

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6905464号
(P6905464)

(45) 発行日 令和3年7月21日 (2021.7.21)

(24) 登録日 令和3年6月29日 (2021.6.29)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	C 1 2 N 15/11 Z
C 0 7 K 14/71 (2006.01)	C 0 7 K 14/71 Z N A
C 1 2 Q 1/6827 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6827 Z
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T
請求項の数 5 (全 27 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2017-504814 (P2017-504814)	(73) 特許権者	514028112
(86) (22) 出願日	平成26年12月30日 (2014.12.30)		フンダシオ インスティトゥ マー ディ
(65) 公表番号	特表2017-522890 (P2017-522890A)		ンヴェスティガシオンズ メディケー (イ
(43) 公表日	平成29年8月17日 (2017.8.17)		ーエメイーエメ)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2014/079477		スペイン国 エー08003 バルセロナ
(87) 国際公開番号	W02016/015788		, カジェ ドゥクト イグアデ, 88
(87) 国際公開日	平成28年2月4日 (2016.2.4)	(73) 特許権者	517025981
審査請求日	平成29年12月4日 (2017.12.4)		バルデッリ, アルベルト
(31) 優先権主張番号	14382288.0		BARDELLI, Alberto
(32) 優先日	平成26年7月28日 (2014.7.28)		イタリア共和国 トリノ エー10123
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		, コルソ ルイジ コシュート 18
前置審査			Corso Luigi Kossuth
			18, 1-10123 Torino (
			1 T)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 上皮増殖因子受容体遺伝子の細胞外ドメイン I I I 内の変異

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌に罹患した対象から得た試料中、配列番号 2 に対応するアミノ酸配列の 4 6 4 位におけるロイシンの存在又は非存在；及び／又は配列番号 2 に対応するアミノ酸配列の 4 6 5 位におけるアルギニンの存在又は非存在；及び／又は配列番号 2 に対応するアミノ酸配列の 4 6 7 位におけるスレオニンの存在又は非存在を同定する、セツキシマブ及び／又はパニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性の予測に使用するためのキットであって、

前記キットは、配列番号 6 (C A A A G T T T T C A G G G A T A C A T T G T T T T T) 及び配列番号 7 (T T A A A T G G G A A T A G C C C T T C A A T A T T) からなるプライマーセットを含む、キット。

【請求項 2】

更に、K R A S 及び／又は P I K 3 C A、及び／又は B R A F 遺伝子の変異、及び／又は E G F R 遺伝子内の追加の変異を検出するための試薬を含む、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

インビトロで、セツキシマブ及び／又はパニツムマブを含む治療レジメンに対する癌に罹患した対象の応答性を予測する方法であって、

(i) 遺伝子型法、及び／又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、対象から得た試料において、以下の変異の少なくとも 1 つが存在するか

存在しないかを決定し：

配列番号2の464位におけるセリンのロイシンへの変異；

配列番号2の465位におけるグリシンのアルギニンへの変異；及び／又は

配列番号2の467位におけるリシンのスレオニンへの変異；

(ii) 工程(i)において同定された任意の変異の存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の耐性と関連付けるか、又は工程(i)における変異の非存在を、パニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性と関連付けることを含む、方法。

【請求項4】

工程(i)を、請求項1又は2に記載のキットを用いて実施する、請求項3に記載のインビトロでの方法。

【請求項5】

工程(i)が配列番号2に対応するアミノ酸配列の492位におけるアルギニンの存在又は非存在を決定することを更に含み、工程(ii)において、工程(i)において同定されたアルギニンの更なる存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の耐性と関連付ける、請求項3又は4に記載のインビトロでの方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、モノクローナル抗体治療に対する応答性を判定するためのマーカーとしてのヒト上皮増殖因子受容体遺伝子の新規な変異に関する。

【背景技術】

【0002】

上皮成長因子受容体遺伝子(EGFR)は、4種の密接に関連した受容体チロシンキナーゼ：EGFR(ErbB-1)、HER2/c-neu(ErbB-2)、Her3(ErbB-3)、及びHer4(ErbB-4)を含む、受容体の上皮成長因子ファミリー(ErbBファミリー)に属する膜貫通チロシンキナーゼ受容体である。リガンドが結合すると、EGFRは、アポトーシス、細胞成長、血管形成、及び転移等の重要な発癌性事象を調節する細胞内シグナル伝達経路、主にRAS-RAF-MEK-ERKカスケード及びPI3K-AKT経路を活性化する。EGFRの異常活性化又は過剰発現は、いくつかの種類の癌において報告されている(即ち、Mendelsohn J、Baselga Jら、「Epidermal growth factor receptor targeting in cancer」、Semin Oncol-2006、Vol.33、pp.:369-38)。EGFR遺伝子における変異は肺癌で説明されている。このような変異の例は、例えばLynch TJら、「Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib」、N Engl J Med-2004、Vol.350、pp:2129-2139の文献に開示されている。

【0003】

転移性(metastatic)結腸直腸癌(mCRC)は、西洋の国々の世界における癌による死亡のうち2番目に主な原因である。

【0004】

EGFRの細胞外ドメインIIIに対するモノクローナル抗体(mAb)、例えばセツキシマブ及びパニツムマブに基づいた治療は、mCRCを患っている患者に顕著な生存利益を与え、現在、これらの患者についての治療レジメン、即ち単独で又は他の抗悪性腫瘍薬と併用してのいずれかでの標準的な成分になっている。これらのmAbのうちの1つである、セツキシマブ(アービタックス)はまた、白金ベースの化学療法剤と併用して、頭頸部癌としても指定されている頭頸部の扁平上皮細胞癌腫を患っている患者の治療のために示されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 5 】

m o A bは癌細胞で発現された異質の抗原に結合する。一旦結合すると、癌細胞は患者の免疫系による破壊のために標識化される。癌細胞を標的化することに加えて、m o A bは腫瘍成長に必要な他の細胞種類及び分子に対して作用するように設計することができる。例えば、抗体は成長因子を中和することができるので、腫瘍増殖を阻害し得る。殆どどのような細胞外/細胞表面標的(癌細胞など)にも特異的なm o A bを作製することが可能である。要約すると、m o A bは、悪性腫瘍細胞を破壊し、特異的細胞受容体を遮断することにより腫瘍成長を防止することに使用することができる。治療的m o A bであるセツキシマブ及びパニツムマブはE G F Rに結合し、E G F Rにより駆動される細胞内シグナル伝達経路(すなわち、R A S - R A F - M E K - E R KカスケードおよびP I 3 K - A K T経路)の活性化を防止する。

10

【 0 0 0 6 】

m C R Cを患っている全ての患者が、m o A bを含む治療レジメンに応答するとは限らない。このような治療に対する、m C R Cを患っている患者の応答の欠如は一次性である可能性があり、即ち抗E G F R m o A b治療の開始以来、一次耐性として知られている。更に、抗E G F R m o A bに対して最初に応答する全てのm C R C患者は、二次耐性、即ち抗E G F R m o A bに対する獲得耐性を常に生じる。両方の場合、結果は治療の失敗に終わる。m C R C患者におけるこのような治療耐性の獲得の一因となるメカニズムはまだ知られていない。

20

【 0 0 0 7 】

K R A S (V - K i - r a s 2 K i r s t e nラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログとしても知られている)は、E G F R下流エフェクターであり、及び抗E G F R m o A bに対する一次抵抗のマーカーである。K R A Sはm C R C患者の治療の最適化に対して顕著に影響を与える。結腸直腸腫瘍の40パーセントはK R A S遺伝子における変異を保有しており、これらの患者は抗E G F R m o A bから利益を受けない。現在の臨床診療において、抗E G F R m o A b治療を考慮されている全てのm C R C患者はK R A S試験を受けるべきであり、K R A S変異が検出される場合、患者はセツキシマブ又はパニツムマブ治療から除外されるべきである。

【 0 0 0 8 】

抗 - E G F R M o A b sに対する一次耐性のマーカーとしてのK R A S変異の使用、更に最近ではN R A S (神経芽腫R a sウイルス癌遺伝子同族体)変異の使用は、m C R C患者の治療の最適化に対する重要なステップを意味するが、抗 - E G F R m o A bに対する獲得耐性の根底にある分子変化の理解は、現在においてこれらの薬物の臨床的利益を改善するための決定的な問題である。最近、患者における二次耐性(獲得耐性)のメカニズムが解明されてきている。最も一般的な事象は、M i s a l e ら、「E m e r g e n c e o f K R A S m u t a t i o n s a n d a c q u i r e d r e s i s t a n c e t o a n t i - E G F R t h e r a p y i n c o l o r e c t a l c a n c e r」Nature - 2012、Vol. No. 486、pp. : 532 - 536から推定されるように、症例の約50%におけるK R A S変異又は遺伝子増幅の出現である。

30

40

【 0 0 0 9 】

二次耐性の他のメカニズムとしては、M o n t a g u t ら、「I d e n t i f i c a t i o n o f a m u t a t i o n i n t h e e x t r a c e l l u l a r d o m a i n o f t h e E p i d e r m a l G r o w t h F a c t o r R e c e p t o r c o n f e r r i n g c e t u x i m a b r e s i s t a n c e i n c o l o r e c t a l c a n c e r」、Nature Medicine - 2012、Vol. No. 18、pp. : 221 - 223に示されているように、セツキシマブのE G F Rへの結合を阻止するE G F Rの細胞外ドメインにおける変異の獲得がある。変異は、E G F R遺伝子の細胞外部分の多型であり、コード化タンパク質のドメインIIIIでアミノ酸置換S 492Rをもたらす。

50

【0010】

モノクローナル抗体のEGFRエピトープとの相互作用を研究する目的で、いくつかの報告は重要なエピトープのマッピングに向けられている。これらの報告は、EGFRのドメインIIIにおける部位特異的突然変異誘発によって得られた変異のデータを提供する。これらの報告の一例は、Voigtら、「Functional Dissection of the Epidermal Growth Factor Receptor Epitopes Targeted by Panitumumab and Cetuximab」、Neoplasia - 2012、Vol. No. 14 (11)、pp. : 1023 - 1031である。この文献は、部位突然変異誘発アッセイのプロトコル及び手段に従って、野生型アミノ酸がアラニンによって殆ど変異された突然変異を開示している。Voigtは、アラニンスキャニングアプローチによるセツキシマブ又はパニツムマブ結合にとって決定的に重要であると定義された残基は、機能的な影響なしにインビボで他のアミノ酸に変異している可能性があるため、部位突然変異誘発からのインビボデータはインビボで有意ではない可能性がある結論付けている。したがって、部位突然変異誘発によって同定された定義されたエピトープの重要な位置は、インビボで有意な突然変異（特定のアミノ酸の交換）を示唆していない。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Semin Oncol - 2006、Vol. 33、pp. : 369 - 38

