



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109072228 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780025480.9

岛田能史 市川宽

(22)申请日 2017.04.07

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

(30)优先权数据

11256

2016-091801 2016.04.28 JP

代理人 杨宏军 唐峥

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2018.10.24

C12N 15/09(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C12Q 1/6886(2018.01)

PCT/JP2017/014517 2017.04.07

G01N 33/50(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

G01N 33/53(2006.01)

W02017/187937 JA 2017.11.02

(71)申请人 电化株式会社

地址 日本东京都

申请人 国立大学法人新潟大学

(72)发明人 井筒浩 儿玉启辅 中田光隆

权利要求书1页 说明书6页

若井俊文 龟山仁史 永桥昌幸

序列表5页 附图1页

(54)发明名称

判定癌细胞对于表皮细胞生长因子受体抑制剂的耐性的方法

(57)摘要

本发明提供在患有癌症的人患者中判定癌细胞对于EGFR抑制剂的耐性的方法,该方法包括使用含有自上述人患者采集的上述癌细胞的样品来确定上述癌细胞的B-Raf蛋白质的氨基酸序列的第326位氨基酸残基是否存在变异的步骤,上述氨基酸残基存在变异的情况下,判定上述癌细胞对于EGFR抑制剂具有耐性。通过所述方法,可预先筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

1. 在患有癌症的人患者中判定癌细胞对于表皮细胞生长因子受体抑制剂的耐性的方法,

所述方法包括下述步骤:使用含有自所述人患者采集的所述癌细胞的样品,确定所述癌细胞的B-Raf蛋白质的氨基酸序列的第326位氨基酸残基是否存在变异,

所述氨基酸残基存在变异的情况下,判定所述癌细胞对于所述表皮细胞生长因子受体抑制剂具有耐性。

2. 如权利要求1所述的方法,其中,所述表皮细胞生长因子受体抑制剂为抗表皮细胞生长因子受体抗体药。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中,所述氨基酸残基是否存在变异的确定包括对编码B-Raf蛋白质的氨基酸序列的第326位氨基酸残基的碱基序列的变异进行检测。

4. 如权利要求3所述的方法,其中,所述碱基序列的变异的检测通过DNA测序、聚合酶链式反应、等位基因特异性扩增、等位基因特异性探针杂交、错配切割分析、单链构象多态性、变性梯度凝胶电泳或温度梯度凝胶电泳来进行。

5. 如权利要求1~4中任一项所述的方法,其中,所述样品为癌切除组织检体、活检检体、腹水浸润癌细胞、血液循环癌细胞、血清或血浆。

6. 如权利要求1~5中任一项所述的方法,其中,所述癌症为大肠癌或直肠癌。

7. 如权利要求1~6中任一项所述的方法,其中,所述氨基酸残基的变异为I326V。

8. 如权利要求3或4所述的方法,其中,所述碱基序列的变异为c.976A>G。

9. 如权利要求1~8中任一项所述的方法,其中,所述癌细胞具有野生型KRAS基因。

## 判定癌细胞对于表皮细胞生长因子受体抑制剂的耐性的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及在患有癌症的人患者中判定癌细胞对于表皮细胞生长因子受体抑制剂(以下称为“EGFR抑制剂”)的耐性的方法。

### 背景技术

[0002] 作为癌症的治疗药,已知有EGFR抑制剂,例如西妥昔单抗(Cetuximab)及帕尼单抗(Panitumumab)等抗表皮细胞生长因子受体抗体药(抗EGFR抗体药)。这些EGFR抑制剂具有在癌细胞中抑制参与癌细胞增殖的表皮细胞生长因子受体(EGFR)功能的作用。

[0003] 另一方面,已知在癌症患者的癌细胞具有KRAS基因变异的情况下,癌细胞对于EGFR抑制剂显示抵抗性,因此EGFR抑制剂的效果降低。由于EGFR抑制剂具有皮肤损伤等副作用,因此,优选只向可通过施予EGFR抑制剂而获得高治疗效果的癌症患者施予EGFR抑制剂。作为对于患者而言利用EGFR抑制剂的治疗有效与否的判别方法,已知有调查患者的癌细胞的KRAS基因中是否存在变异的方法。

[0004] 例如,专利文献1中记载了一种EGFR抑制剂敏感性预测方法,其中,在血液样品中检测出来源于变异型KRAS基因的核酸或其蛋白质的情况下,判定肿瘤无EGFR抑制剂敏感性的可能性高。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:国际公开第2014/148557号

