

(43) 国際公開日
2006年7月6日 (06.07.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/070667 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/023486
- (22) 国際出願日: 2005年12月21日 (21.12.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2004-378919
2004年12月28日 (28.12.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 Shiga (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 鳥田 雅光 (SHIMADA, Masamitsu) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 日野 文嗣 (HINO, Fumitsugu) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 加藤 郁之進 (KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).
- (74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF DETECTING MUTATION IN EGFR GENE AND DETECTION KIT

(54) 発明の名称: E G F R遺伝子変異の検出法ならびに検出キット

```

              740              750
          V K I P V A I K E L R E A T S P K A N K E I
          AA      2220      2230      2240      2250      2260      2270
正常      GTTAAATTCCTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATC
Del-1a    GTTAAATTCCTCGCTATCAAG-----AACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATC
Del-1b    GTTAAATTCCTCGCTATCAAG-----ACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATC
Del-3     GTTAAATTCCTCGCTATCAAGGAA-----CCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATC
Del-4     GTTAAATTCCTCGCTATCAAGGAAT-----CGAAAGCCAACAAGGAAATC
Del-5     GTTAAATTCCTCGCTATCAAGGA-----TCCGAAAGCCAACAAGGAAATC
Del-2     GTTAAATTCCTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACA-----

```

```

          AGAGAAGCAACA      GAAAGCCAACAA
          プローブDF        プローブNH
          BB                  CC

```

```

          760
          L D
          AA      2280
正常      CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-1a    CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-1b    CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-3     CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-4     CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-5     CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-2     CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG

```

```

AA... NORMAL
BB... PROBE DF
CC... PROBE NH
DD... DOWNSTREAM PRIMER RV

```

```

3'-CACTCAAGGACGAAACGACAC-5'
      下流プライマーRV
      DD

```

(57) Abstract: A method whereby a deficient mutation in EGFR gene, which relates to the estimation of a disease and a drug effect and to a side effect, is quickly, conveniently and highly sensitively detected; and a kit therefor.

(57) 要約: 疾病予知や薬効ならびに副作用にも関連したEGFR遺伝子の欠損変異を迅速・簡便・高感度に検出する方法ならびにキット。

WO 2006/070667 A1



CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

EGFR遺伝子変異の検出法ならびに検出キット

技術分野

[0001] 本発明は疾病予知や薬効ならびに副作用にも関連したEGFR遺伝子の欠損変異を迅速・簡便・高感度に検出する方法ならびにキットに関する。

背景技術

[0002] 近年、遺伝子レベルでの多彩な変異(点変異、欠損、挿入、重複)が遺伝病のみに限らず、生活習慣病に密接に絡んでいることが明らかにされつつある。さらには、薬効予測や副作用予測といった薬理ゲノム解析が臨床にも応用されつつある。中でも、肺癌治療薬であるEGFR阻害剤とEGFRの変異との関係が明らかにされた(非特許文献1、2、3、4参照)。

上記遺伝子変異のうち点変異の検出法としては、従来から様々な方法が報告されている(非特許文献5参照)。例えば、3'末端が変異特異的な配列を有するプライマーを用いて核酸増幅の有無を調べる方法(特許文献1参照)、プローブ技術を用いる方法(TaqMan法、特許文献2、3参照)、Invader法(特許文献4参照)、Cycling probe technology(非特許文献6参照)、CataCleave probe法(非特許文献7参照)、Cycleave法(特許文献5参照)、Hybridization probe法(特許文献6参照)、Scorpion法(非特許文献8参照)、シーケンス法、1塩基伸長法などがある。これらの方法は例えばRas変異、各種SNPタイピングに広く用いられており、EGFRに存在する点変異(例えばエキソン21に存在するコドン858のL→R変異)解析にも応用可能である。

[0003] また、欠損変異解析もシーケンス法や高性能電気泳動法によって実施されてきた。例えば、CC chemokine receptor 5(CCR5)遺伝子の+ / Δ32欠損変異に代表される例では、上記遺伝子欠損変異は、その欠損パターンが一定であるため、正常配列に対する通常のプライマーで核酸増幅し、TaqManなど正常配列および欠損ジャンクション領域に対する2種類のプローブを用いてシグナルの有無や強度を調べてタイピングしている(非特許文献9)。

[0004] 特許文献1:特許第2853864号公報

特許文献2:米国特許第5, 210, 015号明細書

特許文献3:米国特許第5, 487, 972号明細書

特許文献4:米国特許第5, 846, 717号明細書

特許文献5:国際公開第03/074696号パンフレット

特許文献6:国際公開第97/46714号パンフレット

非特許文献1:Science、304、p. 1497-1500(2004)

非特許文献2:New England Journal of Medicine、350、p. 2129-2139(2004)

非特許文献3:British Journal of Cancer、93、p. 355-363(2005)

非特許文献4:Clinical Cancer Research、11(12)、p. 4289-4294(2005)

非特許文献5:Nature Reviews、3、p. 749-761(2004)

非特許文献6:BioTechniques、20、p. 240-248(1996)

非特許文献7:Analytical Biochemistry、333(2)、p. 246-255(2004)

非特許文献8:Nucleic Acids Research、28、p. 2752-3761(2000)

非特許文献9:Clinical Chemistry、46、p. 24-30(2000)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] このように欠損パターンが一定の欠損変異解析については検討されているが、欠損パターンが一定でない非定型欠損変異の検出においては、個々の症例に応じてシーケンス解析、核酸増幅後の高性能電気泳動解析(例えばキャピラリー電気泳動)やTOF-MSによる質量分析といった、大掛かりで煩雑な工程を経なければならず、簡便に迅速にできないという問題があった。さらに、検体のがん組織である場合には通常の遺伝子多型解析のように100%か50%かという混在率ではなく、大多数の正常細胞の存在下に混在するがん細胞由来の遺伝子を検出する必要がある。例えば、5%という混在率で存在する変異遺伝子を検出する事は困難であった。

[0006] 本発明の目的は、変異のパターンが多彩でありかつ欠損配列が短い、いわゆる欠損パターンが一定していないEpidermal Growth Factor Receptor(EGFR)遺