20

【非特許文献2】N Engl J Med - 2004、Vol. 350、pp. : 2129 - 2139

【非特許文献3】Nature 2012、Vol. No. 486、pp. : 532 - 536

【非特許文献4】Nature Medicine 2012、Vol. No. 18、pp. : 221 - 223

【非特許文献5】Neoplasia 2012、Vol. No. 14 (11)、pp. : 1023 - 1031

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

抗EGFR薬、即ちセツキシマブ及びパニツムマブで治療される結腸直腸癌患者では、薬物耐性が大きな問題となる。耐性の分子メカニズムの解明は大きな目標であるが、これは応答性を予測するマーカーとしての有意な変異又は他の遺伝子変異の検出を意味し、それと同時に、耐性（二次耐性）を獲得したことにより特定の医療レジメンを改変しなければならないかどうかを決定することを意味する。要約すると、最新技術は、mCRC患者の抗EGFR mAb療法に対する一次及び二次耐性を検出するための有用な手段を提供するが、異なる変異を有する患者をカバーするために、又は耐性分子メカニズムの異なる発展をカバーするために、追加又は他の耐性を予測するバイオマーカーを同定することが必要である。

40

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、癌治療に使用されるある種のmAbによる治療に対する耐性と関連する、ヒトEGFRの細胞外ドメイン（ドメインIII）中の新規な変異を同定した。変異は、EGFRタンパク質の451位におけるアルギニンのシステインへのアミノ酸置換；EGFRタンパク質の464位におけるセリンのロイシンへのアミノ酸置換；EGFRタンパク質の465位におけるグリシンのアルギニンへのアミノ酸置換；EGFRタンパク質の467位におけるリシンのスレオニンへのアミノ酸置換をもたらす。

【0014】

50

野生型のヒトEGFRタンパク質は配列番号2のアミノ酸配列を有し；本明細書において、変異はR451C、S464L、G465R、及びK467Tとして知られる。変異は、抗EGFRモノクローナルで治療した後、mCRCを有する患者において、単独で、又は他のものと組み合わせて検出することができる。

【0015】

これらの変異の全ては、セツキシマブ結合エピトープの特定のアミノ酸配列断片に位置する。即ち、これらの変異は、配列番号2の450位のアミノ酸から470位のアミノ酸の断片中に位置し、この配列番号2はヒトEGFRの野生型のアミノ酸コンセンサス配列に相当する。セツキシマブ結合エピトープのアミノ酸配列断片を、本明細書において配列番号12(LRSLKEISDGDV IISGNKNLC))ともいう。興味深いことに、本発明者らは、この断片が、多くの抗EGFR mAb治療による実際の障害（即ち、有効性をもたらさない）につながる特定の多くのアミノ酸置換（突然変異）を含むことを発見した。上記のように、抗EGFR mAb結合部位をマッピングする際に変異誘発によって多くのアミノ酸位置が重要な位置として決定されているが、マッピングアッセイは治療に対する耐性を決定するために決定的ではないことも知られている。

10

【0016】

従って、本発明者らは、治療の実際の効果を有する、多くの変異点を含むか要約するEGFRの細胞外ドメインIIIの断片を初めて提供する。この断片（配列番号12）中の配列を分析又は決定することにより、抗EGFR mAbを含む治療に対する耐性の可能性のある患者の多くを検出する利点をもたらされる。広く使用されている抗EGFR mAb、セツキシマブに対して耐性をもたらす配列番号12(LRSLKEISDGDV IISGNKNLC)内のアミノ酸の例は、太字で記載されている。

20

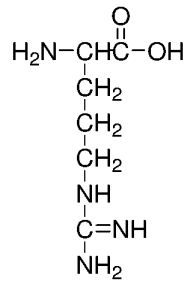
【0017】

これらの変異は全て、最終的に配列番号2のEGFRタンパク質をコードするヒトEGFR遺伝子のmRNAバリエーション1のエクソン12内に位置する。更に、それらの全ては、野生型アミノ酸の嵩高いアミノ酸（即ち、場合によって末端アミノ基を有する、分岐又は非分岐C1 - C4炭化水素からなる側鎖を有するもの）、及び/又は極性若しくは荷電アミノ酸への変換に関する。具体的には、変異の大部分が、末端アミノ（-NH₂）を含む側鎖を有する極性及び/又は荷電アミノ酸の変換に関する。より詳細には、突然変異の2つは、末端アミノ（-NH₂）を含む側鎖を有するアミノ酸の変換に関する。更に、変異R451C及びK467Tは、末端アミノ（-NH₂）を含む側鎖を有するアミノ酸の、酸素族からの原子を有する基を含む炭水化物側鎖、即ち-OH及び-SHを含む極性アミノ酸への置換を含み、それらは下記に示すような類似の鎖サイズを有する。

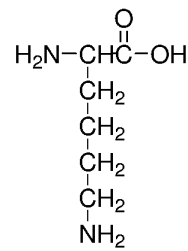
30

【0018】

【化 1】

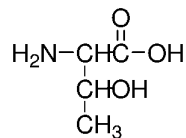


Arg, R

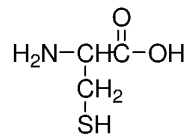


Lys, K

10



Thr, T



Cys, C

【0019】

20

従って、本発明者らは、末端アミノ（-NH₂）を含む塩基性アミノ酸が変化するヒトEGFRのドメインIII内での変異と、癌治療に使用されるある種のmAbによる治療に対する耐性を示すこととの関連を初めて示した。より詳細には、この関連は、これらの塩基性アミノ酸が、システイン及びスレオニンから選択される特定の極性アミノ酸に変化する場合に見られる。

【0020】

更に、極性又は中性のアミノ酸が、荷電又は中性の嵩高いアミノ酸で置換されている上記の配列番号12のアミノ酸の変化は、癌治療で使用されるある種のmAbによる治療に対する耐性を示すこととも関連する。これは、例えば、変異S464L及び変異G465Rの場合である。

30

【0021】

特定の変異R451C及びK467Tが、配列番号1で定義されるペプチド配列を含む変異タンパク質において検出される。

【0022】

更に、上記変異並びに変異S464L及びG465Rは、配列番号13で定義されるペプチド配列を含む変異タンパク質中に検出される。

【0023】

次いで、これらのマーカーを用いて、抗-EGFR療法に対する獲得耐性メカニズムの進化を追跡することができる。獲得耐性の検出は、疾患の進行の追跡調査に沿って別の治療アプローチ又は医療レジメンを提案するための有用なツールとなり得る。

40

【0024】

従って、第1の態様では、本発明は、17～100アミノ酸長を有し、配列番号13の配列を含むペプチド配列に関する。



式中、X¹はR及びCから選択され；

X⁴はS及びLから選択され；

X⁵はG及びRから選択され；

X²はK及びTから選択され；並びに

X¹、X⁴、X⁵、及びX²の少なくとも1つは、それぞれC、L、R、又はTである。

。

50

【 0 0 2 5 】

配列番号 1 3 は上記変異のいずれかであるが、R 4 5 1 C、S 4 6 4 L、G 4 6 5 R、又は K 4 6 7 T の少なくとも 1 つを包含する。

【 0 0 2 6 】

特定の実施形態では、本発明は、1 7 ~ 1 0 0 アミノ酸長を有し、配列番号 1 の配列を含むペプチド配列に関する。

X^1 S L K E I S D G D V I I S G N X^2

式中、

X^1 は R 及び C から選択され；

X^2 は K 及び T から選択され；

X^1 が C である場合、 X^2 は、K 及び T から独立して選択され、 X^1 が R である場合、 X^2 は T である。

【 0 0 2 7 】

配列番号 1 は、上記変異のいずれかであるが、R 4 5 1 C 又は K 4 6 7 T の少なくとも 1 つを包含する。言い換えると、 X^1 及び X^2 は示された意味を有するが、但し、 X^1 又は X^2 の少なくとも 1 つは、それぞれ変異型 C 若しくは T であるか；あるいは、 X^1 及び X^2 のいずれも変異型 C 及び T である。

【 0 0 2 8 】

この配列番号 1 は、配列番号 2 のヒト E G F R タンパク質に由来する。従って、配列番号 1 は、示された突然変異の少なくとも 1 つを含む、ヒトタンパク質配列の断片である。それ故、1 0 0 までのアミノ酸の休止は、配列番号 2 のタンパク質配列に位置するものであり、前記配列番号 1 に隣接するか、または配列番号 1 の C 末端に連結された配列であり、アミノ酸 X^2 によって定義される。

【 0 0 2 9 】

有利には、これらの突然変異 (R 4 5 1 C、S 4 6 4 L、G 4 6 5 R、又は K 4 6 7 T) は、抗 - E G F R m o A b 療法に対する耐性又は一次耐性を獲得していると疑われる対象の試料において試験することができる代替物を意味する。従って、対象の試料中に存在していても存在しなくてもよい他の変異に加え、配列番号 1 (R 4 5 1 C 又は K 4 6 7 T) 又は配列番号 1 3 (R 4 5 1 C、S 4 6 4 L、G 4 6 5 R、又は K 4 6 7 T) で提案された変異は、他の手段では検出できない可能性のある耐性対象を検出するのに役立つ。特に、変異 R 4 5 1 C 及び K 4 6 7 T は、ある種の抗 - E G F R m o A b 療法が依然として許容的 (又は効率的) であることを示すさらなる利点を暗示する。特に、変異 R 4 5 1 C 及び K 4 6 7 T はパニツムマブに対して許容的である。このことは、これらの 2 つの変異の少なくとも 1 つが検出された場合、少なくともパニツムマブ治療が推奨されることを意味する。

【 0 0 3 0 】

第 2 の態様では、本発明は、配列番号 1 又は配列番号 1 3 をコードする配列を含むオリゴヌクレオチドに関する。

【 0 0 3 1 】

配列番号 1 又は配列番号 1 3 を含む単離されたペプチドは、癌治療の分野で非常に関心のある E G F R タンパク質の変異型の検出をもたらす重要な生成物である。これらのタンパク質の変異型はまた、配列番号 1 又は配列番号 1 3 をコードする配列を含むオリゴヌクレオチドの形態で検出可能である。

【 0 0 3 2 】

配列番号 1 又は配列番号 1 3 をコードするオリゴヌクレオチドは、これらの変異部位におけるコドン縮重 (遺伝暗号の重複) を考慮し、前記アミノ酸変化の少なくとも 1 つをもたらすヌクレオチド変化を含むものである。その結果、これらのオリゴヌクレオチドは、アミノ酸変化をもたらす特定の変異を検出するためのハイブリダイゼーションプローブと

10

20

30

40

50

して使用することができる。

【0033】

更に、これら全てのオリゴヌクレオチドは、配列番号1又は配列番号13を含むペプチド配列中のアミノ酸変化をもたらすヌクレオチド突然変異の存在又は非存在を検出することを可能にする適切なプローブである。

【0034】

特に、本発明は、EGFRタンパク質の451位におけるアルギニンのシステインへの；EGFRの464位におけるセリンのロイシンへの；465位におけるグリシンのアルギニンへの；およびEGFRタンパク質の467位におけるリシンのスレオニンへのアミノ酸置換の意外な同定をベースとしている。

