(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年9月19日(19.09.2019)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2019/176939 A1

(51) 国際特許分類:
*C12Q 1/6876* (2018.01) *C12N 15/09* (2006.01)
*C12Q 1/6827* (2018.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/010012

(22) 国際出願日： 2019年3月12日(12.03.2019)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2018-047582 2018年3月15日(15.03.2018) JP

(71) 出願人: 栄研化学株式会社 **(EIKEN KAGAKU KABUSHIKI KAISHA)** [JP/JP]; 〒1108408 東京都台東区台東４丁目１９番９号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 松井 貴香**(MATSUI Atsuka)**; 〒3240036 栃木県大田原市下石上１３８１－３ 栄研化学株式会社那須事業所内 Tochigi (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外**(HASEGAWA Yoshiki et al.)**; 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目１番１号丸の内 ＭＹ ＰＬＡＺＡ（明治安田生命ビル） ９階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

**(54) Title:** OLIGONUCLEOTIDE PROBE FOR DETECTING SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS, AND METHOD FOR DETERMINING CIS-TRANS CONFIGURATION

(54) 発明の名称： 一塩基多型検出用オリゴヌクレオチドプローブ、及びシス型－トランス型判別方法

**(57) Abstract:** Disclosed is a probe comprising: a reporter region for detecting a first single nucleotide polymorphism; an anchor region for detecting a second single nucleotide polymorphism; and a linker region. The reporter region has: an oligonucleotide having a base sequence that is completely identical with a first target base sequence; and a fluorophore that quenches light emission when hybridized with the first target base sequence in which the single nucleotide polymorphism exists. The anchor region has an oligonucleotide comprising a base sequence that is completely identical with a second target base sequence in which the second single nucleotide polymorphism exists. The oligonucleotide of the reporter region is shorter in length than the oligonucleotide of the anchor region.

(57) 要約：第１の一塩基多型を検出するレポーター領域と、第２の一塩基多型を検出するアンカー領域と、リンカー領域と、を含むプローブを開示する。上記レポーター領域は、上記記第１の標的塩基配列に対して完全マッチする塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、上記第１の一塩基多型が存在する第１の標的塩基配列とハイブリダイズしたときに消光する蛍光色素を有する。上記アンカー領域は、上記第２の一塩基多型が存在する第２の標的塩基配列に対して完全マッチする塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを有する。上記レポーター領域のオリゴヌクレオチドの長さは、上記アンカー領域のオリゴヌクレオチドの長さよりも短い。

WO 2019/176939 A1

# 明 細 書

## 発明の名称 ：

# 一塩基多型検出用オリゴヌクレオチドプローブ、及びシス型－トランス型判別方法

## 技術分野

[0001] 一塩基多型検出用オリゴヌクレオチドプローブ、並びに、２種の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別する方法に関する。

## 背景技術

[0002] 上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ：Ｅｐｉｄｅｒｍａｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ）は膜貫通型受容体チロシンキナーゼであり、細胞の増殖や成長の制御に関わる因子として知られている。ＥＧＦＲは、癌遺伝子として肺癌を含む多くの癌で過剰発現していることから、癌治療の分子標的として注目され、ＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害薬（ＥＧＦＲ－ＴＫＩ）等の癌治療薬が開発された。

[0003] ところが、ゲフィチニブ、エルロチニブ及びアファチニブ等のＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害薬は、一年程度で耐性を生じて再増悪してしまうことが知られている。この耐性獲得の原因のおよそ半分を占めるのが、ＥＧＦＲの７９０番目のアミノ酸であるトレオニン（Ｔ）がメチオニン（Ｍ）に置換された変異（Ｔ７９０Ｍ）である。そのため、このＴ７９０Ｍの検出を可能とするためのプローブが開発され、Ｔ７９０Ｍを含むＥＧＦＲ遺伝子の配列にハイブリダイズするように設計した多型検出用プローブが報告されている（特許文献１、特許文献２）。また、このＴ７９０Ｍに有効であるＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害薬であるオシメルチニブが開発され、肺癌治療薬として使用されている。

[0004] しかしながら、さらなる耐性変異の追加により、臨床応用されたすべてのＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害薬の効果がなくなることが報告されている。

この耐性の原因の一つとされるのが、ＥＧＦＲの７９７番目のアミノ酸であるシステイン（Ｃ）がセリン（Ｓ）に置換された変異（Ｃ７９７Ｓ）である。このＣ７９７ＳがＴ７９０Ｍに対してトランス型で存在するときには、既存のＥＧＦＲ－ＴＫＩの組み合わせが有効かもしれないとの知見は得られているものの、Ｃ７９７ＳがＴ７９０Ｍに対してシス型で存在するときには、これらの組み合わせを含む臨床応用されたすべてのＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害薬の効果がなくなることが報告されている（非特許文献１）。このように、治療薬への耐性の原因となる異なる２種の一塩基多型（以下「ＳＮＰ（：Ｓｉｎｇｌｅ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ）」と省略する場合もある）が、シス型又はトランス型と異なる位置関係で存在することで、治療薬への耐性の強度等が異なる場合には、その耐性への対応の選択及び耐性を克服するための治療薬・治療方法の開発等のため、シス型であるか又はトランス型を判別する方法が重要となる。現状ではシス型であるか又はトランス型であるかを判別するには、次世代シーケンサーやｄｉｇｉｔａｌＰＣＲを用いた複雑な方法しかない。そこで、シス型であるか又はトランス型であるかを簡単に判別するための多型検出用プローブの開発が望まれている。

[0005] 多型検出用プローブは、合成が簡便且つ安価であり、多型の存在を正確に感度よく検出できることが好ましい。このようなプローブとして、一塩基多型を検出するレポーター領域と、一塩基多型の有無に関わらず標的塩基配列に結合するアンカー領域と、レポーター領域及びアンカー領域を連結するリンカー領域と、を有する、一塩基多型検出用オリゴヌクレオチドプローブであって、レポーター領域が有する蛍光色素により、その蛍光強度に基づいて一塩基多型の有無を検出できるプローブが開発されている（特許文献３）。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第２００６／０８６７７７号

特許文献2：国際公開第２０１１／０５２７５４号

特許文献3：国際公開第２０１６／０９８５９５号

## 非特許文献

[0007] 非特許文献1：K.Uchibori et al., Brigatinib combined with anti-EGFR antibody overcomes osimertinib resistance in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer, Nature communications 8, Article number:14768 (2017)

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明は、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型が異なる位置に存在する標的核酸において、上記第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別するための一塩基多型検出用オリゴヌクレオチドプローブを提供することを目的とする。本発明はまた、上記オリゴヌクレオチドプローブを用いて、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別する方法を提供することを目的とする。

## 課題を解決するための手段

[0009] 本発明は、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型が異なる位置に存在する標的核酸において、上記第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別するための一塩基多型検出用オリゴヌクレオチドプローブであって、

上記標的核酸が、上記第１の一塩基多型が存在する第１の標的塩基配列と、上記第２の一塩基多型が存在する第２の標的塩基配列と、を含み、

上記プローブが、上記第１の一塩基多型を検出するレポーター領域と、上記第２の一塩基多型を検出するアンカー領域と、リンカー領域と、を含み、

上記レポーター領域が、上記第１の標的塩基配列に対して完全マッチする塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、上記第１の標的塩基配列及び上記レポーター領域がハイブリダイズしたときに消光する蛍光色素と、を有し、

上記アンカー領域が、上記第２の標的塩基配列に対して完全マッチする塩

基配列からなるオリゴヌクレオチドを有し、

上記リンカー領域が、上記レポーター領域及び上記アンカー領域を連結しており、上記第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在する場合の上記標的核酸における上記第１の標的塩基配列及び上記第２の標的塩基配列の間の塩基配列に対して、非相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを有し、

上記レポーター領域のオリゴヌクレオチドの長さが、上記アンカー領域のオリゴヌクレオチドの長さよりも短い、プローブを提供する。

[0010] 本発明のプローブは、第１の一塩基多型を検出するためのレポーター領域とは別に、第２の一塩基多型を検出するためのアンカー領域を備えており、両領域はリンカー領域により連結されている。また、レポーター領域のオリゴヌクレオチドの長さは、アンカー領域のオリゴヌクレオチドの長さよりも短い。そのため、第２の標的塩基配列にアンカー領域がハイブリダイズすることによりプローブの結合性が確保されると、リンカー領域により連結された、蛍光色素を有するレポーター領域により、第１の一塩基多型の有無を感度よく検出できる。レポーター領域及びアンカー領域の両方がそれぞれ対応する標的塩基配列にハイブリダイズすることにより蛍光強度が減少するように適宜調整することで、単一のプローブにより、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを良好な正確性及び検出感度により判別することができる。

[0011] 上記リンカー領域が、ユニバーサル塩基を含まない塩基配列からなるオリゴヌクレオチドであることが好ましい。リンカー領域にユニバーサル塩基を用いないことで、より安価にプローブを合成することができる。

[0012] 上記リンカー領域が、アデニン、グアニン、シトシン、又はチミンのいずれか１種の塩基のみからなるオリゴヌクレオチドであることが好ましい。これにより、プローブのリンカー領域で標的核酸と結合する可能性が低下するため、レポーター領域の自由度が増し、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型の検出能を向上させることができる。また、リンカー領域を上記塩基の

