

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-510304

(P2023-510304A)

(43)公表日 令和5年3月13日(2023.3.13)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/686(2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z Z N A 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6816(2018.01)	C 1 2 Q 1/6816	Z
C 1 2 Q 1/6806(2018.01)	C 1 2 Q 1/6806	Z
C 1 2 Q 1/6886(2018.01)	C 1 2 Q 1/6886	Z
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全233頁)		

(21)出願番号	特願2022-542157(P2022-542157)	(71)出願人	516250683
(86)(22)出願日	令和3年1月7日(2021.1.7)		プレックスバイオ カンパニー, リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和4年9月5日(2022.9.5)		台湾 1 1 4 9 1, タイペイ, ネイフーディストリクト, ヤングアン ストリート, ナンバー 3 5 1, 6エフ-1
(86)国際出願番号	PCT/US2021/012541	(74)代理人	110002077
(87)国際公開番号	WO2021/142153		園田・小林弁理士法人
(87)国際公開日	令和3年7月15日(2021.7.15)	(72)発明者	ツァオ, ディーン
(31)優先権主張番号	62/958,599		アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, ヒルズボロ, パークサイド アベニュー 1 9 8 0
(32)優先日	令和2年1月8日(2020.1.8)	(72)発明者	ヒュアン, チン-ショウ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		台湾 1 1 4 9 1, タイペイ シティ, ネイフー ディストリクト, ヤングアン
(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,最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肺癌におけるDNA変異の検出のための画像識別多重アッセイ

(57)【要約】

本明細書では、がん（例えば、肺癌）に関連するDNA及び／またはRNA変異の存在を検出するための方法及びキットが提供される。方法及びキットは、DNAまたはRNA変異に特異的なプローブ及びプローブ配列に独自の識別子をそれぞれ有するマイクロキャリアを用いる。サンプルからの核酸の単離及び増幅の後、増幅されたDNAと、マイクロキャリアに結合したDNAまたはRNA変異に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションは、サンプルにおける変異の存在を示す。各マイクロキャリアは識別子の検出を介して同定され得るので、多重スクリーニングアッセイが提供される。変異についてスクリーニングされ得る代表的な遺伝子には、例えば、DNA変異についてはKRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2及び／またはRNA変異についてはALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMETが含まれる。

【選択図】 図2B

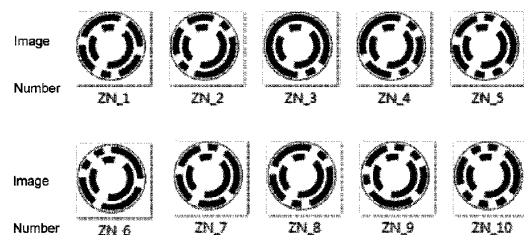


FIG. 2B

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

K R A S、N R A S、P I K 3 C A、B R A F、E G F R、A K T 1、M E K 1、及び H E R 2 遺伝子における変異の存在を検出するための方法であって、前記方法は、

(a) サンプルから D N A を単離すること；

(b) 前記 K R A S、N R A S、P I K 3 C A、B R A F、E G F R、A K T 1、M E K 1、及び H E R 2 遺伝子の各々における 1 つ以上の D N A 変異の遺伝子座に特異的なプライマー対を使用してポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) によって前記単離された D N A を増幅すること；

(c) 前記増幅された D N A を少なくとも 7 つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも 7 つのプローブは、前記 K R A S、N R A S、P I K 3 C A、B R A F、E G F R、A K T 1、M E K 1、及び H E R 2 遺伝子の各々における D N A 変異に特異的な 1 つ以上のプローブを含み、前記少なくとも 7 つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、前記マイクロキャリアの各々は、それに結合した前記プローブに対応する識別子を含む、前記ハイブリダイズさせること；

(d) 前記増幅された D N A と前記少なくとも 7 つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、前記増幅された D N A と前記プローブの 1 つとの間のハイブリダイゼーションは、前記プローブに対応する前記 D N A 変異の存在を示す、前記検出すること；

(e) 前記マイクロキャリアの前記識別子を検出すること；及び

(f) 前記マイクロキャリアの前記検出された識別子を、前記マイクロキャリアの前記対応するプローブに対する前記増幅された D N A のハイブリダイゼーションの前記検出された存在または非存在と関連させることを含む、前記方法。

【請求項 2】

前記 K R A S、N R A S、P I K 3 C A、B R A F、E G F R、A K T 1、M E K 1、及び H E R 2 遺伝子は、ヒト遺伝子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 (b) は、少なくとも 7 つのブロック核酸の存在下で P C R によって前記単離された D N A を増幅することを含み、前記少なくとも 7 つのブロック核酸の各々は、前記 K R A S、P I K 3 C A、B R A F、E G F R、A K T 1、M E K 1、または H E R 2 遺伝子における前記 D N A 変異の 1 つと対応する野生型 D N A 遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型 D N A 遺伝子座の増幅を防止する、請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 7 つのブロック核酸の各々は、

前記対応する野生型 D N A 遺伝子座とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチド；及び

前記一本鎖オリゴヌクレオチドからの伸長をブロックする 3' 末端部位を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 3' 末端部位は、1 つ以上の反転デオキシチミジンを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも 7 つのブロック核酸の各々は、ロック核酸 (L N A)、ペプチド核酸 (P N A)、ヘキソース核酸 (H N A)、トレオース核酸 (T N A)、グリコール核酸 (G N A)、及びシクロヘキセニル核酸 (C e N A) からなる群から選択される 1 つ以上の改変ヌクレオチドを含む、請求項 3 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記 K R A S 遺伝子における前記 1 つ以上の D N A 変異は、G 1 2 D、G 1 2 V、または G 1 2 C 変異 K R A S タンパク質をコードする 1 つ以上の D N A 変異を含む、請求項 2 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記 K R A S 遺伝子における前記 1 つ以上の DNA 変異は、G 1 2 D、G 1 2 V、及び G 1 2 C 変異 K R A S タンパク質をコードする DNA 変異を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 K R A S 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、

(1) T A G T T G G A G C T (配列番号 38)、T G T G G T A G T T G (配列番号 40)、T G A T G G C G T A G (配列番号 42)、T G G A G C T G A T G G C (配列番号 44)、及び G C G T A G G C A A G (配列番号 46) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；

(2) C T G T T G G C G T A G G (配列番号 48)、G T A G T T G G A G C T G (配列番号 50)、T G G A G C T G T T G G C (配列番号 52)、T T G T G G T A G T T G G (配列番号 54)、及び G G C G T A G G C A A G A (配列番号 56) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；及び

(3) T A G T T G G A G C T T (配列番号 58)、G C G T A G G C A A G A (配列番号 60)、G G A G C T T G T G G C (配列番号 62)、T T G T G G C G T A G G (配列番号 64)、及び T G T G G T A G T T G G (配列番号 66) からなる群から選択される配列を含む第 3 のプローブ；

を含み、前記 3 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 3 つのプローブの各々は、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 K R A S 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、

(1) T T T T T T T T T T T T T A A T A G T T G G A G C T (配列番号 39)、T T T T T T T T T T T T A A T G T G G T A G T T G (配列番号 41)、T T T T T T T T T T T T A A T G A T G G C G T A G (配列番号 43)、T T T T T T T T T T T T A T G G A G C T G A T G G C (配列番号 45)、及び T T T T T T T T T T T T T A A G C G T A G G C A A G (配列番号 47) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；

(2) T T T T T T T T T T T T A C T G T T G G C G T A G G (配列番号 49)、T T T T T T T T T T T T A G T A G T T G G A G C T G (配列番号 51)、T T T T T T T T T T T T A T G G A G C T G T T G G C (配列番号 53)、T T T T T T T T T T T T A T T G T G G T A G T T G G (配列番号 55)、及び T T T T T T T T T T T T A G G C G T A G G C A A G A (配列番号 57) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；及び

(3) T T T T T T T T T T T T A A T A G T T G G A G C T T (配列番号 59)、T T T T T T T T T T T T A A G C G T A G G C A A G A (配列番号 61)、T T T T T T T T T T T T A A G G A G C T T G T G G C (配列番号 63)、T T T T T T T T T T T T A A T G T G G C G T A G G (配列番号 65)、及び T T T T T T T T T T T T A A T G T G G T A G T T G G (配列番号 67) からなる群から選択される配列を含む第 3 のプローブ；を含み、前記 3 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

工程 (b) は、配列 G T A C T G G T G G A G T A T T T G A T A G T G (配列番号 1) 及び C G T C A A G G C A C T C T T G C C T A C (配列番号 2) を含むプライマー対を使用して P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含む、請求項 7 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

工程 (b) は、前記 K R A S DNA 変異の 1 つと対応する野生型 K R A S DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型 K R A S DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下で P C R によって前記単離された D N A を増幅することを含み、前記ブロック核酸は、配列

【化 1】

T A C G C C A C C A G C T (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 281) ; T T G G A G C T G G T G G C G T A (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 282) ; G C T G G T G G C G T A G G C A (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 283) ; G C T G G T G G C G T A G G C (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 284) ; または T T G G A G C T G G T G G C G T (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 285) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

を含む、請求項 7 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記 P I K 3 C A 遺伝子における前記 1 つ以上の D N A 変異は、E 5 4 2 K または E 5 4 5 K 変異 P I K 3 C A タンパク質をコードする 1 つ以上の D N A 変異を含む、請求項 2 ～ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記 P I K 3 C A 遺伝子における前記 1 つ以上の D N A 変異は、E 5 4 2 K 及び E 5 4 5 K 変異 P I K 3 C A タンパク質をコードする D N A 変異を含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 P I K 3 C A 遺伝子における 1 つ以上の D N A 変異に特異的な前記プローブは、
(1) G C T C A G T G A T T T T A G (配列番号 87)、T G C T C A G T G A T T T T (配列番号 89)、G C T C A G T G A T T T T A G (配列番号 91)、C C T G C T C A G T G A T T T T A (配列番号 93)、及び C T C A G T G A T T T T A G A (配列番号 95) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ ; 及び

(2) T T C T C C T G C T T A (配列番号 97)、C T C C T G C T T A G T (配列番号 99)、T C T C C T G C T T A G (配列番号 101)、T C C T G C T T A G T G (配列番号 103)、及び C T C C T G C T T A G T G A (配列番号 105) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ ;

を含み、前記 2 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記 2 つのプローブの各々は、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 P I K 3 C A 遺伝子における 1 つ以上の D N A 変異に特異的な前記プローブは、
(1) T T T T T T T T T A G C T C A G T G A T T T T A G (配列番号 88)、T T T T T T T T T G C T C A G T G A T T T T (配列番号 90)、T T T T T T T T T A G C T C A G T G A T T T T A G (配列番号 92)、T T T T T T T T C C T G C T C A G T G A T T T T A (配列番号 94)、及び T T T T T T T T T T T T C T C A G T G A T T

TTAGA（配列番号96）からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；及び
 (2) TTTTCTCTCCTGCTTA（配列番号98）、TTTT
 TTTTCTCTCCTGCTTAGT（配列番号100）、TTTTTTT
 TTATCTCCTGCTTAG（配列番号102）、TTTTTTTCTCTC
 CCTGCTTAGTG（配列番号104）、及びTTTTTTTCTCTC
 TGCTTAGTGA（配列番号106）からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；

を含み、前記3つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項17に記載の方法。

【請求項19】

工程(b)は、配列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT（配列番号5）及びCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC（配列番号6）を含むプライマー対を使用してPCRによって前記単離されたDNAを増幅することを含む、請求項14～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

工程(b)は、前記PIK3CA DNA変異の1つと対応する野生型PIK3CA DNA遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型PIK3CA DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下でPCRによって前記単離されたDNAを増幅することを含み、前記少なくとも7つのブロック核酸のうちの少なくとも1つは、配列

【化2】

CTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である)
 (配列番号291)；TCTCTGAAATCAC TGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号292)；TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号293)；TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号294)；またはTCTCTGAATTCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号295) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

を含む、請求項14～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記PIK3CA遺伝子における前記1つ以上のDNA変異は、H1047R変異PIK3CAタンパク質をコードするDNA変異を含む、請求項2～20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記PIK3CA遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的な前記プローブは、
 (1) GATGCACGTCATG（配列番号107）、TGAATGATGCACG（配列番号109）、TGATGCACGTC（配列番号111）、AATGATGCACGTC（配列番号113）、及びAATGATGCACGTC（配列番号115）からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；
 を含み、前記第1のプローブは、識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記第1のプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項22に記載の

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 24】

前記 P I K 3 C A 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、

(1) T T T T T T T T T T T T T T T T G A T G C A C G T C A T G (配列番号 108)、T T T T T T T T T T T T G A A T G A T G C A C G (配列番号 110)、T T T T T T T T T T T T G A T G C A C G T C (配列番号 112)、T T T T T T T T T T T T A A T G A T G C A C G T C A (配列番号 114)、及び T T T T T T T T T T T T A A T G A T G C A C G T C (配列番号 116) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；

を含み、前記第 1 のプローブは、識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 23 に記載の方法。

10

【請求項 25】

工程 (b) は、配列 A C C C T A G C C T T A G A T A A A A C T G A G C (配列番号 7) 及び T T T G T T G T C C A G C C A C C A T G A (配列番号 8) を含むプライマー対を使用して P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含む、請求項 21 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】

工程 (b) は、前記 P I K 3 C A DNA 変異の 1 つと対応する野生型 P I K 3 C A DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型 P I K 3 C A DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下で P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含み、前記少なくとも 7 つのブロック核酸のうちの少なくとも 1 つは、配列

20

【化 3】

C A C C A T G A T G T G C A T (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 296) ; C C A C C A T G A T G T G C A T (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 297) ; C A C C A T G A T G T G C A T (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 298) ; C C A C C A T G A T G T G C A T C A (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 299) ; または C A T G A T G T G C A (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 300) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む、請求項 21 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 27】

前記 B R A F 遺伝子における前記 1 つ以上の DNA 変異は、V 6 0 0 E 変異 B R A F タンパク質をコードする 1 つ以上の DNA 変異を含む、請求項 2 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 28】

前記 B R A F 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、T T T G G T C T A G C T A C A G A (配列番号 79)、C T A C A G A G A A A T C T C G A (配列番号 81)、G T G A T T T T G G T C T A G C T (配列番号 83)、及び T C T A G C T A C A G A G A A A T (配列番号 85) からなる群から選択される配列を含む、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記 B R A F 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニ

50

ンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記 BRAF 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、TTT TTT AATTGAGAAATCTCTCGATGGAG (配列番号 78)、TTTTTTT AATTTT TGGTCTAGCTACAGA (配列番号 80)、TTTTTTT AATTCTTACAGAGAAATCTCTCGA (配列番号 82)、TTTTTTT AATTGTGATTTTGGTCTAGCT (配列番号 84)、及びTTTTTTT AATTCTAGCTACAGAGAAAT (配列番号 86) からなる群から選択される配列を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

工程 (b) は、配列 ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG (配列番号 9) 及び CAGATATATTTCTTCAATGAAGACCTCACAGTAA (配列番号 10) を含むプライマー対を使用して PCR によって前記単離された DNA を増幅することを含む、請求項 27～30 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 32】

工程 (b) は、前記 BRAF DNA 変異と対応する野生型 BRAF DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型 BRAF DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下で PCR によって前記単離された DNA を増幅することを含み、前記少なくとも 7 つのブロック核酸のうちの少なくとも 1 つは、配列

【化 4】

GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 301) ; GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 302) ; GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 303) ; GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 304) ; または GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 305) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

を含む、請求項 27～31 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 33】

前記 EGFR 遺伝子における前記 1 つ以上の DNA 変異は、G719A 変異 EGFR タンパク質をコードする 1 つ以上の DNA 変異を含む、請求項 2～32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

前記 EGFR 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、TCA AAGTGCTGGCCTC (配列番号 117)、AGATCAAAGTGCTGGCCTCCG (配列番号 119)、AAAGTGCTGGCCT (配列番号 121)、AGTGCTGGCCT (配列番号 123)、及び AAGTGCTGGCCTC (配列番号 125) からなる群から選択される配列を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記 EGFR 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記 E G F R 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、T T T T T T T T T C A A A G T G C T G G C C T C (配列番号 118)、T T T T T T A G A T C A A A G T G C T G G C C T C C G (配列番号 120)、T T T T T T T T T T T T A A A G T G C T G G C C T (配列番号 122)、T T T T T T T T T T T T T T A G T G C T G G C C T (配列番号 124)、及び T T T T T T T T T T T T T A A G T G C T G G C C T C (配列番号 126) からなる群から選択される配列を含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

工程 (b) は、配列 C T T G T G G A G C C T C T T A C A C C C (配列番号 11) 及び T G C C G A A C G C A C C G G A (配列番号 12) を含むプライマー対を使用して P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含む、請求項 33 ~ 36 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 38】

工程 (b) は、前記 E G F R DNA 変異と対応する野生型 E G F R DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型 E G F R DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下で P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含み、前記少なくとも 7 つのブロック核酸のうちの少なくとも 1 つは、配列

【化 5】

CGGAGCC CAGCACTTTGA (inv dT)_n (n は 1、2、または 3 である)
(配列番号 306) ; CGCACCCGGAGCC CAGCACT (inv dT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 307) ; GAGCCCAGCAC (inv dT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 308) ; CGCACCGGAGCCCAGCAC (inv dT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 309) ; または CGCACCGGAGCCCAGCACTTA (inv dT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 310) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

を含む、請求項 33 ~ 37 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 39】

前記 E G F R 遺伝子における前記 1 つ以上の DNA 変異は、E 7 4 6 _ A 7 5 0 d e l 変異 E G F R タンパク質をコードする 1 つ以上の DNA 変異を含む、請求項 2 ~ 38 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 40】

前記 E G F R 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、

(1) A A T C A A A A C A T C T C C G A A A G (配列番号 128)、C A A A A C A T C T C C G (配列番号 130)、A A C A T C T C C G (配列番号 132)、及び A A A C A T C T C C G A A A G C C (配列番号 134) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；及び

(2) A A T C A A G A C A T C T C C G A (配列番号 136)、G C A A T C A A G A C A T C T C C G A (配列番号 138)、A A T C A A G A C A T C T C (配列番号 140)、A A T C A A G A C A T C T C C G A A A G C (配列番号 142)、及び C A A G A C A T C T C C G A (配列番号 144) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；

を含み、前記 2 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記 2 つのプローブの各々は、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記 E G F R 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、

(1) T T T T T T T T T A A T C A A A A C A T C T C C G (配列番号 1 2 7)、T T T T T T T T T A A T C A A A A C A T C T C C G A A A G (配列番号 1 2 9)、T T T T T T T T T T A C A A A A C A T C T C C G (配列番号 1 3 1)、T T T T T T T T T T T T T T T A A C A T C T C C G (配列番号 1 3 3)、及び T T T T T T T T T T T T T T T A A A C A T C T C C G A A A G C C (配列番号 1 3 5) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；及び

(2) T T T T T T T T T A A T C A A G A C A T C T C C G A (配列番号 1 3 7)、T T T T T T G C A A T C A A G A C A T C T C C G A (配列番号 1 3 9)、T T T T T T T T A A T C A A G A C A T C T C (配列番号 1 4 1)、T T T T T T T T T A A T C A A G A C A T C T C C G A A A G C (配列番号 1 4 3)、及び T T T T T T T T T T T T T C A A G A C A T C T C C G A (配列番号 1 4 5) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；

を含み、前記 2 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

工程 (b) は、配列 G C C A G T T A A C G T C T T C C T T C T C (配列番号 1 3) 及び A T C G A G G A T T T C C T T G T T G G C T T (配列番号 1 4) を含むプライマー対を使用して P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含む、請求項 3 9 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 4】

工程 (b) は、前記 E G F R DNA 変異と対応する野生型 E G F R DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型 E G F R DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下で P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含み、前記少なくとも 7 つのブロック核酸のうちの少なくとも 1 つは、配列

【化 6】

CGGAGATGTTGCTTCCTTAATTCC (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 1) ; CGGAGATGTTGCTTCCTTCCT (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 2) ; GTTGCTTCCTTCCTTAATTCCTC (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 3) ; ATGTTGCTTCCTTCCT (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 4) ; または TTGCTTCCTTCCTTA (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 5) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

を含む、請求項 3 9 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記 E G F R 遺伝子における前記 1 つ以上の DNA 変異は、T 7 9 0 M、C 7 9 7 S、S 7 6 8 I、V 7 6 9 _ D 7 7 0 ins ASV、H 7 7 3 _ V 7 7 4 ins H、D 7 7 0 _ N 7 7 1 ins G、または D 7 7 0 _ N 7 7 1 ins SVD 変異 E G F R タンパク質を

コードする1つ以上のDNA変異を含む、請求項2～44のいずれか1項に記載の方法。

【請求項46】

前記EGFR遺伝子における前記1つ以上のDNA変異は、T790M、C797S、S768I、V769__D770insASV、H773__V774insH、D770__N771insG、及びD770__N771insSVD変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異を含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的な前記プローブは、

(1) GAGATGCATGATGA (配列番号146)、TGAGATGCATGATGAG (配列番号147)、ATGAGATGCATGATGAG (配列番号148)、TGAGCTGCATGATGA (配列番号149)、及びCATGAGATGCATGATGA (配列番号150) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；

(2) CCAGGAGGCTGCCG (配列番号461)、CAGGAGGCTGCCGA (配列番号463)、TCCAGGAGGCTGCC (配列番号465)、CCAGGAGGCTGCC (配列番号467)、及びCAGGAGGCTGCC (配列番号469) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；

(3) CCAGGAGGGAGCC (配列番号471)、CCAGGAGGGAGCCG (配列番号473)、TCCAGGAGGGAGCC (配列番号475)、CAGGAGGGAGCCG (配列番号477)、及びCAGGAGGGAGCCGA (配列番号479) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；

(4) ATGGCCATCTTGG (配列番号421)、GGCCATCTTGG (配列番号423)、GATGGCCATCTTG (配列番号425)、TGATGGCCATCTTG (配列番号427)、及びTGGCCATCTTGG (配列番号429) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；

(5) GTGATGGCCGG (配列番号431)、TGATGGCCGGCG (配列番号433)、GTGATGGCCGGCGT (配列番号435)、GATGGCCGGCGT (配列番号437)、及びGATGGCCGGCGTG (配列番号439) からなる群から選択される配列を含む第5のプローブ；

(6) AACCCCCATCACGT (配列番号441)、GACAAACCCCCATCACG (配列番号443)、CGTGGACAACCCCCATCA (配列番号445)、CCCATCACGTGT (配列番号447)、及びTGGACAACCCCCATCAC (配列番号449) からなる群から選択される配列を含む第6のプローブ；及び

(7) GCCAGCGTGGACGG (配列番号451)、CGTGGACGGGTAAC (配列番号453)、GACGGTAACCCCC (配列番号455)、CCAGCGTGGACGGT (配列番号457)、及びGCCAGCGTGGACGGTA (配列番号459) からなる群から選択される配列を含む第7のプローブ；

を含み、前記7つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的な前記7つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的な前記プローブは、

(1) TTTTTTTTTTTTGGAGATGCATGATGA (配列番号352)、TTTTTTTTTTTGGAGATGCATGATGAG (配列番号353)、TTTTTTTTTTTATGAGATGCATGATGAG (配列番号354)、TTTTTTTTTTTGGAGCTGCATGATGA (配列番号355)、及びTTTTTTTTTTTCATGAGATGCATGATGA (配列番号356) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；

工程 (b) は、前記 E G F R DNA 変異と対応する野生型 E G F R DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型 E G F R DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下で P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含み、前記少なくとも 7 つのブロック核酸のうちの少なくとも 1 つは、配列【化 7】

C A T C A C G C A G C T C A T G (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 6) ; *T G C A G C T C A T C A C G C A G C (i n v d T)_n* (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 7) ; *T C A T C A C G C A G C T C A T (i n v d T)_n* (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 8) ; *T C A T C A C G C A G C (i n v d T)_n* (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 9) ; または *C T C A T C A C G C A G C (i n v d T)_n* (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 2 0) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む、請求項 4 5 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 5 2】

前記 E G F R 遺伝子における前記 1 つ以上の DNA 変異は、L 8 5 8 R 変異 E G F R タンパク質をコードする 1 つ以上の DNA 変異を含む、請求項 2 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記 E G F R 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、A T T T T G G G C G G G C C (配列番号 1 5 1)、T T G G G C G G G C C A A A (配列番号 1 5 3)、G C G G G C C A A A C T (配列番号 1 5 5)、G G G C G G G C C A A A C T (配列番号 1 5 7)、及び T G G G C G G G C C A (配列番号 1 5 9) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；

30

を含み、前記第 1 のプローブは、識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記第 1 のプローブは、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記 E G F R 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、T T T T T T T A T T T T G G G C G G G C C (配列番号 1 5 2)、T T T T T T T T T A A T T G G G C G G G C C A A A (配列番号 1 5 4)、T T T T T T T T A A A A A A G C G G G C C A A A C T (配列番号 1 5 6)、T T T T T T T T T A A A A G G G C G G G C C A A A C T (配列番号 1 5 8)、及び T T T T T T T T T A A A T G G G C G G G C C A (配列番号 1 6 0) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；

40

を含み、前記第 1 のプローブは、識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

工程 (b) は、配列 G G A G G A C C G T C G C T T G G (配列番号 1 7) 及び T C T T T C T C T T C C G C A C C C A G (配列番号 1 8) を含むプライマー対を使用して P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含む、請求項 5 2 ~ 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 57】

工程 (b) は、前記 EGFR DNA 変異と対応する野生型 EGFR DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型 EGFR DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下で PCR によって前記単離された DNA を増幅することを含み、前記少なくとも 7 つのブロック核酸のうちの少なくとも 1 つは、配列

【化 8】

CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 321) ; CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 322) ; CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 323) ; AGCAGTTTGGCCAGCC (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 324) ; または CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 325) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

20

を含む、請求項 52 ~ 56 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 58】

前記 AKT1 遺伝子における前記 1 つ以上の DNA 変異は、E17K 変異 AKT1 タンパク質をコードする 1 つ以上の DNA 変異を含む、請求項 2 ~ 57 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 59】

前記 AKT1 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、TGTAAGGGAAGTACA (配列番号 370)、TCTGTAGGGAAGTAC (配列番号 372)、GTCGTGTAGGGAAGTACAT (配列番号 374)、CCGCACGTCGTGTAGGGA (配列番号 376)、及び ACGTCTGTAGGGAAGTA (配列番号 378) からなる群から選択される配列を含む、請求項 58 に記載の方法。

30

【請求項 60】

前記 AKT1 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、5' 末端に 7 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 7 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記 AKT1 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、TTTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA (配列番号 371)、TTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC (配列番号 373)、TTTTTTTTTGTCTGTAGGGAAGTACAT (配列番号 375)、TTTTTTTTTCCGCACGTCGTGTAGGGA (配列番号 377)、及び TTTTTTTTTTACGTCGTGTAGGGAAGTA (配列番号 379) からなる群から選択される配列を含む、請求項 60 に記載の方法。

40

【請求項 62】

工程 (b) は、配列 GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG (配列番号 380) 及び TGGCCGCCAGGTCTTGATGTA (配列番号 381) を含むプライマー対を使用して PCR によって前記単離された DNA を増幅することを含む、請求項 58 ~ 61 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 63】

工程 (b) は、前記 AKT1 DNA 変異と対応する野生型 AKT1 DNA 遺伝子座

50

とハイブリダイズし、前記野生型 A K T 1 DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下で P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含み、前記少なくとも 7 つのブロック核酸のうちの少なくとも 1 つは、配列
【化 9】

T G T A C T C C C C T A C A (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 8 2) ; G A T G T A C T C C C C T (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である)
(配列番号 3 8 3) ; A T G T A C T C C C C T A C (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 8 4) ; G T A C T C C C C T A C A (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 8 5) ; または G A T G T A C T C C C C T A C A (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 8 6) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む、請求項 5 8 ~ 6 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6 4】

前記 M E K 1 遺伝子における前記 1 つ以上の DNA 変異は、K 5 7 N 変異 M E K 1 タンパク質をコードする 1 つ以上の DNA 変異を含む、請求項 2 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 M E K 1 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、T T A C C C A G A A T C A G A A (配列番号 3 8 7)、C C A G A A T C A G A A G G T G (配列番号 3 8 9)、T T C T T A C C C A G A A T C A (配列番号 3 9 1)、C C T T T C T T A C C C A G A A T C (配列番号 3 9 3)、及び C A G A A T C A G A A G G T G G (配列番号 3 9 5) からなる群から選択される配列を含む、請求項 6 4 に記載の方法。

30

【請求項 6 6】

前記 M E K 1 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記 M E K 1 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、T T T T T A A A T T T A C C C A G A A T C A G A A (配列番号 3 8 8)、T T T T T A A A T C C A G A A T C A G A A G G T G (配列番号 3 9 0)、T T T T T A A A T T T C T T A C C C A G A A T C A (配列番号 3 9 2)、T T T T T A A A T C C T T T C T T A C C C A G A A T C (配列番号 3 9 4)、及び T T T T T A A A T C A G A A T C A G A A G G T G G (配列番号 3 9 6) からなる群から選択される配列を含む、請求項 6 6 に記載の方法。

40

【請求項 6 8】

工程 (b) は、配列 C T T G A T G A G C A G C A G C G A A A (配列番号 3 9 7) 及び C C T T C A G T T C T C C C A C C T T C T G (配列番号 3 9 8) を含むプライマー対を使用して P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含む、請求項 6 4 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6 9】

工程 (b) は、前記 M E K 1 DNA 変異と対応する野生型 M E K 1 DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型 M E K 1 DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下で P C R によって前記単離された DNA を増幅することを含み、前記少なくと

50

も 7 つのブロック核酸のうちの少なくとも 1 つは、配列
【化 10】

$TC T G C T T C T G G G T A A G (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列
番号 399) ; $TC T G C T T C T G G G T A A G A (i n v d T)_n$ (n は 1、2、また
は 3 である) (配列番号 400) ; $C A C C T T C T G C T T C T G G G (i n v d T)_n$
(n は 1、2、または 3 である) (配列番号 401) ; $TC T G C T T C T G G G T A (i n$
 $v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 402) ; または $C A C C T T C T G$
 $C T T C T G G G T A A G A (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 4
03) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む、請求項 64～68 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 70】

前記 HER2 遺伝子における前記 1 つ以上の DNA 変異は、A775__G776 ins
YVMA 変異 HER2 タンパク質をコードする 1 つ以上の DNA 変異を含む、請求項 2～
69 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 71】

前記 HER2 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、ATA
CGTGATGTCCTTAC (配列番号 404)、ACGTGATGGCTTACGT (配
列番号 406)、AAGCATACGTGATGGCT (配列番号 408)、GCAT
ACGTGATGGCTT (配列番号 410)、及び GCATACGTGATGGCTT
A (配列番号 412) からなる群から選択される配列を含む、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

前記 HER2 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、5' 末
端に 5 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 5 ヌクレオチドは、アデニ
ンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 71 に記載の方法。

30

【請求項 73】

前記 HER2 遺伝子における 1 つ以上の DNA 変異に特異的な前記プローブは、TTT
TTTTTTATACGTGATGTCCTTAC (配列番号 405)、TTTTTTTTT
TTTACGTGATGGCTTACGT (配列番号 407)、TTTTTTAAGCAT
ACGTGATGGCT (配列番号 409)、TTTTTTTTTG CATACGTGATG
GCTT (配列番号 411)、及び TTTTTTTTG CATACGTGATGGCTTA
(配列番号 413) からなる群から選択される配列を含む、請求項 72 に記載の方法。

【請求項 74】

工程 (b) は、配列 ATGGCTGTGGTTTTGTGATGGT (配列番号 414)
及び ACACCAAGCCATCACGTAAGACA (配列番号 415) を含むプライマ
ー対を使用して PCR によって前記単離された DNA を増幅することを含む、請求項 70
～73 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 75】

前記サンプルは、血液、血清、または血漿サンプルである、請求項 1～74 のいずれか
1 項に記載の方法。

【請求項 76】

(a) は、前記サンプルから循環遊離 DNA (cfDNA) を単離することを含み、前
記単離された cfDNA は、(b) において PCR によって増幅される、請求項 75 に記
載の方法。

50

【請求項 77】

前記方法は、：

(b) において陽性対照 DNA 配列に特異的なプライマー対を使用して前記陽性対照 DNA 配列を増幅すること；

(c) において前記増幅された陽性対照遺伝子配列を前記陽性対照遺伝子配列に特異的なプローブとハイブリダイズさせることであって、前記陽性対照遺伝子配列に特異的な前記プローブは、陽性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、前記ハイブリダイズさせること；

(d) において前記増幅された陽性対照 DNA 配列と前記陽性対照遺伝子配列に特異的な前記プローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出すること；及び

(e) において前記陽性対照に対応する前記識別子を検出すること
をさらに含む、請求項 1～76 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 78】

前記方法は、

(d) において前記増幅された DNA と陰性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリアとのハイブリダイゼーションの非存在を検出することであって、前記陰性対照に対応する前記識別子を有する前記マイクロキャリアは、前記増幅された DNA とハイブリダイズしないプローブを含む、前記検出すること；及び

(e) において前記陰性対照に対応する前記識別子を検出すること
をさらに含む、請求項 1～77 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 79】

ALK、ROS、RET、NTRK1、及び cMET 遺伝子における変異の存在を検出するための方法であって、前記方法は、

(a) サンプルから RNA を単離すること；

(b) 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって前記単離された RNA から DNA を増幅することであって、前記 DNA を増幅することは、

(1) 前記 ALK、ROS、RET、NTRK1、及び cMET 遺伝子の各々に特異的な第 1 のプライマー、前記単離された RNA、及び逆転写酵素を使用して前記単離された RNA から前記 ALK、ROS、RET、NTRK1、及び cMET 遺伝子の各々に特異的な cDNA を生成すること、及び

30

(2) (b) (1) において生成された前記 cDNA、DNA ポリメラーゼ、前記第 1 のプライマー、及び前記対応する第 1 のプライマーの反対の前記 cDNA の鎖に結合し、かつ前記対応する第 1 のプライマーによって促進されるものとは反対の方向で鎖伸長を促進する前記 ALK、ROS、RET、NTRK1、及び cMET 遺伝子の各々に特異的な第 2 のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって前記 ALK、ROS、RET、NTRK1、及び cMET 遺伝子の各々に特異的な DNA を増幅することを含む、前記増幅すること；

(c) 前記増幅された DNA を少なくとも 5 つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも 5 つのプローブは、前記 ALK、ROS、RET、NTRK1、及び cMET 遺伝子の各々における変異に特異的な 1 つ以上のプローブを含み、前記少なくとも 5 つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、前記マイクロキャリアの各々は、それに結合した前記プローブに対応する識別子を含む、前記ハイブリダイズさせること；

40

(d) 前記増幅された DNA と前記少なくとも 5 つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、前記増幅された DNA と前記プローブの 1 つとの間のハイブリダイゼーションは、前記プローブに対応する前記変異の存在を示す、前記検出すること；

(e) 前記マイクロキャリアの前記識別子を検出すること；及び

(f) 前記マイクロキャリアの前記検出された識別子を、前記マイクロキャリアの前記対応するプローブに対する前記増幅された DNA のハイブリダイゼーションの前記検出さ

50

れた存在または非存在と相関させること
を含む、前記方法。

【請求項 80】

前記 A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及び c M E T 遺伝子は、ヒト遺伝子である、請求項 79 に記載の方法。

【請求項 81】

前記 A L K、R O S、R E T、及び N T R K 1 遺伝子における前記変異の 1 つ以上は、融合遺伝子を含む、請求項 79 または請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記 A L K、R O S、R E T、及び N T R K 1 遺伝子における前記変異の各々は、融合遺伝子を含む、請求項 81 に記載の方法。

【請求項 83】

前記 A L K 遺伝子における前記 1 つ以上の変異は、E M L 4 - A L K 融合遺伝子を含む、請求項 79 ~ 82 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 84】

前記第 1 のプライマーは、E M L 4 遺伝子座の領域に特異的であり、前記第 2 のプライマーは、A L K 遺伝子座の領域に特異的である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 85】

前記第 2 のプライマーは、E M L 4 遺伝子座の領域に特異的であり、前記第 1 のプライマーは、A L K 遺伝子座の領域に特異的である、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 86】

前記 A L K 遺伝子における前記 1 つ以上の変異は、E M L E 13 : A L K E 20、E M L E 20 : A L K E 20、及び E M L E 6 : A L K E 20 E M L 4 - A L K 融合遺伝子のうちの 1 つ以上を含む、請求項 83 ~ 85 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 87】

前記 A L K 遺伝子における前記 1 つ以上の変異は、E M L E 13 : A L K E 20、E M L E 20 : A L K E 20、及び E M L E 6 : A L K E 20 E M L 4 - A L K 融合遺伝子を含む、請求項 86 に記載の方法。

【請求項 88】

前記 A L K 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記プローブは、

(1) A A A G G A C C T A A A G T G T (配列番号 161)、C C T A A A G T G T A C C G C (配列番号 163)、G G G A A A G G A C C T A A A G (配列番号 165)、A G T G T A C C G C C G G A A (配列番号 167)、及び T A C C G C C G G A A G C A C C (配列番号 169) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；

(2) G A C T A T G A A A T A T T G T A C (配列番号 171)、G A A A T A T T G T A C T T G T A C (配列番号 173)、T A T T G T A C T T G T A C C G C C (配列番号 175)、T G T A C C G C C G G A A G C A C (配列番号 177)、及び C C G C C G G A A G C A C C A G G A (配列番号 179) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；

(3) T G T C A T C A T C A A C C A A (配列番号 181)、A T G T C A T C A T C A A C C (配列番号 183)、G T G T A C C G C C G G A A G C (配列番号 185)、T C A A C C A A G T G T A C C G (配列番号 187)、及び T A C C G C C G G A A G C A C C A (配列番号 189) からなる群から選択される配列を含む第 3 のプローブ；及び

(4) C G A A A A A A C A G C C A A (配列番号 191)、T C G C G A A A A A A A C A G C (配列番号 193)、G T G T A C C G C C G G A A G C (配列番号 195)、T A C C G C C G G A A G C A C C (配列番号 197)、及び A C A G C C A A G T G T A C C G (配列番号 199) からなる群から選択される配列を含む第 4 のプローブ；を含み、前記 4 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

前記 4 つのプローブの各々は、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記 A L K 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記プローブは、

(1) T T T T T T T T T T A A A G G A C C T A A A G T G T (配列番号 162)、
T T T T T T T T T T C C T A A A G T G T A C C G C (配列番号 164)、T T T T T
T T T T T G G G A A A G G A C C T A A A G (配列番号 166)、T T T T T T T T T T
T A G T G T A C C G C C G G A A (配列番号 168)、及び T T T T T T T T T T T T A
C C G C C G G A A G C A C C (配列番号 170) からなる群から選択される配列を含む
第 1 のプローブ；

(2) T T T T T T T T T T T T T G A C T A T G A A A T A T T G T A C (配列番号 1
72)、T T T T T T T T T T T T T G A A A T A T T G T A C T T G T A C (配列番号 1
74)、T T T T T T T T T T T T T A T T G T A C T T G T A C C G C C (配列番号 1
76)、T T T T T T T T T T T T T T G T A C C G C C G G A A G C A C (配列番号 1
78)、及び T T T T T T T T T T T T T C C G C C G G A A G C A C C A G G A (配列番
号 180) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；

(3) T T T T T T T T T T T T T T G T C A T C A T C A A C C A A (配列番号 1
82)、T T T T T T T T T T T T T T A T G T C A T C A T C A A C C (配列番号 18
4)、T T T T T T T T T T T T T T G T G T A C C G C C G G A A G C (配列番号 18
6)、T T T T T T T T T T T T T T T C A A C C A A G T G T A C C G (配列番号 18
8)、及び T T T T T T T T T T T T T T A C C G C C G G A A G C A C C A (配列番
号 190) からなる群から選択される配列を含む第 3 のプローブ；及び

(4) T T T T T T T T T T T T T T C G A A A A A A A C A G C C A A (配列番号 19
2)、T T T T T T T T T T T T T T C G C G A A A A A A A C A G C (配列番号 194
)、T T T T T T T T T T T T T T G T G T A C C G C C G G A A G C (配列番号 196)
、T T T T T T T T T T T T T T A C C G C C G G A A G C A C C (配列番号 198)、
及び T T T T T T T T T T T T T T A C A G C C A A G T G T A C C G (配列番号 200
) からなる群から選択される配列を含む第 4 のプローブ；

を含み、前記 4 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

前記 A L K 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記第 1 のプライマーは、配列 A
G T T G G G G T T G T A G T C G G T C A T (配列番号 363) または G A A G C C T
C C C T G G A T C T C C (配列番号 364) を含む、請求項 83～90 のいずれか 1 項
に記載の方法。

【請求項 92】

前記 A L K 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記第 2 のプライマーは、T A T
G G A G C A A A A C T A C T G T A G A G C C (配列番号 357)、C C A G C T A C
A T C A C A C A C C T T G A C T (配列番号 358)、及び T A A T A C C A A A A G
T T A C C A A A A C T G C A (配列番号 359) からなる群から選択される配列を含む
、請求項 83～91 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 93】

前記 R O S 遺伝子における前記 1 つ以上の変異は、C D 7 4-R O S、及び S L C 3 4
A 2-R O S からなる群から選択される R O S 融合遺伝子を含む、請求項 79～92 のい
ずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 94】

前記第 1 のプライマーは、C D 7 4、または S L C 3 4 A 2 の領域に特異的であり、前
記第 2 のプライマーは、R O S 遺伝子座の領域に特異的である、請求項 93 に記載の方法

。

【請求項 95】

前記第2のプライマーは、CD74、またはSLC34A2遺伝子座の領域に特異的であり、前記第1のプライマーは、ROS遺伝子座の領域に特異的である、請求項93に記載の方法。

【請求項 96】

前記第1のプライマーは、CD74またはSLC34A2遺伝子座の領域に特異的であり、前記第2のプライマーは、ROS遺伝子座の領域に特異的である；または前記第2のプライマーは、CD74またはSLC34A2遺伝子座の領域に特異的であり、前記第1のプライマーは、ROS遺伝子座の領域に特異的である、請求項93に記載の方法。

10

【請求項 97】

前記ROS遺伝子における前記1つ以上の変異は、CD74 E6:ROS E32、CD74 E6:ROS E34、SLC34A2 E4:ROS E32、及びSLC34A2 E4:ROS E34融合遺伝子のうちの1つ以上を含む、請求項93～96のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 98】

前記ROS遺伝子における前記1つ以上の変異は、CD74 E6:ROS E32、CD74 E6:ROS E34、SLC34A2 E4:ROS E32、及びSLC34A2 E4:ROS E34融合遺伝子を含む、請求項97に記載の方法。

【請求項 99】

前記ROS遺伝子における1つ以上の変異に特異的な前記プローブは、

(1) ACTGACGCTCCACCGAAA (配列番号201)、CCACTGACGCTCCACCGA (配列番号203)、GCTGGAGTCCCAAATAAAC (配列番号205)、GGAGTCCCAAATAAACAG (配列番号207)、及びCACCGAAAGCTGGAGTCCC (配列番号209) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；

(2) CCGAAAGATGATTTTT (配列番号211)、GACGCTCCACCGAAA (配列番号213)、ACTGACGCTCCACCGA (配列番号215)、GATGATTTTTTGGATA (配列番号217)、及びTGATTTTTTGGATACCA (配列番号219) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；

30

(3) AGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA (配列番号221)、CTGGTTGGAGCTGGAGTCCC (配列番号223)、AGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG (配列番号225)、GCTGGAGTCCCAAATAAACCA (配列番号227)、及びGGAGTCCCAAATAAACAGG (配列番号229) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；及び

(4) GCGCCTTCCAGCTGGTTG (配列番号231)、GTAGCGCCTTCCAGCTGGT (配列番号233)、TGGTTGGAGATGATTTTTT (配列番号235)、GATGATTTTTTGGATACAG (配列番号237)、及びTGATTTTTTGGATACCA (配列番号239) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；

40

を含み、前記4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項98に記載の方法。

【請求項 100】

前記4つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項99に記載の方法。

【請求項 101】

前記ROS遺伝子における1つ以上の変異に特異的な前記プローブは、

(1) TTTTTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAA (配列番号202)、TTTTTTTTTTTTTCCACTGACGCTCCACCGA (配列番号204

50

)、TTTTTTTTTTTTTGGCTGGAGTCCCAAATAAAC (配列番号206)
)、TTTTTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCCAG (配列番号208)
)、及びTTTTTTTTTTTTTTCACCGAAAGCTGGAGTCCC (配列番号210) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；

(2) TTTTTTTTTTTTTTTCGAAAGATGATTTTT (配列番号212)
、TTTTTTTTTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA (配列番号214)、TT
TTTTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGA (配列番号216)、TTTT
TTTTTTTTTTTGATGATTTTTTTGGATA (配列番号218)、及びTTTT
TTTTTTTTTTTGATTTTTTTGGATACCA (配列番号220) からなる群から選
択される配列を含む第2のプローブ；

(3) TTTTTTTTTTTTTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA (配列
番号222)、TTTTTTTTTTTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC (配
列番号224)、TTTTTTTTTTTTTTTTTAGTAGCGCCTTCCAGCTGG
TTG (配列番号226)、TTTTTTTTTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAAT
AAACCA (配列番号228)、及びTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGTCCCAA
ATAAACCCAGG (配列番号230) からなる群から選択される配列を含む第3のプ
ローブ；及び

(4) TTTTTTTTTTTTTTGCGCCTTCCAGCTGGTTG (配列番号232)
)、TTTTTTTTTTTTTTGTAGCGCCTTCCAGCTGGT (配列番号234)
、TTTTTTTTTTTTTTTGTTGGAGATGATTTTTT (配列番号236)、T
TTTTTTTTTTTTTGATGATTTTTTTGGATACCCAG (配列番号238)、及び
TTTTTTTTTTTTTTTGATTTTTTTGGATACCA (配列番号240) からなる群
から選択される配列を含む第4のプローブ；

を含み、前記4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合さ
れている、請求項100に記載の方法。

【請求項102】

前記ROS遺伝子における1つ以上の変異に特異的な前記第1のプライマーは、配列A
ATTCAAATACATACTATCAGCTTTCTCCCACTGTATTGAA (配
列番号21) またはAATATTTCTGGTACGAGTGGGATTGTAAACA
ACCCAGAAATA (配列番号22) を含む、請求項93～101のいずれか1項に記
載の方法。

【請求項103】

前記ROS遺伝子における1つ以上の変異に特異的な前記第2のプライマーは、配列G
GAGTGCCATCGCTGTTTGA AATGAGCAGGCACT (配列番号19)
) またはTACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC (配列番号20) を
含む、請求項93～102のいずれか1項に記載の方法。

【請求項104】

前記RET遺伝子における前記1つ以上の変異は、KIF5B-RETからなる群から
選択されるRET融合遺伝子を含む、請求項79～103のいずれか1項に記載の方法。

【請求項105】

前記第1のプライマーは、KIF5B、またはCCDC6遺伝子座の領域に特異的であ
り、前記第2のプライマーは、RET遺伝子座の領域に特異的である、請求項104に記
載の方法。

【請求項106】

前記第2のプライマーは、KIF5B、またはCCDC6遺伝子座の領域に特異的であ
り、前記第1のプライマーは、RET遺伝子座の領域に特異的である、請求項104に記
載の方法。

【請求項107】

前記第1のプライマーは、KIF5B遺伝子座の領域に特異的であり、前記第2のプ
ライマーは、RET遺伝子座の領域に特異的である；または前記第2のプライマーは、KIF

10

20

30

40

50

F 5 B 遺伝子座の領域に特異的であり、前記第 1 のプライマーは、R E T 遺伝子座の領域に特異的である、請求項 1 0 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記 R E T 遺伝子における前記 1 つ以上の変異は、K I F 5 B E 1 5 : R E T E 1 1、K I F 5 B E 1 5 : R E T E 1 2、K I F 5 B E 1 6 : R E T E 1 2、K I F 5 B E 2 2 : R E T E 1 2、K I F 5 B E 2 3 : R E T E 1 2、及び C C D C 6 E 1 : R E T E 1 2 融合遺伝子のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 0 4 ~ 1 0 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 0 9】

前記 R E T 遺伝子における前記 1 つ以上の変異は、K I F 5 B E 1 5 : R E T E 1 1、K I F 5 B E 1 5 : R E T E 1 2、K I F 5 B E 1 6 : R E T E 1 2、K I F 5 B E 2 2 : R E T E 1 2、及び K I F 5 B E 2 3 : R E T E 1 2 融合遺伝子を含む、請求項 1 0 8 に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

前記 R E T 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記プローブは、

(1) G T G G G A A A T A A T G A T G T A A A (配列番号 2 4 1)、C T G T G G G A A A T A A T G A T G T A (配列番号 2 4 3)、G A T C C A C T G T G C G A C G A G C T (配列番号 2 4 5)、T G A T G T A A A G A T C C A C T G T G (配列番号 2 4 7)、及び T C C A C T G T G C G A C G A G C T G T (配列番号 2 4 9) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；

(2) T G G G A A A T A A T G A T G T A A A (配列番号 2 5 1)、C T G T G G G A A A T A A T G A T G T A (配列番号 2 5 3)、G G A G G A T C C A A A G T G G G A A T (配列番号 2 5 5)、G G A T C C A A A G T G G G A A T T (配列番号 2 5 7)、及び A T G A T G T A A A G G A G G A T C C (配列番号 2 5 9) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；

(3) C T T C G T A T C T C T C A A G A G G A T (配列番号 4 8 1)、G T A T C T C T C A A G A G G A T C C A A (配列番号 4 8 3)、T T C G T A T C T C T C A A G A G (配列番号 4 8 5)、T C A A G A G G A T C C A A A (配列番号 4 8 7)、及び T C T C T C A A G A G G (配列番号 4 8 9) からなる群から選択される配列を含む第 3 のプローブ；

(4) G T T A A A A A G G A G G A T C C A A (配列番号 4 9 1)、A C A A G A G T T A A A A A G G A G G A (配列番号 4 9 3)、A A G A G T T A A A A A G G A G G A T C (配列番号 4 9 5)、A A A A G G A G G A T C C A A A G (配列番号 4 9 7)、及び A A G G A G G A T C C A A A G T G (配列番号 4 9 9) からなる群から選択される配列を含む第 4 のプローブ；及び

(5) A A A C A G G A G G A T C C A A A (配列番号 5 0 1)、A A G T G C A C A A A C A G G A G G (配列番号 5 0 3)、G T G C A C A A A C A G G A G G A T C (配列番号 5 0 5)、C A C A A A C A G G A G G A T (配列番号 5 0 7)、及び A A C A G G A G G A T C C A A A (配列番号 5 0 9) からなる群から選択される配列を含む第 5 のプローブ；

を含み、前記 5 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

前記 4 つのプローブの各々は、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 1 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

前記 R E T 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記プローブは、

(1) T T T T T T T T T T T G T G G G A A A T A A T G A T G T A A A (配列番号 2 4 2)、T T T T T T T T T T T C T G T G G G A A A T A A T G A T G T A (配列番号 2

10

20

30

40

50

44)、TTTTTTTTTTTGGATCCACTGTGCGACGAGCT (配列番号246)、TTTTTTTTTTTGGATGTAAGATCCACTGTG (配列番号248)、及びTTTTTTTTTTTCCACTGTGCGACGAGCTGT (配列番号250) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；

(2) TTTTTTTTTTTTGGGAAATAATGATGTAAA (配列番号252)、TTTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA (配列番号254)、TTTTTTTTTTTGGAGGATCCAAAGTGGGAAT (配列番号256)、TTTTTTTTTTTGGATCCAAAGTGGGAATT (配列番号258)、及びTTTTTTTTTTATGATGTAAGGAGGATCC (配列番号260) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；

(3) TTTTTTTTTTTCTTCGTATCTCTCAAGAGGAT (配列番号482)、TTTTTTTTTTTGTATCTCTCAAGAGGATCCAA (配列番号484)、TTTTTTTTTTTTCGTATCTCTCAAGAG (配列番号486)、TTTTTTTTTTTCAAGAGGATCCAAA (配列番号488)、及びTTTTTTTTTTCTCTCAAGAGG (配列番号490) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；

(4) TTTTTTTTTTTGTTAAAAAGGAGGATCCAA (配列番号492)、TTTTTTTTTTTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA (配列番号494)、TTATTTATTAAGAGTTAAAAAGGAGGATC (配列番号811)、TTTTTTTTTTAAAAAGGAGGATCCAAAG (配列番号498)、及びTTTTTTTATAAGGAGGATCCAAAGTG (配列番号500) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；及び

(5) TTTTTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA (配列番号502)、TTTTTTATTAAGTGCACAAACAGGAGG (配列番号504)、TATTTATTAATGTGCACAAACAGGAGGATC (配列番号506)、TATTTTTTTCACAAACAGGAGGAT (配列番号508)、及びTTTTTATTTAACAAGGAGGATCCAAA (配列番号510) からなる群から選択される配列を含む第5のプローブ；

を含み、前記5つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項111に記載の方法。

【請求項113】

前記RET遺伝子における1つ以上の変異に特異的な前記第1のプライマーは、配列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC (配列番号26) またはCTCTAGGAGATATCATTTCCAAATTTCGCCCTTCTCCTAG (配列番号27) を含む、請求項103～112のいずれか1項に記載の方法。

【請求項114】

前記RET遺伝子における1つ以上の変異に特異的な前記第2のプライマーは、TTTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCAACCAAGA (配列番号23)、AAGGAGTTAGCAGCATGTTCAGC (配列番号519)、AACTTTCAGACTTTACACAACCTGC (配列番号520)、及びATTGATTCTGATGACACCGGA (配列番号521) からなる群から選択される配列を含む、請求項106～113のいずれか1項に記載の方法。

【請求項115】

前記NTRK1遺伝子における前記1つ以上の変異は、CD74-NTRK1融合遺伝子を含む、請求項79～114のいずれか1項に記載の方法。

【請求項116】

前記第1のプライマーは、CD74遺伝子座の領域に特異的であり、前記第2のプライマーは、NTRK1遺伝子座の領域に特異的である、請求項115に記載の方法。

【請求項117】

前記第2のプライマーは、CD74遺伝子座の領域に特異的であり、前記第1のプライ

10

20

30

40

50

マーは、NTRK1 遺伝子座の領域に特異的である、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 118】

前記 NTRK1 遺伝子における前記 1 つ以上の変異は、CD74 E8: NTRK1 E12 融合遺伝子を含む、請求項 115～117 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 119】

前記 NTRK1 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記プローブは、CAGGATCTGGGCCCCAGACA (配列番号 261)、GATCTGGGCCCCAGACACTA (配列番号 263)、CCAGACACTAACAGCACAT (配列番号 265)、GGGCCCCAGACACTAACAGC (配列番号 267)、及びCTAACAGCACATCTGGAGA (配列番号 269) からなる群から選択される配列を含む、請求項 118 に記載の方法。

10

【請求項 120】

前記 NTRK1 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記プローブは、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 119 に記載の方法。

【請求項 121】

前記 NTRK1 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記プローブは、TTTTTTTACAGGATCTGGGCCCCAGACA (配列番号 262)、TTTTTTTATCTGGGCCCCAGACACTA (配列番号 264)、TTTTTTTATCCAGACACTAACAGCACAT (配列番号 266)、TTTTTTTAGGGGCCCCAGACACTAACAGC (配列番号 268)、及びTTTTTTTACTAACAGCACATCTGGAGA (配列番号 270) からなる群から選択される配列を含む、請求項 120 に記載の方法。

20

【請求項 122】

前記 NTRK1 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記第 1 のプライマーは、配列GGACGAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTCGT (配列番号 32) を含む、請求項 115～120 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 123】

前記 NTRK1 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記第 2 のプライマーは、配列AGAAAGACGTGACAGGAACCTGGAGGACCCGTCCTT (配列番号 30) を含む、請求項 115～122 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 124】

前記 cMET 遺伝子における前記 1 つ以上の変異は、エクソンスキッピングをもたらす、請求項 79～123 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 125】

前記 cMET 遺伝子における前記 1 つ以上の変異は、エクソン 14 のスキッピングをもたらす、請求項 124 に記載の方法。

【請求項 126】

前記 cMET 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記プローブは、AGAAAGCAAAATTAAGAT (配列番号 271)、AGCAAAATTAAGATCAG (配列番号 273)、AAATTAAGATCAGTTTTC (配列番号 275)、AGATCAGTTTTCCTAATTTC (配列番号 277)、及びAAGATCAGTTTTCCTAATT (配列番号 279) からなる群から選択される配列を含む、請求項 125 に記載の方法。

40

【請求項 127】

前記 cMET 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記プローブは、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 126 に記載の方法。

【請求項 128】

前記 cMET 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記プローブは、TTTTTTT

50

TTTTAGAAAGCAAATTAAAGAT (配列番号272)、TTTTTTTTTTT
TAGCAAATTAAAGATCAG (配列番号274)、TTTTTTTTTTTTTA
AATTAAAGATCAGTTTC (配列番号276)、TTTTTTTTTTTTTAGA
TCAGTTTCTCTAATTC (配列番号278)、及びTTTTTTTTTTTTTAAG
ATCAGTTTCTCTAATT (配列番号280) からなる群から選択される配列を含
む、請求項127に記載の方法。

【請求項129】

前記cMET遺伝子における1つ以上の変異に特異的な前記第1のプライマーは、配列
GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA (配列番
号29)を含む、請求項124～128のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項130】

前記cMET遺伝子における1つ以上の変異に特異的な前記第2のプライマーは、配列
GAATTTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC (配列番号28
)を含む、請求項124～129のいずれか1項に記載の方法。

【請求項131】

前記サンプルは、血液、血清、または血漿サンプルである、請求項79～130のい
ずれか1項に記載の方法。

【請求項132】

(a)において前記サンプルからRNAを単離することは、腫瘍調整血小板、腫瘍エク
ソソーム、及び循環腫瘍細胞(CTC)のうちの1つ以上からRNAを単離することを含
む、請求項131に記載の方法。

20

【請求項133】

前記方法は、

(b)において逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって前記単離され
たRNAから陽性対照DNA配列を増幅することであって、前記陽性対照DNA配列を増
幅することは、

(1)前記陽性対照配列に特異的な第1のプライマー、前記単離されたRNA、及び
逆転写酵素を使用して前記単離されたRNAから前記陽性対照配列に特異的なcDNAを
生成すること、及び

(2)(1)において生成された前記陽性対照配列に特異的な前記cDNA、DNA
ポリメラーゼ、前記第1のプライマー、及び前記対応する第1のプライマーの反対の前記
cDNAの鎖に結合し、かつ前記対応する第1のプライマーによって促進されるものとは
反対の方向で鎖伸長を促進する前記陽性対照配列に特異的な第2のプライマーを使用し
てポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって前記陽性対照配列に特異的なDNAを増幅する
こと

30

を含む、前記増幅すること；

(c)において前記増幅された陽性対照遺伝子配列を前記陽性対照遺伝子配列に特異的
なプローブとハイブリダイズさせることであって、前記陽性対照遺伝子配列に特異的な前
記プローブは、陽性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、
前記ハイブリダイズさせること；

40

(d)において前記増幅された陽性対照DNA配列と前記陽性対照遺伝子配列に特異的
な前記プローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出すること；及び

(e)において前記陽性対照に対応する前記識別子を検出すること
をさらに含む、請求項79～132のいずれか1項に記載の方法。

【請求項134】

前記方法は、

(d)において前記増幅されたDNAと陰性対照に対応する識別子を有するマイクロキ
ャリアとのハイブリダイゼーションの非存在を検出することであって、前記陰性対照に対
応する前記識別子を有する前記マイクロキャリアは、前記増幅されたDNAとハイブリダ
イズしないプローブを含む、前記検出すること；及び

50

(e) において前記陰性対照に対応する前記識別子を検出すること
をさらに含む、請求項 79～133 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 135】

遺伝子における変異の存在を検出するための方法であって、前記方法は、

(a) サンプルから DNA 及び RNA を単離すること；

(b) KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及び HER2 遺伝子の各々における 1 つ以上の DNA 変異の遺伝子座に特異的なプライマー対を使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって前記単離された DNA を増幅すること；

(c) 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって前記単離された RNA から DNA を増幅することであって、前記単離された RNA から前記 DNA を増幅することは、

(1) ALK、ROS、RET、NTRK1、及び cMET 遺伝子の各々に特異的な第 1 のプライマー、前記単離された RNA、及び逆転写酵素を使用して前記単離された RNA から前記 ALK、ROS、RET、NTRK1、及び cMET 遺伝子の各々に特異的な cDNA を生成すること、及び

(2) (c) (1) において生成された前記 cDNA、DNA ポリメラーゼ、前記第 1 のプライマー、及び前記対応する第 1 のプライマーの反対の前記 cDNA の鎖に結合し、かつ前記対応する第 1 のプライマーによって促進されるものとは反対の方向で鎖伸長を促進する前記 ALK、ROS、RET、NTRK1、及び cMET 遺伝子の各々に特異的な第 2 のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって前記 ALK、ROS、RET、NTRK1、及び cMET 遺伝子の各々に特異的な DNA を増幅することを含む、前記増幅すること；

(d) (b) において PCR によって増幅された前記 DNA を少なくとも 7 つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも 7 つのプローブは、前記 KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及び HER2 遺伝子の各々における変異に特異的な 1 つ以上のプローブを含み、前記少なくとも 7 つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、前記マイクロキャリアの各々は、それに結合した前記プローブに対応する識別子を含む、前記ハイブリダイズさせること；

(e) (b) において PCR によって増幅された前記 DNA と前記少なくとも 7 つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、前記増幅された DNA と前記プローブの 1 つとの間のハイブリダイゼーションは、前記プローブに対応する前記変異の存在を示す、前記検出すること；

(f) (c) において RT-PCR によって増幅された前記 DNA を少なくとも 5 つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも 5 つのプローブは、前記 ALK、ROS、RET、NTRK1、及び cMET 遺伝子の各々における変異に特異的な 1 つ以上のプローブを含み、前記少なくとも 5 つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、前記マイクロキャリアの各々は、それに結合した前記プローブに対応する識別子を含む、前記ハイブリダイズさせること；

(g) (c) において RT-PCR によって増幅された前記 DNA と前記少なくとも 5 つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、前記増幅された DNA と前記プローブの 1 つとの間のハイブリダイゼーションは、前記プローブに対応する前記変異の存在を示す、前記検出すること；

(h) 前記マイクロキャリアの前記識別子を検出すること；及び

(i) 前記マイクロキャリアの前記検出された識別子を、(e) 及び (g) において検出された前記マイクロキャリアの前記対応するプローブに対する前記増幅された DNA のハイブリダイゼーションの存在または非存在と相関させること
を含む、前記方法。

【請求項 136】

(a) は、

前記サンプルを遠心分離することによって総RNA豊富血漿 (TRRP) を単離することであって、前記サンプルは、全血または血漿を含む、前記単離すること；

前記TRRPを1つ以上の遠心分離工程に供して、RNA画分及びセルフリーDNA (cfDNA) 画分を生成することであって、前記RNA画分は、血小板、白血球、エクソソーム、循環腫瘍細胞、及び遊離RNAのうちの1つ以上を含む、前記生成すること；

前記cfDNA画分からDNAを単離すること；及び

前記RNA画分からRNAを単離すること

を含む、請求項135に記載の方法。

【請求項137】

前記プライマー対の各々は、検出試薬に結合したプライマーを含む、請求項1～136のいずれか1項に記載の方法。

【請求項138】

前記検出試薬は、蛍光検出試薬を含み、(d)において前記増幅されたDNAと前記プローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することは、前記蛍光検出試薬の蛍光画像化を含む、請求項137に記載の方法。

【請求項139】

前記検出試薬は、ビオチンを含み、工程(d)において前記増幅されたDNAと前記プローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することは、

(1) (c)におけるハイブリダイゼーションの後に、前記マイクロキャリアを、シグナル放出体にコンジュゲートされたストレプトアビジンと接触させること；及び

(2) 前記マイクロキャリアに関連する前記シグナル放出体からのシグナルを検出すること

を含む、請求項137に記載の方法。

【請求項140】

前記シグナル放出体は、フィコエリトリン (PE) を含む、請求項139に記載の方法。

【請求項141】

(e)において前記マイクロキャリアの前記識別子を検出することは、前記識別子の明視野画像化を含む、請求項1～140のいずれか1項に記載の方法。

【請求項142】

前記マイクロキャリアの前記識別子は、デジタルバーコードを含む、請求項1～141のいずれか1項に記載の方法。

【請求項143】

前記マイクロキャリアの各々は、

(i) 第1のフォトポリマー層；

(ii) 第2のフォトポリマー層；及び

(iii) 前記第1の層と前記第2の層との間の中間層であって、前記中間層は、それに定義された前記識別子を表すコードされたパターンを有し、前記中間層は、光に対して部分的に実質的に透過性であり、かつ部分的に実質的に不透明であることで、前記マイクロキャリアに対応するコードを表し、前記マイクロキャリアの最外表面は、フォトレジストフォトポリマーを含み、前記フォトレジストフォトポリマーは、前記DNA変異に特異的な前記プローブで官能化されており、前記マイクロキャリアは、水とおおよそ同じ密度を有する、前記中間層

を含む、請求項142に記載の方法。

【請求項144】

前記マイクロキャリアの前記識別子は、アナログコードを含む、請求項1～141のいずれか1項に記載の方法。

【請求項145】

前記マイクロキャリアの各々は、

10

20

30

40

50

(i) 第1の表面及び第2の表面を有する実質的に透明なポリマー層であって、前記第1及び前記第2の表面は、互いに平行である、前記実質的に透明なポリマー層；

(ii) 二次元形状を構成する実質的に非透明な層であって、前記実質的に非透明な層は、前記実質的に透明なポリマー層の前記第1の表面に付着されており、前記実質的に透明なポリマー層の中央部分を包囲し、前記実質的に非透明な層の前記二次元形状は、アナログコードを表し、前記アナログコードは、前記識別子に対応する、前記実質的に非透明な層；及び

(iii) 前記変異に特異的な前記プローブであって、前記プローブは、前記実質的に透明なポリマー層の少なくとも前記中央部分における前記実質的に透明なポリマー層の前記第1の表面及び前記第2の表面の少なくとも一方に結合されている、前記プローブを含む、請求項144に記載の方法。

10

【請求項146】

前記マイクロキャリアの各々は、前記実質的に非透明なポリマー層の前記アナログコードを配向させるための配向指標をさらに含む、請求項145に記載の方法。

【請求項147】

前記実質的に透明なポリマー層の前記ポリマーは、エポキシベースのポリマーを含む、請求項145または請求項146に記載の方法。

【請求項148】

前記エポキシベースのポリマーは、SU-8である、請求項147に記載の方法。

【請求項149】

少なくとも7つのマイクロキャリアを含むキットであって、前記少なくとも7つのマイクロキャリアの各々は、

20

(i) 前記マイクロキャリアに結合したプローブであって、前記プローブは、KRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、またはHER2遺伝子におけるDNA変異に特異的である、前記プローブ；及び

(ii) それに結合した前記プローブに対応する識別子；
を含み、前記キットは、前記KRAS遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、前記PIK3CA遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、前記BRAF遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、前記EGFR遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、前記AKT1遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、前記MEK1遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、及び前記HER2遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリアを含み；

30

前記KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子は、ヒト遺伝子である、前記キット。

【請求項150】

少なくとも7つのブロック核酸をさらに含み、前記少なくとも7つのブロック核酸の各々は、前記KRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、またはHER2遺伝子における前記DNA変異の1つと対応する野生型DNA遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型DNA遺伝子座の増幅を防止する、請求項149に記載のキット。

40

【請求項151】

前記少なくとも7つのブロック核酸の各々は、

前記対応する野生型DNA遺伝子座とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチド；
及び

前記一本鎖オリゴヌクレオチドからの伸長をブロックする3'末端部位を含む、請求項150に記載のキット。

【請求項152】

50

前記 3' 末端部位は、1つ以上の反転デオキシチミジンを含む、請求項 151 に記載のキット。

【請求項 153】

前記少なくとも 7 つのブロック核酸の各々は、ロック核酸 (LNA)、ペプチド核酸 (PNA)、ヘキソース核酸 (HNA)、トレオース核酸 (TNA)、グリコール核酸 (GNA)、及びシクロヘキセニル核酸 (CeNA) からなる群から選択される 1 つ以上の改変ヌクレオチドを含む、請求項 149 ~ 152 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 154】

前記 KRAS 遺伝子における前記 DNA 変異は、G12D、G12V、または G12C 変異 KRAS タンパク質をコードする 1 つ以上の DNA 変異を含む、請求項 149 ~ 153 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 155】

前記 KRAS 遺伝子における前記 DNA 変異は、G12D、G12V、及び G12C 変異 KRAS タンパク質をコードする DNA 変異を含む、請求項 154 に記載のキット。

【請求項 156】

前記 KRAS 遺伝子における前記 DNA 変異に特異的な前記プローブは、

(1) TAGTTGGAGCT (配列番号 38)、TGTGGTAGTTG (配列番号 40)、TGATGGCGTAG (配列番号 42)、TGGAGCTGATGGC (配列番号 44)、及び GCGTAGGCAAG (配列番号 46) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；

(2) CTGTTGGCGTAGG (配列番号 48)、GTAGTTGGAGCTG (配列番号 50)、TGGAGCTGTTGGC (配列番号 52)、TTGTGGTAGTTGG (配列番号 54)、及び GGCGTAGGCAAGA (配列番号 56) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；及び

(3) TAGTTGGAGCTT (配列番号 58)、GCGTAGGCAAGA (配列番号 60)、GGAGCTTGTGGC (配列番号 62)、TTGTGGCGTAGG (配列番号 64)、及び TGTGGTAGTTGG (配列番号 66) からなる群から選択される配列を含む第 3 のプローブ；

を含み、前記 3 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 155 に記載のキット。

【請求項 157】

前記 3 つのプローブの各々は、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 156 に記載のキット。

【請求項 158】

前記 KRAS 遺伝子における前記 DNA 変異に特異的な前記プローブは、

(1) TTTTTTTTTTTTAAATAGTTGGAGCT (配列番号 39)、TTTTTTTTTTTTAAATGTGGTAGTTG (配列番号 41)、TTTTTTTTTTTTAAATGATGGCGTAG (配列番号 43)、TTTTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC (配列番号 45)、及び TTTTTTTTTTTTTTTTAAAGCGTAGGCAAG (配列番号 47) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；

(2) TTTTTTTTTTTTTTACTGTGGCGTAGG (配列番号 49)、TTTTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG (配列番号 51)、TTTTTTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC (配列番号 53)、TTTTTTTTTTTTTATTGTGGTAGTTGG (配列番号 55)、及び TTTTTTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGA (配列番号 57) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；及び

(3) TTTTTTTTTTTTTTAAATAGTTGGAGCTT (配列番号 59)、TTTTTTTTTTTTTAAAGCGTAGGCAAGA (配列番号 61)、TTTTTTTTTTTTTAAAGGAGCTTGTGGC (配列番号 63)、TTTTTTTTTTTTTTAAAT

10

20

30

40

50

TGTGGCGTAGG（配列番号65）、及びTTTTTTTTTTTAAATGTGGTAGTTGG（配列番号67）からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；を含み、前記3つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項157に記載のキット。

【請求項159】

配列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG（配列番号1）及びCGTCAAGGCACTCTTGCCCTAC（配列番号2）を含むプライマー対をさらに含む、請求項154～158のいずれか1項に記載のキット。

【請求項160】

前記KRAS DNA変異と対応する野生型KRAS DNA遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型KRAS DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、前記ブロック核酸は、配列

【化11】

TACGCCACCAGCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号281) ; TTGGAGCTGGTGGCGTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号282) ; GCTGGTGGCGTAGGCA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号283) ; GCTGGTGGCGTAGGC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号284) ; またはTTGGAGCTGGTGGCGT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号285) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

を含む、請求項154～159のいずれか1項に記載のキット。

【請求項161】

前記PIK3CA遺伝子における前記DNA変異は、E542KまたはE545K変異PIK3CAタンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む、請求項149～160のいずれか1項に記載のキット。

【請求項162】

前記PIK3CA遺伝子における前記DNA変異は、E542K及びE545K変異PIK3CAタンパク質をコードするDNA変異を含む、請求項161に記載のキット。

【請求項163】

前記PIK3CA遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、

(1) GCTCAGTGATTTTAG (配列番号87)、TGCTCAGTGATTTT (配列番号89)、GCTCAGTGATTTTAG (配列番号91)、CCTGCTCAGTGATTTTA (配列番号93)、及びCTCAGTGATTTTAGA (配列番号95) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；及び

(2) TTCCTCCTGCTTAA (配列番号97)、CTCCTGCTTAGT (配列番号99)、TCTCCTGCTTAG (配列番号101)、TCCTGCTTAGTG (配列番号103)、及びCTCCTGCTTAGTGA (配列番号105) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；

を含み、前記2つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項162に記載のキット。

【請求項164】

前記2つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項163

10

20

30

40

50

に記載のキット。

【請求項 165】

前記 P I K 3 C A 遺伝子における前記 D N A 変異に特異的な前記プローブは、

(1) T T T T T T T T T A G C T C A G T G A T T T T A G (配列番号 88)、T T T T T T T T T G C T C A G T G A T T T T (配列番号 90)、T T T T T T T T T A G C T C A G T G A T T T T A G (配列番号 92)、T T T T T T T T C C T G C T C A G T G A T T T T A (配列番号 94)、及び T T T T T T T T T T T T C T C A G T G A T T T T A G A (配列番号 96) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；及び

(2) T T T T T T T T T T T T T T C T C C T G C T T A (配列番号 98)、T T T T T T T T T T T T C T C C T G C T T A G T (配列番号 100)、T T T T T T T T T T T T T A T C T C C T G C T T A G (配列番号 102)、T T T T T T T T T T T T T T C C T G C T T A G T G (配列番号 104)、及び T T T T T T T T T T T T T T C T C C T G C T T A G T G A (配列番号 106) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；

を含み、前記 3 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 164 に記載のキット。

【請求項 166】

配列 C A A T T T C T A C A A G A G A T C C T C T C T C T (配列番号 5) 及び C T C C A T T T T A G C A C T T A C C T G T G A C (配列番号 6) を含むプライマー対をさらに含む、請求項 161～165 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 167】

前記 P I K 3 C A D N A 変異と対応する野生型 P I K 3 C A D N A 遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型 P I K 3 C A D N A 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含む、前記ブロック核酸は、配列

【化 12】

$CTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である)
(配列番号 291) ; $TCTCTGAAATCAC TGAGCAGG (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 292) ; $TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 293) ; $TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 294) ; または $TCTCTGAATTCACTGAGCAGG (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 295) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

を含む、請求項 161～166 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 168】

前記 P I K 3 C A 遺伝子における前記 D N A 変異は、H1047R 変異 P I K 3 C A タンパク質をコードする D N A 変異を含む、請求項 149～167 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 169】

前記 P I K 3 C A 遺伝子における前記 D N A 変異に特異的な前記プローブは、G A T G C A C G T C A T G (配列番号 107)、T G A A T G A T G C A C G (配列番号 109)、T G A T G C A C G T C (配列番号 111)、A A T G A T G C A C G T C A (配列番号 113)、及び A A T G A T G C A C G T C (配列番号 115) からなる群から選択される配列を含む、請求項 168 に記載のキット。

【請求項 170】

前記プローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項169に記載のキット。

【請求項 171】

前記PIK3CA遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、TTTTT
TTTTTTTTTTTTT GATGCACGTCATG (配列番号108)、TTTTTTT
TTTTTTGAATGATGCACG (配列番号110)、TTTTTTTTTTTTTTTTT
GATGCACGTC (配列番号112)、TTTTTTTTTTTTTTTTT AATGATGC
ACGTC A (配列番号114)、及びTTTTTTTTTTTTTTTTT AATGATGCAC
GTC (配列番号116) からなる群から選択される配列を含む、請求項170に記載の
キット。

10

【請求項 172】

配列ACCCCTAGCCCTTAGATAAAACTGAGC (配列番号7) 及びTTT
GTTGTCCAGCCACCATGA (配列番号8) を含むプライマー対をさらに含む
、請求項168～171のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 173】

前記PIK3CA DNA変異と対応する野生型PIK3CA DNA遺伝子座とハイ
ブリダイズし、前記野生型PIK3CA DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸
をさらに含み、前記ブロック核酸は、配列

20

【化 13】

CACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番
号296) ; CCACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、2、または3で
ある) (配列番号297) ; CACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、
2、または3である) (配列番号298) ; CCACCATGATGTGCATCA (inv
dT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号299) ; またはCATGATGTGC
A (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号300) (イタリック体の核
酸はロック核酸を表す)

30

を含む、請求項168～172のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 174】

前記BRAF遺伝子における前記DNA変異は、V600E変異BRAFタンパク質を
コードするDNA変異を含む、請求項149～173のいずれか1項に記載のキット。

【請求項 175】

前記BRAF遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、TTTGGT
CTAGCTACAGA (配列番号79)、CTACAGAGAAATCTCGA (配列
番号81)、GTGATTTTGGTCTAGCT (配列番号83)、及びTCTAGC
TACAGAGAAAT (配列番号85) からなる群から選択される配列を含む、請求項
174に記載のキット。

40

【請求項 176】

前記BRAF遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的な前記プローブは、5'末
端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニ
ンまたはチミンヌクレオチドである、請求項175に記載のキット。

【請求項 177】

前記BRAF遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、TTTTTTT

50

A A T T G A G A A A T C T C G A T G G A G (配列番号78)、T T T T T T T A A T T T T T G G T C T A G C T A C A G A (配列番号80)、T T T T T T T A A T T C T A C A G A G A A A T C T C G A (配列番号82)、T T T T T T T A A T T G T G A T T T T G G T C T A G C T (配列番号84)、及びT T T T T T T A A T T T C T A G C T A C A G A G A A A T (配列番号86)からなる群から選択される配列を含む、請求項176に記載のキット。

【請求項178】

配列A T A G C C T C A A T T C T T A C C A T C C A C A A A A T G (配列番号9)及びC A G A T A T A T T T C T T C A T G A A G A C C T C A C A G T A A (配列番号10)を含むプライマー対をさらに含む、請求項174～177のいずれか1項に記載のキット。

10

【請求項179】

前記B R A F DNA変異と対応する野生型B R A F DNA遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型B R A F DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、前記ブロック核酸は、配列

【化14】

G A G A T T T C A C T G T A G C (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号301) ; G A G A T T T C A C T G T A G C (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号302) ; G A G A T T T C A C T G T A G C (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号303) ; G A G A T T T C A C T G T A G C (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号304) ; またはG A G A T T T C A C T G T A G C (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号305) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

20

を含む、請求項174～178のいずれか1項に記載のキット。

30

【請求項180】

前記E G F R遺伝子における前記DNA変異は、G 7 1 9 A変異E G F Rタンパク質をコードするDNA変異を含む、請求項149～179のいずれか1項に記載のキット。

【請求項181】

前記E G F R遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、T C A A A G T G C T G G C C T C (配列番号117)、A G A T C A A A G T G C T G G C C T C C G (配列番号119)、A A A G T G C T G G C C T (配列番号121)、A G T G C T G G C C T (配列番号123)、及びA A G T G C T G G C C T C (配列番号125)からなる群から選択される配列を含む、請求項180に記載のキット。

40

【請求項182】

前記E G F R遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項181に記載のキット。

【請求項183】

前記E G F R遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、T T T T T T T T T T C A A A G T G C T G G C C T C (配列番号118)、T T T T T T T A G A T C A A A G T G C T G G C C T C C G (配列番号120)、T T T T T T T T T T T T A A A G T G C T G G C C T (配列番号122)、T T T T T T T T T T T T T A G T G C T G G C C T (配列番号124)、及びT T T T T T T T T T T T T A A G T G C T G G C C T

50

C（配列番号126）からなる群から選択される配列を含む、請求項182に記載のキット。

【請求項184】

配列CTTGTTGGAGCCTCTTACACCC（配列番号11）及びTGCCGAACGCACCGGA（配列番号12）を含むプライマー対をさらに含む、請求項180～183のいずれか1項に記載のキット。

【請求項185】

前記EGFR DNA変異と対応する野生型EGFR DNA遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型EGFR DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含む、前記ブロック核酸は、配列

10

【化15】

CGGAGCC CAGCACTTTGA (invdT)_n (nは1、2、または3である)
 (配列番号306) ; CGCACCCGGAGCC CAGCACT (invdT)_n (nは1、
 2、または3である) (配列番号307) ; GAGCCCAGCAC (invdT)_n (nは
 1、2、または3である) (配列番号308) ; CGCACCGGAGCCCAGCAC (i
 nvdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号309) ; またはCGCACCGG
 AGCCCAGCACTTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号3
 10) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

20

を含む、請求項180～184のいずれか1項に記載のキット。

【請求項186】

前記EGFR遺伝子における前記DNA変異は、E746_A750del変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異を含む、請求項149～185のいずれか1項に記載のキット。

30

【請求項187】

前記EGFR遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、

(1) AATCAAAACATCTCCGAAAG（配列番号128）、CAAAACATCTCCG（配列番号130）、AACATCTCTCCG（配列番号132）、及びAAACATCTCCGAAAGCC（配列番号134）からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；及び

(2) AATCAAGACATCTCCGA（配列番号136）、GCAATCAAGACATCTCCGA（配列番号138）、AATCAAGACATCTC（配列番号140）、AATCAAGACATCTCCGAAAGC（配列番号142）、及びCAAGACATCTCCGA（配列番号144）からなる群から選択される配列を含む第2の

40

プローブ；
 を含み、前記2つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項186に記載のキット。

【請求項188】

前記2つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項187に記載のキット。

【請求項189】

前記EGFR遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、

(1) TTTTTTTTAAATCAAAACATCTCTCCG（配列番号127）、T

50

TTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCGAAAG (配列番号129)、TTTTTTTTTTTACAAACATCTCCG (配列番号131)、TTTTTTTTTTTAAACATCTCCG (配列番号133)、及びTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC (配列番号135) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；及び

(2) TTTTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGA (配列番号137)、TTTTTTTGCAATCAAGACATCTCCGA (配列番号139)、TTTTTTTTTAATCAAGACATCTC (配列番号141)、TTTTTTTTTTTAAATCAAGACATCTCCGAAAGC (配列番号143)、及びTTTTTTTTTTTTTTTCAAGACATCTCCGA (配列番号145) からなる群から選択される配列を含む第2

10

のプローブ；
を含み、前記2つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項188に記載のキット。

【請求項190】

配列GCCAGTTTAACGTCTTCTCTCTC (配列番号13) 及びATCGAGGATTTCTCTTGTTGGCTT (配列番号14) を含むプライマー対をさらに含む、請求項186～189のいずれか1項に記載のキット。

【請求項191】

前記EGFR DNA変異と対応する野生型EGFR DNA遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型EGFR DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、前記ブロック核酸は、配列

20

【化16】

CGGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号311)；CGGAGATGTTGCTTCTCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号312)；GTTGCTTCTCTTAATTCC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号313)；ATGTTGCTTCTCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号314)；またはTTGCTTCTCTTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号315) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む、請求項186～190のいずれか1項に記載のキット。

【請求項192】

前記EGFR遺伝子における前記DNA変異は、T790M、C797S、S768I、V769__D770insASV、H773__V774insH、D770__N771insG、またはD770__N771insSVD変異EGFRタンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む、請求項149～191のいずれか1項に記載のキット。

40

【請求項193】

前記EGFR遺伝子における前記DNA変異は、T790M、C797S、S768I、V769__D770insASV、H773__V774insH、D770__N771insG、及びD770__N771insSVD変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異を含む、請求項192に記載のキット。

【請求項194】

前記EGFR遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、

(1) GAGATGCATGATGA (配列番号146)、TGAGATGCATGA

50

T G A G (配列番号 1 4 7)、A T G A G A T G C A T G A T G A G (配列番号 1 4 8)、T G A G C T G C A T G A T G A (配列番号 1 4 9)、及び C A T G A G A T G C A T G A T G A (配列番号 1 5 0) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；

(2) C C A G G A G G C T G C C G (配列番号 4 6 1)、C A G G A G G C T G C C G A (配列番号 4 6 3)、T C C A G G A G G C T G C C (配列番号 4 6 5)、C C A G G A G G C T G C C (配列番号 4 6 7)、及び C A G G A G G C T G C C (配列番号 4 6 9) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；

(3) C C A G G A G G G A G C C (配列番号 4 7 1)、C C A G G A G G G A G C C G (配列番号 4 7 3)、T C C A G G A G G G A G C C (配列番号 4 7 5)、C A G G A G G G A G C C G (配列番号 4 7 7)、及び C A G G A G G G A G C C G A (配列番号 4 7 9) からなる群から選択される配列を含む第 3 のプローブ；

(4) A T G G C C A T C T T G G (配列番号 4 2 1)、G G C C A T C T T G G A (配列番号 4 2 3)、G A T G G C C A T C T T G (配列番号 4 2 5)、T G A T G G C C A T C T T G (配列番号 4 2 7)、及び T G G C C A T C T T G G (配列番号 4 2 9) からなる群から選択される配列を含む第 4 のプローブ；

(5) G T G A T G G C C G G (配列番号 4 3 1)、T G A T G G C C G G C G (配列番号 4 3 3)、G T G A T G G C C G G C G T (配列番号 4 3 5)、G A T G G C C G G C G T (配列番号 4 3 7)、及び G A T G G C C G C G T G (配列番号 4 3 9) からなる群から選択される配列を含む第 5 のプローブ；

