

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7007364号
(P7007364)

(45)発行日 令和4年2月10日(2022.2.10)

(24)登録日 令和4年1月11日(2022.1.11)

(51)国際特許分類	F I			
C 1 2 Q 1/6886(2018.01)	C 1 2 Q	1/6886	Z Z N A	
C 1 2 Q 1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z	

請求項の数 7 (全41頁)

(21)出願番号	特願2019-507932(P2019-507932)	(73)特許権者	591003013
(86)(22)出願日	平成29年8月18日(2017.8.18)		エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー
(65)公表番号	特表2019-531061(P2019-531061 A)		F . HOFFMANN - LA ROCH E AKTIENGESELLSCHA FT
(43)公表日	令和1年10月31日(2019.10.31)		スイス・シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼル
(86)国際出願番号	PCT/EP2017/070903	(74)代理人	100099759
(87)国際公開番号	WO2018/033615		弁理士 青木 篤
(87)国際公開日	平成30年2月22日(2018.2.22)	(74)代理人	100123582
審査請求日	令和2年7月27日(2020.7.27)		弁理士 三橋 真二
(31)優先権主張番号	62/376,799	(74)代理人	100117019
(32)優先日	平成28年8月18日(2016.8.18)		弁理士 渡辺 陽一
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100141977
			弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 エストロゲン受容体 ESR1 変異の検出用のマルチプレックス対立遺伝子特異的 PCR アッセイ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

3つの容器：

- (i) ESR1 V422DeIVに特異的なプライマー対、ESR1 S463Pに特異的なプライマー対、ESR1 L536Hに特異的なプライマー対、ESR1 L536Pに特異的なプライマー対、ESR1 L536Qに特異的なプライマー対、L536Rに特異的なプライマー対、及びESR1 D538Gに特異的なプライマー対を保有する第一容器
 - (ii) ESR1 K303Rに特異的なプライマー対、ESR1 E380Qに特異的なプライマー対、ESR1 L536_D538 Pに特異的なプライマー対、ESR1 Y537Cに特異的なプライマー対、ESR1 Y537Nに特異的なプライマー対、およびESR1 Y537Sに特異的なプライマー対を保有する第二容器；および
 - (iii) ESR1 S341Lに特異的なプライマー対、ESR1 L429Vに特異的なプライマー対、ESR1 V533Mに特異的なプライマー対、ESR1 V534Eに特異的なプライマー対、およびESR1 P535Hに特異的なプライマー対を保有する第三容器
- を含むキットであって、各容器が、
ESR1遺伝子中の異なる配列に特異的な2以上のプローブ、ここで各プローブがフルオロフォアとクエンチャーで標識されており；
内在性コントロール配列に特異的なプライマー対；および
内在性コントロール配列に特異的であり、且つフルオロフォアとクエンチャーで標識されており、そして配列番号24, 113, 134, 158, 178, 264, 261, 262, 285, 286, 298,

314, 394, 407, 31, 42, 90, 415, 447, 469, 476, 477, 481, 528, 59, 60, 70, 231, 235, 237, 245, 350および388の配列を有するオリゴヌクレオチドを含む、プローブを保有する、前記キット。

【請求項2】

各容器が、3～4のプローブを保有する、請求項1に記載のキット。

【請求項3】

少なくとも1のプライマーが、修飾された非天然ヌクレオチドを含む、請求項1又は2に記載のキット。

【請求項4】

各容器がさらに、熱安定性DNAポリメラーゼを保有する、請求項1～3のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項5】

個体からのサンプル中の2以上のESR1変異の有無を決定する方法であって、

(i) 該個体からサンプルを採取し；

(ii) マルチプレックスアレル特異的PCRを実施して2以上のESR1変異の有無を決定し、ここでマルチプレックスアレル特異的PCRが、3つの容器で行われ、ESR1変異の有無が、以下の3つの容器で決定され：

(i) 第一容器においてESR1 V422DeIV、ESR1 S463P、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、L536R、及びESR1 D538G；

(ii) 第二容器において、ESR1 K303R、ESR1 E380Q、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537N、及びESR1 Y537S、

20

(iii) 第三容器において、ESR1 S341L、ESR1 L429V、ESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535H

そしてここで前記容器が、配列番号24, 113, 134, 158, 178, 264, 261, 262, 285, 286, 298, 314, 394, 407, 31, 42, 90, 415, 447, 469, 476, 477, 481, 528, 59, 60, 70, 231, 235, 237, 245, 350および388の配列を有するオリゴヌクレオチドを含む、前記方法。

【請求項6】

前記個体が乳癌を患い、そしてホルモン治療を受けている、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

マルチプレックスアレル特異的PCRを行って、10以上のESR1変異の有無を決定する、請求項5又6に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

乳癌の70%はエストロゲン受容体(ER)陽性であり、乳癌患者の大部分はホルモン療法に初回応答するけれども、その20～30%が治療不応性になる。最近のデータは、抗エストロゲン治療の間に獲得され、稀に未処置の原発性ER陽性乳癌に認められるエストロゲン受容体遺伝子(ESR1)中の活性型変異が、治療耐性に関連があることを示唆している。ホルモン不応性乳癌検体において同定された、リガンド結合ドメイン中にある活性型ESR1変異の数が増加しており、その最も一般的な変異はK303R、E380Q、V392I、S463P、K531E、V534E、P535H、L536Q/R、Y537S/N/C、D538GおよびR555Cを包含する。作用機序は全ての変異についてまだ十分に解明されていないが、L536Q、Y537S/C/NおよびD538Gの変異が活性コンホメーションでのエストロゲン受容体リガンド結合ドメインを安定化し、それによってリガンドの不在下での転写コアクチベーターの動員を可能にすることが生体外(インビトロ)試験により証明された。エストロゲンに対する過敏性はK303R変異の機序と考えられる。

40

【0002】

そのためESR1変異の検出はホルモン耐性を予測し治療に導く可能性がある。次世代シーケンシング(NGS)法は、少量のサンプルで多数の変異を同時検出できるので、そのような

50

変異の検出のための一般的なアプローチである。しかしながら、NGSは非常に労働集約的であり、時間がかかりかつ費用がかかる。デジタルPCR (dPCR) はESR1変異検出に用いられている高感度の方法であるが、多数の欠点を有する：すなわち、dPCRワークフローは冗長であり、特殊な装置を必要とし、現在のdPCR機器において利用可能な光学チャネルの数によってマルチプレックス化(多重化)が制限される。

【発明の概要】

【0003】

ESR1遺伝子中の変異を検出するためのキット、アッセイおよび方法、並びにホルモン感受性癌を有する患者の治療方法を提供する。

【0004】

本発明は1または複数の容器を含むキットであって、該容器の各々は、各々がESR1遺伝子中の異なる配列に特異的な2以上のプライマー対；ESR1遺伝子中の異なる配列に特異的な1または複数のプローブ(各プローブは標識されている)；内在性コントロール配列に特異的なプライマー対；および内在性コントロール配列に特異的なプローブを保有する。ある態様では、各プローブはフルオロフォア(発蛍光団)とクエンチャー(消光剤)により標識される。ある態様では、該キットは1~10個の容器、例えば2-5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10個またはそれ以上の容器を含む。ある態様では、各容器は2以上のプライマー対(内在性コントロールプライマー対を含む)、例えば3~16、4~10または5~8つのプライマー対を含む。例えば、全てのエクソン8変異、内在性コントロールおよび2以上の別の変異プライマー対を単一のチューブに含めることができる。ある態様では、各容器が3~4つのプローブ(内在性コントロールプローブを含む)を有する。ある態様では、各容器が耐熱性DNAポリメラーゼを更に保有する。

【0005】

ある態様では、該キットは陽性対照、例えば既知ESR1変異を有するサンプル、および/または陰性対照、例えばESR1変異を含まないサンプルを更に含む。

【0006】

ある態様では、ESR1遺伝子の各々異なる配列は、ESR1 V422DeIV、ESR1 S463P、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、ESR1 L536R、ESR1 D538G、ESR1 K303R、ESR1 E380Q、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537N、ESR1 Y537S、ESR1 S341L、ESR1 L429V、ESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535Hから成る群より選ばれる。ある態様では、該キットはESR1 V422DeIVに特異的なプライマー対、ESR1 S463Pに特異的なプライマー対、ESR1 L536Hに特異的なプライマー対、ESR1 L536Pに特異的なプライマー対、ESR1 L536Qに特異的なプライマー対、ESR1 L536Rに特異的なプライマー対、ESR1 D538Gに特異的なプライマー対、ESR1 K303Rに特異的なプライマー対、ESR1 E380Qに特異的なプライマー対、ESR1 L536_D538 Pに特異的なプライマー対、ESR1 Y537Cに特異的なプライマー対、ESR1 Y537Nに特異的なプライマー対、ESR1 Y537Sに特異的なプライマー対、ESR1 S341Lに特異的なプライマー対、ESR1 L429Vに特異的なプライマー対、ESR1 V533Mに特異的なプライマー対、ESR1 V534Eに特異的なプライマー対、およびESR1 P535Hに特異的なプライマー対から成る群より選ばれた少なくとも2つのプライマー対を含む。ある態様では、少なくとも1つのプライマーが修飾された非天然型ヌクレオチドを含む。

【0007】

ある態様では、該キットはESR1 V422DeIVに特異的なプライマー対、ESR1 S463Pに特異的なプライマー対、ESR1 L536Hに特異的なプライマー対、ESR1 L536Pに特異的なプライマー対、ESR1 L536Qに特異的なプライマー対、ESR1 L536Rに特異的なプライマー対、ESR1 D538G、ESR1 K303Rに特異的なプライマー対、ESR1 E380Qに特異的なプライマー対、ESR1 L536_D538 Pに特異的なプライマー対、ESR1 Y537Cに特異的なプライマー対、ESR1 Y537Nに特異的なプライマー対、ESR1 Y537Sに特異的なプライマー対、ESR1 S341Lに特異的なプライマー対、ESR1 L429Vに特異的なプライマー対、ESR1 V533Mに特異的なプライマー対、ESR1 V534Eに特異的なプライマー対、およびES

10

20

30

40

50

R1 P535Hに特異的なプライマー対を含む。ある態様では、該キットはESR1 V422DeIV、ESR1 S463P、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、ESR1 L536R、ESR1 D538G、ESR1 K303R、ESR1 E380Q、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537N、ESR1 Y537S、ESR1 S341L、ESR1 L429V、ESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535Hを特異的に検出するプローブを更に含む。

【0008】

ある態様では、該キットは、(i) ESR1 V422DeIVに特異的なプライマー対、ESR1 S463Pに特異的なプライマー対、ESR1 L536Hに特異的なプライマー対、ESR1 L536Pに特異的なプライマー対、ESR1 L536Qに特異的なプライマー対、ESR1 L536Rに特異的なプライマー対、およびESR1 D538Gに特異的なプライマー対を保有する第一容器；(ii) ESR1 K303Rに特異的なプライマー対、ESR1 E380Qに特異的なプライマー対、ESR1 L536_D538 Pに特異的なプライマー対、ESR1 Y537Cに特異的なプライマー対、ESR1 Y537Nに特異的なプライマー対、およびESR1 Y537Sに特異的なプライマー対を保有する第二容器；(iii) ESR1 S341Lに特異的なプライマー対、ESR1 L429Vに特異的なプライマー対、ESR1 V533Mに特異的なプライマー対、ESR1 V534Eに特異的なプライマー対、およびESR1 P535Hに特異的なプライマー対を保有する第三容器を含む。ある態様では、第一容器はESR1 V422DeIV、ESR1 S463P、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、ESR1 L536RおよびESR1 D538Gに特異的なプローブを更に保有する。ある態様では、単一のプローブが、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、ESR1 L536RおよびESR1 D538Gを特異的に検出する。ある態様では、第二容器がESR1 K303R、ESR1 E380Q、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537N、ESR1 Y537Sに特異的なプローブを更に保有する。ある態様では、単一のプローブが、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537N、ESR1 Y537Sを特異的に検出する。ある態様では、第三容器がESR1 S341L、ESR1 L429V、ESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535Hに特異的なプローブを保有する。ある態様では、単一のプローブがESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535Hを特異的に検出する。

【0009】

ある態様では、ESR1 K303R変異を検出するための対立遺伝子（アレル）特異的プライマーが、配列番号479、481および484から成る群より選ばれ、そしてある態様では、コモンプライマーとプローブ配列がそれぞれ配列番号476と477である。ある態様では、ESR1 S341L変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが、配列番号239、240、242、245、246、247、253、254、255、256、257、258および259から成る群より選ばれ、そしてある態様では、コモンプライマーとプローブ配列がそれぞれ配列番号235と237である。ある態様では、ESR1 E380Q変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号32、34、36、37、38、39、40、41および42から成る群より選ばれ、そしてある態様では、コモンプライマーとプローブ配列がそれぞれ配列番号528と31である。ある態様では、ESR1 V422DELV変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号287、294、295、296、297、298から成る群より選択され、そしてある場合には、コモンプライマーとプローブ配列がそれぞれ配列番号285と286である。ある態様では、ESR1 L429V変異を検出するための対立遺伝子プライマーが配列番号66、68、69、70、72、73、75、76、77、78、79、80および81から成る群より選択され、そしてある場合には、コモンプライマーとプローブ配列がそれぞれ配列番号59と60である。ある態様では、ESR1 S463P変異を検出するための対立遺伝子プライマーが配列番号264、265、267、268、269、270、271、272、281、282、283および275から成る群より選択され、そしてある態様では、コモンプライマーとプローブ配列がそれぞれ配列番号261と262である。

【0010】

ある態様では、コモンプライマーとプローブ、例えばそれぞれ配列番号314および/または394と配列番号407が、該アッセイにおいて全てのESR1エクソン8変異を増幅し検出するために用いられる。ある態様では、ESR1 V533M変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号322、329、330、345、346、347、348、349、350、352および

10

20

30

40

50

353から成る群より選択される。ある態様では、ESR1 V534E変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号364, 365, 367, 368, 370, 371, 373, 378, 388, 391, 392および393から成る群より選択される。ある場合には、ESR1 P535H変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号181, 188, 189, 190, 191, 198, 199, 200, 203, 204, 205, 208, 209, 212, 225, 226, 228, 229および231から成る群より選択される。ある態様では、ESR1 L536H変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号96, 101, 104, 105, 107, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116および117から成る群より選択される。ある態様では、ESR1 L536P変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号134, 135および137から成る群より選択される。ある態様では、ESR1 L536Q変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号141, 151, 154, 155, 157, 158, 159および160から成る群より選択される。ある態様では、ESR1 L536R変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号161, 172, 174, 175, 176, 177, 178, 179および180から成る群より選択される。ある態様では、ESR1 Y537C変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号397, 408, 415, 416, 417, 418, 419, 420および424から成る群より選択される。ある態様では、ESR1 Y537N変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号426, 436, 441, 445, 446, 447および448から成る群より選択される。ある態様では、ESR1 Y537S変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号449, 459, 466, 467, 468, 469, 470, 471および472から成る群より選択される。ある態様では、ESR1 D538G変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号14, 21, 22, 23, 24および25から成る群より選択される。ある態様では、ESR1 L536_D538 P変異を検出するための対立遺伝子特異的プライマーが配列番号84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92および93から成る群より選択される。

10

20

【0011】

ある態様では、該キットは、配列番号24, 113, 134, 158, 178, 264, 261, 262, 285, 286, 298, 314, 394, 407, 31, 42, 90, 415, 447, 469, 476, 477, 481, 528, 59, 60, 70, 231, 235, 237, 245, 350および388の配列を有するオリゴヌクレオチドを含む。ある態様では、各容器は内在性コントロール、例えば配列番号511, 514および517を含む。

【0012】

本発明は更に、個体からのサンプル中の2以上のESR1変異の存否を決定する（例えば検出する）方法であって、(i) 該個体からサンプルを採取し；そして(ii) マルチプレックス対立遺伝子特異的PCRを実施して2以上のESR1変異の存否を決定することを含む方法を提供する。ある態様では、前記サンプルが血液、血漿、血清、尿または粘膜組織（例えば頬ぬぐい液）から選ばれる。ある態様では、個体がホルモン応答性癌（例えばエストロゲン受容体および/またはプロゲステロン受容体陽性乳癌または卵巣癌）を有するか、または有すると診断された個体である。ある態様では、前記個体がホルモン療法を受けている。ある態様では、前記方法が、工程(i)の前に個体にホルモン療法（例えばSERM、アロマトーゼ阻害剤、またはLH遮断薬での処置）を施すことを更に含む。ある態様では、前記方法が更に、工程(ii)においてESR1変異の存在が決定された場合に、個体に改変治療（例えば追加のホルモン療法または標準的化学療法）を施すことを含む。

