

【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6年11月21日(2024.11.21)

【公開番号】特開2024-123233(P2024-123233A)

【公開日】令和6年9月10日(2024.9.10)

【年通号数】公開公報(特許)2024-170

【出願番号】特願2024-103130(P2024-103130)

【国際特許分類】

C 12 Q 1/6869(2018.01)

10

C 12 Q 1/6886(2018.01)

C 12 Q 1/686(2018.01)

【F I】

C 12 Q 1/6869 Z

C 12 Q 1/6886 ZZNA

C 12 Q 1/686 Z

C 12 Q 1/6886 Z

【手続補正書】

【提出日】令和6年11月12日(2024.11.12)

20

【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の肺腫瘍をスクリーニングする方法であって、以下：

a) 前記試料から抽出されたDNA中の少なくとも2種のメチル化マーカー遺伝子の量を測定すること、ここで、前記少なくとも2種のメチル化マーカー遺伝子は、IFFO1またはHOPXを含み、さらにBAXR1、FLJ45983、ZNF781およびSOBPから選択される少なくとも1種のメチル化マーカー遺伝子を含む；

b) 前記DNA中の少なくとも1種の参照マーカーの量を測定すること；及び

c) 前記DNA中で測定された前記少なくとも2種のメチル化マーカー遺伝子それぞれの前記量について、前記DNA中で測定された前記参照マーカーの前記量のパーセンテージとしての値を計算すること、ここで、前記値は、前記試料中で測定された前記少なくとも2種のメチル化マーカー遺伝子のメチル化状態を示す；及び

d) 前記少なくとも2種のメチル化マーカー遺伝子の少なくとも1つのメチル化状態が、肺腫瘍を有しない対象由来の試料中でアッセイしたメチル化マーカー遺伝子のメチル化状態と異なる場合に、前記対象が肺腫瘍を有すると特定すること、

を含む、前記方法。

【請求項2】

さらに以下：

i) 前記少なくとも2種のメチル化マーカー遺伝子は、2~15種のメチル化マーカー遺伝子からなる；

ii) 前記少なくとも2種のメチル化マーカー遺伝子は、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ZNF671、ST8SIA1、NKX2-6、FAM59B、DIDO1、MAX\_chr1.110、AGRIN、MAX\_chr10.226、ZMIZ1、MAX\_chr8.145、MAX\_chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50

40

50

、 P T G D R \_ 9 、 A N K R D 1 3 B 、 D O C K 2 、 M A X \_ c h r 1 9 . 1 6 3 、 Z N F 1 3 2 、 M A X . c h r 1 9 . 3 7 2 、 H O X A 9 、 T R H 、 S P 9 、 D M R T A 2 、 A R H G E F 4 、 C Y P 2 6 C 1 、 P T G D R 、 G R I N 2 D 、 M A T K 、 B C A T 1 、 P R K C B \_ 2 8 、 S T 8 S I A \_ 2 2 、 D L X 4 、 S H O X 2 、 E M X 1 、 H O X B 2 、 M A X . c h r 1 2 . 5 2 6 、 B C L 2 L 1 1 、 O P L A H 、 P A R P 1 5 、 K L H D C 7 B 、 S L C 1 2 A 8 、 B H L H E 2 3 、 C A P N 2 、 F G F 1 4 、 F L J 3 4 2 0 8 、 B I N 2 \_ Z 、 D N M T 3 A 、 F E R M T 3 、 N F I X 、 S 1 P R 4 、 S K I 、 S U C L G 2 、 T B X 1 5 、 Z D H H C 1 、 及び Z N F 3 2 9 からなる群より選択される 1 種または複数のメチル化マーカー遺伝子をさらに含む；

i i i ) 前記少なくとも 2 種のメチル化マーカー遺伝子は、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、 9 10

、 1 0 、 1 1 、または 1 2 種のメチル化マーカー遺伝子を含む；ならびに / または

i v ) 前記少なくとも 2 種のメチル化マーカー遺伝子は、さらに、 H O X A 9 、 H O X B 2 、 T R H 、及び F A M 5 9 B のうち 1 種または複数を含む；

v ) 前記少なくとも 2 種のメチル化マーカー遺伝子は、以下の群からなる：

a ) I F F O 1 または H O P X メチル化マーカー遺伝子、ならびに

b ) B A R X 1 、 F L J 4 5 9 8 3 、 H O X A 9 、 Z N F 7 8 1 、 H O X B 2 、 S O B P 、 T R H 、及び F A M 5 9 B メチル化マーカー遺伝子、