【0035】

アミノ酸変化K467Tは、EGFR遺伝子のmRNAバリエーション1のヌクレオチド1400におけるA Cの変化の結果である（本明細書においてA1400Cとしても知られる）（コドンAAAがACAに変化する）。アミノ酸変化R451Cは、EGFR遺伝子のmRNAバリエーション1のヌクレオチド1351におけるC Tのヌクレオチド変化の結果である（本明細書においてC1351T）としても知られる（コドンCGCがTGCに変化する）。アミノ酸変化S464Lは、EGFR遺伝子のmRNAバリエーション1のヌクレオチド1391におけるC Tのヌクレオチド変化の結果である（本明細書においてC1391T）としても知られる（コドンTCAがTTAに変化する）。アミノ酸変化G465Rは、EGFR遺伝子のmRNAバリエーション1のヌクレオチド1393におけるG Aのヌクレオチド変化の結果である（本明細書においてG1393A）としても知られる（コドンGGAがAGAに変化する）。

【0036】

これら全てのアミノ酸変異は、それらをコードするコドンにおける他の変異の結果である可能性がある。特に、これら全てのヌクレオチド変化は、配列番号2（ヒトEGFRタンパク質）の451位におけるシステイン、配列番号2の464位におけるロイシン、配列番号2の465位におけるアルギニン、及び配列番号2の467位におけるスレオニンへの変異をもたらす。

【0037】

既に上記に示したように、上記のヌクレオチド変化の各々は、EGFR遺伝子のmRNA、転写バリエーション1配列（ERBB1、PIG61、プロトオンコジーンc-ErbB-1、トリ赤芽球性白血病ウイルス（v-erb-b）オンコジーンホモログ受容体チロシン-タンパク質キナーゼerbB-1、又はHER1としても示される）を意味する。EGFR遺伝子のmRNA、転写バリエーション1の配列は、配列番号3（又はGenbank受託番号NM_005228.3、2014年5月18日に利用可能となった配列およびデータベースリリースのバージョン3）及びその任意のバリエーションに対応するものであり、前記バリエーションはEGFRタンパク質をコードする。EGFRタンパク質は、そのEGFRタンパク質の基本構造を維持する配列番号2（2014年5月18日の配列及びデータベースリリースのGenbank受託番号NP_005219.2バージョン）又はその任意のバリエーションに対応する。配列番号2及び3はヒト（ホモサピエンス）由来である。それにもかかわらず、EGFRは大部分の哺乳動物において高度に保存されており、この変異点は大部分の哺乳動物において野生型配列中に同じアミノ酸を含む。従って、本発明は、同じ変異を含むが、任意の哺乳動物のEGFRタンパク質又は遺伝子の配列中に決定される。

【0038】

本発明の他の態様は、配列番号6（CAAGTTTTTCAGGGATACATTGT TTTT）及び配列番号7（TTAAATGGGAATAGCCCTTCAATATT）からなるプライマーのセットである。

【0039】

このプライマーのセットは、本発明の変異を生じるヌクレオチド変化が位置するEGF

10

20

30

40

50

Rコード領域の部分を含むゲノム領域を増幅させることを可能にする。従って、それらは本発明者らにより同定される新規アミノ酸変異に関し、意外にも、抗-E G F R m o A bによる治療に対する耐性（獲得又は一次性）をもたらす多くの変異を含む重要な領域として見出された、配列番号12（L R S L K E I S D G D V I I S G N K N L C）と命名された断片をコードするE G F Rコード領域を増幅を可能にする。特に、配列番号6及び7からなるプライマーのセットは、m R N A転写物のバリエーション1におけるエクソン12に至るE G F Rコード領域を増幅を可能にする。このセットは、特に、変異R 4 5 1 C及びK 4 6 7 Tが最終的に得られるE G F Rタンパク質中に存在する場合に、変異R 4 5 1 C、S 4 6 4 L、G 4 6 5 R、及びK 4 6 7 Tが最終的に得られるE G F Rタンパク質中に存在するかどうかを決定することを可能にする。

10

【0040】

本発明の他の態様は、配列番号6及び7のプライマーのセット、並びに/又は本発明の第2の態様で定義されたオリゴヌクレオチドからなるプライマーのセットを含むキットである。

【0041】

このキットは、セツキシマブ治療に対する耐性と関連する、開示された変異を含む可能性のあるE G F R遺伝子の領域を増幅するプライマーを含むので、このキットは、配列番号13の変異（R 4 5 1 C、S 4 6 4 L、G 4 6 5 R、及びK 4 6 7 T）、より具体的には、配列番号1、又はそれを含む任意のアミノ酸配列の変異R 4 5 1 C及びK 4 6 7 T、の存在を容易かつ迅速に検出するための有用なツールである。

20

【0042】

また、本発明の他の態様は、抗-E G F R モノクローナル抗体を含む治療レジメンに対する対象の応答性の予測に使用するための上記に定義したキットである。あるいは、抗-E G F R モノクローナル抗体を含む治療レジメンに対する対象の応答性を予測するための上記に定義したキットの使用である。

【0043】

更に、本発明はまた、インビトロで、セツキシマブ及び/又はパニツムマブを含む対象治療レジメンの応答性を予測する方法であって、(i) 遺伝子型法、及び/又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、対象から得た試料において、配列番号2のヒトE G F Rのコンセンサス野生型アミノ酸配列のアミノ酸450からアミノ酸470の断片である、配列番号12で定義される断片中に変異が存在するか存在しないかを決定し、(ii) 工程(i)において同定された任意の変異の存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の耐性と関連付けるか、又は工程(i)における変異の非存在を、パニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性と関連付けることを含む、方法に関する。

30

【0044】

従って、配列番号12は、ヒトE G F Rの野生型アミノ酸断片（又は配列）に相当し、コンセンサス野生型アミノ酸配列に関する変異は、抗E G F R m o A b治療の予測に関するE G F Rの重要な断片として発見された、この配列番号12内で決定される。この配列番号12はまた、単離されたペプチドとして本発明の一部（L R S L K E I S D G D V I I S G N K N L C）を形成する。

40

【0045】

本発明はまた、インビトロで、セツキシマブ及び/又はパニツムマブを含む対象治療レジメンの応答性を予測する方法であって、(i) 遺伝子型法、及び/又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、対象から得た試料中における、以下のアミノ酸の少なくとも1つ、即ち配列番号2のアミノ酸配列の451位におけるスチン；配列番号2のアミノ酸配列の464位におけるロイシン；配列番号2のアミノ酸配列の465位におけるアルギニン；配列番号2のアミノ酸配列の467位におけるスレオニンの存在又は非存在を決定し；(ii) 工程(i)において同定された任意のアミノ酸の存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の耐性と関連付けるか、あ

50

るいは工程 i) におけるこれらのアミノ酸の全ての非存在を、パニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性と関連付けることを含む、方法に関する。

【 0 0 4 6 】

更に、特定の実施形態では、本発明はまた、インビトロで、セツキシマブ及び／又はパニツムマブを含む対象治療レジメンの応答性を予測する方法であって、(i) 遺伝子型法、及び／又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、対象から得た試料中における、以下のアミノ酸の少なくとも1つ、即ち配列番号2のアミノ酸配列の451位におけるシステイン；及び配列番号2のアミノ酸配列の467位におけるスレオニンの存在又は非存在を決定し；(i i) 工程(i) において同定された任意のアミノ酸の存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の耐性と関連付けるか、あるいは工程 i) におけるこれらのアミノ酸の全ての非存在を、パニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性と関連付けることを含む、方法に関する。

10

【 0 0 4 7 】

このインビトロ方法は、最終的に配列番号2のEGFRタンパク質をコードするヒトEGFR遺伝子のmRNAバリエーション1のエクソン12中に、末端アミノ(- NH₂) を含む側鎖を有するアミノ酸の、酸素族からの原子を有する基を含む炭水化物側鎖を含む極性アミノ酸への変化をもたらす野生型遺伝子中でのヌクレオチドの変化があるかどうかを検出することを包含する。

【 0 0 4 8 】

インビトロでセツキシマブ及び／又はパニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性を予測する方法の実施は、対象にとってより適切な治療に適応し、無駄な時間を招く不適当又は役に立たない治療的アプローチを回避するという利点を暗示し、特に対象が癌に罹患している場合には、対象及び治療の成功にとって不可欠な側面である。

20

【 0 0 4 9 】

更に、これらの突然変異のいずれかの検出は、セツキシマブ治療に対する二次的耐性が、最初にEGFR遺伝子に突然変異を有していない対象において発生しているか否かを決定することを可能にする。

【 0 0 5 0 】

従って、本発明の他の態様は、インビトロで、セツキシマブを含む治療レジメンに対する獲得耐性を判定するための方法であって、(i) 遺伝子型法、及び／又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、対象から得た試料中における、以下のアミノ酸の少なくとも1つ、即ち配列番号2のアミノ酸配列の451位におけるシステイン、配列番号2のアミノ酸配列の464位におけるロイシン、配列番号2のアミノ酸配列の465位におけるアルギニン、及び配列番号2のアミノ酸配列の467位におけるスレオニンの存在又は非存在を決定し；(i i) 工程(i) において同定された任意のアミノ酸の存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の獲得耐性と関連付けるか、あるいは工程(i) におけるこれらのアミノ酸の全ての非存在を、パニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性耐性と関連付けることを含む、方法に関する。

30

【 0 0 5 1 】

セツキシマブによる治療後に対象における獲得耐性を決定するこのインビトロの方法により、有利には治療が停止し、更に二次的又は付随するセツキシマブ副作用を回避することが可能になる。更に、できるだけ早く他のアプローチをとることができる。

40

【 0 0 5 2 】

上述したように、獲得耐性を判定するためのこのインビトロの方法は、最終的に配列番号2のEGFRタンパク質をコードするヒトEGFR遺伝子のmRNAバリエーション1のエクソン12中に、末端アミノ(- NH₂) を含む側鎖を有するアミノ酸の、酸素族からの原子を有する基を含む炭水化物側鎖を含む極性アミノ酸への変化をもたらす野生型遺伝子中でのヌクレオチドの変化があるかどうかを検出することを包含する。このインビトロの方法は、最終的に配列番号12のEGFRタンパク質断片をコードするヒトEGFR遺伝子のmRNAバリエーション1の少なくともエクソン12中に、野生型アミノ酸の嵩高いア

50

ミノ酸（即ち、分岐又は非分岐 C 1 - C 4 炭化水素からなる側鎖を有し、末端アミノ基を有していてもよいもの）及び／又は極性若しくは荷電アミノ酸への変化をもたらすヌクレオチド変化があるかどうかを検出することを包含する。野生型アミノ酸は、ヒト E G F R タンパク質のコンセンサスアミノ酸配列（配列番号 2）によるアミノ酸を意味する。

【 0 0 5 3 】

本発明の他の態様は、インビトロで、対象から得た試料中の配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 5 1 位におけるシステインの存在又は非存在；及び／又は配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 6 4 位におけるロイシンの存在又は非存在；及び／又は配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 6 5 位におけるアルギニンの存在又は非存在；及び／又は配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 6 7 位におけるスレオニンの存在又は非存在を同定する方法であって、少なくとも 4 5 0 位から 4 7 0 位において配列番号 2 の配列を決定することを含む、方法である。

