

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-171965

(P2009-171965A)

(43) 公開日 平成21年8月6日(2009.8.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G 0 4 1
C 0 7 K 14/71 (2006.01)	C 0 7 K 14/71	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	2 G 0 5 4
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48 Z	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	4 B 0 6 3
審査請求 有 請求項の数 11 O L (全 112 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-2422 (P2009-2422)
 (22) 出願日 平成21年1月8日 (2009.1.8)
 (62) 分割の表示 特願2007-506504 (P2007-506504)
 の分割
 原出願日 平成17年3月31日 (2005.3.31)
 (31) 優先権主張番号 60/558, 218
 (32) 優先日 平成16年3月31日 (2004.3.31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/561, 095
 (32) 優先日 平成16年4月9日 (2004.4.9)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/565, 753
 (32) 優先日 平成16年4月27日 (2004.4.27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592017633
 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ
 ション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 1 1 4, ボストン, フルーツ ストリ
 ート 5 5
 (71) 出願人 399052796
 ダナーファーバー キャンサー インステ
 イテュート インク.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ
 ストン ビニー ストリート 4 4
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

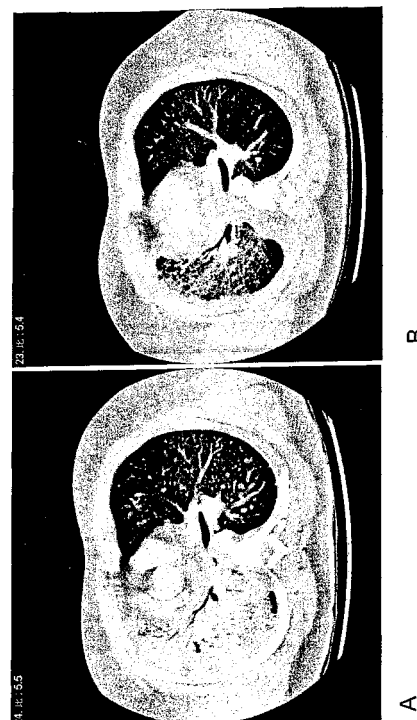
(54) 【発明の名称】 上皮細胞成長因子受容体ターゲティング治療に対する癌の応答性を決定する方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 癌に冒されているヒト患者における上皮細胞成長因子受容体 (EGFR) ターゲティング治療の有効性の可能性を決定するための新規方法及び治療法の提供。

【解決手段】 上皮細胞成長因子受容体 (EGFR) 治療に対する癌の応答を決定するための方法に向けられる。好ましい態様において、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける少なくとも1つの相違の存在は、チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブに対する感受性を与える。したがって、これらの突然変異の診断検査法により、最も薬物に応答しそうな患者に対して、ゲフィチニブ、エルロチニブ、およびその他のチロシンキナーゼ阻害剤を投与することができる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型erbB 1遺伝子と比較して、患者のerbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける少なくとも1つの核酸相違の有無を検出する工程であって、少なくとも1つの核酸相違の存在は、EGFRターゲティング治療が有効である可能性が高いことを示す工程を含む、癌に冒されているか、または癌を発症するリスクがあるヒト患者における上皮細胞成長因子受容体（EGFR）ターゲティング治療の有効な可能性を決定するための方法。

【請求項 2】

核酸相違が、キナーゼ活性を増大する、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

erbB 1遺伝子が患者由来の生体試料から得られる、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける相違が、ATP結合ポケットの高次構造に効果を及ぼす、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

erbB 1のキナーゼドメインにおける相違が、エキソン18、19、20、または21からなる群より選択されるerbB 1遺伝子のエキソンの1つにある、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

相違が、エキソン18、19、または21にある、請求項5記載の方法。

【請求項 7】

erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける相違が、インフレームの欠失、置換または挿入である、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

インフレームの欠失が、erbB 1遺伝子のエキソン19にある、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

erbB 1遺伝子のエキソン19におけるインフレームの欠失が、少なくともSEQ ID NO: 512のコードン747、748、749、および750のアミノ酸ロイシン、アルギニン、グルタミン酸およびアラニンの欠失を含む、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

erbB 1遺伝子のエキソン19におけるインフレームの欠失が、少なくともSEQ ID NO: 512のコードン747、748、および749のアミノ酸ロイシン、アルギニン、およびグルタミン酸の欠失を含む、請求項8記載の方法。

【請求項 11】

インフレームの欠失が、SEQ ID NO: 511の2235～2249、2240～2251、および2240～2257からなる群より選択されるヌクレオチドを含む、請求項8記載の方法。

【請求項 12】

置換が、erbB 1遺伝子のエキソン21にある請求項7記載の方法。

【請求項 13】

エキソン21における置換が、少なくとも1つのアミノ酸を含む、請求項12記載の方法。

【請求項 14】

エキソン21における置換が、SEQ ID NO: 511のヌクレオチド2573のチミンをグアニンで、およびSEQ ID NO: 511のヌクレオチド2582のチミンをアデニンでの置換からなる群による置換を含む、請求項12記載の方法。

【請求項 15】

置換がerbB 1遺伝子のエキソン18にある、請求項7記載の方法。

【請求項 16】

エキソン18における置換が、SEQ ID NO: 511のヌクレオチド2155のグアニンをチミンで、またはグアニンをセリンでの置換である、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

少なくとも1つの相違の有無の検出が、核酸のセグメントを増幅する工程を含む、請求

10

20

30

40

50

項1記載の方法。

【請求項 18】

増幅されるセグメントが、1000ヌクレオチド以下の長さである、請求項17記載の方法。

【請求項 19】

増幅されるセグメントが、複数の相違を含む、請求項17記載の方法。

【請求項 20】

少なくとも1つの相違の有無の検出が、erbB 1核酸を少なくとも1つの核酸プローブと接触させる工程を含み、該少なくとも1つのプローブが、選択的ハイブリダイゼーション条件下で該相違を含む核酸配列と優先してハイブリダイズする、請求項1記載の方法。

【請求項 21】

少なくとも1つの相違の有無の検出が、少なくとも1つの核酸配列をシーケンスする工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 22】

少なくとも1つの相違の有無の検出が、少なくとも1つの核酸配列の質量分析決定を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 23】

少なくとも1つの相違の有無の検出が、erbB 1コード配列を含む核酸を増幅するためにポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）を行う工程、および増幅された核酸のヌクレオチド配列を決定する工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 24】

増幅された核酸のヌクレオチド配列を決定する工程が、少なくとも1つの核酸セグメントをシーケンスする工程を含む、請求項23記載の方法。

【請求項 25】

増幅された核酸のヌクレオチド配列を決定する工程が、増幅された核酸セグメントをゲル上で泳動する工程、およびセグメント・サイズを決定する工程を含む、請求項23記載の方法。

【請求項 26】

少なくとも1つの相違の有無の検出が、遺伝子の複数の相違のハプロタイプを決定する工程を含む、請求項1記載の方法。

【請求項 27】

選択的結合条件下で、erbB 1遺伝子に少なくとも1つの相違を含む核酸配列に対して特異的に結合するプローブであって、相違は、ATP結合ポケットに構造変化を与えるerbB 1のキナーゼドメインにおける突然変異であるプローブ。

【請求項 28】

相違が、エキソン18、19、20、または21からなる群より選択されるerbB 1遺伝子のエキソンにある、請求項27記載のプローブ。

【請求項 29】

プローブが、500ヌクレオチド塩基以下の長さの核酸配列を含む、請求項27記載のプローブ。

【請求項 30】

プローブがDNAを含む、請求項27記載のプローブ。

【請求項 31】

プローブが、DNAおよび少なくとも1つの核酸類似体を含む、請求項27記載のプローブ。

【請求項 32】

プローブが、ペプチド核酸（PNA）を含む、請求項27記載のプローブ。

【請求項 33】

検出可能な標識をさらに含む、請求項27記載のプローブ。

【請求項 34】

検出可能な標識が、蛍光標識である、請求項27記載のプローブ。

【請求項 35】

10

20

30

40

50

プローブが、少なくともSEQ ID NO: 495の核酸15～25、またはこれらの相補物からなる少なくとも10個の連続した核酸を含む、請求項27記載のプローブ。

【請求項36】

プローブが、少なくともSEQ ID NO: 497の核酸20～30、またはこれらの相補物からなる少なくとも10個の連続した核酸を含む、請求項27記載のプローブ。

【請求項37】

プローブが、少なくともSEQ ID NO: 499の核酸20～30、またはこれらの相補物からなる少なくとも10個の連続した核酸を含む、請求項27記載のプローブ。

【請求項38】

患者由来の生体試料におけるerbB 1遺伝子のキナーゼ活性を決定する工程を含む、患者におけるEGFRターゲットティング治療の有効な可能性を決定するための方法であって、対照と比較して、EGFRリガンドで刺激後のキナーゼ活性の増加は、EGFRターゲットティング治療が有効である可能性が高いことを示す方法。

10

【請求項39】

EGFRターゲットティング治療が、チロシンキナーゼ阻害剤である、請求項1および38記載の方法。

【請求項40】

チロシンキナーゼ阻害剤が、アニリノキナゾリンである、請求項39記載の方法。

【請求項41】

アニリノキナゾリンが、合成アニリノキナゾリンである、請求項40記載の方法。

20

【請求項42】

合成アニリノキナゾリンが、ゲフィチニブおよびエルロチニブからなる群より選択される、請求項41記載の方法。

【請求項43】

a. ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）を行ってエキソン18、19、20、または21の一部を増幅する工程によって、エキソン18、19、20、または21における少なくとも1つの核酸相違の有無を検出する工程；および、

b. 増幅されたエキソン18、19、20、または21の少なくとも一部分をシーケンスする工程によって、増幅された核酸のヌクレオチド配列を決定する工程であって、野生型erbB 1と比較して、エキソン18、19、20、または21における少なくとも1つのヌクレオチド相違の存在は、上皮細胞成長因子受容体（EGFR）ターゲットティング治療が有効である可能性が高いことを示す工程、

30

を含む、癌に冒されているか、または癌を発症するリスクがあるヒト患者におけるEGFRターゲットティング治療の有効な可能性を決定するための方法。

【請求項44】

患者のerbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける少なくとも1つの核酸相違の有無を検出する工程を含む、癌に冒されているか、または癌を発症するリスクがある患者を治療する方法であって、該少なくとも1つの核酸相違の存在が検出された場合、患者にはEGFRターゲットティング治療が施される方法。

【請求項45】

a. ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）を行ってエキソン18、19、20、または21の一部を増幅する工程によって、エキソン18、19、20、または21における少なくとも1つの核酸相違の有無を検出する工程；

b. 増幅されたエキソン18、19、20、または21の少なくとも一部分をシーケンスする工程によって、増幅された核酸のヌクレオチド配列を決定する工程；および、

c. 該少なくとも1つの核酸相違の存在が検出された場合、患者にはEGFRターゲットティング治療が施される工程、

を含む、癌に冒されているか、または癌を発症するリスクがある患者を治療する方法。

40

【請求項46】

EGFRターゲットティング治療が、チロシンキナーゼ阻害剤である、請求項44および45記載の

50

方法。

【請求項 4 7】

チロシンキナーゼ阻害剤が、アニリノキナゾリンである、請求項46記載の方法。

【請求項 4 8】

アニリノキナゾリンが、合成アニリノキナゾリンである、請求項47記載の方法。

【請求項 4 9】

合成アニリノキナゾリンが、ゲフィチニブおよびエルロチニブからなる群より選択される、請求項48記載の方法。

【請求項 5 0】

erbB 1遺伝子が、患者由来の生体試料から得られる、請求項44および45記載の方法。

10

【請求項 5 1】

癌が、胃腸癌、前立腺癌、卵巣癌、乳癌、頭頸部癌、肺癌、非小細胞肺癌、神経系の癌、腎臓癌、網膜癌、皮膚癌、肝臓癌、脾臓癌、生殖器-泌尿器癌、および膀胱癌からなる群より選択される、請求項44および45記載の方法。

【請求項 5 2】

癌が、非小細胞肺癌である、請求項51記載の方法。

【請求項 5 3】

核酸相違が、キナーゼ活性を増大する、請求項44および45記載の方法。

【請求項 5 4】

erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける相違が、ATP結合ポケットの高次構造に効果を及ぼす、請求項44および45記載の方法。

20

【請求項 5 5】

erbB 1のキナーゼドメインにおける相違が、エキソン18、19、20、または21からなる群より選択されるerbB 1遺伝子のエキソンの1つにある、請求項44および45記載の方法。

【請求項 5 6】

相違が、エキソン18、19、または21にある、請求項55記載の方法。

【請求項 5 7】

erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける相違が、インフレームの欠失または置換である、請求項44および45記載の方法。

【請求項 5 8】

30

インフレームの欠失が、erbB 1遺伝子のエキソン19にある、請求項57記載の方法。

【請求項 5 9】

erbB 1遺伝子のエキソン19におけるインフレームの欠失が、少なくともコドン747、748、749、および750のアミノ酸ロイシン、アルギニン、グルタミン酸、およびアラニンの欠失を含む、請求項58記載の方法。

【請求項 6 0】

erbB 1遺伝子のエキソン19におけるインフレームの欠失が、少なくともSEQ ID NO: 512のコドン747、748、および749のアミノ酸ロイシン、アルギニン、およびグルタミン酸の欠失を含む、請求項58記載の方法。

【請求項 6 1】

40

インフレームの欠失が、SEQ ID NO: 511の2235~2249、2240~2251、および2240~2257からなる群より選択されるヌクレオチドを含む、請求項59記載の方法。

【請求項 6 2】

置換が、erbB 1遺伝子のエキソン21にある、請求項57記載の方法。

【請求項 6 3】

エキソン21における置換が、SEQ ID NO: 511のヌクレオチド2573のチミンをグアニンで、およびSEQ ID NO: 511のヌクレオチド2582のチミンをアデニンで置換する工程からなる群による置換を含む、請求項62記載の方法。

【請求項 6 4】

エキソン21における置換が、少なくとも1つのアミノ酸を含む、請求項62記載の方法。

50

【請求項 65】

置換がerbB 1遺伝子のエキソン18にある、請求項57記載の方法。

【請求項 66】

エキソン18における置換が、SEQ ID NO: 511のヌクレオチド2155のグアニンをチミンで置換する、請求項65記載の方法。

【請求項 67】

a. EGFRキナーゼドメインのエキソン18、19、20、もしくは21と境界を接するか、またはその範囲内の核酸領域に対してアニールするようにデザインされた少なくとも1つの縮重プライマー対；

b. PCR増幅を実行するために必要とされる製品および試薬；並びに、

c. 説明書、
を含むキット。

10

【請求項 68】

プライマーが、全てのフォワードプライマーの5'末端にSEQ ID NO: 645を、全てのリバースプライマーの5'末端にSEQ ID NO: 674を有する、SEQ ID NO: 505～508およびSEQ ID NO: 646～673からなる群より選択される配列プライマーを含む、請求項67記載のキット。

【請求項 69】

a. EGFRキナーゼドメインのエキソン18、19、20、もしくは21の範囲内の核酸領域に対してアニールするようにデザインされた少なくとも1つのプローブ；

b. アニール反応を実行するために必要とされる製品および試薬；並びに

c. 説明書、
を含むキット。

20

【請求項 70】

少なくとも1つのプローブが、固体支持体に結合されている、請求項69記載のキット。

【請求項 71】

a. EGFRキナーゼドメイン・タンパク質のATP結合ポケットと結合するようにデザインされた少なくとも1つのプローブ；

b. 結合反応を実行するために必要とされる製品および試薬；並びに

c. 説明書、
を含むキット。

30

【請求項 72】

プローブが、抗体、抗体断片、またはキメラ抗体である、請求項71記載のキット。

【請求項 73】

プローブが、検出可能な標識をさらに含む、請求項72記載のキット。

【請求項 74】

a. 化合物を変異体EGFRと接触させる工程；および、

b. 生じる変異体EGFRのキナーゼ活性を検出する工程、

を含み、変異体EGFRのキナーゼ活性を阻害する化合物が選択される、変異体上皮細胞成長因子受容体（EGFR）の触媒キナーゼ活性を阻害する化合物を選択するための方法。

40

【請求項 75】

変異体EGFRが、標識されている、請求項74記載の方法。

【請求項 76】

変異体EGFRが、固体支持体に結合されている、請求項74記載の方法。

【請求項 77】

固体支持体が、タンパク質チップである、請求項74記載の方法。

【請求項 78】

化合物が、抗体、抗体断片、小分子、ペプチド、タンパク質、アンチセンス核酸、リボザイム、PNA、siRNA、オリゴヌクレオチドアプタマー、およびペプチドアプタマーからなる群より選択される、請求項74において変異体EGFRの触媒キナーゼ活性を阻害することが同定された化合物。

50

【請求項 79】

変異体EGFRが、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインに二次突然変異を含む、請求項74記載の方法。

【請求項 80】

請求項74～79において同定されたEGFRキナーゼ活性の阻害剤を含む薬学的組成物。

【請求項 81】

請求項80記載の薬学的組成物を患者に投与する工程を含む、EGFRを媒介した疾患を有する患者を治療する方法。

【請求項 82】

EGFRを媒介した疾患が癌である、請求項81記載の方法。

10

【請求項 83】

癌が、胃腸癌、前立腺癌、卵巣癌、乳癌、頭頸部癌、肺癌、非小細胞肺癌、神経系の癌、腎臓癌、網膜癌、皮膚癌、肝臓癌、脾癌、生殖器-泌尿器癌、および膀胱癌からなる群より選択される、請求項82記載の方法。

【請求項 84】

癌が非小細胞肺癌である、請求項83記載の方法。

【請求項 85】

a. erbB 1遺伝子の変異型を有する細胞を致死量以下のチロシンキナーゼ阻害剤と接触させる工程；

b. チロシンキナーゼ阻害剤の増殖停止効果に耐性である細胞を選択する工程；および、

20

c. erbB 1キナーゼドメインにおける二次突然変異の存在について、耐性細胞由来のerbB 1核酸を解析する工程、
を含む、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける二次突然変異の獲得を予測するための方法。

【請求項 86】

細胞が、インビトロにある、請求項85記載の方法。

【請求項 87】

細胞が、トランスジェニック動物から得られる、請求項85記載の方法。

【請求項 88】

トランスジェニック動物が、マウスである、請求項87記載の方法。

30

【請求項 89】

細胞が、腫瘍生検から得られる、請求項87記載の方法。

【請求項 90】

最初に、変異誘発剤の有効な量と細胞を接触させる工程をさらに含む、請求項85記載の方法。

【請求項 91】

変異誘発剤が、エチルメタンスルホナート (EMS)、N-エチル-N-ニトロソ尿素 (ENU)、N-メチル-N-ニトロソ尿素 (MNU)、ホカルバキシンハイドロクロライド (Prc)、メチルメタンスルホナート (MeMS)、クロランブシル (Chl)、メルファラン、ボルカルバジンハイドロクロライド、シクロホスファミド (Cp)、ジエチル硫酸 (Et_2SO_4)、アクリルアミド単量体 (AA)、トリエチレンメラミン (TEM)、ナイトロジェンマスタード、ビンクリスチン、ジメチルニトロアミン、Nメチル-N'-ニトロ-ニトロソグアニジン (MNNG)、7,12ジメチルベンズ (a) アントラセン (DMBA)、エチレンオキシド、ヘキサメチルホスホルアミド、ビスルファン、およびエチルメタンスルホナート (EtMs) からなる群より選択される、請求項90記載の方法。

40

【請求項 92】

DNA修復欠損菌株内のEGFR遺伝子の変異型を、これを細胞に導入する前に増殖する工程をさらに含む、請求項85記載の方法。

【請求項 93】

化合物をキナーゼドメインに二次突然変異を有する変異体上皮細胞成長因子受容体 (EG

50

FR)と接触させる工程、および生じるキナーゼ活性を検出する工程を含む、化合物を選択するための方法であって、変異体EGFRのキナーゼ活性を阻害する化合物が選択される方法。

【請求項 9 4】

二次突然変異が、ゲフィチニブまたはエルロチニブに対する耐性を生じる、請求項93記載の方法。

【請求項 9 5】

SEQ ID NO: 495を含む単離された核酸。

【請求項 9 6】

ヌクレオチド2235～2249が欠失している、SEQ ID NO: 511を含む単離された核酸。

10

【請求項 9 7】

SEQ ID NO: 497を含む単離された核酸。

【請求項 9 8】

ヌクレオチド2240～2251が欠失している、SEQ ID NO: 511を含む単離された核酸。

【請求項 9 9】

SEQ ID NO: 499を含む単離された核酸。

【請求項 1 0 0】

ヌクレオチド2240～2257が欠失している、SEQ ID NO: 511を含む単離された核酸。

【請求項 1 0 1】

SEQ ID NO: 502を含む単離された核酸。

20

【請求項 1 0 2】

ヌクレオチド2573のグアニンが、チミンに対して置換されている、SEQ ID NO: 511を含む単離された核酸。

【請求項 1 0 3】

SEQ ID NO: 504を含む単離された核酸。

【請求項 1 0 4】

ヌクレオチド2582のアデニンが、チミンに対して置換されている、SEQ ID NO: 511を含む単離された核酸。

【請求項 1 0 5】

ヌクレオチド2155のチミンが、グアニンに対して置換されている、SEQ ID NO: 511の単離された核酸。

30

【請求項 1 0 6】

アミノ酸746～750が欠失している、SEQ ID NO: 512のアミノ酸配列を有する単離されたタンパク質。

【請求項 1 0 7】

アミノ酸747～751が欠失している、SEQ ID NO: 512のアミノ酸配列を有する単離されたタンパク質。

【請求項 1 0 8】

アミノ酸747～753が欠失している、SEQ ID NO: 512のアミノ酸配列を有する単離されたタンパク質。

40

【請求項 1 0 9】

アミノ酸858のロイシンがアルギニンで置換されている、SEQ ID NO: 512のアミノ酸配列を有する単離されたタンパク質。

【請求項 1 1 0】

アミノ酸861のロイシンがグルタミンで置換されている、SEQ ID NO: 512のアミノ酸配列を有する単離されたタンパク質。

【請求項 1 1 1】

アミノ酸719のグリシンがシステインで置換されている、SEQ ID NO: 512のアミノ酸配列を有する単離されたタンパク質。

【請求項 1 1 2】

50

erbB 1遺伝子の核酸相違が、SEQ ID NO: 511のヌクレオチド2155にて、グアニンをチミンで、またはグアニンをセリンでの置換、SEQ ID NO: 511のヌクレオチド2235～2249、2240～2251、2240～2257、2236～2250、2254～2277、または2236～2244における欠失、およびSEQ ID NO: 511のヌクレオチド2573にて、チミンをグアニンで、またはヌクレオチド2582のチミンをアデニンでの置換からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 1 1 3】

a. 患者から生体試料を得る工程；および、
b. 該患者においてAkt、STAT5、またはSTAT3が活性化されるかどうかを決定する工程、
を含み、活性化されたAkt、STAT5、またはSTAT3は、上皮細胞成長因子受容体（EGFR）が有効である可能性が高いことを示す、癌に冒されているか、または癌を発症するリスクがある患者におけるEGFRターゲティング治療の有効な可能性を決定するための方法。 10

【請求項 1 1 4】

生体試料が、生検または吸引液である、請求項113記載の方法。

【請求項 1 1 5】

活性化されたAkt、STAT3、またはSTAT5が、リン酸化されている、請求項113記載の方法。

【請求項 1 1 6】

活性化されたAkt、STAT5、またはSTAT3が、免疫学的に決定される、請求項113記載の方法。

【請求項 1 1 7】

免疫学的検査法が、免疫組織化学法、免疫細胞化学法、FACS走査法、免疫プロット法、放射免疫アッセイ法、ウエスタンブロッティング法、免疫沈降法、または酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）からなる群より選択される、請求項116記載の方法。 20

【請求項 1 1 8】

免疫学的検査法が、抗ホスホAkt、抗ホスホSTAT3、もしくは抗ホスホSTAT5抗体を使用する免疫組織化学法または免疫細胞化学法である、請求項116記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

関連出願の説明 30

本出願は、35 U.S.C. § 119 (e) 下において、2004年3月31日に出願の米国仮出願第60/558,218号、2004年4月9日に出願の米国仮出願第60/561,095号、2004年4月27日に出願の米国仮出願第60/565,753号、2004年4月27日に出願の米国仮出願第60/565,985号、2004年5月25日に出願の米国仮出願第60/574,035号、2004年6月7日に出願の米国仮出願第60/577,916号、および2004年7月29日に出願の米国仮出願第60/592,287号の利益を主張し、これらの内容は、その全体が本明細書に参照として組み入れられる。

【0 0 0 2】

政府支援

本発明は、National Institutes for Health (NIH) 助成金番号R01 CA 092824、P50 CA 090578、P01 95281、および1K12CA87723-01によって支援されており、米国政府は、これらに対して一定の権利を有する。 40

【0 0 0 3】

背景

上皮細胞癌、たとえば前立腺癌、乳癌、大腸癌、肺癌、膵癌、卵巣癌、脾臓癌、精巣癌、胸腺の癌などは、上皮細胞の異常な増殖が促進されることによって特徴づけられる疾患である。この増殖の促進により、最初に腫瘍形成が生じる。最終的には、他の器官部位への転移をも生じ得る。種々の癌の診断および治療は、進歩してきたが、これらの疾患は、なおもかなりの死亡率を生じる。

【0 0 0 4】

肺癌は、依然として先進工業国における癌死の主因である。肺に発生する癌は、細胞が 50

顕微鏡下でどのような状態に見えるかによって、2つの主要なタイプの非小細胞肺癌および小細胞肺癌に分けられる。非小細胞肺癌（扁平上皮癌、腺癌、および大細胞癌）は、一般に小細胞肺癌よりもゆっくりとその他の器官に広がる。約75パーセントの肺癌症例が、非小細胞肺癌（たとえば、腺癌）に分類され、その他の25パーセントが、小細胞肺癌である。非小細胞肺癌（NSCLC）は、米国、日本、および西ヨーロッパにおける癌死の主因である。疾患が進行した患者に対しては、化学療法は、生存に適度な利益をもたらすが、かなりの毒性を犠牲にしており、腫瘍増殖を指揮する重要な遺伝的病変に特異的にターゲットされる治療薬の需要が強調される（Schiller JH et al., *N Engl J Med*, 346: 92-98, 2002(非特許文献1)）。

【0005】

10

上皮細胞成長因子受容体（EGFR）は、上皮細胞の表面上に発現される170キログルトン（kDa）の膜結合型タンパク質である。EGFRは、タンパク質チロシンキナーゼ（細胞周期調節分子種）の生長因子受容体ファミリーのメンバーである（W. J. Gullick et al., 1986 (*Cancer Res.*, 46): 285-292(非特許文献2)）。EGFRは、そのリガンド（EGFまたはTGF- β ）が細胞外ドメインと結合するときに活性化され、受容体の細胞内チロシンキナーゼドメインの自己リン酸化を生じる（S. Cohen et al., 1980, *J. Biol. Chem.*, 255: 4834-4842(非特許文献3)；A. B. Schreiber et al., 1983, *J. Biol. Chem.*, 258: 846-853(非特許文献4)）。

【0006】

20

EGFRは、増殖を促進する発癌遺伝子erbBまたはerbB-1のタンパク質産物であるが、プロトオンコジンのファミリー、すなわちERBBファミリーの一員であり、多くのヒト癌の発症および進行において重要な役割を果たすと考えられる。特に、EGFRの発現増加は、乳癌、膀胱癌、肺癌、頭部癌、頸癌、および胃癌、並びにグリア芽細胞腫において観察された。発癌遺伝子のERBBファミリーは、4つの構造的に関連した膜貫通受容体、すなわちEGFR、HER-2/neu（erbB2）、HER-3（erbB3）、およびHER-4（erbB4）をコードする。臨床的には、腫瘍におけるERBB発癌遺伝子増幅および/または受容体過剰発現は、疾患再発および不十分な患者の予後と、並びに治療法における応答性と相関することが報告されていた（L. Harris et al., 1999, *Int. J. Biol. Markers*, 14: 8-15(非特許文献5)；およびJ. Mendelsohn and J. Baselga, 2000, *Oncogene*, 19: 6550-6565(非特許文献6)）。

【0007】

30

EGFRは、3つの主要ドメイン、すなわち細胞外ドメイン（ECD）（これは、グリコシル化されており、かつ2つのシステイン・リッチ領域と共にリガンド結合ポケットを含む）と；短い膜貫通ドメインと、内因性チロシンキナーゼ活性を有する細胞内ドメインとから構成される。膜貫通領域は、リガンド結合ドメインを細胞内ドメインに連結する。アミノ酸およびDNA配列解析、並びにEGFRの非グリコシル化形態の研究では、EGFRのタンパク質バックボーンが132kDaの質量を有し、1186アミノ酸残基であることを示す（A. L. Ullrich et al., 1984, *Nature*, 307: 418-425(非特許文献7)；J. Downward et al., 1984, *Nature*, 307: 521-527(非特許文献8)；C. R. Carlin et al., 1986, *Mol. Cell. Biol.*, 6: 257-264(非特許文献9)；およびF. L. V. Mayes and M. D. Waterfield, 1984, *The EMBO J.*, 3: 531-537(非特許文献10)）。

【0008】

40

EGFRに対するEGFまたはTGF- β の結合は、シグナル伝達経路を活性化して、細胞増殖を生じる。二量体化、高次構造変化、およびEGFR分子のインターナリゼーションは、細胞内シグナルを伝達して細胞増殖制御を生じるように機能する（G. Carpenter and S. Cohen, 1979, *Ann. Rev. Biochem.*, 48: 193-216(非特許文献11)）。成長因子受容体の制御に影響を及ぼす遺伝子変化により、受容体および/またはリガンドの過剰発現するように機能し、または導き、細胞増殖を生じることとなる。加えて、EGFRは、細胞分化、細胞運動性の増強、タンパク質分泌、新血管新生、浸潤、転移、並びに化学療法薬および放射線に対する癌細胞の耐性において役割を果たすことが決定された。（M.-J. Oh et al., 2000, *Clin. Cancer Res.*, 6: 4760-4763(非特許文献12)）。

50

【 0 0 0 9 】

種々の癌の治療のために、すでに臨床試験を受けている多くのものを含む、EGFRの多様な阻害剤が同定されてきた。最近の概要については、de Bono, J. S. and Rowinsky, E. K. (2002), "The erbB Receptor Family: A Therapeutic Target For Cancer", *Trends in Molecular Medicine*, 8, S 19-26(非特許文献 13)を参照されたい。

【 0 0 1 0 】

癌の治療における治療的介入のための標的の有望なセットには、HER-キナーゼ軸のメンバーを含む。これらは、たとえば前立腺、肺、および乳房の固体上皮腫瘍において頻繁にアップレギュレートされ、さらにグリア芽細胞腫瘍においてもアップレギュレートされる。上皮細胞成長因子受容体(EGFR)は、HER-キナーゼ軸のメンバーであり、いくつかの異なる癌療法の開発のための選択の対象であった。EGFR経路の活性化のためには、チロシン残基の可逆的リン酸化が必要とされるため、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)は、これらの治療法のうちの一つである。言い換えると、EGFR-TKIは、腫瘍細胞の増殖および分裂を誘導する細胞シグナリング経路をトリガーし、および/または維持する役割を担う細胞表面受容体を遮断する。具体的には、これらの阻害剤は、HER-1と称され、EGFRキナーゼドメインを妨害すると考えられる。より有望なEGFR-TKIの中には、3つの一連の化合物: キナゾリン、ピリドピリミジン、およびピロロピリミジンがある。

10

【 0 0 1 1 】

臨床開発においてより進行した化合物のうちの2つは、ゲフィチニブ(AstraZeneca UK Ltd.によって開発された化合物ZD1839; 商品名イレッサの下で入手可能である; 以下に「イレッサ」)およびエルロチニブ(Genentech, Inc.およびOSI Pharmaceuticals, Inc.によって開発された化合物OSI-774; 商品名タルセバの下で入手可能である; 以下に「タルセバ」)を含み; 両方とも、有望な臨床成績を有する。イレッサおよびタルセバの両方による従来の癌治療法には、1日にわずか500mgのそれぞれの化合物の経口投与を含む。進行した非小細胞肺癌患者の治療について承認された2003年5月には、イレッサは、これらの産物で最初に米国市場に行き渡ったものになった。

20

【 0 0 1 2 】

イレッサは、EGFR分子上のチロシンキナーゼリン酸化を直接阻害することによって機能する、経口活性なキナゾリンである。これは、アデノシン三リン酸(ATP)結合部位と競合し、HER-キナーゼ軸の抑制を生じる。イレッサ反応の正確なメカニズムは完全に理解されていないが、研究では、EGFRの存在がその作用に必要な必須条件であることを示唆する。

30

【 0 0 1 3 】

これらの化合物を使用する際の重要な制限は、これらのレシピエントが、彼らが最初に治療法に应答した後に、これらの治療有効性に対して耐性を発生する可能性があり、またはこれらが、なんら測定可能な程度に全くEGFR-TKIに反応しない可能性があることである。実際に、10~15パーセントの進行した非小細胞肺癌患者だけが、EGFRキナーゼ阻害剤に应答する。したがって、イレッサおよびタルセバに対する感受性の根底にある分子機構のより優れた理解は、このような療法によって利益を受ける可能性が最も高い個体に対するターゲティング療法の際に極めて有益である。

40

【 0 0 1 4 】

当技術分野において、TKI療法の利益を取り込み、かつ患者によって示される不応答性を克服して、癌、具体的には肺癌、卵巣癌、乳癌、脳癌、結腸癌、および前立腺癌などの上皮細胞癌を満足に治療することについてのかなりの需要がある。このような治療は、個体、特に癌が特に共通であるより老齢の個体の健康に対して劇的な影響を有し得る。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 5 】

【 非特許文献 1 】 Schiller JH et al., *N Engl J Med*, 346: 92-98, 2002

【 非特許文献 2 】 W. J. Gullick et al., 1986 (*Cancer Res.*, 46): 285-292

50

- 【非特許文献 3】S. Cohen et al., 1980, J. Biol. Chem., 255 : 4834-4842
- 【非特許文献 4】A. B. Schreiber et al., 1983, J. Biol. Chem., 258 : 846-853
- 【非特許文献 5】L. Harris et al., 1999, Int. J. Biol. Markers, 14 : 8-15
- 【非特許文献 6】J. Mendelsohn and J. Baselga, 2000, Oncogene, 19 : 6550-6565
- 【非特許文献 7】A. L. Ullrich et al., 1984, Nature, 307 : 418-425
- 【非特許文献 8】J. Downward et al., 1984, Nature, 307 : 521-527
- 【非特許文献 9】C. R. Carlin et al., 1986, Mol. Cell. Biol., 6 : 257-264
- 【非特許文献 10】F. L. V. Mayes and M. D. Waterfield, 1984, The EMBO J., 3 : 531-537
- 【非特許文献 11】G. Carpenter and S. Cohen, 1979, Ann. Rev. Biochem., 48 : 193-216
- 【非特許文献 12】M.-J. Oh et al., 2000, Clin. Cancer Res., 6 : 4760-4763
- 【非特許文献 13】de Bono, J. S. and Rowinsky, E. K. (2002), "The erbB Receptor Family: A Therapeutic Target For Cancer", Trends in Molecular Medicine, 8, S 19-26
- 【発明の概要】
- 【0016】

概要

ゲフィチニブ（イレッサ（登録商標））などのチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）療法は、上記癌で冒されている大多数の個体では有効でない。本発明の発明者らは、驚くべきことに、EGFRのキナーゼドメインに体細胞突然変異が存在するとイレッサ、タルセバなどのTKIに対するEGFRの感受性を実質的に増大することを発見した。たとえば、このような癌を有する患者の30%未満が現在のTKIによる治療に感受性であるが、EGFRキナーゼドメインに突然変異を有する患者の50%、より好ましくは60、70、80、90%以上が感受性である。加えて、これらの突然変異は、EGFRのキナーゼ活性を増大される。したがって、これらの突然変異を有する患者は、現在のチロシンキナーゼ阻害剤（TKI）療法、たとえばゲフィチニブに応答する可能性が高い。

【0017】

したがって、本発明は、癌に冒されているヒト患者における上皮細胞成長因子受容体（EGFR）ターゲティング治療の有効性の可能性を決定するための新規方法を提供する。本方法は、野生型erbB 1遺伝子と比較して、該患者のerbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける少なくとも1つの核酸相違の有無を検出する工程を含む。少なくとも1つの相違の存在は、EGFRターゲティング治療が有効である可能性が高いことを示す。好ましくは、核酸相違は、EGFRのキナーゼ活性を増大する。次いで、患者をEGFRターゲティング治療で治療することができる。本発明の一つの態様において、EGFRターゲティング治療は、チロシンキナーゼ阻害剤である。好ましい態様において、チロシンキナーゼ阻害剤は、アニリノキナゾリンである。アニリノキナゾリンは、合成アニリノキナゾリンであってもよい。好ましくは、合成アニリノキナゾリンは、ゲフィチニブまたはエルロチニブのいずれかである。もう一つの態様において、EGFRターゲティング治療は、4-ジメチルアミノ-プト-2-エン酸[4-(3-クロロ-4-フルオロ-フェニルアミノ)-3-シアノ-7-エトキシ-キノリン-6-イル]-アミド（「EKB-569」、時に「EKI-569」ともいわれ、たとえば、国際公開公報第/2005/018677号およびTorrance et al., Nature Medicine, vol. 6, No. 9, Sept. 2000, p. 1024を参照されたい）および/またはHKI-272もしくはHKI-357（Wyeth; Greenberger et al., Proc. 11th NCI EORTC-AACR Symposium on New Drugs in Cancer Therapy, Clinical Cancer Res. Vol. 6 Supplement, Nov. 2000, ISSN 1078-0432; in Rabindran et al., Cancer Res. 64 : 3958-3965 (2004); Holbro and Hynes, Ann. Rev. Pharm. Tox. 44 : 195-217 (2004); Tsou et al, J. Med. Chem. 2005, 48, 1107-1131; およびTejpar et al., J. Clin. Oncol. ASCO Annual Meeting Proc. Vol. 22, No.14S : 3579 (2004)を参照されたい）を含む不可逆的EGFR阻害剤である。

【0018】

本発明の一つの態様において、EGFRは、癌であるか、または癌を発症するリスクがある患者由来の生体試料から得られる。EGFR（またはerbB 1遺伝子）のキナーゼドメインにおける相違は、ATP結合ポケットの高次構造上の構造に効果を及ぼす。好ましくは、EGFRのキナーゼドメインにおける相違は、エキソン18、19、20、または21におけるインフレームの欠失または置換である。

【0019】

一つの態様において、インフレームの欠失は、EGFR（erbB 1）のエキソン19にある。エキソン19におけるインフレームの欠失は、好ましくは、少なくともコドン747、748、749、および750における、アミノ酸ロイシン、アルギニン、グルタミン酸、およびアラニンの欠失にて含む。一つの態様において、インフレームの欠失は、ヌクレオチド2235～2249を含み、アミノ酸746～750（配列グルタミン酸、ロイシン、アルギニン、グルタミン酸、およびアラニン）を欠失させ、表2、表S2、図2B、図4A、図5、SEQ ID NO: 511、図6C、および図8Cを参照されたい。もう一つの態様において、インフレームの欠失は、ヌクレオチド2236～2250を含み、アミノ酸746～750を欠失させ、表S2、図5、SEQ ID NO: 511、および図6Cを参照されたい。または、インフレームの欠失は、ヌクレオチド2240～2251（表2、図2C、図4A、図5、SEQ ID NO: 511を参照されたい）、またはヌクレオチド2240～2257（表2、表S3A、図2A、図4A、図5、SEQ ID NO: 511、図6C、および図8Eを参照されたい）を含む。または、インフレームの欠失は、ヌクレオチド2248にてグアニンをシトシンに置換すると共に、ヌクレオチド2239～2247（表S3Aおよび図8Dを参照されたい）、またはヌクレオチド2237のアデニンをチミンに置換するとともにヌクレオチド2238～2255の欠失（表S3Aおよび図8Fを参照されたい）、またはヌクレオチド2254～2277の欠失（表S2を参照されたい）を含む。または、インフレームの欠失は、表S3Bに示したように、ヌクレオチド

2239-2250delTTAAGAGAAGCA; 2251A>C,または2240-

2254delTAAGAGAAGCA,または2257-2271delCCGAAAGCCAACAAG,

を含む。

【0020】

もう一つの態様において、置換は、EGFRのエキソン21にある。エキソン21における置換は、少なくとも1つのアミノ酸を含む。一つの態様において、エキソン21における置換は、ヌクレオチド2573にてチミンをグアニンで置換することを含む（図4Aおよび図5、SEQ ID NO: 511を参照されたい）。この置換は、野生型のロイシンがアミノ酸858にてアルギニンと置換されたアミノ酸置換を生じる（図5、表2、表S2、表S3A、図2D、図6A、図8B、およびSEQ ID NO: 512を参照されたい）。または、エキソン21における置換は、ヌクレオチド2582のチミンをアデニンで置換することを含む（図4Aおよび図5、SEQ ID NO: 511を参照されたい）。この置換は、野生型のロイシンがアミノ酸861にてグルタミンと置換されたアミノ酸置換を生じる（図5、表2、図2E、表S3B、およびSEQ ID NO: 512を参照されたい）。

【0021】

また、置換は、EGFRのエキソン18にあってもよい。一つの態様において、エキソン18にある置換は、ヌクレオチド2155におけるグアニンの代わりにチミンである（図4Aおよび図5、SEQ ID NO: 511を参照されたい）。この置換は、野生型のグリシンが、コドン719にてシステインと置換されたアミノ酸置換を生じる（図5、SEQ ID NO: 512を参照されたい）。もう一つの態様において、エキソン18における置換は、ヌクレオチド2155におけるグアニンの代わりにアデニンであり、野生型のグリシンがコドン719にてセリンに対して置換されたアミノ酸置換を生じる（表S2、図6B、図8A、図5、SEQ ID NO: 511、および512を参照されたい）。

【0022】

もう一つの態様において、置換は、SEQ ID NO: 511のヌクレオチド2316の後の、かつヌクレオチド2317の前のグアニン、グアニン、およびチミン（GGT）の挿入（2316_2317 ins

10

20

30

40

50

GGT)である。これは、アミノ酸772にて、パリン(V)の挿入(P772_H733 ins V)としても記載することができる。その他の突然変異を表S3Bに示してあり、たとえばSEQ ID NO: 511のヌクレオチド2309の後の、およびヌクレオチド2310の前のCAACCCGGの挿入、並びにSEQ ID NO: 511のヌクレオチド2311の後の、およびヌクレオチド2312の前のGCGTGACAの挿入を含む。また、置換は、エキソン20にあってもよく、一つの態様において、ヌクレオチド2334および2335のGGに対するAAの置換である、表S3Bを参照されたい。

【0023】

まとめると、好ましい態様におけるerbB 1遺伝子の核酸相違は、SEQ ID NO: 511のヌクレオチド2155にてグアニンをチミンで、もしくはグアニンをアデニンでの置換、またはSEQ ID NO: 511のヌクレオチド2235~2249、2240~2251、2240~2257、2236~2250、2254~2277、もしくは2236~2244の欠失、SEQ ID NO: 511のヌクレオチド2316の後の、かつヌクレオチド2317の前のヌクレオチドのグアニン、グアニン、およびチミン(GGT)の挿入、並びにSEQ ID NO: 511のヌクレオチド2573のチミンをグアニンで、もしくはヌクレオチド2582のチミンをアデニンでの置換である。

10

【0024】

少なくとも1つの核酸相違の有無の検出は、受容体をコードする核酸のセグメントを増幅することによって決定することができる。増幅されるセグメントは、1000ヌクレオチドの長さ、好ましくは500ヌクレオチドの長さ、および最も好ましくは100ヌクレオチド以下の長さである。増幅されるセグメントは、複数の相違を含むことができる。

20

【0025】

もう一つの態様において、少なくとも1つの相違の有無の検出は、相違部位を含むEGFR核酸を、少なくとも1つの核酸プローブと接触させる工程を提供する。プローブは、相違部位を含み、かつ選択的ハイブリダイゼーション状態で相違部位に相補的ヌクレオチド塩基を含む核酸配列と優先してハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションは、検出可能な標識で検出することができる。

30

【0026】

さらにもう一つの態様において、少なくとも1つの相違の有無の検出は、少なくとも1つの核酸配列をシーケンスする工程、および得られた配列を公知のerbB 1核酸配列と比較する工程を含む。または、少なくとも1つの相違の有無は、少なくとも1つの核酸配列の質量分析の決定を含む。

40

【0027】

好ましい態様において、少なくとも1つの核酸相違の有無の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)を行うことを含む。仮定的相違を含むerbB 1核酸配列を増幅して、増幅された核酸のヌクレオチド配列を決定する。増幅された核酸のヌクレオチド配列を決定する工程は、少なくとも1つの核酸セグメントをシーケンスする工程を含む。または、増幅産物を、自動化および手動ゲル電気泳動等を含むサイズに従って増幅産物を分離することができる任意の方法を使用することによって解析することができる。

【0028】

または、少なくとも1つの相違の有無の検出は、遺伝子における複数の相違のハプロタイプを決定することを含む。

50

【0029】

もう一つの態様において、EGFR相違の有無は、erbB 1遺伝子産物(タンパク質)を解析することによって検出することができる。本態様では、変異体EGFRと特異的に結合するプローブが利用される。好ましい態様において、プローブは、変異体EGFRと優先して結合する抗体である。変異体EGFRの存在により、EGFRターゲティング治療の有効性の可能性を予測する。または、プローブは、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはアブタマーであってもよい。

【0030】

本発明は、EGFR遺伝子(erbB 1)に少なくとも1つの核酸相違を含む核酸配列に対して、選択的結合条件下で、特異的に結合するプローブをさらに提供する。一つの態様におい

60

て、相違は、ATP結合ポケットに構造変化を与えるerbB 1のキナーゼドメインにおける突然変異である。

【0031】

本発明のプローブは、約500ヌクレオチド塩基、好ましくは約100のヌクレオチド塩基、および最も好ましくは約50または約25ヌクレオチド塩基以下の長さの核酸配列を含んでいてもよい。プローブは、DNA、RNA、またはペプチド核酸（PNA）で構成されていてもよい。さらにまた、プローブは、たとえば蛍光標識または酵素標識などの、検出可能な標識を含んでいてもよい。

【0032】

加えて、本発明は、癌に冒されている患者における上皮細胞成長因子受容体（EGFR）ターゲティング治療の有効な可能性を決定するための新規方法を提供する。本方法は、患者由来の生体試料におけるEGFRのキナーゼ活性を決定することを含む。正常対象と比較して、EGFRリガンドで刺激後のキナーゼ活性の増加は、EGFRターゲティング治療が有効である可能性が高いことを示す。

10

【0033】

本発明は、癌に冒されているか、または癌を発症するリスクがある患者を治療するための新規方法をさらに提供する。本方法は、患者のEGFRのキナーゼドメインが、少なくとも1つの核酸相違を含むかどうかを決定することを含む。好ましくは、EGFRは、腫瘍または癌の部位に位置し、核酸相違は、体細胞である。このような相違の存在は、EGFRターゲティング治療が有効なことを示す。相違が存在する場合、チロシンキナーゼ阻害剤が患者に投与される。

20

【0034】

上記のように、同定された患者に投与されるチロシンキナーゼ阻害剤は、たとえば、EK B-569、HKI-272および/またはHKI-357（Wyeth）などのアニリノキナゾリンまたは不可逆的チロシンキナーゼ阻害剤であってもよい。好ましくは、アニリノキナゾリンは、合成アニリノキナゾリンであり、最も好ましくは、合成アニリノキナゾリンは、ゲフィチニブおよびエルロチニブである。

【0035】

本発明の方法によって治療される癌は、たとえば、胃腸癌、前立腺癌、卵巣癌、乳癌、頭頸部癌、肺癌、非小細胞肺癌、神経系の癌、腎臓癌、網膜癌、皮膚癌、肝臓癌、膵癌、生殖器-泌尿器癌、および膀胱癌を含むが、これらに限定されるわけではない。好ましい態様において、癌は、非小細胞肺癌である。

30

【0036】

また、本発明のPCR法を実行するためのキットも包含される。キットは、EGFRキナーゼドメインのATP結合ポケットをコードする遺伝子と境を接する核酸領域に対してアニールするようにデザインされた少なくとも1つの縮重プライマー対を含む。加えて、キットは、PCR増幅を実行するために必要とされる製品および試薬、並びに説明書を含む。

【0037】

好ましい態様において、キットに含まれるプライマー対は、SEQ ID NO: 505、SEQ ID NO: 506、SEQ ID NO: 507、およびSEQ ID NO: 508からなる群より選択される。また、実施例において表6および7の一覧表に記載したプライマーが好ましい。

40

【0038】

さらにもう一つの態様において、本発明は、変異体上皮細胞成長因子受容体（EGFR）の触媒キナーゼ活性を阻害する化合物を選択するための方法を開示する。第1の工程として、変異体EGFRを潜在的化合物と接触させる。次いで、生じる変異体EGFRキナーゼ活性を検出し、変異体EGFRのキナーゼ活性を阻害する化合物を選択する。一つの態様において、変異体EGFRは、細胞内に含まれる。また、本方法は、TKI、たとえばゲフィチニブまたはエルロチニブに対して耐性を与えるキナーゼドメインに二次突然変異を有する変異体EGFRのキナーゼ活性を阻害する化合物を選択するために使用することもできる。