の、いずれか 1 つによって定義される、請求項 1 に記載の方法。

#### 【請求項 3】

前記少なくとも 2 種のメチル化マーカー遺伝子は、以下の群からなる、請求項 1 または 2 20 に記載の方法：

a ) I F F O 1 または H O P X メチル化マーカー遺伝子、ならびに

b ) B A R X 1 、 F L J 4 5 9 8 3 、 Z N F 7 8 1 および S O B P メチル化マーカー遺伝子。

#### 【請求項 4】

さらに以下：

i ) 前記少なくとも 1 種の参照マーカーは、 B 3 G A L T 6 の D N A 及び - アクチン D N A から選択される 1 種または複数の参照マーカーを含む；

i i ) 前記 D N A は、前記 D N A のメチル化状態に特異的な様式で D N A を選択的に修飾する試薬を用いて処理される；

i i i ) 前記試料は、血液、血清、血漿、及び痰のうち 1 種または複数を含む；

i v ) 前記 D N A は、前記試料から抽出される；

v ) 前記 D N A は、重亜硫酸塩試薬で処理されることにより、重亜硫酸塩処理した D N A を生成する；

v i ) 前記少なくとも 2 種のメチル化マーカー遺伝子の量を測定することは、ポリメラーゼ連鎖反応法、核酸シークエンシング、質量分析、メチル化特異的スクレアーゼ、質量による分離、多重増幅、及び標的捕捉のうち 1 種または複数を使用することを含む；ならびに / あるいは

v i i ) 前記少なくとも 2 種のメチル化マーカー遺伝子の前記量を測定することは、メチル化特異的 P C R 、定量的メチル化特異的 P C R 、メチル化特異的 D N A 制限酵素分析、定量的重亜硫酸塩パイロシークエンシング、フラップエンドスクレアーゼアッセイ、 P C R フラップアッセイ、及び重亜硫酸塩ゲノム配列決定 P C R からなる群より選択される 1 種または複数の方法を使用することを含む、

の、少なくともいずれか 1 つによって定義される、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 5】

前記試料は、血漿である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

#### 【請求項 6】

前記 D N A のメチル化状態に特異的な様式で D N A を選択的に修飾する前記試薬は、重亜硫酸塩試薬、メチル化感受性制限酵素、及び / またはメチル化依存性制限酵素を含む、請

求項 4 または 5 に記載の方法。

**【請求項 7】**

さらに以下：

a ) 前記対象から得られた試料中の少なくとも 1 種の RNA マーカーの量を測定すること；及び / または

b ) 前記対象から得られた試料中の少なくとも 1 種のタンパク質マーカーの有無をアッセイすること

のうち 1 つまたは複数を含む、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 8】**

試料中の少なくとも 1 種の RNA マーカーの量を測定することは、以下：

i ) 前記試料中の参照 RNA の量を測定すること；及び

i i ) 前記試料中で測定された前記少なくとも 1 種の RNA マーカーの前記量について、前記試料中で測定された参照 RNA の前記量のパーセンテージとしての値を計算すること、ここで、前記値は、前記試料中で測定された前記少なくとも 1 種の RNA マーカーの前記量を示し、前記試料中の前記少なくとも 1 種の RNA マーカーの前記量は、前記少なくとも 1 種の RNA マーカーの遺伝子の発現レベルを示す、

を含む、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記参照 RNA は、C A S C 3 の m RNA 、 - アクチンの m RNA 、 U 1 の s n RNA 、及び U 6 の s n RNA からなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。

10

20

**【請求項 10】**

前記少なくとも 1 種の RNA マーカーは、 m RNA を含む、請求項 7 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記 m RNA を含む前記少なくとも 1 種の RNA マーカーの遺伝子は、 G A G E 1 2 D 、 F A M 8 3 A 、 L R G 1 、 X A G E - 1 d 、 M A G E A 4 、 S F T P B 、 A K A P 4 、及び C Y P 2 4 A 1 からなる群より選択される、請求項 10 に記載の方法。