(6) A A C C C C C A T C A C G T (配列番号 4 4 1)、G A C A A C C C C C A T C A C G (配列番号 4 4 3)、C G T G G A C A A C C C C C A T C A (配列番号 4 4 5)、C C C A T C A C G T G T (配列番号 4 4 7)、及び T G G A C A A C C C C C A T C A C (配列番号 4 4 9) からなる群から選択される配列を含む第 6 のプローブ；及び

(7) G C C A G C G T G G A C G G (配列番号 4 5 1)、C G T G G A C G G T A A C C (配列番号 4 5 3)、G A C G G T A A C C C C C (配列番号 4 5 5)、C C A G C G T G G A C G G T (配列番号 4 5 7)、及び G C C A G C G T G G A C G G T A (配列番号 4 5 9) からなる群から選択される配列を含む第 7 のプローブ；

を含み、前記 7 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項 1 9 3 に記載のキット。

【請求項 1 9 5】

前記 E G F R 遺伝子における前記 DNA 変異に特異的な前記 7 つのプローブの各々は、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 1 9 4 に記載のキット。

【請求項 1 9 6】

前記 E G F R 遺伝子における前記 DNA 変異に特異的な前記プローブは、

(1) T T T T T T T T T T T T G A G A T G C A T G A T G A (配列番号 3 5 2)、T T T T T T T T T T T T G A G A T G C A T G A T G A G (配列番号 3 5 3)、T T T T T T T T A T G A G A T G C A T G A T G A G (配列番号 3 5 4)、T T T T T T T T T T T T G A G C T G C A T G A T G A (配列番号 3 5 5)、及び T T T T T T T T T T C A T G A G A T G C A T G A T G A (配列番号 3 5 6) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；

(2) T T T T T T T T T T T T A C C A G G A G G C T G C C G (配列番号 4 6 2)、T T T T T T T T T T T T A C A G G A G G C T G C C G A (配列番号 4 6 4)、T T T T T T T T T T T T A T C C A G G A G G C T G C C (配列番号 4 6 6)、T T T T T T T T T T T T A C C A G G A G G C T G C C (配列番号 4 6 8)、及び T T T T T T T T T T T T A C A G G A G G C T G C C (配列番号 4 7 0) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；

(3) T T T T T T T T T T T T A C C A G G A G G G A G C C (配列番号 4 7 2)、T T T T T T T T T T T T A C C A G G A G G G A G C C G (配列番号 4 7 4)、T T T T T T T T T T T T A T C C A G G A G G G A G C C (配列番号 4 7 6)、T T T T T T T T T T

10

20

30

40

50

TTACAGGAGGGAGCCG (配列番号478)、及びTTTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCGA (配列番号480) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；

(4) TTTTTTTTTTATGGCCATCTTGG (配列番号422)、TTTTTTTTTTAGGCCATCTTGA (配列番号424)、TTTTTTTTTTAGATGGCCATCTTG (配列番号426)、TTTTTTTTTTGATGGCCATCTTG (配列番号428)、及びTTTTTTTTTTTGGCCATCTTGG (配列番号430) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；

(5) TTTTTTTTTTTTGTGATGGCCCGG (配列番号432)、TTTTTTTTTTTGTGATGGCCCGCG (配列番号434)、TTTTTTTTTTTGTGATGGCCCGCGT (配列番号436)、TTTTTTTTTTTGTGATGGCCCGCGT (配列番号438)、及びTTTTTTTTTTTGTGATGGCCCGCGTG (配列番号440) からなる群から選択される配列を含む第5のプローブ；

(6) TTTTTTTTTTTTAAACCCCATCACGT (配列番号442)、TTTTTTTTTTTGACAACCCCATCACG (配列番号444)、TTTTTCGTGGACAACCCCATCA (配列番号446)、TTTTTTTTTTTTCATCACGTGT (配列番号448)、及びTTTTTTTTTTTGGAACAACCCCATCAC (配列番号450) からなる群から選択される配列を含む第6のプローブ；及び

(7) TTTTTTTTTTTTGGCCAGCGTGGACGG (配列番号452)、TTTTTTTTTTTTCGTGGACGGTAACC (配列番号454)、TTTTTTTTTTTGGACGGTAACCC (配列番号456)、TTTTTTTTTTTTCAGCGTGGACGGT (配列番号458)、及びTTTTTTTTTTGGCCAGCGTGGACGGTA (配列番号460) からなる群から選択される配列を含む第7のプローブ；

を含み、前記7つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項195に記載のキット。

【請求項197】

配列CCTCCACCGTGCGAGATCATC (配列番号15) 及びTTCCCTGATTACCTTTGCGAT (配列番号16) を含むプライマー対；配列CCACACTGACGTGCGCTCT (配列番号511) 及びGCACACGTAGGGGTGTCCAAGA (配列番号512) を含むプライマー対；配列CCACACTGACGTGCGCTCT (配列番号513) 及びGTACACGTGGCCACGCCG (配列番号514) を含むプライマー対；配列CCACACTGACGTGCGCTCT (配列番号515) 及びCAGGCGGCACACGTGAT (配列番号516) を含むプライマー対；及び／または配列CCACACTGACGTGCGCTCT (配列番号517) 及びAGGCGGCACACGTGCGGGTTAC (配列番号518) を含むプライマー対をさらに含む、請求項192～196のいずれか1項に記載のキット。

【請求項198】

前記EGFR DNA変異と対応する野生型EGFR DNA遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型EGFR DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含む、前記ブロック核酸は、配列

10

20

30

40

50

【化 17】

CATCACGCAGCTCATG (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号316); *TGCAGCTCATCACGCAGC* (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号317); *TCA TCACGCAGCTCAT* (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号318); *TCATCACGCAGC* (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号319); または *CTCATCACGCAGC* (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号320) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む、請求項192～197のいずれか1項に記載のキット。

【請求項199】

前記EGFR遺伝子における前記DNA変異は、L858R変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異を含む、請求項149～198のいずれか1項に記載のキット。

【請求項200】

前記EGFR遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、ATTTTGGGCGGGCC (配列番号151)、TTGGGCGGGCCAAA (配列番号153)、GCGGGCCAAACT (配列番号155)、GGGCGGGGCCAAACT (配列番号157)、及びTTGGGCGGGCCA (配列番号159) からなる群から選択される配列を含む、請求項199に記載のキット。

20

【請求項201】

前記プローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項200に記載のキット。

【請求項202】

前記EGFR遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、TTTTTTTATTTTTGGGCGGGCC (配列番号152)、TTTTTTTTTTAATTGGGCGGGCCAAA (配列番号154)、TTTTTTTTTTAAAAAGCGGGGCCAAACT (配列番号156)、TTTTTTTTTTTAAAAAGGGCGGGGCCAAACT (配列番号158)、及びTTTTTTTTTTTAAATGGGCGGGCCA (配列番号160) からなる群から選択される配列を含む、請求項201に記載のキット。

30

【請求項203】

配列GGAGGACCGTCGCTTGG (配列番号17) 及びTCTTTCTCTTCCGCACCAG (配列番号18) を含むプライマー対をさらに含む、請求項199～202のいずれか1項に記載のキット。

40

【請求項204】

前記EGFR DNA変異と対応する野生型EGFR DNA遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型EGFR DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、前記ブロック核酸は、配列

【化 18】

CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号321) ; CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号322) ; CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号323) ; AGCAGTTTGGCCAGCC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号324) ; またはCCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号325) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む、請求項199～203のいずれか1項に記載のキット。

【請求項205】

前記AKT1遺伝子における前記DNA変異は、E17K変異AKT1タンパク質をコードするDNA変異を含む、請求項149～204のいずれか1項に記載のキット。

20

【請求項206】

前記AKT1遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、TGTAAGGAAGTACA (配列番号370)、TCTGTAGGGAAGTAC (配列番号372)、GTCTGTAGGGAAGTACAT (配列番号374)、CCGCACGTCTGTAGGGA (配列番号376)、及びACGTCTGTAGGGAAGTA (配列番号378) からなる群から選択される配列を含む、請求項205に記載のキット。

【請求項207】

前記AKT1遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、5'末端に7ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記7ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項206に記載のキット。

30

【請求項208】

前記AKT1遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、TTTTTTT TTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA (配列番号371)、TTTTTTTTTTTT TTTCTGTAGGGAAGTAC (配列番号373)、TTTTTTTTTGTCTGTAGGGAAGTACAT (配列番号375)、TTTTTTTTTCCGCACGTCTGTAGGGA (配列番号377)、及びTTTTTTTTTACGTCTGTAGGGAAGTA (配列番号379) からなる群から選択される配列を含む、請求項207に記載のキット。

【請求項209】

配列GAGGGTCTGTACGGGTAGAGTG (配列番号380) 及びTGCCCGCCAGGTCTTGATGTA (配列番号381) を含むプライマー対をさらに含む、請求項205～208のいずれか1項に記載のキット。

40

【請求項210】

前記AKT1 DNA変異と対応する野生型AKT1 DNA遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型AKT1 DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、前記ブロック核酸は、配列

50

【化 19】

$TGTACTCCCC TACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号382); $GATGTACTCCCC T (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号383); $ATGTACTCCCC CTAC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号384); $GTACTCCCC TACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号385); または $GATGTACTCCCC TACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号386) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む、請求項205～209のいずれか1項に記載のキット。

【請求項211】

前記MEK1遺伝子における前記DNA変異は、K57N変異MEK1タンパク質をコードするDNA変異を含む、請求項149～210のいずれか1項に記載のキット。

【請求項212】

前記MEK1遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、TTACCCAGAAATCAGAA (配列番号387)、CCAGAAATCAGAAAGGTG (配列番号389)、TTCTTACCCAGAAATCA (配列番号391)、CCTTTCTTACCCAGAAATC (配列番号393)、及びCAGAAATCAGAAAGGTGG (配列番号395) からなる群から選択される配列を含む、請求項211に記載のキット。

20

【請求項213】

前記MEK1遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項212に記載のキット。

【請求項214】

前記MEK1遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、TTTTTAAATTTACCCAGAAATCAGAA (配列番号388)、TTTTTAAATTCAGAAAGGTG (配列番号390)、TTTTTAAATTTCTTACCCAGAAATCA (配列番号392)、TTTTTAAATTCCTTTCTTACCCAGAAATC (配列番号394)、及びTTTTTAAATTCAGAAATCAGAAAGGTGG (配列番号396) からなる群から選択される配列を含む、請求項213に記載のキット。

30

【請求項215】

配列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA (配列番号397) 及びCCTTCAAGTTCCTCCACCTTCTG (配列番号398) を含むプライマー対をさらに含む、請求項211～214のいずれか1項に記載のキット。

40

【請求項216】

前記MEK1 DNA変異と対応する野生型MEK1 DNA遺伝子座とハイブリダイズし、前記野生型MEK1 DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、前記ブロック核酸は、配列

50

【化 20】

$TCTGCTTC TGGGTAAG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号399); $TTCTGCTTCTGGGTAAGA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号400); $CACCTTCTGCTTC TGGG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号401); $TCTGCTTCTGGGTA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号402); または $CACCTTC TGCCTTC TGGGTAAGA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号403) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む、請求項211～215のいずれか1項に記載のキット。

【請求項217】

前記HER2遺伝子における前記DNA変異は、A775_G776 ins YVMA変異HER2タンパク質をコードするDNA変異を含む、請求項149～216のいずれか1項に記載のキット。

20

【請求項218】

前記HER2遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、ATACGTGATGTCCTTAC (配列番号404)、ACGTGATGGCTTACGT (配列番号406)、AAGCATACGTGATGGCT (配列番号408)、GCATACGTGATGGCTT (配列番号410)、及びGCATACGTGATGGCTTA (配列番号412) からなる群から選択される配列を含む、請求項217に記載のキット。

【請求項219】

前記HER2遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、5'末端に5ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記5ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項218に記載のキット。

30

【請求項220】

前記HER2遺伝子における前記DNA変異に特異的な前記プローブは、TTTTTTT TTTATACGTGATGTCCTTAC (配列番号405)、TTTTTTTTTTTTT TACGTGATGGCTTACGT (配列番号407)、TTTTTTAAGCATACGTGATGGCT (配列番号409)、TTTTTTTTTGCATACGTGATGGCTT (配列番号411)、及びTTTTTTTTTGCATACGTGATGGCTTA (配列番号413) からなる群から選択される配列を含む、請求項219に記載のキット。

【請求項221】

配列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT (配列番号414) 及びACACCAGCCATCACGTAAAGACA (配列番号415) を含むプライマー対をさらに含む、請求項217～220のいずれか1項に記載のキット。

40

【請求項222】

少なくとも5つのマイクロキャリアを含むキットであって、前記少なくとも5つのマイクロキャリアの各々は、

(i) 前記マイクロキャリアに結合したプローブであって、前記プローブは、ALK、ROS、RET、NTRK1、またはcMET遺伝子におけるRNA変異に特異的である、前記プローブ; 及び

(ii) それに結合した前記プローブに対応する識別子;

を含み、前記キットは、前記ALK遺伝子におけるRNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、前記ROS遺伝子におけるRNA変異に特異的なプ

50

ローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、前記RET遺伝子におけるRNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、前記NTRK1遺伝子におけるRNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、及び前記cMET遺伝子におけるRNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリアを含み；

前記ALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子は、ヒト遺伝子である、前記キット。

【請求項223】

前記ALK、ROS、RET、及びNTRK1遺伝子における前記変異の各々は、融合遺伝子を含む、請求項222に記載のキット。

10

【請求項224】

前記ALK遺伝子における前記変異は、EML E13:ALK E20、EML E20:ALK E20、及びEML E6:ALK E20 EML4-ALK融合遺伝子のうちの1つ以上を含む、請求項223に記載のキット。

【請求項225】

前記ALK遺伝子における前記変異は、EML E13:ALK E20、EML E20:ALK E20、及びEML E6:ALK E20 EML4-ALK融合遺伝子を含む、請求項224に記載のキット。

【請求項226】

前記ALK遺伝子における前記変異に特異的な前記プローブは、

20

(1) AAAGGACCTAAAGTGTT (配列番号161)、CCTAAAGTGTT ACCGC (配列番号163)、GGGAAAGGACCTAAAG (配列番号165)、AGTGTTACCGCCGGGAA (配列番号167)、及びTACCGCCCGGGAAG CACC (配列番号169) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；

(2) GACTATGAAATATTGTAC (配列番号171)、GAAATATT GTACTTGTAC (配列番号173)、TATTGTACTTGTACCGCC (配列番号175)、TGTAACCGCCGGGAAGCAC (配列番号177)、及びCCG CCGGAAGCACCAAGGA (配列番号179) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；

(3) TGTCAATCATCAACCAA (配列番号181)、ATGTCAATCAT CAACC (配列番号183)、GTGTACCGCCGGGAAGC (配列番号185)、TCAACCAAAGTGTAACCG (配列番号187)、及びTACCGCCCGGGAAG CACCA (配列番号189) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；
及び

30

(4) CGAAAAAACAGCCAA (配列番号191)、TCGCGAAAAA AACAGC (配列番号193)、GTGTACCGCCGGGAAGC (配列番号195)、TACCGCCCGGAAGCACCC (配列番号197)、及びACAGCCCAAGT GTACCG (配列番号199) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；
を含み、前記4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項225に記載のキット。

40

【請求項227】

前記4つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項226に記載のキット。

【請求項228】

前記ALK遺伝子における前記変異に特異的な前記プローブは、

(1) TTTTTTTTTTTTAAAGGACCTAAAGTGTT (配列番号162)、TTTTTTTTTTTCTAAAGTGTTACCGC (配列番号164)、TTTTTT TTTTTTGGGAAAGGACCTAAAG (配列番号166)、TTTTTTTTTTT TAGTGTTACCGCCGGGA (配列番号168)、及びTTTTTTTTTTTTTA

50

CCGCCGGAAGCACCC（配列番号170）からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；

（2）TTTTTTTTTTTTTTTGAATATGAAATATTGTAC（配列番号172）、TTTTTTTTTTTTTTTGAATATTTGTACTTTGTAC（配列番号174）、TTTTTTTTTTTTTTTTTATTTGTACTTTGTACCGCC（配列番号176）、TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTACCGCCGGAAGCAC（配列番号178）、及びTTTTTTTTTTTTTTTTTCCGCCGGAAGCACCCAGGA（配列番号180）からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；

（3）TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTTCATCATCAACCAA（配列番号182）、TTTTTTTTTTTTTTTTTTTATGTTCATCATCAACC（配列番号184）、TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC（配列番号186）、TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCAACCAAGTGTACCG（配列番号188）、及びTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACCA（配列番号190）からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；及び

（4）TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGAAAAAAACAGCCAA（配列番号192）、TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCGCGAAAAAAACAGC（配列番号194）、TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAAGC（配列番号196）、TTTTTTTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACCC（配列番号198）、及びTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACAGCCAAAGTGTACCG（配列番号200）からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；

を含み、前記4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項227に記載のキット。

【請求項229】

前記ALK遺伝子における前記変異に特異的なcDNAを生成するのに好適な第1のプライマーであって、前記第1のプライマーは、配列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT（配列番号363）またはGAAGCCTCCCTGGATCTCC（配列番号364）を含む、前記第1のプライマー；ならびにTATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC（配列番号357）、CCAGCTACATCACACACCTTGACT（配列番号358）、及びTAATACCAAAAGTTTACCAAAACTGCA（配列番号359）からなる群から選択される配列を含む前記ALK遺伝子における前記変異に特異的な第2のプライマーをさらに含む、請求項224～228のいずれか1項に記載のキット。

【請求項230】

前記ROS遺伝子における前記変異は、CD74-ROS、及びSLC34A2-ROSからなる群から選択されるROS融合遺伝子を含む、請求項223～229のいずれか1項に記載のキット。

【請求項231】

前記ROS遺伝子における前記変異は、CD74 E6:ROS E32、CD74 E6:ROS E34、SLC34A2 E4:ROS E32、及びSLC34A2 E4:ROS E34融合遺伝子を含む、請求項230に記載のキット。

【請求項232】

前記ROS遺伝子における前記変異に特異的な前記プローブは、

（1）ACTGACGCTCCACCGAAA（配列番号201）、CCACTGACGCTCCACCGA（配列番号203）、GCTGGAGTCCCAAATAAAC（配列番号205）、GGAGTCCCAAATAAACAG（配列番号207）、及びCACCGAAAGCTGGAGTCCC（配列番号209）からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；

（2）CCGAAAGATGATTTT（配列番号211）、GACGCTCCACCGAAA（配列番号213）、ACTGACGCTCCACCGA（配列番号215）、GATGATTTTGGATA（配列番号217）、及びTGATTTTGGATA

CCA（配列番号219）からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；

（3）AGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA（配列番号221）、CTGGTTGGAGCTGGAGTCCC（配列番号223）、AGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG（配列番号225）、GCTGGAGTCCCAAATAAACCA（配列番号227）、及びGGAGTCCCAAATAAACCAAGG（配列番号229）からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；及び

（4）GCGCCTTCCAGCTGGTTG（配列番号231）、GTAGCGCCTTCCAGCTGGT（配列番号233）、TGGTTGGAGATGATTTTT（配列番号235）、GATGATTTTTTGGATACCAAG（配列番号237）、及びTGATTTTTTGGATACCA（配列番号239）からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；

10

を含み、前記4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項231に記載のキット。

【請求項233】

前記4つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項232に記載のキット。

【請求項234】

前記ROS遺伝子における前記変異に特異的な前記プローブは、

（1）TTTTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAAA（配列番号202）、TTTTTTTTTTTTTCCACTGACGCTCCACCGA（配列番号204）、TTTTTTTTTTTTTGGCTGGAGTCCCAAATAAAC（配列番号206）、TTTTTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAAG（配列番号208）、及びTTTTTTTTTTTTTCAACCGAAAGCTGGAGTCCC（配列番号210）からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；

20

（2）TTTTTTTTTTTTTCCGAAAGATGATTTTT（配列番号212）、TTTTTTTTTTTTTGGACGCTCCACCGAAAA（配列番号214）、TTTTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGA（配列番号216）、TTTTTTTTTTTTTGATGATTTTTTGGATA（配列番号218）、及びTTTTTTTTTTTTTGATTTTTTGGATACCA（配列番号220）からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；

30

（3）TTTTTTTTTTTTTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA（配列番号222）、TTTTTTTTTTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC（配列番号224）、TTTTTTTTTTTTTTTAGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG（配列番号226）、TTTTTTTTTTTTTTTGGCTGGAGTCCCAAATAAACCA（配列番号228）、及びTTTTTTTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCAAGG（配列番号230）からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；及び

（4）TTTTTTTTTTTTTGCGCCTTCCAGCTGGTTG（配列番号232）、TTTTTTTTTTTTTGTAGCGCCTTCCAGCTGGT（配列番号234）、TTTTTTTTTTTTTGTTGGAGATGATTTTT（配列番号236）、TTTTTTTTTTTTTGATGATTTTTTGGATACCAAG（配列番号238）、及びTTTTTTTTTTTTTGATTTTTTGGATACCA（配列番号240）からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；

40

を含み、前記4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項233に記載のキット。

【請求項235】

前記ROS遺伝子における前記変異に特異的なcDNAを生成するのに好適な第1のプライマーであって、前記第1のプライマーは、配列AATTCAATACATACTATCAGCTTCTCCCACTGTATTGAA（配列番号21）またはAATAATT

50

TCTGGTACGAGTGGGATTGTAAACAACCAGAAATA（配列番号22）を含む、前記第1のプライマー；及び配列GGAGTGCCATCGCTGTTTGA AATGAGCAGGCACCT（配列番号19）またはTACAGCCCTGGATA TTCTTAGTAGCGC（配列番号20）を含む前記ROS遺伝子における前記変異に特異的な第2のプライマーをさらに含む、請求項230～234のいずれか1項に記載のキット。

【請求項236】

前記RET遺伝子における前記変異は、KIF5B-RETからなる群から選択されるRET融合遺伝子を含む、請求項223～235のいずれか1項に記載のキット。

【請求項237】

前記RET遺伝子における前記変異は、KIF5B E15:RET E11、KIF5B E15:RET E12、KIF5B E16:RET E12、KIF5B E22:RET E12、及びKIF5B E23:RET E12融合遺伝子を含む、請求項235に記載のキット。

【請求項238】

前記RET遺伝子における前記変異に特異的な前記プローブは、

（1）GTGGGAATAATGATGTAAA（配列番号241）、CTGTGGGGAATAATGATGTAA（配列番号243）、GATCCACTGTGCGACGAGCT（配列番号245）、TGATGTAAAGATCCACTGTG（配列番号247）、及びTCCACTGTGCGACGAGCTGT（配列番号249）からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；

（2）TGGGAATAATGATGTAAA（配列番号251）、CTGTGGGGAATAATGATGTAA（配列番号253）、GGAGGATCCAAAGTGGGGAAT（配列番号255）、GGATCCAAAGTGGGGAATT（配列番号257）、及びATGATGTAAAGGAGGATCC（配列番号259）からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；

（3）CTTCGTATCTCTCAAGAGGAT（配列番号481）、GTATCTCTCAAGAGGATCCAA（配列番号483）、TTCGTATCTCTCAAGAG（配列番号485）、TCAAGAGGATCCAA（配列番号487）、及びTCTCTCAAGAGG（配列番号489）からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；

（4）GTTAAAAAGGAGGATCCAA（配列番号491）、ACAAGAGTTAAAAAGGAGGA（配列番号493）、AAGAGTTAAAAAGGAGGATC（配列番号495）、AAAAAGGAGGATCCAAAG（配列番号497）、及びAAGGAGGATCCAAAGTG（配列番号499）からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；及び

（5）AAACAGGAGGATCCAA（配列番号501）、AAGTGCAACAACAGGAGG（配列番号503）、GTGCACAAACAGGAGGATC（配列番号505）、CACAAACAGGAGGAT（配列番号507）、及びAAACAGGAGGATCCAA（配列番号509）からなる群から選択される配列を含む第5のプローブ；

を含み、前記5つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項237に記載のキット。

【請求項239】

前記4つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、前記5'末端における前記8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項238に記載のキット。

【請求項240】

前記RET遺伝子における前記変異に特異的な前記プローブは、

（1）TTTTTTTTTTTGTGGGAATAATGATGTAAA（配列番号2

10

20

30

40

50

42)、TTTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA (配列番号244)、TTTTTTTTTTTGATCCACTGTGCGACGAGCT (配列番号246)、TTTTTTTTTTTTTGATGTAAAGATCCACTGTG (配列番号248)、及びTTTTTTTTTTTCCACTGTGCGACGAGCTGT (配列番号250) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；

(2) TTTTTTTTTTTTGGGAAATAATGATGTAAA (配列番号252)、TTTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTA (配列番号254)、TTTTTTTTTTTGGAGGATCCAAAGTGGGAAT (配列番号256)、TTTTTTTTTTTGGATCCAAAGTGGGAATT (配列番号258)、及びTTTTTTTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC (配列番号260) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；

(3) TTTTTTTTTTTCTTCTGTATCTCTCAAGAGGAT (配列番号482)、TTTTTTTTTTTGATATCTCTCAAGAGGATCCAA (配列番号484)、TTTTTTTTTTTCTGTATCTCTCAAGAG (配列番号486)、TTTTTTTTTTTCAAGAGGATCCAAA (配列番号488)、及びTTTTTTTTTTCTCTCAAGAGG (配列番号490) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；

(4) TTTTTTTTTTTGTTA AAAAGGAGGATCCAA (配列番号492)、TTTTTTTTTTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA (配列番号494)、TTATTTATTAAGAGTTAAAAAGGAGGATC (配列番号811)、TTTTTTTTTA AAAAGGAGGATCCAAAG (配列番号498)、及びTTTTTTTATAAGGAGGATCCAAAGTG (配列番号500) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；及び

(5) TTTTTTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA (配列番号502)、TTTTTTATTAAGTGCACAAACAGGAGG (配列番号504)、TATTTATTAATGTGCACAAACAGGAGGATC (配列番号506)、TATTTTTTTCACAAACAGGAGGAT (配列番号508)、及びTTTTTATTTAACAAGGAGGATCCAAA (配列番号510) からなる群から選択される配列を含む第5のプローブ；

を含み、前記5つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、請求項239に記載のキット。

【請求項241】

前記RET遺伝子における前記変異に特異的なcDNAを生成するのに好適な第1のプライマーであって、前記第1のプライマーは、配列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC (配列番号26) またはCTCTAGGAGATATCATTTCCAAATTTCGCCCTTCTCCTAG (配列番号27) を含む、前記第1のプライマー；及びTTTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCCACCA GA (配列番号23)、AAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC (配列番号519)、AACTTTCAGACTTTACACAACCTGC (配列番号520)、及びATTGATTCTGATGACACCGGA (配列番号521) からなる群から選択される配列を含む前記RET遺伝子における前記変異に特異的な第2のプライマーをさらに含む、請求項235～240のいずれか1項に記載のキット。

【請求項242】

前記NTRK1遺伝子における前記変異は、CD74-NTRK1融合遺伝子を含む、請求項223～241のいずれか1項に記載のキット。

【請求項243】

前記NTRK1遺伝子における前記変異は、CD74 E8:NTRK1 E12融合遺伝子を含む、請求項242に記載のキット。

【請求項244】

前記NTRK1遺伝子における前記変異に特異的な前記プローブは、CAGGATCT

10

20

30

40

50

G G G C C C A G A C A (配列番号 261)、G A T C T G G G C C C A G A C A C T A (配列番号 263)、C C A G A C A C T A A C A G C A C A T (配列番号 265)、G G G C C C A G A C A C T A A C A G C (配列番号 267)、及び C T A A C A G C A C A T C T G G A G A (配列番号 269) からなる群から選択される配列を含む、請求項 243 に記載のキット。

【請求項 245】

前記 N T R K 1 遺伝子における前記変異に特異的な前記プローブは、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 244 に記載のキット。

【請求項 246】

前記 N T R K 1 遺伝子における前記変異に特異的な前記プローブは、T T T T T T T T T T T A C A G G A T C T G G G C C C A G A C A (配列番号 262)、T T T T T T T T T T T A G A T C T G G G C C C A G A C A C T A (配列番号 264)、T T T T T T T T T T T A C C A G A C A C T A A C A G C A C A T (配列番号 266)、T T T T T T T T T T T A G G G C C C A G A C A C T A A C A G C (配列番号 268)、及び T T T T T T T T T T T T A C T A A C A G C A C A T C T G G A G A (配列番号 270) からなる群から選択される配列を含む、請求項 245 に記載のキット。

【請求項 247】

前記 N T R K 1 遺伝子における前記変異に特異的な c D N A を生成するのに好適な第 1 のプライマーであって、前記第 1 のプライマーは、配列 G G A C G A A A A T C C A G A C C C C A A A A G G T G T T T C G T (配列番号 32) を含む、前記第 1 のプライマー；及び配列 A G A A G A C G T G A C A G G A A C T G G A G G A C C C G T C T T (配列番号 30) を含む前記 N T R K 1 遺伝子における前記変異に特異的な第 2 のプライマーをさらに含む、請求項 242 ～ 246 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 248】

前記 c M E T 遺伝子における前記変異は、エクソンスキッピングをもたらす、請求項 222 ～ 247 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 249】

前記 c M E T 遺伝子における前記変異は、エクソン 14 のスキッピングをもたらす、請求項 248 に記載のキット。

【請求項 250】

前記 c M E T 遺伝子における前記変異に特異的な前記プローブは、A G A A A G C A A A T T A A A G A T (配列番号 271)、A G C A A A T T A A A G A T C A G (配列番号 273)、A A A T T A A A G A T C A G T T T C (配列番号 275)、A G A T C A G T T T C C T A A T T C (配列番号 277)、及び A A G A T C A G T T T C C T A A T T (配列番号 279) からなる群から選択される配列を含む、請求項 249 に記載のキット。

【請求項 251】

前記 c M E T 遺伝子における 1 つ以上の変異に特異的な前記プローブは、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、前記 5' 末端における前記 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである、請求項 250 に記載のキット。

【請求項 252】

前記 c M E T 遺伝子における前記変異に特異的な前記プローブは、T T T T T T T T T T T A G A A A G C A A A T T A A A G A T (配列番号 272)、T T T T T T T T T T T A G C A A A T T A A A G A T C A G (配列番号 274)、T T T T T T T T T T T A A A T T A A A G A T C A G T T T C (配列番号 276)、T T T T T T T T T T T A G A T C A G T T T C C T A A T T C (配列番号 278)、及び T T T T T T T T T T T A A G A T C A G T T T C C T A A T T (配列番号 280) からなる群から選択される配列を含む、請求項 251 に記載のキット。

【請求項 253】

10

20

30

40

50

前記 c M E T 遺伝子における前記変異に特異的な c D N A を生成するのに好適な第 1 のプライマーであって、前記第 1 のプライマーは、配列 G A C A G T A T T T T G C A G T A A T G G A C T G G A T A T A T C A G A (配列番号 29) を含む、前記第 1 のプライマー；及び配列 G A A T T T C A C A G G A T T G A T T G C T G G T G T T G T C T C (配列番号 28) を含む前記 c M E T 遺伝子における前記変異に特異的な第 2 のプライマーをさらに含む、請求項 248～252 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 254】

前記マイクロキャリアの前記識別子は、デジタルバーコードを含む、請求項 149～253 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 255】

前記マイクロキャリアの各々は、

(i) 第 1 のフォトリソ層；

(ii) 第 2 のフォトリソ層；及び

(iii) 前記第 1 の層と前記第 2 の層との間の中間層であって、前記中間層は、それに定義された前記識別子を表すコードされたパターンを有し、前記中間層は、光に対して部分的に実質的に透過性であり、かつ部分的に実質的に不透明であることで、マイクロキャリアに対応するコードを表し、前記マイクロキャリアの最外表面は、フォトリソフォトリソ層を含み、前記フォトリソフォトリソ層は、前記 D N A 変異に特異的な前記プローブで官能化されており、前記マイクロキャリアは、水とおおよそ同じ密度を有する、前記中間層

を含む、請求項 254 に記載の方法。

【請求項 256】

前記マイクロキャリアの前記識別子は、アナログコードを含む、請求項 149～253 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 257】

前記マイクロキャリアの各々は、

(i) 第 1 の表面及び第 2 の表面を有する実質的に透明なポリマー層であって、前記第 1 及び前記第 2 の表面は、互いに平行である、前記実質的に透明なポリマー層；

(ii) 二次元形状を構成する実質的に非透明な層であって、前記実質的に非透明な層は、前記実質的に透明なポリマー層の前記第 1 の表面に付着されており、前記実質的に透明なポリマー層の中央部分を包囲し、前記実質的に非透明な層の前記二次元形状は、アナログコードを表し、前記アナログコードは、前記識別子に対応する、前記実質的に非透明な層；及び

(iii) 前記変異に特異的な前記プローブであって、前記プローブは、前記実質的に透明なポリマー層の少なくとも前記中央部分における前記実質的に透明なポリマー層の前記第 1 の表面及び前記第 2 の表面の少なくとも一方に結合されている、前記プローブを含む、請求項 256 に記載のキット。

【請求項 258】

前記マイクロキャリアの各々は、前記実質的に非透明なポリマー層の前記アナログコードを配向させるための配向指標をさらに含む、請求項 257 に記載のキット。

【請求項 259】

前記実質的に透明なポリマー層の前記ポリマーは、エポキシベースのポリマーを含む、請求項 257 または請求項 258 に記載のキット。

【請求項 260】

前記エポキシベースのポリマーは、SU-8 である、請求項 259 に記載のキット。

【請求項 261】

キットであって、

(a) 複数のプローブであって、前記複数の各プローブは、マイクロキャリアに結合されており、前記マイクロキャリアは、それに結合した前記プローブに対応する独自の識別子を有し、前記複数のプローブは、配列 T T T T T T T T T T T T A A T A G T T G G A

10

20

30

40

50

G C T (配列番号 39) を含む第 1 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T A G G C G
T A G G C A A G A (配列番号 57) を含む第 2 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T
T A A G G A G C T T G T G G C (配列番号 63) を含む第 3 のプローブ ; 配列 T T T T
T T T C C T G C T C A G T G A T T T T A (配列番号 94) を含む第 4 のプローブ ; 配
列 T T T T T T T T T T T T A T C T C C T G C T T A G (配列番号 102) を含む第 5 の
プローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T A A T G A T G C A C G T C A (配列番号 11
4) を含む第 6 のプローブ ; 配列 T T T T T T T A A T T C T A C A G A G A A A T C T C
G A (配列番号 82) を含む第 7 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T A G T G
C T G G C C T (配列番号 124) を含む第 8 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T
A C A A A A C A T C T C C G (配列番号 131) を含む第 9 のプローブ ; 配列 T T T T
T T T T A A T C A A G A C A T C T C (配列番号 141) を含む第 10 のプローブ ; 配
列 T T T T T T T T T C A T G A G A T G C A T G A T G A (配列番号 356) を含む第 1
1 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T A C A G G A G G C T G C C G A (配列番号
464) を含む第 12 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T A C A G G A G G G A G
C C G (配列番号 478) を含む第 13 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T A G A T G G C
C A T C T T G (配列番号 426) を含む第 14 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T
T G T G A T G G C C G G (配列番号 432) を含む第 15 のプローブ ; 配列 T T T T T
T T T G G A C A A C C C C C A T C A C (配列番号 450) を含む第 16 のプローブ ;
配列 T T T T T T T T G C C A G C G T G G A C G G T A (配列番号 460) を含む第 17
のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T A A A T G G G C G G G C C A (配列番号 160) を
含む第 18 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T G T A G G G A A G T A C A
(配列番号 371) を含む第 19 のプローブ ; 配列 T T T T T A A A T C A G A A T C A
G A A G G T G G (配列番号 396) を含む第 20 のプローブ ; 配列 T T T T T A A A T
C A G A A T C A G A A G G T G G (配列番号 396) を含む第 20 のプローブ ; 配列 T
T T T T T T T T T T A C G T G A T G G C T T A C G T (配列番号 407) を含む第 2
1 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T A G T G T A C C G C C G G A A (配列番号 1
68) を含む第 22 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T G A C T A T G A A A T
A T T G T A C (配列番号 172) を含む第 23 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T
T T T T T A C C G C C G G A A G C A C C A (配列番号 190) を含む第 24 のプロ
ーブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T G T G T A C C G C C G G A A G C (配列番号 19
6) を含む第 25 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T G C T G G A G T C C C A A
A T A A A C (配列番号 206) を含む第 26 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T
T G A C G C T C C A C C G A A A (配列番号 214) を含む第 27 のプローブ ; 配列 T
T T T T T T T T T T T T G G A G T C C C A A A T A A A C C A G G (配列番号 230)
を含む第 28 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T G A T G A T T T T T G G A T A C
C A G (配列番号 238) を含む第 29 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T G T G G
G A A A T A A T G A T G T A A A (配列番号 242) を含む第 30 のプローブ ; 配列 T
T T T T T T T T C T G T G G G A A A T A A T G A T G T A (配列番号 254) を含む
第 31 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T C T C T C A A G A G G (配列番号 490
) を含む第 32 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T A A G G A G G A T C C A A A G T G
(配列番号 500) を含む第 33 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T A A A C A G G A G
G A T C C A A A (配列番号 502) を含む第 34 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T
T A C C A G A C A C T A A C A G C A C A T (配列番号 266) を含む第 35 のプロ
ーブ ; 配列 T T T T T T T T T T A G A A A G C A A A T T A A A G A T (配列番号 272
) を含む第 36 のプローブを含む、前記複数のプローブ ;

(b) 複数のプライマー対であって、前記複数のプライマー対は、配列 G T A C T G G
T G G A G T A T T T G A T A G T G (配列番号 1) 及び C G T C A A G G C A C T C T
T G C C T A C (配列番号 2) を含む第 1 のプライマー対 ; 配列 C A A T T T C T A C A
A G A G A T C C T C T C T C T (配列番号 5) 及び C T C C A T T T T A G C A C T T
A C C T G T G A C (配列番号 6) を含む第 2 のプライマー対 ; 配列 A C C C T A G C C

10

20

30

40

50

TTAGATAAAACTGAGC（配列番号7）及びTTTGTGTGTCAGCCA
CCATGA（配列番号8）を含む第3のプライマー対；配列ATAGCCTCAATT
CTTACCATCCACAAAATG（配列番号9）及びCAGATATATTTCT
TCATGAAGACCTCACAGTAA（配列番号10）を含む第4のプライマー対
；配列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC（配列番号11）及びTGCCGA
ACGCACCGGA（配列番号12）を含む第5のプライマー対；配列GCCAGTT
AACGTCTTCTCTCTC（配列番号13）及びATCGAGGATTTCTCT
GTTGGCTT（配列番号14）を含む第6のプライマー対；配列CCTCCACCG
TGCAGATCATC（配列番号15）及びTTCCTGTATTACCTTTGCG
AT（配列番号16）を含む第7のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCC
TCT（配列番号511）及びGCACACGTAGGGGTGTCCAAGA（配列
番号512）を含む第8のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCCTCT（
配列番号513）及びGTACACGCTGGCCACGCCG（配列番号514）を含
む第9のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCCTCT（配列番号515）
及びCAGGCGGCACACGTGAT（配列番号516）を含む第10のプライマー
対；配列CCACACTGACGTGCCCTCT（配列番号517）及びAGGCGGC
ACACGTGCGGGTTAC（配列番号518）を含む第11のプライマー対；配列
GGAGGACCGTCGCTTGG（配列番号17）及びTCTTTCTCTTCCG
CACCCAG（配列番号18）を含む第12のプライマー対；配列GAGGGTCTG
ACGGGTAGAGTG（配列番号380）及びTGGCCGCCAGGTCTTGA
TGTA（配列番号381）を含む第13のプライマー対；配列CTTGATGAGCA
GACGCGAAA（配列番号397）及びCCTTCAGTTCTCCACCTTC
TG（配列番号398）を含む第14のプライマー対；配列ATGGCTGTGGTTT
GTGATGGT（配列番号414）及びACACCAGCCATCACGTAAAGAC
A（配列番号415）を含む第15のプライマー対；配列AGTTGGGGTTGTAG
TCGGTCAAT（配列番号363）及びTATGGAGCAAAACTACTGTAG
AGCC（配列番号357）を含む第16のプライマー対；配列AGTTGGGGTTG
TAGTCGGTCAAT（配列番号363）及びCCAGCTACATCACACACC
TTGACT（配列番号358）を含む第17のプライマー対；配列AGTTGGGGT
TGTAGTCGGTCAAT（配列番号363）及びTAATACCAAAAGTTAC
CAAAACTGCA（配列番号359）を含む第18のプライマー対；配列GGAGT
GCCATCGCTGTTTGAATGAGCAGGCACT（配列番号19）を含む
第19のプライマー対；配列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAATGAGC
AGGCACT（配列番号19）を含む第20のプライマー対；配列TACAGCCCT
GGATATTTCTTAGTAGCGC（配列番号20）を含む第21のプライマー対；
配列TACAGCCCTGGATATTTCTTAGTAGCGC（配列番号20）を含む
第22のプライマー対；配列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGC
GATC（配列番号26）及びTTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCA
ACCACCAGA（配列番号23）を含む第23のプライマー対；配列CTCTAGG
AGATATCATTTCCAAATTCGCCCTTCTCCTAG（配列番号27）及び
TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCAGA（配列番号
23）を含む第24のプライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAA
ATTCGCCCTTCTCCTAG（配列番号27）及びAAGGAGTTAGCAGC
ATGTCAGC（配列番号519）を含む第25のプライマー対；配列CTCTAGG
AGATATCATTTCCAAATTCGCCCTTCTCCTAG（配列番号27）及び
AACTTCAGACTTTACACAACCTGC（配列番号520）を含む第26の
プライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAAATTCGCCCTTCT
CCTAG（配列番号27）及びATTGATTCTGATGACACCGGA（配列
番号521）を含む第27のプライマー対；配列GGACGAAAATCCAGACCC
CAAAAGGTGTTTCGT（配列番号32）及びAGAAAGACGTGACAGG

10

20

30

40

50

A A C T G G A G G A C C C G T C T T (配列番号 30) を含む第 28 のプライマー対 ;
 配列 G A C A G T A T T T T G C A G T A A T G G A C T G G A T A T A T C A G A (配
 列番号 29) 及び G A A T T T C A C A G G A T T G A T T G C T G G T G T T G T C T
 C (配列番号 28) を含む第 29 のプライマー対を含む、前記複数のプライマー対 ; 及び
 (c) 複数のブロック核酸であって、前記複数のブロック核酸は、
 【化 21】

配列 T T G G A G C T G G T G G C G T (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 である) 10
 (配列番号 285) を含む第 1 のブロック核酸 ; 配列 C T G A A A T C A C T G A G C A G G
 (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 291) を含む第 2 のブロック
 核酸 ; 配列 C C A C C A T G A T G T G C A T C A (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3
 である) (配列番号 299) を含む第 3 のブロック核酸 ; 配列 G A G A T T T C A C T G T A
 G C (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 301) を含む第 4 のブロ
 ック核酸 ; 配列 C G C A C C G G A G C C C A G C A C T T A (i n v d T)_n (n は 1、
 2、または 3 である) (配列番号 310) を含む第 5 のブロック核酸 ; 配列 C G G A G A T G 20
 T T G C T T C T C T (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 312)
 を含む第 6 のブロック核酸 ; 配列 T G C A G C T C A T C A C G C A G C (i n v d T)_n
 (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 317) を含む第 7 のブロック核酸 ; 配列 C C A
 G C A G T T T G G C C A G C C C T (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 である) (配
 列番号 322) を含む第 8 のブロック核酸 ; 配列 G A T G T A C T C C C C T (i n v d T)
 n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 383) を含む第 9 のブロック核酸 ; 及び配列
 C A C C T T C T G C T T C T G G G T A A G A (i n v d T)_n (n は 1、2、または 3 で 30
 ある) (配列番号 403) を含む第 10 のブロック核酸

を含む、前記複数のブロック核酸

を含む、前記キット。

【請求項 262】

キットであって、

(a) 複数のプローブであって、前記複数の各プローブは、マイクロキャリアに結合さ
 れており、前記マイクロキャリアは、それに結合した前記プローブに対応する独自の識別
 子を有し、前記複数のプローブは、配列 T T T T T T T T T T T T A A T G A T G G C G 40
 T A G (配列番号 43) を含む第 1 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T A G T A G
 T T G G A G C T G (配列番号 51) を含む第 2 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T
 T A A T T G T G G C G T A G G (配列番号 65) を含む第 3 のプローブ ; 配列 T T T T
 T T T T T A G C T C A G T G A T T T T A G (配列番号 88) を含む第 4 のプローブ ;
 配列 T T T T T T T T T T T T T T C C T G C T T A G T G (配列番号 104) を含む
 第 5 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T G A T G C A C G T C (配列番号 11
 2) を含む第 6 のプローブ ; 配列 T T T T T T A A T T G A G A A A T C T C G A T G G
 A G (配列番号 78) を含む第 7 のプローブ ; 配列 T T T T T T A G A T C A A A G T G
 C T G G C C T C C G (配列番号 120) を含む第 8 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T
 T T T T T T A A A C A T C T C C G A A A G C C (配列番号 135) を含む第 9 のプロ 50

ープ；配列 T T T T T T T T T T T T C A A G A C A T C T C C G A（配列番号 145）を含む第 10 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T G A G A T G C A T G A T G A（配列番号 352）を含む第 11 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T A C A G G A G G C T G C C（配列番号 470）を含む第 12 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T A C C A G G A G G G A G C C G（配列番号 474）を含む第 13 のプローブ；配列 T T T T T T T T T A T G G C C A T C T T G G（配列番号 422）を含む第 14 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T G A T G G C C C G C G T G（配列番号 440）を含む第 15 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T C C C A T C A C G T G T（配列番号 448）を含む第 16 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T G A C G G T A A C C C C C（配列番号 456）を含む第 17 のプローブ；配列 T T T T T T T T A T T T T G G G C G G G C C（配列番号 152）を含む第 18 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T C T G T A G G G A A G T A C（配列番号 373）を含む第 19 のプローブ；配列 T T T T T A A A T T T C T T A C C C A G A A T C A（配列番号 392）を含む第 20 のプローブ；配列 T T T T T A A G C A T A C G T G A T G G C T（配列番号 409）を含む第 21 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T G G G A A A G G A C C T A A A G（配列番号 166）を含む第 22 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T C C G C C G G A A G C A C C A G G A（配列番号 180）を含む第 23 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T G T G T A C C G C C G G A A G C（配列番号 186）を含む第 24 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T C G A A A A A A C A G C C A A（配列番号 192）を含む第 25 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T A C T G A C G C T C C A C C G A A A（配列番号 202）を含む第 26 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T T G A C G C T C C A C C G A A A（配列番号 214）を含む第 27 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T A G C G C C T T C C A G C T G G T T G G A（配列番号 222）を含む第 28 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T G A T T T T T G G A T A C C A（配列番号 240）を含む第 29 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T C C A C T G T G C G A C G A G C T G T（配列番号 250）を含む第 30 のプローブ；配列 T T T T T T T T T G G A T C C A A A G T G G G A A T T（配列番号 258）を含む第 31 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T C A A G A G G A T C C A A A（配列番号 488）を含む第 32 のプローブ；配列 T T T T T T T T T A C A A G A G T T A A A A A G G A G G A（配列番号 494）を含む第 33 のプローブ；配列 T T T T T A T T A A G T G C A C A A A C A G G A G G（配列番号 504）を含む第 34 のプローブ；配列 T T T T T T T T T A C T A A C A G C A C A T C T G G A G A（配列番号 270）を含む第 35 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T A G A T C A G T T T C C T A A T T C（配列番号 278）を含む第 36 のプローブを含む、前記複数のプローブ；

（b）複数のプライマー対であって、前記複数のプライマー対は、配列 G T A C T G G T G G A G T A T T T G A T A G T G（配列番号 1）及び C G T C A A G G C A C T C T T G C C T A C（配列番号 2）を含む第 1 のプライマー対；配列 C A A T T T C T A C A A G A G A T C C T C T C T C T（配列番号 5）及び C T C C A T T T T A G C A C T T A C C T G T G A C（配列番号 6）を含む第 2 のプライマー対；配列 A C C C T A G C C T T A G A T A A A A C T G A G C（配列番号 7）及び T T T G T T G T C C A G C C A C C A T G A（配列番号 8）を含む第 3 のプライマー対；配列 A T A G C C T C A A T T C T T A C C A T C C A C A A A A T G（配列番号 9）及び C A G A T A T A T T T C T T C A T G A A G A C C T C A C A G T A A（配列番号 10）を含む第 4 のプライマー対；配列 C T T G T G G A G C C T C T T A C A C C C（配列番号 11）及び T G C C G A A C G C A C C G G A（配列番号 12）を含む第 5 のプライマー対；配列 G C C A G T T A A C G T C T T C C T T C T C（配列番号 13）及び A T C G A G G A T T T C C T T G T T G G C T T（配列番号 14）を含む第 6 のプライマー対；配列 C C T C C A C C G T G C A G A T C A T C（配列番号 15）及び T T C C C T G A T T A C C T T T G C G A T（配列番号 16）を含む第 7 のプライマー対；配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T（配列番号 511）及び G C A C A C G T A G G G G T T G T C C A A G A（配列

10

20

30

40

50

番号512)を含む第8のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCTCT(配列番号513)及びGTACACGCTGGCCACGCCG(配列番号514)を含む第9のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCTCT(配列番号515)及びCAGGCGGCACACGTGAT(配列番号516)を含む第10のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCTCT(配列番号517)及びAGGCGGCACACGTGCGGGTTAC(配列番号518)を含む第11のプライマー対；配列GGAGGACCGTCGCTTGG(配列番号17)及びTCTTTCTCTTCCGCCACCCAG(配列番号18)を含む第12のプライマー対；配列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG(配列番号380)及びTGGCCGCCAGGTCTTGTATGTA(配列番号381)を含む第13のプライマー対；配列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA(配列番号397)及びCCTTTCAGTTCTCCCCACCTTCTG(配列番号398)を含む第14のプライマー対；配列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(配列番号414)及びACACCAGCCATCACGTAAGACA(配列番号415)を含む第15のプライマー対；配列AGTTTGGGGTTGTAGTCGGTCAAT(配列番号363)及びTATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC(配列番号357)を含む第16のプライマー対；配列AGTTTGGGGTTGTAGTCGGTCAAT(配列番号363)及びCCAGCTACATCACACACCTTTGACT(配列番号358)を含む第17のプライマー対；配列AGTTTGGGGTTGTAGTCGGTCAAT(配列番号363)及びTAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA(配列番号359)を含む第18のプライマー対；配列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAATAAGCAGGCACT(配列番号19)を含む第19のプライマー対；配列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAATAAGCAGGCACT(配列番号19)を含む第20のプライマー対；配列TACAGCCCTGGATATTTCTTAGTAGCGC(配列番号20)を含む第21のプライマー対；配列TACAGCCCTGGATATTTCTTAGTAGCGC(配列番号20)を含む第22のプライマー対；配列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(配列番号26)及びTTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCAACAGA(配列番号23)を含む第23のプライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAAATTCGCCCTTCTCCTAG(配列番号27)及びTTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCAACCAACAGA(配列番号23)を含む第24のプライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAAATTCGCCCTTCTCCTAG(配列番号27)及びAAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC(配列番号519)を含む第25のプライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAAATTCGCCCTTCTCCTAG(配列番号27)及びAACTTTCAGACTTTACACAACCTGCG(配列番号520)を含む第26のプライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAAATTCGCCCTTCTCCTAG(配列番号27)及びATTGATTCTGATGACACCGGA(配列番号521)を含む第27のプライマー対；配列GGACGAAAAATCCAGACCCCAAAAGGTGTTTTCGT(配列番号32)及びAGAAAGACGTGACAGGAACCTGGAGGACCCGTCCTT(配列番号30)を含む第28のプライマー対；配列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA(配列番号29)及びGAATTTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC(配列番号28)を含む第29のプライマー対を含む、前記複数のプライマー対；及び

(c) 複数のブロック核酸であって、前記複数のブロック核酸は、

10

20

30

40

50

【化 2 2】

配列 $TTGGA GCTGGTGGCGTA (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である)

(配列番号 282) を含む第 1 のブロック核酸；配列 $TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 294) を含む第 2 のブロック核酸；配列 $CCACCATGATGTGCAT (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 297) を含む第 3 のブロック核酸；配列 $GAGATTTCACGTGAGC (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 305) を含む第 4 のブロック核酸；配列 $CGCACCGGAGCCAGCAC (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 309) を含む第 5 のブロック核酸；配列 $GTTGCTTCCTCTAATTCC (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 313) を含む第 6 のブロック核酸；配列 $CTCATCACGCAGC (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 320) を含む第 7 のブロック核酸；配列 $CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 325) を含む第 8 のブロック核酸；配列； $GATGTACTCCCC TACA (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 386) を含む第 9 のブロック核酸；及び配列 $CACCTTCTGCTTC TG GG (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 401) を含む第 10 のブロック核酸

10

20

を含む、前記複数のブロック核酸

を含む、前記キット。

30

【請求項 263】

キットであって、

(a) 複数のプローブであって、前記複数の各プローブは、マイクロキャリアに結合されており、前記マイクロキャリアは、それに結合した前記プローブに対応する独自の識別子を有し、前記複数のプローブは、配列 $TTTTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC$ (配列番号 45) を含む第 1 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTATGGAGCTGTGTTGGC$ (配列番号 53) を含む第 2 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC$ (配列番号 63) を含む第 3 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA$ (配列番号 96) を含む第 4 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT$ (配列番号 100) を含む第 5 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTAAATGATGCACGTC$ (配列番号 116) を含む第 6 のプローブ；配列 $TTTTTTTAAATTTCTAGCTACAGAGAAAT$ (配列番号 86) を含む第 7 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCTC$ (配列番号 118) を含む第 8 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTCAAAAGTAAATCAAACAATCTCCG$ (配列番号 127) を含む第 9 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTAATCAAAGACATCTCCGA$ (配列番号 137) を含む第 10 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTGAGATGCATGATGAG$ (配列番号 353) を含む第 11 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTACCAGGAGGCTGCC$ (配列番号 468) を含む第 12 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCC$ (配列番号 472) を含む第 13 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTT$

40

50

TAGGCCATCTTGGGA (配列番号424)を含む第14のプローブ；配列TTTT
 TTTTGTGATGGCCGGCGT (配列番号436)を含む第15のプ
 ローブ；配列TTTTTTTAAACCCCATCACGT (配列番号442)を
 含む第16のプローブ；配列TTTTTTTTCGTGGACGGTAACC (配
 列番号454)を含む第17のプローブ；配列TTTTTTTAAAAAGCGGCG
 CAAACT (配列番号156)を含む第18のプローブ；配列TTTTTTTACG
 TCTGTAGGGAAGTA (配列番号379)を含む第19のプローブ；配列TTTT
 TTAATAATTACCCAGAAATCAGAA (配列番号388)を含む第20のプ
 ローブ；配列TTTTTTTATACGTGATGTCCTTAC (配列番号405)を
 含む第21のプローブ；配列TTTTTTTCTAAAGTGTAACCGC (配
 列番号164)を含む第22のプローブ；配列TTTTTTTATTTGTA
 CTTGTACCGCC (配列番号176)を含む第23のプローブ；配列TTTTTT
 TTTTCAACCAAGTGTAACCG (配列番号188)を含む第24の
 プローブ；配列TTTTTTTACAGCCAAGTGTAACCG (配列
 番号200)を含む第25のプローブ；配列TTTTTTTCAACCGAAAG
 CTGGAGTCCC (配列番号210)を含む第26のプローブ；配列TTTTTTT
 TTTTCCGAAGATGATTTT (配列番号212)を含む第27のプローブ
 ；配列TTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC (配列番号
 224)を含む第28のプローブ；配列TTTTTTTGGTTGGAGATG
 ATTTT (配列番号236)を含む第29のプローブ；配列TTTTTTT
 GATGTAAAGATCCACTGTG (配列番号248)を含む第30のプローブ；
 配列TTTTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC (配列番号260)を
 含む第31のプローブ；配列TTTTTTTGTATCTCTCAAGAGGATC
 CAA (配列番号484)を含む第32のプローブ；配列TTAATTATAAGAGT
 TAAAAAGGAGGATC (配列番号811)を含む第33のプローブ；配列TAT
 TATTATGTGCACAAACAGGAGGATC (配列番号506)を含む第34
 のプローブ；配列TTTTTTTATAGGGCCAGACACTAACAGC (配
 列番号268)を含む第35のプローブ；配列TTTTTTTAAATTAAAG
 ATCAGTTTC (配列番号276)を含む第36のプローブを含む、前記複数のプロ
 ーブ；

10

20

30

(b) 複数のプライマー対であって、前記複数のプライマー対は、配列GTACTGG
 TGGAGTATTTGATAGTG (配列番号1)及びCGTCAAGGCACCTCT
 TGCCCTAC (配列番号2)を含む第1のプライマー対；配列CAATTCTACA
 AGAGATCCTCTCTCT (配列番号5)及びCTCCATTTTAGCACTT
 ACCGTGTGAC (配列番号6)を含む第2のプライマー対；配列ACCCCTAGCC
 TTAGATAAAACTGAGC (配列番号7)及びTTTGTTGTCCAGCCA
 CCATGA (配列番号8)を含む第3のプライマー対；配列ATAGCCTCAATT
 CTTACCATCCACAAATG (配列番号9)及びCAGATATAATTCT
 TCATGAAGACCTCACAGTAA (配列番号10)を含む第4のプライマー対
 ；配列CTTGTTGGAGCCTCTTACACCC (配列番号11)及びTGCCGA
 ACGCACCGGA (配列番号12)を含む第5のプライマー対；配列GCCAGTT
 AACGTCTTCTTCTC (配列番号13)及びATCGAGGATTTCTCT
 GTTGCTT (配列番号14)を含む第6のプライマー対；配列CCTCCACCG
 TGCAGATCATC (配列番号15)及びTTCCTGTATTACCTTTGCG
 AT (配列番号16)を含む第7のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCC
 TCT (配列番号511)及びGCACACGTAGGGGTGTCCAAGA (配列
 番号512)を含む第8のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCCTCT
 (配列番号513)及びGTACACGCTGGCCACGCCG (配列番号514)を含
 む第9のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCCTCT (配列番号515)
 及びCAGGCGGCACACGTGAT (配列番号516)を含む第10のプライマー

40

50

対；配列CCACACTGACGTGCCTCT（配列番号517）及びAGGCGGC
ACACGTGCGGGTTAC（配列番号518）を含む第11のプライマー対；配列
GGAGGACCGTCGCTTGG（配列番号17）及びTCTTTCTCTTCCG
CACCCAG（配列番号18）を含む第12のプライマー対；配列GAGGGTCTG
ACGGGTAGAGTG（配列番号380）及びTGGCCGCCAGGTCTTGA
TGTA（配列番号381）を含む第13のプライマー対；配列CTTGATGAGCA
GCAGCGAAA（配列番号397）及びCCTTCAGTTCTCCCCACCTTC
TG（配列番号398）を含む第14のプライマー対；配列ATGGCTGTGGTTT
GTGATGGT（配列番号414）及びACACCAGCCATCACGTAAAGAC
A（配列番号415）を含む第15のプライマー対；配列AGTTGGGGTTGTAG
TCGGTTCAT（配列番号363）及びTATGGAGCAAAACTACTGTAG
AGCC（配列番号357）を含む第16のプライマー対；配列AGTTGGGGTTG
TAGTCGGTTCAT（配列番号363）及びCCAGCTACATCACACACC
TTGACT（配列番号358）を含む第17のプライマー対；配列AGTTGGGGT
TGTAGTCGGTTCAT（配列番号363）及びTAATACCAAAAGTTAC
CAAAACTGCA（配列番号359）を含む第18のプライマー対；配列GGAGT
GCCATCGCTGTTTGAATGAGCAGGCCACT（配列番号19）を含む
第19のプライマー対；配列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAATGAGC
AGGCCACT（配列番号19）を含む第20のプライマー対；配列TACAGCCCT
GGATATTCTTAGTAGCGC（配列番号20）を含む第21のプライマー対；
配列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC（配列番号20）を含む
第22のプライマー対；配列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGC
GATC（配列番号26）及びTTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCA
ACCAACCAAGA（配列番号23）を含む第23のプライマー対；配列CTCTAGG
AGATATCATTTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG（配列番号27）及び
TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCAACCAAGA（配列番号
23）を含む第24のプライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAA
ATTCGCCTTCTCCTAG（配列番号27）及びAAGGAGTTAGCAGC
ATGTCAGC（配列番号519）を含む第25のプライマー対；配列CTCTAGG
AGATATCATTTCCAAATTCGCCTTCTCCTAG（配列番号27）及び
AACTTTCAGACTTTACACAACCTGC（配列番号520）を含む第26の
プライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAAATTCGCCTTC
TCTAG（配列番号27）及びATTGATTCTGATGACACCCGGA（配列
番号521）を含む第27のプライマー対；配列GGACGAAAATCCAGACCC
CAAAAGGTGTTTTCGT（配列番号32）及びAGAAAGACGTGACAGG
AACTGGAGGACCCGTCTT（配列番号30）を含む第28のプライマー対；
配列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA（配
列番号29）及びGAATTTACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCT
C（配列番号28）を含む第29のプライマー対を含む、前記複数のプライマー対；及び
（c）複数のブロック核酸であって、前記複数のブロック核酸は、

10

20

30

40

50

【化 2 3】

配列TACGCCACCAAGCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号281)を含む第1のブロック核酸; 配列TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号293)を含む第2のブロック核酸; 配列CACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号296)を含む第3のブロック核酸; 配列GAGATTTCAGTGTAGC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号303)を含む第4のブロック核酸; 配列GAGCCCAGCAC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号308)を含む第5のブロック核酸; 配列CGGAGATGTTGCTTCTCTTAA TTCC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号311)を含む第6のブロック核酸; 配列CATCACGCAGCTCATG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号316)を含む第7のブロック核酸; 配列CCAGCAGTTTGG CCAGCCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号321)を含む第8のブロック核酸; 配列TGTACTCCCCCTACA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号382)を含む第9のブロック核酸; 及び配列TCTGCTTC TGGGTAAG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号399)を含む第10のブロック核酸

10

20

を含む、前記複数のブロック核酸

を含む、前記キット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2020年1月8日に提出された米国特許出願番号62/958,599の優先権の利益を主張し、その内容は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

ASCIIテキストファイルでの配列表の提出

ASCIIテキストファイルでの以下の提出内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる: コンピュータ可読形態(CRF)の配列表(ファイル名: 695502001340SEQLIST.TXT、記録日: 2021年1月5日、サイズ: 245KB)。

40

【0003】

本明細書では、マイクロキャリアを使用する、サンプルにおけるDNA及び/またはRNA変異の多重検出のための方法、ならびにそれに関連するキットが提供される。マイクロキャリアは、識別子でコードされ、対象となる変異の検出のためのプローブを含む。

【背景技術】

【0004】

より進行性の腫瘍の成長及び転移は、死亡率の増加に関連するので、早期検出は、がん

50

に起因する死亡数を低減するのに決定的に重要な要素である。肺癌の多くの症例は、遺伝性ではなく散発性であるが、これらの散発性の症例においていくつかの遺伝子及び特定の変異の種類でさえ共通して見られる。例えば、EGFR、KRAS、MET、LKB1、BRAF、PIK3CA、ALK、RET、及びROS1遺伝子における変異は、肺癌において高い関連性があるものと示唆されている（El-Telbany, A. and Ma, P. C. (2012) Genes Cancer 3: 467-480を参照されたい。肺がん患者についての全体の生存率は依然として比較的低い、標的化療法（例えば、所定の変異のためのチロシンキナーゼ阻害剤）のための患者の早期検出及び早期同定は、改善した反応率をもたらす。そのため、個々の遺伝子検査よりも、高いレベルの正確性で複数の遺伝子を同時に試験する包括的かつ迅速な検査が必要とされている。

10

【0005】

免疫学的及び分子診断アッセイは、研究及び臨床の両方の分野において重要な役割を果たす。しばしば、複数の標的のパネルのためのアッセイを実施して、結果の意義のあるまたは鳥瞰的な観点を得て、研究または臨床的意思決定を容易化することが必要である。これは、遺伝子マーカー及び／またはバイオマーカーの存在量が特定の疾患状態に影響を及ぼし、またはそれを予測すると考えられるゲノミクス及びプロテオミクスの時代において特に当てはまる。理論的には、複数の標的のアッセイは、各標的を異なる反応容器で並行して別々にまたは順次に検査することによって達成され得る（すなわち、複数のシングルプレックス）。しかしながら、シングルプレックスストラテジーを採用するアッセイはしばしば扱いにくいだけでなく、それらはまた、特に分析される標的の数が多い場合、典型的には多量のサンプルが必要とされる。

20

【0006】

多重アッセイは、単一のアッセイにおいて複数の分析物（2つ以上）を同時に測定する。多重アッセイは、多くの試料が一度に分析され得るハイスループットスクリーニング設定で一般的に使用される。それは、多くの分析物を同時に、また、多くの試料を並行してアッセイする能力があり、これは多重アッセイの特徴であり、そのようなアッセイが創薬から臨床的診断に対する機能ゲノミクスにわたる分野において強力なツールになった理由である。シングルプレックスとは対照的に、同じ反応容器においてすべての標的を組み合わせることによって、サンプル当たり1つの反応容器のみが扱われるので、アッセイは、扱いにくさははるかに低下し、はるかに実施しやすくなる。よって、必要とされる検査サンプルは、体積が劇的に低減され得、これは、特にサンプル（例えば、腫瘍組織、脳脊髄液、または骨髄）が多量に回収することが困難及び／または侵襲的である場合に重要である。同等に重要なことは、試薬コストが減少し得、アッセイスループットが劇的に上昇したという事実である。

30

【0007】

複雑なマクロ分子サンプルの多くのアッセイは、2つの工程から構成される。第1の工程では、標的マクロ分子を特異的に捕捉することが可能な薬剤が固相表面に付着される。これらの固定化分子は、様々な手段、例えば、ハイブリダイゼーション（例えば、DNA、RNAベースのアッセイ）によって複雑なサンプルから標的マクロ分子を捕捉するために使用され得る。第2の工程では、検出分子は、捕捉分子及び標的の複合体とインキュベートされ、それに結合されて、シグナル、例えば、蛍光または他の電磁的シグナルを放出する。次いで標的の量が、それらのシグナルの強度によって定量される。

40

【0008】

多重アッセイは、複数の捕捉剤（各々が異なる標的マクロ分子に特異的である）を利用することによって行われ得る。チップベースアレイ多重アッセイでは、各タイプの捕捉剤（例えば、一本鎖オリゴヌクレオチドプローブ）は、チップ上の既定の位置に付着される。複雑なサンプルにおける多重標的の量は、捕捉剤のタイプに対応する各位置で検出分子のシグナルを測定することによって決定される。懸濁アレイ多重アッセイでは、マイクロ粒子またはマイクロキャリアは、アッセイ溶液に懸濁される。これらのマイクロ粒子またはマイクロキャリアは、マイクロ粒子／マイクロキャリアの1つ以上の要素によって包埋

50

、印刷、またはそうでなければ生成され得る識別要素を含有する。各タイプの捕捉剤は、同じIDを有する粒子に固定化され、特定のIDを有する粒子の表面上の検出分子から放出されるシグナルは、対応する標的の量を反映する。

【0009】

多重アッセイが特に良好に適している1つの用途は、DNA及び／またはRNA変異の検出である。特に、肺癌に関連する変異を検出することは、それらががんの遺伝子構成に応じて、早期診断において及び標的化療法に好適な患者の同定において役立ち得る。しかしながら、既存の診断技術は、しばしば、高価であり、または時間がかかる。一連の個々のアッセイを使用して複数の遺伝子変異を検出するための方法は、異なるアッセイタイプを使用して実施する場合、時間がかかり、均一性の欠如が問題となる（Schneider, M. et al. (2011) *Cancers* 3:91-105を参照されたい）。多重アッセイ技術、例えば、アナログコードされたマイクロキャリアをこの問題に適用することは、単一アッセイにおいて腫瘍形成と相関することが知られている多くの変異についての多重スクリーニングを可能としつつ、より正確な結果でより安価でより迅速なアッセイを提供し得る。

10

【0010】

そのため、安定で高感度な多重アッセイシステムをDNA及び／または変異についてのスクリーニングの問題に適用するニーズが存在する。これは、単一アッセイにおいて多くのDNA及び／またはRNA変異の多重検出のためのメカニズムを提供する。

【0011】

本明細書で引用されるすべての刊行物、特許、及び特許出願は、すべての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【発明の概要】

【0012】

このニーズを満たすために、本明細書では、とりわけ、DNAまたはRNA変異、例えば、肺癌に関連する変異を検出するためのプローブを含む独自の識別子でコードされたマイクロキャリアを使用する方法及びキットが提供される。これらのマイクロキャリアは、多重アッセイにおいて使用され得、各マイクロキャリアは、特定の変異を検出するためのプローブならびにマイクロキャリア及びその関連プローブの相関関係のための識別子を含む。本明細書に開示される方法及びキットは、例えば、肺癌のモニタリング、肺癌の処置に対する反応のモニタリング、及び／または肺癌の早期スクリーニング／検出において利用され得る。

30

【0013】

したがって、一態様では、本明細書では、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子におけるDNA変異の存在を検出するための方法であって、方法は、(a) (例えば、患者から得られた) サンプルからDNAを単離すること；(b) (例えば、*in vitro*で) KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子の各々における1つ以上のDNA変異の遺伝子座に特異的なプライマー対を使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって単離されたDNAを増幅すること；(c) 増幅されたDNAを少なくとも7つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも7つのプローブは、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子の各々におけるDNA変異に特異的な1つ以上のプローブを含み、前記少なくとも7つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアの各々は、それに結合したプローブに対応する識別子を含む、ハイブリダイズさせること；(d) 増幅されたDNAと前記少なくとも7つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、増幅されたDNAとプローブの1つとの間のハイブリダイゼーションは、プローブに対応するDNA変異の存在を示す、検出すること；(e) マイクロキャリアの識別子を検出すること；及び(f) マイクロキャリアの検出された識別子を、マイクロキャリアの対応するプローブに対する増幅され

40

50

たDNAのハイブリダイゼーションの検出された存在または非存在と相関させることを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子は、ヒト遺伝子である。

【0014】

いくつかの実施形態では、工程(b)は、少なくとも7つのブロック核酸の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含み、前記少なくとも7つのブロック核酸の各々は、KRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、またはHER2遺伝子におけるDNA変異の1つと対応する野生型DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型DNA遺伝子座の増幅を防止する。いくつかの実施形態では、前記少なくとも7つのブロック核酸の各々は、対応する野生型DNA遺伝子座とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチド；及び一本鎖オリゴヌクレオチドからの伸長をブロックする3'末端部位を含む。いくつかの実施形態では、3'末端部位は、1つ以上の反転デオキシチミジンを含む。いくつかの実施形態では、前記少なくとも7つのブロック核酸の各々は、ロック核酸(LNA)、ペプチド核酸(PNA)、ヘキサース核酸(HNA)、トレース核酸(TNA)、グリコール核酸(GNA)、及びシクロヘキセニル核酸(CeNA)からなる群から選択される1つ以上の改変ヌクレオチドを含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、KRAS遺伝子における1つ以上のDNA変異は、G12D、G12V、またはG12C変異KRASタンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、KRAS遺伝子における1つ以上のDNA変異は、G12D、G12V、及びG12C変異KRASタンパク質をコードするDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、KRAS遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、(1)TAGTTGGAGCT(配列番号38)、TGTTGGTAGTTTG(配列番号40)、TGATGGCGTAG(配列番号42)、TGGAGCTGATGGC(配列番号44)、及びGCGTAGGCAAG(配列番号46)からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2)CTGTTGGCGTAGG(配列番号48)、GTAGTTGGAGCTG(配列番号50)、TGGAGCTGTTTGGC(配列番号52)、TTGTTGGTAGTTTG(配列番号54)、及びGGCGTAGGCAAGA(配列番号56)からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；及び(3)TAGTTGGAGCTT(配列番号58)、GCGTAGGCAAGA(配列番号60)、GGAGCTTGTGGC(配列番号62)、TTGTTGGCGTAGG(配列番号64)、及びTGTTGGTAGTTTG(配列番号66)からなる群から選択される配列を含む第3のプローブを含み、3つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、3つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、KRAS遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、(1)TTTTTTTTTTTTTAATAGTTTGGAGCT(配列番号39)、TTTTTTTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTTG(配列番号41)、TTTTTTTTTTTTTTTAATGATGGCGTAGG(配列番号43)、TTTTTTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC(配列番号45)、及びTTTTTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAG(配列番号47)からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2)TTTTTTTTTTTTTTTACTGTGGCGTAGG(配列番号49)、TTTTTTTTTTTTTTTAGTAGTTTGGAGCTG(配列番号51)、TTTTTTTTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC(配列番号53)、TTTTTTTTTTTTTTTATTGTGGTAGTTTG(配列番号55)、及びTTTTTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGA(配列番号57)からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；及び(3)TTTTTTTTTTTTTTTAATAGTTTGGAGCTT(配列番号59)、TTTTTTTTTTTTTTTAAGCGTAGGCAAGA(配列番号61)、TTTTTTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(配列番号63)、TTTTTTTTTTTTTTTAATTGTGGCGTAGG(配列番号65)、及びTT

TTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTGG (配列番号67) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブを含み、3つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、工程(b)は、配列GTA CTGGTGGAGTATTTGATAGTG (配列番号1) 及びCGTCAAGGCAC TCTTGCC TAC (配列番号2) を含むプライマー対を使用してPCRによって単離されたDNAを増幅することを含む。いくつかの実施形態では、工程(b)は、KRAS DNA変異の1つと対応する野生型KRAS DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型KRAS DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含み、ブロック核酸は、配列

【化1】

10

TACGCCACCAAGCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号281); TTGGAGCTGGTGGCGTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号282); GCTGGTGGCGTAGGCA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号283); GCTGGTGGCGTAGGC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号284); またはTTGGAGCTGGTGGCGT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号285) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

20

を含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、PIK3CA遺伝子における1つ以上のDNA変異は、E542KまたはE545K変異PIK3CAタンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、PIK3CA遺伝子における1つ以上のDNA変異は、E542K及びE545K変異PIK3CAタンパク質をコードするDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、PIK3CA遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、(1) GCTCAGTGATTTTAG (配列番号87)、TGCTCAGTGATTTT (配列番号89)、GCTCAGTGATTTTAG (配列番号91)、CCTGCTCAGTGATTTTA (配列番号93)、及びCTCAGTGATTTTAGA (配列番号95) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ; 及び(2) TTCTCCTGCTTA (配列番号97)、CTCCTGCTTAGT (配列番号99)、TCTCCTGCTTAG (配列番号101)、TCCTGCTTAGTG (配列番号103)、及びCTCCTGCTTAGTGA (配列番号105) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブを含み、2つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、2つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。PIK3CA遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、(1) TTTTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG (配列番号88)、TTTTTTTTTTTTTGCTCAGTGATTTT (配列番号90)、TTTTTTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG (配列番号92)、TTTTTTTTTCTGCTCAGTGATTTTA (配列番号94)、及びTTTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA (配列番号96) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ; 及び(2) TTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTA (配列番号98)、TTTTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT (配列番号100)、TTTTTTTTTTTTTTATCTCCTGCTTAG (配列番号102)、TTTT

30

40

50

TTTTTTTTTTTCTGCTTAGTG (配列番号104)、及びTTTTTTT
TTTTTTTCTCCTGCTTAGTGA (配列番号106) からなる群から選択さ
れる配列を含む第2のプローブを含み、3つのプローブの各々は、異なる識別子を有する
マイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、工程(b)は、配列CA
ATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT (配列番号5) 及びCTCCATT
TTAGCACTTACCTGTGAC (配列番号6) を含むプライマー対を使用してP
CRによって単離されたDNAを増幅することを含む。いくつかの実施形態では、工程(b)
は、PIK3CA DNA変異の1つと対応する野生型PIK3CA DNA遺伝子
座とハイブリダイズし、野生型PIK3CA DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック
核酸の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含み、少なくとも7つ
のブロック核酸のうちの少なくとも1つは、配列
【化2】

10

CTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である)
(配列番号291) ; TCTCTGAAATCAC TGAGCAGG (invdT)_n (nは
1、2、または3である) (配列番号292) ; TCTCTGAAATCACTGAGCAG
G (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号293) ; TCTCTGAA
ATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号2
94) ; またはTCTCTGAATTCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、
2、または3である) (配列番号295) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

20

を含む。いくつかの実施形態では、PIK3CA遺伝子における1つ以上のDNA変異は
、H1047R変異PIK3CAタンパク質をコードするDNA変異を含む。いくつかの
実施形態では、PIK3CA遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは
、(1) GATGCACGTCATG (配列番号107)、TGAAATGATGCACG
C (配列番号109)、TGATGCACGTC (配列番号111)、AATGATGCA
CGTCA (配列番号113)、及びAATGATGCACGTC (配列番号115) か
らなる群から選択される配列を含む第1のプローブを含み、第1のプローブは、識別子を
有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、第1のプローブは
、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニン
またはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、PIK3CA遺伝子におけ
る1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、(1) TTTTTTTTTTTTTTTT
GATGCACGTCATG (配列番号108)、TTTTTTTTTTTTTTTGAATGA
TGCACG (配列番号110)、TTTTTTTTTTTTTTTGAATGATGCACGTC (配
列番号112)、TTTTTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTC (配列番号114)、
及びTTTTTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTC (配列番号116)
) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブを含み、第1のプローブは、識別
子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、工程(b)は
、配列ACCTAGCCTTAGATAAAACTGAGC (配列番号7) 及びTTT
GTTGTCCAGCCACCATGA (配列番号8) を含むプライマー対を使用してP
CRによって単離されたDNAを増幅することを含む。いくつかの実施形態では、工程(b)
は、PIK3CA DNA変異の1つと対応する野生型PIK3CA DNA遺伝子
座とハイブリダイズし、野生型PIK3CA DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック
核酸の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含み、少なくとも7つ
のブロック核酸のうちの少なくとも1つは、配列

30

40

50

【化 3】

$CACCATGATGTGCAT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号296); $CCACCATGATGTGCAT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号297); $CACCATGATGTGCAT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号298); $CCACCATGATGTGCATCA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号299); または $CATGATGTGCA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号300) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、BRAF遺伝子における1つ以上のDNA変異は、V600E変異BRAFタンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、BRAF遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、TTTG

GTCTAGCTACAGA (配列番号79)、CTACAGAGAAATCTCGA (配列番号81)、GTGATTTTGGTCTAGCT (配列番号83)、及びTCTAGCTACAGAGAAAT (配列番号85) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、BRAF遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、BRAF遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTTAATTGAGAGAAATCTCGATGGAG (配列番号78)、TTTTTTTAATTTTGGTCTAGCTACAGA (配列番号80)、TTTTTTTAATTTCTACAGAGAGAAATCTCGA (配列番号82)、TTTTTTTAATTGTGATTTTGGTCTAGCT (配列番号84)、及びTTTTTTTAATTTCTAGCTACAGAGAGAAAT (配列番号86) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、工程(b)は、配列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG (配列番号9) 及びCAGATATATTTCTTTCATGAAGACCTCACAGTAA (配列番号10) を含むプライマー対を使用してPCRによって単離されたDNAを増幅することを含む。いくつかの実施形態では、工程(b)は、BRAF DNA変異と対応する野生型BRAF DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型BRAF DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含み、少なくとも7つのブロック核酸のうちの少なくとも1つは、配列

20

30

40

50

【化 4】

$GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号301) ; $GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号302) ; $GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号303) ; $GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号304) ; または $GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号305) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異は、G719A変異EGFRタンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、TCAAAGTGCTGGCCTC (配列番号117)、AGATCAAAGTGCTGGCCTCCG (配列番号119)、AAAGTGCTGGCCT (配列番号121)、AGTGCTGGCCT (配列番号123)、及びAAGTGCTGGCCTC (配列番号125) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTTTTCAAGTGCTGGCCTC (配列番号118)、TTTTTTAGATCAAAGTGCTGGCCTCCG (配列番号120)、TTTTTTTAAAGTGCTGGCCT (配列番号122)、TTTTTTTAAAGTGCTGGCCT (配列番号124)、及びTTTTTTTAAAGTGCTGGCCTC (配列番号126) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、工程(b)は、配列CTTGTTGGAGCCTCTTACACCC (配列番号11) 及びTGCCGAACGCACCGGA (配列番号12) を含むプライマー対を使用してPCRによって単離されたDNAを増幅することを含む。いくつかの実施形態では、工程(b)は、EGFR DNA変異と対応する野生型EGFR DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型EGFR DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含み、少なくとも7つのブロック核酸のうちの少なくとも1つは、配列

20

30

40

50

【化 5】

CGGAGCC CAGCACTTTGA (invdT)_n (nは1、2、または3である)
 (配列番号306) ; CGCACCCGGAGCC CAGCACT (invdT)_n (nは1、
 2、または3である) (配列番号307) ; GAGCCCAGCAC (invdT)_n (nは
 1、2、または3である) (配列番号308) ; CGCACCGGAGCCCAGCAC (i
 nvdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号309) ; またはCGCACCCGG
 AGCCCAGCACTTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号3
 10) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

20

30

40

を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異は、E
 746_A750del変異EGFRタンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含
 む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的な
 プローブは、(1) AATCAAAACATCTCTCCGAAAG (配列番号128)、C
 AAAACATCTCTCCG (配列番号130)、AACATCTCTCCG (配列番号132
)、及びAAACATCTCTCCGAAAGCC (配列番号134) からなる群から選択さ
 れる配列を含む第1のプローブ；及び(2) AATCAAGACATCTCTCCGA (配列
 番号136)、GCAATCAAGACATCTCTCCGA (配列番号138)、AATC
 AAGACATCTCTC (配列番号140)、AATCAAGACATCTCTCCGAAAG
 C (配列番号142)、及びCAAGACATCTCTCCGA (配列番号144) からなる
 群から選択される配列を含む第2のプローブを含み、2つのプローブの各々は、異なる識
 別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、2つのプロ
 ーブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチド
 は、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝
 子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、(1) TTTTTTTTTTTAA
 TCAAAACATCTCTCCG (配列番号127)、TTTTTTTTTTTTTAATCAAA
 ACATCTCTCCGAAAG (配列番号129)、TTTTTTTTTTTTTTTACAAAA
 CATCTCTCCG (配列番号131)、TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCT
 CCG (配列番号133)、及びTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCTCCG
 AAAGCC (配列番号135) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；
 及び(2) TTTTTTTTTTTAATCAAGACATCTCTCCGA (配列番号137)、
 TTTTTTTTGCAATCAAGACATCTCTCCGA (配列番号139)、TTTTTT
 TTTAATCAAGACATCTCTC (配列番号141)、TTTTTTTTTTTAATCA
 AGACATCTCTCCGAAAGC (配列番号143)、及びTTTTTTTTTTTTTTTC
 AAGACATCTCTCCGA (配列番号145) からなる群から選択される配列を含む第
 2のプローブを含み、2つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリア
 に結合されている。いくつかの実施形態では、工程(b)は、配列GCCAGTTTAAAC
 GTCTTCTCTCTC (配列番号13) 及びATCGAGGATTTCTCTTGTT
 GGCTT (配列番号14) を含むプライマー対を使用してPCRによって単離されたD
 NAを増幅することを含む。いくつかの実施形態では、工程(b)は、EGFR DNA
 変異と対応する野生型EGFR DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型EGFR
 DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下でPCRによって単離されたDN
 Aを増幅することを含み、少なくとも7つのブロック核酸のうちの少なくとも1つは、配
 列

50

【化 6】

CGGAGATGTTGCTTCCTTAATTCC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号311); CGGAGATGTTGCTTCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号312); GTTGCTTCCTTAATTCC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号313); ATGTTGCTTCTCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号314); または TTGCTTCCTTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号315) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異は、T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG、またはD770_N771insSVD変異EGFRタンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異は、T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG、及びD770_N771insSVD変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、(1) GAGATGCATGATGA (配列番号146)、TGAGATGCATGATGAG (配列番号147)、ATGAGATGCATGATGAG (配列番号148)、TGAGCTGCATGATGA (配列番号149)、及びCATGAGATGCATGATGA (配列番号150) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ; (2) CCAGGAGGCTGCCG (配列番号461)、CAGGAGGCTGCCGA (配列番号463)、TCCAGGAGGCTGCC (配列番号465)、CCAGGAGGCTGCC (配列番号467)、及びCAGGAGGCTGCC (配列番号469) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ; (3) CCAGGAGGAGCC (配列番号471)、CCAGGAGGAGCCG (配列番号473)、TCCAGGAGGAGCC (配列番号475)、CAGGAGGAGCCG (配列番号477)、及びCAGGAGGAGCCGA (配列番号479) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ; (4) ATGGCCATCTTG (配列番号421)、GGCCATCTTGGA (配列番号423)、GATGGCCATCTTG (配列番号425)、TGATGGCCATCTTG (配列番号427)、及びTGGCCATCTTGG (配列番号429) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ; (5) GTGATGGCCGG (配列番号431)、TGATGGCCGGCG (配列番号433)、GTGATGGCCGGCGT (配列番号435)、GATGGCCGGCGT (配列番号437)、及びGATGGCCCGCGTG (配列番号439) からなる群から選択される配列を含む第5のプローブ; (6) AACCCCAATCACGT (配列番号441)、GACAACCCCAATCACG (配列番号443)、CGTGGACAACCCCAATCA (配列番号445)、CCCATCACGTGT (配列番号447)、及びTGGACAACCCCAATCAC (配列番号449) からなる群から選択される配列を含む第6のプローブ; 及び (7) GCCAGCGTGGACGG (配列番号451)、CGTGGACGGTAACC (配列番号453)、GACGGTAACCC (配列番号455)、CCAGCGTGGACGGT (配列番号457)、及びGCCAGCGTGGACGGTA (配列番号459) からなる群から選択される配列を含む第7のプローブを含み、7つのプローブの各々は、異なる識別子を有

