(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2016-527900
(P2016-527900A)
(43)公表日　平成28年9月15日(2016.9.15)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12Q 1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	ZNAA	4B063
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	
C12N 15/01	(2006.01)	C12N	15/00	X	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 56 頁）

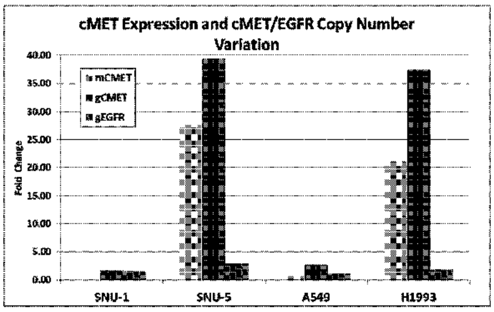
(21)出願番号　特願2016-534613(P2016-534613)
(86)(22)出願日　平成26年8月7日(2014.8.7)
(85)翻訳文提出日　平成28年3月17日(2016.3.17)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/050076
(87)国際公開番号　WO2015/023503
(87)国際公開日　平成27年2月19日(2015.2.19)
(31)優先権主張番号　61/865,755
(32)優先日　平成25年8月14日(2013.8.14)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　508138863
キアゲン　マンスフィールド　インコーポレイテッド
アメリカ合衆国　０２０４８　マサチューセッツ州　マンスフィールド　フォーブス　ブールバード　１７１　スイート　２００
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100102118
弁理士　春名　雅夫
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ｃＭＥＴ核酸のマルチモード解析のための組成物および方法

(57)【要約】
本明細書には、cMET変化（例えばコピー数の変動、発現レベルの変動、および/または点突然変異を含む突然変異の存在）の検出に関係する方法およびアッセイを記載する。既存の方法は、例えば感度の制約、研究室間不一致、または必要なマルチプレックス能を提供できないことなどによって、その臨床的有用性が限定されている。本明細書に提供する方法およびアッセイは、より速く、より費用効果の高い、患者の検査およびスクリーニングのための、マルチモードマルチプレックスアッセイを可能にし、よって健康管理の改善を可能にする。



Data were normalized to reference genes SOD1/SPG21 and expressed in fold change
SNU-5 and H1993 show significant amplification and overexpression of cMET
No amplification/overexpression of EGFR

Figure 6

【特許請求の範囲】
【請求項１】
核酸試料の一部分を2セットのプライマーと接触させる工程であって、
第1のプライマーのセットがcMET遺伝子コピー数多型の変化を検出し、第2のプライマーのセットがcMET遺伝子発現レベルの変化を検出し、
該第1のプライマーのセットが、cMETの少なくとも一つのgDNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含み、ここで、cMET遺伝子コピー数多型を検出するために、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置し、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置せず、
該第2のプライマーのセットが、cMETのmRNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子のmRNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程;
該試料の該一部分と該2セットのプライマーとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;
各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程;
cMETアンプリコンのレベルを参照遺伝子アンプリコンに対して正規化する工程;および
正規化されたcMETアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程
を含む、cMET変化を検出するためのアッセイであって、
参照レベルと比較して高いgDNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMETの遺伝子増幅変化の存在を示し、参照レベルと比較して変化したmRNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMETの遺伝子発現レベル変化の存在を示す、アッセイ。
【請求項２】
前記第1のプライマーのセットが、EGFRの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットをさらに含み、かつ
前記アッセイが、正規化されたEGFRアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程をさらに含み、
参照レベルと比較して高いgDNA特異的EGFRアンプリコンのレベルが、試料におけるEGFRの遺伝子増幅変化の存在を示す、請求項1記載のアッセイ。
【請求項３】
7番染色体上に位置する第1プライマーセットの参照遺伝子がKDELR-2であり、かつ
前記アッセイが、正規化されたKDELR-2アンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程をさらに含み、
参照レベルと比較して高いgDNA特異的KDELR-2アンプリコンのレベルが、試料におけるKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在を示す、請求項1～2のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項４】
cMET、EGFRおよびKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在が7番染色体増幅の存在を示す、請求項1～3のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項５】
7番染色体上に位置しない第1プライマーセットの参照遺伝子がSOD1またはSPG21である、請求項1～4のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項６】
前記第1プライマーセットが、SOD1とSPG21のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、請求項5記載のアッセイ。
【請求項７】
プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも一つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、請求項1～6のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項８】
プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも2つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、請求項1～7のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項９】
プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも3つのアンプリコンを増幅するプライマー

対サブセットを含む、請求項1～8のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項１０】
プライマーセットが、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも2つのgDNA特異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも2つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、請求項1～9のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項１１】
プライマーセットが、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも3つのgDNA特異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも3つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、請求項1～10のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項１２】
前記試料の第2部分を第3のプライマー対のセットと接触させる工程であって、該第3のプライマーのセットが、配列変異を含むcMET配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程;
該試料の該第2部分と該第3のプライマーのセットとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;
各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程
をさらに含み、アンプリコンの存在が、当該プライマー対が特異的である配列変異の存在を示す、請求項1～11のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項１３】
cMETの一つまたは複数の配列変異がSNPである、請求項12記載のアッセイ。
【請求項１４】
cMET SNPが、S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、およびD1246N（SEQ ID NO:131）からなる群より選択される、請求項12～13のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項１５】
S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、およびD1246N（SEQ ID NO:131）が検出される、請求項12～14のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項１６】
両反応に同じPCR熱サイクリングレジメンが使用される、請求項12～15のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項１７】
核酸試料がFFPE腫瘍試料から調製される、請求項1～16のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項１８】
試料が、胃がん、腎がん、胆管がん、肺がん、脳がん、子宮頸がん、大腸がん、頭頸部がん、ヘパトーマ、非小細胞肺がん、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣がん、肉腫、および甲状腺がんからなる群より選択される状態と診断された対象からの腫瘍細胞を含む、請求項1～17のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項１９】
一つまたは複数のプライマーが二重ドメインプライマーである、請求項1～18のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項２０】
あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物を識別することができる、請求項1～19のいずれか一項記載のアッセイ。
【請求項２１】
あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、別個のサイズ

であることによって識別される、請求項1～20のいずれか一項記載のアッセイ。

【請求項２２】

あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される、請求項1～21のいずれか一項記載のアッセイ。

【請求項２３】

第1のプライマーのセットおよび第2のプライマーのセットからの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される、請求項1～22のいずれか一項記載のアッセイ。

【請求項２４】

一つまたは複数のプライマーがSEQ ID NO:1～83からなる群より選択される、請求項1～23のいずれか一項記載のアッセイ。

【請求項２５】

一つまたは複数のプライマーがSEQ ID NO:89～124のいずれかの配列を含む、請求項1～24のいずれか一項記載のアッセイ。

【請求項２６】

プライマーがおよそ表2の濃度で反応混合物中に存在する、請求項1～25のいずれか一項記載のアッセイ。

【請求項２７】

核酸試料の一部分を、cMET遺伝子コピー数多型の変化を検出する1セットのプライマーと接触させる工程であって、

該プライマーのセットが、cMETの少なくとも一つのgDNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含み、ここで、cMET遺伝子コピー数多型を検出するために、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置し、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置しない、工程;

該試料の該一部分と該プライマーのセットとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;

各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程;

cMETアンプリコンのレベルを参照遺伝子アンプリコンに対して正規化する工程;および

正規化されたcMETアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程

を含む、cMET変化を検出する方法であって、

参照レベルと比較して高いgDNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMETの遺伝子増幅変化の存在を示す、方法。

【請求項２８】

前記プライマーのセットが、EGFRの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットをさらに含み、かつ

前記アッセイが、正規化されたEGFRアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程をさらに含み、

参照レベルと比較して高いgDNA特異的EGFRアンプリコンのレベルが、試料におけるEGFRの遺伝子増幅変化の存在を示す、請求項27記載の方法。

【請求項２９】

7番染色体上に位置するプライマーセットの参照遺伝子がKDELR-2であり、かつ

前記方法が、正規化されたKDELR-2アンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程をさらに含み、

参照レベルと比較して高いgDNA特異的KDELR-2アンプリコンのレベルが、試料におけるKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在を示す、請求項27～28のいずれか一項記載の方法。

【請求項３０】

cMET、EGFRおよびKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在が7番染色体増幅の存在を示す、請求項27～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項３１】

7番染色体上に位置しないプライマーセットの参照遺伝子がSOD1またはSPG21である、請求項27～30のいずれか一項記載の方法。

【請求項３２】

プライマーセットが、SOD1とSPG21の少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、請求項31記載の方法。

【請求項３３】

核酸試料の前記一部分を第2のプライマーセットと接触させる工程であって、該第2のプライマーセットがcMET遺伝子発現レベルの変化を検出する、工程

をさらに含み、

該第2のプライマーセットが、cMETのmRNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子の少なくともmRNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含み、かつ

参照レベルと比較して変化したmRNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMETの遺伝子発現レベル変化の存在を示す、請求項27～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項３４】

第1プライマーセットが、SOD1とSPG21のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、請求項27～33のいずれか一項記載の方法。

【請求項３５】

プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも一つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、請求項27～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項３６】

プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも2つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、請求項27～35のいずれか一項記載の方法。

【請求項３７】

プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも3つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、請求項27～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項３８】

プライマーセットが、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも2つのgDNA特異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも2つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、請求項27～37のいずれか一項記載の方法。

【請求項３９】

プライマーセットが、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも3つのgDNA特異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも3つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、請求項27～38のいずれか一項記載の方法。

【請求項４０】

前記試料の第2部分を第3のプライマー対のセットと接触させる工程であって、該第3のプライマーのセットが、配列変異を含むcMET配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程;

該試料の該第2部分と該第3のプライマーのセットとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;

各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程

をさらに含み、アンプリコンの存在が、当該プライマー対が特異的である配列変異の存在を示す、請求項27～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項４１】

cMETの一つまたは複数の配列変異がSNPである、請求項40記載の方法。

【請求項４２】

cMET SNPが、S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、およびD1246N（SEQ ID NO:131）からなる群より選択さ

れる、請求項39～41のいずれか一項記載の方法。
【請求項４３】
S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、およびD1246N（SEQ ID NO:131）が検出される、請求項39～42のいずれか一項記載の方法。
【請求項４４】
両反応に同じPCR熱サイクリングレジメンが使用される、請求項39～43のいずれか一項記載の方法。
【請求項４５】
核酸試料がFFPE腫瘍試料から調製される、請求項39～44のいずれか一項記載の方法。
【請求項４６】
試料が、胃がん、腎がん、胆管がん、肺がん、脳がん、子宮頸がん、大腸がん、頭頸部がん、ヘパトーマ、非小細胞肺がん、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣がん、肉腫、および甲状腺がんからなる群より選択される状態と診断された対象からの腫瘍細胞を含む、請求項27～45のいずれか一項記載の方法。
【請求項４７】
一つまたは複数のプライマーが二重ドメインプライマーである、請求項27～46のいずれか一項記載の方法。
【請求項４８】
あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物を識別することができる、請求項27～47のいずれか一項記載の方法。
【請求項４９】
あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、別個のサイズであることによって識別される、請求項27～48のいずれか一項記載の方法。
【請求項５０】
あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される、請求項27～49のいずれか一項記載の方法。
【請求項５１】
第1のプライマーのセットおよび第2のプライマーのセットからの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される、請求項27～50のいずれか一項記載の方法。
【請求項５２】
一つまたは複数のプライマーがSEQ ID NO:1～83からなる群より選択される、請求項27～51のいずれか一項記載の方法。
【請求項５３】
一つまたは複数のプライマーがSEQ ID NO:89～124のいずれかの配列を含む、請求項27～52のいずれか一項記載の方法。
【請求項５４】
プライマーがおよそ表2の濃度で反応混合物中に存在する、請求項27～53のいずれか一項記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
本願は、2013年8月14日に出願された米国仮出願第61/865,755号の、米国特許法第119条(e)項に基づく恩典を主張し、その内容は、参照によりそのまま本明細書に組み入れられる。
【０００２】
配列表

本願は、ASCIIフォーマットで電子提出された配列表を含み、この配列表は参照によりそのまま本明細書に組み入れられる。2014年7月31日に作成された前記ASCIIコピーはファイル名を046264-077471-PCT_SL.txtといい、サイズは97,800バイトである。

【０００３】

技術分野

本明細書に記載する技術は、cMET変化（例えば、コピー数や発現レベルの変動および/または点突然変異を含む突然変異の存在）の検出を可能にするアッセイおよび方法に関する。

【背景技術】

【０００４】

背景

個別化医療の発達は、擾乱または変化を起こした場合に疾患の一因となりうる遺伝子の同定につながった。しかし疾患連鎖遺伝子はいくつかの形で変化を起こしうる。例えば、所与の疾患を有する対象または所与の疾患を発症するリスクがある対象では野生型対象または健常対象と比較して、遺伝子の発現レベルが変化を起こし、遺伝子をコードする配列が変化を起こし、かつ/または遺伝子のゲノムコピーの数が変化（コピー数多型（copy number variation）；「CNV」）を起こしうる。

【０００５】

例えば、cMETはがんに関係づけられており、所与のがん細胞はいずれも、cMETのこれらの変化のうちの一つまたは複数を示しうる。cMET発現産物HGFR（肝細胞成長因子受容体）の活性化は、細胞増殖、細胞生存、浸潤、細胞運動、転移、および血管新生の一因になる。HGFRの活性化は、成長因子濃度の不均衡、遺伝子増幅、および/または突然変異による過剰発現によって引き起こされうる。cMETのこれらの変化は、固形腫瘍（例えば腎がん、胃がん、および肝細胞がん腫瘍）、腺がん、ならびに扁平上皮大細胞がんおよび扁平上皮小細胞がんに見出されている。

【０００６】

これらのタイプの変化はそれぞれが、典型的には、択一的なアプローチを使って検出され、そのアプローチのそれぞれが、臨床的有用性を制限する弱点を示す。例えば、発現レベルは免疫組織化学によって検出されることが多いが、これには、抗体感度が低くて、陽性試料の発現レベルが弱くみえることが問題になる場合がある。CNVおよび遺伝子発現レベルはFISHによって検出することができるが、これらのアッセイは、20％以上の研究室間不一致を呈しうる。突然変異アッセイおよび遺伝子発現アッセイはRT-PCRによって行うことができるが、既存の技術で得られるマルチプレックス能は、包括的臨床診断に必要なものには届かない。マルチモードマルチプレックスアッセイの開発は、より速く、より費用効果の高い、患者の検査およびスクリーニングを可能にすることができ、健康管理の改善を可能にする。

【発明の概要】

【０００７】

本明細書に記載する技術は、cMETの変化、例えば配列の変化（突然変異）、発現レベルの変化、および/または遺伝子コピー数の変化を検出するための方法およびアッセイに向けられる。本発明者らは、単一のマルチプレックス化反応混合物においてcMETコピー数およびcMET発現レベルを高い信頼性で決定し、わずか2つの個別反応を含む単一のマルチプレックス化アッセイにおいてcMETコピー数、cMET発現レベル、およびcMET突然変異の有無を決定するためのアッセイを開発し、その方法を発見した。

【０００８】

一局面において、本明細書には、

核酸試料の一部分を2セットのプライマーと接触させる工程であって、

第1のプライマーセットがcMET遺伝子コピー数多型の変化を検出し、第2のプライマーセットがcMET遺伝子発現レベルの変化を検出し、

該第1のプライマーセットが、cMETの少なくとも一つのgDNA特異的配列および少な

くとも2つの参照遺伝子のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含み、ここで、cMET遺伝子コピー数多型を検出するために、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置し、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置せず、

該第2のプライマーセットが、cMETのmRNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子のmRNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程;

該試料の該一部分と該2セットのプライマーとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;

各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程;

cMETアンプリコンのレベルを参照遺伝子アンプリコンに対して正規化する工程;および

正規化されたcMETアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程

を含む、cMET変化を検出するためのアッセイであって、

参照レベルと比較して高いgDNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMETの遺伝子増幅変化の存在を示し、参照レベルと比較して変化したmRNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMETの遺伝子発現レベル変化の存在を示すアッセイを記載する。

【０００９】

いくつかの態様では、第1のプライマーセットは、EGFRの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットをさらに含み、アッセイは、正規化されたEGFRアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程をさらに含み、ここでは、参照レベルと比較して高いgDNA特異的EGFRアンプリコンのレベルが、試料におけるEGFRの遺伝子増幅変化の存在を示す。いくつかの態様では、7番染色体上に位置する第1プライマーセットの参照遺伝子はKDELR-2であり、アッセイは、正規化されたKDELR-2アンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程をさらに含み、ここでは、参照レベルと比較して高いgDNA特異的KDELR-2アンプリコンのレベルが、試料におけるKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在を示す。いくつかの態様では、cMET、EGFRおよびKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在が、7番染色体増幅の存在を示す。

【００１０】

いくつかの態様では、7番染色体上に位置しない第1プライマーセットの参照遺伝子はSOD1またはSPG21である。いくつかの態様では、第1プライマーセットは、SOD1とSPG21のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む。

【００１１】

いくつかの態様では、プライマーセットは、各遺伝子の少なくとも一つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む。いくつかの態様では、プライマーセットは、各遺伝子の少なくとも2つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む。いくつかの態様では、プライマーセットは、各遺伝子の少なくとも3つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む。

【００１２】

いくつかの態様では、プライマーセットは、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも2つのgDNA特異的アンプリコン、ならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも2つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む。いくつかの態様では、プライマーセットは、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも3つのgDNA特異的アンプリコン、ならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも3つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む。

【００１３】

いくつかの態様において、アッセイは、

試料の第2部分を第3のプライマー対セットと接触させる工程であって、該第3のプライマーセットが、配列変異を含むcMET配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程;

該試料の該第2部分と該第3のプライマーセットとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;

各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程
をさらに含むことができ、ここで、アンプリコンの存在は、当該プライマー対が特異的である配列変異の存在を示す。いくつかの態様では、cMETの一つまたは複数の配列変異はSNPである。いくつかの態様では、cMET SNPは、S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、およびD1246Nからなる群より選択される。いくつかの態様では、S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、およびD1246Nが検出される。

【００１４】

いくつかの態様では、両反応に同じPCR熱サイクリングレジメンが使用される。いくつかの態様では、核酸試料はFFPE腫瘍試料から調製される。いくつかの態様では、試料は、胃がん、腎がん、胆管がん、肺がん、脳がん、子宮頸がん、大腸がん、頭頸部がん、ヘパトーマ、非小細胞肺がん、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣がん、肉腫、および甲状腺がんからなる群より選択される状態と診断された対象からの腫瘍細胞を含む。

【００１５】

いくつかの態様では、一つまたは複数のプライマーは二重ドメインプライマー（dual domain primer）である。いくつかの態様では、あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物を識別することができる。いくつかの態様では、あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、別個のサイズを持つことによって識別される。いくつかの態様では、あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される。いくつかの態様では、第1のプライマーセットおよび第2のプライマーセットからの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される。

【００１６】

いくつかの態様では、一つまたは複数のプライマーは、SEQ ID NO:1～83からなる群より選択される。いくつかの態様では、一つまたは複数のプライマーは、SEQ ID NO:89～124のいずれかの配列を含む。いくつかの態様では、プライマーは、およそ表2の濃度で反応混合物中に存在する。

【００１７】

一局面において、本明細書には、

核酸試料の一部分を、cMET遺伝子コピー数多型の変化を検出する1セットのプライマーと接触させる工程であって、

該プライマーのセットが、cMETの少なくとも一つのgDNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含み、ここで、cMET遺伝子コピー数多型を検出するために、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置し、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置しない、工程;

該試料の該一部分と該プライマーのセットとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;