### 发明内容

[0008] 发明所要解决的课题

[0009] 本申请的发明人发现,即使是癌细胞具有野生型KRAS基因的癌症患者,也存在EGFR抑制剂的治疗无效的情况。

[0010] 本发明是鉴于上述课题作出的,目的在于预先筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

[0011] 用于解决的课题的手段

[0012] 本发明为在患有癌症的人患者中判定癌细胞对于EGFR抑制剂的耐性的方法,该方法包括使用含有自上述人患者采集的上述癌细胞的样品来确定上述癌细胞的B-Raf蛋白质(以下也简称“B-Raf”)的氨基酸序列的第326位氨基酸残基是否存在变异的步骤,上述氨基酸残基存在变异的情况下,判定上述癌细胞对于EGFR抑制剂具有耐性。

[0013] 根据本方法,通过确定癌细胞的B-Raf的氨基酸序列中第326位氨基酸残基这一特定氨基酸残基是否存在变异,可判定癌细胞对于EGFR抑制剂的耐性,因此,能够预先筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

[0014] 上述EGFR抑制剂可为抗表皮细胞生长因子受体抗体药。

[0015] 上述氨基酸残基是否存在变异的确定可包括对编码B-Raf的氨基酸序列的第326

位氨基酸残基的碱基序列的变异进行检测。

[0016] 上述碱基序列的变异的检测可通过DNA测序、聚合酶链式反应、等位基因特异性扩增、等位基因特异性探针杂交、错配切割分析、单链构象多态性、变性梯度凝胶电泳或温度梯度凝胶电泳来进行。

[0017] 上述样品可为癌切除组织检体、活检检体、腹水浸润癌细胞、血液循环癌细胞、血清或血浆。样品为上述样品时，能够以更高的可靠性筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

[0018] 上述癌症可为大肠癌或直肠癌。癌症为大肠癌或直肠癌时，能够以更高的可靠性筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

[0019] 上述氨基酸残基的变异可为I326V。变异为I326V时，能够以更高的可靠性筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

[0020] 上述碱基序列的变异可为c.976A>G。变异为c.976A>G时，能够以更高的可靠性筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

[0021] 上述癌细胞优选具有野生型KRAS基因。癌细胞具有野生型KRAS基因的情况下，能够以更高的可靠性筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

[0022] 发明的效果

[0023] 通过本发明，能够预先筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

## 附图说明

[0024] [图1]为示出实施例结果的图。

## 具体实施方式

[0025] 以下详细说明用于实施本发明的实施方式。但本发明不限于以下实施方式。

[0026] 在一个方案中，本发明为在患有癌症的人患者（以下也称为“癌症患者”）中判定癌细胞对于EGFR抑制剂的耐性的方法。本方案中涉及的方法包括下述步骤：使用含有自人患者采集的癌细胞的样品，确定癌细胞的B-Raf的氨基酸序列的第326位氨基酸残基是否存在变异。

[0027] 作为可利用本发明所涉及的方法的癌症，可举出例如大肠癌、直肠癌、结肠癌、胃癌、肝癌、甲状腺癌、子宫癌、肾癌、胰癌、舌癌、前列腺癌、肺癌、皮肤癌、卵巢癌、胆囊癌、头颈癌、睾丸肿瘤、肾上腺癌、口腔癌、骨软组织肿瘤、脑肿瘤、恶性黑色素瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、横纹肌肉瘤、平滑肌肉瘤、白血病、恶性淋巴瘤、及多发性骨髓瘤。其中，癌症为大肠癌或直肠癌的情况下，能够以更高的可靠性筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

[0028] 本说明书中的“EGFR抑制剂”只要是抑制EGFR的表达或活性的药物即可，没有特别限制，可为吉非替尼、厄洛替尼等EGFR靶向的低分子化合物、抗EGFR抗体药、针对EGFR的反义寡核苷酸、适体等中的任一种。抗EGFR抗体药例如为抑制表皮细胞生长因子(EGF)与EGFR结合的抗体。作为抗EGFR抗体药，例如可举出将EGFR的细胞外域作为表位的单克隆抗体。作为抗EGFR抗体药的具体例，可举出西妥昔单抗及帕尼单抗。EGFR抑制剂可单独使用，也可联用多种EGFR抑制剂。

