

(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2018-517136

(P2018-517136A)

(43) 公表日 平成30年6月28日(2018.6.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62	V 2GO41
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2GO45

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2017-559442 (P2017-559442)	(71) 出願人	505343745
(86) (22) 出願日	平成28年5月16日 (2016.5.16)		エクスプレッション、パソロジー、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年1月12日 (2018.1.12)		EXPRESSION PATHOLOGY, INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/032794		アメリカ合衆国メリーランド州、ロックビル、メディカル、センター、ドライブ、9600、スイート、300
(87) 国際公開番号	W02016/183597	(74) 代理人	100091982
(87) 国際公開日	平成28年11月17日 (2016.11.17)		弁理士 永井 浩之
(31) 優先権主張番号	62/161,757	(74) 代理人	100091487
(32) 優先日	平成27年5月14日 (2015.5.14)		弁理士 中村 行孝
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100082991
			弁理士 佐藤 泰和

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 線維芽細胞増殖因子受容体2 (FGFR2) タンパク質のためのSRM/MRMアッセイ

(57) 【要約】

ホルマリン中で固定された生体サンプルにおいて、選択反応モニタリング (SRM) / 多重反応モニタリング (MRM) 質量分析の方法により、線維芽細胞増殖因子受容体2 (FGFR2) タンパク質を直接定量するための方法が提供される。生体サンプルは、ホルマリン固定組織/細胞、ホルマリン固定/パラフィン包埋 (FFPE) 組織/細胞、FFPE 組織ブロックおよびそれらのブロックからの細胞、ならびに組織培養細胞を含め、薬剤/固定液を含有するホルムアルデヒドで処理された組織および細胞から選択され得る。タンパク質サンプルは生体サンプルから調製され、FGFR2 タンパク質は、そのサンプルにおいて、SRM/MRM 質量分析の方法を用い、そのタンパク質サンプルにおいてFGFR2 に由来する少なくとも1つのフラグメントペプチドを定量することによって定量される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体サンプルにおいて線維芽細胞増殖因子受容体 2 タンパク質 (F G F R 2) のレベルを測定するための方法であって、該生体サンプルから調製されたタンパク質消化物において 1 以上の修飾または非修飾 F G F R 2 フラグメントペプチドを、質量分析を用いて検出する、および / またはその量を定量すること ; ならびに該サンプルにおける修飾または非修飾 F G F R 2 タンパク質のレベルを計算することを含んでなり、該レベルが相対的レベルまたは絶対的レベルである、方法。

【請求項 2】

1 以上の修飾または非修飾 F G F R 2 フラグメントペプチドを検出する、および / またはその量を定量する前に、前記タンパク質消化物を分画する工程をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記分画工程が、ゲル電気泳動、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、ナノ逆相液体クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、または逆相高速液体クロマトグラフィーからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記生体サンプルの前記タンパク質消化物が、リキッドティッシュプロトコールによって調製される、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記タンパク質消化物がプロテアーゼ消化物を含んでなる、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記タンパク質消化物がトリプシン消化物を含んでなる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記質量分析が、タンデム型質量分析、イオントラップ型質量分析、三連四重極型質量分析、M A L D I - T O F 型質量分析、M A L D I 型質量分析、および / または飛行時間型質量分析を含んでなる、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

使用される質量分析の様式が、選択反応モニタリング (S R M)、多重反応モニタリング (M R M)、および / または多重選択反応モニタリング (m S R M) である、請求項 7 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記 F G F R 2 フラグメントペプチドが、配列番号 1 および配列番号 2 として示されるアミノ酸配列を含んでなる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記生体サンプルが、血液サンプル、尿サンプル、血清サンプル、腹水サンプル、痰サンプル、リンパ液、唾液サンプル、細胞または固形組織である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記組織がホルマリン固定組織である、請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記組織がパラフィン包埋組織である、請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記組織が腫瘍から得られる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 14】

前記腫瘍が原発腫瘍である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記腫瘍が二次腫瘍である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

50

修飾または非修飾 F G F R 2 フラグメントペプチドを定量することをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

F G F R 2 フラグメントペプチドの定量が、ある生体サンプルにおける、配列番号 1 および配列番号 2 に示される F G F R 2 の約 8 ~ 約 45 アミノ酸残基のアミノ酸配列を含んでなる 1 以上の F G F R 2 フラグメントペプチドの量を、異なる別の生体サンプルにおける同じ F G F R 2 フラグメントペプチドの量と比較することを含んでなる、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

1 以上の F G F R 2 フラグメントペプチドの定量が、生体サンプル中の F G F R 2 フラグメントペプチドのそれぞれの量を、加えた既知量の内部標準ペプチドと比較することにより決定することを含んでなり、前記生体サンプル中の F G F R 2 フラグメントペプチドのそれぞれが、同じアミノ酸配列を有する内部標準ペプチドと比較される、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

前記内部標準ペプチドが同位体で標識されたペプチドである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記同位体で標識された内部標準ペプチドが、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{34}S 、 ^{15}N 、 ^{13}C 、 ^2H またはそれらの組合せから選択される 1 以上の重い安定同位体を含んでなる、請求項 19 に記載の方法。

20

【請求項 21】

前記タンパク質消化物における 1 以上の修飾または非修飾 F G F R 2 フラグメントペプチドの検出および / またはその量の定量が、修飾または非修飾 F G F R 2 タンパク質の存在および被験体における癌との関連を示す、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記 1 以上の修飾もしくは非修飾 F G F R 2 フラグメントペプチドの検出および / もしくはその量の定量の結果、または前記 F G F R 2 タンパク質のレベルを、癌の診断病期 / グレード / 状態と相関させることをさらに含んでなる、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 23】

