

(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2020-521440

(P2020-521440A)

(43) 公表日 令和2年7月27日(2020.7.27)

(51) Int.Cl.

C 12 Q 1/6886 (2018.01)
C 12 Q 1/6851 (2018.01)
C 12 Q 1/686 (2018.01)
C 12 N 15/11 (2006.01)

F 1

C 12 Q 1/6886 Z
C 12 Q 1/6851 Z N A Z
C 12 Q 1/686 Z
C 12 N 15/11 Z

テーマコード(参考)

4 B 0 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

(21) 出願番号 特願2019-559727 (P2019-559727)
(86) (22) 出願日 平成30年5月30日 (2018.5.30)
(85) 翻訳文提出日 令和1年10月31日 (2019.10.31)
(86) 國際出願番号 PCT/EP2018/064172
(87) 國際公開番号 WO2018/220004
(87) 國際公開日 平成30年12月6日 (2018.12.6)
(31) 優先権主張番号 62/513,226
(32) 優先日 平成29年5月31日 (2017.5.31)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71) 出願人 591003013
エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー
F. HOFFMANN-LA ROCHE
E AKTIENGESELLSCHAFT
スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
グレンツアーヘルストラツセ124
(74) 代理人 100099759
弁理士 青木 篤
(74) 代理人 100123582
弁理士 三橋 真二
(74) 代理人 100117019
弁理士 渡辺 陽一
(74) 代理人 100141977
弁理士 中島 勝

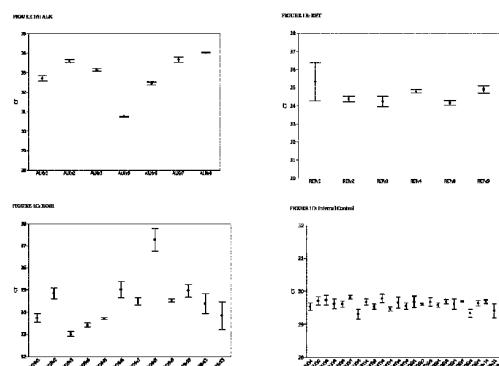
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ALK、RET、およびROS融合の多重PCR検出

(57) 【要約】

本明細書では、非常に高い感受性および特異性で多数の実施可能な遺伝子融合を多重検出する方法および組成物を提供する。本発明の方法および組成物は、随意に他の突然変異および融合と組み合わせて、ALK、RET、およびROS1遺伝子融合を検出することができる。

【選択図】図1A～図1D



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

マルチプレックスアッセイ組成物であって、

A．少なくとも1つのALK融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブと、

B．少なくとも1つのRET融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブと、

C．少なくとも1つのROS1融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブ、および

D．内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよびプローブと、
を含むマルチプレックスアッセイ組成物。

【請求項 2】

前記少なくとも1つのALK融合遺伝子が、EML4エクソン13 - ALKエクソン20、EML4エクソン20 - ALKエクソン20、EML4エクソン6a / b - ALKエクソン20、EML4エクソン2 - ALKエクソン20、EML4エクソン18 - ALKエクソン20、KIF5Bエクソン17 - ALKエクソン20、およびKIF5Bエクソン24 - ALKエクソン20からなる群から選択される、請求項1に記載の組成物。

【請求項 3】

Aが、2つ以上のALK融合遺伝子を増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブを含む、請求項1または2に記載の組成物。

【請求項 4】

Aが、EML4エクソン13 - ALKエクソン20、EML4エクソン20 - ALKエクソン20、EML4エクソン6a / b - ALKエクソン20、EML4エクソン2 - ALKエクソン20、EML4エクソン18 - ALKエクソン20、KIF5Bエクソン17 - ALKエクソン20、およびKIF5Bエクソン24 - ALKエクソン20を増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 5】

前記少なくとも1つのRET融合遺伝子が、KIF5Bエクソン15 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン16 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン22 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン23 - RETエクソン12、CCDC6エクソン1 - RETエクソン12、およびNCOA4エクソン6 - RETエクソン12からなる群から選択される、請求項1～4のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 6】

Bが、2つ以上のRET融合遺伝子を増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 7】

Bが、KIF5Bエクソン15 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン16 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン22 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン23 - RETエクソン12、CCDC6エクソン1 - RETエクソン12、およびNCOA4エクソン6 - RETエクソン12を増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 8】

前記少なくとも1つのROS1融合遺伝子が、CD74エクソン6 - ROS1エクソン34、CD74エクソン6 - ROS1エクソン32、EZREクソン10 - ROS1エクソン34、TPM3エクソン8 - ROS1エクソン35、SDC4エクソン4 - ROS1エクソン34、SDC4エクソン2 - ROS1エクソン32、SDC4エクソン4 - ROS1エクソン32、SLC34A2エクソン13 - ROS1エクソン34、SLC34A2エクソン13 - ROS1エクソン32、SLC34A2エクソン4 - ROS1エクソン32、SLC34A2エクソン4 - R

10

20

30

40

50

O S 1 エクソン 3 5、および L R I G 3 エクソン 1 6 - R O S 1 エクソン 3 5 からなる群から選択される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

C が、2つ以上の R O S 1 融合遺伝子を増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 10】

C が、C D 7 4 エクソン 6 - R O S 1 エクソン 3 4、C D 7 4 エクソン 6 - R O S 1 エクソン 3 2、E Z R エクソン 1 0 - R O S 1 エクソン 3 4、T P M 3 エクソン 8 - R O S 1 エクソン 3 5、S D C 4 エクソン 4 - R O S 1 エクソン 3 4、S D C 4 エクソン 2 - R O S 1 エクソン 3 2 v 2、S D C 4 エクソン 2 - R O S 1 エクソン 3 2、S L C 3 4 A 2 エクソン 1 3 - R O S 1 エクソン 3 4、S L C 3 4 A 2 エクソン 1 3 - R O S 1 エクソン 3 2 v 2、S L C 3 4 A 2 エクソン 4 - R O S 1 エクソン 3 2、S L C 3 4 A 2 エクソン 4 - R O S 1 エクソン 3 5、および L R I G 3 エクソン 1 6 - R O S 1 エクソン 3 5 を増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブを含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。 10

【請求項 11】

熱安定性 D N A ポリメラーゼをさらに含む、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 12】

逆転写酵素をさらに含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の組成物。 20

【請求項 13】

個体に由来する生体試料をさらに含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 14】

前記生体試料が、血漿に由来する R N A を含む、請求項 1 3 に記載の組成物。

【請求項 15】

マルチプレックスアッセイ組成物であって、

A . 少なくとも1つの A L K 融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブと、

B . 少なくとも1つの R E T 融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブ、および 30

C . 内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよびプローブと、を含むマルチプレックスアッセイ組成物。

【請求項 16】

前記少なくとも1つの A L K 融合遺伝子が、E M L 4 エクソン 1 3 - A L K エクソン 2 0、E M L 4 エクソン 2 0 - A L K エクソン 2 0、E M L 4 エクソン 6 a / b - A L K エクソン 2 0、E M L 4 エクソン 2 - A L K エクソン 2 0、E M L 4 エクソン 1 8 - A L K エクソン 2 0、K I F 5 B エクソン 1 7 - A L K エクソン 2 0、および K I F 5 B エクソン 2 4 - A L K エクソン 2 0 からなる群から選択される、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記少なくとも1つの R E T 融合遺伝子が、K I F 5 B エクソン 1 5 - R E T エクソン 1 2、K I F 5 B エクソン 1 6 - R E T エクソン 1 2、K I F 5 B エクソン 2 2 - R E T エクソン 1 2、K I F 5 B エクソン 2 3 - R E T エクソン 1 2、C C D C 6 エクソン 1 - R E T エクソン 1 2、および N C O A 4 エクソン 6 - R E T エクソン 1 2 からなる群から選択される、請求項 1 5 または 1 6 に記載の組成物。 40

【請求項 18】

熱安定性 D N A ポリメラーゼをさらに含む、請求項 1 5 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 19】

逆転写酵素をさらに含む、請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の組成物。 50

【請求項 20】

個体に由来する生体試料をさらに含む、請求項 15～19のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 21】

前記生体試料が、血漿に由来する RNA を含む、請求項 20 に記載の組成物。

【請求項 22】

がんを有する個体を同定する方法であって、

A . 前記個体に由来する生体試料を、請求項 1～12 および 15～19 のいずれか一項に記載の組成物と接触させるステップと、

B . 前記生体試料中の少なくとも 1 つの融合遺伝子の存在下において、増幅産物の形成及び検出が可能な条件下で増幅および検出を行うステップと、

C . 融合遺伝子がステップ B で検出された場合に、少なくとも 1 つの融合遺伝子が存在することを判定するステップと、

D . それによって、少なくとも 1 つの融合遺伝子が存在する場合、前記個体の試料中の少なくとも 1 つの融合遺伝子の存在はキナーゼ阻害剤療法に対する前記個体の感受性を示すステップと、を含む、方法。

【請求項 23】

がんを有する個体のキナーゼ阻害剤療法に対する反応の可能性を判定する方法であって、

A . 前記個体に由来する生体試料を、請求項 1～12 および 15～19 のいずれか一項に記載の組成物と接触させるステップと、

B . 前記生体試料中の少なくとも 1 つの融合遺伝子の存在下において、増幅産物の形成及び検出が可能な条件下で増幅および検出を行うステップと、

C . 融合遺伝子がステップ B で検出された場合に、少なくとも 1 つの融合遺伝子が存在することを判定するステップ、および

D . 前記個体が前記キナーゼ阻害剤療法に反応しそうであることを判定するステップと、を含む、方法。

【請求項 24】

前記生体試料が、DNA または RNA を含む、請求項 22 または 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記生体試料が、前記個体の血漿に由来する RNA である、請求項 22 または 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記増幅および検出が、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) を用いて行われる、請求項 22 または 23 に記載の方法。

【請求項 27】

前記キナーゼ阻害剤療法が、アレチニブ、クリゾチニブ、セリチニブ、ロラチニブ、ブリガチニブ、カボザンチニブ、アパチニブ、バンデタニブ、ポナチニブ、レンバチニブ、DS6051b、またはこれらの変異体からなる群から選択される、請求項 22～26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

がんを有する個体に由来する生体試料中の少なくとも 1 つの融合遺伝子の存在を判定する方法であって、

A . 前記個体に由来する生体試料を、請求項 1～12 および 15～19 のいずれか一項に記載の組成物と接触させるステップと、

B . 前記生体試料中の少なくとも 1 つの融合遺伝子の存在下において、増幅産物の形成及び検出が可能な条件下で増幅および検出を行うステップと、

C . 融合遺伝子がステップ B で検出された場合に、少なくとも 1 つの融合遺伝子の存在を判定するステップと、を含む、方法。

【請求項 29】

10

20

30

40

50

前記生体試料が、DNAまたはRNAを含む、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

前記生体試料が、前記個体の血漿に由来するRNAである、請求項28に記載の方法。

【請求項31】

前記増幅および検出が、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)を用いて行われる、請求項28に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

多くのがんは遺伝子融合と関連している(Yoshihara et al. (2015) Oncogene 34: 4845)。最も初期に報告された事例はおそらく、1960年代におけるBCR-ABLの慢性骨髓性白血病(CML)との関連である(Nowell and Hungerford (1960) J. Natl. Cancer Inst. 25: 85)。それ以降、さまざまな組織のがんにおいてさらに数百もの遺伝子融合が報告されている(Presner and Chinnaiyam (2009) Curr. Opin. Genet. Dev. 19: 82)。

【0002】

別の例としては、チロシン受容体キナーゼALK(未分化リンパ腫キナーゼ)が挙げられる。EML4-ALK(棘皮動物微小管関連たんぱく質様4未分化リンパ腫キナーゼ)融合は非小細胞肺がん(NSCLC)と関連している。この場合、ALKのN末端細胞外部分はEML4で置き換えられる(KIF5B、HIP1、KLC1、TFGもまた同様にALKと融合することができる)。得られた融合遺伝子の発現が、強いEML4プロモーターによって駆動されることで、ALKの細胞内チロシンキナーゼドメインはより高く発現する。さらに、EML4は、リガンドに依存しない二量体形成と、ALKチロシンキナーゼドメインの構成的活性化とをもたらすコイルドコイルを形成する。活性化キナーゼ融合のさらなる例としては、RET(トランスフェクション中に再配列)およびROS1が挙げられる。

【背景技術】

【0003】

遺伝子融合の検出を用いて治療を指示することができる。ほとんどの検出法は腫瘍組織の生検を必要とするが、多くのがん患者、特に後期のがん患者には実施することができない。生検組織切片における検出は、典型的には、蛍光インサイツハイブリダイゼーション法(FISH)または免疫組織化学検査(IHC)によって行われる。これらの試験は、部分的には切断プロセス中の剪断のために、高い偽陽性率およびバックグラウンドを有する。したがって、熟練した細胞学者は複数の組織切片を観察する必要があるために、衰弱した患者からの大量の生検が必要となる。同様に、RT-PCRを使用する障害は、例えばホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)形態における、腫瘍組織由来の遺伝子材料の量および質である。例えば、Liuet al. (2015) PLoS One 10:e0117032を参照されたい。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

検出には時間とリソースがかかるため、検査率は比較的低くなる。ALK融合に関連するがんは、クリゾチニブおよびセレチニブなどのALK阻害剤に対して非常に感受性が高い。KIF5BまたはCDC6などによる、転写中に再配列された(RET)遺伝子融合もまた、例えばパンデタニブによる治療に感受性である(Matsubara et al. (2007) J. Thorac. Oncol. 7: 1872を参照)。したがって、遺伝子融合の検査率が低いということは、治療の機会を大きく失うことを意味する。

【0005】

本明細書では、融合遺伝子、特にALK、RET、およびROS1を含む融合遺伝子を

10

20

30

40

50

検出するための多重方法および組成物が提供される。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本明細書では、(A)少なくとも1つのALK融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、(B)少なくとも1つのRET融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、(C)少なくとも1つのROS1融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、(D)内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよび標識プローブと、を含むマルチプレックスアッセイ組成物を提供する。さらに、(A)少なくとも1つのALK融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、(B)少なくとも1つのRET融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、(C)内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよび標識プローブと、を含むマルチプレックスアッセイ組成物を提供する。本明細書では、(A)少なくとも1つのRET融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、(B)内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよび標識プローブと、を含むマルチプレックスアッセイ組成物を提供する。

