

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-526370

(P2021-526370A)

(43) 公表日 令和3年10月7日(2021.10.7)

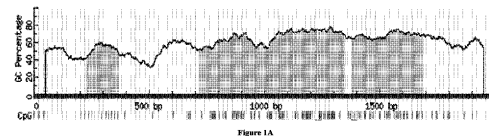
(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	2 G 0 4 5
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	M 4 B 0 6 3
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574	Z 4 C 0 8 4
G O 1 N 33/542 (2006.01)	G O 1 N 33/542	A
G O 1 N 33/72 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 81 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-564893 (P2020-564893)	(71) 出願人	519295247
(86) (22) 出願日	令和1年5月23日 (2019.5.23)		杭州諾輝健康科技有限公司
(85) 翻訳文提出日	令和3年1月14日 (2021.1.14)		HANGZHOU NEW HORIZO
(86) 国際出願番号	PCT/US2019/033831		N HEALTH TECHNOLOGY
(87) 国際公開番号	W02019/226942		CO., LTD.
(87) 国際公開日	令和1年11月28日 (2019.11.28)		中華人民共和国310000浙江省杭州市
(31) 優先権主張番号	201810502359.7		滨江区江二路400号和瑞科技园T1-1
(32) 優先日	平成30年5月23日 (2018.5.23)		3層
(33) 優先権主張国・地域又は機関			13/F Building T1, H
	中国 (CN)		erui Technology Squ
(31) 優先権主張番号	201810502387.9		are No. 400, Jiang'
(32) 優先日	平成30年5月23日 (2018.5.23)		er Road, Binjiang D
(33) 優先権主張国・地域又は機関			istrict, Hangzhou,
	中国 (CN)		Zhejiang 310000, Ch
			ina
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 大腸がんおよび進行腺腫をスクリーニングするためのキットおよびその応用

(57) 【要約】

本発明は、必要とする患者においてBMP3遺伝子およびNDRG4遺伝子のメチル化状態およびレベルを決定するために使用され得る定量PCRを行うためのプライマーおよびプローブの組合せを提供し、これは必要とする患者における大腸がん(CRC)および/または進行腺腫(AA)の有無を診断するための驚くほど高い診断の特異度および感度をもたらす。診断を行うための組成物および方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む、必要とする患者において大腸がん（CRC）または進行腺腫（AA）の有無を検出するためのキット：

a) 患者から得られた生体試料中の BMP 3 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための第 1 のプライマー対および第 1 のプローブ、ここで第 1 のプライマー対および第 1 のプローブはそれぞれ配列番号 1 と同一であるか、相補的であるか、またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする少なくとも 16 ヌクレオチドの連続した配列を含む、

b) 患者から得られた生体試料中の NDRG 4 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための第 2 のプライマー対および第 2 のプローブ、ここで第 2 のプライマー対および第 2 のプローブはそれぞれ配列番号 2 と同一であるか、相補的であるか、またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする少なくとも 16 ヌクレオチドの連続した配列を含む。

【請求項 2】

第 1 のプライマー対および第 1 のプローブが以下からなる群から選択される、請求項 1 記載のキット：

i) 配列番号 3 を含む順方向プライマー、配列番号 4 を含む逆方向プライマー、および配列番号 5 を含むプローブ；

ii) 配列番号 9 を含む順方向プライマー、配列番号 10 を含む逆方向プライマー、および配列番号 11 を含むプローブ；ならびに

iii) 配列番号 15 を含む順方向プライマー、配列番号 16 を含む逆方向プライマー、および配列番号 17 を含むプローブ；

ここで、第 2 のプライマー対および第 2 のプローブは以下からなる群から選択される：

iv) 配列番号 6 を含む順方向プライマー、配列番号 7 を含む逆方向プライマー、および配列番号 8 を含むプローブ；

v) 配列番号 12 を含む順方向プライマー、配列番号 13 を含む逆方向プライマー、および配列番号 14 を含むプローブ；ならびに

vi) 配列番号 18 を含む順方向プライマー、配列番号 19 を含む逆方向プライマー、および配列番号 20 を含むプローブ。

【請求項 3】

以下を含む、請求項 1 記載のキット：

i) 患者から得られた生体試料中の BMP 3 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 3 を含む順方向プライマー、配列番号 4 を含む逆方向プライマー、および配列番号 5 を含むプローブ、ならびに

ii) 患者から得られた生体試料中の NDRG 4 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 6 を含む順方向プライマー、配列番号 7 を含む逆方向プライマー、および配列番号 8 を含むプローブ。

【請求項 4】

以下を含む、請求項 1 記載のキット：

i) 患者から得られた生体試料中の BMP 3 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 9 を含む順方向プライマー、配列番号 10 を含む逆方向プライマー、および配列番号 11 を含むプローブ、ならびに

ii) 患者から得られた生体試料中の NDRG 4 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 12 を含む順方向プライマー、配列番号 13 を含む逆方向プライマー、および配列番号 14 を含むプローブ。

【請求項 5】

以下を含む、請求項 1 記載のキット：

i) 患者から得られた生体試料中の BMP 3 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレ

10

20

30

40

50

オチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 15 を含む順方向プライマー、配列番号 16 を含む逆方向プライマー、および配列番号 17 を含むプローブ、ならびに

i i) 患者から得られた生体試料中の N D R G 4 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 18 を含む順方向プライマー、配列番号 19 を含む逆方向プライマー、および配列番号 20 を含むプローブ。

【請求項 6】

第 1 のプローブおよび第 2 のプローブがともに蛍光ドナーおよびアクセプターフルオロフォアを含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載のキット。

【請求項 7】

第 1 のプローブおよび第 2 のプローブが T A Q M A N (登録商標) プローブである、請求項 6 記載のキット。

【請求項 8】

以下をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載のキット：

(1) 患者における K R A S 遺伝子の少なくとも 1 つの変異の有無を検出するための手段；および

(2) 患者から得られた生体試料中のヘモグロビンの有無を検出するための手段。

【請求項 9】

患者における K R A S 遺伝子の少なくとも 1 つの変異の有無を検出するための手段が、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) において K R A S 遺伝子のエクソン 12 および / またはエクソン 13 領域を増幅できる少なくとも 1 つのプライマー対を含む、請求項 8 記載のキット。

【請求項 10】

生体試料中のヘモグロビンの有無を検出するための手段が抗ヘモグロビン抗体を含む、請求項 8 記載のキット。

【請求項 11】

プライマーが、G 1 2 D、G 1 2 V、G 1 2 C、G 1 3 D、G 1 2 A、G 1 2 R、G 1 2 S および G 1 3 C からなる群から選択される少なくとも 1 つの K R A S 変異を含む K R A S 遺伝子領域を増幅できる、請求項 9 記載のキット。

【請求項 12】

抗体が金コロイド標識抗体である、請求項 10 記載のキット。

【請求項 13】

定量化のための参照遺伝子を増幅する手段をさらに含む、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載のキット。

【請求項 14】

キットを用いて得られた検査結果の使用および / または解釈のための説明書をさらに含む、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載のキット。

【請求項 15】

生体試料中の抗体およびヘモグロビンによって形成された複合体を検出する手段をさらに含む、請求項 10 記載のキット。

【請求項 16】

患者から得られた生体試料が便試料である、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載のキット。

【請求項 17】

重亜硫酸試薬、ならびに重亜硫酸試薬および患者の生体試料または生体試料から得られたポリヌクレオチドを混合するのに適した容器をさらに含む、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載のキット。

【請求項 18】

メチル化感受性制限酵素試薬をさらに含む、請求項 1 ~ 17 のいずれかに記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

以下をさらに含む、請求項 1 ～ 18 のいずれかに記載のキット：

(1) 生体試料中の BMP 3 メチル化を検出するための陽性標準および陰性標準、ならびに

(2) 生体試料中の NDRG 4 メチル化を検出するための陽性標準および陰性標準。

【請求項 20】

請求項 19 記載のキット、ここで BMP 3 メチル化を検出するための陽性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

G T T A G T T T G G T C G G G T G T T T T T A A A A T A A A G C G A G G A G G
G A A G G T A T A G A T A G A T T T T G A A A A T A T T C G G G T T A T A T A C 10
G T C G C G A T T T A T A G T T T T T T T T A G C G T T G G A G T G G A G A C
G G C G T T C G T A G C G T T T T G C G C G G G T G A G G T T C G C G T A G T T
G T T G G G G A A G A G T T T A T T T G T T A G G T T G C G T T G G G T T A G C
G T A G T A A G T G G G G T T G G T C G T T A T T T C G T T G T A T T C G G T C
G C G T T T C G G G T T T C G T G C G T T T T C G T T T T A G (配列番号 67)；

BMP 3 メチル化を検出するための陰性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

G T T A G T T T G G T T G G G T G T T T T T A A A A T A A A G T G A G G A G G
G A A G G T A T A G A T A G A T T T T G A A A A T A T T T G G G T T A T A T A T
G T T G T G A T T T A T A G T T T T T T T T T A G T G T T G G A G T G G A G A T
G G T G T T T G T A G T G T T T T G T G T G G G T G A G G T T T G T G T A G T T 20
G T T G G G G A A G A G T T T A T T T G T T A G G T T G T G T T G G G T T A G T
G T A G T A A G T G G G G T T G G T T G T T A T T T T G T T G T A T T T G G T T
G T G T T T T G G G T T T T G T G T G T T T T T G T T T T A G (配列番号 68)；

NDRG 4 メチル化を検出するための陽性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

T G A G A A G T C G G C G G G G G C G C G G A T C G A T C G G G G T G T T T T T
T A G G T T T C G C G T C G C G G T T T T C G T T C G T T T T T T C G T T C G T
T T A T C G G G T A T T T T A G T C G C G T A G A A G G C G G A A G T T A C G C
G C G A G G G A T C G C G G T T C G T T C G G G A T T A G T T T T A G G T T C G
G T A T C G T T T C G C G G G T C G A G C G T T T A T A T T C G T T A A A T T T 30
A C G C G G G T A C G T T T T C G C G G C G T A T C G T T T T T A G T T (配列番号 69)；および

NDRG 4 メチル化を検出するための陰性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

T G A G A A G T T G G T G G G G G T G T G G A T T G A T T G G G G T G T T T T T
T A G G T T T T G T G T T G T G G T T T T T G T T T G T T T T T T T G T T T G T
T T A T T G G G T A T T T T A G T T G T G T A G A A G G T G G A A G T T A T G T
G T G A G G G A T T G T G G T T T G T T T G G G A T T A G T T T T A G G T T T G
G T A T T G T T T T G T G G G T T G A G T G T T T A T A T T T G T T A A A T T T
A T G T G G G T A T G T T T T T G T G G T G T A T T G T T T T T A G T T (配列番号 70)。

【請求項 21】

内部標準遺伝子を増幅するための手段が、陽性対照遺伝子および/または陰性対照遺伝子を増幅するためのプライマーを含む、請求項 13 記載のキット。

【請求項 22】

以下を含む、必要とする患者における大腸がん (CRC) または進行腺腫 (AA) の有無を検出する方法：

a) 患者の生体試料からゲノム DNA を取得する；

b) a) のゲノム DNA またはその断片を 1 以上の試薬で処理し、メチル化されていないシトシン塩基をウラシルまたはハイブリダイゼーションの特性に関してシトシンとは検 50

出可能に異なる別の塩基に変換する；

c) 処理されたゲノムDNAまたは処理されたその断片を、患者における骨形成タンパク質3 (BMP3) をコードする遺伝子のメチル化部位の有無を検出するための第1のプライマー対、および患者におけるNDRGファミリーメンバー4タンパク質 (NDRG4) をコードする遺伝子のメチル化部位の有無を検出するための第2のプライマー対と接触させる、ここで第1のプライマー対は配列番号1と同一であるか、相補的であるか、またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする少なくとも9ヌクレオチドの連続した配列を含み、第2のプライマー対は配列番号2と相補的であるか、またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする少なくとも9ヌクレオチドの連続した配列を含み、処理されたゲノムDNAまたはその断片は第1のプライマー対または第2のプライマー対によって少なくとも1つの増幅物を生成するように増幅されるか、または増幅されない；および

d) 前記増幅物の有無、患者におけるBMP3遺伝子およびNDRG4遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルに基づいて、患者におけるCRCまたはAAの有無を判定する。

【請求項23】

第1のプライマー対および第1のプローブが以下からなる群から選択される、請求項22記載の方法：

i) 配列番号3を含む順方向プライマー、配列番号4を含む逆方向プライマー、および配列番号5を含むプローブ；

ii) 配列番号9を含む順方向プライマー、配列番号10を含む逆方向プライマー、および配列番号11を含むプローブ；ならびに

iii) 配列番号15を含む順方向プライマー、配列番号16を含む逆方向プライマー、および配列番号17を含むプローブ；

ここで、第2のプライマー対および第2のプローブは以下からなる群から選択される：

iv) 配列番号6を含む順方向プライマー、配列番号7を含む逆方向プライマー、および配列番号8を含むプローブ；

v) 配列番号12を含む順方向プライマー、配列番号13を含む逆方向プライマー、および配列番号14を含むプローブ；ならびに

vi) 配列番号18を含む順方向プライマー、配列番号19を含む逆方向プライマー、および配列番号20を含むプローブ。

【請求項24】

以下を用いることを含む、請求項22記載の方法：

i) 患者から得られた生体試料中のBMP3遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号3を含む順方向プライマー、配列番号4を含む逆方向プライマー、および配列番号5を含むプローブ、ならびに

ii) 患者から得られた生体試料中のNDRG4遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号6を含む順方向プライマー、配列番号7を含む逆方向プライマー、および配列番号8を含むプローブ。

【請求項25】

以下を用いることを含む、請求項22記載の方法：

i) 患者から得られた生体試料中のBMP3遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号9を含む順方向プライマー、配列番号10を含む逆方向プライマー、および配列番号11を含むプローブ、ならびに

ii) 患者から得られた生体試料中のNDRG4遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号12を含む順方向プライマー、配列番号13を含む逆方向プライマー、および配列番号14を含むプローブ。

【請求項26】

以下を用いることを含む、請求項22記載の方法：

10

20

30

40

50

i) 患者から得られた生体試料中の B M P 3 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 1 5 を含む順方向プライマー、配列番号 1 6 を含む逆方向プライマー、および配列番号 1 7 を含むプローブ、ならびに

i i) 患者から得られた生体試料中の N D R G 4 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 1 8 を含む順方向プライマー、配列番号 1 9 を含む逆方向プライマー、および配列番号 2 0 を含むプローブ。

【請求項 2 7】

第 1 のプローブおよび第 2 のプローブがともに蛍光ドナーおよびアクセプターフルオロフォアを含む、請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 2 8】

第 1 のプローブおよび第 2 のプローブが T A Q M A N (登録商標) プローブである、請求項 2 2 ~ 2 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 9】

患者から得られた生体試料中の K R A S 遺伝子の少なくとも 1 つの変異の有無を検出する工程、および患者から得られた生体試料中のヘモグロビンの有無を検出する工程をさらに含む、請求項 2 2 ~ 2 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 0】

患者における K R A S 遺伝子の少なくとも 1 つの変異の有無を検出する工程が、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) において K R A S 遺伝子のエクソン 1 2 および / またはエクソン 1 3 領域を増幅できる少なくとも 1 つのプライマー対を用いることを含む、請求項 2 9 記載の方法。

20

【請求項 3 1】

生体試料中のヘモグロビンの有無を検出する工程が、抗ヘモグロビン抗体を用いることを含む、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 2】

プライマーが、G 1 2 D、G 1 2 V、G 1 2 C、G 1 3 D、G 1 2 A、G 1 2 R、G 1 2 S および G 1 3 C からなる群から選択される少なくとも 1 つの K R A S 変異を含む K R A S 遺伝子領域を増幅できる、請求項 3 0 記載の方法。

【請求項 3 3】

抗体が金コロイド標識抗体である、請求項 3 1 記載の方法。

30

【請求項 3 4】

B M P 3 遺伝子の増幅が定量 P C R (q P C R) で行われ、方法が第 1 の参照遺伝子を増幅し、B M P 3 増幅の C t 値を $\Delta C t 1$ として決定することをさらに含む、請求項 2 2 ~ 3 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 5】

N D R G 4 遺伝子の増幅が定量 P C R (q P C R) で行われ、方法が第 2 の参照遺伝子を増幅し、N D R G 4 増幅の C t 値を $\Delta C t 2$ として決定することをさらに含む、請求項 2 2 ~ 3 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 6】

変異 K R A S 遺伝子の増幅が定量 P C R (q P C R) で行われ、方法が第 3 の参照遺伝子を増幅し、変異 K R A S 増幅の C t 値を $\Delta C t 3$ として決定することをさらに含む、請求項 3 0 ~ 3 3 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 3 7】

第 1 の参照遺伝子と第 2 の参照遺伝子が同一である、請求項 3 4 または 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

同一の参照遺伝子が B 2 M 遺伝子である、請求項 3 7 記載の方法。

【請求項 3 9】

変異 K R A S 遺伝子が、G 1 2 D、G 1 3 D、G 1 2 V、G 1 2 C、G 1 2 S、G 1 2

50

A および G 1 3 R からなる群から選択される変異を含む、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 4 0】

変異 K R A S 遺伝子が以下からなる群から選択される 1 以上のプライマー対によって増幅される、請求項 3 9 記載の方法：

(1) 配列番号 3 5 を含む順方向プライマー G 1 2 D - F、および配列番号 4 2 を含む逆方向プライマー K r a s - R；

(2) 配列番号 3 6 を含む順方向プライマー G 1 3 D - F、および配列番号 4 2 を含む逆方向プライマー K r a s - R；

(3) 配列番号 3 7 を含む順方向プライマー G 1 2 V - F、および配列番号 4 2 を含む逆方向プライマー K r a s - R；

(4) 配列番号 3 8 を含む順方向プライマー G 1 2 C - F、および配列番号 4 2 を含む逆方向プライマー K r a s - R；

(5) 配列番号 3 9 を含む順方向プライマー G 1 2 S - F、および配列番号 4 2 を含む逆方向プライマー K r a s - R；

(6) 配列番号 4 0 を含む順方向プライマー G 1 2 A - F、および配列番号 4 2 を含む逆方向プライマー K r a s - R；ならびに

(7) 配列番号 4 1 を含む順方向プライマー G 1 2 R - F、および配列番号 4 2 を含む逆方向プライマー K r a s - R、

ここで、q P C R のための K R A S プローブは配列番号 4 6 を含む。

【請求項 4 1】

第 3 の参照遺伝子が A C T B 遺伝子である、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 4 2】

A C T B 遺伝子を増幅するための q P C R プライマーが配列番号 4 3 および 4 4 を含み、プローブが配列番号 4 6 を含む、請求項 4 1 記載の方法。

【請求項 4 3】

以下を用いることを含む、請求項 2 2 ~ 4 2 のいずれかに記載の方法：

(1) 試料中の B M P 3 メチル化を検出するための陽性標準および陰性標準、ならびに

(2) 試料中の N D R G 4 メチル化を検出するための陽性標準および陰性標準。

【請求項 4 4】

請求項 4 3 記載の方法、ここで B M P 3 メチル化を検出するための陽性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

G T T A G T T T G G T C G G G T G T T T T T A A A A A T A A A G C G A G G A G G
G A A G G T A T A G A T A G A T T T T T G A A A A T A T T C G G G T T A T A T A C
G T C G C G A T T T A T A G T T T T T T T T T A G C G T T G G A G T G G A G A C
G G C G T T C G T A G C G T T T T G C G C G G G T G A G G T T C G C G T A G T T
G T T G G G G A A G A G T T T A T T T G T T A G G T T G C G T T G G G T T A G C
G T A G T A A G T G G G G T T G G T C G T T A T T T C G T T G T A T T C G G T C
G C G T T T C G G G T T T C G T G C G T T T T C G T T T T A G (配列番号 6 7) ；

B M P 3 メチル化を検出するための陰性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

G T T A G T T T G G T T G G G T G T T T T T A A A A A T A A A G T G A G G A G G
G A A G G T A T A G A T A G A T T T T T G A A A A T A T T T G G G T T A T A T A T
G T T G T G A T T T A T A G T T T T T T T T T A G T G T T G G A G T G G A G A T
G G T G T T T G T A G T G T T T T G T G T G G G T G A G G T T T G T G T A G T T
G T T G G G G A A G A G T T T A T T T G T T A G G T T G T G T T G G G T T A G T
G T A G T A A G T G G G G T T G G T T G T T A T T T T G T T G T A T T T G G T T
G T G T T T T G G G T T T T G T G T G T T T T T G T T T T A G (配列番号 6 8) ；

N D R G 4 メチル化を検出するための陽性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

T G A G A A G T C G G C G G G G G C G C G G A T C G A T C G G G G T G T T T T T
T A G G T T T C G C G T C G C G G T T T T C G T T C G T T T T T T C G T T C G T

10

20

30

40

50

T T A T C G G G T A T T T T A G T C G C G T A G A A G G C G G A A G T T A C G C
G C G A G G G A T C G C G G T T C G T T C G G G A T T A G T T T T A G G T T C G
G T A T C G T T T C G C G G G T C G A G C G T T T A T A T T C G T T A A A T T T
A C G C G G G T A C G T T T T C G C G G C G T A T C G T T T T T A G T T (配列番
号 6 9) ; および

N D R G 4 メチル化を検出するための陰性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む
:

T G A G A A G T T G G T G G G G G T G T G G A T T G A T T G G G G T G T T T T T
T A G G T T T T G T G T T G T G G T T T T T G T T T G T T T T T T T G T T T G T
T T A T T G G G T A T T T T A G T T G T G T A G A A G G T G G A A G T T A T G T
G T G A G G G A T T G T G G T T T G T T T G G G A T T A G T T T T A G G T T T G
G T A T T G T T T T G T G G G T T G A G T G T T T A T A T T T G T T A A A T T T
A T G T G G G T A T G T T T T T G T G G T G T A T T G T T T T T A G T T (配列番
号 7 0) 。

【請求項 4 5】

品質管理標準を増幅することを含む、請求項 2 2 ~ 4 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 6】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載のキットを用いることを含む、必要とする患者におけ
る大腸がん (C R C) または進行腺腫 (A A) の有無を検出する方法。

【請求項 4 7】

以下を含む、必要とする患者における大腸がん (C R C) または進行腺腫 (A A) の有
無を検出する方法 :

- a) 患者の便試料から処理されていないゲノム DNA を取得する ;
- b) a) のゲノム DNA またはその断片を 1 以上の試薬で処理し、メチル化されてい
ないシトシン塩基をウラシルまたはハイブリダイゼーションの特性に関してシトシンとは検
出可能に異なる別の塩基に変換する ;
- c) b) の処理されたゲノム DNA を鋳型として用いて定量 P C R (q P C R) を行い
、患者における B M P 3 遺伝子の C t 値を $\Delta C t 1$ として決定する ;
- d) b) の処理されたゲノム DNA を鋳型として用いて q P C R を行い、患者における
N D R G 4 遺伝子の C t 値を $\Delta C t 2$ として決定する ;
- e) 処理されていないゲノム DNA を鋳型として用いて q P C R を行い、患者における
変異 K R A S 遺伝子の C t 値を $\Delta C t 3$ として決定する ;
- f) 便試料中のヘモグロビンタンパク質の免疫化学的便潜血検査を行い、スコアを F I
T として決定する ;
- g) K の値を決定する、ここで $K = a * \Delta C t 1 + b * \Delta C t 2 + c * \Delta C t 3 + d * F I T + X$ であり、a、b、c、d、X は臨床定数である ; および
- h) 総合指数 P の値を決定する、ここで $P = e^K / (1 + e^K)$ であり、e は自然定数
であり、ここで P が所定の閾値以上である場合、患者は C R C および / または A A を有す
ると判定され、P が所定の閾値未満である場合、患者は健常であると判定される。

【請求項 4 8】

B M P 3 遺伝子を増幅するための q P C R が第 1 のプライマー対および第 1 のプローブ
を含み、第 1 のプライマー対および第 1 のプローブが以下からなる群から選択される、請
求項 4 7 記載の方法 :

- i) 配列番号 3 を含む順方向プライマー、配列番号 4 を含む逆方向プライマー、および
配列番号 5 を含むプローブ ;
- i i) 配列番号 9 を含む順方向プライマー、配列番号 1 0 を含む逆方向プライマー、お
よび配列番号 1 1 を含むプローブ ; ならびに
- i i i) 配列番号 1 5 を含む順方向プライマー、配列番号 1 6 を含む逆方向プライマー
、および配列番号 1 7 を含むプローブ ;

ここで、N D R G 4 遺伝子を増幅するための q P C R は第 2 のプライマー対および第 2

のプローブを含み、第2のプライマー対および第2のプローブは以下からなる群から選択される：

i v) 配列番号6を含む順方向プライマー、配列番号7を含む逆方向プライマー、および配列番号8を含むプローブ；

v) 配列番号12を含む順方向プライマー、配列番号13を含む逆方向プライマー、および配列番号14を含むプローブ；ならびに

v i) 配列番号18を含む順方向プライマー、配列番号19を含む逆方向プライマー、および配列番号20を含むプローブ。

【請求項49】

以下を用いることを含む、請求項47記載の方法：

i) 試料中のBMP3遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号3を含む順方向プライマー、配列番号4を含む逆方向プライマー、および配列番号5を含むプローブ、ならびに

i i) 試料中のNDRG4遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号6を含む順方向プライマー、配列番号7を含む逆方向プライマー、および配列番号8を含むプローブ。

【請求項50】

以下を用いることを含む、請求項47記載の方法：

i) 試料中のBMP3遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号9を含む順方向プライマー、配列番号10を含む逆方向プライマー、および配列番号11を含むプローブ、ならびに

i i) 試料中のNDRG4遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号12を含む順方向プライマー、配列番号13を含む逆方向プライマー、および配列番号14を含むプローブ。

【請求項51】

以下を用いることを含む、請求項47記載の方法：

i) 試料中のBMP3遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号15を含む順方向プライマー、配列番号16を含む逆方向プライマー、および配列番号17を含むプローブ、ならびに

i i) 試料中のNDRG4遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号18を含む順方向プライマー、配列番号19を含む逆方向プライマー、および配列番号20を含むプローブ。

【請求項52】

第1のプローブおよび第2のプローブがともに蛍光ドナーおよびアクセプターフルオロフォアを含む、請求項47～51のいずれかに記載の方法。

【請求項53】

第1のプローブおよび第2のプローブがTAQMAN（登録商標）プローブである、請求項47～52のいずれかに記載の方法。

【請求項54】

変異KRAS遺伝子が、G12D、G12V、G12C、G13D、G12A、G12R、G12SおよびG13Cからなる群から選択される少なくとも1つのKRAS変異を含む、請求項47～53のいずれかに記載の方法。

【請求項55】

免疫化学的便潜血検査が金コロイド標識抗体を含む、請求項47～54のいずれかに記載の方法。

【請求項56】

工程c)および工程d)がB2M遺伝子を参照遺伝子として用いることを含む、請求項47～55のいずれかに記載の方法。

【請求項57】

変異KRAS遺伝子が以下からなる群から選択される1以上のプライマー対によって増

10

20

30

40

50

幅される、請求項 54 記載の方法：

(1) 配列番号 35 を含む順方向プライマー G12D-F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー Kras-R；

(2) 配列番号 36 を含む順方向プライマー G13D-F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー Kras-R；

(3) 配列番号 37 を含む順方向プライマー G12V-F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー Kras-R；

(4) 配列番号 38 を含む順方向プライマー G12C-F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー Kras-R；

(5) 配列番号 39 を含む順方向プライマー G12S-F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー Kras-R；

(6) 配列番号 40 を含む順方向プライマー G12A-F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー Kras-R；ならびに

(7) 配列番号 41 を含む順方向プライマー G12R-F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー Kras-R、

ここで、qPCR のための KRAS プローブは配列番号 46 を含む。

【請求項 58】

ACTB 遺伝子に変異 KRAS 遺伝子を増幅するための qPCR において参照遺伝子として用いられる、請求項 57 記載の方法。

【請求項 59】

ACTB 遺伝子を増幅するための qPCR プライマーが配列番号 43 および 44 を含み、ACTB 遺伝子のための qPCR プローブが配列番号 46 を含む、請求項 58 記載の方法。

【請求項 60】

以下を用いることを含む、請求項 47～59 のいずれかに記載の方法：

(1) 試料中の BMP3 メチル化を検出するための陽性標準および陰性標準、ならびに

(2) 試料中の NDRG4 メチル化を検出するための陽性標準および陰性標準。

【請求項 61】

請求項 60 記載の方法、ここで BMP3 メチル化を検出するための陽性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

GTTAGTTTGGTCGGGTGTTTTTAAATAAGCGAGGAGG
GAAGGTATAGATAGATTTTGAATAATTCGGGTATATAC
GTCGCGATTATAGTTTTTTTTTATAGCGTTTGGAGTGGAGAC
GGCGTTTCGTAGCGTTTTTGC GCGGGGTGAGGTTTCGCGTAGTT
GTTGGGGAAGAGTTTTATTTGTTAGGTTTGC GTTGGGTTAGC
GTAGTAAGTG GGGTTG GTC GTTATTTTC GTTGTATTTCCGGTC
GCGTTTTCCGGTTTTCTGTCGTTTTCTGTTTTAG (配列番号 67)；