【0039】

50

一つの態様において、変異体EGFRは、標識されている。もう一つの態様において、EGFRは、固体支持体に結合される。好ましい態様において、固体支持体は、タンパク質チップである。

【0040】

本発明のさらにもう一つの態様において、変異体上皮細胞成長因子受容体（EGFR）の触媒キナーゼ活性を阻害する薬学的組成物が開示される。変異体EGFRの触媒キナーゼ活性を阻害する化合物は、抗体、抗体断片、小分子、ペプチド、タンパク質、アンチセンス核酸、リボザイム、PNA、siRNA、オリゴヌクレオチドアプタマー、およびペプチドアプタマーからなる群より選択される。

【0041】

また、EGFRを媒介した疾患を有する患者を治療するための方法が開示される。本方法によれば、患者には、変異体上皮細胞成長因子受容体（EGFR）の触媒キナーゼ活性を阻害する薬学的組成物が投与される。

【0042】

一つの態様において、EGFRを媒介した疾患は、癌である。好ましい態様において、癌は、上皮起源のものである。たとえば、癌は、胃癌、前立腺癌、卵巣癌、乳癌、頭頸部癌、肺癌、非小細胞肺癌、神経系の癌、腎臓癌、網膜癌、皮膚癌、肝臓癌、膵癌、生殖器-泌尿器癌、および膀胱癌である。好ましい態様において、癌は、非小細胞肺癌である。

【0043】

もう一つの態様において、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける二次突然変異の獲得を予測する（または、突然変異を選択する）ための方法が開示される。erbB 1遺伝子の変異型を発現する細胞を、チロシンキナーゼ阻害剤の有効であるが、致死量以下の用量と接触させる。チロシンキナーゼ阻害剤の増殖停止効果に耐性である細胞を選択し、erbB 1キナーゼドメインにおけるさらなる突然変異の存在について、erbB 1核酸を解析する。一つの態様において、細胞は、インビトロにある。もう一つの態様では、細胞は、トランスジェニック動物から得られる。一つの態様において、トランスジェニック動物は、マウスである。このマウスモデルにおいて、研究される細胞は、腫瘍生検から得られる。本発明によって選択されたerbB 1キナーゼドメインに二次突然変異を含む細胞は、キナーゼドメインに二次突然変異を有する変異体EGFRのキナーゼ活性を阻害する化合物を選択するための上記方法に使用することができる。

【0044】

erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける二次突然変異の獲得を予測するための代わりの態様では、最初に、erbB 1遺伝子の変異型を発現する細胞を、変異誘発剤の有効な量と接触させる。変異誘発は、たとえば、エチルメタンスルホナート（EMS）、N-エチル-N-ニトロソ尿素（ENU）、N-メチル-N-ニトロソ尿素（MNU）、ホカルバキシンハイドロクロライド（Prc）、メチルメタンスルホナート（MeMS）、クロランブシル（Chl）、メルファラン、ポルカルバジンハイドロクロライド、シクロホスファミド（Cp）、ジエチル硫酸（Et₂SO₄）、アクリルアミド単量体（AA）、トリエチレンメラミン（TEM）、ナイトロジェンマスタード、ピンクリスチン、ジメチルニトロソアミン、N-メチル-N'-ニトロ-ニトロソグアニジン（MNNG）、7,12ジメチルベンズ（a）アントラセン（DMBA）、エチレンオキシド、ヘキサメチルホスホルアミド、ビスルファン、またはエチルメタンスルホラート（EtMs）である。次いで、細胞をチロシンキナーゼ阻害剤の有効であるが、致死量以下の用量と接触させる。チロシンキナーゼ阻害剤の増殖停止効果に耐性である細胞を選択し、erbB 1キナーゼドメインにおけるさらなる突然変異の存在について、erbB 1核酸を解析する。

【0045】

詳細な記載

本発明は、癌に冒されている患者における上皮細胞成長因子受容体（EGFR）ターゲティング治療の有効な可能性を決定するための新規方法を提供する。本方法は、該患者のerbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける少なくとも1つの核酸相違の有無を検出することを含む。少なくとも1つの相違の存在は、EGFRターゲティング治療が有効である可能性が高

10

20

30

40

50

いことを示す。好ましくは、核酸相違は、EGFRのキナーゼ活性を増大する。次いで、EGFRターゲティング治療で患者を治療することができる。本発明の一つの態様において、EGFRターゲティング治療は、チロシンキナーゼ阻害剤である。好ましい態様において、チロシンキナーゼ阻害剤は、アニリノキナゾリンである。アニリノキナゾリンは、合成アニリノキナゾリンであってもよい。好ましくは、合成アニリノキナゾリンは、ゲフィチニブまたはエルロチニブである。

【0046】

定義：

「erbB 1」、「上皮細胞成長因子受容体」、および「EGFR」という用語は、本明細書において交換可能に使用され、たとえば、Carpenter et al. Ann. Rev. Biochem. 56: 881-914 (1987)に開示されるような、天然の配列EGFRをいい、これらの変異体を含む（たとえば、Humphrey et al. PNAS (USA) 87: 4207-4211 (1990)に記載の欠失変異体EGFR）。erbB 1は、EGFRタンパク質産物をコードする遺伝子をいう。

10

【0047】

本明細書に使用される「キナーゼ活性を増大する核酸相違」という用語は、キナーゼ活性の増大を生じる、遺伝子のヌクレオチド配列の相違（すなわち、突然変異）をいう。キナーゼ活性の増大は、核酸の相違の直接的結果であり、遺伝子がコードするタンパク質に関連する。

【0048】

本明細書に使用される「薬物」または「化合物」という用語は、疾患または状態を治療し、または予防し、または制御するために、人に投与される化学的実体もしくは生物学的製剤、または化学的実体もしくは生物学的製剤の組み合わせをいう。化学的実体または生物学的製剤は、好ましくは、しかし必ずしも必要ではないが、低分子量化合物であり、しかし、さらにより大きな化合物、たとえばタンパク質、オリゴヌクレオチド、リボザイム、DNAザイム、糖タンパク質、siRNAs、リボタンパク質、アプタマー、並びにこれらの修飾および組み合わせを含む（しかし、これらに限定されるわけではない）核酸、アミノ酸、または炭水化物のオリゴマーであってもよい。

20

【0049】

本発明の状況における「遺伝子型」という用語は、遺伝子の特定の対立形質の形態をいい、これは、特定の部位の核酸配列に存在する特定のヌクレオチドによって定義することができる。

30

【0050】

「遺伝子の変異型」、「遺伝子の型」、または「対立遺伝子」という用語は、集団における遺伝子の1つの特定の型、遺伝子の配列内の少なくとも1つの、およびより頻繁には複数の変異部位の配列において同じ遺伝子のその他の型とは異なる特定の型をいう。遺伝子の異なる対立遺伝子間で異なるこれらの変異部位の配列は、「遺伝子配列相違」または「相違」または「変異体」と呼ばれる。相当する当技術分野において公知のその他の用語は、突然変異および多型を含むが、突然変異は、有害な表現型と関連する対立遺伝子をいうために使用されることが多い。本発明の好ましい局面において、相違は、本明細書において相違表に一覧を記載した相違からなる群より選択される。

40

【0051】

本発明の状況において、「プローブ」という用語は、構造が異なる標的分子間を検出可能に区別することができる分子をいう。検出は、使用するプローブの型および標的分子の型に応じて、種々の異なる方法で達成することができる。したがって、たとえば、検出は、標的分子の活性レベルの識別に基づいてもよいが、好ましくは特異的結合の検出に基づく。このような特異的結合の例は、抗体結合および核酸プローブ・ハイブリダイゼーションを含む。したがって、たとえば、プローブは、酵素基質、抗体、および抗体断片、並びに好ましくは、核酸ハイブリダイゼーションプローブを含むことができる。

【0052】

本明細書に使用される「有効な」および「有効性」という用語は、薬理学的有効性およ

50

び生理学的安全性を含む。薬理学的有効性は、治療により、患者において望まれる生物学的効果を生じる能力をいう。生理学的安全性は、治療を施すことによって生じる細胞、器官、および/または生物体レベルでの、毒性レベル、またはその他の有害生理作用（副作用と称することが多い）をいう。「あまり有効ではない」とは、治療により、治療的に有意に低いレベルの薬理学的有効性および/または治療的に高いレベルの有害生理作用を生じることを意味する。

【0053】

本明細書に使用される「プライマー」という用語は、ポリヌクレオチドに対して相補的であるプライマー伸長産物の合成が触媒される条件下に配置されたときに、相補鎖に沿ってポリヌクレオチド合成の開始位置として作用することができるオリゴヌクレオチドをいう。このような条件は、4つの異なるヌクレオチド三リン酸またはヌクレオシド類似体と、DNAポリメラーゼおよび/または逆転写酵素などの重合のための1つまたは複数の薬剤とが、適切な緩衝液（「緩衝液」は、補因子であるか、またはpH、イオン強度などに影響を及ぼす置換分を含む。）中に、かつ適切な温度にて存在することを含む。プライマーは、ポリメラーゼのための薬剤の存在下においても伸張産物の合成をブライムするほど十分に長くなければならない。典型的なプライマーは、少なくとも約5ヌクレオチドの長さの、標的配列に対して実質的に相補的な配列を含むが、いくらか長いプライマーが好ましい。通常、プライマーは、約15~26ヌクレオチドを含むが、より長いプライマーを使用してもよい。

10

【0054】

プライマーは、増幅される特異的配列である標的配列に対して実質的に相補的な配列であって、プライマーがアニールすることができる配列を常を含む。プライマーは、任意に、プロモーター配列を含んでいてもよい。「プロモーター配列」という用語は、RNAポリメラーゼによって特異的に認識される核酸配列の一本鎖を定義し、これは、認識した配列と結合して転写プロセスを開始することにより、RNA転写物を産生する。原則として、開始配列を認識することができる、公知の、および利用できるポリメラーゼのために、任意のプロモーター配列を使用してもよい。公知の、および有用なプロモーターは、バクテリオファージT3、T7、またはSP6などの一定のバクテリオファージ・ポリメラーゼによって認識されるものである。

20

【0055】

「マイクロアレイ」は、好ましくは別々の領域の直線状または二次元のアレイであり、それぞれ固体支持体の表面上に形成された定義された領域を有する。マイクロアレイ上の別々の領域の密度は、単一の固相支持体の表面上、好ましくは少なくとも $50/\text{cm}^2$ 、より好ましくは、少なくとも約 $100/\text{cm}^2$ 、さらにより好ましくは少なくとも約 $500/\text{cm}^2$ 、およびなおより好ましくは少なくとも $1,000/\text{cm}^2$ で検出される標的ポリヌクレオチドの総数によって決定される。本明細書に使用される、DNAマイクロアレイは、標的ポリヌクレオチドを増幅し、またはクローン化するために使用される、チップまたはその他の表面上に配置されたオリゴヌクレオチドプライマーのアレイである。アレイにおけるプライマーのそれぞれの特定の群の位置は公知であるので、標的ポリヌクレオチドの同一性は、マイクロアレイにおける特定の位置に対するこれらの結合に基づいて決定することができる。

30

40

【0056】

「標識」という用語は、アッセイ試料中に標的ポリヌクレオチドが存在することを示す検出可能なシグナルを生じることができる組成物をいう。適切な標識は、放射性同位元素、ヌクレオチド発色団、酵素、基質、蛍光分子、化学発光部分、磁性粒子、生物発光部分等を含む。したがって、標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的手段によって検出可能な任意の組成物である。

【0057】

「支持体」という用語は、ビーズ、粒子、計量棒、線維、フィルター、膜、およびガラススライドなどのシランまたはケイ酸支持体などの従来の支持体をいう。

【0058】

50

「増幅する」という用語は、広義には、たとえばさらなる標的分子、または標的様分子もしくは標的分子に対して相補的な分子（これらの分子は、試料中に標的分子が存在することによって作製される）を含んでいてもよい増幅産物を作製することを意味するために使用される。標的が核酸である状況では、増幅産物は、DNAまたはRNAポリメラーゼまたは逆転写酵素で酵素的に作製することができる。

【0059】

本明細書で使用される「生体試料」とは、たとえば血液、血漿、血清、腫瘍生検、尿、糞便、痰、髄液、胸腔内液、乳頭吸引液、リンパ液体、皮膚の外側の切片、呼吸器、腸管、および尿生殖器管、涙、唾液、乳、細胞（血液細胞を含むが、これらに限定されるわけではない）、腫瘍、器官、さらにはインビトロ細胞培養成分の試料を含む（しかし、これらに限定されるわけではない）個体から単離された組織または液体の試料をいう。好ましい態様において、試料は、切除、気管支鏡検査生検、もしくは原発性もしくは転移性の腫瘍のコア針生検に由来するか、または胸腔内液由来の細胞ブロックに由来する。加えて、微細針吸引液試料も使用される。試料は、パラフィン包埋された、または凍結された組織であってもよい。

10

【0060】

「抗体」という用語は、抗原を結合することができる免疫グロブリンタンパク質であることを意味する。本明細書に使用される抗体は、関心対象の抗原または抗原性断片に結合することができる抗体断片、たとえばF(ab')₂、Fab'、Fabを含むことが意味される。好ましくは、抗原に対する抗体の結合は、EGFRの変異型の活性を阻害する。

20

【0061】

「ヒト化抗体」という用語は、本明細書において、完全な、すなわち2つの完全な軽鎖と2つの完全な重鎖で構成される抗体分子、並びに抗体断片、たとえばFab、Fab'、F(ab')₂、およびFvのみからなる抗体であって、CDRが非ヒト供与源に由来し、かつIg分子の残りの部分またはこれらの断片がヒト抗体に由来する、好ましくはヒト抗体をコードする核酸配列から産生される抗体を記載するために使用される。

【0062】

「ヒト抗体」および「ヒト化抗体」という用語は、本明細書において、抗体分子の全ての部分がヒト抗体をコードする核酸配列に由来する抗体を記載するために使用される。このような抗体は、ヒト患者においてほとんど免疫応答を誘発しないので、このようなヒト抗体は、抗体治療法に使用するためには最も望ましい。

30

【0063】

「キメラ抗体」という用語は、本明細書において、上記の「ヒト化抗体」の定義のような、抗体分子、並びに抗体断片を記載するために使用される。「キメラ抗体」という用語は、ヒト化抗体を包含する。キメラ抗体は、第一の哺乳類種に由来する重鎖または軽鎖アミノ酸配列の少なくとも1つの部分と第二の異なる哺乳類種に由来する重鎖または軽鎖アミノ酸配列の別の部分を有する。

【0064】

好ましくは、可変領域は、非ヒト哺乳類種に由来し、かつ定常領域は、ヒト種に由来する。具体的には、キメラ抗体は、好ましくは可変領域をコードする非ヒト哺乳類由来の9ヌクレオチド配列と抗体の定常領域をコードするヒト由来のヌクレオチド配列とから産生される。

40

【0065】

表2は、本発明に記載されている方法に関連するerbB 1のキナーゼドメインにおけるDNA配列相違の部分的な一覧である。これらの相違は、ゲフィチニブに応答したNSCLCである患者およびゲフィチニブに曝露していない患者由来の生体試料の研究で、発明者らによって同定された。

【0066】

核酸分子は、当技術分野において周知の任意の多くの手順を使用して、特定の生体試料

50

から単離することができ、選択される特定の単離手順は、特定の生体試料のために適している。たとえば、凍結融解法およびアルカリ法は、固体物質から核酸分子を得るために有用であり得るし；熱およびアルカリ法は、尿から核酸分子を得るために有用であり得るし；およびプロテイナーゼK抽出は、血液から核酸を得るために使用することができる（Rolf, A et al. PCR: Clinical Diagnostics and Research, Springer (1994)）。

【0067】

検出方法

癌に冒されているか、または発症するリスクのある患者におけるerbB 1遺伝子のキナーゼドメインの相違の特定の相違または複数の相違の有無の検出は、さまざまな方法で行われる。このような試験は、一般に生体試料、たとえば組織生検、尿、糞便、痰、血液、細胞、組織搔爬、乳房吸引液、もしくはその他の細胞物質から収集したDNAまたはRNAを使用して行われ、PCR、対立遺伝子特異的プローブでのハイブリダイゼーション、酵素突然変異検出、ミスマッチの化学開裂、質量分析、またはミニシーケンシングを含むDNAシーケンシングを含む（しかし、これらに限定されるわけではない）種々の方法によって行うことができる。特定の態様において、対立遺伝子特異的プローブとのハイブリダイゼーションは、2つの形式：（1）多くのDNAチップ適用と同様に、固相（ガラス、シリコン、ナイロン膜）に結合された対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドおよび溶液中の標識された試料、または（2）結合された試料（たいいてい、クローン化DNAまたはPCR増幅したDNA）および溶液中の標識されたオリゴヌクレオチド（ハイブリダイゼーションによるシーケンシングを可能するために対立遺伝子特異的か、または短い）。診断試験には、複数の相違の同時定量が可能な、相違のパネル（固体支持体上であることが多い）を含んでいてもよい。

【0068】

もう一つの局面において、erbB 1遺伝子における少なくとも1つのキナーゼ活性を増大する核酸相違の存在を決定するためには、ハプロタイプ決定試験が必要であるかもしれない。ハプロタイプを決定する方法は、たとえば、国際公開公報第00/04194号と同様に、当業者に公知である。

【0069】

好ましくは、キナーゼ活性を増大する核酸相違の有無の決定は、ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）などの方法によって相違部位の配列を決定することを含む。または、キナーゼ活性を増大する核酸相違の有無の決定は、鎖終結DNAシーケンシングもしくはミニシーケンシング、オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーション、または質量分析を包含し得る。

【0070】

本発明の方法は、癌に冒されているか、または発症するリスクがある患者におけるEGFRターゲティング治療の有効な可能性（または有効性の欠如）を予測するために使用してもよい。好ましくは、癌は、胃腸癌、前立腺癌、卵巣癌、乳癌、頭頸部癌、肺癌、非小細胞肺癌、神経系癌、腎臓癌、網膜癌、皮膚癌、肝臓癌、脾癌、生殖器-泌尿器癌、および膀胱癌を含むが、これらに限定されるわけではない上皮起源の癌を含む。好ましい態様において、癌は、非小細胞肺癌である。

【0071】

本発明は、一般に、癌であるか、または癌を発症するリスクがある患者における、EGFRターゲティング治療の有効性の指標であるerbB 1遺伝子のキナーゼドメインの相違の同定に関する。加えて、EGFRのキナーゼドメインに特異的な相違の同定により、事実上、診断試験または予後試験として使用することができる。たとえば、erbB 1のキナーゼドメインにおける少なくとも1つの相違の存在は、患者が、たとえばチロシンキナーゼ阻害剤などの化合物をターゲットするEGFRでの治療による利益を受ける可能性が高いことを示す。

【0072】

診断試験のための方法は、当技術分野において周知であり、特許出願国際公開公報第00/04194号に開示されており、参照として本明細書に組み入れられる。例示的方法において、診断試験は、erbB 1遺伝子配列のキナーゼドメインの1つもしくは複数の公知の相違に

わたるDNAまたはRNA（一般に、RNAをcDNAに変換した後）のセグメントを増幅することを含む。次いで、増幅されたセグメントの核酸相違を同定するために、この増幅されたセグメントをシーケンスし、および/またはポリアクリルアミドゲル電気泳動に供する。

【0073】

PCR

一つの態様において、本発明は、PCRによって、またはライゲーション連鎖反応（LCR）で、試験生体試料中のerbB 1遺伝子のキナーゼドメインの変異体についてスクリーニングする方法を提供し（たとえば、Landegran, et al., 1988. Science 241: 1077-1080; および Nakazawa, et al., 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 360-364を参照されたい）、後者は、特にEGFR-遺伝子における点突然変異を検出するために有用であり得る（Abbravaya, et al., 1995. Nucl. Acids Res. 23: 675-682を参照されたい）。本方法は、標的配列を増幅するための縮重プライマー（遺伝子の1つまたは複数の保存された領域に対応するプライマー）をデザインする工程、鋳型として、試験生体試料から得られたDNAまたはcDNAを使用して、プライマーで反応を増幅する工程、およびPCR産物を解析する工程を含む。対照試料に対する試験生体試料のPCR産物の比較は、試験生体試料における相違を示す。変化は、試験生体試料における核酸相違の有無のいずれかであることができる。

10

【0074】

代わりの増幅方法は、自己維持配列複製（self sustained sequence replication）（Gyatelli, et al., 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878を参照されたい）、転写増幅系（Kwoh, et al., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173-1177を参照されたい）；Qbレプリカーゼ（Lizardi, et al., 1988. BioTechnology 6: 1197を参照されたい）、または任意のその他の核酸増幅方法、続く当業者に周知の技術を使用する増幅された分子の検出を含む。このような分子が非常に少ない数で存在する場合、これらの検出スキームは、特に核酸分子の検出のために有用である。

20

【0075】

本発明に従って有用なプライマーは、ガイドとしてのerbB 1遺伝子のキナーゼドメインのタンパク質のアミノ酸配列または核酸配列、たとえばSEQ ID NO: 493、SEQ ID NO: 494、SEQ ID NO: 509、およびSEQ ID NO: 510を使用してデザインされる。プライマーは、遺伝子の相同領域内であって、少なくとも2つの相同領域が可変配列の多岐にわたる領域によって分離されている相同領域内にデザインされ、配列は、長さまたは核酸配列を変更可能である。

30

【0076】

たとえば、少なくとも約6個の、好ましくは少なくとも8~10の連続したアミノ酸の、同一であるか、または高度に相同的な、好ましくは少なくとも80%~85%、より好ましくは少なくとも90~99%相同的なアミノ酸配列。最も好ましくは、アミノ酸配列は、100%同一である。フォワードおよびリバースプライマーは、公知の遺伝子ファミリーメンバーの所与の位置におけるコドン縮重の維持および種々のアミノ酸の表示に基づいてデザインする。本明細書で言及される相同性の程度は、省略時設定を使用するタンパク質-BLASTなどの標準的な配列比較ソフトウェアを（<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>）を使用して、アミノ酸配列の解析に基づいている。

40

【0077】

下記の表3は、縮重暗号およびこれらの標準的シンボルの使用法を表す：

（表3）

	T	C	A	G
T	TTT Phe (F)	TCT Ser (S)	TAT Tyr (Y)	TGT Cys (C)
	TTC "	TCC "	TAC "	TGC "
	TTA Leu (L)	TCA "	TAA Ter	TGA Ter
	TTG "	TCG "	TAG Ter	TGG Trp (W)
C	CTT Leu (L)	CCT Pro (P)	CAT His (H)	CGT Arg (R)
	CTC "	CCC "	CAC "	CGC "
	CTA "	CCA "	CAA Gln (Q)	CGA "
	CTG "	CCG "	CAG "	CGG "
A	ATT Ile (I)	ACT Thr (T)	AAT Asn (N)	AGT Ser (S)
	ATC "	ACC "	AAC "	AGC "
	ATA "	ACA "	AAA Lys (K)	AGA Arg (R)
	ATG Met (M)	ACG "	AAG "	AGG "
G	GTT Val (V)	GCT Ala (A)	GAT Asp (D)	GGT Gly (G)
	GTC "	GCC "	GAC "	GGC "
	GTA "	GCA "	GAA Glu (E)	GGA "
	GTG "	GCG "	GAG "	GGG "

10

【 0 0 7 8 】

20

L、R、およびSなどの任意の6重縮重

コドンは、実際には6重縮重以上を導入すると考えられるので、これらを回避することが好ましい。Lの場合、TTRおよびCTNは、YTN（8重縮重）を兼ね備えており、Rの場合、CGNおよびAGRは、MGN（8重縮重）を兼ね備えており、最後にSでは、TCNおよびAGYは、WSN（16重縮重）を兼ね備え得る。これらの3つ全ての場合において、6つが標的配列にマッチする。この特異性の喪失を回避するためには、これらの領域を回避するか、またはそれぞれが代わりの縮重コドンをもつ2つの集団、たとえばSについて一方のプールにTCNを、および他方にAGYを含む集団を作製することが好ましい。

【 0 0 7 9 】

30

プライマーは、Oligo Analyzer3.0；Oligo Calculator；NetPrimer；Methprimer；Primer3；WebPrimer；PrimerFinder；Primer9；Oligo2002；Pride or GenomePride；Oligos；およびCodehopを含む（しかし、これらに限定されるわけではない）多くの利用可能なコンピュータプログラムを使用してデザインしてもよい。これらのプログラムに関する詳細な情報は、たとえば、www.molbiol.netから得ることができる。

【 0 0 8 0 】

プライマーは、当業者に公知の標識を使用して標識してもよい。このような標識は、放射線、蛍光、色素、および酵素標識を含むが、これらに限定されるわけではない。

【 0 0 8 1 】

増幅産物の解析は、自動および手動ゲル電気泳動、質量分析等を含む、これらのサイズに従って増幅産物を分離することができる任意の方法を使用して行うことができる。

40

【 0 0 8 2 】

または、産物増幅は、SSCP、DGGE、TGGE、化学開裂、または制限酵素断片多型、並びに、たとえば、核酸アレイに対するハイブリダイゼーションを使用して、配列相違を使用して分離することができる。

【 0 0 8 3 】

核酸単離、増幅、および解析の方法は、当業者にとってルーチンであり、プロトコルの例は、たとえば、Molecular Cloning：A Laboratory Manual（3-Volume Set）Ed. Joseph Sambrook, David W. Russel, and Joe Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory；3rd edition（January 15, 2001），ISBN：0879695773において見いだすことができる。特に、PCR増幅に使用する方法についての有用なプロトコルの供与源は、PCR（Basics

50

: From Background to Bench) by M.J. McPherson, S.G. Moller, R. Beynon, C. Howe, Springer Verlag; 1st edition (October 15, 2000), ISBN: 0387916008である。

【0084】

好ましくは、ヒトEGFRのエキソン19および21は、以下のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)によって増幅される:

Exon19センスプライマー、

5'-GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC-3' (SEQ ID NO: 505)

; Exon19アンチセンスプライマー、

5'-CATAGAA AGTGAACATTTAGGATGTG-3' (SEQ ID NO: 506)

; Exon21センスプライマー、

5'-CTAACGTTTCG CCAGCCATAAGTCC-3' (SEQ ID NO: 507)

; およびExon21アンチセンスプライマー、

5'-GCTGCGAGCTCACCCAG AATGTCTGG-3' (SEQ ID NO: 508)

。

【0085】

代わりの態様において、試料細胞由来のEGFR遺伝子における突然変異は、制限酵素切断パターンの変化によって同定することができる。たとえば、試料DNAおよび対照DNAを単離し、増幅し(任意に)、1つまたは複数の制限エンドヌクレアーゼで消化し、断片長サイズをゲル電気泳動によって決定して比較する。試料DNAと対照DNAとの間の断片長サイズの相違は、試料DNAの突然変異を示す。さらに、配列特異的リボザイム(たとえば、米国特許第5,493,531号を参照されたい)を使用し、リボザイム切断部位の発生または喪失によって特異的突然変異の存在をスコアするために使用することができる。

【0086】

EGFR遺伝子の突然変異を検出するためのその他の方法は、RNA/RNAまたはRNA/DNAヘテロ二重鎖におけるミスマッチの塩基を検出するために、切断薬からの保護を使用する方法を含む。Myers, et al., 1985. Science 230: 1242を参照されたい。一般に、「ミスマッチ切断」の技術分野の技術では、組織試料から得た潜在的変異RNAまたはDNAと野生型EGFR配列を含む(標識された)RNAまたはDNAをハイブリダイズすることによって形成されるヘテロ二重鎖を提供することから始まる。二本鎖の二重鎖を対照と試料鎖との間に塩基対ミスマッチが存在することによるためであると考えられるものなどの二重鎖の一本鎖領域を、切断する薬剤で処置する。たとえば、RNA/DNA二重鎖では、RNaseで処置し、DNA/DNAハイブリッドでは、S1ヌクレアーゼで処置して、ミスマッチ領域を酵素的に消化することができる。その他の態様において、ミスマッチ領域を消化するために、DNA/DNAまたはRNA/DNA二重鎖をヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムで、およびピペリジンで処置することができる。ミスマッチ領域の消化の後、次いで生じる材料を変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズによって分離して、突然変異の部位を決定する。たとえば、Cotton, et al., 1988. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397; Saleeba, et al., 1992. Methods Enzymol. 217: 286-295を参照されたい。ある態様において、対照DNAまたはRNAは、検出のために標識することができる。

【0087】

さらにもう一つの態様において、ミスマッチ切断反応には、細胞の試料から得られたEGFR cDNAにおける点突然変異を検出し、およびマッピングするために定義された系において、二本鎖DNAのミスマッチした塩基対を認識する1つまたは複数のタンパク質(いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素)を使用する。たとえば、大腸菌(E. coli)のmutY酵素は、G/AミスマッチにてAを切断し、HeLa細胞由来のチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチにてTを切断する。Hsu, et al., 1994. Carcinogenesis 15: 1657-1662を参照され

10

20

30

40

50

たい。例示的態様によれば、変異体EGFR配列に基づくプローブ、たとえばDEL-1～DEL-5、G719S、G857V、L883S、またはL858R EGFR配列は、試験細胞由来のcDNAまたはその他のDNA産物に対してハイブリダイズする。二重鎖をDNAミスマッチ修復酵素で処置して、もしあれば、切断産物を電気泳動法プロトコル等によって検出することができる。米国特許第5,459,039号を参照されたい。

【0088】

その他の態様において、EGFR遺伝子における突然変異を同定するために、電気泳動移動度の変化が使用される。たとえば、変異体と野生型核酸との間の電気泳動移動度の相違を検出するために、単鎖高次構造多型 (SSCP) を使用してもよい。たとえば、Orita, et al., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 86: 2766; Cotton, 1993. Mutat. Res. 285: 125-144; Hayashi, 1992. Genet. Anal. Tech. Appl. 9: 73-79を参照されたい。試料および対照EGFR核酸の一本鎖DNA断片は、変性させ、再生させることができる。一本鎖核酸の二次構造が、配列に応じて変化し、生じる電気泳動移動度の変化により、一塩基変化でさえも検出することができる。DNA断片は、標識してもよく、または標識プローブで検出してもよい。二次構造が配列の変化に対してより感受性であるRNA (DNAよりもむしろ) を使用することによって、アッセイ法の感受性を増強してもよい。一つの態様において、本方法は、ヘテロ二重鎖解析を利用して、電気泳動移動度の変化に基づいて二本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離する。Keen, et al., 1991. Trends Genet. 7: 5を参照されたい。

【0089】

さらにもう一つの態様において、変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を使用して、変性剤の勾配を含むポリアクリルアミドゲルにおける変異体または野生型断片の移動をアッセイする。Myers, et al., 1985. Nature 313: 495を参照されたい。解析法としてDGGEを使用するときは、DNAを、これが完全に変性させないことを確実にするように、たとえばPCRによって約40bpの高融点のGCリッチなDNAのGCクランプを付加することによって修飾する。さらなる態様において、対照および試料DNAの移動度の相違を同定するために、変性勾配の代わりに温度勾配が使用される。たとえば、Rosenbaum and Reissner, 1987. Biophys. Chem. 265: 12753を参照されたい。

【0090】

点突然変異を検出するためのその他の技術の例は、選択的オリゴヌクレオチド・ハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長を含むが、これらに限定されるわけではない。たとえば、オリゴヌクレオチドプライマーを、公知の突然変異が中央に配置するように調製し、次いで完全マッチが見いだされる場合にのみハイブリダイゼーションが可能な条件下で標的DNAにハイブリダイズさせてもよい。Saiki, et al., 1986. Nature 324: 163; Saiki, et al., 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6230を参照されたい。このような対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズする膜に付着して、標識された標的DNAとハイブリダイズするときに、PCR増幅された標的DNAまたは多数の異なる突然変異にハイブリダイズする。

【0091】

または、選択的PCR増幅に依存的な対立遺伝子特異的増幅技術を本発明と組み合わせて使用してもよい。特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、分子の中央に (その結果、増幅は、ディファレンシャル・ハイブリダイゼーションに依存する; Gibbs, et al., 1989. Nucl. Acids Res. 17: 2437-2448を参照されたい)、または一方のプライマーの3'末端に関心対象の突然変異を有していてもよく、この場合、適切な条件下で、ミスマッチにより、ポリメラーゼ伸張を防げ、または減少させ得る (たとえば、Prossner, 1993. Tibtech. 11: 238を参照されたい)。加えて、切断に基づいた検出を行うためには、突然変異の領域に新たな制限部位を導入することが望ましい。たとえば、Gasparini, et al., 1992. Mol. Cell Probes 6: 1を参照されたい。ある態様において、増幅は、増幅のためのTaqリガーゼを使用して行ってもよいことが予期される。Barany, 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189を参照されたい。このような場合、完全マッチが5'配列の3'末端にある場合にのみ、ライゲーションが生じ、増幅の有無につい

て検索することによって特定の部位における公知の突然変異の存在を検出することができる。

【0092】

固体支持体およびプローブ

代わりの態様において、少なくとも1つの核酸相違の有無の検出は、上で同定したerbB 1遺伝子の所望の領域に対応する核酸配列をプローブと接触させる工程を含む。プローブは、たとえば、差動的結合またはハイブリダイゼーションによって、遺伝子の特定の形態もしくは存在、または特定の相違を区別することができる。したがって、例示的プローブは、核酸ハイブリダイゼーションプローブ、ペプチド核酸プローブ、ヌクレオチド含有プローブ（これは、少なくとも1つのヌクレオチド類似体も含む）、および抗体、たとえばモノクローナル抗体、並びに本明細書にて論議したその他のプローブを含む。当業者は、特定の特異性をもつプローブの調製に精通している。当業者であれば、塩濃度、温度、pHの変化、およびテトラメチル塩化アンモニウムなどのGC対AT塩基対の差動的親和性に影響を及ぼす種々の化合物の付加を含む種々の変数を、遺伝子の2つの変異型の間の識別を最適化するように調整することができることを認識するであろう（Current Protocols in Molecular Biology by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, K. Struhl および V. B. Chanda (Editors), John Wiley & Sons.を参照されたい）

10

【0093】

したがって、好ましい態様において、少なくとも1つの相違の有無の検出は、少なくとも1つの相違部位を含む核酸配列をプローブ、好ましくは核酸プローブと接触させる工程を含み、この場合、プローブは、相違部位に非相補的塩基を有する核酸配列の形態に対するハイブリダイゼーションと比較して、相違部位にて相補的塩基を含む核酸配列の形態と優先してハイブリダイズするし、ハイブリダイゼーションは、選択的ハイブリダイゼーション条件下で実施される。このような核酸ハイブリダイゼーションプローブは、2つ以上の相違部位にわたってもよい。他に特定されない限り、核酸プローブは、塩基対合機能が保持される限り、1つもしくは複数の核酸類似体、標識、またはその他の置換基もしくは部分を含むことができる。

20

【0094】

プローブは、たとえばSEQ ID NO: 495、SEQ ID NO: 497、またはSEQ ID NO: 499の欠失領域の両側の最後の3つの連続するヌクレオチドに結合するようにデザインしてもよい。このようなプローブは、適切な条件下でハイブリダイズしたときに、EGFRの変異型と結合するが、野生型のEGFRとは結合しない。

30

【0095】

このようなハイブリダイゼーションプローブは、当技術分野において周知である（たとえば、Sambrook et al., Eds., (most recent edition), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (third edition, 2001), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.を参照されたい）。ストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件は、典型的には約1M未満、より一般的には、約500mM未満、好ましくは約200mM未満の塩濃度を含む。ハイブリダイゼーション温度は、5 程度の低さであることができるが、典型的に22 よりも高く、より典型的には約30 よりも高く、および好ましくは約37 よりも高い。特異的なハイブリダイゼーションのためには、断片が長くなるにつれて、ハイブリダイゼーション温度も高くする必要があり得る。相補鎖の塩基組成および長さ、有機溶媒の存在、並びに塩基ミスマッチの範囲を含むその他の要因も、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに影響を及ぼし得るし；使用するパラメータの組み合わせは、いずれか単独での絶対測定よりも重要である。制御され得るその他のハイブリダイゼーション条件は、緩衝液タイプおよび濃度、溶液pH、バックグラウンド結合を減少させるためのブロッキング試薬（たとえば、反復配列、Cot1 DNA、ブロッキングタンパク質溶液）の存在および濃度、洗浄剤タイプおよび濃度、ポリヌクレオチド、金属イオン、およびこれらの濃度の相対濃度を増大する重合体などの分子、キレート剤およびこれらの濃度、並

40

50

びに当技術分野において公知か、または発見できるその他の条件を含む。所与のプロープについて完全相補的な配列に対する最適な融解温度を予測するために、公式を使用してもよいが、ハイブリダイゼーション条件のセット下でのプロープに関する真の融解温度は、経験的に決定しなければならない。また、Sambrook et al, "Molecular Cloning," 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001に記載されているような条件の所与のセット下における正確な融解温度を決定するために、プロープをその正確な相補物に対して試験してもよい。ハイブリダイゼーション温度は、所望のストリンジェンシーのレベルにて、高度な相補性をもつ標的ポリヌクレオチドだけがハイブリダイズする場合、高ストリンジェンシーにて、またはプロープと相補的な領域を有するさらなる標的ポリヌクレオチドが、非相補的標的ポリヌクレオチドに対する、および支持体に対する非特異的結合によってもたらされるバックグラウンドレベル以上に検出可能にハイブリダイズする場合、より低いストリンジェンシーにて、いずれかで検出可能なプロープの結合を検出できる温度範囲が同定されるまで、標的ポリヌクレオチドと関連する支持体を使用して所与のハイブリダイゼーション溶液のために系統的に変更することができる。所与の条件セット下で支持体上の潜在的標的ポリヌクレオチドでハイブリダイゼーションを行うときは、バックグラウンド結合が別の陽性シグナルが見えうる位置まで下がるまで、ストリンジェンシーの条件を増大して（典型的には、塩濃度を低下し、および/または温度を増大するが、その他の条件を変更してもよい）、次いで支持体を洗浄する。これは、プロープが放射標識されている場合はX線撮影でガイガーカウンターを使用して、蛍光イメージャーを使用して、またはプロープ結合を検出する他の手段によって、進行中にモニターすることができる。支持体は、このような手順の間に乾燥させることができないか、またはプロープは、バックグラウンド位置に対してさえも不可逆的に結合してしまうかもしれない。プロープが、望ましくないバックグラウンドまたは偽陽性を生じる場合、陽性シグナルをバックグラウンドから区別することができるまで、ブロッキング試薬を使用するか、またはプロープの異なる領域もしくは異なるプロープを使用する。一旦、バックグラウンド以上の満足なシグナルを提供する状態が見いだされたら、陽性シグナルを提供する標的ポリヌクレオチドを単離して、さらに特徴づける。単離されたポリヌクレオチドをシーケンスすることができ；配列をデータバンク項目または公知の配列と比較することができ；必要な場合には、全長クローンを当技術分野において公知の技術によって得ることができ；かつポリヌクレオチドを適切なベクターおよび宿主を使用して発現させて、同定されたポリヌクレオチドが、プロープポリヌクレオチドが由来するものと同様の活性を有するタンパク質をコードするかどうかを決定することができる。プロープは、10~50ヌクレオチドであることができる。しかし、より大きな（larger）、たとえば50~500ヌクレオチド以上大きいプロープを使用することができる。

【0096】

固相支持体

本発明の固相支持体は、ヌクレオチド・ハイブリダイゼーションおよび合成を補助するために適した任意の固体物質並びに構造であることができる。好ましくは、固相支持体は、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプライマーを固定することができる少なくとも1つの実質的に堅い表面を含む。固相支持体は、たとえば、ガラス、合成重合体、プラスチック、硬い非メッシュ・ナイロン、またはセラミックで作製することができる。その他の適切な固体支持物質が公知であり、当業者が直ちに利用することができる。固体支持体のサイズは、DNAマイクロアレイ技術のために有用な任意の標準的マイクロアレイのサイズであることができ、サイズは、本発明の反応を行うために使用される特定の機械に合うように調整してもよい。オリゴヌクレオチドを固定するための固相支持体を誘導体化するための方法および材料は、当業者に公知であり、たとえば、米国特許第5,919,523号に記載されており、その開示は、参照として本明細書に組み入れられる。

【0097】

固体支持体は、液体含有容器内に、または一部に提供することができる。たとえば、固体支持体は、支持体上にポリメラーゼ連鎖反応法（PCR）を封じ込めるために、チャンバ

ーに側部と共に配置して、固体支持体の端に沿ってシールを作製することができる。具体例では、チャンバーは、PCR混合物が確実に支持体上に残るように、さらにプライマーを提供するために有用な全表面を生じるように、矩形の支持体のそれぞれの側部に壁を有することができる。

【0098】

本発明のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドプライマーは、固体支持体上の特定の位置にオリゴヌクレオチドを固定し、固定化し、提供し、および/または適用するための任意の利用可能な手段を使用して、貼り付け、固定化し、提供し、および/または適用される。たとえば、米国特許第5,919,523号、第5,837,832号、第5,831,070号、および第5,770,722号（これらは、参照として本明細書に組み入れられる）に記載されているように、フォトリソグラフィ（Affymetrix, Santa Clara, Calif.）を使用して、チップまたは固体支持体上の特定位置にオリゴヌクレオチドプライマーを適用することができる。また、オリゴヌクレオチドプライマーは、BrownおよびShalon（米国特許第5,807,522号（1998））に記載されているように固体支持体に適用してもよい。加えて、プライマーは、Genetic MicroSystems（Woburn, Mass.）、GeneMachines（San Carlos, Calif.）、またはCartesian Technologies（Irvine, Calif.）によって製造されるものなどのロボット・システムを使用して固体支持体に適用してもよい。

10

【0099】

本発明の一つの局面において、生体試料由来の標的ポリヌクレオチドの固相増幅が行われ、オリゴヌクレオチドプライマーの複数群が、固相支持体上に固定される。好ましい態様において、群内のプライマーは、少なくとも配列が同一であり、かつ標的ポリヌクレオチドの定義された配列に対して相補的であり、適切な条件下で標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズすることができ、かつ核酸合成（すなわち、鎖伸長または伸張）のための初期プライマーとして適切である第一のプライマーセットを含む。参照配列の特定領域をカバーする選択されたプライマーを、群として、別々の位置にて、固体支持体上に固定する。好ましくは、群間の距離は、増幅産物を検出するために使用される検出手段の分解能よりも大きい。好ましい態様において、プライマーを固定して、マイクロアレイまたはチップを形成し、これを自動化されたプロセッシングを介してプロセスして、解析することができる。固定されたプライマーは、核酸増幅手段のために適した条件下で、標的ポリヌクレオチドの固相増幅のために使用する。このように、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける種々の潜在的相違の有無を、1つのアッセイ法で決定することができる。

20

30

【0100】

健康な個体から単離された標的ポリヌクレオチドの集団は、生物源がerbB 1遺伝子のキナーゼドメインに少なくとも1つのキナーゼ活性を増大する相違を有するかどうかを決定する際の対照として使用することができる。または、同じ個体の健康な組織から単離された標的ポリヌクレオチドを、上記の様に対照として使用してもよい。

【0101】

マイクロアレイ上のインサイチュー型PCR反応は、本質的に、たとえばEmbretson et al, Nature 362: 359-362 (1993); Gosden et al, BioTechniques 15 (1): 78-80 (1993); Heniford et al Nuc. Acid Res. 21 (14): 3159-3166 (1993); Long et al, Histochemistry 99: 151-162 (1993); Nuovo et al, PCR Methods and Applications 2 (4): 305-312 (1993); Patterson et al Science 260: 976-979 (1993)に記載されているように行うことができる。

40

【0102】

または、erbB 1のキナーゼドメインにおける相違は、支持体上でPCRを行うことなく、固相法によって決定することができる。それぞれがerbB 1のキナーゼドメインに異なる相違を含む複数のオリゴヌクレオチドプローブを、二組、三組、または四組で固相支持体に結合していてもよい。試験生体試料における相違の有無は、当業者に公知であり、および上に記載されている選択的ハイブリダイゼーション技術によって検出してもよい。

【0103】

50

質量分析

もう一つの態様において、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおけるキナーゼ活性を増大する核酸相違の有無は、質量分析法を使用して決定される。質量分析を行う核酸分子の適切な量を得るためには、増幅が必要かもしれない。本発明に使用するための適切な増幅手順の例は、以下を含む：クローニング (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001))、ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) (C. R. Newton and A. Graham, PCR, BIOS Publishers, 1994)、リガーゼ連鎖反応 (LCR) (Wiedmam, M., et al., (1994) PCR Methods Appl. Vol. 3, Pp. 57-64; F. Barnay Proc. Natl. Acad. Sci USA 88, 189-93 (1991)、鎖置換増幅 (SDA) (G. Terrance Walker et al., Nucleic Acids Res. 22, 2670-77 (1994))、並びにRT-PCR (Higuchi, et al., Bio/Technology 11: 1026-1030 (1993))、対立遺伝子特異的増幅 (ASA)、および転写に基づいたプロセスなどの変種。

10

【0104】

質量分光分析を容易にするために、検出される核酸配列を含む核酸分子を固体支持体に固定化することができる。適切な固体支持体の例は、ビーズ

(たとえば、シリカゲル、制御された細孔ガラス、磁性物質、セファデックス/セファロース、セルロース)、平坦な表面またはチップ(たとえば、ガラスファイバーフィルタ、ガラス面、金属表面(鋼、金、銀、アルミニウム、銅、およびシリコン)、毛管、プラスチック(たとえば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニリデンジフルオライド膜、またはマイクロタイタープレート);またはビーズを含む同様の材料から作製されたピンもしくは櫛、またはウエハ(たとえば、シリコンウエハ)などの平らな表面のくぼみに配置された平坦な表面またはビーズを含む。

20

【0105】

固定化は、また、たとえば支持体に対してすでに固定された捕獲核酸配列と検出される核酸配列を含む核酸分子の内に含まれる相補核酸配列との間のハイブリダイゼーションに基づいて達成することができる。その結果、相補核酸分子との間のハイブリダイゼーションが支持体によって妨げられず、捕獲核酸は、固体支持体と捕獲核酸配列との間の少なくとも約5ヌクレオチドの長さのスペーサー領域を含むことができる。形成される二重鎖は、レーザーパルスの働きによって切断して、脱離を開始させることができる。固体支持体に結合した塩基配列は、天然のオリゴリボもしくはオリゴデオキシリボヌクレオチド、並びに類似体(たとえば、チオ修飾されたリン酸ジエステルまたはリン酸トリエステル・バックボーン)を介して、またはPNA類似体などのオリゴヌクレオチド擬態を使用して(これは、酵素的分解に対する塩基配列の感受性をより低くし、それ故、固体支持体に結合した捕獲塩基配列の全体の安定性を増大する)、提示することができる(たとえば、Nielsen et al., Science, 254, 1497 (1991)を参照されたい)。

30

【0106】

質量分光分析の前に、核酸分子を「順化させる」こと、たとえば揮発のために必要とされるレーザー・エネルギーを減少させること、および/または断片化を最小化することが有用であるかもしれない。順化は、好ましくは標的検出部位を固定する間に行われる。順化の例は、核酸分子のホスホジエステルバックボーンの修飾(たとえば、陽イオン交換)であり、これは、ヌクレオチド単位あたりの結合した陽イオンが不均一であることによる、ピークブロードニングを除去するために有用である。アルキルヨード、ヨードアセトアミド、 γ -ヨードエタノール、2,3-エポキシ-1-プロパノールなどのアルキル化剤と核酸分子を接触させることにより、核酸分子のモノチオホスホジエステル結合をリン酸トリエステル結合に変換することができる。同様に、トリアルキルシリルクロライドを使用して、ホスホジエステル結合を無電荷の誘導体に変換してもよい。さらなる順化には、脱プリン(MSの間の断片化)に対する感受性を減少させるために、N7-またはN9-デアザプリン・ヌクレオチドなどのヌクレオチドもしくはRNAビルディングブロックの取り込み、またはオリゴヌクレオチドトリエステルの使用、またはアルキル化されたか、またはPNAなどのオリゴヌクレオチド擬態を使用するホスホリチオアート官能基の取り込みを含む。

40

50

【0107】

一定の適用については、特定の捕獲された核酸断片上の複数の（変異された）座位を同時に（アレイの1点において）検出することが有用であり得るし、または種々の固体支持体上のオリゴヌクレオチドもしくはオリゴヌクレオチド擬態のアレイを使用することによって、並列処理を行うことが有用であり得る。「多重化」は、いくつかの異なる方法によって達成することができる。たとえば、いくつかの突然変異を、対応する検出器（プローブ）分子（たとえば、オリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド擬態）を同時に使用することによって、1つの標的配列上で検出することができる。しかし、検出器オリゴヌクレオチドD1、D2、およびD3間の分子重量の相違は、同時検出（多重化）が可能性のように十分に大きくなければならない。これは、配列自体（組成物または長さ）によって、または検出器オリゴヌクレオチド内への質量修飾官能性M1-M3の導入によって達成することができる。

10

【0108】

本発明に使用するための好ましい質量分析形式は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化（MALDI）、エレクトロスプレー（ES）、イオンサイクロトロン共鳴（ICR）、およびフーリエ変換である。質量分析を行う方法は、当業者に公知であり、およびMethods of Enzymology, Vol. 193: "Mass Spectrometry" (J. A. McCloskey, editor), 1990, Academic Press, New Yorkにさらに記載されている。