各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程;

cMETアンプリコンのレベルを参照遺伝子アンプリコンに対して正規化する工程;および

正規化されたcMETアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程

を含む、cMET変化を検出する方法であって、

参照レベルと比較して高いgDNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMETの遺伝子増幅変化の存在を示す方法を記載する。

【００１８】

いくつかの態様では、プライマーのセットは、EGFRの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットをさらに含み、アッセイは、正規化されたEGFRアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程をさらに含み、ここでは、参照レベルと比較して高いgDNA特異的EGFRアンプリコンのレベルが、試料におけるEGFRの遺伝子増幅変化の存在を示す。いくつかの態様では、7番染色体上に位置するプライマーセットの参照遺伝子はKDELR-2であり、方法は、正規化されたKDELR-2アンプリコンのレベルを参照レベル

と比較する工程をさらに含み、ここでは、参照レベルと比較して高いgDNA特異的KDELR-2アンプリコンのレベルが、試料におけるKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在を示す。いくつかの態様では、cMET、EGFRおよびKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在が、7番染色体増幅の存在を示す。いくつかの態様では、7番染色体上に位置しないプライマーセットの参照遺伝子はSOD1またはSPG21である。いくつかの態様では、プライマーセットは、SOD1とSPG21の少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む。

【００１９】

いくつかの態様において、方法は、

核酸試料の一部分を、第2のプライマーセットと接触させる工程であって、該第2のプライマーセットがcMET遺伝子発現レベルの変化を検出する、工程;

をさらに含むことができ、該第2のプライマーセットは、cMETのmRNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子の少なくともmRNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含み、参照レベルと比較して変化したmRNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMETの遺伝子発現レベル変化の存在を示す。

【００２０】

いくつかの態様では、プライマーセットは、各遺伝子の少なくとも一つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む。いくつかの態様では、プライマーセットは、各遺伝子の少なくとも2つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む。いくつかの態様では、プライマーセットは、各遺伝子の少なくとも3つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む。

【００２１】

いくつかの態様では、プライマーセットは、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも2つのgDNA特異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも2つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む。いくつかの態様では、プライマーセットは、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも3つのgDNA特異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも3つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む。

【００２２】

いくつかの態様において、アッセイは、

試料の第2部分を、第3のプライマー対セットと接触させる工程であって、該第3のプライマーセットが、配列変異を含むcMET配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程;

該試料の該第2部分と該第3のプライマーセットとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;

各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程

をさらに含むことができ、ここで、アンプリコンの存在は、当該プライマー対が特異的である配列変異の存在を示す。いくつかの態様では、cMETの一つまたは複数の配列変異はSNPである。いくつかの態様では、cMET SNPは、S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、およびD1246Nからなる群より選択される。いくつかの態様では、S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、およびD1246Nが検出される。

【００２３】

いくつかの態様では、両反応に同じPCR熱サイクリングレジメンが使用される。いくつかの態様では、核酸試料はFFPE腫瘍試料から調製される。いくつかの態様では、試料は、胃がん、腎がん、胆管がん、肺がん、脳がん、子宮頸がん、大腸がん、頭頸部がん、ヘパトーマ、非小細胞肺がん、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣がん、肉腫、および甲状腺がんからなる群より選択される状態と診断された対象からの腫瘍細胞を含む。

【００２４】

いくつかの態様では、一つまたは複数のプライマーは二重ドメインプライマーである。いくつかの態様では、あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産

物を識別することができる。いくつかの態様では、あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、別個のサイズを持つことによって識別される。いくつかの態様では、あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される。いくつかの態様では、第1のプライマーセットおよび第2のプライマーセットからの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される。

【００２５】

いくつかの態様では、一つまたは複数のプライマーは、SEQ ID NO:1～83からなる群より選択される。いくつかの態様では、一つまたは複数のプライマーは、SEQ ID NO:89～124のいずれかの配列を含む。いくつかの態様では、プライマーは、およそ表2の濃度で反応混合物中に存在する。

【図面の簡単な説明】

【００２６】

【図１】本明細書に記載するプライマーターゲットの例示的な態様の模式図を表す。

【図２】胃がん細胞の単一チューブCNVおよび遺伝子発現解析を示し、表1のプライマーを表2で指定するように使用したアッセイのTYEチャネルでの検出を表す。

【図３】胃がん細胞の単一チューブCNVおよび遺伝子発現解析を示し、表1のプライマーを表2で指定するように使用したアッセイのFAMチャネルでの検出を表す。

【図４】肺がん細胞の単一チューブCNVおよび遺伝子発現解析を示し、表1のプライマーを表2で指定するように使用したアッセイのTYEチャネルでの検出を表す。

【図５】肺がん細胞の単一チューブCNVおよび遺伝子発現解析を示し、表1のプライマーを表2で指定するように使用したアッセイのFAMチャネルでの検出を表す。

【図６】cMET発現およびCNVレベルに関する例示的アッセイの定量化された結果のグラフを表す。

【図７】7番染色体ポリソミー解析のグラフを表す。

【図８】cMET点突然変異（例えばSNP）を検出するための代替プライマーセットの模式図を表す。図8はSEQ ID NO:132を開示している。

【図９】表4の短アンプリコンプライマーを使った個別ターゲットに関するマルチプレックスアッセイの結果を表す。

【図１０】表3の長アンプリコンプライマーを使った個別ターゲットに関するマルチプレックスアッセイの結果を表す。

【図１１】実施例1および2のアッセイにおいて使用した熱サイクリングパラメータを表す。

【発明を実施するための形態】

【００２７】

詳細な説明

本明細書に記載する技術の態様は、cMETの変化、例えば配列の変化（突然変異）、発現レベルの変化、および/または遺伝子コピー数の変化を検出するための方法およびアッセイに向けられ、とりわけcMET変化を検出するマルチプレックス化マルチモードアッセイおよび方法に向けられる。

【００２８】

本明細書において使用する用語「HGFR」、「肝細胞成長因子受容体」または「cMET」は、肝細胞成長因子（HGF）への結合によって活性化されるチロシンキナーゼ活性を有する膜貫通型受容体を指す。cMETの配列は、例えばヒトcMET（NCBI Gene ID:4233;SEQ ID NO:84（mRNA）;SEQ ID NO:125（ポリペプチド））など、当技術分野において周知である。

【００２９】

遺伝子または遺伝子発現産物に関して使用する場合、本明細書にいう「変化」は、当該遺伝子または遺伝子発現産物の参照型（例えば野生型）と比較した時の検出可能な変化を指し、例えば遺伝子コピー数の変化、発現レベルの変化、および/または配列の変化（例えば配列変異または突然変異）が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。

【００３０】
本明細書にいう「遺伝子コピー数」は、ゲノム中に存在する所与の遺伝子のコピーの数を指す。いくつかの態様において、単一の遺伝子および/または染色体の一領域は重複している場合があり、例えば一つまたは複数の遺伝子を含む核酸配列のコピーが、互いに隣接してまたはゲノム中の複数の場所に見出され、一方、参照ゲノムでは関連染色体上に当該配列が1コピー（通常の二倍体ゲノムでは2コピー）存在するであろう。いくつかの態様では、染色体全体が重複している（例えばポリソミー）。

【００３１】
本明細書にいう「発現レベル」とは、細胞または試料中に存在する、所与の遺伝子によってコードされるmRNA分子の数を指す。発現レベルは参照レベルに対して増減しうる。cMETの変化はがんと関係づけられており、そのような変化の検出は、診断、予後、および/または処置の選択に役立ちうる。

【００３２】
いくつかの態様において、
核酸試料の一部分を、cMET遺伝子コピー数多型の変化を検出する1セットのプライマーと接触させる工程であって、
該プライマーのセットが、cMETの少なくとも一つのgDNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含み、ここで、cMET遺伝子コピー数多型を検出するために、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置し、かつ一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置しない、工程;
該試料の該一部分と該プライマーのセットとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;
各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程;
cMETアンプリコンのレベルを参照遺伝子アンプリコンに対して正規化する工程
を含む、cMET変化を検出するための本明細書に記載するアッセイおよび/または方法は、それによってcMETコピー数の相対的レベルを決定することができる。いくつかの態様では、cMETコピー数の相対的レベルを、参照レベル（例えば前もって決定された参照レベル）と比較することができ、ここでは、参照レベルと比較して高い、一つまたは複数のgDNA特異的cMETアンプリコンの相対的レベルが、試料におけるcMETの遺伝子増幅変化の存在を示す。いくつかの態様では、方法およびアッセイは、
核酸試料の一部分を、第2のプライマーセットと接触させる工程であって、
該第2のプライマーセットがcMET遺伝子発現レベルの変化を検出し、
該第2のプライマーセットが、cMETのmRNA特異的配列と、任意で少なくとも2つの参照遺伝子の少なくともmRNA特異的配列とを増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程;および
cMETアンプリコンのレベルを参照遺伝子アンプリコンに対して正規化する工程
をさらに含み、それによって、cMET発現の相対的レベルを決定することができる。いくつかの態様では、cMET発現の相対的レベルを、参照レベル（例えば前もって決定された参照レベル）と比較することができ、ここでは、参照レベルと比較して高い、一つまたは複数のmRNA特異的cMETアンプリコンの相対的レベルが、試料におけるcMETの遺伝子発現変化の存在を示す。

【００３３】
いくつかの態様において、cMET変化を検出するための本明細書に記載するアッセイおよび/または方法は、
核酸試料の一部分を2セットのプライマーと接触させる工程であって、
第1のプライマーセットがcMET遺伝子コピー数多型の変化を検出し、第2のプライマーセットがcMET遺伝子発現レベルの変化を検出し、
該第1のプライマーセットが、cMETの少なくとも一つのgDNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含み、ここで、cMET遺伝子コピー数多型を検出するために、一つの

参照遺伝子は7番染色体上に位置し、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置せず、

該第2のプライマーセットが、cMETのmRNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子の少なくともmRNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程;

該試料の該一部分と該2セットのプライマーとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;

各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程;

cMETアンプリコンのレベルを参照遺伝子アンプリコンに対して正規化する工程;および

正規化されたcMETアンプリコンのレベルをcMETの参照レベルと比較する工程

を含み、ここで、cMETの参照レベルと比較して高いgDNA特異的cMETアンプリコンのレベルは、試料におけるcMETの遺伝子増幅変化の存在を示し、cMETの参照レベルと比較して変化したmRNA特異的cMETアンプリコンのレベルは、試料におけるcMETの遺伝子発現レベル変化の存在を示す。

【００３４】

いくつかの態様では、本明細書に記載のアッセイは1本のチューブで行われる。例えば第1および第2のプライマーセットが、単一の反応混合物および/または容器もしくはコンテナ中に存在する。したがって、この態様では、単一の増幅レジメンが遺伝子コピー数および遺伝子発現レベルに関するデータを与えることになる。

【００３５】

いくつかの態様では、第1のプライマーセットは、EGFRの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットをさらに含み、かつ方法は、正規化されたEGFRアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程を含み、ここでは、参照レベルと比較して高いgDNA特異的EGFRアンプリコンのレベルが、試料におけるEGFRの遺伝子増幅変化の存在を示す。本明細書において使用する用語「EGFR」または「上皮成長因子受容体」は、上皮成長因子「EGF」およびTGFαを含むリガンドに結合する膜貫通型受容体を指す。リガンド認識はEGFRの自己リン酸化を引き起こし、MAPK、Akt、および/またはJNK経路を活性化して、細胞増殖をもたらす。EGFRの配列は、例えばヒトEGFR（NCBI Gene ID:1956;SEQ ID NO:85（mRNA）;SEQ ID NO:126（ポリペプチド））など、当技術分野において周知である。

【００３６】

EGFRの変化、例えばEGFRの遺伝子コピー数の増加は、がんと関係づけられており、そのような変化の検出は、診断、予後、および/または処置の選択に役立ちうる。いくつかの態様では、cMETおよびEGFRの遺伝子コピー数が、同じ反応混合物中で、例えば同じチューブ、ウェル、または容器中で、検出される。

【００３７】

cMET（および任意でEGFR）のレベル、例えば遺伝子コピー数レベルおよび/または発現産物レベルを高い信頼性で検出するために、試料中のcMETのレベルを、一つまたは複数の参照遺伝子のそれぞれコピー数または発現レベルに対して正規化することができる。いくつかの態様では、がん細胞において典型的には変化を起こさない遺伝子を、参照遺伝子にすることができる。次に、正規化されたレベルを、ターゲット遺伝子に関する参照レベル、例えば正常試料、健常試料および/または参照試料における当該遺伝子のレベルと比較することができる。

【００３８】

「参照レベル」という用語と「参照試料」という用語は、本明細書においては可換的に使用され、もう一つの試料（すなわち対象から得られたもの）と比較される公知試料中の遺伝子のコピー数シグナルの発現レベルを指す。参照レベルは、核酸を含む生物学的試料における例えばcMETの変化の存在および大きさを決定するのに役立つ。試料における変化の有無または程度を推定するために、試料を適当な基準に対して正規化することができるような形で、参照値は比較のための参照レベルとして役立つ。いくつかの態様では、以前に決定されたレベルを参照レベルにすることができる。例えば参照レベルは、前もって決定された数または比であってよく、本明細書に記載するものと同じアッセイを物理的に繰

り返して決定する必要はない。

【００３９】

参照レベルは、例えば、がんを実質的に持たないかつ/またはがんの症状もがんを有するリスク因子も呈さない対象からの既知の生物学的試料などから得ることができる。既知試料は、複数の個体からの試料をプールして、平均化された集団での参照値または値の範囲を生成させることによって得ることもでき、この場合、参照値は、個体の集団（例えばがんを有さない個体の集団）における、例えば遺伝子コピー数または発現レベルなどの平均レベルを表す。したがって、こうして得られた参照における遺伝子コピー数または遺伝子発現のレベルは、がんを有さない個体の一般集団における平均レベルを代表する。いくつかの態様では、健常成体対象から得られた等価な試料におけるレベルを参照値にすることができる。本明細書にいう「健常成体対象」は、がんのマーカー、徴候、または症状を何も呈さず、がんを有するリスクもない者とすることができる。いくつかの態様では、健常成体対象の集団が、対象と類似する人口学的特性、例えば類似する年齢、類似する民族的背景、類似する食餌などを有する対象を含みうる。

【００４０】

本明細書に記載する方法およびアッセイでは、ターゲット遺伝子（例えばcMET）の相対的コピー数および/または発現レベルを、以下に述べるように、参照遺伝子との比較によって決定することができる。好ましくは、関心対象の疾患に冒された細胞において健常細胞と比較して（発現レベルまたはコピー数が）典型的には変化しないものを、参照遺伝子にすることができる。

【００４１】

健常（例えば非がん性）細胞との比較で疾患細胞（例えばがん細胞、胃がん細胞、腎がん細胞、胆管がん細胞、肺がん細胞、脳がん細胞、子宮頸がん細胞、大腸がん細胞、頭頸部がん細胞、ヘパトーマがん細胞、非小細胞肺がん細胞、黒色腫細胞、中皮腫細胞、多発性骨髄腫細胞、卵巣がん細胞、肉腫細胞および/または甲状腺がん細胞）において変化を起こさない遺伝子を、参照遺伝子にすることができる。

【００４２】

参照遺伝子が7番染色体上に位置しないポリソミー参照遺伝子である場合、そのポリソミー参照遺伝子は、健常（例えば非がん性）細胞との比較で疾患細胞（例えばがん細胞、胃がん細胞、腎がん細胞、胆管がん細胞、肺がん細胞、脳がん細胞、子宮頸がん細胞、大腸がん細胞、頭頸部がん細胞、ヘパトーマがん細胞、非小細胞肺がん細胞、黒色腫細胞、中皮腫細胞、多発性骨髄腫細胞、卵巣がん細胞、肉腫細胞、および/または甲状腺がん細胞）においてポリソミーを起こさないか、またはポリソミーを起こすことが知られていない染色体上に位置することが好ましい。

【００４３】

ターゲット遺伝子（例えばcMET）の遺伝子コピー数レベルを検出する場合は、ターゲット遺伝子のgDNA特異的配列に特異的なプライマー対サブセットによって生成するアンプリコンのレベルを、同じ試料からの2つのポリソミー参照のそれぞれと比較することができる。第1のポリソミー参照は、ターゲット遺伝子と同じ染色体上に存在する遺伝子のgDNA特異的配列に特異的なプライマー対サブセットによって生成するアンプリコンのレベルである。第2のポリソミー参照は、ターゲット遺伝子および第1ポリソミー参照遺伝子とは異なる染色体上に存在する遺伝子のgDNA特異的配列に特異的なプライマー対サブセットによって生成するアンプリコンのレベルである。ターゲット遺伝子について検出されるレベルが、第1ポリソミー参照遺伝子について検出されるレベルより大きければ、それは、ターゲット遺伝子の追加コピー、またはターゲット遺伝子を含むが同染色体参照遺伝子は含まない染色体の一部分の追加コピーが、ゲノム中に存在することを示す。ターゲット遺伝子および第1参照遺伝子について検出されるレベルが、第2参照遺伝子について検出されるレベルよりも大きければ、それは、ターゲット遺伝子と第1ポリソミー参照遺伝子を含む染色体の追加コピーが試料中に存在することを示す（例えばターゲット遺伝子を含む染色体についてポリソミーが示される）。

【００４４】

例えば、いくつかの態様では、cMETの遺伝子コピー数変化は存在するが、7番染色体上に存在するどのポリソミー参照遺伝子の遺伝子コピー数変化も存在しないことから、cMETが遺伝子増幅を起こしていることが示される。いくつかの態様では、7番染色体上に存在するポリソミー参照遺伝子の遺伝子コピー数変化は存在するが、7番染色体上に存在しないどのポリソミー参照遺伝子の遺伝子コピー数変化も存在しないことから、7番染色体のポリソミーの存在が示され、例えば7番染色体全体またはその一部の追加コピーが、その核酸試料を得た細胞中に存在する。いくつかの態様において、cMETと7番染色体上に存在するポリソミー参照遺伝子の両方について遺伝子コピー数変化が検出されるのであれば、その核酸試料については、ポリソミーとcMET（またはcMETを含む領域）の増幅との両方が示されうる。所与の遺伝子（例えばcMET、EGFR、および/またはKDELR-2）に関するgDNA特異的アンプリコンのレベルを、ポリソミー参照遺伝子および/またはポリソミー参照レベルと比較する場合は、7番染色体上の遺伝子の遺伝子コピー数レベルと参照との差のレベルの大きさ（倍率差）を決定することができる。

【００４５】

類似するアプローチを使って、遺伝子発現変化の存在および/または大きさを検出することができる。ターゲット遺伝子（例えばcMET）の発現レベルを検出する場合は、ターゲット遺伝子のmRNA特異的配列に特異的なプライマー対サブセットによって生成するアンプリコンのレベルを、同じ試料からの少なくとも一つの参照遺伝子の発現レベルに対して正規化することができる。参照遺伝子の発現レベルに対して正規化すれば、ターゲット遺伝子の発現レベルを、ターゲット遺伝子に関する参照発現レベル、例えば健常非がん性細胞および/または組織試料におけるターゲット遺伝子の発現レベルなどと比較することができる。いくつかの実施形態では参照レベルを前もって決定しておくことができる。

【００４６】

いくつかの態様では、SOD1および/またはSPG21を、cMETの遺伝子発現レベルを決定するための参照遺伝子にすることができる。いくつかの態様では、本明細書に記載するアッセイまたは方法は、核酸試料中のSOD1および/またはSPG21 mRNAのレベルを決定する工程、例えば試料をSOD1および/またはSPG21配列に特異的なプライマーセットと接触させる工程、SOD1および/またはSPG21ターゲットのPCR増幅を行う工程、およびその結果生じたアンプリコンのレベルを検出する工程を含みうる。