20

30

40

50

50

Rによって単離されたDNAを増幅することを含む。いくつかの実施形態では、工程（b）は、EGFR DNA変異と対応する野生型EGFR DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型EGFR DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含み、少なくとも7つのブロック核酸のうちの少なくとも1つは、配列
【化7】

CATCACGCAGCTCATG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号316); *TGCAGCTCATCACGCAGC* (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号317); *TCA TCACGCAGCTCAT* (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号318); *TCATCACGCAGC* (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号319); または *CTCATCACGCAGC* (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号320) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

20

を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異は、L858R変異EGFRタンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、ATTTTGGGCGGGCC (配列番号151)、TTGGGCGGGCCAAA (配列番号153)、GCGGGCCAAACT (配列番号155)、GGGCGGGCCAAACT (配列番号157)、及びTTGGGCGGGCCA (配列番号159) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブを含み、第1のプローブは、識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、第1のプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTTATATTTTGGGCGGGCC (配列番号152)、TTTTTTTATAATTGGGCGGGCCAAA (配列番号154)、TTTTTTTATAAAAGCGGGCCAAACT (配列番号156)、TTTTTTTATAAAAGGGCGGGCCAAACT (配列番号158)、及びTTTTTTTATAAATGGGCGGGCCA (配列番号160) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブを含み、第1のプローブは、識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、工程（b）は、配列GGAGGACCGTCGCTTGG (配列番号17) 及びTCTTCTCTTCCGCAACCCAG (配列番号18) を含むプライマー対を使用してPCRによって単離されたDNAを増幅することを含む。いくつかの実施形態では、工程（b）は、EGFR DNA変異と対応する野生型EGFR DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型EGFR DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含み、少なくとも7つのブロック核酸のうちの少なくとも1つは、配列

30

40

50

【化 8】

CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号321); CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号322); CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号323); AGCAGTTTGGCCAGCC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号324); またはCCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号325) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、AKT1遺伝子における1つ以上のDNA変異は、E17K変異AKT1タンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、AKT1遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、TGTAGGGAAGTACA (配列番号370)、TCTGTAGGGAAGTAC (配列番号372)、GTCTGTAGGGAAGTACAT (配列番号374)、CCGCACGCTGTAGGGA (配列番号376)、及びACGTCGTGTAGGGAAGTA (配列番号378) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、AKT1遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、5'末端に7ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における7ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、AKT1遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA (配列番号371)、TTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC (配列番号373)、TTTTTTTTTGTCTGTAGGGAAGTACAT (配列番号375)、TTTTTTTTTCCGCACGCTGTGTAGGGA (配列番号377)、及びTTTTTTTTTACGTCGTGTAGGGAAGTA (配列番号379) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、工程(b)は、配列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG (配列番号380) 及びTGGCCCGCCAGGTCCTTGATGTA (配列番号381) を含むプライマー対を使用してPCRによって単離されたDNAを増幅することを含む。いくつかの実施形態では、工程(b)は、AKT1 DNA変異と対応する野生型AKT1 DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型AKT1 DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含み、少なくとも7つのブロック核酸のうちの少なくとも1つは、配列

20

30

40

50

【化 9】

$TGTACTCCCC TACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号382); $GATGTACTCCCC T (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号383); $ATGTACTCCCC CTAC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号384); $GTACTCCCC TACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号385); または $GATGTACTCCCC TACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号386) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

を含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、MEK1遺伝子における1つ以上のDNA変異は、K57N変異MEK1タンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、MEK1遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、TTACCCAGAAATCAGAA (配列番号387)、CCAGAAATCAGAAAGGTG (配列番号389)、TTCTTACCCAGAAATCA (配列番号391)、CCTTTCTTACCCAGAAATC (配列番号393)、及びCAGAAATCAGAAAGGTGG (配列番号395) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、MEK1遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、MEK1遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTAAATTTTACCCAGAAATCAGAA (配列番号388)、TTTTTTAAATCAGAAATCAGAAAGGTG (配列番号390)、TTTTTTAAATTTCTTACCCAGAAATCA (配列番号392)、TTTTTTAAATCCTTTCTTACCCAGAAATC (配列番号394)、及びTTTTTTAAATCAGAAATCAGAAAGGTGG (配列番号396) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、工程(b)は、配列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA (配列番号397) 及びCCTTTCAGTTCTCTCCACCTTCTG (配列番号398) を含むプライマー対を使用してPCRによって単離されたDNAを増幅することを含む。いくつかの実施形態では、工程(b)は、MEK1 DNA変異と対応する野生型MEK1 DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型MEK1 DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含み、少なくとも7つのブロック核酸のうちの少なくとも1つは、配列

10

20

30

40

50

【化 10】

$TCTGCTTC TGGGTAAG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号399); $TTCTGCTTCTGGGTAAGA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号400); $CACCTTCTGCTTC TGGG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号401); $TCTGCTTCTGGGTA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号402); または $CACCTTC TGCCTTC TGGGTAAGA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号403) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、HER2遺伝子における1つ以上のDNA変異は、A775_G776insYVMA変異HER2タンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、HER2遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、ATACGTGATGTCCTTAC (配列番号404)、ACGTGATGGCTTACGT (配列番号406)、AAGCATACGTGATGGCT (配列番号408)、GCATACGTGATGGCTT (配列番号410)、及びGCATACGTGATGGCTTA (配列番号412) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、HER2遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、5'末端に5ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における5ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、HER2遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTTTTTATACGTGATGTCCTTAC (配列番号405)、TTTTTTTTTTTTTACGTGATGGCTTACGT (配列番号407)、TTTTTAAAGCATACGTGATGGCT (配列番号409)、TTTTTTTGCATACGTGATGGCTT (配列番号411)、及びTTTTTTTGCATACGTGATGGCTTA (配列番号413) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、工程(b)は、配列ATGGCTGTGGTTTTGTGATGGT (配列番号414) 及びACACCCAGCCATCACGTAAAGACA (配列番号415) を含むプライマー対を使用してPCRによって単離されたDNAを増幅することを含む。

20

30

【0022】

本明細書に記載の実施形態のいずれかによるいくつかの実施形態では、サンプルは、血液、血清、または血漿サンプルである。いくつかの実施形態では、(a)は、サンプルから循環遊離DNA(cfDNA)を単離することを含み、単離されたcfDNAは、(b)においてPCRによって増幅される。いくつかの実施形態では、方法は、(b)において陽性対照DNA配列に特異的なプライマー対を使用して陽性対照DNA配列を増幅すること; (c)において増幅された陽性対照遺伝子配列を陽性対照遺伝子配列に特異的なプローブとハイブリダイズさせることであって、陽性対照遺伝子配列に特異的なプローブは、陽性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、ハイブリダイズさせること; (d)において増幅された陽性対照DNA配列と陽性対照遺伝子配列に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出すること; 及び(e)において陽性対照に対応する識別子を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、(d)において増幅されたDNAと陰性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリアとのハイブリダイゼーションの非存在を検出することであって、陰性対

40

50

照に対応する識別子を有するマイクロキャリアは、増幅されたDNAとハイブリダイズしないプローブを含む、検出すること；及び（e）において陰性対照に対応する識別子を検出することをさらに含む。

【0023】

別の態様では、本明細書では、ALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子における変異の存在を検出するための方法であって、方法は、（a）（例えば、患者から得られた）サンプルからRNAを単離すること；（b）逆転写－ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって単離されたRNAからDNAを（例えば、*in vitro*で）増幅することであって、DNAを増幅することは、（1）ALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的な第1のプライマー、単離されたRNA、及び逆転写酵素を使用して単離されたRNAからALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的なcDNAを生成すること、及び（2）（b）（1）において生成されたcDNA、DNAポリメラーゼ、第1のプライマー、及び対応する第1のプライマーの反対のcDNAの鎖に結合し、かつ対応する第1のプライマーによって促進されるものとは反対の方向で鎖伸長を促進するALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的な第2のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によってALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的なDNAを増幅することを含む、増幅すること；（c）増幅されたDNAを少なくとも5つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも5つのプローブは、ALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々における変異に特異的な1つ以上のプローブを含み、前記少なくとも5つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアの各々は、それに結合したプローブに対応する識別子を含む、ハイブリダイズさせること；（d）増幅されたDNAと前記少なくとも5つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、増幅されたDNAとプローブの1つとの間のハイブリダイゼーションは、プローブに対応する変異の存在を示す、検出すること；（e）マイクロキャリアの識別子を検出すること；及び（f）マイクロキャリアの検出された識別子を、マイクロキャリアの対応するプローブに対する増幅されたDNAのハイブリダイゼーションの検出された存在または非存在と相関させることを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、ALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子は、ヒト遺伝子である。いくつかの実施形態では、ALK、ROS、RET、及びNTRK1遺伝子における変異の1つ以上は、融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ALK、ROS、RET、及びNTRK1遺伝子における変異の各々は、融合遺伝子を含む。

【0024】

いくつかの実施形態では、ALK遺伝子における1つ以上の変異は、EML4-ALK融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライマーは、EML4遺伝子座の領域に特異的であり、第2のプライマーは、ALK遺伝子座の領域に特異的である。いくつかの実施形態では、第2のプライマーは、EML4遺伝子座の領域に特異的であり、第1のプライマーは、ALK遺伝子座の領域に特異的である。いくつかの実施形態では、ALK遺伝子における1つ以上の変異は、EML E13：ALK E20、EML E20：ALK E20、及びEML E6：ALK E20 EML4-ALK融合遺伝子のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、ALK遺伝子における1つ以上の変異は、EML E13：ALK E20、EML E20：ALK E20、及びEML E6：ALK E20 EML4-ALK融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ALK遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、（1）AAAGGACCTAAAGTG T（配列番号161）、CCTAAAGTG TACCGC（配列番号163）、GGGAAAGGACCTAAAG（配列番号165）、AGTG TACCGCCGGA A（配列番号167）、及びTACCGCCGGAAGCACC（配列番号169）からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；（2）GACTATGAAATA TTGTAC（配列番号171）、GAAATATTGTACTTGTAC（配列番号1

73)、TATTTGTACTTTGTACCGCC(配列番号175)、TGTAACCGC
 CGGAAGCAC(配列番号177)、及びCCGCCCGGAAGCACCCAGGA(配
 列番号179)からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；(3)TGTC
 ATCATCAACCAA(配列番号181)、ATGTCATCATCAACC(配列
 番号183)、GTGTACCGCCCGGAAGC(配列番号185)、TCAACCA
 AGTGTACCG(配列番号187)、及びTACCGCCCGGAAGCACCA(配
 列番号189)からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；及び(4)CGA
 AAAAAACAGCCAA(配列番号191)、TCGCGAAAAAACAGC(配
 列番号193)、GTGTACCGCCCGGAAGC(配列番号195)、TACCG
 CCGGAAGCACCC(配列番号197)、及びACAGCCCAAGTGTACCG(10
 配列番号199)からなる群から選択される配列を含む第4のプローブを含み、4つのプ
 ローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの
 実施形態では、4つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末
 端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実
 施形態では、ALK遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、(1)TTTT
 TTTTAAAGGACCTAAAGTGT(配列番号162)、TTTTTTT
 TTTCTAAAGTGTACCGC(配列番号164)、TTTTTTT
 GAAAGGACCTAAAG(配列番号166)、TTTTTTT
 CCGCCGGA(配列番号168)、及びTTTTTTT
 TTTTACCGCCCG
 AAGCACCC(配列番号170)からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ 20
 ；(2)TTTTTTT
 TTTTGTACTATGAAATATTGTAC(配列番号1
 72)、TTTTTTT
 TTTTGTACTTTGTAC(配列番号1
 74)、TTTTTTT
 TTTTGTACTTTGTACCGCC(配列番号1
 76)、TTTTTTT
 TTTTGTACCGCCGGAAGCAC(配列番号1
 78)、及びTTTTTTT
 TTTTCCGCCGGAAGCACCCAGGA(配列番
 号180)からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；(3)TTTTTTT
 TTTTGTCTCATCATCAACCAA(配列番号182)、TTTTTTT
 TTTTGTCTCATCAACC(配列番号184)、TTTTTTT
 TTTTGTGTACCGCCGGAAGC(配列番号186)、TTTTTTT
 TTTTCAACCAAGTGTACCG(配列番号188)、及びTTTTTTT 30
 TTTTACCGCCGGAAGCACCA(配列番号190)からなる群か
 ら選択される配列を含む第3のプローブ；及び(4)TTTTTTT
 TTTTTCGA
 AAAAAACAGCCAA(配列番号192)、TTTTTTT
 TTTTTCGC
 GAAAAAACAGC(配列番号194)、TTTTTTT
 TTTTGTGTA
 CCGCCGGAAGC(配列番号196)、TTTTTTT
 TTTTACCGC
 CGGAAGCACCC(配列番号198)、及びTTTTTTT
 TTTTACAG
 CCAAGTGTACCG(配列番号200)からなる群から選択される配列を含む第4
 のプローブを含み、4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに
 結合されている。いくつかの実施形態では、ALK遺伝子における1つ以上の変異に特異
 的な第1のプライマーは、配列AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCA(配列番号363)またはGAAGCCTCCCTGGATCTCC(配列番号364)を含む。 40
 いくつかの実施形態では、ALK遺伝子における1つ以上の変異に特異的な第2のプライ
 マーは、TATGGAGCAAACTACTGTAGAGCC(配列番号357)、C
 CAGCTACATCACACACCTTGACT(配列番号358)、及びTAATA
 CCAAAAGTTACCAAACTGCA(配列番号359)からなる群から選択さ
 れる配列を含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、ROS遺伝子における1つ以上の変異は、CD74-ROS
 、及びSLC34A2-ROSからなる群から選択されるROS融合遺伝子を含む。いく
 つかの実施形態では、第1のプライマーは、CD74、またはSLC34A2の領域に特 50

異的であり、第2のプライマーは、ROS遺伝子座の領域に特異的である。いくつかの実施形態では、第2のプライマーは、CD74、またはSLC34A2遺伝子座の領域に特異的であり、第1のプライマーは、ROS遺伝子座の領域に特異的である。いくつかの実施形態では、第1のプライマーは、CD74またはSLC34A2遺伝子座の領域に特異的であり、第2のプライマーは、ROS遺伝子座の領域に特異的である；または第2のプライマーは、CD74またはSLC34A2遺伝子座の領域に特異的であり、第1のプライマーは、ROS遺伝子座の領域に特異的である。いくつかの実施形態では、ROS遺伝子における1つ以上の変異は、CD74 E6:ROS E32、CD74 E6:ROS E34、SLC34A2 E4:ROS E32、及びSLC34A2 E4:ROS E34融合遺伝子のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、ROS遺伝子における1つ以上の変異は、CD74 E6:ROS E32、CD74 E6:ROS E34、SLC34A2 E4:ROS E32、及びSLC34A2 E4:ROS E34融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ROS遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、(1) ACTGACGCTCCACCGAAA (配列番号201)、CCACTGACGCTCCACCGA (配列番号203)、GCTGGAGTCCCAAATAAAC (配列番号205)、GGAGTCCCAAATAAACAG (配列番号207)、及びCACCGAAAGCTGGAGTCCC (配列番号209) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2) CCGAAAGATGATT (配列番号211)、GACGCTCCACCGAAA (配列番号213)、ACTGACGCTCCACCGA (配列番号215)、GATGATTTTTTGGATA (配列番号217)、及びTGATTTTTTGGATACCA (配列番号219) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；(3) AGCGCCTTCCAGCTGGTTGA (配列番号221)、CTGGTTGGAGCTGGAGTCCC (配列番号223)、AGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG (配列番号225)、GCTGGAGTCCCAAATAAACCA (配列番号227)、及びGGAGTCCCAAATAAACAGG (配列番号229) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；及び(4) GCGCCTTCCAGCTGGTTG (配列番号231)、GTAGCGCCTTCCAGCTGGT (配列番号233)、TGGTTGGAGATGATTTTTT (配列番号235)、GATGATTTTTTGGATACCAAG (配列番号237)、及びTGATTTTTTGGATACCA (配列番号239) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブを含み、4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、4つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ROS遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、(1) TTTTTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAA (配列番号202)、TTTTTTTTTTTTTTTCCACTGACGCTCCACCGA (配列番号204)、TTTTTTTTTTTTTTTGCTGGAGTCCCAAATAAAC (配列番号206)、TTTTTTTTTTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACAG (配列番号208)、及びTTTTTTTTTTTTTTTCCACCGAAAGCTGGAGTCCC (配列番号210) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2) TTTTTTTTTTTTTTTTCCGAAAGATGATTTTTT (配列番号212)、TTTTTTTTTTTTTTTGGACGCTCCACCGAAA (配列番号214)、TTTTTTTTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGA (配列番号216)、TTTTTTTTTTTTTTTGATGATTTTTTGGATA (配列番号218)、及びTTTTTTTTTTTTTTTGATTTTTTGGATACCA (配列番号220) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；(3) TTTTTTTTTTTTTTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA (配列番号222)、TTTTTTTTTTTTTTTTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC (配列番号224)、TTTTTTTTTTTTTTTTTAGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG (配列番号226)、TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTGGAGTCCCAAATAAACCA (配列番号228)、及びTTTTTT

10

20

30

40

50

TTTTTTTGGAGTCCCAAATAAACCCAGG (配列番号230) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；及び(4) TTTTTTTTTTTTGGCGCCTTCCAGCTGGTTG (配列番号232)、TTTTTTTTTTTTTTGTAGCGCCCTTCCAGCTGGT (配列番号234)、TTTTTTTTTTTTTTGGTTGGAGATGATTTTTT (配列番号236)、TTTTTTTTTTTTTTGATGATTTTTTGGATACCAAG (配列番号238)、及びTTTTTTTTTTTTTTGATTTTTTGGATACCA (配列番号240) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブを含み、4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、ROS遺伝子における1つ以上の変異に特異的な第1のプライマーは、配列AATTC AATACATACTATCAGCTTTCTCCCACTGTATTGAA (配列番号21) またはAATATTTCTGGGTACGAGTGGGATTTGTAAACAACCAGAAATA (配列番号22) を含む。いくつかの実施形態では、ROS遺伝子における1つ以上の変異に特異的な第2のプライマーは、配列GGAGTGCCATCGCTGTTTGA AATGAGCAGGCACT (配列番号19) またはTACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC (配列番号20) を含む。

10

【0026】

いくつかの実施形態では、RET遺伝子における1つ以上の変異は、KIF5B-RETからなる群から選択されるRET融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライマーは、KIF5B、またはCCDC6遺伝子座の領域に特異的であり、第2のプライマーは、RET遺伝子座の領域に特異的である。いくつかの実施形態では、第2のプライマーは、KIF5B、またはCCDC6遺伝子座の領域に特異的であり、第1のプライマーは、RET遺伝子座の領域に特異的である。いくつかの実施形態では、第1のプライマーは、KIF5B遺伝子座の領域に特異的であり、第2のプライマーは、RET遺伝子座の領域に特異的である；または第2のプライマーは、KIF5B遺伝子座の領域に特異的であり、第1のプライマーは、RET遺伝子座の領域に特異的である。いくつかの実施形態では、RET遺伝子における1つ以上の変異は、KIF5B E15:RET E11、KIF5B E15:RET E12、KIF5B E16:RET E12、KIF5B E22:RET E12、KIF5B E23:RET E12、及びCCDC6 E1:RET E12融合遺伝子のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、RET遺伝子における1つ以上の変異は、KIF5B E15:RET E11、KIF5B E15:RET E12、KIF5B E16:RET E12、KIF5B E22:RET E12、及びKIF5B E23:RET E12融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、RET遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、(1) GTGGGAAATAATGATGTAA A (配列番号241)、CTGTGGGAAATAATGATGTAA (配列番号243)、GATCCACTGTGCGACGAGCT (配列番号245)、TGATGTAAAGATCCACTGTG (配列番号247)、及びTCCACTGTGCGACGAGCTGT (配列番号249) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2) TGGGAAATAATGATGTAA A (配列番号251)、CTGTGGGAAATAATGATGTAA (配列番号253)、GGAGGATCCAAAGTGGGAAT (配列番号255)、GGATCCAAAGTGGGAATT (配列番号257)、及びATGATGTAAAGGAGGATCC (配列番号259) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；(3) CTTCTGTATCTCTCAAGAGGAT (配列番号481)、GTATCTCTCTCAAGAGGATCCAA (配列番号483)、TTCGTATCTCTCTCAAGAG (配列番号485)、TCAAGAGGATCCAA A (配列番号487)、及びTCTCTCTCAAGAGG (配列番号489) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；(4) GTTAAAAAGGAGGATCCAA (配列番号491)、ACAAAGAGTTAAAAAGGAGGA (配列番号493)、AAGAGTTAAAAAGGAGGATC (配列番号495)、AAAAAGGAGGATCCAAAG (配列番号497)、及び

20

30

40

50

A A G G A G G A T C C A A A G T G (配列番号499) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ; 及び(5) A A A C A G G A G G A T C C A A A (配列番号501)、A A G T G C A C A A A C A G G A G G (配列番号503)、G T G C A C A A A C A G G A G G A T C (配列番号505)、C A C A A A C A G G A G G A T (配列番号507)、及びA A C A G G A G G A T C C A A A (配列番号509) からなる群から選択される配列を含む第5のプローブを含み、5つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、4つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、RET遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、(1) T T T T T T T T T T T G T G G G A A A T A A T G A T G T A A A (配列番号242)、T T T T T T T T T T T C T G T G G G A A A T A A T G A T G T A (配列番号244)、T T T T T T T T T T T G A T C C A C T G T G C G A C G A G C T (配列番号246)、T T T T T T T T T T T G A T G T A A A G A T C C A C T G T G (配列番号248)、及びT T T T T T T T T T T T C C A C T G T G C G A C G A G C T G T (配列番号250) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ; (2) T T T T T T T T T T T G G G A A A T A A T G A T G T A A A (配列番号252)、T T T T T T T T T T T C T G T G G G A A A T A A T G A T G T A (配列番号254)、T T T T T T T T T T T G G A G G A T C C A A A G T G G G A A T (配列番号256)、T T T T T T T T T T T G G A T C C A A A G T G G G A A T T (配列番号258)、及びT T T T T T T T T T T A T G A T G T A A A G G A G G A T C C (配列番号260) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ; (3) T T T T T T T T T T C T T C G T A T C T C T C A A G A G G A T (配列番号482)、T T T T T T T T T T G T A T C T C T C A A G A G G A T C C A A (配列番号484)、T T T T T T T T T T T T C G T A T C T C T C A A G A G (配列番号486)、T T T T T T T T T T T T C A A G A G G A T C C A A A (配列番号488)、及びT T T T T T T T T T T C T C T C A A G A G G (配列番号490) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ; (4) T T T T T T T T T T G T T A A A A A G G A G G A T C C A A (配列番号492)、T T T T T T T T A C A A G A G T T A A A A A G G A G G A (配列番号494)、T T A T T A T T A A G A G T T A A A A A G G A G G A T C (配列番号811)、T T T T T T T T T A A A A A G G A G G A T C C A A A G (配列番号498)、及びT T T T T T T T T A A G G A G G A T C C A A A G T G (配列番号500) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ; 及び(5) T T T T T T T T T A A A C A G G A G G A T C C A A A (配列番号502)、T T T T T A T T A A G T G C A C A A A C A G G A G G (配列番号504)、T A T T A T T A T G T G C A C A A A C A G G A G G A T C (配列番号506)、T A T T T T T T T C A C A A A C A G G A G G A T (配列番号508)、及びT T T T A T T T A A C A G G A G G A T C C A A A (配列番号510) からなる群から選択される配列を含む第5のプローブを含み、5つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、RET遺伝子における1つ以上の変異に特異的な第1のプライマーは、配列G T G A T C G C A C A G T A G G A C A G C G G C T G C G A T C (配列番号26) またはC T C T A G G A G A T A T C A T T C C A A A T T C G C C T T C T C C T A G (配列番号27)を含む。いくつかの実施形態では、RET遺伝子における1つ以上の変異に特異的な第2のプライマーは、T T T C T G G T G C T A T G A G G A A A T G A C C A A C C A C C A G A (配列番号23)、A A G G A G T T A G C A G C A T G T C A G C (配列番号519)、A A C T T C A G A C T T T A C A C A A C C T G C (配列番号520)、及びA T T G A T T C T G A T G A C A C C G G A (配列番号521) からなる群から選択される配列を含む。

【0027】

いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における1つ以上の変異は、CD74-NTRK1融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、第1のプライマーは、CD74遺伝子座の領域に特異的であり、第2のプライマーは、NTRK1遺伝子座の領域に特異的

10

20

30

40

50

である。いくつかの実施形態では、第2のプライマーは、CD74遺伝子座の領域に特異的であり、第1のプライマーは、NTRK1遺伝子座の領域に特異的である。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における1つ以上の変異は、CD74 E8:NTRK1 E12融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、CAGGATCTGGGCCCCAGACA（配列番号261）、GATCTGGGCCCCAGACACTA（配列番号263）、CCAGACACTAACAGCACAT（配列番号265）、GGGCCCCAGACACTAACAGC（配列番号267）、及びCTAACAGCACATCTGGAGA（配列番号269）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、TTTTTTTTTTTACAGGATCTGGGCCCCAGACA（配列番号262）、TTTTTTTTTTTAGATCTGGGCCCCAGACACTA（配列番号264）、TTTTTTTTTTTACACAGACACTAACAGCACAT（配列番号266）、TTTTTTTTTTTAGGGGCCCCAGACACTAACAGC（配列番号268）、及びTTTTTTTTTTTACTAACAGCACATCTGGAGA（配列番号270）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における1つ以上の変異に特異的な第1のプライマーは、配列GGACGAAATCCAGACCCCAAAGGTGTTTCGT（配列番号32）を含む。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における1つ以上の変異に特異的な第2のプライマーは、配列AGAAAGACGTGACAGGAACCTGGAGGACCCGTCTT（配列番号30）を含む。

【0028】

いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における1つ以上の変異は、エクソンスキッピングをもたらす。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における1つ以上の変異は、エクソン14のスキッピングをもたらす。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、AGAAAGCAAATTAAGAT（配列番号271）、AGCAAATTAAGATCAG（配列番号273）、AAATTAAGATCAGTTTTC（配列番号275）、AGATCAGTTTTCCTAATTTC（配列番号277）、及びAAGATCAGTTTTCCTAATT（配列番号279）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、TTTTTTTTTAGAAAGCAAATTAAGAT（配列番号272）、TTTTTTTTTTTAGCAAATTAAGATCAG（配列番号274）、TTTTTTTTTTTAAATTAAGATCAGTTTTC（配列番号276）、TTTTTTTTTTTATGATCAGTTTTCCTAATTTC（配列番号278）、及びTTTTTTTTTTTAAAGATCAGTTTTCCTAATT（配列番号280）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における1つ以上の変異に特異的な第1のプライマーは、配列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA（配列番号29）を含む。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における1つ以上の変異に特異的な第2のプライマーは、配列GAATTTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC（配列番号28）を含む。

【0029】

本明細書に記載の実施形態のいずれかによるいくつかの実施形態では、サンプルは、血液、血清、または血漿サンプルである。いくつかの実施形態では、（a）においてサンプルからRNAを単離することは、腫瘍調整血小板（tumor-conditioned platelet）、腫瘍エクソソーム、及び循環腫瘍細胞（CTC）のうちの1つ以上

からRNAを単離することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、(b)において逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって単離されたRNAから陽性対照DNA配列を増幅することであって、陽性対照DNA配列を増幅することは、(1)陽性対照配列に特異的な第1のプライマー、単離されたRNA、及び逆転写酵素を使用して単離されたRNAから陽性対照配列に特異的なcDNAを生成すること、及び(2)(1)において生成された陽性対照配列に特異的なcDNA、DNAポリメラーゼ、第1のプライマー、及び対応する第1のプライマーの反対のcDNAの鎖に結合し、かつ対応する第1のプライマーによって促進されるものとは反対の方向で鎖伸長を促進する陽性対照配列に特異的な第2のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって陽性対照配列に特異的なDNAを増幅することを含む、増幅すること；(c)において増幅された陽性対照遺伝子配列を陽性対照遺伝子配列に特異的なプローブとハイブリダイズさせることであって、陽性対照遺伝子配列に特異的なプローブは、陽性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリアに結合されている、ハイブリダイズさせること；(d)において増幅された陽性対照DNA配列と陽性対照遺伝子配列に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出すること；及び(e)において陽性対照に対応する識別子を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、(d)において増幅されたDNAと陰性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリアとのハイブリダイゼーションの非存在を検出することであって、陰性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリアは、増幅されたDNAとハイブリダイズしないプローブを含む、検出すること；及び(e)において陰性対照に対応する識別子を検出することをさらに含む。

10

20

【0030】

別の態様では、本明細書では、遺伝子における変異の存在を検出するための方法であって、方法は、(a)サンプルからDNA及びRNAを単離すること；(b)KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子の各々における1つ以上のDNA変異の遺伝子座に特異的なプライマー対を使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって単離されたDNAを増幅すること；(c)逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によって単離されたRNAからDNAを増幅することであって、単離されたRNAからDNAを増幅することは、(1)ALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的な第1のプライマー、単離されたRNA、及び逆転写酵素を使用して単離されたRNAからALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的なcDNAを生成すること、及び(2)(c)(1)において生成されたcDNA、DNAポリメラーゼ、第1のプライマー、及び対応する第1のプライマーの反対のcDNAの鎖に結合し、かつ対応する第1のプライマーによって促進されるものとは反対の方向で鎖伸長を促進するALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的な第2のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的なDNAを増幅することを含む、増幅すること；(d)(b)においてPCRによって増幅されたDNAを少なくとも7つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも7つのプローブは、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子の各々における変異に特異的な1つ以上のプローブを含み、前記少なくとも7つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアの各々は、それに結合したプローブに対応する識別子を含む、ハイブリダイズさせること；(e)(b)においてPCRによって増幅されたDNAと前記少なくとも7つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、増幅されたDNAとプローブの1つとの間のハイブリダイゼーションは、プローブに対応する変異の存在を示す、検出すること；(f)(c)においてRT-PCRによって増幅されたDNAを少なくとも5つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも5つのプローブは、ALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々における変異に特異的な1つ以上のプローブを含み、前記少なくとも5つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、マイ

30

40

50

クロキャリアの各々は、それに結合したプローブに対応する識別子を含む、ハイブリダイズさせること；(g)(c)においてRTPCRによって増幅されたDNAと前記少なくとも5つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、増幅されたDNAとプローブの1つとの間のハイブリダイゼーションは、プローブに対応する変異の存在を示す、検出すること；(h)マイクロキャリアの識別子を検出すること；及び(i)マイクロキャリアの検出された識別子を、(e)及び(g)において検出されたマイクロキャリアの対応するプローブに対する増幅されたDNAのハイブリダイゼーションの存在または非存在と関連させることを含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、(a)は、サンプルを遠心分離することによって総RNA豊富血漿(TRRP)を単離することであって、サンプルは、全血または血漿を含む、単離すること；TRRPを1つ以上の遠心分離工程に供して、RNA画分及びセルフリーDNA(cfDNA)画分を生成することであって、RNA画分は、血小板、白血球、エクソソーム、循環腫瘍細胞、及び遊離RNAのうちの1つ以上を含む、生成すること；cfDNA画分からDNAを単離すること；及びRNA画分からRNAを単離することを含む。

10

20

30

40

50

【0031】

本明細書に記載の実施形態のいずれかによるいくつかの実施形態では、プライマー対の各々は、検出試薬に結合したプライマーを含む。いくつかの実施形態では、検出試薬は、蛍光検出試薬を含み、(d)において増幅されたDNAと前記プローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することは、蛍光検出試薬の蛍光画像化を含む。いくつかの実施形態では、検出試薬は、ビオチンを含み、工程(d)において増幅されたDNAと前記プローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することは、(1)(c)におけるハイブリダイゼーションの後に、マイクロキャリアを、シグナル放出体にコンジュゲートされたストレプトアビジンと接触させること；及び(2)マイクロキャリアに関連するシグナル放出体からのシグナルを検出することを含む。いくつかの実施形態では、シグナル放出体は、フィコエリトリン(PE)を含む。いくつかの実施形態では、(e)においてマイクロキャリアの識別子を検出することは、識別子の明視野画像化を含む。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの識別子は、デジタルバーコードを含む。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの各々は、(i)第1のフォトリマー層；(ii)第2のフォトリマー層；及び(iii)第1の層と第2の層との間の中間層であって、中間層は、それに定義された識別子を表すコードされたパターンを有し、中間層は、光に対して部分的に実質的に透過性であり、かつ部分的に実質的に不透明であることで、マイクロキャリアに対応するコードを表し、マイクロキャリアの最外表面は、フォトレジストフォトリマーを含み、前記フォトレジストフォトリマーは、DNA変異に特異的なプローブで官能化されており、前記マイクロキャリアは、水とおおよそ同じ密度を有する、中間層を含む。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの識別子は、アナログコードを含む。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの各々は、(i)第1の表面及び第2の表面を有する実質的に透明なポリマー層であって、第1及び第2の表面は、互いに平行である、実質的に透明なポリマー層；(ii)二次元形状を構成する実質的に非透明な層であって、実質的に非透明な層は、実質的に透明なポリマー層の第1の表面に付着されており、実質的に透明なポリマー層の中央部分を包囲し、実質的に非透明な層の二次元形状は、アナログコードを表し、アナログコードは、識別子に対応する、実質的に非透明な層；及び(iii)変異に特異的なプローブであって、プローブは、実質的に透明なポリマー層の少なくとも中央部分における実質的に透明なポリマー層の第1の表面及び第2の表面の少なくとも一方に結合されている、プローブを含む。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの各々は、実質的に非透明なポリマー層のアナログコードを配向させるための配向指標をさらに含む。いくつかの実施形態では、実質的に透明なポリマー層のポリマーは、エポキシベースのポリマーを含む。いくつかの実施形態では、エポキシベースのポリマーは、SU-8である。

【0032】

別の態様では、本明細書では、少なくとも7つのマイクロキャリアを含むキットであつ

て、前記少なくとも7つのマイクロキャリアの各々は、(i) マイクロキャリアに結合したプローブであって、プローブは、K R A S、P I K 3 C A、B R A F、E G F R、A K T 1、M E K 1、またはH E R 2 遺伝子におけるD N A 変異に特異的である、プローブ；及び(ii) それに結合したプローブに対応する識別子を含み、キットは、K R A S 遺伝子におけるD N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、P I K 3 C A 遺伝子におけるD N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、B R A F 遺伝子におけるD N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、E G F R 遺伝子におけるD N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、A K T 1 遺伝子におけるD N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、M E K 1 遺伝子におけるD N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、及びH E R 2 遺伝子におけるD N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリアを含み、K R A S、N R A S、P I K 3 C A、B R A F、E G F R、A K T 1、M E K 1、及びH E R 2 遺伝子は、ヒト遺伝子である、キットが提供される。

10

【0033】

いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも7つのブロック核酸をさらに含み、前記少なくとも7つのブロック核酸の各々は、K R A S、P I K 3 C A、B R A F、E G F R、A K T 1、M E K 1、またはH E R 2 遺伝子におけるD N A 変異の1つと対応する野生型D N A 遺伝子座とハイブリダイズし、野生型D N A 遺伝子座の増幅を防止する。いくつかの実施形態では、前記少なくとも7つのブロック核酸の各々は、対応する野生型D N A 遺伝子座とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチド；及び一本鎖オリゴヌクレオチドからの伸長をブロックする3'末端部位を含む。いくつかの実施形態では、3'末端部位は、1つ以上の反転デオキシチミジンを含む。いくつかの実施形態では、前記少なくとも7つのブロック核酸の各々は、ロック核酸(L N A)、ペプチド核酸(P N A)、ヘキソース核酸(H N A)、トレオース核酸(T N A)、グリコール核酸(G N A)、及びシクロヘキセニル核酸(C e N A)からなる群から選択される1つ以上の改変ヌクレオチドを含む。

20

【0034】

いくつかの実施形態では、K R A S 遺伝子におけるD N A 変異は、G 1 2 D、G 1 2 V、またはG 1 2 C 変異K R A S タンパク質をコードする1つ以上のD N A 変異を含む。いくつかの実施形態では、K R A S 遺伝子におけるD N A 変異は、G 1 2 D、G 1 2 V、及びG 1 2 C 変異K R A S タンパク質をコードするD N A 変異を含む。いくつかの実施形態では、K R A S 遺伝子におけるD N A 変異に特異的なプローブは、(1) T A G T T G G A G C T (配列番号38)、T G T G G T A G T T G (配列番号40)、T G A T G G C G T A G (配列番号42)、T G G A G C T G A T G G C (配列番号44)、及びG C G T A G G C A A G (配列番号46)からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2) C T G T T G G C G T A G G (配列番号48)、G T A G T T G G A G C T G (配列番号50)、T G G A G C T G T T G G C (配列番号52)、T T G T G G T A G T T G G (配列番号54)、及びG G C G T A G G C A A G A (配列番号56)からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；及び(3) T A G T T G G A G C T T (配列番号58)、G C G T A G G C A A G A (配列番号60)、G G A G C T T G T G G C (配列番号62)、T T G T G G C G T A G G (配列番号64)、及びT G T G G T A G T T G G (配列番号66)からなる群から選択される配列を含む第3のプローブを含み、3つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、3つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、K R A S 遺伝子におけるD N A 変異に特異的なプローブは、(1) T T T T T T T T T T T T A A T A G T T G G A G C T (配列番号39)、T T T T T T T T T T T T A A T G T G G T A G T T G (配列番号41)、T T T T T T T T T T T T A A T G A T G G C G T A G (配列番号43)、T T T T T T T T T T T T A T G G A G C

30

40

50

T G A T G G C (配列番号 45)、及び T T T T T T T T T T T T T A A G C G T A G G C A A G (配列番号 47) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；(2) T T T T T T T T T T T A C T G T T G G C G T A G G (配列番号 49)、T T T T T T T T T T T A G T A G T T G G A G C T G (配列番号 51)、T T T T T T T T T T T A T G G A G C T G T T G G C (配列番号 53)、T T T T T T T T T T T A T T G T G G T A G T T G G (配列番号 55)、及び T T T T T T T T T T T A G G C G T A G G C A A G A (配列番号 57) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブ；及び(3) T T T T T T T T T T T A A T A G T T G G A G C T T (配列番号 59)、T T T T T T T T T T T A A G C G T A G G C A A G A (配列番号 61)、T T T T T T T T T T T A A G G A G C T T G T G G C (配列番号 63)、T T T T T T T T T T T A A T T G T G G C G T A G G (配列番号 65)、及び T T T T T T T T T T T A A T G T G G T A G T T G G (配列番号 67) からなる群から選択される配列を含む第 3 のプローブを含み、3 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、キットは、配列 G T A C T G G T G G A G T A T T T G A T A G T G (配列番号 1) 及び C G T C A A G G C A C T C T T G C C T A C (配列番号 2) を含むプライマー対をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、K R A S DNA 変異と対応する野生型 K R A S DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、野生型 K R A S DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、ブロック核酸は、配列

【化 11】

10

20

T A C G C C A C C A G C T (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 281)；T T G G A G C T G G T G G C G T A (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 282)；G C T G G T G G C G T A G G C A (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 283)；G C T G G T G G C G T A G G C (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 284)；または T T G G A G C T G G T G G C G T (i n v d T) _n (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 285) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。いくつかの実施形態では、P I K 3 C A 遺伝子における DNA 変異は、E 5 4 2 K または E 5 4 5 K 変異 P I K 3 C A タンパク質をコードする 1 つ以上の DNA 変異を含む。いくつかの実施形態では、P I K 3 C A 遺伝子における DNA 変異は、E 5 4 2 K 及び E 5 4 5 K 変異 P I K 3 C A タンパク質をコードする DNA 変異を含む。いくつかの実施形態では、P I K 3 C A 遺伝子における DNA 変異に特異的なプローブは、(1) G C T C A G T G A T T T T A G (配列番号 87)、T G C T C A G T G A T T T T (配列番号 89)、G C T C A G T G A T T T T A G (配列番号 91)、C C T G C T C A G T G A T T T T A (配列番号 93)、及び C T C A G T G A T T T T A G A (配列番号 95) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ；及び(2) T T C T C C T G C T T A (配列番号 97)、C T C C T G C T T A G T (配列番号 99)、T C T C C T G C T T A G (配列番号 101)、T C C T G C T T A G T G (配列番号 103)、及び C T C C T G C T T A G T G A (配列番号 105) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブを含み、2 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、2 つのプローブの各々は、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、5' 末端における 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、P I K 3 C A 遺伝子における DNA 変異に特異的なプローブは、(1) T T T T T T T T T A G C T C A G T G A T T T T A G (配列

40

50

番号 88)、TTTTTTTTTTTGGCTCAGTGATTTT (配列番号 90)、TTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG (配列番号 92)、TTTTTTTTCTGCTCAGTGATTTTA (配列番号 94)、及びTTTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA (配列番号 96) からなる群から選択される配列を含む第 1 のプローブ; 及び (2) TTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTA (配列番号 98)、TTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT (配列番号 100)、TTTTTTTTTTTATCTCCTGCTTAG (配列番号 102)、TTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGTG (配列番号 104)、及びTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGTGA (配列番号 106) からなる群から選択される配列を含む第 2 のプローブを含み、3つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、キットは、配列CAATTTCTACAAGAGATCCTCTCTCT (配列番号 5) 及びCTCCAATTTTAGCACCTTACCTGTGAC (配列番号 6) を含むプライマー対をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、PIK3CA DNA 変異と対応する野生型PIK3CA DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、野生型PIK3CA DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、ブロック核酸は、配列

【化 12】

10

20

CTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である)
 (配列番号 291); TCTCTGAAATCAC TGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号 292); TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号 293); TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号 294); または TCTCTGAATTCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号 295) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。いくつかの実施形態では、PIK3CA 遺伝子におけるDNA変異は、H1047R 変異PIK3CA タンパク質をコードするDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、PIK3CA 遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、GATGCACGTCATG (配列番号 107)、TGAATGATGCACG (配列番号 109)、TGATGCACGTC (配列番号 111)、AATGATGCACGTC (配列番号 113)、及びAATGATGCACGTC (配列番号 115) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、PIK3CA 遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTTTTTTGGATGCACGTCATG (配列番号 108)、TTTTTTTTTTTGAATGATGCACG (配列番号 110)、TTTTTTTTTTTGGATGCACGTC (配列番号 112)、TTTTTTTTTTTAAATGATGCACGTC (配列番号 114)、及びTTTTTTTTTTTAAATGATGCACGTC (配列番号 116) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、プローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、キットは、配列ACCTAGCCTTAGATAAACTGAGC (配列番号 7) 及びTTTGTTGTCCAGCCACCATGA (配列番号 8) を含むプライマー対をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、PIK3CA DNA 変異と対応する野生型PIK3CA DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、野生型PIK3CA DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、ブロック核酸は、配列

40

50

【化 1 3】

$CACCATGATGTGCAT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号296); $CCACCATGATGTGCAT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号297); $CACCATGATGTGCAT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号298); $CCACCATGATGTGCATCA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号299); または $CATGATGTGCA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号300) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、BRAF遺伝子におけるDNA変異は、V600E変異BRAFタンパク質をコードするDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、BRAF遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、TTTGGTCTAGCTACAGA (配列番号79)、CTACAGAGAAATCTCGA (配列番号81)、GTGATTTTGGTCTAGCT (配列番号83)、及びTCTAGCTACAGAGAAAT (配列番号85) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、BRAF遺伝子における1つ以上のDNA変異に特異的なプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、BRAF遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTTAATTGAGAAATCTCGATGGAG (配列番号78)、TTTTTTTAATTTTGGTCTAGCTACAGA (配列番号80)、TTTTTTTAATTCTACAGAGAAATCTCGA (配列番号82)、TTTTTTTAATTGTGATTTTGGTCTAGCT (配列番号84)、及びTTTTTTTAATTTCTAGCTACAGAGAAAT (配列番号86) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAATG (配列番号9) 及びCAGATATATTTCTTTCATGAAGACCTCACAGTAA (配列番号10) を含むプライマー対をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、BRAF DNA変異と対応する野生型BRAF DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型BRAF DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、ブロック核酸は、配列

20

30

【化 1 4】

$GAGATTTCACGTAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号301); $GAGATTTCACGTAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号302); $GAGATTTCACGTAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号303); $GAGATTTCACGTAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号304); または $GAGATTTCACGTAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号305) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

40

50

を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、TCAAAGTGCTGGCCTC（配列番号117）、AGATCAAAGTGCTGGCCTCCG（配列番号119）、AAAGTGCTGGCCT（配列番号121）、AGTGCTGGCCT（配列番号123）、及びAAGTGCTGGCCTC（配列番号125）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCTC（配列番号118）、TTTTTTTAGATCAAAGTGCTGGCCTCCG（配列番号120）、TTTTTTTTTTTAAAGTGCTGGCCT（配列番号122）、TTTTTTTTTTTAAAGTGCTGGCCT（配列番号124）、及びTTTTTTTTTTTAAAGTGCTGGCCTC（配列番号126）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列CTTGTTGGAGCCTCTTACACCC（配列番号11）及びTGCCGAACGCACCGGA（配列番号12）を含むプライマー対をさらに含み。いくつかの実施形態では、キットは、EGFR DNA変異と対応する野生型EGFR DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型EGFR DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、ブロック核酸は、配列

【化15】

10

20

CGGAGCCAGCACTTTGA (invdT)_n (nは1、2、または3である)
 (配列番号306) ; CGCACCGGAGCCAGCACT (invdT)_n (nは1、
 2、または3である) (配列番号307) ; GAGCCCAGCAC (invdT)_n (nは
 1、2、または3である) (配列番号308) ; CGCACCGGAGCCCAGCAC (i
 nvdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号309) ; またはCGCACCGG
 AGCCCAAGCACTTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号3
 10) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子におけるDNA変異は、E746_A750del変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、(1) AATCAAACATCTCCGAAAG（配列番号128）、CAAAACATCTCCG（配列番号130）、AACATCTCCG（配列番号132）、及びAAACATCTCCGAAAGCC（配列番号134）からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；及び(2) AATCAAAGACATCTCCGA（配列番号136）、GCAATCAAAGACATCTCCGA（配列番号138）、AATCAAAGACATCTCCGAAAGC（配列番号142）、及びCAAGACATCTCCGA（配列番号144）からなる群から選択される配列を含む第2のプローブを含み、2つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、2つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、(1) TTTTTTTTTTTAATCAAACATCTCCG（配列番号127）、TTTTTTTTTTTTAATCAAACATCTCCGAAAG（配列番号129）、TTTTTTTTTTTTTACAAACATCTCCG（配列番号131）、T

40

50

TTTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCG (配列番号133)、及びTTTT
TTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC (配列番号135) からなる
群から選択される配列を含む第1のプローブ；及び(2)TTTTTTTTTTAATCAA
GACATCTCCGA (配列番号137)、TTTTTTTGCAATCAAGACAT
CTCCGA (配列番号139)、TTTTTTTTTTAATCAAGACATCTC (配
列番号141)、TTTTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGAAAGC (配
列番号143)、及びTTTTTTTTTTTTTCAAGACATCTCCGA (配列番号1
45) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブを含み、2つのプローブの各
々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態で
は、キットは、配列GCCAGTTAACGTCTTCTCTC (配列番号13) 及
びATCGAGGATTTCTCTTGTGGCTT (配列番号14) を含むプライマ
ー対をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、EGFR DNA変異と対応する
野生型EGFR DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型EGFR DNA遺伝子座
の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、ブロック核酸は、配列
【化16】

10

CGGAGATGTTGCTTCCTTAATTCC (invdT)_n (nは1、2、また
は3である) (配列番号311)；CGGAGATGTTGCTTCCT (invdT)_n
(nは1、2、または3である) (配列番号312)；GTTGCTTCCTTAATT
C (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号313)；ATGTTGCT
TCTCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号314)；または
TGCTTCCTTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号31
5) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

20

を含む。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子におけるDNA変異は、T790M、
C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774ins
H、D770_N771insG、またはD770_N771insSVD変異EGFR
タンパク質をコードする1つ以上のDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、EGF
R遺伝子におけるDNA変異は、T790M、C797S、S768I、V769_D7
70insASV、H773_V774insH、D770_N771insG、及びD
770_N771insSVD変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異を含む。
いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、(1)
GAGATGCATGATGA (配列番号146)、TGAGATGCATGATG
AG (配列番号147)、ATGAGATGCATGATGAG (配列番号148)、T
GAGCTGCATGATGA (配列番号149)、及びCATGAGATGCATGA
TGA (配列番号150) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2)
CCAGGAGGCTGCCG (配列番号461)、CAGGAGGCTGCCGA (配
列番号463)、TCCAGGAGGCTGCC (配列番号465)、CCAGGAGG
CTGCC (配列番号467)、及びCAGGAGGCTGCC (配列番号469) から
なる群から選択される配列を含む第2のプローブ；(3)CCAGGAGGGAGCC (配
列番号471)、CCAGGAGGGAGCCG (配列番号473)、TCCAGGA
GGGAGCC (配列番号475)、CAGGAGGGAGCCG (配列番号477)、
及びCAGGAGGGAGCCGA (配列番号479) からなる群から選択される配列を
含む第3のプローブ；(4)ATGGCCATCTTGG (配列番号421)、GGCC
ATCTTGA (配列番号423)、GATGGCCATCTTG (配列番号425)

30

40

50

、T G A T G G C C A T C T T G (配列番号427)、及びT G G C C A T C T T G G (配列番号429)からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；(5) G T G A T G G C C G G (配列番号431)、T G A T G G C C G G C G (配列番号433)、G T G A T G G C C G G C G T (配列番号435)、G A T G G C C G G C G T (配列番号437)、及びG A T G G C C C G C G T G (配列番号439)からなる群から選択される配列を含む第5のプローブ；(6) A A C C C C C A T C A C G T (配列番号441)、G A C A A C C C C C A T C A C G (配列番号443)、C G T G G A C A A C C C C C A T C A (配列番号445)、C C C A T C A C G T G T (配列番号447)、及びT G G A C A A C C C C C A T C A C (配列番号449)からなる群から選択される配列を含む第6のプローブ；及び(7) G C C A G C G T G G A C G G (配列番号451)、C G T G G A C G G T A A C C (配列番号453)、G A C G G T A A C C C C C C (配列番号455)、C C A G C G T G G A C G G T (配列番号457)、及びG C C A G C G T G G A C G G T A (配列番号459)からなる群から選択される配列を含む第7のプローブを含み、7つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、E G F R遺伝子におけるDNA変異に特異的な7つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、E G F R遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、(1) T T T T T T T T T T T T G A G A T G C A T G A T G A (配列番号352)、T T T T T T T T T T T T G A G A T G C A T G A T G A G (配列番号353)、T T T T T T T T T A T G A G A T G C A T G A T G A G (配列番号354)、T T T T T T T T T T T T G A G C T G C A T G A T G A (配列番号355)、及びT T T T T T T T T C A T G A G A T G C A T G A T G A (配列番号356)からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2) T T T T T T T T T T T T A C C A G G A G G C T G C C G (配列番号462)、T T T T T T T T T T T T A C A G G A G G C T G C C G A (配列番号464)、T T T T T T T T T T T T A T C C A G G A G G C T G C C (配列番号466)、T T T T T T T T T T T T A C C A G G A G G C T G C C (配列番号468)、及びT T T T T T T T T T T T A C A G G A G G C T G C C (配列番号470)からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；(3) T T T T T T T T T T T T A C C A G G A G G G A G C C (配列番号472)、T T T T T T T T T T T T T A C C A G G A G G G A G C C G (配列番号474)、T T T T T T T T T T T T A T C C A G G A G G G A G C C (配列番号476)、T T T T T T T T T T T T A C A G G A G G G A G C C G (配列番号478)、及びT T T T T T T T T T T T A C A G G A G G G A G C C G A (配列番号480)からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；(4) T T T T T T T T T T A T G G C C A T C T T G G (配列番号422)、T T T T T T T T T T T T A G G C C A T C T T G G A (配列番号424)、T T T T T T T T A G A T G G C C A T C T T G (配列番号426)、T T T T T T T T T G A T G G C C A T C T T G (配列番号428)、及びT T T T T T T T T T T T G G C C A T C T T G G (配列番号430)からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；(5) T T T T T T T T T T T G T G A T G G C C G G (配列番号432)、T T T T T T T T T T T T T T G A T G G C C G G C G (配列番号434)、T T T T T T T T T T T T G T G A T G G C C G G C G T (配列番号436)、T T T T T T T T T T T T T T G A T G G C C G G C G T (配列番号438)、及びT T T T T T T T T T T T T T G A T G G C C C G C G T G (配列番号440)からなる群から選択される配列を含む第5のプローブ；(6) T T T T T T T T T T T T A A C C C C C A T C A C G T (配列番号442)、T T T T T T T T T G A C A A C C C C C A T C A C G (配列番号444)、T T T T C G T G G A C A A C C C C C A T C A (配列番号446)、T T T T T T T T T T T T T C C C A T C A C G T G T (配列番号448)、及びT T T T T T T T T T G G A C A A C C C C C A T C A C (配列番号450)からなる群から選択される配列を含む第6のプローブ；及び(7) T T T T T T T T T T T G C C A G C G T G G A C G G (配列番号452)、T T T T T T T T T T T T C G T G G A C G G T A A C C (配列番号454)、T T T T T T T T T T T T G A C G G T A

10

20

30

40

50

A C C C C C (配列番号 4 5 6)、T T T T T T T T T T T C C A G C G T G G A C G G T (配列番号 4 5 8)、及び T T T T T T T G C C A G C G T G G A C G G T A (配列番号 4 6 0) からなる群から選択される配列を含む第 7 のプローブを含み、7 つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、キットは、配列 C C T C C A C C G T G C A G A T C A T C (配列番号 1 5) 及び T T C C C T G A T T A C C T T T G C G A T (配列番号 1 6) を含むプライマー対；配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 5 1 1) 及び G C A C A C G T A G G G T T G T C C A A G A (配列番号 5 1 2) を含むプライマー対；配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 5 1 3) 及び G T A C A C G C T G G C C A C G C C G (配列番号 5 1 4) を含むプライマー対；配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 5 1 5) 及び C A G G C G G C A C A C G T G A T (配列番号 5 1 6) を含むプライマー対；及び／または配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 5 1 7) 及び A G G C G G C A C A C G T G C G G G T T A C (配列番号 5 1 8) を含むプライマー対をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、E G F R DNA 変異と対応する野生型 E G F R DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、野生型 E G F R DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、ブロック核酸は、配列

10

20

$C A T C A C G C A G C T C A T G (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 6)； $T G C A G C T C A T C A C G C A G C (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 7)； $T C A T C A C G C A G C T C A T (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 8)； $T C A T C A C G C A G C (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 9)；または $C T C A T C A C G C A G C (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 2 0) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。いくつかの実施形態では、E G F R 遺伝子における DNA 変異は、L 8 5 8 R 変異 E G F R タンパク質をコードする DNA 変異を含む。いくつかの実施形態では、E G F R 遺伝子における DNA 変異に特異的なプローブは、A T T T T G G G C G G G C C (配列番号 1 5 1)、T T G G G C G G G C C A A A (配列番号 1 5 3)、G C G G G C C A A A C T (配列番号 1 5 5)、G G G C G G G C C A A A C T (配列番号 1 5 7)、及び T G G G C G G G C C A (配列番号 1 5 9) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、プローブは、5' 末端に 8 ヌクレオチドをさらに含み、5' 末端における 8 ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、E G F R 遺伝子における DNA 変異に特異的なプローブは、T T T T T T T A T T T T G G G C G G G C C (配列番号 1 5 2)、T T T T T T T T A A T T G G G C G G G C C A A A (配列番号 1 5 4)、T T T T T T T A A A A A G C G G G C C A A A C T (配列番号 1 5 6)、T T T T T T T T A A A A G G G C G G G C C A A A C T (配列番号 1 5 8)、及び T T T T T T T T A A A T G G G C G G G C C A (配列番号 1 6 0) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列 G G A G G A C C G T C G C T T G G (配列番号 1 7) 及び T C T T T C T C T T C C G C A C C C A G (配列番号 1 8) を含むプライマー対をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、E G F R DNA 変異と対応する野生型 E G F R DNA 遺伝子座とハイブリダイズし、野生型 E G F R DNA 遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、ブロック核酸は、配列

40

50

【化 1 8】

CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号321) ; CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号322) ; CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号323) ; AGCAGTTTGGCCAGCC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号324) ; またはCCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号325) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、AKT1遺伝子におけるDNA変異は、E17K変異AKT1タンパク質をコードするDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、AKT1遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、TG TAGGGAAGTACA (配列番号370)、TCTGTAGGGAAGTAC (配列番号372)、GTCTGTAGGGAAGTACAT (配列番号374)、CCGCACGTCTGTAGGGA (配列番号376)、及びACGTCTGTAGGGAAGTA (配列番号378) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、AKT1遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、5'末端に7ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における7ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、AKT1遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTAGGGAAGTACA (配列番号371)、TTTTTTTTTTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC (配列番号373)、TTTTTTTTTTGTCTGTAGGGAAGTACAT (配列番号375)、TTTTTTTTTCCGCACGTCTGTAGGGA (配列番号377)、及びTTTTTTTTTACGTCTGTAGGGAAGTA (配列番号379) からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列GAGGGTCTGACGGGTAGAGTG (配列番号380) 及びTGGCCGCACAGGTCTTGATGTA (配列番号381) を含むプライマー対をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、AKT1 DNA変異と対応する野生型AKT1 DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型AKT1 DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、ブロック核酸は、配列

20

30

【化 1 9】

TGTACTCCCCCTACA (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号382) ; GATGTACTCCCCCT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号383) ; ATGTACTCCCCCTAC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号384) ; GTACTCCCCCTACA (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号385) ; またはGATGTACTCCCCCTACA (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号386) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

40

50

を含む。いくつかの実施形態では、MEK1遺伝子におけるDNA変異は、K57N変異MEK1タンパク質をコードするDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、MEK1遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、TTACCCAGAAATCAGAA（配列番号387）、CCAGAAATCAGAAAGGTG（配列番号389）、TTCTTACCCAGAAATCA（配列番号391）、CCTTTTCTTACCCAGAAATC（配列番号393）、及びCAGAAATCAGAAAGGTGG（配列番号395）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、MEK1遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、MEK1遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTAAATTTTACCCAGAAATCAGAA（配列番号388）、TTTTTTAAATCCAGAAATCAGAAAGGTG（配列番号390）、TTTTTTAAATTTTCTTACCCAGAAATCA（配列番号392）、TTTTTTAAATCCTTTTCTTACCCAGAAATC（配列番号394）、及びTTTTTTAAATCAGAAATCAGAAAGGTGG（配列番号396）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、キットは、配列CTTGATGAGCAGCAGCGAAA（配列番号397）及びCCTTTCAGTTCTCCCACTTCTG（配列番号398）を含むプライマー対をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、MEK1 DNA変異と対応する野生型MEK1 DNA遺伝子座とハイブリダイズし、野生型MEK1 DNA遺伝子座の増幅を防止するブロック核酸をさらに含み、ブロック核酸は、配列

【化20】

10

20

$TCCTGCTTCTGGGTAAG (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号399); $TTCTGCTTCTGGGTAAGA (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号400); $CACCTTCTGCTTCTGGG (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号401); $TCCTGCTTCTGGGTA (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号402); または $CACCTTCTGCTTCTGGGTAAGA (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号403) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。いくつかの実施形態では、HER2遺伝子におけるDNA変異は、A775_G776insYVMA変異HER2タンパク質をコードするDNA変異を含む。いくつかの実施形態では、HER2遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、ATACGTGATGTCCTTAC（配列番号404）、ACGTGATGGCTTACGT（配列番号406）、AAGCATACGTGATGGCT（配列番号408）、GCATACGTGATGGCTT（配列番号410）、及びGCATACGTGATGGCTTA（配列番号412）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、HER2遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、5'末端に5ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における5ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、HER2遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブは、TTTTTTTTTTATACGTGATGTCCTTAC（配列番号405）、TTTTTTTTTACGTGATGGCTTACGT（配列番号407）、TTTTTTAAGCATACGTGATGGCT（配列番号409）、TTTTTTTTTGATACGTGATGGCTT（配列番号411）、及びTTTTTTTTTGATACGTGATGGCTTA（配列番号413）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態で

40

50

は、キットは、配列 A T G G C T G T G G T T T G T G A T G G T (配列番号 4 1 4) 及び A C A C C A G C C A T C A C G T A A G A C A (配列番号 4 1 5) を含むプライマー対をさらに含む。

【0035】

別の態様では、本明細書では、少なくとも5つのマイクロキャリアを含むキットであって、前記少なくとも5つのマイクロキャリアの各々は、(i) マイクロキャリアに結合したプローブであって、プローブは、A L K、R O S、R E T、N T R K 1、または c M E T 遺伝子における R N A 変異に特異的である、プローブ；及び (i i) それに結合したプローブに対応する識別子を含み、キットは、A L K 遺伝子における R N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、R O S 遺伝子における R N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、R E T 遺伝子における R N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、N T R K 1 遺伝子における R N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、及び c M E T 遺伝子における R N A 変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリアを含み、A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及び c M E T 遺伝子は、ヒト遺伝子である、キットが提供される。いくつかの実施形態では、A L K、R O S、R E T、及び N T R K 1 遺伝子における変異の各々は、融合遺伝子または遺伝子再構成を含む。

【0036】

いくつかの実施形態では、A L K 遺伝子における変異は、E M L E 1 3 : A L K E 2 0、E M L E 2 0 : A L K E 2 0、及び E M L E 6 : A L K E 2 0 E M L 4 - A L K 融合遺伝子のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、A L K 遺伝子における変異は、E M L E 1 3 : A L K E 2 0、E M L E 2 0 : A L K E 2 0、及び E M L E 6 : A L K E 2 0 E M L 4 - A L K 融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、A L K 遺伝子における変異に特異的なプローブは、(1) A A A G G A C C T A A A G T G T (配列番号 1 6 1)、C C T A A A G T G T A C C G C (配列番号 1 6 3)、G G G A A A G G A C C T A A A G (配列番号 1 6 5)、A G T G T A C C G C C G G A A (配列番号 1 6 7)、及び T A C C G C C G G A A G C A C C (配列番号 1 6 9) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2) G A C T A T G A A A T A T T G T A C (配列番号 1 7 1)、G A A A T A T T G T A C T T G T A C (配列番号 1 7 3)、T A T T G T A C T T G T A C C G C C (配列番号 1 7 5)、T G T A C C G C C G G A A G C A C (配列番号 1 7 7)、及び C C G C C G G A A G C A C C A G G A (配列番号 1 7 9) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；(3) T G T C A T C A T C A A C C A A (配列番号 1 8 1)、A T G T C A T C A T C A A C C (配列番号 1 8 3)、G T G T A C C G C C G G A A G C (配列番号 1 8 5)、T C A A C C A A G T G T A C C G (配列番号 1 8 7)、及び T A C C G C C G G A A G C A C C A (配列番号 1 8 9) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；及び(4) C G A A A A A A C A G C C A A (配列番号 1 9 1)、T C G C G A A A A A A C A G C (配列番号 1 9 3)、G T G T A C C G C C G G A A G C (配列番号 1 9 5)、T A C C G C C G G A A G C A C C (配列番号 1 9 7)、及び A C A G C C A A G T G T A C C G (配列番号 1 9 9) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブを含み、4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、4つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、A L K 遺伝子における変異に特異的なプローブは、(1) T T T T T T T T T T T A A A G G A C C T A A A G T G T (配列番号 1 6 2)、T T T T T T T T T T T C C T A A A G T G T A C C G C (配列番号 1 6 4)、T T T T T T T T T T T G G G A A A G G A C C T A A A G (配列番号 1 6 6)、T T T T T T T T T T T A G T G T A C C G C C G G A A (配列番号 1 6 8)、及び T T T T T T T T T T T A C C G C C G G A A G C A C C (配列番号 1 7 0) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2) T T T T T T T T T T T G A C T A T G A A A T A T T G T A C (配列番号 1 7 2)、T

TTTTTTTTTTTTTTGAAATATTGTACTTTGTAC (配列番号174)、T
TTTTTTTTTTTTTTTATTTGTACTTTGTACCGCC (配列番号176)、T
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTGTACCGCCGGAAGCAC (配列番号178)、及
びTTTTTTTTTTTTTTTTTCCGCCCGGAAGCACCCAGGA (配列番号180)
からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ; (3) TTTTTTTTTTTTTTTT
TTTGTCAATCAATCAACCA (配列番号182)、TTTTTTTTTTTTTTTTT
TTATGTCAATCAATCAACC (配列番号184)、TTTTTTTTTTTTTTTTT
TGTGTACCGCCCGGAAGC (配列番号186)、TTTTTTTTTTTTTTTTT
TTCAACCAAGTGTACCG (配列番号188)、及びTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTACCGCCCGGAAGCACCA (配列番号190) からなる群から選択され
る配列を含む第3のプローブ; 及び (4) TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGAAAAA
ACAGCCCA (配列番号192)、TTTTTTTTTTTTTTTTTTCGCGAAAA
AACAGC (配列番号194)、TTTTTTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCC
GGAAGC (配列番号196)、TTTTTTTTTTTTTTTTTACCGCCCGGA
GCACC (配列番号198)、及びTTTTTTTTTTTTTTTTTACAGCCCAAG
TGTACCG (配列番号200) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ
を含み、4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されて
いる。いくつかの実施形態では、キットは、ALK遺伝子における変異に特異的なcDN
Aを生成するのに好適な第1のプライマーであって、第1のプライマーは、配列AGTT
GGGGTTGTAGTTCGGTCAAT (配列番号363) またはGAAGCCTCCC
TGGATCTCC (配列番号364) を含む、第1のプライマー; 及びTATGGAG
CAAAACTACTGTAGAGCC (配列番号357)、CCAGCTACATCA
CACACCTTGACT (配列番号358)、及びTAATACCAAAAGTTAC
CAAAACTGCA (配列番号359) からなる群から選択される配列を含むALK遺
伝子における変異に特異的な第2のプライマーをさらに含む。いくつかの実施形態では、
ROS遺伝子における変異は、CD74-ROS、及びSLC34A2-ROSからなる
群から選択されるROS融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ROS遺伝子にお
ける変異は、CD74 E6:ROS E32、CD74 E6:ROS E34、SL
C34A2 E4:ROS E32、及びSLC34A2 E4:ROS E34融合遺
伝子を含む。いくつかの実施形態では、ROS遺伝子における変異に特異的なプローブは
、(1) ACTGACGCTCCACCGAAAA (配列番号201)、CCACTGAC
GCTCCACCGA (配列番号203)、GCTGGAGTCCCAAAATAAAC (配
列番号205)、GGAGTCCCAAAATAAACAG (配列番号207)、及び
CACCGAAAGCTGGAGTCCC (配列番号209) からなる群から選択される
配列を含む第1のプローブ; (2) CCGAAAGATGATTTTT (配列番号211)
、GACGCTCCACCGAAAA (配列番号213)、ACTGACGCTCCACCG
GA (配列番号215)、GATGATTTTTTGGATA (配列番号217)、及びT
GATTTTTTGGATACCA (配列番号219) からなる群から選択される配列を含
む第2のプローブ; (3) AGCGCCTTCCAGCTGGTTTGA (配列番号22
1)、CTGGTTTGGAGCTGGAGTCCC (配列番号223)、AGTAGCG
CCTTCCAGCTGGTTG (配列番号225)、GCTGGAGTCCCAAAAT
AAACCA (配列番号227)、及びGGAGTCCCAAAATAAACAGG (配
列番号229) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ; 及び (4) GCG
CCTTCCAGCTGGTTG (配列番号231)、GTAGCGCCTTCCAGC
TGGT (配列番号233)、TGGTTTGGAGATGATTTTTT (配列番号235
)、GATGATTTTTTGGATACAG (配列番号237)、及びTGATTTTT
TGGATACCA (配列番号239) からなる群から選択される配列を含む第4のプロ
ーブを含み、4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合さ
れている。いくつかの実施形態では、4つのプローブの各々は、5'末端に8ヌクレオチ
ドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチ

10

20

30

40

50

ドである。いくつかの実施形態では、ROS遺伝子における変異に特異的なプローブは、(1) TTTTCTGACGCTCCACCGAAA (配列番号202)、TTTTTCTGACGCTCCACCGA (配列番号204)、TTTTTGCTGGAGTCCCATAAAC (配列番号206)、TTTTTGAGTCCCATAAACAG (配列番号208)、及びTTTTTCACCGAAAGCTGGAGTCCC (配列番号210) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2) TTTTCTGACGCTCCACCGAAA (配列番号214)、TTTTTCTGACGCTCCACCGA (配列番号216)、TTTTTGATGATTGATA (配列番号218)、及びTTTGTGATACCA (配列番号220) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；(3) TTTTAGCGCCTTCCAGCTGGTTGGA (配列番号222)、TTTCTGGTTGGAGCTGGAGTCCC (配列番号224)、TTTAGTAGCGCCTTCCAGCTGGTTG (配列番号226)、TTTTTGCTGGAGTCCCATAAACCA (配列番号228)、及びTTTGGAGTCCCATAAACAGG (配列番号230) からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；及び(4) TTGCGCCTTCCAGCTGGTTG (配列番号232)、TTGTAGCGCCTTCCAGCTGGT (配列番号234)、TTGGTTGGAGATGATTTT (配列番号236)、TTGATGATTTTGGATACCAAG (配列番号238)、及びTTGATTTTGGATACCA (配列番号240) からなる群から選択される配列を含む第4のプローブを含み、4つのプローブの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、キットは、ROS遺伝子における変異に特異的なcDNAを生成するのに好適な第1のプライマーであって、第1のプライマーは、配列AATTCATATCTAGCTTCTCCACTGTATTGAA (配列番号21) またはAATATTTCTGGTACGAGTGGGATTGTACAACCAGAAATA (配列番号22) を含む、第1のプライマー；及び配列GGAGTGCCATCGCTGTTTGAATGAGCAGGCACT (配列番号19) またはTACAGCCCTGGATATCTTTAGTAGCGC (配列番号20) を含むROS遺伝子における変異に特異的な第2のプライマーをさらに含む。いくつかの実施形態では、RET遺伝子における変異は、KIF5B-RETからなる群から選択されるRET融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、RET遺伝子における変異は、KIF5B E15:RET E11、KIF5B E15:RET E12、KIF5B E16:RET E12、KIF5B E22:RET E12、及びKIF5B E23:RET E12融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、RET遺伝子における変異に特異的なプローブは、(1) GTGGGAATAATGATGTAAA (配列番号241)、CTGTGGGAATAATGATGTA (配列番号243)、GATCCACTGTGCGACGAGCT (配列番号245)、TGATGTAAAGATCCACTGTG (配列番号247)、及びTCCACTGTGCGACGAGCTGT (配列番号249) からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；(2) TGGGAATAATGATGTAAA (配列番号251)、CTGTGGGAATAATGATGTA (配列番号253)、GGAGGATCCAAGTGGAAT (配列番号255)、GGATCCAAGTGGAATT (配列番号257)、及びATGATGTAAAGGAGGATCC (配列番号259) からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；(3) CTTCTCATCTCTCAAGAGGATC (配列番号481)、GTATCTCTCAAGAGGATCAA (配列番号483)、TTCGTATCTCTCAAGAG (配列番号485)、TCAAGAGGATCCAAA (配列番号487)、及びTCTCTCAAGAGG (

配列番号489)からなる群から選択される配列を含む第3のプロープ；(4)GTTAA
AAAAGGAGGATCCAA(配列番号491)、ACAAGAGTTTAAAAAG
GAGGA(配列番号493)、AAGAGTTTAAAAAGGAGGATC(配列番号
495)、AAAAGGAGGATCCAAAG(配列番号497)、及びAAGGAG
GATCCAAAGTG(配列番号499)からなる群から選択される配列を含む第4の
プロープ；及び(5)AAACAGGAGGATCCAAA(配列番号501)、AAG
TGCACAAAACAGGAGG(配列番号503)、GTGCACAAAACAGGAG
GATC(配列番号505)、CACAAACAGGAGGAT(配列番号507)、及
びAACAGGAGGATCCAAA(配列番号509)からなる群から選択される配列
を含む第5のプロープを含み、5つのプロープの各々は、異なる識別子を有するマイクロ
キャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、4つのプロープの各々は、5'末
端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたは
チミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、RET遺伝子における変異に特異
的なプロープは、(1)TTTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAA
A(配列番号242)、TTTTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGT
A(配列番号244)、TTTTTTTTTTTGTATCCACTGTGCGACGAGC
T(配列番号246)、TTTTTTTTTTTGTATGTAAAGATCCACTGT
G(配列番号248)、及びTTTTTTTTTTTCTCCACTGTGCGACGAGC
TGT(配列番号250)からなる群から選択される配列を含む第1のプロープ；(2)
TTTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAA(配列番号252)、TT
TTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTAA(配列番号254)、TTT
TTTTTTTTTGAGGATCCAAAGTGGAAT(配列番号256)、TTTT
TTTTTTGGATCCAAAGTGGAATT(配列番号258)、及びTTTTT
TTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC(配列番号260)からなる群から選
択される配列を含む第2のプロープ；(3)TTTTTTTTTTTCTTCGTATCTC
TCAAGAGGAT(配列番号482)、TTTTTTTTTTTGTATCTCTCAA
GAGGATCCAA(配列番号484)、TTTTTTTTTTTCTTCGTATCTCT
CAAGAG(配列番号486)、TTTTTTTTTTTCAAGAGGATCCAAA
(配列番号488)、及びTTTTTTTTTTTCTCTCAAGAGG(配列番号49
0)からなる群から選択される配列を含む第3のプロープ；(4)TTTTTTTTTTTG
TTAAAAAGGAGGATCCAA(配列番号492)、TTTTTTTTTTTACAA
GAGTTTAAAAAGGAGGA(配列番号494)、TTATTATTAAAGAGT
TAAAAAGGAGGATC(配列番号811)、TTTTTTTTTTTAAAAAGGAG
GATCCAAAG(配列番号498)、及びTTTTTTTTTTTAAAGGAGGATCC
AAAGTG(配列番号500)からなる群から選択される配列を含む第4のプロープ；
及び(5)TTTTTTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA(配列番号502)、
TTTTTTATTAAAGTGCACAAAACAGGAGG(配列番号504)、TATT
ATTATGTGCACAAAACAGGAGGATC(配列番号506)、TATTTT
TTCACAAACAGGAGGAT(配列番号508)、及びTTTTATTTTAAC
AGGAGGATCCAAA(配列番号510)からなる群から選択される配列を含む第
5のプロープを含み、5つのプロープの各々は、異なる識別子を有するマイクロキャリア
に結合されている。いくつかの実施形態では、キットは、RET遺伝子における変異に特
異的なcDNAを生成するのに好適な第1のプライマーであって、第1のプライマーは、
配列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC(配列番号26
)またはCTCTAGGAGATATCATTTCCAAATTTCGCCCTTCTCTCTA
G(配列番号27)を含む、第1のプライマー；及びTTTCTGGTGCTATGAG
GAAATGACCAACCAACCAAGA(配列番号23)、AAGGAGTTAGCA
GCATGTCAGC(配列番号519)、AACTTTCAGACTTTTACACAAC
CTGC(配列番号520)、及びATTGATTCTGATGACACCGGA(配列
番号521)からなる群から選択される配列を含むRET遺伝子における変異に特異的な

10

20

30

40

50

第2のプライマーをさらに含む。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における変異は、CD74-NTRK1融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における変異は、CD74 E8:NTRK1 E12融合遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における変異に特異的なプローブは、CAGGATCTGGGCCCCAGACA（配列番号261）、GATCTGGGCCCCAGACACTA（配列番号263）、CCAGACACTAACAGCACAT（配列番号265）、GGGCCCCAGACACTAACAGC（配列番号267）、及びCTAACAGCACATCTGGAGA（配列番号269）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における変異に特異的なプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子における変異に特異的なプローブは、TTTTTTTTTTTACAGGATCTGGGCCCCAGACA（配列番号262）、TTTTTTTTTTTAGATCTGGGCCCCAGACACTA（配列番号264）、TTTTTTTTTTTACCAGACACTAACAGCACAT（配列番号266）、TTTTTTTTTTTAGGGGCCCCAGACACTAACAGC（配列番号268）、及びTTTTTTTTTTTACTAACAGCACATCTGGAGA（配列番号270）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、キットは、NTRK1遺伝子における変異に特異的なcDNAを生成するのに好適な第1のプライマーであって、第1のプライマーは、配列GGACGAAATCCAGACCCCAAGGTGTTTCGT（配列番号32）を含む、第1のプライマー；及び配列AGAAGACGTGACAGGAAGTGGAGGACCCGTCCTT（配列番号30）を含むNTRK1遺伝子における変異に特異的な第2のプライマーをさらに含む。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における変異は、エクソスキッピングをもたらす。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における変異は、エクソン14のスキッピングをもたらす。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における変異に特異的なプローブは、AGAAAGCAAAATTAAGAT（配列番号271）、AGCAAAATTAAGATCAG（配列番号273）、AAATTAAGATCAGTTTC（配列番号275）、AGATCAGTTTCTTAATTTC（配列番号277）、及びAAGATCAGTTTCTTAATTTC（配列番号279）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における1つ以上の変異に特異的なプローブは、5'末端に8ヌクレオチドをさらに含み、5'末端における8ヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子における変異に特異的なプローブは、TTTTTTTTTTTAGAAAGCAAAATTAAGAT（配列番号272）、TTTTTTTTTTTAGCAAAATTAAGATCAG（配列番号274）、TTTTTTTTTTTAAATTAAGATCAGTTTC（配列番号276）、TTTTTTTTTTTAGATCAGTTTCTTAATTTC（配列番号278）、及びTTTTTTTTTTTAAAGATCAGTTTCTTAATTTC（配列番号280）からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、キットは、cMET遺伝子における変異に特異的なcDNAを生成するのに好適な第1のプライマーであって、第1のプライマーは、配列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA（配列番号29）を含む、第1のプライマー；及び配列GAATTTCAACAGGATTGATTGCTGGTGTGTCTTC（配列番号28）を含むcMET遺伝子における変異に特異的な第2のプライマーをさらに含む。

【0037】

本明細書に記載の実施形態のいずれかによるいくつかの実施形態では、マイクロキャリアの識別子は、デジタルバーコードを含む。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの各々は、(i)第1のフォトリソ層；(ii)第2のフォトリソ層；及び(iii)第1の層と第2の層との間の中間層であって、中間層は、それに定義された識別子を表すコードされたパターンを有し、中間層は、光に対して部分的に実質的に透過性であり、かつ部分的に実質的に不透明であることで、マイクロキャリアに対応するコードを表

し、マイクロキャリアの最外表面は、フォトレジストフォトポリマーを含み、前記フォトレジストフォトポリマーは、DNA変異に特異的なプローブで官能化されており、前記マイクロキャリアは、水とおおよそ同じ密度を有する、中間層を含む。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの識別子は、アナログコードを含む。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの各々は、(i) 第1の表面及び第2の表面を有する実質的に透明なポリマー層であって、第1及び第2の表面は、互いに平行である、実質的に透明なポリマー層；(ii) 二次元形状を構成する実質的に非透明な層であって、実質的に非透明な層は、実質的に透明なポリマー層の第1の表面に付着されており、実質的に透明なポリマー層の中央部分を包囲し、実質的に非透明な層の二次元形状は、アナログコードを表し、アナログコードは、識別子に対応する、実質的に非透明な層；及び(iii) 変異に特異的なプローブであって、プローブは、実質的に透明なポリマー層の少なくとも中央部分における実質的に透明なポリマー層の第1の表面及び第2の表面の少なくとも一方に結合されている、プローブを含む。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの各々は、実質的に非透明なポリマー層のアナログコードを配向させるための配向指標をさらに含む。いくつかの実施形態では、実質的に透明なポリマー層のポリマーは、エポキシベースのポリマーを含む。いくつかの実施形態では、エポキシベースのポリマーは、SU-8である。

10

20

30

40

50

【0038】

別の態様では、本明細書では、キットであって、(a) 複数のプローブであって、複数の各プローブは、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアは、それに結合したプローブに対応する独自の識別子を有し、複数のプローブは、配列TTTTTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCT(配列番号39)を含む第1のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGA(配列番号57)を含む第2のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC(配列番号63)を含む第3のプローブ；配列TTTTTTTTTCTGCTCAGTGATTTTA(配列番号94)を含む第4のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTATCTCCTGCTTAG(配列番号102)を含む第5のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTAATGATGCACGTCA(配列番号114)を含む第6のプローブ；配列TTTTTTTAATTCACAGAGAAATCTCGA(配列番号82)を含む第7のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTAGTGCTGGCCT(配列番号124)を含む第8のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTACAAACATCTCCG(配列番号131)を含む第9のプローブ；配列TTTTTTTTTTTAATCAAGACATCTC(配列番号141)を含む第10のプローブ；配列TTTTTTTTTTTCATGAGATGCATGATGA(配列番号356)を含む第11のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCGCA(配列番号464)を含む第12のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTACAGGAGGGAGCCG(配列番号478)を含む第13のプローブ；配列TTTTTTTTTTAGATGGCCATCTTG(配列番号426)を含む第14のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTGTGATGGCCGG(配列番号432)を含む第15のプローブ；配列TTTTTTTTTTTGACAACCCCATCAC(配列番号450)を含む第16のプローブ；配列TTTTTTTTTTTGCCAGCGTGGAACGGTA(配列番号460)を含む第17のプローブ；配列TTTTTTTTTTTAAATGGGCGGGCCA(配列番号160)を含む第18のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTGTAAGGAAGTACA(配列番号371)を含む第19のプローブ；配列TTTTTTAAATCAGAAATCAGAAAGGTGG(配列番号396)を含む第20のプローブ；配列TTTTTTAAATCAGAAATCAGAAAGGTGG(配列番号396)を含む第20のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTACGTGATGGCTTACGT(配列番号407)を含む第21のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTAGTGTAACCGCCGGA(配列番号168)を含む第22のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTGACTATGAATAATTGTAC(配列番号172)を含む第23のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTACCGCCGGAAGCACCA(配列番号190)を含む第24のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTGTTGTAACCGC

CGGAAGC（配列番号196）を含む第25のプローブ；配列TTTTTTTTTT
TGCTGGAGTCCCAATAAAC（配列番号206）を含む第26のプローブ
；配列TTTTTTTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAA（配列番号214）を
含む第27のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTGAGTCCCAATAAAC
CCAGG（配列番号230）を含む第28のプローブ；配列TTTTTTTTTTTGA
TGATTTTTTGGAATACCAG（配列番号238）を含む第29のプローブ；配列
TTTTTTTTTTTTTGTGGGAATAATGATGTA（配列番号242）を
含む第30のプローブ；配列TTTTTTTTTTCTGTGGGAATAATGATG
TA（配列番号254）を含む第31のプローブ；配列TTTTTTTTTTCTCTC
AAGAGG（配列番号490）を含む第32のプローブ；配列TTTTTTTAAG
GAGGATCCAAAGTG（配列番号500）を含む第33のプローブ；配列TTT
TTTTTAACAAGGAGGATCCAAA（配列番号502）を含む第34のプロ
ーブ；配列TTTTTTTTTTTACCAGACACTAACAGCACAT（配列番号
266）を含む第35のプローブ；配列TTTTTTTAGAAAGCAAAATT
AAAGAT（配列番号272）を含む第36のプローブを含む、複数のプローブ；（b）
複数のプライマー対であって、複数のプライマー対は、配列GTACTGGTGGAG
TATTTGATAGTG（配列番号1）及びCGTCAAGGCACCTCTTGCCCT
AC（配列番号2）を含む第1のプライマー対；配列CAATTTCTACAAGAGA
TCCCTCTCTCT（配列番号5）及びCTCCATTTTAGCACCTTACCTG
TGAC（配列番号6）を含む第2のプライマー対；配列ACCCTAGCCTTAGA
TAAAACTGAGC（配列番号7）及びTTTGTTGTCCAGCCACCATG
A（配列番号8）を含む第3のプライマー対；配列ATAGCCTCAATTTCTTAC
CATCCACAATAATG（配列番号9）及びCAGATATATTTCTTTCATG
AAGACCTCACAGTAA（配列番号10）を含む第4のプライマー対；配列CT
TGTGGAGCCTCTTACACCC（配列番号11）及びTGCCGAACGCA
CCGGA（配列番号12）を含む第5のプライマー対；配列GCCAGTTAAAGT
CTTCTCTCTC（配列番号13）及びATCGAGGATTTCTTGTGTTGG
CTT（配列番号14）を含む第6のプライマー対；配列CCTCCACCGTGCA
GATCATC（配列番号15）及びTTCCTGTATTACCTTTGCGAT（配列
番号16）を含む第7のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCTCT（配
列番号511）及びGCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA（配列番号512）
を含む第8のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCTCT（配列番号5
13）及びGTACACGCTGGCCACGCCG（配列番号514）を含む第9のプ
ライマー対；配列CCACACTGACGTGCCTCT（配列番号515）及びCAG
GCGGCACACGTGAT（配列番号516）を含む第10のプライマー対；配列C
CACACTGACGTGCCTCT（配列番号517）及びAGGCGGCACACG
TGCGGGTTAC（配列番号518）を含む第11のプライマー対；配列GGAGG
ACCGTCGCTTGG（配列番号17）及びTCTTTCTCTTCCGCACCC
AG（配列番号18）を含む第12のプライマー対；配列GAGGGTCTGACGGG
TAGAGTG（配列番号380）及びTGGCCGCCAGGTCTTGATGTA（
配列番号381）を含む第13のプライマー対；配列CTTGATGAGCAGCAGC
GAAA（配列番号397）及びCCTTCAGTTCTCCCACTTCTG（配列
番号398）を含む第14のプライマー対；配列ATGGCTGTGGTTTGTGAT
GGT（配列番号414）及びACACCAGCCATCACGTAAGACA（配列番
号415）を含む第15のプライマー対；配列AGTTGGGGTTGTAGTCGGT
CAT（配列番号363）及びTATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC（
配列番号357）を含む第16のプライマー対；配列AGTTGGGGTTGTAGTC
GGTCAT（配列番号363）及びCCAGCTACATCACACACCTTGAC
T（配列番号358）を含む第17のプライマー対；配列AGTTGGGGTTGTAG
TCGGTCAT（配列番号363）及びTAATACCAAAGTTACCAAAA

