

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-500028

(P2014-500028A)

(43) 公表日 平成26年1月9日 (2014. 1. 9)

(51) Int. Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁)

(21) 出願番号 特願2013-545098 (P2013-545098) (86) (22) 出願日 平成23年12月17日 (2011. 12. 17) (85) 翻訳文提出日 平成25年6月18日 (2013. 6. 18) (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/006399 (87) 国際公開番号 W02012/084173 (87) 国際公開日 平成24年6月28日 (2012. 6. 28) (31) 優先権主張番号 61/426, 436 (32) 優先日 平成22年12月22日 (2010. 12. 22) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 591003013 エフ・ホフマン・ラ ロシュ アーゲー F. HOFFMANN-LA ROCH E AKTIENGESELLSCHAFT スイス・シーエイチ・４０７０バーゼル・ グレンツァーヘルストラッセ １２４ (74) 代理人 100099759 弁理士 青木 篤 (74) 代理人 100077517 弁理士 石田 敬 (74) 代理人 100087871 弁理士 福本 積 (74) 代理人 100087413 弁理士 古賀 哲次 最終頁に続く
---	--

(54) 【発明の名称】 ヒト上皮成長因子受容体遺伝子内の突然変異を検出するための方法及び組成物

## (57) 【要約】

本発明はヒト E G F R 遺伝子における癌誘発突然変異を検出するための試薬及び方法を含む。更に当該突然変異の検出方法及び治療方法が開示される。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試料中のヒト上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: E G F R) 核酸内の突然変異を検出する方法であって、

- (a) 前記試料中の核酸を、配列番号 2、10、18、27、32、51、60、71、82、93、及び 104 から選択されるオリゴヌクレオチドの一次配列を含むオリゴヌクレオチドと接触させ、
- (b) 前記 E G F R 核酸内の標的核酸への前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを許容する条件下で前記試料をインキュベートし、
- (c) 前記 E G F R 核酸内の標的核酸を含む増幅産物を生成し、
- (d) 前記増幅産物の存在を検出することにより、前記 E G F R 核酸内の突然変異の存在を検出することを含む方法。

10

**【請求項 2】**

配列番号 1 の対応部位に対し、少なくとも 1 つの追加のミスマッチを更に含むオリゴヌクレオチドに、前記試料中の核酸を接触させる、請求項 1 の方法。

**【請求項 3】**

環外アミノ基において修飾された塩基を有する少なくとも 1 つのヌクレオチドを更に含むオリゴヌクレオチドに、前記試料中の核酸を接触させる、請求項 1 の方法。

**【請求項 4】**

前記の環外アミノ基において修飾された塩基を有するヌクレオチドが、tert - ブチル - ベンジル - デオキシアデニン、tert - ブチル - ベンジル - デオキシシトシン、メチル - デオキシアデニン、メチル - デオキシキシトシン (deoxyxytosine)、エチル - デオキシアデニン、及びエチル - デオキシシトシンから選択される、請求項 3 の方法。

20

**【請求項 5】**

増幅をリアルタイム P C Rで行う、請求項 1 の方法。

**【請求項 6】**

悪性腫瘍を有する患者が E G F R 阻害剤に応答し得るか否かを決定する方法であって、

- (a) 前記患者由来の試料中の核酸を、配列番号 2、10、18、27、32、51、60、71、82、93、及び 104 から選択されるオリゴヌクレオチドの一次配列を含むオリゴヌクレオチドと接触させ、
- (b) 前記 E G F R 核酸内の標的核酸への前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを許容する条件下で前記試料をインキュベートし、前記 E G F R 核酸内の標的核酸を含む増幅産物を生成し、
- (c) 前記増幅産物の存在を検出することにより、前記 E G F R 核酸内の突然変異の存在を検出し、突然変異が存在する場合には、
- (d) 前記患者が E G F R 阻害剤に応答し得ると決定することを含む方法。

30

**【請求項 7】**

配列番号 1 の対応部位に対し、少なくとも 1 つの追加のミスマッチを更に含むオリゴヌクレオチドに、前記試料中の核酸を接触させる、請求項 6 の方法。

40

**【請求項 8】**

環外アミノ基において修飾された塩基を有する少なくとも 1 つのヌクレオチドをオリゴヌクレオチドに、前記試料中の核酸を接触させる、請求項 6 の方法。

**【請求項 9】**

前記の環外アミノ基において修飾された塩基を有するヌクレオチドが、tert - ブチル - ベンジル - デオキシアデニン、tert - ブチル - ベンジル - デオキシシトシン、メチル - デオキシアデニン、メチル - デオキシキシトシン (deoxyxytosine)、エチル - デオキシアデニン、及びエチル - デオキシシトシンから選択される、請求項 8 の方法。

**【請求項 10】**

工程 (b) の増幅及び工程 (c) の検出をリアルタイム P C Rで行う、請求項 6 の方法

50

。

【請求項 1 1】

前記 E G F R 阻害剤がセツキシマブ、パニツムマブ、エルロチニブ、又はゲフィチニブである、請求項 6 の方法。

【請求項 1 2】

ヒト上皮成長因子受容体 ( E G F R ) 遺伝子内の突然変異を検出するキットであって、  
( a ) 配列番号 2 ~ 7 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 8 のオリゴヌクレオチドとの対、

( b ) 配列番号 1 0 ~ 1 5 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 1 6 のオリゴヌクレオチドとの対、

( c ) 配列番号 1 8 ~ 2 4 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 2 5 のオリゴヌクレオチドとの対、

( d ) 配列番号 2 7 ~ 2 9 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 3 0 のオリゴヌクレオチドとの対、

( e ) 配列番号 3 2 ~ 4 8 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 4 9 のオリゴヌクレオチドとの対、

( f ) 配列番号 5 1 ~ 5 7 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 5 8 のオリゴヌクレオチドとの対、

( g ) 配列番号 6 0 ~ 6 8 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 6 9 のオリゴヌクレオチドとの対、

( h ) 配列番号 7 1 ~ 7 9 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 8 0 のオリゴヌクレオチドとの対、

( i ) 配列番号 8 2 ~ 9 0 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 9 1 のオリゴヌクレオチドとの対、

( j ) 配列番号 9 3 ~ 1 0 1 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 1 0 2 のオリゴヌクレオチドとの対、

( k ) 配列番号 1 0 4 ~ 1 0 6 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 1 0 7 のオリゴヌクレオチドとの対、

から選択される 1 又は 2 以上のオリゴヌクレオチド対を含むキット。

【請求項 1 3】

更に追加のオリゴヌクレオチドとして、

オリゴヌクレオチド対 ( a ) を有するキットの場合、更に配列番号 9 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 ( b ) を有するキットの場合、更に配列番号 1 7 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 ( c ) を有するキットの場合、更に配列番号 2 6 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 ( d ) を有するキットの場合、更に配列番号 3 1 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 ( e ) を有するキットの場合、更に配列番号 5 0 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 ( f ) を有するキットの場合、更に配列番号 5 9 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 ( g ) を有するキットの場合、更に配列番号 7 0 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 ( h ) を有するキットの場合、更に配列番号 8 1 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 ( i ) を有するキットの場合、更に配列番号 9 2 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 ( j ) を有するキットの場合、更に配列番号 1 0 3 のオリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチドを含み、  
オリゴヌクレオチド対 (k) を有するキットの場合、更に配列番号 108 のオリゴヌクレオチドを含む、  
請求項 12 のキット。

【請求項 14】

前記追加のオリゴヌクレオチドが標識されてなる、請求項 12 のキット。

【請求項 15】

更にヌクレオシド三リン酸、核酸ポリメラーゼ、及び前記核酸ポリメラーゼの機能に必要な緩衝剤を含む、請求項 12 のキット。

【請求項 16】

ヒト上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子内の突然変異を検出するための反応混合物であって、

(a) 配列番号 2 ~ 7 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 8 のオリゴヌクレオチドとの対、

(b) 配列番号 10 ~ 15 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 16 のオリゴヌクレオチドとの対、

(c) 配列番号 18 ~ 24 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 25 のオリゴヌクレオチドとの対、

(d) 配列番号 27 ~ 29 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 30 のオリゴヌクレオチドとの対、

(e) 配列番号 32 ~ 48 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 49 のオリゴヌクレオチドとの対、

(f) 配列番号 51 ~ 57 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 58 のオリゴヌクレオチドとの対、

(g) 配列番号 60 ~ 68 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 69 のオリゴヌクレオチドとの対、

(h) 配列番号 71 ~ 79 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 80 のオリゴヌクレオチドとの対、

(i) 配列番号 82 ~ 90 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 91 のオリゴヌクレオチドとの対、

(j) 配列番号 93 ~ 101 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 102 のオリゴヌクレオチドとの対、

(k) 配列番号 104 ~ 106 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 107 のオリゴヌクレオチドとの対、

から選択される 1 又は 2 以上のオリゴヌクレオチド対を含む反応混合物。

【請求項 17】

更に追加のオリゴヌクレオチドとして、

オリゴヌクレオチド対 (a) を有する反応混合物の場合、更に配列番号 9 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 (b) を有する反応混合物の場合、更に配列番号 17 のオリゴヌクレオチド；

オリゴヌクレオチド対 (c) を有する反応混合物の場合、更に配列番号 26 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 (d) を有する反応混合物の場合、更に配列番号 31 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 (e) を有する反応混合物の場合、更に配列番号 50 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 (f) を有する反応混合物の場合、更に配列番号 59 のオリゴヌクレオチドを含み、