30

**【請求項 12】**

さらに以下：

i ) 前記タンパク質は、自己抗体である；

i i ) 前記タンパク質は、がん関連抗原である；

i i i ) 前記タンパク質は、がん関連抗原に対する抗体である；

i v ) 前記方法が、少なくとも 2 種のメチル化マーカー遺伝子の量を測定すること、 RNA マーカーの量を測定すること、及びタンパク質マーカーの有無をアッセイすることを含む；及び / または

v ) 前記測定すること及び前記アッセイすることは、前記対象から得られた単一試料で行われる、

の、少なくともいずれか 1 つによって定義される、請求項 7 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

**【請求項 13】**

キットであって、以下：

a ) 少なくとも 2 種のマーカープライマー対であって、以下：

i ) I F F O 1 マーカープライマー対、ここで、前記 I F F O 1 マーカープライマー対は、メチル化マーカー遺伝子 I F F O 1 の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズして当該メチル化マーカー遺伝子 I F F O 1 の少なくとも一部を増幅する、または H O P X マーカープライマー対、ここで、前記 H O P X マーカープライマー対は、メチル化マーカー遺伝子 H O P X の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズして当該メチル化マーカー遺伝子 H O P X の少なくとも一部を増幅する；ならびに

i i ) 1 種以上の追加マーカープライマー対、ここで、各追加マーカープライマー対は B A R X 1 、 F L J 4 5 9 8 3 、 Z N F 7 8 1 および S O B P から選択されるメチル化マーカー

50

カーディオノンの少なくとも一部分に特異的にハイブリダイズして当該メチル化マークー遺伝子の少なくとも一部分を増幅する、  
を含む、マークープライマー対、ならびに

b) 少なくとも1種の参照プライマー対、ここで、前記参照プライマー対は、参照核酸の少なくとも一部分に特異的にハイブリダイズして当該参照核酸の少なくとも一部分を増幅する、  
を含む、前記キット。

【請求項14】

以下を含む少なくとも3種のオリゴヌクレオチドプローブをさらに含む、請求項13に記載のキット：

10

a) 少なくとも2種のマークーオリゴヌクレオチドプローブであって、以下：  
i) IFFO1マークーオリゴヌクレオチドプローブ、ここで、前記IFFO1マークーオリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、メチル化マークー遺伝子IFFO1から増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする、またはHOPXマークーオリゴヌクレオチドプローブ、ここで、前記HOPXマークーオリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、メチル化マークー遺伝子HOPXから増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする；ならびに

i i) 1種以上の追加マークーオリゴヌクレオチドプローブ、ここで、各追加マークーオリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、BAX1、FLJ45983、ZNF781およびSOBPから選択されるメチル化マークー遺伝子から増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする；

20

を含む、マークーオリゴヌクレオチドプローブ、ならびに

b) 少なくとも1種の参照オリゴヌクレオチドプローブ、ここで、前記参照オリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、参照核酸から増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする。

【請求項15】

さらに以下：

i) LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.1  
24、RASSF1、ZNF671、ST8SIA1、NKX2-6、FAM59B、D  
IDO1、MAX.Chr1.110、AGRIN、MAX.chr10.226、ZMI  
Z1、MAX.chr8.145、MAX.chr10.225、PRDM14、ANG  
PT1、MAX.chr16.50、PTGDR\_9、ANKRD13B、DOCK2、  
MAX.chr19.163、ZNF132、MAX.chr19.372、HOXA9  
、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、GR  
IN2D、MATK、BCAT1、PRKCB\_28、ST8SIA\_22、DLX4、  
SHOX2、EMX1、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、O  
PLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12A8、BHLHE23、CAPN  
2、FGF14、FLJ34208、B3GALT6、BIN2\_Z、DNMT3A、F  
ERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、ZDHHC1  
、及びZNF329からなる群より選択されるメチル化マークー遺伝子から増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする、1種または複数の追加マークープライマー対をさらに含む；

30

i i) 少なくとも、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12種の追加マークープライマー対を含む；

i i i) 前記IFFO1、HOPXおよび追加マークープライマー対、ならびに／または前記参照プライマー対は、重亜硫酸塩処理したDNAから増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする；