BMP3 メチル化を検出するための陰性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

GTTAGTTTGGTTGGGTGTTTTTAAATAAGTGAGGAGG
GAAGGTATAGATAGATTTTGAATAATTTGGGTATATAT
GTTGTGATTTATAGTTTTTTTTTATAGTTTGGAGTGGAGAT
GGTGTTTGTAGTTTGTGTGGGTGAGGTTTTGTGTAGTT
GTTGGGGAAGAGTTTTATTTGTTAGGTTTGTGTGGGTTAGT
GTAGTAAGTG GGGTTG GTTGTTATTTTGTGTATTTGGTT
GTGTTTTTGGGTTTTTGTGTGTTTTTGTTTTTAG (配列番号 68)；

NDRG4 メチル化を検出するための陽性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

TGAGAAAGTCGGCGGGGGCGCGGATCGATCGGGGTGTTTTT
TAGGTTTTCGCGTCCGCGGTTCGTTCGTTTTTTCGTTCGT
TTATCGGGTATTTTATGTCGCGTAGAAGGCGGAAGTTACGC

10

20

30

40

50

G C G A G G G A T C G C G G T T C G T T C G G G A T T A G T T T T A G G T T C G
G T A T C G T T T C G C G G G T C G A G C G T T T A T A T T C G T T A A A T T T
A C G C G G G T A C G T T T T C G C G G C G T A T C G T T T T T A G T T (配列番
号 6 9) ; および

N D R G 4 メチル化を検出するための陰性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む
:

T G A G A A G T T G G T G G G G G T G T G G A T T G A T T G G G G T G T T T T T
T A G G T T T T G T G T T G T G G T T T T T G T T T G T T T T T T T G T T T G T
T T A T T G G G T A T T T T A G T T G T G T A G A A G G T G G A A G T T A T G T
G T G A G G G A T T G T G G T T T G T T T G G G A T T A G T T T T A G G T T T G
G T A T T G T T T T G T G G G T T G A G T G T T T A T A T T T G T T A A A T T T
A T G T G G G T A T G T T T T T G T G G T G T A T T G T T T T T A G T T (配列番
号 7 0) 。

10

【請求項 6 2】

工程 c) および工程 d) において品質管理標準を増幅することを含む、請求項 4 7 ~ 6
1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 3】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載のキットを用いて患者における大腸がん (C R C) お
よび / または進行腺腫 (A A) の有無を決定し、患者における C R C および / または A A
の有無に応じて患者を処置することを含む、必要とする患者における C R C および / また
は A A を診断および処置する方法。

20

【請求項 6 4】

請求項 2 2 ~ 6 2 のいずれかに記載の方法を用いて患者における大腸がん (C R C) お
よび / または進行腺腫 (A A) の有無を決定し、患者における C R C および / または A A
の有無に応じて患者を処置することを含む、必要とする患者における C R C および / また
は A A を診断および処置する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

30

本願は、2018年5月23日に提出された中国特許出願第201810502359.7号、および2018年5
月23日に提出された第201810502387.9号の優先権を主張し、これらはそれぞれ、あらゆる
目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明の分野

本発明は、大腸がんおよび進行腺腫をスクリーニングするための組成物および方法、な
らびに他の応用に関する。

【0003】

電子的に提出されたテキストファイルの説明

本明細書とともに電子的に提出されたテキストファイルの内容は、その全体が参照によ
り本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータで読み取り可能な形式のコピー (ファ
イル名：NEWH-017_01WO_SeqList_ST25.txt、記録日：2019年5月22日、ファイルサイズ：2
2キロバイト) 。

40

【背景技術】

【0004】

大腸がん (C R C) は世界で 4 番目に多いがんであり、死亡率は肺がん、肝がんおよび
胃がんより低い。C R C による年間の死亡者は約 7 0 万人である。C R C は、発展途上国
と比較して先進国での発症率が高い「近代化」した疾患である。米国では、大腸がんは未
だ 2 番目に多い死因である (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976) 。人
々の生活水準の向上に伴って、中国では 2 0 0 0 年以降、C R C の発症率および死亡率が

50

増加している (CA CANCER J CLIN 2016; 66:115-132)。初期の限局性疾患 (ステージ I および II) の患者の 5 年生存率は 90% に近づいているが、後期 CRC の患者の生存率はわずか 13.1% である。後期 CRC 患者の処置費用は莫大な額になることが多く、疾患の症状を軽減することしかできない (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976)。

【0005】

CRC の発生は、腫瘍が便の通過を妨げ得、筋痙攣、疼痛または目に見える出血をもたらし得る数センチメートルのサイズに成長するまで、一般に無症状で遅いプロセスであり、初期に検出するのは困難である。CRC の発生は、経時的に蓄積する一連の組織学的、形態学的および遺伝的变化を伴う多段階の (すなわち健常から、過形成、小さなポリープ、大きなポリープ、腺がん、およびがんへの) プロセスを経る。ポリープは、腸管粘膜内で局所的に増殖または蓄積する異常細胞である。ポリープ内の分裂細胞は腸壁を貫通するのに十分な遺伝子変化を蓄積し得、最終的に CRC に進化し得る。しかし、10 年を超える発達の後に CRC に進化するポリープはごく少数である。主要な 2 種類の潜在的に悪性のポリープは腺腫および無茎性鋸歯状ポリープ (SSP) であり、これらはそれぞれ異なるリスクを伴って CRC に発展する。腺腫が CRC に発展するリスクは、そのサイズに関係する。一般に、腺腫のサイズが大きいほど、CRC に発展する可能性が高い。進行腺腫 (AA) は、サイズが 1 cm 以上であるか、または 25% 以上の絨毛成分もしくは任意のサイズの高度異形成を有することを指す。ほとんどの AA のうち約 10% のみががん化するが、CRC の 60% ~ 70% は腺腫から発症し、残りの 25% ~ 35% の CRC は SSP から発症する (Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976)。したがって、CRC および AA の早期発見および病変の除去は、CRC の進行を効果的に阻止して患者の生命を救い得、患者の 5 年生存率を著しく改善し得、後期の CRC の高額な処置費用を低減し得、これは家族および社会の経済的負担を大幅に軽減する。

【0006】

現在、CRC の検出にはいくつかの検査 (主に、大腸内視鏡検査、S 状結腸鏡検査、CT コロノグラフィー、便潜血検査 (FOBT) および免疫化学的便潜血検査 (FIT) を含む) が存在する。

【0007】

CRC を検出するための大腸内視鏡検査の感度は > 95% である。そのスクリーニング間隔は 10 年ごとである。大腸内視鏡検査の利点は高い感度であり、結腸全体を検査でき、同時に病変を除去できる。しかし、欠点は侵襲的な検査であり、腸管前処置が不快感をもたらし、患者が落ち着く必要がある。大腸内視鏡検査中において腸穿孔および出血のリスクがある。これらの制限は、大腸内視鏡検査のスクリーニングの低いコンプライアンスに寄与している。

【0008】

S 状結腸鏡検査が遠位結腸を検出する感度は 95% を超えている。S 状結腸鏡検査による CRC のスクリーニング間隔は FOBT と組み合わせて 5 年ごとである。S 状結腸鏡検査によって CRC をスクリーニングする利点は高い感度であり、全身性の鎮静の必要がなく、検査中に同時に病変を除去できる。欠点は半侵襲的な検査であり、検査中に不快感を与えやすく、検査費用が高いことである。

【0009】

CT コロノグラフィーは放射線を用いて結腸を可視化し、感度は > 90% であり、5 年ごとに実施される。利点は、結腸全体を観察できる高い感度であり、鎮静の必要がない。欠点は、アッセイが半侵襲的な検査であるため、患者がスクリーニングプロセス中に不快感を生じやすいことである。さらに、病変を同時に除去することはできず、放射線の安全性を考慮する必要がある。

【0010】

要約すると、イメージングに基づいて CRC を検出する上記検査は高い感度を有するが、高価であり、腸管前処置は不快感および他の副作用を生じやすい。結果として、患者の

コンプライアンスは低い。さらに、これらのアッセイは専門的な機器ならびに専門的な技術および豊富な経験を有する医師を必要とし、これらは利用可能でない場合がある。結果として、全体的なスクリーニング率/検出率は低い。さらに、一部の患者はこれらのアッセイに適合しない。例えば、糖尿病患者は腸管前処置の成功率が低く、副作用のリスクがより高い(J Gastrointestin Liver Dis 2010; 19: 369-372, World J Gastrointest Endosc 2013; 5: 39-46)。

【0011】

F O B TおよびF I Tはそれぞれ酵素反応および免疫化学的方法によって患者の便中のヘモグロビンを検出し、C R Cの検出感度はそれぞれ33~75%および60~85%であり、検査は1年ごとに行われる。F O B TおよびF I Tは普及しやすく、非侵襲的で安価であるが、前がん病変の検出率は低い(Clinical Interventions in Aging 2016; 11: 967-976)。

【0012】

ポリープがC R Cに発展する間、いくつかの遺伝子(A P C、K R A S、p 5 3、B R A F、N D R G 4、B M P 3など)の変異およびメチル化変化が蓄積する(Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976)。したがって、これらの変異またはメチル化変化の検出はC R Cおよび前がん病変の検出に役立つ。

【0013】

Zou et al. (Clinical Chemistry 2012; 58: 2375-383)は、メチル化q P C Rを用いて組織試料中のB M P 3、N D R G 4、V I MおよびT F P I 2 遺伝子のメチル化レベルを検出した。合計37例のC R C組織試料において、25例の腺腫組織試料および29例の健常なヒト組織試料を検査した。特異度が95%であった場合、C R C検出のB M P 3、N D R G 4、V I MおよびT F P I 2 遺伝子の感度はそれぞれ84%、92%、86%および92%であり、腺腫検出の感度はそれぞれ68%、76%、76%および88%であった。結腸がん組織中の遺伝子メチル化の検出は高い感度および特異度を有することが示された。しかし、組織サンプリング法は、サンプリングの過程で患者の身体に一定の損傷を与えるため、広く使用されるのは困難である。したがって、一般の人々のC R Cおよび前がん病変のスクリーニングには適していない。

【0014】

マルチターゲット便D N A (m t - s D N A) 検査には、腫瘍剥離細胞(tumor exfoliated cell)のメチル化および変異の検出ならびに便試料中のヘモグロビンの検出が含まれ、これは3年ごとにスクリーニングされ、高感度、非侵襲性および普及しやすいという利点を有する(Clinical Interventions In Aging 2016;11:967-976)。スクリーニング法として、m t - s D N AはC R CおよびA Aを早期に検出でき、患者の生存率を大幅に向上させる。Imperiale et al. (N Engl J Med 2014; 370:1287-97)は、B M P 3およびN D R G 4 遺伝子のメチル化検出、K R A S 遺伝子の点変異検出、ならびに便中ヘモグロビン検出のためのm t - s D N Aに基づくシステムを確立し、ロジスティック回帰式に従ってC R CおよびA Aのリスクを評価した。C R CおよびA Aの検出感度はそれぞれ92.3%および42.4%であり、特異度は86.6%であった。

【0015】

M t - s D N Aは散发性C R CおよびA Aをスクリーニングするのに適用され、大腸内視鏡検査と比較して非侵襲的であり、F O B TおよびF I Tと比較して感度が高いという利点があるが、A Aの検出感度はC R Cよりもはるかに低いままである(Clinical Interventions in Aging 2016; 11:967-976)。

【0016】

現在、C R CまたはA Aを検出するためのm t - s D N Aに基づく製品(C o l o g u a r d (登録商標)など)が、主に欧米人集団のために開発されている。アジア人集団のC R CおよびA Aの検出のために利用可能な製品は存在しない。特に、米国食品医薬品局が発行したC o l o g u a r d (登録商標)の「Summary of safety and effectiveness data (SSED)」(www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf13/P130017b.pdf)によると、白

10

20

30

40

50

人集団およびアフリカ系アメリカ人集団における C o l o g u a r d (登録商標)を用いた A A の検出感度はそれぞれ 42.3%および 42.4%であるが、アジア人集団における同製品を用いた A A の検出感度はわずか 30.8%である。したがって、アジア諸国における大腸がんの発症率および死亡率の現在の増加に対処するために、アジア人集団における C R C および / または A A の検出のための有効なシステムを開発する必要がある。

【0017】

C R C および A A を有する患者由来の便試料中の B M P 3 および N D R G 4 遺伝子のメチル化を検出する方法について多くの研究がなされているが、アジア人集団の B M P 3 および N D R G 4 遺伝子中の高メチル化 C p G 部位についての詳細かつ包括的な研究は存在しない (ONCOLOGY LETTERS 2014;8:1751-1756; ONCOLOGY LETTERS 2015;9:1383-1387)。さらに、試料サイズの制限のために、アジア人患者における B M P 3 および N D R G 4 遺伝子のメチル化に関する先行研究は、C R C および A A に最も関連するメチル化部位を同定するのに有用ではなかった。したがって、アジア人集団における B M P 3 および N D R G 4 遺伝子の高メチル化 C p G 部位の正確な位置を決定し、これらのメチル化 C p G 部位に基づいて A A の検出をより高感度にするキットを設計および最適化する必要がある。

【発明の概要】

【0018】

本開示は、B M P 3 および N D R G 4 遺伝子のプロモーター領域における高メチル化 C p G 部位を含む D N A 配列を提供する。

【0019】

本開示はまた、B M P 3 または N D R G 4 遺伝子のメチル化を検出するための好ましいプライマーおよびプローブ、ならびに B M P 3 および N D R G 4 遺伝子の両方のメチル化を検出するためのそれらの組合せを提供する。

【0020】

本開示は、アジア人集団の C R C および A A を検出するためのキットをさらに提供する。B M P 3 および N D R G 4 遺伝子のプロモーター領域における高メチル化 C p G 部位を含む D N A 配列は、アジア人集団の C R C および / または A A の検出のためのマーカーとして使用され得る。

【0021】

他のプライマーおよびプローブと比較して、B M P 3 および / または N D R G 4 遺伝子のメチル化レベルを検出するための好ましいプライマー対およびプローブは、腫瘍組織 (C R C および A A など、特に A A) を検出するための驚くほど高い感度および特異度を有する。さらに、本開示のこれらの好ましいプライマーおよびプローブの組合せはまた、腫瘍組織 (C R C および A A など、特に A A) を検出するための驚くほど高い感度および特異度を達成する。

【0022】

また、上記の好ましいプライマーおよびプローブの組合せに基づくアジア人集団の C R C および A A を検出するためのキットが提供される。

【0023】

いくつかの実施態様において、キットは以下を含む: (1) プライマー対およびプローブの好ましい組合せならびに対応する q P C R 試薬; (2) K R A S 遺伝子のコード領域における 7 つの変異 () を検出するためのプライマーおよびプローブならびに対応する q P C R 試薬; (3) 便中のヘモグロビンを検出するための試薬。

【0024】

いくつかの実施態様において、キットを用いたアッセイから得られた結果は、ロジスティック回帰式に従って補正および分析される。いくつかの実施態様において、式は、C R C および / または A A の有無を判定するための値を計算するために使用される。いくつかの実施態様において、式は、 $P = e^K / (1 + e^K)$ であり、ここで P は総合指数 (comprehensive index) であり、 $K = a * \Delta C t 1 + b * \Delta C t 2 + c * \Delta C t 3 + d * F I T + X$ であり、e は自然定数であり、a、b、c、d、X は臨床定数である。いくつかの実

施態様において、P 値が所定の閾値以上である場合、結果は患者における C R C および / または A A の陽性検出を示す。いくつかの実施態様において、P 値が閾値未満である場合、結果は患者における C R C および / または A A の陰性検出を示し、患者は健常であると判定される。

【 0 0 2 5 】

本開示は、必要とする患者における大腸がん (C R C) または進行腺腫 (A A) の有無を検出するためのキットを提供する。必要とする患者とは、C R C および / または A A を有することが疑われる患者 (C R C および / または A A を発症する少なくとも 1 つの徴候を有する患者、または C R C および / または A A を発症するリスクを有する患者、または定期的な健康診断を受けているが、そうでなければ徴候またはリスクを有さない対象など) である。

10

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施態様において、キットは、a) 患者から得られた生体試料中の B M P 3 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための第 1 のプライマー対および第 1 のプローブを含む。いくつかの実施態様において、第 1 のプライマー対および第 1 のプローブはそれぞれ配列番号 1 と同一であるか、相補的であるか、またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする少なくとも 1 6 ヌクレオチドの連続した配列を含む。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施態様において、キットは、b) 患者から得られた生体試料中の N D R G 4 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための第 2 のプライマー対および第 2 のプローブを含む。いくつかの実施態様において、第 2 のプライマー対および第 2 のプローブはそれぞれ配列番号 2 と同一であるか、相補的であるか、またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする少なくとも 1 6 ヌクレオチドの連続した配列を含む。

20

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施態様において、第 1 のプライマー対および第 1 のプローブは、以下からなる群から選択される：

【 0 0 2 9 】

i) 配列番号 3 を含む順方向プライマー、配列番号 4 を含む逆方向プライマー、および配列番号 5 を含むプローブ；

30

【 0 0 3 0 】

i i) 配列番号 9 を含む順方向プライマー、配列番号 1 0 を含む逆方向プライマー、および配列番号 1 1 を含むプローブ；ならびに

【 0 0 3 1 】

i i i) 配列番号 1 5 を含む順方向プライマー、配列番号 1 6 を含む逆方向プライマー、および配列番号 1 7 を含むプローブ；

【 0 0 3 2 】

ここで、いくつかの実施態様において、第 2 のプライマー対および第 2 のプローブは、以下からなる群から選択される：

40

【 0 0 3 3 】

i v) 配列番号 6 を含む順方向プライマー、配列番号 7 を含む逆方向プライマー、および配列番号 8 を含むプローブ；

【 0 0 3 4 】

v) 配列番号 1 2 を含む順方向プライマー、配列番号 1 3 を含む逆方向プライマー、および配列番号 1 4 を含むプローブ；ならびに

【 0 0 3 5 】

v i) 配列番号 1 8 を含む順方向プライマー、配列番号 1 9 を含む逆方向プライマー、および配列番号 2 0 を含むプローブ；

【 0 0 3 6 】

50

いくつかの実施態様において、キットは以下を含む：

i) 患者から得られた生体試料中の B M P 3 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 3 を含む順方向プライマー、配列番号 4 を含む逆方向プライマー、および配列番号 5 を含むプローブ、ならびに

i i) 患者から得られた生体試料中の N D R G 4 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 6 を含む順方向プライマー、配列番号 7 を含む逆方向プライマー、および配列番号 8 を含むプローブ。

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施態様において、キットは以下を含む：

i) 患者から得られた生体試料中の B M P 3 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 9 を含む順方向プライマー、配列番号 10 を含む逆方向プライマー、および配列番号 11 を含むプローブ、ならびに

i i) 患者から得られた生体試料中の N D R G 4 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 12 を含む順方向プライマー、配列番号 13 を含む逆方向プライマー、および配列番号 14 を含むプローブ。

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施態様において、キットは以下を含む：

i) 患者から得られた生体試料中の B M P 3 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 15 を含む順方向プライマー、配列番号 16 を含む逆方向プライマー、および配列番号 17 を含むプローブ、ならびに

i i) 患者から得られた生体試料中の N D R G 4 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 18 を含む順方向プライマー、配列番号 19 を含む逆方向プライマー、および配列番号 20 を含むプローブ。

【 0 0 3 9 】

いくつかの実施態様において、第 1 のプローブおよび第 2 のプローブはともに蛍光ドナーおよびアクセプターフルオロフォアを含む。

【 0 0 4 0 】

いくつかの実施態様において、第 1 のプローブおよび第 2 のプローブは、T A Q M A N (登録商標) プローブである。

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施態様において、キットは以下をさらに含む：

(1) 患者における K R A S 遺伝子の少なくとも 1 つの変異の有無を検出するための手段；および

(2) 患者から得られた生体試料中のヘモグロビンの有無を検出するための手段。

【 0 0 4 2 】

いくつかの実施態様において、患者における K R A S 遺伝子の少なくとも 1 つの変異の有無を検出するための手段は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) において K R A S 遺伝子のエクソン 12 および / またはエクソン 13 領域を増幅できる少なくとも 1 つのプライマー対を含む。

【 0 0 4 3 】

いくつかの実施態様において、生体試料中のヘモグロビンの有無を検出するための手段は、抗ヘモグロビン抗体を含む。

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施態様において、プライマーは、G 1 2 D、G 1 2 V、G 1 2 C、G 1 3 D、G 1 2 A、G 1 2 R、G 1 2 S および G 1 3 C からなる群から選択される少なくとも 1 つの K R A S 変異を含む K R A S 遺伝子領域を増幅できる。

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施態様において、抗体は金コロイド標識抗体である。

10

20

30

40

50

いくつかの実施態様において、キットは、内部品質管理遺伝子を増幅する手段をさらに含む。内部標準は、(1)試料または抽出方法からの阻害汚染、(2)装置の異常、(3)化学的な失敗(例えば、キットもしくは成分の期限切れもしくは劣化、または試薬の誤った組合せ)、および(4)ヒューマンエラーを検出し得る。いくつかの実施態様において、内部標準遺伝子は陽性対照(メチル化を有すると判定されている陽性対照試料中の遺伝子など)である。いくつかの実施態様において、内部標準遺伝子は陰性対照(メチル化を有しないと判定されている陰性対照試料中の遺伝子など)である。

【0046】

いくつかの実施態様において、キットは、キットを用いて得られた検査結果の使用および/または解釈のための説明書をさらに含む。

10

【0047】

いくつかの実施態様において、キットは、生体試料中の抗体およびヘモグロビンによって形成された複合体を検出する手段をさらに含む。

【0048】

いくつかの実施態様において、患者から得られた生体試料は、便試料である。

【0049】

いくつかの実施態様において、キットは、重亜硫酸試薬、ならびに重亜硫酸試薬および患者の生体試料または生体試料から得られたポリヌクレオチドを混合するのに適した容器をさらに含む。

【0050】

いくつかの実施態様において、重亜硫酸塩を使用する代わりに、キットはメチル化感受性制限酵素試薬をさらに含む。

20

【0051】

いくつかの実施態様において、キットは以下をさらに含む：(1)生体試料中のBMP3メチル化を検出するための陽性標準および陰性標準、ならびに(2)生体試料中のNDRG4メチル化を検出するための陽性標準および陰性標準。

【0052】

いくつかの実施態様において、BMP3メチル化を検出するための陽性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

G T T A G T T T G G T C G G G T G T T T T T A A A A A T A A A G C G A G G A G G
G A A G G T A T A G A T A G A T T T T G A A A A T A T T C G G G T T A T A T A C
G T C G C G A T T T A T A G T T T T T T T T A G C G T T G G A G T G G A G A C
G G C G T T C G T A G C G T T T T G C G C G G G T G A G G T T C G C G T A G T T
G T T G G G G A A G A G T T T A T T T G T T A G G T T G C G T T G G G T T A G C
G T A G T A A G T G G G G T T G G T C G T T A T T T C G T T G T A T T C G G T C
G C G T T T C G G G T T T C G T G C G T T T T C G T T T T A G (配列番号67)；

30

【0053】

いくつかの実施態様において、BMP3メチル化を検出するための陰性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

G T T A G T T T G G T T G G G T G T T T T T A A A A A T A A A G T G A G G A G G
G A A G G T A T A G A T A G A T T T T G A A A A T A T T T G G G T T A T A T A T
G T T G T G A T T T A T A G T T T T T T T T A G T G T T G G A G T G G A G A T
G G T G T T T G T A G T G T T T T G T G T G G G T G A G G T T T G T G T A G T T
G T T G G G G A A G A G T T T A T T T G T T A G G T T G T G T T G G G T T A G T
G T A G T A A G T G G G G T T G G T T G T T A T T T T G T T G T A T T T G G T T
G T G T T T T G G G T T T T G T G T G T T T T T G T T T T A G (配列番号68)；

40

【0054】

いくつかの実施態様において、NDRG4メチル化を検出するための陽性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

T G A G A A G T C G G C G G G G C G C G G A T C G A T C G G G G T G T T T T T

50

T A G G T T T C G C G T C G C G G T T T T C G T T C G T T T T T T C G T T C G T
T T A T C G G G T A T T T T A G T C G C G T A G A A G G C G G A A G T T A C G C
G C G A G G G A T C G C G G T T C G T T C G G G A T T A G T T T T A G G T T C G
G T A T C G T T T C G C G G G T C G A G C G T T T A T A T T C G T T A A A T T T
A C G C G G G T A C G T T T T C G C G G C G T A T C G T T T T T A G T T (配列番
号 6 9) 。

【 0 0 5 5 】

いくつかの実施態様において、NDRG4メチル化を検出するための陰性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

T G A G A A G T T G G T G G G G G T G T G G A T T G A T T G G G G T G T T T T T
T A G G T T T T G T G T T G T G G T T T T T G T T T G T T T T T T T G T T T G T
T T A T T G G G T A T T T T A G T T G T G T A G A A G G T G G A A G T T A T G T
G T G A G G G A T T G T G G T T T G T T T G G G A T T A G T T T T A G G T T T G
G T A T T G T T T T G T G G G T T G A G T G T T T A T A T T T G T T A A A T T T
A T G T G G G T A T G T T T T T G T G G T G T A T T G T T T T T A G T T (配列番
号 7 0) 。

【 0 0 5 6 】

また、必要とする患者における大腸がん（CRC）または進行腺腫（AA）の有無を検出する方法が提供される。

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施態様において、本方法は、a)患者の生体試料からゲノムDNAを取得することを含む。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施態様において、本方法はさらに、b) a)のゲノムDNAまたはその断片を1以上の試薬で処理し、メチル化されていないシトシン塩基をウラシルまたはハイブリダイゼーションの特性に関してシトシンとは検出可能に異なる別の塩基に変換することを含む。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施態様において、本方法はさらに、c)処理されたゲノムDNAまたは処理されたその断片を、患者における骨形成タンパク質3（BMP3）をコードする遺伝子のメチル化部位の有無を検出するための第1のプライマー対と接触させることを含む。いくつかの実施態様において、本方法はさらに、処理されたゲノムDNAまたはその断片を、患者におけるNDRGファミリーメンバー4タンパク質（NDRG4）をコードする遺伝子のメチル化部位の有無を検出するための第2のプライマー対と接触させることを含む。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施態様において、第1のプライマー対は、配列番号1と同一であるか、相補的であるか、またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする少なくとも9ヌクレオチドの連続した配列を含む。いくつかの実施態様において、第2のプライマー対は、配列番号2と相補的であるか、またはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする少なくとも9ヌクレオチドの連続した配列を含む。

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施態様において、処理されたゲノムDNAまたはその断片は、第1のプライマー対または第2のプライマー対によって少なくとも1つの増幅物を生成するように増幅されるか、または増幅されない。

【 0 0 6 2 】

いくつかの実施態様において、本方法はさらに、d)前記増幅物の有無、患者におけるBMP3遺伝子およびNDRG4遺伝子の少なくとも1つのCpGジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルに基づいて、患者におけるCRCまたはAAの有無を判定すること

を含む。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施態様において、定量 P C R を用いて試料中のメチル化された B M P 3 遺伝子を増幅する。いくつかの実施態様において、定量 P C R を用いて試料中のメチル化された N D R G 4 遺伝子を増幅する。

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施態様において、本方法はまた、参照遺伝子（ノーマライザー、ハウスキーパー遺伝子または内因性対照としても知られる）を増幅するためのプライマーを用いることを含む。いくつかの実施態様において、定量 P C R を用いて試料中の参照遺伝子を増幅する。

10

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施態様において、第 1 のプライマー対および第 1 のプローブは、以下からなる群から選択される：

i) 配列番号 3 を含む順方向プライマー、配列番号 4 を含む逆方向プライマー、および配列番号 5 を含むプローブ；

i i) 配列番号 9 を含む順方向プライマー、配列番号 1 0 を含む逆方向プライマー、および配列番号 1 1 を含むプローブ；ならびに

i i i) 配列番号 1 5 を含む順方向プライマー、配列番号 1 6 を含む逆方向プライマー、および配列番号 1 7 を含むプローブ。

20

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施態様において、第 2 のプライマー対および第 2 のプローブは、以下からなる群から選択される：

i v) 配列番号 6 を含む順方向プライマー、配列番号 7 を含む逆方向プライマー、および配列番号 8 を含むプローブ；

v) 配列番号 1 2 を含む順方向プライマー、配列番号 1 3 を含む逆方向プライマー、および配列番号 1 4 を含むプローブ；ならびに

v i) 配列番号 1 8 を含む順方向プライマー、配列番号 1 9 を含む逆方向プライマー、および配列番号 2 0 を含むプローブ。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施態様において、本方法は、以下を用いることを含む：

30

i) 患者から得られた生体試料中の B M P 3 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 3 を含む順方向プライマー、配列番号 4 を含む逆方向プライマー、および配列番号 5 を含むプローブ、ならびに

i i) 患者から得られた生体試料中の N D R G 4 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 6 を含む順方向プライマー、配列番号 7 を含む逆方向プライマー、および配列番号 8 を含むプローブ。

