

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成22年12月24日(2010.12.24)

【公開番号】特開2010-51316(P2010-51316A)

【公開日】平成22年3月11日(2010.3.11)

【年通号数】公開・登録公報2010-010

【出願番号】特願2009-220076(P2009-220076)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)
A 0 1 K	67/027	(2006.01)
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)
C 0 7 K	14/71	(2006.01)
A 6 1 K	45/00	(2006.01)
A 6 1 K	31/517	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	37/00	(2006.01)
C 0 7 K	16/28	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 Q	1/68	A
A 0 1 K	67/027	
C 1 2 Q	1/48	Z
C 0 7 K	14/71	
A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	31/517	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	1 1 1
G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	37/00	1 0 2
C 0 7 K	16/28	

【手続補正書】

【提出日】平成22年10月26日(2010.10.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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2480 ~ 2494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、SEQ ID NO: 511、図6C、お

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2481～2495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2485～2496（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2485～2502（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2493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2484～2492（表S3Aおよび図8Dを参照されたい）、またはヌクレオチド2482のアデニンをチミンに置換するとともにヌクレオチド2483～2500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2499～2522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

2484-2495delTTAAGAGAAGCA; 2496A>C,または2485-

2499delTAAGAGAAGCA,または2502-2516delCCGAAAGCCAACAAAG,

を含む。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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2818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2827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）。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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2400におけるグアニンの代わりのチミンである（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2400におけるグアニンの代わりのアデニンであり、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）。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正の内容】**【0 0 2 2】**

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2561の後の、かつヌクレオチド2562の前のグアニン、グアニン、およびチミン(GGT)の挿入(2561_2562 ins GGT)である。これは、アミノ酸772にて、バリン(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2554の後の、およびヌクレオチド2555の前のCAACCCGGの挿入、並びにSEQ ID NO: 511のヌクレオチド2556の後の、およびヌクレオチド2557の前のGCGTGGACA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2579および2580のGGに対するAAの置換である、表S3Bを参照されたい。

【手続補正5】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0 0 2 3****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0 0 2 3】**

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2400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2480～2494、2485～2496、2485～2502、2481～2495、2499～2522、もしくは2481～2489の欠失、SEQ ID NO: 511のヌクレオチド2561の後の、かつヌクレオチド2562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2818のチミンをグアニンで、もしくはヌクレオチド2827のチミンをアデニンでの置換である。

【手続補正6】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0 2 0 2****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0 2 0 2】**

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2480～2494における15ヌクレオチドのインフレームの欠失(deLE746-A750)からなり、一方で、NCI-1975は、エキソン21内に、ヌクレオチド2818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。

【手続補正7】**【補正対象書類名】明細書****【補正対象項目名】0 2 5 3****【補正方法】変更****【補正の内容】****【0 2 5 3】****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2480-2494（del LE 746-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2818（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できることが本明細書において示された。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0260

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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2480または2481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。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0290

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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增幅に失敗したが、26全ての凍結検体はうまく增幅した。解釈可能な結果である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2818T>G（L858R）（、並びにそれぞれ1つの2371A>T（E709V）、2400G>A（G719S）、2401G>C（G719A）、2572G>A（R776H）、2788C>T（P848L）、および2827T>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、および頬側スワップ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。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0301

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0301】

（2498_2521 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）にわたるものとのうちの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。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0360

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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 (2480-2494)	インフレームの欠失(746-750)
患者2	12ヌクレオチドの欠失 (2485-2496)	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 (2485-2502)	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 (2485-2502)	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2818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2818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2827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2400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曝露がない患者*		
患者A	18ヌクレオチドの欠失 (2485-2502)	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 (2480-2494)	インフレームの欠失(746-750)

*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1807におけるGの代わりにAの置換、ヌクレオチド2132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3130におけるGの代わりにAの置換。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0362