みで構成することで、より安価にプローブを合成することができる。

[0013] 上記リンカー領域が、３～１１個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドであることが好ましい。これにより、アンカー領域とレポーター領域が一定距離離れるため、レポーター領域の自由度が増し、第１の一塩基多型の検出能を向上させることができ、結果としてシス型ＳＮＰの検出能を向上させることができる。

[0014] 本発明はまた、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別する方法であって、上記本発明のプローブ並びに第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型が異なる位置に存在する標的核酸を混合し、混合液を調製する工程と、上記混合液の蛍光強度を測定する工程と、上記蛍光強度に基づき、上記第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別する工程と、を備える方法を提供する。

[0015] 本発明の方法によれば、単一のプローブを用いることにより、その蛍光強度に基づいて、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別することができる。

## 発明の効果

[0016] 本発明によれば、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型が異なる位置に存在する標的核酸において、上記第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを、単一のプローブを用いて、複雑な工程を必要とすることなく、簡単に判別することが可能となる。

## 図面の簡単な説明

[0017] [図1]図１は、本実施形態のプローブにより、シス型で存在するＴ７９０Ｍ及びＣ７９７Ｓを検出するメカニズムの模式図である。囲み部分はＳＮＰ又はＳＮＰに対応する部分を示す。

[図2]図２は、Ｃ７９７Ｓ検出用プローブを用いたときの熱融解曲線解析の結果を示す。１００％は鋳型ＤＮＡがすべてＣ７９７Ｓ＿１を含むＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡである場合を示し、５０％～５％は、鋳型ＤＮＡに

おけるＣ７９７Ｓ＿１を含むＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡの割合がそれぞれ５０％～５％である場合を示し（他は野生型のＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡ）、０％は鋳型ＤＮＡがすべて野生型のＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡである場合を示し、Ｃ７９７Ｓ＿２は鋳型ＤＮＡがすべてＣ７９７Ｓ＿２を含むＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡである場合を示す。

[図3]図３は、実施例３において設計した３つのプローブ（１）～（３）、並びにＴ７９０Ｍを認識する配列及びＣ７９７Ｓを認識する配列がリンカーで結合された合成オリゴヌクレオチドの概略図である。囲み部分はＳＮＰ又はＳＮＰに対応する部分、各プローブのリンカー領域とは反対側の末端に結合している丸はＱＰｒｏｂｅをそれぞれ示す。

[図4]図４は、Ｔ７９０Ｍを認識する配列及びＣ７９７Ｓを認識する配列がリンカーで結合された図３に記載の合成オリゴヌクレオチドを用いたときの熱融解曲線解析の結果を示す。

[図5]図５は、シス型検出用リンカープローブを用いたときの熱融解曲線解析の結果を示す。「ｃｉｓ（Ｔ７９０Ｍ／Ｃ７９７Ｓ＋ｗｔ）」は鋳型ＤＮＡが、Ｔ７９０Ｍ及びＣ７９７Ｓをシス型に含むＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡ（Ｔ７９０Ｍ／Ｃ７９７Ｓ）、並びにその対立遺伝子として上記変異を含まない野生型のＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡ（ｗｔ）を含む場合を示す。ｃｉｓ５０％及びｃｉｓ２５％は、鋳型ＤＮＡが、それぞれ５０％及び２５％のＴ７９０Ｍ／Ｃ７９７Ｓを含むＤＮＡ（他は野生型のＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡ）、並びにその対立遺伝子として上記変異を含まない野生型のＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡ（ｗｔ）を含む場合を示す。したがって、ｃｉｓ５０％及びｃｉｓ２５％の全体におけるＴ７９０Ｍ／Ｃ７９７Ｓの変異存在率はそれぞれ２５％及び１２．５％である。「ｔｒａｎｓ（Ｔ７９０Ｍ＋Ｃ７９７Ｓ）」は鋳型ＤＮＡがすべてＴ７９０Ｍ及びＣ７９７Ｓをトランス型に含むＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡである場合を示し、ｗｔは鋳型ＤＮＡがすべて野生型のＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡである場合を示し、Ｔ７９０Ｍは鋳型ＤＮＡがすべてＴ７９０Ｍのみを

含むＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡである場合を示し、Ｃ７９７Ｓは鋳型ＤＮＡがすべてＣ７９７Ｓのみを含むＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡである場合を示す。

## 発明を実施するための形態

[0018] 以下、本発明を実施するための形態（以下、「本実施形態」という。）について詳細に説明する。なお、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではない。

[0019] 本明細書において、「一塩基多型（ＳＮＰ：Ｓｉｎｇｌｅ Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ Ｐｏｌｙｍｏｒｐｈｉｓｍ）」とは、塩基配列上の一塩基の置換によって起きる多型のことである。

[0020] 本明細書において、「標的核酸」とは、本実施形態のプローブを用いてＳＮＰの有無を確認するための対象となる核酸のことである。標的核酸は、第１の一塩基多型が存在する領域である第１の標的塩基配列と、第２の一塩基多型が存在する領域である第２の標的塩基配列と、を含む。第１の標的塩基配列及び第２の標的塩基配列は、ＳＮＰの存在が知られている核酸の塩基配列から事前に決めることができる。

[0021] 第１の一塩基多型と第２の一塩基多型は、シス型又はトランス型のいずれかの位置関係で存在する。シス型とは、第１の一塩基多型と第２の一塩基多型が同じ染色体上に位置することを意味し、トランス型とは、第１の一塩基多型と第２の一塩基多型が異なる染色体上に位置することを意味する。第１の一塩基多型と第２の一塩基多型が同一対立遺伝子上に存在し得る場合には、シス型とは、第１の一塩基多型と第２の一塩基多型が同一対立遺伝子上に位置することを意味し、トランス型とは、第１の一塩基多型と第２の一塩基多型が異なる対立遺伝子上に位置することを意味する。第１の一塩基多型と第２の一塩基多型が同一対立遺伝子上に存在し得る例としては、ＥＧＦＲ遺伝子が挙げられ、第１の一塩基多型としてＣ７９７Ｓ、第２の一塩基多型としてＴ７９０Ｍが挙げられる。

[0022] 第１の標的塩基配列は、ＳＮＰの存在が知られている核酸の塩基配列にお

いて、検出したいＳＮＰ（第１の一塩基多型）が入りうる塩基を含む３～６個のヌクレオチドからなる領域が好ましい。第１の標的塩基配列は、３～５個のヌクレオチドからなる領域がより好ましく、４又は５個のヌクレオチドからなる領域が更に好ましい。第１の標的塩基配列において、ＳＮＰが入りうる塩基の位置は、特に限定されるものではないが、第１の標的塩基配列の中心付近が好ましい。

[0023] 第２の標的塩基配列は、第１の標的塩基配列とは重複せず、ＳＮＰの存在が知られている核酸の塩基配列において、検出したいＳＮＰ（第２の一塩基多型）が入りうる塩基を含む８～２０個のヌクレオチドからなる領域が好ましい。第２の標的塩基配列は、１０～１８個のヌクレオチドからなる領域がより好ましく、１１～１５個のヌクレオチドからなる領域が更に好ましく、１４又は１５個のヌクレオチドからなる領域が特に好ましい。第２の標的塩基配列において、ＳＮＰが入りうる塩基の位置は、特に限定されるものではないが、第２の標的塩基配列の中心付近が好ましい。

[0024] 第１の一塩基多型と第２の一塩基多型がシス型の位置関係で存在するときは、第２の標的塩基配列は、第１の標的塩基配列の３’側又は５’側に位置する。第２の標的塩基配列が第１の標的塩基配列の３’側に位置する場合、第１の標的塩基配列の３’末端から第２の標的塩基配列の５’末端までのヌクレオチドの数（インターバル）は、０～１５個が好ましく、３～１２個がより好ましく、４～１０個が更に好ましい。第１の標的塩基配列及び第２の標的塩基配列の間隔を、上記範囲に設定することで、本実施形態のプローブにおけるレポーター領域及びアンカー領域の間で適切な距離を保つことができるため、ＳＮＰの検出能が向上する傾向にある。また、第１の標的塩基配列及び第２の標的塩基配列の間隔に応じて、リンカー領域の長さを設定することができるため、余計なヌクレオチドを合成する必要がなく、経済的にも優れる傾向にある。第２の標的塩基配列が第１の標的塩基配列の５’側に位置する場合は、第１の標的塩基配列の５’末端から第２の標的塩基配列の３’末端までのヌクレオチドの数を上記範囲に設定することができる。

[0025] 本実施形態における標的核酸としては、ＤＮＡ又はＲＮＡが挙げられるが、ＤＮＡであることが好ましい。標的核酸の由来としては、ＤＮＡ又はＲＮＡを含むものであれば特に限定されるものではなく、例えば、動物、植物、菌類、微生物、ウイルス等が挙げられる。また、標的核酸の調製方法も、特に限定されるものではなく、生物体又はウイルスから直接調製してもよく、特定の組織から調製してもよく、テンプレートとなる核酸から人工的にクローニングして調製してもよく、ＰＣＲ法又はＬＡＭＰ法による増幅産物を用いてもよい。