10

【 0 0 5 4 】

この後の態様は、インビトロで、対象から得た試料において、配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 5 1 位におけるシステインの存在又は非存在；及び／又は配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 6 4 位におけるロイシンの存在又は非存在；及び／又は配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 6 5 位におけるアルギニンの存在又は非存在；及び／又は配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 6 7 位におけるスレオニンの存在又は非存在を同定する方法であって、遺伝子型法、及び／又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段により、4 5 1 及び／又は 4 6 4 及び／又は 4 6 5 及び／又は 4 6 7 位のアミノ酸を決定することを含む方法として明確に説明することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 5 】

【図 1】従来のサンガー配列決定（プロット A）、及び 4 5 4 G S J u n i o r p l a t f o r m (R o c h e A p p l i e d S c i e n c e , M a n n h e i m , G e r m a n y) における、次世代配列決定（NGS）によって得られた配列決定の結果の 2 つの表示のプロット（plot B）である。図 1 は、2 つの試料においてセツキシマブで治療した後の E G F R 外部ドメインにおける突然変異の獲得を示す。（A）患者 # 3 1 では、治療後の腫瘍試料において、治療前生検では存在しなかった E G F R 遺伝子のヌクレオチド 1 4 0 0 で A C 置換が得られ、アミノ酸 4 6 7 でリシンのスレオニンへの置換が起こった（K 4 6 7 T）。（B）患者 # 3 5 では、治療後の腫瘍試料において、E G F R 遺伝子のヌクレオチド 1 3 5 1 で C T 置換が検出され、アミノ酸 4 5 1 でアルギニンのシステインへの置換が起こった（R 4 5 1 C）。

30

【図 2】一次抗体としてセツキシマブ（図 2 A）又はパニツムマブ（図 2 B）と共にインキュベートし、ヒト I g G に対するフィコエリトリンと結合した二次抗体を使用した、トリプシン処理された N I H 3 T 3 過剰発現野生型 E G F R (w t E G F R) 及び K 4 6 7 T E G F R 変異体のフローサイトメトリー結合分析である。C は計数を意味し、F L 2 H は、フィコエリトリン（P E）蛍光を検出するために使用される 5 8 5 ± 2 1 の帯域通過を有する蛍光検出の第 2 のチャンネルにおける最大シグナル強度を示し、E は陰性対照を意味する。

【図 3】一次抗体としてセツキシマブ（図 3 A）又はパニツムマブ（図 3 B）と共にインキュベートし、ヒト I g G に対するフィコエリトリンと結合した二次抗体を使用した、トリプシン処理された N I H 3 T 3 過剰発現野生型 E G F R (w t E G F R) 及び S 4 6 4 L E G F R 変異体のフローサイトメトリー結合分析である。C は計数を意味し、F L 2 H は、フィコエリトリン（P E）蛍光を検出するために使用される 5 8 5 ± 2 1 の帯域通過を有する蛍光検出の第 2 のチャンネルにおける最大シグナル強度を示し、E は陰性対照を意味する。

40

【図 4】一次抗体としてセツキシマブ（図 4 A）又はパニツムマブ（図 4 B）と共にインキュベートし、ヒト I g G に対するフィコエリトリンと結合した二次抗体を使用した、トリプシン処理された N I H 3 T 3 過剰発現野生型 E G F R (w t E G F R) 及び G 4 6 5 R E G F R 変異体のフローサイトメトリー結合分析を示す。C は計数を意味し、F L 2

50

Hは、フィコエリトリン（PE）蛍光を検出するために使用される 585 ± 21 の帯域通過を有する蛍光検出の第2のチャンネルにおける最大シグナル強度を示し、Eは陰性対照を意味する。

【発明を実施するための形態】

【0056】

概して、説明、実施例、及び特許請求の範囲に使用される場合、以下の単語又は語句は示した定義を有する。

【0057】

最新技術において、また本明細書に使用される「治療レジメン」という用語は、前癌病変、癌、又は癌転移の成長を防止、遅延、停止、又は反転することを目的とする任意の治療を意味する。それには、化学療法、放射線療法、免疫療法、モノクローナル抗体療法、又は他の方法が含まれる。

【0058】

「応答」とは、腫瘍サイズ又は疾患若しくは疾患進行のエビデンスの測定可能な減少、安定した疾患、無増悪生存の増加若しくは延長、又は毒性の減少から選択される、臨床又は非臨床のいずれかの任意の種類の改善と理解されるが、これらに限定されない。

【0059】

「無増悪生存」とは、癌が成長しない、治療の間及び後の時間の長さを示す。無増悪生存には、患者が完全な応答又は部分的な応答性を経験している時間の量及び患者が安定した疾患を経験している時間の量が含まれる。

【0060】

治療に対する「完全な応答」は、腫瘍及び疾患の全てのエビデンスが消失している、査定できるが、測定できない疾患を有している患者として定義される。

【0061】

治療に対する「部分的な応答」は、完全な応答より少ない応答性をしている患者として定義される。

【0062】

「抗-EGFRモノクローナル抗体（抗-EGFR mAb）」とは、EGFR配列タンパク質中のエピトープを認識することのできるモノクローナル抗体及びその断片を意味する。EGFRの異なるエピトープを認識する承認されたmAbは、セツキシマブ及びパニツムマブであるが、他のmAbは、本発明に開示される顔面の癌の治療レジメンにおいて使用することができる。適切な抗体断片としては、特にF(ab)、F(ab')、Fv、及びナノボディが挙げられる。

【0063】

「遺伝子型法」という表現は、遺伝子型を決定するのに適切なこれらの全ての方法及び方法を含み、あるいはそれは、所与の位置におけるヌクレオチドを同定することと同じである。前記方法の例は、サンガー配列決定、パイロシークエンシング、対立遺伝子特異的PCR、変性高圧液体クロマトグラフィー（DHPLC）、対立遺伝子特異的プライマー伸長（ASPE）、DNAバイオチップ/マイクロアレイ、及び動的対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション（DASH）を包含する。

【0064】

「タンパク質シークエンシング法」に関しては、タンパク質のアミノ酸配列、並びにタンパク質がとる構造及びタンパク質が任意の非ペプチド分子と複合する程度を決定することを可能にする任意の技術と理解される。アミノ酸組成の決定は、アミノ酸の加水分解又は分離により実施することができる。公知の技術としては、サンガー配列決定、エドマン分解、及び質量分光測定が挙げられる。

【0065】

反対に示されないなら、EGFR遺伝子、mRNAバリエーション及びEGFRタンパク質に関連する全ての配列は、明細書に記載されたデータベース受託番号を有するヒト配列に関する。また、反対に示されないなら、オリゴヌクレオチド配列は5' - 3'方向に示さ

10

20

30

40

50

れ、ペプチド配列は、ペプチド配列を書き込むための規約に従い、ペプチドのN末端アミノ酸（アミノ末端、NH₂末端、N末端、又はアミン末端としても知られている）から出発して示される。

【0066】

全てのアミノ酸配列及びオリゴヌクレオチドは、適切なペプチド又はオリゴヌクレオチド化学合成に従って合成することができる。ペプチド合成の例としては、固相合成及び液相合成が挙げられ、両者とも一方のアミノ酸のカルボキシル基又はC末端をもう一方のアミノ基又はN末端にカップリングさせる。9-フルオレニルメチルオキシカルボニル（Fmoc）及びtert-ブチルオキシカルボニル（t-Boc）等の保護基を用いる固相合成では、意図しない反応が回避される。また、ペプチドは、DNA組換え技術によって得ることができる。オリゴヌクレオチドは、ホスホラミダイト法及び保護された2'-デオキシヌクレオシド（dA、dC、dGおよびT）、リボヌクレオシド（A、C、GおよびU）、又は化学的に修飾されたヌクレオシドから誘導されたホスホラミダイトビルディングブロックを用いる固相合成によって得ることができる。また、オリゴヌクレオチドは適切な制限酵素によるDNA消化に由来し得る。

【0067】

上記で既に説明したように、先行技術の教示は、EGFRのドメインIIIでの突然変異が、moAbs（セツキシマブ及びノ又はパニツムマブ）の相互作用の臨界点を位置づけるのに役立つことを示している。それにもかかわらず、これらのデータは特定のエピトープを検出するのに役立つ可能性はあるが、特定のアミノ酸交換のみがこの情報（耐性の情報、一次または二次耐性のいずれか）を包含するので、治療に対する耐性の点で結論付けてはいない。特に、治療に対する獲得耐性は、治療的アプローチを改善し、時間及び努力を浪費することを避けるために非常に重要である。

【0068】

本発明は、EGFR遺伝子のコード領域における新規変異に基づいている。本発明の新規変異は、mCRCを有する患者のmoAbに基づく治療に対する応答性を予測するのに有用である。特に、それらは、一次耐性及び二次耐性の出現を予測するのに有用である。

【0069】

既に上述したように、開示されたヌクレオチドの変化の各々は、配列番号2（ヒトEGFRタンパク質）の451位でのシステインへの、配列番号2の464位でのロイシンへの、配列番号2の465位でのアルギニンへの、及び配列番号2の467位でのスレオニンへの置換をもたらす。これらの全ての特定の突然変異は、この配列番号2のアミノ酸450からアミノ酸470の断片に位置し、ここで前記断片は配列番号12と命名されている。

【0070】

17～100アミノ酸長を有し、配列番号1の配列を含む本発明のペプチドは、変異R451C又はK467Tのいずれかを含む。

【0071】

特定の実施形態では、このペプチドは、X¹がRであり、X²がTである配列番号1を含む配列；X¹がCであり、X²がTである配列番号1を含む配列；及びX¹がCであり、X²がKである配列番号1を含む配列からなる群から選択される。

【0072】

更に特定の実施形態では、ペプチドは配列番号1、より詳細には、X¹がRであり、X²がTである配列番号1；X¹がCであり、X²がTである配列番号1；及びX¹がCであり、X²がKである配列番号1からなる群から選択される配列番号1に含まれる。これらの配列は、配列番号8（RSLKEISDGDV IISGNT）、配列番号9（CSLKEISDGDV IISGNT）、及び配列番号10（CSLKEISDGDV IISGNK）で表わされる。

【0073】

特定の実施形態では、17～100アミノ酸長を有し、配列番号1の配列を含むペプチ

10

20

30

40

50

ドは、配列番号 4 を更に含む。

N L C Y A N T I N W K K L F G T S G G K T K I I X ³

(式中、X ³ は S 及び R から選択される。)

【0074】

特定の実施形態では、配列番号 1 及び配列番号 4 の両方を含むペプチドは、配列番号 1 から開始する連続的なアミノ酸配列に相当する。この配列は 42 アミノ酸を有し、E G F R 遺伝子のエクソン 12 によって部分的にコードされる E G F R タンパク質の断片に相当する。これは、配列番号 5 (X ¹ S L K E I S D G D V I I S G N X ² N L C Y A N T I N W K K L F G T S G G K T K I I X ³) で表わされるか、それからなる。