30

40

【0013】

ある態様では、本方法はマルチプレックス対立遺伝子特異的PCRを使って10以上のESR1変異、例えば10~20, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18または19個のESR1変異の存否を決定することを含む。ある態様では、2以上のESR1変異がESR1 V422DeIV、ESR1 S463P、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、ESR1 L536R、ESR1 D538G、ESR1 K303R、ESR1 E380Q、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537N、ESR1 Y537S、ESR1 S341L、ESR1 L429V、ESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535Hから選ばれる。ある態様では、2以上のESR1変異がESR1 V422DeIV、ESR1 S463P、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、ESR1 L536R、ESR1 D538

50

G、ESR1 K303R、ESR1 E380Q、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537N、ESR1 Y537S、ESR1 S341L、ESR1 L429V、ESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535Hを含む。

【0014】

ある態様では、マルチプレックス対立遺伝子特異的PCRが本明細書中に記載のキット、例えば1~10個の容器、例えば2~5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10またはそれ以上の容器を含むキットを使って実施される。ある態様では、該キットが3容器を含む。例えば、(i) ESR1 V422DeIV、ESR1 S463P、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、L536R、およびESR1 D538Gが第一容器中で検出され；(ii) ESR1 K303R、ESR1 E380Q、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537NおよびESR1 Y537Sが第二容器中で検出され；そして(iii) ESR1 S341L、ESR1 L429V、ESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535Hが第三容器中で検出されるように、マルチプレックス対立遺伝子特異的PCRを3容器中で実施することができる。

10

【0015】

更に、本発明はホルモン療法（例えばSERM、アロマターゼ阻害剤、および/または黄体形成ホルモン遮断薬）を受けているホルモン応答性癌（例えば乳癌）患者の改変治療を提供する方法を提供する。ある態様では、本方法が(i) 個体からサンプルを採取し（例えば血液、血漿、血清、尿、組織、FFPET等）；(ii) マルチプレックス対立遺伝子特異的PCRを実施し、2以上のESR1変異の存否を決定し；そして(iii) ESR1変異の存在が決定されたらその個体に改変治療を提供することを含む。ある態様では、工程(ii)が本明細書中に記載のキットを用いて実施される。

20

【0016】

ある態様では、マルチプレックス対立遺伝子特異的PCRが10以上のESR1変異の存否を決定する。ある態様では、2以上（または10以上）のESR1変異がESR1 V422DeIV、ESR1 S463P、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、ESR1 L536R、ESR1 D538G、ESR1 K303R、ESR1 E380Q、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537N、ESR1 Y537S、ESR1 S341L、ESR1 L429V、ESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535Hから成る群より選ばれる。ある態様では、ESR1 V422DeIV、ESR1 S463P、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、ESR1 L536R、ESR1 D538G、ESR1 K303R、ESR1 E380Q、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537N、ESR1 Y537S、ESR1 S341L、ESR1 L429V、ESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535Hの存否が決定される。

30

【0017】

ある態様では、工程(i)~(iii)が、個体がホルモン療法を開始してから0.5~5年後に実施される。ある態様では、当該方法が例えばホルモン療法に対する腫瘍の潜在的耐性をモニターするために、ホルモン療法中に2回以上実施される。ある態様では、該方法が定期的に、例えば6か月ごとに実施され、また別の態様では、該方法が個体の臨床的進行（例えば腫瘍成長、ホルモン療法に対する応答の減少など）がみられた時に実施される。ある態様では、工程(iii)が追加のホルモン療法または標準的的化学療法を個体に提供することを含む。

40

【0018】

加えて、ホルモン応答性癌（例えば乳癌または卵巣癌）を有する個体を治療する方法が提供される。ある態様では、該方法が、(i) 該個体にホルモン療法を施し；(ii) 該個体からサンプルを採取し；(iii) マルチプレックス対立遺伝子特異的PCRを実施して2以上のESR1変異の存否を決定し；そして(iv) ESR1変異の存在が決定されたら該個体に改変治療を提供することを含む。ある態様では、前記ホルモン療法がSERMである。

【0019】

ある態様では、マルチプレックス対立遺伝子特異的PCRが10以上のESR1変異の存否を決定する。ある態様では、2以上（または10以上）のESR1変異がESR1 V422DeIV、ESR1 S463P、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、ESR1 L536R、ESR1 D538G

50

、ESR1 K303R、ESR1 E380Q、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537N、ESR1 Y537S、ESR1 S341L、ESR1 L429V、ESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535Hから成る群より選ばれる。ある態様では、ESR1 V422DeIV、ESR1 S463P、ESR1 L536H、ESR1 L536P、ESR1 L536Q、ESR1 L536R、ESR1 D538G、ESR1 K303R、ESR1 E380Q、ESR1 L536_D538 P、ESR1 Y537C、ESR1 Y537N、ESR1 Y537S、ESR1 S341L、ESR1 L429V、ESR1 V533M、ESR1 V534EおよびESR1 P535Hの存否が決定される。

【0020】

ある態様では、工程(ii)~(iii)が工程(i)後(個体がホルモン療法を開始した後)の0.5~5年後に実施される。ある態様では、工程(ii)~(iii)がホルモン療法の最中に2回以上実施される。ある態様では、該方法が定期的に、例えば6か月ごとに実施され、またある態様では、該方法が個体に臨床的進行(例えば腫瘍成長、ホルモン療法に対する応答の減少など)が認められた時に実施される。ある態様では、工程(iv)が追加のホルモン療法(例えばアロマターゼ阻害剤および/または黄体形成ホルモン遮断薬)または標準的化学療法を個体に提供することを含む。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】図1A、1Bおよび1Cは、変異型と野生型サンプルを検出するためのプライマーとプローブの識別能を比較する。図1Aは、野生型と変異型との間の識別が弱小である、K303Rに特異的であるように設計されたプライマーとプローブを使った結果(増幅成長曲線)を示す。図1Bは、野生型(緑)と変異型(青;赤)との間の識別がより良好である、K303Rに特異的であるように設計されたプライマーとプローブを使った結果を示す。図1Cは、野生型サンプルに比較して変異型(青;赤)を検出する優れた特異性を示す、L536R_D538 Pに特異的であるように設計されたプライマーとプローブを使った結果を示し、ここで野生型サンプル(緑)は全くシグナルを示さない。

【図2】図2A、2Bおよび2Cも同様、L536R変異型と野生型サンプルを検出するためのプライマーとプローブの識別能を比較する。増幅成長曲線は、X軸に増幅サイクル数をY軸上にシグナルを示す。図2Aは、野生型と変異型との間の識別が貧弱である、L536R_RS01対立遺伝子特異的プライマーを使った結果を示す。図2Bは、野生型(緑)と変異型との間の識別が良好である、L536R_RS09対立遺伝子特異的プライマーを使った結果を示す。図2Cは、野生型サンプルに比較して変異型を検出する特異性がより優れている、L536R_RS04対立遺伝子特異的プライマーを使った結果を示し、ここで野生型サンプル(緑)は本質的に全くシグナルを示さない。

【図3】図3は、別のESR1変異型サンプル(全て別の曲線/色)と比較したP535H変異(ピンク;紺青)に特異的であるように設計されたプライマーとプローブの特異性を示す。

【図4】図4Aは、E380Q変異陽性対照(MC、一番上/左の2本の曲線)、E380Q変異陽性サンプル(IN008、次の下2本の曲線)、E380野生型(FFPET_WT、次の下2本の曲線)、および非鋳型対照(NTC、一番下の水平線)についての増幅成長曲線を示す。図4Bは、E380Q変異陽性対照曲線のない同一増幅成長曲線を示す。

【図5】図5は、D538G変異陽性対照(MC、一番上/左の曲線)、3つのD538G変異陽性サンプル(D538G、次の下3本の曲線)、D538野生型(次の下48本の曲線)および非鋳型対照(NTC、一番下の水平線)についての増幅成長曲線を示す。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細な説明

I.序論

ヒトエストロゲン受容体(ESR1)中の変異の存在を検出するためのマルチプレックスPCRアッセイが提供される。それらの変異は、初回投与された時にはホルモン療法に感受性であったホルモン応答性癌(ESR1陽性および/またはプロゲステロン受容体陽性)を有する癌患者における、ホルモン療法に対する耐性に関連付けられている。これらのアッセイは

、非侵襲性のサンプル（例えば血液、血漿、血清、尿等）を使って実施することが可能であり、そのため多数の組織生検を採取することなくホルモン療法中の患者に反復試験を実施することができる。

【0023】

本明細書に記載のアッセイは、信頼性のある、広く受け入れられる技術に依拠しており、正確で、再現性のある、迅速な結果を提供する。

【0024】

II. 定義

用語「エストロゲン受容体」、「ER」および「ESR1」は、本明細書中異なって指摘されない限り相互交換可能に用いられる。ESR1はERタンパク質をコードする遺伝子を指すためにも用いることができる。

10

【0025】

用語「マルチプレックス」は、複数の標的が検出されるアッセイを指す。

【0026】

用語「容器」、「器」、「チューブ」、「ウェル」、「チャンバー」、「マイクロチャンバー」等は、アッセイを実施または試薬を保有できる容器を指す。容器がキット内にありかつ試薬を保有している時、または増幅反応に使用する予定である時、それは汚染や蒸発を避けるために密閉または密封することができる。容器をアッセイに使用しようとする時、それは少なくともアッセイの準備の間、開封するまたは利用可能にすることができる。

【0027】

マーカー遺伝子またはマーカー遺伝子産物に関する用語「個別に検出される」または「個別検出」は、マルチプレックス反応において各マーカーが検出されることを示す。すなわち、各マーカーが異なる標識に関連付けられる（異なるように標識されたプローブによって検出される）。

20

【0028】

用語「核酸」、「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」はヌクレオチド（例えばリボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド）のポリマーを指し、天然型核酸（アデノシン、グアニジン、シトシン、ウラシルおよびチミジン）、非天然型核酸および修飾核酸を包含する。この用語はポリマーの長さ（例えばモノマーの数）により制限されない。核酸は一本鎖であっても二本鎖であってもよく、一般に5' - 3' ホスホジエステル結合を含むだろうが、ある場合には、ヌクレオチド類似体が別の結合を含むことがある。モノマーとは典型的にはヌクレオチドを言う。用語「非天然型ヌクレオチド」または「修飾ヌクレオチド」とは、修飾された窒素含有塩基、糖またはリン酸基を含むヌクレオチド、またはその構造中に非天然成分を含むヌクレオチドを指す。非天然型ヌクレオチドの例としては、ジデオキシヌクレオチド、ピオチン化、アミノ化、脱アミノ化、アルキル化、ベンジル化およびフルオロフォア標識ヌクレオチドが挙げられる。

30

【0029】

用語「プライマー」は、適当な条件下での核酸ポリメラーゼによるポリヌクレオチド鎖合成の開始点として働く短鎖核酸（オリゴヌクレオチド）を指す。ポリヌクレオチド合成および増幅反応は、典型的には、適当な緩衝液、dNTPsおよび/またはrNTPs、並びに1以上の随意の補因子（コファクター）を含み、そして適当な温度で実施される。プライマーは典型的には、標的配列に対して少なくとも実質的に相補的である（例えば0,1,2または3つのミスマッチを有する）少なくとも1つの標的ハイブリダイズ領域を含む。この領域は、典型的には長さが約8～約40ヌクレオチドであり、例えば12～25ヌクレオチドである。「プライマー対」とは、標的配列に関して反対の方向で配向され、かつ増幅条件下で増幅産物を産生する正(foward)および逆(reverse)プライマーのことを言う。ある態様では、マルチプレックスプライマー対は単一のコモン（common）正または逆プライマーに基づく。例えば、マルチプレックス対立遺伝子特異的正プライマーは、例えば、マルチプレックス対立遺伝子が互いに近接して存在する場合には、同じコモン逆プライマーとのプライマー対の一部と考えることができる。

40

50

【 0 0 3 0 】

本明細書中で用いるとき「プローブ」とは、特別に対象とする標的生体分子に選択的に、例えば該プローブにハイブリダイズする着目の核酸配列に選択的に結合することができる分子を意味する。プローブは、少なくとも1つの非ヌクレオチド成分により検出可能に標識される。ある態様では、プローブはフルオロフォア（発蛍光団）とクエンチャー（消光剤）で標識される。

【 0 0 3 1 】

「相補的」または「相補性」という語は、あるポリヌクレオチド中の核酸が第二のポリヌクレオチド中の別の核酸と塩基対を形成できる能力を指す。例えば、配列A-G-T（RNAの場合はA-G-U）は配列T-C-A（RNAの場合はU-C-A）に相補的である。相補性は、核酸の一部のみが塩基対合に従って一致する部分的相補性であるか、または核酸の全部が塩基対合に従って一致する完全相補性であることができる。プローブまたはプライマーは、それが標的配列に対し少なくとも部分的に相補的であるならば、標的配列に「特異的である」と見なされる。条件に依存して、標的配列に対する相補性の程度は、典型的には、プライマーのような短い核酸の方が長鎖の配列よりも高い（例えば80%、90%、95%またはそれ以上の高い相補性）。ある態様では、用語「ESR1遺伝子中の異なる配列に特異的な各プライマー対」とは、各々のプライマー対がESR1遺伝子の異なる配列、例えば異なる対立遺伝子または変異を特異的に増幅することを示す。

10

【 0 0 3 2 】

用語「特異的に増幅する」は、プライマーセットが統計的に有意なレベルで非標的配列よりも標的配列を多く増幅することを示す。用語「特異的に検出する」は、プローブが統計的に有意なレベルで非標的配列よりも標的配列を多く検出することを指す。当業者に理解されるように、特異的な増幅と検出は、陰性対照（ネガティブコントロール）、例えば試験サンプルと同じ核酸を含むが標的配列を含まないサンプルまたは核酸を欠いているサンプルを使って測定することができる。例えば、標的配列を特異的に増幅し検出するプライマーとプローブは、バックグラウンド（非標的配列）から容易に識別可能であるCt値、例えばバックグラウンドよりも少なくとも2, 3, 4, 5, 5-10, 10-20, または10-30サイクル数だけ少ないCtをもたらず。用語「対立遺伝子特異的」PCRとは、標的配列の特定の対立遺伝子変異体を特異的に増幅するプライマーを使用した標的配列の増幅のことを言う。典型的には、正または逆プライマーは、その位置に対立遺伝子変異体の正確な相補体を含む。

20

30

【 0 0 3 3 】

2以上の核酸または2以上のポリペプチドに関連する用語「同一」または「同一性%」とは、BLASTまたはBLAST 2.0配列比較演算法を使ってデフォルトパラメーターを用いて測定した時、または手動の整列と目視検査により測定した時、同一である（例えば、比較窓を通して比較し最大の同一性（一致）となるよう整列した時の特定の領域に渡ってまたは指定した領域に渡って、例えば約60%一致、例えば少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより高い一致を有する）ヌクレオチドまたはアミノ酸の特定の割合を有する、2以上の配列または部分配列を指す。例えばNCBIウェブサイト ncbi.nlm.nih.gov/BLASTを参照のこと。そのような配列は次いで「実質的に同一」と呼ばれる。同一性%は、典型的には最適に整列（アラインメント）された配列において決定され、そのため欠失および/または付加を有する配列並びに置換を有するものにもその定義を適用する。当業界で一般に用いられる演算法はgap（ギャップ）等を形成する。典型的には、同一性は、長さ少なくとも約8~25アミノ酸またはヌクレオチドである配列を含む領域に渡って、または長さ50~100アミノ酸もしくはヌクレオチドである領域に渡って、または参照配列の全長に渡って存在する。

40

【 0 0 3 4 】

用語「キット」は、本明細書に記載されるようなRNAまたはDNAを特異的に増幅し、捕捉し、タグ付け/変換または検出するための、少なくとも1つの試薬、例えば核酸プローブまたはプローブプール等を含む任意の製品（例えばパッケージまたは容器）を指す。

