

【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 1 2 Q 1/6851 (2018.01)

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

C 1 2 Q 1/686 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6876 (2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6851 Z N A Z

G 0 1 N 33/50 P

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 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 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 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 1 9 の挿入、及び 1 つ又は複数のエクソン 1 9 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 E G F R 核酸配列よりも変異体 E G F R 2 0 核酸配列  
の予備増幅を促進する条件 P C R 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、E G F R のエクソン 1 9、エクソン 2 0、及  
び / 又はエクソン 2 1 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 1 0】

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 P C R ベースの検出  
法もしくは P C R 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 1 1】

工程 ( c ) が q P C R を含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記 q P C R 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 ( A R M S ) である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 A R M S q P C R 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 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

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' - 三リン酸、2, 6 - ジアミ  
ノプリン ( 2 - アミノ - d A )、逆 d T、逆ジデオキシ - T、ヒドロキシメチル d C、イ  
ソ - d C、5 - メチル d C、アミノエチル - フェノキサジン - デオキシシチジン、及びロ  
ックト核酸 ( L N A ) 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 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

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 ~ 1 4  
のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6】

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 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の

方法。

【請求項 17】

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 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 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

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 17 に記載の方法。

【請求項 19】

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 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 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

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 19 の挿入、及び / 又は 1 つ又は複数のエクソン 19 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 19 に記載の方法。

【請求項 21】

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 19 の挿入、及び / 又は 1 つ又は複数のエクソン 19 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 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記細胞外核酸がエキソソーム RNA、エキソソーム DNA、又はエキソソーム RNA とエキソソーム DNA の組み合わせを含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法

。

【請求項 23】

前記循環核酸が、壊死性 DNA、無細胞 DNA、又は無細胞 DNA と壊死性 DNA との組み合わせを含む、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記工程 (c) が、表 1 で同定された配列と少なくとも 90 % 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 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記工程 (c) が、表 1 で同定された配列と少なくとも 90 % 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 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。