オリゴヌクレオチド対 (g) を有する反応混合物の場合、更に配列番号 70 のオリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチドを含み、  
オリゴヌクレオチド対 ( h ) を有する反応混合物の場合、更に配列番号 8 1 のオリゴヌクレオチドを含み、  
オリゴヌクレオチド対 ( i ) を有する反応混合物の場合、更に配列番号 9 2 のオリゴヌクレオチドを含み、  
オリゴヌクレオチド対 ( j ) を有する反応混合物の場合、更に配列番号 1 0 3 のオリゴヌクレオチドを含み、  
オリゴヌクレオチド対 ( k ) を有する反応混合物の場合、更に配列番号 1 0 8 のオリゴヌクレオチドを含む、  
請求項 1 6 の反応混合物。

10

【請求項 1 8】

配列番号 2、1 0、1 8、2 7、3 2、5 1、6 0、7 1、8 2、9 3 及び 1 0 4 から選択されるオリゴヌクレオチドの一次配列を含むオリゴヌクレオチド。

【請求項 1 9】

配列番号 1 の対応部位に対する少なくとも 1 つの追加のミスマッチを更に含む、請求項 1 8 のオリゴヌクレオチド。

【請求項 2 0】

環外アミノ基において修飾された塩基を有する少なくとも 1 つのヌクレオチドを更に含む、請求項 1 8 のオリゴヌクレオチド。

【請求項 2 1】

前記の環外アミノ基において修飾された塩基を有するヌクレオチドが、tert - ブチル - ベンジル - デオキシアデニン、tert - ブチル - ベンジル - デオキシシトシン、メチル - デオキシアデニン、メチル - デオキシシトシン ( deoxyxytosine )、エチル - デオキシアデニン、及びエチル - デオキシシトシンから選択される、請求項 2 0 のオリゴヌクレオチド。

20

【請求項 2 2】

配列番号 3 ~ 7、1 1 ~ 1 5、1 9 ~ 2 4、2 8、2 9、3 3 ~ 4 8、5 2 ~ 5 7、6 1 ~ 6 8、7 2 ~ 7 9、8 3 ~ 9 0、9 4 ~ 1 0 1、1 0 5、及び 1 0 6 から選択されるオリゴヌクレオチド。

【請求項 2 3】

配列番号 8、1 6、2 5、3 0、4 9、5 8、6 9、8 0、9 1、1 0 2、及び 1 0 7 から選択されるオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 2 4】

配列番号 9、1 7、2 6、3 1、5 0、5 9、7 0、8 1、9 2、1 0 3、及び 1 0 8 から選択されるオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、癌診断及び癌治療のためのコンパニオン診断に関する。特に本発明は、診断及び予後、並びに癌の処置の有効性を予測するのに有用な、突然変異の検出に関する。

40

【背景技術】

【0 0 0 2】

上皮成長因子受容体 ( epidermal growth factor receptor : E G F R )、別名 H E R - 1 又は E r b - B 1 は、成長因子受容体の 1 型チロシンキナーゼファミリーの一員である。これらの膜結合タンパク質は細胞内チロシンキナーゼドメインを有し、これが R a s / M A P K、P I 3 K、及び A K T 経路を含む種々のシグナル伝達経路と相互作用する。これらの経路を通じて、H E R ファミリータンパク質は、細胞増殖、分化、及び生存を調節している。

【0 0 0 3】

一部の癌は E G F R キナーゼドメイン ( エクソン 1 8 ~ 2 1 ) 内に突然変異を有するこ

50

とが示されている (Pao et al. (2004). "EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib", P.N.A.S. 101 (36): 13306-13311; Sordella et al. (2004), "Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways", Science 305 (5687): 1163-1167.)。

#### 【 0 0 0 4 】

E G F Rを標的とする治療法が開発されてきた。例えば、セツキシマブ (ERBITUX (登録商標)) 及びパニツムマブ (VECTIBIX (登録商標)) は、抗 E G F R抗体である。エルロチニブ (TARCEVA (登録商標)) 及びゲフィチニブ (IRESSA (登録商標)) は、E G F Rチロシンキナーゼの経口用選択的阻害剤として有用なキナゾリンである。これらの薬物が最も有効なのは、E G F R遺伝子に突然変異を有する患者である。例えば、Mok et al. (2009) "Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma", N Eng J Med 361:947-957 は、E G F R突然変異陽性腫瘍を有する患者において、IRESSA (登録商標) により、化学療法と比べて無進行生存 (progression-free survival: P F S) が延長されたことを示している。E G F Rに突然変異を有さない腫瘍の場合には、逆の結果が得られた。P F SはIRESSA (登録商標) よりも化学療法の方が有意に長くなった。従って、患者の処置が成功する可能性を高めるには、E G F Rの突然変異状態を把握する必要がある。

#### 【 0 0 0 5 】

癌組織の E G F R遺伝子内に存在する突然変異は多数同定されている (米国特許第 7, 960, 118号及び同第 7, 294, 468号公報)。E G F Rキナーゼドメイン内に存在する突然変異のうち一部は頻発するが、他のものは発生頻度がより低い。しかし、E G F Rの突然変異の臨床試験は、できるだけ多くの突然変異を、十分な感度を以って検出することが不可欠である。これにより、希な突然変異を有する患者が、「偽陰性」 (false negative) の試験結果となり、救命治療の可能性が断たれてしまうのを防ぐことが可能となる。ここで課題となるのは、できるだけ多くの癌関連 E G F R突然変異を高い費用効率で調べるためのアッセイを設計することである。

#### 【 0 0 0 6 】

多重化 (multiplexing) に感受性であり、その影響を受けやすい技術の一つが、対立遺伝子特異的 P C R (allele-specific PCR: A S - P C R) である。この技術は、ある核酸配列の野生型変異体の存在下で、当該核酸配列内の突然変異又は多形を検出する。対立遺伝子特異的 P C Rが首尾よく実施されれば、標的核酸の所望の変異体が増幅される一方、他の変異体は、少なくとも検出可能なレベルに増幅されることはない。対立遺伝子特異的 P C Rでは、少なくとも1つのプライマーが対立遺伝子に特異的である。これにより、当該配列の特定の変異体が存在する場合にのみ、プライマー伸長が生じる。同一の反応混合物内に、1又は2以上の多形部位を標的とする1又は2以上の対立遺伝子特異的プライマーが存在していてもよい。首尾よく機能する対立遺伝子特異的プライマーが設計できるか否かは予測し得ない。既知の配列を基準としてプライマーを設計するのが通常であるが、極めて類似する複数の配列を識別可能なプライマーを設計する場合には、定石は存在しない。

#### 【 0 0 0 7 】

診断アッセイにおいては、正確な識別が要求される。例えば、E G F R突然変異検出においては、対立遺伝子特異的プライマーの性能が、患者の癌治療の方針を左右する場合もある。

#### 【 0 0 0 8 】

対立遺伝子特異的 P C Rは、E G F R遺伝子の突然変異の検出にも利用されている (米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 2 6 1 2 1 9号公報)。しかし、最大数の E G F R突然変異を最高の特異性及び感度で検出可能な、包括的なアッセイ法が求められている。

#### 【 発明の概要 】

#### 【 課題を解決するための手段 】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 0 9 】

一態様によれば、本発明は、試料中のヒト上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: E G F R) 核酸内の突然変異を検出する方法であって、前記試料中の核酸を請求項 1 のオリゴヌクレオチドと接触させ；前記 E G F R 核酸内の標的核酸への前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを許容する条件下で前記試料をインキュベートし；前記 E G F R 核酸内の標的核酸を含む増幅産物を生成し；前記増幅産物の存在を検出することにより、前記 E G F R 核酸内の突然変異の存在を検出することを含む方法である。

## 【 0 0 1 0 】

更なる態様によれば、本発明は、上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: E G F R) 遺伝子内に突然変異を有する細胞を含有する可能性のある腫瘍を有する患者を治療する方法であって、前記患者由来の試料中の核酸を請求項 1 のオリゴヌクレオチドと接触させ；前記 E G F R 核酸内の標的核酸への前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを許容する条件下で前記試料をインキュベートし；前記 E G F R 核酸内の標的核酸を含む増幅産物を生成し；前記増幅産物の存在を検出することにより、前記 E G F R 核酸内の突然変異の存在を検出し、突然変異が存在する場合には、前記変異遺伝子によりコードされる変異 E G F R タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物を患者に投与することを含む方法である。

## 【 0 0 1 1 】

更に別の態様によれば、本発明は、悪性腫瘍を有する患者の E G F R 阻害剤による治療が有効である可能性が高いか否かを決定する方法であって、前記患者由来の試料中の核酸を請求項 1 のオリゴヌクレオチドと接触させ；前記 E G F R 核酸内の標的核酸への前記オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを許容する条件下で前記試料をインキュベートし；前記 E G F R 核酸内の標的核酸を含む増幅産物を生成し；前記増幅産物の存在を検出することにより、前記 E G F R 核酸内の突然変異の存在を検出し、突然変異が存在する場合には、治療が有効である可能性が高いと決定することを含む方法である。