10

20

30

40

50

CTGCA（配列番号359）を含む第18のプライマー対；配列GGAGTGCCATCGCTGTTTGA AATGAGCAGGCACT（配列番号19）を含む第19のプライマー対；配列GGAGTGCCATCGCTGTTTGA AATGAGCAGGCACT（配列番号19）を含む第20のプライマー対；配列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC（配列番号20）を含む第21のプライマー対；配列TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC（配列番号20）を含む第22のプライマー対；配列GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC（配列番号26）及びTTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCAC CAGA（配列番号23）を含む第23のプライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAA AATTCGCCCTTCTCCTAG（配列番号27）及びTTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCAC CAGA（配列番号23）を含む第24のプライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAA AATTCGCCCTTCTCCTAG（配列番号27）及びAAGGAGTTAGCAGCATGTCAGC（配列番号519）を含む第25のプライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAA AATTCGCCCTTCTCCTAG（配列番号27）及びAACTTCAGACTTTACACAACCTGC（配列番号520）を含む第26のプライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAA AATTCGCCCTTCTCCTAG（配列番号27）及びATTGATTCTGATGACACCCGGA（配列番号521）を含む第27のプライマー対；配列GGACGAA AATCCAGACCCCA A AAGGTGTTTCGT（配列番号32）及びAGAAAGACGTGACAGGA A CTGGAGGACCCGTCTT（配列番号30）を含む第28のプライマー対；配列GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA（配列番号29）及びGAATTTTACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC（配列番号28）を含む第29のプライマー対を含む、複数のプライマー対；及び（c）複数のブロック核酸であって、複数のブロック核酸は、

10

20

30

40

50

【化 2 1】

配列 $TTGGA GCTGGTGGCGT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である)
 (配列番号 285) を含む第 1 のブロック核酸；配列 $CTGAAATCACTGAGCAGG$
 ($invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 291) を含む第 2 のブロック
 核酸；配列 $CCACCATGATGTGCA TCA (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3
 である) (配列番号 299) を含む第 3 のブロック核酸；配列 $GAGATTTCAC TGTAGC$
 ($invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 301) を含む第 4 のブロッ
 ック核酸；配列 $CGCACCGGAGCCCA GCACTTA (invdT)_n$ (n は 1、
 2、または 3 である) (配列番号 310) を含む第 5 のブロック核酸；配列 $CGGAGATG$
 $TTGCTTC TCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 312)
 を含む第 6 のブロック核酸；配列 $TGCAGCTCATCACGCAGC (invdT)_n$
 (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 317) を含む第 7 のブロック核酸；配列 CCA
 $GCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配
 列番号 322) を含む第 8 のブロック核酸；配列 $GATGTACTCCCCCT (invdT)$
 $_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 383) を含む第 9 のブロック核酸；配列 CA
 $CC TTC TGC TTC TGG GTAAGA (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 であ
 る) (配列番号 403) を含む第 10 のブロック核酸

を含む、複数のブロック核酸を含む、キットが提供される。

【0039】

別の態様では、本明細書では、キットであって、(a) 複数のプローブであって、複数
 の各プローブは、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアは、それに結合
 したプローブに対応する独自の識別子を有し、複数のプローブは、配列 $TTTTTTTTT$
 $TTTTTAATGATGGCGTAG$ (配列番号 43) を含む第 1 のプローブ；配列 $TTTT$
 $TTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG$ (配列番号 51) を含む第 2 のプロー
 ブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTTAATTGTGGCGTAGG$ (配列番号 65) を含む
 第 3 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG$ (配列番号
 88) を含む第 4 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTGCTTAG$
 TG (配列番号 104) を含む第 5 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTTTTTGAT$
 $GACGTC$ (配列番号 112) を含む第 6 のプローブ；配列 $TTTTTTTAATTG$
 $AGAAATCTCGATGGAG$ (配列番号 78) を含む第 7 のプローブ；配列 $TTTT$
 $TTTAGATCAAAGTGCTGGCCCTCCG$ (配列番号 120) を含む第 8 のプ
 ローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC$ (配列
 番号 135) を含む第 9 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTTCAAGACATCT$
 $CCGA$ (配列番号 145) を含む第 10 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTGA$
 $GATGCATGATGA$ (配列番号 352) を含む第 11 のプローブ；配列 $TTTTTT$
 $TTTTTTTACAGGAGGCTGCC$ (配列番号 470) を含む第 12 のプローブ；
 配列 $TTTTTTTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCCG$ (配列番号 474) を含む
 第 13 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTATGGCCATCTTGG$ (配列番号 42
 2) を含む第 14 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTTTTTGATGGCCCCGCG$

T G (配列番号 440) を含む第 15 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T C C C
A T C A C G T G T (配列番号 448) を含む第 16 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T
T T T G A C G G T A A C C C C C (配列番号 456) を含む第 17 のプローブ ; 配列 T
T T T T T T A T T T T G G G C G G G C C (配列番号 152) を含む第 18 のプローブ
; 配列 T T T T T T T T T T T T C T G T A G G G A A G T A C (配列番号 373) を含
む第 19 のプローブ ; 配列 T T T T T A A A T T T C T T A C C C A G A A T C A (配列
番号 392) を含む第 20 のプローブ ; 配列 T T T T T A A G C A T A C G T G A T G G
C T (配列番号 409) を含む第 21 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T G G G A A
A G G A C C T A A A G (配列番号 166) を含む第 22 のプローブ ; 配列 T T T T T T
T T T T T T C C G C C G G A A G C A C C A G G A (配列番号 180) を含む第 23 の
プローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T G T G T A C C G C C G G A A G C (配列
番号 186) を含む第 24 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T C G A A A A A
A A C A G C C A A (配列番号 192) を含む第 25 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T
T T T A C T G A C G C T C C A C C G A A A (配列番号 202) を含む第 26 のプロ
ーブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T G A C G C T C C A C C G A A A (配列番号 214)
を含む第 27 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T A G C G C C T T C C A G C T
G G T T G G A (配列番号 222) を含む第 28 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T
T G A T T T T T G G A T A C C A (配列番号 240) を含む第 29 のプローブ ; 配列 T
T T T T T T T T T T C C A C T G T G C G A C G A G C T G T (配列番号 250) を含
む第 30 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T G G A T C C A A A G T G G G A A T T (配
列番号 258) を含む第 31 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T C A A G A G G A
T C C A A A (配列番号 488) を含む第 32 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T A C A
A G A G T T A A A A A G G A G G A (配列番号 494) を含む第 33 のプローブ ; 配列
T T T T T A T T A A G T G C A C A A A C A G G A G G (配列番号 504) を含む第 3
4 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T A C T A A C A G C A C A T C T G G A G A (配
列番号 270) を含む第 35 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T A G A T C A G T
T T C C T A A T T C (配列番号 278) を含む第 36 のプローブを含む、複数のプロ
ーブ ; (b) 複数のプライマー対であって、複数のプライマー対は、配列 G T A C T G G T
G G A G T A T T T G A T A G T G (配列番号 1) 及び C G T C A A G G C A C T C T T
G C C T A C (配列番号 2) を含む第 1 のプライマー対 ; 配列 C A A T T T C T A C A A
G A G A T C C T C T C T C T (配列番号 5) 及び C T C C A T T T T A G C A C T T A
C C T G T G A C (配列番号 6) を含む第 2 のプライマー対 ; 配列 A C C C T A G C C T
T A G A T A A A A C T G A G C (配列番号 7) 及び T T T G T T G T C C A G C C A C
C A T G A (配列番号 8) を含む第 3 のプライマー対 ; 配列 A T A G C C T C A A T T C
T T A C C A T C C A C A A A A T G (配列番号 9) 及び C A G A T A T A T T T C T T
C A T G A A G A C C T C A C A G T A A (配列番号 10) を含む第 4 のプライマー対 ;
配列 C T T G T G G A G C C T C T T A C A C C C (配列番号 11) 及び T G C C G A A
C G C A C C G G A (配列番号 12) を含む第 5 のプライマー対 ; 配列 G C C A G T T A
A C G T C T T C C T T C T C (配列番号 13) 及び A T C G A G G A T T T C C T T G
T T G G C T T (配列番号 14) を含む第 6 のプライマー対 ; 配列 C C T C C A C C G T
G C A G A T C A T C (配列番号 15) 及び T T C C C T G A T T A C C T T T G C G A
T (配列番号 16) を含む第 7 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T
C T (配列番号 511) 及び G C A C A C G T A G G G G T T G T C C A A G A (配列番
号 512) を含む第 8 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配
列番号 513) 及び G T A C A C G C T G G C C A C G C C G (配列番号 514) を含む
第 9 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 515) 及
び C A G G C G G C A C A C G T G A T (配列番号 516) を含む第 10 のプライマー対
; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 517) 及び A G G C G G C A
C A C G T G C G G G T T A C (配列番号 518) を含む第 11 のプライマー対 ; 配列 G
G A G G A C C G T C G C T T G G (配列番号 17) 及び T C T T T C T C T T C C G C

10

20

30

40

50

A C C C A G (配列番号 18) を含む第 12 のプライマー対; 配列 G A G G G T C T G A
C G G G T A G A G T G (配列番号 380) 及び T G G C C G C C A G G T C T T G A T
G T A (配列番号 381) を含む第 13 のプライマー対; 配列 C T T G A T G A G C A G
C A G C G A A A (配列番号 397) 及び C C T T C A G T T C T C C C A C C T T C T
G (配列番号 398) を含む第 14 のプライマー対; 配列 A T G G C T G T G G T T T G
T G A T G G T (配列番号 414) 及び A C A C C A G C C A T C A C G T A A G A C A
(配列番号 415) を含む第 15 のプライマー対; 配列 A G T T G G G G T T G T A G T
C G G T C A T (配列番号 363) 及び T A T G G A G C A A A A C T A C T G T A G A
G C C (配列番号 357) を含む第 16 のプライマー対; 配列 A G T T G G G G T T G T
A G T C G G T C A T (配列番号 363) 及び C C A G C T A C A T C A C A C A C C T
T G A C T (配列番号 358) を含む第 17 のプライマー対; 配列 A G T T G G G G T T
G T A G T C G G T C A T (配列番号 363) 及び T A A T A C C A A A A G T T A C C
A A A A C T G C A (配列番号 359) を含む第 18 のプライマー対; 配列 G G A G T G
C C A T C G C T G T T T G A A A T G A G C A G G C A C T (配列番号 19) を含む第
19 のプライマー対; 配列 G G A G T G C C A T C G C T G T T T G A A A T G A G C A
G G C A C T (配列番号 19) を含む第 20 のプライマー対; 配列 T A C A G C C C T G
G A T A T T C T T A G T A G C G C (配列番号 20) を含む第 21 のプライマー対; 配
列 T A C A G C C C T G G A T A T T C T T A G T A G C G C (配列番号 20) を含む第
22 のプライマー対; 配列 G T G A T C G C A C A G T A G G A C A G C G G C T G C G
A T C (配列番号 26) 及び T T T C T G G T G C T A T G A G G A A A T G A C C A A
C C A C C A G A (配列番号 23) を含む第 23 のプライマー対; 配列 C T C T A G G A
G A T A T C A T T C C A A A T T C G C C T T C T C C T A G (配列番号 27) 及び T
T T C T G G T G C T A T G A G G A A A T G A C C A A C C A C C A G A (配列番号 2
3) を含む第 24 のプライマー対; 配列 C T C T A G G A G A T A T C A T T C C A A A
T T C G C C T T C T C C T A G (配列番号 27) 及び A A G G A G T T A G C A G C A
T G T C A G C (配列番号 519) を含む第 25 のプライマー対; 配列 C T C T A G G A
G A T A T C A T T C C A A A T T C G C C T T C T C C T A G (配列番号 27) 及び A
A C T T C A G A C T T T A C A C A A C C T G C (配列番号 520) を含む第 26 のプ
ライマー対; 配列 C T C T A G G A G A T A T C A T T C C A A A T T C G C C T T C T
C C T A G (配列番号 27) 及び A T T G A T T C T G A T G A C A C C G G A (配列番
号 521) を含む第 27 のプライマー対; 配列 G G A C G A A A A T C C A G A C C C C
A A A A G G T G T T T C G T (配列番号 32) 及び A G A A G A C G T G A C A G G A
A C T G G A G G A C C C G T C T T (配列番号 30) を含む第 28 のプライマー対; 配
列 G A C A G T A T T T T G C A G T A A T G G A C T G G A T A T A T C A G A (配列
番号 29) 及び G A A T T T C A C A G G A T T G A T T G C T G G T G T T G T C T C
(配列番号 28) を含む第 29 のプライマー対を含む、複数のプライマー対; 及び (c)
複数のブロック核酸であって、複数のブロック核酸は、

10

20

30

40

50

【化 2 2】

配列TTGGA GCTGGTGGCGTA (invdT)_n (nは1、2、または3である)

(配列番号282)を含む第1のブロック核酸；配列TCTCTGAAATCACTGAGC
AGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号294)を含む第2のブ
ロック核酸；配列CCACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、2、または
3である) (配列番号297)を含む第3のブロック核酸；配列GAGATTTCACGTG
AGC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号305)を含む第4のブ
ロック核酸；配列CGCACCGGAGCCAGCAC (invdT)_n (nは1、2、ま
たは3である) (配列番号309)を含む第5のブロック核酸；配列GTTGCTTCCTC
TAATTCC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号313)を含む
第6のブロック核酸；配列CTCATCACGCAGC (invdT)_n (nは1、2、また
は3である) (配列番号320)を含む第7のブロック核酸；配列CCAGCAGTTTGG
CCAGCCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号325)を含
む第8のブロック核酸；配列；GATGTACTCCCC TACA (invdT)_n (nは
1、2、または3である) (配列番号386)を含む第9のブロック核酸；配列CACCTT
CTGCTTC TGGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号40
1)を含む第10のブロック核酸

10

20

を含む、複数のブロック核酸を含む、キットが提供される。

【0040】

別の態様では、本明細書では、キットであって、(a)複数のプローブであって、複数
の各プローブは、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアは、それに結合
したプローブに対応する独自の識別子を有し、複数のプローブは、配列TTTTTTTT
TTTATGGAGCTGATGGC (配列番号45)を含む第1のプローブ；配列TTTT
TTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC (配列番号53)を含む第2のプロー
ブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC (配列番号63)を含む
第3のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAGA (配列番
号96)を含む第4のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTA
GT (配列番号100)を含む第5のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTAATG
ATGCACGTC (配列番号116)を含む第6のプローブ；配列TTTTTTTAAT
TTCTAGCTACAGAGAAAT (配列番号86)を含む第7のプローブ；配列T
TTTTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCCTC (配列番号118)を含む第8のプ
ローブ；配列TTTTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCG (配列番号127)
を含む第9のプローブ；配列TTTTTTTTTTAATCAAGACATCTCCGA (配
列番号137)を含む第10のプローブ；配列TTTTTTTTTTTGAGATGCAT
GATGAG (配列番号353)を含む第11のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTT
ACCAGGAGGCTGCC (配列番号468)を含む第12のプローブ；配列TTTT
TTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCC (配列番号472)を含む第13のプロ
ーブ；配列TTTTTTTTTTTAGGCCATCTTGGA (配列番号424)を含む
第14のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTGTGATGGCCGGCGT (配列番

30

40

50

号 4 3 6) を含む第 1 5 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T A A C C C C C A T C
A C G T (配列番号 4 4 2) を含む第 1 6 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T C G
T G G A C G G T A A C C (配列番号 4 5 4) を含む第 1 7 のプローブ ; 配列 T T T T T
T T A A A A A G C G G G C C A A A C T (配列番号 1 5 6) を含む第 1 8 のプローブ
; 配列 T T T T T T T T T A C G T C T G T A G G G A A G T A (配列番号 3 7 9) を含む
第 1 9 のプローブ ; 配列 T T T T T A A A T T T A C C C A G A A T C A G A A (配列番
号 3 8 8) を含む第 2 0 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T A T A C G T G A T G T C
T T A C (配列番号 4 0 5) を含む第 2 1 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T C C T
A A A G T G T A C C G C (配列番号 1 6 4) を含む第 2 2 のプローブ ; 配列 T T T T T
T T T T T T T T T A T T G T A C T T G T A C C G C C (配列番号 1 7 6) を含む第 2 3
のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T T C A A C C A A G T G T A C C G (配
列番号 1 8 8) を含む第 2 4 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T T A C A G C
C A A G T G T A C C G (配列番号 2 0 0) を含む第 2 5 のプローブ ; 配列 T T T T T T
T T T T T C A C C G A A A G C T G G A G T C C C (配列番号 2 1 0) を含む第 2 6 の
プローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T T C C G A A A G A T G A T T T T (配列番号 2
1 2) を含む第 2 7 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T T C T G G T T G G A G C
T G G A G T C C C (配列番号 2 2 4) を含む第 2 8 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T
T T T G G T T G G A G A T G A T T T T T (配列番号 2 3 6) を含む第 2 9 のプローブ
; 配列 T T T T T T T T T T T T G A T G T A A A G A T C C A C T G T G (配列番号 2 4
8) を含む第 3 0 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T A T G A T G T A A A G G A G G
A T C C (配列番号 2 6 0) を含む第 3 1 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T G T A T
C T C T C A A G A G G A T C C A A (配列番号 4 8 4) を含む第 3 2 のプローブ ; 配列
T T A T T A T T A A G A G T T A A A A G G A G G A T C (配列番号 8 1 1) を含む
第 3 3 のプローブ ; 配列 T A T T A T T A T G T G C A C A A A C A G G A G G A T C (配
列番号 5 0 6) を含む第 3 4 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T A G G G C C C A
G A C A C T A A C A G C (配列番号 2 6 8) を含む第 3 5 のプローブ ; 配列 T T T T T
T T T T T A A A T T A A A G A T C A G T T T C (配列番号 2 7 6) を含む第 3 6 のプ
ローブを含む、複数のプローブ ; (b) 複数のプライマー対であって、複数のプライマー
対は、配列 G T A C T G G T G G A G T A T T T G A T A G T G (配列番号 1) 及び C G
T C A A G G C A C T C T T G C C T A C (配列番号 2) を含む第 1 のプライマー対 ; 配
列 C A A T T T C T A C A A G A G A T C C T C T C T C T (配列番号 5) 及び C T C C
A T T T T A G C A C T T A C C T G T G A C (配列番号 6) を含む第 2 のプライマー対
; 配列 A C C C T A G C C T T A G A T A A A A C T G A G C (配列番号 7) 及び T T T
G T T G T C C A G C C A C C A T G A (配列番号 8) を含む第 3 のプライマー対 ; 配列
A T A G C C T C A A T T C T T A C C A T C C A C A A A A T G (配列番号 9) 及び C
A G A T A T A T T T C T T C A T G A A G A C C T C A C A G T A A (配列番号 1 0)
を含む第 4 のプライマー対 ; 配列 C T T G T G G A G C C T C T T A C A C C C (配列番
号 1 1) 及び T G C C G A A C G C A C C G G A (配列番号 1 2) を含む第 5 のプライ
マー対 ; 配列 G C C A G T T A A C G T C T T C C T T C T C (配列番号 1 3) 及び A T C
G A G G A T T T C C T T G T T G G C T T (配列番号 1 4) を含む第 6 のプライマー対
; 配列 C C T C C A C C G T G C A G A T C A T C (配列番号 1 5) 及び T T C C C T G
A T T A C C T T T G C G A T (配列番号 1 6) を含む第 7 のプライマー対 ; 配列 C C A
C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 5 1 1) 及び G C A C A C G T A G G G G T
T G T C C A A G A (配列番号 5 1 2) を含む第 8 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T
G A C G T G C C T C T (配列番号 5 1 3) 及び G T A C A C G C T G G C C A C G C C
G (配列番号 5 1 4) を含む第 9 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C
T C T (配列番号 5 1 5) 及び C A G G C G G C A C A C G T G A T (配列番号 5 1 6)
を含む第 1 0 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 5
1 7) 及び A G G C G G C A C A C G T G C G G G T T A C (配列番号 5 1 8) を含む第
1 1 のプライマー対 ; 配列 G G A G G A C C G T C G C T T G G (配列番号 1 7) 及び T

10

20

30

40

50

C T T T C T C T T C C G C A C C C A G (配列番号18)を含む第12のプライマー対
; 配列 G A G G G T C T G A C G G G T A G A G T G (配列番号380)及び T G G C C
G C C A G G T C T T G A T G T A (配列番号381)を含む第13のプライマー対; 配
列 C T T G A T G A G C A G C A G C G A A A (配列番号397)及び C C T T C A G T
T C T C C C A C C T T C T G (配列番号398)を含む第14のプライマー対; 配列 A
T G G C T G T G G T T T G T G A T G G T (配列番号414)及び A C A C C A G C C
A T C A C G T A A G A C A (配列番号415)を含む第15のプライマー対; 配列 A G
T T G G G G T T G T A G T C G G T C A T (配列番号363)及び T A T G G A G C A
A A A C T A C T G T A G A G C C (配列番号357)を含む第16のプライマー対; 配
列 A G T T G G G G T T G T A G T C G G T C A T (配列番号363)及び C C A G C T
A C A T C A C A C A C C T T G A C T (配列番号358)を含む第17のプライマー対
; 配列 A G T T G G G G T T G T A G T C G G T C A T (配列番号363)及び T A A T
A C C A A A A G T T A C C A A A A C T G C A (配列番号359)を含む第18のプラ
イマー対; 配列 G G A G T G C C A T C G C T G T T T G A A A T G A G C A G G C A C
T (配列番号19)を含む第19のプライマー対; 配列 G G A G T G C C A T C G C T G
T T T G A A A T G A G C A G G C A C T (配列番号19)を含む第20のプライマー対
; 配列 T A C A G C C C T G G A T A T T C T T A G T A G C G C (配列番号20)を含
む第21のプライマー対; 配列 T A C A G C C C T G G A T A T T C T T A G T A G C G
C (配列番号20)を含む第22のプライマー対; 配列 G T G A T C G C A C A G T A G
G A C A G C G G C T G C G A T C (配列番号26)及び T T T C T G G T G C T A T G
A G G A A A T G A C C A A C C A C C A G A (配列番号23)を含む第23のプライマ
ー対; 配列 C T C T A G G A G A T A T C A T T C C A A A T T C G C C T T C T C C T
A G (配列番号27)及び T T T C T G G T G C T A T G A G G A A A T G A C C A A C
C A C C A G A (配列番号23)を含む第24のプライマー対; 配列 C T C T A G G A G
A T A T C A T T C C A A A T T C G C C T T C T C C T A G (配列番号27)及び A A
G G A G T T A G C A G C A T G T C A G C (配列番号519)を含む第25のプライマ
ー対; 配列 C T C T A G G A G A T A T C A T T C C A A A T T C G C C T T C T C C T
A G (配列番号27)及び A A C T T C A G A C T T T A C A C A A C C T G C (配列番
号520)を含む第26のプライマー対; 配列 C T C T A G G A G A T A T C A T T C C
A A A T T C G C C T T C T C C T A G (配列番号27)及び A T T G A T T C T G A T
G A C A C C G G A (配列番号521)を含む第27のプライマー対; 配列 G G A C G A
A A A T C C A G A C C C C A A A A G G T G T T T C G T (配列番号32)及び A G A
A G A C G T G A C A G G A A C T G G A G G A C C C G T C T T (配列番号30)を含
む第28のプライマー対; 配列 G A C A G T A T T T T G C A G T A A T G G A C T G G
A T A T A T C A G A (配列番号29)及び G A A T T T C A C A G G A T T G A T T G
C T G G T G T T G T C T C (配列番号28)を含む第29のプライマー対を含む、複数
のプライマー対; 及び(c)複数のブロック核酸であって、複数のブロック核酸は、

10

20

30

40

50

【化 2 3】

配列 $TACGCCACCAAGCT (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 281) を含む第 1 のブロック核酸; 配列 $TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 293) を含む第 2 のブロック核酸; 配列 $CACCATGATGTGCAT (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 296) を含む第 3 のブロック核酸; 配列 $GAGATT TCACTGTAGC (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 303) を含む第 4 のブロック核酸; 配列 $GAGCCCAGCAC (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 308) を含む第 5 のブロック核酸; 配列 $CGGAGATGTTGCTTCTCTTAA TTCC (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 311) を含む第 6 のブロック核酸; 配列 $CATCACGCAGCTCATG (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 316) を含む第 7 のブロック核酸; 配列 $CCAGCAGTTTGG CCAGCCCT (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 321) を含む第 8 のブロック核酸; 配列 $TGTACTCCCC TACA (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 382) を含む第 9 のブロック核酸; 配列 $TCTGCTTC TG GGTAAAG (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 399) を含む第 10 のブロック核酸

10

20

を含む、複数のブロック核酸を含む、キットが提供される。

30

【0041】

本明細書に記載される様々な実施形態の特性のうちの 1 つ、いくつか、またはすべてを組み合わせ、本発明の他の実施形態を形成し得ることを理解されたい。本発明のこれら及び他の態様は、当業者には明らかとなるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0042】

【図 1 A】例示的なマイクロキャリアの 2 つの図を示している。

【図 1 B】例示的なマイクロキャリアの 2 つの図を示している。

【図 1 C】例示的なマイクロキャリアを使用する DNA 検出のための例示的なアッセイを示している。

【図 1 D】例示的なマイクロキャリアを使用する DNA 検出のための例示的なアッセイを示している。

40

【図 2 A】独自のアナログコードをそれぞれ有するマイクロキャリアの 3 つの例を示している。

【図 2 B】いくつかの実施形態による、独自のアナログコードを有するマイクロキャリアの例を示している。

【図 2 C】いくつかの実施形態による、独自のアナログコードを有するマイクロキャリアの例を示している。

【図 3】いくつかの実施形態による、DNA 変異 (複数可) 及び RNA バリエーション (複数可) の存在を検出するための例示的な方法を示すフローチャートを示している。

【図 4】いくつかの実施形態に従って、対象となる DNA 変異に対応する野生型 (図 4)

50

遺伝子座よりも変異体（図５）を優先的に増幅し、検出するための例示的なスキームを示している。横実線は、増幅されるDNA配列を示しており、横破線は、プライマー／プローブ／ブロック核酸（NA）配列を示しており、縦線は、ワトソン・クリック塩基対形成を示している。

【図５】いくつかの実施形態に従って、対象となるDNA変異に対応する野生型（図４）遺伝子座よりも変異体（図５）を優先的に増幅し、検出するための例示的なスキームを示している。横実線は、増幅されるDNA配列を示しており、横破線は、プライマー／プローブ／ブロック核酸（NA）配列を示しており、縦線は、ワトソン・クリック塩基対形成を示している。

【図６】血液サンプルからRNA及びセルフリーDNA（cfDNA）を単離するための例示的なプロトコルを示すフローチャートを示している。

【図７Ａ】DNA変異の多重検出の結果を示している。値は、それぞれ示されるDNA変異に特異的な増幅されたDNA（列）と、それぞれ示されるDNA変異に特異的なマイクロキャリア結合プローブ（行）とのそれぞれの対合組み合わせについて得られた蛍光シグナル（任意単位、AU）を反映する。

【図７Ｂ】DNA変異の多重検出の結果を示している。値は、それぞれ示されるDNA変異に特異的な増幅されたDNA（列）と、それぞれ示されるDNA変異に特異的なマイクロキャリア結合プローブ（行）とのそれぞれの対合組み合わせについて得られた蛍光シグナル（任意単位、AU）を反映する。

【図７Ｃ】DNA変異の多重検出の結果を示している。値は、それぞれ示されるDNA変異に特異的な増幅されたDNA（列）と、それぞれ示されるDNA変異に特異的なマイクロキャリア結合プローブ（行）とのそれぞれの対合組み合わせについて得られた蛍光シグナル（任意単位、AU）を反映する。

【図８Ａ】RNAバリエーションの多重検出の結果を示している。値は、それぞれ示されるRNAバリエーションに特異的なRNAサンプル（列）と、それぞれ示されるRNAバリエーションに特異的なマイクロキャリア結合プローブ（行）とのそれぞれの対合組み合わせについて得られた蛍光シグナル（任意単位、AU）を反映する。

【図８Ｂ】RNAバリエーションの多重検出の結果を示している。値は、それぞれ示されるRNAバリエーションに特異的なRNAサンプル（列）と、それぞれ示されるRNAバリエーションに特異的なマイクロキャリア結合プローブ（行）とのそれぞれの対合組み合わせについて得られた蛍光シグナル（任意単位、AU）を反映する。

【図９Ａ】患者サンプルからのRNA及びDNA変異の多重検出の結果を示している。ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）サンプルからRNAを得、選択された変異を、本明細書に記載のマイクロキャリアアプローチ（LCP）と比較して、次世代シーケンシング（NGS）によって検出した。

【図９Ｂ】患者サンプルからのRNA及びDNA変異の多重検出の結果を示している。胸水または血清サンプル中のcfDNAからDNAを得、選択された変異を、本明細書に記載のマイクロキャリアアプローチ（LCP）と比較して、ddPCRまたは次世代シーケンシング（NGS）によって検出した。

【図１０Ａ】ステージⅠまたはⅡ肺癌を有する患者から得られた組織サンプルまたは液体生検（血液サンプル）におけるDNAまたはRNA変異の検出における本明細書に記載のマイクロキャリアアプローチ（LCP）と他の変異検出技術との間の比較を示している。液体生検からのDNAまたはRNA（図１０Ａ）を使用して得られた結果が示されている。これらの結果は、DNAまたはRNAにおいて異なるサンプルから多様ながん関連変異を検出する際のLCPアプローチの多用途性を実証する。

【図１０Ｂ】ステージⅠまたはⅡ肺癌を有する患者から得られた組織サンプルまたは液体生検（血液サンプル）におけるDNAまたはRNA変異の検出における本明細書に記載のマイクロキャリアアプローチ（LCP）と他の変異検出技術との間の比較を示している。組織サンプルからのDNA（図１０Ｂ）を使用して得られた結果が示されている。これらの結果は、DNAまたはRNAにおいて異なるサンプルから多様ながん関連変異を検出

10

20

30

40

50

する際の L C P アプローチの多用途性を実証する。

【図 10 C】ステージ I または II 肺癌を有する患者から得られた組織サンプルまたは液体生検（血液サンプル）における DNA または RNA 変異の検出における本明細書に記載のマイクロキャリアアプローチ（L C P）と他の変異検出技術との間の比較を示している。組織サンプルからの RNA（図 10 C）を使用して得られた結果が示されている。これらの結果は、DNA または RNA において異なるサンプルから多様ながん関連変異を検出する際の L C P アプローチの多用途性を実証する。

【発明を実施するための形態】

【0043】

一態様では、本明細書では、K R A S、N R A S、P I K 3 C A、B R A F、E G F R、A K T 1、M E K 1、及び H E R 2 遺伝子における DNA 変異及び／または A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及び c M E T 遺伝子における RNA 変異の存在を検出するための方法が提供される。

【0044】

いくつかの実施形態では、方法は、サンプルから DNA を単離すること；K R A S、N R A S、P I K 3 C A、B R A F、E G F R、A K T 1、M E K 1、及び H E R 2 遺伝子の各々における 1 つ以上の DNA 変異の遺伝子座に特異的なプライマー対を使用してポリメラーゼ連鎖反応（P C R）によって単離された DNA を増幅すること；増幅された DNA を少なくとも 7 つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも 7 つのプローブは、K R A S、N R A S、P I K 3 C A、B R A F、E G F R、A K T 1、M E K 1、及び H E R 2 遺伝子の各々における DNA 変異に特異的な 1 つ以上のプローブを含み、前記少なくとも 7 つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアの各々は、それに結合したプローブに対応する識別子を含む、ハイブリダイズさせること；増幅された DNA と前記少なくとも 7 つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、増幅された DNA とプローブの 1 つとの間のハイブリダイゼーションは、プローブに対応する DNA 変異の存在を示す、検出すること；マイクロキャリアの識別子を検出すること；及びマイクロキャリアの検出された識別子を、マイクロキャリアの対応するプローブに対する増幅された DNA のハイブリダイゼーションの検出された存在または非存在と相関させることを含む。

【0045】

いくつかの実施形態では、方法は、サンプルから RNA を単離すること；逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（R T - P C R）によって単離された RNA から DNA を増幅することであって、DNA を増幅することは、A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及び c M E T 遺伝子の各々に特異的な第 1 のプライマー、単離された RNA、及び逆転写酵素を使用して単離された RNA から A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及び c M E T 遺伝子の各々に特異的な c D N A を生成すること、及び c D N A、DNA ポリメラーゼ、第 1 のプライマー、及び対応する第 1 のプライマーの反対の c D N A の鎖に結合し、かつ対応する第 1 のプライマーによって促進されるものとは反対の方向で鎖伸長を促進する A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及び c M E T 遺伝子の各々に特異的な第 2 のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応（P C R）によって A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及び c M E T 遺伝子の各々に特異的な DNA を増幅することを含む、増幅すること；増幅された DNA を少なくとも 5 つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも 5 つのプローブは、A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及び c M E T 遺伝子の各々における変異に特異的な 1 つ以上のプローブを含み、前記少なくとも 5 つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアの各々は、それに結合したプローブに対応する識別子を含む、ハイブリダイズさせること；増幅された DNA と前記少なくとも 5 つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、増幅された DNA とプローブの 1 つとの間のハイブリダイゼーションは、プローブに対応する変異の存在を示す、検出すること；マイクロキャリアの識別子を検出すること；及びマイクロキャリアの検出された識別子を、マイクロキャリアの対応す

るプローブに対する増幅されたDNAのハイブリダイゼーションの検出された存在または非存在と相関させることを含む。

【0046】

いくつかの実施形態では、方法は、サンプルからDNA及びRNAを単離すること；KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子の各々における1つ以上のDNA変異の遺伝子座に特異的なプライマー対を使用してポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって単離されたDNAを増幅すること；逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって単離されたRNAからDNAを増幅することであって、単離されたRNAからDNAを増幅することは、ALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的な第1のプライマー、単離されたRNA、及び逆転写酵素を使用して単離されたRNAからALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的なcDNAを生成すること、及びcDNA、DNAポリメラーゼ、第1のプライマー、及び対応する第1のプライマーの反対のcDNAの鎖に結合し、かつ対応する第1のプライマーによって促進されるものとは反対の方向で鎖伸長を促進するALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的な第2のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によってALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々に特異的なDNAを増幅することを含む、増幅すること；単離されたDNAからPCRによって増幅されたDNAを少なくとも7つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも7つのプローブは、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子の各々における変異に特異的な1つ以上のプローブを含み、前記少なくとも7つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアの各々は、それに結合したプローブに対応する識別子を含む、ハイブリダイズさせること；単離されたDNAからPCRによって増幅されたDNAと前記少なくとも7つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、増幅されたDNAとプローブの1つとの間のハイブリダイゼーションは、プローブに対応する変異の存在を示す、検出すること；単離されたRNAからRT-PCRによって増幅されたDNAを少なくとも5つのプローブとハイブリダイズさせることであって、前記少なくとも5つのプローブは、ALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々における変異に特異的な1つ以上のプローブを含み、前記少なくとも5つのプローブの各々は、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアの各々は、それに結合したプローブに対応する識別子を含む、ハイブリダイズさせること；単離されたRNAからRT-PCRによって増幅されたDNAと前記少なくとも5つのプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することであって、増幅されたDNAとプローブの1つとの間のハイブリダイゼーションは、プローブに対応する変異の存在を示す、検出すること；マイクロキャリアの識別子を検出すること；及びマイクロキャリアの検出された識別子を、マイクロキャリアの対応するプローブに対する増幅されたDNAのハイブリダイゼーションの存在または非存在と相関させることを含む。

【0047】

別の態様では、本明細書では、本明細書に記載の方法のいずれかを実施するためのキットが提供される。いくつかの実施形態では、キットには、例えば、本明細書に記載される、マイクロキャリア、プローブ配列、プライマー、及び／またはブロック核酸が含まれる。

【0048】

I. 一般的技術

本明細書に記載の技術の実施は、別段示されない限り、ポリマー技術、微細加工、微小電気機械システム（MEMS）加工、フォトリソグラフィ、マイクロフルイドクス、有機化学、生化学、オリゴヌクレオチド合成及び改変、バイオコンジュゲート化学、核酸ハイブリダイゼーション、分子生物学、微生物学、遺伝学、組換えDNA、ならびに従来の技術の範囲内の関連分野における従来技術を採用する。その技術は、本明細書で引用

される参考文献に記載されており、文献において十分に説明されている。

【0049】

分子生物学及び組換えDNA技術については、例えば、(Maniatis, T. et al. (1982), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor; Ausubel, F. M. (1987), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F. M. (1989), *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Sambrook, J. et al. (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor; Innis, M. A. (1990), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1992), *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995), *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995), *PCR Strategies*, Academic Press; Ausubel, F. M. (1999), *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley、及び年次更新を参照されたい。

【0050】

DNA合成技術及び核酸化学については、例えば、Gait, M. J. (1990), *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein, F. (1991), *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Adams, R. L. et al. (1992), *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, Chapman & Hall; Shabarova, Z. et al. (1994), *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids*, Weinheim; Blackburn, G. M. et al. (1996), *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Oxford University Press; Hermanson, G. T. (1996), *Bioconjugate Techniques*, Academic Press)を参照されたい。

【0051】

微細加工については、例えば、(Campbell, S. A. (1996), *The Science and Engineering of Microelectronic Fabrication*, Oxford University Press; Zaut, P. V. (1996), *Microarray Fabrication: a Practical Guide to Semiconductor Processing*, Semiconductor Services; Madou, M. J. (1997), *Fundamentals of Microfabrication*, CRC

Press; Rai-Choudhury, P. (1997). Handbook of Microlithography, Micromachining, & Microfabrication: Microlithography) を参照されたい。

【0052】

II. 定義

本発明を詳細に説明する前に、本発明が特定の組成物または生物学的系に限定されず、これらが言うまでもなく変化し得ることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定するようには意図されていないことも理解されたい。

【0053】

用語「マイクロキャリア」は、本明細書で使用される場合、捕捉剤またはプローブが結合され得る物理的基質を指し得る。本開示のマイクロキャリアは、任意の好適な幾何学的形態または形状を取り得る。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアは、ディスク形状であり得る。典型的には、マイクロキャリアの形態または形状には、 $10^{-4} \sim 10^{-7} \text{ m}$ (よって、接頭辞「マイクロ」) のオーダーで少なくとも1つの寸法が含まれる。

【0054】

用語「ポリマー」は、本明細書で使用される場合、反復モノマーを含む任意のマクロ分子構造を指し得る。ポリマーは、天然 (例えば、天然に見られる) または合成 (例えば、人工、例えば、非天然モノマー (複数可) から構成された及び/または天然に見られない構成または組み合わせで重合されたポリマー) であり得る。

【0055】

用語「実質的に透明な」及び「実質的に非透明な」は、本明細書で使用される場合、光 (例えば、特定の波長、例えば、赤外、可視、UVなどのもの) が基質、例えば、ポリマー層を通過する能力を指し得る。実質的に透明なポリマーは、光に対して透明、半透明、及び/または透過性であるものを指し得る一方で、実質的に非透明なポリマーは、光を反射及び/または吸収するものを指し得る。物質が実質的に透明であるかまたは実質的に非透明であるかは、物質を照らす光の波長及び/または強度、ならびに物質を通過する光 (またはその減少または非存在) を検出する手段に依存し得ることが理解される。いくつかの実施形態では、実質的に非透明な物質は、例えば、光学顕微鏡検査 (例えば、明視野、暗視野、位相コントラスト、微分干渉コントラスト (DIC)、ノマルスキー干渉コントラスト (NIC)、ノマルスキー、ホフマン変調コントラスト (HMC)、または蛍光顕微鏡検査) によって画像化される場合、周囲物質または画像フィールドと比較して、透過光の観察可能な減少を引き起こす。いくつかの実施形態では、実質的に透明な物質は、例えば、光学顕微鏡検査 (例えば、明視野、暗視野、位相コントラスト、微分干渉コントラスト (DIC)、ノマルスキー干渉コントラスト (NIC)、ノマルスキー、ホフマン変調コントラスト (HMC)、または蛍光顕微鏡検査) によって画像化される場合、観察可能な量の透過光がその物質を通過することを可能にする。

【0056】

用語「アナログコード」は、本明細書で使用される場合、例えば、デジタルコードとは対照的に、コードされた情報が、非量子化及び/または非離散的様式で表される任意のコードを指し得る。例えば、デジタルコードは、限定された値のセット (例えば、0/1タイプの値) について個別の位置でサンプリングされる一方で、アナログコードは、より大きな範囲の位置で (または連続的全体として) サンプリングされ得、及び/または、より広い値のセット (例えば、形状) を含有し得る。いくつかの実施形態では、アナログコードは、1つ以上のアナログ形状認識技術を使用して読み込まれ、またはデコードされ得る。

【0057】

本明細書で使用される場合、「サンプル」は、検出される分子などの物質を含有する組成物を指す。一実施形態では、サンプルは、「生物学的サンプル」 (すなわち、生物源 (例えば、ヒト、動物、植物、細菌、真菌、原生生物、ウイルス) から得られる任意の物質

10

20

30

40

50

）である。生物学的サンプルは、固体物質（例えば、組織、細胞ペレット、生検、FFPE サンプルなど）及び生物学的流体（例えば、尿、血液または血漿、糞便、唾液、リンパ液、涙、汗、前立腺液、精漿、精液、胆汁、粘液、胸水、羊水及び口洗浄液（口腔内細胞を含有する））を含む任意の形態であり得る。固体物質は、典型的には、流体と混合される。サンプルはまた、水、空気、土壌、または任意の他の環境源などの環境サンプルを指し得る。

【0058】

本明細書及び付属の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、内容が別途明確に示さない限り、複数の参照を含む。よって、例えば、「分子」に対する言及は、2つ以上のそのような分子の組み合わせなどを任意に含む。

10

【0059】

用語「約」は、本明細書で使用される場合、この技術分野で当業者に容易に理解されるそれぞれの値についての通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む（及び記載している）。

【0060】

本明細書に記載される本発明の態様及び実施形態は、態様及び実施形態「を含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」を含むことが理解される。

【0061】

III. DNA 及び／または RNA 変異を検出する方法

20

本開示の所定の態様は、マイクロキャリア、例えば、本明細書に記載のコードされたマイクロキャリア、または国際公開番号 WO 2016/198954 に記載のマイクロキャリアのいずれかを使用して DNA 変異（例えば、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及び／または HER2 遺伝子における1つ以上の変異）及び／または RNA 変異（例えば、ALK、ROS、RET、NTRK1、及び／または cMET 遺伝子における1つ以上の変異）の存在を検出するための方法に関する。本開示の方法は、本明細書、例えば、セクション IV、V、及び VI に記載のマイクロキャリアの特徴及び態様の一部またはすべてを有するコードされたマイクロキャリア（複数可）を採用する。有利には、これらのコードされたマイクロキャリアにより、従来の多重アッセイと比較して、多数の潜在的な独自のマイクロキャリア及び低減した認識過誤で改善した多重アッセイにおいて DNA 及び／または RNA 変異の検出が可能となる。変異の検出のための例示的な方法を記載したフローチャートが図3及び6に提供されており、例示的な PCR 技術が図4及び5に示されている。本明細書で使用される検出方法は、当該技術分野で知られている任意の好適なアッセイ容器、例えばマイクロプレート、ペトリ皿、または多数の他のよく知られているアッセイ容器において実施され得る。

30

【0062】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、サンプルから DNA 及び／または RNA を単離することを含む。当該技術分野で知られている標準的な分子技術は、多様な異なるタイプのサンプルからの DNA または RNA の単離を可能にする。多様なサンプルに好適な DNA 及び RNA 単離キットは、市販されている。

40

【0063】

いくつかの実施形態では、方法は、同じサンプル、例えば、全血または血漿サンプルから DNA 及び RNA を単離することを含む。DNA（例えば、循環遊離またはセルフリー DNA、cfDNA）及び RNA（例えば、血小板、白血球、エクソソーム、循環腫瘍細胞、及び遊離 RNA のうちの1つ以上に由来する）を単離するための例示的なプロトコルが図6に示されている（Best, M. G. et al. (2015) Cancer Cells 28:666-676）も参照されたい。例えば、いくつかの実施形態では、方法は、全血または血漿サンプルを遠心分離することによって（例えば、全血を 200 x g で 20 分間を遠心分離し、TRRP を除去することによって）総 RNA 豊富血漿（TRRP）を単離すること、TRRP を 1 つ以上の遠心分離工程に供して RNA 画分及びセル

50

フリーDNA (cfDNA) 画分を生成すること (例えば、TRRPを100xgで20分間遠心分離し、上側画分を除去し、次いで360xgで20分間再度遠心分離することによって)、cfDNA画分からDNAを単離すること、及びRNA画分からRNAを単離することを含む。例示的なプロトコルはまた、実施例2において提供される。

【0064】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、約0.3 ng/μL~約1 ng/μLの濃度でサンプルからのDNAを使用する。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、少なくとも約0.3 ng/μLの濃度でサンプルからのDNAを使用する。

【0065】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、約2 ng/μL~約30 ng/μLの濃度でサンプルからのRNAを使用する。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、少なくとも約2 ng/μLの濃度でサンプルからのRNAを使用する。

【0066】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、例えば、サンプルが採取される患者において、肺癌の処置反応を検出、モニタリング、スクリーニング、またはモニタリングするために使用される。本明細書で使用される場合、肺癌は、限定されないが、非小細胞肺癌 (例えば、腺癌、扁平上皮癌、及び大細胞癌などのサブタイプを含む)、小細胞または燕麦細胞癌、及び肺カルチノイド腫瘍 (例えば、気管支カルチノイド) を含む肺癌の様々なタイプを指し得る。多くの研究組織が、多くの肺癌で重要な遺伝子における特異的な変異を示唆している。例えば、KRAS、PIK3CA、BRAF、またはEGFRにおける変異は、非小細胞肺癌の少なくとも40%に存在すると考えられている (Rosell, R. et al. (2009) N. Engl. J. Med. 361: 958-967)。変異スクリーニングは、チロシンキナーゼ阻害剤などの標的化処置に反応する可能性がより高い患者を同定することによって、患者のアウトカムを改善すると考えられる。

【0067】

本開示の方法は、任意の好適な溶液における分析物 (例えば、DNA及び/またはRNA変異) を検出するために使用され得る。いくつかの実施形態では、溶液は、生物学的サンプルを含む。いくつかの実施形態では、溶液は、生物学的サンプルから単離されたDNAまたはRNA、及び、任意に、緩衝液を含む。DNA/RNA単離のための好適な緩衝液は、当該技術分野でよく知られている。生物学的サンプルの例には、限定されないが、糞便、血液、血清、血漿、尿、痰、胸水、胆汁、脳脊髄液、皮膚または脂肪組織の間質液、唾液、涙、気管支-肺胞洗浄液、口腔咽頭分泌物、腸液、頸-膈または子宮分泌物、及び精液が含まれる。いくつかの実施形態では、生物学的サンプルは、ヒトからのものであり得る。他の実施形態では、溶液は、生物学的サンプルではないサンプル、例えば、環境サンプル、実験室で調製されたサンプル (例えば、調製、単離、精製、及び/または合成された1つ以上の分析物を含むサンプル)、固定サンプル (例えば、ホルマリン固定、パラフィン包埋またはFFPEサンプル) などを含む。

【0068】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によってDNA (例えば、上述したサンプルから単離されたDNA) を増幅することを含む。PCR技術は、当該技術分野でよく知られている。簡潔には、熱安定性DNAポリメラーゼが使用されて、鋳型DNA鎖 (例えば、サンプルから単離され、変性される) 及びDNA鋳型のセンス鎖及びアンチセンス鎖 (それぞれ) の3'末端に対して相補性であるオリゴヌクレオチドプライマーの対を使用して対象となるDNA配列のコピーが増幅される。DNAポリメラーゼは、反応において両方のプライマー、4つすべてのデオキシヌクレオチド (dNTP)、緩衝液、マグネシウムイオン (例えば、MgCl₂)、及びカリウムイオン (例えば、KCl)、及び任意に他の成分と混合される。反応混合物は次いで、DNA鋳型の変性、変性した一本鎖鋳型へのプライマーのアニールリング、及びDNAポリメラーゼによるプライマー伸長を可能とする複数のサイクル (例えば、20~40) の温度変化に供される。対象となる異なる特性を有する様々なDNAポリメラーゼ (例えば、長いま

たは反復鋳型を増幅する能力、ハイフィデリティ、ホットスタートなど）は、PCRにおいて使用するために特性化されており、市販されている。

【0069】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によってRNA（例えば、上述したサンプルから単離されたRNA）からDNAを増幅することを含む。RT-PCR技術は、当該技術分野でよく知られている。簡潔には、逆転写酵素及び対象となるRNA分子の3'末端に相補的なプライマーが第1の鎖cDNAを合成するために使用され、これは次いで、DNAポリメラーゼ及び第1のプライマーによって増幅されるものとは反対の鎖を増幅するための第2のプライマーを使用する上述したPCRのための鋳型として使用される。いくつかの実施形態では、第1のプライマーは、5'標識または改変、例えば、ビオチンを含む。対象となる異なる特性（例えば、向上した耐熱性、改変されたRNase H活性など）を有する様々な逆転写酵素がRT-PCRにおける使用のために特性化されており、市販されている。

10

【0070】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、単離されたDNAまたはRNAから（例えば、PCRまたはRT-PCRによって）対象となる1つ以上の特定の遺伝子における1つ以上の変異の遺伝子座を増幅することを含む。本明細書において、DNAまたはRNA変異の「遺伝子座」は、変異自体ならびに変異DNA配列のPCR増幅及び／またはプローブハイブリダイゼーションのための（または、RNAの場合、RNAから生成されたcDNAのPCR増幅のための）変異の一方または両方の側の十分な隣接配列を含む。当該技術分野で知られているように、PCR増幅に十分な最小配列長さは、限定されないが、ポリメラーゼ、プライマーの溶融温度、プライマーがプライマー二量体を形成する傾向、鋳型のプライマーに対する比などを含むいくつかの要因によって影響を受け得る。いくつかの実施形態では、変異の遺伝子座は、少なくとも約100塩基対の隣接配列（すなわち、変異に対して5'及び3'の両方の隣接配列を含む）を含む。いくつかの実施形態では、変異の遺伝子座は、隣接配列（すなわち、変異に対して5'及び3'の両方の隣接配列を含む）の約200塩基対以下を含む。上述したように、DNA変異の遺伝子座は、DNAまたはcDNA鋳型として遺伝子座を使用して、遺伝子座に特異的なプライマーの対を使用して増幅され得る。

20

【0071】

いくつかの実施形態では、複数のPCR反応が、例えば、様々なDNA変異を検出するために、使用され得る。いくつかの実施形態では、各PCR反応は、複数のプライマー対を含み得、各々が対象となるDNA変異に特異的である。

30

【0072】

変異

本明細書で使用される場合、DNAまたはRNA変異の遺伝子座を増幅することは、変異体遺伝子座及び／または対応する野生型遺伝子座を増幅することを包含する。ほとんどの場合、多くの変異が多重アッセイにおいてスクリーニングされ得るが、任意の個々のサンプルは典型的には、スクリーニングされている変異のうちの1つまたはごく僅かを含むことが理解される。いくつかの実施形態では、本開示のDNA変異は、サンプルからのDNAを使用して検出される変異を指し、本開示のRNA変異は、サンプルからのRNA（例えば、RNAからcDNA、その後DNAを生成することによって）を使用して検出される変異を指す。点変異、欠失、挿入、及び転座／再構成などの変異は、サンプル（例えば、腫瘍細胞及び／または非腫瘍細胞を含む）からのDNA及びRNAの両方に存在し得ることが当業者によって理解される。

40

【0073】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、KRAS遺伝子における1つ以上の変異（例えば、DNA変異）の遺伝子座を増幅することを含む。KRASは、Kirsten rag肉腫ウイルス性がん遺伝子ホモログ、PR310 c-K-rasがん遺伝子、c-Ki-ras、c-Kirsten-ras、K-Ras2、K-ras p21、G

50

20

30

40

50

G C A G T G G C G G C G G C G A A G G T G G C G G C G G C T C G G C C A G T A C
T C C C G G C C C C C G C C A T T T C G G A C T G G G A G C G A G C G C G G C G
C A G G C A C T G A A G G C G G C G G G G C C A G A G G C T C A G C G G C
T C C C A G G C C T G C T G A A A A T G A C T G A A T A T A A A C T T G T G G T
A G T T G G A G C T G G T G G C G T A G G C A A G A G T G C C T T G A C G A T A
C A G C T A A T T C A G A A T C A T T T T G T G G A C G A A T A T G A T C C A A
C A A T A G A G G A T T C C T A C A G G A A G C A A G T A G T A A T T G A T G G
A G A A A C C T G T C T C T T G G A T A T T C T C G A C A C A G C A G G T C A A
G A G G A G T A C A G T G C A A T G A G G G A C C A G T A C A T G A G G A C T G
G G G A G G G C T T T C T T T G T G T A T T T G C C A T A A A T A A T A C T A A
A T C A T T T T G A A G A T A T T C A C C A T T A T A G A G A A C A A A T T A A A
A G A G T T A A G G A C T C T G A A G A T G T A C C T A T G G T C C T A G T A G
G A A A T A A A T G T G A T T T G C C T T C T A G A A C A G T A G A C A C A A A
A C A G G C T C A G G A C T T A G C A A G A A G T T A T G G A A T T C C T T T T
A T T G A A A C A T C A G C A A A G A C A A G A C A G A G A G T G G A G G A T G
C T T T T T A T A C A T T G G T G A G A G A G A T C C G A C A A T A C A G A T T
G A A A A A A A T C A G C A A A G A A G A A A A G A C T C C T G G C T G T G T G
A A A A T T A A A A A A T G C A T T A T A A T G T A A T C T G G G T G T T G A T
G A T G C C T T C T A T A C A T T A G T T C G A G A A A T T C G A A A A C A T A
A A G A A A A G A T G A G C A A A G A T G G T A A A A A G A A G A A A A A G (配
列番号339)に示される。いくつかの実施形態では、DNA変異は、配列番号326ま
たは配列番号339に従ってG12の変異をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では
、K R A S遺伝子におけるDNA変異は、G12C、G12D、またはG12V変異K R
A Sタンパク質(配列番号326に従って付番)をコードし、またはもたらす。これらの
DNA変異はまた、以下の表A1において(変異したポリペプチドコドンではなく)それ
らのヌクレオチド位置によって表される。例えば、いくつかの実施形態では、K R A S遺
伝子におけるDNA変異は、配列番号339の対応するcDNA配列におけるc. 34G
>C、c. 34G>T、c. 35G>A変異をもたらす。

【0075】

いくつかの実施形態では、K R A S変異(例えば、G12C、G12D、またはG12
V変異K R A Sタンパク質をコードし、またはもたらす)の遺伝子座を増幅するためのプ
ライマー対は、配列G T A C T G G T G G A G T A T T T G A T A G T G (配列番号1)
及びC G T C A A G G C A C T C T T G C C T A C (配列番号2)をそれぞれ含む。

【0076】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、B R A F遺伝子における1つ以上の変異(例
えば、DNA変異)の遺伝子座を増幅することを含む。B R A Fは、ヒトがんにおいて
頻繁に変異するセリン／トレオニンキナーゼであるB R A Fがん原遺伝子をコードし、B
- R a f、B R A F1、B - R A F1、R A F B1、N S7、94kDa B - r a fタ
ンパク質、p94、マウス肉腫ウイルス性(v - r a f)がん遺伝子ホモログB1、v -
r a fマウス肉腫ウイルス性がん遺伝子ホモログB、及びv - r a fマウス肉腫ウイルス
性がん遺伝子ホモログB1としても知られている。いくつかの実施形態では、B R A F遺
伝子は、ヒトB R A F遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒトB R A F遺伝子は、
N C B I E n t r e z G e n e I D番号673によって表される遺伝子(その変異
体及びバリエーションを含む)を指す。他の実施形態では、B R A F遺伝子は、以下の生物の
うちの1つからのものである：マウス(例えば、N C B I E n t r e z G e n e I
D番号109880を参照されたい)、ラット(例えば、N C B I E n t r e z G e
n e I D番号114486を参照されたい)、カニクイザル(例えば、N C B I E n
t r e z G e n e I D番号101866436を参照されたい)、魚(例えば、N C
B I E n t r e z G e n e I D番号403065を参照されたい)、イヌ(例えば
、N C B I E n t r e z G e n e I D番号475526を参照されたい)、ウシ(

例えば、NCBI Entrez Gene ID番号536051を参照されたい)、ウマ(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号100065760を参照されたい)、ニワトリ(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号396239を参照されたい)、チンパンジー(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号463781を参照されたい)、アカゲザル(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号693554を参照されたい)、またはネコ(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号101092346を参照されたい)。

【0077】

がんに関連する多様なBRAF変異は、本明細書に記載の方法によって好適に検出され得る；例えば、Lovly, C., L. Horn, W. Pao. 2015. BRAF in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). My Cancer Genome at www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/braf/ (6月18日更新)を参照されたい。BRAF機能獲得変異の大部分は、分子検査によって検出可能なキナーゼドメインにおける残基、最も特にV600Eを変化させる。BRAF変異及びEGFR変異は、相互に排他的と考えられている。FISHによって検出可能なBRAF再構成、例えば、BRAF-KIAA1549もいくつかのがんにおいて報告されている。増幅は、所定のがんにおいて観察される。BRAFの構成的活性化は、肺を含む複数のがんにおいて観察されており、それは、RAF/MEK/ERK経路の活性化をもたらす。BRAFにおける点変異(1~4%)及びコピー数増加(1.43%)は、NSCLCで見られる。BRAF融合体に関連する予後は、化学療法で処置される場合、NSCLCでは中立である。BRAF及びMEK1/2阻害剤は、BRAF変異体癌の処置のために単一の薬剤としてまたは組み合わせて承認されているまたは臨床的評価中である。V600E変異を有する一部の患者は、BRAF阻害剤ベムラフェニブ及びダブラフィニブに対する増加した感受性を有する。BRAF阻害は最終的には、BRAFまたはMEK阻害剤に対する耐性をもたらし得る。また、BRAF V600E変異は、EGFR療法、例えば、セツキシマブまたはパニツムマブ、ならびにイマチニブ及びスニチニブに対して耐性である。特定の変異及び融合体、例えば、BRAF D594A/V及びK483Mは、RAF阻害剤に対して非感受性であるが、MEK阻害剤に対して感受性である。BRAF-KIAA1549のようなBRAF融合体は、第一世代BRAF阻害剤、例えば、ベムラフェニブに対して耐性であるが、第二世代BRAF阻害剤は調査されている。BRAFに対して感受性のあるFDA承認薬には、ダブラフェニブ、ベムラフェニブ、コビメチニブ、及びトラメチニブが含まれる。RAF/MEK/ERK経路の標的化は、BRAF変異体癌において有効であり得る。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、BRAF変異は、例えば、MAALSGGGGGGAEPGQALFNGDMEPEAGAGAGAAASSAADPAIPEEVWNIKQMIKLTQEHIEALLDKFGGEHNPPSIYLEAYEEYTSKLDALQQREQQLLES LGNGTDFSVSSSASMDTVTSSSSSSLSVLPSSLSVFQNP TDVARSNPKSPQKPIVRVFLPNKQRTVVPARCGVTVRDSLKKALMMRGLIPECCA VYRIQDGEKKPIGWDTDISWLTGEE LHVEVLE NVPLTT HNFVRKTFFTLAFCDFCRKL L FQGFR CQT CGYKFHQRCSTEV PLM CVNYDQLDLLFVSKFFEHHPI PQEEASLAETALTS GSSPSAPASDSIGPQILTSPSPSKSIP IPQPFRPADEEDHRNQFGQRDRSSSAPNVHINTIEPVNIDDLIRDQGFRGDGGSTT GLSATPPASLPGLTNVKALQKSPGPQRE RKSSSSSEDRN RMKTLGRRDSSDDWEIPDGQITVGQRIGSGSGFGTVYKGKW HGDVAVKMLNVTAPT PQQLQAFKNEVGVL RKRTRHVNI LLFMGYSTKPKQLAIVTQWCEGSSLYHHLHI IETKFEMI KLIDI ARQTAQGMDYLHAKSIIHRDLKSNNIFLHEDLT VKIGDFGLATVKSRWSGSHQFEQLSGSILWMAPEVIRMQDKNPYSFQ

10

20

30

40

50

50

AGCTACAGTGAAATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTT
GAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTGGATGGCACCCAGAAAG
TCATCAGAATGCAAGATAAAAAATCCATACAGCTTTTCAGTCT
AGATGTATATGCATTTTGGAAATTGTCTGTATGAATTGATG
ACTGGACAGTTTACCTTTATTTCAAACATCAACAACAGGGGACC
AGATAAATTTTTTATGGTGGGACGAGGATACCTGTCTCCAGA
TCTCAGTAAGGTACGGAGTAACCTGTCCAAAAGCCATGAAG
AGATTAAATGGCAGAGTGCCTCAAAAAGAAAAGAGATGAGA
GACCACTCTTTCCCCAAATTTCTCGCCTCTATTGAGCTGCT
GGCCCGCTCATTTGCCAAAATTTACCCGCGAGTGCATCAGAA
CCCTCCTTTGAATCGGGCTGGTTTCCAAAACAGAGGATTTTA
GTCTATATGCTTTGTGCTTTCTCCAAAACACCCCATCCAGGC
AGGGGGATATGGTGCCTTTCTCTGTCCACTGA（配列番号342）

に示される。いくつかの実施形態では、DNA変異は、配列番号329または配列番号342に従ってV600の変異をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、BRAF遺伝子におけるDNA変異は、V600E変異BRAFタンパク質（配列番号329に従って付番）をコードし、またはもたらす。これらのDNA変異はまた、以下の表A1において（変異したポリペプチドコドンではなく）それらのヌクレオチド位置によって表される。V600E BRAF変異に対するいくつかの言及は、およそアミノ酸31においてコドンを欠失していた以前の欠陥があるBRAFタンパク質配列に起因してそれをV599Eと言及していることを理解されたい（説明についてはGarnett, M. J. and Marais, R. (2004) Cancer Cell 6:313-9を参照されたい）。例えば、いくつかの実施形態では、BRAF遺伝子におけるDNA変異は、配列番号342の対応するcDNA配列におけるc.1799T>A変異をもたらす。

【0078】

いくつかの実施形態では、BRAF変異（例えば、V600E変異BRAFタンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列ATAGCCTCAATTCTTACCATCCACAAAATG（配列番号9）及びCAGATATATTTCTTTCATGAAGACCTCACAGTAA（配列番号10）をそれぞれ含む。

【0079】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、NRAS遺伝子における1つ以上の変異（例えば、DNA変異）の遺伝子座を増幅することを含む。NRASは、神経芽細胞腫RASウイルス性がん遺伝子ホモログ、NCMS、NS6、ALPS4、CMNS、及びNCMSとしても知られている、ヒトがんにおいて頻繁に変異する低分子量GTPアーゼであるNRASがん原遺伝子をコードする。いくつかの実施形態では、NRAS遺伝子は、ヒトNRAS遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒトNRAS遺伝子は、NCBI Entrez Gene ID番号4893によって表される遺伝子（その変異体及びバリエーションを含む）を指す。他の実施形態では、NRAS遺伝子は、以下の生物のうちの1つからのものである：マウス（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号18176を参照されたい）、ラット（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号24605を参照されたい）、魚（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号30380を参照されたい）、イヌ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号403872を参照されたい）、ウシ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号506322を参照されたい）、ウマ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号100059469を参照されたい）、またはチンパンジー（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号742713を参照されたい）。

【0080】

がんに関連する多様なNRAS変異が知られており、本明細書に記載の方法によって好適に検出され得る；例えば、Lovly, C., L. Horn, W. Pao. 2015.

10

20

30

40

50

NRAS in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). My Cancer Genome at www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/nras/ (6月18日更新)を参照されたい。がんにおいて観察される最も頻繁なNRAS変化は、コドン12、13、及び61(90%)における、及びリン酸結合ループ/G1モチーフ(残基10~17)、スイッチII領域(残基59~67)、及びG5モチーフ(残基145~147)内の変異である。NRASにおける体細胞変異は、原発性NSCLCでまれに(0.2~1%)報告されるが、発がんにおけるそれらの役割が証明されている。喫煙及び環境発がん性物質は、NRAS変異肺癌の病因に関連する。NRAS変異は、NSCLCの転移と相関している(1.5%)。NRASにおける体細胞変異は通常、標準的な療法に対する反応不良に関連する。MEK阻害剤、例えば、セルメチニブは、RAS変異を有するがん患者の処置において有効である。E63K0などのNRAS変異は、抗EGFR療法、例えば、セツキシマブ及びパニツムマブ、抗BRAF療法、例えば、ベムラフェニブ及びダブラフェニブ、ALK TKI、ならびに放射線療法に対する耐性に関連する。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、NRAS変異は、例えば、MTEYKL V V V G A G G V G K S A L T I Q L I Q N H F V D E Y D P T I E D S Y R K Q V V I D G E T C L L D I L D T A G Q E E Y S A M R D Q Y M R T G E G F L C V F A I N N S K S F A D I N L Y R E Q I K R V K D S D D V P M V L V G N K C D L P T R T V D T K Q A H E L A K S Y G I P F I E T S A K T R Q G V E D A F Y T L V R E I R Q Y R M K K L N S S D D G T Q G C M G L P C V V M (配列番号327)に示されるヒトNRASタンパク質に従って、生じたアミノ酸置換/欠失/フレームシフトに基づいて命名される。例示的なヒトNRAS cDNA配列は、ATGACTGAGTACAAACTGGGTGGTGGTTGGAGCAGGTGGTGTGGGAAAAGCGCACTGACAATCCAGCTAATCCAGAACCACTTTGTAGATGAATATGATCCCACCATAGAGGATTCTTACAGAAAACAAGTGGTTATAGATGGTGAAACCTGT TTTGT TGGACATACTGGATACAGCTGGACAAGAAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAATACATGAGGACAGGCGAAGGCTTCTCTCTGTGTATTTGCCATCAATAA TAGCAAGTCA TTTTGC GGATATTTAACTCTACAGGGAGCAGATTTAAGCGAGTAAAAGACTCGGATGATGTACCTATGGTGTCTAGTGGGAAACAAGTGTGATTTGCCAACACAAGGACAGTTGATACAAAACAAGCCACGAACCTGGCCAAGAGTTACGGGGATTCCATTCA TTGAAACCTCAGCCAAGACCAAGAGGGGTGT TGAAGATGCTTTTTTACACACTGGTAAGAGAAATACGCCAGTACCGAATGAAAAAACTCAACAGCAGTGATGATGGGACTCAGGGTTGTATGGGATTGCCATGTGTGTGGTGATGTAA (配列番号340)に示される。いくつかの実施形態では、DNA変異は、配列番号327または配列番号340に従ってQ61の変異をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、NRAS遺伝子におけるDNA変異は、Q61L変異NRASタンパク質(配列番号327に従って付番)をコードし、またはもたらす。これらのDNA変異はまた、以下の表A1において(変異したポリペプチドコドンではなく)それらのヌクレオチド位置によって表される。例えば、いくつかの実施形態では、NRAS遺伝子におけるDNA変異は、配列番号340の対応するcDNA配列におけるc.182A>T変異をもたらす。

【0081】

いくつかの実施形態では、NRAS変異(例えば、Q61L変異NRASタンパク質をコードし、またはもたらす)の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列CCACACCCCCAGGATTCTT(配列番号3)及びTTGGTCTCTCATGGCACTGTACTC(配列番号4)をそれぞれ含む。

【0082】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、PIK3CA遺伝子における1つ以上の変

10

20

30

40

50

異（例えば、DNA変異）の遺伝子座を増幅することを含む。PIK3CAは、p110 α タンパク質、CLOVE、CWS5、MCM、MCAP、PI3K、CLAPO、MCMTC、及びPI3K- α としても知られている、クラスIホスファチジルイノシトール-4,5-ビスホスフェート(PI)3-キナーゼ触媒サブユニットをコードする。いくつかの実施形態では、PIK3CA遺伝子は、ヒトPIK3CA遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒトPIK3CA遺伝子は、NCBI Entrez Gene ID番号5290によって表される遺伝子（その変異体及びバリエーションを含む）を指す。他の実施形態では、PIK3CA遺伝子は、以下の生物のうちの1つからのものである：マウス（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号18706を参照されたい）、ラット（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号170911を参照されたい）、魚（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号561737を参照されたい）、イヌ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号488084を参照されたい）、ウシ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号282306を参照されたい）、ウマ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号100058141を参照されたい）、チンパンジー（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号460858を参照されたい）、またはアカゲザル（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号709959を参照されたい）。

10

【0083】

がんに関連する多様なPIK3CA変異が知られており、本明細書に記載の方法によって好適に検出され得る；例えば、Lovly, C., L. Horn, W. Pao. 2015. PIK3CA in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). My Cancer Genome at www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/pik3ca/（6月18日更新）を参照されたい。PIK3CAにおける活性化変異または増幅は、構成的に活性なPI3Kをもたらす。ほとんどのPIK3CA機能獲得変異は、キナーゼ（特に残基1043、1047、及びH1049R）、アルファヘリカル（特に残基E542K、E545K、及び546）、及びC-（特に残基345及び420）ドメイン内で生じる。より頻度が低く変異する他の重要なドメインは、アダプター及びリンカードメインである。PIK/AKT/mTOR経路は、NSCLCの50~70%において制御不能であり、PIK3CA変異は、NSCLCの1~5%で検出される。PIK3CAにおけるコピー数増加は、肺癌（16~20%）で、より頻繁にはsqNSCLCで観察され、SCLC（4.7%）ではより頻度が少なく観察される。PIK3CAは、sqNSCLC（33~37%）で増幅され、変異する（6.5~16%）。PIK3CA活性化は通常、予後不良に関連する。構成的に活性なPI3Kを有する腫瘍は、PI3K/AKT/mTOR経路を標的化する薬剤に対して感受性であると提案されている。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、PIK3CA変異は、例えば、MPPRPSSGELWGIHLMPPRI LVECLLPNGMIVTLECLREATLITIKHELFKEARKYPLHQLLQDESSYIFVSVTQEAERE E F F D E T R R L C D L R L F Q P F L K V I E P V G N R E E K I L N R E I G F A I G M P V C E F D M V K D P E V Q D F R R N I L N V C K E A V D L R D L N S P H S R A M Y V Y P P N V E S S P E L P K H I Y N K L D K G Q I I V V I W V I V S P N N D K Q K Y T L K I N H D C V P E Q V I A E A I R K K T R S M L L S S E Q L K L C V L E Y Q G K Y I L K V C G C D E Y F L E K Y P L S Q Y K Y I R S C I M L G R M P N L M L M A K E S L Y S Q L P M D C F T M P S Y S R R I S T A T P Y M N G E T S T K S L W V I N S A L R I K I L C A T Y V N V N I R D I D K I Y V R T G I Y H G G E P L C D N V N T Q R V P C S N P R W N E W L N Y D I Y I P D L P R A A R L C L S I C S V K G R K G A K E E H C P L A W G N I N L F D Y T D T L V S G K M A L N L W P V P H G L E D L L N P I G V T G S N P N K E T P C L E L E F D W F S S V V K F P D M S V I E E H A N W S V S R E A G F S Y S H A G L S N R L A R D N E L R E N D K E Q L K A I S T R D P L S E I T E Q E K D F L W S H R H Y C V T I P E I L P K

20

30

40

50

LLLSVKWNSRDEVAQMYCLVKDWPPPIKPEQAMELLDCNYP
DPMVRGFAVRCLEKYLTDDKLSQYLIQLVQVLKYEQYLDN
LLVRFL LKKALTNQRIGHFFFWHLKSEMHNKTVSQRFGLL
LESYCRACGMYLKHLNRQVEAMEKLINLT DILKQEKKDET
QKVQMKFLVEQMRRP DFM DALQGF LSP LNPAHQ LGNLRLE
ECRIMSSAKRPLWLNWENPDIMSEL L FQNN E I I F K N G D D L
RQDMLTLQIIRIMENIWQNQGLDLRMLPYGCLSIGDCVGL
IEVVRNSHTIMQIQCKGGLKGALQFNSHTLHQWLKDKNKG
EIYDAAIDLFTRSCAGYCVATFILGIGDRHNSNIMVKDDG
QLFHI DFGHFLDHKKKKFGYKRERVPFVLTQDFLIVISKG
AQECTKTREFEFQEMCYKAYLAIRQHANLFINLFSMMLG
SGMPELQSFDDIAYIRKTLALDKTEQEAL EYFMKQMND AH
HGGWTTKMDWIFHTIKQH ALN（配列番号328）に示されるヒトPIK
3CAタンパク質に従って、生じたアミノ酸置換／欠失／フレームシフトに基づいて命名
される。例示的なヒトPIK3CA cDNA配列は、ATGCCTCCACGACCA
TCATCAGGTGAAC TGTGGGGGCATCCACTTGATGCCCCCA
GAATCCTAGTAGAATGTTTACTACCA AATGGAATGATAGT
GACTTTAGAAATGCCTCCGTGAGGCTACATTAATAACCAT
AAGCATGAAC TATTTAAAGAAGCAAGAAAATACCCCTCC
ATCAACTTCTTCAAGATGAATCTTCTTACATTTTTCGTAAAG
TGTTACTCAAGAAGCAGAAAGGGAAGAAATTTTGTATGAA
ACAAGACGACTTTGTGACCTTCGGCTTTTTC AACCCCTTTT
TAAAAGTAATTGAAC CAGTAGGCAACCGTGAAAGAAAAGAT
CCTCAATCGAGAAATTTGGTTTTCGTATCGGGCATGCCAGTG
TGTGAATTTGATATGGTTAAAGATCCAGAAAGTACAGGACT
TCCGAAGAAATATTTCTGAACGTTTGTAAAGAAAGCTGTGGA
TCTTAGGGACCTCAATTCACCTCATAGTAGAGCAATGTAT
GTCTATCCTCCAAATGTAGAAATCTTCAACCAGAAATTGCCAA
AGCACATATATAATAAATTAGATAAAGGGCAAATAATAGT
GGTGATCTGGGTAAATAGTTTCTCCAAATAATGACAAGCAG
AAGTATACTCTGAAAATCAACCATGACTGTGTACCAGAAC
AAGTAATTGCTGAAGCAATCAGGAAAAAAACTCGAAGTAT
GTTGCTATCCTCTGAACAACTAAAAC TCTGTGTTTTAGAA
TATCAGGGCAAAGTATATTTTAAAGAGTGTTGTGGATGTGATG
AATACTTCTCTAGAAAAATATCCTCTGAGTCAGTATAAGTA
TATAAGAAAGCTGTATAATGCTTGGGAGGATGCCCAATTTG
ATGTTGATGGCTAAAGAAAGCCTTTATTTCTCAACTGCCAA
TGGACTGTTTTACAATGCCATCTTATTTCCAGACGCATTTTC
CACAGCTACACCATATATGAATGGAGAAACATCTACAAAA
TCCCTTTGGGTATATAAATAGTGCACCTCAGAAATAAAAAATTC
TTTG TGCAACCTACGTGAATGTAAATATTT CGAGACATTTGA
TAAGATCTATGTTTCGAACAGGTATCTACCATGGAGGGAGAA
CCCTTATGTGACAATGTGAACACTCAAAGAGTACCTTTGTT
CCAATCCCAGGTGGAATGAATGGCTGAATTTATGATATATA
CATTCCTGATCTTCTCTCGTGTCTCGACTTTGCTTTTCC
ATTTGCTCTGTATAAAGGCCGAAAGGGTGCTAAAGAGGAAC
ACTGTCCATTGGCATGGGGGAAATATAAACTTTGTTTGAATTA
CACAGACACTCTAGTATCTGGGAAAAATGGCTTTTGAATCTT
TGGCCAGTACCTCATGGATTAGAAAGATTTGCTGAACCCCTA
TTGGTGTTACTGGATCAAAATCCAAATAAAGAAACTCCATG

10

20

30

40

50

CTTAGAGGTTGGAGTTTGTACTGGTTTCAGCAGTGTTGGTTAAAG
TTCCCAGATATGTCAGTGATTGAAGAGCATGCCAATTGGGT
CTGTATCCCGAGAAAGCAGGATTTAGCTATTCCCACGCAGG
ACTGAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAATTAAAGGGAA
AATGACAAAGAACAGCTCAAAGCAATTTCTACACGAGATC
CTCTCTCTGAAATCACTGAGCAGGAGAAAGATTTTCTATG
GAGTCACAGACACTATTGTGTAACTATCCCCGAAATTCTA
CCCCAAATTGCTTCTGTCTGTATAAATGGAATTCTAGAGATG
AAGTAGCCCAGATGTATTGCTTGGTTAAAGATTTGGCCTCC
AATCAAACCTGAACAGGCTATGGAACCTTCTGGACTGTAAAT
TACCCAGATCCTATGGTTTCGAGGTTTTTGCTGTTTCGGTGCT
TGGAAAAATATTTAAACAGATGACAAACCTTTCTCAGTATTT
AATTCAGCTAGTACAGGTCCTAAAAATATGAACAATATTTG
GATAACTTTGCTTGTGAGATTTTTTACTGAAGAAAGCATTTGA
CTAATCAAAGGATTGGGCACTTTTTTCTTTTGGCATTTTAAA
ATCTGAGATGCACAATAAAACAGTTAGCCAGAGGTTTTGGC
CTGCTTTTGGAGTCTCTATTGTCTGTCATGTGGGATGTATTT
TGAAGCACCTGAATAGGCAAGTCTGAGGCAATGGAAAAAGCT
CATTAACTTAACCTGACATTTCTCAAACAGGAGAAAGAGGAT
GAAACACAAAAGGTACAGATGAAGTTTTTTAGTTGAGCAAAA
TGAGGCGACCAAGATTTTCATGGATGCTCTACAGGGCTTTCT
GTCTCCTCTAAACCCCTGCTCATCAACTAGGAAACCTCAGG
CTTGAAAGAGTGTGGAATTATGTCCTCTGCAAAAAGGCCAC
TGTGGTTTGAATTTGGGAGAAACCCAGACATCATGTCTCAGAGTT
ACTGTTTTCAGAAACAATGAGATCATCTTTAAAAAATGGGGAT
GATTTACGGCAAGATATGCTAACCACTTCAAATTTATTCGTAT
TTATGGAAAAATATCTGGCAAAATCAAGGTCTTTGATCTTTCG
AATGTTACCTTATGGTTGTCTGTCAATCGGGTGACTGTGTG
GGACTTTATTGAGGTGGTGCGAATTTCTCACACTATTTATGC
AAATTCAGTGCAAAAGGCGGGCTTGAAAGGTGCCTGTCAGTT
CAACAGCCACACACTACATCAGTGGCTCAAAGACAAAGAAC
AAAGGAGAAATATATGATGCAGCCATTGACCTGTTTACAC
GTTTCATGTGCTGGATACTGTGTAGCTACCTTCATTTTGGG
AATTTGGAGATCGTCCACAATAGTAACATCATGGTTGAAAGAC
GATGGACAACCTGTTTTCATATAGATTTTGGACACTTTTTTGG
ATCACAAAGAAAGAAAAAATTTGGTTATAAACGAGAAACGTGT
GCCATTTGTTTTTGACACAGGATTTCTTAATAGTGATTAGT
AAAGGAGCCCAAGAAATGCACAAAGACAAAGAGAAATTTGAGA
GGTTTTCAGGAGATGTGTTACAAGGCTTATCTAGCTATTTCTG
ACAGCATGCCAATCTCTTTCATAAATCTTTTCTCAATGATG
CTTGGCTCTGGAATGCCAGAACTACAAATCTTTTGTATGACA
TTGCATACATTCGAAAGACCCCTAGCCCTTAGATAAAAACCTGA
GCAAGAGGGCTTTTGGAGTATTTTCATGAAACAAATGAATGAT
GCACATCATGGTGGCTGGACAACAAAAAATGGATTGGATCT
TCCACACAATTAAAACAGCATGCATTTGAACCTGA（配列番号341

）に示される。いくつかの実施形態では、DNA変異は、配列番号328または配列番号341に従ってE542、E545、またはH1047の変異をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、PIK3CA遺伝子におけるDNA変異は、E542K、E545K、またはH1047R変異PIK3CAタンパク質（配列番号328に従って付番）をコードし、またはもたらす。これらのDNA変異はまた、以下の表A1において（変異し

10

20

30

40

50

たポリペプチドコドンではなく) それらのヌクレオチド位置によって表される。例えば、いくつかの実施形態では、PIK3CA遺伝子におけるDNA変異は、配列番号341の対応するcDNA配列におけるc. 1624G>A、c. 1633G>A、またはc. 3140A>G変異をもたらす。

【0084】

いくつかの実施形態では、PIK3CA変異(例えば、E542K、またはE545K変異PIK3CAタンパク質をコードし、またはもたらす)の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列CAATTCTACAAGAGATCCTCTCTCT(配列番号5)及びCTCCATTTTAGCACTTACCTGTGAC(配列番号6)をそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、PIK3CA変異(例えば、H1047R変異PIK3CAタンパク質をコードし、またはもたらす)の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列ACCTTAGCCCTTAGATAAAACTGAGC(配列番号7)及びTTTGTTGTCCAGCCACCATGA(配列番号8)をそれぞれ含む。

【0085】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、EGFR遺伝子における1つ以上の変異(例えば、DNA変異)の遺伝子座を増幅することを含む。EGFRは、ERBB、ERBB1、HER1、NISBD2、PIG61、及びmENAとしても知られている、ヒトがんにおいて頻繁に変異する受容体チロシンキナーゼである上皮成長因子受容体をコードする。いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子は、ヒトEGFR遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒトEGFR遺伝子は、NCBI Entrez Gene ID番号1956によって表される遺伝子(その変異体及びバリエーションを含む)を指す。他の実施形態では、EGFR遺伝子は、以下の生物のうちの1つからのものである: マウス(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号13649を参照されたい)、ラット(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号24329を参照されたい)、イヌ(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号404306を参照されたい)、ウシ(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号407217を参照されたい)、ウマ(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号100067755を参照されたい)、ニワトリ(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号396494を参照されたい)、またはネコ(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号100510799を参照されたい)。

【0086】

がんに関連する多様なEGFR変異が知られており、本明細書に記載の方法によって好適に検出され得る; 例えば、Lovly, C., L. Horn, W. Pao. 2015. EGFR in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). My Cancer Genome at www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/egfr/ (6月18日更新)を参照されたい。過剰発現、増幅、及び変異を含むEGFR変化は、多数の固形腫瘍の発達に関与する。がんにおける最も頻繁なEGFR変異は、残基739~757の間のインデル及びL858の変異を含むキナーゼドメインに存在し、構成的活性化をもたらす。EGFRにおける肺癌点変異は、その時の28.94%に存在する一方で、コピー数増加は、肺癌の5.06%に見られる。肺癌におけるEGFR変異は、アジア系民族の女性非喫煙者における腺癌と関連する。特定の点変異は、NSCLCにおいて頻繁に遭遇し(G719、T790M、C797S、及びL861)、明確な治療的関連性を有する。エクソン18、19、及び21における変異を有する肺癌患者は、EGFR阻害剤、例えば、エルロチニブ及びゲフィチニブに対して感受性であり得る。エクソン20における獲得変異、例えば、T790Mは、第一世代EGFR TKIに対して耐性であることが知られている。後の世代のEGFR TKI、例えば、アファチニブ及びオシメルチニブは、T790Mを含む耐性バリエーションに対抗するために開発された。他の変異、例えば、C797S、L844V、及びL718Qは、第三世代TKIに対する耐性の原因であり得る。EGFR変化はまた、ALK標的療法に対する耐性を誘導し得る。FDA承