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施態様において、本方法は、以下を用いることを含む：

i) 患者から得られた生体試料中の B M P 3 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 9 を含む順方向プライマー、配列番号 1 0 を含む逆方向プライマー、および配列番号 1 1 を含むプローブ、ならびに

40

i i) 患者から得られた生体試料中の N D R G 4 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 1 2 を含む順方向プライマー、配列番号 1 3 を含む逆方向プライマー、および配列番号 1 4 を含むプローブ。

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施態様において、本方法は、以下を用いることを含む：

i) 患者から得られた生体試料中の B M P 3 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 1 5 を含む順方向プライマー、配列番号 1 6 を含む逆方向プライマー、および配列番号 1 7 を含むプローブ、なら

50

びに

i i) 患者から得られた生体試料中の N D R G 4 遺伝子の少なくとも 1 つの C p G ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 18 を含む順方向プライマー、配列番号 19 を含む逆方向プライマー、および配列番号 20 を含むプローブ。

【0070】

いくつかの実施態様において、第 1 のプローブおよび第 2 のプローブはともに蛍光ドナーおよびアクセプターフルオロフォアを含む。いくつかの実施態様において、第 1 のプローブおよび第 2 のプローブは、T A Q M A N (登録商標) プローブである。

【0071】

いくつかの実施態様において、本方法は、患者から得られた生体試料中の K R A S 遺伝子の少なくとも 1 つの変異の有無を検出する工程をさらに含む。

【0072】

いくつかの実施態様において、本方法は、患者から得られた生体試料中のヘモグロビンの有無を検出する工程をさらに含む。いくつかの実施態様において、生体試料中のヘモグロビンの有無を検出する工程は、抗ヘモグロビン抗体を用いることを含む。いくつかの実施態様において、抗体は金コロイド標識抗体である。

【0073】

いくつかの実施態様において、患者における K R A S 遺伝子の少なくとも 1 つの変異の有無を検出する工程は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) において K R A S 遺伝子のエクソン 12 および / またはエクソン 13 領域を増幅できる少なくとも 1 つのプライマー対を用いることを含む。いくつかの実施態様において、プライマーは、G 12 D、G 12 V、G 12 C、G 13 D、G 12 A、G 12 R、G 12 S および G 13 C からなる群から選択される少なくとも 1 つの K R A S 変異を含む K R A S 遺伝子領域を増幅できる。

【0074】

いくつかの実施態様において、変異 K R A S 遺伝子は、以下からなる群から選択される 1 以上のプライマー対によって増幅される：

(1) 配列番号 35 を含む順方向プライマー G 12 D - F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー K r a s - R；

(2) 配列番号 36 を含む順方向プライマー G 13 D - F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー K r a s - R；

(3) 配列番号 37 を含む順方向プライマー G 12 V - F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー K r a s - R；

(4) 配列番号 38 を含む順方向プライマー G 12 C - F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー K r a s - R；

(5) 配列番号 39 を含む順方向プライマー G 12 S - F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー K r a s - R；

(6) 配列番号 40 を含む順方向プライマー G 12 A - F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー K r a s - R；ならびに

(7) 配列番号 41 を含む順方向プライマー G 12 R - F、および配列番号 42 を含む逆方向プライマー K r a s - R。

【0075】

いくつかの実施態様において、q P C R のための K R A S プローブは、配列番号 46 を含む。

【0076】

いくつかの実施態様において、B M P 3 遺伝子の増幅は定量 P C R (q P C R) で行われ、本方法は第 1 の参照遺伝子 (すなわち、第 1 の参照遺伝子) を増幅し、B M P 3 増幅の C t 値を $\Delta C t 1$ として決定することをさらに含む。

【0077】

いくつかの実施態様において、N D R G 4 遺伝子の増幅は定量 P C R (q P C R) で行われ、本方法は第 2 の参照遺伝子 (すなわち、第 2 の参照遺伝子) を増幅し、N D R G 4

10

20

30

40

50

T G A G A A G T T G G T G G G G G T G T G G A T T G A T T G G G G T G T T T T T

50

T A G G T T T T G T G T T G T G G T T T T T G T T T G T T T T T T T G T T T G T
T T A T T G G G T A T T T T A G T T G T G T A G A A G G T G G A A G T T A T G T
G T G A G G G A T T G T G G T T T G T T T G G G A T T A G T T T T A G G T T T G
G T A T T G T T T T G T G G G T T G A G T G T T T A T A T T T G T T A A A T T T
A T G T G G G T A T G T T T T T G T G G T G T A T T G T T T T T A G T T (配列番
号 7 0)。

【 0 0 8 6 】

いくつかの実施態様において、本方法は、品質管理標準を増幅することを含む。

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施態様において、必要とする患者における大腸がん (C R C) または進行
腺腫 (A A) の有無を検出する方法は、本開示のキットを用いることを含む。

10

【 0 0 8 8 】

本開示はさらに、以下を含む必要とする患者における大腸がん (C R C) または進行腺
腫 (A A) の有無を検出する方法を提供する：

a) 患者の便試料から処理されていないゲノム DNA を取得する；

b) a) のゲノム DNA またはその断片を 1 以上の試薬で処理し、メチル化されてい
ないシトシン塩基をウラシルまたはハイブリダイゼーションの特性に関してシトシンとは検
出可能に異なる別の塩基に変換する；

c) b) の処理されたゲノム DNA を鋳型として用いて定量 P C R (q P C R) を行い
、患者における B M P 3 遺伝子の C t 値を $\Delta C t 1$ として決定する；

20

d) b) の処理されたゲノム DNA を鋳型として用いて q P C R を行い、患者における
N D R G 4 遺伝子の C t 値を $\Delta C t 2$ として決定する；

e) 処理されていないゲノム DNA を鋳型として用いて q P C R を行い、患者における
変異 K R A S 遺伝子の C t 値を $\Delta C t 3$ として決定する；

f) 便試料中のヘモグロビンタンパク質の免疫化学的便潜血検査を行い、スコアを F I
T として決定する；

g) K の値を決定する、ここで $K = a * \Delta C t 1 + b * \Delta C t 2 + c * \Delta C t 3 + d * F I T + X$ であり、a、b、c、d、X は臨床定数である；および

h) 総合指数 P の値を決定する、ここで $P = e^K / (1 + e^K)$ であり、e は自然定数
である。

30

【 0 0 8 9 】

臨床定数 a、b、c、d および X は、患者集団間の臨床データの分布を分析することに
よって決定され得る。

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施態様において、P が所定の閾値以上である場合、患者は C R C および /
または A A を有すると判定され、P が所定の閾値未満である場合、患者は健常であると判
定される。

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施態様において、所定の閾値は、臨床データの分布 (C R C および / また
は A A を有すると判定されている患者および C R C および / または A A を有しないと判定
されている患者から得られた臨床データなど) から計算される。

40

【 0 0 9 2 】

いくつかの実施態様において、B M P 3 遺伝子を増幅するための q P C R は、第 1 のプ
ライマー対および第 1 のプローブを含み、ここで第 1 のプライマー対および第 1 のプロー
ブは以下からなる群から選択される：

i) 配列番号 3 を含む順方向プライマー、配列番号 4 を含む逆方向プライマー、および
配列番号 5 を含むプローブ；

i i) 配列番号 9 を含む順方向プライマー、配列番号 1 0 を含む逆方向プライマー、お
よび配列番号 1 1 を含むプローブ；ならびに

i i i) 配列番号 1 5 を含む順方向プライマー、配列番号 1 6 を含む逆方向プライマー

50

、および配列番号 17 を含むプローブ。

【0093】

いくつかの実施態様において、NDRG4 遺伝子を増幅するための qPCR は、第 2 のプライマー対および第 2 のプローブを含み、ここで第 2 のプライマー対および第 2 のプローブは以下からなる群から選択される：

i v) 配列番号 6 を含む順方向プライマー、配列番号 7 を含む逆方向プライマー、および配列番号 8 を含むプローブ；

v) 配列番号 12 を含む順方向プライマー、配列番号 13 を含む逆方向プライマー、および配列番号 14 を含むプローブ；ならびに

v i) 配列番号 18 を含む順方向プライマー、配列番号 19 を含む逆方向プライマー、および配列番号 20 を含むプローブ。

10

【0094】

いくつかの実施態様において、本方法は、以下を用いることを含む：

i) 試料中の BMP3 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 3 を含む順方向プライマー、配列番号 4 を含む逆方向プライマー、および配列番号 5 を含むプローブ、ならびに

i i) 試料中の NDRG4 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 6 を含む順方向プライマー、配列番号 7 を含む逆方向プライマー、および配列番号 8 を含むプローブ。

20

【0095】

いくつかの実施態様において、本方法は、以下を用いることを含む：

i) 試料中の BMP3 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 9 を含む順方向プライマー、配列番号 10 を含む逆方向プライマー、および配列番号 11 を含むプローブ、ならびに

i i) 試料中の NDRG4 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 12 を含む順方向プライマー、配列番号 13 を含む逆方向プライマー、および配列番号 14 を含むプローブ。

【0096】

いくつかの実施態様において、本方法は、以下を用いることを含む：

i) 試料中の BMP3 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 15 を含む順方向プライマー、配列番号 16 を含む逆方向プライマー、および配列番号 17 を含むプローブ、ならびに

i i) 試料中の NDRG4 遺伝子の少なくとも 1 つの CpG ジヌクレオチドのメチル化状態またはレベルを検出するための、配列番号 18 を含む順方向プライマー、配列番号 19 を含む逆方向プライマー、および配列番号 20 を含むプローブ。

30

【0097】

いくつかの実施態様において、第 1 のプローブおよび第 2 のプローブはともに蛍光ドナーおよびアクセプターフルオロフォアを含む。いくつかの実施態様において、第 1 のプローブおよび第 2 のプローブは、TAQMANN (登録商標) プローブである。

【0098】

いくつかの実施態様において、変異 KRAS 遺伝子は、G12D、G12V、G12C、G13D、G12A、G12R、G12S および G13C からなる群から選択される少なくとも 1 つの KRAS 変異を含む。

40

【0099】

いくつかの実施態様において、免疫化学的便潜血検査は、金コロイド標識抗体を含む。

【0100】

いくつかの実施態様において、本方法の工程 c) および工程 d) は、B2M 遺伝子を参照遺伝子として用いることを含む。

【0101】

いくつかの実施態様において、本方法は、以下を用いることを含む：

50

- (1) 試料中の B M P 3 メチル化を検出するための陽性標準および陰性標準、ならびに
(2) 試料中の N D R G 4 メチル化を検出するための陽性標準および陰性標準。

【 0 1 0 2 】

いくつかの実施態様において、B M P 3 メチル化を検出するための陽性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

G T T A G T T T G G T C G G G T G T T T T T A A A A A T A A A G C G A G G A G G
G A A G G T A T A G A T A G A T T T T T G A A A A T A T T C G G G T T A T A T A C
G T C G C G A T T T A T A G T T T T T T T T T A G C G T T G G A G T G G A G A C
G G C G T T C G T A G C G T T T T G C G C G G G T G A G G T T C G C G T A G T T
G T T G G G G A A G A G T T T A T T T G T T A G G T T G C G T T G G G T T A G C
G T A G T A A G T G G G G T T G G T C G T T A T T T C G T T G T A T T C G G T C
G C G T T T C G G G T T T C G T G C G T T T T C G T T T T A G (配列番号 6 7) 。

10

【 0 1 0 3 】

いくつかの実施態様において、B M P 3 メチル化を検出するための陰性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

G T T A G T T T G G T T G G G T G T T T T T A A A A A T A A A G T G A G G A G G
G A A G G T A T A G A T A G A T T T T T G A A A A T A T T T G G G T T A T A T A T
G T T G T G A T T T A T A G T T T T T T T T T A G T G T T G G A G T G G A G A T
G G T G T T T G T A G T G T T T T G T G T G G G T G A G G T T T G T G T A G T T
G T T G G G G A A G A G T T T A T T T G T T A G G T T G T G T T G G G T T A G T
G T A G T A A G T G G G G T T G G T T G T T A T T T T G T T G T A T T T G G T T
G T G T T T T G G G T T T T G T G T G T T T T T G T T T T A G (配列番号 6 8) 。

20

【 0 1 0 4 】

いくつかの実施態様において、N D R G 4 メチル化を検出するための陽性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

T G A G A A G T C G G C G G G G G C G C G G A T C G A T C G G G G T G T T T T T
T A G G T T T C G C G T C G C G G T T T T C G T T C G T T T T T T C G T T C G T
T T A T C G G G T A T T T T A G T C G C G T A G A A G G C G G A A G T T A C G C
G C G A G G G A T C G C G G T T C G T T C G G G A T T A G T T T T A G G T T C G
G T A T C G T T T C G C G G G T C G A G C G T T T A T A T T C G T T A A A T T T
A C G C G G G T A C G T T T T C G C G G C G T A T C G T T T T T A G T T (配列番
号 6 9) 。

30

【 0 1 0 5 】

いくつかの実施態様において、N D R G 4 メチル化を検出するための陰性標準は、以下のポリヌクレオチド配列を含む：

T G A G A A G T T G G T G G G G G T G T G G A T T G A T T G G G G T G T T T T T
T A G G T T T T G T G T T G T G G T T T T T G T T T G T T T T T T T G T T T G T
T T A T T G G G T A T T T T A G T T G T G T A G A A G G T G G A A G T T A T G T
G T G A G G G A T T G T G G T T T G T T T G G G A T T A G T T T T A G G T T T G
G T A T T G T T T T G T G G G T T G A G T G T T T A T A T T T G T T A A A T T T
A T G T G G G T A T G T T T T T G T G G T G T A T T G T T T T T A G T T (配列番
号 7 0) 。

40

いくつかの実施態様において、本方法は、工程 c) および工程 d) において品質管理標準を増幅することを含む。

【 0 1 0 6 】

また、以下を含む必要とする患者における大腸がん (C R C) および / または進行腺腫 (A A) を診断および処置する方法が提供される：本開示のキットを用いて患者における C R C および / または A A の有無を決定する、および患者における C R C および / または A A の有無に応じて患者を処置する。

【 0 1 0 7 】

50

また、以下を含む必要とする患者における大腸がん（CRC）および／または進行腺腫（AA）を診断および処置する方法が提供される：本明細書に記載の方法を用いて患者におけるCRCおよび／またはAAの有無を決定する、および患者におけるCRCおよび／またはAAの有無に応じて患者を処置する。

【図面の簡単な説明】

【0108】

【図1A】図1A～図1Dは、2つのBMP3およびNDRG4遺伝子のCpGアイランド予測の結果および増幅産物の相対的な位置を示す。「Y」、「R」は縮重塩基である。BMP3遺伝子のプロモーター領域のCpGアイランド予測の結果。

【図1B】図1A～図1Dは、2つのBMP3およびNDRG4遺伝子のCpGアイランド予測の結果および増幅産物の相対的な位置を示す。「Y」、「R」は縮重塩基である。BMP3遺伝子の増幅産物の相対的な位置。

【図1C】図1A～図1Dは、2つのBMP3およびNDRG4遺伝子のCpGアイランド予測の結果および増幅産物の相対的な位置を示す。「Y」、「R」は縮重塩基である。NDRG4遺伝子のプロモーター領域のCpGアイランド予測の結果。

【図1D】図1A～図1Dは、2つのBMP3およびNDRG4遺伝子のCpGアイランド予測の結果および増幅産物の相対的な位置を示す。「Y」、「R」は縮重塩基である。NDRG4遺伝子の増幅産物の相対的な位置。

【0109】

【図2A】図2Aは、白人集団およびアジア人集団におけるBMP3のメチル化CpG部位の差異を示す。

【図2B】図2Bは、白人集団およびアジア人集団におけるNDRG4遺伝子のメチル化CpG部位の差異を示す。

【0110】

【図3A】図3Aは、好ましい群1におけるプライマーおよびプローブを用いたBMP3の分析的感度増幅曲線を示す。

【図3B】図3Bは、好ましい群1におけるプライマーおよびプローブを用いたNDRG4の分析的感度増幅曲線を示す。

【図3C】図3Cは、好ましい群2におけるプライマーおよびプローブを用いたBMP3の分析的感度増幅曲線を示す。

【図3D】図3Dは、好ましい群2におけるプライマーおよびプローブを用いたNDRG4の分析的感度増幅曲線を示す。

【図3E】図3Eは、好ましい群3におけるプライマーおよびプローブを用いたBMP3の分析的感度増幅曲線を示す。

【図3F】図3Fは、好ましい群3におけるプライマーおよびプローブを用いたNDRG4の分析的感度増幅曲線を示す。

【図3G】図3Gは、比較群1におけるプライマーおよびプローブを用いたBMP3の分析的感度増幅曲線を示す。

【図3H】図3Hは、比較群1におけるプライマーおよびプローブを用いたNDRG4の分析的感度増幅曲線を示す。

【図3I】図3Iは、比較群2におけるプライマーおよびプローブを用いたBMP3の分析的感度増幅曲線を示す。

【図3J】図3Jは、比較群2におけるプライマーおよびプローブを用いたNDRG4の分析的感度増幅曲線を示す。

【図3K】図3Kは、比較群3におけるプライマーおよびプローブを用いたBMP3の分析的感度増幅曲線を示す。

【図3L】図3Lは、比較群3におけるプライマーおよびプローブを用いたNDRG4の分析的感度増幅曲線を示す。

【0111】

【図4A】図4Aは、好ましい群1におけるプライマーおよびプローブを用いたBMP3

10

20

30

40

50

の分析的特異度増幅曲線を示す。

【図 4 B】図 4 B は、好ましい群 1 におけるプライマーおよびプローブを用いた N D R G 4 の分析的特異度増幅曲線を示す。

【図 4 C】図 4 C は、好ましい群 2 におけるプライマーおよびプローブを用いた B M P 3 の分析的特異度増幅曲線を示す。

【図 4 D】図 4 D は、好ましい群 2 におけるプライマーおよびプローブを用いた N D R G 4 の分析的特異度増幅曲線を示す。

【図 4 E】図 4 E は、好ましい群 3 におけるプライマーおよびプローブを用いた B M P 3 の分析的特異度増幅曲線を示す。

【図 4 F】図 4 F は、好ましい群 3 におけるプライマーおよびプローブを用いた N D R G 4 の分析的特異度増幅曲線を示す。

10

【図 4 G】図 4 G は、比較群 1 におけるプライマーおよびプローブを用いた B M P 3 の分析的特異度増幅曲線を示す。

【図 4 H】図 4 H は、比較群 1 におけるプライマーおよびプローブを用いた N D R G 4 の分析的特異度増幅曲線を示す。

【図 4 I】図 4 I は、比較群 2 におけるプライマーおよびプローブを用いた B M P 3 の分析的特異度増幅曲線を示す。

【図 4 J】図 4 J は、比較群 2 におけるプライマーおよびプローブを用いた N D R G 4 の分析的特異度増幅曲線を示す。

【図 4 K】図 4 K は、比較群 3 におけるプライマーおよびプローブを用いた B M P 3 の分析的特異度増幅曲線を示す。

20

【図 4 L】図 4 L は、比較群 3 におけるプライマーおよびプローブを用いた N D R G 4 の分析的特異度増幅曲線を示す。

【 0 1 1 2 】

【図 5 A】図 5 A は、臨床試料中の B M P 3 メチル化を検出するための好ましい群 1 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

【図 5 B】図 5 B は、臨床試料中の B M P 3 メチル化を検出するための好ましい群 2 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

【図 5 C】図 5 C は、臨床試料中の B M P 3 メチル化を検出するための好ましい群 3 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

30

【図 5 D】図 5 D は、同じアッセイにおける B M P 3 メチル化を検出するための比較群 1 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

【図 5 E】図 5 E は、同じアッセイにおける B M P 3 メチル化を検出するための比較群 2 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

【図 5 F】図 5 F は、同じアッセイにおける B M P 3 メチル化を検出するための比較群 3 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

【 0 1 1 3 】

【図 6 A】図 6 A は、臨床試料中の N D R G 4 メチル化を検出するための好ましい群 1 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

【図 6 B】図 6 B は、臨床試料中の N D R G 4 メチル化を検出するための好ましい群 2 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

40

【図 6 C】図 6 C は、臨床試料中の N D R G 4 メチル化を検出するための好ましい群 3 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

【図 6 D】図 6 D は、同じアッセイにおける N D R G 4 メチル化を検出するための比較群 1 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

【図 6 E】図 6 E は、同じアッセイにおける N D R G 4 メチル化を検出するための比較群 2 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

【図 6 F】図 6 F は、同じアッセイにおける N D R G 4 メチル化を検出するための比較群 3 におけるプライマーおよびプローブを用いた増幅曲線を示す。

【発明を実施するための形態】

50

【 0 1 1 4 】

定義

「 1 つの実施態様」、「ある実施態様」、「 1 つの例」および「ある例」への言及は、そのように記載された実施態様または例が特定の特徴、構造、特性、性質、要素または制限を含み得るが、すべての実施態様または例が必ずしもその特定の特徴、構造、特性、性質、要素または制限を含むわけではないことを示している。さらに、語句「ある実施態様において」の繰り返しの使用は必ずしも同一の実施態様を指すわけではないが、そうであり得る。

【 0 1 1 5 】

本明細書における「核酸」または「オリゴヌクレオチド」または「ポリヌクレオチド」は、共有結合で互いに連結された少なくとも 2 つのヌクレオチドを意味する。一本鎖の描写はまた、相補鎖の配列を規定する。したがって、核酸はまた、描写された一本鎖の相補鎖を包含する。核酸の多くのバリエーションが、所定の核酸と同じ目的のために使用され得る。したがって、核酸はまた、実質的に同一の核酸およびその相補体を包含する。一本鎖は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で標的配列にハイブリダイズし得るプローブを提供する。したがって、核酸はまた、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするプローブを包含する。核酸は一本鎖または二本鎖であり得、または二本鎖配列および一本鎖配列の両方の一部を含み得る。核酸は、DNA、ゲノムおよび cDNA の両方、RNA、またはハイブリッドであり得、ここで核酸は、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドの組合せ、ならびにウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、イソシトシンおよびイソグアニンを含む塩基の組合せを含み得る。核酸は、化学合成法または組換え法によって得られ得る。

10

20

【 0 1 1 6 】

本明細書における語句「必要とする対象」は、がんを有することが知られている動物またはヒト対象、がんを有するリスクがある動物またはヒト対象（例えば、遺伝的な素因がある対象、がんの病歴および / または家族歴を有する対象、発がん物質、職業上の危険、環境上の危険性にさらされた対象）、および / またはがんの疑わしい臨床徴候を示す対象（例えば、血便またはメレナ、原因不明の疼痛、発汗、原因不明の発熱、原因不明の（最大で食欲不振までの）体重減少、排便習慣の変化（便秘および / または下痢）、テネスマス（特に直腸がんの場合の不完全な排便の感覚）、貧血および / または全身の脱力感）を指す。追加的または代替的に、必要とする対象は、定期的な健康診断を受けている健康なヒト対象であり得る。

30

【 0 1 1 7 】

本明細書における用語「約」は $\pm 10\%$ を指す。

【 0 1 1 8 】

語句「本質的にからなる」は、追加の成分および / または工程が特許請求の範囲に記載の組成物または方法の基本的かつ新規な特性を実質的に変更しない場合にのみ、組成物または方法が追加の成分および / または工程を含み得ることを意味する。

40

【 0 1 1 9 】

本明細書において、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈において明確な指示がない限り、複数形の指示対象を含む。例えば、用語「化合物（a compound）」または「少なくとも 1 つの化合物」は、複数の化合物（それらの混合物を含む）を含み得る。

【 0 1 2 0 】

本明細書における「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」とは、（核酸の混合物などにおいて）第 1 の核酸配列（例えば、プローブ）が第 2 の核酸配列（例えば、標的）にハイブリダイズする条件を意味する。ストリンジェントな条件は配列依存的であり、種々の状況において異なる。ストリンジェントな条件は、規定されるイオン強度 pH における特定の配列の熱的融点（ T_m ）より約 5 ~ 10 低いように選択され得る。 T_m は、標的に相補的なプローブの 50 % が平衡状態において標的配列にハイブリダイズする

50

(規定されるイオン強度、pHおよび核濃度における)温度であり得る(標的配列は過剰に存在するため、 T_m では、プローブの50%が平衡状態において占有される)。ストリンジェントな条件は、塩濃度が約1.0M未満のナトリウムイオン(pH7.0~8.3において約0.01~1.0Mのナトリウムイオン濃度(または他の塩)など)であり、温度が短いプローブ(例えば約10~50ヌクレオチド)について少なくとも約30であり、長いプローブ(例えば約50ヌクレオチドより長い)について少なくとも約60である条件であり得る。ストリンジェントな条件はまた、ホルムアミドなどの不安定化物質の添加により達成され得る。選択的または特異的なハイブリダイゼーションのために、陽性のシグナルは、バックグラウンドのハイブリダイゼーションの少なくとも2~10倍であり得る。例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件には以下が含まれる: 50%ホルムアミド、5×SSCおよび1%SDSで42においてインキュベートする、または5×SSC、1%SDSで65においてインキュベートし、0.2×SSCおよび0.1%SDSで65において洗浄する。

【0121】

本明細書における「実質的に相補的」とは、第1の配列が、第2の配列の相補体と8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100またはそれ以上のヌクレオチドの領域にわたって少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%同一であるか、または2つの配列がストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズすることを意味する。

【0122】

本明細書における「実質的に同一」とは、第1の配列が第2の配列の相補体と実質的に相補的である場合に、第1の配列および第2の配列が、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100またはそれ以上のヌクレオチドもしくはアミノ酸の領域または核酸に関して少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%同一であることを意味する。

【0123】

本明細書において、用語「診断」は、病理または症状を分類すること、病理の重症度(例えば、グレードまたは段階)を決定すること、病理の進行をモニターすること、病理の結果および/または回復の見込みを予測することを指す。

【0124】

語句「本質的にからなる」は、追加の成分および/または工程が特許請求の範囲に記載の組成物または方法の基本的かつ新規な特性を実質的に変更しない場合にのみ、組成物または方法が追加の成分および/または工程を含み得ることを意味する。

【0125】

1. CRCおよびAAの中国人集団におけるBMP3およびNDRG4遺伝子のプロモーター領域の高メチル化CpG部位を含むDNA配列

本発明は、アジア人集団(例えば中国人集団)におけるBMP3およびNDRG4遺伝子のプロモーター領域の詳細な高メチル化CpG部位を含むDNA配列を提供し、これはCRCおよびAAの検出のためのマーカーとして使用され得る。

【0126】

いくつかの実施態様において、以下のBMP3遺伝子の天然配列(5'から3')が提供され、これは上付き文字「m」によって標識される潜在的にメチル化されている部位を示す:

G C C A G T T T G G C ^m C G G G T G T T C C C A A A A T A A A G ^m C G A G G A
G G G A A G G T A C A G A C A G A T C T T G A A A A C A C C ^m C G G G C C A C A
C A ^m C G C ^m C G ^m C G A C C T A C A G C T C T T T C T C A G ^m C G T T G G A G

T G G A G A ^m C G G ^m C G C C C G C A G ^m C G C C C T G ^m C G ^m C G G G T G A G
 G T C ^m C G ^m C G C A G C T G C T G G G G A A G A G C C C A C C T G T C A G G C
 T G ^m C G C T G G G T C A G ^m C G C A G C A A G T G G G G C T G G C ^m C G C T A
 T C T ^m C G C T G C A C C C G G C ^m C G ^m C G T C C ^m C G G G C T C ^m C G T G ^m
 C G C C C T ^m C G C C C C A G (配列番号 6 5)。

【 0 1 2 7 】

いくつかの実施態様において、以下の N D R G 4 遺伝子の天然配列 (5 ' から 3 ') が提供され、これは上付き文字「 m 」によって標識される潜在的にメチル化されている部位を示す：

T G A G A A G T ^m C G G ^m C G G G G G ^m C G ^m C G G A T ^m C G A C ^m C G G G G T
 G T C C C C C A G G C T C ^m C G ^m C G T ^m C G ^m C G G T C C C ^m C G C T ^m C G C
 C C T C C ^m C G C C ^m C G C C C A C ^m C G G G C A C C C C A G C ^m C G ^m C G C A
 G A A G G ^m C G G A A G C C A ^m C G ^m C G ^m C G A G G G A C ^m C G ^m C G G T C ^m
 C G T C ^m C G G G A C T A G C C C C A G G C C ^m C G G C A C ^m C G C C C ^m C G ^m
 C G G G C ^m C G A G ^m C G C C C A C A C C ^m C G C C A A A C C C A ^m C G ^m C G G
 G C A ^m C G C C C C ^m C G ^m C G G ^m C G C A C ^m C G C C C C C A G C C (配列番号
 6 6)。

【 0 1 2 8 】

天然のゲノム DNA またはその断片を 1 以上の試薬で処理し、メチル化されていないシトシン塩基を (例えば重亜硫酸塩によって) ウラシルまたはハイブリダイゼーションの特性に関してシトシンとは検出可能に異なる別の塩基に変換した後、変換された B M P 3 遺伝子の配列は以下 (5 ' から 3 ') であり、これは上付き文字「 m 」によって標識される潜在的にメチル化されている部位を示す：