【００４７】

本明細書にいう「スーパーオキシドジスムターゼ1」または「SOD1」は、スーパーオキシドラジカルを破壊するジスムターゼを指す。SOD1の配列は、例えばヒトSOD1（NCBI Gene ID:6647;SEQ ID NO:87（mRNA）;SEQ ID NO:127（ポリペプチド））など、当技術分野において周知である。

【００４８】

本明細書にいう「spastic paraplegia（痙性対麻痺）21」または「SPG21」は、CD4に直接結合するCD4の負の調節因子を指す。SPG21の配列は、例えばヒトSPG21（NCBI Gene ID:51324;SEQ ID NO:88（mRNA）;SEQ ID NO:128（ポリペプチド））など、当技術分野において周知である。

【００４９】

いくつかの態様では、cMETの遺伝子コピー数レベルを決定するための参照遺伝子に、7番染色体上の少なくとも一つの参照遺伝子と7番染色体上にはない少なくとも一つの参照遺伝子とを含めることができる。いくつかの態様では、cMETの遺伝子コピー数レベルを決定するための参照遺伝子に、7番染色体上の一つの参照遺伝子と7番染色体上にはない一つの参照遺伝子とを含めることができる。いくつかの態様では、cMETの遺伝子コピー数レベルを決定するための参照遺伝子に、7番染色体上の2つの参照遺伝子と7番染色体上にはない2つの参照遺伝子とを含めることができる。いくつかの態様では、EGFRおよび/またはKDELR-2を、7番染色体上に存在する参照遺伝子とすることができる。いくつかの態様では、SOD1および/またはSPG21を、7番染色体上に存在しない参照遺伝子とすることができる。

【００５０】
本明細書にいう「ER内腔タンパク質保持受容体2」または「KDELR-2」は、シスゴルジまたはプレゴルジコンパートメント中のタンパク質にテトラペプチドシグナル（KDEL（SEQ ID NO:130））を介して結合し、結合したタンパク質をER内腔に移動させる受容体を指す。KDELR-2の配列は、例えばヒトKDELR-2（NCBI Gene ID:11014;SEQ ID NO:86（mRNA）;SEQ ID NO:129（ポリペプチド））など、当技術分野において周知である。
【００５１】
いくつかの態様では、SOD1および/またはSPG21を、7番染色体上に位置しない参照遺伝子とすることができる。いくつかの態様では、第1のプライマーセットは、SOD1またはSPG21のgDNA特異的配列に特異的な少なくとも一つのプライマーセットを含む。いくつかの態様では、第1のプライマーセットは、SOD1およびSPG21のそれぞれのgDNA特異的配列に特異的な少なくとも一つのプライマーセットを含む。
【００５２】
KDELR-2が7番染色体上の参照遺伝子であり、正規化されたKDELR-2アンプリコンのレベルが参照レベルと比較されるいくつかの態様では、参照レベルと比較して高いgDNA特異的KDELR-2アンプリコンのレベルが、当該試料におけるKDELR-2の遺伝子コピー数変化の存在および/または7番染色体のポリソミーの存在を示す。
【００５３】
いくつかの態様では、ターゲット遺伝子のそれぞれのなかから複数の配列を検出することによって、本明細書に記載するアッセイおよび方法の正確度および信頼性を改良することができる。例えば、あるプライマーセットは、PCR増幅後に、各ターゲット遺伝子に由来するアンプリコンが複数存在するように、同じ遺伝子の別々の配列に特異的な複数のプライマーサブセットを含有することができる。これによってアッセイの正確度が改良されると予想される。いくつかの態様では、所与のターゲット遺伝子のレベル、例えば遺伝子コピー数レベルまたは遺伝子発現レベルを、例えば正規化および参照レベルとの比較に先だって、複数のアンプリコンのレベルを平均し、かつ/またはその幾何平均をとることによって決定することができる。
【００５４】
いくつかの態様では、プライマーセットは、各遺伝子の少なくとも一つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含みうる。いくつかの態様では、プライマーセットは、各遺伝子の少なくとも2つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含みうる。いくつかの態様では、プライマーセットは、各遺伝子の少なくとも3つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含みうる。
【００５５】
いくつかの態様では、プライマーセットは、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも2つのgDNA特異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも2つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含みうる。いくつかの態様では、プライマーセットは、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも3つのgDNA特異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも3つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含みうる。
【００５６】
いくつかの態様では、本明細書に記載するアッセイおよび方法は、cMET中の配列変異の存在を検出する工程をさらに含みうる。本明細書にいう「配列変異」は、置換、挿入、欠失、重複、または再配列を指しうる。
【００５７】
例えば点突然変異、例えば一塩基多型（SNP）を含む配列変異は、表現型的に中立である場合もあるし、当該遺伝子座において主要な配列が呈する表現型とは識別される関連変異体表現型を有する場合もある。本明細書にいう「中立多型」はその配列変異が遺伝子機能を変化させない多型を指し、「突然変異」または「機能的多型」は、遺伝子機能を変化させる配列変異、したがって関連表現型を有する配列変異を指す。ある集団内に存在する

ある遺伝子座の配列変異をアレルという。ある集団内に2つ以上のアレルが存在する特定遺伝子座についてある個体の遺伝子型に言及する場合、「主要なアレル」とは、問題の集団において最も高頻度に存在するものである（すなわち、2つのアレルがある場合、その集団の50％超に存在するアレルは、主要なアレルであり、3つ以上のアレルがある場合、「主要なアレル」は、対象集団内に最も高頻度に存在するもの、例えば当該部位において他のアレルに対して、少なくとも5％高い頻度で存在するものである）。「変異体アレル」という用語は、当該集団において主要なアレルより低頻度で存在する一つまたは複数のアレルを指すために使用される（例えば2つのアレルがある場合、変異体アレルは、対象集団の50％未満に存在するものであり、3つ以上のアレルがある場合、変異体アレルは、主要なアレルより低い（例えば少なくとも5％低い）頻度で存在するものの全てである）。配列変異は遺伝子のgDNAおよび/またはmRNAに存在（したがって検出）することができる。

【００５８】

いくつかの態様において、配列変異体は点突然変異でありうる。本明細書にいう「点突然変異」は、あるゲノム遺伝子座のミュータントコピー中の突然変異（挿入および欠失を含む）の部位に存在するヌクレオチドの実体を指し、したがってこれは、野生型配列からの、一塩基位置におけるヌクレオチドの配列の変化を指す。SNP（一塩基多型）は、ある集団内の異なる個体間で同じゲノム遺伝子座に生じる点突然変異の1タイプである。点突然変異は、同じ個体内の異なる細胞間に生じる点で、体細胞性でありうる。

【００５９】

いくつかの態様において、配列変異は一塩基多型（SNP）でありうる。本明細書にいう「一塩基多型」または「SNP」は、1ヌクレオチド残基における核酸配列変異を指し、1ヌクレオチドの欠失、挿入、または塩基変化、すなわち置換を含む。SNPは対立因子（allelic）でありうる。いくつかのSNPは明確な表現型、例えば疾患表現型を有し、他のSNPには公知の関連表現型がない。本明細書に記載するSNP検出方法は、表現型特徴の予測、例えば薬物に対する応答性または感受性の予測に使用することができる。これに関連して、本明細書に記載する、そして当技術分野において公知の、SNP遺伝子型判定は、必ずしも、疾患の診断または疾患に対する感受性の診断に役立つわけではない。

【００６０】

上述のように、いくつかの態様では、変化はSNPを含む。SNP遺伝子座には少なくとも4つのアレルが考えられるが、ターゲット部位において2つのヌクレオチド間だけで変動するSNPも珍しくはない。いくつかの態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、SNP遺伝子座の単一アレルを検出することができるプライマー対のサブセットに関係する。いくつかの態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、あるSNP遺伝子座の2つのアレルを検出することができるプライマーセットに関係する（すなわち、本方法および組成物は、2つのSNPアレルの肯定的検出（affirmative detection）、または当該SNPの「二相性」遺伝子型判定を可能にするアッセイに関係しうる）。いくつかの態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、あるSNP遺伝子座の3つのアレルを検出することができるプライマーセットに関係する（すなわち、本方法および組成物は、3つのSNPアレルの肯定的検出、または当該SNPの「三相性」遺伝子型判定を可能にするアッセイに関係しうる）。いくつかの態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、あるSNP遺伝子座の4つのアレルの肯定的検出を可能にするアッセイに関係する（すなわち、本方法および組成物は、4つのSNPアレルのマルチプレックス検出、または当該SNPの「四相性」遺伝子型判定に関係しうる）。いくつかの態様では、SNPの主要アレルおよび/または野生型アレルが検出される。いくつかの態様では、SNPの主要アレルおよび/または野生型アレルは検出されない。「肯定的に検出（affirmatively detected）」とは、アッセイが当該特異的アレルの増幅を可能にすることを意味する。当該SNP部位には2つの可能性しか存在しないことがわかっている場合には、肯定的検出に代わる検出を使用することができる。その場合は、それら2つの変異体の一方が増幅され、他方は増幅されないようにアッセイを設計することができ、このアッセイは、増幅された変異体を肯定的に検

出し、他方を受動的に検出することができる。すなわち、産物の欠如は、当該他方のアレルまたは変異体が存在することを意味する。

【００６１】

いくつかの態様では、本明細書に記載するアッセイまたは方法は、

試料の第2部分を第3のプライマー対セットと接触させる工程であって、該第3のプライマーセットが、配列変異を含むcMET配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程;

該試料の該第2部分と該第3のプライマーセットとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;および

各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程

をさらに含むことができ、ここでは、アンプリコンの存在が、当該プライマー対が特異的である配列変異の存在を示す。いくつかの態様では、試料の第1部分と第1（および任意で第2）プライマーセットとを含む反応、および試料の第2部分と第3プライマーセットとを含む反応を、同じ熱サイクリング条件を使って行うことができる。例えば、2つの反応を、同時に、同じマルチウェルプレートの別々のウェルで行うか、同じ機械または同じ熱サイクリング条件セットを使用する並列の機械に入っている別々のチューブで行うことができる。

【００６２】

いくつかの態様では、cMET配列変異はSNPでありうる。いくつかの態様では、cMET SNPは、以下のアミノ酸残基変化をもたらすSNPでありうる:S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、および/またはD1246N。いくつかの態様では、本明細書に記載するアッセイまたは方法は、以下のアミノ酸残基変化をもたらすSNPの一つまたは複数を特異的に増幅することができる第3プライマーセットを含む:S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、および/またはD1246N。

【００６３】

さまざまな態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、少なくとも一つのオリゴヌクレオチドプライマーセットによるPCR増幅レジメンを行うことに関係する。本明細書にいう「プライマー」は、ポリヌクレオチドテンプレートに配列特異的にアニールしてテンプレート依存性ポリメラーゼの基質として機能する3'端を与え、よってポリヌクレオチドテンプレートに相補的な伸長産物を生成させる能力を有するDNAもしくはRNAポリヌクレオチド分子またはその類似体を指す。開始および伸長のための条件には、通常、適切な緩衝液（この文脈において「緩衝液」は、溶媒（一般に水性）と、必要な補因子、およびpH、イオン強度などに影響を及ぼす試薬を含む）および適切な温度における、少なくとも一つの、ただしより好ましくは4種類全てのデオキシヌクレオシド三リン酸と、DNAポリメラーゼまたは逆転写酵素などの重合誘発物質との存在が含まれる。本明細書に記載する方法において有用なプライマーは一般に一本鎖であり、プライマーとその相補体はアニールして二本鎖ポリヌクレオチドを形成することができる。本明細書に記載する方法および組成物によるプライマーは、300ヌクレオチド長以下、例えば300、または250、または200、または150、または100、または90、または80、または70、または60、または50、または40ヌクレオチド長以下、好ましくは30ヌクレオチド長以下、または20ヌクレオチド長以下、または15ヌクレオチド長以下、かつ少なくとも10ヌクレオチド長であることができる。

【００６４】

本明細書において使用する用語「セット」は、核酸試料、プライマーまたは他の要素の群を意味する。セットは、既知数の、そして少なくとも2つの、前述の要素を含むであろう。1セットのプライマーは、ターゲット配列に特異的な少なくとも一つのフォワードプライマーと少なくとも一つのリバースプライマーとを含む。1セットのプライマーは、少なくとも一つのプライマー対サブセット、例えば一つのプライマー対サブセット、2つの

プライマー対サブセット、3つのプライマー対サブセット、4つのプライマー対サブセット、5つのプライマー対サブセット、6つのプライマー対サブセット、またはそれ以上のプライマー対サブセットを含むであろう。1セットのプライマーは、同じタイプの変化を検出するプライマー対サブセット、例えば遺伝子コピー数レベル、発現レベル、または配列変異を検出することができるプライマー対サブセットの群を含む。1セットのプライマーは、異なる遺伝子中の同じタイプの変化を検出するプライマー対サブセットを含むことができる。例えば一つのプライマーセットは、一方がcMET遺伝子の遺伝子コピー数レベルを検出し、他方がKDELR-2の遺伝子コピー数レベルを検出する、2つのプライマー対サブセットを含むことができる。

【００６５】

したがって、本明細書にいう「プライマー対サブセット」は、一方がターゲット核酸配列の第1鎖にアニールし、他方が第1鎖の相補体にアニールする、フォワードプライマーとリバースプライマーとを含む、少なくとも2つのプライマーの群を指す。いくつかの態様において、プライマー対サブセットの第1プライマーは、ターゲット核酸配列の第1鎖にアニールすることができ、プライマー対サブセットの第2プライマー（例えばリバースプライマー）は、前述の鎖の相補体にアニールすることができる。ターゲットおよび/またはその相補体にアニールした時のプライマーの方向は、プライマー対サブセットの一方のプライマーのプライマー伸長から進行した核酸合成が、そのプライマー対セットの第2プライマーの少なくとも一領域に相補的である核酸配列を生じるような方向でありうる。核酸ターゲットおよび/または核酸配列の「第1鎖」は、ターゲットヌクレオチドおよび/またはターゲット部位遺伝子座の配列を含む二本鎖核酸のどちらの鎖であってもよいが、ひとたび選ばれれば、その相補体は第2鎖と規定される。したがって、本明細書にいう「フォワードプライマー」は、核酸ターゲットの第1鎖にアニールするプライマーであり、一方、同じセットの「リバースプライマー」は、核酸ターゲットの第1鎖の相補体にアニールするプライマーである。

【００６６】

ターゲット核酸に特異的なプライマーに関連して使用する場合、本明細書にいう「特異的」は、プライマーがターゲット核酸にアニールし、その増幅を媒介すると共に、試料中の非ターゲット配列にはアニールせず、その増幅を媒介することもないアニーリング温度が存在するような、プライマーとターゲットの間の相補性のレベルを指す。配列変異を増幅するプライマー対サブセットに関する場合、そのサブセットのプライマーの少なくとも一つは配列変異に特異的であり、例えばプライマー対サブセットは、配列変異を含まない野生型配列を増幅しないであろう。

【００６７】

いくつかの態様において、gDNAの存在下でmRNAまたはcDNAを特異的に検出するために、一つまたは複数のmRNA特異的プライマーは、イントロンをまたぐプライマーであることができる。本明細書において、プライマー対サブセットは、それが、アンプリコンをmRNAおよび/またはcDNAからは増幅するが、gDNAからは増幅しない場合に、またはmRNAおよび/もしくはcDNAから増幅されたアンプリコンがgDNAから増幅されたアンプリコンとはサイズで識別可能である場合に、「mRNA特異的である」という。アンプリコンをmRNAおよび/またはcDNAからは増幅するが、gDNAからは増幅しないmRNA特異的プライマー対サブセットは、例えばイントロンが除去されたmRNAまたはcDNAには特異的に結合することができるが、イントロンが存在するgDNAには結合することができないように、例えばmRNAまたはcDNAのエクソン-エクソン境界に特異的に結合する少なくとも一つのプライマーを含みうる。gDNAから増幅されたアンプリコンとはサイズで識別することができるアンプリコンをmRNAおよび/またはcDNAから増幅するmRNA特異的プライマー対サブセットは、例えば、そのプライマー対サブセットが特異的に結合する配列の間の距離が、一つまたは複数のイントロンを欠くmRNAまたはcDNAよりgDNAの方が大きくなるように、一つまたは複数のイントロンに隣接する配列に特異的に結合するプライマーを含むものでありうる。いくつかの態様では、RNAまたはcDNEの存在下でgDNAを特異的に結合するために、一つまたは複数のgDNA特異的

プライマーが、ターゲット核酸配列のイントロンに特異的にアニールしうる。本明細書において、プライマー対サブセットは、それがアンプリコンをgDNAからは特異的に増幅するが、mRNAまたはcDNAからはアンプリコンを増幅しない場合に、「gDNA特異的」であるという。いくつかの態様では、長いターゲットポリヌクレオチド（例えばmRNAまたはゲノムDNA中のターゲット部位遺伝子座）だけでなく、短いターゲットポリヌクレオチド（例えばmiRNAまたは分解されたターゲットポリヌクレオチド）も検出するために、少なくとも短いターゲットポリヌクレオチド用のプライマーは、ターゲット配列より大きい離散したサイズの増幅産物をもたらすタグ配列を含みうる。タグは、反応中の全ての増幅産物が別々のサイズを持つことになるように設計することができる。

【００６８】

プライマーを作製する方法は当技術分野では周知であり、例えばINVITROGEN（商標）カスタムDNAオリゴ（Life Technologies、ニューヨーク州グランドアイランド）やIDT（アイオワ州コーラルビル）のカスタムDNAオリゴなど、数多くの商業的供給源が、本明細書に記載する方法および組成物のプライマーを用意するのに適したオリゴヌクレオチド合成サービスを提供している。

【００６９】

いくつかの態様では、一つまたは複数のプライマーは、二重ドメインプライマーでありうる。二重ドメインプライマーは、2013年2月22日に出願されたPCT/US13/27383に詳述されており、その内容は参照によりそのまま本明細書に組み入れられる。

【００７０】

プライマーの例示的な態様を本明細書に記載する。いくつかの態様では、一つまたは複数のプライマーを、SEQ ID NO:1～83からなる群より選択することができる。いくつかの態様では、第1のプライマーセットの一つまたは複数のプライマーを、SEQ ID NO:10～18および28～36からなる群より選択することができる。いくつかの態様では、第2のプライマーセットの一つまたは複数のプライマーを、SEQ ID NO:1～10、19～27、および37～45からなる群より選択することができる。第1および第2のプライマーセットのための例示的なプライマー対のサブセットを表2に示す。いくつかの態様では、第3のプライマーセットの一つまたは複数のプライマーを、SEQ ID NO:46～64からなる群より選択することができる。いくつかの態様では、第3のプライマーセットの一つまたは複数のプライマーを、SEQ ID NO:64～83からなる群より選択することができる。いくつかの態様では、プライマーは、およそ表2の濃度で反応混合物中に存在しうる。いくつかの態様では、一つまたは複数のプライマーは、SEQ ID NO:89～124のいずれかの配列を含む。

【００７１】

本明細書に記載する方法および組成物は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅レジメンの実施に関係する。本明細書において使用する用語「増幅レジメン」は、関心対象の核酸配列を特異的に増幅させる、すなわちその存在量を増加させるプロセス、より具体的には、先のポリメラーゼ伸長の産物が次の伸長ラウンドのためのテンプレートとして役立つ場合に起こる指数的増幅を指す。本発明のPCR増幅レジメンは、少なくとも2回、そして好ましくは少なくとも5、10、15、20、25、30、35回またはそれ以上の反復サイクルを含み、各サイクルは、1）鎖分離（例えば熱変性）;2）テンプレート分子へのオリゴヌクレオチドプライマーアニーリング;および3）アニールしたプライマーの核酸ポリメラーゼ伸長という工程を含む。これらの工程のそれぞれに必要な条件および時間は、当業者であれば案出することができる。本明細書に記載する方法の増幅レジメンは、好ましくは、数多く市販されているサーマルサイクラーで行われる。

