

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】令和 4 年 1 月 6 日 (2022.1.6)

【公表番号】特表 2021-503943 (P2021-503943A)

【公表日】令和 3 年 2 月 15 日 (2021.2.15)

【年通号数】公開・登録公報 2021-007

【出願番号】特願 2020-529764 (P2020-529764)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6806 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 N 9/88 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/574 (2006.01)

C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6886 Z N A Z

C 1 2 Q 1/6806 Z

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 N 9/16 A

C 1 2 N 9/88

G 0 1 N 33/53 M

G 0 1 N 33/574 Z

C 1 2 Q 1/6851 Z

【手続補正書】

【提出日】令和 3 年 11 月 29 日 (2021.11.29)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象から得られた試料中における乳癌のスクリーニング方法であって、

1) メチル化特異的手法で DNA を修飾する試薬を用いて、ヒト個体の生体試料中のゲノム DNA を処理し；

選択された 4 ~ 14 個の遺伝子それぞれに対する特異的なプライマーのセットを使用して、処理されたゲノム DNA を増幅し；

ポリメラーゼ連鎖反応、核酸シーケンシング、質量分析、メチル化特異的ヌクレアーゼ、質量に基づく分離、及び標的捕捉からなる群から選択される技術によって、1 つ以上の遺伝子のメチル化レベルを決定する；

ことにより、ヒト個体の生体試料中における前記 4 ~ 14 個の遺伝子のメチル化レベルをアッセイすること；

ここで、前記 4 ~ 14 個の遺伝子は、CD1D、ITPRL1、FAM59B、C10orf125、TRIM67、SPHK2、CALN1\_\_B、CHST2\_\_B、MPZ、CXCL12\_\_B、ODC1\_\_B、OSR2\_\_A、TRH\_\_A、及び C17orf64\_\_B から選択されるアノテーションを有する染色体領域を含む、

ならびに、

2) 前記マーカーの前記メチル化状態が、乳癌を有しない対象でアッセイされたマーカーのメチル化状態とは異なる場合に、前記対象を、乳癌を有すると同定すること、を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記 DNA が、メチル化特異的手法で DNA を修飾する試薬で処理され、前記試薬が、メチル化感受性制限酵素、メチル化依存性制限酵素、亜硫酸水素塩、のうち 1 つ以上を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも 1 つのメチル化マーカー遺伝子量を測定することが、多重増幅、メチル化特異的 PCR、定量メチル化特異的 PCR、メチル化特異的 DNA 制限酵素分析、定量亜硫酸水素塩パイロシーケンシング、フラップエンドヌクレアーゼアッセイ、PCR フラップアッセイ、及び亜硫酸水素塩ゲノムシーケンシング PCR からなる群から選択される 1 つ以上の方法を使用することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記選択された 4 ~ 14 個の遺伝子それぞれに対する特異的なプライマーの前記セットが、

TRH\_\_A については、配列番号：245 及び 246 からなるプライマーのセット、MPZ については、配列番号：175 及び 176 ならびに配列番号：439 及び 440 からなる群から選択されるプライマーのセット、

ITPR1PL1 については、配列番号：97 及び 98、配列番号：99 及び 100 ならびに配列番号：425 及び 426 からなる群から選択されるプライマーのセット、

OSR2\_\_A については、配列番号：187 及び 188 からなるプライマーのセット、

CHST2\_\_B については、配列番号：39 及び 40 からなるプライマーのセット、

C17orf64\_\_B は、配列番号：269 及び 270 ならびに配列番号：449 及び 450 からなる群から選択されるプライマーのセット、

CXCL12\_\_B は、配列番号：289 及び 290 ならびに配列番号：441 及び 442 からなる群から選択されるプライマーのセット、

ODC1\_\_B については、配列番号：341 及び 342 ならびに配列番号：443 及び 444 からなる群から選択されるプライマーのセット、

CD1D については、配列番号：423 及び 424 からなるプライマーのセット、

FAM59B については、配列番号：427 及び 428 からなるプライマーのセット、

C10orf125 については、配列番号：429 及び 430 からなるプライマーのセット、

TRIM67 については、配列番号：431 及び 432 からなるプライマーのセット、

SPHK2 については、配列番号：433 及び 434 からなるプライマーのセット、ならびに

CALN1\_\_B については、配列番号：273 及び 274 からなるプライマーのセットからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記試料が、組織を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記組織が、乳房組織である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記試料が、血液、血清、または血漿である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