G T T A G T T T G G T ^m C G G G T G T T T T T A A A A T A A A G ^m C G A G G A
 G G G A A G G T A T A G A T A G A T T T T G A A A A T A T T ^m C G G G T T A T A
 T A ^m C G T ^m C G ^m C G A T T T A T A G T T T T T T T T T A G ^m C G T T G G A G
 T G G A G A ^m C G G ^m C G T T ^m C G T A G ^m C G T T T T T G ^m C G ^m C G G G T G A
 G G T T ^m C G ^m C G T A G T T G T T G G G G A A G A G T T T A T T T G T T A G G
 T T G ^m C G T T G G G T T A G ^m C G T A G T A A G T G G G G T T G G T ^m C G T T
 A T T T ^m C G T T G T A T T ^m C G G T ^m C G ^m C G T T T ^m C G G G T T T ^m C G T
 G ^m C G T T T T ^m C G T T T T A G (配列番号 1)。

【 0 1 2 9 】

天然のゲノム DNA またはその断片を 1 以上の試薬で処理し、メチル化されていないシトシン塩基を (例えば重亜硫酸塩によって) ウラシルまたはハイブリダイゼーションの特性に関してシトシンとは検出可能に異なる別の塩基に変換した後、変換された N D R G 4 遺伝子の配列は以下 (5 ' から 3 ') であり、これは上付き文字「 m 」によって標識される潜在的にメチル化されている部位を示す：

T G A G A A G T ^m C G G ^m C G G G G G ^m C G ^m C G G A T ^m C G A T ^m C G G G G T
 G T T T T T T A G G T T T ^m C G ^m C G T ^m C G ^m C G G T T T T ^m C G T T ^m C G T
 T T T T T ^m C G T T ^m C G T T T A T ^m C G G G T A T T T T A G T ^m C G ^m C G T A
 G A A G G ^m C G G A A G T T A ^m C G ^m C G ^m C G A G G G A T ^m C G ^m C G G T T ^m
 C G T T ^m C G G G A T T A G T T T T A G G T T ^m C G G T A T ^m C G T T T ^m C G ^m
 C G G G T ^m C G A G ^m C G T T T A T A T T ^m C G T T A A A T T T A ^m C G ^m C G G
 G T A ^m C G T T T T ^m C G ^m C G G ^m C G T A T ^m C G T T T T T A G T T (配列番号
 2)。

【 0 1 3 0 】

本開示のアジア人集団における B M P 3 および N D R G 4 遺伝子のプロモーター領域の詳細な高メチル化 C p G 部位を含む DNA 配列は、アジア人集団において C R C および / または A A を検出するのに特に有用である。例えば、プライマーおよびプローブは、 B M P 3 および / または N D R G 4 のメチル化状態およびレベルを決定し、従って必要とする

患者における腫瘍状態を決定するためのツールとして、BMP3および/またはNDRG4遺伝子における1以上の特定のメチル化部位を標的とするように設計され得る。

【0131】

2. BMP3およびNDRG4遺伝子のメチル化を検出するための各3組の好ましいプライマーおよびプローブならびに対応する試薬。

本発明は、BMP3およびNDRG4遺伝子のメチル化レベルを検出するための各3組の好ましいプライマーおよびプローブを提供する。これらのプライマーおよびプローブは、アジア人集団（例えば中国人集団）において高頻度でメチル化されているCpG部位を標的とするように設計されている。

【0132】

これらの好ましいプライマーおよびプローブの特定の組合せは、既存の市販品（ColoGuard（登録商標）など）と比較して、CRCおよびAAの検出（特にアジア人集団におけるAAの検出）において驚くほど高い感度および特異度を有している。

プライマーおよびプローブの配列は以下である：

【表1】

遺伝子	群	プライマー/プローブ	配列番号	配列（5'から3'）
BMP3	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
		逆方向プライマー	配列番号4	ATAAACTCTTCCCAACAACCTACGCGAA
		プローブ	配列番号5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
		逆方向プライマー	配列番号10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCAAA
		プローブ	配列番号11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	好ましい群3	順方向プライマー	配列番号15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGATT
		逆方向プライマー	配列番号16	ACTTACTACGCTAACCCAAACG
		プローブ	配列番号17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
NDRG4	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
		逆方向プライマー	配列番号7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
		プローブ	配列番号8	CGTCGCGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT
	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
		逆方向プライマー	配列番号13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
		プローブ	配列番号14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
	好ましい群3	順方向プライマー	配列番号18	CGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCG
		逆方向プライマー	配列番号19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
		プローブ	配列番号20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG

【0133】

本開示のオリゴヌクレオチドは、アジア人患者から得られた生体試料中のBMP3またはNDRG4のプロモーター領域における高メチル化CpG部位の極めて特異的な増幅を有利に可能にする。

【0134】

いくつかの実施態様において、配列番号3～20の配列と部分的または完全に相補的なオリゴヌクレオチドを提供する。

【0135】

いくつかの実施態様において、プローブ配列（配列番号5、11、17、8、14および20など）と比較して1つ以上の修飾を有するオリゴヌクレオチドを提供する。いくつかの実施態様において、修飾は、配列番号5、11、17、8、14および20に記載のヌクレオチド配列のうち1つの5'末端および/または3'末端において生じ得る。

【0136】

ヌクレオチドをその構造上の任意の位置において修飾するのに使用され得る修飾された塩基部分の例には、限定されないが、以下が挙げられる：特に、5-フルオロウラシル、

10

20

30

40

50

5 - ブロモウラシル、5 - クロロウラシル、5 - ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、アセチルシトシン、5 - (カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5 - カルボキシメチルアミノメチル - 2 - チオウリジン、5 - カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、ベータ - D - ガラクトシルケウオシン、イノシン、N - 6 - ソペンテニルアデニン、1 - メチルグアニン、1 - メチルイノシン、2 , 2 - ジメチルグアニン、2 - メチルアデニン、2 - メチルグアニン、3 - メチルシトシン、5 - メチルシトシン、N - 6 - アデニン、7 - メチルグアニン、5 - メチルアミノメチルウラシル、メトキシアミノメチル(methoxyarninomethyl) - 2 - チオウラシル、ベータ - D - マンノシルケウオシン、5 ' - メトキシカルボキシメチルウラシル、5 - メトキシウラシル、2 - メチルチオ - N 6 - イソペンテニルアデニン、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、プソイドウラシル、ケウオシン、2 - チオシトシン、5 - メチル - 2 - チオウラシル、2 - チオウラシル、4 - チオウラシル、5 - メチルウラシル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル - 5 - オキシ酢酸、5 - メチル - 2 - チオウラシル、3 - (3 - アミノ - 3 - N - 2 - カルボキシプロピル)ウラシル、および 2 , 6 - ジアミノプリン。

【0137】

ヌクレオチドをその構造上の任意の位置において修飾するのに使用され得る修飾された糖部分の例には、限定されないが、以下が含まれる：アラビノース、2 - フルオロアラビノース、キシロース、およびヘキソース、または修飾されたリン酸骨格成分（ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロアミドチオエート、ホスホロアミダート、ホスホロジアミダート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、またはそれらのホルムアセタールもしくはアナログなど）。

【0138】

いくつかの実施態様において、配列番号 5、11、17、8、14 および 20 の配列におけるオリゴヌクレオチドは、非天然ヌクレオチド（人工核酸など）で置換されている。人工核酸には、限定されないが、ペプチド核酸（PNA）、モルホリノ、ロックド核酸（LNA）、グリコール核酸（GNA）、およびトレオース核酸（TNA）が含まれる。これらはそれぞれ、分子骨格の変化によって天然に存在する DNA または RNA とは区別される。

【0139】

いくつかの実施態様において、本開示のプロープは、5' における標識およびプロープを含む。

【0140】

いくつかの実施態様において、プロープの 5' における標識には、蛍光色素（フルオロフォアなど）が含まれる。本明細書において、フルオロフォアは、光励起時に光を再放出できる蛍光化合物である。フルオロフォアは通常、いくつかの組み合わせられた芳香族基、またはいくつかの π 結合を有する平面状分子もしくは環状分子を含む。非タンパク質有機フルオロフォアには、限定されないが、キサンテン誘導体（例えば、フルオレセイン、ローダミン、オレゴングリーン、エオシンおよびテキサスレッド）；シアニン誘導体（例えば、シアニン、インドカルボシアニン、オキサカルボシアニン、チアカルボシアニンおよびメロシアニン）；スクアライン誘導体および環置換スクアライン（例えば、SeTa、SeTau および Square 色素）；ナフタレン誘導体（例えば、ダンシル誘導体およびプロダン誘導体）；クマリン誘導体；オキサジアゾール誘導体（例えば、ピリジルオキサゾール、ニトロベンゾオキサジアゾールおよびベンゾオキサジアゾール）；アントラセン誘導体（例えば、DRAQ5、DRAQ7 および CyTRAK Orange を含むアントラキノン類）；ピレン誘導体（カスケードブルーなど）；オキサジン誘導体（例えば、ナイルレッド、ナイルブルー、ナイルブルー、クレシルバイオレット、オキサジン 170 など）；アクリジン誘導体（例えば、プロフラビン、アクリジンオレンジ、アクリジンイエローなど）；アリールメチン誘導体（例えば、オーラミン、クリスタルバイオレット、マラカイトグリーン）；テトラピロール誘導体（例えば、ポルフィン、フタロシアニン、ピリルビン）が含まれる。特に例示すると、限定されないが、VIC、PET、テキ

10

20

30

40

50

サスレッド、Cy 3、Cy 5、FAM (6 - カルボキシフルオレセイン)、HEX (6 - カルボキシ - 2', 4, 4', 5', 7, 7' - ヘキサクロフルオレセイン)、ROX (5 (6) - カルボキシ - X - ロードミン)、JOE (6 - カルボキシ - 4', 5' - ジクロロ - 21, 71 - ジメトキシフルオレセイン)、TET (5' - テトラクロロ - フルオレセインホスホロアミダイト)、NED (フルオレセインベンゾキサンテン)、TAMRA (6 - カルボキシ - N, N, N, N - テトラメチルロードミン)、FITC (フルオレセインイソチオシアネート) が挙げられる。本明細書において開示されるプローブに使用され得る特定のフルオロフォアの例は当業者に公知であり、Nazarenko et alの米国特許第 5, 866, 366 号において提供されるフルオロフォア (特に、4 - アセトアミド - 4' - イソチオシアナトスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸; アクリジンおよび誘導体 (アクリジンおよびアクリジンイソチオシアネートなど)、5 - (2' - アミノエチル) アミノナフタレン - 1 - スルホン酸 (EDANS)、4 - アミノ - N - [3 - ビニルスルホニル] フェニル] ナフタリミド - 3, 5 - ジスルホン酸塩 (ルシファーイエロー VS)、N - (4 - アニリノ - 1 - ナフチル) マレイミド、アントラニルアミド; プリリアントイエロー; クマリンおよび誘導体 (クマリン、7 - アミノ - 4 - メチルクマリン (AMC、クマリン 120)、7 - アミノ - 4 - トリフルオロメチルクマリン (couluarin) (クマラン (Coumaran) 151) など); シアノシン; 4', 6 - ジアミニジノ (diaminidino) - 2 - フェニルインドール (DAPI); 5', 5' - ジプロモピロガロール - スルホンフタレイン (プロモピロガロールレッド); 7 - ジエチルアミノ - 3 - (4' - イソチオシアナトフェニル) - 4 - メチルクマリン; ジエチレントリアミンペンタアセテート; 4, 4' - ジイソチオシアナトジヒドロ - スチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸; 4, 4' - ジイソチオシアナトスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸; 5 - [ジメチルアミノ] ナフタレン - 1 - スルホニルクロリド (DNS、ダンシルクロリド); 4 - ジメチルアミノフェニルアゾフェニル - 4' - イソチオシアネート (DABITC); エオシンおよび誘導体 (エオシンおよびエオシンイソチオシアネートなど); エリスロシンおよび誘導体 (エリスロシン B およびエリスロシンイソチオシアネートなど); エチジウム; フルオレセインおよび誘導体 (5 - カルボキシフルオレセイン (FAM)、5 - (4, 6 - ジクロロトリアジン - 2 - イル) アミノフルオレセイン (DTAF)、2' 7' - ジメトキシ - 4' 5' - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン (JOE)、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)、QFITC (XRICTC)、- 6 - カルボキシ - フルオレセイン (HEX) および TET (テトラメチルフルオレセイン) など); フルオレスカミン; IR 144; IR 1446; マラカイトグリーンイソチオシアネート; 4 - メチルウンベリフェロン; オルトクレゾールフタレイン; ニトロチロシン; パラロースアニリン; フェノールレッド; B - フィコエリスリン; o - フタルジアルデヒド; ピレンおよび誘導体 (ピレン、ピレンブチレートおよびスクシンイミジル 1 - ピレンブチレートなど); リアクティブレッド 4 (CIBACRON (商標) プリリアントレッド 3 B - A); ロードミンおよび誘導体 (6 - カルボキシ - X - ロードミン (ROX)、6 - カルボキシロードミン (R6G)、リサミンロードミン B スルホニルクロリド、ロードミン (Rhod)、ロードミン B、ロードミン 123、ロードミン X イソチオシアネート、N, N, N', N' - テトラメチル - 6 - カルボキシロードミン (TAMRA)、テトラメチルロードミン、およびテトラメチルロードミンイソチオシアネート (TRITC) など); スルホロードミン B; スルホロードミン 101 およびスルホロードミン 101 のスルホニルクロリド誘導体 (テキサスレッド); リボフラビン; ロゾール酸およびテルビウムキレート誘導体; ライトサイクラーレッド 640; Cy 5 . 5; および Cy 56 - カルボキシフルオレセイン; ホウ素ジピロメテンジフルオリド (BODIPY); アクリジン; スチルベン; 6 - カルボキシ - X - ロードミン (ROX); Cy 3; Cy 3 . 5、Cy 5、Cy 5 . 5、VIC (登録商標) (Applied Biosystems); LC Red 640; LC Red 705; オレゴングリーン (商標); CAL Red (商標); Red 640; および Yakima yellow; ライトサイクラー (登録商標) Cyan 500; ライトサイクラー (登録商標); Red 610; Alexa 647; Alexa 555; 5 -

(2-アミノエチル)アミノ-1-ナフタレンスルホン酸(EDANS);テトラメチルローダミン(TMR);テトラメチルローダミンイソシアネート(TMRICT)、フルオレセインイソシアネート(FICT)、 χ -ローダミン、それらの誘導体、またはそれらの任意の組合せなど)を含む。さらなる蛍光色素は、米国特許第5866366号、第6818431号、第6056859号、第9140688号、第9581587号、第6165765号、第6485909号、第8158358号、第7625723号、第7560236号、第7867701号、第9150912号、第7960543号、第6555383号、第6881570号、第8198026号、第5625081号、第8445291号、第9194801号、第8835110号、第7893227号、第9243289号、第7427674号、第9512493号、米国特許出願公開第20170152552号、第20030170672号、第20160281151号、第20130084558号、第20060281100号、第20140234833号、第20150072340号、第20050089910号、第20090081677号、第2014002402220180171393号、第20060188886号、第20010018185号、第20110151446号、およびWO/2000/017330A1、WO/2008/030071A1、WO/2013/049631A1、WO/2016/179090A1、WO/2016/123895A1、WO/2003/079022A1に記載されており、これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0141】

いくつかの実施態様において、本開示のプロブは、蛍光ドナーおよびアクセプターフルオロフォアを含む。本明細書において、アクセプターフルオロフォア(例えば、「蛍光消光剤」)は、ドナーフルオロフォアからの(例えば約400~900nmの範囲の)エネルギーを吸収するフルオロフォアである。アクセプターフルオロフォアは一般に、ドナーフルオロフォアの最大吸収波長よりも通常少なくとも10nm高い(例えば少なくとも20nm高い)波長で光を吸収する。ドナーによって放出されたエネルギーが消光剤を励起できるように、アクセプターフルオロフォアはドナーフルオロフォアの発光と重なる励起スペクトルを有する。当分野で公知の任意のアクセプターフルオロフォアが利用され得る。特定の例において、アクセプターフルオロフォアは、ダーククエンチャー(Dabcyl、QSY7(Molecular Probes)、QSY9(Molecular Probes)、QSY21(Molecular Probes)、QSY33(Molecular Probes)、BLACK HOLE QUENCHERS(商標)(Glen Research、例えばBHQ-1、BHQ-2、BHQ-3)、ECLIPSE(商標)ダーククエンチャー(Epoch Biosciences)、DDQ-I、DDQ-II、Dabcyl、Eclipse、またはIOWA BLACK(商標)(Integrated DNA Technologies、例えばIowa Black FQ、Iowa Black RQ)など)である。さらなる蛍光消光剤は、米国特許第9957546号、第US9274008号、米国特許出願公開第20140295422号、第20090042205号、第20160281182号、第20180142284号、第20140147929号、およびWO/2009/009615A1、WO/2016/160572A1、WO/2016/178953A1、WO/2018/229663A1、WO/2010/051544A2、WO/2013/152220A2に記載されており、これらはそれぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。消光剤はドナーフルオロフォアの発光を減少または消光させ得る。そのような例において、ドナーフルオロフォアに十分に近接している場合にアクセプターフルオロフォアからの発光シグナルの増加を検出する(またはドナーフルオロフォアから著しく離れている場合にアクセプターフルオロフォアからの発光シグナルの減少を検出する)代わりに、消光剤がドナーフルオロフォアから著しく離れている場合にドナーフルオロフォアからの発光シグナルの増加が検出され得る(または消光剤のアクセプターフルオロフォアに十分に近接している場合にドナーフルオロフォアからの発光シグナルの減少が検出され得る)。

【0142】

いくつかの実施態様において、本開示のプライマーおよびプローブは、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) に基づく。増幅産物を検出するために使用され得る FRET を用いるオリゴヌクレオチドの例としては、線状オリゴプローブ (Hyb Probes など)、5'ヌクレアーゼオリゴプローブ (TAQMAN (登録商標) プローブ など)、ヘアピンオリゴプローブ (分子ビーコン、scorpion プライマーおよび UniPrimer など)、副溝結合プローブ、および自己蛍光性増幅産物 (sunrise プライマー など) が挙げられる。

【0143】

いくつかの実施態様において、本開示のプライマーおよび / またはプローブは他の機能的実体 (ピオチン、ハプテン、抗原、化学基、放射性物質、酵素マーカー など) によって標識されている。標識された増幅産物の検出は、例えば、蛍光法、化学発光法、濃度測定法、測光法、沈降反応、酵素反応 (酵素補強反応 (enzymatic reinforcement reaction) を含む)、SPR (「表面プラズモン共鳴」) 法、偏光解析法、屈折率の測定、反射率の測定、および類似の方法を用いて達成され得る。

10

【0144】

いくつかの実施態様において、本明細書に記載されるプライマーおよびプローブは、患者における BMP3 および / または NDRG4 遺伝子のメチル化状態およびレベルを決定するために定量 PCR において使用され得る。いくつかの実施態様において、1 以上の参照遺伝子を増幅するために追加の反応が含まれ得る。いくつかの実施態様において、参照遺伝子は、活性が CRC および AA の有無によって影響されず、BMP3 および NDRG4 のメチル化状態およびレベルによって影響されない患者における遺伝子である。いくつかの実施態様において、参照遺伝子には、限定されないが、β グロビン (HBB)、テロメラゼ (TERT)、グリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、アルブミン (ALB)、β アクチン (ACTB)、ベータ 2 マイクログロブリン (B2M)、および T 細胞受容体 γ (TRG) が含まれる。

20

【0145】

いくつかの実施態様において、B2M 遺伝子は、BMP3 / NDRG4 のメチル化状態およびレベルを検出するための定量 PCR において参照遺伝子として使用される。

【0146】

いくつかの実施態様において、1 つ以上の他の対照が導入され得、これには限定されないが、(試薬または装置の汚染を検出するため、および陽性結果を確認するための) 鋳型を含まない対照、(分解された標識プローブによって生成されるバックグラウンド蛍光を検出するための) 増幅されない対照、および (阻害剤または誤動作を検出するため、ならびに試薬および装置が機能していることを確認するための) 陽性対照が含まれる。

30

【0147】

いくつかの実施態様において、qPCR は、試料中のメチル化された BMP3 遺伝子またはメチル化された NDRG4 遺伝子の増幅があるか否かを決定するために使用される。BMP3 または NDRG4 のプローブから検出されたシグナルは、標準曲線を参照することによって、または Ct 値を参照遺伝子と比較することによって定量される。ハウスキーピング遺伝子の分析は、結果を正規化するために使用されることが多い。サイクル閾値 (Ct) は、蛍光シグナルが所定の閾値を超える (例えば、陰性対照試料における増幅のレベルなどのバックグラウンドレベルを超える) のに必要なサイクル数として規定される。いくつかの実施態様において、閾値は、qPCR 装置のソフトウェアまたは他の適切な方法によって自動的に決定される。いくつかの実施態様において、閾値は、陰性対照試料中の末端蛍光値より少し高い値 (例えば、約 0.01%、0.1%、1%、5% または 10% 高い値) に設定される。

40

【0148】

いくつかの実施態様において、検査試料中の BMP3 または NDRG4 の増幅に関連する Ct 値が () 約 35、34、33、32、31、30 またはそれ以下である場合、試料はメチル化 BMP3 または NDRG4 を含むと判定され、患者は CRC および / または

50

A Aを有し（陽性結果）、そうでなければ試料はメチル化B M P 3またはN D R G 4を含まないと判定され、患者はC R CまたはA Aを有しない（陰性結果）。参照遺伝子の増幅について、試料中の対照遺伝子の増幅に関連するC t値が（ ）約34、33、32、31、30、29またはそれ以下である場合、参照遺伝子の増幅は陽性であると判定され、そうでなければ参照遺伝子の増幅は陰性であると判定される。参照遺伝子の増幅が陰性であると判定された場合、検査結果は無効となる。

【0149】

いくつかの実施態様において、B M P 3に関連するC t値の差を参照遺伝子の増幅に関連するC t値と比較し（ $\Delta C t = C t_{\text{対象の遺伝子}} - C t_{\text{参照遺伝子}}$ ）、 $\Delta C t 1$ と呼ぶ。いくつかの実施態様において、 $\Delta C t 1$ が所定の臨界値以下（臨界値）である場合、試料はB M P 3メチル化を有すると判定され（陽性結果）、患者はC R CまたはA Aを有すると判定される。いくつかの実施態様において、 $\Delta C t 1$ が所定の臨界値よりも高い（>臨界値）場合、試料はB M P 3メチル化を有していないと判定され（陰性結果）、患者は健常であると判定される。いくつかの実施態様において、臨界値は、1%（約8個、9個または10個など）のメチル化率を有する5 ng / μ Lのヌクレオチド配列を含む試料の対応する $\Delta C t$ 値である。

10

【0150】

いくつかの実施態様において、N D R G 4に関連するC t値の差を参照遺伝子の増幅に関連するC t値と比較し（ $\Delta C t = C t_{\text{対象の遺伝子}} - C t_{\text{参照遺伝子}}$ ）、 $\Delta C t 2$ と呼ぶ。いくつかの実施態様において、 $\Delta C t 2$ が所定の臨界値以下（臨界値）である場合、試料はN D R G 4メチル化を有すると判定され（陽性結果）、患者はC R CまたはA Aを有すると判定される。いくつかの実施態様において、 $\Delta C t 2$ が所定の臨界値よりも高い（>臨界値）場合、試料はN D R G 4メチル化を有していないと判定され（陰性結果）、患者は健常であると判定される。いくつかの実施態様において、臨界値は、1%（約8個、9個または10個など）のメチル化率を有する5 ng / μ Lのヌクレオチド配列を含む試料の対応する $\Delta C t$ 値である。

20

【0151】

本開示の好ましいプライマーおよびプローブは、アジア人集団におけるC R CおよびA Aの検出（特にA Aの検出）において既存の市販品（C o l o g u a r d（登録商標）など）と比較して驚くほど高い感度および特異度を有する。

30

【0152】

本明細書において、用語「感度」は、所定の集団において実際にC R Cおよび/またはA Aを有する患者が正確に検出される割合を指す。いくつかの実施態様において、感度は、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、もしくはそれ以上、または100%である。いくつかの実施態様において、集団の大きさは、少なくとも約50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000またはそれ以上である。

40

【0153】

本明細書において、用語「特異度」は、所定の集団において実際にC R CまたはA Aを有しない患者がその状態を有しないと正確に診断される割合を指す。いくつかの実施態様において、特異度は、少なくとも約85%、少なくとも約86%、少なくとも約87%、少なくとも約88%、少なくとも約89%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、もしくはそれ以上、または100%である。いくつかの実施態様において、集団の大きさ

50

は、少なくとも約 50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000 またはそれ以上である。

【0154】

実施例において示されるように、好ましいプライマーおよびプローブは BMP 3 および NDRG 4 のメチル化の検出において驚くほど高い感度および特異度を提供し、したがって CRC および / または AA の検出において驚くほど高い感度および特異度をもたらす。例えば、BMP 3 遺伝子の 3 組の好ましいプライマーおよびプローブによる CRC 検出の感度は少なくとも 85 % である ; NDRG 4 遺伝子の 3 組の好ましいプライマーおよびプローブによる CRC 検出の感度は少なくとも 90 % である ; BMP 3 遺伝子の 3 組の好ましいプライマーおよびプローブによる AA 検出の感度は少なくとも 66 % である ; NDRG 4 遺伝子の 3 組の好ましいプライマーおよびプローブによる AA 検出の感度は少なくとも 73 % である。また、BMP 3 遺伝子の 3 組の好ましいプライマーおよびプローブによる CRC および AA 検出の特異度は約 97 % ~ 100 % (例えば少なくとも約 97 . 8 %) である ; NDRG 4 遺伝子の 3 組の好ましいプライマーおよびプローブによる CRC および AA 検出の特異度は約 97 % ~ 100 % (例えば、少なくとも約 97 . 8 %) である。

10

【0155】

3 . 患者において CRC および / または AA を検出するための 3 組の好ましいプライマー - プローブの組合せ

20

本開示はまた、患者における CRC または AA の有無を決定するために、BMP 3 および NDRG 4 遺伝子のメチル化レベルを検出するための 3 組の好ましいプライマーおよびプローブの組合せを提供する。これらの特定の組合せは、アジア人集団における CRC および AA の検出 (特に AA の検出) において既存の市販品 (ColoGuard (登録商標) など) と比較して驚くほど高い感度および特異度を有する。

3 組の好ましいプライマーおよびプローブの配列は以下である :

【表 2】

組合せの 番号	遺伝子	群	プライマー /プローブ	配列番号	配列 (5'から3')
4	BMP3	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号3	TTTGAAAATATTCTGGGTTATATACGTCGC
			逆方向プライマー	配列番号4	ATAAACTCTTCCCCAACAACACTACGCGAA
			プローブ	配列番号5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号6	ATCGATCGGGGTGTTTTTATAGGTTTC
			逆方向プライマー	配列番号7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			プローブ	配列番号8	CGTCGCGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT
5	BMP3	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号3	TTTGAAAATATTCTGGGTTATATACGTCGC
			逆方向プライマー	配列番号4	ATAAACTCTTCCCCAACAACACTACGCGAA
			プローブ	配列番号5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			逆方向プライマー	配列番号13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			プローブ	配列番号14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
7	BMP3	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号9	AATATTCTGGGTTATATACGTCGCGA
			逆方向プライマー	配列番号10	GCAACCTAACAATAAACTCTTCCCCAA
			プローブ	配列番号11	TGGAGTGGAGACGGCGTTTCGTAGCGT
	NDRG4	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号6	ATCGATCGGGGTGTTTTTATAGGTTTC
			逆方向プライマー	配列番号7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			プローブ	配列番号8	CGTCGCGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT

10

20

30

40

50

【0156】

実施例において示されるように、BMP3およびNDRG4プライマー - プローブセットの好ましい組合せは、BMP3およびNDRG4のメチル化の検出において驚くほど高い感度および特異度を提供し、したがってCRCおよび/またはAAの検出において驚くほど高い感度および特異度をもたらす。いくつかの実施態様において、この感度および特異度は、実施例5において説明されるように、同じアッセイがKRAS遺伝子解析およびヘモグロビン検査を含む場合に得られる。例えば、KRAS遺伝子解析およびヘモグロビン検査の組合せにおけるBMP3およびNDRG4遺伝子のプライマーおよびプローブの3つの好ましい組合せによるCRC検出の全体的な感度は少なくとも95%である；KRAS遺伝子解析およびヘモグロビン検査の組合せにおけるBMP3およびNDRG4遺伝子のプライマーおよびプローブの3つの好ましい組合せによるAA検出の感度は少なくとも93%である；KRAS遺伝子解析およびヘモグロビン検査の組合せにおけるBMP3およびNDRG4遺伝子のプライマーおよびプローブの3つの好ましい組合せによるCRC + AA検出の感度は少なくとも97%である；KRAS遺伝子解析およびヘモグロビン検査の組合せにおけるBMP3およびNDRG4遺伝子のプライマーおよびプローブの3つの好ましい組合せによるCRC + AA検出の特異度は少なくとも97%である。

【0157】

4. CRCおよびAAを検出するためのキット

本開示は、BMP3/NDRG4メチル化検出のためのキット、および/またはしたがって必要とされる患者におけるCRC/AA検出のためのキットを提供する。いくつかの実施態様において、キットはアジア人の患者（中国人の患者など）に特に適している。