【００７２】

いくつかの態様では、例えばmRNAのレベルを本明細書に記載するように決定したい場合などに、本明細書に記載のPCR増幅レジメンに先だって核酸試料を逆転写に付すことができる。逆転写のプロトコールおよび試薬類は当技術分野において周知であり、市販されている。逆転写レジメンの例示的な態様は次のとおりである。RT緩衝液、0.5mM dNTP類、5nM RTプライマー、および20単位のSuperscript III（商標）逆転写酵素（RNA依存性DNAポ

リメラーゼ）を含む反応混合物に、RNAとgDNA（例えば25ngのRNAと2.5ngのgDNA）の両方を含む5μLの核酸試料を加える。次に、反応を50℃で30分、90℃で5分、および4℃で5分、インキュベートする。本方法およびアッセイにおける使用に適したRTプライマーの例示的な態様、例えばSEQ ID NO:1～9を、本明細書の実施例に記載する。

【００７３】

PCRには核酸ポリメラーゼを使用する必要がある。本明細書において使用する表現「核酸ポリメラーゼ」は、ヌクレオシド三リン酸のテンプレート依存的重合を触媒することでテンプレート核酸配列に相補的なプライマー伸長産物を形成させる酵素を指す。核酸ポリメラーゼ酵素は、アニールしたプライマーの3'端から合成を開始し、テンプレートの5'端に向かう方向に進行する。当技術分野では数多くの核酸ポリメラーゼが公知であり、市販されている。好ましい核酸ポリメラーゼの一群は耐熱性である。すなわち、それらは、アニールした相補的核酸鎖を変性させるのに足りる温度、例えば94℃または時にはそれ以上の温度に曝した後も、機能を保っている。いくつかの態様において、ポリメラーゼはΔexo-Apta Taqポリメラーゼでありうる。

【００７４】

当技術分野において理解されているとおり、PCRは、一般に反応混合物の加熱を伴う鎖分離工程を含むサイクルを必要とする。本明細書において使用する用語「鎖分離」または「鎖を分離する」は、相補的二本鎖分子がオリゴヌクレオチドプライマーへのアニーリングに利用することができる2つの一本鎖に分離するように核酸試料を処理することを意味する。より具体的には、本明細書に記載する方法の鎖分離は、核酸試料をそのT_m以上に加熱することによって達成される。一般に、核酸ポリメラーゼに適した緩衝液中に核酸分子を含有する試料の場合、鎖分離を達成するには94℃まで加熱すれば足りる。例示的な緩衝液は、50mM KCl、10mM Tric-HCl（25℃でpH8.8）、0.5～3mM $MgCl_2$、および0.1%BSAを含有する。

【００７５】

同じく当技術分野において理解されているとおり、PCRは、プライマーをテンプレート核酸にアニールさせることを必要とする。本明細書にいう「アニールさせる」とは、2つの相補的なまたは実質的に相補的な核酸鎖をハイブリダイズさせること、より具体的には、この用語をPCRに関して使用する場合には、テンプレート依存性ポリメラーゼ酵素のプライマー伸長基質が形成されるようにハイブリダイズさせることを指す。プライマー-ターゲット核酸アニーリングのための条件は、プライマーの長さと配列によって変動し、プライマーのT_m計算値に基づく。一般に、増幅レジメンのアニーリング工程では、鎖分離工程後に温度を、アニーリングを許すのに足りる時間にわたって、そのプライマー配列に関するT_m計算値に基づく温度まで下げる。

【００７６】

当業者は、広く利用可能ないくつかのアルゴリズム（例えばOLIGO（商標）（Molecular Biology Insights Inc.、コロラド州）プライマー設計ソフトウェアおよびVENTRO NTI（商標）（Invitrogen, Inc.、カリフォルニア州）プライマー設計ソフトウェアならびにPrimer3およびOligo Calculatorを含むインターネット上で利用可能なプログラム）のいずれかを使って、T_mを容易に予測することができる。例えばT_mは、NetPrimerソフトウェア（Premier Biosoft、カリフォルニア州パロアルト;ワールドワイドウェブ上、http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprlaunch/Help/xnetprlaunch.htmlにおいて無料で利用可能）を使って計算することができる。NetPrimerソフトウェアが使用し参照によりそのまま本明細書に組み入れられるFrieir et al. PNAS 1986 83:9373-9377に詳述されている以下の式を使って、プライマーのT_mを計算することもできる。

$$T_m = \Delta H / (\Delta S + R \times \ln(C/4)) + 16.6\log([K^+]/(1+0.7[K^+])) - 273.15$$

式中、ΔHはヘリックス形成のエンタルピーであり、ΔSはヘリックス形成のエントロピーであり、Rはモル気体定数（1.987cal/℃×mol）であり、Cは核酸濃度であり、$[K^+]$は塩濃度である。大半の増幅レジメンでは、アニーリング温度が、予想T_mより約5℃低くなるように選択されるが、T_mに近いかT_mを上回る（例えば予想T_mより1℃～5℃低いか予想T_mよ

り1℃～5℃高い）温度も使用することができ、例えば予想T_mを5℃以上下回る温度（例えば6℃下、8℃下、10℃下またはそれ以下）も同様に使用することができる。一般に、アニーリング温度がT_mに近いほど、アニーリングは特異的である。PCR増幅レジメン中のプライマーアニーリングに見込む時間は主として反応体積に依存し、体積が大きいほど長い時間を必要とするが、プライマー濃度およびテンプレート濃度にも依存し、テンプレートに対するプライマーの相対的濃度が高いと、相対的濃度が低い場合より必要な時間は短くなる。体積および相対的プライマー/テンプレート濃度に依存して、増幅レジメンにおけるプライマーアニーリング工程は、1秒～5分程度でありうるが、一般的には10秒～2分であり、好ましくは30秒～2分程度であるだろう。

【００７７】

本明細書にいう「実質的にアニールする」とは、検出可能なレベルの特異的増幅産物を生産するのに足りるPCR増幅レジメン中のアニーリングの程度を指す。

【００７８】

PCRは、各サイクルにおける、アニールしたプライマーのポリメラーゼ伸長にも依拠している。本明細書において使用する用語「ポリメラーゼ伸長」は、アニールしたプライマーの3'端への核酸ポリメラーゼによる少なくとも一つの相補的ヌクレオチドのテンプレート依存的組込みを意味する。ポリメラーゼ伸長は、好ましくは、2つ以上のヌクレオチドを付加し、好ましくは最大でテンプレートの全長に対応する数（その数を含む）のヌクレオチドを付加する。ポリメラーゼ伸長のための条件はポリメラーゼの実体によって変動する。ポリメラーゼ伸長に使用される温度は、一般に、酵素の公知の活性特性に基づく。ただし、アニーリング温度を例えば酵素の至適温度より低くする必要がある場合は、至適温度より低い伸長温度を使用することが許容されうることも多いだろう。一般に、酵素は至適伸長温度未満でも少なくとも部分的な活性を保っているが、最もよく使用される耐熱性ポリメラーゼ（例えばTaqポリメラーゼおよびその変異体）によるポリメラーゼ伸長は65～75℃、好ましくは約68～72℃で行われる。

【００７９】

プライマー伸長は、アニールしたオリゴヌクレオチドプライマーの伸長を許す条件下で行われる。本明細書において使用する用語「伸長産物が生じるように、アニールしたオリゴヌクレオチドの伸長を許す条件」とは、例えば核酸ポリメラーゼがプライマー伸長を触媒する際の温度、塩濃度、補因子濃度、pH、および酵素濃度を含む一組の条件を指す。そのような条件は、使用する核酸ポリメラーゼの実体によって変動するが、多数の有用なポリメラーゼ酵素についての条件は当業者には周知である。例示的な一組の条件は、Taqポリメラーゼがプライマー伸長を触媒する72℃において、50mM KCl、10mM Tric-HCl（25℃でpH8.8）、0.5～3mM $MgCl_2$、200μMの各dNTP、および0.1％BSAである。

【００８０】

いくつかの態様において、熱サイクリング条件は、図11に図示するプロトコールに従いうる。

【００８１】

いくつかの態様では、本明細書に記載する方法およびアッセイにおいて使用するための緩衝液が、Tris緩衝液、トレハロース、酢酸カリウム、グリセロール、ベタイン、塩化マグネシウム、塩化カリウム、硫酸アンモニウム、DMSO、DTT、BSA、dNTP類、Tween-20およびポリメラーゼを含みうる。いくつかの態様では、本明細書に記載する方法およびアッセイにおいて使用するための緩衝液が、10～400mM Tris緩衝液（pH7.5～9.5）、2～20％トレハロース、10～300mM酢酸カリウム、1～7.5％グリセロール、100mM～2Mベタイン、2.5～12.5mM塩化マグネシウム、1～10mM塩化カリウム、1～10mM硫酸アンモニウム、0.1～2％DMSO、1～10mM DTT、10～1,000μg/mL BSA、50～400mM dNTP、0～1％Tween-20および1～10酵素単位のポリメラーゼを含みうる。

【００８２】

本明細書にいう「増幅産物」または「アンプリコン」は、特定ターゲット核酸配列の一部分および/またはその相補配列のコピーであって、テンプレート核酸配列および/または

その相補配列にヌクレオチド配列が対応する、PCR反応によって得られるポリヌクレオチドを指す。本明細書にいう増幅産物は一般的には二本鎖DNAであるだろうが、その個々の鎖に言及する場合もある。

【００８３】

本明細書に記載する方法では、遺伝子発現および/または遺伝子突然変異の定量化または評価だけでなく、遺伝子コピー数およびその変動を定量化または評価するためにも、PCRを使用する。本明細書に記載する方法のいずれについても、複数のサイクル時点で試料をPCR反応から取り出し、取り出した試料中のアンプリコンを分離し、その量を検出することによって、定量化を達成することができる。この方法で測定される各アンプリコンに関する増幅プロファイルは、初期テンプレートの定量化を可能にする。例えば、参照により本明細書にそのまま組み入れられる米国特許第8,321,140号および米国特許出願公開第2013/0053274号を参照されたい。

【００８４】

いくつかの態様では、本明細書に記載する方法および組成物は、マルチプレックスPCRに関係する。本明細書にいう「マルチプレックスPCR」とは、PCRの変法を指し、この変法では、一つの反応容器における2つ以上のターゲット核酸配列の同時増幅と、それに続くまたはそれに並行して行われる複数産物の検出とを、1セット中の1対を上回るプライマー（例えば少なくとも2つ以上のフォワードプライマーおよび/または2つ以上のリバースプライマー）を使用することによって達成することができる。マルチプレックス増幅は、複数のターゲットの存在を検出するためだけでなく、欠失、突然変異、および多型ならびに/または発現レベルの解析、検出、および/または遺伝子型判定、ならびに/または定量的アッセイにも役立ちうる。マルチプレックスは、単一の反応における2～1,000種類の異なるターゲット配列および/またはターゲット核酸の変化の検出を指しうる。本明細書にいうマルチプレックスは、単一の反応における2～1,000種類、例えば5～500、25～1000、または10～100種類の間にある任意の範囲の異なるターゲット配列の検出などを指す。非限定的な例として、本明細書に記載する方法の一部としてのマルチプレックスPCR反応は、少なくとも2つの異なる対立因子ターゲット部位遺伝子座における少なくとも2つのSNPの2つ以上の考えうるアレルの存在を、単一の反応において肯定的に検出することができる。PCRに適用される用語「マルチプレックス」は、少なくとも2つの異なるターゲット配列に対して特異的なプライマーが同じPCR反応中に存在することを含意する。したがって、2つの異なるターゲット配列に特異的なプライマーセットが存在する反応は、たとえ少なくとも2つのターゲット配列のうちの一つしか（またはいずれも）所与の試料中に実際に検出されないとしても、マルチプレックス増幅とみなされる。したがっていくつかの態様において、マルチプレックスPCRとは、一つまたは複数のターゲットが反応中に存在する場合に一つまたは複数の特異的増幅産物をもたらすことができる複数のプライマー対を含有する反応も指すことができる。

【００８５】

いくつかの態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、マルチモードPCRに関係する。本明細書にいう「マルチモード」は、マルチプレックスPCRの変法を指し、この変法では、2タイプまたは2クラス以上の分子または変化の同時増幅が、一つの反応容器内で起こる。マルチモード増幅は、いくつかの態様において、遺伝子コピー数、発現レベル、および/または配列変異の解析に役立ちうる。マルチモードとは、少なくとも2つの異なるタイプのターゲット、すなわち2つの異なるタイプのターゲット、または3つの異なるタイプのターゲットの検出を指すことができる。非限定的な例として、マルチモードPCR反応は、遺伝子コピー数のレベルとmRNA発現産物のレベルとを、そのようなターゲットの定量化を含めて、単一の反応において検出することができる。

【００８６】

定量化局面は、例えば増幅反応中または増幅反応後の任意の時点における試料採取を繰り返し、続いて増幅産物の分離および検出を行うことによって、容易にすることができる。試料採取は、例えば反応の一部を取り出す工程を含みうる。試料採取は、例えば各サイ

クルが終わるごとに行うか、または数サイクルが終わるごとに、例えば2サイクルが終わるごとに、3サイクルが終わるごとに、4サイクルが終わるごとに行うことなどができる。ほとんどの場合、均一な試料間隔が望ましいだろうが、試料採取を均一な間隔で行う必要はない。ほんの一例として、試料採取ルーチンは、最初の5サイクルの各サイクル後の試料採取と、その後の2サイクル後ごとの試料採取とを伴うか、またはその逆を伴いうる。

【００８７】

増幅反応からの試料採取またはアリコートの分取は、いくつかの異なる一般的フォーマットで行うことができる。試料採取方法または取り出し方法は、例えば限定するわけではないが、利用可能な器具、解析すべき試料の数、および試料収集に対する検出のタイミング（例えば並行的か逐次的か）を含むいくつかの因子のどれにでも依存しうる。試料の取り出しまたは排出の正確な方法は、必ずしも本明細書に記載する方法の制限事項ではない。試料採取は、とりわけハイスループット応用の場合には、好ましくは自動化デバイスを使って行われる。試料採取は、PCR反応から毛細管電気泳動デバイスへの直接的な界面動電的注入（electrokinetic injection）または動水力学的注入（hydrodynamic injection）を使って行うこともできる。本方法において使用される試料採取方法は、好ましくは、例えば一つのアリコートを吸引した後は廃棄することにより、あるいは同じチップまたはニードルは同じPCR反応容器から試料を分取するのに使用することにより、サイクリング反応の汚染が最小限に抑えられるように適応させる。同時試料採取および検出のための方法は当業者には公知である（例えば参照により本明細書に組み入れられる米国特許出願公開第2004/0166513号を参照されたい）。

【００８８】

試料採取工程で分取される核酸の量および/またはアリコートの体積は、例えば増幅反応の総体積、産物検出の感度、ならびに使用する試料採取および/または分離のタイプなどに依存して変動しうる。増幅体積は、数マイクロリットルから数百マイクロリットルまで（例えば5μl、10μl、20μl、40μl、60μl、80μl、100μl、120μl、150μl、もしくは200μl、またはそれ以上）変動し、好ましくは10～150μlの範囲で、より好ましくは10～100μlの範囲で変動しうる。増幅反応の正確な体積は本発明の制限事項ではない。アリコートの体積は反応混合物の0.01%から30%まで変動しうる。核酸は一般に、キャピラリー電気泳動毛細管への界面動電的注入によってローディングされるが、試料採取された反応の体積は感知できるほどには減少しないであろう。増幅レジメンは、複数の独立した核酸増幅混合物に対して、任意でマルチウェルコンテナにおいて、行うことができる。増幅反応を行うコンテナは、必ずしも本明細書に記載する方法の制限事項ではない。

【００８９】

さまざまな態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、各ターゲット核酸配列に関する、例えば各ターゲット変化に関する、増幅産物（例えばアンプリコン）の検出に関係する。いくつかの態様では、各ターゲット核酸配列に関する増幅産物の検出により、試料中のターゲット核酸配列の存在が肯定的に示される。いくつかの態様では、各ターゲット核酸配列に関する増幅産物の定量的検出により、試料におけるそのターゲット核酸配列のレベルが示される。

【００９０】

いくつかの態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、互いに識別可能であるべき2つ以上のプライマー対サブセットの増幅産物に関係する。いくつかの態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、2つ以上のプライマー対サブセットの増幅産物が、別個のサイズを持つことによって識別されうる、PCR増幅レジメンに関係する。本明細書において、核酸が異なるサイズの核酸から分割可能であれば、その核酸は「別個のサイズ」を持つという。「異なるサイズ」とは、長さが少なくとも一つのヌクレオチド分は異なる核酸分子を指す。一般に、本明細書に記載する方法で有用な別個のサイズを持つ増幅産物は、所与の分離方法または検出方法において使用される分離プロセスでの分解能の限界に等しいかそれを上回るヌクレオチド数分、異なっている。例えば分離の限界が1塩基である場合、別個のサイズを持つ増幅産物は、長さが少なくとも1塩基分は異なる

が、2塩基分、5塩基分、10塩基分、20塩基分、50塩基分、100塩基分またはそれ以上異なっていてもよい。分解能の限界が例えば10塩基である場合、別個のサイズを持つ増幅産物は、少なくとも10塩基分は異なるであろうが、11塩基分、15塩基分、20塩基分、30塩基分、50塩基分、100塩基分またはそれ以上異なっていてもよい。

【００９１】

いくつかの態様では、プライマーまたはその任意の部分の長さと、それらがアニールするターゲット核酸配列のセグメントの長さが、どちらも変動しうる。例えばフォワードプライマーとリバースプライマーとが遠くにまたは近くに配置するように選ばれることによる、増幅されるターゲット配列の長さの変動は、異なるターゲットからの産物間の容易な区別を保証するための最も簡単なアプローチである。プライマーの長さの変動、とりわけ二重ドメインプライマーの5'テール領域の長さの変動は、例えばアッセイにおいて所与のターゲット遺伝子座の特異的アレルの産物を識別するのに、特に有効である。

【００９２】

いくつかの態様では、増幅産物が異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される。いくつかの態様では、ラベルがプライマーに組み込まれる。いくつかの態様では、ラベルがプライマーにコンジュゲートされる。

【００９３】

いくつかの態様では、PCR増幅レジメンが完了した後に、ラベルがプライマーに結合される。いくつかの態様では、プライマーまたはそこに取り付けられた部分に特異的に結合するオリゴヌクレオチドもしくは抗体またはその一部分に、ラベルがコンジュゲートされる。

【００９４】

2つの検出可能ラベルは、一方からのシグナルを他方からのシグナルと識別することができるのであれば、異なるとみなされる。検出可能ラベルは、例えば光吸収色素、蛍光色素、または放射性ラベルを含みうる。蛍光色素は好ましい。一般に蛍光シグナルは、そのピーク放出波長が少なくとも20nm離れていれば、別の蛍光シグナルと識別することができる。ピーク分離が大きいほど好ましく、ある反応における発蛍光団放出ピークが、狭いピークまたは急峻なピークではなく広い場合には、とりわけそうである。

【００９５】

検出可能ラベル、それらを検出する方法、およびそれらを増幅産物に組み込み、またはカップリングし、かつ/または結合させる方法は、当技術分野において周知である。非限定的な例として以下に説明する。

【００９６】

いくつかの態様では、検出可能ラベルは、分光測光手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、電磁気的手段、放射化学的手段、または化学的手段、例えば蛍光、化学蛍光、もしくは化学発光、または他の任意の適当な手段によって検出することができるラベルを含みうる。

