

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/212247

発行日 令和2年3月19日(2020.3.19)

(43) 国際公開日 平成30年11月22日(2018.11.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6886 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6886 Z N A Z	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

出願番号 特願2019-518842 (P2019-518842)	(71) 出願人 308038613 公立大学法人和歌山県立医科大学 和歌山県和歌山市紀三井寺8 1 1 番地 1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/018967	
(22) 国際出願日 平成30年5月16日 (2018.5.16)	
(31) 優先権主張番号 62/507,010	(74) 代理人 100080791 弁理士 高島 一
(32) 優先日 平成29年5月16日 (2017.5.16)	(74) 代理人 100136629 弁理士 鎌田 光宜
(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)	(74) 代理人 100125070 弁理士 土井 京子
	(74) 代理人 100121212 弁理士 田村 弥栄子
	(74) 代理人 100174296 弁理士 菅麻 博文
	(74) 代理人 100137729 弁理士 赤井 厚子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 E G F R 変異非小細胞肺癌における E G F R チロシンキナーゼ阻害剤の治療奏功性の予測方法

(57) 【要約】

本発明は、非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異が存在するか否かをEGFR阻害薬投与後に確認する工程を含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性の早期予測方法を提供する。本発明はまた、EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅するプライマーセットを含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性の早期予測用キットを提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異が存在するか否かをEGFR阻害薬投与後に確認する工程を含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性の早期予測方法。

【請求項 2】

EGFR阻害薬投与前の非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAがEGFR遺伝子の変異を含む、請求項 1 に記載の早期予測方法。

【請求項 3】

EGFR遺伝子の変異がEGFR遺伝子のc.2573T>GまたはEGFR遺伝子の19番目エキソンの欠失の少なくとも1つを含む、請求項 1 または 2 に記載の早期予測方法。

10

【請求項 4】

確認する工程が、配列番号 1 で表されるプライマーおよび配列番号 2 で表されるプライマーからなるプライマーセットを用いてEGFR遺伝子のc.2573T>Gを含むDNA断片を増幅することを含む、請求項 3 に記載の早期予測方法。

【請求項 5】

確認する工程が、増幅されたEGFR遺伝子のc.2573T>Gを含むDNA断片を配列番号 8 で表される標識されたプローブで検出することをさらに含む、請求項 4 に記載の早期予測方法。

【請求項 6】

確認する工程が、配列番号 3 で表されるプライマーおよび配列番号 4 で表されるプライマーからなるプライマーセットを用いてEGFR遺伝子の19番目エキソンが欠失したDNA断片を増幅することを含む、請求項 3 ~ 5 のいずれか1項に記載の早期予測方法。

20

【請求項 7】

確認する工程が、増幅されたEGFR遺伝子の19番目エキソンが欠失したDNA断片を配列番号 10 で表される標識されたプローブで検出することをさらに含む、請求項 6 に記載の早期予測方法。

【請求項 8】

確認する工程が、EGFR阻害薬投与後2週間以降に行われる、請求項 1 ~ 7 のいずれか1項に記載の早期予測方法。

30

【請求項 9】

EGFR阻害薬投与後に非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異の存在が確認されない場合、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性があると判定する工程をさらに含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか1項に記載の早期予測方法。

【請求項 10】

EGFR阻害薬がアファチニブである、請求項 1 ~ 9 のいずれか1項に記載の早期予測方法。

【請求項 11】

EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅するプライマーセットを含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性の早期予測用キット。

40

【請求項 12】

EGFR阻害薬投与前の血液試料由来のDNAがEGFR遺伝子の変異を含んでいる非小細胞肺癌患者のための、請求項 11 に記載の早期予測用キット。

【請求項 13】

EGFR遺伝子の変異がEGFR遺伝子のc.2573T>GまたはEGFR遺伝子の19番目エキソンの欠失の少なくとも1つである、請求項 11 または 12 に記載の早期予測用キット。

【請求項 14】

EGFR遺伝子のc.2573T>Gを含むDNA断片を増幅するプライマーセットが、配列番号 1 で表されるプライマーおよび配列番号 2 で表されるプライマーからなるプライマーセットである、請求項 13 に記載の早期予測用キット。

50

【請求項 15】

配列番号 8 で表される標識されたプローブをさらに含む、請求項 14 に記載の早期予測用キット。

【請求項 16】

EGFR遺伝子の 19 番目エクソンが欠失したDNA断片を増幅するプライマーセットが、配列番号 3 で表されるプライマーおよび配列番号 4 で表されるプライマーからなるプライマーセットである、請求項 13 ~ 15 のいずれか1項に記載の早期予測用キット。

【請求項 17】

配列番号 10 で表される標識されたプローブをさらに含む、請求項 16 に記載の早期予測用キット。

10

【請求項 18】

EGFR阻害薬がアファチニブである、請求項 11 ~ 17 のいずれか1項に記載の早期予測用キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異が存在するか否かをEGFR阻害薬投与後に確認する工程を含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性の早期予測方法に関する。本発明はまた、EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅するプライマーセットを含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性の早期予測用キットに関する。

20

【背景技術】**【0002】**

非小細胞肺癌におけるEGFR変異を検出するために従来は組織を用いての検査が行われてきたが、代替法として液性検体を用いた検出法が最近承認された（非特許文献1）。しかしながら、検査結果はEGFR阻害剤による治療の適応の可否を判断するためのみに用いられ、治療効果の予測や効果判定における診断意義については不明であった。さらには、血漿における分子遺伝学的寛解の早期評価が臨床的寛解および/またはより長期の有効性の評価の代替手段になりうるか否かについても不明であった。

【先行技術文献】

30

【非特許文献】**【0003】**

【非特許文献1】 Karlovich C et al. Assessment of EGFR Mutation Status in Matched Plasma and Tumor Tissue of NSCLC Patients from a Phase I Study of Rociletinib (CO-1686). Clin Cancer Res. 2016 May 15;22(10):2386-95.