10

20

30

40

50

認EGFR阻害剤には、オシメルチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ネシツムマブ、及びアファチニブが含まれる。オシメルチニブは、T790M肺癌の処置のために承認された。ゲフィチニブは、FDA承認検査によって検出される、EGFREクソン19欠失またはエクソン21(L858R)置換変異を有する転移性NSCLCの処置のために承認された。EGFRに対して感受性のある他のFDA承認薬には、ラパチニブ、バンデタニブ、セツキシマブ、及びパニツムマブが含まれる。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、EGFR変異は、例えば、MRPSGTAGAAALLALLAALCPASRALEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNNECVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAAGYVLIALLNTVERIPLLENLQIIRGNMYYENSYALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNHLGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKEICAQQCSGRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCKDTCPPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGS CVRACGADSYEMEEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKEIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCGWGPPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTC PAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTY GCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGL FMRRRRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGT VYKGLWIPEGEKVKIPVAIKE LREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRL LGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWC VQIAKGMNYLED RRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPIKWMALESI L HRIYTHQS DVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGI PASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLV IQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADEYLIPQQGFFSSPSTSRTPLLSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVPKRPA GSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLVNTVQPTCVNSTFDSPA HWAQKGS HQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLRVAPQSSEFIGA(配列番号330)に示されるヒトEGFRタンパク質に従って、生じたアミノ酸置換／欠失／フレームシフトに基づいて命名される。例示的なヒトEGFR cDNA配列は、ATGCGACCCCTCCGGGACGGGCCGGGGCAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCTGCCCGGCGAGTCCGGGCTCCTGGAGGAAAAGAAAAGTTTGGCAAAGGCACGAGTAACAAGCTCACGCGAGTTGGGGCACTTTTGAAGATCATTTTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAACTGTGAGGTGGTCCCTTGGGAATTTGGAAATTACCTATGTG CAGAGGAATTATGATCTTTCTCTTAAAGACCATCCAGGAGGTGGCTGGTTATGTCCTCATTTGCCCTCAACACAGTGGAGCGAATTCCTTTGGAAAACCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTACTACGAAAATTCCTATGCCTTAGCAGTCTTATCTA ACTATGATGCAAAATAAAAACCGGACTGAAGGAGCTGCCCATGAGAAATTTACAGGAATCCTGCATGGCGGCCGTGCGGTTCAGCA

10

20

30

40

50

ACAACCCTGCCCCTGTGCAACGCTGGAGAGCATCCAGTGGCG
GGACATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAGCAACATGTCGATG
GACTTCCAGAACCACTGGGCGAGCTGCCAAAAGTGTGATC
CAAGCTGTCCCAATGGGAGCTGCTGGGGGTGCAGGAGAGGA
GAACTGCCAGAAACTGACCAAAAATCATCTGTGCCCAGCAG
TGCTCCGGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCCAGTGACTGCT
GCCACAACCAGTGTGCTGCAGGCTGCACAGGCCCCCCGGGA
GAGCGACTGCCTGGTCTGCCGCAAAATTCCGAGACGAAGCC
ACGTGCAAGGACACCTGCCCCCCCACTCATGCTCTACAACC
CCACCACGTACCAAGATGGATGTGAACCCCGAGGGGCAAAATA
CAGCTTTTGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCCGTAAT
TATGTGGTGACAGATCACGGCTCGTGCCTCCGAGCCTGTG
GGGCCGACAGCTATGAGATGGAGGAAGACGGCGTCCGCAA
GTGTAAGAAGTGCGAAGGGCCCTTGCCGCAAAAGTGTGTAAC
GGAATAGGTATTGGTGAAATTTAAAGACTCACTCTCCATAA
ATGCTACGAATATTAAACACTTCAAAAAACTGCACCTCCAT
CAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCATTTTAGGGGT
GACTCCTTCAACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGGAAC
TGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAATAACAGGGGTTTTT
GCTGATTTCAGGCTTTGGCCCTGAAAACAGGACGGACCTCCAT
GCCTTTTGAGAAACCTAGAAATCATACGCGGCAGGACCAAGC
AACATGGTCAAGTTTTTCTCTTGCAAGTCGTCAAGCCTGAACAT
AACATCCTTTGGGATTTACGCTCCCTCAAGGAGATAAGTGAT
GGAGATGTGATAATTTTCAGGAAACAATAAATTTGTGCTATG
CAAAATACAATAAACTGGAAAAAAACTGTTTGGGACCTCCGG
TCAGAAAAACCAAAATTTATAAGCAACAGAGGTGAAAAACAGC
TGCAAGGGCCACAGGCCAGGTCTGCCATGCCCTTGTTGCTCCC
CCGAGGGCTGCTGGGGGCCCGGAGCCCAAGGGACTGCGTCTC
TTGCCGGAATGTCAAGCCGAGGGCAGGGGAATGCGTGGACAAG
TGCAACCTTTCTGGAGGGGTGAGCCAAGGGAGTTTGTGGAGA
ACTCTGAGTGCATACAGTGCCACCCAGAGTGCCCTGCCCTCA
GGCCATGAACATCACCTGCACAGGACGGGGGACCAGACAAC
TGTATCCAGTGTGCCCACTACATTTGACGGGCCCCCCACTGCG
TCAAGACCTGCCCCGGCAGGAGTCAATGGGAGAAAAACAACAC
CCTGGTCTGGAAGTACGCGAGACGCCCGGCCATGTGTGCCAC
CTGTGCCATCCAAACTGCACCTACGGATGCACCTGGGGCCAG
GTCTTGAAAGGCTGTCCAACGAATGGGCCCTAAGATCCCGTC
CATCGCCACTGGGATGGTGGGGGGCCCTCCTCTTGCTGCTG
GTGGTGGCCCTGGGGGATCGGGCCTCTTTCATGCGAAGGCGCC
ACATCGTTTCGGAAGCGCACGCTGCGGAGGGCTGCTGCAGGA
GAGGGAGCTTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAAGCT
CCCAACCAAGCTCTCTTTGAGGATCTTTGAAGGAAACTGAAT
TCAAAAAAGATCAAAAGTGCTGGGGCTCCGGGTGCGTTTCGGCAC
GGTGTATAAGGGGACTCTGGATCCCAGAAAGGTGAGAAAGTT
AAAAATTCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAAGCAACAT
CTCCGAAGGCCAACAAAGGAATCCTCGATGAAGCCTACGT
GATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCGCTGCTG
GGCATCTGCCCTCACCTCCACCGGTGCAGCTCATCACGCAGC
TCATGCCCTTCGGCTGCCTCCTGGACTATGTCCGGGGAACA
CAAGACAAATATTGGCTCCCAGTACCTGCTCAAACTGGTGT

GTGCAGATCGCAAAGGGGCATGAACCTACTTTGGAGGACCGTCT
 GCTTGGTGCACCGCGACCTGGGCAGCCAGGAACGTACTGGT
 GAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTG
 GCCAAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAAGAAATACCATGCGAG
 AAGGAGGCAAAAGTGCCTATCAAGTGGATGGCATTTGGAATC
 AATTTTACACAGAATCTATACCCACCAGAGTGTCTCTGG
 AGCTACGGGGTGA CTGT TGGGAGTTGATGACCTTTGGAT
 CCAAGCCATATGACGGAATCCCTGCCAGCGAGATCTCCTC
 CATCCTGGAGAAAGGAGAAACGCCCTCCCTCAGCCACCCATA
 TGTACCATCGATGTCTACATGATCATGGTCAAGTGTCTGGA
 TGATAGACGCGAGATAGTCGCCCAAAGTTCCGTGAGTTGAT
 CATCGAATTCTCCAATAATGGCCCGAGACCCCCAGCGCTAC
 CTTGTCAATTCAGGGGGATGAAAGAATGCATTTGCCAAGTC
 CTACAGACTCCAACCTTCTACCGTGGCCCTGATGGATGAAGA
 AGACATGGACGACGCTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCATC
 CCACAGCAGGGGCTTCTTTCAGCAGCCCTCCACGTCACGGA
 CTCCCTCTCTGAGCTCTCTGAGTGC AACCCAGCAACAATTCT
 CACCGTGGCTTGCATTTGATAGAAATGGGGCTGCAAAAGCTGT
 CCCATCAAGGAAGACAGCTTCTTGCAGCGATACAGCTCAG
 ACCCCACAGGCGCGCTTGA CTGAGGACAGCATAGACGACAC
 CTTCTCTCCAGTGCCCTGAATACATAAACCCAGTCCGTTCCT
 AAAAGGCCCGCTGGCTCTGTGCAGAAATCCTGTCTATCACA
 ATCAGCCTCTGAACCCCGCGGCCCAGCAGAGACCCACACTA
 CCAGGACCCCCACAGCACTGCAGTGGGCAACCCCGAGTAT
 CTCAACACTGTCCAGCCCACTGTGTCAACAGCACATTCG
 ACAGCCCTGCCCACTGGGCCCAGAAAGGCGAGCCACCAAAAT
 TAGCCTGGACAACCCCTGACTACCAGCAGGACTTCTTTTCCC
 AAGGAAGCCAAGCCAATAATGGCATCTTTAAGGGCTCCACAG
 CTGAAAATGCAGAAATACCTAAGGGTCTGCGGCCACAAAGCAG
 TGAATTTATTGGAGCATGA（配列番号343）に示される。いくつかの実
 施形態では、DNA変異は、配列番号330または配列番号343に従ってG719、E
 746、T790M、C797S、S768I、V769、H773、D770、または
 L858の変異をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子における
 DNA変異は、G719A、E746__A750del、T790M、C797S、S7
 68I、V769__D770insASV、H773__V774insH、D770__N
 771insG、D770__N771insSVD、またはL858R変異EGFRタン
 パク質（配列番号330に従って付番）をコードし、またはもたらす。これらのDNA変
 異はまた、以下の表A1において（変異したポリペプチドコドンではなく）それらのヌク
 レオチド位置によって表される。例えば、いくつかの実施形態では、EGFR遺伝子にお
 けるDNA変異は、配列番号343の対応するcDNA配列におけるc. 2156G>C
 、c. 2235__2249del15、c. 2236__2250del15、c. 236
 9C>T、c. 2389T>A、c. 2390G>C、c. 2303G>T、c. 230
 7__2308ins9GCCAGCGTG、c. 2319__2320insCAC、c.
 2310__2311insGGT、c. 2311__2312ins9GCGTGGACA
 、c. 2309__2310AC>CCAGCGTGGAT、またはc. 2573T>G変
 異をもたらす。

【0087】

いくつかの実施形態では、EGFR変異（例えば、G719A変異EGFRタンパク質
 をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列CTT
 GTGGAGCCTCTTACACCC（配列番号11）及びTGCCGAACGCAAC

CGGA（配列番号12）をそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、EGFR変異（例えば、E746__A750del変異EGFRタンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列GCCAGTTAACTCTTCCCTCTC（配列番号13）及びATCGAGGATTTCTTGTGGCTT（配列番号14）をそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、EGFR変異（例えば、T790M、C797S、S768I、V769__D770insASV、H773__V774insH、D770__N771insG、D770__N771insSVD、またはV769__D770insASV変異EGFRタンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列CCTCCACCGTGCGAGATCATC（配列番号15）及びTTCCCTGATTACCTTTGCGAT（配列番号16）をそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、EGFR変異（例えば、T790M、C797S、S768I、V769__D770insASV、H773__V774insH、D770__N771insG、D770__N771insSVD、またはV769__D770insASV変異EGFRタンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列CCTCCACCGTGCGAGATCATC（配列番号15）及びTTCCCTGATTACCTTTGCGAT（配列番号16）をそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、EGFR変異（例えば、S768変異EGFRタンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列CCACACTGACGTGCCCTCT（配列番号511）及びGCACACGTAGGGGTGTCCAAGA（配列番号512）をそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、EGFR変異（例えば、V769__D770insASV変異EGFRタンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列CCACACTGACGTGCCCTCT（配列番号513）及びGTACACGCTGGCCACGCCG（配列番号514）をそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、EGFR変異（例えば、H773__V774insH変異EGFRタンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列CCACACTGACGTGCCCTCT（配列番号515）及びCAGGCGGCACACGTGAT（配列番号516）をそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、EGFR変異（例えば、D770__N771insG変異EGFRタンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列CCACACTGACGTGCCCTCT（配列番号517）及びAGGCGGCACACGTGCGGGTTAC（配列番号518）をそれぞれ含む。いくつかの実施形態では、EGFR変異（例えば、L858R変異EGFRタンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列GGAGGACCGTCGCTTGG（配列番号17）を含む。

10

20

30

40

50

【0088】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、AKT1遺伝子における1つ以上の変異（例えば、DNA変異）の遺伝子座を増幅することを含む。AKT1は、AKT、CWS6、PKB、PKB-アルファ、PRKBA、RAC、及びRAC-アルファとしても知られている、ヒトがんにおいて頻繁に変異するRAC-アルファセリン／トレオニンプロテインキナーゼをコードする。いくつかの実施形態では、AKT1遺伝子は、ヒトAKT1遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒトAKT1遺伝子は、NCBI Entrez Gene ID番号207によって表される遺伝子（その変異体及びバリエーションを含む）を指す。他の実施形態では、AKT1遺伝子は、以下の生物のうちの1つからのものである：マウス（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号11651を参照されたい）、ラット（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号24185を参照されたい）、魚（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号101910198を参照されたい）、イヌ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号490878を参照されたい）、ウシ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号280991を参照されたい）、ニワトリ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号395928を参照されたい）、またはチンパンジー（例えば、

NCBI Entrez Gene ID番号740898を参照されたい)。
【0089】

がんに関連する多様なAKT1変異が知られており、本明細書に記載の方法によって好適に検出され得る；例えば、Lovly, C., L. Horn, W. Pao. 2015. AKT1 in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). My Cancer Genome at www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/akt1/ (6月18日更新)を参照されたい。染色体14上のAKT1がん原遺伝子は、セリントレオニプロテインキナーゼ(PKB)ならびに細胞増殖、生存、アポトーシス、細胞成長、グルコース代謝、ゲノム安定性、転写、血管新生において役割を果たすPI3Kの下流エフェクターをコードする。AKT1は、複数のがんにおいてmTORシグナル伝達経路及び糖分解表現型の構成的活性化を促進する。がんにおいて観察される最も頻繁なAKT1変化は、プレックストリン相同ドメインにおけるE17Kである。AKT1の増幅及び過剰発現もまた、所定のがんにおいて観察されている。AKT1における点変異は、肺癌(0.6%)で生じるが、より頻繁にはsqNSCLC(2~5%)で生じる。肺癌において、1.01%は、AKT1におけるコピー数増加を有する。AKT1変異についての検査は、様々な薬物、例えば、エベロリムスを含むPI3K/AKT/mTOR阻害剤に対する感受性を決定するのに有用であり得る。AKT1の構成的活性化は、肺癌においてEGFR-TKIを含む多様ながんにおいて化学療法または放射線療法に対する耐性に関連する。直接的AKT阻害剤は、がんについてまだ承認されていないが、AKT1に対して感受性のあるFDA承認薬には、エベロリムス及びテムシロリムスが含まれる。前臨床データは、AKT阻害剤による、E17Kを含む所定のAKT1変異の阻害を報告している。様々なアロステリック及びATP競合性AKT阻害剤が現在、臨床試験中である。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、AKT1変異は、MSDVAIVKEGWLHKRGEYIKTWPRPYFL LKNDGTFIGYKERPQDVDQREAPLN NFSVAQCQLMKTERPRPNTFIIRCLQWTTVIERTFHVE TP EERE EWTTAIQT VADGLKKQEEEEEMDFRSGSPSDNSGAEE MEVSLAKPKHRVTMNEFEY LKLLGKGTFGKVILVKEKATGRYYAMKILKKEVIVAKDEVAHTLTENRVLQNSRHPFLTAL KYSFQTHDR LCFVMEYANGGELFFHLSRERVVFSEDRARFY GAEIVSALDY LHSEKNVVYRD LKLENLMLDKDGH IKITDF GLCKEGIKDGATMKTFCGTPEYLAPEVLEDNDYGRAVDWW GLGVVMYEMMCGR LPFYNQDHEKLFELILMEEIRFPRTLGP EAKSLLSGL LKKDPKQRLGGGSEDAKEIMQHRFFAGIVW QHVEYEKKLSPPFKPQVTSETDTRYFDEEFTAQMITITPPD QDDSMCEVDSERRPHFPQFSYSASGTA(配列番号331)に示されるヒトAKT1タンパク質に従って、生じたアミノ酸置換/欠失/フレームシフトに基づいて命名される。例示的なヒトAKT1 cDNA配列は、ATGAGCGACGTGGCTATTTGTGAAGGAGGGTTGGCTGCACAAACGAGGGGAGTACATCAAGACCTGGCGGGCCACGCTACTTCCTCCTCAAGAA TGATGGCACCTTTCATTTGGCTACAAGGAGCGGGCCGCGAGGATGTGGACCAACGTGAGGCTCCCCCTCAACAACCTTCTCTGTGGCGCAGTGGCCAGCTGATGAAGACGGAGCGGGCCCCGGCCCCAACACCTTTCATCATCCGCTGCGCTGCAGTGGACCACTGTTCATCGAACGCACCTTCCATGTGGAGACTCCTGAGGAGCGGGGAGGA GTGGACAACCGCCATCCAGACTGTGGCTGACGGGCTCAAG AAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGATGGACTTCCGGGTCGGGGCTCAC CCAGTGACAACCTCAGGGGGCTGAAGAGATGGAGGTGTCCCT GGCCAAGCCCAAGCACCGCGTGAACCATGAACGAGTTTGTAG TACCTGAAGCTGCTGGGCAAGGGGCACTTTTCGGGCAAGGTGA

10

20

30

40

50

T C C T G G T G A A G G A G A A G G C C A C A G G C C G C T A C T A C G C C A T
G A A G A T C C T C A A G A A G G A A G T C A T C G T G G C C A A G G A C G A G
G T G G C C C A C A C A C T C A C C G A G A A C C G C G T C C T G C A G A A C T
C C A G G C A C C C C T T C C T C A C A G C C C T G A A G T A C T C T T T C C A
G A C C C A C G A C C G C C T C T G C T T T G T C A T G G A G T A C G C C A A C
G G G G G C G A G C T G T T C T T C C A C C T G T C C C G G G A G C G T G T G T
T C T C C G A G G A C C G G G C C C G C T T C T A T G G C G C T G A G A T T G T
G T C A G C C C T G G A C T A C C T G C A C T C G G A G A A G A A C G T G G T G
T A C C G G G A C C T C A A G C T G G A G A A C C T C A T G C T G G A C A A G G
A C G G G C A C A T T A A G A T C A C A G A C T T C G G G C T G T G C A A G G A
G G G G A T C A A G G A C G G T G C C A C C A T G A A G A C C T T T T G C G G C
A C A C C T G A G T A C C T G G C C C C G A G G T G C T G G A G G A C A A T G
A C T A C G G C C G T G C A G T G G A C T G G T G G G G G C T G G G C G T G G T
C A T G T A C G A G A T G A T G T G C G G T C G C C T G C C C T T C T A C A A C
C A G G A C C A T G A G A A G C T T T T T G A G C T C A T C C T C A T G G A G G
A G A T C C G C T T C C C G C G C A C G C T T G G T C C C G A G G C C A A G T C
C T T G C T T T C A G G G C T G C T C A A G A A G G A C C C C A A G C A G A G G
C T T G G C G G G G G C T C C G A G G A C G C C A A G G A G A T C A T G C A G C
A T C G C T T C T T T G C C G G T A T C G T G T G G C A G C A C G T G T A C G A
G A A G A A G C T C A G C C C A C C C T T C A A G C C C C A G G T C A C G T C G
G A G A C T G A C A C C A G G T A T T T T G A T G A G G A G T T C A C G G C C C
A G A T G A T C A C C A T C A C A C C A C C T G A C C A A G A T G A C A G C A T
G G A G T G T G T G G A C A G C G A G C G C A G G C C C C A C T T C C C C C A G
T T C T C C T A C T C G G C C A G C G G C A C G G C C T G A (配列番号 3 4 4) に

示される。いくつかの実施形態では、DNA 変異は、配列番号 3 3 1 または配列番号 3 4 4 に従って E 1 7 の変異をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、A K T 1 遺伝子における DNA 変異は、E 1 7 K 変異 A K T 1 タンパク質 (配列番号 3 3 1 に従って付番) をコードし、またはもたらす。この DNA 変異はまた、以下の表 A 1 において (変異したポリペプチドコドンではなく) そのヌクレオチド位置によって表される。例えば、いくつかの実施形態では、A K T 1 遺伝子における DNA 変異は、配列番号 3 4 4 の対応する c DNA 配列における c . 4 9 G > A 変異をもたらす。

【0090】

いくつかの実施形態では、A K T 1 変異 (例えば、E 1 7 K 変異 A K T 1 タンパク質をコードし、またはもたらす) の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列 G A G G G T C T G A C G G G T A G A G T G (配列番号 3 8 0) 及び T G G C C G C C A G G T C T T G A T G T A (配列番号 3 8 1) をそれぞれ含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、M E K 1 遺伝子における 1 つ以上の変異 (例えば、DNA 変異) の遺伝子座を増幅することを含む。M E K 1 は、M A P 2 K 1、C F C 3、M A P K K 1、M K K 1、及び P R K M K 1 としても知られている、ヒトがんにおいて頻繁に変異する二重特異性マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ 1 をコードする。いくつかの実施形態では、M E K 1 遺伝子は、ヒト M E K 1 遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒト M E K 1 遺伝子は、N C B I E n t r e z G e n e I D 番号 5 6 0 4 によって表される遺伝子 (その変異体及びバリエーションを含む) を指す。他の実施形態では、M E K 1 遺伝子は、以下の生物のうちの 1 つからのものである: マウス (例えば、N C B I E n t r e z G e n e I D 番号 2 6 3 9 5 を参照されたい)、ラット (例えば、N C B I E n t r e z G e n e I D 番号 1 7 0 8 5 1 を参照されたい)、魚 (例えば、N C B I E n t r e z G e n e I D 番号 4 0 6 7 2 8 を参照されたい)、イヌ (例えば、N C B I E n t r e z G e n e I D 番号 4 7 8 3 4 7 を参照されたい)、ウシ (例えば、N C B I E n t r e z G e n e I D 番号 5 3 3

【 0 0 9 2 】

rgenome.org/content/disease/lung-cancer/map2k1/（6月18日更新）を参照されたい。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、MEK1変異は、例えば、MPKKKPTPIQLNPAPDGS AVNGTS

C DNA 配列は、ATGCCCAAGAAAGAGCGACGCCCATCCAGCT
GAACCCGGCCCCGACGGCTCTGCAGTTAAACGGGACCAAGC
TCTGCGGAGACCAACTTTGGAGGGCCTTGCAAGAAAGAGCTGG
AGGAGCTAGAGCTTTGATGAGCAGCAGCGAAAGCGCCTTGA
GGCCTTTCTTACCCAGAAAGCAGAAAGGTGGGAGAACTGAAG
GATGACGACTTTGAGAAAGATCAGTGAGCTGGGGGGCTGGCA

A A C C C C G C A G A G A G A G C A G A T T T G A A G C A A C T C A T G G T T C

50

A T G C T T T T A T C A A G A G A T C T G A T G C T G A G G A A G T G G A T T T
T G C A G G T T G G C T C T G C T C C A C C A T C G G C C T T A A C C A G C C C
A G C A C A C C A A C C C A T G C T G C T G G C G T C T A A (配列番号 345) に
示される。いくつかの実施形態では、DNA 変異は、配列番号 332 または配列番号 34
5 に従って Q56 または K57 の変異をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、M
E K 1 遺伝子における DNA 変異は、K57N 変異 M E K 1 タンパク質 (配列番号 332
に従って付番) をコードし、またはもたらす。これらの DNA 変異はまた、以下の表 A 1
において (変異したポリペプチドコドンではなく) それらのヌクレオチド位置によって表
される。例えば、いくつかの実施形態では、M E K 1 遺伝子における DNA 変異は、配列
番号 345 の対応する cDNA 配列における c. 171 G > T 変異をもたらす。

10

【0093】

いくつかの実施形態では、M E K 1 変異 (例えば、K57N 変異 M E K 1 タンパク質を
コードし、またはもたらす) の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列 C C T T
C A G T T C T C C C A C C T T C T G (配列番号 398) を含む。

【0094】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、H E R 2 遺伝子における 1 つ以上の変異 (例
例えば、DNA 変異) の遺伝子座を増幅することを含む。H E R 2 は、E R B B 2、H E
R - 2、C D 3 4 0、M L N 1 9、N E U、N G L、及び T K R 1 としても知られている
、ヒトがんにおいて頻繁に変異する受容体チロシンキナーゼである H E R 2 / n e u が
原遺伝子をコードする。いくつかの実施形態では、H E R 2 遺伝子は、ヒト H E R 2 遺
伝子である。いくつかの実施形態では、ヒト H E R 2 遺伝子は、N C B I E n t r e z
G e n e I D 番号 2064 によって表される遺伝子 (その変異体及びバリエーションを含む)
を指す。他の実施形態では、H E R 2 遺伝子は、以下の生物のうちの 1 つからのもので
ある: マウス (例えば、N C B I E n t r e z G e n e I D 番号 13866 を参照
されたい)、ラット (例えば、N C B I E n t r e z G e n e I D 番号 24337
を参照されたい)、魚 (例えば、N C B I E n t r e z G e n e I D 番号 3030
0 を参照されたい)、イヌ (例えば、N C B I E n t r e z G e n e I D 番号 40
3883 を参照されたい)、ウマ (例えば、N C B I E n t r e z G e n e I D 番
号 100054739 を参照されたい)、チンパンジー (例えば、N C B I E n t r e
z G e n e I D 番号 454636 を参照されたい)、またはネコ (例えば、N C B I
E n t r e z G e n e I D 番号 751824 を参照されたい)。

20

30

【0095】

がんに関連する多様な H E R 2 変異が知られており、本明細書に記載の方法によって好
適に検出され得る; 例えば、L o v l y, C., L. H o r n, W. P a o. 2015.
H E R 2 (E R B B 2) i n N o n - S m a l l C e l l L u n g C a n c e r
(N S C L C). M y C a n c e r G e n o m e a t w w w. m y c a n c e r
g e n o m e. o r g / c o n t e n t / d i s e a s e / l u n g - c a n c e r / e
r b b 2 / (6 月 1 8 日 更 新) を 参 照 され たい。がんに見られる E R B B 2 における変化
にはまた、キナーゼドメインにおける挿入または細胞外ドメインにおける欠失が含まれる
。E R B B 2 の細胞外ドメインにおける大きな欠失は、変異体産物 p 9 5 H E R 2 及び Δ
1 6 H E R 2 をもたらす。他の一般的に変異した残基には、G 3 0 9、S 3 1 0、S 3 3
5、L 7 5 5、7 7 7、及び 8 4 2 が含まれる。H E R 2 活性化は、E G F R の共発現を
有する N S C L C を含む多数のがんタイプにおいて予後不良に関連する。E G F R T 7
9 0 M に続いて、H E R 2 及び M E T 増幅は、N S L C において第一世代 E G F R T K
I 下での獲得耐性 (10 ~ 20 %) の最も一般的な知見である。E R B B 2 に対して感受
性のある F D A 承認薬には、トラスツズマブ、アファチニブ、ラパチニブ、及びペルツズ
マブが含まれる。T 7 9 0 M / 活性化変異の比は、第三世代 T K I に対する感受性をより
長く保持する患者を予測し得る。H E R 2 + 状態は、内分泌及び化学療法レジメンに対す
る耐性に関連する。9 5 H E R 2、Δ 1 6 H E R 2、L 7 2 6、L 7 5 5、P 7 8 0、及
びエクソン 20 における小さな挿入を含む変化は、トラスツズマブまたはラパチニブに対

40

50

して耐性である。第一世代EGFR／HER阻害剤に対する耐性を克服するために、アフチニブ、ダコミチニブ、及びネラチニブを含む第二世代EGFR／HER-TKIは、EGFR、HER2、及びHER4の酵素活性化を不可逆的にブロックする。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、HER2変異は、MELAALCRWGLLLALLLP
PGAASTQVCTGTDMLKRLPASPEETHLDMLRHL YQGCGQVVQ
GNLELT YLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLI AHNQVRQVPLQ
RLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPGGL
RELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNN
QLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQS LTR
TVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLH
FNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVT
ACPYNYLSTDVGSCTLVCP LHNQEVTAEDGTQRCEKCSKP
CARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGSLAFL
PESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWPD
SLPDL SVFQNLQVIRGRILHNGAYS LTLQGLGISWLGLRS
LRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTA
NRPEDEC VGEGLACHQLCARGHCWGP GPTQCVNCSQFLRG
QECVEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCF
GPEADQCVACA HYKDP PFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFP
DEEGACQPCPINCTHSCVDLDDKGC PAEQRASPLTSTISA
VVGILLVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELV
EPLTPSGAMPNQAQMRI LKETELRKVKVLGSGAFGT VYKG
IWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGV
GSPYVSRL LGLICTSTVQLVTQLMPYGC LLDHVREN RGR L
GSQDLLNWCMQIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPN
HVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWMAL ESILRR
RFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLL EK
GERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFS
RMARDPQRFVVIQNE DLGPASPLDSTFYRS LLEDDDMGDL
VDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGAGGMVHHRHRS SSTRNM（配
列番号333）に示されるヒトHER2タンパク質に従って、生じたアミノ酸置換／欠失
／フレームシフトに基づいて命名される。例示的なヒトHER2 cDNA配列は、AT
GGAGCTGGCGGCGCCTTGTGCGCGCTGGGGGGCTCCTCCTCGCC
CTCTTGCCCCCGGAGCGCGAGCACCCAAAGTGTGACCCG
GCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCTGCGAGTCCCGAGAC
CCACCTGGACATGCTCCGCCACCTCTACCAGGGCTGCCAG
GTGGTGACAGGGAAACCTGGAACCTACCTACCTGCCACCA
ATGCCAGCCTGTCCTTCTGTCAGGATATCCAGGAGGTGCA
GGGCTACGTGCTCATCGCTCACAAACCAAGTGAGGCAGGTC
CCACTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCGACCCAGCTCT
TTGAGGACAACCTATGCCCTGGCCGTGCTAGACAATGGAGA
CCCGCTGAACAATAACCAACCCCTGTACAGGGGGCTCCCCA
GGAGGCCTGCGGGAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGA
TCTTGAAAGGAGGGGTCTTGATCCAGCGGAACCCCCAGCT
CTGCTACCAAGGACACGATTTTGTGGAAGGACATCTTCCAC
AAGAACAACCAAGCTGGCTCTCACACTGATAGACACCAACC
GCTCTCGGGCCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAAGGG
CTCCCGCTGCTGGGGAGAGAGTTCTGAGGATTGTGAGAGC
CTGACGCGCACTGTCTGTGCGGGTGGCTGTGCGCCGCTGCA
AGGGGCCACTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGC

10

20

30

40

50

T G C C G G C T G C A C G G G C C C C A A G C A C T C T G A C T G C C T G G C C
T G C C T C C A C T T C A A C C A C A G T G G C A T C T G T G A G C T G C A C T
G C C C A G C C C T G G T C A C C T A C A A C A C A G A C A C G T T T G A G T C
C A T G C C C A A T C C C G A G G G C C G G T A T A C A T T C G G C G C C A G C
T G T G T G A C T G C C T G T C C C T A C A A C T A C C T T T C T A C G G A C G
T G G G A T C C T G C A C C C T C G T C T G C C C C C T G C A C A A C C A A G A
G G T G A C A G C A G A G G A T G G A A C A C A G C G G T G T G A G A A G T G C
A G C A A G C C C T G T G C C C G A G T G T G C T A T G G T C T G G G C A T G G
A G C A C T T G C G A G A G G T G A G G G C A G T T A C C A G T G C C A A T A T
C C A G G A G T T T G C T G G C T G C A A G A A G A T C T T T G G G A G C C T G
G C A T T T C T G C C G G A G A G C T T T G A T G G G G A C C C A G C C T C C A
A C A C T G C C C C G C T C C A G C C A G A G C A G C T C C A A G T G T T T G A
G A C T C T G G A A G A G A T C A C A G G T T A C C T A T A C A T C T C A G C A
T G G C C G G A C A G C C T G C C T G A C C T C A G C G T C T T C C A G A A C C
T G C A A G T A A T C C G G G G A C G A A T T C T G C A C A A T G G C G C C T A
C T C G C T G A C C C T G C A A G G G C T G G G C A T C A G C T G G C T G G G G
C T G C G C T C A C T G A G G G A A C T G G G C A G T G G A C T G G C C C T C A
T C C A C C A T A A C A C C C A C C T C T G C T T C G T G C A C A C G G T G C C
C T G G G A C C A G C T C T T T C G G A A C C C G C A C C A A G C T C T G C T C
C A C A C T G C C A A C C G G C C A G A G G A C G A G T G T G T G G G C G A G G
G C C T G G C C T G C C A C C A G C T G T G C G C C C G A G G G C A C T G C T G
G G G T C C A G G G C C C A C C C A G T G T G T C A A C T G C A G C C A G T T C
C T T C G G G G C C A G G A G T G C G T G G A G G A A T G C C G A G T A C T G C
A G G G G C T C C C C A G G G A G T A T G T G A A T G C C A G G C A C T G T T T
G C C G T G C C A C C C T G A G T G T C A G C C C C A G A A T G G C T C A G T G
A C C T G T T T T G G A C C G G A G G C T G A C C A G T G T G T G G C C T G T G
C C C A C T A T A A G G A C C C T C C C T T C T G C G T G G C C C G C T G C C C
C A G C G G T G T G A A A C C T G A C C T C T C C T A C A T G C C C A T C T G G
A A G T T T C C A G A T G A G G A G G G C G C A T G C C A G C C T T G C C C C A
T C A A C T G C A C C C A C T C C T G T G T G G A C C T G G A T G A C A A G G G
C T G C C C C G C C G A G C A G A G A G C C A G C C C T C T G A C G T C C A T C
A T C T C T G C G G T G G T T G G C A T T C T G C T G G T C G T G G T C T T G G
G G G T G G T C T T T G G G A T C C T C A T C A A G C G A C G G C A G C A G A A
G A T C C G G A A G T A C A C G A T G C G G A G A C T G C T G C A G G A A A C G
G A G C T G G T G G A G C C G C T G A C A C C T A G C G G A G C G A T G C C C A
A C C A G G C G C A G A T G C G G A T C C T G A A A G A G A C G G A G C T G A G
G A A G G T G A A G G T G C T T G G A T C T G G C G C T T T T G G C A C A G T C
T A C A A G G G C A T C T G G A T C C C T G A T G G G G A G A A T G T G A A A A
T T C C A G T G G C C A T C A A A G T G T T G A G G G A A A A C A C A T C C C C
C A A A G C C A A C A A A G A A A T C T T A G A C G A A G C A T A C G T G A T G
G C T G G T G T G G G C T C C C C A T A T G T C T C C C G C C T T C T G G G C A
T C T G C C T G A C A T C C A C G G T G C A G C T G G T G A C A C A G C T T A T
G C C C T A T G G C T G C C T C T T A G A C C A T G T C C G G G A A A A C C G C
G G A C G C C T G G G C T C C C A G G A C C T G C T G A A C T G G T G T A T G C
A G A T T G C C A A G G G G A T G A G C T A C C T G G A G G A T G T G C G G C T
C G T A C A C A G G G A C T T G G C C G C T C G G A A C G T G C T G G T C A A G
A G T C C C A A C C A T G T C A A A A T T A C A G A C T T C G G G C T G G C T C
G G C T G C T G G A C A T T G A C G A G A C A G A G T A C C A T G C A G A T G G
G G G C A A G G T G C C C A T C A A G T G G A T G G C G C T G G A G T C C A T T
C T C C G C C G G C G G T T C A C C C A C C A G A G T G A T G T G T G G A G T T

10

20

30

40

50

A T G G T G T G A C T G T G T G G G A G C T G A T G A C T T T T T G G G G C C A A
A C C T T A C G A T G G G A T C C C A G C C C G G G A G A T C C C T G A C C T G
C T G G A A A A G G G G G A G C G G C T G C C C C A G C C C C C C A T C T G C A
C C A T T G A T G T C T A C A T G A T C A T G G T C A A A T G T T G G A T G A T
T G A C T C T G A A T G T C G G C C A A G A T T C C G G G A G T T G G T G T C T
G A A T T C T C C C G C A T G G C C A G G G A C C C C C A G C G C T T T T G T G G
T C A T C C A G A A T G A G G A C T T G G G C C C A G C C A G T C C C T T G G A
C A G C A C C T T C T A C C G C T C A C T G C T G G A G G A C G A T G A C A T G
G G G G A C C T G G T G G A T G C T G A G G A G T A T C T G G T A C C C C A G C
A G G G C T T C T T C T G T C C A G A C C C T G C C C C G G G C G C T G G G G G
C A T G G T C C A C C A C A G G C A C C G C A G C T C A T C T A C C A G G A A T
A T G T G A (配列番号346)に示される。いくつかの実施形態では、DNA変異は、
配列番号333または配列番号346に従ってA775またはG776の変異をもたらす。
例えば、いくつかの実施形態では、HER2遺伝子におけるDNA変異は、A775—
G776 ins YVMA変異HER2タンパク質(配列番号333に従って付番)をコー
ドし、またはもたらす。これらのDNA変異はまた、以下の表A1において(変異したポ
リペプチドコドンではなく)それらのヌクレオチド位置によって表される。例えば、いく
つかの実施形態では、HER2遺伝子におけるDNA変異は、配列番号346の対応する
cDNA配列におけるc.2324—2325 ins 12変異をもたらす。

【0096】

いくつかの実施形態では、HER2変異(例えば、A775—G776 ins YVMA
変異HER2タンパク質をコードし、またはもたらす)の遺伝子座を増幅するためのプライ
マー対は、配列ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT(配列番号414)及び
ACACCAAGCCATCACGTAAGACA(配列番号415)をそれぞれ含む。

【0097】

例示的で非限定的なDNA変異は、以下の表Aに提供されている。

【0098】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、ALK遺伝子における1つ以上の変異(例
えば、RNA変異)の遺伝子座を増幅することを含む。ALKは、CD246、NBLS
T3、またはALKチロシンキナーゼ受容体としても知られている、ヒトがんにおいて頻
繁に変異する受容体チロシンキナーゼである未分化リンパ腫キナーゼをコードする。いく
つかの実施形態では、ALK遺伝子は、ヒトALK遺伝子である。いくつかの実施形態で
は、ヒトALK遺伝子は、NCBI Entrez Gene ID番号238によって
表される遺伝子(その変異体及びバリエーションを含む)を指す。他の実施形態では、ALK
遺伝子は、以下の生物のうちの1つからのものである:マウス(例えば、NCBI En
trez Gene ID番号11682を参照されたい)、ラット(例えば、NCBI En
trez Gene ID番号266802を参照されたい)、魚(例えば、NCB
I Entrez Gene ID番号563509を参照されたい)、ウシ(例えば、
NCBI Entrez Gene ID番号536642を参照されたい)、ニワトリ
(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号421297を参照されたい)
、またはチンパンジー(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号4591
27を参照されたい)。

【0099】

がんに関連する多様なALK変異が知られており、本明細書に記載の方法によって好適
に検出され得る;例えば、Lovly, C., L. Horn, W. Pao. 2015. A
L K i n N o n - S m a l l C e l l L u n g C a n c e r (N S C L C) .
M y C a n c e r G e n o m e a t w w w . m y c a n c e r g e n o m e . o
r g / c o n t e n t / d i s e a s e / l u n g - c a n c e r / a l k / (9 月 2 9
日更新)を参照されたい。染色体2上のALK遺伝子は、細胞成長、形質転換、及び分化
に關与する受容体チロシンキナーゼをコードする。ALKにおける変化は、JAK-ST

10

20

30

40

50

A T 3、P I 3 K-A K T 及び R A S-M A P K 経路を制御し、かつ様々な組織における
 腫瘍形成を誘導するキナーゼを構成的に活性化する。最も一般的な A L K 変化は、蛍光 i
 n s i t u ハイブリダイゼーション (F I S H) によって検出可能な遺伝子再構成であ
 る。融合体に加えて、様々ながんは、F 1 1 7 4 L、D 1 0 9 1 N、I 1 2 5 0 T、及び
 R 1 2 7 5 などの A L K における機能獲得変異を保有する。A L K 再構成 N S C L C は、
 すべての N S C L C の 3 ~ 7 % を表す。A L K 再構成 N S C L C の 8 パーセントはまた、
 E G F R + または K R A S + 変異している。A L K 再構成は、A L K + 患者のおよそ 6 0
 ~ 7 0 % においてクリゾチニブに対する反応に関連する。多数の点変異、例えば、F 1 1
 7 4 L は、A L K 阻害剤療法に対する耐性に関連することが知られている。また、E G F
 R などの他のドライバー遺伝子における A L K コピー数増加及び活性化変異は、A L K 阻
 害剤療法を受けている患者における獲得耐性メカニズムであり得る。N S C L C に対する
 A L K に感受性のある F D A 承認薬には、セリチニブ、アレクチニブ、及びクリゾチニブ
 が含まれる。証拠は、N S C L C において A L K 融合パートナーに応じてクリゾチニブに
 対する異なる一次的反応を示唆している。熱ショックタンパク質 9 0 (H S P 9 0) 阻害
 剤は、安定性について H S P 9 0 に対する E M L 4-A L K などの A L K 融合体の依存性
 のため、潜在的な処置法を提示する。次世代の薬剤、例えば、アレクチニブは、クリゾチ
 ニブ及びセリチニブの両方で処置された A L K + 患者における C N S 転移を救済し得る。
 本明細書に記載のいくつかの実施形態では、A L K 変異は、例えば、M G A I G L L W L
 L P L L L S T A A V G S G M G T G Q R A G S P A A G P P L Q P R E P L S Y S R L
 Q R K S L A V D F V V P S L F R V Y A R D L L L P P S S S E L K A G R P E A R G
 S L A L D C A P L L R L L G P A P G V S W T A G S P A P A E A R T L S R V L K G
 G S V R K L R R A K Q L V L E L G E E A I L E G C V G P P G E A A V G L L Q F N
 L S E L F S W W I R Q G E G R L R I R L M P E K K A S E V G R E G R L S A A I R
 A S Q P R L L F Q I F G T G H S S L E S P T N M P S P S P D Y F T W N L T W I M
 K D S F P F L S H R S R Y G L E C S F D F P C E L E Y S P P L H D L R N Q S W S
 W R R I P S E E A S Q M D L L D G P G A E R S K E M P R G S F L L L N T S A D S
 K H T I L S P W M R S S S E H C T L A V S V H R H L Q P S G R Y I A Q L L P H N
 E A A R E I L L M P T P G K H G W T V L Q G R I G R P D N P F R V A L E Y I S S
 G N R S L S A V D F F A L K N C S E G T S P G S K M A L Q S S F T C W N G T V L
 Q L G Q A C D F H Q D C A Q G E D E S Q M C R K L P V G F Y C N F E D G F C G W
 T Q G T L S P H T P Q W Q V R T L K D A R F Q D H Q D H A L L L S T T D V P A S
 E S A T V T S A T F P A P I K S S P C E L R M S W L I R G V L R G N V S L V L V
 E N K T G K E Q G R M V W H V A A Y E G L S L W Q W M V L P L L D V S D R F W L
 Q M V A W W G Q G S R A I V A F D N I S I S L D C Y L T I S G E D K I L Q N T A
 P K S R N L F E R N P N K E L K P G E N S P R Q T P I F D P T V H W L F T T C G
 A S G P H G P T Q A Q C N N A Y Q N S N L S V E V G S E G P L K G I Q I W K V P
 A T D T Y S I S G Y G A A G G K G G K N T M M R S H G V S V L G I F N L E K D D
 M L Y I L V G Q Q G E D A C P S T N Q L I Q K V C I G E N N V I E E E I R V N R
 S V H E W A G G G G G G G G A T Y V F K M K D G V P V P L I I A A G G G G R A Y
 G A K T D T F H P E R L E N N S S V L G L N G N S G A A G G G G G W N D N T S L
 L W A G K S L Q E G A T G G H S C P Q A M K K W G W E T R G G F G G G G G G C S
 S G G G G G G Y I G G N A A S N N D P E M D G E D G V S F I S P L G I L Y T P A
 L K V M E G H G E V N I K H Y L N C S H C E V D E C H M D P E S H K V I C F C D
 H G T V L A E D G V S C I V S P T P E P H L P L S L I L S V V T S A L V A A L V
 L A F S G I M I V Y R R K H Q E L Q A M Q M E L Q S P E Y K L S K L R T S T I M
 T D Y N P N Y C F A G K T S S I S D L K E V P R K N I T L I R G L G H G A F G E
 V Y E G Q V S G M P N D P S P L Q V A V K T L P E V C S E Q D E L D F L M E A L
 I I S K F N H Q N I V R C I G V S L Q S L P R F I L L E L M A G G D L K S F L R
 E T R P R P S Q P S S L A M L D L L H V A R D I A C G C Q Y L E E N H F I H R D
 I A A R N C L L T C P G P G R V A K I G D F G M A R D I Y R A S Y Y R K G G C A

10

20

30

40

50

MLPVKWMPPPEAFMEGIFTSTKTDTWSTFGVLLWEIFSLGYMP
YPSKSNQEVLEFVTSGGRMDDPPKNCPPGVYRIMTQCWQH
PEDRPNFAIILERIEYCTQDPDVINTALPIEYGPLVEEEE
KVPVRPKDPEGVPPLLVSSQQAKEEERSSPAAPPPLPTTSS
GKAAKKPTAAEISVRVPRGPAVEGGHVNMAFSQSNPPSEL
HKVHGSRNKPTSLWNPTYGSWFTEKPTKKNNPIAKKEPHD
RGNLGLEGSCTVPPNVATGRLPGASLLLEPSSSLTANMKEV
PLFRLRHFPCGNVNYGYQQQGLPLEAATAPGAGHYEDTIL
KSKNSMNPQPGP（配列番号334）に示されるヒトALKタンパク質に従って、
生じたアミノ酸置換／欠失／フレームシフト／転座に基づいて命名される。例示的なヒト
ALK cDNA配列は、ATGGGAGCCATCGGGCTCCTGTGGCTCC
TGCCGCTGCTGCTTTTCCACGGCAGCTGTGGGGCTCCGGGGAT
GGGGACCGGCCAGCGCGCGGGCTCCCCAGCTGCGGGGGCCG
CCGCTGCAGCCCCGGGAGCCACTCAGCTACTCGCGCCCTGC
AGAGGAAGAGTCTGGCAGTTTGACTTCTGTGGTGCCCTCTGCT
CTTCCGTGTCTACGCCCGGGACCTACTGCTGCCACCATCC
TCCTCGGAGCTGAAGGCTGGCAGGCCCGAGGCCCGCGGGCT
CGCTAGCTCTGGACTGCGCCCCGCTGCTCAGGTTGTGTGGG
GCCGGCGCCCGGGGGTCTCCTGGACCGCCGGTTTCAACAGCC
CCGGGCAGAGGCCCGGACGCTGTCCAGGGTGTCTGAAGGGCG
GCTCCGTGCGCAAGCTCCGGCGGTGCCAAGCAGTTGGTGCT
GGAGCTGGGCGAGGAGGCGATCTTGAGGGTTGCGTCTGGG
CCCCCGGGGAGGCCGGCTGTGGGGGCTGCTCCAGTTTCAATC
TCAGCGAGCTGTTTCAAGTTGGTGGAATTCGCCAAGGCCGAAGG
GCGACTGAGGATCCGCCCTGATGCCCGAGAAAGAAAGGCCGTCTG
GAAGTGGGCAGAGAGGGAAGGCTGTCCGCGGGCAATTCGCG
CCTCCCAGCCCCCGCCTTCTCTTCCAGATCTTTCGGGACTGG
TCATAGCTCCTTGGAATCACCAACAACAATGCCCTTCTCCT
TCTCCTGATTATTTTACATGGAATCTCACCTGGGATAATGA
AAGACTCCTTCCCTTTTCTCTGCTCATCGCAGCCGATATGG
TCTGGAGTGCAGCTTTGACTTCCCCCTGTGAGCTGGAGTAT
TCCCCCTCCACTGCATGACCTCAGGAACCAGAGCTGGTCTCT
GGCGCCGCGCATCCCCCTCCGAGGAGGCCCTCCCAGATGGACTT
GCTGGATGGGCGCTGGGGCAGAGCGTTCTAAGGAGATGCC
AGAGGCTCCTTTCTCCTTCTCAACACCTCAGCTGACTCCA
AGCACACCATCCTGAGTCCGTGGATGAGGAGCAGCAGTGGA
GCACTGCACACTGGCCGTCTCGGTGCACAGGCACCTGCAG
CCCTCTGGAAGGTACATTTGCCCAGCTGCTGCCCCACAACG
AGGCTGCAAGAGAGATCCTCCTGATGCCCACTCCAGGGGAA
GCATGGTTGGACAGTGCTCCAGGGGAAGAAATCGGGCGTCCA
GACAACCCATTTCGAGTGGCCCTGGGAATACATCTCCAGTG
GAAACCGCAGCTTGTCTGCAGTGGACTTCTTTGCCCTGAA
GAACCTGCAGTGAAGGAACATCCCCAGGCTCCAAGATGGCC
CTGCAGAGCTCCTTCACTTGTGTGGAAATGGGACAGTCTCTCC
AGCTTGGGGCAGGCCCTGTGACTTCCACCAGGACTGTGCCCA
GGGAGAAAGATGAGAGCCAGATGTGCCGGAAACTGCCCTGTG
GGTTTTTACTGCAACTTTGAAGATGGCTTCTGTGGCTGGGA
CCCAAGGCACACTGTCAACCCCAACAACCTCCTCAATGGCAGGT
CAGGACCCTAAAGGATGCCCGGGTTCCAGGACCACCAAGAC
CATGCTCTATTGCTCAGTACCACTGATGTCCCCGCTTCTG

10

20

30

40

50

AAAGTGCTACAGTGACCAAGTGCTACGTTTCTCTGCAACCGAT
CAAGAGCTCTCCATGTGAGCTCCGAATGTCCTGGCTCATTT
CGTGGAGTCTTTGAGGGGAAACGTGTCTTTGGTGCTAGTGG
AGAAACAAAACCGGGAAGGAGCAAGGCGAGGATGGTCTGGGCA
TGTCGCCCGCCTATGAAGGCTTTGAGCCTGTGGCAGTGGATG
GTGTTGCTCTCTCTCGATGTGTCTGACAGGTTCTGGCTGC
AGATGGTTCGCATGGTGGGGACAAGGATCCAGAGCCATCGT
GGCTTTTGTACAATATCTCCATCAGCCTGGACTGCTACCTC
ACCATTAGCGGAGAGGACAAGATCCTGCAGAAATACAGCAC
CCAAATCAAGAAACCTGTTTGTAGAGAAACCCAAACAAAGGA
GCTGAAACCCGGGGGAAAATTCACCAAGACAGACCCCCCATC
TTTGACCCCTACAGTTTCATTTGGCTGTTTCACCAACATGTGGGG
CCAGCGGGGCCCATGGCCCCACCCAGGCAACAGTGCACAA
CGCCTACCAAGAACTCCAACCTGAGCGTGGAGGTTGGGGAGC
GAGGGGCCCTGAAAGGCATCCAGATCTGGAAGGTTGCCAG
CCACCGACACCTACAGCATCTCGGGCTACGGAGCTGCTGG
CGGGAAAGGCGGGGAAGAACACCATGATGCGGTCCCACGGC
GTGTCTGTGCTGGGGCATCTTCAACCTGGAGAAAGGATGACA
TGCTGTACATCCTGGTTGGGGCAGCAGGGAGAGGACGCCCTG
CCCCAGTACAAACCAGTTAATCCAGAAAGTCTGCATTTGGA
GAGAAACAATGTGATAGAAGAAAGAAATCCGTGTGAACAGAA
GCGTGCATGAGTGGGCAGGAGGCGGAGGAGGAGGGGGTGG
AGCCACCTACGTATTTAAGATGAAGGATGGAGTGGCCGGTG
CCCCCTGATCATTGCAAGCCGGAGGTTGGTGGCAGGGGCCCTACG
GGGCCAAGACAGACACGTTTCCACCCAGAGAGACTGGAGAA
TAACTCCTCGGTTCTAGGGCTAAACGGCAATTTCCGGAGCC
GCAGGTGGTGGAGGTGGCTGGAATGATAACACTTCTCTTG
TCTGGGGCCGGAAAATCTTTGCAAGGAGGGTGGCCACC GGAGG
ACATTTCTGCCCCCAGGCCCATGAAGAAAGTGGGGGGTGGGAG
ACAAAGAGGGGGGTTTTCGGAGGGGGGTGGAGGGGGGGTGTCTCT
CAGGTGGAGGAGGCGGAGGATATATAGGCGGGCAATGCAGC
CTCAAACAATGACCCCGAAATGGATGGGGAAAGATGGGGTT
TCTTTCATCAGTCCACTGGGGCATCCTGTACACCCCCAGCTT
TAAAAGTGATGGAAGGCCACGGGGGAAGTGAATATTTAAGCA
TTATCTAAACTGCAGTCACTGTGAGGTAGACGAATGTCA
ATGGACCCCTGAAAGGCCACAAGGTCTCTGCTTCTGTGACC
ACGGGACGGTGTGCTGGCTGAGGATGGCGTCTCTCTGCATTTGT
GTCACCCAACCCCGGAGCCACACCTGCCCACTCTCGCTGATC
CTCTCTGTGGTGTGACCTCTGCCCCCTCGTGGCCCGCCCTGGTCC
TGGCTTTCTCCGGGCATCATGATTGTGTACCGCCGGGAAGCA
CCAGGAGCTGCAAGCCCATGCAGATGGAGCTGCAGAGCCCT
GAGTACAAGCTGAGCAAGCTCCGCGACCTCGACCATCATGA
CCGACTACAACCCCAACTACTGCTTTGCTGGGCAAGACCTC
CTCCATCAGTGACCTGAAGGAGGTTGCCGCGGGA AAAACATC
ACCCTCATTCGGGGGTCTGGGGCCATGGCGGCCCTTTGGGGAGG
TGTATGAAGGCCAGGTGTCCGGAATGCCCAACGACCCCAAG
CCCCCTGCAAGTGGCTGTGAAGACGCTGCCCTGAAGTGTGC
TCTGAACAGGACGAACCTGGATTTCCTCATGGAAAGCCCTGA
TCATCAGCAAAATTCAAACCACCAAGAACATTTGTTCTGCAT
TGGGGTGTAGCCTGCAATCCCTGCCCCCGGTTTCATCCTGCTG

10

20

30

40

50

G A G C T C A T G G C G G G G G G A G A C C T C A A G T C C T T C C T C C G A G
A G A C C C G C C C T C G C C C G A G C C A G C C C T C C T C C C T G G C C A T
G C T G G A C C T T T C T G C A C G T G G C T C G G G A C A T T G C C T G T G G C
T G T C A G T A T T T G G A G G A A A A C C A C T T C A T C C A C C G A G A C A
T T G C T G C C A G A A A C T G C C T C T T G A C C T G T C C A G G C C C T G G
A A G A G T G G C C A A G A T T G G A G A C T T C G G G A T G G C C C G A G A C
A T C T A C A G G G C G A G C T A C T A T A G A A A G G G A G G C T G T G C C A
T G C T G C C A G T T A A G T G G A T G C C C C A G A G G C C T T C A T G G A
A G G A A T A T T C A C T T C T A A A A C A G A C A C A T G G T C C T T T G G A
G T G C T G C T A T G G G A A A T C T T T T C T C T T G G A T A T A T G C C A T
A C C C C A G C A A A A G C A A C C A G G A A G T T C T G G A G T T T G T C A C
C A G T G G A G G C C G G A T G G A C C C A C C C A A G A A C T G C C C T G G G
C C T G T A T A C C G G A T A A T G A C T C A G T G C T G G C A A C A T C A G C
C T G A A G A C A G G C C C A A C T T T G C C A T C A T T T T G G A G A G G A T
T G A A T A C T G C A C C C A G G A C C C G G A T G T A A T C A A C A C C G C T
T T G C C G A T A G A A T A T G G T C C A C T T G T G G A A G A G G A A G A G A
A A G T G C C T G T G A G G C C C A A G G A C C C T G A G G G G G T T C C T C C
T C T C C T G G T C T C T C A A C A G G C A A A A C G G G A G G A G G A G C G C
A G C C C A G C T G C C C C A C C A C C T C T G C C T A C C A C C T C C T C T G
G C A A G G C T G C A A A G A A A C C C A C A G C T G C A G A G A T C T C T G T
T C G A G T C C C T A G A G G G C C G G C C G T G G A A G G G G G A C A C G T G
A A T A T G G C A T T C T C T C A G T C C A A C C C T C C T T C G G A G T T G C
A C A A G G T C C A C G G A T C C A G A A A C A A G C C C A C C A G C T T G T G
G A A C C C A A C G T A C G G C T C C T G G T T T A C A G A G A A A C C C A C C
A A A A A G A A T A A T C C T A T A G C A A A G A A G G A G C C A C A C G A C A
G G G G T A A C C T G G G G C T G G A G G G A A G C T G T A C T G T C C C A C C
T A A C G T T G C A A C T G G G A G A C T T C C G G G G G C C T C A C T G C T C
C T A G A G C C C T C T T C G C T G A C T G C C A A T A T G A A G G A G G T A C
C T C T G T T C A G G C T A C G T C A C T T C C C T T G T G G G A A T G T C A A
T T A C G G C T A C C A G C A A C A G G G C T T G C C C T T A G A A G C C G C T
A C T G C C C C T G G A G C T G G T C A T T A C G A G G A T A C C A T T C T G A
A A A G C A A G A A T A G C A T G A A C C A G C C T G G G C C C T G A (配列番号

347) に示される。いくつかの実施形態では、RNA 変異は、ALK 遺伝子座における
転座、遺伝子再構成、または融合遺伝子をもたらす。いくつかの実施形態では、RNA 変
異は、ALK と EML 4 遺伝子との間の融合をもたらす。例えば、いくつかの実施形態で
は、ALK 遺伝子における RNA 変異は、E13; A20、E20; A20、E6a; A
20、E6b; A20 A L K 融合タンパク質をコードし、またはもたらす。本明細書で
使用される場合、融合遺伝子（例えば、本明細書に記載の融合遺伝子を含む RNA 変異の
いずれか）のための命名法は、以下の形式を互換的に使用し得る：GENE1 E#: G
ENE2 E#（例えば、EML E13: ALK E20）及び GENE1#; GEN
E2#（例えば、E13; A20）（遺伝子及び関与するそれぞれの遺伝子エクソン番号
の両方に言及している）。

【0100】

いくつかの実施形態では、ALK 変異（例えば、EML 4: ALK 融合タンパク質をコ
ードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、TATGGAG
CAAAACTACTGTAGAGCC（配列番号357）、CCAGCTACATCA
CACACCTTGACT（配列番号358）、TAATACCAAAAAGTTACCA
AAACTGCA（配列番号359）、CAATCTCTGAAGATCATGTGGC
C（配列番号360）、CAAGTGGCACAGTGGTGGC（配列番号361）、
及び TAACTGGAGGAGGGAAAGACAGA（配列番号362）からなる群か

ら選択されるある配列（例えば、融合遺伝子の EML4 特異的遺伝子座とハイブリダイズする）；ならびに AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT（配列番号 363）及び GAAGCCTCCCTGGATCTCC（配列番号 364）からなる群から選択される別の配列（例えば、融合遺伝子の ALK 特異的遺伝子座とハイブリダイズする）を含む。

【0101】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、ROS 遺伝子における 1 つ以上の変異（例えば、RNA 変異）の遺伝子座を増幅することを含む。ROS は、ROS1、MCF3、及び c-ros-1 としても知られている、ヒトがんで頻繁に変異する受容体チロシンキナーゼである c-ros がん原遺伝子をコードする。いくつかの実施形態では、ROS 遺伝子は、ヒト ROS 遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒト ROS 遺伝子は、NCBI Entrez Gene ID 番号 6098 によって表される遺伝子（その変異体及びバリエーションを含む）を指す。他の実施形態では、ROS 遺伝子は、以下の生物のうちの 1 つからのものである：マウス（例えば、NCBI Entrez Gene ID 番号 19886 を参照されたい）、ラット（例えば、NCBI Entrez Gene ID 番号 25346 を参照されたい）、魚（例えば、NCBI Entrez Gene ID 番号 245951 を参照されたい）、ウシ（例えば、NCBI Entrez Gene ID 番号 100336768 を参照されたい）、ニワトリ（例えば、NCBI Entrez Gene ID 番号 396192 を参照されたい）、またはチンパンジー（例えば、NCBI Entrez Gene ID 番号 472108 を参照されたい）。

【0102】

がんに関連する多様な ROS 変異が知られており、本明細書に記載の方法によって好適に検出され得る；例えば、Lovly, C., L. Horn, W. Pao. 2015. ROS1 in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). My Cancer Genome at www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/ros1/ (11 月 17 日更新) を参照されたい。FISH によって検出可能な多数の ROS1 融合体が NSCLC の 1~2% で同定されている：FIG-ROS1、SLC34A2-ROS1、CD74-ROS1、LRIG3-ROS1、KDEL R2-ROS1、及び CCDC6-ROS1。ROS1 再構成は、臨床的及び組織学的特徴：非喫煙歴または軽度喫煙歴、女性、若年、及び印環細胞組織構造を有する腺癌を共有する。ALK 及び ROS1 融合腫瘍は、疾患のない生存期間が有意に短い、これは、患者がクリゾチニブなどの標的療法に反応するので全体的に短い生存期間につながる。ROS1+患者の 3 分の 2 は、NSCLC の第 1 選択で承認されたクリゾチニブに対して反応する。クリゾチニブ耐性 ROS1 G2032R 変異体は、フォレチニブ及びカボザチニブに対して感受性である。患者は最終的に、クリゾチニブ及び後の世代の療法に対する二次的耐性を発症する。増加した EGFR リン酸化は、ALK 及び ROS1 再構成クリゾチニブ耐性腫瘍の 44% で検出され、このメカニズムが耐性を媒介し得ることを示している。セリチニブ、ASP3026、及びブリガチニブは、ROS1 キナーゼに対する活性を示すが、クリゾチニブ耐性 ROS1 を阻害しない。クリゾチニブ、セリチニブ、及びアレクチニブ（メレスチニブ、エントレクチニブ、TAE684、及びロルラチニブを含む）に対する耐性について評価中の多数のマルチ TKI が存在する。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、ROS 変異は、MKNIYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVLNSCLKSCVTNLGQQLDLGT PHNLSEPCIQGCHFWNSVDQKNCALKCRESCVGCSSAEGAYEEVLENADLP TAPFASSIGSHNMTLRWKSANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWTYTKTVSRPSYVVKPLHPFTEYIFRVVWIFTAQLQLYSPPSPSYRTHPHGVPE TAPLIRNIESSSPD TVEVSWDPPQFPGGPILGYNLRLISK NQKLDAGTQRTSFQFYSTLPNTIYRFSIAAVNEVGEGPEAES SIT TSSSAVQQEEQWLF LSRKTS L R K R S L K H L V D E A H C L R

LDAIYHNITGISVDVHQQIVYFSEGTLIWAKKAANMSDVS
DLRIFYRGSGLISSISIDWLYQRMVFIMDELVCVCDLENC
SNIEEITPPSISAPQKIVADSYNGYVFYLLRDGIYRADLP
VPSGRCAEAVRIVESCTLKDFAIKPKQAKRIIYFNDTAQVF
MSTFLDGSASHLILPRIPFADVKSFACENNDFLVTGDKVI
FQQDALSFNEFIVGCDLSHIEEFGGFNLVIFGSSSSQLHPL
PGRPQELSVLFGSHQALVQWKPPALAIGANVILISDIIEL
FELGPSAWQNWTYEVKVSTQDPPEVTHIFLNISGTMLNVP
ELQSAMKYKVSVRASSPKRPGPWSEPSVGTTLVPASEPFF
IMAVKEDGLWSKPLNSFGPGEFLLSSDIGNVSDMDWYNNSL
YYSDTKGDVFVWLLNGTDISENYHLPSTIAGAGALAFEWL
HFLYWAGKTYVIQRQSVLTGHTDIVTHVKLLVNDMVDVSV
GGYLYWTTLYSVESTRLNGESSLVLTQTQPWFSGKKVIALT
LDLSDGLLYWLVDSDQCIHLYTAVLRGQSTGDTTITEFAA
WSTSEISQNALMYYSGRLFWINGFRITITTEIGQKTSVSV
LEPARFNQFTIIQTSCLKPLPGNFSSFTPKVIPDSVQESSFR
IEGNASSFQILWNGPPAVDWGVVFYSVEFSAHSKFLASEQ
HSLPVFTVEGLEPYALFNLSVTPYTYWKGKPKTSLSLRAP
ETVPSAPENPRIFILPSGKCCNKNEVVVEFRWNKPKHENG
VLTKEIFIFYNISNQSITNKTCEDWIAVNVTPSVMSFQLEG
MSPRCFIAFQVRAFTSKGPGPYADVVKSTTSEINPFPHLI
TLLGNKIVFLDMDQNQVVWTFSAERVISAVCYTADNEMGY
YAEGDSLFLHLHNRSSSELFDQDSLVDITVITIDWISRH
LYFALKESQNGMQVFDVDLEHKVKYPREVKIHNRNSTIIS
FSVYPLLSRLYWTEVSNFGYQMFYYSIISHTLHRIQLQPTA
TNQQNKRNQCSCNVTEFELSGAMAIDTSNLEKPLIYFAKA
QEIWAMDLEGCQCWRVITVPAMLAGKTLVSLTVDGDLIYW
IITAKDSTQIYQAKKGNGAIVSQVKALRSRHILAYSSVMQ
PFPDKAFLSLASDTVEPTILNATNTSLTIRLPLAKTNLTW
YGITSPTPTYLVYYAEVNDRKNSSDLKYRILEFQDSIALI
EDLQPFSTYMIQIAVKNYYSDPLEHLPPGKEIWGKTKNV
PEAVQLINTTVRSDTSLIISWRESHKPNGPKESVRYQLAI
SHLALIPETPLRQSEFPNGRLTLVLVTRLSGGNIYVLKVL
ACHSEEMWCTESHPTVEMFNTPEKPYSLVPENTSLQFNWK
APLNVNLIIRFWVELQKWKYNEFYHVKTSCSQGPAYVCNIT
NLQPYTSYNVRVVVYKTGENSTSLPESFKTKAGVPNKP
IPKLLLEGSKNSIQWEKAEDNGCRITYYILEIRKSTSNNLQ
NQNLRWKMTFNGSCSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAANNLG
FGEYSGISENIIILVGDDFWIPETSFILTIIVGIFLVVTIP
LTFVWHRRLLKNQKSAKEGVTVLINEDKELAE LRGLAAGVG
LANACYAHTLPTQEEIENLPAFPREKLTLLRLLLGSGAFG
EVYEGTAVDILGVGSGEIKVAVKTLKKGSTDQEKIEFLKE
AHLMSKFNHPNIIKQLGVCLLNEPQYIILELMEGGDLITY
LRKARMATFYGPLLTLLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIH
RDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKIGDFGLARDIYKNDYYRK
RGEGLLPVRWMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILWEILTLL
GHQPYPAHSNLDVLNYYVQTGGRLPPRNCPPDDLWNLMTC
WAQEPDQRPTFHRIQDQLQLFRNFFLNSIYKSRDEANNSG
VINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVALMETKNREGLNYMVL
ATECGQGEEKSEGPLGSQESSESCGLRKEEKEPHADKDFCQ

10

20

30

40

50

E K Q V A Y C P S G K P E G L N Y A C L T H S G Y G D G S D (配列番号 335) に示されるヒト ROS タンパク質に従って、生じたアミノ酸置換／欠失／フレームシフト／転座に基づいて命名される。例示的なヒト ROS cDNA 配列は、

```
ATGAAGAAC
ATTTACTGTCCTTATTCCGAAGCTTGTCAATTTTGTCAACTC
TTGGCTGCTATGGATTCTGTGGTGCAGTGTACAGTTTTT
AAATAGCTGCCTAAAGTCGTGTGTAACTAATCTGGGGCCAG
CAGCTTGACCTTGGCACACCAACATAATCTGAGTGAACCGT
GTATCCAAGGATGTCACCTTTTGGAACTCTGTAGATCAGAA
AAACTGTGCTTTAAAGTGTGCGGGAGTCGTGTGAGGTTGGC
TGTAGCAGCGCGGAAGGTGCATATGAAGAGGAAGTACTGG
AAAATGCAGACCTACCAACTGCTCCCTTTGCTTCTTCCAT
TGGAAAGCCACAATATGACATTACGATGGAAATCTGCAAAC
TTCTCTGGAGTAAAATACATCATTCAGTGGAAATATGCAC
AACTTCTGGGAAGCTGGACTTATACTAAGACTGTGTCCAG
ACCGTCCCTATGTGGTCAAGCCCCCTGCACCCCTTCACTGAG
TACATTTTCCGAGTGGTTTGGATCTTTCACAGCGCAGCTGC
AGCTCTACTCCCCCTCCAAGTCCCAGTTACAGGACTCATCC
TCATGGAGTTCCCTGAAACTGCACCTTTGATTAGGAATATT
GAGAGCTCAAGTCCCGACACTGTGGAAAGTCAGCTGGGGATC
CACCTCAATTCCCAGGTGGACCTATTTTGGGTTATAACTT
AAGGCTGATCAGCAAAAATCAAAAATTAGATGCAGGGGACA
CAGAGAACCAAGTTTCCAGTTTACTCCACTTTACCAAATA
CTATCTACAGGTTTCTATTTGCAGCAGTAAATGAAGTTGG
TGAGGGTCCAGAAAGCAGAAATCTAGTATTACCACTTTCATCT
TCAGCAGTTCAACAAGAGGAACAGTGGCTCTTTTATCCA
GAAAAACTTCTCTAAGAAAGAGATCTTTAAAAACATTTAGT
AGATGAAGCACATTGCCTTCGGTTGGATGCTATATACCAT
AATATTACAGGAATATCTGTTGATGTCACCCAGCAAATTG
TTTATTTCTCTGAAGGAACCTCTCATATGGGGCGAAGAAAGGC
TGCCAACATGTCTGATGTATCTGACCTGAGAAATTTTAC
AGAGGTTTCAGGATTAAATTTCTTCTATCTCCATAGATTGGC
TTTATCAAAGAATGTATTTTCATCATGGATGAACCTGGTATG
TGTCTGTGATTTAGAGAACTGCTCAAACATCGAGGGAATT
ACTCCACCCCTCTATTAGTGCACCTCAA AAAAATTTGTGGCTG
ATTCATACAAATGGGTATGTCTTTTACCTCCTGAGAGATGG
CATTTATAGAGCAGACCTTCCCTGTACCATCTGGGCCGGTGT
GCAGAAAGCTGTGCGTATTGTGGAGAGTTGCACGTTAAAGG
ACTTTGCAATCAAGCCACAAGCCCAAGCGAATCATTTACTT
CAATGACACTGCCCAAGTCTTTCATGTCAACATTTCTGGAT
GGCTCTGCTTCCCATCTCATCCTACCTCGCATCCCCCTTTG
CTGATGTGAAAAGTTTTGCTTGTGAAAACAATGACTTTCT
TGTCACAGATGGCAAGGTCATTTTCCAACAGGATGCTTTG
TCTTTTAAATGAATTTCATCGTGGGATGTGACCTGAGTCACA
TAGAAGAATTTGGGTTTGGTAACTTGGTCACTTTTGGCTC
ATCCTCCCAGCTGCACCCCTCTGCCAGGCCCGCCCGCAGGAG
CTTTCGGTGCTGTTTGGCTCTCACCAAGGCTCTTGTTC AAT
GGAAGCCTCCTGCCCTTGCCATAGGAGCCAATGTCACTCT
GATCAGTGATATTATTGAACCTCTTTGAATTAGGCCCTTCT
GCCTGGCAGAACTGGACCTATGAGGTGAAAGTATCCACCC
AAGACCCCTCCTGAAGTCACTCATATTTTCTTGAACATAAG
```

10

20

30

40

50

T G G A A C C A T G C T G A A T G T A C C T G A G C T G C A G A G T G C T A T G
A A A T A C A A G G T T T C T G T G A G A G C A A G T T C T C C A A A G A G G C
C A G G C C C C T G G T C A G A G C C C T C A G T G G G T A C T A C C C T G G T
G C C A G C T A G T G A A C C A C C A T T T A T C A T G G C T G T G A A A G A A
G A T G G G C T T T G G A G T A A A C C A T T A A A T A G C T T T G G C C C A G
G A G A G T T C T T A T C C T C T G A T A T A G G A A A T G T G T C A G A C A T
G G A T T G G T A T A A C A A C A G C C T C T A C T A C A G T G A C A C G A A A
G G C G A C G T T T T T G T G T G G C T G C T G A A T G G G A C G G A T A T C T
C A G A G A A T T A T C A C C T A C C C A G C A T T G C A G G A G C A G G G G C
T T T A G C T T T T G A G T G G C T G G G T C A C T T T C T C T A C T G G G C T
G G A A A G A C A T A T G T G A T A C A A A G G C A G T C T G T G T T G A C G G
G A C A C A C A G A C A T T G T T A C C C A C G T G A A G C T A T T G G T G A A
T G A C A T G G T G G T G G A T T C A G T T G G T G G A T A T C T C T A C T G G
A C C A C A C T C T A T T C A G T G G A A A G C A C C A G A C T A A A T G G G G
A A A G T T C C C T T G T A C T A C A G A C A C A G C C T T G G T T T T C T G G
G A A A A A G G T A A T T G C T C T A A C T T T A G A C C T C A G T G A T G G G
C T C C T G T A T T G G T T G G T T C A A G A C A G T C A A T G T A T T C A C C
T G T A C A C A G C T G T T C T T C G G G G A C A G A G C A C T G G G G A T A C
C A C C A T C A C A G A A T T T G C A G C C T G G A G T A C T T C T G A A A T T
T C C C A G A A T G C A C T G A T G T A C T A T A G T G G T C G G C T G T T C T
G G A T C A A T G G C T T T A G G A T T A T C A C A A C T C A A G A A A T A G G
T C A G A A A A C C A G T G T C T C T G T T T T G G A A C C A G C C A G A T T T
A A T C A G T T C A C A A T T A T T C A G A C A T C C C T T A A G C C C C T G C
C A G G G A A C T T T T C C T T T A C C C C T A A G G T T A T T C C A G A T T C
T G T T C A A G A G T C T T C A T T T A G G A T T G A A G G A A A T G C T T C A
A G T T T T C A A A T C C T G T G G A A T G G T C C C C C T G C G G T A G A C T
G G G G T G T A G T T T T C T A C A G T G T A G A A T T T A G T G C T C A T T C
T A A G T T C T T G G C T A G T G A A C A A C A C T C T T T A C C T G T A T T T
A C T G T G G A A G G A C T G G A A C C T T A T G C C T T A T T T A A T C T T T
C T G T C A C T C C T T A T A C C T A C T G G G G A A A G G G C C C C A A A A C
A T C T C T G T C A C T T C G A G C A C C T G A A A C A G T T C C A T C A G C A
C C A G A G A A C C C C A G A A T A T T T A T A T T A C C A A G T G G A A A A T
G C T G C A A C A A G A A T G A A G T T G T G G T G G A A T T T A G G T G G A A
C A A A C C T A A G C A T G A A A A T G G G G T G T T A A C A A A A T T T G A A
A T T T T C T A C A A T A T A T C C A A T C A A A G T A T T A C A A A C A A A A
C A T G T G A A G A C T G G A T T G C T G T C A A T G T C A C T C C C T C A G T
G A T G T C T T T T C A A C T T G A A G G C A T G A G T C C C A G A T G C T T T
A T T G C C T T C C A G G T T A G G G C C T T T A C A T C T A A G G G G C C A G
G A C C A T A T G C T G A C G T T G T A A A G T C T A C A A C A T C A G A A A T
C A A C C C A T T T C C T C A C C T C A T A A C T C T T C T T G G T A A C A A G
A T A G T T T T T T T A G A T A T G G A T C A A A A T C A A G T T G T G T G G A
C G T T T T C A G C A G A A A G A G T T A T C A G T G C C G T T T G C T A C A C
A G C T G A T A A T G A G A T G G G A T A T T A T G C T G A A G G G G A C T C A
C T C T T T C T T C T G C A C T T G C A C A A T C G C T C T A G C T C T G A G C
T T T T C C A A G A T T C A C T G G T T T T T G A T A T C A C A G T T A T T A C
A A T T G A C T G G A T T T C A A G G C A C C T C T A C T T T G C A C T G A A A
G A A T C A C A A A A T G G A A T G C A A G T A T T T G A T G T T G A T C T T G
A A C A C A A G G T G A A A T A T C C C A G A G A G G T G A A G A T T C A C A A
T A G G A A T T C A A C A A T A A T T T C T T T T C T G T A T A T C C T C T T
T T A A G T C G C T T G T A T T G G A C A G A A G T T T C C A A T T T T G G C T

10

20

30

40

50

ACCAGATGTTCTACTACAGTATTATCAGTCACACCTTGCA
CCGAATTCTGCAACCCACAGCTACAAACCAACAAAACAAA
AGGAATCAATGTTCTTGTAATGTGACTGAATTTGAGTTAA
GTGGAGCAATGGCTATTGATACCTCTAACCTAGAGAAACC
ATTGATATACTTTGCCAAAGCACAAAGAGATCTGGGGCAATG
GATCTGGAAGGCTGTTCAGTGTGAGAGTTATCACAGTAC
CTGCTATGCTCGCAGGAAAAAACCTTTGTTAGCTTAACCTGT
GGATGGAGATCTTATATACTGGATCATCACAGCAAAGGAC
AGCACACAGATTTATCAGGCCAAAGAAAGGAAATGGGGGCCA
TCGTTTTCCCAGGTGAAGGCCCTAAGGAGTAGGCCATATCTT
GGCTTACAGTTTCAGTTATGTCAGCCTTTTCCAGATAAAGCG
TTTTCTGTCTCTAGCTTTCAGACACTGTGGAACCAACTATAC
TTAATGCCACTAACACTAGCCTCACAAATCAGATTACCTCT
GGCCAAAGACAAACCTCACATGGGTATGGCATCACCCAGCCCT
ACTCCAACATACCTGGTTTTATTATGTCAGAAAGTTAATGACA
GGAAAAACAGCTCTGACTTTGAAATATAGAATTCTGGGAATT
TCAGGACAGTATAGCTCTTATTGAAGATTTTACAACCATTT
TCAACATACATGATACAGATAGCTGTAAAAAATTATTATT
CAGATCCTTTTGGAAACATTTACCACCCAGGAAAAAGAGATT
GGGAAAAAATAAAAAATGGAGTACCAGAGGCAGTGCAGCTC
ATTAATACAACCTGTGCGGTCAGACACCAGCCTCATTTATAT
CTTGGAGAGAAATCTCACAAAGCCAAATGGACCTAAAGAAATC
AGTCCGTTATCAGTTGGCAATCTCACACCCTGGGCCCTAATT
CCTGAAACTCCTCTAAGACAAAGTGAATTTTCCAAATGGAA
GGCTCACTCTCCTTGTTACTAGACTGTCTGGTGGAAATAT
TTATGTGTTAAAGGTTCTTGCCCTGCCACTCTGAGGAAATG
TGGTGTACAGAGAGTCAATCCTGTCACTGTGGAAATGTTTA
ACACACCAGAGAAACCTTATTTCTTGTTCCAGAGAACAC
TAGTTTTGCAATTTAATTGGAAAGGCTCCATTGAATGTTAAC
CTCATCAGATTTTGGGGTTGAGCTACAGAAAGTGGAAATACA
ATGAGTTTTTACCATGTTAAAACTTTCATGCAGCCAAAGGTCC
TGCTTATGTCTGTAAATATCACAAATCTACAACCTTATACT
TCATATAATGTCAGAGTAGTGGTGGTTTATAAGACGGGGAG
AAAAATAGCACCTCACTTCCAGAAAGCTTTAAGACAAAAAGC
TGGAGTCCCAAATAAACCCAGGCATTCCCAAATTACTAGAA
GGGAGTAAAAAATTCAATACAGTGGGAGAAAGCTGAAGATA
ATGGATGTAGAATTACATACTATATCCTTGAGATAAGAAA
GAGCACTTCAAATAATTTACAGAACCCAGAAATTTAAGGTGG
AAGATGACATTTAATGGATCCTGCAGTAGTGTGTTTGACAT
GGAAGTCCAAAAACCTGAAAGGAATATTTTCAGTTTCAGAGT
AGTAGCTGCAAATAATCTAGGGTTTGGTGAATATAGTGGAA
ATCAGTGAGAAATATTATATTAGTTGGAGATGATTTTTTGGAA
TACCAGAAACAAGTTTTCATACTTACTATTATAGTTTGGAAAT
ATTTCTGGTTGTTACAATCCCCTGACCTTTGTCTGGCAT
AGAAAGATTAAAGAATCAAAAAAGTGCCAAAGGAAGGGGTGA
CAGTGCTTATAAACGAAGACAAAGAGTTGGCTGAGCTGCG
AGGTCTGGCAGCCGGAGTAGGCCCTGGCTAATGCCCTGCTAT
GCAATACATACTCTTCCAACCCCAAGAGGAGATTGAAAAATC
TTCCTGCCTTCCCTCGGGAAAAAACTGACTCTGCGTCTCTT
GCTGGGAAGTGGAGCCCTTTGGAGAAAGTGTATGAAGGAACA

10

20

30

40

50

G C A G T G G A C A T C T T A G G A G T T G G A A G T G G A G A A A T C A A A G
T A G C A G T G A A G A C T T T G A A G A A G G G T T C C A C A G A C C A G G A
G A A G A T T G A A T T C C T G A A G G A G G C A C A T C T G A T G A G C A A A
T T T A A T C A T C C C A A C A T T C T G A A G C A G C T T G G A G T T T G T C
T G C T G A A T G A A C C C C A A T A C A T T A T C C T G G A A C T G A T G G A
G G G A G G A G A C C T T C T T A C T T A T T T G C G T A A A G C C C G G A T G
G C A A C G T T T T A T G G T C C T T T A C T C A C C T T G G T T G A C C T T G
T A G A C C T G T G T G T A G A T A T T T C A A A A G G C T G T G T C T A C T T
G G A A C G G A T G C A T T T C A T T C A C A G G G A T C T G G C A G C T A G A
A A T T G C C T T G T T T C C G T G A A A G A C T A T A C C A G T C C A C G G A
T A G T G A A G A T T G G A G A C T T T G G A C T C G C C A G A G A C A T C T A
T A A A A A T G A T T A C T A T A G A A A G A G A G G G G A A G G C C T G C T C
C C A G T T C G G T G G A T G G C T C C A G A A A G T T T G A T G G A T G G A A
T C T T C A C T A C T C A A T C T G A T G T A T G G T C T T T T G G A A T T C T
G A T T T G G G A G A T T T T A A C T C T T G G T C A T C A G C C T T A T C C A
G C T C A T T C C A A C C T T G A T G T G T T A A A C T A T G T G C A A A C A G
G A G G G A G A C T G G A G C C A C C A A G A A A T T G T C C T G A T G A T C T
G T G G A A T T T A A T G A C C C A G T G C T G G G C T C A A G A A C C C G A C
C A A A G A C C T A C T T T T C A T A G A A T T C A G G A C C A A C T T C A G T
T A T T C A G A A A T T T T T T C T T A A A T A G C A T T T A T A A G T C C A G
A G A T G A A G C A A A C A A C A G T G G A G T C A T A A A T G A A A G C T T T
G A A G G T G A A G A T G G C G A T G T G A T T T G T T T G A A T T C A G A T G
A C A T T A T G C C A G T T G C T T T A A T G G A A A C G A A G A A C C G A G A
A G G G T T A A A C T A T A T G G T A C T T G C T A C A G A A T G T G G C C A A
G G T G A A G A A A A G T C T G A G G G T C C T C T A G G C T C C C A G G A A T
C T G A A T C T T G T G G T C T G A G G A A A G A A G A G A A G G A A C C A C A
T G C A G A C A A A G A T T T C T G C C A A G A A A A C A A G T G G C T T A C
T G C C C T T C T G G C A A G C C T G A A G G C C T G A A C T A T G C C T G T C
T C A C T C A C A G T G G A T A T G G A G A T G G G T C T G A T T A A (配列番号
348) に示される。いくつかの実施形態では、RNA変異は、ROS遺伝子座における
転座、再構成、または融合遺伝子をもたらす。いくつかの実施形態では、RNA変異は、
ROS遺伝子とCD47、及びSLC34A2からなる群から選択される遺伝子との間の
融合をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、ROS遺伝子におけるRNA変異は
、C6；R32もしくはC6；R34 CD74-ROS1融合タンパク質、またはS4
；R32もしくはS4；R34 SLC34A2-ROS1融合タンパク質、SD2；R
32融合タンパク質をコードし、またはもたらす。

