacgaggggtt Cy5-agcagacgaggggtt
APC	C4031A	2	10	ユニバーサル 野生型	ROX-ttcttcagagcgaatct Cy3-ttcttcagagcgaatct Cy5-ttcttcagagcgaatct
APC	C4067A	10	10	ユニバーサル 野生型	ROX-tagtttcttcagaatca Cy3-atttcttcagaatca Cy5-atttcttcagaatca
APC	G4189T	6	13	ユニバーサル 野生型	ROX-aactgacagaagctatct Cy3-acgactctcaaaactat Cy5-acgactctcaaaactat
APC	C4348T	3	16	ユニバーサル 野生型	ROX-cagaaglaaaacacctcca Cy3-aaaccaagcagaagla Cy5-aaaccaagcagaagla
APC	4461delT	1	18	ユニバーサル 野生型	ROX-tcagagggttcagggtctt Cy3-gcgtgacttattaca Cy5-gcgtgacttattaca

↓
図 22-Bへ

【図 2 2 B】

遺伝子	突然変異	患者 番号	アンブレ 番号	プローブ	プローブ配列5'-3'
APC	4465-4468 del TTAC	4	18	ユニバーサル 野生型	ROX-tcagagggttcagggtctt Cy3-tcagagggttcagggtctt Cy5-gatacttattattgca
PIK3CA	G1624A	5.8	20	ユニバーサル 野生型	ROX-acdgtgactccatagaaga Cy3-agtgatttcagagagag Cy5-agtgatttcagagagag
TP53	C535T	9	22	ユニバーサル 野生型	ROX-cctcaaacctcgtctatg Cy3-gcgtctatggtgggggc Cy5-gcgtctatggtgggggc
TP53	C817T	11	25	ユニバーサル 野生型	ROX-cctggagagacccggcgca Cy3-tgaggtgctgtgtgtg Cy5-tgaggtgctgtgtgtg
TP53	G818A	8	25	ユニバーサル 野生型	ROX-cctggagagacccggcgca Cy3-tgaggtgctgtgtgtg Cy5-tgaggtgctgtgtgtg
TP53	C844T	5, 16	25	ユニバーサル 野生型	ROX-tgaggtgctgtgtgtg Cy3-tgaggtgctgtgtgtg Cy5-tgaggtgctgtgtgtg
KRAS	G35A	6, 10, 17	26	ユニバーサル 野生型	ROX-tgacgatacagctaatca Cy3-ggagctggtggcgta Cy5-ggagctggtggcgta
KRAS	G35C	3	26	ユニバーサル 野生型	ROX-tgacgatacagctaatca Cy3-ggagctggtggcgta Cy5-ggagctggtggcgta
KRAS	G35T	7, 15	26	ユニバーサル 野生型	ROX-tgacgatacagctaatca Cy3-ggagctggtggcgta Cy5-ggagctggtggcgta
KRAS	G38A	1, 4, 12	26	ユニバーサル 野生型	ROX-tgacgatacagctaatca Cy3-ggagctggtggcgta Cy5-ggagctggtggcgta

【図 2 3】

患者の特徴	
特徴	数値 (N=18)
年齢一歳	
平均	59.8
範囲	35-82
性別	
男性	8 (44%)
女性	10 (56%)
ステージ	
IV	16 (88%)
III	1 (6%)
II	1 (6%)
分化型	
高分化	3 (17%)
中分化	11 (61%)
低分化	2 (11%)
不特定	2 (11%)
転移の場所	
肝臓	15
肺	2
網または腹膜	2
手術の回数	
1	15
2	2
3	1
術前CEA (ng/mL)	
平均	42
範囲	0.5-2250
正常範囲を超える (>5ng/mL) 比率 (%)	55%

【図 2 4 A】

患者 番号	ステージ	手術 回数	外科手技
1	IV	1	肝転移切除術
2	IV	1	肝転移切除術 (ステージI)
3	IV	1	肝転移切除術を伴う右半結腸切除術
4	IV	1	RFAを伴う肝転移切除術
5	IV	1	肝転移切除術
6	IV	1	肺および肝転移切除術
7	IV	1	RFAを伴う肝転移切除術
8	IV	1	肝転移切除術を伴うS状結腸切除術 (ステージI)
		2	右肝切除術
9	IV	1	右肝切除術
10	IV	1	肝転移切除術を伴う右半結腸切除術
		2	RFAを伴う肝転移切除術
11	IV	1	RFAを伴う肝転移切除術を伴うS状結腸切除術
		2	肝転移切除術
		3	RFAから肝転移切除術へ
12	IV	1	RFAを伴う肝転移切除術
13	IV	1	部分胃切除術および大腸切除術を伴う肝転移切除術
14	II	1	S状結腸切除術 (T3N0M0)
15	IV	1	右肝切除術
16	III	1	S状結腸切除術 (T3N1M0)
17	IV	1	右肝切除術
18	IV	1	肝転移切除術