前記 1 以上の修飾もしくは非修飾 F G F R 2 フラグメントペプチドの検出および / もしくはその量の定量の結果、または前記 F G F R 2 タンパク質のレベルを、癌の診断病期 / グレード / 状態と相関させることが、癌の診断病期 / グレード / 状態に関する付加的情報を提供するために、多重形式で他のタンパク質または他のタンパク質由来のペプチドを検出する、および / またはその量を定量することと組み合わせられる、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記生体サンプルが得られた被験体に対して、1 以上の F G F R 2 フラグメントペプチドの存在、不在、もしくは量、または F G F R 2 タンパク質のレベルに基づき、処置を選択することをさらに含んでなる、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 25】

前記生体サンプルが得られた患者に、治療上有効な量の治療薬を投与することをさらに含んでなり、該治療薬および / または該治療薬の投与量が、1 以上の修飾もしくは非修飾 F G F R 2 フラグメントペプチドの量または F G F R 2 タンパク質のレベルに基づく、請求項 1 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

治療薬が F G F R 2 タンパク質と結合し、かつ / またはその生物活性を阻害する、請求項 24 または 25 に記載の方法。

【請求項 27】

50

前記治療薬が、FGFR2を発現する癌細胞を特異的に標的とするように選択される、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記生体サンプルが、リキッドティッシュプロトコルおよび試薬を用いて1以上の修飾または非修飾FGFR2フラグメントペプチドの量を定量するために処理されたホルマリン固定腫瘍組織である、請求項1～27のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の参照】

【0001】

本出願は、2015年5月14日出願の仮出願第62/161,757号の優先権を主張し、その内容は引用することによりその総てが本明細書の一部とされる。

10

【発明の開示】

【0002】

緒論

癌は、成長および分裂中の細胞を死滅させ、様々な様式で機能する一群の治療薬で処置される。一般的な化学療法薬群が数十年の間、単剤または合剤で使用されており、この一般的な薬剤群は、臨床的腫瘍学実践における旧来の慣例の癌治療となっている。これら旧来の化学療法薬は、ほとんどの癌細胞の主要な特性の1つである、急速に分裂する総ての細胞を死滅させることにより働く。しかしながら、これらの薬剤はまた、成長中の正常細胞も死滅させ、従って、これらの薬剤は癌細胞を死滅させるための「標的」アプローチであると見なされない。近年、癌細胞のみを標的とする大きな癌治療薬群が開発されてきており、この治療薬は、癌細胞のみに発現され正常細胞には発現されないタンパク質に特異的に作用する。このアプローチは、癌療法のための「標的」アプローチであると見なされる。最近では、「標的」様式で癌細胞を死滅されるための別のアプローチは、癌患者の免疫系の癌細胞死滅能を高めるように免疫系を特異的に調節するというものになっている。

20

【0003】

線維芽細胞増殖因子受容体2タンパク質(FGFR2とも呼ばれる)を標的とする治療薬は、初期の臨床試験で有望であることが示された。しかしながら、癌細胞が多量のFGFR2タンパク質を発現する患者だけがこのようなFGFR2標的治療薬による処置から利益を受け得る。FGFR2は正常組織および/または正常上皮細胞では通常発現されないことから、下記の方法は、FGFR2シグナル経路の活性化の相対的尺度を与える定量的プロテオミクスに基づくアッセイを提供する。特に、これらの方法は、癌患者由来のホルマリン固定組織においてFGFR2を定量し、癌療法に関する改善された処置決定を可能とする質量分析アッセイを提供する。

30

【0004】

線維芽細胞増殖因子受容体2タンパク質(CD332、ケラチノサイト増殖因子受容体、およびKGFとも呼ばれ、本明細書ではFGFR2と呼称する)の部分配列に由来する特定のペプチドが提供される。各ペプチドのペプチド配列およびフラグメンテーション/遷移イオンが、質量分析に基づく選択反応モニタリング(Selected Reaction Monitoring)(SRM)では特に有用であり、このSRMは、多重反応モニタリング(Multiple Reaction Monitoring)(MRM)アッセイとも呼ぶことができ、本明細書ではSRM/MRMと呼称する。FGFR2タンパク質のSRM/MRM定量的分析のためのペプチドの使用が記載される。

40

【0005】

このSRM/MRMアッセイは、FGFR2タンパク質に由来する特定のペプチドの1以上の相対的または絶対的定量的レベルを測定するために使用することができ、従って、生体サンプルから得られた所与のタンパク質調製物中のFGFR2タンパク質の量を測定する質量分析法を提供する。

【0006】

50

より具体的には、SRM/MRMアッセイは、ホルマリン固定癌患者組織などの患者の組織サンプルから取得された細胞から調製された複雑なタンパク質溶解液サンプルにおいて、これらのペプチドを直接測定することができる。ホルマリン固定組織からタンパク質サンプルを調製する方法は、米国特許第7,473,532号に記載され、その内容は引用することによりその総てが本明細書の一部とされる。米国特許第7,473,532号に記載の方法は、好都合には、Expression Pathology Inc. (ロックヴィル、MD) から入手可能なリキッドティッシュ試薬およびプロトコールを用いて実施され得る。

【0007】

癌患者組織から最も広くかつ有利に入手可能な組織形態は、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織である。外科的に取り出された組織のホルムアルデヒド/ホルマリン固定は、世界的にみても、癌組織サンプルを保存する断然最も一般的な方法であり、標準的な病理学実践で受け入れられている慣例である。ホルムアルデヒドの水溶液はホルマリンと呼ばれる。「100%」ホルマリンは、水中ホルムアルデヒドの飽和溶液(約40容量%または37質量%)からなり、酸化および重合度を限定するために少量の安定剤、通常はメタノールを含む。組織が保存される最も一般的な方法は、組織全体を長時間(8時間~48時間)、一般に10%中性緩衝ホルマリンと呼ばれるホルムアルデヒド水溶液に浸漬し、次いで、その固定組織全体を室温で長期保存するためにパラフィンワックスに包埋するというものである。よって、ホルマリン固定癌組織を分析するための分子分析法が、癌患者組織の分析のための、最も許容され、頻用される方法となる。