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0004】**

本発明の目的は、非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異が存在するか否かをEGFR阻害薬投与後に確認する工程を含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性の早期予測方法を提供することである。本発明の別の目的は、EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅するプライマーセットを含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性の早期予測用キットを提供することである。

40

【課題を解決するための手段】**【0005】**

本発明者らは、血漿中のEGFR変異が陽性である非小細胞肺癌患者にアフィチニブを投与し、血漿DNAのEGFR変異について分子遺伝学的完全寛解(CMR)が確認された患者は、そうでない患者よりも長期の無憎悪期間を有することを見出した。

【0006】

以上の知見に基づき、本発明が完成された。

50

即ち、本発明は下記のとおりである。

[1] 非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異が存在するか否かをEGFR阻害薬投与後に確認する工程を含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性の早期予測方法。

[2] EGFR阻害薬投与前の非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAがEGFR遺伝子の変異を含む、[1]に記載の早期予測方法。

[3] EGFR遺伝子の変異がEGFR遺伝子のc.2573T>GまたはEGFR遺伝子の19番目エキソンの欠失の少なくとも1つを含む、[1]または[2]に記載の早期予測方法。

[4] 確認する工程が、配列番号1で表されるプライマーおよび配列番号2で表されるプライマーからなるプライマーセットを用いてEGFR遺伝子のc.2573T>Gを含むDNA断片を増幅することを含む、[3]に記載の早期予測方法。

[5] 確認する工程が、増幅されたEGFR遺伝子のc.2573T>Gを含むDNA断片を配列番号8で表される標識されたプローブで検出することをさらに含む、[4]に記載の早期予測方法。

[6] 確認する工程が、配列番号3で表されるプライマーおよび配列番号4で表されるプライマーからなるプライマーセットを用いてEGFR遺伝子の19番目エキソンが欠失したDNA断片を増幅することを含む、[3]～[5]のいずれか1つに記載の早期予測方法。

[7] 確認する工程が、増幅されたEGFR遺伝子の19番目エキソンが欠失したDNA断片を配列番号10で表される標識されたプローブで検出することをさらに含む、[6]に記載の早期予測方法。

[8] 確認する工程が、EGFR阻害薬投与後2週間以降に行われる、[1]～[7]のいずれか1つに記載の早期予測方法。

[9] EGFR阻害薬投与後に非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異の存在が確認されない場合、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性があると判定する工程をさらに含む、[1]～[8]のいずれか1つに記載の早期予測方法。

[10] EGFR阻害薬がアファチニブである、[1]～[9]のいずれか1つに記載の早期予測方法。

[11] EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅するプライマーセットを含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性の早期予測用キット。

[12] EGFR阻害薬投与前の血液試料由来のDNAがEGFR遺伝子の変異を含んでいる非小細胞肺癌患者のための、[11]に記載の早期予測用キット。

[13] EGFR遺伝子の変異がEGFR遺伝子のc.2573T>GまたはEGFR遺伝子の19番目エキソンの欠失の少なくとも1つである、[11]または[12]に記載の早期予測用キット。

[14] EGFR遺伝子のc.2573T>Gを含むDNA断片を増幅するプライマーセットが、配列番号1で表されるプライマーおよび配列番号2で表されるプライマーからなるプライマーセットである、[13]に記載の早期予測用キット。

[15] 配列番号8で表される標識されたプローブをさらに含む、[14]に記載の早期予測用キット。

[16] EGFR遺伝子の19番目エキソンが欠失したDNA断片を増幅するプライマーセットが、配列番号3で表されるプライマーおよび配列番号4で表されるプライマーからなるプライマーセットである、[13]～[15]のいずれか1つに記載の早期予測用キット。

[17] 配列番号10で表される標識されたプローブをさらに含む、[16]に記載の早期予測用キット。

[18] EGFR阻害薬がアファチニブである、[11]～[17]のいずれか1つに記載の早期予測用キット。

【発明の効果】

【0007】

本発明は、EGFR阻害薬投与後の非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異が存在するか否かを確認することによって、早期にEGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性を予測できるようになり、従来方法より早い段階で治療方法の選択

10

20

30

40

50

を可能にする。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、化学療法を受けていない、EGFR感受性変異を有する進行性NSCLC患者に対するアファチニブ単剤治療の概要を示す図である。

【図2】図2は、デジタルPCR法の手順を示す図である。(A)標的核酸を含む試料を40 μ Lになるようにアッセイ試薬と混合した。(B)マイクロ流体チップを用いて、アッセイ試薬を含む試料を800万の個々の5pLの液滴に分割し、任意の液滴内に1つだけ標的分子が存在するようにした。(C)PCR増幅によって特定の配列を含む液滴に蛍光を発光させた。(D)読み取りチップ上のマイクロ流体チャンネルに位置するレーザースポットに液滴を1つずつ通過させることによって蛍光シグナル強度を計測した。

10

【図3】図3は、アファチニブ単剤治療を受けたEGFR感受性変異を有する進行性NSCLC患者の特徴を示す表である。

【図4】図4は、アファチニブ投与時における血漿中EGFR変異の陽性患者と陰性患者の無増悪期間中央値(mPFS)を示す図である。

【図5】図5(A)は、アファチニブ投与後、2週間目までにアファチニブ投与を中止した患者を検証の対象から除いた上で、2週間でCMRとなった患者は、2週間でCMRとならなかった患者と比べてPFSが有意に長かったことを示す図である。図5(B)は、アファチニブ投与後、4週間目までにアファチニブ投与を中止した患者を検証の対象から除いた上で、4週間でCMRとなった患者もまた、4週間でCMRとならなかった患者と比べてPFSが有意に長かったことを示す図である。

20

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明は、非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異が存在するか否かをEGFR阻害薬投与後に確認する工程を含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性の早期予測方法を提供する(以下「本発明の方法」と省略する場合がある)。