## 【 0 0 1 2 】

更なる態様によれば、本発明は、( a ) 配列番号 2 ~ 7 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 8 のオリゴヌクレオチドとの対、( b ) 配列番号 1 0 ~ 1 5 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 1 6 のオリゴヌクレオチドとの対、( c ) 配列番号 1 8 ~ 2 4 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 2 5 のオリゴヌクレオチドとの対、( d ) 配列番号 2 7 ~ 2 9 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 3 0 のオリゴヌクレオチドとの対、( e ) 配列番号 3 2 ~ 4 8 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 4 9 のオリゴヌクレオチドとの対、( f ) 配列番号 5 1 ~ 5 7 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 5 8 のオリゴヌクレオチドとの対、( g ) 配列番号 6 0 ~ 6 8 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 6 9 のオリゴヌクレオチドとの対、( h ) 配列番号 7 1 ~ 7 9 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 8 0 のオリゴヌクレオチドとの対、( i ) 配列番号 8 2 ~ 9 0 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 9 1 のオリゴヌクレオチドとの対、( j ) 配列番号 9 3 ~ 1 0 1 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 1 0 2 のオリゴヌクレオチドとの対、( k ) 配列番号 1 0 4 ~ 1 0 6 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 1 0 7 のオリゴヌクレオチドとの対、から選択される 1 又は 2 以上のオリゴヌクレオチド対を含むキットである。

## 【 0 0 1 3 】

更に別の態様によれば、本発明は、ヒト上皮成長因子受容体 ( E G F R ) 遺伝子内の突然変異を検出するための反応混合物であって、( a ) 配列番号 2 ~ 7 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 8 のオリゴヌクレオチドとの対、( b ) 配列番号 1 0 ~ 1 5 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 1 6 のオリゴヌクレオチドとの対、( c ) 配列番号 1 8 ~ 2 4 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 2 5 のオリゴヌクレオチドとの対、( d ) 配列番号 2 7 ~ 2 9 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 3 0 のオリゴヌクレオチドとの対、( e ) 配列番号 3 2 ~ 4 8 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列

10

20

30

40

50

番号 49 のオリゴヌクレオチドとの対、( f ) 配列番号 51 ~ 57 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 58 のオリゴヌクレオチドとの対、( g ) 配列番号 60 ~ 68 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 69 のオリゴヌクレオチドとの対、( h ) 配列番号 71 ~ 79 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 80 のオリゴヌクレオチドとの対、( i ) 配列番号 82 ~ 90 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 91 のオリゴヌクレオチドとの対、( j ) 配列番号 93 ~ 101 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 102 のオリゴヌクレオチドとの対、( k ) 配列番号 104 ~ 106 のうち 1 のオリゴヌクレオチドと、配列番号 107 のオリゴヌクレオチドとの対、から選択される 1 又は 2 以上のオリゴヌクレオチド対を含む反応混合物である。

【0014】

更に別の態様によれば、本発明は、配列番号 2、10、18、27、32、51、60、71、82、93 及び 104 から選択されるオリゴヌクレオチドの一次配列を含むオリゴヌクレオチドである。別の態様によれば、本発明は、配列番号 3 ~ 7、11 ~ 15、19 ~ 24、28、29、33 ~ 48、52 ~ 57、61 ~ 68、72 ~ 79、83 ~ 90、94 ~ 101、105 及び 106 から選択されるオリゴヌクレオチドである。更に別の態様によれば、本発明は、配列番号 8、16、25、30、49、58、69、80、91、102 及び 107 から選択されるオリゴヌクレオチドである。更に別の態様によれば、本発明は、配列番号 9、17、26、31、50、59、70、81、92、103 及び 108 から選択されるオリゴヌクレオチドであって、任意により検出可能なレベルを含んでいてもよいオリゴヌクレオチドである。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図 1 A】図 1 A ~ C はヒト EGF R 遺伝子のコーディング配列 (配列番号 1) である。

【図 1 B】同上。

【図 1 C】同上。

【発明を実施するための形態】

【0016】

定義：

この開示の理解を容易にするために、本明細書に使用される用語の次の定義が提供される。

【0017】

用語「X [ n ] Y」とは、アミノ酸配列内の位置 [ n ] でのアミノ酸 Y によるアミノ酸 X の置換をもたらすミスセンス変異を言及する。例えば、用語「B 7 1 9 A」とは、位置 7 1 9 でのグリシンがアラニンにより置換されている突然変異を言及する。

【0018】

用語「対立遺伝子 - 特異的プライマー (対立遺伝子特異的 primer)」又は「AS プライマー (AS primer)」とは、標的配列の 1 よりも多くの変異体にハイブリダイズするが、しかし 1 つの変異体とのみ、プライマーは適切な条件下で核酸ポリメラーゼにより効果的にエクステンデされることにおいて、標的配列の変異体間で識別できるプライマーを言及する。標的配列の他の変異体とは、エクステンション (extension) はあまり効率的でないか又は非効率的である。

【0019】

用語「共通プライマー (common primer)」とは、対立遺伝子 - 特異的プライマーを含むプライマー対における第二プライマーを言及する。共通プライマーは、対立遺伝子 - 特異的ではなく、すなわち遺伝子 - 特異的プライマーが識別する標的配列の変異体間を識別しない。

【0020】

用語「相補的 (complementary)」又は「相補性 (complementarity)」とは、ワトソン - クリック塩基対合規則により関連付けられるポリヌクレオチドの逆並行鎖を参照して使用される。用語「完全に相補的 (perfectly complementary)」又は「100% 相補的 (100

10

20

30

40

50



% complementary)」とは、逆並行鎖間のすべての塩基のワトソン - クリック対合を有する、すなわちポリヌクレオチド重複体 (duplex) におけるいずれかの 2 個の塩基間にミスマッチが存在しない相補的配列を言及する。しかしながら、重複体は、完全な相補性の不在下でさえ、逆平行鎖間で形成される。用語「部分的に相補的 (partially complementary)」又は「不完全に相補的 (incompletely complementary)」とは、100% 未満、完全である (例えば、ポリヌクレオチド重複体に少なくとも 1 つのミスマッチ又は不整合塩基が存在する)、逆平行ポリヌクレオチド鎖間の塩基のいずれかのアラインメントを言及する。部分的相補鎖間の重複体は一般的に、完全な相補鎖間の重複体ほど安定ではない。

【0021】

用語「試料 (sample)」とは、核酸を含むか又は含むと推定されるいずれかの組成物を言及する。これは、個人から単離された組織又は体液、例えば皮膚、血漿、血清、髄液、リンパ液、滑液、尿、涙、血液細胞、臓器及び腫瘍の試料、及びまた、個人から採取された細胞から確立されたインビトロ培養物、例えばホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPET) 及びそれから単離された核酸の試料を包含する。

10

【0022】

用語「ポリヌクレオチド (polynucleotide)」及び「オリゴヌクレオチド (oligonucleotide)」は、交換可能的に使用される。「オリゴヌクレオチド」は、より短いポリヌクレオチドを説明するために時々使用される用語である。オリゴヌクレオチドは、企画されるヌクレオチド配列の領域に対応する、少なくとも 6 個のヌクレオチド、例えば少なくとも約 10 - 12 個のヌクレオチド、又は少なくとも約 15 - 30 個のヌクレオチドから構成され得る。

20

【0023】

用語「一次配列 (primary sequence)」とは、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチドにおけるヌクレオチドの配列を言及する。ヌクレオチド修飾、例えば含窒素塩基修飾、糖修飾又は他の骨格修飾は、一次配列の一部ではない。ラベル、例えばオリゴヌクレオチドに接合される発色団もまた、一次配列の一部ではない。従って、2 つのオリゴヌクレオチドは、同じ一次配列を共有することができるが、しかし修飾及びラベルに関して異なる。

【0024】

用語「プライマー (primer)」とは、標的核酸における配列とハイブリダイズし、そして合成のために適切な条件下で核酸の相補的鎖に沿っての合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを言及する。本明細書において使用される場合、用語「プローブ (probe)」とは、標的核酸中の配列とハイブリダイズし、そして通常、検出可能なラベルされるオリゴヌクレオチドを言及する。プローブは、修飾、例えばプローブを、核酸ポリメラーゼ及び 1 又は 2 以上の発色団により非エクステンション可能性にする 3' - 末端修飾を有することができる。同じ配列を有するオリゴヌクレオチドは、1 つのアッセイにおいてプライマーとして、及び異なったアッセイにおいてプローブとして機能することができる。

30

【0025】

本明細書において使用される場合、用語「標的配列 (target sequence)」、「標的核酸 (target nucleic acid)」又は「標的物 (target)」とは、増幅されるか、検出されるか、又は両者である核酸配列の一部を言及する。

40

【0026】

用語「ハイブリダイズされる (hybridized)」及び「ハイブリダイゼーション (hybridization)」とは、重複体の形成をもたらす 2 つの核酸間の塩基対合相互作用を言及する。2 つの核酸は、ハイブリダイゼーションを達成するのにそれらの全長にわたって 100% 相補性を有することは必要条件ではない。

【0027】

ヒト E G F R cDNA (配列番号 1) のコーディング部分は、図 1 (1A - 1C) 上に示されており (Ensemble 参照番号 ENST00000275493、www.ensembl.org、Hubbard et al.