10

20

【0008】

SRM/MRMアッセイからの結果は、組織(生体サンプル)が採取および保存された患者または被験体の特定の組織サンプル(例えば、癌組織サンプル)内のFGFR2タンパク質の正確かつ精密な定量的レベルと関連させるために使用することができる。これにより、その癌に関する診断および予後情報が提供されるだけでなく、医師またはその他の医療専門家がその患者に適切な療法をより正確に決定することも可能となる。罹患組織またはその他の患者サンプルにおけるタンパク質の発現レベルに関して診断上、予後上、および治療上重要な情報を提供するこのようなアッセイは、コンビオン診断アッセイと呼ばれる。例えば、このようなアッセイは、癌の病期または程度を診断し、患者が応答する可能性が最も高い治療薬を決定するように設計することができる。

30

【0009】

概要

本明細書に記載のアッセイは、FGFR2タンパク質由来の特定の非修飾ペプチドの相対的または絶対的レベルを測定し、また、FGFR2タンパク質由来の特定の修飾ペプチドの絶対的または相対的レベルを測定することもできる。修飾の例としては、それらのペプチド上に存在し得るリン酸化アミノ酸残基およびグリコシル化アミノ酸残基が挙げられる。

【0010】

FGFR2タンパク質の相対的定量的レベルは、SRM/MRM法により、例えば、異なるサンプル中の個々のFGFR2ペプチドのSRM/MRMシグネチャーピーク面積(例えばシグネチャーピーク面積または積分フラグメントイオン強度)を比較することによって決定される。あるいは、ある生体サンプル中の相対的FGFR2タンパク質含量を決定するために、各ペプチドがその固有の特定のSRM/MRMシグネチャーピークを有する複数のFGFR2シグネチャーペプチドに関する複数のSRM/MRMシグネチャーピーク面積を1以上の付加的または異なる生体サンプル中のFGFR2タンパク質含量と比較することも可能である。このように、FGFR2タンパク質に由来する特定の1または複数のペプチドの量、および従ってFGFR2タンパク質の量は、同じ試験条件下で、2以上の生体サンプルについて、同じFGFR2ペプチドまたは複数のペプチドと相対的に決定される。加えて、相対的定量は、単一のサンプル内のFGFR2タンパク質から所与の1または複数のペプチドを、SRM/MRM法により、そのペプチドに関するシグネチ

40

50

ャーピーク面積を、その生体サンプルからの同じタンパク質調製物内の異なる1または複数のタンパク質に由来する別の異なる1または複数のペプチドに関するシグネチャーピーク面積と比較することによって決定することができる。このように、FGFR2タンパク質由来の特定のペプチドの量、および従ってFGFR2タンパク質の量は、同じサンプル内で互いに相対的に決定される。これらのアプローチは、サンプル間およびサンプル内で、別の1または複数のペプチドの量に対して、FGFR2タンパク質由来の個々の1または複数のペプチドの定量化を可能とし、この場合、その生体サンプルからのタンパク質調製物中のFGFR2ペプチドの絶対的質量/容量または質量/重量の量に関わらず、シグネチャーピーク面積により決定される量は互いに相対的である。異なるサンプル間の個々のシグネチャーピーク面積に関する相対的定量的データは、サンプル当たり分析されるタンパク質の量に対して正規化される。相対的定量化は、あるペプチド/タンパク質の他のペプチド/タンパク質に対する相対的タンパク質量について洞察を得るために、単一のサンプルでおよび/または多数のサンプルで同時に、複数のタンパク質およびFGFR2タンパク質に由来する多数のペプチドについて行うことができる。

10

20

30

40

50

【0011】

FGFR2タンパク質の絶対的定量的レベルは、例えば、SRM/MRM法により決定され、それにより、生体サンプル中のFGFR2タンパク質に由来する個々のペプチドのSRM/MRMシグネチャーピーク面積が、添加した内部標準のSRM/MRMシグネチャーピーク面積と比較される。1つの実施態様では、内部標準は、1以上の重い同位体で標識された1以上のアミノ酸残基を含有する、同じ正確なFGFR2ペプチドの合成型である。このような同位体標識内部標準は、質量分析により分析した場合に、それが天然FGFR2ペプチドシグネチャーピークとは異なり明瞭に区別され、コンパレータピークとして使用できる予測可能かつ一貫したSRM/MRMシグネチャーピークを生じるように合成される。よって、内部標準が生体サンプルからのタンパク質調製物に既知の量で添加され、質量分析により分析される場合、天然ペプチドのSRM/MRMシグネチャーピーク面積が、内部標準ペプチドのSRM/MRMシグネチャーピーク面積と比較され、この数的比較が、生体サンプルからの元のタンパク質調製物中に存在する天然ペプチドの絶対的モル濃度および/または絶対的質量のいずれかを示す。フラグメントペプチドに関する絶対的定量的データは、サンプル当たり分析されるタンパク質の量に応じて示される。絶対的定量化は、個々の生体サンプルにおいて、また、個々のサンプルのコホート全体において絶対的タンパク質量について洞察を得るために、単一のサンプルでおよび/または多数のサンプルで同時に、多数のペプチド、および従ってタンパク質について行うことができる。