伝子のエキソン19における体細胞欠損変異について、抗癌剤(EGFR阻害剤)の効果予測、疫学調査、疾患予測の面から有用な、簡便で迅速でなおかつ高感度なスクリーニング法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0007] 本発明者らは鋭意検討し、EGFR正常遺伝子中に5%の割合で混在する欠損変異遺伝子であっても検出することが可能な新規な技術を開発した。更には、前記の検出を同一反応系で閉鎖・密閉系で迅速に行う新規な技術を開発した。すなわち、シングルチューブで閉鎖・均一系でクロスコンタミの危険性を防ぎ、90分という短時間で、多検体を同時測定でき、なおかつ正常遺伝子中に5%の欠損変異遺伝子が存在するだけで検出可能な高感度検出法ならびに試薬キットを開発し、本発明を完成させた。
- [0008] すなわち本発明の第1の発明は、以下の工程を包含することを特徴とする、試料中に含まれるEGFR遺伝子のエキソン19の欠損変異の有無を検出する方法に関する：
- EGFR遺伝子の欠損ジャンクション領域にアニーリング可能な少なくとも1つの欠損配列用プライマーおよび前記欠損配列用プライマーと対向するプライマーを用いて試料中の目的領域を増幅する工程、ここで当該欠損配列用プライマーの3'末端の塩基配列は当該欠損ジャンクションに隣接する3'側の非欠損部位由来の2から5塩基からなる塩基配列であり、当該欠損配列用プライマーと対向するプライマーは欠損変異及び正常遺伝子のいずれにもアニーリング可能なプライマーである；および増幅産物の有無に基づいて欠損変異を検出する工程。
- [0009] また、本発明の第1の発明において、さらに、欠損部位を認識するプローブおよび非欠損部位を認識するプローブを含む少なくとも2つのプローブを用いて、増幅反応と同一反応系で欠損変異を検出してもよい。
- [0010] また、特に限定はしないが、本発明の第1の発明においては、配列表の配列番号6～10いずれか記載の塩基配列を有するプライマーから選択される欠損配列用プライマー及び配列表の配列番号11記載の塩基配列を有する前記欠損配列用プライマーと対向するプライマー、及び／又は配列表の配列番号16～17記載の塩基配列を有するプローブを用いることが好ましい。

[0011] 本発明の第2の発明は、以下を含有することを特徴とする本発明の第1の発明の方法のための組成物に関する：

(1) EGFR遺伝子の欠損ジャンクション領域にアニーリング可能な欠損配列用プライマー、ここで当該欠損配列用プライマーの3'末端の塩基配列は当該欠損ジャンクションに隣接する3'側の非欠損部位由来の2から5塩基からなる塩基配列である、

(2) (1)の欠損配列用プライマーと対向するプライマー、ここで当該プライマーは欠損変異及び正常遺伝子のいずれにもアニーリング可能なプライマーである、および

(3) DNAポリメラーゼ。

[0012] 本発明の第2の発明において、さらに、(4) 欠損部位を認識するプローブ(5) 非欠損部位を認識するプローブ、ならびに(6) 標的配列にハイブリダイズした場合に上記プローブを開裂させるための酵素、を含有してもよい。

[0013] また、特に限定はしないが、本発明の第2の発明においては、配列表の配列番号6～10いずれか記載の塩基配列を有するプライマーから選択される欠損配列用プライマー及び配列表の配列番号11記載の塩基配列を有する前記欠損配列用プライマーと対向するプライマー、及び／又は配列表の配列番号16～17記載の塩基配列を有するプローブを含有する事が好ましい。

[0014] 本発明の第3の発明は、以下を含有することを特徴とする本発明の第1の発明の方法のためのキットに関する：

(1) EGFR遺伝子の欠損ジャンクション領域にアニーリング可能な欠損配列用プライマー、ここで当該欠損配列用プライマーの3'末端の塩基配列は当該欠損ジャンクションに隣接する3'側の非欠損部位由来の2から5塩基からなる塩基配列である、および

(2) (1)の欠損配列用プライマーと対向するプライマー、ここで当該プライマーは欠損変異及び正常遺伝子のいずれにもアニーリング可能なプライマーである。

本発明の第3の発明において、さらに、(3) 欠損部位を認識するプローブ、ならびに(4) 非欠損部位を認識するプローブ、を含有しても良い。

[0015] また、特に限定はしないが、本発明の第3の発明においては、配列表の配列番号6～10いずれか記載の塩基配列を有するプライマーから選択される欠損配列用プライ

マー及び配列表の配列番号11記載の塩基配列を有する前記欠損配列用プライマーと対向するプライマー、及び／又は配列表の配列番号16～17記載の塩基配列を有するプローブを含有する事が好ましい。

発明の効果

- [0016] 本発明により、EGFR遺伝子のエクソン19における体細胞欠損変異について、抗癌剤(EGFR阻害剤)の効果予測、や疫学調査、疾患予測の面から有用な、簡便で迅速でなおかつ高感度なスクリーニングが可能となる。

図面の簡単な説明

- [0017] [図1-1]EGFR遺伝子のエクソン19における欠損変異のパターンを示す図である。
[図1-2]EGFR遺伝子のエクソン19における欠損変異のパターンを示す図である。
[図2]実施例5の各サンプルにおけるFAMの蛍光強度当たりのHEXの蛍光強度、H
EX/FAM値を算出しプロットした図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0018] 本明細書において欠損変異とは、正常な配列を持つDNAからDNAの一部が欠けた変異のことを言う。
- [0019] 本明細書において欠損部位とは、上記欠損変異で欠けるDNAの部位のことをいう。
- [0020] 本明細書において非欠損部位とは、上記欠損部位以外の部位のことをいう
- [0021] 本明細書において欠損ジャンクションとは、欠損変異を有する遺伝子において、欠損部位の両側に隣接する塩基と塩基との間の部分を言う。即ち、欠損変異における非欠損部位同士の接合部分のことを言う。
- [0022] 本明細書において欠損ジャンクション領域とは、欠損変異を有する遺伝子において、欠損部位の両側に隣接する塩基を含む領域のことを言う。即ち、欠損変異における非欠損部位同士の接合部分(即ち、欠損ジャンクション)の両側に隣接する塩基を含む領域のことを言う。
- [0023] 本明細書において欠損配列用プライマーと対向するプライマーとは、核酸増幅反応において利用されるプライマー対を欠損配列用プライマーとともに構成するプライマーのことを言う。