【００９７】

本明細書に記載する方法において使用される検出可能ラベルは、一次ラベル（この場合、ラベルは直接検出することができる部分または直接検出することができる部分を生成する部分を含む）または二次ラベル（この場合、検出可能ラベルは、例えば二次抗体および三次抗体を使用する免疫学的標識化で一般的であるように、もう一つの部分に結合することで検出可能なシグナルを生成する）であることができる。

【００９８】

検出可能ラベルは、共有結合的手段または非共有結合的手段によって核酸に連結することができる。あるいは、リガンド-受容体結合対機構を介してまたは他のそのような特異的認識分子を介してもう一つの核酸への結合を果たす分子を直接的に標識することなどによって、検出可能ラベルを連結することもできる。検出可能ラベルとして、放射性同位体、生物発光化合物、発色団、抗体、化学発光化合物、蛍光化合物、金属キレート、および酵素を挙げることができるが、これらに限るわけではない。

【００９９】
いくつかの態様において、検出可能ラベルは、例えば限定するわけではないが、フルオレセイン、フィコエリトリン、Cy3（商標）、Cy5（商標）、アロフィコシアニン、Texas Red、ペリジニンクロロフィル、シアニン、タンデムコンジュゲート、例えばフィコエリトリン-Cy5（商標）、緑色蛍光タンパク質、ローダミン、フルオレセインイソチオシアネート（FITC）およびOregon Green（商標）、ローダミンおよび誘導体（例えばTexas redおよびテトラメチルローダミンイソシアネート（TRITC））、ビオチン、フィコエリトリン、AMCA、CyDyes（商標）、6-カルボキシフルオレセイン（一般にFAMおよびFという略号で知られている）、6-カルボキシ-2',4',7',4,7-ヘキサクロロフルオレセイン（HEX）、6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン（JOEまたはJ）、N,N,N',N'-テトラメチル-6-カルボキシローダミン（TAMRAまたはT）、6-カルボキシ-X-ローダミン（ROXまたはR）、5-カルボキシローダミン-6G（R6G5またはG5）、6-カルボキシローダミン-6G（R6G6またはG6）、およびローダミン110;シアニン色素、例えばCy3、Cy5およびCy7色素;クマリン類、例えばウンベリフェロン;ベンズイミド色素、例えばHoechst 33258;フェナントリジン色素、例えばTexas Red;エチジウム色素;アクリジン色素;カルバゾール色素;フェノキサジン色素;ポルフィリン色素;ポリメチン色素、例えばCy3、Cy5などのシアニン色素など;BODIPY色素およびキノリン色素などの蛍光色素分子または発蛍光団であることができる。

【０１００】
いくつかの態様において、検出可能ラベルは、例えば限定するわけではないが、^{3}H、^{125}I、^{35}S、^{14}C、^{32}P、および^{33}Pなどの放射性ラベルであることができる。

【０１０１】
いくつかの態様において、検出可能ラベルは、例えば限定するわけではないが、セイヨウワサビペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼなどの酵素であることができる。酵素ラベルは、例えば化学発光シグナル、色シグナル、または蛍光シグナルを生成することができる。

【０１０２】
いくつかの態様では、検出可能ラベルは、例えば限定するわけではないが、ルミノール、ルシフェリンまたはルシゲニンなどの化学発光ラベルである。

【０１０３】
いくつかの態様において、検出可能ラベルは、例えば限定するわけではないが、金コロイドまたは着色ガラスもしくは着色プラスチック（例えばポリスチレン、ポリプロピレン、およびラテックス）ビーズなどの分光測色ラベルであることができる。

【０１０４】
いくつかの態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、2つ以上のプライマー対サブセットの増幅産物を配列決定によって識別することができるPCR増幅レジメンに関係する。核酸を配列決定する方法は当技術分野において周知であり、商業的配列決定サービスは広く利用可能である（例えばGenscript、ニュージャージー州ピスカタウェイ）。

【０１０５】
いくつかの態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、2つ以上のプライマー対サブセットの増幅産物を溶解曲線解析によって識別することができるPCR増幅レジメンに関係する。溶解曲線解析の方法は当技術分野において周知である（例えば参照によりそのまま本明細書に組み入れられるRirie et al. Analytical Biochemistry 1997 245:154-160;Wittwer et al. Clinical Chemistry 2003 49:853-860;およびLiew et al. Clinical Chemistry 2007 50:1156-1164を参照されたい）。

【０１０６】
サイズ分離された増幅産物の直接検出は好ましい。しかし、いくつかの態様において、本明細書に記載する方法および組成物は、2つ以上のプライマー対サブセットの増幅産物をオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションによって識別することができるPCR増幅レ

ジメンに関係する。当業者は、ターゲット核酸配列の配列情報を使って、単一のターゲットに対して完全に相補的であり、他のターゲット核酸配列には相補的でないプローブを設計することができる。完全には相補的でないハイブリダイゼーションによるバックグラウンドシグナルが最小限に抑えられるように、ハイブリダイゼーション条件は、常法によって最適化することができる。ハイブリダイゼーションプローブは、そのプローブによってハイブリダイズされる配列が、それを、反応中に存在する少なくとも一つの他の増幅産物と識別する限り、プライマー配列またはプライマーに含まれない増幅産物の一部にハイブリダイズするように設計することができる。

【０１０７】

いくつかの態様では、本明細書に記載するPCR増幅レジメンは、マルチプレックスおよび/またはマルチモードレジメンである。いくつかの態様では、一つのプライマー対サブセットの増幅産物を、少なくとも2つのアプローチで、他のプライマー対サブセットの増幅産物と識別することができる。非限定的な例として、cMETのgDNA特異的ターゲットを増幅するプライマーセットの産物の全てを、一つの共通するラベルで標識し、ユニークな増幅産物のそれぞれを、同じプライマーセットの他の増幅産物から、別個のサイズを持つことによって識別することができる。

【０１０８】

本明細書に記載する方法および組成物は、ターゲット核酸配列の存在および/またはレベル、例えば試料中の遺伝子変化の存在および/またはレベルの検出に関係する。ターゲット核酸はRNAまたはDNAであることができる。ターゲット核酸は二本鎖（ds）核酸または一本鎖（ss）核酸、例えばdsRNA、ssRNA、dsDNA、またはssDNAであることができる。本明細書に述べるように、本明細書に記載の方法は、同じ反応において、これらのタイプのターゲットの2つ以上の検出および/または定量化、すなわちマルチモードの増幅および検出を可能にすることが、特に企図されている。ターゲット核酸の非限定的な例として、核酸配列、突然変異を含む核酸配列、欠失を含む核酸配列、挿入を含む核酸配列、配列変異体、アレル、多型、点突然変異、SNP、マイクロRNA、タンパク質をコードするRNA、非タンパク質をコードするRNA、mRNA、病原体（例えば細菌、ウイルス、または寄生虫）からの核酸、疾患に関連するか疾患を持つ可能性または疾患を発症する可能性に関連する核酸（例えばマーカー遺伝子、疾患に関連するか疾患を持つ可能性または疾患を発症する可能性に関連する多型、またはその発現が疾患に関連するか疾患を持つ可能性または疾患を発症する可能性に関連するRNA）が挙げられる。

【０１０９】

本明細書において有用な試料は核酸を含むであろう。いくつかの態様では、試料はさらにタンパク質、細胞、液体、生体液、保存剤、および/または他の物質を含みうる。いくつかの態様では、試料を対象から得ることができる。いくつかの態様において、試料は、対象から得られた生物学的試料であることができる。いくつかの態様において、試料は、対象から得られた診断用試料であることができる。非限定的な例として、試料は、口腔粘膜スワブ、血液、血清、血漿、喀痰、脳脊髄液、尿、涙、肺胞単離物、胸水、心膜液、嚢胞液、腫瘍組織、組織、生検、唾液、吸引液、またはそれらの組み合わせであることができる。いくつかの態様において、試料は切除または生検によって得ることができる。

【０１１０】

いくつかの態様では、試料は、例えば遠心分離による清澄化液体試料である。いくつかの態様では、試料は、低速遠心分離（例えば3,000×g以下）と、清澄化液体試料を含む上清の収集とによって清澄化される。

【０１１１】

いくつかの態様において、試料は、収集されたばかりの試料であることができる。いくつかの態様では、本明細書に記載する方法および組成物において使用する前に、試料を保存しておくことができる。いくつかの態様では、試料が未処理試料である。本明細書にいう「未処理試料」は、希釈および/または溶液への懸濁を除く試料前処理を事前に何も受けていない生物学的試料を指す。

【０１１２】
いくつかの態様では、試料を対象から入手し、本明細書に記載する方法および組成物において利用する前に、保存または加工することができる。非限定的な例として、試料をパラフィンろうに包埋し、冷蔵または冷凍することができる。冷凍試料は、本明細書に記載する方法および組成物によって核酸の存在を決定する前に融解することができる。いくつかの態様において、試料は加工済み試料または処理済み試料であることができる。試料を処理または加工するための例示的な方法としては、遠心分離、ろ過、超音波処理、ホモジナイゼーション、加熱、凍結および融解、保存剤（例えば抗凝固剤またはヌクレアーゼ阻害剤）との接触、およびそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様では、試料を化学的試薬および/または生物学的試薬で処理することができる。化学的試薬および/または生物学的試薬は、加工および/または貯蔵中の試料または試料が含む核酸を保護しかつ/またはその安定性を維持するために使用することができる。これに加えて、またはこれに代えて、化学的試薬および/または生物学的試薬は、核酸を試料の他の成分から遊離させるために使用することもできる。非限定的な例として、血液試料は、本明細書に記載する方法および組成物において利用する前に、抗凝固剤で処理することができる。核酸解析用に試料を加工、保存、または処理するための方法およびプロセスは、当業者にはよく知られている。
【０１１３】
いくつかの態様において、核酸試料は、FFPE腫瘍試料から調製することができる。いくつかの態様において、試料は、胃がん、腎がん、胆管がん、肺がん、脳がん、子宮頸がん、大腸がん、頭頸部がん、ヘパトーマ、非小細胞肺がん、黒色腫;中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣がん、肉腫、および/または甲状腺がんを有する、または有すると診断された対象からの腫瘍細胞を含みうる。例えば参照により本明細書にそのまま組み入れられるSattler et al. Ther Adv Med Oncol 2011 3:171-184を参照されたい。
【０１１４】
いくつかの態様では、試料中に存在する核酸は、本明細書に記載する方法および組成物において利用する前に、単離され、濃縮され、精製される。試料から核酸を単離、濃縮または精製する方法は当業者には周知である。非限定的な例として、さまざまな試料タイプからゲノムDNAを単離するためのキットが市販されている（例えばQiagen（メリーランド州ジャーマンタウン）のカタログ番号51104、51304、56504、および56404）。
【０１１５】
用語「対象」および「個体」は本明細書では可換的に使用され、試料の入手源となる生物を指す。対象は、その生物またはその生物を構成するもしくはその生物内に含まれる一つまたは複数の細胞における核酸の存在を決定することが望まれる任意の生物であることができる。本明細書にいう「対象」は、生物、例えば細菌、寄生虫、植物、または動物を意味しうる。いくつかの態様では、対象はヒトまたは動物でありうる。通常、動物は、霊長類、齧歯類、家畜または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類としては、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、マカク、例えばアカゲザルが挙げられる。齧歯類としては、例えばマウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギおよびハムスターが挙げられる。家畜および狩猟動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、スイギュウ、ネコ科の動物、例えばイエネコ、イヌ科の動物、例えばイヌ、キツネ、オオカミ、鳥類、例えばニワトリ、エミュー、ダチョウ、および魚類、例えばマス、ナマズおよびサケである。個体または対象には、上述したものの任意のサブセット、例えば上記の全てが含まれる。
【０１１６】
便宜上、明細書、実施例および特許請求の範囲において使用するいくつかの用語および表現の意味を、以下に示す。別段の言明がある場合または文脈からの暗示がある場合を除き、次の用語および表現は以下に示す意味を包含する。定義は、特定の態様を説明する際に役立つように提示するものであって、本願の発明を限定しようとするものではない。なぜなら本発明の範囲は請求項によってのみ限定されるからである。別段の定義がある場合

を除き、本明細書において使用する技術用語および科学用語は全て、本発明が属する技術分野の通常の知識を有する者が一般に理解しているものと同じ意味を有する。当技術分野における用語の用法と本明細書において示すその定義との間に明白な矛盾が存在する場合は、本明細書内に示す定義が優先される。

【０１１７】

便宜上、本願明細書、実施例および特許請求の範囲において使用する一定の用語を、ここに集める。

【０１１８】

「減少させる」、「低減する」、「低減」または「阻害する」という用語は、いずれも本明細書では、統計的に有意な量の減少を意味するために使用される。いくつかの態様において、「低減する」、「低減」または「減少させる」または「阻害する」は、典型的には、参照レベル（例えば所与の処理がない場合）と比較して少なくとも10％の減少を意味し、例えば少なくとも約10％、少なくとも約20％、少なくとも約25％、少なくとも約30％、少なくとも約35％、少なくとも約40％、少なくとも約45％、少なくとも約50％、少なくとも約55％、少なくとも約60％、少なくとも約65％、少なくとも約70％、少なくとも約75％、少なくとも約80％、少なくとも約85％、少なくとも約90％、少なくとも約95％、少なくとも約98％、少なくとも約99％またはそれ以上の減少を包含しうる。本明細書にいう「低減」または「阻害」は、参照レベルと比較した完全な阻害または完全な低減を包含しない。「完全な阻害」とは、参照レベルとの比較で100％の阻害である。減少は、好ましくは、所与の障害を持たない個体にとって正常範囲内として許容できるレベルまでの低下であることができる。

【０１１９】

「増加した」、「増加する」、「強化する」または「活性化する」という用語は、いずれも本明細書では、統計的に有意な量の増加を意味するために使用される。いくつかの態様において、「増加した」、「増加する」、「強化する」または「活性化する」という用語は、参照レベルと比較して少なくとも10％の増加、例えば参照レベルと比較して少なくとも約20％、または少なくとも約30％、または少なくとも約40％、または少なくとも約50％、または少なくとも約60％、または少なくとも約70％、または少なくとも約80％、または少なくとも約90％、または最大100％（100％を含む）の増加、または10～100％の間の任意の増加、または参照レベルと比較して少なくとも約2倍、または少なくとも約3倍、または少なくとも約4倍、または少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍の増加、または参照レベルと比較して、2倍と10倍もしくはそれ以上との間の任意の増加を意味しうる。マーカーまたは症状との関連において、「増加」は、それらのレベルの統計的に有意な増加である。

【０１２０】

本明細書にいう「変化した」は、参照に対する、例えばレベルまたは数（例えば遺伝子発現レベルまたは遺伝子コピー数）の統計的に有意な変化、または配列の変化、例えば参照に対する核酸配列の少なくとも1ヌクレオチドの変化を指しうる。

【０１２１】

本明細書にいう「正規化する」は、一つ目の値を2つ目の値で割るプロセス、例えばyのレベルあたりのxのレベルを得ることを指す。xは典型的には測定されるもの、例えばcMetのコピー数または発現レベルであり、一方、yは参照、例えば参照遺伝子のコピー数または発現レベルである。正規化により、複数の試料および/または反応において測定されたレベルを、例えば試料中に存在する核酸のレベルならびに反応間の異なる効率を調節することによって、比較することが可能になる。参照遺伝子の選択および異なる値を正規化する好ましい手段は、本明細書に項を改めて記述する。

【０１２２】

本明細書にいう「部分」は、全体の一部または断片、例えば分子全体の一部または断片を指す。特定の分子は、複数の部分、例えば2つの部分、3つの部分、4つの部分、5つの部分、またはそれ以上の部分を有しうる。

【０１２３】
本明細書において使用する「単離された」または「部分精製された」という用語は、核酸の場合であれば、その核酸がその自然供給源において見出される時にその核酸と共に存在し、かつ/またはその核酸が細胞によって発現された場合にその核酸と共に存在するであろう少なくとも一つの他の成分（例えば核酸またはポリペプチド）から分離された核酸を指す。化学合成された核酸またはインビトロ転写/翻訳を使って合成されたものは、「単離された」ものとみなされる。

【０１２４】
本明細書において使用する用語「核酸」または「核酸配列」は、リボ核酸、デオキシリボ核酸またはその類似体の単位を組み込んだポリマー分子を指す。核酸は一本鎖または二本鎖であることができる。一本鎖核酸は変性した二本鎖DNAの一本の鎖であることができる。あるいは、どの二本鎖DNAにも由来しない一本鎖核酸であることもできる。一局面では、テンプレート核酸がDNAである。もう一つの局面では、テンプレートがRNAである。適切な核酸分子として、ゲノムDNAおよびcDNAを含むDNAが挙げられる。他の適切な核酸分子として、mRNA、rRNAおよびtRNAを含むRNAが挙げられる。核酸分子はゲノムDNAのように天然物であってもよいし、合成物、すなわち人為的に調製したものであってもよいし、それら2つの組み合わせであってもよい。核酸分子は、例えば米国特許出願公開第20070213292号に記載の2'-デオキシ、2'-デオキシ-2'-フルオロ、2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル（2'-O-MOE）、2'-O-アミノプロピル（2'-O-AP）、2'-O-ジメチルアミノエチル（2'-O-DMAOE）、2'-O-ジメチルアミノプロピル（2'-O-DMAP）、2'-O-ジメチルアミノエチルオキシエチル（2'-O-DMAEOE）、または2'-O-N-メチルアセトアミド（2'-O-NMA）、コレステロール付加、およびホスホロチオエート主鎖;ならびに米国特許第6,268,490号に記載の2'-酸素原子と4'-炭素原子とがメチレン単位によって連結されている一定のリボヌクレオシド（この特許および特許出願は参照によりそのまま本明細書に組み入れられる）などといった、一定の修飾も有しうる。

【０１２５】
用語「遺伝子」は、適当な調節配列に機能的に連結された場合にインビトロまたはインビボでRNAに転写される核酸配列（DNA）を意味する。遺伝子は、コード領域の前後にある調節領域、例えば5'非翻訳（5'UTR）配列または「リーダー」配列および3'UTR配列または「トレイラー」配列、ならびに個々のコードセグメント（エクソン）間の介在配列（イントロン）を含みうる。

【０１２６】
本明細書において使用する「相補的」という用語は、所与の2つのポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列が互いにアニールした時に、DNAではAがTと対を形成し、GがCと対を形成し、RNAではGがCと対を形成し、AがUと対を形成するような、ヌクレオチド塩基G、A、T、CおよびU間の水素結合塩基対形成の優先度の序列を指す。本明細書にいう「実質的に相補的」とは、プライマーが、プライマーの全長にわたって、第2のヌクレオチド配列との間に少なくとも90％の相補性を有すること、例えば90％相補的、95％相補的、98％相補的、99％相補的、または100％相補的であることを指す。

【０１２７】
「統計的に有意」または「有意に」という用語は、統計的有意性を指し、一般的には2標準偏差（2SD）以上の差を意味する。

【０１２８】
実施例を除いて、または別段の表示がある場合を除いて、本明細書において使用する成分の量または反応条件を表す数字は全て、いずれの場合も「約」という用語で修飾されていると理解すべきである。パーセンテージに関連して使用される「約」という用語は、±1％を意味しうる。

【０１２９】
本明細書において使用する「を含む」（「comprising」または「comprises」）という用語は、その方法または組成物にとって必須である組成物、方法、およびその各構成要素

に関して使用されるが、明記されていない要素の包含も、それが必須であるか必須でないかを問わず許されている。

【０１３０】

用語「からなる」は、本明細書に記載する組成物、方法、およびその各構成要素であって、その態様の説明において明言していない要素を一切含まないものを指す。

【０１３１】

本明細書において使用する用語「から本質的になる」は、所与の態様に要求される要素を指す。この用語は、その態様の基本的で新規なまたは機能的な特徴に実質的な影響を及ぼさない要素の存在を許す。