[0026] 本明細書において「完全マッチ」とは、標的核酸中の第１の標的塩基配列に対して、レポーター領域の塩基配列が完全に相補的な配列を有するため、第１の標的塩基配列とレポーター領域とがハイブリダイズすることをいう。これに対し、「ミスマッチ」とは、標的核酸中の塩基配列に対して、レポーター領域の塩基配列が１塩基でも異なる配列を有するため、完全マッチの場合と比較して当該塩基配列とレポーター領域とがハイブリダイズしにくいことをいう。

[0027] ＜プローブ＞

本実施形態のプローブは、第１の一塩基多型を検出するレポーター領域と、第２の一塩基多型を検出するアンカー領域と、リンカー領域と、を含む。本実施形態のプローブにおいて、レポーター領域及びアンカー領域の位置関係は、標的核酸において第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型の位置関係で存在するときの、第１の標的塩基配列及び第２の標的塩基配列の位置関係に応じて、適宜設定することができる。例えば、第２の標的塩基配列が第１の標的塩基配列の３’側に位置するときは、アンカー領域はレポーター領域の５’側に配置される。

[0028] 本実施形態のプローブは、第１の一塩基多型を検出するためのレポーター領域とは別に、第２の一塩基多型を検出するための標的塩基配列に結合するアンカー領域を備える。レポーター領域のオリゴヌクレオチドの長さは、アンカー領域のオリゴヌクレオチドの長さよりも短い。そのため、第２の標的

塩基配列にアンカー領域がハイブリダイズすることによりプローブの結合性が確保されると、リンカー領域により連結されたレポーター領域により、第１の一塩基多型の有無を正確に感度よく検出することができる。

[0029] 本実施形態のプローブの製造方法としては、特に限定されるものではなく、例えば、化学合成法を用いた通常のオリゴヌクレオチドの合成方法等が挙げられる。本実施形態のプローブは、通常のオリゴヌクレオチドからなるため複雑な合成方法がいらず、簡便且つ安価に製造することができる。

[0030] （レポーター領域）

レポーター領域は、第１の一塩基多型を検出するための領域である。レポーター領域のオリゴヌクレオチドは、第１の一塩基多型が存在する第１の標的塩基配列と相補的な塩基配列からなるヌクレオチドである。レポーター領域は、第１の一塩基多型が存在する第１の標的塩基配列に対して完全マッチし、第１の標的塩基配列以外の配列（第１の一塩基多型が存在しない以外は第１の標的塩基配列と同一である配列を含む）のときにはミスマッチとなる塩基配列からなるオリゴヌクレオチドである。

[0031] また、レポーター領域は、第１の標的塩基配列及びレポーター領域がハイブリダイズしたときに消光する蛍光色素を有する。レポーター領域がこのような蛍光色素を有することにより、その蛍光強度を測定することで、一塩基多型の検出を簡便に行うことができる。このような特徴を有する蛍光色素としては、例えば、ＱＰｒｏｂｅシリーズ（日鉄住金環境社製）が挙げられる。ＱＰｒｏｂｅは、ハイブリダイズした際に蛍光色素を修飾した塩基に相補する塩基の近傍にグアニンがあるとき、蛍光共鳴エネルギー移動が生じ、蛍光が消光する。ＱＰｒｏｂｅが有する蛍光色素としては、具体的には、Ｐａｃｉｆｉｃ　Ｂｌｕｅ、ＡＴＴＯ４６５、ＢＯＤＩＰＹ－ＦＬ、Ｒｈｏｄａｍｉｎｅ　６Ｇ、ＴＡＭＲＡ及びＡＴＴＯ６５５等が挙げられる。このような蛍光色素を用いることで、レポーター領域及び第１の標的塩基配列がハイブリダイズするか否かによって蛍光特性が変化する。そのため、本実施形態のプローブは、蛍光色素を有するプローブを用いた通常のＳＮＰの検出方法

のように消光剤を添加する必要がなく、経済的に優れる。蛍光色素は、レポーター領域において、リンカー領域とは反対側の末端に結合させることが好ましい。

[0032] 第１の一塩基多型の検出能をより高める観点から、レポーター領域のオリゴヌクレオチドの長さは、３～６個のヌクレオチドが好ましく、３～５個のヌクレオチドがより好ましく、４又は５個のヌクレオチドが更に好ましい。また、本実施形態のプローブにおいては、シス型ＳＮＰの検出能を向上させる観点から、レポーター領域のオリゴヌクレオチドの長さは、アンカー領域のオリゴヌクレオチドの長さよりも短い。レポーター領域が標的核酸にハイブリダイズし、蛍光色素の蛍光を消光させる観点から、レポーター領域のオリゴヌクレオチドは、蛍光色素の結合部位から１～３個以内に、第１の標的塩基配列中にグアニンが存在するように設計することが好ましい。

[0033] （アンカー領域）

アンカー領域は、第２の一塩基多型を検出するための領域である。アンカー領域のオリゴヌクレオチドは、第２の一塩基多型が存在する第２の標的塩基配列と相補的な塩基配列からなるヌクレオチドである。アンカー領域は、第２の一塩基多型が存在する第２の標的塩基配列に対して完全マッチし、第２の標的塩基配列以外のとき（第２の一塩基多型が存在しない以外は第２の標的塩基配列と同一である配列を含む）にはミスマッチとなる塩基配列からなるオリゴヌクレオチドである。第２の標的塩基配列に対して良好な結合性を得る観点から、アンカー領域のオリゴヌクレオチドの長さは、８～２０個のヌクレオチドが好ましく、１０～１８個のヌクレオチドでより好ましく、１１～１５個のヌクレオチドが更に好ましく、１４又は１５個のヌクレオチドが特に好ましい。

[0034] （リンカー領域）

リンカー領域は、プローブの自由度を増加させるための領域である。リンカー領域は、レポーター領域及びアンカー領域を連結している。リンカー領域は、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在する場合の標

的核酸における第１の標的塩基配列及び第２の標的塩基配列の間の塩基配列に対して、非相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを有する。

[0035] プローブをより安価に合成できるという観点から、リンカー領域は、ユニバーサル塩基を含まないことが好ましい。ユニバーサル塩基としては、アデニン、グアニン、シトシン、チミン及びウラシル以外の塩基であるユニバーサル塩基、又はそのアナログ等が挙げられる。ユニバーサル塩基又はそのアナログとしては、例えば、５－ニトロインドール、デオキシリボシド、３－ニトロピロールデオキシリボシド、４－ニトロベンゾイミダゾールデオキシリボシド、デオキシネブラリン、デオキシイノシン、２’－ＯＭｅイノシン、２’－ＯＭｅ５－ニトロインドールリボシド、２’－ＯＭｅ３－ニトロピロールリボシド、２’－Ｆイノシンリボシド、２’－Ｆネブラリン、２’－Ｆ５－ニトロインドールリボシド、２’－Ｆ４－ニトロベンゾイミダゾールリボシド、２’－Ｆ３－ニトロピロールリボシド、ＰＮＡ－５－ニトロインドール（ｉｎｔｒｏｉｎｄｏｌｅ）、ＰＮＡ－ネブラリン、ＰＮＡ－イノシン、ＰＮＡ－４－ニトロベンゾイミダゾール、ＰＮＡ－３－ニトロピロール、モルホリノ－５－ニトロインドール、モルホリノ－ネブラリン、モルホリノ－イノシン、モルホリノ－４－ニトロベンゾイミダゾール、モルホリノ－３－ニトロピロール、ホスホラミダイト－５－ニトロインドール、ホスホラミダイト－ネブラリン、ホスホラミダイト－イノシン、ホスホラミダイト－４－ニトロベンゾイミダゾール、ホスホラミダイト－３－ニトロピロール、２’－Ｏ－メトキシエチルイノシン、２’－Ｏ－メトキシエチルネブラリン、２’－Ｏ－メトキシエチル５－ニトロインドールリボシド、２’－Ｏ－メトキシエチル４－ニトロ－ベンゾイミダゾールリボシド、２’－Ｏ－メトキシエチル３－ニトロピロールリボシド、デオキシ$Ｒ_{Ｐ}$ＭＰ－５－ニトロインドールダイマー２’－ＯＭｅ$Ｒ_{Ｐ}$ＭＰ－５－ニトロインドールダイマー等が挙げられる。

[0036] リンカー領域は、アデニン、グアニン、シトシン、又はチミンのいずれか１種の塩基のみからなるオリゴヌクレオチドであることが好ましい。これに

より、リンカー領域で標的核酸に結合する可能性が低下するため、レポーター領域の自由度が増し、シス型ＳＮＰの検出能を向上させやすい。また、リンカー領域を上記塩基のみで構成することで、より安価にプローブを合成することができる傾向にある。

[0037] また、リンカー領域のオリゴヌクレオチドの長さは、３～１１個のヌクレオチドが好ましく、３～９個のヌクレオチドがより好ましく、７個であることが特に好ましい。リンカー領域のオリゴヌクレオチドの長さを上記範囲とすることで、標的核酸に結合するアンカー領域とレポーター領域とが一定距離離れるため、レポーター領域の自由度が増し、シス型ＳＮＰの検出能が向上する傾向にある。また、標的核酸と本実施形態のプローブとがハイブリダイズする際に、立体構造上の自由度を得る観点から、リンカー領域のオリゴヌクレオチドの長さは、上述した第１の標的塩基配列及び第２の標的塩基配列の間隔（インターバル）に対して、－５～＋５個が好ましく、－３～＋３個がより好ましい。