50

(2009), Ensembl 2009, Nucl. Acids Res. 37 (suppl 1): D690-D697を参照のこと)、これは、完全 E G F R c D N A 配列 ( N C B I 受託番号 N M \_ 005228.3 ) の一部である。癌患者において頻繁に変異されるコドンのいくつかは、下線を引かれ、そして太字で示されている。

#### 【 0 0 2 8 】

対立遺伝子 - 特異的 P C R は、米国特許第 6 , 6 2 7 , 4 0 2 号に記載されている。対立遺伝子 - 特異的 P C R においては、識別プライマーは、標的配列の所望する変異体に対して相補的であるが、しかし標的配列の所望しない変異体とはミスマッチされる配列を有する。典型的には、プライマーにおける識別ヌクレオチド、すなわち標的配列のわずか 1 つの変異体をマッチングするヌクレオチドは、3' - 末端ヌクレオチドである。しかしながら、プライマーの 3' 末端は、特異性の多くの決定因子の単なる 1 つである。対立遺伝子 - 特異的 P C R の特異性は、マッチしたプライマーのエクステンション速度よりもミスマッチプライマーのより遅いエクステンション速度に起因し、究極的には、ミスマッチ標的物の相対的増幅効率を低める。低められたエクステンション動力学及び従って、P C R 特異性は、多くの要因、例えば酵素の性質、反応成分及びそれらの濃度、エクステンション濃度及びミスマッチの全体的な配列コンテキスト ( sequence context ) により影響される。個々の特定のプライマーに対するそれらの要因の効果は、確実には定量化され得ない。信頼できる定量的ストラジーなしには、及び莫大に多くの変数を伴っては、対立遺伝子 - 特異的プライマーの企画は、しばしば驚くべき結果を伴っての試行錯誤の問題である。下記 E G F R の変異対立遺伝子の場合、試験されるプライマーの一部のみが、適切な性能、すなわち許容可能な P C R 効率及び同時に、変異体と野生型鋳型との間の識別性を与えられた。

10

20

#### 【 0 0 2 9 】

対立遺伝子 - 特異的プライマーの特異性を高めるための 1 つのアプローチは、末端ミスマッチの他に、内部ミスマッチヌクレオチドを含むことによってである。2009 年 10 月 20 日に出願された米国特許出願番号 2010 / 0099110 号を参照のこと。プライマー中の内部ミスマッチヌクレオチドは、所望する及び所望しない両標的配列とミスマッチされ得る。ミスマッチは所望する及び所望しない両鋳型とのプライマー - 鋳型ハイブリッドを不安定化するので、ミスマッチのいくつかは、両鋳型の増幅を妨げ、そして P C R の失敗を引起す。従って、特定の対立遺伝子 - 特異的 P C R プライマーに対するそれらの内部ミスマッチの効果は、予測され得ない。

30

#### 【 0 0 3 0 】

プライマーの好結果をもたらすエクステンションのためには、プライマーは、標的配列に対しての少なくとも部分的相補性を有する必要がある。一般的に、プライマーの 3' - 末端での相補性は、プライマーの 5' - 末端での相補性よりもより決定的である ( Innis et al. Eds., PCR Protocols, (1990) Academic Press, Chapter 1, pp. 9-11 )。従って、本発明は、表 1 - 7 に開示されるプライマー、及び 5' - 末端変異を有するそれらのプライマーの変異体を包含する。

#### 【 0 0 3 1 】

一般的に P C R 増幅に関しては、プライマー特異性はプライマー中のヌクレオチドの化学的修飾の使用より高められ得ることは、これまでに記載されている。環外アミノ基の共有結合修飾を有するヌクレオチド及び P C R へのそのようなヌクレオチドの使用は、アメリカ特許第 6 , 0 0 1 , 6 1 1 号に記載されている。修飾は所望する及び所望しない両鋳型を有するプライマー - 鋳型ハイブリッドにおけるワトソン - クリック水素結合を破壊するので、修飾のいくつかは両鋳型の増幅を妨げ、そして P C R の失敗を引起すことができる。従って、対立遺伝子 - 特異的 P C R に対するそれらの共有結合修飾の効果は予測され得ない。

40

#### 【 0 0 3 2 】

一つの態様によれば、本発明は、表 1 - 7 に開示されるプライマーを用いて、E G F R 突然変異を検出するための診断方法である。前記方法は、核酸の試験試料と、表 1 - 7 か

50

ら選択される E G F R 突然変異のための 1 又は 2 以上の対立遺伝子 - 特異的プライマーとを、その対応する第二プライマー（任意には、また表 1 - 7 から選択される）、ヌクレオシド三リン酸及び核酸ポリメラーゼの存在下で接触せしめ、その結果、前記 1 又は 2 以上の対立遺伝子 - 特異的プライマーが、E G F R 突然変異が試料に存在する場合でのみ、効果的にエクステンションされ；そしてエクステンション産物の存在又は不在を検出することにより、E G F R 突然変異の存在又は不在を検出することを含んで成る。

【0033】

特定の態様によれば、エクステンション産物の存在は、プローブにより検出される。この態様の変動によれば、プローブは表 1 - 7 から選択される。プローブは、放射性、蛍光性又は発色団ラベルによりラベルされ得る。例えば、突然変異は、リアルタイムポリメラーゼ鎖反応（r t - P C R）によりエクステンション産物の増幅を検出することにより検出され得、ここでエクステンション産物へのプローブのハイブリダイゼーションがプローブの酵素消化及び得られる蛍光の検出をもたらす（TaqMan（登録商標）プローブ方法、Holland et al. (1991), P.N.A.S. USA 88:7276-7280）。r t - P C R における増幅産物の存在はまた、プローブとエクステンション産物との間での核酸重複体の形成による蛍光変化を検出することにより検出され得る（米国特許出願番号 2 0 1 0 / 0 1 4 3 9 0 1 号）。他方では、エクステンション産物及び増幅産物の存在は、例えば Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001), Molecular Cloning, 3<sup>rd</sup> ed. CSHL Press, Chapters 5 and 9 に記載されるように、ゲル電気泳動、続く染色又はプロテイング及びハイブリダイゼーションにより検出され得る。

10

20

【0034】

別の態様によれば、本発明は、変異 E G F R 遺伝子により、腫瘍をたぶん保持する細胞を有する患者を治療する方法である。前記方法は、患者からの試料と、表 1 - 7 から選択される E G F R 突然変異のための 1 又は 2 以上の対立遺伝子 - 特異的プライマーとを、対応する第二プライマー（任意には、また表 1 - 7 から選択される）の存在下で接触せしめ、対立遺伝子 - 特異的増幅を実施し、そしてエクステンション産物の存在又は不在を検出することにより E G F R 突然変異の存在又は不在を検出し、そして少なくとも 1 つの突然変異が見出される場合、突然変異誘発された遺伝子によりコードされる変異 E G F R タンパク質のシグナル伝達を阻害する化合物を患者に投与することを含んで成る。個々の突然変異に関して、検出は対応するプローブ（任意には、また表 1 - 7 から選択される）を用いて実施され得る。

30

【0035】

別の態様によれば、本発明は、E G F R 阻害剤による悪性腫瘍を有する患者の治療が成功する可能性があるかどうかを決定する方法である。前記方法は、患者からの試料と、表 1 - 7 から選択された E G F R 突然変異のための 1 又は 2 以上の対立遺伝子 - 特異的プライマーとを、1 又は 2 以上の対応する第二プライマー（任意には、また表 1 - 7 から選択される）の存在下で接触せしめ、対立遺伝子 - 特異的増幅を実施し、そしてエクステンション産物の存在又は不在を検出することにより E G F R 突然変異の存在又は不在を検出し、そして少なくとも 1 つの突然変異が見出される場合、治療が成功する可能性があることを決定することを含んで成る。個々の突然変異に関して、検出は対応するプローブ（任意には、また表 1 - 7 から選択される）を用いて実施され得る。この態様の変動によれば、E G F R 阻害剤は、セツキシマブ（cetuximab）、パニツムマブ（panitumumab）、エルロチニブ（erlotinib）及びゲフィチニブ（gefitinib）である。

40

【0036】

さらなる別の態様によれば、本発明は、E G F R 遺伝子における突然変異を検出するために必要な試薬を含むキットである。試薬は、表 1 - 7 から選択された E G F R 突然変異のための 1 又は 2 以上の対立遺伝子 - 特異的プライマー、1 又は 2 以上の対応する第二プライマー（任意には、また表 1 - 7 から選択される）、及び任意には、1 又は 2 以上のプローブ（任意には、また表 1 - 7 から選択される）を含む。キットはさらに、増幅及び検出アッセイの実施のために必要な試薬、例えばヌクレオシド三リン酸、核酸ポリメラーゼ

50

、及び前記ポリメラーゼの機能のために必要な緩衝液を含む。いくつかの態様によれば、プローブは検出可能的にラベルされる。そのような態様によれば、キットはラベリングし、そしてラベルを検出するための試薬を含むことができる。

#### 【0037】

さらなる別の態様によれば、本発明は、EGFR遺伝子における突然変異を検出するための反応混合物である。前記反応混合物は、表1-7から選択されたEGFR突然変異のための1又は2以上の対立遺伝子-特異的プライマー、1又は2以上の対応する第二プライマー（任意には、また表1-7から選択される）、及び任意には、1又は2以上のプローブ（任意には、また表1-7から選択される）を含む。反応混合物はさらに、試薬、例えばヌクレオシド三リン酸、核酸ポリメラーゼ、及び前記ポリメラーゼの機能のために必要な緩衝液を含む。

10

#### 【0038】

さらなる別の態様によれば、本発明は単一の管に、複数のEGFR突然変異を同時に検出するためのオリゴヌクレオチドを含む。1つの態様によれば、本発明は、ヒトEGFR遺伝子（表1-7）における突然変異を特異的に検出するためのオリゴヌクレオチド（配列番号2-108）を含む。それらのプライマーのいくつかは、表1-7に示されるように内部ミスマッチ及び共有結合修飾を含む。オプションとして、本発明の対立遺伝子-特異的プライマーは、「共有（common）」の、すなわち対立遺伝子-特異的でない第二プライマーと対合され得る。開示される第二プライマーの使用は任意である。いずれか他の適切な下流プライマーが、本発明の対立遺伝子-特異的プライマーと対合され得る。