【0010】

本発明の方法は、非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異が存在するか否かをEGFR阻害薬投与後に確認する工程を含む(以下「本発明の確認工程」と省略する場合がある)。

30

【0011】

本発明の方法における非小細胞肺癌は、腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんなどが含まれ、そのいずれであってもよい。

【0012】

本発明の方法における非小細胞肺癌患者は、非小細胞肺癌に罹患していると病理診断された患者であれば特に制限はない。非小細胞肺癌のステージは任意のステージであってもよいが、ステージIII、ステージIVである場合に本発明の方法がより有効性を有する。本発明の方法における非小細胞肺癌患者は術後再発した患者であってもよい。また、本発明の方法における非小細胞肺癌患者は、EGFR阻害薬による治療を受けていない患者であることが好ましい。EGFR阻害薬としては、ゲフィチニブ、エルロチニブ、オシメルチニブ、アファチニブが挙げられるが、それらに制限されない。

40

【0013】

本発明の方法における血液試料は、非小細胞肺癌患者から採取した、DNAを含有する血液試料であれば特に制限はなく、例えば、血液、血清または血漿などが挙げられる。血液または血清には白血球由来の断片化したゲノムDNAが混入している可能性があるため、血漿を利用することが好ましい。DNAは、血液、血清および血漿から公知の手段で単離することができる。例えば、QIAmp Circulating Nucleic Acid Kitなどの市販品を用いて単離することができる。

【0014】

50

本発明の方法における血液試料由来のDNAは、細胞から血中に遊離したDNAをいい、がん患者においては、腫瘍細胞から遊離される循環腫瘍DNA (ctDNA) を多く含む。循環DNAの濃度はがん患者で上昇していることが知られ、がん細胞のアポトーシス、壊死またはがん細胞からの分泌によって血中に流出すると考えられており、原発巣のコピー数多型、遺伝子変異、またはメチル化を反映していることが報告されている。従って、EGFR阻害薬投与前の非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAは、EGFR遺伝子の変異を含んでいることが好ましい。

【 0 0 1 5 】

本発明の方法におけるEGFR遺伝子の変異は、EGFRの機能が活性化される変異であればどのような変異であってもよく、その中でも、EGFR遺伝子の19番目エキソンの欠失（表1に記載されたアミノ酸の欠失）、EGFRの858番目のアミノ酸であるLeuがArgに置換される結果となるようなEGFR遺伝子の変異を少なくとも1つ含む。19番目エキソンが欠失したEGFR遺伝子としては、表1に記載された塩基配列の欠失が挙げられる。EGFRの858番目のアミノ酸であるLeuがArgに置換される結果となるようなEGFR遺伝子の変異としては、EGFR遺伝子のc.2573T>Gが挙げられる。また、本発明の方法におけるEGFR遺伝子の変異は、上記以外のEGFR遺伝子の変異であってもよく、Lindeman NI et al., Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology., Journal of Thoracic Oncology, Volume 8, Number 7, page 823-859, July 2013にこれまでに報告されたEGFR遺伝子の変異が列挙されており、それらであってもよい。

10

20

【 0 0 1 6 】

【表 1】

ヌクレオチド	アミノ酸	cosmic ID
2235-2249 del15	E746_A750del	6223
2236-2250 del15	E746_A750del	6225
2240 - 2257 del18	L747_P753>S	12370
2239-2248TTAAGAGAAG >C(complex)	L747_A750>P	12382
2240 - 2254 del15 /2239-2253 del15	L747_T751del	12369 /6254
2237-2255>T(complex)	E746_S752>V	12384
2239-2256 del18	L747_S752del	6255
2239-2251>C(complex)	L747_T751>P	12383
2237-2251 del15	E746_T751>A	12678
2239-2247 del19	L747_E749del	6218
2240-2251 del12	L747_T751>S	6210
2239-2258>CA(complex)	L747_P753>Q	12387
2254_2277del124	S752_I759del	6256
2253_2276del124	S752_I759del	13556
2238-2248>GC(complex)	L747_A750>P	12422
2237-2254 del18	E746_S752>A	12367
2238-2255 del18	E746_S752>D	6220
2236-2253 del18	E746_T751del	12728
2238-2252>GCA(complex)	L747_T751>Q	12419
2235-2252>AAT(complex)	E746_T751>I	13551

10

20

30

【0017】

本発明の確認工程は、非小細胞肺癌患者にEGFR阻害薬投与後に行われる。EGFR阻害薬としては、EGFRの機能を阻害できればとくに制限はないが、ゲフィチニブ、エルロチニブ、オシメルチニブ、アファチニブなどがあげられる。その中でも、アファチニブが好ましい。

【0018】

また、EGFR阻害薬の投与量は、EGFR阻害薬の種類、投与経路、患者の年齢、体重、症状などによって異なり一概に規定できないが、通常、経口の場合には成人で1日あたり有効成分量として、数mg～2g程度、好ましくは5mg～数十mg程度を、1日1～数回にわけて投与することができる。注射の場合には成人で有効成分量として約0.1mg～約500mgを投与すればよく、1日の投与量を1回または数回に分けて投与することができる。特にアファチニブの場合、経口投与で1日1回40mg投与することができる。

40

【0019】

本発明の確認工程は、非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異を検出することができる方法であれば特に制限されず、例えば、RFLP法、PCR-SSCP法、ASOハイブリダイゼーション、ダイレクトシーケンシング法、ARMS法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法、RNaseA切断法、化学切断法、DOL法、TaqMan PCR法、インベーター法、MALDI-TOF/MS法、TDI法、モレキュラー・ビーコン法、ダイナミック・アレルスペシフィック・ハイブリダイゼーション法、パドロック・プローブ法、UCAN法、DNAチップまたはDNAマ