【0109】

シーケンシング

その他の好ましい態様において、少なくとも1つのキナーゼ活性を増大する核酸相違の有無を決定することには、少なくとも1つの核酸配列をシーケンシングすることを含む。シーケンシングは、少なくとも1つの相違部位を含む、erbB 1のキナーゼドメインの部分のシーケンシングを含み、複数のこのような部位を含んでいてもよい。好ましくは、部分は、500ヌクレオチド以下の長さ、より好ましくは100ヌクレオチド以下、および最も好ましくは45ヌクレオチド以下の長さである。このようなシーケンシングは、ジデオキシ終結法の使用（たとえば、色素標識されたジデオキシヌクレオチドの使用）、ミニシーケンシング、および質量分析法の使用を含む、当業者によって認識される種々の方法によって実施することができる。

20

【0110】

免疫検出

一つの態様において、少なくとも1つのキナーゼ活性を増大する核酸相違の有無を決定することには、EGFRの下流の標的の活性化状態を決定することを含む。

30

【0111】

本出願の発明者らは、EGFRの主要な下流の標的のリン酸化状態を比較した。たとえば、EGF誘導される、Rasを経たErk1およびErk2の活性化、PLC /PI3Kを経たAktの活性化、並びにJAK2を経たSTAT3およびSTAT5の活性化を調べた。Rasを経たErk1およびErk2の活性化、PLC /PI3Kを経たAktの活性化、並びにJAK2を経たSTAT3およびSTAT5の活性化は、EGFRの発癌効果を媒介する必須の下流の経路である（R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284, 31 (2003)）。

40

【0112】

本出願の発明者は、EGFで誘導されるErk活性化が、野生型EGFR、または2つの活性化しているEGFR変異体のいずれかを発現する細胞の間で見分けがつかないことを示した。

【0113】

対照的に、AktおよびSTAT5のリン酸化は、変異体EGFRsのいずれを発現する細胞においても実質的に上昇した。STAT3のリン酸化の増大は、変異体EGFRを発現する細胞においても同じように観察した。したがって、選択的にEGFで誘導されるEGFR変異体内のC末端のチロシン残基の自己リン酸化は、下流のシグナリング経路の選択的活性化に十分に相関される。

【0114】

50

本出願の一つの態様において、EGFR突然変異の存在は、当技術分野において周知の免疫学的技術、たとえば免疫組織化学法、免疫細胞化学法、FACS走査、免疫プロット法、放射免疫アッセイ法、ウエスタンブロッティング法、免疫沈降法、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）などの抗体技術、および活性化されたEGFRの下流の標的に対して向けられた抗体を利用する誘導体技術を使用して決定することができる。このような標的の例は、たとえばリン酸化されたSTAT3、リン酸化されたSTAT5、およびリン酸化されたAktを含む。リン酸特異的抗体を使用して、STAT3、STAT5、およびAktの活性化状態を決定することができる。STAT3、STAT5、およびAktの活性化は、活性化しているEGFR突然変異の診断指標として有用である。

【0115】

10

本発明の一つの態様において、活性化された（リン酸化された）STAT5、STAT3、またはAktの存在は、EGFRターゲティング治療が有効である可能性が高いことを示す。

【0116】

本発明は、免疫組織化学的または免疫細胞化学的方法によって、試験生体試料におけるerbB 1遺伝子のキナーゼドメインの変異体についてスクリーニングする方法を提供する。

【0117】

たとえば、免疫組織化学（「IHC」）および免疫細胞化学（「ICC」）技術を使用してもよい。IHCは、組織切片に対する免疫化学の適用であり、一方、ICCは、細胞または組織が、たとえば液体に基づいた調製などの特定の細胞学的調製を受けた後の、これらに対する免疫化学の適用である。免疫化学は、特異的抗体の使用に基づく技術のファミリーであり、抗体は、細胞内または細胞上の分子を特異的にターゲットするために使用される。抗体は、典型的には、ターゲットされた分子に遭遇すると即座に生化学的反応を受け、これにより色変化を受けるマーカーを含む。いくつかの場合には、マーカー染料を含む二次抗体を一次特異抗体に適用することを伴うシグナル増幅を特定のプロトコルに組み込んでもよい。

20

【0118】

免疫組織化学的アッセイ法は、当業者に公知である（たとえば、Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 101:976-985（1985）；Jalkanen, et al., J. Cell. Biol. 105:3087-3096（1987））。

【0119】

30

抗体（ポリクローナルまたはモノクローナル）は、種々の市販の供給元から購入することができ、またはたとえば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, 2nd Ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.（1988）に記載されているように周知の方法を使用して製造してもよい。一般に、本発明に有用な抗体の例は、抗リン酸STAT3、抗リン酸STAT5、および抗リン酸Akt抗体を含む。このような抗体は、たとえば、Upstate Biotechnology（Lake Placid, NY）、New England Biolabs（Beverly, MA）、NeoMarkers（Fremont, CA）から購入することができる。

【0120】

典型的には、免疫組織化学のために組織切片を患者から得て、抗体に対して反応するアルコール、アセトン、およびパラホルムアルデヒドなどの適切な固定剤によって固定する。免疫組織化学のための従来法は、Harlow and Lane（eds）（1988）In “Antibodies A Laboratory Manual”，Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York；Ausbel et al（eds）（1987），in Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley and Sons（New York, NY）に記載されている。このような検出アッセイ法に適した生体試料は、細胞、組織生検、全血、血漿、血清、痰、脳脊髄液、乳房吸引液、胸腔内液、尿などを含むが、これらに限定されるわけではない。

40

【0121】

直接標識化技術のためには、標識された抗体が利用される。間接的標識化技術のためには、試料を標識された物質とさらに反応させる。

【0122】

50

または、免疫細胞化学を利用してもよい。一般に、細胞を患者から得て、抗体に対して反応するアルコール、アセトン、およびパラホルムアルデヒドなどの適切な固定剤によって固定する。ヒト試料の免疫細胞学的染色法は、当業者に公知であり、たとえば、Brauer et al., 2001 (FASEB J, 15, 2689-2701), Smith-Swintosky et al., 1997に記載されている。

【0123】

本発明の免疫学的方法は、これらが少量の生物物質だけしか必要としないので有利である。このような方法は、細胞レベルで行ってもよく、これにより最小限の1細胞が必要となる。好ましくは、癌に冒されているか、または発症するリスクがあり、かつ本発明の方法に従ってアッセイされる患者から、いくつかの細胞を得る。

【0124】

その他の診断方法

変異体EGFRタンパク質を検出するための薬剤は、変異体EGFRタンパク質、好ましくは検出可能な標識をもつ抗体に対して結合することができる抗体である。抗体は、ポリクローナルであることができる、またはより好ましくは、モノクローナルであることができる。無処置の抗体、またはこれらの断片（たとえば、 F_{ab} もしくは $F_{(ab)_2}$ ）を使用することができる。プローブまたは抗体に関して、「標識された」という用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体に結合する（すなわち、物理的に連結する）ことによるプローブまたは抗体の直接の標識化、並びに直接標識されている別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接的な標識化を包含することが企図される。間接的な標識化の例は、蛍光標識した二次抗体を使用する一次抗体の検出および蛍光標識したストレプトアビジンで

ビオチンを検出することができるように、ビオチンでのDNAプローブの末端標識化を含む。「生体試料」という用語は、被検者から単離された組織、細胞、および体液、並びに被検者内に存在する組織、細胞、および体液を含むことが企図される。すなわち、本発明の検出方法を使用して、インビトロ並びにインビボで、生体試料中の変異体EGFR mRNA、タンパク質、またはゲノムDNAを検出することができる。たとえば、変異体EGFR mRNAの検出のためのインビトロでの技術には、ノーザンブロット法およびインサイチュハイブリダイゼーション法を含む。変異体EGFRタンパク質の検出のためのインビトロでの技術は、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ウエスタンブロット、免疫沈降法、および免疫蛍光法を含む。変異体EGFRゲノムDNAの検出のためのインビトロでの技術は、サザンブロット法を含む。さらにまた、変異体EGFRタンパク質の検出のためのインビボの技術は、標識された抗変異体EGFRタンパク質抗体を被検者に導入することを含む。たとえば、抗体は、被検者内の存在および位置を標準的撮像技術によって検出することができる放射性マーカーで標識することができる。

【0125】

一つの態様において、生体試料は、試験被検者由来のタンパク質分子を含む。または、生体試料は、試験被検者由来のmRNA分子または試験被検者由来のゲノムのDNA分子を含むことができる。

【0126】

もう一つの態様において、本方法は、対照被検者から対照生体試料を得る工程、変異体EGFRタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在を生体試料中で検出できるように、変異体EGFRタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAを検出することができる化合物または薬剤と対照試料を接触させる工程、および試験試料中の変異体EGFRタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在と、対照試料中の変異体EGFRタンパク質、mRNA、またはゲノムDNAの存在とを比較する工程をさらに含む。

【0127】

異なる態様において、診断アッセイ法は、変異体EGFR活性に関する。特定の態様において、変異体EGFR活性は、チロシンキナーゼ活性である。1つのこのような診断のアッセイ法は、EGFRを媒介した少なくとも1つのEGFR基質のリン酸化を検出するためにある。たとえば、EGFR活性のレベルを種々の変異体EGFRポリペプチド、変異体EGFRを含む種々の組織

10

20

30

40

50

、少なくとも1つの変異体EGFRを有することが疑われる癌組織由来の生検等についてアッセイすることができる。同じもののこれらの種々の細胞、組織、または抽出物中のEGFR活性のレベルの比較を任意に行うことができる。一つの態様において、癌組織においてEGFR活性が高いレベルであることにより、癌が1つまたは複数のチロシンキナーゼ阻害剤での治療に感受性であり得ることが診断される。関連した態様において、EGFR活性レベルを処置したものと未処置の生検試料、株化細胞、トランスジェニック動物、またはこれらの任意の抽出物との間で決定して、変異体EGFR活性に対する所与の治療の効果を未処置の対照と比較して決定することができる。

【0128】

患者を治療する方法

一つの態様において、本発明は、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける少なくとも1つのキナーゼ活性を増大する核酸相違の有無を決定することによって、癌に冒されているか、または発症するリスクのある患者に対する治療を選択するための方法を提供する。もう一つの態様において、相違は、複数の相違であることにより、1、2、3、またはそれ以上の遺伝子座位由来の相違を多数含んでもよい。

【0129】

ある態様において、少なくとも1つの相違の存在は、治療が、患者において有効か、またはさもなければ有益であろう（または、有益である可能性がより高い）ことを示す。治療が有効であろうとは、有益な治療的効果の確率が、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける特定のキナーゼ活性を増大する核酸相違に該当する存在を有していない人よりも高いことを意味することを述べておく。

【0130】

治療は、チロシンキナーゼ阻害剤の投与を含む。治療は、チロシンキナーゼ阻害剤の、その他のチロシンキナーゼ阻害剤、化学療法、放射線などの併用を含む（しかし、これらに限定されるわけではない）治療の併用を含んでもよい。

【0131】

したがって、癌「に対して有効な」薬物であるチロシンキナーゼ阻害剤の投与に関しては、臨床的に適した様式で投与することにより、少なくとも患者の統計学的に有意な割合に対して有益な効果、たとえば症候の改善、治癒、疾患負荷の減少、腫瘍質量もしくは細胞数の減少、生命延長、生活の質の改善、または疾患もしくは状態の特定の型を治療によく精通した医師によって一般に陽性と認識されるその他の効果を生じることを示す。

【0132】

好ましい態様において、化合物は、アニリノキナゾリンまたは合成アニリノキナゾリンである。欧州特許公開第0566226号は、上皮細胞成長因子（EGF）受容体チロシンキナーゼに対して活性を有するアニリノキナゾリンを開示する。また、欧州特許出願第0520722号および第0566226号から、一定の4-アニリノキナゾリン誘導体が受容体チロシンキナーゼの阻害剤として有用であることが公知である。これらの化合物によって示される非常に厳密な構造-活性相関から、キナゾリン環がアデニンポケットで結合し、アニリノ環が隣接した独特の親油性ポケットで結合するという明確に定義された結合様式を示唆する。3つの4-アニリノキナゾリン類似体（2つの可逆的阻害剤および1つの不可逆的阻害剤）が、抗癌薬として臨床的に評価されている。Denny, *Farmaco* January-February 2001; 56 (1-2): 51-6。または、化合物は、EGF受容体キナーゼの阻害剤のEKB-569 (Torrance et al., *Nature Medicine*, vol. 6, No. 9, Sept. 2000, p. 1024) である。最も好ましい態様では、化合物は、ゲフィチニブ（イレッサ（登録商標））またはエルロチニブ（タルセバ（登録商標））である。

【0133】

本明細書に記載されている少なくとも1つの変異体EGFRを含む癌細胞をターゲットする治療では、単独で、または当業者に公知の任意のその他の適切な抗癌治療および/または治療薬と併せて投与してもよい。一つの態様において、癌などの病態の治療が必要な被検者に対して、ゲフィチニブ、エルロチニブ、その他などのEGFRキナーゼ活性を阻害する化

10

20

30

40

50

合物の治療上有効な量を投与することを含む、癌などの病態の治療が提供され、単独で、または少なくとも1つのその他の抗癌剤もしくは療法と併せて投与される。ターゲットされる小分子薬物または抗体に基づいたストラテジーの使用を介した、活性化されたプロテインキナーゼの阻害は、癌療法に有効なアプローチとして登場した。たとえば、G. D. Demetri et al., N. Engl. J. Med. 347, 472 (2002); B. J. Druker et al., N. Engl. J. Med. 344, 1038 (2001); D. J. Slamon et al., N. Engl. J. Med. 344, 783 (2001)を参照されたい。

【0134】

一つの態様において、抗癌剤は、少なくとも1つの化学療法薬である。関連する態様において、抗癌剤は、少なくとも1つの放射線療法である。変異体態様において、抗癌療法は、抗血管形成療法である（たとえば、エンドスタチン、アンジオスタチン、TNP-470、カプロスタチン（Stachi-Fainaro et al., Cancer Cell 7(3), 251 (2005)））。

10

【0135】

治療薬は、同じでも、または異なってもよく、たとえば、治療的放射性核種、薬物、ホルモン、抗ホルモン、受容体アンタゴニスト、酵素、または別の薬剤、自己分泌、サイトカイン、もしくは当業者に公知の任意の適切な抗癌剤によって活性化される酵素前駆体であってもよい。一つの態様において、抗癌剤は、固形癌および血液癌に対する癌の抗血管形成療法において良好であるということが証明された抗VEGF抗体のアバスチンである。たとえば、Ribatti et al. 2003 J Hematother Stem Cell Res. 12 (1), 11-22を参照されたい。また、本発明の方法に毒素を使用することもできる。本発明に有用なその他の治療薬は、抗DNA、抗RNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、抗タンパク質、および抗クロマチン細胞障害薬または抗菌薬などの放射標識されたオリゴヌクレオチドを含む。その他の治療薬も当業者に公知であり、本発明によるこのようなその他の治療薬の使用が、具体的に想定される。

20

【0136】

抗腫瘍薬は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、ホルモン薬、抗菌薬、抗体、抗癌生物製剤、グリベック、コルヒチン、ピンカアルカロイド、L-アスパラギナーゼ、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、ミトタン、ニトロソ尿素、またはイミダゾールカルボキサミドなどの多くの化学療法薬のうちの1つであってもよい。適切な薬剤は、チューブリンの脱分極を促進するか、または腫瘍細胞増殖を妨げる薬剤である。本発明の範囲内として想定される化学療法薬は、the Food and Drug Administration and the U.S. Department of Health and Human Servicesによって編集された、the Orange Book of Approved Drug Products With Therapeutic Equivalence Evaluationsに一覧が記載された抗癌剤を含むが、これらに限定されるわけではない。化学療法薬の非限定の例は、たとえば、カルボプラチンおよびパクリタキセルを含む。また、EGFRキナーゼ活性をターゲットする治療は、放射線療法の治療と共に投与することができる。当技術分野において公知のさらなる抗癌治療も、本発明の範囲内であると想定される。

30

【0137】

治療薬は、化学療法薬であってもよい。化学療法薬は、当技術分野において公知であり、少なくともタキサン、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホナート、ニトロソ尿素、トリアゼン；葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体、ピンカアルカロイド、抗生物質、酵素、白金配位化合物、置換された尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、またはアンタゴニストを含む。より具体的には、化学療法薬は、ステロイド、プロゲステロン、エストロゲン、抗エストロゲン、またはアンドロゲンの非限定の群より選択される1つまたは複数の薬剤であってもよい。さらに具体的には、化学療法薬は、アザリビン、プレオマイシン、プリオスタチン-1、ブスルファン、カルムスチン、クロランブシル、カルボプラチン、シスプラチン、CPT-11、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デキサメサゾン、ジェチルスチルベストロール、ドキシソルビシン、エチニルエストラジオール、エトポシド、フルオロウラシル、フルオキシメステロン、ゲムシタビン、カプロン酸ヒドロキシプロ

40

50

ゲステロン、ヒドロキシ尿素、L-アスパラギナーゼ、ロイコボリン、ロムスチン、メクロレタミン、メドロプロゲステロンアセテート、メゲストロールアセテート、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキセート、メトトレキセート、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトタン、パクリタキセル、フェニル・ブチラート、プレドニゾン、プロカルバジン、セムスチンストレプトゾシン、タモキシフェン、タキサン、タキソール、テストステロンプロピオン酸、サリドマイド、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビンブラスチン、またはビンクリスチンであってもよい。また、化学療法薬の任意の組み合わせの使用が想定される。化学療法薬の投与は、EGFR活性をターゲットする治療の適用の前、間、または後であってもよい。

【0138】

その他の適切な治療薬は、放射性同位元素、ホウ素付加物、免疫調節物質、毒素、光活動性薬剤または色素、癌化学療法剤、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗菌剤、抗原虫薬、および化学増感剤からなる群より選択される（米国特許第4,925,648号および第4,932,412号を参照されたい）。適切な化学療法薬は、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995) に、およびGoodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics (Goodman et al., Eds. Macmillan Publishing Co., New-York, 1980 and 2001 editions) に記載されている。実験用の薬物などのその他の適切な化学療法薬が、当業者に公知である。さらに、適切な治療的放射性同位元素は、⁻エミッタ、⁻エミッタ、⁻エミッタ、オージェ電子エミッタ、⁻粒子を放射する中性子捕獲薬、および電子捕獲によって壊変する放射性同位元素からなる群より選択される。好ましくは、放射性同位元素は、²²⁵Ac、¹⁹⁸Au、³²P、¹²⁵I、¹³¹I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁶⁷Cu、¹⁷⁷Lu、²¹³Bi、¹⁰B、および²¹¹Atからなる群より選択される。

【0139】

複数の治療薬が使用される場合、これらは同じでも、または異なってもよい。たとえば、治療薬は、異なる放射性核種、または1つの薬物および1つの放射性核種を含んでもよい。好ましい態様において、EGFR活性をターゲットする治療は、変異体EGFRキナーゼ活性を阻害する。

【0140】

もう一つの態様において、同位元素の個々のエネルギー発光の結果として種々の距離にわたって有効である種々の同位元素が、第1および第2の治療薬として使用される。このような薬剤は、通常の臨床環境と同様に、より有効な腫瘍の治療を達成するために使用することができ、サイズが異なる複数の腫瘍を提示する患者に有用である。

【0141】

利用できる同位元素のいくつかは、非常に小さな腫瘍沈着および単細胞を治療するために有用である。これらの状況では、薬物または毒素が、より有用な治療薬となり得る。したがって、本発明の好ましい態様において、同位元素は、薬物、毒素、および中性子捕獲薬などの非アイソトープ種と併用して使用される。細胞に対して細胞毒性を有する多くの薬物および毒素が公知であり、本発明に関して使用される。これらは、Merck Index, Goodman and Gilmanなどの薬物および毒素の概論において、並びに前述の参照において見いだされる。

【0142】

また、細胞内タンパク質合成を妨害する薬物を本発明の方法に使用することができ；このような薬物は、当業者に公知であり、およびピューロマイシン、シクロヘキシミド、およびリボヌクレアーゼを含む。

【0143】

本発明の治療的な方法は、癌療法のために使用してもよい。放射性同位元素、薬物、および毒素は、癌細胞によって産生されるか、もしくは関連するマーカーと特異的に結合することができる抗体または抗体断片に対して抱合させることができること、このような抗体複合体を放射性同位元素、薬物、または毒素を腫瘍部位にターゲットするために使用して、これらの治療有効性を増強し、かつ副作用を最小化させることができることが、周知

10

20

30

40

50

である。これらの薬剤および方法の実施例は、Wawrzynczak and Thorpe (in Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer, L. M. Franks and N. M. Teich, eds, Chapter 18, pp. 378-410, Oxford University Press, Oxford, 1986) に、Immunconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer (C. W. Vogel, ed., 3-300, Oxford University Press, N.Y., 1987) に、Dillman, R.O. (CRC Critical Reviews in Oncology/Hematology 1: 357, CRC Press, Inc., 1984) に、Pastan et al. (Cell 47: 641, 1986) に、Vitetta et al. (Science 238: 1098-1104, 1987) に、およびBrady et al. (Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. 13: 1535-1544, 1987) に概説されている。癌のための免疫複合体の使用および療法のその他の形態のその他の例は、とりわけ、米国特許第4,331,647号、第4,348,376号、第4,361,544号、第4,468,457号、第4,444,744号、第4,460,459号、第4,460,561号、第4,624,846号、第4,818,709号、第4,046,722号、第4,671,958号、第4,046,784号、第5,332,567号、第5,443,953号、第5,541,297号、第5,601,825号、第5,635,603号、第5,637,288号、第5,677,427号、第5,686,578号、第5,698,178号、第5,789,554号、第5,922,302号、第6,187,287号、および第6,319,500号に開示されている。

10

【0144】

加えて、本発明の治療方法は、一定の細胞障害性薬の副作用を防げ、緩和し、もしくは逆転させるためのその他の化合物または技術と併用して使用することができる。このような併用の例は、たとえば米国特許第4,624,846号に記載されているように、たとえば迅速クリアランスのための抗体と共にIL-1を投与することを含む。このような投与は、抗癌剤と（たとえば、細胞障害成分として放射性同位元素、薬物、または毒素と）併用して、EGFR活性をターゲットする初期治療的処置の適用後3~72時間に行うことができる。これを使用して、循環からの抱合体、薬物、または毒素のクリアランスを増強し、および治療薬によって生じる骨髄性およびその他の造血性の毒性を緩和し、または逆転することができる。

20

【0145】

本発明のもう一つの局面において、癌療法は、1つ以上の殺腫瘍薬の併用、たとえば薬物と放射性同位元素、または放射性同位元素と中性子活性化療法のためのBoron-10剤、または薬物と生体応答調節剤、または融合分子抱合体と生体応答調節剤を含んでもよい。これらのそれぞれの成分の有効性を最大にするために、サイトカインをこのような療法に組み込むことができる。

30

【0146】

同様に、または エミッタである放射性同位元素と抱合された一定の抗白血病および抗リンパ腫抗体は、これらの薬剤が単に腫瘍細胞に向けられるだけではない場合、骨髄球性およびその他の造血性の副作用を誘導する可能性がある。これは、特に腫瘍細胞が循環にあり、および造血器官にあるときに観察される。造血性の副作用を減少させ、または寛解させ、その一方で、抗癌効果を増大するためには、少なくとも1つの造血性サイトカイン（たとえば、G-CSFおよびGM-CSFなどのコロニー刺激因子などの、成長因子）の同時および/またはその後の投与が好ましい。

40

【0147】

たとえば、Harbert, "Nuclear Medicine Therapy", New York, Thieme Medical Publishers, 1087, pp. 1-340に記載されているように、癌およびその他の病状の治療のために使用することができる放射性核種療法の種々の方法が、当技術分野において周知である。これらの手順を経験した臨床家であれば、これらの任意の造血性副作用を緩和するために、本明細書に記載されているサイトカイン補助療法をこのような手順に容易に適応させることができるであろう。同様に、EGFR活性をターゲットする治療と共に適用される細胞毒での療法は、たとえば癌またはその他の細胞増殖性疾患の治療のために使用することができる。このような治療は、同位元素または放射標識された抗体での放射性同位元素療法に類似の原理によって管理される。通常技術を有する臨床家であれば、一次抗癌療法の前に、間に、および/または後に、さらなる抗癌療法の適用を適合させることができる。

50

【0148】

キット

したがって、また本発明は、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける標的核酸を増幅するための縮重プライマーと増幅プロトコルおよび結果の解析を含む説明書とを含む予測用、診断用、および予後のキットを提供する。または、本キットは、増幅産物の増幅および解析を行うための緩衝液、酵素、および容器も含んでいてもよい。また、キットは、DNAマイクロアレイなどのその他のツールを含むスクリーニング、診断用、または予後のキットの成分であってもよい。好ましくは、本キットは、また、正常組織試料から単離された核酸、および/またはerbB 1遺伝子のキナーゼドメインに種々の相違を示す一連の試料などの、1つまたは複数の対照鋳型を提供する。

10

【0149】

一つの態様において、本キットは、2つ以上のプライマー対であって、各対がerbB 1遺伝子の異なる領域（それぞれの領域が潜在的相違の部位）を増幅することができるプライマー対を提供することにより、一反応またはいくつかの並行反応で生体試料におけるいくつかの遺伝子相違の発現を解析するためのキットを提供する。

【0150】

キットのプライマーは、核酸相違の増幅産物の検出およびそれに伴う解析を容易にするために、標識されていてもよく、たとえば蛍光標識されていてもよい。

【0151】

一つの態様において、複数の相違を1回の解析で検出することができる。したがって、組み合わせキットには、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインの異なるセグメントを増幅することができるプライマーを含む。プライマーは、たとえば、相違間に区別するために、異なる蛍光標識を使用して差動的に標識してもよい。

20

【0152】

キットに含まれるプライマーは、以下のプライマーを含んでいてもよい：
Exon19センスプライマー、

5'-GCAATATCAGCCTTAGGTTGCGGCTC-3' (SEQ ID NO: 505)

; Exon19アンチセンスプライマー、

5'-CATAGAA AGTGAACATTTAGGATGTG-3' (SEQ ID NO: 506)

30

; Exon21センスプライマー、

5'-CTAACGTTTCG CCAGCCATAAGTCC-3' (SEQ ID NO: 507)

およびExon21アンチセンスプライマー、

5'-GCTGCGAGCTCACCCAG AATGTCTGG-3' (SEQ ID NO: 508)

【0153】

好ましい態様において、プライマーは、SEQ ID NO: 646~673からなる群より選択される（表5および6を参照されたい）。これらのプライマーは、フォワードプライマーの5'末端に対してSEQ ID NO: 645およびリバースプライマーの5'末端に対してSEQ ID NO: 674を有する。

40

【0154】

免疫検出キット

さらなる態様において、本発明は、下流のEGFR標的（すなわち、STAT3、STAT5、およびAkt）の活性化レベルを検出するための免疫学的なキットを提供する。このようなキットは、一般に、STAT3、STAT5、またはAktのリン酸化形態に対して免疫特異性を有する1つまたは複数の抗体を含む。

【0155】

リン酸化されたAkt、STAT3、およびSTAT5タンパク質からなる群より選択される、哺乳

50

類細胞においてリン酸化されたタンパク質に免疫特異的に結合することができる抗体と、Akt、STAT3、またはSTAT5経路の活性化について哺乳類細胞を検査するための抗体を使用するための説明書とを含むキットが、本発明において提供される。好ましい方法において、本キットは、種々の抗体を含み、そのそれぞれが、リン酸化されたAkt、STAT3、またはSTAT5タンパク質からなる群より選択される哺乳類細胞のリン酸化されたタンパク質に免疫特異的に結合することができる。

【0156】

キットは、一般に、a) 薬学的に許容されるキャリア；b) 適切な容器手段内のリン酸化されたSTAT3、STAT5、またはAktに対して向けられた抗体；およびc) 免疫検出試薬を含む。また、抗体（モノクローナルまたはポリクローナル）は、市販されており、また当業者に、たとえば、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, 2001において公知の方法によって、調製してもよい。

10

【0157】

一定の態様において、抗原または抗体は、カラム・マトリックスまたはマイクロタイタープレートのウェルなどの固体支持体に結合していてもよい。本キットの免疫検出試薬は、所与の抗体もしくは抗原自体と会合されたか、または連結されている検出可能な標識を含む任意の種々の形態をとっていてもよい。また、二次結合リガンドと会合するか、または付着される検出可能な標識も想定される。例示的な二次リガンドは、第一の抗体または抗原に対して結合親和性を有する二次抗体である。

20

【0158】

適切なアッセイ標識は、当技術分野において公知であり、グルコースオキシダーゼなどの酵素標識；ヨウ素（ ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ $^{115\text{m}}\text{In}$ 、 $^{113\text{m}}\text{In}$ 、 ^{112}In 、 ^{111}In ）、およびテクネチウム（ ^{99}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、タリウム（ ^{201}Ti ）、ガリウム（ ^{68}Ga 、 ^{67}Ga ）、パラジウム（ ^{103}Pd ）、モリブデン（ ^{99}Mo ）、キセノン（ ^{133}Xe ）、フッ素（ ^{18}F ）、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru などの放射性同位元素；ルミノールなどの発光標識；およびフルオレッセインおよびローダミンなどの蛍光標識、並びにビオチンを含む。

30

【0159】

本キットに使用するためにさらに適した免疫検出試薬は、第一の抗体または抗原に対する結合親和性を有する二次抗体を、第二の抗体に対して結合親和性を有する、検出可能な標識に連結された第三の抗体と一緒に含む2成分試薬を含む。

【0160】

例示的な標識の多くが、当技術分野において公知であり、このような標識は、全て本発明に関して使用してもよい。適切な基質と接触することによって有色産物を生じることができる放射標識、核磁気スピン共鳴同位元素、蛍光標識、および酵素タグは、適切な例である。

【0161】

本キットは、抗体-標識抱合体を、完全に抱合された形態で、中間体の形態で、またはキットの使用者によって抱合される別々の部分として、いずれかで含んでいてもよい。

40

【0162】

本キットは、標識されたか、または非標識であるかにかかわらず、適切に分注された抗原の組成物をさらに含んでいてもよく、これは、検出アッセイ法のための検量線を調製するために、またはポジティブ対照として使用してもよい。

【0163】

本発明のキットは、タイプを問わず、一般に、生物学的薬剤が配置され、好ましくは適切に分注されている、1つまたは複数の容器を含む。本キットの成分は、水性媒体に、または凍結乾燥された形態に包装してもよい。

【0164】

50

望まれるならば、本発明の免疫検出キットには、加えて、1つもしくは複数の種々のその他の癌マーカー抗体または抗原を含んでいてもよい。したがって、このようなキットにより、癌マーカーのパネルを提供することができ、これを、種々の患者を試験する際によく使用してもよい。例示として、このようなさらなるマーカーには、PSA、SeLe (X)、HCGなどのその他の腫瘍マーカー、並びにp53、サイクリンD1、p16、チロシナーゼ、MAGE、BAGE、PAGE、MUC18、CEA、p27[bgr]、HCG、または当業者に公知のその他のマーカーを含むことができる。

【0165】

キットの容器手段は、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、瓶、またはさらに注射器もしくはその他の容器手段を一般に含み、その中には、抗体または抗原を配置し、好ましくは適切に分注してもよい。第二もしくは第三の結合リガンド、またはさらなる成分が提供される場合、キットは、また、一般に第二、第三、またはその他のさらなる容器を含み、その中には、このリガンドまたは成分を配置してもよい。

10

【0166】

また、本発明のキットは、典型的には、市販のために密閉する際に、抗体、抗原、およびその他の任意の試薬容器を含むための手段を含む。このような容器は、注射またはブロー成形プラスチックの容器を含んでいてもよく、その中には、所望のバイアルが保持される。

【0167】

また、本発明の方法は、EGFRの変異型のキナーゼ活性を妨害する化合物の同定を包含する。変異体EGFRは、そのキナーゼドメインに少なくとも1つの相違を含む。このような化合物は、たとえばチロシンキナーゼ阻害剤であってもよい。受容体のキナーゼ活性を妨害する化合物を同定するための方法は、当業者に一般に公知であり、たとえば、Dhanabal et al., Cancer Res. 59: 189-197 (1999); Xin et al., J. Biol. Chem. 274: 9116-9121 (1999); Sheu et al., Anticancer Res. 18: 4435-4441; Ausprunk et al., Dev. Biol. 38: 237-248 (1974); Gimbrone et al., J. Natl. Cancer Inst. 52: 413-427; Nicosia et al., In vitro 18: 538-549にさらに記載されており、参照として本明細書に組み入れられる。一般に、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける少なくとも1つの相違の特徴であるキナーゼ活性の増強を妨害する化合物は、本明細書に開示した方法を使用して同定される。

20

30

【0168】

固体支持体

もう一つの態様において、本発明は、本発明の方法を実施するためのキットを提供する。一つの態様において、固体支持体上のerbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける相違の検出のためのキットが記載されている。本キットは、たとえば一回のアッセイ法で複数の相違を検出するための材料および試薬を含むことができる。本キットは、たとえば、固体支持体、標的ポリヌクレオチドの特定のセットのためのオリゴヌクレオチドプライマー、ポリメラーゼ連鎖反応法試薬および成分、たとえば、DNA合成のための酵素、標識化材料、並びにその他の洗浄のための緩衝液および試薬を含むことができる。また、本キットは、固体支持体上の特定の標的を増幅するためのキットの使用説明書を含んでいてもよい。本キットが、たとえば標的ポリヌクレオチドの特定のセットを増幅するために、固体支持体上にすでに固定されたプライマーセットを有する固体支持体上に調製された固体支持体を含む場合、このように調製された固体支持体の設計と構成は、上記されている。また、本キットは、固体支持体上で、たとえばインサイチュー型または固相型PCR法を使用してPCRを行うために必要な試薬を含み、この場合、支持体は、インサイチュー型PCR機器を使用してPCR増幅することができる。キットに含まれるPCR試薬は、通常のPCR緩衝液、耐熱性ポリメラーゼ（たとえば、Taq DNAポリメラーゼ）、ヌクレオチド（たとえば、dNTP）、並びにその他の成分および標識化分子（たとえば、上記の通りの直接的または間接的な標識化のため）を含む。本キットは、固定されたプライマーを単独で、または、代わりに溶液相プライマーと共に使用して、PCR増幅方法の実行を支援するように構築することが

40

50

できる。

【0169】

または、キットは、図4A~4C、並びに図7および8においてさらに定義される、多くのEGFR相違に特異的な、貼り付けられたオリゴヌクレオチドと共に固体支持体を含んでいてもよい。erbB 1のキナーゼドメインにおける相違の有無の決定のために、試験生体試料を、選択的ハイブリダイゼーション条件下で固体支持体に適用してもよい。

【0170】

また、本発明の方法は、EGFRの変異型のキナーゼ活性を妨害する化合物の同定を包含する。変異体EGFRは、そのキナーゼドメインに少なくとも1つの相違を含む。しかし、代わりの態様において、変異体EGFRは、最初にTKI、たとえばゲフィチニブまたはエルロチニブに耐性を与える二次突然変異を含む。このような化合物は、たとえば、チロシンキナーゼ阻害剤であってもよい。受容体のキナーゼ活性を妨害する化合物を同定するための方法は、当業者に一般に公知であり、たとえば、Dhanabal et al., Cancer Res. 59: 189-197 (1999); Xin et al., J. Biol. Chem. 274: 9116-9121 (1999); Sheu et al., Anticancer Res. 18: 4435-4441; Ausprunk et al., Dev. Biol. 38: 237-248 (1974); Gimbrone et al., J. Natl. Cancer Inst. 52: 413-427; Nicosia et al., In vitro 18: 538-549にさらに記載されており、参照として本明細書に組み入れられる。一般に、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける少なくとも1つの相違の特徴であるキナーゼ活性の増強を妨害する化合物は、本明細書に開示した方法を使用して同定される。このような公知の相違を図4、7、8、および表2に記載してある。

【0171】

一旦、同定されれば、このような化合物は、EGFRターゲットされた治療を必要とする患者に、たとえば癌に冒されているか、または発症するリスクがある患者に投与される。

【0172】

投与経路は、経静脈(I.V.)で、筋肉内(I.M.)で、皮下(S.C.)で、皮内(I.D.)で、腹腔内(I.P.)で、クモ膜下(I.T.)で、胸内で、子宮内で、直腸で、膣で、局所的で、腫瘍内等であってもよい。本発明の化合物は、注射によって、または全時間にわたって段階的注入によって、非経口的に投与することができ、蠕動手段によって送達することができる。

【0173】

投与は、経粘膜または経皮手段によるものであってもよい。経粘膜または経皮投与のためには、浸透させる障壁に適した浸透剤が、製剤に使用される。このような浸透剤は、一般に、当技術分野において公知であり、たとえば経粘膜の投与のためには胆汁酸塩およびフシジン酸誘導体を含む。加えて、浸透を容易にするために洗浄剤を使用してもよい。経粘膜の投与は、たとえば鼻内噴霧を介しても、または坐薬を使用してもよい。経口投与のためには、本発明の化合物を、カプセル、錠剤、およびトニックなどの従来の経口投与形態に処方する。

【0174】

局所投与のためには、一般に、当技術分野において公知であるように、薬学的組成物(キナーゼ活性の阻害剤)を軟膏、軟膏、ゲル、またはクリームに処方する。

【0175】

本発明の治療的組成物は、たとえば、単位投与量の注射によるのと同様に、静脈内に従来法で投与される。本発明の治療的組成物に関して使用される「単位用量」という用語は、被検者のための一体的投薬量として適した物理的に分離された単位であって、それぞれの単位は、必要とされる希釈剤、すなわちキャリアまたは媒体に関して望まれる治療効果を生じるように算出された、活性物質の予め定められた量を含む単位をいう。

【0176】

本組成物は、投薬剤形に適合する様式で、かつ治療上有効な量で投与される。投与される量およびタイミングは、治療される被検者、被検者の系が活性成分を利用する能力、および望まれる治療効果の程度に依存する。投与するために必要とされる活性成分の正確な

量は、開業医の確定診断に依存し、それぞれの個体に特有である。

【0177】

本発明の方法を実施するために有用なチロシンキナーゼ阻害剤は、本明細書に記載されている。一般に当業者に公知である、使用目的に適した活性成分を含む任意の製剤または薬物送達系を使用することができる。経口、直腸、局所的、または非経口的（吸入、皮下、腹腔内、筋肉内、および静脈内を含む）投与のための適した薬学的に許容されるキャリアは、当業者に公知である。キャリアは、製剤のその他の成分に適合性で、かつこれらのレシピエントに有害でないという意味において、薬学的に許容されなければならない。

【0178】

本明細書に使用される「薬学的に許容される」、「生理的に許容できる」、およびこれらの文法的変種の用語は、これらが組成物、キャリア、希釈剤、および試薬を指すので、交換可能に使用され、望ましくない生理作用を消磁することなく哺乳類に対して、または哺乳類に材料を投与することができることを表す。

10

【0179】

非経口投与のために適した製剤は、都合よくは、好ましくはレシピエントの血液と等張性である活性化合物の無菌水性標品を含む。

したがって、このような製剤は、都合よくは、蒸留水、5%デキストロースの蒸留水または塩類溶液を含んでいてもよい。また、有用な製剤は、適切な溶媒での希釈により、上記の非経口投与のために適した溶液を生じる化合物を含む濃縮溶液または固体を含む。

【0180】

20

経腸投与のためには、化合物は、それぞれ活性化合物の予め定められた量を含む、カプセル、カシェ剤、錠剤、またはロゼンジなどの別々の単位の不活性キャリアに；粉末または顆粒；または水溶性液体または非水溶性液体の懸濁液または溶液、たとえばシロップ、エリキシル、乳剤、または頓服水剤として取り込むことができる。適切なキャリアは、デンプンまたは糖であってもよく、同じ性質の潤滑剤、調味料、結合剤、およびその他の材料を含んでいてもよい。

【0181】

錠剤は、任意に1つまたは複数の付属の成分と共に圧縮またはすりこみによって作製してもよい。圧縮錠剤は、流動性形態、たとえば粉末または顆粒の活性化合物を、任意に補助成分、たとえば結合剤、潤滑剤、不活性希釈剤、活性表面、または分散剤と混合して、適切な機械において圧縮することによって調製してもよい。すりこみ錠剤は、適切な機械において、任意の適切なキャリアと粉末状の活性化合物の混合物を成形することによって作製してもよい。

30

【0182】

シロップまたは懸濁液は、糖、たとえばショ糖の濃縮水溶液に活性化合物を添加することによって作製してもよく、これに任意の補助成分を添加してもよい。このような補助成分は、香味料、糖の結晶化を遅延させる薬剤、または他の任意の成分の溶解度を増大するための薬剤を、たとえば多価アルコール、たとえばグリセロールまたはソルビトールとして含んでいてもよい。

【0183】

40

坐剤基剤については、直腸投与のための製剤は、従来のキャリア、たとえばカカオ脂またはWitepsol S55 (Dynamite Nobel Chemical, Germanyの商標)と共に坐薬として提示してもよい。

【0184】

経口投与のための製剤は、エンハンサーと共に提示してもよい。経口的に許容される吸収促進薬は、これらのラウリル硫酸ナトリウム、パルミトイル・カルニチン、Laureth-9、ホスファチジルコリン、シクロデキストリンおよび誘導体などの界面活性物質；デオキシコール酸ナトリウム、タウロコール酸ナトリウム、グリココール酸ナトリウム、およびナフシジン酸トリウムなどの胆汁酸塩；EDTA、クエン酸およびサリチラートを含むキレート薬；および脂肪酸（たとえば、オレイン酸、ラウリン酸、アシルカルニチン、モノおよ

50

びジグリセリド)を含む。その他の経口吸収促進薬は、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、CHAPS(3-(3-コラミドプロピル)-ジメチルアンモニオ-1-プロパンスルホナート)、Big-CHAPS(N,N-bis(3-D-グルタミドプロピル)-コラミド)、クロロブタノール、オクトキシノール-9、ベンジルアルコール、フェノール、クレゾール、およびアルキルアルコールを含む。本発明のための特に好ましい経口吸収促進薬は、ラウリル硫酸ナトリウムである。

【0185】

または、化合物は、リポソームまたは微粒子(または微小粒子)中に投与してもよい。患者に投与するためのリポソームおよび微粒子を調製するための方法は、当業者に周知である。米国特許第4,789,734号(その内容は、参照として本明細書に組み入れられる)は、生物物質をリポソームにカプセル化するための方法を記載する。本質的に、材料を水溶液に溶解し、適切なリン脂質および脂質を、必要であれば界面活性物質と共に添加し、必要に応じて材料を透析するか、または超音波処理する。公知の方法の総説は、G. Gregoriadis, Chapter 14, "Liposomes," Drug Carriers in Biology and Medicine, pp. 287-341 (Academic Press, 1979)によって提供される。

10

【0186】

重合体またはタンパク質で形成される微粒子は、当業者に周知であり、胃腸管を通過させて直接血流に入れる目的に作製することができる。または、化合物を取り込んで、微粒子または微粒子の複合体を、数日~数月までの範囲の期間にわたる緩放のために移植することができる。たとえば、米国特許第4,906,474号、第4,925,673号、および第3,625,214号、並びにJain, TIPS 19: 155-157 (1998)を参照されたい(いずれの内容も、参照として本明細書に組み入れられる)。

20

【0187】

一つの態様において、本発明のチロシンキナーゼ阻害剤は、静脈内投与後に、毛細管床にとどまるように、最適な大きさに設定されたりリポソームまたは微小粒子に処方することができる。リポソームまたは微小粒子が、虚血組織を囲む毛細管床にとどまるときは、薬剤をこれらが最も有効となり得る部位に局所投与することができる。たとえば、「Liposomal targeting of ischemic tissue」の表題のBaldeschweilerに対する米国特許第5,593,688号(その内容は、参照として本明細書に組み入れられる)に開示されるように、虚血組織をターゲットするために適したリポソームは、一般に約200ナノメートル未満であり、また典型的には単層の小胞である。

30

【0188】

好ましい微小粒子は、ポリグリコリド、ポリ乳酸、およびこれらの共重合体などの生分解性ポリマーから調製したものである。当業者であれば、所望の薬剤放出速度および所望の投薬量を含む種々の要因に応じて適切な担体系を容易に決定することができる。

【0189】

一つの態様において、製剤は、血管内部に直接カテーテルを経て投与される。投与は、たとえばカテーテルの穴を介して行うことができる。活性化化合物が比較的長い半減期(約1日~1週以上)を有する態様において、Hubbell et al.に対する米国特許第5,410,016号に開示したものなどの製剤は、生体分解性重合体のヒドロゲルに含めることができる。これらの重合体ヒドロゲルを組織内腔の内部に送達して、重合体が分解するにつれて活性化化合物を時間とともに放出させることができる。望ましいならば、重合体ヒドロゲルは、その中に分散された活性化化合物を含む微小粒子またはリポソームを有して、活性化化合物の徐放のためのもう一つのメカニズムを提供することができる。

40

【0190】

製剤は、都合よくは、単位剤形に提示してもよく、薬学技術分野において周知の任意の方法によって調製してもよい。全ての方法は、活性化化合物を1つまたは複数の補助成分を構成するキャリアと会合させる工程を含む。一般に、製剤は、一様に、かつ均質に、活性化化合物を液体キャリアまたは微粉固体キャリアと会合するようにして、次いで、必要に応じて、生成物を所望の単位剤形に成形することによって調製される。

50

【0191】

製剤は、薬学的製剤、たとえば希釈剤、緩衝液、香料、結合剤、表面活性薬、シックナ、潤滑剤、懸濁剤、防腐剤（抗酸化剤を含む）などの技術に利用される1つまたは複数の任意の補助成分をさらに含んでもよい。

【0192】

本方法の化合物は、吹入剤もしくはエアロゾルもしくは噴霧器のための溶液として、またはガス注入のための極微小粉末として、単独で、または乳糖などの不活性キャリアと組み合わせ、気道に投与するために提示してもよい。この種の場合、活性化合物の粒子は、最適には50ミクロン未満、好ましくは10ミクロン未満、より好ましくは、2~5ミクロンの間の直径を有する。

10

【0193】

通常、鼻噴投与のためには、穏やかな酸性のpHが好ましい。好ましくは、本発明の組成物は、約3~5のpH、より好ましくは約3.5から~約3.9、および最も好ましくは3.7を有する。pHの調整は、塩酸などの適切な酸の添加によって達成される。

【0194】

薬理的組成物中に溶解されたか、または分散された活性成分を含む薬理的組成物の標は、当技術分野において周知であるが、製剤に基づいたものに限定する必要はない。典型的には、このような組成物は、液体溶液または懸濁液として注射剤として調製されるが、溶液または懸濁液のために適した固体形態を、使用の前に液体に調製することもできる。また、標品は、乳化することができる。

20

【0195】

活性成分は、薬学的に許容され、かつ活性成分と適合性を有する賦形剤と共に、本明細書に記載されている治療法に使用するために適した量と混合することができる。適切な賦形剤は、たとえば、水、塩類溶液、デキストロース、グリセロール、エタノール等、およびこれらの組み合わせである。加えて、必要に応じて、組成物は、湿潤剤または乳化剤、活性成分の有効性を増強するpH緩衝剤等などの微量の補助物質を含むことができる。

【0196】

本発明のキナーゼ阻害剤は、その中に成分の薬学的に許容される塩を含むことができる。薬学的に許容される塩は、たとえば塩酸もしくはリン酸などの無機酸、または酢酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と形成される酸付加塩（ポリペプチドの遊離アミノ基と形成されたもの）を含む。また、遊離カルボキシル基と形成された塩は、たとえばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基に、およびこのようなイソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基などに由来することができる。

30

【0197】

薬学的に許容されるキャリアは、当技術分野において周知である。例示的液体キャリアは、活性成分と水に加えて材料を含まないか、またはリン酸緩衝食塩水などの生理学的pH値のリン酸ナトリウム、生理食塩水、または両方などの緩衝液を含む無菌水溶液である。なおさらなる水性キャリアは、複数の緩衝塩、並びにナトリウムおよび塩化カリウムなどの塩、デキストロース、ポリエチレングリコール、並びにその他の溶質を含むことができる。

40

【0198】

また、液体組成物は、水に加えて、および水を除外して液相を含むことができる。グリセリン、植物油などの綿実油および水-油乳剤は、このようなさらなる液相の例示である。

【0199】

突然変異

もう一つの態様において、本発明は、チロシンキナーゼ阻害剤での治療後にerbB 1遺伝子の相違を予測するための方法を開示する。チロシンキナーゼ阻害剤での癌治療に対する応答は、チロシンキナーゼ阻害剤に対して、または他の類似化合物に対する耐性を生じる

50

ことが多いことが一般に公知である。このような耐性は、薬物標的に、たとえばEGFRに突然変異を獲得することによって生じると考えられる。このような突然変異を予測する（および、選択する）能力により、より望ましい治療を選択し、かつ再発をより少しにすることができる。

【0200】

本発明の一つの態様において、ゲフィチニブ（または、同様のEGFRターゲティング治療）に応答したが、その後に再発した癌患者の腫瘍試料から、EGFRキナーゼドメインをコードするDNAを単離してシーケンスした。このような患者における再発は、EGFRキナーゼドメインに二次突然変異の獲得を含むことが予想される。次いで、これらの新たに定義された突然変異においてキナーゼ活性をターゲットし、および阻害する化合物を本明細書に開示した方法を使用して同定する。EGFRのキナーゼドメインに一次または二次（上記と同様）突然変異をもつ癌患者を治療するために、このような化合物を単独で、またはその他の公知のEGFRターゲティング治療と組み合わせて使用してもよい。