[0024] 以下、本発明を詳細に説明する。

(A) 本発明のEGFR遺伝子欠損変異の検出方法

本発明の検出方法は、

試料中に含まれるEGFR遺伝子のエキソン19の欠損変異の有無を検出する方法であって、EGFR遺伝子の欠損ジャンクション領域にアニーリング可能な少なくとも1つの欠損配列用プライマー、ここで当該欠損配列用プライマーの3'末端の塩基配列は当該欠損ジャンクションに隣接する非欠損部位由来の2から5塩基からなる塩基配列であり、ならびに前記欠損配列用プライマーと対向するプライマー、ここで当該プライマーは欠損変異および正常遺伝子のいずれにもアニーリング可能なプライマーであり、を用いて試料中の目的領域を増幅する事の特徴とする。増幅産物の検出方法に特に限定はなく、アガロースゲル電気泳動やプローブを用いた検出方法が例示される。

また、欠損部位を識別するプローブならびに非欠損部位を識別するプローブの少なくとも2つのプローブを用いて、増幅反応と同一反応系で欠損変異を検出しても良い。

本発明の検出対象となるEGFR遺伝子のエキソン19の欠損変異としては、EGFR遺伝子のエキソン19のコドン746から752に出現する欠損変異が例示される。このような検出対象の好適例としては、前期非特許文献1～4に記載された欠損変異が挙げられ、より好ましくは前記非特許文献1及び2に記載された欠損変異(図1)が例示される。図1において欠失Del-1a、Del-1b、Del-3、Del-4、Del-5、Del-2はそれぞれ、塩基2235～2249の欠失(アミノ酸E746～A750の欠失)、塩基2236～2250の欠失(アミノ酸E746～A750の欠失)、塩基2239～2247の欠失(アミノ酸L747～E749の欠失、A750Pの置換)、塩基2240～2257の欠失(アミノ酸L747～S752の欠失、P753Sの置換)、塩基2238～2255の欠失(アミノ酸L747～S752の欠失、E746Vの置換)、塩基2254～2277の欠失(アミノ酸S752～I759の欠失)である。図1および上記の塩基番号はヒトEGFR遺伝子の開始コドンATGのAを1とした場合の番号であり、アミノ酸番号は上記開始コドンによってコードされるメチオニン(Met)を1とした場合の番号である。

また、本発明の方法のひとつの態様は、上記欠損変異を検出するための少なくとも1対のプライマー及び欠損部位ならびに非欠損部位を認識する少なくとも2つのプローブを用いることを特徴とする。また、本発明の方法の別の態様は、同一反応系で核酸増幅反応とシグナル検出を同時に行い、欠損変異の有無を迅速高感度に検出することを特徴とする。

[0025] 本発明の方法で用いるプライマーは、正常EGFR遺伝子は実質的に増幅せず、少なくとも一種の欠損変異を実質的に増幅可能なプライマーであればいずれもが好適に使用できる。特に限定はないが、例えば、本発明の方法で用いるプライマーの少なくとも1つはEGFR遺伝子の欠損ジャンクション領域にアニーリング可能であり、当該プライマーの3'末端の塩基配列は欠損ジャンクションに隣接する3'側の非欠損部位由来の塩基配列から選ばれる。当該プライマーの3'末端の塩基配列は、好ましくは欠損ジャンクションに隣接する3'側の非欠損部位由来の2塩基～5塩基であり、特に好ましくは2塩基～3塩基である。また、2種類以上の前記プライマーを同一の反応系で核酸増幅反応に使用する事もできる。この事は、2種類以上の欠損変異を同一の反応系で検出できるという点において好ましい。前記プライマーを2種類以上用いる場合、欠損した塩基配列の鎖長をアカーロースゲル電気泳動等で鎖長を求めることによって同定するために、それぞれのプライマーの5'末端がアニーリングする位置が一致するようにプライマーを設定しても良い。前記プライマーとしては、例えば配列表の配列番号6～10のいずれか記載の塩基配列を有するものが好適に使用できる。

[0026] また、本発明の方法で用いるプライマーのもう一方は、当該遺伝子の欠損変異及び正常遺伝子のいずれにもアニーリング可能なものであれば特に限定はないが、長鎖DNAの増幅が困難な、例えばパラフィン切片からのDNAを増幅できるように設定されたプライマーが好ましい。前記プライマーとしては、核酸増幅反応によって得られる増幅産物の鎖長が100bp以下となるように設定されているプライマーが好ましく、より好ましくは増幅産物の鎖長が87bp以下となるように設定されているプライマーである。前記プライマーとしては、例えば配列表の配列番号11記載の塩基配列を有するものが好適に使用できる。

本発明の方法において上記プライマー対により目的の欠損遺伝子を高感度に検出する事ができる。

- [0027] また、本発明の方法で用いるプライマーを設定する際には、上記の事項に加えて公知の文献、例えば内海らの文献(蛋白質、核酸、酵素、第35巻、p3157～p3163、1990年)に記載された、プライマーを作成するためのガイドラインを参考にする事もできる。
- [0028] 本発明においては、本発明の方法により増幅されたDNA断片を、プローブを使用して検出しても良い。
- [0029] 本発明の方法に用いるプローブは、欠損部位を認識する塩基配列ならびに非欠損部位を認識する塩基配列を有するものであれば特に限定はされないが、標的配列に相補的な配列を持つものが好ましい。前記プローブとしては、例えば標的配列にハイブリダイズした場合に特定の核酸分解酵素により切断を受けるプローブが好ましい。このようなプローブとしては、TaqManTMプローブ、DNA-RNA-DNAキメラプローブが挙げられる。特に好ましいプローブとしては、DNA-RNA-DNAキメラプローブである。前記キメラプローブのRNA部分の鎖長は特に限定されないが、プローブの安定性の観点から1～5塩基である事が好ましく、更に好ましくは1塩基である。プローブ全体の鎖長は、好ましくは6～30塩基であり、更に好ましくは10～15塩基である。
- 上記プローブのうち、欠損部位を認識するプローブは、さまざまな欠損変異において共通して欠損している領域を選択することが好ましい。当該プローブの一部の配列は非欠損部位を含んでも構わないが、増幅された欠損DNAと当該プローブの非欠損部位とが増幅温度条件の範囲でアニールすることを避けることが好ましい。当該プローブの非欠損部位は、好ましくは0～12塩基、さらに好ましくは0～6塩基である。特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号16に記載の塩基配列を有するものが好ましい。
- [0030] また、非欠損部位を認識するプローブは、さまざまな欠損において共通して欠損を受けない領域を選択されたものが好適に使用できる。特に限定はされないが、例えば配列表の配列番号17に記載の塩基配列を有するものが好ましい。