[0029] 需要说明的是，本说明书中的“抗体”不仅包括具有两条完整轻链和两条完整重链的抗体分子，还包括能够与抗原结合的抗体片段。作为抗体片段，例如可举出F(ab')<sub>2</sub>、

Fab'、Fab及Fv。作为抗体,优选为嵌合抗体、人源化抗体或全人源化抗体中的任一种。

[0030] 另外,本实施方式所涉及的方法在判定癌细胞对EGFR抑制剂与其他抗癌剂联用治疗的耐性的情况下也是有效的。作为EGFR抑制剂与其他抗癌剂联用的治疗,例如可举出CPT-11+帕尼单抗疗法、IRIS+帕尼单抗疗法、FOLFOX(例如,mFOLFOX6)+帕尼单抗疗法、FOLFIRI+帕尼单抗疗法、CPT-11+西妥昔单抗疗法、IRIS+西妥昔单抗疗法、FOLFOX(例如,mFOLFOX6)+西妥昔单抗疗法、FOLFIRI+西妥昔单抗疗法、及sLV5FU2+西妥昔单抗疗法。

[0031] 作为含有癌细胞的样品,例如可举出癌切除组织检体、活检检体、腹水浸润癌细胞、血液循环癌细胞、血清、血浆、血液、粪便、尿、痰、脑脊液、胸腔内液、乳头吸引液、淋巴液、细胞培养液、以及自患者采集的其他组织及液体。从以更高的可靠性筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者的观点出发,含有癌细胞的样品优选为癌切除组织检体、活检检体、腹水浸润癌细胞、血液循环癌细胞、血清、或血浆,更优选为癌切除组织检体或活检检体。另外,含有癌细胞的样品为癌切除组织检体或活检检体的情况下,可对这些检体进行冷冻、乙醇固定、福尔马林固定、石蜡包埋或上述处理的组合处理。

[0032] 本说明书中,“氨基酸残基的变异”是指蛋白质的氨基酸序列中的特定的氨基酸残基被置换为与对应的野生型氨基酸序列中的氨基酸残基不同的氨基酸残基。例如,序列号1所示的野生型B-Raf的氨基酸序列的第326位氨基酸残基为异亮氨酸,将其被置换为异亮氨酸以外的氨基酸残基的情况称为变异。

[0033] B-Raf的氨基酸序列的第326位氨基酸残基的变异可以是:将异亮氨酸置换为苯丙氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、丝氨酸、精氨酸、蛋氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸或亮氨酸。氨基酸残基的变异为上述变异的情况下,能够以更高的可靠性筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。其中,在变异是将异亮氨酸置换为缬氨酸的变异(I326V)的情况下,能够以更高的可靠性筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

[0034] 上述氨基酸残基是否存在变异的确定可通过已知方法进行。是否存在变异的确定例如可包括对编码B-Raf的氨基酸序列的第326位氨基酸残基的碱基序列的变异的检测。

[0035] 本说明书中,“碱基序列的变异”是指:碱基序列中的碱基的至少一部分被置换为其他碱基,以使得由该碱基序列编码的氨基酸残基与由对应的野生型的碱基序列编码的氨基酸残基不同(也称为“错义变异”)。

[0036] 编码B-Raf的氨基酸序列的第326位氨基酸残基的碱基序列的变异可以是:由该碱基序列编码的氨基酸残基从异亮氨酸变为苯丙氨酸、苏氨酸、天冬氨酸、赖氨酸、丝氨酸、精氨酸、蛋氨酸、甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸或亮氨酸。碱基序列的变异为上述变异的情况下,能够以更高的可靠性筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。其中,在上述碱基序列的变异是从编码异亮氨酸的碱基序列变异为编码缬氨酸(c.976A>G)的情况下,能够以更高的可靠性筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

[0037] 碱基序列的变异的检测可通过已知方法进行。碱基序列的变异的检测例如可通过DNA测序、聚合酶链式反应、等位基因特异性扩增、等位基因特异性探针杂交、错配切割分析、单链构象多态性、变性梯度凝胶电泳或温度梯度凝胶电泳来进行。这些技术可单独使用,也可组合使用多种技术。