10

20

30

40

50

【0103】

いくつかの実施形態では、ROS変異（例えば、C6；R32またはC6；R34 CD74-ROS1融合タンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列（例えば、融合遺伝子のCD74特異的遺伝子座とハイブリダイズする）GGAGTGGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT（配列番号19）ならびにAATTC AATACATACTATCAGCTTTCTCCCACTGTATTGAA（配列番号39；エクソン32融合体用）及びAATATTTCTGGGTACGAGTGGGATTGTAAACAACCAGAAATA（配列番号40；エクソン34融合体用）からなる群から選択される別の配列（例えば、融合遺伝子のROS特異的遺伝子座とハイブリダイズする）を含む。いくつかの実施形態では、ROS変異（例えば、S4；R32またはS4；R34 SLC34A2-ROS1融合タンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列（例えば、融合遺伝子のSLC34A2特異的遺伝子座とハイブリダイズする）TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC（配列番号20）ならびにAATTC AAT

ACATACTATCAGCTTTCTCCCCACTGTATTGAA（配列番号39；エクソン32融合体用）及びAATATTTCTGGTACGAGTGGGATTGTAAACAACCAGAAATA（配列番号40；エクソン34融合体用）からなる群から選択される別の配列（例えば、融合遺伝子のROS特異的遺伝子座とハイブリダイズする）を含む。

【0104】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、RET遺伝子における1つ以上の変異（例えば、RNA変異）の遺伝子座を増幅することを含む。RETは、PTC、RET51、RET9、CDHF12、CDHR16、HSCR1、MEN2A、MEN2B、MTC1、及びRET-ELF1としても知られている、ヒトがんにおいて頻繁に変異する受容体チロシンキナーゼであるc-RETがん原遺伝子をコードする。いくつかの実施形態では、RET遺伝子は、ヒトRET遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒトRET遺伝子は、NCBI Entrez Gene ID番号5979によって表される遺伝子（その変異体及びバリエーションを含む）を指す。他の実施形態では、RET遺伝子は、以下の生物のうちの1つからのものである：マウス（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号196713を参照されたい）、ラット（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号24716を参照されたい）、魚（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号30512を参照されたい）、ウシ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号515924を参照されたい）、イヌ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号403494を参照されたい）、またはチンパンジー（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号100612888を参照されたい）。

【0105】

がんに関連する多様なRET変異が知られており、本明細書に記載の方法によって好適に検出され得る；例えば、Riely, G. 2012. RET in Lung Cancer. My Cancer Genome at www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/ret/（12月13日更新）を参照されたい。所定の点変異は、RET二量化を不安定化し、RETの構成的活性化をもたらす。RET遺伝子融合体は、腺癌タイプNSCLCの1~2%に見られ、通常、EGFR、KRAS、ALK、及びROS1における変異とは相互に排他的である。NSCLCにおけるRET再構成を有する患者は、より若く（ ≤ 60 ）、喫煙歴がない傾向がある。特定のRET変異、例えば、V804は、TKI、例えば、バンデタニブ、モテサニブ、及びカボザンチニブに対して非感受性の原因となり得る一方で、他のもの、例えば、スニチニブ及びボナチニブに対する感受性を保持する。RETに対して感受性のあるFDA承認薬には、レゴラフェニブ、レンバチニブ、ボナチニブ、カボザンチニブ、ソラフェニブ、スニチニブ、及びバンデタニブが含まれる。RETまたは下流エフェクターRAFまたはMEKを標的とする小分子阻害剤は、RETが変化したがんにおけるそれらの有効性のために開発中である。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、RET変異は、例えば、MAKATSGAAGLRLRLRLRLPLLGKVALGLYFSRDAYWEKLYVDQAAGTPLLHVHALRDAPEEVPSPFRLLGQHLYGTYRTRLHENNWICIQEDTGLLYLNRSLDHSSWEKLSVRNRGFPLLTVYLKVFLSPTSLSREGECQWPGCARVYFSFFNTSFPACSSLKPRELCFPETRPSPFRIENRPPGTFFHQFRLLPVQFLCPNISVAYRLLEGEGLPFRCAPDSLEVSTRWALDREQREKYELVAVCTVHAGAREEVVMVPFPVTVYDEDDSAPTFPAGVDTASAVVEFKRKEDTVVATLRVFDADVVPASGEVRRYTSTLLPGDTWAQQTFRVEHWPNETSVQANGSFVRATVHDYRLVLNRNLSISENRTMQLAVLVNDSDFQGGPGAGVLLLHFNVSVLPLVSLHLPSTYSLSVSRARRRFAQIGKVCVENCQAFSGINVQYKLHSSGANCS TLGVVTS AEDTSGILFVN

DTKALRRPKCAELHYMVVATDQQTSRQAQAQLLVTVEGSY
VAEEAGCPLSCAVSKRRLECEECGGLGSP TGRCEWRQGDG
KGITRNFSTCSPSTKTCPDGHCDVVETQDINICPQDCLRG
SIVGGHEPGEPRGIKAGYGTNCNCFPEEEKCFCEPEDIQDP
LCDELCRTVIAAAVLFSFIVSVLLSAFCIHCYHKFAHKPP
ISSAEMTFRRPAQAFPVSYSSSGARRPSLDSMENQVSVDA
FKILEDPKWEFPRKNLVLGKTLGEGEF GKVVKATAFHLKG
RAGYTTVAVKMLKENASPS E L R D L L S E F N V L K Q V N H P H V I
KLYGAC SQDGPLLLIVEYAKYGS L R G F L R E S R K V G P G Y L G
SGGSRNSSSLDHPDERAL TMGDLISFAWQISQGMQYLAEM
KL VHRDLAARNILVAEGRKMKISDFGLSRDVYEEDSYVKR
SQGRIPVKWMAIESLFDHIYTTQS D V W S F G V L L W E I V T L G
GNPYPGIPPERL FNL L K T G H R M E R P D N C S E E M Y R L M L Q C W
KQEPDKRPVFADISKDLEKMMVKRRDYLDLAASTPSDSL I
YDDGLSEEETPLVDCNNAPLPRALPSTW I ENKLYGRISHA
FTRF（配列番号336）に示されるヒトRETタンパク質に従って、生じたアミノ酸
置換／欠失／フレームシフト／転座に基づいて命名される。例示的なヒトRET cDN
A配列は、ATGGCGAAGGCGACGTC CGGTGCCGCGGGGGCTGCG
TCTGCTGTTGCTGCTGCTGCTGCCGCTGCTAGGCAAAAGTG
GCATTGGGCTCTACTTCTCGAGGGATGCTTACTGGGAGA
AGCTGTATGTGGACCAAGGCAGCCGGCACGCCCTTGCTGTA
CGTCCATGCCCTGCGGGACGCCCTGAGGAGGTGCCCAGC
TTCCGCTGGGCGCAGCATCTCTACGGCACGTACCGCACAC
GGCTGCATGAGAAACA ACTGGATCTGCATCCAGGAGGACAC
CGGCCCTCCTCTACCTTAACCGGAGCCTGGACCATAGCTCC
TGGGAGAAAGCTCAGTGTC CGCAACCGCGGGCTTTCCCTGCTG
TCACCGTCTACCTCAAGGTCTTCTGTCACCACATCCCT
TCGTGAGGGCGAGTGCCAGTGCGCAGGCTGTGCCCGCGTA
TACTTCTCCTTCTTCAACACCTCCTTTCCAGCCTGCAAGCT
CCCTCAAGCCCCGGGAGCTCTGCTTCCCAGAGACAAGGCC
CTCCTTCCGCAATTGCGGAGAAACCGACCCCCAGGCACCTTC
CACCAAGTTCCGCGCTGCTGCCCTGTGCAAGTTCTTGTTGCCCA
ACATCAGCGTGGCCTACAGGCTCCTGGAGGGGTGAGGGGTCT
GCCCTTCCGCTGCGGCCCGGACAGCCTGGAGGTGAGCACG
CGCTGGGCGCCTGGACCGCGAGCAGCGGGAGAAAGTACGAGC
TGGTGCGCGTGTGCAACCGTGCAACCGCGCGCGCGGAGGA
GGTGGTGATGGTGCCCTTCCC GG TGACCGTGTA CGACGAG
GACGACTCGGCGGCCACCTTCCCCGCGGGCGT CGACACCG
CCAGCGCGCTGGTGAGTTCAAGCGGAAGGAGGACACCGT
GGTGCGCACGCTGCGTGTCCTTCGATGCAGACGTGGTACCT
GCATCAGGGGAGCTGGTGAGGCGGTACACAAGCACGCTGC
TCCCCGGGGACACCTGGGCGCCAGCAGACCTTCCGGGGTGGAA
ACA ACTGGGCCAACGAGACCTCGGTCCAGGCCAACGGCAGC
TTCGTGCGGGCGACCGGTACATGACTATAGGCTGGTTCTCA
ACCGGAACCTCTCCATCTCGGAGAAACCGCACCATGCAAGCT
GGCGGTGCTGGTCAATGACTCAGACTTCCAGGGGCCCAGGA
GCGGGCGTCTCTTGCTCCACTTCAACGTGTGCGGTGCTGC
CGGT CAGCCTGCACCTGCCCAGTACCTACTCCTCTCCGT
GAGCAGGAGGGCTCGCCGATTTGCCCAGATCGGGGAAAGTC
TGTGTGGA AAACTGCCAGGCATTTCAGTGGCATCAACGTCC

10

20

30

40

50

AGTACAAGCTGCATTCTCTGGTGCCAACTGCAGCACGCT
AGGGGTGGTCACCTCAGCCGAGGACACCTCGGGGGATCCTG
TTTGTGAATGACACCAAGGCCCTGCGGCGGGCCCAAGTGTG
CCGAACCTTCACTACATGGTGGTGGCCACCGAGCCAGCAGAC
CTCTAGGCGAGGCCCAAGGCCCAAGCTGCTTTGTAACAGTGGAG
GGGTTCATATGTGGCCGAGGAGGCGGGCTGCCCCCTGTCTCT
GTGCAGTCAAGCAAGAGACGGCTGGAGTGTGAGGAGTGTGG
CGGCCCTGGGCTCCCCAACAGGCGAGGTGTGAGTGGAGGCAA
GGAGATGGCAAAGGGGATCACCAAGGAACCTTCTCCACCTGCT
CTCCCAGCACCAAGACCTGCCCCGACGGCCACTGCGATGT
TGTGGAGACCCAAGACATCAACATTTGCCCTCAGGACTGCT
CTCCGGGGGAGCAGCATTTGTTGGGGGACACGAGCCCTGGGGAGC
CCCGGGGGGATTAAAGCTGGCTATGGCACCTGCAACTGCTT
CCCTGAGGAGGAGAAAGTGTCTTCTGCGAGCCCGAAGACATC
CAGGATCCACTGTGCGAGCGAGCTGTGCGCGCACGGGTGATCG
CAGCCGCTGTCTCTCTTCTCTCTTCTCATCGTCTCGGTGCTGCT
GTCTGCTTCTGTCATCCACTGCTACCAACAAGTTTGGCCAC
AAGCCACCCATCTCTCTCAGCTGAGATGACCTTCCGGGAGGC
CCGCCCAAGGCCCTTCCCGGTCAAGCTACTCTCTTCCGGGTGC
CCGCCGGGCCCTCGCTGGACTCCATGGAGAACCAAGGTCTCC
GTGGATGCCTTCAAGATCCTGGAGGATCCAAAGTGGGAAT
TCCCTCGGAAGAACTTTGGTTCTTGGAAAAACTCTAGGAGA
AGGCGAATTTGGAAAAAGTGGTCAAGGCCAACGGCCCTTCCAT
CTGAAAGGCGAGAGCAGGGGTACACCAACGGGTGGCCCGTGAAGA
TGCTGAAAGAGAAACGCTCTCCCGAGTGGAGCTGCGAGACCT
GCTGTCAAGAGTTCAACGCTCCTGAAGCAGGTCAACCAACCCA
CATGTTCATCAAAATTTGTATGGGGCCCTGCGAGCCAGGATGGCC
CGCTCCTCCTCATCGTGGAGTACGCCCAAATACGGCTCTCCCT
GCGGGGGCTTCTCTCCGCGAGAGCCGCAAAAGTGGGGCCCTGGC
TACCTGGGGCAGTGGAGGCGAGCCGCAACTCCAGCTCCCTGG
ACCACCCGGATGAGCGGGGCCCTCACCATGGGCGACCTCAT
CTCATTTTGCCTGGCAGATCTCACAGGGGGATGCAGTATCTG
GCCGAGATGAAGCTCGTTTCATCGGGGACTTGGGCAGCCAGAA
ACATCCTGGTAGCTGAGGGGGCGGAAGATGAAGATTTTCGGA
TTTCGGGCTTGTCCCGAGATGTTTATGAAGAGGATTCCTAC
GTGAAGAGGAGGCCAGGGGTGGGATTCAGTTAAATGGATGG
CAATTGAATCCCTTTTTTGATCATATCTACACCACGCAAAG
TGATGTATGGTCTTTTTGGTGTCTCTGTGGGAGATCGTG
ACCCTAGGGGGGAACCCCTATCCTGGGATTCCTCCTGAGC
GGCTCTTCAACCTTCTGAAGACCGGCCACCGGATGGAGAG
GCCAGACAACCTGCGAGCGAGGAGATGTACCGCCCTGATGCTG
CAATGCTGGAAGCAGGAGCCGGACAAAAGGCCCGGTGTTTG
CGGACATCAGCAAAAGACCTGGAGAAAGATGATGGTTAAGAG
GAGAGACTACTTTGGACCTTGCGGCGTCCACTCCATCTGAC
TCCCTGATTTATGACGACGGCCCTCTCAGAGGAGGAGACAC
CGCTGGTGGACTGTAATAATGCCCCCTCTCCCTCGAGCCCT
CCCTTCCACATGGATTGAAAACAAACTCTATGGTAGAATT
TCCCATGCAATTTACTAGATTCTAG (配列番号349) に示される。い

くつかの実施形態では、RNA変異は、RET遺伝子座における転座、再構成、または融合遺伝子をもたらす。いくつかの実施形態では、RNA変異は、RET遺伝子とKIF5

10

20

30

40

50

B、及びC C D C 6からなる群から選択される遺伝子との間の融合をもたらす。例えば、いくつかの実施形態では、RET遺伝子におけるRNA変異は、K 1 5 ; R 1 1、K 1 5 ; R 1 2、K 1 6 ; R 1 2、K 2 2 ; R 1 1、またはK 2 3 ; R 1 2 K I F 5 B : R E T融合タンパク質をコードし、またはもたらす。

【0106】

いくつかの実施形態では、RET変異（例えば、K 1 5 ; R 1 1、K 1 5 ; R 1 2、K 1 6 ; R 1 2、K 2 2 ; R 1 2、またはK 2 3 ; R 1 2 K I F 5 B : R E T融合遺伝子をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列T T T C T G G T G C T A T G A G G A A A T G A C C A A C C A C C A G A（配列番号23）及びG T G A T C G C A C A G T A G G A C A G C G G C T G C G A T C（配列番号26）（例えば、K 1 5 ; R 1 1 K I F 5 B : R E T融合遺伝子用）；配列T T T C T G G T G C T A T G A G G A A A T G A C C A A C C A C C A G A（配列番号23）及びG T G A T C G C A C A G T A G G A C A G C G G C T G C G A T C（配列番号27）（例えば、K 1 5 ; R 1 2 K I F 5 B : R E T融合遺伝子用）、配列A A G G A G T T A G C A G C A T G T C A G C（配列番号519）及びG T G A T C G C A C A G T A G G A C A G C G G C T G C G A T C（配列番号27）（例えば、K 1 6 ; R 1 2 K I F 5 B : R E T融合遺伝子用）、配列A A C T T C A G A C T T T A C A C A A C C T G C（配列番号520）及びG T G A T C G C A C A G T A G G A C A G C G G C T G C G A T C（配列番号27）（例えば、K 2 2 ; R 1 2 K I F 5 B : R E T融合遺伝子用）、または配列A T T G A T T C T G A T G A C A C C G G A（配列番号521）及びG T G A T C G C A C A G T A G G A C A G C G G C T G C G A T C（配列番号27用）（例えば、K 2 3 ; R 1 2 K I F 5 B : R E T融合遺伝子用）を含む。

【0107】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、NTRK1遺伝子における1つ以上の変異（例えば、RNA変異）の遺伝子座を増幅することを含む。NTRK1は、高親和性神経成長因子受容体、神経栄養チロシンキナーゼ受容体1型、TRK1形質転換チロシンキナーゼタンパク質、MTC、TRK、TRKA、Trk-A、及びp140-TrkAとしても知られている、ヒトがんにおいて頻繁に変異する受容体チロシンキナーゼであるトロポミオシン受容体キナーゼA（TrkAをコードする。いくつかの実施形態では、NTRK1遺伝子は、ヒトNTRK1遺伝子である。いくつかの実施形態では、ヒトNTRK1遺伝子は、NCBI Entrez Gene ID番号4914によって表される遺伝子（その変異体及びバリエーションを含む）を指す。他の実施形態では、NTRK1遺伝子は、以下の生物のうちの1つからのものである：マウス（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号18211を参照されたい）、ラット（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号59109を参照されたい）、魚（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号30546を参照されたい）、ウシ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号353111を参照されたい）、ニワトリ（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号396337を参照されたい）、またはチンパンジー（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号457408を参照されたい）。

【0108】

がんに関連する多様なNTRK1変異が知られており、本明細書に記載の方法によって好適に検出され得る；例えば、Lovly, C., R. Doebele. 2014. NTRK1 (TRKA) in Lung Cancer. My Cancer Genome at www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/ntrk1/（5月23日更新）を参照されたい。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、NTRK1変異は、例えば、MKEAALICLA PSVPPILTVKSWDTMQLRAARSRCTNLLAASYIENQQHLQHLELRDLRGLGELRNLTIVKSGLR FVAPDAFHFTPRLSRLNLSFNALLESLSWKTVQGLSLQELVLSGNPLHCS CALRWLQ

RWEEEG LGGVPEQKLQCHGQG PLAHMPNAS CGVPTLKVQV
PNASVDVGDDVLLRCQVEGRGLEQAGWILTELEQSATVMK
SGGLPSLGLTLANVTSDLNRKNVTCWAENDVGRAEVS VQV
NVSFPASVQLHTAVEMHHWCIPFSVDGQPAPSLRWLFNGS
VLNETSFI FTEFLEPAANETVRHGC LRLNQPTHVNNGNYT
LLAANPFGQASASIMAAFM DNPFEFN PEDPIPD TNSTSGD
PVEKKDETPFGVSVAVGLAVFACLF LSTLLLV LNKCGRRN
KFGINRPAVLAPEDGLAMSLHFM TLGGSSLSPT EGKGSGL
QGHIIENPQYFSDACVHHIKRRDI VLKWE LGE GA FGKVFL
AECHNLLPEQDKMLVAVKALKEASE SARQDFQREAE L LTM
LQHQHIVRFFGVCTEGRPLLMVF EYMRHGD LNRFL RSHGP
DAKLLAGGEDVAPGPLGLGLQL LAVASQVAAGMVYLAGLHF
VHRDLATRNC LVGQGLVVKIGDFGMSRDIYSTDYRVGGR
TMLPIRWMPPE S ILYRKFTTESDVWSFGVVLWEIFTY GKQ
PWYQLSNTEAIDCITQGRELERPRAC PPEVYAIMRG CWQR
EPQQRHSIKDVHARLQALAQAPPVYLDVLG (配列番号337) に
示されるヒトNTRK1タンパク質に従って、生じたアミノ酸置換／欠失／フレームシフ
ト／転座に基づいて命名される。例示的なヒトNTRK1 cDNA配列は、ATGAA
GGAGGCCCGCCCTCATCTGCCTGGGCACCCCTCTGTACCCCGG
ATCTTGACGGTGAAAGTCCTGGGACACCATG CAGTTGCGGG
CTGCTAGATCTCGGTGCACAAACTTGT TGGCAGCAAGCTA
CATCGAGAAC CAGCAGCATCTGCAGCATCTGGAGCTCCGT
GATCTGAGGGGGCCTGGGGGAGCTGAGAAACCTCACCATCG
TGAAGAGTGGTCTCCGTTTCTGCTGGCGCCAGATGCCCTTCCA
TTTCACTCCTCGGCTCAGTCGCCTGAATCTCTCCTTCAAC
GCTCTGGAGTCTCTCTCTCCTGGAAAACTGTGCAGGGCCTCT
CCTTACAGGAAC TGGTCCTGTCTGGGGGAACCCCTCTGCACTG
TTCTTG TGCCCTGCGCTGGCTACAGCGCTGGGAGGGAGGAG
GGACTGGGCGGAGTG CCTGAACAGAAAGCTGCAGTGTCATG
GGCAAGGGGCCCTGGGCCACATGCCCAATGCCAGCTGTGG
TGTGCCCAACGCTGAAGGTCCAGGTGCCCAATGCCCTCGGTG
GATGTGGGGGACGACGTGCTGCTGCGGTGCCAGGTGGAGG
GGCGGGGGCCTGGAGCAGGCCCGGCTGGATCCTCACAGAGCT
GGAGCAGTCAGCCACGGTGATGAAATCTGGGGGGTCTGCCA
TCCCTGGGGGCTGACCCTGGGCCAATGTCAACCAGTGACCTCA
ACAGGAAGAAACGTGACGTGCTGGGCGAGAGAACGATGTGGG
CCGGGCGAGAGGTCTCTGTTCAGGTCAACGTCTCCTTCCCG
GCCAGTG TGCA GCTGCACACGGCGGGTGGAGATGCACCACT
GGTG CATCCCTTCTCTGTGGATGGGCGAGCCGGGCAACCGTC
TCTGCGCTGGCTCTTCAATGGCTCCGCTGCTCAATGAGACC
AGCTT CATCTTCACTGAGTTCTCTGGAGCCGGGCGAGCCAATG
AGACCGTGCGGGCACGGGTGTCTGCGCCTCAACCGAGCCCA
CCACGTCAACAAACGGCAACTACACGCTGCTGGCTGCCAAC
CCCTTCGGGCCAGGCCCTCCGCGCTCCATCATGGCTGCCCTTCA
TGGACAACCCCTTTCGAGTTCAACCCCGAGGACCCCATCCC
TGACACTAACAGCACATCTGGAGACCCGGGTGGAGAAAGAG
GACGAAACACCTTTTGGGGGTCTCGGTGGCTGTGGGGCCTGG
CCGTCTTTG CCTG CCTCTTCTTCTTCTACGCTGCTCCTTGT
GCTCAACAAATGTGGACGGAGAAACAAGTTTGGGGATCAAC
CGCCCGGCTGTGCTGGCTCCAGAGGATGGGGCTGGGCCATGT

10

20

30

40

50

CCCTGCATTTTCATGACATTTGGGTGGCAGCTCCCTGTCCCC
CACCGAGGGCAAGAGGCTCTGGGCTCCAAGGCCACATCATC
GAGAACCCACAATACTTTCAGTGATGCCTGTGTTTCAACCACA
TCAAGCGCCGGGACATCGTGTCTCAAGTGGGAGCTGGGGGGA
GGGCGCCTTTTGGGAAGGTCTTCTCTTGCTGAGTGGCACAAC
CTCCTGCTGTAGCAGGACAAGATGCTGGTGGCTGTCAAGG
CACTGAAGGAGGCGTCCGAGAGTGCTCGGCAGGACTTCCA
GCGTGAGGCTGTAGCTGCTCACCATGCTGCAGCACCCAGCAC
ATCGTGTGCGCTTCTTTCGGCGTCTGCACCGAGGGGCCGCC
TGCTCATGTGCTCTTTGAGTATATGCGGCACGGGGACCTCAA
CCGCTTTCCTCCGATCCCATGGACCTGATGCCAAGCTGTCTG
GCTGGTGGGGAGGATGTGGCTCCAGGCCCCCTGGGTCTGG
GGCAGCTGCTGGCCGTGGCTAGCCAGGTCGCTGCGGGGAT
GGTGTAACCTGGCGGGTCTGCATTTTGTGCACCGGGACCTG
GCCACACGCAACTGTCTAGTGGGCCAGGGACTGGTGGTCA
AGATTGGTGATTTTGGGCATGAGCAGGGATATCTACAGCAC
CGACTATTACCGTGTGGGAGGGCCGCACCATGCTGCCCAT
CGCTGGATGCCGCCCGAGAGCATCCTGTACCGTAAGTTCA
CCACCGAGAGCGACGCTGTGGAGCTTTCGGCGTGGTGTCTG
GGAGATCTTTCACCTACGGCAAGCAGCCCTGGTACCAGCTC
TCCAACACGGAGGCAATCGACTGCATCACGCAGGGACGTG
AGTTGGAGCGGCCACGCTGCCCTGCCACAGAGGTCTACGC
CATCATGCGGGGGCTGCTGGCAGCGGGAGCCCCAGCAACGC
CACAGCATCAAGGATGTGCACGCCCGGGCTGCAAGCCCTGG
CCCAGGCACCTCCTGTCTACCTGGATGTCCTGGGGCTAG (配
列番号350) に示される。いくつかの実施形態では、RNA変異は、NTRK1遺伝子
座における転座、再構成、または融合遺伝子をもたらす。いくつかの実施形態では、RNA
変異は、NTRK1とCD74遺伝子との間の融合をもたらす。例えば、いくつかの実
施形態では、NTRK1遺伝子におけるRNA変異は、C8;N12 CD74:NTR
K1融合タンパク質をコードし、またはもたらす。

10

20

30

【0109】

いくつかの実施形態では、NTRK1変異（例えば、C8;N12 CD74:NTR
K1融合タンパク質をコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマ
ー対は、配列（例えば、融合遺伝子のCD74特異的遺伝子座とハイブリダイズする）A
GAAGACGTGACAGGAAGTGGAGGACCCGTCCTT（配列番号30）
及び配列（例えば、融合遺伝子のNTRK1特異的遺伝子座とハイブリダイズする）GG
ACGAAAATCCAGACCCCAAGAGGTGTTTTCGT（配列番号32）を
含む。

【0110】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、cMET遺伝子における1つ以上の変異（
例えば、RNA変異）の遺伝子座を増幅することを含む。cMETは、肝細胞成長因子受
容体（HGFR）、AUTS9、RCCP2、DFNB97、及びOSFDとしても知ら
れている、ヒトがんにおいて頻繁に変異するチロシンプロテインキナーゼMetをコード
する。いくつかの実施形態では、cMET遺伝子は、ヒトcMET遺伝子である。いくつ
かの実施形態では、ヒトcMET遺伝子は、NCBI Entrez Gene ID番
号4233によって表される遺伝子（その変異体及びバリエーションを含む）を指す。他の実
施形態では、cMET遺伝子は、以下の生物のうちの1つからのものである：マウス（例
えば、NCBI Entrez Gene ID番号17295を参照されたい）、ラッ
ト（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号24553を参照されたい）
、魚（例えば、NCBI Entrez Gene ID番号100150664を参照

40

50

されたい)、ウシ(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号280855を参照されたい)、ニワトリ(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号396134を参照されたい)、またはチンパンジー(例えば、NCBI Entrez Gene ID番号463671を参照されたい)。

【0111】

がんに関連する多様なcMET変異が知られており、本明細書に記載の方法によって好適に検出され得る;例えば、Lovly, C., P. Paik. 2017. MET Exon 14 Skipping Mutations in Lung Cancer. My Cancer Genome at www.mycancergenome.org/content/disease/lung-cancer/met/343 (6月15日更新)を参照されたい。METにおいて時々生じる変異は、細胞外ドメイン(残基52~496)、膜近傍ドメイン(残基956~1093)、及びチロシンキナーゼドメイン(残基1096~1355)にわたって認められている。METにおいて最も頻繁に観察される検証された機能獲得変異は、Y1253Dである。MET遺伝子の転座はまれであるが、肺腺癌で認められている。エクソン14のスキッピング及び膜近傍ドメインの破壊は、NSCLCにおいてMETを活性化し、MET阻害剤に対して感受性である。METはsqNSCLCの6%で増幅され、コピー数増加が肺癌の2.7%に見られる。MET過剰発現及び増幅は通常、予後不良に関連する。MET変異についての検査は、様々なチロシンキナーゼ阻害剤に対する患者の感受性を決定する上で有用であり得る。METに対して感受性のFDA承認薬には、カボザンチニブ及びクリゾチニブが含まれる。本明細書に記載のいくつかの実施形態では、cMET変異は、例えば、MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPNFTAE
TPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPV
LEHPDCFCPCQDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDITYYDDQ
LISCGSVNRGTCQRHVFPNHTADIQSEVHCIFSPQIEEP
SQCPDCVVSA L GAKVLSSSVKDRFINFFVGNTINS SYFPDH
PLHSISVRRLLKETKDGFMFLT DQSYIDVLP EFRDSYPIKY
VHAFESNNFIYFLT VQRETLD AQT FHTRIIRFC SINSGLH
SYMEMPL ECI L TEKRKRKRSTKKEVFNI LQAAYVSKPGAQL
ARQIGAS LND DILFGVF AQS KPD SAEPMDRSAMCAFP IKY
VNDFFNKIVNKNNV RCLQH FYGPNHEHC FNRTL L RNS SGC
EARRDEYRTEFTTALQRVD LFMGQFSEVLLTSISTFIKGD
LTIANLGTSEGRFMQVVVSRS GPSTPHVNFLLDSHPV SPE
VIVEHTLNQNGYT LVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQC
LSAPPFVQCGWCHDKCVRSEEC LSGTWTQQICLP AIYKV F
PNSAPLEGGTRLTICGWDFGFR RN NKF D LKKTRVLLGNES
CTLTLS ESTMNT LKCTVGPAMNKHFNMSIIISNGHGT TQY
STFSYVDPVITSISP KYGPMAGGTLLTLTGNYLNSGNSRH
ISIGGKTCT LKSVSNS ILECYTPAQTISTEF AVKLKIDLA
NRETSIFSYREDPIVYEIHP TKSFISGGSTITGVGKNLNS
VSVP RMVIN VHEAGRNFTVACQHRSNSEIICCTTPSLQQ L
NLQLPLKTKAFFMLD GILSKYFDLIYVHNPFVKPF EK PVM
ISMGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHS
EAVLCTVPNDLLKLNSE LNI EWKQAISSTVLGKVIVQPDQ
NFTGLIAGVVSI STALLLLLGFFLWLKKRKQIKDLGSELV
RYDARVHTPHLDRLVSARSVSPTTEMVS NESVDYRATFPE
DQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPILTSGDSDISSPLLQN
TVHIDL SALNPELVQAVQHVVIGPSS L I VHFNEVIGRGHF
GCVYHGTLLDNDGKKIHC AVKSLNRITDIGEV SQFLTEGI
IMKDFSHPNVLSLLGICLRSEGSP LVVLPYMKHGD L RNF I

10

20

30

40

50

R N E T H N P T V K D L I G F G L Q V A K G M K Y L A S K K F V H R D L A A R N
C M L D E K F T V K V A D F G L A R D M Y D K E Y Y S V H N K T G A K L P V K W
M A L E S L Q T Q K F T T K S D V W S F G V L L W E L M T R G A P P Y P D V N T
F D I T V Y L L Q G R R L L Q P E Y C P D P L Y E V M L K C W H P K A E M R P S
F S E L V S R I S A I F S T F I G E H Y V H V N A T Y V N V K C V A P Y P S L L
S S E D N A D D E V D T R P A S F W E T S (配列番号 338) に示されるヒト c M E
T タンパク質に従って、生じたアミノ酸置換／欠失／フレームシフト／転座に基づいて命
名される。例示的なヒト c M E T c D N A 配列は、A T G C C C A A G A A G A A G C
C G A C G C C C A T C C A G C T G A A C C C G G C C C C C G A C G G C T C T G C
A G T T A A C G G G A C C A G C T C T G C G G A G A C C A A C T T G G A G G C C
T T G C A G A A G A A G C T G G A G G A G C T A G A G C T T G A T G A G C A G C
A G C G A A A G C G C C T T G A G G C C T T T C T T A C C C A G A A G C A G A A
G G T G G G A G A A C T G A A G G A T G A C G A C T T T G A G A A G A T C A G T
G A G C T G G G G G C T G G C A A T G G C G G T G T G G T G T T C A A G G T C T
C C C A C A A G C C T T C T G G C C T G G T C A T G G C C A G A A A G C T A A T
T C A T C T G G A G A T C A A A C C C G C A A T C C G G A A C C A G A T C A T A
A G G G A G C T G C A G G T T C T G C A T G A G T G C A A C T C T C C G T A C A
T C G T G G G C T T C T A T G G T G C G T T C T A C A G C G A T G G C G A G A T
C A G T A T C T G C A T G G A G C A C A T G G A T G G A G G T T C T C T G G A T
C A A G T C C T G A A G A A A G C T G G A A G A A T T C C T G A A C A A A T T T
T A G G A A A A G T T A G C A T T G C T G T A A T A A A A G G C C T G A C A T A
T C T G A G G G A G A A G C A C A A G A T C A T G C A C A G A G A T G T C A A G
C C C T C C A A C A T C C T A G T C A A C T C C C G T G G G G A G A T C A A G C
T C T G T G A C T T T G G G G T C A G C G G G C A G C T C A T C G A C T C C A T
G G C C A A C T C C T T C G T G G G C A C A A G G T C C T A C A T G T C G C C A
G A A A G A C T C C A G G G G A C T C A T T A C T C T G T G C A G T C A G A C A
T C T G G A G C A T G G G A C T G T C T C T G G T A G A G A T G G C G G T T G G
G A G G T A T C C C A T C C C T C C T C C A G A T G C C A A G G A G C T G G A G
C T G A T G T T T G G G T G C C A G G T G G A A G G A G A T G C G G C T G A G A
C C C C A C C C A G G C C A A G G A C C C C C G G G A G G C C C C T T A G C T C
A T A C G G A A T G G A C A G C C G A C C T C C C A T G G C A A T T T T T G A G
T T G T T G G A T T A C A T A G T C A A C G A G C C T C C T C C A A A A C T G C
C C A G T G G A G T G T T C A G T C T G G A A T T T C A A G A T T T T G T G A A
T A A A T G C T T A A T A A A A A A C C C C G C A G A G A G A G C A G A T T T G
A A G C A A C T C A T G G T T C A T G C T T T T A T C A A G A G A T C T G A T G
C T G A G G A A G T G G A T T T T G C A G G T T G G C T C T G C T C C A C C A T
C G G C C T T A A C C A G C C C A G C A C A C C A A C C C A T G C T G C T G G C
G T C T A A (配列番号 351) に示される。いくつかの実施形態では、R N A 変異は、
c M E T 遺伝子座における 1 つ以上のエクソンのスキッピング及び／または c M E T 遺伝
子座の増幅をもたらす。いくつかの実施形態では、R N A 変異は、c M E T 遺伝子座にお
けるエクソン 14 スキッピングをもたらす。

【0112】

いくつかの実施形態では、c M E T 変異（例えば、c M E T エクソン 14 のスキッピ
ングをコードし、またはもたらす）の遺伝子座を増幅するためのプライマー対は、配列 G A
A T T T C A C A G G A T T G A T T G C T G G T G T T G T C T C (配列番号 28) 及
び G A C A G T A T T T T G C A G T A A T G G A C T G G A T A T A T C A G A (配列
番号 29) を含む。

【0113】

上の実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、第 1 のプライマー（例えば、c D
N A を生成するためのもの）は、5' 改変または標識、例えば、ビオチンを含む。

【0114】

例示的で非限定的なRNA変異は、以下の表A2に提供されている。

【0115】

本開示の多重アッセイは、上述した変異の2つ以上を組み合わせることを含む。例えば、アッセイは、上述したDNA変異の2つ以上及び／または上述したRNA変異の2つ以上を組み合わせることを含む。

【0116】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、陽性または陰性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリアの使用をさらに含む。

【0117】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって単離されたRNAから陽性対照配列を増幅することを含む。陽性対照RNA配列は、所与のタイプのすべてのサンプルに存在する可能性が高い任意の配列、例えば、サンプルが得られた生物からの非変異または内因性遺伝子配列であり得る。陽性対照は、RNA（例えば、ヒトRNA）が、検出のために十分なレベルでサンプルに存在することを示す。対象となる変異したRNA配列のように、陽性対照配列は、（例えば、陽性対照配列に特異的な第1のプライマーを使用することによって）単離されたRNAから陽性対照配列に特異的なcDNAを生成し、陽性対照配列に特異的なcDNAを使用してPCRによって陽性対照配列に特異的なDNAを増幅することによって検出される。増幅された陽性対照遺伝子配列は、陽性対照遺伝子配列に特異的なプローブとハイブリダイズする（陽性対照遺伝子配列に特異的なプローブは、陽性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリアに結合されている）。次いで増幅した陽性対照配列と、陽性対照遺伝子配列に特異的なプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在が検出される（また、陽性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリアのアナログコードも検出される）。

【0118】

いくつかの実施形態では、以下で例示されるように、陽性対照RNA配列は、HGPRTまたはHPRTとしても知られているヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ1（HPRT1）遺伝子（例えば、ヒトHPRT1遺伝子）の配列を含む。いくつかの実施形態では、陽性対照RNA配列に特異的なプライマー対は、配列GGAGATATAATTGACACTGGCAAAACA（配列番号34）及びATTCAATTATAGTCAAGGGCATATCC（配列番号35）を含む。

【0119】

ブロック核酸

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、1つ以上のブロック核酸（複数可）（例えば、対象となる各DNA変異の野生型バージョンに対応するブロック核酸）の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含む。有利には、ブロック核酸は、野生型DNA遺伝子座の増幅を防止し、これによりDNA変異を検出することの感受性を増加させる（図4及び5参照）。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも7つのブロック核酸であって、その各々がKRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、またはHER2遺伝子におけるDNA変異と対応する野生型DNA遺伝子座とハイブリダイズする、ブロック核酸（例えば、遺伝子当たり少なくとも1つのブロック核酸）の存在下でPCRによって単離されたDNAを増幅することを含む。

【0120】

いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、対応する野生型DNA遺伝子座とハイブリダイズする一本鎖オリゴヌクレオチド、及び一本鎖オリゴヌクレオチドからの伸長をブロックし、それにより野生型DNA遺伝子座の増幅を防止する3'末端部位を含む。いくつかの実施形態では、3'末端部位は、1つ以上の反転デオキシチミジン（invdT）を含む。所定の実施形態では、3'末端部位は、3つ連続の反転デオキシチミジンを含む。

【0121】

いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、1つ以上の改変ヌクレオチドを含む。一部またはすべての配列位置において改変ヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドが企図され、PCR中にブロック核酸として使用するのに特に有利な改善したハイブリダイゼーション特性を有し得る。例えば、ロック核酸（LNA）を使用して部分的にまたは完全に合成されるオリゴヌクレオチドは、従来のヌクレオチドのみで合成される対応するオリゴヌクレオチドよりも高い熱安定性を有し、それにより、オリゴ：LNA二本鎖の溶融温度を上昇させ、熱サイクル中に安定なハイブリダイゼーションを保持するより短い配列が可能となることが知られている。Koshkin, A. A. et al. (1998) Tetrahedron 54:3607-30を参照されたい。多様な改変ヌクレオチドが知られており、限定されないが、ロック核酸（LNA）、ペプチド核酸（PNA）、ヘキソース核酸（HNA）、トレオース核酸（TNA）、グリコール核酸（GNA）、及びシクロヘキセニル核酸（CeNA）を含む。例示的な改変ヌクレオチドのより詳細な説明については、例えば、Schmidt, M. (2010) BioEssays 32:322-31を参照されたい。

10

【0122】

いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、KRASのG12またはG13における1つ以上のDNA変異、例えば、G12D、G12V、またはG12C変異KRASタンパク質をコードするDNA変異（複数可）の遺伝子座と対応する野生型KRAS遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

20

【化24】

TACGCCACCAGCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号281); TTGGAGCTGGTGGCGTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号282); GCTGGTGGCGTAGGCA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号283); GCTGGTGGCGTAGGC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号284); またはTTGGAGCTGGTGGCGT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号285) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

【化25】

TACGCCACCAGCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号281); TTGGAGCTGGTGGCGTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号282); GCTGGTGGCGTAGGACA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号283); GCTGGTGGCGTAGGC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号284); またはTTGGAGCTGGTGGCGTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号285) (下線の核酸はロック核酸を表す)

40

50

を含む。所定の実施形態では、 n は、3である。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号281～285の配列を含むが、異なるパターンまたはタイプの改変ヌクレオチド（複数可）を任意に含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号281～285の配列を含むが、異なる3'末端部位を含む。

【0123】

いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、NRASのQ61における1つ以上のDNA変異、例えば、Q61L変異NRASタンパク質をコードするDNA変異（複数可）の遺伝子座と対応する野生型NRAS遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

【化26】

10

$CTCTTC TTGTC CAG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号286); $TCTTCTTGTC CAG CTGTATCC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号287); $TCTTGTC CAG CTGT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号288); $TCTTGTC CAG CTGTATC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号289); または $TCTTCTTGTC CAG CTG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号290) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

20

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列
【化27】

$CTCTTCTTGTC CAG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号286); $TCTTCTTGTC CAG CTGTATCC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号287); $TCTTGTC CAG CTGT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号288); $TCTTGTC CAG CTGTATC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号289); または $TCTTCTTGTC CAG CTG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号290) (下線の核酸はロック核酸を表す)

30

40

を含む。上の実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、 n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。所定の実施形態では、 n は、3である。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号286～290の配列を含むが、異なるパターンまたはタイプの改変ヌクレオチド（複数可）を任意に含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号286～290の配列を含むが、異なる3'末端部位を含む。

【0124】

いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、PIK3CAのE542またはE545における1つ以上のDNA変異、例えば、E542K、またはE545K変異PIK3CAタンパク質をコードするDNA変異（複数可）の遺伝子座と対応する野生型PIK3CA遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配

50

列

【化 2 8】

CTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である)
 (配列番号291) ; TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは
 1、2、または3である) (配列番号292) ; TCTCTGAAATCACTGAGCAG
 G (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号293) ; TCTCTGAA
 ATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号2
 94) ; または TCTCTGAATTCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、
 2、または3である) (配列番号295) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

【化 2 9】

20

CTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である)
 (配列番号291) ; TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは
 1、2、または3である) (配列番号292) ; TCTCTGAAATCACTGAGCAG
 G (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号293) ; TCTCTGAA
 ATCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号2
 94) ; または TCTCTGAATTCACTGAGCAGG (invdT)_n (nは1、
 2、または3である) (配列番号295) (下線の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、PIK3CAのH1047
 における1つ以上のDNA変異、例えば、H1047R変異PIK3CAタンパク質をコ
 ードするDNA変異（複数可）の遺伝子座と対応する野生型PIK3CA遺伝子座とハイ
 ブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

40

50

【化 3 0】

CACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号296); CCACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号297); CACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号298); CCACCATGATGTGCATCA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号299); またはCATGATGTGCA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号300) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列
【化 3 1】

20

CACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号296); CCACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号297); CACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号298); CCACCATGATGTGCATCA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号299); またはCATGATGTGCA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号300) (下線の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。上の実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。所定の実施形態では、nは、3である。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号291～300の配列を含むが、異なるパターンまたはタイプの改変ヌクレオチド（複数可）を任意に含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号291～300の配列を含むが、異なる3'末端部位を含む。
【0125】

いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、BRAFのV600における1つ以上のDNA変異、例えば、V600E変異BRAFタンパク質をコードするDNA変異（複数可）の遺伝子座と対応する野生型BRAF遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

40

50

【化 3 2】

GAGATTTCAC TG TAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号301) ; GAGATTTCAC TG TAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号302) ; GAGATTTCAC TG TAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号303) ; GAGATTTCAC TG TAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号304) ; または GAGATTTCAC TG TAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号305) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

【化 3 3】

GAGATTTCAC TG TAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号301) ; GAGATTTCAC TG TAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号302) ; GAGATTTCAC TG TAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号303) ; GAGATTTCAC TG TAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号304) ; または GAGATTTCAC TG TAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号305) (下線の核酸はロック核酸を表す)

20

30

を含む。上の実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。所定の実施形態では、nは、3である。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号301～305の配列を含むが、異なるパターンまたはタイプの改変ヌクレオチド（複数可）を任意に含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号301～305の配列を含むが、異なる3'末端部位を含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、EGFRのG719における1つ以上のDNA変異、例えば、G719A変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異（複数可）の遺伝子座と対応する野生型EGFR遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

40

50

【化 3 4】

CGGAGCC CAGCACTTTGA (invdT)_n (nは1、2、または3である)
 (配列番号306) ; CGCACCCGGAGCC CAGCACT (invdT)_n (nは1、
 2、または3である) (配列番号307) ; GAGCCCAGCAC (invdT)_n (nは
 1、2、または3である) (配列番号308) ; CGCACCGGAGCCCAGCAC (i
 nvdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号309) ; またはCGCACCCGG
 AGCCCAGCACTTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号3
 10) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列
 【化 3 5】

20

CGGAGCC CAGCACTTTGA (invdT)_n (nは1、2、または3である)
 (配列番号306) ; CGCACCCGGAGCC CAGCACT (invdT)_n (nは1、
 2、または3である) (配列番号307) ; GAGCCCAGCAC (invdT)_n (nは
 1、2、または3である) (配列番号308) ; CGCACCCGGAGCCCAGCAC (i
 nvdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号309) ; またはCGCACCCGG
AGCCCAGCACTTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号3
 10) (下線の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、EGFRのE746～A750における1つ以上のDNA変異、例えば、E746__A750del変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異(複数可)の遺伝子座と対応する野生型EGFR遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列
 【化 3 6】

CGGAGATGTTGCTTCCTTAATTCC (invdT)_n (nは1、2、また
 は3である) (配列番号311) ; CGGAGATGTTGCTTCCTTCCT (invdT)_n
 (nは1、2、または3である) (配列番号312) ; GTTGCTTCCTTCCTTAATTC
 C (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号313) ; ATGTTGCT
 TCTCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号314) ; またはT
 TGCTTCCTTCCTTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号31
 5) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

40

50

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列
【化 3 7】

CGGAGAGATGTTGCTTCTCTTAATTCC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号311); CGGAGAGATGTTGCTTCTCTCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号312); GTTGCTTCTCTTAATTCC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号313); ATGTTGCTTCTCTCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号314); またはTTGCTTCTCTTA (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号315) (下線の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、EGFRのT790、C797、S768、V769、H773、またはD770における1つ以上のDNA変異、例えば、T790M、C797S、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG、またはD770_N771insSVD変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異(複数可)の遺伝子座と対応する野生型EGFR遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列
【化 3 8】

20

CATCACGCAGCTCATG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号316); TGCAGCTCATCACGCAGC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号317); TCATCACGCAGCTCAT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号318); TCATCACGCAGC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号319); またはCTCATCACGCAGC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号320) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

40

50

【化 3 9】

CATCACGCAGCTCATG (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号316) ; TGCAGCTCATCACGCAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号317) ; TCATCACGCAGCTCAT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号318) ; TCATCACGCAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号319) ; または CTCATCACGCAGC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号320) (下線の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。上の実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。所定の実施形態では、nは、3である。いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、EGFRのL858またはL861における1つ以上のDNA変異、例えば、L858R変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異(複数可)の遺伝子座と対応する野生型EGFR遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

20

【化 4 0】

CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号321) ; CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号322) ; CCAGCAGTTTGGCCAGCCC T (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号323) ; AGCAGTTTGGCCAGCC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号324) ; または CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号325) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列
【化 4 1】

CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号321) ; CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号322) ; CCAGCAGTTTGGCCAGCCC T (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号323) ; AGCAGTTTGGCCAGCC (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号324) ; または CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (i n v d T)_n (nは1、2、または3である) (配列番号325) (下線の核酸はロック核酸を表す)

40

50

を含む。いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、EGFRのT790における1つ以上のDNA変異、例えば、T790M変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異（複数可）の遺伝子座と対応する野生型EGFR遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列【化42】

$CATCACGCAGC (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号365) ; $CATCACGCAG (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号366) ; $ATCACGCAGC (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号367) ; $CATCACGCAGC (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号368) ; または $CATCACGCAG (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号369) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列【化43】

20

$CATCACGCAGC (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号365) ; $CATCACGCAG (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号366) ; $ATCACGCAGC (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号367) ; $CATCACGCAGC (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号368) ; または $CATCACGCAG (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号369) (下線の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、EGFRのC797における1つ以上のDNA変異、例えば、C797S (T>AまたはG>C) 変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異（複数可）の遺伝子座と対応する野生型EGFR遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

40

50

【化 4 4】

$GGC\ TGCC\ TCC\ TG\ (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号416) ; $CGGC\ TGCC\ TCC\ TG\ (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号417) ; $CGGC\ TGCC\ TCC\ TG\ (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号418) ; $TCGC\ TGCC\ TCC\ TG\ (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号419) ; または $TCGC\ TGCC\ TCC\ T\ (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号420) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列
 【化 4 5】

20

$\underline{GGCTGCCTCCTG}\ (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号416) ; $\underline{CGGCTGCCTCCTG}\ (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号417) ; $\underline{CGGCTGCCTCCTG}\ (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号418) ; $\underline{TCGGCTGCCTCCTG}\ (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号419) ; または $\underline{TCGGCTGCCTCCT}\ (invdT)_n$ (nは1、2、または3である) (配列番号420) (下線の核酸はロック核酸を表す)

30

を含む。上の実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。所定の実施形態では、nは、3である。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号306～325、365～369、及び416～420の配列を含むが、異なるパターンまたはタイプの改変ヌクレオチド(複数可)を任意に含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号306～325、365～369、及び416～420の配列を含むが、異なる3'末端部位を含む。

【0127】

いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、AKT1のE17における1つ以上のDNA変異、例えば、E17K変異AKT1タンパク質をコードするDNA変異(複数可)の遺伝子座と対応する野生型AKT1遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

40

50

【化 4 6】

$TGTACTCCCCTACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号 382); $GATGTACTCCCCCT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号 383); $ATGTACTCCCCCTAC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号 384); $GTACTCCCCTACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号 385); または $GATGTACTCCCCTACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号 386) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列
 【化 4 7】

$TGTACTCCCCCTACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号 382); $GATGTACTCCCCCT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号 383); $ATGTACTCCCCCTAC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号 384); $GTACTCCCCCTACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号 385); または $GATGTACTCCCCCTACA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号 386) (下線の核酸はロック核酸を表す)

20

30

を含む。上の実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、 n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。所定の実施形態では、 n は、3である。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号 382～386の配列を含むが、異なるパターンまたはタイプの改変ヌクレオチド(複数可)を任意に含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号 382～386の配列を含むが、異なる3'末端部位を含む。
 【0128】

いくつかの実施形態では、本開示のブロック核酸は、MEK1のK57における1つ以上のDNA変異、例えば、K57N変異MEK1タンパク質をコードするDNA変異(複数可)の遺伝子座と対応する野生型MEK1遺伝子座とハイブリダイズする。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列

40

【化 4 8】

$TCTGCTTC\ TGGGTAAG\ (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号399) ; $TTCTGCTTCTG\ TGGGTAAGA\ (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号400) ; $CACCTTCTGCTTC\ TGGG\ (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号401) ; $TCTGCTTCTG\ TGGTA\ (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号402) ; または $CACCTTC\ TGCCTTC\ TGGGTAAGA\ (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号403) (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列
 【化 4 9】

$TCTGCTTC\ TGGGTAAG\ (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号399) ; $TTCTGCTTCTG\ TGGGTAAGA\ (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号400) ; $CACCTTCTGCTTC\ TGGG\ (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号401) ; $TCTGCTTCTG\ TGGTA\ (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号402) ; または $CACCTTCTGCTTC\ TGGGTAAGA\ (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号403) (下線の核酸はロック核酸を表す)

20

30

を含む。上の実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、 n は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10である。所定の実施形態では、 n は、3である。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号399～403の配列を含むが、異なるパターンまたはタイプの改変ヌクレオチド(複数可)を任意に含む。いくつかの実施形態では、ブロック核酸は、配列番号399～403の配列を含むが、異なる3'末端部位を含む。

【0129】

ハイブリダイゼーション

【0130】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、増幅されたDNAを本開示のDNAまたはRNA変異に特異的な1つ以上のプローブとハイブリダイズさせることを含む。いくつかの実施形態では、方法は、増幅されたDNAを、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子の各々におけるDNA変異に特異的な1つ以上のプローブ(例えば、各遺伝子における変異を代表する1つ以上のプローブ)を含む少なくとも7つのプローブとハイブリダイズさせること及び/または増幅されたDNAを、ALK、ROS、RET、NTRK1、及びcMET遺伝子の各々におけるRNA変異に特異的な1つ以上のプローブ(例えば、各遺伝子における変異を代表する1つ以上のプローブ)を含む少なくとも5つのプローブとハイブリダイズさせることを含む。

40

【0131】

50

本明細書で使用される場合、プローブは、対象となるDNAまたはRNA変異の遺伝子座の少なくとも一部とのハイブリダイゼーションが可能なオリゴヌクレオチドを指し得る。例えば、プローブは、対象となるDNA変異を含む一本鎖DNA鑄型、または対象となるRNA変異を含む一本鎖DNA鑄型（例えば、RNA及びその後のcDNAから生成される）の塩基対のほとんどまたはすべてと塩基対形成することができる一本鎖オリゴヌクレオチドを含み得る。変異の特異的検出のため、プローブは、DNAまたはRNA変異を保有する遺伝子座とハイブリダイズすることができるが、対応する野生型遺伝子座とハイブリダイズすることはできない（図4及び5参照）。プローブと増幅されたDNAとのハイブリダイゼーションに好適な条件は、当該技術分野で知られており（例えば、本明細書で引用される文献において参照されるとおりである）、以下に例示される。

10

【0132】

いくつかの実施形態では、本開示のプローブは、例えば、セクションIVに記載されているように、本開示のコードされたマイクロキャリアに結合されている。ポリヌクレオチドプローブをマイクロキャリア表面に結合させるための例示的な方法は、当該技術分野で知られており、セクションIVに提供されている。多重アッセイのため、プローブの各タイプは、プローブタイプに対応する特定の識別子を有するマイクロキャリアに結合され得る。有利には、これにより、使用者は、プローブから検出されたシグナルをプローブの同一性と相関させ、複数のプローブが利用される多重アッセイが可能となる。いくつかの実施形態では、本開示のプローブは、5' 改変、例えば、5' アミノ改変因子C6を含む。

20

【0133】

いくつかの実施形態では、本開示のプローブは、（1）対象となるDNAまたはRNA変異の遺伝子座の少なくとも一部とハイブリダイズする配列；及び（2）1つ以上の追加のヌクレオチドを含む。1つ以上の追加のヌクレオチドが使用されて、例えば、プローブがマイクロキャリア表面に結合され、及び／またはハイブリダイゼーション中のマイクロキャリア表面と増幅されたDNAとの立体障害を低減するための空間が提供され得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のヌクレオチドは、プローブ配列の5' 末端にある。他の実施形態では、1つ以上の追加のヌクレオチドは、プローブ配列の3' 末端にある。いくつかの実施形態では、1つ以上の追加のヌクレオチドは、アデニンまたはチミンヌクレオチドである。有利には、これは、非特異的結合の親和性を低減する。いくつかの実施形態では、本開示のプローブは、5' 末端に1つ以上、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、または8つ以上のアデニンまたはチミンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、本開示のプローブは、5' 末端に4、5、6、7、または8つのアデニンまたはチミンヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、本開示のプローブは、少なくとも20、少なくとも24、少なくとも25、または少なくとも30個の総ヌクレオチドを含む。例示的なプローブ配列は、以下に提供されている。

30

【0134】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるKRAS遺伝子におけるDNA変異に特異的な1つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば；配列TAGTTGGAGCT（配列番号38）、TGTTGGTAGTTG（配列番号40）、TGATGGCGTAG（配列番号42）、TGGAGCTGATGGC（配列番号44）、またはGCCGTAGGCAAG（配列番号46）を含むプローブは、G12D変異KRASタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；配列CTGTTGGCGTAGG（配列番号48）、GTAGTTGGAGCTG（配列番号50）、TGGAGCTGTTGGC（配列番号52）、TTGTTGGTAGTTGG（配列番号54）、またはGGCGTAGGCAAGA（配列番号56）を含むプローブは、G12V変異KRASタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；配列TAGTTGGAGCTT（配列番号58）、GCCTAGGCAAGA（配列番号60）、GGAGCTTGTGGC（配列番号62）、TTGTTGGCGTAGG（配列番号64）、及び／またはTGTTGGTAGTTGG（配列番号66）を含むプローブは、G12C変異KRASタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態で

40

50

は、本開示の1つ以上のプローブは、その5'末端に4、5、6、7、もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTTTAATAGTTGGAGCT（配列番号39）、TTTTTTTTTTTTTAATGTGGTAGTTG（配列番号41）、TTTTTTTTTTTTTAATGATGGCGTAG（配列番号43）、TTTTTTTTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC（配列番号45）、またはTTTTTTTTTTTTTTTAAAGCGTAGGCAAG（配列番号47）を含むプローブは、G12D変異KRASタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTACTGTTGGCGTAGG（配列番号49）、TTTTTTTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG（配列番号51）、TTTTTTTTTTTTTTTATGGA
GCTGTTGGC（配列番号53）、TTTTTTTTTTTTTTTATTGTGGTAGTTGG（配列番号55）、またはTTTTTTTTTTTTTTTAGGCGTAGGCAAGAA（配列番号57）を含むプローブは、G12V変異KRASタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTTTTTAA
TAGTTGGAGCTT（配列番号59）、TTTTTTTTTTTTTTTAAAGCGTAGGCAAGAA（配列番号61）、TTTTTTTTTTTTTTTAAAGGAGCTTGTGGC（配列番号63）、TTTTTTTTTTTTTTTAAATTGTGGCGTAGG（配列番号65）、またはTTTTTTTTTTTTTTTAAATGTGGTAGTTGG（配列番号67）を含むプローブは、G12C変異KRASタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。5'アデニン及び／またはチミンを除くこれらの配列を含むプローブも企図
される。

10

20

30

40

50

【0135】

所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTTTTTGACATACTGGATACAG（配列番号69）、TTTTTTTTTTTTTTTACTGGATACAGCTGGA（配列番号71）、TTTTTTTTTTTTTTTACTAGAAAGAGTACAGT（配列番号73）、TTTTTTTTTTTTTTTATACAGCTGGACTAGA（配列番号75）、またはTTTTTTTTTTTTTTTGCTGGACTAGAAAGAGT（配列番号77）を含むプローブは、Q61L（A>T）変異NRASタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。5'アデニン及び／またはチミンを除くこれらの配列を含むプローブも企図
される。

【0136】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるBRAF遺伝子におけるDNA変異に特異的な1つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば、配列TTTGGTCTAGCTACAGA（配列番号79）、CTACAGAGAAATCTCGA（配列番号81）、GTGATTTTGGTCTAGCT（配列番号83）、またはTCTAGCTACAGAGAAAT（配列番号85）を含むプローブは、V600E変異BRAFタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態では、本開示の1つ以上のプローブは、その5'末端に4、5、6、7、もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTAATTGAGAAATCTCGATGGAG（配列番号78）、TTTTTTAATTGTTGTTCTAGCTACAGA（配列番号80）、TTTTTTAATTCTACAGAGAAATCTCGA（配列番号82）、TTTTTTAATTGTGATTTTGGTCTAGCT（配列番号84）、またはTTTTTTAATTCTAGCTACAGAGAAAT（配列番号86）を含むプローブは、V600E変異BRAFタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。5'アデニン及び／またはチミンを除くこれらの配列を含むプローブも企図
される。

【0137】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるPIK3CA遺伝子におけるDNA変異に特異的な1つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば、配列GCTCAGTGATTTTAG（配列番号87）、TGCTCAGTGATTTT（配列番号89）、

GCTCAGTGATTTTAG (配列番号91)、CCTGCTCAGTGATTTTA (配列番号93)、またはCTCAGTGATTTTAGA (配列番号95)を含むプローブは、E542K変異PIK3CAタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；配列TTCTCCTGCTTA (配列番号97)、CTCCTGCTTAGT (配列番号99)、TCTCCTGCTTAG (配列番号101)、TCCTGCTTAGTG (配列番号103)、またはCTCCTGCTTAGTGA (配列番号105)を含むプローブは、E545K変異PIK3CAタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；及び／または配列GATGCACGTCATG (配列番号107)、TGAATGATGCACG (配列番号109)、TGATGCACGTC (配列番号111)、AATGATGCACGTC (配列番号113)、またはAATGATGCACGTC (配列番号115)を含むプローブは、H1047R変異PIK3CAタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態では、本開示の1つ以上のプローブは、その5'末端に4、5、6、7、もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG (配列番号88)、TTTTTTTTTTTGTCTCAGTGATTTT (配列番号90)、TTTTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG (配列番号92)、TTTTTTTTTCTGCTCAGTGATTTTA (配列番号94)、またはTTTTTTTTTTTCTCAAGTGATTTTAGA (配列番号96)を含むプローブは、E542K変異PIK3CAタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTCTCCTGCTTA (配列番号98)、TTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGT (配列番号100)、TTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAG (配列番号102)、TTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGTG (配列番号104)、またはTTTTTTTTTTTCTCCTGCTTAGTGA (配列番号106)を含むプローブは、E545K変異PIK3CAタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTGTGATGCACGTCATG (配列番号108)、TTTTTTTTTTTGAATGATGCACG (配列番号110)、TTTTTTTTTTTGAATGCACGTC (配列番号112)、TTTTTTTTTTAATGATGCACGTC (配列番号114)、またはTTTTTTTTTTAATGATGCACGTC (配列番号116)を含むプローブは、H1047R変異PIK3CAタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。5'アデニン及び／またはチミンを除くこれらの配列を含むプローブも企図される。

【0138】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるEGFR遺伝子におけるDNA変異に特異的な1つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば、配列ATGGCCATCTTG (配列番号421)、GGCCATCTTGGA (配列番号423)、GATGGCCATCTTG (配列番号425)、TGATGGCCATCTTG (配列番号427)、またはTGGCCATCTTGGA (配列番号429)を含むプローブは、S768I変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；配列GTGATGGCCGG (配列番号431)、TGATGGCCGGCG (配列番号433)、GTGATGGCCGGCGT (配列番号435)、GATGGCCGGCGT (配列番号437)、またはGATGGCCGGCGTG (配列番号439)を含むプローブは、V769_D770insASV、D770_N771insSVD、またはV769_D770insASV変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；配列AACCCCATCACGT (配列番号441)、GACAACCCCATCACG (配列番号443)、CGTGGACAACCCCATCA (配列番号445)、CCCATCACGTGT (配列番号447)、またはTGGACAACCCCATCAC (配列番号449)を含むプローブは、H773_V774insH変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；配列GCCAGCG

TGGACGG (配列番号451)、CGTGGACGGTAACC (配列番号453)、GACGGTAACCCCC (配列番号455)、CCAGCGTGGACGGT (配列番号457)、またはGCCAGCGTGGACGGTA (配列番号459)を含むプローブは、D770__N771insG変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；配列CCAGGAGGCTGCCG (配列番号461)、CAGGAGGCTGCCGA (配列番号463)、TCCAGGAGGCTGCC (配列番号465)、CCAGGAGGCTGCC (配列番号467)、またはCAGGAGGCTGCC (配列番号469)を含むプローブは、C797S (T>A)変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；配列CCAGGAGGGAGCC (配列番号471)、CCAGGAGGGAGCCG (配列番号473)、TCCAGGAGGGAGCC (配列番号475)、CAGGAGGGAGCCG (配列番号477)、またはCAGGAGGGAGCCGA (配列番号479)を含むプローブは、C797S (G>C)変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；配列TCAAAGTGCTGGCCTC (配列番号117)、AGATCAAAGTGCTGGCCTCCG (配列番号119)、AAAGTGCTGGCCT (配列番号121)、AGTGCTGGCCT (配列番号123)、またはAAGTGCTGGCCTC (配列番号125)を含むプローブは、G719A変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；配列AATCAAACATCTCCGAAAG (配列番号128)、CAAACATCTCCG (配列番号130)、AACATCTCCG (配列番号132)、AAACATCTCCGAAAGCC (配列番号134)、AATCAAAGACATCTCCGA (配列番号136)、GCAATCAAAGACATCTCCGA (配列番号138)、AATCAAAGACATCTC (配列番号140)、AATCAAAGACATCTCCGAAAGC (配列番号142)、またはCAAAGACATCTCCGA (配列番号144)を含むプローブは、E746__A750del変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る；及び／または配列ATTTTGGGCGGGCC (配列番号151)、TTGGGCGGGCCAAA (配列番号153)、GCGGGCCAAACT (配列番号155)、GGGCGGGCCAAACT (配列番号157)、またはTGGGCGGGCCA (配列番号159)を含むプローブは、L858R変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態では、本開示の1つ以上のプローブは、その5'末端に4、5、6、7、もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTTTGA GATGCATGATGA (配列番号352)、TTTTTTTTTTTTTGAGATGCATGATGA (配列番号353)、TTTTTTTTTTATGAGATGCATGATGA (配列番号354)、TTTTTTTTTTTTTGAGCTGCATGATGA (配列番号355)、またはTTTTTTTTTTCATGAGATGCATGATGA (配列番号356)を含むプローブは、T790M変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTATGGCCATCTTG (配列番号422)、TTTTTTTTTTTAGGCCATCTTGGA (配列番号424)、TTTTTTTTTTAGATGGCCATCTTG (配列番号426)、TTTTTTTTTTGATGGCCATCTTG (配列番号428)、またはTTTTTTTTTTTGCCATCTTG (配列番号430)を含むプローブは、S768I変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTTTTGTGATGGCCGG (配列番号432)、TTTTTTTTTTTTTTGATGGCCGGCG (配列番号434)、TTTTTTTTTTTTTTGTGATGGCCGGCGT (配列番号436)、TTTTTTTTTTTTTTTTTTGATGGCCGGCGT (配列番号438)、またはTTTTTTTTTTTTTTTTTTGATGGCCGGCGTG (配列番号440)を含むプローブは、V769__D770insASV、D770__N771insSVD、またはV769__D770insASV変異EGFRタンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態で

10

20

30

40

50

40

50

特異的な1つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば、配列TGTAGGGGAAGTACA（配列番号370）、TCTGTAGGGGAAGTAC（配列番号372）、GTCTGTAGGGGAAGTACAT（配列番号374）、CCGCACGTCTGTAGGGGA（配列番号376）、またはACGTCTGTAGGGGAAGTA（配列番号378）を含むプローブは、E17K変異AKT1タンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態では、本開示の1つ以上のプローブは、その5'末端に4、5、6、7、もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTT
TTTTTTTGTAGGGGAAGTACA（配列番号371）、TTTTTTT
TTTCTGTAGGGGAAGTAC（配列番号373）、TTTTTTTGTCTGT
AGGGGAAGTACAT（配列番号375）、TTTTTTTCCGCACGTCTGT
TAGGGGA（配列番号377）、またはTTTTTTTACGTCTGTAGGGGA
AGTA（配列番号379）を含むプローブは、E17K変異AKT1タンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。5'アデニン及び／またはチミンを除くこれらの配列を含むプローブも企図される。

10

20

30

40

50

【0140】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるMEK1遺伝子におけるDNA変異に特異的な1つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば、配列TTACCCAGAAATCAGAA（配列番号387）、CCAGAAATCAGAAAGGTG（配列番号389）、TTCCTTACCCAGAAATCA（配列番号391）、CCTTTCTTACC
CAGAAATC（配列番号393）、またはCAGAAATCAGAAAGGTGG（配列番号395）を含むプローブは、K57N変異MEK1タンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態では、本開示の1つ以上のプローブは、その5'末端に4、5、6、7、もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列TTTTT
AAATTTACCCAGAAATCAGAA（配列番号388）、TTTTTTAAATTC
CAGAAATCAGAAAGGTG（配列番号390）、TTTTTTAAATTTCTTA
CCCAGAAATCA（配列番号392）、TTTTTTAAATTCCTTTCTTACC
CAGAAATC（配列番号394）、またはTTTTTTAAATTCAGAAATCAGAA
AGGTGG（配列番号396）を含むプローブは、K57N変異MEK1タンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。5'アデニン及び／またはチミンを除くこれらの配列を含むプローブも企図される。

【0141】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるHER2遺伝子におけるDNA変異に特異的な1つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば、配列ATACGTGATGCTTTAC（配列番号404）、ACGTGATGGCTTACGT（配列番号406）、AAGCATACGTGATGGCT（配列番号408）、GCATACGTGATGGCTT（配列番号410）、またはGCATACGTGATGGCTTA（配列番号412）を含むプローブは、A775_G776insYVMA変異HER2タンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態では、本開示の1つ以上のプローブは、その5'末端に4、5、6、7、もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTATACGTGATGCTTTAC（配列番号405）、TTTTTTT
TTTACGTGATGGCTTACGT（配列番号407）、TTTTTAAGCATACGTGATGGCT（配列番号409）、TTTTTTTGC
ATACGTGATGGCTT（配列番号411）、またはTTTTTTTGCA
TACGTGATGGCTTA（配列番号413）を含むプローブは、A775_G776insYVMA変異HER2タンパク質をコードする変異を検出するために使用され得る。5'アデニン及び／またはチミンを除くこれらの配列を含むプローブも企図される。

【0142】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される A L K 遺伝子における R N A 変異（例えば、E M L 4 - A L K 融合遺伝子をもたらす）に特異的な 1 つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば、配列 A A A G G A C C T A A A G T G T（配列番号 1 6 1）、C C T A A A G T G T A C C G C（配列番号 1 6 3）、G G G A A A G G A C C T A A A G（配列番号 1 6 5）、A G T G T A C C G C C G G A A（配列番号 1 6 7）、または T A C C G C C G G A A G C A C C（配列番号 1 6 9）を含むプローブは、E 1 3；A 2 0 A L K 変異を検出するために使用され得る；配列 G A C T A T G A A A T A T T G T A C（配列番号 1 7 1）、G A A A T A T T G T A C T T G T A C（配列番号 1 7 3）、T A T T G T A C T T G T A C C G C C（配列番号 1 7 5）、T G T A C C G C C G G A A G C A C（配列番号 1 7 7）、または C C G C C G G A A G C A C C A G G A（配列番号 1 7 9）を含むプローブは、E 2 0；A 2 0 A L K 変異を検出するために使用され得る；配列 T G T C A T C A T C A A C C A A（配列番号 1 8 1）、A T G T C A T C A T C A A C C（配列番号 1 8 3）、G T G T A C C G C C G G A A G C（配列番号 1 8 5）、T C A A C C A A G T G T A C C G（配列番号 1 8 7）、T A C C G C C G G A A G C A C C A（配列番号 1 8 9）、C G A A A A A A A C A G C C A A（配列番号 1 9 1）、T C G C G A A A A A A A C A G C（配列番号 1 9 3）、G T G T A C C G C C G G A A G C（配列番号 1 9 5）、T A C C G C C G G A A G C A C C（配列番号 1 9 7）、または A C A G C C A A G T G T A C C G（配列番号 1 9 9）を含むプローブは、E 6；A 2 0 A L K 変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態では、本開示の 1 つ以上のプローブは、その 5' 末端に 4、5、6、7、もしくは 8 またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列 T T T T T T T T T T T T A A A G G A C C T A A A G T G T（配列番号 1 6 2）、T T T T T T T T T T C C T A A A G T G T A C C G C（配列番号 1 6 4）、T T T T T T T T T T T T G G G A A A G G A C C T A A A G（配列番号 1 6 6）、T T T T T T T T T T T T A G T G T A C C G C C G G A A（配列番号 1 6 8）、または T T T T T T T T T T T T A C C G C C G G A A G C A C C（配列番号 1 7 0）を含むプローブは、E 1 3；A 2 0 A L K 変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列 T T T T T T T T T T T T T G A C T A T G A A A T A T T G T A C（配列番号 1 7 2）、T T T T T T T T T T T T T T G A A A T A T T G T A C T T G T A C（配列番号 1 7 4）、T T T T T T T T T T T T T T T T A T T G T A C T T G T A C C G C C（配列番号 1 7 6）、T T T T T T T T T T T T T T T T G T A C C G C C G G A A G C A C（配列番号 1 7 8）、または T T T T T T T T T T T T T T T T C C G C C G G A A G C A C C A G G A（配列番号 1 8 0）を含むプローブは、E 2 0；A 2 0 A L K 変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列 T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T G T C A T C A T C A A C C A A（配列番号 1 8 2）、T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T A T G T C A T C A T C A A C C（配列番号 1 8 4）、T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T G T G T A C C G C C G G A A G C（配列番号 1 8 6）、T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T C A A C C A A G T G T A C C G（配列番号 1 8 8）、T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T A C C G C C G G A A G C A C C A（配列番号 1 9 0）、T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T C G A A A A A A A C A G C C A A（配列番号 1 9 2）、T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T C G C G A A A A A A A C A G C（配列番号 1 9 4）、T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T G T G T A C C G C C G G A A G C（配列番号 1 9 6）、T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T A C C G C C G G A A G C A C C（配列番号 1 9 8）、または T T T T T T T T T T T T T T T T T T T T A C A G C C A A G T G T A C C G（配列番号 2 0 0）を含むプローブは、E 6；A 2 0 A L K 変異を検出するために使用され得る。

【0143】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される R O S 遺伝子における R N A 変異（例えば、C D 7 4 - R O S または S L C 3 4 A 2 - R O S 融合遺伝子をもたらす）に特異的な 1 つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば、配列 A C T G A C G C T C C A C C G A A A（配列番号 2 0 1）、C C A C T G A C G C T C C A C C G A（配列番号 2 0 3）、G C T G G A G T C C C A A A T A A A C（配列番号 2 0 5）、G G A G T C C

10

20

30

40

50

C A A A T A A A C C A G (配列番号 207)、C A C C G A A A G C T G G A G T C C C (配列番号 209)、C C G A A A G A T G A T T T T (配列番号 211)、G A C G C T C C A C C G A A A (配列番号 213)、A C T G A C G C T C C A C C G A (配列番号 215)、G A T G A T T T T T G G A T A (配列番号 217)、または T G A T T T T T G G A T A C C A (配列番号 219)を含むプローブは、C D 7 4 - R O S 変異を検出するために使用され得る；及び／または配列 A G C G C C T T C C A G C T G G T T G G A (配列番号 221)、C T G G T T G G A G C T G G A G T C C C (配列番号 223)、A G T A G C G C C T T C C A G C T G G T T G (配列番号 225)、G C T G G A G T C C C A A A T A A A C C A (配列番号 227)、G G A G T C C C A A A T A A A C C A G G (配列番号 229)、G C G C C T T C C A G C T G G T T G (配列番号 231)、G T A G C G C C T T C C A G C T G G T (配列番号 233)、T G G T T G G A G A T G A T T T T T T (配列番号 235)、G A T G A T T T T T T G G A T A C C A G (配列番号 237)、または T G A T T T T T T G G A T A C C A (配列番号 239)を含むプローブは、S L C 3 4 A 2 - R O S 変異をコードする変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態では、本開示の1つ以上のプローブは、その5'末端に4、5、6、7、もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列 T T T T T T T T T T T A C T G A C G C T C C A C C G A A A (配列番号 202)、T T T T T T T T T T T C C A C T G A C G C T C C A C C G A (配列番号 204)、T T T T T T T T T T T G C T G G A G T C C C A A A T A A A C (配列番号 206)、T T T T T T T T T T T G G A G T C C C A A A T A A A C C A G (配列番号 208)、T T T T T T T T T T T C A C C G A A A G C T G G A G T C C C (配列番号 210)、T T T T T T T T T T T T C C G A A A G A T G A T T T T (配列番号 212)、T T T T T T T T T T T T G A C G C T C C A C C G A A A (配列番号 214)、T T T T T T T T T T T T A C T G A C G C T C C A C C G A (配列番号 216)、T T T T T T T T T T T T G A T G A T T T T T G G A T A (配列番号 218)、または T T T T T T T T T T T T T G A T T T T T G G A T A C C A (配列番号 220)を含むプローブは、C D 7 4 - R O S 変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列 T T T T T T T T T T T A G C G C C T T C C A G C T G G T T G G A (配列番号 222)、T T T T T T T T T T T T C T G G T T G G A G C T G G A G T C C C (配列番号 224)、T T T T T T T T T T T T A G T A G C G C C T T C C A G C T G G T T G (配列番号 226)、T T T T T T T T T T T T G C T G G A G T C C C A A A T A A A C C A (配列番号 228)、T T T T T T T T T T T T T T G G A G T C C C A A A T A A A C C A G G (配列番号 230)、T T T T T T T T T T T T T T G C G C C T T C C A G C T G G T T G (配列番号 232)、T T T T T T T T T T T T G T A G C G C C T T C C A G C T G G T (配列番号 234)、T T T T T T T T T T T T G G T T G G A G A T G A T T T T T (配列番号 236)、T T T T T T T T T T T T G A T G A T T T T T T G G A T A C C A G (配列番号 238)、または T T T T T T T T T T T T G A T T T T T T G G A T A C C A (配列番号 240)を含むプローブは、S L C 3 4 A 2 - R O S 変異を検出するために使用され得る。5'アデニン及び／またはチミンを除くこれらの配列を含むプローブも企図される。

【0144】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される R E T 遺伝子における R N A 変異（例えば、K I F 5 B - R E T 融合遺伝子をもたらす）に特異的な1つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば、配列 G T G G G A A A T A A T G A T G T A A A (配列番号 241)、C T G T G G G A A A T A A T G A T G T A (配列番号 243)、G A T C C A C T G T G C G A C G A G C T (配列番号 245)、T G A T G T A A A G A T C C A C T G T G (配列番号 247)、または T C C A C T G T G C G A C G A G C T G T (配列番号 249)を含むプローブは、K 1 5 ; R 1 1 K I F 5 B - R E T 変異を検出するために使用され得る；配列 T G G G A A A T A A T G A T G T A A A (配列番号 251)、C T G T G G G A A A T A A T G A T G T A (配列番号 253)、G G A G G A T C C

10

20

30

40

50

AAAGTGGGAAT（配列番号255）、GGATCCAAAGTGGGAATT（配列番号257）、またはATGATGTAAAGGAGGATCC（配列番号259）を含むプローブは、K15；R12 KIF5B-RET変異を検出するために使用され得る；配列CTTCGTATCTCTCAAGAGGAT（配列番号481）、GTATCTCTCAAGAGGATCCAA（配列番号483）、TTCGTATCTCTCAAGAG（配列番号485）、TCAAGAGGATCCAAA（配列番号487）、またはTCTCTCAAGAGG（配列番号489）を含むプローブは、K16；R12 KIF5B-RET変異を検出するために使用され得る；配列GTTAAAAAGGAGGATCCAA（配列番号491）、ACAAGAGTTAAAAAGGAGGA（配列番号493）、AAGAGTTAAAAAGGAGGATC（配列番号495）、AAAAGGAGGATCCAAAG（配列番号497）、またはAAGGAGGATCCAAAGTG（配列番号499）を含むプローブは、K22；R12 KIF5B-RET変異を検出するために使用され得る；及び／または配列AAACAGGAGGATCCAAA（配列番号501）、AGTGCACAAACAGGAGG（配列番号503）、GTGCACAAACAGGAGGATC（配列番号505）、CACAAACAGGAGGAT（配列番号507）、またはAACAGGAGGATCCAAA（配列番号509）を含むプローブは、K23；R12 KIF5B-RET変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態では、本開示の1つ以上のプローブは、その5'末端に4、5、6、7、もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAAA（配列番号242）、TTTTTTTTTTTCTGTGGGAAATAATGATGTAA（配列番号244）、TTTTTTTTTTTGTATCCACTGTGCGACGAGCT（配列番号246）、TTTTTTTTTTTGTATGTAAAGATCCACTGTG（配列番号248）、またはTTTTTTTTTTTTCCTCACTGTGCGACGAGCTGT（配列番号250）を含むプローブは、K15；R11 KIF5B-RET変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTGTGGGAAATAATGATGTAAA（配列番号252）、TTTTTTTTTTTCTGTGTGGGAAATAATGATGTAA（配列番号254）、TTTTTTTTTTTGTGAGGATCCAAAGTGGGAAT（配列番号256）、TTTTTTTTTTTGTGATCCAAAGTGGGAATT（配列番号258）、またはTTTTTTTTTTTATGATGTAAAGGAGGATCC（配列番号260）を含むプローブは、K15；R12 KIF5B-RET変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTCTTCGTATCTCTCAAGAGGAT（配列番号482）、TTTTTTTTTTTGTATCTCTCTCAAGAGGATCCAA（配列番号484）、TTTTTTTTTTTTCGTATCTCTCTCAAGAG（配列番号486）、TTTTTTTTTTTTCAGAGGATCCAAA（配列番号488）、またはTTTTTTTTTTTCTCTCTCAAGAGG（配列番号490）を含むプローブは、K16；R12 KIF5B-RET変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTGTTTAAAAAGGAGGATCCAA（配列番号492）、TTTTTTTTTTTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA（配列番号494）、TTATTATTATAAGAGTTAAAAAGGAGGATC（配列番号811）、TTTTTTTTTTTAAAAAGGAGGATCCAAAG（配列番号498）、またはTTTTTTTTTTTAAAGGAGGATCCAAAGTG（配列番号500）を含むプローブは、K22；R12 KIF5B-RET変異を検出するために使用され得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTAAACAGGAGGATCCAAA（配列番号502）、TTTTTTATTATAAGTGCACAAACAGGAGG（配列番号504）、TATTATTATTATGTGCACAAACAGGAGGATC（配列番号506）、TATTTTTTTTCACAAACAGGAGGAT（配列番号508）、またはTTTTATTTTAAACAGGAGGATCCAAA（配列番号510）を含むプローブは、K23；R12 KIF5B-RET変異を検出するために使用され得る。5'アデニン及び

10

20

30

40

50

／またはチミンを除くこれらの配列を含むプローブも企図される。

【0145】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるNTRK1遺伝子におけるRNA変異（例えば、CD74-NTRK1融合遺伝子をもたらす）に特異的な1つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば、配列CAGGATCTGGGCCCCAGACA（配列番号261）、GATCTGGGCCCCAGACACTA（配列番号263）、CCAGACACTAACAGCACAT（配列番号265）、GGGCCCCAGACACTAACAGC（配列番号267）、またはCTAACAGCACATCTGGAGGA（配列番号269）を含むプローブは、CD74-NTRK1変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態では、本開示の1つ以上のプローブは、その5'末端に4、5、6、7、もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTACAGGATCTGGGCCCCAGACA（配列番号262）、TTTTTTTTTTTATAGATCTGGGCCCCAGACACTA（配列番号264）、TTTTTTTTTTTATCCAGACACTAACAGCACAT（配列番号266）、TTTTTTTTTTTATAGGGCCCCAGACACTAACAGC（配列番号268）、またはTTTTTTTTTTTACTTAACAGCACATCTGGAGGA（配列番号270）を含むプローブは、CD74-NTRK1変異を検出するために使用され得る。

10

【0146】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるcMET遺伝子におけるRNA変異（例えば、エクソン14のスキッピングをもたらす）に特異的な1つ以上のプローブ（複数可）が使用される。例えば、配列AGAAAGCAAATTAAAGAT（配列番号271）、AGCAAATTAAAGATCAG（配列番号273）、AAATTAAAGATCAGTTTTC（配列番号275）、AGATCAGTTTTCCTAATTTC（配列番号277）、またはAAGATCAGTTTTCCTAATT（配列番号279）を含むプローブは、cMETエクソン14スキッピング変異を検出するために使用され得る。上述したように、いくつかの実施形態では、本開示の1つ以上のプローブは、その5'末端に4、5、6、7、もしくは8またはそれ以上のヌクレオチド（例えば、アデニンまたはチミン）を含み得る。所定の実施形態では、配列TTTTTTTTTTTATAGAAAGCAAATTAAAGAT（配列番号272）、TTTTTTTTTTTATAGCAAATTAAAGATCAG（配列番号274）、TTTTTTTTTTTAAATTAAAGATCAGTTTTC（配列番号276）、TTTTTTTTTTTATAGATCAGTTTTCCTAATTTC（配列番号278）、またはTTTTTTTTTTTAAAGATCAGTTTTCCTAATT（配列番号280）を含むプローブは、cMETエクソン14スキッピング変異を検出するために使用され得る。5'アデニン及び／またはチミンを除くこれらの配列を含むプローブも企図される。

20

30

【0147】

上述したプライマー、ブロック核酸、及びプローブは、本開示の方法及びキットにおいて任意の数または組み合わせで組み合わせられ得ることを理解されたい。例示的な及び非限定的なキットは、以下により詳細に記載されている。

40

【0148】

検出

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、増幅されたDNAと本開示のプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することを含む。増幅されたDNAとプローブの1つとのハイブリダイゼーションは、増幅されたDNAにおけるプローブに対応するDNAまたはRNA変異の存在を示す。例示的なハイブリダイゼーション条件及び検出技術は、本明細書に記載されており、例示されている。いくつかの実施形態では、ハイブリダイゼーションは、5XSSPE緩衝液を使用して実施される。

