

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和3年1月7日(2021.1.7)

【公表番号】特表2019-536456(P2019-536456A)

【公表日】令和1年12月19日(2019.12.19)

【年通号数】公開・登録公報2019-051

【出願番号】特願2019-528833(P2019-528833)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/6851 (2018.01)

G 01 N 33/50 (2006.01)

C 12 Q 1/686 (2018.01)

C 12 Q 1/6876 (2018.01)

【F I】

C 12 Q 1/6851 Z N A Z

G 01 N 33/50 P

C 12 Q 1/686 Z

C 12 Q 1/6876 Z

【手続補正書】

【提出日】令和2年11月17日(2020.11.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

非小細胞肺癌(N S C L C)の診断、予後予測、モニタリング、又は治療法選択を必要とする対象における非小細胞肺癌(N S C L C)の診断、予後予測、モニタリング、又は治療法選択のための方法であって、

(a) 前記対象由来の血漿試料から微小小胞を単離し、そして微小小胞から細胞外核酸を抽出する工程と、

(b) 微小小胞から抽出された細胞外核酸と、前記血漿試料由来の循環核酸を同時単離する工程と、

(c) 抽出された細胞外核酸と単離された循環核酸中の上皮増殖因子受容体(E G F R)遺伝子中のT 7 9 0 M変異、L 8 5 8 R変異、1つ又は複数のエクソン19の挿入、及び1つ又は複数のエクソン19の欠失のうちの少なくとも1の発現レベルを検出する工程と；

(d) 工程(c)において検出された各発現レベルを、対応する所定のカットオフ閾値と比較して、抽出された細胞外核酸及び単離された循環核酸中のT 7 9 0 M変異、L 8 5 8 R変異、1つ又は複数のエクソン19の挿入、及び1つ又は複数のエクソン19の欠失のうちの少なくとも1の有無を決定する工程と、  
を含み、

ここで、抽出された核酸中のT 7 9 0 M変異、L 8 5 8 R変異、1つ又は複数のエクソン19の挿入、及び1つ又は複数のエクソン19の欠失の存在は、対象におけるN S C L Cの存在、又はN S C L Cを発症する対象のより高い素因を示す、前記方法。

【請求項2】

工程(c)で得られた値がサイクル閾値(C t)である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

微小小胞から抽出された細胞外核酸、及び単離された循環核酸の逆転写を実行することをさらに含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記逆転写工程が、1つ又は複数の増幅対照の使用、1つ又は複数の阻害の対照の使用、或いはそれらの任意の組み合わせを含む、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

前記方法が、工程(b)の後であって工程(c)の前に予備増幅反応工程をさらに含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記予備増幅反応工程がマルチプレックス予備増幅反応工程又は一重予備増幅反応工程である、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記予備増幅反応工程が、野生型EGFR核酸配列よりも変異体EGFR20核酸配列の予備増幅を促進する条件PCR条件下で行われる、請求項5又は6に記載の方法。

【請求項8】

前記マルチプレックス予備増幅反応物が、EGFRのエクソン19、エクソン20、及び/又はエクソン21に対する野生型遮断薬を含む、請求項6又は7に記載の方法。

【請求項9】

前記野生型遮断薬が、疎水性核酸、架橋核酸、ペプチド核酸、3'末端ターミネーターを有する任意のオリゴヌクレオチド、又は野生型配列の効率的な増幅を妨げる任意の他の修飾塩基/ヌクレオチド/配列もしくは条件、又はこれらの組み合わせである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

工程(c)が、配列決定に基づく検出技術、次世代配列技術、又はPCRベースの検出法もしくはPCRを含まない検出法を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

工程(c)がqPCRを含む、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記qPCRが、変異体特異的増幅システム、変異にバイアスされた増幅システム、又は増幅耐性突然変異検出システム(ARMS)である、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記ARMS qPCRシステムが、修飾ヌクレオチド、塩基、もしくは配列を含むプライマー、修飾ヌクレオチド、塩基、もしくは配列を含むプローブ、又は修飾ヌクレオチド、塩基、もしくは配列を含むプライマーと修飾ヌクレオチドを含むプローブとの両方を含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記プライマーが、2-アミノプリン、8-アミノ-2'-デオキシアデノシン、トリメトキシスチルベン、C-5プロピニル-デオキシシチジン、C-5プロピニル-デオキシウリジン、2-アミノ-2'-デオキシアデノシン-5'-ミリン酸、2,6-ジアミノプリン(2-アミノ-dA)、逆dT、逆ジデオキシ-T、ヒドロキシメチルdC、イソ-dC、5-メチルdC、アミノエチル-フェノキサジン-デオキシシチジン、及びロツクト核酸(LNA)からなる群から選択される塩基修飾と、変異体特異的プライムの3'末端での核酸相互作用を増加させるための1つの塩基における少なくとも1つのミスマッチ塩基の包含と、及びこれらの組み合わせとを含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

工程(d)が、1つ又は複数の対照分子を検出することをさらに含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記対応する所定のカットオフ閾値は、機械学習に基づくモデル化、データマイニング方法、及び/又は統計解析を使用して得られる、請求項1～15のいずれか1項に記載の

方法。

【請求項 1 7】

前記抽出された細胞外核酸及び単離された循環核酸中の E G F R 遺伝子中の T 7 9 0 M 変異、 L 8 5 8 R 変異、 1 つ又は複数のエクソン 1 9 の挿入、及び 1 つ又は複数のエクソン 1 9 の欠失のうちの少なくとも 1 の存在が、前記対象が抗 E G F R 療法による治療に対して感受性であるか又は耐性であるかを予測するために使用される、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記抗 E G F R 療法が E G F R 阻害剤による治療を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記抽出された細胞外核酸及び単離された循環核酸において T 7 9 0 M 変異、 L 8 5 8 R 変異、 1 つ又は複数のエクソン 1 9 の挿入、及び 1 つ又は複数のエクソン 1 9 の欠失のうちの少なくとも 1 の存在が検出された場合に、対象に対する治療法選択肢が選択される、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記治療法選択肢が、第 2 世代もしくは第 3 世代チロシンキナーゼ E G F R 阻害剤、又は T 7 9 0 M、 L 8 5 8 R、 1 つ又は複数のエクソン 1 9 の挿入、及び / 又は 1 つ又は複数のエクソン 1 9 の欠失を標的とする任意の他の薬物、による治療である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記方法が、第 2 又は第 3 世代チロシンキナーゼ E G F R 阻害剤、又は T 7 9 0 M、 L 8 5 8 R、 1 つ又は複数のエクソン 1 9 の挿入、及び / 又は 1 つ又は複数のエクソン 1 9 の欠失を特異的に標的とする他の任意の薬物、又はこれらの組み合わせの治療有効量を、前記対象に投与することをさらに含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記細胞外核酸がエキソソーム R N A、エキソソーム D N A、又はエキソソーム R N A とエキソソーム D N A の組み合わせを含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記循環核酸が、壊死性 D N A、無細胞 D N A、又は無細胞 D N A と壊死性 D N A との組み合わせを含む、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記工程 (c) が、表 1 で同定された配列と少なくとも 9 0 % 同一であるオリゴヌクレオチド配列を使用して行われる、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記工程 (c) が、表 1 で同定された配列と少なくとも 9 0 % 同一であるオリゴヌクレオチド遮断薬を使用して行われる、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。