50

マイクロアレイを用いた核酸ハイブリダイゼーション法、ECA法、デジタルPCR法などにより実施することができるが、EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅する工程を含む方法が好ましい。EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅する工程を含む方法としてはPCRを利用した方法が挙げられ、PCRを利用した方法の中でもデジタルPCR法が好ましく挙げられる。

【0020】

本発明の確認工程において、EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅する工程を含む方法を用いる場合、EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅するためのプライマーセットが用いられる。プライマーセットは、本発明の確認工程において検出すべきEGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅し得るように設計されたものであればいかなるものであってもよい。例えば、該プライマーセットは、EGFR遺伝子の部分塩基配列であって、検出すべき変異部位より5'側の相補鎖配列の一部にハイブリダイズする、約15~約50塩基、好ましくは約15~約30塩基の塩基配列を含む核酸と、該変異部位の塩基より3'側の配列の一部にハイブリダイズする、約15~約50塩基、好ましくは約15~約30塩基の塩基配列を含む核酸との組み合わせであり、それらによって増幅される核酸の断片長が約50~約1,000塩基、好ましくは約50~約500塩基、より好ましくは約50~約200塩基である、一对の核酸が挙げられる。

10

【0021】

本発明の方法におけるEGFR遺伝子の変異がEGFR遺伝子のc.2573T>Gである場合、EGFR遺伝子のc.2573T>Gを含むDNA断片は、配列番号1で表されるプライマーおよび配列番号2で表されるプライマーからなるプライマーセットを用いて増幅することができる。また、本発明の方法におけるEGFR遺伝子の変異が、EGFR遺伝子の19番目エキソンが欠失である場合、EGFR遺伝子の19番目エキソンが欠失したDNA断片は、配列番号3で表されるプライマーおよび配列番号4で表されるプライマーからなるプライマーセットを用いて増幅することができる。

20

【0022】

本発明の確認工程において増幅されたEGFR遺伝子の変異を含むDNA断片は、公知の手段で検出することができ、例えば、EGFR遺伝子の変異を含む塩基配列に相補的な塩基配列を含む標識されたプローブで検出することができる。該プローブは、その5'末端がFAMやTETなどの蛍光色素で、中央付近や3'末端がZENやIABkFなどのクエンチャー（消光物質）でそれぞれ標識されており、そのままの状態ではクエンチャーが蛍光エネルギーを吸収するため蛍光は検出されない。プローブは野生型EGFRおよび変異型EGFRの双方のアレルについて調製し、一括検出のために互いに蛍光波長の異なる蛍光色素（例えば、一方のアレルをFAM、他方をTET）で標識することが好ましい。また、プローブからのPCR伸長反応が起こらないように3'末端はリン酸化されている。プローブとハイブリダイズする領域を含むゲノムDNAの部分配列を増幅するように設計されたプライマーおよびTaq DNAポリメラーゼとともにPCRを行うと、プローブが鋳型DNAとハイブリダイズし、同時にPCRプライマーからの伸長反応が起こるが、伸長反応が進むとTaq DNAポリメラーゼの5'ヌクレアゼ活性によりハイブリダイズしたプローブが切断され、蛍光色素が遊離してクエンチャーの影響を受けなくなり、蛍光が検出される。鋳型の増幅により蛍光強度は指数関数的に増大する。

30

40

【0023】

本発明の確認工程において、増幅されたEGFR遺伝子のc.2573T>Gを含むDNA断片は配列番号8で表される標識されたプローブで検出することができる。また、増幅されたEGFR遺伝子の19番目エキソンが欠失したDNA断片は配列番号10で表される標識されたプローブで検出することができる。

【0024】

本発明の確認工程は、EGFR阻害薬の投与後であればどの時点で実施されてもよいが、EGFR阻害薬の投与後2週間目以降であることが好ましい。

【0025】

本発明の方法は、EGFR阻害薬の投与後、EGFR阻害薬投与前のDNAにおいてEGFR遺伝子の

50

変異の存在が確認されない場合、EGFR阻害薬による非小細胞肺がんの治療奏功性があると判断することができる。従って、本発明の方法は、EGFR阻害薬投与後に非小細胞肺がん患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異の存在が確認されない場合、EGFR阻害薬による非小細胞肺がんの治療奏功性があると判定する工程をさらに含む。ここで、EGFR阻害薬投与後の非小細胞肺がん患者の血液試料由来のDNAにおいて検出される変異EGFR遺伝子の頻度が、健常人の血液試料由来のDNAにおいて疑陽性として検出される変異EGFR遺伝子の頻度（カットオフ値）未満になる場合、EGFR遺伝子の変異の存在が確認されない（または分子遺伝学的完全寛解(CMR)）と判定することができる。検出される変異EGFR遺伝子としては、19番目エキソンが欠失したEGFR遺伝子、EGFRの858番目のアミノ酸であるLeuがArgに置換される結果となるようなEGFR遺伝子が挙げられる。19番目エキソンが欠失したEGFR遺伝子としては、表1に記載された塩基配列の欠失が挙げられる。EGFRの858番目のアミノ酸であるLeuがArgに置換される結果となるようなEGFR遺伝子の変異としては、EGFR遺伝子のc.2573T>Gが挙げられる。カットオフ値としては、19番目エキソンの欠失は4 events、c.2573T>Gは2 eventsが挙げられるが、これらに制限されない。

10

【0026】

本発明はまた、EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅するプライマーセットを含む、EGFR阻害薬による非小細胞肺がんの治療奏功性の早期予測用キットを提供する（以下「本発明のキット」と省略する場合がある）。

【0027】

本発明のキットにおける、EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を増幅するプライマーセットとしては、本発明の方法で用いられるプライマーセットであってよい。より具体的には、配列番号1で表されるプライマーおよび配列番号2で表されるプライマーからなるプライマーセット、配列番号3で表されるプライマーおよび配列番号4で表されるプライマーからなるプライマーセットが挙げられる。