10

【0007】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのALK融合遺伝子は、EML4エクソン13 - ALKエクソン20、EML4エクソン20 - ALKエクソン20、EML4エクソン6a/b - ALKエクソン20、EML4エクソン2 - ALKエクソン20、EML4エクソン18 - ALKエクソン20、KIF5Bエクソン17 - ALKエクソン20、およびKIF5Bエクソン24 - ALKエクソン20からなる群から選択され；少なくとも1つのRET融合遺伝子は、KIF5Bエクソン15 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン16 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン22 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン23 - RETエクソン12、CDC6エクソン1 - RETエクソン12、およびNCOA4エクソン6 - RETエクソン12からなる群から選択され；少なくとも1つのROS1融合遺伝子は、CD74エクソン6 - ROS1エクソン34、CD74エクソン6 - ROS1エクソン32、EZREクソン10 - ROS1エクソン34、TPM3エクソン8 - ROS1エクソン35、SDC4エクソン4 - ROS1エクソン32、SDC4エクソン2 - ROS1エクソン32、SDC4エクソン2 - ROS1エクソン34、SDC4エクソン4 - ROS1エクソン34、SLC34A2エクソン13 - ROS1エクソン34、SLC34A2エクソン13 - ROS1エクソン32、SLC34A2エクソン4 - ROS1エクソン32、SLC34A2エクソン4 - ROS1エクソン35、およびLRIG3エクソン16 - ROS1エクソン35からなる群から、あらゆる組み合わせで選択される。

20

30

【0008】

いくつかの実施形態では、組成物は、2つ以上のALK融合遺伝子、2つ以上のRET融合遺伝子、および/または2つ以上のROS1融合遺伝子を増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、EML4エクソン13 - ALKエクソン20、EML4エクソン20 - ALKエクソン20、EML4エクソン6a/b - ALKエクソン20、KIF5Bエクソン15 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン16 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン22 - RETエクソン12、CD74エクソン6 - ROS1エクソン34、およびEZREクソン10 - ROS1エクソン34を増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブを含む。

40

【0009】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのALK融合遺伝子は、EML4エクソン13 - ALKエクソン20、EML4エクソン20 - ALKエクソン20、EML4エクソ

50

ン 6 a / b - A L K エクソン 2 0 、 E M L 4 エクソン 2 - A L K エクソン 2 0 、 E M L 4 エクソン 1 8 - A L K エクソン 2 0 、 K I F 5 B エクソン 1 7 - A L K エクソン 2 0 、 および K I F 5 B エクソン 2 4 - A L K エクソン 2 0 を含み；少なくとも 1 つの R E T 融合遺伝子は、 K I F 5 B エクソン 1 5 - R E T エクソン 1 2 、 K I F 5 B エクソン 1 6 - R E T エクソン 1 2 、 K I F 5 B エクソン 2 2 - R E T エクソン 1 2 、 K I F 5 B エクソン 2 3 - R E T エクソン 1 2 、 C C D C 6 エクソン 1 - R E T エクソン 1 2 、 および N C O A 4 エクソン 6 - R E T エクソン 1 2 を含み；少なくとも 1 つの R O S 1 融合遺伝子は、 C D 7 4 エクソン 6 - R O S 1 エクソン 3 4 、 C D 7 4 エクソン 6 - R O S 1 エクソン 3 2 、 E Z R エクソン 1 0 - R O S 1 エクソン 3 4 、 T P M 3 エクソン 8 - R O S 1 エクソン 3 5 、 S D C 4 エクソン 4 - R O S 1 エクソン 3 2 、 S D C 4 エクソン 2 - R O S 1 エクソン 3 4 、 S D C 4 エクソン 2 - R O S 1 エクソン 3 2 、 S D C 4 エクソン 4 - R O S 1 エクソン 3 2 、 S L C 3 4 A 2 エクソン 1 3 - R O S 1 エクソン 3 4 、 S L C 3 4 A 2 エクソン 1 3 - R O S 1 エクソン 3 2 、 S L C 3 4 A 2 エクソン 4 - R O S 1 エクソン 3 2 、 S L C 3 4 A 2 エクソン 4 - R O S 1 エクソン 3 5 、 および L R I G 3 エクソン 1 6 - R O S 1 エクソン 3 5 を含む。すなわち、アッセイ組成物は、リスト化された融合遺伝子の全てを増幅および検出するためのプライマーセットおよびプローブを含む。

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの A L K 融合遺伝子を増幅するためのプライマーセットについて、順方向プライマーおよび逆方向プライマーは、配列番号： 1 ~ 5 0 、ならびに配列番号： 5 2 ~ 6 1 および 1 8 1 からなる群から選択される配列をそれぞれ有する。いくつかの実施形態では、プローブが少なくとも 1 つの A L K 融合遺伝子を検出するために、プローブ配列は配列番号： 1 8 2 ~ 1 8 6 からなる群から選択される。順方向および逆方向プライマー配列ならびにプローブ配列を、あらゆる適切な組み合わせで一緒に使用して、あらゆる組み合わせにおける 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、または 7 個の A L K 融合変異体のいずれかを検出することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの R E T 融合遺伝子を増幅するためのプライマーセットについて、順方向プライマーおよび逆方向プライマーは、配列番号： 8 3 ~ 1 4 5 および 1 8 7 、ならびに配列番号： 1 6 1 ~ 1 8 0 からなる群から選択される配列をそれぞれ有する。いくつかの実施形態では、プローブが少なくとも 1 つの R E T 融合遺伝子を検出するために、プローブ配列は 1 8 9 ~ 1 9 4 からなる群から選択される。順方向および逆方向プライマー配列ならびにプローブ配列を、あらゆる組み合わせで一緒に使用して、あらゆる組み合わせにおける 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、または 6 個の R E T 融合変異体のいずれかを検出することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの R O S 1 融合遺伝子を検出するためのプライマーセットについて、順方向プライマーおよび逆方向プライマーは、配列番号： 1 9 5 ~ 2 1 2 および列番号： 2 1 3 ~ 2 2 6 からなる群から選択される配列をそれぞれ有する。いくつかの実施形態では、プローブが少なくとも 1 つの R O S 1 融合遺伝子を検出するために、プローブ配列は 2 2 7 ~ 2 3 0 および 5 1 からなる群から選択される。順方向および逆方向プライマー配列ならびにプローブ配列を、あらゆる組み合わせで一緒に使用して、あらゆる組み合わせにおける 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 、 1 0 、 1 1 、 1 2 、または 1 3 個の R O S 1 融合変異体のいずれかを検出することができる。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、内部標準を検出する標識プローブ上の標識は、融合遺伝子を検出する標識プローブ上の標識とは異なる。いくつかの実施形態では、全ての標識プローブ上の標識は、互いに異なる。いくつかの実施形態では、単一の標識プローブを用いて、少なくとも 1 つの A L K 融合遺伝子の全てを検出する。いくつかの実施形態では、単一の標識プローブを用いて、少なくとも 1 つの R E T 融合遺伝子の全てを検出する。いくつかの実施形態では、単一の標識プローブを用いて、少なくとも 1 つの R O S 1 融合遺伝子の全てを検出する。いくつかの実施形態では、標識プローブは、少なくとも 1 つのプライマーセット中のプライマーに結合される。いくつかの実施形態では、標識プローブは、プライマーセットから分離される。

10

20

30

40

50

【0012】

2つ以上のA L K融合遺伝子が増幅および検出されるいくつかの実施形態では、A L K融合遺伝子を増幅する全てのプライマーセットは、単一の共通プライマーを含む。2つ以上のA L K融合遺伝子が増幅および検出されるいくつかの実施形態では、プライマーセットは、ユニークプライマーを含む。2つ以上のR E T融合遺伝子が増幅および検出されるいくつかの実施形態では、R E T融合遺伝子を増幅する全てのプライマーセットは、単一の共通プライマーを含む。2つ以上のR E T融合遺伝子が増幅および検出されるいくつかの実施形態では、プライマーセットは、ユニークプライマーを含む。2つ以上のR O S 1融合遺伝子が増幅および検出されるいくつかの実施形態では、R O S 1融合遺伝子を増幅する全てのプライマーセットは、単一の共通プライマーを含む。2つ以上のR O S 1融合遺伝子が増幅および検出されるいくつかの実施形態では、プライマーセットは、ユニークプライマーを含む。

10

【0013】

本明細書はさらに、(A)少なくとも1つのA L K融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、(B)少なくとも1つのR E T融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、(C)内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよび標識プローブと、を含むマルチプレックスアッセイ組成物を提供する。本明細書はまた、(A)少なくとも1つのR E T融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、(B)内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよび標識プローブと、を含むマルチプレックスアッセイ組成物も提供する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのR O S 1融合遺伝子が増幅されて、別個のマルチプレックスアッセイにおいて検出される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのA L K融合遺伝子は、E M L 4エクソン13 - A L Kエクソン20、E M L 4エクソン20 - A L Kエクソン20、E M L 4エクソン6 a / b - A L Kエクソン20、E M L 4エクソン2 - A L Kエクソン20、E M L 4エクソン18 - A L Kエクソン20、K I F 5 Bエクソン17 - A L Kエクソン20、およびK I F 5 Bエクソン24 - A L Kエクソン20からなる群から選択され；少なくとも1つのR E T融合遺伝子は、K I F 5 Bエクソン15 - R E Tエクソン12、K I F 5 Bエクソン16 - R E Tエクソン12、K I F 5 Bエクソン22 - R E Tエクソン12、K I F 5 Bエクソン23 - R E Tエクソン12、C C D C 6エクソン1 - R E Tエクソン12、およびN C O A 4エクソン6 - R E Tエクソン12からなる群から、あらゆる組み合わせで選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのR O S 1融合遺伝子は、C D 7 4エクソン6 - R O S 1エクソン34、C D 7 4エクソン6 - R O S 1エクソン32、E Z Rエクソン10 - R O S 1エクソン34、T P M 3エクソン8 - R O S 1エクソン35、S D C 4エクソン2 - R O S 1エクソン34、S D C 4エクソン4 - R O S 1エクソン32、S D C 4エクソン2 - R O S 1エクソン32、S D C 4エクソン4 - R O S 1エクソン34、S L C 3 4 A 2エクソン13 - R O S 1エクソン34、S L C 3 4 A 2エクソン13 - R O S 1エクソン32、S L C 3 4 A 2エクソン4 - R O S 1エクソン32、S L C 3 4 A 2エクソン4 - R O S 1エクソン35、およびL R I G 3エクソン16 - R O S 1エクソン35からなる群から選択される。

20

30

40

【0014】

いくつかの実施形態では、組成物は、2つ以上のA L K融合遺伝子および2つ以上のR E T融合遺伝子を増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブを含む。いくつかの実施形態では、組成物は、E M L 4エクソン13 - A L Kエクソン20、E M L 4エクソン20 - A L Kエクソン20、E M L 4エクソン6 a / b - A L Kエクソン20、K I F 5 Bエクソン15 - R E Tエクソン12、K I F 5 Bエクソン16 - R E Tエクソン12、およびK I F 5 Bエクソン22 - R E Tエクソン12を増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよびプローブを含む。

50

【0015】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのALK融合遺伝子は、EML4エクソン13 - ALKエクソン20、EML4エクソン20 - ALKエクソン20、EML4エクソン6a / b - ALKエクソン20、EML4エクソン2 - ALKエクソン20、EML4エクソン18 - ALKエクソン20、KIF5Bエクソン17 - ALKエクソン20、およびKIF5Bエクソン24 - ALKエクソン20を含み；少なくとも1つのRET融合遺伝子は、KIF5Bエクソン15 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン16 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン22 - RETエクソン12、KIF5Bエクソン23 - RETエクソン12、CCDC6エクソン1 - RETエクソン12、およびNCOA4エクソン6 - RETエクソン12を含む。

【0016】

10

いくつかの実施形態では、内部標準を検出する標識プローブ上の標識は、融合遺伝子を検出する標識プローブ上の標識とは異なる。いくつかの実施形態では、全ての標識プローブ上の標識は、互いに異なる。いくつかの実施形態では、単一の標識プローブを用いて、少なくとも1つのALK融合遺伝子の全てを検出する。いくつかの実施形態では、単一の標識プローブを用いて、少なくとも1つのRET融合遺伝子の全てを検出する。いくつかの実施形態では、標識プローブは、少なくとも1つのプライマーセット中のプライマーに結合される。いくつかの実施形態では、標識プローブは、プライマーセットから分離される。

【0017】

20

2つ以上のALK融合遺伝子が増幅および検出されるいくつかの実施形態では、ALK融合遺伝子を増幅する全てのプライマーセットは、単一の共通プライマーを含む。2つ以上のALK融合遺伝子が増幅および検出されるいくつかの実施形態では、プライマーセットは、ユニークプライマーを含む。2つ以上のRET融合遺伝子が増幅および検出されるいくつかの実施形態では、RET融合遺伝子を増幅する全てのプライマーセットは、単一の共通プライマーを含む。2つ以上のRET融合遺伝子が増幅および検出されるいくつかの実施形態では、プライマーセットは、ユニークプライマーを含む。

【0018】

30

本開示のアッセイに使用することができる内部標準の例としては、SDHA（コハク酸デヒドロゲナーゼ）、LDHA（乳酸デヒドロゲナーゼA）、NONO、PGK（ホスホグリセリン酸キナーゼ1）、PPIH、Hprt1、ベータアクチン、GADPH、ACTB、および16S rRNAが挙げられるが、これらに限定されない。

【0019】

30

いくつかの実施形態では、組成物は、DNAポリメラーゼ、例えばTaqまたはTaq誘導体などの熱安定性DNAポリメラーゼをさらに含む。いくつかの実施形態では、組成物は、逆転写酵素をさらに含む。いくつかの実施形態では、組成物は、dNTPをさらに含む。いくつかの実施形態では、組成物は、DNAポリメラーゼおよび逆転写酵素による重合を受けやすい緩衝液をさらに含む。

【0020】

40

いくつかの実施形態では、組成物は、個体または個体の群に由来する生体試料をさらに含む。いくつかの実施形態では、個体は、がん、例えば、肺がん（例として、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺扁平上皮がん、肺腺がん）、膀胱がん、神経膠芽腫、頭頸部がん、神経膠腫、甲状腺がん、卵巣がん、白血病、リンパ腫、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、または乳がんと診断されている。