20

#### 【実施例】

#### 【0039】

典型的な反応条件：

プライマーの性能を試験するために使用される典型的な反応条件は次の通りである。50 mMのトリス-HCl (pH 8.0)、80-100 mMの塩化カリウム、200 µMの個々のdATP、dCTP及びdGTP、400 µMのdUTP、0.1 µMの個々の選択及び共通プライマー、0.05 µMのプローブ、標的DNA（変異体を含む10,000コピーのプラスミド又は10,000コピーの野生型ゲノムDNA）（プールされたゲノムDNA、Clontech、Mountain View, Calif., カタログ番号636401）、0.02 U/µlのウラシル-N-グリコシラーゼ、200 nMのNTQ21-46Aアプタマー（aptamer）、20 nMのDNAポリメラーゼ、0.1 mMのEDTA、2.6 mMの酢酸マグネシウムを含むPCR混合物。増幅及び分析は、Roche LightCycler（登録商標）480 計測計（Roche Applied Science, Indianapolis, Ind.）を用いて行われた。次の温度プロフィールを用いた：95 で1分（又は2サイクルの95（10秒）～62（25秒））、続いて、99サイクルの92（10秒）～62（25-30秒）。蛍光データを、個々の62段階の開始で集めた。任意には、反応は、内因性の陽性対照鑄型を含んだ。

30

#### 【0040】

野生型と変異体配列との間の識別は、野生型及び変異体標的物においての閾値までのサイクル数（cycles-to-threshold）（Ct）値間の差異として測定された。例えば、29サイクルのCtを、変異体標的物との反応が26サイクルの後、閾値サイクルに達し、そして野生型標的物との反応が55サイクルの後、閾値サイクルに達した場合に記録した。

40

#### 【0041】

表の説明：

次の略語を、修飾された塩基ヌクレオチド（modified-base nucleotides）のために使用した：「t-bb-dA」及び「t-bb-dC」はそれぞれ、N6-tert-ブチル-ベンジル-デオキシアデニン及びN4-tert-ブチル-ベンジル-デオキシシトシンを意味し；用語「et-dC」はN4-エチル-デオキシシトシンを意味し；用語「met-dC」はN4-メチル-デオキシシトシンを意味し；そして用語「5-p-dL」は5-プロピニル-デオキシウラシルを意味する。プライマー及びプローブ配列においては、太字の下線を引かれ

50

たヌクレオチドは、修飾された塩基ヌクレオチド、又は野生型及び変異体配列の両者によりミスマッチされたヌクレオチドである。

【 0 0 4 2 】

#### 実施例 1

ヒト E G F R 遺伝中の突然変異 G 7 1 9 A を検出するためのプライマー：

この突然変異は、E G F R 遺伝子（配列番号 1）中のヌクレオチド変化 2 1 5 6 G - > C に起因する。突然変異を検出するためのプライマー及びプローブは、表 1 に示されている。突然変異は、配列番号 2 - 7 から選択された対立遺伝子 - 特異的プライマー及び共通プライマーを用いて検出され得る。任意には、共通プライマーは、配列番号 8 であり得る。増幅は、対立遺伝子 - 特異的プライマーと共通プライマーとの間の領域にハイブリダイズするプローブを用いて検出され得る。任意には、プローブは配列番号 9 であり得る。

10

【 0 0 4 3 】

【 表 1 】

突然変異 G 7 1 9 A を検出するためのプライマー及びプローブ：

配列番号2	ASプライマー	GCCGAACGCACCGGAGG	
配列番号3	ASプライマー	GCCGAACGCACCGGGGG	
配列番号4	ASプライマー	GCCGAACGCACCGAAGG	
配列番号5	ASプライマー	GCCGAACGCACCGGTGG	
配列番号6	ASプライマー	GCCGAACGCACCGCAGG	
配列番号7	ASプライマー	GTGTCGAACGCACCGGEGG	E=t-bb-dA
配列番号8	共通プライマー	AGCCTCTTACCCAGTGGAGAA	
配列番号9	プローブ	HAGCTCTCTTGQAGGATCTTGAAGGAACTGAATTP	

20

H=H e x , Q=B H Q - 2 , P=リン酸 (phosphate)

【 0 0 4 4 】

この実施例に開示される対立遺伝子 - 特異的プライマーは、反応条件に依存して、野生型配列と、68 サイクルまでの C t の G 7 1 9 A 突然変異との間の識別を達成した。

30

【 0 0 4 5 】

#### 実施例 2

ヒト E G F R 遺伝中の突然変異 G 7 1 9 C を検出するためのプライマー：

この突然変異は、E G F R 遺伝子（配列番号 1）中のヌクレオチド変化 2 1 5 6 G - > T に起因する。突然変異を検出するためのプライマー及びプローブは、表 2 に示されている。突然変異は、配列番号 10 - 15 から選択された対立遺伝子 - 特異的プライマー及び共通プライマーを用いて検出され得る。任意には、共通プライマーは、配列番号 16 であり得る。増幅は、対立遺伝子 - 特異的プライマーと共通プライマーとの間の領域にハイブリダイズするプローブを用いて検出され得る。任意には、プローブは配列番号 17 であり得る。

40

【 0 0 4 6 】

【表 2】

突然変異 G 7 1 9 C を検出するためのプライマー及びプローブ：

配列番号10	ASプライマー	GCCGAACGCACCGGAGCA
配列番号11	ASプライマー <sub>r</sub>	GCCGAACGCACCGGAGTA
配列番号12	ASプライマー	GCCGAACGCACCGGGGCA
配列番号13	ASプライマー	GCCGAACGCACCGGAACA
配列番号15	ASプライマー	GCCGAACGCACCGGTGCA
配列番号16	共通プライマー	AGCCTCTTACACCCAGTGGAGAA
配列番号17	プローブ	HAGCTCTCTTGQAGGATCTTGAAGGAACTGAATTP

H=H e x, Q=B H Q-2、P=リン酸

10

## 【0047】

この実施例に開示される対立遺伝子 - 特異的プライマーは、反応条件に依存して、野生型配列と、69サイクルまでの C t の G 7 1 9 A 突然変異との間の識別を達成した。

## 【0048】

## 実施例 3

ヒト E G F R 遺伝子中の突然変異 G 7 1 9 S を検出するためのプライマー：

この突然変異は、E G F R 遺伝子（配列番号 1）中のヌクレオチド変化 2 1 5 5 - 2 1 5 6 G G - > T C に起因する。突然変異を検出するためのプライマー及びプローブは、表 3 に示されている。突然変異は、配列番号 1 8 - 2 4 から選択された対立遺伝子 - 特異的プライマー及び共通プライマーを用いて検出され得る。任意には、共通プライマーは、配列番号 2 5 であり得る。増幅は、対立遺伝子 - 特異的プライマーと共通プライマーとの間の領域にハイブリダイズするプローブを用いて検出され得る。任意には、プローブは配列番号 2 6 であり得る。

## 【0049】

## 【表 3】

20

30

突然変異 G 7 1 9 S を検出するためのプライマー及びプローブ：

配列番号18	ASプライマー	GTGCCGAACGCACCGGAGCT	
配列番号19	ASプライマー	GTGTCCAACGCACCGGEGCT	E=t-bb-dA
配列番号20	ASプライマー	CCGAACGCACCGGAGTT	
配列番号21	ASプライマー	TGCCGAACGCACCGGAGTT	
配列番号22	ASプライマー	GTGCCGAACGCACCGGAGTT	
配列番号23	ASプライマー	TGCCGAACGCACCGGAACT	
配列番号24	ASプライマー	GTGCCGAACGCACCGGAACT	
配列番号25	共通プライマー	AGCCTCTTACACCCAGTGGAGAA	
配列番号26	プローブ	HAGCTCTCTTGQAGGATCTTGAAGGAACTGAATTP	

H=H e x, Q=B H Q-2、P=リン酸

40

## 【0050】

## 実施例 4

ヒト E G F R 遺伝子中の突然変異 T 7 9 0 M を検出するためのプライマー：

この突然変異は、E G F R 遺伝子（配列番号 1）中のヌクレオチド変化 2 3 6 9 C - > T に起因する。突然変異を検出するためのプライマー及びプローブは、表 4 a 及び 4 b に示されている。突然変異は、配列番号 2 7 - 2 9 から選択された対立遺伝子 - 特異的プライ

50

マー及び共通プライマーを用いて検出され得る。任意には、共通プライマーは、配列番号 30 であり得る。増幅は、対立遺伝子 - 特異的プライマーと共通プライマーとの間の領域にハイブリダイズするプローブを用いて検出され得る。任意には、プローブは配列番号 31 であり得る。アンチセンス鎖が使用される場合、突然変異は、配列番号 32 - 48 から選択された対立遺伝子 - 特異的プライマー及び共通プライマーを用いて検出され得る。任意には、共通プライマーは、配列番号 49 であり得る。増幅は、対立遺伝子 - 特異的プライマーと共通プライマーとの間の領域にハイブリダイズするプローブを用いて検出され得る。任意には、プローブは配列番号 50 であり得る。