50

【 0 0 3 5 】

用語「増幅条件」とは、プライマーのハイブリダイゼーションと鋳型依存性伸長を可能にする核酸増幅反応（例えばPCR増幅）の条件を指す。用語「アンプリコン」または「増幅産物」は、標的核酸配列の全体または断片を含む核酸分子であり、任意の適当な増幅方法による試験管内（*in vitro*）増幅の産物として形成される核酸分子を指す。当業者は、正および逆プライマー（プライマー対）が増幅産物の境界を限定することを理解するだろう。プライマーに用いるときの用語「増幅産物を産生する」とは、適当な条件下で（例えばヌクレオチドポリメラーゼとNTPsの存在下で）、該プライマーが限定された増幅産物を産生することを示す。様々なPCR条件がPCR Strategies（Innis他、1995、Academic Press, San Diego, CA）の第14章；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications（Innis他、Academic Press, NY, 1990）中に記載されている。

10

【 0 0 3 6 】

用語「増幅産物」は、増幅反応の生産物を指す。増幅産物は、ポリヌクレオチド合成の各ラウンドを開始するのに使われるプライマーを含む。「アンプリコン」は、増幅のための標的とされる配列であり、該用語は増幅産物を指すためにも用いることができる。アンプリコンの5'および3'境界は、正と逆プライマーにより限定される。

【 0 0 3 7 】

用語「個体」、「被験者」および「患者」は、本明細書中では互いに交換可能に用いられる。個体は診断前、診断後で治療前、治療中、または治療後であることができる。本開示の状況下では、個体は典型的には医療を求めている。

20

【 0 0 3 8 】

用語「サンプル」または「生物学的試料」は、核酸を含むかまたは含むと推測される任意の組成物を言う。該用語は、細胞、組織または血液の精製または分離された成分、例えばDNA、RNA、タンパク質、無細胞画分、または細胞溶解物を包含する。サンプルは例えば腫瘍または転移病巣からのFFPETであることができる。サンプルは凍結もしくは新鮮組織から、または液体サンプルから、例えば血液もしくは血液成分（血漿もしくは血清）、尿、精液、唾液、痰、粘液、精液、涙液、リンパ、脳脊髄液、口ノ喉うがい液、気管支肺胞洗浄液、スワブからの洗浄材料などであることができる。サンプルは個体から採取された細胞（細胞系を含む）の試験管内（*in vitro*）培養物の構成成分および成分を含んでもよい。サンプルは、個体から直接採取されたサンプルから部分的に加工処理することもでき、例えば細胞溶解物または赤血球枯濁血であることもできる。

30

【 0 0 3 9 】

用語「個体からサンプルを採取する」とは、個体からの生物学的試料を試験用に準備することを意味する。採取は個体から直接であることもでき、あるいは個体からサンプルを直接得た第三者からのものであることができる。

【 0 0 4 0 】

用語「個体に治療を施す」は、治療が処方されるか、推奨されるか、個体に利用可能にされることを意味する。治療は第三者により個体に実際に施されてもよく（例えば入院患者への注射）、または個体自身により施されてもよい。

【 0 0 4 1 】

「対照」サンプルまたは値は、試験サンプルまたは試験条件に対する比較のためのリファレンス（基準）として、通常は既知リファレンスとして働く値を指す。例えば、試験サンプルは試験条件から取ることができ、例えば癌を有する疑いのある個体から採取し、そして既知条件から、例えば癌のない個体（陰性対照）から、または癌を有する患者（陽性対照）からのサンプルと比較することができる。本開示のもとでは、試験サンプルは典型的には乳癌患者からのものである。対照は、試験もしくは結果の平均値または試験もしくは結果から集積された範囲を表すこともできる。対照は反応条件に合わせて調製することもできる。例えば、核酸の存在、質および/または量の対照（例えば内在性コントロール）としては、サンプル中に存在することが知られている配列（例えばハウスキーピング遺伝子、例えば アクチン、 グロビン、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ（

40

50

GAPDH)、リボソームプロテインL37とL38、PPIアーゼ、EIF3、真核翻訳伸長因子2 (eEF2)、DHFR、またはコハク酸デヒドロゲナーゼ)を検出するであろうプライマーとプローブを挙げることができる。ある態様では、内在性コントロールは、普通は変異体でない(例えば異なるエクソン中の)同一遺伝子の領域からの配列であることができる。例えば指定された長さを有する既知の追加のポリヌクレオチドを追加することもできる。陰性対照の例は、核酸を持たないもの、またはサンプル中に存在しないと思われる配列に特異的なプライマーまたはプローブを含むもの、例えば異なる種からのものである。当業者は、対照の選択が、例えば対照が細胞型と生物体に適当となるように、特定のアッセイに依存すること理解するだろう。当業者は、任意の数のパラメーターの評価のために対照を設計できることを理解するだろう。例えば、薬理学的データ(例えば半減期)または治療的尺度(例えば効用および/または副作用の比較)に基づいた治療効果を比較するために対照を考案することができる。対照を試験管内用途のために設計することができる。当業者は、対照が特定の状況下で有益でありかつ対照値に対する比較に基づいてデータを分析できることを理解するだろう。対照はデータの有意性を決定するのにも有益である。例えば、ある一定のパラメーターの値が対照サンプルで幅広く変動的であるならば、試験サンプルでの変動は有意とは見なされないだろう。

10

【0042】

用語「標識」、「タグ」、「検出可能成分」等は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的または他の物理的手段により検出可能な成分を指す。例えば、有用な標識としては、フルオロフォア(発蛍光団)、発光性物質、放射性同位体(例えば³²P、³H)、高電子密度試薬、または親和性に基づく成分、例えばポリA(ポリTと相互作用する)、ポリTタグ(ポリAと相互作用する)、Hisタグ(Niと相互作用する)、またはストレプトアビジンタグ(ビオチンで分離可能)が挙げられる。当業者は、核酸に結合された検出可能標識が天然に存在しないことを理解するだろう。

20

【0043】

異なって定義されない限り、本明細書中で用いる技術用語と科学用語は、当業者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。例えば、Lackie, DICTIONARY OF CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier (第4版、2007); Sambrook他、MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor, N.Y. 1989)参照。用語「1つの(a, an)」は「1または複数の」を意味するものである。工程または要素の言及の後に続く用語「含む」、「含んでなる」および「含んでいる」とは、更なる工程または要素の追加が随意であって排他的でないことを意味するつもりである。

30

【0044】

III.核酸サンプル

核酸増幅用のサンプルは、核酸を含む疑いのある任意源から得ることができる。サンプルはホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPET)、組織生検または培養細胞(例えば患者から得られるかまたは対照を表すもの)から採取することができる。ある態様では、サンプルは非侵襲性的な方法で、例えば尿、皮膚、スワブ、唾液、血液または血液画分から得られる。

40

【0045】

細胞を含むサンプルでは、細胞を分離する(例えばサイズに基づいたろ過または遠心を使って)ことができ、それにより無細胞核酸(cfNA)、例えばエキソソーム、微小胞、ウイルス粒子または自由に循環している前記のものの中の核酸を残すことができる。あるいは、磁気ガラス粒子(MGP)の存在下において細胞を溶解させるか、または細胞性溶解物をMGPに添加する前に、細胞を溶解させて細胞性核酸を得ることができる。

【0046】

生物学的サンプルから核酸を単離する方法は、例えばSambrook中に記載されているように既知であり、いくつかのキットが市販されている(例えば、Roche社から入手可能である、高純度RNA単離キット(High Pure RNA Isolation Kit)、高純度ウイルス核酸キ

50

ット (High Pure Viral Nucleic Acid Kit)、MagNA Pure LC全核酸単離キット (MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit)、細胞・組織用DNA単離キット (DNA Isolation Kit for Cells and Tissues)、哺乳類血液用DNA単離キット (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood)、高純度FFPET DNA単離キット (High Pure FFPET DNA Isolation Kit)]。本明細書に開示される方法に関しては、RNAが回収されるが、ある態様では、前もって調製されたcDNAに分類子を用いることができる。

【0047】

IV. エストロゲン受容体変異癌および治療

ホルモン感受性腫瘍は一般にホルモン療法で処置される。ホルモン非感受性腫瘍は典型的にはホルモン療法に反応しない。用語「ホルモン療法」は、腫瘍の成長に影響を及ぼすホルモンの作用を阻止する様々な治療法に適用する。しかしながら、ある種の子宮癌と腎臓癌のような症例には、プロゲステロンまたはその合成種が処方される。

10

【0048】

乳癌はしばしばホルモン感受性であり、乳癌と診断された患者は、腫瘍がエストロゲン受容体 (ESR1) および/またはプロゲステロン受容体陽性であるかどうかを決定するために試験される。受容体陽性腫瘍は、それらのホルモンの産生を阻害する剤で治療することができる。外科手術または放射線を用いて卵巣を除去する卵巣切除を実施することができる。外科手術はしばしば追加の化学療法の後に行われる。ESRに対するエストロゲンの作用を遮断する選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERMS) としては、タモキシフェン、ラロキシフェン、トレミフェン、およびフルベストラントが挙げられる。追加の治療としては、アロマターゼ阻害薬 (例えばアナストロゾール、エキセメスタン、レトロゾール) および黄体形成ホルモン (LH) 遮断薬 (例えばゴセレリン、ロイプロリド) が挙げられる。それらの療法は併用でき、例えば、閉経後の患者にはSERMをアロマターゼ阻害薬と併用して、または閉経前患者にはSERMをLH遮断薬と併用することができる。同様な療法が受容体陽性卵巣癌に有効と考えられるが、前立腺癌は黄体形成ホルモン遮断薬、抗アンドロゲン、および/またはゴナドトロピン放出ホルモン遮断薬で処理することができる。

20

【0049】

その上、患者は標準化学療法から恩恵を受けることができる。該療法は、CHOP (シクロホスファミド; ドキソルピシン; ピンクリスチン; およびプレドニソロン) またはリツキシマブおよび/またはエトポシドを更に含むR-CHOPを包含する。このカクテルは、一定期間の間定期的に、または腫瘍サイズおよび/または症状の低減が認められるまで投与することができる。例えば、CHOPまたはR-CHOPは2~3週間ごとに投与することができる。

30

【0050】

どの処置が選択されるかにかかわらず、典型的には副作用を測定できるように低用量で始まり、そして副作用が出現するまでまたは患者の耐容の範囲内で、あるいは臨床的効果が観察されるまで、用量が増加される。

【0051】

初回治療の後、患者はホルモン療法に耐性になり得る。ホルモン療法に対する耐性は、少なくとも一部は、エストロゲン受容体中の突然変異のためであると考えられる。それらの変異の多くはリガンド結合ドメイン中に存し、そのため該受容体はエストロゲン放出の欠損下で活性となる。その変異の例としては、K303R、E380Q、V392I、S463P、K531E、V534E、P535H、L536Q/R、Y537S/C/N、D538G、およびR555Cが挙げられる。エストロゲン受容体中の変異についての試験は、患者に対しより効果的な治療決定を可能にする。試験はホルモン療法の最中に定期的であることができ、例えば耐性の所見の前、最中、または後であることができる。例えば、SERM療法を受けている患者は、別のホルモン療法もしくはその併用療法に、または標準化学療法にスイッチすることができる。

40

【0052】

V. 増幅と検出

50

核酸サンプルは、例えば核酸増幅を使った、例えば任意のプライマー依存性増幅法を使った、検出と定量に用いることができる。ある態様では、予備的な逆転写工程が実施される（RT-PCRとも呼ばれるが、リアルタイムPCRと混同してはならない）。例えばHierro他（2006）72:7148を参照のこと。本明細書中で用いる用語「qRT-PCR」は、逆転写と定量的PCRを指す。この両反応は中断を伴わずに、例えば試薬を添加するための中断を伴わずに、単一のチューブ中で実施できる。例えば、ポリTプライマーを使って、ポリAテールを有するサンプル中の全mRNAを逆転写することができ、ランダムオリゴヌクレオチドを使用することができ、またはcDNAに逆転写される特定の標的転写物に特異的であるプライマーを設計することができる。cDNAまたはサンプル由来DNAは、定量的増幅（リアルタイムまたは定量的PCR、すなわちRT-PCRまたはqPCR）用に意図される最初の鋳型を成すことができる。qPCRは、PCR工程の各サイクルの間に生成される生成物の信頼できる検出と測定を可能にする。そのような技術は当業界で周知であり、キットと試薬は例えばRoche Molecular Systems社、Life Technologies社、Bio-Rad社等から市販されており、例えばPfaffl（2010）Methods: The ongoing evolution of qPCR、第50巻を参照のこと。別々の逆転写酵素と耐熱性DNAポリメラーゼを、例えば二段階反応（逆転写の後にDNAポリメラーゼの添加と増幅を行う）または組み合わせ反応（両酵素を一度に添加する）で使用することができる。ある態様では、逆転写酵素活性とDNA鋳型依存性活性の両方を有する耐熱性ポリメラーゼを用いて標的核酸が増幅される。典型的な酵素としては、Tth DNAポリメラーゼ、C.thermポリメラーゼ系、およびUS 20140170730とUS 20140051126に開示されたものが挙げられる。

10

20

【0053】

本明細書中に記載されるような使用のためのプローブは、フルオロフォアとクエンチャーで標識することができる（例えばTaqMan, LightCycler, Molecular Beacon, Scorpion, またはDual Labeledプローブ）。適当なフルオロフォアとしてはFAM, JOE, TET, Cal Fluor Gold 540, HEX, VIC, Cal Fluor Orange 560, TAMRA, Cyanine 3, Quasar 570, Cal Fluor Red 590, Rox, Texas Red, Cyanine 5, Quasar 670, およびCyanine 5.5が挙げられる。適当なクエンチャーとしてはTAMRA（FAM,JOEおよびTET用）、DABCYLおよびBHQ1-3が挙げられる。

【0054】

検出装置は従来既知であり、選択される標識に合わせて適当に選択される。定量的PCRに適当な検出装置としては、cobas（登録商標）およびLight Cycler（登録商標）システム（Roche社）、PRISM 7000および7300リアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems社）等が挙げられる。6チャンネル検出がCFX96リアルタイムPCR検出システム（Bio-Rad社）およびRotorgene Q（Qiagen社）上で利用可能であり、より高度のマルチプレックス化を可能にする。

30

【0055】

結果は閾値サイクル（Ctと略記され、場合によりCqまたはCpとも略記される）の形で表すことができる。低いCt値は、例えばより高い標的核酸濃度またはより効率的な増幅のために得られる、予め決められた閾値レベルへの迅速な達成を示す。高いCt値は、より低い標的核酸濃度、または非効率的なもしくは阻害された増幅を反映しうる。ある態様では、Ctは、例えばベースラインに関して、または成長曲線の二次導関数の最大値を求めることにより、予め定められた閾値ラインを超えるサイクル数として設定される。Ctの測定は当業界で公知であり、例えば米国特許第7363168号明細書中に記載されている。

40

【0056】

VI.キット

本発明は、ESR1変異を検出するためのマルチプレックス対立遺伝子特異的PCRを実施するためのキットを提供する。該キットは、本明細書に記載される特定のESR1変異を特異的に検出するためのプライマーとプローブを含有する。