20

【0028】

本発明のキットは、上記プライマーセットを用いて増幅されるEGFR遺伝子の変異を含むDNA断片を、高感度で、定量的に検出することができる、該増幅断片内のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を有し、検出を容易かつ鋭敏にするための標識物質で標識された核酸プローブを、さらに含むことが好ましい。例えば、本発明のキットは、増幅されたEGFR遺伝子のc.2573T>Gを含むDNA断片を検出するためのプローブとして、配列番号8で表される標識されたプローブをさらに含むことができる。また、本発明のキットは、増幅されたEGFR遺伝子の19番目エキソンが欠失したDNA断片を検出するためのプローブとして、配列番号10で表される標識されたプローブをさらに含むことができる。

30

【0029】

本発明のキットに用いられるプライマーセットおよびプローブは、公知の塩基配列情報に基づいて、該塩基配列および/またはその相補鎖配列の一部もしくは全部を市販のDNA/RNA自動合成機等を用いて化学的に合成することによって得ることができる。該プライマーセットおよびプローブを含むキットは、乾燥した状態もしくはアルコール沈澱の状態、固体として提供することもできるし、水もしくは適当な緩衝液（例：TE緩衝液等）中に溶解した状態で提供することもできる。

40

【0030】

本発明のキットは、上記のプライマーセットおよびプローブに加えて、EGFR遺伝子の変異を含むDNA断片の検出のための反応において必要な他の物質であって、共存状態で保存することにより反応に悪影響を及ぼさない物質をさらに含有することができる。あるいは、本発明のキットは、当該他の物質を、上記のプライマーセットおよびプローブを含む試薬とは別個の試薬として含む、試薬キットとして提供されてもよい。当該他の物質としては、例えば、反応緩衝液、dNTPs、耐熱性DNAポリメラーゼ等が挙げられる。

【0031】

以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、実施例は本発明の単なる例示にすぎず、本発明の範囲を何ら限定するものではない。

50

【実施例】

【0032】

化学療法 (EGFR-TKI) を受けていない、EGFR感受性変異を有する進行性NSCLC患者は、病勢増悪 (PD) または毒性中止まで1日1回アファチニブ単剤治療 (40 mg/body) を受けた (図1)。投与開始時 (0日)、2週間、4週間、8週間、12週間、24週間、48週間およびPD時における患者由来の血漿DNAを得た。3種の臨床的に相関のあるEGFR変異 (exon 19 deletion、exon 20 T790Mおよびexon 21 L858R) がmultiplexed, pico-droplet digital PCRアッセイ (RainDrop(R) system, RainDance Technologies, Billerica, MA) を血漿DNAを用いて解析した (図2)。分子遺伝学的完全寛解 (CMR) を「EGFR阻害薬投与後の非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいて検出される変異EGFR遺伝子の頻度が、健常人の血液試料由来のDNAにおいて疑陽性として検出される変異EGFR遺伝子の頻度 (カットオフ値) 未満になる場合」と定義した。カットオフ値としては、exon 19 deletionは4 events, exon 21 L858Rは2 events, exon 20 T790は3 eventsを用いた。本実施例に記載の研究はUMIN (ID: 000015847) に登録されている。

10

【0033】

試料および方法

試料回収

全被験者からBD BiosciencesのVacutainer EDTA採血管に全血を採取した。該血液を4で10分間、1500 x gで遠心分離し、血漿上清 (2~3.5 mL) を50mLコニカルチューブ (BD Falcon) に移し、使用まで-80 で保存した。血漿DNAを製造元の指示に従い、QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて、単離した。血漿DNAをAVEバッファー (45 μL) に溶解した。血漿DNA約20 μLをSpeedVac (Thermo Scientific) によって約10 μLに濃縮した。

20

【0034】

マルチプレックス形式におけるEGFR変異検出

3つの共通EGFR変異および対応する各野生型配列を同定するためにマルチプレックスアッセイを開発した。簡潔には、TaqMan Genotyping Master Mix (Life Technologies) 20.0 μLを10 μMのフォワードおよびリバースプライマー-2.0 μL、4 μM FAMおよびTET標識プローブ2.0 μL、Droplet Stabilizer (RainDance Technologies, Billerica, MA) 4.0 μL、DNaseおよびRNase不含滅菌水4.0 μLを含むアッセイ試薬と混合した。最終反応量は患者由来の血漿DNA試料8 μLを含む40 μLだった。プライマー、プローブおよびクエンチャーの配列を、その濃度とともに表2および表3に示す。

30

【0035】

【表2】

表2 droplet digital PCR (ddPCR) で使用されたプライマー

標的変異	プライマー	配列
L858R	Forward	5' -GCAGCATGTCAAGATCACAGATT-3'
	Reverse	5' -CCTCCTTCTGCATGGTATTCTTTCT-3'
Exon19 del	Forward	5' -GCACCATCTCACAATTGCCAG-3'
	Reverse	5' -CACAGCAAAGCAGAACTCACA-3'
T790M	Forward	5' -GCAGCATGTCAAGATCACAGATT-3'
	Reverse	5' -CCTCCTTCTGCATGGTATTCTTTCT-3'

40

【0036】

50

【表 3】

表 3 droplet digital PCR (ddPCR) で使用されたプローブ

標的変異	プローブ	レポーター色素	クエンチャー	配列	濃度 (nM)	
L858R	Wild-type (2573T)	TET	ZEN/IABkFQ	5' -AGTTTGGCCA GCCCAA-3'	200	
	L858R mutant (2573T>G)	TET	ZEN/IABkFQ	5' -AGTTTGGCCC GCCCAA-3'	40	10
	L858R mutant (2573T>G)	FAM	ZEN/IABkFQ	5' -AGTTTGGCCC GCCCAA-3'	200	
Exon19 del	Wild-type	TET	ZEN/IABkFQ	5' -TATGTTGCTTCTC TTAATTCC-3'	200	20
	Reference	FAM	ZEN/IABkFQ	5' -CAGAAGGTGA GAAAGTT-3'	200	
T790M	Wild-type (2369C)	TET	ZEN/IABkFQ	5' -T+CATC+A+C+GC A+GCTC-3'	200	
	T790M mutant (2369C>T)	FAM	ZEN/IABkFQ	5' -T+CATC+A+T+GC A+GC+TC-3'	200	30