【0021】

50

いくつかの実施形態では、試料は、濃縮されるかまたは単離された核酸、例えば、DNAまたはRNAである。いくつかの実施形態では、試料は、RNA、例えば、血液（例として、血清、血漿、他の血液画分）、気管支肺胞洗浄、または組織生検から単離される。いくつかの実施形態では、生体試料は、融合遺伝子を含むポリヌクレオチドを100nM以下、例えば、0.01 ~ 100nM、0.01 ~ 25nM、0.01 ~ 5nM、0.02 ~ 0.5nM、または0.02 ~ 0.1nM含む。

【0022】

さらに、個体、例えばがんと診断された個体を治療する方法であって、個体に由来する生体試料を、本明細書に記載されたマルチプレックスアッセイ組成物のいずれか（例えば、（A）少なくとも1つのA L K融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（B）少なくとも1つのR E T融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（C）少なくとも1つのR O S 1融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（D）内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよび標識プローブと、を含む）と接触させるステップと、生体試料中の少なくとも1つの融合遺伝子の存在下において、増幅産物の形成及び検出が可能な条件下で増幅および検出を行うステップと、融合遺伝子が検出された場合に、少なくとも1つの融合遺伝子が存在することを判定するステップと、少なくとも1つの融合遺伝子が存在する場合に、個体を治療するステップと、を含む方法を提供する。さらに、個体、例えばがんと診断された個体を治療する方法であって、個体に由来する生体試料を、本明細書に記載されたマルチプレックスアッセイ組成物のいずれか（例えば、（A）少なくとも1つのA L K融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（B）少なくとも1つのR E T融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（C）内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよび標識プローブと、を含む）と接触させるステップと、生体試料中の少なくとも1つの融合遺伝子の存在下において、増幅産物の形成及び検出が可能な条件下で増幅および検出を行うステップと、融合遺伝子が検出された場合に、少なくとも1つの融合遺伝子が存在することを判定するステップと、少なくとも1つの融合遺伝子が存在する場合に、個体を治療するステップと、を含む方法を提供する。さらに、個体、例えばがんと診断された個体を治療する方法であって、個体に由来する生体試料を、本明細書に記載されたマルチプレックスアッセイ組成物のいずれか（例えば、（A）少なくとも1つのR E T融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（B）内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよび標識プローブと、を含む）と接触させるステップと、生体試料中の少なくとも1つの融合遺伝子の存在下において、増幅産物の形成及び検出が可能な条件下で増幅および検出を行うステップと、融合遺伝子が検出された場合に、少なくとも1つの融合遺伝子が存在することを判定するステップと、少なくとも1つの融合遺伝子が存在する場合に、個体を治療するステップと、を含む方法を提供する。

【0023】

いくつかの実施形態では、治療は、キナーゼ阻害剤、例えば、アレチニブ、クリゾチニブ、セリチニブ、ロラチニブ、ブリガチニブ、カボザンチニブ、アパチニブ、バンデタニブ、ポナチニブ、レンバチニブ、D S 6 0 5 1 b、またはこれらの変異体もしくは組合せなどの選択的キナーゼ阻害剤を用いる。いくつかの実施形態では、治療コースは、放射線療法または化学療法（例えば、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ドセタキセル）を含む。いくつかの実施形態では、治療は、G S K 1 8 3 8 7 0 5 A、T A E - 6 8 4、C E P - 1 4 0 8 3、A P 2 6 1 1 3、N M S - E 6 2 8、ソラフェニブ、バンデタニブ、モテサニブ、スニチニブ、およびX L - 1 8 4を用いる（例えば、M o l o g n i (2 0 1 1) C u r r . M e d . C h e m . 1 8 : 1 6 2 を参照）。

【0024】

いくつかの実施形態では、個体は、例えば、融合遺伝子増幅産物の量が増加もしくは減少するかどうか、または異なる融合遺伝子が検出されるかどうかを判定するために、治療の間モニターされる。いくつかの実施形態では、治療は、融合遺伝子増幅産物の量が変化するかどうか、または異なる融合遺伝子が検出されるかどうかによって変更される。例えば、最初に検出された融合遺伝子の量が減少しているが、がんが進行している場合には、例えば放射線または化学療法といった標的化されにくいように治療を変更することができる。個体の状態が改善すれば、治療を減らすことができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、生体試料は、DNAまたはRNA、例えば分離または精製された核酸を含む。いくつかの実施形態では、生体試料は、血液、例えば、血漿、血清、または他の血液画分に由来するRNAである。いくつかの実施形態では、増幅および検出は、qRT-PCRを用いて行われる。

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、個体は、肺がん（例として、非小細胞肺がん（NSCLC）、肺扁平上皮がん、肺腺がん）、膀胱がん、神経膠芽腫、頭頸部がん、神経膠腫、甲状腺がん、卵巣がん、白血病、リンパ腫、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、または乳がんと診断される。

10

【 0 0 2 7 】

さらに、個体、例えばがんと診断された個体に由来する試料中の少なくとも1つの融合遺伝子の存在を判定する方法であって、個体に由来する生体試料を、本明細書に記載されたマルチプレックスアッセイ組成物のいずれか（例えば、（A）少なくとも1つのALK融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（B）少なくとも1つのRET融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（C）少なくとも1つのROS1融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（D）内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよび標識プローブと、を含む）と接触させるステップと、生体試料中の少なくとも1つの融合遺伝子の存在下において、増幅産物の形成及び検出が可能な条件下で増幅および検出を行うステップと、融合遺伝子が検出された場合に、少なくとも1つの融合遺伝子が存在することを判定するステップと、を含む方法を提供する。さらに、個体、例えばがんと診断された個体に由来する試料中の少なくとも1つの融合遺伝子の存在を判定する方法であって、個体に由来する生体試料を、本明細書に記載されたマルチプレックスアッセイ組成物のいずれか（例えば、（A）少なくとも1つのALK融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（B）少なくとも1つのRET融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（C）内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよび標識プローブと、を含む）と接触させるステップと、生体試料中の少なくとも1つの融合遺伝子の存在下において、増幅産物の形成及び検出が可能な条件下で増幅および検出を行うステップと、融合遺伝子が検出された場合に、少なくとも1つの融合遺伝子が存在することを判定するステップと、を含む方法を提供する。さらに、個体、例えばがんと診断された個体に由来する試料中の少なくとも1つの融合遺伝子の存在を判定する方法であって、個体に由来する生体試料を、本明細書に記載されたマルチプレックスアッセイ組成物のいずれか（例えば、（A）少なくとも1つのRET融合遺伝子を特異的に増幅および検出する少なくとも1つのプライマーセットおよび標識プローブと、（B）内部標準を特異的に増幅および検出するプライマーセットおよび標識プローブと、を含む）と接触させるステップと、生体試料中の少なくとも1つの融合遺伝子の存在下において、増幅産物の形成及び検出が可能な条件下で増幅および検出を行うステップと、融合遺伝子が検出された場合に、少なくとも1つの融合遺伝子が存在することを判定するステップと、を含む方法を提供する。

20

30

40

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態では、生体試料は、DNAまたはRNA、例えば分離または精製された核酸を含む。いくつかの実施形態では、生体試料は、血液、例えば、血漿、血清、または他の血液画分に由来するRNAである。いくつかの実施形態では、増幅および検出は、qRT-PCRを用いて行われる。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、個体は、肺がん（例として、非小細胞肺がん（NSCLC）、肺扁平上皮がん、肺腺がん）、膀胱がん、神経膠芽腫、頭頸部がん、神経膠腫、甲状腺

50

がん、卵巣がん、白血病、リンパ腫、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、または乳がんと診断される。

【0030】

いくつかの実施形態では、本方法は、少なくとも1つの融合遺伝子が検出される場合に、治療コースを決定するステップをさらに含む。いくつかの実施形態では、治療は、キナーゼ阻害剤、例えば、アレチニブ、クリゾチニブ、セリチニブ、ロラチニブ、ブリガチニブ、カボザンチニブ、アパチニブ、バンデタニブ、ポナチニブ、レンバチニブ、D S 6 0 5 1 b、またはこれらの変異体もしくは組合せなどの選択的キナーゼ阻害剤を用いる。いくつかの実施形態では、治療コースは、放射線療法または化学療法（例えば、シスプラチン、カルボプラチン、パクリタキセル、ドセタキセル）を含む。いくつかの実施形態では、治療は、G S K 1 8 3 8 7 0 5 A、T A E - 6 8 4、C E P - 1 4 0 8 3、A P 2 6 1 1 3、N M S - E 6 2 8、ソラフェニブ、バンデタニブ、モテサニブ、スニチニブ、およびX L - 1 8 4 を用いる。

10

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1A】図1Aは、示されるA L K 融合変異体（F A M）が、0.1 n g のW T R N A (n = 3) 中において50コピーで検出可能であることを示す。

【図1B】図1Bは、示されるR E T 融合変異体（H E X）が、0.1 n g のW T R N A (n = 3) 中において50コピーで検出可能であることを示す。

【図1C】図1Cは、示されるR O S 1 融合変異体（J A 2 7 0）が、0.1 n g のW T R N A (n = 3) 中において50コピーで検出可能であることを示す。

20

【図1D】図1Dは、各入力R N A の内部標準C t 値を示す。

【図2】図2は、本明細書中に記載されるマルチプレックスアッセイにおける、A L K 融合およびR E T 融合の検出限界を示す。このアッセイは、U H R で希釈した25コピーの融合転写物を検出することができる。

【図3】図3は、代表的なA L K 融合変異体の直線性データを示す。

【図4】図4は、代表的なR E T 融合変異体の直線性データを示す。

【図5】図5は、代表的なR O S 1 融合変異体の直線性データを示す。

【図6】図6は、代表的なA L K 融合変異体のL O D データを示す。

【図7】図7は、代表的なR E T 融合変異体のL O D データを示す。

30

【図8】図8は、代表的なR O S 1 融合変異体のL O D データを示す。

【発明を実施するための形態】

【0032】

I . 序文

本発明者らは、遺伝子領域間の融合を検出する、新規で定量的かつ多重的な方法を発見した。現在開示されている方法は、非侵襲的に収集することができる少量の患者試料、例えば血漿に由来する循環遊離R N A (c f R N A) のみを必要とする。

【0033】

腫瘍に由来する循環核酸の量が限られているため、現在の検査では生検または大量の血漿のいずれかが必要である。現在記載されている方法は、がんおよび治療への応答を予測する複数の遺伝子融合を検出するための、非常に高感度（最大約25コピーまで）な1チューブアッセイを可能にする。本アッセイは、治療および／または進行中のモニタリングおよびサーベイランスと同様に、融合変異体の同定に用いることができる。

40

【0034】

I I . 定義

「遺伝子融合」とは、以前は別々であった2つの染色体位置が連結して形成されたハイブリッド染色体配列である。融合は、同じ染色体上の遺伝子間（例えば、間質性欠失もしくは染色体逆位）でも、または異なる染色体上の遺伝子間（例えば、転座）でも起こりうる。

【0035】

50

「融合遺伝子」は、以前は別々であった2つの遺伝子が連結して形成されたハイブリッド遺伝子であり、腫瘍ゲノムの構造的再配列および／または変異体をもたらす。融合遺伝子は、必ずしも両方の遺伝子からのコード配列を含む必要はないが、遺伝子の1つ、例えばプロモーターまたは3'非翻訳領域からの非コード配列を含むことができる。「遺伝子1」、「遺伝子2」、「遺伝子A」、「遺伝子B」として融合遺伝子を含む遺伝子の名称は、融合を構成する遺伝子を区別するために使用され、必ずしも融合における遺伝子の位置を示す必要はない。ALK融合、RET融合、およびROS1融合という用語は、ALK、RET、およびROS1をメンバーとして含む融合遺伝子をそれぞれ指す。

【0036】

「融合部位」、「融合点」、「限界点」、および同様の用語は、ある遺伝子または遺伝的位置に由来するヌクレオチドが、別の遺伝子または遺伝的位置に由来するヌクレオチドに隣接して見出される、遺伝的な融合における点を指す。10

【0037】

用語「標的領域」、「標的部位」、「標的断片」、および同様の用語は、増幅および／または分析される標的核酸配列の領域を指す。

【0038】

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」、および「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオチド（例えば、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド）のポリマーを指し、天然に存在する（アデノシン、グアニジン、シトシン、ウラシル、およびチミジン）、天然に存在しない、ならびに修飾された核酸を含む。この用語はポリマーの長さ（例えば、モノマーの数）によって制限されない。核酸は、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、一般的には5' - 3' ホスホジエステル結合を含有するが、ある場合には、ヌクレオチド類似体は他の結合を有していてもよい。モノマーは、典型的にはヌクレオチドと呼ばれる。用語「非天然ヌクレオチド」または「修飾ヌクレオチド」とは、修飾された窒素塩基、糖、もしくはリン酸基を含有するヌクレオチド、またはその構造中に非天然部分を組み込むヌクレオチドを指す。非天然ヌクレオチドの例には、ジデオキシヌクレオチド、ビオチン化ヌクレオチド、アミノ化ヌクレオチド、脱アミノ化ヌクレオチド、アルキル化ヌクレオチド、ベンジル化ヌクレオチド、およびフルオロフルオロ標識ヌクレオチドが含まれる。20

【0039】

用語「プライマー」とは、好適な条件下において核酸ポリメラーゼによるポリヌクレオチド鎖合成の開始点として作用する、短い核酸（オリゴヌクレオチド）を指す。ポリヌクレオチド合成および増幅反応は、典型的には、適切な緩衝液、dNTPおよび／またはrNTP、ならびに1つ以上の随意の補助因子を含み、好適な温度で行われる。プライマーは、典型的には、標的配列に対して少なくとも実質的に相補的である少なくとも1つの標的ハイブリダイズ領域を含む。この領域は、典型的には、長さが約15～約40のヌクレオチドである。「プライマー対」とは、標的配列の逆鎖に対して相補的であって、標的配列を増幅するように設計された順方向プライマーおよび逆方向プライマー（5'プライマーおよび3'プライマーと呼ばれることがある）を指す。順方向および逆方向プライマーは、標的配列、例えば約10～5000ヌクレオチド、約25～500ヌクレオチド、または約60～120ヌクレオチド上で互いに増幅可能な距離内に配置される。「プライマーセット」とは、1つ以上のプライマー対、または少なくとも1つの順方向プライマーと少なくとも1つの逆方向プライマーとの組み合わせを指す。例えば、プライマーセットは、3つの異なる増幅産物が潜在的に產生され得るように、3つの順方向プライマーおよび1つの逆方向プライマーを含むことができる。30