[0038] 癌细胞的B-Raf的氨基酸序列的第326位氨基酸残基存在变异的情况下,可判定癌细胞对于EGFR抑制剂具有耐性。

[0039] 癌细胞的B-Raf的氨基酸序列的第326位氨基酸残基是否存在变异与癌细胞对于EGFR抑制剂的耐性之间的机理尚不明确,本申请的发明人推测它们至少通过以下机理而相关联。B-Raf是在参与癌细胞增殖的细胞内增殖信号传导通路中存在于EGFR的下游的活化因子。EGFR抑制剂通过抑制EGFR的功能来抑制增殖信号向EGFR下游的传导,具有抑制癌症进展的效果。然而,若癌细胞的B-Raf的氨基酸序列的第326位氨基酸残基存在变异,则即使由于EGFR抑制剂而使得无法自EGFR向下游传导增殖信号,B-Raf也会活化而使增殖信号向B-Raf下游传导。因此,认为即使对这样的癌细胞施予EGFR抑制剂,也无法发挥抑制癌症进展的效果、或难以发挥这样的效果。

[0040] 本发明也可以说是确定在患有癌症的人患者中癌细胞对于EGFR抑制剂的耐性的方法,该方法包括使用含有自人患者采集的癌细胞的样品、确定癌细胞的B-Raf的氨基酸序列的第326位氨基酸残基是否存在变异的步骤,若氨基酸残基存在变异,则表明癌细胞对于抗EGR抗体药具有耐性。

[0041] 在一个实施方案中,自癌症患者采集的癌细胞可具有野生型KRAS基因。即使癌症患者的癌细胞具有野生型KRAS基因,也会出现EGFR抑制剂治疗无效的情况。根据本实施方案,针对癌细胞具有野生型KRAS基因的癌症患者评价EGFR抑制剂的有效性,由此可避免因EGFR抑制剂引起的不期望的副作用。本说明书中,野生型KRAS基因是指不存在对癌细胞赋予EGFR抑制剂耐性的变异的KRAS基因。所述变异为引起KRAS蛋白质的第12位及第13位氨基酸的种类变化的基因变异。

[0042] 在一个实施方案中,癌症患者可以是欲接受EGFR抑制剂给药治疗的患者或已接受该治疗的患者。根据本实施方案,可避免对于具有EGFR抑制剂耐性癌细胞的患者进行EGFR抑制剂的给药治疗、或可降低施予量。由此,可避免或减少因EGFR抑制剂引起的副作用。

[0043] 在一个实施方案中,自癌症患者采集的癌细胞可以具有野生型KRAS基因、并且具有野生型NRAS基因。通常,对于癌细胞具有野生型KRAS基因、并且具有野生型NRAS基因的癌症患者而言,尽管利用EGFR抑制剂的治疗被认为有效,但这样的患者中也存在EGFR抑制剂治疗无效的患者。根据本实施方案,可从这样的癌症患者中判别出EGFR抑制剂无效的患者。本说明书中,野生型NRAS基因是指不存在对癌细胞赋予EGFR抑制剂耐性的变异的NRAS基因。所述变异例如为引起NRAS蛋白质的第12位、第13位、第59位、第61位、第117位或第146位氨基酸的种类变化的基因变异。

[0044] 在一个方案中,本发明为判定癌症预后的方法,即下述方法:使用含有自患有癌症的人患者采集的癌细胞的样品,确定癌细胞的B-Raf的氨基酸序列的第326位氨基酸残基是否存在变异,氨基酸残基存在变异的情况下,判定为预后不良。

[0045] 以上对于本发明的特定实施方式进行了详细说明,但本发明不限于上述实施方式。

#### [0046] 实施例

[0047] 以下,基于实施例对发明作出具体说明,但本发明不限于以下实施例。

[0048] (BRAF基因中的变异检测)

[0049] 对于在KRAS蛋白质的第12位及第13位氨基酸的密码子中无变异的大肠癌患者,通过使用帕尼单抗或西妥昔单抗的疗法(如表1所示)来进行治疗。将患者的癌切除检体制成福尔马林固定的石蜡包埋检体,将其薄切制成两片厚度为20 $\mu$ m的切片。将所制备的2片切片

贴附于载玻片,制成DNA提取用样品。此外,制备厚度为4 $\mu$ m的切片,将所制备的切片贴附于载玻片,制成显微镜观察用样品。制作患者26人份(患者A~Z)的样品,对于各患者的样品,按以下所示的方式检测BRAF基因的碱基序列中的变异。