[0038] ＜プローブを用いた第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別する方法＞

本実施形態のプローブは、第１の一塩基多型を検出するレポーター領域に蛍光色素を有するため、その蛍光強度に基づいて、標的核酸における第１の一塩基多型の有無を検出することができる。

[0039] 第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別する方法の一実施形態としては、本実施形態のプローブ並びに第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型が異なる位置に存在する標的核酸を混合し、混合液を調製する工程と、この混合液の蛍光強度を測定する工程と、測定した蛍光強度に基づき、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別する工程と、を備える方法が挙げられる。

[0040] 図１は、第１の一塩基多型がＣ７９７Ｓ、第２の一塩基多型がＴ７９０Ｍである場合の、本実施形態のプローブと、標的核酸とを混合したときの両者

の状態を模式的に表した図である。Ｔ７９０Ｍが存在する第２の標的塩基配列に対して相補的な配列を有するアンカー領域において、プローブは標的核酸とハイブリダイズする（図１（ａ）及び（ｂ－１））。そして、さらにレポーター領域が、Ｃ７９７Ｓが存在する第１の標的塩基配列とハイブリダイズすると、蛍光色素の蛍光は消光する（図１（ａ））。この場合、Ｃ７９７Ｓ及びＴ７９０Ｍはシス型で存在すると判断できる。一方、レポーター領域がミスマッチとなる場合、レポーター領域はハイブリダイズできないため、蛍光色素の蛍光は発光し続ける（図１（ｂ－１））。この場合、Ｃ７９７Ｓ及びＴ７９０Ｍはトランス型で存在すると判断できる。また、本実施形態のプローブは、アンカー領域のヌクレオチドの長さよりも、レポーター領域のヌクレオチドの長さが短く、アンカー領域によりプローブの結合性が確保される。そのため、アンカー領域がミスマッチとなる場合には、Ｃ７９７Ｓが存在する第１の標的塩基配列が存在していても、レポーター領域は第１の標的塩基配列にハイブリダイズすることはできないため、蛍光色素の蛍光は発光し続ける（図１（ｂ－２））。この場合も、Ｃ７９７Ｓ及びＴ７９０Ｍはトランス型で存在すると判断できる。

[0041] 本実施形態のプローブは、レポーター領域が標的核酸における第１の標的塩基配列とハイブリダイズしないときは蛍光を発している。したがって、例えば、プローブ及び標的核酸を混合した際に、混合前に比べてその混合液の蛍光強度が減少するときには、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在すると判断することができる。逆に、プローブ及び標的核酸を混合した際に、混合前に比べてその混合液の蛍光強度が維持される又は増加するときには、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がトランス型で存在すると判断することができる。上記蛍光強度は、室温（２５℃付近）でも測定できるため、本実施形態の方法によれば、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかの判別を効率的に行うことができる。

[0042] ＳＮＰを検出するための方法の別の実施形態としては、Ｔｍ（融解温度：

Ｍｅｌｔｉｎｇ　Ｔｅｍｐｅｒａｔｕｒｅ）解析を行う方法が挙げられる。Ｔｍ解析は、当業者が通常用いる方法で行うことができる。Ｔｍ解析としては、例えば、プローブ及び標的核酸を混合し、この混合液の温度を変化させつつ、そのときの混合液の蛍光強度を測定する方法が挙げられる。レポーター領域がミスマッチとなる場合、完全マッチする場合と比較してプローブ及び標的核酸の複合体の熱安定性が低いため、より低い温度でレポーター領域が標的核酸に結合し、蛍光の消光が測定される。この時の温度を消光開始温度と呼ぶ。一方、レポーター領域が完全マッチとなる場合、ミスマッチする場合と比較してプローブ及び標的核酸の複合体の熱安定性が強いため、より高い温度でもレポーター領域が標的核酸と結合し、蛍光の消光が測定される。したがって、例えば、レポーター領域がミスマッチとなるときの標的核酸の消光開始温度を測定し、この値よりも消光開始温度が高温であるときは、測定に用いた標的核酸では、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在すると判断することができる。ただし、レポーター領域の特異性が高く、ミスマッチとなる場合に全く消光が測定されない場合には、例えば、アンカー領域がミスマッチとなるときの標的核酸の消光開始温度を測定し、この値よりも消光開始温度が高温であるときは、測定に用いた標的核酸では、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在すると判断することができる。

[0043]　本実施形態の第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別する方法は、プローブ並びに第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型が異なる位置に存在する標的核酸を混合し、混合液を調製する工程において、さらに、競合オリゴヌクレオチドを混合することができる。競合オリゴヌクレオチドは、第１の標的塩基配列に対する野生型の塩基配列と完全相補する配列を有するオリゴヌクレオチドであってもよく、第２の標的塩基配列に対する野生型の塩基配列と完全相補する配列を有するオリゴヌクレオチドであってもよく、またその組み合わせであってもよいが、第２の標的塩基配列に対する野生型の塩基配列と完全相補する配

列を有するオリゴヌクレオチドであることが好ましい。競合オリゴヌクレオチドをさらに加えることで、シス型ＳＮＰの検出精度を向上することができる。

[0044] 本実施形態のプローブは、アンカー領域が第２の標的塩基配列を介して標的核酸にハイブリダイズするため、第１の一塩基多型を検出するレポーター領域のヌクレオチドの長さを非常に短くすることができる。そのため、レポーター領域の特異性が高くなり、室温のような温度が低い条件下でも、レポーター領域はミスマッチの配列に対してハイブリダイズしにくくなる。その結果、ミスマッチの際の室温付近における混合液の蛍光強度は、消光開始温度のときの蛍光強度と比較しても、顕著には低下しない。一方で、レポーター領域が完全マッチするとき、レポーター領域は室温付近で第１の標的塩基配列を介して標的核酸とハイブリダイズする。したがって、完全マッチの際の室温付近における混合液の蛍光強度は、消光開始温度のときの蛍光強度と比較して、顕著に減少し、およそ６０％以下になる。したがって、例えば、Ｔｍ解析を用いたＳＮＰの検出方法において、室温付近における混合液の蛍光強度が、消光開始温度のときの蛍光強度の６０％以下になるとき、測定に用いた標的核酸では、第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在すると判断することができる。

[0045] 本実施形態の判別方法において、ＰＣＲ法、ＬＡＭＰ法等の方法により増幅された増幅産物を標的核酸として用いてもよい。

[0046] 本実施形態のプローブ及び判別方法によれば、例えば、第１の一塩基多型と第２の一塩基多型が、シス型又はトランス型と異なる位置関係で存在することで、病徴が変化する疾患を有する患者に対する診断、適切な治療薬・治療方法等を選択する上での指標を提供することができる。また、例えば、第１の一塩基多型と第２の一塩基多型が、シス型又はトランス型と異なる位置関係で存在することで、治療薬への反応が変化する疾患を有する患者に対する適切な治療薬・治療方法等を選択する上での指標を提供することができる。また、例えば、治療薬への耐性の原因となる第１の一塩基多型と第２の一

塩基多型が、シス型又はトランス型と異なる位置関係で存在することで、治療薬への耐性の強度等が異なる場合に、その耐性への対応の選択及び耐性を克服するための治療薬・治療方法の開発等のための指標を提供することができる。

## 実施例

[0047] 以下、実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0048] ［実施例１：プローブ及びＬＡＭＰ法用プライマーの設計］

リファレンス配列として、Homo sapiens epidermal growth factor receptor (EGFR), RefSeqGene(LRG_304) on chromosome 7（ＮＣＢＩアクセッション番号：ＮＧ＿００７７２６）の配列を用いた。ＥＧＦＲ遺伝子における変異は以下の通りである。

[表1]

| 変異 | エクソン | 塩基変異 | 略称 |
|---|---|---|---|
| deletions | 19 | 2235_2249del15 | B |
| | | 2238_2248>GC | E1 |
| | | 2238_2252>GCA | E2 |
| | | 2239_2247del9 | E3 |
| | | 2239_2251>C | E4 |
| | | 2238_2255del18 | E5 |
| | | 2239_2248>C | E6 |
| | | 2235_2252>AAT | E7 |
| | | 2236_2253del18 | E8 |
| | | 2236_2250del15 | E9 |
| | | 2237_2251del15 | E10 |
| | | 2237_2255>T | E11 |
| | | 2237_2254del18 | E12 |
| | | 2239_2253del15 | E13 |
| | | 2239_2256del18 | E14 |
| | | 2239_2258>CA | E15 |
| | | 2240_2251del12 | E16 |
| | | 2240_2254del15 | E17 |
| | | 2240_2257del18 | E18 |
| insertion | 20 | 2307_2308insGCCAGCGTG | E19 |
| | | 2319_2320insCAC | E20 |
| | | 2310_2311insGGT | E21 |
| G719A | 18 | 2156G>C | G719A |
| G719C | 18 | 2155G>T | G719C |
| G719S | 18 | 2155G>A | G719S |
| S768I | 20 | 2303G>T | S768I |
| T790M | 20 | 2369C>T | T790M |
| L858R | 21 | 2573T>G | L858R |
| L861Q | 21 | 2582T>A | L861Q |
| C797S | 20 | 2389T>A | C797S_1 |
| C797S | 20 | 2390G>C | C797S_2 |