【0040】

融合部位（または限界点）の5'（または3'）である配列（または遺伝子の一部）に特異的なプライマーセットまたはプライマー対とは、融合部位または限界点を含まない配列を増幅するために使用されるプライマーを指す。40

【0041】

本明細書中で使用される場合、「プローブ」とは、特異的に意図された標的生体分子、50

例えばプローブによって結合されるか、捕捉されるか、またはハイブリダイズされる対象の核酸配列と、選択的に結合することができるあらゆる分子を意味する。プローブは、典型的には、天然に存在しない部分、例えばフルオロフォア、発色団、親和性タグ（例えば、ストレプトアビジンもしくはビオチン）、および／または失活剤で標識される。

【0042】

単語「相補的」または「相補性」とは、ポリヌクレオチド中の核酸が、第2のポリヌクレオチド中の別の核酸と塩基対を形成する能力を指す。例えば、配列A-G-T (RNAではA-G-U) は、配列T-C-A (RNAではU-C-A) に相補的である。相補性は、いくつかの核酸のみが塩基対形成に従って一致する部分的なものであってもよいし、または全ての核酸が塩基対形成に従って一致する完全なものであってもよい。プローブまたはプライマーは、それが標的配列に対して少なくとも部分的に相補的である場合、標的配列に対して「特異的」と考えられる。条件に依存して、標的配列に対する相補性の程度は、典型的には、プライマーのような短い核酸（例えば、80%、90%、95%、またはそれ以上）の方が長い配列よりも高い。

10

【0043】

「同一の」または「パーセント同一性 (percent identity)」という用語は、2つ以上の核酸、または2つ以上のポリペプチドとの関連においては、BLASTまたはBLAST 2.0配列比較アルゴリズムを使用してデフォルトパラメータで測定されるか、もしくは手動アラインメントおよび目視検査によって測定されたものと同一である（例えば、比較ウインドウまたは指定領域上での最大一致に対して比較および整列された場合、約60%同一、例えば65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の同一性の少なくともいずれか）か、または特定の割合のヌクレオチドまたはアミノ酸を有する2つ以上の配列またはサブシーケンスを指す。例えば、NCBIのウェブサイトである、ncbi.nlm.nih.gov / BLASTを参照されたい。したがって、このような配列を「実質的に同一」であるという。パーセント同一性は、典型的には、欠失および／または付加を有する配列ならびに置換を有する配列にその定義が適用されるように、最適に整列された配列にわたって決定される。当技術分野で一般的に使用されるアルゴリズムは、ギャップおよび同様のものなどについて説明する。典型的には、同一性は、少なくとも約8～25アミノ酸長もしくはヌクレオチド長である配列を含む領域、または50～100アミノ長酸もしくはヌクレオチド長である領域、または参照配列の全長にわたって存在する。

20

【0044】

用語「対立遺伝子」とは、遺伝子の配列変異体を指す。1つ以上の遺伝的差異が対立遺伝子を構成することができる。

30

【0045】

用語「キット」とは、本明細書中に記載されるRNAまたはDNAを特異的に増幅、捕捉、タグ付け／変換、または検出するための、核酸プローブ、プローブプール、または同様のものといった、少なくとも1つの試薬を含むあらゆる製品（例えば、包装または容器）を指す。

40

【0046】

用語「増幅条件」とは、ハイブリダイゼーションおよびプライマーの錆型依存性伸長を可能にする核酸増幅反応（例えば、PCR増幅）における条件を指す。用語「単位複製配列」とおよび「増幅産物」とは、標的核酸配列の全部または断片を含有し、あらゆる好適な増幅方法によるインビトロ増幅の産物として形成される核酸分子を指す。所与のアンプリコンの境界は、典型的には、増幅に使用される順方向および逆方向プライマーの相補的部分の位置によって規定される。好適なPCR条件は、PCR Strategies (Innis et al., 1995, Academic Press, San Diego, CA) at Chapter 14; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al.

50

. , Academic Press , N Y , 1990) に記載されている。

【0047】

用語「熱安定性核酸ポリメラーゼ」または「熱安定性ポリメラーゼ」とは、例えば大腸菌由来のポリメラーゼと比較した場合、高温で比較的安定であるポリメラーゼ酵素を指す。熱安定性ポリメラーゼは、ポリメラーゼ連鎖反応（「PCR法」）に典型的な温度サイクル条件下における使用に好適である。例示的な熱安定性ポリメラーゼとしては、Thermus thermophilus、Thermus caldophilus、Thermus sp. Z05（例えば、米国特許第5,674,738号）、およびThermus sp. Z05ポリメラーゼ、Thermus aquaticus、Thermus flavus、Thermus filiformis、Thermus sp. ssp. 17、Deinococcus radiodurans、Hot Spring ファミリーB / クローン7、Bacillus stearothermophilus、Bacillus caldotenax、Thermotoga maritima、Thermotoga neapolitana、およびThermosiphon africanusの変異体、ならびにこれらの改変版が含まれる。
10

【0048】

用語「試料」または「生体試料」とは、個体由来の核酸を含有するか、または含有すると推定されるあらゆる組成物を指す。この用語は、細胞、組織、または血液の精製または分離された構成要素、例えば、DNA、RNA、たんぱく質、無細胞部分、または細胞溶解物を含む。いくつかの実施形態では、分析は血液から単離された血漿試料について行われる。用語「患者の血液中で検出される」および「患者の血漿中で検出される」とは、患者から血液が得られ、そこから得られた血漿が分析に使用されることを意味するために、互換的に使用される。試料はまた、他の種類の生体試料、例えば、皮膚、血漿、血清、全血、および血液構成要素（例として、血小板、バフィーコート）、唾液、尿、涙、精液、膿液、組織生検、ならびにパラフィン包埋組織を含む他の体液および組織を指すことができる。試料はまた、細胞株を含む個体から得られた細胞のインビトロ培養物の成分および構成要素も含み得る。
20

【0049】

「対照（control）」試料または値とは、試験試料または試験条件との比較のための基準、通常は既知の基準として機能する試料を指す。例えば、試験試料は、試験条件、例えばがんを有することが疑われる個体から採取することができ、既知の条件、例えばがんを有しない個体（陰性対照）由来の試料、またはがんおよび／もしくは特定の遺伝子異常を有することが知られている個体（陽性対照）由来の試料と比較することができる。本開示の文脈において、陰性対照の例は、既知の健康な（非がん、非変異）個体由来意の生体試料であってもよく、陽性対照の例は、特定の遺伝子融合を有することが知られている患者または細胞株由来の生体試料であってもよい。対照はまた、平均値、または多数のテスト試験もしくは結果から収集された範囲を表すことができる。反応条件に対して対照を調製することもできる。例えば、核酸の存在についての陽性対照は、試料中に存在することが知られている配列を検出するプライマーまたはプローブを含み得るが、一方で陰性対照は核酸を含まないであろう。当業者は、対照があらゆる数のパラメータを評価するために設計され得ることを認識するであろう。例えば、薬理学的データ（例として、半減期）または治療手段（例として、有益性および／または副作用の比較）に基づいて治療上の有益性を比較するために、対照を考案することができる。対照はインビトロ用途のために設計してもよい。当業者であれば、所与の状況においてどの対照が有用であるかを理解し、対照値との比較に基づいてデータを分析することができるであろう。対照はデータの重要性を判断するのにも役立つ。例えば、所与のパラメータの値が対照群で広く変動している場合、試験試料の変動は有意であるとはみなされない。
30
40

【0050】

「内部標準」（IC）とは、試料中に存在すると予想される核酸、例えば、試料にわたり極めて標準的なレベルで発現または存在するハウスキーピング遺伝子を指す。内部標準
50

を用いて、試料中の核酸の量および品質を他の試料のものと標準化し、増幅および検出反応が機能していることを確実にすることができます。内部標準の例としては、SDH(コハク酸デヒドロゲナーゼ)、LDHA(乳酸デヒドロゲナーゼA)、NONO、PGK(ホスホグリセリン酸キナーゼ1)、PPIH、Hprt1、ベータアクチン、GADPH、ACTB、および16S rRNAが挙げられる。

【0051】

用語「診断」とは、対象ががんまたはある種のがん(例えば、遺伝子融合の結果)などの障害を有する相対的な可能性を指す。同様に、用語「予後」とは、ある種の将来的な結果が対象内で生じ得る相対的 possibility を指す。例えば、本開示の文脈において、診断は、がんの分類または個体が特定の治療に応答する可能性を指すことができる。用語は、医学的診断の分野の当業者によって理解されるように、絶対的であることを意図してはいない。

10

【0052】

「治療への反応」、「処置への反応」、「寛解」、および同様の用語は、症状の重症度のあらゆる低減を指す。がんを治療する場合、治療とは、例えば、腫瘍の大きさ、がん細胞の数、成長速度、転移活性、非癌細胞の細胞死の減少、恶心、および他の化学療法または放射線療法の副作用の減少などを指すことができる。用語「治療する」および「予防する」は、絶対的な用語であることを意図していない。治療および予防とは、発症のあらゆる遅延、症状の寛解、患者生存率の改善、生存期間または生存率の増加などを指すことができる。治療および予防は、完全(検出不能なレベルの新生細胞)または部分的であってもよく、その結果、患者の新生物は、治療を行わなかった場合よりも少なくなる。治療の効果は、治療を受けていない個体もしくは個体のプール(例えば、同じ遺伝子融合を有する個体)、または治療前もしくは治療中の異なる時点の同じ患者で比較することができる。いくつかの態様では、疾患の重症度は、例えば投与前の個体または治療を受けていない対照個体と比較して、少なくとも10%低下する。いくつかの態様では、疾患の重症度は、少なくとも25%、50%、75%、80%、もしくは90%低減されるか、またはいくつかの場合においては、標準的な診断技術を用いてもはや検出可能でない程度まで低減される。

20

【0053】

患者に関して、「治療する」および「投与する」という用語は、特定の治療を患者に推薦、提供、または処方することを含み、直接、患者を物理的に治療することに限定されない。

30

【0054】

用語「閾値サイクル」または「C_t」とは、相対濃度の尺度であって、リアルタイムPCR(qPCRとも呼ばれる)において一般的に使用される。C_tとは、増幅曲線と閾値線との交点を指す。閾値線は、バックグラウンドより上で信号を検出することができる時点、または増幅反応が対数期に入る時点にしばしば設定される。C_tは、標的の濃度および増幅条件、例えば、検出可能な標識および増幅効率に対する条件の効果に影響され得る。高いC_tは、低い標的濃度または非効率的な増幅に起因して、閾値に達するまでのより長い時間に対応する。

40

【0055】

「個体」、「対象」、「患者」、および同様の用語は、示されている場合を除き、交換可能に使用され、ヒトを指す。非ヒト霊長類、ならびにウサギ、ラット、マウス、イヌ、ネコ、および他の哺乳動物種といった他の哺乳動物を対象とみなしてもよい。この用語は、必ずしも対象が特定の疾患と診断されていることを示す必要がないが、典型的には、医学的監督下にある個体を指す。患者は、治療、モニタリング、既存の治療レジメンの調整または変更などを求めている場合がある。患者には、療を受けていない個体、現在治療を受けている個体、手術を受けた個体、および治療を中止した個体が含まれ得る。

【0056】

「標識」、「タグ」、「検出可能な部分」、および同様の用語は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、または他の物理的手段によって検出可能な組成物を指

50

す。例えば、有用な標識としては、蛍光色素、発光剤、放射性同位元素（例として、³²P、³H）、電子密集試薬（electron-dense reagent）、または親和性塩基部分（affinity-based moiety）、例えば、精製用の「His 標識」もしくはビオチンと相互作用する「ストレプトアビシン標識」が含まれる。

【0057】

別途定義されない限り、本明細書で使用される技術的および科学的用語は、当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。例えば、Pfaffl, Methods: The ongoing evolution of qPCR, vol. 50 (2010); van Pelt-Verkuil et al. Principles and Technical Aspects of PCR Amplification, Springer (2010); Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier (4th ed. 2007); Sambrook et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, N.Y. 1989) を参照されたい。用語「ひとつの(a)」または「ひとつの(an)」とは、「1つ以上」を意味するように意図されている。用語「含む(comprise)」、「含む(comprises)」、および「含む(comprising)」は、ステップまたは要素の記載の前にある場合、さらなるステップまたは要素の追加が随意であって、除外されないことを意味するように意図される。

10

20

30

40

【0058】

I II I . 融合遺伝子

数々のがん関連融合遺伝子が知られており、あらゆる種類のがんに発生する。例としては、肺がん（例として、非小細胞肺がん（NSCLC）、肺扁平上皮がん、肺腺がん）、膀胱がん、神経膠芽腫、頭頸部がん、神経膠腫、甲状腺がん、卵巣がん、白血病、リンパ腫、前立腺がん、膵臓がん、腎がん、および乳がんが含まれる。がん関連融合遺伝子は一般に、融合の1つのメンバーが増殖促進シグナル伝達経路に関するキナーゼであり、もう一方のメンバーが発現またはシグナル伝達の上昇または構成に寄与する場合に生じる。これが、ALK、RET、およびROS1の融合の場合である。ALKの一般的な融合パートナーは、EML4 および KIF5B である。RETの一般的な融合パートナーは、KIF5B、CCDC6、およびNCOA4 である。いくつかの遺伝子は、ROS1と融合することが知られており、これには、CD74、EZR、TPM3、SDC4、SLC34A2、およびLRIG3 が含まれる（例えば、Yoshihara et al. (2015) Oncogene 34 : 4845 を参照）。

【0059】

本発明の組成物および方法は、ALK、RET、およびROS1融合を検出するためのマルチプレックスアッセイの設計に焦点を当てる。がん患者では、侵襲的生検または過剰な採血がしばしば実施不可能である。本発明の組成物および方法は、非侵襲性血漿試料であり得る、患者由来の比較的小さな試料とのいくつかの実用的な遺伝子融合の検出を可能にする。

【0060】

これらの高度なマルチプレックスアッセイの設計は変化し得る。複数のALK融合が検出される場合、例えば、融合点近くのALK遺伝子内の配列にハイブリダイズする共通のプライマーおよびプローブ、ならびに種々の融合パートナーに特異的なプライマーを使用することができる。したがって、例えば、5つの異なるALK融合が検出される場合、アッセイは、15個のオリゴヌクレオチド（10プライマーおよび5プローブ）または7個のオリゴヌクレオチド（1つの共通プライマー、1つの共通プローブ、および5つの特異的プライマー）を含むことができる。