[0031] また、欠損部位に他の欠損変異と共通した領域が存在しないか、又は共通して欠損している領域の鎖長がプローブを設定するのに十分でない欠損変異が存在する場合、その欠損変異に対しては、上記の欠損部位を認識するプローブは非欠損部位を認識するプローブとして、非欠損部位を認識するプローブは欠損部位を認識するプローブとして用いることもできる。

特に限定はされないが、例えば図1に記載のEGFR遺伝子のエキソン19の欠損変異を例に挙げて説明すると、欠損配列Del-1a、Del-1b、Del-3、Del-4、Del-5の欠損部位を認識するプローブDF(配列番号16)は、欠損配列Del-2に対しては非欠損部位を認識するプローブとして用いることができる。また、欠損配列Del-1a、Del-1b、Del-3、Del-4、Del-5の非欠損部位を認識するプローブNH(配列番号17)は、欠損配列Del-2に対しては欠損部位を認識するプローブとして用いることができる。

[0032] さらに本発明の方法において、特に限定はされないが例えば、PCR法、ICAN法、LAMP法、SDA法等などの当分野でよく用いられる遺伝子増幅法が利用できる。特に好ましい方法としては、例えばPCR法である。

[0033] さらに本発明において利用できるリアルタイム検出法としては、TaqMan法、Scorpion法、Cycling probe法、ハイブリダイゼーションプローブ法、Cleave法などが挙げられる。特に限定はされないがCleave法が好ましい。当該Cleave法では、増幅産物とRNA含有プローブでハイブリッドを形成させ、増幅産物とプローブの塩基配列が完全マッチのみ反応液中のRNaseHによりプローブのRNA部が切断され、ミスマッチの時はRNaseHによりRNA部は切断されない。このことを利用して、前記のプローブとして、波長の異なる2種以上の蛍光色素で標識され、前記蛍光色素間での蛍光の干渉が生じるようなプローブを使用した場合には、プローブの切断によってその蛍光物質の蛍光強度が変化する事から、変異の有無が判断できる。当該蛍光色素としては蛍光波長が20nm以上へだたればよく、例えば6-FAM(6-carboxy fluorescein)とHEX(Hexachloro-6-carboxyfluorescein)、6-FAMとROX(6-carboxy-X-rhodamine、いずれもABI社製)などの組合せが利用できる。

[0034] また、当該プローブを蛍光物質と該蛍光物質の発する蛍光を消光する作用を有す

る物質、例えばEclipse (Epoch Biosciences社製) またはDABCYL (4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfone) との両方で、互いに適当な間隔をとって標識したものであってもよい。このようなプローブは、インタクトな状態では蛍光物質の発する蛍光の一部は消光物質によって熱エネルギーに変換されるが、切断されて蛍光物質と消光物質との距離が離れた場合には上記作用が解消され、検出される蛍光シグナル強度が上昇する。

[0035] また、Cleave法では、同一反応系で2種類以上のプローブを使用することができる。このような場合、それぞれのプローブは波長の異なる蛍光色素で標識され、その蛍光強度変化の比から、より明確に変異の有無が判定できる。例えば、標的核酸中の欠損部位を検出するプローブと正常部位を検出するプローブをそれぞれ波長が異なる蛍光物質で標識し、Cleave法に用いた場合、欠損が存在する場合には、2つのプローブのうち欠損部位に相当するプローブによる蛍光シグナル強度の上昇は検出されず、正常部位に相当する他方のプローブによる蛍光シグナル強度の上昇のみを検出することができる。

[0036] (B) 本発明の方法のための組成物

本発明の組成物は、

上記(A)記載の方法のための組成物であって、

(1) EGFR遺伝子の欠損ジャンクション領域にアニーリング可能な欠損配列用プライマー、ここで当該欠損配列用プライマーの3'末端の塩基配列は当該欠損ジャンクションに隣接する3'側の非欠損部位由来の2から5塩基からなる塩基配列であり、

(2) (1)の欠損配列用プライマーと対向するプライマー、ここで当該プライマーは欠損変異及び正常遺伝子のいずれにもアニーリング可能なプライマーであり、および

(3) DNAポリメラーゼを含有することを特徴とする。

更には、

(4) 欠損部位を識別するプローブ、および

(5) 非欠損部位を認識するプローブを含有する事を特徴とする。

[0037] 本発明の組成物において、特に限定はされないが例えば、配列表の配列番号6～10のいずれか記載の塩基配列を有するプライマーから選択される欠損配列用プライ

マー及び配列表の配列番号11記載の塩基配列を有する前記欠損配列用プライマーと対向するプライマーを含有していてもよい。

さらには、配列表の配列番号16、17いずれか記載の塩基配列を有するプローブを含有していてもよい。

また、前記プローブは、上記(A)に記載された標識を付されていてもよい。

[0038] また、本発明の組成物に含有されるDNAポリメラーゼとしては、特に限定するものではないが、DNA増幅に一般的に利用されているDNAポリメラーゼが好ましく、例えばTaq(*Thermus aquaticus*)由来DNAポリメラーゼ、Pfu(*Pyrococcus furiosus*)由来DNAポリメラーゼ、Tli(*Thermococcus litoralis*)由来DNAポリメラーゼ、KOD(*Thermococcus kodakaraensis*)由来DNAポリメラーゼ、Bca(*Bacillus caldotenax*)由来DNAポリメラーゼ、Bst(*Geobacillus stearothermophilus*)由来DNAポリメラーゼ、および前記DNAポリメラーゼを2種類以上混合したDNAポリメラーゼが挙げられ、より好ましくは、Taq由来DNAポリメラーゼである。