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0362】

(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	喫煙したパック 一年	エキソン	ヌクレオチド変化	アミノ酸変化
1	F	Adeno	0	18	2371A>T 2400G>A	E709V G719S
2	F	A+BAC	60	18 20	2401G>C 2572G>A	G719A R776H
3	F	A+BAC	0	19	2480_2494 del	K745_A750 del ins K
4	M	A+BAC	0	19	2480_2494 del	K745_A750 del ins K
5	F	Adeno	5	19	2480_2494 del	K745_A750 del ins K
6	M	Adeno	不明	19	2480_2494 del	K745_A750 del ins K
7	F	Adeno	0	19	2481_2495 del	E746_A750 del
8	M	Adeno	45	19	2481_2495 del	E746_A750 del
9	F	Adeno	不明	19	2481_2495 del	E746_A750 del
10	M	A+BAC	12	19	2482_2500 del ins T	E746_S752 del ins V
11	M	Adeno	1	19	2484_2493 del ins C	L747_A750 del ins P
12	M	A+BAC	0	19	2484_2496 del ins C	L747_T751 del ins P
13	F	Adeno	30	19	2498_2521 del	T751_I759 del ins T
14	F	Adeno	0	19	2499_2522 del	S752_I759 del
15	F	Adeno	0	20	2548_2556 dup	D770_N771 ins SVD
16	M	Adeno	5	20	2558_2563 dup CCCCCA	P772_H773 dup
17	F	Adeno	0	21	2788C>T	P848L*
18	M	BAC	0	21	2818T>G	L858R
19	F	A+BAC	0	21	2818T>G	L858R
20	M	A+BAC	1	21	2818T>G	L858R
21	F	Adeno	0	21	2818T>G	L858R
22	F	Adeno	15	21	2818T>G	L858R
23	F	Adeno	0	21	2827T>A	I861Q

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

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0365

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 6 5】

(表S2)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	スクレオチド	アミノ酸
S0514	腺癌	米国	F	18	置換	425	2400G>A	G719S
S0377	腺癌	日本	F	18	置換	426	2400G>A	G719S
S0418	腺癌	日本	F	19	Del-1a	427	2480_2494delGGAAATTAAAGAGAAC	E746_A750del
S0363	大細胞 ca.	日本	F	19	Del-1a	428	2480_2494delGGAAATTAAAGAGAAC	E746_A750del
S0380	腺癌	日本	M	19	Del-1a	429	2480_2494delGGAAATTAAAGAGAAC	E746_A750del
S0399	腺癌	日本	F	19	Del-1a	430	2480_2494delGGAAATTAAAGAGAAC	E746_A750del
S0353	腺癌	日本	F	19	Del-1a	431	2480_2494delGGAAATTAAAGAGAAC	E746_A750del
S0385	腺癌	日本	M	19	Del-1a	432	2480_2494delGGAAATTAAAGAGAAC	E746_A750del
S0301	腺癌	日本	M	19	Del-1a	433	2480_2494delGGAAATTAAAGAGAAC	E746_A750del
S0412	腺癌	日本	M	19	Del-1b	434	2481_2495delGAATTAAAGAGAAC	E746_A750del
S0335	腺癌	日本	M	19	Del-1b	435	2481_2495delGAATTAAAGAGAAC	E746_A750del
S0405	腺癌	日本	F	19	Del-1b	436	2481_2495delGAATTAAAGAGAAC	E746_A750del
S0439	腺癌	日本	M	19	Del-2	437	2499_2522delCTCCGAAAGCCAACAAGGAAATC	S752_I759del
S0361	腺癌	日本	F	21	置換	438	2818T>G	L858R
S0388	腺癌	日本	F	21	置換	439	2818T>G	L858R
S0389	腺癌	日本	F	21	置換	440	2818T>G	L858R

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 6 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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

ゲノミック 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	肺癌	米国	M	19	Del-3	441	2484_2492delTTAAGAGAA, 2493G>C	L747_E749del, A750P
Y	P003	肺癌	米国	M	19	Del-3	442	2484_2492delTTAAGAGAA, 2493G>C	L747_E749del, A750P
Y	IR4T	細気管支肺胞癌	米国	F	19	Del-4	443	2485_2502delTAAGAGAACATCTC	L747_S752del, P753S
Y	IR2T	肺癌	米国	F	19	Del-5	444	2483_2500delATTAAAGAGAACATC,	L747_S752del, E746V
Y	IR3T	肺癌	米国	F	21	置換	445	2818T>G	L858R
Y	IRG	肺癌	米国	F	21	置換	446	2818T>G	L858R
<i>in vitro</i>									
N	IR5	肺癌	米国	F	18-24	検出無し	n/a	n/a	n/a
N	IR6	肺癌	米国	M	18-24	検出無し	n/a	n/a	n/a
N	IR8	肺癌	米国	F	18-24	検出無し	n/a	n/a	n/a
N	IR9	NSCLC	米国	F	18-24	検出無し	n/a	n/a	n/a