10

【0201】

一つの態様において、EGFR（erbB 1遺伝子）のキナーゼ（触媒）ドメインにおける相違を予測することは、インビトロでなされる。本方法では、細胞（たとえば、線維芽細胞細胞）を、ヒト癌株化細胞において同定されたキナーゼドメイン突然変異を含むcDNAで安定にトランスフェクトする。たとえば、細胞には、SEQ ID NO: 495などの突然変異を有するEGFR（図4Aにさらに記載してある）を、または多くの既同定か、もしくははまだ未同定のキナーゼドメインが変異したEGFRをトランスフェクトしてもよい。キナーゼドメインが変異したEGFRの細胞へのトランスフェクションは、培養において細胞の異常な増殖を生じる。安定なトランスフェクション方法は、当業者に公知であり、Current Protocols in Molecular Biology by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, K. Struhl and V. B. Chanda（Editors）, John Wiley & Sons., 2004（参照として本明細書に組み入れられる）においてさらに定義してある。次いで、トランスフェクト細胞には、細胞の増殖を阻害すると予測され、有効であるが、それでも致死量以下の薬物、好ましくはチロシンキナーゼ阻害剤の用量を与える。好ましい態様において、薬物は、アニリノキナゾリン、合成アニリノキナゾリン、ゲフィチニブ、またはエルロチニブである。細胞を薬物の存在下で連続継代して、生存するサブクローンを選択する。多世代にわたって、生存する（すなわち、化合物に耐性である）細胞を選択し、erbB 1における相違について遺伝子を解析した。したがって、インビボにおけるチロシンキナーゼ阻害剤での頻回治療後に、二次相違が生じることが予測され得る。

20

30

【0202】

または、細胞には、ヒトNSCLC株化細胞、たとえばNCI-1650およびNCI-1975に由来するゲフィチニブ耐性変異体cDNAをトランスフェクトする。それぞれの株化細胞は、EGFRのキナーゼドメインにヘテロ接合性の突然変異を有し、したがって、ゲフィチニブに感受性であると予想される。NCI-1650におけるEGFR突然変異は、エキソン19内の位置2235～2249における15ヌクレオチドのインフレームの欠失（delLE746-A750）からなり、一方で、NCI-1975は、エキソン21内に、ヌクレオチド2573にてGをTと置換するミスセンス突然変異（L858R）を有する。本明細書に示したように、NCI-H1975におけるL858R突然変異は、インビトロでゲフィチニブに対する感受性を活性化し、増大させる。EGFRキナーゼドメイン突然変異がひそむその他の癌株化細胞を利用してもよい。癌株化細胞には、肺癌、並びにこのような突然変異がひそむことが見いだされたその他の癌を含んでいてもよい。

40

【0203】

細胞が二次突然変異を得る頻度を増大させるために、細胞を変異誘発物質で治療してもよい。変異誘発物質は、投与計画、送達様式、および変異誘発物質投与時の生物体または細胞の発育時期に応じて、種々の頻度で突然変異を誘導してもよく、これらの全てのパラメーターは、種々の変異誘発物質または突然変異誘発技術についての従来技術に開示されている。変異誘発物質は、エチルメタンスルホナート（EMS）、N-エチル-N-ニトロソ尿素（ENU）、またはN-メチル-N-ニトロソ尿素（メチルニトロソ尿素）などのアルキル化剤で

50

あってもよい。または、変異誘発物質は、たとえば、ホカルバキシンハイドロクロライド (Prc)、メチルメタンスルホナート (MeMS)、クロランブシル (コレステロール)、メルファラン、ポルカルバジンハイドロクロライド、シクロホスファミド (セルロプラスミン)、ジエチル硫酸 (Et_2SO_4)、アクリルアミド単量体 (AA)、トリエチレンメラミン (TEM)、ナイトロジェンマスタード、ピンクリスチン、ジメチルニトロソアミン、Nメチル-N'-ニトロニトロソグアニジン (MNNG)、7, 12ジメチルベンズ (a) アントラセン (DMBA)、エチレンオキサイド、ヘキサメチルホスホルアミド、ビスルファン、およびエチルメタンスルホラート (EtMs) であってもよい。変異誘発物質で細胞を治療する方法は、たとえば、米国特許第6,015,670号に記載されており、参照として本明細書に組み入れられる。突然変異誘発後、細胞 (すなわち、変異体EGFRをトランスフェクトしたか、またはヒト癌株化細胞に由来) をゲフィチニブを補った培地中で培養して耐性クローンの増殖について選択することができる。個々クローンの継代培養は、たとえばEGFRキナーゼドメインに対応するゲノムDNAの特異的PCRを媒介した増幅に続くEGFR遺伝子のヌクレオチド配列決定によって行うことができる。

10

20

30

40

50

【0204】

もう一つの態様において、ゲフィチニブに対する耐性を与えるEGFR遺伝子内の突然変異の自発的な獲得について選択するために、数週間または数月の期間にわたってゲフィチニブ (または同様のチロシンキナーゼ阻害剤) の濃度を段階的に増大して、細胞 (EGFR相違をもつ) を連続継代する。選択した細胞 (比較的高いゲフィチニブ濃度にて増殖し続ける) をコロニーとして単離して、突然変異を上記の通りに同定することができる。したがって、このような相違は、インビボにおいてチロシンキナーゼ阻害剤での頻回治療後に生じることを予測することができる。たとえば、Scappini et al., Cancer, April 1, 2004, Vol. 100, pg. 1459 (本明細書に組み込まれる) を参照されたい。

【0205】

さらにもう一つの態様において、EGFR遺伝子の変異型は、安定に選択された株化細胞にこれを導入する前にDNA修復欠損菌株において増殖させることができる。このような細菌における複製は、突然変異誘発の頻度を増強する。または、インビトロでクローン化されたEGFR DNAにおける突然変異の頻度を増強するために、当業者に公知である標準的方法を用いて、「誤りがちな」PCRを利用することができる。

【0206】

もう一つの態様において、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける相違は、インビボにおいて予測される。たとえば、erbB 1遺伝子のキナーゼ活性を増大する変異型を動物、すなわちマウスにトランスフェクトして癌モデルを作製する。次いで、化合物、好ましくはアニリノキナゾリン、合成アニリノキナゾリン、ゲフィチニブ、またはエルロチニブの有効量で動物を治療する。化合物に対する繰返し暴露により、最初は癌が阻害される。このような化合物で治療したヒトと同様に、動物の腫瘍細胞も、これらをこのような治療に対して耐性にする突然変異を獲得する。本発明の方法は、このような耐性腫瘍におけるerbB 1遺伝子の単離および特性付けを可能にする。これらの新たに特徴づけられた相違を特異的にターゲットする化合物は、このような変異したerbB 1遺伝子を有することが疑われる患者の治療に有用である。このような患者は、たとえば、最初にチロシンキナーゼ阻害剤での療法に反応するが、その後、同じか、または類似の化合物に応答しない患者を含む。

【0207】

動物モデルを作製する方法は、当業者に公知であり、およびたとえば、Ohashi et al., Cell, 65: 305-317 (1991) ; Adams et al., Nature, 325: 223-228 (1987) ; およびRoman et al., Cell, 61: 383-396 (1990) (参照として本明細書に組み入れられる) においてさらに定義されている。受胎卵母細胞の場合、導入遺伝子の好ましい導入方法は、微量注入によるが (たとえばLeder et al. 米国特許第4,736,866号および第5,175,383号 (これらは、参照として本明細書に組み入れられる) を参照されたい)、胚幹 (ES) で細胞の場合、好ましい方法は、電気穿孔法である。しかし、レトロウイルスの感染または

リボソームの融合などのウイルスの送達系を含むその他の方法を使用することもできる。核酸の単離および特性付けは、上記および実施例に記載してある。

【0208】

上で同定したerbB 1遺伝子のキナーゼ活性を増大する相違は、本発明の方法を使用して、患者においてスクリーニングされる（診断上または予後的に）。次いで、このような突然変異の有無は、たとえばチロシンキナーゼ阻害剤などの化合物をターゲットするEGFRでの治療に対して感受性のものを決定するための基準として使用してもよい。

【0209】

これらの新たに定義された相違を特異的にターゲットする化合物は、インビボで、またはインビトロで検出されるかどうかにかかわらず、当技術分野において公知かつ本明細書に論議した技術を使用して選択することができる。候補薬物スクリーニングアッセイ法は、EGFRの変異型の活性を阻害する生理活性候補薬を同定するために使用してもよい。ヒト細胞に対して低毒性を有する薬剤についてスクリーニングするアッセイ法には、特に興味もたれる。標識されたインビトロでのタンパク質-タンパク質結合アッセイ法、電気泳動移動度変化アッセイ法、酵素活性アッセイ法、タンパク質結合についての免疫アッセイ法等を含む、多種多様なアッセイ法をこの目的のために使用してもよい。また、三次元結晶構造の決定のために、精製した変異体EGFRタンパク質を使用してもよく、これを分子間相互作用、輸送体機能などのモデリングために使用することができる。このような化合物は、たとえばEGFRのキナーゼ活性を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤、抗体、アプタマー、siRNA、およびベクターであってもよい。

10

20

【0210】

もう一つの態様において、本発明の方法に有用な化合物は、変異体EGFRを経てキナーゼ・シグナリングを妨害する、モノクローナル抗体、キメラヒト化抗体、および組換え型抗体、並びにこれらの断片を含む抗体であり、これらは、これらがEGFRのキナーゼ活性を阻害する能力によって特徴づけられ、かつ低毒性を有する。

【0211】

中和抗体は、そのキナーゼドメインに少なくとも1つの核酸相違をもつEGFRで免疫化することにより、ウサギまたはマウスなどの動物において容易に生じる。免疫したマウスは、ハイブリドーマの製造のためのB細胞の供与源を提供するために特に有用であり、これを次に培養して、大量の抗EGFRモノクローナル抗体を産生させる。キメラ抗体は、異なる動物種に由来する2つ以上のセグメントまたは部分によって特徴づけられるイムノグロビン分子である。一般に、キメラ抗体の可変領域は、マウスモノクローナル抗体などの非ヒト哺乳類抗体に由来し、イムノグロビン定常領域は、ヒトイムノグロビン分子に由来する。好ましくは、領域および組み合わせは、両方ともルーチン的に決定されるに低免疫原性を有する。ヒト化抗体は、マウス定常領域がヒト対応物で置換されているが、一方マウス抗原結合領域を保持する、遺伝子工学技術によって作製されたイムノグロビン分子である。生じるマウス-ヒトキメラ抗体は、免疫原性が減少されており、ヒトにおける薬物動態が改善されているはずである。本発明の方法に有用な高親和性モノクローナル抗体およびこれらのキメラ誘導体の好ましい例は、欧州特許出願第EP186,833号；PCT特許出願国際公開報第92/16553号；および米国特許第6,090,923号に記載されている。

30

40

【0212】

既存の、または上記のように新たに同定された化合物は、原発性または二次EGFR突然変異を有する患者の治療に有用である。

【0213】

好ましい態様において、化合物は、そのキナーゼドメインに少なくとも1つの相違をもつEGFRのチロシンキナーゼ活性の阻害剤、特にその他のチロシンキナーゼと比較して「変異された」EGFRに対する選択作用を有する小分子状阻害剤である。EGFRの阻害剤は、PID 153035、4-（3-クロロアニリノ）キナゾリンまたはCP-358,774などのキナゾリン、ピリドピリミジン、ピリミドピリミジン、CGP 59326、CGP 60261、およびCGP 62706などのピロロピリミジン、並びにピラゾロピリミジン、4-（フェニルアミノ）-7H-ピロロ[2,3-d]ピ

50

リミジン (Traxler et al., (1996) J. Med Chem 39: 2285-2292)、クルクミン (ジフェルロイルメタン) (Laxmin arayana, et al., (1995)、Carcinogen 16: 1741-1745)、4,5-ビス(4-フルオロアニリノ)フタルイミド (Buchdunger et al. (1995) Clin. Cancer Res. 1: 813-821; Dinney et al. (1997) Clin. Cancer Res. 3: 161-168) などのチロシンキナーゼ阻害剤; ニトロチオフエン部分を含むチルホスチン (Brunton et al. (1996) Anti Cancer Drug Design 11: 265-295); プロテインキナーゼ阻害剤 ZD-1839 (AstraZeneca); CP-358774 (Pfizer, Inc.); PD-0183805 (Warner-Lambert)、EKB-569 (Torrance et al., Nature Medicine, Vol. 6, No. 9, Sept. 2000, p. 1024)、HKI-272、および HKI-357 (Wyeth); または国際特許出願国際公開公報第99/09016号 (American Cyanamid); 国際公開公報第98/43960号 (American Cyanamid); 国際公開公報第97/38983号 (Warener Labert); 国際公開公報第99/06378号 (WarnerLambert); 国際公開公報第99/06396号 (Warner Lambert); 国際公開公報第96/30347号 (Pfizer, Inc.); 国際公開公報第96/33978号 (Zeneca); 国際公開公報第96/33977号 (Zeneca); および国際公開公報第96/33980号 (Zeneca) に記載されたもの (全て参照として本明細書に組み入れられる); を含むが、これらに限定されるわけではない。

10

20

30

40

50

【0214】

もう一つの態様において、変異体EGFRのキナーゼ活性を妨害するためにアンチセンス・ストラテジーを使用してもよい。このアプローチは、たとえば、アンチセンス核酸でそのmRNAをマスキングするか、またはリボザイムでそれを切断することによるかのいずれかによって、特異的mRNAの翻訳を遮断するアンチセンス核酸またはリボザイムを利用してもよい。アンチセンス技術に関する一般的な議論については、Antisense DNA and RNA, (Cold Spring Harbor Laboratory, D. Melton, ed., 1988) を参照されたい。

【0215】

変異体EGFR遺伝子転写の可逆的短鎖阻害も有用であり得る。このような阻害は、siRNAsを使用することによって達成することができる。RNA干渉 (RNAi) 技術は、短鎖干渉RNA (siRNAs) などの小さなRNA分子を使用することによって遺伝子の発現を防げる。この技術は、結果として、RNAiが植物～昆虫～哺乳類までの多くの生体系の大部分の細胞において遺伝子をサイレンシングするための天然の生物学的なメカニズムであるという事実を利用する (McManus et al., Nature Reviews Genetics, 2002, 3 (10) p. 737)。RNAiは、分子中間体である遺伝子のメッセンジャーRNAコピーを確実に破壊することにより、遺伝子が機能的タンパク質を産生するのを防げる。siRNAsは、裸の形態で使用する、および後述するように、ベクターに取り込むことができる。変異体EGFR遺伝子転写を特異的に阻害するために、さらにアプタマー - を利用することができ、たとえば米国特許第6,699,843号を参照されたい。本発明に有用なアプタマーは、SELEXプロセスを使用して同定してもよい。たとえば、SELEXの方法は、米国特許第5,707,796号、第5,763,177号、第6,011,577号、第5,580,737号、第5,567,588号、および第5,660,985号記載されていた。

【0216】

「アンチセンス核酸」または「アンチセンスオリゴヌクレオチド」は、一本鎖核酸分子であり、これは、細胞質条件下で、RNAまたはDNA分子の相補的塩基とハイブリダイズすることにより、後者の役割を阻害する。RNAがメッセンジャーRNA転写物である場合、アンチセンス核酸は、反転写物またはmRNA干渉相補核酸である。現在使用される「アンチセンス」は、広くRNA-RNA相互作用、RNA-DNA相互作用、リボザイム、RNAi、アプタマー、およびRNase-Hを媒介した抑止を含む。

【0217】

リボザイムは、DNA制限エンドヌクレアーゼといくらか似た様式で、その他の一本鎖RNA分子を特異的に切断する能力を有するRNA分子である。リボザイムは、一定のmRNAがそれ自体イントロンを切除す能力を有するという観察から発見した。これらのリボザイムのヌクレオチド配列を修飾することによって、研究者は、RNA分子の特定のヌクレオチド配列を認識し、それを切断する分子を操作することができた (Cech, 1989, Science 245 (4915) p. 276)。これらは、配列特異的であるので、特定の配列をもつmRNAだけが不活性化

される。

【0218】

アンチセンス核酸分子は、細胞における発現のための組換え遺伝子によってコードすることができ（たとえば、米国特許第5,814,500号；米国特許第5,811,234号）、または代わりに、これらは、合成的に調製することができる（たとえば、米国特許第番号5,780,607号）。

【0219】

本発明は、癌である患者、特にEGFRのキナーゼドメインに少なくとも1つの核酸相違をもつ患者を治療する方法をさらに提供する。本治療方法は、患者にsiRNA含有組成物を適切な空白期間投与することを含む。siRNAsは、化学的に合成し、インビトロでの転写などを使用して産生してもよい。加えて、siRNA分子は、正確にこれらの腫瘍において同定された突然変異に対応するような方法で、個々の患者に対してカスタマイズすることができる。siRNAは、単一ヌクレオチドだけによって異なるヌクレオチド配列間を識別することができるので、一塩基置換またはいくつかのヌクレオチドの小さな欠失に付随するEGFR遺伝子の変異形（これらは、両方とも本明細書に記載したように腫瘍において同定された）を一義的にターゲットするsiRNAsをデザインすることができる。SiRNAsは、Brummelkamp et al., Science 296 ; 550-553, 2002, Jaque et al., Nature 418 ; 435-438, 2002, Elbashir S. M. et al. (2001) Nature, 411 : 494-498, McCaffrey et al. (2002), Nature, 418 : 38-39 ; Xia H. et al. (2002), Nat. Biotech. 20 : 1006-1010, Novina et al. (2002), Nat. Med. 8 : 681-686、および米国特許出願第20030198627号に記載されている。

10

20

【0220】

変異した受容体および正常受容体を阻害するゲフィチニブなどの薬物の使用と比較して、このような治療戦略の重要な利点は、変異したEGFRに対して特異的に向けられたsiRNA野生型のEGFRを阻害するはずはないことである。一般に、下痢および皮膚炎を含むゲフィチニブ治療の「副作用」が、EGFRの機能を必要とする正常組織におけるEGFRの阻害の結果であると考えられる、これは有意である。

【0221】

腫瘍に対するsiRNAの送達は、現在利用可能である任意のいくつかの遺伝子送達「媒体」を経て潜在的に達成することができる。これらは、アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、およびレトロウイルスなどのウイルスのベクター、並びに化学的に媒介される遺伝子送達系（たとえば、リポソーム）または機械的DNA送達系（DNA銃）を含む。siRNAを媒介した遺伝子発現の阻害のために発現されるオリゴヌクレオチドは、18~28ヌクレオチドの間の長さである。

30

【0222】

もう一つの態様において、化合物は、そのキナーゼドメインに少なくとも1つの相違を有するEGFRをコードするヒト配列に特異的なアンチセンス分子である。投与される治療薬は、天然の核酸またはRNAなどのアンチセンス分子を発現する核酸構築物からの化学修飾を有する、アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に合成オリゴヌクレオチドであってもよい。アンチセンス配列は、ターゲットされるEGFR遺伝子のmRNAに対して相補的であり、かつターゲットされた遺伝子産物の発現を阻害する（たとえば、Nyce et al. (1997) Nature 385 : 720を参照されたい）。アンチセンス分子は、RNase Hまたは立体障害の活性化を介して、翻訳のために利用できるmRNAの量を減少させることによって遺伝子発現を阻害する。アンチセンス分子の一つまたは組み合わせを投与してもよく、組み合わせは、単一のターゲットされる遺伝子とは異なる複数の配列か、またはいくつかの異なる遺伝子に相補的である配列を含んでいてもよい。

40

【0223】

好ましい標的遺伝子は、そのキナーゼドメインに少なくとも1つの核酸相違をもつEGFRである。たとえば図5のものなど遺伝子配列が、本明細書に組み込まれる。一般に、アンチセンス配列は、動物宿主と起源が同じ種を有する。

50

【0224】

アンチセンス分子は、適切なベクター（ベクターは、ターゲットされる細胞に導入されて発現される）内の標的遺伝子配列の全てまたは一部の発現によって産生してもよい。転写開始は、アンチセンス鎖がRNA分子として産生されるように正しい位置に配置される。

【0225】

アンチセンスRNAは、内因性センス鎖mRNAとハイブリダイズし、これによりターゲットされた遺伝子の発現を遮断する。天然の転写開始領域または外来性転写開始領域を使用してもよい。プロモーターは、インビトロでの組換え方法によって、または染色体への配列の相同的な組込みの結果として導入してもよい。0-アクチンプロモーター、SV40早期および後期プロモーター、ヒトサイトメガロウイルスプロモーター、レトロウイルスLTRなどを
10 含む、筋細胞で活性な多くの強力なプロモーターが当技術分野において公知である。転写ベクターは、一般に、核酸配列の挿入を提供するための、プロモーター配列の近くに位置する便利な制限部位を有する。転写開始領域、標的遺伝子またはこれらの断片、および転写終結領域を含む転写カセットを調製してもよい。転写カセットは、種々のベクター（たとえば、プラスミド）；レトロウイルス（たとえば、レンチウイルス）；アデノウイルス；等に導入してもよく、ベクターは、一般に少なくとも約1日の期間、より一般には少なくとも約数日の期間、細胞において一過性に、または安定に維持することができる。

【0226】

また、アプタマーも有用である。アプタマーは、治療的オリゴヌクレオチドまたはペプチドの有望な新たな種であり、たとえばリガンド受容体などの高親和性で所与の標的と特異的に結合するようにインビトロで選択される。これらの結合特徴は、オリゴヌクレオチドが分子内核酸塩基対形成によって共に保持される三次元構造を形成する能力を反映する
20 可能性が高い。アプタマーは、標的タンパク質（リガンド、脂質、炭水化物、代謝産物、など）と相互作用する合成DNA、RNA、またはペプチド配列であり、これは正常であっても、修飾されていてもよい（たとえば、ペプチド核酸（PNA）、チオリン酸化されたDNAなど）。更なる態様において、治療として、変異体EGFRに特異的なRNAアプタマーを細胞に導入し、または発現させることができる。

【0227】

ペプチド核酸（PNA）は、一定の点においてオリゴヌクレオチドおよびこれらの類似体と同様で、したがってDNAおよびRNAを模倣し得る化合物である。PNAでは、オリゴヌクレオチドのデオキシリボース・バックボーンが、偽ペプチド・バックボーンによって置換されていた（Nielsen et al. 1991 Science 254, 1457-1500）。それぞれのサブユニットまたは単量体は、このバックボーンに付着された天然に存在するか、または天然に存在しない核酸塩基を有する。そのようなバックボーンは、グリシンがアミド結合を介して連結されたN-（2-アミノエチル）の反復単位で構築される。PNAは、ワトソンおよびクリック塩基対形成およびヘリックス形成を介して相補核酸とハイブリダイズする。偽ペプチド・バックボーンは、優れたハイブリダイゼーション特性（Egholm et al. Nature (1993) 365, 566-568）、酵素的分解に対する耐性（Demidov et al. Biochem. Pharmacol. (1994) 48, 1310-1313）、および種々の化学修飾への方法（Nielsen and Haaime Chemical Society Reviews (1997) 73-78）を提供する。治療として、変異体EGFRに特異的なPNAを細胞
30 40 に導入し、または発現させることができる。PNAは、たとえば、米国特許出願第20040063906号に記載されていた。

【0228】

変異体EGFRをターゲットする化合物で治療される患者は、たとえば彼らのEGFRに原発性または二次突然変異をもつと診断された患者、最初にチロシンキナーゼ阻害剤での療法に
40 応答するが、その後同じか、または類似化合物に応答しない患者を含む。または、二次EGFR突然変異をターゲットする化合物は、併用療法として、原発性EGFR突然変異をターゲットする化合物、たとえばゲフィチニブと組み合わせて癌患者に与えてもよい。原発性または二次EGFR突然変異の両方をターゲットする化合物を組み合わせることによって、耐性の可能性が減少される。

10

20

30

40

50

【 0 2 2 9 】

EGFRチロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブ、エルロチニブなど含む
(しかし、これらに限定されるわけではない。)、現在公知の抗癌治療に対する耐性を与えるさらなるEGFR突然変異も本発明の範囲内である。耐性EGFR変異体は、このキナーゼ領域に高い相同性を有するタンパク質を含む関連したチロシンキナーゼドメインのキナーゼドメインにおいて同定される変異体に対して類似の変異体を有することが予測される。類似のタンパク質における突然変異を記載する論文は、BCR-ABLについて当技術分野において公知のものを含む。Bradford et al. Blood.2003 Jul 1; 102 (1): 276-83, Epub 2003 Mar 06; Hochhaus et al., Leukemia. 2002 Nov; 16 (11): 2190-6; and Al-Ali et al., Hematol J. 2004; 5 (1): 55-60を参照されたい。

10

【 0 2 3 0 】

公知のEGFRチロシンキナーゼ阻害剤に耐性な変異体EGFRは、イマニチブ耐性表現型を確証させるc-abl (BCR-ABL) 残基の類似する1つまたは複数の位置に非野生型残基をもつ、任意の1つまたは複数のEGFRポリペプチドまたはEGFRポリペプチドをコードするヌクレオチドを含む。EGFRが変異したときに薬剤抵抗性を与える残基は、特に、たとえばP-ループおよび活性化ループ含む(しかし、これらに限定されるわけではない)キナーゼドメインからの残基を含み、EGFRポリペプチドの変異された残基は、c-abl残基に類似する。想定される耐性EGFR変異体は、少なくともBCR-ABLの

20

Met 244, Leu 248, Gly

250, Gln 252, Tyr 253, Glu 255, Asp 276, Thr 315, Phe 317, Met 351, Glu 355, Phe

359, His 396, Ser 417, および Phe 486

と類似するアミノ酸位置にて非野生型残基を有し、たとえば表S3Cおよび図9を参照されたい。これらのBCL-ABL残基は、それぞれEGFRの

Lys 714, Leu 718, Ser 720,

Ala 722, Phe 723, Thr 725, Ala 750, Thr 790, Leu 792, Met 825, Glu 829, Leu 833,

His 870, Thr 892, Phe 961

30

に対応する。たとえば、表S3C、図9を参照されたい。

【 0 2 3 1 】

予後試験

本発明の方法は、癌の発症の予後指標として使用される。または、本方法は、存在するが、いまだ診断されていないか、または検出不可能である段階にある癌を検出するために使用される。癌が発症するリスクのある患者を、本発明の方法を使用して、erbB 1遺伝子のキナーゼ活性を増大する核酸変異の存在についてスクリーニングする。erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける相違の存在は、癌の存在または差し迫った存在を示す。したがって、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける相違の存在は、患者がEGFRでターゲットされる治療の利益を受けることを示唆する。本明細書に記載したように、EGFRでターゲットされる治療は、好ましくはチロシンキナーゼ阻害剤での治療である。

40

【 0 2 3 2 】

本発明の好ましい態様において、生体試料を得ることによって、erbB 1遺伝子のキナーゼドメインにおける核酸相違の有無について患者をスクリーニングする。試料は、たとえば舌、口、頬、気管、気管支、肺、その他由来の組織、またはたとえば痰または肺吸引液由来の液体を含む患者由来の任意の試料であってもよい。これらの生体試料を得る方法は、当業者に周知である。

【 0 2 3 3 】

したがって、本発明は、異常な変異体EGFR発現または活性と関連する疾患または障害を同定するための方法であって、試験試料を被検者から得て、かつ変異体EGFRタンパク質ま

50

たは核酸（たとえば、mRNA、ゲノムDNA）が検出され、変異体EGFRタンパク質または核酸の存在により、異常な変異体EGFR発現または活性と関連する疾患または障害を有するか、または発症するリスクがある被検者を診断する方法を提供する。本明細書に使用される「試験試料」は、関心対象の被検者から得られる生体試料をいう。たとえば、試験試料は、体液（たとえば、血清）、細胞試料、または組織、特に組織生検試料であることができる。

【0234】

さらにまた、本明細書に記載した予後アッセイ法は、被検者に薬剤（たとえば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド擬態、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子、またはその他の候補薬）を投与して異常な変異体EGFR発現または活性と関連する疾患または障害を治療することができるかどうかを決定するために使用することができる。たとえば、このような方法は、障害のために薬剤で被検者を有効に治療することができるかどうかを決定するために使用することができる。したがって、本発明は、異常な変異体EGFR発現または活性と関連する障害のための薬剤で被検者を有効に治療することができるかどうか決定する方法であって、試験試料を得て、変異体EGFRタンパク質または核酸を検出する方法を提供する（たとえば、変異体EGFRタンパク質または核酸の存在は、変異体EGFR発現または活性と関連する障害を治療するための薬剤を投与することができる被検者のための診断である）。

【0235】

実施例

実施例1

腫瘍検体のヌクレオチド配列解析

【0236】

IRBで承認されたプロトコル下で、初期診断または外科的手技からの腫瘍検体を、その後ゲフィチニブで治療したNSCLCをもつ患者から収集した。凍結腫瘍検体は、対応する正常組織とともに、4症例について入手でき、パラフィン包埋された材料を残りの検体のために使用した。加えて、原発性NSCLCの25人の選別していない症例（15人の細気管支肺癌、7人の腺癌、および3人の大細胞肺癌）は、対応する正常組織と共に、Massachusetts General Hospital腫瘍バンクから得た。完全EGFRコード配列の変異解析のために、DNAを検体から抽出し、続いて全28エキソンを増幅して、クローン化していないPCR断片を自動シーケンシングして、ヘテロ接合性の突然変異の存在についてセンスおよびアンチセンスの両方向にエレクトロフェログラム解析した。全ての配列変異体は、複数の独立したPCR増幅によって確認した。プライマー配列および増幅状態は、補充材料に提供してある。また、エキソン19および21におけるEGFR突然変異は、多様な組織像を示す78の癌に由来する株化細胞のパネルに加えて、乳房（15症例）、結腸（20症例）、腎臓（16症例）、および脳（4症例）の原発腫瘍において得られた（下記の一覧表に記載してある）。

【0237】

変異体EGFR構築物の機能解析

L858RおよびdeIL747-P753insS突然変異を部位特異的変異誘発を使用して全長EGFRコード配列に導入して、サイトメガロウイルス駆動発現構築物（pUSE、Upstate）に挿入した。Cos-7細胞には、1 μ gの発現構築物を使用してトランスフェクトし（Lipofectamine 2000、Invitrogen）、続いて18時間後に、ウシ胎児血清を欠いたDMEMに、 5×10^4 細胞/ウェル（12ウェル・プレート、Costar）で再びまいた。血清飢餓の16時間後、細胞を10ng/mlのEGF（SIGMA）で刺激した。ゲフィチニブ阻害を証明するために、EGF（100ng/mlのEGFで30分刺激）の添加前に、薬物を培地に3時間添加した。細胞可溶化物を100 μ LのLaemmli溶解緩衝液に調製し、続いて10% SDS-PAGEでタンパク質を分離して、PVDF膜に転移し、増強化学発光試薬（Amersham）を使用してウェスタンブロット解析した。EGFRの自己リン酸化は、リン酸化チロシンY-1068に対する抗体を使用して測定し、相当するタンパク質発現は、抗EGFR抗体を使用して示した（1:1000の作用濃度；Cell Signaling Technology）。

【0238】

10

20

30

40

50

突然変異解析

EGFR遺伝子を含む28エキソンを増幅するために、原発性腫瘍組織または腫瘍由来株化細胞をから単離したDNAを使用するポリメラーゼ連鎖反応法を使用した。使用したプライマー対は、以下の通りであった：Exon1、

CAGATTTGGCTCGACCTGGACATAG (センス) (SEQ ID NO: 513) および
CAGCTGATCTCAAGGAAACAGG(アンチセンス)(SEQ ID NO: 514); Exon 2,
GTATTATCAGTCAC TAAAGCTCAC (センス) (SEQ ID NO: 515) および
CACACTTCAAGTGGAATTCTGC (SEQ ID NO: 516); Exon 3, CTCGTG
TGCATTAGGGTTCAACTGG (センス) (SEQ ID NO: 517) および
CCTTCTCCGAGGTGGAATTGAGTGAC(アンチセンス)(SEQ ID NO: 518); Exon 4,
GCTAATTGCGGGACTCTTGTTTCGCAC (センス) (SEQ ID NO: 519) および

TACATGC TTTTCTAGTGGTCAG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 520); Exon 5,
GGTCTCAAGTGATTCTACAAACCAG (センス) (SEQ ID NO: 521)および
CCTTCACCTACTGGTTCACATCTG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 522); Exon 6,
CATGGT TTGACTTAGTTTGAATGTGG (センス) (SEQ ID NO: 523) および
GGATACTAAAGATACTTTGTCAC CAGG(アンチセンス) (SEQ ID NO: 524); Exon
7, GAACACTAGGCTGCAAAGACAGTAAC(センス) (SEQ ID NO: 525) および
CCAAGCAAGGCAAACACATCCACC(アンチセンス) (SEQ ID NO: 526); Exon 8,
GGAGGATGGAGCC TTTCCATCAC (センス) (SEQ ID NO: 527) および
GAAGAGGAAGATGTGTTTCCTTTGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 528); Exons 9 および
10, GAATGAAGGATGATGTGGCAGTGG (センス) (SEQ ID NO: 529) および
CAAAACATCAGCC ATTAACGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 530); Exon 11,
CCACTTACTGTTTCATATAATACAGAG (センス) (SEQ ID NO: 531) および
CATGTGAGATAGCATTGTTGGAATGC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 532); Exon 12,
CATGACCT ACCATCATTGGAAAGCAG (センス) (SEQ ID NO: 533) および
GTAATTTACAGTTAGGAATC (センス) (SEQ ID NO: 534); Exon 13,
GTCACCCAAGGTCATGGAGCACAGG (センス) (SEQ ID NO: 535) および
CAGAATGC CTGTAAAGCTATAAC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 536); Exon 14,
GTCCTGGAGTCCCAACTCCTTGAC (センス) (SEQ ID NO: 537) および
GGAAGTGGCTCTGA TGGCCGTCCTG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 538); Exon 15,
CCAC TCACACACACTAAATATTTTAAG (センス) (SEQ ID NO: 539) および
GACCAAAACACCTTAAGTAA CTGACTC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 540); Exon
16, CCAA TCCAACATCCAGACACATAG (センス) (SEQ ID NO: 541) および
CCAGAGCCATAGAACTTGATCAG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 542); Exon 17,
GTATGGACTATGGC ACTTCAATTGCATGG (センス) (SEQ ID NO: 543) および
CCAGAGAACATGGCAACCAGCACAGGAC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 544);
Exon 18, CAAATGAGCTGGCAAGTGCCGTGTC (センス) (SEQ ID NO: 545) および
GAGTTT CCCAAACACTCAGTGAAAC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 546) or
CAAGTGCCGTGTCCTGGCACCCAAGC (センス) (SEQ ID NO: 675) および
CCAAACACTCAGTGAAACAAAGAG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 676); Exon 19,
GCAATATCAGCC TTAGG TGC GGCTC (センス) (SEQ ID NO: 547) および
CATAGAAAGTGAACATTTAGGATGTG(アンチセンス) (SEQ ID NO: 548); Exon

10

20

30

40

20, CCATGAGTACGTATTTTGAAACTC (センス) (SEQ ID NO: 549) および
 CATATCC CCATGGC AAACCTCTTGC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 550); Exon 21,
 CTAACGTTTCGCCAG CCATAAGTCC (センス) (SEQ ID NO: 551) および
 GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 552); Exon 22,
 GACGGG TCCTGGGGTGATCTGGCTC (センス) (SEQ ID NO: 553) および
 CTCAGTACAATAGATAGACAGCAATG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 684); Exon
 23, CAGGACTACAGAAATGTAGGTTTC (センス) (SEQ ID NO: 555) および
 GTGCCTG CCTTAAGTAATGTGATGAC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 556); Exon
 24, GACTGG AAGTGTGCA TCACCAATG (センス) (SEQ ID NO: 557) および
 GGTTTAATAATGCGATCTGGGACAC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 558); Exon 25,
 GCAGCTATAATTTAGAGAACCAAGG (センス) (SEQ ID NO: 559) および GGTT
 AAAATTGACTTC ATTTCCATG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 560); Exon 26,
 CCTAGTTGCTCTAAA ACTAACG (センス) (SEQ ID NO: 561) および
 CTGTGAGGCGTGACAGCCGTGCAG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 562); Exon 27,
 CAACCTACTAATCAG AACCAGCATC (センス) (SEQ ID NO: 563) および
 CCTTCACTGTGTCTGC AAATCTGC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 564); Exon 28,
 CCTGTCATAAGTCTCCTTGTTGAG (センス) (SEQ ID NO: 565) および
 CAGTCTGTGGGTCTAAG AGCTAATG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 566)

10

20

アニーリング温度は、58 (エキソン1、3、4、7~10、12~25、27、および28)、56 (エキソン2、5、6、および26)、または52 (エキソン11)であった。

【0239】

アーカイブ腫瘍組織から抽出したDNAのネスト状PCR増幅は、以下の通りに行った。エキソン2、5、6、7、11、12、14、16、18、19、20、21、23、24、25、26、および27のための最初のPCRは、上記したプライマーおよび条件を使用して作製した。その後、この反応の2 μ lを以下の内部プライマー対を使用する二次PCRで増幅した: Exon2、

30

CAGGAATGGGTGAGTCTCTGTGTG (センス) (SEQ ID NO: 567) および

GTGGAATTCTGCCCAGGCCTTTC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 568); Exon 5,

GATTCTACAAACCA GCCAGCCAAAC (センス) (SEQ ID NO: 569) および

CCTACTGGTTCACATCTGACCCTG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 570); Exon 6,

GTTTGAATGTGGTTTCGTTGGAAG (センス) (SEQ ID NO: 571) および

40

CTTTGTCACCAGG CAGAGG GCAATATC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 572); Exon

7, GACAGTAACTTGGGCTTTCTGAC (センス) (SEQ ID NO: 573) および
CATCCACCCAAAGACTCTCCAAG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 574); Exon11,
CTGTTTCATA TAATAC AGAGTCCCTG (センス) (SEQ ID NO: 575) および
GAGAGATGCAGGAGCTCTGTGC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 576); Exon12,
GCAGTTTGTAGTCAATCAAAGGTGG (センス) (SEQ ID NO: 577) および
GTAATTTAAATGGGAAT AGCCC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 578); Exon14,
CAACTCCTTGACCATTACCTCAAG (センス) (SEQ ID NO: 579) および
GATGGCCGTCCTGCCCACACAGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 580); Exon16,
GAGTAGTTTAGCA TATATTGC (センス) (SEQ ID NO: 581) および
GACAGTCAGAAATGCAGGAAAGC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 582); Exon18,
CAAGTGCCGTGTCCTGGCACCCAAGC (センス) (SEQ ID NO: 583) および
CCAAACACTCA GTGAAACAAAGAG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 584) または
GCACCCAAGCCCATGCCGTGGCTGC (センス) (SEQ ID NO: 677) および
GAAACAAAGAGTAAAGTAGATGATGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 678); Exon
19, CCTTAGGTGCGGCTCCACAGC (センス) (SEQ ID NO: 585) および
CATTTAGGATGTGGAGATGAGC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 586); Exon 20,
GAAACTCAAG ATCGCATTCATGC (センス) (SEQ ID NO: 587) および
GCAAACCTCTTGCTATCCCAGGAG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 588); Exon 21,
CAGCCATAAGTCCTCGACGTGG (センス) (SEQ ID NO: 589) および
CATCCTCCCCT GCATGTGTTAAAC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 590); Exon 23,
GTAGGTTTCTAAACATCAAGAAAC (センス) (SEQ ID NO: 591) および
GTGATGACATTTCTCCAGGGATGC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 592); Exon 24,
CATCACCA ATGCCTTCTTTAAGC (センス) (SEQ ID NO: 593) および
GCTGGAGGGTTTAATAATGCGATC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 594); Exon 25,
GCAAACACACAGGCACCTGCTGGC (センス) (SEQ ID NO: 595) および CATTTTC
CATGTGAGTTTCACTAGATGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 596); Exon 26,
CACCTTCACAATATACCCTCCATG (センス) (SEQ ID NO: 679) および
GACAGCCGTGCAGGGAAAAACC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 680); Exon 27,
GAACCAGCATCTCAAGGAGATCTC (センス) (SEQ ID NO: 681) および
GAGCACCTGGCTTGGACACTGGAG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 682).

10

20

30

40

【 0 2 4 0 】

残りのエキソンのためのネスト状PCR増幅は、以下のプライマーを使用する一次PCRから成った。

Exon1、

GACCGGACGACAGGCCACCTCGTC (センス) (SEQ ID NO: 597) および
GAAGAACGAAACGTCCCGTTCCTCC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 598); Exon 3,
GTTGAGCACT CGTGTGCATTAGG (センス) (SEQ ID NO: 599) および
CTCAGTGCACGTGTACTGGGTA (アンチセンス) (SEQ ID NO: 600); Exon 4,
GTTCACTGGGCTAATTGCGGGACTCTTGTTCGCAC (センス) (SEQ ID NO: 601)
and GGTA AATACATGCTTTTCTAGTGGTCAG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 602);
Exon 8, GGAGGATGGA GCCTTCCATCAC (センス) (SEQ ID NO: 603) および
GAAGAGGAAGATGTGTTTCCTTTGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 604); Exon 9,
GAATGAAGGATGATGTGGCAGTGG (センス) (SEQ ID NO: 605) および
GTATGTGTGAAGGAG TCACTGAAAC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 606); Exon 10,
GGTGAGTCACAGGTTTCAGTTGC (センス) (SEQ ID NO: 607) および
CAAAACATCAGCCATTAACGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 608); Exon 13,
GTAGCCAGCATGTC TGTGTCAC (センス) (SEQ ID NO: 609) および
CAGAATGCCTGTAAAGCTATAAC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 610); Exon 15,
CATTTGGCTTTCCCCACTCACAC (センス) (SEQ ID NO: 611) および
GACCAAAACACCTTAA GTAAGTACTGCTC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 612); Exon
17, GAAGCTACATAGTGTCTCACTTTCC (センス) (SEQ ID NO: 613) および
CACAACTGCTAATGGCCCGTTCTCG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 614); Exon 22,
GAGCAGCCCTGAACTCCGTCAGACTG (センス) (SEQ ID NO: 683) および
CTCAGTACAATAGATAGACAGCAATG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 684); Exon
28a GCTCC TGCTCCCTGTCATAAGTC (センス) (SEQ ID NO: 615) および
GAAGTCCTGCTGGTAGTCAGGGTTG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 616); Exon 28b,
CTGCAGTGGGCAACCCCGAGTATC (センス) (SEQ ID NO: 617) および CAGTC
TGTGGGTCTAAGAGCTAATG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 618)

10

20

30

二次PCR増幅は、以下のプライマー対を使用することにより行った：Exon1、

GACAGGCCACCTCGTCGGCGTC (センス) (SEQ ID NO: 619) および
 CAGCTGATCTCAAGGAAACAGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 620); Exon 3,
 CTCGTG TGCATTA GGGTTCAACTGG (センス) (SEQ ID NO: 621) および
 CCTTCTCCGAGGTGGAATTGAGTGAC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 622); Exon 4,
 GCTAATTGCGGGACTCTTGTTTCGCAC (センス) (SEQ ID NO: 623) および
 TACATGCTTT TCTAGTGGTCAG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 624); Exon 8,
 CCTTCCATCACCCCTCAAGAGG (センス) (SEQ ID NO: 625) および
 GATGTGTTCTTTGGAGGTGGCATG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 626); Exon 9,
 GATGTGG CAGTGGCGGTTCCGGTG (センス) (SEQ ID NO: 627) および
 GGAGTCACTGAAACAAACAACAGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 628); Exon 10,
 GGTTCAGTTGCTTGATAAAG (センス) (SEQ ID NO: 629) および
 CCATTAACGGT AAAATTTTCAAGAAG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 630); Exon 13,
 CCAAGGTCATGGAGCACAGG (センス) (SEQ ID NO: 631) および
 CTGTAAAGCTATAACAACAACCTGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 632); Exon 15,
 CCACTCACA CAACTAAATATTTTAAG (センス) (SEQ ID NO: 633) および
 GTAAGTACTCAAATACAAACCAC (アンチセンス) (SEQ ID NO: 634); Exon 17,
 GAAGCTACATAGTGTCTCACTTTCC (センス) (SEQ ID NO: 635) および CACAA
 CTGCTAATGGCCCGTTCTCG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 636); Exon 22,
 GACGGGTCCTGGGGTGATCTGGCTC (センス) (SEQ ID NO: 685) および
 CTCAGTACAATAGATAGACAGCAATG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 686); Exon
 28a, CCTGTCATAAG TCTCCTTGTTGAG (センス) (SEQ ID NO: 637) および
 GGTAGTCAGGGTTGTCCAGG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 638); Exon 28b,
 CGAGTATCTCAACACTGTCCAGC (センス) (SEQ ID NO: 639) および
 CTAAGAGCTAATGCGGGC ATGGCTG (アンチセンス) (SEQ ID NO: 640)

10

20

30

エキソン1の増幅のためのアニーリング温度は、54 であった。一次および二次増幅の両方のためのアニーリング温度は、58 (エキソン3、4、7~10、12~17、19~25、27、および28)、56 (エキソン2、5、6、および26)、または52 (エキソン11および18) であった。

【0241】

PCR単位複製配列は、シーケンシングの前にエキソヌクレアーゼI (United States Biochemical, Cleveland, OH) およびエビ・アルカリホスファターゼ (United States Biochemical, Cleveland, OH) を使用して精製した。精製したDNAを希釈して、製造業者の説明書に従ってABIBigDye Terminator kit v1.1 (ABI, Foster City, CA) を使用してサイクルシーケンスした。シーケンシング反応をABI3100遺伝子アナライザーで電気泳動した。ヘテロ接合性の位置をマークするために、Sequence NavigatorソフトウェアをFacturaと組み合わせて使用し、突然変異の存在に関してセンスおよびアンチセンス方向にエレクトロフェログラムを解析した。全ての配列変異体は、複数の独立したPCR増幅およびシーケンシング反応で確認した。

【0242】

40

50

癌由来の株化細胞：

14の肺癌由来する株化細胞のパネルを、EGFR突然変異について解析した。これらは、NSCLC (N=5)、小細胞肺癌 (N=6)、扁平上皮癌 (N=1)、気管支カルチノイド (N=1)、および未知組織像 (N=1) の腫瘍に由来した。具体的な株化細胞は、以下の通りであった：NCI-H460、NCI-522、HOP-92、NCIH841、NCIH734、NCIH2228、NCIH596、NCIH727、NCIH446、NCIH1781、NCIH209、NCIH510、NCIH82、NCIH865。加えて、64の癌由来株化細胞を、エキソン19および21の突然変異についてスクリーニングした。これらは、以下の組織像を表した：乳癌 (BT549、BT483、UACC893、HS467T、HS578T、MCF7、MCF7-ADR、MDA-MB-15、MDA-MB-175、MDA-MB-231、MDA-MB-415、MDA-MB-436、MDA-MB-453、MDA-MB-468、T47D)、卵巣癌 (ES-2、IGROV-1、MDAH2774、OV1063、OVCAR3、OVCAR4、OVCAR5、SKOV3、SW626)、CNS癌 (SF-295、SNB-19、U-251、CCF-STTG1、SW-1088、SW-1783、T98G、M059K、A172、SK-N-DZ、SK-NMC)、白血病 (CCRF-CEM、K562、MOLT-4、RPMI8226、SR)、前立腺癌 (DU-145、PC-3)、大腸癌 (COLO-205、HCT-116、HCT-15、HT-29、SW-620)、腎癌 (7860、ACHN、CAKI-1、SN-12C、UO-31)、黒色腫 (LOX-IMVI、M14、SKMEL2、UACC-62)、骨肉腫 (SAOS-2)、および頭頸部癌 (O11、O13、O19、O28、O22、O029、O12)。頭頸部癌株化細胞は、Dr. James Rocco, Massachusetts General Hospital/Massachusetts Eye and Ear Infirmaryによって提供された。他の全ての株化細胞は、ATCC (Manassas, VA) を通して入手可能である。

10

【0243】

ゲノムDNAは、スナップ凍結した腫瘍検体腫瘍検体から単離した。腫瘍検体は、最初に、予め冷却し、かつ滅菌した乳鉢および乳棒を使用して細粉に粉碎した。腫瘍組織を、10mM塩化ナトリウム、10mM Tris pH7.5、25mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム) pH8.0、および0.5% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウムとの100 μg/mlの新鮮なプロテイナーゼKを含むDNA抽出溶液に直ちに移し、37℃にて一晩または50℃にて3時間インキュベートした。次いで、標準的フェノール-クロロホルム法を使用してDNAを抽出し、エタノール沈殿し、70%エタノールで洗浄して、空気乾燥させ、TE緩衝液に再懸濁した。DNA濃度を分光光度的に決定した。ヒトEGFRのエキソン19および21は、以下のプライマー対を使用してポリメラーゼ連鎖反応法によって増幅した：

20

Exon19センスプライマー、

5'-GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC-3' (SEQ ID NO: 505)

30

； Exon19アンチセンスプライマー、

5'-CATAGAA AGTGAACATTTAGGATGTG-3' (SEQ ID NO: 506)

；

Exon21センスプライマー、

5'-CTAACGTTTCG CCAGCCATAAGTCC-3' (SEQ ID NO: 507)

およびExon21アンチセンスプライマー、

5'- GCTGCGAGCTCACCCAG AATGTCTGG-3' (SEQ ID NO: 508)