【0057】

ESR1 V422DeIVを検出するためのプライマー対とプローブは、配列番号284または287

50

~300の正プライマー配列、配列番号285または302~311の逆プライマー配列、および配列番号286または301のプロープ配列から選択することができる。ESR1 S463Pを検出するためのプライマー対とプロープは、配列番号260または263~272の正プライマー配列、配列番号261または274~283の逆プライマー配列、および配列番号262または273のプロープ配列から選択することができる。ESR1 L536Hを検出するためのプライマー対とプロープは、配列番号96~105の正プライマー配列、配列番号106~120の逆プライマー配列、および配列番号94または95のプロープ配列から選択することができる。ESR1 L536Pを検出するためのプライマー対は、配列番号121~130の正プライマー配列および配列番号131~140の逆プライマー配列から選択することができる。ESR1 L536Qを検出するためのプライマー対は、配列番号141~150の正プライマー配列および配列番号151~160の逆プライマー配列から選択することができる。ESR1 L536Rを検出するためのプライマー対は、配列番号161~170の正プライマー配列および配列番号171~180の逆プライマー配列から選択することができる。ESR1 D538Gを検出するためのプライマー対は、配列番号4~13の正プライマー配列および配列番号14~27または550の逆プライマー配列から選択することができる。ESR1 K303Rを検出するためのプライマー対とプロープは、配列番号473、474または478~487の正プライマー配列、配列番号477、489~498または576の逆プライマー配列、および配列番号477または488のプロープ配列から選択することができる。ESR1 E380Qを検出するためのプライマー対とプロープは、配列番号28または32~42の正プライマー配列、配列番号29、30または44~53の逆プライマー配列、および配列番号43または54のプロープ配列から選択することができる。ESR1 L536_D538 Pを検出するためのプライマーは、配列番号84~93の逆プライマー配列から選択することができる。ESR1 Y537Cを検出するためのプライマー対とプロープは、配列番号394または397~406の正プライマー配列、配列番号395、408~425または574の逆プライマー配列、および配列番号396または407のプロープ配列から選択することができる。ESR1 Y537Nを検出するためのプライマー対は、配列番号426~435の正プライマー配列および配列番号436~448または575~577の逆プライマー配列から選択することができる。ESR1 Y537Sを検出するためのプライマー対は、配列番号449~458の正プライマー配列および配列番号459~472または578の逆プライマー配列から選択することができる。ESR1 S341Lを検出するためのプライマー対とプロープは、配列番号232、233、または238~247の正プライマー配列、配列番号234、235、または250~259の逆プライマー配列、および配列番号248または249のプロープ配列から選択することができる。ESR1 L429Vを検出するためのプライマー対とプロープは、配列番号58または61~70の正プライマー配列、配列番号59または72~81の逆プライマー配列、および配列番号60または71のプロープ配列から選択することができる。ESR1 V533Mを検出するためのプライマー対とプロープは、配列番号312~318、322~333、335または356の正プライマー配列、配列番号319、320または336354の逆プライマー配列、および配列番号321、334または335のプロープ配列から選択することができる。ESR1 V534Eを検出するためのプライマー対とプロープは、配列番号357または363~373の正プライマー配列、配列番号358~362または378~393の逆プライマー配列、および配列番号363または374~377のプロープ配列から選択することができる。ESR1 P535Hを検出するためのプライマー対は、配列番号181~190の正プライマー配列および配列番号191~231の逆プライマー配列から選択することができる。

【0058】

その上、エクソン8中の変異については、コモン（またはユニバーサル）正プライマーまたはコモン逆プライマーを用いて各増幅産物を増幅させることができ、そしてコモンプロープを用いて各増幅産物を検出することができる。当業者は、配列にわずかな変更を加えることができ、例えば1~3個のヌクレオチドの付加または削除を行うことができる。

【0059】

各変異について表5に開示されたものから選ばれた対立遺伝子特異的プライマーを、その変異に相当するコモンプライマーおよびプロープと一緒に、該キットに含めることができ

10

20

30

40

50

る。

【0060】

ある態様では、該キットは、対立遺伝子特異的プライマーとプローブを含む1～18個の原液を含む。この原液は、随意にDNAポリメラーゼを含むことができ、そして随意に内在性コントロールを検出するためのプライマーとプローブを含むことができる。ある場合には、該キットは2～5個の前記原液、例えば2, 3, 4, または5個の原液を含む。

【0061】

ある態様では、前記原液混合物は、緩衝液、dNTPs、および逆転写と増幅に適当な他の要素（例えば補因子またはアプタマー）を更に含む。典型的には、該混合物は、そのアリコートサンプル（例えばDNA）、酵素および/または水と一緒に最終反応容量へと添加されるように濃縮された形である。ある態様では、該キットは逆転写酵素（または逆転写活性を有する酵素）および/またはDNAポリメラーゼ（例えば耐熱性DNAポリメラーゼ、例えばTaq、ZO5およびその誘導体）を更に含む。

10

【0062】

ある態様では、該キットはサンプル、例えば非侵襲性サンプルまたは組織サンプルからのDNAまたはRNA精製の成分を更に含む。例えば、該キットは、MagNA Pure LC全核酸単離キット（MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit）、細胞と組織用DNA単離キット（DNA Isolation Kit for Cells and Tissues）、哺乳類血液用DNA単離キット（DNA Isolation Kit for Mammalian Blood）、高純度FFPET DNA単離キット（High Pure FFPET DNA Isolation Kit）、高純度またはMagNA Pure RNA単離キット（High Pure or MagNA Pure RNA Isolation Kits）（以上Roche社）、DNeasyまたはRNeasy Kit（Qiagen社）、PureLink DNAまたはRNA単離キット（PureLink DNA or RNA Isolation Kits）（Thermo Fischer社）等からの成分を含むことができる。

20

【0063】

ある態様では、該キットは少なくとも1つの対照サンプル、例えば癌でないサンプル（またはプールしたサンプル）からの核酸、または既知のESR1変異型サンプル（またはプールしたサンプル）からの核酸を更に含む。ある態様では、該キットは陰性対照、例えば核酸を持たないもの、または変異型ESR1核酸を持たないものを含む。ある態様では、該キットは消耗品、例えば調製用プレートまたはチューブ、サンプル収集用チューブ等を更に含む。ある態様では、該キットは使用説明書、ウェブサイトへのリファレンス、またはソフトウェアを更に含む。

30

【0064】

VII. 実施例

アッセイ設計

ESR1遺伝子中の18種の変異を検出するためのマルチプレックス対立遺伝子特異的PCRを設計した。検出される変異を表1に示す。

表1 . ESR1変異

【0065】

40

50

【表 1】

	ESR1変異 (AA)	ESR1変異 (NA)	エクソン
1	K303R	908 A>G	4
2	S341L	1022 C>T	4
3	E380Q	1138 G>C	5
4	V422DelV	1262_1264delTGG	6
5	L429V	1285 C>G	6
6	S463P	1387 T>C	7
7	V533M	1597 G>A	8
8	V534E	1601 T>A	8
9	P535H	1604 C>A	8
10	L536Q	1607/8 TC>AC	8
11	L536R	1607 T>G	8
12	L536H	1607 T>A	8
13	L536P	1607 T>C	8
14	L536_D538>P	1607_1614 TCTATGAC>CC	8
15	Y537N	1609 T>A	8
16	Y537C	1610 A>G	8
17	Y537S	1610 A>C	8
18	D538G	1613 A>G	8

【 0 0 6 6 】

アッセイ用に作製したプライマーとプローブを表 2 に示す。当業者は、この一覧表が排他的なものでないこと、そしてプライマーおよび/またはプローブ配列が表示のものから僅かに変更できること、例えば 1 または数個のヌクレオチドを追加または削減するか、修飾ヌクレオチドの位置を移動するか、または所定の位置において異なる修飾ヌクレオチド（例えば t_BB_dC の代わりに N4_Et_dC）を用いることができることを理解するだろう。検出される変異はプライマー/プローブ名で示される。FS# および RS# は、それぞれ正(forward)の特異的プライマーと逆(reverse)の特異的プライマーを指す。CE# および CR# は、それぞれコモン(common)正プライマーとコモン逆プライマーを指す。F_P# および R_P# は、正および逆プローブを指す。エクソン 8 中のプローブは特定の変異に対して標識され、それらは任意のエクソン 8 変異を検出するために用いることができる。このアッセイの対立遺伝子特異性は、対立遺伝子特異的プライマーによって決定される。一例として、D538G 変異を検出するためには、任意の ESR1_D538G_FS# プライマーを、任意の ESR1_[Exon8mut]_CR# プライマーと任意の ESR1_[Exon8mut]_F_P# プローブとともに使用でき、任意の ESR1_D538G_RS# プライマーを、任意の ESR1_[Exon8mut]_CF# プライマーと任意の ESR1_[Exon8mut]_R_P# プローブとともに使用できる。

【 0 0 6 7 】

変異には、t_BB_[dNTP] = N6-tert-ブチル-ベンジル[dNTP] ; N4_Et_[dNTP] = N4-エチル[dNTP] ; N4_Bz_[dNTP] = N4-ベンジル[dNTP] ; N6_Me_[dNTP] = N6-メチル[dNTP] ; pdU = 5-プロピニル-デオキシウラシル ; 7_Dz_dG = 7-デアザdG ; LNA-[dNTP] = ロックド核酸[dNTP]が含まれる。

表 2 . プライマーとプローブ配列

【 0 0 6 8 】

【 表 2 - 1 】

配列番号	Oligo名	配列	修飾
1	ESR1_EXWT1_FS03	TGGCCCTACTGCATCAGATCCAA	
2	ESR1_EXWT1_FS04	ATCAGATCCAAGGGAACGAGCT	
3	ESR1_EXWT1_RS03	GCTTGCTGCTGTCCAGGTACA	
4	ESR1_D538G_FS01	CGTGGTGCCCTCTATGG	
5	ESR1_D538G_FS02	CGTGGTGCCCTCTATAG	
6	ESR1_D538G_FS03	CGTGGTGCCCTCTATCG	
7	ESR1_D538G_FS04	CGTGGTGCCCTCTATTG	
8	ESR1_D538G_FS05	CGTGGTGCCCTCTAAGG	
9	ESR1_D538G_FS06	CGTGGTGCCCTCTACGG	
10	ESR1_D538G_FS07	CGTGGTGCCCTCTAGGG	
11	ESR1_D538G_FS08	CGTGGTGCCCTCTCTGG	
12	ESR1_D538G_FS09	CGTGGTGCCCTCTGTGG	
13	ESR1_D538G_FS10	CGTGGTGCCCTCTTTGG	
14	ESR1_D538G_RS01	GCATCTCCAGCAGC1GGC] = A または随意の t_BB_dA

10

20

【 0 0 6 9 】

30

40

50

【表 2 - 2】

15	ESR1_D538G_RS02	GCATCTCCAGCAGCAGAC	
16	ESR1_D538G_RS03	GCATCTCCAGCAGCAGCC	
17	ESR1_D538G_RS04	GCATCTCCAGCAGCAGTC	
18	ESR1_D538G_RS05	GCATCTCCAGCAGCAAGC	
19	ESR1_D538G_RS06	GCATCTCCAGCAGCACGC	
20	ESR1_D538G_RS07	GCATCTCCAGCAGCATGC	
21	ESR1_D538G_RS08	GCATCTCCAGCAG1CGGC	I=C 5'末端部の N4_Et_dC もしくは t_BB_dC
22	ESR1_D538G_RS09	GCATCTCCAGCAG1GGGC	I=C 5'末端部の N4_Et_dC もしくは t_BB_dC
23	ESR1_D538G_RS10	GCATCTCCAGCAG1TGGC	I=C 5'末端部の N4_Et_dC もしくは t_BB_dC
24	ESR1_D538G_RS11	GCATCTCCAGCAGCG1GC	I=G 5'末端部の 7_Dx_dG
25	ESR1_D538G_RS12	CAGCATCTCCAGCAGCTGGC	
26	ESR1_D538G_TBBDC_RS01	CAGCATCTCCAGCAG1AGGC	I=C 5'末端部の t_BB_dC
27	ESR1_D538G_TBBDC_RS09B	CAGCATCTCCAGCAG1GGGC	I=C 5'末端部の t_BB_dC
28	ESR1_E380Q_CF01	TGAGTCAGCAGGGTTF	
29	ESR1_E380Q_CR01	TAGGAGCAAACAGTAGCTTC	
30	ESR1_E380Q_CR02	AGTTAGGAGCAAACAGTAGCTTC	
31	ESR1_E380Q_F_P01	1TGTGCCT2GGCTAGAGATCTGATGATGGT3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
32	ESR1_E380Q_FS01	CCATGATCAGGTCCACCTT1TAC	I=C 5'末端部の t_BB_dC
33	ESR1_E380Q_FS02	CCATGATCAGGTCCACCTTCTGC	
34	ESR1_E380Q_FS03	CCATGATCAGGTCCACCTTCTGC	
35	ESR1_E380Q_FS04	CCATGATCAGGTCCACCTTCTTC	
36	ESR1_E380Q_FS05	CCATGATCAGGTCCACCTTCAAC	
37	ESR1_E380Q_FS06	CCATGATCAGGTCCACCTTCCAC	
38	ESR1_E380Q_FS07	CCATGATCAGGTCCACCTTCCAC	
39	ESR1_E380Q_FS08	CCATGATCAGGTCCACCTTATAC	
40	ESR1_E380Q_FS09	CCATGATCAGGTCCACCTTGTAC	
41	ESR1_E380Q_FS10	CCATGATCAGGTCCACCTTFTAC	
42	ESR1_E380Q_FS11	CTCCATGATCAGGTCCACCTTGAC	
43	ESR1_E380Q_R_P01	1TGGACCTG2ATCATGGAGGGTCAAAATCCACA3	1-レポーター 2=クエンチャー 3-ホスフェート
44	ESR1_E380Q_RS01	GGATCTCTAGCCAGGCACATG	
45	ESR1_E380Q_RS02	GGATCTCTAGCCAGGCACATAG	
46	ESR1_E380Q_RS03	GGATCTCTAGCCAGGCACATCG	
47	ESR1_E380Q_RS04	GGATCTCTAGCCAGGCACATGG	
48	ESR1_E380Q_RS05	GGATCTCTAGCCAGGCACAATG	
49	ESR1_E380Q_RS06	GGATCTCTAGCCAGGCACACTG	
50	ESR1_E380Q_RS07	GGATCTCTAGCCAGGCACAGTG	
51	ESR1_E380Q_RS08	GGATCTCTAGCCAGGCACCTG	

10

20

30

40

【 0 0 7 0 】

50

【表 2 - 3】

52	ESR1_E380Q_RS09	GGATCTCTAGCCAGGCACGTTG	
53	ESR1_E380Q_RS10	GGATCTCTAGCCAGGCACCTTTG	
54	ESR1_EXWT1_F_P01	1CCCTGAAC2CGTCCGCGAGCTCAAGAT3	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = ホスフェート
55	ESR1_EXWT1_FS01	CCCTACTGCATCAGATCCAA	
56	ESR1_EXWT1_FS02	ATCAGATCCAGGGGACGAG	
57	ESR1_EXWT1_RS01	TTGCTGCTGTCCAGGTACA	
58	ESR1_L429V_CF01	TGCTATGTTTTTCATAGGAACCAGG	
59	ESR1_L429V_CR01	GATTTGAGGGCACACAACCTCCT	
60	ESR1_L429V_F_P01	1TCATCTCGGT2TCCGCATGATGAATCTGCAG3	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = ホスフェート
61	ESR1_L429V_FS01	TGGAGATCTTCGACATG1TGG	1=C または誘導の N4_Bz_dC もしくは N4_Et_dC もしくは t_BB_dC
62	ESR1_L429V_FS02	TGGAGATCTTCGACATGCTAG	
63	ESR1_L429V_FS03	TGGAGATCTTCGACATGCTCG	
64	ESR1_L429V_FS04	TGGAGATCTTCGACATGCTTG	
65	ESR1_L429V_FS05	TGGAGATCTTCGACATGCTAG	
66	ESR1_L429V_FS06	TGGAGATCTTCGACATGCTCG	
67	ESR1_L429V_FS07	TGGAGATCTTCGACATGCTGG	
68	ESR1_L429V_FS08	TGGAGATCTTCGACATGCTGG	
69	ESR1_L429V_FS09	TGGAGATCTTCGACATGCTGG	
70	ESR1_L429V_FS10	TGGAGATCTTCGACATGTTGG	
71	ESR1_L429V_R_P01	1TCGAAGATCTC2CACCATGCCCCTCTACACAT3	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = ホスフェート
72	ESR1_L429V_RS01	GGAACCGAGATGATGTAGCCAC	
73	ESR1_L429V_RS02	GGAACCGAGATGATGTAGCCCC	
74	ESR1_L429V_RS03	GGAACCGAGATGATGTAGCCGC	
75	ESR1_L429V_RS04	GGAACCGAGATGATGTAGCCTC	
76	ESR1_L429V_RS05	GGAACCGAGATGATGTAGCAAC	
77	ESR1_L429V_RS06	GGAACCGAGATGATGTAGCCAC	
78	ESR1_L429V_RS07	GGAACCGAGATGATGTAGCTAC	
79	ESR1_L429V_RS08	GGAACCGAGATGATGTAGACAC	
80	ESR1_L429V_RS09	GGAACCGAGATGATGTAGGCAC	
81	ESR1_L429V_RS10	GGAACCGAGATGATGTAGTCAC	
82	ESR1_L536_CF01	CTTCTGTGTCTTCCACCTACAG	
83	ESR1_L536_CR01	AAGTGGCTTTGGTCCGTC	
84	ESR1_L536_D538>P_RS01	CCAGCAGCAGG1GG	1=G または誘導の 7_Dz_dG
85	ESR1_L536_D538>P_RS02	CAGCAGCAGG1GG	1=G または誘導の 7_Dz_dG
86	ESR1_L536_D538>P_RS03	CCAGCAGCAGG1GG	1=G または誘導の 7_Dz_dG
87	ESR1_L536_D538>P_RS04	TCCAGCAGCAGG1GG	1=G または誘導の 7_Dz_dG
88	ESR1_L536_D538>P_RS05	CTCCAGCAGCAGG1GG	1=G または誘導の 7_Dz_dG