【0012】

SRM/MRMアッセイ法は、例えば、ホルマリン固定組織などの患者由来組織で直接、癌の病期の診断および/または患者の予後の補助に、ならびにどの治療薬がその患者の処置に使用するのに最も有利であるかを決定する補助に使用することができる。部分的もしくは全腫瘍の治療的摘出などの手術を介して、または疑われる疾患の有無を決定するために行われる生検手順を介して患者から取り出される癌組織は、特定の1または複数のタンパク質がその患者組織に存在するかどうか、およびどの形態のタンパク質が存在するかを決定するために分析される。さらに、1または複数のタンパク質の発現レベルを決定し、健康な組織で見られる「正常」または参照レベルと比較することができる。健康な組織で見られるタンパク質の正常または参照レベルは、例えば、癌を持たない1以上の個体の関連組織から導くことができる。あるいは、正常または参照レベルは、癌に侵されていない関連組織の分析により、癌を持つ個体に関して得ることもできる。タンパク質レベル(例えば、FGFR2レベル)のアッセイはまた、FGFR2レベルを使用することにより、患者または癌と診断された被験体の癌の病期を診断するため、およびその予後情報を提供するために使用することもできる。個々のFGFR2ペプチドのレベルは、分析されるタンパク質溶解液の総量当たりの、SRM/MRMアッセイにより決定されるペプチドのモル量と定義される。よって、FGFR2に関する情報は、FGFR2タンパク質(また

は F G F R 2 タンパク質のフラグメントペプチド)のレベルを正常組織に見られるレベルと相関させることにより、癌の病期またはグレードの決定の補助に使用することができる。癌細胞においてひと度 F G F R 2 タンパク質の定量的な量が決定されれば、その情報を、例えば、アッセイされた 1 または複数のタンパク質 (例えば、F G F R 2) の異常な発現を特徴とする癌組織を特異的に処置するために開発された (化学的または生物学的) 治療薬のリストとの一致を探ることができる。F G F R 2 タンパク質アッセイから得られた、例えば、F G F R 2 タンパク質またはこのタンパク質を発現する細胞 / 組織を特異的に標的とする治療薬のリストとの一致情報は、疾患を処置するための個別化医療アプローチと呼ばれてきたものを規定する。本明細書に記載のアッセイ方法は、患者固有の組織に由来するタンパク質の分析を診断および処置決定のよりどころとして使用することにより、

10

【 0 0 1 3 】

詳細な説明

原理上、例えば、既知の特異性のプロテアーゼ (例えば、トリプシン) で消化することにより調製された F G F R 2 タンパク質に由来するいずれの推定ペプチドも、質量分析に基づく S R M / M R M アッセイを用いてサンプル中の F G F R 2 タンパク質の存在量を決定するためのサロゲートリポーターとして使用することができる。同様に、F G F R 2 タンパク質において修飾されている可能性があることが知られている部位にアミノ酸残基を含有するいずれの推定ペプチド配列も、サンプル中の F G F R 2 タンパク質の修飾程度をアッセイするためにおそらく使用可能である。

20

【 0 0 1 4 】

F G F R 2 フラグメントペプチドは、米国特許第 7 , 4 7 3 , 5 3 2 号に示されるリキッドティッシュプロトコールの使用を含む様々な方法によって作製することができる。リキッドティッシュプロトコールおよび試薬は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織から、組織 / 生体サンプルにおけるタンパク質のタンパク質分解消化により、質量分析に好適なペプチドサンプルを作製することができる。リキッドティッシュプロトコールでは、組織 / 生体サンプルをバッファー中で長時間 (例えば、約 8 0 ~ 約 1 0 0 で約 1 0 分 ~ 約 4 時間) 加熱して、タンパク質架橋を逆転させるかまたは解除する。使用するバッファーは、中性バッファー (例えば、T r i s 系バッファー、または洗剤含有バッファー) である。加熱処理後、組織 / 生体サンプルを、限定されるものではないが、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、およびエンドプロテイナーゼ L y s - C を含む 1 以上のプロテアーゼで、前記生体サンプルの組織および細胞構造を破壊してサンプルを液化するのに十分な時間 (例えば、3 7 ~ 6 5 の温度で 3 0 分 ~ 2 4 時間) 処理する。加熱およびタンパク質分解の結果として、液体、可溶性、希釈可能な溶解液が得られる。

30

【 0 0 1 5 】

驚くことに、F G F R 2 タンパク質に由来する多くの潜在的ペプチド配列が、即明らかにならない理由で、質量分析に基づく S R M / M R M アッセイで使用するために適切でないまたは効果的でないことが判明した。このことは特にホルマリン固定組織に由来するペプチドについて言える。M R M / S R M アッセイに最適なペプチドの予測ができなかったため、F G F R 2 タンパク質に関して信頼できる正確な S R M / M R M アッセイを開発するために、実際のリキッドティッシュ溶解液で修飾および非修飾ペプチドを実験的に識別する必要があった。いずれの理論にも縛られるものではないが、ペプチドの中には、十分にイオン化しないため、または他のタンパク質に由来するペプチドと明瞭に異なるフラグメントを生じるために、例えば、質量分析によっては検出が困難なものがあると考えられる。ペプチドはまた、分離 (例えば、液体クロマトグラフィー) で十分に解明できない場合があり、またはガラスもしくはプラスチック器具に付着する場合もある。

40

【 0 0 1 6 】

本開示の種々の実施態様 (例えば、表 1) に見られる F G F R 2 ペプチドは、ホルマリン固定癌組織から取得された細胞から調製された複雑なリキッドティッシュ溶解液内の全タンパク質のプロテアーゼ消化により、F G F R 2 タンパク質から誘導されたものである

50

。そうではないことが述べられない限り、各場合において、プロテアーゼはトリプシンであった。次に、このリキッドティッシュ溶解液を、質量分析により検出され分析される F G F R 2 タンパク質に由来するペプチドを決定するために質量分析により分析した。質量分析に好ましい特定のペプチドのサブセットの同定は、1) タンパク質に由来するどの 1 または複数のペプチドがリキッドティッシュ溶解液の質量分析においてイオン化するかの実験的決定、および 2) リキッドティッシュ溶解液の調製に使用されるプロトコールおよび実験条件に耐えるペプチドの能力に基づく。この後者の特性は、ペプチドのアミノ酸配列に及ぶだけでなく、ペプチド内の修飾アミノ酸残基の、サンプル調製実施地の修飾型での存続能にも及ぶ。