【 0 0 5 1 】

【表 4 a】

10

突然変異 T 7 9 0 M を検出するためのプライマー及びプローブ（センス）：

配列番号27	ASプライマー	ACCTCCACCGTGCAGCTCATCAT
配列番号28	ASプライマー	ACTTCCACCGTGCAGCTCATCCT
配列番号29	ASプライマー	ACITCCACCGTGCAGCTCATAAT
配列番号30	共通プライマー	TGCGATCTGCACACACCAGTTGA
配列番号31	プローブ	JAGCCAATATTGTCTQTTGTGTTCCCGGACAP

J = J a 2 7 0、Q = B H Q - 2、P = リン酸 (phosphate)

20

【 0 0 5 2 】

【表 4 b】

突然変異 T 7 9 0 M を検出するためのプライマー及びプローブ（アンチセンス）：

配列番号32	AS プライマー	CAGCCGAAGGGCATGAGCTGCA	
配列番号33	AS プライマー	CAGTCGAAGGGCATGAGCTGCE	E=t-bb-dA
配列番号34	AS プライマー	CAGCCGAAGGGCATGAGCTAEA	E=t-bb-dC
配列番号35	AS プライマー	CAGTCGAAGGGCATGAGCTGEA	E=t-bb-dC
配列番号36	AS プライマー	CAGCCGAAGGGCATGAGCCGEA	E=t-bb-dC
配列番号37	AS プライマー	CAGCCGAAGGGCATGAGCAGEA	E=t-bb-dC
配列番号38	AS プライマー	CAGCCGAAGGGCATGAGCCGJA	J=N4-et-dC
配列番号39	AS プライマー	CAGCCGAAGGGCATGAGCAGJA	J=N4-et-dC
配列番号40	AS プライマー	CAGTCGAAGGGCATGAGJTGEA	E=t-bb-dC J=N4-et-dC
配列番号41	AS プライマー	GGCGGCCGAAGGGCATGAGCTGEA	E=t-bb-dC
配列番号42	AS プライマー	GGCAGCCGAAGGGCATGAGCTAEA	E=t-bb-dC
配列番号43	AS プライマー	GGCGGCCGAAGGGCATGAGETGEA	E=t-bb-dC
配列番号44	AS プライマー	GGCGGCCGAAGGGCATGAGCTGCE	E=t-bb-dA
配列番号45	AS プライマー	GGCGGCCGAAGGGCATGAGJTGCE	E=t-bb-dA J=N4-et-dC
配列番号46	AS プライマー	CAGTCGAAGGGCATGAGCGGCA	
配列番号47	AS プライマー	CAGCCGAAGGGCATGAGCGGCA	
配列番号48	AS プライマー	GGCAGCCGAAGGGCATGAGCGGCA	
配列番号49	共通プライマー	CCTCCCTCCAGGAAGCCTACGTGA	
配列番号50	プローブ	JTGACGGTGGAGGTQGAGGCAGP	

J = J a 2 7 0、Q = B H Q - 2、P = リン酸

30

40

50

## 【 0 0 5 3 】

この実施例に開示される対立遺伝子 - 特異的プライマーは、反応条件に依存して、野生型配列と、51サイクルまでの Ct の T 7 9 0 M 突然変異との間の識別を達成した。

## 【 0 0 5 4 】

実施例 5

ヒト E G F R 遺伝子中の突然変異 L 8 5 8 R を検出するためのプライマー：

この突然変異は、E G F R 遺伝子（配列番号 1）中のヌクレオチド変化 2 5 7 3 T - > G に起因する。突然変異を検出するためのプライマー及びプローブは、表 5 及び 4 b に示されている。突然変異は、配列番号 5 1 - 5 7 から選択された対立遺伝子 - 特異的プライマー及び共通プライマーを用いて検出され得る。任意には、共通プライマーは、配列番号 5 8 であり得る。増幅は、対立遺伝子 - 特異的プライマーと共通プライマーとの間の領域にハイブリダイズするプローブを用いて検出され得る。任意には、プローブは配列番号 5 9 であり得る。アンチセンス鎖が使用される場合、突然変異は、配列番号 6 0 - 6 8 から選択された対立遺伝子 - 特異的プライマー及び共通プライマーを用いて検出され得る。任意には、共通プライマーは、配列番号 6 9 であり得る。増幅は、対立遺伝子 - 特異的プライマーと共通プライマーとの間の領域にハイブリダイズするプローブを用いて検出され得る。任意には、プローブは配列番号 7 0 であり得る。

## 【 0 0 5 5 】



【表 5】

突然変異 L 8 5 8 R を検出するためのプライマー及びプローブ：

配列番号51	AS プライマー	ATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCG	
配列番号52	AS プライマー	ATGTTAAGATCACAGATTTTGGGJG	J = t-bb-dC
配列番号53	AS プライマー	ATGTCAAGATCACAGATTTTGGACG	
配列番号54	AS プライマー	ATGTCAAGATCACAGATTTTGA <sup>u</sup> GCG	
配列番号55	AS プライマー	ATGTCAAGATCACAGATTTTGGGGG	
配列番号56	AS プライマー	ATGTCAAGATCACAGATTTTGGAJG	J = t-bb-dC
配列番号57	AS プライマー	ATGUCAAGAUCAEAGATUTUGGAJG	E = Me-dC J = t-bb-dC U = 5-p-dU
配列番号58	共通プライマー	CTGGTCCCTGGTGTGAGGAAAA	
配列番号59	プローブ	FTACCATGCAGQAAGGAGGCAAAGTAAGGAGP	
配列番号60	AS プライマー	GCACCCAGCAGTTTGGCCC	
配列番号61	AS プライマー	GEGECEAGEAGUTUGGEJC	E = Me-dC J = t-bb-dC U = 5-p-dU
配列番号62	AS プライマー	GCACCCAGCAGTTTGGCTC	
配列番号63	AS プライマー	GCACCCAGCAGTTTGGC <sup>u</sup> C	
配列番号64	AS プライマー	GCACCCAGCAGTTTGGJAC	J = N4-Et-dC
配列番号65	AS プライマー	GCACCCAGCAGTTTGGJ <sup>u</sup> AC	J = t-bb-dC
配列番号66	AS プライマー	GEAECEAGEAGUTUGGJAC	E = Me-dC J = N4-et-dC U = 5-p-dU
配列番号67	AS プライマー	GEAECEAGEAGUTUGGJ <sup>u</sup> AC	E = Me-dC J = t-bb-dC U = 5-p-dU
配列番号68	AS プライマー	CCGCACCCAGCAGTTTGGJAC	J = t-bb-dC
配列番号69	共通プライマー	CTGGTCCCTGGTGTGAGGAAAA	
配列番号70	プローブ	FTACCATGCAGQAAGGAGGCAAAGTAAGGAGP	

F = FAM0、Q = BHQ-2、P = リン酸

#### 【0056】

この実施例に開示される対立遺伝子 - 特異的プライマーは、反応条件に依存して、野生型配列と、69サイクルまでの Ct の L 8 5 8 R 突然変異との間の識別を達成した。

#### 【0057】

##### 実施例 6

ヒト EGF R 遺伝子中の突然変異 L 8 6 1 Q を検出するためのプライマー：

この突然変異は、EGF R 遺伝子（配列番号 1）中のヌクレオチド変化 2 5 8 2 T - > A に起因する。突然変異を検出するためのプライマー及びプローブは、表 6 及び 4 b に示されている。突然変異は、配列番号 7 1 - 7 9 から選択された対立遺伝子 - 特異的プライマー及び共通プライマーを用いて検出され得る。任意には、共通プライマーは、配列番号 8 0 であり得る。増幅は、対立遺伝子 - 特異的プライマーと共通プライマーとの間の領域にハイブリダイズするプローブを用いて検出され得る。任意には、プローブは配列番号 8

10

20

30

40

50

1 であり得る。アンチセンス鎖が使用される場合、突然変異は、配列番号 82 - 90 から選択された対立遺伝子 - 特異的プライマー及び共通プライマーを用いて検出され得る。任意には、共通プライマーは、配列番号 91 であり得る。増幅は、対立遺伝子 - 特異的プライマーと共通プライマーとの間の領域にハイブリダイズするプローブを用いて検出され得る。任意には、プローブは配列番号 92 であり得る。

【0058】

【表 6】

突然変異 L861Q を検出するためのプライマー及びプローブ：

配列番号71	AS プライマー	TCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACA	
配列番号72	AS プライマー	TCGCAGATTTTGGGCTGGCCAAACE	E=t-bb-dA
配列番号73	AS プライマー	TCGCAGATTTTGGGCTGGCCAAAEA	E=N4-et-dC
配列番号74	AS プライマー	TCGCAGATTTTGGGCTGGCCAAATA	
配列番号75	AS プライマー	TCGCAGATTTTGGGCTGGCCAAGCA	
配列番号76	AS プライマー	TCGCAGATTTTGGGCTGGCCAGACA	
配列番号77	AS プライマー	TCGCAGATTTTGGGCTGGCCAAAGA	
配列番号78	AS プライマー	TCGCAGATTTTGGGCTGGCCAATCA	
配列番号79	AS プライマー	TCGCAGATTTTGGGCTGGCCATACA	
配列番号80	共通プライマー	CTGGTCCCTGGTGTGAGGAAAA	
配列番号81	プローブ	FTACCATGCAGQAAGGAGGCAAAGTAAGGAGP	
配列番号82	AS プライマー	TTCCTTCTCTTCCGCACCCAGCT	
配列番号83	AS プライマー	TTCCTTCTCTTCCGCACCCAGCT	
配列番号84	AS プライマー	TTCCTTCTCTTCCGCACCCAGET	E=t-bb-dC
配列番号85	AS プライマー	TTCCTTCTCTTCCGCACCCAGET	E=N4-et-dC
配列番号86	AS プライマー	TTCCTTCTCTTCCGCACCCAGTT	
配列番号87	AS プライマー	TTCCTTCTCTTCCGCACCCAACT	
配列番号88	AS プライマー	TTCCTTCTCTTCCGCACCCGGCT	
配列番号89	AS プライマー	TTCCTTCTCTTCCGCACCCATCT	
配列番号90	AS プライマー	TTCCTTCTCTTCCGCACCCCTGCT	
配列番号91	共通プライマー	GTCTTCTCTGTTTCAGGGCATGAAC	
配列番号92	プローブ	FTACTGGTGAAQAACACCGCAGCATGTP	