[0039] また、本発明の組成物には、当該組成物がCycling probe法あるいはCycleave法に使用できるものであった場合には、プローブを開裂するための酵素を含有していてもよく、特に限定はされないが例えば、RNaseH(リボヌクレアーゼH)が挙げられる。RNaseHは古細菌由来のものがより好適であり、特に、国際公開第02/22831号パンフレット記載の方法で調製することができるRNaseH(Tli RNaseH)が好適に使用できる。さらに当該組成物においては核酸増幅反応試薬等を含有していてもよい。

[0040] (C)本発明の方法のためのキット

本発明のキットは、

上記(A)記載の方法のためのキットであって、

(1)EGFR遺伝子の欠損ジャンクション領域にアニーリング可能な欠損配列用プライマー、ここで当該欠損配列用プライマーの3'末端の塩基配列は当該欠損ジャンクションに隣接する3'側の非欠損部位由来の2から5塩基からなる塩基配列であり、および

(2)(1)の欠損配列用プライマーと対向するプライマー、ここで当該プライマーは欠

損変異及び正常遺伝子のいずれにもアニーリング可能なプライマーであり、を含有する事を特徴とする。

更には、

(3) 欠損部位を識別するプローブ、ならびに

(4) 非欠損部位を認識するプローブを含有することを特徴とする。

[0041] 本発明のキットにおいて、特に限定はされないが例えば、配列表の配列番号6～10のいずれか記載の塩基配列を有するプライマーから選択される欠損配列用プライマー及び配列表の配列番号11記載の塩基配列を有する前記欠損配列用プライマーと対向するプライマーを含有していてもよい。

さらには、配列表の配列番号16、17いずれか記載の塩基配列を有するプローブを含有していてもよい。また、前記プローブは、上記(A)に記載された標識を付されていてもよい。

[0042] また、本発明のキットに含有されるDNAポリメラーゼとしては、上記(2)で例示されたものが好適に使用できる。

[0043] また、本発明のキットには、上記(2)で例示された酵素を含有していてもよい。さらに核酸増幅反応試薬等を含有していてもよい。

[0044] 上記の、本発明の組成物及び／又は本発明のキットを使用する事により、EGFR遺伝子における欠損変異の有無を簡便に検出する事が可能となる。

[0045] 以下に実施例をもって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

実施例 1

[0046] まず、コントロールテンプレートDNA、欠損配列検出用プライマーの合成を行った。即ち、ヒトEGFR遺伝子配列(GenBank Accession No. AF288738)の164856番目～164948番目の核酸配列より、正常配列コントロールテンプレートDNA(配列表の配列番号1)をDNA合成機により合成した。この配列は、ヒトEGFR遺伝子エキソン19(配列表の配列番号18)の一部を含む。また、Paezらの文献、Science、304、1497－1500(2004)に報告されたEGFRエキソン19の欠損配列Del-1a、Del-1b、Del-3、Del-4のアミノ酸配列情報および上記のヒトEGFR遺伝子配列

情報より、CTDel-1a(配列表の配列番号2)、CTDel-1b(配列表の配列番号3)、CTDel-3(配列表の配列番号4)、及びCTDel-4(配列表の配列番号5)をそれぞれDNA合成機により合成し、欠損配列コントロールテンプレートDNAとした。得られた正常配列コントロールテンプレートDNA及び欠損配列コントロールテンプレートDNAは、滅菌蒸留水でそれぞれ100fg/ μ lとなるように調製した。

[0047] 次にEGFRエキソン19の欠損配列Del-1a、Del-1b、Del-3、Del-4の検出用上流プライマーとして、F1D1a(配列表の配列番号6)、F2D1b(配列表の配列番号7)、F3D3(配列表の配列番号8)、F4D4(配列表の配列番号9)及びF5D5(配列表の配列番号10)をそれぞれDNA合成機により合成した。また、EGFRエキソン19の欠損配列および正常配列に共通の検出用下流プライマーとして、RV(配列表の配列番号11)をDNA合成機により合成した。さらに、EGFRエキソン19の欠損配列Del-1a、Del-1b、Del-3、Del-4の検出用上流プライマーとして、3'末端一塩基のみが正常配列と異なるF1-2D1a(配列表の配列番号12)、F2-2D1b(配列表の配列番号13)、F3-2D3(配列表の配列番号14)、及びF4-2D4(配列表の配列番号15)についても、それぞれDNA合成機により合成した。図1に下流プライマーRVの位置を示す。図1において、それぞれの上流プライマーの位置を下線で示す。

実施例 2

[0048] 実施例1で調製した欠損配列用プライマーを用いたマルチプレックスPCR法によるEGFRエキソン19欠損遺伝子の高感度検出について検討した。まず、鋳型となるDNAを以下のようにして調製した。即ち、欠損配列CTDel-1aが全コントロールテンプレートに対して5モル%となるように、実施例1で調整した100fg/ μ l CTDel-1a欠損配列コントロールテンプレートDNA溶液を100fg/ μ l 正常配列コントロールテンプレートDNA溶液で希釈し、5モル%CTDel-1a欠損配列コントロールテンプレートDNA溶液とした。同様に、CTDel-1b溶液、CTDel-3溶液、及びCTDel-4溶液についても、それぞれ100fg/ μ l 正常配列コントロールテンプレートDNA溶液で希釈し、5モル%欠損配列コントロールテンプレートDNA溶液とした。

[0049] 上記で調製した各5モル%欠損配列コントロールテンプレートDNA溶液中の欠損

配列DNAの検出をマルチプレックスPCR法によって行った。反応液組成は、 $10\times$ PCRバッファー（タカラバイオ社製）、鋳型として100fgの5モル%の欠損配列を含むコントロールテンプレートDNAまたは100fgの正常配列コントロールテンプレートDNA、並びに1.25UのTaKaRa Taq DNAポリメラーゼ（タカラバイオ社製）を使用し、最終濃度が0.2mM dNTP、2mM $MgCl_2$ 、0.2 μ M F1D1aプライマー、0.2 μ M F2D1bプライマー、0.2 μ M F3D3プライマー、0.2 μ M F4D4プライマー、0.2 μ M F5D5プライマー、0.2 μ M RVプライマーとなるように調製した。なお、反応液容量は、25 μ lである。PCR増幅装置は、サーマルサイクラーMP（タカラバイオ）を用い、反応条件は、95℃ 30秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒を1サイクルとする35サイクル反応とした。反応終了後、増幅産物を3%NuSieve3:1アガロース（タカラバイオ社製）で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行って増幅産物を検出した。