【0017】

ホルマリン(ホルムアルデヒド)固定組織から直接取得された細胞に由来するタンパク質溶解液は、リキッドティッシュ試薬と、組織顕微解剖により細胞をサンプルチューブに回収した後に、それらの細胞をリキッドティッシュバッファー中で長時間加熱することを必然的に伴うプロトコールとを用いて調製した。ひと度、ホルマリンにより誘導される架橋が負の作用を受けると、その後、組織/細胞は、例えば、限定されるものではないが、プロテアーゼトリプシンを含むプロテアーゼを用いる予測可能な様式で完全に消化される。各タンパク質溶解液は、無傷のポリペプチドがプロテアーゼにより消化されることでペプチドの集合体となる。各リキッドティッシュ溶解液は、ペプチドのマルチブルグローバルプロテオミックスurveyを行うために分析され(例えば、イオントラップ型質量分析による)、ここでは、データは、各タンパク質溶解液中に存在する総ての細胞タンパク質から質量分析により同定できる可能な限り多くのペプチドの同定として提示された。イオントラップ型質量分析計または単一の複雑なタンパク質/ペプチド溶解液から可能な限り多くのペプチドを同定するためのグローバルプロファイリングを行うことができる別の形態の質量分析計が一般に使用される。しかしながら、イオントラップ型質量分析計が、ペプチドのグローバルプロファイリングを行うために最良のタイプの質量分析計であり得る。SRM/MRMアッセイは、MALDI型、イオントラップ型、または三連四重極型を含む、いずれのタイプの質量分析計に対しても開発および実施可能であるが、有利には、SRM/MRMアッセイ用のインストルメントプラットフォームは、三連四重極型インストルメントプラットフォームである。

【0018】

使用される条件下、単一の溶解液の単一のMS分析でできる限り多くのペプチドが同定されたところで、次に、そのペプチドリストを照合し、その溶解液で検出されたタンパク質を決定するために使用した。そのプロセスを多重リキッドティッシュ溶解液に対して繰り返し、極めて大きなペプチドリストを単一のデータセットと照合した。そのタイプのデータセットは、分析された(プロテアーゼ消化後に)生体サンプルのタイプにおいて、具体的には、生体サンプルのリキッドティッシュ溶解液において、検出可能なペプチドに相当すると考えることができ、従って、例えばF G F R 2 タンパク質などの特定のタンパク質に関するペプチドが含まれる。

【0019】

1つの実施態様では、F G F R 2 タンパク質の絶対的または相対的量の決定において有用であると特定されたF G F R 2 トリプシンペプチドには、配列番号1および配列番号2(いずれも表1に挙げられている)の1以上が含まれる。これらのペプチドのそれぞれは、ホルマリン固定、パラフィン包埋組織から調製されたリキッドティッシュ溶解液において質量分析により検出された。従って、各ペプチドは、直接的にはホルマリン固定患者組織におけるものを含め、ヒト生体サンプルにおけるF G F R 2 タンパク質のための定量的SRM/MRMアッセイの開発において使用するための候補である。

【0020】

10

20

30

40

【表 1】

配列番号	ペプチド配列	モノアイソトピック質量	前駆体荷電状態	前駆体 m/z	遷移 m/z	イオンタイプ
配列番号 1	EAVTVAVK	815.4752	2	408.745	317.218	y3
			2	408.745	416.286	y4
			2	408.745	517.334	y5
			2	408.745	616.402	y6
配列番号 2	YGPDGLPYLK	1121.5756	2	561.795	451.753	y8
			2	561.795	520.312	y4
			2	561.795	690.418	y6
			2	561.795	805.445	y7
			2	561.795	902.498	y8

10

【0021】

表 1 に挙げられている F G F R 2 トリプシンペプチドは、前立腺、結腸、および乳房を含む異なるヒト器官の複数の異なるホルマリン固定組織の多重リキッドティッシュ溶解液から検出された。それらのペプチドのそれぞれは、ホルマリン固定組織における F G F R 2 タンパク質の定量的 S R M / M R M アッセイに有用であると考えられる。これらの試験のさらなるデータ分析では、いずれの特定の器官部位に由来するこれらのペプチドのいずれについても選好性は見られないことが示された。従って、これらのペプチドのそれぞれは、生体サンプルにまたは身体の任意の器官に由来するホルマリン固定組織からのリキッドティッシュ溶解液に対して F G F R 2 タンパク質の S R M / M R M アッセイを行うために好適であると考えられる。

20

【0022】

S R M / M R M アッセイを行う際の重要な考慮事項は、ペプチドの分析に使用され得る機器のタイプである。S R M / M R M アッセイは、M A L D I 型、イオントラップ型、または三連四重極型を含む、いずれのタイプの質量分析計に対しても開発および実施可能であるが、S R M / M R M アッセイのために最も有利なインストルメントプラットフォームは、現在のところ、大抵の場合、三連四重極型インストルメントプラットフォームであると考えられる。このタイプの質量分析計は、現在のところ、細胞内に含まれる全タンパク質に由来する数百ないし数千から数百万までの個々のペプチドからなり得る極めて複雑なタンパク質溶解液内での単一の単離された標的ペプチドの推定分析に最適な機器である。

30

【0023】

F G F R 2 タンパク質に由来する各ペプチドのための S R M / M R M アッセイを最も有効に実施するためには、その分析においてペプチド配列に加えて情報を利用できることが望ましい。その付加的情報は、そのアッセイが有効に実施され得るように、特定の標的化ペプチドの適正かつ集中的分析を行うために質量分析計（例えば、三連四重極型質量分析計）に指示および教示を与える上で使用され得る。