[0049] 本実施例においては、上記の変異のうち、Ｔ７９０Ｍ及びＣ７９７Ｓを対象とした。Ｔ７９０Ｍを検出するためのプローブ及び競合オリゴ配列、Ｃ７

９７Ｓを単独で検出するためのプローブ及び競合オリゴ配列、並びにＴ７９０Ｍ及びＣ７９７Ｓがシス型で存在する場合を検出するためのプローブ及び競合オリゴ配列を、表２のように設計した。なお、Ｃ７９７Ｓは２３８９Ｔ＞Ａと２３９０Ｇ＞Ｃの２つの変異があることが知られているが、検出頻度の高い２３８９Ｔ＞Ａに基づきＣ７９７Ｓを検出するプローブを設計した。以下、２３８９Ｔ＞Ａの変異によるＣ７９７ＳをＣ７９７Ｓ＿１、２３９０Ｇ＞Ｃの変異によるＣ７９７ＳをＣ７９７Ｓ＿２とも表す。

[表2]

| プローブ | | | | | 競合オリゴヌクレオチド | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| プローブ名 | 対象変異 | 配列(5′→3′) | 配列番号 | ＱＰｒｏｂｅ | 配列 | 配列番号 |
| T790M 検出用プローブ | T790M | GCTCATCATGCAGCTC | 1 | TAMRA | AGCTCATCACGCAGCTCAT | 2 |
| シス型検出用リンカープローブ | C797S_1, T790M (シス型) | CATCATGCAGCTCA[AAAAAAA]CAGCC | 3 | TAMRA 又は BODIPY | AGCTCATCACGCAGCTCAT | 4 |
| C797S 検出用プローブ | C797S_1 (2389T>A) | TTCGGCAGCCTC | 5 | TAMRA | CCTTCGGCTGCCTC | 6 |

下線部はＢＮＡ合成部分、囲み部分はＳＮＰに対応する部分、Ｉはイノシン、[] はリンカー配列を示している。ＱＰｒｏｂｅはリンカー配列とは反対側のレポーター領域の末端に結合させている。

[0050]　ＬＡＭＰ法用にプライマーを以下のように設計した。

[表3]

| 対象変異 | プライマー名 | 配列 | 配列番号 |
|---|---|---|---|
| T790M、C797S | EGFR_T790M_3_ID2-F3 | TGGAAGGGGTCCATGTGC | 7 |
| | EGFR_T790M_3_ID2-B3 | GGGAGCCAATATTGTCTTTGT | 8 |
| | EGFR_T790M_3_ID2-FIP | CACGTAGGCTTCCTGGAGGGTCTGGCCACCATGCGAAG | 9 |
| | EGFR_T790M_3_ID2-BIP | GGCATCTGCCTCACCTCCACGTTCCCGGACATAGTCCA | １０ |
| | EGFR_T790M_3_ID2-LF1 | GAGGCACGTCAGTGTGG | １１ |

[0051] ［実施例２：ＬＡＭＰ法を用いたＣ７９７Ｓ＿１の検出］

実施例１で設計したＣ７９７Ｓ＿１（２３８９Ｔ＞Ａ）を単独で検出する

ためのプローブ（表２のＣ７９７Ｓ検出用プローブ）による、Ｃ７９７Ｓの検出能を、ＬＡＭＰ法を用いて測定した。

[0052] （材料）

鋳型ＤＮＡ：Ｃ７９７Ｓ＿１（２３８９Ｔ＞Ａ）を含むＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡ、Ｃ７９７Ｓ＿２（２３９０Ｇ＞Ｃ）を含むＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡ、野生型のＥＧＦＲ遺伝子配列を有するＤＮＡ。鋳型ＤＮＡは、上記ＤＮＡを単独又は混合して用いる。

ＱＰｒｏｂｅ結合プローブ：配列番号５の塩基配列を有するＤＮＡにＱＰｒｏｂｅを結合させたもの（Ｃ７９７Ｓ検出用プローブ）。

ＬＡＭＰ用プライマー：配列番号７～１０のいずれかの塩基配列を有するプライマー。

ＬＡＭＰ用マスターミックス：３０ｍＭ　ＫＣｌ、１．８％　Ｄｅｘｔｒａｎ、１４ｍＭ　Ｔｒｉｃｉｎｅ、０．１％　ｎ－ｈｅｐｔｙｌ、０．５％　Ｔｗｅｅｎ、０．３％　ＦＣＰ、１ｍＭ　ＤＴＴ、１．７ｍＭ　ｅａｃｈ　ｄＮＴＰｓ、８ｍＭ　$MgSO_4$、１．６μＭ　Ｆｏｒｗａｒｄ　ｉｎｎｅｒ　ｐｒｉｍｅｒ（ＦＩＰ、配列番号９）、Ｂａｃｋｗａｒｄ　ｉｎｎｅｒ　ｐｒｉｍｅｒ（ＢＩＰ、配列番号１０）、０．８μＭ　Ｌｏｏｐ　ｐｒｉｍｅｒ（ＬＰ、配列番号１１）、０．２μＭ　Ｆ３（配列番号７）、０．２μＭ　Ｂ３（配列番号８）、１．２μＭ　競合オリゴ、０．０４μＭ　ｐｒｏｂｅ、０．０３７５×　ｉｎｔｅｒｃａｌａｔｏｒ　（ｇｅｌ　ｇｒｅｅｎ）、１９．７Ｕ　Ｂｓｔ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（以上は、濃度は２５μＬ時の最終濃度）。

[0053] （方法）

ＬＡＭＰ用マスターミックス２０μｌに対して加熱変性させた鋳型ＤＮＡ５μｌ（鋳型量１００００ｃｐｓ）を添加し反応液を調製した。リアルタイム蛍光測定器ＬＣ４８０（Ｒｏｃｈｅ社製）にて、反応液を６５℃９０分インキュベートし、増幅産物を９５℃５分で熱変性させてから、３７℃５分で増幅産物とＱＰｒｏｂｅ結合プローブをハイブリダイズさせた。反応後、反

応液の温度を３７℃～８０℃まで徐々に上昇（ａｃｑｕｉｓｉｔｉｏｎ　７／℃）させ、蛍光強度を測定して熱融解曲線解析を行った。蛍光強度は、ＱＰｒｏｂｅがＢｏｄｉｐｙＦＬを有するときには、４６５／５１０（ｎｍ）にて測定し、ＱＰｒｏｂｅがＴＡＭＲＡを有するときには、５３３／５８０（ｎｍ）にて測定した。

[0054]（結果）

熱融解曲線解析を行った際の蛍光強度の変化を図２に示す。実施例１で設計したＣ７９７Ｓ検出用プローブを用いることにより、鋳型量が１００００ｃｐｓのとき、Ｃ７９７Ｓ＿１の変異含有率５％まで検出できることが示された。ここで、変異含有率とは、鋳型ＤＮＡ全体における変異を含む鋳型ＤＮＡの割合を意味する。

[0055]［実施例３：ＬＡＭＰ法を用いたシス型リンカープローブのスクリーニング］

図３のように、長さが同じ３つのプローブ（１）～（３）を作成した。各プローブには、ＱＰｒｏｂｅ（ＴＡＭＲＡ）が結合されている。

（１）Ｔ７９０Ｍ及びＣ７９７Ｓを含む配列からなるプローブ（配列番号１２）

（２）Ｔ７９０Ｍを含む配列及び野生型の配列からなるプローブ（配列番号１３）

（３）野生型の配列及びＣ７９７Ｓを含む配列からなるプローブ（配列番号１４）

[0056]　これに対して、Ｔ７９０Ｍを認識する配列及びＣ７９７Ｓを認識する配列がリンカーで結合された合成オリゴヌクレオチドを設計した。Ｔ７９０Ｍを認識する配列は変えずに、Ｃ７９７Ｓを認識する配列及びリンカーの長さをそれぞれ変化させ、表４のように４種類の合成オリゴヌクレオチドを設計した。

[表4]

スクリーニングに用いた合成オリゴヌクレオチド

| 番号 | Ｃ７９７Ｓ認識配列の長さ | リンカーの長さ |
|---|---|---|
| Ｃ７９７Ｓ－１ | ５ｍｅｒ | ７ｍｅｒ |
| Ｃ７９７Ｓ－２ | ５ｍｅｒ | ９ｍｅｒ |
| Ｃ７９７Ｓ－３ | ４ｍｅｒ | ７ｍｅｒ |
| Ｃ７９７Ｓ－４ | ５ｍｅｒ | ５ｍｅｒ |