【0075】

他の特定の実施形態では、17 ~ 100 アミノ酸長を有し、この配列番号 13 の配列を含むペプチドは、配列番号 4 を更に含む。特定の実施形態では、配列番号 13 及び配列番号 4 の両方を含むペプチドは、配列番号 13 から開始する連続的なアミノ酸配列に相当する。それは、42 アミノ酸を有し、E G F R 遺伝子のエクソン 12 によって部分的にコードされる E G F R タンパク質の断片に相当する。これは、配列番号 14 (X ¹ S L K E I S D G D V I I X ⁴ X ⁵ N X ² N L C Y A N T I N W K K L F G T S G G K T K I I X ³) で表わされるか、それからなる。

【0076】

実際、この配列番号 5 は、変異 R 451 C 及び K 467 T のいずれか又は全てを含み、更に変異 S 492 R を含む選択肢を包含する。従って、X ¹、X ²、及び X ³ は前記と同じ意味を有し、X ¹ が C である場合、X ² は、K および T から独立して選択され、X ¹ が R である場合、X ² は T である。

【0077】

変異 S 492 R は、転移性結腸直腸癌を含む癌における m o A b に対する耐性もまた決定するための重要な突然変異として、M o n t a g u t ら (上記) の発明者らによって最初に開示された。

【0078】

更に、配列番号 14 は、変異 R 451 C、S 464 L、G 465 R、及び K 467 T のいずれか又は全てを含み、更に変異 S 492 R を含む選択肢を包含する。従って、X ¹、X ²、X ³、X ⁴、及び X ⁵ は前記と同じ意味を有するが、X ¹、X ²、X ⁴、又は X ⁵ の少なくとも 1 つは、それぞれ C、L、R、又は T である。

【0079】

他の特定の実施形態では、配列番号 1 又は配列番号 13 を含むペプチド配列は 17 ~ 50 アミノ酸長を有する。他の特定の実施形態では、それは 17 ~ 25 アミノ酸長 (即ち 17、18、19、20、21、22、23、24、又は 25) を有する。他の最も特定の実施形態では、ペプチド配列は 17 アミノ酸長を有する。他の特定の実施形態では、それは、21 アミノ酸長を有し、ロイシン (L) により N - 末端と隣接し、トリペプチド N - アスパラギン - ロイシン - シス테인 - C (N L C と省略) により C - 末端と隣接する配列番号 1 又は配列番号 13 のいずれかである。

【0080】

更に、以下の実施例に示すように、本発明者らはまた、転移性結腸直腸癌を含む癌における、m o A b に対する耐性をもたらす新規変異、即ち配列番号 2 (ヒト E G F R タンパク質) の 491 位のイソロイシンのメチオニンへの変化を検出した。この変異は、本明細書において I 491 M と命名する。アミノ酸変化 I 491 M は、E G F R 遺伝子の m R N A バリエント 1 のヌクレオチド 1473 における A G の変化の結果である (本明細書において A 1473 G としても知られる) (コドン A T A が A T G に変化する)。

【0081】

本発明で同定された新規変異は代替物であるが、適切な治療選択を確実にするために組み合わせ使用することもできる。

【0082】

10

20

30

40

50

本発明は、配列番号 1 又は配列番号 1 3 をコードするオリゴヌクレオチドを包含する。配列番号 1 又は配列番号 1 3 をコードするオリゴヌクレオチドの特定の実施形態では、場合により前記又は下記の任意の実施形態と組み合わせて、前記オリゴヌクレオチドは更に配列番号 4 をコードし、その結果、他の特定の実施形態では、オリゴヌクレオチドは配列番号 5 又は配列番号 1 4 をコードする。特定のオリゴヌクレオチドは、配列番号 8 ~ 1 0 のいずれかの配列をコードするヌクレオチド配列からなる。上述したようなオリゴヌクレオチドは、変異を検出するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用することができる。

【 0 0 8 3 】

本発明のキットは、上述したプライマーセットに加え、変異 R 4 5 1 C 及び K 4 6 7 T のいずれかをコードする E G F R 遺伝子の野生型又は変異形態を検出するためのオリゴヌクレオチドプローブを含む。E G F R 遺伝子の変異形態を検出するためのこれらのプローブは、配列番号 1、5、8、9、及び 1 0 のいずれかをコードするものから選択されるオリゴヌクレオチドに含まれる。

【 0 0 8 4 】

配列番号 1、5、8、9、及び 1 0 のいずれかをコードするものから選択されるオリゴヌクレオチドからなるプローブは、対応する変異点においてコドン縮重のいくつかの選択肢を含むヌクレオチド配列である。

【 0 0 8 5 】

変異 R 4 5 1 C の検出のための特定のプローブは、E G F R の変異領域に相補的なものであり、本発明の突然変異 R 4 5 1 C をもたらすヌクレオチド変化が配置され、遺伝子のコード領域又は相補領域のいずれかである。従って、これらのプローブは変異を有するヌクレオチド配列の断片とハイブリダイズし、上記の 1 3 5 1 位のヌクレオチド変化 C T を検出することを可能にする。

【 0 0 8 6 】

変異 K 4 6 7 T の検出のための特定のプローブは、E G F R の変異領域に相補的なものであり、本発明の突然変異 K 4 6 7 T をもたらすヌクレオチド変化が配置され、遺伝子のコード領域又は相補領域のいずれかである。したがって、これらのプローブは変異を有するヌクレオチド配列の断片とハイブリダイズし、上記の 1 4 0 0 位のヌクレオチド変化 A C を検出することを可能にする。

【 0 0 8 7 】

キット中の他の特定のオリゴヌクレオチドプローブは、変異 S 4 6 4 L 及び G 4 6 5 R のいずれかをコードする E G F R 遺伝子の野生型又は変異形態を検出するためのものである。

【 0 0 8 8 】

変異 S 4 6 4 L の検出のための特定のプローブは、E G F R の変異領域に相補的なものであり、本発明の突然変異 S 4 6 4 L をもたらすヌクレオチド変化が配置され、遺伝子のコード領域又は相補領域のいずれかである。したがって、これらのプローブは変異を有するヌクレオチド配列の断片とハイブリダイズし、上記の 1 3 9 1 位のヌクレオチド変化 C T を検出することを可能にする。

【 0 0 8 9 】

変異 G 4 6 5 R の検出のための他の特定のプローブは、E G F R の変異領域に相補的なものであり、本発明の突然変異 G 4 6 5 R をもたらすヌクレオチド変化が配置され、遺伝子のコード領域又は相補領域のいずれかである。したがって、これらのプローブは変異を有するヌクレオチド配列の断片とハイブリダイズし、上記の 1 3 9 3 位のヌクレオチド変化 G A を検出することを可能にする。

【 0 0 9 0 】

「変異を有するヌクレオチド配列」は、DNA ゲノム構造中のコード鎖又は相補的 DNA 鎖のいずれかであり、及び翻訳される mRNA 鎖であると理解されるべきである。

【 0 0 9 1 】

本発明のキットは、場合により上記又は下記の実施形態のいずれかと組み合わせて、K R A S 及び / 又は P I K 3 C A、及び / 又は B R A F 遺伝子、及び / 又は E G F R 遺伝子中の更なる変異を検出するための試薬を更に含み得る。これらの試薬は、これらの全ての遺伝子における特定の変異、特にセツキシマブ及び / 又はパニツムマブを含む治療レジメンに対する耐性と関連する変異を検出するための特異的プライマーを含む。キットに含まれる他の試薬は、これら全ての遺伝子の野生型又は変異形態のいずれかとハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドプローブに関する。

【 0 0 9 2 】

従って、特定の実施形態では、場合により上記又は下記の実施形態のいずれかと組み合わせて、Karapetisら、「K - r a s Mutations and Bene 10
fit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer」、The New England Journal of Medicine - 2008、Vol. 359、pp. : 1757 - 1765で定義されているように、前記キットは、G 1 2 A ; G 1 2 C ; G 1 2 D ; G 1 2 R ; G 1 2 S ; G 1 2 V ; G 1 3 A ; G 1 3 C , G 1 3 D ; G 1 3 V からなる群から選択されるK R A S 中の変異を検出するためのツール及び手段（試薬）を含む。これら全ての変異は、2011年7月24からGenBank受託番号NP__004976.2 (GTPase KRasアイソフォームb前駆体と命名された) 及び2011年7月24日からNP__203524.1 (GTPase KRasアイソフォームa前駆体と命名された) と同定されたK - r a s のタンパク質配列のコドン12及び13に位置する。他の好ましい実施形態では、キ 20
ットは、2011年7月17日からGenBank受託番号NP__006209.2を有するP I K 3 C A タンパク質を体系化するP I K 3 C A 遺伝子のエクソン9及び20の変異、並びに / 又は2011年7月24日からGenBank受託番号NP__004324.2と同定されたB R A F のタンパク質配列のコドン600に位置するV 6 0 0 E 変異を検出するための試薬を含む。他の好ましい実施形態では、キットは、配列番号2のE G F R タンパク質中の変異S 4 9 2 R を検出するための手段（試薬）を含む。他の好ましい実施形態では、キットは、配列番号2のE G F R タンパク質中の変異I 4 9 1 M を検出するための手段（試薬）を含む。

【 0 0 9 3 】

本発明のキットは、特に抗E G F R モノクローナル抗体、特にセツキシマブ及び / 又は 30
パニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性の予測に使用するためのものである。より具体的には、対象は癌に罹患しており、癌は転移性結腸直腸癌である。

【 0 0 9 4 】

本発明の一態様による本発明は、セツキシマブ及び / 又はパニツムマブを含む対象治療レジメンの応答性を予測するインビトロ方法であって、(i) 遺伝子型法、及び / 又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、対象から得た試料中の配列番号2のヒトE G F R のコンセンサス野生型アミノ酸配列のアミノ酸450からアミノ酸470の断片である、配列番号12で定義される断片中に変異が存在するか存在しないかを決定し、(i i) 工程(i) において同定された任意の変異の存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の耐性と関連付けるか、あるいは工程(i) 30
における変異の非存在を、パニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性耐性と関連付けることを含む、方法に関する。

【 0 0 9 5 】

インビトロでの方法の特定の実施形態においては、工程(i) において、配列番号12中に以下の変異；即ち配列番号2の451位におけるアルギニンのシステインへの変化；配列番号2の464位におけるセリンのロイシンへの変異；配列番号2の465位におけるグリシンのアルギニンへの変異、及び配列番号2の467位におけるリシンのスレオニンへの変異の少なくとも1つが存在するか存在しないかを決定する。

【 0 0 9 6 】

他の特定の実施形態では、セツキシマブ及び / 又はパニツムマブを含む対象治療レジメ 50

ンの応答性を予測するインビトロ方法であって、該方法は、(i) 遺伝子型法、及び/又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、対象から得た試料中における、以下のアミノ酸の少なくとも1つ、即ち配列番号2のアミノ酸配列の451位におけるシステイン；配列番号2のアミノ酸配列の467位におけるスレオニンの存在又は非存在を決定し；(ii) 工程(i)において同定された任意のアミノ酸の存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の耐性と関連付けるか、あるいは工程(i)におけるこれらのアミノ酸の全ての非存在を、パニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性と関連付けることを含む。