【0024】

一般には標的ペプチド、および特定の F G F R 2 ペプチドに関する付加的情報は、ペプチドのモノアイソトピック質量、その前駆体荷電状態、前駆体 m / z 値、m / z 遷移イオン、および各遷移イオンのイオンタイプのうち 1 以上を含み得る。F G F R 2 タンパク質に関する S R M / M R M アッセイを開発するために使用可能な付加的ペプチド情報は、表 1 からこれらの F G F R 2 ペプチドに関して示されている。

40

【0025】

1) F G F R 2 タンパク質に関する質量分析に基づく S R M / M R M アッセイに使用可能な F G F R 2 タンパク質由来の候補ペプチドを同定すること、2) 相関を得るために、F G F R 2 タンパク質由来の標的ペプチドに関して個々の S R M / M R M アッセイまたは一連のアッセイを開発すること、ならびに 3) 定量的アッセイを癌診断および / または最

50

適な療法の選択に適用することを目的に下記の方法を使用した。

【0026】

アッセイ方法

1. FGF R2タンパク質に関するSRM/MRM候補フラグメントペプチドの同定

a. タンパク質を消化するために1または複数のプロテアーゼ(トリプシンを含んでも含まなくてもよい)を用いて、ホルマリン固定生体サンプルからリキッドティッシュタンパク質溶解液を調製する。

b. イオントラップ型タンデム質量分析計でリキッドティッシュ溶解液中の全タンパク質フラグメントを分析し、FGF R2タンパク質由来の全フラグメントペプチドを同定する。ここで、個々のフラグメントペプチドは、リン酸化またはグリコシル化などのいずれのペプチド修飾も含まない。

c. イオントラップ型タンデム質量分析計でリキッドティッシュ溶解液中の全タンパク質フラグメントを分析し、例えば、リン酸化残基またはグリコシル化残基などのペプチド修飾を有する、FGF R2タンパク質由来の全フラグメントペプチドを同定する。

d. おそらく全長FGF R2タンパク質全体から特定の消化方法により作出された全ペプチドを測定することができるが、SRM/MRMアッセイの開発に使用される好ましいペプチドは、ホルマリン固定生体サンプルから調製された複雑なリキッドティッシュタンパク質溶解液において直接、質量分析により同定されるものである。

e. 患者組織において特異的に修飾(リン酸化、グリコシル化など)され、かつ、ホルマリン固定生体サンプルからのリキッドティッシュ溶解液を分析する際に質量分析計でイオン化し、従って、検出されるペプチドが、FGF R2タンパク質のペプチド修飾をアッセイするための候補ペプチドとして同定される。

【0027】

2. FGF R2タンパク質由来のフラグメントペプチドに関する質量分析アッセイ

a. リキッドティッシュ溶解液において同定された個々のフラグメントペプチドに関する三連四重極型質量分析計でのSRM/MRMアッセイをFGF R2タンパク質由来のペプチドに適用する。

i. 限定されるものではないが、ゲル電気泳動、液体クロマトグラフィー、キャピラリー電気泳動、ナノ逆相液体クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、または逆相高速液体クロマトグラフィーを含む最適なクロマトグラフィー条件に関して、フラグメントペプチドの最適保持時間を決定する。

ii. 各ペプチドに関するSRM/MRMアッセイを開発するために、そのペプチドのモノアイソトピック質量、各ペプチドの前駆体荷電状態、各ペプチドの前駆体m/z値、各ペプチドのm/z遷移イオン、および各フラグメントペプチドの各遷移イオンのイオンタイプを決定する。

iii. 次に、SRM/MRMアッセイは、(i)および(ii)からの情報を用いて三連四重極型質量分析計で行うことができ、ここで、各ペプチドは、三連四重極型質量分析計で実施した際のユニークなSRM/MRMアッセイを正確に定義する、特徴的かつユニークなSRM/MRMシグネチャーピークを有する。

b. SRM/MRM質量分析からのユニークなSRM/MRMシグネチャーピーク面積の関数としての、FGF R2タンパク質のフラグメントペプチドの検出量が、特定のタンパク質溶解液におけるタンパク質の相対的および絶対的両方の量を示し得るように、SRM/MRM分析を行う。

i. 相対的定量化は、下記により達成され得る。

1. あるホルマリン固定生体サンプルからのリキッドティッシュ溶解液で検出された所与のFGF R2ペプチドからのSRM/MRMシグネチャーピーク面積を、少なくとも第2、第3、第4またはそれを超えるホルマリン固定生体サンプルからの少なくとも第2、第3、第4またはそれを超えるリキッドティッシュ溶解液における同じFGF R2フラグメントペプチドの同じSRM/MRMシグネチャーピーク面積と比較することにより、FGF R2タンパク質の存在の増加または減少を決定すること。

10

20

30

40

50

2. あるホルマリン固定生体サンプルからのリキッドティッシュ溶解液において検出された所与の F G F R 2 ペプチドからの S R M / M R M シグネチャーピーク面積を、異なる別の生物学的供給源に由来する他のサンプルにおける、他のタンパク質由来のフラグメントペプチドから得られた S R M / M R M シグネチャーピーク面積と比較することにより、F G F R 2 タンパク質の存在の増加または減少を決定すること、ここで、ペプチドフラグメントに関する 2 サンプル間の S R M / M R M シグネチャーピーク面積比較は、各サンプルにおいて分析されたタンパク質の量に対して正規化される。

3. F G F R 2 タンパク質の変化レベルを、様々な細胞条件下でそれらの発現レベルを変化させない他のタンパク質のレベルに対して正規化するために、所与の F G F R 2 ペプチドに関する S R M / M R M シグネチャーピーク面積を、ホルマリン固定生体サンプルからの同じリキッドティッシュ溶解液内の異なるタンパク質に由来する他のフラグメントペプチドからの S R M / M R M シグネチャーピーク面積と比較することにより、F G F R 2 タンパク質の存在の増加または減少を決定すること。