【０１３２】

単数形の用語「一つの(a)」、「一つの(an)」および「その(the)」は、文脈から明らかにそうでないことがわかる場合を除き、複数の指示物を包含する。同様に「または」という単語も、文脈から明らかにそうでないことがわかる場合を除き、「および」を包含するものとする。この開示の実施または試験では、本明細書に記載するものに類似するまたは等価な方法および材料を使用することができるが、好適な方法および材料を以下に説明する。「e.g.（例えば）」という略号は、ラテン語exempli gratiaに由来しており、本明細書では、非限定的な例を示すために使用される。したがって「e.g.」という略号は「for example（例えば）」と同義である。

【０１３３】

細胞生物学および分子生物学における一般的用語の定義は、「The Merck Manual of Diagnosis and Therapy」第19版、Merck Research Laboratories刊、2006（ISBN 0-911910-19-0）;Robert S. Porterら編、The Encyclopedia of Molecular Biology、Blackwell Science Ltd.刊、1994（ISBN 0-632-02182-9）;Benjamin Lewin, Genes X、Jones & Bartlett Publishing刊、2009（ISBN-10:0763766321）;およびKendrewら編、Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference、VCH Publishers, Inc.刊、1995（ISBN 1-56081-569-8）に見出すことができる。

【０１３４】

別段の言明がある場合を除き、本発明は、例えばSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual（3 ed.）, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA（2001）;Davis et al, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA（1995）;またはMethods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques Vol.152, S.L.Berger and A.R.Kimmel Eds., Academic Press Inc., San Diego, USA（1987）（これらは全て参照によりそのまま本明細書に組み入れられる）に記載されているような標準的手法を使って行った。

【０１３５】

他の用語については、本明細書における本発明のさまざまな局面の説明のなかで定義している。

【０１３６】

本願において言及する特許および他の刊行物は、参考文献、発行済み特許、特許出願公開、および同時係属中の特許出願を含めて、いずれも、例えば本明細書に記載の技術に関連して使用されるかもしれない当該刊行物に記載の方法体系を説明し開示する目的で、明示的に、参照により本明細書に組み入れられる。これらの刊行物は、本願の出願日以前にそれらが開示されていたという理由で提示されるに過ぎない。この点に関して、先行発明を根拠として、または他のどのような理由でも、当該開示に先行する資格が本発明者らにないと容認していると解釈すべきものは何もない。これらの文書の日付に関する言明またはこれらの文書の内容に関する表現はいずれも、本出願人が入手できる情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正しさに関して、何らの容認も構成しない。

【０１３７】

本開示の態様の説明は網羅的なものではなく、開示したまさにその形態にこの開示を限定しようとするものでもない。本明細書には、例示を目的として、本開示の具体的な態様

および本開示の実施例を記載するが、関連技術分野の当業者には理解されるとおり、さまざまな等価な変更態様が、本開示の範囲内で考えられる。例えば、方法工程または機能を一定の順序で提示するが、代替態様は異なる順序で機能しうるし、複数の機能が実質的に同時に果たされることもありうる。ここに提供する開示の教示内容は、適宜、他の手法または方法に適用することができる。本明細書に記載するさまざまな態様を組み合わせることで、さらなる態様を得ることができる。本開示の局面は、必要であれば、上記参考文献および出願の組成物、機能および概念を使用することで、本開示のさらなる態様が得られるように変更することができる。これらの変化および他の変化は、詳細な説明に照らして本開示に加えることができる。そのような変更態様はいずれも、本願請求項の範囲内に包含されるものとする。

【０１３８】

上述の態様のいずれかの具体的要素は、他の態様の要素と組み合わせるか、他の態様の要素の代わりに使用することができる。さらにまた、本開示の一定の態様に関連する利点をそれらの態様に関連して説明したが、他の態様もそのような利点を提示するかもしれないし、本開示の範囲に含まれるために、全ての態様が必ずしもそのような利点を呈する必要があるわけでもない。

【０１３９】

本明細書に記載する技術を、以下に実施例を挙げてさらに例示するが、決してこれらの実施例をさらなる限定であると解釈してはならない。

【０１４０】

本明細書に記載する技術のいくつかの態様は、以下の番号付き項のいずれかに従って規定することができる：

１．

核酸試料の一部分を2セットのプライマーと接触させる工程であって、

第1のプライマーのセットがcMET遺伝子コピー数多型の変化を検出し、第2のプライマーのセットがcMET遺伝子発現レベルの変化を検出し、

該第1のプライマーのセットが、cMETの少なくとも一つのgDNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含み、ここで、cMET遺伝子コピー数多型を検出するために、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置し、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置せず、

該第2のプライマーのセットが、cMETのmRNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子のmRNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程;

該試料の該一部分と該2セットのプライマーとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;

各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程;

cMETアンプリコンのレベルを参照遺伝子アンプリコンに対して正規化する工程;および

正規化されたcMETアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程

を含む、cMET変化を検出するためのアッセイであって、

参照レベルと比較して高いgDNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMETの遺伝子増幅変化の存在を示し、参照レベルと比較して変化したmRNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMETの遺伝子発現レベル変化の存在を示す、アッセイ。

２．

前記第1のプライマーのセットが、EGFRの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットをさらに含み、かつ

前記アッセイが、正規化されたEGFRアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程をさらに含み、

参照レベルと比較して高いgDNA特異的EGFRアンプリコンのレベルが、試料におけるEGFRの遺伝子増幅変化の存在を示す、項1記載のアッセイ。

３．

7番染色体上に位置する第1プライマーセットの参照遺伝子がKDELR-2であり、かつ

前記アッセイが、正規化されたKDELR-2アンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程をさらに含み、

参照レベルと比較して高いgDNA特異的KDELR-2アンプリコンのレベルが、試料におけるKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在を示す、項1～2のいずれかに記載のアッセイ。

４．

cMET、EGFRおよびKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在が7番染色体増幅の存在を示す、項1～3のいずれかに記載のアッセイ。

５．

7番染色体上に位置しない第1プライマーセットの参照遺伝子がSOD1またはSPG21である、項1～4のいずれかに記載のアッセイ。

６．

前記第1プライマーセットが、SOD1とSPG21のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、項5記載のアッセイ。

７．

プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも一つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、項1～6のいずれかに記載のアッセイ。

８．

プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも2つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、項1～7のいずれかに記載のアッセイ。

９．

プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも3つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、項1～8のいずれかに記載のアッセイ。

１０．

プライマーセットが、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも2つのgDNA特異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも2つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、項1～9のいずれかに記載のアッセイ。

１１．

プライマーセットが、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも3つのgDNA特異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも3つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、項1～10のいずれかに記載のアッセイ。

１２．

前記試料の第2部分を第3のプライマー対のセットと接触させる工程であって、該第3のプライマーのセットが、配列変異を含むcMET配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程;

該試料の該第2部分と該第3のプライマーのセットとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程;

各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程

をさらに含み、アンプリコンの存在が、当該プライマー対が特異的である配列変異の存在を示す、項1～11のいずれかに記載のアッセイ。

１３．

cMETの一つまたは複数の配列変異がSNPである、項12記載のアッセイ。

１４．

cMET SNPが、S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、およびD1246Nからなる群より選択される、項12～13のいずれかに記載のアッセイ。

１５．

S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T

、V1238I、Y1248C、およびD1246Nが検出される、項12～14のいずれかに記載のアッセイ。
１６．
両反応に同じPCR熱サイクリングレジメンが使用される、項12～15のいずれかに記載のアッセイ。
１７．
核酸試料がFFPE腫瘍試料から調製される、項1～16のいずれかに記載のアッセイ。
１８．
試料が、胃がん、腎がん、胆管がん、肺がん、脳がん、子宮頸がん、大腸がん、頭頸部がん、ヘパトーマ、非小細胞肺がん、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣がん、肉腫、および甲状腺がんからなる群より選択される状態と診断された対象からの腫瘍細胞を含む、項1～17のいずれかに記載のアッセイ。
１９．
一つまたは複数のプライマーが二重ドメインプライマーである、項1～18のいずれかに記載のアッセイ。
２０．
あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物を識別することができる、項1～19のいずれかに記載のアッセイ。
２１．
あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、別個のサイズであることによって識別される、項1～20のいずれかに記載のアッセイ。
２２．
あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される、項1～21のいずれかに記載のアッセイ。
２３．
第1のプライマーのセットおよび第2のプライマーのセットからの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される、項1～22のいずれかに記載のアッセイ。
２４．
一つまたは複数のプライマーがSEQ ID NO:1～83からなる群より選択される、項1～23のいずれかに記載のアッセイ。
２５．
一つまたは複数のプライマーがSEQ ID NO:89～124のいずれかの配列を含む、項1～24のいずれかに記載のアッセイ。
２６．
プライマーがおよそ表2の濃度で反応混合物中に存在する、項1～25のいずれかに記載のアッセイ。
２７．
核酸試料の一部分を、cMET遺伝子コピー数多型の変化を検出する1セットのプライマーと接触させる工程であって、
該プライマーのセットが、cMETの少なくとも一つのgDNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含み、ここで、cMET遺伝子コピー数多型を検出するために、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置し、一つの参照遺伝子は7番染色体上に位置しない、工程；
該試料の該一部分と該プライマーのセットとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程；
各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程；
cMETアンプリコンのレベルを参照遺伝子アンプリコンに対して正規化する工程；および
正規化されたcMETアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程
を含む、cMET変化を検出する方法であって、
参照レベルと比較して高いgDNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMET

の遺伝子増幅変化の存在を示す、方法。
２８．
前記プライマーのセットが、EGFRの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットをさらに含み、かつ
前記アッセイが、正規化されたEGFRアンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程をさらに含み、
参照レベルと比較して高いgDNA特異的EGFRアンプリコンのレベルが、試料におけるEGFRの遺伝子増幅変化の存在を示す、項27記載の方法。
２９．
7番染色体上に位置するプライマーセットの参照遺伝子がKDELR-2であり、かつ
前記方法が、正規化されたKDELR-2アンプリコンのレベルを参照レベルと比較する工程をさらに含み、
参照レベルと比較して高いgDNA特異的KDELR-2アンプリコンのレベルが、試料におけるKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在を示す、項27～28のいずれかに記載の方法。
３０．
cMET、EGFRおよびKDELR-2の遺伝子増幅変化の存在が7番染色体増幅の存在を示す、項27～29のいずれかに記載の方法。
３１．
7番染色体上に位置しないプライマーセットの参照遺伝子がSOD1またはSPG21である、項27～30のいずれかに記載の方法。
３２．
プライマーセットが、SOD1とSPG21の少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、項31記載の方法。
３３．
核酸試料の前記一部分を第2のプライマーセットと接触させる工程であって、該第2のプライマーセットがcMET遺伝子発現レベルの変化を検出する、工程
をさらに含み、
該第2のプライマーセットが、cMETのmRNA特異的配列および少なくとも2つの参照遺伝子の少なくともmRNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含み、かつ
参照レベルと比較して変化したmRNA特異的cMETアンプリコンのレベルが、試料におけるcMETの遺伝子発現レベル変化の存在を示す、項27～32のいずれかに記載の方法。
３４．
第1プライマーセットが、SOD1とSPG21のそれぞれの少なくとも一つのgDNA特異的配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、項27～33のいずれかに記載の方法。
３５．
プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも一つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、項27～34のいずれかに記載の方法。
３６．
プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも2つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、項27～35のいずれかに記載の方法。
３７．
プライマーセットが、各遺伝子の少なくとも3つのアンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、項27～36のいずれかに記載の方法。
３８．
プライマーセットが、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも2つのgDNA特異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも2つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、項27～37のいずれかに記載の方法。
３９．
プライマーセットが、cMET、EGFR、およびKDELR-2のそれぞれの少なくとも3つのgDNA特

異的アンプリコンならびにcMET、SOD1およびSGP21のそれぞれの少なくとも3つのmRNA特異的アンプリコンを増幅するプライマー対サブセットを含む、項27～38のいずれかに記載の方法。

４０．

前記試料の第2部分を第3のプライマー対のセットと接触させる工程であって、該第3のプライマーのセットが、配列変異を含むcMET配列を増幅するプライマー対のサブセットを含む、工程；

該試料の該第2部分と該第3のプライマーのセットとを含む反応混合物で、鎖分離、プライマーアニーリング、およびプライマー伸長のサイクルを含むPCR増幅レジメンを行う工程；

各プライマー対についてアンプリコンのレベルを検出する工程

をさらに含み、アンプリコンの存在が、当該プライマー対が特異的である配列変異の存在を示す、項27～39のいずれかに記載の方法。

４１．

cMETの一つまたは複数の配列変異がSNPである、項40記載の方法。

４２．

cMET SNPが、S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、およびD1246Nからなる群より選択される、項39～41のいずれかに記載の方法。

４３．

S1058P、V1101I、H1112Y、H1124D、G1137V、M1149T、V1206L、L1213V、K1262R、M1268T、V1238I、Y1248C、およびD1246Nが検出される、項39～42のいずれかに記載の方法。

４４．

両反応に同じPCR熱サイクリングレジメンが使用される、項39～43のいずれかに記載の方法。

４５．

核酸試料がFFPE腫瘍試料から調製される、項39～44のいずれかに記載の方法。

４６．

試料が、胃がん、腎がん、胆管がん、肺がん、脳がん、子宮頸がん、大腸がん、頭頸部がん、ヘパトーマ、非小細胞肺がん、黒色腫、中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣がん、肉腫、および甲状腺がんからなる群より選択される状態と診断された対象からの腫瘍細胞を含む、項27～45のいずれかに記載の方法。

４７．

一つまたは複数のプライマーが二重ドメインプライマーである、項27～46のいずれかに記載の方法。

４８．

あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物を識別することができる、項27～47のいずれかに記載の方法。

４９．

あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、別個のサイズであることによって識別される、項27～48のいずれかに記載の方法。

５０．

あるプライマーサブセットの2つ以上のプライマー対からの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される、項27～49のいずれかに記載の方法。

５１．

第1のプライマーのセットおよび第2のプライマーのセットからの増幅産物が、異なる検出可能ラベルで標識されることによって識別される、項27～50のいずれかに記載の方法。

５２．

一つまたは複数のプライマーがSEQ ID NO:1～83からなる群より選択される、項27～51のいずれかに記載の方法。

５３．

一つまたは複数のプライマーがSEQ ID NO:89～124のいずれかの配列を含む、項27～52のいずれかに記載の方法。

５４．

プライマーがおよそ表2の濃度で反応混合物中に存在する、項27～53のいずれかに記載の方法。

【実施例】

【０１４１】

実施例1

ICEPlexシステムと適合する、cMET遺伝子およびEGFR遺伝子の増幅、cMETの発現、ならびに7番染色体のポリソミーを検出するために設計された、18ターゲット単一チューブマルチモードアッセイを開発した。文献で以前に特徴づけられている細胞株を使って、このアッセイを試験した。

【０１４２】

cMETの増幅が、細胞株SNU-5およびH1993に存在することは、公知である。cMETの過剰発現がSNU-5において起こることは公知であり、SNU-1ではcMETの発現が報告されていない。7番染色体ポリソミーは、細胞株SNU-5については存在することが、またH1993についてはおそらく存在することが、公知である。表1のプライマーで、表2に示す濃度を使ってアッセイを行ったところ、図2～7に図示するように、細胞株の以前の特徴付け（表5）が確認された。

【０１４３】

さらに、正常組織または単一の臨床FFPE標本では、本明細書に記載のアッセイによって、cMETの異常レベルまたは7番染色体ポリソミーが見出されることはなかった（データ省略）。正常肺組織および正常胃組織または臨床FFPE胃がん標本でアッセイを試験したところ、cMET、EGFR、または7番染色体の異常な状態が見出されることはなかった（データ省略）。

【０１４４】

適切な緩衝液は以下の成分を含みうる:Tris緩衝液（50～200mM、pH8～9）、トレハロース（5～15%）、酢酸カリウム（25～150mM）、グリセロール（1～7.5%）、およびベタイン（250～1250mM）。Δexo-Apta Taqポリメラーゼを使用した（1PCR反応あたり1～10U）。熱サイクリング条件は図11に図示する。

【０１４５】

（表１）プライマー配列

プライマー	ターゲット	ラベル	配列	塩基数	SEQ ID NO
RT プライマー					
cMET _e14e15_RT1	mM1		GTC TGT CAG AGG ATA CT	17	1
cMET _e5e6_RT1	mM3		TTG TCC CTC CTT CAA G	16	2
cMET _e8e9_RT1	mM2		GCT GGG GTA TAA CAT TC	17	3
mKDELR2-1_RT1	mKDEL-2 (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)		AAA AAG ATC CAG GTA ACG	18	4

mKDELR2-2_RT1	mKDEL-1 (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)		TTT CAG GTA GAT CAG GT	17	5
mSOD1-1_RT1	mSOD-2		AGA GGA TTA AAG TGA GGA	18	6
mSOD1-2_RT1	mSOD-1		ACT TTC TTC ATT TCC ACC	18	7
mSPG21-1_RT1	mSPG-2		GCC AGA TGA AAA ATT TCC	18	8
mSPG21-2_RT1	mSPG-1		CAT GGA ATT GCA GCA A	16	9
フォワードプライマー					
gCMET_e2-I-e3_F1-MTA1	gM1		AAC GCC CGC TTT ATT AAT ATT CTA TGT TCT TAT CTC CTC AGT	42	10
gCMET_e3-I-e4_F2-MTA3	gM2		TGA GTT ACC ATT AAA ATA ATA AAT TAA TTG GTT CCA TCC TAG CTC TT	47	11
gCMET_e5-I-e6 F2-MTA2	gM3		AGC TTA AAC GAA ATA TTA AAT ATT ATT ATT AAC TCA CCC ACT CTC TGA T	49	12
gEGFR_e1-I-e2_2 F1-MTA1	gE2		TCA GAA GGA CAA TAT TTT TAC CCA GTG ACT TAC CTA TG	38	13
gEGFR_e1-I-e2_F1-MTA2	gE3		TAT CGT AAC ATA ATT TAA TAA TAA AAT AAT TTA ATT ATT TCA AAT CTG GAA AGG ACA C	58	14
gEGFR_e3-I-e4_F2-MTA1	gE1		TCC TGC GCT GTA TAA ACT TCT GGG GAA GCT CAT T	34	15
gKDELR2_e1_I_e2_F3-MTA2	gKDEL (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)		ACT TTG CCT AAA TAA ATA TTA ATA ATT AAT ATA TCA GCA TCT GAA ACC CAT AG	53	16

gSOD1_e2_I_e3_F2-MTA2	gSOD		TAA ACT CCC TAT AAA ATT AAA TTA ATA ATA TAT AAT ATT TTG TGC TCT GTG AAT GTC ATC	60	17
gSPG21_e7_I_e9_F2-MTA2	gSPG		TGT GGA GAT TAT AAA ATT AAT TAA TAA TAT ATA ATA TTT TTA CCC AGG TTT CCA GAA TAG	60	18
mCMET_e14e15_F1-MTA11	mM1		AAG CTT CGT GAT AAT TAA ATC TGT AGA CTA CCG AGC TAC	39	19
mCMET_e5e6_F2-MTA1	mM3		TAG GAT GGC CTA TTT TAA TAA AAT AAT TTT ATA ATT AAT CGG AGG AAT GCC TGA	54	20
mCMET_e8e9_F1-MTA11	mM2		AGA AGG ACC GTT TTA TTT ATT TTA TTA TAC TAA ACA GTG GGA ATT CTA GAC	51	21
mKDELR2_e1_e2_F1-MTA5	mKDEL-2 (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)		TTG AGA TGG CAT TAA TTA AAT TTT TAA TAA TAT TTA CTG CTG AAG ATC TGG AAG A	55	22
mKDELR2_e2_e3_F2-MTA11	mKDEL-1 (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)		ACT TTG CCT AAA TAT ATT TTT CTT CAT TTA TTT CAT TGT ATA ACA CA	47	23
mSOD1_e2_e3_F1-MTA2	mSOD-2		ATC TAT ATA AAT AAT TTT ATA AAA TAA TTT ATT AAA ATT AAA TAT ATG CAT TAA AGG ACT GAC TGA A	67	24
mSOD1_e4_e5_F1-MTA11	mSOD-1		ACC ATG GTT TAT AAT AAA TAT TAA GAT CTC ACT CTC AGG AGA	42	25
mSPG21_e6_e7_F2-MTA2	mSPG-2		AAG CAG CAG ATA ATT TAT TAT ATA ATT AAA AAT AAT TAT AAT TAA TAA AAT TTA AAC ACC TCT ATC TTC AAC CAA	75	26
mSPG21_e9_e10_F2-MTA2	mSPG-1		ACC ATC TCG GTA ATT AAT AAT TAA AAT AAT TTA ATT ATG CTC ATC TGA AAA CAG GAG	57	27