10

20

30

40

【 0 0 7 1 】

50

【表 2 - 4】

89	ESR1_L536_D538>P_RS06	CTCCAGCAGCAGG1G	1=G または任意の 7_Dz_dG
90	ESR1_L536_D538>P_RS07	TCTCCAGCAGCAGG1G	1=G または任意の 7_Dz_dG
91	ESR1_L536_D538>P_RS08	ATCTCCAGCAGCAGG1G	1=G または任意の 7_Dz_dG
92	ESR1_L536_D538>P_RS09	CATCTCCAGCAGCAGGG	
93	ESR1_L536_D538>P_RS10	GCATCTCCAGCAGCAGGG	
94	ESR1_L536_F_P01	1TACATG2CGCCCACTAGCCGTGGA3	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = ホスフェート
	ESR1_L536_R_P01	1TGCACTT2CATGCTGTACAGATGCTCCATGC3	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = ホスフェート
96	ESR1_L536H_FS01	GCAAGAACGTGGTGCCCA	
97	ESR1_L536H_FS02	GCAAGAACGTGGTGCCCA	
98	ESR1_L536H_FS03	GCAAGAACGTGGTGCCCA	
99	ESR1_L536H_FS04	GCAAGAACGTGGTGCCCA	
100	ESR1_L536H_FS05	GCAAGAACGTGGTGCCCA	
101	ESR1_L536H_FS06	GCAAGAACGTGGTGCCCA	
102	ESR1_L536H_FS07	GCAAGAACGTGGTGCCCA	
103	ESR1_L536H_FS08	GCAAGAACGTGGTGCCCA	
104	ESR1_L536H_FS09	GCAAGAACGTGGTGCCCA	
105	ESR1_L536H_FS10	GCAAGAACGTGGTGCCCA	
106	ESR1_L536H_RS01	CTCCAGCAGCAGGTCAT1GT	1=A または任意の C_BB_dA
107	ESR1_L536H_RS02	CTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
108	ESR1_L536H_RS03	CTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
109	ESR1_L536H_RS04	CTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
110	ESR1_L536H_RS05	CTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
111	ESR1_L536H_RS06	CTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
112	ESR1_L536H_RS07	CTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
113	ESR1_L536H_RS08	CTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
114	ESR1_L536H_RS09	CTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
115	ESR1_L536H_RS10	CTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
116	ESR1_L536H_RS11	CATCTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
117	ESR1_L536H_RS12	CATCTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
118	ESR1_L536H_RS13	CATCTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
119	ESR1_L536H_RS14	CATCTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
120	ESR1_L536H_RS15	CATCTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
121	ESR1_L536P_FS01	AGAACGTGGTGCCCA	
122	ESR1_L536P_FS02	AGAACGTGGTGCCCA	
123	ESR1_L536P_FS03	AGAACGTGGTGCCCA	
124	ESR1_L536P_FS04	AGAACGTGGTGCCCA	
125	ESR1_L536P_FS05	AGAACGTGGTGCCCA	
126	ESR1_L536P_FS06	AGAACGTGGTGCCCA	
127	ESR1_L536P_FS07	AGAACGTGGTGCCCA	
128	ESR1_L536P_FS08	AGAACGTGGTGCCCA	
129	ESR1_L536P_FS09	AGAACGTGGTGCCCA	
130	ESR1_L536P_FS10	AGAACGTGGTGCCCA	

10

20

30

40

【 0 0 7 2 】

50

【表 2 - 5】

131	ESR1_L536P_RS01	CTCCAGCAGCAGGTCAT1GG	l=A または読書の t_BB_dA
132	ESR1_L536P_RS02	CTCCAGCAGCAGGTCATAG	
133	ESR1_L536P_RS03	CTCCAGCAGCAGGTCATACG	
134	ESR1_L536P_RS04	CTCCAGCAGCAGGTCATATG	
135	ESR1_L536P_RS05	CTCCAGCAGCAGGTCATCGG	
136	ESR1_L536P_RS06	CTCCAGCAGCAGGTCATGGG	
137	ESR1_L536P_RS07	CTCCAGCAGCAGGTCATTGG	
138	ESR1_L536P_RS08	CTCCAGCAGCAGGTCAAAGG	
139	ESR1_L536P_RS09	CTCCAGCAGCAGGTCACAGG	
140	ESR1_L536P_RS10	CTCCAGCAGCAGGTCAGAGG	
141	ESR1_L536Q_FS01	AGAACGTGGTGCCCCAG	
142	ESR1_L536Q_FS02	AGAACGTGGTGCCCCCG	
143	ESR1_L536Q_FS03	AGAACGTGGTGCCCCGG	
144	ESR1_L536Q_FS04	AGAACGTGGTGCCCCTG	
145	ESR1_L536Q_FS05	AGAACGTGGTGCCCAAG	
146	ESR1_L536Q_FS06	AGAACGTGGTGCCCGAG	
147	ESR1_L536Q_FS07	AGAACGTGGTGCCCTAG	
148	ESR1_L536Q_FS08	AGAACGTGGTGCCACAG	
149	ESR1_L536Q_FS09	AGAACGTGGTGCCCGAG	
150	ESR1_L536Q_FS10	AGAACGTGGTGCCCTCAG	
151	ESR1_L536Q_RS01	CTCCAGCAGCAGGTCAT1CT	l=A または読書の t_BB_dA
152	ESR1_L536Q_RS02	CTCCAGCAGCAGGTCATAAT	
153	ESR1_L536Q_RS03	CTCCAGCAGCAGGTCATAGT	
154	ESR1_L536Q_RS04	CTCCAGCAGCAGGTCATATT	
155	ESR1_L536Q_RS05	CTCCAGCAGCAGGTCATCCT	
156	ESR1_L536Q_RS06	CTCCAGCAGCAGGTCATGCT	
157	ESR1_L536Q_RS07	CTCCAGCAGCAGGTCATTCT	
158	ESR1_L536Q_RS08	CTCCAGCAGCAGGTCAAACT	
159	ESR1_L536Q_RS09	CTCCAGCAGCAGGTCACACT	
160	ESR1_L536Q_RS10	CTCCAGCAGCAGGTCAGACT	
161	ESR1_L536R_FS01	AGAACGTGGTGCCCCG	
162	ESR1_L536R_FS02	AGAACGTGGTGCCCCAG	
163	ESR1_L536R_FS03	AGAACGTGGTGCCCCGG	
164	ESR1_L536R_FS04	AGAACGTGGTGCCCTG	
165	ESR1_L536R_FS05	AGAACGTGGTGCCACG	
166	ESR1_L536R_FS06	AGAACGTGGTGCCCGG	
167	ESR1_L536R_FS07	AGAACGTGGTGCCCTCG	
168	ESR1_L536R_FS08	AGAACGTGGTGCACCG	
169	ESR1_L536R_FS09	AGAACGTGGTGCCCGG	
170	ESR1_L536R_FS10	AGAACGTGGTGCTCCG	
171	ESR1_L536R_RS01	CTCCAGCAGCAGGTCAT1GC	l=A または読書の t_BB_dA
172	ESR1_L536R_RS02	CTCCAGCAGCAGGTCATAAC	
173	ESR1_L536R_RS03	CTCCAGCAGCAGGTCATACC	
174	ESR1_L536R_RS04	CTCCAGCAGCAGGTCATATC	
175	ESR1_L536R_RS05	CTCCAGCAGCAGGTCATCGC	
176	ESR1_L536R_RS06	CTCCAGCAGCAGGTCATGGC	
177	ESR1_L536R_RS07	CTCCAGCAGCAGGTCATTGC	
178	ESR1_L536R_RS08	CTCCAGCAGCAGGTCRAAGC	

10

20

30

40

【 0 0 7 3 】

50

【表 2 - 6】

179	ESR1_L536R_RS09	CTCCAGCAGCAGGTCACAGC	
180	ESR1_L536R_RS10	CTCCAGCAGCAGGTCAGAGC	
181	ESR1_P535H_FS01	AAGTGCAGAAACGTGGTGCT	I=A または脱離の N6_Bz_dA
182	ESR1_P535H_FS02	AAGTGCAGAAACGTGGTGAA	
183	ESR1_P535H_FS03	AAGTGCAGAAACGTGGTGGA	
184	ESR1_P535H_FS04	AAGTGCAGAAACGTGGTGTA	
185	ESR1_P535H_FS05	AAGTGCAGAAACGTGGTACA	
186	ESR1_P535H_FS06	AAGTGCAGAAACGTGGTCCA	
187	ESR1_P535H_FS07	AAGTGCAGAAACGTGGTTCA	
188	ESR1_P535H_FS08	AAGTGCAGAAACGTGGAGCA	
189	ESR1_P535H_FS09	AAGTGCAGAAACGTGGCGCA	
190	ESR1_P535H_FS10	AAGTGCAGAAACGTGGGGCA	
191	ESR1_P535H_RS01	AGCAGCAGGTCATAGAGGT	
192	ESR1_P535H_RS02	AGCAGCAGGTCATAGAGAT	
193	ESR1_P535H_RS03	AGCAGCAGGTCATAGAGCT	
194	ESR1_P535H_RS04	AGCAGCAGGTCATAGAGTT	
195	ESR1_P535H_RS05	AGCAGCAGGTCATAGAAGT	
196	ESR1_P535H_RS06	AGCAGCAGGTCATAGACGT	
197	ESR1_P535H_RS07	AGCAGCAGGTCATAGATGT	
198	ESR1_P535H_RS08	AGCAGCAGGTCATAGCGGT	
199	ESR1_P535H_RS09	AGCAGCAGGTCATAGGGGT	
200	ESR1_P535H_RS10	AGCAGCAGGTCATAGGGT	
201	ESR1_P535H_RS11	CCAGCAGCAGGTCATAGGGT	I=A または脱離の t_BB_dA
202	ESR1_P535H_RS12	CCAGCAGCAGGTCATAGGGT	I-AもしくはCまたは 脱離のt_BB_dA もしくはLRR_dC
203	ESR1_P535H_RS13	CCAGCAGCAGGTCATAGGGT	
204	ESR1_P535H_RS14	CCAGCAGCAGGTCATAGGGT	I=A または脱離の t_BB_dA
205	ESR1_P535H_RS15	AGCAGCAGGTCATAAAGGT	
206	ESR1_P535H_RS16	AGCAGCAGGTCATACAGGT	
207	ESR1_P535H_RS17	AGCAGCAGGTCATATAGGT	
208	ESR1_P535H_RS18	AGCAGCAGGTCATAGAGG1	I= 脱離の LNA-T
209	ESR1_P535H_RS19	AGCAGCAGGTCATAGAG1T	I= 脱離の LNA-G
210	ESR1_P535H_RS20	AGCAGCAGGTCATAGAG1GT	I= 脱離の LNA-G
211	ESR1_P535H_RS21	AGCAGCAGGTCATAG1GGT	I= 脱離の LNA-A
212	ESR1_P535H_RS22	CCAGCAGCAGGTCATAG1GGT	I=C または脱離の N4_Et_dC
213	ESR1_P535H_RS23	AGCAGCAGGTCATAAACGT	
214	ESR1_P535H_RS24	AGCAGCAGGTCATACACGT	
215	ESR1_P535H_RS25	AGCAGCAGGTCATATACGT	
216	ESR1_P535H_RS26	AGCAGCAGGTCATAAATGT	
217	ESR1_P535H_RS27	AGCAGCAGGTCATACATGT	
218	ESR1_P535H_RS28	AGCAGCAGGTCATATATGT	
219	ESR1_P535H_RS29	AGCAGCAGGTCATAAAGT	
220	ESR1_P535H_RS30	AGCAGCAGGTCATACAAGT	
221	ESR1_P535H_RS31	AGCAGCAGGTCATATAAGT	
222	ESR1_P535H_RS32	AGCAGCAGGTCATAGGGT	I=A または脱離の N6_Me_dA

10

20

30

40

【 0 0 7 4 】

50

【表 2 - 7】

223	ESR1_P535H_RS33	CCAGCAGCAGGTCATAG1GGT	1=A または塩基の N6_Me_dA
224	ESR1_P535H_RS34	CCAGCAGCAGGTCAT1GTGGT	1=A または塩基の N6_Me_dA
225	ESR1_P535H_RS35	AGCAGCAGGTCATAG1GGT	1=A または塩基の t_BB_dA
226	ESR1_P535H_RS36	CAGCAGCAGGTCATAAAGGT	
227	ESR1_P535H_RS37	CAGCAGCAGGTCATACAGGT	
228	ESR1_P535H_RS38	CAGCAGCAGGTCATATAGGT	
229	ESR1_P535H_RS39	CCAGCAGCAGGTCATAAAGGT	
230	ESR1_P535H_RS40	CCAGCAGCAGGTCATACAGGT	
231	ESR1_P535H_RS41	CCAGCAGCAGGTCATATAGGT	
232	ESR1_S341L_CF01	AGATGGTCAGTGCCTTGTG	
233	ESR1_S341L_CF02	CAGATGGTCAGTGCCTTGTG	
234	ESR1_S341L_CR01	ATTCTTACCTGGCACCCCTCTTC	
235	ESR1_S341L_CR02	CTCTTCGCCAGTTGATCAT	
236	ESR1_S341L_P_P01	1AGACAGG2GAGCTGGTTCACATGATCAACTG3	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = ホスフエート
237	ESR1_S341L_F_P02	1TGATGG2GCTTACTGACCAACCCTGGCAGACA3	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = ホスフエート
238	ESR1_S341L_FS01	CCAGACCCTTCAGTGAAG1TTT	1=C または塩基の t_BB_dC
239	ESR1_S341L_FS02	CCAGACCCTTCAGTGAAGCTAT	
240	ESR1_S341L_FS03	CCAGACCCTTCAGTGAAGCTCT	
241	ESR1_S341L_FS04	CCAGACCCTTCAGTGAAGCTGT	
242	ESR1_S341L_FS05	CCAGACCCTTCAGTGAAGCATT	
243	ESR1_S341L_FS06	CCAGACCCTTCAGTGAAGCCTT	
244	ESR1_S341L_FS07	CCAGACCCTTCAGTGAAGCGTT	
245	ESR1_S341L_FS08	CCAGACCCTTCAGTGAAGATTT	
246	ESR1_S341L_FS09	CCAGACCCTTCAGTGAAGGTTT	
247	ESR1_S341L_FS10	CCAGACCCTTCAGTGAAGTTTT	
248	ESR1_S341L_R_P01	1ACTGAAG2GGTCTGGTAGGATCATACTCGGA3	
249	ESR1_S341L_R_P02	1CTGAAG23GTCTGGTAGGATCATACTCGGAATA4	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = G または塩基の 7_De_dG 4 = ホスフエート
250	ESR1_S341L_RS01	GTTGGTCAGTAAGCCCATCATCA	
251	ESR1_S341L_RS02	GTTGGTCAGTAAGCCCATCATAA	
252	ESR1_S341L_RS03	GTTGGTCAGTAAGCCCATCATGA	
253	ESR1_S341L_RS04	GTTGGTCAGTAAGCCCATCATTA	
254	ESR1_S341L_RS05	GTTGGTCAGTAAGCCCATCAACA	
255	ESR1_S341L_RS06	GTTGGTCAGTAAGCCCATCACCA	
256	ESR1_S341L_RS07	GTTGGTCAGTAAGCCCATCAGCA	
257	ESR1_S341L_RS08	GTTGGTCAGTAAGCCCATCCTCA	
258	ESR1_S341L_RS09	GTTGGTCAGTAAGCCCATCGTCA	
259	ESR1_S341L_RS10	GTTGGTCAGTAAGCCCATCITCA	
260	ESR1_S463P_CF01	CTAGACCTCATCCTCTTTGAGC	
261	ESR1_S463P_CR01	CCATCAGGTGGATCAAAGTGTCTG	