【0097】

この特定の実施形態は、対象の試料中に配列番号1が存在するかどうかを決定し、工程(ii)において、変異R451C及び/又はK467Tのいずれかの存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の耐性と関連付けるか、あるいは工程(i)におけるこれらのアミノ酸の全ての非存在を、パニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性と関連付けることを含む。

10

【0098】

前記方法の更に特定の実施形態では、場合により上記又は下記の任意の実施形態と組み合わせ、あるいは工程(i)の下で、追加的に配列番号4が対象の試料中に存在するかどうかを決定することを包含する。従って、変異R451C及び/又はS464L及び/又はG465R及び/又はK467Tが存在するかどうかを決定した後、方法は、変異S492RがEGFRタンパク質中に存在するかどうかをも決定することを含む。

20

【0099】

変異S492Rの検出は、場合により上記又は下記の実施形態のいずれかと組み合わせ、工程(i)が配列番号2のアミノ酸配列の492位におけるアルギニンの存在又は非存在を決定することを更に含み、工程(ii)において、工程(i)において同定されたアルギニンの更なる存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の耐性と関連付ける、インビトロでの方法の特定の実施形態に関する。

【0100】

他の特定の実施形態では、場合により上記又は下記の実施形態のいずれかと組み合わせ、セツキシマブ及び/又はパニツムマブを含む対象治療レジメンの応答を予測するインビトロ方法は、工程(i)において、配列番号2のアミノ酸配列の491位におけるメチオニンの存在又は非存在を決定し、工程(ii)において工程(i)で同定されたメチオニンの更なる存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の耐性と関連付けることを更に含む。

30

【0101】

他の特定の実施形態では、場合により上記又は下記の実施形態のいずれかと組み合わせ、工程(i)は、配列番号6及び7からなるプライマーのセットを用いて実施する。

【0102】

上記のプライマーによる増幅に加えて、特定の実施形態において、工程(i)は遺伝子型法によって実施される。他の最も特定の実施形態では、場合により上記又は下記の実施形態のいずれかと組み合わせ、前記遺伝子型法は、サンガー配列決定、ピロシーケンス、ドロップレットデジタルPCR(ddPCR)、対立遺伝子特異的PCR、変性高圧液体クロマトグラフィー(DHPLC)、対立遺伝子特異的プライマー伸長(ASPE)、DNAバイオチップ/マイクロアレイ、及び動的対立遺伝子特異的ハイブリダイゼーション(DASH)から選択される。更に最も特定の実施形態は、遺伝子型方法はピロシーケンスである。

40

【0103】

ピロシーケンス遺伝子型法の例としては、特に454個の高出力ピロシーケンス、合成による配列決定(イルミナ)、及びチェーンターミネーションシーケンス(サンガー配列決定)として知られる次世代配列決定(NGS)方法が挙げられる。

【0104】

50

また、工程 (i) は、増幅された領域の遺伝子型決定方法として野生型又は突然変異点を検出するための特異的プローブを含む。特定のプローブは、配列番号 1、配列番号 5、配列番号 8、配列番号 9、及び配列番号 10 をコードするオリゴヌクレオチドである。これらのオリゴヌクレオチドは全て、変異した E G F R 遺伝子のヌクレオチド配列に相補的である。

【 0 1 0 5 】

インビトロでセツキシマブ及び / 又はパニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性を予測する方法は、本発明の E G F R 遺伝子におけるヌクレオチド変化が検出され得る腫瘍を含む試料中で実施される。m C R C の場合、源から得た試料を直接使用してもよく、又は前処理後の試料を使用してもよい。試料は前記腫瘍に隣接する正常組織を更に含んでもよい。従って、m C R C の場合、試料は原発性結腸直腸癌生検又はその転移の生検から選択される。言い換えると、試料は、原発性腫瘍及び転移を含む、結腸直腸癌試料由来の生検であってもよい。好ましい実施形態において、転移は肝組織にある。

10

【 0 1 0 6 】

新規に同定された変異を有する患者は、任意の適切な臨床又は準臨床での無増悪生存の増加又は延長により測定されるように、セツキシマブを含まない治療レジメンに対する応答を示すようである。

【 0 1 0 7 】

好ましい実施形態では、治療レジメンは、セツキシマブ単独であるか、又はイリノテカン、オキサリプラチン及び / 若しくは 5 - フルオロウラシル (5 - F U 又は 5 F U) に基づいた化学療法レジメンとの併用である。好ましい実施形態では、治療レジメンはパニツムマブ単独であるか、又はイリノテカン、オキサリプラチン及び / 又は 5 - フルオロウラシルに基づいた化学療法レジメンとの併用である。

20

【 0 1 0 8 】

本発明はまた、癌、好ましくは m C R C を発症した対象のための治療レジメンを決定及び / 又は推奨する方法であって、(i) 遺伝子型法、及び / 又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、対象から得た試料中における、以下のアミノ酸の少なくとも 1 つ、即ち配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 5 1 位におけるシステイン ; 及び配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 6 7 位におけるスレオニンの存在又は非存在を決定し ; (i i) 前記変異が全て存在しない場合に、セツキシマブ又はその組成物の有効量を、前記変異の少なくとも 1 つが存在する場合にパニツムマブ又はその組成物を前記対象に投与することを推奨することを含む方法を提供する。

30

【 0 1 0 9 】

本発明は、また、本態様の特定の実施形態では、セツキシマブを含む治療レジメンに対する獲得耐性を判定するためのインビトロ方法であって、(i) 遺伝子型法、及び / 又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、対象から得た試料中における、以下のアミノ酸の少なくとも 1 つ、即ち配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 5 1 位におけるシステイン及び配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 6 7 位におけるスレオニンの存在又は非存在を決定し ; (i i) 工程 (i) において同定された任意のアミノ酸の存在を、セツキシマブを含む治療レジメンに対する対象の獲得耐性と関連付けるか、あるいは工程 (i) におけるこれらのアミノ酸の全ての非存在を、パニツムマブを含む治療レジメンに対する対象の応答性と関連付けることを含む、方法を包含する。

40

【 0 1 1 0 】

上記のように、本発明はまた、インビトロで、遺伝子型法、及び / 又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、対象から得た試料中における、配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 5 1 位におけるシステイン及び / 又は配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 6 7 位におけるスレオニンの存在又は非存在を同定する方法を提供する。好ましい実施形態では、インビトロで、配列番号 2 中のこれらの変異の一方又は両方の存在又は非存在を同定する方法は、遺伝子型法、及び / 又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、配列番号 2 のアミノ酸配列の 4 9 2 位におけるアル

50

ギニンの存在又は非存在を同定することを更に含む。

【0111】

特定の実施形態では、場合により上記又は下記の実施形態のいずれかと組み合わせて、配列番号2のアミノ酸配列の451位におけるシステインの存在又は非存在；及び／又は配列番号2のアミノ酸配列の464位におけるロイシンの存在又は非存在；及び／又は配列番号2のアミノ酸配列の465位におけるアルギニンの存在又は非存在；及び／又は配列番号2のアミノ酸配列の467位におけるスレオニンの存在又は非存在を同定する方法は、遺伝子型法、及び／又はタンパク質シーケンシング法からなる群から選択される手段によって、配列番号2の配列を467位まで決定することにより実施される。好ましい実施態様では、該方法は、配列番号2の450～470位まで（配列番号12）、更に好ましくは451～467位までの配列を決定することにより実施される。「位まで配列を決定する」とは、配列決定が、前記配列の1位のオリゴヌクレオチド又はアミノ酸から目的の位置（ヌクレオチド又はアミノ酸）（この特定のケースでは、467位のアミノ酸又はこのアミノ酸をもたらすヌクレオチドまで）まで実施されることと理解される。

10

【0112】

本明細書及び特許請求の範囲全体を通して、「含む」という用語及びその用語の変形は、他の技術的特徴、付加物、成分、又は工程を除外することを意図していない。更に、「含む」という用語は「からなる」という表現を包含する。本発明の更なる目的、利点、及び特徴は、本明細書を精査すれば当業者に明らかになるであろう、あるいは本発明の実施により習得できる。以下の実施例及び図面は例示の目的で提供され、それらは本発明を限定することを意図するものではない。更に、本発明は、本明細書に記載される特定の及び好ましい実施形態の全ての可能な組み合わせを含む。

20

【実施例】

【0113】

実施例1．腫瘍試料および患者

【0114】

定期的な臨床診療において、セツキシマブに基づく治療後に出現する異種変異の存在について試験を行い、特徴付けるための概念実証アプローチを実施した。2010年1月から2013年6月まで、Parc de Salut Mar Biobank (MAR Biobanc, Barcelona, Spain) Hospital del Mar 施設で抗EGFR mAbで治療された全てのmCRCの同意患者をこの試験に含めた。34例の患者において、この試験のために標本を前向きに集め、3例の患者について、過去に採取した連続的な生検を定期的な臨床管理の観点から分析した。この分析では、良好な質のペアの治療前及び治療後生検を有し、a) 完全応答若しくは部分応答、又はb) 16週間を超える安定疾患に続く進行性疾患として定義される抗EGFRに基づく治療に対する耐性を獲得した患者のみが含まれていた(7～9)。応答性は、固形腫瘍の応答評価基準(RECIST) (Eisenhauerら、「New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)」、Eur J Cancer 2009、Vol. 45(2): 228-247)に従って評価した。定期的診断手順の際に得られた腫瘍生検を治療前(初期)試料として使用した。殆どの場合、この試料は定期的な大腸内視鏡検査の際に原発腫瘍から得られた。転移部位からの第2の初期生検は定期的ではなく、病理学的診断に必要な限り実施されなかった。試験には、この余分な手順に同意した患者において治療が失敗した後の再生検が含まれていた。進行時の再生検は、最も接近可能な病変から得られ、倫理的考慮による患者の関連する合併症の潜在的危険性はより低くなる。血清試料は、セツキシマブに基づく治療の開始前及び進行時に収集した。治療後に生検試料において変異が検出された場合には、その同じ患者由来の血清試料をその特定の変異について分析した。本試験では、直接配列決定によるEGFR S492R、KRASエクソン2、BRAF V600E、及びPIK3CA変異についてすでに評価された9例(患者#21～#28および患者#36)が含まれ、

30

40

50

最新の試験では、ディープシーケンシング技術を用いて、報告された変異（R451C及びK467T）を分析した。生物学的試料は、Parc de Salut Mar Biobank（MARBiobanc）から入手した。本試験は、地方倫理委員会（CEIC-2012/4741/I）の承認を得ている。全ての参加患者は書面によるインフォームドコンセントに署名した。