- [0050] その結果、4種類の5モル%欠損配列コントロールテンプレートを鋳型にしたすべてのサンプルにおいて、それぞれの欠損配列コントロールDNAに特異的な増幅鎖長に相当する増幅バンドのみが検出された。また、正常配列コントロールテンプレートDNAを鋳型にしたサンプルでは、正常増幅鎖長に相当する87bpの増幅バンドは確認できなかった。このことから、本発明の方法によって、サンプル中の欠損配列を正確に増幅できることを確認した。

実施例 3

- [0051] ARMS法として報告されている3'末端1塩基のみが正常配列と異なる欠損配列用プライマーを用いたマルチプレックスPCR法によるEGFRエキソン19欠損遺伝子検出と本発明の方法について比較・検討した。

即ち、実施例1で調製した3'末端の1塩基のみがEGFRエキソン19正常配列と異なるEGFRエキソン19欠損配列用上流プライマーF1-2D1a、F2-2D1b、F3-2D3、F4-2D4、及びF5-2D5を用いて、5モル%欠損配列コントロールテンプレートDNA溶液中の欠損配列DNAの検出を行った。使用する欠損配列検出用上流プライマー以外は、PCR条件とその後の増幅産物の検出は、実施例2と同様の条件で行った。

[0052] その結果、Del-1およびDel-1bの5モル%欠損配列コントロールテンプレートDNAを鋳型とした場合は、正常配列DNAを鋳型とした増幅鎖長に相当する88bpの増幅産物のみが検出された。また、Del-4では正常配列DNAを鋳型とした増幅鎖長に相当する88bpの増幅産物と、Del-4欠損配列DNAに特異的な増幅鎖長に相当する70bpの増幅産物が1:1の割合で検出された。

以上の結果および実施例2の結果より、大多数の正常配列DNA存在下の欠損配列DNAの高感度検出には、実施例2で用いたような欠損配列に特異的かつプライマーの3'末端が正常配列と2塩基乃至3塩基異なる配列を有するプライマーが有効であることが確認できた。

実施例 4

[0053] 本発明の検出方法のEGFRエクソン19欠損遺伝子検出の検出限界について検討した。

即ち、実施例2で調製した100fg/ μ lの5モル%欠損配列コントロールテンプレートDNA溶液をさらに100fg/ μ lの正常配列コントロールテンプレートDNA溶液で希釈し、1、0.1、0.01モル%の欠損配列コントロールテンプレートDNA溶液を調製した。これらのDNAをそれぞれ100fg用いて、実施例2と同様の条件でPCR増幅を行い、正常配列DNA存在下の欠損DNAに対する検出感度を検討した。その結果、Del-1a及びDel-1bは1モル%まで、Del-3及びDel-4は0.1モル%まで欠損配列コントロールテンプレートDNAを検出することができた。

実施例 5

[0054] 欠損特異的プライマーマルチプレックスPCR法によるEGFR エクソン19欠損遺伝子増幅産物のサイクリングプローブ法を用いた簡便検出について検討した。検出に用いるEGFR エクソン19欠損配列検出用プローブとして、5'末端をFAM(アプライドバイオシステムズ社製)標識し、3'末端をEclipseクエンチャー(エポック社製)標識したプローブDF(配列表の配列番号16)、及び5'末端をHEX(アプライドバイオシステムズ社製)標識し、3'末端をEclipseクエンチャー標識したプローブNH(配列表の配列番号17)をそれぞれDNA合成機により合成した。

[0055] 上記のプローブを用いて、欠損特異的プライマーマルチプレックスPCR法によるE

GFR エキソン19欠損遺伝子増幅産物のサイクリングプローブ法を用いた簡便検出を行った。反応液組成は、10×PCRバッファー(タカラバイオ社製)、鋳型として100 fgの5モル%の欠損配列を含むコントロールテンプレートDNA、100fgの正常配列コントロールテンプレートDNAあるいは100ngの正常ゲノムDNA、1.25UのTaKaRa Taq DNAポリメラーゼ(タカラバイオ社製)並びに50U Tli RNaseH II(タカラバイオ 国際公開第02/22831号パンフレット)を使用し、最終濃度が0.2mM dNTP、2mM $MgCl_2$ 、0.2 μ M F1D1aプライマー、0.2 μ M F2D1bプライマー、0.2 μ M F3D3プライマー、0.2 μ M F4D4プライマー、0.2 μ M F5D5プライマー、0.2 μ M RVプライマー、0.2 μ M プローブNH、0.2 μ M プローブDFとなるように調製した。なお、反応液容量は、25 μ lである。PCR増幅および蛍光強度の検出には、ABI7500 system(アプライドバイオシステムズ社)を用いた。PCR条件は、95℃ 15秒、60℃ 40秒、72℃ 30秒を1サイクルとする40サイクル反応で行った。また、PCRと同時にABI7500 systemによりFAMおよびHEXの蛍光強度を測定した。

[0056] その結果、欠損を受けない領域のプローブNHのRNaseHによる開裂によって起こるHEXの蛍光強度の上昇は、5モル%欠損配列コントロールテンプレートDNAを用いた全ての反応において顕著に認められた。一方、共通して欠損を受ける領域のプローブDFのRNaseHによる開裂によって起こるFAMの蛍光強度の上昇は、5モル%欠損コントロールテンプレートDNAを鋳型にした全ての反応においてほとんど確認されなかった。一方、正常配列コントロールテンプレートDNAおよび正常ゲノムDNAを鋳型とした反応では、プローブDFのRNaseHによる開裂及びプローブNHのRNaseHによる開裂によって起こる蛍光強度の上昇はほとんど確認されなかった。このことから、上記プローブを用いてリアルタイム検出ができることを確認した。

[0057] さらに正常配列DNAを鋳型にした場合と変異配列DNAを鋳型にした場合における蛍光強度上昇の差を明らかにするために、各サンプルにおけるFAMの蛍光強度当たりのHEXの蛍光強度、HEX/FAM値を算出しプロットした。その結果を図2に示す。ここで、Nは正常配列コントロールテンプレートDNAを鋳型とした場合のHEX/FAM値を、N1～N5は正常ゲノムDNAを鋳型とした場合のHEX/FAM値を、