【0149】

いくつかの実施形態では、増幅されたDNAまたはcDNAは、検出試薬で標識され、

50

ハイブリダイゼーションは、例えば、非特異的結合を低減または排除するための洗浄工程の後、マイクロキャリアに関連する検出試薬のシグナルによって測定される。いくつかの実施形態では、本開示のプライマー対は、検出試薬に結合した一方または両方のプライマーを含む。よって、増幅されたDNAは、標識プライマー（複数可）を使用してPCR増幅後に検出試薬で標識される。いくつかの実施形態では、検出試薬は、フィコエリトリン（PE）、青色蛍光タンパク質、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質、シアン蛍光タンパク質、及びそれらの誘導体を含むがこれらに限定されない蛍光ベースであり得る。他の実施形態では、検出試薬は、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{22}Na 、 ^{36}Cl 、 ^2H 、 ^3H 、 ^{35}S 、及び ^{123}I で標識された分子を含むがこれらに限定されない放射性同位体ベースであり得る。他の実施形態では、検出試薬は、ルシフェラーゼ（例えば、化学発光ベース）、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ及びそれらの誘導体を含むがこれらに限定されない光ベースであり得る。いくつかの実施形態では、増幅されたDNAは、マイクロキャリア組成物との接触の前に検出試薬で標識され得る。いくつかの実施形態では、検出試薬は、例えば、フェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）のように、プローブに近接した場合にシグナルを放出する。多様な核酸標識技術が当該技術分野で知られている；例えば、Gibriel, A. A. Y. (2012) Briefings in Functional Genomics 11:311-8を参照されたい。

10

【0150】

いくつかの実施形態では、検出試薬は、蛍光検出試薬であり得る。いくつかの実施形態では、増幅されたDNAとプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することは、蛍光顕微鏡検査（例えば、蛍光顕微鏡またはプレートリーダー）によって実施される。いくつかの実施形態では、検出試薬は、比色分析ベースであり得る。いくつかの実施形態では、検出試薬は、発光ベースであり得る。いくつかの実施形態では、増幅されたDNAとプローブとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することは、発光顕微鏡検査（例えば、発光顕微鏡またはプレートリーダー）によって実施される。

20

【0151】

いくつかの実施形態では、検出試薬は、シグナル放出体にコンジュゲートされた二次試薬（例えば、上述したもの）の添加によって検出され得るタグまたは他の部位を含む。例えば、いくつかの実施形態では、検出試薬は、ビオチンを含む（例えば、リバーズまたはアンチセンスプライマーなどのプライマーは、5'末端でビオチンで標識され得る）。よって、いくつかの実施形態では、ハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することは、ハイブリダイゼーション及び任意の洗浄の後に、マイクロキャリア（複数可）を、シグナル放出体にコンジュゲートされた二次試薬と接触させること、及びマイクロキャリア（複数可）と関連するシグナル放出体からのシグナルを検出すること（例えば、任意の洗浄の後に）を含み得る。例えば、検出試薬がビオチンを含む場合、マイクロキャリアは、フィコエリトリン（PE）などのシグナル放出体にコンジュゲートされたストレプトアビジンと接触され得、シグナル放出体からのシグナルが検出され得る。

30

【0152】

特定の検出試薬に応じて、多様な技術が使用されて、プローブに対する増幅されたDNAのハイブリダイゼーションが検出され得る。例えば、検出試薬が蛍光検出試薬を含む場合、増幅されたDNAのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することは、蛍光検出試薬の蛍光画像化を含み得る。

40

【0153】

いくつかの実施形態では、検出することは、例えば、混入物質を低減するため、プローブ、DNA、及び／またはマイクロキャリア表面などに非特異的に結合した任意の物質を除去するために、1つ以上の洗浄工程を含み得る。いくつかの実施形態では、磁性分離工程は、本開示の磁性層または物質を含有するマイクロキャリアを洗浄するために使用され得る。他の実施形態では、当該技術分野で知られている他の分離工程が使用され得る。

【0154】

50

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、増幅されたDNAと、アッセイ当たりプローブ当たり合計で約1～約1000のマイクロキャリアとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することを含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、増幅されたDNAと、アッセイプレートのウェル当たりプローブ当たり合計で約1～約1000のマイクロキャリアとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することを含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、増幅されたDNAと、アッセイ当たりプローブ当たり少なくとも約50のマイクロキャリアとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することを含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、増幅されたDNAと、アッセイプレートのウェル当たりプローブ当たり少なくとも約50のマイクロキャリアとのハイブリダイゼーションの存在または非存在を検出することを含む。いくつかの実施形態では、本開示のマイクロキャリアは、1 μ Mの濃度でそれに結合したプローブを含む。

10

【0155】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、コードされたマイクロキャリアの識別子を検出することを含む。例えば、いくつかの実施形態では、コードされたマイクロキャリアの識別子の画像が得られ、デコードされて、マイクロキャリア及びその対応するプローブが同定され得る。いくつかの実施形態では、識別子検出工程（複数可）は、ハイブリダイゼーション検出工程（複数可）の後に行われ得る。他の実施形態では、識別子検出工程（複数可）は、ハイブリダイゼーション検出工程（複数可）の前に行われ得る。さらに他の実施形態では、識別子検出工程（複数可）は、ハイブリダイゼーション検出工程（複数可）と同時に実行され得る。いくつかの実施形態では、ハイブリダイゼーション検出工程（複数可）及び識別子検出工程（複数可）の後、本開示の方法は、マイクロキャリアの検出された識別子を、マイクロキャリアの対応するプローブに対する増幅されたDNAのハイブリダイゼーションの検出された存在または非存在と関連させることをさらに含む。

20

【0156】

多様なマイクロキャリアコード化スキームが本明細書に記載されている。いくつかの実施形態では、コードされたマイクロキャリアの識別子を検出することは、マイクロキャリアのデジタルバーコードを画像化することを含む。一実施形態では、コードされたマイクロキャリアは、相対的幅バーコード画像（例えば、一連の狭いスリットは「0」コードを表し、広いスリットは「1」コードを表し、または逆も同様である）を伴う一連の交互の光透過性領域及び不透明領域を有する本体を含む。マイクロキャリアが光線で照らされる場合、スリットからの透過ピークの「総強度」または透過ピークの「帯域幅」のいずれかに基づいて、ラインスキャンカメラ、フレームグラバー、及びデジタルシグナルプロセッサによってデジタルバーコード（0または1のいずれか）が決定され得る。一実施形態では、一連の狭いバンド及び広いバンドを有するバーコードパターンは、0及び1のための明瞭なシグナル及び識別を提供する。パレット上のスリットの位置は、ビットのどれが最下位ビット（LSB）及び最上位ビット（MSB）であるかを決定する。LSBは、パレットの端部のより近くに配置されて、他のより長い端部でMSBから区別される。

30

【0157】

いくつかの実施形態では、コードされたマイクロキャリアの識別子を検出することは、例えば、本開示のアナログコードなどの識別子の明視野画像化によって、マイクロキャリアの識別子を画像化することを含む。

40

【0158】

多様なデコード技術が企図される。いくつかの実施形態では、識別子は、識別子（例えば、アナログコードされた識別子）を同定するためにアナログ形状認識を使用して検出される。概念上は、このデコードは、例えば、（例えば、溶液またはサンプル中の）各マイクロキャリアのアナログコードを画像化すること、各画像をアナログコードのライブラリに対して比較すること、及び各画像をライブラリからの画像と一致させ、これによりコードを確実に同定することを含み得る。任意に、本明細書に記載されるように、配向指標（例えば、非対称）を含むマイクロキャリアを使用する場合、デコードは、（部分的に、例

50

例えば、配向指標に基づいて）各画像を回転させて特定の配向で整列させる工程をさらに含み得る。例えば、配向指標がギャップを含む場合、画像は、ギャップが既定の位置または配向（例えば、画像の0°位置）に達するまで回転され得る。

【0159】

様々な形状認識ソフトウェア、ツール、及び方法が当該技術分野で知られている。そのようなAPI及びツールの例には、限定されないが、Microsoft（登録商標）Research Face SDK、OpenBR、Face及びScene Recognition（ReKognition製）、Betaface API、及び様々なImageJプラグインが含まれる。いくつかの実施形態では、アナログ形状認識は、限定されないが、画像処理工程、例えば、前景抽出、形状検出、閾値化（例えば、自動または手動画像閾値化）などを含み得る。

10

【0160】

本明細書に記載の方法及びマイクロキャリアは、限定されないが、顕微鏡、プレートリーダーなどを含む様々な画像化デバイスのために適応され得ることが当業者によって理解される。いくつかの実施形態では、識別子（例えば、アナログコード）をデコードすることは、実質的に透明な部分（例えば、マイクロキャリアの実質的に透明なポリマー層（複数可）及び／または周囲の溶液）に光を通過させることによってマイクロキャリアを照らすことを含み得る。次いで光は、マイクロキャリアの実質的に非透明な部分（例えば、実質的に非透明な層（複数可））を通過することができず、またはより低い強度もしくは他の感知できる差で通過して、識別子に対応するアナログコードされた光パターンを生成し得る。すなわち、画像化した光のパターンは、マイクロキャリアの実質的に透明な／実質的に非透明な領域のパターンに対応し、よって、アナログコード識別子の画像を生成し得る。この画像化は、限定されないが、画像を捕捉すること、画像を閾値化すること、及び識別子のより正確な、詳細な、または安定した画像化を達成するために望まれる任意の他の画像処理工程を含む工程を含み得る。

20

【0161】

限定されないが、明視野、暗視野、位相コントラスト、微分干渉コントラスト（DIC）、ノマルスキー干渉コントラスト（NIC）、ノマルスキー、ホフマン変調コントラスト（HMC）、または蛍光顕微鏡検査のうちの1つ以上を含む、任意のタイプの光学顕微鏡検査が本開示の方法のために使用され得る。所定の実施形態では、識別子は、明視野顕微鏡検査を使用してデコードされ得、ハイブリダイゼーションは、蛍光顕微鏡検査を使用して検出され得る。

30

【0162】

いくつかの実施形態では、識別子をデコードすることは、アナログ形状認識を使用して、アナログコードされた画像をアナログコードと一致させることをさらに含み得る。いくつかの実施形態では、画像は、例えば、画像と見本アナログコード画像との間の既定の量の逸脱または非一致を許容する既定の閾値内のアナログコード（例えば、独自の二次元形状／アナログコードに対応する各画像ファイルを有する画像ファイルのライブラリからの画像ファイル）と一致させられ得る。そのような閾値は、経験的に決定され得、アナログコードに使用された特定のタイプの二次元形状及び潜在的二次元形状のセットの中のバリエーションの程度に当然に基づき得る。

40

【0163】

本開示の方法において使用するのに好適なマイクロキャリアの例示的で非限定的な説明、及びその任意の態様は、以下に提供される。

【0164】

IV. コードされたマイクロキャリア

本明細書では、分析物検出、例えば、多重分析物検出に好適なコードされたマイクロキャリアが提供される。コードされたマイクロキャリアのための複数の構成が本明細書において企図され、記載され、例示される。本明細書で使用される場合、「コードされた」マイクロキャリアは、マイクロキャリアに結合したプローブの同一性に対応する識別子を有

50

するマイクロキャリアを指し得る。これにより、マイクロキャリアを使用したアッセイのデータをプローブの同一性に関連付けることができ、任意の個々のマイクロキャリアの結果がそのプローブの同一性と相関させられ得るので、単一の多重アッセイにおいて複数のマイクロキャリアの使用が可能となる。デジタルバーコード及びアナログコードを含む、識別子の例示的なタイプは以下に記載され得る。国際公開番号WO2016198954に記載されているマイクロキャリア（またはその構成もしくは特徴）のいずれかは、本明細書に記載の方法及びキットに利用される。

【0165】

いくつかの態様では、本開示の方法及びキットは、デジタルバーコード識別子を使用する。例えば、いくつかの実施形態では、コードされたマイクロキャリアは、第1のフォトリソ層；第2のフォトリソ層；及び第1の層と第2の層との間の中間層を含む。いくつかの実施形態では、中間層は、それに定義された識別子を表すコードされたパターンを有し、中間層は、光に対して部分的に実質的に透過性であり、かつ部分的に実質的に不透明であることで、マイクロキャリアに対応するコードを表し、マイクロキャリアの最外表面は、フォトレジストフォトリソ層を含み、前記フォトレジストフォトリソ層は、DNA変異に特異的なプローブで官能化されており、前記マイクロキャリアは、水とおおよそ同じ密度を有する。例示的なマイクロキャリアの説明は、例えば、米国特許番号7,858,307；7,871,770；8,148,139；8,232,092；及び9,255,922；ならびに米国PG公開番号US2009/201504、2011/0007955、及び2012/0088691で見ることができる。

【0166】

一実施形態では、本開示のデジタルコードされたマイクロキャリアは、1Dまたは2Dバーコード画像を模倣する相対的位置、幅及び／または間隙を有する、一連の交互の光透過性及び不透明の領域（例えば、バイナリコードを形成するための「0」コードを表す一連の狭いスリット（例えば、幅が約1～5ミクロン）及び「1」コードを表す広いスリット（例えば、幅が約1～10ミクロン）（またはその逆も可能））を有する本体を含む。一実施形態では、マイクロキャリアのサイズは、 $150 \times 50 \times 10 \mu\text{m}$ となるように、または比例的より小さくなるように、また、約 $2.5 \mu\text{m}$ のスリット幅となるようにサイズ調整され、構成される。そのようなマイクロキャリア上の各デジタルバーコードは、最大で14スリット（またはビット）からなり、16,384種の独自のコードが可能となり得る。一実施形態では、コードされたマイクロキャリアの本体は、相対的形状及び／またはサイズが異なる少なくとも2つの直交断面を有するように構成され得る。さらに、断面の形状は、対称もしくは非対称、及び／または規則的もしくは不規則的形状であり得る。一実施形態では、コードされたマイクロキャリアの最長直交軸は、1mm未満である。一実施形態では、コードされたマイクロキャリアは、デコードのための画像認識のためのコントラスト及び光学的効率を改善するために、反射薄膜を備える（例えば、コードされたマイクロキャリアを金属薄膜でめっきもしくはコーティングし、または金属薄膜の中間層を提供する）。1つの代替実施形態は、上記プロセスを適切に改変することによって、2つのポリマー層間にサンドイッチされた層としての金属層を含み得る。この実施形態において、表面状態は、同様の表面コーティング及び固定化条件を提供するために、マイクロキャリアの両方の曝露された平坦な表面について同じにされ得る。別の実施形態は、ポリマーまたは機能性分子、例えば、本開示のプローブでマイクロキャリアをコーティングすることである；そのため、マイクロキャリア全体が、分子固定化のために同じ条件を有する。

【0167】

いくつかの態様では、本開示の方法及びキットは、アナログコード識別子を使用する。例えば、いくつかの実施形態では、本開示の方法及びキットは、第1の表面及び第2の表面を有する実質的に透明なポリマー層であって、第1の及び第2の表面は、互いに平行である、実質的に透明なポリマー層；実質的に非透明な層であって、実質的に非透明なポリマー層が、実質的に透明なポリマー層の第1の表面に付着されており、実質的に透明なポ

リマー層の中央部分を包囲しており、実質的に非透明なポリマー層は、アナログコードを表す二次元形状を含む、実質的に非透明な層；及びDNAまたはRNA変異に特異的な本開示のプローブであって、プローブは、実質的に透明なポリマー層の少なくとも中央部分において実質的に透明なポリマー層の第1の表面及び第2の表面の少なくとも一方に結合されている、プローブを含む、コードされたマイクロキャリアを使用する。アナログコードは、識別子を表す。よって、マイクロキャリアは、少なくとも2つの層を含有し、その1つは、実質的に透明であり、他方は、アナログコード識別子を表す実質的に非透明な二次元形状である。

【0168】

有利には、これらのマイクロキャリアは、例えば、全体的寸法、物理的特性、及び／または溶液中の挙動を含む態様の均一性のための均一な全体的形態（例えば、実質的に透明なポリマー層の外周）を依然として保持しながら多様な二次元形状を採用し得る。これは、例えば、異なる種のマイクロキャリア間のより高い均一性を可能とする際に有利である（すなわち、各々は、透明ポリマー層によって提供される同じ外周形状を有する）。このタイプのマイクロキャリア及びその態様の例が図1A～2Cに示されている。

【0169】

図1A及び1Bは、例示的なマイクロキャリア100の2つの図を示している。マイクロキャリア100は、およそ直径が50 μ m及び厚さが10 μ mの円形ディスクである。図1Aは、ディスクの円形面を見たマイクロキャリア100の図を提供する一方で、図1Bは、図1Aに示される表面に直交するマイクロキャリア100の側面図を示している。マイクロキャリア100の2つの構成要素が示されている。まず、実質的に透明なポリマー層102は、マイクロキャリアの本体を提供する。層102は、例えば、本明細書に記載されるように、SU-8などのポリマーを使用して生成され得る。

【0170】

実質的に非透明なポリマー層104は、層102の表面に付着されている。図1Bに示されるマイクロキャリア100の断面は、層104の非連続的な図を示しているが、図1Aに示される図は、層104が、複数の歯を有する環状歯車のような形状をしていることを示している。これらの歯車の歯の形状、数、サイズ、及び間隔は二次元形状を構成し、歯車の歯のこれらの態様の1つ以上は、アナログコード化のための複数の二次元形状を生成するために改変され得る。有利には、層104の歯車の歯の外側縁部は、層102の外周内に適合する。これにより、多様なアナログコードが可能となり、それぞれが、マイクロキャリアの複数の種にわたって均一な全体的形状を維持しながら、マイクロキャリアの1つの種のための独自の識別子を表す。つまり、複数の種の集団内の各マイクロキャリア種は、異なる二次元歯車形状（すなわち、アナログコード）を有し得るが、各マイクロキャリアは、同じ外周を有し、物理的特性（例えば、サイズ、形状、溶液中の挙動など）のより高い均一性をもたらす。層104は、例えば、色素と混合されたSU-8などのポリマーを使用して、または本明細書に記載される黒色マトリックスレジストを使用して生成され得る。これは、例示的な形状にすぎず；他の形状は、上述しており、例えば、図2A～2Cに示されている。

【0171】

層104は、層102の中央部分106を囲っている。プローブは、層102の一方または両方の表面（すなわち、上側／下側表面）上の少なくとも中央部分106に結合される。有利には、これにより、中央部分106は、層104に起因する干渉のいかなる潜在性も伴わずに、画像化することが可能となる。

【0172】

図1C及び1Dは、分析物検出のためのマイクロキャリア100を使用する例示的なアッセイを示している。図1Cは、マイクロキャリア100が、少なくとも中央部分106における1つ以上の表面に結合したプローブ108を含み得ることを示している。マイクロキャリア100は、増幅されたDNA110を含有する溶液と接触させられ、増幅されたDNA110は、マイクロキャリア100と接触する前に変性されており、プローブ1

10

20

30

40

50

08とハイブリダイズする。上述したように、増幅されたDNA110は、検出試薬に結合される。この例では、検出試薬は、ビオチン（例えば、ビオチン標識プライマーを使用するDNAの増幅に起因する）である。よって、増幅されたDNA110は、DNA110a（例えば、本明細書に記載の変異の遺伝子座を含む）及びビオチン110bを含む。図1Cは、増幅されたDNA110を捕捉する単一のマイクロキャリア種（すなわち、マイクロキャリア100）を示しているが、多重アッセイでは、複数のマイクロキャリア種が使用され、各々の種は、特定のDNA変異を認識する特定のプローブを有する。

【0173】

図1Dは、マイクロキャリア100を「読み込む」ための例示的なプロセスを示している。このプロセスは、同時にまたは別々に達成され得る2つの工程を含む。まず、プローブ108による増幅されたDNA110のハイブリダイゼーションが検出される。図1Dに示される例では、二次検出試薬114（例えば、PEにコンジュゲートされたストレプトアビジン）は、ビオチン：ストレプトアビジン相互作用を介して増幅されたDNA110に結合する。マイクロキャリア100に結合したプローブにハイブリダイズしない増幅されたDNAは、マイクロキャリア100に結合したDNAのみが検出されるように、検出前に洗浄除去されている場合がある。二次検出試薬114のPE部位は、PEの励起スペクトル内の波長の光116によって励起された場合、光118（例えば、光子）を放出する。光118は、任意の好適な検出手段、例えば、蛍光顕微鏡、プレートリーダーなどによって検出され得る。

【0174】

また、マイクロキャリア100は、その独自の識別子について読み込まれる。図1Dに示される例では、光112は、マイクロキャリア100を含有する領域を照らすために使用され得る（いくつかの実施形態では、光112は、光116及び118とは異なる波長を有し得る）。光112がマイクロキャリア100を含有する領域を照らすと、それは、図1Dに示されているように、実質的に透明なポリマー層102を通過するが、実質的に非透明なポリマー層104によってブロックされる。これは、例えば、光学顕微鏡検査によって（例えば、微分干渉コントラスト、またはDIC、顕微鏡検査を使用して）画像化され得る光パターンを生成する。この光パターンは、マイクロキャリア100の二次元形状（すなわち、アナログコード）に基づく。標準的な画像認識技術が使用されて、マイクロキャリア100の画像によって表されるアナログコードがデコードされ得る。

【0175】

以下でより詳細に記載されるように、分析物検出及び識別子画像化工程は、任意の順序で、または同時に行われ得る。有利には、図1Dに示される両方の検出工程は、1つの画像化デバイスで達成され得る。1つの例として、蛍光及び光（例えば、明視野）の両方の顕微鏡検査が可能な顕微鏡が使用されて、マイクロキャリア100に結合した増幅されたDNA110の量（例えば、検出試薬114によって検出される）が定量され、層102及び104によって生成されるアナログコードが撮像され得る。これにより、より少ない設備要求でより効率的なアッセイプロセスが可能となる。

【0176】

いくつかの実施形態では、マイクロキャリアは、実質的に透明なポリマー層の中央部分を包囲する実質的に透明なポリマー層の表面に付着された磁性の実質的に非透明な層をさらに含む。いくつかの実施形態では、磁性の実質的に非透明な層は、実質的に非透明なポリマー層と実質的に透明なポリマー層の中央部分との間にある。

【0177】

いくつかの実施形態では、マイクロキャリアは、第1の実質的に透明なポリマー層と整列し、それに付着された第2の実質的に透明なポリマー層をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1及び第2の実質的に透明なポリマー層はそれぞれ中央部分を有し、第1及び第2の実質的に透明なポリマー層の両方の中央部分は整列されている。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアは、第1及び第2の実質的に透明なポリマー層の両方の中央部分を包囲する磁性の実質的に非透明な層をさらに含む。いくつかの実施形態では、磁性

の実質的に非透明な層は、第 1 及び第 2 の実質的に透明なポリマー層の間に付着されている。いくつかの実施形態では、磁性の実質的に非透明な層は、実質的に非透明なポリマー層と、第 1 及び第 2 の実質的に透明なポリマー層の両方の中央部分との間にある。

【0178】

いくつかの実施形態では、マイクロキャリアは、実質的に非透明なポリマー層のアナログコードを配向させるための配向指標をさらに含む。画像化（例えば、本明細書に記載の顕微鏡的または他の画像化の形態）によって及び／または画像認識ソフトウェアによって視認可能及び／または検出可能なマイクロキャリアの任意の特徴は、配向指標として機能し得る。配向指標は、例えば、画像認識アルゴリズムのための参照点として機能して、アナログコードの画像を均一な配向（すなわち、実質的に非透明なポリマー層の形状）で配向させ得る。有利には、これは、アルゴリズムがすべての可能性のある配向のすべてのアナログコードを含むライブラリに対してではなく、同じ配向のアナログコードのライブラリに対して特定のアナログコードの画像を比較するだけでよい。ため、画像認識を単純化させ得る。いくつかの実施形態では、配向指標は、実質的に非透明なポリマー層の外形の非対称性を含む。例えば、配向指標は、マイクロキャリアの外形の可視的特徴、例えば、非対称を含み得る（例えば、図 2 C に示されるコードの環における非連続性によって示されるように）。

10

【0179】

本明細書に記載のマイクロキャリアのいずれかは、以下に記載の特徴、要素、または態様の 1 つ以上を含み得る。また、以下に記載の特徴、要素、または態様の 1 つ以上は、例えば、上述されている、マイクロキャリアの実施形態に応じて異なる特性を採用し得る。

20

【0180】

いくつかの実施形態では、本開示のポリマーは、エポキシベースのポリマーを含む。本明細書に記載の組成物の製造のための好適なエポキシベースのポリマーには、Hexion Specialty Chemicals, Inc. (Columbus, OH) によって提供される EPON (商標) ファミリーのエポキシ樹脂及び The Dow Chemical Company (Midland, MI) によって提供される様々なエポキシ樹脂が含まれるがこれらに限定されない。好適なポリマーの多くの例は、当該技術分野で一般的に知られており、限定されないが、SU-8、EPON 1002F、EPON 165 / 154、及びポリ(メチルメタクリレート) / ポリ(アクリル酸) ブロックコポリマー (PMMA-co-PAA) が含まれる。追加のポリマーについては、例えば、Warad, IC Packaging: Package Construction Analysis in Ultra Small IC Packaging, LAP LAMBERT Academic Publishing (2010); The Electronic Packaging Handbook, CRC Press (Blackwell, ed.), (2000); 及び Pecht et al., Electronic Packaging Materials and Their Properties, CCR Press, 1st ed., (1998) を参照されたい。これらのタイプの物質は、水性環境において膨潤しないという利点を有し、これは、均一なマイクロキャリアのサイズ及び形状が、マイクロキャリアの集団内で維持されることを確保する。いくつかの実施形態では、実質的に透明なポリマーは、フォトレジストポリマーである。いくつかの実施形態では、エポキシベースのポリマーは、エポキシベースのネガティブトーンの近紫外線フォトレジストである。いくつかの実施形態では、エポキシベースのポリマーは、SU-8 である。

30

40

【0181】

いくつかの実施形態では、実質的に非透明なポリマーは、1 つ以上の非透明または着色色素（複数可）と混合された本明細書に記載のポリマー（例えば、SU-8）である。他の実施形態では、実質的に非透明なポリマーは、黒色マトリックスレジストである。当該技術分野で知られている任意の黒色マトリックスレジストが使用され得る；例えば、例示的な黒色マトリックスレジスト及びそれに関連する方法については米国特許番号 8,61

50

0, 848を参照されたい。いくつかの実施形態では、黒色マトリックスレジストは、例えば、黒色マトリックスの一部としてLCDのカラーフィルター上でパターン化されている、黒色の顔料で着色されたフォトレジストであり得る。黒色マトリックスレジストには、限定されないが、Toppa Printing Co (Tokyo)、Tokyo OHKA Kogyo (Kawasaki)、及びDaxin Materials Corp. (Taichung City, Taiwan)によって販売されているものが含まれ得る。

【0182】

上述したように、本開示のマイクロキャリアは、本明細書に記載される多様な形状を採用し得る磁性層をさらに含む。いくつかの実施形態では、磁性層は、実質的に非透明な層であり得る。いくつかの実施形態では、磁性層は、磁性物質を含み得る。本開示の磁性層は、任意の好適な磁性物質、例えば、常磁性、強磁性、またはフェリ磁性特性を有する物質から作製され得る。磁性物質の例には、限定されないが、鉄、ニッケル、コバルト、及びいくつかの希土類金属（例えば、ガドリニウム、ジスプロシウム、ネオジムなど）、ならびにそれらの合金が含まれる。いくつかの実施形態では、磁性物質は、限定されないが、元素ニッケル及び磁性ニッケル合金、例えば、アルニコ及びパーマロイを含む、ニッケルを含む。本開示のマイクロキャリアにおける磁性層の包含は、例えば、磁性分離の容易化において有利であり得、これは、1つ以上のマイクロキャリアを洗浄、収集、及びそうでなければ操作するのに有用であり得る。

【0183】

いくつかの実施形態では、本開示のマイクロキャリアは、二次元形状を構成する実質的に非透明な層でコードされ得る。例えば、上述したように、二次元形状は、マイクロキャリアの実質的に透明な層と対照をなす実質的に非透明な層の形状を構成し得、またはそれは、マイクロキャリア自体の形状（例えば、外周）を構成し得る。すなわち、コードは、実質的に非透明な層自体の形状である（例えば、マイクロキャリアの層の表面上の蛍光または他の可視部位によって生成されるコードではない）。複数の分解可能な独特の多様性を包含し得る任意の二次元形状が使用され得る。いくつかの実施形態では、二次元形状は、線状、円形、楕円形、長方形、四角形、またはより多角形の態様、要素、及び／または形状のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、二次元形状は、本開示の磁性の実質的に非透明な層を使用して生成され得る。いくつかの実施形態では、アナログコードは、連続または非連続環を形成する（例えば、マイクロキャリアの中央部分を囲う）1つ以上の重複または部分的重複弧状要素を含む。

【0184】

図2Aは、アナログコード化スキームの3つの例示的な実施形態：マイクロキャリア200、202、及び204を示している。重要なことに、上述したように、より複雑なコード化スキームがアナログ画像認識を使用して利用可能であり、それにより、潜在的な独自のコードの数が大幅に増加する。いくつかの実施形態では、実質的に非透明なポリマー層の二次元形状は、実質的に透明なポリマー層の中央部分を包囲する1つ以上の環を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の環の少なくとも1つは、非連続性を含む。非連続性の様々な数及び構成を有する1つ以上の環（例えば、2つの環）を使用して形成された例示的かつ非限定的な二次元形状が図2Bに示されている。図2Bは、とりわけ、形状の数（例えば、コードZN__10における7つの区別される形状と比較したコードZN__3における2つの区別される形状）及び／または形状のサイズ（例えば、コードZN__2における大きな、小さな、及び中程度のサイズの形状）の観点から、10種の例示的なコードの実施形態を示している。

【0185】

いくつかの実施形態では、アナログコードは、連続または非連続環を形成する（例えば、マイクロキャリアの中央部分を囲う）1つ以上の重複または部分的重複弧状要素を含む。二次元形状は、マイクロキャリアを（例えば、光学顕微鏡検査によって）画像化することによってデコードされ、これにより、コードの画像は、実質的に透明な磁性ポリマー層

を通過する光、及び実質的に非透明な層を通過するのを遮断される光によって生成されるパターンによって形成される。非連続環を形成する重複弧状要素から構成される二次元形状の非限定的な例が図 2 C に示されている。

【0186】

いくつかの実施形態では、マイクロキャリアは、直径が約 200 μm 未満である。例えば、いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの直径は、約 200 μm 未満、約 180 μm 未満、約 160 μm 未満、約 140 μm 未満、約 120 μm 未満、約 100 μm 未満、約 80 μm 未満、約 60 μm 未満、約 40 μm 未満、または約 20 μm 未満である。

【0187】

いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの直径は、約 180 μm 、約 160 μm 、約 140 μm 、約 120 μm 、約 100 μm 、約 90 μm 、約 80 μm 、約 70 μm 、約 60 μm 、約 50 μm 、約 40 μm 、約 30 μm 、約 20 μm 、または約 10 μm である。所定の実施形態では、マイクロキャリアは、直径が約 60 μm である。

【0188】

いくつかの実施形態では、マイクロキャリアは、厚さが約 50 μm 未満である。例えば、いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの厚さは、約 70 μm 未満、約 60 μm 、約 50 μm 、約 40 μm 、約 30 μm 、約 25 μm 未満、約 20 μm 未満、約 15 μm 未満、約 10 μm 未満、または約 5 μm 未満である。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの厚さは、おおよそ以下の厚さ (μm) のいずれかよりも小さい：70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、または 2。いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの厚さは、おおよそ以下の厚さ (μm) のいずれかよりも大きい：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、または 65。すなわち、マイクロキャリアの厚さは、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、または 2 の上限及び 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、または 65 の独立して選択される下限を有する様々な厚さ (μm) のものであり得る（下限は上限未満である）。

【0189】

いくつかの実施形態では、マイクロキャリアの厚さは、約 50 μm 、約 45 μm 、約 40 μm 、約 35 μm 、約 30 μm 、約 25 μm 、約 20 μm 、約 19 μm 、約 18 μm 、約 17 μm 、約 16 μm 、約 15 μm 、約 14 μm 、約 13 μm 、約 12 μm 、約 11 μm 、約 10 μm 、約 9 μm 、約 8 μm 、約 7 μm 、約 6 μm 、約 5 μm 、約 4 μm 、約 3 μm 、約 2 μm 、または約 1 μm である。所定の実施形態では、マイクロキャリアは、厚さが約 10 μm である。

【0190】

本開示のプローブをコードされたマイクロキャリアに結合させるために多様な技術が使用され得る。いくつかの実施形態では、プローブは、マイクロキャリアの表面（いくつかの実施形態では、マイクロキャリア表面の少なくとも中央部分）に結合される。いくつかの実施形態では、プローブは、ポリマー層の第 1 のまたは第 2 の表面の一方または両方に結合され得る。いくつかの実施形態では、ポリマーは、エポキシベースのポリマーを含み、またはそうでなければエポキシド基を含有する。

【0191】

いくつかの実施形態では、プローブは、マイクロキャリアに化学的に付着され得る。他の実施形態では、プローブは、マイクロキャリアの表面に物理的に吸着され得る。いくつかの実施形態では、プローブとマイクロキャリア表面との間の付着連結は、共有結合であり得る。他の実施形態では、プローブとマイクロキャリア表面との間の付着連結は、塩橋もしくは他のイオン結合、1 つ以上の水素結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス力、ロンドン分散力、機械的結合、1 つ以上のハロゲン結合、金親和性 (aurophilicity)、インターカレーション、または積層を含むがこれらに限定されない非共有

結合であり得る。

【0192】

いくつかの実施形態では、プローブを結合させることは、ポリマーを光酸発生剤及び光と反応させて架橋ポリマーを生成することを含む。いくつかの実施形態では、光は、光酸発生剤を活性化する波長のもの、例えば、UVまたは近UV光である。光酸発生剤は、Sigma-Aldrich (St. Louis) 及び BASF (Ludwigshafen) から市販されている。限定されないが、トリフェニルまたはトリアリールスルホニウムヘキサフルオロアンチモネート；トリアリールスルホニウムヘキサフルオロホスフェート；トリフェニルスルホニウムパーフルオロ-1-ブタンスルホネート；トリフェニルスルホニウムトリフレート；トリス(4-tert-ブチルフェニル)スルホニウムパーフルオロ-1-ブタンスルホネートまたはトリフレート；ビス(4-tert-ブチルフェニル)ヨードニウムを含有する光酸発生剤、例えば、ビス(4-tert-ブチルフェニル)ヨードニウムパーフルオロ-1-ブタンスルホネート、p-トルエンスルホネート、及びトリフレート；Boc-メトキシフェニルジフェニルスルホニウムトリフレート；(tert-ブトキシカルボニルメトキシナフチル)-ジフェニルスルホニウムトリフレート；(4-tert-ブチルフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフレート；ジフェニルヨードニウムヘキサフルオロホスフェート、ナイトレート、パーフルオロ-1-ブタンスルホネート、トリフレート、またはp-トルエンスルホネート；(4-フルオロフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフレート；N-ヒドロキシナフタルイミドトリフレート；N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシミドパーフルオロ-1-ブタンスルホネート；(4-ヨードフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフレート；(4-メトキシフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフレート；2-(4-メトキシスチリル)-4,6-ビス(トリクロロメチル)-1,3,5-トリアジン；(4-メチルフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフレート；(4-メチルチオフェニル)メチルフェニルスルホニウムトリフレート；(4-フェノキシフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフレート；(4-フェニルチオフェニル)ジフェニルスルホニウムトリフレート；または product-finder.basf.com/group/corporate/product-finder/de/literature-document:/Brand+Irgacure-Brochure-Photoacid+Generator+Selection+Guide-English.pdf に記載されている光酸発生剤のいずれかを含む、当該技術分野で知られている任意の好適な光酸発生剤が使用され得る。いくつかの実施形態では、光酸発生剤は、スルホニウムを含有する光酸発生剤である。

10

20

30

40

【0193】

いくつかの実施形態では、プローブを結合させることは、架橋ポリマーのエポキシドを官能基、例えば、アミン、カルボキシル、チオールなどと反応させることを含む。代替的には、表面上のエポキシ基は、ヒドロキシル基に酸化され得、これはその後、ポリ(アクリル酸)などの水溶性ポリマーのグラフト重合のための開始部位として使用される。ポリ(アクリル酸)におけるカルボキシル基は次いで、捕捉剤におけるアミノまたはヒドロキシル基と共有結合を形成するために使用される。例えば、所定の実施形態では、ポリ(アクリル酸)におけるカルボキシル基は、プローブにおけるアミノ基と共有結合を形成するために使用される。

【0194】

いくつかの実施形態では、プローブを結合させることは、架橋ポリマーのエポキシドをアミン及びカルボキシルを含有する化合物と反応させることを含む。いくつかの実施形態では、化合物のアミンは、エポキシドと反応して、化合物が結合した架橋ポリマーを形成する。理論に縛られることを望むものではなく、プローブは、ポリマーが架橋される前にポリマーと結合され得ると考えらえる；しかしながら、これは、得られる表面の均一性を低減し得る。第一級アミン及びカルボキシル基を有する任意の化合物が使用され得る。化合物には、限定されないが、グリシン、アミノウンデカン酸、アミノカプロン酸、アクリ

50

ル酸、2-カルボキシエチルアクリル酸、4-ビニル安息香酸、3-アクリルアミド-3-メチル-L-ブタン酸、メタクリル酸グリシジルなどが含まれ得る。いくつかの実施形態では、化合物が結合した架橋ポリマーのカルボキシルは、プローブのアミン（例えば、第一級アミン）と反応して、捕捉剤を実質的に透明なポリマーに結合させる。

【0195】

本明細書に記載のコードされたマイクロキャリアのいずれかを作製するための方法は、国際公開番号WO2016198954においてより詳細に記載されている。

【0196】

V. キット

さらに本明細書では、本開示の複数のマイクロキャリアを含有するキットまたは製造品が提供される。これらのキットまたは製造品は、とりわけ、多重アッセイ、例えば、本明細書に記載の例示的な多重アッセイ（例えば、上記セクションIIIを参照されたい）の実行において利用され得る。本明細書に記載のマイクロキャリア（例えば、上記セクションIVを参照されたい）のいずれかは、本開示のキットまたは製造品に利用され得る。

【0197】

いくつかの実施形態では、本開示のキットまたは製造品は、少なくとも7つのコードされたマイクロキャリアを含む。いくつかの実施形態では、7つのコードされたマイクロキャリアの各々は、(i) マイクロキャリアに結合した、KRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、またはHER2遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブ；及び(ii) プローブに対応する識別子を含む。いくつかの実施形態では、キットは、KRAS遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、PIK3CA遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、BRAF遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、EGFR遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、AKT1遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、MEK1遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、及びHER2遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリアを含む。すなわち、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子の各々は、遺伝子における変異に特異的なプローブを有するマイクロキャリアによってキットにおいて表される。例示的なKRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子ならびに変異は、上述されている。いくつかの実施形態では、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子は、ヒト遺伝子である。いくつかの実施形態では、キットは、以下の変異の各々を検出するのに好適なプローブを有するマイクロキャリアを含む（例えば、キットにおいて各変異用の少なくとも1つのマイクロキャリア+プローブ種を有する）：G12D、及びG12V変異KRASタンパク質をコードするDNA変異；E542K、E545K、及びH1047R変異PIK3CAタンパク質をコードするDNA変異；V600E変異BRAFタンパク質をコードするDNA変異；G719A、E746_A750del、T790M、C797S（T>A及び／またはG>C）、S768I、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insSVD、及びL858R変異EGFRタンパク質をコードするDNA変異；E17K変異AKT1タンパク質をコードするDNA変異；K57N変異MEK1タンパク質をコードするDNA変異；及びA775_G776insYVMA変異HER2タンパク質をコードするDNA変異。本明細書（例えば、セクションIII）に記載のプローブのいずれかは、キットに含まれ、例えば、コードされたマイクロキャリアに結合され得る。いくつかの実施形態では、キットは、1つ以上のRNA変異、例えば、以下に記載されるものに対応する1つ以上のマイクロキャリア、プローブ、及び／またはプライマーをさらに含む。

【0198】

いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも7つのブロック核酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記少なくとも7つのブロック核酸は、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子の各々におけるDNA変異と対応する野生型DNA遺伝子座とハイブリダイズする。ブロック核酸の例示的な説明は、セクションIIIに提供されている。

【0199】

いくつかの実施形態では、キットは、例えば、対象となるDNA変異の遺伝子座を増幅するための、1つ以上のプライマー対をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、及びHER2遺伝子の各々における1つ以上のDNA変異の遺伝子座に特異的なプライマー対、例えば、少なくとも7つのプライマー対を含む。プライマー対の例示的な説明は、セクションIIIに提供されている。

【0200】

いくつかの実施形態では、本開示のキットまたは製造品は、(a)複数のプローブであって、複数の各プローブは、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアは、それに結合したプローブに対応する独自の識別子を有し、複数のプローブは、TAGTTGGAGCT (配列番号38)、TGTGGTAGTTG (配列番号40)、TGATGGCGTAG (配列番号42)、TGGAGCTGATGGC (配列番号44)、及びGCGTAGGCAAG (配列番号46)からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；CTGTTGGCGTAGG (配列番号48)、GTAGTTGGAGCTG (配列番号50)、TGGAGCTGTTGGC (配列番号52)、TTGTGGTAGTTGG (配列番号54)、及びGGCGTAGGCAAGA (配列番号56)からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；TAGTTGGAGCTT (配列番号58)、GCGTAGGCAAGA (配列番号60)、GGAGCTTGTGGC (配列番号62)、TTGTGGCGTAGG (配列番号64)、及びTGTGGTAGTTGG (配列番号66)からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；GCTCAGTGATTTTAG (配列番号87)、TGCTCAGTGATTTT (配列番号89)、GCTCAGTGATTTTAG (配列番号91)、CCTGCTCAGTGATTTTA (配列番号93)、及びCTCAGTGATTTTAGA (配列番号95)からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；TTCCTCCTGCTTA (配列番号97)、CTCCTGCTTAGT (配列番号99)、TCTCCTGCTTAG (配列番号101)、TCTCCTGCTTAGTG (配列番号103)、及びCTCCTGCTTAGTGA (配列番号105)からなる群から選択される配列を含む第5のプローブ；GATGCACGTCA TG (配列番号107)、TGAATGATGCACG (配列番号109)、TGATGCACGTC (配列番号111)、AATGATGCACGTC A (配列番号113)、及びAATGATGCACGTC (配列番号115)からなる群から選択される配列を含む第6のプローブ；TTTGGTCTAGCTACAGA (配列番号79)、CTACAGAGAAATCTCGA (配列番号81)、GTGATTTTGGTCTAGCT (配列番号83)、及びTCTAGCTACAGAGAAAT (配列番号85)からなる群から選択される配列を含む第7のプローブ；TCAAAGTGCTGGCCTC (配列番号117)、AGATCAAAGTGCTGGCCTCCG (配列番号119)、AAAGTGCTGGCCT (配列番号121)、AGTGCTGGCCT (配列番号123)、及びAAGTGCTGGCCTC (配列番号125)からなる群から選択される配列を含む第8のプローブ；AATCAAACATCTCCGAAAG (配列番号128)、CAAAACATCTCCG (配列番号130)、AACATCTCCG (配列番号132)、及びAAACATCTCCGAAAGCC (配列番号134)からなる群から選択される配列を含む第9のプローブ；AATCAAAGACATCTCCGA (配列番号136)、GCAATCAAAGACATCTCCGA (配列番号138)、AATCAAAGACATCTC (配列番号140)、AATCAAAGACATCTCCGAAAGC (配列番号142)、及びCAAGACATCTCCGA (配列番号144)からなる群

10

20

30

40

50

から選択される配列を含む第10のプロープ；CCAGGAGGCTGCCG（配列番号461）、CAGGAGGCTGCCGA（配列番号463）、TCCAGGAGGCTGCC（配列番号465）、CCAGGAGGCTGCC（配列番号467）、及びCAGGAGGCTGCC（配列番号469）からなる群から選択される配列を含む第11のプロープ；CCAGGAGGAGCC（配列番号471）、CCAGGAGGAGCCG（配列番号473）、TCCAGGAGGAGCC（配列番号475）、CAGGAGGAGCCG（配列番号477）、及びCAGGAGGAGCCGA（配列番号479）からなる群から選択される配列を含む第13のプロープ；ATGGCCATCTTGG（配列番号421）、GGCCATCTTGGGA（配列番号423）、GATGGCCATCTTG（配列番号425）、TGATGGCCATCTTG（配列番号427）、及びTGGCCATCTTGG（配列番号429）からなる群から選択される配列を含む第14のプロープ；GTGATGGCCGG（配列番号431）、TGATGGCCGGCG（配列番号433）、GTGATGGCCGGCGT（配列番号435）、GATGGCCGGCGT（配列番号437）、及びGATGGCCCGCGTG（配列番号439）からなる群から選択される配列を含む第15のプロープ；AACCCCCATCACGT（配列番号441）、GACAACCCCCATCACG（配列番号443）、CGTGGACAACCCCCATCA（配列番号445）、CCCATCACGTGT（配列番号447）、及びTGGACAACCCCCATCAC（配列番号449）からなる群から選択される配列を含む第16のプロープ；GCCAGCGTGGACGG（配列番号451）、CGTGGACGGTAACC（配列番号453）、GACGGTAACCCCC（配列番号455）、CCAGCGTGGACGGT（配列番号457）、及びGCCAGCGTGGACGGTA（配列番号459）からなる群から選択される配列を含む第17のプロープ；ATTTTGGGCGGGCC（配列番号151）、TTGGGCGGGCCAAA（配列番号153）、GCGGGCCAAACT（配列番号155）、GGGCGGGCCAAACT（配列番号157）、及びTGGGCGGGGCCA（配列番号159）からなる群から選択される配列を含む第18のプロープ；TGTAAGGAAGTACA（配列番号370）、TCTGTAGGGAAGTAC（配列番号372）、GTCTGTAGGGAAGTACAT（配列番号374）、CCGCACGTCTGTAGGGA（配列番号376）、及びACGTCTGTAGGGAAGTA（配列番号378）からなる群から選択される配列を含む第19のプロープ；TTACCCAGAAATCAGAA（配列番号387）、CCAGAATCAGAAAGGTG（配列番号389）、TTCTTACCCAGAAATCA（配列番号391）、CCTTTCTTACCCAGAAATC（配列番号393）、及びCAGAATCAGAAAGGTGG（配列番号395）からなる群から選択される配列を含む第20のプロープ；及びATACGTGATGTCCTTAC（配列番号404）、ACGTGATGGCTTACGT（配列番号406）、AAGCATACGTGATGGCT（配列番号408）、GCATACGTGATGGCTT（配列番号410）、及びGCATACGTGATGGCTTA（配列番号412）からなる群から選択される配列を含む第21のプロープを含む、複数のプロープ；（b）複数のプライマー対であって、複数のプライマー対は、配列GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG（配列番号1）及びCGTCAAGGCACCTCTTGCCCTAC（配列番号2）を含む第1のプライマー対；配列CAATTTCTACAAAGAGATCCTCTCTCT（配列番号5）及びCTCCATTTTAGCCTTACCTGTGAC（配列番号6）を含む第2のプライマー対；配列ACCCTAGCCCTTAGATAAAACTGAGC（配列番号7）及びTTTGTTGTCCAGCCACCATGA（配列番号8）を含む第3のプライマー対；配列ATAGCCTCAATCTTACCATCCACAAAATG（配列番号9）及びCAGATATATTTCTTCAATGAAGACCTCACAGTAA（配列番号10）を含む第4のプライマー対；配列CTTGTTGGAGCCTCTTACACCC（配列番号11）及びTGCCGAACGCACCGGA（配列番号12）を含む第5のプライマー対；配列GCCAGTTAAACGTCTTCCCTTCTC（配列番号13）及びATCGAGGATTTCTCT

10

20

30

40

50

G T T G G C T T (配列番号 1 4) を含む第 6 のプライマー対 ; 配列 C C T C C A C C G
T G C A G A T C A T C (配列番号 1 5) 及び T T C C C T G A T T A C C T T T G C G
A T (配列番号 1 6) を含む第 7 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C
T C T (配列番号 5 1 1) 及び G C A C A C G T A G G G G T T G T C C A A G A (配列
番号 5 1 2) を含む第 8 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 5 1 3) 及び G T A C A C G C T G G C C A C G C C G (配列番号 5 1 4) を含
む第 9 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 5 1 5)
及び C A G G C G G C A C A C G T G A T (配列番号 5 1 6) を含む第 1 0 のプライマー
対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 5 1 7) 及び A G G C G G C
A C A C G T G C G G G T T A C (配列番号 5 1 8) を含む第 1 1 のプライマー対 ; 配列
G G A G G A C C G T C G C T T G G (配列番号 1 7) 及び T C T T T C T C T T C C G
C A C C C A G (配列番号 1 8) を含む第 1 2 のプライマー対 ; 配列 G A G G G T C T G
A C G G G T A G A G T G (配列番号 3 8 0) 及び T G G C C G C C A G G T C T T G A
T G T A (配列番号 3 8 1) を含む第 1 3 のプライマー対 ; 配列 C T T G A T G A G C A
G C A G C G A A A (配列番号 3 9 7) 及び C C T T C A G T T C T C C C A C C T T C
T G (配列番号 3 9 8) を含む第 1 4 のプライマー対 ; 配列 A T G G C T G T G G T T T
G T G A T G G T (配列番号 4 1 4) 及び A C A C C A G C C A T C A C G T A A G A C
A (配列番号 4 1 5) を含む第 1 5 のプライマー対を含む、複数のプライマー対 ; 及び (c) 複数のブロック核酸であって、複数のブロック核酸は、

10

20

30

40

50

【化 5 0 - 1】

$TACGCCACCAGCT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号281); $TTGGAGCTGGTGGCGTA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号282); $GCTGGTGGCGTAGGCA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号283); $GCTGGTGGCGTAGGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号284); 及び $TTGGAGCTGGTGGCGGT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号285) からなる群から選択される配列を含む第1のブロック核酸; $CTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号291); $TCTCTGAAATCAC TGAGCAGG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号292); $TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号293); $TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号294); 及び $TCTCTGAATTCACTGAGCAGG (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号295) からなる群から選択される配列を含む第2のブロック核酸; $CACCATGATGTGCAT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号296); $CCACCATGATGTGCAT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号297); $CACCATGATGTGCAT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号298); $CCACCATGATGTGCATCA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号299); 及び $CATGATGTGCA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号300) からなる群から選択される配列を含む第3のブロック核酸; $GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号301); $GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号302); $GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号303); $GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号304); 及び $GAGATTTCAC TG TAGC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号305) からなる群から選択される配列を含む第4のブロック核酸; $CGGAGCCAGCACTTTGA (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号306); $CGCACCCGAGCCAGCACT (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号307); $GAGCCAGCAC (invdT)_n$ (n は1、2、または3である) (配列番号308); $CGCACCCGAGCCAGCAC (invdT)_n$ (n は1、2、または3

10

20

30

40

【化 5 0 - 2】

である) (配列番号 3 0 9) ; または $CGCACCGGAGCCCA GCACTTA (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 0) からなる群から選択される配列を含む第 5 のブロック核酸 ; $CGGAGATGTTGCTTC TCTTAATTCC (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 1) ; $CGGAGATGTTGCTTC TCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 2) ; $GTTGCTTC TCTTAATTCC (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 3) ; $ATGTTGCTTC TCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 4) ; 及び $TTGCTTC TCTTA (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 5) からなる群から選択される配列を含む第 6 のブロック核酸 ; $CATCACGCAGCTCATG (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 6) ; $TGCAGCTCATCACGCAGC (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 7) ; $TCA TCACGCAGCTCAT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 8) ; $TCA TCACGCAGC (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 1 9) ; 及び $CTCATCACGCAGC (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 2 0) からなる群から選択される配列を含む第 7 のブロック核酸 ; $CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 2 1) ; $CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 2 2) ; $CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 2 3) ; $AGCAGTTTGGCCAGCC (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 2 4) ; 及び $CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 2 5) からなる群から選択される配列を含む第 8 のブロック核酸 ; $TGTACTCCCCTACA (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 8 2) ; $GATGTACTCCCCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 8 3) ; $ATGTACTCCCCTAC (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 8 4) ; $G TACTCCCC TACA (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 8 5) ; 及び $GATGTACTCCCCTACA (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 8 6) からなる群から選択される配列を含む第 9 のブロック核酸 ; 及び $CTGTCTTC TGGGTAAG (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 3 9 9) ; $TTC TGTCTCTGGTAAGA (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 4

10

20

30

40

【化50-3】

00) ; C A C C T T C T G C T T C T G G G (i n v d T) _n (nは1、2、または3である) (配列番号401) ; T C T G C T T C T G G G T A (i n v d T) _n (nは1、2、または3である) (配列番号402) ; 及び C A C C T T C T G C T T C T G G G T A A G A (i n v d T) _n (nは1、2、または3である) (配列番号403) からなる群から選択される配列を含む第10のブロック核酸 (イタリック体の核酸はロック核酸を表す)

10

を含む、複数のブロック核酸を含む。

【0201】

いくつかの実施形態では、本開示のキットまたは製造品は、少なくとも5つのコードされたマイクロキャリアを含む。いくつかの実施形態では、7つのコードされたマイクロキャリアの各々は、(i) マイクロキャリアに結合した、A L K、R O S、R E T、N T R K 1、またはc M E T 遺伝子におけるRNA変異に特異的なプローブ；及び(ii) プローブに対応する識別子を含む。いくつかの実施形態では、キットは、A L K 遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、R O S 遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、R E T 遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、N T R K 1 遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリア、及びc M E T 遺伝子におけるDNA変異に特異的なプローブを含む少なくとも1つのマイクロキャリアを含む。すなわち、A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及びc M E T 遺伝子の各々は、遺伝子における変異に特異的なプローブを有するマイクロキャリアによってキットにおいて表される。例示的なA L K、R O S、R E T、N T R K 1、及びc M E T 遺伝子ならびに変異は、上述されている。いくつかの実施形態では、A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及びc M E T 遺伝子は、ヒト遺伝子である。いくつかの実施形態では、キットは、以下の変異の各々を検出するのに好適なプローブを有するマイクロキャリアを含む (例えば、キットにおいて各変異用の少なくとも1つのマイクロキャリア+プローブ種を有する) : E 1 3 ; A 2 0、E 2 0 ; A 2 0、及びE 6 ; A 2 0 A L K RNA変異 ; C 6 ; R 3 2、C 6 ; R 3 4、S 4 ; R 3 2、及びS 4 ; R 3 4 R O S RNA変異 ; K 1 5 ; R 1 1、K 1 5 ; R 1 2、K 1 6 ; R 1 2、K 2 2 ; R 1 2、及びK 2 3 ; R 1 2 R E T RNA変異 ; C 8 ; N 1 2 N T R K 1 RNA変異 ; 及びエクソン14スキッピングc M E T RNA変異。本明細書 (例えば、セクションI I I) に記載のプローブのいずれかは、キットに含まれ、例えば、コードされたマイクロキャリアに結合され得る。いくつかの実施形態では、キットは、1つ以上のDNA変異、例えば、上述したものに対応する1つ以上のマイクロキャリア、プローブ、及び/またはプライマーをさらに含む。

20

30

【0202】

いくつかの実施形態では、キットは、少なくとも5つのブロック核酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、前記少なくとも7つのブロック核酸は、A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及びc M E T 遺伝子の各々におけるRNA変異と対応する野生型DNA遺伝子座 (例えば、c DNAのPCR増幅を介してRNAから増幅される) とハイブリダイズする。ブロック核酸の例示的な説明は、セクションI I Iに提供されている。

40

【0203】

いくつかの実施形態では、キットは、例えば、対象となるRNA変異の遺伝子座を増幅するための、1つ以上のプライマー対をさらに含む。いくつかの実施形態では、キットは、A L K、R O S、R E T、N T R K 1、及びc M E T 遺伝子の各々における1つ以上のRNA変異の遺伝子座に特異的なプライマー対、例えば、少なくとも5つのプライマー対

50

(例えば、cDNAの生成のための第1のプライマー及び第1のプライマーと組み合わせたcDNAからのDNAのPCR増幅のための第2のプライマー)を含む。プライマー対の例示的な説明は、セクションIIIに提供されている。

【0204】

いくつかの実施形態では、本開示のキットまたは製造品は、(a)複数のプローブであって、複数の各プローブは、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアは、それに結合したプローブに対応する独自の識別子を有し、複数のプローブは、A A A G G A C C T A A A G T G T (配列番号161)、C C T A A A G T G T A C C G C (配列番号163)、G G G A A A G G A C C T A A A G (配列番号165)、A G T G T A C C G C C G G A A (配列番号167)、及びT A C C G C C G G A A G C A C C (配列番号169)からなる群から選択される配列を含む第1のプローブ；G A C T A T G A A A T A T T G T A C (配列番号171)、G A A A T A T T G T A C T T G T A C (配列番号173)、T A T T G T A C T T G T A C C G C C (配列番号175)、T G T A C C G C C G G A A G C A C (配列番号177)、及びC C G C C G G A A G C A C C A G G A (配列番号179)からなる群から選択される配列を含む第2のプローブ；T G T C A T C A T C A A C C A A (配列番号181)、A T G T C A T C A T C A A C C (配列番号183)、G T G T A C C G C C G G A A G C (配列番号185)、T C A A C C A A G T G T A C C G (配列番号187)、及びT A C C G C C G G A A G C A C C A (配列番号189)からなる群から選択される配列を含む第3のプローブ；C G A A A A A A A C A G C C A A (配列番号191)、T C G C G A A A A A A A C A G C (配列番号193)、G T G T A C C G C C G G A A G C (配列番号195)、T A C C G C C G G A A G C A C C (配列番号197)、及びA C A G C C A A G T G T A C C G (配列番号199)からなる群から選択される配列を含む第4のプローブ；A C T G A C G C T C C A C C G A A A (配列番号201)、C C A C T G A C G C T C C A C C G A (配列番号203)、G C T G G A G T C C C A A A T A A A C (配列番号205)、G G A G T C C C A A A T A A A C C A G (配列番号207)、及びC A C C G A A A G C T G G A G T C C C (配列番号209)からなる群から選択される配列を含む第5のプローブ；C C G A A A G A T G A T T T T (配列番号211)、G A C G C T C C A C C G A A A (配列番号213)、A C T G A C G C T C C A C C G A (配列番号215)、G A T G A T T T T T G G A T A (配列番号217)、及びT G A T T T T T G G A T A C C A (配列番号219)からなる群から選択される配列を含む第6のプローブ；A G C G C C T T C C A G C T G G T T G G A (配列番号221)、C T G G T T G G A G C T G G A G T C C C (配列番号223)、A G T A G C G C C T T C C A G C T G G T T G (配列番号225)、G C T G G A G T C C C A A A T A A A C C A (配列番号227)、及びG G A G T C C C A A A T A A A C C A G G (配列番号229)からなる群から選択される配列を含む第7のプローブ；G C G C C T T C C A G C T G G T T G (配列番号231)、G T A G C G C C T T C C A G C T G G T (配列番号233)、T G G T T G G A G A T G A T T T T T (配列番号235)、G A T G A T T T T T G G A T A C C A G (配列番号237)、及びT G A T T T T T T G G A T A C C A (配列番号239)からなる群から選択される配列を含む第8のプローブ；G T G G G A A A T A A T G A T G T A A A (配列番号241)、C T G T G G G A A A T A A T G A T G T A (配列番号243)、G A T C C A C T G T G C G A C G A G C T (配列番号245)、T G A T G T A A A G A T C C A C T G T G (配列番号247)、及びT C C A C T G T G C G A C G A G C T G T (配列番号249)からなる群から選択される配列を含む第9のプローブ；T G G G A A A T A A T G A T G T A A A (配列番号251)、C T G T G G G A A A T A A T G A T G T A (配列番号253)、G G A G G A T C C A A A G T G G G A A T (配列番号255)、G G A T C C A A A G T G G G A A T T (配列番号257)、及びA T G A T G T A A A G G A G G A T C C (配列番号259)からなる群から選択される配列を含む第10のプローブ；C T T C G T A T C T C T C A A G A G G A T (配列番号481)、G T A T C T C T C A A G A G G A T C C A A (配列番号483)、T T C G T A T C T C T C A A G

10

20

30

40

50

AG（配列番号485）、TCAAGAGGATCCAAA（配列番号487）、及びTCTCTCAAGAGG（配列番号489）からなる群から選択される配列を含む第11のプローブ；GTTAAAAAGGAGGATCCAA（配列番号491）、ACAAGAGTTAAAAAGGAGGA（配列番号493）、AAGAGTTAAAAAGGAGGATC（配列番号495）、AAAAAGGAGGATCCAAAAG（配列番号497）、及びAAGGAGGATCCAAAGTG（配列番号499）からなる群から選択される配列を含む第12のプローブ；AAACAGGAGGATCCAAA（配列番号501）、AAGTGACACAAACAGGAGG（配列番号503）、GTGCACAAAACAGGAGGATC（配列番号505）、CACAAACAGGAGGAT（配列番号507）、及びAACAGGAGGATCCAAA（配列番号509）からなる群から選択される配列を含む第13のプローブ；CAGGATCTGGGCCCCAGACA（配列番号261）、GATCTGGGCCCCAGACACTA（配列番号263）、CCAGACACTAACAGCACAT（配列番号265）、GGGCCCCAGACACTAACAGC（配列番号267）、及びCTAACAGCACATCTGGAGA（配列番号269）からなる群から選択される配列を含む第14のプローブ；及びAGAAAGCAAATTAAGAT（配列番号271）、AGCAAATTAAGATCAG（配列番号273）、AAATTAAGATCAGTTTC（配列番号275）、AGATCAGTTTCTTAATTC（配列番号277）、及びAAGATCAGTTTCTTAATTC（配列番号279）からなる群から選択される配列を含む第15のプローブを含む、複数のプローブ；及び（b）複数のプライマーであって、複数のプライマーは、以下の配列の各々を含む（配列当たり少なくとも1つの個々のそれぞれのプライマーを有する）AGTTGGGGTTGTAGTCGGTCAT（配列番号363）、AGCCTCCC TG GATCTCC（配列番号364）、TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC（配列番号357）、CCAGCTACATCACACACCTTGACT（配列番号358）、TAATACCAAAAGTTACCAAAACTGCA（配列番号359）、GGAGTGCCATCGCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT（配列番号19）、TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC（配列番号20）、GTGATCGCACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC（配列番号26）、CTCTAGGAGATATCATTTCCAAATTCGCCCTTCTCTCTAG（配列番号27）、TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCAC CAGA（配列番号23）、AAGGAGTTAGCAGCATGTGAGC（配列番号519）、AACTTCAGACTTTACACAACCTGC（配列番号520）、ATTGATTCTGATGACACCGGA（配列番号521）、GGACGAAAAATCCAGACCCCAAAGGTGTTTTCGT（配列番号32）、CATTTGGGTGACATCAGGGAGCTGCCACCCCAA（配列番号33）、AGAAAGACGTGACAGGAACCTGGAGGACCCGTCCTT（配列番号30）、GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA（配列番号29）、及びGAATTTACAGGATTGATTGCTGGTGTTGTCTC（配列番号28）、複数のプライマーを含む。

【0205】

本開示のキットは、本開示の1つ以上のDNA変異及び／または1つ以上のRNA変異を検出するのに好適な様々なマイクロキャリア／プローブ、プライマー、及び／またはブロック核酸を含み得ることを理解されたい。そのようなキットの非限定的な例が以下に記載されているが、本開示のDNA／RNA変異のいずれかを検出するための試薬のいずれかは、任意の数または組み合わせで組み合わせられ得ることが企図される。

【0206】

いくつかの実施形態では、本開示のキットまたは製造品は、（a）複数のプローブであって、複数の各プローブは、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアは、それに結合したプローブに対応する独自の識別子を有し、複数のプローブは、配列TTTTTTTTTAAATAGTTGGAGCT（配列番号39）を含む第1のプローブ

；配列 T T T T T T T T T T T T A G G C G T A G G C A A G A (配列番号 57) を含む第 2 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T A A G G A G C T T G T G G C (配列番号 63) を含む第 3 のプローブ；配列 T T T T T T T C C T G C T C A G T G A T T T T A (配列番号 94) を含む第 4 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T A T C T C C T G C T T A G (配列番号 102) を含む第 5 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T A A T G A T G C A C G T C A (配列番号 114) を含む第 6 のプローブ；配列 T T T T T T A A T T C T A C A G A G A A A T C T C G A (配列番号 82) を含む第 7 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T A G T G C T G G C C T (配列番号 124) を含む第 8 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T A C A A A A C A T C T C C G (配列番号 131) を含む第 9 のプローブ；配列 T T T T T T T T A A T C A A G A C A T C T C (配列番号 141) を含む第 10 のプローブ；配列 T T T T T T T T C A T G A G A T G C A T G A T G A (配列番号 356) を含む第 11 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T A C A G G A G G C T G C C G A (配列番号 464) を含む第 12 のプローブ；配列 T T T T T T T T T A C A G G A G G G A G C C G (配列番号 478) を含む第 13 のプローブ；配列 T T T T T T T T A G A T G G C C A T C T T G (配列番号 426) を含む第 14 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T G T G A T G G C C G G (配列番号 432) を含む第 15 のプローブ；配列 T T T T T T T T G G A C A A C C C C C A T C A C (配列番号 450) を含む第 16 のプローブ；配列 T T T T T T T G C C A G C G T G G A C G G T A (配列番号 460) を含む第 17 のプローブ；配列 T T T T T T T T A A A T G G G C G G G C C A (配列番号 160) を含む第 18 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T T T T G T A G G G A A G T A C A (配列番号 371) を含む第 19 のプローブ；配列 T T T T T A A A T C A G A A T C A G A A G G T G G (配列番号 396) を含む第 20 のプローブ；配列 T T T T T A A A T C A G A A T C A G A A G G T G G (配列番号 396) を含む第 20 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T A C G T G A T G G C T T A C G T (配列番号 407) を含む第 21 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T A G T G T A C C G C C G G A A (配列番号 168) を含む第 22 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T G A C T A T G A A A T A T T G T A C (配列番号 172) を含む第 23 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T T T T A C C G C C G G A A G C A C C A (配列番号 190) を含む第 24 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T T T T G T G T A C C G C C G G A A G C (配列番号 196) を含む第 25 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T G C T G G A G T C C C A A A T A A A C (配列番号 206) を含む第 26 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T G A C G C T C C A C C G A A A (配列番号 214) を含む第 27 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T T T G G A G T C C C A A A T A A A C C A G G (配列番号 230) を含む第 28 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T G A T G A T T T T T G G A T A C C A G (配列番号 238) を含む第 29 のプローブ；配列 T T T T T T T T T T T G T G G G A A A T A A T G A T G T A A A (配列番号 242) を含む第 30 のプローブ；配列 T T T T T T T T T C T G T G G G A A A T A A T G A T G T A (配列番号 254) を含む第 31 のプローブ；配列 T T T T T T T T T C T C T C A A G A G G (配列番号 490) を含む第 32 のプローブ；配列 T T T T T T T T T A A G G A G G A T C C A A A G T G (配列番号 500) を含む第 33 のプローブ；配列 T T T T T T T T A A A C A G G A G G A T C C A A A (配列番号 502) を含む第 34 のプローブ；配列 T T T T T T T T T A C C A G A C A C T A A C A G C A C A T (配列番号 266) を含む第 35 のプローブ；配列 T T T T T T T T T A G A A A G C A A A T T A A A G A T (配列番号 272) を含む第 36 のプローブを含む、複数のプローブ；(b) 複数のプライマー対であって、複数のプライマー対は、配列 G T A C T G G T G G A G T A T T T G A T A G T G (配列番号 1) 及び C G T C A A G G C A C T C T T G C C T A C (配列番号 2) を含む第 1 のプライマー対；配列 C A A T T T C T A C A A G A G A T C C T C T C T C T (配列番号 5) 及び C T C C A T T T T A G C A C T T A C C T G T G A C (配列番号 6) を含む第 2 のプライマー対；配列 A C C C T A G C C T T A G A T A A A A C T G A G C (配列番号 7) 及び T T T G T T G T C C A G C C A

10

20

30

40

50

CCATGA（配列番号8）を含む第3のプライマー対；配列ATAGCCTCAATT
CTTACCATCCACAAATG（配列番号9）及びCAGATATATTTCT
TCATGAAGACCTCACAGTAA（配列番号10）を含む第4のプライマー対
；配列CTTGTGGAGCCTCTTACACCC（配列番号11）及びTGCCGA
ACGCACCGGA（配列番号12）を含む第5のプライマー対；配列GCCAGTT
AACGTCTTCTCTCTC（配列番号13）及びATCGAGGATTTCTCT
GTTGGCTT（配列番号14）を含む第6のプライマー対；配列CCTCCAACCG
TGCAGATCATC（配列番号15）及びTTCCCTGATTACCTTTGCG
AT（配列番号16）を含む第7のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCC
TCT（配列番号511）及びGCACACGTAGGGGTTGTCCAAGA（配列
番号512）を含む第8のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCCTCT（
配列番号513）及びGTACACGTGGCCACGCCG（配列番号514）を含
む第9のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCCTCT（配列番号515）
及びCAGGCGGCACACGTGAT（配列番号516）を含む第10のプライマー
対；配列CCACACTGACGTGCCCTCT（配列番号517）及びAGGCGGC
ACACGTGCGGGTTAC（配列番号518）を含む第11のプライマー対；配列
GGAGGACCGTCTGCTTTGG（配列番号17）及びTCTTTCTCTTTCCG
CACCCAG（配列番号18）を含む第12のプライマー対；配列GAGGGTCTG
ACGGGTAGAGTG（配列番号380）及びTGGCCGCCAGGTCTTGA
TGTA（配列番号381）を含む第13のプライマー対；配列CTTGATGAGCA
GCAGCGAAA（配列番号397）及びCCTTCAGTTCTCCCACTTC
TG（配列番号398）を含む第14のプライマー対；配列ATGGCTGTGGTTT
GTGATGGT（配列番号414）及びACACCAGCCATCACGTAAAGAC
A（配列番号415）を含む第15のプライマー対；配列AGTTGGGGTTGTAG
TCGGTTCAT（配列番号363）及びTATGGAGCAAAACTACTGTAG
AGCC（配列番号357）を含む第16のプライマー対；配列AGTTGGGGTTG
TAGTCGGTTCAT（配列番号363）及びCCAGCTACATCACACACC
TTGACT（配列番号358）を含む第17のプライマー対；配列AGTTGGGGT
TGTAGTCGGTTCAT（配列番号363）及びTAATACCAAAAGTTAC
CAAAACTGCA（配列番号359）を含む第18のプライマー対；配列GGAGT
GCCATCTGCTGTTTGAATGAGCAGGCACT（配列番号19）を含む
第19のプライマー対；配列GGAGTGCCATCTGCTGTTTGAATGAGC
AGGCACT（配列番号19）を含む第20のプライマー対；配列TACAGCCCT
GGATATTTCTTAGTAGCGC（配列番号20）を含む第21のプライマー対；
配列TACAGCCCTGGATATTTCTTAGTAGCGC（配列番号20）を含む
第22のプライマー対；配列GTGATCTGCACAGTAGGACAGCGGCTGC
GATC（配列番号26）及びTTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCA
ACCAACCAAGA（配列番号23）を含む第23のプライマー対；配列CTCTAGG
AGATATCATTTCCAAATTCGCCCTTCTCCTAG（配列番号27）及び
TTTCTGGTGCTATGAGGAAATGACCAACCAACCAAGA（配列番号
23）を含む第24のプライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAA
ATTCGCCCTTCTCCTAG（配列番号27）及びAAGGAGTTAGCAGC
ATGTCAGC（配列番号519）を含む第25のプライマー対；配列CTCTAGG
AGATATCATTTCCAAATTCGCCCTTCTCCTAG（配列番号27）及び
AACTTCAGACTTTACACAACCTGC（配列番号520）を含む第26の
プライマー対；配列CTCTAGGAGATATCATTTCCAAATTCGCCCTTCT
CCTAG（配列番号27）及びATTGATTCTGATGACACCGGA（配列
番号521）を含む第27のプライマー対；配列GGACGAAAATCCAGACCC
CAAAAGGTGTTTCTG（配列番号32）及びAGAAAGACGTGACAGG
AACTGGAGGACCCGTCTT（配列番号30）を含む第28のプライマー対；

10

20

30

40

50

配列 $GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA$ (配列番号 29) 及び $GAAATTTACAGGATTGATTGCTGGTGTGTCTC$ (配列番号 28) を含む第 29 のプライマー対を含む、複数のプライマー対；及び (c) 複数のブロック核酸であって、複数のブロック核酸は、
【化 51】

配列 $TTGGA GCTGGTGGCGT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である)
(配列番号 285) を含む第 1 のブロック核酸；配列 $CTGAAA TCACTGAGCAGG (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 291) を含む第 2 のブロック核酸；配列 $CCACCATGATGTGCA TCA (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 299) を含む第 3 のブロック核酸；配列 $GAGATT TCAC TGTA GC (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 301) を含む第 4 のブロック核酸；配列 $CGCACCGGAGCCCA GCACTTA (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 310) を含む第 5 のブロック核酸；配列 $CGGAGATG TTGCTTC TCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 312) を含む第 6 のブロック核酸；配列 $TGCAGCTCATCACGCAGC (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 317) を含む第 7 のブロック核酸；配列 $CCAGCAGTTTGGCCAGCCCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 322) を含む第 8 のブロック核酸；配列 $GATGTACTCCCCCT (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 383) を含む第 9 のブロック核酸；及び配列 $CACCTTC TGC TTC TGGGTAAGA (invdT)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 403) を含む第 10 のブロック核酸

を含む、複数のブロック核酸を含む。
【0207】

いくつかの実施形態では、本開示のキットまたは製造品は、(a) 複数のプローブであって、複数の各プローブは、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアは、それに結合したプローブに対応する独自の識別子を有し、複数のプローブは、配列 $TTTTTTTTTTAATGATGGCGTAG$ (配列番号 43) を含む第 1 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTAGTAGTTGGAGCTG$ (配列番号 51) を含む第 2 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTAATTGTGGCGTAGG$ (配列番号 65) を含む第 3 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTAGCTCAGTGATTTTAG$ (配列番号 88) を含む第 4 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTTTTTCTCTGCTTAGTG$ (配列番号 104) を含む第 5 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTTGTGATGCACGTC$ (配列番号 112) を含む第 6 のプローブ；配列 $TTTTTTTAAATTGAGAAATCTCGATGGAG$ (配列番号 78) を含む第 7 のプローブ；配列 $TTTTTTTAGATCAAAGTGCTGGCCTCCG$ (配列番号 120) を含む第 8 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTTAAACATCTCCGAAAGCC$ (配列番号 135) を含む第 9 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTTCAAGACATCTCCGA$ (配列番号 145) を含む第 10 のプローブ；配列 $TTTTTTTTTTTTTTTGAGATGCATGATGA$ (配列番号 352) を含む第 11 のプローブ；配列

TTTTTTTTTTTTTACAGGAGGCTGCC (配列番号470)を含む第12の
プローブ；配列TTTTTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCCG (配列番号47
4)を含む第13のプローブ；配列TTTTTTTTTTATGGCCATCTTGG (配
列番号422)を含む第14のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTGATGGC
CCGCGTG (配列番号440)を含む第15のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTT
TTCCCATCACGTGT (配列番号448)を含む第16のプローブ；配列TTTT
TTTTTTTTTGACGGTAACCCCC (配列番号456)を含む第17のプロー
ブ；配列TTTTTTTTTATTTTGGGCGGGCC (配列番号152)を含む第18
のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTCTGTAGGGAAGTAC (配列番号3
73)を含む第19のプローブ；配列TTTTTAAATTTCTTACCCAGAAAT
CA (配列番号392)を含む第20のプローブ；配列TTTTTAAGCATACGT
GATGGCT (配列番号409)を含む第21のプローブ；配列TTTTTTTTTTTT
GGGAAAGGACCTAAAG (配列番号166)を含む第22のプローブ；配列T
TTTTTTTTTTTTTCCGCGCGGAAGCACCCAGGA (配列番号180)を含
む第23のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTTTTGTGTACCGCCGGAA
GC (配列番号186)を含む第24のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTTTCG
AAAAAAACAGCCAA (配列番号192)を含む第25のプローブ；配列TTT
TTTTTTTTTACTGACGCTCCACCGAAAA (配列番号202)を含む第2
6のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTTTGACGCTCCACCGAAAA (配列番
号214)を含む第27のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTTTAGCGCCTTC
CAGCTGGTTGGA (配列番号222)を含む第28のプローブ；配列TTTTT
TTTTTTTTGATTTTTTGATACCA (配列番号240)を含む第29のプロー
ブ；配列TTTTTTTTTTTTTTTCCACTGTGCGACGAGCTGT (配列番号2
50)を含む第30のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTGGAATCCAAAGTGGG
AATT (配列番号258)を含む第31のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTCAA
GAGGATCCAAA (配列番号488)を含む第32のプローブ；配列TTTTTT
TTACAAGAGTTAAAAAGGAGGA (配列番号494)を含む第33のプロー
ーブ；配列TTTTTTATTAAGTGCAACAACAGGAGG (配列番号504)
を含む第34のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTACTAACAGCACATCTG
GAGA (配列番号270)を含む第35のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTAGA
TCAGTTTTCTATAATTC (配列番号278)を含む第36のプローブを含む、複
数のプローブ；(b)複数のプライマー対であって、複数のプライマー対は、配列GTA
CTGGTGGAGTATTTGATAGTG (配列番号1)及びCGTCAAGGCA
CTCTTGCCCTAC (配列番号2)を含む第1のプライマー対；配列CAATTTCT
TACAAGAGATCCTCTCTCT (配列番号5)及びCTCCATTTTTCAGC
ACTTACCTGTGAC (配列番号6)を含む第2のプライマー対；配列ACCCCT
AGCCTTAGATAAAAACTGAGC (配列番号7)及びTTTGTTGTCCA
GCCACCATGA (配列番号8)を含む第3のプライマー対；配列ATAGCCTC
AATTCCTTACCATCCACAAAAATG (配列番号9)及びCAGATATAT
TCTTTCATGAAGACCTCACAGTAA (配列番号10)を含む第4のプラ
イマー対；配列CTTGTTGGAGCCTCTTACACCC (配列番号11)及びTG
CCGAACGCACCGGA (配列番号12)を含む第5のプライマー対；配列GCC
AGTTAAACGTCTTCCCTTCTC (配列番号13)及びATCGAGGATTT
CCTTGTTGGCTT (配列番号14)を含む第6のプライマー対；配列CCTCC
ACCGTGCAGATCATC (配列番号15)及びTTCCTTGATTAACCTT
TGCGAT (配列番号16)を含む第7のプライマー対；配列CCACACTGACG
TGCCCTCT (配列番号511)及びGCACACGTAGGGGTGTCCAAG
A (配列番号512)を含む第8のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCC
TCT (配列番号513)及びGTACACGCTGGCCACGCCG (配列番号51
4)を含む第9のプライマー対；配列CCACACTGACGTGCCCTCT (配列番号

10

20

30

40

50

515) 及び CAGGCGGCGACACGTGAT (配列番号516) を含む第10のプライマー対; 配列 CCACACTGACGTGCCTCT (配列番号517) 及び AGGCGGCGACACGTGCGGGTTAC (配列番号518) を含む第11のプライマー対; 配列 GGAGGACCGTCTGCTTTGG (配列番号17) 及び TCTTTCTCTCTTCCGCGACCCAG (配列番号18) を含む第12のプライマー対; 配列 GAGGGTCTTGACGGGTAGAGTG (配列番号380) 及び TGGCCGCGCCAGGTC TTGATGTA (配列番号381) を含む第13のプライマー対; 配列 CTTGATGAGCAGCAGCGAAA (配列番号397) 及び CCTTCAGTTCTCCACCTTCTG (配列番号398) を含む第14のプライマー対; 配列 ATGGCTGTGGTTTGTGATGGT (配列番号414) 及び ACACCAGCCATCACGTAAGACA (配列番号415) を含む第15のプライマー対; 配列 AGTTGGGGTTGTAGTCTGGTCAAT (配列番号363) 及び TATGGAGCAAAACTACTGTAGAGCC (配列番号357) を含む第16のプライマー対; 配列 AGTTGGGGTTGTAGTCTGGTCAAT (配列番号363) 及び CCAGCTACATCACACACCTTGACT (配列番号358) を含む第17のプライマー対; 配列 AGTTGGGGTTGTAGTCTGGTCAAT (配列番号363) 及び TAATACCAAAAAGTTACCAAAAAGTCA (配列番号359) を含む第18のプライマー対; 配列 GAGTGCCATCTGCTGTTTGA AATGAGCAGGCACT (配列番号19) を含む第19のプライマー対; 配列 GGAGTGCCATCTGCTGTTTGA AATGAGCAGGCACT (配列番号19) を含む第20のプライマー対; 配列 TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC (配列番号20) を含む第21のプライマー対; 配列 TACAGCCCTGGATATTCTTAGTAGCGC (配列番号20) を含む第22のプライマー対; 配列 GTGATCTGCGACAGTAGGACAGCGGCTGCGATC (配列番号26) 及び TTTCTGCTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCCAGA (配列番号23) を含む第23のプライマー対; 配列 CTC TAGGAGATATCATTTCCAAAATTCGCCCTTCTCCTAG (配列番号27) 及び TTTCTGCTGCTATGAGGAAATGACCAACCACCCAGA (配列番号23) を含む第24のプライマー対; 配列 CTC TAGGAGATATCATTTCCAAAATTCGCCCTTCTCCTAG (配列番号27) 及び AAGGAGTTAGCAGCATGTCTAGC (配列番号519) を含む第25のプライマー対; 配列 CTC TAGGAGATATCATTTCCAAAATTCGCCCTTCTCCTAG (配列番号27) 及び AACTTTCAGACTTTACACAACCTGC (配列番号520) を含む第26のプライマー対; 配列 CTC TAGGAGATATCATTTCCAAAATTCGCCCTTCTCCTAG (配列番号27) 及び ATTGATTCTGATGACACCGGA (配列番号521) を含む第27のプライマー対; 配列 GGACGAAAAATCCAGACCCCAAAAAGGTGTTTCTG (配列番号32) 及び AGAAGACGTGACAGGAACCTGGAGGACCCGTCTT (配列番号30) を含む第28のプライマー対; 配列 GACAGTATTTTGCAGTAATGGACTGGATATATCAGA (配列番号29) 及び GAATTTTCACAGGATTGATTGCTGGTGTGTCTC (配列番号28) を含む第29のプライマー対を含む、複数のプライマー対; 及び (c) 複数のブロック核酸であって、複数のブロック核酸は、

10

20

30

40

【化 5 2】

配列TTGGA GCTGGTGGCGTA (invdT)_n (nは1、2、または3である)

(配列番号282)を含む第1のブロック核酸；配列TCTCTGAAATCACTGAGC
AGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号294)を含む第2のブ
ロック核酸；配列CCACCATGATGTGCAT (invdT)_n (nは1、2、または
3である) (配列番号297)を含む第3のブロック核酸；配列GAGATTTCACGTG
AGC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号305)を含む第4のブ
ロック核酸；配列CGCACCGGAGCCAGCAC (invdT)_n (nは1、2、ま
たは3である) (配列番号309)を含む第5のブロック核酸；配列GTTGCTTCCTC
TAATTC (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号313)を含む
第6のブロック核酸；配列CTCATCACGCAGC (invdT)_n (nは1、2、また
は3である) (配列番号320)を含む第7のブロック核酸；配列CCAGCAGTTTGG
CCAGCCCT (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号325)を含
む第8のブロック核酸；配列；GATGTACTCCCC TACA (invdT)_n (nは
1、2、または3である) (配列番号386)を含む第9のブロック核酸；及び配列CACC
TTCTGCTTC TGGG (invdT)_n (nは1、2、または3である) (配列番号4
01)を含む第10のブロック核酸

10

20

を含む、複数のブロック核酸を含む。

【0208】

いくつかの実施形態では、本開示のキットまたは製造品は、(a)複数のプローブであ
って、複数の各プローブは、マイクロキャリアに結合されており、マイクロキャリアは、
それに結合したプローブに対応する独自の識別子を有し、複数のプローブは、配列TTTT
TTTTTTTTTATGGAGCTGATGGC (配列番号45)を含む第1のプローブ
；配列TTTTTTTTTTTTTATGGAGCTGTTGGC (配列番号53)を含む第
2のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTTAAGGAGCTTGTGGC (配列番号6
3)を含む第3のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTCTCAGTGATTTTAG
A (配列番号96)を含む第4のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTCTCCT
GCTTAGT (配列番号100)を含む第5のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTT
TAATGATGCACGTC (配列番号116)を含む第6のプローブ；配列TTTT
TTAATTTCTAGCTACAGAGAAAT (配列番号86)を含む第7のプロー
ブ；配列TTTTTTTTTTTTTCAAAGTGCTGGCCCTC (配列番号118)を含
む第8のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTAATCAAAACATCTCCG (配列番
号127)を含む第9のプローブ；配列TTTTTTTTTTAATCAAGACATCTC
CGA (配列番号137)を含む第10のプローブ；配列TTTTTTTTTTTGAGA
TGCAATGATGAG (配列番号353)を含む第11のプローブ；配列TTTTTT
TTTTTACCAGGAGGCTGCC (配列番号468)を含む第12のプローブ；
配列TTTTTTTTTTTTTACCAGGAGGGAGCC (配列番号472)を含む第
13のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTAGGCCATCTTGGA (配列番号42
4)を含む第14のプローブ；配列TTTTTTTTTTTTTGTGATGGCCGGCG