【0115】

KRAS、BRAF、NRAS、PIK3CA、及びEGFRの配列決定のために、腫瘍試料からのDNA抽出をDiazら（「The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers」、*Nature* - 2012、Vol No. 486、pp. : 537 - 40）によって既に記載されているようにして実施した。KRAS（エクソン2、3、及び4）、BRAF（エクソン15）、NRAS（エクソン2及び3）、PIK3CA（エクソン9及び20）、並びにおEGFR（エクソン12、13）の変異分析は、製造業者の説明書に従い、BigDye v3.1（Applied Biosystems、Foster City、CA）を用いたサンガー配列決定により実施し、3500Dx Genetic Analyzer（Applied Biosystems）により分析した。全てのケースは、Next Generation Sequencing（NGS）454 GS Juniorプラットフォーム（Roche Applied Science、Mannheim、Germany）を用いたピロシーケンスによってスクリーニングした。更に、処理されて質で選別された読取りデータを、GS Amplicon Variant Analyzerソフトウェアバージョン2.5p1（Roche）を用いて分析した。特定のアッセイが利用可能である場合、NGSによって検出された変異は、競合的対立遺伝子特異的TaqMan（登録商標）PCR（CAST-PCR、Applied Biosystems）によって確認された。

【0116】

EGFR配列のためのプライマーは、上記に開示され、配列番号6及び7に含まれるプライマーのセットによって定義されたものであった。配列番号6及び配列番号7の対は、変異R451C及びK467T、並びにいくつかのイントロン隣接領域を含み得るエクソン12を完全増幅するのに役立った。この配列は、配列番号11：

c a a a g t t t t c a g g g a t a c a t t g t t t t t a t a t t t t c a c c a c
a t g a t t t t t c t t c t c t c c a a t g t a g T G G T C A G T T T T C T C T
T G C A G T C G T C A G C C T G A A C A T A A C A T C C T T G G G A T T A C G C
T C C C T C A A G G A G A T A A G T G A T G G A G A T G T G A T A A T T T C A G
G A A A C A A A A T T T G T G C T A T G C A A A T A C A A T A A A C T G G A A
A A A A C T G T T T G G G A C C T C C G G T C A G A A A A C C A A A A T T A T A
A G C A A C A G A G G T G A A A A C A G C T G C A g t a a g t c a c c g c t t t
c t g t t t a g t t t a t g g a g t t g g t t c t a a t g g g t c c t t t a t t
t g t a t t t a g a a t a t t g a a g g g c t a t t c c c a t t t a a ;

（式中、下線を引いたヌクレオチドは、一連のプライマーに対して同一（配列番号6に対して）又は相補的（配列番号7に対して）な配列に相当し、大文字はエクソン12に相当し、小文字はイントロン断片である）により表わされる。

【0117】

増幅は以下の条件：即ち、95°Cで10分間；95°Cで1分間を40サイクル、60°Cで1分30秒、及び72°Cで1分間；72°Cで10分間の最後の伸長で実施した。

【0118】

また、蛍光in situハイブリダイゼーション（FISH）を実施した。FISHは、突然変異の解析後に十分な残存物質が存在する場合にいつでも実施した。EGFRの増幅は、既に開示されているようにして（例えば、Salidoら、「Increased ALK gene copy number and amplification

are frequent in non-small cell lung cancer」、J Thorac Oncol - 2011、Vol. No. 6、pp. : 21 - 7のような文献)、LSI EGFR/CEP7プローブ(Abbott Molecular Inc.、Des Plaines、IL)を用いた蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)によって評価した。KRASの増幅は、KRAS/CEP12プローブ(Abnova)を用いた二重色FISHアッセイを用いて分析した。分析した50個の核の少なくとも10%の試料において、KRAS/CEP12比が3より大きいとスコア化された。第12染色体の平均数が細胞あたり2.5又は4を超えた場合に、このケースは、それぞれポリソーム又は高ポリソームと考えられた。

【0119】

実施例2 R451C及びK467T EGFR変異の存在及びセツキシマブに対する耐性獲得

【0120】

Next Generation Sequencing(NGS)454 GS Junior platform(Roche Applied Science、Mannheim、Germany)の2つの異なるディスプレイのプロットである図1に示すように、一部の患者はセツキシマブ治療後にEGFR外部ドメインに変異を獲得した。図1(A)は、治療後の腫瘍試料が、治療前生検では存在しなかったEGFR遺伝子のヌクレオチド1400にA C置換を獲得し、アミノ酸467位でのリシンのスレオニンへの置換を引き起こした(K467T)患者#31を示す。この置換は、遺伝子型決定法によって検出され、この位置のダブルピック(バンドまたはカーブ)によって視覚化(矢印)される。下方のピックはCヌクレオチドに相当する。

【0121】

別の側面では、図1(B)では、患者#35からのシーケンシングプロセスの表示(参照からの参照)が示されており、EGFR遺伝子のヌクレオチド1351のC T置換が治療後の試料において検出され、アミノ酸451におけるアルギニンのシステインへの置換をもたらす(R451C)。置換はまた矢印でマークされ、この場合、変化は負の値で視覚化される。

【0122】

実施例3 配列番号12(配列番号2のアミノ酸450からアミノ酸470の断片)の変異は、セツキシマブ治療に対する耐性に関与している。

【0123】

3A: CRC細胞モデルにおけるEGFR外部ドメイン変異およびセツキシマブ耐性獲得

【0124】

CRC細胞における耐性の獲得が、KRAS、BRAF、及びNRAS活性化突然変異の出現と関連することは、以前に報告されている。EGFR遮断に対する耐性の更なるメカニズムを見つけるために、セツキシマブに対して非常に感受性の高い5つのCRC細胞株(Difi、LIM1215、HCA-46、NCIH508、OXC0-2およびCCK81)を利用した。これらの細胞株は、全てKRAS、NRAS、BRAF、及びPIK3CAの野生型であるが、p.E545K PIK3CA変異を示すNCIH508は例外である。全体として、これらの細胞モデルは、抗EGFR療法に応答する可能性が高いCRC患者からの腫瘍の分子的特徴を概括している。各システムについて、少なくとも500万個の細胞を、耐性集団が出現するまでセツキシマブに連続的に曝した。耐性獲得の基礎となる分子メカニズムの意味を明確にするために、EGFRシグナル伝達経路(EGFR、KRAS、BRAF、NRAS、及びPIK3CA)の調節に関与する遺伝子のサングー配列決定を最初に行った。以前の報告によれば、耐性集団はKRAS、BRAF、及びNRAS変異を示す場合があった(Misaleら「Blockade of egfr and mek intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-egfr therapies in colorectal cancer」、Sci T

10

20

30

40

50

ransl Med - 2014; 6: 224-226を参照されたい)。これらの対立遺伝子の全ては耐性細胞内で検出されたが、それらが由来する対応の親集団では検出されなかった。重要なことに、いくつかの場合においては、耐性細胞集団に複数の遺伝子改変が同時に存在しており、そのポリクローナル状態を示した。したがって、個々のクローンの分子的特徴を評価するために、LIM1215及びCCK81の限定細胞希釈を行い、その後、これらの細胞株はこの手順に従う。次いで、単一のクローンを候補遺伝子(EGFR、KRAS、BRAF、NRAS、及びPIK3CA)についてサンガー配列決定に供した。次いで、候補遺伝子(EGFR、KRAS、BRAF、NRAS、及びPIK3CA)について、単一のクローンをサンガー配列決定に供した。注目すべきことに、クローンの変異プロファイリングにより、3種の新規なEGFRバリエーション: S464L、G465R、及びI491Mが同定された。変異S464L、G465Rは、実施例2の変異(R541C及びK467T)とともに、配列番号12(セツキシマブ結合エピトープの一部を定義する断片)中に位置する。耐性誘導体がポリクローナルであり、サンガー配列決定法の感度に制限があることを考慮すると、細胞集団の20%未満に存在するバリエーションは検出されなかった可能性があるとして想定された。低頻度で存在する変異を同定するために、1:20000の変異/野生型感受性を有することが知られているドロップレットデジタルPCR(ddPCR)を使用した。ddPCRプローブを設計し、対照の変異体DNAを用いて個別に検証し、腫瘍生検又は細胞株で以前に同定されたEGFRバリエーションを検出した。この分析により、耐性細胞集団においてサンガー配列決定により検出されなかった3種の新規なEGFRバリエーション(S464L、G465R、及びI491M)の存在が明らかになった。十分な材料が残っていないため、ddPCRは組織試料中で実施することができなかった。全体的に、セツキシマブに対する耐性を獲得した細胞株の変異の状況は、セツキシマブ治療で再発した腫瘍の分子プロファイルを要約している。

【0125】

KRAS、NRAS、BRAF、及びEGFRアッセイ(PrimePCR(商標)ddPCR(商標)変異アッセイ、Bio-Rad及び特注設計品)を用いたddPCR(商標)Supermix for Probes(Bio-Rad)。ddPCRを製造業者のプロトコールに従って実施し、その結果を、全ての(変異体+野生型)DNA対立遺伝子に対する変異DNA対立遺伝子の割合又は分数存在量として報告した。8~10µlのDNA鋳型を10µlのddPCR(商標)Supermix for Probes(Bio-Rad)及び2µlのプライマー/プローブ混合物に添加した。この20µlの試料を70µlのDroplet Generation Oil for Probes(Bio-Rad)に加え、液滴を生成するために使用した。次いで、95で5分間、94で30秒間、55で1分間を40サイクル、続いて98で10分間(ランプ速度2/秒)の条件で液滴を熱サイクルさせた。次いで、FAMおよびHEXプローブの蛍光測定のために、試料をQX200(商標)液滴リーダー(Bio-Rad)に移した。陽性及び陰性対照に基づいてゲーティングを実施し、変異集団を同定した。野生型DNAバックグラウンドにおける突然変異型DNAの分数存在量を、QuantaSoftソフトウェア(Bio-Rad)を用いて各試料について計算した。各試料について複数回の複製(最低4回)を実施した。細胞株由来の正常の対照gDNAおよびDNA鋳型を含まない(水)対照のddPCR分析を、全ての試料と並行して実施したが、汚染のない対照として複数回の複製を再度行った。EGFRプローブ及びプライマー配列は、要求に応じて入手可能である。

【0126】

本明細書で利用される細胞培養及び耐性細胞の作製は、既に以前に開示されている(Misale Sら Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. Nature. 2012; 486: 532-6; Misale S、Arena Sら Blockade of EGFR and MEK intercepts heterogeneous mechani

sms of acquired resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 224ra26を参照されたい)。5% FBS、2mM L-グルタミン、抗生物質（100U/mLペニシリン及び100mg/mLストレプトマイシン）を補充したMEM培地（Invitrogen）中でCCK81細胞を培養し、37℃及び5%CO₂空気インキュベーター（air incubator）中で増殖させた。CCK81セツキシマブ耐性誘導体は、6ヶ月間、セツキシマブの投与量を680nMから1.4μMまで段階的に増加させることによって得られた。

【0127】

3B：S464L、G465R、及びK467T EGFR変異の存在、並びにセツキシマブに対する耐性

10

【0128】

本発明のS464L、G465R、及びK467T EGFR変異が、セツキシマブに対して観察された耐性に関与しているかどうかを確認するために、全長の野生型EGFR及びS464L、G465R、又はK467T EGFR突然変異のいずれかを、検出可能な内在性EGFR発現を欠く培養NIH3T3マウス胚線維芽細胞株中で異所的に発現させた。