【0061】

いくつかの実施形態では、マルチプレックスアッセイは、単一の増幅および検出反応に

50

て、2、3、4、5、6、または7のALK融合、および2、3、4、5、または6のRET融合を検出する。いくつかの実施形態では、マルチプレックスアッセイは、同じ反応において、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13のROS1融合をさらに検出する。いくつかの実施形態では、ROS1融合は別個の増幅および検出反応において検出される。いくつかの実施形態では、増幅および検出反応は、内部標準（例えば、ハウスキーピング遺伝子）をさらに含む。

【0062】

ALK、RET、およびROS1融合の存在は、がん患者が選択的キナーゼ阻害剤に応答性であることを示す。これらには、アレチニブ、クリゾチニブ、セリチニブ、ロラチニブ、ブリガチニブ、カボザンチニブ、アパチニブ、バンデタニブ、ボナチニブ、レンバチニブ、DS-6051b、およびこれらの変異体、またはこれらの組み合わせが含まれる。患者の融合状態により、治療を通して監視して、治療アプローチを、例えば異なるキナーゼ阻害剤またはより標準的な化学療法もしくは放射線療法に変更することができるかどうかを決定することができる。10

【0063】

I V . 試料の調製

遺伝的融合を検査するための試料は、あらゆる供給源から得ることができるが、有利には、非侵襲的様式、例えば、血液または血液画分（例として、血漿、血清、血小板など）から得る。本発明の方法のための試料はまた、尿、気管支肺胞洗浄、または組織生検から採取することもできる。生体試料から核酸を単離する方法は、例えば、Sambrookに記載されているように公知であり、いくつかのキットが市販されている（例として、口20
シュ社のHigh Pure RNA Isolation Kit、High Pure Viral Nucleic Acid Kit、およびMagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit）。

【0064】

いくつかの実施形態では、DNAを調製し、現在開示されている増幅および検出方法のための鋳型として使用する。いくつかの実施形態では、RNAを調製する。RNAをPCRによる増幅の鋳型として使用する場合には、cDNAを調製するために逆転写ステップが必要である。次いで、Taqまたは別の熱安定性ポリメラーゼといったDNAポリメラーゼを用いて増幅を行うことができる。30

【0065】

いくつかの実施形態では、試料は、血漿から単離されるRNAである。患者の状態に応じて、約1～10mLの血漿を検査のために採取することができる（通常は約2mL）。循環遊離RNAを単離するためのキットは、例えば、Norgen Bioteck CorpまたはQiagenから市販されている。

【0066】

実施例に示されるように、カスタム標的特異的オリゴを用いた試料調製および増幅／検出のための現在開示されている方法は、非常に感度が高く、かつ野生型RNAバックグラウンドで1：4000に希釈された試料中の約50コピーおよびある場合には約20コピーという少ない遺伝子融合突然変異を検出するために使用することができる。これは、標的配列が非常にまれである試料、例えば、循環無細胞RNA(cfRNA)における融合変異体の検出を可能にする。血漿中のRNAおよびDNAの種々のバックグラウンドは、低コピー数であっても検出の特異性を損なわない。40

【0067】

V . 増幅および検出

核酸増幅は、あらゆるプライマー依存的方法を用いて行うことができる。いくつかの実施形態では、増幅は定量的であるため、所与の増幅標的の相対的または実際の存在量は、増幅産物の量によって決定することができる。

【0068】

DNAベースの方法は、現在開示されている増幅および検出方法、例えばPCRに用い

10

20

30

40

50

ことができる。いくつかの実施形態では、リアルタイムまたは定量的PCRが使用される(RT PCRまたはqPCR)。qPCRは、PCRプロセスの各サイクル中に生成される産物の信頼できる検出および測定を可能にする。このような技術は当技術分野で周知であり、キットおよび試薬は、例えば、Roche Molecular Systems、Life Technologies、Bio-Radなどから市販されている。例えば、Pfaffl(2010)Methods: The ongoing evolution of qPCR vol. 50を参照されたい。いくつかの実施形態では、増幅および検出は、失活剤およびフルオロフォア(例えば、Gasparic et al. (2010)Anal. Bioanal. Chem. 396: 2023を参照)で標識された二重標識プローブ(例えば、TaqMan、CPT、LNA、またはMGBプローブ)の存在下で行われる。

10

【0069】

いくつかの実施形態では、予備的な逆転写ステップが行われる(RT-PCRとも呼ばれ、リアルタイムPCRと混同されることはない)。例えば、Hierro et al. (2006)72: 7148を参照されたい。本明細書中で使用される場合、用語「qRT-PCR」とは、定量的PCRに先んじた逆転写を指す。どちらの反応も、例えば試薬を加えるために、中断することなく単一のチューブ内で行うことができる。

【0070】

RNAベースの増幅方法はまた、例えば、転写媒介増幅(TMA)または核酸配列ベースの増幅(NASBA)も使用することができる。例えば、Fakruddin et al. (2013)J Pharm Bioallied Sci. 5: 245; van Deursen et al. (1999)Nucl. Acids Res. 27: e15; Kamisango et al. (1999)J Clin. Microbiol. 37: 310を参照されたい。

20

【0071】

本発明のアッセイで使用されるオリゴヌクレオチドのいくつか(プライマーおよびプローブ)は、選択的増幅を強化するためのアルキル塩基修飾を、特に多重形式で含む。

【0072】

プローブ、またはプライマー対におけるプライマーの一方もしくは両方は、直接的または間接的に検出可能なシグナルを放出または生成するあらゆる物質または構成要素で標識することができる。いくつかの実施形態では、標識はフルオロフォア(染料)であり、その多くは文献に報告され、当業者に知られており、かつその多くは市販されている。フルオロフォアは、例えば、Cardullo et al. (1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8790; Hochstrasser et al. (1992)Biophysical Chemistry 45: 133; Selvin (1995)Methods in Enzymology 246: 300; Steinberg, Ann. Rev. Biochem., 40: 83-114 (1971); およびWang et al., Anal. Chem. 67: 1197-1203 (1995)に記載されている。

30

【0073】

フルオロフォアの例としては、以下の標識を使用することができる: 4-アセトアミド-4'-イソチオシアネートスチルベン-2, 2'ジスルホン酸; アクリジン; アクリジンイソチオシアネート; 5-(2'-アミノエチル)アミノナフタレン-1-スルホン酸(EDANS); 4-アミノ-N-[3-ビニルスルホニル]フェニル]ナフタルイミド-3, 5ジスルホネート[0070]N-(4-アニリノ-1-ナフチル)マレイミド; アンスラニラミド; BOGIFY; ブリリアントイエロー; クマリン; 7-アミノ-4-メチルクマリン(AMC、クマリン120)/7-アミノ-4-トリフルオロメチルクマリン(クマラン151); シアニン色素; シアノシン4', 6-ジアミニジノ-2-フェニルインドール(DAPI); 5', 5'''-ジプロモピロガロール-スルホナフタイン(プロモピロガロールレッド); 7-ジエチルアミノ-3-(4'-イソチオシアネート

40

50

フェニル) - 4 - メチルクマリン；ジエチレントリアミンペニタアセテート；4 , 4' - ジイソチオシアネートジヒドロ - スチルベン - 2 , 2' - ジスルホン酸；4 , 4' - ジイソチオシアネートスチルベン - 2 , 2' - ジスルホン酸；5 - [ジメチルアミノ]ナフタレン - 1 - スルホニルクロリド(DNS、ダンシルクロリド)；4 - (4' - ジメチルアミノフェニラゾ)安息香酸(DABCイル)；4 - ジメチルアミノフェニラゾフェニル - 4' - イソチオシアネート(DABITC)；エオシン；エオシンイソチオシアネート；エリスロシンB；エリスロシンイソチオシアネート；エチジウム；5 - カルボキシフルオレセイン(FAM)；5 - (4 , 6 - ジクロロトリアジン - 2 - イル)アミノフルオレセイン(DTAF)；2' , 7' - ジメトキシ - 4' 5' - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン(JOE)；フルオレセイン；フルオレセインイソチオシアネート；フルオレサミン；IR144；IR1446；マラカイトグリーンイソチオシアネート；4 - メチルウンベリフェロン；オルトクレソルフタレン；ニトロチロシン；パラロザニリン；フェノールレッド；フェコエリトリン(BおよびR型を含むがこれらに限定されない)；o - フタルジアルデヒド；ピレン；ピレンブチレート；サクシニミドイル1 - ピレンブチレート；量子ドット；反応性レッド4(シバクロンブリリアントレッド3B-A)；6 - カルボキシ-X - ローダミン(ROX)；6 - カルボキシローダミン(R6G)；リザミンローダミンBスルホニルクロリドローダミン；ローダミンB；ローダミン123；ローダミンXイソチオシアネート；スルホローダミンB；スルホローダミン101；スルホローダミン101(テキサスレッド)のスルホニルクロリド誘導体；N , N , N' , N' - テトラメチル - 6 - カルボキシローダミン(TAMRA)；テトラメチルローダミン；テトラメチルローダミンイソチオシアネート(TRITC)；リボフラビン；ロゾール酸；ならびにランタニドキレート誘導体。

10

20

20

30

40

【0074】

リスト化したフルオロフォア(染料)のいずれをも、本明細書に記載される核酸を標識するために、現在記載されるアッセイにおいて使用することができる。フルオロフォアは、フルオロフォアおよび/または核酸上の適切な官能基を用いて、従来の共有結合によって結合され得る。

【0075】

上記のように、二重標識プローブを検出に使用することができる。二重標識プローブは、上記のフルオロフォアのいずれかなどのフルオロフォア、および失活剤を含んでなっていてもよい。好適な失活剤としては、DDQ-I、ダブシリル、エクリップス、アイオワブラックFQ、BHQ-1、QSY-7、BHQ-2、DDQ-II、アイオワブラックRQ、QSY-21、およびBHQ-3が含まれる、これらに限定されない。500~550nmの発光極大を有するフルオロフォア(例えば、FAM、TET、HEX)については、450~500nmの吸収極大を有する失活剤を選択することができる(例えば、ダビシリルまたはBHQ-1)。550nmを超える発光極大を有するフルオロフォア(例えば、ローダミンおよびCy色素)については、550nmを超える吸収極大を有する失活剤を選択することができる(例えば、BHQ-2)。色素失活剤対を選択する際の考察については、例えば、Johansson(2003)Meth. Mol. Biol. 335: 17を参照されたい。

【0076】

検出装置は当技術分野で公知であり、選択された標識に適切なものとして選択することができる。定量的PCRに適した検出装置には、cobas(登録商標)およびLight Cycler(登録商標)システム(Roche)、PRISM7000および7300リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems)などが含まれる。

【0077】

VII. キット

いくつかの実施形態では、現在開示されている方法を実施するための試薬および材料は、キットに含まれる。いくつかの実施形態では、キットは、試料入手し、保存し、およ

50

び／または調製するための構成要素を含む。そのような構成要素としては、例えば、滅菌針およびシリング、EDTAラインチューブ、緩衝液（例として、核酸のマトリックスへの結合、およびマトリックスからの溶出）、リボヌクレアーゼ阻害剤、ならびに／またはデオキシリボヌクレアーゼなどが含まれる。

【0078】

いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：1～50、ならびに配列番号：52～61および181からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、ALK融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：182～186からなる群から選択される配列を有するALK融合変異体を検出するためのプローブを含む。順方向および逆方向プライマー配列ならびにプローブ配列を、あらゆる適切な組み合わせで一緒に使用して、あらゆる組み合わせにおけるあらゆる1、2、3、4、5、6、または7個のALK融合変異体を検出することができる。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：83～145および187、ならびに配列番号：161～180からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、RET融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、189～194からなる群から選択される配列を有するRET融合変異体を検出するためのプローブを含む。順方向および逆方向プライマー配列ならびにプローブ配列を、あらゆる組み合わせで一緒に使用して、あらゆる組み合わせにおけるあらゆる1、2、3、4、5、または6個のRET融合変異体を検出することができる。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：195～212、ならびに配列番号：213～226からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、ROS1融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、227～230および51からなる群から選択される配列を有するROS1融合変異体を検出するためのプローブを含む。順方向および逆方向プライマー配列ならびにプローブ配列を、あらゆる組み合わせで一緒に使用して、あらゆる組み合わせにおけるあらゆる1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、または13個のROS1融合変異体を検出することができる。

【0079】

いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：1～10、ならびに配列番号：52～61および181からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、EMLエクソン13-ALKエクソン20融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：11～20、ならびに配列番号：52～61および181からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、EMLエクソン20-ALKエクソン20融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：21～30、ならびに配列番号：52～61および181からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、EMLエクソン6-ALKエクソン20融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。キットは、配列番号：31～35、ならびに配列番号：52～61および181からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、EMLエクソン2-ALKエクソン20融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：36～40、ならびに配列番号：52～61および181からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、EMLエクソン18-ALKエクソン20融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：41～45、ならびに配列番号：52～61および181からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、KIFエクソン24-ALKエクソン20融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：46～50、ならびに配列番号：52～61および181からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、KIFエクソン17-ALKエクソン20融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、

10

20

30

40

50

キットは、配列番号：182～186からなる群から選択される配列を有するA L K融合を検出するためのプローブを含む。

【0080】

いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：83～97、ならびに配列番号：161～180からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、K I F エクソン15-R E T エクソン12融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：98～107、ならびに配列番号：161～180からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、K I F エクソン16-R E T エクソン12融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：108～117、ならびに配列番号：161～180からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、K I F エクソン22-R E T エクソン12融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：118～127および187、ならびに配列番号：161～180からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、K I F エクソン23-R E T エクソン12融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：128～135および118、ならびに配列番号：161～180からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、C C D C エクソン1-R E T エクソン12融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：136～145、ならびに配列番号：161～180からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、N C O エクソン6-R E T エクソン12融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：189～194からなる群から選択される配列を有するR E T融合を検出するためのプローブを含む。10

【0081】

いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：195～197、ならびに配列番号：222～226からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、C D 7 4 エクソン6-R O S 1 エクソン34融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：195～197、ならびに配列番号：213～215からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、C D 7 4 エクソン6-R O S 1 エクソン32融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：208、ならびに配列番号：222～226からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、E Z R エクソン10-R O S 1 エクソン34融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：211～212、ならびに配列番号：216～221からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、T P M 3 エクソン8-R O S 1 エクソン35融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：200～202、ならびに配列番号：222～226からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、S D C 4 エクソン4-R O S 1 エクソン34融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：198～199、ならびに配列番号：213～215からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、S D C 4 エクソン2-R O S 1 エクソン32融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：198～199、ならびに配列番号：222～226からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、S D C 4 エクソン2-R O S 1 エクソン34融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：200～202、ならびに配列番号：213～215からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、S D C 4 エクソン4-R O S 1 エクソン32融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。20304050