[0050] [表1]

| 患者 | 疗法   | B-Raf 变异 | 癌缩小指数 (%) |
|----|--|----------|-----------|
| A  | IRIS+帕尼单抗                                      | I326V    | 115       |
| B  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | 34.3      |
| C  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | 18.5      |
| D  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | 17.8      |
| E  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | 11.3      |
| F  | IRIS+帕尼单抗                                      | D22N     | 5         |
| G  | FOLFIRI+西妥昔单抗                                  | -        | 5.1       |
| H  | IRIS+帕尼单抗,<br>CPT-11+西妥昔单抗                     | -        | 0.1       |
| I  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -7.4      |
| J  | CPT-11+西妥昔单抗                                   | -        | -11.6     |
| K  | mFOLFOX6+帕尼单抗                                  | V600E    | -11.5     |
| L  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -12.5     |
| M  | mFOLFOX6+西妥昔单抗                                 | -        | -15.9     |
| N  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -19.1     |
| O  | IRIS+帕尼单抗,<br>mFOLFOX6+西妥昔单抗,<br>sLV5FU2+西妥昔单抗 | N581Y    | -22.4     |
| P  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -27       |
| Q  | FOLFIRI+西妥昔单抗                                  | -        | -26.6     |
| R  | CPT-11+西妥昔单抗                                   | -        | -32.8     |
| S  | mFOLFOX6+帕尼单抗                                  | -        | -33.8     |
| T  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -33.7     |
| U  | CPT-11+帕尼单抗                                    | V600E    | -35.7     |
| V  | CPT-11+帕尼单抗                                    | -        | -36.8     |
| W  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -52.8     |
| X  | mFOLFOX6+西妥昔单抗                                 | -        | -55       |
| Y  | mFOLFOX6+帕尼单抗                                  | -        | -72.3     |
| Z  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -72.7     |

[0051]

[0052] 用苏木精伊红对显微镜观察用样品进行染色。通过显微镜观察染色后的样品,确

定出切片中含有较多癌细胞的部位。用剃刀从DNA提取用样品中刮取在显微镜观察用样品中确定的部位,自刮取的部位提取DNA。DNA的提取采用BiOstic FFPE Tissue DNA Isolation Kit(商品名)进行。

[0053] 作为探针,使用含有BRAF基因的18个外显子序列的各自的一部分连续序列或全部序列(100~130个碱基)、或它们的互补序列的探针核酸,自检体的DNA中分离BRAF基因。利用Illumina公司的MiSeq测序仪对BRAF基因的碱基序列进行分析,检测BRAF基因的碱基序列中的变异。

[0054] 对于患者A,在BRAF基因的碱基序列中,检测到在B-Raf的氨基酸序列中引起1326V变异的变异(c.976A>G)。对于患者F、K、O及U,在BRAF基因的碱基序列中,检测到在B-Raf的氨基酸序列中分别引起D22N、V600E、N581Y、V600E变异的变异。对于其他患者,在BRAF基因的碱基序列中,未检测到引起B-Raf的氨基酸序列变异的变异。

[0055] (抗EGFR抗体药的治疗效果)

[0056] 对于患者A~Z,按下式算出癌缩小指数(%)。

[0057] 癌缩小指数(%) = (治疗后的原发病灶直径+治疗后的转移病灶直径) / (治疗前的原发病灶直径+治疗前的转移病灶直径) × 100-100

[0058] 将患者A~Z中的BRAF基因是否存在变异与抗EGFR抗体药的治疗效果之间的关系示于图1及表1、表2。

[0059] [表2]

[0060]

| B-Raf 变异               | 患者数 | 平均癌缩小指数 (%) | 标准偏差 |
|------------------------|-----|-------------|------|
| I326V                  | 1   | 115         | -    |
| D22N<br>V600E<br>N581Y | 4   | -16.3       | 17.3 |
| 无变异                    | 22  | -19         | 28.9 |

[0061] 如图1及表1、表2所示,在患者A(在其BRAF基因的碱基序列中检测到引起B-Raf的氨基酸序列的第326位氨基酸残基变异的变异)中观察到癌症进展,患者A的癌细胞对于抗EGFR抗体药具有耐性。

## 序列表

- <110> 电化株式会社  
国立大学法人新潟大学
- <120> 判定癌细胞对于表皮细胞生长因子受体抑制剂的耐性的方法
- <130> FP17-0160-00
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1  
<211> 766  
<212> PRT  
<213> 智人
- <400> 1