40

i v) さらに、メチル化特異的制限酵素及び重亜硫酸塩試薬のうち1種または複数を含む；

v) 前記1種または複数の追加マークープライマー対は、HOXA9、HOXB2、TR

50

H、及びF A M 5 9 B からなる群より選択される異なるメチル化マークー遺伝子から増幅された核酸にそれぞれ特異的にハイブリダイズする；

v i ) 前記1種または複数の追加マークープライマー対は、B A R X 1、F L J 4 5 9 8 3、H O X A 9、Z N F 7 8 1、H O X B 2、S O B P、T R H、及びF A M 5 9 B からなるメチル化マークー遺伝子の群から増幅された核酸にそれぞれ特異的にハイブリダイズする、マークープライマー対の群からなる；

ならびに／あるいは

v i i ) さらに、固相支持体を含む、

の、少なくともいずれか1つによって定義される、請求項13または14に記載のキット

10

【請求項16】

前記固相支持体は、さらに以下：

i ) 磁気ビーズである；

i i ) 1種または複数の捕捉試薬を含む；及び／あるいは

i i i ) 1種または複数の前記メチル化マークー遺伝子と相補的なオリゴヌクレオチドを含む、捕捉試薬を含む、

ことを特徴とする、請求項15に記載のキット。

【請求項17】

以下を含む反応混合物を含む組成物：

a ) 少なくとも2種のマークーオリゴヌクレオチドプローブであって、以下：

i ) I F F O 1マークーオリゴヌクレオチドプローブ、ここで、前記I F F O 1マークーオリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、メチル化マークー遺伝子I F F O 1の少なくとも一部分に特異的にハイブリダイズして当該メチル化マークー遺伝子I F F O 1の少なくとも一部分を増幅するプライマー対を使用することによりメチル化マークー遺伝子I F F O 1から増幅された核酸に、特異的にハイブリダイズする；またはH O P Xマークーオリゴヌクレオチドプローブ、ここで、前記H O P Xマークーオリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、メチル化マークー遺伝子H O P Xの少なくとも一部分に特異的にハイブリダイズして当該メチル化マークー遺伝子H O P Xの少なくとも一部分を増幅するプライマー対を使用することによりメチル化マークー遺伝子H O P Xから増幅された核酸に、特異的にハイブリダイズする；ならびに

i i ) 1種以上の追加マークーオリゴヌクレオチドプローブ、ここで、各追加マークーオリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、B A R X 1、F L J 4 5 9 8 3、Z N F 7 8 1およびS O B Pから選択される異なるメチル化マークー遺伝子から増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする；

を含む、マークーオリゴヌクレオチドプローブ、ならびに

b ) 少なくとも1種の参照オリゴヌクレオチドプローブ、ここで、前記参照オリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、参照核酸から増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする；

c ) 以下から選択される少なくとも1種のメチル化マークー複合体：

i ) メチル化マークー遺伝子I F F O 1から増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする前記I F F O 1マークーオリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分を含む、I F F O 1複合体；

i i ) メチル化マークー遺伝子H O P Xから増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする前記H O P Xマークーオリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分を含む、H O P X複合体；ならびに

i i i ) B A R X 1、F L J 4 5 9 8 3、Z N F 7 8 1およびS O B Pから選択されるメチル化マークー遺伝子から増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする追加マークーオリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分を含む、マークー複合体；ならびに

d ) 前記参照核酸から増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする前記参照オリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分を含む、参照複合体。

20

30

40

50

## 【請求項 18】

マーカーオリゴヌクレオチドプローブを含む少なくとも1種の追加マーカー複合体をさらに含む、請求項17に記載の組成物であって、当該マーカーオリゴヌクレオチドプローブは、LOC100129726、SPOCK2、TSC22D4、MAX.chr8.124、RASSF1、ZNF671、ST8SIA1、NKX2-6、FAM59B、DIDO1、MAX.Chr1.110、AGRIN、MAX.chr10.226、ZMZ1、MAX.chr8.145、MAX.chr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAX.chr16.50、PTGDR\_9、ANKRD13B、DOCK2、MAX.chr19.163、ZNF132、MAX.chr19.372、HOXA9、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、GRIN2D、MATK、BCAT1、PRKCB\_28、ST8SIA\_22、DLX4、SHOX2、EMX1、HOXB2、MAX.chr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12a、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、B3GALT6、BIN2\_Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、ZDHHC1、ZNF329からなる群より選択されるメチル化マーカー遺伝子の少なくとも一部分に特異的にハイブリダイズして少なくとも一部分を増幅するプライマー対の使用によりメチル化マーカー遺伝子から増幅された核酸に、特異的にハイブリダイズする、組成物。