かの実施形態では、キットは、配列番号：203～205、ならびに配列番号：222～226からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、SLC34A2エクソン13-R0S1エクソン34融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：203～205、ならびに配列番号：213～215からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、SLC34A2エクソン13-R0S1エクソン32融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：206～207、ならびに配列番号：213～215からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、SLC34A2エクソン4-R0S1エクソン32融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：206～207、ならびに配列番号：222～226からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、SLC34A2エクソン4-R0S1エクソン34融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列番号：209～210、ならびに配列番号：216～221からなる群から選択される配列をそれぞれ有する、LRIG3エクソン16-R0S1エクソン35融合変異体を増幅するための順方向プライマーおよび逆方向プライマーを含む。

【0082】

いくつかの実施形態では、プライマーセットのそれぞれは、例えばユーザによって決定される比率で添加されるように、別々のチューブにパッケージされる。いくつかの実施形態では、プライマーセットの1つ以上または全ては、所定の比率で単一のチューブにパッケージされる。

【0083】

キットはまた、逆転写酵素および/またはDNAポリメラーゼのような酵素も含み得る。いくつかの実施形態では、DNAポリメラーゼは、熱サイクル条件、例えばTaqまたはTaq誘導体で増幅することができる熱安定性DNAポリメラーゼである。いくつかの実施形態では、キットはdNTPを含む。いくつかの実施形態では、キットは、選択されたポリメラーゼによる重合/増幅に対して伝導性の緩衝液を含む。

【0084】

いくつかの実施形態では、キットは、例えば、検出されるべき遺伝子融合において野生型であるポリヌクレオチド(すなわち、遺伝的融合がない)、または検出されるべき遺伝子融合を含むポリヌクレオチドを含む。

【0085】

キットはまた、試料管またはバイアルなどの消耗品、反応容器(例えば、チューブ、マルチウェルプレート、マイクロ流体チップ、またはチャンバーなど)、および使用方法またはウェブサイトへの参照も含むことができる。

【実施例】

【0086】

VII. 実施例

A. 実施例1：ALK、RET、およびR0S1融合パネルの検出用マルチプレックスアッセイ

この例では、ALK、RET、およびR0S1融合(ALK/RET/R0S1パネル)を検出するために、多重定量RT-PCR法を試験した。測定可能で信頼できる結果を達成するのに必要な試料の量を減らすために、4つの異なるセットのプライマーおよびプローブを単一チューブ(または、容器、ウェル、チャンバー、コンパートメント)アッセイにおいて使用する。これら4つのセットは、(i)ALK(第1の標識で標識された1つ以上のプローブで検出)、(ii)RET(第2の標識で標識された1つ以上のプローブで検出)、(iii)R0S1(第3の標識で標識された1つ以上のプローブで検出)、および(iv)内部標準(第4の標識で標識されたプローブで検出)と対応する。標識は、本明細書に開示されたものから選択することができ、いくつかの実施形態では、互いに識別可能である。本実施例では、ALK融合はFAM標識プローブで検出され、RET

10

20

30

40

50

融合は H E X 標識プローブで検出され、R O S 1 融合は J A 2 7 0 標識プローブで検出され、内部標準は C y 5 . 5 標識プローブで検出される。

【 0 0 8 7 】

高度マルチプレックスアッセイの適用範囲を、括弧内に示された融合変異体番号と共に表 1 に示す。

【 0 0 8 8 】

【 表 1 】

表 1

標識	遺伝子	融合	適用範囲	オリゴヌクレオチド
FAM	ALK	EML4エクソン13-ALKエクソン20 (V1) EML4エクソン20-ALKエクソン20 (V2) EML4エクソン6a/b-ALKエクソン20 (V3) EML4エクソン2-ALKエクソン20 (V5) EML4エクソン18-ALKエクソン20 (V8) KIF5Bエクソン17-ALKエクソン20 (V6) KIF5Bエクソン24-ALKエクソン20 (V7)	7の融合 ALK融合94%	15個のプライマー 2つのプローブ
HEX	RET	KIF5Bエクソン15-RETエクソン12 (V1) KIF5Bエクソン16-RETエクソン12 (V2) KIF5Bエクソン22-RETエクソン12 (V3) KIF5Bエクソン23-RETエクソン12 (V4) CCDC6エクソン1-RETエクソン12 (V8) NCOA4エクソン6-RETエクソン12 (V9)	6の融合 RET融合97%	
JA270	ROS1	CD74エクソン6-ROS1エクソン34 (V2) CD74エクソン6-ROS1エクソン32 (V1) EZRエクソン10-ROS1エクソン34 (V10) TPM3エクソン8-ROS1エクソン35 (V13) SDC4エクソン4-ROS1エクソン34 (V5) SDC4エクソン2-ROS1エクソン32 (V3) SDC4エクソン2-ROS1エクソン34 (V14) SDC4エクソン4-ROS1エクソン32 (V4) SLC34A2エクソン13-ROS1エクソン34 (V7) SLC34A2エクソン13-ROS1エクソン32 (V6) SLC34A2エクソン4-ROS1エクソン32 (V8) SLC34A2エクソン4-ROS1エクソン34 (V9) LRIG3エクソン16-ROS1エクソン35 (V11)	12の融合 ROS1融合95%	11個のプライマー 3つのプローブ
CY5.5	IC	IC	N/A	2個のプライマー 1つのプローブ

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

多重化は、種々の遺伝子融合検出の組合せを含むことができ、いくつかの実施形態では、より少ない融合がアッセイされて検出される。A L K および R E T 融合の検出のためのアッセイ形式の例を表 2 に示す。R O S 1 中の融合は、例えば表 3 に示すように、別個に、または並行アッセイにおいて検出することができる。

【 0 0 9 0 】

【表2】

表2

標識	遺伝子	融合	適用範囲	オリゴヌクレオチド
FAM	ALK	EML4エクソン13-ALKエクソン20 (V1) EML4エクソン20-ALKエクソン20 (V2) EML4エクソン6a/b-ALKエクソン20 (V3) EML4エクソン2-ALKエクソン20 (V5) EML4エクソン18-ALKエクソン20 (V8) KIF5Bエクソン17-ALKエクソン20 (V6) KIF5Bエクソン24-ALKエクソン20 (V7)	7の融合 ALK融合94%	15個のプライマー 2つのプローブ
HEX	RET	KIF5Bエクソン15-RETエクソン12 (V1) KIF5Bエクソン16-RETエクソン12 (V2) KIF5Bエクソン22-RETエクソン12 (V3) KIF5Bエクソン23-RETエクソン12 (V4) CCDC6エクソン1-RETエクソン12 (V8) NCOA4エクソン6-RETエクソン12 (V9)	6の融合 RET融合97%	
CY5.5	IC	IC	N/A	2個のプライマー 1つのプローブ

10

20

【0091】

【表3】

表3

標識	遺伝子	融合	適用範囲	オリゴヌクレオチド
FAM	ROS1	CD74エクソン6-ROS1エクソン32 (V1) SDC4エクソン2-ROS1エクソン32 (V3) SDC4エクソン4-ROS1エクソン32 (V4) SLC34A2エクソン13-ROS1エクソン32 (V6) SLC34A2エクソン4-ROS1エクソン32 (V8)	12の融合 ROS1融合95%	11個のプライマー 3つのプローブ
HEX	ROS1	CD74エクソン6-ROS1エクソン34 (V2) EZRエクソン10-ROS1エクソン34 (V10) SDC4エクソン4-ROS1エクソン34 (V5) SLC34A2エクソン13-ROS1エクソン34 (V7) SLC34A2エクソン4-ROS1エクソン34 (V9) SDC4エクソン2-ROS1エクソン34 (V14)		
JA270	ROS1	TPM3エクソン8-ROS1エクソン35 (V13) LRIG3エクソン16-ROS1エクソン35 (V11)		
CY5.5	IC	IC	N/A	2個のプライマー 1つのプローブ

30

40

【0092】

表4～6に示されるオリゴヌクレオチドは、アッセイにおいて使用するために選択することができる。順方向および逆方向プライマーの第1のセットは、EML4-ALKおよびKIF5B-ALK融合にわたって増幅する。プライマーは、遺伝子名（例えば、EML4はEML）、エクソン（例えば、エクソン13は13）、および記号（例えば、Forward1はF1）で指定される。記号<t_bb_da>、<t_bb_dc>、<

50

t _ b b _ d T >、 < t _ b b _ d G > とは、 p - t e r t プチルベンジル修飾 A、 C、 T、 および G をそれぞれ指し示す。当業者によって理解されるように、順方向および逆方向プライマーは、異なる融合産物を増幅するために、単一の対またはあらゆる組み合わせで使用することができる。本実施例では、表 1 ~ 3 に示すように、反応中のオリゴヌクレオチドの数は最小であった。全ての反応における逆方向プライマーは、逆転写酵素反応のプライマーとして機能した。

【 0 0 9 3 】

【表4-1】

表4：A L K融合の増幅および検出で使用するためのオリゴヌクレオチド

プローブ染料 (例として)	順方向プライマー	配列番号	配列
FAM	EML13F1	1	ACACCTGGAAAGGACCTAAA
	EML13F2	2	CACACCTGGAAAGGACCTAAA
	EML13F3	3	CCACACCTGGAAAGGACCTA
	EML13F4	4	CCACACCTGGAAAGGACCT
	EML13F5	5	CCACACCTGGAAAGGACC
	EML13F6	6	CCACACCTGGAAAGGAC
	EML13F7	7	CCCACACCTGGAAAGGAC
	EML13F8	8	GCCCACACCTGGAAAGGA
	EML13F9	9	AGCCCACACCTGGAAAG
	EML13F10	10	GAGCCCACACCTGGAAA
	EML20F1	11	CTCGGGAGACTATGAAATATTGTACT
	EML20F2	12	TCGGGAGACTATGAAATATTGTACT
	EML20F3	13	CGGGAGACTATGAAATATTGTACT
	EML20F4	14	CTCGGGAGACTATGAAATATTGTAC
	EML20F5	15	ACTCGGGAGACTATGAAATATTGTA
	EML20F6	16	AACTCGGGAGACTATGAAATATTGTA
	EML20F7	17	TAACTCGGGAGACTATGAAATATTGTA
	EML20F8	18	TAACTCGGGAGACTATGAAATATTGT
	EML20F9	19	TAACTCGGGAGACTATGAAATATTGTA
	EML20F10	20	ACTCGGGAGACTATGAAATATTGTAC
	EML6F1	21	AAGCATAAAGATGTCATCATCAACCAA
	EML6F2	22	AGCATAAAGATGTCATCATCAACCAA
	EML6F3	23	GCATAAAGATGTCATCATCAACCAA
	EML6F4	24	CATAAAGATGTCATCATCAACCAAG
	EML6F5	25	GCATAAAGATGTCATCATCAACCAAG
	EML6F6	26	GCATAAAGATGTCATCATCAACCA
	EML6F7	27	GCATAAAGATGTCATCATCAACC
	EML6F8	28	AGCATAAAGATGTCATCATCAACC
	EML6F9	29	AAGCATAAAGATGTCATCATCAACC
	EML6F10	30	AAGCATAAAGATGTCATCATCAAC
	EML2F1	31	CTCAGTAAAAAATCAGTCTCAAG
	EML2F2	32	CTCAGTAAAAAATCAGTCTCAAGT
	EML2F3	33	TCAGTAAAAAATCAGTCTCAAGTA
	EML2F4	34	TCAGTAAAAAATCAGTCTCAAGTAA
	EML2F5	35	CAGTAAAAAATCAGTCTCAAGTAAAG
	EML18F1	36	CAGCTCTGTGATGCGCTA
	EML18F2	37	CTCTCTGTGATGCGCTACT

10

20

30

40

【表4-2】

プローブ染料 (例として)	順方向プライマー	配列番号	配列
10	EML18F3	38	TCTCTGTGATGCGCTACTCAA
	EML18F4	39	GCTCTCTGTGATGCGCTAC
	EML18F5	40	CTGTGATGCGCTACTCAATAG
	KIF24F1	41	AGAAGAGGGCATTCTGCACA
	KIF24F2	42	GAGGGCATTCTGCACAGA
	KIF24F3	43	GAGGGCATTCTGCACAGAT
	KIF24F4	44	GAAGAGGGCATTCTGCACAG
	KIF24F5	45	GGGCATTCTGCACAGATTG
	KIF17F1	46	GAACTAGTCCAGCTTCGAGCA
	KIF17F2	47	TGAAGAACTAGTCCAGCTTCGA
	KIF17F3	48	CTAGTCCAGCTTCGAGCACAA
	KIF17F4	49	AAGAACTAGTCCAGCTTCGAG
	KIF17F5	50	GTCCAGCTTCGAGCACAAAG
	逆方向プライマー		
20	ALK20R1	52	GCTCTGCAGCTCCATCTG
	ALK20R2	53	GGCTCTGCAGCTCCATCT
	ALK20R3	54	GGGCTCTGCAGCTCCATC
	ALK20R4	55	GGGCTCTGCAGCTCCAT
	ALK20R5	56	GGGCTCTGCAGCTCCA
	ALK20R6	57	TGCAGCTCCATCTGCATGG
	ALK20R7	58	GCAGCTCCATCTGCATGG
	ALK20R8	59	CAGCTCCATCTGCATGGC
	ALK20R9	60	AGCTCCATCTGCATGGC
	ALK20R10	61	GCTCCATCTGCATGGCT
	ALK20R11	181	TGCAGCTCCATCTGCATGGCT TGCAGCTCCATCTGCATGG< t_bb_dC> T
30	プローブ		
	ALK20P9_Q6	182	< DYE-Thr > CCGCCG< BHQ_2 > GAAGCACCAGGAGC
	ALK20P4	183	< DYE-Thr > TACCGCC < BHQ_2 > GGAAGCACCAGGAGCTGCA
	ALK20P5	184	< DYE-Thr > TACCGCC < BHQ_2 > GGAAGCACCAGGAGCTGC
	ALK20P6	185	< DYE-Thr > TACCGCC < BHQ_2 > GGAAGCACCAGGAGCTG
	ALK20P7	186	< DYE-Thr > TACCGCC < BHQ_2 > GGAAGCACCAGGAGCT
40			