[0001]

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Gln  
1                   5                   10                   15

Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly Ala Gly  
                  20                   25                   30

Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp  
                  35                   40                   45

Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu  
50                   55                   60

Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu  
65                   70                   75                   80

Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu  
                  85                   90                   95

Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser  
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Met Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu  
 115 120 125

Ser Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val  
 130 135 140

Ala Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe  
 145 150 155 160

Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr  
 165 170 175

[0002] Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro  
 180 185 190

Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile  
 195 200 205

Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val  
 210 215 220

Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys  
 225 230 235 240

Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe  
 245 250 255

Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys  
 260 265 270

Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu  
 275 280 285

Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu  
 290 295 300

Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala  
 305 310 315 320

Pro Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro  
 325 330 335

Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp  
 340 345 350

[0003] His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn  
 355 360 365

Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg  
 370 375 380

Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala  
 385 390 395 400

Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu  
 405 410 415

Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser  
 420 425 430

Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp  
 435 440 445

Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly  
 450 455 460

Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val  
 465 470 475 480

Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln  
 485 490 495

Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn  
 500 505 510

Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val  
 515 520 525

[0004] Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile  
 530 535 540

Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr  
 545 550 555 560

Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp  
 565 570 575

Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile  
 580 585 590

Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His  
 595 600 605

Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val  
 610 615 620



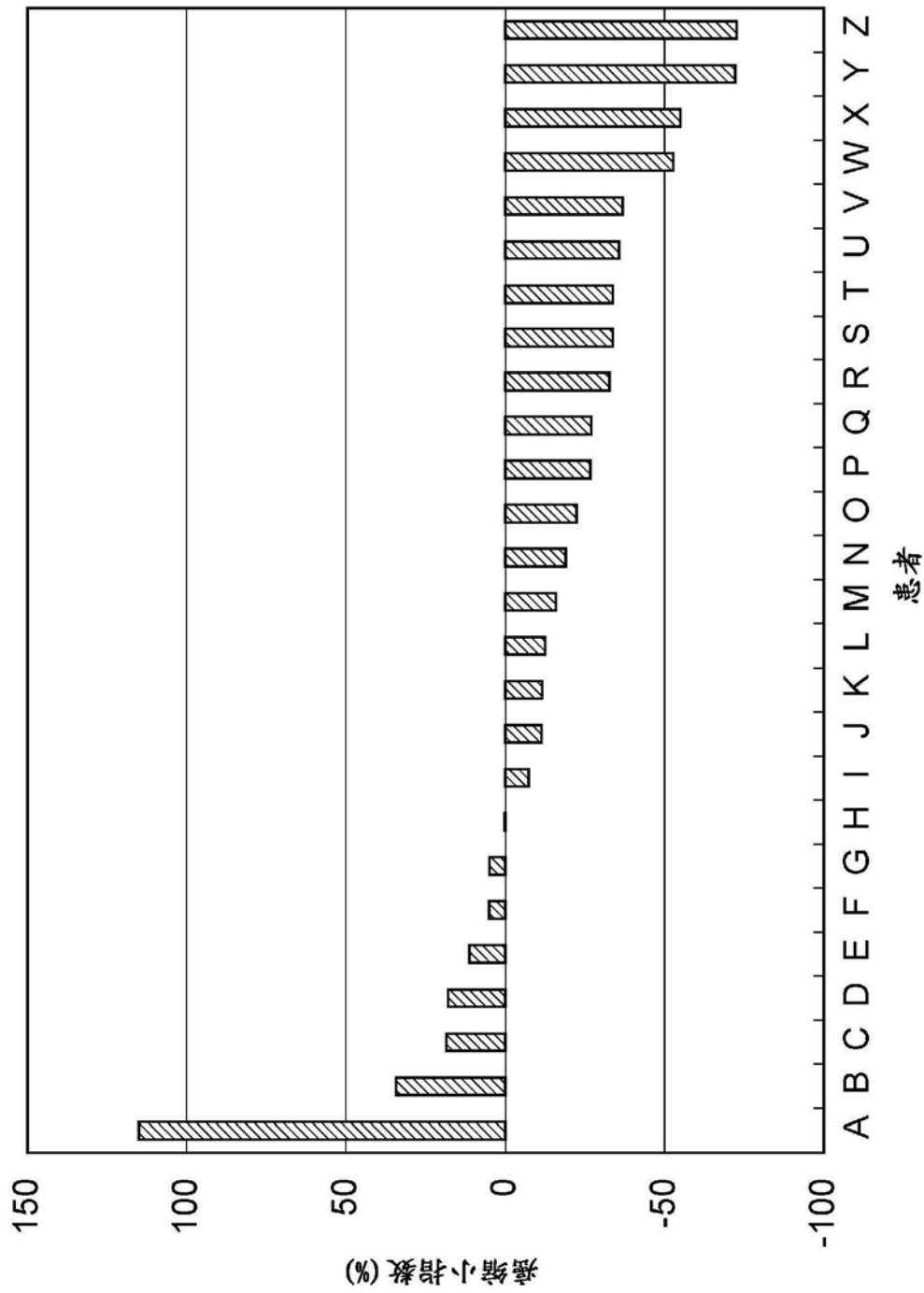


图1

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 判定癌细胞对于表皮细胞生长因子受体抑制剂的耐性的方法                                 |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN109072228A</a>                               | 公开(公告)日 | 2018-12-21 |