40

それぞれの試料について、1×Expand Long Template buffer 1 (Roche, Mannheim Germany)、50 μMシーケンシング等級dATP (Amersham Biosciences, Cleveland OH)、50 μMシーケンシング等級dCTP (Amersham Biosciences, Cleveland OH)、50 μMシーケンシング等級dGTP (Amersham Biosciences, Cleveland OH)、50 μMシーケンシング等級dTTP (Amersham Biosciences, Cleveland OH)、0.2 μMセンスプライマー、0.2 μMアンチセンスプライマー、1/6体積のTaq Start Antibody (1.1 μg/1 μl) (Clontech, Palo Alto, CA) と氷上で5分間プレインキュベートした1.25ユニットExpand Long Template酵素混合物 (Taq DNAポリメラーゼ/Tgo DNAポリメラーゼ) (Roche, Mannheim Germany)、および25 μlの最終体積までの水からなるPCR反応で20ngのゲノムDNAを増幅した。また、それぞれの

50

一連の増幅には、DNA鋳型を除いたネガティブ対照を含む。両方のエキソンのためのPCRサイクリング条件は、95℃を2分間、続いて95℃を30s間、58℃を30s間、および72℃を45秒間を40サイクル、並びに72℃を10分間の最終伸張を4℃にて保持することによって、MJ-Research PTC-200またはPTC-225thermal-cycler (MJ-Research, Waltham MA)で行った。

【0244】

PCR産物を0.8%のアガロースゲルを通す電気泳動法によって分離して、患者の材料からの増幅とネガティブ対照において増幅がないことを確認した。PCR単位複製配列 (amplicon) 各々10 µlを0.5 µlのエキソヌクレアーゼI (10U / µl) (United States Biochemical, Cleveland, OH) および1 µlのエピアルカリホスファターゼ (1U / µl) (United States Biochemical, Cleveland, OH) と混合して、37℃で20分間インキュベートし、続いてサーマルサイクラー (MJ-Research, Waltham, MA) で80℃にて15分間不活性化することによってPCR産物をシーケンスする前に精製した。単位複製配列の強度に従って精製したDNAを水に希釈し、製造業者の説明書に従ってABI BigDye Terminatorキットv1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用してサイクルシーケンシングを行った。サイクルシーケンシングは、以下のサイクリング条件を使用してMJ-Researchthermal-サイクラーで行った：シーケンシングのために使用したプライマーは、以下の通りであった：Exon19センスプライマー、

5'-GCAATATCAGCCTTAGGTGCGGCTC-3' (SEQ ID NO: 505)

； Exon19アンチセンスプライマー、

5'-CATAG AAAGTGAACATTTAGGATGTG-3' (SEQ ID NO: 506)

；

Exon21センスプライマー、

5'-CTAACGTTTCGCCAG CCATAAGTCC-3' (SEQ ID NO: 507)

または

5'-CGTGGAGAGGCTCAGAGCCTGGCATG-3' (SEQ ID NO: 687)

およびExon21アンチセンスプライマー、

5'-GCTGCGAGCTCACCCAGAATGTCTGG-3' (SEQ ID NO: 508)

シーケンシング反応をABI3100遺伝子アナライザーで電気泳動した。FacturaおよびSequence Navigatorソフトウェアを使用して、ヘテロ接合性の位置をマークし、評価のためにこれらを示した。二次ピークの高さが一次ピークの高さの30%以上高いヌクレオチド位置をヘテロ接合性としてマークし、センスおよびアンチセンスの両方を読みを解析することによって確認した。突然変異の存在を示す配列をもつ試料を再び増幅して、確認のためにシーケンスした。

【0245】

エキソン19および21に関連する配列解析に使用したプライマーの位置

イントロンのプライマーは、小文字で示し、下線を引いてある。

イントロンの配列は、小文字で示してある。

エキソンの配列は、大文字で示してある。

【0246】

EGFR

Exon19 (5'-3') (SEQ ID NO: 641)。

gcaatatcagccttaggtgctgggctccacagccccagtggtccctcaccttcgggggtgcatcgc
tggtaacatccaccagatcactgggcagcatgtggcaccatctcacaattgccagttaacg
 tcttccttctctctctgtcatagGGA CTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAAGTTAAAATTTCCC
 GTGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATCCTCGATgt
 gagtttctgctttgctgtgtgggggtccatggctctgaacctcaggccaccttttctcatg
 tctggcagctgctctgctctagaccctgctcatctccacatcctaaatgttcactttctatg

【 0 2 4 7 】

EGFR

10

Exon21 (5' -3') (SEQ ID NO: 642) または (SEQ ID NO: 687)

ctaacggttcgccagccataagtcctcgacgtggagaggctcagagcctggcatgaacatgac
 cctgaattcggatgcagagcttcttcccctgatgatctgtccctcacagcagggtcttctct
 gtctcagGGCATGAACTACTTTGGAGGACCGTCGCTTGGTGACCCGCGACCTGGCAGCCAGGA
 ACGTACTGGTGAAAA CACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAAACTGCTG
 GGTGCGGAAGAGAAA GAATACCATGCAGAAGGAGGCAA Agtaaggaggtggcttttaggtcag
 ccagcattttcctga caccagggaccaggctgccttcccactagctgtattgtttaacacat
 gcaggggaggatgct ctccagacattctgggtgagctcgcagc

20

【 0 2 4 8 】

結果

ゲフィチニブ応答者の臨床的特徴

進歩した化学療法不応性のNSCLCである患者は、Massachusetts General Hospitalでは、2000年以降単剤ゲフィチニブで治療してきた。FDAによる2003年5月の承認前に合計275人の患者を、同情的使用の拡張的自主プログラムの一部として、およびその日付後には市販供給を使用して、両方で治療した。この期間に、25人の患者が、有意な臨床効果を有することが臨床家によって同定された。有意な臨床応答は、測定可能な疾患をもつ患者に対しては、RECIST基準を使用して部分的応答と定義し、または腫瘍負担をこれらの基準を使用して定量化することができない患者に対しては、評価できる応答を2人の医師によって評価した。表1は、初診時に得た腫瘍検体が利用できた9症例の臨床的特徴を示す。その他のゲフィチニブ応答者については、最も一般には、診断検体が針吸引液による細胞診断に限られていたので、組織を入手できなかった。群として、9人の患者が、ゲフィチニブから実質的利益を受けた。薬物療法の開始からの生存期間の中央値は18ヶ月を上回り、および治療期間の中央値は16ヶ月を越える。以前の報告と一致して、ゲフィチニブ応答者は女性の有病率が高く、喫煙歴がなく、および気管支肺胞組織像をもつ腫瘍を有する(11, 12)。症例6は、ゲフィチニブ応答性のコホートを代表する。この患者は、32歳の男性で、喫煙歴なしであり、その人は、複数の脳病変および右肺に細気管支肺胞上皮癌と診断された疾患を示した。彼は、全脳放射線療法で治療し、続いて彼の腫瘍が応答しなかったものに対して一連の化学療法措置(カルボプラチンおよびゲムシタビン; ドセタキセル; ビノレルビン)によって治療した。機能状態が減退し、および進行性肺腫瘍負担を伴ったので、彼には、1日あたり250/mgのゲフィチニブでの療法を始めた。彼の息切れはすぐに改善され、治療開始の6週間後の肺CTスキャンでは、図1に示した劇的な改善を示した。

30

40

【 0 2 4 9 】

ゲフィチニブ応答者におけるEGFR突然変異

本発明者らは、ゲフィチニブに対して著明に応答するNSCLCの症例では、EGFRに体細胞突然変異がひそんでいるかもしれないと仮定し、これらの腫瘍において、この成長因子シグナリング経路が果たす必須の役割を示した。このような突然変異を探索するために、本発明者らは、最初に、神経膠腫(15)の特徴であるEGFRの細胞外ドメイン内の再配列について試験したが：何も検出されなかった。したがって、本発明者らは、個々のエキソンの

50

PCR増幅を使用して、遺伝子の全てのコード領域をシーケンスした。ヘテロ接合性の突然変異が、8/9症例において観察され、その全てがEGFRのキナーゼドメインにクラスター形成していた（表2および図2）。4つの腫瘍では、アミノ酸746～750（delE756-A750；症例1）、747～750（delL747-T751insS；症例2）、および747～752（delL747-P753insS；症例3および4）を除去するインフレームの欠失を有した。後の2つの欠失は、欠失中断点に新規コドンを生じることにより、セリン残基の挿入を伴った。意外なことに、これらの4つの欠失は、全ての症例で共有されるエキソン19内の4つのアミノ酸（コドン747～750のロイシン、アルギニン、グルタミン酸、およびアラニン）の欠失が重複していた（図4aを参照されたい）。別の3つの腫瘍では、エキソン21内にアミノ酸置換：コドン858にてロイシンからアルギニンに（L858R；症例5および6）およびコドン861にてロイシンからグルタミンに（L861 Q；症例7）を有した。マウスegfr遺伝子に同じアミノ酸変化は、EGFRシグナリング（18）の変更を伴い、Dark Skin（dsk5）形質の原因となるため、L861Q突然変異は、特に興味をもたれる。キナーゼドメインにおける4つめのミスセンス突然変異は、エキソン18内のコドン719にてグリシンからシステインへの置換を生じた（G719C；症例8）。対応する正常組織が、症例1、4、5、および6に入手でき、かつ野生型配列だけを示したことから、腫瘍形成の間に突然変異が体細胞性に生じたことを示す。突然変異は、ゲフィチニブに応答することができなかったNSCLCの7つの症例において観察されなかった（ $P=0.0007$ ；Fisherの両側直接確率検定）。

10

20

30

40

50

【0250】

NSCLCおよびその他の癌タイプにおける特異的EGFR突然変異の有病率

EGFR細胞外ドメインに影響を及ぼす再配列が広範に研究されてきた神経膠腫とは異なり（15）、NSCLCにおけるEGFR突然変異の頻度は定義されてこなかった。したがって、本発明者らは、ゲフィチニブ研究に無関係なNSCLCの25人の原発性症例（以前の臨床試験においてゲフィチニブ応答性と関連していた15人の気管支肺胞の組織像を含む（11,12））における遺伝子の全てのコード領域をシーケンスした。ヘテロ接合性の突然変異は、2つの気管支肺胞癌において検出された。両症例では、ゲフィチニブ応答者（すなわち、delL747-P753insSおよびdelE746-A750（表2））において見いだされたものと同じのキナーゼドメインのインフレームの欠失を有した。EGFR突然変異においてクラスター形成が明らかであることを考慮して、本発明者らは、合計55の原発腫瘍および78の癌由来株化細胞におけるエキソン19および21をシーケンスし、多様な腫瘍型を示した（補助材料を参照されたい）。突然変異は検出されなかったことから、これらが、EGFRシグナリングが腫瘍形成において重要な役割を果たし得る癌のサブセットのみにおいて生じることが示唆される。

【0251】

突然変異EGFRタンパク質のEGFで誘導される活性化およびゲフィチニブ阻害の増大

これらの突然変異によってコードされる機能的特性を研究するために、L747-S752insS欠失およびL858Rミスセンス変異体を培養細胞において発現させた。野生型および変異体構築物のCos-7細胞への一過性トランスフェクションでは、同等量の発現レベルを示し、突然変異がタンパク質安定性に影響を及ぼさないことを示した。EGFR活性化は、チロシン¹⁰⁶⁸残基のリン酸化を測定することによって定量化し、一般に受容体自己リン酸化のマーカーとして使用した（19）。血清および関連する成長因子の非存在下では、野生型も変異体EGFRも自己リン酸化を示さなかった（図3a）。しかし、EGFの添加により、野生型受容体と比較して、ミスセンスおよび欠失EGFR変異体の両方において2～3倍の受容体活性化の増加を生じた。さらに、正常なEGFR活性化は、受容体インターナリゼーションと一致して、15分後にダウンレギュレートされたのに対して、2つの変異体受容体は、3時間までの間、連続して活性化を示した（図3a）。同様の結果は、EGFの添加後の総EGFRリン酸化を測定する抗体でも得られた（図示せず）。

【0252】

7/8のEGFRキナーゼ突然変異は、ゲフィチニブによってターゲットされるATP裂の近くにあるため、本発明者らは、変異タンパク質が阻害剤に対する感受性を変化させるかどうかを決定した。ゲフィチニブの濃度を変化して前処理した細胞において、EGFで誘導される

受容体自己リン酸化を測定した。意外なことに、両変異体受容体は、ゲフィチニブによる阻害に対する感受性の増大を示した。野生型EGFRは、 $0.1 \mu\text{M}$ の IC_{50} を有し、 $2 \mu\text{M}$ ゲフィチニブにて自己リン酸化の完全な阻害を示したのに対し、2つの変異タンパク質は、 $0.015 \mu\text{M}$ の IC_{50} を有し、 $0.2 \mu\text{M}$ で自己リン酸化がなくなった（図3b）。薬物動態学的研究では、 $400 \sim 600\text{mg}$ のゲフィチニブの1日の経口投与により、 $1.1 \sim 1.4 \mu\text{M}$ の平均定常状態の最低血漿濃度を生じることを示し、一方で、現在推奨される 250mg の1日量では、 $0.4 \mu\text{M}$ （20）の平均最低濃度に至ったので、この薬物感受性の相違は臨床的に妥当であり得る。

【0253】

実施例2

EGFRのキナーゼドメイン内に突然変異がひそみ、したがって、ゲフィチニブ治療による増殖阻害に感受性である腫瘍細胞は、キナーゼドメイン内にさらに「第二の部位」の突然変異を受ける可能性があり、これは、ゲフィチニブに耐性を与えるが、これらが野生型EGFRと比較して増大されたEGFRシグナリングを示すという意味で、さらに「活性化している」。このようなゲフィチニブ耐性の変異体は、2つの散発性ヒトNSCLC株化細胞（すなわち、NCI-1650およびNCI-1975）から作製される。それぞれの株化細胞は、EGFRのキナーゼドメインにヘテロ接合性の突然変異を含み、したがって、ゲフィチニブに感受性であることが予想される。NCI-1650におけるEGFR突然変異は、エキソン19内の位置2235-2249（delLE746-A750）にて15ヌクレオチドのインフレームの欠失からなり、一方で、NCI-1975は、エキソン21内のヌクレオチド2573（L858R）にてGをTと置換するミスセンス突然変異を有する。NCI-H1975のL858R突然変異は、インビトロでゲフィチニブを活性化し、ゲフィチニブに対する感受性を増大させることが本明細書において示された。

【0254】

NCI-1650およびNCI-1975の両方に由来するゲフィチニブ耐性の株化細胞は、EMS（エチルメタンスルホナート）を使用してランダム化学突然変異誘発し、続いてゲフィチニブを補った培地中で培養して耐性クローンの増殖について選択した後に単離された。個々のクローンの継代培養は、EGFRキナーゼドメインに対応するゲノムDNAの特異的なPCRを媒介した増幅後に、EGFR遺伝子のヌクレオチド配列を決定することによって行う。

【0255】

この戦略の変種には、ゲフィチニブに耐性を与えるEGFR遺伝子内の突然変異の自発的獲得について選択するために、数週間または数月の期間にわたって段階的にゲフィチニブの濃度を増大して存在させて、これらの2つの株化細胞を連続継代することを含む。選択された細胞（これは、相対的に高ゲフィチニブ濃度にて増殖し続ける）をコロニーとして単離し、突然変異を上記の通りに同定する。

【0256】

実施例3

受容体チロシンキナーゼの突然変異がNSCLCの原因となる役割を果たすかどうかを決定するために、本発明者らは、日本のNagoya City University Hospitalからの58試料とBrigham and Women's Hospital in Boston, Massachusettsからの61とからなる119の原発性NSCLC腫瘍のセットにおける体細胞の遺伝子の変化について探索した。腫瘍は、74人の男性および45人の女性患者からの70の肺腺癌と49のその他のNSCLC腫瘍を含み、これらの人はいずれも、EGFRキナーゼ阻害剤での治療を考証していなかった。

【0257】

最初のスクリーニングとして、本発明者らは、41の肺腺癌のサブセットを含む58のNSCLC試料由来のゲノムDNAから、58のヒト受容体チロシンキナーゼ遺伝子（*）（表S1）のうち47の活性化ループをコードするエキソンを増幅してシーケンスした。腫瘍のうちの3つ（全て肺腺癌）は、同じ患者（表S2；S0361、S0388、S0389）由来の正常肺組織からのDNAには存在しないEGFRのヘテロ接合性のミスセンス突然変異を示した。突然変異は、その他の受容体チロシンキナーゼ遺伝子からの単位複製配列には検出されなかった。3つの腫瘍全てが、位置858にてロイシン（「L」）からアルギニン（「R」）に変化すると予測される同じEGFR突然変異を有した（図6A；CTG CGG；"L858R"）（全ての番号付けは、ヒトEGF

Rを参照する)。

【0258】

本発明者らは、次に、119のNSCLC腫瘍の完全コレクションのEGFRのエキソン2～25を調べた。ゲノムDNAのエキソン・シーケンシングにより、合計16の腫瘍(全てキナーゼドメインのエキソン18～21内の)におけるEGFRのミスセンスおよび欠失突然変異が明らかになった。この群における全ての配列変化は、腫瘍DNAにおいて異種接合体であり;いずれの場合においても、同じ患者由来の対となった正常肺組織では、野生型配列を示し、突然変異が、もとは体細胞であることを確認した。ヌクレオチドおよびタンパク質配列変化の分布、およびこれらの異常と関連する患者の特徴を表S2に要約してある。

【0259】

置換突然変異G719SおよびL858Rは、それぞれ2つおよび3つの腫瘍で検出された。「G719S」突然変異は、位置719にてグリシン(G)をセリン(S)に変える(図6B)。これらの突然変異は、それぞれ、ヌクレオチド三リン酸結合ドメインのGXGXXGモチーフ(SEQ ID NO: 490)または活性化ループのP-ループおよび隣接する高度に保存されたDFGモチーフに位置する(52)。図7を参照されたい。変異した残基は、全てのプロテインキナーゼでほとんど不変であり、B-Rafタンパク質セリンスレオニンキナーゼの類似の残基(G463およびL596)が、結腸直腸、卵巣、および肺癌腫において体細胞性に変異している(41, 53)(図6A、6B)。

【0260】

また、本発明者らは、EGFRのキナーゼドメイン内のコドン746～759におよぶ領域にわたってクラスター形成している複数の欠失突然変異を検出した。10の腫瘍は、ヌクレオチド2235または2236にて始まる、EGFRコドン746～750を除去する15ヌクレオチドの2つの重複する欠失のうちの1つを有する

(Del-1; 図6Cおよび8C; 表S2)。別の腫瘍由来のEGFR DNAは、コドン752～759の欠失を生じるヘテロ接合性の24ヌクレオチド・ギャップを示した(Del-2; 図6C)。代表的なクロマトグラムを図8A-8Fに示してある。

【0261】

EGFRキナーゼドメインの活性型の三次元構造における置換突然変異およびDel-1欠失の位置(54)を図7に示してある。配列変化は、キナーゼの活性部位のまわりにクラスター形成しており、置換突然変異が活性化-ループおよびグリシン-リッチなP-ループ(多くのプロテインキナーゼにおける自己調節に重要なことが公知の構造エレメント(52))に位置する点に留意されたい。

【0262】

2つの異なる腫瘍型における2つのさらなるEGFR突然変異が同定された。すなわち、本発明者らは、急性骨髄性白血病(AML)におけるEGFR突然変異G857Vおよび転移性肉腫におけるEGFR突然変異L883Sを同定した。「G857V」突然変異は、位置857にてバリリン(V)で置換されたグリシン(G)を有し、一方で、「L883S」突然変異は、位置883にてセリン(S)で置換されたロイシン(L)を有する。これらの知見は、EGFRにおける突然変異がいくつかの腫瘍タイプで生じること、および最も重要なことに、EGFR阻害剤がこのような突然変異のひそむ患者の治療においてに効果的なことを示唆する。これにより、NSCLC以外の腫瘍タイプを治療する際の、たとえばチロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブ(イレッサ(登録商標))として市場に出された)、エルロチニブ(タルセバ(登録商標))を市場に出された)等のキナーゼ阻害剤のことにける等)の使用が拡大する。

【0263】

EGFR突然変異は、日本および米国の患者集団で記載された差動的な患者の特徴と著明な相関を示す。上記の如く、臨床試験では、チロシンキナーゼ阻害剤ゲフィチニブ(イレッサ(登録商標))に対する応答において有意な変動性を示し、日本の患者において、主に欧州由来集団よりも高い応答が見られ(27.5%対10.4%の、多組織の第二相試行において)(48);米国では、女性で、非喫煙者で、および腺癌である患者において、より頻繁に部分的応答が見られた(49-51)。本発明者らは、EGFR突然変異が、腺癌において(15/70ま

10

20

30

40

50

たは21%)、その他のNSCLCにおける(1/49または2%)よりも頻繁にあったことを示し;女性(9/45または20%)において、男性(7/74または9%)におけるよりも頻繁に、かつ日本由来の患者において(15/58または26%、および14/41腺癌または32%)、米国由来のものよりも(1/61または2%、および1/29腺癌または3%)頻繁にあることを示す。EGFR突然変異で最も高い割合は、腺癌(8/14または57%)で、日本の女性で観察された。特に、EGFR突然変異の存在と相関する患者の特徴は、ゲフィチニブ治療に対する臨床応答と相関するものであるように見える。

【0264】

EGFR突然変異がゲフィチニブ感受性の決定因子であり得るどうかを調査するために、前処理NSCLC試料を、応答した5人の患者とゲフィチニブで治療の間に進行した4人の患者とから得た。これらの患者は、同情的使用の拡張的自主プログラムの、またはゲフィチニブの法的認可後のいずれかに、Dana-Farber Cancer Instituteにて治療された125人以上の患者から割り出された(49)。患者のうちの4人は、部分的X線撮影応答を有したが(治療の2ヶ月後のCTスキャンにおいて50%の腫瘍退縮)、一方で、5人目の患者は、2ヶ月未満に劇的な症候改善を受けた。患者は全員米国の出身であり、かつカフカス人であった。

【0265】

キナーゼドメイン(エキソン18~24)のシーケンシングでは、腫瘍がゲフィチニブに対して進行した4人の患者由来の腫瘍における突然変異は明らかにされず、ゲフィチニブ応答性患者由来の全5つの腫瘍は、EGFRキナーゼドメイン突然変異がひそんでいた。二乗検定では、ゲフィチニブ応答者(5/5)と非応答者(0/4)との間で、 $p=0.0027$ で統計学的に有意なEGFR突然変異体頻度の相違が明らかになり、一方で、ゲフィチニブ応答者と選別していない米国NSCLC患者との間の相違(5/5対1/61)も、 $p < 10^{-12}$ (*)で有意であった。選別していない腫瘍において以前に観察されたEGFR L858R突然変異は、1つのゲフィチニブ感受性肺腺癌において同定された(図6A;表S3A、IR3T)。3つのゲフィチニブ感受性腫瘍は、ヘテロ接合性のインフレーションの欠失を含み(図6Cおよび表S3AおよびS3B、2つの症例においてDel-3および1つにおいてDel-4)、1つは、ホモ接合性のインフレーションの欠失を含んだ(図6C並びに表S3AおよびS3B、Del-5)。これらの欠失は、それぞれEGFRのコドン746~753領域内にあり、欠失が選別していない腫瘍においても見いだされた。また、これらの3つの欠失はそれぞれ、アミノ酸置換と関連する(表S3A-S3C)。対応する正常組織を入手できた全4つの試料では、これらの突然変異が体細胞と同様に確認された。

【0266】

実施例3A:プライマーデザイン

受容体チロシンキナーゼのcDNA配列はGenBank(表S1の一覧表に記載されたアクセッション番号)から得て、ヒトゲノム構築(<http://genome.ucsc.edu>)に対してBLAT整列を使用してエキソン/イントロン境界を同定する。外部遺伝子特異的なプライマー対は、Primer3プログラムを使用して、それぞれの側に対して、エキソン配列と、少なくとも250bpの隣接するイントロン配列または隣接したエキソン配列とを増幅するようにデザインした(http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html)。次いで、生じる予測単位複製配列を使用して、エキソンに隣接し(一般にエキソン/イントロン境界から50bpよりも大きい)かつ末端に添えたM13フォワードまたはリバースプライマー尾部を含む内部プライマーをデザインした。これらのネスト状プライマーセットを、対照DNA由来の適切な単位複製配列サイズおよび高品質の配列について試験した。47のチロシンキナーゼの受容体チロシンキナーゼ活性化ループをコードするエキソンを包含する単位複製配列が増幅され、Nagoya City University Medical Schoolからの58の原発性肺癌試料のセットにおいてシーケンスした。加えて、全長EGFRをカバーする単位複製配列も増幅した。

【0267】

実施例3B:PCRおよびゲノムDNAのためのシーケンシング方法

チロシンキナーゼエキソンおよび隣接イントロンの配列は、384ウェル形式のネスト状PCR構成で、特異的プライマーを使用して増幅した。それぞれのPCR反応には、5ngのDNA、1×HotStar Buffer、0.8mM dNTPs、1mM MgCl₂、0.2U HotStar Enzyme(Qiagen, Valencia

、CA)、並びに0.2 μ Mフォワードおよびリバースプライマーを10 μ Lの反応体積に含んだ。PCRサイクリングパラメーターは、以下の通りであった: 95 $^{\circ}$ Cを15分の1サイクル、95 $^{\circ}$ Cを20s、60 $^{\circ}$ Cを30s、および72 $^{\circ}$ Cを1分の35サイクル、続いて72 $^{\circ}$ Cを3分の1サイクル。

【0268】

生じるPCR産物は、固相可逆固定化化学、続いて汎用M13プライマーで二方向色素ターミネーター蛍光シーケンシング (bi-directional dye-terminator fluorescent sequencing) によって精製した。シーケンシング断片は、ABI Prism3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用して、キャピラリー電気泳動法を経て検出した。PCRおよびシーケンシングは、Agencourt Bioscience Corporation (Beverly, MA) によって行った。

10

【0269】

実施例3B: 配列分析およびバリデーション

フォワード (F) およびリバース (R) クロマトグラムは、Mutation Surveyor 2.03 (SoftGenetics, State College, PA)、続いて手動再調査によってバッチで解析した。変異が一方または両方の方向で見いだされた高品質配列を候補突然変異として記録した。上記の様に、候補突然変異がひそむエキソンを本来のDNAから試料を増幅し、再びシーケンスした。

【0270】

実施例3C: 患者

肺腫瘍検体は、Nagoya City University HospitalおよびBrigham and Women's Hospital (それぞれ、選別していない日本腫瘍およびゲフィチニブで治療下米国腫瘍) にて治療された非小細胞肺癌である患者から、および施設内倫理委員会下で研究が承認されたBrigham and Women's Hospitalの匿名腫瘍バンク (選別していない米国試料) から得た。性、年齢、および組織学上の情報は、大部分の試料で入手できた。患者試料は、Dana-Farber Cancer Institute (13) にてゲフィチニブのオープンラベル臨床試験で治療した患者からも得た。ゲフィチニブに対する応答は、標準的基準を使用して定義した (A. B. Miller, B. Hoogstraten, M. Staquet, A. Winkler, 1981 Cancer 47, 207-14を参照されたい)。これらの研究のためにIRB承認を得た。

20

【0271】

ゲフィチニブ応答性の患者には、少なくとも1サイクルの化学療法で以前に治療された2人の患者、放射線療法で以前に治療された1人の患者、化学療法で同時に治療された1人の患者、および他のいかなる治療も受けなかった1人の患者がいた。ゲフィチニブ非感受性の患者については、治療の失敗は、ゲフィチニブ治療の2ヶ月後において、新たな腫瘍病変の外見またはベースラインCTスキャンと比較して、CTスキャンにおいて既存の腫瘍病変が増殖していることとして定義した。

30

【0272】

実施例3D: 患者試料のcDNAシーケンシング

総RNAは、Trizol (登録商標) (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して組織試料から単離し、RN easy (登録商標) mini-elute cleanup kit (Qiagen, Valencia, CA) を使用して精製する。cDNAは、Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen Life technologies, Carlsbad, CA) で、製造業者の推奨に従って2 μ gの総RNAから転写する。その後のEGFRのPCR増幅のために、cDNAを鋳型として使用する。

40

【0273】

PCRの成分は、以下の通りである: 20mM Tris-HCl (pH 8.4)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.1mMのそれぞれのdATP、dCTP、dGTP、dTTP、0.2 μ Mのそれぞれのプライマー、および0.05ユニット/ μ L Taqポリメラーゼ (Taq Platinurn, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)。断片「a」の増幅には、反応に4%のDMSOの添加が必要である。プライマー配列は、表S4の一覧表に記載してある。フォワードおよびリバースプライマーは、それぞれオーバーハングM13フォワードおよびリバース配列の18塩基対で合成する。熱サイクリング条件は、以下の通りである: 94 $^{\circ}$ C、4分; 続いて、94 $^{\circ}$ Cで20' 'の変性工程、72 $^{\circ}$ Cで20' 'の伸長工

50

程、およびサイクル1の60 ～ サイクル11の50 まで1 / サイクルで減少させて20 ' ' のアニーリング工程で11サイクル；次いでサイクル11を25回繰り返した。72 にて6分のインキュベーション、続いて4 の浸漬によってプログラムを完了する。

【0274】

PCR反応のアリコートを手で1：50希釈する。希釈したPCR産物を、M13 Forward Big Dye Primer Kit (Perkin-Elmer / Applied Biosystems, Foster City, CA) を使用して、製造業者の推奨に従ってシーケンする。シーケンシング産物を蛍光配列決定装置 (Applied Biosystems, Foster City, CAからのmodel3100) で分離する。塩基呼び出しを機器ソフトウェアによって作製し、目視検査によって再検査する。それぞれの配列は、Sequencher 4.1ソフトウェア (Gene Codes Corp.) を使用して、対応する正常配列と比較する。

10

【0275】

実施例3E：変異体EGFRを発現する腫瘍タイプ

2つのさらなるEGFRの突然変異が、2つの異なる腫瘍タイプで見いだされた。位置857 (「G857V」) にてグリシン (G) をバリン (V) と置換したEGFR突然変異は、急性骨髄性白血病 (AML) において同定された。転移性肉腫において、位置883 (「L883S」) のロイシン (L) をセリン (S) で置換するEGFR突然変異。

【0276】

実施例3F：株化細胞

NSCLC株化細胞に対するゲフィチニブの効果をインビトロで調べた。1つの株化細胞 (H3255) は、特にゲフィチニブに感受性であり、40nMの IC_{50} であった。その他の株化細胞は、より高い IC_{50} を有した。たとえば、野生型株化細胞H1666は、2 μ Mの IC_{50} を有し、これは、変異体株化細胞よりも50倍高い。この株化細胞からのEGFRをシーケンスしたときに、L858Rミスセンス突然変異を含んだが、一方、その他の株化細胞は、EGFRに関して野生型であった。EGFR、更にはEGFRによるAKTおよびERKリン酸化を遮断するためには、EGFR野生型細胞と比較して (同一の効力を達成するために少なくとも100倍高濃度のゲフィチニブが必要であった)、より低濃度のゲフィチニブが必要とされた。これらの知見は、変異体受容体がゲフィチニブの効果により感受性であることを示唆する。また、本明細書において留意されたい。

20

【0277】

実施例3G：併用療法。

30

腫瘍検体は、エルロチニブの有無にかかわらずカルボプラチン / パクリタキセルのランダム治験で治療した、進行したNSCLCである患者からのものを解析した。この治験の臨床的部分では、2つの治療アームにおいて同等の生存を証明した。腫瘍検体は、1076人の患者のうちの228人から、シーケンシングに利用できた。これらの患者の予備的臨床的特徴は、全体として、ベースライン人口統計、反応率、中央値、および全体の生存に関して、本グループと異なるない。

【0278】

チロシンキナーゼドメインのエキソン18～21をシーケンスし、29の突然変異 (12.7パーセントの突然変異頻度) を同定した。

【0279】

40

全体として、EGFR突然変異をもつ患者は、彼らが化学療法単独で、またはエルロチニブと併せて治療を受けたかどうかにかかわらず、より長く生存する。これらの相違は、統計学的に有意であり、0.001未満の確率値である。これらの知見から、EGFR突然変異は、ゲフィチニブおよびエルロチニブに対する応答の予言者であることに加えて、生存が改善されることについて予想する可能性が生じる。

【0280】

(*) 選別していない米国患者におけるEGFR突然変異の頻度 (61のうちの1) は、報告された10.4%のゲフィチニブ応答の頻度と比較したときに低いように見える点に留意されたい。この相違は、適度の統計的有意性を有する (二乗試験による $p=0.025$)。したがって、この結果は、なおも偶然のためであり得るか、EGFR突然変異を有しない一部分の応答

50

者のためであり得るか、または実験的にこの腫瘍コレクションにおけるEGFR突然変異を検出することができないためであり得る。ゲフィチニブ応答性の米国患者におけるEGFR突然変異の頻度は(5/5)、ゲフィチニブ応答の予想される頻度(10.4%)と比較した場合、二乗確率は、再び10~12未満である。

【0281】

実施例4

研究デザイン

本発明者らは、Massachusetts General Hospital (MGH)、Dana-Farber Cancer Institute (DFCI)、およびBrigham and Women's Hospital (BWH)にて2004年8月2日~2005年1月までの体細胞EGFRキナーゼドメインのシーケンシングで調べたNSCLC患者の遡及コホート研究を行った。これらの3つの機関には、Dana-Farber/Partners Cancer Care (DF/PCC) (1年あたり約1,200人の肺癌患者を看護する学術ジョイントベンチャー癌センター)を含む。2004年8月には、EGFRキナーゼドメイン・シーケンシングをDF/PCCにて臨床用途のために利用できるようになった。臨床家は、試験で調べるため患者を選択することができるが、しかし、患者は、十分かつ適切に利用できる腫瘍検体を有することが必要であった。腫瘍細胞は、MGHおよびBWH参照病理学者による組織学的検査に基づいて、検体の少なくとも50%を含まなければならず、検体は、原発性もしくは転移性腫瘍からの切除、気管支鏡生検、もしくはコア針生検、または胸腔内液から細胞ブロックからでなければならなかった。まれな場合には、細針吸引液試料を適切に決定した。試料は、パラフィン包埋されているか、または凍結組織であることができる。扁平細胞腫瘍におけるEGFR突然変異は、低発病率であるために(62)、この診断である患者は、試験対象にはしなかった。

【0282】

本発明者らは、Laboratory for Molecular Medicine (LMM), of the Harvard Medical School/Partners HealthCare Center for Genetics and Genomics (CLIA#22D1005307) (全てのシーケンシングが行われ、解明された診断試験施設)にて維持されたEGFR取り扱い症例を使用してEGFR試験を受けている患者を同定した。本発明者らは、研究期間の間にNSCLC診断を伴うDF/PCCからのEGFR試験で調べた全ての患者を含んだ。

【0283】

患者の年齢、性、および人種は、電子診療記録システムから収集した。喫煙状態、癌病歴、EGFRキナーゼドメイン・シーケンシング結果、およびその後のEGFR-TKI治療方針は、構成された医師チャート総説を使用して考証した。具体的には、喫煙状態および癌病歴は、医師および看護ノートから得た。以前の喫煙者は、彼らの肺癌の診断の少なくとも1年前に喫煙をやめた患者として定義し、喫煙未経験者は、彼らの生涯に100本未満のタバコを吸った患者として定義した。彼らの診断の1年以内にやめたか、または診断時に喫煙していた喫煙者は、現在の喫煙者として分類した。パック-喫煙の年数は、1日あたりに吸ったパックの数を喫煙の年数を掛けることによって算出した。腫瘍組織像およびEGFRキナーゼドメイン・シーケンシング結果は、病理学報告から得た。全ての病理学検体は、中心的にMGHまたはBWHにて概説されており、組織像は、世界保健機構(WHO)分類系(63)を使用して分類した。その後の治療方針は、医師ノートから得た。

【0284】

完全なデータは、年齢、性、腫瘍組織像、およびEGFR突然変異状態について入手できた。人種(12%)、試験時の腫瘍段階(4%)、喫煙状態(6%)、従来の治療(5%)、およびその後のEGFR-TKI治療方針(11%)についてのデータは、失われた。この研究は、DF/PCCの施設内倫理委員会によって承認された。

【0285】

EGFR遺伝子シーケンシング:

凍結したか、またはホルマリン固定した、いずれかをパラフィン包埋した(FFPE)腫瘍組織の連続切片を切断し、ガラススライド上に配置した。少なくとも50%の生存可能な腫瘍細胞からなる腫瘍組織領域を病理学者によって同定した。FFPE試料をキシレンおよびエタノールで抽出し、パラフィンを除去した。FFPEおよび凍結組織試料をプロテイナーゼK

で一晩消化した。ゲノム・デオキシリボ核酸 (DNA) を、標準的方法を使用して組織および末梢全血から抜いた。ゲノムDNAは、DNA Genotek-Oragene (登録商標) 唾液キットを使用して、唾液試料から抽出した。

【0286】

EGFRのキナーゼドメイン (エキソン18~24および隣接するイントロンの領域) は、個々のネスト状ポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) 反応のセットで増幅した。ネスト状PCR増幅に使用したプライマーは、表S1AおよびB並びにSEQ ID NO: 1~424に記載されており、プライマー

(5' tgtaaacgacggccagt) (SEQ ID NO. 645)

10

の5' 末端に汎用配列を付加する。PCR産物は、色素-ターミネーターシーケンシングによって双方向的に直接シーケンスした。PCRは、5ng ゲノムDNA、2mM MgCl₂、0.75 μl DMSO、1 M ベタイン、0.2mM dNTPs、20pmol プライマー、0.2 μl AmpliTaqGold (登録商標) (Applied Biosystems)、1× 緩衝液 (AmpliTaqGoldで供給される) を含む15 μlの体積で、384ウェル・プレートで行った。熱サイクリング条件は、以下の通りであった: 95、10分間; 95、30秒間、60、30秒間、72、1分間を30サイクル; および72、10分間。PCR産物は、Ampure (登録商標) Magnetic Beads (Agencourt) で精製した。

【0287】

シーケンシング産物は、Cleanseq (登録商標) Magnetic Beads (Agencourt) を使用して精製し、ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) でのキャピラリー電気泳動法によって分離した。配列解析は、Mutation Surveyor (SoftGenetics, State College, PA) によって、手動で2人の調査官によって行った。非同義DNA配列変異体は、本来のゲノムDNA試料の3~5回の独立したPCR反応の解析によって確認した。配列変化が腫瘍組織に独特だったかどうかを決定するために、非同義DNA配列変異体をもつ個体由来の血液または唾液試料を解析した。

20

【0288】

統計解析:

本発明者らは、患者の人口統計学および臨床的特徴とEGFR突然変異状態との間の一変量の関連を評価するために、ロジスティック回帰モデルを構築した。突然変異陽性状態の有意な予言者を同定するために、本発明者らは、予測的突然変異として、従来の研究で同定された独立変数、具体的には性、人種、組織像、および喫煙状態を含む多変数ロジスティック回帰モデルを構築した。6人の患者では、PCRを失敗した結果、EGFR突然変異データを失ったため、これらの解析から除外した。全ての解析は、SAS統計ソフトウェア (バージョン8.02、SAS Institute, Cary, NC) を使用して行った。

30

【0289】

結果:

患者の特徴:

研究期間の間に臨床的癌治療の一部として体細胞のEGFRキナーゼドメイン・シーケンシングで調べたNSCLCである100人の患者の中で、平均年齢は、60.7年であり、63%が女性であった (表4)。大部分の患者は、白人 (76%) またはアジア人 (7%) であり、試験が命じられた時に、転移性疾患を有した (67%)。EGFR突然変異について試験したほとんど全ての患者 (94%) は、腺癌、細気管支肺胞性の癌腫 (BAC) 特色をもつ腺癌、または純粋なBACを有した。患者の約1/3は、喫煙未経験者であった。EGFR試験について照会前に施された療法は、外科手術 (50%)、胸部放射線療法 (22%)、化学療法 (47%)、およびEGFRに向けてターゲットされる療法 (11%) を含んだ。

40

【0290】

同定された突然変異:

試験で調べてから結果を入手できるまでの平均延べ時間は、12営業日であった。提出した大部分の検体は、パラフィン包埋されていた (74%)。74のうちの6つのパラフィン包埋した検体 (8%) では、PCR増幅に失敗したが、26全ての凍結検体はうまく増幅した。解釈

50

可能な結果である94人の患者の中で、23人(24%)がEGFRキナーゼドメインに少なくとも1つの突然変異を有することが見いだされ、同定した合計25個の突然変異について、これらの患者のうちの2人が、それぞれ2つの点突然変異を示した(表5)。突然変異がある23人の患者の中で、9人(39%)が1つまたは複数の点突然変異を有し、12人(52%)は、エキソン19にインフレームの重複する欠失を有し、2人の患者(9%)は、エキソン20に重複を有した。点突然変異は、エキソン18および21にあり、5つの2573T>G(L858R)(、並びにそれぞれ1つの2126A>T(E709V)、2155G>A(G719S)、2156G>C(G719A)、2327G>A(R776H)、2543C>T(P848L)、および2582T>A(L861Q)を含んだ。点突然変異(P848L)のうちの1つは、腫瘍検体において、および頬側スワブから得られる単核細胞において、両方で検出された。突然変異は、エキソン22、23、または24では検出されなかった。

10

【0291】

突然変異の予測変数：

本発明者らの試料では、EGFR突然変異状態と年齢($p=0.61$)、女性の性($p=0.92$)、アジア人($p=0.08$)、または照会時の転移性疾患($p=0.43$ 、表4)との間に有意な関連はなかった。非腺癌腫瘍組織である6人の患者では、だれも突然変異を有することが見いだされなかった。腺癌、BAC特色をもつ腺癌、および純粋BACである患者の中で、BAC/BAC特色とEGFR突然変異状態($p=0.35$)との間に関連はなかった。

【0292】

17人の現在の喫煙者では、だれも突然変異を有することが見いだされなかった。喫煙未経験者は、以前の喫煙者よりもEGFR突然変異を有する可能性が有意に高かった(オッズ比[OR]=3.08, 95%の信頼区間[CI]1.09-8.76)。パック-喫煙年の平均数は、EGFR突然変異-陰性患者(25.0パック-年、 $p<0.001$)と比較して、EGFR突然変異陽性患者(0.7パック-年)において有意により低かった。それぞれのさらなるパック-喫煙年については、突然変異を有する可能性が4%減少した(OR=0.96(95% CI 0.93-0.99))。

20

【0293】

パック-喫煙年数は、性、人種、および腫瘍組織を制御した後の突然変異状態の有意な予言者のままであった(OR=0.96、95% CI 0.93-0.99)。

【0294】

試験情報のその後の使用：

EGFR突然変異陽性患者は、EGFR突然変異陰性患者(11%、 $p<0.001$)よりも、その後のEGFR-TKI治療(86%)を受けるための計画を実証する可能性が有意に高かった。臨床家は、EGFR結果が、症例の38%において、推奨された療法の優先順位に影響を及ぼすことを実証した。これらの症例には、試験が陰性であった試験を受けるよりも前にEGFR-TKI療法が推奨された23人の突然変異陽性患者のうちの14人(61%)と、EGFR-TKI療法が推奨されなかったか、または試験が陽性であった試験を受けた後で推奨された71人の突然変異陰性患者のうちの24人(34%)とを含んだ。

30

【0295】

EGFR突然変異状態により、局部的または局所的に疾患が進行した患者(19%、 $p=0.003$)におけるよりも、転移性疾患である患者(54%)における治療選択肢の優先順位が変化する可能性が高かった。この知見を考慮して、本発明者らは、さらに転移性患者における意思決定プロセスを解析した(図10)。試験結果が治療推奨に影響を及ぼした転移性疾患である31人の患者の中で、5人の突然変異陽性患者には、第一次EGFR-TKI治療を提供し、6人の突然変異陽性患者には、化学療法の代わりに第二次EGFR-TKI治療を提供した。20人の突然変異陰性患者には、彼らの陰性EGFR試験結果に基づいて、第三次治療またはそれ以上までEGFR-TKI治療を延期することを奨励した。試験結果が治療推奨に影響を及ぼさなかった転移性疾患である26人の患者の中で、2人の突然変異陰性患者は、彼らが否定的結果であるにもかかわらず、第一次EGFR-TKI治療を受けた、4人の突然変異陽性患者を含む9人の患者は、第二または第三次EGFR-TKI治療を受け、2人の突然変異陽性患者を含む15人の患者は、EGFR-TKIのための推奨を受けなかった。転移性疾患である患者のうちの3人は、第一次EGFR-TKI療法を評価する試験に関与していた。転移性疾患である患者のうちの9人は、E

40

50

GFR試験時にEGFR-TKIを以前に受けたか、または受けていた。

【0296】

考察：

本発明者らは、最初に、本発明者らの機関にて、臨床的癌治療の一部として体細胞のEGFR突然変異についてスクリーニングを受けたNSCLCである100人の患者を研究し、本試験が可能であり、有意にNSCLC患者の治療に影響を与えることを見いだした。EGFR突然変異がひそむ患者は、突然変異のない患者よりもEGFR-TKI療法についての推奨を受ける可能性が有意に高かった。医師は、症例の1/3以上において、試験結果に基づいて彼らの治療推奨を調整し、転移性疾患である患者において、よりそのようにする可能性が高かった。本発明者らの患者試料において、医師は、数人の患者に対して、特に第一次または第二次治療に対して、化学療法以上にEGFR-TKIを優先させる決定をするのを補助するために、陽性なEGFR試験結果を使用した。しかし、陰性EGFR試験結果では、医師が選択した患者に対してEGFR-TKIを投与するのを防げなかった。試験結果が臨床的意思決定に影響を与えなかった患者の多くは、疾患を切除した早期段階であるか、または試験時にすでに転移性疾患のためにEGFR-TKIを受けていた。補助療法としてのEGFR-TKIの有用性は、わかっていなかったもので、これは、合理的であり、EGFR突然変異が同定されていない小数の患者におけるEGFR-TKI療法に対しても利益があった（65、66～70、71）。

10

【0297】

また、本発明者らの研究は、分子診断法により、EGFR突然変異をもつ患者を同定するための臨床的能力を増強することができるという証拠を提供する。多くの腫瘍学者が、現在では、NSCLCである患者のための意思決定プロセスの手引きのために、EGFR突然変異およびEGFR-TKIに対する反応と関連した臨床的特徴を使用する。実際に、EGFR試験で調べた患者の本発明者らの集団は、このような特徴の有病率が増大されたことを証明した。たとえば、一般的なNSCLC集団における45%と比較して、調べた患者の95%では、腺癌またはBAC腫瘍組織を有した（72）。本発明者らの集団の29%が、喫煙未経験者を含んだが、一般的なNSCLC集団における喫煙未経験者の発病率は、2～10%と報告されており、NSCLCである女性の27%と同じ程度であり得る（73～75）。同様に、新たに診断されたNSCLC患者の中で、38～75%の割合の現在に喫煙者と比較して、本発明者らの集団は、17%のみの現在の喫煙者からなった（75、78～80）。したがって、本発明者らの臨床的に選択した集団は、実質的に、本発明者らおよび選別していない入手可能なNSCLC腫瘍試料を試験したその他の米国グループによって実証された割合よりも高い24%のEGFR突然変異率を有した（65～66、81）。しかし、臨床家が、試験のためにEGFR突然変異の予測的な臨床的特徴を有する患者を選択することを試みているように思われると共に、突然変異体頻度は、いまだ24%であり、分子診断法が臨床決定を行うために入手可能な情報を増大することが最も重要な部分となる点に留意することが重要である。

20

30

【0298】

喫煙状態は、本発明者らの患者におけるEGFR突然変異状態の最も強力な予言者であり、前述した突然変異状態の予言者に対して調節した後には、喫煙歴の増大が、EGFR突然変異のひそむ可能性の有意な減少に関連された。本発明者らの結果は、その他の一連の症例と一致しており、EGFR突然変異の可能性における喫煙状態の重要性を実証している（66、69、70、81、82）。扁平細胞腫瘍ではEGFR突然変異の有病率が極めて低いことにより（62）、腺癌腫瘍の方へ試験効果が移ってきたのと同じように、喫煙歴が少ないか、または未経験患者に対して将来の努力を集中させることが適切であり得る。しかし、典型的な臨床的特徴をもたない患者におけるEGFR突然変異の報告は、厳密な試験限界に対する助言となる（83）。突然変異と関連すると考えられるその他の臨床的特徴を調べるときに、本発明者らは、アジア人種およびBAC腫瘍組織がEGFR突然変異状態を予測することに対して有意な傾向を有さないことを見いだした。これらの関連に統計的有意性がないのは、試料サイズが小さいためである可能性がある。

40

【0299】

試験は、臨床的癌治療の時間制約内で可能であり、かつ適していた。解析のために提出

50

された腫瘍のほとんど全てが、解釈可能な結果を生じた。PCR増幅に失敗した6検体は、全てパラフィン包埋されていたが、一方、凍結検体では、いずれのPCR増幅も失敗しなかった。入手可能なときは、新鮮な凍結組織が、EGFR突然変異試験のための好ましい基質である。