【0094】

【表5-1】

表5：RET融合の增幅および検出で使用するためのオリゴヌクレオチド

プローブ染料 (例として)	順方向プライマー	配列番号	配列
HEX	KIF15F1	83	GAATTGCTGTGGAAATAATGATG
	KIF15F2	84	GAATTGCTGTGGAAATAATGATGAT
	KIF15F3	85	ATTGCTGTGGAAATAATGATGTAAAG
	KIF15F4	86	TTGCTGTGGAAATAATGATGTAAAG
	KIF15F5	87	TGCTGTGGAAATAATGATGTAAAG
	KIF15F6	88	GCTGTGGAAATAATGATGTAAAG
	KIF15F7	89	GAATTGCTGTGGAAATAATGATGTAAA
	KIF15F8	90	GAATTGCTGTGGAAATAATGATGTAA
	KIF15F9	91	AATTGCTGTGGAAATAATGATGTAAA
	KIF15F10	92	ATTGCTGTGGAAATAATGATGTAAA
	KIF15F11	93	ATTGCTGTGGAAATAATGATGTAA
	KIF15F12	94	AATTGCTGTGGAAATAATGATGTAA
	KIF15F13	95	ATTGCTGTGGAAATAATGATGTAA
	KIF15F14	96	GAATTGCTGTGGAAATAATGATGTAA
	KIF15F15	97	GAATTGCTGTGGAAATAATGATGT
	KIF16F1	98	CATGTCAGCTTCGTATCTCTCAA
	KIF16F2	99	ATGTCAGCTTCGTATCTCTCAA
	KIF16F3	100	CATGTCAGCTTCGTATCTCTCA
	KIF16F4	101	GCATGTCAGCTTCGTATCTCTC
	KIF16F5	102	CATGTCAGCTTCGTATCTCTC
	KIF16F6	103	GCATGTCAGCTTCGTATCTCT
	KIF16F7	104	GCATGTCAGCTTCGTATCTC
	KIF16F8	105	CAGCATGTCAGCTTCGTATC
	KIF16F9	106	TAGCAGCATGTCAGCTTCGTA
	KIF16F10	107	AGCAGCATGTCAGCTTCG
KIF22F1	KIF22F1	108	AGGACCTGGCTACAAGAGTTAA
	KIF22F2	109	GGACCTGGCTACAAGAGTTAA
	KIF22F3	110	GGACCTGGCTACAAGAGTTAAA
	KIF22F4	111	AGGACCTGGCTACAAGAGTTAAA
	KIF22F5	112	AGGACCTGGCTACAAGAGTTA
	KIF22F6	113	GGACCTGGCTACAAGAGTTA
	KIF22F7	114	GACCTGGCTACAAGAGTTAAAAAG
	KIF22F8	115	ACCTGGCTACAAGAGTTAAAAAG
	KIF22F9	116	AGGACCTGGCTACAAGAGTT
	KIF22F10	117	GGACCTGGCTACAAGAGTT
KIF23F1	KIF23F1	118	TTAACAGCTCACTAAAGTGCACAAA
	KIF23F2	119	TGAACAGCTCACTAAAGTGCACAAA

10

20

30

40

【表 5 - 2】

プローブ染料 (例として)	順方向プライマー	配列番号	配列
	KIF23F3	120	GAACAGCTCACTAAAGTGCACAAA
	KIF23F4	121	AACAGCTCACTAAAGTGCACAAA
	KIF23F5	122	ACAGCTCACTAAAGTGCACAAA
	KIF23F6	123	GAACAGCTCACTAAAGTGCACAA
	KIF23F7	124	AACAGCTCACTAAAGTGCACAA
	KIF23F8	125	ACAGCTCACTAAAGTGCACAA
	KIF23F9	126	GAACAGCTCACTAAAGTGCACA
	KIF23F10	127	AACAGCTCACTAAAGTGCACA
	KIF23F13	187	TTGAACAGCTCACTAAAGTGCA
	CCDC1F1	128	TGCGCAAAGCCAGCGT
	CCDC1F2	129	CGACCTGCGCAAAGCCA
	CCDC1F3	130	GACCTGCGCAAAGCCAG
	CCDC1F4	131	CCTGCGCAAAGCCAGC
	CCDC1F5	132	ACCTGCGCAAAGCCAGC
	CCDC1F6	133	CTGCGCAAAGCCAGCGT
	CCDC1F7	134	GACCTGCGCAAAGCCAGC
	CCDC1F8	135	CGACCTGCGCAAAGCC
	CCDC1F14	188	CAAAGCCAGCGTGACCA
	NC06F1	136	TGTATCTCCATGCCAGAGCAG
	NC06F2	137	GTATCTCCATGCCAGAGCAG
	NC06F3	138	CTGTATCTCCATGCCAGAGCA
	NC06F4	139	GCTGTATCTCCATGCCAGAG
	NC06F5	140	GGCTGTATCTCCATGCCAGA GGCTGTATCTCCATGCCAG<t_bb_da>
	NC06F6	141	GGCTGTATCTCCATGCCAG
	NC06F7	142	AGGCTGTATCTCCATGCCA
	NC06F8	143	GAGGCTGTATCTCCATGCCA
	NC06F9	144	AGAGGCTGTATCTCCATGC
	NC06F10	145	GAGAGGCTGTATCTCCATGC
逆方向プライマー			
	RET12R1	161	AGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
	RET12R2	162	CTAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
	RET12R3	163	CTAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTC
	RET12R4	164	CTAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTT
	RET12R5	165	CTAGAGTTTTCCAAGAACCAAGT
	RET12R6	166	CTAGAGTTTTCCAAGAACCAAG
	RET12R7	167	TAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT
	RET12R8	168	GAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT

【表5-3】

プローブ染料 (例として)	順方向プライマー	配列番号	配列
	RET12R9	169	AGTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT
	RET12R10	170	GTTTTCCAAGAACCAAGTTCTT
	RET12R11	171	TAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
	RET12R12	172	TAGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTC
	RET12R13	173	AGAGTTTTCCAAGAACCAAGTTC
	RET12R14	174	AGAGTTTTCCAAGAACCAAGTT
	RET12R15	175	AGAGTTTTCCAAGAACCAAGT
	RET12R16	176	CTCCTAGAGTTTTCCAAGAACCAA
	RET12R17	177	CTCCTAGAGTTTTCCAAGAACCA
	RET12R18	178	TCCTAGAGTTTTCCAAGAACCAA
	RET12R19	179	CCTAGAGTTTTCCAAGAACCAA
	RET12R20	180	GAGTTTTCCAAGAACCAAGTTCT
	プローブ		
	RET12P3_HEX	189	< DYE_Thr > ATCCAAA < BHQ_2 > GTGGGAATT CCCTCGGAAGAAC
	RET12P4_HEX	190	< DYE_Thr > CCAAAGT < BHQ_2 > GGGATT CCCTCGGAAGAAC
	RET12P8_HEX	191	< DYE_Thr > TCCAAAG < BHQ_2 > TGGGAATT CCCTCGGAAGAAC
	RET12P14_HEX	192	< DYE_Thr > CCAAAGT < BHQ_2 > GGGATT CCCTCGGAAGAACCTT
	RET12P18_HEX	193	< DYE_Thr > TCCAAAG < BHQ_2 > TGGGAATT CCCTCGGAAGAACCTT
	RET12P13_HEX	194	< DYE_Thr > ATCCAAA < BHQ_2 > GTGGGAATT CCCTCGGAAGAACCTT

10

20

30

【0095】

【表 6 - 1】

表 6 : ROS 1 融合の増幅および検出で使用するためのオリゴヌクレオチド

プローブ染料 (例として)	順方向プライマー	配列番号	配列
JA270	CD74ex6F2	195	CACTGACGCTCCACCGAA
	CD74ex6F1	196	AAGCCCACGTACGCTCCA
	CD74ex6F3	197	ACTGACGCTCCACCGAAA
	SDC4ex2F1	198	GAGCTGTCTGGCTCTGG< t_BB_dA >
	SDC4ex2F2	199	TGTCTGGCTCTGGAGATCT TGTCTGGCTCTGGAGAT< t_bb_dC > T
	SDC4ex4F1	200	TTGAGAGAACGGAGGTCT
	SDC4exF2	201	TGAGAGAACGGAGGTCT
	SDC4ex4F3	202	TTGAGAGAACGGAGGTCT
	SLC34A2ex13F1	203	ATAACCATTAGCAGAGAGGCT
	SLC34A2ex13F2	204	AACCATTAGCAGAGAGGCTCA
	SLC34A2ex13F3	205	ATAACCATTAGCAGAGAGGCT
	SLC34A2ex4F1	206	AGTAGCGCTTCCAGCT
	SLC34A2ex4F2	207	GCCTTCCAGCTGGTTGGA
	EZRex10F2	208	GAAGACAAAGAAGGCAGAGAGA
	LRIG3ex16F1	209	TTCTTACCAACATGACAGTAGT
	LRIG3ex16F2	210	TCTTACCAACATGACAGTAGTG
	TPM3ex8F1	211	GAAAAGACAATTGATGACCTGG< t_BB_dA >
	TPM3ex8F5	212	AAGCTGGAAAAGACAATTGATGAC
	逆方向プライマー		
	ROS1ex32R1	213	GTATTGAATTTTACTCCCTCTAGTAATTG
	ROS1ex32R2	214	GTATTGAATTTTACTCCCTCTAGTAATT
	ROS1ex32R3	215	GTATTGAATTTTACTCCCTCTAGTAATT
	ROS1ex35R1	216	TATAAGCACTGTCACCCCTT
	ROS1ex35R2	217	ATAAGCACTGTCACCCCTT
	ROS1ex35R3	218	TATAAGCACTGTCACCCCTT
	ROS1ex35R4	219	CTTTGTCTTCGTTATAAGCACTGTCA
	ROS1ex35R5	220	AACTCTTGTCTTCGTTATAAGCACTGT
	ROS1ex35R6	221	AGCCAACCTTTGTCTTCGTTATAAGCA
	ROS1ex34LAre v1	222	CAGTGGGATTGTAACAACCAAGAAAT
	ROS1ex34LAre v2	223	GTCAGTGGGATTGTAACAACCA
	ROS1ex34LAre v3	224	GTCAGTGGGATTGTAACAACCA
	ROS1ex34LAre v4	225	CAGTGGGATTGTAACAACCAAGAA
	ROS1ex34LAre v5	226	CAGTGGGATTGTAACAACCAAGAA
	プローブ		

10

20

30

40

【表6-2】

プローブ染料 (例として)	順方向プライマー	配列番号	配列
	ROS1EX32P2	227	< DYE_Thr>TGGAGTCCTAA<BHQ_2> TAAACCAGGCATTCCCA
	ROS1EX34P1	228	< DYE_Thr>TGATTTGGAT<BHQ_2> ACCAAGAAACAAGTTCATAC
	ROS1EX32P3	229	< DYE_Thr>TGGAGTC<BHQ_2> CCAAATAAACCAGGC<t_BB_dA>TTCCCA
	ROS1EX34P3	230	< DYE_Thr>TGATTT<BHQ_2> TGGATACCAGAAACAAGTTCATAC
	ROS1EX35P1	51	< DYE_Thr>TCTGGCATAGAA<BHQ_2> GATTAAGAATCAAAAAGTGCCAAG

10

【0096】

本発明者らは、Horizon DiscoveryのEML4 - ALK陽性細胞株NCI-H2228およびEML4 - ALK融合変異形1細胞株、CDC6 - RET細胞株LC2AD、ならびにNSCLCホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPET)および血漿検体に由来するからRNAを用いて、この方法を試験した。

20

【0097】

血漿の場合は、MagNA Pure Lysis BufferおよびEspresso酶を用いたRoche High Pure FFPE RNA抽出キットを用いてcfRNAを抽出した。cfRNAの収率は正確に測定するには低すぎるため、一定量(全体の1/24)の抽出した血漿cfRNAをqRT-PCRに投入した。

20

【0098】

反応条件は以下の通りであった。各反応について、25uLの入力RNAを、順方向および逆方向プライマー、標識プローブ、緩衝液、dUTP、dTTP、dATP、dGTP、UNG、およびZ05酵素を含むRT-PCR反応混合物へ添加して、最終容量50uLとした。反応は、それぞれが表1に示された全ての融合変異体に特異的なプライマーおよびプローブを用いて、複数回行った。

30

【0099】

結果は、qRT-PCRアッセイでカバーされる融合変異体を検出する次世代シーケンシングアッセイを用いて確認した。

【0100】

最大Ct(閾値サイクル)を38に設定した。これは、シグナルがCt38以下のバックグラウンド上で検出可能でなければならないことを意味する。データを図1A、1B、1C、および1Dに示す。各反応の入力RNAは、示された融合変異体を有することが知られていた。各反応を3回繰り返した。

40

【0101】

図1Aは、各ALK融合変異体が、50コピーで検出可能であることを示す。図1Bは、各RET融合変異体が、50コピーで検出可能であることを示す。図1Cは、各ROS1融合変異体が、50コピーで検出可能であることを示す。図1Dは、内部標準Ct'によって示されるように、反応効率と入力とが同等であったことを示す。

【0102】

B. 実施例2：力価転写物におけるALKおよびRET融合の感受性

実施例1、表1に示されるALKおよびRET融合変異体の検出限界について、多重qRT-PCRを試験した。ALKまたはRET融合陽性転写物を、250、100、50、または25コピーで0.1ngのユニバーサルヒトRNA(UHR)に力価測定するこ

50

とによって、マルチプレックスアッセイを試験した。増幅および検出反応を3回繰り返した。

【0103】

図2に示されるように、試験されたALKおよびRET融合変異体の全ては、25コピーまで検出可能であった。

【0104】

C. 実施例3：直線性試験およびさらなる検出限界（LOD）試験

ALK、RET、およびROS1融合について検出の直線性を判定するため、図3～5に示した上で解説するように、さらなる研究を実施した。

【0105】

感度または検出限界（LOD）の研究を、図6～8に示した上で解説する。各アッセイのLODを表7および8に示す。7のALK、6のRET、および13のROS1融合変異体の全ては、10コピー未満まで検出可能である。主要な融合変異体は*で示される。