対象から得られた試料中におけるトリプルネガティブ乳癌のスクリーニング方法であって、

1) メチル化特異的手法で DNA を修飾する試薬を用いて、ヒト個体の生体試料中のゲノム DNA を処理し；

選択された 4 ～ 14 個の遺伝子それぞれに対する特異的なプライマーのセットを使用して、処理されたゲノム DNA を増幅し；

ポリメラーゼ連鎖反応、核酸シーケンシング、質量分析、メチル化特異的ヌクレアーゼ、質量に基づく分離、及び標的捕捉によって、1 つ以上の遺伝子のメチル化レベルを決定する；

ことにより、ヒト個体の生体試料中における前記 4 ～ 14 個の遺伝子のメチル化レベルをアッセイすること；

ここで、前記 4 ～ 14 個の遺伝子は、BHLHE23\_\_C、NACAD、ATP6V1B1、BANK1、DLX4、FOXP4、GP5、LMX1B\_\_A、STX16\_\_B、ABLM1、ZSCAN12、CXCL12、OTX1、MAX.chr17.73073682-73073814、MAX.chr20.1784209-1784461、LOC100132891、PRKCB、TRIM67、BHLHE23\_\_D、TRH\_\_A、DNM3\_\_A、PLXNC1\_\_A、MAX.chr12.4273906-4274012、CALN1\_\_A、ALOX5、MAX.chr19.46379903-46380197、ODC1、CHST2\_\_A、CHST2\_\_B、MAX.chr5.77268672-77268725、DSCR6、ITPR1PL1、IGF2BP3\_\_B、GRASP、ST8SIA4、MAX.chr11.14926602-14927148、UBTF、MPZ、MAX.chr12.4273906-4274012、MAX.chr5.77268672-77268725、C17orf64、EMX1\_\_A、CDH4\_\_E、SLC30A10、C10orf125、GYPC\_\_B、MAX.chr5.42994866-42994936、OSR2\_\_A、SCRT2\_\_B、MAX.chr5.145725410-145725459、MAX.chr11.68622869-68622968、MAX.chr8.124173030-124173395、KHLDC7B、TBX1、及びMAST1から選択されるアノテーションを有する染色体領域を含む、

ならびに、

2) 前記マーカーの前記メチル化状態が、乳癌を有しない対象でアッセイされたマーカーのメチル化状態とは異なる場合に、前記対象を、トリプルネガティブ乳癌を有すると同定すること、

を含む、前記方法。

#### **【請求項 9】**

前記 DNA が、メチル化特異的手法で DNA を修飾する試薬で処理され、前記試薬が、メチル化感受性制限酵素、メチル化依存性制限酵素、亜硫酸水素塩、のうち 1 つ以上を含む、請求項 8 に記載の方法。

#### **【請求項 10】**

少なくとも 1 つのメチル化マーカー遺伝子量を測定することが、多重増幅、メチル化特異的 PCR、定量メチル化特異的 PCR、メチル化特異的 DNA 制限酵素分析、定量亜硫酸水素塩パイロシーケンシング、フラップエンドヌクレアーゼアッセイ、PCR フラップアッセイ、及び亜硫酸水素塩ゲノムシーケンシング PCR からなる群から選択される 1 つ以上の方法を使用することを含む、請求項 8 に記載の方法。

#### **【請求項 11】**

前記選択された 4 ～ 14 個の遺伝子それぞれに対する特異的なプライマーの前記セットが、

BHLHE23\_\_C については、配列番号：19 及び 20 からなるプライマーのセット

、

NACAD については、配列番号：179 及び 180 からなるプライマーのセット、

ATP6V1B1 については、配列番号：13 及び 14 からなるプライマーのセット、

BANK1 については、配列番号：15 及び 16 からなるプライマーのセット、

DLX4 については、配列番号：51 及び 52 からなるプライマーのセット、

FOXP4 については、配列番号：73 及び 74 からなるプライマーのセット、

GP5については、配列番号：77及び78からなるプライマーのセット、  
LMX1B\_\_Aについては、配列番号：115及び116からなるプライマーのセット

、

STX16\_\_Bについては、配列番号：233及び234または配列番号：235及び236からなるプライマーのセット、

ABLM1については、配列番号：3及び4からなるプライマーのセット、  
ZSCAN12については、配列番号：251及び252からなるプライマーのセット

、

CXCL12については、配列番号：47及び48からなるプライマーのセット、  
OTX1については、配列番号：189及び190からなるプライマーのセット、  
MAX.chr17.73073682-73073814については、配列番号：141及び142からなるプライマーのセット、

MAX.chr20.1784209-1784461については、配列番号：151及び152ならびに配列番号：153及び154からなる群から選択されるプライマーのセット、

LOC100132891については、配列番号：117及び118または配列番号：119及び120からなる群から選択されるプライマーのセット、

PRKCBについては、配列番号：201及び202からなるプライマーのセット、  
TRIM67については、配列番号：247及び248からなるプライマーのセット、  
BHLHE23\_\_Dについては、配列番号：21及び22からなるプライマーのセット