10

20

30

40

【 0 0 7 5 】

50

【表 2 - 8】

262	ESR1_S463P_F_P01	1ACCATAT2CCACCGAGTCTCGGACAAGATCA3	1=レポーター 2=クエンチャー 3=ホスフェート
263	ESR1_S463P_FS01	CATTTCAGGAGTGTACACATTTTGGC	I=C または経路の t_BB_dC
264	ESR1_S463P_FS02	CATTTCAGGAGTGTACACATTTCTAC	
265	ESR1_S463P_FS03	CATTTCAGGAGTGTACACATTTCTCC	
266	ESR1_S463P_FS04	CATTTCAGGAGTGTACACATTTCTTC	
267	ESR1_S463P_FS05	CATTTCAGGAGTGTACACATTTCCGC	
268	ESR1_S463P_FS06	CATTTCAGGAGTGTACACATTTCCGC	
269	ESR1_S463P_FS07	CATTTCAGGAGTGTACACATTTCCGC	
270	ESR1_S463P_FS08	CATTTCAGGAGTGTACACATTTATGC	
271	ESR1_S463P_FS09	CATTTCAGGAGTGTACACATTTGTGC	
272	ESR1_S463P_FS10	CATTTCAGGAGTGTACACATTTTGC	
273	ESR1_S463P_R_P01	1TGTGTAC2ACTCCTGAATGCGCAGAGAGA3	1=レポーター 2=クエンチャー 3=ホスフェート
274	ESR1_S463P_RS01	AGACTTCAGGGTGCTGGG	
275	ESR1_S463P_RS11	CAGACTTCAGGGTGCTGAG	
276	ESR1_S463P_RS03	AGACTTCAGGGTGCTGCG	
277	ESR1_S463P_RS04	AGACTTCAGGGTGCTGTG	
278	ESR1_S463P_RS05	AGACTTCAGGGTGCTAGG	
279	ESR1_S463P_RS06	AGACTTCAGGGTGCTCGG	
280	ESR1_S463P_RS07	AGACTTCAGGGTGCTTGG	
281	ESR1_S463P_RS08	AGACTTCAGGGTGCAGGG	
282	ESR1_S463P_RS09	AGACTTCAGGGTGCCGGG	
283	ESR1_S463P_RS10	AGACTTCAGGGTGCCGGG	
284	ESR1_V422DELV_CF01	GTCTTGTGGAAAGATTTTCTGT	
285	ESR1_V422DELV_CR01	TTGAGGCACACAACTCCTC	
286	ESR1_V422DELV_F_P01	1TGGCTACATCA2TCTCGGTTCCGCATGATGA3	1=レポーター 2=クエンチャー 3=ホスフェート
287	ESR1_V422DELV_FS01	ATGTGTAGAGGGCATGG1GAT	I=A または経路の t_BB_dA
288	ESR1_V422DELV_FS02	ATGTGTAGAGGGCATGGAGCT	
289	ESR1_V422DELV_FS03	ATGTGTAGAGGGCATGGAGGT	
290	ESR1_V422DELV_FS04	ATGTGTAGAGGGCATGGAGTT	
291	ESR1_V422DELV_FS05	ATGTGTAGAGGGCATGGAAAT	
292	ESR1_V422DELV_FS06	ATGTGTAGAGGGCATGGACAT	
293	ESR1_V422DELV_FS07	ATGTGTAGAGGGCATGGATAT	
294	ESR1_V422DELV_FS08	ATGTGTAGAGGGCATGGCGAT	
295	ESR1_V422DELV_FS09	ATGTGTAGAGGGCATG12GAT	I=G または経路の 7_Dz_dG 2=G または経路の 7_Dz_dG
296	ESR1_V422DELV_FS10	ATGTGTAGAGGGCATGGTGAT	
297	ESR1_V422DELV_FS14	AAATGTGTAGAG1GCATGGCGAT	I=G または経路の d_I
298	ESR1_V422DELV_FS15	AAATGTGTAGAGGGCATGGTGAT	
299	ESR1_V422DELV_FS16	AAATGTGTAGAGGGCATGTAGAT	
300	ESR1_V422DELV_FS17	AAATGTGTAGAGGGCATGAAGAT	

10

20

30

40

【 0 0 7 6 】

50

【表 2 - 9】

301	ESR1_V422DELV_R_P01	1CCTCTACACATT2TTCCCTGGTTCCTATGA3	1=レポーター 2=クエンチャー 3=ホスフェート
302	ESR1_V422DELV_RS01	GCAGCATGTCGAAGATCTCCAT	
303	ESR1_V422DELV_RS02	GCAGCATGTCGAAGATCTCCCT	
304	ESR1_V422DELV_RS03	GCAGCATGTCGAAGATCTCCGT	
305	ESR1_V422DELV_RS04	GCAGCATGTCGAAGATCTCCTT	
306	ESR1_V422DELV_RS05	GCAGCATGTCGAAGATCTCAAT	
307	ESR1_V422DELV_RS06	GCAGCATGTCGAAGATCTCGAT	
308	ESR1_V422DELV_RS07	GCAGCATGTCGAAGATCTCFAT	
309	ESR1_V422DELV_RS08	GCAGCATGTCGAAGATCTACAT	
310	ESR1_V422DELV_RS09	GCAGCATGTCGAAGATCTGCAT	
311	ESR1_V422DELV_RS10	GCAGCATGTCGAAGATCTTCAT	
312	ESR1_V533M_CF01	GTAGTCCTTTCTGTGTCCTCCC	
313	ESR1_V533M_CF02	CTTTCTGTGTCCTTCCCACCTAC	
314	ESR1_V533M_CF03	TGTCCTCCCACCTACAGTAACAAA	
315	ESR1_V533M_CF04	CTCTAAAGTAGTCCTTTCTGTGTCCTTC	
316	ESR1_V533M_CF05	TCTAAAGTAGTCCTTTCTGTGTCCTTC	
317	ESR1_V533M_CF06	TAAAGTAGTCCTTTCTGTGTCCTTCC	
318	ESR1_V533M_CF07	AGTAGTCCTTTCTGTGTCCTTCC	
319	ESR1_V533M_CR01	GCTAGTGGGCGCATGTA	
320	ESR1_V533M_CR02	CTAGTGGGCGCATGTA	
321	ESR1_V533M_F_P01	1TCTATG2ACCTGCTGCTGGAGATGCTGGA3	1=レポーター 2=クエンチャー 3=ホスフェート
322	ESR1_V533M_FS01	ACAGCATGAAGTGCAAGAA12	1=Cまたは塩基の N4_Bz_dC もしくは N4_Et_dC 2=Aまたは塩基の N6_Bz_dA
323	ESR1_V533M_FS02	ACAGCATGAAGTGCAAGAAA	
324	ESR1_V533M_FS03	ACAGCATGAAGTGCAAGAGA	
325	ESR1_V533M_FS04	ACAGCATGAAGTGCAAGAATA	
326	ESR1_V533M_FS05	ACAGCATGAAGTGCAAGACCA	
327	ESR1_V533M_FS06	ACAGCATGAAGTGCAAGAGCA	
328	ESR1_V533M_FS07	ACAGCATGAAGTGCAAGATCA	
329	ESR1_V533M_FS08	ACAGCATGAAGTGCAAGCACA	
330	ESR1_V533M_FS09	ACAGCATGAAGTGCAAGGACA	
331	ESR1_V533M_FS10	ACAGCATGAAGTGCAAGTACA	
332	ESR1_V533M_FS12	TGTACAGCATGAAGTGCAAGCACA	
333	ESR1_V533M_FS13	TGTACAGCATGAAGTGCAAGGACA	
334	ESR1_V533M_R_P01	1TGCACT2TCATGCTGTACAGATGCTCCATGC3	1=レポーター 2=クエンチャー 3=ホスフェート
335	ESR1_V533M_R_P02	1TGCACTT2CATGCTGTACAGATGCTCCATGC3	1=レポーター 2=クエンチャー 3=ホスフェート
336	ESR1_V533M_RS01	GGTCATAGAG1GGCACCAT	1=塩基の 7_Dz_dG

10

20

30

40

【 0 0 7 7 】

50

【表 2 - 1 0】

337	ESR1_V533M_RS018	GGTCATAGAG1GGCA2CAT	1= 照準の 7_Dz_dG 2=C または照準の t_BB_dC もしくは N4_Et_dC
338	ESR1_V533M_RS02	GGTCATAGAG1GGCACCCCT	1= 照準の 7_Dz_dG
339	ESR1_V533M_RS20	GGTCATAGAG1GGCACCC2T	1= 照準の 7_Dz_dG 2=C または照準の 1.NA-A
340	ESR1_V533M_RS03	GGTCATAGAG1GGCACCCGT	1= 照準の 7_Dz_dG
341	ESR1_V533M_RS04	GGTCATAGAG1GGCACCTT	1= 照準の 7_Dz_dG
342	ESR1_V533M_RS05	GGTCATAGAG1GGCACAAAT	1= 照準の 7_Dz_dG
343	ESR1_V533M_RS06	GGTCATAGAG1GGCACGAT	1= 照準の 7_Dz_dG
344	ESR1_V533M_RS07	GGTCATAGAG1GGCACTAT	1= 照準の 7_Dz_dG
345	ESR1_V533M_RS08	GGTCATAGAG1GGCAACAT	1= 照準の 7_Dz_dG
346	ESR1_V533M_RS09	GGTCATAGAG1GGCAGCAT	1= 照準の 7_Dz_dG
347	ESR1_V533M_RS10	GGTCATAGAG1GGCATCAT	1= 照準の 7_Dz_dG
348	ESR1_V533M_RS11	AGGTCATAGAG1GGCAGCAT	1= 照準の 7_Dz_dG
349	ESR1_V533M_RS12	AGGTCATAGAG1GGCTCCAT	1= 照準の 7_Dz_dG
350	ESR1_V533M_RS13	AGGTCATAGAG1GGCGCCAT	1= 照準の 7_Dz_dG
351	ESR1_V533M_RS14	AGGTCATAGAG1GGCCCCAT	1= 照準の 7_Dz_dG
352	ESR1_V533M_RS15	CAGGTCATAGAG1GGCTCCAT	1= 照準の 7_Dz_dG
353	ESR1_V533M_RS16	CAGGTCATAGAG1GGCGCCAT	1= 照準の 7_Dz_dG
354	ESR1_V533M_RS17	CAGGTCATAGAG1GGCCCCAT	1= 照準の 7_Dz_dG
355	ESR1_V533M_TBBA_FS01	ACAGCATGAAGTGCAAG1ACA	1=A または照準の t_BB_dA
356	ESR1_V533M_TBBDC_FS01	ACAGCATGAAGTGCAAGAA1A	1=C または照準の t_BB_dC
357	ESR1_V534E_CF01	CTTTCTGTGTCTTCCCACCTAC	
358	ESR1_V534E_CR01	GCTTTGGTCCGTCTCTCT	
359	ESR1_V534E_CR02	TGGCTTTGGTCCGTCTCTCT	
360	ESR1_V534E_CR03	ATGTAGCGGTGGGCGTCT	
361	ESR1_V534E_CR04	CTCCACGGCTAGTGGGCG	
362	ESR1_V534E_CR05	TGCCCCCTCCACGGCTAGT	

10

20

30

40

【 0 0 7 8】

50

【表 2 - 1 1】

363	ESR1_V534E_F_P01	1TCTATGA2CCTGCTGCTGGAGATGCTGGG3	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = ホスフェート
364	ESR1_V534E_FS01	GCATGAAGTGCAAGAAGCTGG1	1=A または任意の N6_Bz_dA
365	ESR1_V534E_FS02	GCATGAAGTGCAAGAAGCTGAA	
366	ESR1_V534E_FS03	GCATGAAGTGCAAGAAGCTGCA	
367	ESR1_V534E_FS04	GCATGAAGTGCAAGAAGCTGTA	
368	ESR1_V534E_FS05	GCATGAAGTGCAAGAAGCTAGA	
369	ESR1_V534E_FS06	GCATGAAGTGCAAGAAGCTCGA	
370	ESR1_V534E_FS07	GCATGAAGTGCAAGAAGCTTGA	
371	ESR1_V534E_FS08	GCATGAAGTGCAAGAAGCTGGA	
372	ESR1_V534E_FS09	GCATGAAGTGCAAGAAGCTGGA	
373	ESR1_V534E_FS10	GCATGAAGTGCAAGAAGCTGGA	
374	ESR1_V534E_R_P01	1TGCACTT2CATGCTGTACAGATGCTCCATG3	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = ホスフェート
375	ESR1_V534E_R_P03	1TGCACTT2CA3GCTG3ACAGATGCTCCATG4	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = pdU(3x) 4 = ホスフェート
376	ESR1_V534E_R_P04	1TGCACTT2CATGCTGTACAGATGCTCCATG3	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = ホスフェート
377	ESR1_V534E_R_P05	1TGCACTT2CA3GCTG3ACAGATGCTCCATG4	1 = レポーター 2 = クエンチャー 3 = pdU(4x) 4 = ホスフェート
378	ESR1_V534E_RS01	GCAGGTCATAGAG1GGCT	1=G または任意の 7_Dz_dG
379	ESR1_V534E_RS02	GCAGGTCATAGAGGGGAT	
380	ESR1_V534E_RS03	GCAGGTCATAGAGGGGGT	
381	ESR1_V534E_RS04	GCAGGTCATAGAGGGGTT	
382	ESR1_V534E_RS05	GCAGGTCATAGAGGGGACT	
383	ESR1_V534E_RS06	GCAGGTCATAGAGGGGCT	
384	ESR1_V534E_RS07	GCAGGTCATAGAGGGTCT	
385	ESR1_V534E_RS08	GCAGGTCATAGAGGGAGCT	
386	ESR1_V534E_RS09	GCAGGTCATAGAGGGCGCT	
387	ESR1_V534E_RS10	GCAGGTCATAGAGGTGCT	
388	ESR1_V534E_RS11	GCAGGTCATAGAG1GGCT	1=G または任意の 7_Dz_dG
389	ESR1_V534E_RS13	GCAAGTCATAGAGTGGCT	
390	ESR1_V534E_RS14	GCAGGTCATAGAGCGGCT	
391	ESR1_V534E_RS15	CAGCAGGTCATAGAGAGGCT	
392	ESR1_V534E_RS16	CAGCAGGTCATAGAGTGGCT	
393	ESR1_V534E_RS17	CAGCAGGTCATAGAGCGGCT	
394	ESR1_Y537C_CP01	CTGTGTCTTCCCACTACAGTA	
395	ESR1_Y537C_CR01	AAGTGGCTTTGGTCCGT	
396	ESR1_Y537C_F_P01	1TACATG2CGCCACTAGCCGTGGA3	1 = レポーター 2 = 蛍光剤 3 = ホスフェート

10

20

30

40

【 0 0 7 9】

50

【表 2 - 1 2】

397	ESR1_Y537C_FS01	ACGTGGTGCCCOCTCG	
398	ESR1_Y537C_FS02	ACGTGGTGCCCOCTCAG	
399	ESR1_Y537C_FS03	ACGTGGTGCCCOCTCGG	
400	ESR1_Y537C_FS04	ACGTGGTGCCCOCTCGG	
401	ESR1_Y537C_FS05	ACGTGGTGCCCOCTATG	
402	ESR1_Y537C_FS06	ACGTGGTGCCCOCTGTG	
403	ESR1_Y537C_FS07	ACGTGGTGCCCOCTTTG	
404	ESR1_Y537C_FS08	ACGTGGTGCCCOCTG	
405	ESR1_Y537C_FS09	ACGTGGTGCCCOCTG	
406	ESR1_Y537C_FS10	ACGTGGTGCCCOCTG	
407	ESR1_Y537C_R_P01	1TGCACTT2CATGCTGTACAGATGCTCCATGC3	1 = レポーター 2 = プロモーター 3 = ホスフェート
408	ESR1_Y537C_RS01	CTCCAGCAGCAGGT1AC	1=C または他の t_BB_dC
409	ESR1_Y537C_RS02	CTCCAGCAGCAGGTCC	
410	ESR1_Y537C_RS03	CTCCAGCAGCAGGTCCG	
411	ESR1_Y537C_RS04	CTCCAGCAGCAGGTCC	
412	ESR1_Y537C_RS05	CTCCAGCAGCAGGTAC	
413	ESR1_Y537C_RS06	CTCCAGCAGCAGGTAC	
414	ESR1_Y537C_RS07	CTCCAGCAGCAGGTAC	
415	ESR1_Y537C_RS08	CTCCAGCAGCAGGTAC	
416	ESR1_Y537C_RS09	CTCCAGCAGCAGGTAC	
417	ESR1_Y537C_RS10	CTCCAGCAGCAGGTAC	
418	ESR1_Y537C_RS11	ATCTCCAGCAGCAGGTAC	
419	ESR1_Y537C_RS12	CATCTCCAGCAGCAGGTAC	
420	ESR1_Y537C_RS13	ATCTCCAGCAGCAGGTAC	1=C または他の t_BB_dC
421	ESR1_Y537C_RS14	ATCTCCAGCAGCAGGTAC	1=A または他の t_BB_dA
422	ESR1_Y537C_RS15	ATCTCCAGCAGCAGGTAC	1=C または他の t_BB_dC
423	ESR1_Y537C_RS16	CTCCAGCAGCAGGTAC	1=C または他の t_BB_dC
424	ESR1_Y537C_RS17	CTCCAGCAGCAGGTAC	1=A または他の t_BB_dA もしくは LNA-A
425	ESR1_Y537C_RS18	CTCCAGCAGCAGGTAC	1=C または他の t_BB_dC
426	ESR1_Y537N_FS01	AACGTGGTGCCCOCTCA	
427	ESR1_Y537N_FS02	AACGTGGTGCCCOCTAA	
428	ESR1_Y537N_FS03	AACGTGGTGCCCOCTGA	
429	ESR1_Y537N_FS04	AACGTGGTGCCCOCTTA	
430	ESR1_Y537N_FS05	AACGTGGTGCCCOCTCA	
431	ESR1_Y537N_FS06	AACGTGGTGCCCOCTCA	
432	ESR1_Y537N_FS07	AACGTGGTGCCCOCTCA	
433	ESR1_Y537N_FS08	AACGTGGTGCCCOCTCA	
434	ESR1_Y537N_FS09	AACGTGGTGCCCOCTCA	
435	ESR1_Y537N_FS10	AACGTGGTGCCCOCTCA	
436	ESR1_Y537N_RS01	CTCCAGCAGCAGGT1ATT	1=C または他の t_BB_dC