【0158】

いくつかの実施態様において、本キットは以下を含む：(1) CRCおよびAAを検出するための3組の好ましいプライマーおよびプローブの組合せ（表20の組合せ番号4、

5 および 7) のうち少なくとも 1 つ、および対応する q P C R 試薬 ; (2) K R A S 遺伝子のコード領域における 7 つの変異 (すなわち、G 1 2 D、G 1 3 D、G 1 2 V、G 1 2 C、G 1 2 S、G 1 2 A および G 1 3 R) を検出するための手段 (適切なプライマーおよびプローブなど) および対応する q P C R 試薬 ; (3) 便試料中のヘモグロビンを検出するための手段 (F I T 技術に基づく試薬など、例えば、抗ヘモグロビン抗体、ならびに便試料中の抗体およびヘモグロビンによって形成される複合体を検出するための試薬) 。

【 0 1 5 9 】

いくつかの実施態様において、キットは、以下の好ましいプライマー - プローブの組合せのうち少なくとも 1 組を含む :

(1) 3 組の好ましいプライマーおよびプローブの組合せは以下である :

10

【 表 3 】

番号	遺伝子	群	プライマー / プローブ	配列番号	配列 (5' から 3')
4	BMP3	好ましい群 1	順方向プライマー	配列番号 3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			逆方向プライマー	配列番号 4	ATAAACTCTTCCCAACAACACTACGCGAA
			プローブ	配列番号 5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	好ましい群 1	順方向プライマー	配列番号 6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			逆方向プライマー	配列番号 7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			プローブ	配列番号 8	CGTCGCGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT
5	BMP3	好ましい群 1	順方向プライマー	配列番号 3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			逆方向プライマー	配列番号 4	ATAAACTCTTCCCAACAACACTACGCGAA
			プローブ	配列番号 5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	好ましい群 2	順方向プライマー	配列番号 12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			逆方向プライマー	配列番号 13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			プローブ	配列番号 14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
7	BMP3	好ましい群 2	順方向プライマー	配列番号 9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			逆方向プライマー	配列番号 10	GCAACCTAACAATAAACTCTTCCCA
			プローブ	配列番号 11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG4	好ましい群 1	順方向プライマー	配列番号 6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			逆方向プライマー	配列番号 7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			プローブ	配列番号 8	CGTCGCGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT

20

30

【 0 1 6 0 】

(2) B M P 3 および N D R G 4 遺伝子のメチル化レベルを検出するための 3 重の定量 P C R 試薬。

40

いくつかの実施態様において、キットは、B M P 3 および N D R G 4 のメチル化を同時に検出するためのマルチプレックス P C R を行うための試薬を含む。いくつかの実施態様において、マルチプレックス P C R は定量 P C R である。

【 0 1 6 1 】

いくつかの実施態様において、試薬は T a q D N A ポリメラーゼを含む。いくつかの実施態様において、T a q D N A ポリメラーゼの終濃度は約 2 U / 反応物である。いくつかの実施態様において、試薬は M g C l ₂ を含む。いくつかの実施態様において、反応物中の M g C l ₂ の終濃度は 2 m M である。いくつかの実施態様において、試薬は d N T P を含む。いくつかの実施態様において、d N T P は 0 . 2 m M の終濃度を有する。いくつかの実施態様において、試薬は、B M P 3、N D R G 4 および参照遺伝子を増幅する約

50

0.5 mM ~ 0.75 mMのプライマーを含む。いくつかの実施態様において、試薬は、BMP3、NDRG4および参照遺伝子のDNA配列とハイブリダイズされる約0.1 mM ~ 0.25 mMのプロープを含む。いくつかの実施態様において、試薬は、濃縮（例えば5×または10×）PCR緩衝液などのPCR緩衝液をさらに含み、これは1×の終濃度に希釈され得る。いくつかの実施態様において、B2Mは参照遺伝子であり、定量PCRにおいて品質管理のために増幅される。

【0162】

(3) KRAS遺伝子のコード領域における7つの変異を検出するためのプライマーおよびプロープ。

いくつかの実施態様において、キットはKRAS遺伝子における変異を検出するための手段を含む。いくつかの実施態様において、キットは、KRAS遺伝子のオープンリーディング領域のエクソン12およびエクソン13における7つの変異ホットスポットであるG12D、G13D、G12V、G12C、G12S、G12AおよびG13Rを増幅および検出するように設計されたプライマーおよびプロープを含む。いくつかの実施態様において、プライマーおよびプロープの配列は以下である：

【表4】

名称	プライマー/プロープ	配列番号	配列(5'から3')
G12D-F	順方向プライマー	配列番号35	AACTTGTGGTAGTTGGAGGTGA
G13D-F	順方向プライマー	配列番号36	AACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGGGA
G12V-F	順方向プライマー	配列番号37	AACTTGTGGTAGTTGGAGTTGT
G12C-F	順方向プライマー	配列番号38	AAACTTGTGGTAGTTGGGGCTT
G12S-F	順方向プライマー	配列番号39	AAACTTGTGGTAGTTGGTGCTA
G12A-F	順方向プライマー	配列番号40	AACTTGTGGTAGTTGGAGCAGC
G12R-F	順方向プライマー	配列番号41	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTC
Kras-R	逆方向プライマー	配列番号42	GAATGGTCCTGCACCAGTAATATG
ACTB-F	順方向プライマー	配列番号43	AGGGCTTCTTGTCTTTTCCTT
ACTB-R	逆方向プライマー	配列番号44	CGTGCTCGATGGGGTACTTC
KRAS-P	プロープ	配列番号45	AGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGC
ACTB-P	プロープ	配列番号46	CGTGATGGTGGGCATGGGTCAGAAGGA

【0163】

(4) KRAS遺伝子のコドン変異を検出するためのマルチプレックス定量PCR試薬。

KRAS遺伝子の7つ全ての変異を検出するためのマルチプレックス定量PCRシステムが提供される。いくつかの実施態様において、マルチプレックス定量PCR反応物は、終濃度2.5 U / 反応物のTaq DNAポリメラーゼ、終濃度1 mMのMgCl₂、終濃度0.1 mMのdNTP、KRASおよびACTB遺伝子を増幅する0.3 ~ 0.9 μMのプライマー、KRASおよびACTB遺伝子のDNA配列にハイブリダイズされる0.05 ~ 0.1 μMのプロープ、および1×PCR緩衝液を含む。ACTBは参照遺伝子であり、定量PCRにおいて品質管理のために増幅される。

【0164】

(5) 便中のヘモグロビンを検出するキット

いくつかの実施態様において、キットはヘモグロビンを検出するための試薬を含む。いくつかの実施態様において、ヘモグロビンは酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)によって定性的に検査される。

【0165】

5. ロジスティック回帰モデル

いくつかの実施態様において、BMP3 / NDRG4メチル化検査、KRAS変異検査およびヘモグロビン検査の結果を得た後、患者におけるCRCおよび/またはAAの有無を決定するために、すべての結果を収集し、ロジスティック回帰モデルにかける。

【0166】

いくつかの実施態様において、本方法はがんの総合指数値Pの値を計算することを含み

、ここで $P = e^K / (1 + e^K)$ であり、 e は自然定数である。

【0167】

いくつかの実施態様において、 K は、 $K = a * \Delta Ct1 + b * \Delta Ct2 + c * \Delta Ct3 + d * FIT + X$ と規定され、ここで a 、 b 、 c 、 d 、 X は臨床定数である。 $\Delta Ct1$ 、 $\Delta Ct2$ および $\Delta Ct3$ は、 $BMP3$ 、 $NDRG4$ および $KRAS$ の Ct 値から参照遺伝子の Ct 値を差し引いた値である。

【0168】

いくつかの実施態様において、 P 値が所定の閾値以上である場合、検査結果は陽性であり、そうでなければ陰性である。陽性の結果はヒトが CRC または AA を有する可能性があることを示し、そうでなければ健常であることを示す。

10

【0169】

6. 処置方法

いくつかの実施態様における本開示の方法は、患者が大腸がんおよび/または腺腫を有すると分類された後に、必要とする患者を処置することを含む。いくつかの実施態様において、処置には、手術、化学療法、放射線療法、免疫療法、緩和ケア、運動が含まれるが、これらに限定されない。

【0170】

本明細書において、語句「処置レジメン」は、必要とする対象（例えば、病理学により診断された対象）に提供される処置の種類、投与量、スケジュールおよび/または処置期間を規定する処置計画を指す。選択される処置レジメンは最良の臨床結果（例えば病理の完治）をもたらすと予想される積極的なレジメンであり得、または病理の症状を軽減し得るが病理の不完全な治癒をもたらすより中程度のレジメンであり得る。場合により、処置レジメンは対象への不快感または有害な副作用（例えば、健常細胞または組織への損傷）を伴い得ることが理解される。処置の種類には、外科的介入（例えば、病変、疾患細胞、組織または器官の除去）、細胞補充療法、局所または全身の様式における治療薬（例えば、受容体アゴニスト、アンタゴニスト、ホルモン、化学療法物質）の投与、外部線源（例えば外部ビーム）および/または内部線源（例えば小線源療法）を用いた放射線療法への曝露、および/またはそれらの任意の組合せが含まれ得る。投与量、スケジュールおよび処置期間は病理の重症度および選択された処置の種類に応じて様々であり得、当業者は投与量、スケジュールおよび処置期間により処置の種類を調整できる。

20

30

【0171】

いくつかの実施態様において、処置には、限定されないが、フルオロウラシル、カペシタビン、オキサリプラチン、イリノテカン、 UFT 、 $FOLFOX$ 、 $FOLFOXIRI$ および $FOLFIRI$ 、抗血管新生薬（ベバシズマブなど）、ならびに上皮増殖因子受容体阻害剤（例えばセツキシマブおよびパニツムマブ）が含まれる。

【0172】

7. 本発明の利点

特定の理論に拘束されることを望まないが、本発明は少なくとも以下の利点を有する：

(1) 中国人集団における $BMP3$ および $NDRG4$ 遺伝子のプロモーター領域の詳細なメチル化 CpG 部位が提供され、これらは CRC および/または AA を検出するためのバイオマーカーであり得る。

40

(2) 従来の製品は白人集団を対象としているのに対し、本発明は中国人集団に特異的なメチル化 CpG 部位を標的としているため、本キットは $mt-sDNA$ に基づく他の類似の製品（ $ColoGuard$ （登録商標）など）よりも中国人集団における CRC および AA の検出に適している。

(3) CRC 検出の感度および特異度は、 $mt-sDNA$ に基づく他の類似の製品と比較して高い。

(4) AA 検出の感度および特異度は、 $mt-sDNA$ に基づく他の類似の製品と比較して著しく向上している。

(5) 本方法は非侵襲的であり、在宅での試料採取が容易であるため、患者の良好なコ

50

ンプライアンスをもたらし、CRCおよびAAのスクリーニング方法として広く利用され得る。本方法は、アジア人集団におけるCRCによる発症率および死亡率を減少させる。

【実施例】

【0173】

実施例 1

中国のCRCおよびAAの集団におけるそれぞれBMP3およびNDRG4遺伝子のプロモーター領域のメチル化CpG部位の発見。

(1) 試料収集

大腸内視鏡検査によって確認されたCRCおよびAAを有する患者から計191個の大腸FFPE組織試料を収集し、これは50個の大腸がん組織および49個の対となる隣接正常組織、46個の腺腫がん組織および46個の対となる補助的な正常組織を含んでいた。

10

【0174】

(2) DNA抽出

ゲノムDNAを、Takara MiniBEST FFPE DNA抽出キット(カタログ番号: 9782)を用いてFFPE試料から抽出した。詳細な操作の段階を以下に記載する:

i. 滅菌メスで30mgのパラフィン切片組織をスクラップ(scrap)し、余分なパラフィンを除去する。

ii. パラフィン切片組織を1.5mLの遠心管に入れ、500μLの緩衝液DPを添加し、80℃の水中で1分間混合およびインキュベートした後、10秒間ボルテックスする。180μLの緩衝液GLを添加し、ボルテックスする。

20

iii. 混合物を室温において12,000rpmで1分間遠心分離した後、溶液が2層(上側の油相、下側の水相)に形成された。下側の水相に20μLのプロテイナーゼK(20mg/mL)および10μLのRNase(10mg/mL)を添加し、ピペットで上下に穏やかに十分に混合する。層を乱さないように注意する。その後、56℃で1時間水浴する。

iv. 前の段階の溶液を90℃で30分間インキュベートし、室温まで冷却した。次いで、溶液に200μLの緩衝液GBおよび200μLの100%エタノールを添加し、10秒間ボルテックスする。室温において12,000rpmで1分間遠心分離し、溶液が2層(上側の油相、下側の水相)に形成された。

30

v. スピncラムを採取管に入れ、前の工程の下側の水相をスピncラムに添加する。層を乱さないように注意し、室温において12,000rpmで2分間遠心分離した後、廃棄物を捨てる。

vi. スピncラムに500μLの緩衝液WAを添加し、室温において12,000rpmで1分間遠心分離した後、廃棄物を捨てる。

vii. スピncラムに500μLの緩衝液WBを添加し、室温において12,000rpmで1分間遠心分離した後、廃棄物を捨てる。これを1回繰り返す。

viii. スピncラムを採取管に入れ、室温において12,000rpmで2分間遠心分離する。

40

ix. 新しい1.5mLの遠心管にスピncラムを入れ、スピncラム膜の中心に50~100μLの滅菌水または溶出緩衝液を添加し、室温で5分間放置する。

x. 室温において12,000rpmで2分間遠心分離し、DNAを溶出させる。

xi. 溶出したDNAをNanodrop 2000蛍光光度計で定量し、使用するために-20℃で保存する。

【0175】

(3) BMP3およびNDRG4遺伝子のプロモーター領域におけるCpGアイランドの予測および増幅産物の配列決定のためのプライマー設計。

i. BMP3およびNDRG4遺伝子のプロモーター領域におけるCpGアイランドの予測。

50

BMP3およびNDRG4遺伝子のプロモーター配列をダウンロードし、これは転写開始部位(TSS)および5'UTR領域から約1000~1500bp上流のDNA配列を含んでいた。これらの配列のCpGアイランドを、MethPrimerソフトウェア(www.urogene.org/methprimer/)を用いて予測した。図1A~図1Dに示されるように、BMP3遺伝子の3つのCpGアイランドのうち2つの大きなCpGアイランドは、TSSおよび5'UTR領域全体から約400bp上流に位置しており(chr4:81951752-81952760)、NDRG4遺伝子の唯一のCpGアイランドは、TSSおよび部分的な5'UTR領域から約500bp上流に位置していた(chr16:58497061-58497938)。ヒト参照ゲノムの構築はGRCh37/hg19である。

10

【0176】

ii. BMP3遺伝子およびNDRG4遺伝子の予測されるCpGアイランドの配列を増幅するためのプライマー設計。

増幅する配列の長さおよび配列決定の読み取りの長さに基づいて、BMP3およびNDRG4遺伝子についてそれぞれ4組および5組のプライマーを設計した。2つの遺伝子のCpGアイランドを完全に配列決定できるように、隣接する増幅産物間にはできるだけ多くの重複がある。2つの遺伝子のプライマーを表1に示し、2つの遺伝子の増幅産物の相対的な位置を図1A~図1Dに示す。

表1 BMP3およびNDRG4遺伝子の増幅産物の配列決定のためのプライマー
【表5】

20

遺伝子	増幅産物	プライマー	配列番号	配列(5'から3')
BMP3	増幅	順方向プライマー1	配列番号47	AGTTTGGTGTAAGTTAAGAG
BMP3	産物1	逆方向プライマー1	配列番号48	CTAACTCTATTTTAAACRCCA
BMP3	増幅	順方向プライマー2	配列番号49	GTTTTAATTTTGGAAAAAGGTAA
BMP3	産物2	逆方向プライマー2	配列番号50	ACCTAACAAATAAACTCTTCC
BMP3	増幅	順方向プライマー3	配列番号51	GAAGGTATAGATAGATTTTGAA
BMP3	産物3	逆方向プライマー3	配列番号52	CACCTAACACAACCTTTACRAAACT
BMP3	増幅	順方向プライマー4	配列番号53	GTATTTAGTTATGGTTGGGGYGAGTA
BMP3	産物4	逆方向プライマー4	配列番号54	CTCACCTACTACTACCGCCCR
NDRG4	増幅	順方向プライマー1	配列番号55	AGGTTTTTGAGTTTTTGGTTTTTTTT
NDRG4	産物1	逆方向プライマー1	配列番号56	CCCTCCAAACCCCCCTATAAC
NDRG4	増幅	順方向プライマー2	配列番号57	GGATGGGGATGTTTTTGTAG
NDRG4	産物2	逆方向プライマー2	配列番号58	RGRGAAACCTAAAAAACACC
NDRG4	増幅	順方向プライマー3	配列番号59	GYGGAGYGGGTGAGAAGT
NDRG4	産物3	逆方向プライマー3	配列番号60	CRAACAACCAAAAACCCCTC
NDRG4	増幅	順方向プライマー4	配列番号61	GTTYGTTYGGGATTAGTTTTAGG
NDRG4	産物4	逆方向プライマー4	配列番号62	CRCAAACRAAAAACRAAAC
NDRG4	増幅	順方向プライマー5	配列番号63	GYGGYGTTTYGTTTTTG
NDRG4	産物5	逆方向プライマー5	配列番号64	CRACRACTAAAAATCCCCAA

30

【0177】

40

DNA試料を以下に記述するように重亜硫酸処理した。

(4) 重亜硫酸処理

i. 抽出したDNAを室温で放置して解凍し、DNA濃度を20ng/μLに希釈する。40μLの希釈したDNAを1.5mLの遠心管に添加し、4μLの3M NaOH溶液を添加し、42℃で20分間インキュベートする。

ii. 400μLの変換溶液を添加して混合し、暗所において50℃で16時間インキュベートする。

iii. 550μLの結合溶液を添加して混合し、溶液をDNA精製カラムに移す。13,000rpmで90秒間遠心分離し、廃棄物を捨てる。再度3分間遠心分離し、廃棄物を捨てる。

50

i v . 6 0 0 μ L の 9 0 % エタノールを D N A 精製カラムに添加し、1 3 , 0 0 0 r p m で 9 0 秒間遠心分離し、廃棄物を捨てる。再度 1 3 , 0 0 0 r p m で 1 5 秒間遠心分離する。

v . 3 0 0 μ L の脱硫化溶液 (0 . 3 M N a O H の 9 0 % エタノール溶液) を D N A 精製物に添加し、室温で 3 0 分間放置する。1 3 , 0 0 0 r p m で 9 0 秒間遠心分離し、廃棄物を捨てる。

v i . 6 0 0 μ L の 9 0 % エタノールを添加し、1 3 , 0 0 0 r p m で 9 0 秒間遠心分離し、廃棄物を捨てる。この手順を 1 回繰り返し、再度 1 3 , 0 0 0 r p m で 3 分間遠心分離する。

v i i . D N A 精製カラムを新しい 1 . 5 m L の遠心管に入れ、4 0 μ L の溶出液を添加する。遠心管を 5 0 で 3 0 分間インキュベートし、1 3 , 0 0 0 r p m で 9 0 秒間遠心分離する。変換した D N A 溶液を使用のために - 2 0 で保存する。

【 0 1 7 8 】

(5) ライブラリーの調製および増幅産物の配列決定

(a) マルチプレックス P C R 増幅

i . P C R マスター混合物を以下のように調製する :

表 2

【表 6】

番号	試薬	終濃度
1	2×QIAGEN マルチプレックスPCR マスターミックス(QIAGEN, カタ ログ番号: 206143)	1×
2	10×プライマーミックス(各2 μ M)	0.2 μ M
3	RNaseを含まない水	最大で40 μ L

i i . 混合物を穏やかにボルテックスし、そのうち 4 0 μ L を各 P C R チューブにピペットし、次いで 1 0 μ L の重亜硫酸処理した D N A を添加する。

i i i . 穏やかにボルテックスし、P C R 増幅を以下に行った : 1 サイクルの 9 5 での 1 5 分間の変性、3 5 サイクルの 9 4 での 3 0 秒間の変性、5 5 での 9 0 秒間のアニールおよび 7 2 での 9 0 秒間の伸長、1 サイクルの 7 2 での 1 0 分間の伸長、ならびに最後の 4 での時間の制限のない放置。

i v . 5 μ L の P C R 産物を 6 X ローディングバッファー (TakaRa、カタログ番号 : 9 1 5 6) と混合し、D L 2 0 0 0 D N A マーカー (TakaRa、カタログ番号 : 3 4 2 7 Q) の対照とともに 1 % (w / v) アガロースゲルにロードし、1 2 0 V で 4 0 分間電気泳動した。

v . 非特異的な増幅があった場合、キットの説明書 (QIAGEN、カタログ番号 : 2 8 7 0 4) に従って電気泳動後に残りの 4 5 μ L の P C R 産物を回収する必要がある。

【 0 1 7 9 】

(b) P C R 産物の精製および定量化

P C R 産物を、キットの説明書 (QIAGEN、カタログ番号 : 2 8 0 0 4) に従って M i n E l u t e P C R 精製キットを用いて精製した。精製した P C R 産物を Q u b i t (商標) d s D N A B R アッセイキット (カタログ番号 : Q 3 2 8 5 0) を用いて定量化した。

【 0 1 8 0 】

(c) アダプター連結

アダプターを N E B N e x t Q u i c k L i g a t i o n M o d u l e (NEB、カタログ番号 : E 6 0 5 6 L) を用いて精製した P C R 産物に連結し、反応混合物を以下のように調製した :

表 3 . アダプター連結のための反応混合物

10

20

30

40

50

【表 7】

番号	試薬	体積(μL)/反応物
1	NEBNext Quick Ligation反応緩衝液(5×)	10
2	アダプター	5
3	Quick T4 DNAリガーゼ	5
4	RNaseを含まない水	10

30 μL の混合物を各 PCR チューブに添加し、20 μL の精製した PCR 産物をそれぞれ添加する。溶液を穏やかに混合し、20 で 15 分間インキュベートし、4 で 10 分間維持した。

【0181】

(d) 連結産物の精製

i . Agencourt AMPure XP ビーズ (Beckman、カタログ番号 : A63882) を使用するために室温に置く。

ii . PCR チューブを 20 において 280 g で 1 分間遠心分離し、50 μL の連結産物を新しい 96 ウェル PCR プレートに移す。

iii . AMPure XP ビーズを 30 秒間ボルテックスして均一に分散させ、56 μL のビーズを PCR プレートの各ウェルに添加する。混合物を穏やかに 10 回ピペットして混合し、室温で 5 分間維持する。

iv . 96 ウェル PCR プレートを 96 ウェル磁気プレート上に置き、上清が透明になるまで 2 分間維持した。96 ウェル PCR プレートを 96 ウェル磁気プレート上に維持し、上清を除去し、各ウェルに新たに調製した 200 μL の 80 % エタノールを添加し、室温で 30 秒間インキュベートし、上清を除去する。

v . 96 ウェル PCR プレートを 96 ウェル磁気プレート上に維持し、各ウェルに新たに調製した 200 μL の 80 % エタノールを添加する。次いで、室温で 30 秒間インキュベートする。上清を捨て、残留エタノールを 10 μL ピペットで除去する。

vi . 96 ウェル PCR プレートを磁気プレート上に維持し、ビーズを 10 分間自然乾燥させる。

vii . 96 ウェル PCR プレートを磁気プレートから取り出し、96 ウェルプレートの各ウェルに 27.5 μL の 10 mM Tris (pH 8.5) を添加する。ビーズが完全に分散するまでビーズおよび Tris を穏やかに上下に 10 回ピペットして混合する。プレートを室温で 2 分間維持する。

viii . 96 ウェル PCR プレートを磁気プレート上に置き、上清が透明になるまで 2 分間放置する。25 μL の上清を新たな PCR チューブにピペットし、使用するために -20 で保存する。

【0182】

(e) PCR 増幅および産物の精製

PCR マスター混合物を以下のように調製し、穏やかに混合した。各 PCR チューブに 40 μL の混合物を添加し、5 μL の精製した連結産物を添加する。

表 4 . PCR 反応混合物

【表 8】

番号	試薬	終濃度
1	NEBNext Ultra Q5 マスターミックス (NEB, カタログ番号: M0544)	1×
2	順方向プライマー(10μM)	1μM
3	逆方向プライマー(10μM)	1μM
4	ヌクレアーゼを含まない水	最大で 40 10 μL

PCR チューブを穏やかにボルテックスし、短時間遠心分離し、以下の条件で PCR 反応

を行う：1サイクルの98℃での30秒間の変性、8～15サイクルの98℃での10秒間の変性および65℃での75秒間の伸長、1サイクルの65℃での5分間の変性、ならびに最後の4℃での維持。PCR産物を、(d)連結産物の精製に従って精製した。

【0183】

(f)ライブラリーの検出および配列決定

精製したPCR産物の濃度およびサイズ分布を、それぞれQubit(商標) dsDNA BRアッセイキット(カタログ番号：Q32850)およびAgilent 2100 Bioanalyzer装置を用いて分析した。ライブラリーを等モル濃度でプールし、Illumina HiSeq 2500上でPE125の読み取り長さで配列決定した。

10

【0184】

(g)配列データ解析

生データを試料のインデックスに従って逆多重化し、シーケンシングの読み取りをSHRIMP V2.04ソフトウェアを用いてBMP3およびNDRG4の参照遺伝子配列にマッピングした。マッピングの結果に基づいてメチル化CpG部位を同定した。最終的に、BMP3およびNDRG4遺伝子の26個および39個のCpG部位が隣接する正常組織と比較してCRCおよびAA組織において高メチル化されている($p < 0.05$)ことが見出され、これにより、これらのメチル化されたCpG部位がCRCおよびAAの早期診断のためのDNAバイオマーカーとなり得ることが示された。

表5 CRC組織および隣接する正常組織におけるBMP3遺伝子のCpG部位のメチル化の頻度。

20

【表 9】

CpG 部位	染色体座標 (hg19)	転写開 始部位 の位置 (NM_ 001201. 3)	メチル化さ れた試料の 数を試料の 総数で割っ た値－CRC	メチル化 の割合－ CRC	メチル化された 試料の数を試料 の総数で割った 値－正常	メチル化 の割合－ 正常	P値
#1	81952078	-41	34/50	0.68	2/49	0.04	<0.01
#2	81952099	-20	38/50	0.76	2/49	0.04	<0.01
#3	81952135	17	33/50	0.66	1/49	0.02	<0.01
#4	81952146	28	34/50	0.68	2/49	0.04	<0.01
#5	81952149	31	34/50	0.68	1/49	0.02	<0.01
#6	81952151	33	35/50	0.7	2/49	0.04	<0.01
#7	81952172	54	33/50	0.66	0/49	0.00	<0.01
#8	81952186	68	33/50	0.66	1/49	0.02	<0.01
#9	81952189	71	36/50	0.72	1/49	0.02	<0.01
#10	81952193	75	37/50	0.74	0/49	0.00	<0.01
#11	81952198	80	34/50	0.68	1/49	0.02	<0.01
#12	81952205	87	37/50	0.74	2/49	0.04	<0.01
#13	81952207	89	37/50	0.74	2/49	0.04	<0.01
#14	81952218	100	34/50	0.68	1/49	0.02	<0.01
#15	81952220	102	37/50	0.74	2/49	0.04	<0.01
#16	81952255	137	35/50	0.7	0/49	0.00	<0.01
#17	81952266	148	33/50	0.66	1/49	0.02	<0.01
#18	81952285	167	38/50	0.76	1/49	0.02	<0.01
#19	81952293	175	36/50	0.72	1/49	0.02	<0.01
#20	81952302	184	35/50	0.7	1/49	0.02	<0.01
#21	81952306	188	33/50	0.66	1/49	0.02	<0.01
#22	81952308	190	36/50	0.72	0/49	0.00	<0.01
#23	81952313	195	35/50	0.7	0/49	0.00	<0.01
#24	81952320	202	35/50	0.7	2/49	0.04	<0.01
#25	81952324	206	38/50	0.76	2/49	0.04	<0.01
#26	81952330	212	33/50	0.66	2/49	0.04	<0.01