、

TRH\_\_Aについては、配列番号：245及び246からなるプライマーのセット、  
DNM3\_\_Aについては、配列番号：55及び56からなるプライマーのセット、  
PLXNC1\_\_Aについては、配列番号：193及び194からなるプライマーのセット、

ト、

MAX.chr12.4273906-4274012については、配列番号：133及び134ならびに配列番号：135及び136からなる群から選択されるプライマーのセット、

CALN1\_\_Aについては、配列番号：29及び30からなるプライマーのセット、  
ALOX5については、配列番号：9及び10からなるプライマーのセット、  
MAX.chr19.46379903-46380197については、配列番号：145及び146ならびに配列番号：147及び148からなる群から選択されるプライマーのセット、

ODC1については、配列番号：181及び182、配列番号：183及び184、ならびに配列番号：185及び186からなるプライマーのセット、

CHST2\_\_Aについては、配列番号：37及び38からなるプライマーのセット、  
CHST2\_\_Bについては、配列番号：39及び40からなるプライマーのセット、  
MAX.chr5.77268672-77268725については、配列番号：161及び162からなるプライマーのセット、

DSCR6については、配列番号：57及び58からなるプライマーのセット、  
ITPRIPL1については、配列番号：97及び98、ならびに配列番号：99及び100からなる群から選択されるプライマーのセット、

IGF2BP3\_\_Bについては、配列番号：93及び94からなるプライマーのセット

、

GRASPについては、配列番号：253及び254からなるプライマーのセット、  
ST8SIA4については、配列番号：227及び228からなるプライマーのセット

、

MAX.chr11.14926602-14927148については、配列番号：129及び130からなるプライマーのセット、

UBTFについては、配列番号：249及び250からなるプライマーのセット、

M P Zについては、配列番号：1 7 5 及び 1 7 6 からなるプライマーのセット、  
M A X . c h r 1 2 . 4 2 7 3 9 0 6 - 4 2 7 4 0 1 2については、配列番号：1 3 3  
及び 1 3 4 ならびに配列番号：1 3 5 及び 1 3 6 からなる群から選択されるプライマーの  
セット、

M A X . c h r 5 . 7 7 2 6 8 6 7 2 - 7 7 2 6 8 7 2 5については、配列番号：1 6  
1 及び 1 6 2 からなるプライマーのセット、

C 1 7 o r f 6 4については、配列番号：2 5 及び 2 6 からなるプライマーのセット、  
E M X 1 \_ \_ Aについては、配列番号：6 1 及び 6 2 からなるプライマーのセット、  
C D H 4 \_ \_ Eについては、配列番号：3 5 及び 3 6 からなる群から選択されるプライマ  
ーのセット、

S L C 3 0 A 1 0については、配列番号：2 1 9 及び 2 2 0 からなるプライマーのセッ  
ト、

C 1 0 o r f 1 2 5については、配列番号：2 3 及び 2 4 からなるプライマーのセット  
、

G Y P C \_ \_ Bについては、配列番号：8 1 及び 8 2 からなるプライマーのセット、  
M A X . c h r 5 . 4 2 9 9 4 8 6 6 - 4 2 9 9 4 9 3 6については、配列番号：1 5  
9 及び 1 6 0 からなるプライマーのセット、

O S R 2 \_ \_ Aについては、配列番号：1 8 7 及び 1 8 8 からなるプライマーのセット、  
S C R T 2 \_ \_ Bについては、配列番号：2 1 1 及び 2 1 2 からなるプライマーのセット  
、

M A X . c h r 5 . 1 4 5 7 2 5 4 1 0 - 1 4 5 7 2 5 4 5 9については、配列番号：  
1 5 7 及び 1 5 8 からなるプライマーのセット、

M A X . c h r 1 1 . 6 8 6 2 2 8 6 9 - 6 8 6 2 2 9 6 8については、配列番号：1  
3 1 及び 1 3 2 からなるプライマーのセット、

M A X . c h r 8 . 1 2 4 1 7 3 0 3 0 - 1 2 4 1 7 3 3 9 5については、配列番号：  
1 6 5 及び 1 6 6 からなるプライマーのセット、

K H L D C 7 Bについては、配列番号：1 0 9 及び 1 1 0 からなるプライマーのセット  
、

T B X 1については、配列番号：2 3 9 及び 2 4 0 からなるプライマーのセット、なら  
びに

M A S T 1については、配列番号：1 2 5 及び 1 2 6 からなるプライマーのセットから  
なる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記試料が、組織を含む、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記組織が、乳房組織である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記試料が、血液、血清、または血漿である、請求項 8 に記載の方法。