## 【請求項 19】

前記少なくとも1種の追加メチル化マーカー遺伝子は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12種の追加メチル化マーカー遺伝子を含む、請求項18に記載の組成物。

## 【請求項 20】

前記メチル化マーカー遺伝子は、重亜硫酸塩変換したメチル化マーカーDNAを含む、請求項17から19のいずれか1項に記載の組成物。

## 【請求項 21】

以下を含む、請求項17から20のいずれか1項に記載の組成物：

i) 配列番号412もしくはその相補配列、または配列番号426もしくはその相補配列を含むメチル化マーカー遺伝子；ならびに

ii) 配列番号21、131、292、371、およびそれらの相補配列からなる群より選択される核酸配列を含む、少なくとも1種のメチル化マーカー遺伝子。

## 【請求項 22】

配列番号1、6、11、16、21、28、33、38、43、48、53、58、63、68、73、78、86、91、96、101、106、111、116、121、126、131、136、141、146、151、156、161、166、171、176、181、186、191、196、201、214、219、224、229、234、239、247、252、257、262、267、272、277、282、287、292、298、303、308、313、319、327、336、341、346、351、356、361、366、371、384、及び403、ならびにそれらの相補配列からなる群より選択される核酸配列を含む、少なくとも1種のメチル化マーカー遺伝子をさらに含む、請求項21に記載の組成物。

## 【請求項 23】

以下を含む、請求項17から19のいずれか1項に記載の組成物：

i) 配列番号413もしくはその相補配列、または配列番号427もしくはその相補配列を含む重亜硫酸塩変換したメチル化マーカーDNA；ならびに

ii) 配列番号22、132、293、372、およびそれらの相補配列からなる群より選択される核酸配列を含む、少なくとも1種の重亜硫酸塩変換したメチル化マーカーDNA。

## 【請求項 24】

配列番号2、7、12、17、29、34、39、44、49、54、59、64、69

、 7 4 、 7 9 、 8 7 、 9 2 、 9 7 、 1 0 2 、 1 0 7 、 1 1 2 、 1 1 7 、 1 2 2 、 1 2 7 、  
1 3 7 、 1 4 2 、 1 4 7 、 1 5 2 、 1 5 7 、 1 6 2 、 1 6 7 、 1 7 2 、 1 7 7 、 1 8 2 、  
1 8 7 、 1 9 2 、 1 9 7 、 2 0 2 、 2 1 0 、 2 1 5 、 2 2 0 、 2 2 5 、 2 3 0 、 2 3 5 、  
2 4 0 、 2 4 8 、 2 5 3 、 2 5 8 、 2 6 3 、 2 6 8 、 2 7 3 、 2 7 8 、 2 8 3 、 2 8 8 、  
2 9 9 、 3 0 4 、 3 0 9 、 3 1 4 、 3 2 0 、 3 2 8 、 3 3 7 、 3 4 2 、 3 4 7 、 3 5 2 、  
3 5 7 、 3 6 2 、 3 6 7 、 3 8 5 、 及び 4 0 4 、 ならびにそれらの相補配列からなる群より選択される核酸配列を含む、少なくとも 1 種の重亜硫酸塩変換したメチル化マーク - D N A をさらに含む、請求項 2 3 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

さらに以下：

10

i ) 前記マーク - オリゴヌクレオチドプローブはそれぞれ、レポーター分子を含む；  
i i ) 前記マーク - オリゴヌクレオチドプローブのうち 1 種または複数は、フラップ配列を含む； ならびに / あるいは  
i i i ) さらに、F R E T カセット、F E N - 1 エンドヌクレアーゼ、及び熱安定性 D N A ポリメラーゼのうち 1 種または複数を含む、  
の、少なくともいずれか 1 つによって定義される、請求項 1 7 から 2 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 2 6】

前記レポーター分子は、フルオロフォアを含む、請求項 2 5 に記載の組成物。

20

30

40

50