図24Bへ

*平均値±1SD (標準偏差) が示されている。

NEG. ctDNAを検出不能

-、サンプリングが実施されていない。

【図 2 4 B】

		ctDNAレベル (ctDNA分子数/2mL)*			
切除術	遺伝子	術前 第0日	術後 第1日	術後 第2~10日	術後 フォローアップ 第13~56日
完全	APC	99 ± 38	4.0 ± 2.0	0.9 ± 0.3	15 ± 2.3
	KRAS	79 ± 35	2.5 ± 1.3	NEG	5.6 ± 0.9
不完全	APC	2851 ± 773	1335 ± 408	1508 ± 156	1049 ± 254
不完全	APC	59 ± 18	421 ± 85	404 ± 121	166 ± 83
	KRAS	46 ± 15	485 ± 98	393 ± 118	136 ± 51
完全	APC	18 ± 4	NEG	NEG	NEG
	KRAS	15 ± 4	NEG	NEG	NEG
完全	PIK3CA	213 ± 90	4.9 ± 2.1	7.7 ± 2.3	9.8 ± 3.8
	TP53	275 ± 116	4.5 ± 2.0	2.6 ± 0.8	5.7 ± 1.7
完全	APC	3650 ± 1313	1.3 ± 0.4	3.3 ± 1.3	2.2 ± 0.6
	KRAS	2375 ± 917	1.2 ± 0.5	4.4 ± 1.7	1.2 ± 0.4
完全	KRAS	856 ± 394	117 ± 24	-	220 ± 9
不完全	PIK3CA	2575 ± 1027	1370 ± 551	6459 ± 2305	1420 ± 408
	TP53	2362 ± 937	802 ± 248	4171 ± 1494	944 ± 258
完全	PIK3CA	544 ± 281	26.5 ± 7.9	3.7 ± 1.2	0.9 ± 0.1
	TP53	389 ± 169	5.9 ± 1.7	NEG	NEG
完全	TP53	91 ± 33	2.6 ± 3.3	1.2 ± 1.3	NEG
完全	APC	6.0 ± 1.6	NEG	NEG	NEG
	KRAS	2.8 ± 1.0	NEG	2.4 ± 0.5	1.5 ± 0.7
完全	APC	128 ± 34	37 ± 14	-	315 ± 64
	KRAS	42 ± 13	11 ± 5	-	131 ± 32
不完全	TP53	14 ± 3	59 ± 22	-	286 ± 71
完全	TP53	2713 ± 775	10 ± 5	14 ± 7	1.8 ± 0.4
完全	TP53	1267 ± 243	465 ± 8	-	39 ± 2
不完全	KRAS	28 ± 8	67 ± 9	27 ± 9	120 ± 42
完全	APC	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.9	-	-
完全	APC	1.7 ± 0.7	NEG	NEG	NEG
完全	KRAS	519 ± 125	612 ± 80	35 ± 11	20 ± 4
完全	APC	5.1 ± 1.7	-	3.5 ± 0.9	NEG
	TP53	1.8 ± 0.6	-	1.6 ± 0.2	NEG
完全	APC	20144 ± 5504	56 ± 22	13 ± 3	-
	KRAS	17482 ± 4777	97 ± 36	108 ± 27	-
完全	APC	29 ± 8	3.91 ± 1.28	-	0.7 ± 0.4

図24A
から

図24Cへ

【図 2 4 C】

CEAレベル (ng/ml)				
術前 第0日	術後 第1日	術後 第2~10日	術後 フォローアップ 第13~56日	疾患 再発
69	53	24	22	はい
22	14	10	12	はい
6.8	7.2	6.5	12	はい
1.6	1.4	0.8	1.8	いいえ
9.4	6.8	4.4	2.1	はい
422	149	61	7.2	はい
5.3	2.7	-	3.4	はい
4.5	2.4	1.5	3.8	はい
1.4	0.6	0.5	0.7	はい
4.4	1.1	0.7	0.5	いいえ
0.9	0.8	0.7	1.2	はい
2.0	0.9	-	1.8	はい
93	55	-	32	はい
74	43	22	2.8	はい
52	44	-	9.1	はい
1.6	0.8	0.8	0.7	はい
2.0	1.5	-	-	はい
3.9	2.7	1.7	1.3	いいえ
17	14	11	4.5	はい
<0.5	<0.5	<0.5	<0.5	いいえ
25	17	0.8	-	はい
24	16	-	2.2	いいえ

図24B
から

【配列表】

2016104010000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年12月22日(2015.12.22)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、腫瘍の再発を予測するために突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントの存在または非存在を試験する方法：