表 6 A A 組織および隣接する正常組織における B M P 3 遺伝子の C p G 部位のメチル化の頻度。

【表 10】

CpG 部位	染色体座標 (hg19)	転写開始部位の位置 (NM_001201.3)	メチル化された試料の数を試料の総数で割った値 - AA	メチル化の割合 - AA	メチル化された試料の数を試料の総数で割った値 - AA	メチル化の割合 - 正常	P値
#1	81952078	-41	30/50	0.60	2/49	0.04	<0.01
#2	81952099	-20	29/50	0.58	1/49	0.02	<0.01
#3	81952135	17	32/50	0.64	2/49	0.04	<0.01
#4	81952146	28	29/50	0.58	2/49	0.04	<0.01
#5	81952149	31	30/50	0.60	2/49	0.04	<0.01
#6	81952151	33	32/50	0.64	0/49	0.00	<0.01
#7	81952172	54	32/50	0.64	2/49	0.04	<0.01
#8	81952186	68	32/50	0.64	2/49	0.04	<0.01
#9	81952189	71	28/50	0.56	0/49	0.00	<0.01
#10	81952193	75	29/50	0.58	1/49	0.02	<0.01
#11	81952198	80	29/50	0.58	0/49	0.00	<0.01
#12	81952205	87	31/50	0.62	1/49	0.02	<0.01
#13	81952207	89	29/50	0.58	0/49	0.00	<0.01
#14	81952218	100	32/50	0.64	1/49	0.02	<0.01
#15	81952220	102	28/50	0.56	1/49	0.02	<0.01
#16	81952255	137	29/50	0.58	0/49	0.00	<0.01
#17	81952266	148	31/50	0.62	0/49	0.00	<0.01
#18	81952285	167	32/50	0.64	1/49	0.02	<0.01
#19	81952293	175	33/50	0.66	0/49	0.00	<0.01
#20	81952302	184	32/50	0.64	1/49	0.02	<0.01
#21	81952306	188	30/50	0.60	0/49	0.00	<0.01
#22	81952308	190	31/50	0.62	1/49	0.02	<0.01
#23	81952313	195	29/50	0.58	1/49	0.02	<0.01
#24	81952320	202	32/50	0.64	1/49	0.02	<0.01
#25	81952324	206	31/50	0.62	2/49	0.04	<0.01
#26	81952330	212	32/50	0.64	1/49	0.02	<0.01

表 7 C R C 組織および隣接する正常組織における N D R G 4 遺伝子の C p G 部位のメチル化の頻度。

【表 1 1 - 1】

CpG 部位	染色体座標 (hg19)	転写開始 部位の位 置 (NM_ 020465.3)	メチル化 された試 料の数を 試料の総 数で割っ た値 - CR C	メチル化 の割合 - CRC	メチル化 された試 料の数を 試料の総 数で割っ た値 - 正 常	メチル化 の割合 - 正常	P値
#1	chr16:58497349	-200	38/50	0.75	1/49	0.02	<0.01
#2	chr16:58497352	-197	35/50	0.70	2/49	0.04	<0.01
#3	chr16:58497358	-191	35/50	0.70	2/49	0.04	<0.01
#4	chr16:58497360	-189	39/50	0.78	1/49	0.03	<0.01
#5	chr16:58497365	-184	39/50	0.78	1/49	0.03	<0.01
#6	chr16:58497369	-180	39/50	0.77	1/49	0.02	<0.01
#7	chr16:58497388	-161	37/50	0.74	1/49	0.02	<0.01
#8	chr16:58497390	-159	37/50	0.73	1/49	0.03	<0.01
#9	chr16:58497393	-156	40/50	0.79	1/49	0.03	<0.01
#10	chr16:58497395	-154	37/50	0.74	1/49	0.02	<0.01
#11	chr16:58497402	-147	38/50	0.76	1/49	0.03	<0.01
#12	chr16:58497406	-143	39/50	0.78	1/49	0.02	<0.01
#13	chr16:58497414	-135	37/50	0.74	1/49	0.03	<0.01
#14	chr16:58497418	-131	36/50	0.72	0/49	0.00	<0.01
#15	chr16:58497425	-124	36/50	0.72	1/49	0.02	<0.01
#16	chr16:58497438	-111	36/50	0.72	2/49	0.04	<0.01
#17	chr16:58497440	-109	36/50	0.71	1/49	0.02	<0.01
#18	chr16:58497449	-100	37/50	0.73	2/49	0.04	<0.01
#19	chr16:58497458	-91	39/50	0.77	2/49	0.04	<0.01
#20	chr16:58497460	-89	37/50	0.74	1/49	0.03	<0.01
#21	chr16:58497462	-87	38/50	0.75	1/49	0.03	<0.01
#22	chr16:58497470	-79	35/50	0.70	1/49	0.02	<0.01
#23	chr16:58497472	-77	36/50	0.71	2/49	0.04	<0.01
#24	chr16:58497477	-72	36/50	0.72	1/49	0.03	<0.01
#25	chr16:58497481	-68	37/50	0.74	1/49	0.02	<0.01
#26	chr16:58497499	-50	37/50	0.73	1/49	0.02	<0.01
#27	chr16:58497505	-44	40/50	0.79	2/49	0.04	<0.01
#28	chr16:58497510	-39	40/50	0.79	1/49	0.02	<0.01
#29	chr16:58497512	-37	40/50	0.79	2/49	0.04	<0.01
#30	chr16:58497517	-32	35/50	0.70	1/49	0.02	<0.01
#31	chr16:58497521	-28	39/50	0.77	1/49	0.02	<0.01
#32	chr16:58497531	-18	38/50	0.76	1/49	0.03	<0.01
#33	chr16:58497542	-7	36/50	0.71	1/49	0.02	<0.01
#34	chr16:58497544	-5	37/50	0.74	1/49	0.03	<0.01
#35	chr16:58497550	2	37/50	0.74	0/49	0.00	<0.01
#36	chr16:58497556	8	38/50	0.75	1/49	0.03	<0.01
#37	chr16:58497558	10	39/50	0.78	2/49	0.04	<0.01

10

20

30

40

【表 1 1 - 2】

#38	chr16:58497561	13	36/50	0.71	2/49	0.04	<0.01
#39	chr16:58497566	18	35/50	0.70	1/49	0.03	<0.01

表 8 A A 組織および隣接する正常組織における N D R G 4 遺伝子の C p G 部位のメチル化の頻度。

【表 1 2】

CpG 部位	染色体座標 (hg19)	転写開始 部位の位 置 (NM_0 20465.3)	メチル化 された試 料の数を 試料の総 数で割っ た値-AA	メチル 化の割 合-AA	メチル化さ れた試料の 数を試料の 総数で割っ た値-正常	メチル化 の割合- 正常	P値
#1	chr16:58497349	-200	28/46	0.60	1/46	0.02	<0.01
#2	chr16:58497352	-197	28/46	0.60	1/46	0.02	<0.01
#3	chr16:58497358	-191	27/46	0.59	1/46	0.03	<0.01
#4	chr16:58497360	-189	29/46	0.62	1/46	0.03	<0.01
#5	chr16:58497365	-184	30/46	0.65	2/46	0.04	<0.01
#6	chr16:58497369	-180	28/46	0.61	2/46	0.04	<0.01
#7	chr16:58497388	-161	29/46	0.64	1/46	0.03	<0.01
#8	chr16:58497390	-159	29/46	0.64	1/46	0.03	<0.01
#9	chr16:58497393	-156	30/46	0.65	1/46	0.02	<0.01
#10	chr16:58497395	-154	28/46	0.60	2/46	0.04	<0.01
#11	chr16:58497402	-147	29/46	0.62	1/46	0.03	<0.01
#12	chr16:58497406	-143	29/46	0.62	1/46	0.03	<0.01
#13	chr16:58497414	-135	28/46	0.61	1/46	0.02	<0.01
#14	chr16:58497418	-131	30/46	0.65	1/46	0.02	<0.01
#15	chr16:58497425	-124	29/46	0.64	2/46	0.04	<0.01
#16	chr16:58497438	-111	29/46	0.64	1/46	0.02	<0.01
#17	chr16:58497440	-109	29/46	0.62	2/46	0.04	<0.01
#18	chr16:58497449	-100	29/46	0.64	1/46	0.03	<0.01
#19	chr16:58497458	-91	29/46	0.62	1/46	0.02	<0.01
#20	chr16:58497460	-89	27/46	0.59	1/46	0.03	<0.01
#21	chr16:58497462	-87	29/46	0.62	1/46	0.02	<0.01
#22	chr16:58497470	-79	29/46	0.64	1/46	0.02	<0.01
#23	chr16:58497472	-77	30/46	0.65	2/46	0.04	<0.01
#24	chr16:58497477	-72	30/46	0.65	2/46	0.04	<0.01
#25	chr16:58497481	-68	28/46	0.60	2/46	0.04	<0.01
#26	chr16:58497499	-50	29/46	0.63	1/46	0.02	<0.01
#27	chr16:58497505	-44	28/46	0.61	1/46	0.02	<0.01
#28	chr16:58497510	-39	27/46	0.59	1/46	0.02	<0.01
#29	chr16:58497512	-37	30/46	0.65	2/46	0.04	<0.01
#30	chr16:58497517	-32	29/46	0.62	2/46	0.04	<0.01
#31	chr16:58497521	-28	29/46	0.64	1/46	0.02	<0.01
#32	chr16:58497531	-18	29/46	0.62	2/46	0.04	<0.01
#33	chr16:58497542	-7	29/46	0.64	1/46	0.02	<0.01
#34	chr16:58497544	-5	29/46	0.63	1/46	0.02	<0.01
#35	chr16:58497550	2	29/46	0.62	1/46	0.02	<0.01
#36	chr16:58497556	8	28/46	0.61	1/46	0.03	<0.01
#37	chr16:58497558	10	30/46	0.65	1/46	0.03	<0.01
#38	chr16:58497561	13	29/46	0.63	1/46	0.02	<0.01
#39	chr16:58497566	18	30/46	0.65	1/46	0.02	<0.01

実施例 2

種々の人種間におけるCRCに関連するBMP3およびNDRG4遺伝子の差別的なメチル化CpG部位の比較

本発明者らはTCGAデータベースにおけるBMP3およびNDRG4遺伝子のメチル化マイクロアレイデータ(illuminaヒトメチル化450データ)を分析し、白人集団とアジア人集団との間でNDRG4遺伝子のプロモーター領域において有意に異なる5つのメチル化CpG部位があることを見出した(図2および表9)。差別的なメチル化CpG部位をさらに検証するため、中国における106人のCRCおよびAA患者から組織および血液試料を採取した。DNAを抽出し、重亜硫酸処理した。BMP3およびNDRG4遺伝子のプロモーター領域を増幅し、配列決定した。本発明者らは配列データを解析し、実際にアジア人集団の高メチル化CpG部位はTCGAデータベースにおける白人集団のものとは異なっており、高メチル化CpG部位はCRC組織試料とAA組織試料との間で異なっていることを見出した。これらの種々のメチル化CpG部位に従って、本発明者らはアジア人集団(例えば中国人集団)におけるCRCおよびAAのスクリーニングに特異的な検出キットを開発した。

表9 白人集団とアジア人集団におけるBMP3およびNDRG4遺伝子のメチル化CpG部位の差異。

【表13】

番号	遺伝子	メチル化部位	一元配置分散分析	座標(hg19)	遺伝子領域	メチル化の割合(白人>アジア人)
1	BMP3	cg19675063	$p = 0.001735, (f = 4.408)$	81975265	エクソン3	Y
2	NDRG4	cg27147718	$p = 0.00004290, (f = 6.558)$	58496542	プロモーター	Y
3	NDRG4	cg04190807	$p = 0.01761, (f = 3.036)$	58497230	プロモーター	N
4	NDRG4	cg00687686	$p = 0.01657, (f = 3.072)$	58497236	プロモーター	N
5	NDRG4	cg04942472	$p = 0.01955, (f = 2.973)$	58497239	プロモーター	N
6	NDRG4	cg01466678	$p = 0.02327, (f = 2.867)$	58497395	プロモーター	N
7	NDRG4	cg05469759	$p = 0.03612, (f = 2.599)$	58498456	イントロン1	N
8	NDRG4	cg00262031	$p = 0.02585, (f = 2.803)$	58498574	イントロン1	N
9	NDRG4	cg06650115	$p = 0.01221, (f = 3.256)$	58498585	イントロン1	N
10	NDRG4	cg04005075	$p = 0.01938, (f = 2.978)$	58498636	イントロン1	N
11	NDRG4	cg09324514	$p = 0.0004509, (f = 5.194)$	58498710	イントロン1	N
12	NDRG4	cg16812519	$p = 0.01862, (f = 3.002)$	58498754	イントロン1	N
13	NDRG4	cg26824423	$p = 0.007544, (f = 3.543)$	58498818	イントロン1	N
14	NDRG4	cg05333442	$p = 0.003665, (f = 3.970)$	58533743	イントロン3	N
15	NDRG4	cg01343363	$p = 0.01099, (f = 3.319)$	58533808	イントロン3	Y
16	NDRG4	cg27113419	$p = 0.006302, (f = 3.649)$	58533979	イントロン3	Y
17	NDRG4	cg05725404	$p = 0.01145, (f = 3.294)$	58534157	イントロン3	N

【0186】

実施例 3

10

20

30

40

50

BMP3 および NDRG4 遺伝子のためのプライマーおよびプローブのスクリーニング

(1) BMP3 および NDRG4 遺伝子のプライマーおよびプローブの設計および選択

qPCR プライマーおよびプローブを、BMP3 および NDRG4 遺伝子のメチル化 CpG 部位に基づいて設計した。3 組の好ましいプライマーおよびプローブを同定した。好ましいプライマーおよびプローブを、陽性対照および陰性対照を伴って BMP3 および NDRG4 遺伝子の他の数種の候補プライマーおよびプローブと比較する。プライマーおよびプローブの情報を表 10 に示す。

表 10 好ましいおよび残りのプライマーおよびプローブの情報

【表 14】

遺伝子	群	プライマー/プローブ	プライマー/プローブ ID	配列 (5'から3')
BMP3	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号3	TTTGAAAATATTCGGGTATATACGTCGC
BMP3	好ましい群1	逆方向プライマー	配列番号4	ATAAACTCTTCCCCAACAACCTACGCGAA
BMP3	好ましい群1	プローブ	配列番号5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTTCG
NDRG4	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
NDRG4	好ましい群1	逆方向プライマー	配列番号7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
NDRG4	好ましい群1	プローブ	配列番号8	CGTCGCGGTTTTCGTTCGTTTTTTCGTTTCGT
BMP3	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号9	AATATTCGGGTATATACGTCGCGA
BMP3	好ましい群2	逆方向プライマー	配列番号10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCCAA
BMP3	好ましい群2	プローブ	配列番号11	TGGAGTGGAGACGGCGTTTCGTAGCGT
NDRG4	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
NDRG4	好ましい群2	逆方向プライマー	配列番号13	GTAACCTCCGCTTCTACGC
NDRG4	好ましい群2	プローブ	配列番号14	TAGGTTTCGCGTCGCGTTTTTCGTT
BMP3	好ましい群3	順方向プライマー	配列番号15	AATATTCGGGTATATACGTCGCGATT
BMP3	好ましい群3	逆方向プライマー	配列番号16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
BMP3	好ましい群3	プローブ	配列番号17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTTCGTA
NDRG4	好ましい群3	順方向プライマー	配列番号18	CGGTTTTCGTTTCGTTTTTTCG
NDRG4	好ましい群3	逆方向プライマー	配列番号19	AACCTAAAACTAATCCCGAACGAACC
NDRG4	好ましい群3	プローブ	配列番号20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG
BMP3	対照1	順方向プライマー	配列番号21	GAGTGGAGACGGCGTTTCGTA
BMP3	対照1	逆方向プライマー	配列番号22	CCACTTACTACGCTAACCCAACG
BMP3	対照1	プローブ	配列番号23	CGGGTGAGGTTTCGCGTAGTTGTTGGG
NDRG4	対照1, 対照2, 対照3	順方向プライマー	配列番号24	GGGTGTTTTTTAGGTTTCGCGTC
NDRG4	対照1	逆方向プライマー	配列番号25	CGTAACTTCCGCTTCTACGC
NDRG4	対照1, 対照2, 対照3	プローブ	配列番号26	ACGCGACTAAAATACCCGATAAACGAA CGAAAAAACGAAC
BMP3	対照2	順方向プライマー	配列番号27	TTAGGTTGCGTTGGGTTAGCG
BMP3	対照2	逆方向プライマー	配列番号28	ACTCCGAAAACGCAAAAAACCG
BMP3	対照2	プローブ	配列番号29	ATTCGGTCGCGTTTCGGGTTTCGTGC
NDRG4	対照2	逆方向プライマー	配列番号30	GACCCGCGAAACGATACCG
BMP3	対照3	順方向プライマー	配列番号31	TATTCGGGTATATACGTCGC
BMP3	対照3	逆方向プライマー	配列番号32	CTTACTACGCTAACCCAACG
BMP3	対照3	プローブ	配列番号33	CCCAACAACCTACGCGAACCTCACCCG
NDRG4	対照3	逆方向プライマー	配列番号34	TCGCGCGTAACTCCGCCTT

【0187】

(2) 好ましいプライマーおよびプローブの BMP3 および NDRG4 遺伝子の陽性対照および陰性対照を含む対照との比較。

種々のメチル化の割合を有する標準試料を、BMP3 および NDRG4 遺伝子のそれぞ

れの陰性対照DNAに陽性対照DNAを種々の割合で添加することによって形成した（表11）。BMP3およびNDRG4遺伝子のそれぞれの好ましいプライマーおよびプローブならびに対照プライマーおよびプローブを用いて標準試料DNAを増幅することにより、分析感度を比較した。BMP3およびNDRG4遺伝子のそれぞれの好ましいプライマーおよびプローブならびに対照プライマーおよびプローブを用いてBMP3およびNDRG4遺伝子の陰性対照DNAを増幅することにより、分析特異度を比較し、反応物当たりの陰性対照DNAの量は 10^4 コピー、 10^5 コピー、 10^6 コピー、 10^7 コピーおよび 10^8 コピーであった。

表11 BMP3およびNDRG4遺伝子の標準試料

【表15】

メチル化の割合	メチル化DNAのコピー数	全DNAのコピー数
1	10^5	10^5
1/10	10^4	10^5
1/10 ²	10^3	10^5
1/10 ³	10^2	10^5
1/10 ⁴	10	10^5

10

【0188】

マスター混合物を表5のように調製し、定量PCR反応条件は、最初の95℃での1分間の変性、次いで50サイクルの95℃での20秒間の変性および60℃での1分間の伸長である。

20

表12 メチル化qPCRの試薬の終濃度

【表16】

番号	試薬	終濃度
1	10×PCR緩衝液	1×
2	MgCl ₂	2mM
3	dNTPs	0.2mM
4	Taq DNAポリメラーゼ	2U
5	各プライマー	0.75mM
6	各プローブ	0.25 mM
7	DNA鋳型	2 μL
8	超純水	最大で50μL

30

【0189】

表13および図3A～図3Lに示されるように、 $1/10^4$ メチル化DNAは、3組の好ましいプライマーおよびプローブを用いて検出できるが、3組の対照では検出できない。

40

【0190】

表13および図3A～図3Lに示されるように、本発明の好ましい3組のBMP3およびNDRG4プライマーおよびプローブは1万分の1という低いメチル化レベルを安定に検出できるが、3組の比較プライマーおよびプローブは1万分の1のメチル化レベルを検出できない。

表13 BMP3およびNDRG4遺伝子の好ましいプライマーおよびプローブならびに対照プライマーおよびプローブの分析感度の比較。

50

【表 17】

遺伝子	メチル化 の割合	メチル 化DNA のコピ ー数	全DN Aのコ ピー 数	好ましいプライマーおよび プローブ			対照プライマーおよび プローブ		
				好まし い群1	好まし い群2	好まし い群3	対照1	対照2	対照3
BMP3	1	10^5	10^5	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10	10^4	10^5	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ²	10^3	10^5	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ³	10^2	10^5	Y	Y	Y	Y	N	N
	1/10 ⁴	10	10^5	Y	Y	Y	N	N	N
NDRG4	1	10^5	10^5	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10	10^4	10^5	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ²	10^3	10^5	Y	Y	Y	Y	Y	Y
	1/10 ³	10^2	10^5	Y	Y	Y	N	N	Y
	1/10 ⁴	10	10^5	Y	Y	Y	N	N	N

Y: 検出、N: 未検出

【0191】

BMP3およびNDRG4の分析感度の増幅曲線を、対照群と比較して好ましい組合せのそれぞれについて図3A～図3Lに示す。

【表 18】

プライマーお よびプローブ	BMP3	NDRG4
好ましい群1	図3A	図3B
好ましい群2	図3C	図3D
好ましい群3	図3E	図3F
対照1	図3G	図3H
対照2	図3I	図3J
対照3	図3K	図3L

【0192】

表14および図4A～図4Lに示されるように、BMP3およびNDRG4遺伝子の3組の好ましいプライマーおよびプローブは種々の濃度の非メチル化DNAに対して増幅シグナルを有しないが、比較プライマーおよびプローブは種々の程度の非特異的な増幅を示す。

表14 好ましいプライマーおよびプローブと対照プライマーおよびプローブとの間の分析特異度の比較。

【表 19】

BMP3 (反応物あ たりのコ ピー)	NDRG4 (反応物あ たりのコ ピー)	好ましいプライマー およびプローブ			対照プライマー およびプローブ		
		好まし い群1	好まし い群2	好まし い群3	対照 1	対照 2	対照 3
10^8	10^8	N	N	N	Y	Y	Y
10^7	10^7	N	N	N	N	Y	Y
10^6	10^6	N	N	N	N	N	N
10^5	10^5	N	N	N	N	N	N
10^4	10^4	N	N	N	N	N	N

Y: 増幅なし、N: 非特異的な増幅

BMP3およびNDRG4の分析特異度の増幅曲線

【表 2 0】

プライマーおよびプローブ	BMP3	NDRG4
好ましい群1	図4A	図4B
好ましい群2	図4C	図4D
好ましい群3	図4E	図4F
対照1	図4G	図4H
対照2	図4I	図4I
対照3	図4K	図4L

【 0 1 9 3 】

10

実施例 4

好ましいメチル化プライマーおよびプローブならびに比較のメチル化プライマーおよびプローブの検証を、BMP3およびNDRG4遺伝子の便試料を用いて実施する。

81個の便試料中のBMP3およびNDRG4遺伝子のメチル化レベルを、3組の好ましいプライマーおよびプローブならびに比較プライマーおよびプローブを用いて検出した。3つの比較プライマーおよびプローブは以下である：

比較1：BMP3順方向プライマー配列番号21、BMP3逆方向プライマー配列番号22、およびBMP3プローブ配列番号23；NDRG4順方向プライマー配列番号24、NDRG4逆方向プライマー配列番号25、およびNDRG4プローブ配列番号26；

比較2：BMP3順方向プライマー配列番号27、BMP3逆方向プライマー配列番号28、およびBMP3プローブ配列番号29；NDRG4順方向プライマー配列番号24、NDRG4逆方向プライマー配列番号30、およびNDRG4プローブ配列番号26；

比較3：BMP3順方向プライマー配列番号31、BMP3逆方向プライマー配列番号32、およびBMP3プローブ配列番号33；NDRG4順方向プライマー配列番号24、NDRG4逆方向プライマー配列番号34、およびNDRG4プローブ配列番号26。

20

【 0 1 9 4 】

便試料の情報を表15に示す。

表15 81個の便試料の統計

【表 2 1】

大腸内視鏡検査	数
正常	46
腺腫	15
大腸がん	20
合計	81

30

【 0 1 9 5 】

便DNAを、以下に記載される方法に従って試料から抽出した。

40

(1) 便DNAの抽出

i. 4～6gの便試料に40mLの可溶化液を添加し、十分にボルテックスした後、50で16時間インキュベートする。

ii. 次に、5000rpmで10分間遠心分離する。遠心分離前の秤量に注意する。遠心分離終了後、遠心管を慎重に取り出し、激しく振らないようにする。

iii. 9mLの上清を新たな50mLの遠心管にピペットし、1mLの抽出アジュバント、60μLの磁気ビーズ、および10mLのイソプロパノールを添加する。10秒間ボルテックスし、65で20分間インキュベートする。インキュベート中、5分ごとに1回上下に混合する。

iv. インキュベーション後、50mLの遠心管を磁気スタンド上に置き、上清が透明

50

になるまで3分間安定に維持し、上清を捨てる。

v. 50 mLの遠心管を磁気スタンドから取り出し、12 mLの洗浄溶液を添加する。磁気ビーズが遠心管のウェルから離れるまでボルテックスし、3分間安定に維持する。50 mLの遠心管を磁気スタンドに戻し、上清が透明になるまで3分間静置し、上清を捨てる。

vi. 15 mLの80%エタノール溶液を添加し、ビーズが遠心管のウェルから離れるまでボルテックスし、3分間安定に維持する。遠心管を磁気スタンドに戻し、上清が透明になるまで3分間安定に維持し、上清を捨てる。

vii. 前の手順を1回繰り返す。

viii. 底部の残液をピペットし、遠心管を開いたまま65 で5分間インキュベートする。ビーズが乾燥するまで遠心管を磁気スタンドから取り出し、1.5 mLの予熱した溶離液Iを添加する。ビーズをウェルから溶離液Iに1000 µLのピペットでピペットし、混合物を2 mLの遠心管に移して蓋を閉め、65 で5分間インキュベートする。

ix. 13000 rpmで3分間遠心分離し、600 µLの上清を新たな1.5 mLのチューブにピペットし、600 µLの結合溶液を添加して十分にボルテックスする。

x. 600 µLの上記混合物をDNA精製カラムに移し、13,000 rpmで1分間遠心分離し、廃棄物を捨てる。

xi. 残りの混合物を前の手順で処理し、13,000 で2分間遠心分離する。

xii. DNA精製カラムに600 µLの90%エタノール溶液を添加し、13,000 rpmで1分間遠心分離し、廃棄物を捨てる。

xiii. 前の手順を2回繰り返す。

xiv. 13,000 rpmで3分間遠心分離し、DNA精製カラムを新たな1.5 mLの遠心管に入れる。DNA精製カラムを開き、65 で5分間インキュベートして乾燥させる。

xv. DNA精製カラムの中央に100 µLの予熱した溶離液IIを滴下し、蓋をして65 で5分間インキュベートする。13,000 rpmで2分間遠心分離する。溶出したDNA溶液を取得し、使用するために2~8 で保存する。長期保存は-25 ~ -15 で維持すべきである。

【0196】

(2) 重亜硫酸処理

詳細な操作手順は実施例3に従う。

【0197】

(3) qPCR

QPCRマスター混合物を以下のように調製した。

表16

10

20

30

【表 2 2】

番号	試薬	終濃度
1	10×PCR緩衝液	1×
2	MgCl ₂	2 mM
3	dNTP	0.2 mM
4	Taq DNAポリメラーゼ	2 U
5	各プライマー	0.75 μM
6	各プローブ	0.25 μM
7	DNA鋳型	2 μL
8	超純水	最大で50 μL

10

qPCR反応条件は、1サイクルの95℃での2分間の変性、ならびに50サイクルの95℃での20秒間の変性および95℃での1分間の伸長である。B2M遺伝子はqPCR反応の品質管理のための参照遺伝子である。

20

【0198】

(4) 結果

表17に示されるように、BMP3およびNDRG4遺伝子の3組の好ましいプライマーおよびプローブを用いた81個の便試料におけるCRCおよびAA検出の感度は、それぞれ最大で85.0%~95.0%(BMP3メチル化によるCRC)、66.7%~73.3%(BMP3メチル化によるAA)、90.0%~95.0%(NDRG4メチル化によるCRC)、および73.3%~86.7%(NDRG4メチル化によるAA)である。さらに、BMP3メチル化データまたはNDRG4メチル化データのいずれかを用いたCRCおよびAA検出の特異度は、いずれも約97.8%~100.0%である。

【0199】

しかしながら、BMP3およびNDRG4遺伝子の3組の比較プライマーおよびプローブを用いた81個の便試料におけるCRCおよびAA検出の感度は、それぞれ85.0%~90.0%(BMP3メチル化によるCRC)、46.7%~60.0%(BMP3メチル化によるAA)、90.0%~95.0%(NDRG4メチル化によるCRC)、および66.7%~73.3%(NDRG4メチル化によるAA)である。また、BMP3メチル化データまたはNDRG4メチル化データのいずれかを用いたCRCおよびAA検出の全体的な特異度は、それぞれ最大で約91.3%~93.5%および93.5%~95.7%である。

30

【0200】

臨床試料の検出(特にAA検出)において、好ましいプライマーおよびプローブが比較プライマーおよびプローブよりも優れていることがわかる。

40

表17 臨床試料の検出結果の統計

【表 2 3 - 1】

BMP3									
項目	好ましい群1			好ましい群2			好ましい群3		
試料の分類	CRC	AA	正常	CRC	AA	正常	CRC	AA	正常
検出された陽性試料の数	19/20	11/15	0/46	18/20	11/15	1/46	17/20	10/15	1/46
感度	95.0%	73.3%	/	90.0%	73.3%	/	85.0%	66.7%	/
特異度	100.0%			97.8%			97.8%		
全体の遵守率	93.8%			91.4%			88.9%		
増幅曲線	図5A			図5B			図5C		
項目	比較群1			比較群2			比較群3		
試料の分類	CRC	AA	正常	CRC	AA	正常	CRC	AA	正常
検出された陽性試料の数	18/20	9/15	3/46	17/20	8/15	4/46	17/20	7/15	4/46
感度	90.0%	60.0%	/	85.0%	53.3%	/	85.0%	46.7%	/
特異度	93.5%			91.3%			91.3%		
全体の遵守率	86.4%			82.7%			81.5%		
増幅曲線	図5D			図5E			図5F		