[0057] 表４の合成オリゴヌクレオチドをそれぞれ鋳型ＤＮＡとして用い、図３のプローブ（１）～（３）をそれぞれＱＰｒｏｂｅ結合プローブとして用いて、以下の試薬組成でハイブリダイズさせた。スクリーニング用マスターミックス（３０ｍＭ　ＫＣｌ、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．０）、０．１％　Ｔｗｅｅｎ、１．６μＭ　合成オリゴヌクレオチド、０．０５μＭ　プローブ）を混合させた後、リアルタイム蛍光測定器ＬＣ４８０（Ｒｏｃｈｅ社製）にて、反応液の温度を３７～８０℃まで徐々に上昇（ａｃｑｕｉｓｉｔｉｏｎ　７／℃）させ、蛍光強度を測定して熱融解曲線解析を行った。蛍光強度を測定して熱融解曲線解析を行った結果、Ｃ７９７Ｓ－１の合成オリゴヌクレオチドを用いたときに、最も効率よくプローブ（１）のみが消光し、シス型のＴ７９０Ｍ及びＣ７９７Ｓを含む配列のみを検出することができた。図３に記載されたＴ７９０Ｍを認識する配列及びＣ７９７Ｓを認識する配列がリンカー（ＴＴＴＴＴＴＴ）で結合された合成オリゴヌクレオチドを用いたときの熱融解曲線解析の結果を図４に示す。

[0058] ［実施例４：ＬＡＭＰ法を用いたシス型変異の検出］

実施例３において、効率よくシス型のＴ７９０Ｍ及びＣ７９７Ｓを含む配列のみを検出することができたＣ７９７Ｓ－１の合成オリゴヌクレオチド（配列番号３）をプローブへと変換し、シス型検出用リンカープローブを作製した。

[0059] 実施例１のＥＧＦＲ遺伝子リファレンス配列及び表１の変異を参考に、シス型のＴ７９０Ｍ及びＣ７９７Ｓを含むＥＧＦＲ遺伝子配列、トランス型のＴ７９０Ｍ及びＣ７９７Ｓを含むＥＧＦＲ遺伝子配列、Ｔ７９０Ｍのみを含

むＥＧＦＲ遺伝子配列、並びにＣ７９７Ｓのみを含むＥＧＦＲ遺伝子配列を設計し、人工遺伝子を作製した。

[0060] 上記人工遺伝子及び野生型のＥＧＦＲ遺伝子の配列を有するゲノムＤＮＡをそれぞれ鋳型ＤＮＡとして用い、上記シス型検出用リンカープローブをＱＰｒｏｂｅ結合プローブとして用いて、実施例２と同様にＬＡＭＰ法によりハイブリダイズさせた。Ｃ７９７Ｓのみを含む人工遺伝子の配列を有するオリゴヌクレオチドを用いた場合にわずかに観察される消光を除外し、さらに感度を高めるため、Ｔ７９０Ｍ配列部位の野生型に完全相補する競合オリゴ（配列番号２）を１．２μＭ添加した。ＬＡＭＰ産物について実施例２と同様に蛍光強度を測定して熱融解曲線解析を行った結果を図５に示す。

[0061] 上記シス型検出用リンカープローブを用いることにより、Ｔ７９０Ｍ及びＣ７９７Ｓがシス型で存在する場合のみを検出することができた。また、変異含有率１２．５％まで検出できることが示された。ここで、変異含有率とは、鋳型ＤＮＡ全体における変異を含む鋳型ＤＮＡの割合を意味する。

# 請求の範囲

[請求項1] 第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型が異なる位置に存在する標的核酸において、前記第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別するための一塩基多型検出用オリゴヌクレオチドプローブであって、

前記標的核酸が、前記第１の一塩基多型が存在する第１の標的塩基配列と、前記第２の一塩基多型が存在する第２の標的塩基配列と、を含み、

前記プローブが、前記第１の一塩基多型を検出するレポーター領域と、前記第２の一塩基多型を検出するアンカー領域と、リンカー領域と、を含み、

前記レポーター領域が、前記第１の標的塩基配列に対して完全マッチする塩基配列からなるオリゴヌクレオチドと、前記第１の標的塩基配列及び前記レポーター領域がハイブリダイズしたときに消光する蛍光色素と、を有し、

前記アンカー領域が、前記第２の標的塩基配列に対して完全マッチする塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを有し、

前記リンカー領域が、前記レポーター領域及び前記アンカー領域を連結しており、前記第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在する場合の前記標的核酸における前記第１の標的塩基配列及び前記第２の標的塩基配列の間の塩基配列に対して、非相補的な塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを有し、

前記レポーター領域のオリゴヌクレオチドの長さが、前記アンカー領域のオリゴヌクレオチドの長さよりも短い、プローブ。

[請求項2] 前記リンカー領域が、ユニバーサル塩基を含まない塩基配列からなるオリゴヌクレオチドである、請求項１に記載のプローブ。

[請求項3] 前記リンカー領域が、アデニン、グアニン、シトシン、又はチミンのいずれか１種の塩基のみからなるオリゴヌクレオチドである、請求

項１又は２に記載のプローブ。

[請求項4] 前記リンカー領域が、３～１１個のヌクレオチドからなるオリゴヌクレオチドである、請求項１～３のいずれか一項に記載のプローブ。

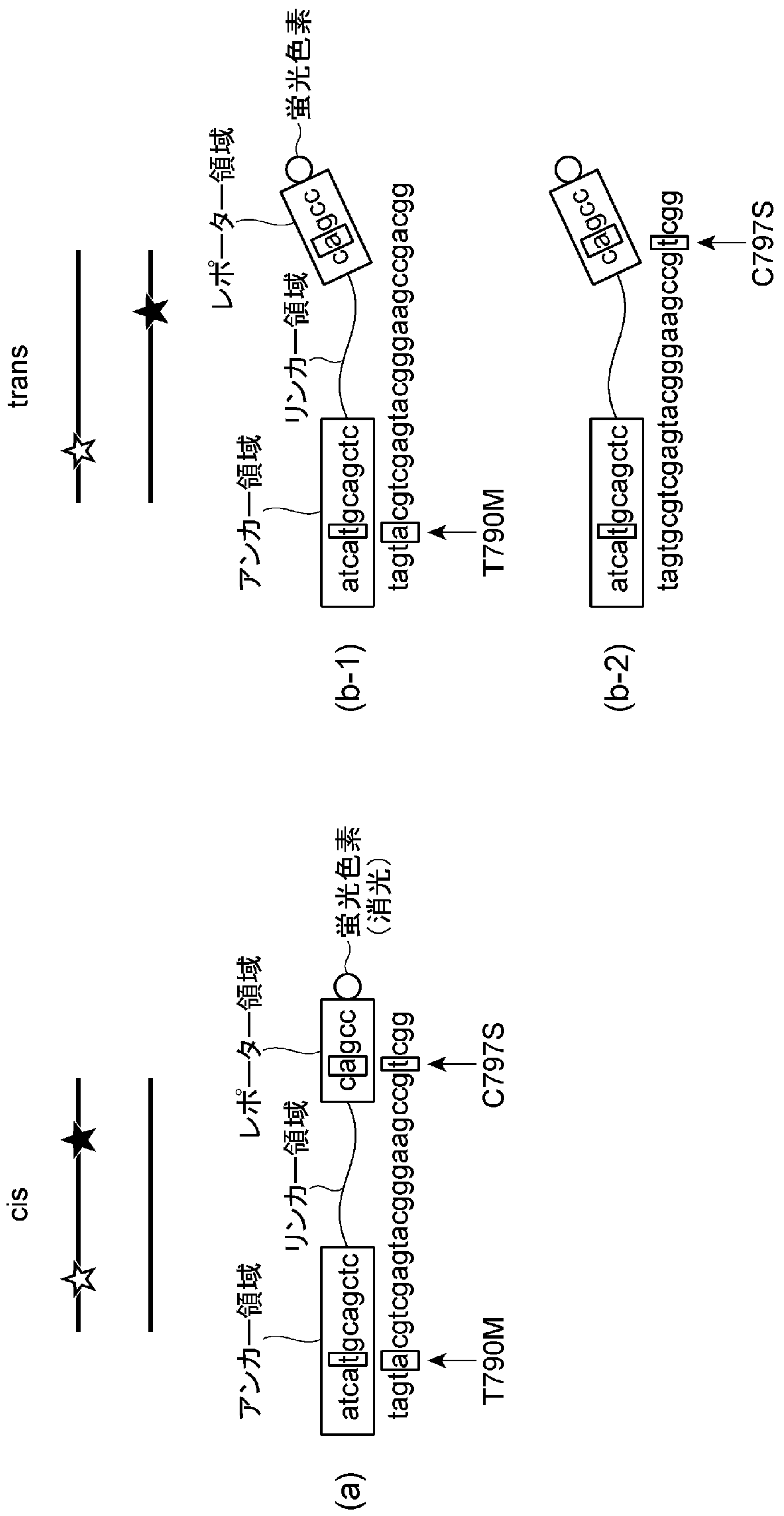
[請求項5] 第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別する方法であって、

請求項１～４のいずれか一項に記載のプローブ並びに第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型が異なる位置に存在する標的核酸を混合し、混合液を調製する工程と、

