

【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 12 Q	1/6886	(2018.01)
C 12 Q	1/6806	(2018.01)
C 12 Q	1/6869	(2018.01)
C 12 N	9/16	(2006.01)
C 12 N	9/88	(2006.01)
G 01 N	33/53	(2006.01)
G 01 N	33/574	(2006.01)
C 12 Q	1/6851	(2018.01)

【F I】

C 12 Q	1/6886	Z N A Z
C 12 Q	1/6806	Z
C 12 Q	1/6869	Z
C 12 N	9/16	A
C 12 N	9/88	
G 01 N	33/53	M
G 01 N	33/574	Z
C 12 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、ITPRIP1、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) 前記マーク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ク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つのメチル化マーク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、

T R H\_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、M P Z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、

I T P R I P L 1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、

O S R 2\_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、

C H S T 2\_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、

C 1 7 o r f 6 4\_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、

C X C L 1 2\_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、

O D C 1\_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、

C D 1 D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、

F A M 5 9 B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、

C 1 0 o r f 1 2 5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、

T R I M 6 7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、S P H K 2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

C A L N 1\_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つて、

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、ABLIM1、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、ITPRIP1、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、

G P 5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、

L M X 1 B \_ 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

S T X 1 6 \_ 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、

A B L I M 1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、

Z S C A N 1 2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

C X C L 1 2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、

O T X 1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、

M A X . c h r 1 7 . 7 3 0 7 3 6 8 2 - 7 3 0 7 3 8 1 4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、

M A X . c h r 2 0 . 1 7 8 4 2 0 9 - 1 7 8 4 4 6 1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、

L O C 1 0 0 1 3 2 8 9 1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、

P R K C B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、

T R I M 6 7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、

B H L H E 2 3 \_ 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

T R H \_ 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、

D N M 3 \_ 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、

P L X N C 1 \_ 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、

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：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、

C A L N 1 \_ 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、

A L O X 5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、

M A X . c h r 1 9 . 4 6 3 7 9 9 0 3 - 4 6 3 8 0 1 9 7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、

O D C 1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、

C H S T 2 \_ 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、

C H S T 2 \_ 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、

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：161及び162からなるプライマーのセット、

D S C R 6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、

I T P R I P L 1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、

I G F 2 B P 3 \_ 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

G R A S P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、

S T 8 S I A 4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

M A X . c h r 1 1 . 1 4 9 2 6 6 0 2 - 1 4 9 2 7 1 4 8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、

U B T F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。