Del1-1a, Del1-1b, Del-3, Del-4は欠損配列コントロールテンプレートDNAを鋳型とした場合のHEX/FAM値を示す。図2に示したように正常配列コントロールテンプレートDNAおよび5種類の正常ゲノムDNAを鋳型にした反応においては、すべて0.5以下の極めて低いHEX/FAM値を示したのに対して、5モル%欠損配列コントロールテンプレートDNAではHEX/FAM値は5.8~52.5であり、欠損配列コントロールテンプレートDNAを含むサンプルでは、正常配列DNAのみを含むサンプルに比べて10倍以上の高い値を示した。この様に、HEX/FAM値を指標にすることにより、EGFR エキソン19欠損配列の存在を明確に判定できることが示された。

以上のように、サイクリングプローブ法と欠損配列特異的プライマーマルチプレックスPCR法を組み合わせる事により、正常遺伝子存在下においてもEGFR エキソン19欠損遺伝子の5モル%混在を検出することができ、高感度で簡便なシングルチューブでの検出法が有効であることが確認できた。

産業上の利用可能性

[0058] 本発明によって、欠損パターンが一定していないEGFR遺伝子のエキソン19における体細胞欠損変異の簡便で迅速でなおかつ高感度な検出方法が提供される。該検出方法は、抗癌剤の効果予測や疫学調査、疾患予測において有用である。

配列表フリーテキスト

[0059] SEQ ID NO:1:Control template DNA
SEQ ID NO:2:Control template DNA CTDel-1a
SEQ ID NO:3:Control template DNA CTDel-1b
SEQ ID NO:4:Control template DNA CTDel-3
SEQ ID NO:5:Control template DNA CTDel-4
SEQ ID NO:6:PCR primer F1D1a to amplify a deletion mutant "Del-1a"
SEQ ID NO:7:PCR primer F2D1b to amplify a deletion mutant "Del-1b"
SEQ ID NO:8:PCR primer F3D3 to amplify a deletion mutant "Del-3"
SEQ ID NO:9:PCR primer F4D4 to amplify a deletion mutant "Del-4"
SEQ ID NO:10:PCR primer F5D5 to amplify a deletion mutant "Del-5"

SEQ ID NO:11:PCR primer RV to amplify a deletion mutant of EGFR exon 19

SEQ ID NO:12:PCR primer F1-2D1a to amplify a deletion mutant "Del-1a"

SEQ ID NO:13:PCR primer F2-2D1b to amplify a deletion mutant "Del-1b"

SEQ ID NO:14:PCR primer F3-2D3 to amplify a deletion mutant "Del-3"

SEQ ID NO:15:PCR primer F4-2D4 to amplify a deletion mutant "Del-4"

SEQ ID NO:16:Chimeric oligonucleotide probe DF to detect the DNA fragment of human mutant type EGFR exon 19. "nucleotides 4 is a ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

SEQ ID NO:17:Chimeric oligonucleotide probe NH to detect the DNA fragment of human mutant type EGFR exon 19. "nucleotides 5 is a ribonucleotides—other nucleotides are deoxyribonucleotides"

請求の範囲

- [1] 以下の工程を包含することを特徴とする、試料中に含まれるEGFR遺伝子のエキソン19の欠損変異の有無を検出する方法：
- EGFR遺伝子の欠損ジャンクション領域にアニーリング可能な少なくとも1つの欠損配列用プライマーおよび前記欠損配列用プライマーと対向するプライマーを用いて試料中の目的領域を増幅する工程、ここで当該欠損配列用プライマーの3'末端の塩基配列は当該欠損ジャンクションに隣接する3'側の非欠損部位由来の2から5塩基からなる塩基配列であり、当該欠損配列用プライマーと対向するプライマーは欠損変異及び正常遺伝子のいずれにもアニーリング可能なプライマーである；および増幅産物の有無に基づいて欠損変異を検出する工程。
- [2] さらに、欠損部位を認識するプローブおよび非欠損部位を認識するプローブを含む少なくとも2つのプローブを用いて、増幅反応と同一反応系で欠損変異を検出することを特徴とする請求項1記載の方法。
- [3] 配列表の配列番号6～10のいずれか記載の塩基配列を有するプライマーから選択される欠損配列用プライマー及び配列表の配列番号11記載の塩基配列を有する前記欠損配列用プライマーと対向するプライマーを用いることを特徴とする請求項1記載の方法。
- [4] 配列表の配列番号16、17いずれか記載の塩基配列を有するプローブを用いる事を特徴とする請求項2記載の方法。
- [5] 以下を含有することを特徴とする請求項1記載の方法のための組成物：
- (1)EGFR遺伝子の欠損ジャンクション領域にアニーリング可能な欠損配列用プライマー、ここで当該欠損配列用プライマーの3'末端の塩基配列は当該欠損ジャンクションに隣接する3'側の非欠損部位由来の2から5塩基からなる塩基配列である、
- (2)(1)の欠損配列用プライマーと対向するプライマー、ここで当該プライマーは欠損変異及び正常遺伝子のいずれにもアニーリング可能なプライマーである、および
- (3)DNAポリメラーゼ。
- [6] さらに、
- (4)欠損部位を認識するプローブ、

(5)非欠損部位を認識するプローブ、ならびに

(6)標的配列にハイブリダイズした場合に上記プローブを開裂させるための酵素、を含有することを特徴とする請求項5記載の組成物。

[7] 配列表の配列番号6～10のいずれか記載の塩基配列を有するプライマーから選択される欠損配列用プライマー及び配列表の配列番号11記載の塩基配列を有する前記欠損配列用プライマーと対向するプライマーを含有することを特徴とする請求項5記載の組成物。

[8] 配列表の配列番号16、17いずれか記載の塩基配列を有するプローブを含有する事を特徴とする請求項6記載の組成物。

[9] 以下を含有することを特徴とする請求項1記載の方法のためのキット:

(1)EGFR遺伝子の欠損ジャンクション領域にアニーリング可能な欠損配列用プライマー、ここで当該欠損配列用プライマーの3'末端の塩基配列は当該欠損ジャンクションに隣接する3'側の非欠損部位由来の2から5塩基からなる塩基配列である、および