10

20

30

【表 2 3 - 2】

NDRG4										
項目	好ましい群1			好ましい群2			好ましい群3			
試料の分類	CRC	AA	正常	CRC	AA	正常	CRC	AA	正常	
検出された陽性試料の数	19/20	13/15	0/46	19/20	12/15	0/46	18/20	11/15	1/46	
感度	95.0%	86.7%	/	95.0%	80.0%	/	90.0%	73.3%	/	
特異度	100.0%			100.0%			97.8%			
全体の遵守率	96.3%			95.1%			91.4%			
増幅曲線	図6A			図6B			図6C			
項目	比較群1			比較群2			比較群3			
試料の分類	CRC	AA	正常	CRC	AA	正常	CRC	AA	正常	
検出された陽性試料の数	18/20	10/15	2/46	18/20	10/15	3/46	19/20	11/15	3/46	
感度	90.0%	66.7%	/	90.0%	66.7%	/	95.0%	73.3%	/	
特異度	95.7%			93.5%			93.5%			
全体の遵守率	88.9%			87.7%			90.1%			
増幅曲線	図6D			図6E			図6F			

表 1 8 8 1 個の便試料の検出結果

10

20

30

40

【表 2 4 - 1】

番号	性別	年齢	大腸内視鏡検査	Ct BMP3						NDRG4								
				好ましいブライマーおよび プローブ			比較ブライマーおよび プローブ			好ましいブライマーおよび プローブ			比較ブライマーおよび プローブ					
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
1	男性	50	CRC-ステージⅠ	33.9	32.1	37.5	32.7	35.8	36.2	U	33.6	35	33.9	38.8	40.1			
2	男性	51	CRC-ステージⅡ	34.9	32.2	29.1	41.3	37.6	39.9	39.4	38.4	33.8	34	38.1	40.3			
3	女性	56	CRC-ステージⅢ	35.1	33.1	31.4	34.9	41.2	35.1	30.7	30.4	33.2	34.2	42.6	35			
4	男性	72	CRC-ステージⅠ	35.7	U	U	33.4	40.1	36	37.2	38.9	U	U	U	36.7			
5	女性	75	CRC-ステージⅡ	31.9	36.6	32.7	37.9	36.3	34.5	35.4	37.4	34.5	36.4	33	40.5			
6	女性	55	CRC-ステージⅡ	37.5	35.1	29.5	43	39.8	39.7	34.4	35.9	35.6	35.1	37.4	42			
7	女性	50	CRC-ステージⅡ	36.2	32.2	38.8	39.7	37.2	37.3	33.6	37.4	38.8	42.3	36.4	37.5			
8	男性	62	CRC-ステージⅣ	U	U	U	U	U	U	36.1	34.5	39.9	41	41.8	40.4			
9	女性	74	CRC-ステージⅠ	35.7	37.7	29.3	38	36	44	29.6	32.3	36.6	42.6	36.8	33			
10	女性	73	CRC-ステージⅡ	31.7	29.7	33.9	32.6	42	32.1	36.5	35.7	39.7	39.3	33.5	31.8			
11	男性	52	CRC-ステージⅡ	34	40	35.9	39.5	38.1	42.4	36.9	U	36.5	42.6	37.8	36.6			
12	女性	57	CRC-ステージⅡ	34.5	29.1	29.3	34.6	42.6	41.3	37.7	31.8	35.6	42.3	39	42.6			
13	男性	51	CRC-ステージⅠ	37.6	34	33.2	38.8	U	U	31.9	35.4	35.9	39.1	35.1	34.6			
14	男性	60	CRC-ステージⅡ	36.2	31.7	35.6	40.1	42.2	33.1	29.6	31.7	29.1	33.8	36.4	36.5			
15	女性	49	CRC-ステージⅢ	31.1	37	29.4	41.9	35.8	34.3	34.4	33.6	35.6	40.3	39.2	39			
16	男性	49	CRC-ステージⅣ	34	35.5	U	41.8	35.9	37.5	37.6	32.3	32.3	38.1	U	31.3			
17	男性	48	CRC-ステージⅠ	38.1	37.1	35.8	39	40.7	38.3	29.4	30.7	U	U	37.1	U			
18	男性	54	CRC-ステージⅡ	36.1	33.7	35.2	U	U	U	29.4	37	33.5	34.7	34	41.5			
19	女性	60	CRC-ステージⅢ	29.2	36.4	33.6	38.4	36.5	33.7	32.9	30.1	35.1	33.5	38.5	41.3			
20	女性	62	CRC-ステージⅣ	36.4	34.7	38.5	39.5	37.9	38.9	36.4	29.4	33.1	35.8	43.1	42.8			
21	女性	50	AA	38.7	U	U	35.3	U	U	34.6	37	U	U	U	40.9			
22	女性	56	AA	U	35.6	30	40.9	38.6	35	34.6	U	29.3	42.7	33.4	U			
23	男性	58	AA	U	U	29.6	39.3	38	41.1	39.3	35.1	39.5	39.4	U	37.4			
24	男性	67	AA	36.3	32.8	34.2	U	U	U	33.9	33	32.7	36	35.5	U			
25	男性	51	AA	35.9	33.7	33.9	36.4	38	39	32.7	33.9	U	U	35.8	40.4			
26	女性	71	AA	29.3	30	35.4	40.3	37.7	34.4	30.7	34.9	38.3	33.8	41.1	33			
27	男性	65	AA	U	30.3	U	U	U	U	34.8	34	36.8	41.9	42.7	36.1			

10

20

30

40

【表 2 4 - 2】

番号	性別	年齢	大腸内視鏡検査	Ct BMP3									NDRG4								
				好ましいブライマーおよび グループ			比較ブライマーおよび グループ			好ましいブライマーおよび グループ			比較ブライマーおよび グループ			好ましいブライマーおよび グループ			比較ブライマーおよび グループ		
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
28	男性	62	AA	37.5	29.2	U	U	U	U	U	U	U	U	U	36.8	43.1	43.9	32.8	U	U	U
29	女性	45	AA	31	37.6	37.4	37.2	38.5	37.8	30.8	31.7	30.8	U	U	U	U	U	U	U	U	U
30	男性	67	AA	29.7	34.3	29.8	31.3	U	U	33.9	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
31	女性	53	AA	36.3	U	U	U	35.4	34.6	29.5	34.9	37.7	39.6	40	42.9	U	U	U	U	U	U
32	女性	68	AA	38.4	37.3	30.4	U	U	U	U	37.2	U	U	U	35.1	U	U	U	U	U	U
33	女性	50	AA	36.9	39	32.1	36.6	U	U	39.5	29.1	30.7	37.1	37.6	36.6	U	U	U	U	U	U
34	女性	48	AA	U	U	U	U	37.3	35.8	38.3	32.2	32.4	36.2	36	43.9	U	U	U	U	U	U
35	男性	50	AA	35.5	29.1	32.7	39.4	42.7	U	29.8	33.8	32.9	36.4	38.2	42	U	U	U	U	U	U
36	男性	45	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
37	女性	50	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
38	男性	59	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
39	男性	73	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
40	男性	47	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
41	男性	71	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
42	女性	45	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
43	女性	62	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
44	男性	55	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
45	女性	54	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
46	男性	63	正常	U	U	U	39.4	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
47	女性	53	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	41.2	U	U	U	U	U	U	U	U
48	男性	67	正常	U	U	U	U	37.2	41.2	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
49	男性	69	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
50	男性	54	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
51	男性	50	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
52	女性	65	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	40.3	41	U	U	U	U	U	U
53	女性	56	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
54	男性	67	正常	U	35.6	U	U	41.3	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

10

20

30

40

【表 2 4 - 3】

番号	性別	年齢	大腸内視鏡検査	Ct BMP3								NDRG4							
				好ましいプライマーおよび プローブ				比較プライマーおよび プローブ				好ましいプライマーおよび プローブ				比較プライマーおよび プローブ			
				1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1
55	男性	70	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
56	女性	75	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
57	女性	50	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
58	女性	66	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
59	男性	49	正常	U	U	U	U	U	41.6	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
60	男性	71	正常	U	U	U	40.8	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
61	男性	70	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	40.5	U	U	U	U
62	男性	73	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
63	男性	48	正常	U	U	U	U	38.5	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
64	男性	52	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	39.6	U
65	男性	71	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
66	女性	60	正常	U	U	U	U	U	41.9	U	U	U	U	U	39.4	U	U	U	U
67	女性	65	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
68	女性	74	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
69	男性	71	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
70	女性	73	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
71	男性	49	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
72	女性	69	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
73	男性	59	正常	U	U	U	42.7	41.9	42.5	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
74	男性	71	正常	U	U	37.1	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
75	女性	54	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	38.9	U	35.2	U	U
76	男性	71	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
77	女性	63	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
78	男性	74	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
79	男性	62	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
80	女性	75	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U
81	男性	48	正常	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U

注釈 U：未検出

【0201】

実施例 5

BMP3 および NDRG4 遺伝子のメチル化プライマーおよびプローブの組合せのスクリーニング

(1) 便DNAの抽出

便DNAを実施例3のプロトコルに従って抽出する。

【0202】

10

20

30

40

50

(2) BMP3 および NDRG4 遺伝子のメチル化検出

BMP3 および NDRG4 遺伝子のプライマーおよびプローブの組合せを以下に示す。
実施例3の手順に従って、9個の組合せをそれぞれ用いて qPCR を行った。

表19．プライマーおよびプローブの組合せ

【表25】

組合せの番号	BMP3	NDRG4
1	好ましい群3	好ましい群1
2	好ましい群3	好ましい群2
3	好ましい群3	好ましい群3
4	好ましい群1	好ましい群1
5	好ましい群1	好ましい群2
6	好ましい群1	好ましい群3
7	好ましい群2	好ましい群1
8	好ましい群2	好ましい群2
9	好ましい群2	好ましい群3

10

BMP3 および NDRG4 遺伝子のプライマーおよびプローブの9個の組合せの配列は以下である：

表20．組合せにおけるプライマーおよびプローブの配列

【表 2 6】

組合 せの 番号	遺伝子	群	プライマー/プローブ	配列番号	配列 (5'から3')
1	BMP3	好ましい群3	順方向プライマー	配列番号15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGATT
			逆方向プライマー	配列番号16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
			プローブ	配列番号17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
	NDRG4	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			逆方向プライマー	配列番号7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			プローブ	配列番号8	CGTCGCGGTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT
2	BMP3	好ましい群3	順方向プライマー	配列番号15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGATT
			逆方向プライマー	配列番号16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
			プローブ	配列番号17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
	NDRG4	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			逆方向プライマー	配列番号13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			プローブ	配列番号14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
3	BMP3	好ましい群3	順方向プライマー	配列番号15	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGATT
			逆方向プライマー	配列番号16	ACTTACTACGCTAACCCAACG
			プローブ	配列番号17	TAGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCGTA
	NDRG4	好ましい群3	順方向プライマー	配列番号18	CGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCG
			逆方向プライマー	配列番号19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
			プローブ	配列番号20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG
4	BMP3	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			逆方向プライマー	配列番号4	ATAAACTCTTCCCAACAACACTACGCGAA
			プローブ	配列番号5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			逆方向プライマー	配列番号7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			プローブ	配列番号8	CGTCGCGGTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT
5	BMP3	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			逆方向プライマー	配列番号4	ATAAACTCTTCCCAACAACACTACGCGAA
			プローブ	配列番号5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			逆方向プライマー	配列番号13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			プローブ	配列番号14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
6	BMP3	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号3	TTTGAAAATATTCGGGTTATATACGTCGC
			逆方向プライマー	配列番号4	ATAAACTCTTCCCAACAACACTACGCGAA
			プローブ	配列番号5	AGCGTTGGAGTGGAGACGGCGTTCG
	NDRG4	好ましい群3	順方向プライマー	配列番号18	CGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCG
			逆方向プライマー	配列番号19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
			プローブ	配列番号20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG
7	BMP3	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			逆方向プライマー	配列番号10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCCAA
			プローブ	配列番号11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG4	好ましい群1	順方向プライマー	配列番号6	ATCGATCGGGGTGTTTTTAGGTTTC
			逆方向プライマー	配列番号7	CCTTCTACGCGACTAAAATACCCGAT
			プローブ	配列番号8	CGTCGCGGTTTTCGTTTCGTTTTTCGTTTCGT
8	BMP3	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			逆方向プライマー	配列番号10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCCAA
			プローブ	配列番号11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG4	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号12	GCGGGTGAGAAGTCGGC
			逆方向プライマー	配列番号13	GTAACCTCCGCCTTCTACGC
			プローブ	配列番号14	TAGGTTTCGCGTCGCGGTTTTTCGTT
9	BMP3	好ましい群2	順方向プライマー	配列番号9	AATATTCGGGTTATATACGTCGCGA
			逆方向プライマー	配列番号10	GCAACCTAACAAATAAACTCTTCCCCAA
			プローブ	配列番号11	TGGAGTGGAGACGGCGTTCGTAGCGT
	NDRG4	好ましい群3	順方向プライマー	配列番号18	CGGTTTTTCGTTTCGTTTTTCG
			逆方向プライマー	配列番号19	AACCTAAAATAATCCCGAACGAACC
			プローブ	配列番号20	TCGTTTATCGGGTATTTTAGTCGCGTAG

10

20

30

40

【0203】

反応に用いたQPCRマスター混合物は以下である：

表 2 1 . BMP 3 / NDRG 4 のためのQPCRマスター混合物

【表 2 7】

番号	試薬	終濃度
1	10× PCR緩衝液	1×
2	MgCl ₂	2 mM
3	dNTP	0.2 mM
4	Taq DNAポリメラーゼ	2 U
5	各プライマー	0.75 μM
6	各プローブ	0.25 μM
7	DNA鋳型	2 μL
8	超純水	最大で50 μL

10

【 0 2 0 4】

qPCR反応条件は、1サイクルの95 °Cでの2分間の変性、ならびに50サイクルの95 °Cでの20秒間の変性および60 °Cでの1分間の伸長である。

20

【 0 2 0 5】

(3) KRAS遺伝子のバリエーションの検出

KRAS遺伝子のコドン12および13において7つの変異ホットスポットが検出された。7つの変異体は、G12D、G13D、G12V、G12C、G12S、G12AおよびG13Rであり、これらのプライマーおよびプローブの配列は表22である。

表22 KRAS遺伝子の7つの変異を検出するためのプライマーおよびプローブ

【表 2 8】

プライマー名	プライマー/プローブ	配列番号	配列(5'から3')
G12D-F	順方向プライマー	配列番号35	AACTTGTGGTAGTTGGAGGTGA
G13D-F	順方向プライマー	配列番号36	AACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGGGA
G12V-F	順方向プライマー	配列番号37	AACTTGTGGTAGTTGGAGTTGT
G12C-F	順方向プライマー	配列番号38	AAACTTGTGGTAGTTGGGGCTT
G12S-F	順方向プライマー	配列番号39	AAACTTGTGGTAGTTGGTGCTA
G12A-F	順方向プライマー	配列番号40	AACTTGTGGTAGTTGGAGCAGC
G12R-F	順方向プライマー	配列番号41	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCTC
Kras-R	逆方向プライマー	配列番号42	GAATGGTCCTGCACCAGTAATATG
ACTB-F	順方向プライマー	配列番号43	AGGGCTTCTTGTCTTTTCCTT
ACTB-R	逆方向プライマー	配列番号44	CGTGCTCGATGGGGTACTTC
KRAS-P	プローブ	配列番号45	AGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGC
ACTB-P	プローブ	配列番号46	CGTGATGGTGGGCATGGGTCAGAAGGA

30

反応に用いたQPCRマスター混合物は以下である：

40

表23 . KRASのためのQPCRマスター混合物

【表 2 9】

番号	試薬	終濃度
1	G12A-F	0.72 μM
2	G12C-F	0.60 μM
3	G12D-F	0.72 μM
4	G12R-F	0.48 μM
5	G12S-F	0.90 μM
6	G12V-F	0.72 μM
7	G13D-F	0.48 μM
8	Kras-R	0.90 μM
9	Kras-P	0.10 μM
10	ACTB-F	0.30 μM
11	ACTB -R	0.30 μM
12	ACTB -P	0.05 μM
13	5×PCR緩衝液,-Mg ²⁺	1×
14	MgCl ₂	1.0 mM
15	dNTPs	0.1 mM
16	Taq DNAポリメラーゼ	2.5 U
17	DNA鋳型	2 μL
18	超純水	最大で50 μL

10

20

30

40

50

【0206】

QPCR反応条件は、1サイクルの95℃での5分間の変性、ならびに45サイクルの95℃での15秒間の変性、71℃での60秒間のアニール、および55℃での50秒間の伸長である。

【0207】

qPCRの反応の品質管理を、ACTBを参照遺伝子として用いて行った。

【0208】

(4) 便中ヘモグロビン検査

便中ヘモグロビンを免疫学的便潜血検査(FIT)により検出し、結果は陽性または陰性である。

【0209】

(5) 式を用いたスコアの生成

BMP3、NDRG4およびKRAS遺伝子のqPCR検出のCt値、ならびに便中ヘモグロビン検査の陽性結果および陰性結果を以下のロジスティック回帰式に入れる：

$$P = e^K / (1 + e^K)$$

【0210】

ここで、Pは総合指数、 $K = a * \Delta Ct1 + b * \Delta Ct2 + c * \Delta Ct3 + d * FIT + X$ 、eは自然定数、a、b、c、d、Xは臨床定数である。 $\Delta Ct1$ 、 $\Delta Ct2$ および $\Delta Ct3$ は、標的遺伝子のCt値から参照遺伝子のCt値を差し引いた値である。

【0211】

P値が所定の閾値以上である場合、検査結果は陽性であり、そうでなければ陰性である。陽性の結果は、対象がCRCまたはAAを有する可能性があることを示す。

【0212】

(6) 検査結果

実施例 3 の 8 1 個の便試料を検出し、B M P 3 および N D R G 4 遺伝子のプライマーおよびプローブの種々の組合せの結果を表 2 4 に示す。

表 2 4 8 1 個の便試料の検出結果

【表 3 0】

組合せの番号	BMP3	NDRG4	感度 (CRC+AA)	特異度 (CRC+AA)	CRCにおいて 陽性と判定さ れた試料の数	AAにおいて 陽性と判定さ れた試料の数	正常において 陰性と判定さ れた試料の数	感度 (CRC)	感度 (AA)
1	好ましい群3	好ましい群1	94.3%	97.8%	19/20	14/15	45/46	95.0%	93.3%
2	好ましい群3	好ましい群2	91.4%	97.8%	18/20	14/15	45/46	90.0%	93.3%
3	好ましい群3	好ましい群3	80.0%	95.6%	16/20	12/15	44/46	80.0%	80.0%
4	好ましい群1	好ましい群1	97.1%	100.0%	20/20	14/15	46/46	100.0%	93.3%
5	好ましい群1	好ましい群2	97.1%	97.8%	20/20	14/15	45/46	100.0%	93.3%
6	好ましい群1	好ましい群3	88.6%	95.6%	19/20	12/15	44/46	95.0%	80.0%
7	好ましい群2	好ましい群1	97.1%	97.8%	19/20	15/15	45/46	95.0%	100.0%
8	好ましい群2	好ましい群2	94.3%	97.8%	19/20	14/15	45/46	95.0%	93.3%
9	好ましい群2	好ましい群3	85.7%	95.6%	19/20	11/15	44/46	95.0%	73.3%

以下のことがわかった：（１）組合せの番号４、５および７は、他の６つの組合せよりも優れている。検査したすべてのプライマーおよびプローブが好ましいものであり、他のプライマーおよびプローブよりも優れていることを考慮すると（実施例３参照）、この３つの特定の組合せはＢＭＰ３およびＮＤＲＧ４プライマー／プローブのあらゆる公知の組合せよりも優れている。（２）ＢＭＰ３、ＮＤＲＧ４、ＫＲＡＳ遺伝子および便中ヘモグロビン検出を含むＣＲＣおよびＡＡ検出のための本キットの感度および特異度は、ＢＭＰ３またはＮＤＲＧ４の単一遺伝子のメチル化検出のためのキットの感度および特異度よりも著しく優れている。（３）アジア人集団（例えば中国人集団）におけるＣＲＣ検出のための本キットの感度および特異度は、既存の類似の製品（Ｃｏｌｏｇｕａｒｄ（登録商標）など）よりも明らかに優れている。（４）アジア人集団（例えば中国人集団）におけるＡＡ検出のための本キットの感度および特異度は、既存の類似の製品（Ｃｏｌｏｇｕａｒｄ（登録商標）など）よりも著しく優れている。

10

【０２１４】

本明細書において引用されたあらゆる特許、特許出願および刊行物の開示（特許請求の範囲、図および／または図面を含む）は、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

【０２１５】

別段の規定がない限り、本明細書におけるあらゆる技術用語および科学用語は、本発明が属する分野における当業者によって通常理解される意味と同じ意味を有する。本明細書に記載される方法および物質と類似または同等である任意の方法および物質が本発明の実施または試験に使用され得るが、好ましい方法および物質が本明細書に記載されている。引用されるあらゆる刊行物、特許および特許出願は、あらゆる目的のためにその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

20

【０２１６】

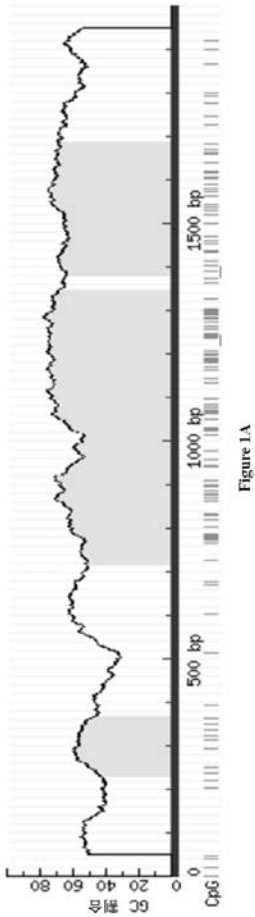
本明細書で議論された刊行物は、本願の出願日より前の開示のみを目的として提供される。本明細書のいかなる記述も、本発明が先行発明を理由にそのような刊行物に先行する権利を有していないことを認めるものと解釈されるものではない。

【０２１７】

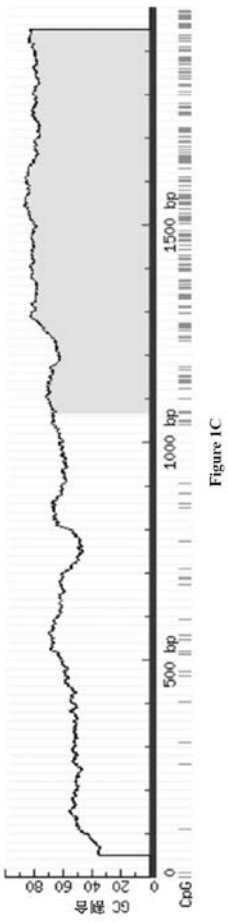
本発明はその特定の実施態様に関連して記載されているが、さらなる変更が可能であり、本願は一般に本発明の原理に従い、かつ本発明が属する分野における公知または慣例の範囲内であり、先述の本質的な特徴に適用され得、添付の特許請求の範囲に従うような本開示からの逸脱を含む、本発明のあらゆる変形、使用または適合を包含することが意図されることが理解される。