腫瘍切除後の癌患者の血液もしくは糞便の試験サンプル中において、該DNAフラグメントのレベルを測定する工程であって、該突然変異が、該癌患者の腫瘍組織中には存在するが該患者の正常組織中には存在せず、該遺伝子が、APC、KRAS、TP53、およびPIK3CAからなる群より選択され、該DNAフラグメントの存在が、将来の腫瘍の再発を示す、工程。

【請求項 2】

腫瘍組織中の遺伝子における突然変異を検出する工程をさらに含む、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

正常組織中の遺伝子における突然変異の非存在を決定するために患者の正常組織を試験する工程をさらに含む、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

測定する工程が、

試験サンプル中の突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントのコピー数を測定する工程；

試験サンプル中の突然変異を有していない遺伝子のDNAフラグメントのコピー数を測定する工程；および

比率を提供するために、該突然変異を有するDNAフラグメントのコピー数を、該試験サンプル中の該突然変異を有していない遺伝子のDNAフラグメントのコピー数で割る工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

癌患者の試験サンプル中のDNAの総量を測定してDNAの該総量に対する比率を標準化する工程をさらに含む、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から2カ月以内に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から1週間以内に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から1日以内に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から2日後に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から2日後に検出された場合に腫瘍再発を予測する工程をさらに含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

突然変異を有する遺伝子のDNAフラグメントが腫瘍切除から4時間より後に検出された場合にアジュバント療法を勧告する工程をさらに含む、請求項1~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

突然変異が、癌患者の腫瘍DNAのヌクレオチドシーケンシングによって検出される、請求項2記載の方法。

【請求項 13】

突然変異が、突然変異特異的核酸プローブへのハイブリダイゼーションによって検出される、請求項2記載の方法。

【請求項 14】

測定する工程が、対立遺伝子特異的核酸プローブへのハイブリダイゼーションを使用する、請求項1~13のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

測定する工程が、エマルジョン中のビーズ上での増幅を使用する、請求項1~14のいずれか一項記載の方法。

【請求項 16】

DNAフラグメントが、エマルジョン中での増幅の前に増幅させられる、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

DNAフラグメントが、対立遺伝子特異的核酸プローブへのハイブリダイゼーションの前に熱変性させられ、かつ塩化テトラメチルアンモニウム（TMAC）の存在下で冷却される、請求項14記載の方法。

【請求項 18】

冷却が、少なくとも0.1 /秒程度に緩徐である、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

試験サンプルが血液である、請求項1～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項 20】

試験サンプルが糞便であり、かつ腫瘍が結腸直腸腫瘍である、請求項1～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項 21】

測定する工程が、腫瘍量の増加、減少、または安定性をモニタリングするため複数の時点に実施される、請求項1～20のいずれか一項記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 2 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図 2 1】

アンパロン 番号	遺伝子	エクソン	患者 番号	PCR 回数	サイズ (bp)	フォワードプライマー-5'-3'	リバースプライマー-5'-3'	PCR 条件	サイズ(bp) LINE-1 PCR
3	APC	15	17	第1回	99	TAG2-tggagagagaacgcggaattggt	TAG1-ctgcagtggtggagatctgcaaac	A	A
5	APC	15	13	第1回	116	gtgtagaagatactccaatattttcaagatgtagtic	gtattagcagaatctgcttcctggtctg	B	97 & 127
				第2回	108	TAG2-gtgtagaagatactccaatattttcaagatgtagtic	TAG1-cagaatctgcttcctggtctgctg	E	
6	APC	15	14, 16	第1回	120	TAG1-ctgaagatgaaataggatgtaacagac	TAG2-cacaggatcttcagctgacctagttcaaac	A	127
9	APC	15	18	第1回	95	TAG2-tgtgagcgaagtccacagctgic	TAG1-cttctgctgctgctgattctgaag	A	97
10	APC	15	2, 10	第1回	110	aaatccagcagactcagaggtctag	ggtgtctgagcaccactttttag	A	97 & 127
				第2回	102	TAG2-aaatccagcagactcagaggtctag	TAG1-agcaccacttttggaggagatttc	D	
13	APC	15	6	第1回	115	TAG1-caggagacccactcatgittagcag	TAG2-cacttaaccatccactgcatggtcac	A	97 & 127
16	APC	15	3	第1回	98	TAG2-gacaaaccatgccaacag	TAG1-agcagtaggtcttatttttagg	C	97
18	APC	15	1, 4	第1回	111	atgctgcagttcagaggtccag	tcagagcactcaggtctggaac	A	97 & 127
				第2回	106	TAG2-gcagttcagaggtccaggtcttc	TAG1-tcagagcactcaggtctggaac	D	
20	PIK3CA	9	5, 8	第1回	101	gctcaagcattctacacgagactcct	cagagaatctcattttagcacttaactgtgac	A	97
				第2回	90	TAG1-gctcaagcattctacacgagactcct	TAG2-catttttagcacttaactgtgactccatagaaaatc	D	
22	TP53	5	9	第1回	84	TAG1-tctacaagcagtcacacacagcag	TAG2-gctgctcaccatcgtatctgagc	A	79 & 97
25	TP53	8	5, 8, 11, 16	第1回	95	TAG2-tgtaatctactgggacggaacagctt	TAG1-cttcttgaggagattctctctctg	A	97
26	KRAS	1	1, 3, 4, 6, 7, 10, 12, 15, 17	第1回	96	TAG2-tgactgaatataaactgtgtgtagttg	TAG1-catatctgtccacaaaatgattc	C	97