【手続補正 15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0367

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0367】

(表S3B) 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	スクレオチド	アミノ酸
Tar4T	肺腺癌	19	欠失	2484-2495delTTAAGAGAAAGCA; 2496A>C	L747_A750del; T751T
AD355	肺腺癌	19	欠失	2485-2499delTTAAGAGAAAGCA	L747_T751del
IR TT	肺腺癌	19	欠失	2502- 2516 delCCGAAAGCCAACAAG	P753_K757del
AD240	肺腺癌	20	挿入	2554-2555insCAACCCGG	D770_N771ins NPG
AD261	肺腺癌	20	挿入	2556-2557insGCGTGGACA	D770_N771ins SVD
	肺腺癌	20	挿入	2561-2562insGGT	P772_H773ins V
AD356	肺腺癌	20	置換	2579-2580GG>AA	G779S
SP02-23	急性骨髓性白血病	21	置換	2815G>T	G857V
SP08-94	神経膠腫	21	置換	2827T>A	I861Q
SP06-45	肉腫	21	置換	2893T>C	L883S
AD241	結腸腺癌	22	置換	2931G>T	D896Y

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0370

【補正方法】変更

【補正の内容】

【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ム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プ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細胞のウエスタンプ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ー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つのインフレームの欠失は、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) 残基に近くにで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ームの欠失は、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文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1～3878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) および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 (ST1571、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。

【手続補正17】

【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、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。

個体の肺腫瘍組織において、上皮細胞成長因子受容体（EGFR）遺伝子のエキソン18、19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有無を検出する工程であって、

a) 配列番号：511の2400位のヌクレオチドにおける、グアニンからチミンもしくはグアニンからアデニンへの置換、もしくは配列番号：511の2401位のヌクレオチドにおける、グアニンからシトシンへの置換を含む、または配列番号：512の719位のアミノ酸におけるグリシンからシステイン、セリンもしくはアラニンへの置換をもたらす、エキソン18内のヌクレオチド相違、

b) 配列番号：511の2486～2493位のヌクレオチドの欠失を含む、または少なくとも配列番号：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もたらす、エキソン19内のヌクレオチド相違、または

c) 配列番号：511の2818位のヌクレオチドにおける、チミンからグアニンへの置換、もしくは配列番号：511の2827位のヌクレオチドにおける、チミンからアデニンへの置換を含む、または配列番号：512の858位のアミノ酸におけるロイシンからアルギニンへの置換もしくは配列番号：512の861位のアミノ酸におけるロイシンからグルタミンへの置換をもたらす、エキソン21内のヌクレオチド相違、

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】

前記エキソン19内のヌクレオチド相違が、配列番号：511の2481～2495位のヌクレオチドの欠失、2482～2496位のヌクレオチドの欠失、2485～2493位のヌクレオチドの欠失、2486～2496位のヌクレオチドの欠失、2486～2497位のヌクレオチドの欠失、2486～2503位のヌクレオチドの欠失からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも1つのヌクレオチド相違が、エキソン19内におけるヌクレオチド相違であり、少なくとも配列番号：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、さらに配列番号：512のコドン750のアミノ酸アラニンの欠失をもたらすヌクレオチド相違である、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも配列番号：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が、さらに配列番号：512のコドン751のアミノ酸スレオニンの欠失を含む、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

前記少なくとも配列番号：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が、さらに配列番号：512のコドン752のアミノ酸セリンの欠失を含む、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも配列番号：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が、さらに配列番号：512のコドン746のアミノ酸グルタミン酸の欠失を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 7】

前記エキソン19内のヌクレオチド相違が、配列番号：511の2485～2496位のヌクレオチドの欠失、2483～2501位のヌクレオチドの欠失、2485～2494位のヌクレオチドの欠失、2485～2497位のヌクレオチドの欠失、2484～2501位のヌクレオチドの欠失からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも1つのヌクレオチド相違の有無が、シークエンシング、增幅、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 9】