【0129】

トランスフェクト細胞中、セツキシマブ又はパニツムマブの存在下で、EGFRをその天然リガンドEGFで刺激した。抗体結合は、フィコエリトリン（PE）と結合したヒトIgGに対する二次抗体を用いたフローサイトメトリーによって分析した。空のベクターを発現するNIH3T3細胞を陰性対照（EMPTY）として使用した。抗体に結合する細胞の割合を、図2～4の二次元ドットプロットに示す。図2～4では、蛍光検出のFL2Hチャネルにおける細胞カウント（「カウント」のC、Y軸）を、セツキシマブを用いたアッセイ（図2A、3Aおよび4A）、パニツムマブを用いたアッセイ（図2B、3Bおよび4B）についてプロットした。

20

【0130】

野生型EGFR細胞（図2～4A/B中、EGFRWT）では、セツキシマブ及びパニツムマブはいずれもEGFRの活性化を阻害したが、K467T変異（図2A/B中、EGFR_K467T）、S464L（図3A/B中、EGFR_S464L）、及びG465R（図4A/B中、EGFR_G465R）を有する細胞では、パニツムマブは、EGFが誘発するEGFRの活性化を効率的に遮断したが、セツキシマブは遮断しなかった。EMPTYは陰性対照（EGFR非発現細胞）である。DNA構築物、pLX301-EGFR_WT構築物については、C. Sun博士及びR. Bernards教授（NKI、Amsterdam）からの寄贈物がpLX301（Addgene（登録商標））から構築された。鋳型DNAとしてpLX301-EGFR_WTプラスミドを有するAgilent TechnologiesのQuikChange（登録商標）II部位特異的突然変異誘発キットを用いて、4点突然変異（R451C、S464L、G465R、及びK467T）を含むEGFR変異体を構築した。変異の存在は、DNA配列決定によって確認した。

30

40

【0131】

明細書に引用された参考文献

- Mendelsohn J, Baselga J et al., "Epidermal growth factor receptor targeting in cancer". *Semin Oncol* - 2006, Vol. 33, pp.: 369-38.
- Lynch TJ et al., "Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib", *N Engl J Med*-2004, Vol. 350, pp:2129-2139.
- Misale et al., "Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer", *Nature* - 2012, Vol. No. 486, pp.: 532-536.
- Montagut et al., "Identification of a mutation in the extracellular domain of

50

the Epidermal Growth Factor Receptor conferring cetuximab resistance in colorectal cancer", Nature medicine - 2012, Vol. No. 18, pp.:221-223.

- Voigt et al., "Functional Dissection of the Epidermal Growth Factor Receptor Epitopes Targeted by Panitumumab and Cetuximab", Neoplasia- 2012, Vol. No. 14(11), pp.: 1023-1031.

- Karapetis et al., "K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer", The New England Journal of Medicine - 2008, Vol. 359, pp.: 1757-1765.

- Eisenhauer et al., "New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)", Eur J Cancer 2009, Vol. 45(2):228-247.

- Salido et al., "Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer", J Thorac Oncol - 2011, Vol. No. 6, pp.:21-7.

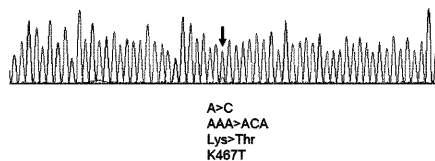
- Diaz et al. "The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers", Nature-2012, Vol No. 486, pp.:537-40.

- Misale et al. "Blockade of egfr and mek intercepts heterogeneous mechanisms of acquired resistance to anti-egfr therapies in colorectal cancer", Sci Transl Med- 2014;6:224ra226.

10

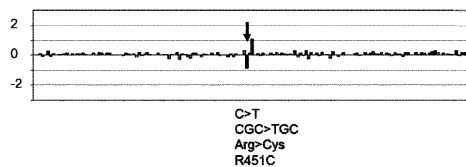
【図 1 (A)】

(A)



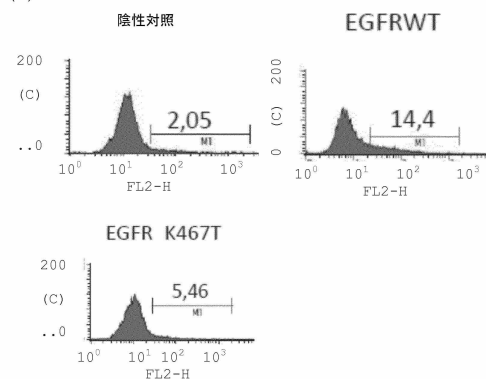
【図 1 (B)】

(B)



【図 2】

(A)



(B)

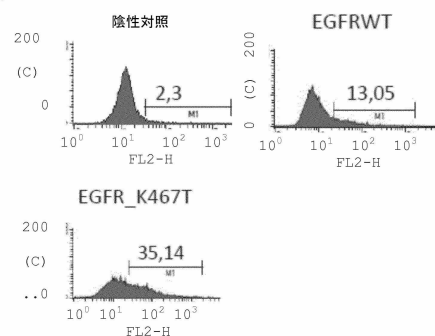


FIG. 2

【図 3 - 1】

(A)

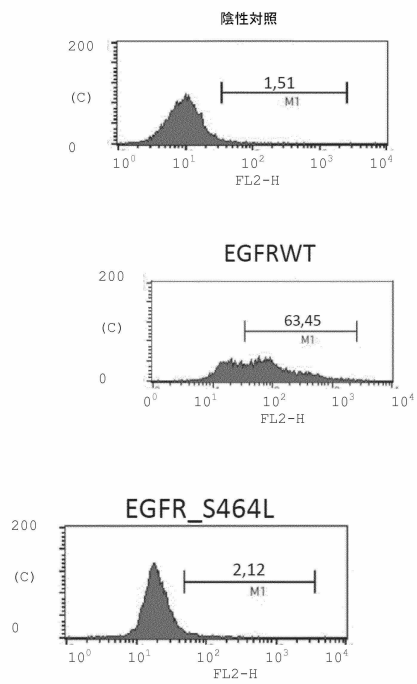
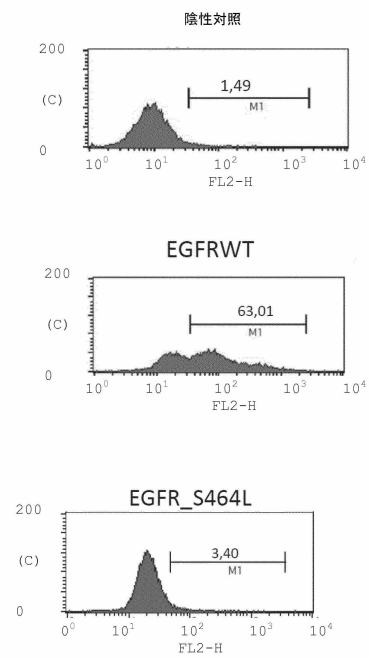


FIG. 3

【図 3 - 2】

(B)



Cont. FIG. 3

【図 4 - 1】

(A)

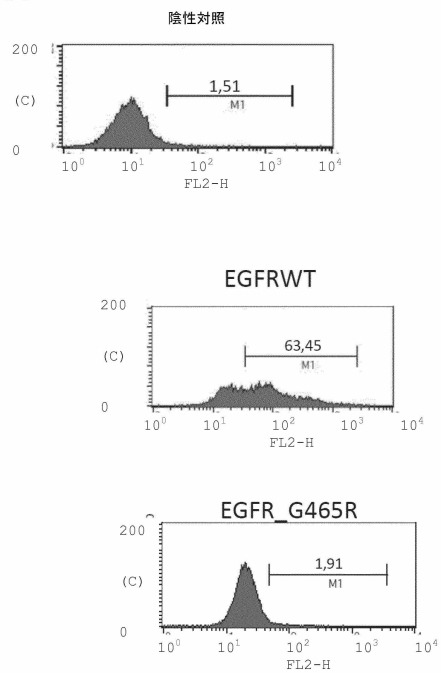
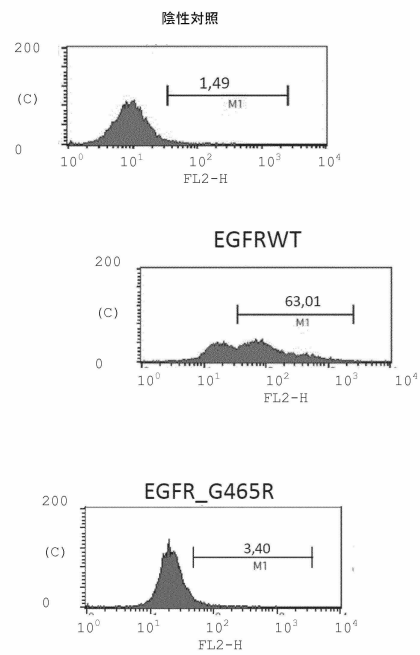


FIG. 4

【図 4 - 2】

(B)



Cont. FIG. 4

【配列表】

0006905464000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 35/00

(73)特許権者 517025992

アレーナ, サブリナ

ARENA, Sabrina

イタリア共和国 トリノ エ - 1 0 1 2 6 , ヴィア ジェノヴァ 2 3

Via Genova 23, I - 1 0 1 2 6 Torino (IT)

(74)代理人 110000659

特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所

(72)発明者 バルデッリ, アルベルト

イタリア共和国 トリノ イ - 1 0 1 2 3 , コルソ ルイジ コシュート 1 8

(72)発明者 アレーナ, サブリナ

イタリア共和国 トリノ イ - 1 0 1 2 6 , ヴィア ジェノヴァ 2 3

(72)発明者 モンタグ ビラドット, クララー

スペイン王国 バルセロナ エ - 0 8 0 0 3 , 8 8 , カジェ ドウクト イグアデ, イーエメー
エメ

(72)発明者 アルバネイ メストレス, ホアン

スペイン王国 バルセロナ エ - 0 8 0 0 3 , 8 8 , カジェ ドウクト イグアデ, イーエメー
エメ

(72)発明者 ロヴィーラ ゲリン, アナ

スペイン王国 バルセロナ エ - 0 8 0 0 3 , 8 8 , カジェ ドウクト イグアデ, イーエメー
エメ

(72)発明者 ベッロシッロ パリシオ, ベアトリス

スペイン王国 バルセロナ エ - 0 8 0 0 3 , 8 8 , カジェ ドウクト イグアデ, イーエメー
エメ

(72)発明者 ダルマサス マッセグ, アルバ

スペイン王国 バルセロナ エ - 0 8 0 0 3 , 8 8 , カジェ ドウクト イグアデ, イーエメー
エメ

審査官 松原 寛子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 0 1 7 6 4 5 (WO, A 1)

Genome research, 2 0 0 6 年, Vol.16, p.55-65

Nature medicine, 2 0 1 2 年, Vol.18, p.221-223

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 1 1

C 0 7 K 1 4 / 7 1

C 1 2 Q 1 / 6 8 2 7

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)