リバースプライマー					
gCMET_e2-I-e3_R1 TYE	gM1	TYE	/5TYE665/TCA TTG CCC TTT TAA ATA AGC AGT GGC AGA AAT TC	35	28
gCMET_e3-I-e4_R2 TYE	gM2	TYE	/5TYE665/AGC ATG CGT ATT TAA GTT AAG AGG CAG AAG AGA AC	35	29
gCMET_e5-I-e6 R2 TYE	gM3	TYE	/5TYE665/ATA GCT GTT ATT TAA CAG GAT ATG CCA TGA ACA G	34	30
gEGFR_e1-I-e2_2 R2 TYE	gE2	TYE	/5TYE665/ATG ATG GAG TTT TAA CTG CCT GCT ACT GTA TGA	33	31
gEGFR_e1-I-e2_R1 TYE	gE3	TYE	/5TYE665/AGG CCA CCG TTT TAA TGT TAA AAG CCT ATT GGA GC	35	32
gEGFR_e3-I-e4_R2 TYE	gE1	TYE	/5TYE665/TTC ATG CAA TTT TAA CAT GTT GTG TGT ACA GAG T	34	33
gKDELR2_e1_I_e2_R3 TYE	gKDEL	TYE	/5TYE665/AGG AGA AGT CTT TTT ATA TTT ATT ATA TGG ACA TTT ATG TGG TGT G	46	34
gSOD1_e2_I_e3_R2 TYE	gSOD	TYE	/5TYE665/ACT AGT TGC TAT TAA TTA AAA TTT TTA TAT TTT GCT GCC TTA CAC AAC T	49	35
gSPG21_e7_I_e9_R2 TYE	gSPG	TYE	/5TYE665/ACT AGT TGC TAT TTA ATA ATA AAT TTA AAA ATA TCA GAA AAG TCA TCA GTG AGG	54	36
mCMET_e14e15_R1 FAM	mM1	FAM	/56-FAM/TTG CGA TCC CTT TAA GTC TGT CAG AGG ATA CTG C	34	37
mCMET_e5e6_R2 FAM	mM3	FAM	/56-FAM/AAA CTT CGC ATT TAA TTG TCC CTC CTT CAA GG	32	38
mCMET_e8e9_R1 FAM	mM2	FAM	/56-FAM/TCG CGC TAG ATT TAA GCT GGG GTA TAA CAT TCA AG	35	39
mKDELR2_e1_e2_R1 FAM	mKDEL-2 (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)	FAM	/56-FAM/TTT ATG CCA TTT ATA ATA ATA TAA AAA AAA AGA TCC AGG TAA CGA G	46	40
mKDELR2_e2_	mKDEL	FAM	/56-FAM/AGG AGA AGT	35	41

e3_R2 FAM	-1 (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)		CTT TAA TTT CAG GTA GAT CAG GTA CA		
mSOD1_e2_e3_R1 FAM	mSOD-2	FAM	/56-FAM/TTC CGT AAA CTT TAA AGA GGA TTA AAG TGA GGA CC	35	42
mSOD1_e4_e5_R1 FAM	mSOD-1	FAM	/56-FAM/AAC CAT ACG ATT TAA ACT TTC TTC ATT TCC ACC TT	35	43
mSPG21_e6_e7_R2 FAM	mSPG-2	FAM	/56-FAM/TGC ATA AGA ATT TAA TAG CCA GAT GAA AAA TTT CCA A	37	44
mSPG21_e9_e10_R2 FAM	mSPG-1	FAM	/56-FAM/AGG AGA AGT CTT TAA CAT GGA ATT GCA GCA AAT G	34	45

【０１４６】
（表２）マルチプレックスプライマー対セットおよび濃度の例示的な態様

ターゲット	アンプリコンサイズ	フォワード	リバース	フォワード(uM)	リバース(uM)
mM1	124	mCMET_e14e15_F1-MTA11	mCMET_e14e15_R1 FAM	1.3	1.3
mM2	135.5	mCMET_e8e9_F1-MTA11	mCMET_e8e9_R1 FAM	1.6	1.6
mM3	146.5	mCMET_e5e6_F2-MTA1	mCMET_e5e6_R2 FAM	1.6	1.6
gM1	127	gCMET_e2-I-e3_F1-MTA1	gCMET_e2-I-e3_R1 TYE	2	2
gM2	139	gCMET_e3-I-e4_F2-MTA3	gCMET_e3-I-e4_R2 TYE	2.2	2.2
gM3	144	gCMET_e5-I-e6 F2-MTA2	gCMET_e5-I-e6 R2 TYE	1.8	1.8
gE1	120	gEGFR_e3-I-e4_F2-MTA1	gEGFR_e3-I-e4_R2 TYE	2.5	2.5
gE2	132	gEGFR_e1-I-e2_2 F1-MTA1	gEGFR_e1-I-e2_2 R2 TYE	4	4
gE3	150	gEGFR_e1-I-e2_F1-MTA1	gEGFR_e1-I-e2_R1 TYE	2.8	2.8
mSPG2	165	mSPG21_e6_e7_F2_MTA2	mSPG21_e6_e7_R2 FAM	2.5	2.5
mSPG1	144	mSPG21_e9_e10_F2_MTA2	mSPG21_e9_e10_R2 FAM	2.5	2.5
gSPG	169.5	gSPG21_e7_I_e9_F2_MTA2	gSPG21_e7_I_e9_R2 TYE	3.8	3.8
mKDEL2 (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)	151	mKDELR2_e1_e2_F1_MTA5	mKDELR2_e1_e2_R1 FAM	1.6	1.6
mKDEL1 (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)	118	mKDELR2_e2_e3_F2_MTA11	mKDELR2_e2_e3_R2 FAM	1.5	1.5
gKDELR	157	gKDELR2_e1_I_e2_F3_MTA2	gKDELR2_e1_I_e2_R3 TYE	4.5	4.5
mSO2	158	mSOD1_e2_e3_F1_MTA2	mSOD1_e2_e3_R1 FAM	2	2
mSO1	130	mSOD1_e4_e5_F1_MTA3	mSOD1_e4_e5_R1 FAM	1.8	1.8
gSOD	163	gSOD1_e2_I_e3_F2_MTA2	gSOD1_e2_I_e3_R2 TYE	2.7	2.7

【０１４７】
実施例2
　実施例1の緩衝液、酵素、および熱サイクリングパラメータを使ってcMETスニップ（snip）の検出を行った。2つの代替的プライマーセット（図8）、すなわち長アンプリコンを増幅するもの（表3）と短アンプリコンを増幅するもの（表4）を、図9～10に示すように試験した。
【０１４８】
実施例3:cMETおよびEGFRのコピー数の変動ならびにcMET遺伝子発現の相対的定量化
　cMETおよびEGFRのコピー数の変動ならびにcMET遺伝子発現の相対的定量化は、ΔΔCt法を使用し、Livak and Schmittgen,2001に従って計算した。異なるターゲットについて90～110％の範囲の類似するPCR効率が得られるようにアッセイを最適化し、コピー数多型およびターゲット発現に関する相対的定量化を、以下に述べるように行った。
工程1:cMETもしくはEGFR CNVターゲットまたはcMET遺伝子発現ターゲットの平均Ctを計算する。
工程2:参照遺伝子の平均Ctを計算する。コピー数多型計算には2つの遺伝子を使用する。2つの遺伝子を使って、それぞれ2つのアンプリコンで、cMET遺伝子発現を測定した。
工程3:以下の式を使って相対的定量化の計算を行う:
　cMETもしくはEGFR CNVまたはcMET遺伝子発現に関して、参照に対する倍率差は、以下の式を使って計算した:
$=2^{(\text{cMETもしくはEGFRまたはcMET遺伝子発現の平均Ct}-\text{参照遺伝子の平均Ct})}$
【０１４９】

（表３）cMET SNP検出用プライマー-長アンプリコン

突然変異	プライマー	コア産物	産物の長さ	SEQ ID NO
領域1	-	-	-	
S1058P-CF	aagggcaCCTAACTAGTGGGGACC	107	107+7+6 = 120 bp	46
cMET-1R	actcatCTACATGCTGCACTGCCTG			47
領域2				
cMET-2F	ctccGAAGCTCATAAAGGGTTTGAT			48
V1110I-AR	cccggAACAAAGTCCCATGATATAT	115	115+5+4 = 124 bp	49
H1112Y-TR	ctgccGTCCAACAAAGTCCCATA	119	119+5+4 = 128 bp	50
H1124D-GR	taatacataacagtttGGATTTCACAGCACAGTC	155	155+16+4 = 175bp	51
領域3				
cMET-3F	ccattCATTTCATTGCTCTTCCTATCTA			52
G1137V-TR	acaaccgAGAAATTGGGAAACTTCTA	120	120+7+5= 132 bp	53
M1149T-CR	cacagcGGATGACTAAAATCTTTCG	156	156+6+5 = 167 bp	54
領域4				
cMET-4F	caaattcaaaatAGGTCAAAATTAGAACAGTAGATG			55
V1206L-TR	accttctcaTCATGCCTTTGGCTAA	115	115+9+12 = 136 bp	56
L1213V-GR3	ccccgAAACTTTTTGCTTGCtACA	138	138+5+12 = 155 bp	57
領域5				
cMET-5F	cttcatataaattatTGTAGATATTCAGCATCATTGTAA			58
V1238I-AR	acaaaacaaaatAAGACCAAAATCAGCAAT	113	113+12+15 = 140 bp	59
D1246N-AR	cgggcATAGTATTCTTTATCATACATGTT	143	143+5+15 = 163 bp	60
Y1248C-GR	cccccTGTACACTATAGTATTCTTTATCAC	151	151+5+15 = 171 bp	61
領域6				
K1262R-GF	acactccataAACAAAACAGGTGCAAG	124	124+10+14 = 148 bp	62
M1268T-CF	ctttattattctatttactatttaCTGCCAGTGAAGTGGAC	106	106+24+14 = 144 bp	63
cMET-6R	ctcaaatatataatAAGTAAAAGAGGAGAAACTCAGA			64

【０１５０】

（表４）cMET SNP検出用プライマー-短アンプリコン

cMET SNP 領域	プライマー名	プライマー配列	コアサイズ	ICEPlexerでの実際のサイズ	SEQ ID NO
領域1	ゲノム修飾_S1058P-CF	TAGGATGGCCCCTAACTAGTGGGGACC	107	117	65
	cMET-1R	/56-FAM/ttaCTACATGCTGCACTGCCTG			66
領域2	cMET-2F	/56-FAM/AGAAGGACCGAAATTTTAAAACGCAGTGCTAACCAAGTTCT			67
	ゲノム修飾_V1110I-AR	AAGCTTCGTGATAAAATTAATTAATAATATATAATATTTTAACAAAGTCCCATGATATAT	68	125	68

	ゲノム修飾_H1112Y-TR	ACCATGGTTTATAAAATTAATTAATAATATATAATATTTTGTCCAACAAAGTCCCATA	72	129	69
	ゲノム修飾_H1124D-GR	ATCGGACTTCGGATTTCACAGCACAGTC	108	135	70
領域3	cMET-3F	/56-FAM/ATCGGACTTCTATTTTAATAAAATAATTTTATAATTAACTCCACCACTGGATTTCTCAGG			71
	ゲノム修飾_G1137V-TR	AACTTCTGGGAATATTTTTATATTAAAAATATTTAAAATATTAAATAAGAAATTGGGAAACTTCTA	55	140	72
	ゲノム修飾_M1149T-CR	TGAGTTACCAAATAAAAGGATGACTAAAATCTTTCG	91	146	73
領域4	cMET-4F	/56-FAM/TGGCAGTAGGATAAAATTAATTAATAATATATAATATTTTTGACTGCAGAATCCAACTGT			74
	ゲノム修飾_V1206L-TR	AGGCCACCGTATATAATTTTTTTAAAAAATATTAATATTTTTATTTAATCATGCCTTTGGCTAG	64	152	75
	ゲノム修飾_L1213V-GR3	AACCATACGAATTAATTAAAATTTTTATATTTAAACTTTTTGCTTGCtACA	86	158	76
領域5	cMET-5F	/56-FAM/TTCCGTAAACTAATTAATAATAAAATAATTTAATTATTGTCCTTTCTGTAGGCTGGATGA			77
	ゲノム修飾_V1238I-AR	AACCATACGAAATTTTTTAAAATTTTATAAATAAATATTTAAAATTTAAATATTAATTTAAAATTTTAAAAAGACCAAAATCAGCAAT	57	164	78
	ゲノム修飾_D1246N-AR	TTGAGATGGCAATTTTTTATTATAAATTTTAATTTTTTAATTAATTATAGTATTCTTTATCATACATGTT	87	170	79
	ゲノム修飾_Y1248C-GR	AGGAGAAGTCTTTATTAAATTATATAATTTAATTTTAAATTTTTGTACACTATAGTATTCTTTATCAC	95	175	80
領域6	ゲノム修飾_K1262R-GF	TGTGGAGATTAATTTTTTAAAATTTTATAAATAAATATTTAAAATTTAAATATTAATTTAATTAATTAAAATTTTTATATAACAAAACAGGTGCAAG	86	185	81
	ゲノム修飾_M1268T-CF	TGTGGAGATTAATTTTTTAAAATTTTATAAATAAATATTTAAAATTTAAATATTAATTTAAATAATAATATTACTGCCAGTGAAGTGGAC	68	180	82
	cMET-6R	/56-FAM/AGGCCACCGTAAAAATTAAAAATTAATAAATATTAATAAACCACATCTGACTTGGTGGTA			83

【０１５１】

（表５）試料の特徴

試料	供給源	組織の由来	マトリックス	MET コピー数	MET 発現	7番染色体ポリソミー	参考文献 *
A549	細胞株	肺	新鮮凍結	2	低	不明	3
H1993	細胞株	肺	新鮮凍結	>10	高	不明	3
肺	組織	肺	新鮮凍結	不明	不明	不明	
SNU-1	細胞株	胃部	新鮮凍結	2	なし	なし	1, 2
SNU-5	細胞株	胃部	新鮮凍結	>10	高	あり	1, 2
胃部	組織	胃	新鮮凍結	不明	不明	不明	
胃部	組織	胃 - 正常	FFPE	不明	不明	不明	
胃部	組織	胃 - がん	FFPE	不明	不明	不明	

*（1）Catenacci D, Cancer BioTher, 2011, 12(1):9-46
（2）Smolen G, PNAS, 2006 103(7):2316-2321
（3）Lutterbach B, Cancer Res, 2007, 67:2081

【０１５２】

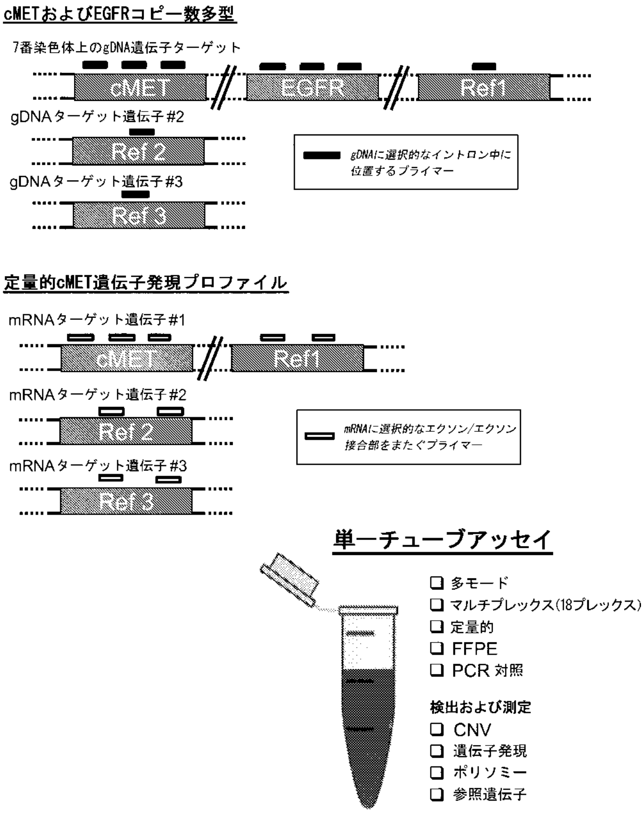
（表６）プライマー

ターゲット		SEQ ID NO:
リバースプライマー		
gM1	ATA AGC AGT GGC AGA AAT TC	89

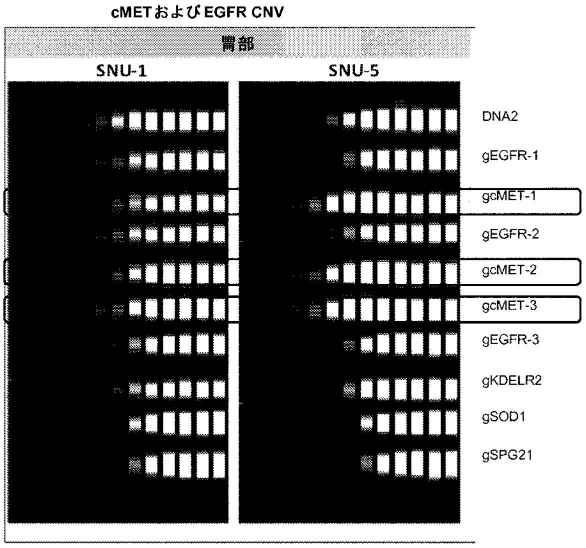
gM2	GTT AAG AGG CAG AAG AGA AC	90
gM3	CAG GAT ATG CCA TGA ACA G	91
gE2	CTG CCT GCT ACT GTA TGA	92
gE3	TGT TAA AAG CCT ATT GGA GC	93
gE1	CAT GTT GTG TGT ACA GAG T	94
gKDEL (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)	TGG ACA TTT ATG TGG TGT G	95
gSOD	T GCT GCC TTA CAC AAC T	96
gSPG	CA GAA AAG TCA TCA GTG AGG	97
mM1	GTC TGT CAG AGG ATA CTG C	98
mM3	TTG TCC CTC CTT CAA GG	99
mM2	GCT GGG GTA TAA CAT TCA AG	100
mKDEL-2 (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)	A AAA AGA TCC AGG TAA CGA G	101
mKDEL-1 (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)	TTT CAG GTA GAT CAG GTA CA	102
mSOD-2	AGA GGA TTA AAG TGA GGA CC	103
mSOD-1	ACT TTC TTC ATT TCC ACC TT	104
mSPG-2	G CCA GAT GAA AAA TTT CCA A	105
mSPG-1	CAT GGA ATT GCA GCA AAT G	106
フォワードプライマー		
gM1	CTA TGT TCT TAT CTC CTC AGT	107
gM2	G GTT CCA TCC TAG CTC TT	108
gM3	AC TCA CCC ACT CTC TGA T	109
gE2	AC CCA GTG ACT TAC CTA TG	110
gE3	T TCA AAT CTG GAA AGG ACA C	111
gE1	CT TCT GGG GAA GCT CAT T	112
gKDEL (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)	CA GCA TCT GAA ACC CAT AG	113
gSOD	G TGC TCT GTG AAT GTC ATC	114
gSPG	TA CCC AGG TTT CCA GAA TAG	115
mM1	C TGT AGA CTA CCG AGC TAC	116
mM3	T CGG AGG AAT GCC TGA	117
mM2	C TAA ACA GTG GGA ATT CTA GAC	118
mKDEL-2	CTG CTG AAG ATC TGG AAG A	119

(SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)		
mKDEL-1 (SEQ ID NO:130として開示する「KDEL」)	CTT CAT TTA TTT CAT TGT ATA ACA CA	120
mSOD-2	G CAT TAA AGG ACT GAC TGA A	121
mSOD-1	GAT CTC ACT CTC AGG AGA	122
mSPG-2	AC ACC TCT ATC TTC AAC CAA	123
mSPG-1	G CTC ATC TGA AAA CAG GAG	124

【図１】

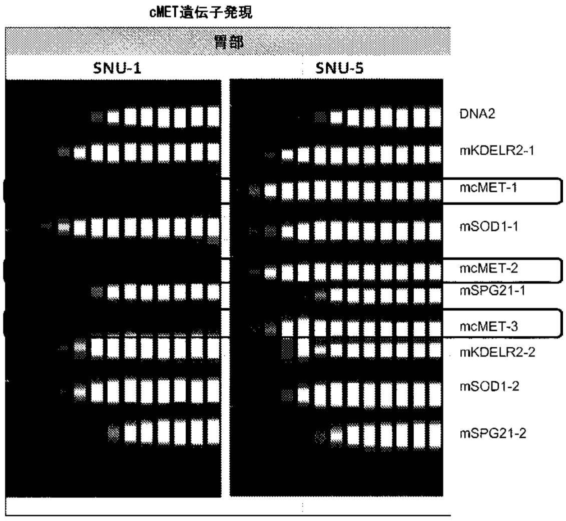


【図２】



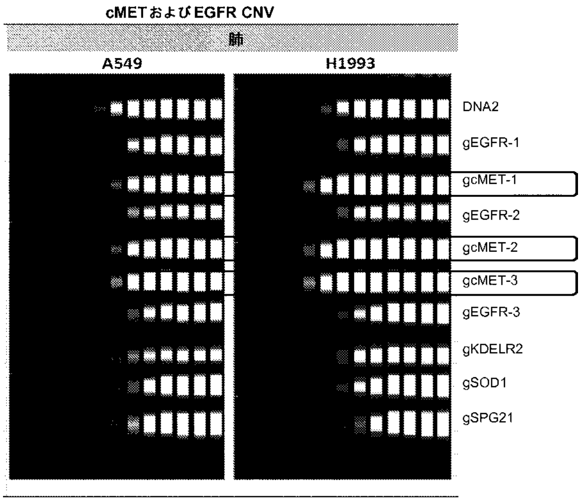
2つの胃がん細胞株におけるcMET/EGFR CNV解析：
cMETおよびEGFRのそれぞれについて3つのアンプリコン
参照遺伝子KDELR2、SOD1およびSPG21についてそれぞれ1つのアンプリコン
TYEチャネルにおける検出

【図３】



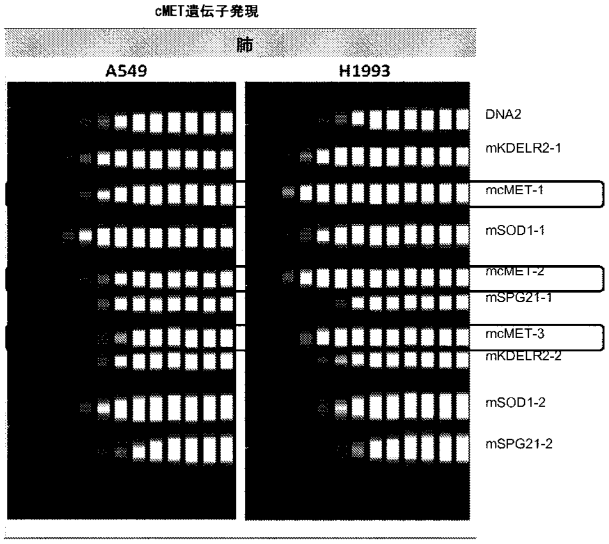
2つの胃がん細胞株におけるcMET遺伝子発現解析：
cMETについて3つのアンプリコン
参照遺伝子KDELR2、SOD1およびSPG21についてそれぞれ2つのアンプリコン
FAMチャネルにおける検出

【図４】



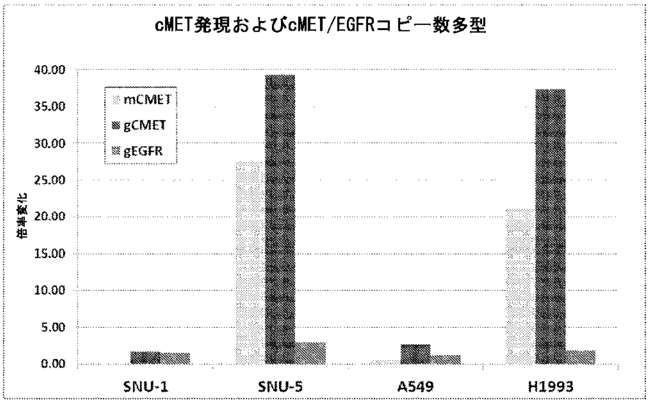
2つの肺がん細胞株におけるcMET/EGFR CNV解析：
cMETおよびEGFRのそれぞれについて3つのアンプリコン
参照遺伝子KDELR2、SOD1およびSPG21についてそれぞれ1つのアンプリコン
TYEチャネルにおける検出

【図５】



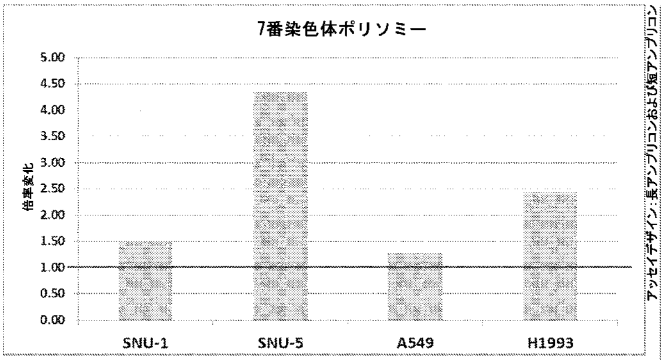
2つの肺がん細胞株におけるcMET遺伝子発現解析：
cMETについて3つのアンプリコン
参照遺伝子KDELR2、SOD1およびSPG21についてそれぞれ2つのアンプリコン
FAMチャネルにおける検出

【図６】



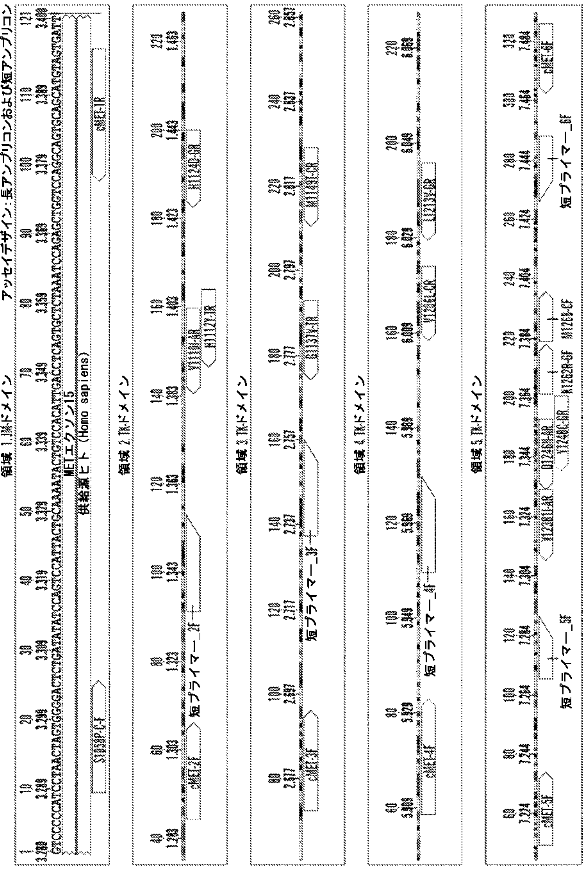
データを参照遺伝子SOD1/SPG21に対して正規化し倍率変化で表した
SNU-5およびH1993はcMETの著しい増幅および過剰発現を示す
EGFRの増幅/過剰発現はない

【図７】

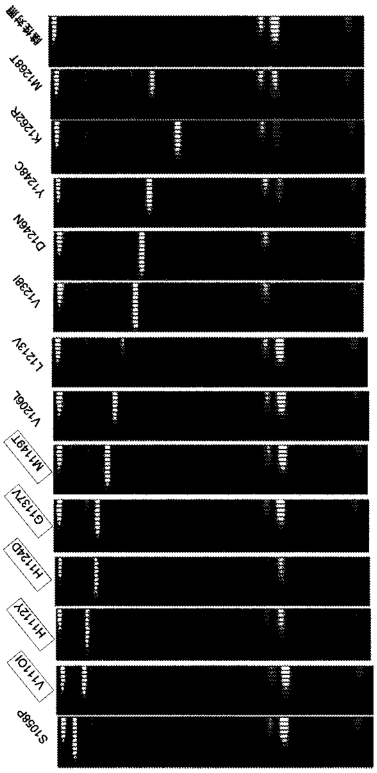


gSOD1（21番染色体）およびgSPG21（15番染色体）と比較した
7番染色体ターゲット（gKDELR2）の検出
SNU-5およびH1993はgKDELR2コピーの増加を示すことから
7番染色体のポリソミーが示唆される（SNU-5では約8コピーおよびH1993では
約4コピー）

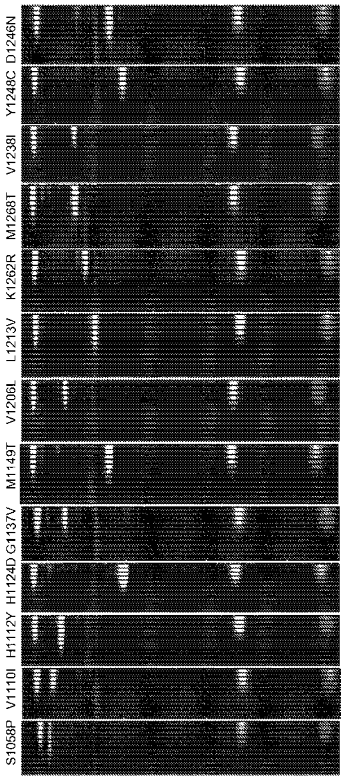
【図８】



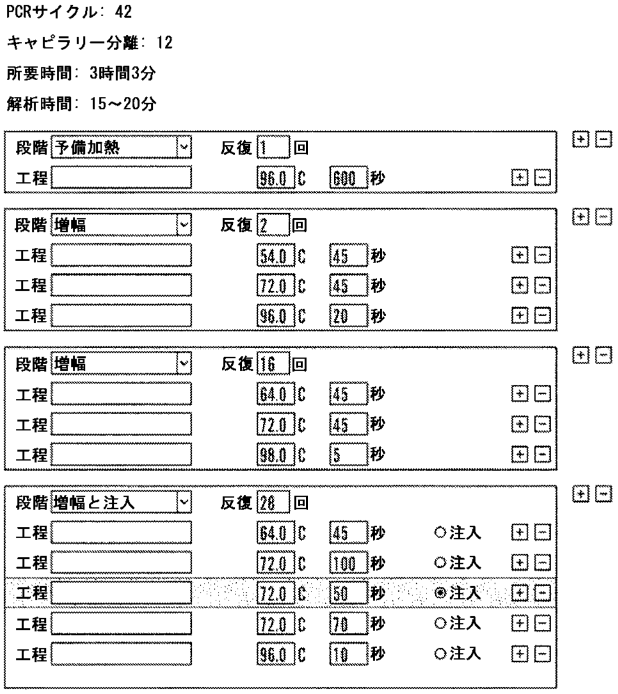
【図９】



【図１０】



【図１１】



【配列表】
2016527900000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/050076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6886 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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SMOLEN GROMOSLAW A ET AL: "Amplification of MET may identify a subset of cancers with extreme sensitivity to the selective tyrosine kinase inhibitor PHA-665752", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 103, no. 7, 1 February 2006 (2006-02-01), pages 2316-2321, XP002392188, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0508776103 the whole document ----- -/--	1-54

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 May 2015	03/06/2015

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Botz, Jürgen

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2014/050076

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ENGELMAN JEFFREY A ET AL: "MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 316, no. 5827, 18 May 2007 (2007-05-18), pages 1039-1043, XP002498405, ISSN: 1095-9203, DOI: 10.1126/SCIENCE.1141478 the whole document -----	1-54
Y	WO 2010/059654 A1 (LILLY CO ELI [US]; DAVIES JULIAN [US]; LIU LING [US]; LU JIRONG [US];) 27 May 2010 (2010-05-27) page 29 -----	1-54
Y	KATSUHIRO OKUDA ET AL: "Met gene copy number predicts the prognosis for completely resected non-small cell lung cancer", CANCER SCIENCE, vol. 99, no. 11, 1 November 2008 (2008-11-01), pages 2280-2285, XP055012508, ISSN: 1347-9032, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2008.00916.x the whole document -----	1-54
Y	EP 2 143 441 A1 (PF MEDICAMENT [FR]) 13 January 2010 (2010-01-13) the whole document -----	1-54
Y	GOETSCH L ET AL: "Selection criteria for c-Met-targeted therapies: Emerging evidence for biomarkers", BIOMARKERS IN MEDICINE JAN 2014, BIOMARKERS IN MEDICINE, vol. 4, no. 1, 18 November 2011 (2011-11-18), pages 149-170, XP009154090, ISSN: 1752-0363, DOI: 10.2217/BMM.09.67 the whole document -----	1-54
Y	WO 2012/119113 A2 (NESTEC SA [CH]; GONG HUA [US]; SINGH SHARAT [US]) 7 September 2012 (2012-09-07) paragraph [0111]; claims 1-9 -----	1-54
A	WO 2012/088337 A1 (PROMETHEUS LAB INC [US]; SINGH SHARAT [US]; HOE NICHOLAS [US]; PRINCEN) 28 June 2012 (2012-06-28) paragraphs [0170] - [0240] -----	1-54

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2014/050076

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010059654 A1	27-05-2010	AR 074360 A1	12-01-2011
		AU 2009316742 A1	27-05-2010
		CA 2743508 A1	27-05-2010
		CN 102216333 A	12-10-2011
		EA 201170716 A1	30-12-2011
		EP 2358755 A1	24-08-2011
		JP 5688027 B2	25-03-2015
		JP 2012509881 A	26-04-2012
		KR 20110074612 A	30-06-2011
		NZ 592215 A	28-09-2012
		PA 8849001 A1	28-06-2010
		TW 201023885 A	01-07-2010
		US 2010129369 A1	27-05-2010
		US 2012263723 A1	18-10-2012
		WO 2010059654 A1	27-05-2010
EP 2143441 A1	13-01-2010	AU 2009268040 A1	14-01-2010
		CA 2730110 A1	14-01-2010
		CN 102083465 A	01-06-2011
		EP 2143441 A1	13-01-2010
		EP 2315601 A1	04-05-2011
		GE P20135829 B	27-05-2013
		JP 5677949 B2	25-02-2015
		JP 2011527313 A	27-10-2011
		KR 20110043548 A	27-04-2011
		MA 32458 B1	03-07-2011
		RU 2011103125 A	20-08-2012
		US 2011117098 A1	19-05-2011
		US 2014186356 A1	03-07-2014
		WO 2010003992 A1	14-01-2010
WO 2012119113 A2	07-09-2012	CA 2828052 A1	07-09-2012
		EP 2681552 A2	08-01-2014
		US 2014057798 A1	27-02-2014
		WO 2012119113 A2	07-09-2012
WO 2012088337 A1	28-06-2012	AU 2011348256 A1	11-07-2013
		CA 2822283 A1	28-06-2012
		CN 103384828 A	06-11-2013
		EP 2656077 A1	30-10-2013
		JP 2014503821 A	13-02-2014
		KR 20140002711 A	08-01-2014
		NZ 612483 A	27-03-2015
		SG 191230 A1	31-07-2013
		US 2014024548 A1	23-01-2014
		WO 2012088337 A1	28-06-2012

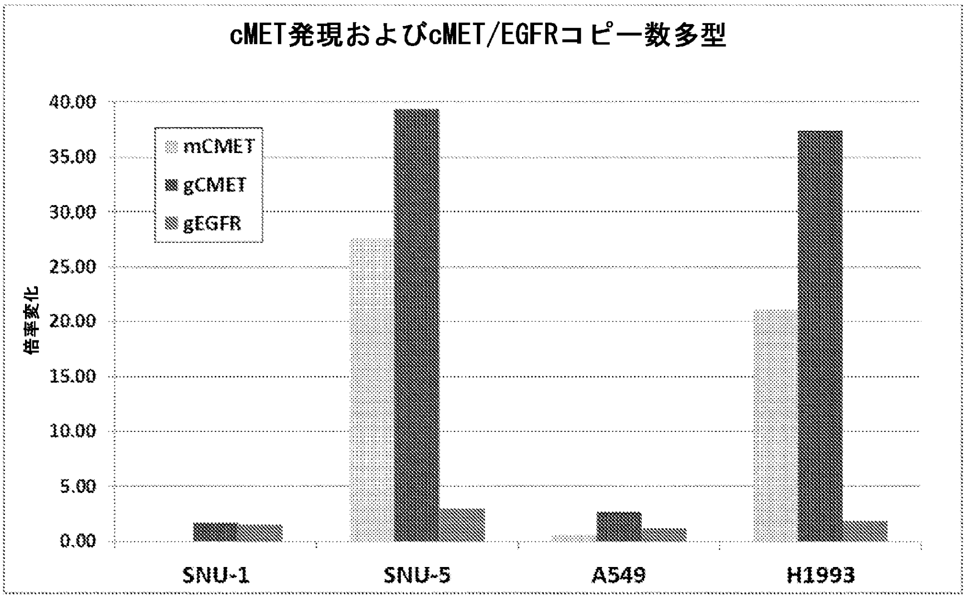
フロントページの続き

(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,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,KM,ML,MR,NE,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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,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,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤　利光
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林　智彦
(74)代理人　100114340
弁理士　大関　雅人
(74)代理人　100114889
弁理士　五十嵐　義弘
(74)代理人　100121072
弁理士　川本　和弥
(72)発明者　ノリング　ヨルク
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　ホープデール　ダッチャー　ストリート　１９４
(72)発明者　ディバカル　キラン　マダナハリー
アメリカ合衆国　マサチューセッツ州　シュルーズベリー　マーキュリー　ドライブ　２７

Ｆターム(参考) 4B063 QA01　QA19　QQ03　QQ08　QQ42　QQ52　QR08　QR42　QR55　QR62
QS25　QS34　QX01

【要約の続き】



データを参照遺伝子SOD1/SPG21に対して正規化し倍率変化で表した
SNU-5およびH1993はcMETの著しい増幅および過剰発現を示す
EGFRの増幅/過剰発現はない