(2)(1)の欠損配列用プライマーと対向するプライマー、ここで当該プライマーは欠損変異及び正常遺伝子のいずれにもアニーリング可能なプライマーである。

[10] さらに、

(3)欠損部位を認識するプローブ、ならびに

(4)非欠損部位を認識するプローブ、を含有することを特徴とする請求項9記載のキット。

[11] 配列表の配列番号6～10のいずれか記載の塩基配列を有するプライマーから選択される欠損配列用プライマー及び配列表の配列番号11記載の塩基配列を有する前記欠損配列用プライマーと対向するプライマーを含有することを特徴とする請求項9記載のキット。

[12] 配列表の配列番号16、17いずれか記載の塩基配列を有するプローブを含有する事を特徴とする請求項10記載のキット。

[図1-1]

	740	750
	V K I P V A I K E L R E A T S P K A N K E I	
	2220 2230 2240 2250 2260 2270	
正常	GTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATC	
Del-1a	GTTAAAATTCCCGTCGCTATCAA-----AACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATC	
Del-1b	GTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAG-----ACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATC	
Del-3	GTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAGGAA-----CCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATC	
Del-4	GTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAGGAAT-----CGAAAGCCAACAAGGAAATC	
Del-5	GTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAGGA-----TCCGAAAGCCAACAAGGAAATC	
Del-2	GTTAAAATTCCCGTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACA-----	

	AGAGAAGCAACA	GAAAGCCAACAA
	プローブDF	プローブNH

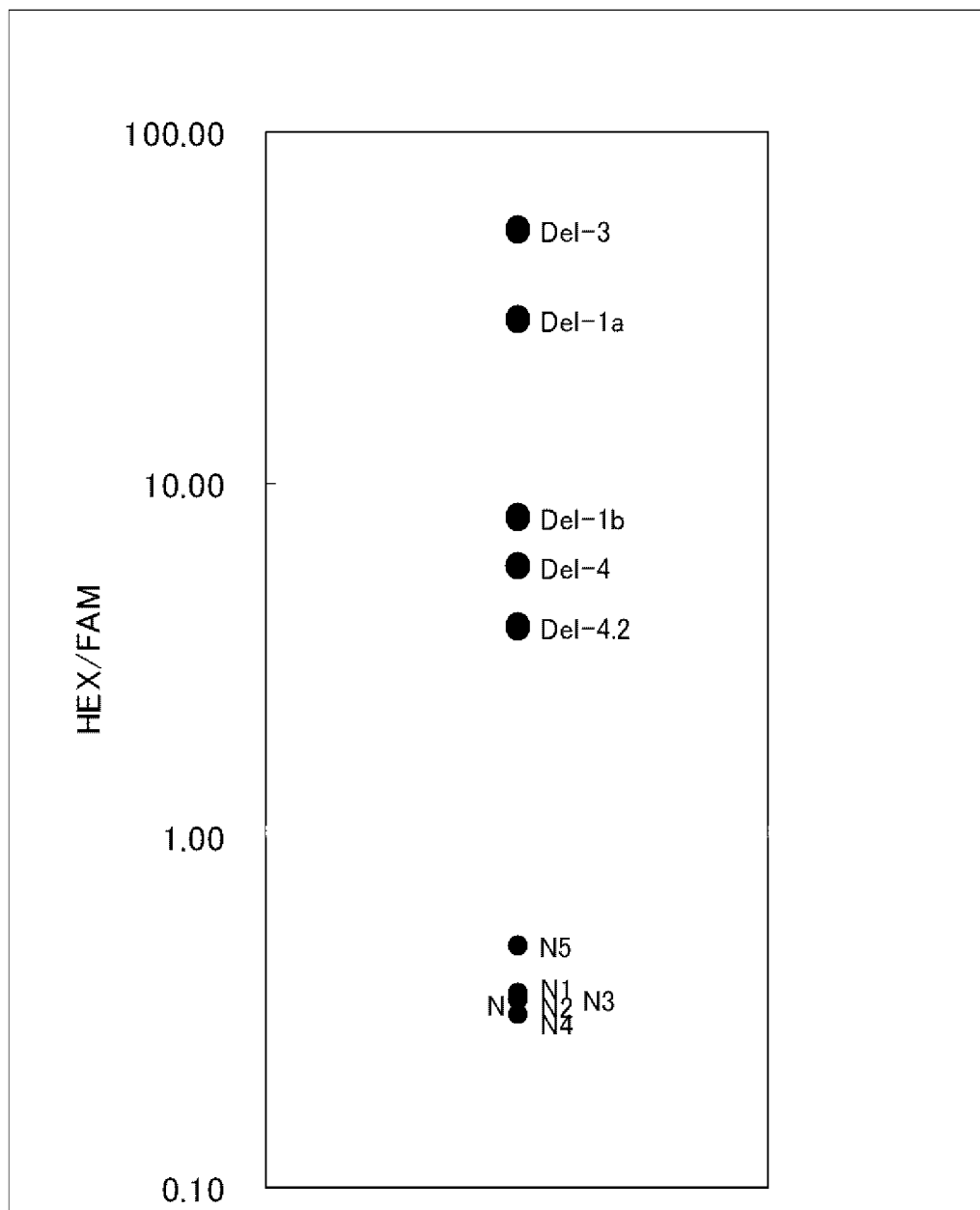
[図1-2]

	760
	L D
	2280
正常	CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-1a	CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-1b	CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-3	CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-4	CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-5	CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG
Del-2	CTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTG

3'-CACTCAAAGACGAAACGACAC-5'

下流プライマーRV

[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/023486

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01) , **C12N15/09**(2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68(2006.01) , **C12N15/09**(2006.01)

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)

CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN) , GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAO William et al., "EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib", 2004 Sep, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.101(36), pages 13306 to 13311	1-12
P, X	WO 2005/094357 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORP.) , 13 October, 2005 (13.10.05) , Full text (Family: none)	1-12

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 March, 2006 (02.03.06)Date of mailing of the international search report
14 March, 2006 (14.03.06)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12Q1/68 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	PAO William et al. "EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib", 2004 Sep, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.101(36), p.13306-13311	1-12
P, X	WO 2005/094357 A2 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2005.10.13 文献全体参照 (ファミリーなし)	1-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.03.2006

国際調査報告の発送日

14.03.2006

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4 N

9 4 5 1