【0300】

これまでに、部分的または完全なEGFR配列分析を受けたことが報告された2,500人近くのNSCLC試料に近似していた。本発明者らの患者は、以前の報告と同様の突然変異を示し、重複するエキソン19の9～23塩基対の欠失とエキソン18および21に単一のアミノ酸置換を生じる点突然変異をもつ。本発明者らが見いだした点突然変異のうちの5つは、上記した(E709V、G719S、G719A、L858R、およびL861Q)。本発明者らが見いだした点突然変異のうちの1つは、異なるアミノ酸置換が以前に記載されていたコドンに、アミノ酸置換を生じさせる(R776H)。E709VおよびR776H変異体は、それぞれコドン719を含む公知のゲフィチニブを感作する抗原突然変異と併せて見いだされた。エキソン21におけるP848L突然変異は、体細胞および類側試料において見いだされ、これが、有意性が不確かな生殖系列変異体であるかもしれないことを示唆した。ゲフィチニブ治療に対して15ヶ月間安定な疾患を有した腺癌である女性の患者は、EGFR突然変異試験の前に、喫煙したことがなかった。P848L突然変異が明らかになったときに、彼女は、進行性疾患を有することが最近見いだされ、エルロチニブ療法が始まった。エルロチニブに対する応答に関する情報は、この時点では入手できない。

【0301】

(2253_2276 del)欠失は、前述したエキソン19欠失と重複する。本発明者らの患者における欠失は、2群：最小限にコドン747-749にわたるもの(アミノ酸配列LRE)とコドン752-759(図11)にわたるもののうちの1つに分類することができる。現在までに報告された全てのエキソン19の欠失の解析は、広範な多様性のアミノ酸がコドン747-759にわたるチミジンキナーゼ領域から欠失し得ることを示唆する。共通のコドンが欠失されることが必要とは思われないが；本発明者らが検出した欠失の全てが、位置745にリジン残基を維持した。

【0302】

2つのエキソン20の突然変異のうちの一方は、本発明者らのEGFR試験が行われた後にエルロチニブで治療され、かつこの時点で2ヶ月間安定な疾患を有した再発性腺癌である、喫煙未経験女性のものである。他方は、EGFR-TKIで治療された転移性腺癌をもつ以前に喫煙している男性であるが、重篤な発疹のためにそれを許容することができなかった。臨床的に関連したエキソン20のEGFR突然変異の同定は、EGFRのチミジンキナーゼ領域の包括的シーケンシングが重要であることを強調する。

【0303】

結論として、本研究は、臨床的癌治療の一部としての、NSCLC患者における体細胞突然変異に関するEGFR遺伝子のチミジンキナーゼ領域の包括的スクリーニングの実現可能性および有用性を証明する。試験の結果は、EGFR-TKI応答の臨床的予言者に関して、有用な情報を提供する。現在の喫煙者は、突然変異がひそむ可能性は低く、そのことは多数のパック-年の喫煙歴をもつ以前の喫煙者も同様である。

【0304】

実施例

非小細胞肺癌のためのEGFR遺伝子試験

標準的操作手順：

臨床徴候：

本試験は、非小細胞肺癌である個体について示してある。

分析原理

EGFR遺伝子試験は、EGFRのキナーゼドメインの突然変異を検出する遺伝子検査である。最初に、DNAを腫瘍生検から得る。次いで、EGFRの7つのエキソン(18、19、20、21、22、23、24)のDNA配列を直接、双方向性遺伝子シーケンシングによって決定する。次いで、

10

20

30

40

50

得られた配列を公知のEGFR配列と比較してDNA配列変化を同定する。DNA配列変化が腫瘍組織において検出される場合、もとの組織試料に対して試験を繰り返す。変化がゲフィチニブまたはエルロチニブ応答者において以前に報告されていなかった場合、突然変異が構成的であるか（したがって、正常に生じている多型の可能性が高い）、または腫瘍組織において体細胞性に生じたかどうかを決定するために、試験を個々の血液試料でも行う。

【0305】

検体要件：

最小でも100ngのDNAが組織試料から必要であった。注：DNAが極めて少量であれば、組織試料から抽出してもよい。このDNAの濃度は、正確に定量化しなくてもよい。

【0306】

品質管理：

使用した対照

それぞれのエキソンについて2つのネガティブ対照（水）とポジティブ対照（ヒトDNA）をPCR反応に含める。ネガティブ対照は、得られた配列が汚染の結果ではないことを確認するために、全ての手順を通じて続行するべきである。pGEMポジティブ対照およびABIアレイ対照は、シーケンシング工程に含める。

【0307】

対照調製および貯蔵：

PCRのためのポジティブ対照は、ClontechヒトDNAか、または匿名の血液試料からのヒトDNAであり、4℃に貯蔵する。PCR反応のためのネガティブ対照は、室温に貯蔵されたHyPure分子生物学等級水である。pGEMポジティブ・シーケンシング反応対照およびABIアレイ対照は、-20℃に貯蔵する。

【0308】

個々の対照がない場合の許容範囲および行うべき工程：

ポジティブPCR対照がないが、ネガティブ対照および試料を通用する場合、PCR結果は、パスとして命名し、シーケンシングを行う。ネガティブ対照がDNA増幅の徴候を示す場合、全反応を患者のDNAの新たなアリコートで繰り返す。pGEM対照がなく、かつ試験反応がない場合、実行したシーケンシングをPCR産物の第二のアリコートで繰り返す。シーケンシング対照が反応がなく、試験反応を通用する場合、シーケンシングを繰り返す必要はない。注：パラフィン包埋された組織試料からのDNA抽出は低収率であるため、外側PCR反応では、可視産物を生じないことが多い。内側PCR反応では、可視産物を生じるはずである。適切なPCR産物が得られたことを確認するために、ゲルで検出される産物のサイズを予想されるサイズと比較するべきである（下記を参照されたい）。内側PCR産物がゲル上に見えない場合、エキソン特異的PCR失敗が繰り返されるはずである。

【0309】

個々の試料についてPCR増幅ができない場合、投入DNA鋳型を2倍に増やして新たなPCRのラウンドを試みるべきである。再びPCR増幅ができない場合、入手できるならば、その患者のための新たなDNA試料を得るべきである。試料がパラフィン包埋された組織試料である場合、さらなるスライドを搔爬すべきである。入手できるならば、もとの試料を作製するために使用したのよりも多くのスライドを搔爬して、プロテイナーゼKでの消化を3夜の間おこなうべきである。

【0310】

設備および試薬（他に断らない限り、全ての試薬は1年間安定）

【0311】

PCRおよびシーケンシング（一般に、PCRおよびシーケンシング設備および試薬は、当業者に公知であり、本明細書に、また上記したとおりに使用してもよい）

【0312】

プライマー：（下記の表6および7を参照されたい）

（表6）外側PCRプライマー：

10

20

30

40

エキソン	フォワードプライマー配列, (5'→3')	SEQ ID NOS	リバースプライマー配列, (5'→3')	SEQ ID NOS
18	TCAGAGCCTGTGTTTCTACCAA	653	TGGTCTCACAGGACCACTGATT	646
19	AAATAATCAGTGTGATTTCGTGGAG	654	GAGGCCAGTGCTGTCTCTAAGG	647
20	ACTTCACAGCCCTGCGTAAAC	655	ATGGGACAGGCACTGATTGT	648
21	GCAGCGGGTTACATCTTCTTTC	656	CAGCTCTGGCTCACACTACCAG	649
22	CCTGAACTCCGTCAGACTGAAA	657	GCAGCTGGACTCGATTTCCT	650
23	CCTTACAGCAATCCTGTGAAACA	658	TGCCCAATGAGTCAAGAAGTGT	651
24	ATGTACAGTGCTGGCATGGTCT	659	CACTCACGGATGCTGCTTAGTT	652

10

【 0 3 1 3 】

(表 7) 内側PCRプライマー :

エキソン	フォワードプライマー配列, (5'→3')	リバースプライマー配列, (5'→3')	産物長 (bp)
18	TCCAAATGAGCTGGCAAGTG (SEQ ID NO 660)	TCCCAAACACTCAGTGAAACAAA (SEQ ID NO 667)	397
19	GTGCATCGCTGGTAACATCC (SEQ ID NO 661)	TGTGGAGATGAGCAGGGTCT (SEQ ID NO 668)	297
20	ATCGCATTTCATGCGTCTTCA (SEQ ID NO 662)	ATCCCCATGGCAAACCTTTG (SEQ ID NO 669)	378
21	GCTCAGAGCCTGGCATGAA (SEQ ID NO 663)	CATCCTCCCCTGCATGTGT (SEQ ID NO 670)	348
22	TGGCTCGTCTGTGTGTGCA (SEQ ID NO 664)	CGAAAGAAAATACTTGCATGTCAGA (SEQ ID NO 671)	287
23	TGAAGCAAATTGCCCAAGAC (SEQ ID NO 665)	TGACATTCTCCAGGGATGC (SEQ ID NO 672)	383
24	AAGTGTGCGCATCACCATGTC (SEQ ID NO 666)	ATGCGATCTGGGACACAGG (SEQ ID NO 673)	302
F プライマー リンカー	tgtaaaacgacggccagt (SEQ ID NO 645)	全てのフォワードプライマーの5'末端	18
R プライマー リンカー	aacagctatgacctg (SEQ ID NO 674)	全てのリバースプライマーの5'末端	16

20

30

【 0 3 1 4 】

注意

(表 8)

作業	指示	リスク
1. PCR 準備	PCRフードを使用 専用ピペットおよびフィル ターチップを使用 フード内においてのみ試薬 を開く	PCR反応物の混入
2. PCRフードを 使用	フード内でいずれの PCR 後試料または試薬も使用 しない	PCR反応物の混入

40

50

【 0 3 1 5 】

外側PCRのためのPCR反応混合物の調製

ゲノムDNAのための全ての手順をPCRフード内（クリーンフードではない）で行った。

1. 氷上でTaqGoldおよびdNTPを融解する。
 2. 下記の表を使用して、チューブ（eppendorfまたは15mlのチューブ）にマスター混合物を調製する。水、Betaine, 10×緩衝液、MgCl₂、DMSO、Taq Gold、およびdNTPは、一覧表に記載した順序で添加するべきである。それぞれの試薬を添加すると共に、ピペット操作によって穏やかに上下して試薬を混合することが非常に重要である。
 3. DNAは、等分する前にマスター混合物に添加するべきである。大量のマスター混合物を作製した後に、アリコートそれぞれの患者または態様のために分離したチューブに96 μ lのアリコートをとる（8rxnsのために十分）。5ng / μ lの8 μ lのDNAを、96 μ lのマスター混合物に添加する。次いで、プレートの個々のウェルに13 μ lを添加するか、またはストリップチューブにおいて、多チャンネルピペッタでピペットする。
 4. 全384-ウェル・プレートの反応のためには、約415反応のために十分なマスター混合物を作製する。
 5. 気泡を除去するために、マスター混合物のプレートを回転させる。
 6. 多数のプライマーセットを使用するならば、これらを別々のプレートにフォワードプライマーとリバースプライマーと共に96ウェル・プレートにいれると助けになるであろう。
 7. 多チャンネルピペットを使用してプライマーを添加する。ピペット操作によって穏やかに上下して確実に混合する。
 8. いずれの気泡も除去するために、プレートを回転させる。
 9. 増幅するために下記のサイクルを使用する。
- 注：PCRは、384-ウェル・プレートで行う。

10

20

【 0 3 1 6 】

（表 9）試薬

試薬	反応あたりの体積 (μ L)
オートクレーブした ddH ₂ O	4.90
5M ベタイン	3.00
10X 緩衝液	1.50
塩化マグネシウム	1.50
DMSO	0.75
Taq	0.20
dNTP	0.15
PCRフォワードプライマー1 (濃度 20pmol/uL)	1.00
PCRリバースプライマー 2 (濃度 20pmol/uL)	1.00
DNA (濃度 5ng/uL)	1.00
PCR 反応の合計体積	15.00

30

40

【 0 3 1 7 】

（表 1 0）PCR増幅サイクル

Taq Gold の活性化	10 分	95 °C	
変性	30 秒	95 °C	30 サイクル
アニーリング	30 秒	60 °C	
	1 分	72 °C	
伸長	10 分	72 °C	
保持	∞	4 °C	

10

注：浄化は、外側PCRを行った後には必要ない。

【 0 3 1 8 】

内部PCRのためのPCR反応混合物

内側PCRの準備は、少数の例外もあるがほぼ外側PCRと同じである。

1. PCRフード内で外側PCRのために記載したように大量のマスター混合物を作製する。
2. 7つのストリップチューブにMMをアリコートを取り、384-ウェル・プレートへ12 µlを多チャンネルピペットする。
3. フォワードおよびリバース内側プライマーをそれぞれ1 µL添加する。一時的に、プレートを封止する。
4. フードから取り出して、プレートを遠心沈殿し、PCR準備後の領域に進む。
5. 専用のピペットを使用して、1 µlの外側PCR産物をそれぞれの反応にアリコートをとる。
6. 加熱封止して、再び回転する。
7. 外側と同じ増幅サイクルを実行する。

20

【 0 3 1 9 】

精製前に1%のゲルでPCR産物を泳動する。繰り返しPCRについて、適用 / 失敗エキソンを決定する。

【 0 3 2 0 】

Ampure磁気ビーズ精製を使用する内側PCRの精製

【 0 3 2 1 】

精製

1. Ampure磁気ビーズのプレートを、ビーズの沈着がなくなるまでボルテックスする。
2. Ampureビーズの温度は、室温にてあることが非常に重要である。
3. Biomekの384-ウェルAmpureプロトコルを使用して、反応体積を12 µLに変えて精製のために使用する試薬を適応する。これを行わない場合、誤りが生じる。
4. プログラム完了後、1ウェルあたり20 µlのオートクレーブしたddH₂Oでプレートに水分を添加する。水を添加する間に、ピペット操作によって穏やかに上下して確実に混合する。
5. いずれの気泡も除去するために、プレートを回転させる。
6. ビーズを析出するために、磁石上にプレートをおく。ここで、あなたは、1 µLのDNAを準備シーケンシング反応に取り上げることができるはずである。残りを将来の使用のために-20 °Cに取っておく。

40

【 0 3 2 2 】

シーケンシング・プロトコル

シーケンシング反応混合物の調製

1. 氷上で、暗所においてBigDye 3.1を融解する。
2. 下記の表を使用して、チューブ（eppendorfまたは15mlのチューブ）にマスター混合物を調製する。水、緩衝液、DMSO、およびBigDyeは、一覧表に記載されたに順に添加すべきである。
3. それぞれの試薬を添加すると共に、ピペット操作によって穏やかに上下して試薬を

50

混合することが非常に重要である。

4. 汎用プライマーを使用するときは、シーケンシングのためのプライマーも、この時点でマスター混合物に添加することができる。プライマーが独特である場合、マスター混合物を384-ウェル・プレートにいったあと、これを個々に添加するべきである。

5. 全384-ウェル・プレートの反応のためには、約415反応のために十分なマスター混合物を作製する。

6. 一旦マスター混合物が準備されれば、ストリップチューブの8つのウェルに混合物を分ける。(マスター混合物のアリコートをとるために貯蔵所を使用しない。それは、試薬の消耗である。)

7. ここで、多チャンネルピペットを使用してマスター混合物を384-ウェル・プレートにアリコートをとることができる。

8. 気泡を除去するために、マスター混合物のプレートを回転させる。

9. 多チャンネル・ピペットを使用してシーケンスするPCR産物を添加する。ピペット操作によって上下して確実に混合する

10. いずれの気泡も除去するために、プレートを回転させる。

11. 増幅するために下記のサイクルを使用する。

【 0 3 2 3 】

(表 1 1)

試薬	反応あたりの体積 (μL)
オートクレーブした ddH ₂ O	4.38
5X ABI 緩衝液	3.65
DMSO	0.50
ABI BigDye 3.1	0.35
シーケンシングプライマー 濃度	0.12
内側 PCR 反応由来の DNA	1.00
反応の合計体積	10.00

【 0 3 2 4 】

(表 1 2) シーケンシングのためのPCR増幅サイクル

変性	10 秒	96 °C	25 サイクル
アニーリング	5 秒	50 °C	
伸長	4 分	60 °C	
保持	∞	4 °C	

【 0 3 2 5 】

Cleanseq磁気ビーズ精製を経た精製

1. Cleanseq磁気ビーズのプレートをビーズの沈着がなくなるまでボルテックスする。

2. BiomekのCleanseq 384-ウェル・プレート・プログラムを使用して試料を精製する。

3. 一旦プログラムが行われたら、もとのプレートを-20 に保存する。清潔な試料を含む新たなプレートをABI 3730を行うために準備する。

(注 : PCR産物が300bpよりも短い場合、あなたは、3730にこれを置く前に試料を希釈しな

ければならないかもしれない)。

【0326】

EGFR試験のために突然変異検査テンプレートを作製し、LMM/Sequencing/Sequences-MSR
view / EGFRにこれらを保存する。

【0327】

繰り返し反応基準

全ての陽性結果を、特定のエキソン(その中のDNA配列変化が、もとの組織試料に由来する患者のDNAの第二のアリコートから検出された)を増幅し、シーケンスすることによって繰り返される。加えて、患者の血液試料から抽出したDNAを平行して泳動し、検出された配列変化がゲフィチニブまたはエルロチニブ応答者において以前に検出されていなかったかどうかを、腫瘍組織と比較するべきである。

10

【0328】

抽出、PCR、またはシーケンシングのいずれかからの明瞭な配列を生じなかったいずれのエキソンでも、特定の技術的問題に基づいて繰り返した。

【0329】

アッセイパラメーター

試験の感受性-体細胞のEGFRキナーゼドメイン突然変異の感受性は、NSCLCである個体の約13%に見いだされた(Paez JG et al., 2004)。加えて、体細胞のEGFRキナーゼドメイン突然変異は、ゲフィチニブ応答性であったNSCLCである13/14(92.8%)の個体においても見いだされた(Paez JG et al., 2004, Lynch, et al., 2004)。試験の技術的感受性の確認では、公知の突然変異に対する100%の感度を証明し、本発明者らの研究室におけるシーケンシング・プラットフォームの確認では、100%の感度を示す(下記の「技術の精度」を参照されたい)。モザイク試料の突然変異検出についての感度は、25%であることが決定された(すなわち、細胞混合物の50%にて存在するときに、ヘテロ接合性突然変異を検出することができる)。本発明者らは、20%までのパラフィン包埋された組織が高品質DNAを生じないことを見いだした。本発明者らは、これらの試料から配列情報を得ることができない。

20

【0330】

試験の特異性-今日まで、公表された文献では、EGFRに体細胞突然変異がある個体は、ゲフィチニブに反応しない(11/11)ことを示す。双方向シーケンシングの人為的結果のために突然変異が見いだされる可能性は、0%近くである(下記の「技術の精度」を参照されたい)。したがって、試験の特異性は、約100%である。

30

【0331】

技術の精度-DNAシーケンシングの技術は、分子診断法の標準法(Gold standard)である。本研究室では、98.5%の精度を有することが報告されているABI 3730 DNA Analyzerを使用する。双方向シーケンシング、Mutation Surveyorでの自動クロマトグラム解析、および偽陽性の手動解析をこれと組み合わせ、本発明者らは、100%の精度を達成した。これは、生の配列の100,000以上の塩基解析に基づいている。この評価の詳細については、本発明者らの品質保証プログラムマニュアルを参照されたい。

【0332】

注:本発明者らは、これらの結果が、このプラットフォームの100%の精度を保証するとは考えない。シーケンスの誤りは生じ得るし、したがって、本発明者らは、本発明者らの精度が、大規模シーケンシングプロジェクトによって99.99%のあると見いだされたことを報告する(Hill et al. 2000)。

40

【0333】

試験の再現性-結果が達成されるとき試験の精度により、試験の精度と同等の再現性がある(99.99%)。しかし、ときどき、試験は、以下に一覧を記載した要因により(方法の制限を参照されたい)、または未解明の技術的な理由によるPCRまたはシーケンシングの失敗のために、失敗しうる。これらの場合、結果は達成されず、結果が達成されるか、または患者の検体が容認できないと考えられるまで、アッセイ法を繰り返す。それぞれの

50

アッセイ工程の、および検体の具体的な失敗率は、本発明者らの品質保証プログラムマニュアルの精度報告において見いだすことができる。

【0334】

結果の正常な範囲-EGFR遺伝子の正常配列は、GenBankアクセッション番号：NT_033968.5 (ゲノム配列) およびNM_005228.3 (mRNA配列) を使用して、オンラインで見いだすことができる。

【0335】

方法の制限：

1つまたは複数のエキソンにわたる大きな欠失は、特にヘテロ接合性に存在する場合、シーケンシング法によっては検出されない。キナーゼドメインの外側のEGFR遺伝子の突然変異は、本アッセイ法によっては検出されない。阻害剤をDNA試料中に存在させて、PCRによる増幅を防いでもよい。分解されたDNAは、分析可能なデータを生じなくてもよく、検体の再提出が必要であるかもしれない。ターゲットされたプライマー配列のまれな配列変異または二次構造は、PCR増幅に影響を及ぼす可能性があり、したがって、突然変異は、1つの対立遺伝子のその領域にないことがある。

【0336】

実施例6

ゲフィチニブ (イレッサ) は、上皮細胞成長因子受容体 (EGFR) をターゲットするチロシンキナーゼ阻害剤であり、EGFRキナーゼドメインの突然変異を活性化することで、非小細胞肺癌 (NSCLC) における劇的な臨床効果を誘導する。本発明者らは、これらの変異体EGFRが、AktおよびSTATシグナリング経路を選択的に活性化し、これが細胞生存を促進するが、増殖を誘導するErk / MAPKシグナリングに対して効果を有さないことを報告する。変異体EGFRを発現するNSCLCは、siRNAを媒介した変異体EGFRのノックダウンまたはAktおよびSTATシグナリングの薬理的阻害剤での処置に続いて、広範なアポトーシスを受け、従来の化学療法剤によって誘導されるアポトーシスに対して比較的耐性であった。したがって、変異体EGFRは、NSCLCが依存的になる生存シグナルを選択的に伝達し、したがって、ゲフィチニブによるこれらのシグナルの阻害は、顕著な臨床効果の基礎をなし得る。

【0337】

EGFRファミリーの受容体チロシンキナーゼは、増殖、生存、遊走、および分化を含む必須の細胞機能を調節し、固形腫瘍の原因および進行の中心的役割を果たすと思われる (R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284,31 (2003), H. S. Earp, T. L. Dawson, X. Li, H. Yu, Breast Cancer Res. Treat. 35,115 (1995))。EGFRは、乳房、肺、結腸、卵巣、および脳腫瘍において頻繁に過剰発現されており、触媒ドメイン内のATPポケットに結合することによってEGFRキナーゼ活性を崩壊させる、ゲフィチニブなどの特異的な薬理的阻害剤の開発を促す (A-E. Wakeling et al., Cancer Res. 62,5749 (2002))。ゲフィチニブは、化学療法不応性のNSCLCである約10%の患者に対して劇的な臨床応答を誘導した (J. Baselga et al., J.Clin. Oncol. 20,4292 (2002), M. Fukuoka et al., J. Clin. Oncol. 21,2237 (2003), G. Giaccone et al., J Clin Oncol. 22,777 (2004), M. G. Kris et al., JAMA 290,2149 (2003))。実質的に、全てのゲフィチニブ応答性の肺癌が、EGFRキナーゼドメイン内に体細胞突然変異がひそむが、非応答性の症例では、突然変異が見られなかった (T. J. Lynch et al., N.Engl. J. Med. 350,2129 (2004), J. G. Paez et al., Science 304,1497 (2004))。これらのヘテロ接合性突然変異は、ATP結合ポケット内にクラスター形成した小さなインフレイムの欠失およびミセンスの置換を含む。

【0338】

変異体EGFRの一過性トランスフェクションを使用して、本発明者らは、両タイプの突然変異が、Y1068 (EGFRの顕著なC末端リン酸化部位のうちの1つ) の自己リン酸化によって測定するとEGF依存的な受容体活性化の増大を導くことを以前に示した (T. J. Lynch et al., N. Engl. J. Med. 350,2129 (2004))。

【0339】

10

20

30

40

50

変異体EGFRによるシグナリングにおける定性的相違の研究を可能にするために、本発明者らは、野生型または変異体EGFRを発現する非形質転換マウス乳房上皮細胞 (NMuMg) の安定な系統を作製し、別の下流のエフェクターの活性化にリンクした、複数のチロシン残基のEGFを媒介した自己リン酸化を解析した (R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284, 31 (2003))。野生型EGFRまたはゲフィチニブ応答性患者由来の腫瘍で検出された2つの反復突然変異：ミスセンス突然変異L858Rおよび18bpインフレームの欠失 (delL747-P753insS) のうちの1つを発現した株化細胞を作製した。野生型と2つの変異体EGFRとの間で、いくつかのC末端部位にて有意に異なるチロシン・リン酸化パターンが観察された。Y1045およびY1173のEGFで誘導されるリン酸化は、野生型と変異体EGFRとの間で実質的に見分けがつかなかったが、Y992およびY1068のリン酸化は、両方の変異体において実質的に増大した。面白いことに、Y845は、L858Rミスセンス変異体において高度にリン酸化されたが、野生型または欠失変異体ではリン酸化されず、それ故、EGFR突然変異の2つのタイプ間の区別する際に独特であるように見える。野生型および変異体受容体で見られる差動的なEGFで誘導されるチロシン・リン酸化パターンは、一過性にトランスフェクトしたCOS7細胞でも再現性があり、潜在性細胞型に特異的な効果を保証した。

10

【0340】

したがって、ゲフィチニブ応答性変異体EGFRは、野生型EGFRによって媒介されるものとは定性的に異なるシグナルを伝達する。これらの相違は、基質特異性に影響を及ぼす触媒ポケット内の構造変化により、またはEGFRシグナリングを調整する補助タンパク質との相互作用が変更されたことにより、直接生じ得る。

20

【0341】

変異体EGFRを安定にトランスフェクトした株化細胞の確立により、共有細胞のバックグラウンドにおけるEGFRの主要な下流標的のリン酸化状態を比較することができた。EGFで誘導されるRasを経たErk1およびErk2の活性化、PLC / PI3Kを経たAktの活性化、およびJAK2を経たSTAT3およびSTAT5の活性化は、EGFRの発癌効果を媒介する必須の下流経路である (R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284, 31 (2003))。EGFで誘導されるErk活性化は、野生型EGFRを発現する細胞間で、または2つの活性化EGFR変異体のいずれにおいても、本質的に見分けがつかなかった。対照的に、AktおよびSTAT5のリン酸化は、変異体EGFRのいずれも発現する細胞では実質的に上昇した。STAT3のリン酸化の増大は、変異体EGFRを発現する細胞でも同じように観察された。変異体EGFRによるErk活性化に変化がないことは、ShcおよびGrb-2アダプターのための重要なドッキング部位であるY1173のリン酸化 (これにより、Ras活性化およびその後Erkリン酸化に至る) が増大されないことと一致する (R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284, 31 (2003))。変異体EGFRの活性化に続いて増大されるAktおよびSTATリン酸化は、Y992およびY1068リン酸化の増大 (いずれも、以前にAktおよびSTAT活性化にリンクされていた) に一致する (R. N. Jorissen et al., Exp. Cell Res. 284, 31 (2003))。したがって、EGFR変異体内のC末端チロシン残基の、EGFで誘導される選択的自己リン酸化は、下流のシグナリング経路の選択的な活性化に十分に相関される。

30

【0342】

これらの観察を、EGFR突然変異が腫瘍形成を駆動するように見える肺癌細胞まで拡張するために、本発明者らは、5つのNSCL腫瘍に由来する系統を研究した。NCI-H1975は、再発性のヘテロ接合性ミスセンス突然変異L858Rを有し、NCI-H1650は、インフレームの欠失delE746-A750を有するが、NCI-358、NCI-H1666、およびNCI-H1734は、野生型EGFRを発現する。トランスフェクト細胞と同様に、EGFで誘導されるY992およびY1068の自己リン酸化は、内因性EGFR突然変異をもつ2つの系統において著しく上昇し、同様にAktおよびSTAT5のリン酸化も上昇したが、Erkでは上昇しなかった。

40

【0343】

EGFRの発癌活性は、細胞増殖および細胞生存を促進するシグナルの活性化を反映する (S. Grant, L. Qiao, P. Dent, Fro7zt. Biosc. 7, d376 (2002))。これらの経路は重複を示すが、Rasを媒介したErkキナーゼの活性化は、実質的にEGFRの増殖性の活性に寄与

50

するが、一方AktおよびSTATの活性化は、主に抗アポトーシスの機能にリンクしている (S. Grant, L. Qiao, P. Dent, *Front. Biosci.* 7, d376 (2002), F. Chang et al., *Leukemia* 17,1263 (2003), F. Chang et al., *Leukemia* 17,590 (2003), F. Chang et al., *Int. J. Oncol.* 22,469 (2003), V. Calo et al., *J. Cell Physiol.* 197,157 (2003), T. J. Ahonen et al., *J. Biol. Chem.* 278, 27287 (2003))。EGFR突然変異がひそむ2つの肺癌株化細胞は、低血清中濃度にてEGFに対する増殖反応を示したが、これは、野生型受容体をもつ細胞では観察されなかった。しかし、コンフルエンスにおけるこれらの増殖速度および細胞密度は、正常な血清中濃度に相当した。

【0344】

SiRNA

対照的に、アポトーシス経路は、変異体EGFRをもつ肺癌細胞では著しく異なっており：これらの株化細胞におけるsiRNAを媒介した変異体EGFRの特異的な不活性化は、迅速かつ大量のアポトーシスを生じた。L858R特異的siRNAをトランスフェクトした約90%のNCI-H1975細胞は、96時間以内に死滅し、delE746-A750特異的siRNAをトランスフェクトしたNCI-H1650細胞でも同様であった。いずれのEGFR突然変異に対する特異的SiRNAも、代替の突然変異を発現する細胞に対しては全く効果を有さず、野生型および変異体EGFRの両方をターゲットするsiRNAは、野生型受容体のみを発現する細胞の生存度に対して最小限の効果を有したが、EGFR変異体を発現する系統では、迅速に細胞死が誘導された。siRNAsが対応するEGFR対立遺伝子の特異的にターゲットする能力は、トランスフェクトしたCOS7細胞において免疫プロットによって確認した。したがって、変異体EGFRの発現は、これらの突然変異がひそむ肺癌におけるプロアポトーシスシグナルの抑制のために必須のように見える。野生型受容体のみを発現する肺癌細胞は、EGFR発現に対して同様の依存性を示さないという事実は、また、野生型EGFRを過剰発現するヒト腫瘍の相対的ゲフィチニブ非応答性の原因であるかもしれない。

【0345】

変異体EGFRがひそむ肺癌におけるゲフィチニブの有効性は、これらの細胞が厳密に依存することとなる重要な抗アポトーシス経路のその阻害、並びに変異体受容体における変更された生化学的性質の両方に反映され得る。本発明者らは、変異体EGFRがEGF依存的な自己リン酸化のゲフィチニブ阻害に対して、野生型受容体よりも感受性であることを以前に報告した (T. J. Lynch et al., *N. Engl. J. Med.* 350, 2129 (2004))。変異体受容体によるこの薬物感受性の増大は、ErkおよびSTAT5活性化についても観察された。したがって、変異体受容体によるEGFで誘導されるシグナリングは、差動的な自己リン酸化イベントを経て下流のエフェクターの選択的な活性化を証明すると共に、ゲフィチニブによるこれらの阻害の増強は一樣であり、かつ変異体ATPポケットに対する薬物結合が変更されたことを反映し得る。

【0346】

EGFRを媒介したNSCLC生存においてAktおよびSTATシグナリングが増大されたことの関連を確立するために、本発明者らは、これらの経路の特異的な薬理的阻害剤でターゲットした。EGFR突然変異がひそむ肺癌細胞は、野生型受容体をもつ細胞よりもゲフィチニブに対して100倍感受性であった。また、変異体EGFRを発現する細胞は、AktまたはSTATシグナリングの薬理的阻害に対して、野生型EGFRのみを発現する細胞よりも感受性であった。EGFR-変異体肺癌細胞は、Akt/STATを媒介した抗アポトーシスシグナルの破壊に対して感受性が増大されることを示したが、これらは、一般に使用される化学療法薬ドキソルビンおよびシスプラチンによって誘導される細胞死シグナルおよびプロアポトーシスFas-リガンドに対する耐性が著しく増大されることを証明した。

【0347】

したがって、変異体EGFRをもつ細胞においてAkt / STATシグナリングが増強されるということは、さらなる治療標的を提供するかもしれず、一方で、従来の化学療法がこれらの腫瘍に対してあまり有効ではなくなる可能性が高くなる。

【0348】

10

20

30

40

50

「発癌遺伝子耽溺性」は、これらが依存的になった増殖シグナルの抑制に続く癌細胞のアポトーシスを説明するために提唱された (I. B. Weinstein, Science 297, 63 (2002))。面白いことに、イマチニブ (グリベック) は、BCR-ABL転位置産物を発現する慢性骨髄性白血病において、および活性化c-Kit突然変異を発現する消化管間質腫瘍において有効に細胞死を誘発し、その両方共が、薬物によって有効に阻害される構成的STAT活性化を頻繁に示す (T. Kindler et al., Leukemia 17, 999 (2003), G. P. Paner et al., Anticancer Res. 23,2253 (2003))。同様に、EGFRキナーゼ突然変異をもつ肺癌細胞でも、ゲフィチニブ応答性は、大部分が、変異体受容体によって伝達される必須の抗アポトーシスシグナルのその有効な阻害によって生じ得る。

【0349】

10

材料および方法

免疫ブロッティング

培養細胞由来の可溶化液を氷冷RIPA溶解溶液 (1%トリトンX-100、0.1% SDS、50mM Tris-HCl、pH 7.4、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、10mM β-グリセロールリン酸、10mM NaF、1mMプロテアーゼ阻害剤を含むオルトバナジウム酸Na) 中に調製した。12,000 × gで10分間、4℃にて微量遠心管中で遠心分離することによって細片を除去した。浄化された可溶化液をゲルローディング緩衝液中で煮沸して、10%のSDS-PAGEによって分離した。タンパク質をニトロセルロースに電気転写して、特異的抗体で、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合二次ヤギ抗体細胞シグナリング (Beverly (MA) ; 1:2000) とのインキュベーションおよび増強された化学発光 (DuPont NEN) で発色、続くオートラジオグラフィーで検出した。ホスホEGFR Y845、Y992、Y1045、Y1068、ホスホSTAT5 (tyr694)、ホスホAKT (Ser473)、ホスホERK1/2 (Thr202 / Tyr204)、AKT、STAT5、およびERK1/2抗体は、New England Biolabs (Beverly, MA) から得た。総EGFR Ab20の抗体は、NeoMarkers (Fremont, CA) から得た。ホスホEGFR Y1173抗体は、Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY) からであり、総ホスホチロシン抗体PY-20は、Transduction Laboratory (Lexington, KY) からであった。全ての抗体は、1:1000希釈にて使用した。

20

【0350】

EGFR発現ベクター

野生型、L858、またはデルL747-P753insS突然変異をコードする全長EGFR発現構築物は、プラスミドpUSEampに標準的方法を使用してサブクローニングした。全ての構築物は、DNA配列解析によって確認した。

30

【0351】

株化細胞およびトランスフェクション

COS7細胞およびNMuMg (乳房の正常マウス上皮) 細胞は、2mM L-グルタミンおよび50U/mlペニシリン/ストレプトマイシンの存在下において、10%ウシ胎児血清を含むDMEM (ダルベッコイーグル修飾培地) 中で培養した。NCI-H358、NCI-H1650、NCI-H1734、NCI-H1666、およびNCI-H1975ヒト肺癌株化細胞は、ATCC収集から得て、10%ウシ胎児血清、2mM L-グルタミン、50U/mlペニシリン/ストレプトマイシン、および1mM ビルビン酸ナトリウムを含むRPMI1640中で培養した。これらは、本文中では、それぞれ省略様式でH358、H1650、H1734、H1666、およびH1975と呼ぶ。COS7細胞の一過性トランスフェクションは、Lipofectamine 2000 (Invitrogen; Carlsbad, Ca) を使用して行った。プラスミド (1μg) を10cmのディッシュ上の80%のコンフルエンスの細胞にトランスフェクトした。12時間後に、細胞を収集して、血清の非存在下で12-ウェル・プレートに再びまいた。次の日、細胞を30ng/mlのEGFで刺激した。安定なNMuMg株化細胞は、薬物選択可能なプラスミドpBABE puroとEGFR発現構築物を同時トランスフェクトし、続いて3μg/mlピューロマイシン中で選択することによって調製した。薬物抵抗性細胞のプールを解析のために使用した。安定にトランスフェクトされた細胞におけるEGFRの発現は、免疫ロットによって確認した。

40

【0352】

EGFR発現のSiRNAを媒介した「ノックダウン」

EGFR L858RのためのSiRNAは、ヌクレオチド配列

50

CACAGATTTTGGGCGGGCCAA (SEQ ID NO.: 688)

をターゲットするように設計し、一方、

GCTATCAAAACATCTCCGAAA (SEQ ID NO.: 689)

配列をdelE745-A750のために使用した (Qiagen ; Valencia, Ca)。EGFRの全ての形態をターゲットするために、ヒト野生型EGFRに対応する商業的に調製されたsiRNAをDharmacon (Lafayette, CO) から得た。siRNAsのトランスフェクションは、製造業者の説明書に従ってLipofectamine 2000 (Invitrogen) で行った。細胞は、MTTアッセイ法を使用して96時間後に生存度をアッセイした。

10

【0353】

アポトーシス・アッセイ法

10,000個の細胞を96ウェル・プレートの個々のウェルに播種した。6時間後に、培地を変えて、細胞をドキソルビシン (Sigma ; St. Louis, MO)、シスプラチン (Sigma)、Fas-リガンド (ヒト活性化、cloneCH11 ; Upstate Biotechnology)、Ly294002 (Sigma)、またはAG490 (Calbiochem ; La Jolla (Ca)) の濃度を増大して存在させて維持した。96時間後に、MTTアッセイ法を使用して細胞の生存度を決定した。カスパーゼ免疫染色のためには、10,000個の細胞を10mmのカバーガラスに播種した。その翌日、これらには、siRNAをトランスフェクトした (詳細については、以前の節を参照されたい)。72時間後に、細胞を4%のパラホルムアルデヒド中で室温にて10分間固定した。これらを、その後0.5%のトリトンX-100中で5分間透過化させ、5%の正常ヤギ血清 (NGS) 中で1時間ブロックした。次いで、カバーガラスを1:100希釈の一次抗体 (Cell Signalingからの切断型カスパーゼ-3 Asp 175 5A1) 中で4 にて一晩インキュベートした。その翌日、カバーガラスをPBS中で3回洗浄し、二次抗体 (Jackson Immunoresearch ; West Grove, PAからのヤギ抗ウサギテキサスレッド抱合) の1:250希釈のDAPIの5%の正常ヤギ血清および0.5 µg/mlにおいて (4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール) 溶液と共に1時間インキュベートした。PBS中で3回洗浄後、カバーガラスをMolecular Probes (Eugene, OR) からのProLong Gold抗退色試薬と共にのせた。

20

【0354】

細胞生存率測定

10 µlの5mg/ml MTTの (チアゾリルブルー ; Sigma) 溶液を96ウェル・プレートのそれぞれのウェルに添加した。37 にて2時間インキュベーション後、培地を除去し、100 µlの酸性イソプロパノール (0.1N HCL) をそれぞれのウェルに添加することによってMTTを可溶化した。吸光度は、570nmにて分光測定で決定した。

30

【0355】

成長曲線

H-358、H-1650、H-1734、およびH-1975細胞のための増殖曲線は、96ウェル・プレートの個々のウェルに1000個の細胞を播種することによって得た。それぞれの株化細胞は、8つの別々のウェルにまいた。連日、細胞を4%のホルムアルデヒド中で固定し、0.1% (w/v) クリスタルバイオレット溶液で染色した。次いで、クリスタルバイオレットを100 µlの10%の酢酸に可溶して、相対的細胞数を決定するために、プレートリーダーを使用して吸光度を570nmにて測定した。

40

【0356】

突然変異同定

EGFR内に突然変異がひそむ散在性NSCLC株化細胞を同定するために、本発明者らは、上記の通りに15個のNSCLC株化細胞のパネル内のエキソン19および21をシーケンスした。株化細胞は、喫煙歴 (NCI-H358、NCI-H650、NCI-H1650) に関係なく、気管支肺胞組織の腫瘍から、または非喫煙者 (NCI-H1435、NCI-H1563、NCI-H1651、NCI-H1734、NCI-H1793、NCI-H1975、NCI-H2291、NCI-H2342、NCI-H2030、NCI-H1838、NCI-H2347、NCI-H2023) の中に生じた腺癌からの誘導に基いて、解析のために選択した。NCI-H1666は、野生型EGFRの

50

みがひそむことが報告されていた（上記実施例を参照されたい）。全ての株化細胞は、ATCCから入手可能である。

【 0 3 5 7 】

本明細書において、および明細書全体を通じて引用した参考文献は、これらの全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【 0 3 5 8 】

参考文献

1. Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346:92-98. 10
2. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-1037.
3. Arteaga CL. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res*. 2003; 284:122-30. 20
4. Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signaling. *Exp Cell Res* 2003;284:31-53
5. Luetkeke NC, Phillips HK, Qui TH, Copeland NG, Earp HS, Jenkins NA, Lee DC. The mouse waved-2 phenotype results from a point mutation in the EGF receptor tyrosine kinase. *Genes Dev* 1994;8:399-413.
6. Nicholson RI, Gee JMW, Harper ME. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 2001;37:S9-15 30
7. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, et al. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *Proc Natl Acad Sci*. 1992;89:2965-2969.
8. Ciesielski MJ, Genstermaker RA. Oncogenic epidermal growth factor receptor mutants with tandem duplication: gene structure and effects on receptor function. *Oncogene* 2000; 19:810-820. 40
9. Frederick L, Wang W-Y, Eley G, James CD. Diversity and frequency of epidermal growth factor receptor mutations in human glioblastomas. *Cancer Res* 2000; 60:1383-1387.

10. Huang H-JS, Nagane M, Klingbeil CK, et al. The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 1997;272:2927-2935
11. Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res* 2000;103:57-75. 10
12. Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res*. 2001;7:2958-2970
13. Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR et al. ZD1839 (Iressa): An orally active inhibitor of Epidermal Growth Factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* 2002;62:5749-5754. 20
14. Moulder SL, Yakes FM, Muthuswamy SK, Bianco R, Simpson JF, Arteaga CL. Epidermal growth factor receptor (HER1) tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) inhibits HER2/neu (erbB2)-overexpressing breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2001;61:8887-8895.
15. Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, Rosen N. The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER-2 overexpressing tumor cells. *Cancer Res* 2001;61:7184-7188. 30
16. Ranson M, Hammond LA, Ferry D, et al. ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol*. 2002; 20: 2240-2250.
17. Herbst RS, Maddox A-M, Rothernberg ML, et al. Selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 is generally well tolerated and has activity in non-small cell lung cancer and other solid tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol*. 2002;20:3815-3825. 40

18. Baselga J, Rischin JB, Ranson M, et al. Phase I safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of ZD1839, a selective oral Epidermal Growth Factor Receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with five selected solid tumor types. *J Clin Onc* 2002;20:4292-4302.
19. Albanell J, Rojo F, Averbuch S, et al. Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition. *J Clin Oncol*. 2001; 20:110-124. 10
20. Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of Gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: A randomized trial. *JAMA* 2003;290:2149-2158.
21. Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2237-2246. 20
22. Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A phase III trial-INTACT 1. *J Clin Oncol* 2004;22:777-784.
23. Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A phase III trial – INTACT 2. *J Clin Oncol* 2004;22:785-794. 30
24. Rich JN, Reardon DA, Peery T, et al. Phase II Trial of Gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2004;22:133-142
25. Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, et al. United States Food and Drug Administration Drug Approval Summary: Gefitinib (ZD1839;Iressa) Tablets. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1212-1218. 40
26. Cappuzzo F, Gregorc V, Rossi E, et al. Gefitinib in pretreated non-small-cell lung cancer (NSCLC): Analysis of efficacy and correlation with HER2 and

- epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or Metastatic NSCLC. *J Clin Oncol*. 2003;21:2658-2663.
27. Fitch KR, McGowan KA, van Raamsdonk CD, et al. Genetics of Dark Skin in mice. *Genes & Dev* 2003;17:214-228.
 28. Nielsen UB, Cardone MH, Sinskey AJ, MacBeath G, Sorger PK. Profiling receptor tyrosine kinase activation by using Ab microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9330-5. 10
 29. Burgess AW, Cho H, Eigenbrot C, et al. An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 2003;12:541-552.
 30. Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenbrot C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem*. 2002;277:46265-46272. 20
 31. Lorenzato A, Olivero M, Patrane S, et al. Novel somatic mutations of the MET oncogene in human carcinoma metastases activating cell motility and invasion. *Cancer Res* 2002; 62:7025-30.
 32. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417:906-7.
 33. Bardelli A, Parsons DW, Silliman N, et al. Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 2003;300:949. 30
 34. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990;247:824-30.
 35. Heinrich MC, Corless CL, Demetri GD, et al. Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* 2003;21:4342-4349. 40
 36. Li B, Chang C, Yuan M, McKenna WG, Shu HG. Resistance to small molecule inhibitors of epidermal growth factor receptor in malignant gliomas. *Cancer Res* 2003;63:7443-7450.