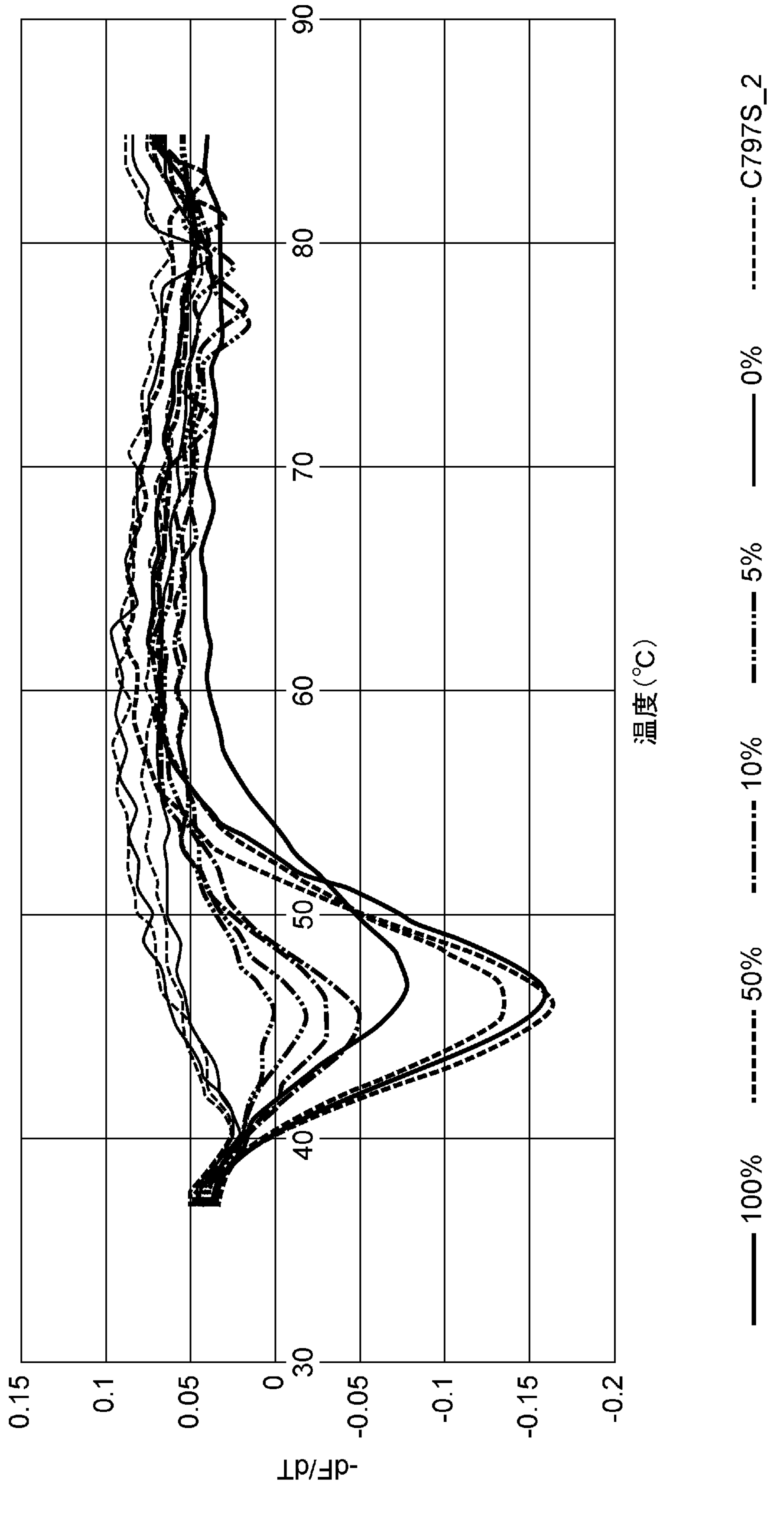
前記混合液の蛍光強度を測定する工程と、

前記蛍光強度に基づき、前記第１の一塩基多型及び第２の一塩基多型がシス型で存在するか又はトランス型で存在するかを判別する工程と、を備える方法。

［図1］

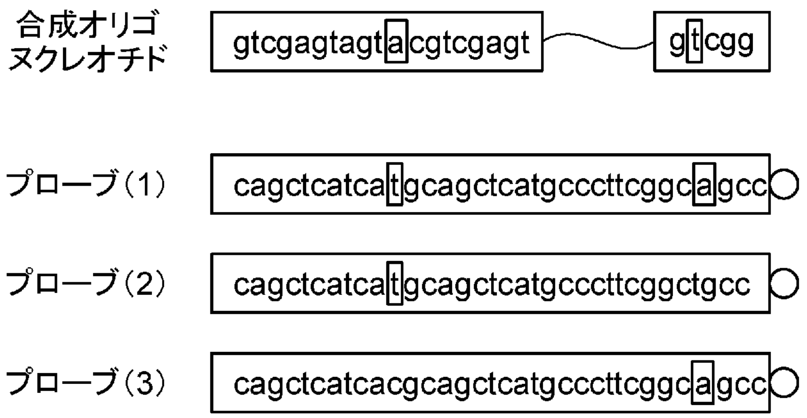

cis
trans
(a)
(b-1)
(b-2)
アンカー領域
リンカー領域
レポーター領域
蛍光色素
（消光）
蛍光色素
atcatgcagctc
cagcc
tagtacgtcgagtacgggaagccgtcgg
tagtacgtcgagtacgggaagccgacgg
tagtgcgtcgagtacgggaagccgtcgg
T790M
C797S

[図2]

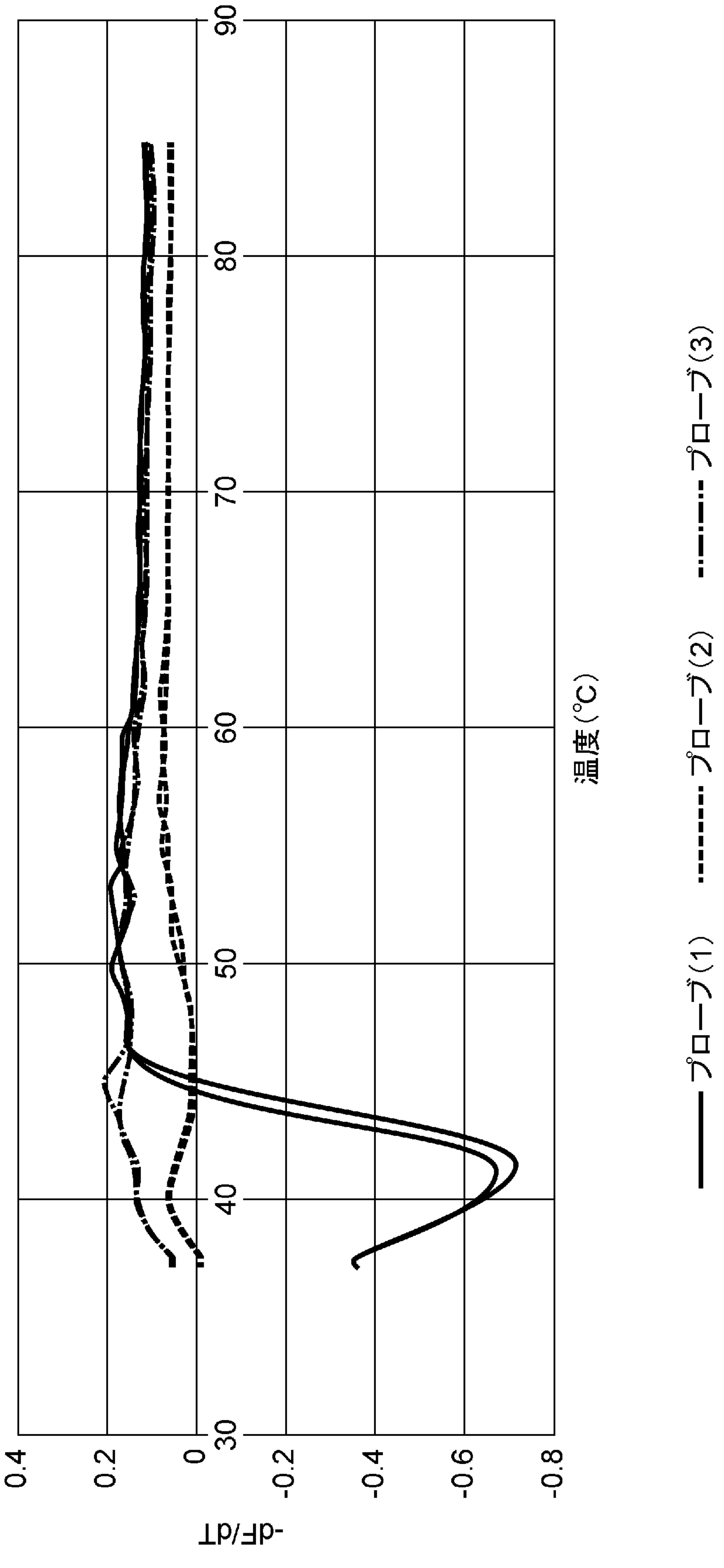


-dF/dT
0.15
0.1
0.05
0
-0.05
-0.1
-0.15
-0.2
30
40
50
60
70
80
90
温度(℃)
100%
50%
10%
5%
0%
C797S_2