TAG1: 5'-tcccgggaaattaatacagac

TAG2: 5'-gctggagctctgagcta

- A、98℃、30秒間:37×(98℃、10秒間:71℃、10秒間)
 B、98℃、30秒間:35×(98℃、10秒間:69℃、10秒間)
 C、98℃、30秒間:3×(98℃、10秒間:70℃、72℃、10秒間)、
 3×(98℃、10秒間:67℃、10秒間:72℃、10秒間)、
 3×(98℃、10秒間:64℃、72℃、10秒間)、
 28×(98℃、10秒間:61℃、10秒間:72℃、10秒間)、
 D、98℃、30秒間:4×(98℃、10秒間:71℃、10秒間)
 E、98℃、30秒間:4×(98℃、10秒間:69℃、10秒間:71℃、10秒間)

フロントページの続き

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ディール フランク
ドイツ連邦共和国 ショルテンス オスターウェグ 9

(72)発明者 ディアス ルイス
アメリカ合衆国 メリーランド州 エルクリッジ メドウ ローズ 5 9 4 3

(72)発明者 キンズラー ケネス ダブリュ .
アメリカ合衆国 メリーランド州 バルチモア ハルカーク ウェイ 1 4 0 3

(72)発明者 ヴォゲルスティン バート
アメリカ合衆国 メリーランド州 バルチモア ブレトン ウェイ 3 7 0 0

(72)発明者 シュミット カースティン
アメリカ合衆国 テネシー州 ナッシュビル コンベント プレイス 1 9 0 8 アpartment
1 3

F ターム(参考) 4B024 AA12 CA02 CA20 HA14
4B063 QA01 QA13 QA17 QA19 QQ02 QQ03 QQ43 QQ58 QR08 QR32
QR55 QR62 QS10 QS14 QS25 QS34 QS39 QX02

专利名称(译)	循环突变DNA用于评估肿瘤动力学		
公开(公告)号	JP2016104010A	公开(公告)日	2016-06-09
申请号	JP2015231649	申请日	2015-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学		
申请(专利权)人(译)	约翰·霍普金斯大学		
[标]发明人	ディールフランク ディアスルイス キンズラーケネスダブリュ ヴォゲルスティンバート シュミットカースティン		
发明人	ディール フランク ディアス ルイス キンズラー ケネス ダブリュ. ヴォゲルスティン パート シュミット カースティン		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2525/197 C12Q2535/131 C12Q2549/119 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/136		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M C12Q1/68.AZN.A C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA02 4B024/CA20 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QQ58 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS10 4B063/QS14 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS39 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	61/085175 2008-07-31 US 12/512585 2009-07-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：一种高灵敏度地定量癌症患者生物学样品中的循环突变DNA (ctDNA) (一种体细胞突变) 的技术，以及一种基于该技术的诊断，预后，治疗和监测癌症的技术。 报价。 在癌症患者的血液或粪便的测试样品中测量了由于基因突变引起的DNA片段的拷贝数，并且该突变存在于癌症患者的肿瘤组织中但在患者体内是正常的。 一种在组织中不存在并且使用拷贝数作为患者肿瘤负荷指标的方法。 [选择图]无

(21) 出願番号	特願2015-231649 (P2015-231649)	(71) 出願人	506321481
(22) 出願日	平成27年11月27日 (2015.11.27)		ザ ジョーンズ ホプキンス ユニバーシテ
(62) 分割の表示	特願2011-521359 (P2011-521359)		イー
	の分割		アメリカ合衆国、メリーランド州 212
原出願日	平成21年7月31日 (2009.7.31)		18、ボルチモア、ノース・チャールズ・
(31) 優先権主張番号	61/085,175		ストリート 3400
(32) 優先日	平成20年7月31日 (2008.7.31)	(74) 代理人	100102978
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 清水 初志
(31) 優先権主張番号	12/512,585	(74) 代理人	100102118
(32) 優先日	平成21年7月30日 (2009.7.30)		弁理士 春名 雅夫
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
最終頁に続く			