4. これらのアッセイは、F G F R 2 タンパク質の非修飾フラグメントペプチドおよび修飾フラグメントペプチドの両方に適用でき、ここで、これらの修飾には、限定されるものではないが、リン酸化および/またはグリコシル化が含まれ、修飾ペプチドの相対的レベルは、非修飾ペプチドの相対的量の決定と同様に決定される。

i i . 所与のペプチドの絶対的定量化は、個々の生体サンプルにおける F G F R 2 タンパク質由来の所与のフラグメントペプチドの S R M / M R M シグネチャーピーク面積を、生体サンプルからのタンパク質溶解液中に添加された内部フラグメントペプチド標準の S R M / M R M シグネチャーピーク面積と比較することにより達成され得る。

1. 内部標準は、調査対象の F G F R 2 タンパク質由来のフラグメントペプチドの標識合成型である。この標準は既知量でサンプルに添加され、生体サンプルにおいて内部フラグメントペプチド標準および天然フラグメントペプチドの両方の S R M / M R M シグネチャーピーク面積を個別に決定した後に、両ピーク面積の比較を行うことができる。

2. これを非修飾フラグメントペプチドおよび修飾フラグメントペプチドに適用することができ、ここで、これらの修飾には、限定されるものではないが、リン酸化および/またはグリコシル化が含まれ、修飾ペプチドの絶対的レベルは、非修飾ペプチドの絶対的レベルの決定と同様に決定することができる。

【 0 0 2 8 】

3. 癌診断および処置に対するフラグメントペプチド定量化の適用

a. F G F R 2 タンパク質のフラグメントペプチドレベルの相対的および/または絶対的定量化を行い、癌の分野でよく理解されているように、予め決定された、F G F R 2 タンパク質の発現と患者腫瘍組織における癌の病期/グレード/状態との関連が確認されることを実証する。

b. F G F R 2 タンパク質のフラグメントペプチドレベルの相対的および/または絶対的定量化を行い、異なる処置戦略からの臨床転帰との相関を実証する、ここで、この相関は、当技術分野ですでに実証されているか、または患者および患者由来の組織のコホート間の相関研究により将来、実証され得る。従前に確立された相関または将来に導き出される相関のいずれかがこのアッセイにより確認されれば、そのアッセイ方法は、最適な処置戦略を決定するために使用することができる。

【 0 0 2 9 】

特定の F G F R 2 ペプチドに関する特定のユニークな特徴は、イオントラップ型および三連四重極型質量分析計の両方での全 F G F R 2 ペプチドの分析により明らかにした。その情報には、ペプチドのモノアイソトピック質量、その前駆体荷電状態、前駆体 m/z 値、前駆体の遷移 m/z 値、および同定された遷移のそれぞれのイオンタイプが含まれる。その情報は、直接、ホルマリン固定サンプル/組織からのリキッドティッシュ溶解液におけるそれぞれの全候補 S R M / M R M ペプチドに関して、実験的に決定されなければならないが、これは、興味深いことに、F G F R 2 タンパク質由来の総てのペプチドが、本明細書に記載の S R M / M R M を用いてこのような溶解液で検出できるわけではなく、この

10

20

30

40

50

ことは検出されない F G F R 2 ペプチドは、ホルマリン固定サンプル/組織からのリキッドティッシュ溶解液においてペプチド/タンパク質を直接定量する上で使用するための S R M / M R M アッセイを開発するための候補ペプチドとは見なされ得ないことを示すからである。

【 0 0 3 0 】

特定の F G F R 2 ペプチドに関する特定の S R M / M R M アッセイは、三連四重極型質量分析計で実施される。特定の F G F R 2 S R M / M R M アッセイにより分析される試験サンプルは、例えば、ホルマリン固定およびパラフィン包埋された組織から調製されるリキッドティッシュタンパク質溶解液である。アッセイなどからのデータは、ホルマリン固定サンプル中のこの F G F R 2 ペプチドに関するユニークな S R M / M R M シグネチャーピークの存在を示す。

10

【 0 0 3 1 】

このペプチドの特定の遷移イオンの特徴は、ホルマリン固定生体サンプルにおける特定の F G F R 2 ペプチドを定量的に測定するために使用される。これらのデータは、分析されるタンパク質溶解液 1 マイクログラム当たりのペプチドのモル量の関数としての、この F G F R 2 ペプチドの絶対的量を示す。ホルマリン固定された患者由来組織の分析に基づく組織中の F G F R 2 タンパク質レベルの評価は、特定の各患者に関する診断、予後、および治療関連情報を提供し得る。1つの実施態様において、本開示は、生体サンプルにおいて線維芽細胞増殖因子受容体 2 (F G F R 2) のレベルを測定するための方法であって、前記生体サンプルから調製されたタンパク質消化物において、質量分析を用いて、1以上の修飾または非修飾 F G F R 2 フラグメントペプチドを検出するおよび/またはその量を定量すること、ならびに前記サンプルにおける修飾または非修飾 F G F R 2 タンパク質のレベルを計算することを含んでなる方法を記載し、ここで、前記レベルは相対的レベルまたは絶対的レベルである。関連の実施態様において、1以上の F G F R 2 フラグメントペプチドの定量は、加えた既知量の内部標準ペプチドと比較することにより、生体サンプル中の F G F R 2 フラグメントペプチドのそれぞれの量を決定することを含んでなり、ここで、生体サンプル中の F G F R 2 フラグメントペプチドのそれぞれは、同じアミノ酸配列を有する内部標準ペプチドと比較される。いくつかの実施態様では、内部標準は、¹⁸O、¹⁷O、³⁴S、¹⁵N、¹³C、²H またはそれらの組合せから選択される 1 以上の重い安定同位体を含んでなる、同位体で標識された内部標準ペプチドである。