| 申请号            | CN201780025480.9   | 申请日     | 2017-04-07 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 国立大学法人，新泻  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 电化株式会社<br>国立大学法人新泻大学                                       |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 电化株式会社<br>国立大学法人新泻大学                                       |         |            |
| [标]发明人         | 井筒浩<br>儿玉启辅<br>中田光隆<br>若井俊文<br>龟山仁史<br>永桥昌幸<br>岛田能史<br>市川宽 |         |            |
| 发明人            | 井筒浩<br>儿玉启辅<br>中田光隆<br>若井俊文<br>龟山仁史<br>永桥昌幸<br>岛田能史<br>市川宽 |         |            |
| IPC分类号         | C12N15/09 C12Q1/6886 G01N33/50 G01N33/53                   |         |            |
| CPC分类号         | C12Q1/68 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/158              |         |            |
| 代理人(译)         | 杨宏军<br>唐峥  |         |            |
| 优先权            | 2016091801 2016-04-28 JP                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>             |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供在患有癌症的人患者中判定癌细胞对于EGFR抑制剂的耐性的方法，该方法包括使用含有自上述人患者采集的上述癌细胞的样品来确定上述癌细胞的B-Raf蛋白质的氨基酸序列的第326位氨基酸残基是否存在变异的步骤，上述氨基酸残基存在变异的情况下，判定上述癌细胞对于EGFR抑制剂具有耐性。通过所述方法，可预先筛选EGFR抑制剂治疗无效的癌症患者。

| 患者 | 疗法   | B-Raf 变异 | 疼痛小指数 (%) |
|----|--|----------|-----------|
| A  | IRIS+帕尼单抗                                      | I326V    | 115       |
| B  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | 34.3      |
| C  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | 18.5      |
| D  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | 17.8      |
| E  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | 11.3      |
| F  | IRIS+帕尼单抗                                      | D22N     | 5         |
| G  | FOLFIRI+西妥昔单抗                                  | -        | 5.1       |
| H  | IRIS+帕尼单抗,<br>CPT-11+西妥昔单抗                     | -        | 0.1       |
| I  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -7.4      |
| J  | CPT-11+西妥昔单抗                                   | -        | -11.6     |
| K  | mFOLFOX6+帕尼单抗                                  | V600E    | -11.5     |
| L  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -12.5     |
| M  | mFOLFOX6+西妥昔单抗                                 | -        | -15.9     |
| N  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -19.1     |
| O  | IRIS+帕尼单抗,<br>mFOLFOX6+西妥昔单抗,<br>sLV5FU2+西妥昔单抗 | N581Y    | -22.4     |
| P  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -27       |
| Q  | FOLFIRI+西妥昔单抗                                  | -        | -26.6     |
| R  | CPT-11+西妥昔单抗                                   | -        | -32.8     |
| S  | mFOLFOX6+帕尼单抗                                  | -        | -33.8     |
| T  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -33.7     |
| U  | CPT-11+帕尼单抗                                    | V600E    | -35.7     |
| V  | CPT-11+帕尼单抗                                    | -        | -36.8     |
| W  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -52.8     |
| X  | mFOLFOX6+西妥昔单抗                                 | -        | -55       |
| Y  | mFOLFOX6+帕尼单抗                                  | -        | -72.3     |
| Z  | IRIS+帕尼单抗                                      | -        | -72.7     |