+N(N は A, T, C または G) は Locked Nucleic Acid (LNA) を示す。

【 0 0 3 7 】

製造元の指示に従い、液滴作製マイクロ流体チップ (Souse chip, RainDance Technologies) で流体力学的流動収束により、血漿DNA試料を含むアッセイ溶液から均一なサイズの水滴の集団 (エマルジョン) を作製した。8 つの 0.2 mL コニカル底 PCR チューブを含む PCR チューブストリップ (Axygen, Tewksbury, MA) にエマルジョンを集めた。エマルジョンおよびキャリアオイルを総量 75 μ L 含む PCR チューブストリップを 8-Strip Dome Cap (Axygen) でしっかりと閉め、熱蓋を備えるサーマルサイクラ (Proflex PCR system, Life Technologies) で設置した。エマルジョンを表 4 に記載した条件でサーマルサイクルした。

【 0 0 3 8 】

【表4】

表4 PCR条件

Duplex: EGFR L858R		
サイクル数	温度(°C)	時間
1	95	10 min
	60	2 min
45	95	30 sec
	60	1 min
1	98	10 min
	10	∞

Duplex: EGFR exon19 deletion		
サイクル数	温度(°C)	時間
1	95	10 min
	60	2 min
45	98	30 sec
	60	2 min
1	98	10 min
	10	∞

Duplex: EGFR T790M		
サイクル数	温度(°C)	時間
1	95	10 min
45	95	15 sec
	58	15 sec
	60	45 sec
1	98	15 min
	10	∞

Multiplex		
サイクル数	温度(°C)	時間
1	95	10 min
45	95	30 sec
	58	15 sec
	60	75 sec
1	98	15 min
	10	∞

【0039】

サーマルサイクルしたエマルジョンを第2マイクロ流体チップ(Souse chip, RainDance Technologies)に移し、製造元の指示に従い、エンドポイント蛍光シグナルを計測した。

【0040】

データ解析

液滴イベントデータを製造元の指示に従いRainDrop Analystソフトウェア(RainDance Technologies)で解析した。簡潔には、試料データを液滴サイズゲートテンプレート(RainDance Technologies)でロードした。ポジティブコントロール試料由来のデータを用いて、RainDrop Analystソフトウェア内に補正マトリクスを作成した。補正マトリクスを各試料由来のデータに適用し、TETおよびFAM蛍光分子からのクロストーク蛍光シグナルを除いた。ポジティブコントロールにおける野生型または変異型クラスターを含むエリアの手動選別によって野生型および変異型ゲートのサイズと位置を決定した。

各未知試料については、PCR陽性液滴イベントの数を各ゲート内でカウントした。各ゲート内のイベントの数を未処理液滴の総数を用いて、アッセイごとのイベントの数に変換した。臨床試料を解析する場合、組織試料におけるEGFR変異ステータスの結果を、血漿試料中のEGFR変異ステータスの結果が表れるまで隠した。

【0041】

結果

10

20

30

40

50

本実施例では55名の患者を検証した(図3)。アファチニブの有効性は以前の報告と同程度であった(全寛解率:78.6%、無増悪期間中央値(mPFS):14.2ヶ月)。投与開始時において、患者の62.5%(35/56)において血漿中のEGFR変異が陽性であった。血漿中のEGFR変異陽性患者は、陰性患者よりもわずかに短いPFSを有したが、有意ではなかった($p = 0.24$, log-rank)(図4)。投与開始時において血漿中のEGFR変異が陽性であった患者のうち、60.6%が2週間で、87.5%が4週間でそれぞれCMRに達した(図5)。2週間目までにアファチニブ投与を中止した患者を検証の対象から除いた上で、2週間でCMRとなった患者は、2週間でCMRにならなかった患者と比べてPFSが有意に長かった(13.6 versus 7.5ヶ月, $p = 0.0001$)。4週間目までにアファチニブ投与を中止した患者を検証の対象から除いた上で、4週間でCMRとなった患者もまた、4週間でCMRにならなかった患者と比べてPFSが有意に長かった(13.6 versus 5.1ヶ月, $p < 0.0001$)。4週間までにCMRとなった患者のうち、CMRに達するまでの時間はPFSに影響を与えなかった($p = 0.59$)。

【産業上の利用可能性】

【0042】

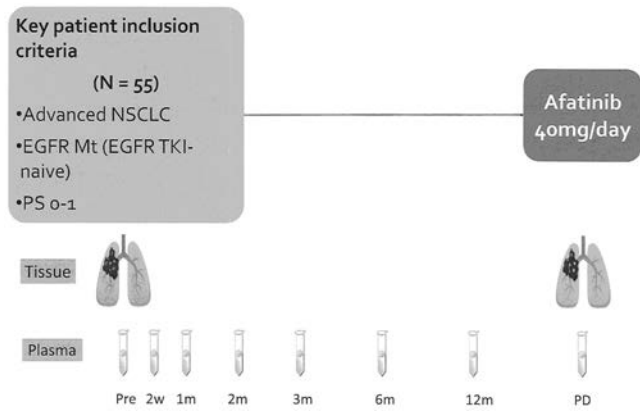
本発明は、EGFR阻害薬投与後の非小細胞肺癌患者の血液試料由来のDNAにおいてEGFR遺伝子の変異が存在するか否かを確認することによって、早期にEGFR阻害薬による非小細胞肺癌の治療奏功性を予測できるようになり、従来方法より早い段階で治療方法の選択を可能にする。

