

【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 1 2 Q 1/6869(2018.01)

10

C 1 2 Q 1/6886(2018.01)

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/6869 Z

C 1 2 Q 1/6886 Z Z N A

C 1 2 Q 1/686 Z

C 1 2 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、I F F O 1 または H O P X を含み、さらに 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 から選択される少なくとも 1 種のメチル化マーカー遺伝子を含む；

30

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、

40

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；

i i) 前記少なくとも 2 種のメチル化マーカー遺伝子は、L O C 1 0 0 1 2 9 7 2 6、S P O C K 2、T S C 2 2 D 4、M A X . c h r 8 . 1 2 4、R A S S F 1、Z N F 6 7 1、S T 8 S I A 1、N K X 2 - 6、F A M 5 9 B、D I D O 1、M A X _ C h r 1 . 1 1 0、A G R N、M A X _ c h r 1 0 . 2 2 6、Z M I Z 1、M A X _ c h r 8 . 1 4 5、M A X _ c h r 1 0 . 2 2 5、P R D M 1 4、A N G P T 1、M A X . c h r 1 6 . 5 0

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、SLC12A8、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、BIN2 Z、DNMT3A、FERMT3、NFIIX、S1PR4、SKI、SUCLG2、TBX15、ZDHHC1、及び ZNF329 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；

iii) 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、11、または 12 種のメチル化マーカー遺伝子を含む； ならびに / または

iv) 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、HOXA9、HOXB2、TRH、及び FAM59B 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) IFFO1 または HOPX メチル化マーカー遺伝子、ならびに

b) BARX1、FLJ45983、HOXA9、ZNF781、HOXB2、SOBP、TRH、及び FAM59B 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。

10

20

30

40

50

【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 に記載の方法；

a) IFFO1 または HOPX メチル化マーカー遺伝子、ならびに

b) BARX1、FLJ45983、ZNF781 および SOBP 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、B3GALT6 の DNA 及び - アクチン DNA から選択される 1 種または複数の参照マーカーを含む；

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

iii) 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；

iv) 前記 DNA は、前記試料から抽出される；

v) 前記 DNA 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 DNA を生成する；

vi) 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

vii) 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 PCR、定量的メチル化特異的 PCR、メチル化特異的 DNA 制限酵素分析、定量的重亜硫酸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、及び重亜硫酸塩ゲノム配列決定 PCR 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 DNA のメチル化状態に特異的な様式で DNA 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。

10

【請求項 9】

前記参照 RNA は、CASC3 の mRNA、 α -アクチンの mRNA、U1 の snRNA、及び U6 の snRNA からなる群より選択される、請求項 8 に記載の方法。

20

【請求項 10】

前記少なくとも 1 種の RNA マーカーは、mRNA 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 mRNA を含む前記少なくとも 1 種の RNA マーカーの遺伝子は、GAGE12D、FAM83A、LRG1、XAGE-1d、MAGEA4、SFTPB、AKAP4、及び CYP24A1 からなる群より選択される、請求項 10 に記載の方法。

【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。

30

【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) IFFO1 マーカープライマー対、ここで、前記 IFFO1 マーカープライマー対は、メチル化マーカー遺伝子 IFFO1 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カー遺伝子 IFFO1 の少なくとも一部分を増幅する、または HOPX マーカープライマー対、ここで、前記 HOPX マーカープライマー対は、メチル化マーカー遺伝子 HOPX 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カー遺伝子 HOPX の少なくとも一部分を増幅する；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 BARX1、FLJ45983、ZNF781 および SOBP から選択されるメチル化マ-

40

50

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当該メチル化マーカ－遺伝子の少なくとも一部分を増幅する、

を含む、マーカ－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：

a) 少なくとも2種のマーカ－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マーカ－オリゴヌクレオチドプローブ、ここで、前記I F F O 1マーカ－オリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、メチル化マーカ－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マーカ－オリゴヌクレオチドプローブ、ここで、前記H O P Xマーカ－オリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、メチル化マーカ－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種以上の追加マーカ－オリゴヌクレオチドプローブ、ここで、各追加マーカ－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から選択されるメチル化マーカ－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、マーカ－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) L O C 1 0 0 1 2 9 7 2 6、S P O C K 2、T S C 2 2 D 4、M A X . c h r 8 . 1 2 4、R A S S F 1、Z N F 6 7 1、S T 8 S I A 1、N K X 2 - 6、F A M 5 9 B、D I D O 1、M A X _ C h r 1 . 1 1 0、A G R N、M A X _ c h r 1 0 . 2 2 6、Z M I Z 1、M A X _ c h r 8 . 1 4 5、M A X _ c h r 1 0 . 2 2 5、P R D M 1 4、A N G P T 1、M A X . c h r 1 6 . 5 0、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 3 G A L T 6、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メチル化マーカ－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カ－プライマー対をさらに含む；

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

i i i) 前記I F F O 1、H O P Xおよび追加マーカ－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D N Aから増幅された核酸に特異的にハイブリダイズする；

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カ－プライマー対は、H O X A 9、H O X B 2、T R

10

20

30

40

50

H、及びFAM59Bからなる群より選択される異なるメチル化マーカ―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カ―プライマー対は、BARX1、FLJ45983、HOXA9、ZNF781、HOXB2、SOBP、TRH、及びFAM59Bからなるメチル化マーカ―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、マーカ―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カ―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種のマーカ―オリゴヌクレオチドプローブであって、以下：

i) IFFO1マーカ―オリゴヌクレオチドプローブ、ここで、前記IFFO1マーカ―オリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、メチル化マーカ―遺伝子IFFO1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カ―遺伝子IFFO1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カ―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マーカ―オリゴヌクレオチドプローブ、ここで、前記HOPXマーカ―オリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、メチル化マーカ―遺伝子HOPX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カ―遺伝子HOPX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カ―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

20

i i) 1種以上の追加マーカ―オリゴヌクレオチドプローブ、ここで、各追加マーカ―オリゴヌクレオチドプローブの少なくとも一部分は、BARX1、FLJ45983、ZNF781およびSOBPから選択される異なるメチル化マーカ―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；

30

を含む、マーカ―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種のメチル化マーカ―複合体：

i) メチル化マーカ―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前記IFFO1マーカ―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、IFFO1複合体；

40

i i) メチル化マーカ―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前記HOPXマーカ―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、HOPX複合体；ならびに

i i i) BARX1、FLJ45983、ZNF781およびSOBPから選択されるメチル化マーカ―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カ―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、マーカ―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。

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、MAXchr8.124、RASSF1、ZNF671、ST8SIA1、NKX2-6、FAM59B、DIDO1、MAXchr1.110、AGRN、MAXchr10.226、ZMIZ1、MAXchr8.145、MAXchr10.225、PRDM14、ANGPT1、MAXchr16.50、PTGDR9、ANKRD13B、DOCK2、MAXchr19.163、ZNF132、MAXchr19.372、HOXA9、TRH、SP9、DMRTA2、ARHGEF4、CYP26C1、PTGDR、GRIN2D、MATK、BCAT1、PRKCB28、ST8SIA22、DLX4、SHOX2、EMX1、HOXB2、MAXchr12.526、BCL2L11、OPLAH、PARP15、KLHDC7B、SLC12a、BHLHE23、CAPN2、FGF14、FLJ34208、B3GALT6、BIN2Z、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

、 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カー-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) 前記マーカー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) 前記マーカー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、FRET カセット、FEN - 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