さらに以下の工程を含む、請求項 1 に記載の方法。

コントロールサンプルにおいて、上皮細胞成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子のエキソン18、19または21における、

a) 配列番号：511の2400位のヌクレオチドにおける、グアニンからチミンもしくはグアニンからアデニンへの置換、もしくは配列番号：511の2401位のヌクレオチドにおける、グアニンからシトシンへの置換を含む、または配列番号：512の719位のアミノ酸におけるグリシンからシスティン、セリンもしくはアラニンへの置換をもたらす、エキソン18内のヌクレオチド相違、

b) 配列番号：511の2486～2493位のヌクレオチドの欠失を含む、または少なくとも配列番号：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もたらす、エキソン19内のヌクレオチド相違、または

c) 配列番号：511の2818位のヌクレオチドにおける、チミンからグアニンへの置換、もしくは配列番号：511の2827位のヌクレオチドにおける、チミンからアデニンへの置換を含む、または配列番号：512の858位のアミノ酸におけるロイシンからアルギニンへの置換もしくは配列番号：512の861位のアミノ酸におけるロイシンからグルタミンへの置換をもたらす、エキソン21内のヌクレオチド相違、

より選択された少なくとも 1 つのヌクレオチド相違の有無を検出する工程、および

コントロールサンプルにおいて検出されたヌクレオチド相違の有無を、肺腫瘍組織において検出されたヌクレオチド相違の有無と比較する工程。

【請求項 10】

a) EGFRキナーゼドメインのエキソン18の範囲内の相違を検出するようにデザインされた少なくとも 1 つの核酸プローブであって、該核酸プローブが、EGFR遺伝子内のエキソン18内の少なくとも 1 つの相違を検出し、ここで、該相違が、配列番号：512の719位におけるグリシンからセリンへの置換 (G719S) を含むアミノ酸変異をもたらす、エキソン18内の置換であるか、または該相違が、配列番号：512の719位におけるグリシンからアラニンへの置換 (G719A) を含むアミノ酸変異をもたらす、エキソン18内の置換であり、該検出が核酸相違配列への特異的なハイブリダイゼーションに基づくものである、核酸プローブ；

b) アニーリング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 11】

a) EGFRキナーゼドメインのエキソン18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であって、該プライマー対が、EGFR遺伝子内のエキソン18内の少なくとも 1 つの相違を含む核酸配列を特異的に増幅し、ここで、該相違が、配列番号：512の719位におけるグリシンからセリンへの置換 (G719S) を含むアミノ酸変異をもたらす、エキソン18内の置換であるか、または該相違が、配列番号：512の719位におけるグリシンからアラニンへの置換 (G719A) を含むアミノ酸変異をもたらす、エキソン18内の置換であるプライマー対；

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 12】

EGFRキナーゼドメインのエキソン18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プライマー対であって、該プライマー対が、EGFR遺伝子内のエキソン18内の少なくとも 1 つの相違を含む核酸配列を特異的に増幅し、ここで、該相違が、配列番号：512の719位におけるグリシンからセリンへの置換 (G719S) を含むアミノ酸変異をもたらす、エキソン18内の置換であるか、または該相違が、配列番号：512の719位におけるグリシンからアラニンへの置換 (G719A) を含むアミノ酸変異を

もたらす、エキソン18内の置換であるプライマー対であるプライマー対。

【請求項 1 3】

EGFR遺伝子内のエキソン18内の相違を検出するようにデザインされた核酸プローブであって、ここで、該相違が、配列番号：512の719位におけるグリシンからセリンへの置換（G719S）を含むアミノ酸変異をもたらす、エキソン18内の置換であるか、または該相違が、配列番号：512の719位におけるグリシンからアラニンへの置換（G719A）を含むアミノ酸変異をもたらす、エキソン18内の置換であり、該検出が核酸相違配列への特異的なハイブリダイゼーションに基づくものである、核酸プローブ。

【請求項 1 4】

前記核酸プローブが、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 1 3 に記載の核酸プローブ。

【請求項 1 5】

前記核酸プローブが、ペプチド核酸（PNA）を含む、請求項 1 3 に記載の核酸プローブ。

【請求項 1 6】

検出可能な標識をさらに含む、請求項 1 3 に記載の核酸プローブ。

【請求項 1 7】

719位のアミノ酸のグリシンの、セリンまたはアラ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。