本出願は、米国仮特許出願番号62/507,010を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

10

20

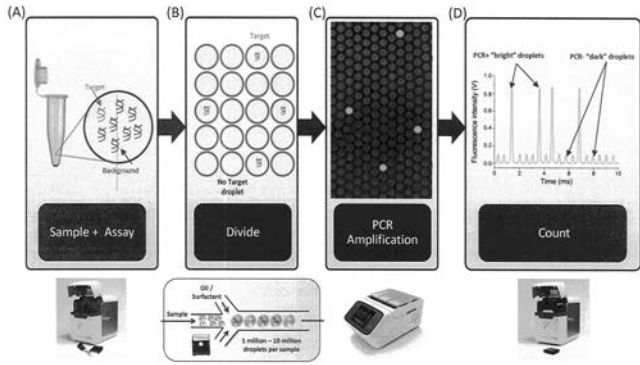
【図1】



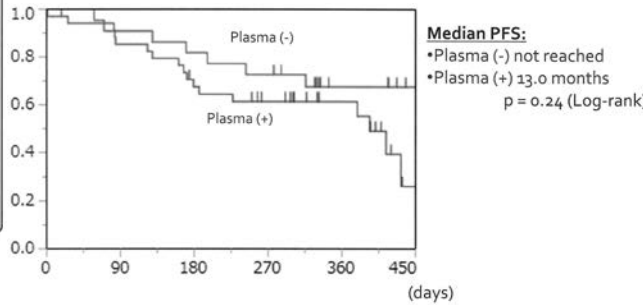
【図3】

N = 55	
性別	男性/女性 25 / 30
年齢	中央値 (範囲) 69 (37-78)
喫煙歴	無/有 31 / 24
ECOG PS	0 / 1 23 / 32
c-Stage	IIIB / IV (M1a, b)/術後再発 2 / 37 (12, 25) / 16
EGFR変異部位	ex19 del / ex21 L858R 28 / 27
全寛解率(%)	78.6 (95% CI 65.7-87.8)
無増悪期間中央値(月)	14.2
投与開始時における血漿中のEGFR(+) の陽性患者(%)	62.5 (95% CI 49.8-75.2)

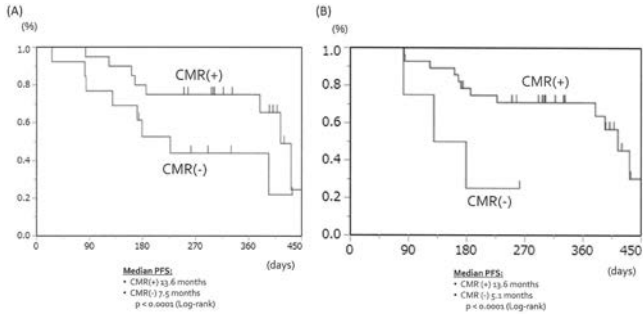
【図2】



【図4】



【 図 5 】



【 配列表 】

2018212247000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/018967

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. C12Q1/6886(2018.01) i, C12N15/11(2006.01) i 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) Int.Cl. C12Q1/68-1/6897, C12N15/00-15/90		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Published examined utility model applications of Japan	1922-1996	
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018	
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018	
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	IWAMA, E. et al., "Monitoring of somatic mutations in circulating cell-free DNA by digital PCR and next-generation sequencing during afatinib treatment in patients with lung adenocarcinoma positive for EGFR activating mutations", Ann. Oncol., 2017, 28(1), pp. 136-141, Published online 06 October 2016, ISSN 0923-7534, in particular, abstract, pp. 137-140, results, fig. 1-2	1-18 4-10, 14-18
X Y	LEE, JY et al., "Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02)", Oncotarget, 2016, 7(6), pp. 6984-6993, ISSN 1949-2553, in particular, abstract, page 6987, right column, paragraph [0001] to page 6989, left column, paragraph [0001], fig. 3	1-9, 11-17 4-10, 14-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 19 July 2018 (19.07.2018)		Date of mailing of the international search report 07 August 2018 (07.08.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/018967

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	NISHIO, M. et al., "Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Serum Among Japanese Patients Treated With First-Line Erlotinib for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer", Clin. Lung Cancer, 2016, 17(1), pp. 24-29. el, ISSN 1525-7304, in particular, abstract, pp. 28-29, conclusion	1-9, 11-17 4-10, 14-18
X Y	TSENG, JS et al., "Dynamic plasma EGFR mutation status as a predictor of EGFR-TKI efficacy in patients with EGFR-mutant lung adenocarcinoma", J. Thorac Oncol., 2015, 10(4), pp. 603-610, ISSN 1556-0864, in particular, abstract, page 604, right column, paragraph [0002], table 4, fig. 1	1-9, 11-17 4-10, 14-18
X Y	JP 2016-516395 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 09 June 2016, paragraphs [0012], [0043], examples & US 2014/0272953 A, paragraphs [0011], [0068], examples & US 2014/0287417 A1 & US 2016/0237507 A1 & WO 2014/135669 A1 & EP 2964781 A1 & CA 2902099 A & CN 105229173 A	1-9, 11-17 4-10, 14-18
Y A	CN 106434941 A (BEIJING GENETRON HEALTH TECH CO., LTD.) 22 February 2017, paragraph [0010] (Family: none)	4-10, 14-18 1-3, 11-13
Y A	JP 2012-511927 A (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 31 May 2012, fig. 11D & US 2010/0221717 A1, fig. 11D & JP 2012-523821 A & US 2010/0285478 A1 & US 2011/0287 424 A1 & US 2015/0140557 A1 & US 2016/0040256 A1 & US 2016/0076090 A1 & WO 2010/077324 A2 & WO 2010/080559 A2 & WO 2010/111682 A2 & EP 2376659 A2 & EP 2411543 A2 & EP 3249053 A1 & CA 2747026 A & CN 102301005 A & CN 102428190 A & CN 103911428 A	4-10, 14-18 1-3, 11-13
Y A	JP 2012-105646 A (ARKRAY, INC.) 07 June 2012, paragraphs [0033]-[0056], [0105] & US 2012/0107817 A1, paragraphs [0084]-[0171], [0234] & JP 2016-73304 A & US 2014/0170657 A1 & EP 2447378 A1 & EP 3219814 A1 & KR 10-2012-0046068 A & CN 102559866 A & KR 10-2013-0075757 A & CN 105331733 A	4-10, 14-18 1-3, 11-13
Y A	CN 104131091 A (SYSBIOMICS BIOLOG INFORMATION TECHNOLOGY BEIJING CO., LTD.) 05 November 2014, paragraph [0056] (Family: none)	4-10, 14-18 1-3, 11-13
Y A	CN 103382503 A (WUHAN YZY BIOPHARMA CO., LTD.) 06 November 2013, paragraph [0025] (Family: none)	4-10, 14-18 1-3, 11-13
P, X P, Y	WO 2017/094805 A1 (DNA CHIP RESEARCH INC.) 08 June 2017, examples (Family: none)	1-9, 11-17 4-10, 14-18