20

30

【 0 0 3 2 】

本明細書に記載の生体サンプル中の F G F R 2 タンパク質 (またはそのサロゲートとしてのフラグメントペプチド) のレベルを測定するための方法は、患者または被験体の癌の診断および/または予後指標として使用することができる。1つの実施態様では、F G F R 2 タンパク質のレベルの測定からの結果は、組織中に見られた F G F R 2 タンパク質のレベルを正常および/または癌性もしくは前癌組織中に見られるそのタンパク質のレベルと関連させる (例えば、比較する) ことにより、癌の診断病期 / グレード / 状態を決定するために使用することができる。

【 0 0 3 3 】

核酸およびタンパク質の両方が同じリキッドティッシュ (商標) 生物分子調製物から分析できるので、タンパク質分析時と同じサンプルで核酸から疾患診断および薬物処置決定に関する付加的情報を得ることができる。例えば、F G F R 2 タンパク質がある特定の細胞により高レベルで発現される場合、S R M によりアッセイすれば、そのデータは、細胞の状態およびそれらの脱制御増殖に関する能力、潜在的薬剤耐性ならびに癌の発生に関する情報を提供することができる。同時に、F G F R 2 遺伝子および/または核酸およびそれらがコードするタンパク質の状態 (例えば、m R N A 分子およびそれらの発現レベルまたはスプライス型) に関する情報が、同じリキッドティッシュ (商標) 生物分子調製物中に存在する核酸から得られ、F G F R 2 タンパク質の S R M 分析と同時に評価可能である。F G F R 2 に由来しないが同じ生物分子調製物中に存在する、いずれの遺伝子および/または核酸も、F G F R 2 タンパク質の S R M 分析と同時に評価することができる。1つ

40

50

の実施態様では、F G F R 2 タンパク質および/または1つ、2つ、3つ、4つまたはそれを超える付加的タンパク質に関する情報は、それらのタンパク質をコードする核酸を調べることにより評価することができる。それらの核酸は、例えば、シーケンシング法、ポリメラーゼ連鎖反応法、制限フラグメント多形分析、欠失、挿入の同定、および/または限定されるものではないが、一塩基多形、トランジション、トランスバージョン、もしくはそれらの組合せを含む、突然変異の決定のうち1以上、2以上、または3以上により調べることができる。

【配列表】

201851713600001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/32794

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/68, 33/48, 33/574 (2016.01) CPC - G01N 33/00, 33/574, 33/57442, 33/68 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): G01N 33/68, 33/48, 33/574 (2016.01) CPC: G01N 33/00, 33/574, 33/57442, 33/68, 2333/00, 2333/435, 2033/57403, 2033/57457 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google Scholar, Pubmed, EBSCO; Fibroblast Growth Factor Receptor 2, FGFR2, CD332, KGF-R, Keratinocyte growth factor receptor, BBDS, BEK, BFR-1, CEK3, CFD1, ECT1, JWS, K-SAM, TK14, TK25, Selected Reaction Monitoring, SRM/MRM, assay, method, detect, measure, spectroscop*		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2013/0288233 A1 (MURRAY, R) October 31, 2013; paragraphs [0007], [0008], [0014], [0019]	1-3, 4/1-3, 5/1-3, 6/5/1-3
Y	(HATTORI, Y et al.) Immunohistochemical Detection of K-sam Protein in Stomach Cancer* by Clinical Cancer Research. 1996. Vol. 2. pages 1373-1381; abstract, pages 1375-1376; figure 4; page 1376	1-3, 4/1-3, 5/1-3, 6/5/1-3
Y	US 2005/0014203 A1 (DARFLER, MM et al.) 20 January 2005; paragraph [0021]	4/1-3
A	(KATOH, M) Cancer genomics and genetics of FGFR2 (Review). International Journal of Oncology. Vol. 33. Pages 233-237; entire document	1-6
A	(NOMURA, S et al.) FGF10/FGFR2 signal induces cell migration and invasion in pancreatic cancer. British Journal of Cancer. 2008. Vol. 99. Pages 305 - 313; entire document	1-6
A	(ZHAO, Q et al.) Tumor-Specific Isoform Switch of the Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Underlies the Mesenchymal and Malignant Phenotypes of Clear Cell Renal Cell Carcinomas. Clin Cancer Res; 19(9) May 1, 2013; entire document	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "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 claim 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 02 August 2016 (02.08.2016)	Date of mailing of the international search report 07 SEP 2016	
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/32794

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. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	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. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 7-28 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. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input type="checkbox"/>	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	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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

(74)代理人 100105153

弁理士 朝倉 悟

(74)代理人 100120617

弁理士 浅野 真理

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(72)発明者 デイビッド、ビー・クリズマン

アメリカ合衆国メリーランド州、ゲイザーズバーグ、ウェルシュ、ロード、24305

(72)発明者 トッド、ヘンブロー

アメリカ合衆国メリーランド州、ゲイザーズバーグ、ニューベリー、ロード、24336

(72)発明者 シーノ、ティパランビル

アメリカ合衆国メリーランド州、フレデリック、シングルトン、テラス、3730

(72)発明者 ウェイ - リ、リャオ

アメリカ合衆国バージニア州、ハーンドン、シャノン、プレイス、1112

Fターム(参考) 2G041 CA01 EA04 FA12 FA21 GA03 HA01 HA02 JA04 LA08

2G045 AA01 AA13 AA16 AA24 AA25 AA26 BA13 BB01 BB03 BB22

CA25 CA26 CB01 CB02 CB03 CB07 CB08 CB26 DA20 DA30

DA36 FA34 FB06 JA01 JA06