30

40

50

T (配列番号 436) を含む第 15 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T A A C C C C C A T C A C G T (配列番号 442) を含む第 16 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T C G T G G A C G G T A A C C (配列番号 454) を含む第 17 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T A A A A A A G C G G G C C A A A C T (配列番号 156) を含む第 18 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T A C G T C T G T A G G G A A G T A (配列番号 379) を含む第 19 のプローブ ; 配列 T T T T T A A A T T T A C C C A G A A T C A G A A (配列番号 388) を含む第 20 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T A T A C G T G A T G T C T T A C (配列番号 405) を含む第 21 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T C C T A A A G T G T A C C G C (配列番号 164) を含む第 22 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T A T T G T A C T T G T A C C G C C (配列番号 176) を含む第 23 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T T T C A A C C A A G T G T A C C G (配列番号 188) を含む第 24 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T T T A C A G C C A A G T G T A C C G (配列番号 200) を含む第 25 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T C A C C G A A A G C T G G A G T C C C (配列番号 210) を含む第 26 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T T C C G A A A G A T G A T T T T (配列番号 212) を含む第 27 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T T T C T G G T T G G A G C T G G A G T C C C (配列番号 224) を含む第 28 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T G G T T G G A G A T G A T T T T T (配列番号 236) を含む第 29 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T T G A T G T A A A G A T C C A C T G T G (配列番号 248) を含む第 30 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T A T G A T G T A A A G G A G G A T C C (配列番号 260) を含む第 31 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T G T A T C T C T C A A G A G G A T C C A A (配列番号 484) を含む第 32 のプローブ ; 配列 T T A T T A T T A A G A G T T A A A A A G G A G G A T C (配列番号 811) を含む第 33 のプローブ ; 配列 T A T T A T T A T G T G C A C A A A C A G G A G G A T C (配列番号 506) を含む第 34 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T A G G G C C C A G A C A C T A A C A G C (配列番号 268) を含む第 35 のプローブ ; 配列 T T T T T T T T T T T A A A T T A A A G A T C A G T T T C (配列番号 276) を含む第 36 のプローブを含む、複数のプローブ ; (b) 複数のプライマー対であって、複数のプライマー対は、配列 G T A C T G G T G G A G T A T T T G A T A G T G (配列番号 1) 及び C G T C A A G G C A C T C T T G C C T A C (配列番号 2) を含む第 1 のプライマー対 ; 配列 C A A T T T C T A C A A G A G A T C C T C T C T C T (配列番号 5) 及び C T C C A T T T T A G C A C T T A C C T G T G A C (配列番号 6) を含む第 2 のプライマー対 ; 配列 A C C C T A G C C T T A G A T A A A A C T G A G C (配列番号 7) 及び T T T G T T G T C C A G C C A C C A T G A (配列番号 8) を含む第 3 のプライマー対 ; 配列 A T A G C C T C A A T T C T T A C C A T C C A C A A A A T G (配列番号 9) 及び C A G A T A T A T T T C T T C A T G A A G A C C T C A C A G T A A (配列番号 10) を含む第 4 のプライマー対 ; 配列 C T T G T G G A G C C T C T T A C A C C C (配列番号 11) 及び T G C C G A A C G C A C C G G A (配列番号 12) を含む第 5 のプライマー対 ; 配列 G C C A G T T A A C G T C T T C C T T C T C (配列番号 13) 及び A T C G A G G A T T T C C T T G T T G G C T T (配列番号 14) を含む第 6 のプライマー対 ; 配列 C C T C C A C C G T G C A G A T C A T C (配列番号 15) 及び T T C C C T G A T T A C C T T T G C G A T (配列番号 16) を含む第 7 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 511) 及び G C A C A C G T A G G G G T T G T C C A A G A (配列番号 512) を含む第 8 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 513) 及び G T A C A C G C T G G C C A C G C C G (配列番号 514) を含む第 9 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 515) 及び C A G G C G G C A C A C G T G A T (配列番号 516) を含む第 10 のプライマー対 ; 配列 C C A C A C T G A C G T G C C T C T (配列番号 517) 及び A G G C G G C A C A C G T G C G G G T T A C (配列番号 518) を含む第 11 のプライマー対 ; 配列 G G A G G A C C G T C G C T T G G (配列番号 1

10

20

30

40

50

7) 及び T C T T T C T C T T C C G C A C C C A G (配列番号 18) を含む第 12 のプライマー対; 配列 G A G G G T C T G A C G G G T A G A G T G (配列番号 380) 及び T G G C C G C C A G G T C T T G A T G T A (配列番号 381) を含む第 13 のプライマー対; 配列 C T T G A T G A G C A G C A G C G A A A (配列番号 397) 及び C C T T C A G T T C T C C C A C C T T C T G (配列番号 398) を含む第 14 のプライマー対; 配列 A T G G C T G T G G T T T G T G A T G G T (配列番号 414) 及び A C A C C A G C C A T C A C G T A A G A C A (配列番号 415) を含む第 15 のプライマー対; 配列 A G T T G G G G T T G T A G T C G G T C A T (配列番号 363) 及び T A T G G A G C A A A A C T A C T G T A G A G C C (配列番号 357) を含む第 16 のプライマー対; 配列 A G T T G G G G T T G T A G T C G G T C A T (配列番号 363) 及び C C A G C T A C A T C A C A C A C C T T G A C T (配列番号 358) を含む第 17 のプライマー対; 配列 A G T T G G G G T T G T A G T C G G T C A T (配列番号 363) 及び T A A T A C C A A A A G T T A C C A A A A C T G C A (配列番号 359) を含む第 18 のプライマー対; 配列 G G A G T G C C A T C G C T G T T T G A A A T G A G C A G G C A C T (配列番号 19) を含む第 19 のプライマー対; 配列 G G A G T G C C A T C G C T G T T T G A A A T G A G C A G G C A C T (配列番号 19) を含む第 20 のプライマー対; 配列 T A C A G C C C T G G A T A T T C T T A G T A G C G C (配列番号 20) を含む第 21 のプライマー対; 配列 T A C A G C C C T G G A T A T T C T T A G T A G C G C (配列番号 20) を含む第 22 のプライマー対; 配列 G T G A T C G C A C A G T A G G A C A G C G G C T G C G A T C (配列番号 26) 及び T T T C T G G T G C T A T G A G G A A A T G A C C A A C C A C C A G A (配列番号 23) を含む第 23 のプライマー対; 配列 C T C T A G G A G A T A T C A T T C C A A A T T C G C C T T C T C C T A G (配列番号 27) 及び T T T C T G G T G C T A T G A G G A A A T G A C C A A C C A C C A G A (配列番号 23) を含む第 24 のプライマー対; 配列 C T C T A G G A G A T A T C A T T C C A A A T T C G C C T T C T C C T A G (配列番号 27) 及び A A G G A G T T A G C A G C A T G T C A G C (配列番号 519) を含む第 25 のプライマー対; 配列 C T C T A G G A G A T A T C A T T C C A A A T T C G C C T T C T C C T A G (配列番号 27) 及び A A C T T C A G A C T T T A C A C A A C C T G C (配列番号 520) を含む第 26 のプライマー対; 配列 C T C T A G G A G A T A T C A T T C C A A A T T C G C C T T C T C C T A G (配列番号 27) 及び A T T G A T T C T G A T G A C A C C G G A (配列番号 521) を含む第 27 のプライマー対; 配列 G G A C G A A A A T C C A G A C C C C A A A A G G T G T T T C G T (配列番号 32) 及び A G A A G A C G T G A C A G G A A C T G G A G G A C C C G T C T T (配列番号 30) を含む第 28 のプライマー対; 配列 G A C A G T A T T T T G C A G T A A T G G A C T G G A T A T A T C A G A (配列番号 29) 及び G A A T T T C A C A G G A T T G A T T G C T G G T G T T G T C T C (配列番号 28) を含む第 29 のプライマー対を含む、複数のプライマー対; 及び (c) 複数のブロック核酸であって、複数のブロック核酸は、

10

20

30

40

50

【化 5 3】

配列 $TACGCCACCAAGCT (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 281) を含む第 1 のブロック核酸; 配列 $TCTCTGAAATCACTGAGCAGG (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 293) を含む第 2 のブロック核酸; 配列 $CACCATGATGTGCAT (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 296) を含む第 3 のブロック核酸; 配列 $GAGATTTCACCTGTAGC (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 303) を含む第 4 のブロック核酸; 配列 $GAGCCCAGCAC (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 308) を含む第 5 のブロック核酸; 配列 $CGGAGATGTTGCTTCTCTTAA TTCC (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 311) を含む第 6 のブロック核酸; 配列 $CATCACGCAGCTCATG (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 316) を含む第 7 のブロック核酸; 配列 $CCAGCAGTTTGG CCAGCCCT (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 321) を含む第 8 のブロック核酸; 配列 $TGTACTCCCCCTACA (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 382) を含む第 9 のブロック核酸; 及び配列 $TC TGC TTC TGGGTAAG (i n v d T)_n$ (n は 1、2、または 3 である) (配列番号 399) を含む第 10 のブロック核酸

10

20

を含む、複数のブロック核酸を含む。

30

【0209】

いくつかの実施形態では、キットは、陽性対照遺伝子配列に特異的なプローブが結合される陽性対照に対応する識別子を有するマイクロキャリア、及び陽性対照 DNA 配列に特異的なプライマー対を含む。例えば、いくつかの実施形態では、陽性対照 RNA 配列は、ヒトヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 (H P R T 1) 遺伝子の配列を含む。いくつかの実施形態では、陽性対照 RNA 配列に特異的なプライマー対は、配列 $GGAAGATATAATTGACACTGGCAAACA$ (配列番号 34) 及び $ATTCATTATAGTCAAGGGCATATCC$ (配列番号 35) を含む。いくつかの実施形態では、各プローブは、独自の識別子を有する本開示のマイクロキャリアに結合されている。いくつかの実施形態では、キットは、陰性対照に対応する識別子、例えば、増幅された DNA とハイブリダイズしないプローブを有する本開示のマイクロキャリアを含む。

40

【0210】

いくつかの実施形態では、キットは、プライマー対を含み、対の一方または両方のプライマーは、検出試薬、例えば、上述したもので標識されている。いくつかの実施形態では、検出試薬は、蛍光検出試薬を含む。いくつかの実施形態では、検出試薬は、ビオチンを含み、キットは、シグナル放出体にコンジュゲートされたストレプトアビジン (例えば、フィコエリトリンにコンジュゲートされたストレプトアビジン) を含む。

【0211】

いくつかの実施形態では、キットまたは製造品は、第 1 のマイクロキャリアに結合した第 1 の分析物の量及び第 2 のマイクロキャリアに結合した第 2 の分析物の量を検出するた

50

めの本開示の1つ以上の検出試薬をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、第1の分析物のための検出試薬は、第2の分析物のための検出試薬と同じであり得る。他の実施形態では、第1の分析物のための検出試薬は、第2の分析物のための検出試薬と異なり得る。

【0212】

いくつかの実施形態では、キットまたは製造品は、本開示の1つ以上のDNAまたはRNA変異を検出するためにキットまたは製造品を使用するための指示書をさらに含み得る。これらの指示書は、例えば、本明細書に記載の方法のいずれかにおいて、キットまたは製造品を使用するためのものであり得る。

【0213】

いくつかの実施形態では、キットまたは製造品は、1つ以上の検出試薬（例えば、上述したように、PEにコンジュゲートされたストレプトアビジンなど）を、検出試薬を1つ以上の分析物に結合させるのに好適な、もしくは検出試薬を分析物を認識する1つ以上のマクロ分子に結合させるのに好適な任意の指示書または検出試薬と共にさらに含み得る。キットまたは製造品は、限定されないが、プレート（例えば、96ウェルまたは他の同様のマイクロプレート）、皿、顕微鏡スライド、または他の好適なアッセイ容器；非一時的コンピュータ可読保存媒体（例えば、アナログ形状またはコード認識のためのソフトウェア及び／または他の指示書を含む）；洗浄剤；緩衝液；プレート封止剤；混合容器；希釈剤または保存溶液などを含む、アッセイ（例えば、多重アッセイ）においてマイクロキャリアを使用するための任意の追加の構成要素をさらに含み得る。

【0214】

いくつかの実施形態では、本開示のプローブは、本開示のマイクロキャリア、例えば、本明細書に記載のマイクロキャリア及び／または本明細書に記載の方法のいずれかによって生成されるマイクロキャリアに結合され得る。本明細書に記載のプローブのいずれかは、本開示の方法及び／またはマイクロキャリアに利用され得る。

【実施例】

【0215】

本発明は、以下の実施例を参照することによってより完全に理解される。しかしながら、それらは、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書に記載の実施例及び実施形態が例証のみを目的とするものであり、それを考慮した様々な修正または変更が当業者に提案され、本出願の趣旨及び範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれるべきであることが理解される。

【0216】

実施例1：コードされたマイクロキャリアを使用する肺癌関連変異の多重検出

上述したように、血液または組織サンプルから単離されたDNA及びRNAを使用するがん関連DNA変異及びRNAバリエーションについての多重スクリーニングは、早期検出のための非侵襲的方法を提供する。以下の実施例は、肺癌に関連する多様な重要なDNA変異及びRNAバリエーションを同定するための多重スクリーニングのためのマイクロキャリアベースのアプローチの検証を記載する。

【0217】

材料及び方法

サンプル調製

コードされたマイクロキャリアを使用するDNA変異及びRNAバリエーションの検出を検査するために使用された方法のフローチャートが図3に提供されている。標準的な技術を使用して表Cに記載のプラスミドまたは表Bに記載されるK562細胞からDNAを単離した。製造業者の指示書に従ってNanoDrop（商標）UV-Vis分光光度計（Thermo Scientific）またはQubit（登録商標）Fluorometer（Thermo Scientific）を使用してDNAを定量した。すべての実験のために使用された抽出されたDNAの濃度は、 $\geq 12.5 \text{ ng} / \mu\text{L}$ であった。コードされたマイクロキャリアを使用してRNAバリエーションの検出を検査するために、標準的

10

20

30

40

50

な技術を使用して培養して24時間後に表Dに記載されるプラスミドでトランスフェクションされたHEK293細胞からRNAを単離した。

【0218】

これらの実験において検出された変異は、表A1及びA2に提供されている。

【0219】

DNA変異の検出限度(LOD)試験のため、K562細胞からDNAを「野生型」DNAとして使用するために抽出した。変異したKRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF、EGFR、AKT1、MEK1、またはHER2配列を有するプラスミドを使用して対象となる様々な変異の1つを有するDNAを得た。野生型及び変異DNAを混合し、希釈して、1%変異DNAの99%野生型DNAに対する比で12.5 ng/μLの総DNA濃度を達成した。実験のために使用された各DNAサンプルの濃度は、以下の表B及びCに示されている。

【0220】

RNAバリエーションについての検出限度(LOD)試験のため、ALK、ROS、RET、NTRK1またはcMETのRNAバリエーションの配列を有するプラスミドを使用してRNAを得た。

【表1】

表B. 野生型DNA.

WT	WT DNA ストック		WT DNA 500ng/μl			WT DNA 100ng/μl		
細胞株	変異%	濃度 (ng/μl)	ストック体積	最終体積	トリ ス	100ng/μl 体積	最終体積	トリ ス
K562	-	1208	207.0	500	293.0	100	1000	900

【0221】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)

変異濃縮PCRを使用して、上で調製されたDNAサンプルから対象となる変異を有するポリヌクレオチドを選択的に増幅した。3'反転dTヌクレオチドを有するロック核酸(LNA)を使用して、野生型DNA配列の増幅をブロックし、それにより対象となる変異を濃縮した。簡潔には、ブロック核酸をPCR反応に含めて、野生型遺伝子座の増幅をブロックした。ブロック核酸は、図4に示されているように、野生型遺伝子座のセンス鎖にハイブリダイズし、センス鎖から増幅するプライマー伸長を防止した。標準的な核酸を有するオリゴヌクレオチドと比較してより安定なハイブリダイゼーションのため、LNAを使用した。サンプルに存在する変異体遺伝子座の任意のコピーは、ブロック核酸が変異体配列とハイブリダイズしないため、ブロック核酸からの干渉を伴わずにPCRによって増幅することができた(図5)。以下のプライマー対を使用した: 配列番号1及び2、3及び4、5及び6、7及び8、9及び10、11及び12、13及び14、15及び16、17及び18。以下のブロック核酸を使用した: 配列番号281、286、293、296、303、308、311、316、321、及び365。

【0222】

各サンプルをボルテックスで混合し、次いで遠沈し、氷上で維持した。PCR反応を以下のように行った。各サンプルについて、表D及びEに列挙された量に従って2回のPCR反応を実施した。各PCR反応は、4 μLの12.5 ng/μLの抽出DNA(合計で50 ngのDNA)を含んでいた。PCR反応ミックスをPCRチューブ内で生成した後

、チューブをタッピングによって混合し、簡潔に遠沈し、サーモサイクラーに入れた。PCRサーモサイクル条件は、以下の表 F に記載したとおりである。ランプ速度は、1℃／秒であった。

【0223】

上で調製されたRNAサンプルから対象となるRNAバリエーションを有するポリヌクレオチドを選択的に増幅するために、cDNAをまず、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）によって単離されたRNAから生成し、これをさらに、変異濃縮PCRによって増幅した。PCRサーモサイクル条件は、以下の表 G に記載したとおりである。ランプ速度は、5℃／秒であった。以下のプライマーを使用した：配列番号19～37。

【表2】

10

表D. PCR反応1.

PCR 反応 1	
材料	反応当たりの体積 (μL)
反応ミックス 1	11
プライマーミックス 1	5
抽出された DNA/PC/NC	4
合計	20

20

【表3】

30

表E. PCR反応2.

PCR 反応 2	
材料	反応当たりの体積 (μL)
反応ミックス 2	11
プライマーミックス 2	5
抽出された DNA/PC/NC	4
合計	20

40

50

【表 4】

表F. DNA変異のためのPCR条件.

工程	温度	時間	サイクル	ランプ速度
変性前保持	95℃	5 分	1	1℃/s
変性	95℃	20 秒	38 サイクル	
LNA ブロッキング	70℃	20 秒		
アニーリング	55℃	20 秒		
伸長	60℃	25 秒		
保存	4℃	∞		

10

【表 5】

20

表G. RNAバリエントのためのPCR条件.

工程	温度	時間	サイクル	ランプ速度
cDNA 合成 (RT)	55℃	15 分	1	5℃/s
変性前保持	95℃	2 分	1	
変性	95℃	15 秒	45	
アニーリング	60℃	30 秒		
伸長	72℃	30 秒		
保存	4℃	∞	∞	

30

【0224】

ハイブリダイゼーション

PCRアンプリコンを、マイクロキャリアの捕捉剤プローブ配列にハイブリダイズさせた。プローブは、変異体配列とハイブリダイズし、野生型配列とはハイブリダイズせず、それにより変異体DNAまたはRNAバリエントの特異的検出を可能とするように設計された。野生型配列に結合するブロック核酸の使用と組み合わせることで、この戦略により、アッセイは、対応する野生型遺伝子座よりもはるかに少ないコピー数で存在する場合であっても変異体DNAを検出することが可能となる（図4及び5を参照されたい）。DNAのために以下のプローブを使用した：配列番号45、53、63、75、86、96、100、116、118、127、137、353、及び156。RNAのために以下のプローブを使用した：配列番号164、176、188、200、210、212、224、236、248、260、268、及び276。

40

【0225】

簡潔には、コードされたマイクロキャリア（それぞれ、表A1及びA2に示される変異またはRNAバリエントに個々に特異的である）を、96ウェルプレートの単一のウェル

50

にブールした。マイクロキャリア溶液を10秒間ボルテックスすることによって混合し、次いで20 μ Lのマイクロキャリア溶液を96ウェルプレートの各ウェルに添加した。ストックマイクロキャリア溶液を4ウェル毎に再ボルテックスして、均質な懸濁液を確保した。100 μ Lのハイブリダイゼーション緩衝液(5XSSPE緩衝液)を各ウェルに添加した。PCR産物を遠沈し、95 $^{\circ}$ Cに5分間加熱することによって変性させ、次いで4 $^{\circ}$ Cに冷却した。10 μ Lの変性したPCR産物1または10 μ Lの変性したPCR産物2を各ウェルに添加した。アッセイプレートを1200rpmで20分間、37 $^{\circ}$ Cで振盪することによって混合した。次いでウェルを1X洗浄緩衝液で洗浄した。

【0226】

検出のため、50 μ Lのストレプトアビジンがコンジュゲートされたフィコエリトリン(SA-PE)溶液を各ウェルに添加し、プレートを1200rpmで10分間、37 $^{\circ}$ Cで再度振盪した。次いでウェルを再度洗浄した。次いで各ウェルをアナログ画像デコード及び蛍光検出に供した。

【0227】

結果

表Aに列挙される変異またはRNAバリエーションの各々に特異的なプローブを有するマイクロキャリアを使用して、上述したLOD試験アッセイにおいて変異DNAまたはRNAバリエーションの存在を検出した。これらの実験の結果が図7A~7C(DNA)ならびに図8A及び8B(RNA)に示されている。マイクロキャリアベースのアッセイを、アッセイ当たり1つのプローブ及び1つの変異DNA配列または1つのRNAバリエーション配列を使用して、ペアワイズ様式で各変異について検証した。列は、サンプルにどの変異DNA配列またはRNAバリエーション配列が存在したかを示している。行は、これらのアッセイについてマイクロキャリアにどのプローブが結合したかを示している。DNA変異については、陰性対照として、プローブを有さない「ブランク」マイクロキャリアを使用した。陽性対照DNAについては、ヒトIGF DNAを増幅し、増幅した配列に特異的なプローブを使用して検出した。

【0228】

図7A~7Cは、各DNA実験について得られた蛍光シグナル(任意単位、AU)を報告している。示されているように、変異DNA配列及びプローブがミスマッチであったほぼすべての場合において、蛍光は検出されず、プローブとDNAとの間のハイブリダイゼーションの欠如を示している。KRAS DNAは、KRAS G12Dプローブ、及びNRAS Q61Lプローブと弱く交差反応したが、各それぞれのKRASまたはNRAS DNAサンプルよりもはるかに低い蛍光シグナルを生成した。対照的に、各変異DNA配列を適切なマイクロキャリア結合プローブと混合した場合、強い蛍光シグナルによってハイブリダイゼーションが検出された。

【0229】

野生型DNAを使用して陽性対照以外のシグナルは検出されず、LNAオリゴヌクレオチドは野生型DNA増幅をブロックするのに有効であり、及び／またはプローブ配列は野生型DNAのハイブリダイゼーションを排除するのに有効であったことを示している。

【0230】

RNAバリエーション検出のため、陰性対照として、プローブを有さない「ブランク」マイクロキャリアを使用した。陽性対照のため、ヒトHPRT1 RNAを逆転写し、増幅し、増幅した配列に特異的なプローブを使用して検出した。

【0231】

図8A及び8Bは、各実験について得られた蛍光シグナル(任意単位、AU)を報告している。示されているように、RNAバリエーションについてのcDNA配列及びプローブがミスマッチであったほぼすべての場合において、蛍光は検出されず、プローブとcDNAとの間のハイブリダイゼーションの欠如を示している。ALK-v3aのcDNAは、ALK-v3bプローブと弱く交差反応し、ALK-v3bのcDNAは、ALK-v3aプローブと弱く交差反応したが、各々のそれぞれのバリエーションよりもはるかに低い蛍光シ

10

20

30

40

50

グナルを生成した。これは、2つのバリエーション間の配列類似性に起因する可能性が高かった。対照的に、RNAバリエーションの各cDNA配列を適切なマイクロキャリア結合プローブと混合した場合、強い蛍光シグナルによってハイブリダイゼーションが検出された。

【0232】

これらの結果は、対象となる変異配列よりも数桁多い量で存在する野生型DNAを伴う場合でさえ、対象となる個々の変異の高感度で正確な検出を実証する。有利には、各遺伝子の検出は、他の遺伝子のすべてについての内部対照として作用するので、タンデムでのいくつかの変異の多重検出は、より高い信頼性及び忠実性につながる。これらの結果は、ヒトサンプルからの重要ながん関連変異の同定のためのオリゴヌクレオチドプローブを有するコードされたマイクロキャリアを使用した迅速な多重ストラテジーを示唆している。

10

【0233】

実施例2：コードされたマイクロキャリアを使用する血液サンプルからの肺癌関連変異の多重検出

先行実施例は、単離されたDNAまたはRNAサンプルに基づくがん関連変異の多重検出のためのオリゴヌクレオチドプローブを有するコードされたマイクロキャリアの使用を実証した。以下の実施例は、血液サンプルから抽出されたDNA及びRNAを使用してこのアプローチの有効性を実証する。

【0234】

材料及び方法

血漿総RNA及び血漿セルフリーDNA (cfDNA) の単離

図6は、血液サンプルから血漿総RNA及び血漿cfDNAを単離するプロセスを示している (Best, M. G. et al. (2015) Cancer Cell 28: 666-676を参照されたい)。血漿総RNAを単離するために、紫キャップ付きBDバキュティナまたはセルフリーDNA BCT (EDTA抗凝固剤を含有する) に全血を収集した。チューブを室温で保存し、1時間処理した。細胞及び凝集物を室温で20分間、200gで遠心分離によって除去し、総RNA豊富血漿をもたらした。総RNA豊富血漿を、上清をピペティングせずに、または赤血球がピペットチップに触れないように、15mLの円錐チューブ (チューブA) に移した。総RNA豊富血漿を20分間100gで室温にて遠心分離し、上清を第2の円錐チューブ (チューブB) に移した。チューブBにおける上清を20分間360gで室温にてさらに遠心分離した。上清を除去し、第3の円錐チューブ (チューブC) に移した。30µLのRNA安定緩衝液を、チューブBにおける総RNA豊富ペレットに添加し、4℃で一晩インキュベートしてから、将来の使用のために-80℃で凍結した。

20

30

【0235】

チューブCにおける上清を1.5mLまたは2mLチューブに分注し、室温で10分間、16,000gで遠心分離した。各チューブからのcfDNAを含有する上清を15mLの円錐チューブに移した。cfDNAの抽出のため、以下の市販キットを製造業者のプロトコルに従って使用した: Promega-Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit、Thermo-MagMAX Nucleic Acid Isolation Kit、Catchgene-Catch-cfDNA Serum/Plasma Ki、Qiagen-QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit。

40

【0236】

cfDNA豊富血漿の単離

cfDNA豊富血漿のみを単離するために、全血を1,600gで10分間遠心分離した。上側の血漿を1.5mLまたは2mLチューブに移し、16,000gで10分間遠心分離した。得られた上側の血漿を15mLの円錐チューブに移し、将来の使用のために-80℃で凍結した。

【0237】

血漿総RNAの抽出

50

総RNA豊富サンプルを4℃で5～10分解凍し、1mLのRNA単離緩衝液に溶解し、ドラフト下で室温にて10分間放置した。200μLのクロロホルムを各チューブに添加し、続いて15～30秒のボルテックスを行い、室温で2～3分間放置した。次いでチューブを12,000gで4℃にて15分間遠心分離した。次いでRNA単離緩衝液及びクロロホルムミックスを含有する水相（上相）を異なるチューブに移した。混入DNAのキャリーオーバーを最小限にするため、中間層上の約3～4mmの水相は移さなかった。500μLのイソプロパノール（-20℃に冷却した）をRNA単離緩衝液及びクロロホルムミックスを有する各チューブに添加した。チューブを反転して混合し、-20℃で1時間放置した。次いでサンプルを12,000gで4℃にて15分間遠心分離し、すべての液体を除去し、1mLの新たに生成したRNA洗浄緩衝液を添加した。7,500gで10分間4℃にて遠心分離した後、すべての液体を除去し、ペレットを、蓋を開けたままドラフト内で5分間チューブを置くことによって乾燥させた。RNAペレットが乾燥したように見えた場合、40μLのRNA溶出緩衝液を添加してRNAを溶解し、溶液をボルテックスし、氷上で維持した。

10

【0238】

PCR反応物を、以下の割合に従って上で単離されたDNAを使用して生成した。プライマーミックスを実施例1に記載されているように生成した。

【表6】

20

表G. PCR反応1.

PCR 反応 1	
材料	反応当たりの体積 (μL)
反応ミックス 1	10
プライマーミックス 1	10
抽出された DNA/PC/NC	20
合計	40

30

40

50

【表 7】

表H. P C R反応 2.

PCR 反応 2	
材料	反応当たりの体積 (μL)
反応ミックス 2	10
プライマーミックス 2	10
抽出された DNA/PC/NC	20
合計	40

10

【0239】

他の P C R 条件（例えば、サーモサイクル）、ハイブリダイゼーション条件、及び検出は、実施例 1 に記載されているとおりであった。

20

【0240】

結果

図 9 A では、ホルマリン固定パラフィン包埋（F F P E）サンプルから R N A を得、選択された変異を、本明細書に記載のマイクロキャリアアプローチ（L C P）と比較して、次世代シーケンシング（N G S）によって検出した。図 9 B では、胸水または血清サンプル中の c f D N A から D N A を得、選択された変異を、本明細書に記載のマイクロキャリアアプローチ（L C P）と比較して、d d P C R または次世代シーケンシング（N G S）によって検出した。これらの結果は、本明細書に記載の方法を使用する患者サンプルからの D N A 及び R N A における複数のがん関連変異の多重検出の成功を実証する。

30

【0241】

次に、本明細書に記載のマイクロキャリアアプローチによって検出された肺癌パネル（L C P）の性能を、デジタル P C R（d d P C R）のものと比較した。これらのアプローチは、ステージ I I I 非小細胞肺癌患者から得られた組織サンプル（F F P E サンプル）を使用して比較した。この比較研究のために使用された d d P C R アッセイは、E G F R 遺伝子における変異しか検出しなかった。

【0242】

9 種のサンプルを、E G F R 遺伝子における変異について d d P C R によって検査した。結果が表 I に示されている。これらの結果は、L C P アプローチが参照 d d P C R 法と同じ変異を検出することができた一方で、野生型（W T）E G F R 遺伝子も同様に正確に検出することができたことを示している。

40

【表 8】

表 I.

参照方法	サンプル ID	肺癌パネル - FFPE (DNA)	外部第三者単一遺伝 子検査結果**
		EGFR	
デジタル PCR EGFR (のみ)	1	WT	WT
	2	p.L747_T751del	L747_T751del
	3	WT	WT
	4	p.L858R	L858R
	5	p.E746_A750del	E746_A750del
	6	p.L858R	L858R
	7	p.E746_A750del	E746_A750del
	8	WT	WT
	9	WT	WT

10

20

【0243】

LC P パネルをまた、上述したように 41 人の患者サンプルからの EGFR、KRAS、及び BRAF 遺伝子における変異を検出するための RT-PCR ベースのアプローチと比較した（表 J）。これらの結果は、LC P アプローチが、既存の RT-PCR アプローチと比較して、これらの遺伝子における特定の変異及び野生型配列を正確に同定することができたことを確認する。

30

40

50

【表 9 - 1】

表 J.

参照方法	サンプル ID	肺癌パネル - FFPE (DNA)			外部第三者 RT-PCR 検査結果
		EGFR	KRAS	BRAF	
RT-PCR EGFR KRAS BRAF	1	WT	WT	V600E1	BRAF
	2	WT	WT	V600E1	BRAF
	3	WT	G12V	WT	KRAS
	4	WT	WT	WT	EGFR ex19 ¹
	5	WT	WT	WT	KRAS 146 ¹
	6	p.L747_P753>S	WT	WT	EGFR ex19
	7	WT	Q61K	WT	KRAS 61
	8	WT	WT	WT	KRAS 146 ¹
	9	L858R	WT	WT	EGFR L858R
	10	WT	WT	V600E1	BRAF V600E1
	11	WT	G12C	WT	KRAS G12C
	12	WT	G12V	WT	KRAS G12V
	13	WT	G12V	WT	KRAS G12V
	14	WT	G12C	WT	KRAS G12C
	15	p.E746_A750del	WT	WT	EGFR E746_A750del
	16	G719A	WT	WT	EGFR G719A

10

20

30

40

50

【表 9 - 2】

RT-PCR EGFR のみ	17	WT	N/A	N/A	WT
	18	WT	N/A	N/A	WT
	19	エクソン 19 del (E746_A750 del)	N/A	N/A	エクソン 19 del
	20	WT	N/A	N/A	WT
	21	WT	N/A	N/A	WT
	22	エクソン 19 del (L747_P753>S)	N/A	N/A	エクソン 19 del
	23	WT	N/A	N/A	WT
	24	エクソン 19 del (E746_A750 del)	N/A	N/A	エクソン 19 del
	25	WT	N/A	N/A	WT
	26	エクソン 19 del (L747_P753>S)	N/A	N/A	エクソン 19 del
	27	WT	N/A	N/A	エクソン 20 Ins
	28	WT	N/A	N/A	WT
	29	WT	N/A	N/A	WT
RT-PCR EGFR のみ	30	WT	N/A	N/A	WT
	31	WT	N/A	N/A	エクソン 19 mut ¹
	32	WT	N/A	N/A	WT
	33	WT	N/A	N/A	WT
	34	WT	N/A	N/A	WT
	35	エクソン 19 del	N/A	N/A	エクソン 19 del
	36	L858R	N/A	N/A	L858R
	37	エクソン 19 del	N/A	N/A	エクソン 19 del
	38	WT	N/A	N/A	WT
	39	WT	N/A	N/A	WT
	40	WT	N/A	N/A	WT
	41	WT	N/A	N/A	WT

¹これらの標的は、この検査に使用された肺癌パネルのバージョンに含まれず、不一致の結果をもたらした。

【 0 2 4 4 】

LC P パネルをまた、上述したように 7 人の患者サンプルからの EGFR、KRAS、NRAS、PIK3CA、及び BRAF 遺伝子における変異を検出するための NGS ベースのアプローチと比較した（表 K）。これらの結果もまた、LC P アプローチが、変異の NGS 検出と比較して、これらの遺伝子における特定の変異及び野生型配列を正確に同定することができたことを確認する。

【表 10】

表K.

参照方法	サンプル ID	肺癌パネル - FFPE (DNA)					外部第 三者 NGS 検 査結果 **
		EGFR	KRAS	NRAS	PIK3CA	BRAF	
NGS	53	WT	WT	WT	WT	V600E	V600E
	54	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	55	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	56	WT	G12D (1833)	WT	WT	WT	WT
	57	WT	G12C	WT	WT	WT	G12C
	58	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	59	WT	G12V	WT	WT	WT	G12V

10

20

【0245】

上述したようにLCPを使用した変異のRNA検出を、RNA変異のNGS検出と比較した。RNAを、ステージIII肺癌を有する14人の患者からのFFPEサンプルから抽出し、ALK、ROS1、RET、NTRK1、またはcMETにおける遺伝子再構成についてNGSまたはLCPアプローチによって分析した。表Lに示されているように、LCPは、NGSによって検出された変異のすべてを検出することができた。また、LCPは、潜在的にLCPのより高い感受性のため、NGSによって検出可能ではなかったRET及びcMETにおける再構成を同定することができた（NGS検出限度は約250コピーであったのに対し、LCPの検出限度は10未満であった）。

30

40

50

【表 1 1】

表 L.

参照 方法	サンプ ル ID	肺癌パネル - FFPE (RNA)					外部第三 者 NGS 検 査結果**
		ALK	ROS1	RET	NTRK 1	cMET	
NGS	1	v1	WT	WT	WT	WT	EML4- ALK+
	2	v1	WT	WT	WT	WT	EML4- ALK+
	3	v1	WT	WT	WT	WT	EML4- ALK+
	4	v1	WT	WT	WT	WT	EML4- ALK+
	5	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	6	v1	WT	WT	WT	WT	EML4- ALK+
	7	v1	WT	WT	WT	WT	EML4- ALK+
	8	v1	WT	WT	WT	WT	EML4- ALK+
	9	WT	CD74- ROS1	WT	WT	WT	ROS1+
	10	v1	WT	WT	WT	WT	EML4- ALK+
	11	WT	WT	CCDC- RET	WT	WT	WT ^a
	12	WT	WT	WT	WT	cMET エクソン 14 スキッピング	WT ^a
	13	v1	WT	WT	WT	WT	EML4- ALK+
	14	v1	WT	WT	WT	WT	EML4- ALK+

^a CCDC-RET 及び cMET エクソン 14 スキッピングバリエントに対する NGS 検出限度は、約 250 コピーであり、これは、肺癌パネルのもの (LOD < 10 コピー) よりも劣っていた。

【0246】

LCP を液体生検サンプルに適用するために、胸水から抽出された DNA、または血漿／血清からのセルフリー DNA (cfDNA) のいずれかを使用して、LCP 性能を ddPCR アプローチに対して検査した。EGFR 及び BRAF における変異は、22 種のサンプルにおいて検出された (表 M)。ddPCR アプローチを使用した検査結果は、外部第三者によって提供され、各変異の分数的存在量 ($FA\% = \frac{\# \text{変異コピー}}{\# \text{変異コピー} + \# \text{野生型コピー}}$) を報告した。ddPCR アプローチを比較として使用したが、その理由は、それは、単一変異の絶対定量のための方法として知られているからである。

【表 1 2】

表M.

参照方法	サンプル タイプ	サンプル ID	肺癌パネル	外部第三者単一遺伝子検査結 果**
			EGFR	
デジタル PCR EGFR (の み)	胸水 (DNA)	1	T790M	EGFR T790M 及び L747_751>P ^a
		2	WT	WT
		3	WT	WT
デジタル PCR EGFR (の み)	cfDNA (血清) (DNA)	4	p.L747_P753>S, T790M	L747_P753>S 及び T790M
		5	p.E746_A750del	E746_A750del 及び T790M
		6	p.L747_T751del	L747_T751del
		7	WT	WT
		8	WT	WT
デジタル PCR BRAF (のみ)	cfDNA (血清) (DNA)	9	V600E	V600E (29.1%)
		10	WT	V600E (2.4%)
		11	V600E	V600E (17%)
		12	V600E	V600E (31.3%)
		13	WT	V600E (0.7%)
		14	V600E	V600E (4%)
		15	V600E	V600E (2.4%)
		16	V600E	V600E (1%)
		17	WT	V600E (1.7%)
		18	V600E	V600E (8%)
		19	V600E	V600E (26.5%)
		20	V600E	V600E (1.7%)
		21	V600E	V600E (17%)
		22	V600E	V600E (4.3%)

^a L 7 4 7 - 7 5 1 > P は、肺癌パネルにおける標的ではない

【 0 2 4 7 】

液体生検サンプルを使用した L C P 性能もまた、血清からの c f D N A における E G F R、K R A S、N R A S、P I K 3 C A、及び B R A F における変異の検出のために 5 人の患者サンプルを使用して N G S に対して比較した（表 N）。

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表N.

参照 方法	サンプル タイプ	サンプル ID	肺癌パネル - cfDNA (血清) (DNA)					外部第三者単一遺伝 子検査結果**
			EGF R	KR AS	NR AS	PIK3 CA	BR AF	
NGS	cfDNA (血清) (DNA)	1	WT	G13 D	WT	H104 7R	WT	KRAS G13D/ PIK3CA H1047R
		2	WT	WT	WT	WT	WT	KRAS G13D/ PIK3CA E545K
		3	WT	WT	WT	E545 K	WT	PIK3CA E545K
		4	WT	Q61 H	WT	WT	WT	KRAS Q61H
		5	WT	Q61 H	WT	WT	WT	KRAS Q61H

10

20

【0248】

30

まとめると、これらの結果は、標準的なアプローチと比較して、組織サンプル及び液体生検の両方からの多様なDNA及びRNA変異を検出する際のLCPアプローチの使用を認証する。

【0249】

実施例3：コードされたマイクロキャリアを使用する血液及び組織サンプルからの肺癌関連変異の多重検出を実証する臨床試験データ

ステージIまたはII肺癌を有する患者からの液体生検（血液サンプル）または組織サンプルを使用して、上述したLCPアプローチを、がん関連変異の検出のための他の方法と比較した。

【0250】

40

まず、LCPアプローチを、NGSベースの検出方法であるOncoPrint Lung Cell-Free Total Nucleic Acid Research Assay（Cat. 番号A35864；Thermo Fisher Scientific, Inc.）から得られた結果と比較した。このアッセイは、全血の血漿画分から単離された肺腫瘍由来セルフリーDNA及びRNA（セルフリー総核酸；cfTNA）を検出するために使用する。20種の液体生検（血液サンプル）を、OncoPrintアッセイまたは本明細書に記載の包括的肺癌パネル（LCP）アプローチのいずれかを使用して肺癌関連変異について分析した。図10Aに示されているように、20種のサンプルからの結果は、ほぼ一致していた。

【0251】

50

次に、LCPアプローチを、EGFR、KRAS、またはPIK3CAにおける変異を検出するためのいくつかのPCRベースのアプローチから得られた結果と比較した。EGFRについては、リアルタイムPCRベースの検出方法であるcobas（登録商標）EGFR Mutation Test v2（Cat. 番号07248563190；Roche Molecular Diagnostics）を使用した。cobas（登録商標）EGFR Mutation Test v2アッセイは、T790M変異を含む、EGFRのエクソン18、19、20、及び21における42個の変異を同定するために使用した。結果をまた、KRASまたはPIK3CAにおける変異の検出を目的とした以下のデジタルPCR（dPCR）ベースの方法と比較した：Bio-Rad（登録商標）ddPCR（商標）KRAS G12/G13スクリーニングキット（Cat. 番号1863506；Bio-Rad）、PIK3CA p.E545K変異のためのBio-Rad（登録商標）PrimePCR（商標）ddPCR（商標）PIK3CA変異検出アッセイキット（Cat. 番号1863132；Bio-Rad）、Bio-Rad（登録商標）ddPCR（商標）変異検出アッセイ（Cat. 番号10042964；Bio-Rad）、及びPIK3CA変異のためのTaqMan（商標）Liquid Biopsy dPCRアッセイ（Cat. 番号A44177；Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific）。DNAを20種の組織サンプル（ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織、FFPET）から得、使用して、上記のPCRベースのアッセイまたは本明細書に記載の包括的肺癌パネル（LCP）アプローチを使用してEGFR、KRAS、またはPIK3CAにおける肺癌関連変異を検出した。図10Bに示されているように、20サンプルからの結果はほぼ一致し、LCPアプローチの実現可能性の検証に成功した。

10

20

30

【0252】

最後に、LCPアプローチを、固形腫瘍に対する既知の関連性を有する遺伝子のバイオマーカー分析のためのNGSベースの標的化再シーケンシングアッセイであるIllumina（登録商標）AmpliSeq（商標）Focus Panel（Cat. 番号20019164；Illumina）から得られた結果と比較した。RNAを20種の組織サンプルから得、使用してIllumina（登録商標）AmpliSeq（商標）Focus Panelまたは本明細書に記載の包括的肺癌パネル（LCP）アプローチを使用して肺癌関連変異を検出した。図10Cに示されているように、20種のサンプルからの結果は、ほぼ一致していた。

【0253】

まとめると、これらの結果は、他のNGSまたはPCRベースのアプローチと比較して、組織サンプルまたは液体生検を使用してDNA及びRNAからの多様な変異を検出する際のLCPアプローチの使用を認証した。

【0254】

上述の発明は、明確な理解のための例示説明及び例としてある程度詳細に記載されたが、これらの説明及び例は、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書で引用されるすべての特許及び科学文献の開示は、参照によりそれらの全体が明示的に組み込まれる。

40

50

【表 1 4 - 1】

表A1. DNA変異.

DNA 変異										
頻度	遺伝子	エクソン	ドメイン	アミノ酸変化	ヌクレオチド変化	COSMIC 番号	My Cancer Genomeにおける 各変異遺伝子 における頻度	COSMICからの 肺サンプルに おける変異 サンプル	各々の% 合計%	各遺伝子 における 総変異
15~25%	KRAS	エクソン 2	GTP結合	G12D	c.34G>C (GGT>CGT)	518	17%	1277	19.76%	6461
				G12V	c.34G>T (GGT>TGT)	516	20%	1478	22.88%	
				G12C	c.35G>A (GGT>GAT)	521	42%	2341	36.23%	
1%	NRAS	エクソン3	GTP結合	Q61L (A>T)	c.182A>T (CAA>CTA)	583	25~50%	26	29.21%	89
1~3%	PIK3CA	エクソン9	ヘリカル	E542K	c.1624G>A	760	8.9%	26	9.67%	269
				E545K	c.1633G>A	763	26.7%	69	25.65%	
				エクソン20	キナーゼ	H1047R	c.3140A>G	775	12.9%	
1~3%	BRAF	エクソン15	キナーゼ	V600E1	c.1799T>A	476	55%	127	43.34%	293
EGFR		エクソン18	キナーゼ	G719A	c.2156G>C	6239	0.60%	56	0.73%	7700
		エクソン19		E746_A750del	c.2235_2249del115	6223	48%	1034	13.43%	
				E746_A750del	c.2236_2250del115	6225		483	6.27%	
				T790M	c.2369C>T	6240	<5%	300	3.90%	5.04%
				C797S T>A	c.2389T>A	6493937	-	1	0.01%	
				C797S G>C	c.2390G>C	5945664	-	2	0.03%	
				S768I	c.2303G>T	6241	1.5~3%	41	0.53%	
		エクソン20		V769_D770insASV	c.2307_2308ins9GCCAGCGTG	12376	4~9.2%	10	0.13%	
				H773_V774insH	c.2319_2320insCAC	12377		6	0.08%	
				D770_N771insG	c.2310_2311insGGT	12378		8	0.10%	
				D770_N771insSVD	2311_2312ins9CGGTGGACA	13428		19	0.25%	
				p.V769_D770insASV	2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	13558		1	0.01%	

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

	エクソン 21	アレクストリン 相同性	pL858R (T>G)	c.2573T>G	6224	43%	2334	30.31%	30.31%	
1%	AKT1	エクソン4	E17K	c.49G>A	33765	88%	16	61.54%	61.54%	26
1%	MEK1	エクソン2	K57N	c.171G>T	1235478		7	25.00%	25.00%	28
2~4%	HER2	エクソン 20	p.Ala775_Gly776msYVMA	c.2324_2325ms12	20959	83~100%	47	28.14%	28.14%	167

10

20

30

40

50

【表 1 5】

表 A 2. RNA 変異.

頻度	遺伝子	融合体名	最終名	肺癌 における数	RNAバリアント				変異 サンプル	検査され たサンプル	肺おける%
					総バリアント の数	%	カバレ ージ				
3~7%	ALK	V1	E13;A20	175	387	45.22%	91.73%	355	9765	3.64%	
		V2	E20;A20	51		13.18%					
		V3a	E6a;A20	98		25.32%					
		V3b	E6b;A20	31		8.01%					
1~2%	ROS	CD74-ROS1	C6;R32	3	36	8.3%	100.00%	36	1678	2.15%	
			C6;R34	33		91.7%					
		SLC34A2-ROS1	S4;R32	6	9	66.7%	77.8%	7	1322	0.53%	
			S4;R34	1		11.1%					
1~2%	RET	KIF5B-RET	K15;R11	1	59	1.7%	91.5%	54	4009	1.35%	
			K15;R12	36		61.0%					
			K16;R12	12		20.3%					
			K22;R12	3		5.1%					
			K23;R12	2		3.4%					
			C8;N12	1		100.0%					
1~5%	NTRK1	CD74-NTRK1	-	1	1	100.0%	100.0%	COSMICにお ける記録なし		-	
4%	cMET	cMETエクソン14スキッピング							合計	4%	
										12%	

10

20

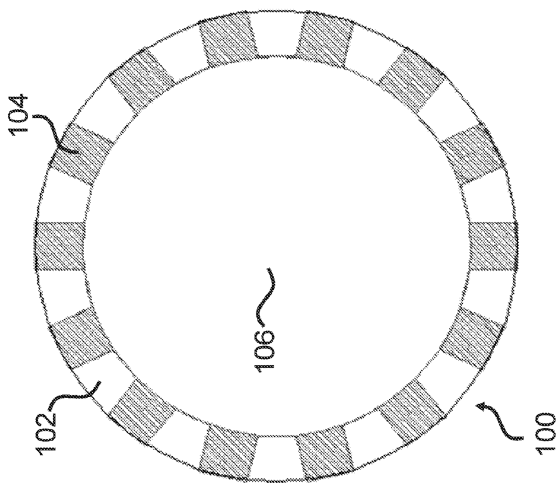
30

40

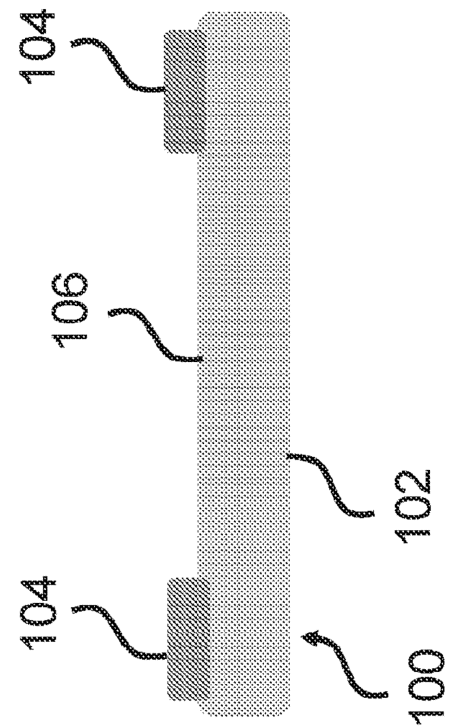
50

【図面】

【図 1 A】



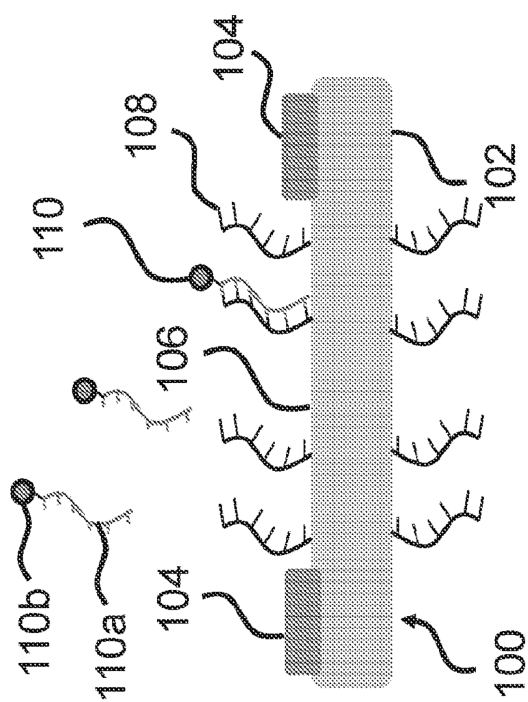
【図 1 B】



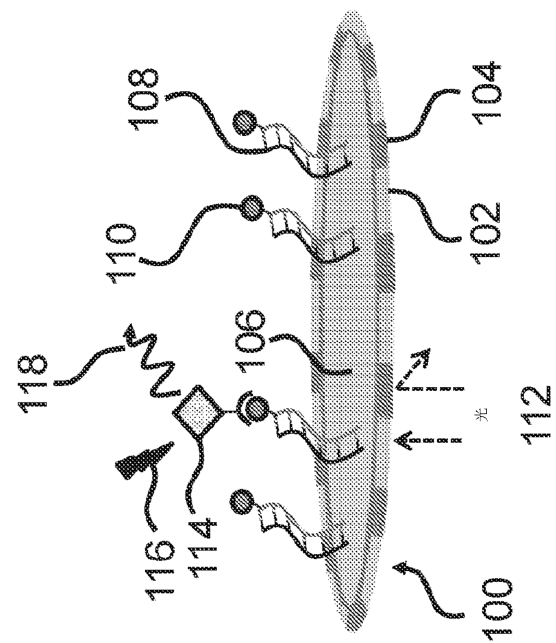
10

20

【図 1 C】



【図 1 D】

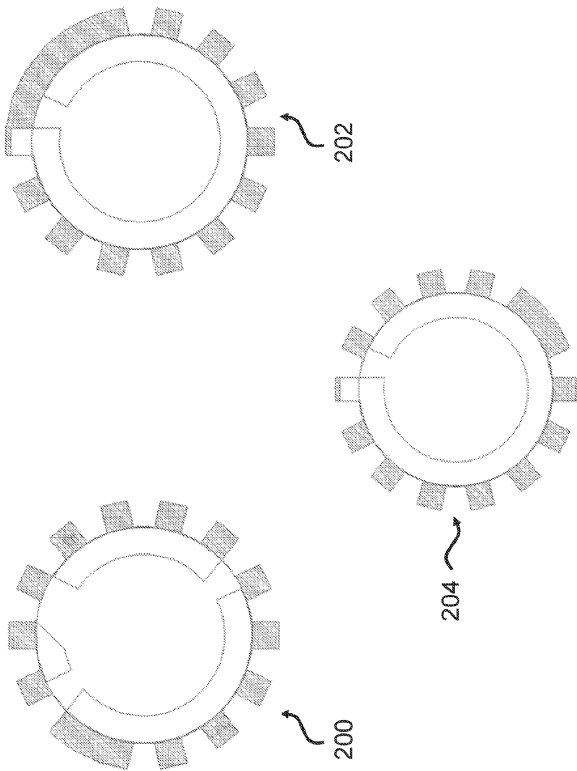


30

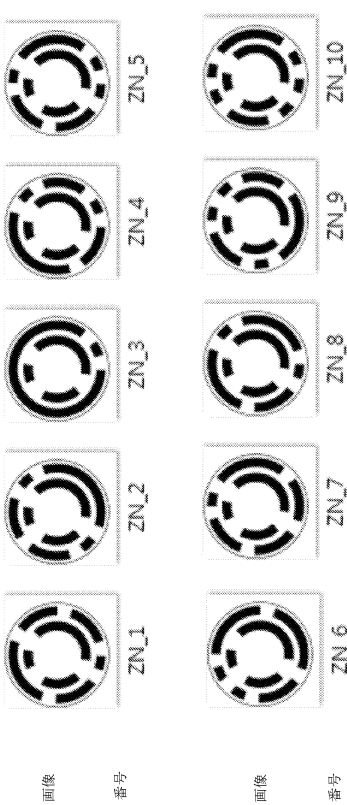
40

50

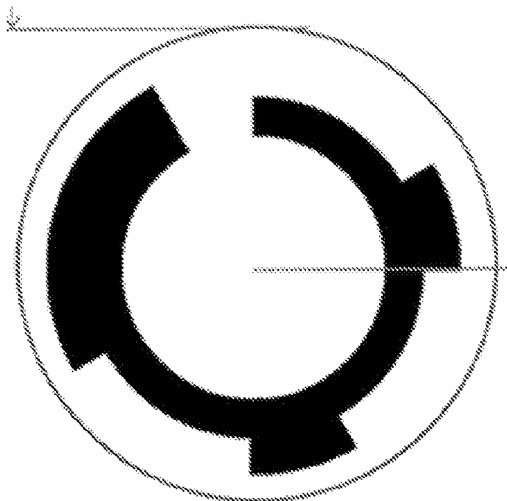
【図 2 A】



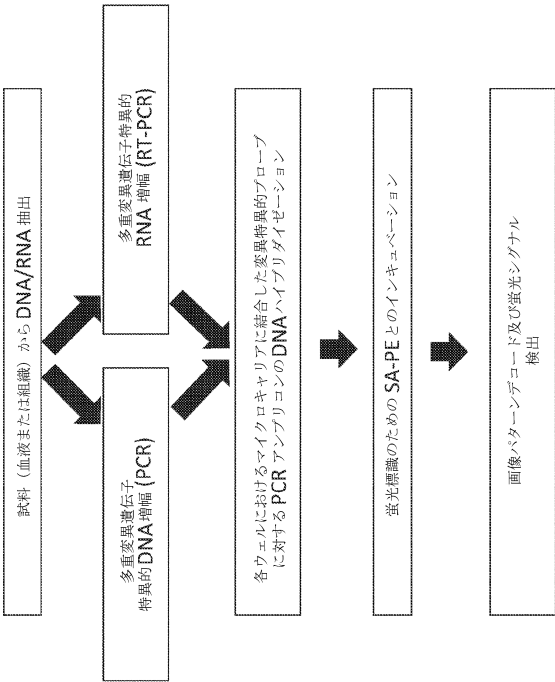
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 3】



10

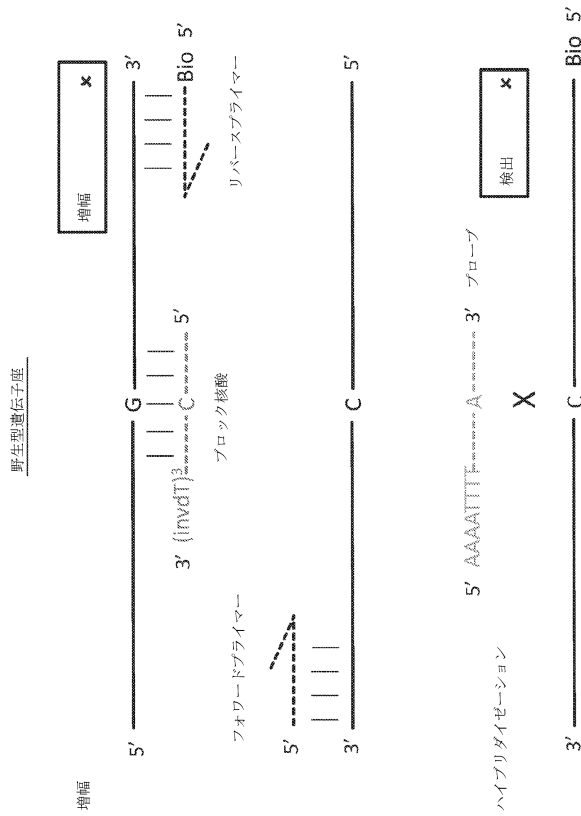
20

30

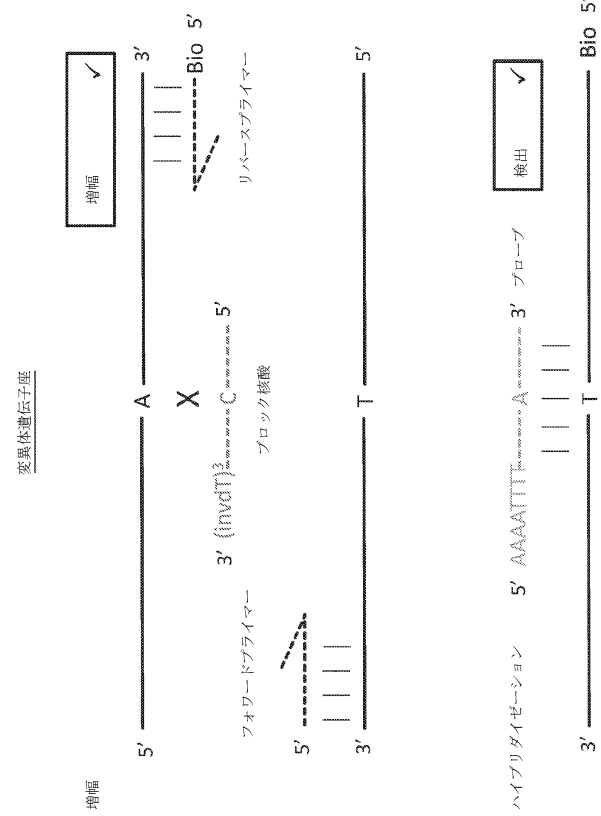
40

50

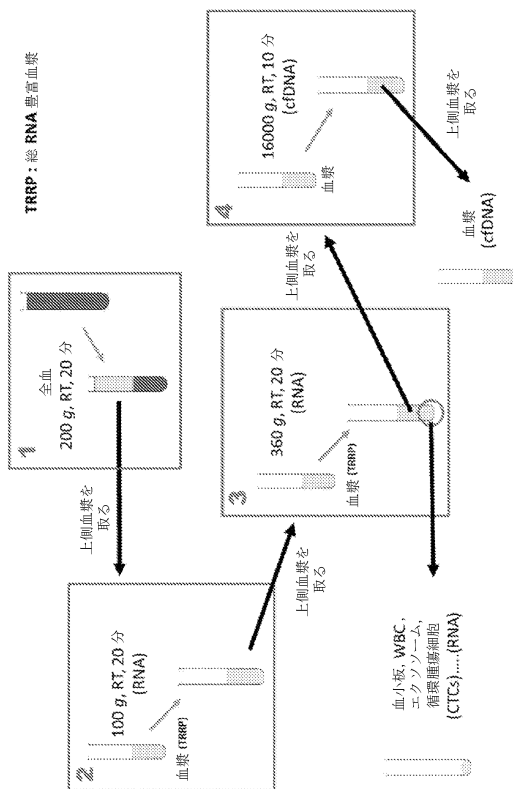
【圖 4】



【図 5】



【圖 6】



【図 7 A】

[illegible]

【図 7 B】

[illegible]

【圖 7 C】

DUA	G719A	G719C	E746A		E746B		L747A	L747B	L747C	L747D	L747E	L747F	L747G	L747H	L747I	L747J	L747K	L747L	L747M	L747N	L747O	L747P	L747Q	L747R	L747S	L747T	L747U	L747V	L747W	L747X	L747Y	L747Z	L747AA	L747AB	L747AC	L747AD	L747AE	L747AF	L747AG	L747AH	L747AI	L747AJ	L747AK	L747AL	L747AM	L747AN	L747AO	L747AP	L747AQ	L747AR	L747AS	L747AT	L747AU	L747AV	L747AW	L747AX	L747AY	L747AZ	L747BA	L747BB	L747BC	L747BD	L747BE	L747BF	L747BG	L747BH	L747BI	L747BJ	L747BK	L747BL	L747BM	L747BN	L747BO	L747BP	L747BQ	L747BR	L747BS	L747BT	L747BU	L747BV	L747BW	L747BX	L747BY	L747BZ	L747CA	L747CB	L747CC	L747CD	L747CE	L747CF	L747CG	L747CH	L747CI	L747CJ	L747CK	L747CL	L747CM	L747CN	L747CO	L747CP	L747CQ	L747CR	L747CS	L747CT	L747CU	L747CV	L747CW	L747CX	L747CY	L747CZ	L747DA	L747DB	L747DC	L747DD	L747DE	L747DF	L747DG	L747DH	L747DI	L747DJ	L747DK	L747DL	L747DM	L747DN	L747DO	L747DP	L747DQ	L747DR	L747DS	L747DT	L747DU	L747DV	L747DW	L747DX	L747DY	L747DZ	L747EA	L747EB	L747EC	L747ED	L747EE	L747EF	L747EG	L747EH	L747EI	L747EJ	L747EK	L747EL	L747EM	L747EN	L747EO	L747EP	L747EQ	L747ER	L747ES	L747ET	L747EU	L747EV	L747EW	L747EX	L747EY	L747EZ	L747FA	L747FB	L747FC	L747FD	L747FE	L747FF	L747FG	L747FH	L747FI	L747FJ	L747FK	L747FL	L747FM	L747FN	L747FO	L747FP	L747FQ	L747FR	L747FS	L747FT	L747FU	L747FV	L747FW	L747FX	L747FY	L747FZ	L747GA	L747GB	L747GC	L747GD	L747GE	L747GF	L747GG	L747GH	L747GI	L747GJ	L747GK	L747GL	L747GM	L747GN	L747GO	L747GP	L747GQ	L747GR	L747GS	L747GT	L747GU	L747GV	L747GW	L747GX	L747GY	L747GZ	L747HA	L747HB	L747HC	L747HD	L747HE	L747HF	L747HG	L747HH	L747HI	L747HJ	L747HK	L747HL	L747HM	L747HN	L747HO	L747HP	L747HQ	L747HR	L747HS	L747HT	L747HU	L747HV	L747HW	L747HX	L747HY	L747HZ	L747IA	L747IB	L747IC	L747ID	L747IE	L747IF	L747IG	L747IH	L747II	L747IJ	L747IK	L747IL	L747IM	L747IN	L747IO	L747IP	L747IQ	L747IR	L747IS	L747IT	L747IU	L747IV	L747IW	L747IX	L747IY	L747IZ	L747JA	L747JB	L747JC	L747JD	L747JE	L747JF	L747JG	L747JH	L747JI	L747JJ	L747JK	L747JL	L747JM	L747JN	L747JO	L747JP	L747JQ	L747JR	L747JS	L747JT	L747JU	L747JV	L747JW	L747JX	L747JY	L747JZ	L747KA	L747KB	L747KC	L747KD	L747KE	L747KF	L747KG	L747KH	L747KI	L747KJ	L747KK	L747KL	L747KM	L747KN	L747KO	L747KP	L747KQ	L747KR	L747KS	L747KT	L747KU	L747KV	L747KW	L747KX	L747KY	L747KZ	L747LA	L747LB	L747LC	L747LD	L747LE	L747LF	L747LG	L747LH	L747LI	L747LJ	L747LK	L747LL	L747LM	L747LN	L747LO	L747LP	L747LQ	L747LR	L747LS	L747LT	L747LU	L747LV	L747LW	L747LX	L747LY	L747LZ	L747MA	L747MB	L747MC	L747MD	L747ME	L747MF	L747MG	L747MH	L747MI	L747MJ	L747MK	L747ML	L747MM	L747MN	L747MO	L747MP	L747MQ	L747MR	L747MS	L747MT	L747MU	L747MV	L747MW	L747MX	L747MY	L747MZ	L747NA	L747NB	L747NC	L747ND	L747NE	L747NF	L747NG	L747NH	L747NI	L747NJ	L747NK	L747NL	L747NM	L747NN	L747NO	L747NP	L747NQ	L747NR	L747NS	L747NT	L747NU	L747NV	L747NW	L747NX	L747NY	L747NZ	L747OA	L747OB	L747OC	L747OD	L747OE	L747OF	L747OG	L747OH	L747OI	L747OJ	L747OK	L747OL	L747OM	L747ON	L747OO	L747OP	L747OQ	L747OR	L747OS	L747OT	L747OU	L747OV	L747OW	L747OX	L747OY	L747OZ	L747PA	L747PB	L747PC	L747PD	L747PE	L747PF	L747PG	L747PH	L747PI	L747PJ	L747PK	L747PL	L747PM	L747PN	L747PO	L747PP	L747PQ	L747PR	L747PS	L747PT	L747PU	L747PV	L747PW	L747PX	L747PY	L747PZ	L747QA	L747QB	L747QC	L747QD	L747QE	L747QF	L747QG	L747QH	L747QI	L747QJ	L747QK	L747QL	L747QM	L747QN	L747QO	L747QP	L747QQ	L747QR	L747QS	L747QT	L747QU	L747QV	L747QW	L747QX	L747QY	L747QZ	L747RA	L747RB	L747RC	L747RD	L747RE	L747RF	L747RG	L747RH	L747RI	L747RJ	L747RK	L747RL	L747RM	L747RN	L747RO	L747RP	L747RQ	L747RR	L747RS	L747RT	L747RU	L747RV	L747RW	L747RX	L747RY	L747RZ	L747SA	L747SB	L747SC	L747SD	L747SE	L747SF	L747SG	L747SH	L747SI	L747SJ	L747SK	L747SL	L747SM	L747SN	L747SO	L747SP	L747SQ	L747SR	L747SS	L747ST	L747SU	L747SV	L747SW	L747SX	L747SY	L747SZ	L747TA	L747TB	L747TC	L747TD	L747TE	L747TF	L747TG	L747TH	L747TI	L747TJ	L747TK	L747TL	L747TM	L747TN	L747TO	L747TP	L747TQ	L747TR	L747TS	L747TT	L747TU	L747TV	L747TW	L747TX	L747TY	L747TZ	L747UA	L747UB	L747UC	L747UD	L747UE	L747UF	L747UG	L747UH	L747UI	L747UJ	L747UK	L747UL	L747UM	L747UN	L747UO	L747UP	L747UQ	L747UR	L747US	L747UT	L747UU	L747UV	L747UW	L747UX	L747UY	L747UZ	L747VA	L747VB	L747VC	L747VD	L747VE	L747VF	L747VG	L747VH	L747VI	L747VJ	L747VK	L747VL	L747VM	L747VN	L747VO	L747VP	L747VQ	L747VR	L747VS	L747VT	L747VU	L747VV	L747VW	L747VX	L747VY	L747VZ	L747WA	L747WB	L747WC	L747WD	L747WE	L747WF	L747WG	L747WH	L747WI	L747WJ	L747WK	L747WL	L747WM	L747WN	L747WO	L747WP	L747WQ	L747WR	L747WS	L747WT	L747WU	L747WV	L747WW	L747WX	L747WY	L747WZ	L747XA	L747XB	L747XC	L747XD	L747XE	L747XF	L747XG	L747XH	L747XI	L747XJ	L747XK	L747XL	L747XM	L747XN	L747XO	L747XP	L747XQ	L747XR	L747XS	L747XT	L747XU	L747XV	L747XW	L747XX	L747XY	L747XZ	L747YA	L747YB	L747YC	L747YD	L747YE	L747YF	L747YG	L747YH	L747YI	L747YJ	L747YK	L747YL	L747YM	L747YN	L747YO	L747YP	L747YQ	L747YR	L747YS	L747YT	L747YU	L747YV	L747YW	L747YX	L747YY	L747YZ	L747ZA	L747ZB	L747ZC	L747ZD	L747ZE	L747ZF	L747ZG	L747ZH	L747ZI	L747ZJ	L747ZK	L747ZL	L747ZM	L747ZN	L747ZO	L747ZP	L747ZQ	L747ZR	L747ZS	L747ZT	L747ZU	L747ZV	L747ZW	L747ZX	L747ZY	L747ZZ	L747AA	L747AB	L747AC	L747AD	L747AE	L747AF	L747AG	L747AH	L747AI	L747AJ	L747AK	L747AL	L747AM	L747AN	L747AO	L747AP	L747AQ	L747AR	L747AS	L747AT	L747AU	L747AV	L747AW	L747AX	L747AY	L747AZ	L747BA	L747BB	L747BC	L747BD	L747BE	L747BF	L747BG	L747BH	L747BI	L747BJ	L747BK	L747BL	L747BM	L747BN	L747BO	L747BP	L747BQ	L747BR	L747BS	L747BT	L747BU	L747BV	L747BW	L747BX	L747BY	L747BZ	L747CA	L747CB	L747CC	L747CD	L747CE	L747CF	L747CG	L747CH	L747CI	L747CJ	L747CK	L747CL	L747CM	L747CN	L747CO	L747CP	L747CQ	L747CR	L747CS	L747CT	L747CU	L747CV	L747CW	L747CX	L747CY	L747CZ	L747DA	L747DB	L747DC	L747DD	L747DE	L747DF	L747DG	L747DH	L747DI	L747DJ	L747DK	L747DL	L747DM	L747DN	L747DO	L747DP	L747DQ	L747DR	L747DS	L747DT	L747DU	L747DV	L747DW	L747DX	L747DY	L747DZ	L747EA	L747EB	L747EC	L747ED	L747EE	L747EF	L747EG	L747EH	L747EI	L747EJ	L747EK	L747EL	L747EM	L747EN	L747EO	L747EP	L747EQ	L747ER	L747ES	L747ET	L747EU	L747EV	L747EW	L747EX	L747EY	L747EZ	L747FA	L747FB	L747FC	L747FD	L747FE	L747FF	L747FG	L747FH	L747FI	L747FJ	L747FK	L747FL	L747FM	L747FN	L747FO	L747FP	L747FQ	L747FR	L747FS	L747FT	L747FU	L747FV	L747FW	L747FX	L747FY	L747FZ	L747GA	L747GB	L747GC	L747GD	L747GE	L747GF	L747GG	L747GH	L747GI	L747GJ	L747GK	L747GL	L747GM	L747GN	L747GO	L747GP	L747GQ	L747GR	L747GS	L747GT	L747GU	L747GV	L747GW	L747GX	L747GY	L747GZ	L747HA	L747HB	L747HC	L747HD	L747HE	L747HF	L747HG	L747HH	L747HI	L747HJ	L747HK	L747HL	L747HM	L747HN	L747HO	L747HP	L747HQ	L747HR	L747HS	L747HT	L747HU	L747HV	L747HW	L747HX	L747HY	L747HZ	L747IA	L747IB	L747IC	L747ID	L747IE	L747IF	L747IG	L747IH	L747II	L747IJ	L747IK	L747IL	L747IM	L747IN	L747IO	L747IP	L747IQ	L747IR	L747IS	L747IT	L747IU	L747IV	L747IW	L747IX	L747IY	L747IZ	L747JA
-----	-------	-------	-------	--	-------	--	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

【図 8 A】

RNA データ								
	V1	V2	V3a	V3b	V4	V5a	V5b	V5"
ALK-v1	10564	0	0	0	0	0	0	0
ALK-v2	0	4779	0	0	0	0	0	0
ALK-v3a	0	0	13800	2098	0	0	0	0
ALK-v3b	0	0	6685	22407	0	0	0	0
ALK-v4	0	0	0	0	47386	0	0	0
ALK-v5a	0	0	0	0	0	14097	0	0
ALK-v5b	0	0	0	0	0	0	28481	0
ALK-v5"	0	0	0	0	0	0	0	6117
C074-ROS1(C6R32)	0	0	0	0	0	0	0	0
C074-ROS1(C6R34)	0	0	0	0	0	0	0	0
SIC3A2-ROS1(SL4R32)	0	0	0	0	0	0	0	0
SIC3A2-ROS1(SL4R34)	0	0	0	0	0	0	0	0
KIF5B-RET(K15H11)	0	0	0	0	0	0	0	0
KIF5B-RET(K15R12)	0	0	0	0	0	0	0	0
TRIM33-RET	0	0	0	0	0	0	0	0
CCDC6-RET	0	0	0	0	0	0	0	0
CD74-NTRK1	0	0	0	0	0	0	0	0
MPRIP-NTRK1	0	0	0	0	0	0	0	0
c-MET+エタニン ¹⁴ -キッピン ^ク	0	0	0	0	0	0	0	0
HPR11(参照遺伝子)	16624	14932	16336	16671	15996	16124	15891	16471
BC(内部対照)	3408	3623	3619	2249	1196	2750	3824	4004
ブランク				0	0	0	0	0

各 RNA
バリエーション
に特異的
なプローブ

【圖 8 B】

[illegible]

【図 9 A】

血液（液体生検）			
サンプル ID	Oncomine Lung cffTNA Research Assay (*1)		LCP 結果
	変異	アレル頻度	
1	変異 KRAS GQ1H (A>T)	0.1%	再構成
2	E545K	14.49%	なし
3	KRAS G12C	11.80%	変異
4	エクソン20ins	6.99%	E545K
5	KRAS G13D	0.05%	KRAS G12C
6	なし	-	エクソン20ins
7	なし	-	なし
8	KRAS G12A	0.06%	なし
9	なし	-	なし
10	N-A59T	0.05%	なし
11	なし	-	なし
12	L858R	0.11%	なし
13	なし	-	なし
14	G12D	0.08%	なし
15	なし	-	なし
16	エクソン19del	0.05%	なし
17	なし	-	なし
18	なし	-	なし
19	G12V	0.10%	なし
20	なし	-	なし

【図 9 B】

組織・DNA			
サンプル ID	ddPCR または NGS 結果		LCP 結果
	サンプル タイプ	ddPCR または NGS 結果	
1	1	T790M	T790M
2	2	WT	WT
3	3	WT	WT
4	4	p.L747_P753S, T790M	L747_P753S & T790M
5	5	p.E746_A750del & T790M	E746_A750del & T790M
6	6	p.L747_T751del	L747_T751del
7	7	WT	WT
8	8	WT	WT
9	9	V600E (23.1%)	V600E
10	10	V600E (2.4%)	WT
11	11	V600E (17%)	V600E
12	12	V600E (1.3%)	V600E
13	13	V600E (3.3%)	V600E
14	14	V600E (0.7%)	V600E
15	15	V600E (4%)	V600E
16	16	V600E (2.4%)	V600E
17	17	V600E (1%)	V600E
18	18	V600E (1.7%)	WT
19	19	V600E (8%)	V600E
20	20	V600E (26.5%)	V600E
21	21	V600E (1.7%)	V600E
22	22	V600E (17%)	V600E
23	23	V600E (4.3%)	V600E
24	24	G13D_H1047R	G13D_H1047R
25	25	G13D_E545K	WT
26	26	E545K	E545K
27	27	Q61H	Q61H

【図 10 A】

血液（液体生検）			
整理番号	Oncomine Lung cffTNA Research Assay (*1)		包括的肺癌パネル
	変異	アレル頻度	
NO.1	変異 KRAS GQ1H (A>T)	0.1%	再構成
NO.2	E545K	14.49%	なし
NO.3	KRAS G12C	11.80%	変異
NO.4	エクソン20ins	6.99%	E545K
NO.5	KRAS G13D	0.05%	KRAS G12C
NO.6	なし	-	エクソン20ins
NO.7	なし	-	なし
NO.8	KRAS G12A	0.06%	なし
NO.9	なし	-	なし
NO.10	N-A59T	0.05%	なし
NO.11	なし	-	なし
NO.12	L858R	0.11%	なし
NO.13	なし	-	なし
NO.14	G12D	0.08%	なし
NO.15	なし	-	なし
NO.16	エクソン19del	0.05%	なし
NO.17	なし	-	なし
NO.18	なし	-	なし
NO.19	G12V	0.10%	なし
NO.20	なし	-	なし

【図 10 B】

組織・DNA			
整理番号	Cobas (*2)		包括的肺癌パネル
	EGFR	dPCR (*3)	
NO.1	なし	KRAS, PIK3CA	変異
NO.2	エクソン19del	KRAS, 2.4%	G12A
NO.3	なし	まだない	E545K E545Q
NO.4	エクソン20ins	KRAS, 0.2%	G12V
NO.5	L858R	なし	なし
NO.6	エクソン19del	エクソン20ins (12376)	なし
NO.7	なし	L858R	なし
NO.8	なし	エクソン19del (6254)	なし
NO.9	エクソン19del	なし	H1047L
NO.10	まだない	なし	E545Q
NO.11	まだない	エクソン19del (6223)	なし
NO.12	なし	L858R	なし
NO.13	L858R	なし	G12A
NO.14	エクソン19del	なし	H1047R
NO.15	まだない	エクソン19del (6223)	なし
NO.16	エクソン19del	なし	なし
NO.17	まだない	エクソン19del (6225)	なし
NO.18	まだない	Del24	なし
NO.19	L858R	なし	G12D
NO.20	エクソン19del	L858R	なし

【図 10 C】

整理番号	組織 - RNA		包括的肺癌パネル
	Ampliseq for illumina focus panel (*4)	再構成	
1		なし	再構成
2		なし	なし
3		なし	なし
4		なし	なし
5		なし	なし
6		なし	なし
7		まだない	cMETex14 スキッピング
8		まだない	なし
9		まだない	なし
10		まだない	まだない
11		まだない	なし
12		cMETex14 スキッピング	cMETex14 スキッピング
13		cMETex14 スキッピング	cMETex14 スキッピング
14		なし	なし
15		なし	なし
16		まだない	なし
17		なし	なし
18		なし	なし
19		なし	なし
20		まだない	なし

10

20

【配列表】

202351030400001.app

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2021/012541
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6886 (2018.01)		
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)		
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) STN (databases Medline, CAPLus, Biosis, Embase) and EPOQUE (Patentw: EPODOC, WPIAP and all English language databases) keywords: cancer, biomarker, signature, microcarrier, and KRAS, NRAS, PIK3CA, BRAF, EGFR AKT1, MEK1, HER2, ALK, ROS, RET, NTRK1, cMET and like terms. Genome Quest SEQ ID NOs: 1-2, 5-23, 26-30, 32, 38-67, 78-280, 352-359, 363-364, 370-381, 387-398, 404-415, 421-521. Keyword filters: multiplex*, panel*, signature*. Inventor and applicant search (databases DOCDB, DWPI, PUBMED, THE LENS): PLEXBIO CO LTD, TSAO D. OR HUANG C. OR HU S OR CHANG F OR HSIEH Y[Author] and multiplex and cancer and lung [keywords] and like terms.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 22 April 2021		Date of mailing of the international search report 22 April 2021
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustalia.gov.au		Authorised officer Peta Snikeris AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832683

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/US2021/012541
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/107183 A1 (PLEXBIO CO., LTD.) 14 June 2018 Abstract, Example 1, Table A, [0013, 0019-0020, 0026, 0063, 0079, 0107, 0127], SEQ ID NOs 3, 10, 11, 51, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148 and 149.	1-263
Y	WO 2014/144121 A9 (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 18 September 2014 Abstract, [0005-0006, 0009]	1-263
Y	CN 107881232 A (SHANGHAI RENDONG MEDICAL SCIENCE LABORATORIES CO LTD) 06 April 2018 & EPO English language machine translation [0023, 0034]	1-263
Y	SU, Z. et al., 'A platform for rapid detection of multiple oncogenic mutations with relevance to targeted therapy in non-small-cell lung cancer.' The Journal of Molecular Diagnostics 2011, vol. 13, no. 1, pages 74-84. Abstract, Materials and Methods	1-78, 149-221
Y	KRIS, MG. et al., 'Using multiplexed assays of oncogenic drivers in lung cancers to select targeted drugs.' Jama 2014, vol. 311, no. 19, pages 1998-2006. Abstract, Materials and Methods	1-78, 149-221
Y	HOSGOOD III, HD. et al., 'Driver mutations among never smoking female lung cancer tissues in China identify unique EGFR and KRAS mutation pattern associated with household coal burning.' Respiratory medicine 2013, vol. 107, no. 11, pages 1755-1762. Abstract, Materials and Methods	1-78, 149-221
Y	KARLSSON, A. et al., 'A combined gene expression tool for parallel histological prediction and gene fusion detection in non-small cell lung cancer.' Scientific reports. 2019, vol. 9, no. 5207, pages 1-13. Abstract, Materials and Methods	79-134, 222-260
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/012541

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:
- SEQ ID NOs: 1-2, 5-23, 26-30, 32, 38-67, 78-280, 352-359, 363-364, 370-381, 387-398, 404-415, 421-521 searched.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/012541

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Box for Details

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2021/012541
Supplemental Box	
Continuation of: Box III This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. This Authority has found that there are 3 different inventions based on the following features: Invention 1: Independent claims 1 and 149: The feature common to this invention is a set of microcarriers for detecting DNA mutations in the group of genes KRAS, NRAS, PIK3CA, BRAF, EGFR AKT1, MEK1 and HER2. Invention 2: Independent claims 79 and 222: The feature common to this invention is a set of microcarriers for detecting RNA mutations including fusion genes and exon skipping in the group of genes ALK, ROS, RET, NTRK1 and cMET. Invention 3: Independent claims 135 and 261 to 263: The feature common to this invention is a set of microcarriers for detecting DNA and RNA mutations in a combination of the above two groups. PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art. When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention. In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is a set of microcarriers each microcarrier comprising: - a probe coupled to the microcarrier specific for a genetic mutation - an identifier corresponding to the probe coupled to the microcarrier. However such sets of microcarriers are disclosed in WO 2018/107183 A1 (Plexibo Co., Ltd) 14 June 2018 which discloses methods and kits for detecting the present of DNA mutations using microcarriers, each with a probe specific for a DNA mutation in the KRAS, BRAF, CTNNB1 or APC gene and an identifier unique to the probe set (Abstract). Therefore this common feature cannot be a special technical feature and the claims lack unity. As the applicant has timely paid the additional fees requested, all inventions have been included in the international search and opinion.	
Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2019)	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.	
Information on patent family members		PCT/US2021/012541	
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2018/107183 A1	14 June 2018	WO 2018107183 A1	14 Jun 2018
		CN 110382711 A	25 Oct 2019
		EP 3551767 A1	16 Oct 2019
		US 2018201983 A1	19 Jul 2018
		US 10894975 B2	19 Jan 2021
		US 2018195113 A1	12 Jul 2018
WO 2014/144121 A9	18 September 2014	WO 2014144121 A2	18 Sep 2014
		AU 2014227883 A1	15 Oct 2015
		AU 2014227883 B2	03 Sep 2020
		CN 105102635 A	25 Nov 2015
		CN 105102635 B	25 Sep 2020
		CN 105722996 A	29 Jun 2016
		EP 2971093 A2	20 Jan 2016
		EP 2971093 B1	19 Sep 2018
		EP 3044324 A1	20 Jul 2016
		EP 3434788 A1	30 Jan 2019
		JP 2016515380 A	30 May 2016
		US 2014288116 A1	25 Sep 2014
		US 2015080239 A1	19 Mar 2015
		US 2016265065 A1	15 Sep 2016
		US 2018155795 A1	07 Jun 2018
US 2020362421 A1	19 Nov 2020		
WO 2015038190 A1	19 Mar 2015		
CN 107881232 A	06 April 2018	CN 107881232 A	06 Apr 2018
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.			

10

20

30

40

50

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,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,IT,JO,JP,K
E,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,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

ストリート, ナンバー 351, 6エフ-1, シー/オー プレックスバイオ カンパニー,
リミテッド

(72)発明者 フー, シアン ピン

台湾 11491, タイペイ シティ, ネイフー ディストリクト, ヤングアン ストリート,
ナンバー 351, 6エフ-1, シー/オー プレックスバイオ カンパニー, リミテッド

(72)発明者 チャン, フェイ-ユイ

台湾 11491, タイペイ シティ, ネイフー ディストリクト, ヤングアン ストリート,
ナンバー 351, 6エフ-1, シー/オー プレックスバイオ カンパニー, リミテッド

(72)発明者 シエ, イー リン

台湾 11491, タイペイ シティ, ネイフー ディストリクト, ヤングアン ストリート,
ナンバー 351, 6エフ-1, シー/オー プレックスバイオ カンパニー, リミテッド

F ターム (参考) 4B063 QA01 QA13 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35 QR55
QR62 QS34 QS36 QS39