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 1 8 9 6 7									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/6886(2018.01)i, C12N15/11(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/68-1/6897, C12N15/00-15/90											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2018年										
日本国実用新案登録公報	1996-2018年										
日本国登録実用新案公報	1994-2018年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS (STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	IWAMA E et al., Monitoring of somatic mutations in circulating cell-free DNA by digital PCR and next-generation sequencing during afatinib treatment in patients with lung adenocarcinoma positive for EGFR activating mutations, Ann. Oncol., 2017, 28(1), pp.136-141, Published online 6 Oct 2016, ISSN 0923-7534, 特に、要約、137-140頁 Resultsの項、Figs. 1-2	1-18 4-10, 14-18									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 19.07.2018		国際調査報告の発送日 07.08.2018									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 竹内 祐樹	4B 5082								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2018/018967
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	LEE JY et al., Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02), <i>Oncotarget</i> , 2016, 7(6), pp.6984-6993, ISSN 1949-2553, 特に、要約、6987頁右欄第1段落-6989頁左欄第1段落、F i g . 3	1-9, 11-17 4-10, 14-18
X Y	NISHIO M et al., Analysis of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Serum Among Japanese Patients Treated With First-Line Erlotinib for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer, <i>Clin. Lung Cancer</i> , 2016, 17(1), pp.24-29.e1, ISSN 1525-7304, 特に、要約、28-29頁 C o n c l u s i o n の項	1-9, 11-17 4-10, 14-18
X Y	TSENG JS et al., Dynamic plasma EGFR mutation status as a predictor of EGFR-TKI efficacy in patients with EGFR-mutant lung adenocarcinoma, <i>J. Thorac Oncol.</i> , 2015, 10(4), pp.603-610, ISSN 1556-0864, 特に、要約、604頁右欄第2段落、T a b l e 4、F i g . 1	1-9, 11-17 4-10, 14-18
X Y	JP 2016-516395 A (エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー) 2016.06.09, [0012]、[0043]、実施例 & US 2014/0272953 A1, [0011]、[0068]、 E x a m p l e s & US 2014/0287417 A1 & US 2016/0237507 A1 & WO 2014/135669 A1 & EP 2964781 A1 & CA 2902099 A & CN 105229173 A	1-9, 11-17 4-10, 14-18
Y A	CN 106434941 A (BEIJING GENETRON HEALTH TECH CO LTD) 2017.02.22, [0010] (ファミリーなし)	4-10, 14-18 1-3, 11-13
Y A	JP 2012-511927 A (ライフ テクノロジーズ コーポレーション) 2012.05.31, 図11D & US 2010/0221717 A1, F i g . 11D & JP 2012-523821 A & US 2010/0285478 A1 & US 2011/0287424 A1 & US 2015/0140557 A1 & US 2016/0040256 A1 & US 2016/0076090 A1 & WO 2010/077324 A2 & WO 2010/080559 A2 & WO 2010/111682 A2 & EP 2376659 A2 & EP 2411543 A2 & EP 3249053 A1 & CA 2747026 A & CN 102301005 A & CN 102428190 A & CN 103911428 A	4-10, 14-18 1-3, 11-13

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2018/018967
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	JP 2012-105646 A (アークレイ株式会社) 2012.06.07, [0033] - [0056], [0105] & US 2012/0107817 A1, [0084] - [0171], [0234] & JP 2016-73304 A & US 2014/0170657 A1 & EP 2447378 A1 & EP 3219814 A1 & KR 10-2012-0046068 A & CN 102559866 A & KR 10-2013-0075757 A & CN 105331733 A	4-10, 14-18 1-3, 11-13
Y A	CN 104131091 A (SYSBIOMICS BIOLOG INFORMATION TECHNOLOGY BEIJING CO LTD) 2014.11.05, [0056] (ファミリーなし)	4-10, 14-18 1-3, 11-13
Y A	CN 103382503 A (WUHAN YZY BIOPHARMA CO LTD) 2013.11.06, [0025] (ファミリーなし)	4-10, 14-18 1-3, 11-13
P, X P, Y	WO 2017/094805 A1 (株式会社DNAチップ研究所) 2017.06.08, 実施例 (ファミリーなし)	1-9, 11-17 4-10, 14-18

フロントページの続き

(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 100151301

弁理士 戸崎 富哉

(72)発明者 山本 信之

和歌山県和歌山市紀三井寺 8 1 1 番地 1 公立大学法人和歌山県立医科大学内

(72)発明者 洪 泰浩

和歌山県和歌山市紀三井寺 8 1 1 番地 1 公立大学法人和歌山県立医科大学内

(72)発明者 赤松 弘朗

和歌山県和歌山市紀三井寺 8 1 1 番地 1 公立大学法人和歌山県立医科大学内

Fターム(参考) 4B063 QA17 QA19 QQ42 QQ58 QR08 QR55 QR62 QS25 QX01

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。