F=FAM0、Q=BHQ-2、P=リン酸

【0059】

この実施例に開示される対立遺伝子 - 特異的プライマーは、反応条件に依存して、野生型配列と、57.5 サイクルまでの Ct の L861Q 突然変異との間の識別を達成した。

【0060】

#### 実施例 7

ヒト EGF R 遺伝子中の突然変異 S768I を検出するためのプライマー：

この突然変異は、EGF R 遺伝子（配列番号 1）中のヌクレオチド変化 2301 G -> T に起因する。突然変異を検出するためのプライマー及びプローブは、表 7 及び 4b に示されている。突然変異は、配列番号 93 - 101 から選択された対立遺伝子 - 特異的プライマー及び共通プライマーを用いて検出され得る。任意には、共通プライマーは、配列番号 102 であり得る。増幅は、対立遺伝子 - 特異的プライマーと共通プライマーとの間の領域にハイブリダイズするプローブを用いて検出され得る。任意には、プローブは配列番号 103 であり得る。アンチセンス鎖が使用される場合、突然変異は、配列番号 104 -

106 から選択された対立遺伝子 - 特異的プライマー及び共通プライマーを用いて検出され得る。任意には、共通プライマーは、配列番号107であり得る。増幅は、対立遺伝子 - 特異的プライマーと共通プライマーとの間の領域にハイブリダイズするプローブを用いて検出され得る。任意には、プローブは配列番号108であり得る。

【0061】

【表7】

突然変異S768Iを検出するためのプライマー及びプローブ：

配列番号93	AS プライマー	AGGAAGCCTACGTGATGGCCAT	
配列番号94	AS プライマー	AGGAGGCCTACGTGATGGCC <u>E</u> T	E=t-bb-dA
配列番号95	AS プライマー	AGGAGGCCTACGTGATGGC <u>E</u> AT	E=t-bb-dC
配列番号96	AS プライマー	AGGAGGCCTACGTGATGG <u>E</u> CAT	E=t-bb-dC
配列番号97	AS プライマー	AGGAGGCCTACGTGATGGCCG <u>T</u>	
配列番号98	AS プライマー	AGGAGGCCTACGTGATGGC <u>T</u> AT	
配列番号99	AS プライマー	AGGAGGCCTACGTGATGGCC <u>T</u> T	
配列番号100	AS プライマー	AGGAGGCCTACGTGATGGC <u>A</u> AT	
配列番号101	AS プライマー	AGGAGGCCTACGTGATGGAC <u>A</u> T	
配列番号102	共通プライマー	CCAATATTGTC <u>T</u> TTGTGTTCCCGGAC	
配列番号103	プローブ	JCACGGTGGAGGTGAQGGCAGATGCP <u>P</u>	
配列番号104	AS プライマー	ACGTGGGGGTTGTCCACGA	
配列番号105	AS プライマー	ATGTGGGGGTTGTCCACGA	
配列番号106	AS プライマー	ATGTGGGGGTTGTCCG <u>C</u> GA	
配列番号107	共通プライマー	ATCGCATTGATGCGTCTTCACC	
配列番号108	プローブ	JAGTGTGGCTTCGCAQTGGTGGCCAGAAGGAP <u>P</u>	

J = J a 270、Q = B H Q - 2、P = リン酸

【0062】

この実施例に開示される対立遺伝子 - 特異的プライマーは、野生型配列と、71サイクルまでの Ct の S768I 突然変異との間の識別を達成した。

10

20

30

【 図 1 B 】

**FIGURE 1A**

1 ATGCGACCTCTCCGGAGCGCCGGGGCAGCGCTCTTGGCGCTCTGCGTGTGCGCTCTGGCCG  
2 GTGGCTCCGGCTCTCGAGAGAAAGAAAGATTTGCCAAGGACAGMTGAAACAGCTACACGACG  
3 121 TCGGACGTTTGAAGATCTTCTTTCAGCTCGTCAAGGAGAGAGTGTCTAAATACCTGTGAGTG  
4 GTCTCTGGGAAATTGGAAATTTACCTATGTGCAGAGGAAATATGATCTTCTCTTCTGTAAGT  
5 181 ACCATACCTGCGTGGCTGGCTGGTTATGCTATCTTCAGCTGACCAACAGTGGAGCGAATAGC  
6 241 TGTGAAAACCTGCAGATCTACAGGAAAGATATGTACATGCGAAAATTCCTGATCTCTAGCA  
7 301 GTCTTTATCTAATATGATGCAAAATAAACCCGAGCTAGGAGAGTCCGCCATGGAATTTTA  
8 361 CAGGAAATCTCGATCGGCCCGCTGCGGTGTACCAACACCTGCCCTCTGTGTGCAAGTGGAG  
9 421 AGCATCAGCTCGCGGGACATGATGACGAGTATCTTCTCAGCAACATGTGATGGATCTAT  
10 481 CAGACACCACTGGGACGACGTGACAGATGTATCTGACGAGTGTGCCAATGAGCTGCGCTGTG  
11 541 GTGTCAGGAGAGAGGAACTCCGAAAACATGACCAAAATCATCTGTGCCGACAGATGCTCT  
12 601 GGGCGCTCTGTGCGCAAGTCCCCAGCTGACTGCTGCCACACCGAGTGTGCTGACGGTGG  
13 661 AGCTGCGCCCGGAGAGAGAGTCTGCTGCTGGCCAAATTCAGGATGAGACAGACGCTGCT  
14 721 AAGGACACTGCCCCCTCATGTCTTACAAACCCACCACTACGACATGTGAGTGTGAAC  
15 781 CCGAGAGGAAATACAGCTCTCTTGTGCCACTCTGTGGAGAGATGTCCCGTAATTTAGTAA  
16 841 GTGACAGATGTCCGCTGTGCTGCTGGAGCTGTGGGCGCGACAGCTATGAAATGAGAA  
17 901 GACGCGCTCCGCGCTGTGTAAAGATGCTCAATCCAGTCTGCCCAAGTGTGTAAAGGAAT  
18 961 AACTGTGCGTAATTTAAAGACTCTCAATCATAAATGTCTAGATAATTTAAACATCTCAA  
19 1021 AACCTGACCTCCATCATGCGGCTATCCCATCTGCTGCTGGCTGTGCTGTGGGTGATACG  
20 1081 TTCACATCATCTGCTCCCTGTGATCTACACAGCATGTGATATCTTGAAACAGTCAATCC  
21 1141 ATCACAGGTTTTCCTGATTTACAGCTTTGGCTGTGAAACAGGACGGATCTCATGCTTT  
22 1201 ATCACAGGTTTTCCTGATTTACAGCTTTGGCTGTGAAACAGGACGGATCTCATGCTTT  
23 1261 GTGACAGTGAAGATCTACATCCGCGACCAACAGCAAGTCAAGATTTCTCTTCTGCACTG  
24 1321 GTGACCTGAATCATCACTCTTGGGATATGCTCTCTCAGGATATATGATGTAGAGAT  
25 1381 GTGATTAATTTAGAAAACAAAAATTTGTGTGTCTCAATACATATGCTGGAAGAAAACGT  
26 1441 TGTGGGACTCTCGCTGTGAAACAAAAAATTTAATGACAGTGTGGAAGACAGCTGCAGAG  
27 1501 GTCACAGGCGACATCTGACATGCTCTTCTGCTGCTGCGGAGCGCTGTGGGCGCCGAGCGC  
28 1561 AAGGATCGCTGCTTCCGGAGATGTGACGCGAGGACAGGAATGTGCGTGAAGATACGAC