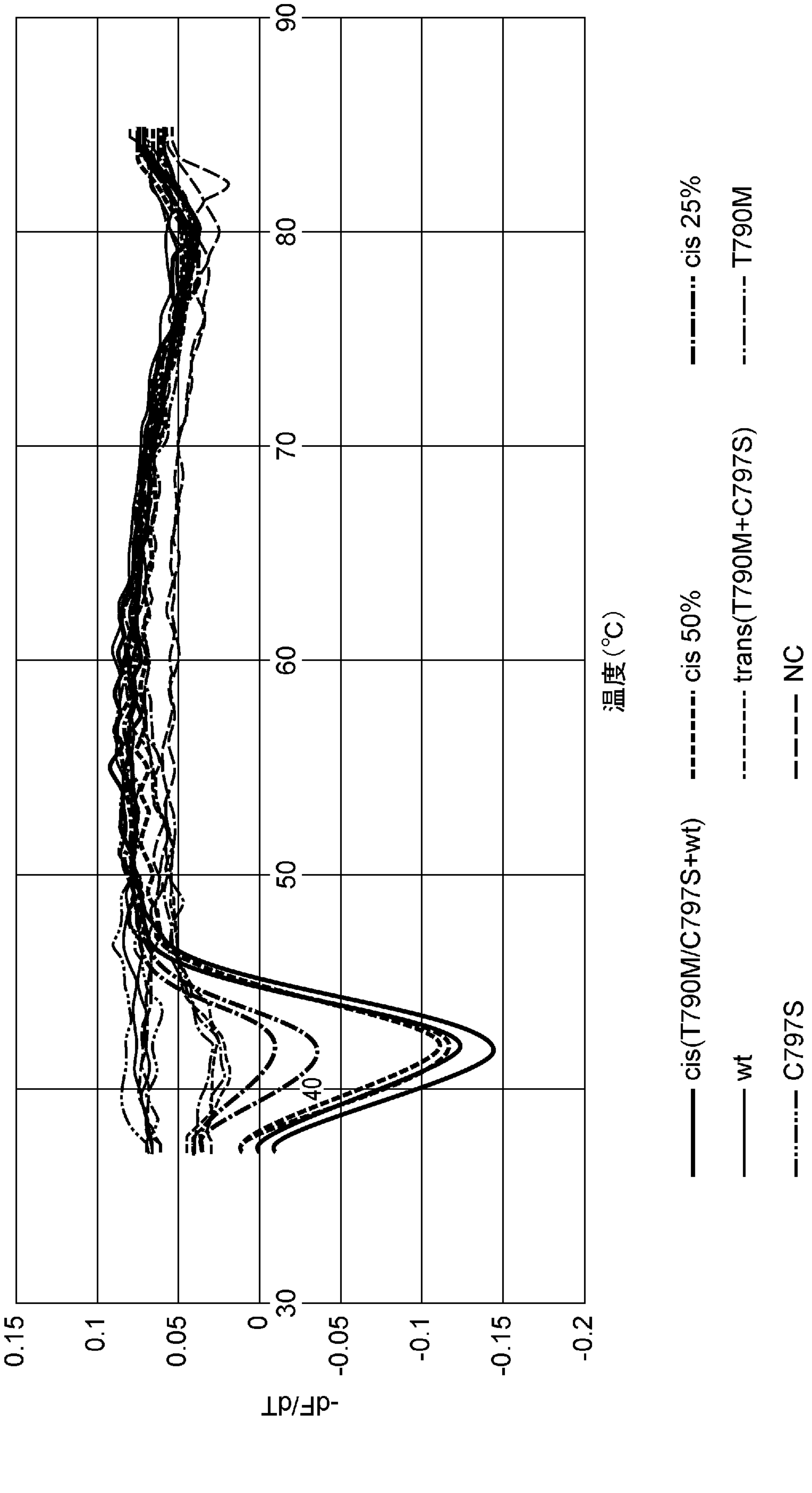
[図3]


合成オリゴ
ヌクレオチド
gtcgagtagtacgtcgagt
gtcgg
プローブ(1)
cagctcatcatgcagctcatgcccttcggcagcc
プローブ(2)
cagctcatcatgcagctcatgcccttcggctgcc
プローブ(3)
cagctcatcacgcagctcatgcccttcggcagcc

［図4］



［図5］


-dF/dT
0.15
0.1
0.05
0
-0.05
-0.1
-0.15
-0.2
30
40
50
60
70
80
90
温度(℃)
cis(T790M/C797S+wt)
cis 50%
cis 25%
wt
trans(T790M+C797S)
T790M
C797S
NC

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/010012

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C12Q1/6876(2018.01)i, C12Q1/6827(2018.01)i, C12N15/09(2006.01)n
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)
Int.Cl. C12Q1/6876, C12Q1/6827, C12N15/09

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

| | |
|---|---|
| Published examined utility model applications of Japan | 1922-1996 |
| Published unexamined utility model applications of Japan | 1971-2019 |
| Registered utility model specifications of Japan | 1996-2019 |
| Published registered utility model applications of Japan | 1994-2019 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN), AGRICOLA (STN), FSTA (STN), SCISEARCH (STN), TOXCENTER (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | WO 2016/098595 A1 (EIKEN CHEMICAL CO., LTD.) 23 June 2016 & US 2017/0342471 A1 & EP 3241900 A1 & CN 107109398 A | 1-5 |
| A | JP 2001-286300 A (JAPAN BIOINDUSTRY ASSOCIATION) 16 October 2001 & JP 2003-334078 A & JP 2004-305219 A & US 2001/0000175 A1 & US 2001/0000148 A1 & US 2003/0082592 A1 & US 2004/0063137 A1 & US 2006/0177856 A1 & EP 1046717 A2 | 1-5 |

☒ 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 |
|---|---|
| 27 May 2019 (27.05.2019) | 04 June 2019 (04.06.2019) |

| Name and mailing address of the ISA/ | Authorized officer |
|---|---|
| Japan Patent Office<br>3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,<br>Tokyo 100-8915, Japan | Telephone No. |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.
PCT/JP2019/010012

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | JP 2012-523821 A (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 11 October 2012 & US 2010/0221717 A1 & US 2010/0285478 A1 & US 2011/0287424 A1 & US 2015/0140557 A1 & WO 2010/111682 A2 & WO 2010/077324 A2 & WO 2010/080559 A2 & EP 2376659 A2 & EP 2411543 A2 & EP 3249053 A1 | 1-5 |
| A | WO 2013/145939 A1 (NEC CORP.) 03 October 2013 & US 2015/0064696 A1 | 1-5 |
| A | JP 2009-517054 A (SIMONS HAPLOMICS LIMITED) 30 April 2009 & US 2009/0280484 A1 & WO 2007/062486 A1 | 1-5 |
| A | JP 2014-526257 A (EPISTEM LIMITED) 06 October 2014 & US 2014/0227683 A1 & WO 2013/041853 A1 & EP 2758542 A1 & KR 10-2014-0063780 A | 1-5 |
| A | WO 2004/000995 A2 (MARSHALL UNIVERSITY) 31 December 2003 & US 2004/0005613 A1 & AU 2003267960 A | 1-5 |

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０１００１２

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/6876(2018.01)i, C12Q1/6827(2018.01)i, C12N15/09(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/6876, C12Q1/6827, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|---|---|
| 日本国実用新案公報 | １９２２－１９９６年 |
| 日本国公開実用新案公報 | １９７１－２０１９年 |
| 日本国実用新案登録公報 | １９９６－２０１９年 |
| 日本国登録実用新案公報 | １９９４－２０１９年 |

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), WPIDS/WPIX (STN), AGRICOLA (STN), FSTA (STN), SCISEARCH (STN), TOXCENTER (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー＊ | 引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
|---|---|---|
| A | WO 2016/098595 A1 (栄研化学株式会社) 2016.06.23, & US 2017/0342471 A1 & EP 3241900 A1 & CN 107109398 A | 1-5 |
| A | JP 2001-286300 A (財団法人 バイオインダストリー協会) 2001.10.16, & JP 2003-334078 A & JP 2004-305219 A & US 2001/0000175 A1 & US 2001/0000148 A1 & US 2003/0082592 A1 & US 2004/0063137 A1 & US 2006/0177856 A1 & EP 1046717 A2 | 1-5 |

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

| | |
|---|---|
| 国際調査を完了した日 ２７．０５．２０１９ | 国際調査報告の発送日 ０４．０６．２０１９ |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号 | 特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　３９５９ 太田　雄三 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８ |

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

| 引用文献のカテゴリー＊ | 引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する請求項の番号 |
|---|---|---|
| A | JP 2012-523821 A (ライフ　テクノロジーズ　コーポレーション) 2012.10.11, & US 2010/0221717 A1 & US 2010/0285478 A1 & US 2011/0287424 A1 & US 2015/0140557 A1 & WO 2010/111682 A2 & WO 2010/077324 A2 & WO 2010/080559 A2 & EP 2376659 A2 & EP 2411543 A2 & EP 3249053 A1 | 1-5 |
| A | WO 2013/145939 A1 (日本電気株式会社) 2013.10.03, & US 2015/0064696 A1 | 1-5 |
| A | JP 2009-517054 A (サイモンズ　ハプロミクス　リミテッド) 2009.04.30, & US 2009/0280484 A1 & WO 2007/062486 A1 | 1-5 |
| A | JP 2014-526257 A (エピスタム　リミテッド) 2014.10.06, & US 2014/0227683 A1 & WO 2013/041853 A1 & EP 2758542 A1 & KR 10-2014-0063780 A | 1-5 |
| A | WO 2004/000995 A2 (MARSHALL UNIVERSITY) 2003.12.31, & US 2004/0005613 A1 & AU 2003267960 A | 1-5 |