【0106】

【表7】

表7

融合	ヒット率	確立95%に対するLOD
E13:A20*	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
E20:A20*	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
E6:A20*	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
E2:A20	6.25コピーで11/12	6.45コピー
K17:A20	6.25コピーで12/12(12.5コピーで11/12)	4.78コピー
K24:A20	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
E18:A20	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
K15:R12*	6.25コピーで11/12	6.45コピー
K16:R12*	6.25コピーで11/12	6.45コピー
K22:R12	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
K23:R12	6.25コピーで11/12	6.45コピー
C1:R12*	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
N6:R12	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満

【0107】

10

20

30

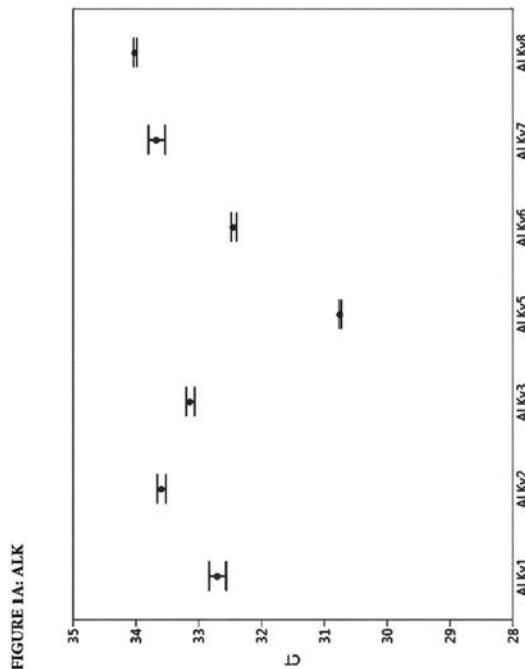
【表8】

表8

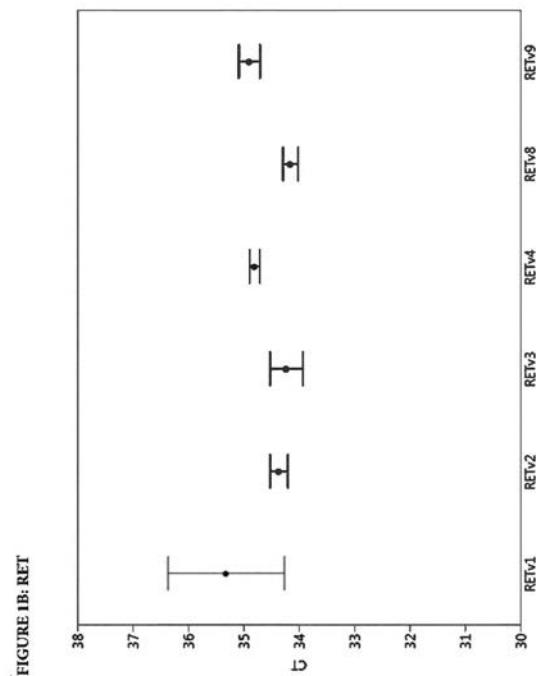
融合変異形	ヒット率	確立95%に対するLOD
C6:R32	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
C6:R34*	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
SD2:R32	6.25および12.5コピーで11/12	11.07コピー
SD4:R34	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
SL13:R32	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
SL13:R34	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
SL4:R32	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
SL4:R34	6.25コピーで11/12	6.45コピー
E10:R34*	6.25コピーで11/12	6.45コピー
L16:R35	12.5コピーで11/12；6.25コピーで12/12	4.78コピー
T8:R35	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満
SD2:R34	12/12、全レベル試験	コピー6.25未満

10

【図1A】

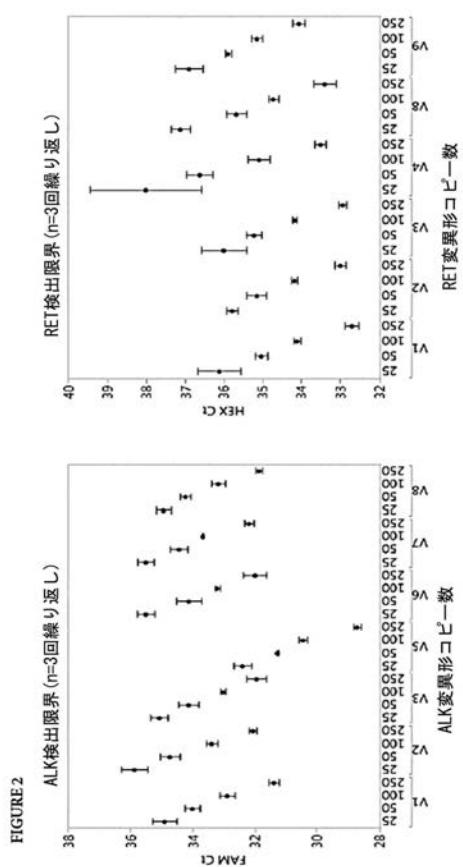


【図1B】



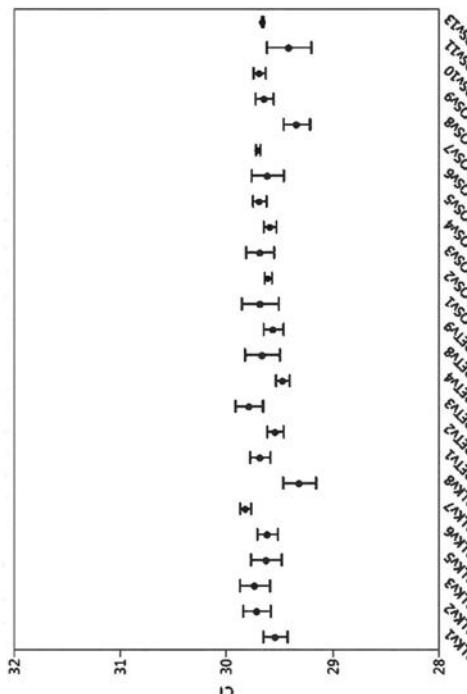
【図 1 C】

FIGURE 1C: ROS1



【図 1 D】

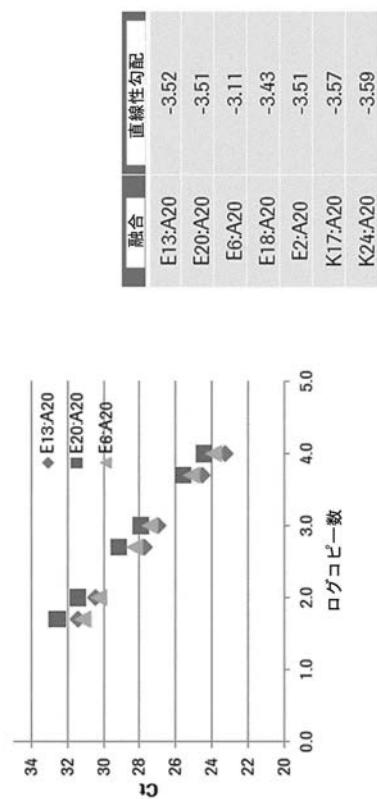
FIGURE 1D: 内部標準



【図 2】

【図 3】

- Figure 3
- 各融合RNA転写物を0.5ngのUHRバッケグラウンドで試験
 - UHRへのスパイク5段階: 10000、5000、1000、500、100、および50
 - 段階ごとに3つの複写物: ddPCRで見積もった入力コピー数
 - 示された代表的なALK変異形



【図4】

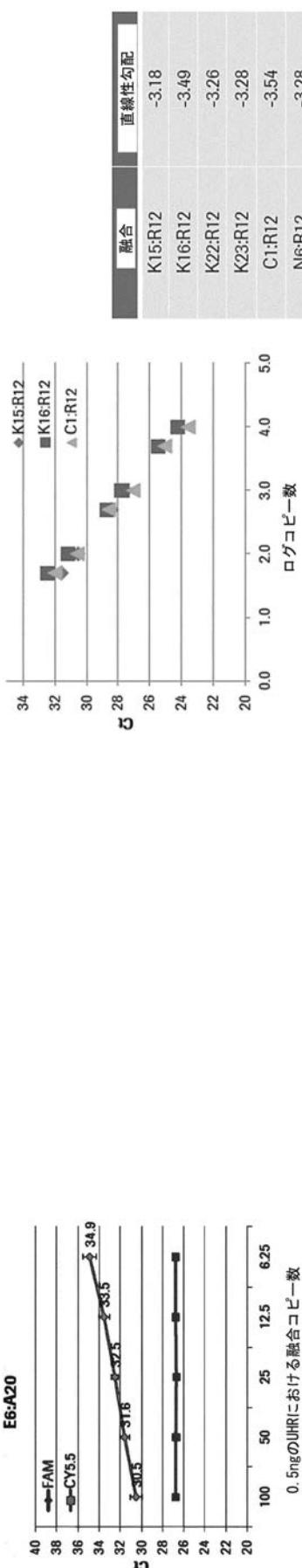


Figure 4

〔 四 6 〕

- 各融合RNA断片を0.5ngのUHRバッファグランンドで試験
 - アッセイの堅牢性を試験するために増加したUHRバッカグラウンド；以前に0.1ngで試験
 - UHRへのスパイク5段階：PCR rxn当たり100、50、25、12.5、および6.25のコピー
 - 段階ごとに12の複数物：ddPCRで累積もった入力コピー数
 - 示された代表的なALK異型

Figure 6

【 四 5 】

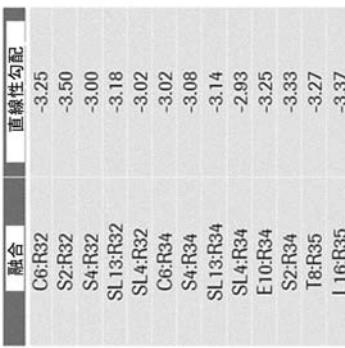


Figure 5

【 四 7 】

- 各融合RNA転写物を0.5ngのUHRバックグラウンドで試験
 - アッセイの堅牢性を試験するために増加したUHRバックグラウンド；以前に0.1ngで試験
 - UHRへのスパイク5段階：PCR ran当たり100、50、25、12.5、および6.25のコピー
 - 段階ごとに120の複写物；ddPCRで見積もった入力コピー数

Figure 7

【図 8】

Figure 8

- 各融合RNA転写物を0.5ngのUHRバックグラウンドで試験
 - アッセイの堅牢性を試験するために増加したUHRバックグラウンド：以前に0.1ngで試験
 - UHRへのスパイク5段階：PCR rxn当たり100、50、25、12.5、および6.25のコピー数
 - 段階ごとに12の複写物：ddPCRで見積もった入力コピー数
 - 示された代表的なROSI変異形
- C6:R34**
-
- | 0.5ngのUHRにおける融合コピー数 | 0.5ngのUHRにおける融合コピー数 |
|---------------------|---------------------|
| 38 | 38 |
| 35.5 | 35.5 |
| 33.5 | 33.5 |
| 34.3 | 34.3 |
| 31.3 | 31.3 |

【配列表】

2020521440000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2018/064172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6851 C12Q1/6886
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

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

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104 818 320 A (AMOY DIAGNOSTICS CO LTD) 5 August 2015 (2015-08-05) abstract; table 1 paragraph [0018] -----	1-31
A	WO 2016/166269 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; F HOFFMANN-LA ROCHE AG [CH]; ROCHE MOLECU) 20 October 2016 (2016-10-20) claims 8-10; examples 1-2 -----	1-31
A	US 2015/315657 A1 (RHODES DANIEL [US] ET AL) 5 November 2015 (2015-11-05) paragraphs [0111] - [0125] paragraphs [0272] - [0276] -----	1-31
A	WO 2014/144121 A2 (LIFE TECHNOLOGIES CORP [US]) 18 September 2014 (2014-09-18) paragraph [0043]; claims 1,11 ----- -/-	1-31

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

10 August 2018

29/08/2018

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Aguilera, Miguel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2018/064172

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TONI-MAREE ROGERS ET AL: "Multiplexed transcriptome analysis to detect ALK, ROS1 and RET rearrangements in lung cancer", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 7, no. 1, 9 February 2017 (2017-02-09), XP055498617, DOI: 10.1038/srep42259 the whole document -----	1-31
A	ISAMU OKAMOTO ET AL: "Multiplex genomic profiling of non-small cell lung cancers from the LETS phase III trial of first-line S-1/carboplatin versus paclitaxel/carboplatin: results of a West Japan Oncology Group study", ONCOTARGET, vol. 5, no. 8, 30 April 2014 (2014-04-30), XP055498814, United States ISSN: 1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.1906 page 2294, column 2, paragraph 2 page 2297, column 2, paragraph 3 -----	1-31
A	MARIJA E. LIRA ET AL: "A Single-Tube Multiplexed Assay for Detecting ALK, ROS1, and RET Fusions in Lung Cancer", JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS, THE, vol. 16, no. 2, 1 March 2014 (2014-03-01), pages 229-243, XP055280268, US ISSN: 1525-1578, DOI: 10.1016/j.jmoldx.2013.11.007 the whole document -----	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2018/064172

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
CN 104818320	A	05-08-2015	NONE		
WO 2016166269	A1	20-10-2016	CA 2982870 A1	20-10-2016	
			CN 107532209 A	02-01-2018	
			EP 3283645 A1	21-02-2018	
			JP 2018514202 A	07-06-2018	
			US 2016304937 A1	20-10-2016	
			WO 2016166269 A1	20-10-2016	
US 2015315657	A1	05-11-2015	NONE		
WO 2014144121	A2	18-09-2014	AU 2014227883 A1	15-10-2015	
			CN 105102635 A	25-11-2015	
			EP 2971093 A2	20-01-2016	
			JP 2016515380 A	30-05-2016	
			US 2014288116 A1	25-09-2014	
			US 2016265065 A1	15-09-2016	
			WO 2014144121 A2	18-09-2014	

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,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,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100138210

弁理士 池田 達則

(72)発明者 アン ベゴビック

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
, シー / オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 シンディー チュン

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
, シー / オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 ジャベリン チー

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
, シー / オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 グラントランド ヒルマン

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
, シー / オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 ドワイト クオ

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
, シー / オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 マイケル リー

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
, シー / オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 シアオチュイ マックス マー

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
, シー / オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 チトラ マノハ

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
, シー / オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 エレン オーディナリオ

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
, シー / オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 ジャヤ ラジャマニ

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
, シー / オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

(72)発明者 フアン チュオン

アメリカ合衆国, カルフォルニア 94588, プレザントン, ハシエンダ ドライブ 4300
, シー / オー ロシュ モレキュラー システムズ, インコーポレイティド

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QR08 QR55 QR62 QS25

QX02