37. C. L. Sawyers, *Genes Dev* 17, 2998-3010 (2003).
38. G. D. Demetri et al., *N Engl J Med* 347, 472-80 (2002).
39. B. J. Druker et al., *N Engl J Med* 344, 1038-42. (2001).
40. D. J. Slamon et al., *N Engl J Med* 344, 783-92 (2001).
41. H. Davies et al., *Nature* 417, 949-54 (2002).
42. Bardelli et al., *Science* 300, 949 (2003).
43. Y. Samuels et al., *Science* (2004). 10
44. Jemal et al., *CA Cancer J Clin* 54, 8-29 (2004).
45. S. Breathnach et al., *J Clin Oncol* 19, 1734-1742 (2001).
46. V. Rusch et al., *Cancer Res* 53, 2379-85 (1993).
47. R. Bailey et al., *Lung Cancer* 41 S2, 71 (2003).
48. M. Fukuoka et al., *J Clin Oncol* 21, 2237-46 (2003).
49. P. A. Janne et al., *Lung Cancer* 44, 221-230 (2004).
50. M. G. Kris et al., *Jama* 290, 2149-58 (2003). 20
51. V. A. Miller et al., *J Clin Oncol* 22, 1103-9 (2004).
52. M. Huse, J. Kuriyan, *Cell* 109, 275-82 (2002).
53. K. Naoki, T. H. Chen, W. G. Richards, D. J. Sugarbaker, M. Meyerson, *Cancer Res* 62, 7001-3 (2002).
54. J. Stamos, M. X. Sliwkowski, C. Eigenbrot, *J Biol Chem* 277, 46265-72 (2002).
55. T. Fujishita et al., *Oncology* 64, 399-406 (2003). 30
56. M. Ono et al., *Mol Cancer Ther* 3, 465-472 (2004).
57. M. C. Heinrich et al., *J Clin Oncol* 21, 4342-9 (2003).
58. G. Giaccone et al., *J Clin Oncol* 22, 777-84 (2004).
59. R. S. Herbst et al., *J Clin Oncol* 22, 785-94 (2004).
60. H. Yamazaki et al., *Mol Cell Biol* 8, 1816-20 (1988).
61. M. E. Gorre et al., *Science* 293, 876-80 (2001).
62. Marchetti A, Martella C, Felicioni L, et al: EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* 23:857-65, 2005. 40

63. Franklin WA: Diagnosis of lung cancer: pathology of invasive and preinvasive neoplasia. *Chest* 117:80S-89S, 2000.
64. Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304:1497-500, 2004.
65. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129-39, 2004. 10
66. Pao W, Miller V, Zakowski M, et al: EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:13306-11, 2004
67. Huang SF, Liu HP, Li LH, et al: High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan. *Clin Cancer Res* 10:8195-203, 2004. 20
68. Han SW, Kim TY, Hwang PG, et al: Predictive and Prognostic Impact of Epidermal Growth Factor Receptor Mutation in Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Treated With Gefitinib. *J Clin Oncol*, 2005.
69. Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, et al: The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 11:1167-73, 2005. 30
70. Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, et al: Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene Predict Prolonged Survival After Gefitinib Treatment in Patients with Non-Small-Cell Lung Cancer With Postoperative Recurrence. *J Clin Oncol*, 2005.
71. Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al: KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib. *PLoS Med* 2:e17, 2005
72. Read WL, Page NC, Tierney RM, et al: The epidemiology of bronchioloalveolar carcinoma over the past two decades: analysis of the SEER database. *Lung Cancer* 45:137-42, 2004. 40

73. Sanderson Cox L, Sloan JA, Patten CA, et al: Smoking behavior of 226 patients with diagnosis of stage IIIA/IIIB non-small cell lung cancer. *Psychooncology* 11:472-8, 2002.
74. Radzikowska E, Glaz P, Roszkowski K: Lung cancer in women: age, smoking, histology, performance status, stage, initial treatment and survival. Population-based study of 20 561 cases. *Ann Oncol* 13:1087-93, 2002.
75. Tong L, Spitz MR, Fueger JJ, et al: Lung carcinoma in former smokers. *Cancer* 78:1004-10, 1996. 10
76. de Perrot M, Licker M, Bouchardy C, et al: Sex differences in presentation, management, and prognosis of patients with non-small cell lung carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119:21-6, 2000
77. Capewell S, Sankaran R, Lamb D, et al: Lung cancer in lifelong non-smokers. Edinburgh Lung Cancer Group. *Thorax* 46:565-8, 1991
78. Gritz ER, Nisenbaum R, Elashoff RE, et al: Smoking behavior following diagnosis in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Cancer Causes Control* 2:105-12, 1991 20
79. Sridhar KS, Raub WA, Jr.: Present and past smoking history and other predisposing factors in 100 lung cancer patients. *Chest* 101:19-25, 1992
80. Barbone F, Bovenzi M, Cavallieri F, et al: Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men. *Chest* 112:1474-9, 1997
81. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al: Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 97:339-46, 2005 30
82. Kosaka T, Yatabe Y, Endoh H, et al: Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res* 64:8919-23, 2004
83. Cho D, Kocher O, Tenen DG, et al: Unusual cases in multiple myeloma and a dramatic response in metastatic lung cancer: case 4. Mutation of the epidermal growth factor receptor in an elderly man with advanced, gefitinib-responsive, non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 23:235-7, 2005 40

【 0 3 5 9 】

(表 1) 非小細胞性肺癌である9人の患者の特徴およびゲフィチニブに対する応答

患者番号	性別	ゲフィチニブ 療法の 開始年齢	病理学的 タイプ☆	以前の 療法数	喫煙状態†	治療期間	全体的 生存‡	EGFR 突然変異§	応答¶
		yr				mo			
1	F	70	BAC	3	全くなし	15.6	18.8	あり	大部分、肺病変の改善
2	M	66	BAC	0	全くなし	>14.0	>14.0	あり	大部分、両側の肺病変の改善
3	M	64	Adeno	2	全くなし	9.6	12.9	あり	部分的、肺病変および 軟部組織質量の改善
4	F	81	Adeno	1	以前にあり	>13.3	>21.4	あり	一部、胸膜疾患の改善
5	F	45	Adeno	2	全くなし	>14.7	>14.7	あり	部分的、肝臓病変の改善
6	M	32	BAC	3	全くなし	>7.8	>7.8	あり	大部分、肺病変の改善
7	F	62	Adeno	1	以前にあり	>4.3	>4.3	あり	部分的、肝臓および 肺病変の改善
8	F	58	Adeno	1	以前にあり	11.7	17.9	あり	部分的、肝臓病変の改善
9	F	42	BAC	2	全くなし	>33.5	>33.5	なし	部分的、肺小結節の改善

10

20

* 気管支肺胞の癌腫（BAC）の任意のエレメントをもつ腺癌（アデノ）をBACとして一覧表に記載してある。

† 喫煙状態は、患者が侵入の12ヶ月前以内に一切タバコを吸わなかった場合、および患者が彼または彼女の生涯において100本未満のタバコしか吸わなかった場合、以前のとおりに定義した。

‡ 全体的生存は、ゲフィチニブ治療の開始から死ぬまでを測定した。

§ EGFRは、表皮成長因子受容体遺伝子を意味する。

¶ 部分的応答は、固形腫瘍における反応評価基準を用いて評価した；これらの基準を用いて応答を測定することができない患者における大部分および少数の応答は、2人の医師によって評価した。

30

【0360】

（表2）非小細胞肺癌で患者におけるEGFRのチロシンキナーゼ・ドメインにおける体細胞突然変異

患者	突然変異	突然変異の効果
ゲフィチニブに対する応答を有する患者		
患者 1	15ヌクレオチドの欠失 (2235-2249)	インフレームの欠失 (746-750)
患者 2	12ヌクレオチドの欠失 (2240-2251)	インフレームの欠失 (747-751) およびセリン残基の挿入
患者 3	18ヌクレオチドの欠失 (2240-2257)	インフレームの欠失 (747-753) およびセリン残基の挿入
患者 4	18ヌクレオチドの欠失 (2240-2257)	インフレームの欠失 (747-753) およびセリン残基の挿入
患者 5	ヌクレオチド 2573 における T の代わりに G の置換	アミノ酸置換 (L858R)
患者 6	ヌクレオチド 2573 における T の代わりに G の置換	アミノ酸置換 (L858R)
患者 7	ヌクレオチド 2582 における T の代わりに A の置換	アミノ酸置換 (L861Q)
患者 8	ヌクレオチド 2155 における G の代わりに T の置換	アミノ酸置換 (G719C)
ゲフィチニブに対する暴露がない患者*		
患者 A	18ヌクレオチドの欠失 (2240-2257)	インフレームの欠失 (747-753) およびセリン残基の挿入
患者 B	15ヌクレオチドの欠失 (2235-2249)	インフレームの欠失 (746-750)

10

20

*ゲフィチニブに対する曝露のない25人の患者の中で、（気管支肺胞癌である15人、腺癌である7人、および大細胞型癌腫である3人）、2人（患者AおよびB）—両者とも気管支肺胞癌—は、EGFR突然変異を有した。突然変異は、多様な組織型を示す14の肺癌株化細胞：非小細胞肺癌（6検体）、小細胞型肺癌（6検体）、気管支カルチノイド（1検体）および未知の型（1検体）では見いだされなかった。EGFR内で同定された多形性変異体は、以下を含んだ：ヌクレオチド1562におけるGの代わりにAの置換、ヌクレオチド1887におけるTの代わりにAの置換、および未知の機能的有意性の生殖系列変異体、チロシンキナーゼドメイン内のヌクレオチド2885におけるGの代わりにAの置換。

【 0 3 6 1 】

30

（表4）NSCLC治療の一部としてEGFR突然変異について試験した100人の患者間の集団特徴

特徴	頻度
平均年齢、年(標準偏差)	60.7 (11.0)
女性	63
人種	
白人	76
アジア人	7
その他	5
不明	12
試験時の段階	
I	15
II	4
III	10
IV	67
不明	4
組織像	
純粹 BAC	1
BAC の特徴をもつ腺癌	24
腺癌	69
NSCLC、他の全てのサブタイプ	6
喫煙状態	
現在	17
以前に	48
未経験	29
不明	6
現在および以前の喫煙者が喫煙した平均量、 パック-年(標準偏差)	39.0 (32.3)
診断から <i>EGFR</i> 試験までの平均期間、 月(標準偏差)	18.7 (78.4)
従来 of 化学療法治療	47
従来 of <i>EGFR</i> 標的治療	11

10

20

30

BAC=細気管支肺胞性癌腫、EGFR =上皮細胞成長因子受容体

【 0 3 6 2 】

(表 5) 同定された上皮成長因子受容体の体細胞遺伝子突然変異

患者	性別	組織像	喫煙したパ -年	エキソン	ヌクレオチド変化	アミノ酸変化
1	F	Adeno	0	18	2126A>T	E709V
				18	2155G>A	G719S
2	F	A+BAC	60	18	2156G>C	G719A
				20	2327G>A	R776H
3	F	A+BAC	0	19	2235 2249 del	K745 A750 del ins K
4	M	A+BAC	0	19	2235 2249 del	K745 A750 del ins K
5	F	Adeno	5	19	2235 2249 del	K745 A750 del ins K
6	M	Adeno	不明	19	2235 2249 del	K745 A750 del ins K
7	F	Adeno	0	19	2236 2250 del	E746 A750 del
8	M	Adeno	45	19	2236 2250 del	E746 A750 del
9	F	Adeno	不明	19	2236 2250 del	E746 A750 del
10	M	A+BAC	12	19	2237 2255 del ins T	E746 S752 del ins V
11	M	Adeno	1	19	2239 2248 del ins C	L747 A750 del ins P
12	M	A+BAC	0	19	2239 2251 del ins C	L747 T751 del ins P
13	F	Adeno	30	19	2253 2276 del	T751 I759 del ins T
14	F	Adeno	0	19	2254 2277 del	S752 I759 del
15	F	Adeno	0	20	2303 2311 dup	D770 N771 ins SVD
16	M	Adeno	5	20	2313 2318 dup CCCCCA	P772 H773 dup
17	F	Adeno	0	21	2543C>T	P848L*
18	M	BAC	0	21	2573T>G	L858R
19	F	A+BAC	0	21	2573T>G	L858R
20	M	A+BAC	1	21	2573T>G	L858R
21	F	Adeno	0	21	2573T>G	L858R
22	F	Adeno	15	21	2573T>G	L858R
23	F	Adeno	0	21	2582T>A	L861Q

10

20

30

40

Adeno=腺癌、Adeno+BAC=細気管支肺胞性癌腫の特徴をもつ腺癌、BAC=同型接合体細気管支肺胞性癌腫

*この突然変異は、生殖系列変異体として同定された

【0363】

(表S1A) 選択したEGFRおよび受容体チロシンキナーゼ・エキソンの増幅のためのプライマー (SEQ ID NO: 1-212)

遺伝子	RefSeq	エキソン	SEQ ID NO	F ネスト	R ネスト
ALK	NM 004304	24	1,2	GGAAATATAGGGAAGGGAAGGAA	TGACAGGGTACCAGGAGATGA
ALK	NM 004304	25	3,4	CTGAACCGCCAAGGACTCAT	TTTCCCTCCCTACTAAACACACG
AXL	NM 021913	19	5,6	ACTGATGCCCTGACCCTGTT	CCCATGGTTCCCCACTCTT
CSF1R	NM 005211	18	7,8	AGGGACTCCAAAGCCATGTG	CTCTCTGGGGCCATCCACT
CSF1R	NM 005211	19	9,10	CATTGTCAAGGGCAATGTAAGTG	CTCTACCAACCCCTCGCTGT
DDR1	NM 013994	15	11,12	ACATGGGGAGCCAGAGTGAC	TGCAACCCAGAGAAAAGTGTG
DDR2	NM 006182	16	13,14	TGAGCTTTCAACCCTAGTTTGTG	GTITGCTCTCTGCTGTCTCA
DKFZp761P1010	NM 018423	8	15,16	TGTCCTTGTGTTTTGAAGATTCC	TGCAGACAGATGACAAACATGAA
EGFR	NM 005228	2	17,18	TGGGTGAGTCTCTGTGTGGAG	CATTGCCATAGCAAAAATAAACACA
EGFR	NM 005228	3	19,20	GGTTCAACTGGGCGTCTA	CCTTCTCCGAGGTGGAATTG
EGFR	NM 005228	4	21,22	CGCACCATGGCATCTCTTTA	AAAACGATCTCTATGTCGTTG
EGFR	NM 005228	5	23,24	CAGCCAGCCAAACAATCAGA	TCTTTGGAGTCTTCAGAGGGAAA
EGFR	NM 005228	6	25,26	TGTGGTTTCGTGGGAAGCAA	AATTGACAGCTCCCCACAG
EGFR	NM 005228	7	27,28	GGCTTCTGACGGGAGTCAA	CCACCCAAAGACTCTCAAGA
EGFR	NM 005228	8	29,30	CCTTTCATCACCCCTCAAG	AGTGCCTTCCCATTCGCTAA
EGFR	NM 005228	9	31,32	ACCGGAATTCTTCTCTGCTT	CACTGAAACAAACAACAGGGTGA
EGFR	NM 005228	10	33,34	AGGGGGTGAGTCACAGGTTT	TCAGAAGAAATGTTTTATTCCAAGG
EGFR	NM 005228	11	35,36	GCAAATCCAATTTTCCACTT	GCAGGAGCTCTGTGCCCTAT
EGFR	NM 005228	12	37,38	TCCACAGCATGACCTACCA	TTTGCTTCTAAGGAACTGAAAA
EGFR	NM 005228	13	39,40	TGTCACCCAAGGTGATGGAG	CAAAAGCCAAGGGCAAGAA
EGFR	NM 005228	14	41,42	GGAGTCCCAACTCTTGACC	GTCTGCCCCACACAGGATG
EGFR	NM 005228	15	43,44	GCTTTCCTCACTCACACACA	CAAACTCGGCAATTTGTTG
EGFR	NM 005228	16	45,46	CCACCAATCCAACATCCAGA	TGGCCAGAGCCATAGAAAC
EGFR	NM 005228	17	47,48	TTCCAAGATCATTCTACAAGATGCA	GCACATTCAGAGATTCCTTCTGC
EGFR	NM 005228	18	49,50	TCCAAATGAGCTGGCAAGTG	TCCCAAACACTCAGTGAAACAAA
EGFR	NM 005228	19	51,52	GTGCATCGCTGGTAACATCC	TGTGGAGATGAGCAGGCTCT
EGFR	NM 005228	20	53,54	ATCGCATTATGCGTCTTCA	ATCCCCATGGCAAACCTTTG
EGFR	NM 005228	21	55,56	GCTCAGAGCCTGGCATGAA	CATCTCCCCCTGCATGTTGT
EGFR	NM 005228	22	57,58	TGGCTCGTCTGTGTGTGCTA	CGAAAGAAAATACTTGCTCATGTGAGA
EGFR	NM 005228	23	59,60	TGAAGCAAATTGCCAAGAC	TGACATTTCTCCAGGGATGTC
EGFR	NM 005228	24	61,62	AAGTGTGCGCATACCAATGC	ATGCGATCTGGGACACAGG
EGFR	NM 005228	25	63,64	GGCACCTGCTGGCAATAGAC	TGACTTCATATCCATGTTGAGTTTCACT
EGFR	NM 005228	26	65,66	TATACCTCCATGAGGCACA	GGGAAAAACCCACACAGGAA
EGFR	NM 005228	27	67,68	TCAGAACCCAGCATCTCAAGGA	GATGCTGGAGGGAGCACTCT
EGFR	NM 005228	28	69,70	CCTTGTGAGGACATTCACAGG	ATGTGCCCCGAGGTGGAAGTA
EPHA1	NM 005232	14	71,72	GGAGGGCAGAGGACTAGCTG	GTGCTGGCCAAGTCTTTGT
EPHA1	NM 005232	15	73,74	CTGCAGCCTAGCAACAGAGC	AAGAACCAGAGGAGCCAGGA
EPHA2	NM 004431	13	75,76	CGGGTAAGGATGTGGGTGT	CAGGTGTTCTGCCTCTTGAA
EPHA2	NM 004431	14	77,78	GCCTCAGGAGGCAGAACACC	GGAGCAAGCCTAAGAAAGTTCA
EPHA3	NM 005233	10	79,80	GCCTTGATCCATTGCCCACA	TGACAAACAGTTTTGGGTTCAT
EPHA3	NM 005233	11	81,82	TGCATATTCCATTTCAGAACAGA	AAACAGTTTTCATTTGCTGCTAAAT
EPHA4	NM 004438	13	83,84	CCGGATACAGATACCCAAAAAGA	GGAGGCTTCAAGGGATGAGA
EPHA4	NM 004438	14	85,86	GCTGTTGCTCTGCTTGGCTA	TGGTTGTAATGTTGAACCTAGCTTGC
EPHA7	NM 004440	13	87,88	TGGCTGTCAGCTAAATAAGCATGT	TCAATTTGCTTCATTTCCTGTT
EPHA7	NM 004440	14	89,90	TGCTGCTGAACCTACCAACCAA	TGTGGTAGTAATTGTGGAAAACCTG
EPHA8	NM 020526	13	91,92	CAAAGCACCGTCTCAACTCG	CCCGAAACTGCCAACTTCAT
EPHA8	NM 020526	14	93,94	GGAAAACAGGACCCAGTGT	CCCTCTCCACAGAGCTGAT
EPHB1	NM 004441	7	95,96	GACAGAAGCTGACAAGCAGCA	AGGTTCATTCCCTCCCAGT
EPHB1	NM 004441	8	97,98	TGGGAGTGAGAGTTTGAAGAA	TATGAGGCCGTGAGCTGAAA
EPHB2	NM 017449	11	99,100	AGGGCCCTGCTCTGGTTT	CCAATTGGGCGTTAGTGAAA
EPHB2	NM 017449	12	101,	CTCATGAGATTGGGGCATCA	AGGCCCATGATCTCAGAACG
EPHB3	NM 004443	11	103,	GTTTGCAGGAGAGACGAGGT	AGGCCCTTCAACCTGTGAC
EPHB3	NM 004443	12	105	ATGACCCTCCGATCCTACC	TAATCCTGCTCCACGGCATT

10

20

30

40

EPHB4	NM 004444	14	107	GGAAAAAGCAGAGGCAGGTG	TGGTCTCAAGAACCCAGCAG
EPHB6	NM 004445	16	109	GACACCCTCCCCCTCTCAT	ACTATGACACCCCGGCTGAG
EPHB6	NM 004445	17	111	TGCTTGATGTAAACCCCTTGG	GCAATCCAACAGCCATGAGA
ERBB2	NM 004448	21	113	GGAGCAAACCCCTATGTCCA	TCCTCCAACCTGTGTGTGTGG
ERBB3	NM 001982	21	115	TGGGGACCACTGCTGAGAG	TGCAGCCTTCTCTCCTTGAA
FGFR1	NM 000604	14	117	GCAGAGCAGTGTGGCAGAAG	ACAGGTGGGAAGGGACTGG
FGFR1	NM 000604	15	119	AGTGGGGTGGGCTGAGAAC	TCTCTGGGGCAGAAAGAGGA
FGFR2	NM 000141	14	121	ACCCGGCCACACTGTATTTC	CATCCCAACCCAGCTCTCAAC
FGFR2	NM 000141	15	123	AGGGCATAGCCCTATTGAGC	CCCAGGAAAAAGCCAGAGAA
FGFR3	NM 000142	13	125	CAGGTGTGGGTGGAGTAGGC	CTCAGGCGCCATCCACTT
FGFR3	NM 000142	14	127	AAGAAGACGACCAACGTGAGC	AGGAGCTCCAGGGCACAAG
FGFR4	NM 002011	14	129	CCTCCTCTGTAAAGTGGGTGGA	AGAGGGCCTCAGTGCAAGAGT
FGFR4	NM 002011	15	131	AGATGGGGCAGAACTGGATG	GGGTCCCAGACCAAAATCTGA
FLT1	NM 002019	23	133	AGGTGCTCCCTTCACAGCAT	TTCAGGGACTACAGCTGAGGAA
FLT1	NM 002019	24	135	GCCGTATGTTATCTGGGAGGT	TGGGCCCATTAACATTTAAGA
FLT3	NM 004119	20	137	TTCCATCACCGGTACCTCCT	CCATAAATCAAAAATGCACCACA
FLT3	NM 004119	21	139	GAGTGGTCTTAGGAAGATGATGC	AAAGTCATGGGCTGCAA TACAA
FLT4	NM 002020	23	141	ATGGTCCCCACTGCTTGG	AGGAGCTCACCTCACCC TGT
IGF1R	NM 000875	18	143	CCTTGGCTCTCTCCACACAT	TGGCAACGGGTAACAATGAA
INSR	NM 000208	18	145	GGCTGAGGTAAGCTGCTTCG	AAAAAGAAGTATCTTGC CCCTTT
INSR	NM 000208	19	147	AACCCCTCTTAGGGCTCTGTG	CAGGAGGATGGCAGGCTTC
KDR	NM 002253	24	149	CGTAGAGAGCTTCAGGACCTGTG	TTCCGAGAAGTTTTGCCTTGA
KIT	NM 000222	17	151	TGTGAACATCATTCAGGCGTA	AAAATGTGTGATATCCCTAGACAGG
KIT	NM 000222	18	153	TCCACATTTACAGCAACAGCA	GGCTGCTTCTGAGACA CAGT
LTK	NM 002344	16	155	TATCTACCGGTGCGGGACTT	AGGTGTAGCCTCCCCCTACA
MERTK	NM 006343	17	157	AGGCTGGTGGTGTCTCTGTG	CAAGCTGCCAACCCCTCA GTT
MET	NM 000245	19	159	TGGATTTCAAATACTGAAGCCACT	TGGAATTGGTGGTGTGTGAATTT
MUSK	NM 005592	15 1	161	GGGCTTCATATGTTCTGACATGG	CAGAGGACCACGCCATA GG
MUSK	NM 005592	15 2	163	CCGAGATTTAGCCACCAGGA	CCTGGGAAGCAAAACAACA
NTRK1	NM 002529	15	165	AGGTCCCCAGTCTCCTCTCC	AGACCCATGCAGCCATCCTA
NTRK1	NM 002529	16	167	CGTGAACCACCGAGCTTGT	AGAGGGGCAGAAAGGGGAAC
NTRK2	NM 006180	15	169	GGTGGGGGTGAGGAGCTTAG	TCGTTTAAGCCACCCAGTCA
NTRK2	NM 006180	16	171	TGCAAATAAGGAAAGCAAACA	TCCTGACATGGTCTTCCACC
NTRK3	NM 002530	17	173	CAGCATCTTCACACACCTCTGA	GCTGGCTCTAAATCCCA CCT
NTRK3	NM 002530	18	175	CTAATCCGGGAAGTTGTTGC	TTCTGTATCAGCAGCTTCTCTGTG
PDGFRA	NM 006206	18	177	CAAGTGCCACCATGGATCA	GGCAGTGTACTGACCCC TTGA
PDGFRA	NM 006206	19	179	GCACAAGTTATTAAGAGCCCAAGG	AGCATACTGGCCTCACACCA
PDGFRB	NM 002609	18	181	GCACATGGGCAGTGTGTATT	GAGCCCCACACAGATTTCCT
PDGFRB	NM 002609	19	183	ATGGGACGGAGAAGTGTTG	TCCCTGTATCAGGGCTCCGTC
PTK7	NM 002821	18	185	TTCTACGCGACACACCAAT	GCAGGCACTAAACCTT TCC
PTK7	NM 002821	19	187	GCACGATGTGACCAATTTT	AGCCCTGAGAGGGAGGT AGG
RET	NM 000323	15	189	CACACACCACCCCTCTGCT	AAAGATTGGGGTGAGG GCTA
RET	NM 000323	16	191	CTGAAAGCTCAGGGATAGGG	CTGGCCAAGCTGCACAG A
ROR1	NM 005012	09 1	193	TGCAGCCAACGATTTGAAAG	GGAAAGCCCCAAGTCTG AAA
ROR1	NM 005012	09 2	195	TCATCATGAGATCCCCACACT	GCATTTCCCCCTGAAGGAGT
ROR1	NM 005012	09 3	197	TGGATTGAGTAACAGGAAGTGA	CCCATTCACCAGGATGATT
ROR1	NM 005012	09 4	199	GTTCCAGCTGCCCACTACC	GCTCGAAACCATGTTCCA
RYK	NM 002958	13	201	CTGGATTTGGGGTCTCTGC	CGGGAACAGCTAGCAGATTTT
TEK	NM 000459	18	203	GGGAATTTTGGAGGGGAAC	GCCTCAGTCAACACAGAGCA
TEK	NM 000459	19	205	TGAGTCTACCCAGCAATCATTTG	TTCCCGAGAGCTACAGGACA
TIE	NM 005424	18	207	GGTAACAAGGGTACCCACGAA	GTITGAGGGGCTGAGTGTGG
TIE	NM 005424	19	209	CCTCACCTTAGGGCTTGTG	AGCCAGGTCATGCCTTAGA
TYRO3	NM 006293	18	211,212	GGGTAGCTTGGGAGCAAAGA	CCAAACCCAGAGAGCA GAC

10

20

30

40

【 0 3 6 4 】

(表 S 1 B) 選択したEGFRおよび受容体チロシンキナーゼ・エキソンの増幅のためのプライマー (SEQ ID NO: 213-424)

50

遺伝子	RefSeq	エキソン	SEQ ID NO	F 外部	R 外部
ALK	NM_004304	24	213,214	CATTTCCCTAATCTTTTCCA	GTGATCCCAGATTTAGGCCTTC
ALK	NM_004304	25	215	GCCTCTCGTGGTTGTGTTGTC	CCCAGGGTAGGGTCCAATAATC
AXL	NM_021913	19	217	CTTCTGGTGGAGGTGACTGAT	CAGGCATAGTGTGTGATGGTCA
CSF1R	NM_005211	18	219	TCACGATACACATTCTCAGATCC	GAAGATCTCCCAGAGGAGGATG
CSF1R	NM_005211	19	221	CGTAACGTGCTGTTGACCAAT	AAACGAGGGAAGAGCCAGAAAG
DDR1	NM_013994	15	223	TGGGGAGCACAATAAAGAAGA	ACTCTGGCTCCTGGATTCTTG
DDR2	NM_006182	16	225	GGAAGTCAGTGTGCAGGGAATA	TTTAGCAGAAATAGGCAAGCA
DKFZp761P1010	NM_018423	8	227	TGGTAATCCTAAACACAATGCAGA	CTGGGCAACACAGTGAGATCCT
EGFR	NM_005228	2	229	TCACAAATTTCTTTGCTGTGTCC	CATGGAACTCCAGATTAGCCTGT
EGFR	NM_005228	3	231	GATTGTTGCAGATCGTGGACAT	CGCTTAAATCTTCCCATTCCAG
EGFR	NM_005228	4	233	CTCCATGGCACCATCATTAACA	CTCAGGACACAAAGTCTCTGCT
EGFR	NM_005228	5	235	GCAGTTTCATGGTTTCATCTTTT	CAAAATAGCCACCCCTGGATT
EGFR	NM_005228	6	237	CTTTCTGCATTGCCCAAGATG	CAAGGTCTCAGTGAGTGGTGA
EGFR	NM_005228	7	239	GAGAAGGGTCTTTCTGACTCTGC	CAGGTGTTTCTCTGTGAGGTG
EGFR	NM_005228	8	241	CACATTGCGGCCTAGAATGTTA	ACCCCGTCACAACCTTCAGT
EGFR	NM_005228	9	243	GCCGTAGCCCCAAAGTGTACTA	TCAGCTCAAACCTGTGATTCC
EGFR	NM_005228	10	245	CTCACTCTCCATAAATGCTACGAA	GACTTAACGTGTCCCTTTTGC
EGFR	NM_005228	11	247	GCCTCTTCGGGGTAATCAGATA	GAAGTCTGTGGTTTAGCGGACA
EGFR	NM_005228	12	249	ATCTTTTGCCTGGAGGAACCTT	CAGGGTAAATTCATCCCATTTGA
EGFR	NM_005228	13	251	CAGCAGCCAGCACAACACTCTT	TTGGCTAGATGAACCATTTGATGA
EGFR	NM_005228	14	253	TGAATGAAGCTCTGTGTTTACTC	ATGTTTATCGCAGGCTAATGTG
EGFR	NM_005228	15	255	AAAACAGGGAGAAGTCTAAGCAA	CATGGCAGAGTCATTCCCACT
EGFR	NM_005228	16	257	CAATGCTAGAACACGCCTGTC	TCCCTCCACTGAGGACAAAGTT
EGFR	NM_005228	17	259	GGGAGAGCTTGAGAAAGTTGGA	ATTTCTCGGATGGATGTACCA
EGFR	NM_005228	18	261	TCAGAGCTGTGTTTCTACCAA	TGGTCTCAGGACCACTGATT
EGFR	NM_005228	19	263	AAATAATCAGTGTGATTCGTGGAG	GAGGCCAGTGCTGTCTCTAAGG
EGFR	NM_005228	20	265	ACTTCACAGCCTGCGTAAAC	ATGGGACAGGCACTGATTGT
EGFR	NM_005228	21	267	GCAGCGGGTTACATCTTCTTTC	CAGCTCTGGCTCACACTACCAG
EGFR	NM_005228	22	269	CCTGAAGTCCGTCAGACTGAAA	GCAGCTGGACTCGATTTCCT
EGFR	NM_005228	23	271	CCTTACAGCAATCCTGTGAAACA	TGCCCAATGAGTCAAGAAGTGT
EGFR	NM_005228	24	273	ATGTACAGTGTGGCATGGTCT	CACTCACGGATGCTGCTTAGTT
EGFR	NM_005228	25	275	TAAGGCACCCACATCATGTCA	TGGACCTAAAAGGCTTACAATCA_A
EGFR	NM_005228	26	277	GCCTTTTAGGTCCACTATGGAATG	CCAGGCGATGCTACTACTGGTC
EGFR	NM_005228	27	279	TCATAGCACACCTCCCTCACTG	ACACAACAAAGAGCTTGTGCAG
EGFR	NM_005228	28	281	CCATTACTTTGAGAAGGACAGGAA	TATTCTTGCTGGATGCGTTTCT
EPHA1	NM_005232	14	283	AGGAGGGCAGAGGACTAGCTG	GGCAATGTGAATGTGCACTG
EPHA1	NM_005232	15	285	CTTGAACCTGGGAGGTGGAG	ATCAGGGTGGGAGGAGTAAAGA
EPHA2	NM_004431	13	287	CCCATTACCTCTCACCTGTGC	GTGAAGTCCGGTAGGAAATGG
EPHA2	NM_004431	14	289	AGGGGACCTCAAGGGAGAAG	AGATCATGCCAGTGAATCCAG
EPHA3	NM_005233	10	291	GGACCAGGAAAGTCTTGCTTT	GGTGGGGAACATTAAACTGAGG
EPHA3	NM_005233	11	293	GCCTCAGGTTGTTTGTGTCAG	ACCCCTGCTTGAGGGAAATATG
EPHA4	NM_004438	13	295	CCCAGCTCTAGGGTACAGTCT	CAGTCAGCTTCAAAATCCCTCTT
EPHA4	NM_004438	14	297	TCATTCCCTGTGAGTAAAGAAAA	GGCCATTAAATCTTGTCTCTGA
EPHA7	NM_004440	13	299	TGGACTTGTGCAAACTCAAACCTG	TCCCAATATAGGGCAGTCATGTT
EPHA7	NM_004440	14	301	TCTCAATCAGTTGAGTTGCCTTG	AGCTGTGCAAGTGTGGAAACAT
EPHA8	NM_020526	13	303	GCTGTGAGGGTAAATGAGACCA	GTCTCCTGGTGAGTGACTGTGG
EPHA8	NM_020526	14	305	CCTTCCTTCGTCTCCACAGC	GTCCTTGTGCCAACAGTCGAG
EPHB1	NM_004441	7	307	GCTTGGCAAGGAGAAGAGAACA	GCTTGCTTTCTTGCTTGAACAAC
EPHB1	NM_004441	8	309	GCTGGTCACCTTGAGCTTCTCT	CCATGCTGGGCTCTTTGATTA
EPHB2	NM_017449	11	311	CACCACTCTGAAGTTGGCCTCT	ATGGCTCTGCACATTGTTC
EPHB2	NM_017449	12	313	CAGAGTGGGAAAAGGCACTTCA	CCAGAGTCTGTGCAGACATTC
EPHB3	NM_004443	11	315	ATGGGGATTAAGTGGGATGTTG	CGTAGCTCCAGACATCACTAGCA
EPHB3	NM_004443	12	317	GCAACCTGGTCTGCAAAGTCTC	ACCCAGCAGTCCAGCATGAG

10

20

30

40

EPHB4	NM 004444	14	319	GAGTTTCAGTGAGCCAAGATCG	TTACAGGCTTGAGCCACTAGGC
EPHB6	NM 004445	16	321	AAGCTTCCAGGAGACGAGGTC	GTCCCTGAAATCCCTCAAACC
EPHB6	NM 004445	17	323	TGCTCCATAAACGTGACTATTGC	GTAAGAGGGTGGGCTGGAATCT
ERBB2	NM 004448	21	325	CTTAGACCATGTCCGGGAAAAC	CACATCACTCTGGTGGGTGAAC
ERBB3	NM 001982	21	327	AAATTTTCATCCAAAACCAACC	CCAGTCCCAAGTTCTTGATCAT
FGFR1	NM 000604	14	329	ACAAGTCGGCTAGTTGCATGG	TCTCAGATGAAACCACCAGCAC
FGFR1	NM 000604	15	331	TTCTCTGAGAAGCAAGGAGTGG	CCAGGGAGAAAGCAGGACTCTA
FGFR2	NM 000141	14	333	TTCTGGCGGTGTTTGAAATTA	CTCAACATTGACGGCCTTCTT
FGFR2	NM 000141	15	335	TCAGCTCTTAAACAGGGCATAGC	GAAATGCAGCAGCCACTAAAGA
FGFR3	NM 000142	13	337	CTCACCTTCAAGGACCTGGTGT	CAGGGAGGGGTAGAAACCACA
FGFR3	NM 000142	14	339	GGAGAGGTGGAGAGGCTTCAG	GAGACTCCCAGGACAGACACCT
FGFR4	NM 002011	14	341	CACTCGTTCCTCACCCTTCC	AGGACTCACACGTCACTCTGGT
FGFR4	NM 002011	15	343	GGACAATGTGATGAAGATTGCTG	ATAGCAGGATCCCAAAAGACCA
FLT1	NM 002019	23	345	GGCTTGGGGACCTGTATTTGTA	CAGTGGCCTTCTGAGCCTTAC
FLT1	NM 002019	24	347	GCACCTAGCTCCCTCTTTAGC	TTTACAGTAGAGGGCAGACATGC
FLT3	NM 004119	20	349	GCCACCATAGTGCAGAATTAG	CCCAAGGACAGATGTGATGCTA
FLT3	NM 004119	21	351	GCCTTTGTTCGAGAGGAGTTGT	GTTACGCTCTCAAGCAGGTTA
FLT4	NM 002020	23	353	ATTCCACAAGCTCTCTCCATGA	CTTGCCCCAAGATGCCTAAG
IGF1R	NM 000875	18	355	TGCTTGGTATTGCTCATCATGT	CCCTTAGCTAGCCCACTGACAA
INSR	NM 000208	18	357	CTCCTGGGAGTGGTGTCCAA	CCTGGGCAACAGACAGAGTAAG
INSR	NM 000208	19	359	CTTCACTTCCCCATGCGTACC	GGGTTCACAATGCCTACAGGA
KDR	NM 002253	24	361	AAAATCTGTGACTTTGGCTTGG	GGGAGGAGACATTCTTTGATTTG
KIT	NM 000222	17	363	GCAGTCTGAGAAGAAAACAGC	CTTCACATGCCCAAAATTACA
KIT	NM 000222	18	365	TGAGCCATGTATTTAGAGGTGA	TACATTTACAGCAGGTGCGTGT
LTK	NM 002344	16	367	TTGCCTACTCTGTAGGGATATTGC	ATAGGGCATGTAGCCAGTGA
MERTK	NM 006343	17	369	GCTCTGCTGTGGTCTCACT	TTGCAAAGCACACATCTTCTGA
MET	NM 000245	19	371	TGGCAATGTCAATGTCAAGCAT	GTATGTGCCCCACTCAACAAA
MUSK	NM 005592	15 1	373	TGCATTTCTAGCTGAGACTCC	TGCCATCTCGCAGTAGTAAAT
MUSK	NM 005592	15 2	375	CTCTCTGTGCTGAGCAGCTTT	TGTTTCCAATCACTGGCTTTCA
NTRK1	NM 002529	15	377	GAACCATGGGCTGTCTCTGG	ATCTGGGATAGCGAAGGAGACA
NTRK1	NM 002529	16	379	ATTACAGGCCACACGCCATC	AAGGCAAGAATAAGGGAGGAAGA
NTRK2	NM 006180	15	381	GCTCTCAGGACTGCAGAAGTACA	GAGGAACCAATCCCACTCACAC
NTRK2	NM 006180	16	383	TCACTCTTTGCCTTCTGTCTCTG	GCACTGTGCTTGTCTTCTCAG
NTRK3	NM 002530	17	385	TGTCTCCTTTATCGTAGGTCTCCA	CACCACATTTCTACAGTTCCA
NTRK3	NM 002530	18	387	CACTGTGCACCAGACAGACAAA	TGTGGTTTTCTGTATCAGCAGCTT
PDGFRA	NM 006206	18	389	CAGGGAGTCTGAAATCATCAGG	TCAAGTATCTAGCCCCAAATCCA
PDGFRA	NM 006206	19	391	GGCAATATTGACCATTATCATTC	AGGCCAGGAGTAAGACGCAAC
PDGFRB	NM 002609	18	393	AAGAACGTACGTGTGGTGTGG	CGCTATACTGTCTCCATGCACT
PDGFRB	NM 002609	19	395	AGGAAACAGCCTCTGGTCTCTC	GTCAATGCTCAGACAGGGAGAT
PTK7	NM 002821	18	397	CCCAGGAAGGCAGGTACTGTTA	TTTTACAACCACCAAGGGTGTG
PTK7	NM 002821	19	399	TCGTGTGGTTACCTCCAGATTTT	AAATTAGCCAGGGAGTGGAGGT
RET	NM 000323	15	401	CATGCCATGCTATGGCTCAC	AGGCTGAGCGGAGTTCTAATTG
RET	NM 000323	16	403	ATCTCAGCAATCCACAGGAGGT	ATTTGCCTCACGAACATCAT
ROR1	NM 005012	09 1	405	TGGAAGTTGTCTATGGACCTC	ATGGGCAGCAAGGACTTACTCT
ROR1	NM 005012	09 2	407	CACCCAATATTGTCTGCCTTC	GGCTCGGGAACATGTAATTAGG
ROR1	NM 005012	09 3	409	CCATCATGTATGGCAAATTCTCTT	TGGCGTCTCTAGTAAAGATGCT
ROR1	NM 005012	09 4	411	GCCAGATTGCTGGTTTCATTG	GGCTAAAACACAAAGCACCATT
RYK	NM 002958	13	413	GGGAAGTCATCCACAAAGACCT	GGTCTGGGTACAGCTCCTC
TEK	NM 000459	18	415	TTCTTCTGCCAAGATGTGGTGT	TGCAGATGCTGCAATCATGTTA
TEK	NM 000459	19	417	TGGACCCCGAAAGATAAATAGG	TTCTGCACTCCTCTGGAAGCTG
TIE	NM 005424	18	419	GGGTGAGAGCCAACACTGATCT	CTGTGCCCTCTCATCTCACACT
TIE	NM 005424	19	421	AGAACTAGCCTCCAAGATTGC	ACACCTTCCAAGACTCCTTCCA
TYRO3	NM 006293	18	423,424	GACTCGAGGGTGGGAGACAG	GCTGTCACTAGGTGTCTGAGC

10

20

30

40

【 0 3 6 5 】

(表 S 2) 未処置の肺癌におけるEGFR突然変異状態

試料	組織像	供与源	性別	エキソン	配列変化	SEQ ID NO	ヌクレオチド	アミノ酸
S0514	腺癌	米国	F	18	置換	425	2155G>A	G719S
S0377	腺癌	日本	F	18	置換	426	2155G>A	G719S
S0418	腺癌	日本	F	19	Del-1a	427	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0363	大細胞 ca.	日本	F	19	Del-1a	428	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0380	腺癌	日本	M	19	Del-1a	429	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0399	腺癌	日本	F	19	Del-1a	430	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0353	腺癌	日本	F	19	Del-1a	431	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0385	腺癌	日本	M	19	Del-1a	432	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0301	腺癌	日本	M	19	Del-1a	433	2235_2249delGGAAATTAAGAGAAAGC	E746_A750del
S0412	腺癌	日本	M	19	Del-1b	434	2236_2250delGAAATTAAGAGAAAGCA	E746_A750del
S0335	腺癌	日本	M	19	Del-1b	435	2236_2250delGAAATTAAGAGAAAGCA	E746_A750del
S0405	腺癌	日本	F	19	Del-1b	436	2236_2250delGAAATTAAGAGAAAGCA	E746_A750del
S0439	腺癌	日本	M	19	Del-2	437	2254_2277delTCTCCGAAAGCCCAACAAGGAAATC	S752_I759del
S0361	腺癌	日本	F	21	置換	438	2573T>G	L858R
S0388	腺癌	日本	F	21	置換	439	2573T>G	L858R
S0389	腺癌	日本	F	21	置換	440	2573T>G	L858R

10

20

30

40

【 0 3 6 6 】

(表 S 3 A) ゲフィチニブで治療した肺癌におけるEGFR突然変異状態

ゲフィチニブ 感受性	試料	組織像	供与源	性別	エキソン	配列変化	SEQ ID NO	ヌクレオチド	アミノ酸
Y	IR1T	腺癌	米国	M	19	Del-3	441	2239_2247delTTAAGAGAA, 2248G>C	L747_E749del, A750P
Y	P003	腺癌	米国	M	19	Del-3	442	2239_2247delTTAAGAGAA, 2248G>C	L747_E749del, A750P
Y	IR4T	細気管支肺癌	米国	F	19	Del-4	443	2240_2257delTTAAGAGAAAGCAACATCTC	L747_S752del, P753S
Y	IR2T	腺癌	米国	F	19	Del-5	444	2238_2255delATTAAAGAGAAAGCAACATC, 2237A>T	L747_S752del, E746V
Y	IR3T	腺癌	米国	F	21	置換	445	2573T>G	L858R
Y	IRG	腺癌	米国	F	21	置換	446	2573T>G	L858R
<i>in vitro</i>	H3255								
N	IR5	腺癌	米国	F	18-24	検出無し		n/a	n/a
N	IR6	腺癌	米国	M	18-24	検出無し		n/a	n/a
N	IR8	腺癌	米国	F	18-24	検出無し		n/a	n/a
N	IR9	NSCLC	米国	F	18-24	検出無し		n/a	n/a

10

20

30

40

【 0 3 6 7 】

(表 S 3 B) 表2、表S2、または表S3Aに示されていないEGFR突然変異

試料	組織	エキソン	配列変化	ヌクレオチド	アミノ酸
Tar4T	肺腺癌	19	欠失	2239-2250delTTAAGAGAAAGCA; 2251A>C	L747_A750del; T751T
AD355	肺腺癌	19	欠失	2240-2254delTAAAGAGAAAGCA	L747_T751del
IR TT	肺腺癌	19	欠失	2257- 2271delCCGAAAGCCCAACAAG	P753_K757del
AD240	肺腺癌	20	挿入	2309-2310insCAACCCCGG	D770_N771ins NPG
AD261	肺腺癌	20	挿入	2311-2312insGCGTGGACA	D770_N771ins SVD
	肺腺癌	20	挿入	2316-2317insGGT	P772_H773ins V
AD356	肺腺癌	20	置換	2334-2335GG>AA	G779S
SP02-23	急性骨髄性白血病	21	置換	2570G>T	G857V
SP08-94	神経膠腫	21	置換	2582T>A	L861Q
SP06-45	肉腫	21	置換	2648T>C	L883S
AD241	結腸腺癌	22	置換	2686G>T	D896Y

10

20

30

40

【 0 3 6 8 】

(表 S 3 C) イマチニブに耐性のBCR-ABL変異体の位置およびEGFR受容体における類似位置

耐性突然変異を受けた Abl1 残基	類似EGFR 残基	同一／類似／非保存
Met-244	Lys-714	非保存
Leu-248	Leu-718	同一
Gly-250	Ser-720	非保存
Gln-252	Ala-722	非保存
Tyr-253	Phe-723	類似
Glu-255	Thr-725	非保存
Asp-276	Ala-750	非保存
Thr-315	Thr-790	同一
Phe-317	Leu-792	類似
Met-351	Met-825	同一
Glu-355	Glu-829	同一
Phe-359	Leu-833	類似
His-396	His-870	同一
Ser-417	Thr-892	類似
Phe-486	Phe-961	同一

10

20

30

【 0 3 6 9 】

(表 S 4) cDNAシーケンシングのために使用したプライマー

プライマー名	SEQ ID NO	プライマー配列、5' から3' へ
cDNA EGFR aF	447	TGTAACACGACGGCCAGTCGCCAGACCGGACGACA
cDNA EGFR aR	448	CAGGAAACAGCTATGACCAGGGCAATGAGGACATAACCA
cDNA EGFR bF	449	TGTAACACGACGGCCAGTGGTGGTCCTTGGGAATTTGG
cDNA EGFR bR	450	CAGGAAACAGCTATGACCCCATCGACATGTTGCTGAGAAA
cDNA EGFR cF	451	TGTAACACGACGGCCAGTGAAGGAGCTGCCCATGAGAA
cDNA EGFR cR	452	CAGGAAACAGCTATGACCCGTGGCTTCGTCTCGGAATT
cDNA EGFR dF	453	TGTAACACGACGGCCAGTGAAGGAGCTGACCAAAATCATCTGT
cDNA EGFR dR	454	CAGGAAACAGCTATGACCTACCTATTCGGTTACACACTTT
cDNA EGFR eF	455	TGTAACACGACGGCCAGTCCGTAATTATGTGGTGACAGAT
cDNA EGFR eR	456	CAGGAAACAGCTATGACCCGTATGATTTCTAGGTTCTCA
cDNA EGFR fF	457	TGTAACACGACGGCCAGTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCAC
cDNA EGFR fR	458	CAGGAAACAGCTATGACCCCTGCCTCGGCTGACATTTC
cDNA EGFR gF	459	TGTAACACGACGGCCAGTTAAGCAACAGAGGTGAAAACAG
cDNA EGFR gR	460	CAGGAAACAGCTATGACCCGTGTTGTTTTCTCCCATGACT
cDNA EGFR hF	461	TGTAACACGACGGCCAGTGGACAGACAACGTATCCA
cDNA EGFR hR	462	CAGGAAACAGCTATGACCTTCCTCAAGATCCTCAAGAGA
cDNA EGFR iF	463	TGTAACACGACGGCCAGTGATCGGCCTCTTCATGCGAA
cDNA EGFR iR	464	CAGGAAACAGCTATGACCACGGTGGAGGTGAGGCAGAT
cDNA EGFR jF	465	TGTAACACGACGGCCAGTCGAAAGCCAACAAGGAAATCC
cDNA EGFR jR	466	CAGGAAACAGCTATGACCATTCATGCCATCCACTTGAT
cDNA EGFR kF	467	TGTAACACGACGGCCAGTAACACCGCAGCATGTCAAGAT
cDNA EGFR kR	468	CAGGAAACAGCTATGACCTCGGGCCATTTTGGAGAATT
cDNA EGFR lF	469	TGTAACACGACGGCCAGTTCAGCCACCCATATGTACCAT
cDNA EGFR lR	470	CAGGAAACAGCTATGACCGCTTTGCAGCCATTTCTATC
cDNA EGFR mF	471	TGTAACACGACGGCCAGTACAGCAGGGCTTCTTCAGCA
cDNA EGFR mR	472	CAGGAAACAGCTATGACCTGACACAGGTGGGCTGGACA
cDNA EGFR nF	473	TGTAACACGACGGCCAGTGAATCCTGTCTATCACAATCAG
cDNA EGFR nR	474	CAGGAAACAGCTATGACCGGTATCGAAAGAGTCTGGATTT
cDNA EGFR oF	475	TGTAACACGACGGCCAGTGCTCCACAGCTGAAAATGCA
cDNA EGFR oR	476	CAGGAAACAGCTATGACCACGTTGCAAAACAGTCTGTG

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0370】

【図1】図1A-1Bは、不応性非小細胞肺癌（NSCLC）におけるゲフィチニブ応答の代表的な例証を示す。症例6（表1）の胸部CTスキャンでは、ゲフィチニブでの治療前に右肺に大きな塊を示し（図1A）、ゲフィチニブの6週間後に顕著な改善が始まった（図1B）。

【図2】ゲフィチニブ応答性腫瘍におけるEGFR突然変異を示す。図2A～2Cは、キナーゼドメイン内にヘテロ接合性インフレーションの欠失をもつ腫瘍検体におけるEGFR遺伝子のヌクレオチド配列を示す（二重ピーク）（それぞれ、表した順にSEQ ID NO: 643～654）。センスおよびアンチセンス方向の両方のトレーシングには、欠失の2つの中断点を示すことが示されており；野生型ヌクレオチド配列を大文字で示し、変異体配列を小文字の文字にしてある。del L747-T751 ins S突然変異の5'中断点では、TからC置換が先行し、コードされるアミノ酸を変更することはない。図2Dおよび図2Eは、チロシンキナーゼ・ドメイン（SEQ ID NO: 656および658）にアミノ酸置換を生じるヘテロ接合性ミスセンス突然変異を示す（矢印）。二重ピークは、ヘテロ接合性突然変異部位における2つのヌクレオチドを表す。また、比較のために、対応する野生型配列も示してある（SEQ ID NO: 655および657）。図2Fは、EGFリガンドに結合した二量体化EGFR分子の概略図である。細胞外ドメイン（2つの受容体リガンド[L]-ドメインとfurin様ドメインを含む）、膜貫通領域、および細胞質ドメイン（触媒キナーゼドメインを含む）を強調表示してある。受容体活性化のマーカールとして使用される自己リン酸化部位であるチロシン¹⁰⁶⁸（Y-1068）の位置は、EGFR自

己リン酸化によって活性化される下流のエフェクター（STAT3、MAPキナーゼ（MAPK）、およびAKT）とともに示してある。腫瘍関連突然変異の位置（全てチロシンキナーゼ・ドメイン内）を示してある。

【図3】変異体EGFRのEGF依存的活性化が増強されたこと、およびゲフィチニブに対する変異体EGFRの感受性が増大されたことを証明する。図3Aは、血清飢餓細胞にEGFを添加後の野生型EGFRと比較して、del L747-P753 ins SおよびL858R変異体のリガンドで誘導される活性化の時間経過を示す。EGFRのリン酸化されたチロシン¹⁰⁶⁸残基を特異的に認識する抗体でのウエスタンブロット法を使用して（左パネル）、Cos-7細胞に発現されるEGFRの総レベルと比較して（対象；右パネル）、受容体活性化のマーカーとしてEGFR自己リン酸化を使用する。EGFRの自己リン酸化は、EGF（10ng/ml）の添加後の期間に測定する。図3Bは、野生型および変異体の受容体リン酸化のEGF-誘導のグラフ図である（パネルAを参照されたい）。3つの独立した実験からのオートラジオグラフをNIHイメージ・ソフトウェアを使用して定量化し；EGFRリン酸化の強度を総タンパク質発現に対して規準化し、標準偏差と共に受容体のパーセント活性化として示される。図3Cは、ゲフィチニブによるEGFR活性化の用量依存的な阻害を示す。EGFRチロシン¹⁰⁶⁸の自己リン酸化は、野生型または変異体受容体を発現し、かつ100ng/mlのEGFで30分間刺激したCos-7細胞のウエスタンブロット解析によって証明してある。細胞を無処置（U）または示したように、ゲフィチニブの濃度を増大させて3時間前処理した（左パネル）。発現されたEGFRタンパク質の総量を対象として示してある（右パネル）。図3Dは、パネル3Cについて記載した2つの実験からの結果の定量化（NIHイメージ・ソフトウェア）を示す。リン酸化されたEGFRの濃度をタンパク質発現レベルに対して規準化し、受容体のパーセント活性化として表した。