30

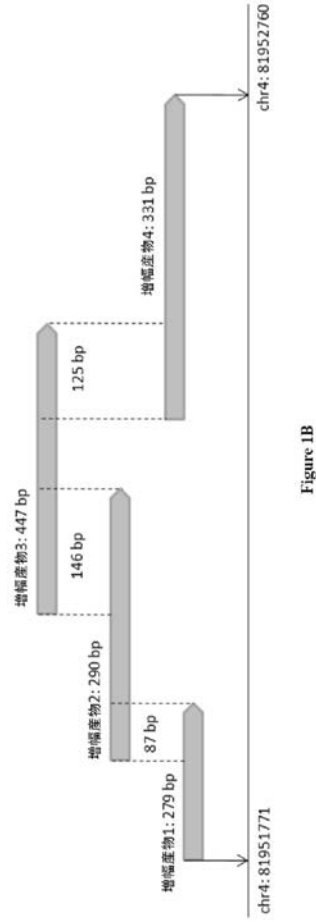
【図 1 A】



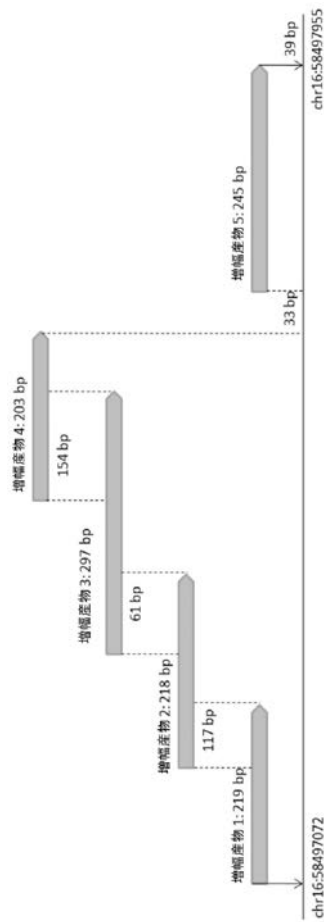
【図 1 C】



【図 1 B】



【図 1 D】



【図 2 A】

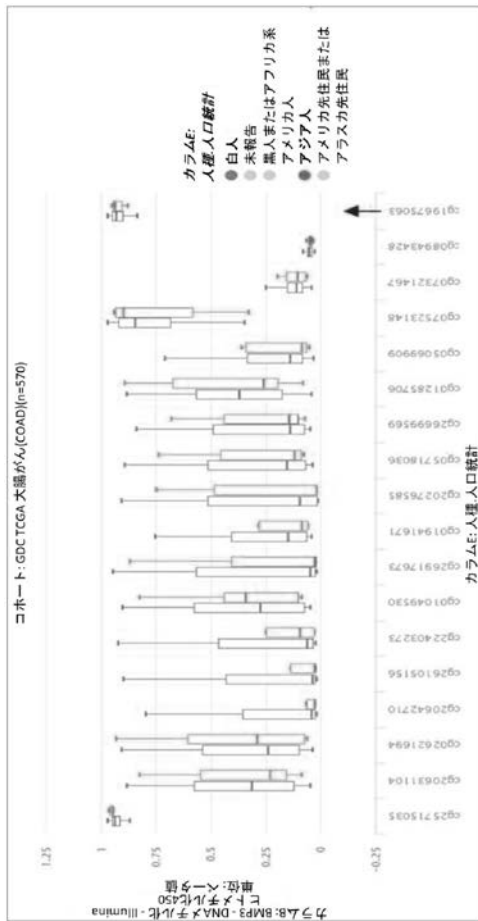


Figure 2A. 白人集団およびアジア人集団におけるBMP3遺伝子のメチル化CpG部位の差異

【図 2 B】

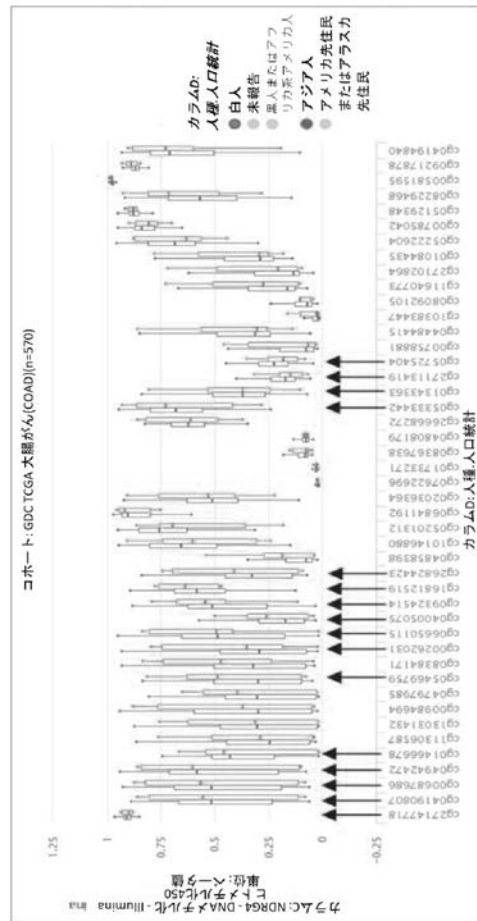


Figure 2B. 白人集団およびアジア人集団におけるNDRC4遺伝子のメチル化CpG部位の差異

【図 3 A】

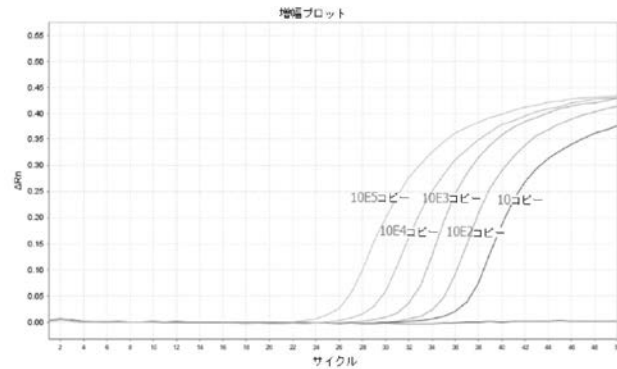


Figure 3A

【図 3 B】

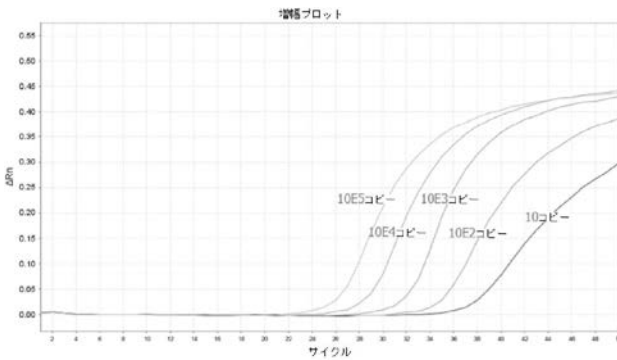


Figure 3B

【図 3 C】

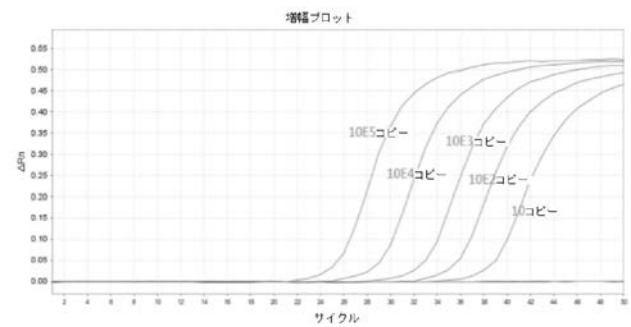


Figure 3C

【図 3 D】

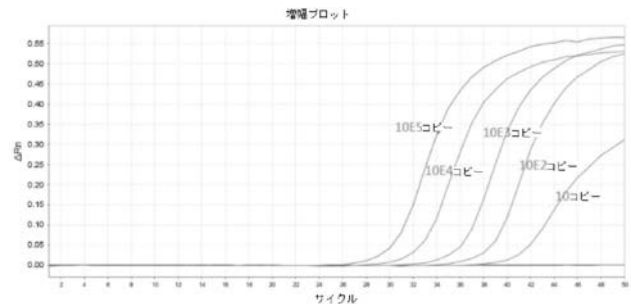


Figure 3D

【図 3 E】

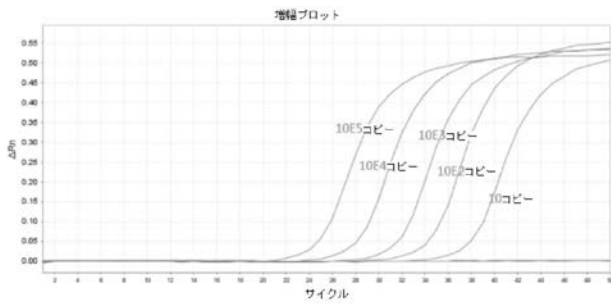


Figure 3E

【図 3 G】

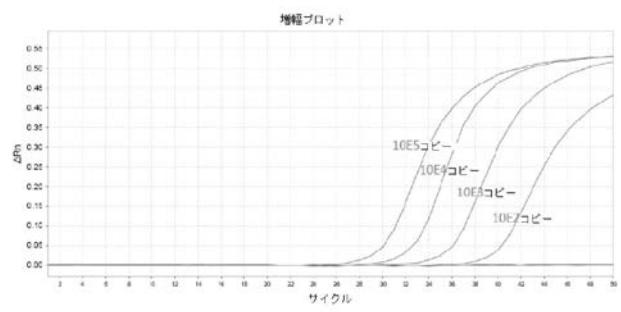


Figure 3G

【図 3 F】

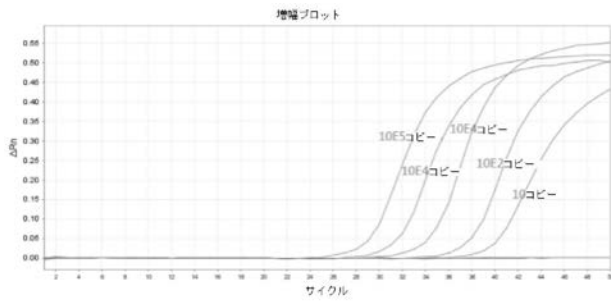


Figure 3F

【図 3 H】

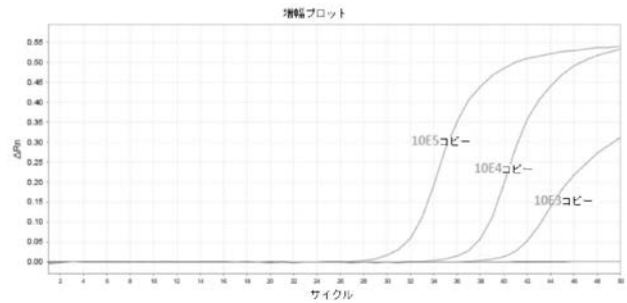


Figure 3H

【図 3 I】

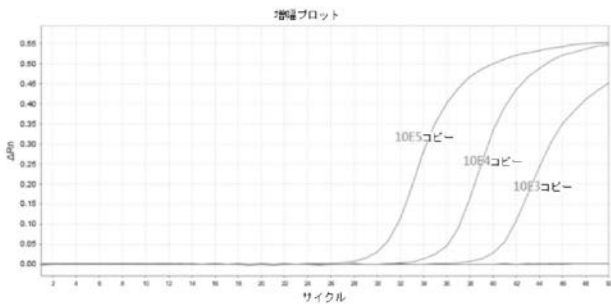


Figure 3I

【図 3 K】

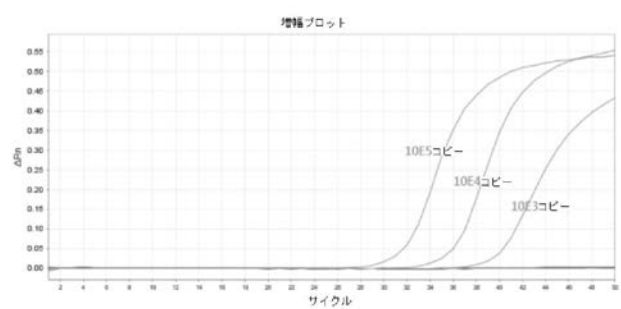


Figure 3K

【図 3 J】

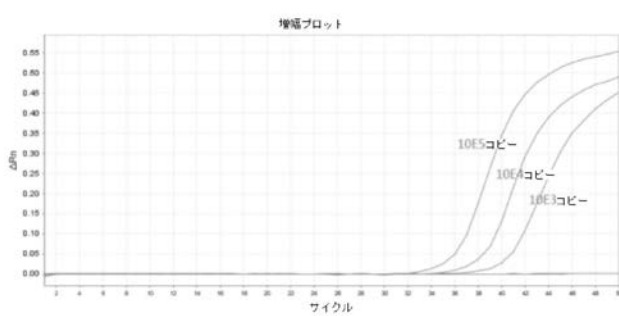


Figure 3J

【図 3 L】

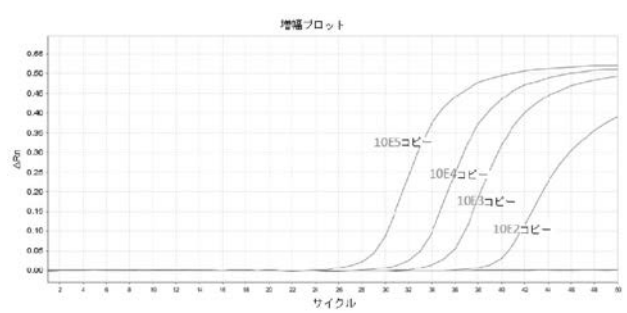


Figure 3L

【 図 4 A 】

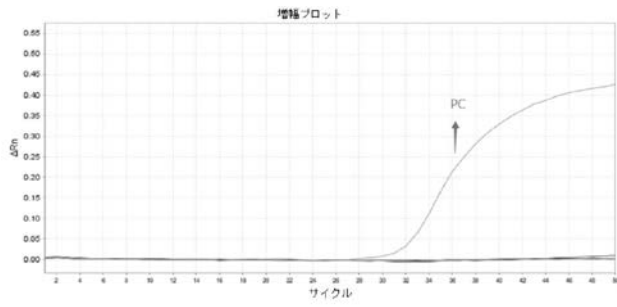


Figure 4A

【 図 4 B 】

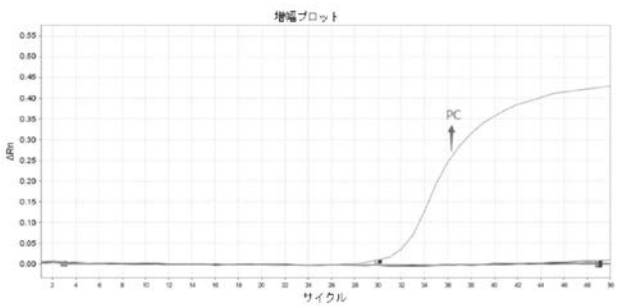


Figure 4B

【 図 4 C 】

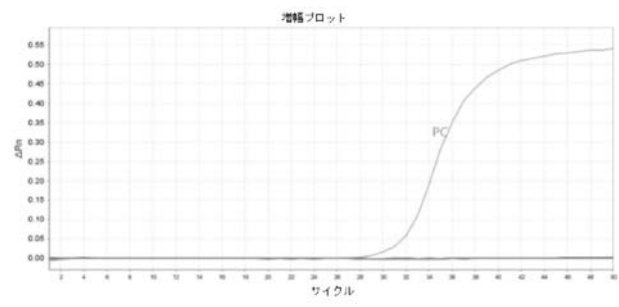


Figure 4C

【 図 4 D 】

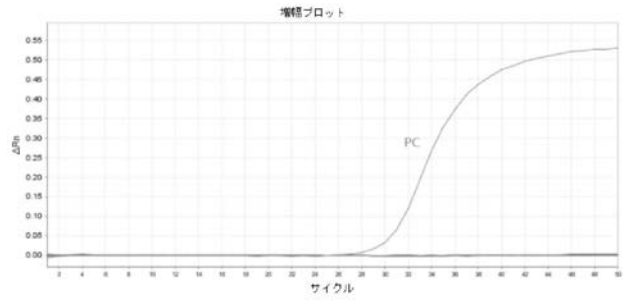


Figure 4D

【 図 4 E 】

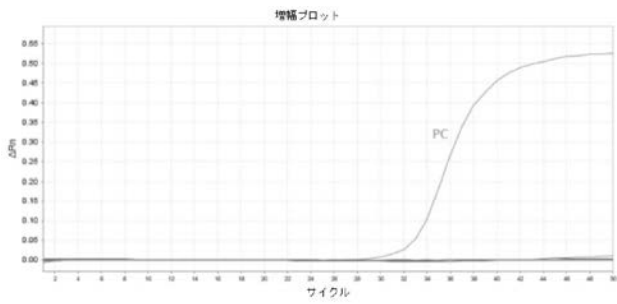


Figure 4E

【 図 4 F 】

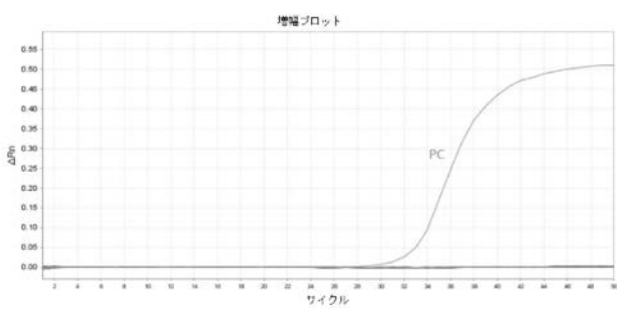


Figure 4F

【 図 4 G 】

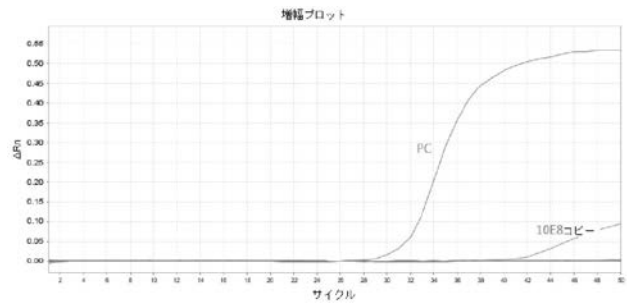


Figure 4G

【 図 4 H 】

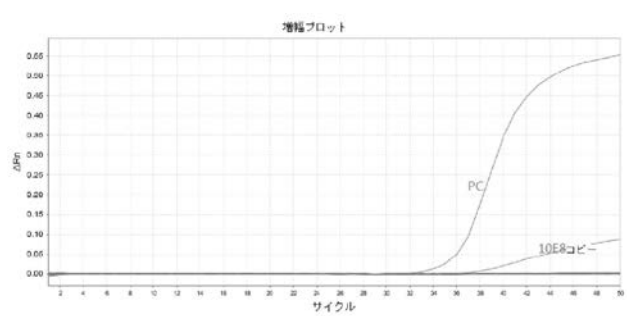


Figure 4H

【図 4 I】

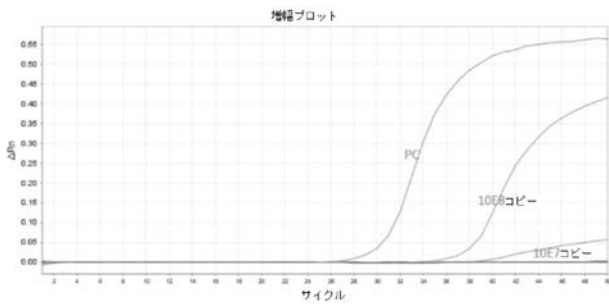


Figure 4I

【図 4 K】

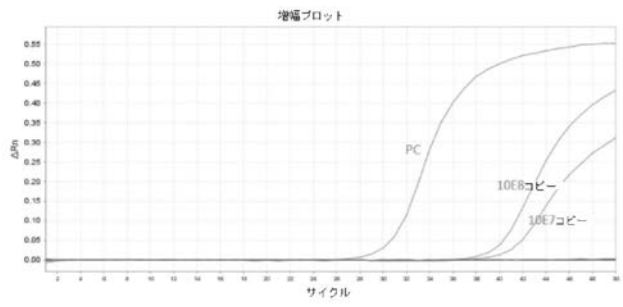


Figure 4K

【図 4 J】

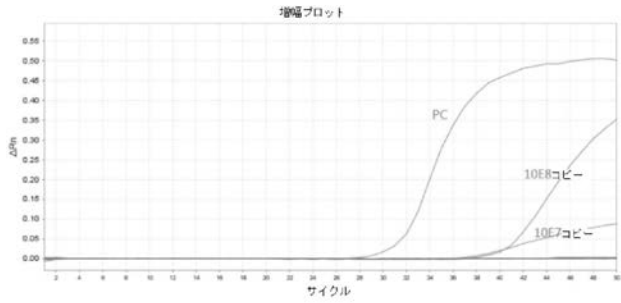


Figure 4J

【図 4 L】

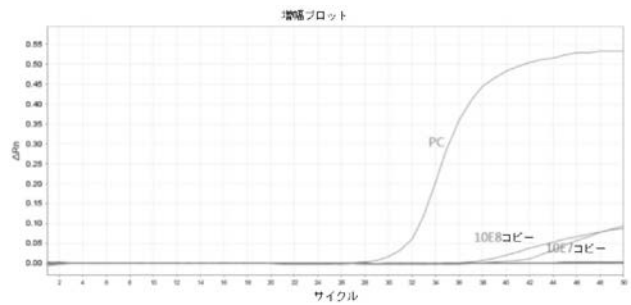


Figure 4L

【図 5 A】

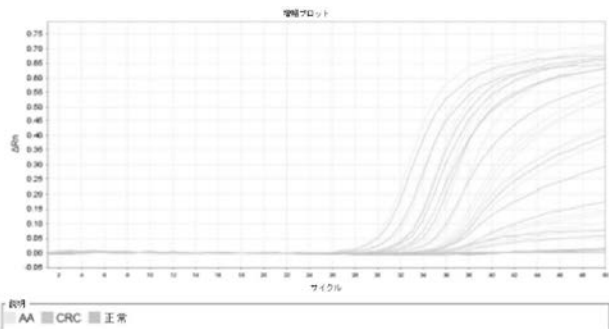


Figure 5A

【図 5 C】

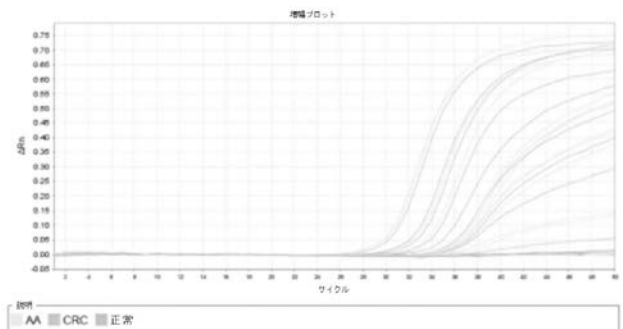


Figure 5C

【図 5 B】

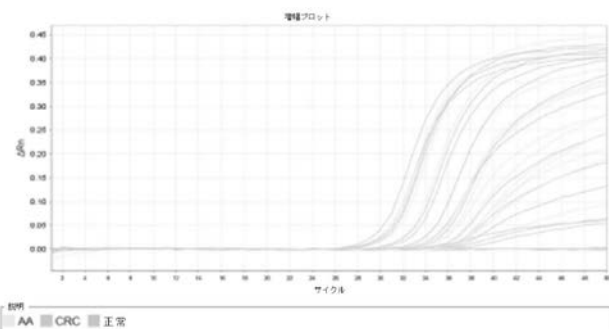


Figure 5B

【図 5 D】

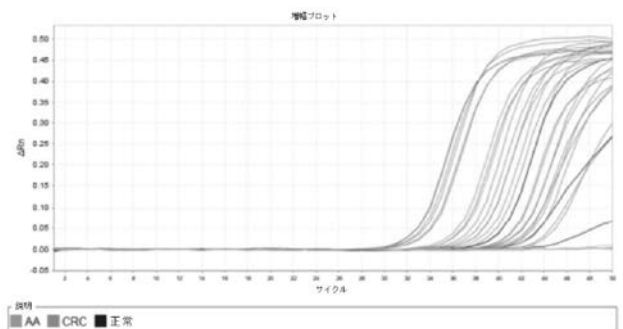


Figure 5D

【図 5 E】

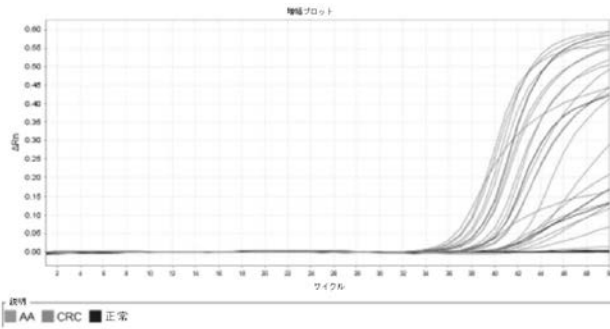


Figure 5E

【図 6 A】

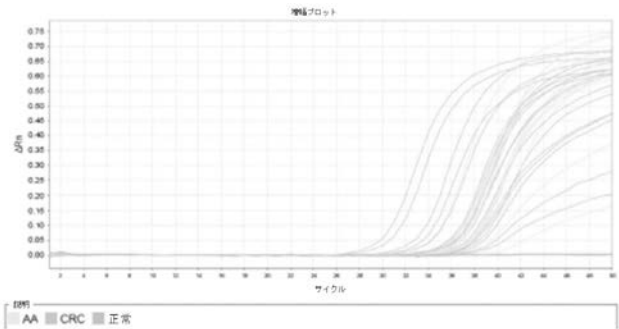


Figure 6A

【図 5 F】

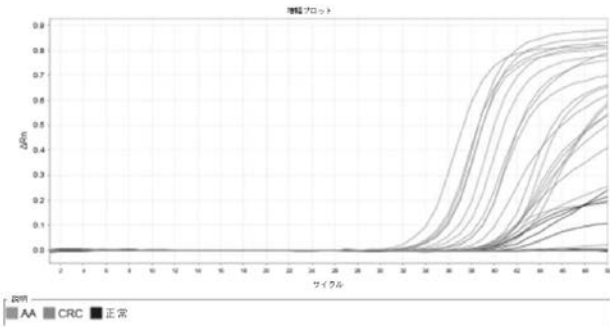


Figure 5F

【図 6 B】

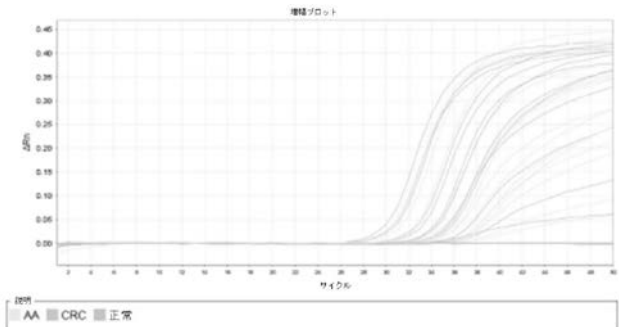


Figure 6B

【図 6 C】

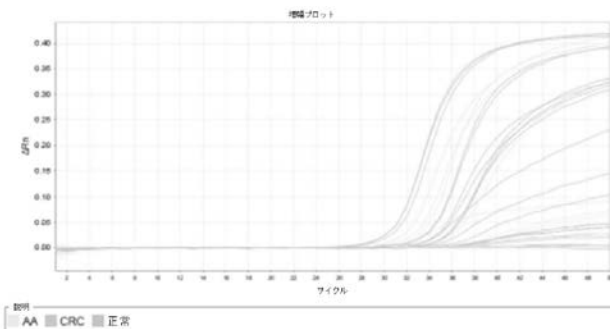


Figure 6C

【図 6 E】

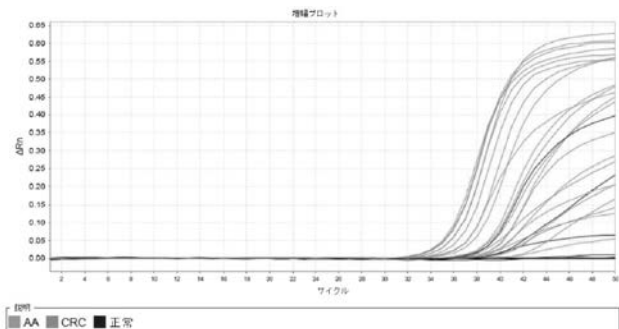


Figure 6E

【図 6 D】

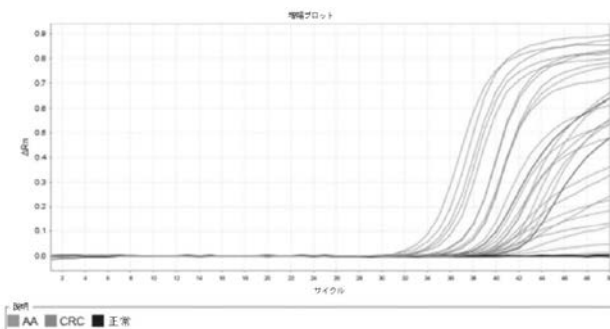


Figure 6D

【図 6 F】

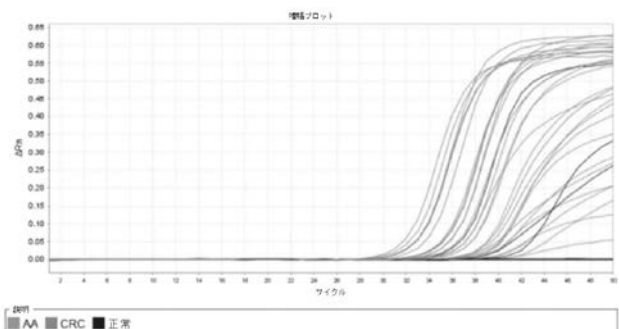


Figure 6F

【配列表】

2021526370000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/033831

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C07H 21/04; C12N 15/09; C12N 15/11; C12P 19/34; C12Q 1/02; C12Q 1/68 (2019.01)

CPC - C12Q 1/68; C12Q 1/6827; C12Q 1/6886; C12Q 2600/112; C12Q 2600/154; C12Q 2600/16; G01N 21/78; G01N 27/447; G01N 27/62; G01N 30/88; G01N 33/483; G01N 33/50; G01N 33/58; H01J 49/0031 (2019.08)

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)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/0136687 A1 (OLEK et al) 09 June 2011 (09.06.2011) entire document	1-5, 22-26
Y		6, 7, 27, 28, 47-52
Y	US 2012/0107807 A1 (OLEK et al) 03 May 2012 (03.05.2012) entire document	6, 7, 27, 28, 47-52
Y	US 2015/0072866 A1 (EXACT SCIENCES CORPORATION et al) 12 March 2015 (12.03.2015) entire document	47-52
A	US 2017/0121704 A1 (EXACT SCIENCES CORPORATION) 04 May 2017 (04.05.2017) entire document	1-7, 22-28, 47-52
A	HAN et al. "Circulating Tumor DNA as Biomarkers for Cancer Detection," Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 07 April 2017 (07.04.2017), Vol. 15, No. 2, Pgs. 59-72. entire document	1-7, 22-28, 47-52
A	US 2017/0073772 A1 (MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION AND RESEARCH et al) 16 March 2017 (16.03.2017) entire document	1-7, 22-28, 47-52

☐ 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

14 August 2019

Date of mailing of the international search report

03 OCT 2019

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/033831

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☒ forming part of the international application as filed:
☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 1-20 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2019/033831

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 8-21, 29-46, 53-64
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	G 0 1 N 33/72 A	
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6886 Z N A Z	
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813 Z	
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z	
C 1 2 Q 1/683 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851 Z	
C 1 2 Q 1/6827 (2018.01)	C 1 2 Q 1/683 Z	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/6827 Z	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
	A 6 1 P 35/00	

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100145403
弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100106518
弁理士 松谷 道子

(74)代理人 100138911
弁理士 櫻井 陽子

(72)発明者 リー・ツンヤオ
中華人民共和国 3 1 0 0 5 2 ジェジアン、ハンジョウ、ピンジャン・ディストリクト、チャンファー・ストリート、ジャンアー・ロード、ナンバー 4 0 0、フルイ・インターナショナル・サイエンス・アンド・テクノロジー・プラザ、フロア・エス 1 - 1、ハンジョウ・ニュー・ホライズン・ヘルス・テクノロジー・カンパニー・リミテッド内

(72)発明者 リー・ホイ
中華人民共和国 3 1 0 0 5 2 ジェジアン、ハンジョウ、ピンジャン・ディストリクト、チャンファー・ストリート、ジャンアー・ロード、ナンバー 4 0 0、フルイ・インターナショナル・サイエンス・アンド・テクノロジー・プラザ、フロア・エス 1 - 1、ハンジョウ・ニュー・ホライズン・ヘルス・テクノロジー・カンパニー・リミテッド内

(72)発明者 ジェン・ウェイシアン
中華人民共和国 3 1 0 0 5 2 ジェジアン、ハンジョウ、ピンジャン・ディストリクト、チャンファー・ストリート、ジャンアー・ロード、ナンバー 4 0 0、フルイ・インターナショナル・サイエンス・アンド・テクノロジー・プラザ、フロア・エス 1 - 1、ハンジョウ・ニュー・ホライズン・ヘルス・テクノロジー・カンパニー・リミテッド内

(72)発明者 ヤン・ジャオ
中華人民共和国 3 1 0 0 5 2 ジェジアン、ハンジョウ、ピンジャン・ディストリクト、チャンファー・ストリート、ジャンアー・ロード、ナンバー 4 0 0、フルイ・インターナショナル・サイエンス・アンド・テクノロジー・プラザ、フロア・エス 1 - 1、ハンジョウ・ニュー・ホライズン・ヘルス・テクノロジー・カンパニー・リミテッド内

(72)発明者 リウ・ガン
中華人民共和国 3 1 0 0 5 2 ジェジアン、ハンジョウ、ピンジャン・ディストリクト、チャンファー・ストリート、ジャンアー・ロード、ナンバー 4 0 0、フルイ・インターナショナル・サイエンス・アンド・テクノロジー・カンパニー・リミテッド内

ス・アンド・テクノロジー・プラザ、フロア・エス１ - １、ハンジョウ・ニュー・ホライズン・ヘルス・テクノロジー・カンパニー・リミテッド内

(72)発明者 ルウ・ニン

中華人民共和国 3 1 0 0 5 2 ジェジアン、ハンジョウ、ピンジャン・ディストリクト、チャンフー・ストリート、ジャンアー・ロード、ナンバー 4 0 0、フールイ・インターナショナル・サイエンス・アンド・テクノロジー・プラザ、フロア・エス１ - １、ハンジョウ・ニュー・ホライズン・ヘルス・テクノロジー・カンパニー・リミテッド内

(72)発明者 チェン・イーユウ

中華人民共和国 3 1 0 0 5 2 ジェジアン、ハンジョウ、ピンジャン・ディストリクト、チャンフー・ストリート、ジャンアー・ロード、ナンバー 4 0 0、フールイ・インターナショナル・サイエンス・アンド・テクノロジー・プラザ、フロア・エス１ - １、ハンジョウ・ニュー・ホライズン・ヘルス・テクノロジー・カンパニー・リミテッド内

F ターム(参考) 2G045 AA26 CB04 DA13 DA51 FB01 FB02 FB03 FB11 FB12
4B063 QA01 QA13 QA17 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR32
QR35 QR48 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01
4C084 AA17 NA05 ZB26