10

20

30

40

【 0 0 8 0】

50

【表 2 - 1 3】

437	ESR1_Y537N_RS02	CTCCAGCAGCAGGTCAAT	
438	ESR1_Y537N_RS03	CTCCAGCAGCAGGTCACT	
439	ESR1_Y537N_RS04	CTCCAGCAGCAGGTCAOT	
440	ESR1_Y537N_RS05	CTCCAGCAGCAGGTCCFT	
441	ESR1_Y537N_RS06	CTCCAGCAGCAGGTCTTT	
442	ESR1_Y537N_RS07	CTCCAGCAGCAGGTCTTT	
443	ESR1_Y537N_RS08	CTCCAGCAGCAGGTAAT	
444	ESR1_Y537N_RS09	CTCCAGCAGCAGGTGAT	
445	ESR1_Y537N_RS10	CTCCAGCAGCAGGTTATT	
446	ESR1_Y537N_RS11	ATCTCCAGCAGCAGGTTATT	
447	ESR1_Y537N_RS12	CATCTCCAGCAGCAGGTTATT	
448	ESR1_Y537N_RS13	GCATCTCCAGCAGCAGGTTATT	
449	ESR1_Y537S_FS01	ACGTGGTGCCCTCTC	
450	ESR1_Y537S_FS02	ACGTGGTGCCCTCAC	
451	ESR1_Y537S_FS03	ACGTGGTGCCCTCCC	
452	ESR1_Y537S_FS04	ACGTGGTGCCCTCCG	
453	ESR1_Y537S_FS05	ACGTGGTGCCCTTATC	
454	ESR1_Y537S_FS06	ACGTGGTGCCCTGTC	
455	ESR1_Y537S_FS07	ACGTGGTGCCCTTTC	
456	ESR1_Y537S_FS08	ACGTGGTGCCCACTC	
457	ESR1_Y537S_FS09	ACGTGGTGCCCCCTC	
458	ESR1_Y537S_FS10	ACGTGGTGCCCGCTC	
459	ESR1_Y537S_RS01	ATCTCCAGCAGCAGGTTAG	1=C 左方は加糖の t_BB_dC
460	ESR1_Y537S_RS02	ATCTCCAGCAGCAGGTTCCG	
461	ESR1_Y537S_RS03	ATCTCCAGCAGCAGGTTCCG	
462	ESR1_Y537S_RS04	ATCTCCAGCAGCAGGTTCTG	
463	ESR1_Y537S_RS05	ATCTCCAGCAGCAGGTTAAG	
464	ESR1_Y537S_RS06	ATCTCCAGCAGCAGGTTGAG	
465	ESR1_Y537S_RS07	ATCTCCAGCAGCAGGTTAG	
466	ESR1_Y537S_RS08	ATCTCCAGCAGCAGGTTACG	
467	ESR1_Y537S_RS09	ATCTCCAGCAGCAGGTTCCG	
468	ESR1_Y537S_RS10	ATCTCCAGCAGCAGGTTCCG	
469	ESR1_Y537S_RS11	CATCTCCAGCAGCAGGACAG	
470	ESR1_Y537S_RS12	CATCTCCAGCAGCAGGACAG	
471	ESR1_Y537S_RS13	GCATCTCCAGCAGCAGGACAG	
472	ESR1_Y537S_RS14	CTCCAGCAGCAGGACAG	
473	ESR1K303RWSNP_CF01	AGAGATGATGGGAGGGCA	
474	ESR1K303RWSNP_CF02	AGATGATGGGAGGGCA	
475	ESR1K303RWSNP_CR01	TCAGCATCCAACAGGCA	
476	ESR1K303RWSNP_CR02	CTCAGCATCCAACAGGCA	
477	ESR1K303RWSNP_F_P01	ATTGTCCCTGACAGGCGACAGATGGTCA	1=レポーター 2=クエンチャー 3=ホスフェート
478	ESR1K303RWSNP_FS01	CGCTCATGATCAAACGCTCTAAGAG	
479	ESR1K303RWSNP_FS02	CGCTCATGATCAAACGCTCTAAGCG	
480	ESR1K303RWSNP_FS03	CGCTCATGATCAAACGCTCTAAGGG	
481	ESR1K303RWSNP_FS04	CGCTCATGATCAAACGCTCTAAGTG	
482	ESR1K303RWSNP_FS05	CGCTCATGATCAAACGCTCTAAAAG	
483	ESR1K303RWSNP_FS06	CGCTCATGATCAAACGCTCTAACAG	
484	ESR1K303RWSNP_FS07	CGCTCATGATCAAACGCTCTAATAG	

10

20

30

40

【 0 0 8 1】

50

【表 2 - 1 4】

485	ESR1K303RWSNP_FS08	CGCTCATGATCAAACGCTCTAGGAG	
486	ESR1K303RWSNP_FS09	CGCTCATGATCAAACGCTCTAGGAG	
487	ESR1K303RWSNP_FS10	CGCTCATGATCAAACGCTCTATGAG	
488	ESR1K303RWSNP_R_P01	1TTTGATCATGA20CGGGCTTGGCCAAAGGTT3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
489	ESR1K303RWSNP_RS01	ACAAGGCCAGGCTGTTC	
490	ESR1K303RWSNP_RS02	ACAAGGCCAGGCTGTAC	
491	ESR1K303RWSNP_RS03	ACAAGGCCAGGCTGTTC	
492	ESR1K303RWSNP_RS04	ACAAGGCCAGGCTGTTC	
493	ESR1K303RWSNP_RS05	ACAAGGCCAGGCTGTACC	
494	ESR1K303RWSNP_RS06	ACAAGGCCAGGCTGTCC	
495	ESR1K303RWSNP_RS07	ACAAGGCCAGGCTGTCC	
496	ESR1K303RWSNP_RS08	ACAAGGCCAGGCTGTCC	
497	ESR1K303RWSNP_RS09	ACAAGGCCAGGCTGTCC	
498	ESR1K303RWSNP_RS10	ACAAGGCCAGGCTGTCC	
499	SC_ESR1_D01F	GTCTGGCGAGAGATGCAAA	
500	SC_ESR1_D01FP1	1CTCTAC2TTCCCTTACCTCCTTCCTTCC3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
501	SC_ESR1_D01R	GCCTCAATGAAGACAACCTTGA	
502	SC_ESR1_D02F	AGGATAAAGTGGATCTGCTGCA	
503	SC_ESR1_D02R	CCTGGCGTCGATTATCTGAA	
504	SC_ESR1_D03F	GCTGTTAATTGTCATGCATAA	
505	SC_ESR1_D03R	GAAAGGGGAGAACANCTAAA	
506	SC_ESR1_D04F	GAGGATGGATTCTCAATGGA	
507	SC_ESR1_D04R	CCCTGGGCTGTGATCACTAA	
508	SC_ESR1EX1WTASR1	GCCACGGACCATGACCATGA	
509	SC_ESR1EX1WTCRP1	CTTGAGCTGGGACGGTTCA	
510	SC_ESR1EX1WTPRB1	1TGGCCCTA2CTGCATCAGATCCAAGG3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
511	SC_ESR1EX2WTASR1	CAGAGAAGATTGGCCAGTACC	
512	SC_ESR1EX2WTASR2	GCCAGTACCAATGACAGGGGAA	
513	SC_ESR1EX2WTASR3	CCAGGGTGGCAGAGAAAGATY	
514	SC_ESR1EX2WTCRP1	CAGACTCCATAATGGTAGCCTGA	
515	SC_ESR1EX2WTCRP2	TAATGGTAGCCTGAAGCATAGTCAT	
516	SC_ESR1EX2WTCRP3	CACGACAGTAGCGAGTCTCTT	
517	SC_ESR1EX2WTPRB1	1TGACAAGG2GAAGTATGGCTATGGAACT3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
518	SC_ESR1EX2WTPRB2	1TGACAAG2G1AAGTATGGCTATGGAACT4	1-レポーター 2=7_Dz_dG 3-クエンチャー 4-ホスフェート
519	SC_ESR1EX2WTPRB2B	1CTATGGAA2TCTGCCAAGGAGACTCGCTA3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
520	SC_ESR1EX2WTPRB3	1TGACAAGGGA2AGTATGGCTATGGAACT3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート

10

20

30

40

【 0 0 8 2】

50

【表 2 - 1 5】

521	SC_ESRIEX2WTPRB3B	1CAGTACCA2ATGACAAGGGAGTATGGCT3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
522	SC_ESRIEX2WTPRB4	1TGACAAGG2GAAGTATGGCTATGGAATCT3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
523	SC_ESRIEX5E380QASR1	CATGATCAGGTCCACCTTCTAC	
524	SC_ESRIEX5E380QASR2	CCATGATCAGGTCCACCTTCTAC	
525	SC_ESRIEX5E380QASR3	TCCATGATCAGGTCCACCTTCTAC	
526	SC_ESRIEX5E380QCRP1	GAAGCAAGT TAGGAGCAAACAGTA	
527	SC_ESRIEX5E380QCRP2	AGAGCAAGTTAGGAGCAAACAGTA	
528	SC_ESRIEX5E380QCRP3	AAGAGCAAGTTAGGAGCAAACAGTA	
529	SC_ESRIEX5WTASR1	CATGATCAGGTCCACCTTCTAG	
530	SC_ESRIEX5WTCRP1	GAAGCAAGT TAGGAGCAAACAGTA	
531	SC_ESRIEX5WTCRP2	AGAGCAAGTTAGGAGCAAACAGTA	
532	SC_ESRIEX5WTCRP3	AAGAGCAAGTTAGGAGCAAACAGTA	
533	SC_ESRIEX5WTPBR1	1TGCCCTG2GCTAGAGATCCTGATGATTGGT3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
534	SC_ESRIEX6L429DVASR1	GGTAGAGATCTTCGACATGCTGG	
535	SC_ESRIEX6L429DVASR2	ATGGTAGAGATCTTCGACATGCTGG	
536	SC_ESRIEX6V422DVASR1	ATGTGTAGAGGGCATGGAGATCT	
537	SC_ESRIEX6V422DVCRP1	GTTATCAACTCACCAGAATTAAGCAA	
538	SC_ESRIEX6V422DVCRP2	TGTTATCAACTCACCAGAATTAAGCAA	
539	SC_ESRIEX6V422DVCRP3	GTGTTATCAACTCACCAGAATTAAGCAA	
540	SC_ESRIEX6V422DVPRB1	1CATCTCGGTT2CCGCATGATGAATCTGCA3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
541	SC_ESRIEX6WT2ASR1	GGTAGAGATCTTCGACATGCTGC	
542	SC_ESRIEX6WT2CRP1	GTTATCAACTCACCAGAATTAAGCAA	
543	SC_ESRIEX6WTASR1	GGTAGAGATCTTCGACATGCTGC	
544	SC_ESRIEX6WTCRP1	TCACCAGAATTAAGCAAANTAAAGATT	
545	SC_ESRIEX6WTPRB1	1CATCTCGGTT2CCGCATGATGAATCTGCA3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
546	SC_ESRIEX7S463PASR1	ATTGAGGAGTGTACACATTTCTGC	
547	SC_ESRIEX7WTASR1	CATTCAGGAGTGTACACATTTCTGT	
548	SC_ESRIEX7WTCRP1	ATCAGGTGGATCAAAGTGTCTGT	
549	SC_ESRIEX7WTPRB1	1TCTCTG2GAAGAGAAGGACCATATCCACT3	1-レポーター 2-クエンチャー 3-ホスフェート
550	SC_ESRIEX8D536HASR1	ACGTGGTGCCCCCTCTATGG	
551	SC_ESRIEX8L536HASR1	CAAGAACGTGGTGCCCCA	
552	SC_ESRIEX8L536HASR2	TGCAAGAACGTGGTGCCCCA	
553	SC_ESRIEX8L536HASR3	GTGCAAGAACGTGGTGCCCCA	
554	SC_ESRIEX8L536HASR4	GTGCAAGAACGTGGTGCCACA	
555	SC_ESRIEX8L536PASR1	CAAGAACGTGGTGCCCCC	
556	SC_ESRIEX8L536QASR1	CAAGAACGTGGTGCCCCAG	
557	SC_ESRIEX8L536RASR1	CAAGAACGTGGTGCCCCG	
558	SC_ESRIEX8P535H1ASR1	TGAAGTCCAAGAACGTGGTGCA	
559	SC_ESRIEX8P535H1ASR2	CATGAAGTCCAAGAACGTGGTGCA	

10

20

30

40

【 0 0 8 3】

50

【表 2 - 1 6】

560	SC_ESR1EX8P535H2ASR1	TGAAGTACAAGAACGTGGTGCA	
561	SC_ESR1EX8P535H2ASR2	ATGAAGTACAAGAACGTGGTGCA	
562	SC_ESR1EX8P535H2ASR3	CATGAAGTACAAGAACGTGGTGCA	
563	SC_ESR1EX8P535H2ASR4	TGAAGTGCAAGAACGTGATGCA	
564	SC_ESR1EX8P535H2ASR5	AGCATGAAGTACAAGAACGTGGTGCA	
565	SC_ESR1EX8P535H3ASR1	TGAAGTGCAAGAACGTGGTACA	
566	SC_ESR1EX8P535H3ASR2	ATGAAGTGCAAGAACGTGGTACA	
567	SC_ESR1EX8P535H3ASR3	CATGAAGTGCAAGAACGTGGTACA	
568	SC_ESR1EX8V534EASR1	CATGAAGTGCAAGAACGTGGA	
569	SC_ESR1EX8V534EASR2	GCATGAAGTGCAAGAACGTGGA	
570	SC_ESR1EX8V534EASR3	AGCATGAAGTGCAAGAACGTGGA	
571	SC_ESR1EX8WTASR1	ACGTGGTGCCCTCTATGAC	
572	SC_ESR1EX8WTCRP1	GCTTTGGTCCGCTCCTCTCC	
573	SC_ESR1EX8WTPRB1	1CTGCTG2GAGATGCTGGACGCCACC3	1 = レポーター 2 = プロエンチナー 3 = スフェート
574	SC_ESR1EX8Y537CASR1	AGAACGTGGTGCCCTCTCG	
575	SC_ESR1EX8Y537NASR1	AGAACGTGGTGCCCTCTCA	
576	SC_ESR1EX8Y537NASR2	AAGAACGTGGTGCCCTCTCA	
577	SC_ESR1EX8Y537NASR3	CAAGAACGTGGTGCCCTCTCA	
578	SC_ESR1EX8Y537SASR1	AGAACGTGGTGCCCTCTC	
579	ESR1_S463P_CF02	CTCCTAGACCTCATCCTCTTGA	