FIGURE 1B

1621 CTTCTCGAGAGGTGAQCCAAAGGAGTTTGTGAGACCTCTTGATGTGCATATCAATGCCACCA  
1681 GAGTGTCCTCTCCACAGCTAGCAATCTGCACAGACCGGGACCAAGCTGTNTG  
1741 CAGTGTGTCCCATACCTACGTGACGCCGCCATCTGTCTCAGACGTGCGCCGACAGATGTAC  
1801 GGAGAAACCAACACCTGTGCTTGAAGTGTACGACACCGCCGCTATGTGTGTCCACCTGTGCG  
1861 CATCCACACCTGCATCTACGGTAGCTGCGGACAGTCTTGAAAGTGTCTTCAAGCAATGGG  
1921 CTATGAGATGCTCCCTACCTGACCTGGGATGGTGGGGGGCTCTCTTCTGTCTCCAGAGTGG  
1981 GCCCTGGGATCGCCCTCTTCACTGCGAAGCGGCCACATCTGTCTGGAAAGCCACGCTCGCG  
2041 AGGCTCTCGACAGAGAGGAGCTTGTGTGGAGCGCTTGTATACACCTGAGGAGAGCTCCCAAC  
2101 CAACTCTCTTGAGATGCTTGAAAGAACCTAATTAAAGAACTCAAAGTGTCTTCAAGTGG  
2161 GGTGCTGTTCGGACAGGTGTATAAGGAGCTCTGATGATCCCAAGGATGAGAAAGTTAAATAT  
2221 CCCCTGCTTACAAGSATAATGAGAGAACCAATCTCTCGAAGACCAACAAGAAATATCTC  
2281 GATGAAGCTTACGTGTATGCCAGCTAGCTGACCAACCTCCACAGCTGTGCTGCTCTGGGACTC  
2341 TGCCCTACCTCCACGCTGTGATCTCAACAGCACTATGCCCTCTCGCTGTCTCTTGAGAC  
2401 TATGTCCGGAGACCAAGAGCAATATTTGGCTCCAGTACTGTCTCAATGTGTGTGTGAG  
2461 AGCAAAAGGAGTCAAGACTACTTGGAGAGCGAGCTGTGTGCTGTGACAGCACTGGACAGC  
2521 AGGACAACTCTGTGTAAGATCCGAGAGCGAGTGTCAAGTACATGAAATTTTGGGTGTGGCAAA  
2581 CTGCTGGCTGGGTGAGAGAAAGATACCATCGACAGAGGAGCAAGATGCCATTATCAAGTGG  
2641 ATGGCATGTGATCAATTTACACAGAACTCTATACCCACAGAGATGTCTGTGAGACTAC  
2701 GGGTGACTGTCTTGGGATGTGAGCCTTTGGATCAACAGAGATATGACGAAATCTCCCTG  
2761 ACGGATACCTCTCTTACGAGTGGAGAAAGAGACACCTCCCTACGACCAATATGTACAC  
2821 ATCGATGTCCTACATGATCATGTGCAAGTGTGTGATGATAGACGAGATAGTGCCCACAG  
2881 TTTCTGAGTGATGTATGATGATCTGTCTCAAATGCGCCGAGACGCCACAGCCTACTTGTG  
2941 ATTCAGGGGAGTGAAAGAGTCAATTTGAGTGTGCTACAGACTGCACTCTTACCTGTGGC  
3001 CTGATGGATGAGAGAGCATGGAACGACGTGGTGGATGCCAGAGTATGACGAACTCTCCACAG  
3061 CAGGCGCTCTTACAGACGCCCTCTCAGCTCAGACGATCTCCCTCTGAGTCTCTTGATGAG  
3121 ACAGCAACCAACTCTCCCGCTGTGATGTATGAGATAATGGCTCGAAAGTGTGCCATCT  
3181 AAGGAAGACAGCTCTTTCGACAGATACGCTCAGACCTCCCAACAGGCGCTTGACGTAGAC

【 図 1 C 】

**FIGURE 1C**

3241 AGCATAGACGACACTCTCTCCCAAGTGCATATCAAAACAGCTCGTGTCCCAAAGG  
3301 CCGCGTGGCTGTGACAGATCTCTGTATCAACAATCAGCTCTGAACCGCGCCAGCAAG  
3361 CCGGCTGCTGACAGAAACCCCGACAGAGTCTGAGTGGGCAACGCTGCTGCTTCAAC  
3421 ACTGTCCAGCCCACTGTGTCAACGACACATTCGACGCCCTGCCACTGGGCGCAGAA  
3481 GCGAGCCCAAAATAGCGTGACACCTGATGACACGACAGCTTCTTCCACAGGA  
3541 GCCAAGCAAAATGGCATTTTAAAGGCTCATGACCTGAAATGCAATGCAATGGGTG  
3601 GCGCCACAAGACGATGAATTTATGGAGACAG

【配列表】

2014500028000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/006399

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12Q1/68

ADD.

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, FSTA, Sequence Search

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/149403 A1 (MACLACHLAN IAN [GB] ET AL) 11 June 2009 (2009-06-11) SEQ ID NO: 7194; SEQ ID NO: 7525;	1-24
X	----- WO 02/10449 A2 (COMPUGEN INC [US]; SHOSHAN AVI [US]; WASSERMAN ALON [US]; MINTZ ELI [U]) 7 February 2002 (2002-02-07) SEQ ID 21937 ----- -/--	18-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

## \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 August 2012

Date of mailing of the international search report

11/09/2012

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Leber, Thomas

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/006399

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAE SOOK HWANG: "Molecular Biologic Techniques in Cytopathologic Diagnosis", THE KOREAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 43, no. 5, 1 January 2009 (2009-01-01), page 387, XP55023495, ISSN: 1738-1843, DOI: 10.4132/KoreanJPathol.2009.43.5.387 page 390, right col. -----	1-17
Y	T JOHN ET AL: "Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors", ONCOGENE, vol. 28, 1 August 2009 (2009-08-01), pages S14-S23, XP55023496, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2009.197 page S17, left and right col. -----	1-17
Y	NEWTON C R ET AL: "ANALYSIS OF ANY POINT MUTATION IN DNA. THE AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM (ARMS)", NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 17, no. 7, 11 April 1989 (1989-04-11), pages 2503-2516, XP000141596, ISSN: 0305-1048 abstract -----	1-17
Y	DONOVAN M J ET AL: "A systems pathology model for predicting overall survival in patients with refractory, advanced non-small-cell lung cancer treated with gefitinib", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 45, no. 8, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 1518-1526, XP026056404, ISSN: 0959-8049, DOI: 10.1016/J.EJCA.2009.02.004 [retrieved on 2009-03-09] abstract; item 2.2 ----- -/--	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/006399

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	L. V. SEQUIST ET AL: "First-Line Gefitinib in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring Somatic EGFR Mutations", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 26, no. 15, 20 May 2008 (2008-05-20), pages 2442-2449, XP55018867, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2007.14.8494 abstract -----	6-17
Y	S.-W. HAN: "Predictive and Prognostic Impact of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Gefitinib", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 23, no. 11, 7 March 2005 (2005-03-07), pages 2493-2501, XP55023498, ISSN: 0732-183X, DOI: 10.1200/JCO.2005.01.388 abstract -----	6-17
Y	US 5 981 725 A (VOGELSTEIN BERT [US] ET AL) 9 November 1999 (1999-11-09) claim 11; Fig. 1 -----	12-17,22
Y	GILMER TONA M ET AL: "Impact of common epidermal growth factor receptor and HER2 variants on receptor activity and inhibition by lapatinib", CANCER RESEARCH, AACR, US PHILADELPHIA, PA, vol. 68, no. 2, 15 January 2008 (2008-01-15), pages 571-579, XP002570142, ISSN: 1538-7445, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2404 abstract -----	6,12-17, 22
X	"Oligonucleotide comprising SEQ ID NO:27", 10 June 2009 (2009-06-10), XP55035504, Retrieved from the Internet: URL:http:// [retrieved on 2012-08-14] the whole document ----- -/--	18



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/006399

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>BLENCKE STEPHANIE ET AL: "Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, THE AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, INC, US, vol. 278, no. 1, 25 April 2003 (2003-04-25), pages 15435-15440, XP009114694, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M211158200 [retrieved on 2003-02-19] abstract</p> <p>-----</p>	6
Y	<p>K. MASAGO ET AL: "Good Clinical Response to Gefitinib in a Non-small Cell Lung Cancer Patient Harboring a Rare Somatic Epidermal Growth Factor Gene Point Mutation; Codon 768 AGC &gt; ATC in Exon 20 (S768I)", JAPANESE JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 40, no. 11, 1 November 2010 (2010-11-01), pages 1105-1109, XP55035487, ISSN: 0368-2811, DOI: 10.1093/jjco/hyq087 abstract</p> <p>-----</p>	12-17,22
Y	<p>SASAKI: "AKT1 and AKT2 mutations in lung cancer in a Japanese population", MOLECULAR MEDICINE REPORTS, 1 January 2008 (2008-01-01), XP55035486, ISSN: 1791-2997, DOI: 10.3892/mmr_00000009 abstract</p> <p>-----</p>	12-17,22

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP2011/006399**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:
  
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).

**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 additional sheet

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 an 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.:  
1-22(partially)
  
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.:

**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.

International Application No. PCT/ EP2011/ 006399

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-21(partially)

Methods, kits, reaction mixtures and an oligonucleotide characterised by SEQ ID NO:2.

---

2. claims: 1-24(partially)

Methods, kits, reaction mixtures and an oligonucleotide characterised by SEQ ID NO:3.

---

3-107. claims: 1-24(partially)

Methods, kits, reaction mixtures and an oligonucleotide characterised by SEQ ID NO: 4 / 5 ... 107 / 108.

---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/006399

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009149403	A1	11-06-2009	NONE	
-----				
WO 0210449	A2	07-02-2002	AU 1079102 A	13-02-2002
			EP 1305450 A2	02-05-2003
			JP 2004508019 A	18-03-2004
			US 2003165843 A1	04-09-2003
			WO 0210449 A2	07-02-2002
-----				
US 5981725	A	09-11-1999	US 5981725 A	09-11-1999
			US 6127126 A	03-10-2000
			US 6455498 B1	24-09-2002
-----				

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

(72)発明者 キース パウアー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 9 0 1, サン ラファエル, ウェスト クレセント ドライブ 6 2

(72)発明者 ナンシー シェーンブルナー

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 5 6, モラガ, クロスブルック ドライブ 7 4 6

(72)発明者 アリソン ツァン

アメリカ合衆国, 9 4 5 2 6 ダンビル, セント ジーン コート 1 2 2

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 HA11

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32 QR35

QR55 QR62 QS25 QS32 QX01