【図4】EGFRのATP結合ポケットの重要な部位における突然変異のクラスター形成を証明する。図4Aは、NSCLC（SEQ ID NO: 495-504（DNA））の複数の症例において、EGFR遺伝子のエキソン19およびエキソン21のミスセンス突然変異におけるインフレイムの欠失に重なる位置を示す。部分ヌクレオチド配列をそれぞれのエキソンについて示してあり、欠失は、破線によってマークしてあり、ミスセンス突然変異は、強調表示し、かつ下線を引いてあり；野生型EGFRヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示してある（SEQ ID NO: 493および494（DNA）および509～510（アミノ酸））。図4Bは、キナーゼドメインのアミノ（N）およびカルボキシ（C）裂片に隣接するEGFR ATP間隙の三次元構造を示す（座標は、PDB1M14に由来し、およびCn3Dソフトウェアを使用して示した）。ゲフィチニブを表す阻害剤は、ATP間隙を占めて描いてある。2つのミスセンス突然変異の位置は、キナーゼの活性化ループ内に示してあり；3つのインフレイムの欠失は、全てATP間隙に隣接するもう一つのループ内に存在する。図4Cは、EGFRキナーゼドメインのクローズアップであり、ATPに対して、または阻害剤に対して、いずれに結合する際にも関係する重要なアミノ酸残基を示す。具体的には、ゲフィチニブなどの4-アニリノキナゾリン化合物は、ATP結合部位を占めて、ここで、これらがメチオニン⁷⁹³（M793）およびシステイン⁷⁷⁵（C775）残基と水素結合を形成し、一方でこれらのアニリノ環がメチオニン⁷⁶⁶（M766）、リジン⁷⁴⁵（K745）、およびロイシン⁷⁸⁸（L788）残基に近くにあることによって触媒作用を阻害する。突然変異によってターゲットされるループ内のインフレイムの欠失は、阻害剤と比較して、これらのアミノ酸の位置を変更することが予測される。変異された残基をチロシンキナーゼの活性化ループ内に示してある。

【図5】erbB 1遺伝子のヌクレオチドおよびアミノ酸配列を示す。アミノ酸は、当業者にとって公知の一字として示してある。キナーゼドメインにおけるヌクレオチド相違は、患者番号によって強調表示してあり、表2を参照されたい。SEQ ID NO: 511は、ヌクレオチド1～3633を含む。SEQ ID NO: 512は、アミノ酸1～1210を含む。

【図6】図6A～6C：EGFRおよびB-Rafキナーゼドメインの選択した領域の配列整列。NSCLC腫瘍におけるヒトNSCLC。EGFR（gb：X00588；）突然変異におけるEGFR突然変異の描写は、灰色に強調表示してある。複数の腫瘍型（5）におけるB-Raf（gb：M95712）突然変異は、黒に強調表示してある。アステリスクは、残基がEGFRとB-Rafとの間に保存されたことを意味する。図6Aは、活性化ループ（SEQ ID NO: 477～479）におけるL858R突然変異を示

10

20

30

40

50

す。図6Bは、P-ループ (SEQ ID NO: 480~482) におけるG719S変異体を示す。図6Cは、EGFRエキソン19 (SEQ ID NO: 483~489) における欠失変異体を示す。

【図7】EGFRキナーゼドメインの三次元構造におけるミスセンス突然変異G719SおよびL858R並びにDel-1欠失の位置。活性化ループは、黄色に示してあり、P-ループは、青であり、C-裂片およびN-裂片は、示したとおりである。突然変異または欠失によってターゲットされる残基は、赤に強調表示してある。Del-1突然変異は、コドン746~750における残基ELREAをターゲットする。突然変異は、キナーゼ内の高度に保存された領域に位置し、p-ループおよび活性化ループに見いだされ、これはATP、更にゲフィチニブおよびエルロチニブが結合することが予測される領域を囲む。

【図8】図8A-8F。正常組織からの、および腫瘍組織からのEGFR DNAの代表的クロマトグラム。同定された突然変異の位置は、以下の通りである。図8Aは、エキソン18キナーゼドメインPループ (SEQ ID NO: 659~660) を示す。図8Bは、エキソン21キナーゼドメインA-ループ (SEQ ID NO: 661~662) を示す。図8Cは、エキソン19キナーゼドメインDel-1 (SEQ ID NO: 663~665) を示す。図8Dは、エキソン19キナーゼドメインDel-3 (SEQ ID NO: 666~668) を示す。図8Eは、エキソン19キナーゼドメインDel-4 (SEQ ID NO: 669~671) を示す。図8Fは、エキソン19キナーゼドメインDel-5 (SEQ ID NO: 672~674) を示す。

【図9】EGFRおよびBCR-ABLポリペプチドの配列整列および薬剤抵抗性表現型を与える残基の位置。GenBankアクセッション番号NM_005228に開示されたヌクレオチド配列によってコードされるEGFRポリペプチド (SEQ ID NO: 492) おとびGenBankアクセッション番号M14752に開示されたヌクレオチド配列によってコードされるBCR-ABLポリペプチド (SEQ ID NO: 491) を整列させ、保存された残基には陰影をつけてある。チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブ (STI571、Glivec / Gleevec) に耐性を与えるBCR-ABL突然変異は、アステリスクによって示してある。

【図10】EGFR試験を受けている転移性NSCLCである患者のための意思決定プロセスを示す。

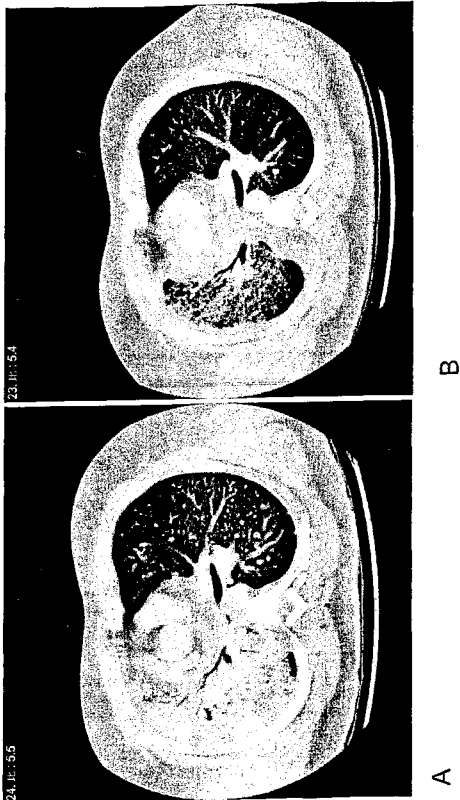
【図11】EGFRエキソン18~24の図を示す (一定の比率ではない)。矢印は、同定された突然変異の位置を示す。アステリスクは、それぞれの位置に突然変異をもつ患者数を示す。破裂図は、エキソン19欠失の重複およびそれぞれの欠失をもつ患者数 (n) を示す。これらは、現在までの全てのEGFR突然変異を含むことを意味しない結果であること点に留意されたい。

10

20

30

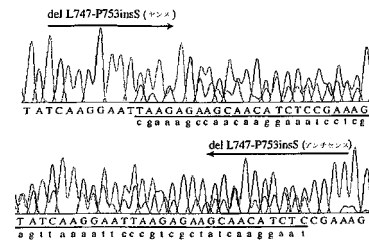
【 図 1 】



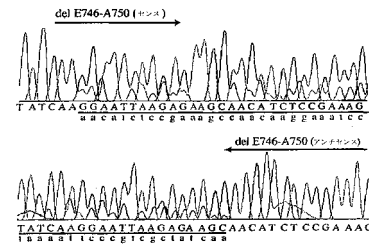
B

A

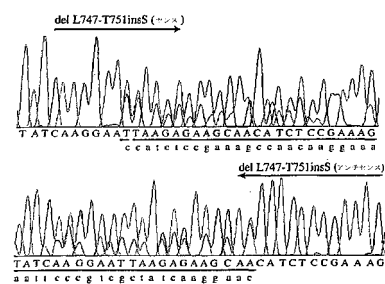
【 図 2 A 】



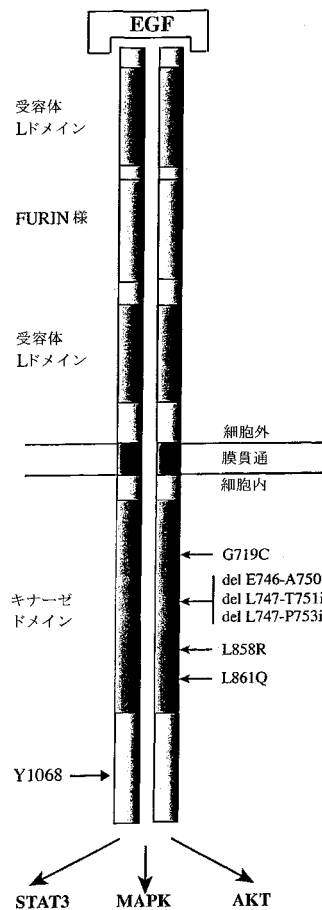
【 図 2 B 】



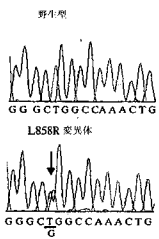
【 図 2 C 】



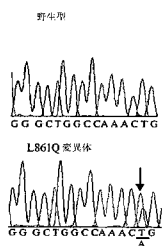
【 図 2 F 】



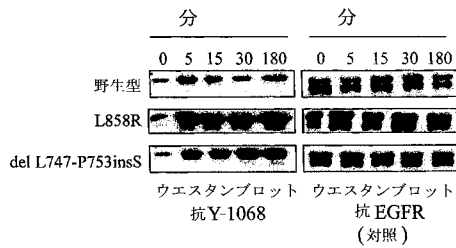
【 図 2 D 】



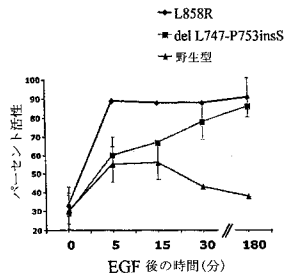
【 図 2 E 】



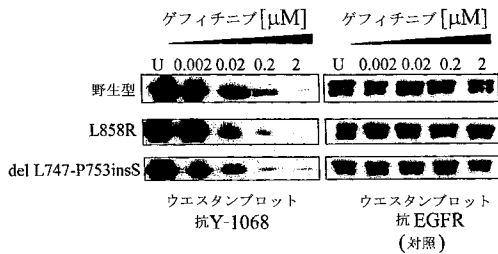
【図 3 A】



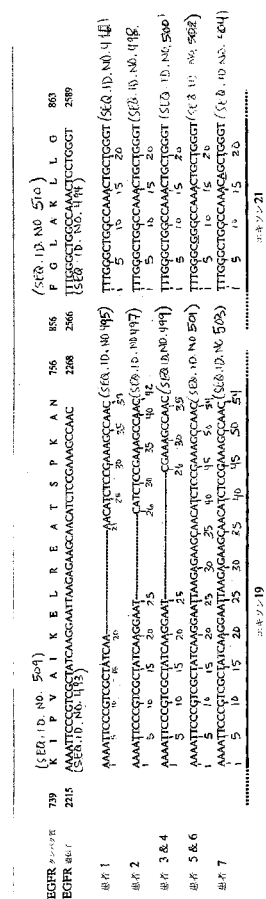
【図 3 B】



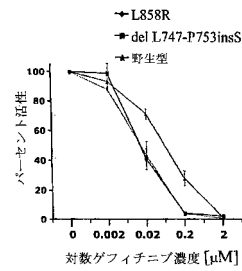
【図 3 C】



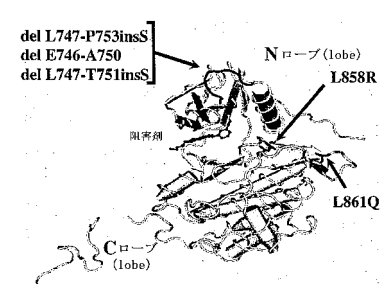
【図 4 A】



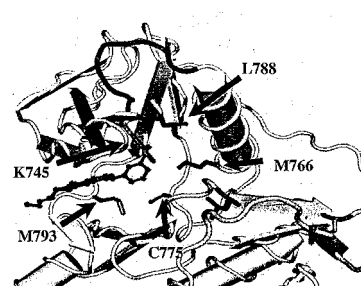
【図 3 D】



【図 4 B】



【図 4 C】



【図 5 - 1】

CCCGGGCGAGCGCGCGCGAGCAGCTCCGCGCCCGCGAGCGTGTGAGCGCCGCGCGG - 185

 CCGAGGCGCGCGAGTCCGAGCTAGCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGAGCGCGAGCAGCACA - 125

 GGGCACCTCGTCGGCGTCCGCGGAGTCCCGCGCTCGCCGCAACGCCACCAACACCGCG - 65

 CACGGCCCGCTGACTCCGTCCAGTATGATCGGGAGCGCGAGCGAGCTCTTCGGGGAG - 5

 CAGCGATGCGACCCCTCGGGAGCGCGCGGGCGAGCGCTCCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCT 55
-M-R--P--S--G--T--A--G--A--L--L--L--L--L--L--A--A--L--L-- 18
 GCGCGCGAGTCCGGCTCTGGAGGAAAGAAAGTTGCCAAGGACAGAGTAACAGCTCA 115
 C--P--A--S--R--A--L--L--B--E--K--K--V--C--Q--G--T--S--N--K--L-- 38
 CGCAGTTGGGCACTTTTGAAGATCAITTTCTCAGCTCCAGAGGATGTCAATCACTGTG 175
 T--G--L--G--T--P--E--D--H--F--L--Y--S--L--Q--R--N--F--N--N--C-- 58
 AGTGGTCTTGGGAATTTGGAATTTACCTATGTGCGAGGAATATGATCTTTCTCTCT 235
 E--V--V--L--G--N--L--E--I--T--X--V--Q--R--N--Y--D--L--S--F-- 78
 TAAAGACCATCCAGGAGTGGCTGGTTATGTCTCATTCGCCCTCAACAGTGGAGCGAA 295
 L--K--T--I--Q--E--V--A--G--Y--V--L--L--A--L--N--T--V--E--R-- 98
 TTCCTTTGGAAGAACCTGCAGATCATCAGAGGAATATGTAACGAAATTCCTATGCCT 355
 I--P--L--E--N--L--Q--I--I--R--G--N--M--Y--Y--E--N--S--Y--A-- 118
 TAGCAGCTCTTATCTAACTATGTGCAATATAACCGGACTGAAGAGCTGCCATGAGAA 415
 L--A--V--L--L--S--N--Y--D--A--N--K--T--G--L--K--E--L--P--M--R-- 138
 ATTACAGGAATCTCGGATCGCCCGCTGGGTTCCAGCAACAACTCCCTGTGCAACG 475
 N--L--Q--E--I--L--H--G--A--V--R--F--S--N--N--P--A--L--C--N-- 158
 TGGAGGACATCCAGTGGCGGACATAGTCAGCAGTGACTTTCTCAGCAACATGTGATGG 535
 V--E--S--I--Q--W--R--D--L--V--S--S--D--F--L--S--N--M--S--M-- 178
 ACTTCCAGAACCACTGGGCGAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAGCTGTCCCAATGGAGCT 595
 D--F--Q--N--H--L--G--S--C--Q--K--C--D--P--S--C--P--N--G--S-- 198
 GCTGGGCTGCAGGAGGAGAGAACTCCGAGAACTGACCAAAATCATCTGTGCCCGCAGT 655
 C--W--G--A--G--E--N--C--Q--K--L--T--K--I--I--C--A--Q--Q--Q-- 218
 GCTCCGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCAGTACTGCTGCCCAACACAGTGTGCTGCGAG 715
 C--S--G--R--C--R--G--K--S--D--C--C--H--N--Q--C--A--A-- 238
 GCTGCAAGGCGCCCGGAGAGGACCATGCTGCTGCTGCCCAATTCGAGAGCAAGGCCA 775
 G--C--T--G--P--R--E--S--D--C--L--V--C--R--K--F--R--D--E--A-- 258
 CGTGCAGGACACCTGCCCGCCACTCATGCTCTCAACCCCAACAGTACAGATGGATG 835
 T--C--K--D--T--C--P--V--M--A--S--V--D--I--N--P--T--T--Y--Q--M--D-- 278
 TGAACCCCGAGGCAAAATACAGCTTTGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCGTAAT 895
 V--N--P--E--G--K--Y--S--F--G--A--T--C--V--K--K--C--P--R--N-- 298

【図 5 - 3】

TGCGGAGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGAGCCCTTACACCCAGTGGAGAGCTC 2095
 L--R--R--L--L--Q--E--R--E--L--V--E--P--L--T--P--S--G--E--A-- 698
 CCAACCAAGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGAACTGAATTCAAAAGATCAAGTGTCTGG 2155
 P--N--Q--A--L--L--L--R--I--L--K--E--T--E--F--K--K--I--K--V--L-- 718
 GCTCCGGTGGCTTGGCGACGGTGTATAGGGAATCTGGATCCGAGAAGTGAAGAAGTTA 2215
 G--S--G--D--E--A--Y--V--M--A--S--V--D--I--N--P--H--V--E--G--E--K--V-- 738
 AAATTCCTCGCTATCAAGGAATTAAGAGAGCAACATCTCCGAAGCCAAACAGGAAA 2275
 K--I--P--V--A--I--K--E--L--R--E--A--T--S--P--K--A--N--K--E-- 758
 TCCTCGATGAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCAAGCTGTGCCCGCTGCTGG 2335
 I--L--D--E--A--Y--V--M--A--S--V--D--I--N--P--H--V--E--G--E--K--V-- 778
 GCATCTGCCTCACTCCAGCTGCAGCTCATCAGCAGCTCATGCCCTTCGGCTGCCTCC 2395
 G--I--C--L--T--S--T--V--Q--L--I--T--Q--L--M--P--F--G--C--L-- 798
 TGGACTATGTCGGGGAACAAAGACAAATATGGCTCCAGTACCTGCTCAACTGGTGTG 2455
 L--D--Y--V--L--E--H--K--D--N--I--G--S--Q--Y--D--L--N--W--C-- 818
 TGCAGATCGAAAGGCGATGAATCTACTTGGAGGACCGTGGCTGGTGACCOCGACCTGG 2515
 V--Q--I--A--K--G--M--N--Y--L--E--D--R--R--L--V--H--R--D--L-- 838
 CAGCCAGGAACGTACTGTGAAACACCGCAGCATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGG 2575
 A--A--R--N--K--L--L--V--L--K--T--P--Q--H--V--K--I--T--D--F--G--L-- 858
 CCAAACTGCTGGTGGCGGAAGAGAAATACCATGCGAGAAGAGGCAAGTGCCTATCA 2635
 A--K--L--L--G--A--E--E--K--E--Y--H--A--E--G--G--K--V--P--I-- 878
 AGTGGATGGCATTGGAATCAATTTACACAGAATCTATACCCACAGAGTGTGCTGGA 2695
 K--W--M--A--L--E--S--I--L--H--R--I--Y--T--H--Q--S--D--V--W-- 898
 GCTACGGGGTACTGTTTGGGAGTTGATGACCTTTGGATCCAAGCCATATGACGSAATCC 2755
 S--Y--G--V--T--V--W--E--L--M--T--F--G--S--K--P--Y--D--G--I-- 918
 CTGCCAGCGAGATCTCTCCATCTCTGGAGAAAGGAGAACGCTCTCCCTCAGGCCCATAT 2815
 P--A--S--E--I--S--S--I--L--E--K--G--D--N--P--Q--P--P--P--I-- 938
 GTACCATCGATGCTACATGATCATGGTCAAGTGTGATGATAGACGAGATAGTGCCTC 2875
 C--T--I--D--V--Y--M--I--M--V--K--C--W--M--I--D--A--D--S--R-- 958
 CAAAGTTCCTGAGTGTGATCATCGAATTTCCAAATATGGCCGAGACCCCGAGCGCTACC 2935
 P--K--R--B--L--I--I--B--F--S--X--M--A--R--D--P--Q--R--Y-- 978
 TTGTCAITTCAGGGGGATGAAAGAAATGCATTTGCCAAGTCTACAGACTCCAACCTTCTACC 2995
 L--V--I--Q--G--D--E--R--M--H--L--P--S--P--T--D--S--N--F--Y-- 998
 GTGCCCTGATGGATGAAGAAGATGAGCAGCGTGGTGGATGCCGACGAGTACCTCATCC 3085
 R--A--L--M--D--E--D--M--D--V--V--D--A--D--E--Y--L--I-- 1018
 CACAGCAGGGCTTCTTCAGCAGCCCTCCACGTCACGGACTCCCTCTGAGCTCTCTGA 3115
 P--Q--Q--G--F--F--S--S--P--S--T--S--R--T--P--L--L--S--S--L-- 1038
 GTGCAACAGCAACAATTCACCGTGGCTTGCTGATGAGAAATGGGCTGCAAGAGCTGTC 3175
 S--A--T--S--N--N--S--T--V--A--C--I--D--R--N--G--L--Q--S--C-- 1058

【図 5 - 2】

ATGTGGTGACAGATCACGGCTCGTGCCTCCGAGCTGTGGGGCGAGCAGTATGAGATGG 955
 Y--V--V--T--D--H--G--S--C--V--R--A--C--G--A--D--S--Y--E--M-- 318
 AGGAAGACGGCTCCGCAAGTGAAGAAGTGAAGAAGGCTTCGCCCAAGTGTGTAAGC 1015
 E--E--D--G--V--R--K--C--K--K--C--E--G--P--K--V--C--N-- 338
 GAATAGGTATTTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATTAAGTCTACGAATATTAAGACT 1075
 G--I--G--I--G--E--P--K--D--S--L--S--I--N--A--T--N--I--K--H-- 358
 TCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCTGCGGCTGGCATTTAGGGGTG 1135
 P--K--N--C--T--S--I--S--G--D--L--H--I--L--P--V--A--F--R--G-- 378
 ACTCCTTCACACATACTCCTCCTCTGATCCACAGGAAGTGGATATTTGAAACCGGTAA 1195
 K--E--I--T--G--F--L--L--D--D--P--Q--E--L--D--I--L--K--T--V-- 418
 AGGAATACACAGGTTTTTGTGATTCAGGCTTGGCTGAAACAGGACCGACCTCCATG 1255
 C--E--I--T--G--F--L--L--I--Q--A--W--P--E--N--R--T--D--L--H-- 438
 KCTTTGAGAACCTAGAATCATACCGGCGAGGACCAAGCAACATGCTGCTTTCTCTTG 1315
 A--F--E--N--L--E--I--R--G--R--T--K--Q--H--G--Q--F--S--L-- 458
 CAGTCGTCAGCTGAACATAACATCTCTGGGATACGCTCCCTCAAGGAGATTAAGATG 1375
 A--V--V--S--L--N--I--T--S--L--G--L--P--Q--E--L--L--K--E--I-- 478
 GAGATGTGATTAATTCAGGAACCAAAATTTGTGCTATGCAATAACAATAAATGGAATA 1435
 G--D--V--I--I--S--G--N--K--N--L--C--Y--A--N--T--I--N--W--K-- 498
 AACTGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACCAAAATATAAGCAACAGAGGTGAAACAGCT 1495
 K--L--R--G--T--S--G--Q--K--T--K--I--I--S--N--R--G--E--N--S-- 498
 GCAAGGCCACAGGCGAGTGTGCCCTGCTGCTGCTCCCGGGGCTGCTGGGGCCCGG 1555
 C--K--A--T--G--Q--V--C--H--A--L--C--S--P--E--G--C--W--G--P-- 518
 AGCCAGGAGTGTGCTCTCTTGGCGAATGTGAGCGAGGAGGAGGATGCTGGGACAACT 1615
 E--P--R--D--C--V--S--C--R--N--V--S--R--G--R--E--C--V--D--K-- 538
 GCAACCTTCTGGAGGTCAGCAAGGAGGATTTGTGGAAGTCTGAGTGCAATACATGCTCC 1675
 C--N--L--L--E--G--E--P--R--E--F--V--E--N--S--E--C--I--Q--C-- 558
 ACCCAGAGTGTGCTGCTCAGGCCATGAACATCACTGCAAGGAGGAGGACAGCAACT 1735
 H--P--E--C--L--P--Q--A--M--N--I--T--C--T--G--R--G--P--D--N-- 578
 GTATCCAGTGTGCCACTACATGTGAGCGCCCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG 1795
 C--I--Q--C--A--H--Y--I--D--G--P--H--C--V--K--T--C--P--A--G-- 598
 TCATGGGAGAGAAACAAACCTGCTGGAAGTACGAGAGGAGGAGGATGCTGGGACCACT 1855
 V--M--G--E--N--N--T--L--V--W--K--Y--A--D--A--G--H--C--C--I--Q--C-- 618
 TGTGCCATCCAACTGCACCTACGAGTGCATGCGGCGAGGCTTGAAGGCTTCCAAACGA 1915
 L--C--H--P--N--C--T--Y--G--C--T--G--P--G--L--E--G--C--P--T-- 638
 ATGGGCTTAAGATCCCGTCCATGCCACTGGATGCTGGGGGCGCTCTCTGCTGCTGCTG 1975
 P--P--K--I--P--S--I--A--T--G--M--V--G--H--D--A--G--H--C--C--I--Q--C-- 658
 TGGTGGCCTGGGATCGGCTCTTCATGCGAAGGCGCCACATCGGTCGGAAGCGCAGCG 2035
 V--V--A--L--G--I--G--L--P--M--R--R--R--H--I--V--R--K--R--T-- 678

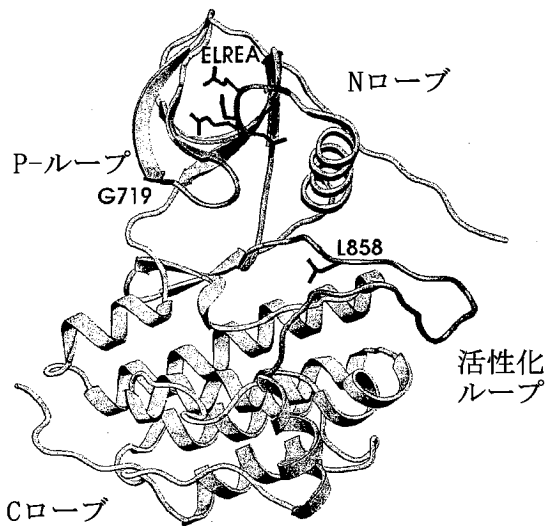
【図 5 - 4】

CCATCAAGGAAGACAGCTTCTTGACGAGTACAGCTCAGACCCACAGGCGCTTGACTG 3235
 P--I--K--E--D--S--F--L--Q--R--Y--S--S--D--P--T--G--A--L--T-- 1078
 AGGACAGCATAGACGACCTTCTCCAGTGCCTGAATACATAAACAGTCCGTTCCCA 3295
 E--D--S--I--D--D--T--F--L--P--V--P--E--Y--I--N--Q--S--V--P-- 1098
 AAAGGCCGCTGGCTCTGTGAGAACTCTGCTATCAACATCAGCTCTGAACCCCGGCG 3355
 K--R--P--A--G--S--V--Q--N--P--V--Y--H--N--Q--P--L--N--P--A-- 1118
 CCAGCAGACACCCACTACAGGAGCCCGACAGCATGCTGAGTGGGCAACCCCGAGTATC 3415
 P--S--R--D--P--H--Y--Q--D--P--H--S--T--A--V--G--N--P--E--Y-- 1138
 TCAACACTGTCCAGCCCACTGTGTCAACAGCAGTTCGACAGCCCTGCCACTGGGCCC 3475
 L--N--T--V--Q--P--T--C--V--N--S--T--P--D--S--P--A--H--W--A-- 1158
 AGAAAGGCGAGCCACCAATTAAGCTGGACAACCTGACTACAGCAGGAGTCTTTCCCA 3535
 Q--K--G--S--H--Q--I--S--L--D--N--P--D--Y--Q--Q--D--F--F--P-- 1178
 AGGAAGCAAGCCAAATGGCATCTTTAAGGCTCCACAGCTGAAATCGAATACCTAA 3595
 K--E--A--K--P--N--G--I--F--K--G--S--T--A--E--N--A--E--Y--L-- 1198
 GGGTCGCGCCACAAAGCAGTGAATTTATGAGCATGA 3633 (SEQ ID NO 511)
 R--V--A--P--Q--S--S--E--F--I--G--A--* 1210 (SEQ ID NO 512)

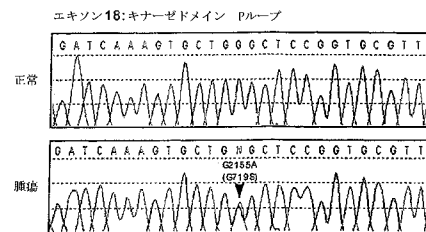
【図 6】

A		SEQ ID NO	
L858R	KTPQHVKITDFGR ^{活性化ループ} AKLLGAEKEYH	870	477
EGFR	KTPQHVKITDFGLAKLLGAEKEYH	870	478
BRAF	HE ^{活性化ループ} DLTVKIGDEGLATV ^{活性化ループ} KSRWSGSHQ	608	479
*** **			
B		P-ループ	
G719S	ETEFKKIKVL ^{活性化ループ} SSGAFGTVYKGLWIP	733	480
EGFR	ETEFKKIKVLSSGAFGTVYKGLWIP	733	481
BRAF	DGQITVQGRIS ^{活性化ループ} SSGAFGTVYKGLWIP	477	482
*** **			
C		742 [750]752	
Del-1	VAIK ^{活性化ループ} ET-SPKANKEILDEAYV	765	483
Del-2	VAIKELREAT ^{活性化ループ} ET-SPKANKEILDEAYV	765	484
Del-3	VAIKELREAT ^{活性化ループ} ET-SPKANKEILDEAYV	765	485
Del-4	VAIKELREAT ^{活性化ループ} ET-SPKANKEILDEAYV	765	486
Del-5	VAIKELREAT ^{活性化ループ} ET-SPKANKEILDEAYV	765	487
EGFR	VAIKELREAT-SPKANKEILDEAYV	765	488
BRAF	VAVKMLNVTAPT ^{活性化ループ} PQQLQAFKNEVGV	503	489
*** **			

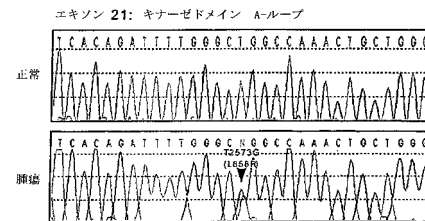
【図 7】



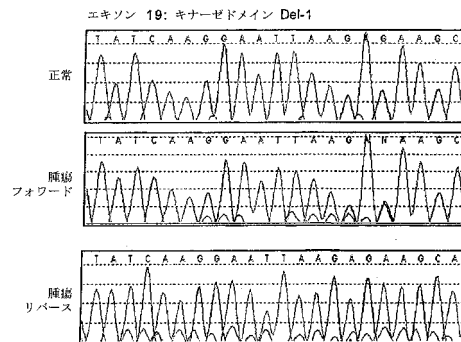
【図 8 A】



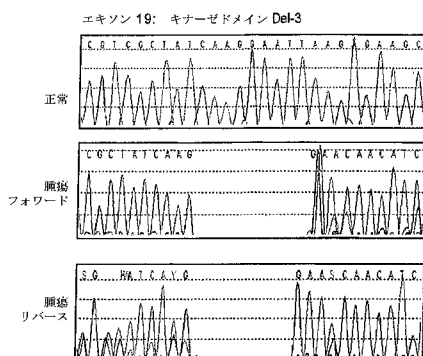
【図 8 B】



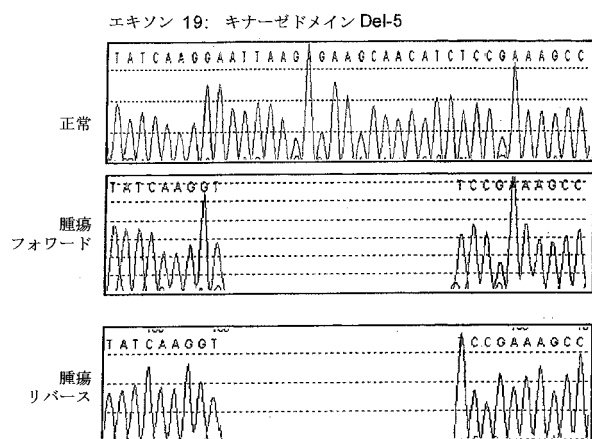
【図 8 C】



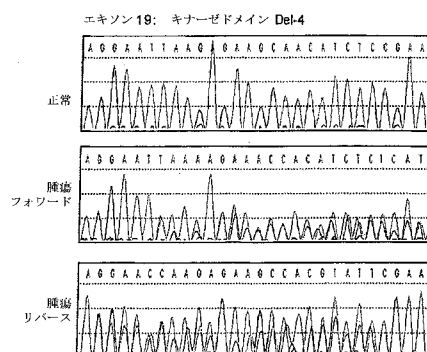
【図 8 D】



【図 8 F】



【図 8 E】

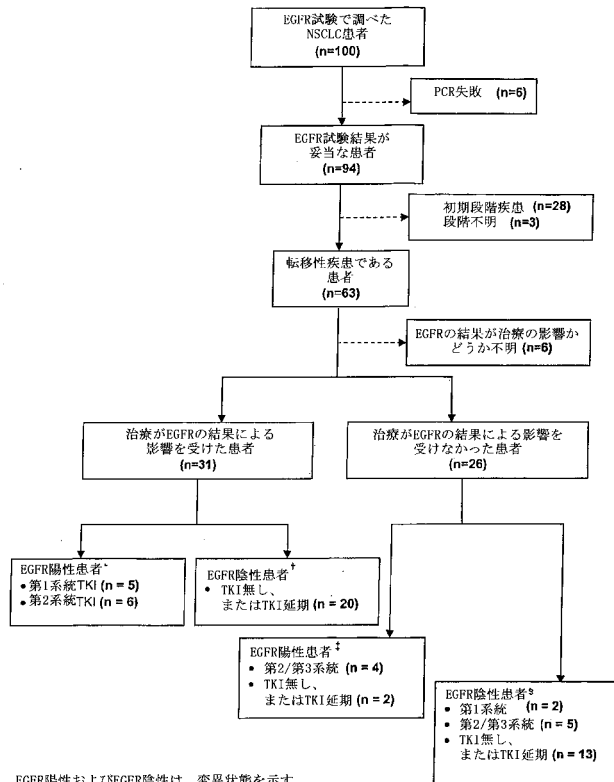


【 図 1 0 】

EGFRに対するAb11のアラインメント

712	FKKILGGQGVGEVGEVWK-----KSLTAVVILKEDT-----NEVEBVLKEAAMKEIKHNVLQVLQVCTREPPYIIT	790
Ab11 (242)	ITFKKILGGQGVGEVGEVWK-----KSLTAVVILKEDT-----NEVEBVLKEAAMKEIKHNVLQVLQVCTREPPYIIT	
EGR (712)	FKKILGGQGVGEVGEVWK-----KSLTAVVILKEDT-----NEVEBVLKEAAMKEIKHNVLQVLQVCTREPPYIIT	
コンセンサス	LG G VG VG GW K I VAIK LKE T S L EA VM I P L LGIC	869
791	QWPTGNCILDYLRERQBNVAVLLVMATQVSSAMEYLEKFNIRHDLAASNCLVGENHSLVAVDFGVSRLMTGGTGYTA	
Ab11 (316)	QWPTGNCILDYLRERQBNVAVLLVMATQVSSAMEYLEKFNIRHDLAASNCLVGENHSLVAVDFGVSRLMTGGTGYTA	
EGR (791)	QWPTGNCILDYLRERQBNVAVLLVMATQVSSAMEYLEKFNIRHDLAASNCLVGENHSLVAVDFGVSRLMTGGTGYTA	
コンセンサス	M FG LLDYLR N I A LL QIA AM YLE K IRHDLAASN LV VKI DFLGAKL AD	949
870	HA-GAKPIKWTADESIANNKFSIKSDWAPGVLLMETATVMSYFGIDLSQVLEFKDYMRPDEGCPKVEYELMWA	
Ab11 (396)	HA-GAKPIKWTADESIANNKFSIKSDWAPGVLLMETATVMSYFGIDLSQVLEFKDYMRPDEGCPKVEYELMWA	
EGR (870)	HREGGVTKWMALESILRIHYHQSDVWVLMETATVMSYFGIDLSQVLEFKDYMRPDEGCPKVEYELMWA	
コンセンサス	HA GAK PIKW A ESI H FS SDVWAFVG IWEI TFG FI GI S I ILEK RL P C Y VM IWK	
950	QWQNFNSDRESFAITHQAT----- (SEQ ID NO 491)	
Ab11 (475)	QWQNFNSDRESFAITHQAT----- (SEQ ID NO 491)	
EGR (950)	QWQNFNSDRESFAITHQAT----- (SEQ ID NO 491)	
コンセンサス	QWIDADRSPKFEILIEFSWARDPQYIL (SEQ ID NO 492)	
	RP F EI F	

EGFR試験を受けている転移性NSCLCを有する患者のための意思決定プロセス



EGFR陽性およびEGFR陰性は、変異状態を示す

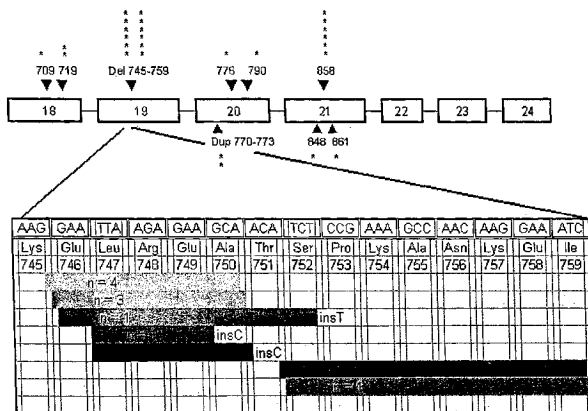
* 2人の患者が第1系統TKI臨床試験に登録された

↑ 2人の患者が試験前にTKIを受けている

‡ 3人の患者が試験前にTKIを受けている

§ 1人の患者が第1系統TKI臨床試験に登録され、かつ4人の患者が試験前にTKIを受けている

【 図 1 1 】



TK領域をコードするEGFRエクソン18〜24の概略図を示す（一定比率ではない）。矢印は同定された突然変異の位置を示す。アスタリスクは各位置に突然変異を有する患者の数を示す。拡大図はエクソン19欠失の重複、およびそれぞれの欠失を有する患者の数(n)を示す。

【配列表】

2009171965000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成21年2月9日(2009.2.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程を含む、非小細胞肺癌と診断された個体におけるゲフィチニブまたはエルロチニブによる治療の薬理有効性の可能性の増大を決定するための方法。

個体の非小細胞肺癌腫瘍サンプルからDNAを得る工程；及び該DNA中の上皮細胞成長因子受容体（EGFR）遺伝子のエキソン19または21において、少なくとも1つのヌクレオチド相違の有無を検出する工程であって、

a) 少なくとも配列番号：512の747位、748位および749位のアミノ酸ロイシン、アルギニン、及びグルタミン酸の欠損を含むアミノ酸変異をもたらす、コドン746～753内の欠損からなるEGFR遺伝子のエキソン19内のインフレーム欠損、

b) 配列番号：512の858位におけるロイシンからアルギニンへの置換（L858R）からなるアミノ酸変異をもたらす、エキソン21内の置換、
から選択された少なくとも一つのヌクレオチド相違の存在は、個体におけるゲフィチニブまたはエルロチニブによる治療の薬理有効性の可能性が増大することを示す工程

【請求項2】

少なくとも1つのヌクレオチド相違の存在が、DNAシーケンシング、アリル特異的増幅、ミスマッチ切断検出、一本鎖DNA高次構造多型、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動、または温度勾配ゲル電気泳動解析によって検出される、請求項1記載の方法。

【請求項3】

a. EGFRキナーゼドメインのエキソン19、もしくは21と境界を接するか、またはその範囲内の核酸領域に対してアニールするようにデザインされた少なくとも1つの縮重プライマー対；

b. PCR増幅を実行するために必要とされる製品および試薬；並びに、

c. 説明書、

を含むキット。

【請求項4】

a. EGFRキナーゼドメインのエキソン19、もしくは21の範囲内の核酸領域に対してアニールするようにデザインされた少なくとも1つのプローブ；

b. アニール反応を実行するために必要とされる製品および試薬；並びに

c. 説明書、

を含むキット。

【請求項5】

前記プローブが、選択的結合条件下で、erbB 1遺伝子内のエクソン19または21内の少なくとも1つの相違を含む核酸配列に対して特異的に結合し、ここで、該相違が、少なくとも配列番号：512の747位、748位および749位のアミノ酸ロイシン、アルギニン、及びグルタミン酸の欠損を含むアミノ酸変異をもたらす、コドン746～753内の欠損からなるEGFR遺伝子のエキソン19内のインフレーム欠損であるか、または該相違が、配列番号：512の858位におけるロイシンからアルギニンへの置換（L858R）からなるアミノ酸変異をもたらす、エキソン21内の置換であるプローブである、請求項4に記載のキット。

【請求項6】

選択的結合条件下で、erbB 1遺伝子内のエクソン19または21内に少なくとも1つの相違

を含む核酸配列に対して特異的に結合するプローブであって、該相違が、少なくとも配列番号：512の747位、748位および749位のアミノ酸ロイシン、アルギニン、及びグルタミン酸の欠損を含むアミノ酸変異をもたらす、コドン746～753内の欠損からなるEGFR遺伝子のエキソン19内のインフレーム欠損であるか、または該相違が、配列番号：512の858位におけるロイシンからアルギニンへの置換（L858R）からなるアミノ酸変異をもたらす、エキソン21内の置換である、プローブ。

【請求項7】

プローブが、500ヌクレオチド塩基以下の長さの核酸配列を含む、請求項6記載のプローブ。

【請求項8】

プローブが、ペプチド核酸（PNA）を含む、請求項6記載のプローブ。

【請求項9】

検出可能な標識をさらに含む、請求項6記載のプローブ。

【請求項10】

アミノ酸746～750、アミノ酸747～751、およびアミノ酸747～753からなる群より選択されるアミノ酸が欠失している、配列番号：512のアミノ酸配列を有する単離されたタンパク質。

【請求項11】

アミノ酸858のロイシンのアルギニンへの置換を含む、配列番号：512のアミノ酸配列を有する単離されたタンパク質。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 5
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)	A 6 1 K 31/5377	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/517 (2006.01)	A 6 1 K 31/517	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 31/7105 (2006.01)	A 6 1 K 31/7105	
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/48	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 27/62 (2006.01)	G 0 1 N 37/00 1 0 2	
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 27/62 V	
	G 0 1 N 21/78 C	

- (31)優先権主張番号 60/565,985
 (32)優先日 平成16年4月27日(2004.4.27)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/574,035
 (32)優先日 平成16年5月25日(2004.5.25)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/577,916
 (32)優先日 平成16年6月7日(2004.6.7)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 60/592,287
 (32)優先日 平成16年7月29日(2004.7.29)
 (33)優先権主張国 米国(US)

- (72)発明者 ベル ダフネ ウィニフレッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 アーリントン アリゾナ テラス 7 アpartment
 # 3
 (72)発明者 ハーバー ダニエル エー .
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 チェスナット ヒル モナドノック ロード 3 4
 (72)発明者 ジャンヌ パシ アンテロ
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン ラウンドウッド ロード 1 2 8
 (72)発明者 ジョンソン ブルース イー .
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックリン シーバー ストリート 8 0
 (72)発明者 リンチ トマス ジェイ .
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン プリンス ストリート 1 3 1
 (72)発明者 マイヤソン マシュー
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 コンコード インディペンデンス ロード 3 0 7

(72)発明者 パエス ジュアン ギエルモ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボストン リバーウェイ 3 5 2 # 2 2

(72)発明者 セラーズ ウィリアム アール .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブルックリン シーバー ストリート 8 0

(72)発明者 セトルマン ジェフリー イー .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ニュートン ウェイバリー アベニュー 1 4 0

(72)発明者 ソルデッラ ラファエラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベッドフォード サンセット ロード 3 8

F ターム(参考) 2G041 CA01 FA11 HA02

2G045 AA26 DA13 DA14 DA36 FB01 FB02 FB03

2G054 AA06 AB04 CA21 CE02 EA03

4B024 AA01 AA12 AA20 BA10 BA63 CA02 CA09 CA20 DA02 DA03

EA04 GA13 GA18 GA25 GA27 HA11 HA19 HA20

4B063 QA01 QA05 QA13 QA17 QA19 QQ02 QQ08 QQ21 QQ27 QQ41

QQ61 QQ79 QQ89 QQ91 QQ95 QR07 QR08 QR32 QR35 QR40

QR42 QR48 QR51 QR55 QR56 QR62 QR72 QR77 QR80 QR82

QS16 QS25 QS33 QS34 QS36 QX01 QX02

4C084 AA13 AA17 BA01 BA02 BA08 BA22 BA23 DC01 DC50 NA14

ZB26 ZC20

4C085 AA13 CC03 EE01 GG01

4C086 AA01 BC46 BC73 EA17 EA18 GA07 GA09 MA01 MA04 NA14

ZB26 ZC20

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 DA50 DA89 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	确定癌症对表皮生长因子受体靶向治疗的反应性的方法		
公开(公告)号	JP2009171965A	公开(公告)日	2009-08-06
申请号	JP2009002422	申请日	2009-01-08
[标]申请(专利权)人(译)	总医院集团 达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	总医院集团 达纳 - 法伯癌症研究所的油墨.		
[标]发明人	ベルダフネウニフレッド ハーバーダニエル ジャンヌパシアンテロ ジョンソンプルースイー リンチトマスジェイ マイヤソンマシュー パエスジュアンギエルモ セラーズウィリアムアール セトルマンジェフリーイー ソルデッララファエラ		
发明人	ベル ダフネ ウニフレッド ハーバー ダニエル エー. ジャンヌ パシ アンテロ ジョンソン プルース イー. リンチ トマス ジェイ. マイヤソン マシュー パエス ジュアン ギエルモ セラーズ ウィリアム アール. セトルマン ジェフリー イー. ソルデッラ ラファエラ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/71 C12Q1/02 C12Q1/48 C12Q1/68 A61K45/00 A61P43/00 A61K31/5377 A61K31/517 A61P35/00 A61K39/395 A61K38/00 A61K48/00 A61K31/711 A61K31/7105 A61K38/43 A61K31/713 A61K31/7088 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00 G01N27/62 G01N21/78 G01N33/574 G01N33/74		
CPC分类号	C12Q1/485 C12Q1/6886 C12Q1/6888 C12Q2600/106 C12Q2600/118 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/16 G01N33/574 G01N33/74 G01N2333/485 G01N2800/52 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/71 C12Q1/6827 G01N33/48 G01N33/5008 G01N33/5308 G01N33/57423		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/71 C12Q1/02 C12Q1/48.Z C12Q1/68.A A61K45/00 A61P43/00.111 A61K31/5377 A61K31/517 A61P35/00 A61K39/395 A61K37/02 A61K48/00 A61K31/711 A61K31/7105 A61K37/48 A61K31/713 A61K31/7088 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N27/62.V G01N21/78.C A61K38/00 A61K38/02 A61K38/16 A61K38/43 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12Q1/6886.C C12Q1/6886.Z		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/FA11 2G041/HA02 2G045/AA26 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/CA21 2G054/CE02 2G054/EA03 4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA20 4B024/BA10 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/GA18 4B024/GA25 4B024/GA27 4B024/HA11 4B024/HA19 4B024/HA20 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA13 4B063/QA17 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ27 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QQ95 4B063/QR07 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063		

/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063 /QS36 4B063/QX01 4B063/QX02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DC01 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C084/ZC20 4C085 /AA13 4C085/CC03 4C085/EE01 4C085/GG01 4C086/AA01 4C086/BC46 4C086/BC73 4C086/EA17 4C086/EA18 4C086/GA07 4C086/GA09 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086 /ZC20 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74

代理人(译)	清水初衷
优先权	60/558218 2004-03-31 US 60/561095 2004-04-09 US 60/565753 2004-04-27 US 60/565985 2004-04-27 US 60/574035 2004-05-25 US 60/577916 2004-06-07 US 60/592287 2004-07-29 US
其他公开文献	JP4468475B2
外部链接	Espacenet

摘要(译)

要解决的问题：提供一种确定表皮生长因子受体（EGFR）靶向治疗在患有癌症的人类患者中的潜在疗效的新颖方法和治疗方法。一种确定癌症对表皮生长因子受体（EGFR）治疗的反应的方法。在一个优选的实施方案中，erbB1基因的激酶结构域中至少一个差异的存在赋予酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼敏感性。因此，对这些突变的诊断测试可以向最可能对该药产生反应的患者使用吉非替尼，厄洛替尼和其他酪氨酸激酶抑制剂。[选型图]图1