10

20

【 0 0 8 4】

変異体の高感度で高特異性の検出のためのオリゴヌクレオチド選択
 変異体シグナルが野生型に比較して確実に高感度でかつ特異的に検出できるようにするプライマーを選択した。ESR1 K303R変異およびL536_D538 P変異に特異的であるように設計したプライマー対とプローブを用いて、野生型DNAに対し1 : 1600の比（野生型160,000コピー中変異型DNA100コピー）で添加された変異型鋳型を検出し、または野生型DNAのみで検出した。対立遺伝子特異的増幅と検出はコバズ（cobas z）（登録商標）480上で実施した。データは増幅サイクル数対蛍光シグナルをプロットしたCt曲線により表示した（増幅産物の検出を示す）。

30

【 0 0 8 5】

図 1 A は、全く識別のないK303Rに特異的な反応を示す。選ばれたプライマーとプローブは、本質的に同じレベルで変異型サンプルと野生型サンプルからのシグナルを増幅し検出する。図 1 B はより良好な識別を有するK303Rに特異的な反応を示す。2つの野生型サンプルのCtは、少なくとも2サイクル数だけ右側にシフトする。図 1 C は、少なくとも1 : 1600の比で変異型DNAを検出するのに十分なほど感受性である、L536_D538 Pについてはるかに高特異的な反応を示す。野生型サンプルは全く検出されず、それに対し変異型サンプルは35 ~ 38あたりにCtを有する。

40

【 0 0 8 6】

L536R変異に特異的であるように設計されたプライマーとプローブを用いた同様な比較を図 2 A、2 B および 2 C に示す。図 2 A は、L536R_RS09対立遺伝子特異的プライマーを使った良好な識別を有する反応を示す。野生型は変異型と本質的に同じレベルで増幅される。図 2 B は、L536R_RS09対立遺伝子特異的プライマーを使った良好な識別を有する反応を示し、ここでは野生型が変異型に比較して少なくとも5サイクル数だけ遅延したCtを有した。図 2 C はL536R_RS04対立遺伝子特異的プライマーを使った良好な識別を有する反応を示す。野生型は50サイクル以上のCtを有し、非検出と見なされたが、それに比較して変異型のCtは35あたりの十分検出可能範囲の中にあった。

【 0 0 8 7】

50

マルチプレックス変異検出の特異性

プライマー対とプローブセットを、特異性を決定するためおよび別のESR1変異を検出しないことを保証するために多重形式（マルチプレックス）で試験した。個々のサンプル混合物を表1に列挙する18種の変異体の各々に対して調製し、該混合物は変異型DNAを野生型に対して1：1の比で添加して調製した（各々5000コピー）。18種の変異すべてに特異的であるプライマー対とプローブを添加した。図3は、ESR1 P535Hに対して高特異性を有する典型的Ct曲線を示す。25～30辺りにCtを有する最も左側2本の曲線は、サンプル中に存在するESR1 P535H変異の特異的検出を表す（薄い矢印で示される）。その他のプライマー対とプローブのCtは、はるかに遅延したCtを有する（2つの黒矢印の間に示される）。

10

【0088】

アッセイの直線性

各変異に対して一定範囲の鋳型濃度に渡って、検出の直線性も認められた。一例として、ESR1 S341Lに特異的なプライマー対とプローブを用いて、10,000コピーの野生型バックグラウンド中5～5000コピーの変異体鋳型を増幅させた。その結果を表3に示す。それは当該アッセイが高度に直線性を持つことを示す。

【0089】

【表3】

変異型コピー数	Ct
5	33.04
50	29.32
500	26.23
5000	22.89
傾き	-3.36
R ²	0.9987

20

【0090】

人為的血漿サンプルにおけるESR1変異の検出

血漿成分が干渉するかどうかを調べるために血漿バックグラウンド中で該アッセイを試験した。変異型DNAを1000コピー数において2 mL正常（野生型）血漿に添加した。DNAをcobas（登録商標）DNAサンプル調製キットを使って抽出した。0.5 mL血漿からのものに相当するDNAを各PCR反応に加えた。プライマー対とプローブセットを各変異に対応して添加した。典型的な結果を表4に示す。このデータは、変異型DNAが野生型血漿バックグラウンド中で高感度で検出できることを示す。

【0091】

30

40

50

【表 4】

変異	変異型が添加された場合の 平均変異型Ct	血漿のみのサンプル中の 平均変異型Ct
L536Q	28.62	45.20
V422delV	28.55	ND
L536R	28.55	45.20
L536H	28.40	45.20
Y537S	28.41	ND
E380Q	28.28	ND
L536P	29.41	45.20

10

【 0 0 9 2 】

選択されるオリゴヌクレオチド

変異型配列に対して優れた特異性を示す対立遺伝子特異的プライマーを、上記基準に基づいて選択した。それらのデータを表 5 に示し、表中にプライマー名とカッコ内に配列番号を示す。ボールド体は、下記の表 6 のアッセイ構成において選択性と特異性を示したプライマーを指摘するが、その他の組み合わせも上手く機能する。

20

表 5：選択される対立遺伝子特異的プライマー

【 0 0 9 3 】

30

40

50

【表 5 - 1】

変異	選択される対立遺伝子特異的プライマー
K303R	FS02 (479), FS04 (481) , FS07 (484)
S341L	FS02 (239), FS03 (240), FS05 (242), FS08 (245) , FS09 (246), FS10 (247), RS04 (253), RS05 (254), RS06 (255), RS07 (256), RS08 (257), RS09 (258), RS10 (259)
E380Q	FS01 (32), FS03 (34), FS05 (36), FS06 (37), FS07 (38), FS08 (39), FS09 (40), FS10 (41), FS11 (42)
V422DELV	FS01 (287), FS08 (294), FS09 (295), FS10 (296), FS12, FS14 (297), FS15 (298)
L429V	FS06 (66), FS08 (68), FS09 (69), FS10 (70) , RS01 (72), RS02 (73), RS04 (75), RS05 (76), RS06 (77), RS07 (78), RS08 (79), RS09 (80), RS10 (81)
S463P	FS02 (264) , FS03 (265), FS05 (267), FS06 (268), FS07 (269), FS08 (270), FS09 (271), FS10 (272), RS08 (281), RS09 (282), RS10 (283), RS11 (275), RS12
V533M	FS01 (322), FS08 (329), FS09 (330), RS08 (345), RS09 (346), RS10 (347), RS11 (348), RS12 (349), RS13 (350) , RS15 (352), RS16 (353), RS19
V534E	FS01 (364), FS02 (365), FS04 (367), FS05 (368), FS07 (370), FS08 (371), FS10 (373), RS01 (378), RS11 (388) , RS15 (391), RS16 (392), RS17 (393)

10

20

【 0 0 9 4 】

30

40

50

【表 5 - 2】

P535H	FS01 (181), FS08 (188), FS09 (189), FS10 (190), RS01 (191), RS08 (198), RS09 (199), RS10 (200), RS13 (203), RS14 (204), RS15 (205), RS18 (208), RS19 (209), RS22 (212), RS35 (225), RS36 (226), RS38 (228), RS39 (229), RS41 (231)
L536H	FS01 (96), FS06 (101), FS09 (104), FS10 (105), RS02 (107), RS05 (110), RS06 (111), RS07 (112), RS08 (113) , RS09 (114), RS10 (115), RS11 (116), RS12 (117)
L536P	RS04 (134) , RS05 (135), RS07 (137)
L536Q	FS01 (141), RS01 (151), RS04 (154), RS05 (155), RS07 (157), RS08 (158) , RS09 (159), RS10 (160)
L536R	FS01 (161), RS02 (172), RS04 (174), RS05 (175), RS06 (176), RS07 (177), RS08 (178) , RS09 (179), RS10 (180)
Y537C	FS01 (397), RS01 (408), RS08 (415) , RS09 (416), RS10 (417), RS11 (418), RS12 (419), RS13 (420), RS19 (424)
Y537N	FS01 (426), RS01 (436), RS06 (441), RS10 (445), RS11 (446), RS12 (447) , RS13 (448), RS14
Y537S	FS01 (449), RS01 (459), RS08 (466), RS09 (467), RS10 (468), RS11 (469) , RS12 (470), RS13 (471), RS14 (472)
D538G	RS01 (14), RS08 (21), RS09 (22), RS10 (23), RS11 (24) , RS12 (25)
L536_D538 >P	RS01 (84), RS02 (85), RS03 (86), RS04 (87), RS05 (88), RS06 (89), RS07 (90) , RS08 (91), RS09 (92), RS10 (93)

10

20

30

【 0 0 9 5 】

エクソン 8 RSプライマーの場合、どのエクソン 8 CFプライマーでも使用でき、例えばV533M_CF03 (配列番号314) またはY537C_CF01 (配列番号394) を使用できる。任意のエクソン 8 プローブ、例えばY537C_R_P01 (配列番号407) が使用できる。一般に、どのFS対立遺伝子特異的プライマーについても、任意の対応するCRプライマーとFプローブを使用することができる。同様にどのRS対立遺伝子特異的プライマーについても、任意の対応するCFプライマーとRプローブを使用することができる。

【 0 0 9 6 】

特定の例としては、K303R_CR02 (配列番号476) とK303R_F_P01 (配列番号477) ; S341L_CR02 (配列番号235) とS341L_F_P02 (配列番号237) ; E380QCRP3 (配列番号528) とE380Q_F_P01 (配列番号31) ; V422delV_CR01 (配列番号285) とV422delV_F_P01 (配列番号286) ; L429V_CR01 (配列番号59) とL429_F_P01 (配列番号60) ; およびS436P_CR01 (配列番号261) とS463P_F_P01 (配列番号262) が挙げられる。

【 0 0 9 7 】

アッセイ構成の例

最小数の反応容器中で最大数の変異を検出するために高度に多重化されたアッセイを設計しようと試みた。3容器アッセイの例を下表 6 と 7 に示す。エクソン 8 変異を、コモン正

40

50

プライマーとプローブの使用を可能にするために一緒にグループ化した。当業者は、所望であれば、例えばシーケンシングを使ってまたは変異特異的プローブを用いるPCRを使って、変異陽性シグナルを生じる正確なエクソン8変異を同定する方法を知っているだろう。

表6：対立遺伝子特異的マルチプレックスESR1変異のための典型的アッセイ構成

【0098】

【表6】

レポーター	1	2	3
FAM	L536H/ L536P/ L536Q/ L536R/ D538G	Y537C/ Y537N/ Y537S/ L536_D538>P	V533M/ V534E/ P535H
HEX	S463P	E380Q	S341L
JA270	V422DELV	K303R	L429V
CY5.5	IC	IC	IC

10

表7：対立遺伝子特異的マルチプレックスESR1変異のための典型的アッセイ構成

【0099】

【表7】

レポーター	1	2	3
FAM	L536H/ L536P/ L536Q/ L536R/ L536_D538>P	Y537C/ Y537N/ Y537S/ D538G	V533M/ V534E/ P535H
HEX	S463P	S341L	E380Q
JA270	K303R	L429V	V422DELV
CY5.5	IC	IC	IC

20

30

【0100】

当業者は、着目の変異と蛍光チャンネルの利用可能性に依存して、異なるアッセイ構成を構築できることがわかるだろう。例えば、チューブの数は、エクソン8変異の個別検出ができるように増やすことができる。蛍光チャンネルの数が増加するにつれ、単一チューブ中に含めることができる変異の数が増加するだろう。

【0101】

マルチプレックス反応によるFFPETサンプル中のE380Q変異の検出

癌患者からの142本のFFPETサンプル（乳癌、リンパ節、肺、骨）からcobas（登録商標）DNAサンプル調製キットを使ってDNAを抽出した。DNA（50 ng/反応）を、本明細書に記載の通りにマルチプレックス対立遺伝子特異的PCR（二通りに実施）によりESR1変異について分析した。結果を図4Aと4Bに示す。1サンプル（IN008）がE380Q変異に関して陽性であると認められ、これはE380Q変異陽性対照（MC）と類似した増幅成長曲線を示した（図4A参照）。図4Bは、E380Q変異陽性対照のない同一データを示す。ddPCRを使って結果を確認した。

40

【0102】

E380Q変異陽性サンプルは、E380野生型および非鋳型対照から明確に識別できるプロファイルを示す。この結果は、本明細書に記載のマルチプレックスアッセイが、FFPET臨床サンプルからのDNA中の特異的変異を検出するのに有効であることを示す。

50

【 0 1 0 3 】

マルチプレックス反応による血漿サンプル中のD538G変異の検出

臨床血漿サンプル（2 mL血漿）を、アロマターゼ阻害剤での治療中に再発したまたは断薬後12か月以内に再発した103名の閉経後転移乳癌患者から採取した。cobas（登録商標）cfDNAサンプル調製キットを使ってDNAを抽出し、本明細書に記載のマルチプレックス対立遺伝子特異的PCRによりESR1変異について分析した。図5に示されるように、試験した3サンプルがD538G陽性であった。図5は、51本のサンプルのうち、3本がD538G陽性であり、48本がD538野生型であることを示した。D538G変異陽性対照と非鋳型対照も図示されており、D538G陽性サンプルは明確に識別可能であるプロファイルを示した。ddPCRを使って結果を確認した。

10

【 0 1 0 4 】

これらの結果は、本明細書に記載のマルチプレックスアッセイが非侵襲性（血漿）臨床サンプルからのDNA中の特異的変異を検出するのに有効であることを示す。

20

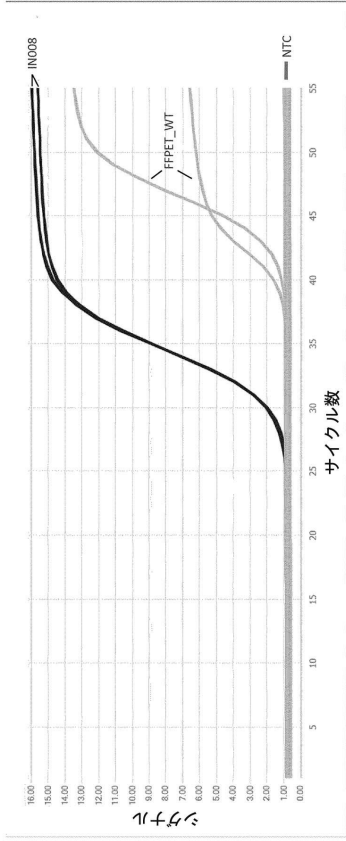
30

40

50

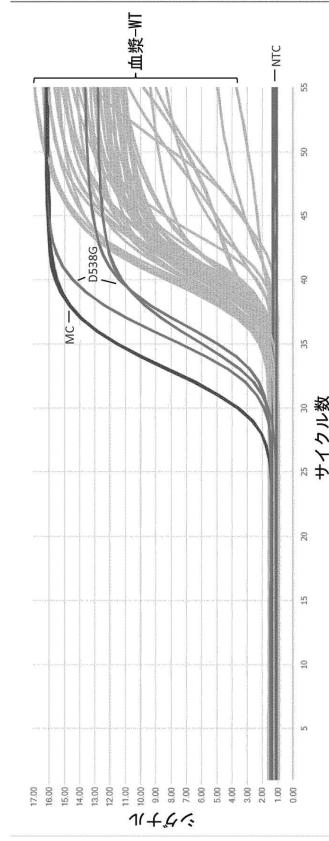
【 図 4 B 】

FIGURE 4B



【 図 5 】

FIGURE 5



【 配列表 】

0007007364000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 100150810
弁理士 武居 良太郎
- (74)代理人 100166165
弁理士 津田 英直
- (72)発明者 チェン シアオイン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94506, ダンビル, コッツワルド ストリート 1719
- (72)発明者 ショーン チーエン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94506, ダンビル, イースト カミノ アローヨ 307
- (72)発明者 クラウディア リッテルスト
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94597, ウォールナット クリーク, テラス ロード 1714
- (72)発明者 ハー トラン
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94014, デーリー シティ, ミッション サークル 60
- 審査官 西垣 歩美
- (56)参考文献 国際公開第2013/056178 (WO, A2)
国際公開第2015/136017 (WO, A1)
国際公開第2015/093948 (WO, A2)
Peilu Wang, CLINICAL CANCER RESEARCH, 2016年03月01日, Vol:22, No:5, Page(s):1130-1137
Jiaxin Niu, OncoTargets and Therapy, Vol:8, Page(s):3323-3328
Ting Wang, EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY, 2015年, Vol:98, No:2, Page(s):152-157
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C12N 15/00 - 15/90
C12Q 1/00 - 3/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)